

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5771140号
(P5771140)

(45) 発行日 平成27年8月26日(2015. 8. 26)

(24) 登録日 平成27年7月3日(2015. 7. 3)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 39/395	(2006. 01)	A 6 1 K 39/395	Z N A N
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	I O I
A 6 1 K 45/00	(2006. 01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 25/00	(2006. 01)	A 6 1 P 25/00	

請求項の数 24 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-506688 (P2011-506688)	(73) 特許権者	512069865
(86) (22) 出願日	平成21年4月28日(2009. 4. 28)		アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲー ーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2011-518857 (P2011-518857A)		ドイツ 81477 ミュンヘン シュタ ッフエルゼー シュトラーセ 2
(43) 公表日	平成23年6月30日(2011. 6. 30)	(74) 代理人	230104019
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/055129		弁護士 大野 聖二
(87) 国際公開番号	W02009/133103	(74) 代理人	100106840
(87) 国際公開日	平成21年11月5日(2009. 11. 5)		弁理士 森田 耕司
審査請求日	平成24年3月29日(2012. 3. 29)	(74) 代理人	100105991
(31) 優先権主張番号	61/125, 880		弁理士 田中 玲子
(32) 優先日	平成20年4月29日(2008. 4. 29)	(74) 代理人	100119183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用のGM-CSFおよびIL-17阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

炎症性疾患に罹患している対象における前記炎症性疾患を治療するための医薬の製造のための、GM-CSFを中和する化合物とIL-17を中和する化合物との使用であって、前記GM-CSFを中和する化合物が、GM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、前記IL-17を中和する化合物が、IL-17またはIL-17受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、炎症性疾患が関節リウマチである使用。

【請求項2】

(a) 前記GM-CSFを中和する化合物が、前記IL-17を中和する化合物の前に投与されるか、

(b) 前記GM-CSFを中和する化合物が、前記IL-17を中和する化合物の後に投与されるか、または

(c) 前記GM-CSFを中和する化合物と前記IL-17を中和する化合物とが同時に投与される、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記対象が、ヒトまたは非ヒト霊長類である、請求項1に記載の使用。

【請求項4】

前記GM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する抗体またはその機能的断片が、ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、請求項1に記載の使用。

10

20

【請求項 5】

前記 GM - CSF または GM - CSF 受容体に結合する抗体またはその機能的断片が GM - CSF のエピトープに結合するものであり、前記エピトープはアミノ酸 23 ~ 27 (R R L L N) および / またはアミノ酸 65 ~ 77 (G L R / Q G S L T K L K G P L) を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

前記エピトープが、

(a) アミノ酸 28 ~ 31 (L S R D)、

(b) アミノ酸 32 ~ 33 (T A)、および / または

(c) アミノ酸 21 ~ 22 (E A)

をさらに含む、請求項 5 に記載の使用。

10

【請求項 7】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 17 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 18 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその軽鎖可変領域に含み、配列番号 14 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 15 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2 領域、および配列番号 1 ~ 13 および 56 のいずれかに示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその重鎖可変領域に含む、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 8】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 17 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 18 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその軽鎖可変領域に含み、配列番号 14 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 15 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2 領域、および配列番号 2 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその重鎖可変領域に含む、請求項 4 に記載の使用。

20

【請求項 9】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、その軽鎖可変領域に配列番号 19、54、および 55 のいずれかに示されているアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の使用。

30

【請求項 10】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、その重鎖可変領域に配列番号 20 - 33、52、および 53 のいずれかに示されているアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 11】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 34 に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 35 ~ 48 のいずれかに示されている重鎖アミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 12】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 34 に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 35 に示されている重鎖アミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の使用。

40

【請求項 13】

前記 I L - 17 または I L - 17 受容体に結合する抗体またはその機能的断片が、それぞれヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 14】

(a) GM - CSF または GM - CSF 受容体に結合する抗体またはその機能的断片である GM - CSF を中和する化合物と、

(b) I L - 17 または I L - 17 受容体に結合する抗体またはその機能的断片である I L - 17 を中和する化合物と

50

を含む関節リウマチの治療のための医薬組成物。

【請求項 15】

前記 GM - CSF または GM - CSF 受容体に結合する抗体またはその機能的断片が、ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記 GM - CSF または GM - CSF 受容体に結合する抗体またはその機能的断片が、アミノ酸 23 ~ 27 (RRLLN) および / またはアミノ酸 65 ~ 77 (GLR / QGSLTKLKGPL) を含む GM - CSF のエピトープに結合する、請求項 14 または 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記エピトープが、

(a) アミノ酸 28 ~ 31 (LSRD)、

(b) アミノ酸 32 ~ 33 (TA)、および / または

(c) アミノ酸 21 ~ 22 (EA)

をさらに含む、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列を含む CDR1、配列番号 17 に示されているアミノ酸配列を有する CDR2、および配列番号 18 に示されているアミノ酸配列を有する CDR3 をその軽鎖可変領域に含み、配列番号 14 に示されているアミノ酸配列を含む CDR1 領域、配列番号 15 に示されているアミノ酸配列を有する CDR2 領域、および配列番号 1 ~ 13 および 56 のいずれかに示されているアミノ酸配列を有する CDR3 をその重鎖可変領域に含み、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列を含む CDR1、配列番号 17 に示されているアミノ酸配列を有する CDR2、および配列番号 18 に示されているアミノ酸配列を有する CDR3 をその軽鎖可変領域に含み、配列番号 14 に示されているアミノ酸配列を含む CDR1 領域、配列番号 15 に示されているアミノ酸配列を有する CDR2 領域、および配列番号 2 のいずれかに示されているアミノ酸配列を有する CDR3 をその重鎖可変領域に含み、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、その軽鎖可変領域に配列番号 19、54、および 55 のいずれかに示されているアミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、その重鎖可変領域に配列番号 20 - 33、52、および 53 のいずれかに示されているアミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 34 に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 35 ~ 48 のいずれかに示されている重鎖アミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 34 に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 35 に示されている重鎖アミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記 IL - 17 または IL - 17 受容体に結合する抗体またはその機能的断片が、ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は炎症性疾患の治療に関する。本発明の別の態様は、癌などの腫瘍性疾患の治療に関する。本発明のさらに別の態様は、炎症性および/または腫瘍性疾患を治療するための医薬組成物に関する。本出願が出願される法律体系に応じて、本発明は、上記疾患の治療用医薬品の製造における2つの特定の物質の使用にも同様に関連し得る。

【背景技術】

10

【0002】

造血成長因子として最初に同定された顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)は、炎症および自己免疫における重要なサイトカインであることがより最近になって示されている。GM-CSF mRNAまたはタンパク質のレベル上昇は、アレルギーおよび乾癬患者、関節炎および喘息患者におけるものを含む、様々な炎症部位で測定される。

【0003】

多数の*in vivo*研究により、中和抗体によるGM-CSFの遮断が、関節炎、実験的自己免疫性脳炎、乾癬、および肺疾患のモデルを含む種々の炎症モデルの炎症促進性疾患を予防し、または治癒までもできることが過去数年にわたって示されている。GM-CSFは、成熟好中球およびマクロファージの増殖および活性化を刺激することにより、先天性免疫に重要な役割を果たす。加えて、GM-CSFの重要な役割が、*in vitro*で樹状細胞の分化および成熟を支配することにより抗原提示において実証されている。In *vivo*では、GM-CSFは、ヒトPBMC、T細胞、およびAPCで1型の炎症促進性サイトカインを優先的に誘導することが報告されている。

20

【0004】

インターロイキン-17(IL-17)は、現在は6つのメンバー、IL-17A~IL-17Fからなる後天性免疫系のサイトカインのファミリーである。IL-17は、互いにかなり高い配列相同性を共有する、現在は5つのメンバーIL-17RA~IL-17REを含むファミリーであるIL-17受容体に結合することが記述されている。IL-17受容体ファミリーのメンバーは、I型膜貫通型タンパク質である。IL-17に対する受容体は免疫系の全ての細胞により豊富に発現されており、IL-17A、IL-17F、およびIL-17Dによる種々の細胞タイプの刺激が、IL-1、TNF、およびIL-6のような他のサイトカイン、ならびにケモカインIL-8およびMIP-1の発現を誘導することができる。現在一般的に受け入れられている。その受容体とは対照的に、IL-17は、最近発見されたTh17細胞により主として産生されており、その発現は感染および自己免疫と関連することが多い。

30

【0005】

関節リウマチ(RA)は、慢性、炎症性、および全身性の自己免疫疾患である。RAの病因および病原性はまだ完全には理解されていないが、この疾患は、侵襲性の滑膜過形成(パヌス形成)および炎症(滑膜炎)を特徴とし、関節軟骨および硬骨の進行性破壊につながる。関節リウマチ(RA)は、免疫系の先天性および後天性の両機構に属する多数の細胞タイプおよび因子間の複雑な相互作用から生じる。例えば、様々なサイトカイン発現の一般的な増加、つまり対照と比較して非常に高いレベルのIL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-13、IFN、G-CSF、GM-CSF、MCP-1、およびMIP-1がRA患者に観察されることが報告されている。さらに、IL-1、TNF、およびIL-18は、RAにおいてT細胞を刺激する顕著な炎症性因子として同定されている。公開されている報告では、RAにおけるGM-CSFの病原的役割が仮定されている。以下の知見がこの仮説を支持している:(i)GM-CSFはRA患者の滑膜で産生されており、このサイトカインのレベル上昇は患者の関節液で測定す

40

50

ることができる；(i i) 中和性抗GM-CSFモノクローナル抗体(mAb)による治療は、コラーゲン誘導性関節炎のマウスモデル(CIA)の疾患重症度を減少させる；(i i i) GM-CSF欠損マウスは、コラーゲンおよびmBSAによる疾患誘導に対する感受性の低減を示す；(i v) 組換えGM-CSFをCIAマウスに注射すると、疾患が悪化する；(v) 化学療法後にGM-CSFを投与したRA患者は、関節炎重症度の拡大を示す。

【0006】

上記の特定されている様々なサイトカインとは別に、IL-17レベルがRAの滑膜および関節液で上昇し、IL-17の遮断が実験モデルでの関節炎期間中の関節炎および関節破壊を低減するため、IL-17はRAの病理にも関与していると考えられる。加えて、IL-17の遺伝子欠損マウスはコラーゲン誘導性関節炎の抑制を示し、IL-17-/-マウスは、IL-1Ra-/-マウスと交配すると、IL-1受容体アンタゴニスト欠損Balb/cマウスに通常見られる多発関節炎の自然発生的な発症を完全に欠如する。IL-17およびTNFによる局所的同時刺激は、好中球の動員および生存の両方に対する効果により、気道における好中球のGM-CSF依存性蓄積が、マウスでの*in vivo*実験で引き起こされることも報告されている。

【0007】

マウスにおいてヒトRA様疾患を研究するために使用されるモデルの1つは、連鎖球菌(*Streptococcal*)細胞壁(SCW)関節炎である。このモデルでは、急性疾患および慢性再発性関節炎は両方とも、マウスの1つの膝関節に細菌細胞壁断片を関節内(i.a.)注射することにより誘導することができる。先天性免疫が主要な病原的役割を果たす急性関節炎は、未処置マウスの膝関節にSCW断片を単回注射することにより得られる。SCW断片のi.a.注射を繰り返すことにより慢性再発性モデルが確立され、後天性免疫のメディエーターが先天性応答の初期の優勢を徐々に引き継いでいく。コラーゲン誘導性関節炎(CIA)は、軟骨コラーゲンII型(CII)に対するT細胞および抗体媒介性の自己免疫応答性に基づく、別の広く受け入れられている関節炎モデルである。このマウスモデルは、いくつかの臨床的、組織病理学的、および免疫学的な特徴をヒトRAと共有しており、滑膜炎ならびにその後の重篤な軟骨および硬骨侵食を主な特徴とする。本発明者らは、TNF非依存性の慢性SCW関節炎モデルおよびTNF依存性CIAモデルにおけるGM-CSF中和の治療的効能を探究した。加えて、本発明者らは、GM-CSFおよびIL-17経路を阻害することにより、先天性免疫および適応免疫を両方とも阻止する効果を研究した。これは、IL-17受容体の遺伝子欠損マウス(IL-17R-KOマウス)において、GM-CSFを中和することにより、またはGM-CSFおよびIL-17を中和する化合物による併用治療により実施された。本発明者らは、驚くべきことに、GM-CSFおよびIL-17経路の併用遮断により、非常に効率的な様式で両タイプの炎症性疾患を治療することができることを観察した。CIAモデルでは、GM-CSF阻害性化合物およびIL-17阻害性化合物の併用投与は、コラーゲン誘導性関節炎の臨床スコアを有意に低減させたが、GM-CSF阻害性化合物またはIL-17阻害性化合物単独による治療は、関節炎の重症度を有意には減少させなかった。加えて、詳細な組織学的分析から、軟骨および硬骨の関節炎および関節破壊に対する併用療法の相乗効果を実証された。このように、両経路の併用遮断は、その結果として炎症および関節破壊からの非常に効果的な保護をもたらした。これらの結果は、ごく最近まで、GM-CSFがIL-17の下流にあると仮定されていたため、特に驚くべきことである(例えば、Kawaguchi M. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 114 (2004), 444-450; Starnes T. et al., *The Journal of Immunology* 169 (2002), 642-646; Laan M. et al., *Eur. Respir. J.* 21 (2003), 387-393を参照)。したがって、GM-CSFおよびIL-17を中和する化合物を併用する治療からは、相加効果または相乗効果は予測されていなかった。本出願は、*in vivo*でのIL-17およびGM-CSFの併用阻止の有利な効果を初めて実証するものである。本明細書で示されているデータは、抗IL-17治療と組み合わせた抗GM-CSFが、RAだけでなく、本明細書の下記で定義されている

10

20

30

40

50

ような他の自己免疫疾患および炎症性疾患の状況でも顕著な治療効果を示すことを強く表している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

このように、本発明の薬学的手段および方法は、特に関節炎の治療を対象とするが、多発性硬化症、乾癬、ならびに喘息および慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの肺炎症を含む他の炎症性疾患にも適用することができる。

【0009】

定義

本明細書全体にわたって使用される「対象」という用語は、動物を指す。「動物」という用語には、これらに限定されないが、実験動物（げっ歯動物、例えばラット、モルモット、ハムスターまたはマウス、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルまたはマカクサル）、家庭内動物またはペット動物（例えば、イヌまたはネコ）、家畜または農業用動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、およびブタ動物）、およびノまたはヒトなどの哺乳類が含まれる。好ましくは、動物は、ヒトまたは非ヒト霊長類である。

【0010】

本明細書全体にわたって使用される「GM-CSF」という用語は、文献に定義されているようなヒト（ホモサピエンス）および非ヒト霊長類GM-CSFの両方を表し、その変異体（相同体）を含む。この用語は、ヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSF受容体、およびそれらの変異体（相同体）も含む。非ヒト霊長類GM-CSFまたは非ヒト霊長類GM-CSF受容体の特に好ましい変異体（相同体）には、テナガザル（ノマスカス・コンカラー（*nomascus concolor*）、ウエスタンブラッククレステッドギボン（*western black crested gibbon*）としても知られている）のGM-CSF、ならびにマカク科のサルのGM-CSF、例えばアカゲザル（マカカ・ムラッタ（*Macaca mulatta*））およびカニクイザル（マカカ・ファシキュラリス（*Macaca fascicularis*））のGM-CSFが含まれる。

【0011】

本明細書の全体にわたって使用される「GM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する抗体」またはその機能的断片という用語は、動物のGM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する能力を有する任意の抗体または抗体断片を含む。特に、この用語は、ヒトと上記で言及したサル種の少なくとも1つとの間で交差反応性（GM-CSFまたはGM-CSF受容体に対する結合に関して）を示す任意の抗体またはその断片を含む。例えば、抗体またはその断片は、ヒトGM-CSFおよびカニクイザル（マカカ・ファシキュラリス）GM-CSFの両方に結合（および両方を中和）することが可能である。これは、ヒト対象への治療的投与を目的とする抗体分子の場合は特に有利である。なぜならそのような抗体は、通常、規制認可前に多数の試験を通らなければならない、それらの試験のうちのある初期試験には非ヒト動物種が関与するからである。そのような試験を実施する際に、ヒトと高度な遺伝的類似性を有する種（例えば、カニクイザルなどの非ヒト霊長類）を非ヒト種として使用することは一般的に望ましい。なぜならそのようにして得られる結果は、一般的に、同じ分子をヒトに投与する場合に期待される対応結果を高度に予測させるからである。しかしながら、動物試験に基づくそのような予測能力は、分子の比較可能性に少なくとも部分的に応じており、同じ治療用分子をヒトおよび非ヒト動物に投与することができる場合、種間交差反応性のためこの能力は非常に高い。したがって、ある抗体分子がヒトおよび別の種で同一抗原に対して交差反応性であれば、その同一抗体分子を使用して、ヒトおよび他の種、例えば上記で言及したサル種のうちの1つで試験を実施することができる。これにより、試験自体の効率性、ならびに治療上の見地から最終的な目的種であるヒトにおけるそのような抗体の挙動に関するそのような試験の予測能力をともに向上させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

本明細書の全体にわたって使用される「GM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する抗体」という用語は、GM-CSFまたはGM-CSF受容体に対するモノクローナル抗体、またはそのような結合能力を有するその機能的断片も含む。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

本発明の第1の態様は、炎症性疾患に罹患している対象における該炎症性疾患を治療するための方法であって、GM-CSFを中和する化合物（簡潔には、GM-CSF阻害性化合物）およびIL-17を中和する化合物（簡潔には、IL-17阻害性化合物）を投与することを含む方法に関する。本化合物は、当業者に周知のパラメーターに応じて、1つの組成物の一部であってもよく、または別々の医薬品であってもよい。

10

【 0 0 1 4 】

本方法の好ましい実施形態は、下記の通りである：

(a) 該GM-CSF中和化合物が、該IL-17中和化合物の前にまたはその後で該対象に投与される方法、または両化合物が同時に投与される方法；

(b) 該治療対象が上記で定義した動物である、本発明の第1の態様に記載のまたは(a)に記載の方法、

(c) 該GM-CSF中和化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である、本発明の第1の態様に記載のまたは(a)もしくは(b)に記載の方法；

(d) 該ポリペプチドが、GM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは該抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(c)に記載の方法；

20

(e) 該抗体がヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(d)に記載の方法、

(f) 該抗体またはその機能的断片が、ヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSFのエピトープに結合する、(d)または(e)に記載の方法。該エピトープは、ヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSFの不連続エピトープが好ましく、該エピトープは、好ましくはアミノ酸23~27(RRLLN)および/またはアミノ酸65~77(GLR/QGSLTKLKGPL)を含む。該アミノ酸配列伸長65~77内の67位における変異性は、一方ではヒトおよびテナガザルGM-CSF(67位はRである)と、他方ではマカク科のサル、例えばカニクイザルおよびアカゲザル(67位はQである)との間に、GM-CSFのこの位置における不均質性があることを反映している；

30

(g) 前記不連続エピトープが、アミノ酸28~31(LSRD)、アミノ酸32~33(TA)、および/またはアミノ酸21~22(EA)をさらに含む、(f)に記載の方法；

(h) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号1~13または56に示されているアミノ酸配列のいずれかを含むCDR3をその重鎖可変領域に含む、(e)、(f)、および(g)のいずれかに記載の方法；

(i) 前記重鎖可変領域CDR3配列のいずれかが、配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列および配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列と共に重鎖可変領域に存在する、(h)に記載の方法；

40

(j) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号16に示されているアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号17に示されているアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号18に示されているアミノ酸配列を含むCDR3をその軽鎖可変領域に含む、(h)または(i)に記載の方法；

(k) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号19、54および55のいずれかに示されているアミノ酸配列を、その軽鎖可変領域にさらに含む、(j)に記載の方法；

(l) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号20~33、52または53のいずれかに示されているアミノ酸配列をその重鎖可変領域に含む、(h)ま

50

たは (i) に記載の方法 ;

(m) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 1 6 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 1 7 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 1 8 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその軽鎖可変領域に含み、配列番号 1 4 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 1 5 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2 領域、および配列番号 1 ~ 1 3 または 5 6 のいずれかに示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 領域をその重鎖可変領域に含む、(h) ~ (l) のいずれかに記載の方法 ;

(n) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 3 4 に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 3 5 ~ 4 8 のいずれかに示されている重鎖アミノ酸配列を含む、(h) ~ (m) のいずれかに記載の方法 ;

(o) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 1 ~ 4 8 および / または 5 2 ~ 5 6 のいずれかに示されているそれぞれのアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の相同性を保有するアミノ酸配列を含む、(h) ~ (n) のいずれかに記載の方法 ; 相同性は、ベクター N T I (I n f o r M a x (商標)、メリーランド州、アメリカ合衆国) などの標準的配列アラインメントプログラムにより決定される。そのようなプログラムでは、整列させた配列をアミノ酸毎に比較し、比較について種々のレベルの厳密性を設定することができる (例えば、同一アミノ酸、保存的アミノ酸置換など)。この用語が本明細書中で使用される場合、問題の 2 つのアミノ酸は、各々が同じ化学的クラス、つまり酸性、無極性、無荷電の極性、および塩基性に属する場合、互いの「保存的置換」とであるとみなされる。非限定的な例では、無極性アミノ酸のクラスに属する 2 つの異なるアミノ酸は、これらの 2 つのアミノ酸が同一でない場合でも、互いの「保存的置換」とみなされることになるが、一方が無極性アミノ酸であり、他方が塩基性アミノ酸である場合は、互いの「保存的置換」とはみなされないだろう。「Molecular Biology of the Cell」、第 4 版 (2 0 0 2 年)、Alberts、Johnson、Lewis、Raff、Roberts、および Walter 著のパネル 3 . 1 では、アミノ酸が、4 つの主な群 : 酸性、無極性、無荷電極性、および塩基性に分類されている。そのような分類は、特定のアミノ酸が問題の別のアミノ酸の保存的置換であるかどうかを本発明のために決定する目的で使用することができる。

(p) 該 I L - 1 7 中和化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である、本発明の第 1 の態様に記載のまたは (a) ~ (o) のいずれかに記載の方法 ;

(q) 該ポリペプチドが、I L - 1 7 または I L - 1 7 受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは、該抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(p) に記載の方法 ;

(r) 該抗体がヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である (q) に記載の方法 ;

(s) 該炎症性疾患が、関節リウマチ (R A) (T N F アルファ中和剤による治療に抵抗性の R A を含む)、喘息、多発性硬化症 (M S)、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、急性呼吸窮迫症候群 (A R D S)、特発性肺線維症 (I P F)、炎症性腸疾患 (I B D)、クローン病、ブドウ膜炎、黄斑変性症、大腸炎、乾癬、ウォーラー変性、抗リン脂質症候群 (A P S)、急性冠動脈症候群、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、再発性多発性軟骨炎 (R P)、急性または慢性肝炎、整形外科インプラントの失敗、糸球体腎炎、狼瘡、または別の自己免疫障害である、本発明の第 1 の態様に記載のまたは (a) ~ (r) のいずれかに記載の方法。

【 0 0 1 5 】

本発明の第 2 の態様は、腫瘍性疾患に罹患している対象における該腫瘍性疾患を治療するための方法であって、G M - C S F 中和化合物および I L - 1 7 中和化合物を投与することを含む方法に関する。本化合物は、当業者に周知のパラメーターに応じて、1 つの組成物の一部であってもよく、または別々の医薬品であってもよい。

【 0 0 1 6 】

10

20

30

40

50

第2の態様による本方法の好ましい実施形態は、下記の通りである：

(a) 該GM-CSF中和化合物が、該IL-17中和化合物の前にまたはその後で該対象に投与される方法、または両化合物が同時に投与される方法；

(b) 該治療対象が上記で定義した動物である、本発明の第2の態様に記載のまたは(a)に記載の方法。好ましくは、該対象はヒトまたは非ヒト霊長類である；

(c) 該GM-CSF中和化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である、本発明の第2の態様に記載のまたは(a)もしくは(b)に記載の方法；

(d) 該ポリペプチドが、GM-CSFまたはGM-CSF受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは該抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(c)に記載の方法；

(e) 該抗体がヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(d)に記載の方法；

(f) 該抗体またはその機能的断片が、ヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSFのエピトープに結合する、(d)または(e)に記載の方法。該エピトープは、好ましくはヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSFの不連続エピトープであり、該エピトープは、好ましくはアミノ酸23~27(RRLLN)および/またはアミノ酸65~77(GLR/QGSLTKLKGPL)を含む；

(g) 前記不連続エピトープが、アミノ酸28~31(LSRD)、アミノ酸32~33(TA)、および/またはアミノ酸21~22(EA)をさらに含む、(f)に記載の方法；

(h) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号1~13または56に示されているアミノ酸配列のいずれかを含むCDR3をその重鎖可変領域に含む、(e)、(f)、および(g)のいずれかに記載の方法；

(i) 前記重鎖可変領域CDR3配列のいずれかが、配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列および配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列と共に重鎖可変領域に存在する、(h)に記載の方法；

(j) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号16に示されているアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号17に示されているアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号18に示されているアミノ酸配列を含むCDR3をその軽鎖可変領域に含む、(h)または(i)に記載の方法；

(k) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号19、54および55のいずれかに示されているアミノ酸配列を、その軽鎖可変領域にさらに含む、(j)に記載の方法；

(l) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号20~33、52または53のいずれかに示されているアミノ酸配列をその重鎖可変領域に含む、(h)または(i)に記載の方法；

(m) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号16に示されているアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号17に示されているアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号18に示されているアミノ酸配列を有するCDR3をその軽鎖可変領域に含み、配列番号14に示されているアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号15に示されているアミノ酸配列を有するCDR2領域、および配列番号1~13または56のいずれかに示されているアミノ酸配列を有するCDR3をその重鎖可変領域に含む、(h)~(l)のいずれかに記載の方法；

(n) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号34に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号35~48のいずれかに示されている重鎖アミノ酸配列を含む、(h)~(m)のいずれかに記載の方法；

(o) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号1~48および/または52~56のいずれかに示されているそれぞれのアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性を保有するアミノ酸配列を含む、(h)~(n)のいずれかに記載の方法。相同性は、本発明の第1の態様、実施形態(o)に関する前述の段落のように本明細書中で定

10

20

30

40

50

義されている；

(p) 該 I L - 1 7 中和化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である、本発明の第 2 の態様に記載のまたは (a) ~ (o) のいずれかに記載の方法；

(q) 該ポリペプチドが、I L - 1 7 または I L - 1 7 受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは、該抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(p) に記載の方法；

(r) 該抗体がヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(q) に記載の方法；

(s) 前記腫瘍性疾患が癌である、本発明の第 2 の態様に記載のまたは (a) ~ (r) のいずれかに記載の方法；

(t) 前記癌が、白血病、多発性骨髄腫、胃癌または皮膚癌である、(s) に記載の方法。

【 0 0 1 7 】

本発明の第 3 の態様は、ヒトおよび/または獣医学に使用するための、特にヒトおよび/または上記で定義した動物の炎症性疾患または腫瘍性疾患を治療するための医薬組成物である。該組成物は、G M - C S F 中和化合物(簡潔には、G M - C S F 阻害性化合物)および I L - 1 7 中和化合物(簡潔には：I L - 1 7 阻害性化合物)を含む。本発明の第 3 の態様による組成物の好ましい実施形態は、以下の通りである。

(a) 該 G M - C S F 阻害性化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である組成物；

(b) 該ポリペプチドが、G M - C S F または G M - C S F 受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは該抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(a) に記載の組成物；

(c) 該抗体またはその機能的断片がヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(b) に記載の組成物；

(d) 該抗体またはその機能的断片が、ヒトおよび非ヒト霊長類 G M - C S F のエピートープに結合する、(b) または (c) に記載の組成物。該エピートープは、好ましくはヒトおよび非ヒト霊長類 G M - C S F の不連続エピートープであり、該エピートープは、好ましくはアミノ酸 2 3 ~ 2 7 (R R L L N) および/またはアミノ酸 6 5 ~ 7 7 (G L R / Q G S L T K L K G P L) を含む；

(e) 前記不連続エピートープが、アミノ酸 2 8 ~ 3 1 (L S R D)、アミノ酸 3 2 ~ 3 3 (T A)、および/またはアミノ酸 2 1 ~ 2 2 (E A) をさらに含む、(d) に記載の組成物；

(f) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 1 ~ 1 3 または 5 6 に示されているアミノ酸配列のいずれかを含む C D R 3 をその重鎖可変領域に含む、(c)、(d) および (e) のいずれかに記載の組成物；

(g) 前記重鎖可変領域 C D R 3 配列のいずれかが、配列番号 1 4 に示されている重鎖可変領域 C D R 1 配列および配列番号 1 5 に示されている重鎖可変領域 C D R 2 配列と共に重鎖可変領域に存在する、(f) に記載の組成物；

(h) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 1 6 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 1 7 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 1 8 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 3 をその軽鎖可変領域に含む、(f) または (g) に記載の組成物；

(i) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 1 9、5 4 および 5 5 のいずれかに示されているアミノ酸配列をその軽鎖可変領域にさらに含む、(h) に記載の組成物；

(j) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 2 0 ~ 3 3、5 2 または 5 3 のいずれかに示されているアミノ酸配列をその重鎖可変領域に含む、(f) または (g) に記載の組成物；

10

20

30

40

50

(k) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号16に示されているアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号17に示されているアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号18に示されているアミノ酸配列を有するCDR3をその軽鎖可変領域に含み、配列番号14に示されているアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号15に示されているアミノ酸配列を有するCDR2領域、および配列番号1～13または56のいずれかに示されているアミノ酸配列を有するCDR3をその重鎖可変領域に含み、(f)～(j)のいずれかに記載の組成物；

(l) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号34に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号35～48のいずれかに示されている重鎖アミノ酸配列を含む、(f)～(k)のいずれかに記載の組成物；

(m) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号1～48および/または52～56のいずれかに示されているそれぞれのアミノ酸配列と少なくとも70%の相同性を保有するアミノ酸配列を含む、(f)～(l)のいずれかに記載の組成物。相同性は、本発明の第1の態様、実施形態(o)に関する前述の段落のように本明細書中で定義されている；

(n) 該IL-17F阻害性化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である、(a)～(m)のいずれかに記載の組成物；

(o) 該ポリペプチドが、IL-17またはIL-17受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは、該抗体がモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(n)に記載の組成物；

(p) 該抗体またはその機能的断片がそれぞれヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である、(o)に記載の組成物；

(q) 前記組成物が、炎症性疾患および/または腫瘍性疾患の治療用であり、具体的には、該炎症性疾患が、関節リウマチ(RA)(TNFアルファ中和剤による治療に抵抗性のRAを含む)、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、特発性肺線維症(IPF)、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病、ブドウ膜炎、黄斑変性症、大腸炎、乾癬、ウオーラー変性、抗リン脂質症候群(APS)、急性冠動脈症候群、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、再発性多発性軟骨炎(RP)、急性または慢性肝炎、整形外科インプラントの失敗、糸球体腎炎、狼瘡、もしくは自己免疫障害であり、かつ/または該腫瘍性疾患が、白血病、多発性骨髄腫、胃癌、もしくは皮膚癌などの癌であり、かつ/または前記腫瘍性疾患が、白血病、多発性骨髄腫、胃癌、もしくは皮膚癌などの癌である、(a)～(p)のいずれかに記載の組成物。

【0018】

本出願が出願される法律体系に応じて、本発明の第4の態様は、上記でさらに詳述したように、炎症性疾患および腫瘍性疾患治療用の医薬品の製造におけるGM-CSF阻害性化合物およびIL-17阻害性化合物の併用使用であってもよい。したがって、本発明の第4の態様の好ましい実施形態では、GM-CSF阻害性化合物およびIL-17阻害性化合物を含む医薬品は、(i)まずGM-CSF阻害性化合物、次にIL-17阻害性化合物を、(ii)まずIL-17阻害性化合物、次にGM-CSF阻害性化合物を、(iii)GM-CSF阻害性化合物およびIL-17阻害性化合物を同時に投与するために製剤化することができる。したがって、2つの化合物は、当業者に周知のパラメーターに応じて、1つの組成物の一部であってもよく、または別々の医薬品であってもよい。

【0019】

代替として、第5の態様は、上記で詳述した疾患のいずれかの治療に使用するためのGM-CSF阻害性化合物およびIL-17阻害性化合物であってもよい。やはり、本化合物の投与は、任意の順序で順次行ってもよく、または同時に行ってもよい。同様に、本化合物は、当業者に周知のパラメーターに応じて、1つの組成物の一部であってもよく、または別々の医薬品であってもよい。

【0020】

医薬品の製造でGM-CSF阻害性化合物およびIL-17阻害性化合物を使用する場

10

20

30

40

50

合、ならびに該疾患のいずれかの治療で使用する GM - C S F 阻害性化合物および IL - 17 阻害性化合物の場合における好ましい実施形態は、下記の通りである。

(a) 治療される対象は上記で定義されている；

(b) 該 GM - C S F 阻害性化合物は、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である；

(c) (b) に記載のポリペプチドは、GM - C S F または GM - C S F 受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは、該抗体は、モノクローナル抗体またはその機能的断片である。

(d) (c) で定義されている抗体またはその機能的断片は、ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である；

(e) 該抗体またはその機能的断片は、ヒトおよび非ヒト霊長類 GM - C S F のエピトープに結合する。該エピトープは、好ましくはヒトおよび非ヒト霊長類 GM - C S F の不連続エピトープであり、該エピトープは、好ましくはアミノ酸 23 ~ 27 (R R L L N) および / またはアミノ酸 65 ~ 77 (G L R / Q G S L T K L K G P L) を含む。

(f) 不連続エピトープは、アミノ酸 28 ~ 31 (L S R D)、アミノ酸 32 ~ 33 (T A)、および / またはアミノ酸 21 ~ 22 (E A) をさらに含む；

(g) (d)、(e) および (f) のいずれかに記載のヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、配列番号 1 ~ 13 または 56 に示されているアミノ酸配列のいずれかを含む C D R 3 をその重鎖可変領域に含む；

(h) 前記重鎖可変領域 C D R 3 配列のいずれかが、配列番号 14 に示されている重鎖可変領域 C D R 1 配列および配列番号 15 に示されている重鎖可変領域 C D R 2 配列と共に重鎖可変領域に存在する、実施形態 (g) ；

(i) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 17 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 18 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 3 をその軽鎖可変領域に含む、実施形態 (h) または (g) ；

(j) (i) に記載のヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、配列番号 19、54 および 55 のいずれかに示されているアミノ酸配列をその軽鎖可変領域にさらに含む；

(k) 実施形態 (h) または (g) に記載のヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、配列番号 20 ~ 33、52 または 53 のいずれかに示されているアミノ酸配列をその重鎖可変領域に含む；

(l) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 16 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 17 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2、および配列番号 18 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその軽鎖可変領域に含み、配列番号 14 に示されているアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、配列番号 15 に示されているアミノ酸配列を有する C D R 2 領域、および配列番号 1 ~ 13 または 56 のいずれかに示されているアミノ酸配列を有する C D R 3 をその重鎖可変領域に含む、実施形態 (g) ~ (k) のいずれか；

(m) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 34 に示されている軽鎖アミノ酸配列、および配列番号 35 ~ 48 のいずれかに示されている重鎖アミノ酸配列を含む、実施形態 (g) ~ (l) のいずれか；

(n) 該ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片が、配列番号 1 ~ 48 および / または 52 ~ 56 のいずれかに示されているそれぞれのアミノ酸配列と少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 (g) ~ (m) のいずれか。同一性は、ベクター N T I (I n f o r M a x (商標)、メリーランド州、アメリカ合衆国) などの標準的配列アラインメントプログラムにより決定される。そのようなプログラムでは、整列した配列をアミノ酸毎に比較し、比較について種々のレベルの厳密性を設定することができる (例えば、同一アミノ酸、保存的アミノ酸置換など)。この用語が本明細書中で使用される場合、問題の 2 つのアミノ酸は、各々が同じ化学的クラス、つまり酸性、無極

10

20

30

40

50

性、無荷電極性、および塩基性に属する場合、互いの「保存的置換」であるとみなされる。非限定的な例では、無極性アミノ酸のクラスに属する2つの異なるアミノ酸は、これらの2つのアミノ酸が同一でない場合でも、互いの「保存的置換」とみなされることになるが、一方が無極性アミノ酸であり、他方が塩基性アミノ酸である場合は、互いの「保存的置換」とはみなされないだろう。「Molecular Biology of the Cell」、第4版(2002年)、Alberts、Johnson、Lewis、Raff、Roberts、およびWalter著のパネル3.1では、アミノ酸が、4つの主な群：酸性、無極性、無荷電極性、および塩基性に分類されている。そのような分類は、特定のアミノ酸が、問題の別のアミノ酸の保存的置換であるかどうかを本発明のために決定する目的で使用することができる。

(o) 該IL-17阻害性化合物が、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸、または低分子である、実施形態(a)~(n)のいずれか；

10

(p) (o)に記載のポリペプチドは、IL-17またはIL-17受容体に結合する抗体またはその機能的断片であり、好ましくは、該抗体はモノクローナル抗体またはその機能的断片である；

(q) (p)に記載の抗体またはその機能的断片は、ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片である；

(r) 該炎症性疾患は、関節リウマチ(RA)(TNFアルファ中和剤による治療に抵抗性のRAを含む)、喘息、多発性硬化症(MS)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、特発性肺線維症(IPF)、炎症性腸疾患(IBD)、クローン病、ブドウ膜炎、黄斑変性症、大腸炎、乾癬、ウォーラー変性、抗リン脂質症候群(APS)、急性冠動脈症候群、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、再発性多発性軟骨炎(RP)、急性または慢性肝炎、整形外科インプラントの失敗、糸球体腎炎、狼瘡、または自己免疫障害であり；かつ/または該腫瘍性疾患は、白血病、多発性骨髄腫、胃癌または皮膚癌などの癌である。

20

【0021】

上記で言及したように、「IL-17」という用語は、本出願中で使用される場合、6つのメンバー、IL-17A~IL-17Fからなる、後天性免疫系のサイトカインのファミリーを指す。この用語の定義は、生理学上、例えばCD4⁺T細胞で発現されることが報告されているIL-17A/IL-17Fなどのヘテロ二量体も含む。本発明により中和されるIL-17ファミリーの特に好ましい群は、IL-17A、IL-17FおよびIL-17Dを含む。より好ましくは、IL-17AおよびIL-17Fの効果は、本発明により中和される。IL-17A、IL-17FおよびIL-17Dからなる群が好ましいため、IL-17受容体(IL-17R)の亜群のシグナル伝達、つまりIL-17RA、IL-17RBおよびIL-17RC、より好ましくはIL-17RAおよびIL-17RCのシグナル伝達を中和/阻害することも好ましい。

30

【0022】

「特異的に結合する」という用語、または「特異的結合」、「特異的に結合した」、「特異的結合剤」などの関連表現は、本明細書中で使用される場合、複数の異なる抗原のプールから潜在的な結合パートナーGM-CSF/IL-17だけに結合または著しく結合するような程度に、GM-CSF/IL-17と、GM-CSF/IL-17とは異なる任意の数の他の潜在的な抗原とを区別する、GM-CSF阻害性化合物/IL-17阻害性化合物、および好ましくはヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片(上記で定義したような)の能力を指す。本発明の意図としては、複数の等しく接近可能な異なる抗原のプール中から、GM-CSF/IL-17が、潜在的な結合パートナーとして、GM-CSF/IL-17とは異なる任意の他の抗原より少なくとも10倍、好ましくは50倍、最も好ましくは100倍以上の頻度で(動力学的意味で)結合している場合、GM-CSF/IL-17は、「著しく」結合している。そのような動力学的測定はBiacore装置で実施することができる。

40

【0023】

本明細書中で使用される場合、「中和」、「中和剤」、「中和している」、およびその

50

文法的関連変形は、GM-CSF/IL-17の生物学的効果（複数可）の部分的または完全な減衰を指す。GM-CSF/IL-17の生物学的効果（複数可）のそのような部分的または完全な減衰は、例えば細胞内シグナル伝達に見られるようなシグナル伝達、細胞増殖または可溶性物質の放出、細胞内遺伝子活性化の上方または下方制御、例えばGM-CSF以外のリガンドの表面受容体の発現に帰着する制御などの、GM-CSF/IL-17媒介性プロセスの修飾、中断および/または抑止から生じる。当業者であれば理解するように、ある薬剤、例えば問題の抗体またはその機能的断片が、中和剤として分類されるかどうかを決定するための様式は複数存在する。一例としては、これは、標準的 *in vitro* 試験を一般的に以下のように実施することにより達成することができる：第1の増殖実験では、その増殖の程度がGM-CSFの活性に依存することが知られている細胞株を、GM-CSFの濃度を変えて一連の試料中でインキュベートし、インキュベーション後、細胞株の増殖の程度を測定する。この測定から、細胞の最大半量増殖を可能にするGM-CSFの濃度が決定される。その後、第1の増殖実験で使用したのと同数の細胞、上記で決定したGM-CSF濃度、およびこの時点で、GM-CSFの中和剤であることが疑われる様々な濃度の抗体またはその機能的断片を一連の試料の各々で使用して、第2の増殖実験を実施する。細胞増殖を再び測定して、最大半量増殖阻害を実施するのに十分な抗体またはその機能的断片の濃度を決定する。得られる増殖阻害対抗体（またはその機能的断片）濃度のグラフはシグモイド形状であり、抗体（またはその機能的断片）濃度が増加すると共に細胞増殖が減少する結果となり、ひいてはある程度の抗体依存性増殖阻害が達成され、つまりGM-CSF活性はある程度中和された。そのような場合、抗体またはその機能的断片は、本発明が意図する「中和剤」と考えることができる。その増殖の程度がGM-CSF活性に依存することが知られている細胞株の一例は、Kitamura, T. et al. (1989). *J Cell Physiol* 140, 323-34に記載されているようなTF-1細胞株である。

【0024】

当業者であれば理解するように、細胞増殖の程度は、GM-CSFの中和能力を確立することができる唯一のパラメーターではない。例えば、その分泌レベルがGM-CSFに依存するシグナル伝達分子（例えば、サイトカイン）のレベル測定を使用して、疑わしいGM-CSF中和剤（GM-CSF阻害性化合物）を同定することができる。IL-17阻害性化合物の中和効果を検証するための対応する細胞実験の設定は、当業者に公知である。

【0025】

問題の抗体またはその機能的断片がGM-CSF活性の中和剤であるかどうかを決定するために使用することができる細胞株の他の例には、AML-193 (Lange, B. et al. (1987). *Blood* 70, 192-9) ; GF-D8 (Rambaldi, A. et al. (1993). *Blood* 81, 1376-83) ; GM/SO (Oez, S. et al. (1990). *Experimental Hematology* 18, 1108-11) ; MO7E (Avanzi, G. C. et al. (1990). *Journal of Cellular Physiology* 145, 458-64) ; TALL-103 (Valtieri, M. et al. (1987). *Journal of Immunology* 138, 4042-50) ; UT-7 (Komatsu, N. et al. (1991). *Cancer Research* 51, 341-8) が含まれる。問題の化合物、例えば抗体またはその機能的断片がIL-17活性の中和剤であるかどうかを決定するために使用することができる細胞株/細胞に基づくアッセイの例には、IL-17タンパク質のBEAS-2B *in vitro*アッセイ (BEAS-2B、ヒト気管支上皮細胞 (ATCC, CRL-9609) または線維芽細胞からの標準的IL-6放出アッセイ (Yao et al., 1995, *Journal of Immunology*, 155, 5483-5486) が含まれる。

【0026】

本発明に従って、それぞれGM-CSFおよびIL-17の阻害/中和を、これらのサイトカインに対する受容体を保有する細胞の外部または前記細胞の内部のいずれでも実施できることが理解される。したがって、化合物によるGM-CSFおよびIL-17の阻害/中和は、その特異的受容体に対するGM-CSFまたはIL-17結合の阻害もしくは

10

20

30

40

50

は防止、またはその受容体に対するサイトカイン結合により誘導される細胞内シグナルの阻害のいずれであってもよい。IL-17シグナルの細胞内作用性阻害剤/中和剤用の例には、JAK/STAT、MAPK p38、NF- κ BまたはJNKの阻害剤を含む、細胞内シグナル経路を阻止する化合物が含まれる。

【0027】

本明細書の上記で定義されているように、GM-CSFまたはIL-17の阻害剤は、ポリペプチド、ペプチド模倣物質、核酸分子、および低分子からなる群から選択することができる。「ポリペプチド」という用語は、本明細書中で使用される場合、30個を超えるアミノ酸からなる1群の分子を記述する。本発明によれば、上記1群のポリペプチドは、単一のポリペプチドまたは複数のポリペプチドからなる「タンパク質」を含む。「ポリペプチド」という用語は、これらの断片が30個を超えるアミノ酸からなる限り、タンパク質の断片も記述する。ポリペプチドが、二量体、三量体およびより高次のオリゴマーなどの多量体を形成していてもよい、つまり複数のポリペプチド分子からなっていることもよいことは、当技術分野で周知である。そのような多量体も「ポリペプチド」という用語の定義に含まれる。そのような二量体、三量体などを形成するポリペプチド分子は、同一であってもよくまたは異なっていることもよい。したがって、そのような多量体の対応する高次構造は、ホモ二量体またはヘテロ二量体、ホモ三量体またはヘテロ三量体などである。ヘテロ多量体の例は、抗体分子であり、それは、その天然に存在する形態では、2つの同一の軽ポリペプチド鎖および2つの同一の重ポリペプチド鎖からなる。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、天然または非天然修飾ポリペプチド/タンパク質も指し、上記修飾は、例えばグリコシル化、アセチル化およびリン酸化などのような翻訳後修飾によって実施される。そのような修飾は当技術分野で周知である。

【0028】

「低分子」という用語は、1000ダルトン未満、好ましくは300~700ダルトンの分子量を有する1群の薬物化合物を定義する。対応する低分子は、少なくとも部分的にランダム化されたペプチドライブラリーに由来する場合がある。本発明に従って好適な低分子のライブラリーは当技術分野で周知であり、かつ/または販売業者から購入することができる。

【0029】

「核酸」という用語は、本発明の場面では、リン酸、糖、ならびにプリンおよびピリミジン塩基の多重繰り返し単位からなる巨大分子を定義する。これらの分子の実施形態には、DNA、RNAおよびPNAが含まれる。核酸の特に好ましい実施形態は、本発明の場面ではアプタマーである。アプタマーとは、他の分子に結合するそれらの能力に基づいてランダムなプールから選択されたDNAまたはRNA分子である。核酸、タンパク質、低分子有機化合物に、また生物全体にも結合するアプタマーが選択されている。

【0030】

「ペプチド模倣物質(peptidomimetic)」という用語は、ペプチドを模倣するように設計された小型タンパク質様の鎖を記述する。このタイプの分子は、分子の特性を変更するために既存ペプチドを修飾することにより人為的に導出される。例えば、親の既存ペプチドを修飾して、分子の安定性または生物活性を変更する。これらの修飾は、骨格の変更および非天然アミノ酸の組み込みを含む。

【0031】

「GM-CSF受容体」という用語は、GM-CSFの生理学的な細胞表面受容体を指し、当技術分野では、CD116と共通ベータ(c)サブユニットとのヘテロマーとして記述されている。「IL-17受容体」という用語は、IL-17の様々なアイソフォームの生理学的な細胞表面受容体のファミリーを指す。このファミリーは、現在のところ、特にアイソフォームIL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RDおよびIL-17REを含む。

【0032】

中和ペプチドの好ましい実施形態は、抗体(またはその機能的断片)、より好ましくは

10

20

30

40

50

ヒト化抗体（またはその機能的断片）である。抗体を産生するための技術は、当技術分野で周知であり、例えばHarlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988およびHarlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999に記載されている。「抗体」という用語は、異なるクラス（つまり、I g A、I g G、I g M、I g DおよびI g E）およびサブクラス（I g G 1、I g G 2などのような）の免疫グロブリン（I g）を含む。抗体の誘導体は、本発明の意図する抗体という用語の定義の範囲内であり、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、ファルネシル化、ヒドロキシル化、メチル化またはエステル化のような、そのような分子の修飾を含む。

【0033】

非ヒトおよびヒト抗体またはその機能的断片（GM-CSFおよびIL-17の両方に対して特異性を有する）は、好ましくはモノクローナルである。モノクローナルであるヒト抗体を調製するのは特に難しい。マウスB細胞と不死化細胞株との融合体とは対照的に、ヒトB細胞と不死化細胞株との融合体は生存可能ではない。したがって、ヒトモノクローナル抗体は、抗体技術の分野に存在すると一般的に認識されている重大な技術的障害を克服した結果である。抗体のモノクローナル的性質は、そのような抗体がよく特徴付けられており再現性よく作製および精製することができる単一の均質な分子種として存在することになるため、その抗体を治療薬としての使用に特に好適なものにする。これらの要因は、その生物活性を高レベルの精度で予測することができる産物をその結果としてもたらし、そのような分子のヒトに対する治療的投与の規制認可を獲得しようとする場合に非常に重要である。

【0034】

モノクローナル抗体（または対応する機能的断片）は、ヒト抗体（または対応する機能的断片）であることが特に好ましい。ヒトに対する治療的投与を目的とした抗体剤（antibody agent）を企図する場合、抗体がヒト由来であることは非常に有利である。ヒト患者への投与後、ヒト抗体またはその機能的断片は、患者の免疫系による強力な免疫原性応答を誘発する可能性がほとんどなく、つまり非ヒトタンパク質である外来性物質とは認識されないだろう。これは、本来なら治療用抗体の活性を遮断し、かつ/または患者体内からの治療用抗体の除去を加速させ、それによって治療用抗体が所望の治療効果を発揮するのを妨げる、治療用抗体に対する宿主抗体、つまり患者抗体が産生されないことを意味する。

【0035】

「ヒト」抗体という用語は、本明細書中で使用される場合、いずれかの特異性を有する抗体またはその機能的断片が、ヒト生殖系抗体レパートリーに含有されているアミノ酸配列（1つまたは複数）を含むことを意味すると理解される。したがって、本明細書中で定義する場合、抗体またはその断片は、（a）それがヒト生殖系アミノ酸配列（複数可）からなる場合、つまり問題の抗体またはその機能的断片のアミノ酸配列（複数可）が、発現されたヒト生殖系アミノ酸配列（複数可）と同一である場合に、ヒトとみなすことができる。抗体またはその機能的断片は、その（それらの）最も近いヒト生殖系配列（複数可）からの逸脱（複数可）が、体細胞超変異の痕跡によりわずかに予測される可能性のある配列（1つまたは複数）からなる場合も、ヒトであるとみなすことができる。加えて、多数の非ヒト哺乳類、例えばマウスおよびラットなどのげっ歯動物の抗体は、発現されたヒト抗体レパートリーにも同様に存在することを予測することができるVH CDR3アミノ酸配列を含む。発現されたヒトレパートリーに存在することが予測できるヒトまたは非ヒト由来の任意のそのような配列（複数可）も、本発明の目的では「ヒト」とみなされるだろう。

【0036】

本発明の好ましい実施形態によれば、医薬目的に使用されるヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、ヒトと少なくとも1つのサル種との両者間で交差反応性を示す。同じ種間交差反応性は、GM-CSFおよび/またはIL-17の他の全ての（非抗体ま

10

20

30

40

50

たは非抗体由来の)中和/阻害性化合物の場合も好ましい。医薬品は、通常、規制認可前に多数の試験を通らなければならない、それらの試験のうちのある初期試験には非ヒト動物種が関与することになるため、そのような交差反応性抗体は非常に有用である。そのような試験を実施する際に、ヒトと高度な遺伝的類似性を有する種を非ヒト種として使用することは一般的に望ましい。なぜならそのようにして得られる結果は、一般的に、ヒトと同じ分子を投与する場合に予測できる対応する結果を高度に予測することになるからである。しかしながら、動物実験に基づくそのような予測能力は、分子の比較可能性に少なくとも部分的に依っており、同じ治療用分子をヒトおよび動物モデルに投与することができる場合、種間交差反応性のため、この能力は非常に高い。その実施形態のように、ある抗体分子が、ヒトと別の近縁種とで同一の抗原に対して交差反応性であれば、その同一抗体分子を使用して、ヒトおよびこの近縁種、例えば上記で言及したサル種で試験を実施することができる。これにより、試験自体の効率性、ならびに治療上の見地から最終的な目的種であるヒトにおけるそのような抗体の挙動に関するそのような試験により可能となる予測能力を両方とも増加させる。同じことが、抗体ではない(または抗体由来ではない)中和/阻害性化合物を用いる代替的な実施形態に当てはまる。

【0037】

本発明のさらなる実施形態によれば、ヒトモノクローナル抗体はI g G抗体であってもよい。I g Gは、高度に特異的な抗原認識および結合に関与する可変抗体領域だけでなく、通常は内因的に産生された抗体に存在し、ある場合には1つまたは複数の部位での糖による修飾までも存在する重および軽抗体ポリペプチド鎖の定常領域も含む。そのようなグリコシル化は、一般的にI g G形態の特徴であり、これら定常領域の部分は、*in vivo*で種々のエフェクター機能を誘発することが知られている完全抗体のいわゆるFc領域を形成する。加えて、Fc領域はFc受容体へのI g Gの結合を媒介し、したがって*in vivo*半減期を長期化し、ならびにFc受容体の存在が増加した部位、例えば炎症組織へのI g G誘導を容易にする。有利には、I g G抗体は、I g G1抗体またはI g G4抗体であり、それらの形態が好ましいのは、それらの作用機構が*in vivo*で特によく理解および特徴付けられているためである。これは、特にI g G1抗体の場合に当てはまる。

【0038】

本発明のさらなる実施形態によれば、ヒトモノクローナル抗体の機能的断片は、scFv、単ドメイン抗体、Fv、VHH抗体、ダイアボディ、タンデムダイアボディ、Fab、Fab'、またはF(ab)2であってもよい。これらの形態は、一般的に2つのサブクラス、すなわち単一のポリペプチド鎖からなるもの、および少なくとも2つのポリペプチド鎖を含むものに分類することができる。前者のサブクラスのメンバーには、scFv(ポリペプチドリンカーで結合されて単一のポリペプチド鎖となった1つのVH領域および1つのVL領域を含む);VHH抗体(単一のVH領域を含む)などの単ドメイン抗体(単一の抗体可変領域を含む)が含まれる。後者のサブクラスのメンバーには、Fv(1つのVH領域および1つのVL領域を、非共有結合で互いに結合している別々のポリペプチド鎖として含む);ダイアボディ(非共有結合で結合している2つのポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖の各々が2つの抗体可変領域、通常は1つのポリペプチド鎖当たり1つのVHおよび1つのVLを含み、二価抗体分子が生じるように2つのポリペプチド鎖が頭-尾の高次構造に配置されている);タンデムダイアボディ(共有結合で結合されており、上述のダイアボディの2倍大型のホモ二量体を形成し、2つの異なる特異性を有する4つの免疫グロブリン可変領域、VHおよびVL領域を含む二重特異的単鎖Fv抗体);Fab(それ自体がVL領域および軽鎖定常領域全体を含む抗体軽鎖全体を1つのポリペプチド鎖として含む、完全なVH領域および重鎖定常領域の一部を含む抗体重鎖の一部を別のポリペプチド鎖として含む、前記2つのポリペプチド鎖が、鎖間ジスルフィド結合により分子間で結合されている);Fab'(追加的な還元ジスルフィド結合が抗体重鎖に含まれていること以外は、上記Fabと同様);およびF(ab)2(2つのFab'分子を含み、各Fab'分子が鎖間ジスルフィド結合によりそれぞれ他方のFab'

10

20

30

40

50

分子に結合されている)が含まれる。一般的に、上記に記載されているタイプの機能的抗体断片は、例えば、直面する特定の事態に対する治療的投与に望まれる抗体の薬物動態特性に合わせて作製する際に大きな柔軟性をもたらす。例えば、血管新生が不良であることが知られている組織(例えば、関節)を治療する場合、組織透過性の程度を増加させるために、投与する抗体のサイズを低減することが望ましい場合がある。ある環境下では、治療用抗体が体内から除去される速度を増加させることが望ましい場合もあり、一般的に前記速度は、投与する抗体のサイズを減少させることにより加速することができる。抗体断片は、本発明の場面では、断片が親抗体のエピトープ/標的の特異的結合特性を維持している限り、つまり断片がGM-CSFまたはIL-17にそれぞれ特異的に結合する限り、機能的抗体断片と定義される。

10

【0039】

本発明のさらなる実施形態によれば、前記ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、一価性単一特異的形態;多価性単一特異的形態、特に二価性単一特異的形態;または多価性多重特異的形態、特に二価性二重特異的形態で存在してもよい。一般的に、上記に記載されているような完全ヒトIgGなどの多価性単一特異的抗体、特に二価性単一特異的抗体は、そのような抗体により行われる中和が、親和性効果(avidity effect)、つまり同じ抗原、本明細書中ではGM-CSF/IL-17の複数の分子に対する同一抗体による結合により強化されるという治療上の利点をもたらすことができる。いくつかの一価性単一特異的形態の抗体断片は、上記に記載されている(例えば、scFv、Fv、VHHまたは単一ドメイン抗体)。ヒトモノクローナル抗GM-CSF/IL-17抗体の多価性多重特異的形態、特に二価性二重特異的形態は、1つの結合アームが非ヒト霊長類GM-CSF/IL-17に結合し、その抗体の他方の結合アームがGM-CSF/IL-17とは異なる別の抗原に結合する完全IgGを含むことができる。さらなる多価性多重特異的形態、特に二価性二重特異的形態は、有利には、ヒト単鎖二重特異性抗体、つまり当技術分野で一般的に知られているように(例えば、抗CD19x抗CD3二重特異的単鎖抗体については、国際公開第99/54440号パンフレットを参照)、短い挿入ポリペプチドスペーサーによって結合されて1つの連続したポリペプチド鎖になっている上記に記載されているような2つのscFv実体を含む組換えヒト抗体構築体であってもよい。本明細書では、二重特異的単鎖抗体内に含まれる二重特異的単鎖抗体の1つのscFv部分は、上記に示されているようなGM-CSF/IL-17に特異的に結合し、この二重特異的単鎖抗体の他のscFv部分はそれぞれ、治療上有益であると判明している別の抗原に結合するだろう。好ましい代替形態では、二重特異的単鎖抗体は、上記に示されているようなGM-CSFに特異的に結合し、この二重特異的単鎖抗体の他のscFv部分はそれぞれ、IL-17に結合するだろう。

20

30

【0040】

さらなる実施形態によれば、阻害性ヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、例えば有機ポリマー、例えばポリエチレングリコール(「PEG」)および/またはポリビニルピロリドン(「PVP」)の1つまたは複数の分子で誘導体化されていてもよい。当技術分野で知られているように、そのような誘導体化は、抗体またはその機能的断片の薬学的特性の調節に有利であり得る。システインアミノ酸のスルフヒドリル基により部位特異的な様式で抗体またはその機能的断片と結合可能な、PEG-マレイミドとして誘導体化されたPEG分子が特に好ましい。これらのうち、分岐または直鎖状の20kDおよび/または40kDのPEG-マレイミドが特に好ましい。scFv断片などのより小型のヒト抗GM-CSF/IL-17抗体断片の有効分子量を、PEG、特にPEG-マレイミドの1つまたは複数の分子を後者に結合させることによって増加させることが特に有利であり得る。

40

【0041】

本明細書中で使用される場合、ヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSFの付番は、成熟GM-CSF、つまりその17個アミノ酸のシグナル配列を有していないGM-CSF(上記に記載されているヒトおよび非ヒト霊長類種の両方の成熟GM-CSFの全長は、12

50

7個のアミノ酸である)の付番を指す。ヒトGM-CSF(配列番号57)およびテナガザルGM-CSF(配列番号58)の配列は、以下の通りである：

【化1】

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EVISEMFDLQ
 EPTCLQTRLE LYKQGLRGS L TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI
 ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

例えば、アカゲザル(配列番号59)およびカニクイザル(配列番号60)などのマカク科サルの特定のメンバーのGM-CSFの配列は、以下の通りである：

【化2】

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNKTV EVVSEMFDLQ
 EPSCLOTRLE LYKQGLQGS L TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI
 ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

【0042】

上記に記載されているようなヒトモノクローナル抗体(またはその機能的断片)が結合する最小限のエピトープ、有利には不連続エピトープは、上記のGM-CSF配列中大字体で示されている。本明細書中で使用される場合、「不連続エピトープ」という用語は、所与のポリペプチド鎖、本明細書では成熟ヒトおよび非ヒト霊長類GM-CSF内にある、抗体と同時におよび特異的に結合する少なくとも2つの隣接していないアミノ酸配列伸長であると理解されるべきである。この定義によれば、そのような同時的および特異的結合は、線形のGM-CSFポリペプチドの結合であってもよい。本明細書では、上記の大字体で示されている2つの配列が、例えば、おおよそ平行して互いに接近して並んでいる伸長ループを形成している成熟GM-CSFポリペプチドが想定され得る。この状態で、それらは、特異的におよび同時に抗体断片と結合する。この定義によれば、上記に示されている成熟GM-CSFの2つの配列伸長の同時的特異的結合は、立体構造エピトープに結合する抗体の形態をとっている場合もある。本明細書では、成熟GM-CSFは、それが通常*in vivo*で存在するような、その三次立体構造を既に形成している。この三次立体構造では、成熟GM-CSFのポリペプチド鎖は、上記に示されている2つの配列伸長を、例えば成熟して折りたたまれたGM-CSFの特定領域の外側表面上で空間的に接近させるような様式で折りたたまれており、その後2つの配列伸長は、周囲のポリペプチド配列の状況下で、その三次元立体構造により認識される。

【0043】

好ましいヒトモノクローナル抗GM-CSF抗体またはその機能的断片は、以下を含むものである：配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配列番号1に示されている重鎖可変領域CDR3配列；または配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配列番号2に示されている重鎖可変領域CDR3配列；または配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配列番号3に示されている重鎖可変領域CDR3配列；または配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配列番号4に示されている重鎖可変領域CDR3配列；または配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配列番号5に示されている重鎖可変領域CDR3配列；または配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配列番号6に示されている重鎖可変領域CDR3配列；または配列番号14に示されている重鎖可変領域CDR1配列、配列番号15に示されている重鎖可変領域CDR2配列、および配

ているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 38 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 39 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 40 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 41 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 42 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 43 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 44 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 45 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 46 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 47 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含み；または配列番号 34 に示されているアミノ酸配列をその軽鎖に、配列番号 48 に示されているアミノ酸配列をその重鎖に含む。

10

【0050】

上記の好ましい実施形態は、非ヒト霊長類およびヒト GM - CSF の活性の中和剤として特に有利なヒトモノクローナル抗体分子および/またはその機能的断片を提供する。これら特に好ましい実施形態によるヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、いくつかの理由で非常に有利である。

20

【0051】

第1に、それらは、非ヒト霊長類およびヒト GM - CSF を高度に特異的に認識する。すなわち、これら特に好ましい実施形態による結合分子は、非ヒト霊長類 GM - CSF と他の非ヒト霊長類コロニー刺激因子（例えば、非ヒト霊長類 G - CSF および M - CSF ）との混合物から、非ヒト霊長類 GM - CSF を高度に識別する一方で、同じ環境中の他のコロニー刺激因子は認識されない。同じことは、必要な変更を加えるとヒト GM - CSF に当てはまる。これは、これら実施形態によるヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片は、ヒトに投与されると、所望の標的だけに特異的に結合しそれを中和するが、他の所望でない標的には結合も中和もしないと予想されることを意味する。最終的に、これは、*in vivo* での治療の作用様式に関する高度の予測性へとつながる。

30

【0052】

第2に、これら特に好ましい実施形態による結合剤は、非ヒト霊長類およびヒト GM - CSF と非常に高度な親和性で結合する。約 4×10^{-9} M から低くは約 0.04×10^{-9} M までの K_D 値が、このクラスの分子で観察され、後者の値は約 40 pM に相当した。水溶液中のそのような分子の動力学的結合速度は主として拡散制御されており、したがって局所的拡散条件が生理学的条件下で可能にする速度を超えて向上することはあり得ないため、この低い K_D は、最も高度な親和性抗体結合剤の場合およそ 10^{-5} s^{-1} である動力学的解離速度 k_{off} の結果として主に生じる。これは、一方ではこれら実施形態のいずれかによるヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片と、他方では GM - CSF との間の複合体がいったん形成されると、複合体は直ちには、少なくとも急速には分離しないことを意味する。生物活性の中和剤として意図されている結合分子の場合、所望の中和効果は、通常、その生物活性が中和される分子（本明細書では、非ヒト霊長類およびヒト GM - CSF ）が中和結合分子と結合したままである限り続くため、これらの特徴は非常に有利である。したがって、その意図した標的に長期間結合したままである中和分子は、それに応じて長期間中和し続けることになる。

40

【0053】

非ヒト霊長類およびヒト GM - CSF に対するヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片の高度な結合親和性は、さらなる利点を有する。通常、抗体またはその機能的断片は、サイズ依存的な様式で患者の血流から除去され、より小さな分子はより大きなものよ

50

り早く排泄および除去されるだろう。2つのポリペプチド、抗体または抗体断片および結合したGM-CSFの複合体は、抗体単独より明らかに大型であるため、上記で言及した低い k_{off} は、治療的中和剤が、GM-CSFと結合していなかった場合に排泄および除去されるよりよりゆっくりと患者の体内から排泄および除去されるという効果を有する。したがって、中和活性の強度だけでなくその期間も*in vivo*で増加される。

【0054】

上記の実施形態による結合剤について決定された中和活性は、驚くほど高い。本明細書の下記でより詳細に記載されるように、GM-CSF中和活性を、TF-1増殖阻害アッセイを使用して*in vitro*で測定した(Kitamura, T. et al. (1989). J Cell Physiol 140, 323-34)。中和能力の指標として、 IC_{50} 値を測定した。 IC_{50} は、TF-1細胞増殖の最大半量阻害を誘発するのに必要なこれら実施形態のいずれかによるヒトモノクローナル抗体またはその機能的断片の濃度を表す。上記で指定したヒトモノクローナル抗GM-CSF抗体またはその機能的断片の場合、およそ 3×10^{-10} M、つまり約0.3 nMの IC_{50} 値が決定された。したがって、該結合分子は、非ヒト霊長類およびヒトGM-CSFの活性の非常に強力な中和剤である。

10

【0055】

要約すると、したがって、ヒトモノクローナル抗GM-CSF抗体またはその機能的断片は、所望の抗原に対する高度の識別力を示し、この抗原と非常に強固に長期間結合し、それらが結合したままである長期間にわたって非常に強力な中和活性を示す。同時に、結合剤-抗原複合体の長期持続性は、体内からのこの結合剤の除去を遅延させ、それにより*in vivo*での所望の治療効果の持続期間を延長する。

20

【0056】

同様の考察が、中和/阻害性モノクローナル抗-IL-17抗体にも適用される。

【0057】

本発明によれば、「医薬組成物」という用語は、患者、好ましくはヒト患者に投与するための組成物に関する。好ましくは、医薬組成物は、担体、安定化剤および/または賦形剤の好適な製剤を含む。好ましい実施形態では、医薬組成物は、非経口、経皮、腔内、動脈内、髄腔内および/もしくは鼻腔内投与、または組織への直接注射による投与用の組成物を含む。前記組成物を点滴または注射により患者に投与することが特に想起される。好適な組成物の投与は、様々な方法により、例えば静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所的または皮内投与により達成することができる。本発明の組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。好適な薬学的担体の例は当技術分野で周知であり、それらには、リン酸緩衝生理食塩水、水、油/水乳濁剤などの乳濁剤、種々のタイプの湿潤剤、無菌液、リポソームなどが含まれる。そのような担体を含む組成物は、周知の従来法により製剤化することができる。これらの医薬組成物は、好適な用量で対象に投与することができる。投与計画は、主治医および臨床的要因により決定されるだろう。医学技術において周知であるように、任意のある患者用の用量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および投与経路、全体的健康、および同時に投与されている他の薬物を含む多数の要因に依存する。非経口投与用の調製物には、無菌の水溶液または非水性溶液、懸濁剤、および乳濁剤が含まれる。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルなどの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、生理食塩水および緩衝化媒質を含む水、アルコール溶液/水溶液、乳濁剤または懸濁剤が含まれる。非経口媒体には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル、または固定油が含まれる。静脈内媒体には、体液および栄養補給剤、ならびに電解質補給剤など(リンゲルデキストロースに基づくものなど)が含まれる。例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤も存在してよい。加えて、本発明による医薬組成物は、例えば、好ましくはヒト由来の血清アルブミンまたは免疫グロブリンのような、タンパク質性担体を含んでいてもよい、本発明による医薬組成物は、上記に記載されている化合物に加えて、医薬組成物の使用目的に

30

40

50

応じてさらなる生理活性剤を含んでいてもよいことが想起される。そのような薬剤は、胃腸系に作用する薬物、細胞増殖抑制薬として作用する薬物、高尿酸血症を予防する薬物、免疫反応を阻害する薬物（例えば、コルチコステロイド）、炎症応答を調節する薬物、循環系に作用する薬物、および/または当技術分野で公知のサイトカインなどの薬剤であってもよい。

【0058】

本明細書中で定義されている医薬組成物の生物活性は、以下の例、国際公開第99/54440号明細書に、またはSchlerethら（Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12）に記載されているように、例えば、細胞毒性アッセイにより決定することができる。「効能」または「in vivo効能」は、本明細書中で使用される場合、例えば、標準的なNCI応答基準を使用した、本発明の医薬組成物による治療に対する応答を指す。本発明による医薬組成物を使用する治療の成功またはin vivo効能は、その意図する目的での組成物の有効性、つまり組成物とその所望の効果、つまり病的細胞、例えば腫瘍細胞の枯渇を引き起こす能力を指す。in vivo効能は、これらに限定されないが、白血球計数、分化（differentials）、蛍光活性化細胞選別、骨髄穿刺を含む、それぞれの疾病について確立されている標準的方法によりモニターすることができる。加えて、種々の疾患特異的な臨床化学パラメーターおよび他の確立されている標準的方法を使用することができる。さらに、コンピューター断層撮影法、X線、核磁気共鳴断層撮影法（例えば、国立癌研究所の基準に基づく応答評価のため）、陽電子放射形断層撮影走査、白血球計数法、交差法、蛍光活性化細胞選別法、骨髄穿刺法、リンパ節生検/組織検査、および種々のリンパ腫特異的な臨床化学パラメーター（例えば、乳酸脱水素酵素）、ならびに他の確立されている標準的方法を使用することができる。

【0059】

本発明による医薬組成物など、薬物の開発における別の主要な課題は、薬物動態特性を予測可能に調節することである。この目的のため、薬物候補の薬物動態特性、つまり特定の薬物が所与の状態を治療する能力に影響を与える薬物動態パラメーターの特性を確立する。ある疾病を治療するための薬物の能力に影響を及ぼす薬物の薬物動態パラメーターには、これらに限定されないが、半減期、分布容積、肝臓初回通過代謝および血清結合度が含まれる。所与の薬剤の効能は、上記で言及したパラメーターの各々により影響を受ける場合がある。

【0060】

「半減期」とは、投与した薬物の50%が生物学的プロセス、例えば代謝、排泄などにより排泄される時間を意味する。

【0061】

「肝臓初回通過代謝」とは、肝臓と最初に接触する際に、つまり薬物が最初に肝臓を通過する間に薬物が代謝される傾向を意味する。

【0062】

「分布容積」とは、例えば、細胞内および細胞外空間、組織ならびに器官などのような体内の種々のコンパートメントの至る所で薬物が滞留する度合い、およびこれらのコンパートメント内の薬物の分布を意味する。

【0063】

「血清結合の度合い」とは、薬物がアルブミンなどの血清タンパク質と相互作用および結合して、薬物の生物活性の低減または喪失へつながる傾向を意味する。

【0064】

薬物動態パラメーターには、投与される所定量の薬物に関する、バイオアベイラビリティ、遅延時間（Tlag）、Tmax、吸収速度、より多くの発症、および/またはCmaxも含まれる。

【0065】

「バイオアベイラビリティ」とは、血液コンパートメントにおける薬物の量を意味する。

10

20

30

40

50

【0066】

「遅延時間」とは、薬物の投与と、血液または血漿中でのその検出および可測性との間の時間的遅れを意味する。

【0067】

「Tmax」とは、薬物の血中濃度が最大に到達した時間であり、「Cmax」とは、所与の薬物で最大限に得られる血中濃度である。その生物学的効果に必要な薬物の血中または組織内濃度に達するまでの時間は、全てのパラメーターにより影響を受ける。

【0068】

「毒性」という用語は、本明細書中で使用される場合、有害事象または重篤な有害事象を起こす薬物の毒性作用を指す。これらの副作用は、一般的に、薬物の耐容性の欠如および/または投与後の局所的耐性の欠如を指す場合がある。毒性には、薬物により引き起こされる催奇形作用または発癌作用が含まれる場合がある。

10

【0069】

「安全性」、「in vivo安全性」、または「耐容性」という用語は、本明細書中で使用される場合、投与後（局所的耐性）およびより長い薬物適用期間中に重篤な有害事象を直接的に誘導しない薬物の投与を定義する。「安全性」、「in vivo安全性」、または「耐容性」は、例えば、治療期間中および追跡期間中に定期的な間隔で評価することができる。測定には、臨床評価、例えば器官所見、および検査所見異常のスクリーニングが含まれる。臨床評価を実施して、正常所見からの逸脱を、NCI-CTCおよび/またはMedDRA基準に従って記録/コード化する。器官所見には、例えば有害事象共通用語基準v3.0 (CTCAE)などの示されているアレルギー/免疫学、血液/骨髄、心不整脈、凝血などの基準が含まれ得る。試験することができる検査パラメーターには、例えば、血液学、臨床化学、凝固特性、ならびに尿検査、ならびに血清、血漿、リンパ液または髄液などの他の体液の検査が含まれていてもよい。このように、安全性は、例えば、理学的検査、画像化技術（例えば、超音波、X線、CTスキャン、磁気共鳴画像法 (MRI)、技術的装置（例えば、心電図）を用いた他の測定、生命徴候により、検査パラメーターの測定および有害事象の記録により、評価することができる。「有効で無毒性の用量」という用語は、本明細書中で使用される場合、病的細胞の枯渇、腫瘍消失、腫瘍収縮、または疾患の安定化を引き起こすほど十分に高用量であるが、大きな毒性作用を示さないかまたは本質的に示さない、本明細書中で定義されている二重特異的単鎖抗体の耐性用量を指す。そのような有効で無毒性の用量は、例えば、当技術分野で記述されている用量漸増研究により決定することができ、重篤な有害副作用を誘発する用量未満（用量制限毒性、DLT）であるべきである。

20

30

【0070】

本出願は以下に示すいくつかの図面を含む。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】慢性SCW炎症における関節腫脹に対する、GM-CSFを中和するmAb 22E9 (A)、IL-1を中和するmAb 1400.24.17 (B)、およびTNFアンタゴニストエタネルセプト (C) による治療効果を表す図である。方法に記載されているように関節炎を誘導した。14、17、21、および24日目に、用量300 μgとして治療をi.p.で与えた。炎症は、膝への^{99m}Tc取り込みにより測定し、右（関節炎膝）/左（PBS対照膝）比として表した。1.10を超える比率を関節腫脹とみなす。マン-ホイットニーU検定 (* 0.05 > p > 0.01; ** 0.01 > p > 0.001); 1群当たりn = 7で群を比較した。

40

【図2】滑膜への炎症細胞の流入 (A)、および軟骨傷害 (B) に対する、GM-CSFを中和するmAb (22E9 mAb)、IL-1を中和するmAb (1400.24.17)、およびTNFアンタゴニストエタネルセプトによる治療効果を表す図である。方法に記載されているように疾患を誘導し治療した。マウスを28日目に安楽死させ、組織学的切片を調製し、視覚的にスコア化した。マン-ホイットニーU検定、n = 7によ

50

り、群を対照治療と比較した。

【図3】GM-CSFを中和するmAb(22E9)(A)、IL-1 mAb(1400.24.17)(B)、TNFアンタゴニストエタネルセプト(C)、および対照mAb(D)で治療した慢性SCW関節炎を有するマウスの代表的な膝のマイクロ写真を表す図である。初回SCW関節炎誘導後28日目に切片を作製し、サフラニンO/ファストグリーンで染色した。P=膝蓋骨; F=大腿骨; C=軟骨。(A)および(B)では軟骨が良好に保存されており、(C)および(D)では軟骨プロテオグリカン減少および侵食があることに留意されたい。元の拡大率は200×であった。

【図4】SCW関節炎の初回誘導後21日目に確立された膝蓋骨の1時間培養からの上清中のLuminesceビーズにより測定した局所的IL-1(A)およびKC(Gro等価物)(B)のレベルを表す図である。図1の説明文に記載されているように、治療を実施した。

【図5】対照抗体または抗GM-CSFで治療した野生型およびIL-17R欠損マウスの慢性SCW誘導性関節炎を表す図である。(A)野生型(WT)およびIL-17R/-マウスの関節腫脹。上記に示されているように、WTマウスにおける22、23、および28日目の対照治療および抗GM-CSF治療マウス間で関節腫脹に有意差が見出された。(B)28日目の関節炎および軟骨プロテオグリカン(PG)破壊。(C)対照抗体で処理したWTマウスの膝蓋骨および大腿骨の軟骨層における軟骨損傷(侵食および軟骨死)。(D)抗GM-CSF抗体で治療したIL-17R/-マウスにおける軟骨損傷の低減。(E)対照抗体で治療したWTマウスの膝蓋骨および大腿骨の軟骨層における軟骨PG減少。(F)抗GM-CSFで治療したIL-17R/-マウスにおける軟骨PG減少。詳細については図3を参照されたい。データは、1群当たり少なくとも6匹のマウスの平均±SDとして表されている。実験をもう一度繰り返し、同様の結果を得た。 $*P < 0.01$ 、対照抗体で治療したWT対照マウスとの比較、 $**P < 0.01$ 、抗GM-CSF抗体で治療したIL-17R/-マウスとの比較、マン-ホイットニーU検定。

【図6】治療開始後10日間追跡したコラーゲン誘導性関節炎を有するマウスの肉眼的スコアを表す図である。関節炎の初発症状の出現時に(図6の1日目に対応する)、(i)抗IL17モノクローナル抗体:mAb421 1.5mg/kg単独の単一単回投与、(ii)抗GM-CSFモノクローナル抗体22E9 3mg/kg単独、または(iii)mAb421 1.5mg/kgおよび22E9 3mg/kgの組合せにより、マウスをi.v.で治療した(やはり図6の1日目)。22E9の使用によるGM-CSF中和と組み合わせたmAb421によるIL-17の阻止は、コラーゲン誘導性関節炎の臨床スコアを有意に低減したが、mAb421または22E9単独による治療は、疾患重症度を有意には減少させなかった。マウスの関節炎症状は、デキサメタゾン(2mg/kg、陽性対照)の腹腔内投与の2~3日後に消失した。IgG2A抗体(アイソタイプ対照)を陰性対照として使用した。結果は、 $n = 9 \sim 10$ 匹マウス/群の平均+SEMである。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、IgG2Aアイソタイプ陰性対照処理マウスとの対比、一元配置ANOVAおよびダネット多重比較検定により決定した。

【図7】22E9 3mg/kg(A)、mAb421 1.5mg/kg(B)、22E9 3mg/kgおよびmAb421 1.5mg/kgの組合せ(C)、またはアイソタイプ対照(D)を単回投与した10日後の代表的な関節切片を表す図である。関節を4%ホルマリンで固定し、脱灰し、薄切し、ヘマトキシリン/エオシンで染色した。アイソタイプ対照ラットIgG2aを投与したマウス(図7D)は、滑膜にはなはだしい細胞浸潤を有する顕著な関節炎(*)、および軟骨侵食および硬骨侵食による関節破壊()を示す。22E9、3mg/kg(図7A)またはmAb421、1.5mg/kg(図7B)の用量を投与したわずかに重症度が低いマウスも、重症炎症および関節破壊を示すが、mAb421 1.5mg/kgと一緒の22E9 3mg/kgの併用治療の単回投与を受けたマウスは、非常に著しい炎症の低減(*) (図7C)、および図7Cの()で示されている正常な軟骨表面付近での関節完全性の良好な保存を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0072】

当業者であれば、以下の実験の詳細により本発明の要点を完全に理解できるだろう。

【0073】

動物

雄C57Bl/6マウスは、Charles River社（スルツフェルト、ドイツ）から取得した。IL-17R欠損マウスは、J. Peschon氏、アムジェン、シアトル、ワシントン州、アメリカ合衆国の好意により提供されたものである。マウスをフィルタートップケージに収容し、水および餌は自由に与えた。マウスは、10～12週齢で使用した。動物の取扱いは全て、施設倫理委員会により承認されていた。

10

【0074】

SCWの調製およびSCW関節炎の誘導

化膿連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）T12生物を、トッド-ヒューウィットブロスで終夜培養した。van den Broek et al., Am J Pathol 133(1), 139-149 (1988)に記載されているように、細胞壁を調製した。得られた10,000×g上清を、実験全体で使用した。調製物には、11%ムラミン酸が含有されていた。6μlリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中25μgのSCW（ラムノース内容物）を、Joosten et al., Ann Rheum Dis 59(3), 196-205 (2000)に記載されているように、未処理マウスの右膝関節に関節内（i.a.）注射することにより、片側関節炎を誘導した。連鎖球菌細胞壁（SCW）誘導性慢性関節炎を引き起こすために、右膝関節へのi.a.注射を、0、7、14、および21日目に実施した。これらの反復注射により、慢性関節炎が生じる。対照として、PBSを左膝関節に注射した。

20

【0075】

試薬および治療プロトコール

GM-CSFを、ラットmAb 22E9（MM500CS、Perbio Science社製、ボン、ドイツ）を使用して中和した。エタネルセプト（Enbrel（登録商標）；Wyeth Pharma社製、ミュンスター、ドイツ）を、TNF遮断に使用した。いくつかの研究により、CIAを含む様々なマウスモデルにおいて、このヒト可溶性TNF受容体Fc融合タンパク質の有効性が報告されている。ラットIgG2aアイソタイプ対照（BLD-400516-バルク、Biozol Diagnostica社製、エヒング、ドイツ）およびHumira（登録商標）（アボット社製、ウィースバーデン-デンケンハイム、ドイツ）をアイソタイプ対照として使用した。IL-1を、ラット抗マウスIL-1 mAb 1400.24.17（MM425、Perbio Science社製、ボン、ドイツ）で中和した。治療は全て300μgの用量で腹腔内投与し、4回：i）3回目の再活性化（14日目）の2時間前、ii）17日目、iii）4回目の再活性化の2時間前（21日目）、およびiv）最初の疾患誘導後の24日目に投与した。

30

【0076】

関節腫脹の測定

SCW関節炎期間中の関節腫脹を、Kruijsen et al., Agents Actions 11(6-7), 640-2 (1981)に記載されている^{99m}Tc取り込み法により定量化した。この有効な方法では、局所的な血流増加および組織腫脹による、炎症部位における放射性同位体の蓄積を外部ガンマ線放射計数で測定する。腫脹の重症度を、左（対照）膝関節に対する右（炎症）の^{99m}Tc取り込み比として表す。1.10を超える値を全て、関節腫脹とみなした。

40

【0077】

サイトカインおよびケモカイン測定

IL-1、IL-6、TNF、RANTES、KC、およびMIP-1を含むいくつかのサイトカインおよびケモカインのレベルを、膝蓋骨洗い出しで決定した。膝蓋骨を周囲の滑液膜組織と共に炎症膝関節から単離し、0.1%BSAを含有するRPMI 1640培地で（200μl/膝蓋骨）Joosten et al., J Immunol 165(11), 6553-8 (2

50

000)に以前に記載されているように室温で1時間培養した。その後、上清を回収し、1000 × gで5分間遠心分離した。サイトカインおよびケモカインのレベルを、Luminox多重検体技術を使用して決定した。本発明者らは、BioRad社製(ミュンヘン、ドイツ)のBioPlexシステムを、多重サイトカインおよびケモカインキットと組み合わせて使用した。

【0078】

組織学的分析

マウスを28日目に頸椎脱臼で屠殺した。膝関節全体を摘出し、4%ホルムアルデヒドで7日間固定し、その後5%ギ酸で脱灰し、パラフィン包埋用に処理した。組織切片(7 μm)を、ヘマトキシリン/エオシン(H/E)またはサフラニンO/ファストグリーン(SO)で染色した。膝関節の組織病理学的変化を、140 μm間隔の5つの半連続切片上の膝蓋骨/大腿骨領域でスコア化した。スコア化は、2人の異なる観察者により以下のパラメーターを使用してコード化スライドで行われた。H/Eで染色したスライドでは、滑膜表層に浸潤した細胞の量を0~3でスコア化した。SO染色スライドでは、軟骨損傷を0~3のスケールでスコア化した。

10

【0079】

統計分析

実験群間の差異を、マン-ホイットニーU検定を使用し、GraphPad Prism 4ソフトウェアを使用して検定した。有意性のリードアウトを以下のようにグループ化した： $* = 0.05 > p > 0.01$ ； $** 0.01 > p > 0.001$ ；および $*** = p < 0.001$ 。

20

【0080】

以下の実施例により、同様にして、当業者は本発明の要点を完全に理解できるだろう。

【実施例1】

【0081】

全身性GM-CSF中和は、慢性SCWモデルの関節腫脹を減少させる

C57Bl/6マウスのSCW関節炎の慢性期中に、GM-CSF(mAb 22E9)、TNF(エタネルセプト)、またはIL-1(mAb 1400.24.17)を中和する生物製剤による治療後の関節腫脹に対する効果を、膝関節への^{99m}Tc取り込みの差異により、15、16、22、23、および28日目で調査した。結果を、SCW注射関節炎膝とPBS注射対照膝との間の^{99m}Tc取り込み比として表した。

30

【0082】

GM-CSF中和抗体の全身性投与は、16、22、23および28日目に関節腫脹を強力および有意に減少させ、p値は、それぞれ0.018、0.004、0.004および0.002であった(図1A)。IL-1中和も関節腫脹を減少させたが、対照膝に対する膝の^{99m}Tc取り込みの有意な減少は、22日目(p=0.011)および23日目(p=0.001)にしか見られなかった(図1B)。予想通り、ヒトならびにマウスTNFを中和することができるエタネルセプトによるTNF遮断は、慢性SCWモデルの関節腫脹に対する効果を示さなかった(図1C)。対照的に、エタネルセプトは、この疾患モデルの急性期に活性のあることが以前に示されている。したがって、慢性SCW関節炎期間中のGM-CSFの中和は、IL-1の中和より強力であると考えられ、その効果は、28日目(つまり、抗体の最終投与の4日後)まで持続した。第2の独立した研究により、慢性SCWモデルにおける関節腫脹の減少に対するGM-CSF中和の効能が確認された。

40

【実施例2】

【0083】

GM-CSF中和は、炎症細胞の滑膜への流入および軟骨損傷を低減する

異なる群のマウスの関節に由来する組織病理学的切片を、28日目の実験終了後に調製した。滑膜への炎症細胞流入の範囲および軟骨損傷の評価を、盲検H/EおよびSO染色組織切片で、2人の研究者により独立してスコア化した。

50

【 0 0 8 4 】

3つの治療全て、mAb 22E9によるGM-CSF中和、mAb 1400.24.17によるIL-1中和、およびエタネルセプトによるTNF遮断は、滑膜への炎症細胞流入を有意に低減するという点で有効であった(図2A)。TNF遮断は、有意に効果的であったが、GM-CSFまたはIL-1中和ほど強力でないと考えられた。対照と比べたp値は、それぞれ0.042、0.004、および0.001であった。さらに、エタネルセプト治療マウスの膝関節の炎症細胞流入が低減したにもかかわらず、軟骨完全性は保存されなかった(図2B)。対照的に、GM-CSF中和により、軟骨損傷が有意に保護された(p=0.02; mAb 22E9対アイソタイプ対照mAb)(図2B)。以前に報告されているように、IL-1中和は、軟骨の損傷を保護するという点で非常に強力であった(p=0.004、抗IL-1対対照; 図2B)。

10

【 0 0 8 5 】

軟骨完全性に対する種々の治療の影響は、3つの治療群の各々の1匹の代表的なマウスに由来する膝関節のサフラニンO/ファストグリーン染色のマイクロ写真を示す図3に例示されている。mAb 22E9で治療したマウスで観察された強い軟骨染色および良好な組織保存(図3A)は、軟骨完全性の保護に対するGM-CSF中和の効果強調する。対照的に、アイソタイプ対照抗体を投与したマウスに由来する軟骨(図3D)は、プロテオグリカン、関節軟骨の主成分の1つが減少したことを実証する破壊的な侵食および染色強度の減少を示す。同様に、プロテオグリカンの減少および軟骨損傷の増加は、エタネルセプト治療マウスで見られる(図3C)。これは、TNFの独立性を示す関節炎の慢性SCWモデルでの初期研究と一致している。IL-1は、関節炎の実験モデルにおいて軟骨に顕著な破壊的效果を示すことが知られている。したがって、抗体によるIL-1の中和は、本発明者らの本研究において、軟骨に対する顕著な保護効果を示す(図3B)。

20

【 実施例 3 】

【 0 0 8 6 】

GM-CSF中和は、膝関節でのIL-1およびKCの産生を低減する

GM-CSFの保護効果およびIL-1とのその関係性をより良好に理解するために、本発明者らは、膝蓋骨洗い出しでの様々なサイトカインおよびケモカインの濃度を調査した。非罹患対照膝(左)でのレベルは以前の実験で検出限界未満であることが繰り返して見出されたため、関節炎(右)膝だけを分析した。

30

【 0 0 8 7 】

mAb 22E9によるGM-CSF中和の結果、アイソタイプ対照抗体治療を受けたマウスの関節で検出されたレベルと比較して、局所IL-1が有意に低減した(p=0.042; 22E9治療対対照)(図4)。エタネルセプトによるTNF遮断は、関節中のIL-1レベルに影響を与えなかったが(図4)、予想通り、IL-1中和mAbを投与したマウスでは、IL-1レベルは基線に近かった。ケモカインKC(マウス、GRO-)のレベルは、3つの治療全てにより関節炎膝関節中で有意に低減した(22E9対対照の場合、p=0.0047; エタネルセプト対対照の場合、p=0.0007; 抗IL-1対対照の場合、p=0.007)。IL-6およびRANTESの局所的レベルは、調査した治療のいずれによっても影響を受けなかった(データ非表示)。IL-2、TNFおよびGM-CSFのレベルは、アッセイの検出限界未満、例えば10pg/ml未満であった。

40

【 実施例 4 】

【 0 0 8 8 】

IL-17シグナル伝達の非存在下でのGM-CSF中和は、軟骨破壊に対する保護効果を増強する

GM-CSF中和は、関節腫脹を低下させ軟骨を損傷から保護し、効能はIL-1中和で観察された効能と類似していた。その後、慢性SCW関節炎に抗GM-CSF mAbを用いた同様の研究を、IL-17Rを欠損しているマウスで実施した。IL-17R

50

欠損により、慢性SCW関節炎期間中の関節腫脹および軟骨破壊の抑制が生じる(図5A)。この関節炎モデルでのGM-CSFおよびIL-17シグナル伝達の両方の併用標的化により、関節腫脹の強力な増強された抑制が生じた(図5A)。抗GM-CSF治療ならびにIL-17R欠損の両方により、細胞流入が低減したが、併用標的化では、関節炎は有意に低下しなかった(図5B)。しかしながら、興味深いことには、プロテオグリカン枯渇および軟骨損傷(軟骨細胞死および侵食)は、抗GM-CSFで治療したIL-17R欠損マウスで有意に低減された(図5B~E)。これらの結果は、T細胞サイトカインIL-17をさらに標的化することで、抗GM-CSFの軟骨に対する保護効果をさらに増強することができることを実証する。

【実施例5】

【0089】

ヒトの慢性RA後期段階において典型的なように、慢性再発性SCW関節炎マウスモデルは、重症の関節破壊を特徴とする。CIAマウスモデルおよび急性SCW関節炎モデルで観察されるものとは対照的に、TNF中和は、IL-1が主な病原性役割を果たすと考えられる慢性SCW関節炎の制御にはもはや有効ではない(72)。慢性SCW関節炎での軟骨破壊におけるIL-1のTNF依存性の重要な役割は、本発明者らの研究で確認されている。

【0090】

GM-CSF遮断をこの特定モデルで最初に研究し、300 μ gの用量の抗体を疾患慢性期に腹腔内投与すると、SCWを注射した膝の関節腫脹および軟骨破壊に対する顕著な阻害効果を示すことを見出した。これは、ヒトでの約1mg/kgの抗体用量(非比例的補正後)と等しい用量の抗GM-CSF抗体が、マウスでは、関節炎膝関節中のGM-CSFレベルを補正するのに十分であることを実証する。慢性関節炎モデルでのGM-CSF中和の治療効能は顕著であった。関節腫脹は、抗IL-1治療よりも抗GM-CSFにより良好に制御されたが、TNF遮断は効果がなかった。異常なTNF産生は、その中和が炎症細胞の流入およびKCケモカインレベルに対して効果を示したため、依然として慢性SCW関節炎においていくつかの役割を果たしている可能性がある。しかしながら、この慢性疾患の駆動におけるTNFの役割は、疾患の急性期とは対照的に、他の関節炎マウスモデルとは対照的に減少した。軟骨保護に関して、抗GM-CSFおよび抗IL-1治療の両方は非常に有効であった。GM-CSF作用とIL-1作用との相互依存性は、関節炎の別のモデルで以前に報告されている。mBSA注射後のIL-1誘導性関節炎のこのモデルでは、GM-CSFは、圧倒的な病原性役割を果たす。GM-CSF KOマウスにおけるようなGM-CSFの非存在、またはWT動物におけるGM-CSF中和は、関節炎を顕著に低減した。しかしながら、その中和が、関節炎関節のIL-1レベルを低減させたため、慢性SCW関節炎期間中、GM-CSFはIL-1の上流で作用すると考えられる。活性化マクロファージおよび他のGM-CSFに刺激された免疫細胞によるIL-1産生のこのような低減は、抗GM-CSF治療が本発明者らのモデルの軟骨に対して保護効果を示した理由も説明することができる。急性SCWモデルにおいて、本発明者らは、抗GM-CSF抗体はIL-1レベルを低減することができるが、TNF遮断薬エタネルセプトはIL-1レベルを低減することができないことも見出した。RAのCIAマウスモデルでは、GM-CSF遮断が、IL-1およびTNFのレベルを両方とも、非常に著しい様式で低減した。

【0091】

GM-CSF発現は、転写因子NF- κ Bなどの活性化を介して、TNFおよびIL-1などの炎症性サイトカインにより、種々の免疫細胞で急性誘導されるが、サイトカインの階層性は、炎症の後期段階で逆転し、GM-CSFがTNFおよびIL-1、恐らくは他のサイトカインおよびケモカインの産生を引き継ぐ。関節炎組織でTNFおよびIL-1を阻害すると同時に、GM-CSF遮断は、顆粒球、好中球、マクロファージなどのGM-CSF依存性免疫細胞の活性および生存を低減させる能力も有する。GM-CSFがIL-1およびTNFの発現を直接的に誘導するだけでなく、

10

20

30

40

50

協調的抗アポトーシス作用および先天性免疫系の複数細胞の持続的活性化を引き起こし、それによりIL-1 およびTNF の産生を間接的に増強することも考えられる。細胞周期および生存に対するそのような効果は、*in vivo*でのGM-CSF中和により、関節炎関節の全体的な細胞充実性ならびに細胞周期中にある細胞数の顕著な低減が生じるmBSA関節炎モデルで実証された。

【実施例6】

【0092】

WT動物において慢性SCW関節炎期間中にGM-CSFを阻止することに加えて、IL-17R欠損マウスでの実験も実施した。IL-17は、Th17細胞により産生され、この細胞はTNF およびGM-CSFを同時に産生することができる。TNF の存在下で、IL-17は、滑膜細胞を刺激してGM-CSFの産生を開始させ、GM-CSFの上流でIL-17が役割を果たしていることを示唆する。他方では、LPSにより刺激されたGM-CSF処理骨髄細胞は、IL-17産生Th17細胞の重要な生存因子であるIL-23を産生する。本発明の以前は、IL-17およびGM-CSFの併用阻止は、*in vitro*または*in vivo*で研究されていなかった。本発明者らの本研究は、GM-CSFおよびIL-17経路両方の同時遮断の結果、単一経路の遮断と比べて優位に関節腫脹が抑制され、軟骨破壊に対する保護が高まったことを初めて示した。これら2つのサイトカインが、RA患者の滑膜によるサイトカイン産生と、骨関節炎軟骨でのPGE₂およびNO産生とに対する相乗効果を有することが以前に示されているため、軟骨に対するこの強力な効果は、IL-17と(GM-CSF誘導性)IL-1との間の相乗効果により説明することができる。本研究および従来の研究は、GM-CSFの中和が、ヒトRA患者、TNF 遮断にもはや応答しない、または最初から応答しない患者にも治療能力を有する可能性があるということ強く表している。加えて、本研究は、抗IL-17治療と組み合わせた抗GM-CSFが、RAならびに他の自己免疫性および炎症性疾患の状況において、顕著な治療効果を示すことを実証する。

【実施例7】

【0093】

コラーゲン誘導性関節炎(CIA)は、軟骨コラーゲンII型(CII)に対するT細胞および抗体媒介性の自己免疫応答性に基づく広く受け入れられている関節炎マウスモデルである。このモデルは、いくつかの臨床的、組織病理学的、および免疫学的な特徴をヒトRAと共有しており、滑膜炎ならびにその後の重篤な軟骨および硬骨侵食を主な特徴とする。本明細書に記載されている本研究の目的は、CIAマウスモデル系におけるGM-CSF中和化合物およびIL-17中和化合物の併用投与の治療効果の評価であった。特に、(i)抗IL-17モノクローナル抗体(mAb 421)単独、(ii)抗GM-CSFモノクローナル抗体(mAb 22E9)単独、および(iii)両抗体の組合せによるマウスの治療効果を、CIAの発症後に陰性対照(IgG2A)および陽性対照(デキサメタゾン)と比較して研究した。抗IL-17抗体mAb421は、R&D Systems社から取得し、mAb 22E9はPerbio Science社から取得した。ラットIgG2aアイソタイプ対照抗体は、Biolegend社から取得した。抗体は全て-80 で保管した。デキサメタゾンは、Centrafarm社から取得し、室温で保管した。化合物は全て投与用無菌PBSで希釈した。

【0094】

上記で示されている化合物によるCIAマウスの治療効果を、7週間の研究計画で研究した。0日目に、雄DBA/1Jマウスを、イソフルラン麻酔下で100 μgのウシCIIを用いて尾基部で免疫した。21日目に、マウスは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解された100 μg CIIの腹腔内追加免疫注射を受け、関節炎の発症は、この追加免疫注射の数日後に生じた。0.05 M酢酸中2 mg/mlの濃度のウシII型コラーゲン(CII)を、等容積のフロイント完全アジュバント(2 mg/mlの結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)菌株H37Ra)で乳化した。関節炎の初発症状(スコアは0.25以上)時に、マウスを、下記に列挙されている様々な実験群に順次割当て、さらに1

10

20

30

40

50

0日の研究期間中観察した。

【0095】

マウスは、指または足の他の部分に発赤および/または腫脹の著しい変化が認められた際に、関節炎を有するとみなした。各足の関節炎を、R. Smeets et al, Arthritis Rheum 2003に記載されているように、1本の足当たり0~2のスコアで1匹の動物当たり最大8のスコア(関節炎症状を有する4本の足、各足2までのスケール)を使用して視覚的にスコア化した: 0 = 炎症なし、1 = 軽度の炎症、1.5 = 顕著な炎症、および2 = 重篤な炎症。スコア化は、実験群に関する知識のない独立した観察者により21日目から45日目まで1週当たり3回実施した。

【0096】

抗体を、関節炎症状の発症時に単回単一用量で投与した。2 mg / kgの用量のデキサメタゾンを、腹腔内で1週当たり3回(月曜日、水曜日、および金曜日)投与した。研究の35日目までにいかなる関節炎症状も示していなかったマウスを、不応答動物とみなし、さらなる研究分析から除外した。

【0097】

以前の実験結果に基づいて、本研究用の用量を、1.5 mg / kg mAb 421に設定した。抗GM-CSF抗体22E9の場合、用量は3 mg / kgに設定した。これらの用量を使用して本研究を実施し、コラーゲン誘導性関節炎期間中のIL-17およびGM-CSFの併用阻止の効果を評価した。デキサメタゾンを陽性対照として使用し、ラットIgG2a抗体を陰性対照として使用した。加えて、本研究は、全てが表示されている用量の抗IL-17(mAb 421)、抗GM-CSF(22E9)、およびそれらの組合せによる治療用の実験群を含んでいた。

【0098】

実験群

mAb 421 1.5 mg / kg + ラットIgG2a 3 mg / kg (合計4.5 mg / kg)

22E9 3 mg / kg + ラットIgG2a 1.5 mg / kg

mAb 421 1.5 mg / kg + 22E9 3 mg / kg

ラットIgG2a 15 mg / kg

デキサメタゾン 2 mg / kg

【0099】

図6に示されているように、22E9の使用によるGM-CSFの中和と組み合わせたmAb 421によるIL-17の中和は、コラーゲン誘導性関節炎の臨床スコアを有意に低減した。対照的に、mAb 421または22E9単独による治療は、疾患重症度を有意には減少させなかった。関節炎症状は、デキサメタゾン(2 mg / kg、陽性対照)の腹腔内投与の2~3日後に消失した。IgG2A抗体で治療したマウス(陰性対照)は、関節炎重症度の明らかな進行を示した。

【0100】

組織病理学的分析では、正面および後足(左および右; 4つの試料/マウス)が摘出された。4%ホルムアルデヒド溶液で足を固定した。EDTAまたは標準的脱灰溶液中で3日間脱灰した後、足をパラフィン(paraplast(登録商標))に包埋し、H&Eで染色し、光学顕微鏡で評価した。組織学的評価は、足の遠位関節(足根/手根および指)に限定されていた。

【0101】

組織学的評価により、肢(手根/足根、指)のより低部の関節の慢性関節炎に亜急性が明らかになった。関節炎は、滑膜の肥厚化(滑膜過形成)、関節内滲出液、および主に関節嚢での顕著な混合細胞浸潤により特徴付けられた。顕著な場合は、結合組織および腱でも炎症細胞反応が見られた。加えて、より慢性の場合、線維組織および主に単核細胞からなる典型的な肉芽組織が観察された。遠位関節の軟骨の浸食変化も見られた。ほとんどの場合、複数の関節が罹患した(多発関節炎)。図7は、22E9 3 mg / kg (A)、

10

20

30

40

50

mAb 421 1.5 mg/kg (B)、22E9 3 mg/kg および mAb 421 1.5 mg/kg の組合せ (C)、またはアイトタイプ対照 15 mg/kg (D) を単回投与した 10 日後の代表的な関節切片を示す。関節を 4%ホルマリンで固定し、脱灰し、薄切し、ヘマトキシリン/エオシンで染色した。アイトタイプ対照を投与したマウス (図 7D) は、滑膜にはなはだしい細胞浸潤を有する顕著な関節炎、および軟骨侵食および硬骨侵食による関節破壊を示した。22E9、3 mg/kg (図 7A) または mAb 421、1.5 mg/kg (図 7B) を投与したわずかに重症度が低いマウスも、重症炎症および関節破壊を示したが、mAb 421 1.5 mg/kg と一緒に 22E9 3 mg/kg の併用治療の単回投与を受けたマウスは、非常に著しい炎症の低減、および正常な軟骨表面付近での関節完全性の良好な保存を示した (図 7C)。その結果、関節炎を有するほとんどの症例が、陰性対照群 (ラット IgG2A) で見られた。デキサメタゾン (陽性対照) を投与した 2~3 日後では関節炎を検出することができなかった。mAb 421 もしくは mAb 22E9 単独でまたは組合せで治療した CIA マウスを陰性対照と比較すると、関節炎の発症および重症度に関する最も良好な結果は、mAb 22E9 と組み合わせた mAb 421 により治療した群で見られた。

【0102】

結論

本発明者らは、2つの異なる関節炎モデル系、つまり (i) TNF 非依存性の慢性 SCW 関節炎モデル、および (ii) TNF 依存性 CIA モデルにおける GM-CSF 中和の治療的効能を探究した。加えて、本発明者らは、GM-CSF および IL-17 経路を阻害することにより、先天性免疫および適応免疫を両方とも阻止する効果を研究した。これは、IL-17 受容体の遺伝子欠損マウス (IL-17R-KO マウス) において GM-CSF を中和することにより、または GM-CSF および IL-17 を中和するモノクローナル抗体による併用治療により実施された。本発明者らは、驚くべきことに、GM-CSF および IL-17 経路の併用遮断により、非常に効率的な様式で両タイプの炎症性疾患を治療することができることを観察した。CIA モデルでは、GM-CSF 阻害性化合物および IL-17 阻害性化合物の併用投与は、コラーゲン誘導性関節炎の臨床スコアを有意に低減させたが、GM-CSF 阻害性化合物または IL-17 阻害性化合物単独による治療は、関節炎の重症度を有意には減少させなかった。加えて、詳細な組織学的分析から、軟骨および硬骨の関節炎および関節破壊に対する併用療法の相乗効果が実証された。このように、両経路の併用遮断は、その結果として炎症および関節破壊からの非常に効率的な保護をもたらした。これらの結果は、ごく最近まで、GM-CSF が IL-17 の下流にあると仮定されていたため、特に驚くべきことである (例えば、Kawaguchi M. et al., J. Allergy Clin. Immunol. 114 (2004), 444-450; Starnes T. et al., The Journal of Immunology 169 (2002), 642-646; Laan M. et al., Eur. Respir. J. 21 (2003), 387-393 を参照)。したがって、相加効果または相乗効果を、これら 2つの経路の遮断を併用する治療から予測することはできなかった。本出願は、IL-17 および GM-CSF の併用阻止の有利な効果を *in vivo* で初めて実証するものである。IL-17 および GM-CSF 経路両方の同時遮断の結果、単一経路の遮断と比べて優位に関節腫脹が抑制され、軟骨破壊に対する保護が高まった。本明細書で示されているデータは、抗 IL-17 治療と組み合わせた抗 GM-CSF が、RA だけでなく、本明細書の上記で定義されているような他の自己免疫疾患および炎症性疾患の状況でも顕著な治療効果を示すことを強く表している。

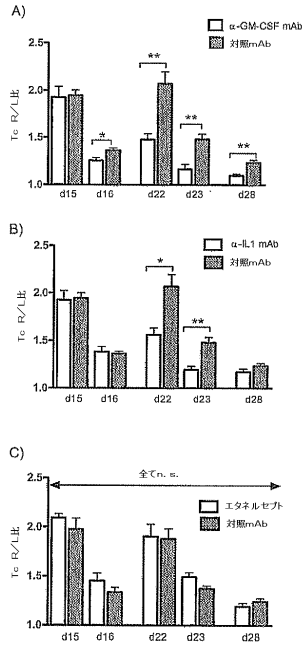
10

20

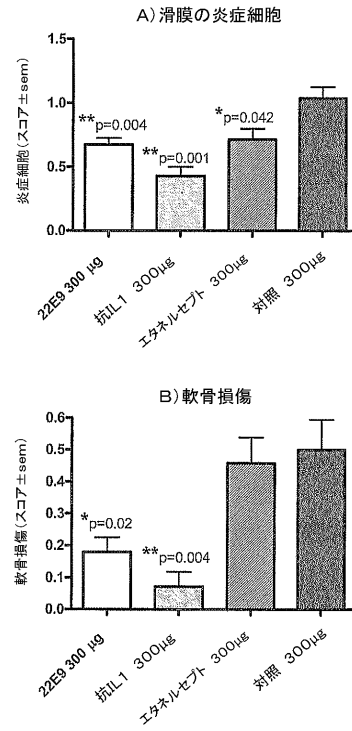
30

40

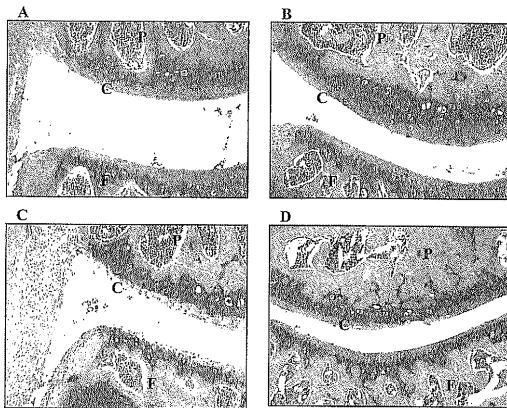
【 図 1 】



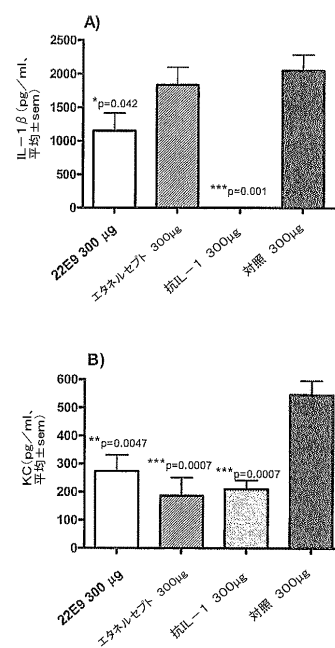
【 図 2 】



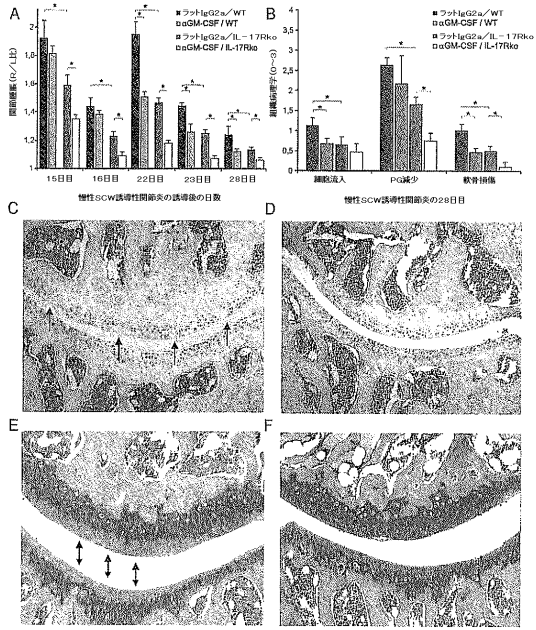
【 図 3 】



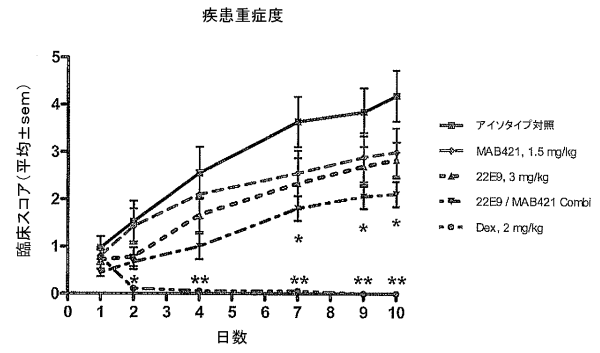
【 図 4 】



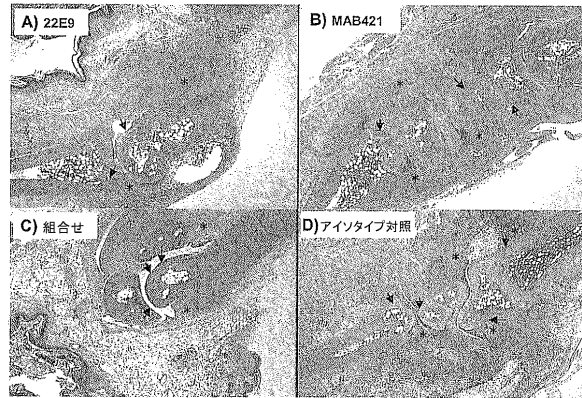
【図5】



【図6】



【図7】



【配列表】

0005771140000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/00
A 6 1 P	31/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/06
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(72)発明者 プラター - ザイバーク, クリスティーヌ

フランス エフ - 7 4 1 4 0 イヴォワール, ボスナ 1 1 5

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 Arthritis Research, 2 0 0 1年, Vol.3, No.5, p.293-298

Annals of the Rheumatic Diseases, 2 0 0 7年, Vol.66, No.4, p.452-457

Arthritis and Rheumatism, 2 0 0 4年, Vol.50, No.2, p.650-659

日本臨床免疫学会会誌, 2 0 0 7年, 第30巻, 第5号, p. 3 7 5 - 3 8 2

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

P u b M e d

C i N i i

医中誌W E B