

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-532931

(P2008-532931A)

(43) 公表日 平成20年8月21日 (2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24 Z N A	4 B O 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 153 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-554330 (P2007-554330)	(71) 出願人	505222646
(86) (22) 出願日	平成18年2月8日 (2006.2.8)		ザイモジェネティクス, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月3日 (2007.9.3)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/004311		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
(87) 国際公開番号	W02006/086396		イーストレイク アベニュー イースト
(87) 国際公開日	平成18年8月17日 (2006.8.17)		1 2 0 1
(31) 優先権主張番号	60/650,830	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成17年2月8日 (2005.2.8)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	スー ウェンフェン
			アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
			2 5 ス プレイス ノースイースト 8
			8 0 9
		Fターム (参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 DA01
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 I L - 2 O、抗 I L - 2 2 および抗 I L - 2 2 R A 抗体ならびに結合パートナー、ならびに炎症における使用法

(57) 【要約】

本発明は、IL-22、IL-20、またはIL-20およびIL-22ポリペプチド分子の双方の活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和することに関する。IL-20およびIL-22は、炎症プロセスおよびヒト疾患に関与するサイトカインである。IL-22RA (zcytor 11) は、IL-20とIL-22の共通の受容体である。本発明には、抗IL-22RA抗体および結合パートナーと共に、そのような抗体および結合パートナーを用いてIL-22またはIL-20とIL-22の双方に拮抗する方法が含まれる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の段階を含む、ポリペプチドに対する抗体を産生する方法：

動物において抗体を産生するように免疫応答を誘発する、以下からなる群より選択されるポリペプチドを動物に接種する段階：

(a) 配列番号：3のアミノ酸番号1 (Pro) ~ アミノ酸番号6 (Asp) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(b) 配列番号：3のアミノ酸番号26 (Ser) ~ アミノ酸番号32 (Pro) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(c) 配列番号：3のアミノ酸番号41 (Lys) ~ アミノ酸番号47 (Asp) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(d) 配列番号：2のアミノ酸番号49 (Val) ~ アミノ酸番号62 (Cys) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(e) 配列番号：3のアミノ酸番号41 (Lys) ~ アミノ酸番号62 (Cys) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(f) 配列番号：3のアミノ酸番号84 (Ala) ~ アミノ酸番号97 (Ser) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(g) 配列番号：3のアミノ酸番号103 (Thr) ~ アミノ酸番号108 (Asp) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(h) 配列番号：3のアミノ酸番号130 (Arg) ~ アミノ酸番号135 (His) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(i) 配列番号：3のアミノ酸番号164 (Gly) ~ アミノ酸番号166 (Lys) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(j) 配列番号：3のアミノ酸番号175 (Tyr) ~ アミノ酸番号179 (Glu) のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(k) 配列番号：3のアミノ酸番号193 (Lys) ~ アミノ酸番号196 (Ala) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(l) 配列番号：3のアミノ酸番号203 (Lys) ~ アミノ酸番号209 (Thr) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；および

(m) 配列番号：3のアミノ酸配列からなるポリペプチド；および

(n) 配列番号：4のアミノ酸配列からなるポリペプチド；ならびに

IL-22RAポリペプチド (配列番号：2または配列番号：3) に対して特異的に結合して、IL-20 (配列番号：8) またはIL-22 (配列番号：6) のいずれかの活性を減少させる抗体を動物から単離する段階。

【請求項 2】

産生される抗体が、IL-20 (配列番号：8) またはIL-22 (配列番号：6) のいずれかの前炎症性活性を減少させる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

産生される抗体が、IL-20 (配列番号：8) またはIL-22 (配列番号：6) のいずれかとIL-22RA (配列番号：2) との相互作用を中和する、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

抗体による中和が、インビトロでの細胞に基づく中和アッセイにおいてIL-20 (配列番号：8) またはIL-22 (配列番号：6) のいずれかの中和を示すことによって測定される、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

産生される抗体が、IL-20 (配列番号：8) およびIL-22 (配列番号：6) の双方の前炎症性活性を減少させる、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

産生される抗体が、IL-20 (配列番号：8) およびIL-22 (配列番号：6) の双方とIL-22RA (配列番号：2) との相互作用を中和する、請求項1記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

抗体による中和が、インビトロでの細胞に基づく中和アッセイにおいてIL-20（配列番号：8）およびIL-22（配列番号：6）の双方の中和を示すことによって測定される、請求項3記載の方法。

【請求項 8】

配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドに結合する、請求項1記載の方法によって産生された抗体。

【請求項 9】

（a）ポリクローナル抗体、（b）マウスモノクローナル抗体、（c）（b）に由来するヒト化抗体、（d）抗体断片、または（e）ヒトモノクローナル抗体である、請求項2記載の抗体。

10

【請求項 10】

放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、または毒素をさらに含む、請求項2記載の抗体。

【請求項 11】

PEG化をさらに含む、請求項9記載の抗体。

【請求項 12】

（a）ポリクローナル抗体、（b）マウスモノクローナル抗体、（c）（b）に由来するヒト化抗体、（d）抗体断片、または（e）ヒトモノクローナル抗体である、請求項5記載の抗体。

20

【請求項 13】

放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項5記載の抗体。

【請求項 14】

PEG化をさらに含む、請求項12記載の抗体。

【請求項 15】

配列番号：3に示すアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドに結合して、IL-20（配列番号：8）またはIL-22（配列番号：6）のいずれかの前炎症性活性を減少させる、抗体または抗体断片。

30

【請求項 16】

IL-20（配列番号：8）およびIL-22（配列番号：6）の双方の前炎症性活性を減少させる、請求項15記載の抗体または抗体断片。

【請求項 17】

（a）ポリクローナル抗体、（b）マウスモノクローナル抗体、（c）（b）に由来するヒト化抗体、（d）抗体断片、または（e）ヒトモノクローナル抗体である、請求項15記載の抗体または抗体断片。

【請求項 18】

抗体が放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項15記載の抗体または抗体断片。

40

【請求項 19】

PEG化をさらに含む、請求項17記載の抗体。

【請求項 20】

（a）ポリクローナル抗体、（b）マウスモノクローナル抗体、（c）（b）に由来するヒト化抗体、（d）抗体断片、または（e）ヒトモノクローナル抗体である、請求項16記載の抗体または抗体断片。

【請求項 21】

抗体が放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項16記載の抗体または抗体断片。

【請求項 22】

PEG化をさらに含む、請求項20記載の抗体。

50

【請求項 2 3】

骨髓または末梢血細胞を、抗体の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して、骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の請求項3記載の抗体を含む組成物と共に培養する段階を含む、造血細胞および造血前駆細胞のIL-22によるもしくはIL-20による増殖または分化のいずれかを減少させるまたは阻害する方法。

【請求項 2 4】

造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である、請求項23記載の方法。

【請求項 2 5】

リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である、請求項24記載の方法。

10

【請求項 2 6】

炎症を減少させるために十分な量の請求項3記載の抗体組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与する段階を含む、IL-22によるまたはIL-20による炎症を減少させる方法。

【請求項 2 7】

骨髓または末梢血細胞を、抗体の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して、骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の請求項5記載の抗体を含む組成物と共に培養する段階を含む、造血細胞および造血前駆細胞のIL-22によるおよびIL-20による増殖もしくは分化を減少させるまたは阻害する方法。

【請求項 2 8】

造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である、請求項27記載の方法。

20

【請求項 2 9】

リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である、請求項28記載の方法。

【請求項 3 0】

炎症を減少させるために十分な量の請求項5記載の抗体組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与する段階を含む、IL-22によるおよびIL-20による炎症を減少させる方法。

【請求項 3 1】

骨髓または末梢血細胞を、抗体または抗体断片の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して、骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の請求項15記載の抗体または抗体断片を含む組成物と共に培養する段階を含む、造血細胞および造血前駆細胞のIL-22によるおよびIL-20による増殖もしくは分化を減少させるまたは阻害する方法。

30

【請求項 3 2】

造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

炎症を減少させるために十分な量の請求項15記載の抗体または抗体断片の組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与する段階を含む、IL-22によるおよびIL-20による炎症を減少させる方法。

40

【請求項 3 5】

骨髓または末梢血細胞を、抗体の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して、骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の請求項16記載の抗体または抗体断片を含む組成物と共に培養する段階を含む、造血細胞および造血前駆細胞のIL-22によるおよびIL-20による増殖もしくは分化を減少させるまたは阻害する方法。

【請求項 3 6】

造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である、請求項35記載の方法。

【請求項 3 7】

リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である、請求項36記載の方法。

50

【請求項 3 8】

炎症を減少させるために十分な量の請求項16記載の抗体または抗体断片の組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与する段階を含む、IL-22によるおよびIL-20による炎症を減少させる方法。

【請求項 3 9】

以下の段階を含む、炎症を有する哺乳動物における炎症反応を抑制する方法：

- (1) 血清アミロイドAタンパク質レベルを決定する段階；
- (2) 許容される薬学的媒体において請求項3記載の抗体を含む組成物を投与する段階；
- (3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを決定する段階；
- (4) 血清アミロイドAタンパク質レベルが増加しなければ、または減少すれば炎症反応を抑制することが示される、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質レベルを段階(3)における血清アミロイドAタンパク質レベルと比較する段階。

10

【請求項 4 0】

以下の段階を含む、炎症を有する哺乳動物における炎症反応を抑制する方法：

- (1) 血清アミロイドAタンパク質レベルを決定する段階；
- (2) 許容される薬学的媒体において請求項5記載の抗体を含む組成物を投与する段階；
- (3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを決定する段階；
- (4) 血清アミロイドAタンパク質レベルが増加しなければ、または減少すれば炎症反応を抑制することが示される、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質レベルを段階(3)における血清アミロイドAタンパク質レベルと比較する段階。

20

【請求項 4 1】

以下の段階を含む、炎症を有する哺乳動物における炎症反応を抑制する方法：

- (1) 血清アミロイドAタンパク質レベルを決定する段階；
- (2) 許容される薬学的媒体において請求項15記載の抗体を含む組成物を投与する段階；
- (3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを決定する段階；
- (4) 血清アミロイドAタンパク質レベルが増加しなければ、または減少すれば炎症反応を抑制することが示される、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質レベルを段階(3)における血清アミロイドAタンパク質レベルと比較する段階。

30

【請求項 4 2】

以下の段階を含む、炎症を有する哺乳動物における炎症反応を抑制する方法：

- (1) 血清アミロイドAタンパク質レベルを決定する段階；
- (2) 許容される薬学的媒体において請求項16記載の抗体を含む組成物を投与する段階；
- (3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを決定する段階；
- (4) 血清アミロイドAタンパク質レベルが増加しなければ、または減少すれば炎症反応を抑制することが示される、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質レベルを段階(3)における血清アミロイドAタンパク質レベルと比較する段階。

【請求項 4 3】

以下の段階を含む、IL-22またはIL-20が役割を果たす炎症疾患に罹患した哺乳動物を治療する方法であって、IL-22(配列番号：6)またはIL-20(配列番号：8)のいずれかの炎症活性が減少する方法：

40

- (i) IL-22RA(配列番号：3)のポリペプチドもしくはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体、抗体断片、もしくは結合ポリペプチド、または(ii) IL-22RA(配列番号：3)のポリペプチドもしくはポリペプチド断片を含む、IL-22またはIL-20のアンタゴニストを、炎症が減少するように哺乳動物に投与する段階。

【請求項 4 4】

疾患が慢性炎症疾患である、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

疾患が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、また

50

は乾癬を含む慢性炎症疾患である、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

疾患が急性炎症疾患である、請求項43記載の方法。

【請求項 4 7】

疾患が、内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む急性炎症疾患である、請求項46記載の方法。

【請求項 4 8】

抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドが、放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項43記載の方法。

【請求項 4 9】

以下の段階を含む、IL-22およびIL-20が役割を果たす炎症疾患に罹患した哺乳動物を治療する方法であって、IL-22（配列番号：6）およびIL-20（配列番号：8）の双方の炎症活性が減少する方法：

（i）IL-22RA（配列番号：3）のポリペプチドもしくはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体、抗体断片、もしくは結合ポリペプチド、または（ii）IL-22RA（配列番号：3）のポリペプチドもしくはポリペプチド断片を含む、IL-22およびIL-20の双方のアнтаゴニストを、炎症が減少するように哺乳動物に投与する段階。

【請求項 5 0】

疾患が慢性炎症疾患である、請求項49記載の方法。

【請求項 5 1】

疾患が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、または乾癬を含む慢性炎症疾患である、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

疾患が急性炎症疾患である、請求項49記載の方法。

【請求項 5 3】

疾患が、内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む急性炎症疾患である、請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドが、放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項49記載の方法。

【請求項 5 5】

以下からなる群より選択されるヒトIL-22RA（配列番号：3）の抗原性エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む抗体であって、ヒトIL-22（配列番号：6）もしくはIL-20（配列番号：8）のいずれかの活性を減少させるまたは中和する抗体：

（a）配列番号：3のアミノ酸番号1（Pro）～アミノ酸番号6（Asp）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

（b）配列番号：3のアミノ酸番号26（Ser）～アミノ酸番号32（Pro）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

（c）配列番号：3のアミノ酸番号41（Lys）～アミノ酸番号47（Asp）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

（d）配列番号：2のアミノ酸番号49（Val）～アミノ酸番号62（Cys）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

（e）配列番号：3のアミノ酸番号41（Lys）～アミノ酸番号62（Cys）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

（f）配列番号：3のアミノ酸番号84（Ala）～アミノ酸番号97（Ser）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

（g）配列番号：3のアミノ酸番号103（Thr）～アミノ酸番号108（Asp）のアミノ酸配列からなるエピトープ；

10

20

30

40

50

(h) 配列番号：3のアミノ酸番号130(Arg)～アミノ酸番号135(His)のアミノ酸配列からなるエピトープ；

(i) 配列番号：3のアミノ酸番号164(Gly)～アミノ酸番号166(Lys)のアミノ酸配列からなるエピトープ；

(j) 配列番号：3のアミノ酸番号175(Tyr)～アミノ酸番号179(Glu)のアミノ酸配列からなるエピトープ；

(k) 配列番号：3のアミノ酸番号193(Lys)～アミノ酸番号196(Ala)のアミノ酸配列からなるエピトープ；

(l) 配列番号：3のアミノ酸番号203(Lys)～アミノ酸番号209(Thr)のアミノ酸配列からなるエピトープ；

(m) 配列番号：3のアミノ酸配列からなるエピトープ；および

(n) 配列番号：4のアミノ酸配列からなるエピトープ。

【請求項56】

ヒトIL-22(配列番号：6)およびIL-20(配列番号：8)の双方の活性を減少させるまたは中和する、請求項55記載の抗体。

【請求項57】

以下からなる群より選択される、請求項55記載の抗体：(a)マウスモノクローナル抗体、(b)(a)に由来するヒト化抗体、(c)抗体断片、および(d)ヒトモノクローナル抗体。

【請求項58】

PEG化をさらに含む、請求項57記載の抗体。

【請求項59】

以下からなる群より選択される、請求項56記載の抗体：(a)マウスモノクローナル抗体、(b)(a)に由来するヒト化抗体、(c)抗体断片、および(d)ヒトモノクローナル抗体。

【請求項60】

PEG化をさらに含む、請求項59記載の抗体。

【請求項61】

請求項55記載の抗体の有効量を投与し、それによって病態を治療する段階を含む、IL-22RA活性に関連した被験体における病態を治療する方法。

【請求項62】

病態が慢性炎症状態である、請求項61記載の方法。

【請求項63】

慢性炎症状態が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、または乾癬を含む、請求項62記載の方法。

【請求項64】

病態が急性炎症状態である、請求項61記載の方法。

【請求項65】

急性炎症状態が、内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む、請求項64記載の方法。

【請求項66】

以下の段階を含む、IL-22RAが役割を果たす炎症疾患に罹患した哺乳動物を治療する方法であって、炎症活性が減少する方法：

IL-22RA(配列番号：3)のポリペプチドまたはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドを含むIL-22RAのアンタゴニストを、炎症が減少するように哺乳動物に投与する段階。

【請求項67】

疾患が慢性炎症疾患である、請求項66記載の方法。

【請求項68】

疾患が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、また

10

20

30

40

50

は乾癬を含む慢性炎症疾患である、請求項67記載の方法。

【請求項 69】

疾患が急性炎症疾患である、請求項66記載の方法。

【請求項 70】

疾患が、内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む急性炎症疾患である、請求項69記載の方法。

【請求項 71】

抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドが、放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素をさらに含む、請求項66記載の方法。

【請求項 72】

抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドがさらに含み、抗体がPEG化をさらに含む、請求項66記載の方法。

【請求項 73】

炎症を減少させるために十分な量の請求項55記載の抗体組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与する段階を含む、炎症を減少させる方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

サイトカインは、多くの細胞タイプの増殖および分化の調節を含む多様な生物作用を媒介する可溶性の小さいタンパク質である（例えば、Araiら、Annu. Rev. Biochem. 59: 783 (1990) (非特許文献1)；Mosmann、Curr. Opin. Immunol. 3: 311 (1991) (非特許文献2)；Paul and Seder, Cell 76: 241 (1994) (非特許文献3)を参照されたい）。サイトカイングループを構成するタンパク質には、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、および他の調節分子が含まれる。例えば、ヒトインターロイキン-17は、インターロイキン-6、細胞内接着分子1、インターロイキン-8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、およびプロスタグランジンE2の発現を刺激するサイトカインであり、CD34+造血前駆細胞の好中球への選択的成熟において役割を有する（Yaoら、J. Immunol. 155: 5483 (1995) (非特許文献4)；Fossiezら、J. Exp. Med. 183: 2593 (1996) (非特許文献5)）。

【0002】

サイトカインに結合する受容体は典型的に、高い親和性でサイトカインに結合して、この結合事象を、特定の受容体サブユニットの細胞質部分を通して細胞に伝達する、一つまたはそれ以上の膜貫通タンパク質からなる。サイトカイン受容体は、その細胞外リガンド結合ドメインの類似性に基づいて、いくつかのクラスに分類されている。例えば、インターフェロンの結合および/または作用の伝達に關与する受容体鎖は、特徴的な200残基の細胞外ドメインに基づいて、クラスIIサイトカイン受容体ファミリーメンバーである。

【0003】

サイトカインおよびその受容体に関して証明されたインビボ活性から、他のサイトカイン、サイトカイン受容体、サイトカインアゴニスト、およびサイトカインアンタゴニストの臨床での可能性および必要性が示される。例えば、前炎症性サイトカインファミリーについて証明されたインビボ活性により、膨大な臨床での可能性および前炎症性分子のアンタゴニストの必要性が示される。本発明は、前炎症性サイトカインIL-20およびIL-22に対するアンタゴニストを提供することによってこれらの必要性に取り組む。IL-22、IL-20、またはIL-20とIL-22の双方の活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する可能性がある本発明のそのようなアンタゴニストには、可溶性IL-22RA受容体および中和性抗IL-22RA抗体が含まれる。本発明はさらに、炎症疾患においてそれらを用いることと共に、関連する組成物および方法を提供する。

【0004】

10

20

30

40

50

- 【非特許文献1】Araiら、Annu. Rev. Biochem. 59 : 783 (1990)
【非特許文献2】Mosmann、Curr. Opin. Immunol. 3 : 311 (1991)
【非特許文献3】Paul and Seder, Cell 76 : 241 (1994)
【非特許文献4】Yaoら、J. Immunol. 155 : 5483 (1995)
【非特許文献5】Fossiezら、J. Exp. Med. 183 : 2593 (1996)

【発明の開示】

【0005】

発明の詳細な説明

1. 概要

他の発明の中でも、本発明は、「Zcytor 11」または「IL-22RA」と命名される可溶性受容体およびIL-22RAサイトカイン受容体に対する中和抗体の新規使用を提供する。本発明はまた、ヒト炎症および自己免疫疾患において用いるための可溶性IL-22RAポリペプチド断片および融合タンパク質を提供する。本発明の中和性抗IL-22RA抗体を含む本発明の抗IL-22RA抗体および可溶性のIL-22RA受容体は、乾癬、乾癬性関節炎、関節炎、内毒素血症、炎症性腸疾患（IBD）、大腸炎、および本明細書において開示される他の炎症病態のような特定のヒト疾患の治療においてIL-22、IL-20、またはIL-20とIL-22の双方の活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するために用いることができる。

【0006】

ヒトZcytor 11（IL-22RA）をコードする例としてのヌクレオチド配列を配列番号：1に提供し、コードされるポリペプチドを配列番号：2に示す。IL-22RAはIL-20およびIL-22の双方の受容体サブユニットである。Zcytor 11（IL-22RA）は、共有される米国特許第5,965,704号、共有されるWIPO出願国際公開公報第02/12345号、および共有されるWIPO出願国際公開公報02/072607号に開示される。IL-22RA（配列番号：1）をコードするヒトcDNAクローンの分析から、アミノ酸残基約211個（配列番号：2の残基18～228位；配列番号：3）の細胞外リガンド結合ドメイン、アミノ酸残基約23個（配列番号：2の残基229～251位）の膜貫通ドメイン、およびアミノ酸残基約313個（配列番号：2の残基252～574位）の細胞内ドメインを含むアミノ酸574個をコードするオープンリーディングフレーム（「配列番号：2」）が明らかとなった。このように、本発明の分子には、配列番号：2のアミノ酸残基18～228位；配列番号：3を含むサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドが含まれる。本発明の可溶性受容体の一つの態様において、可溶性IL-22Rを重鎖定常領域に融合させる（例を配列番号：4に代表的に示す）。当業者は、これらのドメインの境界がおおよそであることを認識するであろう。ドメインの末端からの残基の欠失は起こりうる。

【0007】

下記のように、本発明は、単離ポリペプチドが、配列番号：3のアミノ酸残基を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体に特異的に結合する、配列番号：3としても示される配列番号：2の18～228位の参照アミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または96%、97%、98%、のような95%より大きい、または99%を超えてまたはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。例としてのポリペプチドには、配列番号：3のアミノ酸残基または配列番号：3のアミノ酸残基のいずれかを含むポリペプチドが含まれる。その上、本発明はまた、IL-22（例えば、配列番号：6に示されるヒトIL-22ポリペプチド配列）に結合する上記の単離ポリペプチドを提供する。ヒトIL-22ポリヌクレオチド配列を配列番号：5に示す。マウスIL-22ポリヌクレオチド配列を配列番号：10に示し、対応するポリペプチドを配列番号：11に示す。本発明はまた、先に開示したIL-20に結合する単離ポリペプチド（例えば、配列番号：8に示すヒトIL-20ポリペプチド配列；WIPO出願国際公開公報第99/27103号）を提供する。ヒトIL-20ポリヌクレオチド配列を配列番号：7に示す。

【0008】

本発明はまた、配列番号：3のアミノ酸配列の少なくとも15隣接アミノ酸残基を含む単離ポリペプチドおよびエピトープを提供する。例としてのポリペプチドには、配列番号：3、その抗原性エピトープ、またはその機能的IL-20もしくはIL-22結合断片を含む、また

10

20

30

40

50

はそれらからなるポリペプチドが含まれる。その上、本発明はまた、IL-22またはIL-20に結合する、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する、先に開示した単離ポリペプチドを提供する。

【0009】

本発明にはまた、変種ポリペプチドのアミノ酸配列が、少なくとも70%同一性、少なくとも80%同一性、少なくとも90%同一性、少なくとも95%同一性、または96%、97%、98%のような95%より大きい同一性、または99%より大きいまたはそれ以上の同一性からなる群より選択される、配列番号：3のアミノ酸残基と同一性を共有し、変種ポリペプチドと配列番号：3の対応するアミノ酸配列との如何なる差も一つまたはそれ以上の保存的アミノ酸置換によって起こる、変種IL-22RAポリペプチドが含まれる。そのような保存的アミノ酸置換は本明細書に開示される。その上、本発明はまた、IL-22またはIL-20に結合する、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する上記の単離ポリペプチドを提供する。

10

【0010】

本発明はさらに、そのようなポリペプチドと特異的に結合する抗体および抗体断片をさらに提供する。例としての抗体には、中和抗体、ポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体に由来するヒト化抗体、およびヒトモノクローナル抗体が含まれる。例としての抗体断片には、F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、および最小の認識単位が含まれる。中和抗体は好ましくは、IL-20およびIL-22とIL-22RAとの相互作用が遮断、阻害、減少、拮抗、または中和されるようにIL-22RAに結合する；IL-22RAに対するIL-20またはIL-22のいずれかの結合が遮断、阻害、減少、拮抗、または中和される抗IL-22RA中和抗体も同様に、本発明に含まれる。すなわち、本発明の中和性抗IL-22RA抗体は、IL-20またはIL-22のそれぞれに単独で結合、遮断、阻害、減少、拮抗、もしくは中和することができる、またはIL-20およびIL-22に共に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または阻害することができる。本発明にはさらに、担体と、本明細書に記述のペプチド、ポリペプチド、または抗体とを含む組成物が含まれる。

20

【0011】

さらに、本発明は、薬学的に許容される担体と、発現ベクターまたはそのような発現ベクターを含む組換え型ウイルスの少なくとも一つを含む薬学的組成物を提供する。本発明にはさらに、薬学的に許容される担体および本明細書に記述のポリペプチドまたは抗体を含む薬学的組成物が含まれる。

30

【0012】

本発明はまた、配列番号：3のアミノ酸配列またはその断片を含む、ポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗体断片に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体、または抗イディオタイプ抗体断片を企図する。例としての抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体に結合する。

【0013】

本発明はまた、IL-22RAポリペプチドおよび免疫グロブリン部分を含む融合タンパク質を提供する。そのような融合タンパク質において、免疫グロブリン部分は、ヒトFc断片のように免疫グロブリン重鎖定常領域であってもよい。本発明にはさらに、そのような融合タンパク質をコードする単離核酸分子が含まれる。

40

【0014】

本発明はまた、可溶性受容体を含む、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体受容体のような、IL-22RA細胞外ドメインを含むポリペプチドに結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を抵抗する。その上、そのような抗体は、IL-22RA受容体に対するIL-22RAリガンド、IL-22（配列番号：6）、およびIL-20（配列番号：8）の結合に個々にまたは共に拮抗するために用いることができる。

【0015】

その上、IL-22およびIL-20の過剰発現またはアップレギュレーションが、皮膚乾癬病変および皮膚アトピー性皮膚炎の皮膚試料において示されており、IL-22がIL-20と同様にヒ

50

ト乾癬、アトピー性皮膚炎、または皮膚および上皮組織の他の炎症疾患に關与していることを示唆している。その上、本明細書に記述するように、トランスジェニックマウスにおけるIL-20またはIL-22の過剰発現は、乾癬表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の關与を示した；さらに、IL-22を正常マウスに注射すると、乾癬表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の關与を示したが、これは可溶性受容体アンタゴニストIL-22RA2によって消失した（zcytor 16：WIPO公開番号国際公開公報第01/40467号）。そのようなインビボデータは、前炎症性IL-22が、乾癬、アトピー性皮膚炎、または皮膚および上皮組織の他の炎症疾患に關与していることをさらに示唆している。そのため、IL-22RA可溶性受容体、ならびに抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体および本発明の中和抗体を含むそれに対する抗体のような、IL-22およびIL-20活性に対するアンタゴニストは、炎症疾患の治療的治療において、特に乾癬の治療において、IL-22とIL-20の単独または双方に対するアンタゴニストとして有用である。その上、IL-22RA可溶性受容体、ならびに抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体および本発明の中和抗体を含むそれに対する抗体のようなIL-22活性に対するアンタゴニストは、他の炎症疾患の治療的治療において、例えばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒素血症、関節炎、リウマチ性関節炎、および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患（ARD）、敗血症ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎のような炎症性肺損傷、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性および接触性皮膚炎、ならびに炎症性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患の治療において、IL-22およびIL-20（個々にまたは共に）に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するために有用である。

10

20

【0016】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明を参照してより明らかとなるであろう。さらに、様々な参考文献を下記に示し、その全内容物が参照として本明細書に組み入れられる。

【0017】

2. 定義

以下の説明において、多くの用語が広く用いられている。以下の定義は、本発明の理解を促進するために提供される。

【0018】

本明細書において用いられるように、「核酸」または「核酸分子」とは、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）のようなポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって産生された断片、およびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエキソヌクレアーゼ作用によって産生された断片を指す。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド（DNAおよびRNAのような）である単量体、または天然に存在するヌクレオチド（例えば、天然に存在するヌクレオチドのエナンチオマー型）の類似体、または双方の組み合わせからなりうる。改変ヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジンまたはプリン塩基部分において改変を有しうる。糖改変には、例えば一つまたはそれ以上のヒドロキシル基をハロゲン、アルキル基、アミン、およびアジド基に置換することが含まれ、または糖はエーテルもしくはエステルとして官能基化することができる。その上、糖部分全体を、アザ糖および炭素環糖類似体のような、立体的および電子的に類似の構造に置換することができる。塩基部分における改変の例には、アルキル化プリンおよびピリミジン、アセチル化プリンもしくはピリミジン、または他の周知の複素環置換体が含まれる。核酸単量体は、ホスホジエステル結合またはそのような結合の類似体によって結合することができる。ホスホジエステル結合の類似体には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、ホスホロアミデート等が含まれる。「核酸分子」という用語にはまた、ポリアミド骨格に結合した天然に存在する、または改変核酸塩基を含む、いわゆる「ペプチド核酸」が含まれる。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかとなりうる。

30

40

【0019】

「核酸分子の相補体」という用語は、参照ヌクレオチド配列と比較して逆方向の相補的

50

ヌクレオチド配列を有する核酸分子を指す。例えば、配列5' ATGCACGGG 3'は、5' CCCGTG CAT 3'と相補的である。

【 0 0 2 0 】

「縮重ヌクレオチド配列」という用語は、ポリペプチドをコードする参照核酸分子と比較して一つまたはそれ以上の縮重コドンを含むヌクレオチドの配列を指す。縮重コドンは、異なるヌクレオチドトリプレットを含むが、同じアミノ酸残基（すなわち、GAUおよびG ACトリプレットはそれぞれAspをコードする）をコードする。

【 0 0 2 1 】

「構造遺伝子」という用語は、メッセンジャーRNA（mRNA）に転写され、その後特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸の配列に翻訳される核酸分子を指す。

10

【 0 0 2 2 】

「単離核酸分子」は、生物のゲノムDNAに組み入れられていない核酸分子である。例えば、細胞のゲノムDNAから分離されている増殖因子をコードするDNA分子は、単離DNA分子である。単離核酸分子のもう一つの例は、生物のゲノムに組み入れられていない化学合成された核酸分子である。特定の種から単離されている核酸分子は、その種からの染色体の完全なDNA分子より小さい。

【 0 0 2 3 】

「核酸分子構築物」は、ヒトの介入を通して、天然に存在しない配置で組み合わせて並置した核酸のセグメントを含むように改変されている一本鎖または二本鎖核酸分子である。

20

【 0 0 2 4 】

「直線状DNA」は、遊離の5'および3'末端を有する非環状のDNA分子を指す。直線状DNAは、プラスミドのような閉環DNA分子から、酵素消化または物理的破壊によって調製することができる。

【 0 0 2 5 】

「相補的DNA（cDNA）」は、逆転写酵素によってmRNA鋳型から形成された一本鎖DNA分子である。典型的に、逆転写を開始するために、mRNAの一部と相補的なプライマーが用いられる。当業者はまた、そのような一本鎖DNA分子とその相補的DNA鎖からなる二本鎖DNA分子を指すために、「cDNA」という用語を用いる。「cDNA」という用語はまた、RNA鋳型から合成したcDNA分子のクローンを指す。

30

【 0 0 2 6 】

「プロモーター」は、構造遺伝子の転写を指示するヌクレオチド配列である。典型的に、プロモーターは、構造遺伝子の転写開始部位に近位の遺伝子の5'非コード領域に存在する。プロモーター内で転写の開始において機能する配列要素はしばしば、コンセンサスヌクレオチド配列を特徴とする。これらのプロモーター要素には、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化特異的要素（DSEs；McGeheeら、Mol. Endocrinol. 7：551（1993））、環状AMP反応要素（CREs）、血清反応要素（SREs；Treisman、Seminars in Cancer Biol. 1：47（1990））、グルココルチコイド反応要素（GREs）、およびCRE/ATF（O'Reillyら、J. Biol. Chem. 267：19938（1992））、AP2（Yeら、J. Biol. Chem. 269：25728（1994））、SP1、cAMP反応要素結合タンパク質（CREB；Loeken、Gene Expr. 3：253（1993））、および八量体因子（一般的に、Watsonら編、「Molecular Biology of the Gene」、第四版、（Benjamin/Cummings Publishing Company、1987）、およびLemaigre and Rousseau、Biochem. J. 303：1（1994））のような他の転写因子の結合部位が含まれる。プロモーターが誘導型プロモーターである場合、転写速度は誘導物質に反応して増加する。対照的に、プロモーターが構成的プロモーターである場合、転写速度は誘導物質によって調節されない。抑制性プロモーターも同様に既知である。

40

【 0 0 2 7 】

「コアプロモーター」は、TATAボックスおよび転写開始を含むプロモーター機能にとって本質的なヌクレオチド配列を含む。この定義により、コアプロモーターは、活性を増加させる、または組織特異的活性を付与する可能性がある特異的配列の非存在下で検出可能

50

な活性を有してもよく、有しなくてもよい。

【0028】

「調節要素」は、コアプロモーターの活性を調節するヌクレオチド配列である。例えば、調節要素は、特定の細胞、組織、またはオルガネラにおいて独占的または選択的に転写を可能にする細胞要素に結合するヌクレオチド配列を含んでもよい。これらのタイプの調節要素は通常、「細胞特異的」、「組織特異的」、または「オルガネラ特異的」に発現される遺伝子に関連する。

【0029】

「エンハンサー」は、転写開始部位に対するエンハンサーの距離または方向にかかわらず、転写効率を増加させることができるタイプの調節要素である。

10

【0030】

「異種DNA」は、所定の宿主細胞において天然に存在しないDNA分子またはDNA分子の集団を指す。特定の宿主細胞に対して異種であるDNA分子は、宿主DNAを非宿主DNA（すなわち、外因性のDNA）と組み合わせる限り、宿主細胞種に由来するDNA（すなわち、内因性のDNA）を含んでもよい。例えば、転写プロモーターを含む宿主DNAセグメントに機能的に結合したポリペプチドをコードする非宿主DNAセグメントを含むDNA分子は、異種DNA分子であると見なされる。逆に、異種DNA分子は、外因性のプロモーターに機能的に結合した内因性の遺伝子を含みうる。もう一つの例として、野生型細胞に由来する遺伝子を含むDNA分子は、そのDNA分子が野生型遺伝子を欠損する変異体細胞に導入されている場合、異種DNAであると見なされる。

20

【0031】

「ポリペプチド」は、天然または合成的に産生されるか否かによらず、ペプチド結合によって結合されたアミノ酸残基のポリマーである。アミノ酸残基約10個未満のポリペプチドは、一般的に「ペプチド」と呼ばれる。

【0032】

「タンパク質」は、一つまたはそれ以上のポリペプチド鎖を含む高分子である。タンパク質はまた、炭化水素基のような非ペプチド成分を含んでもよい。炭化水素および他の非ペプチド置換基を、タンパク質が産生される細胞によってタンパク質に加えてもよく、これは細胞のタイプによって変化するであろう。タンパク質は、本明細書においてアミノ酸骨格構造に関して定義される；炭化水素基のような置換基は一般的に明記されないが、存在してもよい。

30

【0033】

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

【0034】

「クローニングベクター」は、宿主細胞において自律複製能を有するプラスミド、コスミド、またはバクテリオファージのような核酸分子である。クローニングベクターは典型的に、ベクターの本質的な生物機能を喪失することなく、決定可能な方法で核酸分子の挿入を可能にする一つまたは小数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位と共に、クローニングベクターによって形質転換された細胞の同定および選択において用いるために適したマーカー遺伝子を含む。マーカー遺伝子には典型的にテトラサイクリン抵抗性またはアンピシリン抵抗性を提供する遺伝子が含まれる。

40

【0035】

「発現ベクター」は、宿主細胞において発現される遺伝子をコードする核酸分子である。典型的に、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子、および転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は通常、プロモーターの制御下に置かれ、そのような遺伝子は、プロモーターに「機能的に結合」していると言われる。同様に、調節要素およびコアプロモーターは、調節要素がコアプロモーターの活性を調節する場合に、機能的に結合している。

【0036】

「組換え型宿主」は、クローニングベクターまたは発現ベクターのような異種核酸分子

50

を含む細胞である。本発明の状況において、組換え型宿主の例は、発現ベクターからIL-22RAを産生する細胞である。対照的に、IL-22RAは、IL-22RAの「天然起源」であって、発現ベクターを欠損する細胞によって産生されうる。

【0037】

「組み込み形質転換体」は、その中で異種DNAが細胞のゲノムDNAに組み入れられるようになる組換え型宿主細胞である。

【0038】

「融合タンパク質」は、少なくとも二つの遺伝子のヌクレオチド配列を含む核酸分子によって発現されるハイブリッドタンパク質である。例えば、融合タンパク質は、アフィニティマトリクスに結合するポリペプチドと融合したIL-22RAポリペプチドの少なくとも一部を含みうる。そのような融合タンパク質は、アフィニティクロマトグラフィーを用いて大量のIL-22RAを単離する手段を提供する。

10

【0039】

「受容体」という用語は、「リガンド」と命名される生物活性分子に結合する細胞会合タンパク質を指す。この相互作用は、細胞上のリガンドの作用を媒介する。受容体は、膜結合型、細胞質、または核受容体型；単量体（例えば、甲状腺刺激ホルモン受容体、アドレナリン受容体）または多量体（例えば、PDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリスロポエチン受容体およびIL-6受容体）型となりうる。膜結合型受容体は、細胞外リガンド結合ドメインと、典型的にシグナル伝達に關与する細胞内エフェクタードメインとを含む多ドメイン構造を特徴とする。特定の膜結合型受容体において、細胞外リガンド結合ドメインと細胞内エフェクタードメインとは、完全な機能的受容体を含む異なるポリペプチドに存在する。

20

【0040】

一般的に、リガンドが受容体に結合すると、受容体の立体配座の変化が起こり、それによってエフェクタードメインと他の分子との相互作用が起こり、その結果細胞の代謝の変化が起こる。受容体-リガンド相互作用にしばしば関連する代謝事象には、遺伝子の転写、リン酸化、脱リン酸化、環状AMP産生の増加、細胞内カルシウムの動員、膜脂質の動員、細胞接着、イノシトール脂質の加水分解、およびリン脂質の加水分解が含まれる。

【0041】

「可溶性受容体」は、細胞膜に結合していない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン、ならびに糖ホスホイノシトール（gpi）のような細胞膜との他の結合を欠損する最も一般的なリガンド-結合受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、ポリペプチドの精製を提供する、または基質もしくは免疫グロブリン定常領域配列に対するポリペプチドの結合部位を提供するアフィニティタグのようなさらなるアミノ酸残基を含みうる。多くの細胞表面受容体は、タンパク質分解によって産生された、または選択的にスプライシングされたmRNAから翻訳された天然に存在する可溶性の相対物を有する。可溶性受容体は、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体となりえて、多量体受容体は一般的に9個より多くのサブユニットを含まず、好ましくは6個より多くのサブユニットを含まず、最も好ましくは3個より多いサブユニットを含まない。受容体ポリペプチドは、それらが、膜の結合またはシグナル伝達を提供するためにこれらのセグメントの十分な部分を欠損する場合にそれぞれ、膜貫通および細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に含まないと言われる。クラスIおよびクラスIIサイトカイン受容体の可溶性受容体は、一般的に膜貫通ドメインを含まない細胞外サイトカイン結合ドメインと細胞内ドメインとを含む。例えば、代表的な可溶性受容体には、配列番号：44および配列番号：45に示されるように、CRF2-4の可溶性受容体（a.k.a. IL-10RB）（Genbankアクセッション番号Z17227）；配列番号：46に示されるIL-10RAの可溶性受容体（Genbankアクセッション番号U00672およびNM_001558）；配列番号：47に示されるpDIRS1の可溶性受容体（a.k.a. IL-20RB）（Genbankアクセッション番号AY358305）；および配列番号：3に示されるIL-22RAの可溶性受容体（米国特許第5,965,704号）が含まれる。既知のクラスIまたはクラスIIサイトカイン配列のどの配列が、膜貫通ドメインを含まない細胞外サイ

30

40

50

トカイン結合ドメインと細胞内ドメインとを含むかを明確に示すことは、当業者の範囲内である。その上、当業者は、遺伝子コードを用いて、そのような可溶性受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを容易に決定することができる。

【0042】

「分泌シグナル配列」という用語は、より大きいポリペプチドの成分として、より大きいポリペプチドを、それが合成される細胞の分泌経路に向けるペプチド（「分泌ペプチド」）をコードするDNA配列を指す。より大きいポリペプチドは、一般的に切断されて、分泌経路を通して移動する際に分泌ペプチドが除去される。

【0043】

「単離ポリペプチド」は、本来ポリペプチドに関連する炭化水素、脂質、または他のタンパク質様不純物のような混入細胞成分を本質的に含まないポリペプチドである。典型的に、単離ポリペプチドの調製物は、高度精製型のポリペプチド、すなわち少なくとも約80%純粋、少なくとも約90%純粋、少なくとも約95%純粋、96%、97%、98%、またはそれ以上純粋のような95%より多く純粋、または99%より多く純粋であるポリペプチドを含む。特定のタンパク質調製物が単離ポリペプチドを含むことを示す一つの方法は、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクマシーブリリアントブルー染色を行った後に単一のバンドが出現することによる。しかし、「単離された」という用語は、二量体または選択的グリコシル化もしくは誘導体のような、同じポリペプチドがもう一つの物理的な型で存在する場合を除外しない。

【0044】

「アミノ末端」および「カルボキシル末端」という用語は、本明細書においてポリペプチド内の位置を指すために用いられる。状況によって、これらの用語は、ポリペプチドの特定の配列または一部を参照して近位性または相対的位置を指すために用いられる。例えば、ポリペプチドにおける参照配列に対してカルボキシ末端に存在する特定の配列は、参照配列のカルボキシル末端に対して近位に存在するが、必ずしも完全なポリペプチドのカルボキシル末端に存在するわけではない。

【0045】

「発現」という用語は、遺伝子産物の生合成を指す。例えば、構造遺伝子の場合、発現は、構造遺伝子のmRNAへの転写、およびmRNAの一つまたはそれ以上のポリペプチドへの翻訳を含む。

【0046】

「スプライス変種」という用語は、本明細書において遺伝子から転写されたRNAのもう一つの型を指すために用いられる。スプライス変種は、転写されたRNA分子内のまたはあまり一般的ではないが転写されたRNA分子間の選択的スプライシング部位を用いることによって天然に発生し、それによって同じ遺伝子から転写されたいくつかのmRNAが得られる可能性がある。スプライス変種は変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする可能性がある。スプライス変種という用語はまた、本明細書において、遺伝子から転写されたmRNAのスプライス変種によってコードされるポリペプチドを指すために用いられる。

【0047】

本明細書において用いられるように、「免疫調節因子」という用語には、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンフォカイン、共刺激因子、造血因子等、およびこれらの分子の合成類似体が含まれる。

【0048】

「相補体/抗相補体対」という用語は、適当な条件で非共有結合によって会合した安定な対を形成する非同一部分を指す。例えば、ビオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）は、プロトタイプメンバーである。他の例としての相補体/抗相補体対には、受容体/リガンド対、抗体/抗原（またはハプテンもしくはエピトープ）対、センス/アンチセンスポリヌクレオチド対等が含まれる。相補体/抗相補体対がその後解離することが望ましい場合、相補体/抗相補体対は好ましくは 10^9 M^{-1} 未満の結合親和性を有する。

【0049】

「抗イディオタイプ抗体」は、免疫グロブリンの可変領域ドメインに結合する抗体である。本発明の状況において、抗イディオタイプ抗体は、抗IL-22RA抗体の可変領域に結合し、このように抗イディオタイプ抗体はIL-22RAのエピトープを模倣する。

【0050】

「抗体断片」は、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 等のような抗体の一部である。構造にかかわらず、抗体断片は、無傷の抗体によって認識される同じ抗原に結合する。例えば、抗IL-22RAモノクローナル抗体断片は、IL-22RAのエピトープに結合する。

【0051】

「抗体断片」という用語にはまた、軽鎖可変領域からなるポリペプチド、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって結合されている組換え型一本鎖ポリペプチド分子（「scFvタンパク質」）、および高度可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位のような、特異的抗原に結合する合成または遺伝子操作ポリペプチドが含まれる。

【0052】

「キメラ抗体」は、可変ドメインおよび齧歯類抗体に由来する相補性決定領域を含むが、抗体分子の残りの部分はヒト抗体に由来する組換え型タンパク質である。

【0053】

「ヒト化抗体」は、モノクローナル抗体のマウス相補性決定領域が、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変領域からヒト可変ドメインに転移されている組換え型タンパク質である。ヒトタンパク質に結合するまたは中和する抗体のような、マウス抗体に由来するヒトにおいて治療的に用いるためのヒト化抗体の構築は、当業者の範囲内である。

【0054】

本明細書において用いられるように、「治療物質」は、治療にとって有用である結合体を産生するために抗体部分に結合される分子または原子である。治療物質の例には、薬物、毒素、免疫調節物質、キレート剤、ホウ素化合物、光活性物質、または色素、および放射性同位元素が含まれる。

【0055】

「検出可能な標識」は、診断にとって有用な分子を産生するために抗体部分に結合することができる分子または原子である。検出可能な標識の例には、キレート剤、光活性物質、放射性同位元素、蛍光物質、常磁性イオン、または他のマーカー部分が含まれる。

【0056】

「アフィニティタグ」という用語は、本明細書において、第二のポリペプチドの精製または検出を提供するために、または基質に対する第二のポリペプチドの結合部位を提供するために、第二のポリペプチドに結合させることができるポリペプチド部分を指すために用いられる。原則的に、抗体または他の特異的結合物質が利用可能である如何なるペプチドまたはタンパク質もアフィニティタグとして用いることができる。アフィニティタグには、ポリヒスチジン路、プロテインA (Nilssonら、EMBO J. 4:1075 (1985); Nilssonら、Methods Enzymol. 198:3 (1991))、グルタチオンSトランスフェラーゼ (Smith and Johnson、Gene 67:31 (1988))、Glu-Gluアフィニティタグ (Grussenmeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985))、サブスタンスP、FLAGペプチド (Hoppら、Bio technology 6:1204 (1988))、ストレプトアビジン結合ペプチド、または他の抗原性エピトープもしくは結合ドメインが含まれる。一般的に、Fordら、Protein Expression and Purification 2:95 (1991)を参照されたい。アフィニティタグをコードするDNA分子は、市販されている（例えば、Pharmacia Biotech、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）。

【0057】

「裸の抗体」は、治療物質に結合していない、抗体断片に対して抗体全体である。裸の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の双方と共に、キメラおよびヒト化抗体のような特定の組換え型抗体が含まれる。

【 0 0 5 8 】

本明細書において用いられるように、「抗体成分」という用語には、抗体全体と抗体断片の双方が含まれる。

【 0 0 5 9 】

「免疫結合体」には、治療物質または検出可能な標識との抗体成分の結合体である。

【 0 0 6 0 】

本明細書において用いられるように、「抗体融合タンパク質」という用語は、抗体成分とIL-22RAポリペプチド成分とを含む組換え型分子を指す。抗体融合タンパク質の例には、IL-22RA細胞外ドメインと、Fcドメインまたは抗原結合領域のいずれかとを含むタンパク質が含まれる。

10

【 0 0 6 1 】

「標的ポリペプチド」または「標的ペプチド」は、少なくとも一つのエピトープを含み、腫瘍細胞または感染因子抗原を有する細胞のような標的細胞上に発現されるアミノ酸配列である。T細胞は、標的ポリペプチドまたは標的ペプチドに対して主要組織適合性抗原複合体分子によって提示されるペプチドエピトープを認識して、典型的に標的細胞を溶解するか、または標的細胞部位に他の免疫細胞を動員させて標的細胞を殺す。

【 0 0 6 2 】

「抗原性ペプチド」は、主要組織適合性抗原複合体分子に結合して、T細胞によって認識されるMHC-ペプチド複合体を形成し、それによってT細胞に提示されると細胞障害性リンパ球反応を誘導するペプチドである。このように、抗原性ペプチドは、適当な主要組織適合性抗原分子に結合することができ、細胞溶解または抗原に結合するまたは抗原に結合するもしくは抗原を発現する標的細胞に対する特異的サイトカイン放出のような、細胞障害性T細胞反応を誘導することができる。抗原性ペプチドは、抗原提示細胞または標的細胞において、クラスIまたはクラスII主要組織適合性抗原複合体分子の状況において結合することができる。

20

【 0 0 6 3 】

真核細胞において、RNAポリメラーゼIIは、構造遺伝子の転写を触媒してmRNAを産生する。核酸分子は、RNA転写物が特異的mRNAのそれと相補的である配列を有するRNAポリメラーゼII鋳型を含むように設計することができる。RNA転写物は、「アンチセンスRNA」と呼ばれ、アンチセンスRNAをコードする核酸分子は、「アンチセンス遺伝子」と呼ばれる。アンチセンスRNA分子は、mRNA分子に結合することができ、それによってmRNA翻訳の障害が起こる。

30

【 0 0 6 4 】

「IL-22RAに対して特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド」、または「IL-22RAアンチセンスオリゴヌクレオチド」は、(a) IL-22RA遺伝子の一部と安定な三本鎖を形成することができる、またはIL-22RA遺伝子のmRNA転写物の一部と安定な二本鎖を形成することができる配列を有するオリゴヌクレオチドである。

【 0 0 6 5 】

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

40

【 0 0 6 6 】

「外部誘導配列」は、内因性のリボザイムであるRNアーゼPを、細胞内mRNAの特定の種に向けて、それによってRNアーゼPによるmRNAの切断が起こる核酸分子である。外部誘導配列をコードする核酸分子は、「外部誘導配列遺伝子」と呼ばれる。

【 0 0 6 7 】

「変種IL-22RA遺伝子」という用語は、配列番号：3の改変であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子を指す。そのような変種には、IL-22RA遺伝子の天然に存在する多形と共に、配列番号：3のアミノ酸配列の保存的アミノ酸置換を含む合成遺伝子が含まれる。IL-22RA遺伝子のさらなる変種型は、本明細書に記述のヌクレオチド配

50

列の挿入、または欠失を含む核酸分子である。変種IL-22RA遺伝子は、例えば遺伝子がストリンジェントな条件で配列番号：1またはその相補体のヌクレオチド配列を有する核酸分子とハイブリダイズするか否かを決定することによって、同定することができる。

【0068】

または、変種IL-22RA遺伝子は、配列比較によって同定することができる。二つのアミノ酸配列は、二つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、最大に対応するように配置した場合に同一であれば、「100%アミノ酸配列同一性」を有する。同様に、二つのヌクレオチド配列は、二つのヌクレオチド配列のヌクレオチド残基を最大に対応するように配置した場合に同一であれば、「100%ヌクレオチド配列同一性」を有する。配列比較は、DNASTAR（マディソン、ウィスコンシン州）が製造するLASERGENEバイオインフォマティクス計算
10
スートに含まれるような標準的なソフトウェアプログラムを用いて行うことができる。最適なアラインメントを決定することによって二つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較する他の方法は、当業者に周知である（例えば、Peruski and Peruski、「The Internet and the New Biology: Tools for Genomics and Molecular Research」（ASM Press Inc.、1997）、Wuら（編）、「Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins」、Methods in Gene Biotechnology、123～151頁（CRC Press、1997）、およびBishop（編）、「Guide to Human Genome Computing」、第二版（Academic Press Inc.、1998）を参照されたい）。配列の同一性を決定する特定の方法を下記に示す。

【0069】

変種IL-22RA遺伝子または変種IL-22RAポリペプチドを同定するために用いられる特定の
20
方法にもかかわらず、変種遺伝子または変種遺伝子によってコードされるポリペプチドは、抗IL-22RA抗体に対する特異的結合能を機能的に特徴とする。変種IL-22RA遺伝子または変種IL-22RAポリペプチドも同様に、本明細書に記述の生物または生化学アッセイを用いて、そのリガンドIL-22に対する結合能を機能的に特徴としてもよい。

【0070】

「対立遺伝子変種」という用語は、本明細書において、同じ染色体座を占める遺伝子の
30
二つまたはそれ以上のもう一つの形を指すために用いられる。対立遺伝子変種は、変異から本来発生し、集団内で表現型多形が起こる可能性がある。遺伝子変異は、サイレントとなりうる（コードされるポリペプチドに変化なし）、または変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする可能性がある。対立遺伝子変種という用語はまた、本明細書において、遺伝子の対立遺伝子変種によってコードされるタンパク質を指すために用いられる。

【0071】

「オルトログ」という用語は、異なる種からのポリペプチドまたはタンパク質の機能的
相対物である一つの種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を指す。オルトログ間の配列の差が種分化の結果である。

【0072】

「パラログ」は、生物によって産生される異なるが構造的に関連するタンパク質である
40
。パラログは、遺伝子複製を通して生じると考えられている。例えば、 α -グロビン、 β -グロビン、およびミオグロビンは互いにパラログである。

【0073】

本発明には、IL-22RA遺伝子の機能的断片が含まれる。本発明の状況において、IL-22RA
遺伝子の「機能的断片」は、本明細書に記述のドメインである、または抗IL-22RA抗体に少なくとも特異的に結合するIL-22RAポリペプチドの一部をコードする核酸分子を指す。

【0074】

標準的な分析法が不正確であるために、ポリマーの分子量および長さは概算値であると
理解される。そのような値が「約」Xまたは「およそ」Xとして表記される場合、記載のX
の値は $\pm 10\%$ まで正確であると理解されるであろう。

【0075】

10

20

30

40

50

3. IL-22RAポリヌクレオチドまたは遺伝子の産生

ヒトIL-22RA遺伝子をコードする核酸分子は、配列番号：1に基づくポリヌクレオチドプローブを用いて、ヒトcDNAまたはゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得ることができる。これらの技術は標準的であって十分に確立され、市販のクローニングキットを用いて行ってもよい。例えば、Ausubelら（編）、「Short Protocols in Molecular Biology」、第三版、John Wiley & Sons、1995；Wuら、Methods in Gene Biotechnology、CRC出版 Inc.、1997；Aviv and Leder、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69：1408（1972）；Huynhら、表題「Constructing and Screening cDNA Libraries in gt10 and gt11」、書籍名「DNA Cloning：A Practical Approach」第1巻、Glover（編）、49頁（IRL Press、1985）；Wu（1997）、47～52頁を参照されたい。

10

【0076】

ヒトIL-22RA遺伝子をコードする核酸分子はまた、IL-22RA遺伝子またはcDNAのヌクレオチド配列に基づいているヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて得ることができる。PCRによってライブラリをスクリーニングする一般的な方法は、例えば、Yuら、「Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries」、Methods in Molecular Biology、15巻；PCR Protocols：Current Methods and Applications、White（編）、Humana Press Inc.、1993によって提供される。その上、関連する遺伝子を単離するためにPCRを用いる技術は、例えばPreston、「Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members」、Methods in Molecular Biology、15巻；PCR Protocols：Current Methods and Applications、White（編）、Humana Press Inc.、1993に記述されている。代用法として、IL-22RA遺伝子は、相互プライミングする長いオリゴヌクレオチドと本明細書に記述のヌクレオチド配列とを用いて、核酸分子を合成することによって得ることができる（例えば、Ausubel（1995）を参照されたい）。ポリメラーゼ連鎖反応を用いる確立された技術は、長さが少なくとも2キロベースのDNA分子の合成能を提供する（Adangら、Plant Molec. Biol. 21：1131（1993）、Bambotら、PCR Methods and Applications 2：266（1993）、Dillonら、「Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes」、Methods in Molecular Biology、15巻；PCR Protocols：Current Methods and Applications、White（編）、263～268頁、（Humana Press Inc.、1993）、およびHolowachukら、PCR Methods Appl. 4：299（1995））。ポリヌクレオチド合成に関する論評に関しては、Glick and Pasternak、「Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA.」（ASM Press、1994）、Itakuraら、Innu. Rev. Biochem, 53：323（1984）、およびClimieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87：633（1990）を参照されたい。

20

30

【0077】

4. IL-22RA遺伝子変種の作製

本発明は、本明細書に開示のIL-22RAポリペプチドをコードするDNAおよびRNA分子を含む、多様な核酸分子を提供する。当業者は、遺伝子コードの縮重を考慮して、これらのポリヌクレオチド分子においてかなりの配列の変動が起こりうることを容易に認識するであろう。その上、本発明はまた、配列番号：3の受容体ポリペプチドと実質的に相同である少なくとも1つのIL-22RA受容体サブユニットを含む単離された可溶性単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体受容体ポリペプチドを提供する。このように、本発明は、配列番号：1の縮重ヌクレオチドを含むIL-22RAポリペプチドコード核酸分子、およびそのRNA同等物を企図する。

40

【0078】

表1は、縮重ヌクレオチド部分を指す一文字コードを示す。「変換」はコード文字によって示されるヌクレオチドである。「補体」は、相補的ヌクレオチドのコードを指す。例えば、コードYは、CまたはTのいずれかを指し、その相補体RはAまたはGを指し、AはTと相補的であって、GはCと相補的である。

【0079】

50

【表 1】

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

10

20

【 0 0 8 0 】

所定のアミノ酸について起こりうる全てのコドンを含む縮重コドンを、表2に記載する

30

【 0 0 8 1 】

【表 2】

アミノ酸	一文字コード	コドン	縮重コドン
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Any	X		NNN

【 0 0 8 2 】

当業者は、アミノ酸をコードする起こりうる全てのコドンを表す縮重コドンを決めるために何らかの曖昧さが導入されることを認識するであろう。例えば、セリン（WSN）の縮重コドンは、場合によってアルギニン（AGR）をコードし、アルギニン（MGN）の縮重コドンは、場合によってはセリン（AGY）をコードしうる。類似の関係は、フェニルアラニンとロイシンをコードするコドンの間にも存在する。このように、縮重配列によって含まれるいくつかのポリヌクレオチドは、変種アミノ酸配列をコードする可能性があるが、当業者は配列番号：3のアミノ酸配列を参照することによってそのような変種配列を容易に

10

20

30

40

50

同定することができる。変種配列は、本明細書に記述されるように機能性に関して容易に試験することができる。

【0083】

異なる種が「選択的コドン使用」を示しうる。一般的に、Granthamら、Nucl. Acids Res. 8:1893 (1980)、Haasら、Curr. Biol. 6:315 (1996)、Wain-Hobsonら、Gene 13:355 (1981)、Grosjean and Fiers、Gene 18:199 (1982)、Holm、Nuc. Acids. Res. 14:3075 (1986)、Ikemura、J. Mol. Biol. 158:573 (1982)、Sharp and Matassi、Curr. Opin. Genet. Dev. 4:851 (1994)、Kane、Curr. Opin. Biotechnol. 6:494 (1995)、およびMakrides、Microbiol. Rev. 60:512 (1996)を参照されたい。本明細書において用いられるように、「選択的コドン使用」または「選択的コドン」は、当技術分野において、特定の種の細胞において最も頻繁に用いられ、このようにそれぞれのアミノ酸をコードする起こりうるコドンの一つまたは少数の代表に都合がよいタンパク質翻訳コドンを指す用語である(表2を参照されたい)。例えば、アミノ酸トレオニン(Thr)は、ACA、ACC、ACG、またはACTによってコードされる可能性があるが、哺乳動物細胞において、ACCは最も一般的に用いられるコドンである；他の種において、例えば昆虫細胞、酵母、ウイルス、または細菌において、異なるThrコドンは選択的であってもよい。特定の種に関する選択的コドンを当技術分野で既知の多様な方法によって、本発明のポリヌクレオチドに導入することができる。選択的コドン配列の組換え型DNAへの導入は、例えばタンパク質翻訳を特定の細胞タイプまたは種においてより効率的にすることによってタンパク質の産生を増強することができる。したがって、本明細書において開示される縮重コドン配列は、当技術分野において一般的に用いられる、および本明細書において開示される様々な細胞タイプおよび種におけるポリヌクレオチドの発現を最適にするための鋳型として役立つ。選択的コドンを含む配列を、様々な種において発現に関して試験して、最適にすることができ、本明細書に開示の機能性に関して試験することができる。

10

20

【0084】

IL-22RAコードcDNAは、完全もしくは部分的ヒトcDNAによって、または開示の配列に基づく一つもしくはそれ以上の組の縮重プローブによってプロービングすることによるような、多様な方法によって単離することができる。cDNAはまた、本明細書に開示の代表的なヒトIL-22RA配列から設計したプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応を用いてクローニングすることができる。さらに、cDNAライブラリを用いて、宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができ、対象cDNAの発現をIL-22RAポリペプチドに対する抗体によって検出することができる。

30

【0085】

当業者は、配列番号：1に開示の配列がヒトIL-22RAの単一の対立遺伝子を表し、対立遺伝子変種および選択的スプライシングが起こると予想されることを認識するであろう。この配列の対立遺伝子変種は、標準的な技法に従って異なるヒトからのcDNAまたはゲノムライブラリをプロービングすることによってクローニングすることができる。サイレント変異を含む変種および変異によってアミノ酸配列の変化が起こる変種を含む、本明細書に開示のヌクレオチド配列の対立遺伝子変種は、本明細書に開示のアミノ酸配列の対立遺伝子変種であるタンパク質と同様に、本発明の範囲内である。IL-22RAポリペプチドの特性を保持する選択的スプライシングmRNAから生成されたcDNA分子は、そのようなcDNAおよびmRNAによってコードされるポリペプチドと同様に本発明の範囲内に含まれる。これらの配列の対立遺伝子変種およびスプライス変種は、当業者に既知の標準的な技法に従って異なる個体または組織からcDNAまたはゲノムライブラリをプロービングすることによってクローニングすることができる。

40

【0086】

上記の方法を用いて、当業者は、配列番号：1と実質的に相同である、または配列番号：3のアミノ酸、またはその対立遺伝子変種をコードして、野生型IL-22RA受容体のリガンド結合特性を保持する、可溶性のIL-22RA受容体サブユニットを含む多様なポリペプチドを調製することができる。そのようなポリペプチドにはまた、本明細書において一般的に

50

開示されるさらなるポリペプチドセグメントが含まれてもよい。

【0087】

本発明の特定の態様において、単離核酸分子は、本明細書に開示のヌクレオチド配列を含む核酸分子とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる。例えば、そのような核酸分子は、配列番号：1のヌクレオチド配列を含む核酸分子、または配列番号：1と相補的なヌクレオチド配列を含む核酸分子もしくはその断片とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる。

【0088】

一般的に、ストリンジェントな条件は、既定のイオン強度およびpHで特定の配列に関する熱融解点 (T_m) より約5% 低いように選択される。 T_m は、標的配列の50%が完全にマッチしたプローブとハイブリダイズする温度 (既定のイオン強度およびpHで) である。ハイブリダイゼーション後、核酸分子を、ストリンジェントな条件または高ストリンジェント条件で洗浄して、ハイブリダイズしていない核酸分子を除去することができる。例えばSambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版 (コールドスプリングハーバー出版、1989) ; Ausubelら (編)、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons Inc., 1987) ; Berger and Kimmel (編)、「Guide to Molecular Cloning Techniques」(Academic Press Inc., 1987) ; およびWetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227 (1990) を参照されたい。OLIGO 6.0 (LSR; ロングレーク、カリフォルニア州) およびプライマープレミア4.0 (プレミアバイオソフトインターナショナル (Premier Biosoft International)、パロアルト、カリフォルニア州) のような配列分析ソフトウェアと共にインターネットのサイトは、ユーザー定義基準に基づいて所定の配列を分析して T_m を計算するための利用可能なツールである。特定のポリヌクレオチドハイブリッドについて用いるためにハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を適合させることは、十分に当業者の能力範囲内である。

【0089】

本発明はまた、配列番号：3のポリペプチド、またはそのオルトログと実質的に類似の配列同一性を有する単離IL-22RAポリペプチドを提供する。「実質的に類似の配列同一性」という用語は、本明細書において、配列番号：3に示される配列またはそのオルトログと少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、96%、97%、98%のような少なくとも95%、または95%より大きい配列同一性を有するポリペプチドを指すために用いられる。例えば、変種およびオルトログIL-22RA受容体は、免疫応答を産生するために、およびヒトIL-22RAに対する交叉反応抗体を産生するために用いることができる。そのような抗体は、ヒト化することができ、本明細書に記述されるように改変することができ、乾癬、乾癬性関節炎、IBD、大腸炎、内毒素血症と共に本明細書において記述される他の治療応用を治療するために治療的に用いることができる。

【0090】

本発明はまた、二つの基準を用いて同定することができるIL-22RA変種核酸分子を企図する：配列番号：3のアミノ酸配列を有するコードされるポリペプチド間の類似性の決定、およびハイブリダイゼーションアッセイ。そのようなIL-22RA変種には、(1) 洗浄のストリンジェンシーが0.1% SDSを含む $0.5 \times \sim 2 \times$ SSCで55~65 と同等である、ストリンジェントな洗浄条件で、配列番号：1のヌクレオチド配列 (またはその相補体) を有する核酸分子とハイブリダイズしたままである、および(2) 配列番号：3のアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または96%、97%、98%のような95%より大きい、または99%配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。または、IL-22RA変種は、(1) 洗浄のストリンジェンシーが0.1% SDSを含む $0.1 \times \sim 0.2 \times$ SSCで50~65 と同等である、高ストリンジェント洗浄条件で、配列番号：1 (またはその相補体) のヌクレオチド配列を有する核酸分子とハイブリダイズしたままである、および(2) 配列番号：3のアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または96%、97%、98%のような95%より大きい、または99%もしくはそれより大きい配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸

分子を特徴とすることができる。

【 0 0 9 1 】

% 配列同一性は、通常の方法によって決定される。例えば、Altschulら、Bull Math. Bio. 48 : 603 (1986)、およびHenikoff and Henikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 (1992) を参照されたい。簡単に説明すると、二つのアミノ酸配列を、表3に示すように、ギャップオープンペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ1、およびHenikoff and Henikoffの「BLOCUM 62」スコア行列を用いて、アラインメントスコアを最適にするように配置する（アミノ酸は、標準的な一文字コードで示す）。% 同一性は以下のように計算される：（[同一マッチの総数] / [より長い配列の長さプラス二つの配列を配置するためにより長い配列に導入されたギャップの数]）（100）。 10

【 0 0 9 2 】

【表 3】

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

【 0 0 9 3 】

当業者は、二つのアミノ酸配列を配置するために利用できる多くの確立されたアルゴリズムがあることを認識するであろう。Pearson and Lipmanの「FASTA」類似性検索アルゴリズムは、本明細書に開示のアミノ酸配列と推定のIL-22RA変種のアミノ酸配列によって共有される同一性のレベルを調べるための適したタンパク質アラインメント法である。FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444 (1988) およびPearson、Meth. Enzymol. 183 : 63 (1990) に記述される。簡単に説明すると、FASTAは、保存的アミノ酸置換、挿入、または欠失を考慮することなく、問い合わせ配列（例えば、配列番号：2または配列番号：3）と、同一性の最高密度を有する（ktup変数が1の場合）または同一性の対（ktup = 2の場合）を有する試験配列とによって共有される領域を同定することによって、配列類似性の特徴を示す。次に、最高の同一性密度を有する 40 50

領域10個を、アミノ酸置換行列を用いて全ての対のアミノ酸の類似性を比較することによって再スコアし、領域の末端部を、最高のスコアに貢献する残基のみを含めるように「整える」。「カットオフ」値より大きいスコアを有するいくつかの領域が存在する場合（配列の長さおよびktup値に基づいて既定の式によって計算される）、整えた最初の領域を、領域を結合させてギャップのおおよそのアラインメントを形成することができるか否かを決定するために調べる。最後に、二つのアミノ酸配列の最高のスコア領域を、アミノ酸の挿入および欠失を認めるNeedleman-Wunsch-Sellersアルゴリズム（Needleman and Wunsch -、J. Mol. Biol. 48 : 444 (1970) ; Sellers、SIAM J. Appl. Math. 26 : 787 (1974)）の改変を用いて整列させる。FASTA分析の例としてのパラメータは、ktup = 1、ギャップオープンペナルティ = 10、ギャップ伸長ペナルティ = 1、および置換行列 = BLOSUM 62である。これらのパラメータは、Pearson、Meth. Enzymol. 183 : 63 (1990) の付録2において説明されるように、スコア行列ファイル（「SMATRIX」）を改変することによってFASTAプログラムに導入することができる。

10

【0094】

FASTAはまた、上記のような比を用いて核酸分子の配列同一性を決定するために用いることができる。ヌクレオチド配列比較の場合、ktup値は、他のパラメータを上記のように設定した場合、1~6の範囲となりえて、好ましくは3~6、最も好ましくは3となりうる。

【0095】

本発明には、本明細書に開示のアミノ酸配列と比較して、保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。例えば、アルキルアミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列においてアルキルアミノ酸の代わりに置換されている、芳香族アミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列において芳香族アミノ酸の代わりに置換されている、硫黄含有アミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列において硫黄含有アミノ酸の代わりに置換されている、ヒドロキシ含有アミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列においてヒドロキシ含有アミノ酸の代わりに置換されている、酸性アミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列において酸性アミノ酸の代わりに置換されている、塩基性アミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列において塩基性アミノ酸の代わりに置換されている、または二塩基性モノカルボン酸アミノ酸がIL-22RAアミノ酸配列において二塩基性モノカルボン酸アミノ酸の代わりに置換されている、配列番号：3の一つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む変種を得ることができる。一般的なアミノ酸の中で、例えば「保存的アミノ酸置換」は、以下の群のそれぞれにおけるアミノ酸の置換によって示される：（1）グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、（2）フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、（3）セリンおよびトレオニン、（4）アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩、（5）アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（6）リジン、アルギニン、およびヒスチジン。BLOSUM 62表は、関連するタンパク質の500基より多い高度保存領域を表す、タンパク質配列セグメントの約2,000の局所多重アラインメントに由来するアミノ酸置換行列である（Henikoff and Henikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 (1992)）。したがって、BLOSUM 62置換頻度を用いて、本発明のアミノ酸配列に導入してもよい保存的アミノ酸置換を定義することができる。化学的特性（上記のように）のみに基づいてアミノ酸置換を設計することは可能であるが、「保存的アミノ酸置換」という用語は、好ましくは-1より大きいBLOSUM 62値によって表される置換を指す。例えば、アミノ酸置換は、置換がBLOSUM 62値0、1、2、または3を特徴とする場合、保存的である。このシステムに従って、好ましい保存的アミノ酸置換は、BLOSUM 62値が少なくとも1（例えば、1、2、または3）であることを特徴とするが、より好ましい保存的アミノ酸置換は少なくとも2（例えば、2または3）のBLOSUM 62を特徴とする。IL-22RAの特定の変種は、アミノ酸配列における変動が一つまたはそれ以上の保存的アミノ酸置換による、対応するアミノ酸配列（例えば、配列番号：3）と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または96%、97%、98%のような95%より大きい、または99%もしくはそれより大きい配列同一性を有することを特徴とする。

20

30

40

【0096】

50

IL-22RA遺伝子における保存的アミノ酸変化は、例えば配列番号：1において引用したヌクレオチドの代わりにヌクレオチドを置換することによって導入することができる。そのような「保存的アミノ酸」変種は、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発、リンカースキャニング変異誘発、ポリメラーゼ連鎖反応を用いた変異誘発等によって得ることができる（Ausubel（1995）；およびMcPherson（編）、「Directed Mutagenesis：A Practical Approach」（IRL Press、1991））。変種IL-22RAポリペプチドは、抗IL-22RA抗体との特異的結合能によって同定することができる。

【0097】

本発明のタンパク質はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含みうる。天然に存在しないアミノ酸には、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコール酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-および4-メチルプロリン、3,3'-ジメチルプロリン、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、および4-フルオロフェニルアラニンが含まれるがこれらに限定されない。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質に組み入れるためのいくつかの方法が当技術分野において既知である。例えば、化学的にアミノアシル化されたサプレッサー-tRNAを用いてナンセンス変異が抑制されるインビトロシステムを用いることができる。アミノ酸およびアミノアシル化tRNAを合成する方法は当技術分野で既知である。ナンセンス変異を含むプラスミドの転写および翻訳は典型的に、大腸菌S30抽出物および市販の酵素および他の試薬を含む無細胞系において行われる。タンパク質はクロマトグラフィーによって精製する。例えば、Robertsonら、J. Am. Chem. Soc. 113：2722（1991）、Ellmanら、Methods Enzymol. 202：301（1991）、Chungら、Science 259：806（1993）、およびChungら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：10415（1993）を参照されたい。

【0098】

第二の方法において、変異mRNAおよび化学的にアミノアシル化されたサプレッサー-tRNAのマイクロインジェクションによって、翻訳をアフリカツメガエルにおいて行う（Turcattira、J. Biol. Chem. 271：19991（1996））。第三の方法において、置換される（例えば、フェニルアラニン）天然のアミノ酸の非存在下で、望ましい天然に存在しないアミノ酸（例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、または4-フルオロフェニルアラニン）の存在下で、大腸菌細胞を培養する。天然に存在しないアミノ酸を、その天然の相対物の代わりにタンパク質に組み入れる。Koideら、Biochem. 33：7470（1994）を参照されたい。天然に存在するアミノ酸残基をインビトロ化学改変によって天然に存在しない種に変換することができる。化学改変を部位特異的変異誘発と併用して、置換の範囲をさらに広げることができる（Wynn and Richards、Protein Sci. 2：395（1993））。

【0099】

限られた数の非保存的アミノ酸、遺伝子コードによってコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、および非天然アミノ酸をIL-22RAアミノ酸残基の代わりに置換してもよい。

【0100】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発のような当技術分野で既知の技法に従って同定することができる（Cunningham and Wells、Science 244：1081（1989）、Bassら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：4498（1991）、Coombs and Corey、「Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering」、書籍名「Proteins：Analysis and Design」、Angeletti（編）、259～311頁（Academic Press Inc.、1989））。後者の技術において、単アラニン変異を、分子のあらゆる残基に導入して、得られた変異体分子を分子の活性にとって肝要であるアミノ酸残基を同定するために生物活性に関して試験する。同様に、Hiltonら、J. Biol. Chem. 2

71 : 4699 (1996) を参照されたい。

【 0 1 0 1 】

配列分析を用いてIL-22RAリガンド結合領域をさらに定義することができるが、IL-22RA結合活性において役割を有するアミノ酸（リガンドIL-22または抗IL-22RA抗体に対するIL-22RAの結合）は同様に、推定の接触部位アミノ酸の変異と共に、核磁気共鳴、結晶学、電子回折、光親和性標識のような技術によって決定されるように、物理的構造分析によって決定することができる。例えば、de Vosら、Science 255 : 306 (1992)、Smithら、J. Mol. Biol. 224 : 899 (1992)、およびWlodaverら、FEBS Lett. 309 : 59 (1992)。

【 0 1 0 2 】

Reidhaar-Olson and Sauer (Science 241 : 53 (1988)) またはBowie and Sauer (Proc . Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2152 (1989)) によって開示されるような、既知の変異誘発およびスクリーニング法を用いて、多数のアミノ酸置換を行って試験することができる。簡単に説明すると、これらの著者らは、ポリペプチドにおける二つまたはそれ以上の位置を同時に無作為化する、機能的ポリペプチドを選択する、および変異誘発ポリペプチドをシーケンシングして、各位置での許容可能な置換のスペクトルを決定する方法を開示する。用いることができる他の方法には、ファージディスプレイ（例えば、Lowmanら、Biochem. 30 : 10832 (1991)、Ladnerら、米国特許第5,223,409号、Huse、国際公開公報第92/06204号）および領域特異的変異誘発（Derbyshireら、Gene 46 : 145 (1986)、およびNerら、DNA 7 : 127 (1988)）が含まれる。その上、ビオチンまたはFITCによって標識されたIL-22RAは、IL-22RAリガンドの発現クローニングのために用いることができる。

【 0 1 0 3 】

開示のIL-22RAヌクレオチドおよびポリペプチド配列の変種も同様に、Stemmer、Nature 370 : 389 (1994)、Stemmer、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 10747 (1994)、および国際公開公報第97/20078号によって開示されるようにDNAシャッフリングを通して作製することができる。簡単に説明すると、変種DNA分子を親DNAの無作為断片化の後にPCRを用いて再構築することによるインビトロ相同的組換えによって産生し、それによって点突然変異が無作為に導入された変種が得られた。この技術は、異なる種からの対立遺伝子変種またはDNA分子のような親DNA分子のファミリーを用いて、プロセスにさらなる多様性を導入するように改変することができる。所望の活性の選択またはスクリーニングの後にさらなる変異誘発およびアッセイの繰り返しによって、有害な変化に対して同時に選択しながら所望の変異を選択することによって配列の急速な「進化」が提供される。

【 0 1 0 4 】

本明細書に開示の変異誘発法は、宿主細胞におけるクローニングした変異誘発ポリペプチドの活性を検出するために高スループットの自動スクリーニング法と組み合わせることができる。生物活性ポリペプチド、または抗IL-22RA抗体に結合するポリペプチドをコードする変異誘発DNA分子を、宿主細胞から回収して、近代的な設備を用いて迅速にシーケンシングすることができる。これらの方法によって、対象ポリペプチドにおける個々のアミノ酸残基の重要性を迅速に決定することができ、構造不明のポリペプチドに適用することができる。

【 0 1 0 5 】

本発明にはまた、IL-22RAポリペプチドの「機能的断片」およびそのような機能的断片をコードする核酸分子が含まれる。核酸分子の通常の欠失分析を行って、IL-22RAポリペプチドをコードする核酸分子の機能的断片を得ることができる。一例として、配列番号：1のヌクレオチド配列を有するDNA分子を、一連の重なり合う欠失を得るために、Bal31ヌクレアーゼによって消化することができる。次に、断片を発現ベクターに適当な読み取り枠で挿入して、発現されたポリペプチドを単離して抗IL-22RA抗体との結合能に関して試験する。エキソヌクレアーゼ消化に対する一つの代用法は、欠失もしくは終止コドンを導入するため、または所望の断片の産生を指定するために、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発を用いることである。または、IL-22RA遺伝子の特定の断片は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて合成することができる。

【 0 1 0 6 】

この全般的アプローチは、Horisberger and DiMarco、Pharmac. Ther. 66 : 507 (1995) によって概要される、インターフェロンの片方または双方の末端での切断に関する試験によって例示される。その上、タンパク質の機能的分析に関する標準的な技術は、例えば Treuterら、Molec. Gen. Genet. 240 : 113 (1993)、Contentら、「Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5 A synthetase induced by human interferon.」、「Biological Interferon Systems」、インターフェロンシステムに関する ISIR-TNO会議抄録、Cantell (編)、65~72頁 (Nijhoff、1987)、Herschman、「The EGF Receptor」、「Control of Animal Cell Proliferation.」第1巻、Boyntonら (編)、169~199頁 (Academic Press、1985)、Coumilleauら、J. Biol. Chem. 270 : 29270 (1995) ; Fukunagaら、J. Biol. Chem. 270 : 25291 (1995) ; Yamaguchiら、Biochem. Pharmacol. 50 : 1295 (1995)、および Meiselら、Plant Molec. Biol. 30 : 1 (1996) に記述される。

10

【 0 1 0 7 】

本明細書に開示の特定の配列の分析は、表4に示した説明となる機能的断片の組を提供した。本明細書に記載のさらなるヒトIL-22RA機能的変種ドメインをコードするヌクレオチドは、表4に示していないが、配列番号：1を参照して決定することができる。そのような機能的断片には、例えば、配列番号：1の以下のヌクレオチド配列：配列番号：1のヌクレオチド85~381位、206~717位、および85~717位、ならびに配列番号：2および配列番号：3にそれぞれ示される、それによってコードされる対応するアミノ酸配列が含まれる。

20

【 0 1 0 8 】

【表 4】

IL-22RAの特徴	アミノ酸残基 (配列番号：2)	ヌクレオチド (配列番号：1)
第一のIgドメイン	18-116	85-381
第二のIgドメイン	125-228	206-717
双方のIgドメイン	18-228	85-717

30

【 0 1 0 9 】

本発明はまた、本明細書に開示のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸変化を有するIL-22RAの機能的断片を企図する。変種IL-22RA遺伝子は、上記のように開示のヌクレオチドおよびアミノ酸配列との同一性のレベルを決定することによって構造に基づいて同定することができる。構造に基づいて変種遺伝子を同定するためのもう一つのアプローチは、可能性のある変種IL-22RA遺伝子をコードする核酸分子が、配列番号：1のようなヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリダイズすることができるか否かを決定することである。

【 0 1 1 0 】

本発明にはまた、IL-22RAポリペプチド、抗原性エピトープ、IL-22RAポリペプチドのエピトープ含有部分、およびIL-22RAポリペプチドのそのような機能的断片、抗原性エピトープ、エピトープ含有部分をコードする核酸分子を用いることが含まれる。そのような断片を用いて、IL-22またはIL-20とIL-22の双方に結合する、活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する抗体および結合パートナーを作製するために用いられるポリペプチドを作製することができる。本明細書において定義される「機能的」IL-22RAポリペプチドまたはその断片は、IL-20もしくはIL-22の炎症、増殖、もしくは分化活性の遮断、阻害、減少、拮抗、もしくは中和能、特殊な細胞機能の誘導もしくは阻害能、または抗IL-22RA抗体、細胞、IL-20、もしくはIL-22との特異的結合能を特徴とする。本明細書において既に記述されているように、IL-22RAは、本明細書に記述のクラスIIサイトカイン受容体構造およびドメインを特徴とする。このように、本発明は、以下を含む融合タンパク質を用

40

50

いることをさらに企図する：(a) 上記のドメインの一つまたはそれ以上を含むポリペプチド分子；および(b) これらのドメインの一つまたはそれ以上を含む機能的断片。融合タンパク質の他のポリペプチド部分は、IL-10R、IL-13R、IL-20RA、IL-20RB、IL-10RB (C RF2-4)、IL-22RA2のようなもう一つのクラスIIサイトカイン受容体によって、または融合タンパク質の分泌を促進する非天然および/または無関係な分泌シグナルペプチドによって与えられる可能性がある。

【0111】

本発明はまた、本明細書に記述のIL-22RAポリペプチドのエピトープ含有部分を含むポリペプチド断片またはペプチドを提供する。そのような断片またはペプチドは、タンパク質全体を免疫原として用いる場合に、抗体反応を誘発するタンパク質の一部である「免疫原性エピトープ」を含んでもよい。免疫原性エピトープ含有ペプチドは、標準的な方法を用いて同定することができる(例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998 (1983))。

【0112】

対照的に、ポリペプチド断片またはペプチドは、それに対して抗体が特異的に結合することができるタンパク質分子の領域である「抗原性エピトープ」を含んでもよい。特定のエピトープは、アミノ酸の直線または連続的な鎖からなり、そのようなエピトープの抗原性は、変性物質によって破壊されない。タンパク質のエピトープを模倣することができる比較的短い合成ペプチドを用いて、タンパク質に対する抗体の産生を刺激することができることは当技術分野で既知である(例えば、Sutcliffeら、Science 219: 660 (1983)を参照されたい)。したがって、本発明の抗原性エピトープ含有ペプチド、抗原性エピトープ、およびポリペプチドは、本明細書に記述のポリペプチドに結合する抗体を作製するためのみならず、中和性であって、IL-22およびIL-20に結合する、その活性を遮断する、阻害する、減少させる、拮抗する、または中和する可能性がある(個々にまたは共に)抗IL-22RAモノクローナル抗体を同定およびスクリーニングするために有用である。本発明のそのような中和モノクローナル抗体は、IL-22RA抗原性エピトープに結合することができる。Hopp/Woods疎水性プロファイルを用いて、配列番号：3において最も抗原性が高い領域を決定することができる(Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 3824~3828、1981; Hopp、J. Immun. Meth. 88: 1~18、1986およびTriquierら、Protein Engineering 11: 153~169、1998)。プロファイルは、スライディング6残基のウィンドウに基づく。埋もれているG、S、およびT残基および露出したH、Y、およびW残基を無視した。IL-22RAにおいて、これらの領域は、当業者によって決定することができる。その上、例えばDNASTAR Proteinプログラム(DNASTAR Inc.、マディソン、ウィスコンシン州)を用いてJameson-Wolfプロットによって予想されるように、配列番号：3におけるIL-22RA抗原性エピトープは、好ましい抗原性エピトープとして役立ち、当業者によって決定することができる。そのような抗原性エピトープには、(1) 配列番号：3のアミノ酸番号1(Pro)~6(Asp)；(2) 配列番号：3のアミノ酸番号26(Ser)~32(Pro)；(3) 配列番号：3のアミノ酸番号41(Lys)~47(Asp)；(4) 配列番号：3のアミノ酸番号49(Val)~62(Cys)；(5) 配列番号：3のアミノ酸番号41(Lys)~62(Cys)；(6) アミノ酸番号84(Ala)~97(Ser)；(7) 配列番号：3のアミノ酸番号103(Thr)~108(Asp)；(8) 配列番号：3のアミノ酸番号130(Arg)~135(His)；(9) 配列番号：3のアミノ酸番号164(Gly)~166(Lys)；(10) 配列番号：3のアミノ酸番号175(Tyr)~179(Glu)；(11) 配列番号：3のアミノ酸番号193(Lys)~196(Ala)；(12) 配列番号：3のアミノ酸番号203(Lys)~209(Thr)が含まれる。さらなるエピトープには、CnBrによって切断された非還元完全長のヒトIL-22RAからおそらく生成される以下のペプチドが含まれる：ペプチド6(配列番号：56)、ペプチド7(配列番号：57)、ペプチド8(配列番号：58)、ペプチド9(配列番号：59)、ペプチド10(配列番号：60)、およびペプチド11(配列番号：61)。システインはジスルフィド結合されて、ペプチド7(配列番号：57)と10(配列番号：60)との間におそらく結合が起こる。特に、配列番号：56は、配列番号：3のアミノ酸番号1(Pro)~92(Met)に対応し、配列番号：57は、配列番号：3のアミノ酸番号93(Thr)~120(

10

20

30

40

50

Met)、配列番号:58は、配列番号:3のアミノ酸番号121(Ile)~160(Met)に対応し、配列番号:59は、配列番号:3のアミノ酸番号161(His)~185(Met)に対応し、配列番号:60は、配列番号:3のアミノ酸番号186(Ile)~199(Met)に対応し、および配列番号:61は配列番号:3のアミノ酸番号200(Cys)~211(Thr)に対応する。さらに、リガンド-受容体結合にとって重要な配列番号:2の残基(および対応する配列番号:3の残基)は、配列番号:2(および配列番号:3の対応する残基)のTyr-60およびPhe-164、Tyr-93、Arg-112、Lys-210、およびGlu-211を含む。その上、リガンド受容体結合を支持するために重要である配列番号:2の一次残基(および配列番号:3の対応する残基)は、配列番号:2のTyr-60およびPhe-164(および配列番号:3の対応する残基)を含み、二次残基は、配列番号:2および配列番号:3の対応する残基)の残基Tyr-93、Arg-112、Lys-210、およびGlu-211を含む。好ましい態様において、本発明の中和抗体が結合する抗原性エピートープは、例えばIL-22RAおよびIL-20またはIL-22(個々にまたは共に)とのリガンド-受容体結合にとって重要である配列番号:2の残基(および配列番号:3の対応する残基)を含むであろう。

10

【0113】

抗原性エピートープ含有ペプチドおよびポリペプチドは、本明細書に開示のアミノ酸配列のアミノ酸を少なくとも4個~10個、アミノ酸少なくとも10~15個、またはアミノ酸約15~約30個を含みうる。そのようなエピートープ含有ペプチドおよびポリペプチドは、本明細書において記述されるように、IL-22RAポリペプチドの断片化によって、またはペプチドの化学合成によって産生することができる。その上、エピートープは、ランダムペプチドライブラリのファージディスプレイによって選択することができる(例えば、Lane and Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5:268(1993)、およびCorteseら、Curr. Opin. Biotechnol. 7:616(1996)を参照されたい)。エピートープを同定して、エピートープを含む小さいペプチドから抗体を産生する標準的な方法は、例えば、Mole、「Epitope Mapping」、Methods in Molecular Biology、第10巻、Manson(編)、105~116頁(Humana Press Inc.、1992)、Price、「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」、Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application.、Ritter and Ladyman(編)60~84頁(Cambridge University Press、1995)、およびColiganら(編)、「Current Protocols in Immunology」、9.3.1~9.3.5頁および9.4.1~9.4.11頁(John Wiley & Sons、1997)によって記述されている。

20

30

【0114】

変種および融合タンパク質を含む任意のIL-22RAポリペプチドに関して、当業者は、上記の表1および2に記載の情報を用いてその変種をコードする完全な縮重ポリヌクレオチド配列を容易に産生することができる。その上、当業者は、本明細書に記述のヌクレオチドおよびアミノ酸配列に基づいてIL-22RA変種を考案するために標準的なソフトウェアを利用することができる。

【0115】

5. IL-22RAポリペプチドの産生

完全長のポリペプチド;可溶性の単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体受容体;完全長の受容体;受容体断片(例えば、リガンド結合断片および抗原性エピートープ)、機能的断片、および融合タンパク質を含む本発明のポリペプチドは、通常の技術に従って組換え型宿主細胞において産生することができる。IL-22RA遺伝子を発現するために、ポリペプチドをコードする核酸分子を、発現ベクターにおける転写発現を制御する調節配列に機能的に結合させて、次に宿主細胞に導入しなければならない。プロモーターおよびエンハンサーのような転写調節配列の他に、発現ベクターには、翻訳調節配列および発現ベクターを有する細胞の選択にとって適したマーカー遺伝子が含まれうる。

40

【0116】

真核細胞において外来タンパク質を産生するために適した発現ベクターは典型的に、(1)細菌宿主における発現ベクターの増殖および選択を提供するための、細菌の複製開始点および抗生物質抵抗性マーカーをコードする原核細胞DNA要素、(2)プロモーターのよ

50

うな、転写の開始を制御する真核細胞DNA要素、および(3)転写終了/ポリアデニル化配列のような転写物のプロセッシングを制御するDNA要素を含む。先に考察したように、発現ベクターにはまた、異種ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路に向ける分泌配列をコードするヌクレオチド配列が含まれる。例えば、IL-22RA発現ベクターは、IL-22RA遺伝子と任意の分泌された遺伝子に由来する分泌配列とを含んでもよい。

【0117】

本発明のIL-22RAタンパク質は哺乳動物細胞において発現されてもよい。適した哺乳動物宿主細胞の例には、アフリカミドリザル腎細胞(Vero; ATCC CRL 1587)、ヒト胎児腎細胞(293-HEK; ATCC CRL 1573)、ベビーハムスター腎細胞(BHK-21、BHK-570; ATCC CRL 8544、ATCC CRL 10314)、イヌ腎細胞(MDCK; ATCC CCL 34)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasinら、Som. Cell Molec. Genet. 12: 555、1986))、ラット下垂体細胞(GH1; ATCC CCL82)、HeLa S3細胞(ATCC CCL2.2)、ラット肝腫細胞(H-4-II-E; ATCC CRL 1548)、SV40形質転換サル腎細胞(COS-1; ATCC CRL 1650)、およびマウス胚細胞(NIH-3T3; ATCC CRL 1658)が含まれる。

10

【0118】

哺乳動物宿主の場合、転写および翻訳調節シグナルは、調節シグナルが高レベル発現を有する特定の遺伝子に関連している、哺乳動物のウイルス起源、例えばアデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、シミアンウイルス等に由来してもよい。適した転写および翻訳調節配列はまた、例えばアクチン、コラーゲン、ミオシン、およびメタロチオネイン遺伝子から得ることができる。

20

【0119】

転写調節配列には、RNA合成の阻害を指示するために十分なプロモーター領域が含まれる。適した真核細胞プロモーターには、マウスメタロチオネイン1遺伝子のプロモーター(Hamerら、J. Molec. Appl. Genet. 1: 273 (1982))、ヘルペスウイルスのTKプロモーター(McKnight、Cell 31: 355 (1982))、SV40初期プロモーター(Benoistら、Nature 290: 304 (1981))、ラウス肉腫ウイルスプロモーター(Gormanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777 (1982))、サイトメガロウイルスプロモーター(Foeckingら、Gene 45: 101 (1980))、およびマウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター(一般的に、Etcheverry、"Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture."、Protein Engineering: Principles and Practice、Clelandら(編)、163~181頁(John Wiley & Sons Inc.、1996))が含まれる。

30

【0120】

または、原核細胞プロモーターが真核細胞プロモーターによって調節される場合、バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターのような原核細胞プロモーターを用いて、哺乳動物細胞におけるIL-22RA遺伝子発現を制御することができる(Zhouら、Mol. Cell Biol. 10: 4529 (1990)、およびKaufmanら、Nucle. Acids. Res. 19: 4485 (1991))。

【0121】

特定の態様において、IL-22RA可溶性受容体ポリペプチドをコードするDNA配列またはIL-22RAポリペプチドの断片は、発現ベクターにおいて、一般的に転写プロモーターおよびターミネーターを含むその発現にとって必要な他の遺伝子要素に機能的に結合する。ベクターはまた、一つまたはそれ以上の選択マーカーおよび一つまたはそれ以上の複製開始点を共通に含むが、当業者は特定のシステムにおいて選択マーカーが異なるベクターにおいて提供されてもよく、外因性DNAの複製は宿主細胞ゲノムに組み入れることによって提供してもよいと認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクターおよび他の要素の選択は、当業者のレベル内での普通的设计の問題である。そのような多くの要素が文献に記述されており、市販されている。可溶性受容体複合体の多数の成分を個々の発現ベクターに同時トランスフェクトさせる、または単一の発現ベクターに含めることができる。タンパク質複合体の多数の成分を発現させるそのような技術は当技術分野で周知である。

40

50

【0122】

発現ベクターは、リン酸カルシウムトランスフェクション、リボソーム媒介トランスフェクション、微小弾丸媒介輸送、電気穿孔等を含む多様な標準的な技法を用いて宿主細胞に導入することができる。トランスフェクトされた細胞は、宿主細胞ゲノムに安定に組み入れられた発現ベクターを含む組換え型宿主細胞を提供するために選択および増殖させることができる。ベクターを真核細胞に導入する技術、およびそのような安定な形質転換体を選択する技術は、例えばAusubel (1995) およびMurray (編) 「Gene Transfer and Expression Protocols」 (Humana Press、1991) に記述されている。

【0123】

例えば、一つの適した選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する抵抗性を提供する遺伝子である。この場合、選択は、G418等のようなネオマイシン型の薬剤の存在下で行われる。選択システムはまた、「増幅」と呼ばれるプロセスである対象遺伝子の発現レベルを増加させるために用いることができる。増幅は、低レベルの選択物質の存在下でトランスフェクタントを培養して、その後導入された遺伝子の産物を高レベルで産生する細胞を選択するために選択物質の量を増加させることによって行われる。適した増幅可能な選択マーカーは、メソトレキセートに対する抵抗性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) である。他の薬剤抵抗性遺伝子 (例えば、ヒグロマイシン抵抗性、多剤抵抗性、ピュロマイシンアセチルトランスフェラーゼ) も同様に用いることができる。または、緑色蛍光タンパク質のような変化した表現型を導入するマーカー、またはCD4、CD8、クラス I MHC、胎盤アルカリホスファターゼのような細胞表面タンパク質を用いて、FACSソーティングまたは磁気ビーズ分離技術のような手段によって、トランスフェクトした細胞を非トランスフェクト細胞からソーティングしてもよい。

【0124】

IL-22RAポリペプチドはまた、ウイルス輸送系を用いて培養哺乳動物細胞によって産生することができる。この目的の例としてのウイルスには、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノ随伴ウイルス (AAV) が含まれる。二本鎖DNAウイルスであるアデノウイルスは、異種核酸を輸送するために現在最もよく研究されている遺伝子移入ベクターである (論評に関しては、Beckerら、Meth. Cell Biol. 43: 161 (1994)、およびDouglas and Curiel、Science & Medicine 4: 44 (1997) を参照されたい)。アデノウイルス系の長所には、比較的大きいDNAインサートに適合できること、高い力価での増殖能、広範囲の哺乳動物細胞タイプへの感染能、および異なるプロモーターを含む利用可能な多数のベクターと共に用いることができる柔軟性が含まれる。

【0125】

アデノウイルスゲノムの一部を欠失させることによって、異種DNAのより大きいインサート (7 kbまで) を適合させることができる。これらのインサートは、直接ライゲーションまたは同時トランスフェクトしたプラスミドとの相同的組換えによって、ウイルスDNAに組み入れることができる。選択肢は、ウイルスベクターからの本質的なE1遺伝子を欠失させることであり、それによってE1遺伝子が宿主細胞によって提供されなければ複製することができない。アデノウイルスベクター感染ヒト293細胞 (ATCC CRL-1573、45504、45505) は、例えば、接着細胞としてまたは比較的高い細胞密度で浮遊培養として増殖させて、有意な量のタンパク質を産生することができる (Garnierら、Cytotechnol. 15: 145 (1994) を参照されたい)。

【0126】

IL-22RAはまた、トリ、真菌、昆虫、酵母、または植物細胞のような他のより高等真核細胞において発現させることができる。バキュロウイルスシステムは、クローニングしたIL-22RA遺伝子を昆虫細胞に導入するための効率的な手段を提供する。適した発現ベクターは、オートグラファ核多角体ウイルス (AcMNPV) に基づき、ショウジョウバエ熱ショックタンパク質 (hsp) 70プロモーター、オートグラファ核多角体ウイルス前初期遺伝子プロモーター (ie-1)、および遅延型初期39Kプロモーター、バキュロウイルスp10プロモーター

ター、およびショウジョウバエメタロチオネインプロモーターのような周知のプロモーターを含む。組換え型バキュロウイルスを作製する第二の方法は、Luckow (Luckowら、J. Virol. 67: 4566 (1993)) によって記述されるトランスポゾンに基づく系を利用する。転移ベクターを利用するこの系は、BAC-to-BACキット (Life Technologies (Life Technologies)、ロックビル、メリーランド州) において販売されている。この系は、IL-22RAポリペプチドをコードするDNAを、「バクミド」と呼ばれる大きいプラスミドとして大腸菌において維持されたバキュロウイルスゲノムにIL-22RAポリペプチドをコードするDNAを移動させるために、Tn7トランスポゾンを含む転移ベクターPFASTBAC (Life Technologies) を利用する。Hill-Perkins and Possee、J. Gen. Virol. 71: 971 (1990); Bonningら、J. Gen. Virol. 75: 1551 (1994)、およびChazenbalk and Rapoport、J. Biol. Chem. 270: 1543 (1995) を参照されたい。さらに、転移ベクターには、発現されたIL-22RAポリペプチドのC-またはN末端でエピトープタグ、例えばGlu-Gluエピトープタグ (Grussenmeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952 (1985)) をコードするDNAとのインフレーム融合体が含まれる。当技術分野で既知の技術を用いて、IL-22RA遺伝子を含む転移ベクターを、大腸菌において形質転換して、組換え型バキュロウイルスを示す中断されたlacZ遺伝子を含むバクミドに関してスクリーニングする。次に、組換え型バキュロウイルス遺伝子を含むバクミドDNAを一般的な技術を用いて単離する。

【0127】

例としてのPFASTBACベクターはかなりの程度まで改変することができる。例えば、ポリヘドリンプロモーターを除去して、バキュロウイルス感染の初期に発現され、分泌型タンパク質を発現するために都合がよいことが示されているバキュロウイルス塩基性タンパク質プロモーター (Pcor、p6.9、またはMPプロモーターとしても知られる) に置換することができる (例えば、Hill-Perkins and Possee、J. Gen. Virol. 71: 971 (1990); Bonningら、J. Gen. Virol. 75: 1551 (1994)、およびChazenbalk and Rapoport、J. Biol. Chem. 270: 1543 (1995) を参照されたい)。そのような転移ベクター構築物において、短いまたは長いバージョンの塩基性タンパク質プロモーターを用いることができる。その上、本来のIL-22RA分泌シグナル配列を昆虫タンパク質に由来する分泌シグナル配列に置換する転移ベクターを構築することができる。例えば、エクジステロイドグルコシルトランスフェラーゼ (EGT)、ミツバチのメリチン (Invitrogenコーポレーション (Invitrogen Corporation)、カールスバッド、カリフォルニア州)、またはバキュロウイルスgp67 (ファーマーミンゲン (PharMingen)、サンジエゴ、カリフォルニア州) からの分泌シグナル配列を、天然のIL-22RA分泌性シグナル配列の代わりに置換するために構築物において用いることができる。

【0128】

組換え型ウイルスまたはバクミドは宿主細胞をトランスフェクトするために用いられる。適した昆虫宿主細胞には、IPLB-sf-21、Sf9 (ATCC CRL 1711)、Sf21AE、およびSf21 (Invitrogen Corporation、サンジエゴ、カリフォルニア州) のようなスポドブレタ・フルギベルダ (Spodoptera frugiperda) サナギ卵巣細胞株と共に、ショウジョウバエSchneider-2細胞、およびトリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来するHIGH FIVE0細胞株 (Invitrogen) (米国特許第5,300,435号) が含まれる。市販の無血清培地を用いて細胞を増殖および維持することができる。適した培地は、Sf9細胞に関してSf900 II (商標) (Life Technologies) またはESF 921 (商標) (Expression systems) であり、およびT. ni細胞に関してはEx-Cell 0405 (商標) (JRH Biosciences、レネキサ、カンザス州) またはExpress Five0 (商標) (Life Technologies) である。組換え型ウイルスを用いる場合、細胞は典型的に約 $2 \sim 5 \times 10^5$ 個の接種密度から $1 \sim 2 \times 10^6$ 個までの密度で増殖させて、この時点で組換え型ウイルス保存液を感染多重度 (MOI) 0.1 ~ 10、より典型的にはほぼ3で加える。

【0129】

バキュロウイルス系において組換え型タンパク質を産生するために確立された技術は、Baileyら、「Manipulation of Baculovirus Vectors」、Methods in Molecular Biology

、第7巻：Gene Transfer and Expression Protocols、Murray（編）、147～168頁（Humana Press Inc.、1991）、Patelら、「The baculovirus expression system」、DNA Cloning 2：Expression systems、第二版、Gloverら（編）、205～244頁（Oxford University Press、1995）、Ausubel（1995）、16～37頁から16～57頁、Richardson（編）Baculovirus Expression Protocols（Humana Press Inc.、1995）およびLucknow、「Insect Cell Expression Technology」、Protein Engineering：Principles and Practice、Clelandら（編）、183～218頁（John Wiley & Sons Inc.、1996）によって提供される。

【0130】

酵母細胞を含む真菌細胞も同様に、本明細書に記述の遺伝子を発現させるために用いることができる。この点において特に重要である酵母種には、出芽酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）およびピチア・メタノリカ（*Pichia metanolica*）が含まれる。酵母における発現に適したプロモーターには、GAL1（ガラクトース）、PGK（ホスホグリセレートキナーゼ）、ADH（アルコールデヒドロゲナーゼ）、AOX1（アルコールオキシダーゼ）、HIS4（ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ）等が含まれる。多くの酵母クローニングベクターが設計されて、容易に入手できる。これらのベクターには、Ylp5のようなYlpに基づくベクター、YRp17のようなYRpベクター、YEp13のようなYEpベクター、およびYCp19のようなYCpベクターが含まれる。外因性のDNAによって出芽酵母細胞を形質転換して、そこから組換え型ポリペプチドを産生する方法は、例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号、Kawasakiら、米国特許第4,931,373号、Brake、米国特許第4,870,008号、Welchら、米国特許第5,037,743号、およびMurrayら、米国特許第4,845,075号に開示されている。形質転換細胞は、選択マーカーによって決定された表現型、一般的に薬剤抵抗性、または特定の栄養素（例えば、ロイシン）の非存在下での増殖能によって選択される。出芽酵母において用いるために適したベクター系は、Kawasakiら（米国特許第4,931,373号）によって開示される、グルコース含有培地における増殖によって形質転換細胞を選択することができるPOT1ベクター系である。酵母において用いるためにさらに適したプロモーターおよびターミネーターには、糖分解酵素遺伝子（例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号、Kingsmanら、米国特許第4,615,974号、およびBitter、米国特許第4,977,092号）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子からのプロモーターおよびターミネーターが含まれる。同様に、米国特許第4,990,446号、第5,063,154号、第5,139,936号、および第4,661,454号を参照されたい。

【0131】

ハンゼヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、シゾサッカロミセス・ボム（*Schizosaccharomyces pombe*）、クルイベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）、クルイベロミセス・フラギリス（*Kluyveromyces fragilis*）、ウスチラゴ・マイディス（*Ustilago maydis*）、ピチア・パストリス、ピチア・メタノリカ、ピチア・ギラーモンディ（*Pichia guilliermondii*）およびカンジダ・マルトーサ（*Candida maltosa*）を含む他の酵母の形質転換系が当技術分野で既知である。例えば、Gleesonら、J. Gen. Microbiol. 132：3459（1986）、およびCregg、米国特許第4,882,279号を参照されたい。McKnightらの米国特許第4,935,349号の方法に従って、アスペルギルス（*Aspergillus*）細胞を利用してもよい。アクレモニウム・クリソゲナム（*Acremonium chrysogenum*）を形質転換する方法は、Suminoらの米国特許第5,162,228号によって開示される。ニューロスボラ（*Neurospora*）を形質転換する方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号に開示されている。

【0132】

例えば、組換え型タンパク質を産生するための宿主としてピチア・メタノリカを用いることは、Raymondの米国特許第5,716,808号、Raymondの米国特許第5,736,383号、Raymondら、Yeast 14：11～23（1998）、および国際公開公報第97/17450号、国際公開公報第97/17451号、国際公開公報第98/02536号、および国際公開公報第98/02565号に開示されている。P.メタノリカを形質転換するために用いられるDNA分子は、一般的に二本鎖の環状プラスミドとして調製され、これを好ましくは形質転換の前に直線状にする。P.メタノリカにおけるポリペプチド産生に関して、プラスミドにおけるプロモーターおよびターミネータ

ーは、P.メタノリカルアルコール利用遺伝子（AUG1またはAUG2）のような、P.メタノリカ遺伝子のプロモーターおよびターミネーターとなりうる。他の有用なプロモーターには、ジヒドロキシアセトンシンターゼ（DHAS）、蟻酸デヒドロゲナーゼ（FMD）、およびカタラーゼ（CAT）遺伝子のプロモーターが含まれる。宿主染色体へのDNAの組み込みを促進するために、両端に宿主DNA配列が隣接するプラスミドの完全な発現セグメントを有することが好ましい。ピチア・メタノリカにおいて用いるために適した選択マーカーは、ホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ（AIRC；EC 4.1.1.21）をコードして、ade2細胞をアデニンの非存在下で増殖させるP.メタノリカADE2遺伝子である。メタノールの使用を最小限にすることが望ましい大規模工業的プロセスの場合、メタノール利用遺伝子（ATG1およびAUG2）がいずれも欠失した宿主細胞を用いることができる。分泌型タンパク質を産生する場合、宿主細胞は、液胞プロテアーゼ遺伝子（PEP4およびPRB1）が欠損となりうる。対象ポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドのP.メタノリカ細胞への導入を促進するために、電気穿孔を用いることができる。P.メタノリカ細胞は、電場強度2.5～4.5 kV/cm、好ましくは約3.75 kV/cm、および時定数（ t ）1～40ミリ秒、最も好ましくは約20ミリ秒の指数的に減衰するパルス電場を用いる電気穿孔によって形質転換することができる。

10

【0133】

発現ベクターはまた、植物プロトプラスト、無傷の植物組織、または単離植物細胞に導入することができる。発現ベクターを植物組織に導入する方法には、植物組織をアグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）の直接感染または同時培養すること、微小弾丸媒介輸送、DNA注入、電気穿孔等が含まれる。例えば、Horschら、*Science* 227：1229（1985）、Kleinら、*Biotechnology* 10：268（1992）、およびMikiら、「Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants」、*Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*、Glickら（編）、67～88頁（CRC出版、1993）を参照されたい。

20

【0134】

または、IL-22RA遺伝子は原核宿主細胞において発現させることができる。原核細胞宿主においてIL-22RAポリペプチドを発現させるために用いることができる適したプロモーターは、当業者に周知であり、T4、T3、Sp6、およびT7ポリメラーゼを認識することができるプロモーター、バクテリオファージの P_R および P_L プロモーター、大腸菌の trp 、 $recA$ 、熱ショック、 $lacUV5$ 、 tac 、 $lpp-lacSpr$ 、 $phoA$ 、および $lacZ$ プロモーター、枯草菌（*B. subtilis*）のプロモーター、バチルス（*Bacillus*）のバクテリオファージプロモーター、ストレプトミセス（*Streptomyces*）プロモーター、バクテリオファージの int プロモーター、pBR32の bla プロモーター、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターが含まれる。原核細胞プロモーターは、Glick、*J. Ind. Microbiol.* 1：277（1987）、Watsonら、*Molecular Biology of the Gene*、第4版（Benjamin/Cummins、1987）、およびAusubelら（1995）によって論評されている。

30

【0135】

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

40

【0136】

大腸菌のような細菌においてIL-22RAポリペプチドを発現する場合、ポリペプチドは、典型的に不溶性の顆粒として細胞質に留まるか、または細菌分泌配列によってペリプラスム間隙に向けられる可能性がある。前者の場合、細胞を溶解して顆粒を回収し、例えばグ

50

アニジンイソチオシアネートまたは尿素を用いて変性させる。次に、変性されたポリペプチドを再生して尿素溶液ならびに還元および酸化グルタチオンの混合物に対して透析した後に、緩衝生理食塩液に対して透析するような、変性剤を希釈することによって二量体形成させる。後者の場合、ポリペプチドは、細胞を破壊して、ペリプラスム腔の内容物を放出させることによって可溶性の機能的な型でペリプラスム腔から回収して、タンパク質を回収することができ、それによって変性および再生の必要がなくなる。

【0137】

原核細胞宿主においてタンパク質を発現させる方法は当業者に周知である（例えば、Williamsら、「Expression of foreign protein in E. coli. using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies.」、「DNA Cloning 2: Expression Systems」、第二版、Gloverら（編）、15頁（Oxford University Press、1995）、Wardら「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies」、Monoclonal Antibodies: Principles and Applications、137（Wiley-Liss Inc.、1995）、およびGeorgiou、「Expression of Proteins in Bacteria.」、Protein Engineering: Principles and Practice、Clelandら（編）、101頁（John Wiley & Sons Inc.、1996）を参照されたい）。10

【0138】

発現ベクターを細菌、酵母、昆虫、および植物細胞に導入する標準的な方法は、例えば、Ausubel（1995）によって提供される。

【0139】

哺乳動物細胞系によって産生された外来タンパク質を発現および回収する一般的な方法は、例えば、Etcheverry、「Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture.」、Protein Engineering: Principles and Practice、Clelandら（編）163頁（Wiley-Liss Inc.、1996）によって提供される。細菌系において産生されたタンパク質を回収する標準的な技術は、例えばGrisshammerら、「Purification of over-produced proteins from E. coli cells.」、DNA Cloning 2: Expression Systems、第二版、Gloverら（編）、59～92頁（Oxford University Press、1995）によって提供される。バキュロウイルス系から組換え型タンパク質を単離する確立された方法は、Richardson（編）、「Baculovirus Expression Protocols」（The Humana Press Inc.、1995）に記述される。20

【0140】

もう一つの方法として、本発明のポリペプチドは、固相合成のみ、部分的固相合成法、断片の縮合または古典的な溶液合成によって合成することができる。これらの合成法は当業者に周知である（例えば、Merrifield、J. Am. Chem. Soc. 85: 2149（1963）、Stewartら「Solid Phase Peptide Synthesis」、第二版（Pierce Chemical、1984）、Bayer and Rapp、Chem. Pept. Prot. 3: 3（1986）、Athertonら、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach（IRL Press、1989）、Fields and Colowick、「Solid-Phase Peptide Synthesis」、Methods in Enzymology 第289巻（Academic Press、1997）、およびLloyd-Williamsら、「Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins.」（CRC Press Inc.、1997）を参照されたい）。「天然の化学物質ライゲーション」および「発現タンパク質ライゲーション」のような全化学合成戦略の変法も同様に標準である（例えば、Dawsonら、Science 266: 776（1994）、Hackengら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7845（1997）、Dawson、Methods Enzymol. 287: 34（1997）、Muirら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6705（1998）、およびSeverinov and Muir、J. Biol. Chem. 273: 16205（1998）を参照されたい）。30 40

【0141】

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、配列番号：3の少なくとも6、少なくとも9、または少なくとも15連続アミノ酸残基を含む。説明として、ポリペプチドは、配列番号：3の少なくとも6、少なくとも9、または少なくとも15連続アミノ酸残基を含みうる。本発明の特定の態様において、ポリペプチドは、これらのアミノ酸配列の20、30、40、50、100またはそれ以上の隣接残基を含む。そのようなペプチドおよびポリペプチドをコードする核酸分子は、ポリメラーゼ連鎖反応のプライマーおよびプローブとして有用である。50

【0142】

その上、IL-22RAポリペプチドおよびその断片は、高等真核細胞において、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体として発現されうる。そのような細胞を用いて、少なくとも一つのIL-22RAポリペプチドを含むIL-22RA単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体および多量体受容体ポリペプチド（「IL-22RAを含む受容体」、もしくは「IL-22RAを含む受容体ポリペプチド」）を産生することができる、またはスクリーニング系におけるアッセイ細胞として用いることができる。本発明の一つの局面において、IL-22RA細胞外ドメインを含む本発明のポリペプチドは、培養細胞によって産生され、細胞を用いて、天然のリガンドIL-22と共に天然のリガンドのアゴニストおよびアンタゴニストを含む、受容体のリガンドに関してスクリーニングする。このアプローチを要約するために、受容体をコードするcDNAまたは遺伝子を、その発現を必要とする他の遺伝子要素（例えば、転写プロモーター）と組み合わせて、得られた発現ベクターを宿主細胞に挿入する。DNAを発現して、機能的受容体を産生する細胞を選択して、これを多様なスクリーニング系において用いる。単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体および多量体受容体複合体のそれぞれの成分を、同じ細胞において発現させることができる。その上、単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体および多量体受容体複合体の成分はまた、膜貫通ドメインまたは他の膜融合部分と融合させて、上記のように複合体を構築させ、およびトランスフェクタントをスクリーニングすることができる。

10

【0143】

本発明のIL-20およびIL-22アンタゴニストポリペプチドおよび抗体をアッセイするために、IL-22RAを含む受容体またはIL-20もしくはIL-22に結合することが知られている他の受容体を発現するために（例えば、IL-22RA/CRF2-4；およびIL-20RA、IL-20RB、IL-22RA/IL-20RB、またはIL-20RA/IL-20RBを発現する細胞）、および受容体媒介シグナルを伝達するために用いるために適した哺乳動物細胞には、IL-22RA（またはIL-20RA）と機能的複合体を形成する可能性がある他の受容体サブユニットを発現する細胞が含まれる。これらのサブユニットには、インターフェロン受容体ファミリーのサブユニット、または他のクラスIIもしくはクラスIサイトカイン受容体、例えばCRF2-4（Genbankアクセッション番号Z17227）、IL-10R（Genbankアクセッション番号U00672およびNM_001558）、IL-22RA（共有される米国特許第5,965,704号）、zcytor7（IL-20RA）（共有される米国特許第5,945,511号）、IL-20RA/IL-20RB（WIPO国際公開公報第01/46232号）およびIL-9Rのサブユニットが含まれてもよい。同様に、発現される受容体と同じ種からの細胞を用いることが好ましい。好ましい態様において、細胞は、その増殖のために外から供給された造血増殖因子に依存する。このタイプの好ましい細胞株は、GM-CSF依存的ヒト白血病細胞株であるヒトTF-1細胞株（ATCC番号CRL-2003）およびAML-193細胞株（ATCC番号CRL-9589）、ならびにIL-3依存的マウスプレB細胞株であるBaF3（Palacios and Steinmetz, Cell 41:727~734（1985））である。他の細胞株には、BHK、COS-1、およびCHO細胞が含まれる。適した宿主細胞は、所望の細胞反応にとって必要な受容体サブユニットまたは他の細胞成分を産生するように操作することができる。このアプローチは、細胞株を如何なる種からの受容体サブユニットも発現するように操作することができ、それによって種特異性のために生じる可能性がある制限を克服することから都合がよい。ヒト受容体cDNAの種オルトログをクローニングして、BaF3細胞株におけるマウスcDNAのように、同じ種からの細胞株において用いることができる。GM-CSFまたはIL-3のような一つの造血増殖因子に依存する細胞株は、このように、IL-22のような、IL-22RA受容体を通して作用するもう一つのサイトカインに依存するようになるように操作することができる。

20

30

40

【0144】

機能的受容体を発現する細胞は、スクリーニングアッセイにおいて用いられる。多様な適したアッセイが当技術分野で既知である。これらのアッセイは、標的細胞における生物反応の検出に基づく。そのような一つのアッセイは細胞増殖アッセイである。細胞を試験化合物の存在下または非存在下で培養して、細胞増殖を例えば、トリチウムチミジンの取り込みの測定によって、または3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラ

50

ゾリウムブロミド (MTT) の代謝的分解に基づく比色アッセイによって検出する (Mosman、J. Immunol. Meth. 65: 55~63 (1983))。もう一つのアッセイフォーマットは、レポーター遺伝子を発現するようにさらに操作された細胞を利用する。レポーター遺伝子を受容体媒介経路に対して反応するプロモーター要素に結合させて、アッセイはレポーター遺伝子の転写の活性化を検出する。この点において好ましいプロモーター要素は、血清反応要素またはSREである。例えばShawら、Cell 56: 563~572 (1989) を参照されたい。そのような好ましいレポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である (de Wetら、Mol. Cell Biol. 7: 725 (1987))。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当技術分野で既知の方法を用いて発光によって検出する (例えば、Baumgartnerら、J. Biol. Chem. 269: 29094~29101 (1994); Schenborn and Goiffin、Promega Notes 41: 11、1993)。ルシフェラーゼ活性アッセイキットは、例えばウィスコンシン州マディソンのPromega社から販売されている。このタイプの標的細胞株は、化学物質のライブラリ、細胞培養後の条件培地、真菌ブロス、土壌試料、水試料等をスクリーニングするために用いることができる。例えば、一連の細胞条件培地試料を標的細胞において、リガンドを産生する細胞を同定するためにアッセイすることができる。次に、陽性細胞を用いて、哺乳動物発現ベクターにおけるcDNAライブラリを作製して、これをプールに分けて、宿主細胞にトランスフェクトして、発現させる。次に、トランスフェクトした細胞からの培地試料をアッセイして、その後プールに分割して、再度トランスフェクションして、サブ培養し、陽性細胞に関して再度アッセイして、リガンドをコードするクローニングしたcDNAを単離する。

10

20

【0145】

いくつかのIL-20反応性細胞株が当技術分野で既知であるか、または例えばBaf3/DIRS1/cytoR11細胞株 (WIPO公開番号国際公開公報第02/072607号) を構築することができる。その上、いくつかのIL-22反応性細胞株 (Dumontierら、J. Immunol. 164: 1814~1819、2000; Dumoutier, L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 10144~10149、2000; Xie MHら、J. Biol. Chem. 275: 31335~31339、2000; Kotenko SVら、J. Biol. Chem. 276: 2725~2732、2001) と共にIL-22受容体サブユニットIL-22RAを発現する細胞株が既知である。例えば、以下の細胞はIL-22に対して反応性である: TK-10 (Xie MHら、上記) (ヒト腎癌); SW480 (ATCC CCL-228) (ヒト結腸腺癌); HepG2 (ATCC HB-8065) (ヒト肝癌); PC12 (ATCC CRL-1721) (マウス神経細胞モデル; ラットクロム親和性細胞腫); およびMES13 (ATCC CRL-1927) (マウス腎メサングイウム細胞株)。さらに、IL-22RA (IL-22受容体) を発現するいくつかの細胞株も同様にIL-22に対して反応性の細胞株の候補体である: A549 (ATCC CCL-185) (ヒト肺癌); G-361 (ATCC CRL-1424) (ヒト黒色腫); およびCaki-1 (ATCC HTB-46) (ヒト腎癌)。さらに、IL-22反応性細胞株、例えば本明細書に記述のBaf3/cytoR11/CRF2-4細胞株を構築することができる (WIPO公開番号国際公開公報第02/12345号)。これらの細胞は、IL-20もしくはIL-22アンタゴニスト、または抗炎症因子としてIL-22RAの機能性を評価するためにアッセイにおいて用いることができる。

30

【0146】

本発明によって提供されるさらなるスクリーニングアプローチには、ハイブリッド受容体ポリペプチドを用いることが含まれる。これらのハイブリッドポリペプチドは、二つの一般的なクラスに分けられる。第一のクラスにおいて、IL-22RAの細胞内ドメインを第二の受容体のリガンド結合ドメインに結合させる。ハイブリッド受容体ポリペプチドの第二のクラスは、第二の受容体の細胞内ドメイン、好ましくは造血性サイトカイン受容体、および膜貫通ドメインと共にIL-22RA (配列番号: 3) の細胞外 (リガンド結合) ドメインを含む。本発明のこの第二のクラスの受容体のハイブリッドIL-22RA単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、および多量体は、第二の受容体によって伝達されるシグナルに反応することができることが知られている細胞において発現される。共に、これらの二つのクラスのハイブリッド受容体は、IL-22またはIL-20を検出するためのアッセイの開発にとって反応性細胞タイプの同定を可能にする。その上、そのような細胞は、IL-22またはIL-20の存在下で、競合型アッセイにおいて本発明の可溶性の受容体アンタゴニストをアッセイするために、用いることができる。そのようなアッセイにおいて、本発明の可溶性受容体の存在

40

50

下でIL-22またはIL-20の増殖またはシグナル伝達活性が減少すれば、アンタゴニスト活性を示している。その上、IL-22RA可溶性受容体結合アッセイ、細胞に基づくアッセイも同様に用いて、可溶性受容体がIL-22またはIL-20に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するか否かを評価することができる。

【0147】

6. IL-22RA融合タンパク質および共役体の産生

IL-22RA類似体の一つの一般的なクラスは、本明細書に開示のアミノ酸配列の変異であるアミノ酸配列を有する変種である。もう一つの一般的なクラスのIL-22RA類似体は、下記のように、抗イディオタイプ抗体、およびその断片によって提供される（例えば、Monfardiniら、*Proc. Assoc. Am. Physicians* 108:420 (1996)を参照されたい）。抗イディオタイプIL-22RA抗体の可変ドメインは、IL-22RAを模倣することから、これらのドメインはIL-22RA結合活性を提供することができる。抗イディオタイプ触媒抗体を産生する方法は当業者に既知である（例えば、Joronら、*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 672:216 (1992)、Fribouletら、*Appl. Biochem. Biotechnol.* 47:229 (1994)およびAvalleら、*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 864:118 (1998)を参照されたい）。

10

【0148】

IL-22RA類似体を同定するもう一つのアプローチは、組み合わせライブラリを用いることによって提供される。ファージディスプレイおよび他の組み合わせライブラリを構築してスクリーニングする方法は、例えば、Kayら、*Phage Display of Peptides and Proteins* (Academic Press, 1996)、Verdine、米国特許第5,783,384号、Kayら、米国特許第5,747,334号、およびKaufmannら、米国特許第5,723,323号によって提供される。

20

【0149】

IL-22RAポリペプチドはインビボおよびインビトロの双方での用途を有する。一例として、可溶性型のIL-22RAを細胞培養培地に加えて、培養細胞によって産生されたIL-22RAリガンドの作用を阻害することができる。

【0150】

IL-22RAの融合タンパク質を用いて、組換え型宿主においてIL-22RAを発現させる、および産生されたIL-22RAを単離することができる。下記のように、特定のIL-22RA融合タンパク質も同様に診断および治療において用いられる。一つのタイプの融合タンパク質は、組換え型宿主細胞からIL-22RAポリペプチドを誘導するペプチドを含む。IL-22RAポリペプチドを真核宿主細胞の分泌経路に向けるために、分泌シグナル配列（シグナルペプチド、リーダー配列、プレプロ配列またはプレ配列としても知られる）をIL-22RA発現ベクターに提供する。分泌シグナル配列はIL-22RAに由来してもよいが、適したシグナル配列はまた、もう一つの分泌タンパク質に由来してもよく、またはデノボで合成してもよい。分泌シグナル配列は、二つの配列が正確な読み取り枠において結合して、新しく合成されたポリペプチドを宿主細胞の分泌経路に向けるように配置されるように、IL-22RAコード配列に機能的に結合する。分泌シグナル配列は一般的に、対象ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して5'に存在するが、特定の分泌シグナル配列は、対象ヌクレオチド配列に対して何処に存在してもよい（例えば、Welchら、米国特許第5,037,743号；Hollandら、米国特許第5,143,830号を参照されたい）。

30

40

【0151】

IL-22RAまたは哺乳動物細胞によって産生されたもう一つのタンパク質（例えば、米国特許第5,641,655号に記述されるように、例えば組織型プラスミノゲン活性化因子シグナル配列）の分泌シグナル配列は、組換え型哺乳動物宿主においてIL-22RAの発現にとって有用であるが、酵母シグナル配列は、酵母細胞における発現にとって好ましい。適した酵母シグナル配列の例は、酵母接合フェロモン-因子（MF1遺伝子）、インベルターゼ（SUC2遺伝子によってコードされる）または酸ホスファターゼ（PHO5遺伝子によってコードされる）に由来する配列である。例えばRomanosら、「*Expression of Cloned Genes in Yeast*」、DNA Cloning 2: A Practical Approach、第二版、Glover and Hames（編）、123~167頁（Oxford University Press, 1995）を参照されたい。

50

【0152】

IL-22RA可溶性受容体ポリペプチドは、細胞外ドメイン、例えば配列番号：3を含むポリペプチド、またはヒト以外の受容体の対応する領域をコードする切断型DNAを発現させることによって調製することができる。細胞外ドメインポリペプチドは、実質的に膜貫通セグメントおよび細胞内ポリペプチドセグメントを含まない形で調製されることが好ましい。宿主細胞から受容体ドメインの輸出を指示するために、受容体DNAを、t-PA分泌ペプチドのような分泌ペプチドをコードする第二のDNAセグメントに結合させる。分泌された受容体ドメインの精製を容易にするために、ポリヒスチジンタグ、サブスタンスP、Flag（商標）ペプチド（Hoppeら、Biotechnology 6：1204～1210（1988）；コネチカット州ニューヘブンのEastman Kodak. Co.から販売）のようなC-末端伸長物、またはそれに対する抗体もしくは他の特異的結合物質が利用できる他のポリペプチドもしくはタンパク質を、受容体ポリペプチドに融合させることができる。その上、細胞外サイトカイン結合ドメインからのIL-22RA抗原性エピトープも同様に上記のように調製される。

【0153】

もう一つのアプローチにおいて、IL-22RAまたは他のクラスIもしくはIIサイトカイン受容体成分の受容体細胞外ドメインは、免疫グロブリン重鎖定常領域、典型的に二つの定常領域ドメインとヒンジ領域を含むが可変領域を欠損する（Sledziewski, AZら、米国特許第6,018,026号および第5,750,375号を参照されたい）Fc断片との融合体として発現させることができる。本発明の可溶性IL-22RAポリペプチドにはそのような融合体が含まれる。そのような融合体の一つを配列番号：4に示す。そのような融合体は典型的に、Fc部分が互いにジスルフィド結合して、二つの受容体ポリペプチドが互いに非常に近位に整列する、多量体分子として分泌される。このタイプの融合体は、溶液から同源のリガンドをアフィニティ精製するために、インビトロアッセイツールとして、リガンドを特異的に滴定することによってインビトロでのシグナルを遮断、阻害、または減少させるために、およびそれらを非経口投与によって投与して循環中のリガンドに結合させ、それを循環中から排泄させることによって、インビボでアンタゴニストとして用いることができる。リガンドを精製するために、IL-22RA-Igキメラを、リガンド（例えば、細胞条件培地、または組織抽出物）を含む試料に受容体-リガンド結合を促進する条件（典型的に、生理的温度、pH、およびイオン強度に近い）で加える。次に、キメラ-リガンド複合体を、固相支持体（例えば、不溶性の樹脂ビーズ）に固定したプロテインAを用いて混合することによって分離する。次に、リガンドを、塩またはpH勾配のような通常の化学的技術を用いて溶出する。もう一つの方法において、キメラ自身を固相支持体に結合させて、上記のように結合および溶出を行うことができる。キメラはインビボで、血清アミロイドA（SAA）、C-反応性タンパク質（CRP）等のような急性期反応を含む炎症反応を調節するために用いてもよい。結合親和性が高いキメラを非経口投与する（例えば、筋肉内、皮下、または静脈内注射）。循環中の分子はリガンドに結合して、正常な生理的プロセスによって循環中から排泄される。アッセイにおいて用いるために、キメラをFc領域によって支持体に結合させて、ELISAフォーマットで用いる。

【0154】

本発明の抗IL-22RAおよび結合パートナーの単離を補助するために、リガンド結合受容体（または抗体、相補体／抗相補体対の一つのメンバー）、またはその結合断片、および市販のバイオセンサー機器（BIA Core、Pharmacia Biosensor、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）を利用するアッセイ系を用いると都合がよいかも知れない。そのような受容体、抗体、相補体／抗相補体対のメンバーまたは断片を受容体チップ表面に固定する。この機器を用いることはKarlsson、J. Immunol. Methods 145：229～40、1991およびCunningham and Wells、J. Mol. Biol. 234：554～63、1993によって開示されている。受容体、抗体、メンバー、または断片は、アミンまたはスルフヒドリル化学を用いて、フローセル内で金フィルムに結合しているデキストラン繊維に共有結合する。試験試料をセルの中に通過させる。リガンド、エピトープ、または相補体／抗相補体対の反対のメンバーが試料中に存在する場合、固定された受容体、抗体、またはメンバーにそれぞれ結合して、培

地の屈折指数の変化を引き起こし、これを金フィルムの表面プラズモン共鳴の変化として検出する。この系は、オンおよびオフ率の決定を可能にし、そこから結合親和性を計算することができ、結合の化学量論を評価することができる。または、SELDI (TM) 技術 (Ciphergen Inc.、パロアルト、カリフォルニア州) を用いてリガンド / 受容体結合を分析することができる。その上、上記のBIACORE技術は、異なるモノクローナル抗体がIL-22RAポリペプチド上で同じまたは異なるエピトープに結合するか否かを決定するために、競合実験において用いることができ、そのため、IL-22またはIL-20とIL-22の双方に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または減少させる本発明の中和抗体のエピトープマッピングにおいて役立つように用いることができる。

【 0 1 5 5 】

リガンド結合受容体ポリペプチドも同様に、当技術分野で既知の他のアッセイ系において用いることができる。そのようなシステムには、結合親和性を決定するためのスキャッチャード分析 (Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51 : 660 ~ 72, 1949) および熱量アッセイ (Cunninghamら、Science 253 : 545 ~ 48, 1991 ; Cunninghamら、Science 245 : 821 ~ 25, 1991) が含まれる。

【 0 1 5 6 】

本発明はさらに、多様な他のポリペプチド融合体および一つまたはそれ以上のポリペプチド融合体を含む関連する多量体タンパク質を提供する。例えば、可溶性IL-22RA受容体は、米国特許第5,155,027号および第5,567,584号に開示される二量体形成タンパク質との融合体として調製することができる。この点において好ましい二量体形成タンパク質には、免疫グロブリン定常領域ドメイン、例えばIgG 1、およびヒト 軽鎖が含まれる。免疫グロブリン溶解性IL-22RA融合体を、遺伝子操作細胞において発現させて、多様な多量体IL-22RA受容体類似体を産生することができる。補助ドメインを可溶性IL-22RA受容体に融合させて、それらを特定の細胞、組織、または高分子 (例えば、コラーゲン、またはIL-22RAリガンド、IL-22またはIL-20を発現する細胞) にターゲティングすることができる。IL-22RAポリペプチドは、精製のためのアフィニティタグとターゲティングドメインのような、二つまたはそれ以上の部分に融合させることができる。ポリペプチド融合体はまた、特にドメイン間に一つまたはそれ以上の切断部位を含みうる。Tuanら、Connective Tissue Research 34 : 1 ~ 9, 1996を参照されたい。

【 0 1 5 7 】

細菌細胞において、毒性を減少させるため、安定性を増加させるため、および発現されたタンパク質の回収を増強するために、融合タンパク質として異種タンパク質を発現させることがしばしば望ましい。例えば、IL-22RAは、グルタチオンS-トランスフェラーゼポリペプチドを含む融合タンパク質として発現させることができる。グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質は典型的に可溶性であり、グルタチオンカラムに固定した大腸菌溶解物から容易に精製可能である。類似のアプローチにおいて、マルトース結合タンパク質ポリペプチドを含むIL-22RA融合タンパク質は、アミロース樹脂カラムによって単離することができるが、切断型プロテインA遺伝子のC-末端を含む融合タンパク質は、IgG-セファロースを用いて精製することができる。細菌細胞において融合タンパク質として異種ポリペプチドを発現するための確立された技術は、例えば、Williamsら、「Expression of Foreign Proteins in E. coli. Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies.」、DNA Cloning 2 : A Practical Approach、第二版、Glover and Hames (編)、15 ~ 58頁 (Oxford University Press, 1995) によって記述される。さらに、市販の発現系が利用可能である。例えば、PINPOINT Xaタンパク質精製システム (プロメガコーポレーション ; マディソン、ウィスコンシン州) は、発現の際にピオチン化されるようになるポリペプチドと、アビジンを含む樹脂とを含む融合タンパク質を単離する方法を提供する。

【 0 1 5 8 】

原核細胞または真核細胞のいずれかによって発現される異種ポリペプチドを単離するために有用であるペプチドタグには、ポリヒスチジンタグ (ニッケルキレート樹脂に対して

10

20

30

40

50

親和性を有する)、c-mycタグ、カルモジュリン結合タンパク質(カルモジュリンアフィニティークロマトグラフィーによって単離される)、サブスタンスP、RYIRSタグ(抗RYIRS抗体に結合する)、Glu-Gluタグ、およびFLAGタグ(抗FLAG抗体に結合する)が含まれる。例えば、Luoら、Arch. Biochem. Biophys. 329:215(1996)、Morgantiら、Biotechnol. Appl. Biochem. 23:67(1996)、およびZhengら、Gene 186:55(1997)を参照されたい。そのようなペプチドタグをコードする核酸分子は、例えばSigma-Aldrich Corporation(セントルイス、ミズーリ州)から利用可能である。

【0159】

もう一つの型の融合タンパク質は、IL-22RAポリペプチド、および免疫グロブリン重鎖定常領域、典型的に二つまたは三つの定常領域ドメインおよびヒンジ領域を含むが可変領域を欠損するFc断片を含む。一例として、Changらの米国特許第5,723,125号はヒトインターフェロンとヒト免疫グロブリンFc断片とを含む融合タンパク質を記述する。インターフェロンのC-末端を、ペプチドリンカー部分によって、Fc断片のN末端に結合させる。ペプチドリンカーの例は、免疫学的に不活性である主にT細胞不活性配列を含むペプチドである。例としてのペプチドリンカーは、アミノ酸配列GGSGG SGGGG SGGGG S(配列番号:9)を有する。この融合タンパク質において、例としてのFc部分はヒト 4鎖であり、これは溶液中で安定で、ほとんどまたは全く補体活性化活性を有しない。したがって、本発明は、配列番号:4のアミノ酸配列を含むペプチドのように、IL-22RA部分のC-末端がペプチドリンカーによってFc断片のN末端に結合している。IL-22RA部分とヒトFc断片とを含むIL-22RA融合タンパク質を企図する。IL-22RA部分は、IL-22RA分子またはその断片となりうる。例えば、融合タンパク質は配列番号:3のアミノ酸とFc断片(例えば、ヒトFc断片)とを含みうる(配列番号:4)。

【0160】

もう一つの変種において、IL-22RA融合タンパク質は、IgG配列、IgG配列のアミノ末端に共有結合させたIL-22RA部分、およびIL-22RA部分のアミノ末端に共有結合させたシグナルペプチドを含み、IgG配列は以下の要素が以下の順からなる:ヒンジ領域、CH₂ドメイン、およびCH₃ドメイン。したがって、IgG配列はCH₁ドメインを欠損する。IL-22RA部分は、IL-22RAリガンドとの結合能のような、本明細書に記述のIL-22RA活性を示す。抗体と非抗体部分の双方を含む融合タンパク質を産生するためのこの一般的なアプローチは、LaRocheら、欧州特許第742830号(国際公開公報第95/21258号)に記述されている。

【0161】

IL-22RA部分とFc部分とを含む融合タンパク質は、例えば、インビトロアッセイツールとして用いることができる。例えば、生物試料におけるIL-22RAリガンドの存在はIL-22RA免疫グロブリン融合タンパク質を用いて検出することができるが、このタンパク質では、IL-22RA部分がリガンドを結合させるために用いられ、および固相支持体に対して融合タンパク質を結合させるために、プロテインAまたは抗Fc抗体のような高分子が用いられる。そのようなシステムは、アゴニスト、およびIL-22RAリガンド、例えばIL-22またはIL-20およびIL-22の双方のその受容体に対する結合を妨害するアンタゴニストを同定するために用いることができる。

【0162】

抗体融合タンパク質の他の例には、抗原結合ドメインとIL-22RA細胞外ドメインを含むIL-22RA断片とを含むポリペプチドが含まれる。そのような分子は、IL-22RA結合活性の利益が得られるように特定の組織にターゲティングするために用いることができる。

【0163】

本発明はさらに、多様な他のポリペプチド融合体を提供する。例えば、生物機能を付与するドメインの一部または全てを、もう一つのサイトカイン受容体ファミリーメンバーからの機能的に同等なドメインを有する本発明のIL-22RAの間で交換することができる。ポリペプチド融合体は、多様なIL-22RA融合類似体を産生するために、組換え型宿主細胞において発現させることができる。IL-22RAポリペプチドは、精製のためのアフィニータグおよびターゲティングドメインのような、二つまたはそれ以上の部分またはドメインに

融合させることができる。ポリペプチド融合体はまた、特にドメイン間に一つまたはそれ以上の切断部位を含みうる。例えばTuanら、Connective Tissue Research 34 : 1 (1996) を参照されたい。

【 0 1 6 4 】

融合タンパク質は、融合タンパク質のそれぞれの成分を調製して、それらを化学的に結合させることによって、当業者に既知の方法によって調製することができる。または、融合タンパク質の双方の成分を適切な読み取り枠においてコードするポリヌクレオチドを、既知の技術を用いて産生させて、本明細書に記述の方法によって発現させることができる。融合タンパク質の酵素および化学的切断の一般的な方法は、例えばAusubel (1995) の16 ~ 19頁から16 ~ 25頁によって記述される。

10

【 0 1 6 5 】

IL-22RA結合ドメインはさらに、IL-22RAリガンドアゴニストの推定の接触部位アミノ酸の変異と共に、核磁気共鳴、結晶学、電子回折、または光親和性標識のような技術によって決定されるように、物理的な構造分析によって特徴を調べることができる。例えば、de Vosら、Science 255 : 306 (1992)、Smithら、J. Mol. Biol. 224 : 899 (1992)、およびWlodaverら、FEBS Lett. 309 : 59 (1992) を参照されたい。

【 0 1 6 6 】

本発明はまた、IL-22RAポリペプチドがポリマーに結合している化学改変IL-22RA組成物を企図する。例としてのIL-22RAポリペプチドは、配列番号 : 3のアミノ酸残基からなるポリペプチドのような、機能的膜貫通ドメインを欠損する可溶性ポリペプチドである。典型的に、ポリマーはIL-22RA結合体が、生理的環境のような水性環境において沈殿しないように水溶性である。適したポリマーの例は、アシル化のための活性なエスエル、またはアルキル化のためのアルデヒドのような、単一の反応基を有するように改変されているポリマーである。このようにして、重合化の程度を制御することができる。反応性アルデヒドの例は、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはモノ-(C1-C10)アルコキシ、またはそのアリアルオキシ誘導体 (例えば、Harrisら、米国特許第5,252,714号を参照されたい) である。ポリマーは、分岐または非分岐であってもよい。その上、ポリマー混合物を用いてIL-22RA結合体を産生することができる。

20

【 0 1 6 7 】

治療に用いられるIL-22RA結合体は、薬学的に許容される水溶性のポリマー部分を含みうる。適した水溶性ポリマーには、ポリエチレングリコール (PEG)、モノメトキシ-PEG、モノ(C1-C10)アルコキシ-PEG、アリアルオキシ-PEG、ポリ-(N-ビニルピロリドン)PEG、トレシルモノメトキシPEG、PEGプロピオンアルデヒド、ビススクシニミジルカーボネートPEG、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロース、または他の炭化水素骨格のポリマーが含まれる。適したPEGは、例えば分子量5,000、12,000、20,000、および25,000を含む分子量約600 ~ 約60,000を有してもよい。IL-22RA結合体はまた、そのような水溶性ポリマーの混合物を含みうる。

30

【 0 1 6 8 】

IL-22RA結合体の一つの例は、IL-22RA部分とIL-22RA部分のN末端に結合させたポリアルキルオキシド部分とを含む。PEGは一つの適したポリアルキルオキシドである。例として、IL-22RAは、「PEG化」として知られるプロセスであるPEGによって改変することができる。IL-22RAのPEG化は、当技術分野で既知の任意のPEG化反応によって行うことができる (例えば、欧州特許第0 154 316号、Delgadoら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9 : 249 (1992)、Duncan and Spreafico、Clin. Pharmacokinet. 27 : 290 (1994)、およびFrancisら、Int. J. Hematol. 68 : 1 (1998) を参照されたい)。例えば、PEG化は、アシル化反応によって、または反応性ポリエチレングリコール分子とのアルキル化反応によって行うことができる。もう一つのアプローチにおいて、IL-22RA結合体は、PEGの末端のヒドロキシまたはアミノ基が活性化リンカーによって置換されてい

40

50

る活性化PEGを縮合することによって形成される（例えば、Karasiewiczら、米国特許第5,382,657号を参照されたい）。

【0169】

アシル化によるPEG化は、典型的に、PEGの活性エステル誘導体をIL-22RAポリペプチドと反応させる必要がある。活性化PEGエステルの例は、N-ヒドロキシスクシニミドにエステル化されたPEGである。本明細書において用いられるように、「アシル化」という用語には、IL-22RAと水溶性ポリマーとの間に以下のタイプの結合が含まれる：アミド、カルバメート、ウレタン等。アシル化によってPEG化IL-22RAを調製する方法は、典型的に（a）IL-22RAポリペプチドをそれによって一つまたはそれ以上のPEG基がIL-22RAに結合する条件でPEG（PEGのアルデヒド誘導体の反応性エステルのような）に反応させる段階、および（b）反応産物を得る段階を含むであろう。一般的に、アシル化反応のための最適な反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定されるであろう。例えば、PEG：IL-22RAの比がより大きければ、ポリPEG化IL-22RA産物の割合はより大きくなる。

10

【0170】

アシル化によるPEG化産物は典型的に、リジン - アミノ基がアシル結合基によってPEG化されるポリPEG化IL-22RA産物である。連結する結合の例はアミドである。典型的に、得られたIL-22RAは少なくとも95%モノ-、ジ-、トリPEG化されるが、より高い程度のPEG化を有する何らかの種が反応条件によって形成される可能性がある。PEG化種は、透析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のような、標準的な精製法を用いて非結合IL-22RAポリペプチドから分離することができる。

20

【0171】

アルキル化によるPEG化は一般的に、還元剤の存在下でPEGの末端アルデヒド誘導体をIL-22RAと反応させることを含む。PEG基は、 $-\text{CH}_2-\text{NH}$ 基を通してポリペプチドに結合させることができる。

【0172】

その上、本発明の抗IL-22RA抗体または抗体断片は、当技術分野における、および本明細書に記述の方法を用いてPEG化することができる。

【0173】

モノPEG化産物を産生するための還元的アルキル化による誘導体形成は、誘導体形成に利用できる異なるタイプの一級アミノ基の異なる反応性を利用する。典型的に、反応はリジン残基の アミノ基とタンパク質のN末端残基の アミノ基とのpKa値の差を利用することができるpHで行われる。そのような選択的誘導体形成によって、アルデヒドのような反応基を含む水溶性のポリマーのタンパク質への結合が制御される。ポリマーの結合は、リジン側鎖アミノ基のような他の反応基を有意に改変することなく、タンパク質の主にN末端で起こる。本発明は、IL-22RAモノポリマー結合体の実質的に均一な調製物を提供する。

30

【0174】

モノポリマーIL-22RA結合体の実質的に均一な集団を生じる還元的アルキル化は、以下の段階を含みうる：（a）IL-22RAのアミノ末端で -アミノ基の選択的改変を可能にするために適したpHで、還元的アルキル化条件で反応性PEGとIL-22RAポリペプチドとを反応させる段階；および（b）反応産物を得る段階。還元的アルキル化に用いられる還元剤は、水溶液において安定であって、還元的アルキル化の最初のプロセスにおいて形成されたシッフ塩基のみを還元させることができなければならない。例としての還元剤には、水素化ホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウム、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン、およびピリジンボランが含まれる。

40

【0175】

モノポリマーIL-22RA結合体の実質的に均一な集団に関して、還元的アルキル化反応条件は、IL-22RAのN末端に水溶性ポリマー部分を選択的に結合させる条件である。そのような反応条件は一般的に、リジンアミノ基とN末端での アミノ基とのpKaの差を提供する。pHはまた、用いられるポリマー対タンパク質の比にも影響を及ぼす、一般的に、N末端

50

基の反応性が低くなればなるほど最適な条件を得るために必要なポリマーの量は多くなることから、pHが低い場合、大過剰量のポリマー対タンパク質が望ましいであろう。pHが高ければ、より多くの反応基が利用できることから、ポリマー：IL-22RAは大きい必要はない。典型的に、pHは3~9、または3~6の範囲内であろう。この方法は、IL-22RA含有ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体可溶性受容体結合体を作製するために用いることができる。

【0176】

検討すべきもう一つの要因は、水溶性ポリマーの分子量である。一般的に、ポリマーの分子量がより高ければ、タンパク質に結合されるポリマー分子はより少なくなる。PEG化反応の場合、典型的な分子量は約2 kDa~約100 kDa、約5 kDa~約50 kDa、または約12 kDa~約25 kDaである。水溶性ポリマー対IL-22RAのモル比は一般的に、1:1~100:1の範囲であろう。典型的に、水溶性ポリマー対IL-22RAのモル比は、ポリPEG化に関して1:1~20:1であり、モノPEG化に関して1:1~5:1であろう。

10

【0177】

ポリペプチドおよび水溶性ポリマー部分を含む結合体を産生する一般的な方法は当技術分野で既知である。例えば、Karasiewiczら、米国特許第5,382,657号、Greenwaldら、米国特許第5,738,846号、Nieforthら、Clin. Pharmacol. Ther. 59:636(1996)、Monkars hら、Anal. Biochem. 247:434(1997)を参照されたい。この方法は、IL-22RA含有ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体可溶性受容体結合体を作製するために用いることができる。

20

【0178】

本発明は、本明細書に記載の可溶性受容体または抗体のような、ペプチドまたはポリペプチドを含む組成物を企図する。そのような組成物はさらに、担体を含みうる。担体は、通常の有機または無機担体となりうる。担体の例には、水、緩衝液、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油等が含まれる。

【0179】

7. IL-22RAポリペプチドの単離

本発明のポリペプチドは、混入高分子、特に他のタンパク質および核酸に関して純度少なくとも約80%、純度少なくとも約90%、純度少なくとも約95%、または96%、97%、98%のような95%より高い、または純度99%より高くなるように精製することができ、感染因子および発熱性物質を含まない。本発明のポリペプチドはまた、薬学的に純粋な状態、すなわち純度99.9%より高くなるまで精製してもよい。特定の調製物において、精製ポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。

30

【0180】

分画および/または通常の前製法を用いて、天然起源(例えば、ヒト組織起源)から精製されたIL-22RAの前製物、合成IL-22RAポリペプチド、ならびに組換え型宿主細胞から精製された組換え型IL-22RAポリペプチドおよび融合IL-22RAポリペプチドを得ることができる。一般的に、硫酸アンモニウム沈殿または酸もしくはカオトロピック抽出を試料の前製のために用いてもよい。例としての精製段階には、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLC、および逆相高速液体クロマトグラフィーが含まれてもよい。適したクロマトグラフィー媒体には、誘導体化デキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特殊シリカ等が含まれる。PEI、DEAE、QAE、およびQ誘導体が適している。例としてのクロマトグラフィー媒体には、フェニル-セファロースFF(Pharmacia)、Toyoperalブチル650(Toso Haas、モンゴメリービル、ペンシルバニア州)、オクチル-セファロース(Pharmacia)等のようなフェニル、ブチル、またはオクチル基によって誘導体化した媒体;またはAmberchrom CG 71(Toso Haas)のようなポリアクリル樹脂等が含まれる。適した固相支持体には、それらが用いられる条件で不溶性であるガラスビーズ、シリカ骨格の樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、クロスリンクしたアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、クロスリンクしたポリアクリルアミド樹脂等が含まれる。これらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基および/または炭化水素

40

50

部分によってタンパク質の結合を可能にする反応基によって改変してもよい。

【0181】

共役化学の例には、臭化シアンの活性化、N-ヒドロキシスクシニミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化、ならびにカルボジイミド共役化学のカルボキシルおよびアミノ酸誘導体が含まれる。これらおよび他の固相媒体は周知であり、当技術分野において広く用いられ、市販されている。ポリペプチドを単離および精製する特定の方法の選択は、普通の設計の問題であり、選択した支持体の特性によって部分的に決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles and Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, 1988)、およびDoonan、Protein Purification Protocols (The Humana Press, 1996)を参照されたい。

10

【0182】

IL-22RA単離および精製におけるさらなる変種は、当業者によって考案されうる。例えば、下記のように得られる抗IL-22RA抗体は、免疫アフィニティ精製によって大量のタンパク質を単離するために用いることができる。

【0183】

本発明のポリペプチドはまた、特定の特性を利用することによって単離することができる。例えば、固定された金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーを用いて、ポリヒスチジンタグを含むタンパク質を含む、ヒスチジンに富むタンパク質を精製することができる。簡単に説明すると、ゲルにまず、二価金属イオンを満たしてキレートを形成させる (Sulkowski, Trends in Biochem 3:1 (1985))。ヒスチジンに富むタンパク質をこのマトリクスに、用いる金属イオンに応じて異なる親和性で吸着させて、pHを低下させて、または強いキレート剤を用いて、競合的溶出によって溶出させる。他の精製法には、レクチンアフィニティクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化タンパク質の精製が含まれる (M. Deutscher (編)、Meth. Enzymol. 182:529 (1990))。本発明のさらなる態様において、精製を容易にするために、対象ポリペプチドとアフィニティタグ (例えば、マルトース結合タンパク質、免疫グロブリンドメイン) との融合体を構築してもよい。その上、IL-22RA細胞外ドメインのリガンド-結合特性を、例えばIL-22リガンドがカラムに結合してIL-22RAを含む受容体が結合し、その後標準的なクロマトグラフィー法を用いて溶出させるアフィニティクロマトグラフィーを用いることによって、例えばIL-22RAを含む可溶性受容体を精製するために利用することができる。

20

30

【0184】

IL-22RAポリペプチドまたはその断片も同様に、上記のように化学合成によって調製してもよい。IL-22RAポリペプチドは、単量体または多量体: グリコシル化または非グリコシル化; PEG化または非PEG化であってもよく; および最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでも含まなくてもよい。

【0185】

8. IL-22RAタンパク質に対する抗体の産生

IL-22RAに対する抗体は、例えばIL-22RA発現ベクターの産物、または天然起源から抗原として単離されたIL-22RAを用いて得ることができる。特に有用な抗IL-22RA抗体は、IL-22RAに「特異的に結合する」。抗体は、抗体が以下の二つの特性の少なくとも一つを示す場合、特異的に結合すると見なされる: (1) 抗体が結合活性の閾値レベルでIL-22RAに結合する; および (2) 抗体がIL-22RAに近縁のポリペプチドと有意に交叉反応しない。

40

【0186】

第一の特徴に関して、抗体は、それらがIL-22RAポリペプチド、ペプチド、またはエピトープに 10^6 M^{-1} またはそれより大きい、好ましくは 10^7 M^{-1} またはそれより大きい、より好ましくは 10^8 M^{-1} またはそれより大きい、および最も好ましくは 10^9 M^{-1} またはそれより大きい結合親和性 (K_a) で結合する場合に、特異的に結合する。抗体の結合親和性は、例えばスキャッチャード分析 (Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51:660 (1949)) によって当業者によって容易に決定することができる。第二の特徴に関して、抗体は、例えばそれらが、標準的なウェスタンブロット分析を用いてIL-22RAを検出するが現在既知のポリ

50

ペプチドを検出しない場合、近縁のポリペプチド分子と有意に交叉反応しない。既知の近縁のポリペプチドの例には、既知のサイトカイン受容体が含まれる。

【0187】

抗IL-22RA抗体は、抗原性IL-22RAエピトープ含有ペプチドおよびポリペプチドを用いて産生することができる。本発明の抗原性エピトープ含有ペプチドおよびポリペプチドは、配列番号：3または本明細書に開示のもう一つのアミノ酸配列に含まれるアミノ酸少なくとも9個、または15～約30個を含む。しかし、アミノ酸30～50個または本発明のポリペプチドのアミノ酸配列全体を含む任意の長さを含む、本発明のアミノ酸配列のより大きい部分を含むペプチドまたはポリペプチドも同様に、IL-22RAに結合する抗体を誘導するために有用である。エピトープ含有ペプチドのアミノ酸配列は、水性溶媒において実質的な溶解度（すなわち、配列には、比較的親水性の残基が含まれるが、疎水性の残基は典型的に回避される）を提供するように選択されることが望ましい。その上、プロリン残基を含むアミノ酸配列も同様に抗体産生のために望ましい可能性がある。

10

【0188】

例として、IL-22RAにおける可能性がある抗原性部位を、LASERGENE（DNASTAR；マディソン、ウィスコンシン州）のPROTEANプログラム（バージョン3.14）によって実行されるJameson-Wolf法、Jameson and Wolf、CABIOS 4：181（1988）を用いて同定した。この分析においてデフォルトパラメータを用いた。

【0189】

Jameson-Wolf法は、タンパク質構造予測に関する六つの主要なサブルーチンを組み合わせることによって可能性がある抗原性決定因子を予測する。簡単に説明すると、Hopp-Woods法、Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78：3824（1981）を最初に用いて最大の局所親水性領域を表すアミノ酸配列を同定した（パラメータ：7残基の平均）。第二段階において、Emini法、Eminiら、J. Virology 55：836（1985）を用いて表面確率を計算した（パラメータ：表面決定閾値（0.6）=1）。第三に、Karplus-Schultz法、Karplus and Schultze、Naturwissenschaften 72：212（1985）を用いて、骨格鎖の柔軟性を予測した（パラメータ：柔軟性閾値（0.2）=1）。分析の第四および第五段階において、Chou-Fasman、Chou、「Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition」、Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation、Fasman（編）、549～586頁（Plenum Press、1990）およびGarnier-Robson、Garnierら、J. Mol. Biol. 120：97（1978）（Chou-Fasmanパラメータ：コンフォメーション表=64タンパク質；領域閾値=103；領域閾値=105；Garnier-Robsonパラメータ：および決定定数=0）の方法を用いて、データに二次構造予測を適用した。第六のサブルーチンにおいて、柔軟性パラメータおよびハイドロパシー/溶媒到達因子を組み合わせ、「抗原指数」と呼ばれる表面輪郭値を決定した。最後に、ピーク広域化関数を抗原指数に適用して、これは、下位の領域と比較して表面領域の運動性に由来するさらなる自由エネルギーを説明するためにそれぞれのピーク値の20、40、60、または80%を加えることによって主要な表面ピークを広くする。しかし、ヘリックス領域はより柔軟性が低い傾向があることから、この計算は、ヘリックス領域に存在する如何なる主要なピークにも適用しなかった。

20

30

40

【0190】

この分析の結果から、配列番号：3の以下のアミノ酸配列が適した抗原性ペプチドを提供するであろうことが示された：Hopp/Woods親水性プロフィールを用いて、配列番号：3内の最も抗原性が高い領域を決定することができる（Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78：3824～3828、1981；Hopp、J. Immun. Meth. 88：1～18、1986、およびTriquierら、Protein Engineering 11：153～169、1998）。プロフィールはスライディング6残基ウィンドウに基づく。隠れたG、SおよびT残基および露出したH、Y、およびW残基を無視した。その上、例えば、DNASTAR Proteanプログラム（DNASTAR Inc.、マディソン、ウィスコンシン州）を用いてJameson-Wolfプロットによって予測されるように、配列番号：3内のIL-22RA抗原性エピトープは、好ましい抗原性エピトープとして役立ち、当業者によって決定す

50

ることができる。そのような抗原性エピトープには、(1)配列番号：3のアミノ酸番号1 (Pro) ~ 6 (Asp) ; (2)配列番号：3のアミノ酸番号26 (Ser) ~ 32 (Pro) ; (3)配列番号：3のアミノ酸番号41 (Lys) ~ 47 (Asp) ; (4)配列番号：3のアミノ酸番号49 (Val) ~ 62 (Cys) ; (5)配列番号：3のアミノ酸番号41 (Lys) ~ 62 (Cys) ; (6)配列番号：3のアミノ酸番号84 (Ala) ~ 97 (Ser) ; (7)配列番号：3のアミノ酸番号103 (Thr) ~ 108 (Asp) ; (8)配列番号：3のアミノ酸番号130 (Arg) ~ 135 (His) ; (9)配列番号：3のアミノ酸番号164 (Gly) ~ 166 (Lys) ; (10)配列番号：3のアミノ酸番号175 (Tyr) ~ 179 (Glu) ; (11)配列番号：3のアミノ酸番号193 (Lys) ~ 196 (Ala) ; (12)配列番号：3のアミノ酸番号203 (Lys) ~ 209 (Thr) が含まれる。本発明は、IL-22RAに対する抗体を作製するために、または本発明の中和性モノクローナル抗体をスクリーニングもしくは同定するためのツールとして、抗原性ペプチド1~12までのいずれか一つを用いることを企図する。本発明はまた、抗原性ペプチド1~10の少なくとも一つを含むポリペプチドも同様に企図する。本発明は、IL-22RAに対する抗体を産生するためのみならず、中和性である、ならびにIL-22およびIL-20に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する抗IL-22RAモノクローナル抗体を同定およびスクリーニングするために、本明細書に記載の任意の抗原性ペプチドまたはエピトープを(個々にまたは共に)用いることを企図する。

10

【0191】

その上、適した抗原には、可溶性のIL-22RA/CRF2-4、IL-22RA/zcytor11、IL-22RA/zcytor7等のような、可溶性IL-22RAヘテロ二量体または多量体ポリペプチドを形成するポリペプチドのような、もう一つのクラスIまたはIIサイトカイン細胞外ドメインと共に先に開示のIL-22RAサイトカイン結合または細胞外ドメインを含むIL-22RAポリペプチドが含まれる。

20

【0192】

組換え型IL-22RAタンパク質または天然起源から単離したIL-22RAに対するポリクローナル抗体は、当業者に周知の方法を用いて調製することができる。例えば、Greenら、「Production of Polyclonal Antisera」、Immunochemical Protocols (Manson編)、1~5頁 (Humana Press、1992) およびWilliamsら、「Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies」、DNA Cloning 2: Expression Systems、第二版、Gloverら (編)、15頁 (Oxford University Press、1995) を参照されたい。IL-22RAポリペプチドの免疫原性は、ミョウバン (水酸化アルミニウム) またはフロイントの完全もしくは不完全アジュバントのようなアジュバントを用いて増加させることができる。免疫にとって有用なポリペプチドにはまた、IL-22RAまたはその一部と免疫グロブリンポリペプチドもしくはマルトース結合タンパク質との融合体のような、融合ポリペプチドが含まれる。ポリペプチド免疫原は、完全長の分子またはその一部であってもよい。ポリペプチド部分が「ハプテン様」である場合、そのような部分は、免疫のために高分子担体 (キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、または破傷風トキソイドのような) に結合または連結させることが都合がよいかも知れない。

30

【0193】

ポリクローナル抗体は典型的にウマ、ウシ、イヌ、ニワトリ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ヤギ、またはヒツジのような動物において産生されるが、本発明の抗IL-22RA抗体は、ヒト下霊長類抗体に由来してもよい。ヒヒにおいて診断的および治療的に有用な抗体を産生する一般的な技術は、例えば、Goldenbergら、国際特許公開番号国際公開公報第91/11465号およびLosmanら、Int. J. Cancer 46: 310 (1990) に認められるであろう。

40

【0194】

または、モノクローナル抗IL-22RA抗体を産生することができる。特定の抗原に対する齧歯類のモノクローナル抗体は、当業者に既知の方法によって得てもよい (例えば、Kohlerら、Nature 256: 495 (1975)、Coliganら (編)、Current Protocols in Immunology

50

、第1巻、2.5.1～2.6.7頁 (John Wiley & Sons、1991) [Coligan]、Picksleyら、「Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli.」、DNA Cloning 2: Expression Systems、第二版、Glover (編)、93頁 (Oxford University Press、1995) を参照されたい)。

【0195】

簡単に説明すると、IL-22RA遺伝子産物を含む組成物をマウスに注射すること、血清試料を採取することによって抗体産生の有無を確認すること、脾臓を摘出してB-リンパ球を得ること、B-リンパ球を骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを産生すること、ハイブリドーマをクローニングすること、抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択すること、抗原に対する抗体を産生するクローンを培養すること、およびハイブリドーマ培養物から抗体を単離することによって、モノクローナル抗体を得ることができる。

10

【0196】

さらに、本発明の抗IL-22RA抗体は、ヒトモノクローナル抗体に由来してもよい。ヒトモノクローナル抗体は、抗原チャレンジに反応して特異的ヒト抗体を産生するように操作されているトランスジェニックマウスから得られる。この技術において、ヒト重鎖および軽鎖座の要素を、内因性の重鎖および軽鎖座の標的化破壊を含む胚幹細胞に由来するマウスの系統に導入する。トランスジェニックマウスは、ヒト抗原に対して特異的なヒト抗体を合成することができ、マウスを用いてヒト抗体分泌ハイブリドーマを産生することができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、例えばGreenら、Nature Genet. 7: 13 (1994)、Lonbergら、Nature 368: 856 (1994)、およびTaylorら、Int. Immun. 6: 579 (1994) によって記述されている。

20

【0197】

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

【0198】

特定の用途に関して、抗IL-22RA抗体の断片を調製することが望ましいかも知れない。そのような抗体断片は、例えば抗体のタンパク質分解加水分解によって得ることができる。抗体断片は、通常の方法によって抗体全体のペプシンまたはパバイン消化によって得ることができる。例として、抗体断片は、抗体をペプシンによって酵素的に切断してF(ab')₂と命名される5S断片を提供することができる。この断片をさらにチオール還元剤によって切断すると、3.5SのFab'一価断片を得ることができる。選択的に、切断反応は、ジスルフィド結合の切断に起因するスルフヒドリル基のプロッキング基を用いて行うことができる。例として、ペプシンを用いた酵素的切断は、二つの一価Fab断片およびFc断片を直接産生する。これらの方法は、例えばGoldenberg、米国特許第4,331,647号、Nisonoffら、Arch. Biochem. Biophys. 89: 230 (1960)、Porter、Biochem. J. 73: 119 (1959)、Edelmanら、Methods in Enzymology 1巻、422頁 (Academic Press、1967) およびColigan、2.8.1～2.8.10および2.10～2.10.4に記述される。

30

40

【0199】

重鎖を分離して一価の軽重鎖断片の形成、断片のさらなる切断、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝子技法のような、抗体を切断する他の方法も同様に、無傷の抗体によって認識される抗原に断片が結合する限り、用いてもよい。

【0200】

例えば、Fv断片は、V_HおよびV_L鎖の会合を含む。この会合は、Inbarら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2659 (1972) によって記述されるように非共有結合となりうる。または、可変鎖を分子間ジスルフィド結合によって結合するか、またはグルタルアルデヒドの

50

ような化学物質によってクロスリンクすることができる（例えば、Sandhu、Crit. Rev. Biotech. 12 : 437 (1992) を参照されたい）。

【 0 2 0 1 】

Fv断片は、ペプチドリinkerによって結合されたV_HおよびV_L鎖を含んでもよい。これらの一本鎖抗原結合タンパク質（scFv）は、オリゴヌクレオチドによって結合されるV_HおよびV_LドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子を発現ベクターに挿入して、これを大腸菌のような宿主細胞に導入する。組換え型宿主細胞は、二つのVドメインを架橋するリンカーペプチドによって一本鎖ポリペプチドを合成する。scFvsを産生する方法は、例えば、Whitlowら、Methods : A Companion to Methods in Enzymology 2 : 97 (1991)（同様に、Birdら、Science 242 : 423 (1988)）、Ladnerら、米国特許第4,946,778号、Packら、Bio/Technology 11 : 1271 (1993)、およびSandhu、上記を参照されたい）。

【 0 2 0 2 】

例として、scFVは、リンパ球をインビトロでIL-22RAポリペプチドに曝露すること、ファージまたは類似のベクターにおける抗体ディスプレイライブラリを選択すること（例えば、固定または標識IL-22RAタンパク質またはペプチドを用いることによって）によって得ることができる。可能性のあるIL-22RAポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ（ファージディスプレイ）または大腸菌のような細菌上で示されるランダムペプチドライブラリをスクリーニングすることによって得ることができる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ランダム変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成のような多くの方法によって得ることができる。これらのランダムペプチドディスプレイライブラリを用いて、リガンドまたは受容体のようなタンパク質もしくはポリペプチド、生物学的もしくは合成高分子、または有機もしくは無機物質となりうる既知の標的と相互作用するペプチドに関してスクリーニングすることができる。そのようなランダムペプチドディスプレイライブラリを作製およびスクリーニングする技術は当技術分野で既知である（Ladnerら、米国特許第5,223,409号、Ladnerら、米国特許第4,946,778号、Ladnerら、米国特許第5,403,484号、Ladnerら、米国特許第5,571,698号、およびKayら、Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press Inc., 1996)、およびランダムペプチドディスプレイライブラリおよびそのようなライブラリをスクリーニングするためのキットは、例えば、CLONTECH Laboratories Inc.（パロアルト、カリフォルニア州）、Invitrogen Inc.（サンジエゴ、カリフォルニア州）、New England Biolabs, Inc.（ビバリー、マサチューセッツ州）、およびPharmacia LKB Biotechnology Inc.（ピスカタウェイ、ニュージャージー州）から市販されている。ランダムペプチドディスプレイライブラリは、IL-22RAに結合するタンパク質を同定するために本明細書に開示のIL-22RA配列を用いてスクリーニングすることができる。

【 0 2 0 3 】

抗体断片のもう一つの型は、一つの相補性決定領域（CDR）をコードするペプチドである。CDRペプチド（「最小認識単位」）は、対象抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するために、ポリメラーゼ連鎖反応を用いることによって調製される（例えば、Larrickら、Methods : A Companion to Methods in Enzymology 2 : 106 (1991)、Courtenay-Luck、「Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies.」、Monoclonal Antibodies : Production, Engineering and Clinical Application、Ritterら（編）、166頁（Cambridge University Press、1995）、およびWardら、「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies」、Monoclonal Antibodies : Principles and Applications、Birchら（編）、137頁（Wiley-Liss, Inc., 1995）を参照されたい）。

【 0 2 0 4 】

または、抗IL-22RA抗体は、「ヒト化」モノクローナル抗体に由来してもよい。ヒト化モノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変ドメインからのマウス相補性決定領域をヒト可変ドメインに転移することによって産生される。次に、ヒト抗

体の典型的な残基をマウス相対物のフレームワーク領域において置換する。ヒト化モノクローナル抗体に由来する抗体成分を用いることによって、マウス定常領域の免疫原性に関連して起こりうる問題が回避される。マウス免疫グロブリン可変領域をクローニングする一般的な技術は、例えば、Orlandiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3833 (1989) に記述されている。ヒト化モノクローナル抗体を産生する技術は、例えばJonesら、Nature 321 : 522 (1986)、Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 4285 (1992)、Sandhu、Crit. Rev. Biotech. 12 : 437 (1992)、Singerら、J. Immun. 150 : 2844 (1993)、Sudhir (編)、「Antibody Engineering Protocols」(Humana Press Inc.、1995)、Kelly、「Engineering Therapeutic Antibodies」、Protein Engineering : Principles and Practice、Clelandら (編)、399 ~ 434頁 (John Wiley & Sons Inc.、1996)、およびQueenら、米国特許第5,693,762号 (1997) に記述されている。 10

【0205】

その上、本発明の抗IL-22RA抗体または抗体断片は、当技術分野における、本明細書に記述される方法を用いてPEG化することができる。

【0206】

ポリクローナル抗イディオタイプ抗体は、標準的な技術を用いて、抗IL-22RA抗体によって動物を免疫することによって調製することができる。例えば、Greenら、「Production of Polyclonal Antisera」、Methods In Molecular Biology : Immunochemical Protocols、Manson (編) 1 ~ 12頁 (Humana Press、1992) を参照されたい。同様に、Coligan、2.4.1 ~ 2.4.7頁を参照されたい。または、モノクローナル抗イディオタイプ抗体を、上記のような技術によって免疫原として抗IL-22RA抗体または抗体断片を用いて調製することができる。もう一つの方法として、ヒト化抗イディオタイプ抗体またはヒト下霊長類抗イディオタイプ抗体は、上記の技術を用いて調製することができる。抗イディオタイプ抗体を産生する方法は、例えばIrie、米国特許第5,208,146号、Greeneら、米国特許第5,637,677号、およびVarthakavi and Minocha、J. Gen. Virol. 77 : 1875 (1996) によって記述される。 20

【0207】

抗IL-22RA抗体を検出可能な標識と結合させて、抗IL-22RA免疫結合体を形成することができる。適した検出可能な標識には、例えば放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識、生物発光標識、または金コロイドが含まれる。そのような検出可能に標識された免疫結合体を作製および検出する方法は当業者に周知であり、下記により詳細に記述する。 30

【0208】

検出可能な標識は、オートラジオグラフィーによって検出される放射性同位元素となりうる。本発明の目的にとって特に有用な同位元素は³H、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、および¹⁴Cである。

【0209】

抗IL-22RA免疫結合体はまた、蛍光化合物によって標識することができる。蛍光標識抗体の存在は、免疫結合体を適当な波長の光に曝露すること、得られた蛍光を検出することによって決定される。蛍光標識化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレスカミンが含まれる。 40

【0210】

または、抗IL-22RA免疫結合体は、抗体成分を化学発光化合物に共役させることによって検出可能に標識することができる。化学発光タグ免疫結合体の存在は、化学反応の過程において発生する発光の存在を検出することによって決定される。化学発光標識化合物の例には、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルが含まれる。

【0211】

同様に、生物発光化合物を用いて、本発明の抗IL-22RA免疫結合体を標識することがで 50

きる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増加させる生物系において認められるタイプの化学発光である。生物発光タンパク質の存在は発光の存在を検出することによって決定される。標識にとって有用な生物発光化合物には、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびアエコリンが含まれる。

【0212】

または、抗IL-22RA免疫結合体は、抗IL-22RA抗体成分を酵素に結合させることによって検出可能に標識することができる。抗IL-22RA酵素結合体を適当な基質の存在下でインキュベートすると、酵素部分が基質と反応して化学部分を産生し、これを例えば、分光光度法、蛍光測定、または肉眼的手段によって検出することができる。多特異的免疫結合体を検出可能に標識するために用いることができる酵素の例には、 α -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが含まれる。

10

【0213】

当業者は、本発明に従って用いることができる他の適した標的を知っているであろう。マーカー部分を抗IL-22RA抗体に結合させることは、当技術分野で既知の標準的な技術を用いて行うことができる。この点において典型的な方法論は、Kennedyら、Clin. Chim. Acta. 70:1 (1976)、Schursら、Clin. Chim. Acta. 81:1 (1977)、Shihら、Int'l J. Cancer 46:1101 (1990)、Steinら、Cancer Res. 50:1330 (1990)、およびColigan、上記によって記述される。

【0214】

その上、免疫化学的検出の便利性および多用途性は、アビジン、ストレプトアビジン、およびビオチンに結合させた抗IL-22RA抗体を用いることによって増強することができる（例えば、Wilchekら（編）、「Avidin-Biotin Technology」、Methods in Enzymology、184巻（Academic Press、1990）、およびBayerら、「Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology」、Methods in Molecular Biology、10巻、Manson（編）、149~162頁（Humana Press Inc.、1992）を参照されたい）。

20

【0215】

イムノアッセイを行う方法は十分に確立されている。例えば、Cook and Self、「Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays」、Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application、Ritter and Ladyman（編）、180~208頁（Cambridge University Press、1995）、Perry、「The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology」、Monoclonal Antibodies: Principles and Applications、Birch and Lennox（編）、107~120頁（Wiley-Liss Inc.、1995）、およびDimandis、Immunoassay（Academic Press Inc.、1996）を参照されたい。

30

【0216】

本発明はまた、IL-22RA遺伝子発現に関する免疫診断アッセイを行うためのキットを企図する。そのようなキットは、抗IL-22RA抗体、または抗体断片を含む少なくとも一つの容器を含む。キットはまた、IL-22RA抗体または抗体断片の存在を示すことができる一つまたはそれ以上の試薬を含む第二の容器を含んでもよい。そのような指標試薬の例には、放射活性標識、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識、生物発光標識、金コロイド等が含まれる。キットはまた、IL-22RA抗体または抗体断片を用いてIL-22RAタンパク質を検出することをユーザーに伝える手段を含んでもよい。例えば、書面での説明書は、同封の抗体または抗体断片を用いてIL-22RAを検出できることを示してもよい。書面での材料は、容器に直接適用してもよく、または書面での材料は添付文書の形で提供されうる。

40

【0217】

9. IL-22またはIL-20およびIL-22の双方に対するIL-22RA結合に拮抗するための抗IL-22RA抗体の利用

本明細書において有用な抗体を産生または選択するためのもう一つの技術には、リンパ球を、可溶性のIL-22RA受容体ポリペプチドまたは抗原性エピトープのようなその断片にインビトロで曝露すること、ファージまたは類似のベクターにおける抗体ディスプレイライブラリを選択すること（例えば、固定または標識された可溶性のIL-22RA受容体ポリペ

50

プチドまたは抗原性エピトープのようなその抗体断片を用いることによって)が含まれる。可溶性IL-22RA受容体ポリペプチドまたは抗原性エピトープのようなその断片のような、可能性のある結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ(ファージディスプレイ)または大腸菌のような細菌上で示されるランダムペプチドライブラリをスクリーニングすることによって得ることができる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ランダム変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成のような多様な方法で得ることができる。これらのランダムペプチドディスプレイライブラリを用いてリガンドまたは受容体のようなタンパク質またはポリペプチド、生体または合成高分子、または有機もしくは無機物質となりうる既知の標的と相互作用するペプチドに関してスクリーニングすることができる。そのようなランダムペプチドディスプレイライブラリを作製およびスクリーニングする技術は当技術分野で既知であり(Ladnerら、米国特許第5,223,409号;Ladnerら、米国特許第4,946,778号;Ladnerら、米国特許第5,403,484号およびLadnerら、米国特許第5,571,698号)、ランダムペプチドディスプレイライブラリおよびそのようなライブラリをスクリーニングするためのキットは、例えば、Clontech(パロアルト、カリフォルニア州)、Invitrogen Inc.(サンジエゴ、カリフォルニア州)、New England Biolabs Inc.(ピバリー、マサチューセッツ州)、およびPharmacia LKB Biotechnology Inc.(ピスカタウェイ、ニュージャージー州)から市販されている。ランダムペプチドディスプレイライブラリは、IL-22RAを含む受容体ポリペプチドに結合するタンパク質を同定するために本明細書に開示の抗原性エピトープポリペプチド配列のような、可溶性IL-22RA受容体ポリペプチドまたはその断片を用いてスクリーニングすることができる。可溶性のIL-22RAを含む受容体ポリペプチドと相互作用するこれらの「結合ポリペプチド」は、細胞をタグ付けするために;アフィニティ精製によって相同体ポリペプチドを単離するために用いることができる;それらは薬物、毒素、放射性核種等に直接または間接的に結合させることができる。これらの結合ポリペプチドも同様に、例えばIL-22リガンドおよび受容体に結合する、その相互作用、または受容体に対するウイルスの結合を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するか否かに関して、発現ライブラリおよび中和抗体をスクリーニングするためのような分析法において用いることができる。結合ポリペプチドも同様に、可溶性IL-22RAを含む受容体ポリペプチドの循環中のレベルを決定するために;基礎となる病態または疾患のマーカーとして可溶性または非可溶性IL-22RA含有受容体を検出または定量するために、診断アッセイにおいて用いることができる。これらの結合ポリペプチドはまた、可溶性もしくは膜結合型IL-22RA単量体受容体、またはIL-22RAホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体ポリペプチド結合(例えばリガンドに対する)、ならびにインビトロおよびインビボでのシグナル伝達を遮断または阻害するために「アンタゴニスト」として作用することができる。この場合も、これらの結合ポリペプチドは抗IL-22RA単量体受容体または抗IL-22RAホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体ポリペプチドとして作用し、IL-22またはIL-20およびIL-22活性の双方のみならず、受容体活性またはタンパク質結合を阻害するために有用である。本発明の天然の受容体複合体に対する抗体、IL-22RAエピトープ結合抗体、および抗IL-22RA中和性モノクローナル抗体は、それらがIL-22RAに対して特異的に作用する可能性があり、IL-22またはIL-20およびIL-22の双方を阻害することができることから、好ましい態様であるかも知れない。その上、本発明の抗体のアンタゴニストおよび結合活性は、IL-20またはIL-22、およびIL-22RA含有可溶性受容体の存在下でIL-20またはIL-22増殖、シグナルトラップ、ルシフェラーゼ、または結合アッセイ、および本明細書に記載の他の生物学的または生化学的アッセイにおいてアッセイすることができる。

【0218】

可溶性IL-22RA受容体ポリペプチドに対する抗体(例えば、配列番号:3に対する抗体)または抗原性エピトープのようなその断片は、インビボでIL-20、IL-22、またはIL-20およびIL-22の双方の炎症作用を阻害するために、乾癬、アトピー性皮膚炎、炎症性皮膚疾患、内毒素血症、関節炎、喘息、IBD、大腸炎、乾癬性関節炎、リウマチ性関節炎、または他のIL-20およびIL-22による炎症病態に対して治療的に用いるために、IL-22RA受容体

を発現する細胞にタグを付けるために、アフィニティ精製によって可溶性のIL-22RA含有受容体ポリペプチドを単離するために；可溶性のIL-22RA含有受容体ポリペプチドの循環中のレベルを決定する診断アッセイのために；基礎病態または疾患のマーカーとして可溶性IL-22RA含有受容体を検出または定量するために；FACSを用いる分析法において；発現ライブラリをスクリーニングするために；IL-22またはIL-20アゴニストとして作用することができる抗イディオタイプ抗体を産生するために；ならびにIL-22RA受容体に結合、その機能を遮断、阻害、減少、もしくは拮抗するため、またはインビトロおよびインビボでIL-22および/またはIL-20に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、もしくは中和するための中和抗体もしくはアンタゴニストとして用いてもよい。適した直接タグまたは標識には、放射性核種、酵素、基質、共因子、ビオチン、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子等が含まれる；間接的なタグまたは標識は、中間体としてビオチン-アビジンまたは他の補体/抗補体対を用いることを特徴としてもよい。本明細書において用いられる抗体は、薬物、毒素、放射性核種等に直接または間接的に結合させてもよく、これらの結合体は、インビボで診断的または治療的応用のために用いてもよい。その上、可溶性IL-22RA含有受容体ポリペプチドに対する抗体またはその断片は、インビトロで、アッセイ、例えばウェスタンブロットまたは当技術分野で既知の他のアッセイにおいて、変性または非変性IL-22RA含有受容体ポリペプチドまたはその断片を検出するために用いてもよい。

10

【0219】

可溶性IL-22RA受容体または可溶性IL-22RAホモ二量体、ヘテロ二量体、もしくは多量体受容体ポリペプチドに対する抗体は、対応する受容体を発現する細胞にタグを付けて、その発現レベルをアッセイするために、アフィニティ精製のために、受容体ポリペプチドの循環中のレベルを決定するための診断アッセイにおいて、蛍光活性化細胞ソーティングを用いる分析法において、有用である。その上、二価抗体および抗イディオタイプ抗体は、IL-22RAリガンド、IL-22、またはIL-20の作用を模倣するアゴニストとして用いてもよい。

20

【0220】

本明細書における抗体はまた、薬物、毒素、放射性核種等に直接または間接的に結合することができ、これらの結合体はインビボ診断または治療応用のために用いられる。例えば、可溶性のIL-22RA受容体または可溶性のIL-22RAホモ二量体、ヘテロ二量体、多量体受容体ポリペプチドを認識する抗体または結合ポリペプチドを用いて、対応する抗相補体分子（すなわち、IL-22RA含有可溶性または膜結合型受容体）を発現する組織または臓器を同定または治療することができる。より具体的には、可溶性のIL-22RA含有受容体ポリペプチド、その生物活性断片もしくは一部に対する抗体を、検出可能な、または細胞障害性分子に結合させて、IL-22RA発現癌のようなIL-22RA含有受容体を発現する細胞、組織、または臓器を有する哺乳動物に輸送することができる。

30

【0221】

適した検出可能な分子を、「結合ポリペプチド」（先に開示した結合ペプチドを含む）、抗体、またはその生物活性断片もしくは一部のようなIL-22RA含有受容体ポリペプチドに結合するポリペプチドに直接または間接的に結合させてもよい。適した検出可能な分子には、放射性核種、酵素、基質、共因子、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子等が含まれる。適した細胞障害性分子は、ポリペプチドまたは抗体に直接または間接的に結合させてもよく、これには細菌または植物毒素（例えば、ジフテリア毒素、シュードモナスエンドトキシン、リシン、アブリン等）と共にヨウ素-131、レニウム-188、またはイットリウム-90のような治療的放射性核種（ポリペプチドもしくは抗体に直接結合させる、または例えばキレート部分によって間接的に結合させる）が含まれてもよい。結合ポリペプチドまたは抗体はまた、アドリアマイシンのような細胞障害薬に結合させてもよい。検出可能なまたは細胞障害性の分子に間接的に結合させるために、検出可能なまたは細胞障害性の分子を、他のメンバーが結合ポリペプチドまたは抗体部分に結合している相補体/抗相補体対のメンバーに結合させることができる。これらの目的に関して、ビオ

40

50

チン/ストレプトアビジンは、例としての相補体/抗相補体対である。

【0222】

もう一つの態様において、結合ポリペプチド-毒素融合タンパク質または抗体-毒素融合タンパク質を、ターゲティングされる細胞または組織の阻害または除去のために用いることができる（例えば、癌細胞または組織を治療するため）。または、結合ポリペプチドが多機能ドメインを有する場合（すなわち、活性化ドメインまたはリガンド結合ドメイン、プラスターゲティングドメイン）、ターゲティングドメインのみを含む融合タンパク質は、検出可能な分子、細胞障害性分子、または相補的分子を対象細胞または組織タイプに向けるために適している可能性がある。単一のドメインのみを含む融合タンパク質に相補的分子が含まれる場合、抗相補的分子を検出可能または細胞障害性分子に結合させることができる。このように、そのようなドメイン-相補的分子融合タンパク質は、一般的な抗相補体検出可能/細胞障害性分子結合体の細胞/組織特異的輸送のための一般的なターゲティング媒体となる。

10

【0223】

もう一つの態様において、IL-22RA結合ポリペプチド-サイトカインまたは抗体-サイトカイン融合タンパク質は、結合ポリペプチド-サイトカインまたは抗IL-22RA受容体抗体が過増殖細胞を標的とする場合、標的組織（例えば、脾臓、膵臓、血液、類リンパ、結腸、および骨髄癌）のインビボ殺細胞を増強するために用いることができる（一般的に、Hornickら、Blood 89: 4437~47、1997を参照されたい）。記述の融合タンパク質は、所望の作用部位へのサイトカインのターゲティングを可能にして、それによってサイトカインの局所濃度の上昇を提供する。適した抗IL-22RA単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体抗体が、望ましくない細胞または組織（すなわち、腫瘍または白血病）を標的として、融合サイトカインがエフェクター細胞による標的細胞の溶解を改善した。この目的にとって適したサイトカインには、例えば、インターロイキン2および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）が含まれる。

20

【0224】

または、本明細書に記述のIL-22RA受容体結合ポリペプチドまたは抗体融合タンパク質は、IL-22RA受容体調節アポトーシス経路を直接刺激して、それによってIL-22RA含有受容体を発現する過増殖細胞の細胞死が起こることによって、標的組織のインビボ殺細胞を増強するために用いることができる。

30

【0225】

10. IL-22RA活性を有するポリペプチドまたはIL-22RAに対する抗体の治療的使用

可溶性IL-22RA活性を有するアミノ酸配列を用いて、IL-22RAリガンドであるIL-20およびIL-22（単独または共に）に結合して、このように内因性のIL-22RA受容体とIL-22RAリガンドとの結合を防止することによって、免疫系を調節することができる。抗IL-22RA抗体のようなIL-22RAアンタゴニストも同様に、内因性のIL-22RA受容体とIL-22RAリガンドとの結合を阻害することによって免疫系を調節することができる。したがって、本発明には、IL-22RA活性を有するタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド（可溶性のIL-22RAポリペプチド、IL-22RAポリペプチド断片、IL-22RA類似体（例えば、抗IL-22RA抗イデオタイプ抗体）、およびIL-22RA融合タンパク質）を、このポリペプチドの適当量を欠損する、またはIL-22RAリガンドの過剰量を産生する被験体に用いることが含まれる。IL-22RAアンタゴニスト（例えば、抗IL-22RA抗体）も同様に、IL-22RAリガンドまたはIL-22RAのいずれかの過剰量を産生する被験体を治療するために用いることができる。例えば、そのようなIL-22RAポリペプチドおよび抗IL-22RA抗体は、乾癬、アトピー性皮膚炎、炎症性皮膚疾患、乾癬性関節炎、関節炎、内毒素血症、喘息、炎症性腸疾患（IBD）、大腸炎、および本明細書に開示の他の炎症病態の治療において、IL-20およびIL-22（単独または共に）に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するために有用である。

40

【0226】

その上、本発明者らは、IL-22RA受容体がT-細胞誘導型因子（IL-22）と呼ばれるリガンドに結合することを示した（配列番号：6；Dumoutier, L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 9

50

7: 10144 ~ 10149、2000; マウスIL-22配列はDumontierら、J. Immunol. 164: 1814 ~ 1819、2000に示される)。その上、共有されるzcytor11 (IL-22RA) (米国特許第5,965,704号) およびCRF2-4受容体も同様に、ヘテロ二量体としてIL-22に結合する(WIPO公開番号国際公開公報第00/24758号; Dumontierら、J. Immunol. 164: 1814 ~ 1819、2000; Spencer, SDら、J. Exp. Med. 187: 571 ~ 578、1998; Gibbs, VC and Pennica、Gene 186: 97 ~ 101、1997 (CRF2-4 cDNA); Xie, MHら、J. Biol. Chem. 275: 31335 ~ 31339、2000; およびKotenko, SVら、J. Biol. Chem. 276: 2725 ~ 2732、2001)。その上、IL-10 受容体は、IL-22の受容体として関係する可能性があり、CRF2-4と類似であると考えられている(Dumontier, L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 10144 ~ 10149、2000; Liu Y.ら、J. Immunol. 152: 1821 ~ 1829、1994 (IL-10R cDNA))。その上、本発明者らは、IL-22RA受容体がIL-20 (配列番号: 8、WIPO公開番号国際公開公報第92/27103号) と呼ばれるリガンドに結合することを示した。好ましい態様において、IL-22RAの可溶性受容体型 (配列番号: 3) は、インビボでIL-22およびIL-20に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体である。そのようなIL-22RA単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体に対する抗体および結合ポリペプチドは、本明細書に記述のようにIL-22RA活性のアンタゴニスト、ならびにIL-20およびIL-22アンタゴニスト (単独または共に) として作用する。

10

【0227】

さらに、本発明者らは本明細書において、ポリクローナル抗体およびモノクローナル中和性抗IL-22抗体が、細胞に基づく中和アッセイにおいてIL-22およびIL-20に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和することを記述して示した。

20

【0228】

IL-22は、IL-9の存在下で誘導されることが示されており、Th1-型免疫応答および炎症の促進に関与することが疑われている。IL-9は、多様な方法で免疫機能の増殖、活性化、分化および/または誘導を刺激して、喘息、肺肥満細胞腫、および他の疾患に関与すると共にSTAT経路を活性化する。IL-22またはIL-9機能のアンタゴニストは、そのようなヒト疾患に対して有益な用途を有しうる。本発明は、IL-22のそのような新規アンタゴニストを提供する。

【0229】

IL-22は、血清アミロイドA (SAA)、1-アンチキモトリプシン、およびハプトグロビンのような急性期反応体の産生のアップレギュレーションに関与すること、およびIL-22発現がインビボでリポ多糖類 (LPS) の注射によって増加することが示されており、IL-22が炎症反応に関与することを示唆している (Dumontier, L.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 10144 ~ 10149、2000)。SAAのような急性期タンパク質の産生は、炎症が有益である場合の短期生存メカニズムであると見なされている; しかし、急性期タンパク質が長期間維持されると、慢性炎症に関与して、ヒトの健康に有害となりうる。論評に関しては、Uhlir, CM and Whitehead, AS., Eur. J. Biochem. 265: 501 ~ 523、1999、およびBaumann, H. and Gauldie, J. Immunology Today 15: 74 ~ 80、1994を参照されたい。その上、急性期タンパク質SAAは、いくつかの慢性炎症疾患の発病に関与しており、アテローム性動脈硬化症およびリウマチ性関節炎に関与し、アミロイドーシスにおいて沈着されるアミロイドAタンパク質の前駆体である (Uhlir, CM. and Whitehead、上記)。このように、IL-22は、前炎症性分子として作用し、SAAの産生を誘導することから、アンタゴニストは、炎症疾患およびIL-22によって誘導される急性期反応タンパク質に関連した他の疾患を治療するために有用となるであろう。そのようなアンタゴニストは、本発明によって提供される。例えば、IL-22またはIL-9による炎症を減少させる方法は、炎症を減少させるために十分な量の可溶性IL-22RA-含有受容体組成物を炎症を有する哺乳動物に投与することを含む。その上、炎症を有する哺乳動物において炎症反応を抑制する方法は、以下を含む: (1) 血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定する段階; (2) 本明細書に記載の可溶性IL-22RAサイトカイン受容体ポリペプチドを含む組成物を許容される薬学的媒体において投与する段階; (3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後のレベルを決定する段階

30

40

50

；（４）血清アミロイドＡタンパク質レベルが増加しないまたは減少すれば、炎症反応の抑制が示される、段階（１）における血清アミロイドＡタンパク質のレベルを段階（３）における血清アミロイドＡタンパク質レベルと比較する段階。本明細書に記述の実験的証拠から、可溶性受容体および抗体のようなIL-22アンタゴニストが、インビボ炎症モデルにおいて実際にSAAレベルを減少させることが示されており、IL-22の結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和が抗炎症作用を有することを示している。

【 0 2 3 0 】

IL-20およびその受容体の役割が乾癬に関係していることは、証拠によって示されている。この複遺伝子性皮膚疾患は、ケラチノサイト増殖の増加、ケラチノサイト分化の変化、および免疫細胞の皮膚への浸潤を特徴とする。乾癬におけるIL-20の役割に関する最初の証拠は、トランスジェニックマウスにおいて認められた過角化症および肥厚した上皮が、ヒトの乾癬による異常に類似することである。角質化の欠損に関連すると考えられている張フィラメント数の減少は、ヒト乾癬の顕著な特徴である。ミトコンドリア内封入体は、マウスにおける化学誘導および天然に存在する過形成皮膚疾患の双方において認められる。封入体の原因およびそのミトコンドリアに及ぼす機能は不明である。IL-20トランスジェニックマウスは、ヒト乾癬において認められる特徴の多くを示す。

10

【 0 2 3 1 】

その上、IL-20受容体mRNA（IL-20RAおよびIL-20RB mRNA）は、正常な皮膚と比較してヒト乾癬皮膚において顕著にアップレギュレートされており、乾癬におけるIL-20の役割をさらに示唆している。いずれのIL-20受容体サブユニットも、表皮全体を通してケラチノサイトにおいて発現され、同様に免疫および内皮細胞のサブセットにおいても発現される。本発明者らは、活性化IL-20受容体の発現の増加が、内皮細胞、免疫細胞、およびケラチノサイトの相互作用を変化させる可能性があり、それによってケラチノサイトの増殖および分化の調節障害が起こることを提唱している。さらに、本明細書において記述した、IL-22RA受容体をノックアウトしたマウスのノックアウトデータは、IL-22RAがトランスジェニック動物の皮膚におけるIL-20による炎症作用にとって必要であったことを示している。これらの結果は、例えばIL-22RA遺伝子ノックアウトによってまたは同様に本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体によって、IL-22RA活性を有効に遮断すれば、例えば、乾癬、IBD、大腸炎、またはIBD、関節炎、喘息、乾癬性関節炎、大腸炎、炎症性皮膚疾患、およびアトピー性皮膚炎を含む、IL-20および/またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患において、IL-20による皮膚作用のみならず、IL-22による皮膚作用も同様に減少するであろう。

20

30

【 0 2 3 2 】

その上、IL-20はヒトケラチノサイトHaCaT細胞株においてシグナル伝達を刺激し、皮膚におけるこの新規リガンドの直接作用を支持する。さらに、ケラチノサイトにおいて活性であって、皮膚における増殖性および前炎症性シグナルに関与することが知られているタンパク質であるIL-1、EGF、およびTNF- α は、IL-20に対する反応を増強する。IL-20受容体を発現するHaCaTおよびBHK細胞の双方において、IL-20は、STAT3を通してシグナルを伝達する。

【 0 2 3 3 】

先の考察および下記の実施例において示されるように、IL-20は乾癬の病理に関与している。本発明は、特にIL-20に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する物質を投与することによって、乾癬を治療する方法である。IL-20に対するアンタゴニストは、可溶性のIL-22RAのようなIL-20に結合する可溶性受容体、またはIL-20もしくはIL-20受容体のいずれかに結合する抗体、一本鎖抗体もしくは抗体断片、例えば抗IL-22RA抗体のいずれかとなりうる。このように、アンタゴニストは、IL-20受容体の活性化を防止するであろう。その上、IL-20およびIL-22は共通の受容体としてIL-22RAを共有し、可溶性のIL-22RAのようなアンタゴニスト、または抗体、IL-22RA受容体に結合する一本鎖抗体または抗体断片は、IL-22またはIL-20とIL-22活性の双方に同時に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するために用いることができる。

40

50

【0234】

乾癬は、世界の人口の1~2%までに罹患する最も一般的な皮膚科疾患の一つである。これは、紅斑、輪郭のはっきりした丘疹、および銀色の雲母状鱗片に覆われた丸い斑を特徴とする慢性炎症性皮膚障害である。乾癬の皮膚病変は、変わりやすく痒みを有する。外傷領域はしばしば、乾癬の病変を発症する。さらに、感染症、ストレス、および投薬、例えばリチウム、遮断剤、および抗マラリア剤を含む他の外的要因は、乾癬を悪化させる可能性がある。

【0235】

乾癬の最も一般的な型は斑状と呼ばれる。斑状乾癬を有する患者は、安定な徐々に増殖する斑を有するが、これは長期間基本的に変化しないままである。斑状乾癬が起こる最も一般的な領域は、肘、膝、臀裂、および頭皮である。発症は対称的となる傾向がある。逆位乾癬は、液化、鼠径、乳腺下領域、および臍を含む間擦領域に影響を及ぼし、同様に頭皮、手のひら、および足底にも影響を及ぼす傾向がある。個々の病変は、輪郭の明確な斑であるが、その位置により湿潤することがある。斑状乾癬は一般的に、徐々に発症し、無痛性の経過をたどる。自然寛解することはまれである。

【0236】

発疹性の乾癬（滴状乾癬）は、子供および若い成人に最も一般的である。これは乾癬を有しない人、または慢性の斑状乾癬を有する人に急性に発症する。患者は、しばしば型溶血連鎖球菌による上呼吸器感染症の後に、多くの小さい紅斑、剥がれ落ちる丘疹を示す。乾癬患者はまた、膿疱性病変を発症することがある。これらは、手のひらおよび足底に存在することがあり、または全身に広がって、発熱、倦怠感、下痢、および関節痛に関連する。

【0237】

乾癬を有する約半数の患者が、爪への関与を有し、点状のへこみ、爪の肥厚、または爪下の過角化症として出現する。乾癬患者の約5~10%が関節の愁訴に関連し、これらは爪の関与を有する患者に最もしばしば認められる。人によっては、古典的なリウマチ性関節炎と同時に発生するが、多くは、乾癬に関連した五つのタイプの一つに入る関節疾患を有する：（1）単一または少数の関節に限定される疾患（症例の70%）；（2）血清陰性リウマチ性関節炎様疾患；（3）遠位指節間関節の関与；（4）「破壊性関節炎」の発症を伴う重度の破壊性関節炎；および（5）脊柱に限定される疾患。

【0238】

乾癬は、IL-22、IL-20、またはIL-20とIL-22の双方に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する物質を投与することによって治療することができる。好ましいアンタゴニストは、IL-22RA（配列番号：3）のようなIL-20およびIL-22に対する可溶性受容体、または本発明の中和抗体のような、IL-22RA受容体に結合する抗体、抗体断片、もしくは一本鎖抗体のいずれかである。そのようなアンタゴニストは、単独で、または潤滑剤、角質溶解剤、局所コルチコステロイド、局所ビタミンD誘導体、アントラリン、メソトレキセートのような抗代謝剤の全身投与、ソラレン紫外光治療（PUVA）、エトレチネート、イソトレチノイン、シクロスポリン、および局所ビタミンD3誘導体カルシポトリオールのような他の確立された治療と併用して投与することができる。その上、そのようなアンタゴニストは、個体に皮下、静脈内、またはアンタゴニストを含むクリームもしくは経皮パッチを用いて経皮投与することができる。皮下投与する場合、アンタゴニストは、一つまたはそれ以上の乾癬斑に注射することができる。経皮投与する場合、アンタゴニストは、アンタゴニストを含むクリーム、軟膏、軟膏（salve）、または溶液を用いて斑に直接投与することができる。

【0239】

IL-20またはIL-22に対するアンタゴニストは、喘息、気管支炎、嚢胞性線維症、または他の炎症性肺疾患を有する患者に、疾患を治療するために投与することができる。アンタゴニストは、静脈内、皮下、気管支洗浄、およびアンタゴニストを含む吸入剤の使用を含む任意の適した方法によって投与することができる。

【0240】

IL-22RA cDNAに対応するmRNAの組織分布の分析から、mRNAレベルが胎盤および脾臓において最高であること、そしてIL-22RAが結合するリガンド（IL-22）が、急性期反応の誘導を含む炎症反応の誘導に関与していることが示された（Dumoutier, L.ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144~10149、2000）。このように、本発明の特定の態様は、乾癬、乾癬性関節炎、アトピー性皮膚炎、炎症性皮膚疾患、リウマチ性関節炎、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、憩室症、喘息、膵炎、I型糖尿病（IDDM）、膵臓癌、膵炎、グレーブス病、結腸および腸管癌、自己免疫疾患、敗血症、臓器または骨髄移植；内毒素血症、外傷、手術、または感染症による炎症；アミロイドーシス；脾腫；移植片対宿主病；および炎症の阻害、免疫抑制、造血、免疫、炎症、もしくはリンパ様細胞、マクロファージ、T細胞（Th1およびTh2細胞を含む）の増殖の減少、病原体または抗原に対する免疫応答の抑制、またはIL-22もしくはIL-20サイトカインの阻害が望ましい他の場合のような、炎症および免疫疾患または病態においてアンタゴニストとして可溶性IL-22RAおよび抗IL-22RA抗体を用いることに向けられる。

10

【0241】

その上、本明細書に記述のIL-22RAポリペプチドに結合する抗体または結合ポリペプチド、およびIL-22RAポリペプチド自身は、以下に対して有用である。

【0242】

1) 外傷、組織損傷、手術、敗血症、または感染症の結果としての炎症である急性炎症の治療において、喘息、炎症性腸疾患（IBD）、慢性大腸炎、脾腫、リウマチ性関節炎、再発性急性炎症性事例（例えば、結核）のような慢性炎症疾患の治療において、ならびにアミロイドーシスおよびアテローム性動脈硬化症、カストルマン病、喘息、および急性期反応の誘導に関連した他の疾患の治療において、IL-20またはIL-22受容体によるシグナル伝達を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和すること。

20

【0243】

2) 免疫細胞（例えば、リンパ球、単球、白血球）におけるシグナル伝達を防止または阻害するために、IDDM、多発性硬化症（MS）、全身性狼瘡性紅斑（SLE）、重症筋無力症、リウマチ性関節炎、およびIBDのような自己免疫疾患の治療においてIL-20またはIL-22受容体によるシグナル伝達をIL-22RAによって遮断、阻害、減少、拮抗、または中和すること（Hughes, C.ら、J. Immunol. 153: 3319~3325、1994）。または、IL-22RAを含む受容体に対するモノクローナル抗体（MAb）のような抗体も同様に、自己免疫疾患を治療するために、望ましくない免疫細胞を枯渇するためのアンタゴニストとして用いることができる。喘息、アレルギー、および他のアトピー性疾患を、免疫応答を阻害するため、または攻撃的な細胞を枯渇するために、例えば可溶性のIL-22RA受容体に対するMAbによって処置してもよい。本発明のポリペプチドおよび抗体を用いて、IL-22RAによるシグナル伝達を遮断、阻害、減少、または拮抗することも同様に、膵臓、腎臓、下垂体、および神経細胞の疾患に対して利益を有する可能性がある。IDDM、NIDDM、膵炎、および膵臓癌も利益を受ける可能性がある。IL-22RAは、拮抗性MAbが癌の増殖を阻害して免疫媒介殺細胞を標的とする、癌のMAb治療の標的として役立つ可能性がある（Holliger, P. and Hoogenboom, H.: Nature Biotech. 16: 1015~1016、1998）。可溶性IL-22RAに対するMAbも同様に、糸球体硬化症、膜性腎症、アミロイドーシス（同様に他の組織の中でも腎臓に影響を及ぼす）、腎動脈硬化症、様々な原因の糸球体腎炎、腎臓の線維増殖疾患のような腎症と共に、SLE、IDDM、II型糖尿病（NIDDM）、腎腫瘍、および他の疾患に関連した腎機能障害を治療するために有用となる可能性がある。

30

40

【0244】

3) IDDM、MS、SLE、重症筋無力症、リウマチ性関節炎、およびIBDのような自己免疫疾患の治療において、IL-20またはIL-22受容体によるシグナル伝達に拮抗、増強、増加、または開始すること。抗IL-22RA中和性モノクローナル抗体は、リンパ球または他の免疫細胞に、分化する、増殖を変化させる、自己免疫を改善するサイトカインまたは細胞表面タンパク質の産生を変化させるようにシグナルを送る可能性がある。特に、T-ヘルパー細胞

50

反応を、交互のサイトカイン分泌パターンへと調節すると、自己免疫反応を疾患を改善するように偏らせる可能性がある (Smith, JAら、J. Immunol. 160 : 4841 ~ 4849、1998)。同様に、アゴニスト抗可溶性IL-22RA、抗可溶性IL-22RA/CRF2-4ヘテロ二量体および多量体モノクローナル抗体を用いて、喘息、アレルギー、およびアトピー疾患に關与する免疫細胞にシグナルを送る、枯渇する、および偏らせてもよい。IL-22RAによるシグナル伝達はまた、膵臓、腎臓、下垂体、および神経細胞の疾患にも有用となる可能性がある。IDDM、NIDDM、膵炎、および膵臓癌も同様に利益を受ける可能性がある。IL-22RAは、シグナル伝達性のMAbが癌の増殖を阻害して、免疫媒介性殺細胞を標的とする場合、膵臓癌のMAb治療の標的として役立つ可能性がある (Tutt, AL.ら、J. Immunol. 161 : 3175 ~ 3185、1998)。同様に、腎細胞癌は、本発明のIL-22RA含有可溶性受容体に対するモノクローナル抗体によって治療してもよい。

10

【 0 2 4 5 】

本明細書に記述の可溶性IL-22RAポリペプチドは、上記のように自己免疫疾患、アトピー疾患、NIDDM、膵炎、および腎機能障害の治療において、単独または共に、IL-22またはIL-20に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和するために用いることができる。IL-22RAの可溶性型は、Th細胞によって媒介される抗体反応を促進する、および/またはリンパ球または他の免疫細胞によってIL-4または他のサイトカインの産生を促進するために用いてもよい。

【 0 2 4 6 】

本発明の可溶性IL-22RA含有受容体は、IL-20またはIL-22サイトカインのアンタゴニストとして有用である。そのようなアンタゴニスト効果は、直接中和またはIL-20またはIL-22の結合によって行うことができる。アンタゴニストとしての用途の他に、本発明の可溶性受容体は、体内の異なる組織、臓器、および細胞にリガンドを輸送するために、IL-22に結合して、IL-20またはIL-22サイトカインの担体タンパク質として作用することができる。そのため、本発明の可溶性受容体は、組織、特異的免疫細胞、または腫瘍のような特定の部位に可溶性受容体-リガンド複合体を向ける分子、ポリペプチド、または化学物質に融合または結合させることができる。例えば、急性反応またはいくつかの癌において、IL-22の作用による炎症および局所急性期反応タンパク質の誘導から利益が得られる可能性がある。このように、本発明の可溶性受容体は、IL-20またはIL-22の作用を特異的に向けるために用いることができる。Cosman, D., Cytokine 5 : 95 ~ 106、1993 ; およびFernandez-Botran, R., Exp. Opin. Invest. Drugs 9 : 497 ~ 513、2000を参照されたい。

20

30

【 0 2 4 7 】

その上、本発明の可溶性受容体を用いて、リガンドを分解もしくは排泄から安定化することによって、または体内での作用部位にリガンドをターゲティングすることによって、IL-22またはIL-20を安定化するために、リガンドの生物学的利用率、治療の寿命、および/または有効性を増加させることができる。例えば、天然に存在するIL-6/可溶性IL-6複合体は、IL-6を安定化させて、gp130受容体を通してシグナルを伝達することができる。Cosman, D., 上記およびFernandez-Botran, R., 上記を参照されたい。その上、IL-22RAは、リガンド/可溶性受容体複合体を含むように、IL-22のような同源のリガンドと併用してもよい。そのような複合体を用いて、例えば、pDIRS1 (IL-20RB) またはCRF2-4 (IL-10RB) のようなコンパニオン受容体サブユニットを表す細胞からの反応を刺激してもよい。IL-22RA/リガンド複合体の細胞特異性は、単独で投与したリガンドについて認められた特異性とは異なる可能性がある。さらに、複合体は、半減期、用量/反応および臓器または組織特異性に影響を及ぼすような、異なる薬物動態特性を有する可能性がある。このように、IL-22RA/IL-22またはIL-22RA/IL-20複合体は、免疫応答を増強する、メサングウム細胞を刺激する、または肝細胞を刺激するアゴニスト活性を有する可能性がある。または、シグナル伝達サブユニットを発現する組織のみが複合体とヘテロ二量体を形成することは、IL6/IL6R複合体に対する反応と同様に影響を受ける可能性がある (Hirota, H.ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 92 : 4862 ~ 4866、1995 ; Hirano, T., Thomason, A. (編), 「The Cytokine Handbook」、第三版、208 ~ 209頁)。IL12およびCNTFに関する可溶性受容体/

40

50

サイトカイン複合体は、類似の活性を示す。

【0248】

その上、炎症は、浸潤物質をかわすために生物による保護反応である。炎症は、多くの細胞および液性メディエータを含むカスケード事象である。一方、炎症反応を抑制すると、宿主を免疫無防備状態にしうる；しかし、チェックされないままにすると、炎症によって、慢性炎症疾患（例えば、乾癬、関節炎、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患等）、敗血症ショックおよび多臓器不全を含む重篤な合併症が起こりうる。重要なことは、これらの多様な疾患状態は、共通の炎症メディエータを共有する。炎症の特徴を示す集合的疾患は、ヒトの罹患率および死亡率に大きい影響を及ぼす。したがって、IL-22RAおよび抗IL-22RA抗体のような抗炎症タンパク質は、喘息およびアレルギーから自己免疫および敗血症ショックに至る多数のヒトおよび動物疾患にとって非常に重要な治療可能性を有しうるであろうことは明白である。

10

【0249】

1. 関節炎

変形性関節炎、リウマチ性関節炎、損傷の結果としての関節炎関節等を含む関節炎は、本発明のIL-22RAポリペプチドのような抗炎症タンパク質の治療的使用によって利益が得られるであろう一般的な炎症疾患である。例えば、リウマチ性関節炎（RA）は、全身に罹患する全身性の疾患であり、関節炎の最も一般的な型の一つである。これは、疼痛、こわばり、暖かさ、発赤、および腫脹を引き起こす関節の内側の膜の炎症を特徴とする。炎症細胞は、骨および軟骨を消化する酵素を放出する。リウマチ性関節炎の結果として、炎症を起こした関節の内層、すなわち滑膜が、骨および軟骨に浸潤して損傷を与え、関節の悪化および他の生理的作用の中でも重度の疼痛が起こる。罹患した関節はその形状および配置を失い、疼痛および運動不能が起こる。

20

【0250】

リウマチ性関節炎（RA）は、重度の無能力および死亡率の増加に至る炎症およびその後の組織損傷を特に特徴とする免疫媒介疾患である。リウマチ関節において多様なサイトカインが局所産生される。多くの研究から、二つの原型的前炎症性サイトカインであるIL-1およびTNF- α が、滑膜の炎症および進行性の関節破壊に関与するメカニズムにおいて重要な役割を果たすことが証明された。実際に、RA患者におけるTNF- α およびIL-1阻害剤の投与によって、炎症の臨床および生物学的兆候の劇的な改善が起こり、骨侵食および軟骨破壊の放射線による兆候が減少する。しかし、これらの勇気づけられる結果にもかかわらず、患者の有意な割合はこれらの物質に対して反応せず、他のメディエータも同様に関節炎の病理生理学に関与していることを示唆している（Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2 (2): 135~149, 2002）。それらのメディエータの一つは、IL-20またはIL-22となりえて、IL-22RAポリペプチドまたは抗IL-22RA抗体もしくは結合パートナーのような、IL-22またはIL-20に結合またはその活性を阻害するそのような分子は、リウマチ性関節炎および他の関節炎疾患における炎症を減少させるために重要な治療物質として役立つ。

30

【0251】

当技術分野で既知のリウマチ性関節炎のいくつかの動物モデルが存在する。例えば、コラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルにおいて、マウスはヒトのリウマチ性関節炎に非常に類似の慢性炎症性関節炎を発症する。CIAはRAと類似の免疫学的および病理学的特徴を共有することから、これは可能性があるヒトの抗炎症化合物をスクリーニングするための理想的なモデルとなる。CIAモデルは、その発生が免疫応答および炎症反応の双方に依存する、マウスにおける周知のモデルである。免疫応答は、抗原として投与されるコラーゲンに反応したB-細胞およびCD4⁺ T細胞の相互作用を含み、抗コラーゲン抗体の産生に至る。炎症相は、これらの抗体のいくつかはマウスの本来のコラーゲンと相互作用して、補体カスケードを活性化させた結果として、炎症のメディエータからの組織反応の結果である。CIAモデルを用いる長所は、発病の基礎メカニズムが既知である点である。II型コラーゲン上での関連するT-細胞およびB-細胞エピトープが同定されており、免疫媒介関節炎に関する様々な免疫学的（例えば、遅延型過敏症および抗コラーゲン抗体）、および炎症性（

40

50

例えば、サイトカイン、ケモカイン、およびマトリクス分解酵素)パラメータが決定されており、このように、CIAモデルにおける試験化合物の有効性を評価するために用いることができる(Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3: 407~20, 1999; Williamsら、Immunol. 89: 9784~788, 1992; Myersら、Life Sci. 61: 1861~78, 1997; およびWangら、Immunol. 92: 8955~959, 1995)。

【0252】

zcytor16-Fc4または他のIL-22RA2可溶性および融合タンパク質のような、ポリペプチド(zcytor16)を含む可溶性IL-22RA2をこれらのCIAモデルマウスに投与することを用いて、疾患の症状を改善するため、および経過を改変するために用いられるIL-22に対するアンタゴニストとしてIL-22RAを用いることを評価した。その上、IL-22RA2によるIL-22の阻害を示す結果は、IL-22RAまたはそれに対する抗体のような他のIL-22アンタゴニストも同様に、疾患の症状を改善するためおよび疾患の経過を変化させるために用いることができる。IL-22RA2のリガンドであるIL-22は、リウマチ性関節炎の発病に關与するSAAの産生を誘導すること、ならびにIL-22RA2は、IL-22およびSAA活性をインビトロおよびインビボで阻害できることが証明されていることから、zcytor16-Fc4または他のIL-22可溶性受容体(例えば、IL-22RA; 配列番号: 3)のようなIL-22RA2含有ポリペプチド、抗IL-22RA抗体、および融合タンパク質の全身または局所投与は、おそらくRAにおいて炎症反応を抑制することができる。zcytor16-Fc 10 μg(週に3回4週間)の注射は、疾患のスコア(足のスコア、炎症または疾患の発生率)を有意に減少させた。他の可能性がある治療物質には、IL-22RAポリペプチド、抗IL-22RA抗体、または抗IL-22抗体もしくは結合パートナー等が含まれる。

10

20

【0253】

抗マウスIL-22抗体が、対照マウスと比較してマウスCIAモデルにおいて症状を減少させる可能性があることが、一つの研究グループによって示され、このように可溶性IL-22RAポリペプチドおよびIL-22RAに対する中和抗体が、ヒト疾患の治療において有用となる可能性があることを概念的に示している。マウスIL-22特異的ラットモノクローナル抗体(P3/1)を、予防的に導入した場合に、またはCIA誘導関節炎がモデルにおいて誘導された後に1回投与すると、動物における関節炎の症状は減少した(WIPO出願国際公開公報02/068476号; 2002年9月9日に公表)。したがって、本発明の可溶性IL-22RAポリペプチドおよび本発明の中和性抗ヒトIL-22RA抗体を含む抗IL-22RA抗体は、乾癬、乾癬性関節炎、関節炎、内毒素血症、炎症性腸疾患(IBD)、大腸炎、および本明細書に開示の他の炎症疾患のような特定のヒト疾患の治療において、IL-22およびIL-20を中和するために用いることができる。

30

【0254】

2. 内毒素血症

内毒素血症は、細菌および他の感染性疾患物質のような感染因子、敗血症、毒性ショック症候群に一般的に起因する、または日和見感染を受ける免疫無防備患者において起こる重度の病態である。本発明のIL-22RAポリペプチドおよび抗体のような治療的に有用な抗炎症性タンパク質は、ヒトおよび動物において内毒素血症を予防および治療するために役立つ。IL-22RAポリペプチド、抗IL-22RA抗体、または抗IL-22抗体もしくは結合パートナーは、内毒素血症において炎症および病理作用を減少させるために貴重な治療物質として役立つ。

40

【0255】

リポ多糖類(LPS)誘導内毒素血症は、感染疾患において病的作用を生じる多くの前炎症性メディエータに關与して、齧歯類におけるLPS誘導内毒素血症は、可能性がある前炎症性または免疫調節物質の薬理学的作用を研究するために広く用いられている許容されるモデルである。グラム陰性菌によって産生されるLPSは、敗血症ショックの発病における主な原因物質である(Glausnerら、Lancet 338: 732, 1991)。ショック様の状態は実際に、LPSを動物に1回注射することによって実験的に誘導することができる。LPSに反応性の細胞によって産生された分子は、病原体を直接または間接的に標的とすることができる

50

。これらの生物反応は、浸潤病原体に対して宿主を保護するが、それらはまた害を引き起こす可能性がある。このように、重度のグラム陰性菌感染症の結果として起こる生得の免疫の大量の刺激により、サイトカインおよび他の分子の過剰な産生が起こり、発熱、血圧低下、播種性血管内凝固、および多臓器不全を特徴とする、致死性の症候群である敗血症症候群が起こる（Dumitruら、Cell 103：1071～1083、2000）。

【0256】

LPSのこれらの毒性作用は、ほとんどが多数の炎症性メディエータの放出に至るマクロファージ活性化に関連している。これらのメディエータの中で、TNFは中和性抗TNF抗体の投与によってLPS毒性の予防によって示されるように、重要な役割を果たすように思われる（Beutlerら、Science 229：869、1985）。大腸菌LPS 1 μgをC57Bl/6マウスに注射すると、注射後約2時間で循環中のIL-6、TNF- α 、IL-1、および急性期タンパク質（例えば、SAA）が有意に増加するであろうことは十分に確立されている。LPSの毒性は、これらのメディエータに対する受動免疫によって死亡率が減少しうることから（Beutlerら、Science 229：869、1985）、これらのサイトカインによって媒介されるように思われる。敗血症ショックの予防および/または治療に関して可能性がある免疫介入戦略には、抗TNF mAb、IL-1受容体アンタゴニスト、LIF、IL-10、およびG-CSFが含まれる。

【0257】

zcytor16-Fc4または他のIL-22RA可溶性および融合タンパク質のような可溶性IL-22RA2を含むポリペプチドをこれらのLPS誘導モデルに投与することを用いて、症状を改善するおよびLPS誘導疾患の経過を変化させるためにIL-22RA2を用いることを評価した。その上、IL-22RA2によるIL-22の阻害を示す結果は、IL-22RAまたはそれに対する抗体のような他のIL-22アンタゴニストも同様に、LPS誘導モデルにおける症状を改善させ、疾患の経過を変化させるために用いることができるという考え方の証拠を提供する。モデルは、LPS注射によるIL-22の誘導、およびIL-22RA2ポリペプチドによる疾患の治療の可能性を示した。LPSは、おそらく内毒素血症の病理に関与する前炎症性IL-22、SAA、または前炎症性因子の産生を誘導することから、アンタゴニストであるIL-22RA2ポリペプチドによるIL-22活性、SAA、または他の前炎症性因子の中和を用いて、エンドトキシンショックにおいて認められるような、内毒素血症の症状を減少させることができる。他の可能性がある治療物質には、IL-22RAポリペプチド、抗IL-22RA抗体、または抗IL-22抗体もしくは結合パートナー等が含まれる。

【0258】

3. 炎症性腸疾患、IBD

米国において、約500,000人の人が、結腸および直腸（潰瘍性大腸炎）またはその双方、小腸および大腸（クローン病）に影響を及ぼしうる炎症性腸疾患（IBD）を有する。これらの疾患の発病は不明であるが、それらは罹患組織の慢性の炎症を伴う。IL-22RAポリペプチド、抗IL-22RA抗体、または抗IL-22抗体もしくは結合パートナーは、IBDおよび関連疾患における炎症および病理作用を減少させるために重要な治療物質として役立つであろう。

【0259】

潰瘍性大腸炎（UC）は、結腸の粘膜または最も内側の内層の炎症および潰瘍化を特徴とする、一般的に結腸と呼ばれる大腸の炎症疾患である。この炎症は、結腸をしばしば空にして、下痢を引き起こす。症状には軟便および関連する腹部こむらえり、発熱、および体重減少が含まれる。UCの正確な原因は不明であるが、最近の研究から、体が異物であると考えられる体内のタンパク質に対して体の天然の防御が作用する（「自己免疫」）ことが示唆されている。おそらく、それらは腸管における細菌タンパク質に類似することから、これらのタンパク質は、結腸の内層を破壊し始める炎症プロセスを煽動または刺激する可能性がある。結腸の内層が破壊されると、粘液、膿、および血液を放出する潰瘍が形成される。疾患は最終的に直腸領域で始まり、最終的に大腸全体に広がることもある。繰り返し炎症が起こると、腸壁が肥厚して、直腸に瘢痕組織が残る。結腸組織の死または敗血症は、重度の疾患と共に起こる可能性がある。潰瘍性大腸炎の症状は、重症度およびその発病

が多様であり、徐々に、または突然始まることがある。発症は、呼吸器感染症またはストレスを含む多くの要因によって誘発される可能性がある。

【0260】

利用できるUCの治癒法は現在のところないが、治療は、結腸内層における異常な炎症プロセスの抑制に重点が置かれている。コルチコステロイド、免疫抑制剤（例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、およびメソトレキセート）およびアミノサリチレートを含む治療が、疾患を治療するために利用できる。コルチコステロイドおよびアザチオプリンのような免疫抑制剤の長期使用によって、骨の薄化、白内障、感染症、ならびに肝臓および骨髄作用を含む重篤な副作用が起こりうる。現在の治療が成功していない患者では、手術も選択肢である。手術は、結腸全体および直腸の摘出を含む。

10

【0261】

慢性の潰瘍性大腸炎を部分的に模倣することができるいくつかの動物モデルがある。最も広く用いられているモデルは、2,4,6-トリニトロペンシルホン酸ノエタノール（TNBS）誘導大腸炎モデルであり、これは結腸の慢性炎症および潰瘍化を誘導する。TNBSが直腸内点滴によって感受性があるマウスの結腸に導入されると、TNBSは結腸粘膜においてT-細胞媒介免疫応答を誘導し、この場合、大腸の壁全体を通してのT細胞およびマクロファージの密な浸潤を特徴とする大量の粘膜炎症が起こる。その上、この組織病理学的所見は、進行性の体重減少（衰弱）、血便、直腸脱、および大腸壁肥厚の臨床所見を伴う（Neurathら、Intern. Rev. Immunol. 19: 51~62、2000）。

【0262】

20

もう一つの大腸炎モデルは、血便、体重減少、結腸の短縮、および好中球の浸潤を伴う粘膜潰瘍化を症状とする急性大腸炎を誘導する硫酸デキストランナトリウム（DSS）を用いる。DSS誘導大腸炎は、リンパ様過形成、巣状陰窩損傷、および上皮潰瘍化を伴う固有層への炎症細胞の浸潤を組織学的に特徴とする。これらの変化は、上皮におけるDSSの毒性作用、固有層の細胞の貪食、およびTNF- α およびIFN- γ の産生のために発症するように思われる。その一般的な使用にもかかわらず、ヒト疾患に関連するDSSのメカニズムに関するいくつかの問題は解決されないままである。DSSは、SCIDマウスのようなT-細胞欠損動物において認められることから、T細胞非依存的であると見なされる。

【0263】

30

IL-22 α 1-Fc4または他のIL-22RA可溶性および融合タンパク質のような可溶性のIL-22RA2含有ポリペプチドをこれらのTNBSまたはDSSモデルに投与することを用いて、消化管疾患の症状を改善させて、経過を変化させるためにIL-22RAを用いることを評価することができる。その上、IL-22RA2によるIL-22の阻害を示す結果は、IL-22RAまたはそれに対する抗体のような他のIL-22アンタゴニストも同様に大腸炎/IBDモデルにおける症状を改善するためにおよび疾患の経過を変化させるために用いることができるという考え方の証拠を提供する。本発明者らは、RT-PCRによってDSS-マウスの結腸組織におけるIL-22の発現の増加、および腸細胞株に及ぼすIL-22とIL-1 β との相乗活性を認めた。IL-22は大腸炎における炎症反応において役割を有する可能性があること、およびIL-22RA2ポリペプチドの投与によるIL-22活性の中和は、IBDに関して可能性がある治療的アプローチであることを示している。他の可能性がある治療物質には、IL-22RAポリペプチド、抗IL-22RA抗体、または抗IL-22抗体もしくは結合パートナー等が含まれる。

40

【0264】

4. 乾癬

乾癬は、700万人より多いアメリカ人が罹患する慢性皮膚疾患である。乾癬は、新しい皮膚細胞が異常に増殖する際に起こり、皮膚の炎症、腫脹、および鱗片様小片が起こり、乾癬部位では古い皮膚が速やかに剥がれ落ちない。最も一般的な型である斑状乾癬は、銀白色の鱗片が上部に存在する皮膚の炎症小片（「病変」）を特徴とする。乾癬は、少数の斑に限定される、または中等度から広汎な領域の皮膚に罹患する可能性があり、頭皮、膝、肘、および躯幹において最も一般的に認められる。乾癬は非常によく目につくが、感染性の疾患ではない。疾患の発病は、罹患組織の慢性炎症を伴う。IL-22RAポリペプチド、

50

抗IL-22RA抗体、または抗IL-22および抗IL-20抗体もしくは結合パートナーは、乾癬、他の炎症性皮膚疾患、皮膚および粘膜アレルギー、ならびに関連疾患における炎症および病理作用を減少させるために重要な治療物質として役立つであろう。

【0265】

乾癬は、かなりの不快感を引き起こしうる皮膚のT細胞媒介炎症障害である。これは、治癒することはなく、全ての年齢の人に罹患する疾患である。乾癬は、ヨーロッパおよび北アメリカの人口の約2%に罹患する。軽度の乾癬を有する人は、しばしばその疾患を外用药によって制御できるが、世界中で100万人を超える人が紫外線または全身性の免疫抑制剤治療を必要としうる。残念なことに、紫外線照射の不便さおよびリスクならびに多くの治療の毒性のために、長期間の使用が制限される。その上、患者は通常、乾癬の再発を有して、場合によっては、免疫抑制剤療法を中止した直後にリバウンドが起こる。

10

【0266】

IL-20は、IL-20トランスジェニックマウスにおいて異常な上皮分化を含む皮膚異常を有する新生児致死を引き起こすことが示されている新規IL-10相同体である(Blumberg, H.ら, Cell 104: 9~19, 2001)。IL-20受容体は、乾癬皮膚において劇的にアップレギュレートされている。IL-22はIL-20受容体と受容体サブユニット(zcytor11)を共有し、IL-22トランスジェニックマウスは類似の表現型を示すことから、IL-22も同様に、乾癬のような炎症性皮膚疾患に関与する可能性がある。IL-22RAポリペプチドまたは抗IL-22RA抗体アンタゴニストの皮下または局所皮膚への投与は、炎症および症状を減少させる可能性がある。他の可能性がある治療物質には、IL-22RAポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、または抗IL-22抗体もしくは結合パートナーが含まれる。

20

【0267】

その上、IL-22およびIL-20の過剰発現は、ヒト乾癬病変において示され、IL-20と同様に、IL-22もまたヒト乾癬において関与していることを示唆している。その上、本明細書に記述するように、トランスジェニックマウスにおけるIL-20またはIL-22の過剰発現は、乾癬の表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の関与を示している；およびさらに、IL-22を正常なマウスに注射すると、乾癬表現型を示す上皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、これは可溶性受容体アンタゴニストIL-22RA2によって消失した(zcytor16; WIPO公開番号国際公開公報第01/40467号)。そのようなインビボデータはさらに、前炎症性IL-22が乾癬に関与していることを示唆している。そのため、IL-22RA可溶性受容体および本発明の抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれに対する抗体のような、IL-22およびIL-20活性に対するアンタゴニストは、炎症疾患の治療的治療において有用であり、特にIL-22とIL-20の双方に対するアンタゴニストとして乾癬の治療において単独または併用して有用である。その上、IL-22RA可溶性受容体および本発明の抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体および中和抗体を含むそれに対する抗体のような、IL-22活性に対するアンタゴニストは、他の炎症疾患の治療的治療において、例えばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒素血症、関節炎、リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎のような炎症性肺損傷、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性および接触性皮膚炎、ならびに潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患の治療において、IL-22およびIL-20に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する物質として有用である。

30

40

【0268】

その上、本発明の抗IL-22RA抗体およびそのIL-22RA可溶性受容体は、本明細書に記述の多くの炎症疾患に関連した体重減少に対する予防および治療と共に、癌(例えば、化学療法およびカヘキシア)ならびに感染疾患のために用いることができる。例えば、重度の体重減少は、敗血症モデル、MS、RA、および腫瘍のモデルに関連した重要なマーカーである。さらに、体重減少は、癌、感染疾患、および炎症疾患を含む多くのヒト疾患に関する重要なパラメータである。体重減少は、本明細書に記述のIL-22アデノウイルスを注射したマウスにおいて示された。本発明の抗IL-22抗体、ならびに可溶性IL-22RA受容体およびそれに対する抗体のような、IL-22アンタゴニストは、zcytor16(IL-22RA2)受容体と共に

50

、本明細書に記述のIL-22アデノウイルスを注射したマウスにおいて体重減少を予防および治療することができるか否かに関して調べることができる。そのようなIL-22アンタゴニストの予防的または治療的レジメを決定する方法は、当技術分野において既知であり、本明細書に記述の方法を用いて決定することができる。

【0269】

IL-22RA可溶性受容体ポリペプチドおよびそれに対する抗体はまた、循環中のIL-22またはIL-20リガンドレベルを検出する診断システムにおいて、および急性期炎症反応に関連したIL-22を検出するために用いてもよい。関連する態様において、本発明のIL-22RA可溶性受容体に特異的に結合する抗体または他の物質を用いて、循環中の受容体ポリペプチドを検出することができる；逆に、IL-22RA可溶性受容体そのものを用いて、循環中または局所作用型IL-22またはIL-20ポリペプチドを検出することができる。リガンドまたは受容体ポリペプチドのレベルの上昇または低下は、炎症または癌を含む病態を示す可能性がある。IL-22は、関連する急性期炎症反応を誘導することが知られている。その上、IL-20またはIL-22のような急性期タンパク質または分子の検出は、特定の疾患状態（例えば、乾癬、リウマチ性関節炎、大腸炎、IBD）における慢性炎症状態を示しうる。そのような状態の検出は、疾患の診断において役立つと共に医師が適切な治療を選択する場合に役立つ。

10

【0270】

中和性抗IL-22またはIL-20抗体の子宮内投与を用いて、IL-22を過剰発現するIL-22トランスジェニック仔、またはIL-20を過剰発現するIL-20トランスジェニック仔において認められた皮膚表現型を減少または消失させることによって、疾患モデルにおいてインビボで有効性を示すことができる。当技術分野には、中和性モノクローナル抗体(mAb)による子宮内治療に関する先例が存在する。一つの例において、B細胞のB-1サブセットの発生は、B-細胞特異的分子であるCD19に対して特異的なmAbによって妊娠雌性マウスを処置すると、劇的に影響を受けた（例えば、Krop, I.ら、Eur. J. Immunol. 26(1):238~42、1996）。Kropらは、ラット抗マウスCD19mAb（またはラットアイソタイプマッチ対照Ab）500 µgのPBS溶液を計画妊娠マウスの妊娠9日目から腹腔内注射して、その後出産まで1日おきに注射した。仔にもこれらの抗体500 µgを10日齢の際に1回注射した。もう一つの場合において、Tanakaらは、IL-2受容体鎖に対するモノクローナル抗体による子宮内処置がThy-1+樹状表皮細胞の発達を完全に消失させることを発見した。IL-2受容体の二つの異なるサブユニット、すなわち鎖(IL-2R α)と鎖(IL-2R β)は、胎児胸腺個体発生を通してほぼ相互に排他的に発現される。IL-2R β に対する中和性mAbを投与することによって、IL-2Rのシグナル伝達成分であるIL-2R β を遮断すると、Thy-1+皮膚樹状表皮細胞の完全かつ選択的な消失が起こった。他の任意のT細胞サブセットの発達は影響を受けなかった。このことは、IL-2、が胎児V β 5+細胞およびその子孫の発達において重要な役割を有することを示した（Tanaka, T.ら、Int. Immunol. 4(4):487~9、1992を参照されたい）。さらに、Schattmann GCらは、子宮内系を用いて正常なマウス心血管発達にとってPDGF-Aが必要であることを示した。いくつかの系統の証拠から、血小板由来増殖因子A鎖(PDGF-A)が、胎児心血管発達に必要であることが示唆されている。子宮内でマウス脱落膜に抗PDGF-A中和抗体を導入すると、インビボでPDGF-Aリガンド受容体相互作用が18~24時間選択的に破壊され、PDGF-Aが心血管発達にとって必要であるか否か、および必要とされる時期はいつかを評価することができた（Schattmann, GCら、Dev. Biol. 176(1):133~42、1996）。これらの結果は、当技術分野に記載の他の結果と共に、中和性mAbが子宮内で強い作用を誘発できる証拠を提供する。同様に、IL-20およびIL-22をそれぞれ過剰発現するIL-20およびIL-22トランスジェニック仔において認められる皮膚表現型を減少または消失させるための疾患モデルにおいて、インビボでモノクローナル抗体によってIL-20またはIL-22を中和する有効性を示すデータを示すことができる。これらのトランスジェニックマウスは、少なくとも部分的に、本明細書に記述の表皮の肥厚のために「光る」皮膚外観を持って生まれた。かなり低レベルのトランスジェニックサイトカインを発現するIL-20 TG仔は、回復して生存し交配させることができるが、IL-22 TGマウスは生後間もな

20

30

40

50

く、一般的に5日齢までに死亡する。

【0271】

例えば、IL-20に対する中和抗体には、IL-20抗原性エピトープに結合して、IL20活性を中和することができる中和モノクローナル抗体のような抗体が含まれる。したがって、IL-20の抗原性エピトープを有するペプチドおよびポリペプチドは、本明細書に記述のIL-20ポリペプチドに結合する抗体を作製するために有用であると共に、中和性であって、IL-20に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する可能性がある抗IL-20モノクローナル抗体を同定およびスクリーニングするために有用である。本発明のそのような中和モノクローナル抗体は、IL-20抗原性エピトープに結合することができる。Jameson-Wolfプロット、例えばDNASTAR Proteanプログラム(DNASTAR Inc.、マディソン、ウィスコンシン州)を用いて予測されるような配列番号:8におけるそのようなエピトープは、好ましい抗原性エピトープとして役立ち、当業者によって決定することができる。そのような抗原性エピトープには:配列番号:8のアミノ酸番号42(Ile)~102(Asp);配列番号:8のアミノ酸番号42(Ile)~60(Ile);配列番号:8のアミノ酸番号42(Ile)~69(Glu);配列番号:8のアミノ酸番号42(Ile)~81(Cys);配列番号:8のアミノ酸番号42(Ile)~96(Lys);配列番号:8のアミノ酸番号42(Ile)~102(Asp);配列番号:8のアミノ酸番号60(Ile)~69(Glu);配列番号:8のアミノ酸番号60(Ile)~81(Cys);配列番号:8のアミノ酸番号60(Ile)~96(Lys);配列番号:8のアミノ酸番号60(Ile)~102(Asp);配列番号:8のアミノ酸番号69(Glu)~81(Cys);配列番号:8のアミノ酸番号69(Glu)~96(Lys);配列番号:8のアミノ酸番号69(Glu)~102(Asp);配列番号:8のアミノ酸番号81(Cys)~96(Lys);配列番号:8のアミノ酸番号81(Cys)~102(Asp);および配列番号:8のアミノ酸番号96(Lys)~102(Asp)が含まれる。

10

20

【0272】

本明細書に記述の他の疾患モデルの他に、ヒト乾癬病変に由来する炎症組織に及ぼす抗IL-22RA抗体の活性を、重度の複合免疫欠損(SCID)マウスモデルを用いてインビボで測定することができる。ヒト細胞を免疫欠損マウスに移植した(集合的に異種移植片モデルと呼ばれる)いくつかのマウスモデルが開発されている;例えばCattan AR, Douglas E., Leuk. Res. 18: 513~22, 1994およびFlavell, DJ., Hematological Oncology 14: 67~82, 1996を参照されたい。乾癬のインビボ異種移植片モデルとして、ヒト乾癬皮膚組織をSCIDマウスモデルに移植して、適当なアンタゴニストをチャレンジした。その上、AGR129マウスモデルに移植して、適当なアンタゴニストをチャレンジしたヒト乾癬皮膚移植片のような、当技術分野における他の乾癬動物モデルを用いて、IL-20およびIL-22アンタゴニストを評価してもよい(例えば、参照として本明細書に組み入れられる、Boyman, O.ら、J. Exp. Med. オンライン出版第20031482号、2004を参照されたい)。IL-22またはIL-20とIL-22の双方に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する抗IL-22RA抗体は、好ましいアンタゴニストであるが、抗IL-20および抗IL-22抗体(単独または併用して)、可溶性IL-22RAと共に他のIL-20およびIL-22アンタゴニストもこのモデルにおいて用いることができる。同様に、ヒト大腸炎、IBD、関節炎、または他の炎症病変に由来する組織または細胞をSCIDモデルにおいて用いて、本明細書に記述のIL-20およびIL-22アンタゴニストの抗炎症特性を評価することができる。

30

40

【0273】

抗IL-22RA抗体またはその誘導体、アゴニスト、結合体、または変種を用いて炎症を消失、遅延、または減少させるように計画された治療は、ヒト炎症組織(例えば、乾癬病変等)を有するSCIDマウスまたは本明細書に記述の他のモデルに、抗IL-22RA抗体または可溶性IL-22RA化合物を投与することによって調べることができる。治療の有効性は、当技術分野で周知の方法を用いて処置集団における抗炎症作用の経時的な増加として測定して統計学的に評価した。いくつかの例としての方法には、例えば、乾癬モデルにおいて、表皮の肥厚、上部表皮における炎症細胞数、および過角化症の等級の測定が含まれるがこれらに限定されない。そのような方法は当技術分野で既知であり、本明細書に記述される。

50

例えば、Zeigler, M.ら、Lab. Invest. 81:1253、2001; Zollner, T.M.ら、J. Clin. Invest. 109:671、2002; Yamanaka, N.ら、Microbiol. Immunol. 45:507、2001; Raychaudhuri, S.P.ら、Br. J. Dermatol. 144:931、2001; Boehncke, W.H.ら、Arch. Dermatol. Res. 291:104、1999; Boehncke, W.H.ら、J. Invest. Dermatol. 116:596、2001; Nickoloff, B.J.ら、Am. J. Pathol. 146:580、1995; Boehncke, W.H.ら、J. Cutan. Pathol. 24:1、1997; Sugai, J.M.ら、J. Dermatol. Sci. 17:85、1998; およびVilladsen, L.S.ら、J. Clin. Invest. 112:1571、2003を参照されたい。炎症はまた、試料中に存在する炎症または病変細胞数、IBDのスコア（体重減少、下痢、直腸出血、結腸の長さ）、足疾患スコア、およびCIA RAモデルの炎症スコアを定量するために、フローサイトメトリ（またはPCR）のような周知の方法を用いて経時的にモニターしてもよい。例えば、そのようなモデルにおいて試験するために適切な治療戦略には、抗IL-22RA抗体とそのリガンドであるIL-20およびIL-22との相互作用の破壊に基づいて、抗IL-22RA抗体、他のIL-20およびIL-22アンタゴニスト（単独または併用）、もしくは関連する結合体もしくはアンタゴニストを用いる直接治療、または抗IL-22RA抗体もしくはその誘導体、アゴニスト、結合体、もしくは変種を利用した細胞に基づく治療が含まれる。

10

20

30

40

50

【0274】

その上、乾癬は、過形成表皮ケラチノサイトおよびCD4+メモリーT細胞、好中球、およびマクロファージを含む浸潤性単核球に関連する慢性炎症皮膚疾患である（Christophers、Int. Arch. Allergy Immunol. 110:199、1996）。現在、環境抗原が疾患の開始および病理への関与において重要な役割を果たすと考えられている。しかし、乾癬の病理を媒介すると考えられているのは自己抗原の寛容の喪失である。樹状細胞およびCD4⁺ T細胞は、発病に至る免疫応答を媒介する抗原提示および認識において重要な役割を果たすと考えられている。本発明者らは、最近、CD4+CD45RB移入モデルに基づく乾癬モデルを開発した（Davenportら、Internat. Immunopharmacol. 2:653~672）。本発明の抗IL-22RA抗体のような、抗IL-20、抗IL-22またはIL-20Rおよび/またはIL-22Rに対する抗体、または可溶性IL-22RAをマウスに投与する。疾患のスコア（皮膚病変、炎症性サイトカイン）が阻害されれば、乾癬におけるIL-20およびIL-22アンタゴニスト、例えば抗IL-22RA抗体またはIL-22RA可溶性受容体、またはIL-20および/またはIL-22もしくはその受容体に対する抗体のような他のアンタゴニストの有効性が示される。

【0275】

アトピー性皮膚炎

IL-20およびIL-22はいずれもヒトアトピー性皮膚炎（AD）患者の試料においてアップレギュレートされている。ADは、ヘルパーT細胞サブセット2（Th2）の高度活性化サイトカインを特徴とする一般的な慢性炎症疾患である。ADの正確な病因は不明であるが、活動亢進Th2免疫応答、自己免疫、感染症、アレルゲン、および遺伝的素因を含む多数の要因が関与している。疾患の重要な特徴には、乾皮症（皮膚の乾燥）、そう痒症（皮膚の痒み）、結膜炎、炎症性皮膚病変、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）感染症、血液好酸球増加症の増加、血清IgEおよびIgG1の上昇、ならびにT細胞、肥満細胞、マクロファージ、好酸球浸潤を伴う慢性的な皮膚炎が含まれる。黄色ブドウ球菌による定着または感染症は、ADを悪化させて、この皮膚疾患の慢性性を持続させることが認識されている。

【0276】

ADはしばしば喘息およびアレルギー性鼻炎患者において認められ、しばしば、アレルギー疾患の最初の症状発現となる。西欧諸国における人口の約20%がこれらのアレルギー疾患に苦しみ、先進諸国におけるADの発生率は理由がわからないものの上昇している。ADは典型的に小児期に始まり、しばしば思春期から成人まで持続しうる。ADの現在の治療には、局所ステロイド、経口シクロスポリンA、タクロリムス（FK506軟膏）のような非コルチコステロイド性免疫抑制剤、およびインターフェロンが含まれる。ADに関する多様な治療にもかかわらず、多くの患者の症状は改善せず、または患者は投薬に対する副作用を有して、他のより有効な治療物質を探す必要がある。可溶性のIL-22RAポリペプチドおよび本発明の中和性抗ヒトIL-22RA抗体を含む抗IL-22RA抗体は、アトピー性皮膚炎、炎症性皮

膚疾患、および本明細書に開示の他の炎症疾患のような特定のヒト疾患の治療において、IL-22およびIL-20を中和するために用いることができる。

【0277】

薬学的に用いるために、本発明の可溶性IL-22RAまたは抗IL-22RA抗体は、通常の方法に従って経口、特に静脈内、または皮下輸送のために調製される。静脈内投与は、ボラス注射、例えばミニポンプまたは他の適当な技術を用いる徐放性投与、または1～数時間かけての点滴注入によって行われるであろう。一般的に、薬学的製剤には、生理食塩液、緩衝生理食塩液、5%デキストロース水等のような薬学的に許容される担体と共に造血タンパク質が含まれるであろう。製剤にはさらに、パイアル表面等の上でのタンパク質損失を防止するために、一つまたはそれ以上の賦形剤、保存剤、溶解剤、緩衝剤、アルブミンが含まれてもよい。そのような併用治療を利用する場合、サイトカインを単一の製剤で併用してもよく、または異なる製剤で投与してもよい。調製法は当技術分野で周知であり、例えば参照として本明細書に組み入れられる、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Gennaro編、Mack Publishing Co.、イーストン、ペンシルバニア州、1990において開示される。治療用量は一般的に、0.1～100 mg/kg体重/日、好ましくは0.5～20 mg/kg/日であり、正確な用量は、治療される病態の性質および重症度、患者の形質等を考慮して、容認される標準に従って臨床医によって決定される。用量の決定は当業者の範囲内である。タンパク質は一般的に、化学療法もしくは骨髄移植後28日までの期間において、または血小板数 $>20,000$ 個/mm³、好ましくは $>50,000$ 個/mm³が得られるまで投与されるであろう。より一般的に、タンパク質は、しばしば1～3日間の間隔で1週間またはそれ未満投与されるであろう。一般的に、可溶性IL-22RAまたは抗IL-22RA抗体の治療的有効量は、リンパ様または骨髄前駆細胞の増殖および/または分化の臨床的に有意な増加を生じるために十分な量であり、循環中の成熟細胞（例えば、血小板または好中球）のレベルの増加として現れるであろう。血小板障害の治療は、血小板数が少なくとも $20,000$ 個/mm³、好ましくは $50,000$ 個/mm³に達するまで継続されるであろう。本発明の可溶性IL-22RAまたは抗IL-22RA抗体はまた、IL-3、-6、および-11；幹細胞因子；エリスロポエチン；G-CSFおよびGM-CSFのような他のサイトカインと併用して投与することができる。併用療法のレジメにおいて、他のサイトカインの1日量は一般的に：EPO、150 U/kg；GM-CSF、5～15 Ig/kg；IL-3、1～5 Ig/kg；およびG-CSF、1～25 Ig/kgであろう。例えば、EPOとの併用療法は、EPOレベルが低い貧血患者において適応される。

【0278】

一般的に、投与される可溶性IL-22RA（またはIL22RA類似体もしくは融合タンパク質）、または抗IL-22RA抗体の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、全身健康状態、および既往のような要因に依存して変化するであろう。典型的に、約1 pg/kg～10 mg/kg（物質の量/患者の体重）の用量範囲の可溶性のIL-22RAまたは抗IL-22RA抗体をレシピエントに提供することが望ましいが、これより低いまたは高い用量も同様に状況に応じて投与してもよい。

【0279】

可溶性IL-22RAまたは抗IL-22RA抗体の被験体への投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、限局カテーテルによる環流、または直接病変内注射となる。治療タンパク質を注射によって投与する場合、投与は連続注入または1回もしくは複数回ボラス投与によって行ってもよい。

【0280】

さらなる投与経路には、経口、粘膜、肺内、および経皮投与が含まれる。経口輸送は、ポリエステルミクロスフェア、ゼインミクロスフェア、プロテインノイドミクロスフェア、ポリシアノアクリレートミクロスフェア、および脂質に基づく系にとって適している（例えば、DiBase and Morrel、「Oral Delivery of Microencapsulated Proteins」、Protein Delivery: Physical Systems、Sanders and Hendren（編）、255～288頁（Plenum Press、1997）を参照されたい）。鼻腔内輸送の実現可能性は、インスリン投与様式によって示される（例えば、Hinchcliffe and Illum、Adv. Drug Deliv. Rev. 35:199（1999）を

参照されたい)。IL-22RAを含む乾燥または液体粒子を調製して、乾燥粉末分散剤、液体エアロゾル生成器、またはネブライザーの助けを借りて吸入することができる(例えば、Pettit and Gombotz、TIBTECH 16:343(1998); Pattonら、Adv Drug. Deliv. Rev. 35:235(1999))。このアプローチは、エアロゾル化インスリンを肺に輸送する携帯式の電子吸入器であるAERX糖尿病管理システムによって例示される。この研究から、低周波超音波の助けを借りて48,000 kDaもの大きいタンパク質が皮膚を超えて治療的濃度で輸送されることが示され、これは経皮投与の実現可能性の例となる(Mitragotriら、Science 269:850(1995))。電気穿孔を用いる経皮輸送は、IL-22RA結合活性を有する分子を投与するためのもう一つの手段を提供する(Pottsら、Pharm. Biotechnol. 10:213(1997))。

10

【0281】

可溶性IL-22RAまたは抗IL-22RA抗体を含む薬学的組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するために既知の方法に従って調製することができ、それによって治療化合物を薬学的に許容される担体と混合することができる。組成物は、その投与がレシピエント患者によって認容されることができれば、「薬学的に許容される担体」とされると言われる。滅菌リン酸緩衝生理食塩液は、薬学的に許容される担体の一例である。他の適した担体は当業者に周知である。例えば、Gennaro(編)、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第19版(Mack Publishing Company、1995)を参照されたい。

【0282】

治療目的のために、可溶性IL-22RAまたは抗IL-22RA抗体分子および薬学的に許容される担体を、治療的に有効量で患者に投与する。本発明の治療分子と薬学的に許容される担体との配合物は、投与される量が生理的に有意であれば、「治療的有效量」で投与されると言われる。物質は、その存在によってレシピエント患者の生理学に検出可能な変化が起こる場合に生理的に有意である。例えば、炎症を治療するために用いられる物質は、その存在が炎症反応を緩和する場合、生理的に有意である。

20

【0283】

IL-22RA(またはIL-22RA類似体もしくは融合タンパク質)または中和性抗IL-22RA抗体を含む薬学的組成物は、液体、エアロゾルまたは固体の形で供給することができる。液体型は、注射用溶液および経口懸濁液として示される。例としての固体剤形には、カプセル剤、錠剤、および徐放性剤形が含まれる。後者はミニ浸透圧ポンプおよびインプラントによって例示される(Bremerら、Pharm Biotechnol. 10:239(1997); Ranade、「Implants in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems、Ranade and Hollinger(編)、95~123頁(CRC Press、1995); Bremerら、「Protein Delivery with Infusion Pumps」、Protein Delivery: Physical Systems、Sanders and Hendren(編)、239~254頁(Plenum Press、1997); Yeweyら、「Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant」、Protein Delivery: Physical Systems、Sanders and Hendren(編)、93~117頁(Plenum Press 1997))。

30

【0284】

リポソームは、被験体に治療ポリペプチドを静脈内、腹腔内、髄腔内、筋肉内、皮下、または経口投与、吸入、もしくは鼻腔内投与によって提供する一つの手段を提供する。リポソームは、水性区画を取り巻く一つまたはそれ以上の脂質二重層からなる顕微鏡的小胞である(一般的に、Bakker-Woudenbergら、Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(補則1):S61(1993)、Kim、Drugs 46:618(1993)、およびRanade、「Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers」、Drug Delivery Systems、Ranade and Hollinger(編)、3~24頁(CRC Press、1995))。リポソームは、細胞膜の組成と類似であり、その結果、リポソームは安全に投与されて生体分解性となりうる。調製法に応じて、リポソームは一枚膜または多重膜リポソームとなる可能性があり、リポソームは直径が0.02 μm ~10 μm より大きい、多様な大きさとなりうる。多様な物質をリポソームに封入することができる;疎水性物質は二重層に分配され、親水性物質は内部水溶性腔に分配される(例えば、Machyら、Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey

40

50

、1987)、およびOstroら、*American J. Hosp. Pharm.* 46:1576(1989)を参照されたい)。その上、リポソームの大きさ、二重層の数、脂質組成と共にリポソームの電荷および表面特徴を変化させることによって、封入された物質の治療的利用率を制御することが可能である。

【0285】

リポソームは、実質的に如何なるタイプの細胞も吸着して、その後封入された物質を徐々に放出する。または、吸収されたりリポソームは、貪食性の細胞によるエンドサイトーシスを受ける。エンドサイトーシスの後に、リポソーム脂質のライソゾーム内分解が起こり、封入された物質が放出される(Scherphofら、*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368(1985))。静脈内投与後、小さいリポソーム(0.1~1.0 μm)は、典型的に、肝臓および脾臓に主に存在する細網内皮系の細胞によって取り込まれるが、3.0 μm より大きいリポソームは、肺に沈着する。細網内皮系の細胞によるより小さいリポソームのこの選択的取り込みは、マクロファージおよび肝臓の腫瘍に化学療法剤を輸送するために用いられている。

10

【0286】

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

20

【0287】

リポソームはまた、リン脂質組成物を変化させることによって、または受容体もしくはリガンドをリポソームに挿入することによって、特定の細胞または臓器を標的とるように調製することができる。例えば、高い含有量の非イオン性界面活性剤によって調製されたりリポソームは、肝臓を標的とするために用いられている(Hayakawaら、日本国特許第04-244,018号; Katoら、*Biol. Pharm. Bull.* 16:960(1993))。これらの製剤は、大豆ホスファチジルコリン、 α -トコフェロール、およびエトキシ化硬化ヒマシ油(HCO-60)をメタノール中で混合して、混合物を真空下で濃縮し、混合物を水に溶解することによって調製した。大豆由来ステリルグルコシド混合物(SG)およびコレステロール(Ch)を有するジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)のリポソーム製剤も同様に、肝臓を標

30

【0288】

または、抗体、抗体断片、炭化水素、ビタミン、および輸送タンパク質のような様々なターゲティングリガンドをリポソームの表面に結合させることができる。例えば、リポソームは、肝細胞の表面上のみに発現されるアシアロ糖タンパク質(ガラクトース)受容体を標的とする分岐型ガラクトシル脂質誘導体によって改変することができる(Kato and Sugiyama、*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287(1997); Murahashiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20:259(1997))。同様に、Wuら、*Hepatology* 27:772(1998)は、アシアロフェツインによるリポソームの標識によって、リポソームの血漿中半減期が短縮され、アシアロフェツイン標識リポソームの肝細胞による取り込みが大きく増強されることを示した。一方、分岐型ガラクトシル脂質誘導体を含むリポソームの肝臓への蓄積は、アシアロフェツインを予め注射することによって阻害することができる(Murahashiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20:259(1997))。ポリアコニチル化ヒト血清アルブミンリポソームは、リポソームを肝臓にターゲティングするためのもう一つのアプローチを提供する(Kampsら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11681(1997))。その上、Gehoら、米国特許第4,603,044号は、肝臓の特殊な代謝細胞に関連する肝胆管受容体に対して特異性を有する肝細胞指向性リポソーム小胞輸送系を記述している。

40

【0289】

組織ターゲティングのためのより一般的なアプローチにおいて、標的細胞を、標的細胞によって発現されるリガンドに対して特異的なビオチン化抗体によって予め標識する(Ha

50

rasymら、Adv. Drug Deliv. Rev. 32 : 99 (1998))。遊離の抗体の血漿からの消失後、ストレプトアビジン-結合リポソームを投与する。もう一つのアプローチにおいて、ターゲティング抗体をリポソームに直接結合させる (Harasymら、Adv. Drug Deliv. Rev. 32 : 99 (1998))。

【0290】

ポリペプチドおよび抗体は、タンパク質微小封入に関する標準的な技術を用いてリポソーム内に封入することができる (例えば、Andersonら、Infect. Immun. 31 : 1099 (1981))、Andersonら、Cancer Res. 50 : 1853 (1990))、およびCohenら、Biochim. Biophys. Acta. 1063 : 95 (1991))、Alvingら、「Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies.」、Liposome Technology、第二版、第III巻、Gregoriadis (編)、317頁 (CRC Press、1993))、Wassefら、Meth. Enzymol. 149 : 124 (1987))を参照されたい)。先に記述したように、治療的に有用なリポソームは、多様な成分を含んでもよい。例えば、リポソームはポリ (エチレングリコール) の脂質誘導体を含んでもよい (Allenら、Biochim. Biophys. Acta. 1150 : 9 (1993))。

10

【0291】

分解性のポリマーミクロスフェアは、治療タンパク質の高い全身レベルを維持するように設計されている。ミクロスフェアは、その中にタンパク質がポリマーに封入されているポリ (ラクチド-コグリコリド) (PLG)、ポリアンヒドリド、ポリ (オルトエステル)、非生体分解性酢酸エチルビニルポリマーのような分解性のポリマーから調製される (Gombotz and Pettit、Bioconjugate Chem. 6 : 332 (1995)) ; Ranade、「Role of Polymers in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems、Ranade and Hollinger (編)、51~93頁 (CRC Press、1995) ; Roskos and Maskiewicz、「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery.」、Protein Delivery : Physical Systems、Sanders and Hendren (編)、45~92頁 (Plenum Press、1997) ; Bartusら、Science 281 : 1161 (1998) ; Putney and Burke、Nature Biotechnology 16 : 153 (1998) ; Putney、Curr. Opin. Chem. Biol. 2 : 548 (1988))。ポリエチレングリコール (PEG) コーティングナノスフェアも同様に、治療タンパク質の静脈内投与のための担体を提供する (例えば、Grefら、Pharm. Biotechnol. 10 : 167 (1997))を参照されたい)。

20

【0292】

本発明はまた、IL-22RA単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体可溶性受容体、およびIL-22RAアンタゴニスト、例えば抗IL-22RA抗体もしくは結合ポリペプチド、または中和性抗IL-22RA抗体のようなIL-22RA結合活性を有し、ポリペプチドが上記のようにポリマーに結合している化学改変ポリペプチドを企図する。

30

【0293】

他の投与剤形は例えば、Ansel and Popovich、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems、第5版 (Lea & Febiger、1990))、Gennaro (編)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第19版 (Mack Publishing Company、1995))、およびRanade and Hollinger、Drug Delivery Systems (CRC Press、1996))によって示されるように当業者によって考案することができる。

【0294】

説明として、薬学的組成物は、IL-22RA細胞外ドメインを有するポリペプチド、例えばIL-22RA単量体、ホモ二量体、ヘテロ二量体、または多量体可溶性受容体、またはIL-22RAアンタゴニスト (例えば、抗体、IL-22RAポリペプチドに結合する抗体断片、または中和性抗IL-22RA抗体) を含む容器を含むキットとして提供してもよい。治療ポリペプチドは、1回もしくは複数回投与のための注射用溶液の形で提供することができる、または注射前に溶解する滅菌粉末として提供することができる。または、そのようなキットには、治療ポリペプチドを投与するための乾燥粉末ディスペンサー、液体エアロゾル発生装置、またはネブライザーが含まれる。そのようなキットはさらに、薬学的組成物の適応および用途に関する書面での情報を含んでもよい。その上、そのような情報には、IL-22RA組成物がIL-22RAに対する既知の過敏症を有する患者において禁忌であるという声明が含まれ

40

50

てもよい。

【0295】

抗IL-22RA抗体もしくは結合パートナー（または抗IL-22RA抗体断片、抗体融合体、ヒト化抗体等）、またはIL-22RA可溶性受容体を含む薬学的組成物を、液体型、エアロゾル型、または固体型で提供することができる。液体型は注射用溶液、エアロゾル、滴剤、トボロギー溶液および経口懸濁剤によって示される。例としての固体剤形には、カプセル剤、錠剤、および徐放性剤形が含まれる。後者は、ミニ浸透圧ポンプおよびインプラントによって例示される（Bremerら、Pharm Biotechnol. 10: 239 (1997) ; Ranade、*「Implants in Drug Delivery.」*、Drug Delivery Systems、Ranade and Hollinger (編)、95~123頁 (CRC Press、1995) ; Bremerら、*「Protein Delivery with Infusion Pumps」*、Protein Delivery: Physical Systems、Sanders and Hendren (編)、239~254頁 (Plenum Press、1997) ; Yeweyら、*「Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant.」*、Protein Delivery: Physical Systems、Sanders and Hendren (編)、93~117頁 (Plenum Press 1997))。他の固体剤形には、クリーム、パスタ、他のトボロギー適用等が含まれる。

【0296】

リポソームは、被験体に治療ポリペプチドを静脈内、腹腔内、髄腔内、筋肉内、皮下、または経口投与、吸入、もしくは鼻腔内投与によって輸送する一つの手段を提供する。リポソームは、水性区画を取り巻く一つまたはそれ以上の脂質二重層からなる顕微鏡的小胞である（一般的に、Bakker-Woudenbergら、Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (補則1): S61 (1993)、Kim、Drugs 46: 618 (1993)、およびRanade、*「Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers」*、Drug Delivery Systems、Ranade and Hollinger (編)、3~24頁 (CRC Press、1995))。リポソームは、細胞膜の組成と類似であり、その結果、リポソームは安全に投与されて生体分解性となりうる。調製法に応じて、リポソームは一枚膜または多重膜リポソームとなる可能性があり、リポソームは直径が0.02 μm ~10 μm より大きい、多様な大きさとなりうる。多様な物質をリポソームに封入することができる；疎水性物質は二重層に分配され、親水性物質は内部水溶性腔に分配される（例えば、Machyら、Liposomes in Cell Biology And Pharmacology (John Libbey、1987)、およびOstroら、American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989)を参照されたい)。その上、リポソームの大きさ、二重層の数、脂質組成と共にリポソームの電荷および表面特徴を変化させることによって、封入された物質の治療的利用率を制御することが可能である。

【0297】

リポソームは、実質的に如何なるタイプの細胞も吸着して、その後封入された物質を徐々に放出する。または、吸収されたリポソームは、貪食性の細胞によるエンドサイトーシスを受ける。エンドサイトーシスの後に、リポソーム脂質のライソゾーム内分解が起こり、封入された物質が放出される（Scherphofら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985))。静脈内投与後、小さいリポソーム (0.1~1.0 μm) は、典型的に、肝臓および脾臓に主に存在する細網内皮系の細胞によって取り込まれるが、3.0 μm より大きいリポソームは、肺に沈着する。細網内皮系の細胞によるより小さいリポソームのこの選択的取り込みは、マクロファージおよび肝臓の腫瘍に化学療法剤を輸送するために用いられている。

【0298】

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

【0299】

リポソームはまた、リン脂質組成を変化させることによって、または受容体もしくはリ

ガンドをリボソームに挿入することによって、特定の細胞または臓器を標的とるように調製することができる。例えば、高い含有量の非イオン性界面活性剤によって調製されたリボソームは、肝臓を標的とするために用いられている (Hayakawaら、日本国特許第04-244,018号; Katoら、*Biol. Pharm. Bull.* 16: 960 (1993))。これらの製剤は、大豆ホスファチジルコリン、 α -トコフェロール、およびエトキシ化硬化ヒマシ油 (HCO-60) をメタノール中で混合して、混合物を真空下で濃縮し、混合物を水に溶解することによって調製した。大豆由来ステリルグルコシド混合物 (SG) およびコレステロール (Ch) を含むジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のリボソーム製剤は、肝臓を標的とすることが示されている (Shimizuら、*Biol. Pharm. Bull.* 20: 881 (1997))。

【0300】

または、抗体、抗体断片、炭化水素、ビタミン、および輸送タンパク質のような様々なターゲティングリガンドをリボソームの表面に結合させることができる。例えば、リボソームは、肝細胞の表面上のみに発現されるアシアロ糖タンパク質 (ガラクトース) を標的とする分岐型ガラクトシル脂質誘導体によって改変することができる (Kato and Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14: 287 (1997); Murahashiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20: 259 (1997))。同様に、Wuら、*Hepatology* 27: 772 (1998) は、アシアロフェツインによるリボソームの標識によって、リボソームの血漿中半減期が短縮され、アシアロフェツイン標識リボソームの肝細胞による取り込みが大きく増強されることを示した。一方、分岐型ガラクトシル脂質誘導体を含むリボソームの肝臓への蓄積は、アシアロフェツインを予め注射することによって阻害することができる (Murahashiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20: 259 (1997))。ポリアコニチル化ヒト血清アルブミンリボソームは、リボソームを肝臓にターゲティングするためのもう一つのアプローチを提供する (Kampsら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11681 (1997))。その上、Gehoら、米国特許第4,603,044号は、肝臓の特殊な代謝細胞に関連する肝胆管受容体に対して特異性を有する肝細胞指向性リボソーム小胞輸送系を記述している。

【0301】

組織ターゲティングのためのより一般的なアプローチにおいて、標的細胞を、標的細胞によって発現されるリガンドに対して特異的なビオチン化抗体によって予め標識する (Harasymら、*Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998))。遊離の抗体の血漿からの消失後、ストレプトアビジン-結合リボソームを投与する。もう一つのアプローチにおいて、ターゲティング抗体をリボソームに直接結合させる (Harasymら、*Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99 (1998))。

【0302】

IL-22またはIL-20結合活性を有する抗IL-22RA中和抗体および結合パートナー、またはIL-22RA可溶性受容体は、タンパク質微小封入に関する標準的な技術を用いてリボソーム内に封入することができる (例えば、Andersonら、*Infect. Immun.* 31: 1099 (1981)、Andersonら、*Cancer Res.* 50: 1853 (1990)、およびCohenら、*Biochim. Biophys. Acta.* 1063: 95 (1991)、Alvingら、「Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies.」、*Liposome Technology*、第2版、第3巻、Gregoriadis (編)、317頁 (CRC Press、1993)、Wassefら、*Meth. Enzymol.* 149: 124 (1987) を参照されたい)。先に記述したように、治療的に有用なリボソームは、多様な成分を含んでもよい。例えば、リボソームは、ポリ (エチレングリコール) の脂質誘導体を含んでもよい (Allenら、*Biochim. Biophys. Acta.* 1150: 9 (1993))。

【0303】

分解性のポリマーミクロスフェアは治療タンパク質の高い全身レベルを維持するように設計されている。ミクロスフェアは、その中にタンパク質がポリマーに封入されているポリ (ラクチド-コグリコリド) (PLG)、ポリアンヒドリド、ポリ (オルトエステル)、非生体分解性酢酸エチルビニルポリマーのような分解性のポリマーから調製される (Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6: 332 (1995); Ranade、「Role of Polymers in Drug Delivery」、*Drug Delivery Systems*、Ranade and Hollinger (編)、51~93頁 (CRC

Press、1995) ; Roskos and Maskiewicz、 「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery.」、Protein Delivery: Physical Systems、Sanders and Hendren (編)、45~92頁 (Plenum Press、1997) ; Bartusら、Science 281: 1161 (1998) ; Putney and Burke、Nature Biotechnology 16: 153 (1998) ; Putney、Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1988))。ポリエチレングリコール (PEG) コーティングナノスフェアも同様に、治療タンパク質の静脈内投与のための担体を提供しうる (例えば、Grefら、Pharm. Biotechnol. 10: 167 (1997) を参照されたい)。

【0304】

本発明はまた、化学改変抗IL-22RA抗体または結合パートナー、例えば上記のようにポリマーに結合した抗IL-22RA抗体またはIL-22RA可溶性受容体も企図する。

10

【0305】

他の投与剤形は例えば、Ansel and Popovich、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems、第5版 (Lea and Febiger、1990)、Gennaro (編)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第19版 (Mack Publishing Company、1995)、およびRanade and Hollinger、Drug Delivery Systems (CRC Press、1996) によって示されるように当業者によって考案することができる。

【0306】

本発明は、抗IL-22抗体の組成物、および本明細書に記述の抗体、ペプチド、またはポリペプチドを含む方法および治療的用途を企図する。そのような組成物はさらに担体を含みうる。担体は通常の有機または無機担体となりうる。担体の例には、水、緩衝液、アルコール、ポリエチレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油等が含まれる。

20

【0307】

11. トランスジェニックマウスの作製

IL-20およびIL-22の双方の過剰発現は、ヒト乾癬病変において示されており、IL-20およびIL-22の双方がヒト乾癬に関与していることを示唆している。その上、本明細書に記述するように、トランスジェニックマウスにおけるIL-20およびIL-22の過剰発現は、乾癬表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、さらにIL-22を正常マウスに注射すると、乾癬表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与が示され、これは可溶性受容体アンタゴニストIL-22RA2 (IL-22RA2) によって消失した。そのようなインビボデータはさらに、前炎症性IL-22が乾癬に関与していることを示唆している。そのため、本発明の抗ヒトIL-22RA中和およびモノクローナル抗体のようなIL-22活性に対するアンタゴニストと共に、可溶性のIL-22RA受容体は、炎症疾患、特にIL-22およびIL-20に対するアンタゴニストとして乾癬の治療において有用である。その上、本発明の抗ヒトIL-22RA中和およびモノクローナル抗体のようなIL-22またはIL-20およびIL-22に結合、その双方の活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和する物質は、可溶性IL-22RA受容体と共に、他の炎症疾患の治療的治療において、例えばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒素血症、関節炎、リウマチ性関節炎、および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患 (ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎のような炎症性肺損傷、細菌性肺炎、湿疹、アトピー性および接触性皮膚炎、ならびに潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患等の治療において、IL-22またはIL-20およびIL-22の双方に対するアンタゴニストとして有用である。

30

40

【0308】

一つの局面において、本発明は、以下を含むポリペプチドに対する抗体を産生する方法を提供する：動物において免疫応答を誘発して抗体を産生する、以下の群のポリペプチドを動物に接種する段階：(a) 配列番号：3のアミノ酸番号1 (Pro) ~ アミノ酸番号6 (Asp) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(b) 配列番号：3のアミノ酸番号26 (Ser) ~ アミノ酸番号32 (Pro) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(c) 配列番号：3のアミノ酸番号41 (Lys) ~ アミノ酸番号47 (Asp) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(d) 配列番号：2のアミノ酸番号49 (Val) ~ アミノ酸番号62 (Cys) のアミノ酸配列からな

50

るポリペプチド；(e) 配列番号：3のアミノ酸番号41 (Lys) ~ アミノ酸番号62 (Cys) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(f) 配列番号：3のアミノ酸番号84 (Ala) ~ アミノ酸番号97 (Ser) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(g) 配列番号：3のアミノ酸番号103 (Thr) ~ アミノ酸番号108 (Asp) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(h) 配列番号：3のアミノ酸番号130 (Arg) ~ アミノ酸番号135 (His) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(i) 配列番号：3のアミノ酸番号164 (Gly) ~ アミノ酸番号166 (Lys) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(j) 配列番号：3のアミノ酸番号175 (Tyr) ~ アミノ酸番号179 (Glu) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(k) 配列番号：3のアミノ酸番号193 (Lys) ~ アミノ酸番号196 (Ala) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(l) 配列番号：3のアミノ酸番号203 (Lys) ~ アミノ酸番号209 (Thr) のアミノ酸配列からなるポリペプチド；(m) 配列番号：3のアミノ酸配列からなるポリペプチド；および(n) 配列番号：4のアミノ酸配列からなるポリペプチド；ならびにIL-22RAポリペプチド(配列番号：2または配列番号：3)に特異的に結合して、IL-20(配列番号：8)またはIL-22(配列番号：6)のいずれかの活性を減少させる抗体を、動物から単離する段階。一つの態様において、方法は、方法によって産生される抗体がIL-20(配列番号：8)またはIL-22(配列番号：6)のいずれかの前炎症性活性を減少させる、先に記述した方法である。もう一つの態様において、方法によって産生される抗体がIL-20(配列番号：8)またはIL-22(配列番号：6)のいずれかとIL-22RA(配列番号：2)との相互作用を中和する、先に記述した方法である。もう一つの態様において、方法は、抗体による中和が、インビトロで細胞に基づく中和アッセイにおいて、IL-20(配列番号：8)またはIL-22(配列番号：6)のいずれかの中和を示すことによってインビトロで測定される、先に記述した方法である。もう一つの態様において、方法は方法によって産生された抗体が、IL-20(配列番号：8)およびIL-22(配列番号：6)の双方の前炎症活性を減少させる、先に記述した方法である。もう一つの態様において、方法は、方法によって産生された抗体がIL-20(配列番号：8)およびIL-22(配列番号：6)の双方とIL-22RA(配列番号：2)との相互作用を中和する、先に記述した方法である。もう一つの態様において、方法は、抗体による中和が、インビトロで細胞に基づく中和アッセイにおいて、IL-20(配列番号：8)およびIL-22(配列番号：6)の双方の中和を示すことによって測定される、先に記述した方法である。

【0309】

もう一つの局面において、本発明は、配列番号：2または配列番号：3のポリペプチドに結合する、本明細書に開示の方法によって産生された抗体を提供する。一つの態様において、抗体は、(a) ポリクローナル抗体である、(b) マウスモノクローナル抗体である、(c) (b) に由来するヒト化抗体である、(d) 抗体断片である、または(e) ヒトモノクローナル抗体である、先に記述した抗体である。もう一つの態様において、抗体は、先に記述した通りであって、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子または毒素を含む。もう一つの態様において、抗体は先に記述した通りであって、PEG化をさらに含む。もう一つの態様において、抗体は先に記述した通りであって、(a) ポリクローナル抗体である、(b) マウスモノクローナル抗体である、(c) (b) に由来するヒト化抗体である、(d) 抗体断片である、または(e) ヒトモノクローナル抗体である。もう一つの態様において、抗体は、先に記述した通りであって、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素を含む。もう一つの態様において、抗体は先に記述した通りであって、PEG化をさらに含む。

【0310】

もう一つの局面において、本発明は配列番号：3に示すアミノ酸残基の配列を含むポリペプチドに結合して、IL-20(配列番号：8)またはIL-22(配列番号：6)の前炎症性活性を減少させる抗体または抗体断片を提供する。一つの態様において、抗体または抗体断片は先に記述した通りであって、IL-20(配列番号：8)およびIL-22(配列番号：6)の双方の前炎症性活性を減少させる。もう一つの態様において、抗体または抗体断片は先に記述した通りであって、(a) ポリクローナル抗体である、(b) マウスモノクローナル抗体で

ある、(c)(b)に由来するヒト化抗体である、(d)抗体断片である、または(e)ヒトモノクローナル抗体である。もう一つの態様において、抗体または抗体断片は、先に記述した通りであって、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素を含む。もう一つの態様において、抗体または抗体断片は先に記述した通りであって、さらにPEG化を含む。もう一つの態様において、抗体または抗体断片は先に記述した通りであって、(a)ポリクローナル抗体である、(b)マウスモノクローナル抗体である、(c)(b)に由来するヒト化抗体である、(d)抗体断片である、または(e)ヒトモノクローナル抗体である。もう一つの態様において、抗体または抗体断片は先に記述した通りであって、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素を含む。もう一つの態様において、抗体または抗体断片は先に記述した通りであって、さらにPEG化を含む。

10

20

30

40

50

【0311】

もう一つの局面において、本発明は、抗体の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して、骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体を含む組成物と共に、骨髓または末梢血細胞を培養することを含む、造血細胞および造血前駆細胞のIL-22によるまたはIL-20によるいずれかの増殖または分化を減少または阻害する方法を提供する。一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である。もう一つの態様において、方法は、リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である。

【0312】

もう一つの局面において、本発明は、炎症を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与することを含む、IL-22によるまたはIL-20による炎症を減少させる方法を提供する。

【0313】

もう一つの局面において、本発明は、抗体の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して、骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体を含む組成物と共に、骨髓または末梢血細胞を培養することを含む、造血細胞および造血前駆細胞のIL-22によるおよびIL-20による増殖または分化を減少または阻害する方法を提供する。一つの態様において、方法は先に記述した通りであって、造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である。もう一つの態様において、方法は、リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である。

【0314】

もう一つの局面において、本発明は、炎症を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体の組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与することを含む、IL-22によるおよびIL-20による炎症を減少させる方法を提供する。

【0315】

もう一つの局面において、本発明は、骨髓または末梢血細胞を、抗体または抗体断片の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体または抗体断片を含む組成物と共に、骨髓または末梢血細胞を培養することを含む、IL-22によるおよびIL-20による造血細胞および造血前駆細胞の増殖または分化を減少または阻害する方法を提供する。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である。

【0316】

もう一つの局面において、本発明は、炎症を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体または抗体断片の組成物を炎症を有する哺乳動物に投与することを含む、IL-22によるおよびIL-20による炎症を減少させる方法を提供する。

【0317】

もう一つの局面において、本発明は、抗体または抗体断片の非存在下で培養した骨髓または末梢血細胞と比較して骨髓または末梢血細胞における造血細胞の増殖または分化を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体または抗体断片を含む組成物と共に、骨髓または末梢血細胞を培養することを含む、IL-22によるおよびIL-20による造血細胞および造血前駆細胞の増殖または分化を減少または阻害する方法を提供する。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、造血細胞および造血前駆細胞がリンパ様細胞である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、リンパ様細胞がマクロファージまたはT細胞である。

【0318】

もう一つの局面において、本発明は、炎症を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体または抗体断片の組成物を、炎症を有する哺乳動物に投与することを含む、IL-22によるおよびIL-20による炎症を減少させる方法を提供する。

10

【0319】

もう一つの局面において、本発明は、以下を含む、炎症を有する哺乳動物における炎症反応を抑制する方法を提供する：(1) 血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定する段階；(2) 許容される薬学的媒体において本明細書に記載の抗体または抗体断片に従う抗体を含む組成物を投与する段階；(3) 血清アミロイドAタンパク質の投与後レベルを決定する段階；(4) 血清アミロイドAタンパク質レベルが増加しない、または減少すれば、炎症反応を抑制することが示される、段階(3)における血清アミロイドAタンパク質のレベルと、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質レベルを比較する段階。

20

【0320】

もう一つの局面において、本発明は、アンタゴニストが、(i) IL-22RA (配列番号：3) のポリペプチドまたはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体、抗体断片、もしくは結合ポリペプチド、または(ii) IL-22RA (配列番号：3) のポリペプチドもしくはポリペプチド断片を含み、IL-22 (配列番号：6) またはIL-20 (配列番号：8) のいずれかの炎症活性が減少する、炎症が減少するようにIL-22またはIL-20のアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、IL-22またはIL-20が役割を果たす炎症疾患に罹患した哺乳動物を治療する方法を提供する。一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、または乾癬を含む慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は先に記述した通りであって、疾患が急性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む急性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドが、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素を含む。

30

【0321】

もう一つの局面において、本発明は、アンタゴニストが、(i) IL-22RA (配列番号：3) のポリペプチドまたはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体、抗体断片、もしくは結合ポリペプチド、または(ii) IL-22RA (配列番号：3) のポリペプチドまたはポリペプチド断片を含み、IL-22 (配列番号：6) およびIL-20 (配列番号：8) の双方の炎症活性が減少する、炎症が減少するようにIL-22またはIL-20のアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、IL-22およびIL-20が役割を果たす炎症疾患に罹患した哺乳動物を治療する方法を提供する。一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、または乾癬を含む慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が急性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む急性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、抗体、抗体断

40

50

片、または結合ポリペプチドが、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素を含む。

【0322】

もう一つの局面において、本発明は、抗体がヒトIL-22（配列番号：6）またはIL-20（配列番号：8）のいずれかの活性を減少または中和する、以下の群のヒトIL-22RA（配列番号：3）の抗原性エピトープに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む抗体を提供する：（a）配列番号：3のアミノ酸番号1（Pro）～アミノ酸番号6（Asp）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（b）配列番号：3のアミノ酸番号26（Ser）～アミノ酸番号32（Pro）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（c）配列番号：3のアミノ酸番号41（Lys）～アミノ酸番号47（Asp）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（d）配列番号：2のアミノ酸番号49（Val）～アミノ酸番号62（Cys）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（e）配列番号：3のアミノ酸番号41（Lys）～アミノ酸番号62（Cys）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（f）配列番号：3のアミノ酸番号84（Ala）～アミノ酸番号97（Ser）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（g）配列番号：3のアミノ酸番号103（Thr）～アミノ酸番号108（Asp）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（h）配列番号：3のアミノ酸番号130（Arg）～アミノ酸番号135（His）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（i）配列番号：3のアミノ酸番号164（Gly）～アミノ酸番号166（Lys）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（j）配列番号：3のアミノ酸番号175（Tyr）～アミノ酸番号179（Glu）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（k）配列番号：3のアミノ酸番号193（Lys）～アミノ酸番号196（Ala）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（l）配列番号：3のアミノ酸番号203（Lys）～アミノ酸番号209（Thr）のアミノ酸配列からなるエピトープ；（m）配列番号：3のアミノ酸配列からなるエピトープ；および（n）配列番号：4のアミノ酸配列からなるエピトープ。一つの態様において、抗体は先に記述した通りであって、ヒトIL-22（配列番号：6）およびIL-20（配列番号：8）の双方の活性を減少または中和する。もう一つの態様において、抗体は、先に記述した通りであって、（a）マウスモノクローナル抗体、（b）（a）に由来するヒト化抗体、（c）抗体断片、および（d）ヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される。もう一つの態様において、抗体は、先に記述した通りであって、さらにPEG化を含む。もう一つの態様において、抗体は、先に記述した通りであって、（a）マウスモノクローナル抗体、（b）（a）に由来するヒト化抗体、（c）抗体断片、および（d）ヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される。もう一つの態様において、抗体は、先に記述した通りであって、さらにPEG化を含む。

【0323】

もう一つの局面において、本発明は、本明細書に開示の抗体の有効量を投与することを含み、それによって病態を治療する、IL-22RA活性に関連した被験体における病態を治療する方法を提供する。一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、病態が慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、慢性炎症状態が炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、または乾癬である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、病態が急性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、急性炎症疾患が内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む。

【0324】

もう一つの局面において、本発明は、アンタゴニストが、IL-22RA（配列番号：3）のポリペプチドまたはポリペプチド断片に特異的に結合する抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドを含み、および炎症活性が減少する、炎症が減少するように、哺乳動物にIL-22RAのアンタゴニストを投与することを含む、IL-22RAが役割を果たす炎症疾患に罹患している哺乳動物を治療する方法を提供する。一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、疾患が炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、アトピー性皮膚炎、または乾癬を含む慢性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、疾患が急性炎症疾患である、先に記述した通りである。もう一つの態様において、方法は、先に

記述した通りであって、疾患が内毒素血症、敗血症、毒性ショック症候群、または感染疾患を含む急性炎症疾患である。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドが、さらに放射性核種、酵素、基質、共因子、蛍光マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、磁気粒子、薬物、または毒素を含む。もう一つの態様において、方法は、先に記述した通りであって、抗体、抗体断片、または結合ポリペプチドがさらにPEG化を含む。

【0325】

もう一つの局面において、本発明は、炎症を減少させるために十分な量の本明細書に開示の抗体の組成物を炎症を有する哺乳動物に投与することを含む、炎症を減少させる方法を提供する。

【0326】

本発明は以下の非制限的な実施例によってさらに説明する。

【0327】

実施例1

トランスフェクトしたBHK 570細胞からのIL-22RA2-Fc4ポリペプチドの精製

特に明記していなければ、操作は全て4で行った。IL-22RA2-Fc4と命名されるヒトFc4（配列番号：14）とのC-末端融合体を含むIL-22RA2ポリペプチド（配列番号：13の残基23～231位の成熟可溶性受容体ポリペプチド；配列番号：12に示されるポリヌクレオチド）を精製するために、以下の技法を用いた。IL-22RA2-Fc4をトランスフェクトしたBHK 570細胞からの条件培地約16,500 mlを0.2 μmの濾過滅菌フィルターを通して濾過した後、最終濃度0.001 mMロイペプチン（Boehringer-Mannheim、インジアナポリス、インジアナ州）、0.001 mMペプスタチン（Boehringer-Manheim）、および0.4 mMペファブロック（Boehringer-Manheim）のプロテアーゼ阻害剤溶液を加えた。多孔性タンパク質A50カラム（床容積20 ml、Applied Biosystems）を充填して、PBS（Gibco/BRL）400 mlによって洗浄した。添加した条件培地を流速15 ml/分でカラムを通過させた後、PBS（BRL/Gibco）800 mlによって洗浄した。IL-22RA2-Fc4を、0.1 Mグリシン、pH 3.0によってカラムから溶出させて、5 ml分画を2 Mトリス、pH 7.8 0.5 mlに直接回収して、分画の最終的なpHを7.4に調節した。

【0328】

カラムの性能の特徴は、開始媒体の還元SDS-PAGEゲルのウェスタンブロットティングおよびカラム通過分画によって調べた。ウェスタンブロットティングは、抗ヒトIgG HRP（Amersham）抗体を用いて、これは開始媒体において60,000 Daで免疫反応性のタンパク質を示したが通過分画にはタンパク質を示さず、完全な捕獲を示した。タンパク質A50溶出分画の特徴を、還元SDS PAGEゲルによって調べた。このゲルは、分画3～11において60,000 Daで強いクマシーブルー染色バンドを示した。分画3～11をプールした。

【0329】

30,000 Da Ultrafree Biomax遠心濃縮器（容積15 ml、Millipore）を用いて、プロテインA 50溶出プールを44 mlから4 mlに濃縮した。セファクリルS-300ゲル濾過カラム（床容積175 ml；Pharmacia）をPBS（BRL/Gibco）350 mlによって洗浄した。濃縮したプールを流速1.5 ml/分でカラムに注入した後、PBS（BRL/Gibco）225 mlによって洗浄した。溶出したピークを2 mlの分画に回収した。

【0330】

溶出した分画は、還元および非還元銀染色（Geno Technology）SDS x PAGEゲルによって特徴を調べた。還元銀染色SDS PAGEゲルは、分画14～31において60,000 Daで強く染色されたバンドを示したが、非還元銀染色SDS PAGEゲルは、分画14～31において160,000 Daで強く染色されたバンドを示した。分画1～13は、様々な大きさの多くのバンドを示した。分画14～31をプールして、30,000 Da Ultrafree Biomax遠心濃縮器（容積15 ml、Millipore）を用いて22 mlに濃縮した。この濃縮物を0.2 μm Acrodisc滅菌フィルター（Pall Corporation）により濾過した。

【0331】

10

20

30

40

50

濃縮したプール分画のタンパク質濃度は、BCA分析（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）によって行い、材料を少量に分けて、本発明者らの標準的なプロトコールに従って-80℃で保存した。プールした分画の濃度は1.50 mg/mlであった。

【0332】

実施例2

CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞（BaF3/CRF2-4細胞）およびIL-22RA受容体と共にCRF2-4受容体を発現するBaF3細胞（BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞）の構築

完全長のCRF2-4受容体を発現するBaF3細胞を、CRF2-4発現ベクター30 µgを用いて以下のように構築した。CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞をBaF3/CRF2-4と命名した。これらの細胞を対照として用いて、完全長のIL-22RA受容体をさらにトランスフェクトして（米

10

【0333】

A. CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞の構築

CRF2-4（Genbankアクセッション番号Z17227）の完全長のcDNA配列をDaudi細胞株cDNAライブラリから単離して、発現ベクターpZP7Pにクローニングした。

【0334】

マウス骨髄に由来するインターロイキン-3（IL-3）依存的前リンパ様細胞株（Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727~734, 1985; Mathey-Prevotら, Mol. Cell Biol. 6: 4133~4135, 1986）であるBaF3を、10%熱不活化仔ウシ胎児血清、2 ng/mlマウスIL-3（mIL-3）（R & D、ミネアポリス、ミネソタ州）、2 mM L-GlutaMax-1（商標）（Gibco-BRL）、1 mMピルビン酸ナトリウム（Gibco-BRL）、およびPSN抗体（Gibco-BRL）を添加した完全な培地（RPMI培地（JRH Bioscience Inc.）、レネキサ、カンザス州）において維持した。電気穿孔の前に、CRF2-4/pZP7Pを調製して、Qiagen Max Prepキット（Qiagen）を用いて製造元の説明書に従って精製した。電気穿孔の場合、BaF3細胞を無血清RPMI培地において1回洗浄した後、無血清RPMI培地に細胞密度 10^7 個/mlで播種した。浮遊させたBaF3細胞1 mlをCRF2-4/pZP7PプラスミドDNA 30 µgと混合して、別の使い捨ての電気穿孔チャンバー（Gibco-BRL）に移した。室温で15分インキュベートした後、細胞に、電気穿孔装置（CELL-PORATOR（商標）；Gibco-BRL）によって与えられる2連続ショック（800 IFad/300 V；1180 IFad/300 V）を与えた。5分間回復させた後、電気穿孔した細胞を完全培地50 mlに移してインキュベーター（37℃、5%CO₂）に15~24時間入れた。細胞を遠心沈降させて、T-162フラスコにおいて2 µg/mlピューロマイシンを含む完全培地50 mlに再浮遊させて、ピューロマイシン抵抗性のプールを単離した。以降BaF3/CRF2-4細胞と呼ぶトランスフェクトしたBaF3細胞のプールを、下記のようにシグナル伝達能に関してアッセイした。その上、これらの細胞に、下記のようにIL-22RA受容体をさらにトランスフェクトした。

20

30

【0335】

B. CRF2-4およびIL-22RA受容体を発現するBaF3細胞の構築

完全長のIL-22RA受容体を発現するBaF3/CRF2-4細胞を、IL-22RA発現ベクター30 µgを用いて先に記述した通りに構築した。回復後、200 µg/mlゼオシンおよび2 µg/mlピューロマイシンを用いてトランスフェクタントを選択した。IL-22RA受容体を発現するBaF3/CRF2-4細胞を、BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞と命名した。これらの細胞を用いて、IL-22活性に関してスクリーニングすると共に本明細書に記述のIL-22RA2アンタゴニスト活性に関してスクリーニングした。

40

【0336】

実施例3

Alamar Blue増殖アッセイを用いてBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞を用いたIL-22アンタゴニスト活性のスクリーニング

A. Alamar Blue増殖アッセイを用いてBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞を用いたIL-22活性のスクリーニング

精製IL-22-CEE（実施例4）を用いて下記のように増殖活性の有無を試験した。精製IL-2

50

2RA2-Fc4（実施例1）を、下記のように本アッセイにおけるIL-22の増殖反応に拮抗させるために用いた。

【0337】

BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞を遠心沈降させて、10%熱不活化仔ウシ胎児血清、2 ng/ml マウスIL-3 (mIL-3) (R & D、ミネアポリス、ミネソタ州)、2 mM L-GlutaMax-1 (商標) (Gibco-BRL)、1 mMピルビン酸ナトリウム (Gibco-BRL)、およびPSN抗生物質 (Gibco-BRL) を添加したが、mIL-3を含まない（以降、「無mIL-3培地」と呼ぶ）完全な培地 (RPMI 培地 (JRH Bioscience Inc.)、レネキサ、カンザス州) において洗浄した。細胞を遠心沈降させて、3回洗浄し、mIL-3を確実に除去した。細胞を血球計算盤において計数した。細胞を96ウェルフォーマットにおいて、無mIL-3培地を用いて、5000個/ウェルで容量100 μ l/ウェルで播種した。

10

【0338】

BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞の増殖を、無mIL-3培地によって濃度50、10、2、1、0.5、0.25、0.13、0.06 ng/mlに希釈したIL-22-CEEタンパク質を用いて評価した。希釈したタンパク質100 μ lをBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞に加えた。総アッセイ容積は200 μ lである。アッセイプレートを37℃、5%CO₂で3日間インキュベートした後Alamar Blue (Accumed、シカゴ、イリノイ州) を20 μ l/ウェルで加えた。プレートを37℃、5%CO₂で再度24時間インキュベートした。Alamar Blueは、生存細胞数に基づいて蛍光測定値を生じ、このように、陰性対照と比較して細胞増殖の直接測定である。プレートを37℃、5%CO₂で再度24時間インキュベートした。SoftMax (商標) Proプログラムを用いて、Fmax (商標) プレートリーダー (Molecular Devices、サニーベール、カリフォルニア州) において、波長544 nm (励起) および590 nm (放出) でプレートを読み取った。結果から、BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞のIL-22-CEEに対する用量依存的な増殖反応が確認された。測定された反応は、最高濃度の50 ng/mlでのバックグラウンドに対して約15倍から最低濃度の0.06 ng/mlでの2倍誘導であった。BaF3野生型細胞およびBaF3/CRF2-4細胞は、IL-22CEEに反応して増殖せず、IL-22がCRF2-4/IL-22RAヘテロ二量体受容体特異的であることを示している。IL-22RA2がIL-22活性に拮抗できるか否かを決定するために、上記のアッセイを精製可溶性IL-22RA2/Fc4を用いて繰り返した。IL-22を10 μ g/ml IL-22RA2と併用すると、全ての濃度でのIL-22に対する反応はバックグラウンドまで減少した。可溶性IL-22RA2の存在がIL-22の増殖作用を阻害したということは、これがIL-22リガンドの強力なアンタゴニストであることを証明している。このアッセイを用いて、抗IL-22RA抗体のような、本明細書に記述のIL-22活性の他のアンタゴニストを試験することができる。

20

30

【0339】

実施例4

BHK570細胞からのIL-22CEEの精製

特に明記していなければ、操作は全て4℃で行った。C-末端GluGlu (EE) タグ (配列番号: 15または配列番号: 16) を含むIL-22ポリペプチドを精製するために以下の技法を用いた。IL-22-CEEを発現するBHK細胞からの条件培地を、ProFlux A30においてAmicon S10Y3スパイラルカートリッジによって濃縮した。濃縮した条件培地に、最終濃度2.5 mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA、Sigma Chemical、セントルイス、ミズーリ州)、0.003 mMロイペプチン (Boehringer-Mannheim、インジアナポリス、イリノイ州)、0.001 mMペプスタチン (Boehringer-Mannheim)、および0.4 mMペファブロック (Boehringer-Mannheim) となるようにプロテアーゼ阻害剤溶液を加えた。試料を分析のために採取して、精製を開始するまで、バルク容積を-80℃で凍結した。濃縮した条件培地の総標的タンパク質濃度を、抗EE- HRP結合抗体を用いてSDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析によって決定した。

40

【0340】

抗EE-G-セファロース (下記に記述のように調製) の約100 mlカラムをWaters AP-5、5 cm x 10 cmガラスカラムに注いだ。カラムを、BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems、フラミンガム、マサチューセッツ州) においてpH 7.4のリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を

50

流して充填し、平衡にした。濃縮した条件培地を融解して、0.2ミクロンのフィルターで濾過滅菌して、pHを7.4に調節した後、カラムに約1 ml/分の流速で一晩ローディングした。カラムを10カラム容積 (CV) のリン酸緩衝生理食塩液 (PBS、pH 7.4) によって洗浄した後、0.5 mg/ml EEペプチド (Anaspec、サンノゼ、カリフォルニア州) を含むPBS (pH 6.0) 200 mlによってプラグを溶出した。用いたEEペプチドは配列EYMPME (配列番号: 15) を有する。カラムを10 CVのPBSによって洗浄した後、5 CVの0.2 Mグリシン、pH 3.0によって溶出した。グリシン溶出カラムのpHを2 CVの5×PBSによって7.0に調節した後、PBS (pH 7.4) によって平衡にした。全溶出クロマトグラフィーに対して5 mlの分画を回収して、280および215 nmでの吸光度をモニターした; 通過および洗浄プールも同様に保存して分析した。EE-ポリペプチド溶出ピーク分画を、SDS-PAGE銀染色および抗-EE HRP結合抗体によるウェスタンブロッティングによって、標的タンパク質に関して分析した。対象ポリペプチド溶出分画をプールして、分子量カットオフ10,000ダルトンのメンブレンスピン濃縮器 (Millipore、ベッドフォード、マサチューセッツ州) を用いて、製造元の説明書に従って60 mlから5.0 mlに濃縮した。

10

【0341】

IL-22-CEEを他の同時精製タンパク質から分離するために、濃縮ポリペプチド溶出プール分画をPOROS HQ-50 (PerSeptive BioSystems、フラミンガム、マサチューセッツ州の強い陰イオン交換樹脂) にpH 8.0で供した。1.0×6.0 cmカラムをBioCad Sprintにおいて注ぎ、フローバックした。カラムに対してイオンを充填した後、20 mMトリスpH 8.0 (トリス (ヒドロキシメチルアミノメタン)) において平衡にした。試料を1:13倍希釈して (PBSのイオン強度を減少させるため)、POROS HQカラムに5 ml/分でローディングした。カラムを10 CVの20 mMトリス、pH 8.0によって洗浄した後、40 CVの20 mMトリス/1 M塩化ナトリウム (NaCl) 勾配で10 ml/分で溶出した。全クロマトグラフィーについて分画1.5 mlを回収して、280および215 nmでの吸光度をモニターした。溶出ピーク分画をSDS-PAGE銀染色によって分析した。対象分画をプールして分子量カットオフ10,000ダルトンのメンブレンスピン濃縮器 (Millipore、ベッドフォード、マサチューセッツ州) を用いて製造元の説明書に従って1.5~2 mlに濃縮した。

20

【0342】

遊離のEEペプチドおよび如何なる混入同時精製タンパク質からIL-22-CEEポリペプチドを分離するために、プールした濃縮分画に、BioCad Sprintを用いてPBSを流速1.0 ml/分で平衡にしてローディングした1.5×90 cmセファデックスS200 (Pharmacia、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) においてサイズ排除クロマトグラフィーを行った。分画1.5 mlを全クロマトグラフィーに関して回収して、280および215 nmでの吸光度をモニターした。ピーク分画の特徴をSDS-PAGE銀染色によって調べ、最も純粋な分画のみをプールした。この材料は精製IL-22-CEEポリペプチドを表した。

30

【0343】

この精製材料を、残留エンドトキシンを除去するために、最終的に4 ml ActiClean Etox (Sterogene) カラムに供した。試料をPBS平衡重力カラムに4回通過させた後、カラムをPBS 3 ml容積によって1回洗浄し、これを「洗浄した」思慮と共にプールした。材料を0.2ミクロンのフィルターにより濾過滅菌して、少量に分割するまで-80 で保存した。

40

【0344】

ウェスタンブロッティング、クーマシーブルーおよび銀染色SDS-PAGEゲルによって、IL-22-CEEポリペプチドは一つの主要なバンドであった。精製材料のタンパク質濃度をBCA分析 (Pierce、ロックフォード、イリノイ州) によって行い、タンパク質を少量に分けて、標準的なプロトコールに従って-80 で保存した。

【0345】

抗-EEセファロースを調製するために、プロテインG-セファロース (Pharmacia、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) の100 ml床容積を、500 ml Nalgene 0.45ミクロンフィルターユニットを用いて、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS 100 mlによって3回洗浄した。ゲルを200 mMトリエタノールアミン (TEA、Sigma、セントルイス、ミズーリ州)、pH

50

8.2の6.0倍容積によって洗浄して、抗体900 mgを含むEE抗体溶液の等量を加えた。4 で一晩インキュベートした後、未結合の抗体を、上記のように200 mM TEAの5倍量によって樹脂を洗浄することによって除去した。樹脂をTEAの2倍量に浮遊させて、適した容器に移し、TEAに溶解したジメチルピミリミデート二塩酸（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）を、プロテインG-セファロースゲルに最終濃度36 mg/mlで加えた。ゲルを室温で45分間揺り動かし、上記のように液体をフィルターユニットから除去した。ゲル上の非特異的部位を、200 mM TEAに溶解した20 mMエタノールアミンの5倍量と共に室温で10分間インキュベートすることによってブロックした。次に、ゲルを0.02%アジ化ナトリウムを含むPBSの5倍量によって洗浄して、この溶液を4 で保存した。

【0346】

10

実施例5

IL-22ポリペプチドのインビボ作用

マウス（雌性、C57BL/6N、8週齢；Charles River Labs、キングストン、ニューヨーク州）を三つの群に分けた。IL-22ポリペプチド（配列番号：6）を発現するアデノウイルスを、標準的な方法を用いて既に作製した。0日目に、親またはIL-22アデノウイルスを第一（ $n=8$ ）および第二（ $n=8$ ）の群に尾静脈より投与して、それぞれのマウスに $\sim 1 \times 10^{11}$ 粒子の用量を ~ 0.1 mlの容量で投与した。第三の群（ $n=8$ ）には処置を行わなかった。12日目に、マウスの体重を測定して血液をマウスから採取した。試料を全血球計算（CBC）および血清化学に関して分析した。親アデノウイルス処置群と比較してIL-22アデノウイルス投与群の血液試料において、好中球および血小板数の統計学的に有意な上昇を検出した。同様に、リンパ球および赤血球数は、IL-22アデノウイルス投与群では親アデノウイルス処置群と比較して有意に減少した。さらに、IL-22アデノウイルス処置マウスは体重が減少したが、親アデノウイルス処置群は体重が増加した。同様に、血清IL-22レベルは増加し、グルコースレベルは3日目に減少した。要約すると、IL-22アデノマウスは急性期反応を示し、これはTNF- α 、IL-1 β 、およびgp130サイトカインのような、前炎症性サイトカインによって開始されうる。急性期反応は、パターン認識分子によって開始される一連の即時型炎症反応である。急性期タンパク質は、微生物に対する保護の増強を提供し、細胞の物資移動およびメディエータの放出に及ぼす作用によって炎症反応を改変する。例えば、SAAは、化学走性の誘導、内皮細胞に対する白血球接着の増強、および貪食の増加を含む、強力な白血球活性化機能を有する。急性期反応を開始させ、その程度および持続を変化させる要因を理解することは、感染および炎症疾患にとって新しい治療を開発するための重要な段階となる。

20

30

【0347】

結果は、IL-22が造血、すなわちインビボでの血球形成に影響を及ぼすことを示唆した。そのため、IL-22は、異なる血液幹細胞に影響を及ぼす生物活性を有し、その結果特定の系列における特定の分化した血球が増加または減少した。例えば、IL-22は、リンパ球を減少させるように思われ、これはおそらくリンパ様細胞を生じる拘束前駆細胞の阻害による可能性がある。IL-22はまた、赤血球を減少させ、これらのプロセスに参与する血球に影響を及ぼすことによって、IL-22が貧血、感染症、炎症、および/または免疫疾患において役割を果たしうるという考え方を支持する。抗体またはその可溶性受容体IL-22RA2のようなIL-22に対するアンタゴニストは、これらの疾患において治療試薬として用いることができるであろう。

40

【0348】

その上、マウスにおいてIL-22アデノウイルスを用いるこれらの実験は、IL-22の過剰発現が、インビボで好中球および血小板レベルを増加させることを示唆している。全ての動物系において、IL-22に対する反応に参与する他の要因（サイトカインおよび改変遺伝子のような）があると考えられる。それにもかかわらず、これらのデータは、造血におけるIL-22の関与を強く支持する。このように、IL-22およびその受容体は、炎症、免疫障害、感染症、貧血、造血および他の癌等のような多様な障害における診断および治療にとって適した試薬/標的である。

50

【0349】

実施例6

IL-22発現トランスジェニックマウス

A. マウスIL-22を発現するトランスジェニックマウスの作製

リンパ様特異的E μ LCKプロモーター、マウスIL-22（配列番号：10；配列番号：11に示されるポリペプチド）、ラットインスリンIIイントロン、IL-22 cDNAおよびヒト成長ホルモンポリA配列の5'および3'隣接配列を含むトランスジェニックベクターからのDNA断片を、標準的な方法を用いて調製して、これを用いて受精B6C3f1（Taconic、ジャーマンタウン、ニューヨーク州）マウス卵母細胞に、標準的なマイクロインジェクションプロトコルを用いてマイクロインジェクションした。Hogan, B.ら、「Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1994を参照されたい。

【0350】

類リンパ特異的E μ LCKプロモーターを有するマウスIL-22に関してトランスジェニックであるマウス25匹を仔154匹において同定した。トランスジェニック仔マウス11匹が生後数時間以内に死亡し、光沢のある外観を有するトランスジェニック仔マウス9匹を出生時に剖検して、2匹が成体まで成長した。成体動物1匹では発現レベルは低かった。剖検した仔マウスの組織を、下記のように調製して組織学的に調べた。

【0351】

新生児マウスの光沢のある外観は、あたかも乾燥しつつあるかのような皮膚の硬化に関連するように思われ、それによって適切な哺乳が減少した。それらの運動は一般的にこわばるようになった。

【0352】

B. トランスジェニックマウスからの遺伝子型および発現分析

上記のE μ LCKプロモーターによって促進されるマウスIL-22トランスジェニックマウス系統から、新生児を1日目（出生日）に異常に関して観察して、組織採取のために屠殺した。仔は全て独自の耳タグ番号を与えられ、屠殺時に光沢のある皮膚表現型を有すると指定されたマウスを記録した。仔マウス12匹中、6匹が光沢のある皮膚表現型を有することが認められ、2匹は、「重度の」表現型を有すると指定された。重度の表現型は、その皮膚が特に光って非常に乾燥し、運動性がほとんどない小さい仔マウスであると定義された。皮膚をそれぞれの仔の左側から採取してTissue-Tek抱埋培地において凍結した。

【0353】

遺伝子型の決定により、光沢のある皮膚がトランスジェニック状態の良好な指標であることが確認されたが、発現データは収集しなかった。凍結皮膚ブロックを低温槽において7ミクロンの切片にして、CD3、CD4、CD8、マウスマクロファージ、B-細胞、CD80、およびMHCクラスIIの有無に関して調べるために染色した。染色プロトコルは、組織に対する市販の抗体の結合、ペルオキシダーゼ標識二次抗体による検出、染色を可視化するためのDAB色素産生反応を含んだ。

【0354】

トランスジェニック動物は、抗原提示細胞および樹状細胞をそれぞれ染色するMHCクラスIIおよびCD80が高いことが判明した。マクロファージマーカーはまた、重度および重度でないトランスジェニック動物では野生型動物より多くの細胞を検出したが、これらの細胞の分布は高度真皮に特に局在した。重度の表現型であると分類された動物は、これらのマーカーの三つ全てに関して最も強い染色を示し、野生型と比較して細胞密度および数の劇的な増加を示した。この多様性は、これらのトランスジェニック創始仔マウスにおけるIL-22の発現レベルの差による可能性がある。MHCクラスII陽性細胞は、緩く開いた集団に配列されたより低い真皮に存在したが、CD80陽性細胞は、筋/脂肪層の中または真上で真皮の下に主に存在した。これらの二つの細胞集団は、重なり合わないように思われる。他のマーカーは全て、全ての動物において同等の染色であった。肥満細胞に関するトルイジンブルー染色は、野生型およびトランスジェニック動物の間でほとんど差を示さないか全

く差を示さなかった。

【0355】

C. トランスジェニックマウスからの組織の顕微鏡評価：EuLcKプロモーターを有するIL-22 TGは新生児致死性組織学を有する

出生日にIL-22トランスジェニックマウスを含む同腹子を人道的に安楽死させて、10%緩衝ホルマリンに全身を沈めて固定した。トランスジェニックマウス6匹および非トランスジェニックマウス2匹をさらなる研究に供した。トランスジェニックマウス6匹中4匹は、安楽死の時点で光沢のある皮膚を有することが認められた。固定した組織を切片5個に切断した（頭部の縦方向断面、上位および下位胸部の断面、ならびに上位および下位腹部の断面）。組織をパラフィンに抱埋して通常のように処理して、5 μmの切片（Jung 2065 Supercutミクロトーム、Leica Microsystems、ウェツラー、ドイツ）を作製してH&Eによって染色した。染色した組織を光学顕微鏡（Nikon Eclipse E600、Nikon Inc.、メルビル、ニューヨーク州）下で、委員会によって認定された（ACVP）獣医病理学者が評価した。

10

【0356】

顕微鏡検査の際に、トランスジェニック仔マウス2匹の表皮は、対照を含む他のマウス6匹の表皮より肥厚していることが認められた。その他の異常はいずれのマウスの皮膚および他の組織においても認められなかった。胸部および腹部の対応する領域からの皮膚の代表的な領域を、40倍の対物レンズおよび顕微鏡に接続したCoolSnapデジタルカメラ（Roper Scientific Inc.、サンジエゴ、カリフォルニア州）によって撮像した。表皮の厚さを組織形態計測ソフトウェア（ウィンドウズ用シオンイメージ（NIHイメージ）、Scion Corp.、フレデリック、メリーランド州、バージョンB4.0.2）によって測定した。結果を以下の表5に示した。

20

【0357】

【表5】

遺伝子型/表現型	胸部の皮膚の厚さの平均値 (μm)	腹部の皮膚の厚さの平均値 (μm)
非トランスジェニック/正常	5.2	5.4
トランスジェニック/光沢なし	5.0	6.7
トランスジェニック/光沢あり	8.2	7.4
トランスジェニック/全て	7.1	7.1

30

【0358】

統計学的有意性を決定するためにはマウス数が不十分であったが、光沢のある皮膚を有するトランスジェニックマウスは、光沢のないトランスジェニックおよび非トランスジェニック対照より表皮が厚い傾向があった。光沢のあるトランスジェニックマウスは、光沢のないトランスジェニックマウスより高いIL-22発現レベルを有する可能性がある；しかし、発現レベルはこれらのマウスに関して測定しなかった。これらは、乾癬、乾癬性関節炎、または他の炎症性皮膚病態もしくは他の炎症疾患におけるIL-22の役割を示唆した。

40

【0359】

実施例7

IL-22ポリペプチドのインビオ作用

A. IL-22アデノウイルスを感染させたマウスはSAAの誘導を示す

マウス（雌性、C57BL/6N、8週齢；Charles River Labs、キングストン、ニューヨーク州）を三つの群に分けた。IL-22ポリペプチド（配列番号：6）を発現するアデノウイルスを、標準的な方法を用いて既に作製した。0日目に、親またはIL-22アデノウイルスを第一（n=8）および第二（n=8）の群のそれぞれのマウスに $\sim 1 \times 10^{11}$ 粒子の用量を ~ 0.1 ml

50

の容量で尾静脈より投与した。第三の群 (n=8) には処置を行わなかった。12日目に、マウスの体重を測定して血液をマウスから採取した。試験の20日目に、マウスを屠殺して、体重を記録し、血液および組織を分析のために採取した。

【0360】

血液試料を全血球計算 (CBC) および血清化学に関して分析した。12および20日目に、IL-22アデノウイルス投与群の血液試料では、親アデノウイルス処置群と比較して好中球および血小板数の統計学的に有意な上昇を検出した。同様に、リンパ球数は、親アデノウイルス処置群と比較してIL-22アデノウイルス投与群では12日目に有意に減少したが、20日目では反対の作用を認めた。さらに、IL-22アデノウイルス処置マウスは体重が減少したのに対し、親アデノウイルス処置マウスは体重が増加した。グルコースは、親アデノウイルス処置群と比較してIL-22アデノウイルス投与群の血清試料において、双方の時点で有意に減少した。血清アルブミンも同様に、双方の時点で有意に減少した。血中尿素窒素レベルは20日目でも有意に減少した。血清グロブリンレベルは、親アデノウイルス処置群と比較してIL-22アデノウイルス投与群では、双方の時点で有意に増加した。顕微鏡で調べたところ、認められたIL-22による一つの組織形態学的変化は、腎臓の尿細管再生であった。マウスにおいて一般的ではないが、この群の動物において発生率および重症度の増加を認めた。腎症は、皮質尿細管上皮細胞の好塩基球性斑点が多数現れることを特徴とする。

【0361】

結果を確認するため、およびさらなる試料を採取するために、先に記述した実験と同じデザインのさらなる実験を行った。本研究において、体重を3日毎に記録して、アデノウイルス注射後3日目にマウスから血液を採取して、10日目 (n=4/群) および20日目 (n=4/群) に血液および組織を採取するためにマウスを屠殺した。この場合も、IL-22アデノウイルス投与群の血液試料では親アデノウイルス処置群と比較して、好中球数および血小板数の増加が検出された。この作用は3日までに好中球に関して明白であったが、血小板数は10日まで有意差を示さなかった。同様に、リンパ球数は、親アデノウイルス処置群と比較して3および10日目でIL-22アデノウイルス投与群では有意に減少したが、先の実験と同様に20日目では上昇しなかった。この場合も、IL-22アデノウイルスを投与したマウスは、試験期間中体重が減少したが、対照ウイルス処置および無処置マウスは体重が増加した。IL-22アデノウイルス処置に関連した腎尿細管再生に関する組織学的知見も同様に、本試験を確認した。これは、IL-22アデノウイルスを投与したマウスにおける中等度のタンパク尿症のさらなる知見と一致する (20日目)。

【0362】

結果は、IL-22が造血、すなわちインビボで血球形成に影響を及ぼすことを示唆した。そのためIL-22は、異なる血液幹細胞に影響を及ぼす生物活性を有する可能性があり、それによって特定の系列における特定の分化した血球が増加または減少する。例えば、IL-22は、リンパ球を減少させるように思われるが、これは類リンパ細胞を生じる拘束前駆細胞の阻害による可能性があり、IL-22が、これらのプロセスに関与する血球に影響を及ぼすことによって、貧血、感染症、炎症、および/または免疫疾患において役割を果たす可能性があるという考え方を支持する。抗体またはその可溶性受容体IL-22RA2のようなIL-22に対するアンタゴニストは、これらの疾患における治療試薬として用いることができるであろう。

【0363】

その上、マウスにおいてIL-22アデノウイルスを用いるこれらの実験は、IL-22過剰発現がインビボで好中球および血小板レベルを増加させることを示唆している。動物全体の系においてIL-22に対する反応に関与する他の要因 (サイトカインおよび改変遺伝子のような) が存在すると考えられる。それにもかかわらず、これらのデータは、造血におけるIL-22の関与を強く支持する。このように、IL-22、抗IL-22抗体、IL-22RA可溶性受容体 (例えば、配列番号: 3)、および抗IL-22RA抗体は、炎症、免疫障害、感染症、貧血、造血および他の癌等のような多様な障害において診断および治療のための適した試薬/標的である。

10

20

30

40

50

【0364】

IL-22の発現と体重減少、急性期タンパク質SAAの出現、ならびに血清中グルコース、アルブミンおよび尿素窒素の減少によって示される代謝障害との関連により、IL-22が特定の炎症反応において初期に作用するサイトカインであることが示唆される。IL-22アデノウイルスを投与したマウスは、IBD、潰瘍性大腸炎、関節炎、乾癬、乾癬性関節炎、喘息等において認められるような、慢性炎症状態を表す可能性がある。特定の有害な炎症プロセスは、抗IL-22抗体およびIL-22RA可溶性受容体（例えば、配列番号：3）のようなその受容体、ならびに抗IL-22RA抗体等のような、IL-22に対するアンタゴニストを用いることによって阻害される可能性がある。

【0365】

B. IL-22は前炎症性サイトカインである：アデノIL-22マウスにおけるSAAの血清レベル

マウスSAAイムノアッセイキットおよびプロトコール（Biosource International、カリフォルニア州、アメリカ）を用いて、IL-22アデノマウスにおけるSAAレベルを決定するために、ELISAアッセイを行った。希釈した標準物質および未知物質をHRP-抗マウスSAAと共に、予め抗マウスSAA抗体をコーティングしたアッセイプレートに播種した。プレートを37℃で1時間インキュベートした後、キットの説明書に従って洗浄した。TMBを用いてプレートを室温で15分間展開させて、2 M H₂SO₄を用いて停止させた。450 nmでの吸光度をSpectromax 190（Molecular Devices、カリフォルニア州、アメリカ）を用いて読み取った。得られたデータをSoftmax Pro（Molecular Devices、カリフォルニア州、アメリカ）およびエクセル（Microsoft Corp.、ワシントン州、アメリカ）を用いて分析した。

【0366】

IL-22アデノウイルスを感染させたマウスは、親アデノウイルス対照と比較してmSAAのレベルが10倍より大きく非常に上昇した。

【0367】

C. IL-22アデノウイルス感染マウスのフローサイトメトリ分析

アデノウイルスによるインビボでのIL-22発現の作用を分析するために、本発明者らは、感染後10日および20日目にIL-22アデノウイルス感染C57BL/6Nマウスからの末梢血、脾臓、および骨髓を単離した。血液約100 μlをヘパリン加試験管に採取した後、低張溶解によって赤血球を枯渇した（細胞をdH₂O 4.5 mlにおいて～5秒間溶解した後、3.6% NaCl 1.5 mlを加えた）。脾臓を2枚のすりガラスのスライドガラスの間でつぶして、放出された細胞をNytexメンブレン（細胞濾過器）に通過させて、沈降させた。骨髓は、大腿骨1本を乳鉢と乳棒においてつぶして、細胞を細胞濾過器（Falcon）に通過させることによって得た。細胞をFACS洗浄緩衝液（WB = HBSS/1% BSA/10 mM hepes）に浮遊させて、トリパンブルーによって計数し、各タイプの生存細胞1 × 10⁶個を5 mlポリスチレンチューブに加えた。細胞を洗浄して沈降させた後、特定の免疫細胞サブセットを同定するために用いられる様々な細胞表面マーカーを認識する蛍光標識（FITC、PE、およびサイクロム）モノクローナル抗体（PharMingen、サンジエゴ、カリフォルニア州）のカクテルと共に氷中で20分間インキュベートした。これらのマーカーには、以下が含まれる（本発明者らが調べた3群に分けて記載する）。血液の染色の場合：CD3、Gr1、およびB220；脾臓の染色の場合：CD62L、CD44、およびCD3；CD21、CD23、およびB220；IgD、IgM、およびB220；CD11b、Gr1、およびCD8；骨髓染色の場合：CD11b、Gr1、CD3；IgD、IgM、およびB220。細胞をWB 1.5 mlによって洗浄して沈降させた後、WB 0.4 mlに浮遊させてCellQuestソフトウェア（Becton Dickinson、マウンテンビュー、カリフォルニア州）を用いてFACSscanによって分析した。

【0368】

本発明者らは、IL-22アデノウイルス処置マウスの血液中の好中球分画が10日目で4～13倍、および20日目で2～3倍上昇したことを発見した。10日目では、この差によって、血液中のリンパ球および単球の分画が同時に減少した。骨髓において、本発明者らは、B細胞の総数が～1.5倍減少したが、成熟再循環B細胞の割合は、10日目で増加し、未成熟B細胞の総数はわずかに減少したことを発見した。20日目では、これらの差の多くが明白ではな

かったが、本発明者らは、成熟再循環B細胞の分画においてわずかな増加を認めた。脾臓では、B細胞の総数は、調べた双方の日においてわずかに減少したが（1.5～2倍）、20日目では辺縁域のB細胞分画（CD21+CD23-B220+）は2倍増加し、濾胞B細胞（CD21+CD23+B220+）数は2倍減少した。辺縁域B細胞は、より一般的な濾胞B細胞よりB細胞マイトゲン（例えば、LPS）に対する感受性が高いことから、病原体に対する第一線の防御であると考えられ、それらがその同源の抗原に遭遇すると、それらは抗体分泌細胞へと非常に速やかに分化する。IL-22は、濾胞B細胞の辺縁域B細胞への変換を増強する、またはより成熟でない濾胞細胞を選択的に枯渇する可能性がある。骨髓において認められたB細胞数の変化は、プレ/プロおよび/または未成熟B細胞の分化の増加、または再循環B細胞の血液/脾臓からの流入の増加、および未成熟B細胞の末梢への輸送のおそらく同時の増加を反映する可能性がある。未熟BM B細胞の実数の数は増加せず、そのためIL-22はそれらの増殖を増強しない可能性がある。または、IL-22は未成熟B細胞の分化を遮断、減少、または阻害して、それによって成熟B細胞の相対量を増加させる可能性がある。

10

【0369】

D. IL-22RA2-Fc4は、インビボでIL-22活性を中和する：IL-22によって誘導されるSAA発現を示すSAA ELISAは、IL-22RA2-Fc4注射によって阻害される

IL-22RA2がIL-22によるSAA誘導を阻害できるか否かを評価するために、マウス（雌性、C3H/HEJ、8週齢；Jackson Lab.、バーハーバー、メイン州）を各群3匹の5群に分けて、下記の表6に示すようにタンパク質のIP注射によって処置した。

20

【0370】

【表6】

群番号	IL-22	IL-22RA2
群1：	-	-
群2：	-	100 μg
群3：	3 μg	-
群4：	3 μg	20 μg
群5：	3 μg	100 μg

30

【0371】

IL-22RA2注射は、IL-22注射の15分前に行った。いずれのタンパク質注射も、腹腔内経路によって行った。血液試料を、処置前に各マウスから採取した後、処置後2および6時間目に採取した。SAAおよびIL-22を測定するために、試料のそれぞれから血清を調製した。

【0372】

IL-22および本明細書に記述のIL-22の可溶性受容体であるIL-22RA2-Fc4によって処置したマウスにおけるSAAレベルを決定するために、ELISAを既に記述された通りに行った。20～100 μgの濃度のIL-22RA2-Fc4と共にIL-22 3 μgによってマウスを処置すると、IL-22単独によって誘導されるSAAレベルのバックグラウンドレベルまでの減少を示し、IL-22RA2がインビボでIL-22のSAA誘導活性を阻害したことを示した。

40

【0373】

実施例8

炎症性腸疾患マウスモデルにおけるIL-22の発現

炎症性腸疾患（IBD）は、二つのタイプ、すなわち潰瘍性大腸炎（UC）とクローン病（CD）に分けられる多因子性疾患である。これらの疾患の病院は現在のところわかっておらず、臨床所見は異なる。UCは、結腸に限定され、症状には、血便、体重減少、および腹痛が含まれる。UCの肉眼的所見は、穿孔性潰瘍および結腸短縮が含まれる。対称的に、クロ

50

ーン病は、腸の他の部分に罹患しうる。症状には、下痢（UCにおいて認められる血便はしばしば少ない）、微熱および疼痛が含まれる。肉眼的所見には、狭窄、深部潰瘍、裂およびそを伴う線維性および狭窄性腸が含まれる。

【0374】

これらのヒト疾患を模倣するいくつかの動物モデルが利用できる。新薬スクリーニングのために一般的に用いられる結腸炎の三つのモデルは、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘導ラットモデル、マウスT細胞移入モデル、およびデキストラン硫酸ナトリウムまたはDSS誘導マウスモデルである。DSSモデルは、疾患活動度指数採点システム（S.N.S. Murthy、「Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclosporin」、Digestive Disease and Sciences、第38巻、9号（9月、1993）、1722～1734頁）を用いる、S. Murthy博士のモデルに由来する。

10

【0375】

本試験において、マウスが飲料水に含まれるDSSを6日間摂取すると、急性の結腸炎が起こった。動物は体重減少および血便を示し、UC患者の状態を模倣した。DSS損傷のメカニズムは十分には特徴が示されていないが、これは非特異的炎症性免疫応答を誘導し、腸における環境作用を模倣すると考えられる。細胞に対して毒性となりうる H_2S が産生される可能性がある。さらに、内腔の菌叢の変化が起こる。活性化単球、マクロファージ、および肥満細胞は結腸において証明されている。三つ全ての動物モデルのメディエータには、炎症性のプロスタグランジン、ロイコトリエン代謝物、およびサイトカインが含まれる。

【0376】

20

A. 方法

DSSの摂取によって、Charles River LaboratoriesのSwiss Webster系雌性マウスに大腸炎を誘導した。マウスは試験開始時10～11週齢であった。マウスに飲料水において4%DSSを6日間投与した（処置マウス）、または通常の飲料水のみを与えた（対照マウス）。便の性質、潜血、および体重減少を含む複合測定値を含む疾患活動度指数臨床スコア（DAI）を用いた。DAIは、DSS処置後1日目から開始して各マウスに関して毎日得た。6日後、DSSを処置マウスの飲料水から除去した。マウスを全て、試験開始後2、7、または10日後に屠殺するまでDAI臨床スコアによってモニターした。2および7日目のそれぞれにおいて、DSS処置マウス4匹および対照マウス1匹を屠殺した。10日目に、DSS処置マウス4匹および対照マウス2匹を屠殺した。屠殺後全ての動物に関して結腸の長さを測定した。結腸の断面を組織学分析のために10%中性緩衝ホルマリンにおいて固定するか、またはmRNA抽出のために凍結した。

30

【0377】

B. 組織学採点および疾患活動度指数（DAI）採点

組織学指数スコアは、参考文献1の方法に従って得た。一般的に病理学者が、結腸断面の陰窩スコア、過形成上皮、陰窩の歪みおよび炎症に関して盲検的に採点した。

【0378】

毎日、各マウスを体重減少、便の硬さ、および腸出血に基づいて臨床スコアに関して等級を調べた。体重減少の度合い、下痢、および出血量が増加するとより高いスコアが割付られた。各マウスの毎日のスコアは、三つの結果/観察から得た等級の平均値であった。

40

【0379】

C. 結果

DSS処置マウスの結腸の長さは7および10日目では、無処置対照より幾分短かったが、結果は有意ではない可能性がある（統計法の適用によってチェックしていない）。臨床DAIスコアは、DSS処置マウスにおいて、このモデルを用いて過去の研究において認められたものと類似の疾患症状の増加を反映した。潜血は、およそ4および5日目で最大であったが、軟便は6および7日目により多く認められた。組織病理学の結果から、疾患のスコアが全ての屠殺日、特に7日目（ピーク）および10日目に対照とは異なることが示された。組織病理学スクリーニングスコアは以下の通りであった：対照 = 0.5、2日目のDSS処置マウス = 8.8、7日目のDSS処置マウス = 21、10日目のDSS処置マウス = 18。臨床および組織病理学

50

スコアは、DSS処置マウスが、無処置対照と比較して有意な結腸疾患を有することを示している。凍結組織試料を下記のようにmRNA測定のために後に用いた。

【0380】

D. RT-PCRを用いたマウスIBD結腸試料におけるIL-22 RNAの組織発現

炎症性腸疾患モデルにおけるマウスIL-22 RNA（配列番号：10；配列番号：11）の相対的発現を決定するために、DSS処置マウスの遠位結腸を採取して、液体窒素において瞬間凍結した。本実験において、マウスをDSSによって処置して、試料を処置後2、7、および10日目に採取した。正常な無処置マウスからの試料も同様に採取した。次に、RNAを標準的なRNeasy Midiprep（商標）キット（Qiagen、パレンシア、カリフォルニア州）を用いて、製造元の説明書に従って試料から単離した。

10

【0381】

RT-PCR反応は「Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq」（Life Technologies、ガイサースバーグ、メリーランド州）を用いた。各反応物25 μ lは以下からなった：2 \times 反応緩衝液12.5 μ l、ZC39,289（配列番号：17）（20 pmol/ μ l）0.5 μ l、ZC39,290（配列番号：18）（20 pmol/ μ l）0.5 μ l、RT/Taqポリメラーゼミクス0.4 μ l、RNアーゼ不含水10 μ l、総RNA（100 ng/ μ l）1.0 μ l。増幅は以下のように行った：50

で30分1サイクルの後に、94 で30秒；58 で30秒；72 で60秒を35サイクル；最後に72 で7分間の最終伸長で終了する。PCR反応産物8～10 μ lに、2%アガロースゲルを用いて標準的なアガロースゲル電気泳動を行った。正確な予想cDNA断片の大きさは以下のように認められた。2日目の試料ではかすかなバンドを認めた。7日目の試料3例中2例は、強いバンドを生じたが、7日目の第三の試料は非常に強いバンドを生成した。10日目の試料3個は、強いバンドを生成した。最後に、「正常な」対照試料2例は如何なるバンドも生成しなかった。これらの結果は、IBD、UC、およびCDに関連した反応を含む、結腸における特定のタイプの炎症反応においてIL-22のアップレギュレーションが存在する可能性があることを示唆している。データは、相対的発現を以下のように採点した下記の表7に要約する：0 = バンドなし、1 = かすかなバンド、2 = 強いバンド、3 = 非常に強いバンド。

20

【0382】

【表7】

組 織	相対的発現 (0-3)
正常結腸	0
正常結腸	0
処置後2日目	1
処置後2日目	1
処置後7日目	3
処置後7日目	2
処置後7日目	2
処置後10日目	2
処置後10日目	2
処置後10日目	2

30

40

【0383】

実施例9

IL-22RA2はマウスコラーゲン誘発関節炎（CIA）モデルにおいてIL-6およびSAAレベルを減

50

小させる

A. マウスコラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデル

10週齢の雄性DBA/1Jマウス (Jackson Labs.) をマウス13匹 / 群の3群に分けた。 - 21日目、動物に、フロイントの完全アジュバント (Chondrex、レッドモンド、ワシントン州) と共に調製した1 mg/mlニワトリII型コラーゲン50~100 μ lを皮下注射して、3週間後の0日目に、凍結乾燥試料 (Sigma、セントルイス、ミズーリ州) から250 μ g/mlとして調製した大腸菌0111:B4からのLPS 100 μ l (25 μ g) を注射した。IL-2RA2は、週に3回、0日目から25日目まで4週間、腹腔内注射として投与した。最初の2群には、IL-22RA2を100または10 μ g/動物/用量のいずれかを与えて、第三の群には、溶媒対照、PBS (Life Technologies、ロックビル、メリーランド州) を投与した。動物は、LPS注射後関節炎の症状を示し始め、ほとんどの動物が2~3週間以内に炎症を発症した。疾患の程度を、足の厚みを測定するためにキャリパーを用いて、各足に対して臨床スコア (0~3) を割付することによって、それぞれの足において評価した: 0 = 正常、0.5 = 足指の炎症、1 = 軽度の足の炎症、2 = 中等度の足の炎症、および3 = 下記に詳細に示されるような重度の足の炎症。

【0384】

疾患のモニタリング

動物は、2回目のコラーゲン注射後間もなく、足の炎症の兆候を示し始めるが、動物によっては、2回のコラーゲン注射前に足指の炎症の兆候を示し始めるものもある。ほとんどの動物は追加免疫の2~3週間以内に感染症を発症するが、より長い期間を必要とする動物もある。このモデルにおける疾患の発生率は典型的に、95~100%であり、動物40例を用いる研究では、典型的に非反応体0~2例を認める (観察の6週間後に判定)。炎症が始まると、足または足先に多様な軽度の炎症が一般的に一過性に発生しうる。この理由から、動物は、顕著な持続的な足の腫脹を発症するまで確立された疾患を有すると見なされない。

【0385】

全ての動物を、その足における疾患の状態を評価するために毎日観察して、これは足のそれぞれに定性的臨床スコアを割付するために行った。毎日、各動物の四肢をその臨床疾患の状態に従って採点した。臨床スコアを決定するために、足は、三つの領域、すなわち足先、足そのもの (手または足)、および手首または足首の関節を有すると考えることができる。任意の関節の腫脹、爪の裂傷、または発赤に関する全ての足先の知見、任意の足における浮腫または発赤の任意の証拠に関する記録、腱または骨の微細な解剖学的境界の喪失に関する記録、任意の浮腫または発赤に関する手首または足首の評価、および炎症が近位の脚まで進行しているか否かの記録を含む、これらの領域に対する炎症の程度および重症度を観察した。スコア1、2、または3の足は、最初に重症度に関する全体的な印象に基づき、第二にどれほど多くの領域が関与しているかに基づいた。臨床採点に用いた尺度を下記に示す。

【0386】

臨床スコア:

0 = 正常

0.5 = 一つまたはそれ以上の足先が罹患しているが、足先のみが炎症を有する

1 = 足を含む軽度の炎症 (一つの領域) および足先または複数の足先が含まれてもよい

2 = 足における中等度の炎症であって、足先および / または手首 / 足首の何らかが含まれてもよい (二つの領域)

3 = 足、手首 / 足首、および足先の一部または全体における重度の炎症 (三つの領域)

【0387】

確立された疾患は、一晚持続する (連続して2日) ランク2またはそれ以上の足の炎症の定性的スコアとして定義される。確立された疾患が存在する場合、日を記録して「確立された疾患」を有する動物の最初の日と指定する。

【0388】

抗コラーゲン抗体の血清レベルをモニターするために、実験を通して血液を採取した。動物を21日目に安楽死させて、血清およびCBCのために血液を採取した。各動物から、罹患した一つの足を組織学のために10%NBFにおいて採取して、液体窒素において凍結し、mRNA分析のために-80℃で保存した。同様に、脾臓1/2、胸腺1/2、腸間膜リンパ節1/2、肝臓1および左腎臓1をRNA分析のためにRNAlaterにおいて回収し、脾臓1/2、胸腺1/2、腸間膜リンパ節1/2、残りの肝臓、および右腎臓を組織学のために10%NBFにおいて回収した。血清を採取して免疫グロブリンおよびサイトカインアッセイのために-80℃で保存した。

【0389】

足のスコアおよび測定データを分析すると、群の間に統計学的有意差を認めなかったが、IL-22RA2を投与した一つの処置群では、足の炎症の発生および進行が遅延する可能性があることが示唆された。体重の変化、CBCパラメータ、または抗コラーゲン抗体レベルに関して群の間で有意差を認めなかった。これらの初期の結果は、IL-22RA2が体重、赤血球もしくは白血球、または抗体産生に負の影響を及ぼさないが、炎症を減少することができる可能性があることを示している。投与、作用機序、および有効性に関するさらなる研究が進行中である（例えば、実施例10を参照されたい）。

【0390】

B. マウスCIAモデルにおける抗コラーゲンELISAデータ

マウスコラーゲン関節炎モデルでは、LPSチャレンジ日（0日）に対して0、7、14、21、および28日目に血清試料を採取した（先の実施例9A）。血清試料を抗コラーゲン抗体力価に関してELISAによってスクリーニングした。100 μgまたは10 μg処置群ではPBS対照と比較してIL-22RA処置の抗コラーゲン抗体レベルに対して統計学的に有意な作用を認めなかった。下記に、抗コラーゲンELISA法および材料を説明する。

【0391】

抗コラーゲンELISAに関して用いられる試薬は、Maxisorp 96ウェルマイクロタイタープレート（NUNC、ロチェスター、ニューヨーク州）、ニワトリII型コラーゲン（Chondrex、レッドモンド、ワシントン州）、Super Block（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合ヤギ抗マウスIgG+A+M（H+L）（Zymed、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州）、および塩酸o-フェニレンジアミン基質（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）であった。全てのアッセイに用いた緩衝液は、ELISA B希釈緩衝液（PBS + 0.1%BSA + 0.05%ツイーン（Sigma、セントルイス、ミズーリ州））、ELISA C洗浄緩衝液（PBS + 0.05%ツイーン）、およびNovoD展開緩衝液（0.063 Mクエン酸ナトリウム、0.037 Mクエン酸）、H₂O₂（Sigma）および1N H₂SO₄（VWR、ツクウィラ、ワシントン州）であった。

【0392】

末梢血約100 μlを、眼窩後方からの出血によって血清分離用試験管（Becton Dickinson）に採取した。血清を遠心（2~3分、16,000 × g、4~6℃）によって回収して、分析するまで-20℃で保存した。抗コラーゲンIg抗体レベルを決定するために、NUNCプレートを10 μg/mlニワトリII型コラーゲン（Chondrex、レッドモンド、ワシントン州）によってコーティングして、4℃で一晩インキュベートした。プレートをELISA Cによって洗浄して、Super Block（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）によってブロックして（5分間、室温）、ELISA Cによって洗浄した。希釈した血清試料（ELISA Bによって1:5000~1:625,000まで5倍希釈）を1試料あたり3個ずつELISAプレートに加えて、プレートを4℃で一晩インキュベートした。インキュベーション後、プレートをELISA Cによって洗浄して、ペルオキシダーゼ-標識ヤギ抗マウスIg Fc（Zymed、ELISA Bによって1:2000）を加えた。プレートをインキュベートして（室温、90分）、ELISA Cによって再度すすぎ、塩酸o-フェニレンジアミン基質（NovoD 10 ml + OPD 1錠 + H₂O₂ 10 μl、Pierce）を用いてHRP活性を展開した。反応を1 N H₂SO₄によって停止させた。血清試料の相対的吸光度測定を、Spectra MAX 190を用いて490 nmで得て、データをSoftMax Proソフトウェア（Molecular Devices Corporation、パロアルト、カリフォルニア州）を用いて分析した。

【0393】

C. マウスCIAモデルにおけるIL-6およびSAA分析

0日目の血清試料を、LPS 25 μ gの腹腔内投与の4時間後にCIAマウスから採取した（上記の実施例9A）。試料を、IL-6および血清アミロイドA（SAA）濃度に関して、Biosource International（カマリロ、カリフォルニア州）から購入した市販のELISAキットによって製造元の説明書に従ってスクリーニングした。

【0394】

IL-6レベルは、IL-22 RA2 100 μ g、IL-22RA2 10 μ g、およびPBS対照を処置したマウスの群においてそれぞれ、9651 \pm 1563 pg/ml、10,865 \pm 1478 pg/ml、および15,006 \pm 2,099 pg/mlであった。IL-22RA2 100 μ gを曝露したCIAマウスの群におけるIL-6濃度は、PBS対照マウスと比較して有意に低かった（ $p=0.351$ ）。統計学的有意性は有意水準5%でフィッシャーPLSDを用いて計算した（ABACUS Concepts、INC、バークレー、カリフォルニア州）。

10

【0395】

さらに、SAA濃度は、IL-22 RA2 100 μ g、IL-22RA2 10 μ g、およびPBS対照を処置したマウスの群においてそれぞれ、381 \pm 40 μ g/ml、348 \pm 37 μ g/ml、および490 \pm 50 μ g/mlであった。IL-22RA 10 μ g用量を曝露したCIAマウスの群におけるSAA濃度はPBS対照マウスと比較して $p=.0257$ で有意に低かった。統計学的有意性は有意水準5%でフィッシャーPLSDを用いて計算した（ABACUS Concepts、INC、バークレー、カリフォルニア州）。

【0396】

20

実施例10

抗IL-22RA mAbまたは抗IL-22 mAbsは、マウスCIAモデルにおいて疾患の重症度を阻害するコラーゲン関節炎（CIA）モデルは、ヒトにおいて認められる疾患の大部分を反映するリウマチ性関節炎のマウスモデルである（Moore、Methods Mol. Biol. 225：175～179、2003；Waksman、Scand. J. Immunol. 56：12～34、2002）。マウスをCFAにおいて乳化したコラーゲン2用量によって尾根部で免疫した。これによって、経時的に増加する足の腫脹が起こり、キャリパーを用いてこれを肉眼的に採点および測定することができる。さらに、血清抗コラーゲン抗体は疾患の重症度によく相関する。IL-20およびIL-22による炎症を示すデータに基づいて、抗IL-22RAおよび抗IL-22 mAbをコラーゲン免疫マウスの群に投与して、疾患のスコアに及ぼす作用を評価する。抗IL-22RA mAbsまたは抗IL-22 mAbsの投与後に足のスコアおよび足の厚さが減少したことは、IL-20およびIL-22が自己免疫モデルにおいて存在する免疫応答を促進すること、そしてその機能を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和はすれば、自己免疫障害を阻害する可能性があることを示唆している。血清中TNF α および抗コラーゲン抗体の阻害も同様に、IL-22RAの遮断が自己免疫疾患において有用である可能性があることを示唆している。

30

【0397】

このように、抗IL-22RA mAbsまたは抗IL-22 mAbsが自己免疫に対して作用を有するか否かを決定するために、それらを、マウスリウマチ性関節炎-コラーゲン関節炎（CIA）モデルにおいて調べた。具体的には、DBA1Jマウスにコラーゲン注射を行ってリウマチ様関節炎を誘導する。0日目での接種は、フロイントの完全アジュバント（CFA）およびII型コラーゲン（50～100 μ l、2 mg/mlコラーゲンとして調製）からなるホモジネートの皮下注射である。注射は尾根部近傍に行う。21日目、2回目の接種を行うが、唯一の差は、ホモジネートをCFAの代わりにフロイントの不完全アジュバント（IFA）を用いて調製する点である。足のスコアおよび厚みを毎日測定する。マウスの群に、PBS、アイソタイプをマッチさせた対照モノクローナル抗体20～200 μ g、または抗IL-22RA mAbもしくは抗IL-22 mAb 20～200 μ gを、2回目のコラーゲンの注射時から開始して週に2回または3回、1～4週間腹腔内投与した。マウスを30日まで毎日モニターする。マウスを30日目に屠殺して、抗コラーゲン抗体分析および血清サイトカイン分析（TNF α ）のために血清を採取する。

40

【0398】

抗IL-22RAまたは抗IL-22 mAbの投与によって足のスコア、足の厚さ、血清中TNF α 、お

50

よび血清中抗コラーゲン抗体が阻害されたことは、IL-22RAの遮断がIL-22に結合、遮断、阻害、減少、拮抗、または中和することができること、そして自己免疫モデルにおいて存在する免疫応答を阻害して、自己免疫障害を阻害する可能性があることを示唆している。

【0399】

実施例11

DSSマウスモデルにおけるIL-22受容体、IL-22RAの発現

DSS誘導IBDマウスの結腸におけるマウスIL-22RAの発現レベルを測定するために、定量的RT-PCRを行った（実施例8）。正常マウス結腸および処置2、7、および10日目でのDSS処置マウスの遠位結腸からRNAを単離した。Applied Biosystems 7700 TaqMan機器およびプロトコルを用いてRT-PCRを行った。簡単に説明すると、「プライマーエクスプレス」ソフトウェアを用いて、Applied Biosystemsのガイドラインに従って、マウスIL-22RA配列に対するプライマー（ZC39776（配列番号：19）およびZC39777（配列番号：20））ならびにFAM/TAMRA標識TaqManプローブ（ZC 38752（配列番号：21））をデザインした。RNA 25 ngを、PE/Applied Biosystems TaqMan EZ RT-PCRコア試薬ならびに上記のプライマーおよびプローブと共に各反応物に加えた。RT-PCR反応は、以下の条件で1試料あたり2個ずつ行った：50 で2分間、60 で30分間、95 で5分間、94 で20秒間および60 で1分間を40サイクル。発現値を、合成マウスIL-22RA RNA転写物の既知の分子数の標準曲線と比較して、発現を反応あたりのマウスIL-22RA分子の絶対数として報告する。予備データは、マウスIL-22RA発現が、正常マウス結腸における発現レベルと比較した場合、DSS誘導IBDマウスの7日および10日での遠位結腸においてわずかにダウンレギュレートされる可能性があることを示唆している。

【0400】

実施例12

軽度内毒素血症モデルにおけるIL-22および前炎症性指標：マウスLPS誘導内毒素血症モデル

A. LPSによるマウス内毒素血症モデル：LPSによるマウス内毒素血症モデルにおける前炎症性サイトカインおよび体温の評価

マウスLPS軽度内毒素血症モデルにおけるIL-22RA2（IL-22RA2）の作用を調べるために、インビボ実験をデザインした。最初にモデルを評価するために、本発明者らは、モデルに関する参照データを収集するために前炎症性サイトカインおよび体温を測定した。

【0401】

簡単に説明すると、6ヶ月齢のBalb/c（CRL）マウスにLPS 25 μ g（Sigma）を滅菌PBSにおいて腹腔内（IP）注射した。血清試料を各時点について1群8匹のマウスから0、1、4、8、16、24、48、および72時間目に採取した。血清試料を炎症性サイトカインレベルに関してアッセイした。IL-1b、IL-6、TNF、IL-10および血清アミロイドAタンパク質（SAA）レベルを、Biosource International（カリフォルニア州）から購入した市販のELISAキットを用いて測定した。

【0402】

TNF レベルはLPS注射の1時間後に4000 pg/mlでピークに達し、IL-10レベルは341 pg/mlであった。LPS注射の4時間後では、IL-6、IL-1b、およびIL-10はそれぞれ、6,100 pg/ml、299 pg/ml、および229 pg/mlであった。血清中のSAAレベルはLPS注射後4時間までに0.405 mg/mlであった。血清中のSAAレベルはLPS注射後24時間までに3.9 mg/mlまで増加し続けたが、血清における1~2 mg/mlより高いSAAレベルは、SAAと他の血清成分との相互作用により、既存のELISAキットでは正確または再現可能に測定することが困難である。これらの結果は、IL-22の他に（実施例11B）、前炎症性サイトカインがこのモデルにおいて実際に誘導されたことを示した。このように、LPS軽度内毒素血症モデルにおける生物マーカーとして、以下の基準を確立した：LPS注射後1時間でのTNF 血清レベル、LPS注射後4時間でのIL-6血清レベル、ならびにLPS注射後4および8時間でのSAA血清レベル。

【0403】

異なる群の動物における体温を、72時間の実験の経過において、外科的に埋め込んだ遠

10

20

30

40

50

隔測定装置によってモニターした。マウスの体温は、LPS注射後30分で37.07 から34.98 へと最大で2 低下した。

【0404】

IL-22RA2-Fc融合タンパク質100 μg をLPS注射の30分前に注射すると、4時間および8時間の時点でのSAA誘導が有意に約50%減少したが、IL-22RA2-Fc 10 μg は有意な作用を示さなかった。TNF およびIL-6レベルには有意な変化を認めない。IL-22RA2-Fc注射によって、1時間の時点で循環中の好中球数が減少した。IL-22RA2-Fcの投与は、SAA誘導に関してIL-22活性を中和できることが示された。

【0405】

B. Alamar Blue増殖アッセイにおいてBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞を用いてLPSによるマウス内毒素血症モデルのマウス血清におけるIL-22活性の検出

本明細書において記述したBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞を、遠心沈降させてPBSによって2回洗浄し、mIL-3を確実に除去した後、3回目の遠心沈降を行って、mIL-3を含まない完全な培地(RPMI 1640、10%FBS、1%GlutaMAX、1%ピルビン酸ナトリウム)(以降「無mIL-3培地」と呼ぶ)に浮遊させた。細胞を血球計算盤において計数した。無mIL-3培地を用いて、細胞を96ウェルフォーマットで5000個/ウェルで100 μl /ウェルの容積で播種した。

【0406】

先の実施例11Aに記述した実験からのLPSによる内毒素血症マウスからの血清を、プレート一番上の列において無mIL-3培地によって2%に希釈して、96ウェルプレートの残りの7列に対して連続1:2希釈して、各ウェルに容量100 μl を残した。次に、これに細胞100 μl を加えて、最終的な血清濃度は総アッセイ容積を200 μl において1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.063%、0.031%、0.016%、および0.018%であった。アッセイプレートを37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂において4日間インキュベートして、その後Alamar Blue (Accumed、シカゴ、イリノイ州)を20 μl /ウェルで加えた。プレートを37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂で再度16時間インキュベートした。Alamar Blueは、生存細胞数に基づいて蛍光測定値を生じ、このように、陰性対照と比較して細胞増殖の直接測定である。プレートをWallac Victor 2 1420マルチラベルカウンター(Wallac、ツルク、フィンランド)において波長530(励起)および590(放出)で読み取った。

【0407】

結果は、0時間、1時間、8時間、および16時間の時点でバックグラウンドレベルを超えて有意な増殖を示さなかった。4時間の時点での血清試料は、バックグラウンドを超えて4倍増加から10倍増加より大きい増殖を示し、それらの試料にIL-22が存在することを示した。

【0408】

C. LPSによるマウス内毒素血症モデル：IL-22RA2の作用を評価する実験

IL-22RA2処置が、LPS 25 μg 用量のマウスへの1回腹腔内注射によって誘導された前炎症性指標に影響を及ぼすか否かを調べた。全ての試料を、SAA、IL-22および循環中の好中球数に関して分析した。各群のサブセットを特定のサイトカインレベルに関して分析した(1時間試料をTNF に関してスクリーニングし、4時間試料をIL-6に関して分析した)。動物を下記の表8における表記の時点で屠殺して、全血および血清を分析のために採取して少量に分けた。

【0409】

C57BL/6N雌性マウス(CRL)72匹に、下記の表8に記述するように、IL-22RA2を1回IP投与した。対照マウスはC57BL/6N(CRL)であった。

【0410】

30分後、マウスにLPS(Sigma)25 μg を100 μl においてIP注射して、内毒素血症のカスケードを開始させた。各群のマウスを、表8に示すように、対応する時点で屠殺して、全血50 μl を回収して循環中の好中球の総数を測定して、血清を得るために残りを遠心して本明細書に記述の様々なアッセイのために少量ずつ分けた。

【0411】

10

20

30

40

50

【表 8】

群	数	処置	LPS	屠殺	試料
A	8	100 μ g IL-22RA2 IP	25 μ g IP tx後30分	1時間	血清のアリコート CBC用血液
B	8	10 μ g IL-22RA2 IP	25 μ g IP tx後30分	1時間	血清のアリコート CBC用血液
C	8	200 μ l PBS IP	25 μ g IP tx後30分	1時間	血清のアリコート CBC用血液
D	8	100 μ g IL-22RA2 IP	25 μ g IP tx後30分	4時間	血清のアリコート CBC用血液
E	8	10 μ g IL-22RA2 IP	25 μ g IP tx後30分	4時間	血清のアリコート CBC用血液
F	8	200 μ l PBS IP	25 μ g IP tx後30分	4時間	血清のアリコート CBC用血液
G	8	100 μ g IL-22RA2 IP	25 μ g IP tx後30分	8時間	血清のアリコート CBC用血液
H	8	10 μ g IL-22RA2 IP	25 μ g IP tx後30分	8時間	血清のアリコート CBC用血液
J	8	200 μ l PBS IP	25 μ g IP tx後30分	8時間	血清のアリコート CBC用血液
K	5	対照	なし	LPS前	血清のアリコート CBC用血液

【0412】

D. IL-22RA2-Fc4はインビボでSAA誘導を中和する：マウスLPS内毒素血症モデルにおいてLPSによって誘導されるSAA発現を示すSAA ELISAはIL-22RA2-Fc4注射によって阻害される

IL-22RA2がマウスLPS内毒素血症モデルにおいてSAA誘導を阻害するか否かを評価するために、先の実施例11Cにおける表8に示すように、LPS注射の30分前にマウスにIL-22RA2を注射した。

【0413】

4時間および8時間試料においてSAAレベルを決定するためのELISAを、マウスSAAイムノアッセイキット（BioSource International、カリフォルニア州）を用いて、製造元の指示に従って行った。4時間の時点で、IL-22RA2 100 μ gまたは10 μ gを処置したマウスは、PBS注射マウスと比較してSAAレベルの用量依存的な統計学的に有意な減少を示した。8時間の時点で、100 μ gを処置したマウスは、PBS注射マウスと比較してSAAレベルの統計学的に有意な減少を示し続けた。このことは、IL-22RA2の存在がインビボでLPSによるSAAの誘導を阻害できることを示している。

【0414】

実施例13

皮膚に及ぼすIL-22ポリペプチドのインビボ作用

A. IL-22によるアカントーシス

マウス（雌性、C3H/HEJ、8週齢；Jackson Labs、バーハーバー、メイン州）を1群6匹の3群および4匹の1群に分けた。ヒトBHK産生IL-22をミニ浸透圧ポンプによってマウスに持続的注入によって投与すると、ポンプに含まれるIL-22の濃度に比例して局所および定常状態血清濃度が得られた。Alzetミニ浸透圧ポンプ（モデル2002；Alza Corporation、パロアルト、カリフォルニア州）に、滅菌条件で、リン酸緩衝生理食塩液（pH 7.0）によってポンプ内濃度が1群のマウスに関して2 mg/ml、2群のマウスに関して0.2 mg/ml、3群のマウスに関して0.02 mg/ml、または4群のマウスに関して0 mg/ml（希釈液のみ）となるように希釈したIL-22タンパク質（A601F、0.22ml）を充填した。ポンプを背側皮膚の1 cm切開部を通してマウスの皮下に埋め込んで、皮膚を滅菌縫合糸によって閉じた。これらのポンプは、14日間にわたって0.5 μ l/時間の速度でその内容物を輸送するように設計されている。この名目上の注入速度を用いると、用量レベルは1～4群に関してそれぞれ、24 μ g/日、2.4 μ g/日、0.24 μ g/日、および0 μ g/日であると計算された。

【0415】

14日間の終了時、マウスを安楽死させて、ポンプ領域周辺の皮膚約1 cm四方の試料を各マウスから採取した。皮膚を10%中性緩衝ホルマリンにおいて固定した。皮膚ホルマリン固定試料をパラフィンに抱埋して通常通りに処理し、5 μ mの切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジンによって染色した。組織を、ACVP委員会認定の獣医病理学者が顕微鏡下で盲検的に観察した。組織学的変化を記録して、アカントーシス（すなわち、表皮の肥厚）の重症度を、以下の採点システムを用いて主観的に採点した：0 - 正常、1 - 最小のアカントーシス、2 - 軽度のアカントーシス、3 - 中等度のアカントーシス、および4 - 重度のアカントーシス。さらに、選択された群の皮膚を、CoolSnapデジタルカメラ（Roper Scientific Inc.、サンジエゴ、カリフォルニア州）を用いて撮像し、表皮の厚さを組織形態計測ソフトウェア（Scion Image for Windows、バージョン4.02、Scion Corp.、フレデリック、メリーランド州）を用いて測定した。

【0416】

IL-22を2.4および24 μ g/日で投与すると、対照群の皮膚において認められるスコアより一貫して高いアカントーシススコアの平均値によって示されるように、表皮の肥厚が起こった。その上、IL-22処置動物はまた、表皮への単核球の浸潤を認めた。これらの浸潤物は、溶媒対照群では認められなかった。

【0417】

群毎の表皮の厚さのアカントーシススコアおよび皮膚の厚さ（一般的なピクセル単位で）の測定値を下記の表9に示す。

【0418】

【表9】

群番号	n=	ポンプ	アカントーシス	測定した
			の平均値	厚さ
1	6	24 μ g IL-22/日	3.0	ND
2	6	2.4 μ g IL-22/日	2.4	67.5
3	6	0.24 μ g IL-22/日	2.2	ND
4	4	PBS注入	1.8	45.6

【0419】

B. IL-22によるアカントーシスに及ぼすIL-22RA2の影響

マウス（雌性、C3H/HEJ、8週齢；Jackson Labs、バーハーバー、メイン州）を1群8匹の8群に分けた。IL-22を実施例12Aに記述するようにミニ浸透圧ポンプによる持続的注入によって投与した。Alzetミニ浸透圧ポンプ（モデル2001；Alza Corporation、パロアルト

、カリフォルニア州)に、滅菌条件で、リン酸緩衝生理食塩液(pH 7.0)によってポンプ内濃度が1~2群のマウスに関して0.22 mg/ml、3~4群のマウスに関して0.45 mg/ml、5~6群のマウスに関して0.9 mg/ml、または7~8群のマウスに関して0 mg/ml(希釈液のみ)となるように希釈したIL-22タンパク質(A#601F、0.22 ml)を充填した。これらのポンプは、14日間にわたって0.5 µl/時間の速度でその内容物を輸送するように設計されている。この名目上の注入速度を用いると、用量レベルは、1~2群に関して10 µg/日、3~4群に関して5 µg/日、5~6群に関して2.5 µg/日、および7~8群に関して0 µg/日であると計算された。IL-22の所定の用量レベルでの群のそれぞれの対に関して、群の一つに、ヒトIL-22RA2 Fcタンパク質(本明細書において記述の)0.1 mgの腹腔内経路による3回注射(1、3、および5日)を行った。他の群には溶媒(PBS)を同じように注射した。

10

【0420】

試験8日目、マウスを安楽死させて、ポンプ領域周辺の皮膚約1 cm四方の試料を各マウスから採取した。皮膚を10%中性緩衝ホルマリンにおいて固定した。皮膚ホルマリン固定試料をパラフィンに抱埋して通常通りに処理し、5 µmの切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジンによって染色した。組織を、ACVP委員会認定の獣医病理学者が顕微鏡下で盲検的に観察した。本試験は、これまでの試料とは異なるように採点した。基底層から顆粒層までの表皮の層の数を決定した。結果に基づいて、切片を以下のように採点した：0 - 正常(2~3層)、1 - 軽度の肥厚(3~4層)、2 - 中等度の肥厚(4~6層)、および3 - 重度の肥厚(>6層)。

20

【0421】

IL-22の2.5、5、10 µg/日の投与によって、表皮の肥厚が起こった(表10を参照されたい)。その上、IL-22処置動物はまた表皮への単核球の浸潤を示した。これらの浸潤物は溶媒を処置した対照では認められなかった。IL-22RA2 100 µg(3回注射)の同時投与によって、IL-22 5 µg/日を処置したマウスにおける表皮の肥厚量は減少した。

【0422】

群毎の表皮肥厚のアカントーシスコアを下記の表10に示す。

【0423】

【表10】

群番号	n =	ポンプ	注 射	アカントーシスの 平均値
1	8	2.5 µg IL-22/日	100 µL 溶媒 (3回注射)	1.1
2	8	2.5 µg IL-22/日	100 µg IL-22RA2 (3回注射)	0.8
3	8	5 µg IL-22/日	100 µL 溶媒 (3回注射)	2.0
4	8	5 µg IL-22/日	100 µg IL-22RA2 (3回注射)	0.6
5	8	10 µg IL-22/日	100 µL 溶媒 (3回注射)	2.0
6	8	10 µg IL-22/日	100 µg IL-22RA2 (3回注射)	1.9
7	8	溶媒	100 µL 溶媒 (3回注射)	0.0
8	8	溶媒	100 µg IL-22RA2 (3回注射)	0.0

30

40

【0424】

表皮の肥厚および免疫浸潤物はまた、ヒト乾癬皮膚においても認められた。IL-22皮下注射において認められた皮膚表現型は、乾癬の発病におけるIL-22の可能性のある役割をさらに示した。IL-22RA2-FcがIL-22による皮膚表現型を中和できるという事実は、乾癬および他のIL-22による炎症疾患の治療に抗IL-22中和抗体または可溶性受容体のような他の

50

IL-22アンタゴニストを用いる可能性を示唆する。

【0425】

C. IL-22によるまたはIL-20によるアカントーシスに及ぼすIL-22RA可溶性受容体および抗IL-22RA抗体の影響

IL-22またはIL-20のインビボ活性を阻害するIL-22RA可溶性受容体またはIL-22RAに対する抗体の活性を、IL-22またはIL-20タンパク質の皮下注射によって引き起こされたアカントーシスの組織学的エンドポイントを用いて同様に評価する。このモデルの例において、先の実施例12(A)および12(B)に記述されたミニ浸透圧ポンプを、C3H/HEJマウスの皮下に埋め込む。IL-22またはIL-20に対する曝露期間に、マウスをIL-22に対する精製モノクローナル抗体の注射によって処置するか、または対照として溶媒を同様に注射した。IL-22注入期間の終了時、皮膚を組織学的分析のためにポンプ領域から採取する。IL-22RA2可溶性受容体IL-22アンタゴニストと同様に、本発明のIL-22またはIL-20アンタゴニストIL-22RA可溶性受容体または抗IL-22RA抗体は、IL-22またはIL-20によって引き起こされた表皮の肥厚および免疫細胞の浸潤の減少を示すと予想され、したがって、乾癬および他のIL-22またはIL-20による炎症疾患の治療薬としてIL-22またはIL-20アンタゴニストとして有用である。

【0426】

実施例14

IL-22はヒト乾癬皮膚試料においてアップレギュレートされる

RNA試料

正常皮膚試料と共に乾癬患者からの皮膚を得た。後者には、安定な斑状乾癬および隣接する無関係な皮膚からの皮膚が含まれた。RNAを、通常の方法を用いてヒト皮膚試料から単離した。RNA試料の完全性および品質をAgilent 2100バイオアナライザー (Agilent Technologies、ワルドブロン、ドイツ) において試験した。

【0427】

RT-PCRのためのプライマーおよびプローブ

ABI PRISM 7700配列検出システム (PE Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いるリアルタイム定量的RT-PCRは、既に記述されている (Heid, C.A.ら、Genome Research 6: 986~994, 1996; Gibson, U.E.M.ら、Genome Research 6: 995~1001, 1996; Sundaresan, S.ら、Endocrinology 139: 4756~4764, 1998を参照されたい)。この方法は、レポーターおよびクエンチャー蛍光色素の双方を含む遺伝子特異的プローブを用いることを取り入れている。プローブが無傷の場合、レポーター色素の放出は、クエンチャー色素が近位に存在することにより打ち消される。さらなる遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマーを用いるPCR伸長の際に、プローブは、rTth DNAポリメラーゼの5'から3'ヌクレオチド溶解活性によって切断され、これによってプローブからレポーター色素が放出されて、蛍光の放出が増加する。

【0428】

IL-22発現のリアルタイム定量的RT-PCR分析のために用いられるプローブおよびプライマーは、プライマーデザインソフトウェアPrimer Express (商標) (PE Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いて設計した。ゲノムDNAの増幅を消失させるために、イントロン-エキソン接合部に及ぶヒトIL-22のプライマーを設計した。フォワードプライマー、ZC42459 (配列番号: 22) およびリバースプライマーZC42458 (配列番号: 23) を濃度800 nMでPCR反応 (下記) において用いて、72 bpの産物を合成した。対応するIL-22プローブZC42460 (配列番号: 24) をZymoGeneticsの施設内において合成および標識した。IL-22プローブは、5'末端でレポーター蛍光色素 (6-カルボキシ-フルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) によっておよび3'末端でクエンチャー蛍光色素 (6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン) (TAMRA) (PE Applied Biosystems) によって標識した。

【0429】

C. リアルタイム定量的RT-PCR

IL-22 mRNAの相対的レベルを、TaqMan EZ RT-PCRコア試薬キット (PE Applied Biosystems) を用いて総RNA試料を分析することによって決定した。ランオフ (runoff) IL-22転写物を作製して、定量のために用いる標準曲線を作製した。曲線は、1試料あたり3個ずつ分析したそれぞれの標準曲線の点を有するIL-22の全メッセージの約 $1e8 \sim 1e3$ の総コピーに及ぶ10倍連続希釈からなった。皮膚からの総RNA試料も同様にヒトIL-22転写物レベルに関しておよび内因性の対照としてhGUSのレベルに関して1試料あたり3個ずつ分析した。全量25 μ lにおいて、各RNA試料に、以下を含むTaqMan EZ RT-PCR反応 (PE Applied Biosystems) を行った：DEPC処置水 (DNase/RNase不含) における総RNA約25 ng；適当なプライマー (約800 nM ZC42459 (配列番号：22) およびZC42458 (配列番号：23))；適当なプローブ (約100 nM ZC42460 (配列番号：24))；1 \times TaqMan EZ緩衝液；3 mM酢酸マンガニン；300 μ M各d-CTP、d-ATP、およびd-GTPおよび600 μ M d-UTP；rTth DNAポリメラーゼ (0.1 U/ μ l)；ならびにAmpErase UNG (0.01 U/ μ l)。PCRサーマルサイクリング条件は以下の通りであった：最初のUNG処置段階、50 で2分を1サイクル；その後逆転写 (RT) 段階、60 で30分を1サイクル；その後UNGの脱活性化段階、95 で5分を1サイクル；その後94 で20秒および60 で1分の増幅を40サイクル。

【0430】

相対的IL-22 RNAレベルは、製造元であるPE Biosystems (ユーザー会報#2：ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, 1997年12月11日) によって記述される標準曲線法を用いて決定した。hGUS測定値を用いて、IL-22レベルを標準化した。データを下記の表11に示す。

【0431】

【表11】

皮膚試料	IL-22
正常	0
非関与	0
関与	1149

【0432】

IL-22 mRNAは、正常患者または非罹患領域からの皮膚試料において検出不能であった。対照的に、乾癬患者からの罹患皮膚ではIL-22メッセージの劇的なアップレギュレーションを認めた。これらのデータは、ヒト乾癬に対するIL-22の強い疾患関連性を支持する。

【0433】

IL-22の過剰発現がヒト乾癬病変において示され、このことはIL-22がヒト乾癬に関与していることを示唆している。その上、本明細書に記述するように、トランスジェニックマウスにおけるIL-22の過剰発現は、乾癬表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、さらに、IL-22を正常マウスに注射すると、乾癬表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示したが、これは可溶性受容体アンタゴニストIL-22RA2によって消失した。そのようなインビボデータは、前炎症性IL-22が乾癬に関与していることをさらに示唆する。そのため、可溶性受容体およびそれに対する抗体と共に本発明の抗ヒトIL-22モノクローナル抗体のような、IL-22活性に対するアンタゴニストは、炎症疾患の治療的治療において、特に乾癬の治療においてIL-22のアンタゴニストとして有用である。その上、本発明の抗ヒトIL-22モノクローナル抗体と共に可溶性受容体およびそれに対する抗体のような、IL-22活性に対するアンタゴニストは、他の炎症疾患の治療的治療において、例えばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒素血症、関節炎、リウマチ性関節炎、および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患 (ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎のような炎症性肺損傷、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性および接触性皮膚炎、ならびに潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患の治療において、IL-22に対するアンタゴニストとして有用である。

【0434】

実施例15

IL-22はヒトアトピー性皮膚炎皮膚試料においてアップレギュレートされる

正常皮膚試料 (n=4) と共に、アトピー性皮膚炎患者 (n=4) からの皮膚を得た。RNAを通常の方法を用いてヒト皮膚試料から単離した。RNA試料の完全性および性質は、Agilent 2100バイオアナライザー (Agilent Technologies、ワルドブロン、ドイツ) において試験した。

【0435】

RT-PCRのためのプライマーおよびプローブ

ABI PRISM 7700配列検出システム (PE Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いるリアルタイム定量的RT-PCRは既に記述されている (Heid, C.A.ら、Genome Research 6: 986~994、1996; Gibson, U.E.M.ら、Genome Research 6: 995~1001、1996; Sundaresan, S.ら、Endocrinology 139: 4756~4764、1998を参照されたい)。この方法は、レポーターおよびクエンチャー蛍光色素の双方を含む遺伝子特異的プローブを用いることを取り入れている。プローブが無傷の場合、レポーター色素の放出は、クエンチャー色素が近位に存在することにより打ち消される。さらなる遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマーを用いるPCR伸長の際に、プローブは、rTth DNAポリメラーゼの5'から3'ヌクレオチド溶解活性によって切断され、これによってプローブからレポーター色素が放出されて、蛍光の放出が増加する。

【0436】

IL-22発現のリアルタイム定量的RT-PCR分析のために用いられるプローブおよびプライマーは、プライマーデザインソフトウェアPrimer Express (商標) (PE Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いて設計した。ゲノムDNAの増幅を消失させるために、イントロン-エキソン接合部に及ぶヒトIL-22のプライマーを設計した。フォワードプライマー、ZC42459 (配列番号: 22) およびリバースプライマーZC42458 (配列番号: 23) を濃度800 nMでPCR反応 (下記) において用いて、72 bpの産物を合成した。対応するIL-22プローブZC42460 (配列番号: 24) をZymoGeneticsの施設内において合成および標識した。IL-22プローブは、5'末端でレポーター蛍光色素 (6-カルボキシ-フルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) によっておよび3'末端でクエンチャー蛍光色素 (6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン) (TAMRA) (PE Applied Biosystems) によって標識した。

【0437】

C. リアルタイム定量的RT-PCR

IL-22 mRNAの相対的レベルを、TaqMan EZ RT-PCRコア試薬キット (PE Applied Biosystems) を用いて総RNA試料を分析することによって決定した。ランオフIL-22転写物を作製して、定量的ために用いる標準曲線を作製した。曲線は、1試料あたり3個ずつ分析したそれぞれの標準曲線の点を有するIL-22の全メッセージの約 $1e8 \sim 1e3$ の総コピーに及ぶ10倍連続希釈からなった。皮膚からの総RNA試料も同様にヒトIL-22転写物レベルに関しておよび内因性の対照としてhGUSのレベルに関して1試料あたり3個ずつ分析した。総容積25 μ lにおいて、各RNA試料に、以下を含むTaqMan EZ RT-PCR反応 (PE Applied Biosystems) を行った: DEPC処置水 (DNase/RNase不含) における総RNA約25 ng; 適当なプライマー (約800 nM ZC42459 (配列番号: 22) およびZC42458 (配列番号: 23)); 適当なプローブ (約100 nM ZC42460 (配列番号: 24)); $1 \times$ TaqMan EZ緩衝液; 3 mM酢酸マンガニン; 300 μ M各d-CTP、d-ATP、およびd-GTPおよび600 μ M d-UTP; rTth DNAポリメラーゼ (0.1 U/ μ l); およびAmpErase UNG (0.01 U/ μ l)。PCRサーマルサイクリング条件は以下の通りであった: 最初のUNG処置段階、50 で2分を1サイクル; その後逆転写 (RT) 段階、60 で30分を1サイクル; その後UNGの脱活性化段階、95 で5分を1サイクル; その後94 で20秒および60 で1分の増幅を40サイクル。

【0438】

相対的IL-22 RNAレベルは、製造元であるPE Biosystems (ユーザー会報#2: ABI Prism

7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression、1997年12月11日)によって記述される標準曲線法を用いて決定した。hGUS測定値を用いて、IL-22レベルを標準化した。

【0439】

IL-22 mRNAは、正常患者からの皮膚試料において検出不能であった。対照的に、アトピー性皮膚炎患者からの皮膚試料4例中3例において、IL-22メッセージの劇的なアップレギュレーションを認めた(約400~2300コピー)。これらのデータは、ヒトアトピー性皮膚炎に対するIL-22の強い疾患関連性を支持する。

【0440】

IL-22の過剰発現がヒトアトピー性皮膚炎の皮膚において示され、IL-22がヒトアトピー性皮膚炎に関係していることを示唆している。その上、本明細書において記述されるように、トランスジェニックマウスにおけるIL-22の過剰発現は、アトピー性皮膚炎の表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、さらにIL-22を正常マウスに注射すると、アトピー性皮膚炎を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示し、これは可溶性受容体アンタゴニストIL-22RA2によって消失した。そのようなインビボデータは、前炎症性IL-22がアトピー性皮膚炎に関与していることをさらに支持する。そのため、本発明の抗ヒトIL-22モノクローナル抗体と共に、可溶性受容体およびそれに対する抗体のようなIL-22活性に対するアンタゴニストは、炎症疾患の治療的治療において、特にアトピー性皮膚炎の治療においてIL-22に対するアンタゴニストとして有用である。その上、本発明の抗ヒトIL-22モノクローナル抗体と共に、可溶性受容体およびそれに対する抗体のようなIL-22活性に対するアンタゴニストは、他の炎症疾患の治療的治療において、例えばアトピー性皮膚炎、IBD、大腸炎、内毒素血症、関節炎、リウマチ性関節炎、および乾癬性関節炎、成人呼吸器疾患(ARD)、敗血症ショック、多臓器不全、喘息または気管支炎のような炎症性肺損傷、細菌性肺炎、乾癬、湿疹、アトピー性および接触性皮膚炎、ならびに潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患の治療においてIL-22に対するアンタゴニストとして有用である。

【0441】

実施例16

ヒトIL-22ポリクローナル抗体

抗IL-22ポリクローナル抗体は、BHK細胞によって産生される精製成熟組換え型ヒトIL-22ポリペプチド(配列番号:6のアミノ酸番号22(Ala)~167(Ile))(IL-22-BHK)によって雌性ニュージーランドホワイトウサギ2羽を免疫することによって調製した。ウサギにそれぞれ、最初に精製タンパク質200 µgと共にフロイントの完全アジュバントを腹腔内注射した後、3週間毎にフロイントの不完全アジュバントと共にペプチド100 µgの腹腔内注射によって追加免疫した。2回目の追加免疫(全体で3回の注射)の注射後7~10日目に、動物から採血して血清を回収した。動物を追加免疫してさらに3週間毎に採血した。

【0442】

ヒトIL-22特異的ポリクローナル抗体を、特異的抗原精製組換え型タンパク質ヒトIL-22-BHK 10 mg/mg CNBr-セファロースを用いて調製した後にPBSによる一晚透析20回によって調製したCNBr-セファロース4Bタンパク質カラム(Pharmacia LKB)を用いて免疫ウサギ血清からアフィニティ精製した。ヒトIL-22特異抗体は、抗体標的として精製組換え型タンパク質ヒトIL-22-BHK 500 ng/mlを用いてELISAによって特徴を調べた。ウサギ抗ヒトIL-22アフィニティ精製抗体の検出下限(LLD)は、その特異的精製組換え型抗原ヒトIL-22-BHKに対して280 pg/mlである。

【0443】

ヒトIL-22特異的ポリクローナル抗体を、BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞における精製組換え型ヒトIL-22 BHKの細胞増殖活性(「中和アッセイ」)の遮断能に関してさらに特徴を調べた(実施例2および実施例3)。ヒトIL-22特異的ポリクローナル抗体の50倍モル過剰量は、細胞の増殖を阻害するために十分であった。

【0444】

10

20

30

40

50

実施例17

抗ヒトIL-22モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、雌性Sprague-Dawley系ラット（Charles River Laboratories、ウィルミントン、マサチューセッツ州）4匹を、BHK細胞によって産生された精製成熟組換え型ヒトIL-22ポリペプチド（配列番号：6のアミノ酸番号22（Ala）～167（Ile））（IL-22-BHK）によって免疫することによって調製した。ラットに精製ヒト組換え型IL-22タンパク質100 µgをフロイントの完全アジュバントと共に最初に腹腔内注射した後、2週間毎にフロイントの不完全アジュバントと共に精製組換え型タンパク質50 µgの腹腔内注射による追加免疫を行った。3回目の追加免疫の注射後7～10日目に、動物から採血して血清を採取した。

【0445】

ヒトIL-22特異的ラット血清試料を、500 ng/ml ビオチン化ヒトIL-22-BHKおよび500 ng/ml ビオチン化マウスIL-22、ビオチン化muIL-22-大腸菌（R+D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州）抗体標的を用いてELISAによって特徴を調べた。三つのラット血清試料は、1：1E5の希釈で特異的抗体標的のビオチン化ヒトIL-22-BHKに対する力価を有し、1：1E4の希釈で特異的抗体標的のビオチン化muIL-22-大腸菌に対する力価を有した。

【0446】

脾細胞およびリンパ節細胞を高力価ラット2匹から回収して、異なる二つの融合技法において（4：1融合比、脾細胞対骨髓腫細胞、「Antibodies A Laboratory Manual」、E. Harlow and D. Lane、Cold Spring Harbor Press）、PEG 1500を用いてSP2/0（マウス）骨髓腫細胞と融合した。融合後10日間増殖させた後、特異的抗体産生ハイブリドーマプールを、異なる抗体標的としてビオチン化組換え型タンパク質ヒトIL-22-BHKおよびビオチン化組換え型タンパク質muIL-22-大腸菌を用いてELISAによって同定した。双方のELISAプロトコールにおいて陽性であるハイブリドーマプールを、BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞における精製組換え型muIL-22-大腸菌の細胞増殖活性の遮断または減少能（「中和アッセイ」）に関してさらに分析した（実施例2および実施例3）。

【0447】

ELISAのみによって、およびELISAと「中和アッセイ」の双方によって陽性の結果を生じたハイブリドーマプールを限界希釈によって少なくとも2回クローニングした。

【0448】

組織培養培地から精製したモノクローナル抗体を、マウスおよびヒト血清試料における組換え型および天然のヒトIL-22を定量的に測定するために、ELISAにおけるその有用性に関して特徴を調べた。選択した二つの抗体によって、100%ヒト血清における検出下限が約1 ng/ml組換え型huIL-22-大腸菌である定量的アッセイが得られた。

【0449】

組織培養培地から精製したモノクローナル抗体を、BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞における精製組換え型huIL-22-大腸菌またはmuIL-22-大腸菌の細胞増殖活性の遮断または減少能（「中和アッセイ」）に関して特徴を調べた（実施例2および実施例3）。「中和モノクローナル抗体」6個をこのようにして同定した。上記のヒトIL-22に対する中和性モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC；マナッサス、バージニア州）特許寄託機関に、ブダペスト条約に基づく原寄託として寄託し、以下のATCCアクセッション番号を与えられた：クローン266.16.1.4.4.1（ATCC特許寄託指定番号PTA-5035）；クローン266.5.1.2.2.3（ATCC特許寄託指定番号PTA-5033）；クローン267.17.1.1.4.1（ATCC特許寄託指定番号PTA-5038）；クローン267.4.1.1.4.1（ATCC特許寄託指定番号PTA-5037）；クローン266.12.6.1.3.2.1（ATCC特許寄託指定番号PTA-5034）；クローン266.19.1.10.5.2（ATCC特許寄託指定番号PTA-5036）；およびクローン267.9.1.1.4.1（ATCC特許寄託指定番号PTA-5353）。

【0450】

実施例18

抗IL-22RAモノクローナル抗体

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体は、Lewisラット（Rockland Immunochemicals、ギルバーツビル、ペンシルバニア州）を切断型および精製型組換え型融合タンパク質muIL-22RA-Fc（配列番号：4）によって免疫することによって調製した。ラットにそれぞれ、精製組換え型融合タンパク質100 μgをフロイントの完全アジュバント（Pierce、ロックフォード、イリノイ州）と共に最初に腹腔内注射した後、フロイントの不完全アジュバントと共に精製組換え型タンパク質50 μgの腹腔内注射による追加免疫を2週間毎に4週間行った。最初の4週間の免疫の後、フロイントの不完全アジュバントと共に担体タンパク質キーホールリンペットヘモシアニン（KLH、Pierce、ロックフォード、イリノイ州）に共役させた切断型精製組換え型タンパク質50 μgの腹腔内注射による追加免疫を2週間毎に4週間行った。4回目の追加免疫注射後7～10日目に、動物から採血して血清を採取した。

10

【0451】

muIL-22RA特異的ラット血清試料を、特異的抗体標的として500 ng/ml精製組換え型融合タンパク質muIL-22RA-Fcおよび非特異的抗体標的として無関係な融合タンパク質を用いてELISAによって特徴を調べた。

【0452】

高い力価のラット1匹から脾細胞を採取して、最適なPEG-媒介融合プロトコール（Rockland Immunochemicals）においてSP2/0（マウス）骨髓腫細胞に融合した。融合後12日間の増殖後、500 ng/ml各精製組換え型融合タンパク質muIL-22RA-Fc-Bvを特異的抗体標的としておよび無関係な融合タンパク質を非特異的抗体標的として用いるELISAによって、特異的抗体産生ハイブリドーマプールを同定した。特異的抗体標的のみに対して陽性であるハイブリドーマプールを、BaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞（実施例2および実施例3）における精製組換え型muIL-22-大腸菌の細胞増殖活性の遮断または減少能（「中和アッセイ」）に関してさらに分析して、抗体標的としてBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞（実施例2および実施例3）に対する結合能に関してFACS分析によって分析した。

20

【0453】

ELISAアッセイにおいて特異的陽性結果およびFACSまたは「中和アッセイ」のいずれかにおいて陽性結果を生じるハイブリドーマプールを、限界希釈によって少なくとも2回クローニングした。

【0454】

組織培養培地におけるモノクローナル抗体を、精製組換え型タンパク質muIL-22-大腸菌またはhuIL-22-BHKの存在下で増殖させたBaF3/CRF2-4/IL-22RA細胞（実施例2および実施例3）の増殖の遮断または阻害能に関して特徴を調べた。「中和性」モノクローナル抗体14個が同定され、モノクローナル抗体9個をクローニングした。

30

【0455】

上記のマウスIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC；マナッサス、バージニア州）特許寄託機関に、ブダペスト条約に基づく原寄託として寄託し、以下のATCCアクセッション番号を与えられた：クローンR2.1.1G11.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；クローンR2.1.5F4.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；クローンR2.1.5H8.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；クローンR2.1.12G7.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；クローンR.2.1.13C8.1（ATCC特許寄託指定番号PTA-5037）；クローンR2.1.15E2.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；クローンR2.1.16C11.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；クローンR2.1.18C8.1（ATCC特許寄託指定番号[####]）；およびクローンR2.1.21G8.2（ATCC特許寄託指定番号[####]）。

40

【0456】

実施例19

二つのラット抗Ms-IL-22RA mAbに対する結合親和性

ヤギ抗ラットIgG-Fc 特異的抗体（Jackson）をCM5 Biacoreチップに固定した。アッセイは、各mAbが抗ラット捕獲表面に結合するように最適にされ、結合定数（K_a）および解離定数（K_d）を調べるためにmAbに対して一連の濃度のIL-22RAを注射した。予備試験の後

50

、非特異的結合を融合タンパク質とチップ上の捕獲表面との間に認めた。トロンピンによって切断したFc4タグを有するIL-22RAのバイアルを獲得してその後バックグラウンド作用を示さないことを調べた。各試験後、表面を20 mM HClの2回注入によって抗ラット抗体に対して再度再生した。データをそれぞれのmAbについて作製して、評価ソフトウェア（BIA評価ソフトウェア、バージョン3.2；Pharmacia BIA core、ウプサラ、スウェーデン）を用いて、下記の表12に示すようにIL-22RAタンパク質に対する抗IL-22抗体結合の動態を評価した。

【 0 4 5 7 】

【表 1 2】

<u>クローンR2.1.5F4.1**</u>		<u>クローンR2.1.15E2.1**</u>	
<u>ka (M-1s-1)</u>	<u>1.49E+06</u>	<u>ka (M-1s-1)</u>	<u>1.76E+06</u>
<u>kd (s-1)</u>	<u>1.70E-04</u>	<u>kd (s-1)</u>	<u>2.55E-04</u>
<u>KA (M-1)</u>	<u>8.76E+09</u>	<u>KA (M-1)</u>	<u>6.66E+09</u>
<u>KD (M)</u>	<u>1.14E-10</u>	<u>KD (M)</u>	<u>1.504E-10</u>
<u>Chi2</u>	<u>2.08</u>	<u>Chi2</u>	<u>1.5</u>

** 各抗IL-22RA mAbの平衡結合定数（Ka）および解離定数（Kd）を示し、値は装置の検出限界内に入る。Chi2は、結合曲線と評価適合曲線の間の残余の平方の和を指す。0に近づけば、データの信頼性はより高くなる。

【 0 4 5 8 】

表12に示すように、抗IL-22RA mAbはいずれも、IL-22RAに対するピコモル濃度での結合によって示されるように（トロンピン切断Fc4タグ）IL-22RAタンパク質に強く結合する。これらのデータは低いChi²値に基づいて良好な信頼性をもって示され、mAbクローンR2.1.5F4.1のほうにIL-22RA受容体に対してわずかに強い親和性を有することを示している。

【 0 4 5 9 】

実施例20

組織試料におけるインビボIL-22タンパク質発現の免疫組織化学分析

A. 概要

IL-22タンパク質発現および局在に関する免疫組織化学（IHC）分析を、抗ヒトIL-22（抗hIL-22）モノクローナル抗体（Mab 266.19.1.10.5.2）を用いて以下の組織試料において行った：ヒトmulti-Normal GridおよびTumor Grid；ヒト脾臓、肺、および腎疾患試料；ヒト乾癬皮膚試料；INS IL-22 TG（ラットインスリンプロモーターから発現）およびWTマウス脾臓；mulIL-22-EuLCK TGおよびWTマウス皮膚試料；ならびにDSS（WTおよびIL-22KO）マウス結腸試料。その上、抗hIL-22モノクローナル抗体MAB 266.19.1.10.5.2（実施例17）対ポリクローナル抗体（ウサギ抗hIL-22）（実施例16）の染色パターンを比較した。

【 0 4 6 0 】

ラット抗ヒトIL-22モノクローナル抗体MAB 266.16.1.4.4.1およびMAB 266.19.1.10.5.2（実施例17）を調べたところ、BHK/ヒトIL-22（>50%）の大多数、およびいくつかのBHK/マウスIL-22細胞（1~5%）を染色することが示され、これを用いて、ヒト患者および動物モデル試料の双方におけるIL-22の組織分布および発現を調べ、結果を確認するためにポリクローナルウサギ抗体による染色パターンと比較した。

【 0 4 6 1 】

B. 材料および方法

ヒト起源およびマウス動物モデルからのホルマリン固定およびパラフィン抱埋細胞およ

10

20

30

40

50

び組織を5 μ mの切片にした。細胞には、ヒトまたはマウスIL-22のいずれかを発現するBHK細胞ならびに陽性対照および陰性対照としての野生型が含まれた。ヒト組織には、様々な正常ヒト組織の切片50個（例えば、脳、下垂体、副腎、乳腺、腎臓、心臓、胃、小腸、大腸、胎児肝臓、肝臓、皮膚、膵臓、肺、扁桃、卵巣、精巣、前立腺、子宮、胎盤、甲状腺、および脾臓）を有する多組織対照スライドガラス（Normal Grid（商標）；Biomedica、フォスターシティ、カリフォルニア州）；様々なヒト腫瘍の切片50個（例えば、肺腺癌、肝腺癌、腎腺癌、結腸腺癌、乳腺癌、甲状腺腺癌、胃腺癌、前立腺腺癌、膵臓腺癌、卵巣腺癌、リンパ腫、黒色腫、ユーイング肉腫、類上皮細胞肉腫、MFH肉腫、横紋肉腫、カルチノイド、未分化癌、中皮腫、奇形腫、および精上皮腫）を有する多組織対照スライドガラス（Tumor Grid（商標）；Biomedica、フォスターシティ、カリフォルニア州）；CHTN（共同ヒト組織ネットワーク、クリーブランド、オハイオ州）からの肺癌；NDRI（国立疾患研究インターチェンジ、フィラデルフィア、ペンシルバニア州）からの正常膵臓、慢性膵炎を有する膵臓、慢性血管周囲炎を有する肺炎、多病巣性系球体硬化症、膜性増殖性系球体腎炎、または硬化性系球体間質性線維症のいずれかを有する腎臓；およびヒトの乾癬皮膚試料が含まれた。マウス組織には、炎症性腸疾患動物モデルの結腸（本明細書に開示のDSSモデル、Swiss Webster系雌性マウス）ならびに溶媒または4%DSSを飲料水において7日間処置したIL-20 WTおよびKO大腸炎動物モデルの結腸（DSSマウス、野生型およびIL-20（IL-20）ノックアウト雌性マウス）；ならびにmIL-22-EuLCK TGおよびmIL-22-INS対照およびTG動物を含むトランスジェニック（TG）動物モデルからの皮膚試料が含まれた。ブロック/スライドあたり切片1枚を、組織学検査のためにヘマトキシリン-エオジン（H&E）によって染色して、その後の切片は、IL-22タンパク質発現および局在に関して免疫組織化学的に染色した。

10

20

【0462】

免疫組織化学に関して、細胞および組織切片をChemMate（商標）毛細管ギャッププラス顕微鏡スライドガラス（BioTek、ウィヌースキ、バーモント州）に載せて、60の乾燥器において60分乾燥させて、キシレン中で3×5分、100%EtOH中で4分、100%EtOH中で3分、および95%EtOH中で2分の標準的な条件を用いてロウを除去した。次に、組織切片に37でペプシン（NeoMarkers、フリーモント、カリフォルニア州）によって20分間の酵素誘導エピトープ検索プロセスを行った後に、製造元（Zymed、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州）の説明書に従ってアビジン/ビオチン-遮断段階を行った。アビジン-ビオチン複合体検出系を用いたTechMate 500（商標）自動免疫染色装置およびイムノペルオキシダーゼ（IP）免疫組織化学プロトコール（Ventana Biotek Systems、ツーソン、アリゾナ州）を染色に用いた。TechMate 500（商標）自動免疫染色装置は、毛細管作用の原理を利用し、IPプロトコールは「サンドイッチ」技術と呼ばれるタイプの免疫染色を利用した。切片を5%正常ヤギ血清（Vector、バーミンガム、カリフォルニア州）のPBS溶液によって10分間予めブロッキングしてから、1×緩衝液1（Signet、デッドハム、マサチューセッツ州）洗浄を行い、1：800希釈したIL-22に対する一次抗体（MaB 266.19.1.10.5.2（実施例17）、2.04 mg/mlでPAS精製）と共に室温で30分間インキュベートした後、緩衝液1によって5回洗浄した。一次抗体をTechMate 500（商標）抗体希釈緩衝液（Ventana）によって希釈した。1：200希釈したビオチン化ヤギ抗ラットIgG（Vector）プラス5%正常ヤギ血清および2.5%脱脂粉乳を、PBSにおいて室温で25分間二次結合抗体として用い、その後緩衝液1によって1回洗浄し、緩衝液2&3（Signet）によって1回洗浄した。次に、組織切片に、7分間の3%過酸化水素（HP）ブロッキング（Ventana）を3回行った後、緩衝液2&3によって3回洗浄した。イムノペルオキシダーゼ標識は、ペルオキシダーゼDABキット（Ventana）によって行い、アビジン-ビオチン-複合体（ABC）と共に30分間インキュベートした後、緩衝液2&3によって5回洗浄し、ジアミノベンジジン（DAB）と共に4分間を4回インキュベートした後、緩衝液2&3によって2回、および水によって1回洗浄した（Signet、カタログ番号2340）。次に、組織をメチルグリーン（Dako、カタログ番号S1962）によって10分間対比染色した後、緩衝液2&3によって2回、および水によって3回洗浄した。対照には、一次抗体を交換するためにラット一次抗体アイソタイプ対照（Zymed）を用いる非免疫一

30

40

50

次血清が含まれた。

【0463】

免疫染色は、Olympus BH-2顕微鏡を用いて観察し、画像はCoolSNAP HQデジタルカメラ（Roper Scientific、ツーソン、アリゾナ州）を用いて獲得した。

【0464】

C. 結果

陽性および陰性対照細胞株：

抗hIL-22モノクローナル抗体であるMAB266.19.1.10.5.2は、ヒトIL-22発現BHK細胞（++）およびマウスIL-22発現BHK細胞（+）の双方に関して陽性の染色を示したが、野生型BHK細胞に関して染色を示さなかった（-）。一次抗体を交換するためにラットアイソタイプ陰性対照によって染色した陽性および陰性BHK細胞株は全て、染色を示さず（-）このことは、抗体がIL-22リガンドに対して特異的であることを示した。抗体は、ヒトおよびマウスIL-22の双方に対して交叉免疫反応性を有した。

10

【0465】

ヒト組織：

ヒトmulti-Normal GridおよびTumor Grid；脾臓、肺、および腎疾患試料；ならびにヒト乾癬皮膚試料を調べた。これらのヒト組織には、多組織対照スライドガラス（Normal/Grid（商標））/正常ヒト組織における1）脳、下垂体、副腎、乳腺、腎臓、心臓、胃、小腸、大腸、胎児肝臓、肝臓、皮膚、脾臓、肺、扁桃、卵巣、子宮、精巣、胎盤、甲状腺、および脾臓；2）多組織対照スライドガラス（TumorGrid（商標））/ヒト異常組織/腫瘍における肺腺癌、肝腺癌、腎腺癌、甲状腺腺癌、胃腺癌、前立腺腺癌、脾臓腺癌、卵巣腺癌、リンパ腫、黒色腫、ユーイング肉腫、類上皮細胞肉腫、MFH肉腫、横紋肉腫、カルチノイド、未分化癌、中皮腫、奇形腫、および精上皮腫；3）CHTNおよび/またはNDRIからの正常脾臓、慢性脾炎を有する脾臓、慢性血管周囲炎を有する肺、肺癌、多病巣性系球体硬化症を有する腎臓、膜性増殖性系球体腎炎を有する腎臓、硬化性系球体間質性線維症を有する腎臓が含まれた；4）。

20

【0466】

マウス組織：

INS IL-22 TGおよびWTマウス脾臓を調べた。INS IL-22 TG脾臓において島全体に散在する細胞は、Mab MAB 266.19.1.10.5.2によって強い陽性染色（+++）を示したが、WT脾臓は染色を示さなかった（-）。

30

【0467】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の比較：

抗IL-22ポリクローナル抗体（実施例16）は、感受性が高いことが示されたが、モノクローナル抗体MAB 266.19.1.10.5.2は特異的であった。ポリクローナル抗体は、ヒトIL-22発現BHK細胞（+++）、マウスIL-22発現BHK細胞（+）、様々なヒトおよびマウス組織試料（+）、ならびにINS mIL-22 TGマウスの島（+++）に対して陽性染色を示した。トランスジェニック動物（野生型と比較して）の島のより大きい割合が陽性染色を含んだ。トランスジェニック島における染色は一般的に、島（+++）全体に分布するが、野生型島における染色は一般的に、島の辺縁部に限定された（+）。しかし、この抗体はまた、WT BHK陰性対照細胞において非特異的染色を示した（+）。

40

【0468】

MAB 266.19.1.10.5.2は、ヒトIL-22発現BHK細胞（+++）、マウスIL-22発現BHK細胞（+）、およびINC mIL-22 TGマウスの島（+++）において陽性染色を示した。トランスジェニック島における染色は、島全体を通して一般的に分布したが（+++）、野生型島は陰性染色を示した（-）。

【0469】

実施例21

IL-20はヒト乾癬皮膚試料においてアップレギュレートされる

A. RNA試料

50

正常皮膚試料と共に乾癬患者からの皮膚を得た。後者には、乾癬に罹患した皮膚および隣接する非罹患皮膚が含まれた。通常の方法を用いてヒト皮膚試料からRNAを単離した。RNA試料の完全性および品質は、Agilent 2100バイオアナライザー (Agilent Technologies、ワルドブロン、ドイツ) において試験した。

【 0 4 7 0 】

B. 定量的RT-PCRのためのプライマーおよびプローブ

ABI PRISM 7700配列検出システム (PE Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いるリアルタイム定量的RT-PCRは既に記述されている (Heid, C.A.ら、Genome Research 6 : 986 ~ 994、1996 ; Gibson, U.E.M.ら、Genome Research 6 : 995 ~ 1001、1996 ; Sundaresan, S.ら、Endocrinology 139 : 4756 ~ 4764、1998を参照されたい)。この方法は、レポーターおよびクエンチャー蛍光色素の双方を含む遺伝子特異的プローブを用いることを取り入れている。プローブが無傷の場合、レポーター色素の放出は、クエンチャー色素が近位に存在することにより打ち消される。さらなる遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマーを用いるPCR伸長の際に、プローブは、rTth DNAポリメラーゼの5'から3'ヌクレオチド溶解活性によって切断され、これによってプローブからレポーター色素が放出されて、蛍光の放出が増加する。

10

【 0 4 7 1 】

IL-20発現のリアルタイム定量的RT-PCR分析のために用いられるプライマーおよびプローブは、プライマーデザインソフトウェアPrimer Express (商標) (PE Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いて設計した。フォワードプライマー、ZC40541 (配列番号 : 25) およびリバースプライマーZC40542 (配列番号 : 26) を濃度80 nMでPCR反応 (下記) において用いて、71 bpの産物を合成した。対応するIL-20 TaqMan (商標) プローブZC40544 (配列番号 : 27) は、PE Applied Biosystemsが合成および標識した。IL-20プローブは5'末端でレポーター蛍光色素 (6-カルボキシ-フルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) によっておよび3'末端でクエンチャー蛍光色素 (6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン) (TAMRA) (PE Applied Biosystems) によって標識した。

20

【 0 4 7 2 】

C. リアルタイム定量的RT-PCR

IL-20 mRNAの相対的レベルを、TaqMan EZ RT-PCRコア試薬キット (PE Applied Biosystems) を用いて総RNA試料を分析することによって決定した。ランオフIL-20転写物を作製して、定量のために用いる標準曲線を作製した。曲線は、1試料あたり3個ずつ分析したそれぞれの標準曲線の点を有するIL-20の全メッセージの約 $1e8 \sim 1e3$ の総コピーに及ぶ10倍連続希釈からなった。皮膚からの総RNA試料も同様にヒトIL-20転写物レベルに関しておよび内因性の対照としてhGUSのレベルに関して1試料あたり3個ずつ分析した。総容積25 μ lにおいて、各RNA試料に、以下を含むTaqMan EZ RT-PCR反応 (PE Applied Biosystems) を行った : DEPC処置水 (DNase/RNase不含) における総RNA約25 ng ; 適当なプライマー (約800 nM ZC40541 (配列番号 : 25) およびZC40542 (配列番号 : 26)) ; 適当なプローブ (約100 nM ZC40544 (配列番号 : 27)) ; 1 \times TaqMan EZ緩衝液 ; 3 mM酢酸マンガニン ; 300 μ M各d-CTP、d-ATP、およびd-GTP、および600 μ M d-UTP ; rTth DNAポリメラーゼ (0.1 U/ μ l) ; ならびにAmpErase UNG (0.01 U/ μ l)。PCRサーマルサイクリング条件は以下の通りであった : 最初のUNG処置段階、50 で2分を1サイクル ; その後逆転写 (RT) 段階、60 で30分を1サイクル ; その後UNGの脱活性化段階、95 で5分を1サイクル ; その後94 で20秒および60 で1分の増幅を40サイクル。

30

40

【 0 4 7 3 】

相対的IL-20 RNAレベルは、製造元であるPE Biosystems (ユーザー会報#2 : ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression、1997年12月11日) によって記述される標準曲線法を用いて決定した。hGUS測定値を用いて、IL-20レベルを標準化した。データを下記の表13に示す。

【 0 4 7 4 】

50

【表 1 3】

皮膚試料	IL-20
正常	2903
非関与	7233
関与	27,695

【 0 4 7 5 】

IL-20 mRNAは、正常な患者または非関与領域からの皮膚試料において検出不能であったが、乾癬患者からの関与皮膚においてIL-20メッセージのアップレギュレーションを認めた。IL-20RA、IL-22RA (IL-22RA)、およびIL-20RBを含むIL-20の受容体サブユニットは、ヒト正常および疾患皮膚において発現された。これらのデータは、ヒト乾癬に対するIL-20の強い疾患関連性を支持する。

【 0 4 7 6 】

IL-20の過剰発現は、ヒト乾癬病変において示され、IL-20がヒト乾癬に関与していることを示唆している。その上、本明細書に記述するように、トランスジェニックマウスにおけるIL-20の過剰発現は、乾癬表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示した。そのようなインビボデータは、IL-20が乾癬に関与していることをさらに示唆している。そのため、本発明の抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体と共に可溶性受容体およびそれに対する抗体、ならびに抗IL-20中和性モノクローナル抗体のようなIL-20活性に対するアンタゴニストは、乾癬のような炎症疾患の治療と共に、本明細書に開示の他の適応においてIL-20に対するアンタゴニストとして治療的に有用である。

【 0 4 7 7 】

実施例22

IL-20はヒトアトピー性皮膚炎皮膚試料においてアップレギュレートされる

C. RNA試料

正常な皮膚試料と共にアトピー性皮膚炎患者からの皮膚を得た。RNAは通常の方法を用いてヒト皮膚試料から単離した。RNA試料の完全性および品質は、Agilent 2100バイオアナライザー (Agilent Technologies、ワルドブロン、ドイツ) において試験した。

【 0 4 7 8 】

D. 定量的RT-PCRのためのプライマーおよびプローブ

ABI PRISM 7700配列検出システム (PE Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いるリアルタイム定量的RT-PCRは既に記述されている (Heid, C.A.ら、Genome Research 6 : 986 ~ 994、1996 ; Gibson, U.E.M.ら、Genome Research 6 : 995 ~ 1001、1996 ; Sundaresan, S.ら、Endocrinology 139 : 4756 ~ 4764、1998を参照されたい)。この方法は、レポーターおよびクエンチャー蛍光色素の双方を含む遺伝子特異的プローブを用いることを取り入れている。プローブが無傷の場合、レポーター色素の放出は、クエンチャー色素が近位に存在することにより打ち消される。さらなる遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマーを用いるPCR伸長の際に、プローブは、rTth DNAポリメラーゼの5'から3'ヌクレオチド溶解活性によって切断され、これによってプローブからレポーター色素が放出されて、蛍光の放出が増加する。

【 0 4 7 9 】

IL-20発現のリアルタイム定量的RT-PCR分析のために用いられるプローブおよびプライマーは、プライマーデザインソフトウェアPrimer Express (商標) (PE Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いて設計される。フォワードプライマー、ZC40541 (配列番号 : 25) およびリバースプライマーZC40542 (配列番号 : 26) を濃度800 nMでPCR反応 (下記) において用いて71 bpの産物を合成した。対応するIL-20 TaqMan (商標) プローブZC40544 (配列番号 : 27) は、PE Applied Biosystemsが合成および標識した。IL-20プローブは、5'末端でレポーター蛍光色素 (6-カルボキシ-フルオレセ

イン) (FAM) (PE Applied Biosystems) によっておよび3'末端でクエンチャー蛍光色素 (6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン) (TAMRA) (PE Applied Biosystems) によって標識した。

【0480】

C. リアルタイム定量的RT-PCR

IL-20 mRNAの相対的レベルを、TaqMan EZ RT-PCRコア試薬キット (PE Applied Biosystems) を用いて総RNA試料を分析することによって決定した。ランオフIL-22転写物を作製して、定量のために用いる標準曲線を作製した。曲線は、1試料あたり3個ずつ分析したそれぞれの標準曲線の点を有するIL-20の全メッセージの約 $1e8 \sim 1e3$ の総コピーに及ぶ10倍連続希釈からなった。皮膚からの総RNA試料も同様に、ヒトIL-20転写物レベルに関しておよび内因性の対照としてhGUSのレベルに関して1試料あたり3個ずつ分析した。総容積25 μ lにおいて、各RNA試料に、以下を含むTaqMan EZ RT-PCR反応 (PE Applied Biosystems) を行った: DEPC処置水 (DNase/RNase不含) における総RNA約25 ng; 適当なプライマー (約800 nM ZC40541 (配列番号: 25) およびZC40542 (配列番号: 26)); 適当なプローブ (約100 nM ZC40544 (配列番号: 27)); 1x TaqMan EZ緩衝液; 3 mM酢酸マンガニン; 300 μ M各d-CTP、d-ATP、およびd-GTP、および600 μ M d-UTP; rTth DNAポリメラーゼ (0.1 U/ μ l); ならびにAmpErase UNG (0.01 U/ μ l)。PCRサーマルサイクリング条件は以下の通りであった: 最初のUNG処置段階、50 で2分を1サイクル; その後逆転写 (RT) 段階、60 で30分を1サイクル; その後UNGの脱活性化段階、95 で5分を1サイクル; その後94 で20秒および60 で1分の増幅を40サイクル。

10

20

【0481】

相対的IL-20 RNAレベルは、製造元であるPE Biosystems (ユーザー会報#2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, 1997年12月11日) によって記述される標準曲線法を用いて決定した。hGUS測定値を用いて、IL-20レベルを標準化した。

【0482】

IL-20 mRNAは皮膚試料において低レベルで検出可能であった (約800コピー)。対照的に、アトピー性皮膚炎患者からの皮膚においてIL-20メッセージのアップレギュレーションを認めた (約8600コピー)。IL-20RA、IL-22RA、およびIL-20RBを含むIL-20に対する受容体サブユニットは、ヒトの正常および疾患を有する皮膚において発現されている。これらのデータは、ヒトアトピー性皮膚炎に対するIL-20の強い疾患関連性を支持している。IL-20の過剰発現は、ヒトアトピー性皮膚炎の皮膚において示されており、IL-20がヒトアトピー性皮膚炎に関与していることを示唆している。その上、本明細書に記述するように、トランスジェニックマウスにおけるIL-20の過剰発現は、アトピー性皮膚炎の表現型を示す表皮の肥厚および免疫細胞の関与を示した。そのようなインビボデータは、IL-20がアトピー性皮膚炎に関与していることをさらに示唆している。そのため、本発明の抗ヒトIL-22RAモノクローナル抗体と共に可溶性受容体およびそれに対する抗体、ならびに抗IL-20中和性モノクローナル抗体のような、IL-20活性に対するアンタゴニストは、アトピー性皮膚炎のような炎症疾患の治療と共に、本明細書に記述の他の適応においてIL-20に対するアンタゴニストとして治療的に有用である。

30

40

【0483】

実施例23

IL-20によるIL-8のアップレギュレーション

継代2代目の正常ヒト表皮新生児ケラチノサイト (NHEK) (Clonetics) を12ウェル組織培養プレートに播種してコンフルエンスまで増殖させた。KGM (ケラチノサイト増殖培地) をCloneticsから購入した。細胞がコンフルエンスに達すると、細胞を増殖因子を含まないKGB培地 = KBM (ケラチノサイト基本培地) によって洗浄した。細胞をKBMにおいて72時間血清を枯渇してから試験化合物を添加した。トロンピン1 I.U./mlおよびトリプシン25 nMを陽性対照として用いた。培地1 ml/ウェルを加えた。KBMのみを陰性対照として用いた。

50

【0484】

IL-20は、KBM培地において調製して、第一の実験において2.5 $\mu\text{g/ml}$ から618 ng/mlまで、第二の実験において2.5 $\mu\text{g/ml}$ から3 ng/mlまでの様々な濃度で加えた。

【0485】

細胞を37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂で48時間インキュベートした。上清を採取してIL-8およびGM-CSFレベルをアッセイする前に数日間 - 80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結した。ヒトIL-8イムノアッセイキット#D8050 (RandD Systems, Inc.) およびヒトGM-CSFイムノアッセイキット#HSGMO (RandD Systems, Inc.) を用いて、製造元の説明書に従ってサイトカイン産生を決定した。

【0486】

結果は、IL-8およびGM-CSFの発現がIL-20によって誘導されることを示した。

10

【0487】

実施例24

IL-20による炎症性サイトカインのアップレギュレーション

ヒトケラチノサイト細胞株HaCaTを、T-75組織培養フラスコにおいてコンフルエンス後37 $^{\circ}\text{C}$ で数日間増殖させた。この時点で正常増殖培地 (DMEM + 10% FBS) を除去して無血清培地に交換した。次に、細胞を37 $^{\circ}\text{C}$ で2日間インキュベートした。次に、DMEMを除去して処置あたり4本のフラスコを以下の条件のそれぞれの一つによって37 $^{\circ}\text{C}$ で処置した：5 ng/ml 組換え型ヒト (rh) IL-1、20 ng/ml rhIL-1、5 ng/ml rhIL-1 + 1 $\mu\text{g/ml}$ IL-20、1 $\mu\text{g/ml}$ IL-20、または10 ng/ml rhIL-10。

【0488】

20

サイトカイン処置後、培地を除去して、グアニジニウムチオシアネート溶液を用いて細胞を溶解した。塩化セシウム勾配において一晚遠心することによって、細胞溶解物から総RNAを単離した。翌日、RNA沈降物をTE/SDS溶液に浮遊させて、エタノール沈殿させた。次に、分光光度計を用いてRNAを定量した後、ClontechのAtlas (商標) cDNA発現アレイユーザーマニュアル (バージョンPT3140-1/PR9X390、1999年11月5日公表) のV.B.の章に従ってDNアーゼ処置を行った。RNA試料の品質は、分光光度計の測定値に基づく純度の計算によって、およびアガロースゲル上での可視化により確認した。RNA試料のゲノムの混入は、 β -アクチン遺伝子のPCR分析によって除外した。

【0489】

30

ポリA+濃縮、プローブ合成およびAtlas (商標) アレイとのハイブリダイゼーションに関してはClontechのプロトコールに従った (上記の他に99年6月22日に公表されたAtlas (商標) 純粋総RNA標識システムユーザーマニュアル、PT3231-1/PR96157を参照されたい)。簡単に説明すると、ストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ (Clontech、パロアルト、カリフォルニア州) および磁気粒子分離器を用いて、ポリA+ RNAを総RNA 50 mgから単離した。次に、ポリA+ RNAをRT-PCRによって ³²P-dATPによって標識した。Atlas (商標) ヒトサイトカイン/受容体アレイ (カタログ番号#7744-1) において268遺伝子に対して特異的なClontechのCDSプライマーを反応において用いた。標識したプローブを、カラムクロマトグラフィーを用いて単離して、シンチレーション液において計数した。

【0490】

40

Atlas (商標) アレイをClontech ExpressHybプラス100 mg/ml熱変性サケ精子DNAと、絶えず攪拌しながら68 $^{\circ}\text{C}$ で少なくとも30分間予めハイブリダイズした。次に、メンブレンを1.9 $\times 10^6$ CPM/ml (全体で1.14 $\times 10^7$ CPM) と絶えず攪拌しながら68 $^{\circ}\text{C}$ で一晚ハイブリダイズさせた。翌日、メンブレンを2 \times SSC、1% SDSにおいて68 $^{\circ}\text{C}$ で30分間を4回、プラス0.1 \times SSC、0.5% SDSにおいて68 $^{\circ}\text{C}$ で30分間を1回の後、最後に室温で2 \times SSCにおいて5分間洗浄した。アレイメンブレンをコダックプラスチック袋に入れて密封し、室温でホスホイメージャースクリーンに一晚露出した。翌日ホスホイメージャースクリーンをホスホイメージャーによって走査してClontechのAtlasImage (商標) 1.0ソフトウェアを用いて分析した。

【0491】

IL-20によってアップレギュレートされる遺伝子

1. 腫瘍壊死因子 (TNF) はIL-20によって1.9~2.4倍アップレギュレートされた。

50

2. 胎盤増殖因子1&2 (PLGF) はIL-20によって1.9~2.0倍アップレギュレートされた。
 3. 凝固因子II受容体は、IL-20によって2.0~2.5倍アップレギュレートされた。
 4. カルシトニン受容体は、IL-20によって2.2~2.3倍アップレギュレートされた。
 5. TNF誘導型ヒアルロネート結合タンパク質TSG-6は、IL-20によって2.1~2.2倍アップレギュレートされた。

6. 血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体-1前駆体、チロシン-タンパク質キナーゼ受容体 (FLT-1) (SFLT) は、IL-20によって2.1~2.7倍アップレギュレートされた。

7. MRP-8 (マクロファージにおけるカルシウム結合タンパク質、MIF関連) は、IL-20によって2.9~4.1倍アップレギュレートされた。

8. MRP-14 (マクロファージにおけるカルシウム結合タンパク質、MIF関連) は、IL-20によって3.0~3.8倍アップレギュレートされた。

9. リラキシンH2は、IL-20によって3.14倍アップレギュレートされた。

10. トランスフォーミング増殖因子 (TGF) 受容体III 300 kDaは、IL-20によって2.4~3.6倍アップレギュレートされた。

【0492】

IL-20 + IL-1処置によって相乗作用を示す遺伝子

1. 骨形態形成タンパク質2aは、IL-20処置単独によって1.8倍、IL-1処置単独によって2.5倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって8.2倍アップレギュレートされた。

2. MRP-8は、IL-20処置単独によって2.9倍、IL-1処置単独によって10.7倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって18.0倍アップレギュレートされた。

3. 赤血球分化タンパク質 (EDF) は、IL-20処置単独によって1.9倍、IL-1処置単独によって9.7倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって19.0倍アップレギュレートされた。

4. MRP-14 (マクロファージにおけるカルシウム結合タンパク質、MIF関連) は、IL-20処置単独によって3.0倍、IL-1処置単独によって12.2倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって20.3倍アップレギュレートされた。

5. ヘパリン結合EGF様増殖因子は、IL-20処置単独によって2.0倍、IL-1処置単独によって14倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって25.0倍アップレギュレートされた。

6. -トロノグロブリン様タンパク質は、IL-20処置単独によって1.5倍、IL-1処置単独によって15倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって27倍アップレギュレートされた。

7. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、IL-20処置単独によって1.7倍、IL-1処置単独によって25倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって48倍アップレギュレートされた。

8. 単球化学走性および活性化因子MCAFは、IL-20処置単独によって1.3倍、IL-1処置単独によって32倍、およびIL-20とIL-1の併用処置によって56倍アップレギュレートされた。

【0493】

実施例25

IL-20トランスジェニック表現型

ヒトおよびマウスIL-20はいずれも、多様なプロモーターを用いてトランスジェニックマウスにおいて過剰発現された。最初にタンパク質の循環中のレベルを得る試みで、ヒトIL-20の発現を指示する肝臓特異的マウスアルブミンプロモーターを用いた。その後の研究は、主に表皮および他の層状扁平上皮に対する発現を標的とするケラチン14 (K14) プロモーター；広い発現パターンを生じるマウスメタロチオネイン-1プロモーター；および類リンパ系列の細胞における発現を促進するEμLCKプロモーターを用いて行った。おそらくこれらのプロモーターは全て循環中IL-20レベルを増加させることから、類似の結果が四つ全ての場合において得られた。

【0494】

全ての場合において、IL-20トランスジーンを発現するトランスジェニック仔マウスは、非トランスジェニック同腹子より小さく、光る外観を伴う硬くしわのある皮膚を有し、生後最初の数日間の間に死亡した。仔の胃の中には乳汁があり、仔が哺乳できることを示

している。これらのマウスは、腫脹した四肢、尾、鼻孔、および口領域を有し、動作が困難であった。さらに、マウスは弱く、目に見える脂肪組織がなく、耳および足指の発達が遅れていた。肝臓における低い発現レベル（mRNA分子100個未満/細胞）は、新生児死亡率および皮膚の異常の双方にとって十分であった。目に見える表現型を有しないトランスジェニックマウスは、トランスジーンを発現していないか、または検出可能なレベルで発現していないか、またはモザイクであった。

【0495】

IL-20トランスジェニックマウスの皮膚の組織学分析は、非トランスジェニック同腹子と比較して肥厚した表皮、過角化症、および密な角質層を示した。漿膜細胞カ皮（カ皮）が時に認められた。トランスジェニックマウスの皮膚の電子顕微鏡（EM）分析から、ヒト乾癬皮膚およびマウス皮膚疾患モデルにおいて認められる知見と類似の、ミトコンドリア内リポイド封入体、斑状のケラトヒアリン顆粒、および比較的少数の張フィラメントが示された。さらに、トランスジェニックマウスの多くがアポトーシス胸腺リンパ球を示した。その他の異常は組織病理学分析において検出されなかった。これらの組織学およびEMの結果は、認められた肉眼的な皮膚の変化を支持し拡大する。

【0496】

実施例26

可溶性ヒトIL-22RA-muFcの発現のための発現ベクターの構築

マウス 2a重鎖Fc領域（mG2a）と融合させたIL-22RAの細胞外ドメインを含むヒトIL-22RA可溶性受容体-muFc融合体（IL-22RA-C(mG2a)）を調製した。IL-22RA-C(mG2a)を含む発現プラスミドを、二つの異なるDNA断片および発現ベクターpZMP40を用いて相同的組換えによって構築した。IL-22RA（配列番号：1）およびmG2a（配列番号：39）のポリヌクレオチド配列の断片を、以下のプライマーを用いるPCR増幅によって作製した：（a）IL-22RAプライマーZC45,593（配列番号：28）およびZC45,592（配列番号：29）、ならびに（b）mG2aプライマーZC45,591（配列番号：30）、およびZC45,594（配列番号：31）。

【0497】

第一の断片は、IL-22RA細胞外ドメインコード領域を含み、これはIL-22RAポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1）を鋳型として用いて作製した。第一の断片には、部分的pZMP40ベクター配列を有する5'オーバーラップ、IL-22RAセグメント、ならびにリンカー配列および部分的mG2a配列を含む3'オーバーラップが含まれた。PCR条件：94 で5分を1サイクル；94 で1分の後に55 で2分、72 で3分を35サイクル；72 で10分を1サイクル。

【0498】

第二の断片には、リンカー配列および部分的IL-22RA配列を有する5'オーバーラップ、mG2aセグメント、ならびに部分的pZMP40ベクター配列を含む3'オーバーラップが含まれた。マウス 2a重鎖Fc領域（mG2a）（配列番号：39）は、マウスIg 2a重鎖cDNAのクローンから作製した。mG2aは、ヒンジ、マウス免疫グロブリン 2a重鎖定常領域のC_H2およびC_H3ドメインを含む。PCR条件：94 で5分を1サイクル；94 で1分の後に55 で2分、72 で3分を35サイクル；72 で10分を1サイクル。

【0499】

PCR反応混合物を1%アガロースゲルにおいて泳動させて、インサートの大きさに対応するバンドをQIAquick（商標）ゲル抽出キット（Qiagen）を用いてゲル抽出した。

【0500】

BglIIIによって切断したプラスミドpZMP40を、PCRインサート断片の双方の三方向組換えに用いた。プラスミドpZMP40は、MPSVプロモーター、およびコード配列の挿入のための多数の制限部位；大腸菌複製開始点；SV40プロモーター、複製のエンハンサーおよび開始点、DHFR遺伝子、およびSV40ターミネーターを含む哺乳動物選択マーカー発現単位；ならびに出芽酵母（*S. cerevisiae*）における選択および複製にとって必要なURA3およびCEN-ARS配列、を有する発現カセットを含む哺乳動物発現ベクターである。プラスミドpZMP40は、ポリリンカーにいくつかの制限酵素部位を加えることによってpZMP21（アメリカンタイプカルチャーコレクション、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄

10

20

30

40

50

託され、PTA-5266と指定された)から構築した。

【0501】

コンピテント酵母(出芽酵母)細胞100 µlをインサートDNA 10 µlおよび切断したpZM P40ベクター100 ngと個々に混合して、混合物を0.2 cm電気穿孔キュベットに移した。酵母/DNA混合物に、0.75 kV(5 kV/cm)、オーム、および25 µFに設定した電源(BioRad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)を用いて電気パルスを与えた。1.2 Mソルビトール600 µlをキュベットに加えて、酵母を100 µlおよび300 µlの量で二つのURA-Dプレートに播種して、30 でインキュベートした。72時間後、一つのプレートからのUra+酵母形質転換体をH₂O 1 mlに浮遊させて、短時間遠心して酵母細胞を沈降させた。細胞沈降物を溶解緩衝液(2%トライトンX-100、1%SDS、100 mM NaCl、10 mMトリス、pH 8.0、1 mM EDTA)0.5 mlに浮遊させた。溶解混合物500 µlを、酸洗浄ガラスビーズ250 µlおよびフェノールクロロホルム300 µlを含むエッペンドルフチューブに加えて、ボルテックスミキサーによって3分間攪拌し、エッペンドルフ遠心機において最高速度で5分間遠心した。水相300 µlを新しいチューブに移して、エタノール(EtOH)600 µlおよび3 M酢酸ナトリウム30 µlによってDNAを沈殿させ、その後最高速度で30分間遠心した。チューブをデカントして、沈降物を70%エタノール1 mlによって洗浄した。チューブをデカントして、DNA沈降物をTE 30 µlに浮遊させた。

10

【0502】

エレクトロコンピテント大腸菌宿主細胞(DH12S)の形質転換は、酵母DNA調製物5 µlおよび細胞50 µlを用いて行った。細胞に2.0 kV、25 µF、および400 オームの電気パルスを与えた。電気穿孔後、SOC(2%Bacto(商標)トリプトン(Difco、デトロイト、ミシガン州)、0.5%酵母抽出物(Difco)、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM MgCl₂、10 mM M gSO₄、20 mMグルコース)1 mlを加えて細胞を50 µlおよび200 µlの量で二つのLB AMPプレート(LBブロス(Lennox)、1.8%Bacto(商標)アガー(Difco)、100 mg/Lアンピシリン)に播種した。

20

【0503】

構築物の三つのクローンのインサートに配列分析を行って、各構築物について、正しい配列を含む一つのクローンを選択した。より大規模なプラスミドDNAは、市販のキット(Q IAGENプラスミドメガキット、Qiagen、パレンシア、カリフォルニア州)を用いて製造元の説明書に従って単離した。

30

【0504】

実施例27

ヒト可溶性IL-22RA-muFcポリペプチドの発現および精製

三組のIL-22RA-C(mG2a)構築物200 µg(実施例22)をPvu I 200単位によって37 で3時間消化した後、IPAによって沈殿させて、1.5 ml微量遠心管において遠心した。上清をデカントして、沈降物を70%エタノール1 mlによって洗浄し、室温で5分間インキュベートした。チューブを微量遠心機において14,000 rpmで10分間遠心して、上清を沈降物から捨てた。次に沈降物を、滅菌環境でPF-CHO培地750 µlに浮遊させて、60 で30分間インキュベートした。5E6 APFDXB11細胞を三つのチューブのそれぞれにおいて遠心沈降させ、DNA-培地溶液を用いて浮遊させた。DNA/細胞混合物を0.4 cmギャップキュベットに入れて、以下のパラメータを用いて電気穿孔した: 950 µF、高い静電容量、および300 V。キュベットの内容物を採取してプールし、PF-CHO培地によって25 mlに希釈して、125 ml振とうフラスコに入れた。フラスコをシェーカーに載せて37 、6%CO₂のインキュベーターに入れて、120 RPMで振とうさせた。

40

【0505】

細胞株に栄養選択を行った後、100 nMメソトレキセート(MTX)の次に500 nM MTX、および最後に1 µM MTXに対する段階的増幅を行った。段階的増幅の後にCD8細胞ソーティングを行った。CD8細胞ソーティングは、安定な1 µM MTX増幅プールを得て、製造元の推奨する濃度のモノクローナルFITC抗CD8抗体(BD PharMingen、カタログ番号30324X)によってほぼ5E6細胞を染色することによって行った。染色した細胞を処理して、FACS Vantage(B

50

D) フローサイトメーターにおいてソーティングした。上部の5%の細胞を回収して増殖させた。ウェスタンブロットによって発現を確認し、細胞株の規模を拡大して、標準的な方法を用いてタンパク質精製を行った。

【0506】

実施例28

huIL-22RA-mG2aによって免疫したマウスからの血清によるhuIL-22RAの中和

A. IL-20および/またはIL-22の阻害に関して試験するための細胞に基づく中和アッセイ

IL-22RAおよびIL-22RB (pDIRS1) を同時トランスフェクトした因子依存的プレB細胞株BaF3 (BaF/IL-22RA/IL-20RB; 実施例38) を用いて、IL-22RA/IL-20RB受容体上でIL-20に拮抗することによって、抗IL-22RA抗体の中和能を評価した。同様に、IL-22RAおよびIL-10RB (CRF2-4) を同時トランスフェクトしたBaF3細胞 (BAF/IL-22RA/CRF2-4細胞; 実施例2) を用いて、IL-22RA/IL-10RB受容体上でIL-22に拮抗することによって抗IL-22RA抗体の中和能を評価した。そのそれぞれの受容体発現細胞株におけるIL-20またはIL-22の存在下での増殖、およびアンタゴニスト抗体の存在下でのそのような増殖の阻害を、実施例3に記述したようにAlamar blueアッセイを用いて評価した。これらの細胞に及ぼす増殖阻害はこのアッセイにおける中和活性を示している。

【0507】

B. 抗IL-22RA血清は細胞に基づく中和アッセイにおいてIL-20およびIL-22の双方を中和する

実施例28Aに記述したアッセイを用いて、huIL-22RA-muG2a (実施例30 (A) (1)) によって免疫したIL-22RAノックアウトマウスの血清を1%、0.5%、0.25%、0.13%、0.06%、0.03%、0.02%、および0%の連続希釈液として加えた。アッセイプレートを37℃、5% CO₂で4日間インキュベートして、Alamar Blue (Accumed、シカゴ、イリノイ州) を20 μl/ウェルで加えた。プレートを再度37℃、5% CO₂で16時間インキュベートした。Alamar Blueは、生存細胞数に基づいて蛍光測定読み取り値を生じ、このように、陰性対照と比較して細胞増殖の直接測定である。プレートをWallac Victor 2 1420マルチラベルカウンター (Wallac、ツルク、フィンランド) において波長530 (励起) および590 (放出) で読み取った。結果は、免疫動物7匹全てからの血清が、huIL-22RAを通してhuIL-22およびhuIL-20の双方のシグナル伝達を中和できることを示した。例えば、1%濃度では、動物5匹 (16517、16518、16519、16520、および16527) からの血清は、huIL-22によって誘導される増殖を完全に中和して、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。その上、1%濃度では、他の動物2匹 (16471および16701) からの血清は、huIL-22によって誘導される増殖を約90%阻害して、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。同様に、1%および0.5%濃度では、動物5匹 (16517、16518、16519、16520、および16527) からの血清は、huIL-20によって誘導される増殖を完全に中和して、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。その上、1%濃度では、動物16701からの血清は、huIL-20によって誘導される増殖を完全に中和して、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。1%濃度では、動物16471からの血清は、huIL-20によって誘導される増殖を約95%中和して、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。このように、動物7匹全てからの血清は、huIL-22RA受容体を通してIL-20またはIL-22のいずれかによって誘導される増殖を中和できることを示した。これらの結果は、IL-22RAに対する抗体が実際に、前炎症性リガンドIL-20およびIL-22の活性に低濃度で拮抗できることを示した。

【0508】

これらの結果は、例えば本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体によって、IL-20またはIL-22 (個々にまたは共に) に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和することによって、IL-22RA活性を有効に阻害することは、インビボでIL-20およびIL-22 (単独または共に) の作用を減少するために有利となり、IL-20による皮膚作用のみならずIL-22による皮膚作用において認められるような、例えば乾癬、IBD、大腸炎、または、IBD、関節炎、喘息、乾癬性関節炎、大腸炎、炎症性皮膚病態、およびアトピー

性皮膚炎を含むIL-20および/またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患において認められるような、IL-20および/またはIL-22による炎症を減少させる可能性があるというさらなる証拠を提供した。

【0509】

実施例29

P815/hIL-22RA細胞の作製とマウスの免疫

A. P815/hIL-22RA細胞の作製および抗hIL-22RA抗体を作製するためにマウスへの注射

WT P815細胞(ATCC番号TIB-64)に、hIL-22RA cDNA配列(例えば、配列番号:1)および選択可能なピューロマイシン抵抗性マーカーを含むプラスミドベクターを、Fugene試薬を用いて製造元(Roche、インジアナポリス、インジアナ州)のプロトコールに従ってトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクション後ピューロマイシン選択下で48時間培養した。ピューロマイシン抵抗性のトランスフェクタントを限界希釈によってクローニングして、ビオチン化ヒトIL-22(huIL-22-ビオチン)を用いるフローサイトメトリーによって、そのhIL-22RA細胞表面発現レベルに関してスクリーニングした。簡単に説明すると、細胞を5 μ g/ml huIL-22-ビオチンと共に氷中で30分間インキュベートした後、洗浄した。細胞に対するhuIL-22-ビオチンの結合を、1:500希釈のPE-標識ストレプトアビジンを用いて検出した。細胞を、CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson、サンノゼ、カリフォルニア州)を用いてFACScanフローサイトメーターによって分析した。

【0510】

選択したP815/IL-22RA細胞クローンを増殖させて、注射のために回収した。細胞を回収してPBSにおいて3回洗浄して、計数し、 1×10^8 個/mlで浮遊させて、10,000 radの放射線を照射した。細胞浮遊液を1 mlシリンジに移して、腹腔内経路によってDBA/2マウスに注射した。マウスを同様に3週間後に追加免疫して、hIL-22RAトランスフェクタント細胞株に対する結合に関して血清をスクリーニングした。簡単に説明すると、血清をFacs緩衝液(HBSS、2%BSA、.02%NaN₃)において1:100倍希釈して、hIL-22RAを過剰発現するFcブロック293ヒト腎細胞と共にインキュベートした。細胞に対する抗IL-22RA抗体の結合を、1:200倍希釈したフルオレセイン結合ヤギ抗マウスIgG(Southern Biotech、バーミングハム、アラバマ州)を用いて検出した。細胞は既に記述されている通りに分析した。マウスを全体でさらに3回追加免疫して、既に記述されているように血清をスクリーニングした。マウス2匹を、モノクローナル抗体を産生するために当技術分野で標準的な方法を用いて、hIL-22RAトランスフェクタントに対するその血清の結合レベルに基づいて、ハイブリドーマ融合体に関して選択した(実施例25)。

【0511】

上記の方法はまた、例えば、IL-22RAおよびIL-22RA含有ヘテロ二量体受容体に対するモノクローナル抗体を作製するためにマウスを免疫するために、IL-22RA/CRF2-4(P815/IL-22RA/CRF2-4細胞)、IL-22RA/pDIRS1(P815/IL-22RA/pDIRS1細胞)、またはIL-22RA/CRF2-4/pDIRS1(P815/IL-22RA/CRF2-4/pDIRS1細胞)のような、ヘテロ二量体IL-22RA受容体を発現するP815細胞を作製するために用いた。

【0512】

実施例30

マウス抗ヒトIL-22RA(IL-22RA)mAbの作製

A. 抗IL-22RA抗体を作製するための免疫

(1) 可溶性IL-22RA-muFcを用いる

6~12週齢のIL-22RAノックアウトマウス(実施例26)を、Ribiアジュバント(Sigma)と1:1(v/v)混合した可溶性ヒトIL-22RA-muFcタンパク質(実施例23)25~50 μ gの週に2回の腹腔内注射によって免疫した。3回目の免疫後7~10日目に血液試料を眼窩後方から採取して、血清を回収し、IL-22またはIL-20およびIL-22のIL-22RAに対する結合の阻害能に関して中和アッセイ(例えば、本明細書に記述される)において評価して、FACS染色アッセイにおいてIL-22RAトランスフェクト対非トランスフェクト293細胞を染色した。マウスを免疫し続けて、血液試料を採取して、中和力価が平衡に達するまで上記のように評

価した。その時点で、最高の中和力価を有するマウスの血管内に可溶性IL-22RA-Fcタンパク質25～50 μgのPBS溶液を注射した。3日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取して、例えばマウス骨髓腫（P3-X63-Ag8.653.3.12.11）細胞または当技術分野における他の適当な細胞株を用いて、当技術分野で既知の標準的な方法（例えば、Kearney, J.F.ら、J. Immunol. 123: 1548～50、1979、およびLane R.D.、J. Immunol. Methods 81: 223～8、1995を参照されたい）を用いて、ハイブリドーマ作製のために用いた。

【0513】

（2）IL-22RA受容体を発現するP815トランスフェクタントを用いる

6～10週齢の雌性DBA/2マウスを、生存トランスフェクトP815細胞、例えばP815/IL-22RA細胞、P815/IL-22RA/CRF2-4、P815/IL-22RA/pDIRS1、またはP815/IL-22RA/CRF2-4/pDIRS1細胞（実施例24） 1×10^5 個（例えば、細胞密度 2×10^5 個/mlを0.5 ml）の腹腔内注射によって免疫する。注射の前に、細胞を指数増殖期に維持する。注射のために細胞を回収して、PBSによって3回洗浄した後、PBSにおいて 2×10^5 個/mlの密度に浮遊させた。このモデルにおいて、マウスは2～3週間以内に腹水腫瘍を発症して、トランスフェクトした標的抗原に対する免疫応答が開始されなければ、4～6週間までに死亡する。3週目に、明らかな腹部腫脹（腹水を示す）を認めないマウスを上記のように2～3週間の間隔で再度免疫する。2回目の免疫の7～10日後、血液試料を眼窩後方からの採血によって採取して血清を回収し、中和アッセイ（例えば、本明細書に記述の）においてIL-22またはIL-20およびIL-22の双方のIL-22RAに対する結合の阻害能に関して、およびFACS染色アッセイにおいてIL-22RAトランスフェクト対非トランスフェクト293細胞の染色能に関して評価した。マウスを免疫し続けて、血液試料を採取し、中和力価が平衡に達するまで上記のように評価した。その時点で、最高の中和力価を有するマウスの腹腔内に生存トランスフェクトP815細胞 1×10^5 個を注射した。4日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取して、例えばマウス骨髓腫（P3-X63-Ag8.653.3.12.11）細胞または当技術分野における他の適当な細胞株を用いて、当技術分野で既知の標準的な方法（例えば、Kearney, J.F.ら、上記、およびLane R.D.、上記を参照されたい）を用いて、ハイブリドーマ作製のために用いた。

【0514】

生存トランスフェクトP815細胞による上記の免疫スキームに対する代替の方法は、放射線照射したトランスフェクト細胞 $1 \sim 5 \times 10^6$ 個を2～3週間毎に腹腔内注射することを含む。このアプローチにおいて、動物は腹水を発症せず、腹水のために死亡しなかった。その代わりに、動物は、先に概要したように、2回目の免疫後の採血から開始してその血清中のIL-22RAに対する中和性免疫応答に関してモニターする。中和力価が最高レベルに達すると、最高力価を有するマウスに、融合前の放射線照射細胞 5×10^6 個の腹腔内注射を行い、4日後、これらのマウスから脾臓およびリンパ節を採取して、例えばマウス骨髓腫（P3-X63-Ag8.653.3.12.11）細胞または当技術分野における他の適当な細胞株を用いて、当技術分野で既知の標準的な方法（例えば、Kearney, J.F.ら、上記、およびLane R.D.、上記を参照されたい）を用いて、ハイブリドーマ作製のために用いた。

【0515】

B. IL-22RAに結合して、IL-22RAに対するIL-22の結合を阻害する抗体に関するハイブリドーマ融合体のスクリーニング

融合後8～10日目のハイブリドーマ上清に関して異なる二つの主なスクリーニングを用いた。第一のアッセイに関して、上清における抗体を、結合したマウス抗体を同定するために、HRP-結合ヤギ抗マウス および抗 軽鎖第二段階試薬を用いるELISAによって、プレートに結合したヒトIL-22RA-muFcタンパク質に対する結合能に関して試験した。IL-22RA-muFcタンパク質のIL-22RA部分に対する特異性を証明するために、最初のアッセイにおける陽性上清を同じマウスFc領域（mG2a）に融合させた無関係なタンパク質に関して評価した。IL-22RA-muFcに結合した上清における抗体は、IL-22RAに対して特異的であるように思われたが、無関係なmuFc含有融合タンパク質は特異的ではないように思われた。第二のアッセイに関して、全てのハイブリドーマ上清における抗体を、プレートに結合したIL-22RA-muFcに対するビオチン化ヒトIL-22の結合の阻害能に関してELISAによって評価した

。

【0516】

IL-22RAに特異的に結合する抗体を含む上清は全て、それらがIL-22RAに対するIL-22の結合を阻害するか、またはELISAアッセイにおいて阻害しないか否かによらず、IL-22RA/IL-20RBおよびIL-22RA/CRF2-4トランスフェクトBaF3細胞に対するIL-20またはIL-22の結合の阻害能に関してそれぞれ試験した。IL-22阻害アッセイまたはIL-20およびIL-22双方の阻害アッセイのいずれかにおいて中和陽性であった上清を全て、その後、FACS分析によってIL-22RAトランスフェクト対非トランスフェクトBaF3細胞の染色能に関して評価した。この分析は、IL-22RA/CRF2-4に対するIL-22の結合、またはIL-22RA/IL-20RBに対するIL-20の結合の阻害が、実際に、IL-22RA受容体に特異的に結合する抗体によるものであることを確認するためにデザインした。さらに、FACS分析は、抗IgG第二段階試薬によって行ったことから、特異的FACS陽性結果は、中和抗体がIgGクラスの抗体である可能性を示している。これらの手段によって、プレート結合ELISAにおいてIL-22RAに結合する、ELISAに基づく阻害アッセイにおいてIL-22RAに対するIL-22の結合を阻害する、IL-20およびIL-22とIL-22RA/IL-20RBおよびIL-22RA/CRF2-4トランスフェクトBaF3細胞（実施例28）のそれぞれの相互作用を遮断する、ならびに抗マウスIgG第二段階試薬によるIL-22RA/IL-20RBおよびIL-22RA/CRF2-4トランスフェクトBaF3細胞の双方の染色に関して強く陽性であるマスターウェルをそれぞれ同定した。

10

【0517】

D. 抗IL-22RA特異的抗体産生ハイブリドーマのクローニング

20

おおよそトランスフェクトしたBaF3細胞に対するIL-20およびIL-22の結合を交叉中和する抗IL-22RA mAbを産生するハイブリドーマを、標準的な低密度希釈（細胞1個未満/ウェル）アプローチによってクローニングした。播種した約5~7日後、クローンをプレート結合ヒトIL-22RA-muFc上でのELISAによってスクリーニングした後、上記のように陽性ウェルを無関係なmuFc含有融合タンパク質に関するELISAによって再度試験した。その上清がIL-22RA-muFcに結合するが、無関係なmuFc含有融合タンパク質には結合しない選択したクローンを、FACS分析と共に双方の中和アッセイを繰り返すことによって特異的抗体活性に関してさらに確認した。選択したIL-22RA抗体陽性クローンは全て、クローン性を保証するために役立つように、および抗体産生の安定性を評価するために少なくとも2回クローニングした。好ましくは得られたクローンの少なくとも95%が中和性の抗IL-22RA抗体産生に関して陽性となるまで、さらなるラウンドのクローニングを行って、記述のようにスクリーニングした。

30

【0518】

E. 抗IL-22RA mAbによって認識される分子の生化学的特徴付け

推定の抗IL-22RA mAbsによって認識される標的分子であるIL-22RAが実際にIL-22RAであることの生化学的確認を、いずれもIL-22RAトランスフェクト対非トランスフェクトBaF3細胞からの可溶性膜調製物を用いて、標準的な免疫沈降法の後にSDS-PAGE分析またはウェスタンブロッティング技法によって行う。その上、IL-22RAを発現する非トランスフェクト細胞株の可溶性膜調製物は、mAbsがトランスフェクト細胞株と共に天然の受容体鎖を認識することを示している。または、mAbsを、可溶性IL-22RA-muFcタンパク質を特異的に免疫沈降またはウェスタンブロットするか否かに関して試験する。

40

【0519】

実施例31

huL-22RAをトランスフェクトしたP815細胞を注射したマウスからの血清によるhuL-22RAの中和

実施例28に記述される細胞に基づく中和アッセイを用いて、生存huIL-22RAトランスフェクトP815細胞（実施例30.A.2）を注射したマウスからの血清を、1%、0.5%、0.25%、0.13%、0.06%、0.03%、0.02%、および0%の連続希釈液として加えた。アッセイプレートを37℃、5%CO₂で4日間インキュベートして、Alamar Blue（Accumed、シカゴ、イリノイ州）を20 μl/ウェルで加えた。プレートを再度37℃、5%CO₂で16時間インキュベ

50

トした。結果は、動物4匹からの血清が、huIL-22RAを通してhuIL-22およびhuIL-20の双方のシグナル伝達を中和できることを示した。

【0520】

1%濃度では、動物6匹(7125、7127、7128、7118、7124、および7117)からの血清は、huIL-22によって誘導される増殖を50%~80%中和し、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。その上、1%濃度では、動物4匹からの血清(7125、7127、7118、および7117)は、huIL-20によって誘導される増殖を40%~70%中和し、増殖の阻害は、濃度が低くなれば用量依存的に減少した。これらの結果は、IL-22RAに対する抗体が実際に、前炎症性リガンドであるIL-20およびIL-22の活性に低濃度で拮抗できることをさらに証明した。

10

【0521】

これらの結果は、例えば本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体によって、IL-20またはIL-22(個々にまたは共に)に結合、その活性を遮断、阻害、減少、拮抗、または中和することによって、IL-22RA活性を有効に阻害することが、インビボでIL-20およびIL-22(単独または共に)の作用を減少するために有利となり、IL-20による皮膚作用のみならずIL-22による皮膚作用において認められるような、例えば乾癬、IBD、大腸炎、または、IBD、関節炎、喘息、乾癬性関節炎、大腸炎、炎症性皮膚病態、およびアトピー性皮膚炎を含むIL-20および/またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患において認められるような、IL-20および/またはIL-22による炎症を減少させる可能性があるというさらなる証拠を提供した。

20

【0522】

実施例32

IL-22RAノックアウトマウスの表現型

A. 遺伝子改変を有するマウスの作製

1. マウスIL-20を発現する光沢のある新生児トランスジェニックマウスの作製

a) K14プロモーターからマウスIL-20を発現する構築物

インビボでIL-20の生物機能を調べるために、マウスIL-20がヒトK14プロモーターによって促進されるトランスジェニック構築物を作製した(同様に、実施例21を参照されたい)。コンセンサスコザック配列およびマウスIL-20コード領域を含むPCR断片を作製するようにオリゴヌクレオチドをデザインした。これらのオリゴヌクレオチドは、標準的なトランスジェニックベクターであるpRSK14へのクローニングを容易にするために5'末端でFseI部位、および3'末端でAscI部位を有するようにデザインした。

30

【0523】

マウスIL-20鋳型(配列番号:33)約200 ngおよびIL-20の完全長を増幅するためにデザインされたオリゴヌクレオチド(配列番号:34)によってPCR反応を行った。PCR反応条件は、当技術分野で既知の方法を用いて決定した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分離して、QiaQuick(商標)(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。単離された正確な大きさのDNA断片をFseIおよびAscI(Boehringer-Mannheim)によって消化して、エタノール沈殿し、FseIおよびAscIによって予め消化したpRSK14にライゲーションした。トランスジェニックマウスにおいてケラチノサイトおよび上皮において対象遺伝子が発現するようにデザインされたpRSK14プラスミドは、約3 kbのヒトケラチン特異的K14プロモーターが隣接する発現カセットを含む。

40

【0524】

ライゲーション反応物約1 μ lを、製造元の説明書に従ってDH10B ElectroMax(商標)コンピテント細胞(GIBCO BRL、ガイサースバーグ、メリーランド州)に電気穿孔して、100 μ g/mlアンピシリンを含むLBプレートに播種して一晚インキュベートした。コロニーを採取して100 μ g/mlアンピシリンを含むLB培地において増殖させた。採取したコロニーからMiniprep DNAを調製して、FseIおよびAscIを組み合わせた制限酵素消化によってマウスIL-20インサートに関してスクリーニングして、その後アガロースゲル電気泳動を行った。正しいcDNAインサートを有するTG構築物をシーケンシング分析によって確認した。

50

正しいpRSK14-マウスIL-20のMaxiprepを行った。

【0525】

b) K14 IL-20トランスジェニックマウスの作製と特徴付け

長さ約4 kbのNotI断片を、ケラチン特異的K14プロモーターの5'および3'隣接配列、マウスIL-20（配列番号：33；ポリペプチドを配列番号：34に示す）、Gormonイントロン、IL-20 cDNAおよびヒト成長ホルモンポリAシグナル配列を含むトランスジェニック（TG）ベクターから単離した。これを受精B6C3f1（Taconic、ジャーマンタウン、ニュージャージー州）マウス卵母細胞のマイクロインジェクションのために用いた。トランスジェニックマウスのマイクロインジェクションおよび産生は、Hogan, B.ら、「Manipulating the Mouse Embryo」、第二版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州、1994に記述されている。 10

【0526】

TaqMan（商標）RT-PCR反応を用いて、トランスジーン（ヒト成長ホルモンポリAシグナル部分）に対して特異的なPCRプライマーを用いて、TG RNAの発現を定量した。

【0527】

IL-20を発現するTG構築物は全て、出生前後の高い死亡率を示し、生まれたTG仔は、典型的に「光沢のある」表現型を示す。新生児マウスの光沢のある外観は、それらがあたかも乾燥しつつあるかのような皮膚のこわばりに関連するよう思われ、それによって適切な授乳が減少した。それらの運動は、一般的にこわばっていた。組織病理学的に、光沢のある仔マウスは、肥厚した表皮を有し、ケラチン層が密であった。これらの光沢のある創始動物は最初の5日以内に死亡し、生存しているおよび離乳した仔は、一般的にトランスジーンを発現していなかった（転写物分析により）か、またはそれらはキメラであった（子孫へのトランスジーン（ヒト成長ホルモンポリAシグナル部分）の伝播が低いことにより）。 20

【0528】

K14プロモーターによって促進されるマウスIL-20を発現する一つの系統が確立された。皮膚および胸腺における発現レベルは低かったが、新生児マウスは全て光沢のある表現型を持って生まれた。一般的に、この系統は20%TG子孫を有し、トランスジェニック仔マウスの50~60%が子宮内で死亡したことを示している（ヘミ接合交配では子孫の50%がTGとなるはずである）。 30

【0529】

2. IL-22RA発現が消失したマウスの作製：IL-22RAノックアウトマウス

a) マウスIL-22RAに関するノックアウト（KO）構築物の作製

インビボでIL-22RAの生物機能をさらに調べるため、IL-22RA発現を消失させるためにマウスノックアウト（KO）系統を作製した。第一に、マウスIL-22RA cDNAプローブを用いてマウス129/SvJゲノムBACライブラリをスクリーニングした。IL-22RAゲノム座を含むクローンを同定して特徴を調べた。マウスIL-22RAポリヌクレオチドを配列番号：41に示し、ポリペプチドを配列番号：42に示す。

【0530】

IL-22RAを除去したノックアウト構築物を作製するために、ETクローニング技術を用いて（Zhangら、1998「A new logic for DNA engineering using recombination in *E. coli*」、*Nat. Genet.* 20:123~8）ノックアウトベクターを作製した。簡単に説明すると、KOベクターは、IL-22RA遺伝子の1.8 kbの5'アーム（単腕）、IRES-LacZ/MC1neo選択可能マーカ、および10 Kb 3'アーム（長腕）を含む。KOベクターにおいて、IL-22RAゲノム配列のエキソン2、3、および4と共にイントロン2および3を、ES細胞における相同的組換えによって約4.4 Kbの欠失が作製されるように、IRES-LacZ/MC1neo選択マーカーに置換した。 40

【0531】

制限酵素PmeIによってKOベクターを直線にした後、129/SvJ ES細胞にこれを電気穿孔した。相同的組換え事象の選択と共に組換え型ESクローンの同定は、Robertson, E.J.ら、「Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach」、第二版、IRL 50

Press Limited.、オックスフォード、1987に記述される通りに実施した。

【0532】

b) IL-22RA発現が消失したマウスの作製および分析

IL-22RAゲノム座のエキソン2~4およびイントロン2~3の欠失が起こる陽性ESクローンを増殖させた。それらをC57Bl/6jマウスの胚盤胞に注入した。注入した胚盤胞を短期間増殖させた後、それらを偽妊娠仮親の雌性動物に導入してキメラを作製した。胚盤胞の注射、キメラの交配、およびその後の変異IL-22RAの生殖系列伝播は、Robertson, E.J.ら、「Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach」、第二版、IRL Press Limited.、オックスフォード、1987に記述される通りに実施した。

【0533】

KO変異体マウスをPCR遺伝子タイピング戦略によって同定した。三つのPCRプライマー、ZC22901（配列番号：35）、ZC45039（配列番号：36）、ZC38573（配列番号：37）を多重PCR反応において用いて野生型対立遺伝子および変異体対立遺伝子を検出した。野生型（WT）対立遺伝子は、長さが229 bpのDNA断片を生じ、変異体対立遺伝子は、長さが371 bpのDNA断片を生成する。

【0534】

ヘミ接合体マウスの交配は、ホモ接合体（HOM）、ヘテロ接合体（Het）、および野生型（WT）子孫の正常な比率とともに正常な性比を生じる。PhysioScreen（体重、組織重量、全血球計算（CBC）、臨床化学、肉眼的所見、および組織病理学）を通してマウスを調べると、HOM、Het、およびWT動物の間に明らかな差を認めなかった。

【0535】

B. IL-22RAはIL-22によるSAAにとって必要であった：IL-22によって誘導されるSAA発現を示すSAA ELISAは、IL-22RAノックアウトマウスにおいて存在しなかった

IL-22RAがIL-22を注射したマウスにおいてSAA誘導のために必要であるか否かを評価するために、IL-22RA KOマウスにIL-22 5 µgを注射して6時間後に採血した。

【0536】

マウスSAAイムノアッセイキット（BioSource International、カリフォルニア州）を用いて製造元の説明書に従って、1：1000倍希釈した血清試料におけるSAAレベルを決定するためのELISAを行った。WTマウス5匹中4匹がIL-22注射に反応して上昇したSAAレベルを示したが、HOM IL-22RA KOマウスでは5匹中4匹が基礎レベルのSAAを示した。調べたHet IL-22RA KOマウスはいずれもSAAレベルが上昇したが、上昇したWTマウスのSAAレベルより低かった。このことは、IL-22RAがIL-22によるSAAの誘導にとって必要であったことを示している。

【0537】

これらの結果は、例えばIL-22RA遺伝子ノックアウトによって、または同様に本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体によって、IL-22RA活性を有効に遮断すれば、例えば、乾癬、IBD、大腸炎、内毒素血症、またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患におけるIL-22による炎症を減少させるであろうという証拠を提供した。

【0538】

C. IL-22RAはIL-22による上皮肥厚にとって必要であった：皮下に埋め込まれた浸透圧ミニポンプによるIL-22の純粋なタンパク質の投与は、IL-22R KOマウスにおいて表皮の肥厚を引き起こさない

IL-22RAがIL-22による上皮肥厚にとって必要であるか否かを評価するために、IL-22をIL-22RA HOMおよびWT KOマウスに、浸透圧ミニポンプによって皮下投与した。ポンプはIL-22を流速18.4 µl/日で7日間輸送した。HOMマウス4匹およびWT IL-22RA KOマウス6匹にIL-22タンパク質を投与して、HOMマウス3匹およびWTマウス1匹にPBSを投与した。

【0539】

IL-22処置マウスからの血清試料を、BaF3増殖アッセイにおいてIL-22の有無を確認するために試験した。IL-22RAおよびCRF2-4をトランスフェクトしたBaF3細胞は、増殖するためにIL-22またはマウスIL-3のいずれかの存在を必要とする。これらの細胞を遠心して、1

10

20

30

40

50

0%熱不活化仔ウシ胎児血清、2 mM L-GlutaMax-1 (商標) (Gibco BRL)、1 mMピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL)、およびPSN抗生物質 (Gibco BRL) を添加したmIL-3を含まない完全な培地 (RPMI 培地 (JRH Bioscience Inc、レネキサ、カンザス州)) (以降、「無IL-3培地」と呼ぶ) において洗浄した。細胞を遠心して、mIL-3が確実に除去されるように3回洗浄した。細胞を血球計算盤において計数して、96ウェルフォーマットで5000個/ウェルで最終容積200 μ l/ウェルで無IL-3培地を用いて播種した。マウス血清はウェル中に1%、0.5%、0.25%、または0.125%として存在した。アッセイプレートを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で3日間インキュベートして、Alamar Blue (Accumed、シカゴ、イリノイ州) を20 μ l/ウェルで加えた。プレートを再度37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で24時間インキュベートした。Alamar Blueは、生存細胞数に基づいて蛍光測定値を生じ、このように、陰性対照と比較して細胞増殖の直接測定であった。プレートを再度37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で24時間インキュベートした。プレートをWallac Victor 2 1420マルチラベルカウンター (Wallac、ツルク、フィンランド) において波長530 (励起) および590 (放出) で読み取った。結果は、PBS注射動物はいずれもIL-22活性を示さなかったが、Het動物1匹中1匹、HOM動物4匹中2匹、およびWT動物6匹中3匹が検出可能なIL-22活性を示した。この血清によって誘導された増殖は、1 μ g/ml IL-22BPの存在下で遮断され、これがIL-22特異的であることを証明した。

10

20

30

40

50

【0540】

IL-22処置および無処置IL-22RA HOMおよびHetノックアウト (KO) およびWT対照マウスからの皮膚試料を10%緩衝ホルマリンに沈めて固定した。組織を整えて、パラフィンに抱埋し、通常通り処理して5 μ mの切片を作製して (Jung 2065 Supercutミクロトーム、Leica Microsystems、ウェツラー、ドイツ)、H&E染色した。染色した組織をACVP委員会認定獣医病理学者が光学顕微鏡下 (Nikon Eclipse E600、Nikon Inc.、メルビル、ニューヨーク州) で評価した。

【0541】

各皮膚試料を、皮下組織におけるポンプ埋め込み部位周囲の組織における炎症の重症度に関して0 (なし) ~ 4 (重度) まで、表皮の肥厚の程度に関して0 (なし) ~ 3 (散在性) まで評価し、および上皮層の数を表皮の最も厚い部分において計数した。PBSを投与したHOMマウスおよびWTマウスの間に差を認めなかった。これらの二群の結果をPBS群にプールした。平均値および標準偏差を各治療群について決定し、下記の表14に示した。

【0542】

【表14】

処置	PBS対照	HOM KO: IL-22	WT: IL-22
マウスの数	4	4	6
表皮の厚さ	3.5 \pm 1.0	3.2 \pm 0.5	5.9 \pm 2.3
アカントーシスの程度	0.5 \pm 1.0	0.2 \pm 0.5	1.9 \pm 1.3
炎症	1.5 \pm 1.0	1.2 \pm 1.0	2.0 \pm 1.0

【0543】

結果は、IL-22によって処置したWTマウスにおける表皮の厚さおよびアカントーシスの増加傾向を示し、IL-22に曝露した際にIL-22RA HOMマウスでは表皮肥厚およびアカントーシスはより少なかった。

【0544】

これらの結果は、例えばIL-22RA遺伝子ノックアウトによって、または同様に本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体によって、IL-22RA活性を有効に遮断することは、例えば、乾癬、IBD、大腸炎、またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患においてIL-22による皮膚作用を同様に減少させるであろうという証拠を提供する。

【0545】

D. IL-22RAは、新生児マウス皮膚のIL-20による光沢にとって必要である：IL-22RA KOマ

ウスとマウスIL-20を発現するトランスジェニックマウスとの交配によって光沢のないトランスジェニック仔が得られる

IL-22RAが新生児TGの仔マウスのIL-20による光沢にとって必要であるか否かを評価するために、K14 muIL-20トランスジーンをIL-22RA KO系統と交配させて、新生児マウスを光沢のある表現型に関して観察した。

【0546】

仔マウス69匹がメンデルの遺伝子型の比率で生まれた。Het KOバックグラウンドのTGは全て光沢があったが、非TGまたはHOM KOバックグラウンドのTGはいずれも光沢がなかった。

【0547】

10

IL-20RAおよびIL-20RBを発現するBaF3細胞を用いるAlamar Blue増殖アッセイを行って、マウス血清におけるIL-20の有無を評価した。これらの細胞は、IL-20またはマウスIL-3のいずれかに反応して増殖するであろう。技法は、先のCの章に記載した技法と同じであった。アッセイの結果から、TGマウスは全て、C57Bl/6NバックグラウンドのIL-20 TGと同じレベルで同等のIL-20活性を有することが示された。光沢のある新生児表現型が存在しなければ、光沢のある新生児表現型がIL-22RAの存在に依存したことを示している。増殖アッセイは、TGマウスが全て、C57Bl/6NバックグラウンドのIL-20 TGと同じレベルで、同等のIL-20活性を有することを示した。光沢のある新生児表現型が存在しなければ、光沢のある新生児表現型がIL-22RAの存在に依存したことを示している。

【0548】

20

出生後3日目に、IL-22RA KOバックグラウンドのK14 muIL-20 TGを含む同腹子からの仔を、人道的に安楽死させて、全身を10%緩衝ホルマリンに沈めて固定した。固定した組織を胸部および腹部の断面に整えて、パラフィン抱埋し、通常通り処理して、5 μmの切片を作製して(Jung 2065 Supercutミクロトーム、Leica Microsystems、ウェツラー、ドイツ)、H&E染色した。染色した組織をACVP委員会認定獣医病理学者が光学顕微鏡(Nikon Eclipse E600、Nikon Inc.、メルビル、ニューヨーク州)下で盲検的に評価した。組織の異常を記録して、背側前方胸部の表皮における表皮層の数を計数した。

【0549】

HOM IL-22RA KOバックグラウンドのIL-20 TG(IL-20 TG/IL-22RA KO HOM)3匹およびIL-22RA HOM KOバックグラウンドの非TG(非TG/IL-22RA KO HOM)マウス3匹からの組織を顕微鏡下で調べて、異常を含まないことを発見した。Het IL-22RA KOバックグラウンドのIL-20 TGマウス(IL-20 TG/IL-22RA KO Het)2匹からの組織も同様に調べた。表皮における上皮層の数は全ての動物において類似であった。しかし、二つのIL-20 TG/IL-22RA KO Hetマウスの表皮は、他の動物と比較して好酸球増加であり、顆粒層における顆粒の喪失を示した。マウスの皮膚または如何なる他の組織にも他の異常を認めなかった。

30

【0550】

これらの結果は、例えばIL-22RA遺伝子ノックアウトによる、または同様に本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体による有効なIL-22RA活性の遮断が、例えば、IL-22によって誘導される乾癬、IBD、大腸炎、もしくは他の炎症疾患、ならびに/またはIL-22によって誘導されるIBD、関節炎、喘息、乾癬性関節炎、大腸炎、炎症性皮膚状態、およびアトピー性皮膚炎における、IL-20による皮膚作用およびIL-22による皮膚作用を同様に減少させるであろうという証拠を提供する。

40

【0551】

実施例33

IL-22RAノックアウトマウスの組織形態計測画像分析

K14 IL-20mトランスジェニック(TG)マウスの系統を確立して、TG新生児は光沢のある表現型を示す。トランスジーンは、皮膚におけるケラチン産生細胞に対する発現を指示するK14プロモーターによって発現される。IL-22RAノックアウト(KO)マウスの系統も同様に確立し、非チャレンジマウスでは有意な変化を認めなかった。二つの系統を互いに交配して、以下の四つの異なる表現型を有する新生児マウスを採取した：(1)TG/-HOM：IL-2

50

2RAを発現しないバックグラウンドにおいてk14 IL-20 mトランスジーンを発現する；（2）TG/-Het：IL-22RA遺伝子1コピーからいくつかのIL-22RAを発現するバックグラウンドにおいてk14 IL-20 mトランスジーンを発現する；（3）WT/HOM：IL-22RAを発現しないバックグラウンドにおいてk14 IL-20 mトランスジーンを発現しない；および（4）WT/Het：IL-22RA遺伝子1コピーからいくつかのIL-22RAを発現するバックグラウンドにおいてk14 IL-20 mトランスジーンを発現しない。これらの様々な遺伝子型の新生児マウス34匹を3日目、生後約48時間で安楽死させた（表15）。

【0552】

【表15】

	TG/- HOM*	TG/- Het*	WT/HOM*	WT/Het*
	(群1)	(群2)	(群3)	(群4)
合計	n=10	n=10	n=9	n=5

TG = トランスジェニック；WT = 野生型；HOM = ホモ接合；Het = ヘテロ接合；およびn = 仔の数

【0553】

それぞれの仔マウスを、全身を三つの部分（頭蓋胸部、尾胸部、および腹部）に横に切断して、頭部を捨てた。厚さ4.0～5.0 mmの組織標本を10%中性緩衝ホルマリンにおいて固定し、パラフィンブロックに処理して、通常の組織学検査および組織形態計測画像分析のためにヘマトキシリン-エオジン（H&E）染色した。各組織試料における脊髄の背側領域からの表皮を、Olympus BH-2顕微鏡、ビデオカメラ（Dage-MTI、ミシガンシティ、インディアナ州）、およびBioQuant True Colorウィンドウズ98ソフトウェア（R&M Biometrics Inc.、ナッシュビル、テネシー州37209）を用いて、以下の設定で組織形態計測画像分析のために選択した；パラメータ：倍率10倍、Zオフセット0；アレイ：長さ（ μm ）；測定：マニュアルおよび相加的模式。各皮膚試料からの表皮、および角質層、または角化層の厚さ（ μm ）を、各測定間を約0.1 mmの間隔でそれぞれの10倍の顕微鏡視野において、個々に10回測定して、平均値、SD、およびSEMをエクセルの計算によって得た。切片を全て無作為化して盲検的に測定した。測定後、切片の盲検を外し、結果を治療群にマッチさせた。治療群毎の最終的な結果を以下のように分類した：1．頭側胸部、尾側胸部、および腹部における表皮の厚さの平均値（ μm ）および次に（a）頭側胸部における表皮の厚さの平均値；（b）尾側胸部の表皮の厚さの平均値；および（c）腹部における表皮の厚さの平均値としてさらに分類した。2．頭側胸部、尾側胸部、および腹部における角質層の厚さの平均値（ μm ）、および次に（a）頭側胸部における角質層の厚さの平均値；（b）尾側胸部の角質層の厚さの平均値；および（c）腹部における角質層の厚さの平均値としてさらに分類した。3．頭側胸部、尾側胸部、および腹部における表皮プラス角質層の厚さの平均値。得られたデータを、GraphPad InStatソフトウェア（GraphPad Software, Inc.、サンジエゴ、カリフォルニア州）を用いて分析した。片側の分散分析（ANOVA）を適用して、群1～群4の平均値の差の統計学的有意性を調べた。二つの群の平均値の統計学的差を決定するためにTukey-Kramer多重比較試験を用いた（* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ ）。 $P < 0.05$ の知見は有意であると見なされた。

【0554】

（1）組織形態計測結果

（a）頭側胸部、尾側胸部、および腹部における表皮の厚さの平均値（ μm ）

表皮の厚さは、IL-22RA遺伝子1コピーを欠損するIL-20トランスジェニック仔マウス（TG/-Het）では、IL-22RAを発現しないIL-20トランスジェニック仔マウス（TG/-HOM、 $P = 0.001^{***}$ ）および対照同腹子（WT/HOM、 $P = 0.001^{***}$ およびWT/Het、 $P = 0.001^{***}$ ）と比較して有意に増加した（表16）。TG/-Het仔は、おそらくケラチノサイトの過栄養により角化表皮の厚さの増加を示した。この増加は、三つ全ての非角化層（基底、有棘、および顆粒

）を巻き込むが、最もしばしば有棘細胞層に罹患する。TG/-HOM仔マウスの表皮の厚さは約25%増加し、棘はより顕著となった。TG/-Het仔マウスの表皮は対照よりわずかに厚かったが（WT/HOMおよびWT/Het）、統計学は群の間に有意差を示さなかった（ $P > 0.05$ ）。頭側胸部、尾側胸部、および腹部における表皮の厚さも同様に比較した。腹部の通常の薄い表皮は、尾側胸部より厚く、尾側胸部は頭側胸部より厚い（表16）。

【0555】

【表16】

	TG/- HOM	TG/- Het	WT/HOM	WT/Het
	(N=28)	(N=30)	(N=27)	(N=15)
平均	32.58±1.25	41.05±2.04	31.31±1.08	30.83±1.43

10

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【0556】

TG/-Het仔マウスの頭側胸部における皮膚の扁平上皮は、表皮細胞（ケラチノサイト）の過栄養を伴う厚さの増加を示した；しかし、他の群、TG/-HOM、WT/HOMおよびWT/Het（ $P = 0.1565$ 、表17）と比較して統計学的有意性を認めなかった。これは、組織学的アーチファクト、例えば切片間の変動、表皮の天然の構造が原因であるように思われるか、または頭側胸部における薄い皮膚にはそれほど大きい作用を示さないためであった。注意：頭側胸部の組織学技法または組織切片は、統計学的有意性を得るために組織形態計測分析に不適である可能性がある。

20

【0557】

【表17】

	TG/- HOM	TG/- Het	WT/HOM	WT/Het
	(N=10)	(N=10)	(N=9)	(N=5)
平均	29.18±2.24	33.20±2.24	27.28±0.62	29.38±1.77

30

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【0558】

IL-22RA遺伝子（Het）1コピーを有するIL-20（TG/-）は、TG/-HOM（ $P < 0.05^*$ ）、WT/HOM（ $P < 0.001^{***}$ ）、およびWT/Het（ $P < 0.01^*$ ）と比較してそれぞれ、表皮の厚さの平均値の増加を示した（表18）。統計学は、群における差が極めて有意であることを示した（ $P < 0.0001^{****}$ ）。TG/-Het表皮は、WT/Hetより約29%増加した。IL-22RA（HOM）が存在しないIL-20（TG/-）仔マウスの表現型は、部分的に対照同腹子（WT/HOMおよびWT/Het）の表現型より厚い表皮に関連するIL-22RA遺伝子（Het）1コピーを欠損する仔マウスの表現型と類似したが、対照と比較して統計学的に差は示されなかった（ $P > 0.05$ ）。TG/-HOM表皮は、WT/HOM表皮より約14%増加した。IL-20TG/-仔マウスとは異なり、IL-22RA受容体欠損仔マウス（WT/HOMおよびWT/Het）は、比較的薄い表皮の厚さを示した。特に、尾側胸部における表皮の厚さの組織形態計測結果は、頭側胸部、尾側胸部、および腹部（表15）における表皮の厚さの平均値と相関して一貫した知見であり、尾側胸部の組織学的技法および組織切片が、組織形態計測画像分析にとって最善の品質を有することを示した。

40

【0559】

【表 18】

	TG/- HOM (N=10)	TG/- Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
平均	35.91±1.37	43.79±2.35	30.83±1.86	30.94±2.83

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【0560】

腹部における表皮の厚さの平均値の結果（図19）は、TG/-HOMが対照同腹子（WT/HOMおよびWT/Het、 $P > 0.05$ ）と比較して差を示さなかったことを除いて、尾側胸部（表18）の結果と類似であった。組織切片に何らかの変動があり、二つの切片が紛失し、すなわちTG/-HOM群における背側領域を含む表皮が存在しなかった。

【0561】

【表 19】

	TG/- HOM (N=8)	TG/- Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
平均	32.35±1.44	46.33±3.10	35.81±1.90	32.16±2.97

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【0562】

(b) 頭側胸部、尾側胸部、および腹部における角質層の厚さの平均値（ μm ）

IL-22RA（HOM）を発現しない、または遺伝子（Het）1コピーを発現するいずれかのバックグラウンドのIL-20トランスジェニック仔マウス（TG/-）では表皮の厚さが増加したにもかかわらず、TG/-HOMおよびTG/-Het皮膚では、対照同腹子（WT/HOMおよびWT/Het）と比較して角質層または角化層の厚さの顕著な減少を認め、統計学は群の差が極めて有意であることを示した（ $P < 0.0001^{****}$ 、表20）。TG/-Het仔マウスは、TG/-HOM（ $P < 0.01^{**}$ ）、WT/HOM（ $P < 0.001^{***}$ ）、およびWT/Het（ $P < 0.001^{***}$ ）と比較して、表皮表面上のセラチンの量のそれぞれ、約36%、50%、および49%減少を示した。TG/-HOM仔マウスは、その対照（WT/HOM、 $P < 0.05^*$ ）と比較して角質層の厚さの約22%の有意な減少を示したが、WT/Hetと比較すると17%の減少を示したに過ぎず、これは統計学的有意ではなかった（ $P > 0.05$ ）。対照群であるWT/HOMおよびWT/Hetにおける角質層の厚さはほぼ同じであった。明らかに、尾側胸部における角質層は腹部より厚く、腹部は頭側胸部の角質層より厚い。

【0563】

【表 20】

	TG/- HOM (N=8)	TG/- Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=5)
平均	33.26±2.69	21.41±1.27	42.54±2.01	40.31±3.82

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【0564】

頭側胸部における角質層の厚さの平均値（表21）は、頭側胸部、尾側胸部、および腹部における平均値と類似であった（表20）が、TG/-HOM（ $P < 0.05^*$ ）およびWT/HOM（ $P < 0.01^{**}$ ）と比較すると、TG/-Hetに限って角質層の有意な減少を認めた。平均値の標準偏差および標準誤差が高かったが、これは切片の不良、皮膚試料の紛失、表皮の天然の構造による可能性がある、または頭側胸部においてそれほど作用がないためであった。注意：頭側

胸部の組織学技法または組織切片は、品質の結果を得るための組織形態計測分析には不適である可能性がある。

【 0 5 6 5 】

【 表 2 1 】

	TG/- HOM (N=28)	TG/- Het (N=30)	WT/HOM (N=26)	WT/Het (N=14)
平均	34.96±3.53	18.14±3.99	40.47±4.38	32.96±8.11

10

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【 0 5 6 6 】

尾側胸部における角質層の厚さの平均値の結果（表22）は、頭側胸部、尾側胸部、および腹部における結果と三つの例外を除いて類似であった：（1）TG/-HOM対TG/-HetおよびTG/-HOM対WT/HOMは、統計学的有意差を示さなかった（ $P > 0.05$ ）；（2）TG/-HOM対WT/Hetは有意差を示した（ $P < 0.01^{**}$ ）；（3）WT/Hetにおける角質層は顕著に肥厚したが、これは組織処理のアーチファクトの結果である可能性があり、例えばケラチンは低張溶液に入れると、または水浴中に長い間放置すると腫脹または膨張する可能性がある。

【 0 5 6 7 】

【 表 2 2 】

	TG/- HOM (N=10)	TG/- Het (N=10)	WT/HOM (N=8)	WT/Het (N=4)
平均	35.64±3.4	24.22±1.54	44.35±3.51	53.77±7.21

20

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

【 0 5 6 8 】

TG/-HOM対WT/HOMおよびTG/-Het対WT/HOMのみが統計学的有意差、 $P < 0.05^{*}$ および $P < 0.01^{***}$ をそれぞれ示した（表23）。TG/-仔マウスは、その対照同腹子（WT/HOMおよびWT/Het）と比較して腹部の角質層の肥厚の減少を示した。

30

【 0 5 6 9 】

【 表 2 3 】

	TG/- HOM (N=8)	TG/- Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=4)
平均	28.84±4.36	21.86±1.30	42.45±3.15	33.25±3.96

結果は平均値 ± SEMを表す。N = 測定した切片数。

40

【 0 5 7 0 】

（c）頭側胸部、尾側胸部、および腹部における表皮プラス角質層の厚さの平均値（ μm ）

TG/-Het仔マウスは、対照同腹子（WT/HOMおよびWT/Het）と比較して表皮の厚さの有意な増加および角質層の厚さの有意な減少を示し、TG/-HOM仔マウスは、類似の結果を生じたがその作用は小さかった（表24）。

【 0 5 7 1 】

【表 2 4】

	TG/- HOM (N=10)	TG/- Het (N=10)	WT/HOM (N=9)	WT/Het (N=4)
角質層	32.58	41.05	31.31	30.83
表皮	33.26	21.41	42.54	40.31

結果は平均値を表す。N = 仔マウスの数。

【 0 5 7 2 】

(d) IL-20RAおよびIL-22RAの双方によるIL-20のシグナル伝達

表皮は、恒常性のために細胞増殖、分化、および細胞死のバランスに依存して絶えず再生する階層化上皮である。正常な表皮において、分裂活性の高い基底層は最終分化ケラチノサイトを生じ、これは外側に遊走して、最終的に除核された鱗屑として皮膚表面から脱落し、ケラチンまたは角化層は角質層に存在する。多くのタンパク質が表皮の恒常性を維持するために機能することが知られているが、これらの事象に関する分子の協調はあまり理解されていない。IL-20は新規受容体-相互作用タンパク質であり、これはケラチノサイトの増殖に関連する皮膚の層において発現されるIL-20RAまたはIL-22RA受容体 (IL-22RA) のいずれかを通してシグナルを伝達する。IL-20トランスジェニック新生児マウスは、異常な肥厚した光沢のある皮膚表現型を示す。マウスにおけるIL-22RAm (HOM) 欠損は、IL-22処置に対する反応を示さなかったが、IL-22RA遺伝子を有する野生型マウスをIL-22によって処置すると、表皮の厚さの有意な増加を示した ($P < 0.001^{***}$ 、IL-22RAm KO/IL-22組織形態計測画像分析の結果を参照されたい、PID 59.2)。IL-22RAが非存在しないことがK14 IL-20m TG新生児マウスにおいて認められた光沢のある表現型に影響を及ぼすか否かを調べるために、IL-20を異所発現するトランスジェニックマウスをIL-22RAホモ接合 (HOM) またはIL-22RAヘテロ接合 (Het) 欠損体と交配させた。表皮の厚さの定量的画像分析は、本試験からの尾側胸部においてより少ない仔マウスにおいて既に行われた (すなわち、仔マウス19匹、1切片/仔、全体で切片19個) が、調べた動物数が限られていたために、そして群間の変動のために統計学的有意差が得られなかった。本試験の目的は、IL-20の生物学を調べるために、および信頼できる定量的結果を得るために、同じ試験のそれぞれの仔マウスからの頭側胸部、尾側胸部、および腹部におけるより多くの皮膚試料を組織形態計測的に定量することであった (すなわち、仔マウス34匹、切片3個/仔、全体で切片102個)。有効な画像分析のために、本発明者らは、確実に、パラフィンブロックにおける皮膚の方向が一貫している、および皮膚試料が全ての個体および仔の群において同じそれぞれの位置から測定されるようにした。二種類の測定を行った: (1) ケラチノサイト増殖および分化の媒介におけるIL-20の役割を調べるために、表皮の厚さは、脊髄の背側のそれぞれにおける各皮膚試料において、顕微鏡の倍率10倍の視野において10回測定する; (2) 角化層または角質層の厚さはIL-20 TG新生児マウスにおける光沢のある皮膚外観と結果を相関させるために同じように測定した。

【 0 5 7 3 】

表皮の厚さに関する組織形態計測画像分析から、IL-22RA遺伝子1コピーからいくつかのIL-22RAを発現するバックグラウンドにおいてk14 IL-20mトランスジーンを発現するTG/-Het新生児マウスは、肥厚した表皮を示し、IL-22RAを発現しないバックグラウンドにおいてk14 IL-20mトランスジーンを発現するTG/-HOM新生児マウスは、有意な変化を示さなかった。表皮の厚さは、IL-22RA遺伝子 (TG/-HOM、 $P = 0.001^{***}$) の双方のコピーを欠損するIL-20トランスジェニック仔マウスおよび対照同腹子 (WT/HOM、 $P = 0.001^{***}$ および WT/Het、 $P = 0.001^{***}$) と比較して、IL-22RA遺伝子1コピーを欠損するIL-20トランスジェニック仔マウス (TG/-Het) では有意に増加した。TG/-Het仔マウスは、主に有棘層におけるケラチノサイトの過栄養のために、非ケラチン化表皮の厚さの増加を示した。TG-Het仔マウスの表皮は厚さが約25%増加したが、TG/-HOM仔マウスの表皮はごくわずかに厚みが増し

たに過ぎず、対照 (WT/HOMおよびWT/Het) より約4~5%の増加であり、統計学はTG/-HOMおよびその対照WT/HOMとの間に有意差を示さなかった ($P > 0.05$)。

【0574】

角質層の組織形態計測結果は、TG/-Het仔マウスにおける表皮の肥厚にもかかわらず、TG/-HOMおよびTG/-Het皮膚では、対照同腹子 (WT/HOMおよびWT/Het) と比較してケラチンまたは角化層の厚さの顕著な減少を認め、統計学は群の差が極めて有意であることを示した ($P < 0.0001^{****}$)。TG/-Het仔マウスは、TG/-HOM ($P < 0.01^{**}$)、WT/HOM ($P < 0.001^{***}$)、およびWT/Het ($P < 0.001^{***}$) と比較してそれぞれ、表皮の表面上のケラチン量の約36%50%、および49%の減少を示した。TG/-HOM仔マウスは、その対照 (WT/HOM、 $P < 0.05^{*}$) と比較して角質層の厚さの約22%の有意な減少を示し、WT/Hetと比較すると17%減少したに過ぎなかった ($P > 0.05$)。対照仔マウス、WT/HOMおよびWT/Hetにおける角質層の厚さはほぼ同じであった。TG/-HOMおよびTG/-Het新生児マウスにおける角質層の厚さの平均値の減少は、囊での肉眼的所見と相関するよう思われたが、肉眼的なレベルではIL-20 (TG) / IL-22RA (Het) 新生児マウスは、光彩と呼ばれる光沢の減少 (例えば、ケラチンがより少ない) を示すよう思われ、IL-20 (TG) / IL-22RA (HOM) 新生仔は光沢を有しない (例えば、より多くのケラチン)。組織学的に、TG/-仔マウスの角質層におけるケラチンは、WT仔マウスの場合より密度が高いよう思われた。それと共に、IL-20トランスジェニック新生児マウスにおける過栄養ケラチノサイトに関連した肥厚表皮および角質層の薄い層は、それらが光沢のある皮膚表現型を示した理由を説明する可能性がある。

10

20

【0575】

ケラチノサイトの過栄養の増加およびケラチノサイトの最終分化の障害は、IL-22RA遺伝子1コピーの標的化ノックアウトを有するIL-20トランスジェニック新生児マウス (Het) において認めた。皮膚は、ケラチノサイトの過栄養を示し、ケラチンまたは角質層を欠損して完全に分化することができない。IL-22RA遺伝子 (HOM) 2コピーが破壊されたIL-20トランスジェニック新生児マウスは、TG/-Het皮膚に類似の表現型を示すが、その作用はより小さいまたは最小であった (図12~15)。IL-22RA (HOM) が存在しないことは、k14 IL-20m TG新生児マウスにおいて認められた光沢のある表現型に対して部分的な作用を有し、IL-22RA (Het) が存在しないことは、光沢のある表現型に対してわずかかまたは全く作用を示さないよう思われる。言い換えれば、IL-20RAまたはIL-22RA受容体 (IL-22RA) のいずれかにシグナルを伝達する新規受容体-相互作用タンパク質であるIL-20のシグナル伝達は、おそらくIL-22RA遺伝子1コピーの発現の欠損 (Het) によって妨害されるのではなく、IL-22RA遺伝子2コピーの発現の欠損 (HOM) によって部分的に妨害される。

30

【0576】

これらの結果は、例えばIL-22RA遺伝子ノックアウト、または同様に本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体を用いてIL-22RA活性を有効に遮断すれば、例えば乾癬、IBD、大腸炎、またはIL-20および/またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患において、IL-20による皮膚作用のみならずIL-22による皮膚作用を同様に減少するであろうという証拠を提供する。

【0577】

実施例34

IL22RAノックアウトマウスに及ぼすIL-22の影響

IL-22RA KO (HOM) 23匹および対照 (WT) 13匹を含むマウス36匹に、IL-22またはPBのいずれかを、チューブを備えたミニポンプまたはミニポンプのみを埋め込むことによって皮下投与によって処置した (表25)。

40

【0578】

【表 2 5】

	HOM/PBS (群1)	HOM/IL-22 (群2)	WT/PBS (群3)	WT/IL-22 (群4)
雄性	n=3	n=10	n=3	n=8
雌性	n=0	n=10	n=0	n=2
合計	n=3	n=20	n=3	n=10

【 0 5 7 9 】

各動物のポンプ埋め込み部位から長さが1.5～2.5 cmおよび厚さが4.0～5.0 mmの皮膚試料を、通常の組織学検査および組織形態計測画像分析のために得た。組織標本は全て、10 %中性緩衝ホルマリンにおいて固定して、パラフィンブロックに処理した。動物のそれぞれの皮膚試料からの表面全体を覆う、厚さ5 μm および隣接する切片との間隔10 μm の6分画の切片を、ヘマトキシリン-エオジン(H&E)によって染色した。皮膚試料の組織形態計測画像分析は、Olympus BH-2顕微鏡、ビデオカメラ(Dage-MTI、ミシガンシティ、インジアナ州)、およびBioQuant True Colorウィンドウズ98ソフトウェア(R&M Biometrics Inc.、ナッシュビル、TN37209)を用いて以下の設定で行った；パラメータ：倍率10倍、Zオフセット0；アレイ：長さ(μm)；測定：マニュアルおよび相加的模式。表皮の厚さ(μm)は、各皮膚切片の中心0.4 cmから獲得した全4視野から顕微鏡倍率10倍で5回測定した(例えば、顕微鏡10倍で1=0.1 cm、顕微鏡10倍で4=0.4 cm)。各動物に関して全体で切片6個を測定して、平均値、SD、およびSEMをエクセル計算によって得た。切片は全て無作為化して盲検的に測定した。測定後、切片の盲検を解除して、結果を治療群にマッチさせた。治療群毎の最終的な結果を以下のように分類した：1. HOMおよびWT雄性および雌性マウスからの表皮の厚さ。2. HOMおよびWT雄性マウスからの表皮の厚さ。得られたデータを、GraphPad InStatソフトウェア(GraphPad Software, Inc.、サンジエゴ、カリフォルニア州92121)を用いて分析した。一元配置分散分析(ANOVA)を適用して、群1～群4の平均値の差の統計学的有意性を調べた。Tukey-Kramer多重比較検定および対応のないT検定を適用して、二つの群の平均値における有意性を分析した。P<0.05の知見は有意であると見なされた。

【 0 5 8 0 】

III. HOMおよびWT雄性および雌性マウスの表皮の厚さ(μm)の組織形態計測結果(1)

IL-22(WT/IL-22)を処置したWTマウス皮膚における表皮の厚さはWT/PBS対照と比較して有意に増加した(P=0.0001)。IL-22を処置したIL-22RA^m KOマウス皮膚(HOM/IL-22)は、HOM/PBS対照と比較して表皮の厚さの平均値の増加を示したが、二つの群の間に統計学的有意差を認めなかった(P>0.05)。IL-22RA KOマウスでは、WTマウスと比較して表皮の厚さの顕著な減少を認めた(例えば、HOM/IL-22対WT/IL-22；P<0.001)(表26)。

【 0 5 8 1 】

【表 2 6】

	HOM/PBS (N=3)	HOM/IL-22 (N=19)	WT/PBS (N=3)	WT/IL-22 (N=10)
平均	14.15±0.19	19.01±1.03	23.34±5.49	43.08±1.85

結果は平均値±SEMを表す。N=動物数。

【 0 5 8 2 】

(2) HOMおよびWT雄性マウスの表皮の厚さ(μm)

表皮の厚さは、WT/PBS雄性対照と比較してIL-22(WT/IL-22)処置したWT雄性マウス皮膚では約2倍増加した(P=0.0001)が、IL-22を処置したIL-22RA^m KO雄性マウスの表皮(

HOM/IL-22) は、HOM/PBS雄性対照と比較してごくわずかな増加を示したに過ぎなかった ($P > 0.05$)。特に、IL-22RAm KOマウスは、対照のWT雄性マウス (例えば、HOM/PBS対WT/PBS : $P < 0.05$; HOM/IL-22対WT/IL-22 : $P < 0.001$) (表27) と比較すると、表皮の厚さの顕著な減少を示した。

【0583】

【表27】

	HOM/PBS (N=3)	HOM/IL-22 (N=9)	WT/PBS (N=3)	WT/IL-22 (N=8)
平均	14.15±0.19	15.86±0.75	23.34±5.49	41.41±1.71

10

結果は平均値 ± SEMを表す。

【0584】

(3) HOMおよびWTマウスからの雄性対雌性マウスの表皮の厚さ (μm)

雌性マウスの表皮は雄性マウスより厚いことが判明した (例えば、HOM/IL-22雄性対HOM/IL-22雌性 : $P < 0.01$; WT/IL-22雄性対WT/IL-22雌性 : $P < 0.05$) (表28)。

【0585】

【表28】

	HOM/IL-22 (雄性, N=9)	HOM/IL-22 (雌性, N=10)	WT/IL-22 (雄性, N=8)	WT/IL-22 (雌性, N=2)
平均	15.86±0.75	21.85±1.3	41.41±1.71	49.75±4.82

20

結果は平均値 ± SEMを表す。

【0586】

(4) HOMマウス、IL-22ポンプ 対 チューブを有するIL-22ポンプからの表皮の厚さ (μm)

IL-22ポンプ & チューブを有するIL-22RAm KO (HOM) マウスの表皮は、ポンプのみを埋め込んだIL-22RAm KO (HOM) マウスより有意に厚いことが判明した ($P < 0.0001$ 、対応のないT検定による) (表29)。

30

【0587】

【表29】

	HOM w/IL-22 ポンプ (M=8 & F=2, N=10)	HOM w/IL-22 チューブを有するポンプ (M=2 & F=8, N=10)
平均	15.85±0.65	23.30±1.36

40

結果は平均値 ± SEMを表す。M : 雄性 ; F : 雌性 ; N : マウスの総数

【0588】

IV. 考察

併せて考慮すると、本研究の目的は、IL-22RAm KOおよびWTマウスの双方からのIL-22処置皮膚における表皮の作用の特徴を調べて、これらの知見を臨床での適応に関連させることである。定量的画像分析を行って、H&E染色皮膚切片における表皮の厚さを決定した。各動物からの皮膚試料を組織形態計測によって120回測定して (すなわち、各マウスからの6区画切片のそれぞれ20回測定 = 120測定)、表皮の厚さの平均値をエクセル計算によって得た。組織形態計測試験から、IL-22によってIL-22RA受容体の存在下で特にWTマウスにおいて表皮の厚さの有意な増加が起こり (ANOVAによって $P < 0.0001$ 、極めて有意であると

50

見なされる)、IL-22RA受容体の非存在下でIL-22RAm KO (HOM) マウスに対してほとんどまたは全く作用を示さなかった ($P > 0.05$) が示された。IL-22処置WTマウスにおける表皮の厚さはPBSを処置したマウスより約43%増加したのに対し(例えば、WT/PBS、 $P < 0.001$)、IL-22処置IL-22RAmKO (HOM) マウスは、対照と比較して表皮の厚さの26%増加を示したに過ぎなかった (HOM/PBS、 $P > 0.05$)。IL-22RAm KOマウスはWTマウスと比較してより薄い表皮を示した ($P < 0.001$)。全体として、マウス皮膚に及ぼすIL-22の生物作用は、この因子が表皮の成長および増殖の調節に関係する可能性があることを示唆している。

【0589】

実施例35

抗ヒトIL-20モノクローナル抗体(クローン#262.7.1.3.2.4)の薬物動態

試験モノクローナル抗体、抗ヒトIL-20 mAb(クローン#262.7.1.3.2.4)を濃度1.08 mg/ml (280 nmでのUV吸光度によって決定)で3×3 mlに分けて、使用するまで-80 で保存した。溶媒は1×PBS (50 mM NaPO₄、109 mM NaCl)、pH 7.3であった。mAbを使用前に室温で融解して少量1および2をそれぞれ100 μg IVおよびSC投与群のために用いた。少量3の半分を1×PBSによって1:2倍希釈して50 μg SC投与群とし、少量3のもう半分を1×PBSによって1:10倍希釈して10 μg SC投与群とした。雌性SCIDマウス(n=96)はCharles River Labsから得た。到着時に動物の健康状態をチェックして群毎に収容した(動物3匹/ケージ)。マウスは試験開始時12週齢であり、平均体重は22 gであった。

【0590】

A. 投与プロトコール

雌性SCIDマウス(n=24/用量群)を四つの投与群に無作為に割付した(表30を参照されたい)。群1には、抗huIL-20 mAb約93 μlを尾静脈からIV注射によって投与し、群2、3および4には、首筋にmAb約93 μlをSC注射によって投与した。

【0591】

B. 試料の採取

採血の前に、マウスをハロタンまたはイソフルオランによって十分に麻酔した。血液試料を168時間の時点(眼窩採血によって採取し、同じ動物を504時間では心穿刺によって採血した)を除く全ての時点で心穿刺によって採取した。血液を血清分離用試験管に採取して15分間凝固させた。その後試料を14,000 rpmで3分間遠心した。遠心後、125~150 μlの少量を、ラベルを付けたエッペンドルフチューブに分配して、分析するまで-80 で直ちに保存した(表30)。

【0592】

【表30】

群番号	用量(ROA)	動物	PK時点
1	100 μg (IV)	マウス3匹/時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および504時間
2	100 μg (SC)	マウス3匹/時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および504時間
3	50 μg (SC)	マウス3匹/時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および504時間
4	10 μg (SC)	マウス3匹/時点*	0.25, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336 および504時間

* 同じ動物を168および504時間の時点で用いた。

【0593】

C. ELISAによる血清中の抗-huIL-20 mAb濃度の定量

酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)を開発して、薬物動態研究において抗IL-20 mAb 267.7.1.3.2.4を投与した動物からのマウス血清試料を分析するために適合させた。このアッセイは、市販の二次抗体およびTMBを用いる比色検出を利用するようにデザイ

10

20

30

40

50

ンされた。標準曲線のために用いられる希釈液は、標準曲線の直線部分の定義を改善するように改変された。100 ng/ml ~ 0.231 ng/mlの範囲の2倍希釈の標準曲線によってマウス血清試料を定量することが可能であった。QC試料を、10% SCIDマウス血清において1:100、1:1000および1:10000倍希釈して、標準曲線から逆計算した。

【0594】

D. 薬物動態分析

血清濃度対時間データを、薬物動態分析のためにWinNonlinプロフェッショナル4.0ソフトウェア(Pharsight, Inc., キャリー、ノースカロライナ州)にダウンロードした。ノンコンパートメント分析を用いて、各時点での平均データに基づく薬物動態パラメータを決定した。

10

【0595】

E. 結果

100 µg IV、ならびに100、50、および10 µg SC投与後の血清中抗ヒトIL-20 mAb濃度の平均値を表31に示す。

【0596】

【表31】

時間 (hr)	100 µg IV 濃度 (µg/mL)	10 µg SC 濃度 (µg/mL)	50 µg SC 濃度 (µg/mL)	100 µg SC 濃度 (µg/mL)
0.25	196 (12)	LTR	0.101 (0.065)	0.481 (0.485)
1	154 (18)	0.356 (0.146)	1.61 (0.52)	3.48 (1.72)
4	118 (20)	2.42 (0.53)	10.4 (3.4)	19.7 (4.7)
8	112 (20)	3.41 (0.30)	18.9 (3.6)	40.2 (6.4)
24	103 (13)	4.95 (0.05)	26.3 (0.7)	50.1 (6.2)
72	101 (16)	4.27 (0.79)	21.0 (3.4)	43.4 (2.7)
168	45.6 (15.4)	2.92 (0.53)	19.6 (2.7)	37.6 (3.4)
336	36.4 (16.6)	3.60 (0.31)	23.5 (3.5)	34.4 (5.8)
504	28.8 (3.8)	2.74 (0.39)	20.5 (3.6)	25.7 (2.1)

20

30

LTR: 報告可能値未満

【0597】

IV投与後、mAb濃度対時間プロファイルは双指数的減少を示した。SC投与後、mAbは遅い吸収相を有し、吸収速度によって限定される排泄を示すように思われた。各時点でのデータの平均値に基づく血清中の薬物動態パラメータを、表32に示す。

【0598】

【表 3 2】

パラメータ	単位	100 μ g IV	10 μ g SC	50 μ g SC	100 μ g SC
C_0 (IV); C_{\max} (SC)	μ g/mL	212	4.95	26.3	50.1
T_{\max}	hr	N/A	24	24	24
$t_{1/2, \lambda z}$	hr	509	ND	ND	612
$AUC_{(0-t)}$	hr \cdot μ g/mL	27059	1730	10845	18110
$AUC_{(0-inf)}$	L	48269	ND	ND	41561
AUC (% 外挿)	%	43.9	ND	ND	56.4
V_{ss} (IV); V_z/F (SC)	mL	1.34	ND	ND	2.12
Cl (IV); Cl/F (SC)	mL/hr	0.002	ND	ND	0.002
F (生物学的利用率)	%	N/A	ND	ND	86.1

ND：濃度対時間プロファイルの最終消失相のデータがないために決定不能

【0599】

IV投与後、mAbは非常に低いクレアランス ($Cl = 0.002$ ml/時間) および長い消失半減期 ($t_{1/2, \lambda z} =$ 約21日) を示した。mAbは、マウスの血液量 (= 約1.7 ml) より少ない定常状態分布容積 ($V_{ss} = 1.3$ ml) を示し、mAbが実質的に血管区画から外れて分布しなかったことを示唆している。逆計算した最高濃度 (C_0) は、注射した用量およびマウスの血液量に基づいて予想されるより高かった。このことは、小さい V_{ss} と共にmAbが血液の血清分画に大部分が限定されている可能性があることを示唆している。

【0600】

SC投与後、 C_{\max} 値は用量と共に直線的に増加した。100 μ g SC用量では、mAbは、約25日の $t_{1/2, \lambda z}$ を有し、クレアランスおよび見かけの分布容積はIV投与後と類似であった。生物学的利用率は86%であった。より低い二つのSC用量では、試料を504時間まで保持しても、測定可能な最終消失相がないために、ほとんどの薬物動態パラメータを推定することができなかった。SC投与後のmAbの吸収は、試験期間を通して消失しながら定常状態に達するように思われる。

【0601】

実施例36

CD4⁺CD45RB^{hi} (CD25) 大腸炎および乾癬モデルにおけるIL-20およびIL22アンタゴニストA. 概要

CD4⁺CD45RB^{hi} またはCD4⁺CD25⁺-T細胞を同系SCIDマウスに移入すると、マウスに大腸炎が起こる。調節性T細胞 (CD4⁺CD25⁺またはCD4⁺CD45RB^{lo}) を同時移入すると、大腸炎を阻害する。CD4⁺CD25⁺-T細胞をマウスに移入した後、マウスにブドウ球菌のエンドトキシンB (SEB) をさらに注射すると、マウスは大腸炎を発症するのみならず、乾癬を発症する。IL-22RA、IL-20、IL-22、IL-20Rおよび/またはIL-22Rに対する抗体、または可溶性IL-22RA受容体を、細胞移入後0~21日目に投与して、大腸炎および乾癬の症状をモニターする。乾癬スコアまたは大腸炎 (組織学) が阻害されれば、IL-21がこれらの自己免疫疾患を阻害できることを示している。

【0602】

B. 試験デザイン

脾臓および鼠径リンパ節をB10.D2マウスから単離した。単細胞浮遊液を作製して計数する。Miltenyi ビードシステムを用いて、CD25⁺細胞を陽性選択によってソーティングする。細胞をCD25-PE (BD Pharmingen) の1:100倍希釈液によって染色し、15分間インキュベートする。過剰量の抗体を洗浄して、細胞を10 μ lの抗PEビーズ/細胞10⁶個と共に20分間インキュベートした。細胞をPBSによって洗浄し、LSカラムに通過させる (Miltenyi Biot

ech)。カラムを通過する細胞 (CD25-) をさらなる分析のために保持する。CD4濃縮カクテル (Stem Cell technologies) をこれらのCD25-細胞に加え (1:100倍)、15分間インキュベートする。細胞をPBSによって洗浄する。抗ビオチン四量体の1:10倍希釈液を細胞に15分間加えた後、磁気コロイド ($60 \mu\text{l}/10^6$ 個) を15分間加える (全て、Stem Cell technologies)。細胞を負の選択カラム (0.5", Stem Cell technologies) に通過させる。通過した細胞はCD4+CD25-である。純度はフローサイトメトリーを用いて分析する。未投薬のCB-17 SCIDマウスに細胞 0.4×10^6 個を全量 $200 \mu\text{l}$ で i.v. 注射する。マウスにSEB $10 \mu\text{g}$ を翌日 (d1) に i.p. 注射する。乾癬および大腸炎の症状を2~5週間追跡する。マウスを以下の基準で乾癬疾患に関して採点する。0 - 病変なし、1 - 頸部の軽度の病変、2 - 頸部および背部 (体躯) での重度の病変、3 - 頸部、背部、および腹部における非常に重度の病変。耳の肥厚も同様に疾患の重症度の測定として測定する。マウスの群に、PBS、対照抗体 $100 \mu\text{g}$ 、またはIL-22RA、IL-20、IL-22、IL-20R、またはIL-22R、または可溶性IL-22RAに対する抗体 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ を異なる投与レジメで1~30日間 i.p. 注射する (3回/週、または2回/週)。

10

【0603】

C. 結果および結論

抗体処置マウスにおいて乾癬および大腸炎の症状が阻害されたことは、IL-20および/またはIL-22を阻害すると、乾癬および大腸炎のこのモデルにおける自己免疫症状を阻害できることを示している。

20

【0604】

実施例37

SCID-hu移植乾癬モデルにおけるIL-20およびIL-22アンタゴニスト

SCIDマウスに移植したヒト乾癬皮膚は、その臨床的、光学顕微鏡、および免疫組織化学的乾癬特徴を数週間維持することができる。このモデルは病変組織を正常な表現型まで回復させることを意図する治療を評価するための系を提供する。ヒト皮膚の移植に成功した後、IL-22RA、IL-20、IL-22、IL-20R、および/またはIL-22Rに対する抗体、または可溶性IL-20もしくはIL-22受容体を数週間投与することができ、表皮の厚さを分析して乾癬に対するこれらのアンタゴニストの作用を評価することができる。

【0605】

B. 試験デザイン

30

表皮全体および数mmの真皮からなる6 mmの完全な厚みの穿孔生検を、健康な成人ボランティアおよび乾癬病変皮膚から得る。生検4~6個を各ドナーから得る。各ドナーからの穿孔生検1個をレシピエントSCIDマウスの背側表面に移植する (CB-17、Taconic)。動物を病原体を含まない環境において維持する。処置は、以下のように移植の成功後 (移植後2~3週間) 開始する: 陰性対照のために生検1個 (PBSまたはアイソタイプmAb)、陽性対照のために生検1個 (シクロスポリンA)、および抗ヒトIL-22RA、抗ヒトIL-20、抗ヒトIL-22 mAb、またはIL-20もしくはIL-22に対する可溶性受容体による処置のために生検2~3個 (腹腔内注射、M-W-Fスケジュールで週に3回を2~4週間)。

【0606】

C. 定量的分析

40

臨床観察および評価は実験を通して定期的に行い、記録されるであろう。乾癬病変の重症度を、鱗屑、硬化、および紅斑に関して盲検的に評価する。パラメータは3点尺度を用いて採点することができる: 0 = 皮膚の罹患が完全でないこと; 1 = わずかな罹患; 2 = 中等度の罹患; 3 = 重度の罹患。投与期間終了時、各動物を安楽死させて、組織学およびIHCのために組織を採取する。(1) 組織の一部を10%ホルマリンにおいて固定して、ヘマトキシリン-エオジンによって染色する。表皮領域を、NIH画像ソフトウェアを用いて単位長さあたりの表皮の厚さの変化の関数として測定する。各移植体からの多数の領域を定量して高いn値および表皮面積の平均値を提供する。(2) 上部真皮において高倍率 ($0.103 \times 0.135 \text{ mm}$) での炎症性単核球数; (3) 錯角化症の等級を0~3までの任意の尺度で採点し、0は錯角化症なし、1は、切片の3分の1未満における錯角化症、2は切片の3分の1を超える

50

が3分の2未満における錯角化症、および3は切片の3分の2を超える錯角化症である。(4)組織の残りをKi67(増殖しつつあるケラチノサイトのマーカー)に関して染色して、切片のKi67循環中ケラチノサイト数/長さmmを評価する。表皮の厚さによって測定した乾癬の重症度の減少は、IL-20およびIL-22機能の中和がこの乾癬モデルにおいて有効となりうることを示している。乾癬の重症度の減少を定量するために、本発明者らは、上部真皮における炎症細胞数、Ki67循環中ケラチノサイト数、および錯角化症の等級を測定する。対照マウスと比較して治療群に関する四つ全てのパラメータが有意に減少すれば、IL-20、IL-22アンタゴニストの治療的利用の可能性を示している。

【0607】

実施例38

Alamar Blue増殖アッセイを用いてBaF3/IL-22RA/IL-20RB細胞を用いるIL-20アンタゴニスト活性のスクリーニング

因子依存的プレB細胞株であるBaF3に、IL-22RAおよびIL-20RBを同時トランスフェクトして(実施例3を参照されたい)、様々な濃度のIL-20を処置した。増殖は、実施例3に記述したようにAlamar Blueアッセイを用いて評価した。IL-20はサイトカインに関して期待される濃度で用量依存的に増殖を刺激し、IL-20がサイトカインに関して期待される濃度でヘテロ二量体IL-22RA/IL-20RB受容体に結合して活性化することを示している。非トランスフェクトBaF3細胞を含む陰性対照は増殖しなかった。

【0608】

抗IL-22RA抗体がIL-20活性に拮抗できるか否かを決定するために、IL-20活性に対するアンタゴニストとして抗IL-22RA抗体を用いて上記のアッセイを行う。IL-20をそのようなアンタゴニストと併用する場合、IL-20に対する反応はバックグラウンドレベルまで減少する。IL-20の増殖作用を消失または減少させるアンタゴニストが存在することは、これがIL-20リガンドのアンタゴニストであることを示している。このアッセイを用いて、可溶性IL-22RA受容体を含むアンタゴニストポリペプチドのような、本明細書に記述のIL-20活性の他のアンタゴニストを試験することができる。

【0609】

実施例39

抗huIL-22RAモノクローナル抗体によるIL-20およびIL-22活性の中和

実施例28に記述される細胞に基づく中和アッセイを用いて、精製マウス抗huIL-22RAモノクローナル抗体(実施例30(D))を連続希釈液、例えば10 µg/ml、5 µg/ml、2.5 µg/ml、1.25 µg/ml、625 ng/ml、313 ng/ml、156 ng/ml、および78 ng/mlとして加えた。アッセイプレートを37 °C、5%CO₂で4日間インキュベートして、Alamar Blue (Accumed、シカゴ、イリノイ州)を20 µl/ウェルで加えた。プレートを再度37 °C、5%CO₂で16時間インキュベートした。結果は、精製抗huIL-22RAモノクローナル抗体が、huIL-22RAを通してhuIL-22およびhuIL-20の双方のシグナル伝達を中和できることを示した。10 µg/ml濃度では、抗体はhuIL-22またはhuIL-20によって誘導される増殖を完全に中和したが、増殖の障害は濃度が低くなれば用量依存的に減少した。アイソタイプマッチ陰性対照マウスmAbは上記の調べた濃度でいずれのサイトカインの増殖障害も示さなかった。これらの結果は、IL-22RAに対するモノクローナル抗体が、低濃度で前炎症性リガンドであるIL-20およびIL-22の活性に実際に拮抗できることをさらに証明している。

【0610】

これらの結果は、例えば本発明のIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体によってIL-22RA活性を有効に遮断することが、インビボでのIL-20およびIL-22(単独または併用)の作用を遮断、障害、減少、拮抗、または中和するために都合がよく、そしてIL-20による皮膚作用と共にIL-22による皮膚作用において認められるような、例えば、乾癬、IBD、大腸炎、またはIBD、関節炎、喘息、乾癬性関節炎、大腸炎、炎症性皮膚疾患、およびアトピー性皮膚炎を含む、IL-20および/またはIL-22によって誘導される他の炎症疾患において認められるような、IL-20および/またはIL-22による炎症をおそらく減少させるというさらなる証拠を提供した。

10

20

30

40

50

【0611】

実施例40

中和性抗IL-22RAモノクローナル抗体による妊娠IL-20およびIL-22トランスジェニックマウスの処置

インビボで中和抗体に関するラット抗マウスIL-22RAモノクローナル抗体(mAb)を調べるために、妊娠IL-20トランスジェニック(Tg)およびIL-22 Tgマウスに抗マウスIL-22RA mAbを腹腔内注射する。新生児マウスをこれらの系統のマウスの通常の特徴である「光沢のある」皮膚表現型の有無を評価する。

【0612】

特に、雄性IL-20 Tg(ケラチン-14を用いて産生される)またはIL-22 Tg(インスリンプロモーターを用いて)マウスを、発情期のC57BL/6N雌性動物と交配させて、交配した雌性動物を、翌日に膈栓の存在によって同定する。各妊娠雌性動物を異なるケージに入れて毎日モニターする。治療群には、妊娠雌性動物少なくとも各4匹が含まれ、Tgおよび非Tg仔の双方の統計学的に有意な分析が可能となる。これらのTgマウスに関するこれまでの経験に基づき、同腹子は通常、同腹子あたり仔約6~8匹の範囲であり、その中で2~3匹がTg+である。

10

【0613】

マウスを交配した7~9日後(胚日齢7~9; e7~9)、雌性マウスにラット抗マウスIL-22RA mAb(ラットIgG2aアイソタイプ)250~500 µgをPBS 200~250 µlの容量で腹腔内注射する。子宮に直接注射しないように、短い針を浅い注射角度で用いる。発達途中の胚に首尾よく近づくために、妊娠雌性動物に、週に3回このようにして2週間(出生まで)注射する。対照群(各妊娠雌性マウス4匹以上)には以下が含まれる:アイソタイプ対照ラットIgG2a mAb、抗ヒト/マウスIL-22 mAb(ラットIgG1アイソタイプ)、およびアイソタイプ対照ラットIgG1 mAb。マウスIL-20を中和するための対照として、妊娠雌性動物に、ヒトおよびマウスIL-20またはFc4対照タンパク質の双方に結合して中和することができる可溶性IL-20R-Fc4融合タンパク質のいずれかを注射する。

20

【0614】

生後1~2日まで、仔マウスを光沢のある皮膚表現型の出現に関して密にモニターする。2日目、仔マウスを安楽死させて、DNA単離のために尾の一部を採取して各仔マウスの遺伝子型(Tgまたは非Tg)を決定する。仔マウスが、これらのTgマウスの通常の特徴である肥厚した表皮細胞層を示すか否かを評価するために、皮膚試料を組織学分析のために採取する。体躯血液も同様に仔から採取して(および生後1日目の母親からの眼窩採血)、ELISAによって、各マウスの血清中の抗IL-22RA mAbレベルを定量する。これらのmAbsはインビボでIL-20および/またはIL-22の強力な阻害剤であることから、Tg仔マウスは正常な皮膚を有する(すなわち、表皮の肥厚または「光沢のある」外観を示さない)。

30

【0615】

実施例41

臓器培養乾癬モデルにおけるIL-20およびIL-22アンタゴニスト

ヒト乾癬斑の皮膚を臓器培養において維持して、異常な組織学特徴を有する病変皮膚を外因性の増殖因子の非存在下で維持する。IL-22RA、IL-20、IL-22、IL-20R、および/またはIL-22Rに対する抗体、または可溶性IL-20もしくはIL-22受容体を投与して、乾癬病変皮膚の組織学特徴を改善することができる。

40

【0616】

B. 試験デザイン

完全な表皮および数mmの真皮からなる完全な厚みの2 mm穿孔生検を、健康な成人ボランティアまたは乾癬病変皮膚から得る。生検直後、組織を、ケラチノサイト基本培地(KBM)(Clonetics Inc.、ウォーカービル、メリーランド州)からなる培養培地に沈める。培養培地にCaCl₂を添加して、最終的なCa²⁺濃度を1.4 mMにする(Varaniら、1993、1994)。次に、生検を、ヒトIL-20、IL-22、IL-22RAに対する抗体、またはIL-20もしくはIL-22の可溶性受容体によるさらなる処置を行う、または行わずに、Ca²⁺添加KBM 200 µlを

50

含む96ウェル培養皿のウェルにおいてインキュベートする。培養物を95%空気および5%CO₂の大気中で37℃で8日間インキュベートする。

【0617】

C. 定量的分析

インキュベーション期間の終了時、組織を10%緩衝ホルマリンにおいて固定し、ヘマトキシリン-エオジンによって染色後組織学的に調べた。抗体または可溶性受容体に曝露した乾癬組織の外観は、以下の知見を含む正常組織の外観に非常によく類似している：最初の無秩序な不規則的な基底上皮細胞は、極性を回復してより柱状の外観を示した；上皮網の隆起は退縮して、上皮細胞が真皮空間に侵入している領域はより少ない；および上部上皮層の全体的な変性はより少なかった。臓器培養モデルは、特定の化合物が抗過増殖物質としての可能性を有するか否かを決定するための迅速かつ感度のよい手段を提供する。異常な組織学特徴は、IL-20、IL-22アンタゴニストの存在下で改善される可能性があり、乾癬の治療におけるそのような物質の有効性を示唆している。

10

【0618】

実施例42

中和性mAb R2.1.5F4.1およびR2.1.15E.2.1に結合するmIL-22RA (zCytoR11m) 領域のマッピング

A. 中和性モノクローナル抗体が結合するマウスIL-22RA上のエピトープ

下記の実験は、マウスIL-22RA可溶性受容体タンパク質（配列番号：62）のアミノ酸配列における、受容体活性またはアンタゴニストもしくは中和性抗体結合にとって重要な領域または複数の領域を同定することを目的とした。Fcを除去するために予めトロンピンによって切断したマウスIL-22RA-Fcタンパク質を、臭化シアン（CNBr）と共にインキュベートすることによって、配列におけるメチオニン残基に対するC-末端で切断した。CNBrによって産生されたペプチドを分画して、分画をELISAによって検出される結合活性に関して、および中和特性を有するモノクローナル抗体、クローンR.2.1.5F4.1およびR2.1.15E2.1を用いるウェスタン分析による反応性に関して調べた。

20

【0619】

CNBrによって切断すると、非還元完全長mIL-22RAからおそらく以下のペプチドが産生された（表33）。非還元条件では、システインはジスルフィド結合して、それによってペプチド1における内部結合およびペプチド3と5との間の結合が起こる可能性がある。太字の残基はおそらく、実施例42Bに記述されるように、配列番号：2または配列番号：3におけるリガンド結合に関与するヒトIL-22RA残基に対応するリガンド結合に関与する。特に、配列番号：48は、配列番号：42のアミノ酸番号16（His）～83（Met）に対応する；配列番号：49は配列番号：42のアミノ酸番号84（Glu）～109（Met）に対応する；配列番号：50は配列番号：42のアミノ酸番号110（Thr）～137（Met）に対応する；配列番号：51は配列番号：42のアミノ酸番号138（Leu）～177（Met）に対応する；および配列番号：52は配列番号：42のアミノ酸番号163（His）～208（Pro）、または配列番号：62のアミノ酸番号163（His）～212（Arg）に対応する。

30

【0620】

【表 3 3】

ペプチド番号	から	まで	配列
CNBr Peptide 1	1	68	HTTVDTSGLLQHVKFQSSNFENILTWGGP ASTSDTVYSVEYKKYGERKWLAKAGCQRI TQKFCNLTM (配列番号: 48)
非還元: ペプチド 1 におけるシステインが結合する			
CNBr ペプチド 2	69	94	ETRNHTEFYAKVTAVSAGGPPVTKM (配列番号: 49)
CNBr ペプチド 3	95	122	TDRFSSLQHTTIKPPDVTCIPKVRSIQM (配列番号: 50)
非還元: ペプチド 3~5 が結合する			
CNBr ペプチド 4	123	162	LVHPTLTPVLSEDGHQLTLEEIFHDLFYRLE LHVNHTYQM (配列番号: 51)
CNBr ペプチド 5	163	212	HLEGKQREYEFLGLTPDTEFLGSITILTPILS KESAPYVCRVKTLPLVPR (配列番号: 52)

10

【 0 6 2 1】

20

1. CNBr 切断およびペプチド分画の単離

mIL 22RA 50 μ g を凍結乾燥して蟻酸 (70%) 180 μ l に溶解する。アセトニトリルに溶解した 5 M CNBr 1 μ l を加えた。試料を混合して、室温の暗所で 18 時間反応させた。反応混合物 150 μ l を、分析的 Zorbax SB300-C8 カラムを備えた逆相 HPLC によって分画した。25% アセトニトリル (0.085% TFA) および 75% 水 (0.1% TFA) から開始して 95% アセトニトリル (0.085% TFA) および 5% 水 (0.1% TFA) で終了する勾配を用いてピークを分離した。UV 分析は、三つの主要なピークと二つの小さいピークとを示し、これらを回収した。各分画を半分に分割した; 一つの部分に ELISA を行い、他の部分を凍結乾燥して、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) 150 μ l に溶解した。PBS 分画の UV 分析によって、分析カラムから回収した全てのピークが回収されたことを確認した。PBS 分画にウェスタン分析を行った。

30

【 0 6 2 2】

2. ELISA

CNBr によって切断された IL-22RA からのペプチド配列を含む HPLC 分画を、HPLC 緩衝液 (90% アセトニトリル、10% H_2O 、0.09% トリフルオロ酢酸) を用いてほぼ等濃度に希釈した。試料を 96 ウェルマイクロタイタープレートに各 4 ウェルずつ 100 μ l/ウェルで加えて換気フード内で室温で一晩乾燥させた。プレートを ELISA C 緩衝液 (PBS、0.05% ツイーン 20) によって洗浄した後、ELISA B 緩衝液 (PBS、0.1% BSA、0.05% ツイーン 20) によって 37 $^{\circ}$ C で 2 時間ブロックした。IL 22RA に対する二つのモノクローナル抗体 (クローン R2.1.5F4.1 および クローン R2.1.15E.2.1) を ELISA B において 2 μ g/ml に希釈した。各 mAb を各ペプチド配列試料に 100 μ l/ウェルで加えて、プレートを 37 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。プレートを洗浄して未結合抗体を除去し、二次抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ラット IgG (Jackson)) を ELISA B 緩衝液において 1 μ g/ml に希釈して、全てのウェルに 100 μ l/ウェルで加えた。プレートを 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。ウェルを ELISA C 緩衝液によって洗浄した後、TMB 1 成分 HRP マイクロウェル基質 (BioFxx) と共に 5 分間インキュベートした。TMB マイクロウェル (BioFxx) 用 450 nm 停止試薬を加えて反応を停止させて、Dynatech ELISA プレートリーダー (Molecular Devices) において 450 nm での吸光度を読み取った。

40

【 0 6 2 3】

結果は、mAb R2.1.5F4.1 が mIL-22RA CNBr 反応の HPLC 分画 #4 と反応したことを示し、これは同様にウェスタンブロッティング実験においてもバンドを生じた。

50

【 0 6 2 4 】

3. ウェスタン

CNBrによって切断したIL-22RAからのペプチド配列を含むHPLC分画を室温で一晩凍結乾燥して、PBSに溶解した。次に試料を非還元試料緩衝液（Invitrogen）と混合して、10分間沸騰させた。試料を全て室温で、1×MES-SDS泳動用緩衝液（Invitrogen）を用いて4～12%ビストリスゲル（Invitrogen）上にローディングしてSDS-PAGEによって電気泳動し、20%メタノール転写緩衝液においてニトロセルロース（0.2 μm；Bio-Rad）に転写した。フィルターを室温で一晩乾燥させた。フィルターを10%脱脂粉乳の緩衝液A（50 mMトリス、pH 7.4、5 mM EDTA、0.05% Igepal CA-630、150 mM NaCl、0.25%ゼラチン）溶液によって室温で30分間ブロックした。IL-22RAに対するモノクローナル抗体（mAb）（クローンR.2.1.5F4.1）を2.5%脱脂粉乳を含む緩衝液Aにおいて2 μg/mlに希釈した。プロットをこの一次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プロットを緩衝液Aにおいて3回洗浄して1：5000倍希釈の二次抗体（ヤギ抗ラットIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼ；Jackson Inc.）の2.5%脱脂粉乳を含む緩衝液A溶液と共に室温で1時間インキュベートした。プロットを洗浄して、化学発光基質（Lumi-Lightウェスタンプロッティング基質；Roche）によって展開して、発光イメージャー（Mannheim Boehringer Lumi-Imager）を用いて露出した。

10

【 0 6 2 5 】

30分間露出を用いると、非還元ゲルは分画#4および#5に関して非常に強いバンドを示し、分画#3に関してかすかなバンドを示した。分画#4はまた、ELISAにおいても試験陽性であった。

20

【 0 6 2 6 】

活性分画#4のN末端シーケンシング

分析的逆相カラムから採取したCNBr ペプチドの中で、分画#4はELISAにおいて活性を示し、同様にウェスタンプロッティング陽性であった。活性分画#4に存在するペプチドを同定するために、周知の方法を用いて試料にEdman分解を行った。三つのN末端を活性分画から同定し、これらはペプチド2（配列番号：49）、3（配列番号：50）および5（配列番号：52）と一致した。これらの結果は、抗体がペプチド2（配列番号：49）、3（配列番号：50）および5（配列番号：52）に結合したことを示した。

【 0 6 2 7 】

30

【表 3 4】

エドマン分解	N末端配列	ペプチドの同定
分画 #4 から得られた最初の配列 CNBrによって生成された mIL22RA 配列	HLEGK QREYE FLGLT PDTEF HLEGK QREYE FLGLT PDTEF LGSIT ILTPI LSKES APYVC RVKTL PLVPR (配列番号:53)	CNBr ペプチド 5 (配列番号:52)
分画 #4 から得られた第二の配列 CNBrによって生成されたmIL22RA 配列	ETRNH TEFYY AKVTA VSAGG ETRNH TEFYY AKVTA VSAGG PPVTK M (配列番号:54)	CNBr ペプチド 2 (配列番号:49)
分画 #4 から得られた第三の配列 CNBrによって生成されたmIL22RA 配列	TDRFS XLQHT XIXPX DXXXI TDRFS SLQHT TIKPP DVTCL PKVRS IQM (配列番号:55)	CNBr ペプチド 3 (配列番号:50)

10

20

【 0 6 2 8 】

考察

CNBr-切断mIL22RAペプチドの混合物から五つの分画を単離した。これらの中で分画#4のみがELISAにおいて活性であり、ウェスタン分析陽性であった。エドマン分解によって、CNBrペプチド2(配列番号:49)、3(配列番号:50)および5(配列番号:52)に一致する三つのN末端が同定された。これらの領域において、残基6個はおそらくリガンド結合に関係している。これらの残基は、配列番号:42のY93、R112、K210、およびE211であり、同様に配列番号:62の残基Y78、R97、K195、およびE196に対応する。配列番号:42の残基Y60およびF164も同様にリガンド結合に関与している。

30

【 0 6 2 9 】

B. 中和性モノクローナル抗体が結合するヒトIL-22RA上のエピトープ

下記の実験は、ヒトIL-22RAタンパク質(配列番号:2)のアミノ酸配列の細胞外ドメインにおける、受容体活性またはアンタゴニストもしくは中和性抗体結合にとって重要な領域または複数の領域を同定することを目的とした。ヒト可溶性受容体IL-22RAタンパク質(例えば、Fcを除去するためにトロンピンによって切断したIL-22RA-Fcのような、配列番号:3を含む)を、臭化シアン(CNBr)、または既定の断片にヒトタンパク質を切断する当技術分野で既知の他の試薬と共にインキュベートすることによって、配列におけるメチオニン残基に対してC-末端で切断する。CNBr生成ペプチドを分画して、得られた分画をELISAによって検出されるように結合活性に関して試験して、ELISAによって検出される結合活性に関して、および中和特性を有するモノクローナル抗体を用いるウェスタン分析による反応性に関して試験した。

40

【 0 6 3 0 】

システイン4個は、配列番号:2のCys71 - Cys79およびCys204 - Cys217の結合パターンからジスルフィド結合すると予想される。CNBrによって切断すると、以下のペプチドが非還元完全長ヒトIL-22RAからおそらく生成される:ペプチド6(配列番号:56)、ペプチド7(配列番号:57)、ペプチド8(配列番号:58)、ペプチド9(配列番号:59)、ペプチド10(配列番号:60)、およびペプチド11(配列番号:61)(表35)。システインはジスルフィド結合し、それによってペプチド7(配列番号:57)と10(配列番号:60)の間におそらく結合が起こる。特に、配列番号:56は、配列番号:3のアミノ酸番号1(Pro)~92

50

(Met) に対応する；配列番号：57は、配列番号：3のアミノ酸番号93 (Thr) ~ 120 (Met) に対応する；配列番号：58は、配列番号：3のアミノ酸番号121 (Ile) ~ 160 (Met) に対応する；配列番号：59は、配列番号：3のアミノ酸番号161 (His) ~ 185 (Met) に対応する；配列番号：60は、配列番号：3のアミノ酸番号186 (Ile) ~ 199 (Met) に対応する；および配列番号：61は配列番号：3のアミノ酸番号200 (Cys) ~ 211 (Thr) に対応する。

【0631】

【表35】

ペプチド番号	から	まで	配列
CNBr ペプチド6 配列番号	1	92	Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met (配列番号: 56)
CNBr ペプチド7	93	120	Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met (配列番号: 57)
CNBr ペプチド8	121	160	Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met (配列番号: 58)
CNBr ペプチド9	161	185	His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met (配列番号: 59)
CNBr ペプチド 10	186	199	Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met (配列番号: 60)
CNBr ペプチド 11	200	211	Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr (配列番号: 61)

【0632】

4. ペプチド分画のCNBr切断および単離、ウェスタンおよびELISA、ならびにN末端シーケンシング

ヒトIL-22RA約50 μgを凍結乾燥して、溶解、分画、回収して、抗IL-22RAモノクローナル抗体を含む分画、およびELISAおよびウェスタン分析によって示されるようにIL-22RAに結合する分画を同定するために、実施例42Aに記述されるようにウェスタン分析およびELISAを用いて分析する。次に、分析的逆相カラムから採取したCNBrペプチド分画を、ELISAにおいて活性に関して試験し、ウェスタンブロッティングによって陽性であると確認する。陽性分画に関して、ペプチドを周知の方法を用いてエドマン分解によって同定する。

【0633】

考察

マウスCNBrペプチド#5（配列番号：52）は、ヒトCNBrペプチド#9、および#10（配列番号：59および配列番号：60）に対応する；マウスCNBrペプチド#2（配列番号：49）はヒトCNBr #6（配列番号：56）に対応する；およびマウスCNBrペプチド#3（配列番号：50）はヒトCNBr #7（配列番号：57）に対応する。CNBr-切断ヒトIL-22RAペプチドの混合物から単離した分画の中で、可能性のある領域内の6個の残基がおそらくリガンド結合に参与している：リガンド受容体結合にとって重要である配列番号：2の残基（および配列番号：3の対応する残基）は、配列番号：2のTyr-60およびPhe-164、Tyr-93、Arg-112、Lys-210、およびGlu-211（ならびに配列番号：3の対応する残基）を含む。その上、直接リガンド-受容体結合にとって重要である配列番号：2の一次残基（および配列番号：3の対応する残基）は、配列番号：2（および配列番号：3の対応する残基）のTyr-60、およびPhe-164を含み、二次残基は配列番号：2のTyr-93、Arg-112、Lys-210、およびGlu-211（および配列番号：3の対応する残基）を含む。

10

【0634】

実施例43

IBD組織におけるIL-20およびIL-22の発現

炎症性腸疾患（IBD）の病因が知られていないにもかかわらず、いくつかの未知の抗原に対して遺伝的に感受性の宿主における調節不全の粘膜免疫反応は、疾患の2つの臨床表現型：潰瘍性大腸炎（UC）およびクローン病（CD）の中心的な特徴であることが明らかである。様々なサイトカインが腸内に粘膜炎症を媒介することが示されているので、前炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの不均衡がIBDの病因において重要な役割を果たすと推測される。IBD組織試料を、リアルタイムPCRによりIL-20およびIL-22のmRNA発現、および（IHCにより）それらの対応するタンパク質発現について分析した。

20

【0635】

リアルタイムPCR

10人の潰瘍性大腸炎（UC）患者、10人のクローン病（CD）患者および5人の正常対照に由来する結腸の生検試料を、当技術分野において記載されるように（例えばSeegert D et al., Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. Gut 2001; 48: 326-332）回収し、およびRNAをQiagen製のRNeasy Total RNA Isolationキットを使用して精製した。各全RNA試料中のIL-20、IL-22 およびIL-22RA mRNAの相対的なレベルを、内在性対照遺伝子GusのC_Tレベルに対する対象の遺伝子のPCR産物のサイクル閾値（C_T）を比較することにより決定した。最初に、Taqman EZ RT-PCR Core キット（PE Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州）からの試薬を使用して以下の試薬を含有する27 μL/試料マスター混合物を作製した：9.6 μL dH₂O、6.0 μL 5× Taqman（登録商標）EZ PCR Master Mix、3.6 μLの25mMの酢酸マンガンを、各0.9 μLの10mM dATP、dCTP、dGTPおよびdUTP、0.3 μLの1.0U/μL AmpErase UNG、1.2 μL 25× rTth DNA Polymerase。このマスター混合物に、最終的なプライマー濃度が800 μM、および最終的なプローブ濃度が100 μMになるように、1.2 μLの20mMのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、および0.3 μLの10mM Taqmanプローブを添加した。以下のプライマーが用いられた：

30

IL-20フォワードプライマー

(5'-CGCCAATTCCTTTCTTACCATC-3'; 配列番号:63)

40

リバースプライマー

(5'-CCCCACAATGGCATGTCA-3'; 配列番号:64)

プローブ

(5'-FAM-CCTCCGGCTCTGTCATGCCCCAC-3'TAMRA; 配列番号:65)

IL-22フォワードプライマー

(5'-TGGCCAGGCTCAGCAA-3'; 配列番号:66)

50

リバースプライマー

(5'-GCACATTCCTCTGGATATGCA-3'; 配列番号: 67)

およびプローブ

(5'-FAM-AGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATG-3'TAMRA; 配列番号: 68)

IL-22RAフォワードプライマー

(5'-CCCCTCGCCGTGCTC-3'; 配列番号: 69)

リバースプライマー

(5'-TTTAGCCTTGAACCTGCTGCTTGA-3'; 配列番号: 70)

およびプローブ

(5'-FAM-CAAAGTCCTGGCACACTGCTTCTCAGAAG-3'TAMRA; 配列番号: 71)

。ヒトGusフォワードプライマー

(5'-CTCATTTGGAATTTTGCCGATT-3'; 配列番号: 72)

リバースプライマー

(5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'; 配列番号: 73)

およびプローブ

(5'-VIC-TGAACAGTCACCGACGAGAGTGCTGG-3'TAMRA'; 配列番号: 74)

を、それぞれ300 μ M、300 μ Mおよび10 μ Mで用いた。RNAを30ng/ μ Lの濃度でウェル毎に3 μ Lの容量で384-ウェル光学プレート (PE Applied Biosystems) に適用した。次に、27 μ Lの上記のマスター混合物を各RNA試料に加えた。各ウェル中の総30 μ Lは、上下に12回ピペッティングすることにより十分に混合され、その後、各試料について10 μ Lが3つとなるように、2つの隣接するウェルに10 μ Lに等分した。プレートは、光学プレートシーラー (PE Applied Biosystems) を用いて覆われ、750gで2分間遠心処理され、以下の条件下でTaqman (登録商標) 7900HT Sequence Detection Thermocycler (PE Applied Biosystems) にかげられた: 50 で2分、60 で30分、95 で5分、次いで94 で20秒および60 で1分を40サイクル。結果は、ABI Prism SDS 2.0ソフトウェア (PE Applied Biosystems) を使用して分析された。相対的な発現データは、比較C_T法 (Comparative C_T Method) (ユーザー会報#2, PE Applied Biosystems) を使用した、GusおよびIL-21R C_T値の比較により作成した。結果は、Gusに対する増加倍率として表される。

【0636】

IL-20およびIL-22の発現レベルは、リアルタイム PCRにより、IBD (UCおよびCD) 患者の炎症を起こした結腸生検において劇的に増加する。IL-20の検出可能な基礎発現は (GUSハウスキーピング遺伝子に対して標準化された ~100相対単位) 健常なドナーの結腸中にあり、および炎症を起こしていない生検におけるIL-20レベルは、正常対照 (CD患者について ~200相対単位、およびUC患者について ~300相対単位) に類似している。同じ患者に由来する正常対照かまたは炎症を起こしていない生検のいずれかと比較される場合、UC (~2500相対単位) かCD患者 (~1300相対単位) のいずれかの炎症を起こした生検でIL-20 mRNAレベルは有意に上昇する。検出可能なIL-22の発現は正常対照試料中にはないが、UC患者 (~3相対単位) およびCD患者 (~8相対単位) に由来する炎症を起こしていない生検におけるIL-22レベルはわずかに上昇し、IL-22発現は同じIBD患者に由来する炎症を起こした生検中でより高い (UC患者について ~123相対単位、およびCD患者について ~20相対単位)。全体として、IL-20レベルはIL-22レベルより高い。IL-22RAは検査された全ての

10

20

30

40

50

組織中で発現しており、ならびに正常対照とIBD患者との間の、または同じドナー（～100,000～300,000相対単位）に由来する炎症を起こした生検と炎症を起こしていない生検との間で有意差はない。

【0637】

IHC

IL-20およびIL-22に対する抗体は、免疫組織化学を用いてIL-20およびIL-22の発現レベルを分析するために使用した。ヒトIL-20またはヒトIL-22を発現するBHK細胞を対照として用いた。1回のTSA増幅は、以下のプロトコール（指定された以外は全て室温で）を使用して実施した：pH9で20分間蒸気にあて、および20分間室温まで冷却して標的を回収し、30分間タンパク質をブロックし、一次Ab（1：1000～2000）を4で一晩、二次Abおよびその後SA-HRPをそれぞれ45分間、ビオチン化したチラミド(tyramide)を1：50～100で8分間、SA-HRP/SA-APを45分間反応させ、ならびにその後様々な時間で基質を添加する。

10

【0638】

一般に、様々な病的状態に由来する結腸試料中で発現する抗IL-20抗体に特異的なタンパク質がある。循環中の細胞のサブセット（おそらく好中球）、および粘膜領域上部に存在する細胞（おそらく免疫関連細胞）の多くが抗IL-20抗体に関して陽性であるように見える。このタンパク質が、循環または明らかに発現している細胞から周囲組織へ「拡散する」ように時々見えう。データは、IL-20発現のアップレギュレーションが、その「炎症を起こしていない」かまたは「正常な」対応物と比較してIBD関連の結腸中にありうることも示す。したがって、このことは、本明細書において記載される抗IL-20抗体が、IL-20関連の炎症に対する処置として効果的であることを示す。

20

【0639】

IL-22について、様々な病的状態に由来する結腸試料中に、抗IL-22抗体に特異的なタンパク質の非常に低レベルの発現が存在する。抗IL-20抗体の染色パターンに類似して、WBCのサブセットは時折抗IL-22抗体について陽性に染色された。抗IL-20抗体の細胞とは異なり、より深い粘膜および筋肉領域における柔らかい結合組織で2、3の単離された細胞（おそらく免疫細胞）は抗IL-22抗体で陽性に染色された。また、抗IL-20抗体と異なり、陽性抗IL-22抗体染色細胞と関連して認められる重要な「拡散」は全くない。おそらくリアルタイムPCR法と比較してIHCの感度がより低いため、「正常な」試料およびIBD試料との間にはっきり区別された発現パターンがない。しかしながら、弱い円柱上皮のシグナルは、「正常な」（または「炎症を起こしていない」）結腸ではなく、IBD（クローン病）結腸のサブセット中にのみ観察される（注意：「正常な」結腸の場合の数は少ない）。したがって、このことは、本明細書において記載される抗IL-22抗体がIL-22関連の炎症に対する処置として効果的であることを示す。

30

【0640】

さらに、IL-20およびIL-22が共通の受容体サブユニット（IL-22RA）を共有する場合、本データは、本明細書において記載される抗-IL-22RA抗体が、IL-20および/またはIL-22関連の炎症に対する処置として効果的であることも示す。

【0641】

実施例44

40

結腸腫瘍細胞株において活性なIL-20およびIL-22

上述のように、IL-20およびIL-22が、マウスDSS-誘導性大腸炎モデルの結腸組織において、およびヒトIBD（大腸炎およびCD）患者に由来する炎症を起こした（炎症を起こしていないわけではない）結腸生検においてアップレギュレートされることから、後述する実験はIL-20および/またはIL-22が結腸腫瘍細胞株中のそれらの各受容体を活性化できるか否かについて決定することを目的とする。さらに、それは、IL-20および/またはIL-22が他の前炎症性サイトカインを用いて何らかの相乗効果を有するかどうかについて決定することも目的とする。

【0642】

1日目に、完全な成長培地中の以下の細胞株を白い不透明な共演(costar)ルシフェラー

50

ゼプレートに10,000細胞/ウェルで蒔き、その後37 °Cおよび5%CO₂でインキュベートした：

1. HT-29 (ヒト上皮結腸直腸 (結腸) 腺癌細胞株、ATCC# HTB-38) ；
2. COLO 205 (ヒト上皮結腸直腸 (結腸) 腺癌細胞株、ATCC# CCL-222) ；および
3. IEC-6 (正常なネズミ上皮小腸細胞株、ATCC# CRL-1592) 。

3日目に、何も加えないRPMI培地 (JRH RPMI 1640培地、cat# 51502-78P) 中で、全ての細胞株を5000粒子/細胞でKZ136アデノウイルス (STAT/SRE/Luc.) に感染させ、一晚細胞をインキュベートした。4日目に、アッセイにかけ、0.5%BSAを用いて何も加えないRPMI中で全ての処理を施し、その後、細胞を処理しかつそれらを4時間インキュベートした。次に、細胞を溶解させて、ルシフェラーゼレポーター活性についてBerthold MicroLumat Plus LB96V2R (PerkinElmer Life Sciences、ボストン、マサチューセッツ州) 上でそれらを読み込む。

【0643】

結腸腫瘍細胞株において活性なIL-20およびIL-22

結腸腫瘍細胞株上のIL-20およびIL-22のインビトロ活性を分析するために、上記の細胞株を、STAT-ルシフェラーゼレポーターに感染させ、およびその後IL-20またはIL-22のいずれかを用いて処理した。用量依存性の反応が、IL-20およびIL-22についてヒト結腸細胞株Colo205およびHT29上で、ならびにIL-22について (しかし、IL-20ではない) ネズミ小腸細胞株IEC-6上で観察された。1:10に段階希釈したIL-22タンパク質 (100、10、1、0.1、0.01ug/ml) をColo205細胞に加える場合、用量依存性ルシフェラーゼ活性 (RLU) は以下のように観察された：65495、57133、41266、17232、7492；IL-20タンパク質 (1000、100、10、1 ug/ml) に関しては、ルシフェラーゼ反応は、以下であった：24372、24744、19631、11460。同様の反応は、IL-20およびIL-22についてHT-29細胞株で見られた。

【0644】

IL-1 との相乗効果で結腸細胞株を活性化できるIL-20およびIL-22

他の前炎症性サイトカインを用いて結腸細胞株上でのIL-20活性およびIL-22活性の相乗効果を試験するために、異なる用量のIL-20またはIL-22を、結腸細胞株 (Colo205) で、低い一定量のIL-10ファミリーの他のメンバーおよび他の前炎症性サイトカインと共に加え、かつそれらの受容体の活性化はSTAT-ルシフェラーゼレポーターによってモニタリングした。

【0645】

データは、STATシグナル伝達 (おそらく細胞内クロストークを介して) において、IL-20およびIL-22がIL-1 と相乗効果を示すが、IL-10ファミリーの他のメンバーとは相乗効果を示さないことを示した。例えば、IL-20 (5ng/ml)、IL-22 (0.1ng/ml)、IL-19 (8ng/ml)、IL-24 (10ng/ml)、およびIL-1 (2ng/ml) は最小のルシフェラーゼ反応 (~700~2000RLU) を引き起こすだけであるが、IL-20 (例えば500ng/ml、1585RLU) またはIL-22 (例えば10ng/ml、3600RLU) の異なる用量を用いて組み合わせる場合、IL-1 がIL-20 (13387RLU) またはIL-22 (32106RLU) の組み合わせとの劇的な相乗効果を示したことを除き、全ての他のサイトカイン (例えばIL-19、IL-24) は付加的な効果 (IL-20について~1400~1900RLU、IL-22について~3000~5000RLU) を呈するだけである。

【0646】

前述から、本発明の特定の態様を説明する目的で本明細書において記述してきたが、様々な改変を行ってもよく、それらも本発明の趣旨および範囲に含まれることは認識されるであろう。したがって、本発明は添付の請求の範囲によってのみ制限される。

【配列表】

2008532931000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年10月11日 (2007.10.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 4 5 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 4 5 5 】

上記のマウスIL-22RAに対する中和性モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; マナッサス、バージニア州)特許寄託機関に、ブダペスト条約に基づく原寄託として寄託し、以下のATCCアクセッション番号を与えられた: クローンR2.1.1G11.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6035]); クローンR2.1.5F4.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6024]); クローンR2.1.5H8.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6025]); クローンR2.1.12G7.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6036]); クローンR.2.1.13C8.1(ATCC特許寄託指定番号PTA-6037); クローンR2.1.15E2.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6038]); クローンR2.1.16C11.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6039]); クローンR2.1.18C8.1(ATCC特許寄託指定番号[PTA-6040]); およびクローンR2.1.21G8.2(ATCC特許寄託指定番号[PT-6111])。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/004311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K14/715		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/085476 A (ZYMOGENETICS, INC; XU, WENFENG; KINDSVOGEL, WAYNE; CHANDRASEKHER, YASM) 7 October 2004 (2004-10-07) the whole document	1-73
X	WO 02/12345 A (ZYMOGENETICS, INC) 14 February 2002 (2002-02-14) the whole document	1-73
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 August 2006		Date of mailing of the international search report 21/08/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kalsner, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/004311

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>XU WENFENG ET AL: "A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 98, no. 17, 14 August 2001 (2001-08-14), pages 9511-9516, XP002186667 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/004311

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26, 30, 34, 38-54, 61-73
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 26, 30, 34, 38-54, 61-73 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/004311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004085476 A	07-10-2004	AU 2004223836 A1	07-10-2004
		AU 2004223837 A1	07-10-2004
		BR PI0408683 A	28-03-2006
		BR PI0408705 A	07-03-2006
		CA 2519057 A1	07-10-2004
		CA 2519089 A1	07-10-2004
		EP 1606317 A2	21-12-2005
		EP 1606316 A2	21-12-2005
		MX PA05010134 A	16-11-2005
		MX PA05010136 A	16-11-2005
		WO 2004085475 A2	07-10-2004
WO 0212345 A	14-02-2002	AU 9052401 A	18-02-2002
		CA 2418950 A1	14-02-2002
		EP 1337636 A2	27-08-2003
		JP 2004505641 T	26-02-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 17/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 17/06	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
		C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

- 1 . ウィンドウズ
- 2 . W I N D O W S

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 GG02 GG03 GG04
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 BA57 CA40 DA75 DA76 EA20 FA71
 FA72