

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6096938号
(P6096938)

(45) 発行日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)

(24) 登録日 平成29年2月24日 (2017. 2. 24)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/24 (2006. 01)	C O 7 K 16/24 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 24 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-561515 (P2015-561515)	(73) 特許権者	594197872
(86) (22) 出願日	平成26年3月4日 (2014. 3. 4)		イーライ リリー アンド カンパニー
(65) 公表番号	特表2016-510744 (P2016-510744A)		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(43) 公表日	平成28年4月11日 (2016. 4. 11)		8 5 インディアナポリス リリー コー
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/020064		ポレイト センター (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02014/137962	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成26年9月12日 (2014. 9. 12)		弁理士 小林 浩
審査請求日	平成27年9月11日 (2015. 9. 11)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	61/774, 732		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成25年3月8日 (2013. 3. 8)	(74) 代理人	100147131
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 今里 崇之
早期審査対象出願		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1 L-2 3 を結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軽鎖および重鎖を含む、ヒト 1 L-2 3 の p 1 9 サブユニットへ結合する抗体であって、軽鎖が軽鎖可変領域 (L C V R) を含み、重鎖が重鎖可変領域 (H C V R) を含み、L C V R がアミノ酸配列 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、H C V R がアミノ酸配列 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、L C D R 1 が配列番号 4 であり、L C D R 2 が配列番号 5 であり、L C D R 3 が配列番号 6 であり、H C D R 1 が配列番号 1 であり、H C D R 2 が配列番号 2 であり、H C D R 3 が配列番号 3 である、抗体。

【請求項 2】

前記軽鎖が軽鎖可変領域 (L C V R) を含み、前記重鎖が重鎖可変領域 (H C V R) を含み、該 L C V R のアミノ酸配列が配列番号 8 であり、該 H C V R のアミノ酸配列が配列番号 7 である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

2 つの軽鎖可変領域 (L C V R) および 2 つの重鎖可変領域 (H C V R) を含み、各々の L C V R のアミノ酸配列が配列番号 8 であり、各々の H C V R のアミノ酸配列が配列番号 7 である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 1 0 であり、前記重鎖のアミノ酸配列が配列番号 9 である、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 5】

10

20

2つの軽鎖および2つの重鎖を含み、各々の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号10であり、各々の重鎖のアミノ酸配列が配列番号9である、請求項4に記載の抗体。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】

前記重鎖可変領域（H C V R）が配列番号11によってコードされ、前記軽鎖可変領域（L C V R）が配列番号12によってコードされる、請求項6に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項8】

前記重鎖が配列番号13によってコードされ、前記軽鎖が配列番号14によってコードされる、請求項6または7に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項9】

前記ポリヌクレオチドが発現制御配列へ作動可能に連結される、請求項6～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項10】

請求項9に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項11】

軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子および重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む組換え宿主細胞であって、その細胞が重鎖および軽鎖を含む抗体を発現でき、該重鎖がアミノ酸配列番号9を含み、該軽鎖がアミノ酸配列の配列番号10を含む、組換え宿主細胞。

【請求項12】

請求項6～8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドにより形質転換された組換え宿主細胞であって、その細胞が重鎖および軽鎖を含む抗体を発現でき、該重鎖のアミノ酸配列が配列番号9であり、該軽鎖のアミノ酸配列が配列番号10である、組換え宿主細胞。

【請求項13】

前記宿主細胞が、CHO細胞、NS0細胞、HEK293細胞およびCOS細胞からなる群から選択される哺乳動物宿主細胞である、請求項11または請求項12に記載の組換え宿主細胞。

【請求項14】

重鎖および軽鎖を含む、ヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する抗体を産生するプロセスであって、該重鎖はアミノ酸配列の配列番号9を含み、該軽鎖はアミノ酸配列の配列番号10を含み、

a) 前記抗体が発現されるような条件下で請求項11～13のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞を培養する工程と、

b) 前記宿主細胞から発現された抗体を回収する工程とを含む、プロセス。

【請求項15】

重鎖および軽鎖を含む、ヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する抗体を産生するプロセスであって、該重鎖のアミノ酸配列が配列番号9であり、該軽鎖のアミノ酸配列が配列番号10であり、

a) 配列番号9によって与えられるポリペプチド配列をコードする第1のポリヌクレオチド配列および配列番号10によって与えられたポリペプチド配列をコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞を、該ポリペプチド配列が発現されるような条件下で、培養する工程と、

b) 重鎖および軽鎖を含み、該重鎖のポリペプチド配列が配列番号9によって与えられ、該軽鎖のポリペプチド配列が配列番号10によって与えられる抗体を前記宿主細胞から回収する工程と

を含む、プロセス。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 14 または請求項 15 に記載のプロセスによって産生される抗体。

【請求項 17】

請求項 1～5 および請求項 16 のいずれか一項に記載の抗体ならびに 1 つまたは複数の医薬的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 18】

自己免疫性病態または炎症性病態を治療または予防するための、請求項 17 に記載の組成物であって、該病態が、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される、組成物。

10

【請求項 19】

癌を治療または予防するための、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記癌が、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

治療法における使用のための請求項 1～5 および請求項 16 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 22】

前記病態が、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される、自己免疫性病態または炎症性病態の治療における使用のための請求項 1～5 および請求項 16 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 23】

癌の治療における使用のための請求項 1～5 および請求項 16 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 24】

前記癌が、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である、請求項 23 に記載の使用のための抗体。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトインターロイキン-23 (IL-23) を結合する抗体およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

インターロイキン-23 (IL-23) は、p19 サブユニットおよび p40 サブユニットから構成されるジスルフィド結合されたヘテロダイマー性サイトカインである。IL-23 はサイトカインのインターロイキン 12 (IL-12) ファミリーの一部である。IL-12 は、共有結合で連結された p40 サブユニットおよび p35 サブユニットからなる 70 kDa のヘテロダイマー性サイトカインである。IL-12 は、保護的な先天性免疫応答および適応的免疫応答の発達ならびに腫瘍監視において重要な役割を果たす。IL-12 は、T ヘルパータイプ 1 (Th1) 反応を促進する能力を介して炎症反応にも関与する。しかしながら、炎症反応における IL-12 の機能的役割は関連するサイトカイン (IL-23) の発見により再評価された。IL-23 は IL-12 と同じ p40 サブユニットから構成されるが、p19 サブユニットと共有結合でペアになる。IL-12 の役割の査定に使用される多くの試薬は共有の IL-12 / IL-23 の p40 サブユニットに対して向けられており、今までに IL-12 へ割り当てられた活性が IL-23 経由で媒介されていたかもしれないことを意味する。IL-23 欠損マウスの開発によって I

40

50

IL-12とIL-23の活性を区別することができ、自己免疫性応答／炎症性応答の必須の媒介因子としてIL-23が同定された。

【0003】

機能的なIL-23受容体は、IL-12R β 1サブユニット（それはIL-12受容体と共有される）およびIL-23Rサブユニットのヘテロダイマーである。IL-23についての受容体はJanusキナーゼ2（Jak2）と構成的に会合し、STAT3を優先的に活性化し、STAT4活性化はIL-12よりも少ない。

【0004】

IL-23受容体は活性化T細胞／メモリーT細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞上で発現する。単球、マクロファージおよび樹状細胞も低いレベルでIL-23受容体を発現する。IL-23は、ナイーブCD4⁺T細胞がTh17細胞（それは古典的なTh1およびTh2細胞とは異なる）と呼ばれる新規の細胞のサブセットへと分化し維持することを支援する。Th17細胞はインターロイキン17A（IL-17A）およびインターロイキン-17F（IL-17F）を産生する。Th17細胞は、広範囲にわたる炎症反応を推進することが公知である他の因子（炎症反応を推進することが公知である腫瘍壊死因子が含まれる）を産生し、それらには腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）、インターロイキン6（IL-6）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、CXCL1およびCCL20が含まれる。NK細胞および先天性リンパ系組織（リンパ系組織誘導（LTi）様細胞等）は、IL-23受容体およびレチノイン酸関連オーファン受容体（ROR） γ を発現し、IL-23に応答してIL-17を産生する。IL-1 β およびIL-23は $\gamma\delta$ T細胞も共刺激してT細胞レセプターとの係合なしにIL-17産生を誘導する。

【0005】

IL-23応答性細胞が自己免疫性炎症性疾患および癌と関連するという実質的証拠がある。特に、IL-23特異的阻害剤（すなわちIL-12ではなくIL-23を阻害する阻害剤）は、IL-12に影響せずにIL-23を阻害するものとして特に有用であり、宿主防御の抑制のリスクを最小限にする一方で治療法上の利益を最大化するという仮説がある。

【0006】

IL-23のp19サブユニットへ特異的に結合する抗体は可能性のある有用な阻害剤であり、例えば特許文献1および特許文献2を参照されたい。特許文献1中で開示される抗体に関する問題は、少なくとも組織交差反応性についての可能性（特に網膜組織に結合する可能性）であり、それは安全性についての懸念である。さらに、特許文献1中で開示される抗体は少なくとも、最適ではない物理化学的特性（例えば凝集をもたらす極度に高い疎水性）を有し、それは工業規模での抗体の産生への重要な障害を提示する。加えて、IL-23のp19サブユニットを標的化する抗体は、治療法上の使用のために承認されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2007／024846号

【特許文献2】国際公開第2007／027714号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、IL-23抗体についての必要性が依然として存在する。特に、IL-23（特にヒトIL-23）のp19サブユニットへ高親和性で結合し、関連するサイトカインファミリーメンバー（IL-12）のp40サブユニットへ結合しない、IL-23抗体についての必要性が依然として存在する。より特に、IL-23のp19サブユニットへ高親和性で結合し、組織交差反応性（特に網膜組織交差反応性）を観察可能に示さな

10

20

30

40

50

い、I L-23抗体についての必要性が依然として存在する。開発、製造または製剤を促進する、医薬的に許容可能な物理化学的特性を保持する、I L-23抗体についての必要性がさらにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、軽鎖および重鎖を含む、ヒトI L-23のp19サブユニットへ結合する抗体であって、軽鎖が軽鎖可変領域(LCVR)を含み、重鎖が重鎖可変領域(HCVR)を含み、LCVRがアミノ酸配列LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、HCVRがアミノ酸配列HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含み、LCDR1が配列番号4であり、LCDR2が配列番号5であり、LCDR3が配列番号6であり、HCDR1が配列番号1であり、HCDR2が配列番号2であり、HCDR3が配列番号3である、抗体を提供する。

10

【0010】

本発明の一実施形態において、抗体は軽鎖および重鎖を含み、軽鎖は軽鎖可変領域(LCVR)を含み、重鎖は重鎖可変領域(HCVR)を含み、LCVRのアミノ酸配列は配列番号8であり、HCVRのアミノ酸配列は配列番号7である。

【0011】

本発明のさらなる実施形態において、抗体は2つの軽鎖可変領域(LCVR)および2つの重鎖可変領域(HCVR)を含み、各々のLCVRのアミノ酸配列は配列番号8であり、各々のHCVRのアミノ酸配列は配列番号7である。

20

【0012】

本発明のなおさらなる実施形態において、抗体は軽鎖および重鎖を含み、軽鎖のアミノ酸配列は配列番号10であり、重鎖のアミノ酸配列は配列番号9である。

【0013】

本発明のなおさらなる実施形態において、抗体は2つの軽鎖および2つの重鎖を含み、各々の軽鎖のアミノ酸配列は配列番号10であり、各々の重鎖のアミノ酸配列は配列番号9である。

【0014】

本発明は、軽鎖および重鎖を含む、ヒトI L-23のp19サブユニットへ結合する抗体であって、軽鎖が軽鎖可変領域(LCVR)を含み、重鎖が重鎖可変領域(HCVR)を含み、LCVRが相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、HCVRが相補性決定領域HCDR1およびHCDR2およびHCDR3を含み、LCDR1がアミノ酸配列の配列番号4からなり、LCDR2がアミノ酸配列の配列番号5からなり、LCDR3がアミノ酸配列の配列番号6からなり、HCDR1がアミノ酸配列の配列番号1からなり、HCDR2がアミノ酸配列の配列番号2からなり、HCDR3がアミノ酸配列の配列番号3からなる、抗体を提供する。

30

【0015】

本発明は、軽鎖および重鎖を含む、ヒトI L-23のp19サブユニットへ結合する抗体であって、軽鎖が軽鎖可変領域(LCVR)を含み、重鎖が重鎖可変領域(HCVR)を含み、LCVR鎖がアミノ酸配列の配列番号8を含み、HCVR鎖がアミノ酸配列の配列番号7を含む、抗体も提供する。

40

【0016】

本発明は、軽鎖および重鎖を含む、ヒトI L-23のp19サブユニットへ結合する抗体であって、軽鎖がアミノ酸配列の配列番号10を含み、重鎖がアミノ酸配列の配列番号9を含む、抗体も提供する。

【0017】

本発明は、2つの軽鎖および2つの重鎖を含む、ヒトI L-23のp19サブユニットへ結合する抗体であって、各々の軽鎖がアミノ酸配列の配列番号10を含み、各々の重鎖がアミノ酸配列の配列番号9を含む、抗体も提供する。

【0018】

50

本発明の抗体のアミノ酸配列を以下に提供する。

【表 1】

配列番号

抗体	重鎖	軽鎖	HCVR	LCVR
I	9	10	7	8

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	1	2	3	4	5	6

10

【0019】

本発明は、配列番号15のアミノ酸位置81～99および115～140内の立体配座のエピトープでヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する抗体も提供する。

【0020】

本発明は、配列番号15のアミノ酸位置81～99および115～140内の立体配座のエピトープでヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する抗体であって、抗体が配列番号15の少なくともアミノ酸残基94P、95S、97L、98P、99D、123W、130S、133Pおよび137Wに接触する、抗体も提供する。

20

【0021】

本発明のなおさらなる実施形態において、本抗体はヒトIL-23のp19サブユニットに対して選択的である。

【0022】

本発明の抗体は、ヒトIL-23のp19サブユニットへ結合した場合に、IL-23受容体のIL-23サブユニットへのヒトIL-23の結合を妨害する。したがって、本発明の抗体は、IL-23受容体のヒトIL-23サブユニットでヒトIL-23の活性を阻害する。

30

【0023】

本発明の抗体は、IL-23受容体のIL-12Rβ1サブユニットへのヒトIL-23の結合を妨害せず、したがってIL-23受容体のIL-12Rβ1サブユニットでヒトIL-23の活性を阻害しない。

【0024】

本抗体は、ヒトIL-23およびヒトIL-12によって共有されるp40サブユニットへ検出可能に結合しない。

【0025】

本発明のなおさらなる実施形態において、抗体はヒトIL-23のp19サブユニットへの中和活性を有する。

40

【0026】

本発明のなおさらなる実施形態において、本発明の抗体は約90pM以下のIC₅₀を有する。好ましくは、本発明の抗体は約74pM以下のIC₅₀を有する。IC₅₀値は、実施例1中の表題「マウス脾細胞における抗体IによるヒトまたはカニクイザルのIL-23のインビトロの中和」のセクション中で記載される通りに、インビトロのマウス脾細胞アッセイにおいて測定される。

【0027】

本発明のなおさらなる実施形態において、本発明の抗体は選択的であり、ヒトIL-23のp19サブユニットへの中和活性を有する。

50

【0028】

本発明のなおさらなる実施形態において、本発明の抗体は、ヒト IL-23 について約 10 pM ~ 約 30 pM の解離平衡定数 (K_D) を有する。好ましくは、本発明の抗体はヒト IL-23 について約 21 pM の K_D を有する。 K_D 値は、実施例 1 中の表題「抗体 I についての表面プラズモン共鳴による親和結合測定 (BIACore)」のセクション中で記載される通りに、37℃での結合動態によって確定される。本発明の抗体は、約 $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ ~ 約 $2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ のヒト IL-23 の p19 サブユニットへの k_{on} 速度でさらに特徴づけられる。好ましくは、本発明の抗体は約 $2.43 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ のヒト IL-23 の p19 サブユニットへの k_{on} 速度を有する。本発明の抗体は、約 $0.30 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ ~ 約 $0.70 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ のヒト IL-23 の p19 サブユニットへの k_{off} 速度でなおさらに特徴づけられる。好ましくは、本発明の抗体は約 $0.52 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ のヒト IL-23 の p19 サブユニットへの k_{off} 速度を有する。

10

【0029】

本発明の抗体はヒト IL-23 の p19 サブユニットへ高親和性で結合する。本開示の目的のために、「高親和性」という用語は少なくとも約 21 pM の K_D を指す。 K_D 値は、実施例 1 中の表題「抗体 I についての表面プラズモン共鳴による親和結合測定 (BIACore)」のセクション中で記載される通りに、37℃での結合動態によって確定される。

【0030】

ヒト IL-23 へ結合する特定の先行技術抗体とは異なり、本発明の抗体は組織交差反応性を観察可能に示さない。特に、本発明の抗体は網膜組織へ観察可能に結合しない。

20

【0031】

本発明の抗体は医薬的に許容可能な物理化学的特性を保持し、それには生理的条件および実験室条件において医薬的に許容可能な可溶性、ならびに医薬的に許容可能な化学的安定性および物理的安定性が含まれ、その場合、抗体はモノマー形状でとどまり、非常に少ない高分子量 (HMW) 凝集が、実施例 1 中の表題「IL-23 抗体の物理化学的特性」のセクション中で記載されるような範囲の条件下で観察される。

【0032】

本発明は、本発明の抗体および 1 つもしくは複数の医薬的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物をさらに提供する。より特に、本発明の医薬組成物は 1 つまたは複数の追加の治療用薬剤をさらに含む。

30

【0033】

本発明は、本発明の抗体の効果的な量をそれを必要とする患者へ投与することを含む患者における病態を治療または予防する方法であって、病態が、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される自己免疫性病態または炎症性病態である、方法も提供する。

【0034】

本発明は、本発明の抗体の効果的な量をそれを必要とする患者へ投与することを含む患者における病態を治療または予防する方法であって、病態が癌である、方法も提供する。

40

【0035】

本発明の一実施形態において、癌は、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である。

【0036】

本発明は、治療法における使用のための本発明の抗体も提供する。

【0037】

より特に、本発明は、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される、自己免疫性病態または炎症性病態の治療または予防における使用のための本発明の抗体を

50

提供する。

【0038】

本発明は、癌の治療または予防における使用のための本発明の抗体も提供する。

【0039】

本発明の一実施形態において、癌は、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である。

【0040】

本発明は、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される病態の治療または予防のための医薬品の製造における本発明の抗体の使用を提供する。

10

【0041】

本発明は、癌の治療または予防のための医薬品の製造における本発明の抗体の使用も提供する。

【0042】

本発明の一実施形態において、癌は、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である。

【0043】

本発明は、本発明の上述の抗体をコードするポリヌクレオチドにも関する。

【0044】

本発明は、アミノ酸配列の配列番号10を有する軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を提供する。

20

【0045】

本発明は、アミノ酸配列の配列番号9を有する重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子も提供する。

【0046】

一実施形態において、本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドであって、HCV Rが配列番号11によってコードされ、LCV Rが配列番号12によってコードされる、ポリヌクレオチドを提供する。

【0047】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドであって、重鎖が配列番号13によってコードされ、軽鎖が配列番号14によってコードされる、ポリヌクレオチドを提供する。

30

【0048】

本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形状またはDNAの形状（そのDNAにはcDNAおよび合成DNAが含まれる）であり得る。DNAは二本鎖または一本鎖であり得る。本発明の抗体をコードするコード配列は、遺伝コードの冗長または縮重の結果として変動し得る。

【0049】

本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドは、以下の、抗体についてのコード配列のみ、抗体についてのコード配列および追加のコード配列（リーダー配列もしくは分泌配列または前駆タンパク質配列等）；抗体についてのコード配列および非コード配列（イントロンまたはタンパク質についてのコード配列の5'および/もしくは3'の非コード配列等）を含み得る。したがって、「抗体をコードするポリヌクレオチド」という用語は、タンパク質についてのコード配列を含み得るポリヌクレオチドだけでなく、追加のコーディング配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドも包含する。

40

【0050】

本発明のポリヌクレオチドは、配列が発現制御配列へ作動可能に連結された後に、宿主細胞中で発現されるだろう。発現ベクターは、典型的には、エピソードとしてまたは宿主染色体DNAの組込み部分として宿主生物中で複製可能である。一般的には、発現ベクターは選択マーカー（例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、ジヒドロ葉酸還元酵素）を

50

含有して、所望されるDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするだろう。

【0051】

本発明は、アミノ酸配列の配列番号10を有する軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子およびアミノ酸配列の配列番号9を有する重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む組換え宿主細胞であって、その細胞が重鎖および軽鎖を含む抗体を発現でき、重鎖のアミノ酸配列が配列番号9であり、軽鎖のアミノ酸配列が配列番号10である、細胞を提供する。

【0052】

本発明の抗体は、哺乳動物細胞（CHO細胞、NS0細胞、HEK293細胞またはCOS細胞等）中で；細菌細胞（E. coli、Bacillus subtilisまたはPseudomonas fluorescense等）中で；または菌類細胞もしくは酵母細胞中で容易に産生することができる。宿主細胞は当技術分野において周知の技法を使用して培養される。

【0053】

対象となるポリヌクレオチド配列（例えば抗体のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび発現制御配列）を含有するベクターは、周知の方法によって宿主細胞の中へ移行させることができ、それは細胞の宿主のタイプに依存して変動する。例えば、塩化カルシウム形質転換は、原核生物細胞のために一般的には利用されるが、リン酸カルシウム処理または電気穿孔を他の細胞の宿主のために使用することができる。

【0054】

タンパク質精製の様々な方法を用いることができ、かかる方法は当技術分野において公知であり、例えばDeutscherおよびMethods in Enzymology 182:83-89 (1990) およびScopes, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Edition, Springer, NY (1994) 中で記載される。

【0055】

本発明は、重鎖および軽鎖を含む、ヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する抗体を産生するプロセスであって、重鎖がアミノ酸配列の配列番号9を含み、軽鎖がアミノ酸配列の配列番号10を含み、

a) 請求項7に記載の組換え宿主細胞を前記抗体が発現されるような条件下で培養する工程と、

b) 前記宿主細胞から発現された抗体を回収する工程とを含む、プロセスを提供する。

【0056】

さらに、本発明は、重鎖および軽鎖を有する、ヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する抗体を産生するプロセスであって、重鎖のアミノ酸配列が配列番号9であり、軽鎖のアミノ酸配列が配列番号10であり、

a) 配列番号9によって与えられるポリペプチド配列をコードする第1のポリヌクレオチド配列および配列番号10によって与えられたポリペプチド配列をコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞を、該ポリペプチド配列が発現されるような条件下で、培養する工程と、

b) 重鎖および軽鎖を含み、該重鎖のポリペプチド配列が配列番号9によって与えられ、該軽鎖のポリペプチド配列が配列番号10によって与えられる抗体を該宿主細胞から回収する工程とを含む、プロセスを提供する。

【0057】

上述のプロセスの一実施形態において、配列番号9によって与えられるポリペプチド配列をコードする第1のポリヌクレオチド配列および配列番号10によって与えられるポリペプチド配列をコードする第2のポリヌクレオチド配列は、同じ核酸分子の一部である。

【0058】

一実施形態において、本発明は前述のプロセスによって産生された抗体を提供する。

【0059】

さらなる実施形態において、前述のプロセスによって産生された抗体は2つの重鎖および2つの軽鎖を有し、各々の重鎖のポリペプチド配列は配列番号9によって与えられ、各々の軽鎖のポリペプチド配列は配列番号10によって与えられる。

【発明を実施するための形態】

【0060】

本発明の抗体はIgGタイプ抗体であり、鎖内および鎖間のジスルフィド結合経路で架橋される4つのアミノ酸鎖（2つの「重」鎖および2つの「軽」鎖）を有する。特定の生物学的システムにおいて発現された場合、生来のヒトFc配列を有する抗体はFc領域中で糖鎖付加される。抗体は他の位置で同様に糖鎖付加され得る。

【0061】

各々の重鎖はN末端のHCVRおよび重鎖定常領域（「HCCR」）からなる。ヒト重鎖はγ、μ、α、δまたはεとして分類され、抗体のアイソタイプはそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEとして定義される。ヒトIgG抗体はサブクラス（例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄）へとさらに分けることができる。

【0062】

好ましくは、本発明の抗体はFc部分を含有し、ヒトIgG₄ Fc領域は、Fc受容体媒介性炎症性機序への関与または補体の活性化の能力が減少しエフェクター機能の減少を生じるので、Fc部分はヒトIgG₄ Fc領域に由来する。

【0063】

より好ましくは、本発明の抗体はIgG₄-PAA Fc部分を含有する。IgG₄-PAA Fc部分は、位置223でセリンからプロリンへの変異（S223P；配列番号9）、位置229でフェニルアラニンからアラニンへの変異（F229A；配列番号9）、および位置230でロイシンからアラニンへの変異（L230A；配列番号9）を有する。S223P変異は、半抗体形成（IgG₄抗体における半分子の動的交換の現象）を妨害するヒンジ変異である。F229AおよびL230Aの変異は、既に低いヒトIgG₄アイソタイプのエフェクター機能をさらに減少させる。

【0064】

各々の重鎖タイプは、当技術分野において周知の配列を備えた特定の定常領域も特徴とする。重鎖定常領域はIgGについて3つのドメイン（CH1、CH2およびCH3）からなる。

【0065】

軽鎖はκまたはλとして分類され、当技術分野において公知のように、各々は特定の定常領域を特徴とする。各々の軽鎖はLCVRおよび軽鎖定常領域（「LCCR」）からなる。好ましくは、本発明の抗体はκ軽鎖を含む。

【0066】

各々の軽鎖／重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。HCVRおよびLCVRの領域は、フレームワーク領域（「FR」）と称されるより保存された領域が散在する、相補性決定領域（「CDR」）と称される超可変性の領域へと細分することができる。各々のHCVRおよびLCVRは、以下の順序、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端までアレンジされる3つのCDRおよび4つのFRからなる。本明細書において、重鎖の3つのCDRは「HCDR1、HCDR2およびHCDR3」と称され、軽鎖の3つのCDRは「LCDR1、LCDR2およびLCDR3」と称される。CDRは、抗原との特異的相互作用を形成する大部分の残基を含有する。配列の概要説明のために使用される抗体についてのCDR割り当ての3つのシステムが現在ある。KabataのCDR定義（Kabata et al.、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、National Institutes of Health、Bethesda、Md.（1991））は、抗体配列可変性に基づく。ChothiaのC

DR定義(Chothia et al.、「Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins」、Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al.、「Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins」、Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))は、抗体の三次元構造およびCDRループのトポロジーに基づく。ChothiaのCDR定義は、HCDR1およびHCDR2を例外としてKabatのCDR定義に同一である。NorthのCDR定義(North et al.、「A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations」、Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))は、多数の結晶構造による親和性伝播クラスタリングに基づく。

【0067】

本発明の目的のために、3つの方法のコンセンサスを使用してCDRを定義する。軽鎖CDRの事例において、KabatおよびChothiaのCDR定義が使用される。HCDR1の事例において、KabatおよびChothiaのCDR定義のハイブリッドが使用される。HCDR1のKabatの定義は重鎖の第1のシステインの8残基後に開始し、5残基の長さであり、一方HCDR1のChothiaの定義は重鎖のこのシステインの3残基後に開始し、7残基の長さである。本発明の抗体のHCDR1はChothiaの出発位置およびKabatの終結位置によって定義される。HCDR2の事例において、KabatのCDR定義が使用される。HCDR3の事例において、North、KabatおよびChothiaのCDR定義のハイブリッドが使用される。HCDR3のKabatの定義は重鎖の残基95～102(本発明の抗体についての配列番号13)を含み、典型的にはシステインの3残基後に開始する。HCDR3のChothiaの定義はKabatの定義と同じである。HCDR3のNorthの定義は重鎖の残基93～102(本発明の抗体についての配列番号13)を含み、典型的にはシステイン残基の直後に開始する。本発明の抗体のHCDR3は、Northの出発位置およびKabat/Chothia/Northの終結位置によって定義される。

【0068】

表1は、本発明の抗体の例示的なCDR割り当てを示す。

【表2】

表1：CDR割り当て

CDR	開始の定義	終結の定義
LCDR1	Kabat/Chothia/North	Kabat/Chothia/North
LCDR2	Kabat/Chothia	Kabat/Chothia/North
LCDR3	Kabat/Chothia/North	Kabat/Chothia/North
HCDR1	Chothia	Kabat/North
HCDR2	Kabat/North	Kabat
HCDR3	North	Kabat/Chothia/North

【0069】

本発明の抗体は、ヒトゲノム配列に由来するフレームワークおよび定常領域と同一かまたは実質的に同一である(実質的にヒト)、ヒト起源のフレームワーク、ヒンジ領域および定常領域を有するようにデザインした操作された抗体である。完全なヒトのフレームワ

ーク、ヒンジ領域および定常領域は、それらのヒト生殖系列配列に加えて、天然に存在する体細胞変異を備えた配列および操作された変異を備えた配列である。本発明の抗体は、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失または追加をその中に含有する完全なヒトのフレームワーク、ヒンジ、または定常領域に由来するフレームワーク、ヒンジ、または定常領域を含み得る。さらに、本発明の抗体は好ましくはヒトにおいて実質的に非免疫原性ある。

【0070】

多様な異なるヒトフレームワーク配列は、本発明の抗体のための基礎として単独または組み合わせで使用することができる。好ましくは、本発明の抗体のフレームワーク領域は、ヒト起源または実質的にヒト（少なくとも95%、97%または99%がヒト起源）である。ヒト起源のフレームワーク領域の配列は、The Immunoglobulin Factsbook、Marie-Paule Lefranc著、Gerard Lefranc、Academic Press 2001、ISBN 012441351から得ることができる。

10

【0071】

本発明の抗体についてのフレームワーク配列は「ドナー」可変フレームワーク領域として役立ち、当技術分野において公知の方法論を用いて本明細書において規定された同じCDRを備えた追加の抗体を生成するのに使用することができる。さらに、本発明の抗体についてのフレームワーク配列を他の公知のヒトフレームワーク配列に対して比較して、追加の抗体を生成することができる。したがって、この情報を使用して、別の選択された相同なヒトフレームワーク領域をこれらの位置でドナーアミノ酸残基へ「復帰変異」させることができる。さらに、任意の「まれな」アミノ酸を追加のヒトフレームワーク中で検出することができ、その結果コンセンサスなアミノ酸残基またはドナーアミノ酸残基に関連する位置で使用することができる。

20

【0072】

抗体を産生するおよび精製する方法は当技術分野において周知であり、例えばHarlow and Lane (1988) Antibodies. A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor、New York、チャプター5～8および15中に見出すことができる。例えば、マウスはヒトIL-23またはその断片により免疫付与することができ、次いで生じた抗体は精製し回収することができ、アミノ酸配列は当技術分野において周知の従来の方法を使用して決定される。本発明の抗体は非ヒト抗体に由来したCDRを囲む1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含有するように操作される。ヒトフレームワークの生殖系列配列は、ウェブサイト<http://imgt.cines.fr>経由でIMMUNOGENETICS (IMGT)、またはThe Immunoglobulin Facts Book、Marie-Paule Lefranc and Gerard Lefranc著、Academic Press、2001、ISBN 012441351から得ることができる。本発明の抗体における使用のための特定の生殖系列の軽鎖フレームワークは02を含む。

30

【0073】

本発明の抗体における使用のための特定の生殖系列の重鎖フレームワーク領域はVH1-69を含む。

40

【0074】

本発明の操作された抗体は公知の方法を使用して調製および精製することができる。例えば、重鎖（例えば配列番号9によって与えられるアミノ酸配列）および軽鎖（例えば配列番号10によって与えられるアミノ酸配列）をコードするcDNA配列は、クローン化しGS（グルタミン合成酵素）発現ベクターの中へ操作することができる。次いで操作された免疫グロブリン発現ベクターをCHO細胞中に安定的にトランスフェクションすることができる。抗体の哺乳動物の発現は典型的にはFc領域中の高度に保存されたN-糖鎖付加部位での糖鎖付加を生じるだろう。安定的クローンはヒトIL-23へ特異的に結合する抗体の発現について検証することができる。陽性クローンはバイオリアクター中での

50

抗体産生のために無血清培地の中で増幅させることができる。抗体が分泌された培地は従来の技法によって精製することができる。例えば、培地は、好都合には、適合性のある緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水等）により平衡化されたプロテインAまたはプロテインGのセファロースFFカラムへ適用することができる。結合した抗体を例えばpH勾配によって溶出し、抗体画分をSDS-PAGE等によって検出し、次いでプールする。抗体は通常の技法を使用して濃縮および／または滅菌濾過することができる。可溶性の凝集物およびマルチマーは、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが含まれる通常の技法によって効果的に除去することができる。産物は例えば直ちに -70°C で凍結または凍結乾燥することができる。

10

【0075】

本発明の抗体はモノクローナル抗体である。本明細書において使用される時「モノクローナル抗体」または「mAb」は、単一コピーまたはクローン（例えば任意の真核生物クローン、原核生物クローンまたはファージクローンが含まれる）に由来する抗体を参照し、それが産生される方法ではない。そのモノクローナル抗体は、例えばハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術（例えばCDRグラフト）、またはかかる技術もしくは当技術分野において公知の他の技術の組み合わせによって産生することができる。

【0076】

本発明の別の実施形態において、抗体またはそれをコードする核酸は単離された形態で提供される。

20

【0077】

本発明の抗体またはそれを含む医薬組成物は、非経口的経路（例えば皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内または経皮）によって投与することができる。

【0078】

本発明の医薬組成物は、当技術分野において周知の方法（例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy、第19版（1995）（A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.））によって調製することができ、本明細書において開示されるような抗体および1つもしくは複数の医薬的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む。例えば、本発明の抗体は薬剤（クエン酸ナトリウム、クエン酸およびポリソルベート80および塩化ナトリウムおよびショ糖等）と共に製剤化することができ、次いで生じた組成物は凍結乾燥し、 2°C ～ 8°C で保存することができる。次いで凍結乾燥された組成物は投与の前に注射用蒸留水により再構成することができる。

30

【0079】

本明細書において使用される時「ヒトIL-23のp19サブユニットへ結合する」という用語は、配列番号15のアミノ酸配列によって与えられるヒトIL-23のp19サブユニット上のエピトープとの本発明の抗体の検出可能な相互作用を指す。本発明の抗体とヒトIL-23のp19サブユニットとの間の相互作用は、実施例1中の表題「抗体Iについての表面プラズモン共鳴による親和結合測定(BIACore)」のセクション中で記載される通りに、 37°C での結合動態によって測定される。

40

【0080】

本明細書において使用される時「エピトープ」という用語は、タンパク質（抗原）表面上でともに接近して、抗体と相互作用するアミノ酸残基を指す。2つの大まかなクラスのエピトープ（直線状エピトープおよび立体配座的エピトープ）がある。

【0081】

本明細書において使用される時「直線状エピトープ」という用語は、タンパク質の特定の領域の連続的な一次的なアミノ酸配列を指す。

【0082】

本明細書において使用される時「立体配座的エピトープ」という用語は、本発明の抗体

50

によって接触される、抗原のアミノ酸配列の不連続セクションを指す。立体配座のエピトープは構造に加えて生来のタンパク質の配列によっても定義され、これらのエピトープは連続または不連続であり得る。エピトープの成分はタンパク質の異なる部分に位置することができ、折り畳まれた生来のタンパク質構造において互いに接近させられる。本発明の文脈において、本発明の抗体は、配列番号15のアミノ酸位置81～99および115～140内の立体配座のエピトープでヒトIL-23のp19サブユニットへ結合し、抗体は配列番号15の少なくともアミノ酸残基94P、95S、97L、98P、99D、123W、130S、133Pおよび137Wに接触する。しかしながら、立体配座のエピトープはこれらのアミノ酸残基へ限定されず、配列番号15のアミノ酸位置81～99および115～140内の追加のアミノ酸残基を含むことができる。

10

【0083】

本明細書において使用される時「網膜組織に観察可能に結合しない」という用語は、ヒトおよびカニクイザル網膜組織と本発明の抗体の検出可能な相互作用が存在しないことを指す。本発明の抗体とヒトおよびカニクイザルの網膜組織との間の相互作用は、実施例1中の表題「網膜組織交差反応性：免疫組織化学によるインビトロの分析」のセクション中で記載される通りに、免疫組織化学アッセイにおいて査定される。本文脈中で使用される時「観察可能に」という用語は、本発明の抗体がヒトおよびカニクイザル網膜組織へ結合するかどうかを決定する該ヒトおよびカニクイザル網膜組織の視覚的評価を指す。

【0084】

本発明の抗体に関して本明細書において使用される時「選択的である」という用語は、ヒトIL-23のp19サブユニットに結合するが、ヒトIL-23およびヒトIL-12によって共有されるp40サブユニットへ結合しない抗体を指す。

20

【0085】

本明細書において使用される時「中和すること」という用語は「中和抗体」を指し、ヒトIL-23の生物学的活性の阻害を指すことが意図される。マウス脾細胞バイオアッセイ（実施例1中の表題「マウス脾細胞における抗体IによるヒトまたはカニクイザルのIL-23のインビトロの中和」のセクションを参照）またはヒトIL-23中和アッセイ（実施例1中の表題「ヒトIL-23の中和：急性、局所的」のセクションを参照）のいずれかを使用して決定されるような、IL-23生物学的活性の1つまたは複数の指標の測定は、ヒトIL-23の生物学的活性のこの阻害を査定することができる。

30

【0086】

本明細書において使用される時「 K_D 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離定数を指すことが意図される。それは以下の式によって計算される。

$$K_{off}/K_{on} = K_D$$

【0087】

本明細書において使用される時「 k_{on} 」という用語は、単位 $M^{-1} \text{秒}^{-1}$ で測定される、順反応または複合体形成反応の会合もしくは結合の速度定数または特異的反応速度を指すことが意図される。

【0088】

本明細書において使用される時「 k_{off} 」という用語は、単位 秒^{-1} で測定される、抗体/抗原複合体からの抗体の解離についての解離もしくは離脱の速度定数または特異的反応速度を指すことが意図される。

40

【0089】

本明細書において使用される時「 IC_{50} 」という用語は、実施例1中の表題「マウス脾細胞における抗体IによるヒトまたはカニクイザルのIL-23のインビトロの中和」のセクション中で記載されるバイオアッセイにおいて、マウス脾細胞上のIL-23の生物活性の50%を中和するのに必要な本発明の抗体の有効濃度を指すことが意図される。

【0090】

本明細書において使用される時「ポリヌクレオチド」という用語は、DNA分子およびRNA分子を含むことが意図される。核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得る。

50

【0091】

本明細書において使用される時「単離された」という用語は、細胞環境において見出される他の巨大分子種がないかまたは実質的にないタンパク質、ペプチドまたは核酸を指す。

【0092】

本明細書において使用される時「実質的にない」という用語は、対象となるタンパク質、ペプチドまたは核酸が、存在する巨大分子種の80%より多く（モルベース上で）、好ましくは90%より多く、およびより好ましくは95%より多くを構成することを意味する。

【0093】

「患者」は哺乳動物、好ましくはヒトである。

【0094】

「治療すること」（または「治療する」または「治療」）という用語は、既存の症状、障害、病態または疾患の進行または重症度を減速させるか、中断するか、阻止するか、軽減するか、停止するか、減少させるか、または回復させることを指す。

【0095】

本明細書において使用される時「効果的な量」という用語は、患者への単一用量または複数用量の投与に際して、治療下の患者において所望される効果を提供する、本発明の抗体の量または用量を指す。効果的な量は、多数の因子（哺乳動物の種；大きさ、年齢および全体的な健康；関与する特異的疾患；疾患の程度または重症度；個別の患者の応答；投与された特定の抗体；投与のモード；投与された調製物の生物学的利用能特徴；選択された用量レジメン；ならびに任意の併用医薬物の使用等）を考慮して、当業者として参加する診断医によって容易に決定することができる。

【実施例】

【0096】

以下の実施例は本発明をさらに例証する。しかしながら、実施例が限定ではなく例示のために記載され、様々な修飾が当業者によって行えることは理解される。

【0097】

実施例1

抗体の産生

この実施例の抗体Iは2つの重鎖および2つの軽鎖を含み、各々の重鎖は配列番号9によって与えられるアミノ酸配列を有し、各々の軽鎖は配列番号10によって与えられるアミノ酸配列を有する。抗体Iを作製し、以下の通り精製することができる。適切な宿主細胞（HEK293またはCHO等）は、最適な所定のHC：LCベクター比、または重鎖（配列番号9）および軽鎖（配列番号10）の両方をコードする単一ベクターシステムを使用して、抗体を分泌するための発現システムにより一過性にまたは安定的にトランスフェクションする。一般的に使用される技法のうちのいずれかを使用して、抗体が分泌された清澄培地を精製する。例えば、培地は、好都合には、適合性のある緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）等）により平衡化されたプロテインAまたはプロテインGのカラムへ適用することができる。カラムを洗浄して非特異的結合成分を除去する。結合した抗体は、例えばpH勾配（0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8から0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH2.5等）によって溶出される。抗体画分を中和し（例えばpH8.0の1M TRISの1/10の体積の添加によって）、検出し（SDS-PAGEによって等）、次いでプールする。意図される使用に依存して、さらなる精製はオプションである。抗体は通常の技法を使用して濃縮および／または滅菌濾過することができる。可溶性の凝集物およびマルチマーは、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーが含まれる通常の技法によって効果的に除去することができる。これらのクロマトグラフィー工程後の抗体の純度は99%を超える。産物は直ちに-70℃で凍結または凍結乾燥することができる。

10

20

30

40

50

【0098】

表面プラズモン共鳴による親和結合測定 (BIAcore)

ヒト、カニクイザルまたはウサギの IL-23 への抗体親和性 (K_D) は、物質移動モデルの 1:1 結合による BIAcore Biosensor 2000 および BIAevaluation ソフトウェアを使用して決定される。捕捉タンパク質 (プロテイン A、Calbiochem) は、N-エチル-N-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) および N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の混合物を使用して、CM4 バイオセンサーチップのフローセル 1 および 2 上のカルボキシル基へ遊離アミン基経由でカップルされる。フローセルは、0.01 M HEPES (pH 7.4、150 mM NaCl)、0.005% 界面活性剤 P20 を含有する緩衝液を使用して、80 μ L / 分の流速でモニターする。抗体 I をフローセル 2 上で捕捉して、合計 40~60 反応単位 (RU) を得る。次いで IL-23 を、濃度を増加させる複数のサイクルでフローセル 1 および 2 の上に注入し (ヒトおよびサル IL-23 について 0.62 nM~30 nM およびウサギ IL-23 について 30 nM~240 nM)、各々のサイクルの間にはグリシン HCl (pH 1.5) を使用する再生工程が続く。フローセル 1 を対照として使用して IL-23 の非特異的結合をモニターし、データはフローセル 1 を引いたフローセル 2 を反映する。各々のサイクルは抗体捕捉工程、続いて 30 分の解離期間による 1 つの濃度での IL-23 の注入、次いで再生を含む。緩衝液が IL-23 の代わりに注入される 2 つのサイクルはベースラインサブトラクションのための対照として役立ち、プロテイン A 表面からの抗体 I の解離と関連したドリフトについて補正する。親和性を 37°C で測定する。アッセイはヒト、サルまたはウサギの IL-23 により 2 回行う。抗体 I は、333 nM でマウス IL-23、200 nM でラット IL-23、333 nM でヒト IL-12、500 nM でヒト IL-27 または 833 nM でヒト IL-35 により各々 2 回試験する。

10

20

【0099】

各々の抗原についての結合速度 (k_{on}) および離脱速度 (k_{off}) は物質移動モデルの 1:1 結合を使用して評価する。親和性 (K_D) は、関係性 $K_D = k_{off} / k_{on}$ に従う結合動態から計算される。

【表 3】

表 2-抗体 I についての結合パラメーター

抗原	結合速度 (k_{on}) (Avg $\pm$ SD) ($M^{-1}s^{-1}$) (10^6)	離脱速度 (k_{off}) (Avg $\pm$ SD) (s^{-1}) (10^{-4})	親和性 (K_D^a) (Avg $\pm$ SD) (pM)
ヒト IL-12	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し
ヒト IL-23	2.43 ± 0.16	0.52 ± 0.21	21 ± 9.9
ヒト IL-27	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し
ヒト IL-35	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し
サル IL-23	1.28 ± 0.05	0.7 ± 0.11	55 ± 6.4
ウサギ IL-23	0.09 ± 0.001	47.9 ± 0.4	$53,000 \pm 1131$
マウス IL-23	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し
ラット IL-23	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し	検出可能な結合無し
^a $K_D = k_{off}/k_{on}$ として計算される			
各々の抗原について n=2。IL-12 は IL-23 について検出可能な濃度の 400 倍の濃度で試験した。IL-27 および IL-35 は IL-23 について検出可能な濃度の 800 倍の濃度で試験した。マウスおよびラットの IL-23 は、ヒト IL-23 について検出可能な濃度の 500 倍および 300 倍の濃度で試験した。			

【0100】

抗体 I は、この方法を使用してヒト、カニクイザルおよびウサギの IL-23 により濃度依存的結合応答を生じる。IL-23 の結合の飽和は、チップ表面上で捕捉された 80 ~ 100 反応単位の抗体 I を使用して 30 nM (ヒトおよびサル) および 240 nM (ウサギ) の濃度で達成される。試験された条件下で、抗体 I へのヒト、サルまたはウサギの IL-23 の結合親和性 (K_D) は、それぞれ 21、55 または 53,000 pM である (表 1)。マウス IL-23、ラット IL-23、ヒト IL-12、ヒト IL-27 またはヒト IL-35 は、これらの条件下で抗体 I へ結合しない。

【0101】

IL-23 受容体への IL-23 結合のインビトロ阻害

組換えヒト IL-23 R/Fc は、N-エチル-N-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC) および N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) の混合物を使用

10

20

30

40

50

して、CM4 バイオセンサーチップのフローセル2上のカルボキシル基へ遊離アミン基經由でカップルされる。組換えヒト IgG₁ Fc (R&D Systems, Inc.) は同じ方法を使用して同じチップのフローセル1へカップリングされる。マウス抗6×HIS抗体 (R&D Systems, Inc.) は同じ方法を使用して同じチップのフローセル4へカップリングされる。マウス抗6×HISを使用して、HISタグを含有するヒト IL-12Rβ1/Fc (R&D Systems, Inc.) を前捕捉する。フローセルは、0.01M HEPES (pH7.4、150のmM NaCl)、0.005%界面活性剤P20を含有する緩衝液を使用して、30μL/分の流速でモニターする。組換えヒト IL-23は、16倍モル過剰の抗体Iの添加の有りまたは無しで90分間ブレインキュベーションする。各々の組み合わせを150μLの全体積でフローセル1、2および4の上に注入し、各々の試験の間にはグリシンHCl (pH1.5) を使用する再生工程が続く。フローセル1を対照として使用してチップへのIL-23の非特異的結合をモニターする。BIAevaluationソフトウェアを使用して個別の結合センサーグラムのオーバーレイを作成する。

【0102】

抗体Iはインビトロの機能アッセイを使用して、ヒトIL-23を中和する。さらに、抗体IはIL-23R/FcへのIL-23の結合を防止する。表3中のデータは、

(A) IL-23はIL-23R/Fcへ結合する；

(B) 抗体I/IL-23複合体はIL-23R/Fcへ結合しない；

(C) IL-23はIL-12Rβ1/Fcへ結合する；および

(D) 抗体I/IL-23複合体はIL-12Rβ1/Fcへ結合する

ことを示す。

【表4】

表3：IL-23RへのIL-23結合に対する抗体Iの効果

サイトカイン	抗体	IL-23Rへの結合	IL-12Rβ1への結合
IL-23	無し	結合する	結合する
IL-23	I	結合しない	結合する

【0103】

したがって、抗体IがIL-23RサブユニットへのIL-23の結合を阻害するので、抗体IはIL-23を中和する。加えて、抗体IはIL-12Rβ1サブユニットへのIL-23の結合を阻害しない。

【0104】

マウス脾細胞における抗体IによるヒトまたはカニクイザルのIL-23のインビトロ中和

抗体Iの評価のために、IL-17の最大産出のおよそ50%を与えるヒトまたはカニクイザルのIL-23の濃度を使用する(16pM)。800,000~4.4pMの範囲の抗体Iの用量応答を評価する。抗体IまたはIgG₄対照抗体は、細胞への添加の前に分離したウェル中でヒトまたはカニクイザルのIL-23と37℃で90分間組み合わせる(前インキュベーション混合)。

【0105】

IL-23およびIL-2により刺激されたC57BL/6マウスからの脾細胞は、IL-17を産生する(Aggarwal, S. et al., 「Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17」、Journal of Biological Chemistry, 278(3):1910-1914 2003)。マウ

ス脾細胞を、アッセイ培地（10% FBS、1% 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、0.00035% 2-メルカプトエタノール、50 ng/mL ヒト IL-2 を含有する L-グルタミン入り RPMI 1640）中で 5×10^6 WBC/mL で再懸濁し、96 ウェル培養プレートの中へ1ウェルあたり体積100 μ L で分注する。抗体 I / IL-23 の前インキュベーション混合物を1ウェルあたり100 μ L として分注し、5% CO₂ 中で37℃でインキュベーションする。48時間後に、培養上清は、各々の希釈で二重でウェルを使用してキット中の説明書に従って R&D Systems からの商業的な ELISA キット（DY421）を使用して、mIL-17 について試験する。IC₅₀ はデータの4パラメーター曲線フィッティングを使用して決定する。

10

【0106】

マウス脾細胞はヒトまたはカニクイザルの IL-23 に応答して IL-17 を産生する。抗体 I はヒトまたはカニクイザルの IL-23 を中和する。計算された IC₅₀ はヒトについて 82 ± 11 pM およびカニクイザル IL-23 について 120 ± 14 pM であり、各々について n = 2 である（表4）。これらの結果は抗体 I がインビトロでヒトまたはカニクイザルの IL-23 を中和できることを実証する。

【表5】

表4：インビトロのヒトおよびカニクイザルの IL-23 中和アッセイにおける IC₅₀

種	アッセイ番号	抗体	IC ₅₀ (pM)
ヒト	1	I	90
ヒト	2	I	74
ヒト		平均 (標準偏差)	82 (11)
カニクイザル	3	I	110
カニクイザル	4	I	130
カニクイザル		平均 (標準偏差)	120 (14)

20

【0107】

ヒト IL-23 の中和：急性、局所的

動物（C57BL/6メス、Jackson Labs からの8週齢）を収容し（到着後最小72時間）、実験の前および研究の継続の間に正常に給餌する。体毛を電気バリカンによりマウスの背から除去し、3日後にマウス（1群あたり n = 10）に抗体 I または IgG₄ アイソタイプ対照抗体（1マウスあたり0.54 mg）を皮下注射する。その後の2日間、背の1つの側面上の1つの場所においてヒト IL-23（50 μ L 中の1 μ g を滅菌生理食塩水により希釈した）を、29ゲージ針を使用してマウスに皮内注射する。滅菌生理食塩水を背の他の側面上で賦形剤対照として使用する。最後のヒト IL-23 注射の24時間後にマウスを屠殺し、皮膚サンプルを、体毛の境界から少なくとも5mm離して、IL-23 を注射した側面および滅菌生理食塩水を注射した側面から摘出する。皮膚サンプルはmRNA 研究のために液体窒素中で直接凍結する。

40

【0108】

全RNAは、Lysing Matrix A シューカーチューブ（Qiagen Inc. / Bio101 Systems）中でのホモジナイゼーション、続いて RNeasy ミニキット クリーンアップ（Qiagen, Inc.）によって凍結皮膚組織から単離する。RNA 濃度は260nmでの分光測光吸収から決定する。RNAはHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（PE Applied Biosystems）を使用してcDNAへと逆転写する。すべての反応はABI Prism 7900HT（PE Applied Biosystems）上で三重で行って、アッセイしたmRNAの相対的存在量を決定する。マウ

50

ス IL-17A (Mm00439618__m1)、マウス IL-17F (Mm00521423__m1) およびマウスケラチン-16 (Mm00492979__g1) についてのプライマープローブセットは、PE Applied Biosystems から得る。18S および GAPD の両方を内因性の対照として測定して、遺伝子発現レベルにおける変動性を正規化する。発現データはデルタ (Δ - Δ) Ct 方法を使用して分析する。個別の Ct 値は三重測定の前平均として計算される。実験は 2 回行う。非対合 t 検定は必要に応じて使用する。P < 0.05 は統計的に有意であると判断される。

【0109】

抗体 I の全身投与がヒト IL-23 への局所的反応を中和できるかどうか調査するために、ヒト IL-23 タンパク質をマウスへ皮内注射して皮膚の IL-23 曝露の下流の帰結を調査する。毎日生理食塩水で処理した野生型マウスからの皮膚は検出可能なレベルのマウス IL-17A またはマウス IL-17F を示さない。

【0110】

しかしながら、ヒト IL-23 の注射はマウス IL-17A およびマウス IL-17F の mRNA 発現を誘導する (表 5)。抗体 I による処理はヒト IL-23 誘導性の IL-17A および IL-17F の mRNA 発現を無効にしたが、アイソタイプ対照抗体ではそのようなことはなかった。

【表 6】

表 5：ヒト IL-23 誘導性マウス IL-17A および IL-17F mRNA 発現のインビボの中和。

		Ct 値	
		PBS	IL-23
		IL-17A	IL-17F
アイソタイプ対照 抗体 I	アイソタイプ対照	≥40	≥40
	抗体 I	≥40	≥40

【0111】

さらに、ヒト IL-23 注射はケラチン-16 (増殖関連性サイトケラチン) の発現増加と関連した表皮肥厚を誘導する。ケラチン-16 の誘導は抗体 I の投与によって有意に阻害される (マウスケラチン-16 が何倍誘導されたかは、アイソタイプ対照抗体について 5.21 ± 2.72 vs 抗体 I について 1.23 ± 0.72 である; $p = 0.0003$)。

【0112】

総合すると、これらの結果は、抗体 I が急性の局所的なインビボのアッセイにおいてヒトの IL-23 誘導性のマウス IL-17A、IL-17F およびケラチン-16 の mRNA 産生を効果的に阻害することを示す。

【0113】

網膜組織の交差反応性：免疫組織化学によるインビトロ分析

新鮮な凍結したヒトおよびカニクイザルの網膜組織 (5~7 μ m 厚) の切片をクライオスタット上で切断する。切片は室温でおよそ 10 分間アセトン中で固定し、室温で一晩乾燥させ、使用までおよそ -80 °C で保存する。続いてアセトン固定したスライドをフリーザーから取り出し、室温で一晩乾燥させる。以下の工程は室温で行う。スライドを 1 × Morphosave (商標) 中でおよそ 15 分間インキュベーションして形態を維持する。スライドを 1 × PBS 中で 10 分間洗浄し、次いで 1 × PBS 中の 0.3% H_2O_2 中で室温でおよそ 20 分間インキュベーションして内因性のペルオキシダーゼ活性をクエンチングする。インキュベーション後に、スライドを 1 × PBS 中でおよそ 5 分間 2 回洗浄する。内因性のビオチンを、アビジン溶液およびビオチン溶液中での連続的なインキュベーション (各々およそ 15 分) によってブロックする。ビオチン中でのインキュベーションに後続して、組織切片をブロッキング抗体溶液により 30 分間ブロックする。抗体 I ま

たは対照ヒト IgG₄ を最適濃度 (2.5 μg/mL または 5 μg/mL) または最適濃度の 5 倍 (25 μg/mL) で切片へ適用し、室温で 1 時間インキュベーションする。次いでスライドをリンスし、ビオチン化マウス抗ヒト IgG₄ 抗体 (2.5 μg/mL) により 30 分間インキュベーションする。結合した一次抗体/二次抗体複合体は、ストレプトアビジン-ビオチン-ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートおよびジアミノベンジジンクロモゲン基質により検出する。

【0114】

ヒト IL-23 によりトランスフェクションした CHO 細胞をすべての実験において陽性対照サンプルとして使用する。親 CHO (トランスフェクションしなかった) 細胞を陰性対照サンプルとして使用し、染色しなかった。結合は、アイソタイプ対照抗体 (ヒト IgG₄) により染色した連続切片において観察されない。抗体 I は観察可能に網膜組織に結合しない。

10

【0115】

抗体 I についてのエピトープマッピング：アラニンスキャニング

酵母ディスプレイ抗原を使用するエピトープマッピングに対する背景

エピトープマッピング研究を行って、抗体 I 結合のために必要とされるヒト IL-23 p19 サブユニット (配列番号 15) 中の特異的アミノ酸を決定する。抗体 I のエピトープマッピングは、酵母ディスプレイプラットフォームと併用したアラニンスキャニングの利用によって行う。

【0116】

20

ヒト IL-23 の p19 サブユニットの曝露されるアミノ酸位置は PyMOL における分析によって同定する。IL-23 の p19 サブユニットの曝露される位置または部分的に曝露される位置を表 6 中で示す。曝露されないことが決定された位置はこの研究から省略される (すなわち、曝露されるかまたは部分的に曝露されるヒト IL-23 の p19 サブユニットのアミノ酸位置のみが変異された)。したがって、すべての位置が調査されるとは限らない。

【0117】

エピトープマッピングは IL-23 の p19 サブユニット上のみで行われるが (抗体 I に関して IL-23 の p40 サブユニット上で行われたエピトープマッピングは、p40 サブユニットへ検出可能に結合しない)、ヒト IL-23 の p19 サブユニットおよび p40 サブユニットの両方は、酵母ディスプレイプラットフォーム中で共発現されなくてはならない。

30

【0118】

エピトープを同定するために、単一酵母にディスプレイされたヒト IL-23 の p19 サブユニットのアラニン変異体を構築し、抗体結合を決定する。酵母にディスプレイされた野生型抗原に比較した変異体の抗体への親和性を測定することによって、抗体結合へのアミノ酸側鎖のエネルギー的寄与を決定することは可能である。

【0119】

変異体ライブラリー構築

p40 遺伝子は、可溶性発現プラスミド pYKY (ウラシル選択マーカーを有する) の中へクローン化される。p19 サブユニット遺伝子は、酵母ディスプレイプラスミド pEMD3 (N 末でのトリプトファン選択マーカーおよび V5 タグならびにトリプトファン選択可能なマーカー下で酵母の表面上でディスプレイされる C 末での GPD L2 アンカータンパク質を含有する) の中へクローン化される。クローニングのために使用される制限部位は、それぞれ pYKY プラスミド中の XhoI および BamHI ならびに pEMD3 プラスミド中の AvrII および XmaI である。

40

【0120】

アラニン変異をすべての曝露される位置で導入し、V5 抗体および抗体 I により二重陽性染色について試験する。p19 アラニン変異体のパネルは、部位特異的変異誘発 (Knockout 変異誘発) を使用して pEMD3 プラスミドにおいて構築する。簡潔には、CJ

50

236 (New England Biolabs) の中への形質転換後に、pEMD3 ベクターのウラシル含有 ssDNA が産生される。形質転換した単一コロニーを一晩増殖させ、M13K07 ヘルパーファージ (New England Biolabs) による感染後に ssDNA をレスキューし、QIAprep spin M13 kit を使用して ssDNA を精製する。アラニン変異をコードするオリゴヌクレオチドは、85℃ で5分間変性させ、1時間にわたって55℃へ上昇させ、55℃で5分間維持し、次いで氷上で冷却することによって、ウラシルテンプレートへ20:1モル比でアニールさせる。次いで第2の鎖合成は、T4ポリメラーゼ、T4リガーゼおよびdNTPs (Invitrogen) により行う。反応物をTop10大腸菌 (Invitrogen) の中へエレクトロポレーションし、単一コロニーをピックアップし、dsDNAをQIAprepミニプレップキット (Qiagen) を使用して調製し、変異をシーケンシングによって確認する。次いで、p19変異体をp40 pYKYプラスミドと共にBJ5464酵母 (ATCC) に共形質転換し、トリプトファンおよびウラシルなしの完全最少培地中で増殖させる。

10

【0121】

抗原結合の損失についての変異抗原ライブラリーの選択

抗体エピトープを同定するために、変異抗原ライブラリーをフローサイトメトリーによって抗体結合の損失について選択する。酵母細胞を、2つの抗体（そのうちの1つのはマッピングされ、そのうちの1つはされない）により染色する。酵母にディスプレイされた抗原変異体は、第1の抗体への結合は損失しているが第2の抗体への結合は保持していることについて選択する。第2の抗体の結合が保持されていることは、変異体がエピトープ中の変異に基づいて選択されており、折畳まれないかまたは提示が不十分である変異体を選択しているのではないことを保証する。

20

【0122】

本分析のために、第1の抗体（すなわちそのエピトープがマッピングされる抗体）は抗体Iであり、第2の抗体は抗V5の抗体である。酵母は、初めに抗V5抗体 (Invitrogen) および抗体I、続いて抗V5抗体（発現/ディスプレイ）を検出するために二次ヤギ抗マウスIgG_{2a} (Invitrogen, Alexa Fluor (登録商標) 647) および抗体Iを検出するためにヤギ抗ヒトκRPE (Southern Biotech) により染色する。酵母はBecton Dickinson LSRII上でのフローサイトメトリーによって分析し、光散乱 (V5/Alexa647および抗体I/PE染色) による細胞のゲーティングに基づいて50,000イベントを収集する。各々の抗体Iおよび抗V5の抗体の結合についてのデータ解析は、FACS Diva v6.1.2ソフトウェア（二重染色された酵母細胞のパーセンテージを計算する）を使用して行う。

30

【0123】

結果

提示されたタンパク質分割に起因して、最もよい時で酵母の50%がIL-23 p19をディスプレイするだろう。二重陽性酵母細胞の検出は、調査中のアミノ酸位置がIL-23への抗体Iの結合と関連しないことを実証する。V5染色のみの検出は、タンパク質が発現されて酵母の表面にディスプレイされ、かつ調査中のアミノ酸位置が抗体Iの結合のために重要であることを実証する。隣接した残基に比較して二重陽性染色において>50%の減少を実証した残基が、結合のために重要であると決定する。これらの残基は表7中で強調される。いくつかの位置はV5および抗体Iの結合の両方の欠如を実証し、アミノ酸残基はタンパク質立体配座について必要かもしれないことを示唆する。IL-23 p19サブユニット（配列番号15）中の各々の曝露されるかまたは部分的に曝露されるアミノ酸位置の体系的調査は、V5および抗体Iの結合についての二重陽性染色の量の減少に基づいて、位置94P、95S、97L、98P、99D、123W、130S、133Pおよび137WがヒトIL-23へ抗体I結合のために重要であることを実証する（表7）。

40

50

【0124】

エピトープマッピングは水素-重水素交換を使用しても行う。この水素-重水素交換エピトープマッピングの結果は、抗体 I のエピトープがヒト IL-23 の残基 81～99 および 115～140（配列番号 15）内の立体配座のエピトープであることを例証する。

【表 7-1】

表 6：成熟ヒト IL-23 p19 サブユニットの曝露されたアミノ酸または部分的に曝露されたアミノ酸の配列

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
アミノ酸	R	A	V	P	G	G	S	S	P	A
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x	x	x	x		x
位置	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
アミノ酸	W	T	Q	C	Q	Q	L	S	Q	K
曝露された/部分的に曝露された		x	x		x	x	x		x	x
位置	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
アミノ酸	L	C	T	L	A	W	S	A	H	P
曝露された/部分的に曝露された			x	x			x		x	x
位置	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
アミノ酸	L	V	G	H	M	D	L	R	E	E
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
位置	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
アミノ酸	G	D	E	E	T	T	N	D	V	P
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x	x	x	x		x
位置	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
アミノ酸	H	I	Q	C	G	D	G	C	D	P
曝露された/部分的に曝露された			x		x	x	x		x	
位置	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
アミノ酸	Q	G	L	R	D	N	S	Q	F	C
曝露された/部分的に曝露された	x	x		x	x	x		x	x	
位置	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
アミノ酸	L	Q	R	I	H	Q	G	L	I	F
曝露された/部分的に曝露された		x	x			x			x	x
位置	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
アミノ酸	Y	E	K	L	L	G	S	D	I	F
曝露された/部分的に曝露された		x	x	x		x	x	x		

10

20

30

40

【表 7 - 2】

位置	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
アミノ酸	T	G	E	P	S	L	L	P	D	S
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
位置	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
アミノ酸	P	V	G	Q	L	H	A	S	L	L
曝露された/部分的に曝露された			x	x		x	x	x		x
位置	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
アミノ酸	G	L	S	Q	L	L	Q	P	E	G
曝露された/部分的に曝露された	x			x	x		x		x	x
位置	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
アミノ酸	H	H	W	E	T	Q	Q	I	P	S
曝露された/部分的に曝露された	x	x		x	x	x	x	x	x	x
位置	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
アミノ酸	L	S	P	S	Q	P	W	Q	R	L
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
位置	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
アミノ酸	L	L	R	F	K	I	L	R	S	L
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x			x		
位置	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
アミノ酸	Q	A	F	V	A	V	A	A	R	V
曝露された/部分的に曝露された							x	x	x	x
位置	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
アミノ酸	F	A	H	G	A	A	T	L	S	P
曝露された/部分的に曝露された	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

10

20

30

【表 8】

表 7 : 抗体 I についてのエピトープマッピングデータ

アミノ酸位置	二重陽性染色(V5 および抗体 I)の%
87	26
88	27
91	37
92	29
94	16
95	12
96	35
97	7
98	10
99	7
100	22
118	31
119	28
120	26
121	28
122	31
123	5
124	26
125	18
126	22
127	25
129	21
130	4
133	1
134	16
136	15
137	2
140	23

【0125】

I L-23 抗体の物理化学的特性

抗体 I は医薬的に許容可能な可溶性、化学的安定性および物理的安定性を有する。

A. 可溶性

十分に高い可溶性が好都合な用量を可能にするために所望される。例えば、100 kg の患者への 1.0 mL 注射によって投与される 1 mg/kg の用量は、100 mg/mL の可溶性を必要とするだろう。加えて、高濃度で高分子量 (HMW) 凝集なしにモノマー状態で抗体を維持することも所望される。

【0126】

抗体 I は、生理的な緩衝液 (PBS、pH 7.4) 中で、2つの薬剤製品製剤条件 (10 mM クエン酸塩、pH 6、150 mM NaCl 有りおよび無し) 下でおよそ 1 mg/

10

20

30

40

50

mLで製剤化される。抗体をAmicon Ultra 30kDa分子量フィルター（Millipore、UFC803204）を介して2000×Gで遠心分離して、同じ緩衝液条件を維持しながら抗体を濃縮する。装置の溶解限度または最小のホールドアップ体積が達成されるまで、遠心分離を継続する。100mg/mLを超える可溶性が3つのすべての条件下で達成される。

【0127】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して、高分子量（HMW）ポリマーの増加が100mg/mLを超える抗体製剤の濃度に後続して起こったかどうかを査定する。出発の抗体溶液および濃縮された抗体溶液を、12mMリン酸塩、500mM NaCl、pH7.4からなる移動相を使用してTSK3000 SWXLカラム（TOSOH Bioscience）の上に注入する。可溶性ポリマーの大きな増加は試験された任意の製剤条件下で観察されない（SECによって<0.6%のHMWポリマー）。 10

【0128】

B. 化学的安定性

抗体Iを10mM緩衝液（pH4、5、6および7について10mMクエン酸塩；pH8について10mM TRIS）中の1mg/mLで製剤化し、4、25または40℃で4週間インキュベーションする。化学的安定性は、SEC（上述の方法を参照）、陽イオン交換クロマトグラフィー〔CEX；ダイオネックス、緩衝液A（20mMリン酸ナトリウム（pH5.8）および0.36%CHAPS）と緩衝液B（20mMリン酸ナトリウム（pH5.8）、0.36%CHAPS、200mM塩化ナトリウム）との間の勾配を使用して〕、CE-SDS（Agilent Bioanalyzer、還元条件下でタンパク質230チップによる）および酵素消化された材料のLC-MS特徴づけによって、モニターする。 20

【0129】

抗体Iは、40℃で4週間後でさえpH5～8にわたりポリマー形成（SEC）に対して安定的である。pH4では、有意なポリマーは25℃で観察されないが40℃で観察される（4週間）。予想されるペプチド結合の加水分解または短縮は、CE-SDSによってpH4（40℃）で明白である。pH4.0での分解レベルはIgG₄抗体に特有である。pH4より上（pH5～8）では、レベルは低く時間とともに一貫して変化せず、したがって恐らくバックグラウンドノイズを表わす。 30

【0130】

この仮説は、pH6で短縮を検出しないがpH4で典型的なレベルの抗体短縮を測定するLC-MS分析と一致する。チャージしたバリエーションにおける変化をCEXによってモニターする。出発材料は、このアッセイの解像力を最小化にする3つの有意な主要なピークからなる。一般に、25℃および40℃でストレスをかけたサンプルは4℃対照よりも高いが、レベルはインキュベーション時間と共に増加しなかった（実際に多くの事例において減少した）。pH6.0でのパーセント変化（4週間の25℃対照マイナス4℃対照）は2.5%である。LC-MS分析から、大部分の修飾がCDR領域の外部であり他のIgG₄抗体に特有なレベルであることが示される。CDR内の3つの分解部位が同定され、1%未満で変化する（pH6；4週間の25℃対照マイナス4℃対照）。CDR内の分解部位の欠如は、pH4、6、または8のいずれかでの40℃の4週間のインキュベーション後に、BIACore親和性または化学量論において有意な変化がないこととも一致する。 40

【0131】

C. 物理的安定性

i) 凍解安定性

抗体Iは以下の条件下で製剤化される。

a) 10mMクエン酸塩（pH6.0）中で1mg/mL；

b) 10mMクエン酸塩（pH6.0）、0.02%ツイーン80中で1mg/mL；

c) 10mMクエン酸塩（pH6.0）、150mM NaCl中で1または50mg 50

／mL；および

d) 10mMクエン酸塩 (pH 6.0)、150mM NaCl、0.02%ツイーン80中で1または50mg/mL。

【0132】

これらの製剤を1℃/分で制御される凍結コンテナ (Nalgene、5100-0001) 中に配置し、-80℃で少なくとも8時間フリーザー中で凍結し、次いで取り出し、少なくとも室温で8時間融解する。この凍結／融解サイクルを最大3回反復する。サンプルを1回および3回の凍結融解サイクル後に取り出し、SEC (上述のパートA中で記載されるSEC方法を参照) によってHMWポリマーおよびHIAc粒子計数器 (低体積アタッチメントを備えたPacific Scientificモデル9703) によって不溶性の粒子形成について分析する。HMWポリマー形成における有意な増加は、試験された任意の条件下での3回の凍結融解サイクル後に観察されない。1mg/mLの製剤について、HIAc粒子カウントにおける有意な増加がツイーン80非含有製剤中でのみ観察される。50mg/mLで、粒子カウントは他のよく動作するIgG₄抗体に特有なものであり、粒子カウント (>10ミクロン) はツイーン80なしでおよそ1500カウント/mLで、ツイーン80ありでおよそ280へ低下した。

10

【0133】

i i) 高濃度での静的保持

抗体は以下の条件下で50mg/mLの製剤である。

a) 10mMクエン酸塩 (pH 6.0)、150mM NaCl；および

b) 10mMクエン酸塩 (pH 6.0)、150mM NaCl、0.02%ツイーン80。

20

【0134】

これらの製剤を4℃および25℃で4週間静的に保持する。HIAc粒子カウントにおける変化 (低体積アタッチメントを備えたPacific Scientificモデル9703) を4週間後に25℃で測定する。

【0135】

Tween含有製剤についてのHIAc粒子カウント (>10ミクロン) は平均290カウント/mL (270および310) であり、Tweenなしの製剤について804カウント/mL (728および880) と中程度に高い。これらの結果は良好な物理的安定性を示す他のIgG₄抗体に特有である。これらの2つの製剤を標準プラスチックエペンドルフチューブの代わりにガラス中でも保存した。ガラス中で保存されたサンプルについての粒子カウントは4～8倍低い (Tweenの存在および非存在下で、それぞれの平均で35および191カウント/mL)。

30

配列表

重鎖CDR

配列番号1	gykftryvmh
配列番号2	yinpynDgtynyekfkg
配列番号3	ARnwdtgl

40

軽鎖CDR

配列番号4	kasdhilkFlT
配列番号5	gatslEt
配列番号6	qmywstpft

重鎖可変領域

配列番号7 (抗体I)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYKFTRYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAY

50

MELSSLRSED TAVYYCARNWDTGLWGQGT TTVTVSS

軽鎖可変領域

配列番号 8 (抗体 I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHILKFLTWYQQKPGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQMYWSTPFTFGGGTKVEIK

完全な重鎖

配列番号 9 (抗体 I)

10

qvqlvqsgaevkkpgssvkvscasgykft tryvmhwvrqapggglewmgy inpynDgt nynefkgrvt i t adkst stay
melsslrsedtavyycarnwdt glwgqgt tvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswnsa
l tsgvhtfpav lqssg l yslssvvtvpssslgtktytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcpapeaaggpsvflfpp
kpkdt l m i s r t p e v t c v v d v s q e d p e v q f n w y v d g v e h n a k t k p r e e q f n s t y r v v s v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n
k g l p s s i e k t i s k a k g p p r e p q v y t l p p s q e m t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f
l y s r l t v d k s r w q e g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s l g

完全な軽鎖

配列番号 10 (抗体 I)

20

d i q m t q s p s s l s a s v g d r v t i t c k a s d h i l k f l t w y q q k p g k a p k l l i y g a t s l e t g v p s r f s g s g s g t d f t l t i s s l q p
e d f a t y y c q m y w s t p f t f g g g t k v e i k r t v a a p s v f i f p p s d e q l k s g t a s v v c l l n n f y p r e a k v q w k v d n a l q s g n s q
e s v t e q d s k d s t y s l s s t l t l s k a d y e k h k v y a c e v t h q g l s s p v t k s f n r g e c

ヌクレオチド配列

重鎖可変領域

配列番号 11 (抗体 I)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATA
TAAATTCACCTCGTTATGTTATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATTAATCCTT
ACAATGATGGTACTAATACTACAATGAGAAAGTTCAAAGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACTGGGACACAGGCCTCTGGGGCCA
AGGCACCACTGTCACAGTCTCCTCA

30

ヌクレオチド配列

軽鎖可変領域

配列番号 12 (抗体 I)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTGA
CCACATTCTCAAATTTTAACTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCAACCAGTT
TGGAACCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAATGTATTGGAGTACTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAGGTGGAAATAAA
A

40

ヌクレオチド配列

完全な重鎖

配列番号 13 (抗体 I)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATA

50

TAAATTCACCTCGTTATGTTATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATATATTAATCCTT
 ACAATGATGGTACTAATACTACAATGAGAAAGTTCAAAGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAACTGGGACACAGGCCCTCTGGGGCCA
 AGGCACCACTGTACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
 CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
 CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
 CTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
 AGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCCCA
 AAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGA
 GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA
 CGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCC
 CCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
 GCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

10

ヌクレオチド配列

完全な軽鎖

配列番号 14 (抗体 I)

20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCAAGTGA
 CCACATTCTCAAATTTTTAACTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGAACCAAGTT
 TGGAAACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
 GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAATGTATTGGAGTACTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAGGTGGAAATAAA
 ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT
 GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG
 GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
 AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
 TGC

30

タンパク質配列

成熟ヒト I L - 23 p 19 サブユニットアミノ酸配列

配列番号 15

RAVPGSSPAWTQCQQLSCLKLCTLAWSAHLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIF
 YEKLLGSDIFTGEPSSLPPSPVGLHASLLGLSLLQPEGHHWETQQIPSLSPSPWQRLRLRKFILRSLQAFVAVAAARV
 FAHGAATLSP

本発明は以下を提供する。

40

[1]

軽鎖および重鎖を含む、ヒト I L - 23 の p 19 サブユニットへ結合する抗体であって、
 軽鎖が軽鎖可変領域 (L C V R) を含み、重鎖が重鎖可変領域 (H C V R) を含み、 L
 C V R がアミノ酸配列 L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、H C V R がアミ
 ノ酸配列 H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、L C D R 1 が配列番号 4 であ
 り、L C D R 2 が配列番号 5 であり、L C D R 3 が配列番号 6 であり、H C D R 1 が配列
 番号 1 であり、H C D R 2 が配列番号 2 であり、H C D R 3 が配列番号 3 である、抗体。

[2]

前記軽鎖が軽鎖可変領域 (L C V R) を含み、前記重鎖が重鎖可変領域 (H C V R) を
 含み、該 L C V R のアミノ酸配列が配列番号 8 であり、該 H C V R のアミノ酸配列が配列

50

番号 7 である、請求項 1 に記載の抗体。

[3]

2 つの軽鎖可変領域 (L C V R) および 2 つの重鎖可変領域 (H C V R) を含み、各々の L C V R のアミノ酸配列が配列番号 8 であり、各々の H C V R のアミノ酸配列が配列番号 7 である、請求項 2 に記載の抗体。

[4]

前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 1 0 であり、前記重鎖のアミノ酸配列が配列番号 9 である、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

[5]

2 つの軽鎖および 2 つの重鎖を含み、各々の軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 1 0 であり、各々の重鎖のアミノ酸配列が配列番号 9 である、請求項 4 に記載の抗体。

[6]

アミノ酸配列の配列番号 1 0 を有する軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、DNA 分子。

[7]

アミノ酸配列の配列番号 9 を有する重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、DNA 分子。

[8]

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[9]

前記重鎖可変領域 (H C V R) が配列番号 1 1 によってコードされ、前記軽鎖可変領域 (L C V R) が配列番号 1 2 によってコードされる、請求項 8 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

[1 0]

前記重鎖が配列番号 1 3 によってコードされ、前記軽鎖が配列番号 1 4 によってコードされる、請求項 8 または 9 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

[1 1]

前記ポリヌクレオチドが発現制御配列へ作動可能に連結される、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[1 2]

請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[1 3]

請求項 6 に記載の DNA 分子および請求項 7 に記載の DNA 分子を含む組換え宿主細胞であって、その細胞が重鎖および軽鎖を含む抗体を発現でき、該重鎖がアミノ酸配列番号 9 を含み、該軽鎖がアミノ酸配列の配列番号 1 0 を含む、組換え宿主細胞。

[1 4]

請求項 8 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドにより形質転換された組換え宿主細胞であって、その細胞が重鎖および軽鎖を含む抗体を発現でき、該重鎖のアミノ酸配列が配列番号 9 であり、該軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 1 0 である、組換え宿主細胞。

[1 5]

前記宿主細胞が、CHO 細胞、NSO 細胞、HEK 2 9 3 細胞および COS 細胞からなる群から選択される哺乳動物宿主細胞である、請求項 1 3 または請求項 1 4 に記載の組換え宿主細胞。

[1 6]

重鎖および軽鎖を含む、ヒト IL-23 の p 1 9 サブユニットへ結合する抗体を産生するプロセスであって、該重鎖はアミノ酸配列の配列番号 9 を含み、該軽鎖はアミノ酸配列の配列番号 1 0 を含み、

a) 前記抗体が発現されるような条件下で請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の組換

10

20

30

40

50

え宿主細胞を培養する工程と、

b) 前記宿主細胞から発現された抗体を回収する工程とを含む、プロセス。

[1 7]

重鎖および軽鎖を含む、ヒト I L - 2 3 の p 1 9 サブユニットへ結合する抗体を産生するプロセスであって、該重鎖のアミノ酸配列が配列番号 9 であり、該軽鎖のアミノ酸配列が配列番号 1 0 であり、

a) 配列番号 9 によって与えられるポリペプチド配列をコードする第 1 のポリヌクレオチド配列および配列番号 1 0 によって与えられたポリペプチド配列をコードする第 2 のポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞を、該ポリペプチド配列が発現されるような条件下で、培養する工程と、

b) 重鎖および軽鎖を含み、該重鎖のポリペプチド配列が配列番号 9 によって与えられ、該軽鎖のポリペプチド配列が配列番号 1 0 によって与えられる抗体を前記宿主細胞から回収する工程と

を含む、プロセス。

[1 8]

請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載のプロセスによって産生される抗体。

[1 9]

請求項 1 ～ 5 および請求項 1 8 のいずれか一項に記載の抗体ならびに 1 つまたは複数の薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む、医薬組成物。

[2 0]

請求項 1 ～ 5 および請求項 1 8 のいずれか一項に記載の抗体の効果的な量をそれを必要とする患者へ投与することを含む患者における自己免疫性病態または炎症性病態を治療または予防する方法であって、該病態が、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される、方法。

[2 1]

請求項 1 ～ 5 および請求項 1 8 のいずれか一項に記載の抗体の効果的な量をそれを必要とする患者へ投与することを含む、患者における癌を治療または予防する方法。

[2 2]

前記癌が、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である、請求項 2 1 に記載の患者における癌を治療する方法。

[2 3]

治療法における使用のための請求項 1 ～ 5 および請求項 1 8 のいずれか一項に記載の抗体。

[2 4]

前記病態が、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、強直性脊椎炎、移植片対宿主病、狼瘡およびメタボリックシンドロームからなる群から選択される、自己免疫性病態または炎症性病態の治療における使用のための請求項 1 ～ 5 および請求項 1 8 のいずれか一項に記載の抗体。

[2 5]

癌の治療における使用のための請求項 1 ～ 5 および請求項 1 8 のいずれか一項に記載の抗体。

[2 6]

前記癌が、メラノーマ、結腸癌、卵巣癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌または胃癌である、請求項 2 5 に記載の使用のための抗体。

【配列表】

0006096938000001.app

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P 3/00
			A 6 1 K 39/395 N

- (72)発明者 ベイドラー, キャサリン ブラウティハム
 アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6-6 2 8 8, インディアナポリス, ピー. オー. ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内
- (72)発明者 ブライト, スチュアート ウィリス
 アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6-6 2 8 8, インディアナポリス, ピー. オー. ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内
- (72)発明者 ジラード, ダニエル スコット
 アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6-6 2 8 8, インディアナポリス, ピー. オー. ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内
- (72)発明者 キクリー, クリスティン ケイ
 アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 6-6 2 8 8, インディアナポリス, ピー. オー. ボックス 6 2 8 8, イーライ リリー アンド カンパニー内

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 2/0 6 1 4 4 8 (WO, A 1)
 特表2 0 1 0-5 1 8 8 5 8 (JP, A)
 特表2 0 0 9-5 0 5 6 7 7 (JP, A)
 特表2 0 0 9-5 0 6 0 4 1 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5/0 0
 C 0 7 K 1 6/0 0
 C A p l u s/REG I S T R Y/MED L I N E/EMBASE/BIOSIS (STN)