(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009 年6 月11 日 (11.06.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/072598 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 17/04* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/072142

(22) 国際出願日: 2008 年12 月5 日 (05.12.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2007-315144 2007 年12 月5 日 (05.12.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間５丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 樋口 義信 (HIGUCHI, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 糟谷 恵子 (KASUTANI, Keiko) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 北村 秀智 (KITAMURA, Hidetomo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 長谷川 雅一 (HASEGAWA, Masakazu) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町１－１－１ 関鉄つくばビル６階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:
— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) **Title:** THERAPEUTIC AGENT FOR PRURITUS

(54) **発明の名称:** 掻痒症治療剤

(57) **Abstract:** A clone BM095 having a potent proliferation-inhibiting activity is obtained from a human antibody phage library in an IL-31-dependent Ba/Fc cell proliferation assay system. When the anti-mouse NR10 neutralizing antibody is administered to a pruritus model mouse, a significant effect of preventing the conditions of the disease is observed. It is revealed that the anti-NR10 neutralizing antibody is useful as a therapeutic agent for pruritus.

(57) 要約: 本発明者らは、ヒト抗体ファージライブラリーから、ＩＬ－３１依存性Ｂａ／Ｆ３細胞増殖アッセイ系に於いて、強い増殖抑制活性を示すクローンＢＭ０９５を得た。この抗マウスＮＲ１０中和抗体を用いて、掻痒症モデルマウスに投与したところ、顕著な症状の抑制効果が示された。抗ＮＲ１０中和抗体が掻痒症治療薬として有用であることが明らかとなった。

WO 2009/072598 A1

明 細 書

掻痒症治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、掻痒症の治療もしくは予防のための薬剤に関する。

背景技術

[0002] 種々の細胞の増殖分化、あるいは分化成熟した細胞の機能の賦活化に関与する液性因子として、数多くのサイトカインの存在が知られている。生体では、サイトカイン刺激を受けた細胞が別のサイトカインを産生し、複数のサイトカインによるネットワークが形成されている。生体の恒常性は、このネットワークが互いに調節し合うことによって、微妙なバランスの上に保たれている。多くの免疫炎症性の疾患は、これらのサイトカイン・ネットワークの破綻により生じると考えられ、モノクローナル抗体による抗サイトカイン療法が注目されている。例えば、抗TNF抗体や抗IL-6受容体抗体は、臨床で高い効果を示している。しかし一方で、実際の病態では代償経路が働き、IL-4等ひとつのサイトカインを遮断しただけでは治療効果が得られず、失敗した例も多い。

[0003] 本発明者らは、IL-6のシグナル伝達受容体gp130に相同性の高い、新規サイトカイン受容体NR10の単離に成功した(特許文献1)。NR10は、オンコスタチンM受容体(OSMR)とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能する(非特許文献1)。NR10は、glm-r(非特許文献2)、GPL(非特許文献3)、IL-31RA(非特許文献4)などの名前としても知られている。又、IL-31を過剰発現させたトランスジェニック・マウスが掻痒性皮膚炎を自然発症することが報告されている(非特許文献4)。

[0004] しかしながら、マウスにおけるサイトカインの強制発現や、病態マウスにおける血中のサイトカイン濃度の高さが、実際に疾患の原因となっていると断言することは出来ない。抗体によりシグナルを遮断した時に治療効果が得られるかは、全く不明である。例えば、IL-18をケラチノサイトで過剰発現させたトランスジェニック・マウスは、掻痒性皮膚炎を発症する。また、アトピー性皮膚炎自然発症モデルNC/Ngaマウスでは、血中のIL-18濃度が病態の進行とともに上昇する。これらから、IL-18の過剰発現が疾患の原因として推察された。しかしながら、実際には、中和抗体投与による治療効果は

認められなかった(非特許文献5)。

[0005] このように、サイトカインの発現が上昇している疾患において、そのサイトカインの機能を阻害したとしても必ずしも治療効果が得られる訳ではなく、サイトカインの発現量から実際に治療効果が得られる疾患を推測することは困難である。従って、ターゲットとするサイトカインのシグナル伝達の阻害により実際に治療効果が得られる疾患を見出すことが重要である。

[0006] なお、本発明の先行技術文献を以下に示す。

特許文献1:WO00/75314

非特許文献1:IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis., J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb; 117(2):418-25.

非特許文献2:A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5.J Biol Chem 277, 16831-6, 2002

非特許文献3:GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor.J Biol Chem 278, 49850-9, 2003

非特許文献4:Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice.Nat Immunol 5, 752-60, 2004

非特許文献5:Administration of anti-interleukin 18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga., British Journal of Dermatology 149: 39-45, 2003

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は上述の背景に鑑みてなされたものであり、本発明の課題は、掻痒症の治療もしくは予防のための薬剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意研究を行った。本発明者らは、NR10に対する中和抗体等のNR10アンタゴニストが、掻痒症に対する治療剤もしくは予防剤として有用であることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] 本発明は、掻痒症の治療もしくは予防のための薬剤に関し、より具体的には、

〔1〕 NR10アンタゴニストを有効成分として含有する、掻痒症の予防または治療剤、

〔2〕 NR10アンタゴニストがNR10に対する中和活性を有する抗体である、〔1〕に記載の予防または治療剤、

〔3〕 抗体がモノクローナル抗体である、〔2〕に記載の予防または治療剤、

〔4〕 抗体がヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体である、〔3〕に記載の予防または治療剤、

〔5〕 抗体が組換え抗体である、〔2〕～〔4〕のいずれかに記載の予防または治療剤、

〔6〕 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、〔2〕～〔5〕のいずれかに記載の予防または治療剤、

を提供するものである。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]IL-31誘発の掻痒行動を評価したグラフである。平均値±標準誤差。

[図2]ダニ抗原誘発の掻痒行動を評価したグラフである。平均値±標準誤差。

[図3]DSS大腸炎モデルマウスの体重変化率の推移を示すグラフである。

[図4]急性Picryl chrolide 接触性皮膚炎モデルの耳介の厚さの変化の推移を示すグラフである。

[図5]掻痒回数を指標とした、抗NR10抗体H0L0の掻痒症に対する抑制効果を示すグラフである。

[0011] 〔発明を実施するための形態〕

NR10は、オンコスタチンM受容体(OSMR)とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能するタンパク質である。glm-r(J Biol Chem 277, 16831-6, 2002)、GPL(J Biol Chem 278, 49850-9, 2003)、IL-31RA(Nat Immunol 5, 752-60, 2004)などの名称としても知られており、本発明のNR10には、これらの名称で呼ばれるタンパク質も含まれる。

[0012] 本発明のNR10には、ヒトやマウス、その他の哺乳動物に由来するNR10も含まれ、特に限定されるものではないが、好ましいNR10としてヒトやマウス由来のNR10が挙げられる。ヒト由来のNR10として、複数のスプライシングバリアントが知られている(WO0

0/075314)。上記スプライシングバリアントのうち、NR10.1は662アミノ酸からなり、細胞膜貫通領域を有することを特徴とする。また、NR10.2は、252アミノ酸配列からなる膜貫通領域を持たない可溶性受容体様タンパク質である。一方、細胞膜貫通型受容体タンパク質として機能するNR10スプライシングバリアントとして、NR10.3およびIL-31RAv3が知られている。本発明におけるヒトNR10は、オンコスタチンM受容体(OSMR)とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能するものであれば特に制限されるものではないが、好ましいNR10としてはNR10.3(ILRAv4とも呼ばれる(Nat Immunol 5, 752-60, 2004))およびIL-31RAv3を挙げることができる。NR10.3(IL-31RAv4)は662アミノ酸からなり(WO00/075314, Nat Immunol 5, 752-60, 2004)、IL-31RAv3は732アミノ酸からなる(GenBank Accession No: NM_139017)。IL-31RAv4のアミノ酸配列を配列番号:6に、IL-31RAv3のアミノ酸配列を配列番号:7に示す。一方、マウス由来のNR10としては、配列番号:5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0013] 本発明においてNR10アンタゴニストとは、NR10に結合することにより、NR10活性化に基づく細胞内シグナル伝達を遮断し、細胞の生理的活性を喪失させるまたは抑制する物質を意味する。ここで生理的活性としては、例えば、生理活性物質(例えば、ケモカイン、炎症性サイトカインなど)の産生誘導活性、産生抑制活性、分泌促進活性、分泌抑制活性、増殖活性、増殖誘導活性、生存活性、分化活性、分化誘導活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化/脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

[0014] アンタゴニスト活性の有無の判定は当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、細胞表面上に発現させたNR10に、リガンドの存在下で被検化合物を接触させ、NR10の活性化の指標となる細胞内シグナル伝達が生じるか否かを判定すればよい。このような判定は、例えば、文献「Dillon SR, et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol. 2004 Jul; 5(7):752-60.」に記載の方法によって行うことが可能である。リガンド刺激に応答した細胞内シグナル伝達を阻害する化合物は、NR10のアンタゴニストであると考えられる。

本発明におけるアンタゴニストは、天然の化合物であっても人工の化合物であってもよい。本発明におけるアンタゴニストとしては公知のものを用いることができる。また、上記方法によってアンタゴニスト活性を有すると判定された新規化合物を用いることもできる。

[0015] 本発明におけるNR10アンタゴニストの1つの態様としては、NR10に結合する抗体を挙げることができる。NR10に結合する抗体は特に限定されないが、好ましくはNR10に特異的に結合する抗体である。NR10に結合する抗体の好ましい態様としては、NR10に対する中和活性を有する抗体が挙げられる。本発明における「NR10に対する中和活性を有する抗体」とは、NR10に基づく生理活性を抑制する作用を有する抗体を意味する。本発明における「NR10に対する中和活性を有する抗体」はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、好ましい態様としてはモノクローナル抗体が挙げられる。

[0016] 又、本発明の抗体は、NR10に結合する抗体であれば特に限定されず、キメラ(chimeric)抗体、ヒト化(humanized)抗体、ヒト抗体などの組換え抗体も含まれる。キメラ抗体とは、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体である。キメラ抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。例えば、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入することによって行うことが可能である(例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望のヒト抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、ヒト抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、キメラ抗体を発現させることができる。

[0017] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region;FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K.et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0018] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる(国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。

[0019] さらに、ヒト抗体ファージライブラリーを用いて、パニング法によりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388

などを参考にすることができる。

[0020] 重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、NR10に対する中和活性を有する限り、NR10に対する中和活性が確認された抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されており、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer,W, Drutsa,V, Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492)などを用いて、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域と機能的に同等な変異体を調製することができる。このように、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域において、1もしくは複数のアミノ酸が変異しており、NR10に対する中和活性を有する抗体の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域もまた本発明の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域に含まれる。

[0021] アミノ酸残基を改変する場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂

肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、及び、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。これらの各グループ内のアミノ酸の置換を保存的置換と称す。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl.Acad.Sci.USA (1984)81:5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res.(1982)10:6487-500; Wang, A. et al., Science(1984)224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1982)79:6409-13)。このような変異体は、アミノ酸変異前の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有する。本明細書において配列の同一性は、配列同一性が最大となるように必要に応じ配列を整列化し、適宜ギャップ導入した後、元となった重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列の残基と同一の残基の割合として定義される。アミノ酸配列の同一性は、上述の方法により決定することができる。

[0022] また、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されており、NR10に対する中和活性を有する重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、該重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸から得ることも可能である。重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離するための、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、6M 尿素、0.4% SDS、0.5 x SSC、37℃の条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を例示できる。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1 x SSCの条件、42℃を用いれば、より相同

性の高い核酸の単離を期待することができる。単離した核酸の配列の決定は、後述の公知の方法によって行うことが可能である。単離された核酸の相同性は、塩基配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上(例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上)の配列の同一性を有する。

[0023] 上記ハイブリダイゼーション技術を利用する方法にかえて、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用して、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離することも可能である。

[0024] 塩基配列及びアミノ酸配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al.,J.Mol.Biol.(1990)215:403-10)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) のウェブサイトを参照;http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0025] また本発明における抗体は、低分子化抗体であってもよい。本発明の低分子化抗体は、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、NR10への中和活性を有する限り特に限定されない。本発明の低分子化抗体は、全長抗体の一部分を含む限り特に限定されないが、重鎖可変領域(VH)又は軽鎖可変領域(VL)を含んでいることが好ましく、特に好ましくはVHとVLの両方を含む低分子化抗体である。又、本発明の低分子化抗体の他の好ましい例として、抗体のCDRを含む低分子化抗体を挙げることができる。低分子化抗体に含まれるCDRは抗体の6つのCDR全てが含まれいてもよいし、一部のCDRが含まれていてもよい

。

[0026] 本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

[0027] 本発明における低分子化抗体の一つとして、scFv抗体を挙げることができる。scFv抗体は、重鎖可変領域([VH])及び軽鎖可変領域([VL])をリンカー等で結合して一本鎖ポリペプチドにした抗体である(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenburg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))。結合される重鎖可変領域と軽鎖可変領域の順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよく、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

[VH]リンカー[VL]

[VL]リンカー[VH]

[0028] 重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

[0029] 本発明において、抗体の可変領域を結合するリンカーは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカーを用いることができる。

[0030] 本発明において好ましいリンカーはペプチドリンカーである。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1～100アミノ酸、好ましくは3～50アミノ酸、更に好ましくは5～30アミノ酸、特に好ましくは12～18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。

[0031] ペプチドリンカーのアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる。

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:8)

Ser・Gly・Gly・Gly(配列番号:9)

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:10)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:11)

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:12)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:13)

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:14)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:15)

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:10))n

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:11))n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。

[0032] 合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ－EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ－DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ－BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0033] 本発明の抗体には、本発明の抗体のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加された抗体も含まれる。また、これら抗体と他のペプチド又はタンパク質とが融合した融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと他のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させれ

ばよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、例えば、FLAG(Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis(ヒスチジン)残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、α-tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のポリペプチドとしては、例えば、GST(グルタチオン－S－トランスフェラーゼ)、HA(インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、β－ガラクトシダーゼ、MBP(マルトース結合タンパク質)等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと融合させ、これにより調製された融合ポリヌクレオチドを発現させることにより、融合ポリペプチドを調製することができる。

[0034] また本発明の抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)、ヒアルロン酸、放射性物質、蛍光物質、発光物質、酵素、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている(例えば、US5057313、US5156840)。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

[0035] 又、特に限定されないが、本発明における抗NR10抗体の好ましい態様の一つとしてドメイン1を認識する抗体を挙げることができる。本発明においてドメイン1とは配列番号:7に記載のヒトNR10のアミノ酸配列においてシグナルペプチドを含んでいる状態での番号で21番目のアミノ酸から120番目のアミノ酸までの領域(LPAKP～LENIA)をいう。

[0036] 本発明の抗体は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、NR10アンタゴニストとしての機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明の抗体はこの

ような抗体も包含する。

[0037] NR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体は、たとえば、ヒトやマウス等の哺乳動物に由来するNR10またはその断片ペプチドを免疫原として、公知の方法によって抗NR10モノクローナル抗体を調製した後、得られた抗NR10モノクローナル抗体の中からNR10中和活性を有する抗体を選別することにより、得ることが出来る。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫する。得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングすることによって、抗NR10モノクローナル抗体を作製することが可能である。免疫される動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、サル、ヤギ、ロバ、ウシ、ウマ、ブタなどの哺乳動物を用いることができる。抗原の調製は、公知NR10遺伝子配列を用い、公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法(WO98/46777など)等に準じて行うことができる。

[0038] ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行ってもよい。

[0039] 本発明のNR10に対する中和活性を有する抗体の一態様として、ヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体が挙げられる。ヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体を作製するための免疫原としては、ヒトNR10に対する中和活性を有する抗体を作製できる限り、特に限定されない。例えばヒトNR10には複数のバリアントの存在が知られるが、ヒトNR10に対する中和活性を有する抗体を作製できる限り、いずれのバリアントを免疫原としてもよい。または同様の条件のもとに、NR10の断片ペプチドや、天然のNR10配列に人為的な変異を加えたものを免疫原としてもよい。ヒトNR10.3は、本発明のNR10に対する結合活性および/または中和活性を有する抗体を作製するうえで、好ましい免疫原の一つである。

[0040] また、抗体のNR10に対する中和活性の測定は、例えば、参考例記載の、該IL-31依存性細胞株の増殖抑制効果を観察する方法によって行うことができる。

[0041] 一方、モノクローナル抗体は、DNA免疫（DNA Immunization）によっても得ることができる。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現できるような態様で構築されたベクターDNAを当該免疫動物に投与し、免疫抗原を免疫動物の生体内で発現させることによって、免疫刺激を与える方法である。蛋白質抗原を投与する一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性を期待できる。

－膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激を与えることができる

－免疫抗原を精製する必要が無い

しかし一方で、DNA免疫においては、アジュバントなどの免疫刺激手段と組み合わせることが困難である。

[0042] DNA免疫によってモノクローナル抗体を得るには、まず、NR10をコードするDNAを免疫動物に投与する。NR10をコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成することができる。得られたDNAを適当な発現ベクターに挿入し、免疫動物に投与する。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターを利用することができる。ベクターを生体に投与する方法も、一般に用いられている方法を利用することができる。たとえば、発現ベクターを吸着させた金粒子を、遺伝子銃（gene gun）で細胞内に打ち込むことによってDNA免疫を行うことができる。DNA免疫後に、NR10発現細胞による追加免疫（boost）を行うことは、モノクローナル抗体を得る好ましい方法である。

[0043] このように哺乳動物が免疫され、血清中における所望の抗体量の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に付される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用できる。

[0044] 上記の免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン－グアニン－ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポ

キサンチンーアミノプテリンーチミジン感受性(以下HAT感受性と省略する)を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0045] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン(以下8AGと省略する)、あるいは5'ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択することができる。正常な細胞はこれらのピリミジンアナログをDNA中に取り込んでしまうので死滅するが、これらの酵素を欠損した細胞は、これらのピリミジンアナログを取り込めないので選択培地の中で生存することができる。この他、G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプタミン系抗生物質(ゲンタマイシン類似体)に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0046] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法(Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol.(1981)73, 3-46)等に準じて、免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0047] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、細胞融合が実施できる。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等を使用することができる。更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤を加えることもできる。

[0048] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定できる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。細胞融合に用いる培養液としては、例えば、ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液を利用することができる。さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を培養液に添加することができる。

[0049] 細胞融合は、免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液を混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)が形成される。細胞融合法においては、例えば平均分子量1000から6000程度のPEGを、通常30から60%(w/v)の濃度で添加することができる。続いて、上記に

挙げた適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去される。

[0050] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択することができる。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択できる。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞を選択的に増殖させることができる。目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、目的とするハイブリドーマを選択することができる。ついで、通常の限界希釈法を実施することによって、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施できる。あるいは、NR10を認識する抗体を国際公開WO03/104453に記載された方法によって作製することもできる。

[0051] 目的とする抗体のスクリーニングおよび単一クローニングは、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施できる。例えば、ポリスチレン等でできたビーズや市販の96ウェルのマイクロタイタープレート等の担体に抗原を結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させる。次いで担体を洗浄した後に酵素で標識した二次抗体等を反応させる。もしも培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗体が含まれる場合、二次抗体はこの抗体を介して担体に結合する。最終的に担体に結合する二次抗体を検出することによって、目的とする抗体が培養上清中に存在しているかどうかが決定できる。抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等によりクローニングすることが可能となる。この際、抗原としては免疫に用いたものを始め、実質的に同質なNR10タンパク質が好適に使用できる。たとえばNR10を発現する細胞株、NR10の細胞外ドメイン、あるいは当該領域を構成する部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを、抗原として利用することができる。

[0052] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫することによって上記ハイブリドーマを得る方法

以外に、ヒトリンパ球を抗原感作して目的とする抗体を得ることもできる。具体的には、まずインビトロにおいてヒトリンパ球をNR10タンパク質で感作する。次いで免疫感作されたリンパ球を適当な融合パートナーと融合させる。融合パートナーには、たとえばヒト由来であって永久分裂能を有するミエローマ細胞を利用することができる(特公平1-59878号公報参照)。この方法によって得られる抗体は、NR10タンパク質への結合活性を有するヒト抗体である。

[0053] 上述のようにして取得された抗体は当業者に公知の方法により作製することができる。例えば、NR10を認識する抗体の配列を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することが可能である。具体的には、NR10を認識する抗体の配列を基に抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

[0054] ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5α、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Wardら, Nature (1989) 341, 544-546;FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター(Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1(ファルマシア製)、「QIAexpress system」(キアゲン製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラ

ーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0055] また、ベクターには、抗体分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0056] 大腸菌以外にも、例えば、本発明の抗体を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製)や、pEF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」(ギブコBRL製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウィルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウィルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

[0057] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1αプロモーター(Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0058] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター(例えば、pSV2-dhfr(「Molecular Cloning 2nd edition」 Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))など)を導入し、メトトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、S

V40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcDなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス(BPV)等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。

[0059] これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外(培地など)から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

[0060] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose FF(GE Amersham Biosciences)等が挙げられる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も包含する。

[0061] 抗体のNR10に対する結合活性の測定は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、抗原をコーティン

グしたプレートに、抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

[0062] また、抗体のNR10に対する中和活性の測定は、例えば、参考例記載の、該IL-31依存性細胞株の増殖抑制効果を観察する方法によって行うことができる。

[0063] 本発明のNR10アンタゴニスト又はNR10に対する中和活性を有する抗体は、掻痒症の予防または治療剤に用いることが出来る。本発明者らは、マウスNR10に対する中和抗体を掻痒症モデル動物に投与し、顕著な治療効果が得られることを実証した。さらに、抗体以外のNR10アンタゴニストについても、本実施例における所見と同様に、掻痒症に対する治療効果を有するものと考えられる。

[0064] 本発明者らは、NR10に対するアンタゴニスト抗体が掻痒症に対して治療効果を有していることを見出した。一方、急性接触性皮膚炎およびDSS急性大腸炎モデルにおいては、NR10に対するアンタゴニスト抗体がそれらの疾患自体には治療効果を有さないことが判明した。

[0065] 本発明においては、掻痒症の治療と、掻痒症の基となる疾患や症状(例えば、以下に記載されているアトピー性皮膚炎、C型肝炎などの疾患)の治療とは区別される。従って、本発明の掻痒症の治療剤または予防剤は、掻痒症の基となる疾患や症状自体を治療または予防するものではなく、掻痒症自体の予防または治療をターゲットとするものである。本発明の治療剤又は予防剤は、掻痒症の基となる疾患や症状を治療又は予防する目的ではなく、掻痒症の治療又は予防が必要な患者に、掻痒症を治療または予防する目的で投与される。

[0066] 本発明により治療される掻痒症は特に限定されず、如何なる掻痒症でもよい。本発明により治療される掻痒症の具体的な例として、例えば、疥癬、シラミ寄生症、虫による刺咬傷、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、扁平苔癬、汗疹、疱疹状皮膚炎、乾皮症、胆道閉塞、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、C型肝炎などの感染性肝炎、尿毒症、慢性腎不全、腎透析、リンパ腫、白血病、真性一次性赤血球増加症、妊娠、薬物の服用(バルビツレート、サリチル酸など)、甲状腺機能亢進症、真性糖尿病、

内臓癌などにおける掻痒症を挙げることができる。

[0067] 本発明の掻痒症の予防または治療剤は、上述のNR10アンタゴニスト又はNR10に対する中和活性を有する抗体を有効成分として含有することを特徴とする。NR10アンタゴニストを「有効成分として含有する」とは、NR10アンタゴニストを活性成分の少なくとも1つとして含むという意味であり、その含有率を制限するものではない。また、本発明の掻痒症の予防または治療剤は、NR10アンタゴニストと合わせて他の掻痒症の予防または治療を促進する成分を含有してもよい。

[0068] 本発明の掻痒症治療剤または予防剤が対象とする掻痒症は特に限定されず、いかなる原因による掻痒症でもよいが、好ましくはIL-31が関与する掻痒症である。IL-31が関与する掻痒症としては、IL-31により引き起こされる掻痒症、IL-31が高発現している掻痒症などを挙げることができる。

[0069] 本発明のNR10アンタゴニストは、常法に従って製剤化することができる(例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A)。さらに、必要に応じ、医薬的に許容される担体及び/または添加物を供に含んでもよい。例えば、界面活性剤(PEG、Tween等)、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、キレート剤(EDTA等)、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含むことができる。しかしながら、本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜含んでいてもよい。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン及び免疫グロブリン等の蛋白質、並びに、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸を含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、NR10アンタゴニストを、例えば、生理食塩水、ブドウ糖またはその他の補助薬を含む等張

液に溶解する。補助薬としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、さらに、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

[0070] また、必要に応じNR10アンタゴニストをマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition &, Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、NR10アンタゴニストに適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res.(1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982)12: 98-105;米国特許第3,773,919号;欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers(1983)22:547-56; EP第133,988号)。

[0071] 本発明の掻痒症の予防または治療剤は、経口または非経口のいずれでも投与可能であるが、好ましくは非経口投与される。具体的には、注射及び経皮投与により患者に投与される。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射または皮下注射等により全身又は局所的に投与することができる。炎症を抑制したい部位またはその周辺に局所注入、特に筋肉内注射してもよい。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、1回につき体重1kgあたり活性成分が0.0001 mg～100 mgの範囲で選ぶことが可能である。または、例えば、ヒト患者に投与する場合、患者あたり活性成分が0.001～1000 mg/kg・body・weightの範囲を選ぶことができ、1回当たり投与量としては、例えば、NR10アンタゴニストが0.01～50 mg/kg・body・weight程度の量が含まれることが好ましい。しかしながら、本発明の掻痒症の予防または治療剤は、これらの投与量に制限されるものではない。

[0072] さらに、本発明はIL-31アンタゴニストを有効成分として含有する掻痒症治療剤を提供する。IL-31アンタゴニストはIL-31に結合して、IL-31の生物学的活性を阻害する物質であれば特に限定されない。IL-31アンタゴニストの好ましい例として、抗IL-31

抗体を挙げることができる(例えば、WO2006/088955、WO2006/88956、WO2006/122079)。抗IL-31抗体の作製、改変、修飾、製造、精製、投与、製剤化などの全ては上述の抗NR10抗体の記載を準用できる。

[0073] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0074] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により制限されるものではない。

[0075] 〔実施例1〕

IL-31誘発の掻痒行動評価

9週齢、メスの正常BALB/cマウス(日本チャールスリバー)に10μgのマウスIL-31 (in house)を静脈内投与し、投与直後から12時間の掻痒行動を掻痒測定装置(MicroAct、ニューロサイエンス)を用いて測定、解析した。その結果、vehicle (0.5 % BALB/cマウス血清含有PBS)投与群(n=8)に比較して、IL-31投与群(n=8)で投与後約5時間をピークとする有意な掻痒回数の増加を認めた。また、このIL-31誘発の掻痒行動は、IL-31投与前に抗マウスNR10中和抗体であるBM095 350 mg/kgの静脈内投与により(n=8)、完全に抑制された(図1)。この結果から、抗NR10中和抗体がIL-31により惹起された掻痒症に対する抑制効果を有することが証明された。

[0076] ダニ抗原誘発皮膚炎モデルに対する抗NR10中和抗体の効果

9週齢のSPF雌性NC/Nga Tnd Crljマウス(日本チャールス・リバー)の腹側耳介皮内に、ダニ抗原としてDermatophagoides pteronyssinus (Dp) 粗抽出物 (Cosmo Bio LSL) 5μgを週3回、3週間投与して皮膚炎を誘発した (Int Arch Allergy Immunol 2004;133:55-63)。Dpの溶媒対照群は、生理的食塩水(大塚製薬)5μLを同様のスケジュールで投与した (n=7)。この病態モデルに対して、抗マウスR10中和抗体BM-095 20 mg/kgをday 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21に静脈内投与した(n=8)。溶媒対照群として、200 mmol/L NaCl/20 mmol/L Na acetate buffer (pH 5.5)を同様のスケジュールで静脈内投与した(n=8)。

[0077] 掻痒症の評価は、day 21において掻痒測定装置(MicroAct, ニューロサイエンス)を

用いて12時間の測定時間中の掻痒回数(Scratching)を計測した。その結果、溶媒対照群の掻痒回数はDpの溶媒対照群に対して有意($p<0.005$)に増加した。この時、BM095投与群は溶媒対照群に対して有意($p<0.05$)に掻痒回数を抑制した(図2)。

この結果から、抗NR10中和抗体が掻痒症に対する抑制効果を有することが示された。

[0078] 〔実施例2〕カニクイザルにおけるIL-31誘発掻痒症に対するH0L0の抑制効果

4-5年齢のカニクイザルにカニクイザルIL-31を静脈内投与して誘発される掻痒症に対する抗ヒトNR10抗体H0L0(重鎖アミノ酸配列／配列番号:17、軽鎖アミノ酸配列／配列番号:18)の影響を検討した。PBS (vehicle)またはH0L0 0.01、0.03、0.06、0.3、0.6 mg/kgを静脈内投与後24時間目にカニクザルIL-31 1 g/kgを静脈内投与して、その後の2時間の行動を、ビデオ撮影した。撮影したビデオは再生して、3回以上連続した掻破行動を掻痒行動として掻痒回数を計測した。その結果、H0L0はカニクザルIL-31で誘発される掻痒回数を用量依存的に抑制した(図5)。この結果より、抗NR10抗体H0L0が掻痒症に対する抑制効果を有することが示された。

[0079] 〔参考例1〕NR10およびOSMR発現Ba/F3細胞株の樹立

ヒトNR10 cDNA(WO 0075314 SEQ ID No:1／配列番号:16)を発現ベクターpCOS1(Biochem Biophys Res Commun. 228, p838-45, 1996)に組み込み、pCosNR10.3とした。オンコスタチンM受容体 cDNA(OSMR, GenBank accession No. NM003999)をヒト胎盤ライブラリーからPCR法により単離し、同様に、発現ベクターpCos1-hOSMRを構築した。マウスIL-3依存性pro-B細胞由来細胞株Ba/F3に、それぞれのベクター10 μ gずつを同時にエレクトロポレーション法で導入した(BioRad Gene Pulser, 960 μ F, 0.33 kV)。導入後は、ヒトIL-31を添加・培養し、IL-31依存性に増殖を示す細胞株を得た。同様に、マウスIL-31依存性細胞株も、マウスNR10およびマウスOSMR遺伝子を発現させたBa/F3細胞から作製した。

[0080] いずれも数ng/mLのED50を示し、良好に増殖する細胞株が得られた。ヒトIL-31依存性細胞株はマウスIL-31に反応せず、ヒトNR10蛋白(細胞外領域)添加により抑制された。マウスIL-31依存性細胞株は、ヒトIL-31に反応せず、マウスNR10添加蛋白(細胞外領域)により抑制されなかった。

[0081] 〔参考例2〕NR10蛋白(細胞外領域)の調製

ヒトNR10 cDNAを鋳型に、PCR法により細胞外領域のみを増幅し、またC末端にFLAGタグ配列を付加し、発現ベクターpCXND3(WO2005/005636)に組み込んだ(pCXND3-NR10-flag)。直鎖状にしたこのベクター10μgをチャイニーズハムスター卵巣細胞株DG44へエレクトロポレーション法によって導入し(BioRad Gene PulserII, 25μF, 1.5 kV)、高発現を示す細胞株を得た。この細胞株を大量培養した培養上清から抗FLAG抗体カラム(SIGMA製)、ゲル濾過法により精製標品を得、以下の実験に供した。C末端にFLAGタグ配列を付加したマウスNR10(細胞外領域)も同様に調製した。

[0082] 〔参考例3〕抗マウスNR10中和活性を有するscFvの単離とキメラIgG化BM095の調製

ヒト抗体ファージライブラリーから、ビオチン化したマウスNR10蛋白(細胞外領域)を用いて、パニング法により候補クローンの絞り込みを行った。これらのクローンから分泌scFvを精製し、これを参考例1に記載のIL-31依存性Ba/F3細胞増殖アッセイ系に添加した。その結果、強い増殖抑制活性を示すクローンBM095を得ることに成功した。

[0083] PCR法により、BM095のヒトH鎖可変領域配列(VH)をマウスIgG2a定常領域(CH1以降)に、ヒトL鎖可変領域配列(VL)をマウスλ鎖定常領域に連結し、発現ベクターを構築した。この時のVHのアミノ酸配列を配列番号:1に、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号:2に示す。また、VLのアミノ酸配列を配列番号:3に、該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号:4に示す。直鎖状にした各々の発現ベクターを同時にDG44株に導入し、キメラIgGの高い発現量を示す細胞株を選別した。この細胞株を大量培養した培養上清から、プロテインA(rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Amersham Biosciences製)カラム、陽イオン交換(SP-TOYOPEARL 650M, TOSOH製)カラムクロマトグラフィーにより、精製標品を得た。さらに、ActiClean Etox(Sterogen製)樹脂によりパイロジェンを検出限界以下まで低減した。

[0084] 〔参考例4〕Dextran Sulfate Sodium (DSS) 誘発大腸炎に対するBM095の薬効

炎症性腸疾患 (IBD)の病態モデルとして報告されているDSS誘発大腸炎モデル(J Immunol 2003;171:5507-5513)を作製し、抗マウスNR10中和抗体であるBM-095の効果を検討した。Dextran Sulfate Sodium Salt (和光純薬製)の5% (w/v) 水溶液を、0.22

μmフィルター(Millipore製)で濾過滅菌した蒸留水を用いて調製し、6週齢のオスBalb/cAnN Crjマウス(日本チャールス・リバー製)に給水ビンにて7日間自由摂取させ、体重を測定し、DSS投与開始日の体重に対する変化率を薬効の評価項目とした。

[0085] 本モデルにおいて、IL-31シグナリング中和により病態が改善されるかどうかを、抗マウスNR10中和抗体であるBM095をDSS投与前日に10 mg/kgの用量で静脈内投与して体重減少を評価した(n=10)。溶媒対照群として、溶媒(酢酸緩衝液 [20 mmol/L 酢酸ナトリウム、20 mmol/L 塩化ナトリウム]と燐酸緩衝生理食塩水[PBS, GIBCO製]を容量比1:5で混合したもの)を、DSS投与前日に静脈内投与した群(Vehicle群, n=10)を設けた。また、正常マウスの体重変化率の推移を把握するため、DSS投与群と同じ週齢、性別のBalb/cAnN Crjマウスの体重変化率の推移も観察した(n=1)。

[0086] 体重の推移を図3に示した。Vehicle群においてはDSS投与により体重変化率が低下した。一方、BM095投与群においてもVehicle群と同様の体重推移を示したが、DSS投与後4および5日後ではBM095群ではVehicle群よりも有意に体重変化率が低下した。これら結果から、BM095投与による本モデルの大腸炎治療効果は認められなかった。

[0087] 本モデルにおいては、IL-31RAの発現が亢進することが報告されているが(WO2004/003140)、上記実験の結果、同分子の中和抗体は本モデルの大腸炎に対して治療効果がないことが明らかになった。

[0088] 〔参考例5〕急性Picryl chrolide接触性皮膚炎モデルに対するBM095の薬効

急性接触性皮膚炎のモデルとして報告されている(Clin Immunol 2003; 108: 257-262)、塩化ピクリル塗布による感作・誘発による遅延型過敏症反応の結果生じる皮膚炎を作製し、抗マウスNR10中和抗体であるBM-095の効果を検討した。8週齢のメスBalb/cAnN Crjマウス(日本チャールス・リバー製)の腹部皮膚に、50μLの7%塩化ピクリル(nacalai tesque, Inc.)溶液(エタノール:アセトン=3:1, v/v)を塗布して感作し、5日後に20μLの1% 塩化ピクリル溶液(アセトン:オリーブ=1:4, v/v)を右の耳介皮膚に塗布して接触性皮膚炎を惹起した(誘発)。溶媒の耳介の厚さへの影響を評価するための対照として、20μLの溶媒(アセトン:オリーブ=1:4, v/v)を同一マウスの左の耳介皮膚に塗布した(陽性対照群, n=6)。誘発直前および誘発後24,48,72時

間に左右の耳の厚さをDial thickness gauge(尾崎製作所製)で測定し、誘発直前の耳介の厚さに対する変化を薬効評価項目とした。

[0089] 病態の成立を評価するための対照群として、感作時に塩化ピクリルを含まないエタノール:アセトン混合液(3:1, v/v)を腹部皮膚に塗布し、その5日後に20μLの1% 塩化ピクリル溶液を右の耳介皮膚に、溶媒(アセトン:オリーブ=1:4, v/v)20μLを左の耳介皮膚に塗布した群(陰性対照群, n=6)を設けた。

[0090] 本系病態における抗NR10抗体投与の効果を評価するために、上記陽性対照群の方法で急性接触性皮膚炎を惹起し、感作前日および誘発前日にBM095 10 mg/kgを静脈内投与した群(BM095群, n=6)と、同じタイミングで溶媒(酢酸緩衝液 [20 mmol/L 酢酸ナトリウム、20 mmol/L 塩化ナトリウム]と燐酸緩衝生理食塩水[PBS, GIBCO製]を容量比1:5で混合したもの)を投与した群(Vehicle群、n=5)を設けた。

[0091] 誘発後72時間までの耳介の厚さの変化を図4に示した。陽性対照群は誘発後24、48、72時間のいずれにおいても陰性対照群に対して有意に耳介が肥厚しており、病態が成立したことが示された。このとき、BM-095群はVehicle群と同様の耳介の厚さの推移を示し、有意な抑制は認められなかった。

[0092] これら結果より、BM095投与による本モデルで観察される急性接触性皮膚炎に対する治療効果は認められないことが判明した。

産業上の利用可能性

[0093] 本発明によって提供されるNR10に対する中和抗体等のNR10アンタゴニストは、掻痒症に対する治療剤もしくは予防剤として有用である。

請求の範囲

[1] NR10アンタゴニストを有効成分として含有する、掻痒症の予防または治療剤。

[2] NR10アンタゴニストがNR10に対する中和活性を有する抗体である、請求項1に記載の予防または治療剤。

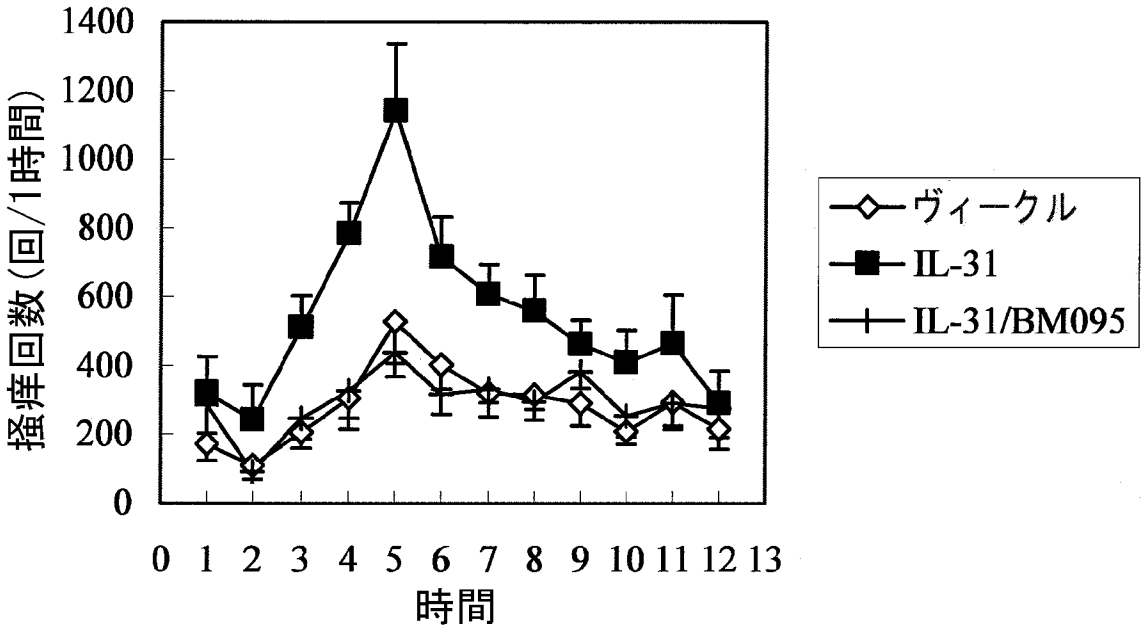
[3] 抗体がモノクローナル抗体である、請求項2に記載の予防または治療剤。

[4] 抗体がヒトNR10に対する中和活性を有するモノクローナル抗体である、請求項3に記載の予防または治療剤。

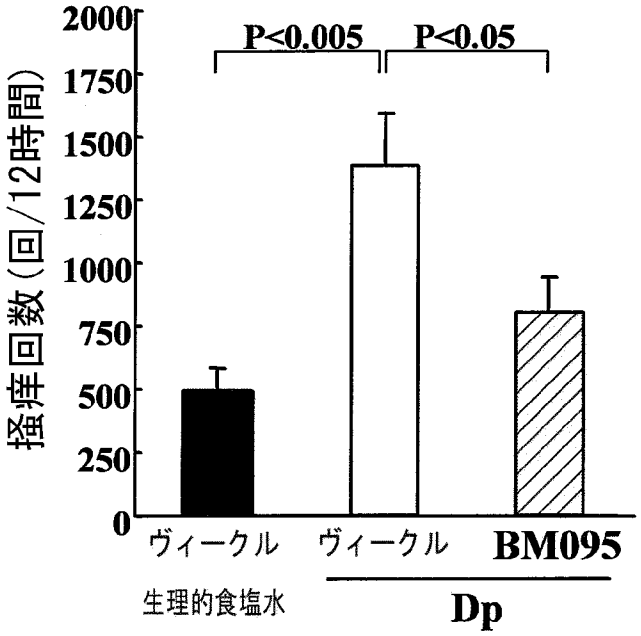
[5] 抗体が組換え抗体である、請求項2～4のいずれかに記載の予防または治療剤。

[6] 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項2～5のいずれかに記載の予防または治療剤。

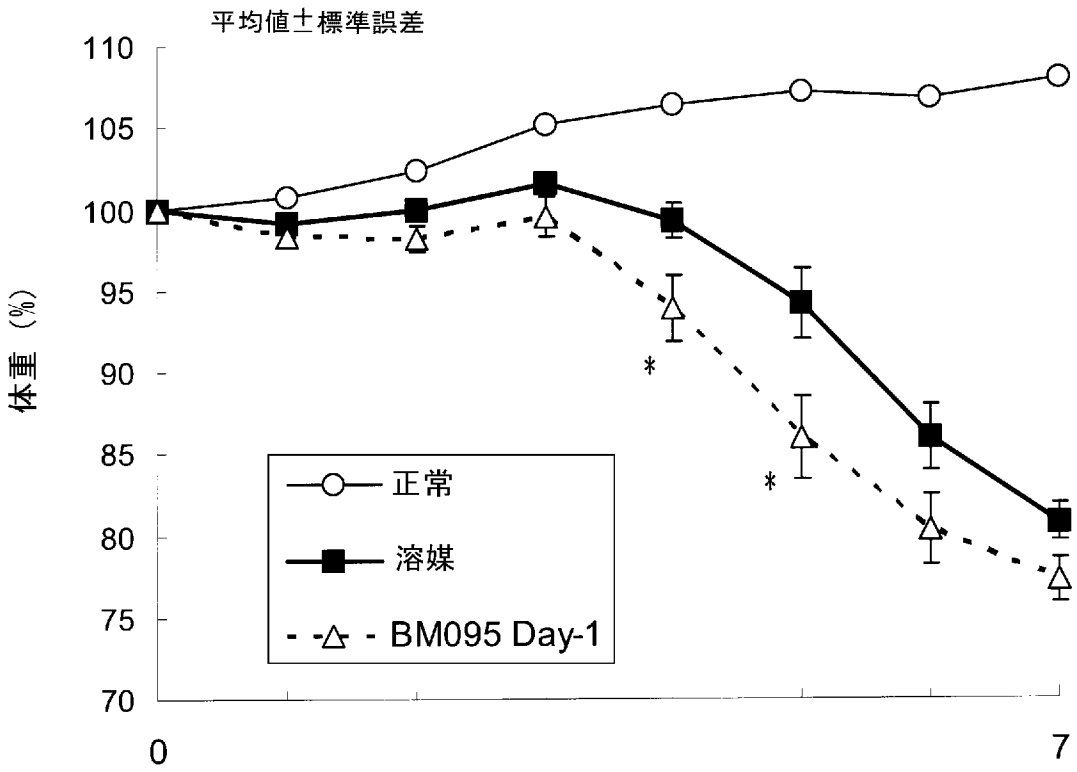
[図1]


1400
1200
1000
800
600
400
200
0
掻痒回数(回/1時間)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
時間
ヴィークル
IL-31
IL-31/BM095

[図2]

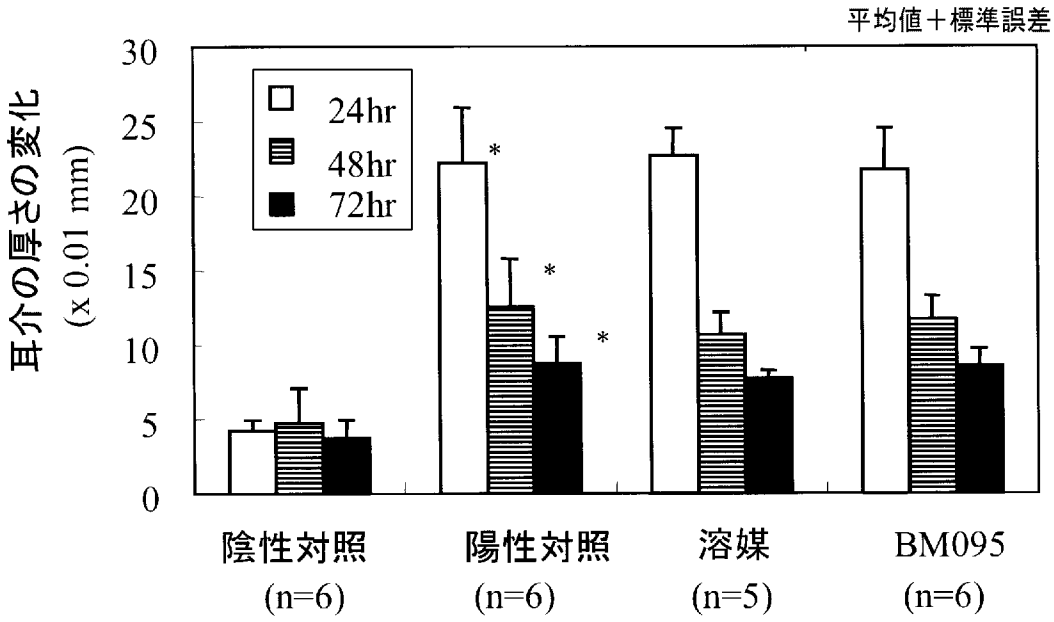

2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
掻痒回数(回/12時間)
P<0.005
P<0.05
ヴィークル
ヴィークル
BM095
生理的食塩水
Dp

[図3]



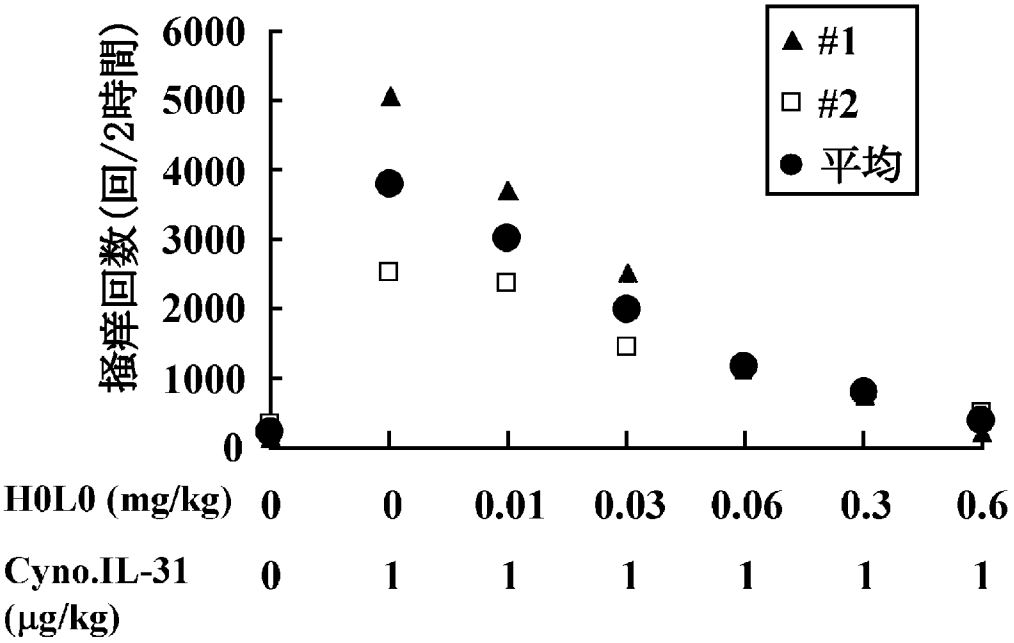
*P<0.05, 溶媒群に対するStudent t-検定

[図4]



*P<0.05,陰性対照群に対するStudent t-検定

[図5]


掻痒回数(回/2時間)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
▲ #1
□ #2
● 平均
H0L0 (mg/kg) 0 0 0.01 0.03 0.06 0.3 0.6
Cyno.IL-31 (μg/kg) 0 1 1 1 1 1 1

N=2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/072142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K45/00(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P17/04*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K45/00, A61K39/395, A61P17/04, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/088855 A1 (ZYMOGENETICS, INC.), 24 August, 2006 (24.08.06), Claims 1 to 25; DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION (particularly, Par. Nos. [0032] to [0033], [0047] to [0111]) & US 2006/0182743 A1 & EP 1858924 A1 & CA 2594490 A & JP 2008-530132 A	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report
17 December, 2008 (17.12.08)	06 January, 2009 (06.01.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

ａ．タイプ
- ☑ 配列表
- ☐ 配列表に関連するテーブル

ｂ．フォーマット
- ☐ 紙形式
- ☑ 電子形式

ｃ．提出時期
- ☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの
- ☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- ☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００８／０７２１４２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P17/04(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00, A61K39/395, A61P17/04, C07K16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 2006/088855 A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 2006.08.24, Claim 1-25、DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION 欄（特に段落[32]-[33] 及び[47]-[111] ）など & US 2006/0182743 A1 & EP 1858924 A1 & CA 2594490 A & JP 2008-530132 A	１－６

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １７．１２．２００８	国際調査報告の発送日 ０６．０１．２００９
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　３７６９ 横井　宏理 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２