

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-522564

(P2010-522564A)

(43) 公表日 平成22年7月8日 (2010. 7. 8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 14/54 (2006. 01)</b>	C O 7 K 14/54	4 B O 6 4
<b>C O 7 K 16/24 (2006. 01)</b>	C O 7 K 16/24	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 19/00 (2006. 01)</b>	C O 7 K 19/00	4 C O 7 6
<b>C 1 2 P 21/08 (2006. 01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 144 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-501176 (P2010-501176)	(71) 出願人	505222646
(86) (22) 出願日	平成20年3月26日 (2008. 3. 26)		ザイモジェネティクス, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月6日 (2009. 11. 6)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/058190		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
(87) 国際公開番号	W02008/118930		イーストレイク アベニュー イースト
(87) 国際公開日	平成20年10月2日 (2008. 10. 2)		1 2 0 1
(31) 優先権主張番号	11/691, 000	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成19年3月26日 (2007. 3. 26)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	60/908, 554		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成19年3月28日 (2007. 3. 28)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	60/983, 822	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成19年10月30日 (2007. 10. 30)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 可溶性 I L-1 7 R A / R C 融合タンパク質および関連する方法

## (57) 【要約】

本発明により、IL-17AおよびIL-17Fのアンタゴニストが開示される。これらのアンタゴニストは、IL-17RCおよびIL-17RAの両方の部分を含むハイブリッド可溶性受容体(「IL-17RC/IL-17RA」)を含む、IL-17RAおよびIL-17RCの可溶性融合タンパク質に基づく。このようなアンタゴニストは、IL-17F、IL-17A、またはIL-17AおよびIL-17Fの両方の活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する働きをする。また、疾患、特に、IL-17Aおよび/またはIL-17Fによって少なくとも部分的に媒介される炎症性疾患を治療するためにこのようなアンタゴニストを使用する方法も開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32～458と少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合することができる、単離されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1～426を含む、請求項1記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 3】

免疫グロブリン部分を含む、請求項2記載の単離されたポリペプチド。

10

## 【請求項 4】

免疫グロブリン部分が免疫グロブリン重鎖定常領域である、請求項3記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 5】

SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1～657または1～658を含む、請求項4記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 6】

分泌シグナル配列をさらに含む、請求項2記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

免疫グロブリン部分をさらに含む、請求項1記載の単離されたポリペプチド。

20

## 【請求項 8】

免疫グロブリン部分が免疫グロブリン重鎖定常領域である、請求項7記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 9】

SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32～690と少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項7記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 10】

免疫グロブリン部分がSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基459～689または459～690を含む、請求項7記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 11】

免疫グロブリン部分がSEQ ID NO: 175のアミノ酸残基1～232を含む、請求項7記載の単離されたポリペプチド。

30

## 【請求項 12】

PEG化をさらに含む、請求項1記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 13】

請求項1～12のいずれか一項記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。

## 【請求項 14】

機能的に連結された以下のエレメントを含む発現ベクター：

(a) 転写プロモーター；

(b) 請求項1～12のいずれか一項記載のポリペプチドをコードするDNAセグメント；および

(c) 転写ターミネーター。

40

## 【請求項 15】

DNAセグメントによりコードされたポリペプチドを発現する、請求項14記載の発現ベクターを含む培養細胞。

## 【請求項 16】

以下の段階を含む、ポリペプチドを作製する方法：

請求項14記載の発現ベクターが導入された細胞を培養する段階であって、該細胞が、DNAセグメントによりコードされたポリペプチドを発現する、段階；および  
発現された前記ポリペプチドを回収する段階。

## 【請求項 17】

50

請求項1～12のいずれか一項記載の単離されたポリペプチド；および  
薬学的に許容されるビヒクル  
を含む、組成物。

【請求項18】

請求項1～12のいずれか一項記載のポリペプチドの有効量を炎症性疾患を有する対象に  
投与する段階を含む、対象における炎症性疾患を治療する方法。

【請求項19】

炎症性疾患が、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、連鎖球菌細胞壁  
(SCW)によって誘発された関節炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、過敏性腸症候群(IBS)、憩  
室症、脾炎、Ⅰ型糖尿病(IDDM)、グレーブス病、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、免疫  
介在性の腎疾患、多発性硬化症(MS)、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症  
、全身性エリテマトーデス(SLE)、重症筋無力症、糸球体硬化症、膜性神経障害(membrano  
us neuropathy)、腎動脈硬化症、糸球体腎炎、アミロイド症、キャッスルマン病、脾腫、  
移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、アテローム性動脈硬化症、内毒素血症、毒性ショッ  
ク症候群、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、喘息、成人呼吸器疾患(ARD)、  
慢性閉塞性肺疾患(COPD)、嚢胞性線維症、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、気道応  
答性亢進、慢性気管支炎、湿疹、腹膜炎の結果としての腹腔内癒着および/または腹腔  
内膿瘍、ループス腎炎、脳卒中、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗しょう  
症、神経炎、再狭窄、ならびに川崎病からなる群より選択される、請求項18記載の方法  
。

10

20

【請求項20】

炎症性疾患が慢性炎症性疾患である、請求項18記載の方法。

【請求項21】

慢性炎症性疾患が、炎症性腸疾患(IBD)、関節炎、アトピー性皮膚炎、および乾癬から  
なる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項22】

炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎およびクローン病からなる群より選択される、請求項21  
記載の方法。

【請求項23】

関節炎が、関節リウマチおよび乾癬性関節炎からなる群より選択される、請求項21記載  
の方法。

30

【請求項24】

炎症性疾患が急性炎症性疾患である、請求項18記載の方法。

【請求項25】

急性炎症性疾患が、内毒素血症、敗血症、および毒性ショック症候群からなる群より選  
択される、請求項24記載の方法。

【請求項26】

炎症性疾患が自己免疫疾患である、請求項18記載の方法。

【請求項27】

自己免疫疾患が、Ⅰ型糖尿病(IDDM)、多発性硬化症(MS)、全身性エリテマトーデス(SLE)  
、重症筋無力症、関節リウマチ、炎症性腸疾患(IBD)、および過敏性腸症候群(IBS)からな  
る群より選択される、請求項26記載の方法。

40

【請求項28】

炎症性疾患が慢性炎症性気道疾患である、請求項18記載の方法。

【請求項29】

慢性炎症性気道疾患が、喘息、成人呼吸器疾患(ARD)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、嚢胞  
性線維症、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、気道応答性亢進、および慢性気管支炎  
からなる群より選択される、請求項28記載の方法。

【請求項30】

炎症性疾患が、移植拒絶および移植片対宿主疾患(GVHD)からなる群より選択される、請

50

求項18記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

サイトカインは、多くの細胞型の増殖および分化の調節を含む様々な生物学的作用を媒介する、可溶性の小型タンパク質である(例えば、Arai et al., Annu. Rev. Biochem. 59 : 783(1990) (非特許文献1)、Mosmann, Curr. Opin. Immunol. 3 : 311(1991) (非特許文献2)、Paul and Seder, Cell 76 : 241(1994) (非特許文献3)を参照されたい)。サイトカイン群を構成するタンパク質には、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、および他の調節分子が含まれる。例えば、ヒトインターロイキン-17は、インターロイキン-6、細胞内接着分子1、インターロイキン-8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の発現、およびプロスタグランジンE2発現を刺激し、かつ、CD34+造血前駆体の好中球への優先的成熟において役割を果たしているサイトカインである(Yao et al., J. Immunol. 155 : 5483(1995) (非特許文献4)、Fossiez et al., J. Exp. Med. 183 : 2593(1996) (非特許文献5))。

10

【0002】

サイトカインに結合する受容体は、典型的には、高い親和力でサイトカインに結合し、かつ、特定の受容体サブユニットの細胞質内部分を介して、この結合事象を細胞に伝達する、1つまたは複数の内在性膜タンパク質から構成される。サイトカイン受容体は、細胞

20

【0003】

サイトカインおよびそれらの受容体の実証されたインビボ活性により、他のサイトカイン、サイトカイン受容体、サイトカインアゴニスト、およびサイトカインアンタゴニストの臨床上の可能性およびそれらの必要性が例示される。例えば、炎症誘発性サイトカインファミリーの実証されたインビボ活性により、炎症誘発性分子のアンタゴニストの並外れた臨床上の可能性およびそれらの必要性が例示される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0004】

【非特許文献1】Arai et al., Annu. Rev. Biochem. 59 : 783(1990)

【非特許文献2】Mosmann, Curr. Opin. Immunol. 3 : 311(1991)

【非特許文献3】Paul and Seder, Cell 76 : 241(1994)

【非特許文献4】Yao et al., J. Immunol. 155 : 5483(1995)

【非特許文献5】Fossiez et al., J. Exp. Med. 183 : 2593(1996)

【発明の概要】

【0005】

本発明は、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32~458と少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合することができる、単離されたポリペプチド、該ポリペプチドを含む組成物、該ポリペプチドを作製する方法、ならびに該ポリペプチドを投与して炎症性疾患を治療する方法である。さらに、本発明は、該ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、該ポリペプチドをコードするDNAセグメントを含む発現ベクター、該発現ベクターを含む培養細胞も含む。

40

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1Aおよび1Bは、ヒトIL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のエキソン構造の図式表示である。コドンがエキソン/イントロン連結によってスプライシングされるアミノ酸の場合、コドン全体を含むように連結部を移動した。

【図2】図2Aおよび2Bは、ヒトIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のエキソン構造の図式表示で

50

ある。

【図3】ヒトIL-17RA(SEQ ID NO: 21)のエキソン構造の図式表示である。

【図4】図4Aおよび4Bは、本明細書ならびにSEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158において説明される本発明の好ましい可溶性ポリペプチドのエキソン構造の図式表示である。この可溶性ポリペプチドは、ヒトIL-17RA(SEQ ID NO: 21)およびヒトIL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)の両方に由来するエキソンを含む。

【図5】実施例34で概説するプロトコールを用いた典型的なアッセイ法の結果のグラフ表示である。このグラフは、Prizmソフトウェアプログラムを用いて作成した。Yの値は、リガンドのみの対照ウェルおよびリガンド無し/可溶性受容体無しの対照ウェルに基づいて最大値および最小値(100%および0%)に対して標準化したMFI、したがって、細胞へのリガンドの結合率(%)を表す。ソフトウェアを用いて各曲線のIC50を算出する。

10

【図6】移植片対宿主疾患(GVHD)のマウスモデルにおけるmIL-17RA-Fc処置の有効性を示す。レシピエントマウス(C57BL/6 x DBA/2 F1)を処置群(PBSまたはmIL-17RA-Fc)に分けた。-1日目開始し、15日目まで継続して1日おきに腹腔内注射(注射1回当たり150  $\mu$ g)することによって、マウスIL-17RA-Fc処置を施した。0日目に、B6マウスに由来するドナー脾臓リンパ球8000万個を、レシピエントマウス(C57BL/6 x DBA/2 F1(BDF1));1群当たりn=10のマウスに静脈注射した。週に3回、体重の変化、すなわちこのモデルにおける疾患憎悪の証明となる徴候に関してマウスをモニターした。IL-17RA-Fc処置群(白い三角形)における体重減少は激しくなく、PBS対照(黒い菱形)の場合よりも有意に体重減少が少なかった( $p<0.05$ )。

20

【発明を実施するための形態】

【0007】

発明の詳細な説明

本発明は、炎症誘発性サイトカインIL-17AおよびIL-17Fに対するアンタゴニストを提供することによってこれらの必要性に取り組む。具体的には、炎症誘発性サイトカインIL-17AおよびIL-17Fは、高度の配列類似性を有し、多くの生物学的特性を共有し、かつ両方とも、活性化T細胞によって産生される。これらは両方とも、関節リウマチおよび喘息を含む、様々な自己免疫性疾患および炎症性疾患の進行をもたらす因子として意味付けられている。実際に、IL-17A機能を打ち消す反応物は、ヒト疾患のいくつかのマウスモデルにおいて疾患の発生率および重症度を有意に改善する。IL-17Aは、その同族受容体であるIL-17受容体(IL-17R)との相互作用を介してその作用をもたらすが、IL-17Fの受容体はまだ同定されていなかった。以前に、本発明者らは、IL-17RCが、IL-17AおよびIL-17Fの両方に対する受容体であり、かつ、同様の高い親和性で両方に結合することを報告していた。その一方で、IL-17Rは、高い親和性でIL-17Aに結合するが、非常に低い親和力でIL-17Fに結合する。これと一致して、可溶性のIL-17Rが、いずれかの受容体を発現する細胞においてIL-17A結合およびシグナル伝達を妨害するが、IL-17RCへのIL-17Fの結合にも機能にも干渉しないことが示されている。

30

【0008】

IL-17Aへの介入は、いくつかの自己免疫疾患に対する有効な療法として提案されているため、IL-17A、IL-17F、またはIL-17AおよびIL-17Fの両方の活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和し得る、可溶性IL-17RC受容体および可溶性IL-17RC/IL-17RA受容体が含まれる、本発明のアゴニストを使用することは、これら2種のサイトカインのうち1種のみを標的とする療法よりも有利であると考えられる。本発明はさらに、炎症性疾患におけるその使用、ならびに関連する組成物および方法も提供する。

40

【0009】

(A) 概要

免疫に関連した疾患および炎症性疾患は、正常な生理においては、傷害または損傷に回答し、傷害または損傷からの修復を開始し、かつ、外来の生物に対抗する先天性防御および後天性防御を始めるのに重要である、かなり複雑で、しばしば複数の相互に連結した生物学的経路の症状発現または結果である。疾患または病状は、これらの正常な生理学的経

50

路が、応答の強度に直接関連して、異常な調節もしくは過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、またはこれらの組合せとして、さらなる傷害または損傷を引き起こす場合に生じる。

#### 【0010】

これらの疾患の起源は、多くの場合、多段階経路、および、しばしば複数の異なる生物学的系/経路を含むが、1つまたは複数のこれらの経路中の重要な点への介入は、改善効果または治療的效果を有し得る。治療的介入は、有害なプロセス/経路への拮抗または有益なプロセス/経路の刺激のいずれかによって起こり得る。

#### 【0011】

多くの免疫関連疾患が公知であり、広範囲にわたって研究されている。このような疾患には、免疫介在性炎症性疾患(関節リウマチ、免疫介在性の腎疾患、肝胆道疾患、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬、および喘息など)、非免疫介在性炎症性疾患、感染症、免疫不全疾患、新形成などが含まれる。

#### 【0012】

Tリンパ球(T細胞)は哺乳動物の免疫応答の重要な構成要素である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)内の遺伝子によってコードされる自己分子と結合している抗原を認識する。抗原は、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面にMHC分子と共に提示され得る。T細胞系は、宿主哺乳動物に健康上の脅威を与えるこれらの改変細胞を排除する。T細胞には、ヘルパーT細胞および細胞障害性T細胞が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞上の抗原-MHC複合体を認識した後に、大規模に増殖する。また、ヘルパーT細胞は様々なサイトカイン、すなわちリンホカインも分泌し、これは、B細胞、細胞障害性T細胞、および免疫応答に関与する様々な他の細胞の活性化において中心的な役割を果たす。

#### 【0013】

体液性免疫応答および細胞媒介性免疫応答の両方における中心的事象は、ヘルパーT細胞の活性化およびクローン増殖である。ヘルパーT細胞の活性化は、T細胞受容体(TCR)-CD3複合体と抗原提示細胞の表面上の抗原-MHCとの相互作用により開始される。この相互作用は、休止ヘルパーT細胞を誘導して細胞周期に移行させる(G0からG1に移行)生化学的事象のカスケードを媒介し、その結果、IL-2、および時にはIL-4に対する高親和性受容体の発現をもたらす。活性化されたT細胞は、周期を通じて発展して増殖し、かつ、記憶細胞またはエフェクター細胞に分化する。

#### 【0014】

TCRによって媒介されるシグナルに加えて、T細胞の活性化は、抗原提示細胞によって放出されるサイトカインによって、または抗原提示細胞およびT細胞上の膜結合型分子との相互作用を通じて誘導される付加的な同時刺激も伴う。サイトカインIL-1およびIL-6は、同時刺激シグナルを提供することが示されている。また、抗原提示細胞の表面に発現されるB7分子とT細胞表面で発現されるCD28分子およびCTLA-4分子との相互作用も、T細胞活性化をもたらす。活性化T細胞は、数の増加した細胞接着分子、例えば、ICAM-1、インテグリン、VLA-4、LFA-1、CD56などを発現する。

#### 【0015】

混合リンパ球培養物または混合リンパ球反応(MLR)におけるT細胞増殖は、化合物が免疫系を刺激する能力の確立された指標である。多くの免疫応答において、炎症細胞は、損傷部位または感染部位に浸潤する。遊走細胞は、罹患組織の組織学的検査によって決定することができるように、好中球性、好酸球性、単球性、またはリンパ球性でよい。Current Protocols in Immunology、John. E. Coligan編、1994、John Wiley & Sons, Inc.を参照。

#### 【0016】

免疫関連疾患は、免疫応答を抑制することによって治療され得る。免疫刺激活性を有する分子を阻害する可溶性受容体および/または中和抗体を使用することは、免疫介在性疾患および炎症性疾患の治療において有用であると思われる。免疫応答を阻害する分子は、

免疫応答を阻害し、それによって、免疫関連疾患を改善するのに使用され得る(タンパク質を直接使用、または抗体アゴニストの使用を介する)。

【 0 0 1 7 】

インターロイキン-17(IL-17A)は、Tリンパ球向性リスザルヘルペスウイルス(Herpes virus Saimiri)(HSV)によってコードされるタンパク質の細胞性相同分子種として同定されている(Rouvier et al., J. Immunol., 150(12): 5445-5456(19993)、Yao et al., J. Immunol., 122(12): 5483-5486(1995)、およびYao et al., Immunity, 3(6): 811-821(1995)を参照されたい)。その後の特徴付けにより、このタンパク質が、多種多様の末梢組織において炎症誘発性応答を誘導するために作用する強力なサイトカインであることが示された。IL-17Aは、活性化されたCD4+記憶T細胞によってのみ合成および分泌される、ジスルフィド結合した約32kDaのホモ二量体サイトカインである(Fossiez et al., Int. Rev. Immunol., 16: 541-551 (1998)に総説がある)。具体的には、IL-17は、19~23残基のN末端シグナル配列を有する155アミノ酸のポリペプチド前駆体として合成され、かつ、ジスルフィド結合したホモ二量体糖タンパク質として分泌される。IL-17Aは、WO9518826(1995)、WO9715320(1997)、およびWO9704097(1997)、ならびに米国特許第6,063,372号において開示されている。

10

【 0 0 1 8 】

組織分布が限局的であるにもかかわらず、IL-17Aは、様々な細胞型に対する多面的な生物活性を示す。IL-17Aは、多くのサイトカインの産生を刺激することが見出されている。これは、線維芽細胞、ケラチノサイト、上皮細胞、および内皮細胞のような接着細胞による、IL-6、IL-8、IL-12、白血病抑制因子(LIF)、プロスタグランジンE2、MCP-1、およびG-CSFの分泌を誘導する。IL-17Aはまた、ICAM-1の表面発現、T細胞増殖、ならびにCD34+ヒト前駆体の増殖および好中球への分化を誘導する能力も有する。IL-17Aはまた、骨代謝にも関係があるとされており、かつ、関節リウマチおよび骨移植片のゆるみなど活性化T細胞の存在およびTNF- $\alpha$ 産生を特徴とする病理学的状態において重要な役割を果たしていることが示唆されている(Van Bezooijen et al., J. Bone Miner. Res. 14: 1513-1521 (1999))。関節リウマチ患者に由来する滑膜組織の活性化T細胞は、正常な個体または変形性関節症患者に由来するものよりも、より多量のIL-17Aを分泌することが見出された(Chabaud et al., Arthritis Rheum. 42: 963-970 (1999))。この炎症誘発性サイトカインが、関節リウマチにおける滑膜炎に能動的に寄与することが示唆された。その炎症誘発性役割に加えて、IL-17Aは、さらに別のメカニズムによって関節リウマチの病理に寄与するようである。例えば、IL-17Aは、骨芽細胞において破骨細胞分化因子(ODF)mRNAの発現を誘導することが示されている(Kotake et al., J. Clin. Invest., 103: 1345-1352 (1999))。ODFは、骨吸収に関与している細胞である破骨細胞への前駆細胞の分化を刺激する。

20

30

【 0 0 1 9 】

IL-17Aのレベルは、関節リウマチ患者の滑液において有意に上昇しているため、IL-17Aによって誘導される破骨細胞形成は、関節リウマチでの骨吸収において非常に重要な役割を果たしていると思われる。また、IL-17Aは、多発性硬化症のようないくつかの他の自己免疫障害においても重要な役割を果たすと考えられている(Matusevicius et al., Mult. Scler., 5: 101-104 (1999))。IL-17Aは、細胞内シグナル伝達によって、ヒトマクロファージにおけるCa<sup>2+</sup>流入および[cAMP]の減少を刺激することもさらに示されている(Jovanovic et al., J. Immunol., 160: 3513 [1998])。IL-17Aで処理された線維芽細胞は、NF- $\kappa$ Bの活性化を誘導するのに対し[Yao et al., Immunity, 3: 811(1995)、Jovanovic et al.、前記]、これで処理されたマクロファージは、NF- $\kappa$ Bおよびマイトジェン活性化プロテインキナーゼを活性化する(Shalom-Barek et al., J. Biol. Chem., 273: 27467 (1998))。

40

【 0 0 2 0 】

さらに、IL-17Aはまた、硬骨および軟骨の成長に関与している哺乳動物サイトカイン様因子7との配列類似性を共有する。IL-17Aポリペプチドが配列類似性を共有する他のタンパク質は、ヒト胚由来インターロイキン関連因子(EDIRF)およびインターロイキン-20であ

50

る。

【0021】

IL-17Aの広範囲の作用と一致して、IL-17Aに対する細胞表面受容体が多く組織および細胞型において幅広く発現されていることが見出されている(Yao et al., Cytokine, 9: 794 [1997])。ヒトIL-17A受容体(IL-17R)(866アミノ酸)のアミノ酸配列から、単一の膜貫通ドメインおよび525アミノ酸の長い細胞内ドメインを有するタンパク質が予想されるが、受容体配列は独特であり、サイトカイン/増殖因子受容体ファミリーに由来する受容体のいずれの配列にも類似していない。IL-17Aそれ自体が他の公知のタンパク質との類似性を欠くことと合わせて、このことから、IL-17Aおよびその受容体が、シグナル伝達タンパク質および受容体の新規なファミリーの一部であり得ることが示唆される。IL-17A活性は、その独特な細胞表面受容体への結合によって媒介されることが実証されており、以前の研究により、T細胞と可溶性のIL-17A受容体ポリペプチドを接触させると、PHA、コンカナバリンA、および抗TCRモノクローナル抗体によって誘導されるT細胞増殖およびIL-2産生が阻害されたことが示されている(Yao et al., J. Immunol., 155: 5483-5486 (1995))。したがって、公知のサイトカイン受容体、具体的にはIL-17A受容体に対する相同性を有する新規なポリペプチドを同定および特徴付けすることに大きな関心が寄せられている。

10

【0022】

IL-17Fの発現パターンは、IL-17Aのものと同様であると思われ、これは、活性化されたCD4+T細胞および単球のみを含む(Starnes et al. J. Immunol. 167: 4137-4140 (2001))。IL-17Fは、線維芽細胞におけるG-CSF、IL-6、およびIL-8(Hymowitz et al, EMBO J. 20: 5322-5341 (2001))、ならびに内皮細胞におけるTGF- (Starnes et al. J. Immunol. 167: 4137-4140 (2001))を誘導することが実証された。樹状細胞によって産生されるサイトカインであるIL-23が、主に記憶T細胞においてIL-17AおよびIL-17Fの両方の産生を媒介できることが、最近報告された(Aggarwal et al. J. Biol. Chem. 278: 1910-1914 (2003))。

20

【0023】

さらに、IL-17AおよびIL-17Fの両方の過剰発現または上方調節が、関節炎の個体および喘息の個体において示されている(Moseley et al. Cytokine Growth Factor Rev 14: 155-174 (2003)に総説がある)。関節炎に関しては、これらのサイトカインは、関節リウマチおよび変形性関節炎に関連する軟骨および関節の破壊に特徴的な様式で作用する。例えば、IL-17AおよびIL-17Fは、新しいプロテオグリカンおよびコラーゲンの合成を阻害しつつ、軟骨プロテオグリカングリコサミノグリカンおよびコラーゲン断片の放出によって関節軟骨移植片中の基質分解を促進することが実証されている(Cai et al. Cytokine 16: 10-21 (2001)、Attur et al Arthritis Rheum 44: 2078-2083 (2001))。

30

【0024】

IL-17Aと同様に、マウスにおけるIL-17Fの過剰発現もまた、肺好中球動員を増加させ、かつ、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IP-10、およびMIGを含む、肺中のTh1関連サイトカインの発現の増大をもたらすことが示されている(Starnes et al. J. Immunol. 167: 4137-4140 (2001))。IL-17Fはまた、アレルゲンでチャレンジされた喘息患者に由来するT細胞において上方調節されており(Kawaguchi et al J. Immunol 167: 4430-4435 (2001))、かつ、NHBEにおいてIL-6およびIL-8の産生を誘導することが見出された。IL-17Aと対照的に、IL-17Fは、インビトロで血管新生を阻害すると思われる(Starnes et al. J. Immunol. 167: 4137-4140 (2001))。

40

【0025】

IL-17F mRNAは、様々なヒト組織においてノーザンブロットによって検出されなかったが、CD4+ T細胞および単球が活性化されると、劇的に誘導された。前掲書。マウスにおいて、Th2細胞および肥満細胞は、活性化されるとIL-17Fを発現することが見出された。Dumont, Expert Opin. Ther. Patents 13(3)(2003)を参照されたい。IL-17Aと同様に、IL-17Fの発現も、マウスにおいてIL-23によって上方調節されることが判明した。

【0026】

50



IL-17サイトカイン/受容体ファミリーは、免疫応答および炎症応答の操作に対する革新的なアプローチを与えると考えられる、サイトカインネットワーク内の独特なシグナル伝達システムに相当すると思われる。したがって、本発明は、新規なIL-17ファミリー受容体IL-17RC、ならびにIL-17AおよびIL-17Fの両方へのその結合能力の発見に基づいている。

#### 【 0 0 2 7 】

IL-17RCは、IL-17RAに関連したタンパク質を探索するためのバイオインフォマティクスアプローチを用いて最初に同定され、IL-17受容体に関連したタンパク質IL-17RCをコードするcDNAを介して同定された。IL-17ファミリーの原型的メンバーであるIL-17Aに結合するIL-17受容体(IL-17RA)に明らかに類似し、かつ、IL-17サイトカインファミリーの他の5つのメンバーが同定されているにもかかわらず、IL-17RCに対する特定のリガンドは以前に報告されていなかった。しかしながら、2005年6月10日に出願され、米国特許公報第20060002925号として公開された米国特許出願第11/150,533号において説明されているように、IL-17AおよびIL-17FがIL-17RCに対する特定のリガンドであると同定された。具体的には、これらのリガンドは、ヒトIL-17A(hIL-17A)またはヒトIL-17RC(hIL-17RC)のいずれかをコードする構築物を安定にトランスフェクトされた仔ハムスター腎臓細胞(BHK)を用いて同定された。表面における受容体の発現は、hIL-17RAに対するモノクローナル抗体またはhIL-17RCに対するポリクローナル抗血清のいずれかをを用いたFACS解析によって確認した。サイトカイン結合を評価するために、ヒトIL-17A、IL-17C、IL-17D、IL-17E、およびIL-17Fのビオチン標識型ならびに蛍光色素を結合させたストレプトアビジンを、トランスフェクトされた細胞へのサイトカイン結合をフローサイトメトリーによって検出するために使用した。これらの結果から、hIL-17RAを発現する安定にトランスフェクトされたBHK細胞が、予想通りヒトIL-17A(hIL-17A)にはっきりと結合するのに対し、空の発現ベクターをトランスフェクトされたものは、試験したIL-17ファミリーのどのメンバーにも結合しないことが明確に示された。また、hIL-17RAをトランスフェクトされた細胞に対するヒトIL-17F(hIL-17F)の比較的弱い結合も観察されたが、試験したIL-17ファミリーの他のメンバーの有意な結合はなかった。hIL-17RCをトランスフェクトされた細胞への結合に関して他のIL-17ファミリーメンバーを検査し、これらの細胞がhIL-17Fに対して有意な結合を示すことに注目した。さらに、これらの細胞へのhIL-17Aの有意な結合が認められたが、hIL-17Cも、hIL-17Dも、hIL-17Eも、結合はしなかった。このデータから、hIL-17RCがhIL-17FおよびhIL-17Aの両方の受容体であることが分かった。

#### 【 0 0 2 8 】

さらに、ある範囲のサイトカイン濃度における蛍光レベルを検査して、hIL-17RAおよびhIL-17RCに対するhIL-17AおよびhIL-17Fの相対的親和性を決定した。各トランスフェクトにおける個々のサイトカインの平均蛍光強度を比較することによって、hIL-17AはhIL-17FよりもはるかによくhIL-17RAに結合するが、どちらのサイトカインも、hIL-17RCをトランスフェクトされた細胞には同じくらいよく結合するらしいことに注目した。興味深いことに、両方の受容体を発現する細胞へのサイトカイン結合は付加的であるように思われ、協同作用の証拠はなかった。

#### 【 0 0 2 9 】

次に、非標識サイトカインと結合を競合させるよう試みることによって、この結合の特異性を調査した。一定濃度のビオチン化サイトカインおよび濃度を段階的に上げた非標識サイトカインと共に、トランスフェクトされたBHK細胞をインキュベートし、結合されたビオチン化材料の量をFACSによって定量した。濃度を段階的に上げた非標識サイトカインがビオチン化材料の結合に干渉したため、hIL-17RCに対するhIL-17AおよびhIL-17F両方の結合が特異的であることが示された。実際には、非標識のhIL-17AおよびhIL-17Fが、hIL-17RCをトランスフェクトされた細胞へのビオチン標識型の両方のサイトカインの結合に関して効果的に交差競合したことから、これら2種のサイトカインが類似した親和性でhIL-17RCに結合していること、およびそれらが、同一ではないとしても共通の部分がある部位に結合していることが示唆された。非標識hIL-17Aはまた、hIL-17RAをトランスフェクト

された細胞へのビオチン化hIL-17Aおよびビオチン化hIL-17Fの両方の結合に関して効果的に交差競合するのに対し、非標識hIL-17Fは、hIL-17RAへのhIL-17A結合に関して競合する能力は本質的に示さなかった。このことから、hIL-17FはhIL-17RAに対して特異的結合を示すが、この相互作用の結合力は、hIL-17AおよびhIL-17RAの相互作用より有意に低いと思われることが示された。

#### 【 0 0 3 0 】

飽和結合の研究を実施して、hIL-17RCおよびhIL-17RAへのhIL-17AおよびhIL-17Fの結合親和性を測定した。hIL-17RAまたはhIL-17RCを安定に発現するBHK細胞株を、ヨウ素化したhIL-17AまたはhIL-17Fと共に飽和結合条件下でインキュベートして、各受容体に対する各サイトカインの親和性定数を決定した。hIL-17Aは、hIL-17RAおよびhIL-17RCの両方に同程度の親和性で結合した(表1)。具体的には、表に示した受容体をトランスフェクトしたBHK細胞を用いて、方法の箇所で説明するようにして、hIL-17AおよびhIL-17Fの $K_d$ 値を確立した。示した結果は、3回の測定に由来する平均 $K_d$ 値である。

10

#### 【 0 0 3 1 】

(表1)

	hIL-17A	hIL-17F
hIL-17RC (x1) <sup>1</sup>	0.6 nM	1.0 nM
hIL-17RA	1.9 nM	1.5 $\mu$ M

20

<sup>1</sup>は、hIL-17RCのx1スプライス変種を示す。

#### 【 0 0 3 2 】

さらに、hIL-17RCに対するhIL-17Fの親和性は、この受容体に対するhIL-17Aの親和性に非常に類似していた(上記の表1を参照されたい)。しかしながら、ビオチン化サイトカインを用いて得られた結果と一致して、hIL-17RAに対するhIL-17Fの親和性は、測定した他の親和性と比べておよそ1000分の1の低さであった(同上)。このことから、hIL-17AおよびhIL-17FはhIL-17RCに同様の親和性で結合するが、hIL-17RAに対するそれらの親和性は劇的に異なることが示される。

#### 【 0 0 3 3 】

hIL-17RCはhIL-17AおよびhIL-17Fの両方に高い親和性で結合したという観察結果により、hIL-17RCを発現する細胞は、hIL-17AおよびhIL-17Fに同等に応答できるはずであることが示唆される。その一方で、hIL-17RAはhIL-17Aに高い親和性で結合したが、hIL-17Fは約1000分の1の親和性で結合したため、hIL-17RAを発現する細胞は、生理的条件下で、hIL-17Aにのみ応答するであろうことが暗示される。以前は、hIL-17RAは普遍的に発現されることが示されていたが、その発現は、造血細胞においてより多く、他の組織中での発現は少ないことが報告されている。したがって、hIL-17RCの発現を検査して、発現パターンの重複の程度を決定した。ノーザンブロット解析により、hIL-17RCが、副腎、前立腺、肝臓、および甲状腺などの腺組織において高レベルで発現され、造血組織では検出可能な発現はないことが示された。

30

#### 【 0 0 3 4 】

造血細胞でのこれらの受容体の発現をさらに調査するために、末梢血単核細胞(PBMC)へのビオチン化hIL-17AおよびhIL-17Fの結合もまた、多パラメーターFACS解析によって検査した。結果から、検査されるPBMC部分集団の事実上すべてにhIL-17Aが結合するのに対し、hIL-17Fは、これらの集団のいずれにも検出可能な結合を示さないことが示された。これは、hIL-17RAはhIL-17Aに高い親和性で結合できるがhIL-17Fには結合できないこと、およびPBMCにおいてhIL-17RC mRNAを検出できないことと一致している。まとめると、これらのデータから、IL-17RCは非造血組織で優先的に発現されるのに対し、IL-17RAは造血細胞で優先的に発現されることが示される。

40

#### 【 0 0 3 5 】

hIL-17RCをトランスフェクトされた細胞にhIL-17AおよびhIL-17Fが高い親和性で結合す

50

ることから、効果的な治療物質が、可溶型のhIL-17RCであり得ることが示唆される。このような分子は、これらの2種のサイトカインの有効なアンタゴニストであると思われる。このことを直接試験するために、可溶型のヒトhIL-17RCをFc-融合タンパク質として産生させ、hIL-17AおよびhIL-17Fの両方の結合を阻害する能力を試験した。次いで、これらの効果を、可溶型hIL-17RAを用いて得た結果と比較した。濃度を段階的に上げたhIL-17RC-IgまたはhIL-17RA-Igを結合反応に含め、FACS解析を用いて、安定にトランスフェクトされたBHK細胞へのビオチン化サイトカインの結合に対する可溶性受容体の効果を評価した。可溶性hIL-17RCは、hIL-17AおよびhIL-17F両方の結合を同じ程度まで阻害したのに対し、IL-17Rファミリーの別のメンバーであるhIL-17RDのFc-融合タンパク質は効果をもたらさなかった。その一方で、可溶性hIL-17RAは、hIL-17Aの結合を有効に妨害したが、hIL-17Fの結合には本質的に効果をもたらさなかった。造血細胞へのhIL-17Aの結合を検査すると、同様の結果が得られた。この結合は、hIL-17RA-IgおよびhIL-17RC-Igによって有効に妨害されるが、hIL-17RD-Igでは妨害されなかった。これらのデータは、親和性測定から得られた結果と一致しており、可溶性受容体が、膜固定型と同じ挙動をしていることが示される。

#### 【 0 0 3 6 】

ヒトhIL-17RC-IgがhIL-17AおよびhIL-17Fに結合する能力の補足的評価として、これらのサイトカインに対する可溶性受容体の親和性をBiacore解析によって評価した。可溶性hIL-17RCは、hIL-17AおよびhIL-17Fの両方に高い親和性で結合したことから(表2)、インビボでのhIL-17AおよびhIL-17Fの両方の効果に対するアンタゴニストとしてこの反応物を使用するアイデアがさらに支持された。具体的には、可溶性受容体をチップ上に捕捉し、後述するように結合実験を実施した。ND=検出可能な結合無し。

#### 【 0 0 3 7 】

(表2)

hIL-17RC-Ig	$k_a$ (結合速度)	$k_d$ (解離速度)	$K_D$
mIL17A	ND		
mIL17F	ND		
hIL17A	1.05E+06	4.90E-04	0.469nM
	1.24E+06	4.38E-04	0.352nM
hIL17F	9.91E+05	4.31E-04	0.435nM
	1.11E+06	3.84E-04	0.346nM

mL-17RA-Ig	$k_a$ (結合速度)	$k_d$ (解離速度)	$K_D$
mIL17A	9.78E+05	6.79E-05	0.069nM
	1.12E+06	7.99E-05	0.072nM
mIL17F	ND		

#### 【 0 0 3 8 】

ヒトにおけるスプライス変種の数をはるかに多く、したがって、本発明者らは、これらの分子の部分集団に対してのみ初期実験を実施した。また、この解析のために選択されたものは、エキソン7を含むか、または含まないかの点で異なっていたが、マウスとは違って、すべてのスプライス変種はエキソン8のすべてを組み入れていた。マウスエキソン8の配列の中央に存在する隠れたスプライスアクセプターは、ヒトエキソン8には存在しない。しかしながら、試験した他のスプライス変種は、hIL-17RCエキソン12を含むか、または除外するかのいずれかであった。これらの変種は、hIL-17RCx1(エキソン構成が上記のマウスx1と同一)、hIL-17RCx4(エキソン構成が上記のマウスx4と同一)、hIL-17RCx2、およびhIL-17RCx7と呼んだ。やはり、これらのスプライス変種を293F細胞において一過性に発

現させ、マウスおよびヒトのビオチン化IL-17AおよびIL-17Fに結合する能力に関して試験した。これらの結果を表3に要約する。

【0039】

(表3)

	変種	エキソン <sup>1</sup>			サイトカイン結合 <sup>2</sup>			
		7	8	12	hIL-17A	hIL-17F	mIL-17A	mIL-17F
ヒト	IL-17RCx4	+	+	+	+	+	-	+
	IL-17RCx1	-	+	+	+	+	-	-
	IL-17RCx2	-	+	-	-	-	-	-
	IL-17RCx7	+	+	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>は、転写物に完全に含まれるエキソンを示す。<sup>2</sup>(+)記号は、FACSによる蛍光の有意な増加に基づいて評価される検出可能で有意なサイトカイン結合を示す。(-)記号は蛍光の有意な変化が無いことを示す。

【0040】

先に提示した実験と一致して、hIL-17RCx1はhIL-17AおよびhIL-17Fの両方に結合したが、マウスサイトカインのいずれにも結合しなかった。hIL-17RCx4もまた、両方のヒトサイトカインに結合し、かつ、マウス対応物と同様に、mIL-17Fに結合したが、mIL-17Aには結合しなかった。hIL-17RCx2およびhIL-17RCx7は、hIL-17RCに対するポリクローナル抗血清がCD8<sup>+</sup>細胞を染色したため(データ不掲載)、トランスフェクトされた細胞の表面で明らかに発現されていたが、試験した4種のサイトカインのいずれにも結合できなかった。これらの結合結果は、安定にトランスフェクトされたBHK細胞においても同様に、忠実に再現された。まとめると、これらのデータは、ヒトサイトカインへの結合のために必要とされるIL-17RCタンパク質の不可欠な部分に関する結論を裏付ける。

【0041】

多数の刊行物が、IL-17Aおよび程度は落ちるがIL-17Fを、マウスコラーゲン誘発関節炎(CIA)およびヒト関節リウマチにおける疾患の進行および重症度の一因として結び付けている。CIAを誘導するためにコラーゲンで免疫化しておいたマウスの関節または流入領域リンパ節(DLN)におけるmIL-17AおよびmIL-17F両方の発現を検査した。リアルタイムPCRによる解析から、両方のサイトカインが、未免疫の対照と比べて罹病マウスの両方の組織で上方調節されていることがはっきりと実証され、発現が疾患と相関していることが明らかに示された。さらに、mIL-17RAおよびmIL-17RCの相対的発現もまた、同じ組織で検査した。しかしながら、この場合、どちらの受容体の発現にも疾患との再現可能な相関関係はなかった。さらに、DLNを非造血組織(後足)と比較した際、発現の不一致が明らかであった。ヒト受容体の発現に注目した先の結果と一致して、mIL-17RAは造血組織でより高度に発現され、mIL-17RCは非造血組織でより高度に発現されることが判明した。このデータから、mIL-17A発現およびmIL-17F発現が疾患と相関していること、必要な受容体の両方が罹病組織および正常組織中に存在することが示唆され、かつ、これらのサイトカインの中和が、疾患の進行を防ぐために有効な療法であり得ることが示唆される。

【0042】

したがって、IL-17AおよびIL-17Fに対する同族受容体がIL-17RCであることが示された。特に、hIL-17RCは、hIL-17AおよびhIL-17Fに同様の親和性で結合する。IL-17ファミリーのこれら2種のメンバーは、55%の配列同一性を共有するため、これらが受容体を共有することはおそらく意外ではない。しかしながら、hIL-17RAは高い親和性でhIL-17Aに結合するが、hIL-17Fには、ほぼ1000分の1の低さの親和性で結合することから、生理的条件下ではhIL-17RAはhIL-17Fに結合しないであろうことが示唆される。hIL-17RCを発現する

10

20

30

40

50

細胞は、hIL-17AおよびhIL-17Fの両方に応答するはずであるが、hIL-17RAのみを発現する細胞は、IL-17Aにのみ応答するであろうことが暗示される。この差異には、これらのサイトカインが異なる組織に影響を及ぼす方法に強い影響を与える可能性がある。発現解析を通じて、IL-17RAは遍在的に発現されるが、造血細胞においてより高度に発現されるのに対し、IL-17RCは非造血組織で発現される傾向があり、造血細胞では発現されないことが示された。これと一致して、ヒト末梢血単核細胞のすべての部分集合はhIL-17Aに結合するが、hIL-17Fに結合しない。さらに、このことから、非造血組織はIL-17AおよびhIL-17Fの両方に応答するはずであるのに対し、造血細胞はIL-17Aにのみ応答するはずであることが示唆される。

#### 【0043】

様々なIL-17RCスプライス変種に対するサイトカイン結合のこの検査により、サイトカイン結合に不可欠である受容体の2つの部分が明らかになり、マウスサイトカインとヒトサイトカインの結合特徴には微妙な違いがある。さらに、これらの特徴は、検査した受容体の種に関わらずサイトカインに関して一貫している。表3で提示したデータから示されるように、hIL-17AおよびhIL-17Fは、ヒトx1変種およびヒトx4変種にのみ結合するため、エキソン12およびエキソン8のすべてが、これらのサイトカインがIL-17RCに結合するために必要とされている。これらの各アイソフォームは、エキソン7が含まれるか否かに関しては異なるが、エキソン8のすべておよびエキソン12を含む。このことから、エキソン7がヒトサイトカインの結合に必須ではないことが暗示される。

#### 【0044】

IL-17A機能およびIL-17F機能の両方に対するアンタゴニストを作製することの重要性は、IL-17AおよびIL-17Fの発現といくつかの自己免疫疾患および炎症性疾患の進行との強い相関関係を示す入手可能な情報から明らかと思われる。これら2種のサイトカインは、他の炎症性のサイトカインおよびケモカイン、ならびにマトリックスメタロプロテアーゼを誘導し、これらは、自己免疫性関節炎におけるコラーゲンおよび骨の破壊の一因となる。この反応物は、関節リウマチの有効な治療物質として、ならびにhIL-17AおよびhIL-17Fが役割を果たす他の炎症性疾患において、役立つはずである。

#### 【0045】

したがって、IL-17AおよびIL-17Fの両方に対するアンタゴニストとして役立つように、可溶性のヒトIL-17RCを開発した。治療上、これらの可溶性IL-17RCポリペプチドは有効であった。しかしながら、多数の因子が原因となって、可溶性IL-17RCは、当技術分野において利用可能な多数および様々な産生系から容易に分泌されない。また、製造目的のために必要である十分な量で分泌されもしない。したがって、製造用にスケールアップできる量で発現および分泌され得る、IL-17AおよびIL-17Fに対するアンタゴニストを開発することが当技術分野において必要である。

#### 【0046】

したがって、本発明は、発現および分泌され得る、IL-17AおよびIL-17Fのアンタゴニストを提供することによってこの必要に応じる。具体的には、本発明は、IL-17AおよびIL-17Fに結合し、それらの同族受容体への結合に拮抗し、かつ/または妨害する、いくつかの天然に存在しない可溶性分子または可溶性ポリペプチドの開発および発見に基づいている。これらの可溶性ポリペプチドは、IL-17RCの一部を含む。これらの可溶性ポリペプチドはまた、IL-17RCおよびIL-17RAの両方の一部を含んでよい(「IL-17RC/IL-17RA」)。

#### 【0047】

1つのこのような好ましい態様は、図4Aおよび4B、ならびにSEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158で説明する。この可溶性ポリペプチドは、ヒトIL-17RA(SEQ ID NO: 21)のエキソン1~6およびヒトIL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のエキソン8~16を含む。より具体的には、この可溶性ポリペプチドは、Fc5のようなFc分子がSEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158に含まれる場合には、融合されている。しかしながら、当業者は、二量体化をもたらすと思われる他の任意の分子と同様に、任意のFc分子を利用できることを容易に認識するであろう。

10

20

30

40

50

## 【0048】

したがって、本発明のIL-17RC可溶性受容体およびIL-17RC/IL-17RA可溶性受容体のようなIL-17F活性およびIL-17A活性に対するアンタゴニストは、炎症性疾患の治療的処置において、特に、これらの分子の関与する疾患の治療において単独または併用のIL-17FおよびIL-17Aの両方に対するアンタゴニストとして有用である。さらに、本発明の可溶性受容体のような、IL-17A活性およびIL-17F活性に対するアンタゴニストは、他の炎症性疾患の治療的処置において有用であり、例えば、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌(*helicobacter pylori*)感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、多発性硬化症、全身性硬化症、ネフローゼ症候群、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、腎臓、肺、心臓などの移植拒絶、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、血管新生、再狭窄、および川崎病の治療において、IL-17FおよびIL-17Aを(個々にまたは一緒に)結合、妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する。

10

## 【0049】

サイトカイン受容体サブユニットは、リガンド結合ドメインおよび典型的にはシグナル伝達に関与しているエフェクタードメインを含むマルチドメイン構造を特徴とする。多量体サイトカイン受容体には、単量体、ホモ二量体(例えば、PDGF受容体 アイソフォームおよび アイソフォーム、エリスロポエチン受容体、MPL[トロンプオエチン受容体]、およびG-CSF受容体)、サブユニットがそれぞれリガンド結合ドメインおよびエフェクタードメインを有するヘテロ二量体(例えば、PDGF受容体 アイソフォーム)、ならびに、異なる機能を有する構成要素サブユニットを有する多量体(例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、およびGM-CSFの受容体)が含まれる。いくつかの受容体サブユニットは、複数の受容体に共通である。例えば、それ自体ではリガンドに結合できないが細胞内シグナル伝達ドメインを含む、AIC2Bサブユニットは、IL-3受容体およびGM-CSF受容体の構成要素である。多くのサイトカイン受容体は、その構造および機能に基づいて、4種の関連ファミリーのうちの1つに分類することができる。例えば、クラスI造血受容体は、保存されているシステイン残基およびWSXWSモチーフを含むドメインの存在を特徴とする。プロテインキナーゼドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、および免疫グロブリンドメインを含む、ジスルフィド結合されたループを特徴とするその他のドメインは、いくつかの造血受容体中に存在する。サイトカイン受容体構造についての総説は、Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26:221-228, 1991およびCosman, Cytokine 5:95-106, 1993にある。一般に、生物が新しい生物学的機能を獲得する際の選択圧下で、新しい受容体ファミリーメンバーが、既存の受容体遺伝子の重複から生じて、多重遺伝子ファミリーの存在をもたらしたと考えられている。したがって、ファミリーメンバーは、先祖遺伝子の痕跡を含み、かつ、これらの特徴的な特徴は、その他のファミリーメンバーの単離および同定において活用することができる。

20

30

40

## 【0050】

したがって、本発明は、各リガンドが、対応する1つもしくは複数の受容体に結合し、かつ/またはそれらを介してシグナル伝達しないように妨害するIL-17AアンタゴニストおよびIL-17Fアンタゴニストを対象としている。

## 【0051】

好ましい態様において、このようなアンタゴニストは、図1~4に示すIL-17RCのポリペプチド構造をベースとしている。IL-17RC受容体は、特定のエキソンの包含または除外に基づいた多数のスプライス変種を有する。後述するように、これらのエキソンの一部は、リガンド(IL-17Aおよび/またはIL-17F)結合のために必要とされる。

50

## 【 0 0 5 2 】

本発明は、IL-17RCとIL-17RA(SEQ ID NO: 21)のようなIL-17ファミリーの他のメンバーとの構造的類似性(「ドメイン」)の発見に部分的に基づいている。具体的には、以下の3つのドメインが同定された:

- (1)ドメイン1(SEQ ID NO: 159およびSEQ ID NO: 160)は、IL-17RCのエキソン8~10を含む。これは、IL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のアミノ酸残基193~276およびIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のアミノ酸残基208~291に対応する。
- (2)ドメイン2(SEQ ID NO: 161およびSEQ ID NO: 162)は、IL-17RCのエキソン11~13を含む。これは、IL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のアミノ酸残基277~370およびIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のアミノ酸残基292~385に対応する。
- (3)ドメイン3(SEQ ID NO: 163およびSEQ ID NO: 164)は、IL-17RCのエキソン14~16を含む。これは、IL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のアミノ酸残基371~447およびIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のアミノ酸残基386~462に対応する。

10

## 【 0 0 5 3 】

したがって、本発明は、図1に示すエキソンの様々な組合せをベースとする可溶性IL-17RCポリペプチドを対象とする。具体的には、これらの可溶性ポリペプチドの例には以下が含まれる:

- (1)ヒトIL-17RCx1のエキソン1~6および8~16を含み、リンカー(SEQ ID NO: 176およびSEQ ID NO: 177)を介してFc10(SEQ ID NO: 174およびSEQ ID NO: 175)に融合されている、変種1210(SEQ ID NO: 67およびSEQ ID NO: 68)。変種1210はまた、otPAに由来するプレプロシグナルペプチド(SEQ ID NO: 178に示すポリペプチド配列)も有する。Fc5または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc10の代わりに使用してよい。
- (2)ヒトIL-17RCx1のエキソン1~6および8~16を含み、Fc10(SEQ ID NO: 174およびSEQ ID NO: 175)に融合されている、変種1390(SEQ ID NO: 69およびSEQ ID NO: 70)。変種1390はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc5または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc10の代わりに使用してよい。
- (3)マウスIL-17RAのエキソン1~6およびヒトIL-17RCx1のエキソン8~16を含み、リンカー(SEQ ID NO: 176およびSEQ ID NO: 177)を介してFc10(SEQ ID NO: 174およびSEQ ID NO: 175)に融合されている、変種1341(SEQ ID NO: 71およびSEQ ID NO: 72)。変種1341はまた、マウスIL-17RAに由来するシグナルペプチド(SEQ ID NO: 181)も有する。Fc5または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc10の代わりに使用してよい。
- (4)ヒトIL-17RCx1のエキソン8~16を含み、リンカー(SEQ ID NO: 176およびSEQ ID NO: 177)を介してFc10(SEQ ID NO: 174およびSEQ ID NO: 175)に融合されている、変種1342(SEQ ID NO: 73およびSEQ ID NO: 74)。変種1342はまた、otPAに由来するプレプロシグナルペプチド(SEQ ID NO: 178に示すポリペプチド配列)も有する。Fc5または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc10の代わりに使用してよい。
- (5)ヒトIL-17RCx1のエキソン1~7を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S1(SEQ ID NO: 77およびSEQ ID NO: 78)。変種S1はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。
- (6)ヒトIL-17RCx1のエキソン1~8を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S2(SEQ ID NO: 81およびSEQ ID NO: 82)。変種S2はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。
- (7)ヒトIL-17RCx1のエキソン1~9を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S3(SEQ ID NO: 85およびSEQ ID NO: 86)。変種S3はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。
- (8)ヒトIL-17RCx1のエキソン1~10を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S4(SEQ ID NO: 89およびSEQ ID NO: 90)。変種S4はまた、天然のシ

20

30

40

50

グナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(9) ヒトIL-17RCx1のエキソン1~11を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S5(SEQ ID NO: 93およびSEQ ID NO: 94)。変種S5はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(10) ヒトIL-17RCx1のエキソン14~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S6(SEQ ID NO: 97およびSEQ ID NO: 98)。変種S6はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(11) ヒトIL-17RCx1のエキソン11~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S7(SEQ ID NO: 101およびSEQ ID NO: 102)。変種S7はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(12) ヒトIL-17RCx1のエキソン7~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S10(SEQ ID NO: 105およびSEQ ID NO: 106)。変種S10はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(13) ヒトIL-17RCx1のエキソン1~7およびエキソン14~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S11(SEQ ID NO: 109およびSEQ ID NO: 110)。変種S11はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(14) ヒトIL-17RCx1のエキソン1~7およびエキソン11~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S12(SEQ ID NO: 113およびSEQ ID NO: 114)。変種S12はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(15) ヒトIL-17RCx1のエキソン1~13およびヒトIL-17RAのエキソン7~9を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S13(SEQ ID NO: 117およびSEQ ID NO: 118)。変種S13はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(16) マウスIL-17RAのエキソン1~6、ヒトIL-17RCx1のエキソン8~13、およびマウスIL-17RAのエキソン7~9を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種S14(SEQ ID NO: 121およびSEQ ID NO: 122)。変種S13はまた、天然のシグナル配列も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(17) ヒトIL-17RAのエキソン1~10およびヒトIL-17RCx1のエキソン8~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種1407(SEQ ID NO: 139およびSEQ ID NO: 140)。変種1407はまた、ヒトIL-17RAに由来する天然のシグナルペプチドも有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(18) ヒトIL-17RCx1のエキソン1~6およびエキソン8~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合され、Leu21Ala置換(IL-17RCx1と比較)を含む、変種1459(SEQ ID NO: 151およびSEQ ID NO: 152)。変種1459はまた、otPAに由来するブレブロシグナルペプチド(SEQ ID NO: 178に示すポリペプチド配列)も有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

(19) ヒトIL-17RAのエキソン1~6およびヒトIL-17RCx1のエキソン8~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種1454(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)。変種1454はまた、ヒトIL-17RAに由来する天然のシグナルペプチドも有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。変種1454ポリペプチドの成熟型はSEQ ID NO: 183に示され、SEQ ID NO: 182の核酸

10

20

30

40

50



分子にコードされる。真核細胞で発現させるために、ヒトIL-17RAシグナル配列の代わりに他の分泌シグナル配列を使用してよく、例えば、ヒトIL-17RCシグナル配列(例えば、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基1~20)、otPAプレプロシグナル配列(SEQ ID NO: 178)、ヒト成長ホルモンシグナル配列(SEQ ID NO: 168およびSEQ ID NO: 169)、ならびにヒトCD33シグナル配列(SEQ ID NO: 172およびSEQ ID NO: 173)が含まれる。任意で、C末端アミノ酸残基(SEQ ID NO: 183の残基658(Lys))が変種1454から切断されるか、または欠失している。

【0054】

前述の変種は、限られた数の本発明の態様を表すにすぎない。当業者は、本出願の教示、および特に本明細書と共に含まれる図1~4に基づいて、他のIL-17RC変種および/またはIL-17RC/IL-17RA変種を、容易に、かつ過度に実験をすることなく設計および試験できるであろう。例えば、上記に開示したものの代わりに使用され得る他のシグナルペプチドには、ヒト成長ホルモンシグナルペプチド(SEQ ID NO: 168およびSEQ ID NO: 169)、マウス免疫グロブリン重鎖可変領域(VH26-10)(SEQ ID NO: 170およびSEQ ID NO: 171)、またはヒトCD33(SEQ ID NO: 172およびSEQ ID NO: 173)が含まれる。

【0055】

他の発明の中で、本発明は、本発明の可溶性受容体の新規な用途を提供する。これらの可溶性受容体は、IL-17RC(「IL-17RC」、「可溶性IL-17RC」、もしくは「sIL-17RC」と呼ばれる。これらはすべて、本明細書において同義的に使用され得る)だけをベースとしてよく、または、IL-17RAとIL-17RCの組合せ部分(「IL-17RC/IL-17RA」、「ハイブリッドRC/RA」、「RC/RA」、「IL-17RA/RC」、もしくはそれらの任意の変形、例えば、変種1454。これらはすべて、本明細書において同義的に使用され得る)をベースとしてよい。本発明はまた、ヒトの炎症性疾患および自己免疫疾患において使用するための可溶性IL-17RCポリペプチド断片および可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド断片ならびに融合タンパク質も提供する。本発明の可溶性受容体は、炎症、ならびに乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、内毒素血症、IBD、IBS、結腸炎、喘息、同種移植拒絶、免疫介在性腎疾患、肝胆道疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、腫瘍増殖の促進、または変性関節疾患などの炎症性疾患および本明細書において開示する他の炎症性状態の治療において、IL-17FもしくはIL-17Aのいずれか、またはIL-17AおよびIL-17Fの両方の活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和するのに使用することができる。

【0056】

ヒトIL-17RC(「IL-17RCx1」)をコードする例示的なヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 1によって提供され、コードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 2に示される。IL-17RCは、IL-17A(SEQ ID NO: 13およびSEQ ID NO: 14)ならびにIL-17F(SEQ ID NO: 15およびSEQ ID NO: 16)の両方に対する受容体として機能する。IL-17RCは、単量体、ホモ二量体、またはヘテロ二量体として作用することができる。好ましくは、IL-17RCは、IL-17Aおよび/またはIL-17Fの両方に対するホモ二量体受容体として作用する。本出願で説明するように、単量体受容体またはホモ二量体受容体のどちらも、IL-17RCのみを含んでよく、または、IL-17RAのような他のIL-17ファミリー受容体の一部分を含んでもよい(「IL-17RC/IL-17RA」)。したがって、本発明は、IL-17RA、IL-17RE、または他の任意のIL-17ファミリー受容体と組み合わせてIL-17RCの一部分を含む可溶性受容体を包含する。IL-17RCはまた、IL-17関連サイトカインに対するヘテロ二量体受容体サブユニットとして作用することもできる。例えば、IL-17RCは、IL-17RAまたは別のIL-17様受容体とヘテロ二量体を形成し得る。IL-17RCは、いずれもその全体が参照により本明細書に組み入れられる、本願の権利者が所有する米国特許出願第10/458,647号および本願の権利者が所有するWIPO公開WO 01/04304において開示されている。IL-17RC(SEQ ID NO: 1)をコードするヒトcDNAクローンの解析により、約20個のアミノ酸残基からなる推定上のシグナル配列(SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基1~20)、約431個のアミノ酸残基からなる細胞外リガンド結合ドメイン(SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基21~452; SEQ ID NO: 3)、約20個のアミノ酸残基からなる膜貫通ドメイン(SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基453~473)、および約203個のアミノ酸残基からなる細胞内ドメイン(SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基474~677)を含む、692個のアミノ酸(SEQ ID NO: 2)を

10

20

30

40

50

コードするオープンリーディングフレームが明らかになった。さらに、リガンド結合ドメインは、SEQ ID NO: 22によって表される。

【0057】

「IL-17RCx4」と呼ばれる変種ヒトIL-17RCをコードするさらに別の例示的なヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 165によって提供され、コードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 166に示される。予測されるシグナルペプチドは、SEQ ID NO: 165の残基1~60およびSEQ ID NO: 166の残基1~20に由来し;細胞外ドメインは、SEQ ID NO: 165の残基61~1401およびSEQ ID NO: 166の残基21~467に由来し;膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 165の残基1402~1464およびSEQ ID NO: 166の残基468~488に由来し;細胞内ドメインは、SEQ ID NO: 165の残基1465~2121およびSEQ ID NO: 166の残基489~707に由来する。

10

【0058】

「IL-17RC-1」と呼ばれる変種ヒトIL-17RCをコードするさらに別の例示的なヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 4によって提供され、コードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 5に示される。IL-17RC-1は、いずれもその全体が参照により本明細書に組み入れられる、本願の権利者が所有する米国特許出願第10/458,647号および本願の権利者が所有するWIPO公開WO01/04304において開示されている。配列解析により、IL-17RC-1が切断型の受容体ポリペプチドであることが明らかになった。すなわち、IL-17RC-1は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基1~113を欠く。SEQ ID NO: 10は、IL-17RCのN末端部分を含むIL-17RC-1ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0059】

20

また、IL-17RCおよびIL-17RC-1のアミノ酸配列比較により、これら2種のポリペプチドが選択的にスプライシングされた変種に相当することも示された。IL-17RCのアミノ酸配列は、IL-17RC-1が欠いているアミノ酸17個のセグメント(SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基339~355)を含むが、IL-17RCは、アミノ酸479の後に、IL-17RC-1中に存在するアミノ酸13個のセグメント(SEQ ID NO: 5のアミノ酸残基350~362)を欠いている。両方のアミノ酸セグメントを含むポリペプチドはSEQ ID NO: 11によって提供されるのに対し、SEQ ID NO: 12は、アミノ酸13個およびアミノ酸17個のセグメントの両方を欠くポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0060】

「IL-17RC-6」と呼ばれる変種ヒトIL-17RCをコードするさらに別の例示的なヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 23によって提供され、コードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 24に示される。IL-17RC-6は、SEQ ID NO: 2に例示されるIL-17RCと比べてアミノ酸残基25個の欠失を含む。具体的には、IL-17RC-6は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基94~アミノ酸残基118を含まない。IL-17RC-6 (SEQ ID NO: 23)をコードするヒトcDNAクローンの解析により、約427個のアミノ酸残基からなる細胞外リガンド結合ドメイン(SEQ ID NO: 24のアミノ酸残基1~427)、約20個のアミノ酸残基からなる膜貫通ドメイン(SEQ ID NO: 24のアミノ酸残基428~448)、および約218個のアミノ酸残基からなる細胞内ドメイン(SEQ ID NO: 24のアミノ酸残基449~667)が明らかになった。

30

【0061】

変種マウスIL-17RCをコードする例示的なヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 25によって提供され、コードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 26に示される。マウスIL-17RCは、マウスIL-17A(SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 18)ならびにマウスIL-17F(SEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 20)の両方に対する受容体として機能する。IL-17RC(SEQ ID NO: 25)をコードするマウスcDNAクローンの解析により、約449個のアミノ酸残基からなる細胞外リガンド結合ドメイン(SEQ ID NO: 27)が明らかになった。さらに、リガンド結合ドメインは、SEQ ID NO: 28によって表される。

40

【0062】

変種マウスIL-17RCをコードするさらに別の例示的なヌクレオチド配列はSEQ ID NO: 29によって提供され、コードされるポリペプチドはSEQ ID NO: 30に示される。

【0063】

50

IL-17RC遺伝子は、染色体3p25～3p24中に存在する。下記に考察するように、この領域は、様々な障害および疾患に関連している。

【0064】

ノーザン解析により、甲状腺組織、副腎組織、前立腺組織、および肝臓組織においてIL-17RC遺伝子が強く発現され、心臓組織、小腸組織、胃組織、および気管組織における発現はこれより少ないことが示される。一方、脳、胎盤、肺、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、結腸、末梢血白血球、脊髄、リンパ節、および骨髄では、ほとんどまたは全く発現されない。これらの観察結果から、様々な組織を識別するのにIL-17RC配列を使用できることが示される。

【0065】

後述するように、本発明は、SEQ ID NO：2の21～692の参照アミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、もしくは少なくとも90%、または95%超、例えば、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する、単離されたポリペプチドを提供する。本発明はまた、(a)SEQ ID NO：2のアミノ酸残基21～452、(b)SEQ ID NO：10のアミノ酸残基21～435、(c)SEQ ID NO：2のアミノ酸残基21～677、および(d)SEQ ID NO：2のアミノ酸残基1～692からなる群より選択される参照アミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列またはSEQ ID NO：10のアミノ酸配列のいずれかからなるポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する、単離されたポリペプチドを提供する。例示的なポリペプチドには、SEQ ID NO：2、SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11、またはSEQ ID NO：12のアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれる。

【0066】

本発明はまた、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列のアミノ酸残基21～452またはSEQ ID NO：10のアミノ酸配列のアミノ酸残基21～435のいずれかを含む細胞外ドメインを含む単離されたポリペプチドも提供する。このようなポリペプチドは、細胞外ドメインに対してカルボキシル末端位置に存在し、SEQ ID NO：2のアミノ酸残基453～473を含む膜貫通ドメインもさらに含んでよい。これらのポリペプチドはまた、膜貫通ドメインに対してカルボキシル末端位置に存在し、SEQ ID NO：2のアミノ酸残基474～677またはSEQ ID NO：10のアミノ酸残基457～673のいずれかを含む細胞内ドメイン、および任意で、細胞外ドメインに対してアミノ末端位置に存在し、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列のアミノ酸残基1～20を含むシグナル分泌配列も含んでよい。

【0067】

本発明はまた、変種IL-17RCポリペプチドも含み、この変種ポリペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO：2のアミノ酸配列と、少なくとも70%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または95%を上回る同一性からなる群より選択される同一性を有し、かつ、変種ポリペプチドのアミノ酸配列とSEQ ID NO：2のアミノ酸配列との任意の差異は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換に起因する。

【0068】

さらに、本発明はまた、IL-17F(例えば、SEQ ID NO：16に示されるヒトIL-17Fポリペプチド配列)に結合する、上記に開示した単離されたポリペプチドも提供する。ヒトIL-17Fポリヌクレオチド配列は、SEQ ID NO：15に示される。マウスIL-17Fポリヌクレオチド配列はSEQ ID NO：19に示され、対応するポリペプチドはSEQ ID NO：20に示される。本発明はまた、IL-17A(例えば、SEQ ID NO：14に示すヒトIL-17Aポリペプチド配列)に結合する、上記に開示した単離されたポリペプチドも提供する。ヒトIL-17Aポリヌクレオチド配列は、SEQ ID NO：13に示される。マウスIL-17Aポリヌクレオチド配列はSEQ ID NO：17に示され、対応するポリペプチドはSEQ ID NO：18に示される。

【0069】

本発明はまた、SEQ ID NO：2またはSEQ ID NO：3のアミノ酸配列の少なくとも15個の連

10

20

30

40

50

続したアミノ酸残基を含む、単離されたポリペプチドおよびエピトープも提供する。例示的なポリペプチドには、SEQ ID NO: 2もしくはSEQ ID NO: 3、その抗原エピトープ、またはその機能的なIL-17AもしくはIL-17F結合断片を含むか、またはそれらからなるポリペプチドが含まれる。さらに、本発明はまた、IL-17FまたはIL-17Aに結合するか、その活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する、上記に開示した単離されたポリペプチドも提供する。

【0070】

本発明はまた、変種IL-17RCポリペプチドも含み、この変種ポリペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基と、少なくとも70%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または95%を上回る同一性、例えば、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれ以上の同一性からなる群より選択される同一性を有し、かつ、変種ポリペプチドのアミノ酸配列とSEQ ID NO: 2の対応するアミノ酸配列との任意の差異は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換に起因する。このような保存的アミノ酸置換は、本明細書において説明される。さらに、本発明はまた、IL-17FまたはIL-17Aに結合するか、その活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する、上記に開示した単離されたポリペプチドも提供する。

10

【0071】

本発明はさらに、薬学的に許容される担体およびそのような発現ベクターまたはそのような発現ベクターを含む組換えウイルスのうち少なくとも1種を含む薬学的組成物も提供する。本発明はさらに、薬学的に許容される担体、および本明細書において説明するポリペプチドまたは抗体を含む薬学的組成物も含む。

20

【0072】

本発明はまた、IL-17RCポリペプチドおよび免疫グロブリン部分を含む融合タンパク質も提供する。このような融合タンパク質において、免疫グロブリン部分は、ヒトFc断片のような免疫グロブリン重鎖定常領域でよい。本発明はさらに、このような融合タンパク質をコードする単離された核酸分子も含む。

【0073】

本発明のこれらの局面および他の局面は、以下の詳細な説明を参照すると、明らかになると考えられる。さらに、様々な参考文献が下記に特定され、かつ、それらの全体が参照により組み入れられる。

30

【0074】

(B) 定義

以下の説明において、いくつかの用語が広範に使用される。以下の定義は、本発明の理解を容易にするために提供される。

【0075】

本明細書において使用される場合、「核酸」または「核酸分子」は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)などのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によって作製された断片、ならびに、ライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエキソヌクレアーゼ作用のいずれかによって作製された断片を意味する。核酸分子は、天然のヌクレオチドである単量体(DNAおよびRNAなど)、もしくは天然のヌクレオチドの類似体(例えば、天然のヌクレオチドの - 鏡像異性型)、または両方の組合せから構成され得る。改変されたヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジンもしくはプリン塩基部分に変更を有してよい。糖改変には、例えば、ハロゲン、アルキル基、アミン、およびアジド基による1つもしくは複数のヒドロキシル基の置換が含まれ、または、糖は、エーテルもしくはエステルとして官能化されてよい。さらに、糖部分全体が、アザ糖および炭素環系糖類似体など立体的かつ電子的に類似した構造体で置換されてもよい。塩基部分の改変の例には、アルキル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンもしくはピリミジン、または他の周知の複素環系置換が含まれる。核酸単量体は、リン酸ジエステル結合またはそのような結合の類似体によって連結されてよい。リン酸ジエステル結合の類似体には、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホス

40

50

ホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオアート、ホスホルアニリダート、およびホスホルアミダートなどが含まれる。「核酸分子」という用語はまた、ポリアミド主鎖に結合された天然または改変された核酸塩基を含む、いわゆる「ペプチド核酸」も含む。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかでよい。

【0076】

「核酸分子の相補体」という用語は、参照ヌクレオチド配列と比べて相補的なヌクレオチド配列および反対の向きを有する核酸分子を意味する。例えば、配列5' ATGCACGGG 3' は、5' CCCGTGCAT 3' に相補的である。

【0077】

「縮重ヌクレオチド配列」という用語は、あるポリペプチドをコードする参照核酸分子と比べて1つまたは複数の縮重コドンを含む、ヌクレオチド配列を示す。縮重コドンは、ヌクレオチドの異なるトリプレットを含むが、同じアミノ酸残基をコードする(すなわち、GAUおよびGACトリプレットは、それぞれAspをコードする)。

【0078】

「構造遺伝子」という用語は、メッセンジャーRNA(mRNA)に転写され、次いで、特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸配列に翻訳される核酸分子を意味する。

【0079】

「単離された核酸分子」は、生物のゲノムDNA中に組み込まれていない核酸分子である。例えば、細胞のゲノムDNAから分離された、増殖因子をコードするDNA分子は、単離DNA分子である。単離された核酸分子の別の例は、生物のゲノム中に組み込まれていない、化学合成された核酸分子である。特定の種から単離された核酸分子は、その種に由来する染色体の完全なDNA分子より小型である。

【0080】

「核酸分子構築物」は、天然には存在しない配置で組み合わせられ、かつ並べられた核酸のセグメントを含むように、ヒトの介入によって改変された、一本鎖または二本鎖の核酸分子である。

【0081】

「直鎖DNA」は、遊離の5'末端および3'末端を有する非環状DNA分子を示す。直鎖DNAは、酵素的消化または物理的破壊によって、プラスミドのような閉じた環状DNA分子から調製することができる。

【0082】

「相補的DNA(cDNA)」は、酵素逆転写酵素によってmRNA鋳型から形成される一本鎖DNA分子である。典型的には、mRNAの一部分に相補的なプライマーが、逆転写の開始のために使用される。また、当業者は、そのような一本鎖DNA分子およびその相補的DNA鎖からなる二本鎖DNA分子を指すために、「cDNA」という用語も使用する。「cDNA」という用語はまた、RNA鋳型から合成されたcDNA分子のクローンも意味する。

【0083】

「プロモーター」は、構造遺伝子の転写を指示するヌクレオチド配列である。典型的には、プロモーターは、遺伝子の5'非コード領域中、構造遺伝子の転写開始部位の近位側に位置する。転写開始において機能するプロモーター内の配列エレメントは、しばしば、コンセンサスヌクレオチド配列を特徴とする。これらのプロモーターエレメントには、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化特異的エレメント(DSE; McGehee et al., Mol. Endocrinol. 7: 551(1993))、環状AMP応答エレメント(CRE)、血清応答エレメント(SRE; Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1: 47(1990))、糖質コルチコイド応答エレメント(GRE)、ならびに、CRE/ATF(O'Reilly et al., J. Biol. Chem. 267: 19938(1992))、AP2(Ye et al., J. Biol. Chem. 269: 25728(1994))、SP1、cAMP 応答エレメント結合タンパク質(CREB; Loeken, Gene Expr. 3: 253(1993))、および八量体因子(一般に、Watson et al. 編、Molecular Biology of the Gene、第4版(The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987)ならびにLemaigreおよびRousseau, Biochem. J. 303: 1(1994)を参照されたい)など他の転写因子に対する結合部位が含まれる。プロモーターが誘導性

10

20

30

40

50

プロモーターである場合には、転写速度は、誘導物質に応答して上昇する。一方、プロモーターが構成的プロモーターである場合には、転写速度は誘導物質によって調節されない。抑制プロモーターもまた、公知である。

【0084】

「コアプロモーター」は、TATAボックスおよび転写開始部位を含む、プロモーター機能のために不可欠なヌクレオチド配列を含む。この定義により、コアプロモーターは、活性を増大させ得るか、または組織特異的な活性を与え得る特定の配列の不在で検出可能な活性を有してもよく、または有さなくてもよい。

【0085】

「調節エレメント」は、コアプロモーターの活性を調整するヌクレオチド配列である。例えば、調節エレメントは、特定の細胞、組織、または細胞小器官において排他的または優先的に転写を可能にする細胞因子と結合するヌクレオチド配列を含んでよい。これらのタイプの調節エレメントは、通常、「細胞特異的」、「組織特異的」、または「細胞小器官特異的」な様式で発現される遺伝子と結合している。

【0086】

「エンハンサー」は、転写開始部位に対するエンハンサーの距離にも向きにも関わらず、転写の効率を高めることができるタイプの調節エレメントである。

【0087】

「異種DNA」は、所与の宿主細胞内に天然には存在しない、DNA分子またはDNA分子の集団を意味する。特定の宿主細胞に異種のDNA分子は、宿主DNAが非宿主DNA(すなわち、外来性DNA)と結合していない限りにおいて、宿主細胞種に由来するDNA(すなわち、内在性DNA)を含んでよい。例えば、転写プロモーターを含む宿主DNAセグメントに機能的に連結された、あるポリペプチドをコードする非宿主DNAセグメントを含むDNA分子は、異種DNA分子とみなされる。逆に、異種DNA分子は、外来性プロモーターと機能的に連結された内在性遺伝子を含んでよい。別の例として、野生型細胞に由来する遺伝子を含むDNA分子は、そのDNA分子が、野生型遺伝子を欠く変異細胞中に導入される場合には、異種DNAとみなされる。

【0088】

「ポリペプチド」は、天然に産生されるか合成的に作製されるかを問わず、ペプチド結合によって結合されたアミノ酸残基のポリマーである。約10アミノ酸残基未満のポリペプチドは、一般に「ペプチド」と呼ばれる。

【0089】

「タンパク質」は、1つまたは複数のポリペプチド鎖を含む高分子である。タンパク質はまた、炭水化物基のような非ペプチド性構成要素を含んでもよい。炭水化物および他の非ペプチド性置換基は、タンパク質が産生される細胞によって、そのタンパク質に付加されてよく、かつ、細胞のタイプによって異なる。タンパク質は、本明細書において、そのアミノ酸主鎖の構造の観点から定義され、炭水化物基のような置換基は一般に特定されないが、それでもなお存在してよい。

【0090】

非宿主DNA分子によってコードされるペプチドまたはポリペプチドは、「異種」ペプチドまたはポリペプチドである。

【0091】

「クローニングベクター」は、プラスミド、コスミド、またはバクテリオファージなど、宿主細胞において自主的に複製する能力を有する核酸分子である。クローニングベクターは、典型的には、ベクターの極めて重要な生物学的機能を喪失せずに、決定可能な様式で核酸分子を挿入することを可能にする1つまたは小数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位、ならびに、クローニングベクターで形質転換された細胞の同定および選別に使用するのに適しているマーカー遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含む。マーカー遺伝子には、典型的には、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性を提供する遺伝子が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0092】

「発現ベクター」は、宿主細胞において発現される遺伝子をコードする核酸分子である。典型的には、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子、および転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は、通常、プロモーターの制御下に置かれ、このような遺伝子は、プロモーター「に機能的に連結された」と言われる。同様に、調節エレメントがコアプロモーターの活性を調節する場合には、調節エレメントおよびコアプロモーターは、機能的に連結されている。

## 【0093】

「組換え宿主」は、クローニングベクターまたは発現ベクターなどの異種核酸分子を含む細胞である。本発明の文脈において、組換え宿主の例は、発現ベクターからIL-17RCを産生する細胞である。一方、IL-17RCは、IL-17RCの「天然供給源」であり、かつ、発現ベクターを欠く細胞によって産生され得る。

## 【0094】

「組込み形質転換体」は、異種DNAが細胞のゲノムDNA中に組み込まれた組換え宿主細胞である。

## 【0095】

「融合タンパク質」は、少なくとも2種の遺伝子のヌクレオチド配列を含む核酸分子によって発現されるハイブリッドタンパク質である。例えば、融合タンパク質は、アフィニティマトリックスに結合するポリペプチドと融合されたIL-17RCポリペプチドの少なくとも一部分を含んでよい。このような融合タンパク質は、アフィニティクロマトグラフィーを用いて多量のIL-17RCを単離するための手段を提供する。

## 【0096】

「受容体」という用語は、「リガンド」と呼ばれる生理活性分子に結合する、細胞関連タンパク質を示す。この相互作用は、細胞に対するリガンドの作用を媒介する。受容体は、膜結合型、細胞質ゾル内、または核内によく、単量体(例えば、甲状腺刺激ホルモン受容体、 $\alpha$ -アドレナリン作動性受容体)または多量体(例えば、PDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリスロポエチン受容体、およびIL-6受容体)でよい。膜結合型受容体は、細胞外のリガンド結合ドメインおよび典型的にはシグナル伝達に関与している細胞内のエフェクタードメインを含むマルチドメイン構造を特徴とする。ある種の膜結合型受容体において、細胞外のリガンド結合ドメインおよび細胞内のエフェクタードメインは、完全な機能的受容体を含む別々のポリペプチドに位置している。

## 【0097】

一般に、受容体にリガンドが結合すると、受容体の立体配置が変化して、細胞中のエフェクタードメインと他の分子との相互作用が引き起こされ、その結果として、細胞の代謝が変更される。受容体-リガンド相互作用にしばしば関係があるとされる代謝事象には、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、環状AMP産生の増加、細胞カルシウムの動員、膜脂質の流動、細胞接着、イノシトール脂質の加水分解、およびリン脂質の加水分解が含まれる。

## 【0098】

「可溶性受容体」は、細胞膜に結合していない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメイン、ならびにグリコホスホイノシトール(gpi)を介する結合のような細胞膜への他の結合を欠く、最も一般的なリガンド結合受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、ポリペプチドの精製を提供するか、もしくは、基質へのポリペプチドの結合部位を提供するアフィニティータグ、または免疫グロブリン定常領域配列など付加的なアミノ酸残基を含んでよい。多くの細胞表面受容体は、タンパク分解によって産生されるか、または選択的にスプライシングされたmRNAから翻訳される、天然の可溶性対応物を有する。可溶性受容体は、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体でよく、多量体受容体は、一般に、9個を超えるサブユニットを含まず、好ましくは、6個を超えるサブユニットを含まず、および最も好ましくは、3個を超えるサブユニ

10

20

30

40

50

ットを含まない。受容体ポリペプチドは、それぞれ膜固定またはシグナル伝達を提供するのに十分な膜貫通ポリペプチドセグメントおよび細胞内ポリペプチドセグメントの部分をそれらが欠いている場合、これらを実質的に含まないと言われる。サイトカイン受容体の可溶性受容体は、一般に、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含まない細胞外サイトカイン結合ドメインを含む。例えば、代表的な可溶性受容体には、SEQ ID NO: 167(ポリヌクレオチド)およびSEQ ID NO: 21(ポリペプチド)に示されるIL-17RAの可溶性受容体が含まれる。公知のサイトカイン受容体配列のどの配列が、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含まない細胞外サイトカイン結合ドメインを含むかを正確に叙述することは、当業者が十分に対応できるレベルの範囲内である。さらに、当業者は、遺伝コードを用いて、このような可溶性受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを容易に決定することができる。

10

#### 【0099】

「分泌シグナル配列」という用語は、より大型のポリペプチドの構成要素として、合成される場である細胞の分泌経路を介してその大型ポリペプチドを誘導するペプチド(「分泌ペプチド」)をコードするDNA配列を示す。この大型ポリペプチドは、一般に、分泌経路を介して移行する間に切断されて、分泌ペプチドが除去される。

#### 【0100】

「単離されたポリペプチド」は、炭水化物、脂質、または天然にポリペプチドに結合している他のタンパク質性の不純物など、混入した細胞成分を本質的に含まないポリペプチドである。典型的には、単離されたポリペプチドの調製物は、高度に精製された形態の、すなわち、少なくとも約80%の純度、少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、95%超の純度、例えば、96%、97%、もしくは98%またはそれ以上の純度、または99%超の純度のポリペプチドを含む。特定のタンパク質調製物が単離されたポリペプチドを含むことを示す1つの方法は、そのタンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクーマシーブリリアントブルー染色の後のシングルバンドの出現による。しかしながら、「単離された」という用語は、二量体あるいはグリコシル化型または誘導体化型など、代替の物理的形態の同じポリペプチドの存在を除外しない。

20

#### 【0101】

「アミノ末端」および「カルボキシル末端」という用語は、本明細書において、ポリペプチド内部の位置を示すために使用される。文脈が許す場合、これらの用語は、ポリペプチドの特定の配列または部分に関して、近接または相対的位置を示すために使用される。例えば、ポリペプチド内の参照配列に対してカルボキシ末端に位置した特定の配列は、その参照配列のカルボキシ末端の近位側に位置するが、必ずしも、ポリペプチド全体のカルボキシル末端にはない。

30

#### 【0102】

「発現」という用語は、遺伝子産物の生合成を意味する。例えば、構造遺伝子の場合、発現は、mRNAへの構造遺伝子の転写および1種または複数種のポリペプチドへのmRNAの翻訳を含む。

#### 【0103】

「スプライス変種」という用語は、本明細書において、ある遺伝子から転写されたRNAの代替形態を示すために使用される。スプライス変異は、転写されたRNA分子内の、または、頻度は低いものの、別々に転写されたRNA分子間の選択的スプライシング部位の使用を通じて天然に起こり、その結果、同じ遺伝子から転写されたいくつかのmRNAが生じ得る。スプライス変種は、アミノ酸配列が変更されたポリペプチドをコードする場合がある。また、スプライス変種という用語は、本明細書において、ある遺伝子から転写されたmRNAのスプライス変種によってコードされるポリペプチドを示すのにも使用される。

40

#### 【0104】

本明細書において使用される場合、「免疫調節物質」という用語は、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、共刺激分子、および造血因子など、ならびに、これらの

50



分子の合成類似体を含む。

【0105】

「相補体/抗相補体ペア」という用語は、適切な条件下で、非共有結合的に結合した安定なペアを形成する、非同質な部分を示す。例えば、ビオチンおよびアビジン(またはストレプトアビジン)は、相補体/抗相補体ペアの典型メンバーである。他の例示的な相補体/抗相補体ペアには、受容体/リガンドペア、抗体/抗原(またはハプテンもしくはエピトープ)ペア、およびセンス/アンチセンスポリヌクレオチドペアなどが含まれる。相補体/抗相補体ペアのその後の分離が望ましい場合、相補体/抗相補体ペアは、好ましくは、 $10^9 \text{M}^{-1}$ 未満の結合親和力を有する。

【0106】

「抗イディオタイプ抗体」は、免疫グロブリンの可変領域ドメインと結合する抗体である。本発明の文脈において、抗イディオタイプ抗体は、抗IL-17RC抗体の可変領域と結合し、したがって、抗イディオタイプ抗体は、IL-17RCのエピトープを模倣している。

【0107】

「抗体断片」は、 $\text{F(ab')}_2$ 、 $\text{F(ab)}_2$ 、 $\text{Fab}'$ 、および $\text{Fab}$ など抗体の一部である。構造に関わらず、抗体断片は、完全な抗体によって認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗IL-17RCモノクローナル抗体断片は、IL-17RCのエピトープと結合する。

【0108】

「抗体断片」という用語はまた、軽鎖可変領域からなるポリペプチド、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、軽鎖可変領域および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結されている組換え単鎖ポリペプチド分子(「scFvタンパク質」)、ならびに超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位など、特定の抗原に結合する合成ポリペプチドまたは遺伝的に操作されたポリペプチドも含む。

【0109】

「キメラ抗体」は、げっ歯動物抗体に由来する可変ドメインおよび相補性決定領域を含むが、抗体分子の残りの部分はヒト抗体に由来する、組換えタンパク質である。

【0110】

「ヒト化抗体」は、モノクローナル抗体のマウスの相補性決定領域が、マウス免疫グロブリンの重鎖可変鎖および軽鎖可変鎖からヒト可変ドメイン中に移入されている、組換えタンパク質である。マウス抗体に由来する、ヒトタンパク質に結合するか、または中和するもののようなヒトにおいて治療的に使用するためのヒト化抗体の構築は、当業者の技能の範囲内である。

【0111】

本明細書において使用される場合、「治療物質」は、抗体部分に結合されて、治療法に有用である結合体を生じる、分子または原子である。治療物質の例には、薬物、毒素、免疫調節物質、キレート剤、ホウ素化合物、光活性物質または光活性色素、および放射性同位体が含まれる。

【0112】

「検出可能な標識」は、抗体部分に結合されて、診断に有用な分子を生じることができる、分子または原子である。検出可能な標識の例には、キレート剤、光活性物質、放射性同位体、蛍光物質、常磁性イオン、または他のマーカー部分が含まれる。

【0113】

「アフィニティータグ」という用語は、本明細書において、第2のポリペプチドに結合されて、第2のポリペプチドの精製もしくは検出を実現するか、または第2のポリペプチドが基質に結合するための部位を提供することができる、ポリペプチドセグメントを示すために使用される。主に、抗体または他の特異的結合物質がそれらに対して利用可能である任意のペプチドまたはタンパク質は、アフィニティータグとして使用され得る。アフィニティータグには、ポリヒスチジン領域、プロテインA(Nilsson et al., EMBO J. 4: 1075(1985)、Nilsson et al., Methods Enzymol. 198: 3(1991))、グルタチオンSトランスフェラーゼ(SmithおよびJohnson, Gene 67: 31(1988))、Glu-Gluアフィニティータグ(Grussen

10

20

30

40

50

meyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952(1985)), サブスタンスP、FLAGペプチド(Hopp et al., Biotechnology(6: 1204(1988)), ストレプトアビジン結合ペプチド、または他の抗原エピトープもしくは結合ドメインが含まれる。一般に、Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95(1991)を参照されたい。アフィニティタグをコードするDNA分子は、商業的な供給業者(例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)から入手可能である。

【0114】

「裸抗体」は、抗体断片と対立するものとして、完全な抗体であり、治療物質と結合していない。裸抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびに、キメラ抗体およびヒト化抗体などある種の組換え抗体が含まれる。

10

【0115】

本明細書において使用される場合、「抗体構成要素」という用語は、完全な抗体および抗体断片の両方を含む。

【0116】

「免疫複合体」は、抗体構成要素と治療物質または検出標識との結合体である。

【0117】

本明細書において使用される場合、「抗体融合タンパク質」という用語は、抗体構成要素およびIL-17RCポリペプチド構成要素を含む組換え分子を意味する。抗体融合タンパク質の例には、IL-17RC細胞外ドメインおよびFcドメインまたは抗原結合領域のいずれかを含有するタンパク質が含まれる。

20

【0118】

「標的ポリペプチド」または「標的ペプチド」は、少なくとも1つのエピトープを含み、かつ、腫瘍細胞または感染病原体抗原を保有する細胞などの標的細胞上で発現される、アミノ酸配列である。T細胞は、標的ポリペプチドまたは標的ペプチドに対して主要組織適合性複合体分子によって提示されるペプチドエピトープを認識し、かつ、典型的には、標的細胞を溶解するか、または標的細胞の部位に他の免疫細胞を動員し、それによって標的細胞を死滅させる。

【0119】

「抗原ペプチド」は、主要組織適合性複合体分子と結合して、T細胞によって認識されるMHC-ペプチド複合体を形成し、それによって、T細胞に提示された際に細胞障害性リンパ球応答を誘導すると考えられるペプチドである。したがって、抗原ペプチドは、適切な主要組織適合性複合体分子に結合し、かつ、細胞溶解または抗原に結合するか、もしくは抗原を発現する標的細胞に対する特異的サイトカイン放出など細胞障害性T細胞応答を誘導することができる。抗原ペプチドは、クラスIまたはクラスII主要組織適合性複合体分子の場合、抗原提示細胞または標的細胞上で結合され得る。

30

【0120】

真核生物において、RNAポリメラーゼIIは、構造遺伝子の転写を触媒して、mRNAを生成させる。RNA転写物が特定のmRNAの配列に相補的である配列を有する核酸分子は、RNAポリメラーゼII鋳型を含むように設計することができる。RNA転写物は、「アンチセンスRNA」と呼ばれ、アンチセンスRNAをコードする核酸分子は、「アンチセンス遺伝子」と呼ばれる。アンチセンスRNA分子は、mRNA分子に結合して、mRNA翻訳を阻害することができる。

40

【0121】

「IL-17RCに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド」または「IL-17RCアンチセンスオリゴヌクレオチド」は、(a)IL-17RC遺伝子の一部分と安定な三重鎖(triplex)を形成することができるか、または(b)IL-17RC遺伝子のmRNA転写物の一部分と安定な二重鎖を形成することができる配列を有するオリゴヌクレオチドである。

【0122】

「リボザイム」は、触媒中心を含む核酸分子である。この用語は、RNA酵素、自己スプライシングRNA、自己切断RNA、およびこれらの触媒機能を果たす核酸分子を含む。リボザイムをコードする核酸分子は、「リボザイム遺伝子」と呼ばれる。

50

## 【0123】

「外部ガイド配列」は、特定の種類の細胞内mRNAに内因性リボザイム、RNase Pを誘導して、RNase PによるmRNAの切断をもたらす核酸分子である。外部ガイド配列をコードする核酸分子は、「外部ガイド配列遺伝子」と呼ばれる。

## 【0124】

「変種IL-17RC遺伝子」という用語は、SEQ ID NO: 2の改変体であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子を意味する。このような変種には、IL-17RC遺伝子の天然の多型、ならびにSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列の保存的アミノ酸置換を含む合成遺伝子が含まれる。IL-17RC遺伝子のその他の変種型は、本明細書において説明するヌクレオチド配列の挿入または欠失を含む核酸分子である。変種IL-17RC遺伝子は、例えば、その遺伝子が、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列を有する核酸分子またはその相補体とストリンジントな条件下でハイブリダイズするかどうかを判定することによって同定することができる。

10

## 【0125】

あるいは、変種IL-17RC遺伝子は、配列比較によって同定することもできる。2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、最大限一致するように整列された際に同じである場合には、2つのアミノ酸配列は「100%のアミノ酸配列同一性」を有する。同様に、2つのヌクレオチド配列のヌクレオチド残基が、最大限一致するように整列された際に同じである場合には、2つのヌクレオチド配列は「100%のヌクレオチド配列同一性」を有する。配列比較は、DNASTAR(Madison, Wisconsin)によって制作されているLASERGENEバイオインフォマティクス演算セットに含まれるもののような標準的ソフトウェアプログラムを用いて実施することができる。最適アライメントを決定することによって2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者に周知である(例えば、PeruskiおよびPeruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research(ASM Press, Inc. 1997)、Wu et al.(編)、「Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins」、Methods in Gene Biotechnology、123~151頁(CRC Press, Inc. 1997)、およびBishop(編)、Guide to Human Genome Computing、第2版(Academic Press, Inc. 1998)を参照されたい)。配列同一性を決定するための具体的な方法は後述する。

20

## 【0126】

変種IL-17RC遺伝子または変種IL-17RCポリペプチドを同定するために使用される個々の方法に関わらず、変種遺伝子または変種遺伝子によってコードされるポリペプチドは、抗IL-17RC抗体に特異的に結合する能力を機能的に特徴付けることができる。変種IL-17RC遺伝子または変種IL-17RCポリペプチドはまた、本明細書において説明する生物学的アッセイ法または生化学的アッセイ法を用いて、そのリガンド、例えば、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合する能力を機能的に特徴付けることができる。

30

## 【0127】

「対立遺伝子変種」という用語は、本明細書において、同じ染色体座位を占める、ある遺伝子の2つまたはそれ以上の代替形態のいずれかを示すために使用される。対立遺伝子変異は、突然変異によって天然に起こり、その結果、集団内の表現型多型をもたらす得る。遺伝子変異はサイレントでよく(コードされるポリペプチドは無変化)、または、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしてよい。対立遺伝子変種という用語はまた、本明細書において、遺伝子の対立遺伝子変種によってコードされるタンパク質を示すのにも使用される。

40

## 【0128】

「オルソログ」という用語は、異なる種に由来するポリペプチドまたはタンパク質の機能的対応物である、1つの種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を示す。オルソログ間の配列差異は、種分化の結果である。

## 【0129】

「パラログ」は、生物によって産生される、独特であるが、構造的に関連したタンパク

50

質である。パラログは、遺伝子重複によって発生すると考えられている。例えば、 $\alpha$ -グロビン、 $\beta$ -グロビン、およびミオグロビンは、互いのパラログである。

【0130】

本発明は、IL-17RC遺伝子の機能的断片を含む。本発明の文脈内で、IL-17RC遺伝子の「機能的断片」は、本明細書において説明するドメインであるか、または少なくとも、抗IL-17RC抗体と特異的に結合するIL-17RCポリペプチドの一部をコードする核酸分子を意味する。

【0131】

標準的な解析方法が不正確なため、ポリマーの分子量および長さは、概算値であると理解される。このような値が「約(about)」Xまたは「約(approximately)」Xとして表現される場合、表示されたXの値は、 $\pm 10\%$ まで正確であると理解される。

10

【0132】

(C) IL-17RAおよびIL-17RCポリヌクレオチドまたは遺伝子の作製

ヒトIL-17RAもしくはIL-17RC遺伝子または本発明の任意の可溶性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをコードする核酸分子は、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 4に基づいたポリヌクレオチドプローブを用いて、ヒトcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。これらの技術は標準的かつ十分に確立されており、商業的供給業者から入手可能なクローニングキットを用いて遂行することができる。例えば、Ausubel et al.(編)、Short Protocols in Molecular Biology、第3版、John Wiley & Sons 1995; Wu et al., Methods in Gene Biotechnology, CRC Press, Inc. 1997; AvivおよびLeder, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 1408(1972); Huynh et al., 「Constructing and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11」、DNA Cloning: A Practical Approach 第1巻、Glover(編)、49頁(IRL Press, 1985); Wu(1997) 47~52頁を参照されたい。

20

【0133】

ヒトIL-17RAまたはIL-17RC遺伝子をコードする核酸分子はまた、IL-17RAまたはIL-17RC遺伝子またはcDNAのヌクレオチド配列に基づいているヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によって得ることもできる。PCRを用いてライブラリーをスクリーニングするための一般的な方法は、例えば、Yu et al., 「Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries」、Methods in Molecular Biology、第15巻: PCR Protocols: Current Methods and Applications、White(編)、Humana Press, Inc., 1993によって提供されている。さらに、PCRを用いて関連遺伝子を単離するための技術は、例えば、Preston, 「Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members」、Methods in Molecular Biology、第15巻: PCR Protocols: Current Methods and Applications、White(編)、Humana Press, Inc. 1993によって説明されている。代替案として、IL-17RAまたはIL-17RC遺伝子は、交互にプライミングする(mutually priming)長いオリゴヌクレオチドおよび本明細書において説明するヌクレオチド配列を用いて核酸分子を合成することによって得ることができる(例えば、Ausubel(1995)を参照されたい)。ポリメラーゼ連鎖反応法を用いる確立された技術により、少なくとも2キロベース長のDNA分子を合成することができる(Adang et al., Plant Molec. Biol. 21: 1131(1993)、Bambot et al., PCR Methods and Applications 2: 266(1993)、Dillon et al., 「Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes」、Methods in Molecular Biology、第15巻: PCR Protocols: Current Methods and Applications、White(編)、263~268頁、(Humana Press, Inc. 1993)、およびHolowachuk et al., PCR Methods Appl. 4: 299(1995))。ポリヌクレオチド合成に関する総説については、例えば、GlickおよびPasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA(ASM Press 1994)、Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53: 323(1984)、およびClimie et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 633(1990)を参照されたい。

30

40

【0134】

50

## (D) IL-17RAまたはIL-17RC遺伝子変種の作製

本発明は、本明細書において開示するIL-17RAまたはIL-17RCポリペプチドをコードする、DNA分子およびRNA分子を含む様々な核酸分子を提供する。当業者は、遺伝コードの縮重を考慮して、かなりの配列変化がこれらのポリヌクレオチド分子の間で可能であることを容易に認識すると考えられる。さらに、本発明はまた、SEQ ID NO：2の受容体ポリペプチドに実質的に相同であるIL-17RCの少なくとも一部分を含む、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体の単離された可溶性受容体ポリペプチドも提供する。したがって、本発明は、SEQ ID NO：1 またはSEQ ID NO：4の縮重ヌクレオチドを含む、IL-17RAまたはIL-17RCポリペプチドをコードする核酸分子およびそれらのRNA等価物を企図する。

## 【 0 1 3 5 】

当業者は、遺伝コードの縮重を考慮して、かなりの配列変化がこれらのポリヌクレオチド分子の間で可能であることを容易に認識すると考えられる。SEQ ID NO：7は、SEQ ID NO：2のIL-17RCポリペプチドをコードする全核酸分子を含む縮重ヌクレオチド配列である。当業者は、TをUで置換することによって、SEQ ID NO：7の縮重配列はSEQ ID NO：2をコードする全RNA配列も提供することを認識すると考えられる。したがって、本発明は、SEQ ID NO：1のヌクレオチド154～2229を含む、IL-17RCポリペプチドをコードする核酸分子およびそれらのRNA等価物を企図する。同様に、TをUで置換することによって、SEQ ID NO：6のIL-17RC-1縮重配列はSEQ ID NO：5をコードする全RNA配列も提供する。

## 【 0 1 3 6 】

表4は、縮重したヌクレオチド位置を示す1文字記号を示す。「変換(Resolution)」は、記号文字によって示されるヌクレオチドである。「相補体」は、相補的ヌクレオチドの記号を示す。例えば、記号YはCまたはTのいずれかを示し、かつ、その相補体RはAまたはGを示し、AはTに相補的であり、GはCに相補的である。

## 【 0 1 3 7 】

(表4)

ヌクレチド	変換	相補体	変換
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

## 【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

所与のアミノ酸に対して存在し得る全コドンを含む縮重コドンを表5に示す。

【 0 1 3 9 】

( 表 5 )

アミノ酸	1文字 記号	コドン	縮重コドン
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
任意	X		NNN

【 0 1 4 0 】

当業者は、あるアミノ酸をコードする存在し得る全コドン表す縮重コドンを決断する際に、いくつかの曖昧性が導入されることを理解すると考えられる。例えば、セリンの縮重コドン(WSN)は、いくつかの状況において、アルギニン(AGR)をコードすることができ、アルギニンの縮重コドン(MGN)は、いくつかの状況において、セリン(AGY)をコードする。同様の関係が、フェニルアラニンおよびロイシンをコードするコドン間で存在する。したがって、縮重配列に含まれるいくつかのポリヌクレオチドは、変種アミノ酸配列をコードし得るが、当業者は、SEQ ID NO : 6のアミノ酸配列を参照することにより、そのような変種配列を容易に同定することができる。変種配列は、本明細書において説明するような機能性に関して容易に試験することができる。

【 0 1 4 1 】

異なる種は、「優先的コドン使用」を示し得る。一般に、Grantham et al., Nucl. Acids Res. 8 : 1893(1980)、Haas et al. Curr. Biol. 6 : 315(1996)、Wain-Hobson et al., Gene 13 : 355(1981)、GrosjeanおよびFiers、Gene 18 : 199(1982)、Holm, Nuc. Acids Res. 14 : 3075(1986)、Ikemura, J. Mol. Biol. 158 : 573(1982)、SharpおよびMatassi, Curr. Opin. Genet. Dev. 4 : 851(1994)、Kane, Curr. Opin. Biotechnol. 6 : 494(1995)、ならびにMakrides, Microbiol. Rev. 60 : 512(1996)を参照されたい。本明細書において使用される場合、「優先的コドン使用」または「優先コドン」という用語は、特定の種の細胞において最も頻繁に使用され、したがって、各アミノ酸をコードする存在し得るコドン(表5を参照されたい)のうち1つまたは少数の代表物を好んで使用する、タンパク質翻訳コドンを意味する技術用語である。例えば、アミノ酸トレオニン(Thr)は、ACA、ACC、ACG、またはACTによってコードされ得るが、哺乳動物細胞においては、ACCが最も一般に使用されるコドンであり、他の種、例えば、昆虫細胞、酵母、ウイルス、または細菌においては、異なるThrコドンが優先され得る。特定の種に対する優先コドンを、当技術分野において公知の様々な方法によって、本発明のポリヌクレオチド中に導入することができる。組換えDNA中への優先コドン配列の導入は、例えば、特定の細胞型または種内のタンパク質翻訳をより効率的にすることによって、タンパク質産生を促進することができる。したがって、本明細書において開示する縮重コドン配列は、当技術分野において一般に使用され、かつ本明細書において開示する様々な細胞型および種におけるポリヌクレオチドの発現を最適化するための鋳型として役立つ。優先コドンを含む配列は、様々な種における発現に関して試験および最適化することができ、かつ、本明細書において開示するような機能性に関して試験することができる。

10

20

#### 【0142】

IL-17RAまたはIL-17RCをコードするcDNAは、完全もしくは不完全なヒトcDNAを用いたプロービングまたは開示する配列に基づいた1つもしくは複数の縮重プローブセットを用いたプロービングのような様々な方法によって単離することができる。また、cDNAは、本明細書において開示する代表的なヒトIL-17RAまたはIL-17RC配列から設計されたプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応法によってクローン化することもできる。さらに、cDNAライブラリーは、宿主細胞を形質転換もしくはトランスフェクトするために使用することができ、かつ、対象となるcDNAの発現は、IL-17RAまたはIL-17RCポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。

30

#### 【0143】

当業者は、SEQ ID NO : 1に開示された配列がヒトIL-17RCの単一の対立遺伝子を表すこと、ならびに対立遺伝子変異および選択的スプライシングが生じると予測されることを認識すると考えられる。この配列の対立遺伝子変種は、標準手順に従って、様々な個体由来するcDNAまたはゲノムライブラリーをプロービングすることによってクローン化することができる。サイレント変異を含むもの、および変異によってアミノ酸配列が変化しているものを含む、本明細書において開示するヌクレオチド配列の対立遺伝子変種は、本明細書において開示するアミノ酸配列の対立遺伝子変種であるタンパク質と同様に、本発明の範囲内である。IL-17RCポリペプチドの特性を保持している、選択的にスプライシングされたmRNAから作製されたcDNA分子は、そのようなcDNAおよびmRNAによってコードされるポリペプチドと同様に、本発明の範囲内に含まれる。これらの配列の対立遺伝子変種およびスプライス変種は、当技術分野において公知の標準手順に従って、様々な個体または組織由来するcDNAまたはゲノムライブラリーをプロービングすることによってクローン化することができる。

40

#### 【0144】

上記の方法を用いて、当業者は、SEQ ID NO : 1もしくはSEQ ID NO : 4のいずれかに実質的に相同である、またはSEQ ID NO : 2もしくはSEQ ID NO : 5の全部または断片をコードするIL-17RC受容体サブユニットの一部分を含む可溶性受容体、またはその対立遺伝子変種をコードし、かつ、野生型IL-17RC受容体のリガンド結合特性を保持している様々なポリペプチドを調製することができる。また、このようなポリペプチドは、本明細書において

50

一般に開示するその他のポリペプチドセグメントも含んでよい。

【0145】

本発明の特定の態様において、単離された核酸分子は、本明細書において開示するヌクレオチド配列を含む核酸分子に、ストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる。例えば、このような核酸分子は、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはSEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 4に相補的なヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはそれらの断片にストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる。

【0146】

一般に、ストリンジントな条件は、所定のイオン強度およびpHにおける個々の配列の熱融点( $T_m$ )より約5℃低くなるように選択される。 $T_m$ は、標的配列の50%が、完全にマッチしたプローブとハイブリダイズする(所定のイオン強度およびpHのものの)温度である。ハイブリダイゼーション後、核酸分子を洗浄して、ストリンジントな条件下または高度にストリンジントな条件下でハイブリダイズしなかった核酸分子を除去することができる。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel et al.(編)、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons, Inc. 1987); BergerおよびKimmel(編)、Guide to Molecular Cloning Techniques(Academic Press, Inc. 1987); ならびにWetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227(1990))を参照されたい。OLIGO 6.0(LSR; Long Lake, MN)およびPrimer Premier 4.0(Premier Biosoft International; Palo Alto, CA)などの配列解析ソフトウェア、ならびにインターネット上のサイトは、所与の配列を解析し、かつ使用者が定義した基準に基づいて $T_m$ を計算するために利用可能な手段である。特定のポリヌクレオチドハイブリッドと共に使用するためにハイブリダイゼーション条件および洗浄条件を適応させることは、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0147】

本発明はまた、SEQ ID NO: 2(IL-17RC)およびSEQ ID NO: 21(IL-17RA)のポリペプチドまたはそれらのオルソログと実質的に同様な配列同一性を有する、単離されたIL-17RAポリペプチドまたはIL-17RCポリペプチドも提供する。「実質的に同様な配列同一性」という用語は、本明細書において、SEQ ID NO: 2に示される配列またはそれらのオルソログに対して、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、例えば、96%、97%、98%、または95%を超える配列同一性を有するポリペプチドを示すために使用される。例えば、変種IL-17RA受容体または変種IL-17RC受容体およびオルソログスなIL-17RA受容体またはIL-17RC受容体は、免疫応答を生じさせ、かつ、ヒトIL-17RAまたはヒトIL-17RCに対して交差反応性の抗体を産生させるのに使用することができる。このような抗体は、ヒト化し、本明細書において説明するように改変することができ、かつ、乾癬、乾癬性関節炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症を治療するために、ならびに本明細書において説明する他の治療的用途において、治療的に使用することができる。

【0148】

本発明はまた、次の2つの基準を用いて同定できる、IL-17RAもしくはIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAの変種核酸分子も企図する:コードされるポリペプチドと、本明細書において説明する任意のアミノ酸配列、例えば、SEQ ID NO: 2(IL-17RC)、SEQ ID NO: 21(IL-17RA)、またはSEQ ID NO: 158およびSEQ ID NO: 183(IL-17RC/IL-17RA)のアミノ酸配列との類似性の判定、ならびにハイブリダイゼーションアッセイ法。このような変種には、(1)ストリンジントな洗浄条件下(洗浄ストリンジエンシーは、0.1% SDSを含む $0.5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^3$  SC、55~65℃に等しい)で、本明細書において説明するヌクレオチド配列、例えば、IL-17RCのSEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 4(もしくはその完全長相補体)またはIL-17RC/IL-17RAのSEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド配列を有する核酸分子とハイブリダイズしたままである核酸分子、ならびに(2)本明細書において説明するアミノ酸配列、例えば、SEQ ID NO: 2およびSEQ ID NO: 158のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%を超える、例え



ば、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。あるいはIL-17RC変種は、(1)高度にストリンジェントな洗浄条件下(洗浄ストリンジェンシーは、0.1% SDSを含む $0.1\times\sim 0.2\times$  SSC、50~65 に等しい)で、本明細書において説明する核酸分子、例えば、SEQ ID NO: 1もしくはSEQ ID NO: 4(もしくはその完全長相補体)またはSEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド配列とハイブリダイズしたままである核酸分子、ならびに(2)本明細書において説明するアミノ酸配列、例えば、SEQ ID NO: 2およびSEQ ID NO: 158のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%を超える、例えば、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれ以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子として特徴付けることもできる。

10

#### 【0149】

本発明は、例えば、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基200~458(IL-17RCのエキソン8~16を含む)、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32~458(IL-17Aのエキソン1~6およびIL-17RCのエキソン8~16を含む)、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~458、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32~690、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~690と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、および少なくとも99.5%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合する、単離されたポリペプチドを提供する。特定の態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~690またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~458を含むポリペプチドではない。いくつかの態様において、ポリペプチドは、(a)機能的に連結された次のエレメント(転写プロモーター、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~690またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~458を含むポリペプチドをコードするDNA配列、および転写ターミネーター)を含む発現ベクターが導入された細胞を培養する段階、ならびに(b)発現されたポリペプチドを回収する段階によって作製されたポリペプチドではない。また、これらのポリペプチドは、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、I型糖尿病、冠動脈疾患、脳卒中、多発性硬化症、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、移植拒絶(例えば、腎臓、肺、および心臓)、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗鬆症、神経炎、ヘルペス性間質性角膜炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、癌血管新生(卵巣癌、子宮頸部癌、および前立腺癌など)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、嚢胞性線維症、再狭窄、および川崎病の治療において、IL-17Aおよび/またはIL-17Fを結合、妨害、低減、拮抗、または中和するために使用することもできる。

20

30

40

#### 【0150】

本発明は、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、コードされるポリペプチドが、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基200~458(IL-17RCのエキソン8~16を含む)、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32~458(IL-17Aのエキソン1~6およびIL-17RCのエキソン8~16を含む)、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~458、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基32~690、またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~690と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%の

50

配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合する、単離された核酸分子を提供する。特定の態様において、コードされるポリペプチドは、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~690またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~458を含むポリペプチドではない。いくつかの態様において、ポリペプチドは、(a)機能的に連結された次のエレメント(転写プロモーター、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~690またはSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基1~458を含むポリペプチドをコードするDNA配列、および転写ターミネーター)を含む発現ベクターが導入された細胞を培養する段階、ならびに(b)発現されたポリペプチドを回収する段階によって作製されたポリペプチドではない。また、これらのポリペプチドは、IL-17Aおよび/またはIL-17Fを結合、妨害、低減、拮抗、または中和するために、ならびに、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、I型糖尿病、冠動脈疾患、脳卒中、多発性硬化症、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、移植拒絶(例えば、腎臓、肺、および心臓)、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗鬆症、神経炎、ヘルペス性間質性角膜炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、癌血管新生(卵巣癌、子宮頸部癌、および前立腺癌など)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、嚢胞性線維症、再狭窄、および川崎病の治療において使用するために、使用することもできる。

10

20

30

40

50

#### 【0151】

本発明はまた、ポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、ハイブリダイゼーション溶液(5×SSC(1×SSCは、0.15M塩化ナトリウムおよび0.015Mクエン酸ナトリウムである)、0.02%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.1%N-ラウロイルサルコシン、1%ブロッキング試薬)中、62℃で1時間のプレハイブリダイゼーションを行い、続いて、室温で5分間、2×SSC、0.1%SDSで2回ストリンジェンシー洗浄し、62℃で15分間、0.5×SSC、0.1%SDSで1回洗浄するハイブリダイゼーション条件下で、SEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド598~1374、SEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド94~1374、SEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド1~1374、SEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド94~2070、またはSEQ ID NO: 157(もしくはその完全長相補体)のヌクレオチド1~2070にハイブリダイズし、コードされるポリペプチドが、IL-17Aおよび/またはIL-17Fを結合、妨害、低減、拮抗、または中和する、単離された核酸分子も提供する。また、コードされるポリペプチドは、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、I型糖尿病、冠動脈疾患、脳卒中、多発性硬化症、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、移植拒絶(例えば、腎臓、肺、および心臓)、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗鬆症、神経炎、ヘルペス性間質性角膜炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、癌血管新生(卵巣癌、子宮頸部癌、および前立腺癌など)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、嚢胞性線維症、再狭窄、および川崎病を治療するために使用することもできる。

。

## 【 0 1 5 2 】

本発明は、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~657、またはSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~658を含む、単離されたポリペプチドを提供する。任意で、ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のような免疫グロブリン部分をさらに含んでよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgM、IgE、またはそれらの誘導体由来してよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(「ADCC」)および/または補体依存性細胞障害(「CDC」)を有する場合がある。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、Fc5、Fc10、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657、およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658でよい。これらのポリペプチドは、任意で、ヒトIL-17RA(例えば、SEQ ID NO: 184およびSEQ ID NO: 185)、ヒトIL-17RC(例えば、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基1~20)、otPAプレプロシグナルペプチド(SEQ ID NO: 178)、ヒト成長ホルモン(SEQ ID NO: 168およびSEQ ID NO: 169)、ならびにヒトCD33(SEQ ID NO: 172およびSEQ ID NO: 173)などの分泌シグナル配列をさらに含んでよい。これらのポリペプチドは、原核細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*))および真核細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞のような哺乳動物細胞、ならびにサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)およびピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などの酵母細胞)などの培養細胞中で組換えによって発現させることができる。

10

## 【 0 1 5 3 】

本発明はまた、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426を含むポリペプチドをコードする、単離された核酸分子も提供する。核酸分子は、例えば、SEQ ID NO: 182のヌクレオチド配列でよい。任意で、コードされるポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のような免疫グロブリン部分をさらに含んでよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgM、IgE、またはそれらの誘導体由来してよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(「ADCC」)および/または補体依存性細胞障害(「CDC」)を有する場合がある。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、Fc5、Fc10、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657、およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658でよい。これらのコードされるポリペプチドは、任意で、ヒトIL-17RA(例えば、SEQ ID NO: 184およびSEQ ID NO: 185)、ヒトIL-17RC(例えば、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基1~20)、otPAプレプロシグナルペプチド(SEQ ID NO: 178)、ヒト成長ホルモン(SEQ ID NO: 168およびSEQ ID NO: 169)、ならびにヒトCD33(SEQ ID NO: 172およびSEQ ID NO: 173)などの分泌シグナル配列をさらに含んでよい。これらのコードされるポリペプチドは、原核細胞(例えば大腸菌)および真核細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞のような哺乳動物細胞、ならびにサッカロミセス・セレビシエおよびピキア・パストリスなどの酵母細胞)などの培養細胞中で組換えによって発現させることができる。

20

30

## 【 0 1 5 4 】

本発明はまた、機能的に連結された次のエレメントを含む発現ベクターも提供する:(a) 転写プロモーター、(b)コードされるポリペプチドがSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426を含む、ポリペプチドをコードするDNAセグメント、および(c)転写ターミネーター。コードされるポリペプチドは、免疫グロブリン部分をさらに含んでよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgM、IgE、またはそれらの誘導体由来してよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(「ADCC」)および/または補体依存性細胞障害(「CDC」)を有する場合がある。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、Fc5、Fc10、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657、およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658でよい。これらのコードされるポリペプチドは、任意で、ヒトIL-17RA(例えば、SEQ ID NO: 184およびSEQ ID NO: 185)、ヒトIL-17RC(例えば、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基1~20)、otPAプレプロシグナルペプチド(SEQ ID NO: 178)、ヒト成長ホルモン(SEQ ID NO: 168およびSEQ ID NO: 169)、ならびにヒトCD33(SEQ ID NO: 172およびSEQ ID NO: 173)などの分泌シグナル配列をさらに含んでよい。これらのコードされるポリペプチドは、原核細胞(例えば大腸菌)および真核細胞(例えば、

40

50

チャイニーズハムスター卵巣細胞のような哺乳動物細胞、ならびにサッカロミセス・セレピシエおよびピキア・パストリスなどの酵母細胞)などの培養細胞中で組換えによって発現させることができる。本発明はまた、本明細書において説明する発現ベクターが導入された細胞を培養する段階であって、その細胞が、DNAセグメントにコードされたポリペプチドを発現する段階、および発現されたポリペプチドを回収する段階を含む、ポリペプチドを作製する方法も提供する。

#### 【0155】

本発明はまた、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426を含むポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物も提供する。任意で、ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のような免疫グロブリン部分をさらに含んでよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgM、IgE、またはそれらの誘導体に由来してよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(「ADCC」)および/または補体依存性細胞障害(「CDC」)を有する場合がある。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、Fc5、Fc10、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657、およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658でよい。

10

#### 【0156】

本発明はまた、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426を含むポリペプチドを対象に投与する段階を含む、疾患に罹患している対象を治療する方法であって、そのポリペプチドが、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合し、IL-17A活性および/またはIL-17F活性を妨害、低減、拮抗、または中和し、かつ、疾患が、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、1型糖尿病、冠動脈疾患、脳卒中、多発性硬化症、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、移植拒絶(例えば、腎臓、肺、および心臓)、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗鬆症、神経炎、ヘルペス性間質性角膜炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、癌血管新生(卵巣癌、子宮頸部癌、および前立腺癌など)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、嚢胞性線維症、再狭窄、および川崎病からなる群より選択される、方法も提供する。任意で、ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のような免疫グロブリン部分をさらに含んでよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgM、IgE、またはそれらの誘導体に由来してよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(「ADCC」)および/または補体依存性細胞障害(「CDC」)を有する場合がある。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、Fc5、Fc10、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657、およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658でよい。

20

30

#### 【0157】

本発明はまた、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426を含むポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を対象に投与する段階を含む、疾患に罹患している対象を治療する方法であって、そのポリペプチドが、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合し、IL-17A活性および/またはIL-17F活性を妨害、低減、拮抗、または中和し、かつ、疾患が、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテ

40

50

マトーデス(SLE)、ループス腎炎、I型糖尿病、冠動脈疾患、脳卒中、多発性硬化症、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、移植拒絶(例えば、腎臓、肺、および心臓)、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗鬆症、神経炎、ヘルペス性間質性角膜炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、癌血管新生(卵巣癌、子宮頸部癌、および前立腺癌など)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、嚢胞性線維症、再狭窄、および川崎病からなる群より選択される、方法も提供する。任意で、ポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のような免疫グロブリン部分をさらに含んでよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgM、IgE、またはそれらの誘導体由来してよい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(「ADCC」)および/または補体依存性細胞障害(「CDC」)を有する場合がある。免疫グロブリン重鎖定常領域は、例えば、Fc5、Fc10、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657、およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658でよい。

10

#### 【0158】

本発明はまた、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~657、および/またはSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~658を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗体断片も提供する。抗体は、ポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体に由来するヒト化抗体、抗体断片、中和抗体、およびヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される抗体でよい。抗体断片は、任意で、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、scFv、および最小認識単位からなる群より選択される断片でよい。本発明はまた、本明細書において説明する抗体または抗体断片に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

20

#### 【0159】

本発明はまた、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基1~426および免疫グロブリン部分を含む融合タンパク質も提供する。免疫グロブリン部分は、任意で、SEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~657およびSEQ ID NO: 183のアミノ酸残基427~658などの免疫グロブリン部分重鎖定常領域でよい。本発明はまた、SEQ ID NO: 182のヌクレオチド1~1971およびSEQ ID NO: 182のヌクレオチド1~1974など、本明細書において説明する融合タンパク質をコードする単離された核酸分子も提供する。本発明はまた、本明細書において説明する融合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む組成物も提供する。これらの組成物は、本明細書において説明する1種または複数種の様々な疾患を治療するために使用され得る。

30

#### 【0160】

配列同一性パーセントは、従来の方法によって決定される。例えば、Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48: 603(1986)、ならびにHenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915(1992)を参照されたい。手短に言えば、ギャップ形成ペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ1、ならびに表6に示す(アミノ酸は、標準的な1文字記号によって示される)HenikoffおよびHenikoff(同書)の「BLOSUM62」スコアリングマトリックスを用いて、アライメントスコアを最適化するように2つのアミノ酸配列を整列させる。次いで、同一性パーセントを([同一マッチの総数]/[より長い配列の長さ+2つの配列を整列させるために、より長い配列中に導入されるギャップ数])(100)として計算する。

40

#### 【0161】

(表6)

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

10

20

30

40

50

# 【0162】

当業者は、2つのアミノ酸配列を整列させるために利用可能な多くの確立されたアルゴリズムがあることを理解する。PearsonおよびLipmanの「FASTA」類似性探索アルゴリズムは、本明細書において開示するアミノ酸配列および推定上のIL-17RC変種のアミノ酸配列によって共有される同一性のレベルを検査するための適切なタンパク質アライメント方法である。FASTAアルゴリズムは、PearsonおよびLipman、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85 : 2444(1988)、ならびにPearson, Meth. Enzymol. 183 : 63(1990)によって記述されている。手短に言えば、FASTAは、最初に、保存的なアミノ酸置換も、挿入も、欠失も考慮せずに、クエリ配列(例えば、SEQ ID NO : 2またはSEQ ID NO : 3)および最も高い同一性(ktup変数が1である場合)または同一性のペア(ktup=2の場合)のいずれかを有する試験配列によって共有される領域を同定することによって、配列類似性を特徴付ける。次いで、アミノ酸置換行列を用いて全ペアのアミノ酸の類似性を比較することによって、同一性の最も高い10個の領域のスコアを再びつけ、かつ、最も高いスコアに寄与する残基のみを含むように、領域の末端を「切って整える」。「カットオフ値」(配列の長さおよびktup値に基づいて予め定められた式によって計算する)より大きなスコアを有するいくつかの領域がある場合には、整えられた最初の領域を検査して、それらの領域が連結してギャップを有する正確に近いアライメントを形成することができるかどうかを判定する。最後に、2つのアミノ酸配列の最もスコアの高い領域を、アミノ酸の挿入および欠失を可能にする、Needleman-Wunsch-Sellersアルゴリズム(NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48 : 444(1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26 : 787(1974))の改良法を用いて整列させる。FASTA解析のための例示的なパラメーターは、ktup=1、ギャップ開始ペナルティ=10、ギャップ伸長ペナルティ=1、および置換行列=BLOSUM62である。これらのパラメーターは、Pearson, Meth. Enzymol. 183 : 63(1990)の補遺2に説明されているように、スコアリングマトリ

ックスファイル(「SMATRIX」)を改良することによって、FASTA プログラムに導入することができる。

【0163】

FASTAはまた、上記に開示する比率を用いて核酸分子の配列同一性を決定するのに使用することができる。ヌクレオチド配列比較の際、ktup値は1~6の間、好ましくは3~6、最も好ましくは3の範囲でよく、他のパラメーターは、前述したように設定される。

【0164】

本発明は、本明細書において開示するアミノ酸配列と比べて保存的アミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする核酸分子を含む。例えば、以下のようなSEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 21の1つまたは複数のアミノ酸置換を含む変種を得ることができる: IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中のアルキルアミノ酸が別のアルキルアミノ酸で置換されているもの、IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中の芳香族アミノ酸が別の芳香族アミノ酸で置換されているもの、IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中の硫黄含有アミノ酸が別の硫黄含有アミノ酸で置換されているもの、IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中のヒドロキシ含有アミノ酸が別のヒドロキシ含有アミノ酸で置換されているもの、IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中の酸性アミノ酸が別の酸性アミノ酸で置換されているもの、IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中の塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸で置換されているもの、または、IL-17RAもしくはIL-17RCのアミノ酸配列中の二塩基性モノカルボキシルアミノ酸が別の二塩基性モノカルボキシルアミノ酸で置換されているもの。一般的なアミノ酸のうちで、例えば、「保存的アミノ酸置換」の例は、以下のグループのそれぞれの内でのアミノ酸間の置換である: (1)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、(2)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(3)セリンおよびトレオニン、(4)アスパルターおよびグルタマート、(5)グルタミンおよびアスパラギン、ならびに(6)リシン、アルギニン、およびヒスチジン。BLOSUM62表は、500グループを超える関連タンパク質の高度に保存された領域を表す、タンパク質配列セグメントの局所的マルチプルアラインメント約2,000個に由来するアミノ酸置換マトリックスである(HenikoffおよびHenikoff、Proc.Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915(1992))。したがって、BLOSUM62置換頻度は、本発明のアミノ酸配列中に導入され得る保存的アミノ酸置換を定めるのに使用することができる。(前述の)化学的特性にのみ基づいてアミノ酸置換を設計することは可能であるが、「保存的アミノ酸置換」という用語は、好ましくは、-1より大きいBLOSUM62値によって示される置換を意味する。例えば、置換が、0、1、2、または3のBLOSUM62値を特徴とする場合、そのアミノ酸置換は保存的である。このシステムによれば、好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも1(例えば1、2、または3)のBLOSUM62値を特徴とし、より好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも2(例えば2または3)のBLOSUM62値を特徴とする。IL-17RCの特定の変種は、対応するアミノ酸配列(例えば、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 21)に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%を超える、例えば、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれ以上の配列同一性を有することを特徴とし、アミノ酸配列中の変異は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換に起因する。

【0165】

IL-17RAまたはIL-17RC遺伝子中の保存的アミノ酸変化は、例えば、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 4中で挙げられるヌクレオチドを別のヌクレオチドで置換することによって導入することができる。このような「保存的アミノ酸」変種は、オリゴヌクレオチド指定変異誘発、リンカースキニング変異誘発、およびポリメラーゼ連鎖反応法を用いた変異誘発などによって得ることができる(Ausubel(1995);およびMcPherson(編)、Directed Mutagenesis: A Practical Approach(IRL Press 1991))を参照されたい。変種IL-17RCポリペプチドは、抗IL-17RC抗体に特異的に結合する能力によって同定することができる。

【0166】

本発明のタンパク質はまた、非天然のアミノ酸残基を含み得る。非天然のアミノ酸には、trans-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、cis-4-ヒドロキシプロリン、trans-4-

ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、allo-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-および4-メチルプロリン、3,3-ジメチルプロリン、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、および4-フルオロフェニルアラニンが含まれるが、それに限定されるわけではない。タンパク質中に非天然のアミノ酸残基を組み入れるためのいくつかの方法が、当技術分野において公知である。例えば、化学的にアミノアシル化させたサプレッサー-tRNAを用いてナンセンスな変異が抑制される、インビトロ系が使用され得る。アミノ酸の合成およびtRNAのアミノアシル化のための方法は、当技術分野において公知である。ナンセンス変異を含むプラスミドの転写および翻訳は、典型的には、大腸菌(*E. coli*) S30抽出物ならびに市販の酵素および他の試薬を含む、無細胞系において実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーによって精製される。例えば、Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722(1991)、Ellman et al., *Methods Enzymol.* 202:301(1991)、Chung et al., *Science* 259:806(1993)、およびChung et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10145(1993)を参照されたい。

10

#### 【0167】

第2の方法において、翻訳は、変異させたmRNAおよび化学的にアミノアシル化させたサプレッサー-tRNAのマイクロインジェクションによって、アフリカツメガエル(*Xenopus*)卵母細胞中で実施される(Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* 271:19991(1996))。第3の方法では、大腸菌細胞が、置換されるべき天然アミノ酸(例えばフェニルアラニン)の不在下、かつ所望の非天然アミノ酸(例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、または4-フルオロフェニルアラニン)の存在下で培養される。非天然アミノ酸は、その天然の対応物の代わりにタンパク質中に組み入れられる。Kohide et al., *Biochem.* 33:7470(1994)を参照されたい。天然のアミノ酸残基は、インビトロの化学的改変によって非天然の種類に変換することができる。化学的改変を部位特異的変異誘発と組み合わせて、置換の範囲をさらに拡大することができる(WynnおよびRichards, *Protein Sci.* 2:395(1993))。

20

#### 【0168】

IL-17RAまたはIL-17RCアミノ酸残基は、限定的な数の非保守的アミノ酸、遺伝コードによってコードされていないアミノ酸、非天然アミノ酸、および非自然アミノ酸で置換されてよい。

30

#### 【0169】

本発明のポリペプチド中の必須アミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発など当技術分野において公知の手順に従って同定することができる(CunninghamおよびWells, *Science* 244:1081(1989)、Bass et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:4498(1991)、CoombsおよびCorey、「Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering」、*Proteins: Analysis and Design*, Angeletti(編)、259~311頁(Academic Press, Inc. 1998))。後者の技術では、分子中のすべての残基に単一のアラニン変異が導入され、かつ、分子の活性に不可欠であるアミノ酸残基を同定するために、結果として生じる変異体分子の生物活性が試験される。Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271:4699(1996)も参照されたい。

40

#### 【0170】

配列解析を用いて、IL-17RAまたはIL-17RCのリガンド結合領域をさらに定めることができるが、IL-17RAまたはIL-17RCの結合活性(IL-17AもしくはIL-17FのいずれかへのIL-17RCの結合およびIL-17AへのIL-17RAの結合など)において役割を果たしているアミノ酸は、推定上の接触部位アミノ酸の変異と組み合わせて、核磁気共鳴、結晶構造解析、電子回折、または光親和性標識などの技術によって決定されるように、構造の物理的解析によって決定することもできる。例えば、de Vos et al., *Science* 255:306(1992)、Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899(1992)、およびWlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59(1992)を参照されたい。具体的には、以下の3つのドメインが同定された：

50



(1)ドメイン1(SEQ ID NO: 159およびSEQ ID NO: 160)は、IL-17RCのエキソン8~10を含む。これは、IL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のアミノ酸残基193~276およびIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のアミノ酸残基208~291に対応する。

(2)ドメイン2(SEQ ID NO: 161およびSEQ ID NO: 162)は、IL-17RCのエキソン11~13を含む。これは、IL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のアミノ酸残基277~370およびIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のアミノ酸残基292~385に対応する。

(3)ドメイン3(SEQ ID NO: 163およびSEQ ID NO: 164)は、IL-17RCのエキソン14~16を含む。これは、IL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)のアミノ酸残基371~447およびIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)のアミノ酸残基386~462に対応する。

#### 【0171】

Reidhaar-OlsonおよびSauer(Science 241:53(1988))またはBowieおよびSauer(Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:2152(1989))によって開示されたもののような変異誘発およびスクリーニングの公知の方法を用いて、複数のアミノ酸置換を行い、かつ試験することができる。手短に言えば、これらの著者は、ポリペプチド中の2つまたはそれ以上の位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドを選択し、次いで、変異誘発されたポリペプチドの配列決定をして、各位置で許容できる置換の範囲を決定するための方法を開示している。使用され得る他の方法には、ファージディスプレイ(例えば、Lowman et al., Biochem. 30:10832(1991)、Ladner et al., 米国特許第5,223,409号、Huse、国際公開WO 92/06204、および領域指定変異誘発(Derbyshire et al., Gene 46:145(1986)、およびNer et al., DNA 7:127,(1988))が含まれる。さらに、ビオチンまたはFITCで標識されたIL-17RCまたはIL-17RAは、IL-17RCリガンドの発現クローニングのために使用され得る。

#### 【0172】

開示するIL-17RCまたはIL-17RAヌクレオチドおよびポリペプチド配列の変種はまた、Stemmer, Nature 370:389(1994)、Stemmer, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:10747(1994)および国際公開WO97/20078によって開示されるようなDNAシャッフリングによって作製することもできる。手短に言えば、ランダムに導入された点突然変異をもたらす、親DNAのランダム断片化とそれに続くPCRを用いた再構築によるインビトロの相同組換えによって、変種DNA分子が作製される。この技術は、対立遺伝子変種または異なる種に由来するDNA分子などの親DNA分子ファミリーを用いて、付加的な変異性をプロセスに導入することによって、改良することができる。続いて変異誘発およびアッセイ法をさらに繰り返す、所望の活性の選択またはスクリーニングは、同時に不利益な変化を避けて選択しつつ望ましい変異を選択することによって、配列の迅速な「進化」を提供する。

#### 【0173】

本明細書において開示する変異誘発方法は、宿主細胞中のクローン化され変異誘発されたポリペプチドの活性を検出するためのハイスループットな自動スクリーニング方法と組み合わせることができる。生物学的に活性なポリペプチドまたは抗IL-17RCまたは抗IL-17RA抗体と結合するポリペプチドをコードする変異誘発されたDNA分子は、宿主細胞から回収し、かつ、最新の機器を用いて迅速に配列決定することができる。これらの方法により、関心対象のポリペプチド中の個々のアミノ酸残基の重要性を迅速に決定することが可能になり、かつ、これらの方法は、構造の不明なポリペプチドに適用することもできる。

#### 【0174】

本発明はまた、IL-17RCポリペプチドまたはIL-17RAポリペプチドの「機能的断片」およびそのような機能的断片をコードする核酸分子も含む。これらの機能的断片は、1つまたは複数のリガンド(すなわち、IL-17AおよびIL-17Fの両方)に、個々にまたは一緒に結合し得る。核酸分子のルーチンな欠失解析を実施して、IL-17RCポリペプチドまたはIL-17RAポリペプチドをコードする核酸分子の機能的断片を得ることができる。例として、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列を有するDNA分子をBal31ヌクレアーゼで消化して、一連の入れ子(nested)欠失を得ることができる。次いで、これらの断片を発現ベクターの適切なリーディングフレーム中に導入し、かつ、発現されたポリペプチドを単離し、抗IL-17RC抗体に結合する能力について試験する。エキソヌクレアーゼ消化の1つの代替

10

20

30

40

50

方法は、オリゴヌクレオチド指定変異誘発を用いて、所望の断片の産生を指定する欠失または停止コドンを導入することである。あるいは、IL-17RC遺伝子またはIL-17RA遺伝子の特定の断片は、ポリメラーゼ連鎖反応法を用いて合成することができる。

【0175】

この一般的アプローチは、HorisbergerおよびDi Marco、Pharmac. Ther. 66:507(1995)によって要約されている、インターフェロンの一方または両方の末端での切断に関する研究によって例示されている。さらに、タンパク質の機能解析のための標準技術は、例えば、Treuter et al., Molec. Gen. Genet. 240:113(1993);Content et al., 「Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon」、Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell(編)、65~72頁(Nijhoff 1987);Herschman, 「The EGF Receptor」、Control of Animal Cell Proliferation、第1巻、Boynton et al.(編)、169~199頁(Academic Press 1985);Coumilleau et al., J. Biol. Chem. 270:29270(1995); Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 270:25291(1995); Yamaguchi et al., Biochem. Pharmacol. 50:1295(1995)、およびMeisel et al., Plant Molec. Biol. 30:1(1996)において説明されている。

【0176】

本発明はまた、本明細書において開示するアミノ酸配列と比べてアミノ酸が変化しているIL-17RC遺伝子またはIL-17RA遺伝子の機能的断片も企図する。変種IL-17RC遺伝子または変種IL-17RA遺伝子は、上述したように、開示されるヌクレオチド配列およびアミノ酸配列との同一性レベルを決定することにより、構造に基づいて同定することができる。構造に基づいて変種遺伝子を同定することへの代替のアプローチは、潜在的な変種IL-17RC遺伝子または変種IL-17RA遺伝子をコードする核酸分子が、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 4などのヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズすることができるかどうかを判定することである。

【0177】

本発明はまた、IL-17RCポリペプチドまたはIL-17RAポリペプチドの機能的断片、IL-17RCポリペプチドおよび/またはIL-17RAポリペプチドの抗原性エピトープ、エピトープを有する部分、またはリガンド結合部分、ならびに、IL-17RCポリペプチドおよび/またはIL-17RAポリペプチドのそのような機能的断片、抗原性エピトープ、エピトープを有する部分、またはリガンド結合部分をコードする核酸分子を使用することを含む。このような断片は、IL-17AもしくはIL-17F、またはIL-17AおよびIL-17Fの両方に結合し、活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する可溶性受容体または結合分子を作製するために使用するためのポリペプチドを作製するのに使用される。本明細書において定義される「機能的」IL-17RCポリペプチドもしくはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドまたはその断片は、IL-17Aおよび/もしくはIL-17Fの炎症活性、増殖活性、もしくは分化活性を妨害、阻害、低減、拮抗、もしくは中和する能力、特殊な細胞機能を誘導もしくは阻害する能力、またはIL-17Aおよび/もしくはIL-17Fに特異的に結合する能力を特徴とする。本明細書において前述したように、IL-17RAおよびIL-17RCの両方とも、本明細書において説明する独特なサイトカイン受容体構造およびドメインを特徴とする。したがって、本発明はさらに、(a)前述の1つまたは複数のドメインを含むポリペプチド分子、および(b)1つまたは複数のこれらのドメインを含む機能的断片を含む融合タンパク質を使用することも企図する。融合タンパク質の他のポリペプチド部分は、IL-17様受容体、IL-17RA、IL-17RE、IL-17RDなど別のサイトカイン受容体によって、または、融合タンパク質の分泌を促進する、非天然および/もしくは無関係な分泌シグナルペプチドによって与えられてよい。

【0178】

本発明はまた、本明細書において説明するIL-17RCポリペプチドまたはIL-17RAポリペプチドのリガンド結合部分を含む、ポリペプチド断片またはペプチドも提供する。このような断片またはペプチドは、各自のリガンド(IL-17Aおよび/またはIL-17F)に結合するIL-17RCまたはIL-17RAいずれかの一部を含んでよい。

## 【0179】

変種および融合タンパク質を含む、任意のIL-17RCポリペプチドまたはIL-17RAポリペプチドに関して、当業者は、上記の表1および表2において示した情報を用いて、その変種をコードする十分に縮重したポリヌクレオチド配列を容易に作製することができる。さらに、当業者は、標準的なソフトウェアを用いて、本明細書において説明するヌクレオチド配列およびアミノ酸配列に基づき、IL-17RC変種またはIL-17RA変種を考案することもできる。

## 【0180】

(E) IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAポリペプチドの作製

完全長ポリペプチド;可溶性単量体受容体、ホモ二量体受容体、ヘテロ二量体受容体、および多量体受容体;完全長受容体;受容体断片(例えば、リガンド結合断片および抗原エピトープ)、機能的断片、ならびに融合タンパク質を含む、本発明のポリペプチドは、従来の技術に従って、組換え宿主細胞中で作製することができる。IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA遺伝子を発現させるには、ポリペプチドをコードする核酸分子は、発現ベクターにおいて転写発現を制御する調節配列に機能的に連結されており、次いで、宿主細胞中に導入されなければならない。プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列に加えて、発現ベクターは、翻訳調節配列および発現ベクターを有する細胞の選択に適しているマーカー遺伝子を含んでよい。

## 【0181】

真核細胞における外来タンパク質の作製に適している発現ベクターは、典型的には、(1)細菌宿主における発現ベクターの増殖および選択を提供するための細菌の複製起点および抗生物質耐性マーカーをコードする原核生物DNAエレメント、(2)プロモーターのような、転写開始を制御する真核生物DNAエレメント、ならびに(3)転写終結/ポリアデニル化配列のような転写物のプロセッシングを制御するDNAエレメントを含む。上述したように、発現ベクターはまた、宿主細胞の分泌経路中に異種ポリペプチドを誘導する分泌配列をコードするヌクレオチド配列も含んでよい。例えば、IL-17RC発現ベクターは、IL-17RC遺伝子および任意の分泌遺伝子に由来する分泌配列を含んでよい。

## 【0182】

本発明のIL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAタンパク質は、哺乳動物細胞において発現され得る。適切な哺乳動物宿主細胞の例には、アフリカミドリザル腎臓細胞(Ver o; ATCC CRL1587)、ヒト胚性腎臓細胞(293-HEK; ATCC CRL 1573)、仔ハムスター腎臓細胞(BHK-21、BHK-570; ATCC CRL8544、ATCC CRL10314)、イヌ腎臓細胞(MDCK; ATCC CCL34)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44(Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555, 1986))、ラット脳下垂体細胞(GH1; ATCC CCL82)、HeLa S3細胞(ATCC CCL2.2)、ラット肝癌細胞(H-4-II-E; ATCC CRL 1548)、SV40形質転換サル腎臓細胞(COS-1; ATCC CRL1650)、およびマウス胚性細胞(NIH-3T3; ATCC CRL1658)が含まれる。

## 【0183】

哺乳動物宿主の場合、転写調節シグナルおよび翻訳調節シグナルは、哺乳動物ウイルス源、例えば、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、またはサルウイルスなどに由来してよく、その際、調節シグナルは、高レベルに発現される特定の遺伝子と結合している。適切な転写調節配列および翻訳調節配列はまた、哺乳動物遺伝子、例えば、アクチン、コラーゲン、ミオシン、およびメタロチオネインの遺伝子から得ることもできる。

## 【0184】

転写調節配列は、RNA合成の開始を指示するのに十分なプロモーター領域を含む。適切な真核生物プロモーターには、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター(Hamer et al., J. Molec. Appl. Genet. 1: 273(1982))、ヘルペスウイルスのTKプロモーター(McKnight, Cell 31: 355(1982))、SV40 初期プロモーター(Benoist et al., Nature 290: 304(1981))、ラウス肉腫ウイルスプロモーター(Gorman et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U S A 79: 6777(1982))、サイトメガロウイルスプロモーター(Foecking et al., Gene 45: 1

10

20

30

40

50

01(1980))、およびマウス乳癌ウイルスプロモーター(一般に、Etcheverry、「Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture」、Protein Engineering: Principles and Practice、Cleland et al.(編)、163~181頁(John Wiley & Sons, Inc. 1996))が含まれる。

【0185】

あるいは、バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターのような原核生物プロモーターが、その原核生物プロモーターが真核生物プロモーターによって調節される場合には、哺乳動物細胞における遺伝子発現を制御するのに使用され得る(Zhou et al., Mol. Cell. Biol. 10: 4529(1990)およびKaufman et al., Nucl. Acids Res. 19: 4485(1991))。

10

【0186】

特定の態様において、IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA可溶性受容体ポリペプチド、またはIL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAポリペプチドの断片をコードするDNA配列は、発現ベクター内で、一般に転写プロモーターおよびターミネーターを含む、その発現のために必要とされる他の遺伝子エレメントに機能的に連結されている。ベクターはまた、普通、1つまたは複数の選択マーカーおよび1つまたは複数の複製起点も含むと考えられるが、当業者は、特定の系では、選択マーカーが別のベクター上で提供されてよく、かつ、外来性DNAの複製が、宿主細胞ゲノム中への組み込みによって提供され得ることを認識すると考えられる。プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクター、および他のエレメントの選択は、当業者のレベルの範囲内のルーチンな設計の事柄である。多くのこのようなエレメントは文献に記載されており、かつ商業的な供給業者を通して入手可能である。可溶性受容体複合体の複数の構成要素は、個別の発現ベクター上で同時トランスフェクトされてよく、または、単一の発現ベクター中に含まれてもよい。タンパク質複合体の複数の構成要素を発現させるこのような技術は、当技術分野において周知である。

20

【0187】

発現ベクターは、リン酸カルシウムトランスフェクション、リボソームを介したトランスフェクション、マイクロプロジェクトイルによる送達、およびエレクトロポレーションなどを含む様々な標準技術を用いて、宿主細胞中に導入することができる。トランスフェクトされた細胞を選択し、かつ増殖させて、宿主細胞ゲノム中に安定に組み込まれた発現ベクターを含む組換え宿主細胞を提供することができる。真核細胞中にベクターを導入するための技術、および優性の選択マーカーを用いてそのような安定な形質転換体を選択するための技術は、例えば、Ausubel(1995)によって、およびMurray(編)、Gene Transfer and Expression Protocols(Humana Press 1991)によって記述されている。

30

【0188】

例えば、1つの適切な選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性を提供する遺伝子である。この場合、選択は、G-418などのようなネオマイシン型薬物の存在下で実施される。選択系はまた、対象となる遺伝子の発現レベルを増大させる、「増幅」と呼ばれるプロセスのためにも使用され得る。増幅は、低レベルの選択物質の存在下でトランスフェクタントを培養し、次いで、導入された遺伝子の産生物を高レベルで産生する細胞を選択するために、選択物質の量を増加させることによって実施される。適切な増幅可能な選択マーカーは、メトトレキサートに対する耐性を与えるジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHF R)である。他の薬物耐性遺伝子(例えば、ヒグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ)もまた、使用され得る。あるいは、緑色蛍光タンパク質のような表現型変更を導入するマーカー、またはCD4、CD8、クラスI MHC、胎盤アルカリホスファターゼなどの細胞表面タンパク質が、FACS選別または磁性ビーズ分離技術などの手段によって、非トランスフェクト細胞からトランスフェクトされた細胞を選別するのに使用され得る。

40

【0189】

本発明のポリペプチドはまた、ウイルス送達系を用いて培養された哺乳動物細胞によっ

50

て産生され得る。この目的のための例示的なウイルスには、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ随伴ウイルス(AAV)が含まれる。アデノウイルスは二本鎖DNAウイルスであり、現在、異種核酸を送達するための最も良く研究された遺伝子トランスファーベクターである(総説については、Becker et al., Meth. Cell Biol. 43: 161(1994)、ならびにDouglasおよびCuriel、Science & Medicine 4: 44(1997)を参照されたい)。アデノウイルス系の利点には、比較的大きなDNA挿入物の収容力、高力価になるまで増殖する能力、広範囲の哺乳動物細胞型に感染する能力、および、様々なプロモーターを含む多数の入手可能なベクターと共に使用することを可能にする柔軟性が含まれる。

#### 【0190】

アデノウイルスゲノムを部分的に除去することによって、異種DNAのより大きな挿入物(最大7kb)が収容され得る。これらの挿入物は、直接的ライゲーションによって、または、同時トランスフェクトされるプラスミドを用いた相同組換えによってウイルスDNA中に組み入れることができる。1つの選択肢は、ウイルスベクターから不可欠なE1遺伝子を除去することであり、これにより、E1遺伝子が宿主細胞によって提供されない場合には、複製することができなくなる。例えば、アデノウイルスベクターに感染されたヒト293細胞(ATCC番号CRL-1573、45504、45505)は、接着細胞として、または懸濁培養において比較的高い細胞密度で増殖して、かなりの量のタンパク質を産生することができる(Garnier et al., Cytotechnol. 15: 145(1994)を参照されたい)。

#### 【0191】

本発明のポリペプチドはまた、鳥類細胞、真菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または植物細胞など他の高等真核細胞においても発現され得る。バキュロウイルス系は、クローン化された遺伝子を昆虫細胞中に導入するための効率的な手段を提供する。適切な発現ベクターは、オートグラファカリフォルニカ(*Autographa californica*)多核多角体病ウイルス(AcMNPV)に基づいており、かつ、ショウジョウバエ(*Drosophila*)熱ショックタンパク質(hsp)70プロモーター、オートグラファカリフォルニカ核多角体病ウイルス最初期遺伝子プロモーター(ie-1)および後初期39Kプロモーター、バキュロウイルスp10プロモーター、ならびにショウジョウバエメタロチオネインプロモーターなど周知のプロモーターを含む。組換えバキュロウイルスを作製する第2の方法は、Luckow(Luckow, et al., J. Virol. 67: 4566(1993))によって記述されているトランスポゾンに基づいた系を使用する。トランスファーベクターを使用するこの系は、BAC-to-BACキット(Life Technologies, Rockville, MD)において販売されている。この系は、Tn7トランスポゾンを含むトランスファーベクター-PFASTBAC(Life Technologies)を用いて、ポリペプチドをコードするDNAを、「バクミド」と呼ばれる大型プラスミドとして大腸菌中に保持されているバキュロウイルスゲノム中に移動させる。Hill-PerkinsおよびPossee、J. Gen. Virol. 71: 971(1990)、Bonning, et al., J. Gen. Virol. 75: 1551(1994)、ならびにChazenbalkおよびRapoport、J. Biol. Chem. 270: 1543(1995)を参照されたい。さらに、トランスファーベクターは、発現されるポリペプチドのC末端またはN末端のエピトープタグ、例えばGlu-GluエピトープタグをコードするDNAとのインフレームの融合物を含んでよい(Grussenmeyer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 82: 7952(1985))。当技術分野において公知の技術を用いて、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を含むトランスファーベクターが大腸菌中に形質転換され、かつ、組換えバキュロウイルスを示す分断されたlacZ遺伝子を含むバクミドに関してスクリーニングされる。次いで、一般的な技術を用いて、組換えバキュロウイルスゲノムを含むバクミドDNAが単離される。

#### 【0192】

例示的なPFASTBACベクターは、かなりの程度まで改変されてよい。例えば、ポリヘドリンプロモーターは除去され、かつ、バキュロウイルス感染時により早期に発現されるバキュロウイルス塩基性タンパク質プロモーター(Pcor、p6.9、またはMPプロモーターとしても公知)で置換されてよく、分泌タンパク質を発現させるのに有利であることが示されている(例えば、Hill-PerkinsおよびPossee、J. Gen. Virol. 71: 971(1990)、Bonning, et

10

20

30

40

50

al., J. Gen. Virol. 75: 1551(1994)、ならびにChazenbalkおよびRapoport、J. Biol. Chem. 270: 1543(1995)を参照されたい)。このようなトランスファーベクター構築物において、塩基性タンパク質プロモーターの短い種類または長い種類が使用され得る。さらに、昆虫タンパク質に由来する分泌シグナル配列でネイティブな分泌シグナル配列を置換するトランスファーベクターが構築され得る。例えば、エクジステロイドグルコシルトランスフェラーゼ(EGT)、ミツバチメリチン(Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA)、またはバキュロウイルスgp67(PharMingen: San Diego, CA)に由来する分泌シグナル配列が、ネイティブなIL-17RC分泌シグナル配列を置換するために構築物中で使用され得る。

#### 【0193】

組換えウイルスまたはバクミドは、宿主細胞をトランスフェクトするために使用される。適切な昆虫宿主細胞には、IPLB-Sf-21由来の細胞株、Sf9(ATCC CRL 1711)、Sf21AE、およびSf21(Invitrogen Corporation; San Diego, CA)などのスポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*) 蛹卵巣細胞株、ならびにショウジョウバエシュナイダー-2細胞、およびイラクサギンウワバ(*Trichoplusia ni*) (米国特許第5,300,435号)に由来するHIGH FIVEO細胞株(Invitrogen)が含まれる。市販されている無血清培地が、細胞を増殖させ、かつ維持するために使用され得る。適切な培地は、Sf9細胞に対しては、Sf900 II(商標)(Life Technologies) または ESF 921(商標)(Expression Systems)であり、イラクサギンウワバ(*T. ni*)細胞に対してはEx-cell10405(商標)(JRH Biosciences, Lenexa, KS)またはExpress FiveO(商標)(Life Technologies)である。組換えウイルスが使用される場合、細胞は、典型的には、約 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞の接種密度から $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の密度まで増殖させられ、この時、組換えウイルスストックが0.1~10、より典型的には約3の感染多重度(MOI)で添加される。

#### 【0194】

バキュロウイルス系において組換えタンパク質を作製するための確立された技術は、Bailey et al., 「Manipulation of Baculovirus Vectors」、Methods in Molecular Biology、第7巻: Gene Transfer and Expression Protocols、Murray(編)、147~168頁(The Humana Press, Inc. 1991)によって、Patel et al., 「The baculovirus expression system」、DNA Cloning 2: Expression Systems、第2版、Glover et al.(編)、205~244頁(Oxford University Press 1995)によって、Ausubel(1995)、16-37~16-57頁によって、Richardson(編)、Baculovirus Expression Protocols(The Humana Press, Inc. 1995)によって、およびLucknow, 「Insect Cell Expression Technology」、Protein Engineering: Principles and Practice、Cleland et al.(編)、183~218頁(John Wiley & Sons, Inc. 1996)によって提供される。

#### 【0195】

酵母細胞を含む真菌細胞もまた、本明細書において説明する遺伝子を発現させるために使用され得る。この点に関して特に対象となる酵母種には、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、およびピキア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)が含まれる。酵母における発現に適したプロモーターには、GAL1(ガラクトース)、PGK(ホスホグリセリン酸キナーゼ)、ADH(アルコールデヒドロゲナーゼ)、AOX1(アルコールオキシダーゼ)、およびHIS4(ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ)などに由来するプロモーターが含まれる。多くの酵母クローニングベクターが設計されており、容易に入手可能である。これらのベクターには、YIp5のようなYIpベースのベクター、YRp17のようなYRpベクター、YEp13のようなYEpベクター、およびYCp19のようなYCpベクターが含まれる。外来性DNAを用いてS.セレビシエ(*S. cerevisiae*)細胞を形質転換し、かつ、それらから組換えポリペプチドを産生させるための方法は、例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号、Kawasaki et al., 米国特許第4,931,373号、Brake、米国特許第4,870,008号、Welch et al., 米国特許第5,037,743号、およびMurray et al., 米国特許第4,845,075号によって開示されている。形質転換細胞は、選択マーカー、一般に、薬物耐性または特定の栄養物(例えばロイシン)の不在下で増殖する能力によって決定される表現型に基づいて選択される。サッカロミセス・セレビシエにおいて使用するのに適した

ベクター系は、グルコースを含む培地における増殖に基づいて形質転換細胞を選択することを可能にする、Kawasaki et al. (米国特許第4,931,373号)によって開示されているPOT1ベクター系である。酵母において使用するためのその他の適切なプロモーターおよびターミネーターには、解糖系酵素遺伝子(例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号、Kingsman et al.、米国特許第4,615,974号、およびBitter、米国特許第4,977,092号を参照されたい)およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子に由来するものが含まれる。また、米国特許第4,990,446号、同第5,063,154号、同第5,139,936号、および同第4,661,454号も参照されたい。

#### 【0196】

ハンセンラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)、シゾサッカロミセス・ボンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クルイベロマイセス・ラクティス(Kluyveromyces lactis)、クルイベロマイセス・フラギリス(Kluyveromyces fragilis)、トウモロコシ黒穂菌(Ustilago maydis)、ピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・グイリエルモンジイ(Pichia guilliermondii)、およびカンジダ・マルトース(Candida maltosa)を含む、他の酵母用の形質転換系が当技術分野において公知である。例えば、Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459(1986)およびCregg、米国特許第4,882,279号を参照されたい。アスペルギルス属(Aspergillus)細胞は、McKnight et al.、米国特許第4,935,349号の方法に従って使用され得る。アクレモニウム・クリソゲナム(Acremonium chrysogenum)を形質転換させるための方法は、Sumino et al.、米国特許第5,162,228号によって開示されている。アカパンカビ属(Neurospora)を形質転換させるための方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号によって開示されている。

#### 【0197】

例えば、組換えタンパク質の作製用の宿主としてのピキア・メタノリカの使用は、Raymond、米国特許第5,716,808号、Raymond、米国特許第5,736,383号、Raymond et al., Yeast 14:11-23(1998)、ならびに国際公開WO 97/17450、WO 97/17451、WO 98/02536、およびWO 98/02565において開示されている。P.メタノリカを形質転換する際に使用するためのDNA分子は、一般に、二本鎖の環状プラスミドとして調製され、好ましくは、形質転換の前に直鎖状にされる。P.メタノリカにおけるポリペプチド作製の場合、プラスミド中のプロモーターおよびターミネーターは、P.メタノリカアルコール使用遺伝子(AUG1またはAUG2)のようなP.メタノリカ遺伝子のものでよい。他の有用なプロモーターには、ジヒドロキシアセトン合成酵素(DHAS)遺伝子、ギ酸デヒドロゲナーゼ(FMD)遺伝子、およびカタラーゼ(CAT)遺伝子のもが含まれる。宿主染色体中へのDNAの組込みを容易にするには、プラスミドの発現セグメント全体の両末端が宿主DNA配列に隣接していることが好ましい。ピキア・メタノリカにおいて使用するのに適した選択マーカーは、P.メタノリカADE2遺伝子であり、これは、ホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ(AIRC; EC 4.1.1.21)をコードし、かつ、ade2宿主細胞がアデニンの不在下で増殖することを可能にする。メタノールの使用を最小限に抑えることが望ましい大規模な工業プロセスの場合、両方のメタノール使用遺伝子(AUG1およびAUG2)が欠失している宿主細胞が使用され得る。分泌タンパク質を作製する場合、宿主細胞は、液胞プロテアーゼ遺伝子(PEP4およびPRB1)が欠損してよい。エレクトロポレーションは、P.メタノリカ細胞中への関心対象のポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドの導入を容易にするために使用される。P.メタノリカ細胞は、2.5kV/cm~4.5kV/cm、好ましくは約3.75kV/cmの電界強度を有する指数的に減衰するパルス電界、および1ミリ秒~40ミリ秒、最も好ましくは約20ミリ秒の時定数( $\tau$ )を用いるエレクトロポレーションによって、形質転換され得る。

#### 【0198】

発現ベクターはまた、植物プロトプラスト、完全な植物組織、または単離された植物細胞中にも導入され得る。植物組織中に発現ベクターを導入するための方法には、アグロバクテリウム・チュメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)による植物組織の直接的な感染または共培養、マイクロプロジェクトイルによる送達、DNA注入、およびエレクトロポレーションなどが含まれる。例えば、Horsch et al., Science 227:1229(1985)、KI

ein et al., *Biotechnology* 10 : 268(1992)、およびMiki et al., 「Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants」、*Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al.(編)、67～88頁(CRC Press, 1993)を参照されたい。

#### 【0199】

あるいは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、原核生物宿主細胞においても発現され得る。原核生物宿主においてIL-17RCポリペプチドを発現させるのに使用され得る適切なプロモーターは当業者に周知であり、T4ポリメラーゼ、T3ポリメラーゼ、Sp6ポリメラーゼ、およびT7ポリメラーゼを認識できるプロモーター、バクテリオファージの $P_R$ プロモーターおよび $P_L$ プロモーター、大腸菌のtrpプロモーター、recAプロモーター、熱ショックプロモーター、lacUV5プロモーター、tacプロモーター、lpp-lacSprプロモーター、phoAプロモーター、およびlacZプロモーター、枯草菌(*B. subtilis*)のプロモーター、パチルス属(*Bacillus*)のバクテリオファージのプロモーター、ストレプトミセス属のプロモーター、バクテリオファージのintプロモーター、pBR322のblaプロモーター、ならびにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターが含まれる。原核生物プロモーターは、Glick, J. *Ind. Microbiol.* 1 : 277(1987)、Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 第4版(Benjamin Cummins 1987)、およびAusubel et al.(1995)によって概説されている。

10

#### 【0200】

適切な原核生物宿主には、大腸菌および枯草菌(*Bacillus subtilis*)が含まれる。大腸菌の適切な株には、BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS、BL21(DE3)pLysE、DH1、DH4I、DH5、DH5I、DH5IF'、DH5IMCR、DH10B、DH10B/p3、DH11S、C600、HB101、JM101、JM105、JM109、JM110、K38、RR1、Y1088、Y1089、CSH18、ER1451、およびER1647が含まれる(例えば、Brown(編)、*Molecular Biology Labfax*(Academic Press 1991)を参照されたい)。枯草菌の適切な株には、BR151、YB886、MI119、MI120、およびB170が含まれる(例えば、Hardy, 「*Bacillus Cloning Methods*」、*DNA Cloning : A Practical Approach*, Glover(編)(IRL Press 1985)を参照されたい)。

20

#### 【0201】

大腸菌のような細菌において本発明のポリペプチドを発現させる場合、ポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として、細胞質中に保持されてよく、または、細菌分泌配列によって細胞周辺腔に誘導されてよい。前者の場合、細胞は溶解され、かつ、顆粒は回収され、例えば、グアニジンイソチオシアナートまたは尿素を用いて変性させられる。次いで、変性したポリペプチドは、例えば、尿素の溶液および還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの組合せに対する透析とそれに続く緩衝生理食塩水に対する透析によって、変性剤を希釈することによって、リフォールディングおよび二量体化することができる。後者の場合、ポリペプチドは、(例えば、超音波処理または浸透圧ショックによって)細胞を破壊して、細胞周辺腔の内容物を放出させ、かつ、タンパク質を回収し、それによって、変性およびリフォールディングの必要を回避することによって、可溶性かつ機能的な形態で細胞周辺腔から回収することができる。

30

#### 【0202】

原核生物宿主においてタンパク質を発現させるための方法は当業者に周知である(例えば、Williams et al., 「Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies」、*DNA Cloning 2 : Expression Systems*, 第2版, Glover et al.(編)、15頁(Oxford University Press 1995)、Ward et al., 「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies」、*Monoclonal Antibodies : Principles and Applications*, 137頁(Wiley-Liss, Inc. 1995)、およびGeorgiou, 「Expression of Proteins in Bacteria」、*Protein Engineering : Principles and Practice*, Cleland et al.(編)、101頁(John Wiley & Sons, Inc. 1996)を参照されたい)。

40

#### 【0203】

細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、および植物細胞中に発現ベクターを導入するための標

50



準的方法は、例えば、Ausubel(1995)によって提供されている。

【0204】

哺乳動物細胞系によって産生される外来タンパク質を発現および回収するための一般的方法は、例えば、Etcheverry、「Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture」、Protein Engineering: Principles and Practice、Cleland et al.(編)、163頁(Wiley-Liss, Inc. 1996)によって提供される。細菌系によって産生されるタンパク質を回収するための標準技術は、例えば、Grishammer et al.、「Purification of over-produced proteins from E. coli cells」、DNA Cloning 2: Expression Systems、第2版、Glover et al.(編)、59~92頁(Oxford University Press 1995)によって提供される。バキュロウイルス系から組換えタンパク質を単離するための確立された方法は、Richardson(編)、Baculovirus Expression Protocols(The Humana Press, Inc. 1995)によって記述されている。 10

【0205】

代替案として、本発明のポリペプチドは、排他的な固相合成、部分的固相法、フラグメント縮合、または古典的な溶液合成によって合成され得る。これらの合成方法は当業者に周知である(例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149(1963)、Stewart et al.、「Solid Phase Peptide Synthesis」(第2版)、(Pierce Chemical Co. 1984)、BayerおよびRapp、Chem. Pept. Prot. 3: 3(1986)、Atherton et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach(IRL Press 1989)、FieldsおよびColowick、「Solid-Phase Peptide Synthesis」、Methods in Enzymology Volume 289(Academic Press 1997)、なら 20  
びにLloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins(CRC Press, Inc. 1997)を参照されたい)。「ネイティブ化学ライゲーション」および「発現タンパク質のライゲーション」など総合的な化学合成戦略の変形法もまた、標準的である(例えば、Dawson et al., Science 266: 776(1994)、Hackeng et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 7845(1997)、Dawson, Methods Enzymol. 287: 34(1997)、Muir et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 6705(1998)、ならびにSeverinovおよびMuir, J. Biol. Chem. 273: 16205(1998)を参照されたい)。

【0206】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、SEQ ID NO: 2、5、または21の少なくとも6個、少なくとも9個、または少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含む。例として、ポリペプチドは、SEQ ID NO: 2、5、および/または21の少なくとも6個、少なくとも9個、または少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含んでよい。本発明の特定の態様において、ポリペプチドは、これらのアミノ酸配列の20個、30個、40個、50個、100個、またはそれ以上の連続した残基を含む。このようなペプチドおよびポリペプチドをコードする核酸分子は、ポリメラーゼ連鎖反応法のプライマーおよびプローブとして有用である。 30

【0207】

さらに、本発明のポリペプチドおよびその断片は、高等真核細胞内で、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体として発現され得る。このような細胞は、IL-17RCポリペプチドの少なくとも一部分を含む、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体のIL-17RC受容体ポリペプチド(「IL-17RCを含む受容体」もしくは「IL-17RCを含む受容体ポリペプチド」)、IL-17RCおよびIL-17RA両方の一部分(単量体、ホモ二量体、またはヘテロ二量体のいずれかとして)を作製するのに使用されてよく、または、スクリーニング系においてアッセイ用細胞として使用されてよい。本発明の1つの局面において、IL-17RCまたはIL-17RA細胞外ドメインのいずれかの少なくともリガンド結合部分を含む本発明のポリペプチドは、培養細胞によって産生され、かつ、その細胞は、天然リガンド、IL-17F、ならびにIL-17A、またはさらに天然リガンドのアゴニストおよびアンタゴニストを含む、受容体に対するリガンドをスクリーニングするのに使用される。このアプローチを要約すると、受容体をコードするcDNAまたは遺伝子が、発現に必要とされる他の遺伝子エレメント(例えば転写プロモーター)と組み合わせられ、かつ、結果として生じる発現ベクターが宿主細胞中に挿入される。DNAを発現し、かつ、機能的受容体を産生する細胞が選択され 40 50

、かつ、様々なスクリーニング系内で使用される。単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体の受容体複合体の各構成要素は、同じ細胞において発現され得る。さらに、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体の受容体複合体の構成要素はまた、前述したような複合体組立およびトランスフェクタントのスクリーニングを可能にするために、膜貫通ドメインまたは他の膜融合部分に融合されてもよい。

#### 【0208】

本発明のポリペプチドを分析するために、IL-17RC受容体およびIL-17RC/IL-17RA受容体またはIL-17AもしくはIL-17Fに結合することが公知の他の受容体を発現させ(例えば、IL-17Rを発現する細胞)、かつ、受容体を介したシグナルを伝達する際に使用するのに適した哺乳動物細胞には、IL-17RCと機能的な複合体を形成し得る他の受容体サブユニットを発現する細胞が含まれる。また、発現される受容体と同じ種に由来する細胞を使用することも好ましい。好ましい態様において、細胞は、増殖に関して、外因的に供給される造血性増殖因子に依存している。このタイプの好ましい細胞株は、GM-CSF依存性のヒト白血病細胞株であるヒトTF-1細胞株(ATCC番号CRL-2003)およびAML-193細胞株(ATCC番号CRL-9589)、ならびにIL-3依存性マウスプレB細胞株であるBaF3(PalaciosおよびSteinmetz, Cell 41: 727-734, (1985))である。他の細胞株には、BHK細胞、COS-1細胞、およびCHO細胞が含まれる。適切な宿主細胞は、必要な受容体サブユニットまたは所望の細胞応答に必要とされる他の細胞構成要素を産生するように操作され得る。細胞株を操作して、任意の種に由来する受容体サブユニットを発現させ、それによって種特異性に起因する潜在的な制限を克服することができるため、このアプローチは有利である。ヒト受容体cDNAの種オルソログは、BaF3細胞株におけるマウスcDNAのように、同じ種に由来する細胞株内でクローニングし、かつ使用され得る。したがって、GM-CSFまたはIL-3などの1種の造血性増殖因子に依存している細胞株は、IL-17FまたはIL-17AなどIL-17RC受容体またはIL-17RA受容体を介して作用する別のサイトカインに依存するように操作され得る。

#### 【0209】

機能的な受容体を発現する細胞が、スクリーニングアッセイ法において使用される。様々な適切なアッセイ法が当技術分野において公知である。これらのアッセイ法は、標的細胞における生物学的応答の検出に基づいている。1つのこのようなアッセイ法は細胞増殖アッセイ法である。細胞は試験化合物の存在下または不在下で培養され、かつ、細胞増殖が、例えば、トリチウムチミジンの取込みを測定することによって、または、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)の代謝分解に基づいた比色アッセイ法によって(Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, (1983))、検出される。代替のアッセイ法形式では、レポーター遺伝子を発現するようにさらに操作されている細胞を使用する。レポーター遺伝子は、受容体と結合した経路に応答性であるプロモーターエレメントに連結されており、アッセイ法は、レポーター遺伝子転写の活性化を検出する。この点に関して好ましいプロモーターエレメントは、血清応答エレメントまたはSREである。例えば、Shaw et al., Cell 56: 563-572, (1989)を参照されたい。好ましいこのようなレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子である(de Wet et al., Mol. Cell Biol. 7: 725, (1987))。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当技術分野において公知の方法(例えば、Baumgartner et al., J. Biol. Chem. 269: 29094-29101, (1994); SchenbornおよびGoiffin, Promega\_Notes 41: 11, 1993)を用いて、ルミネセンスによって検出される。ルシフェラーゼ活性アッセイ法キットは、例えば、Promega Corp.(Madison, WI)から市販されている。このタイプの標的細胞株は、化学物質のライブラリー、細胞馴化培地、真菌培養液、土壌試料、および水試料などをスクリーニングするのに使用され得る。例えば、細胞馴化培地試料のバンクを標的細胞において分析して、リガンドを産生する細胞を同定することができる。次いで、陽性細胞を用いて、哺乳動物発現ベクター中でcDNAライブラリーが作製され、これはプールに分割され、宿主細胞中にトランスフェクトされ、かつ発現される。次いで、トランスフェクトされた細胞に由来する培地試料が分析され、その後、プールへの分割、再トランスフェクション、継代培養、および陽性細胞の再分析が行われて、リガンドをコードするクローン化cDNAが単離される。

10

20

30

40

50

## 【0210】

本発明によって提供されるその他のスクリーニングアプローチは、ハイブリッド受容体ポリペプチドの使用を含む。これらのハイブリッドポリペプチドは、2つの一般的クラスに分類される。第1のクラスでは、IL-17RCの細胞内ドメインが、第2の受容体のリガンド結合ドメインに連結されている。第2のクラスのハイブリッド受容体ポリペプチドは、第2の受容体、好ましくは造血サイトカイン受容体の細胞内ドメインおよび膜貫通ドメインと共にIL-17RC(SEQ ID NO: 3)およびIL-17RA(SEQ ID NO: 21)の細胞外(リガンド結合)ドメインを含む。この第2のクラスの本発明の受容体のこのようなハイブリッド単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体は、第2の受容体によって伝達されるシグナルに応答できることが公知の細胞において発現される。総合すると、これら2つのクラスのハイブリッド受容体により、IL-17FまたはIL-17Aの検出用のアッセイ法を開発するための応答性細胞型を同定することが可能になる。さらに、このような細胞をIL-17FまたはIL-17Aの存在下で使用して、競合型のアッセイ法において本発明の可溶性受容体アンタゴニストを分析することができる。このようなアッセイ法において、本発明の可溶性受容体の存在下でIL-17FまたはIL-17Aの増殖またはシグナル伝達活性が減少する場合、アンタゴニスト活性が実証される。さらに、IL-17RC可溶性受容体結合アッセイ法、細胞ベースのアッセイ法もまた、可溶性受容体が、IL-17FまたはIL-17Aに結合し、活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和するかを評価するために使用され得る。

10

## 【0211】

本発明は、機能的に連結された次のエレメント:(a)転写プロモーター、(b)コードされるポリペプチドが、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基33~458と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、IL-17Aおよび/またはIL-17Fに結合する、ポリペプチドをコードするDNAセグメント、ならびに(c)転写ターミネーターを含む発現ベクターを提供する。DNAセグメントは、分泌シグナル配列をさらにコードしてよい。DNAセグメントは、免疫グロブリン部分、例えば、免疫グロブリン部分重鎖定常領域、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基459~690をさらにコードしてよい。発現ベクターは、任意で、大腸菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞などの培養細胞中に導入されてよく、細胞は、DNAセグメントにコードされたポリペプチドを発現する。本発明の別の態様は、請求項13記載の発現ベクターが導入された細胞を培養する段階であって、その細胞が、DNAセグメントにコードされたポリペプチドを発現する段階、および発現されたポリペプチドを回収する段階を含む、ポリペプチドを作製する方法である。

20

30

## 【0212】

本発明はまた、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基33~458と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物も提供する。ポリペプチドは、免疫グロブリン部分(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、それらの変種および変異体に由来するFc領域のような免疫グロブリン重鎖定常領域;SEQ ID NO: 175のアミノ酸残基1~232、およびSEQ ID NO: 158のアミノ酸残基459~690)をさらに含んでよい。

## 【0213】

本発明はまた、SEQ ID NO: 158のアミノ酸残基33~458と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを対象に投与する段階を含む、IL-17A活性および/またはIL-17F活性によって引き起こされるか、維持されるか、または悪化させられる疾患に罹患している対象を治療する方法であって、そのポリペプチドが、IL-17Aおよび/またはIL-17Fを結合、妨害、低減、拮抗、または中和し、かつ、疾患が、乾癬、アトピー性皮膚炎および接触性皮膚炎、IBD、IBS、結腸炎、内毒素血症、関節炎、関節リウマチ、ライム病関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、炎症性肺損傷、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道応答性亢進、慢性気管支炎、アレルギー性喘息、細菌性肺炎など、乾癬、湿疹、ならびに、潰瘍性大腸炎およびクローン病などの炎症性腸疾患、ピロリ菌感染症、腹膜炎の結果としての(すなわち、感染、損傷などに起因する)腹腔内癒着および/または腹腔内膿瘍、全身性エリテマトーデス(S

40

50

LE)、ループス腎炎、I型糖尿病、冠動脈疾患、脳卒中、多発性硬化症、全身性硬化症、強皮症、ネフローゼ症候群、敗血症、臓器同種移植拒絶、移植片対宿主疾患(GVHD)、移植拒絶(例えば、腎臓、肺、および心臓)、連鎖球菌細胞壁(SCW)によって誘発された関節炎、変形性関節症、歯ぎん炎/歯周炎、ヘルペス性間質性角膜炎、骨粗鬆症、神経炎、前立腺癌、腎臓癌、結腸癌、卵巣癌、子宮頸部癌を含む癌、白血病、癌血管新生(卵巣癌、子宮頸部癌、および前立腺癌など)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、嚢胞性線維症、再狭窄、および川崎病からなる群より選択される、方法も提供する。

#### 【0214】

(F) IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA融合タンパク質および結合体の作製

1つの一般的クラスのIL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA類似体は、本明細書において開示するアミノ酸配列の変異体であるアミノ酸配列を有する変種である。IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA類似体の別の一般的クラスは、後述するように、抗イディオタイプ抗体、およびその断片によって提供される。さらに、抗イディオタイプ可変ドメインを含む組換え抗体が、類似体として使用され得る(例えば、Monfardini et al., Proc. Assoc. Am. Physicians 108:420(1996)を参照されたい)。抗イディオタイプIL-17RC抗体の可変ドメインはIL-17RCを模倣するため、これらのドメインは、IL-17RC結合活性を提供し得る。抗イディオタイプの触媒抗体を作製する方法は当業者に公知である(例えば、Joron et al., Ann. N Y Acad. Sci. 672:216(1992)、Friboulet et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 47:229(1994)、およびAvalle et al., Ann. N Y Acad. Sci. 864:118(1998)を参照されたい)。

10

20

#### 【0215】

IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA類似体の同定に対する別のアプローチは、コンビナトリアルライブラリーの使用によって提供される。ファージディスプレイおよび他のコンビナトリアルライブラリーを構築およびスクリーニングするための方法は、例えば、Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins(Academic Press 1996)、Verdine、米国特許第5,783,384号、Kay, et. al., 米国特許第5,747,334号、およびKauffman et al., 米国特許第5,723,323号によって提供されている。

#### 【0216】

IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、インビボ用途およびインビトロ用途の両方を有する。例として、IL-17RCの可溶型を細胞培養培地に添加して、培養細胞によって産生されるIL-17RCリガンド(すなわち、IL-17F、IL-17A、または両方)の作用を阻害することができる。

30

#### 【0217】

IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAの融合タンパク質は、対応するポリペプチドを発現および単離するために使用され得る。後述するように、特定のIL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA融合タンパク質はまた、診断および治療法における用途も有する。1つのタイプの融合タンパク質は、組換え宿主細胞に由来するIL-17RCポリペプチドを導くペプチドを含む。真核生物宿主細胞の分泌経路中にIL-17RCポリペプチドを誘導するために、分泌シグナル配列(シグナルペプチド、リーダー配列、プレプロ配列、またはブレ配列としても公知)が、IL-17RC発現ベクター中で提供される。分泌シグナル配列はIL-17RCに由来してよいが、適切なシグナル配列はまた、別の分泌タンパク質に由来してもよく、または、新規に合成されてもよい。分泌シグナル配列は、IL-17RCをコードする配列に機能的に連結されており、その結果、これら2つの配列は正確なリーディングフレーム中で連結され、かつ、新規に合成されたポリペプチドを宿主細胞の分泌経路中に誘導するように配置されている。分泌シグナル配列は、一般に、関心対象のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して5'側に位置するが、ある種の分泌シグナル配列は、関心対象のヌクレオチド配列中の別の場所に位置してもよい(例えば、Welch et al., 米国特許第5,037,743号、Holland et al., 米国特許第5,143,830号を参照されたい)。

40

#### 【0218】

IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAまたは哺乳動物細胞によって産生される別

50

のタンパク質の分泌シグナル配列(例えば、米国特許第5,641,655号などに記載されているような組織型プラスミノゲンアクチベーターシグナル配列)が、組換え哺乳動物宿主において対応するポリペプチドを発現させるために有用であるが、酵母細胞における発現のためには、酵母シグナル配列が好ましい。適切な酵母シグナル配列の例は、酵母接合フェロモン 因子(MF 1遺伝子にコードされる)、インペルターゼ(SUC2遺伝子にコードされる)、または酸性ホスファターゼ(PHO5遺伝子にコードされる)に由来するものである。例えば、Romanos et al.、「Expression of Cloned Genes in Yeast」、DNA Cloning 2: A Practical Approach、第2版、GloverおよびHames(編)、123~167頁(Oxford University Press 1995)を参照されたい。

#### 【0219】

本発明の可溶性受容体ポリペプチドは、細胞外ドメイン、例えば、SEQ ID NO: 3の全部または一部を含むポリペプチド、または非ヒト受容体の対応する領域をコードする切断型DNAを発現させることによって、調製することができる。細胞外ドメインポリペプチドは、膜貫通ポリペプチドセグメントおよび細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に含まない形態で調製されることが好ましい。宿主細胞からの受容体ドメインの搬出を指示するために、受容体DNAは、t-PA分泌ペプチドのような分泌ペプチドをコードする第2のDNAセグメントに連結されている。分泌された受容体ドメインの精製を容易にするために、ポリヒスチジンタグのようなC末端伸長、サブスタンスP、Flag(商標)ペプチド(Hopp et al., Biotechnology 6: 1204-1210, (1988); Eastman Kodak Co., New Haven, CTから入手可能)、または、それに対する抗体もしくは他の特異的結合物質が入手可能な別のポリペプチドもしくはタンパク質を、受容体ポリペプチドに融合してよい。

#### 【0220】

代替のアプローチにおいて、IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAの受容体細胞外ドメインまたはその一部分は共に、免疫グロブリン重鎖定常領域、典型的には、2つの定常領域ドメインおよびヒンジ領域を含むが、可変領域を欠いているFc断片との融合物として発現され得る(Sledziewski, AZ et al., 米国特許第6,018,026号および同第5,750,375号を参照されたい)。本発明の可溶性ポリペプチドには、このような融合物が含まれる。1つのこのような融合物をSEQ ID NO: 64に示す。このような融合物は、典型的には、Fc部分が互いにジスルフィド結合されており、かつ、2つの受容体ポリペプチドが互いに接近して配列されている多量体分子として分泌される。このタイプの融合物は、リガンドを特異的に滴定することによってインビトロでシグナルを妨害、阻害、または低減させるためのインビトロのアッセイ法ツールとして、および、循環中のリガンドに結合し、かつ、それを血液循環から除くために非経口的にそれらを投与することによる、インビボでのアンタゴニストとして、溶液から同系リガンドをアフィニティー精製するために使用することができる。リガンドを精製するために、IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA-Igキメラが、受容体-リガンド結合を促進する条件(典型的には、生理学的状態に近い温度、pH、およびイオン強度)下で、リガンドを含む試料(例えば、細胞馴化培地または組織抽出物)に添加される。次いで、キメラ-リガンド複合体が、固体支持体(例えば、不溶性の樹脂ビーズ)上に固定化されているプロテインAを用いた混合物によって分離される。次いで、リガンドは、塩またはpH勾配を用いるような従来の化学的技術を用いて溶離される。別の方法では、キメラ自体が固体支持体に結合されてよく、前述のように、結合および溶離が実施される。キメラは、血清アミロイドA(SAA)およびC反応性タンパク質(CRP)など、急性期応答を含む炎症応答を調節するためにインビボで使用され得る。結合親和性の高いキメラは、非経口的に(例えば、筋肉内注射、皮下注射、または静脈注射によって)投与される。循環中の分子はリガンドに結合し、かつ、通常の生理学的プロセスによって血液循環から除かれる。アッセイ法で使用する場合、キメラは、Fc領域を介して支持体に結合され、かつ、ELISA形式で使用される。

#### 【0221】

本発明のポリペプチドの単離を支援するために、リガンド結合受容体(もしくは抗体、相補体/抗相補体ペアの1つのメンバー)またはその結合断片、および市販されているバイ

オセンサー機器(BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)を使用するアッセイ法システムが有利に使用され得る。このような受容体、抗体、相補体/抗相補体ペアのメンバー、または断片は、受容体チップの表面に固定化される。この機器の使用は、Karlsson, J. Immunol. Methods 145 : 229-40, 1991ならびにCunninghamおよびWells, J. Mol. Biol. 234 : 554-63, 1993によって開示されている。受容体、抗体、メンバー、または断片は、フローセル内の金フィルムに結合されたデキストラン繊維に、アミンまたはスルフィドリル化学反応によって共有結合的に結合される。試験試料に、そのセルを通過させる。リガンド、エピトープ、または相補体/抗相補体ペアの反対のメンバーが試料中に存在する場合には、それぞれ、固定化された受容体、抗体、またはメンバーに結合して、金フィルムの表面プラズモン共鳴の変化として検出される、媒体の屈折率の変化を引き起こすと考えられる。このシステムにより、結合速度および解離速度(これらから結合親和性を計算することができる)の決定、ならびに結合の化学量論の評価が可能になる。あるいは、リガンド/受容体結合は、SELDI(商標)技術(Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA)を用いて解析することができる。

10

#### 【0222】

リガンド結合受容体ポリペプチドはまた、当技術分野において公知の他のアッセイ系においても使用され得る。このような系には、結合親和性を決定するためのスキャッチャード解析(Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51 : 660-72, 1949を参照されたい)および熱量測定アッセイ法(Cunningham et al., Science 253 : 545-48, 1991, Cunningham et al., Science 245 : 821-25, 1991)が含まれる。

20

#### 【0223】

本発明はさらに、様々な他のポリペプチド融合物および1つまたは複数のポリペプチド融合物を含む関連した多量体タンパク質を提供する。例えば、可溶性IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA受容体ポリペプチドは、米国特許第5,155,027号および同第5,567,584号において開示されている二量体化タンパク質に対する融合物として調製され得る。この点に関して好ましい二量体化タンパク質には、免疫グロブリン定常領域ドメイン、例えば、IgG 1、およびヒト 軽鎖が含まれる。本発明の免疫グロブリン-可溶性融合物は、様々な多量体IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RA受容体類似体を産生させるために遺伝的に操作された細胞において発現され得る。補助的ドメインを可溶性ポリペプチド受容体に融合して、特定の細胞、組織、または高分子(例えば、コラーゲン、またはIL-17RCリガンド、IL-17F、もしくはIL-17Aを発現する細胞)にそれらを標的化することができる。本発明のポリペプチドは、精製用のアフィニティータグおよびターゲティングドメインなど2種またはそれ以上の部分に融合されてよい。ポリペプチド融合物はまた、特にドメイン間に、1つまたは複数の切断部位も含んでよい。Tuan et al., Connective Tissue Research 34 : 1-9, 1996を参照されたい。

30

#### 【0224】

細菌細胞では、発現されたタンパク質の毒性を減少させ、安定性を高め、かつ、回収を促進するために、異種タンパク質を融合タンパク質として発現させることがしばしば望ましい。例えば、IL-17RC(または本発明の任意のポリペプチド)は、グルタチオンS-トランスフェラーゼポリペプチドを含む融合タンパク質として発現され得る。グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質は、典型的には可溶性であり、かつ、固定化されたグルタチオンカラム上で、大腸菌溶菌液から容易に精製することができる。同様のアプローチにおいて、マルトース結合タンパク質ポリペプチドを含むIL-17RC融合タンパク質は、アミロース樹脂カラムを用いて単離することができ、切断型プロテインA遺伝子のC末端を含む融合タンパク質は、IgG-セファロースを用いて精製することができる。細菌細胞において異種ポリペプチドを融合タンパク質として発現させるための確立された技術は、例えば、Williams et al., 「Expression of Foreign Proteins in E. coli Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies」、DNA Cloning 2 : A Practical Approach、第2版、GloverおよびHames(編)、15~58頁(Oxford University Press 1995)によって記述されている。さらに、市販されている発現系が利用可能である。例え

40

50

ば、PINPOINT Xaタンパク質精製システム(Promega Corporation; Madison, WI)は、アビジンを含む樹脂を用いて、発現の間にビオチン化されるポリペプチドを含む融合タンパク質を単離するための方法を提供する。

#### 【0225】

原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかによって発現される異種ポリペプチドを単離するために有用であるペプチドタグには、ポリヒスチジントグ(ニッケルキレート化樹脂に対する親和性を有する)、c-mycタグ、カルモジュリン結合タンパク質(カルモジュリンアフィニティークロマトグラフィーを用いて単離される)、サブスタンスP、RYIRSタグ(抗RYIRS抗体と結合する)、Glu-Gluタグ、およびFLAGタグ(抗FLAG抗体と結合する)が含まれる。例えば、Luo et al., Arch. Biochem. Biophys. 329:215(1996)、Morganti et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 23:67(1996)、およびZheng et al., Gene 186:55(1997)を参照されたい。このようなペプチドタグをコードする核酸分子は、例えば、Sigma-Aldrich Corporation(St. Louis, MO)から入手可能である。

10

#### 【0226】

別の形態の融合タンパク質は、本発明のポリペプチドならびに免疫グロブリン重鎖定常領域、典型的には、2つまたは3つの定常領域ドメインおよびヒンジ領域を含むが、可変領域を欠いているFc断片を含む。例として、Chang et al., 米国特許第5,723,125号では、ヒトインターフェロンおよびヒト免疫グロブリンFc断片を含む融合タンパク質を記述している。インターフェロンのC末端は、ペプチドリンカー部分によって、Fc断片のN末端に連結されている。ペプチドリンカーの例は、免疫学的に不活性であるT細胞不活性配列を主に含むペプチドである。例示的なペプチドリンカーは、アミノ酸配列:

20

GGSGG SGGGG SGGGG S (SEQ ID NO:9)

を有する。この融合タンパク質において、例示的なFc部分は、ヒト 4鎖であり、これは、溶液中で安定であり、かつ、補体活性化活性をほとんど持たないか、または全く持たない。したがって、本発明は、SEQ ID NO: 2、5、または21のアミノ酸配列の少なくとも一部分を含むペプチドのように、IL-17RC部分のC末端がペプチドリンカーを介してFc断片のN末端に結合されている、IL-17RC部分またはIL-17RC部分およびIL-17RA部分ならびにヒトFc断片を含むIL-17RC融合タンパク質またはIL-17RC/IL-17RA融合タンパク質を企図する。IL-17RC部分およびIL-17RA部分の両方とも、細胞外ドメインまたはその任意の断片でよい。例えば、融合タンパク質は、SEQ ID NO: 3のアミノ酸およびFc断片(例えばヒトFc断片)(SEQ ID NO: 64)を含んでよい。このような融合タンパク質の別の例は、ヒトIL-17RAのエキソン1~6およびヒトIL-17RCx1のエキソン8~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、変種1454(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)である。変種1454はまた、ヒトIL-17RAに由来する天然のシグナルペプチドも有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

30

#### 【0227】

別の変形法において、本発明の融合タンパク質は、IgG配列、IgG配列のアミノ末端に共有結合されたIL-17RC部分、IL-17RA部分、またはIL-17RC/IL-17RA部分、およびIL-17RC部分またはIL-17RA部分のアミノ末端に共有結合されたシグナルペプチドを含み、その際、IgG配列は、次の順序の次のエレメントからなる:ヒンジ領域、CH<sub>2</sub>ドメイン、およびCH<sub>3</sub>ドメイン。したがって、IgG配列はCH<sub>1</sub>ドメインを欠く。これらの部分は、IL-17Aおよび/またはIL-17Fと結合する能力のような、本明細書において説明する生物活性を示すはずである。抗体部分および非抗体部分の両方を含む融合タンパク質の作製へのこの一般的アプローチは、LaRoche et al., EP 742830(WO 95/21258)によって記述されている。

40

#### 【0228】

IL-17RC部分またはIL-17RC/IL-17RA部分およびFc部分を含む融合タンパク質は、例えば、インビトロのアッセイ法ツールとして使用され得る。例えば、生物試料中のIL-Fの存在は、IL-17RC-免疫グロブリン融合タンパク質を用いて検出することができ、その際、IL-17RC部分が、リガンドに結合するために使用され、かつ、プロテインAまたは抗Fc抗体などの高分子が、融合タンパク質を固体支持体に結合させるのに使用される。このようなシス

50

テムを用いて、IL-17ファミリーリガンド、例えば、IL-17FまたはIL-17AおよびIL-17Fの両方がそれらの受容体に結合するのを邪魔するアゴニストおよびアンタゴニストを同定することができる。

#### 【0229】

本発明はさらに、様々な他のポリペプチド融合物も提供する。例えば、IL-17RCの一部に、サイトカイン受容体ファミリーの別のメンバー(すなわちIL-17RA)に由来する機能的に等価なドメインを用いて、所望の生物学的機能(例えば、IL-17A結合)を与えるドメインの一部または全体を付加して、異なる分子(すなわちIL-17RC/IL-17RA)を作り出すことができる。ポリペプチド融合物を組換え宿主細胞において発現させて、様々なこれらの融合物類似体を作製することができる。IL-17RCポリペプチド、IL-17RAポリペプチド、またはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、精製用のアフィニティータグおよびターゲティングドメインなど2種またはそれ以上の部分またはドメインに融合されてよい。ポリペプチド融合物はまた、特にドメイン間に、1つまたは複数の切断部位も含んでよい。例えば、Tuan et al., *Connective Tissue Research* 34:1(1996)を参照されたい。

10

#### 【0230】

融合タンパク質は、当業者に公知の方法により、融合タンパク質の各構成要素を調製し、かつそれらを化学的に結合させることによって調製することができる。あるいは、適切なリーディングフレーム中で融合タンパク質の両方の構成要素をコードするポリヌクレオチドを、公知の技術を用いて作製し、かつ、本明細書において説明する方法によって発現させることもできる。融合タンパク質を酵素的切断および化学的切断するための一般的な方法は、例えば、Ausubel(1995)、16-19~16-25頁に記述されている。

20

#### 【0231】

IL-17RCおよび/またはIL-17RA結合ドメインは、リガンドアゴニストの推定上の接触部位アミノ酸の変異と組み合わせ、核磁気共鳴、結晶構造解析、電子解析、または光親和性標識などの技術によって決定されるように、構造の物理的解析によってさらに特徴付けることができる。例えば、de Vos et al., *Science* 255:306(1992)、Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899(1992)、およびWlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59(1992)を参照されたい。

#### 【0232】

本発明はまた、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドがポリマーと連結されている、化学的に修飾されたIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA組成物も企図する。例示的なIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、SEQ ID NO:3または21のアミノ酸残基からなるポリペプチドなどの、機能的な膜貫通ドメインを欠いている可溶性ポリペプチドである。典型的には、ポリマーは水溶性であり、その結果、結合体は、生理学的環境のような水性環境において沈殿しない。適切なポリマーの例は、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒドなど単一の反応性基を有するように修飾されたものである。このようにして、重合の程度を調節することができる。反応性アルデヒドの例は、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはそのモノ(C1-C10)アルコキシもしくはアリーロキシ誘導体である(例えば、Harris, et al., 米国特許第5,252,714号を参照されたい)。ポリマーは分枝状または非分枝状でよい。さらに、ポリマーの混合物は、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA結合体を作製するために使用され得る。

30

40

#### 【0233】

治療法用に使われる本発明の結合体は、薬学的に許容される水溶性ポリマー部分を含んでよい。適切な水溶性ポリマーには、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシ-PEG、モノ-(C1-C10)アルコキシ-PEG、アリーロキシ-PEG、ポリ-(N-ビニルピロリドン)PEG、トレシルモノメトキシPEG、PEGプロピオンアルデヒド、ビス-スクシンイミジルカルボナートPEG、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化されたポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマーが含まれる。適切なPEGは、例えば、5,000、12,000、20,000、および25,000を含む、約600~約

50



60,000の分子量を有してよい。IL-17RC結合体はまた、このような水溶性ポリマーの混合物を含んでよい。

【0234】

IL-17RC結合体の1つの例は、IL-17RC部分(またはIL-17RC/IL-17RA部分)およびIL-17RC部分のN末端に結合されたポリアルキルオキシド部分を含む。PEGは、1つの適切なポリアルキルオキシドである。例として、IL-17RC(またはIL-17RC/IL-17RA)は、PEGで修飾されてよく、「PEG化」として公知のプロセスである。IL-17RCのPEG化は、当技術分野において公知のPEG化反応のいずれかによって実施することができる(例えば、EP 0 154 316、Delgado et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9:249(1992)、DuncanおよびSpreafico、Clin. Pharmacokinet. 27:290(1994)、およびFrancis et al., Int J Hematol 68:1(1998)を参照されたい)。例えば、PEG化は、アシル化反応によって、または、反応性のポリエチレングリコール分子とのアルキル化反応によって実施することができる。代替のアプローチにおいて、IL-17RC結合体は、活性化PEGを縮合することによって形成され、その際、PEGの末端ヒドロキシ基またはアミノ基は、活性化リンカーによって置換されている(例えば、Karasiewicz et al., 米国特許第5,382,657号を参照されたい)。

【0235】

アシル化によるPEG化は、典型的には、PEGの活性なエステル誘導体をIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドと反応させることを要する。活性化PEGエステルの例は、N-ヒドロキシスクシンイミドにエステル結合しているPEGである。本明細書において使用される場合、「アシル化」という用語は、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAおよび水溶性ポリマー間の以下のタイプの結合を含む：アミド、カルバマート、およびウレタンなど。アシル化によってPEG化IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAを調製するための方法は、典型的には、(a)1つまたは複数のPEG基がIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに結合する条件下で、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドを(PEGのアルデヒド誘導体の反応性エステルのような)PEGと反応させる段階、および(b)反応生成物を得る段階を含む。一般に、アシル化反応のために最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、PEG:IL-17RC(またはPEG:IL-17RC/IL-17RA)の比率が大きいほど、ポリPEG化IL-17RC(またはIL-17RC/IL-17RA)生成物のパーセンテージが大きくなる。

【0236】

アシル化によるPEG化の生成物は、典型的には、リシン-アミノ基がアシル連結基を介してPEG化されている、ポリPEG化生成物である。連結結合の例は、アミドである。典型的には、結果として生じるIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAは、少なくとも95%がモノPEG化、ジPEG化、またはトリPEG化されていると考えられるが、PEG化の程度がより高いいくつかの化学種が、反応条件に応じて形成され得る。PEG化された化学種は、透析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、およびアフィニティクロマトグラフィーなど標準的な精製方法を用いて、非結合型IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドから分離することができる。

【0237】

アルキル化によるPEG化は、一般に、還元剤の存在下でPEGの末端のアルデヒド誘導体をIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAと反応させることを含む。PEG基は、 $-\text{CH}_2-\text{NH}$ 基を介してポリペプチドに結合され得る。

【0238】

モノPEG化生成物を作製するための還元的アルキル化を介した誘導体化は、誘導体化のために利用可能な様々なタイプの第一級アミノ基の差別的な反応性を利用する。典型的には、反応は、リシン残基の-アミノ基とタンパク質のN末端残基の-アミノ基の間のpKa差異を利用することを可能にするpHで実施される。このような選択的誘導体化によって、アルデヒドのような反応性基を含む水溶性ポリマーのタンパク質への結合が制御される。ポリマーとの結合は、大部分はタンパク質のN末端で起こり、リシン側鎖アミノ基のような他の反応性基の顕著な修飾は伴わない。本発明は、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAモノ

ポリマー結合体の実質的に均一な調製物を提供する。

【0239】

モノポリマーIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA結合体分子の実質的に均一な集団を作製するための還元的アルキル化は、(a)還元的アルキル化条件下、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAのアミノ末端の -アミノ基の選択的修飾を可能にするのに適したpHで、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドを反応性PEGと反応させる段階、および(b)反応生成物を得る段階を含んでよい。還元的アルキル化のために使用される還元剤は、水溶液中で安定であり、かつ、還元的アルキル化の初期プロセスにおいて形成されるシッフ塩基のみを還元できることが望ましい。例示的な還元剤には、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン、およびピリジンボランが含まれる。

10

【0240】

モノポリマーIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA結合体の実質的に均一な集団の場合、還元的アルキル化反応条件は、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAのN末端への水溶性ポリマー部分の選択的結合を可能にする反応条件である。このような反応条件は、一般に、リシンアミノ基とN末端の -アミノ基の間のpKa差異を提供する。pHはまた、使用すべきポリマーとタンパク質の比率にも影響を及ぼす。一般に、pHが低い場合には、タンパク質に対してかなり過剰なポリマーが望ましいと考えられる。これは、N末端の -基の反応性が低いほど、最適条件を実現するためにより多くのポリマーが必要とされるためである。pHが高い場合には、より多くの反応性基が利用可能であるため、ポリマー：IL-17RCの比率(またはポリマー：IL-17RC/IL-17RAの比率)はそれほど大きい必要はない。典型的には、pHは、3~9、または3~6の範囲に収まると考えられる。この方法は、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAを含むホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体の可溶性受容体結合体を作製するために使用することができる。

20

【0241】

考慮すべき別の因子は、水溶性ポリマーの分子量である。一般に、ポリマーの分子量が大きいほど、タンパク質に結合され得るポリマー分子の数は少ない。PEG化反応の場合、典型的な分子量は、約2kDa~約100kDa、約5kDa~約50kDa、または約12kDa~約25kDaである。水溶性ポリマーとIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAのモル比は、一般に、1:1~100:1の範囲にある。典型的には、水溶性ポリマーとIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAのモル比は、ポリPEG化の場合には1:1~20:1、およびモノPEG化の場合には1:1~5:1である。

30

【0242】

ポリペプチドおよび水溶性ポリマー部分を含む結合体を作製するための一般的方法は、当技術分野において公知である。例えば、Karasiewicz et al.、米国特許第5,382,657号、Greenwald et al.、米国特許第5,738,846号、Nieforth et al., Clin.Pharmacol. Ther. 59:636(1996)、Monkarsh et al., Anal. Biochem. 247:434(1997))を参照されたい。この方法は、IL-17RCを含むホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体の可溶性受容体結合体を作製するために使用することができる。

【0243】

本発明は、本明細書において説明する可溶性受容体または抗体のようなペプチドまたはポリペプチドを含む組成物を企図する。このような組成物は、担体をさらに含んでよい。担体は、従来の有機担体または無機担体でよい。担体の例には、水、緩衝液、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、およびトウモロコシ油などが含まれる。

40

【0244】

(G) IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドの単離

本発明のポリペプチドは、混入する高分子、特に他のタンパク質および核酸に関して、少なくとも約80%の純度まで、少なくとも約90%の純度まで、少なくとも約95%の純度まで、または95%を上回る、例えば96%、97%、98%、もしくは99%を超える純度まで、かつ、感染性物質および発熱性物質を含まないように、精製することができる。本発明のポ

50

リペプチドはまた、純度が99.9%を上回る、薬学的に純粋な状態まで精製することもできる。ある種の調製物において、精製されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に、動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。

#### 【0245】

分別および/または従来の精製方法を用いて、天然供給源(例えばヒト組織供給源)から精製されたIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA、合成IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチド、ならびに組換え宿主細胞から精製された組換えIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドおよび融合IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドの調製物を得ることができる。一般に、硫酸アンモニウム沈殿法および酸抽出またはカオトロブ抽出が、試料の分別のために使用され得る。例示的な精製段階には、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、FPLCクロマトグラフィー、および逆相高速液体クロマトグラフィーが含まれてよい。適切なクロマトグラフィー媒体には、誘導体化されたデキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、および特殊シリカなどが含まれる。PEI誘導体、DEAE誘導体、QAE誘導体、およびQ誘導体が適切である。例示的なクロマトグラフィー媒体には、フェニル基、ブチル基、またはオクチル基で誘導体化された媒体、例えば、Phenyl-Sepharose FF(Pharmacia)、Toyopearl butyl 650(Toso Haas, Montgomeryville, PA)、およびOctyl-Sepharose(Pharmacia)など、またはAmberchrom C G71(Toso Haas)などのようなポリアクリル樹脂が含まれる。適切な固体支持体には、ガラスビーズ、シリカベースの樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋されたアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋されたポリアクリルアミド樹脂、および使用される条件下で不溶性である同種のもが含まれる。これらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、および/または炭水化物部分によってタンパク質との結合を可能にする反応性基で修飾されてよい。

10

20

#### 【0246】

結合化学反応の例には、臭化シアン活性化、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化、エボキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化、ならびに、カルボジイミド結合化学反応の場合のカルボキシル誘導体およびアミノ誘導体が含まれる。これらの媒体および他の固体媒体は当技術分野において周知であり、広く使用されており、かつ、商業的供給業者から入手可能である。ポリペプチドを単離および精製するための特定の方法の選択は、ルーチンな計画の事柄であり、選択される支持体の特性によってある程度決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles & Methods(Pharmacia LKB Biotechnology 1988)、およびDoonan, Protein Purification Protocols(The Humana Press 1996)を参照されたい。

30

#### 【0247】

IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAの単離および精製のその他の変形法は、当業者によって考案され得る。

#### 【0248】

本発明のポリペプチドはまた、特定の特性を活用することによっても単離することができる。例えば、固定化金属イオン吸着(IMAC)クロマトグラフィーを用いて、ポリヒスチジンタグを含むものを含む、ヒスチジンに富むタンパク質を精製することができる。手短に言えば、最初に、二価金属イオンをゲルに添加してキレートを形成させる(Sulkowski, Trends in Biochem.3:1(1985))。ヒスチジンに富むタンパク質は、使用される金属イオンに応じて、様々な親和性でこのマトリックスに吸着されると考えられ、かつ、競合的溶出、pHの引き下げ、または強力なキレート剤の使用によって溶離される。他の精製方法には、レクチンアフィニティクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによる、グリコシル化タンパク質の精製が含まれる(M.Deutscher(編)、Meth.Enzymol. 182:529(1990))。本発明のさらなる態様において、精製を容易にするために、関心対象のポリペプチドおよびアフィニティタグ(例えば、マルトース結合タンパク質、免疫グロブリンドメイン)の融合物を構築することができる。さらに、本発明のIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドのリガンド結合特性は、例えば、IL-17RCを含む可溶性受容体の精製の

40

50

ために活用することができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィーを用いることにより、その場合、IL-17Fリガンドがカラムに結合され、IL-17RCを含む受容体が結合され、続いて、標準的なクロマトグラフィー法を用いて溶離される。

#### 【0249】

IL-17RC、IL-17RA、およびIL-17RC/IL-17RAポリペプチドまたはそれらの断片はまた、前述したように、化学合成によって調製され得る。これらのポリペプチドは単量体または多量体、グリコシル化または非グリコシル化、PEG化または非PEG化のものでよく、かつ、最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでも含まなくてもよい。

#### 【0250】

(H) IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAタンパク質に対する抗体の作製

IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに対する抗体は、例えば、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA発現ベクターの産生物または天然供給源から単離されたIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAを抗原として用いて、得ることができる。特に有用な抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体は、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAと「特異的に結合する」。抗体は、以下の2つの特性のうち少なくとも1つを示す場合、特異的に結合するとみなされる：(1)抗体が、閾値レベルの結合活性でIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに結合する、および(2)抗体が、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに関連するポリペプチドと有意に交差反応しない。

#### 【0251】

第1の特徴に関して、抗体は、 $10^6 \text{M}^{-1}$ またはそれ以上、好ましくは $10^7 \text{M}^{-1}$ またはそれ以上、より好ましくは $10^8 \text{M}^{-1}$ またはそれ以上、および、最も好ましくは $10^9 \text{M}^{-1}$ またはそれ以上の結合親和力( $K_a$ )で、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチド、ペプチド、またはエピトープに結合する場合、特異的に結合する。抗体の結合親和力は、当業者によって、例えば、スキャッチャード解析(Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660(1949))により、容易に決定することができる。第2の特徴に関して、例えば、標準的なウェスタンブロット解析によって、抗体がIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAを検出するが、現在公知のポリペプチドを検出しない場合、抗体は、関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない。関連する公知のポリペプチドの例には、公知のサイトカイン受容体が含まれる。

#### 【0252】

抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体は、抗原性のIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAエピトープを有するペプチドおよびポリペプチドを用いて作製することができる。本発明の抗原性のエピトープを有するペプチドおよびポリペプチドは、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、または本明細書において開示する別のアミノ酸配列内に含まれる少なくとも9個、または15個～約30個の間のアミノ酸の配列を含む。しかしながら、30個～50個のアミノ酸を含む、本発明のアミノ酸配列のより多くの部分を含むか、または本発明のポリペプチドのアミノ酸配列全体を含む長さまでの任意の長さを含むペプチドまたはポリペプチドもまた、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに結合する抗体を導入するのに有用である。エピトープを有するペプチドのアミノ酸配列は、水溶性溶媒中で実質的な溶解性を提供するように選択されることが望ましい(すなわち、配列は、比較的親水性の残基を含み、疎水性残基は典型的には避けられる)。さらに、プロリン残基を含むアミノ酸配列もまた、抗体作製のために望ましい場合がある。

#### 【0253】

例として、IL-17RC中の潜在的な抗原性部位は、LASERGENE(DNASTAR;Madison, WI)のPROTEANプログラム(バージョン3.14)によって実行される、Jameson-Wolf法(JamesonおよびWolf, CABIOS 4:181, (1988))を用いて同定した。初期設定パラメーターをこの解析において使用した。

#### 【0254】

Jameson-Wolf法は、タンパク質構造予測に関する6つの主要なサブルーチンを組み合わせることによって潜在的な抗原決定基を予測する。手短に言えば、Hopp-Woods法(Hopp et al., Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 78:3824(1981))を最初に用いて、局所的親水性が最大である領域に相当するアミノ酸配列を同定した(パラメーター:7残基の平均)。第2の段階

において、Emini法(Emini et al., J.Virology 55 : 836(1985))を用いて表面確率を計算した(パラメーター：表面決定閾値(0.6)=1)。第3に、Karplus-Schultz法(KarplusおよびSchultz, Naturwissenschaften 72 : 212 (1985))を用いて、主鎖柔軟性を予測した((パラメーター：柔軟性閾値(0.2) = 1)。解析の第4および第5の段階において、Chou-Fasman法(Chou, 「Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition」、Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation、Fasman(編)、549~586頁(Plenum Press 1990))およびGarnier-Robson法(Garnier et al., J.Mol.Biol. 120 : 97(1978))を用いて、2次構造予測をデータに適用した(Chou-Fasmanパラメーター：立体配座表=64タンパク質； 領域閾値=103； 領域閾値=105;Garnier-Robsonパラメーター： および 決定定数=0)。第6のサブルーチンにおいて、柔軟性パラメーターおよびヒドロパシー/溶媒接近容易性因子を組み合わせて、「抗原性指数」と呼ばれる表面輪郭値を決定した。最後に、内部領域と比べて、表面領域の可動性に由来する付加的な自由エネルギーを説明するために、各ピーク値の20%、40%、60%、または80%を加えることによって主要な表面ピークを広げるピーク広幅化関数を抗原指数に適用した。しかしながら、ヘリックス領域の柔軟性はより低い傾向があるため、ヘリックス領域に存在するどの主要ピークにもこの計算は適用しなかった。Hopp-Woodsの親水性プロファイルを用いて、SEQ ID NO : 3内で抗原性の最も高い可能性がある領域を決定することができる(Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci.78 : 3824-3828, 1981;Hopp, J. Immun. Meth. 88 : 1-18, 1986、およびTriquier et al., Protein Engineering 11 : 153-169, 1998)。プロファイルは、6残基のスライディングウィンドウに基づいている。埋もれたG残基、S残基、およびT残基ならびに露出したH残基、Y残基、およびW残基は無視した。さらに、例えばDNASTAR Proteanプログラム(DNASTAR Inc., Madison, WI)を用いて、Jameson-Wolfプロットによって予測されるSEQ ID NO : 3内のIL-17RC抗原エピトープは、好ましい抗原エピトープとしての機能を果たし、かつ、当業者によって決定され得る。このような抗原エピトープには、(1)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基73~82、(2)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基95~104、(3)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基111~119、(4)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基179~186、(5)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基200~205、(6)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基229~236、(7)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基264~268、および(8)SEQ ID NO : 3のアミノ酸残基275~281が含まれる。本発明は、IL-17RCに対する抗体を作製するために、または本発明の中和性モノクローナル抗体をスクリーニングもしくは同定するためのツールとして、抗原性ペプチドX~Yのいずれか一つを使用することを企図する。本発明はまた、抗原ペプチドX~Yの少なくとも1種を含むポリペプチドも企図する。本発明は、IL-17RCに対する抗体を作製するため、ならびに、中和性であり、(個々にまたは共に)IL-17FおよびIL-17Aに結合し、その活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和し得る抗IL-17RCモノクローナル抗体を同定およびスクリーニングするために、本明細書において説明する任意の抗原ペプチドまたはエピトープを使用することを企図する。

10

20

30

40

#### 【0255】

さらに、適切な抗原には、ヘテロ二量体または多量体の可溶性IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドなどを形成し得るもののような、別のサイトカイン細胞外ドメイン、例えばクラスIまたはクラスIIサイトカイン受容体ドメインと組み合わせて、上記に開示したIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAサイトカイン結合ドメインまたはIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA細胞外ドメインを含むIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドも含まれる。

#### 【0256】

組換えIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAタンパク質または天然供給源から単離されたIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに対するポリクローナル抗体は、当業者に周知の方法を用いて調製することができる。例えば、Green et al., 「Production of Polyclonal Antisera」、Immunochemical Protocols(Manson編)、1~5頁(Humana Press 1992)およびWilliams et al., 「Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies」、DNA Cloning 2 : Expression System

50

s、第2版、Glover et al.(編)、15頁(Oxford University Press 1995)を参照されたい。IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドの免疫原性は、ミョウバン(水酸化アルミニウム)またはフロイントの完全もしくは不完全アジュバントなどのアジュバントを用いて増大させることができる。また、免疫化のために有用なポリペプチドには、IL-17RCもしくはIL-17RC/IL-17RAまたはその一部分と免疫グロブリンポリペプチドまたはマルトース結合タンパク質との融合物のような融合ポリペプチドが含まれる。ポリペプチド免疫原は、完全長分子またはその一部分でよい。ポリペプチド部分が「ハプテン様」である場合、そのような部分は、有利には、免疫化のために高分子担体(キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、または破傷風トキソイドなど)に結合または連結され得る。

10

#### 【0257】

ポリクローナル抗体は典型的にはウマ、雌ウシ、イヌ、ニワトリ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ヤギ、またはヒツジなどの動物において産生されるが、本発明の抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体は、ヒトより下等な霊長類抗体に由来してもよい。ヒヒにおいて診断的および治療的に有用な抗体を産生させる一般的な技術は、例えば、Goldenberg et al.、国際特許国際公開WO91/11465およびLosman et al.、Int. J. Cancer 46:310(1990)において見出すことができる。

#### 【0258】

あるいは、モノクローナル抗IL-17RCまたは抗IL-17RC/IL-17RA抗体を作製することもできる。特定の抗原に対するげっ歯動物モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって得ることができる(例えば、Kohler et al.、Nature 256:495(1975)、Coligan et al.(編)、Current Protocols in Immunology、第1巻、2.5.1~2.6.7頁(John Wiley & Sons 1991)[「Coligan」]、Picksley et al.、「Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli」、DNA Cloning 2: Expression Systems、第2版、Glover et al.(編)、93頁(Oxford University Press 1995))。

20

#### 【0259】

手短に言えば、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA遺伝子産物を含む組成物をマウスに注射し、血清試料を採取することによって抗体産生の存在を確認し、脾臓を摘出してBリンパ球を得、Bリンパ球を骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを作製し、ハイブリドーマをクローニングし、抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択し、抗原に対する抗体を産生するクローンを培養し、かつハイブリドーマ培養物から抗体を単離することによって、モノクローナル抗体を得ることができる。

30

#### 【0260】

さらに、本発明の抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体はヒトモノクローナル抗体に由来してもよい。ヒトモノクローナル抗体は、抗原チャレンジに应答して特異的ヒト抗体を産生するように操作されたトランスジェニックマウスから得られる。この技術において、ヒト重鎖座位およびヒト軽鎖座位のエレメントを、内因性の重鎖座位および軽鎖座位の標的化された破壊を含む胚性幹細胞株に由来するマウスの系統に導入する。トランスジェニックマウスは、ヒト抗原に対して特異的なヒト抗体を合成することができ、これらのマウスは、ヒト抗体を分泌するハイブリドーマを作製するために使用され得る。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、例えばGreen et al.、Nature Genet. 7:13(1994)、Lonberg et al.、Nature 368:856(1994)、およびTaylor et al.、Int. Immun. 6:579(1994)によって記述されている。

40

#### 【0261】

モノクローナル抗体は、様々な十分に確立された技術によってハイブリドーマ培養物から単離および精製することができる。このような単離技術には、プロテイン-Aセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが含まれる(例えば、Coligan、2.7.1~2.7.12頁、および2.9.1~2.9.3頁;Baines et al.、「Purification of Immunoglobulin G(IgG)」、Methods in Molecular Biology、10巻、79~104頁(The Humana Press Inc. 1992)を参照されたい)。

50

## 【0262】

特定の用途の場合、抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体の断片を調製することが望ましい場合がある。このような抗体断片は、例えば、抗体のタンパク分解性の加水分解によって得ることができる。抗体断片は、従来の方法による全抗体のペプシン消化またはパパイン消化によって得ることができる。例として、抗体断片は、 $F(ab')_2$ と表される5S断片を提供するように、ペプシンで抗体を酵素的に切断することによって作製することができる。この断片をチオール還元剤によってさらに切断して、一価の3.5S Fab'断片を作製することができる。任意で、ジスルフィド結合の切断に起因するスルフィドリル基に対するブロック基を用いて、切断反応を実施してよい。代替の方法として、ペプシンを用いた酵素的切断では、一価のFab断片2つおよびFc断片1つが直接生じる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4,331,647号;Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89:230(1960);Porter, Biochem. J. 73:119, (1959);Edelman et al., Methods in Enzymology第1巻、422頁(Academic Press 1967);Coligan、2.8.1~2.8.10頁および2.10~2.10.4頁に記載されている。

10

## 【0263】

一価の軽鎖-重鎖断片を形成するための重鎖の分離、断片のさらなる切断、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝的技術など抗体を切断する他の方法も、それらの断片が、完全な抗体によって認識される抗原に結合する限りにおいて、使用してよい。

## 【0264】

例えば、Fv断片は、 $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖の結合を含む。この結合は、Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659(1972)によって説明されているように、非共有結合性でよい。あるいは、これらの可変鎖は、分子間のジスルフィド結合によって連結され得るか、またはグルタルアルデヒドのような化学物質によって架橋され得る(例えば、Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437(1992)を参照されたい)。

20

## 【0265】

Fv断片は、ペプチドリinkerによって連結された $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖を含んでよい。これら単鎖の抗原結合タンパク質(scFv)は、オリゴヌクレオチドによって連結された $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子は、発現ベクター中に挿入され、続いて、このベクターは、大腸菌(E. coli)のような宿主細胞中に導入される。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一のポリペプチド鎖を合成する。scFvを作製するための方法は、例えば、Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97(1991)によって説明されている(同様に、Bird et al., Science 242:423(1988)、Ladner et al., 米国特許第4,946,778号、Pack et al., Bio/Technology 11:1271(1993)、およびSandhu、前記も参照されたい)。

30

## 【0266】

例として、scFvは、リンパ球をIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドにインビトロで曝露させ、かつ、(例えば、固定化または標識したIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAタンパク質またはIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAペプチドの使用によって)ファージベクターまたは類似ベクターにおいて抗体ディスプレイライブラリーを選択することによって得ることができる。潜在的なIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ上(ファージディスプレイ)または大腸菌のような細菌上にディスプレイされたランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。これらのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ランダム変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成によるなど、いくつかの方法で得ることができる。これらのランダムペプチドディスプレイライブラリーを使用して、タンパク質またはポリペプチド、例えば、リガンドもしくは受容体、生物学的巨大分子もしくは合成巨大分子、または有機物質もしくは無機物質などであり得る公知の標的と相互作用するペプチドをスクリーニングすることができる。このようなランダムペプチドディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするための技術は、当技術分野にお

40

50

いて公知であり(Ladner et al., 米国特許第5,223,409号、Ladner et al., 米国特許第4,946,778号、Ladner et al., 米国特許第5,403,484号、Ladner et al., 米国特許第5,571,698号、およびKay et al., Phage Display of Peptides and Proteins(Academic Press, Inc. 1996)), かつ、ランダムペプチドディスプレイライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えば、CLONTECH Laboratories, Inc.(Palo Alto, CA)、Invitrogen Inc.(San Diego, CA)、New England Biolabs, Inc.(Beverly, MA)、およびPharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway, NJ)から市販されている。本明細書において開示するIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RA配列を用いてランダムペプチドディスプレイライブラリーをスクリーニングして、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAに結合するタンパク質を同定することができる。

10

#### 【0267】

抗体断片の別の形態は、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識単位」)は、関心対象の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。このような遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法を用いて、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成することによって、調製する(例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106(1991)、Courtenay-Luck, 「Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies」、Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application、Ritter et al.(編)、166頁(Cambridge University Press 1995)、およびWard et al., 「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies」、Monoclonal Antibodies: Principles and Applications、Birch et al.(編)、137頁(Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照されたい)。

20

#### 【0268】

あるいは、抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体は、「ヒト化」モノクローナル抗体に由来してもよい。ヒト化モノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変鎖に由来するマウスの相補性決定領域をヒト可変ドメイン中に移入することによって作製される。次いで、ヒト抗体の典型的な残基は、マウス対応物のフレームワーク領域において置換される。ヒト化モノクローナル抗体に由来する抗体構成要素を使用することにより、マウスの定常領域の免疫原性に関連する潜在的な問題が回避される。マウスの免疫グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般的技術は、例えば、Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 3833(1989)によって説明されている。ヒト化モノクローナル抗体を作製するための技術は、例えば、Jones et al., Nature 321: 522(1986)、Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285(1992)、Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437(1992)、Singer et al., J. Immun. 150: 2844(1993)、Sudhir(編)、Antibody Engineering Protocols(Humana Press, Inc. 1995)、Kelley, 「Engineering Therapeutic Antibodies」、Protein Engineering: Principles and Practice、Cleland et al.(編)、399~434頁(John Wiley & Sons, Inc. 1996)およびQueen et al., 米国特許第5,693,762号(1997)によって説明されている。

30

#### 【0269】

さらに、本発明の抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体または抗体断片は、当技術分野におけるものであり、本明細書において説明する方法を用いてPEG化することができる。

40

#### 【0270】

ポリクローナル抗イディオタイプ抗体は、標準技術を用いて、抗IL-17RCもしくは抗IL-17RC/IL-17RA抗体または抗体断片で動物を免疫化することによって調製することができる。例えば、Green et al., 「Production of Polyclonal Antisera」、Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson(編)、1~12頁(Humana Press 1992)を参照されたい。また、Coligan、2.4.1~2.4.7頁も参照されたい。あるいは、モノクローナル抗イディオタイプ抗体は、前述の技術により、抗IL-17RCもしくは抗IL-17RC/IL-17RA抗体または抗体断片を免疫原として用いて調製することもできる。別の代替方法として、ヒト化抗イディオタイプ抗体またはヒトより下等な霊長類の抗イディオタイプ抗体を、前

50



述の技術を用いて調製することができる。抗イディオタイプ抗体を作製するための方法は、例えば、Irie、米国特許第5,208,146号、Greene, et. al., 米国特許第5,637,677号、ならびにVarthakaviおよびMinocha、J.Gen.Virol. 77:1875(1996)によって記述されている。

#### 【0271】

抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体を検出可能な標識と結合させて、抗IL-17RCまたは抗IL-17RC/IL-17RA免疫複合体を形成させることができる。適切な検出可能標識には、例えば、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識、生物発光標識、またはコロイド金が含まれる。このような検出可能となるように標識された免疫複合体を作製および検出する方法は当業者に周知であり、かつ、下記により詳細に説明する。

10

#### 【0272】

検出可能な標識は、オートラジオグラフィーによって検出される放射性同位体でよい。本発明の目的のために特に有用である同位体は、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、および $^{14}\text{C}$ である。

#### 【0273】

抗IL-17RCまたは抗IL-17RC/IL-17RA免疫複合体はまた、蛍光性化合物で標識することもできる。蛍光標識した抗体の存在は、適切な波長の光にその免疫複合体を曝露させ、かつ、結果として生じる蛍光を検出することによって決定される。蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、フィコエリテリン(phycoerytherin)、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド(phthaldehyde)、およびフルオレスカミンが含まれる。

20

#### 【0274】

あるいは、抗体構成要素を化学発光化合物に結合させることによって、抗IL-17RCまたは抗IL-17RC/IL-17RA免疫複合体を検出可能に標識することもできる。化学発光タグ付き免疫複合体の存在は、化学反応の過程を通じて生じる発光の存在を検出することによって決定される。化学発光標識化合物の例には、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルが含まれる。

#### 【0275】

同様に、生物発光化合物を使用して、本発明の抗IL-17RCまたは抗IL-17RC/IL-17RA免疫複合体を標識することもできる。生物発光は、触媒的タンパク質によって化学発光反応の効率が高められる生物学的系において見出される、あるタイプの化学発光である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識するのに有用な生物発光化合物には、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンが含まれる。

30

#### 【0276】

あるいは、抗IL-17RCまたは抗IL-17RC/IL-17RA免疫複合体は、抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体の構成要素を酵素に結合させることによって、検出可能に標識することもできる。抗IL-17RC-酵素結合体または抗IL-17RC/IL-17RA-酵素結合体を適切な基質の存在下でインキュベートすると、酵素部分は基質と反応して、例えば、分光光度的手段、蛍光定量的手段、または視覚的手段によって検出できる化学的部分を生成する。多特異性の免疫複合体を検出可能に標識するのに使用できる酵素の例には、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが含まれる。

40

#### 【0277】

当業者は、本発明に従って使用できる他の適切な標識について知っていると考えられる。抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体へのマーカー部分の結合は、当技術分野において公知である標準的な技術を用いて実施することができる。この点に関する典型的な方法論は、Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1(1976)、Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1(1977)、Shih et al., Int'l J. Cancer 46:1101(1990)、Stein et al.,

50

Cancer Res. 50 : 1330(1990)、およびColigan、前記によって説明されている。

【 0 2 7 8 】

さらに、免疫化学的検出の利便性および汎用性は、アビジン、ストレプトアビジン、およびビオチンと結合させた抗IL-17RC抗体または抗IL-17RC/IL-17RA抗体を用いることによって高めることができる(例えば、Wilchek et al.(編)、「Avidin-Biotin Technology」、Methods In Enzymology、第184巻(Academic Press 1990)、およびBayer et al.、「Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology」、Methods In Molecular Biology、第10巻、Manson(編)、149~162頁(The Humana Press, Inc.1992を参照されたい)。

【 0 2 7 9 】

イムノアッセイ法を実施するための方法は、十分に確立されている。例えば、CookおよびSelf、「Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays」、Monoclonal Antibodies : Production, Engineering, and Clinical Application、RitterおよびLadyman(編)、180~208頁(Cambridge University Press, 1995)、Perry、「The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology」、Monoclonal Antibodies : Principles and Applications、BirchおよびLennox(編)、107~120頁(Wiley-Liss, Inc. 1995)、ならびにDiamandis, Immunoassay(Academic Press, Inc. 1996)を参照されたい。

【 0 2 8 0 】

本発明はまた、IL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAの遺伝子発現に関する免疫学的診断アッセイ法を実施するためのキットも企図する。このようなキットは、抗IL-17RC抗体もしくは抗IL-17RC/IL-17RA抗体または抗体断片を含む少なくとも1つの容器を含む。キットはまた、IL-17RC抗体もしくはIL-17RC/IL-17RA抗体または抗体断片の存在を示すことができる1種または複数種の反応物を含む第2の容器も含んでよい。このような指示反応物の例には、放射性標識、蛍光性標識、化学発光標識、酵素標識、生物発光標識、およびコロイド金などの検出可能な標識が含まれる。キットは、IL-17RC抗体もしくはIL-17RC/IL-17RA抗体または抗体断片がIL-17RCタンパク質またはIL-17RC/IL-17RAタンパク質を検出するために使用されることを使用者に知らせるための手段も含んでよい。例えば、書面の取扱い説明書において、同梱された抗体または抗体断片を用いてIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAを検出できることを述べてよい。書面資料は容器に直接添付してよく、または、書面資料は包装挿入物の形態で提供してもよい。

【 0 2 8 1 】

(I) 本発明のIL-17RCポリペプチドまたはIL-17RC/IL-17RAポリペプチドの治療的使用

可溶性のIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAの活性を有するアミノ酸配列は、(個々にまたは一緒に)リガンドIL-17AおよびIL-17Fに結合し、それによって、これらのリガンドと内因性のIL-17RC受容体および/またはIL-17RA受容体の結合を妨害することによって免疫系を調整するのに使用され得る。可溶性IL-17RCまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAなどのこのようなアンタゴニストもまた、IL-17Aおよび/またはIL-17Fと内因性のIL-17RC受容体および/またはIL-17RA受容体の結合を阻害することによって免疫系を調整するのに使用され得る。したがって、本発明は、IL-17RC活性またはIL-17RC/IL-17RA活性を有するタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド(可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド、IL-17RCポリペプチド断片またはIL-17RAポリペプチド断片、IL-17RC類似体またはIL-17RC/IL-17RA類似体、およびIL-17RC融合タンパク質またはIL-17RC/IL-17RA融合タンパク質など)の、適切な量のこのポリペプチドを欠くか、または過剰なIL-17Aおよび/またはIL-17Fを産生する対象に対する使用を含む。本発明のポリペプチド(例えば、可溶性IL-17RCおよび/または可溶性IL-17RC/IL-17RA)はまた、IL-17A、IL-17F、IL-17RA、またはIL-17RCのいずれかを過剰に産生する対象を治療するのににも使用され得る。適切な対象には、ヒトのような哺乳動物が含まれる。例えば、このような可溶性ポリペプチドは、炎症および炎症性疾患、例えば、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、内毒素血症、IBD、IBS、結腸炎、喘息、同種移植拒絶、免疫介在性の腎疾患、肝胆道疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、腫瘍増殖の促進、または変性関節疾患、および本明細書に

において開示する他の炎症性状態などの治療において、IL-17AおよびIL-17Fを(個々にまたは一緒に)結合、妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する際に有用である。

【0282】

好ましい態様において、可溶性受容体は、IL-17RC (SEQ ID NO: 3)を含み、インビボでIL-17FおよびIL-17Aを(個々にまたは一緒に)結合、妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体である。このようなIL-17RC単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体に対する抗体および結合ポリペプチドはまた、本明細書において説明するように、IL-17RC活性のアンタゴニストとして、ならびにIL-17FおよびIL-17Fのアンタゴニスト(個々にまたは一緒に)としての機能も果たす。

【0283】

他の好ましい態様において、可溶性受容体は、IL-17RCおよびIL-17RAの両方の部分を含む。1つのこのような好ましい態様は、ヒトIL-17RAのエキソン1~6およびヒトIL-17RCx1のエキソン8~16を含み、Fc5(SEQ ID NO: 179およびSEQ ID NO: 180)に融合されている、IL-17変種1454(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)である。変種1454はまた、ヒトIL-17RAに由来する天然のシグナルペプチドも有する。Fc10または当技術分野において公知の任意の等価物もまた、Fc5の代わりに使用してよい。

【0284】

さらに、ポリクローナル中和性抗IL-17F抗体およびモノクローナル中和性抗IL-17F抗体の両方が、細胞ベースの中和アッセイ法においてIL-17FおよびIL-17Aに結合し、その活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和することも本明細書において説明する。IL-17RC cDNAに対応するmRNAの組織分布の解析により、IL-17RC遺伝子のmRNAが甲状腺、副腎、前立腺、および肝臓組織において強く発現され、心臓、小腸、胃、および気管組織においてはより低い程度で発現されることが示された。特に、IL-17RCは、単球、B細胞、および骨髄系の細胞を含む非T細胞末梢血細胞株において一貫して発現されている。また、IL-17RC mRNAは、皮膚に由来する細胞株において確実に発現される。IL-17RCを発現する他の細胞株は、アレイ上に存在した大腸細胞株の5種すべてである。一方、脳、胎盤、肺、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、結腸、末梢血白血球、脊髄、リンパ節、および骨髄では、ほとんどまたは全く発現されない。IL-17RCが結合するリガンド(IL-17Fおよび/またはIL-17A)は、炎症応答を誘導すること、ならびにIL-1、IL-6、およびTNF- $\alpha$ を含む炎症メディエーター、ならびに好中球の増殖、成熟、および走化性に関与しているメディエーターの産生を増大させる能力を主に介して、炎症性疾患を引き起こすことに関係があるとされている(Witowski et al., Cell. Mol. Life Sci. 61:567-579 (2004)に総説がある)。

【0285】

したがって、本発明の特定の態様は、炎症性および免疫性の疾患または状態、例えば、乾癬、乾癬性関節炎、アトピー性皮膚炎、炎症性皮膚病態、関節リウマチ、IBD、IBS、クローン病、憩室症、喘息、膵炎、I型糖尿病(IDDM)、膵臓癌、膵炎、グレーブス病、結腸癌および腸癌、自己免疫疾患、敗血症、臓器移植もしくは骨髄移植;内毒素血症、外傷、外科手術、もしくは感染に起因する炎症;アミロイド症;脾腫;移植片対宿主疾患など、ならびに、炎症の抑制、免疫抑制、造血細胞、免疫細胞、炎症細胞、もしくはリンパ系細胞、マクロファージ、T細胞(Th1細胞およびTh2細胞を含む)の増殖の低減、病原体もしくは抗原に対する免疫応答の抑制が望ましい場合、またはIL-17Fおよび/もしくはIL-17Aの阻害が望ましい他の場合における、アンタゴニストとしての可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの使用を対象としている。

【0286】

さらに、可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、以下のために有用である。

【0287】

(1)急性炎症、外傷、組織損傷、外科手術、敗血症、または感染の結果としての炎症、および喘息、炎症性腸疾患(IBD)、IBS、慢性大腸炎、脾腫、関節リウマチ、再発性の急性

10

20

30

40

50

炎症エピソード(例えば結核)などの慢性炎症性疾患の治療、ならびに、アミロイド症、およびアテローム性動脈硬化症、キャスルマン病、喘息、および急性期応答の誘導に関連した他の疾患の治療において、IL-17RAまたはIL-17RCを介したシグナル伝達を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和すること。

【0288】

(2) IDDM、多発性硬化症(MS)、全身性エリテマトーデス(SLE)、重症筋無力症、関節リウマチ、IBS、およびIBDなどの自己免疫疾患の治療においてIL-17RAまたはIL-17RCを介したシグナル伝達を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和して、免疫細胞(例えば、リンパ球、単球、白血球)におけるシグナル伝達を妨害または阻害すること。本発明のポリペプチドを用いて、IL-17RCおよび/またはIL-17RAを介したシグナル伝達を妨害、阻害、低減、または拮抗することはまた、膵臓、腎臓、脳下垂体、および神経細胞の疾患にも利益を与え得る。IDDM、NIDDM、膵炎、および膵臓癌は、利益を得ることができる。IL-17RCおよび/またはIL-17RAは、癌治療の標的としての機能を果たすことができ、その際、本発明のアンタゴニストは癌増殖を抑制し、かつ免疫を介して死滅させることを目標とする(Holliger PおよびHoogenboom、H:Nature Biotech. 16:1015-1016, 1998)。本発明の可溶性ポリペプチドはまた、糸球体硬化症、膜性神経障害(membranous neuropathy)、アミロイド症(他の組織のうちで腎臓も冒す)、腎動脈硬化症、様々な起源の糸球体腎炎、腎臓の線維増殖性疾患などの腎症、ならびに、SLE、IDDM、II型糖尿病(NIDDM)、腎腫瘍、および他の疾患に関連した腎機能障害を治療するのに有用な場合がある。

10

20

【0289】

(3) IDDM、MS、SLE、重症筋無力症、関節リウマチ、IBS、およびIBDなどの自己免疫疾患の治療において、IL-17RAまたはIL-17RCを介したシグナル伝達を作用(agonize)、増強、増加、または開始させること。本発明の可溶性ポリペプチドは、リンパ球または他の免疫細胞にシグナル伝達して、分化させるか、増殖を変更するか、または、自己免疫を改善するサイトカインもしくは細胞表面タンパク質の産生を変化させ得る。具体的には、代替パターンのサイトカイン分泌に対するTヘルパー細胞応答の調整により、自己免疫応答が逸脱して、疾患が改善され得る(Smith JA et al., J.Immunol. 160:4841-4849, 1998)。同様に、アゴニストの可溶性ポリペプチドは、喘息、アレルギー、およびアトピー性疾患に関連している免疫細胞にシグナル伝達し、それらを枯渇させ、かつ逸脱させるのに使用され得る。IL-17RCおよび/またはIL-17RAを介したシグナル伝達はまた、膵臓、腎臓、脳下垂体、および神経細胞の疾患にも利益を与え得る。IDDM、NIDDM、膵炎、および膵臓癌は、利益を得ることができる。

30

40

【0290】

本明細書において説明する可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、自己免疫疾患、アトピー性疾患、NIDDM、膵炎、および前述の腎機能障害の治療において、個々にまたは一緒に、IL-17FまたはIL-17Aに結合するか、その活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和するのに使用され得る。可溶性のIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAは、Th細胞によって媒介される抗体応答を促進するか、かつ/またはリンパ球もしくは他の免疫細胞によるIL-4もしくは他のサイトカインの産生を促進するのに使用され得る。

【0291】

本発明の可溶性ポリペプチドは、IL-17Aおよび/またはIL-17Fのアンタゴニストとして有用である。このような拮抗性の作用は、IL-17AまたはIL-17Fの直接的な中和または結合によって実現され得る。アンタゴニスト用途の他に、本発明の可溶性受容体は、IL-17FまたはIL-17Aに結合し、かつ、体内の様々な組織、器官、および細胞にそれを輸送するために、リガンドの担体タンパク質として作用することができる。したがって、本発明の可溶性受容体は、可溶性受容体-リガンド複合体を特定の部位、例えば、組織、特定の免疫細胞、または組織に誘導する分子、ポリペプチド、または化学的部分に融合または結合されてよい。例えば、急性の感染症またはいくつかの癌において、利益は、IL-17Fの作用による炎症タンパク質および局所的急性期応答タンパク質の誘導の結果として生じ得る。した

50

がって、本発明の可溶性受容体は、IL-17AまたはIL-17Fの作用を特異的に指示するために使用され得る。Cosman, D. Cytokine 5:95-106, 1993およびFernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9:497-513, 2000を参照されたい。

#### 【0292】

炎症は、侵入物質を避けるための、生物による防御応答である。炎症は、多くの細胞性メディエーターおよび液性メディエーターを含むカスケード式の事象である。一方では、炎症応答を抑制すると、宿主が免疫無防備状態にされる場合がある；しかしながら、抑制されないままの場合には、炎症は、慢性炎症性疾患(例えば、乾癬、関節炎、関節リウマチ、多発性硬化症、および炎症性腸疾患など)、敗血症ショック、ならびに多臓器不全を含む重篤な合併症をもたらし得る。重要なことには、これらの多様な疾患状態は、共通の炎症メディエーターを共有する。炎症を特徴とする集合的疾患は、ヒトの罹患率および死亡率に大きな影響を与える。したがって、本発明の可溶性ポリペプチドのような抗炎症性タンパク質が、喘息およびアレルギーから自己免疫および敗血症ショックに至る膨大な数のヒト疾患および動物疾患に対して非常に重要な治療可能性を有する可能性があることは明らかである。

10

#### 【0293】

##### 1. 関節炎

変形性関節炎、関節リウマチ、および損傷の結果としての関節炎関節などを含む関節炎は、本発明の可溶性ポリペプチドのような抗炎症性タンパク質の治療的使用から利益を受けると考えられる一般的な炎症性状態である。例えば、関節リウマチ(RA)は、全身を冒す全身性疾患であり、関節炎の最も一般的な形態の一つである。これは、疼痛、こわばり、熱感、発赤、および腫脹を引き起こす関節の内側を覆う膜の炎症を特徴とする。炎症細胞は、硬骨および軟骨を消化し得る酵素を放出する。関節リウマチの結果として、炎症を起こした関節内層、すなわち滑膜が、骨および軟骨に浸潤し、かつ損傷を与えて、関節の変質および他の生理的作用の中でも重度の疼痛をもたらし得る。関与した関節は、その形状および配列を失って、疼痛および動作低下を起こし得る。

20

#### 【0294】

関節リウマチ(RA)は、重度の障害および死亡率の増加をもたらす炎症およびその後の組織損傷を特に特徴とする免疫介在性疾患である。様々なサイトカインが、リウマチ関節において局所的に産生される。多数の研究により、2種のプロトタイプの炎症誘発性サイトカインであるIL-1およびTNF- $\alpha$ が、滑膜の炎症および進行性の関節破壊に関与するメカニズムにおいて重要な役割を果たすことが実証された。実際、RA患者にTNF- $\alpha$ およびIL-1の阻害剤を投与すると、炎症の臨床徴候および生物学的徴候が劇的に改善され、かつ、骨侵食および軟骨破壊の放射線学的徴候が減少した。しかしながら、これらの励みになる結果にもかかわらず、かなりの比率の患者はこれらの作用物質に応答せず、他のメディエーターも同様に関節炎の病態生理学に関与していることが示唆されている(Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2):135-149, 2002)。これらのメディエーターの1つは、IL-17AまたはIL-17Fである可能性があり、したがって、可溶性IL-17RCまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAなど、IL-17FまたはIL-17Aに結合するか、またはそれらの活性を阻害する分子は、関節リウマチおよび他の関節炎疾患において炎症を減少させるための価値ある治療物質としての機能を果たし得る。

30

40

#### 【0295】

当技術分野において公知のいくつかの関節リウマチ動物モデルがある。例えば、コラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルにおいて、マウスはヒトの関節リウマチに非常に似た慢性炎症性関節炎を発症する。CIAはRAと同様な免疫学的特徴および病理学的特徴を共有するため、これは、潜在的なヒト用抗炎症性化合物をスクリーニングするための理想的なモデルとなる。CIAモデルは、その発生が免疫応答および炎症応答の両方に依存する、周知のマウスモデルである。免疫応答は、抗原として与えられるコラーゲンに応答したB細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞の相互作用を含み、かつ、抗コラーゲン抗体の産生を招く。炎症相は、これらの抗体のいくつかがマウスの生来のコラーゲンと交差反応し、かつ補体カスケードを活

50

性化させた結果としての炎症のメディエーターからの組織応答の結果である。CIAモデルを使用する際の利点は、病因の基本的なメカニズムが公知であることである。II型コラーゲン上の関連するT細胞エピトープおよびB細胞エピトープが同定されており、かつ、免疫介在性関節炎に関する様々な免疫学的パラメーター(例えば、遅延型過敏症および抗コラーゲン抗体)ならびに炎症性パラメーター(例えば、サイトカイン、ケモカイン、およびマトリックス分解酵素)が決定されており、したがって、これらを用いて、CIAモデルにおける試験化合物の有効性を評価することができる(Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407-20, 1999; Williams et al., Immunol. 89:9784-788, 1992; Myers et al., Life Sci. 61:18 61-78, 1997;およびWang et al., Immunol. 92:8955-959, 1995)。

#### 【0296】

抗マウスIL-17抗体は対照マウスと比べてマウスCIAモデルにおいて症状を減少させることが1つのグループによって示され、したがって、本発明の可溶性ポリペプチドが、ヒト疾患の治療において有益であろうことが概念的に示された。マウスIL-17に特異的なラット抗血清を1回投与すると、予防的に導入された場合、または関節炎の症状が既にモデルに存在していた後の場合、動物における関節炎の症状は減少した(Lubberts et al, Arthritis Rheum. 50:650-9, 2004)。したがって、IL-17RC-FcまたはIL-17RC/IL-17RA-Fcは、関節炎、乾癬、乾癬性関節炎、内毒素血症、炎症性腸疾患(IBD)、IBS、結腸炎、および本明細書において開示する他の炎症性状態など特定のヒト疾患の治療において、IL-17Aおよび/またはIL-17Fを中和するために使用され得る。

#### 【0297】

これらのCIAモデルマウスへの本発明の可溶性ポリペプチド、例えば、IL-17RC-Fcまたは他のIL-17RC/IL-17RA可溶性タンパク質および融合タンパク質の投与を用いて、疾患の症状を改善するため、および疾患の経過を変更するための、IL-17FおよびIL-17Aに対するアンタゴニストとしてのそれらの使用を評価する。さらに、本発明の可溶性ポリペプチドによるIL-17Fおよび/またはIL-17Aの阻害または中和を示す結果は、他のIL-17AアンタゴニストまたはIL-17Fアンタゴニストもまた、疾患の症状を改善するため、および疾患の経過を変更するために使用され得るという概念の証拠を提供すると思われる。さらに、IL-17Aおよび/またはIL-17Fは、IL-1 およびTNF- $\alpha$  (いずれも、関節リウマチの病因および進行に関係があるとされている)の産生を誘導するため、これらの可溶性ポリペプチドの全身投与または局所投与は、RAにおける炎症応答を潜在的に抑制し得る。例として、非限定的に、マウス1匹当たりIL-17RC-Fc 10~200ugを注射すると(1週1~7回、非限定的に最長4週間、皮下、腹腔内、または筋肉内の投与経路による)、疾患スコア(足スコア、炎症または疾患の発生率)は有意に低下し得る。IL-17RC-Fc投与の開始時期に応じて(例えば、コラーゲン免疫化前、もしくは免疫化時、または、疾患が既に進行している時点を含む、2回目のコラーゲン免疫化後の任意の時点)、IL-17RCは、関節リウマチの予防、ならびにその進行の防止に有効となり得る。他の潜在的な治療物質には、IL-17RC/IL-17RAポリペプチドなどが含まれる。

#### 【0298】

### 2. 内毒素血症

内毒素血症は、細菌および他の感染症病原体などの感染病原体、敗血症、毒性ショック症候群に一般に起因するか、または日和見感染症などにかかりやすい免疫無防備状態の患者において起こる重度の病態である。本発明の可溶性ポリペプチドのような治療的に有用な抗炎症性タンパク質は、ヒトおよび動物において内毒素血症を予防および治療する際に役立ち得る。これらの可溶性ポリペプチドは、内毒素血症において炎症および病理学的作用を減少させるための貴重な治療物質として役立ち得る。

#### 【0299】

リポ多糖類(LPS)によって誘発される内毒素血症には、感染症において病理学的作用をもたらす炎症誘発性メディエーターの多くが関与しており、げっ歯動物におけるLPS誘発性内毒素血症は、潜在的な炎症誘発物質または免疫調節物質の薬理学的効果を研究するために広く使用され、かつ許容されているモデルである。グラム陰性菌において産生される

LPSは、敗血症ショックの病因論における主要な原因物質である(Glausner et al., Lancet 338:732, 1991)。ショック様の状態は、実際、LPSを動物に1回注射することによって実験的に誘導することができる。LPSに応答する細胞によって産生される分子は、直接または間接的に病原体を標的とすることができる。これらの生物学的応答は、侵入病原体から宿主を保護するが、それらはまた、害を引き起こす場合もある。すなわち、重度のグラム陰性菌感染の結果として起こる先天性免疫の強い刺激により、サイトカインおよび他の分子が過剰に産生され、かつ、発熱、低血圧、播種性血管内凝固、および多臓器不全を特徴とする、致死症候群である敗血症ショック症候群が発症する(Dumitru et al. Cell 103:1071-1083, 2000)。

#### 【0300】

LPSのこれらの毒性作用は、多数の炎症性メディエーターの放出をもたらすマクロファージ活性化に主に関係している。これらのメディエーターのうちで、TNFは、中和性抗TNF抗体の投与によるLPS毒性の予防によって示されるように、非常に重要な役割を果たしていると思われる(Beutler et al., Science 229:869, 1985)。大腸菌LPS 1ugをC57Bl/6マウスに注射すると、注射後約2時間で、循環血中のIL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1、および急性期タンパク質(例えばSAA)が有意に増加することは十分に確立されている。これらのメディエーターに対抗する受動免疫によって死亡率が減少し得るため、LPSの毒性は、これらのサイトカインによって媒介されていると思われる(Beutler et al., Science 229:869, 1985)。敗血症ショックの予防および/または治療のための潜在的な免疫介入戦略には、抗TNF mAb、IL-1受容体アンタゴニスト、LIF、IL-10、およびG-CSFが含まれる。

#### 【0301】

これらのLPS誘発性モデルへの本発明の可溶性ポリペプチドの投与を用いて、LPS誘発性疾患の症状を改善するため、および疾患の経過を変更するためのIL-17RCまたはIL-17RC/IL-17RAの使用を評価することができる。さらに、これらの可溶性ポリペプチドによるIL-17FまたはIL-17Aの阻害を示す結果は、他のこのようなアンタゴニストもまた、LPS誘発性モデルの症状を改善するため、および疾患の経過を変更するために使用され得るという概念の証拠を提供すると思われる。このモデルから、LPS注射によるIL-17Fの誘導、および可溶性ポリペプチドによる疾患の治療の可能性が示される。LPSは、おそらく内毒素血症の病理の一因となる炎症誘発性因子の産生を誘導するため、アンタゴニストである可溶性ポリペプチドによるIL-17F活性または他の炎症誘発性因子の中和を用いて、エンドトキシンショックにおいて認められるような内毒素血症の症状を減少させることができる。

#### 【0302】

### 3. 炎症性腸疾患IBD

米国では、約500,000名の人々が、結腸および直腸(潰瘍性大腸炎)またはその両方、小腸および大腸(クローン病)を冒し得る炎症性腸疾患(IBD)に罹患している。これらの疾患の病因は不明瞭であるが、これらは罹患組織の慢性の炎症を伴う。本発明の可溶性ポリペプチドは、IBD、UC、および関連疾患において炎症および病理学的作用を減少させるための貴重な治療物質として役立ち得る。

#### 【0303】

潰瘍性大腸炎(UC)は、結腸の粘膜または最内側の内壁の炎症および潰瘍を特徴とする、一般に結腸と呼ばれる大腸の炎症性疾患である。この炎症が原因で、結腸はしばしば空になり、結果として下痢が起こる。症状には、便のゆるみ、ならびに付随する腹部有痛性痙攣、発熱、および体重減少が含まれる。UCの正確な原因は不明であるが、最近の調査により、身体の天然防御が、身体が異物と考える身体中のタンパク質に対抗して作動していることが示唆されている(「自己免疫反応」)。おそらくは、それらが腸中の細菌タンパク質に似ているため、これらのタンパク質は、結腸の内壁を破壊し始める炎症プロセスを扇動または刺激し得る。結腸内壁が破壊されるにつれ、潰瘍が形成して、粘液、膿汁、および血液を放出する。この疾患は、通常、直腸領域で始まり、かつ、最終的に、大腸全体に拡大し得る。炎症エピソードの反復は、瘢痕組織を伴う腸および直腸の壁の肥厚を招く。結腸組織の死滅または敗血症が、重度の疾患と共に発生することがある。潰瘍性大腸炎の症

状の重症度は様々であり、それらの発症は、漸進的または急激な場合がある。発病は、呼吸器感染症またはストレスを含む多くの要因によって誘発され得る。

【0304】

現在、UCの治癒法は利用可能ではないが、治療は、結腸内壁における異常な炎症プロセスを抑制することに焦点を合わせている。コルチコステロイド、免疫抑制薬(例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、およびメトトレキサート)ならびにアミノサリチル酸を含む治療薬が、この疾患を治療するために利用可能である。しかしながら、コルチコステロイドおよびアザチオプリンなどの免疫抑制薬の長期の使用は、骨の希薄化、白内障、感染症、ならびに肝臓および骨髄への影響を含む重大な副作用をもたらし得る。現在の治療法が成功していない患者においては、外科手術が選択肢である。外科手術は、結腸全体および直腸の切除を含む。

10

【0305】

慢性の潰瘍性大腸炎をある程度再現し得るいくつかの動物モデルがある。最も広く使用されているモデルは、結腸における慢性的な炎症および潰瘍形成を誘発する、2,4,6-トリニトロベンズルホン酸(trinitrobenesulfonic acid)/エタノール(TNBS)誘発性結腸炎モデルである。TNBSが、感受性の高いマウスの結腸に直腸内点滴注入によって導入された場合、これは、結腸粘膜においてT細胞性免疫応答を誘導して、この場合、大腸壁全体に広がるT細胞およびマクロファージの密な浸潤を特徴とする広範囲の粘膜炎症をもたらす。さらに、この組織病理学的病像は、進行性の体重減少(痩せ)、血性下痢、直腸脱、および大腸壁肥厚の臨床像を伴う(Neurath et al. Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000)。

20

【0306】

別の結腸炎モデルは、硫酸デキストランナトリウム(DSS)を使用し、これは、血性下痢、体重減少、結腸の短縮化、および好中球浸潤を伴う粘膜潰瘍形成が認められる急性結腸炎を誘発する。DSS誘発性結腸炎は、組織学的に、リンパ様過形成、限局性の陰窩損傷、および上皮潰瘍形成を伴う、固有層中への炎症細胞の浸潤を特徴とする。これらの変化は、上皮に対するDSSの毒性作用に起因し、かつ、固有層細胞の食作用ならびにTNF- $\alpha$  およびIFN- $\gamma$  の産生によって発生すると考えられている。一般的に使用されているものの、ヒト疾患との関連性に関するDSSのメカニズムについてのいくつかの問題は、依然として解明されていない。DSSは、SCIDマウスのようなT細胞欠損動物において観察されるため、T細胞非依存性モデルとみなされている。

30

【0307】

これらのTNBSモデルまたはDSSモデルへの本発明の可溶性ポリペプチドの投与を用いて、胃腸疾患の症状を改善するため、および胃腸疾患の経過を変更するためのそれらの使用を評価することができる。さらに、これらの可溶性ポリペプチドによるIL-17Fおよび/またはIL-17Aの阻害または中和を示す結果は、それら(または同様の分子)もまた、結腸炎/IBDモデルの症状を改善するため、および疾患の経過を変更するために使用され得るという概念の証拠を提供する。

【0308】

4. 乾癬

乾癬は、700万人を超えるアメリカ人に発症する慢性皮膚病態である。乾癬は、新しい皮膚細胞が異常に増殖した結果、古い皮膚が十分な速さで剥がれ落ちずに、炎症を起こし、隆起し、かつ鱗屑を有する皮膚部分を生じる場合に発生する。最も一般的な型である尋常性乾癬は、銀白の鱗屑で覆われた、皮膚の炎症部分(「病変」)を特徴とする。乾癬は、少数のプラークに限定されるか、または中程度から広範囲の皮膚領域を含む場合があり、頭皮、膝、肘、および胴に最も一般的に現れる。極めて目立つが、乾癬は、接触感染性疾患ではない。これらの疾患の病因は、罹患組織の慢性的な炎症に関係する。本発明の可溶性ポリペプチドは、乾癬、他の炎症性皮膚疾患、皮膚アレルギーおよび粘膜アレルギー、ならびに関連した疾患における炎症および病理学的作用を減少させるための貴重な治療物質として役立ち得る。

40

【0309】

50



乾癬は、かなりの不快感を引き起こし得る、皮膚のT細胞性炎症性障害である。これは、治癒法が無く、かつあらゆる年齢の人々に発症する疾患である。乾癬は、ヨーロッパ人および北米人の人口の約2%に発症する。軽度の乾癬に罹患している個体は、しばしば、局所剤を用いて疾患を制御することができるが、世界中の100万人を超える患者は、紫外線療法または全身的免疫抑制療法を必要とする。残念ながら、紫外線放射は不便でリスクがあり、かつ、多くの治療法は毒性があるため、長期の使用には制限がある。さらに、患者は、通常、乾癬を再発し、症例によっては、免疫抑制療法の中止後すぐに、元に戻る。

#### 【0310】

本発明の可溶性ポリペプチドはまた、IL-17FまたはIL-17Aの循環レベルを検出するための診断システム内、および急性期炎症応答に関連したIL-17FまたはIL-17Aの検出において使用され得る。関連した態様において、本発明の可溶性ポリペプチドを用いて、循環中または局所的に作用しているIL-17FポリペプチドまたはIL-17Aポリペプチドを検出することができる。リガンドまたは受容体ポリペプチドのレベルの上昇または低下は、炎症または癌を含む病理学的状態を示している場合がある。IL-17Fは、関連する急性期炎症応答を誘導することが公知である。さらに、IL-17AまたはIL-17Fなどの急性期タンパク質または分子の検出は、ある種の疾患状態(例えば、喘息、乾癬、関節リウマチ、結腸炎、IBD、IBS)における慢性炎症性状態を示し得る。このような状態の検出は、疾患の診断を助けるのに役立ち、かつ、医師が適切な治療法を選択するのに役立つ。

#### 【0311】

本明細書において説明する他の疾患モデルに加えて、ヒト乾癬病変に由来する炎症組織に対する本発明の可溶性ポリペプチドの活性は、重症複合免疫不全(SCID)マウスモデルを用いてインビボで測定することができる。ヒト細胞が免疫不全マウスに移植された、いくつかのマウスモデルが開発されている(まとめて、異種移植モデルと呼ばれる);例えば、Cattan AR, Douglas E, Leuk. Res. 18:513-22, 1994、およびFlavell, DJ, Hematological Oncology 14:67-82, 1996を参照されたい。乾癬のインビボ異種移植モデルとして、ヒト乾癬皮膚組織をSCIDマウスモデルに移植し、かつ、適切なアンタゴニストでチャレンジする。さらに、当技術分野における他の乾癬動物モデルも、IL-17AアンタゴニストおよびIL-17Fアンタゴニストを評価するのに使用することができ、例えば、AGR129マウスモデルにヒト乾癬皮膚移植片を移植し、かつ、適切なアンタゴニストでチャレンジする(例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Boyman, O. et al., J. Exp. Med. オンライン出版番号20031482、2004を参照されたい)。IL-17FまたはIL-17AおよびIL-17Fの両方に結合し、それらの活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和する本発明の可溶性ポリペプチドが好ましいアンタゴニストであり、かつ、他のIL-17AアンタゴニストおよびIL-17Fアンタゴニストもこのモデルにおいて使用され得る。同様に、ヒト結腸炎、IBD、IBS、関節炎、または他の炎症性病変由来の組織または細胞をSCIDモデルにおいて使用して、本明細書において説明するIL-17AアンタゴニストおよびIL-17Fアンタゴニストの抗炎症特性を評価することもできる。

#### 【0312】

本発明の可溶性ポリペプチドを用いて炎症を消滅、遅延、または減少させるように設計された治療法は、ヒト炎症組織(例えば、乾癬病変など)を有するSCIDマウスまたは本明細書において説明する他のモデルに施すことによって試験することができる。治療の有効性は、当技術分野において周知の方法を用いて、処置集団における抗炎症作用の経時的な増大として測定され、かつ統計学的に評価される。いくつかの例示的な方法には、例えば、乾癬モデルにおいて、表皮の厚さ、真皮上層中の炎症細胞の数、および錯角化のグレードを測定することが含まれるが、それらに限定されるわけではない。このような方法は当技術分野において公知であり、かつ本明細書において説明される。例えば、Zeigler, M. et al. Lab Invest 81:1253, 2001; Zollner, T.M. et al. J. Clin. Invest. 109:671, 2002; Yamanaka, N. et al. Microbiol. Immunol. 45:507, 2001; Raychaudhuri, S.P. et al. Br. J. Dermatol. 144:931, 2001; Boehncke, W. H et al. Arch. Dermatol. Res. 291:104, 1999; Boehncke, W. H et al., J. Invest. Dermatol. 116:596, 2001; Nickolo

ff, B. J. et al. Am. J. Pathol. 146:580, 1995; Boehncke, W.H et al. J.Cutan. Pathol. 24:1, 1997; Sugai, J., M. et al. J. Dermatol. Sci. 17:85, 1998;およびVilladsen L.S. et al. J. Clin. Invest. 112:1571, 2003を参照されたい。また、フローサイトメトリー(またはPCR)のような周知の方法を用いて経時的に炎症をモニターして、試料中に存在する炎症細胞または損傷細胞の数、IBDに関するスコア(体重減少、下痢、直腸出血、結腸の長さ)、CIA RAモデルの足疾患スコアおよび炎症スコアを定量することもできる。例えば、このようなモデルにおいて試験するために適切な治療戦略には、可溶性IL-17RCもしくは可溶性IL-17RC/IL-17RA、または他のIL-17AアンタゴニストおよびIL-17Fアンタゴニスト(単独もしくは併用)、またはIL-17RCおよび/もしくはIL-17RAとそれらの対応するリガンドとの相互作用の混乱に基づいた関連する結合体もしくはアンタゴニストを用いる直接的治療が含まれる。

10

#### 【0313】

乾癬は、過形成表皮ケラチノサイトならびにCD4<sup>+</sup>記憶T細胞、好中球、およびマクロファージを含む浸潤性単核細胞を伴う慢性炎症性皮膚疾患である(Christophers, Int. Arch. Allergy Immunol., 110:199, 1996)。疾患を開始し、かつ疾患の病状を引き起こすにあたって、環境抗原が重要な役割を果たしていると現在考えられている。しかしながら、乾癬の病状をもたらすと考えられているのは自己抗原に対する寛容性の喪失である。樹状細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞は、病状を招く免疫応答をもたらす抗原提示および抗原認識において重要な役割を果たすと考えられている。本発明者らは、最近、CD4+CD45RB導入モデルに基づく乾癬モデルを開発した(Davenport et al., Internat. Immunopharmacol., 2:653-672)。

20

本発明の可溶性ポリペプチドをマウスに投与する。疾患スコア(皮膚病変、炎症性サイトカイン)が抑制される場合、乾癬におけるそれらの可溶性ポリペプチドの有効性が示される。

#### 【0314】

### 5. アトピー性皮膚炎

ADは、ヘルパーT細胞サブセット2(Th2)の活性化過剰サイトカインを特徴とする一般的な慢性炎症性疾患である。ADの正確な病因は不明であるが、活動過多のTh2免疫応答、自己免疫、感染、アレルゲン、および遺伝的素因を含む多数の要因が関係があるとされている。疾患の重要な特徴には、乾皮症(皮膚の乾燥)、そう痒症(皮膚の痒み)、結膜炎、炎症性皮膚病変、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)感染、血液好酸球増加症の亢進、血清IgEおよびIgG1の上昇、ならびにT細胞、肥満細胞、マクロファージ、および好酸球の浸潤を伴う慢性皮膚炎が含まれる。黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)によるコロニー形成または感染は、ADを増悪し、かつ、この皮膚疾患の慢性を持続させることが認識されている。

30

#### 【0315】

ADは喘息患者およびアレルギー性鼻炎患者において認められることが多く、しばしば、アレルギー性疾患の最初の症状発現である。西欧諸国の人口の約20%がこれらのアレルギー性疾患に罹患しており、先進諸国におけるADの発病率は理由が不明なものの上昇している。ADは典型的には小児期に始まり、しばしば、思春期から成人期まで持続し得る。ADの現在の治療法には、局所用コルチコステロイド、経口シクロスポリンA、タクロリムス(FK506軟膏)のような非コルチコステロイド免疫抑制薬、およびインターフェロンが含まれる。ADの治療法は多様であるが、多くの患者の症状は改善しないか、または患者は薬剤投与に対する副作用を有するため、他のより効果的な治療物質を探す必要がある。本発明の可溶性ポリペプチドは、アトピー性皮膚炎、炎症性皮膚病態、および本明細書において開示する他の炎症性状態など特定のヒト疾患の治療において、IL-17FおよびIL-17Aを中和するために使用することができる。

40

#### 【0316】

### 6. 喘息

IL-17は、アレルゲンによって誘導されるT細胞活性化および気道中への好中球流入において重要な役割を果たす。IL-17の受容体は気道中で発現され(Yao et al., Immunity 3:811(1995))、アレルギー性喘息においてIL-17によって媒介される好中球動員は、IL-17に

50

刺激されたヒト気管支上皮細胞(HBEC)およびヒト気管支線維芽細胞によって産生される化学誘引物質IL-8、GRO- $\alpha$ およびマクロファージ炎症タンパク質-2(MIP-2)によって大部分は誘導される(Yao et al., J Immunol 155:5483(1995)); Molet et al., J Allergy Clin Immunol 108:430(2001))。IL-17はまた、HBECを刺激して、好中球活性化因子であるIL-6を放出させ(Fossiez et al., J Exp Med 183:2593(1996)およびLinden et al., Int Arch Allergy Immunol 126:179(2001))、かつ、TNF- $\alpha$ と協同して、インビトロでのヒト好中球の生存を延長することも示されている(Laan et al., Eur Respir J 21:387(2003))。さらに、IL-17は、線維化促進(profibrotic)サイトカインであるIL-6およびIL-11、ならびに炎症メディエーターである顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)など気道の組織修復に関係があるとされているサイトカインの分泌を促進する能力によって、喘息における炎症応答を増幅することができる(Molet et al., J Allergy Clin Immunol 108:430(2001))。

10

20

30

40

50

#### 【0317】

臨床エビデンスにより、喘息の急性かつ重度の増悪が、気道における好中球の動員および活性化に関連していることが示されており、したがって、IL-17は、喘息において重要な役割を果たしている可能性が高い。軽度の喘息患者は、遊離の可溶性IL-17Aタンパク質の局所濃度の検出可能な増加を示す(Molet et al., J Allergy Clin Immunol 108:430(2001))のに対し、ブタの飼育舎(confinement)に曝露することによって重度の気道炎症を誘発させた健常なヒトボランティアは、気管支肺胞空間における遊離の可溶性IL-17Aタンパク質の濃度の顕著な増加を示す(Fossiez et al., J Exp Med 183:2593(1996)およびLinden et al., Int Arch Allergy Immunol 126:179(2001))。さらに、痰中のIL-17レベルは、気道の反応性亢進が増大した個体と相関関係があった(Barczyk et al., Respir Med 97:726(2003))。

#### 【0318】

気道応答性亢進の動物モデルにおいて、感作マウスに卵白アルブミンを長期的に吸入させると、気管支の好中球増加と共に、気管支の好酸球性炎症および炎症を起こした肺組織におけるIL-17 mRNA発現の早期の誘導が起こった(Hellings et al., Am J Respir Cell Mol Biol 28:42(2003))。抗IL-17モノクローナル抗体は、気管支への好中球流入を大きく減少させたが、気管支肺胞洗浄液および血清の両方におけるIL-5レベルを有意に上昇させ、かつ、アレルゲンに誘導された気管支への好酸球流入を悪化させたことから、IL-17Aが、抗原侵襲後の好中球および好酸球の蓄積のバランスを決定するのに関与している可能性があることが示唆される(同書)。

#### 【0319】

IL-17ファミリーのメンバーのうちで、IL-17FがIL-17Aに最も密接に関連している。IL-17Fによって媒介される生物活性は、IL-17Aのものに類似しており、IL-17Fは、IL-6、IL-8、およびG-CSFの産生を刺激する(Hurst et al., J Immunol 169:443(2002))。IL-17Fはまた、内皮細胞において、IL-2、形質転換増殖因子(TGF)- $\beta$ 、および単球走化性タンパク質(MCP)の産生も誘導する(Starnes et al., J Immunol 167:4137(2001))。同様に、アレルゲンチャレンジにより、アレルギー性喘息患者において局所的IL-17Fを増加させることができる(Kawaguchi et al., J Immunol 167:4430(2001))。マウス肺にIL-17Fを遺伝子導入すると、気管支肺胞空間中の好中球が増加するのに対し、IL-17F遺伝子を粘膜に移入すると、Agにより誘発された肺好中球増加およびメタコリンに対する気道応答性のレベルが上昇する(Oda, et al., Am J Respir Crit Care Med 171:12(2005))。

#### 【0320】

喘息以外に、いくつかの慢性炎症性気道疾患が、気道における好中球動員を特徴とし、IL-17は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、細菌性肺炎、および嚢胞性線維症などの呼吸器病態の病因において重要な役割を果たすことが報告されている(Linden et al., Eur Respir J 15:973(2000)、Ye et al., Am J Respir Cell Mol Biol 25:335(2001)、Rahman et al., Clin Immunol 115:268(2005))。抗IL-17A治療的分子および/または抗IL-17F治療的分子は、慢性炎症性気道疾患に有効であることを炎症のインビトロモデルにおいて実証するこ

とができる。IL-17Aおよび/またはIL-17Fによって誘導される、培養されたHBECまたは気管支線維芽細胞からのサイトカインおよびケモカイン産生を阻害するための、IL-17RC可溶性受容体ならびに本発明の抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれらに対する抗体などIL-17F活性および/またはIL-17A活性に対するアンタゴニストの能力は、IL-17Aおよび/またはIL-17F刺激に直接起因する炎症メディエーターの産生の防止におけるそのようなアンタゴニストの有効性の指標として使用することができる。本発明の可溶性ポリペプチドのようなIL-17F活性および/またはIL-17A活性に対するアンタゴニストを添加すると、炎症メディエーターの産生および発現が著しく減少する場合は、慢性の気道炎症に付随する炎症局面において有効であることが予想される。

【0321】

#### 7. 過敏性腸症候群(「IBS」)

過敏性腸症候群は、腹痛または腹部不快感および不規則な排便習慣を特徴とする疾患に相当する。IBS患者は、排便習慣に基づいて次の3つの主要なグループに特徴付けることができる:主に緩い便または頻繁な便を伴う者、主に硬い便またはまれな便を伴う者、および多様な便または正常な便を伴う者(Talley et al., 2002)。腸の運動性の変化、上皮機能の異常、便および腸内ガスの異常な通過、ならびにストレスが、症状の一因となり得るが、内臓過敏性が大半の患者において重要な特徴である。疼痛のシグナル伝達および求心性シグナルの中樞処理の乱れに影響を及ぼす遺伝因子が、特定の環境に曝露された後に個体をIBSに罹患しやすくすると仮定されている。また、研究により、結腸での炎症応答が、平滑筋および腸神経の感受性を高める一因となり、したがって、腸の感覚運動機能を乱す可能性があることが実証された(Collins et al., 2001)。IBSとIBDには臨床的な重複があり、IBS様症状は、IBDと診断される前の患者において頻繁に報告され、定着したIBDから寛解した患者では予想を上回るIBS症状がある。したがって、これらの状態は、予想を上回る頻度で共存してよく、または連続体上に、同じ範囲の別の端部にIBSおよびIBDが存在してよい。しかしながら、大半のIBS患者において、結腸の生検標本が正常と思われることに留意すべきである。それでもなお、IBSは、非常に多数の個体(2000年の米国での有病率は、約1600万人)に大きな影響を及ぼし、費用負担の合計は17億ドル(2000年)である。したがって、最も有病率が高く、かつ費用のかかる胃腸疾患および障害のうちで、IBSは、胃食道逆流症(GERD)に次いで2番目である。しかし、GERDとは違って、IBS治療は依然として満足できるものではなく(Talley et al., 2002; Farhadi et al., 2001; Collins et al., 2001)、IBSが未達成の医学的必要に明らかに相当することが実証されている。

【0322】

正常なホメオスタシスの中枢混乱(心理社会的)または末梢混乱(組織刺激、炎症、感染)に対する中枢神経系(CNS)中または腸中の神経回路、免疫回路、または神経免疫回路の応答性の亢進を仮定する、収束的(Converging)疾患のモデルが提案されている(Talley et al., 2002)。この亢進した応答性により、腸運動性、上皮機能(免疫、透過性)の調節不全、および内臓過敏性がもたらされ、その結果として、IBS症状が生じる。

【0323】

神経細胞を刺激する分子および炎症プロセスの開始に関与している分子の役割を含む、IBSの病因におけるいくつかの異なる分子の役割がある可能性がある。IL-17D、IL-17B、およびIL-31を含む、本発明者らの研究施設内で作製したいくつかの分子は、神経細胞による直接的なそれらの発現または神経細胞上でのそれらの受容体の発現の寄与により、神経細胞において存在し得る活性に関与していることが公知である。さらに、IL-17A、IL-17F、IL-23、およびIL-31を含む、いくつかのIL-17ファミリーメンバーおよび関連分子は、腸の炎症に関連付けられている。

【0324】

これらの分子の阻害物質の有効性は、疾患の動物モデルにおいてインビボで試験することができる。IBSの主要な特徴を再現し、中枢を標的とする刺激(ストレス)または末梢を標的とする刺激(感染、炎症)を伴ういくつかの動物モデルが提案されている。IBSの治療における阻害物質の有効性を判定するのに使用できるインビボ動物モデルの2つの例は、(

10

20

30

40

50

i) IBSのCNSを対象とする主要な病因に焦点を合わせたモデル(ストレスモデル)、および(i i) 腸を対象としたストレス誘導因子(すなわち、腸炎症、感染、または身体的ストレス)に焦点を合わせたモデルである。しかしながら、CNS内部または胃腸(GI)管中の事象は単独では起こらないこと、およびIBSの症状は、CNSからGIへのシグナル(逆もまた同じ)間の複雑な相互作用に起因する可能性が高いことに留意すべきである。

#### 【0325】

##### (J) 薬学的製剤

医薬用途の場合、本発明の可溶性ポリペプチドは、従来の方法に従って、非経口送達、特に静脈内送達または皮下送達用に製剤化される。静脈内投与は、ボーラス注射、例えばミニポンプもしくは他の適切な技術を用いる制御放出によって、または、1時間～数時間の典型的な期間に渡る輸注によって行われる。一般に、薬学的製剤は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、または5%デキストロース水溶液など薬学的に許容される担体と組み合わせて造血タンパク質を含む。製剤はさらに、バイアル表面などの上でのタンパク質損失を防止するために、1種または複数種の賦形剤、保存剤、可溶化剤、緩衝剤、アルブミンを含んでよい。このような併用療法を利用する場合、サイトカインは、単一の製剤中に混合してもよく、または別々の製剤中で投与してもよい。調剤方法は当技術分野において周知であり、例えば、参照により本明細書に組み入れられる「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Gennaro編、Mack Publishing Co., Easton PA, 1990において開示されている。治療用量は一般に、0.1mg/kg患者体重/日～100mg/kg患者体重/日、好ましくは0.5mg/kg/日～20mg/kg/日の範囲であり、正確な用量は、治療される病態の性質および重症度、患者の体質などを考慮に入れて、容認されている標準に従って臨床家が決定する。用量の決定は当業者のレベルの範囲内である。タンパク質は、一般に、化学療法もしくは骨髄移植後の最長28日の期間に渡って、または血小板数が20,000個/mm<sup>3</sup>超、好ましくは50,000個/mm<sup>3</sup>を超えるまで投与される。より一般的に、タンパク質は、1週間またはそれ未満に渡って、しばしば1日～3日間に渡って投与される。一般に、本発明の可溶性ポリペプチドの治療的有効量は、リンパ系または骨髄系の前駆細胞の増殖および/または分化の臨床的に有意な増大をもたらすのに十分な量であり、この増大は、成熟細胞(例えば、血小板または好中球)の循環レベルの上昇として顕在化する。したがって、血小板障害の治療は、血小板数が少なくとも20,000個/mm<sup>3</sup>、好ましくは50,000個/mm<sup>3</sup>に達するまで継続される。本発明の可溶性ポリペプチドはまた、IL-3、IL-6、およびIL-11;幹細胞因子;エリスロポエチン; G-CSFおよびGM-CSFなど他のサイトカインと組み合わせて投与することもできる。併用療法の治療計画において、他のサイトカインの1日量は一般的に以下のとおりである: EPO、150U/kg; GM-CSF、5lg/kg～15lg/kg; IL-3、1lg/kg～5lg/kg; およびG-CSF、1lg/kg～25lg/kg。例えば、EPOとの併用療法は、EPOレベルが低い貧血患者において適用される。

#### 【0326】

一般に、投与される可溶性ポリペプチドの投薬量は、患者の年齢、体重、身長、性別、全般的医学的状态、および既往歴などの因子に応じて変動すると考えられる。典型的には、約1pg/kg～10mg/kg(作用物質の量/患者の体重)の範囲の投薬量のこのような可溶性ポリペプチドをレシピエントに提供することが望ましいが、これより少ない投薬量または多い投薬もまた、状況に応じて投与してよい。

#### 【0327】

対象への本発明の可溶性ポリペプチドの投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜腔内、くも膜下腔内、局所カテーテルによる灌流、または直接的な病巣内注射でよい。治療用タンパク質を注射によって投与する場合、投与は、持続輸注によって、または単回ボーラスもしくは複数回ボーラスによって行ってよい。

#### 【0328】

その他の投与経路には、経口、粘膜、肺、および経皮が含まれる。経口送達は、ポリエステルマイクロスフェア、ゼインマイクロスフェア、プロテイノイドマイクロスフェア、ポリシアノアクリレートマイクロスフェア、および脂質ベースの系に適している(例えば、DiBaseおよびMorrel、「Oral Delivery of Microencapsulated Proteins」、Protein D

10

20

30

40

50

elivery:Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、255~288頁(Plenum Press 1997)を参照されたい)。鼻腔内送達の実現可能性は、インスリン投与のような様式によって示される(例えば、Hinchcliffeおよび Illum、Adv. Drug Deliv. Rev. 35:199(1999)を参照されたい)。可溶性IL-17RC抗体または抗IL-17RC抗体を含む乾燥粒子または液体粒子を調製し、乾燥粉末分散装置、液体エアロゾル発生装置、またはネブライザーを用いて吸入することができる(例えば、PettitおよびGombotz、TIBTECH 16:343(1998);Patton et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 35:235(1999))。このアプローチは、エアロゾル化したインスリンを肺に送達する手持ち型電子吸入器であるAERX糖尿病管理システムによって例示される。研究により、低周波超音波の助けを借りて48,000 kDaほどの大型タンパク質が皮膚を通過して治療的濃度で送達されることが示されており、これは、経皮投与の実現可能性を示す(Mitragotri et al., Science 269:850(1995))。エレクトロポレーションを用いる経皮送達は、本発明の可溶性ポリペプチドを投与するための別の手段を提供する (Potts et al., Pharm. Biotechnol. 10:213(1997))。

10

20

30

40

50

#### 【0329】

本発明の可溶性ポリペプチドを含む薬学的組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法に従って調製することができ、それにより、治療用タンパク質は薬学的に許容される担体との混合物中に混合される。組成物は、その投与がレシピエント患者によって許容され得る場合、「薬学的に許容される担体」とであると言われる。滅菌リン酸緩衝生理食塩水は、薬学的に許容される担体の一例である。他の適切な担体は当業者に周知である。例えば、Gennaro(編)、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第19版(Mack Publishing Company 1995)を参照されたい。

#### 【0330】

治療法のために、本発明の可溶性ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体は、治療的有効量で患者に投与される。本発明の治療的分子および薬学的に許容される担体の組合せは、投与される量が生理学的に有意である場合、「治療的有効量」で投与されると言われる。作用物質は、その存在により、レシピエント患者の生理機能に検出可能な変化をもたらされる場合、生理学的に有意である。例えば、炎症を治療するのに使用される作用物質は、その存在によって炎症応答が軽減される場合、生理学的に有意である。

#### 【0331】

本発明の可溶性ポリペプチドを含む薬学的組成物は、液状形態で、エアロゾルで、または固形形態で提供され得る。液状形態の例は、注射液剤および経口懸濁剤である。例示的な固形形態には、カプセル剤、錠剤、および制御放出形態が含まれる。後者の形態の例は、ミニ浸透圧ポンプおよび埋め込み剤である(Bremer et al., Pharm. Biotechnol. 10:239(1997); Ranade、「Implants in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems、RanadeおよびHollinger(編)、95~123頁(CRC Press 1995); Bremer et al.,「Protein Delivery with Infusion Pumps」、Protein Delivery:Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、239~254頁(Plenum Press 1997); Yewey et al.,「Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant」、Protein Delivery:Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、93~117頁(Plenum Press 1997))。

#### 【0332】

リポソームは、静脈内に、腹腔内に、くも膜下腔内に、筋肉内に、皮下に、または、経口投与、吸入、もしくは鼻腔内投与を介して、対象に治療的ポリペプチドを送達するための1つの手段を提供する。リポソームは、水溶性の区画を取り囲む1つまたは複数の脂質二重層からなる顕微鏡的小胞である(一般に、Bakker-Woudenberg et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(補遺1):S61(1993)、Kim, Drugs 46:618(1993)、およびRanade、「Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers」、Drug Delivery Systems、RanadeおよびHollinger(編)、3~24頁(CRC Press 1995)を参照されたい)。リポソームは、組成が細胞膜に類似しており、結果として、リポソームは安全に投与ことができ、かつ生分解性である。調製方法によって、リポソームは、単層または多重層でよく、かつ、リポソームのサイズは様々でよく、直径は0.02  $\mu\text{m}$ ~10  $\mu\text{m}$ 超の範囲である。様々

な作用物質をリボソーム中に封入することができる。疎水性作用物質は二重層に分配し、親水性作用物質は内側の水溶性空間内に分配する(例えば、Machy et al., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology*(John Libbey 1987)、およびOstro et al., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576(1989)を参照されたい)。さらに、リボソームサイズ、二重層の数、脂質組成、ならびにリボソームの電荷および表面の特徴を変更することによって、封入された作用物質の治療的有効性を制御することも可能である。

#### 【0333】

リボソームは、実質的に任意のタイプの細胞に吸着し、次いで、封入された作用物質をゆっくりと放出することができる。あるいは、吸着されたリボソームは、食作用を有する細胞によるエンドサイトーシスを受け得る。エンドサイトーシスの後に、リボソーム脂質のリソソーム内分解および封入された作用物質の放出が続く(Scherphof et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446:368(1985))。静脈内投与後、小型リボソーム( $0.1\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ )は、典型的には、肝臓および脾臓に主に位置する網内系の細胞によって取り込まれるが、 $3.0\mu\text{m}$ より大きいリボソームは、肺に蓄積される。網内系の細胞による小型リボソームのこの選択的取り込みは、マクロファージおよび肝臓の腫瘍に化学療法剤を送達するために用いられている。

10

#### 【0334】

網内系は、大量のリボソーム粒子による飽和、または薬理学的手段による選択的マクロファージ不活化を含むいくつかの方法によって回避することができる(Claassen et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 802:428(1984))。さらに、糖脂質またはポリエチレングリコールで誘導体化したリン脂質をリボソーム膜中に組み込むと、網内系による取込みの有意な減少が起こることが示されている(Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133(1991); Allen et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9(1993))。

20

#### 【0335】

リボソームはまた、リン脂質組成を変更することによって、または受容体もしくはリガンドをリボソーム中に挿入することによって、特定の細胞または器官を標的とするように調製することもできる。例えば、高い含有量の非イオン性界面活性剤を用いて調製されたリボソームは、肝臓を標的とするために用いられている(Hayakawa et al., 日本国特許第04-244,018号; Kato et al., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960(1993))。これらの製剤は、大豆ホスファチジルコリン、 $\alpha$ -トコフェロール、およびエトキシル硬化ヒマシ油(HCO-60)をメタノール中で混合し、混合物を真空下で濃縮し、次いで、水で混合物を溶解することによって調製された。ダイズ由来ステリルグルコシド混合物(SG)およびコレステロール(Ch)を含むジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)のリボソーム製剤もまた、肝臓を標的とすることが示されている(Shimizu et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881(1997))。

30

#### 【0336】

あるいは、抗体、抗体断片、炭水化物、ビタミン、および輸送タンパク質など様々なターゲットリガンドをリボソームの表面に結合させてもよい。例えば、リボソームを分枝型のガラクトシル脂質誘導体で修飾して、肝臓細胞表面で専ら発現される、アシアロ糖タンパク質(ガラクトース)受容体を標的にさせることができる(KatoおよびSugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287, (1997)、Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259, (1997))。同様に、Wu et al., *Hepatology* 27:772(1998)では、アシアロフェツインでリボソームを標識すると、リボソームの血漿半減期が短縮され、かつ、アシアロフェツイン標識リボソームの肝細胞による取込みが大幅に増強されたことが示された。一方で、分枝型ガラクトシル脂質誘導体を含むリボソームの肝臓蓄積は、アシアロフェツインを前もって注射することにより阻害され得る(Murahashi et al., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259(1997))。ポリアコニチル化ヒト血清アルブミンリボソームは、肝臓細胞にリボソームをターゲティングするための別のアプローチを提供する(Kamps et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681(1997))。さらに、Geho, et al.の米国特許第4,603,044号では、肝臓の特殊な代謝細胞に関連した肝胆道受容体に対する特異性を有する、肝細胞を対象とするリボソーム小胞送達系を説明している。

40

50

## 【0337】

組織ターゲティングに対するより一般的なアプローチでは、標的細胞は、標的細胞によって発現されるリガンドに特異的なビオチン化抗体で前標識される (Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99(1998))。遊離抗体を血漿から除去した後、ストレプトアビジンを結合させたりポソームが投与される。別のアプローチでは、ターゲティング抗体がリポソームに直接結合される (Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99(1998))。

## 【0338】

ポリペプチドおよび抗体は、タンパク質マイクロカプセル化の標準的技術を用いて、リポソーム内に封入され得る (例えば、Anderson et al., Infect. Immun. 31:1099(1981)、Anderson et al., Cancer Res. 50:1853(1990)、およびCohen et al., Biochim. Biophys. Acta 1063:95(1991)、Alving et al. 「Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies」、Liposome Technology、第2版、第3巻、Gregoriadis(編)、317頁 (CRC Press 1993)、Wassef et al., Meth. Enzymol. 149:124(1987)を参照されたい)。上記のように、治療的に有用なリポソームは、様々な成分を含んでよい。例えば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含んでよい (Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9(1993))。

## 【0339】

分解性ポリマーマイクロスフェアは、治療タンパク質の高い全身レベルを維持するために設計された。マイクロスフェアは、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLG)、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)、非生分解性酢酸エチルビニルポリマーなどの分解性ポリマーから調製され、その際、タンパク質はポリマー中に閉じ込められる (GombotzおよびPettit, Bioconjugate Chem. 6:332(1995); Ranade, 「Role of Polymers in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems、RanadeおよびHollinger(編)、51~93頁 (CRC Press 1995); Roskos およびMaskiewicz, 「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery」、Protein Delivery:Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、45~92頁 (Plenum Press 1997); Bartus et al., Science 281:1161(1998); PutneyおよびBurke, Nature Biotechnology 16:153(1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:548(1998))。ポリエチレングリコール(PEG)でコーティングされたナノスフェアもまた、治療用タンパク質の静脈内投与のための担体を提供し得る (例えば、Gref et al., Pharm. Biotechnol. 10:167(1997)を参照されたい)。

## 【0340】

本発明はまた、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体の可溶性IL-17RC受容体または可溶性IL-17RC/IL-17RA受容体など、IL-17Aおよび/またはIL-17F結合活性を有し、前述したようにポリマーと結合している、化学的に修飾されたポリペプチドも企図する。

## 【0341】

他の剤形は、例えば、AnselおよびPopovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems、第5版 (Lea&Febiger 1990)、Gennaro(編)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第19版 (Mack Publishing Company 1995)によって、かつ、RanadeおよびHollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996)によって示されているように、当業者によって考案され得る。

## 【0342】

例として、薬学的組成物は、本発明の可溶性ポリペプチドの内の1つを含む容器を含むキットとして供給されてよい。治療的ポリペプチドは、単回投与もしくは複数回投与用の注射液剤の形態で、または、注射前に溶解される滅菌粉末として、提供され得る。あるいは、このようなキットは、治療的ポリペプチドを投与するための乾燥粉末分散装置、液体エアロゾル発生装置、またはネブライザーも含んでよい。このようなキットは、薬学的組成物の適応症および使用法に関する書面情報をさらに含んでよい。さらに、このような情報は、組成物がIL-17RCまたはIL-17RAに対する過敏性が公知である患者には禁忌であるという記載も含んでよい。



## 【0343】

本発明の可溶性ポリペプチドを含む薬学的組成物は、液状形態で、エアロゾルで、または固形形態で提供され得る。液状形態の例は、注射液剤、エアロゾル、液滴、トポロジー (topological) 液剤、および経口懸濁剤である。例示的な固形形態には、カプセル剤、錠剤、および制御放出形態が含まれる。後者の形態の例は、ミニ浸透圧ポンプおよび埋め込み剤である (Bremer et al., Pharm. Biotechnol. 10:239(1997); Ranade, 「Implants in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems、RanadeおよびHollinger(編)、95~123頁 (CRC Press 1995); Bremer et al., 「Protein Delivery with Infusion Pumps」、Protein Delivery:Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、239~254頁 (Plenum Press 1997); Yewey et al., 「Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant」、Protein Delivery:Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、93~117頁 (Plenum Press 1997))。他の固形形態には、クリーム剤、パスタ剤、および他のトポロジー外用剤 (topological application) などが含まれる。

## 【0344】

リポソームは、静脈内に、腹腔内に、くも膜下腔内に、筋肉内に、皮下に、または、経口投与、吸入、もしくは鼻腔内投与を介して、対象に治療的ポリペプチドを送達するための1つの手段を提供する。リポソームは、水溶性の区画を取り囲む1つまたは複数の脂質二重層からなる顕微鏡的小胞である (一般に、Bakker-Woudenberg et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(補遺1):S61(1993)、Kim, Drugs 46:618(1993)、およびRanade, 「Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers」、Drug Delivery Systems、RanadeおよびHollinger(編)、3~24頁 (CRC Press 1995)を参照されたい)。リポソームは、組成が細胞膜に類似しており、結果として、リポソームは安全に投与することができ、かつ生分解性である。調製方法によって、リポソームは、単層または多重層でよく、かつ、リポソームのサイズは様々でよく、直径は0.02  $\mu\text{m}$ ~10  $\mu\text{m}$ 超の範囲である。様々な作用物質をリポソーム中に封入することができる。疎水性作用物質は二重層に分配し、親水性作用物質は内側の水溶性空間内に分配する (例えば、Machy et al., Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987)、およびOstro et al., American J. Hosp. Pharm. 46:1576(1989)を参照されたい)。さらに、リポソームサイズ、二重層の数、脂質組成、ならびにリポソームの電荷および表面の特徴を変更することによって、封入された作用物質の治療的有効性を制御することも可能である。

## 【0345】

リポソームは、実質的にどんなタイプの細胞にも吸着し、次いで、封入された作用物質をゆっくりと放出することができる。あるいは、吸着されたりリポソームは、食作用を有する細胞によるエンドサイトーシスを受け得る。エンドサイトーシスの後に、リポソーム脂質のリソソーム内分解および封入された作用物質の放出が続く (Scherphof et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 446:368(1985))。静脈内投与後、小型リポソーム (0.1  $\mu\text{m}$ ~1.0  $\mu\text{m}$ ) は、典型的には、肝臓および脾臓に主に位置する網内系の細胞によって取り込まれるが、3.0  $\mu\text{m}$ より大きいリポソームは、肺に蓄積される。網内系の細胞による小型リポソームのこの選択的取り込みは、マクロファージおよび肝臓の腫瘍に化学療法剤を送達するために用いられている。

## 【0346】

網内系は、大量のリポソーム粒子による飽和、または薬理学的手段による選択的マクロファージ不活化を含むいくつかの方法によって回避することができる (Claassen et al., Biochim. Biophys. Acta. 802:428(1984))。さらに、糖脂質またはポリエチレングリコールで誘導体化したリン脂質をリポソーム膜中に組み込むと、網内系による取込みの有意な減少が起こることが示されている (Allen et al., Biochim. Biophys. Acta. 1068:133(1991); Allen et al., Biochim. Biophys. Acta. 1150:9(1993))。

## 【0347】

リポソームはまた、リン脂質組成を変更することによって、または受容体もしくはリガンドをリポソーム中に挿入することによって、特定の細胞または器官を標的とするように

調製することもできる。例えば、高い含有量の非イオン性界面活性剤を用いて調製されたリポソームは、肝臓を標的とするために用いられている(Hayakawa et al., 日本国特許第04-244,018号;Kato et al., Biol. Pharm. Bull. 16:960(1993))。これらの製剤は、大豆ホスファチジルコリン、 $\alpha$ -トコフェロール、およびエトキシ化硬化ヒマシ油(HCO-60)をメタノール中で混合し、混合物を真空下で濃縮し、次いで、水で混合物を溶解することによって調製された。ダイズ由来ステリルグルコシド混合物(SG)およびコレステロール(Ch)を含むジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)のリポソーム製剤もまた、肝臓を標的とすることが示されている(Shimizu et al., Biol. Pharm. Bull. 20:881(1997))。

#### 【0348】

あるいは、抗体、抗体断片、炭水化物、ビタミン、および輸送タンパク質など様々なターゲットリガンドをリポソームの表面に結合させてもよい。例えば、リポソームを分枝型のガラクトシル脂質誘導体で修飾して、肝臓細胞表面で専ら発現される、アシアロ糖タンパク質(ガラクトース)受容体を標的にさせることができる(KatoおよびSugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:287(1997)、Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull. 20:259(1997))。同様に、Wu et al., Hepatology 27:772(1998)では、アシアロフェツインでリポソームを標識すると、リポソームの血漿半減期が短縮され、かつ、アシアロフェツイン標識リポソームの肝細胞による取込みが大幅に増強されたことが示された。一方で、分枝型ガラクトシル脂質誘導体を含むリポソームの肝臓蓄積は、アシアロフェツインを前もって注射することにより阻害され得る(Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull. 20:259(1997))。ポリアコニチル化ヒト血清アルブミンリポソームは、肝臓細胞にリポソームをターゲティングするための別のアプローチを提供する(Kamps et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:11681(1997))。さらに、Gehoらの米国特許第4,603,044号では、肝臓の特殊な代謝細胞に関連した肝胆道受容体に対する特異性を有する、肝細胞を対象とするリポソーム小胞送達系を記載している。

#### 【0349】

組織ターゲティングに対するより一般的なアプローチでは、標的細胞は、標的細胞によって発現されるリガンドに特異的なビオチン化抗体で前標識される(Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99(1998))。遊離抗体を血漿から除去した後、ストレプトアビジンを結合させたりポソームが投与される。別のアプローチでは、ターゲティング抗体がリポソームに直接結合される(Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99(1998))。

#### 【0350】

本発明の可溶性ポリペプチドは、タンパク質マイクロカプセル化の標準的技術を用いて、リポソーム内に封入され得る(例えば、Anderson et al., Infect. Immun. 31:1099(1981)、Anderson et al., Cancer Res. 50:1853(1990)、およびCohen et al., Biochim. Biophys. Acta 1063:95(1991)、Alving et al., 「Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies」、Liposome Technology、第2版、第3巻、Gregoriadis(編)、317頁(CRC Press 1993)、Wassef et al., Meth. Enzymol. 149:124(1987)を参照されたい)。上記のように、治療的に有用なリポソームは、様々な成分を含んでよい。例えば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含んでよい(Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9(1993))。

#### 【0351】

分解性ポリマーマイクロスフェアは、治療タンパク質の高い全身レベルを維持するために設計された。マイクロスフェアは、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLG)、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)、非生分解性酢酸エチルビニルポリマーなどの分解性ポリマーから調製され、その際、タンパク質はポリマー中に閉じ込められる(GombotzおよびPettit, Bioconjugate Chem. 6:332, 1995; Ranade, 「Role of Polymers in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems、RanadeおよびHollinger(編)、51~93頁(CRC Press 1995);RoskosおよびMaskiewicz, 「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery」、Protein Delivery: Physical Systems、SandersおよびHendren(編)、45~92頁(Plenum Press 1997);Bartus et al., Science 281:1161(1998);PutneyおよびBurke, Na

10

20

30

40

50

ture Biotechnology 16 : 153(1998);Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2 : 548(1998))。ポリエチレングリコール(PEG)でコーティングされたナノスフェアもまた、治療用タンパク質の静脈内投与のための担体を提供し得る(例えば、Gref et al., Pharm. Biotechnol. 10 : 167(1997)を参照されたい)。

#### 【0352】

他の剤形は、例えば、AnselおよびPopovich、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems、第5版(Lea&Febiger 1990)、Gennaro(編)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第19版(Mack Publishing Company 1995)によって、ならびにRanadeおよびHollinger、Drug Delivery Systems(CRC Press 1996)によって示されているように、当業者によって考案され得る。

#### 【0353】

本発明は、本発明の可溶性ポリペプチドの組成物、ならびに本明細書において説明する該ポリペプチドを含む方法および治療的使用を企図する。このような組成物は、担体をさらに含んでよい。担体は、従来の有機担体または無機担体でよい。担体の例には、水、緩衝液、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、およびトウモロコシ油などが含まれる。

#### 【0354】

#### (K)トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウスは、全組織において、または組織特異的もしくは組織優先的な調節エレメントの制御下で、IL-17F遺伝子、IL-17A遺伝子、IL-17RA遺伝子、またはIL-17RC遺伝子のいずれかを過剰発現するように操作することができる。これらの過剰産生マウスは、過剰発現に起因する表現型を特徴付けるために使用することができ、かつ、トランスジェニック動物は、過剰なIL-17F、IL-17A、IL-17RA遺伝子、またはIL-17RCによって引き起こされるヒト疾患のモデルとして役立ち得る。また、これらのうちいずれかを過剰発現するトランスジェニックマウスは、大型動物の乳または血液中の本発明の任意の可溶性ポリペプチドのようなIL-17RAまたはIL-17RCを作製するためのモデルバイオリクターも提供する。トランスジェニックマウスを作製するための方法は当業者に周知である(例えば、Jacob、「Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice」、Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice、Jacob(編)、111~124頁(Academic Press, Ltd. 1994)、MonastorskyおよびRobl(編)、Strategies in Transgenic Animal Science(ASM Press 1995)、ならびにAbbudおよびNilson、「Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice」、Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression、FernandezおよびHoeffler(編)、367~397頁(Academic Press, Inc. 1999)を参照されたい)。

#### 【0355】

例えば、IL-17RC遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製するための方法は、繁殖力のある成体雄マウス(種マウス)(B6C3f1、2月齢~8月齢(Taconic Farms, Germantown, NY))、精管切除された雄マウス(繁殖不能)(B6D2f1、2月齢~8月齢(Taconic Farms))、思春期前の妊娠可能な雌マウス(ドナー)(B6C3f1、4週齢~5週齢(Taconic Farms))、および妊娠可能な成体雌マウス(レシピエント)(B6D2f1、2月齢~4月齢、(Taconic Farms))を用いて始めることができる。ドナーを1週間順化させ、次いで、約8IU/マウスの妊馬血清ゴナドトロピン(Sigma Chemical Company; St. Louis, MO)を腹腔内注射し、かつ、46~47時間後、8IU/マウスのヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG(Sigma))を腹腔内注射して、過剰排卵を誘導する。ホルモン注射の後に、ドナーを種マウスと交尾させる。排卵は、一般に、hCG注射から13時間以内に起こる。交尾は、交尾後の朝に膣栓の存在によって確認する。

#### 【0356】

受精卵は、外科用スコープのもとで採取する。輸卵管を採取し、ヒアルロニダーゼ(Sigma)を含む尿検査スライドに卵を放出させる。ヒアルロニダーゼ中で1回、ならびに、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、および90%N<sub>2</sub>と共に37℃でインキュベートしておいたホイットン(Whitten)の

W640培地(例えば、MeninoおよびO'Claray、Biol.Reprod. 77:159(1986)、ならびにDienhartおよびDowns、Zygote 4:129(1996)によって記述されている)中で2回、卵を洗浄する。次いで、マイクロインジェクションするまで、卵を37℃/5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で保存する。

【0357】

IL-17RCをコードする配列を含むプラスミドDNA 10マイクログラム~20マイクログラムを直線化し、ゲル精製し、かつ、マイクロインジェクション用に、10mM Tris-HCl(pH7.4)、0.25mM EDTA(pH8.0)中に再懸濁して最終濃度5ナノグラム/マイクロリットル~10ナノグラム/マイクロリットルにする。例えば、IL-17RCをコードする配列はSEQ ID NO:2のアミノ酸21~452残基目を含むポリペプチドをコードすることができる。

10

【0358】

温かいCO<sub>2</sub>平衡化鉱油で覆われたW640培地の液滴中に含まれる採取した卵に、プラスミドDNAを微量注入する。DNAを注射針中に吸い上げ(内径0.75mm、外径1mmのホウケイ酸ガラス毛细管から引っ張る)、個々の卵中に注射する。各卵の一倍体前核の一方または両方に、注射針を貫通させる。

【0359】

ピコリットルのDNAを前核中に注入し、かつ、核小体と接触しないように注射針を引き抜く。すべての卵に注入するまで、この手順を繰り返す。成功裡に微量注入された卵を、前もって気体を供給したW640培地を入れた器官組織培養皿中に移し、37℃/5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で一晩保管する。

20

【0360】

翌日、2細胞期胚を偽妊娠レシピエントに移入する。レシピエントは、精管切除された繁殖不能マウスと交尾させた後に、交尾栓の存在によって確認する。レシピエントに麻酔をかけ、背部左側を剪毛し、かつ、外科用顕微鏡に移す。胸郭、鞍状部、および後肢によって輪郭を描かれた腹部領域の中央、すなわち膝と脾臓の中間の皮膚および筋肉壁を通る小切開部を作る。小さな外科用ドレープ上に生殖器官を露出させる。脂肪パッドを外科用ドレープ上に広げ、小型止血小鉗子(Roboz, Rockville, MD)を脂肪パッドに取り付け、かつ、マウスの背中の上にぶら下がったままにして、器官が中に戻るのを防ぐ。

【0361】

鉱油、続いて交互にW640および気泡を含む細い移入ピペットを用いて、前日の注入から得られる12~17個の健常な2細胞期胚をレシピエント中に移入する。膨らんだ膨大部の位置を特定し、膨大部と囊の間の輸卵管を保持し、膨大部にも囊にも傷をつけないように確認しつつ、囊の近くの輸卵管に28g針で切れ目を入れる。

30

【0362】

輸卵管中の切れ目にピペットを入れ、胚を吹き入れて、最初の気泡がピペットから出て行くのを可能にする。脂肪パッドを穏やかに腹膜中に押し入れ、生殖器官を中に戻らせる。腹腔壁を一針縫って閉じ、皮膚を創傷クリップで閉じる。37℃のスライドウォーマー上で最低4時間、マウスを回復させる。

【0363】

レシピエントを2匹1組でケージに戻し、19日~21日間の妊娠期間を与える。出産後、19日~21日間の出産後期間を与えた後、離乳する。離乳マウスの性別を区別し、別々の性別ケージに入れ、かつ、清潔なハサミを用いて、(遺伝子タイピングのために使用する)0.5cm生検を尾部から切り取る。

40

【0364】

例えば、QIAGEN DNEASYキットを製造業者の取扱い説明書に従って用いて、尾部小片からゲノムDNAを調製する。IL-17RC遺伝子または同じプラスミド中に導入された選択マーカ-遺伝子を増幅するように設計されたプライマーを用いるPCRによってゲノムDNAを解析する。動物がトランスジェニックであることを確認した後、雌トランスジェニックマウスを野生型雄マウスと一緒にすることによって、または雄トランスジェニックマウスを1匹もしくは2匹の野生型雌マウスと一緒にすることにより、それらを戻し交雑して近交系にす

50

る。仔マウスが生まれ、離乳すると、性別を分け、遺伝子タイピングのために尾部を切り取る。

【0365】

生動物における導入遺伝子の発現を確認するために、部分的肝切除を実施する。剣状突起(zyphoid process)の真下の上腹部から外科的調製物を作製する。無菌的技法を用いて、胸骨下に1.5cm~2cmの小切開を行い、肝臓の左側葉を露出させる。4-0シルクで下葉の周りを縛って、体腔の外側にそれを固定する。非外傷性クランプを用いて、結び目を保持しつつ、吸収性のDexon(American Cyanamid; Wayne, NJ.)の第2の輪を第1の結び目の近位に作る。遠位切断をDexonの結び目から行い、約100mgの切除された肝臓組織を、無菌ペトリ皿に入れる。切除された肝臓切片を、14mlのポリプロピレン製丸底試験管に移し、液体窒素中で急速凍結し、次いで、ドライアイス上で保存する。手術部位を縫合および創傷クリップによって閉じ、動物のケージを37℃の加熱パッド上に手術後24時間置く。手術後、動物を毎日検査し、創傷クリップを手術後7日~10日目に取り外す。IL-17RC mRNAの発現レベルを、RNA溶液ハイブリダイゼーションアッセイ法またはポリメラーゼ連鎖反応法を用いて、個々のトランスジェニックマウスについて検査する。

10

【0366】

IL-17F、IL-17A、IL-17RA、またはIL-17RCを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製することに加えて、これらの遺伝子のうちいずれかを異常に少なく発現するか、または全く発現しないトランスジェニックマウスを設計することも有用である。このようなトランスジェニックマウスは、IL-17F、IL-17A、IL-17RA、またはIL-17RCの欠失に関連する疾患に関する有用なモデルを提供する。上述したように、IL-17RC遺伝子発現は、アンチセンス遺伝子、リボザイム遺伝子、または外部ガイド配列遺伝子を用いて阻害することができる。例えば、IL-17RC遺伝子を過小発現するトランスジェニックマウスを作製するためには、このような阻害配列にIL-17RC mRNAを標的とさせる。特定の遺伝子を異常に低く発現するトランスジェニックマウスを作製するための方法は、当業者に公知である(例えば、Wu et al., 「Gene Underexpression in Cultured Cells and Animals by Antisense DNA and RNA Strategies」、Methods in Gene Biotechnology、205~224頁(CRC Press 1997)を参照されたい)。

20

【0367】

IL-17RC遺伝子発現をほとんどまたは全く有さないトランスジェニックマウスを作製するための代替アプローチは、少なくとも1つの正常なIL-17RC対立遺伝子が非機能的IL-17RCによって置換されているマウスを作製することである。非機能的IL-17RCを設計する1つの方法は、選択マーカー遺伝子のような別の遺伝子を、IL-17RCをコードする核酸分子内に挿入することである。これらのいわゆる「ノックアウトマウス」を作製するための標準的な方法は、当業者に公知である(例えば、Jacob, 「Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice」、Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice、Jacob(編)、111~124頁(Academic Press, Ltd. 1994)、およびWu et al., 「New Strategies for Gene Knockout」、Methods in Gene Biotechnology、339~365頁(CRC Press 1997))を参照されたい)。

30

【0368】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに例示される。

40

【0369】

実施例1

IL-17RC遺伝子の発現

ヒト多組織プロット(CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)を用いてノーザン解析を実施した。ゲル精製したPCR産物から2つのプローブを作製した。第1のプローブはZC21798 (5' CGG CGT GGT GGT CTT GCT CTT 3'; SEQ ID NO:8)および

ZC21808 (5' TCC CGT CCC CCG CCC CAG GTC 3'; SEQ ID NO:31)

をプライマーとして用いて作製した。Amersham(Arlington Heights, IL)社製のMultiprim

50

e標識キットを製造業者のプロトコルに従って使用して、このプローブを放射性標識した。このプローブを、NUCTRAPプッシュカラム (STRATAGENE, La Jolla, CA) を用いて精製した。EXPRESSHYB (CLONTECH) 溶液を、ノーザンブロット用のプレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液として用いた。ハイブリダイゼーションは65℃で一晩実施した。ハイブリダイゼーション後、以下のように0.1% SDSおよびSSCを含む溶液中でそれぞれ30分間、ブロットを洗浄した: 2×SSC中、室温で2回; 0.1×SSC中、50℃で3回; 0.1×SSC中、55℃で1回; および0.1×SSC中、65℃で1回。これらの結果から、IL-17RC遺伝子が甲状腺、副腎、前立腺、および肝臓組織において強く発現され、心臓、小腸、胃、および気管組織においてはより低い程度で発現されることが実証された。一方、脳、胎盤、肺、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、結腸、末梢血白血球、脊髄、リンパ節、および骨髄では、ほとんどまたは全く発現されない。

10

#### 【0370】

##### 実施例2

PCRを用いた、細胞株パネルにおけるmRNAの分布

全RNAを、施設内で増殖させた休止中かつ刺激された細胞株から精製し、製造業者の取り扱い説明書に従ってQiagen (Valencia, CA) RNeasyキットを用いて、または酸-フェノール精製プロトコル (Chomczynski および Sacchi, Analytical Biochemistry, 162: 156-9, 1987) を用いて、精製した。Agilent Bioanalyzerでアリコート进行分析することによって、RNAの質を評価した。RNAが顕著に分解していた場合は、続いて第1鎖cDNAを作製するためにそれを使用しなかった。混入ゲノムDNAの存在は、遺伝子間ゲノムDNAの単一部位を増幅するプライマーである

20

zc41011 (5'-CTCTCCATCCTTATCTTTTCATCAAC 3'; SEQ ID NO:32) および zc41012 (5'-CTCTCTGCTGGCTAAACAAAACAC 3'; SEQ ID NO:33)

を用いて、RNAのアリコートに対するPCRアッセイ法を実施することによって評価した。混入ゲノムDNAを分析するためのPCR条件は、以下のとおりであった: 10×緩衝液2.5 μl および Advantage 2 cDNAポリメラーゼミックス (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 0.5 μl、2.5mM dNTPミックス (Applied Biosystems, Foster City, CA) 2 μl、10×Rediload (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2.5 μl、ならびに20 μM zc41011 および zc41012 0.5 μl、最終体積25 μl。サイクリング条件は、94℃で20秒; 94℃で20秒、60℃で1分20秒を40サイクル、および72℃で7分を1サイクルであった。各反応物10 μlをアガロースゲル電気泳動に供し、混入ゲノムDNAに由来するPCR産物の存在に関してゲルを検査した。混入ゲノムDNAが観察された場合、製造業者の取り扱い説明書に従ってDNAフリー試薬 (Ambion, Inc, Austin, TX) を用いて、全RNAをDNアーゼ処理し、次いで、前述のように再試験した。混入ゲノムDNAを含まないと思われるRNAのみを、続いて第1鎖cDNAの作製に使用した。

30

#### 【0371】

82種のヒト細胞株に由来する全RNA 20 μgにそれぞれH<sub>2</sub>Oを加えて98 μlにし、次いで、それぞれ全RNA 10 μgを含む49 μlアリコート2つに分割し、かつ、96ウェルのPCRプレート2つに入れた。各アリコートに次の第1鎖cDNA合成用の試薬 (Invitrogen First Strand cDNA Synthesis System, Carlsbad, CA) を添加した: 25mM MgCl<sub>2</sub> 20 μl、10×RT緩衝液10 μl、0.1M DTT 10 μl、オリゴdT 2 μl、RNAseOut 2 μl。次いで、各細胞株のアリコート1つに、Superscript II Reverse Transcriptase 2 μlを添加し、かつ、対応する細胞株のアリコートに、H<sub>2</sub>O 2 μlを添加して、Reverse Transcriptase無しの陰性対照を作製した。全試料を以下のとおりインキュベートした: 25℃で10分、42℃で50分、70℃で15分。試料を深型ウェルプレート中に並べ、H<sub>2</sub>Oで1.7 mlまで希釈した。Multipette (Saigan) ロボットを用いて、複数回、96ウェルPCRプレートの各ウェル中に16.5 μlずつ入れて、細胞株の多数の1回用PCRパネルを作製し、次いでこれを密封し、-20℃で保存した。これらのパネル中の各ウェルは、全RNA約100 ngに由来する第1鎖cDNAに相当する。82種の細胞株を2つのパネル、アレイ118A番および118B番に広げる。広範に発現されるが量は並でしかない2種の遺伝子、すなわちCLTC (クラスリン) およびTFRC (トランスフェリン受容体C) に対するプライ

40

50

マーを用いて、これらのパネルの1セットに対して多重PCRアッセイ法を実施することによって、パネル上の第1鎖cDNAの質を評価した。各0.5ulのクラスリンプライマー  
zc42901 (5'CTCATATTGCTCAACTGTGTGAAAAG

3'; SEQ ID NO:34), zc42902(5'TAGAAGCCACCTGAACACAAATCTG3'; SEQ ID NO:35)

およびTFRCプライマー

zc42599 (5'ATCTTGCGTTGTATGTTGAAAATCAATT3'; SEQ ID NO:36),

zc42600 (5'TTCTCCACCAGGTAAACAAGTCTAC3'; SEQ ID NO:37)

を、10×緩衝液2.5μlおよびAdvantage 2 cDNAポリメラーゼミックス(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)0.5μl、2.5mM dNTPミックス(Applied Biosystems, Foster City, CA)2μl、10×Rediload(Invitrogen, Carlsbad, CA)2.5μlを混合し、アレイ118A番およびアレイ118B番のパネルの各ウェルに添加した。サイクリング条件は以下のとおりであった：94 で20秒；94 で20秒、67 で80秒を35サイクル、および72 で7分を1サイクル。各反応物10μlをアガロースゲル電気泳動に供し、各細胞株の+RTウェルに特異的な各遺伝子に対する強固なPCR産物の存在に関してゲルをスコアリングした。

【0372】

IL-17RCのヒト第1鎖cDNAパネルにおけるmRNA発現を、センスオリゴ

ZC42756 (5'ctctccaggcccaagtgctct3'; SEQ ID NO:38)

およびアンチセンスオリゴ

ZC42757 (5'tgtctctggggcctctgtctcc3'; SEQ ID NO:39)

を用いて、試料当たり以下のPCR条件下でPCRを実施することによって分析した：10×緩衝液2.5μlおよびAdvantage 2 cDNAポリメラーゼミックス(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)0.5μl、2.5mM dNTPミックス(Applied Biosystems)2μl、10×Rediload(Invitrogen, Carlsbad, CA)2.5ul、ならびに20uMの各センスプライマーおよびアンチセンスプライマー0.5μl。サイクリング条件は94 で2分；94 で1分、66 で30秒、72 で1.5分を35サイクル、および72 で7分を1サイクルであった。各反応物10μlをアガロースゲル電気泳動に供し、IL-17RCの陽性発現または陰性発現に関してゲルをスコアリングした。

【0373】

IL-17RC mRNAは、広範な組織型および細胞型に相当する多くの細胞株において広範に発現されている。特に、IL-17RCは、単球、B細胞、および骨髄系の細胞を含む非T細胞末梢血細胞系統において一貫して発現されている。また、IL-17RC mRNAは、皮膚に由来する細胞株において確実に発現される。IL-17RCを発現する他の細胞株は、アレイ上に存在した大腸細胞株の5種すべてである。

【0374】

実施例3

RT PCRを用いた、マウス細胞株パネルにおけるmRNAの分布

全RNAを、施設内で増殖させた休止中かつ刺激された細胞株60種から精製し、製造業者の取扱い説明書に従ってQiagen(Valencia, CA)RNeasyキット、酸-フェノール精製プロトコル(ChomczynskiおよびSacchi, Analytical Biochemistry, 162:156-9, 1987)、またはトリゾール試薬プロトコル(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて精製した。

【0375】

各細胞株に由来する全RNA 5μgを深型ウェル96ウェルプレート中に並べ、3M NaOAc 125μlおよびPellet Paint(Novagen, Madison, WI)100μlを各ウェルに添加し、次いで、H<sub>2</sub>Oを加えて最終体積を1.25mlに調整した。Multipette(Saigan)ロボットを用いて、複数回、96ウェルPCRプレートの各ウェル中にRNA混合物25μlずつ、続いてEtOH 75μlずつを入れて、細胞株の多数の1回用RT PCRパネルを作製し、次いでこれを密封し、-20 で保存した。6000RPMで10分間、Qiagen(Valencia, CA)96ウェル遠心分離機中でパネルを最初に遠心分離することによってRT PCRスクリーニングを実施した。プレートを吸収紙上に伏せることによって上清を除去した。RNA沈殿物を70%EtOH 100μlで洗浄し、続いて、6000RPMで5

10

20

30

40

50

分間遠心分離した。再び上清を除去し、残存EtOHが蒸発するまでプレートを風乾させた。RNA沈殿物をH<sub>2</sub>O 15 µl中に再懸濁した。

【0376】

マウス細胞株RNAパネルにおけるIL-17RC mRNAの発現を、  
zc38910 (5'acgaagcccaggtaccagaagag3'; SEQ ID NO:40) および zc38679  
(5'aaaagcggcgcagccaagagtagg3'; SEQ ID NO:41)

を用いて、試料当たり以下のRT PCR条件下でRT PCRを実施することによって分析した：PI  
atinum Taqキット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いたSuperScript One-Step PCR。サイ  
クリング条件は次のとおりであった：48 で30分、94 で2分を1サイクル、続いて、94  
で15秒、55 で30秒、72 で1.5分を35サイクル、続いて72 で7分を1サイクル。各反応  
物10 µlをアガロースゲル電気泳動に供し、IL-17RCの陽性発現または陰性発現に関してゲ  
ルをスコアリングした。

10

【0377】

マウスIL-17RC mRNAはいくつかのマウス細胞株において、特に、骨芽細胞を含む骨髓由  
来の細胞株、脂肪細胞株、および前脂肪細胞株において発現されている。また、マウスIL  
-17RC mRNAは、脾臓間質細胞株、脾臓細胞株、ならびに視床下部細胞株、唾液腺細胞株、  
および精巣細胞株など内分泌系由来のいくつかの試料においても表現されている。

【0378】

実施例4

20

大腸菌において産生されたpIL-17Fのリフォールディングおよび精製

(A)pIL-17Fの封入体単離および抽出

回分発酵または振とうフラスコ培養のいずれかでタンパク質発現を導入した後、1リッ  
トル瓶に入れた大腸菌培養液をSorvallスイングバケットローターにおいて3000 RPMで遠  
心分離をする。任意の培養液混入物を除去するための細胞ペースト洗浄は、200mM NaClお  
よび5mM EDTAを含む50mM Tris pH8.0を用いて、上清が清澄になるまで実施する。

【0379】

次いで、細胞沈殿物を、600nmにおける光学濃度単位が10~20になるまで、氷冷した溶  
解緩衝液(50mM Tris(pH8.0); 5mM EDTA; 200mM NaCl、10%スクロース(w/v); 5mM DTT; 5mMベ  
ンズアミジン)中に懸濁する。次いで、このスラリーを、冷却しておいたAPV 2000 Labホ  
モジナイザーにおける8500psi~9000psiでの粉碎に3回供して、破壊された細胞溶解物を  
生成させる。20,000×G、4 で1時間、細胞溶解物を遠心分離することによって不溶性画  
分(封入体)を回収する。

30

【0380】

20,000×Gの遠心脱水の結果として生じる封入体沈殿物を計量し、次いで、封入体1グラ  
ム当たり洗浄緩衝液10mlで、洗浄緩衝液(200mM NaCl、5mM EDTA、5mM DTT、5mMベンズ  
アミジンを含む50mM Tris(pH8))中に再懸濁する。OMNI international社製ローターステ  
ーター型ジェネレーターを用いてホモジナイズすることによって、完全に分散させる。20,0  
00×G、4 で30分間、この懸濁液を遠心分離する。上清が清澄になるまで、この洗浄サイ  
クルを3~5回繰り返す。

40

【0381】

最終の洗浄済み沈殿物を0.1M亜硫酸ナトリウムおよび0.02Mテトラチオン酸ナトリウム  
を含む40mM Tris緩衝液(pH8)中7M塩酸グアニジンに可溶化する。4 で一晩、穏やかに攪  
拌しながら、抽出および亜硫酸分解反応を進行させる。結果として生じる桃色がかった色  
の溶液を35,000×g、4 で1時間遠心分離し、かつ、可溶性pIL-17Fを含む清澄化された上  
清を0.45µmのフィルターで濾過する。

【0382】

(B)pIL-17Fのリフォールディング手順

可溶化し亜硫酸分解させたpIL-17Fを、55mM MES、10.56mM NaCl、0.44mM KCl、0.055%  
PEG(3400K)、1.1mM EDTA、20%グリセロール、0.5M塩酸グアニジン、0.75Mアルギニン、

50



および比率1:1のグルタチオン酸化還元対(1mM GSH:1mM GSSG)を含む氷冷リフォールディング緩衝液中に滴下希釈することによってリフォールディングさせる。リフォールディング緩衝液のpHをHClで6.5に調整し、かつ、pIL-17Fを最終濃度が100ug/mlになるまで添加する。希釈した後、混合物を冷室で72時間、緩徐に攪拌する。

【0383】

#### (C)生成物の回収および精製

ラボスケールTFFシステムにおいて10kDaカットオフ膜を用いて、リフォールディングされたpIL-17Fを10倍に濃縮する。次に、0.45ミクロン膜を用いてこれを濾過し、酢酸を添加してpHを5.1に調整する。50mM酢酸緩衝液(pH5.1)中で平衡化したPharmacia SP Fast Flowカラムによる陽イオン交換クロマトグラフィーによって、pHを調整した材料を捕捉する。平衡緩衝液と1:5で分配するインラインによって流速190cm/時でpIL-17Fを添加する。この希釈によってイオン強度が低下して、標的をマトリックスに効率的に結合させることが可能になる。試料添加が完了した後、ベースラインの吸光度になるまで平衡緩衝液でカラムを洗浄する。50mM酢酸緩衝液(pH5.1)中0.4M NaClでカラムを洗浄し、次いで、50mM酢酸緩衝液(pH5.1)中0.4M NaClから1.5M NaClまでの5カラム用量(CV)の勾配を用いて、結合されたタンパク質を溶出させる。タンパク質は、約1M NaClで溶出し、溶出液画分のSDS PAGE解析によると約85%が二量体である。pIL-17Fを含む画分を集め、Amicon攪拌細胞装置を用いて10kDaカットオフ限外ろ過膜を通して濃縮して、最終精製およびサイズ排除クロマトグラフィーによるバッファー交換に備える。

【0384】

#### (D)サイズ排除バッファー交換および調剤

濃縮された陽イオンプール(カラム容積(CV)の3%~4%の体積)を、109mM NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)中で平衡化したPharmacia Superdex 75サイズ排除カラム上に、流速30cm/時で注入する。生成物を含む対称的な溶出液ピークを、109mM NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)中で1mg/mlの濃度まで希釈する。最後に、pIL-17Fを0.2ミクロンで滅菌濾過し、等分し、-80℃で保存する。最終的なプロセス収率は20%である。

【0385】

#### 実施例5

##### 哺乳動物可溶性IL-17RC発現構築物の構築

ヒトIL-17RC[L21-K451]-mFc1(マウスBALB/c  $\mu$ 2a Fc)を含む発現構築物を、IL-17RCポリペプチド(SEQ ID NO:43)をコードするDNA断片(SEQ ID NO:42)、mFc1をコードするDNA断片(SEQ ID NO:44)、および発現ベクターpZMP20を用いるオーバーラップPCRおよび相同組換えによって構築する。PCR増幅によってこれらの断片を作製する。

【0386】

IL-17RC[L21-K451]をコードするPCR断片は、pZMP20ベクター配列の最適化組織プラスミノーゲンアクチベータープレプロ分泌リーダー配列コード領域との5'オーバーラップ、IL-17RC細胞外ドメインをコードする[L21-K451]、およびmFc1コード領域との3'オーバーラップを含む。PCR増幅反応では、5'オリゴヌクレオチド

[GTTTCGCTCAGCCAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCGTAGACTGGAGAGGCT  
TGTGGGGCCT; SEQ ID NO:46]

、3'オリゴヌクレオチド

[TGTGGGGCCCTCTGGGCTCCTTGTTGGATGTATTTGTC; SEQ ID NO:47]

、および鑄型としての予め作製されたIL-17RCのDNAクローンを使用する。

【0387】

mFc1をコードするPCR断片は、IL-17RC配列との5'オーバーラップ、mFc1コード領域、およびpZMP20ベクターのポリオウイルス配列内リボソーム進入部位領域との3'オーバーラップを含む。PCR増幅反応では、5'オリゴヌクレオチド

[GACAAATACATCCACAAGGAGCCCCAGAGGGCCCCACA; SEQ ID NO:48]

、3'オリゴヌクレオチド

[CAACCCAGAGCTGTTTTAAGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGTCCGGGA; SEQ  
ID NO:49]

、および鋳型としての予め作製されたmFc1のDNAクローンを使用する。

【0388】

PCR増幅反応条件は以下のとおりである：94 で5分を1サイクル；94 で1分、続いて55  
で2分、続いて72 で3分を35サイクル；72 で10分を1サイクル。PCR反応混合物を1%ア  
ガロースゲル上で泳動させ、かつ、QIAquick(商標)Gel Extraction Kit(Qiagen、カタロ  
グ番号28704)を用いて、予想されるサイズに対応するDNA断片をゲルから抽出する。

10

【0389】

2つのPCR断片をオーバーラップPCRによって連結する。5'オリゴヌクレオチド  
[GTTTCGCTCAGCCAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCGTAGACTGGAGAGGCT  
TGTGGGGCCT; SEQ ID NO: 46]

、および3'オリゴヌクレオチド

[CAACCCAGAGCTGTTTTAAGGCGCGCCTCTAGATTATTTACCCGGAGTCCGGGA; SEQ  
ID NO:49]

を用いるPCR増幅反応において、2種のゲル抽出断片のそれぞれ約1μlを結合させる。使用  
するPCR条件は以下のとおりである：94 で5分を1サイクル；94 で1分、続いて55 で2分  
、続いて72 で3分を35サイクル；72 で10分を1サイクル。PCR反応混合物を1%アガロー  
スゲル上で泳動させ、かつ、QIAquick(商標)Gel Extraction Kit(Qiagen、カタログ番号2  
8704)を用いて、挿入物のサイズに対応するDNA断片をゲルから抽出する。

20

【0390】

プラスミドpZMP20は、MPSVプロモーター、酵母組換え前に直線化するためのBglII部位  
、otPAシグナルペプチド配列、ポリオウイルス由来の配列内リボソーム進入エレメント、  
膜貫通ドメインのC末端が切断されたCD8の細胞外ドメイン；大腸菌の複製起点；SV40のプロ  
モーター、エンハンサー、および複製起点、DHFR遺伝子、およびSV40ターミネーターを含  
む、哺乳動物選択マーカー発現ユニット；ならびにS.セレビシエ(S.cerevisiae)における  
選択および複製のために必要とされるURA3配列およびCEN-ARS配列を有する発現カセット  
を含む、哺乳動物発現ベクターである。

30

【0391】

プラスミドpZMP20をBglIIで消化した後、ゲル抽出したIL-17RC[L21-K451]-mFc1 PCR断  
片との組換えを酵母中で実施する。コンピテントな酵母(S.セレビシエ)細胞100μlをIL-1  
7RC[L21-K451]-mFc1挿入DNA 10μlおよびBglIIで消化したpZMP20ベクター100ngと混合し  
、0.2cmエレクトロポレーションキュベットにこの混合物を移す。0.75kV(5kV/cm)、無限  
大オーム、および25μFの電源供給(BioRad Laboratories, Hercules, CA)設定を用いて、  
酵母/DNA混合物に電気パルスをかける。1.2Mソルビトール600μlをキュベットに添加し、  
かつ、URA-Dプレート2つに酵母を100μlおよび300μlずつ播種し、30 でインキュベート  
する。約72時間後、1つのプレートのUra<sup>+</sup>酵母形質転換体をH<sub>2</sub>O 1ml中に再懸濁し、短時間  
遠心脱水して、酵母細胞を沈殿させる。溶解緩衝液(2%TritonX-100、1%SDS、100mM NaCl、  
10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA)0.5ml中に細胞沈殿物を再懸濁する。酸で洗浄したガラ  
スピーズ250μlおよびフェノール-クロロホルム300μlを含むエッペンドルフチューブに  
この溶解混合物500μlを添加し、3分間ボルテックスし、かつ、エッペンドルフ遠心分離  
機によって最大速度で5分間、遠心分離する。水性相300μlを新しい試験管に移し、エタ  
ノール600μlを加えてDNAを沈殿させ、続いて、最大速度で30分間、遠心分離する。試験  
管をデカントし、70%エタノール1mlで沈殿物を洗浄する。試験管をデカントし、10mM Tr  
is(pH8.0)、1mM EDTA 30μl中にDNA沈殿物を再懸濁する。

40

【0392】

50

酵母DNA調製物5 µlおよび大腸菌細胞50 µlを用いて、エレクトロコンピテント大腸菌宿主細胞(DH12S)を形質転換させる。これらの細胞に2.0kV、25 µF、および400オームで電気パルスをかける。エレクトロポレーション後、SOC(2% Bacto(商標)トリプトン(Difco, Detroit, MI)、0.5%酵母抽出物(Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM MgSO<sub>4</sub>、20mMグルコース)1mlを添加し、次いで、LB AMPプレート(LBプロス(Lennox)、1.8% Bacto(商標)寒天(Difco)、100mg/Lアンピシリン)2つに50 µlおよび200 µlずつ細胞を播種する。

#### 【0393】

構築物用の3種のDNAクローン挿入物を配列解析に供し、正確な配列を含む1つのクローンを選択する。製造業者の取扱い説明書に従って市販のキット(QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA)を用いて、大量のプラスミドDNAを単離する。

10

#### 【0394】

##### 実施例6

IL-17RC-CEE、IL-17RC-CHIS、およびIL-17RC-CFLAGを発現する哺乳動物可溶性IL-17RC発現構築物の構築

Glu-Glu(CEE)、6His(CHIS)、またはFLAG(CFLAG)のいずれかのC末端タグを有するヒトIL-17RC[L21-K451]を含む発現構築物を、IL-17RC[L21-K451]をコードするDNA断片(SEQ ID NO: 42)および発現ベクターpZMP20を用いたPCRおよび相同組換えによって構築する。

#### 【0395】

IL-17RCCEEをコードするPCR断片は、pZMP20ベクター配列の最適化組織プラスミノーゲンアクチベータープロモーター分泌リーダー配列コード領域との5'オーバーラップ、IL-17RC細胞外ドメインをコードする[L21-K451]、Glu-Gluタグの配列(Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu; SEQ ID NO: 53)、およびpZMP20ベクターのポリオウイルス配列内リボソーム進入部位領域との3'オーバーラップを含む。PCR増幅反応では、5'オリゴヌクレオチド  
[GTTTCGCTCAGCCAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCGTAGACTGGAGAGGCT  
TGTGGGGCCT; SEQ ID NO:46]

20

、3'オリゴヌクレオチド

[CAACCCAGAGCTGTTTTAAGGCGCGCCTCTAGATTATTCCATGGGCATGTATTCTTCCT  
TGTGGATGTATTTGTC; SEQ ID NO:50]

30

、および鋳型としての予め作製されたIL-17RCのDNAクローンを使用する。

#### 【0396】

PCR増幅反応条件は以下のとおりである：94 °Cで5分を1サイクル；94 °Cで1分、続いて55 °Cで2分、続いて72 °Cで3分を35サイクル；72 °Cで10分を1サイクル。PCR反応混合物を1% アガロースゲル上で泳動させ、かつ、QIAquick(商標)Gel Extraction Kit(Qiagen、カタログ番号28704)を用いて、予想されるサイズに対応するDNA断片をゲルから抽出する。

#### 【0397】

プラスミドpZMP20をBglIIで消化した後、ゲル抽出したIL-17RCCEE PCR断片との組換えを酵母中で実施する。コンピテントな酵母(S. セレビシエ)細胞100 µlをIL-17RCCEE挿入DNA 10 µlおよびBglIIで消化したpZMP20ベクター100ngと混合し、0.2cmエレクトロポレーションキュベットにこの混合物を移す。0.75kV(5kV/cm)、無限大オーム、および25 µFの電源供給(BioRad Laboratories, Hercules, CA)設定を用いて、酵母/DNA混合物に電気パルスをかける。1.2Mソルビトール600 µlをキュベットに添加し、かつ、URA-Dプレート2つに酵母を100 µlおよび300 µlずつ播種し、30 °Cでインキュベートする。約72時間後、1つのプレートのUra<sup>+</sup>酵母形質転換体をH<sub>2</sub>O 1ml中に再懸濁し、短時間遠心脱水して、酵母細胞を沈殿させる。溶解緩衝液(2% TritonX-100、1% SDS、100mM NaCl、10mM Tris、pH8.0、1 mM EDTA)0.5ml中に細胞沈殿物を再懸濁する。酸で洗浄したガラスビーズ250 µlおよびフェノール-クロロホルム300 µlを含むエッペンドルフチューブにこの溶解混合物500 µlを添加し、3分間ボルテックスし、かつ、エッペンドルフ遠心分離機によって最大速度で5分

40

50

間、遠心分離する。水性相300  $\mu$ lを新しい試験管に移し、エタノール600  $\mu$ lを加えてDNAを沈殿させ、続いて、最大速度で30分間、遠心分離する。試験管をデカントし、70%エタノール1mlで沈殿物を洗浄する。試験管をデカントし、10mM Tris(pH8.0)、1mM EDTA 30  $\mu$ l中にDNA沈殿物を再懸濁する。

#### 【0398】

酵母DNA調製物5  $\mu$ lおよび大腸菌細胞50  $\mu$ lを用いて、エレクトロコンピテント大腸菌宿主細胞(DH12S)を形質転換させる。これらの細胞に2.0kV、25  $\mu$ F、および400オームで電気パルスをかける。エレクトロポレーション後、SOC(2%Bacto(商標)トリプトン(Difco, Detroit, MI)、0.5%酵母抽出物(Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM  $MgCl_2$ 、10mM  $MgSO_4$ 、20mMグルコース)1mlを添加し、次いで、LB AMPプレート(LBプラス(Lennox)、1.8%Bacto(商標)寒天(Difco)、100mg/Lアンピシリン)2つに50  $\mu$ lおよび200  $\mu$ lずつ細胞を播種する。

10

#### 【0399】

構築物用の3種のDNAクローン挿入物を配列解析に供し、正確な配列を含む1つのクローンを選択する。製造業者の取扱い説明書に従って市販のキット(QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA)を用いて、大量のプラスミドDNAを単離する。

#### 【0400】

同じプロセスを用いて、Gly Ser Gly Gly His His His His Hisから構成されるC末端Hisタグを有するIL-17RC(IL-17RCCHIS;SEQ ID NO:51)またはGly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lysから構成されるC末端FLAGタグを有するIL-17RC(IL-17RCFLAG;SEQ ID NO:52)を調製する。これらの構築物を調製するために、SEQ ID NO:50の3'オリゴヌクレオチドの代わりに、3'オリゴヌクレオチド

20

[CAACCCAGAGCTGTTTTAAGGCGCGCCTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGTCCA  
CCAGATCCCTTGTGGATGTATTTGTC; SEQ ID NO:54]

を使用して、IL-17RCCHISを作製するか、または3'オリゴヌクレオチド

[CAACCCAGAGCTGTTTTAAGGCGCGCCTCTAGATTACTTATCATCATCATCCTTATAAT  
CGGATCCCTTGTGGATGTATTTGTC; SEQ ID NO:55]

を使用して、IL-17RCFLAGを作製する。

30

#### 【0401】

##### 実施例7

IL-17RC-mFc1融合タンパク質、ならびにC末端タグ付きタンパク質IL-17RC-CEE、IL-17RC-CHIS、およびIL-17RC-CFLAGを発現する可溶性IL-17RC受容体発現構築物のトランスフェクションおよび発現

可溶性IL-17RC融合物発現構築物またはタグ付きの発現構築物それぞれ200  $\mu$ gの3セットを、37℃で3時間、PvuI 200ユニットで別々に消化し、イソプロピルアルコールで沈殿させ、かつ、1.5mLマイクロチューブ中で遠心分離する。デカントして沈殿物から上清を除き、この沈殿物を70%エタノール1mLで洗浄し、かつ、室温で5分間インキュベートさせる。微量遠心管中、14,000RPMで10分間、試験管を遠心脱水し、デカントして沈殿物から上清を除く。次いで、無菌環境でCHO細胞組織培養培地750  $\mu$ l中に沈殿物を再懸濁し、60℃で30分間インキュベートさせ、かつ、室温まで放冷する。試験管3本のそれぞれにおいて約 $5 \times 10^6$ 個のCHO細胞を沈殿させ、かつ、DNA-培地溶液を用いて再懸濁させる。DNA/細胞混合物を0.4cmギャップのキュベットに入れ、以下のパラメーターを用いてエレクトロポレーションする：950  $\mu$ F、高キャパシタンス、300V。次いで、キュベットの内容物を取り出し、集め、CHO細胞組織培養培地を加えて25mLまで希釈し、125mL振盪フラスコ中に入れる。振盪機上の37℃、6%CO<sub>2</sub>のインキュベーターにフラスコを入れ、120RPMで振盪する。

40

#### 【0402】

栄養素選択、続いて200nMメトトレキサート(MTX)、次いで1  $\mu$ M MTXへの段階的増幅にCH

50

O細胞を供する。ウェスタンブロットによって融合タンパク質またはタグ付きタンパク質の発現を確認し、かつ、タンパク質精製用の採取物を得るためにCHO細胞プールをスケールアップする。

#### 【0403】

##### 実施例8

##### 可溶性IL-17RCの発現

IL-17RC\_TbxのDNA断片および発現ベクターpZMP40を用いた相同組換えによって、IL-17RC-Tbx-C(Fc9)(SEQ ID NO: 64)を含む発現プラスミドを構築した。プライマーzc44531およびzc44545を用いたPCR増幅によって断片を作製した。

#### 【0404】

PCR断片IL-17RC\_Tbxは、予め作製されたIL-17RCクローンを鋳型として用いて作製された、部分的なIL-17RC細胞外ドメインコード領域を含む。この断片は、pZMP40ベクター配列のotPAコード領域との5'オーバーラップ、IL-17RCセグメント(SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基21~451)、リンカー配列、トロンピン切断部位、およびpZMP40ベクターのFc9コード領域との3'オーバーラップを含む。使用したPCR条件は以下のとおりであった: 94 で5分を1サイクル; 94 で1分、続いて55 で2分、続いて72 で3分を35サイクル; 72 で10分を1サイクル。

#### 【0405】

PCR反応混合物を1%アガロースゲル上で泳動させ、かつ、QIAquick(商標)Gel Extraction Kit(Qiagen、カタログ番号28704)を用いて、挿入物のサイズに対応するバンドをゲルから抽出した。

#### 【0406】

プラスミドpZMP40は、MPSVプロモーター、コード配列を挿入するための複数の制限部位、otPAシグナルペプチド配列、およびFc9の配列; ポリオウイルス由来の配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメント、ならびに膜貫通ドメインのC末端が切断されたCD8の細胞外ドメイン; 大腸菌の複製起点; SV40のプロモーター、エンハンサー、および複製起点、DHFR遺伝子、およびSV40ターミネーターを含む、哺乳動物選択マーカー発現ユニット; ならびにS.セレピシエにおける選択および複製のために必要とされるURA3配列およびCEN-ARS配列を有する発現カセットを含む、哺乳動物発現ベクターである。pZMP21(米国特許出願公開第2003/0232414 A1号、アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)に寄託され、ATCC番号PTA-5266に指定されている)からこれを構築した。

#### 【0407】

プラスミドpZMP40をBglIIで切断した後、PCR断片との組換えを酵母中で実施した。コンピテントな酵母(S.セレピシエ)細胞100 µlを挿入DNA(SEQ ID NO: 66)10 µlおよび切断したpZMP40ベクター100ngと独立に混合し、0.2cmエレクトロポレーションキュベットにこの混合物を移した。0.75kV(5kV/cm)、無限大オーム、および25 µFの電源供給(BioRad Laboratories, Hercules, CA)設定を用いて、酵母/DNA混合物に電気パルスをかけた。1.2Mソルビトール600 µlをキュベットに添加し、かつ、URA-Dプレート2つに酵母を100 µlおよび300 µlずつ播種し、30 でインキュベートした。約72時間後、1つのプレートのUra<sup>+</sup>酵母形質転換体をH<sub>2</sub>O 1ml中に再懸濁し、短時間遠心脱水して、酵母細胞を沈殿させた。溶解緩衝液(2% TritonX-100、1% SDS、100mM NaCl、10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA)0.5ml中に細胞沈殿物を再懸濁した。酸で洗浄したガラスビーズ250 µlおよびフェノール-クロロホルム300 µlを含むエッペンドルフチューブにこの溶解混合物500マイクロリットルを添加し、3分間ボルテックスし、かつ、エッペンドルフ遠心分離機によって最大速度で5分間、遠心分離した。水性相300マイクロリットルを新しい試験管に移し、エタノール(EtOH)600 µlを加えてDNAを沈殿させ、続いて、最大速度で30分間、遠心分離した。試験管をデカントし、70%エタノール1mlで沈殿物を洗浄した。試験管をデカントし、TE 30 µl中にDNA沈殿物を再懸濁した。

#### 【0408】

酵母DNA調製物5 µlおよび細胞50 µlを用いて、エレクトロコンピテント大腸菌宿主細胞

10

20

30

40

50

(DH12S)を形質転換させた。これらの細胞に2.0kV、25  $\mu$ F、および400オームで電気パルスのかけた。エレクトロポレーション後、SOC(2%Bacto(商標)トリプトン(Difco, Detroit, MI)、0.5%酵母抽出物(Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM  $MgCl_2$ 、10mM  $MgSO_4$ 、20mM グルコース)1mlを添加し、次いで、LB AMPプレート(LBプラス(Lennox)、1.8%Bacto(商標)寒天(Difco)、100mg/Lアンピシリン)2つに50  $\mu$ lおよび200  $\mu$ lずつ細胞を播種した。

#### 【0409】

構築物用の3種のクローン挿入物を配列解析に供し、各構築物に対して正確な配列を含む1つのクローンを選択した。製造業者の取扱い説明書に従って市販のキット(QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA)を用いて、大量のプラスミドDNAを単離した。

#### 【0410】

次いで、IL-17RC[L21-K451]\_Tbx\_C(Fc9)構築物200  $\mu$ gの3セットを、37℃で3時間、Pvu II 200ユニットでそれぞれ消化し、次いでIPAで沈殿させ、かつ、1.5mLマイクロチューブ中で遠心分離した。デカントして沈殿物から上清を除き、この沈殿物を70%エタノール1mLで洗浄し、かつ、室温で5分間インキュベートさせた。微量遠心管中、14,000 RPMで10分間、試験管を遠心脱水し、デカントして沈殿物から上清を除いた。次いで、無菌環境でPF-CHO培地750  $\mu$ l中に沈殿物を再懸濁し、60℃で30分間インキュベートさせ、かつ、室温まで放冷した。3本の各試験管において $5 \times 10^6$ 個のAPFDXB11細胞を遠心沈殿させ、かつ、DNA-培地溶液を用いて再懸濁させた。DNA/細胞混合物を0.4cmギャップのキュベット中に入れ、以下のパラメーターを用いてエレクトロポレーションした：950  $\mu$ F、高キャパシタンス、および300V。次いで、キュベットの内容物を取り出し、集め、PF-CHO培地を加えて25mLまで希釈し、125mL振盪フラスコ中に入れた。振盪機上の37℃、6%CO<sub>2</sub>のインキュベーターにフラスコを入れ、120RPMで振盪した。

#### 【0411】

栄養素選択、続いて200nMメトトレキサート(MTX)、次いで1  $\mu$ M MTXへの段階的増幅に細胞株を供した。ウェスタンブロットによって発現を確認し、かつ、細胞株をスケールアップし、続いてタンパク質を精製した。

#### 【0412】

##### 実施例9

##### CHO細胞からの可溶性IL-17RCの精製

2つのBiomax 0.1 m<sup>2</sup> 30kD分子量カットオフ膜カセット(Millipore, Bedford, MA)を通過させるPellicon-II接線流システムを用いて、IL-17RC-TbX-Fc9(SEQ ID NO: 64)を発現するCHO細胞に由来する馴化培地を約10倍に濃縮した。濃縮した培地を氷酢酸によってpH5.5に調整し、0.2  $\mu$ mで滅菌ろ過し、次いで、4℃で一晩、バッチクロマトグラフィーによってProtein Gセファロース高流速樹脂(Pharmacia, Piscataway, NJ)上に添加した。pH調整した馴化培地を添加する前に、5カラム容量(約150ml)の25mM酢酸ナトリウム、150mM NaCl(pH5.5)を用いてProtein G樹脂を予め平衡化した。濾過し、pH調整した馴化培地と樹脂の比率は33:1(v/v)であった。

#### 【0413】

バッチ式クロマトグラフィーの工程は周囲温度(約21℃)で実施した。1回分として処理し、pH調整し、0.22  $\mu$ mで濾過した馴化培地を空の5.5  $\times$  20.5cmガラスカラム(BioRad, Hercules, CA)中に注ぎ、重力によって充填した。10カラム容量(約300ml)の25mM酢酸ナトリウム、150mM NaCl(pH5.5)でカラムを洗浄した。次いで、100mMグリシン(pH2.7)を用いて、結合されたタンパク質のpH溶離を実施した。9.0mlの画分を集め、2.0M Tris(pH8.0)1.0 mlで直ちに中和した。集めた画分をSDS-PAGEクーマシー染色によって解析した。IL-17RC-Tbx-Fc9を含む画分をプールし、かつ、分子量カットオフ5kDのBiomax膜スピン濃縮装置(Millipore, Bedford, MA)を製造業者の取扱い説明書に従って用いて、約6倍に濃縮した。

#### 【0414】

次いで、プールした濃縮画分を、7kD分子量カットオフ膜を用いるSlide-A-Lyzer(Pierce, Rockford, IL)によって、1  $\times$  リン酸緩衝化生理食塩水(pH7.3)(Sigma, St. Louis, MO)に対して徹底的に4℃で透析した。1  $\times$  リン酸緩衝化生理食塩水(pH7.3)中で調製したIL-17

10

20

30

40

50

RC-TbX-Fc9を0.22  $\mu$ mで滅菌ろ過した後、等分し、-80 で保存した。

【0415】

実施例10

ヒトIL-17RCへのIL-17AおよびIL-17Fの結合

(A)トランスフェクトされた細胞に対するビオチン化サイトカインの結合

ヒトIL-17受容体(SEQ ID NO: 21)、ヒトIL-17RC(SEQ ID NO: 2)、またはこれらの受容体の両方をコードする発現ベクターでトランスフェクトされた仔ハムスター腎臓(BHK)細胞を、ビオチン化したヒトIL-17AおよびヒトIL-17Fへのそれらの結合能力に関して評価する。ペルセンを用いて細胞を回収し、計数し、かつ、染色培地(SM)(HBSSに1mg/mlウシ血清アルブミン(BSA)、10mM Hepes、および0.1%アジ化ナトリウム(w/v)を添加したもの)中に細胞 $10^7$ 個/mlの濃度まで希釈した。ビオチン化されたヒトIL-17A(SEQ ID NO: 14)およびヒトIL-17F(SEQ ID NO: 16)を様々な濃度で細胞と共に氷上で30分間インキュベートする。30分後、SMで過剰なサイトカインを洗い流し、フィコエリトリンと結合させたストレプトアビジン(SA-PE)の1:100希釈物と共に氷上で30分間、細胞をインキュベートする。過剰なSA-PEを洗い流し、細胞をフローサイトメトリーによって解析する。サイトカイン染色の平均蛍光強度からサイトカイン結合の量を定量した。この解析から、本発明者らは、ヒトIL-17AがヒトIL-17RおよびIL-17RCの両方に同程度結合することを見出す。また、ヒトIL-17FはIL-17RCに同様のレベルで結合するが、IL-17Rには検出可能な程度に結合し、IL-17Aの場合に認められたレベルよりもレベルはかなり低い。

【0416】

(B)ヒト末梢血単核細胞へのビオチン化サイトカインの結合

フィコール密度勾配遠心分離によって、全血からヒト末梢血単核細胞(PBMC)を調製した。細胞 $10^7$ 個/mlのPBMCを、1  $\mu$ g/mlのビオチン化したIL-17AまたはIL-17F、および様々な白血球系系統を識別するように設計された特異的な細胞表面タンパク質に対する蛍光色素結合抗体と共に同時にインキュベートした。これらのマーカーには、CD4、CD8、CD19、CD11b、CD56、およびCD16が含まれる。過剰な抗体およびサイトカインを洗い流し、かつ、前述したようにSA-PEと共にインキュベートすることによって特異的なサイトカイン結合を検出する。フローサイトメトリーによって試料を解析し、この解析から、本発明者らは、ヒトIL-17Aは検査したPBMC集団のほぼ全てに結合するが、ヒトIL-17Fは、いかなる集団にも検出可能な程度に結合しないことを見出す。

【0417】

(C)非標識サイトカインによる、ビオチン化したヒトIL-17AおよびIL-17Fの特異的な結合の阻害

過剰な非標識のヒトIL-17AおよびIL-17Fを結合反応に含めること以外は前述したようにして結合研究を実施する。BHK細胞を用いた研究において、非標識サイトカインの量はある範囲の濃度で変動した。本発明者らは、非標識のIL-17Aを添加すると、IL-17RCおよびIL-17Rの両方に対するIL-17AおよびIL-17Fの両方の結合に対して競合したことを見出す。しかしながら、非標識IL-17Fは、IL-17RCに対するIL-17AおよびIL-17Fの両方の結合に対して競合したが、IL-17Rへの結合に対しては効果的に競合しなかった。このことから、IL-17AおよびIL-17Fの両方がIL-17RCに特異的に結合すること、ならびに、それらが結合の際に交差競合するため、同一であるか、または顕著にオーバーラップしている部位にそれらが結合することが示唆される。また、IL-17Aは、IL-17Rに対するIL-17Fの比較的弱い結合に対して競合することから、これら2種のサイトカインはまた、IL-17Rの同様の領域に結合するが、IL-17Fは、IL-17RCと比べてかなり低い親和力でIL-17Rに結合することが示唆される。

【0418】

(D)可溶性IL-17RCおよびIL-17Rによる、ビオチン化したヒトIL-17AおよびIL-17Fの特異的な結合の阻害

可溶性のIL-17RCまたはIL-17Rを結合反応に含める以外は前述したようにして結合研究を実施する。これらの可溶性受容体は、ヒトIgG1定常(Fc)領域に融合された各受容体の細

10

20

30

40

50

胞外ドメインに由来する融合タンパク質である。本発明者らは、IL-17RおよびIL-17RCをトランスフェクトされたBHK細胞の両方に対するヒトIL-17AおよびIL-17Fの両方の結合を可溶性IL-17RCが阻害することを見出す。しかしながら、可溶性IL-17Rは、いずれかの受容体に対するIL-17Aの結合を阻害するが、IL-17RCへのIL-17Fの結合を効果的に妨害せず、これは、IL-17Rに対するIL-17Fの結合が弱いことと一致している。

#### 【0419】

##### 実施例11

IL-17AおよびIL-17FはIL-17RCに結合する

##### (A) 非放射性リガンドによる結合阻害

hIL-17RC(SEQ ID NO: 2)およびIL-17R(SEQ ID NO: 21)でトランスフェクトしたBHK細胞を、アッセイ法の2日前に、40,000細胞/ウェルの濃度で24ウェルディッシュ(Costar 3527)に播種した。ヨードビーズ法によって放射性標識しておいたIL-17A(SEQ ID NO: 14)およびIL-17F(SEQ ID NO: 16)を、結合緩衝液(10mg/ml ウシ血清アルブミン(Gibco 15260-037))を含むRPMI 1640培地(JRH 51502-500M)中に、トリプリケート、濃度10ng/mlで、合計250ul/ウェルとなるように、独立にウェルに添加した。非放射性の競争物を100倍モル過剰で添加した。試験した競争物には、IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、およびIL-21が含まれた。氷上で1時間、ウェルをインキュベートした後、PBS(Invitrogen 20012-027)で2回洗浄し、高塩濃度溶液(1.5M NaCl、50mM HEPES pH7.4)で1回洗浄した。室温で30分間、0.8M NaOH 500ulでウェルを抽出し、かつ、ガンマカウンター(Packard Cobra II A5005)でカウント/分を測定した。

#### 【0420】

これらの結果から、100倍モル濃度の非放射性IL-17AおよびIL-17Fが、BHK hIL-17RCへの<sup>125</sup>I IL-17Aの結合を約7分の1に減少させることができるのに対し、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、およびIL-21は、結合に全く影響を与えないことが示された。100倍モル濃度の非放射性IL-17Aが、BHK IL-17Rへの<sup>125</sup>I IL-17Aの結合を約4分の1に減少させたのに対し、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F、およびIL-21は、結合に全く影響をあたえなかった。100倍モル濃度の非放射性IL-17AおよびIL-17Fが、BHK hIL-17RCへの<sup>125</sup>I IL-17Fの結合をそれぞれ約4分の1および5分の1に減少させたのに対し、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、およびIL-21は、結合に全く影響をあたえなかった。

#### 【0421】

##### (B) 可溶性受容体による結合阻害

100倍モル過剰の可溶性hIL-17RCx1/Fc9(実施例8)および可溶性IL-17R/Fc(R&Dから入手; 参照番号177-IR)を非放射性リガンドの代わりに競合において使用した以外はパート1と同じようにして、hzytor14(SEQ ID NO: 2)およびIL-17R(SEQ ID NO: 21)をトランスフェクトさせたBHK細胞に対する結合を実施した。パート1と同様にして、細胞を洗浄、抽出し、計数した。

#### 【0422】

可溶性hIL-17RC/Fcは、BHK hIL-17RCへの<sup>125</sup>I IL-17Fの結合を阻害し、3回の実験の平均IC<sub>50</sub>は、10倍モル過剰であった。同じ細胞株における可溶性hIL-17RC/Fcによる<sup>125</sup>I IL-17Aの阻害の平均IC<sub>50</sub>は20倍モル過剰であり、可溶性IL-17R/Fcによる<sup>125</sup>I IL-17Aの阻害の平均IC<sub>50</sub>は20倍モル過剰であった。

#### 【0423】

##### (C) 結合飽和

トランスフェクトさせたBHK細胞をパート1と同様に24ウェルディッシュに播種した。放射性標識したIL-17AおよびIL-17Fを、結合緩衝液中に、濃度4nMで開始し、(濃度1.83pMまで)8回の1:3希釈を実施して、トリプリケートで、合計250ul/ウェルとなるように添加した。別に、100倍モル過剰の非放射性リガンドを各希釈ポイントで添加した。パート1と同様にして、細胞を洗浄、抽出し、計数した。各希釈ポイントの非競合カウント数から100倍過剰のカウント数を引くことによって、添加した放射性標識リガンドの濃度に対して個々のカウント/分をプロットした。次いで、標準化したデータをプロットして、放射性



標識リガンドとトランスフェクトしたBHK細胞の各組合せに対する飽和結合曲線を作製した。表4は、3回の実験すべてから算出した親和性の値を示す。

【 0 4 2 4 】

(表 7)

125I IL-17A + BHK hIL-17RC	125I IL-17A + BHK IL-17R
1. 180pM	1. 2.5 +/- 0.2nM
2. 200pM	2. 4.5 +/- 0.3nM
3. 370pM	3. 5.9 +/- 0.1nM
125I IL-17F + BHK hIL-17RC	125I IL-17F + BHK IL-17R
1. 50pM	1. 非常に低い親和性
2. 60pM	2. 非常に低い親和性
3. 80pM	3. 非常に低い親和性

10

【 0 4 2 5 】

ワンサイト結合曲線適合が、IL-17Rに対するIL-17AおよびIL-17Fの結合と最も接近して一致した。ツーサイト結合曲線適合は、hIL-17RCに対するIL-17AおよびIL-17Fの結合と最も接近して一致した。高親和性結合部位は、上記に示した値である。低親和性結合部位は、非常に低い親和性を有し、かつ、3回の実験の間で大きく変動した。

20

【 0 4 2 6 】

実施例12

マウスNih3t3細胞は、ヒトIL-17AおよびIL-17Fに応答する

(A)細胞の平板培養およびkz142アデノウイルスレポーター感染

マウス繊維芽細胞に由来するNih3t3細胞(ATCCで記載)Nih3t3を、グルタミンを含みビルビン酸で修正したDMEM/10%FBSを用いて、固体白色の細胞培養用コーティング96ウェルプレート(カタログ番号3917.Costar)中に5000細胞/ウェルで播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。2日目に、平板培養培地を取り出し、かつ、5000粒子/細胞の感染多重度のKz142アデノウイルス粒子を、グルタミンを含みビルビン酸で修正したDMEM/1%FBS中で調製し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。

30

【 0 4 2 7 】

(B)kz142アデノウイルスレポーター感染nih3t3細胞のIL-17AおよびIL-17F活性化を測定するルシフェラーゼアッセイ法

アデノウイルス粒子レポーターと共に一晩インキュベーションした後、ヒトIL-17AおよびIL-17Fリガンド処理物を、0.28%BSAに修正した無血清培地中で調製した。アデノウイルス粒子および培地を取り出し、適切なりガンド用量をトリプリケートで添加した。37℃、5%CO<sub>2</sub>で4時間インキュベーションを継続した後、培地を取り出し、細胞を15分間溶解し、かつ、ルシフェラーゼアッセイ系および試薬(カタログ番号1531、Promega, Madison, WI)ならびにマイクロプレート照度計を用いて、平均蛍光強度(MFI)を測定した。ヒトIL-17AおよびIL-17Fの濃度範囲0.1ng/ml~1000ng/mlで活性を検出して、両リガンドに関して約50ng/mlのEC50値を得た。これらのデータから、nih3t3細胞がこれらのリガンドに対する受容体を有すること、ならびにIL-17AおよびIL-17FがNfKb/Ap-1転写因子を活性化することが示唆される。

40

【 0 4 2 8 】

実施例13

マウスNih3t3細胞はIL-17RAおよびIL-17RCの両方を発現する

nih3t3 RNAのRTPCR解析により、これらの細胞がIL-17RAおよびIL-17RCの両方に対して陽性であることが実証され、これは、ヒトIL-17AおよびIL-17F媒介に対するそれらのnfkb/ap1応答がこれらの受容体の一方または両方によって媒介されていることと一致した。

【 0 4 2 9 】

50

RT-PCRの詳細:

(A) マウス IL-17RC PCR

標準方法を用いて、nih3t3細胞から単離した全RNAから第1鎖cDNA調製した。HotStarポリメラーゼおよび製造業者の推奨(Qiagen, Valencia, CA)を使用し、センスプライマーzc38910, 5' ACGAAGCCCAGGTACCAGAAAGAG 3' (SEQ ID NO:56)

およびアンチセンスプライマー

zc 38679, 5' AAAAGCGCCGCAGCCAAGAGTAGG 3' (SEQ ID NO:57)

ならびに35サイクルの増幅を用いて、PCRを適用した。アガロースゲル電気泳動により、予測されたサイズ850bpの単一の強いアンプリコンが示された。

【0430】

(B) マウス IL-17RA PCR

標準方法を用いて、nih3t3細胞から単離した全RNAから第1鎖cDNA調製した。HotStarポリメラーゼおよび製造業者の推奨(Qiagen, Valencia, CA)を使用し、センスプライマーzc38520, 5' CGTAAGCGGTGGCGGTTTTC 3' (SEQ ID NO:58)

およびアンチセンスプライマー

zc 38521, 5' TGGGCAGGGCACAGTCACAG 3' (SEQ ID NO:59)

ならびに35サイクルの増幅を用いて、PCRを適用した。アガロースゲル電気泳動により、予測されたサイズ498bpの単一の強いアンプリコンが示された。

【0431】

実施例14

ap1/nfkb転写因子を発現する安定なNih3t3アッセイクロンの作製

前述のマウスnih3t3細胞株を、ネオマイシン選択マーカを含むkz142 ap1/nfkbレポーター構築物で安定にトランスフェクトした。Neo耐性トランスフェクションプールを、クローン密度で播種した。クローニングリングを用いてクローンを単離し、かつ、ヒトIL-17Aリガンドを誘導物質として用いるルシフェラーゼアッセイ法によってスクリーニングした。平均蛍光強度(MFI)(Ap-1/Nf-kBルシフェラーゼによる)が最高であり、かつバックグラウンドが最小であるクローンを選択した。安定なトランスフェクタント細胞株を選択し、nih3t3/kz142.8と呼んだ。

【0432】

実施例15

可溶性IL-17RCおよびIL-17RA/FCキメラを用いた、マウスNih3t3細胞におけるヒトIL-17AおよびIL-17Fによる活性化の阻害

ルシフェラーゼアッセイ法におけるAp-1/Nf-kBエレメントのヒトIL-17AおよびIL-17F活性化のアンタゴニストとして、可溶性のIL-17RCまたはIL-17RAを使用した。これらの可溶性受容体は、ヒトIgG1定常(Fc)領域に融合された各受容体の細胞外ドメインに由来する融合タンパク質である。可溶性ヒトIL-17R FC融合タンパク質は購入した(組換えヒトIL-17R/FCキメラ、カタログ番号177-IR-100、R&D Systems, Inc., Minneapolis, Mn)。可溶性ヒトIL-17RC FCキメラ(IL-17RCsR/FC9)は、前述したようにして構築した。本発明者らは、過剰なIL-17RCsR/FC9およびヒトIL17RsR/FCキメラは、マウスnih3t3/kz142.8アッセイ細胞株のAp-1/Nf-kB活性化のヒトIL-17AおよびIL-17F媒介の両方のEC50レベルを抑制する、ということを見出す。

【0433】

IL-17RCsR/FC9タンパク質はIL-17F活性化に拮抗する際に最大の効力を示し、IL17RsR/FCキメラはIL-17A活性化に拮抗する際に最大の効力を示した。

【0434】

実施例16

IL-17F mRNAは、喘息のマウスモデルにおいて上方調節される

感作および気道チャレンジマウスモデルにおいてIL-17F mRNAレベルを測定した。0日目および7日目に、組換えヤケヒョウヒダニ(Dermatophagoides pteronyssinus)アレルゲン

10

20

30

40

50

1(DerP1)(Indoor biotechnologies, Cardiff, UK)10 ugの50 % Imject Alum(Pierce)溶液を腹腔内注射することによって、8週齢～10週齢のマウス群を感作した。7日後、3日間連続して(14日目、15日目、および16日目)、DerP1 20  $\mu$ gの50  $\mu$ l PBS溶液でマウスをチャレンジした。この群に相当するマウスは4匹であった。陰性対照は、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)感作とそれに続くPBSチャレンジを受けたマウス5匹を含んだ。さらに、3匹のマウスは、DerP1感作とそれに続くPBSチャレンジを受けた。アレルゲンチャレンジまたは対照チャレンジ後48時間目に、肺組織全体を採取し、かつ全RNAを単離した。

#### 【0435】

各対象に由来する同一量の全RNAを用いて、第1の鎖cDNAを調製した。Qiagenホットスタートポリメラーゼ(Qiagen, Valencia, CA)および製造業者の推奨によって、IL-17F PCRを実施した。IL-17F PCRでは、センスプライマー

zc46098, 5' ACTTGCCATTCTGAGGGAGGTAGC 3' (SEQ ID NO:60)

およびアンチセンスプライマー

46099, 5' CACAGGTGCAGCCAACTTTTAGGA 3' (SEQ ID NO:61)

を用いた35サイクルの増幅を使用した。鋳型の質が対象すべての間で均一であることを確かめるために、IL-17F増幅において使用される同量の各鋳型に アクチンPCRを適用した。

。 アクチンPCRは、センスプライマー

zc44779, 5' GTGGGCCGCTCTAGGCACCA 3' (SEQ ID NO:62)

およびアンチセンスプライマー

zcc44776, 5' CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG 3' (SEQ ID NO:63)

を用いた25サイクルのPCRを含んだ。

#### 【0436】

DerP1で感作し、DerP1でチャレンジした処置群(喘息模擬)のマウス4匹はすべて、活発なIL-17F増幅を示した。一方、DerP1感作/PBSチャレンジ処置群に相当する対象3匹のうち3匹およびPBS感作/PBSチャレンジ処置群の対象5匹のうち5匹を含む陰性対照からは、弱いIL-17F増幅が認められた。 アクチン増幅は、陰性対照に対して、喘息を模擬した対象の場合と少なくとも同じくらい活発であったことから、陰性対照の弱いIL-17F増幅は鋳型の問題が原因ではないことが実証された。

#### 【0437】

実施例17

COS細胞トランスフェクションおよび分泌トラップ

(A)Cos細胞トランスフェクションアッセイ法および分泌トラップアッセイ法により、IL-17RCsR/Fc9およびIL-17Fが受容体/リガンドペアであることが示される。

分泌トラップアッセイ法を用いて、ヒトIL-17RC(SEQ ID NO:2)をヒトIL-17F(SEQ ID NO:16)とマッチさせた。可溶性IL-17RCsR/Fc9融合タンパク質(実施例8)を、分泌アッセイ法における結合試薬として用いた。ヒトIL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、およびIL-17FのcDNAを含む、SV40oriを含む発現ベクターを、COS細胞中に一過性にトランスフェクトした。後述する分泌トラップアッセイ法を用いて、トランスフェクトされたCOS細胞にIL-17RCsR/Fc9を結合させた。IL-17RCsR/Fc9の陽性結合は、ヒトIL-17Fに対してのみ認められた。これらの結果から、ヒトIL-17RCおよびIL-17Fが受容体/リガンドペアであるという新規な知見が実証される。

#### 【0438】

(B)COS細胞トランスフェクション

COS細胞トランスフェクションを、以下のようにして実施した：無血清DMEM培地(ピルビン酸ナトリウム55mg、L-グルタミン146mg、トランスフェリン5mg、インスリン2.5mg、セレン1 $\mu$ g、およびフェチイン5mgのDMEM 500mlの溶液)92 $\mu$ l中で、プールのDNA 3 $\mu$ lおよびリポフェクタミン(商標)5 $\mu$ lを混合し、室温で30分間インキュベートし、次いで、無血清DMEM培地400 $\mu$ lを添加する。この混合物500 $\mu$ lを、12ウェル組織培養プレートに播種したCOS細胞 $1.5 \times 10^5$ 個/ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで5時間インキュベートする。500 $\mu$ lの20%FBS DMEM培地(FBS 100ml、ピルビン酸ナトリウム55mg、およびL-グルタミン146mgのDM

10

20

30

40

50

EM 500mlの溶液)を添加し、一晚インキュベートする。

【0439】

(C)分泌トラップアッセイ法

分泌トラップを、以下のようにして実施した：PBSで細胞から培地を洗い流し、次いで、PBS中1.8%ホルムアルデヒドで15分間固定した。次いで、細胞をTNT(0.1M Tris-HCL、0.15M NaCl、および0.05%Tween-20の水溶液)で洗浄し、PBS中0.1%Triton-Xを15分間浸透させ、再びTNTで洗浄した。細胞をTNB(0.1M Tris-HCL、0.15M NaCl、および0.5%ブロッキング試薬(NEN Renaissance TSA-Directキット)の水溶液)で1時間ブロッキングし、再びTNTで洗浄した。1 $\mu$ g/mlヒトIL-17RCx1sR/FC9可溶性受容体融合タンパク質と共に細胞を1時間インキュベートした。次いで、TNTで細胞を洗浄した。1：200で希釈したヤギ抗ヒトIg-HRP(Fc特異的)と共に、細胞をさらに1時間インキュベートした。細胞を再びTNTで洗浄した。

10

【0440】

希釈緩衝液中で1：50希釈したフルオレセインチラミド試薬(NENキット)を用いて陽性結合を検出し、4～6分間インキュベートし、TNTで洗浄した。TNT中で1：5希釈したVectashield Mounting Media(Vector Labs Burlingame, CA)を用いて細胞を保存した。蛍光顕微鏡上でFITCフィルターを用いて、細胞を可視化した。

【0441】

実施例18

マウス抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体の作製

20

(A)抗IL-17RC抗体の作製のための免疫化

1. 可溶性IL-17RC-muFc

隔週スケジュールで、Ribiアジュバント(Sigma)と1：1(v/v)で混合した可溶性ヒトIL-17RC-muFcタンパク質(実施例23)25 $\mu$ g～50 $\mu$ gを腹腔内注射することにより、6～12週齢の無処置マウスまたはIL-17RCノックアウトマウスを免疫化する。3回目の免疫化後7日～10日目に、眼窩後方から放血させて血液試料を採取し、血清を回収し、かつ、(例えば本明細書中において説明する)中和アッセイ法においてIL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害する能力、およびFACS染色アッセイ法において非トランスフェクト293細胞に対してIL-17RCトランスフェクト細胞を染色する能力に関して評価した。中和力価が頭打ちになるまで、前述したようにマウスを免疫化し、血液試料を採取および評価し続けた。頭打ちになった時点で、中和力価が最も高いマウスにPBS中可溶性IL-17RC-Fcタンパク質25 $\mu$ g～50 $\mu$ gを血管内注射した。3日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取し、例えばマウス骨髄腫(P3-X63-Ag8.653.3.12.11)細胞または当技術分野における他の適切な細胞株を用いて、当技術分野において公知の標準方法(例えばKearney, J.F. et al., J Immunol. 123：1548-50, 1979;およびLane, R.D. J Immunol Methods 81：223-8, 1985を参照されたい)によってハイブリドーマを作製するために用いた。

30

【0442】

2. 可溶性IL-17RC、IL-17RC-CEE、IL-17RC-CHIS、IL-17RC-CFLAG

隔週スケジュールで、Ribiアジュバント(Sigma)と1：1(v/v)で混合した可溶性ヒトIL-17RC-CEE、IL-17RC-CHIS、またはIL-17RC-CFLAG 25 $\mu$ g～50 $\mu$ gを腹腔内注射することにより、6～12週齢の無処置マウスまたはIL-17RCノックアウトマウスを免疫化する。3回目の免疫化後7日～10日目に、眼窩後方から放血させて血液試料を採取し、血清を回収し、かつ、(例えば本明細書中において説明する)中和アッセイ法においてIL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害する能力、およびFACS染色アッセイ法において非トランスフェクト293細胞に対してIL-17RCトランスフェクト細胞を染色する能力に関して評価する。中和力価が頭打ちになるまで、前述したようにマウスを免疫化し、血液試料を採取および評価し続ける。頭打ちになった時点で、中和力価が最も高いマウスにPBS中の可溶性IL-17RC、IL-17RC-CEE、zcytor-CHIS、またはIL-17RC-CFLAG抗原タンパク質25 $\mu$ g～50 $\mu$ gを血管内注射する。3日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取し、例えばマウス骨髄腫(P3-X63-Ag8.653.3.12.11)細胞または当技術分野における他の適切な細胞株を用いて、当技術

40

50

分野において公知の標準方法(例えばKearney, J.F. et al., J Immunol. 123: 1548-50, 1979;およびLane, R.D. J Immunol Methods 81: 223-8, 1985を参照されたい)によってハイブリドーマを作製するために用いる。

#### 【0443】

### 3. IL-17RCを発現するP815トランスフェクタント

1×10<sup>5</sup>個のトランスフェクトされたP815生細胞、例えばP815/IL-17RC細胞の腹腔内注射(例えば2×10<sup>5</sup>細胞/mlの細胞濃度で0.5ml)により、6~10週齢の雌DBA/2マウスを免疫化する。注射前に、細胞を指数増殖期で維持する。注射用に細胞を採取し、PBSで3回洗浄し、次いで、PBS中に再懸濁して2×10<sup>5</sup>細胞/mlの濃度にする。このモデルでは、マウスは2~3週間以内に腹水腫瘍を発症し、トランスフェクトされた標的抗原に対する免疫応答が開始されない場合には、4~6週目までに進行して死に至る。3週目に、腹部膨張(腹水を示す)が認められないマウスを、2~3週間間隔で、上記のように再免疫化する。2回目の免疫化後7日~10日目に、眼窩後方から放血させて血液試料を採取し、血清を回収し、かつ、(例えば本明細書中において説明する)中和アッセイ法においてIL-17またはIL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害する能力、およびFACS染色アッセイ法において非トランスフェクト293細胞に対してIL-17RCトランスフェクト細胞を染色する能力に関して評価する。中和力価が頭打ちになるまで、前述したようにマウスを免疫化し、血液試料を採取および評価し続ける。頭打ちになった時点で、中和力価が最も高いマウスに1×10<sup>5</sup>個のトランスフェクトされたP815生細胞を腹腔内注射する。4日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取し、例えばマウス骨髄腫(P3-X63-Ag8.653.3.12.11)細胞または当技術分野における他の適切な細胞株を用いて、当技術分野において公知の標準方法(例えばKearney, J. F. et al., 前記;およびLane, R.D.前記を参照されたい)によってハイブリドーマを作製するために用いる。

#### 【0444】

トランスフェクトされたP815生細胞を用いる上記の免疫化スキームの代替案は、2~3週毎に1~5×10<sup>6</sup>個の放射線照射済みトランスフェクト細胞を腹腔内注射することを含む。このアプローチでは、腹水を発症し、それで死亡する動物はいない。その代わりに、2回目の免疫化後の採血で開始して、上記に概説したようにそれらの血清中のIL-17RCに対する中和免疫応答に関して動物をモニターする。中和力価が最高レベルに達したら、力価が最も高いマウスに、5×10<sup>6</sup>個の放射線照射済み細胞の融合前(pre-fusion)腹腔内注入を施し、その4日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取し、例えばマウス骨髄腫(P3-X63-Ag8.653.3.12.11)細胞または当技術分野における他の適切な細胞株を用いて、当技術分野において公知の標準方法(例えばKearney, J.F. et al., 前記;およびLane, R.D. 前記を参照されたい)によってハイブリドーマを作製するために用いる。

#### 【0445】

(B) IL-17RCに結合し、IL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害する抗体を得るためのハイブリドーマ融合物のスクリーニング

融合後8~10日目に、ハイブリドーマ上清に対して3つの異なる一次スクリーニングを実施する。第1のアッセイ法の場合、HRP結合ヤギ抗マウス および抗 軽鎖第2ステップ試薬を用いるELISAによって結合されたマウス抗体を同定することにより、上清中の抗体を、プレートに結合された可溶性ヒトIL-17RC、IL-17RC-muFc、IL-17RC-CEE、IL-17RC-CHIS、またはIL-17RC-CFLAGタンパク質に結合するそれらの能力に関して試験した。IL-17RC融合タンパク質のIL-17RC部分に対する特異性を実証するために、同じマウスのFc領域(mG2a)、EE配列、HIS配列、またはFLAG配列に融合された無関係なタンパク質に関して、最初のアッセイ法での陽性上清を評価した。IL-17RC融合タンパク質と結合するが、無関係なmuFcまたは融合タンパク質配列を含む他のタンパク質と結合しない、それらの上清中の抗体は、IL-17RCに対して特異的であるとみなした。第2のアッセイ法では、ELISAにより、プレートに結合されたIL-17RC-muFcまたはIL-17RC-融合タンパク質へのビオチン化ヒトIL-17またはビオチン化ヒトIL-17Fの結合を阻害する能力に関して、すべてのハイブリドーマ上清中の抗体を評価した。

## 【0446】

ELISAアッセイ法においてIL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害したか否かを問わず、IL-17RCに特異的に結合した抗体を含む上清はすべて、続いて、IL-17RCをトランスフェクトされたBaf3細胞もしくはBHK細胞または正常なヒト気管支上皮細胞へのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害する能力に関して試験した。IL-17もしくはIL-17Fの阻害アッセイ法のいずれか、またはIL-17およびIL-17Fの阻害アッセイ法の両方において中和陽性である上清はすべて、続いて、FACS解析により、非トランスフェクトBaf3細胞またはBHK細胞に対してIL-17RCをトランスフェクトされたそれらの細胞を染色する能力に関して評価した。この解析は、IL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合の阻害が、実際は、IL-17RC受容体と特異的に結合する抗体に起因するということを確認するために設計された。さらに、FACS解析は抗IgG第2ステップ試薬を用いて実施したため、個々のFACS陽性結果から中和抗体がIgGクラスのものである可能性が高かったことが示唆される。これらの手段により、プレート結合ELISAにおいてIL-17RCに結合し、ELISAベースの阻害アッセイ法においてIL-17RCへのIL-17またはIL-17Fの結合を阻害し、IL-17およびIL-17FとIL-17RCをトランスフェクトされたBaf3細胞またはBHK細胞とのそれぞれの相互作用を妨害し、かつ、抗マウスIgG第2ステップ試薬によるIL-17RCをトランスフェクトされたBaf3細胞またはBHK細胞の染色に関して強い陽性を示したマスターウェルを同定した。

10

## 【0447】

第3のアッセイ法は、IL-17RCを発現し、かつ、IL-17F処理に応答してIL-8またはIL-6を分泌するように誘導され得る初代ヒト気管支上皮細胞からなる。特異的モノクローナル抗体は、IL-17またはIL-17Fにより刺激されるこれらの細胞によるIL-8またはIL-6の産生を阻害する能力によって分析する。IL-17またはIL-17Fに応答したIL-8およびIL-6産生は、本明細書において説明するように分析される。

20

## 【0448】

あるいは、NIH3T3または他のIL-17RCを含む細胞におけるIL-17またはIL-17F誘導性ルシフェラーゼ産生のモノクローナル抗体、抗IL-17RCを媒介とした阻害が、上記の生物活性中和アッセイ法のうちの1つとともに、またはその代わりに使用され得る。NIH3T3細胞におけるNF- $\kappa$ B媒介性ルシフェラーゼアッセイ法は、本明細書において説明する。

## 【0449】

(C) 抗IL-17RC特異的抗体を産生するハイブリドーマのクローニング

30

適切にトランスフェクトされたBaF3細胞またはBHK細胞へのIL-17およびIL-17Fの結合を交差中和した特異的抗IL-17RC mAbを産生するハイブリドーマ細胞株を、標準的な低濃度希釈(細胞1個未満/ウェル)アプローチによりクローン化する。播種後約5~7日目に、例えば、プレートに結合したヒトIL-17RC-muFcに対するELISAと、それに続く、前述したように無関係なmuFc含有融合タンパク質に対するELISAによる陽性ウェルの再試験によって、クローンをスクリーニングする。上清がIL-17RC-muFcに結合するが無関係なmuFc含有融合タンパク質には結合しない選択クローンを、中和アッセイ法ならびにFACS解析の両方を繰り返すことにより、特異的抗体活性に関してさらに確認する。選択したIL-17RC抗体陽性クローンすべてを最低2回クローン化して、クローン性を保証し、かつ抗体産生の安定性を評価するのを助ける。好ましくは、結果として生じるクローンの少なくとも95%が中和性抗IL-17RC抗体産生に関して陽性になるまで、さらに何回かクローニングを実施し、前述したようにスクリーニングする。

40

## 【0450】

(D) 抗IL-17RC mAbによって認識される分子の生化学的特徴付け

推定上の抗IL-17RC mAbによって認識される標的分子IL-17RCが、実際、IL-17RCであるという生化学的確認は、標準的な免疫沈降法とそれに続くSDS-PAGE解析またはウェスタンブロット法手順(両方とも、非トランスフェクトBaf3細胞またはBHK細胞に対してIL-17RCトランスフェクトBaf3細胞またはBHK細胞に由来する可溶性膜調製物を使用する)によって実施される。さらに、IL-17RCを発現する非トランスフェクト細胞株の可溶性膜調製物を用いて、mAbがネイティブ受容体鎖ならびにトランスフェクト受容体鎖を認識することを

50

示す。あるいは、可溶性IL-17RC-muFcタンパク質を特異的に免疫沈降させるか、またはウェスタンブロットする能力に関してmAbを試験する。

#### 【0451】

##### 実施例19

ヒトIL-17RCをトランスフェクトしたP815細胞を注射したマウスに由来する血清によるヒトIL-17RCの中和

細胞ベースの中和アッセイ法を用いて、ヒトIL-17RCトランスフェクトP815生細胞(実施例17)を注射したマウスに由来する血清を、1%、0.5%、0.25%、0.13%、0.06%、0.03%、0.02%、および0%の段階希釈液として添加する。アッセイプレートを37℃、5%CO<sub>2</sub>で4日間インキュベートし、完了時に20μl/ウェルのAlamar Blue(Accumed, Chicago, IL)を添加する。37℃、5%CO<sub>2</sub>で16時間、プレートを再びインキュベートする。結果から、これらの動物のうち4匹に由来する血清が、huIL-17およびhuIL-17Fの両方のシグナル伝達をヒトIL-17RCによって中和し得ることが示された。

#### 【0452】

これらのような結果から、例えば本発明のIL-17RCに対する中和モノクローナル抗体を介して(個々にまたは共に)IL-17またはIL-17Fに結合し、その活性を妨害、阻害、低減、拮抗、または中和することによってIL-17RCを効果的に妨害することが、インビボでのIL-17およびIL-17Fの作用を(単独または共に)を低減するのに有利となり得、かつ、例えば、乾癬、IBD、結腸炎、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、またはIL-17および/もしくはIL-17Fによって誘発される他の炎症性疾患(IBD、関節炎、喘息、乾癬性関節炎、結腸炎、炎症性皮膚病態、およびアトピー性皮膚炎を含む)において認められるもののような、IL-17および/またはIL-17Fによって誘発される炎症を低減し得るといふさらなる証拠が提供される。

#### 【0453】

##### 実施例20

抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体の薬物動態

試験モノクローナル抗体である抗ヒトIL-17RC mAbを、例えば濃度約1mg/mL(280nMでのUV吸光度により決定)の3×3mLアリコートで提供し、使用するまで-80℃で保存した。ビヒクルは、1×PBS(50mM NaPO<sub>4</sub>、109mM NaCl)、pH7.3である。使用前にmAbを室温で解凍し、アリコート1および2を使用して、それぞれ100μgのIV投薬群およびSC投薬群を提供する。アリコート3の半量を1×PBS中で1:2希釈して50μg SC投薬群とし、アリコート3の残り半量を1×PBS中で1:10希釈して10μg SC投薬群とする。SCID雌マウス(n=96)をCharles River Labsから入手する。到着時に動物の健康状態を検査し、群別に収容する(動物3匹/ケージ)。マウスは、試験開始時に12週齢であり、平均体重は約22gである。

#### 【0454】

##### (A)投薬プロトコル

SCID雌マウス(n=24/投薬群)を4つの投薬群にランダムに配置する(表8)。第1群には、尾静脈への約93μLのIV注射により抗ヒトIL-17RC mAbを投与した。第2、第3、および第4群には、頸部の首筋への約93μLのSC注射によりmAbを投与する。

#### 【0455】

##### (B)試料収集

血液収集前に、ハロタンまたはイソフルオランでマウスを十分に麻酔した。168時間後の時点(眼からの採血によって収集し、504時間後の時点に心臓穿刺によって同じ動物から再び採血した)を除く全時点において心臓穿刺によって血液試料を収集した。血液を血清分離管中に採取し、15分間凝血させた。続いて、14,000rpmで3分間、試料を遠心分離した。遠心分離後、125μL~150μLのアリコートをラベル付きエッペンドルフ管中に分注し、解析まで直ちに-80℃で保存した。

#### 【0456】

(表8)

10

20

30

40

群番号	用量 (投与経路)	動物	薬物動態 (PK) 測定時点
1	100 µg (IV)	マウス3匹/測定時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および 504 時間
2	100 µg (SC)	マウス3匹/測定時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および 504 時間
3	50 µg (SC)	マウス3匹/測定時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および 504 時間
4	10 µg (SC)	マウス3匹/測定時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および 504 時間

10

\* 168時間後および504時間後の時点に対して同じ動物を使用した。

【 0 4 5 7 】

#### (C)ELISAによる血清抗ヒトIL-17RC mAb濃度の定量

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を発達させ、薬物動態試験中に抗IL-17RCmAbを投与した動物に由来するマウス血清試料を解析するのに適格にする。このアッセイ法は、市販されている二次抗体およびTMBを用いた比色検出を活用するように設計する。検量線のために使用する希釈物を改良して、検量線の直線部分の明確さを改善した。2倍希釈物を用いた100ng/mL ~ 0.231ng/mLの範囲の検量線により、マウス血清試料の定量化が可能になる。QC試料を10% SCIDマウス血清中で1 : 100、1 : 1000、および1 : 10000に希釈し、検量線から逆算する。

20

【 0 4 5 8 】

#### (D)薬物動態学的解析

薬物動態学的解析のために、血清濃度対時間データをWinNonlin Professional 4.0ソフトウェア(Pharsight, Inc.; Cary, NC)にダウンロードする。非コンパートメント解析を用いて、各時点での平均データに基づいて薬物動態学的パラメーターを決定する。

【 0 4 5 9 】

#### 実施例21

抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体によるIL-17AおよびIL-17Fの活性の中和

細胞ベースの中和アッセイ法を用いて、精製したマウス抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体を、例えば10 µg/ml、5 µg/ml、2.5 µg/ml、1.25 µg/ml、625ng/ml、313ng/ml、156ng/ml、および78ng/mlの段階希釈液として添加する。アッセイプレートを37 °C、5% CO<sub>2</sub>で4日間インキュベートし、完了時に20 µl/ウェルのAlamar Blue(Accumed, Chicago, IL)を添加する。37 °C、5% CO<sub>2</sub>で16時間、プレートを再びインキュベートする。このアッセイ法により、精製した抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体がヒトIL-17RCを介してhIL-17およびhIL-17Fの両方のシグナル伝達を中和できることを実証することができる。著しく効果的な抗体の場合、濃度約10 µg/mlで使用される場合、その抗体はhIL-17またはhIL-17Fによって誘導される増殖を完全に中和し、この増殖阻害はより低い濃度では用量依存的に低減する。アイソタイプを一致させた陰性対照マウスmAbは、前述の濃度で試験した場合、いずれのサイトカインの増殖の阻害も提供しないと予想される。これらの結果から、IL-17RCに対するモノクローナル抗体が、低濃度で炎症誘発性リガンドIL-17およびIL-17Fの活性に実際に拮抗し得ることをさらに実証することができる。

30

40

【 0 4 6 0 】

#### 実施例22

IL-17Aは、ヒト末梢血単核細胞中のIFN- $\gamma$  およびTNF- $\alpha$  のレベルの上昇を誘導する

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)をフィコール密度勾配遠心分離によって精製し、次いで、培地単独、50ng/ml抗ヒトCD3抗体、または50ng/ml抗ヒトCD3抗体と1 µg/ml抗ヒトCD28抗体の組合せ中、37 °Cで一晩インキュベートする。これらの各条件に対する複製培養物を準備し、サイトカイン無し、25ng/mlヒトIL-17A、または25ng/mlヒトIL-17Fを与える。24時間インキュベーションした後、各培養物の上清を採取し、B-D Bioscience'sヒトTh1/Th2 Cy

50



tometric Bead Array(CBA)を用いてサイトカイン含有量を分析する。本発明者らは、抗CD3または抗CD3および抗CD28のいずれかで刺激され、かつ、IL-17Aを補充された培養物が、サイトカインを添加されなかった培養物またはIL-17Fを与えられた培養物よりも、有意に高いレベルのIFN- $\gamma$  およびTNF- $\alpha$  (それぞれ3~5倍上昇)を含むことを発見した。抗CD3刺激を与えられなかった培養物は、サイトカインレベルの有意な変化を示さなかった。さらに、IL-17A添加は、CBAを用いて分析した、IL-2、IL-4、IL-5、およびIL-10を含む他のサイトカインの有意な変化も誘導しなかった。このデータから、IL-17Aは、抗CD3または抗CD3および抗CD28で刺激したPBMC培養物におけるIFN- $\gamma$  およびTNF- $\alpha$  の産生を増大させることができるが、IL-17Fはこれできないことが示唆される。

【0461】

#### 実施例23

マウスの代用分子であるmIL-17RA-Fcは、マウスコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデルにおいて疾患の発生率および進行を低減させる

#### (A)マウスコラーゲン誘発関節炎(CIA)モデル

関節炎のCIAモデルは、ヒト関節炎を治療するための薬物(本明細書において説明するIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質など)の治療可能性を評価するための適切かつ高い評価を受けているモデルである。CIAモデルでは、マウスIL-17AおよびIL-17FのmRNAレベルが、関節炎マウスの罹患した膝窩リンパ節および足では、関節炎に罹患していないマウスのリンパ節および足で存在するレベルと比べて、有意に上昇している(10~20倍の増加; $p<0.001$ )ことが見出されたことから、IL-17AおよびIL-17Fが役割を果たす疾患のモデルとしての使用がさらに支持された。mIL-17RA-Fcは、マウスIL-17AおよびIL-17Fを中和することもでき、これは、ヒトIL-17AおよびIL-17Fに結合できるヒトIL-17RCまたはIL-17RA/RCの類似した特徴であるため、mIL-17RA-Fcタンパク質は、本明細書において説明するIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質の適切な代用物である。

【0462】

8~10週齢の雄DBA/1Jマウス(Jackson Labs;各約25~30g)をこれらの研究のために使用した。21日前に、(Chondrex(Redmond, WA)によって調製された)完全フロイントアジュバント中で調製した1mg/mlヒヨコII型コラーゲン100uIを動物の尾部に皮内注射し、3週間後の0日目に、不完全フロイントアジュバント中で調製した以外は同じ注射液をマウスに注射した。動物は、2回目のコラーゲン注射後に関節炎の症状を示し始め、ほとんどの動物が1~2週間以内に炎症を発症した。各足の疾患の程度を、足の厚みを測定するためのカリパスを用い、かつ、各足に対して以下の臨床スコア(0~3)を割り当てることによって評価した:0=正常、0.5=足指の炎症、1=軽度の足の炎症、2=中等度の足の炎症、および3=下記に詳述する重度の足の炎症。

【0463】

#### (B)疾患のモニタリング

このモデルにおける疾患の発生率は、典型的には95%~100%であり、動物40匹を用いた研究では、典型的には非応答動物0匹~2匹(6週間の観察後に判定)が認められる。炎症が始まると、多様な軽度の足炎症または足指炎症が一般的に一過性に発生し得ることに留意されたい。この理由から、動物は、顕著で持続的な足の腫脹を発症するまでは、確立された疾患を有するとみなされない。

【0464】

全ての動物を毎日観察して、足の疾患の状態を評価した。これは、各足に定性的臨床スコアを割り当てることによって実施した。毎日、臨床疾患の状態に従って、各動物の4つの足を採点した。臨床スコアを決定するために、足は、3つの領域、すなわち足指、足それ自体(手または足)、および手首または足首の関節を有すると考える。以下を含む、これらの領域に対する炎症の程度および重症度に注目した:各足指の腫脹の観察;爪の裂傷または足指の発赤;任意の足における浮腫または発赤の任意の証拠に関する記録;腱または骨の微細解剖学的境界の任意の消失に関する記録;手首または足首の任意の浮腫または発赤の評価;および、炎症が脚の基部方向に及んでいるかの記録。足スコア1、2、または3は、第

10

20

30

40

50

1に重症度の全体的印象に基づき、第2に、いくつかの領域が関与しているかに基づいた。臨床スコアリングのために使用される尺度を以下に示す。

【 0 4 6 5 】

(C) 臨床スコア

0 = 正常

0.5 = 1つまたは複数の足指が関与しているが、足指のみが炎症を起こしている

1 = 足を含む軽度の炎症(1つの領域)。1つまたは複数の足指を含んでよい

2 = 足における中等度の炎症。足指のうちいくつかおよび/または手首/足首を含んでよい(2つの領域)

3 = 足、手首/足首、および足指の一部または全体における重度の炎症(3つの領域)

10

【 0 4 6 6 】

処置: 確立された疾患は、1またはそれ以上にランク付けされる定性的スコアの足炎症として定義した。確立された疾患が存在したら、その日付を記録し、「確立された疾患」を有する動物の最初の日と呼び、処置を開始した。マウスをPBSで処置するか、または以下の用量のmIL-17RA-Fc(所望の濃度にPBS中で希釈)の内の1つを1日おきに合計5回、腹腔内投与して処置した: 150  $\mu$ g; 75  $\mu$ g; 25  $\mu$ g; 10  $\mu$ g。

【 0 4 6 7 】

抗コラーゲン抗体の血清レベル、ならびに血清免疫グロブリンレベルおよび血清サイトカインレベルをモニターするために、実験期間の全体を通して血液を採取した。最後(5回目)の処置後48時間目に、動物を安楽死させた。これは、疾患発症後約11日目であった。血清を得るために血液を採取し、組織学的検査のためにすべての足を採取して10% NBF中に入れた。免疫グロブリンアッセイ法およびサイトカインアッセイ法用に血清を採取し、-80 で凍結した。mIL-17RA-Fcで処置したマウス群の平均足スコアを下記の表9に示す。

20

【 0 4 6 8 】

(表9) CIAモデルにおいてmIL-17RA-Fcで処置したマウス群の平均足スコア

処置	処置4日目	処置10日目
PBS	1.59 + 0.15	2.13 + 0.20
10 $\mu$ g mIL-17RA-Fc	0.89 + 0.16*	1.49 + 0.14*
20 $\mu$ g mIL-17RA-Fc	0.95 + 0.19*	1.35 + 0.24*
75 $\mu$ g mIL-17RA-Fc	0.86 + 0.13*	1.18 + 0.12*
150 $\mu$ g mIL-17RA-Fc	0.64 + 0.17*	0.83 + 0.2*

30

注意: 1日目は、治療的処置の最初の日であった; 処置は、1日おきに腹腔内注射によって実施した。データは平均値 + SEMとして示す。

\*PBS処置群とは有意に異なる平均足スコア ( $p < 0.05$ )

【 0 4 6 9 】

PBS処置マウスと比べて、mIL-17RA-Fcで処置したマウスの臨床スコアの重症度には、用量依存的で有意な減少が認められた。mIL-17RA-Fc 10 $\mu$ gで処置したマウスにおいて、有意な有効性は最も少なかった(すなわち、10日間の処置日数のうち3日間のみ有意であった)。反復測定ANOVAによって解析した場合、mIL-17RA-Fc 10 $\mu$ gおよび25 $\mu$ gで処置したマウスに対する経時的な傾向は、PBSと比べて統計学的に異なっていた( $p < 0.05$ ); mIL-17RA-Fc 75  $\mu$ gまたは150 $\mu$ gで処置したマウスに対する経時的な傾向は、PBS処置マウスと比べて著しく顕著であった( $p < 0.001$ )。mIL-17RA-Fcで処置したマウスではまた、罹患する足の数も用量依存的に減少した。終了時に測定した血清サイトカインすべて(IL-1、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IP-10、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MCP、KC、およびRANTES)に関して、血清レベルは、罹患していない前もって採血された(pre-bled)動物と比べて、罹患動物において上昇していた。mIL-17RA-Fcで処置した場合、IL-1、IL-6、IL-10、IL-15、およびMIP-1の血清サイトカインレベルは、PBS処置マウスと比べて低下していた。最大

40

50

かつ最も有意な減少は、mIL-17RA-Fc 150 µgで処置した動物において認められた。また、実験の最後に測定した際、mIL-17RA-Fcの血清レベルは用量依存的に上昇していた。組織学的解析によって、関節炎症および関節破壊の用量依存的減少が実証され、mIL-17RA-Fc 75 µgで処置したマウス群は $p<0.01$ で有意な減少を示し、mIL-17RA-Fc 150 µgで処置した群は最大の有効性を示した( $p<0.001$ )。

#### 【0470】

罹患動物はすべて、前もって採血された動物と比べてより高いレベルの血清中抗コラーゲンAbをELISAにより示した。処置群の間で有意な差は認められなかった。

#### 【0471】

要約すれば、これらの結果から、本明細書において説明するヒトIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質のマウス代用物(例えばmIL-17RA-Fc)が、炎症、ならびに関節炎のこの適切なモデルに関連する疾患の発生率および進行を低減させ得ることが示され、したがって、ヒト関節炎の治療のためのヒトIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質の有効性が示される。

#### 【0472】

##### 実施例24

ap1/nfkb転写因子を発現するマウスのアッセイ用細胞株Nih3t3/kz142.8におけるIL-17RCの安定な過剰発現

マウスnih3t3/kz142.8アッセイ用細胞株に、メトトレキサート耐性遺伝子(ジヒドロ葉酸還元酵素、DHFR)を有する発現ベクター中のヒトIL-17RCx1(SEQ ID NO: 2)をトランスフェクトした。このトランスフェクションは、市販されているキットおよび製造業者の推奨(Mirus, Madison, WI. カタログ番号MIR218)を用いて実施した。ヒトIL-17RCx1導入遺伝子を含む発現ベクターを選択するために、1 µM メトトレキサート(mtx)で修正した増殖培地に細胞を播種した。選択後、ヒトIL-17RCx1トランスフェクションプールを作製し、nih3t3/kz142.8/hcytor14x1と呼んだ。

#### 【0473】

(A)nih3t3/kz142.8アッセイ用細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイ法

nih3t3/kz142.8は安定なkz142レポーターを有するため、このレポーターを付加するためのアデノウイルス感染を必要としない。したがってルシフェラーゼアッセイ法プロトコルを短縮し、以下の方法を実施した。

#### 【0474】

##### 1. 細胞の平板培養

nih3t3/kz142.8細胞を、グルタミンを含みビルビン酸で修正したDMEM/10%FBSを用いて、固体白色の細胞培養用コーティング96ウェルプレート(カタログ番号3917.Costar)中に5000細胞/ウェルで播種し、37 °C、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。この2日目に、平板培養培地を除去し、グルタミンを含みビルビン酸で修正したDMEM/1%FBSと交換し、37 °C、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。

#### 【0475】

##### 2. 安定なkz142レポーターのIL-17AおよびIL-17F活性化を測定するルシフェラーゼアッセイ法

1%FBS、DMEM培地中で一晩インキュベーションした後、BSAで0.28%レベルに修正した無血清培地中でヒトIL-17AおよびIL-17Fリガンド希釈液を作製した。リガンド希釈液を添加した後、37 °C、5%CO<sub>2</sub>で4時間、細胞をインキュベーションし、その後培地を取り出し、細胞を15分間溶解し、かつ、ルシフェラーゼアッセイ系および試薬(カタログ番号e1531、Promega, Madison, WI)ならびにマイクロプレート照度計を用いて、平均蛍光強度(MFI)を測定した。活性は、0.1ng/ml ~ 1000ng/mlの範囲の濃度で両リガンドに関して検出した。nih3t3/kz142.8/hcytor14x1トランスフェクションプールは、マウスIL-17Aリガンドに対して親細胞株の場合と同様の活性を示した(実施例14)。しかしながら、cytor14x1トランスフェクタントプールは、これらのリガンド濃度が20フェムトグラム(femtogram)程度に低い場合でさえ、ヒトIL-17AおよびIL-17F処理に対する応答性の増大を示した。mIL-17

10

20

30

40

50

Aシグナル伝達が親細胞株におけるシグナル伝達に匹敵する(実施例14)ということから、ヒトIL-17RC発現細胞に一般的な非特異的問題は存在しないということ、およびマウスIL-17Aがおそらくは内因性のマウスnih3t3細胞IL-17RまたはIL-17RC受容体を介してシグナル伝達しているということが示唆される。したがって、ヒトIL-17AおよびIL-17Fがこのような低リガンド濃度でMFIの増大を引き起こすということは、過剰発現されたヒトIL-17RC受容体によって媒介される、それらのリガンドに対する細胞の特異的応答性亢進を示し得る。

#### 【0476】

この結果は、重要な臨床的および生物学的な派生問題および有用性を有する。例えば、生理学的状況は、IL-17RC受容体の局所的上方調節を引き起こす場合があり、これは次に、IL-17AおよびIL-17Fに対するこれらの領域の応答性を亢進させ、結果として、IL-17RC過剰発現が無い場合に示される場合よりもはるかに低いリガンド濃度で生物学的活性化をもたらし得る。したがって、当業者が従来考えるかまたは認識していたよりもはるかに低い可溶性受容体レベルが、これらの仮説上より低いリガンド濃度に拮抗するのに十分であり得る。

10

#### 【0477】

##### 実施例25

IL-17FおよびIL-17A活性に対するアンタゴニストは、炎症性腸疾患(IBD)モデルにおいて疾患の発生率および進行を低減させる

このモデルは、IBD患者由来の培養された腸組織が、健全な対照由来の組織と比べて、より高レベルの炎症メディエーターを産生することを示すために設計される。炎症メディエーター(IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MIPファミリーメンバー、MCP-1、G-CSFおよびGM-CSFなどを含むがこれらに限定されるわけではない)の産生のこの増大は、炎症経路および下流のエフェクター細胞の活性化に対する作用を介して、クローン病(CD)および潰瘍性大腸炎(UC)などのIBDに関連する症状および病理の一因となる。次いで、これらの経路および成分は、インビボで観察される組織および細胞の損傷/破壊をもたらす。したがって、このモデルは、IBDの炎症メディエーターが増強されたこの状況を模擬し得る。さらに、健全な対照またはヒト腸上皮細胞(IEC)株に由来する腸組織をこれらの炎症性成分の存在下で培養する場合、炎症経路シグナル伝達、ならびに組織および細胞の損傷の証拠が観察され得る。

20

30

#### 【0478】

ヒトIBDにおいてインビボで有効であると思われる治療薬は、炎症メディエーターの産生および/または存在を阻害および/または中和することによって、上記のエキスピボモデルまたはIECモデルにおいて作用するはずである。

#### 【0479】

このモデルでは、ヒト腸組織を、IBD患者もしくは腸生検、切除を受けた健常対照から、または死後の組織採集から採取し、Alexakis et al.(Gut 53:85-90; 2004)の改変法を用いて処理する。無菌条件下で、大量のPBSで試料を穏やかに洗浄し、続いて、完全組織培養培地(および細菌の過剰増殖を防止するための抗生物質)の存在下で、細かく切った組織切片を培養する。細かく切った組織の同じプールに由来する試料を以下のうち1種で処理する: ピヒクル(PBS)、組換えヒト(rh)IL-17A、rhIL-17F、またはrhIL-17A+rhIL-17F。さらに、IL-17AまたはIL-17Fのいずれかのアンタゴニストを用いて、または用いずに、単独でまたは組み合わせて(可溶性IL-17RCなど)、これら进行处理する。この実験プロトコールは、細胞が既存のストックから継代培養される点を除いて、ヒトIEC株を用いた研究用のプロトコールに従う。様々な期間(1時間~数日間)培養した後、上清を採取し、上記に挙げたものを含む炎症メディエーターのレベルを解析する。IBD患者由来の試料において、またはrhIL-17Aおよび/もしくはrhIL-17Fで処理した試料において、炎症性サイトカインおよび炎症性ケモカインのレベルは、未処理の健常な対照組織試料と比べて上昇している。IL-17RC可溶性受容体ならびに本発明の抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体および中

40

50

和抗体を含むそれらに対する抗体などIL-17F活性および/またはIL-17A活性に対するアンタゴニストを添加すると、炎症メディエーターの産生が著しく減少し、したがって、ヒトIBDにおいて有効であることが予想される。

【0480】

#### 実施例26

IL-17FおよびIL-17A活性に対するアンタゴニストは、多発性硬化症(MS)モデルにおいて疾患の発生率および進行を低減させる

多発性硬化症(MS)は、リンパ球性および単核性の細胞炎症性浸潤物の存在ならびにCNSの全体にわたる脱髄を含む、いくつかの要因によって媒介されると考えられている複合疾患である。ミクログリアは、中枢神経系(CNS)に存在し、かつ、損傷または炎症の際に活性化されるマクロファージ様細胞である。ミクログリアは、MSを含む様々なCNS疾患において重大な役割を果たすと意味付けられており、疾患の開始、進行、および治療法のメカニズムを研究するために使用され得る(Nagai et al. Neurobiol Dis 8: 1057-1068; 2001、Olson et al. J Neurosci Methods 128: 33-43; 2003)。したがって、不死化されたヒトミクログリア細胞株および/または樹立されたヒトアストログリア細胞株は、これらの細胞型に対する炎症メディエーターの作用のいくつかおよび中和に対するそれらの可能性を研究するために使用することができる。炎症メディエーター(IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MIPファミリーメンバー、RANTES、IP-10、MCP-1、G-CSFおよびGM-CSFなどを含むがこれらに限定されるわけではない)は、炎症経路および下流のエフェクター細胞の活性化に対する作用を介して、MSに関連する症状および病理の一因となり得る。

【0481】

IL-17AおよびIL-17Fの炎症誘発性作用、ならびにこれらの作用を中和または減少させるための、IL-17RC可溶性受容体ならびに本発明の抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれらに対する抗体などIL-17F活性および/またはIL-17A活性に対するアンタゴニストの能力を評価するために、培養したグリア細胞を以下のうち1種で処理する：ビヒクル、rhIL-17A、rhIL-17F、rhIL-17A+IL-17F。さらに、IL-17AまたはIL-17Fのいずれかのアンタゴニストを用いて、または用いずに、単独でまたは組み合わせて(可溶性IL-17RCなど)、これら进行处理する。様々な期間(1時間～数日間)培養した後、上清および細胞を採取し、上記に挙げたものを含む炎症メディエーターのレベルおよび/または発現を解析する。炎症性サイトカインおよび炎症性ケモカインのレベルは、ビヒクルのみで処理した培養物と比べて、rhIL-17Aおよび/またはIL-17Fの存在下で上昇している。IL-17RC可溶性受容体ならびに本発明の抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれらに対する抗体などIL-17F活性および/またはIL-17A活性に対するアンタゴニストを添加すると、炎症メディエーターの産生および発現が著しく減少し、したがって、ヒトMSに関連した炎症性状況において有効であることが予想される。

【0482】

#### 実施例27

IL-17FおよびIL-17A活性に対するアンタゴニストは、関節リウマチ(RA)および変形性関節症(OA)モデルにおいて疾患の発生率および進行を低減させる

このモデルは、ヒト滑膜培養物(滑膜マクロファージ、滑膜線維芽細胞、および関節軟骨細胞を含む)ならびにRA患者およびOA患者由来の外植片が、健常な対照に由来する培養物/外植片と比べて、より高いレベルの炎症メディエーターを産生することを示すために設計される。炎症メディエーター(オンコスタチンM、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IP-10、RANTES、RANKL、MIPファミリーメンバー、MCP-1、G-CSFおよびGM-CSF、一酸化窒素などを含むがこれらに限定されるわけではない)の産生のこの増大は、炎症経路および下流のエフェクター細胞の活性化に対する作用を介して、RAおよびOAに関連する症状および病理の一因となる。次いで、これらの経路および成分は、炎症性浸潤物、軟骨および基質の減少/破壊、骨量減少、ならびにプロスタグランジンおよびシクロオキシゲナーゼの上方調節をもたらす。したがっ

て、このモデルは、インビトロ実験およびエキスピボ実験においてRAおよびOAの破壊的な炎症性状況を模擬することができる。さらに、健常な対照に由来する外植片および滑膜培養物が、これらの炎症性成分(例えば、オンコスタチンM、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17AおよびIL-17F、IL-15など)のうちいくつかの存在下で培養される場合、炎症経路のシグナル伝達が観察され得る。ヒトRAにおいてインビボで有効であると思われる治療薬は、炎症メディエーターの産生および/または存在を阻害および/または中和することによって、上記のインビトロモデルおよびエキスピボモデルにおいて作用するはずである。

#### 【0483】

このモデルでは、ヒト滑膜外植片は、RA患者、OA患者、もしくは関節置換術を受けた健常な対照から、または死後の組織採取から採取し、かつ、WoolleyおよびTetlow(Arthritis Res 2:65-70; 2000)ならびにvan't Hof et al(Rheumatology 39:1004-1008; 2000)の改変法を用いて処理する。同様に、滑膜線維芽細胞、滑膜マクロファージおよび関節の軟骨細胞の培養物も研究する。複製試料を以下のうち1種で処理する: ビヒクル(PBS)、組換えヒト(rh)IL-17A、rhIL-17F、またはrhIL-17A+rhIL-17F。一部の試料は、オンコスタチンM、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17A、IL-17F、およびIL-15の様々な組合せを含む。さらに、IL-17RC可溶性受容体ならびに本発明の抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれらに対する抗体などIL-17F活性および/もしくはIL-17A活性に対するアンタゴニストを用いて、または用いずに、これら进行处理する。様々な期間(1時間~数日間)培養した後、上清を採取し、上記に挙げたものを含む炎症メディエーターのレベルを解析する。RA患者もしくはOA患者由来の試料において、または(単独もしくは他の炎症性サイトカインと組み合わせて)rhIL-17Aおよび/もしくはrhIL-17Fで処理した試料において、炎症性サイトカインおよび炎症性ケモカインのレベルは、未処理の健常な対照外植片または未処理の細胞培養物と比べて上昇している。IL-17RC可溶性受容体ならびに本発明の抗ヒトIL-17RCモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれらに対する抗体などIL-17F活性および/またはIL-17A活性に対するアンタゴニストを添加すると、炎症メディエーターの産生が著しく減少し、したがって、ヒトRAおよびOAにおいて有効であることが予想される。

#### 【0484】

##### 実施例28

##### IL-17AおよびIL-17Fの機能的応答

NIH-3T3/KZ142細胞を、ヒトIL-17RCx1(SEQ ID NO: 1)およびマウスIL-17RCx1(SEQ ID NO: 25)で安定にトランスフェクトした。前述したように、IL-17A、IL-17F、マウスIL-17F、および適切な対照の用量応答で7分間および15分間、各株进行处理した。IL-17RCx1(SEQ ID NO: 1)をトランスフェクトした場合、IL-17AおよびIL-17Fの両方とも、対照株からの固有のシグナル伝達より約30%高い、リン酸化I $\kappa$ B-およびp38MAPK転写因子の用量依存的応答を示した。IL-17AおよびIL-17Fは、マウスIL-17RCx1(SEQ ID NO: 25)をトランスフェクトした場合、シグナル伝達増大を示さなかった。マウスIL-17Fは、ヒトまたはマウスのIL-17RCx1のいずれに対してもシグナル伝達の増大を示さなかった。

#### 【0485】

##### 実施例29

##### マウス疾患モデルにおけるIL-17A、IL-17F、IL-17R、およびIL-17RCの発現

4種のマウス疾患モデル(喘息、DSS結腸炎、アトピー性皮膚炎、および実験的アレルギー性脳脊髄炎)を、公知の技術を用いて、IL-17A、IL-17F、IL-17R、およびIL-17RCの発現に関して分析した。

#### 【0486】

喘息モデルにおいて、IL-17AおよびIL-17Fは、罹患マウスおよび非罹患マウスの肺、脾臓、肺流入領域リンパ節、および肺浸潤細胞において非常に低いレベルから検出不可能なレベルで発現される。IL-17RCメッセージは、脾臓およびリンパ節よりも肺において高発現されることが判明したが、疾患によって調節されていなかった。IL-17Rは、肺よりも脾臓および肺流入領域リンパ節において高発現されていたが、やはり疾患によって調節されていなかった。

10

20

30

40

50

## 【0487】

喘息モデルとは異なり、IL-17AおよびIL-17Fは、罹患マウスDSS結腸炎モデルの近位結腸および遠位結腸の両方において著しく上方調節されていたが、正常マウスのモデルでは上方調節されていなかった。どちらのサイトカインも、腸間膜リンパ節において有意に上方調節されていなかった。さらに、急性のDSS誘発性結腸炎において両方のサイトカインが上方調節されるが、慢性のDSS誘発性結腸炎においては上方調節されないことも判明した。IL-17Rは、近位結腸および遠位結腸と比べて腸間膜リンパ節において顕著に発現されることが判明したが、疾患によって調節されていなかった。一方、IL-17RCは、腸間膜リンパ節よりも近位の遠位結腸組織において高発現された。IL-17RC発現もまた、疾患によって調節されていなかった。

10

## 【0488】

アトピー性皮膚炎において、IL-17A mRNAは検出可能ではなかった。IL-17Fは、皮膚および皮膚流入領域リンパ節の両方において発現されることが判明したが、疾患によって有意に調節されていないと思われた。IL-17R mRNAは、皮膚よりも皮膚流入領域リンパ節において高発現されていたが、疾患によって調節されていなかった。IL-17RCは、皮膚流入領域リンパ節よりも皮膚において高発現されていたが、やはり、疾患によって調節されていなかった。

## 【0489】

実験的アレルギー性脳脊髄炎において、IL-17AおよびIL-17Fの両方とも、罹患マウスの脊髄において上方調節されているようであったが、健常マウスにおいてはそうではなかった。IL-17Fは、脊髄よりもリンパ節で高発現されている場合があったが、リンパ節における発現は疾患によって調節されていなかった。しかしながら、これらの組織における発現の総合的レベルは非常に低かった。IL-17Rは、脳および脊髄よりもリンパ節組織において高発現されていた。IL-17RCは試験しなかった。

20

## 【0490】

要するに、IL-17AおよびIL-17Fの発現は、DSS誘発性結腸炎モデルおよび実験的アレルギー性脳脊髄炎モデルにおいては疾患によって調節されていると思われたが、喘息またはアトピー性皮膚炎の場合はそのように見受けられなかった。IL-17RおよびIL-17RCの発現は疾患によって調節されていると思われないが、IL-17R発現は、リンパ組織において強化されていると思われ、IL-17RC発現は、非リンパ組織において強化されていると思われる。

30

## 【0491】

## 実施例30

IL-17RCはIL-17AおよびIL-17Fの両方に対する活性化のメディエーターである

マウスnih3t3/kz142.8アッセイ用細胞株を、メトトレキサート耐性遺伝子(ジヒドロ葉酸還元酵素、DHFR)を有する発現ベクター中のヒトIL-17RCX1(SEQ ID NO: 2)でトランスフェクトした。ヒトIL-17RA(SEQ ID NO: 21)を、この細胞株に同様にトランスフェクトした。トランスフェクションは、市販されているキットおよび製造業者の推奨(Mirus, Madison, WI. カタログ番号MIR218)を用いて実施した。発現構築物を含む発現ベクターを選択するために、1  $\mu$ M メトトレキサート(mtx)で修正した増殖培地に細胞を播種した。選択後、トランスフェクションプールを作製し、nih3t3/kz142.8/hcytor14X1およびnih3t3/kz142.8/IL-17Rと呼んだ。

40

## 【0492】

(A)nih3t3/kz142.8ベースの細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイ法

nih3t3/kz142.8ベースの細胞株は安定なap1/nfkbレポーター(kz142)を有するため、このレポーターを付加するためのアデノウイルス感染を必要としない。したがって、ルシフェラーゼアッセイ法プロトコルを短縮し、以下の方法を実施した。

## 【0493】

## 1. 細胞の平板培養

細胞を、グルタミンを含みビルビン酸で改良したDMEM/10% FBSを用いて、固体白色の細

50

胞培養用コーティング96ウェルプレート(カタログ番号3917.Costar)中に5000細胞/ウェルで播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。この2日目に、平板培養培地を除去し、グルタミンを含みピルビン酸で改良したDMEM/1%FBSと交換し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。

【0494】

## 2. 安定なkz142レポーターのIL-17AおよびIL-17F活性化を測定するルシフェラーゼアッセイ法

1% fbs、DMEM培地中で一晩インキュベーションした後、BSAで0.28%レベルに修正した無血清培地中でヒトIL-17AおよびIL-17Fリガンド希釈液を作製した。リガンド希釈液を添加した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>で4時間、細胞をインキュベーションし、その後培地を取り出し、細胞を15分間溶解し、かつ、ルシフェラーゼアッセイ系および試薬(カタログ番号e1531、Promega, Madison, WI)ならびにマイクロプレート照度計を用いて、平均蛍光強度(MFI)を測定した。活性は、0.1ng/ml ~ 100ng/mlの範囲の濃度で両リガンドに関して検出した。

【0495】

下記に考察するEC<sub>50</sub>は、少なくとも4回の実験の平均である。nih3t3/kz142.8/hcytor14x1トランスフェクションプールは、マウスIL-17Aリガンドに対して親細胞株の場合と同様の活性を示し、EC<sub>50</sub>は約4ng/mlであった(実施例14)。hcytor14x1組換え株におけるmIL-17Aシグナル伝達が親細胞株におけるシグナル伝達に匹敵する(実施例14)ということから、マウスIL-17Aがおそらくは内因性マウスnih3t3細胞IL-17RAまたはIL-17RC受容体を介してシグナル伝達しており、かつ、hcytor14X1を介しては細胞を活性化しないということが示唆される。しかしながら、hIL-17RCX1トランスフェクタントプールは、ヒトIL-17A処理に対する応答性増大を示し、EC<sub>50</sub>は親株における2.8ng/mlに対して0.41ng/ml(実験4回の平均)であった(組換え株においてEC<sub>50</sub>は6.8倍強力)。さらに、hIL-17RCX1組換え株はhIL-17Fに対して増大した応答性を有し、EC<sub>50</sub>は親株における10ng/mlに対して組換え株において0.61ng/mlであった(組換え株においてEC<sub>50</sub>は17倍強力)。hIL-17RCX1株におけるhIL-17AおよびhIL-17Fに対する効力増大は、ヒトIL-17RCX1がヒトIL-17AおよびIL-17Fの両方に対する高親和性受容体であることと一致している。一方、hIL-17RA組換え株は、hIL-17Aに対してのみ感受性増大を示し、EC<sub>50</sub>は親株における2.8ng/mlに対して0.6ng/mlであった。hIL-17RA組換え株におけるhIL-17FのEC<sub>50</sub>の増大は認められず、IL-17F EC<sub>50</sub>は親株における8.9ng/mlに対して12.4ng/mlであった。

【0496】

この結果は、hIL-17AおよびhIL-17Fの両方に対する活性化のメディエーターとしてhIL-17RCX1を具体的に意味付けるため重要であり、かつ、hIL-17RAがhIL-17A活性化に対してのみシグナル伝達を媒介し、hIL-17F活性化に対しては媒介しないことを示唆する。

【0497】

### 実施例31

#### IL-17AおよびIL-17Fの静脈内投与

マウスまたはヒトのIL-17AまたはIL-17Fの静脈内送達が多様な時点のBALB/cマウスの全血球算定(CBC)および血清サイトカイン/ケモカインに与える影響を決定するため。

【0498】

mIL-17A 1μgを静脈内投与すると、投与後1~2時間目に、循環血中の好中球は約2倍増加し(CBCによる)、血清KCおよび血清MCP-1は約10倍増加した(Luminexによる);hIL-17A 5μgを用いた場合も、これらのケモカインにおいて同様の結果が観察された。血液単球レベルもまた、mIL-17A 1μg(最大の上昇を示した)、hIL-17A 5μg、またはhIL-17F 5μgで処置したマウスにおいて、2時間の時点で有意に上昇していた。mIL-17FおよびhIL-17Fを静脈内投与すると、1時間および2時間の時点で血清IL-15は著しく増加し(Luminexによる)、これらの同じ時点で血清KCおよび血清MCP-1は少し増加した。

【0499】

### 実施例32

#### IL-17AおよびIL-17F静脈内投与の中和

静脈内IL-17AおよびIL-17Fによって媒介されたサイトカインおよびケモカインの増加を



可溶性受容体(マウスリガンドに対するmIL-17RA:Fc;ヒトリガンドに対する可溶性ヒトIL-17RC)の腹腔内投与によって中和するために、PBS;mIL-17A、mIL-17Fいずれかを2 $\mu$ g、もしくはmIL-17AおよびmIL-17F両方を2 $\mu$ g(mIL-17RA-Fcを与えるマウスの場合);またはhIL-17A、hIL-17Fいずれかを2 $\mu$ g、もしくはhIL-17AおよびhIL-17F両方を2 $\mu$ g(可溶性ヒトIL-17RCを与えるマウスの場合)を尾静脈注射によって与えるより3時間前に、PBS、mIL-17RA-Fc 100 $\mu$ g、または可溶性ヒトIL-17RC 100 $\mu$ gのいずれかを腹腔内注射によって雌BALB/cマウスに投与した。リガンド投与後1時間目に血清を採取し、小数の血清サイトカインおよびケモカインに関して解析した。

#### 【0500】

マウス可溶性受容体の腹腔内投与によって前処置したマウスでは、PBS+マウスIL-17Aで処置したマウスと比べて、マウスIL-17Aによって媒介されるIL-17AおよびKC(CXCL1)の血清濃度の上昇が有意に低下していた(約2~2.2分の1; $p<0.05$ )。ヒトIL-17RC-Fcの腹腔内投与によって前処置したマウスでは、ヒトIL-17Fによって媒介されるIL-15の血清濃度の上昇が有意に低下し(約2分の1; $p<0.05$ );IL-17Aによって媒介されるKCの増加が有意に低下し(約30%減少; $p<0.05$ );ヒトIL-17A+IL-17Fによって媒介されるKCの増加が有意に低下し(約25%減少; $p<0.05$ );ヒトIL-17FまたはIL-17A+IL-17Fのいずれかによって媒介されるIL-15の増加が有意に低下した(約2分の1; $p<0.05$ )。

#### 【0501】

##### 実施例33

可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドのプレートベースのタンパク質結合アッセイ法

捕捉EIAの形式は次のとおりである:ELISAプレートを1 $\mu$ g/mlのヤギ抗ヒトIgGでコーティングし、4で一晩インキュベートする。洗浄し、室温にて1時間、200 $\mu$ l/ウェルの1%BSAでプレートをブロッキングする。洗浄し、可溶性受容体変種(A1586F、A1587F)またはIL17RCx1(A1034F)の希釈系列(100 $\mu$ g/ml~0.10 $\mu$ g/ml)をプレートに添加し、室温で1時間インキュベートする。洗浄し、ビオチン標識リガンドを10:1(IL17A)または6:1(IL17F)で添加し、室温で1時間インキュベートする。洗浄し、0.5 $\mu$ g/mLのストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを添加し、室温で1時間インキュベートする。洗浄し、TMB基質を4分間添加する。停止液を添加することによって反応を停止させる(注意:別段の記載が無い限り、反応物体積はすべて50 $\mu$ l/ウェルであった)。陽性の結果は、高いOD値、一般に0.5超である。これらの結果から、構築物1342(SEQ ID NO: 74)は、このアッセイ法においてIL-17Aに結合せず、IL-17Fに弱く結合することが示された。構築物1341(SEQ ID NO: 72)はIL-17AおよびIL-17Fの両方に非常に強く結合する。IL-17RCx1はIL-17AおよびIL-17Fに結合する。

#### 【0502】

中和EIAの形式は以下のとおりである:1 $\mu$ g/mlの可溶性受容体(A1034F)でELISAプレートをコーティングし、4で一晩インキュベートする。洗浄し、室温にて1時間、200 $\mu$ l/ウェルの1%BSAでプレートをブロッキングする。ブロッキングしている間、別のプレート中で、可溶性受容体変種(A1586F、A1587F)の希釈系列(50 $\mu$ g/ml~0.05 $\mu$ g/ml)を、10:1(IL17A)または6:1(IL17F)のビオチン標識リガンドと共に、等体積にて室温で1時間インキュベートする。ブロッキングしたプレートを洗浄し、ブロッキングしたプレートに受容体-リガンド複合体を添加し、室温で1時間インキュベートする。洗浄し、0.5 $\mu$ g/mLのストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼを添加し、室温で1時間インキュベートする。洗浄し、TMB基質を7分間添加する。停止液を添加することによって反応を停止させる(注意:別段の記載が無い限り、反応物体積はすべて50 $\mu$ l/ウェルであった)。陽性の結果は、低いOD値、一般に0.5未満である。これらの結果から、構築物1342(SEQ ID NO: 74)は、IL17RCx1へのIL17Aの結合を弱い力で中和し、IL17RCx1へのIL17Fの結合を強い力で中和することが示された。構築物1341(SEQ ID NO: 72)は、IL17RCx1へのIL17Aの結合を弱い力で中和し、IL17RCx1へのIL17Fの結合を弱い力で中和する。中和から、変種タンパク質がビオチン化リガンドに結合していることが示唆される。

10

20

30

40

50

## 【 0 5 0 3 】

## 実施例34

## FACS結合アッセイ法のプロトコール

本発明の可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドがリガンドIL-17AおよびIL-17Fに結合する能力を評価するために、フローサイトメトリーに基づいた競合結合アッセイ法を利用した。完全長IL-17RCx4を安定にトランスフェクトしたBHK細胞株をリガンドIL17AまたはIL17F、およびそれらのリガンドに結合するようにターゲティングされた可溶性受容体の存在下でインキュベーションすることにより、細胞表面に結合された(したがって、可溶性受容体に結合されていない)リガンドの検出および相対的定量が可能になる。リガンドをビオチン化することにより、二次的なストレプトアビジン結合蛍光体を用いたFACS検出が可能になる。可溶性受容体の滴定の間の細胞に結合されるリガンドの減少は、細胞の平均蛍光の減少として記録される。ビオチン化リガンドは、1ug/mlの濃度で、染色用媒体(HBSS+1%BSA+0.1%アジ化ナトリウム+10mM HEPES)中の滴定量の可溶性受容体と個別に体積100ulで予備混合し、室温で15分間インキュベートする。完全長IL-17RCx4を安定にトランスフェクトしたBHK細胞株を、Versene(Invitrogenカタログ15040-066)による再懸濁、 $2 \times 10^5$ 細胞/100ulへの平衡化、沈殿、リガンド/可溶性受容体の予備混合物への再懸濁によって、リガンド染色用に調製する。染色された細胞を4で30分間インキュベートし、染色媒体中で1回洗浄し、1:100の比率のストレプトアビジン-PE(BD Pharmingen カatalog 554061)で染色した。暗所、4で30分間、細胞をインキュベートし、染色媒体中で2回洗浄し、1:1の比率の染色媒体およびCytofix(BD Bioscience 554655)中に再懸濁する。BD LSRIIフローサイトメーターまたは同様の機器をデータ収集および解析のために使用する。図5は、標準的なグラフを示す。グラフはPrizmソフトウェアプログラムを用いて作成した。Yの値は、リガンドのみおよびリガンド無し/可溶性受容体無しの対照ウェルに基づいた最大値および最小値(100%および0%)に対して標準化したMFI、したがって、細胞へのリガンドの結合率(%)を表す。ソフトウェアによって各曲線のIC50を算出する。

10

20

## 【 0 5 0 4 】

## 実施例35

可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドによる、ビオチン化ヒトIL-17AおよびIL-17Fの特異的結合の阻害

30

可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドがIL-17AおよびIL17Fに結合する能力を決定するために使用される結合アッセイ法を本明細書において説明する。SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158など、さらなる可溶性ポリペプチドを結合反応に含めること以外は前述したようにして結合研究を実施する。この可溶性ポリペプチドは、IL-17RCをトランスフェクトされたBHK細胞へのヒトIL-17AおよびヒトIL-17Fの両方の結合を、可溶性ヒトIL-17RCx1 Fc融合タンパク質(SEQ ID NO: 64)と同程度阻害した。SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158の可溶性ポリペプチドを含む、可溶性ポリペプチドの残りを下記の表10に含める。

## 【 0 5 0 5 】

(表 1 0 \* )

40

可溶性 ポリペプチド	変種	IC50 - IL17A	可溶性 ポリペプチド	変種	IC50 - IL17F
IL17RA/RC	1407	7	IL17RC	1390	9
IL17RA/RC	1407	9	IL17RA/RC	1454	18
IL17RA/RC	1454	4	IL17RA/RC	1454	31
IL17RA/RC	1454	17	IL17RA/RC	1454	95
IL17RA/RC	1454	20	IL17RA/RC	1407	33
IL17RC	1390	12	IL17RA/RC	1407	42
IL17RA/RC	1341	30	IL17RC	1210	31
IL17RC	1210	35	IL17RC	1210	61
IL17RC	1210	47	IL17RC	1210	67
IL17RC	1210	74	IL17RA/RC	1341	47
IL17RC	1459	126	IL17RC	1459	103
IL17RC	1342	217	IL17RC	1342	313

10

20

\* 細胞ベースの競合結合IC50(ng/uL);各リガンドに対するIC50に基づいて、構築物を最も強い結合物から最も弱いものまで順序付け。

【 0 5 0 6 】

#### 実施例36

IL-17AおよびIL-17Fに対するIL-17RC可溶性ポリペプチドおよびIL-17RC/IL-17RA可溶性ポリペプチドの結合親和性

IL-17RCx1、IL-17RA、および可溶性IL-17RC/IL-17RA可溶性ポリペプチド(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)を、IL-17AおよびIL-17Fの両方に対する結合親和性に関して次のようにして試験した:Gt-抗Hu IgG-Fc特異的抗体(Jackson 109-005-008)を酢酸ナトリウム(pH5.0)中で50ug/mlに希釈し、CM5 Biacoreチップ上に固定した。理論上の結合最大値で受容体を捕捉するようにプロトコルを最適化した後、各リガンドの濃度系列を注入して、結合および解離を観察した。可溶性受容体およびIL-17RC/IL-17RAポリペプチドを、各リガンドの濃度系列の結合に関して試験した。各サイクルの間にpH1.75のグリシンを2×30秒注入して、表面を再生した。Biacore Evaluationソフトウェアを用いてデータを評価して動力学値を定めた。これを下記の表11に示す。

30

【 0 5 0 7 】

( 表 1 1 \* )

ヒト IL-17A に対するヒト IL17RCx1 の親和性

ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
1.05E+06	4.90E-04	4.69E-10	9.02	0.424
1.24E+06	4.38E-04	3.52E-10	8.86	0.324

ヒト IL-17F に対するヒト IL17RCx1 の親和性

05-2005

ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
9.91E+05	4.31E-04	4.35E-10	7.22	0.378
1.11E+06	3.84E-04	3.46E-10	7.57	0.549

10

ヒト IL-17A に対する可溶性 IL-17RC/IL-17RA ポリペプチド 04-2006

ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
1.42E+06	6.22E-05	4.39E-11	20.5	0.460
2.61E+06	9.95E-05	3.82E-11	18.3	0.888

ヒト IL-17F に対する可溶性 IL-17RC/IL-17RA ポリペプチド 04-2006

ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
1.82E+06	2.61E-04	1.43E-10	10.2	0.495
2.49E+06	3.15E-04	1.26E-10	11.2	0.544

20

ヒト IL-17A に対するヒト IL-17RA の親和性

06-2006

ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
3.70E+05	8.65E-05	2.34E-10	29.5	0.249
2.89E+05	8.57E-05	2.96E-10	35.1	0.197

ヒト IL-17F に対するヒト IL-17RA の親和性

07-2006

ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
2.09E+04	5.56E-04	2.66E-08	20.3	0.071
2.55E+04	4.40E-04	1.72E-08	9.9	0.076

30

\* 平衡定数および速度定数が示され、値は機器の限界の範囲内である。

Chi2は、結合曲線と評価フィッティング曲線の残差の平方和を意味する。

0に近いほど、本発明者らのデータの信頼性は高い。このデータは十分な信頼性で示される。

#### 【0508】

これらのデータから、ヒト IL-17RA およびヒト IL-17RC に対するヒト IL-17A およびヒト IL-17F の結合が実証される。具体的には、ヒト IL-17RC は、ヒト IL-17A およびヒト IL-17F の両方に対して同様の結合親和性を示し、解離平衡定数 (KD) は 400 ピコモル (pM) の範囲である。可溶性 IL-17RC/IL-17RA ポリペプチドは、ヒト IL-17F (約 140 pM の KD) より若干高い親和性でヒト IL-17A (約 40 pM の KD) に結合した。ヒト IL-17RA は、リガンド親和性の最大の不一致をもたらし、ヒト IL-17A 結合 (約 300 pM の KD) とヒト IL-17F 結合 (約 30 ナノモル濃度 (nM) の KD) に 100 倍の差があった。

40

#### 【0509】

実施例 37

組換えヒト IL-17RA/NIH3T3/KZ142.8 および組換えヒト IL-17RCx4/NIH3T3/KZ142.8 レポーターアッセイ用細胞株の作製

本明細書において説明するマウス NIH3T3/KZ142.8 レポーター細胞株を用いて、ヒト IL-1

50

7RA(SEQ ID NO: 21)またはIL-17RCx4(SEQ ID NO: 166)いずれかを組み替えた新しいアッセイ用細胞株を作製した。これらの各cDNAを含む発現構築物でこれらの細胞をトランスフェクションすることによって、これを遂行した。利用した発現ベクターpzm11は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を含む。したがって、トランスフェクタントは、安定なプールを作り出すように1 $\mu$ Mのメトトレキサートで修正した増殖培地を用いて選択した。これらのアッセイ用細胞株をhIL-17RA/NIH3T3/KZ142.8およびhIL-17RCx4/NIH3T3/KZ142.8と呼んだ。

#### 【0510】

##### 実施例38

可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、組換えヒトIL-17RA/NIH3T3/KZ142.8細胞のヒトIL-17A活性化に拮抗する

組換えhIL-17RA/NIH3T3/KZ142.8細胞のヒトIL-17A活性化に対する可溶性IL-17RC/IL-17RA可溶性ポリペプチド(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)競合の有効性を次のようにして測定した:ルシフェラーゼアッセイ法のための細胞の平板培養および調製は、本明細書において説明するものと同じであった。アッセイ実施日に、出発濃度2 $\mu$ g/mlの上記の可溶性ポリペプチド、IL-17RA、およびIL-17RCを含む最終濃度の2倍(リガンドと混合されると、1 $\mu$ g/mlの最終濃度になる)の1体積量の可溶性受容体の2倍用量系列を3つ1組でこれらの細胞に最初に与えた。次に1体積量のIL-17Aを1ng/ml(受容体とリガンドの混合の結果として生じる最終濃度0.5ng/mlの2倍である)で添加した。最大活性化は、受容体無しで0.5ng/mlのIL-17Aを与えた3つ1組のセットを用いて決定した。基礎的活性化は、リガンドも可溶性受容体も含まないアッセイ用媒体のみを与えた3つ1組のセットを用いて決定した。データ解析により、可溶性ポリペプチドによる上記の細胞株のIL-17A活性化のIC50は7ng/mlであることが明らかになった。最大用量の1 $\mu$ g/ml可溶性受容体を用いた場合でさえ、この細胞株の0.5ng/ml hIL-17A活性化に納得のゆくように拮抗する、可溶性IL-17RAまたはIL-17RCの十分な能力はなかった。

#### 【0511】

##### 実施例39

可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、組換えヒトIL-17RA/NIH3T3/KZ142.8細胞のヒトIL-17F活性化に拮抗する

組換えhIL-17RA/NIH3T3/KZ142.8細胞(前述)のヒトIL-17F活性化に対する可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)競合の有効性を次のようにして測定した:ルシフェラーゼアッセイ法のための細胞の平板培養および調製は、本明細書において説明するものと同じであった。アッセイ実施日に、出発濃度4 $\mu$ g/mlの上記の可溶性ポリペプチド、IL-17RA、およびIL-17RCを含む最終濃度の2倍(リガンドと混合されると、2 $\mu$ g/mlの最終濃度になる)の1体積量の可溶性ポリペプチドの2倍用量系列を3つ1組でこれらの細胞に最初に与えた。次に1体積量のIL-17Fを40ng/ml(受容体とリガンドの混合の結果として生じる最終濃度20ng/mlの2倍である)で添加した。最大活性化は、受容体無しで20ng/mlのIL-17Fを与えた3つ1組のセットを用いて決定した。基礎的活性化は、リガンドも可溶性受容体も含まないアッセイ用媒体のみを与えた3つ1組のセットを用いて決定した。データ解析により、IL-17RC/IL-17RA可溶性ポリペプチドによる上記の細胞株のIL-17F活性化のIC50は0.48 $\mu$ g/mlであることが明らかになった。最大用量の2 $\mu$ g/ml可溶性受容体を用いた場合でさえ、この細胞株の20ng/ml IL-17F活性化に対して任意の拮抗作用を示す、可溶性IL-17RAまたはIL-17RCの十分な能力はなかった。

#### 【0512】

##### 実施例40

可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、組換えヒトIL-17RCx4/NIH3T3/KZ142.8細胞のヒトIL-17F活性化に拮抗する

組換えhIL-17RCx4/NIH3T3/KZ142.8細胞(前述)のIL-17F活性化に対する可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)競合の有効性を次のようにして測定した:ルシフェラーゼアッセイ法のための細胞の平板培養および調製は、本明細書

において説明するものと同じであった。アッセイ実施日に、出発濃度4ug/mlの上記の可溶性ポリペプチド、IL-17RA、およびIL-17RCを含む最終濃度の2倍の、1体積量の可溶性受容体の5倍系列用量(serial dose)を3つ1組でこれらの細胞に最初に与えた。次に1体積量のIL-17FロットA1275Fを2ng/ml(受容体とリガンドの混合の結果として生じる最終濃度1ng/mlの2倍である)で添加した。最大活性化は、受容体無しで1ng/mlのIL-17Fを与えた3つ1組のセットを用いて決定した。基礎的活性化は、リガンドも可溶性受容体も含まないアッセイ用媒体のみを与えた3つ1組のセットを用いて決定した。データ解析により、可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドによるIL-17F活性化のIC50は0.8ug/mlであり、IL-17RCの場合は6ug/mlであり、IL-17RAはいかなる用量でも拮抗作用を示さないことが明らかになった。

【0513】

10

実施例41

可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドは、ヒトIL-17AおよびヒトIL-17F両方のG-CSF、IL-6、およびIL-8誘導活性を中和する

ヒト小気道上皮細胞(SAEC)をヒトIL-17AまたはヒトIL-17Fで処理し、48時間後に上清を採取した。これらの上清を分析したところ、下記の表12に示すように、G-CSF、IL-6、およびIL-8の用量依存的誘導が示された。

【0514】

(表12)

	48時間後の 上清における誘導倍率		
	G-CSF	IL-6	IL-8
以下のものでSAECを処理			
huIL-17A 50 ng/ml	26	13	8
10 ng/ml	24	14	6
2 ng/ml	14	8	3
0.4 ng/ml	13	8	3
huIL-17F 250 ng/ml	15	11	4
50 ng/ml	10	8	3
10 ng/ml	8	8	2
2 ng/ml	4	5	2

20

30

【0515】

また、10ng/mlのヒトIL-17Aまたは50ng/mlのヒトIL-17Fと組み合わせた0.01~10ug/ml用量の可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 157およびSEQ ID NO: 158)(細胞に添加する前に、リガンドおよび可溶性ポリペプチドの両方を37℃で30分間、一緒にインキュベートした)でもSAECを処理し、48時間後の上清を採取した。下記の表13に示すように、これらの上清はG-CSF、IL-6、およびIL-8の減少を示したことから、可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドが、ヒトIL-17AおよびヒトIL-17Fの両方によるこれらのサイトカインの誘導活性を効果的に中和できることが実証された。試験した可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの最低濃度(0.01μg/ml)では、中和は最大値の約50%に戻ったにすぎなかったため、IL-6の中和に関するIC50値は決定できなかったことに留意されたい。

40

【0516】

(表13)

可溶性 IL-17RA/RC 受容体は、 huIL-17A/Fの活性を中和する	IL-17RA/RCの IC50 (ug/ml)
huIL-17A(10 ng/ml) による G-CSF の誘導	0.14
huIL-17F(50 ng/ml) による G-CSF の誘導	1.20
huIL-17A(10 ng/ml) による IL-8 の誘導	0.03
huIL-17F(50 ng/ml) による IL-8 の誘導	0.57
huIL-17A(10 ng/ml) による IL-6 の誘導	10 ug/ml で 94% 中和された 0.01 ug/ml で 49% 中和された
huIL-17F(50 ng/ml) による IL-6 の誘導	10 ug/ml で 72% 中和された 0.01 ug/ml で 57% 中和された

10

## 【 0 5 1 7 】

## 実施例42

ヒト多発性硬化症試料における可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの有効性

多発性硬化症(MS)は、リンパ球性および単核性の細胞炎症性浸潤物の存在ならびにCNSの全体にわたる脱髄を含む、いくつかの要因によって媒介されると考えられている複合疾患である。ミクログリアは、中枢神経系(CNS)に存在し、かつ、損傷または炎症の際に活性化されるマクロファージ様細胞である。ミクログリアおよび神経細胞は両方とも、MSを含む様々なCNS疾患において重大な役割を果たすと意味付けられており、疾患の開始、進行、および治療法のメカニズムを研究するために使用され得る(Nagai et al., Neurobiol Dis 8:1057-1068; 2001; Olson et al., J Neurosci Methods 128:33-43; 2003; Giuliani et al., J Neuroimmunol 165: 83-91; 2005)。したがって、神経細胞初代培養物、不活化されたヒトミクログリア細胞株、および/または樹立されたヒトアストログリア細胞株は、これらの細胞型に対する炎症メディエーターの作用のいくつかおよび中和に対するそれらの可能性を研究するために使用することができる。炎症メディエーター(IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF-、IFN-、MIPファミリーメンバー、RANTES、IP-10、MCP-1、G-CSFおよびGM-CSFなどを含むがこれらに限定されるわけではない)は、炎症経路および下流のエフェクター細胞の活性化に対する作用を介して、MSに関連する症状および病理の一因となり得る。

20

30

## 【 0 5 1 8 】

これらの細胞型に対するIL-17AおよびIL-17Fの炎症誘発性作用、ならびに可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)のような本発明の可溶性ポリペプチドがこれらの作用を中和または減少させる能力を評価するために、培養した神経細胞またはグリア細胞を以下のうち1種で処理する: ビヒクル、rhIL-17A、rhIL-17F、rhIL-17A+IL-17F。さらに、可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)のような本発明の可溶性ポリペプチドを用いて、または用いずに、これらを処理する。別の1組の培養物において、ヒト対象から単離し、抗CD3で活性化した循環血中T細胞を、外因性IL-17AまたはIL-17Fの不在下で、培養した神経細胞およびグリア細胞に添加し、このようにして、これらの細胞型に対する活性化T細胞の破壊作用を調査する同時培養法を提供する。可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)のような本発明の可溶性ポリペプチドを用いて、または用いずに、これらのT細胞を処理する。様々な期間(1時間~数日間)培養した後、上清および細胞を採取し、上記に挙げたものを含む炎症メディエーターのレベルおよび/または発現を解析し、また、細胞生存についても解析する。炎症性サイトカインおよび炎症性ケモカインのレベルならびに神経細胞の死滅は、ビヒクルのみで処理した培養物と比べて、rhIL-17Aおよび/またはIL-17Fの存在下で上昇している。可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)のような本発明の可溶性ポリペプチドを添加すると、これらの培養物

40

50

中の炎症メディエーターの産生および発現が著しく減少し、神経細胞の細胞生存が増加する。

#### 【0519】

したがって、これらのエキスピボの実験から、可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)のような本発明の可溶性ポリペプチドが、ヒトMSの病理生物学に関連している破壊作用および炎症作用を低減させ得ることが実証されたため、このような可溶性ポリペプチドを用いた処置が、ヒトMSに関連した炎症局面、神経細胞死、および/または脱髄を低減させる際に有効であることが予想される。

#### 【0520】

##### 実施例43

ヒト関節リウマチ(「RA」)試料および変形性関節症(「OA」)試料中における可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの有効性

これらのモデルは、ヒト滑膜培養物(滑膜マクロファージ、滑膜線維芽細胞、および関節軟骨細胞を含む)ならびにRA患者およびOA患者由来の外植片が、健常な対照に由来する培養物/外植片と比べて、より高いレベルの炎症メディエーターを産生し、その結果として、これらの疾患の特徴である、細胞外基質構成要素(例えば、骨、軟骨など)の分解を引き起こし得ることを示すために設計される。さらに、後述する同時培養モデルは、RA/OA滑液に存在する炎症メディエーターおよび/または活性化T細胞もまた、よりひどい炎症および基質分解をもたらし得ることを示すために設計される。

#### 【0521】

炎症メディエーター(オンコスタチンM、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IP-10、RANTES、RANKL、MIPファミリーメンバー、MCP-1、MMP-9、G-CSFおよびGM-CSF、一酸化窒素などを含むがこれらに限定されるわけではない)の産生の増大は、炎症経路および下流のエフェクター細胞の活性化に対する作用を介して、RAおよびOAに関連する症状および病理の一因となる。次いで、これらの経路および成分は、炎症性浸潤物、軟骨および基質の減少/破壊、骨量減少、ならびにマトリックスメタロプロテアーゼ、プロスタグランジン、およびシクロオキシゲナーゼの上方調節をもたらす。したがって、これらのモデルは、インビトロ実験およびエキスピボ実験においてRAおよびOAの破壊的な炎症局面を模擬することができる。さらに、健常な対照に由来する外植片および滑膜培養物が、外因的に添加された炎症性成分(例えば、オンコスタチンM、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-17AおよびIL-17F、IL-15など)の存在下で、あるいは、RA患者由来の滑液(炎症性成分を内因的に含むと思われる)の存在下で培養される場合、炎症および分解経路のシグナル伝達が観察され得る。ヒトRAにおいてインビボで有効であると思われる治療薬は、炎症メディエーターの産生および/または存在を阻害および/または中和することによって、上記のインビトロモデルおよびエキスピボモデルにおいて作用するはずである。

#### 【0522】

これらのモデルでは、ヒト滑膜外植片は、RA患者、OA患者、もしくは関節置換術を受けた健常な対照から、または死後の組織採取から採取し、かつ、WooleyおよびTetlow(Arthritis Res 2:65-70; 2000)ならびにvan't Hof et al (Rheumatology 39:1004-1008; 2000)の改変法を用いて処理する。同様に、滑膜線維芽細胞、滑膜マクロファージおよび関節の軟骨細胞の培養物も研究する。複製試料を以下のうち1種で処理する: ビヒクル(PBS)、組換えヒト(rh)IL-17A、rhIL-17F、またはrhIL-17A+rhIL-17F。一部の試料は、オンコスタチンM、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-17A、IL-17F、およびIL-15の様々な組合せを含む。別の1組の試料を、活性化ヒトT細胞、または健常な対照またはRA患者もしくはOA患者に由来する滑液で処理する。さらに、可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)などの本発明の可溶性ポリペプチドを用いて、または用いずに、これらの試料すべてを処理する。様々な期間(1時間~数日間)培養した後、上清および細胞を採取し、上記に挙げたものを含む炎症メディエーターおよび軟骨/骨/基質のバイオマーカーのレベルを解析する。RA患者もしくはOA患者由来の試料において、またはRA

10

20

30

40

50



/OA滑液、活性化T細胞、rhIL-17Aおよび/もしくはrhIL-17F(単独もしくは他の炎症性サイトカインと組み合わせで)で処理した試料において、炎症性サイトカインおよび炎症性ケモカインならびに軟骨/骨/基質の分解マーカーのレベルは、未処理の健常な対照外植片または未処理の細胞培養物と比べて上昇している。本発明の可溶性ポリペプチドを添加すると、炎症メディエーターおよび軟骨/骨/基質の分解メディエーターの産生が著しく減少し、したがって、ヒトRAおよびOAにおいて有効であることが予想される。

#### 【0523】

##### 実施例44

粘膜生検材料培養物を用いた、ヒト炎症性腸疾患(「IBD」)試料における可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの有効性

このモデルは、IBD患者由来の培養された腸組織が、健常な対照由来の組織と比べて、より高レベルの炎症メディエーターを産生することを示すために設計される。炎症メディエーター(IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MIPファミリーメンバー、MCP-1、G-CSFおよびGM-CSFなどを含むがこれらに限定されるわけではない)の産生のこの増大は、炎症経路および下流のエフェクター細胞の活性化に対する作用を介して、クローン病(CD)および潰瘍性大腸炎(UC)などのIBDに関連する症状および病理の一因となる。次いで、これらの経路および成分は、インビボで観察される組織および細胞の損傷/破壊をもたらす。したがって、このモデルは、IBDの炎症メディエーターが増強されたこの局面を模擬し得る。さらに、健常な対照またはヒト腸上皮細胞(IEC)株に由来する腸組織をこれらの炎症性成分の存在下で培養する場合、炎症経路シグナル伝達、ならびに組織および細胞の損傷の証拠を観察することができる。

#### 【0524】

ヒトIBDにおいてインビボで有効であると思われる治療薬は、炎症メディエーターの産生および/または存在を阻害および/または中和することによって、上記のエクスピボモデルまたはIECモデルにおいて作用するはずである。

#### 【0525】

このモデルでは、ヒト腸組織を、IBD患者もしくは腸生検、切除を受けた健常対照から、または死後の組織採集から採取し、Alexakis et al. (Gut 53:85-90; 2004)の改変法を用いて処理する。無菌条件下で、大量のPBSで試料を穏やかに洗浄し、続いて、完全組織培養培地(および細菌の過剰増殖を防止するための抗生物質)の存在下で、細かく切った組織切片を培養する。細かく切った組織の同じプールに由来する試料を以下のうち1種で処理する:ビヒクル(PBS)、組換えヒト(rh)IL-17A、rhIL-17F、またはrhIL-17A+rhIL-17F。さらに、可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)などの本発明の可溶性ポリペプチドを用いて、または用いずに、これらを処理する。この実験プロトコールは、細胞が既存のストックから継代培養される点を除いて、ヒトIEC株を用いた研究用のプロトコールに従う。様々な期間(1時間~数日間)培養した後、上清を採取し、上記に挙げたものを含む炎症メディエーターのレベルを解析する。IBD患者由来の試料において、またはrhIL-17Aおよび/もしくはrhIL-17Fで処理した試料において、炎症性サイトカインおよび炎症性ケモカインのレベルは、未処理の健常な対照組織試料と比べて上昇している。本発明の可溶性ポリペプチドを添加すると、炎症メディエーターの産生が著しく減少し、したがって、ヒトIBDにおいて有効であることが予想される。

#### 【0526】

この研究のさらなる部門(arm)は、有効な治療を受けているIBD患者、および現在は投薬されていないか、または治療に対する非応答者とみなされている患者の組織生検材料からの炎症メディエーターの産生の比較を含み得る。

#### 【0527】

##### 実施例45

上皮バリア機能を介した、ヒトIBD試料における可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの有効性

上皮バリアの完全性の維持は、健常な胃腸管を保持する上で決定的に重要な因子である。実験的証拠から、腸の上皮バリアの漏れやすさが、IBDの発症の一因となり得ることが示唆されている。腸の固有層中に位置する免疫細胞は、一般に、細胞間の接触または可溶性因子の産生を介して腸上皮細胞と相互に作用して、免疫監視を維持し、上皮バリアの完全性に寄与する。しかしながら、長期または調節不全の免疫介在性炎症は、上皮バリア細胞の完全性および機能の欠陥の一因となり得る。以下の研究は、上皮バリアの完全性に対するT細胞由来のIL-17Aおよび/またはIL-17Fの直接的作用を測定するために設計する。

#### 【0528】

本実施例において、Caco-2細胞のような腸上皮細胞株を半透性膜上で分化させ、かつ、IBD患者または正常な個体の生検材料に由来するT細胞または単球のいずれかと共に側底側で同時培養する。上皮単層の完全性は、経上皮電気抵抗または色素拡散に対する単層の抵抗性の評価を用いて、経時的にモニターする。同時培養物中の単層の経上皮抵抗の減少は、同時培養物中のT細胞または単球の活性によって単層の破壊が誘導されたことを示唆すると考えられる。可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)などの本発明の可溶性ポリペプチドのような、IL-17AおよびIL-17Fの阻害物質は、上皮単層の破壊へのIL-17AおよびIL-17Fの相対的な寄与率を決定するため、ならびにIL-17AおよびIL-17Fの阻害物質が上皮バリアの完全性を維持するにあたって有効であるかどうかを判定するために使用され得る。活性化されたT細胞によって誘導される上皮単層破壊がこのような分子によって防止される場合、本発明の可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドがヒトのIBDの治療的処置のために有効であり得ることが示唆される。

#### 【0529】

また、IBD患者に由来する上皮初代培養物(primary epithelium)によって形成される単層を用いて同時培養系を作って、これらの細胞のIL-17AおよびIL-17Fに対する感受性が、健常個体由来の上皮細胞と比べて高いかどうかを判定することもできる。その場合、これらのデータから、IL-17AおよびIL-17Fを阻害することは、IBDの治療的処置のために適切な戦略であることが示唆される。

#### 【0530】

##### 実施例46

正常試料およびヒトIBD試料に由来する固有層T細胞および単球/マクロファージに対するIL-17AおよびIL-17Fの影響

正常に調節されないか、または持続的な免疫介在性炎症は、組織損傷または不適切もしくは長期の免疫応答に恒常的に偏らせる(skewing)ことによって、IBDに関連した症状および病理の一因となり得る。このモデルにより、疾患に関連するT細胞および単球を、腸組織のすぐ隣の周囲のサイトカイン環境中に存在し得るIL-17AおよびIL-17Fに曝露することによる潜在的なその後の(down-stream)結果を判定することができる。

#### 【0531】

インビボでヒトIBDに有効と思われる治療物質は、炎症メディエーター(IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17AおよびIL-17F、IL-18、IL-23、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MIPファミリーのメンバー、MCP-1、G-CSFおよびGM-CSFなどを含むがそれ限定されるわけではない)の産生および/または存在を阻害および/または中和することによって、上記のエキスピボモデルにおいて作用すると思われる。

#### 【0532】

このモデルでは、HBSS中で生検材料をハサミで注意深く切り刻み、コラゲナーゼおよびディスパーゼIIで処理し、振盪機中、37℃で1時間、インキュベートすることによって、生検試料からT細胞および単球/マクロファージを単離する。細胞懸濁液をナイロンメッシュに通して過して、破片および細胞塊を除去し、HBSS中で複数回洗浄する。T細胞およびマクロファージ/単球は、直接的細胞選別またはビーズ除去/濃縮プロトコルを用いて単離することができる。単離した細胞をIL-17AおよびIL-17Fの存在下でインキュベートする。これにより、T細胞および単球/マクロファージによる炎症メディエーターの産生が誘

導されるか、または、炎症誘発性の高い応答に対する後続のT細胞応答が偏る。IBD患者由来の細胞によって産生される炎症メディエーターと正常個体の細胞に由来する炎症メディエーターのタイプを比較することができ、IBD患者由来のT細胞および単球/マクロファージが、IL-17AおよびIL-17Fの存在下で炎症誘発性のより高いプロファイルを生じることが示唆され得る。IL-17AおよびIL-17Fによって誘導される下流の炎症メディエーターの産生を中和するために可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)などの本発明の可溶性ポリペプチドを添加することによって、このような可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドがIBD患者の治療的処置において有効であり得ることが示される。

【0533】

#### 実施例47

過敏性腸症候群(「IBS」)における可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの有効性:CNSを対象とする病因

IBSに特徴的な症状を誘導するためにストレス刺激を使用する、CNSを対象とする主な病因に焦点をおいたIBSモデル。新生仔の心理社会的ストレスモデルは、内臓の痛覚過敏、下痢、およびストレス感受性を含む、IBS患者に付随するいくつかの臨床的特徴を再現する。生後4~18日の間、毎日180分間、母親から同腹仔を毎日引き離すと、母親の挙動が変化し、なめる/毛づくろいする挙動の回数が有意に減少する。新生仔にかかるストレスにより、CNSが永久的に変化して、ストレスによって誘発される内臓および体細胞の疼痛感受性が変化する。ストレスに応答した結腸の運動機能はこれらの動物において亢進しており、予備データから、腸透過性が増大している証拠が示されている(Mayer et al., 2002)。可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)などの本発明の可溶性ポリペプチドで処置し、結腸の運動機能、上皮の透過性、およびストレス刺激に対する応答を続いて解析することにより、IBSのこの動物モデルにおける有効性を判定することができる。これらの阻害物質による処置後に症状の発生率が低下することから、IBSの治療における潜在的な有効性が示唆される。

【0534】

#### 実施例48

過敏性腸症候群(「IBS」)における可溶性IL-17RCポリペプチドおよび可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチドの有効性:腸を対象とする主なストレス誘導因子

これは、腸を対象とする主なストレス誘導因子(すなわち、腸炎症、感染、または身体的ストレス)に焦点を合わせたモデルである。動物試験により、低グレードの炎症または免疫活性化が、腸の運動性ならびに/または求心性機能および上皮機能の変化の基本原則である可能性があることが示された(Mayer et al., 2002)。このモデルでは、カラシ油を毎日結腸内注射する形で、新生仔動物(8~21日齢)の結腸に毎日刺激をもたらす。カラシ油は、神経刺激物であり、結腸内投与後に内臓痛覚過敏を誘導することが示されている。このモデルは、内臓痛覚過敏および排便習慣の変化を含む、IBSの主要な特徴を再現する。動物はまた、IBS患者の主要な特徴である下痢または便秘も示す(Mayer et al., 2002; Kimball et al., 2005)。可溶性IL-17RCポリペプチドまたは可溶性IL-17RC/IL-17RAポリペプチド(SEQ ID NO: 158)などの本発明の可溶性ポリペプチドを送達して、このモデルに関連する症状の発現の変化を決定することができる。本発明者らの阻害物質による治療的処置後に内臓過敏性の発生率または規模が低減すること、および腸の運動性が変化することから、これらの分子がIBS治療において有効である可能性が示唆される。

【0535】

#### 実施例49

IL-17AおよびIL-17Fの可溶性アンタゴニストの測定可能なタンパク質製造プロセスの設計

可溶性IL-17RCの測定可能なタンパク質製造プロセスを開発することに焦点を合わせた戦略を設計するにあたって、順化培地中での高レベルのタンパク質濃度を可能にする発現系を特定する際に多くの困難に出会った。ウェスタンブロット解析によって、低レベルのタンパク質分泌があり、細胞中にタンパク質が蓄積することが実証された。本発明の可溶

10

20

30

40

50

性ポリペプチドを発見するにあたって、70種を超える様々な発現構築物を設計し、作製し、BHK細胞、CHO細胞、またはHEK293細胞のいずれかにおいて発現を試験した。いくつかは、複数の宿主細胞株で試験した。試験した可溶性IL-17RC発現カセットの変形は、以下のものを含んだ：

- (1) 代替のシグナル配列、例えば、：(a)天然、(b)otPA、(c)マウス免疫グロブリン重鎖可変領域、(d)ヒト成長ホルモン、(e)マウスIL-17RA。
- (2) 天然に存在する2種の異なるスプライス変種(IL-17RCx1、SEQ ID NO: 2およびIL-17RCx4、SEQ ID NO: 166)。
- (3) IL-17RC細胞外ドメイン(ECD)とFc部分の間のリンカー配列の付加、例えば、(a)リンカー無し、(b)GlyGlyGlySerをベースとするアミノ酸9個のリンカー、および(c)GlyGlyGlySerをベースとするアミノ酸20個のリンカー。
- (4) Hisタグ付きの単量体型。
- (5) アミノ酸末端およびカルボキシル末端両方のFc融合タンパク質。
- (6) N結合型炭水化物結合部位の除去。
- (7) AsnからGlnへのアミノ酸置換。
- (8) IL17RAおよびIL17RCのハイブリッド融合タンパク質。

#### 【 0 5 3 6 】

HEK293細胞での一過性トランスフェクションによって、可溶性IL-17RC変種の発現構築物すべてをタンパク質発現に関して試験した。ウェスタンブロット解析を用いて、細胞溶解物を試料採取することにより、細胞中に保持されたタンパク質と比べて順化培地中に分泌されたタンパク質を検出した。構築物の大半は、順化培地中に分泌されるタンパク質を発現したが、ウェスタンブロットによってかろうじて検出可能な程度であった。さらに、順化培地試料と比べて、細胞溶解物からのシグナルの方が大きかったことから、タンパク質が効率的に分泌されないことが示された。順化培地において最も大きいシグナルをもたらした発現構築物を用いて、安定なCHO細胞プールをトランスフェクトした。安定なCHOプールのタンパク質力価を測定し、可能な場合には、細胞ベースの競合結合アッセイ法で、精製タンパク質をIL-17AおよびIL-17F結合に関して解析した。次の表は、安定なCHO細胞プールにおいて最も高発現の構築物から得られたタンパク質発現の結果を示す。絶対的なタンパク質濃度測定値が検出レベル未満であった場合、タンパク質力価は0.5mg/mL未満として示す。

#### 【 0 5 3 7 】

IL-17RCタンパク質およびIL-17RC/RAタンパク質の発現構築物の番号表示、含まれるエキソンの簡単な説明、安定にトランスフェクトされたCHO細胞プールのタンパク質力価、ならびにIL17AおよびIL17Fの結合力。表14に含まれる変種の配列すべてがここに含まれるとは限らない。

#### 【 0 5 3 8 】

( 表 1 4 )

説明	タンパク質力価 (mg/L)	結合
x1 スプライス変種 IL17RC エキソン1～6、エキソン 8～16 (変種1210)	3.0	IL17A および IL17F を妨害できる
X4 スプライス変種 IL17RC エキソン1～16	< 0.5	十分な試料を 得ることができない
IL17RC エキソン1～6	< 0.5	不活性
IL17RC エキソン8～13	1.6	不活性
IL17RC エキソン7～16 (変種 S10)	< 0.5	IL17A および IL17F を妨害できる
IL17RA エキソン1～10 IL17RC エキソン8～16 (変種 1407)	32.5	IL17A および IL17F を妨害できる
IL17RA エキソン1～6 IL17RC エキソン8～16 IL17RA エキソン7～10	< 0.5	不活性
IL17RA エキソン1～3 IL17RC エキソン4～16	< 0.5	十分な試料を 得ることができない
IL17RA エキソン1 IL17RC エキソン2～16	< 0.5	十分な試料を 得ることができない
IL17RA エキソン1～6 IL17RC エキソン8～16 (変種 1454)	19	IL17A および IL17F を妨害できる

10

20

30

## 【 0 5 3 9 】

## 実施例50

## IL-17RA/RC-Fc5のアミノ末端配列の決定

タンパク質発現: IL17RA/RC-Fc5をコードするDNA(SEQ ID NO: 157、SEQ ID NO: 158のアミノ酸配列をコードする)を含む発現構築物を用いてCHO DXB-11細胞をトランスフェクトした。プロテインAアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くサイズ排除クロマトグラフィーによって、順化培地採取物からIL17RA/RC-Fc5タンパク質を精製した。

40

## 【 0 5 4 0 】

N末端アミノ酸配列解析: Applied Biosystems社製の試薬を用いて、標準的な自動N末端ポリペプチド配列決定(エドマン分解)を実施した。Model 494 Protein Sequencer System (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)を用いてN末端配列解析を実施した。SequencePro Protein Sequencing Analysis Software、バージョン2.0(Applied Biosystems)を用いてデータ解析を実施した。試料調製は、100ピコモル(pmol)の試料をプレサイクルされたフィルターに添加する段階を含んだ。

## 【 0 5 4 1 】

IL-17RA/RC-Fc5試料(ロットA1672F、A1774F、およびA1776F)のN末端配列解析により、L33(ロイシン)で始まる配列が得られた。

50

## 【0542】

## 実施例51

マウスの代用分子である可溶性マウスIL-17RA-Fcを用いた、オキサザロン(Oxazalone)による結腸炎の治療

以下のオキサザロン結腸炎の研究を雌C57BL/10マウス(約20g)において実施した。5日前にマウスの皮膚をオキサザロン(100%エタノール中3%)で感作し、続いて、0日目に50%エタノール中1.25%オキサザロンで直腸内にチャレンジする。マウスは次の2~3日目の間に急性結腸炎を発症する。典型的には、2日目にそれらを安楽死させ、組織を採取する。

## 【0543】

オキサザロンによる結腸炎の独立した2つの研究を実施して、可溶性マウス(m)IL-17RA-Fc処置が、ヒト潰瘍性大腸炎に似ているマウスのオキサザロン誘発性結腸炎において有効性を示し得るかを判定した。mIL-17RA-Fcは、マウスIL-17AおよびIL-17Fを中和することもでき、これは、ヒトIL-17AおよびIL-17Fに結合できるヒトIL-17RCおよびIL-17RA/RCの類似した特徴であるため、mIL-17RA-Fcタンパク質は、本明細書において説明するIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質の適切な代用物である。

10

## 【0544】

第1の研究の結果から、mIL-17RA-Fc処置の結果、PBSで処置したオキサザロンマウスと比べて、疾患指数スコア(体重、便の硬さ、および便中の血液を含む)が有意に( $p<0.05$ )約2分の1に減少することが示された。オキサザロン結腸炎モデルを作る6日前または1日前のいずれかから1日目まで、100  $\mu$ gを毎日腹腔内投与して、処置を施した。また、mIL-17RA-Fcで処置したマウス群の方が、PBSで処置したオキサザロン結腸炎マウスと比べて、改善した低い組織学的スコアを有し、結腸炎に起因する結腸の重度の短縮が少なかった。

20

## 【0545】

第2の研究では、モデルを作る6日前から1日目まで、PBSまたはmIL-17RA-Fc(100  $\mu$ g、腹腔内)でマウスを毎日処置し、適切なオキサザロン-溶媒対照(エタノールのみ)も含めた。さらに、チャレンジ後7日間、結腸炎から回復させるマウス群も含めて、mIL-17RA-Fcがモデルのこの段階に影響を及ぼし得るかどうかを評価した。結果から、モデルを作る6日前から1日目まで毎日投与して可溶性マウスIL-17RA-Fc1で処置した場合、疾患指標スコアが有意に約3分の1に減少( $p<0.05$ )することが示された。2日目の時点で目立った病変の発生率は、オキサザロンPBS処置マウス(マウスの75%)と比べて、mIL-17RA-Fc1で処置したオキサザロンマウス(マウスの37.5%)において減少していた。さらに、PBSで処置したオキサザロン結腸炎マウスと比べて、mIL-17RA-Fcで処置したマウスでは、組織学的スコアが改善し、結腸炎に起因する結腸の重度の短縮が少なかった( $p<0.05$ )。マウスはすべてこの時点までに回復していたため、7日間回復させた群において差はなかった。モデル作製後2日目にオキサザロンマウスから得た結腸培養物(37℃で24時間インキュベートした結腸断片)において、評価した炎症性サイトカイン/ケモカインはすべて、溶媒(エタノール)マウスと比べて増加していた。オキサザロンマウスをmIL-17RA-Fcで処置すると、PBSで処置したオキサザロンマウスでのレベルと比べて、結腸におけるIL-17A、IL-17F、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-4、IL-12、GM-CSF、およびIFN- $\gamma$ の産生が減少した。結腸中のIL-17AおよびIL-17Fの濃度は、互いに有意に関連していた( $R=0.93$ ;  $p<0.000001$ )。IL-17AおよびIL-17Fの濃度は、TNF- $\alpha$  ( $R=0.91$ および $0.95$ ;  $p<0.0000001$ )、IL-1 (両方とも $R=0.64$ ;  $p<0.01$ )、IFN- $\gamma$  ( $R=0.71$ および $0.72$ ;  $p<0.01$ )、ならびにIL-6(両方とも $R=0.57$ ;  $p<0.05$ )のレベルと有意に関連していた。疾患指標スコアは、IL-17A( $R=0.70$ ;  $p<0.01$ )、IL-17F( $R=0.72$ ;  $p<0.01$ )、TNF- $\alpha$  ( $R=0.76$ ;  $p<0.001$ )、IL-4( $R=0.59$ ;  $p<0.05$ )、IL-1 ( $R=0.50$ ;  $p<0.05$ )、およびIFN- $\gamma$  ( $R=0.52$ ;  $p<0.05$ )の結腸での産生と関連していた。

30

40

## 【0546】

要約すれば、本明細書において説明するヒトIL-17RCタンパク質およびヒトIL-17RA/RCタンパク質の代用物(例えばmIL-17RA-Fc)で処置すると、結腸炎疾患の症状が軽減され、炎症性サイトカインの結腸での産生が減少し、病状が改善する。これらの結果から、本明細書において説明するヒトIL-17RCタンパク質またはヒトIL-17RA/RCタンパク質の使用が

50

ヒトIBDの治療において有効であることが示される。

【0547】

実施例52

マウス疾患モデルにおけるマウスIL-17F過剰発現の影響

本明細書において実質的に説明する方法を用いて、造血細胞に特異的なプロモーター(EuLckプロモーター)の制御下でIL-17F遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した(Production of Transgenic Mice、セクション(K)、前記を参照されたい)。

【0548】

IL-17Fトランスジェニックマウスにおける血清IL-17AとIL-17Fの比はヒトと同様である:EuLckプロモーターのもとでマウスIL-17Fを過剰発現するマウスでは、研究施設内で開発されたLuminexに基づいたアッセイ法によって測定した場合、野生型マウス(検出不可能なレベル)において見出されるレベルと比べて、IL-17Fの血清レベルが著しく上昇している(約2ng/mL)ことが判明した。IL-17Aの血清レベルは、IL-17FトランスジェニックマウスにおけるIL-17Fレベルの約10分の1であった(約0.2ng/mL)。したがって、トランスジェニックマウスにおけるIL-17A:IL-17Fの比は約1:10であった。野生型マウスでは、わずかに検出可能な血清IL-17A(約0.1ng/mL)が存在した。IL-17AレベルよりIL-17F血清レベルが著しく高い(例えば10倍)という観察結果は、自己免疫疾患に罹患していえるヒトで典型的に観察されることであり、したがって、多発性硬化症および関節炎などのヒト疾患のマウスモデルにおけるIL-17Fの役割を研究するためにIL-17Fトランスジェニックマウスを使用することが支持される。

【0549】

実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)研究:2つの独立した研究を実施して、ヒト多発性硬化症のマウスモデル、具体的にはマウスの実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)におけるIL-17F過剰発現の影響を評価した。対照の雌C57BL/6野生型同腹仔マウスまたはC57BL/6を元にしたEuLck IL-17Fトランスジェニックマウス(それぞれ約20~22g)を0日目にMOG35-55/Ribiアジュバント(研究1)またはMOG35-55/CFAアジュバント(研究2)で、続いて、2日目に百日咳毒素を静脈内投与して免疫化した。マウスを計量し、疾患の臨床症状(例えば、尾部および肢の麻痺)を毎日採点した。両方の研究の結果から、IL-17Fトランスジェニックマウスでは、野生型マウスと比べて疾患の発症および重症度が有意に( $p < 0.05$ )増大していることが示された。研究1では、トランスジェニックマウスの方が、野生型マウスより疾患のピークが早く、平均して、36%高い疾患重症度スコアを示した。研究2では、IL-17Fトランスジェニックマウスの方が、対照の野生型同腹仔マウスよりも疾患重症度スコアが50~70%高かった。

【0550】

コラーゲン誘発関節炎(CIA)研究:2つの独立した研究を実施して、ヒト関節リウマチのマウスモデル、具体的にはマウスのコラーゲン誘発関節炎(CIA)におけるIL-17F過剰発現の影響を評価した。対照の雌C57BL/6野生型同腹仔マウスまたはC57BL/6を元にしたEuLck IL-17Fトランスジェニックマウス(それぞれ約23~28g)を、CFA中ヒヨコII型コラーゲン、続いて3週間後のIFA中ヒヨコII型コラーゲンの尾部注射によって免疫化した。マウスの疾患の臨床症状(すなわち、足の腫脹)を毎日採点した。両方の研究の結果から、IL-17Fトランスジェニックマウスでは、対照の野生型同腹仔マウスと比べて疾患の発症および重症度が有意に( $p < 0.05$ )増大(約2.5~3倍)していることが示された。

【0551】

実施例53

マウスIL-17RA-Fc、ヒトIL-17RC-Fc、およびヒトIL-17RA/RC-Fcの薬物動態

ヒト可溶性IL-17RC受容体およびIL-17RA/RC受容体のマウス代用物(mIL-17RA-Fc)を含む、様々な可溶性IL-17受容体を用いて、3つの独立した薬物動態研究を実施した。これらの研究のために、雌C57BL/6マウスをCharles River Labsから得た。到着時に動物の健康状態を検査し、群別に収容した(動物5匹/ケージ)。マウスは、研究開始時に10~12週齢であり、平均体重は約20gであった。

10

20

30

40

50

## 【0552】

## (A)投薬プロトコール

3つの各研究用に、マウス(n=24/投薬群)を、次の特定の投与経路用に指定した群にランダムに分けた:静脈内(i.v.)、腹腔内(i.p.)、または皮下(s.c.; 頸部の首筋)。割り付けた投与経路を介して、マウスの各群に体積100  $\mu$ lの適切なタンパク質を投与した。

## 【0553】

## (B)試料採取

様々な時点(0.25時間~336時間)での血液採取に先立って、ハロタンまたはイソフルオランでマウスを十分に麻酔した。血液試料は、全時点において心臓穿刺によって採取した。血液を血清分離管中に採取し、15分間凝血させた。続いて、14,000rpmで3分間、試料を遠心分離した。遠心分離後、125 $\mu$ L~150 $\mu$ Lのアリコートを手付けエプENDORF管中に分注し、解析まで直ちに-80℃で保存した。

10

## 【0554】

## (C)結果

マウスのIL-17RA-Fc薬物動態研究:静脈内投与の場合の半減期は61時間であり、腹腔内投与の場合は70時間であり、皮下投与の場合は69時間であった。腹腔内投与の場合、生物学的利用能は100%であり、皮下投与の場合は67%であった。静脈内経路、腹腔内経路、および皮下経路の分布容積は、それぞれ、6.7mL、8.7mL、および10.3mLであった。データ収集の最も遅い時点は、投与後120時間目であった。この時点までに、mIL-17RA-Fc1の血清レベルは基礎レベルまで戻っていなかった。その後の薬物動態研究(下記に要約する)は、336時間目まで実施した。

20

## 【0555】

ヒトIL-17RC-Fc薬物動態研究:静脈内投与の場合の半減期は72時間であり、腹腔内投与の場合は64時間であり、皮下投与の場合は54時間であった。腹腔内投与および皮下投与の場合、生物学的利用能は100%であった。静脈内経路、腹腔内経路、および皮下経路の分布容積は、それぞれ、2.7mL、2.4mL、および2.2mLであった。

## 【0556】

ヒトIL-17RA/RC-Fc(変種1454)薬物動態研究:静脈内投与の場合の半減期は46時間であり、腹腔内投与の場合は49時間であり、皮下投与の場合は52時間であった。腹腔内投与の場合、生物学的利用能は100%であり、皮下投与の場合は69%であった。静脈内経路、腹腔内経路、および皮下経路の分布容積は、それぞれ、1.7mL、2.2mL、および3.5mLであった。

30

## 【0557】

## 実施例54

移植片対宿主疾患(GVHD)の治療における、マウス代用分子mIL-17RA-Fcの治療的有効性

移植片対宿主疾患(GVHD)は、幹細胞もしくは骨髄移植の後、または血液もしくは血液成分の輸血後に、免疫無防備状態の患者において最も一般的に観察される合併症である。同種異系移植後に最も一般的であるが、GVHDはまた、同系移植または自家移植後にも、頻度は落ちるが発生する。GVHDは、患者がヘテロ接合性であるHLAハプロタイプに関してホモ接合性であるドナーから血液を受け取った免疫適格性患者において発生し得る。この病態は、宿主抗原に应答して活性化され増殖する、移植片中に含まれる免疫適格性ドナーリンパ球の移植に起因する。感染と戦うこれらの細胞は、次に、宿主体内の組織を攻撃する。GVHDは、伝統的に、移植後から最初の100日以内に発生する場合は急性、移植後100日より後に発生する場合は慢性と分類されている。典型的に関与する組織には、肝臓、胃腸管、および皮膚が含まれる。著しい炎症が発生し得る。

40

## 【0558】

GVHDの発生率は、ドナーとレシピエントのHLA抗原のミスマッチの程度の増大、ドナー年齢の上昇、および患者年齢の上昇と共に増加する。発病率の推定値は、これらおよび他のパラメーターに応じて、20%~70%の範囲にわたる。しかしながら、この疾患は、過小診断されるか、または過小報告される場合がある。

50



## 【0559】

急性GVHDの症状には、発疹、ビリルビン濃度の上昇に起因する黄色い皮膚および眼、ならびに下痢が含まれる。急性GVHDは1~4のスケールに格付けされる。グレード4は最も重症である。慢性GVHDは、デノボで、または急性GVHDからの進行によって発症する場合がある。症状は、急性GVHDの症状よりも幅広く多様であり、様々な自己免疫障害に類似している。いくつかの症状には、ドライアイ、口渇、発疹、皮膚および口の潰瘍、関節性拘縮(関節を容易に動かせないこと)、肝臓から得られた血液の異常な試験結果、肺の硬化(呼吸が困難)、眼の炎症、嚥下困難、筋衰弱、または口中の白い薄膜が含まれる。GVHDの他の症状には、組織損傷(腸、皮膚、肝臓、ならびに、重度の場合は肺および腎臓を含む)ならびに循環血中の炎症性サイトカインのレベル上昇(「サイトカインストーム」)によって引き起こされる敗血症様の症状が含まれる。いくつかの重症例では、GVHDは致死的になり得る。

10

## 【0560】

GVHDの第一選択治療は、ステロイド(例えばメチルプレドニゾロン)療法を含む。慢性GVHDは、ステロイドとシクロスポリンAの組合せによって治療される。ステロイド免疫抑制の副作用には、感染率の上昇および続発性悪性腫瘍が含まれ、致死的になり得る。また、現在の治療は、移植されたドナー細胞の移植片対腫瘍活性を妨害する場合がある。これらの重大な副作用を考えると、より選択的な治療物質が必要とされる。

## 【0561】

本明細書において説明するIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質は、GVHDおよび/または移植において有効であると予想される。IL-17A(およびIL-17Fも可能性が高い)のレベルは、移植拒絶の患者および動物モデルの血清および尿において上昇していることが報告されている。したがって、可溶性ヒトIL-17RCタンパク質または可溶性ヒトIL-17RA/RCタンパク質によってIL-17AおよびIL-17Fを中和すると、GVHDおよび/または臓器移植の転帰がより良くなると思われる。

20

## 【0562】

ヒトIL-17RCタンパク質およびヒトIL-17RA/RCタンパク質のマウス代用物(mIL-17RA-Fc)の有効性を、急性GVHDのマウスモデルにおいて評価した(Durie et al., J. Clin. Invest. 94:1333-1338, 1994)。親マウス(C57BL/6;n=12)を安楽死させ、それらの脾臓を採取した。集めた脾臓を2つのスライドガラスで粉砕して、脾臓細胞を分離させた。脾細胞懸濁液に溶解緩衝液を添加して、赤血球を除去した。これらの細胞をRPMI 1640(10%FBS)培地中で洗浄し、適切な量のPBS中に再懸濁して、細胞3億個/mlの細胞濃度にした。レシピエントマウス(C57BL/6 x DBA/2 F1)を処置群(PBSまたはmIL-17RA-Fc)に分けた。1日おきに腹腔内注射(注射1回当たり150 µg)することによってマウスIL-17RA-Fc処置を施した。これは、1日前から始めて、15日目まで継続した。0日目に、B6マウスに由来するドナー脾臓リンパ球8000万個をレシピエントマウス(C57BL/6xDBA/2 F1(BDF1);n=10/群)マウスに静脈内注射した。体重の変化(このモデルの疾患増悪の特徴的徴候)および瀕死状態の任意の徴候に関して、マウスを週に3回モニターした。最初の体重から20%超減ったマウスは安楽死させた。それ以外は、細胞移入後12~18日目にマウスを屠殺し、脾臓および血液を採取した。

30

40

## 【0563】

脾臓を、MHCクラスIマーカー(H2<sup>b</sup>およびH2<sup>d</sup>)を含むT細胞およびB細胞のマーカーについて染色して、ドナー/レシピエントの細胞比率(急性GVHD脾臓細胞の大部分はドナー細胞である)を調べた。血清を採取して、ELISAによってIgG1、IgG2a、およびIgEの血清レベルを測定し、市販されているキット(Luminex Corporation, Austin, TX)を用いてサイトカインおよびケモカインのレベルを測定した。

## 【0564】

2つの独立した研究の結果から、動物モデルと急性GVHDの発症との相関が示された。PBS対照では、宿主(BDF1)脾臓細胞が減少し、ドナー(C57BL/6)Treg細胞の数が減少していた。処置された動物では、mIL-17RA-Fc処置により、宿主の脾臓細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、およびTr

50

eg細胞が維持されていた。どの処置も、ドナー(C57BL/6)の通常のCD4<sup>+</sup>T細胞の活性化も増殖も妨げなかった。すべての群において、ドナーの通常のCD4<sup>+</sup>T細胞は同様の数であり、GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene) (糖質コルチコイドによって誘導される腫瘍壊死因子受容体ファミリー関連遺伝子)は、ドナーの通常のCD4<sup>+</sup>T細胞によって上方調節されていた。両方の研究において、IL-17RA-Fc処置群における体重減少は重度ではなく、PBS対照の場合よりも、両方の研究における体重減少は有意に少なかった( $p < 0.05$ ) (研究2、図6を参照されたい)。脾臓:体重比を基準として考えると、IL-17RA-Fc処置によって脾腫は予防されなかったが、研究2において、処置により、PBSで処置した対照と比べて、疾患によってもたらされる脾臓細胞数増加が減少した(2分の1の数、 $p < 0.01$ )。研究1では、mIL-17RA-Fcで処置したマウスは、PBSで処置した対照と比べて、IL-10の血清濃度が有意に高かった(約2倍の高さ、 $p < 0.05$ ) (IL-10は、主として抗炎症性サイトカインであると考えられている)。研究2では、mIL-17RA-Fcで処置したマウスは、TNF- およびIFN- の血清濃度が有意に低かった。両方の研究において、mIL-17RA-Fc処置の結果、宿主顆粒球の百分率が有意に低くなった(約2.5分の1、 $p < 0.001$ )。

10

#### 【0565】

要約すれば、本明細書において説明するIL-17RCタンパク質およびIL-17RA/RCタンパク質のマウス代用物(mIL-17RA-Fc)による処置は、GVHDのマウスモデルにおいて治療的有効性をもたらした。これらの結果から、本明細書において説明するヒトIL-17RCタンパク質およびヒトIL-17RA/RCタンパク質の使用がGVHDおよび移植拒絶の治療において有効であることが示される。

20

#### 【0566】

##### 実施例55

##### 293FにおけるIL17A-CH6/IL17F-CEEヘテロ二量体の発現

IL17A-CH6(ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 186およびSEQ ID NO: 187にそれぞれ示される)およびIL17F-CEE(ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 188およびSEQ ID NO: 189にそれぞれ示される)をコードする2つの発現プラスミドを、酵母での相同組換えによってベクター-pZMP45中にそれぞれ構築した。

#### 【0567】

鋳型としてのIL17A、pZMP45中に5'オーバーラップを作り出すためのフォワードプライマー-zc57312、ならびにpZMP45中にセリン-グリシンリンカー、6×ヒスチジンタグ、および3'オーバーラップを作り出すためのリバースプライマー-zc48893を含むあらかじめ作製したプラスミドを用いて、IL17A-CH6断片をPCRによって作製した。鋳型としてのIL17F、pZMP45中に5'オーバーラップを作り出すためのフォワードプライマー-zc57314、ならびにpZMP45中にセリン-グリシンリンカー、EEタグ(EEYMPME;SEQ ID NO: 190)、および3'オーバーラップを作り出すためのリバースプライマー-zc58978を含むあらかじめ作製したプラスミドを用いて、IL17F-CEE断片をPCRによって作製した。Platinum(登録商標)PCR SuperMix High Fidelity(Invitrogen、カタログ番号12532-016を用い、PCR条件は次のとおりであった:94 で2分を1サイクル;94 で30秒、55 で30秒、68 で45秒を30サイクル;次に4で維持。次に、1×TAEを用いて1%アガロースゲル上でPCR反応混合物を泳動させた。正確なバンドを切り出し、Qiagen社製のゲル精製キット(Qiagen、カタログ番号28704)を用いて精製した。

30

40

#### 【0568】

プラスミドpZMP45は、CMVプロモーター、イントロンA、コード配列を挿入するための複数の制限部位、およびotPAシグナルペプチド配列、SV40ターミネーター、大腸菌の複製起点、ならびにS. セレビシエ(S. cerevisiae)における選択および複製のために必要とされるURA3配列およびCEN-ARS配列を有する発現カセットを含む、哺乳動物発現ベクターである。

#### 【0569】

エレクトロコンピテント酵母細胞(S. セレビシエ)100  $\mu$ Lを、上記のものから精製したDN

50

A 10  $\mu$ Lと組み合わせ、BglIIで切断したpZMP45プラスミド100ngと混合し、0.2cmエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母-DNA混合物に0.75kV(5kV/cm)、 $100 \Omega$ 、25  $\mu$ Fで電気パルスのかけた。各キュベットに1.2Mソルビトール1mlを添加し、酵母をURA-DSプレート上に播き、30℃でインキュベートした。約72時間後、1つのプレートのUra+酵母形質転換体から採取した、密に詰まった酵母細胞約50  $\mu$ Lを溶解緩衝液(2% Triton X-100、1% SDS、100mM NaCl、10mM Tris、pH8.0、1mM EDTA)100  $\mu$ L、Qiagenミニブレップキット(Qiagen, Valencia, CA、カタログ番号27104)のQiagen P1緩衝液100  $\mu$ L、およびZymolyase (Zymo Research, Orange, CA、カタログ番号1001)20Uに再懸濁した。この混合物を37℃で30分間インキュベートし、試薬P2の添加から始まるQiagenミニブレッププロトコルの残りの部分を実施した。EB試薬40  $\mu$ Lを用いてDNAを溶出させた。

10

#### 【0570】

0.2cmエレクトロポレーションキュベット中で、エレクトロコンピテントな大腸菌細胞(DH12S, Invitrogen, Carlsbad, CA)15  $\mu$ Lを酵母DNA 2  $\mu$ Lで形質転換した。これらの細胞に1.75kV、25  $\mu$ F、および400 $\Omega$ で電気パルスのかけた。エレクトロポレーション後、SOC(2%Bacto Tryptone (Difco, Detroit, MI)、0.5%酵母抽出物(Difco)、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM MgSO<sub>4</sub>、20mMグルコース)1mlをキュベットに添加した。この溶液をLB AMPプレート(LBプラス(Lennox)、1.8%Bacto Agar(Difco)、100mg/Lアンピシリン)2枚に播種した。1枚には形質転換体200  $\mu$ Lを播種し、2つ目には100  $\mu$ Lを播種した。

#### 【0571】

個々のクローンを形質転換プレートから採取し、配列決定して、IL17A-CH6の正確な発現構築物を含む1つのクローンおよびIL17F-CEEの正確な発現構築物を含む1つのクローンを同定した。Invitrogenメガブレップキット(Invitrogen, Carlsbad, CA、カタログ番号457009)を製造業者の取扱い説明書に従って用いて、規模のより大きなプラスミドDNAを単離した。

20

#### 【0572】

293F細胞中へのトランスフェクション

IL17A CH6-IL17F CEEヘテロ二量体の発現を試験するために、Lipofectamine2000(Invitrogen, Carlsbad, CA、カタログ番号11668-019)およびOptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA、カタログ番号31985-070)を用いて293F細胞を一過性にトランスフェクトし、12ウェルプレート中で増殖させた。IL17Aは2種のうちで発現の少ない方のタンパク質であることが以前に決定されていたため、IL17A CH6が3、IL17F CEEが1のDNA比率をトランスフェクションのために使用した。プラスミドDNA 2  $\mu$ gおよび細胞100万個をトランスフェクションのために使用した。96時間後、培地を回収し、ウェスタンブロットアッセイ法のために準備した。

30

#### 【0573】

Invitrogen社の材料およびプロトコルをウェスタンブロットのために使用した。IL17A CH6の検出抗体として抗6 $\times$ ヒスチジン(R&D Systems, Minneapolis, MN、カタログ番号MAB050H)を用い、IL17F CEEの検出抗体として研究施設内で作製したマウスmAbを用い、二次抗体としてJackson社製HRP-ヤギ抗マウスIgG(H+L)(カタログ番号115-035-003)+BD Pharmacia社製HRP-抗マウスIgG2a(R19-15)(カタログ番号553391)を用いた。有意な発現が観察された。したがって、大規模なトランスフェクションがタンパク質獲得のために実施された。

40

#### 【0574】

実施例56

CHO DXB11細胞培養発現物からの単鎖ヒトIL17A:IL17Fヘテロ二量体の精製

組換えヒトIL17A:IL17Fヘテロ二量体タンパク質(zcyto40f2 v.2)を、CHO DXB11細胞における単鎖構築物の発現およびWAVE装置における細胞培養によって作製した。構築物は、(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>リンカーで連結された、N末端のヒトIL17A配列およびC末端のIL17F配列からなった(構築物1789;C-Hisタグ付き)。Hisタグは、効率的な産生物捕獲を達成するためにC末端に付加した。約10Lの順化培地を回収し、0.2  $\mu$ mフィルターを用いて滅菌ろ過した。攪拌しながら酢酸を添加して、培地をpH5.0に調整した。この時点で、かなりの沈殿プロセスが

50

起こり、0.8ミクロンから0.2ミクロンへの2段階フィルター(Pall Corporation)に通して、pH調整した培地を再びろ過した。

【0575】

#### 陽イオン交換クロマトグラフィー

次いで、AKTATM explorerクロマトグラフィープラットフォーム(GE Healthcare)を用いて、予め平衡化した陽イオン交換カラム(床容量16mL、直径2cm)(SP Fast Flow樹脂、GE Healthcare)に調整した培地を10ml/分で添加した。平衡緩衝液は、pH5.0、0.02M酢酸、0.1M NaClであった。試料添加が完了したら、20カラム容量の平衡緩衝液でカラムを洗浄し、この時点で、安定な280nmでの紫外線ベースラインを得た。

【0576】

平衡緩衝液と溶出緩衝液(0.02, 酢酸、1.0M NaCl、pH 5.0)の間に20カラム容量の勾配を形成させながら、結合されたタンパク質の画分を流速20ml/分で溶出させて、5ml画分を採取した。SDS-PAGEクーマシーおよびウェスタンブロット形式を用いて画分を解析した。勾配溶離の間に観察された2つの溶出液ピークのうち1つ目(主なピーク)において、38kDaの濃い明瞭なバンドが観察された。主なピーク移動領域(画分20~48を含む)は、特異的な抗Hisタグ染色を示した。ウェスタンブロットで染色可能な画分をすべて集め、工程の次の段階に進めた。

【0577】

#### IMACクロマトグラフィー(金属キレート化親和性段階)

5mL HisTrap IMACカラム(GE Healthcare)を20カラム容量の緩衝液(0.5M NaCl、50mM リン酸ナトリウム;25mM イミダゾール、pH7.5)で平衡化した。濃度を25mM イミダゾールにするのに十分な固形試薬を添加して、陽イオン交換によって得たプール144mlをIMACクロマトグラフィー用に調整した。第一リン酸ナトリウム溶液および第二リン酸ナトリウム溶液(各0.5M)の等モル混合物を添加してリン酸緩衝液を20mMにし、この時点で、2N NaOHを添加してpHを7.5に調整した。

【0578】

この時点で、調整した陽イオン交換プールをHisTrap IMACカラムに添加する準備ができる。添加流速は4 ml/分であった。試料添加が完了したら、0.4M NaCl、400mM イミダゾール、pH7.5緩衝液を用いた段階的溶離に先立って、IMACカラムを40カラム容量の平衡緩衝液で洗浄した。溶出緩衝液に交換してからほどなく、実質的なピークがカラムから溶出した。

【0579】

この材料を集め、最終の工程段階であるサイズ排除クロマトグラフィーに注入するために3mlに濃縮した。

【0580】

#### サイズ排除クロマトグラフィー工程

IMAC段階から得た濃縮物を予め平衡化したSuperdex 200(GE Healthcare;16/60;120ml)SECカラムに注入し、35mM リン酸ナトリウム緩衝液、109mM NaCl、pH7.3から構成される移動相中、1.5 ml/分で流した。1.5mlの画分を採取した。0.7カラム容量で溶出する大部分は対称なピークの前に、いくつかの材料が早い段階に低レベルで溶出する。この主なピークの直前およびピーク内の画分を、クーマシー染色を用いたSDS-PAGEによって解析した。最も純度の高い産生物を送達する画分のプールを作り、産生物を含むいくつかの画分は、望ましくない不純物と同時に溶出されたため、排除した。

【0581】

#### 精製した単鎖ヒトIL17A:IL17Fヘテロ二量体の解析

組換え単鎖ヒトIL17A:IL17Fヘテロ二量体を、タンパク質の0.1%クーマシーR250染色を用いるSDS-PAGE(10% BisTris, Invitrogen, Carlsbad, CA)によって、およびニトロセルロースへの移動後、抗His-HRPを用いたイムノブロットティングによって解析した。精製したタンパク質を、Invitrogen NovexのXcell IIミニセルを用いて電気泳動し、25mM Tris塩基、200mMグリシン、および20%メタノールを含む緩衝液中、周囲温度、600mAで45分間

10

20

30

40

50

、ニトロセルロース(0.2 mm; Invitrogen, Carlsbad, CA)に移した。次いで、室温で15分間、50mM Tris、150mM NaCl、5mM EDTA、0.05% Igepal(TBS)に溶かした10%脱脂粉乳でフィルターをブロッキングした。ニトロセルロースを素早くゆすぎ、特異的HRP結合抗体(1:2500)を添加した。穏やかに振盪しながら、プロットを4で一晚インキュベートした。インキュベーション後、プロットをTBS中で各15分間、3回洗浄し、次いで、H<sub>2</sub>O中で素早くゆすいだ。市販されている化学発光基質試薬(Roche LumiLigh)を用いてプロットを発色させ、Lumi-ImagerのLumi Analyst 3.0ソフトウェア(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)を用いてシグナルを捕捉した。非還元クーマシー染色の解析によって、二重線として二量体産生物が明らかになり、下側の線(member)が目立っていた。

#### 【0582】

還元型の産生物および非還元型の産生物をクーマシー染色によって解析するSDS-PAGEによって、二量体ポリペプチド鎖の見かけの電気泳動度で不均衡な強度の二重線が明らかになった。二重線の上側のバンドが主な形態として観察された。還元SDS-PAGEおよびウェスタンブロットのデータから、無視できる量の低分子量化学種が示された。産生物100pmolを用いてN末端配列解析を実施した。これらの結果から、57.9pmolの平均反応収率で単一のN末端が回収され、そのN末端残基は、ヒトIL-17A配列の出発点であるG24であることが示された。アミノ酸組成のデータは、理論上の組成と一致した。解析的サイズ排除解析により、産生物の99+%の純度が示された。

#### 【0583】

##### 実施例57

表面プラズモン共鳴(Biacore)による、IL-17A/Fヘテロ二量体抗原に対するIL-17RA/RC-Fc5の結合親和性の測定

この研究は、IL-17A/Fの2鎖ヘテロ二量体に対するIL-17RA/RC-Fc5(変種1454)の結合親和性を評価するために実施した。

#### 【0584】

##### 親和性測定

IL-17RA/RC-Fc5とIL-17A/Fヘテロ二量体抗原の相互作用の動力学的速度定数、平衡結合定数、および平衡解離定数を表面プラズモン共鳴によって測定した。結合速度定数( $k_a$ (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>))は、抗原-受容体複合体形成の速度を反映する値である。解離速度定数( $k_d$ (s<sup>-1</sup>))は、この複合体の安定性を反映する値である。平衡結合親和性は、典型的には、平衡解離定数( $K_D$ (M))または平衡結合定数( $K_A$ (M<sup>-1</sup>))のいずれかとして表される。 $K_D$ は、解離速度定数を結合速度定数で割ることによって得られ( $k_d/k_a$ )、 $K_A$ は、結合速度定数を解離速度定数で割ることによって得られる( $k_a/k_d$ )。同様の $K_D$ (または同様の $K_A$ )を有するアンタゴニストは、非常に多様な結合速度定数および解離速度定数を有し得る。したがって、 $k_a$ および $k_d$ ならびに $K_A$ または $K_D$ を測定することは、受容体-抗原相互作用の親和性をより一意的に説明するのに役立つ。

#### 【0585】

##### 材料および方法

ヒト組換えIL-17A/Fヘテロ二量体に対する精製したIL-17RA/RC-Fc5受容体の結合親和性を測定するために実験を完成させた。Biacore T100(商標)システム(GE Healthcare, Piscataway, NJ)を用いて、結合の動態および親和性の研究を実施した。Biacore T100(商標)のための方法は、Biacore T100(商標)コントロールソフトウェア、バージョン1.1.1を用いてプログラムした。IL-17RA/RC-Fc5受容体はヒトFcドメインを含むため、ヤギ抗ヒトIgG Fc- (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を捕捉抗体としてこれらの研究のために使用した。0.4M EDC[N-ethyl-N'-(3-diethylamino-propyl)carbodiimide]および0.1M NHS(N-hydroxysuccinimide)の混合物を用いて、約4000RUの密度になるまで、CM4センサーチップに捕捉抗体を共有結合的に固定した。抗体の固定後、フローセル上に残存する活性部位を1Mエタノールアミンでブロッキングした。90~100RUの適切な密度のCM4チップの1つのフローセル上にIL-17RA/RC-Fc5受容体を捕捉した。固定化された表面への受容体の捕捉は、流速10  $\mu$ L/分で実施した。センサーチップ表面に結合されたタンパク質の質量を

Biacore機器で測定し、このようにして、各解析サイクルにおいて可溶性受容体の捕捉を確認した。

#### 【0586】

IL-17A/Fヘテロ二量体(前記の実施例55で説明したIL17A-CH6/IL17F-CEEの2鎖ヘテロ二量体)を用いた結合研究のために、抗原の1:3段階希釈物(33nM~0.015nM)を表面一面に注入して、センサーチップ上に捕捉されたIL-17RA/RC-Fc5 受容体に特異的に結合させた。各IL-17A/F抗原濃度について2つ1組の注入を実施し、7分の結合時間および15分の解離時間であった。動力学結合の研究を流速30  $\mu$ L/分で実施した。結合実験はすべて、10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Surfactant P20 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)、1mg/mLウシ血清アルブミン(Proliant Biologicals, Boone, IA)、pH 7.4の緩衝液中、

10

#### 【0587】

解析サイクルの間に、20mM塩酸でフローセルを洗浄して表面を再生した。この洗浄段階により、捕捉されたIL-17RA/RC-Fc5受容体が、固定された抗体表面から除去され、次の試験試料を続いて結合することが可能になった。Biacore T100(商標)評価ソフトウェア(バージョン1.1.1)を用いてデータをまとめた。参照フローセルおよびブランク注入のデータを引くことによって、データを処理した。再生段階により、一連の注入の間ずっと、変わらない結合表面が確実に提供されるように、ベースラインの安定性を評価した。2つ1組の注入曲線の再現性をチェックした。IL-17A/Fヘテロ二量体は、IL-17RA/RC-Fc5受容体に対して2つの潜在的な結合相手(IL-17AおよびIL-17F)を有する。ヘテロ二量体の1つの部分のみが受容体に結合する場合、単純な1:1の結合モデルが適切であると思われ、曲線はこのモデルにうまくフィットするはずである。しかしながら、ヘテロ二量体のIL-17A部分およびIL-17F部分の両方が受容体に結合する場合、二価の結合モデルが適切であると思われ、曲線はこのモデルにフィットするはずである。1:1結合モデルおよび二価分析物結合モデルの両方に、結合曲線を全体的にフィットさせた。

20

#### 【0588】

##### 結果

IL-17RA/RC-Fc5受容体を、ヒトIL-17A/Fヘテロ二量体抗原に対するその結合親和性に関して特徴付けた。結合速度定数( $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ))および解離速度定数( $k_d$ ( $s^{-1}$ ))を測定した。結果として得られる結合曲線は、1:1結合モデルにフィットしなかったが、データは二価分析物結合モデルによく当てはまった。この結果は、IL-17A/Fヘテロ二量体の両方の部分(IL-17AおよびIL-17F)が可溶性受容体に結合することと一致している。二価分析物結合モデルでは、 $k_a$ および $k_d$ の両方について2つの値( $k_{a1}$ および $k_{a2}$ 、 $k_{d1}$ および $k_{d2}$ )を測定する。1つ目の組の値( $k_{a1}$ および $k_{d1}$ )は、相互作用の一価の速度論を説明する。これらの試料に関して報告する親和性は、これらの値から導き、 $K_{D1}$ および $K_{A1}$ と呼ぶ。2つ目の組の値( $k_{a2}$ および $k_{d2}$ )は、相互作用の結合活性を指す。これらは報告しなかった。測定した結合動態は、 $k_{a1}$ が $5E+05$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )、 $k_{d1}$ が $2E-03$ ( $s^{-1}$ )であり、その結果、算出された $K_{D1}$ は $4E-9$ (M)となった[ $K_{A1}$ は $2E+8$ ( $M^{-1}$ )]。これらの値は、IL17A/Aホモ二量体およびIL17F/Fホモ二量体を用いて得られた結果に似ている。

30

#### 【0589】

(表15) IL-17A/Fヘテロ二量体に対する結合親和性

40

抗体	$k_{a1}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{d1}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{D1}$ (M)	$K_{A1}$ ( $M^{-1}$ )
IL-17A/F ヘテロ二量体	5.E+05	2.E-03	4.E-9	2.E+8

#### 【0590】

##### 実施例58

IL-17A/Fヘテロ二量体の活性およびIL-17RA/RC-Fc5による中和

IL17A/Fヘテロ二量体構築物(zcyto40f2v.1-2鎖およびzcyto40f2-単鎖)を、活性およびIL-17RA/RC-Fc5による中和に関して試験した。IL-17RC活性のアッセイ法では、IL-17Aおよ

50

びIL-17Fのシグナル伝達のNF- $\kappa$ Bによる検出をルシフェラーゼレポーターアッセイ法で検出するために、KZ170レポーター構築物をトランスフェクトしたNIH-3T3細胞株を利用する。両方のヘテロ二量体構築物が、このアッセイ法において用量依存的な応答を示し、2鎖構築物および単鎖構築物のEC50の値はそれぞれ15.19nMおよび20.59nMであった。IL-17Aホモ二量体およびIL-17Fホモ二量体もまた、用量依存的な応答を示し、EC50の値はそれぞれ2.026nMおよび17.31nMであった。

#### 【0591】

また、細胞ベースのNIH-3T3/KZ170ルシフェラーゼレポーターアッセイ法を用いた中和アッセイ法でも、IL-17A/Fヘテロ二量体構築物を試験した。可溶性受容体IL-17RA/RC-Fc5(変種1454)を一定濃度のリガンドで滴定し、レポーターバイオアッセイ法で試験した。両方のヘテロ二量体構築物が、IL-17RA/RC-Fc5可溶性受容体によって用量依的に中和され、2鎖構築物および単鎖構築物のIC50の値はそれぞれ3.169nMおよび13.34nMであった。また、IL-17Aホモ二量体およびIL-17Fホモ二量体も用量依的に中和され、IC50の値はそれぞれ0.1673nMおよび0.8735nMであった。

#### 【0592】

前述の内容から、本発明の特定の態様が、例証のために本明細書において説明されるが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な修正を実施し得ることが、理解されると考えられる。本明細書に引用したすべての刊行物、特許、および特許出願は、あらゆる目的のために、全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【図1A】

```

IL17RCx1  M P V P W F L L S L A L G R S P V V L S L E R L V
           10          20          25
           シグナル配列      エキソン 1

IL17RCx1  G P Q D A T H C S P | G L S C R L W | D S D I L C L P
           |          |          |
           エキソン 2      エキソン 3

IL17RCx1  G D I V P A P G F V L A P T H L Q T E L V L R C Q
           |          |
           エキソン 3      エキソン 4

IL17RCx1  K E T D C C L C I R V A V H L A V H | G H W E E P E
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 4      エキソン 5      エキソン 6      エキソン 7 (スプライスアウトされる)

IL17RCx1  V L S F Q A Y P T A R C V L L E V Q V P A A L V Q
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 5      エキソン 6      エキソン 7      エキソン 8      エキソン 9      エキソン 10

IL17RCx1  F G Q S V | G S V V Y D C F E A A L G S E V R I W S
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 6      エキソン 7      エキソン 8      エキソン 9      エキソン 10      エキソン 11

IL17RCx1  Y T Q P R Y E K E L N E T Q Q L P | A L P H L N V S
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 8      エキソン 9      エキソン 10      エキソン 11      エキソン 12      エキソン 13

IL17RCx1  A D G D N V H L V L N V S E E Q H F G L S L Y W N
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 11      エキソン 12      エキソン 13      エキソン 14      エキソン 15      エキソン 16

IL17RCx1  Q V Q G P P K P R W H K N L | T G P Q I I T L N H T
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 16      エキソン 17      エキソン 18      エキソン 19      エキソン 20      エキソン 21

IL17RCx1  D L V P C L C I Q | V W P L E P D S V R T N I C P F
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 21      エキソン 22      エキソン 23      エキソン 24      エキソン 25      エキソン 26

IL17RCx1  R | E D F R A H Q N L W Q A A R L R L L T L Q S W L
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 26      エキソン 27      エキソン 28      エキソン 29      エキソン 30      エキソン 31

IL17RCx1  L D A P C S L P A E A A L C W R A P G G D P C Q P
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 31      エキソン 32      エキソン 33      エキソン 34      エキソン 35      エキソン 36

IL17RCx1  L V F P L S W E N V T V D | K V L E F P L L K G H P
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 36      エキソン 37      エキソン 38      エキソン 39      エキソン 40      エキソン 41
  
```

#### 【図1B】

```

IL17RCx1  N L C V Q | V N S S E K L Q L Q E C L W A | D S L G P
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 13      エキソン 14      エキソン 15      エキソン 16      エキソン 17      エキソン 18 (スプライスアウトされる)

IL17RCx1  L K D D V L L L E T R G P Q D N R S L C A L E P S
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 14      エキソン 15      エキソン 16      エキソン 17      エキソン 18      エキソン 19

IL17RCx1  G C T S L P S K A S T | R A A R L G E Y L L Q D L Q
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 15      エキソン 16      エキソン 17      エキソン 18      エキソン 19      エキソン 20

IL17RCx1  S G Q C L Q | L W D D D L G A L W A C P M D K | Y I H
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 16      エキソン 17      エキソン 18      エキソン 19      エキソン 20      エキソン 21

IL17RCx1  K R W A L V W L A C L L F A A A L S L I L L K K
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 17      エキソン 18      エキソン 19      エキソン 20      エキソン 21      エキソン 22

           エキソン 18 (スプライスアウトされる)
           ▼
IL17RCx1  D H A K | A A A R G R A A L L L Y S A D D S G F E R
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 22      エキソン 23      エキソン 24      エキソン 25      エキソン 26      エキソン 27

IL17RCx1  L V G A L A S A L C Q L P L R V A V D L W S R R E
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 27      エキソン 28      エキソン 29      エキソン 30      エキソン 31      エキソン 32

IL17RCx1  L S A Q G P V A W F H A Q R R Q T L Q E G G V V V
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 32      エキソン 33      エキソン 34      エキソン 35      エキソン 36      エキソン 37

IL17RCx1  L L F S P G A V A L C S E W L Q D G V S G P G A H
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 37      エキソン 38      エキソン 39      エキソン 40      エキソン 41      エキソン 42

IL17RCx1  G P H D A F R A S L S C V L P D F L Q G R A P G S
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 42      エキソン 43      エキソン 44      エキソン 45      エキソン 46      エキソン 47

IL17RCx1  Y V G A C F D R L L H P D A V P A L F R T V P V F
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 47      エキソン 48      エキソン 49      エキソン 50      エキソン 51      エキソン 52

IL17RCx1  T L P S Q L P D F L G A L Q Q P R A P R S G R L Q
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 52      エキソン 53      エキソン 54      エキソン 55      エキソン 56      エキソン 57

IL17RCx1  E R A E Q V S R A L Q P A L D S Y F H P P G T P A
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 57      エキソン 58      エキソン 59      エキソン 60      エキソン 61      エキソン 62

IL17RCx1  P G R G V G P G A G P G A G D G T
           |          |          |          |          |          |
           エキソン 62      エキソン 63      エキソン 64      エキソン 65      エキソン 66      エキソン 67
  
```

## 【図 2 A】

IL17RCx4 M P V P W F L S L A L G R S P V V L S L E R L V  
 シグナル配列 エキソン 1

IL17RCx4 G P Q D A T R C S P I G L S C R L W I D S D I L C L P  
 エキソン 2

IL17RCx4 G D I V P A P G P V L A P T H L Q T E L V L R C Q  
 エキソン 3

IL17RCx4 K E T D C D L C L R V A V H L A V E I G H W E E P E  
 エキソン 4

IL17RCx4 D E E K Y G G A A D S G V E E P R N I A S L Q A Q V  
 エキソン 5

IL17RCx4 V L S F Q A Y P T A R C V L L E V Q V P A A L V Q  
 エキソン 6

IL17RCx4 F G C S V I G S V V Y D C F E A A L G S E V R I W S  
 エキソン 7

IL17RCx4 Y T Q P R Y E K E L K H T Q Q L F I D C R G L E V W  
 エキソン 8

IL17RCx4 N S I P S C W I A L P K L K V S  
 エキソン 9

IL17RCx4 A D G D N V H L V L N V S E E O H F G L S I Y W N  
 エキソン 10

IL17RCx4 Q V Q G P P K P R W H K N L I T G P Q I I T I N H T  
 エキソン 11

IL17RCx4 D L V P C L C I Q I V K P L E P D S V R T N I C P F  
 エキソン 12

IL17RCx4 R I E D P R A E Q N L W Q A A R L R L L T L Q S W L  
 エキソン 13

IL17RCx4 L D A P C S L P A E A A L C W R A P G G D F C Q P  
 エキソン 14

## 【図 3】

IL17RA M G A A R S P P S A V P G P C L G L L L L L L G V  
 シグナル配列

IL17RA L A P G S A S L R L L D H R A L V C S Q F I G L N C  
 エキソン 1 エキソン 2

IL17RA T V K N I S T C L D D S W I H P R N L T P S S P K D  
 エキソン 3

IL17RA L Q I Q C L E F A H T Q Q Q D L F P V A H I E W T L  
 エキソン 4

IL17RA Q T D I A S I L Y L E G A E L S V L Q L N T N E R L  
 エキソン 5

IL17RA C V R F E F L S K L R I I H H R R I W R F T F S H F V  
 エキソン 6

IL17RA V D P D Q E Y E V T V H H L P K P I P D G D P N H  
 エキソン 7

IL17RA Q S K N F L V F I D C E H A R K K V T T P C H S S I G  
 エキソン 8

IL17RA S L W D P N I T V E T L E A H Q L R V S F T L W N  
 エキソン 9

IL17RA E S T E Y Q I L L T S F P H M E N H S C F E H K E  
 エキソン 10

IL17RA H T P A I P R P E R F H Q R S N V T I T I R N I K G  
 エキソン 11

IL17RA C C R E Q V Q I I Q P F F S S C L N D C L R H S A T  
 エキソン 12

IL17RA V S C P E N P D T P I S P I P O Y H P L W . . . . .  
 エキソン 13 TMD

## 【図 2 B】

IL17RCx4 L V P P L S W E N V T V D I K V L E F F L L K G H P  
 エキソン 12

IL17RCx4 N L C V Q I V N S S E K L Q L Q E C L W A I D S L G P  
 エキソン 13

IL17RCx4 L K D D V L L L E T R G P Q D N R S L C A L E P S  
 エキソン 14

IL17RCx4 G C T S L P S K A S T I R A A R L G E Y L L Q D L Q  
 エキソン 15

IL17RCx4 S G Q C L Q I L W D D D L G A L W A C P M D K I Y I H  
 エキソン 16

IL17RCx4 K R E C S L C V F I A C L L F A S A S I S C L I S L K K  
 エキソン 17

IL17RCx4 D H A K I A A A R G R A A L L L Y S A D D S G F E R  
 エキソン 18

IL17RCx4 L V G A L A S A L C Q L P L R V A V D L W S R R E  
 エキソン 19

IL17RCx4 L S A Q G P V A W F H A Q R R Q T L Q E G G V V V  
 エキソン 20

IL17RCx4 L L F S P G A V A L C S E W L Q D G V S G P G A H  
 エキソン 21

IL17RCx4 G P H D A F R A S L S C V L P D F L Q G R A P G S  
 エキソン 22

IL17RCx4 Y V G A C F D R L L H P D A V P A L F R T V P V F  
 エキソン 23

IL17RCx4 T L P S Q L P D F L G A L Q Q P R A P R S G R L Q  
 エキソン 24

IL17RCx4 E R A E Q V S R A L Q P A L D S Y F H P P G T P A  
 エキソン 25

IL17RCx4 P G R G V G P G A G P G A G D G T  
 エキソン 26

## 【図 4 A】

IL17RA M G A A R S P P S A V P G P C L G L L L L L L G V  
 シグナル配列

IL17RA L A P G S A S L R L L D H R A L V C S Q F I G L N C  
 エキソン 1 エキソン 2

IL17RA T V K N I S T C L D D S W I H P R N L T P S S P K D  
 エキソン 3

IL17RA L Q I Q C L E F A H T Q Q Q D L F P V A H I E W T L  
 エキソン 4

IL17RA Q T D I A S I L Y L E G A E L S V L Q L N T N E R L  
 エキソン 5

IL17RA C V R F E F L S K L R I I H H R R I W R F T F S H F V  
 エキソン 6

IL17RA V D P D Q E Y E V T V H H L P K P I P D G D P N H  
 エキソン 7

IL17RA Q S K N F L V F I D C E H A R K K V T T P C H S S I G  
 エキソン 8

IL17RA S L W D P N I T V E T L E A H Q L R V S F T L W N  
 エキソン 9

IL17RA E S T E Y Q I L L T S F P H M E N H S C F E H K E  
 エキソン 10

IL17RA H T P A I P R P E R F H Q R S N V T I T I R N I K G  
 エキソン 11

IL17RA C C R E Q V Q I I Q P F F S S C L N D C L R H S A T  
 エキソン 12

IL17RA V S C P E N P D T P I S P I P O Y H P L W . . . . .  
 エキソン 13 TMD



## 【図 4 B】

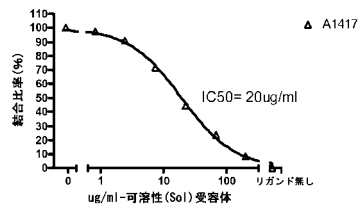
```

      |                               | 390
IL17RC  N L C V Q I V N S S E K L Q L Q E C L W A I D S L G P
      |                               |
      |                               | エキソン 13
      |                               |
      |                               | 415
IL17RC  L K D D V L L L D E T R G P Q D N R S L C A L E P S
      |                               |
      |                               | エキソン 14
      |                               |
      |                               | 440
IL17RC  G C T S L P S K A S T I R A A R L G E Y L L Q D L Q
      |                               |
      |                               | エキソン 15
      |                               |
      |                               | 465
IL17RC  S G Q C L Q I L W D D D L G A L W A C P N D K I Y I H
      |                               |
      |                               | エキソン 16
      |                               |
      |                               |
IL17RC  K I . . . .
      |
      |

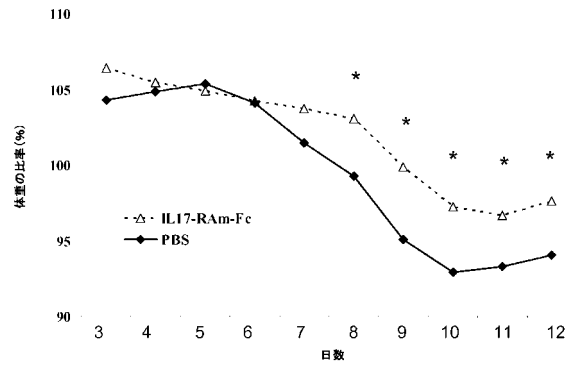
```

## 【図 5】

BHK/hIL-17RCx4細胞へのhIL-17Fの競合結合の参照標準



## 【図 6】



\* 平均体重は有意に異なる。(p &lt; 0.05)

## 【配列表】

2010522564000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/058190

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/435		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, PAJ, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2007/038703 A (ZYMOGENETICS INC [US]; LEVIN STEVEN D [US]; RIXON MARK W; GAO ZEREN [U] 5 April 2007 (2007-04-05) the whole document	1-30
Y	WO 2005/065711 A (SCHERING CORP [US]; GORMAN DANIEL M [US]) 21 July 2005 (2005-07-21) the whole document & WO 2005/010044 A (GENENTECH INC [US]; ARNOTT DAVID [US]; GURNEY AUSTIN [US]; HASS PHILIP) 3 February 2005 (2005-02-03)	1-30
Y	WO 2005/010044 A (GENENTECH INC [US]; ARNOTT DAVID [US]; GURNEY AUSTIN [US]; HASS PHILIP) 3 February 2005 (2005-02-03) the whole document	1-30
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  31 July 2008		Date of mailing of the international search report  27/08/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Keller, Yves

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/058190

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAUDENSCHILD D ET AL: "Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 277, no. 6, 8 February 2002 (2002-02-08), pages 4309-4316, XP002238284 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-30
Y	MOSELEY T A ET AL: "Interleukin-17 family and IL-17 receptors" CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 2, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 155-174, XP002321611 ISSN: 1359-6101 the whole document	1-30
Y	HAUDENSCHILD DOMINIK R ET AL: "Generation of interleukin-17 receptor-like protein (IL-17RL) in prostate by alternative splicing of RNA" PROSTATE, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US, vol. 66, no. 12, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1268-1274, XP002464693 ISSN: 0270-4137 the whole document	1-30

International Application No. PCT/US2008 /058190

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.1

Although claims 18-30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2008/Q58190

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/058190

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007038703	A	05-04-2007	AU 2006294511 A1	05-04-2007
			CA 2621623 A1	05-04-2007
			EP 1931697 A2	18-06-2008
WO 2005065711	A	21-07-2005	US 2008045698 A1	21-02-2008
			US 2008044432 A1	21-02-2008
WO 2005010044	A	03-02-2005	AU 2004259638 A1	03-02-2005
			CA 2530284 A1	03-02-2005
			EP 1641822 A2	05-04-2006
			JP 2008500803 T	17-01-2008
			KR 20060035732 A	26-04-2006
			KR 20070092319 A	12-09-2007
			MX PA06000347 A	28-03-2006

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード ( 参考 )	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
A 6 1 K	47/34	(2006.01)	A 6 1 K	47/34		
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 K	47/48		
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00		
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/18		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
A 6 1 P	1/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/02		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
			A 6 1 P	3/10		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 レービン スティーブン ディー .  
アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル ノースウエスト 第 1 1 6 ストリート 7 0 3

(72)発明者 リクソン マーク ダブリュー .  
アメリカ合衆国 ワシントン州 イサクアー サウスイースト 第 2 4 8 プレイス 3 7 2 4

(72)発明者 ガオ ゼレン  
アメリカ合衆国 ワシントン州 レッドモンド ノースイースト 第 2 2 9 レーン 9 8 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA26 BA61 CA04 CA09 CA20 DA02 DA06 DA12 EA04  
GA14 HA14  
4B064 AG03 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 CD09 CD13 CD21  
CE12 DA01  
4B065 AA26X AA57X AA72X AA90X AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA03  
BB12 BB15 BB19 BB29 BB37 BD14 CA24 CA25 CA44  
4C076 AA95 CC41 EE23 FF31  
4C084 AA02 AA07 BA02 BA22 BA41 BA42 MA05 NA14 ZA01 ZA33  
ZA34 ZA36 ZA45 ZA59 ZA66 ZA67 ZA68 ZA81 ZA89 ZA94  
ZA96 ZA97 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB35 ZC35  
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA02 DA75 EA20 FA74 GA26