

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6513657号
(P6513657)

(45) 発行日 令和1年5月15日 (2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日 (2019.4.19)

(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 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 U

A 6 1 P 17/06 (2006.01)

A 6 1 P 17/06

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

請求項の数 22 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-528824 (P2016-528824)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月27日 (2014.10.27)
 (65) 公表番号 特表2017-502924 (P2017-502924A)
 (43) 公表日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2014/089542
 (87) 国際公開番号 WO2015/070697
 (87) 国際公開日 平成27年5月21日 (2015.5.21)
 審査請求日 平成29年10月2日 (2017.10.2)
 (31) 優先権主張番号 201310580942.7
 (32) 優先日 平成25年11月18日 (2013.11.18)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(73) 特許権者 508209602
 シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティ
 カル カンパニー リミテッド
 SHANGHAI HENGRUI PH
 ARMACEUTICAL CO., L
 TD.
 中華人民共和国 シャンハイ、ミンシン・
 ディストリクト、ウェンジン・ロード N
 o. 279

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-17A結合剤およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 3、配列番号 1 4、および配列番号 1 5 で示されるLCDR1、LCDR2 および LC
 DR3を含む抗体L鎖可変領域；および

配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2 で示されるHCDR1、HCDR2 および HCDR3を
 含む抗体H鎖可変領域を含む、IL-17A抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

抗体L鎖可変領域が更にマウス κ 鎖に由来したL鎖FR領域、またはマウス λ 鎖に由来した
 L鎖FR領域を含む、請求項 1 に記載のIL-17A抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

抗体L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 で示される、請求項 2 に記載のIL-17A抗
 体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

更にマウス κ 鎖に由来したL鎖定常領域、またはλ 鎖に由来したL鎖定常領域を含む、請
 求項 2 に記載のIL-17A抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

抗体H鎖可変領域が更にマウス IgG1に由来したH鎖FR領域、マウス IgG2に由来したH鎖FR
 領域、マウス IgG3に由来したH鎖FR領域、マウス IgG4に由来したH鎖FR領域を含む、請求項
 1 に記載のIL-17A抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

10

20

抗体H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 1 で示される、請求項 5 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

更にマウス IgG1 に由来した H 鎖定常領域、マウス IgG2 に由来した H 鎖定常領域、マウス IgG3 に由来した H 鎖定常領域、マウス IgG4 に由来した H 鎖定常領域を含む、請求項 5 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

抗体L鎖可変領域が更にヒト κ 鎖に由来した L 鎖FR領域、またはヒト λ 鎖に由来した L 鎖FR領域を含む、請求項 1 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

L 鎖FR領域が、アミノ酸配列が配列番号 4 で示されるヒト生殖系列 L 鎖A10 のFR領域、または 0 ~ 10 のアミノ酸変異を有するその変異体である、請求項 8 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

アミノ酸変異が F71Y、K49Y、Y36F および L47W から選択される 1 つ以上である、請求項 9 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

抗体L鎖が配列番号 9 の L 鎖である、請求項 8 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

更にヒト κ 鎖に由来した L 鎖定常領域、またはヒト λ 鎖に由来した L 鎖定常領域を含む、請求項 8 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

H 鎖可変領域が更にヒト IgG1 に由来した H 鎖FR領域、ヒト IgG2 に由来した H 鎖FR領域、ヒト IgG3 に由来した H 鎖FR領域、ヒト IgG4 に由来した H 鎖FR領域を含む、請求項 1 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 14】

H 鎖FR領域が、アミノ酸配列が配列番号 3 で示されるヒト生殖系列 H 鎖VH1-18 のFR領域、または 0 ~ 10 のアミノ酸変異を有するその変異体である、請求項 13 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

アミノ酸変異が A93T、T71A、M48I、V67A、M69L、T73D および S76N から選択される 1 つ以上である、請求項 14 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 16】

H 鎖が配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 で示される H 鎖から選択される、請求項 14 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 17】

更にヒト IgG1 に由来した H 鎖定常領域、ヒト IgG2 に由来した H 鎖定常領域、ヒト IgG3 に由来した H 鎖定常領域、ヒト IgG4 に由来した H 鎖定常領域を含む、請求項 13 に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメントを発現するベクター。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメントをコードするヌクレオチドを含む、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の IL-17A 抗体またはその抗原結合フラグメント；および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体を含む、医薬組成物。

【請求項 21】

IL-17が介在する疾患や障害を治療するための薬物の製造における、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のIL-17A抗体またはその抗原結合フラグメント、または請求項 20 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 22】

疾患が炎症性および自己免疫性疾患から選択され；

該疾患は好ましくは乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、炎症性関節炎である、請求項 21 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

IL-17A結合剤および治療剤としての、特に種々の炎症性または自己免疫性疾患の治療剤としてのその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

インターロイキン17ファミリーのサイトカインは、それぞれIL-17A~IL-17Fと呼ばれている。同時に、それらの受容体のファミリー、IL-17受容体A~IL-17受容体Eも見つかっている。これらのIL-17サイトカインは対応する受容体に結合して、それにより異なる炎症反応を媒介する。

【0003】

20

このファミリーの最も典型的なメンバーはIL-17Aである。感染または傷害部位へ移動するリンパ球はIL-17Aを分泌することができる。一方で、IL-17Aは炎症性サイトカインとケモカインの発現を誘発し、それにより炎症部位へより多くの免疫細胞を補充して、炎症反応を増悪させる；他方で、IL-17Aは組織修復に関与する幾つかの因子の発現を誘起し、それ故該生命体の回復を加速する。自己免疫疾患や癌を患う患者において、インターロイキン17Aは免疫防御応答を増幅し、ホストが感染に抵抗し組織修復する間生命体を防御する効果を有しているが、インターロイキン17Aは高度に発現し、インターロイキン17Aの過剰の発現は種々の炎症性因子の発現を誘起するため、病態を増悪させる役割を果たす。多くの動物実験は、種々の自己免疫疾患の病理学的重症度がインターロイキン17A不足またはインターロイキン17A抗体中和により効果的に抑制できることを証明している。IL-17シグナルが関節リウマチ(RA)、乾癬、クローン病、多発性硬化症(MS)、乾癬疾患、喘息およびループスなどの自己免疫疾患を治療するためのターゲットとして一定の効果を示した証拠がある(非特許文献1; Lubberts et al. 参照)。

30

【0004】

ヒトIL-17は155までのアミノ酸を有するポリペプチドをコードする遺伝子である。該ポリペプチドは19アミノ酸のシグナル配列と132アミノ酸の成熟領域から成っている。17,000Daの相対分子量を持つ、ヒトIL-17Aはホモ二量体またはヘテロ二量体の形で存在する糖タンパクである(非特許文献2)。相同体であるIL-17FはIL-17Aと結合してIL-17A/Fヘテロ二量体を形成することができる。IL-17F(IL-24, ML-1)のアミノ酸配列はIL-17Aのものに対して55%までの類似性を持ち、両者は同じ受容体IL-17Rを有している。IL-17Rは、血管内皮細胞、末梢性T細胞、B細胞、線維芽細胞、骨髄性単球および骨髄間質細胞などの種々の細胞で広範に発現する(非特許文献3~5)。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】CN101001645A

【特許文献2】CN101326195A

【特許文献3】CN101646690A

【非特許文献】

【0006】

50

【非特許文献 1】Aggarwal et al., J.Leukoc.Biol, 71 (1): 1-8 (2002)

【非特許文献 2】Spriggs et al, J.Clin.Immunol, 17: 366-369 (1997)

【非特許文献 3】Kolls et al, Immunity, 21: 467-476 (2004)

【非特許文献 4】Kawaguchi et al, J.Allergy Clin.Immunol, 114 (6): 1267-1273 (2004)

【非特許文献 5】Moseley et al, Cytokine Growth Factor Rev, 14 (2): 155-174 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

インターロイキン17Aの発見から今日まで、特許文献 1 ~ 3 などの種々の抗 IL-17A 抗体が見つかるているが、炎症反応や自己免疫性疾患で IL-17 活性を効果的に減少または除去する種々の改良した抗体を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は高い親和性と長い半減期を持つ抗 IL-17A 抗体を提供する。

本発明は、

配列番号 13、配列番号 14、および配列番号 15 で示されるものから選択される 0 - 3 のLCDR領域から成る抗体L鎖可変領域；および

配列番号 10、配列番号 11、および配列番号 12 で示されるものから選択される 0 - 3 のHCDR領域から成る抗体H鎖可変領域；を含み、

20

抗体L鎖可変領域とH鎖可変領域のCDR領域の数は同時に 0 ではない、IL-17A 結合剤を提供する。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 13 を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 14 を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 15 を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 10 を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 11 を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 12 を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 から選択される 1 つのLCDR領域を含有する。

30

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 から選択される 1 つのHCDR領域を含有する。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 から選択される 2 つのLCDR領域を含有する。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 から選択される 2 つのHCDR領域を含有する。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は、LCDR1のアミノ酸配列が配列番号 13 で示され、LCDR2のアミノ酸配列が配列番号 14 で示され、LCDR3のアミノ酸配列が配列番号 15 で示される、3 つのLCDR領域を含有する。

40

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤は、HCDR1のアミノ酸配列が配列番号 10 で示され、HCDR2のアミノ酸配列が配列番号 11 で示され、HCDR3のアミノ酸配列が配列番号 12 で示される 3 つのHCDR領域を含む。

【0009】

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤では、抗体L鎖可変領域は更にマウスの κ 、 λ 鎖またはそれらの変異体から誘導されたL鎖FR領域を含む。幾つかの実施態様において、抗体L鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 である。さらに、IL-17A 結合剤はマウスの κ 、 λ 鎖またはそれらの変異体から誘導されたL鎖定常領域を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A 結合剤では、抗体H鎖可変領域は更にマウスの IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 またはそれらの変異体から誘導されたH鎖FR領域を含有する

50

。幾つかの実施態様において、抗体H鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号1である。さらに、IL-17A結合剤はマウスのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはそれらの変異体から誘導されたH鎖定常領域を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A結合剤では、その抗体L鎖可変領域は更にヒトのκ、λ鎖またはそれらの変異体から誘導されたL鎖FR領域を含有する。幾つかの実施態様において、抗体L鎖可変領域のL鎖FR領域はヒト生殖系列L鎖A10FR領域であり、そのアミノ酸は配列番号4で示されるかまたはその変異体である。幾つかの実施態様において、抗体L鎖可変領域FR領域の変異体とは0 - 10のアミノ酸変異を持つヒト生殖系列L鎖A10FR領域をいう。幾つかの実施態様において、L鎖可変領域のFR領域変異体におけるアミノ酸変異はF71Y、K49Y、Y36FおよびL47Wから成る群から選択される1以上である。幾つかの実施態様において、抗体L鎖は配列番号9およびその変異体から選択される。さらに、IL-17A結合剤はヒトのκ、λ鎖またはそれらの変異体から誘導されたL鎖定常領域を含む。

本発明の幾つかの実施態様によれば、IL-17A結合剤では、その抗体H鎖可変領域は更にヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはそれらの変異体から誘導されたH鎖FR領域を含有する。幾つかの実施態様において、抗体H鎖可変領域のH鎖FR領域はヒト生殖系列H鎖VH1-18のFR領域であり、そのアミノ酸配列は配列番号3で示されるかまたはその変異体である。幾つかの実施態様において、抗体H鎖可変領域のFR領域変異体とは0 - 10のアミノ酸変異を持つヒト生殖系列H鎖VH1-18をいう。幾つかの実施態様において、H鎖可変領域のFR領域変異体におけるアミノ酸変異はA93T、T71A、M48I、V67A、M69L、T73DおよびS76Nから成る群から選択される1以上である。幾つかの実施態様において、抗体H鎖は配列番号5、配列番号6、配列番号7および配列番号8から選択される。さらに、IL-17A結合剤はヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはそれらの変異体から誘導されたH鎖定常領域を含む。

【0010】

さらに、本発明の幾つかの実施態様によれば、上記IL-17Aを発現するベクターが提供される。ベクターでトランスフェクトした後、宿主細胞はIL-17A結合剤を発現して分泌する。

本発明の幾つかの実施態様によれば、ベクターは本発明のIL-17A結合剤をコードするヌクレオチドから成る。

さらに、本発明の幾つかの実施態様によれば、上記のIL-17A結合剤および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体を含有する、医薬組成物が提供される。

さらに、幾つかの実施態様によれば、本発明はIL-17が介在する疾患や障害の治療のための薬物の製造における、上記IL-17A結合剤、またはそれを含む医薬組成物の使用をも提供する。該疾患は炎症性または自己免疫疾患である；該疾患は乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、炎症性関節炎から選択される；炎症性疾患は好ましくは炎症性関節炎である。炎症性関節炎は変形性関節炎、関節リウマチ、リウマチ性関節炎または骨粗鬆症から選ばれ、好ましくはリウマチ性関節炎である。

幾つかの実施態様によれば、本発明はIL-17が介在する疾患や障害の治療のための薬物の製造における、上記IL-17A抗体、またはそれを含む医薬組成物の使用をも提供する。該疾患は炎症性または自己免疫疾患である。該炎症性疾患は好ましくは炎症性関節炎である。炎症性関節炎は変形性関節炎、関節リウマチまたは骨粗鬆症から選ばれる。

幾つかの実施態様によれば、本発明はまた、上記IL-17A結合剤またはヒト化IL-17A抗体またはそれを含む医薬組成物の治療上の有効量をそれを必要とする患者に投与することを含む、IL-17によって媒介される疾患や障害の治療方法も提供する。

【0011】

本発明がより容易に理解できるように、一定の技術的、科学的用語を以下に具体的に定義する。本明細書のどこかで具体的に定義されていない場合は、本明細書で用いた全ての他の技術的、科学的用語は本発明の属する技術分野における当業者に一般的に理解されている意味を有する。

【0012】

I. 用語

本明細書において、アミノ酸についての一文字コードおよび三文字コードはJ. Biol. Chem., 243, (1968) p3558に記載されている通りである。

本明細書において、「結合剤」とは標的に結合することができる可溶性の受容体またはフラグメントまたはそれらの類縁体、または抗体またはそれらのフラグメントまたはそれらの類縁体をいう。本発明の「IL-17A結合剤」とは、IL-17Aを特異的に認識してIL-17Aに結合することができる抗体またはフラグメントまたはそれらの類縁体をいう。

用語「IL-17A」とは、一般的に天然または組換え型ヒトIL-17A、およびヒトIL-17Aの非ヒト相同体をいう。特に示さない限り、IL-17Aホモ二量体の分子量をIL-17Aのモル濃度を計算するために採用した(例えば、ヒトIL-17Aに対して30KDa)。

本明細書において、「抗体」とは、ジスルフィド結合を介して結合した2つの同一のH鎖と2つの同一のL鎖から成る4つのペプチド鎖構造を持つ免疫グロブリンをいう。免疫グロブリンH鎖定常領域は異なるアミノ酸成分と配列を示し、それ故異なった抗原性を示す。従って、免疫グロブリンは5つのカテゴリーに分けられ、または免疫グロブリンアイソタイプ、即ちIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEと呼ばれている。ヒンジ領域のアミノ酸成分と数およびH鎖ジスルフィド結合の位置により、同じカテゴリーのIgはさらに異なるサブタイプに分けられ、例えばIgGはIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に分けることができる。L鎖は異なる定常領域によりκまたはλ鎖に分けられる。

抗体HおよびL鎖のN末端近くの約110のアミノ酸配列の領域は大きく変化し、可変領域(V領域)として知られている; C末端近くの残りのアミノ酸配列の領域は比較的安定していて、定常領域(C領域)として知られている。可変領域は3つの高頻度可変領域(HVR)と4つの比較的保存されたFR領域(FR)から成る。3つの高頻度可変領域は抗体の特異性を決定し、相補性決定領域(CDR)としても知られている。各L鎖可変領域(LCVR)および各H鎖可変領域(HCVR)は3つのCDR領域と4つのFR領域から構成されていて、アミノ末端からカルボキシル末端への配列順序は: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4である。3つのL鎖CDR領域、即ちL鎖高頻度可変領域(LCDR)はLCDR1、LCDR2、およびLCDR3をいい; 3つのH鎖CDR領域、即ちH鎖高頻度可変領域(LCDR)はHCDR1、HCDR2およびHCDR3をいう。本発明における抗体または抗原結合フラグメントのLCVRおよびHCVRにおけるCDR領域のアミノ酸残基の数と位置は公知のKabatナンバリング基準(LCDR1-3、HCDE2-3)に従うか、またはkabatとchothiaナンバリング基準(HCDR1)に従う。

【0013】

本明細書において、「抗原結合フラグメント」とは、抗原結合活性を持つFabフラグメント、Fab' フラグメント、F(ab')₂フラグメントまたは単一Fvフラグメントをいう。Fv抗体はH鎖可変領域、L鎖可変領域および全ての抗原結合サイトから成り、定常領域を持たない最小の抗体フラグメントである。一般に、Fv抗体はさらにVHとVLの間のポリペプチドリンカーを含んでいて、抗原結合に必要な構造を形成することができる。

本明細書において、本発明の用語「抗原決定基」とは、抗原上に分散していて、本発明の抗体または抗原結合フラグメントによって認識される、三次元の部位をいう。

「投与」および「処置」とは、それらを動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、または生体液に適用する場合、動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官、または生体液を外來の薬物、治療剤、診断剤、または組成物と接触させることをいう。「投与」および「処置」とは、例えば、治療、薬物動態、診断、研究および実験方法とも言える。細胞の処置は、体液が細胞と接触している場合、体液を薬剤と接触させることだけでなく、細胞を薬剤と接触させることも包含する。「投与」および「処置」は、また、薬剤、診断または結合組成物による、または他の細胞による、例えば細胞のin vitroおよびex vivo処置をも意味する。「処置」は、ヒト、獣医学、または研究対象に適用する場合、研究や診断への応用のための治療処置、予防または防止処置をいう。「処置」は、ヒト、獣医学、または研究対象、または細胞、組織、または器官に適用する場合、ヒトまたは動物対象、細胞、組織、生理的コンパートメント、生理液をIL-17AアゴニストまたはIL-17Aアンタゴニストと接触させることを包含する。「細胞の処置」は、またIL-17AアゴニストまたはIL-17AアンタゴニストがIL-17A受容体と、例えば液相またはコロイド相中で接触している場合も含み

、アゴニストまたはアンタゴニストが細胞又は受容体と接触していない場合も含む。

「治療する」とは、本発明のいずれかの結合化合物を含有する組成物などの治療剤を内用または外用で該薬剤が治療活性を有することが知られている1以上の疾患症状を有する患者に投与することを意味する。典型的には、薬剤は臨床的に測定できる程度にそのような症状の退行を誘起するかまたは進行を抑制することによって、治療される患者や集団の1以上の疾患症状を緩和するのに有効な量で投与される。何らかの特定の疾患症状を緩和するのに有効である治療剤の量（「治療上の有効量」ともいう）は疾患の状態、年齢、および患者の体重、および患者の望ましい応答を引き出す薬物の能力などの種々の因子により異なる。

【0014】

ここでヒトIL-17Aタンパクの4つの変異体について述べる：

1) 本明細書で、用語「ヒトIL-17A(huIL-17A)」および「天然ヒトIL-17A」とは、受入番号NP_002181およびAAT22064を持つヒトIL-17Aタンパクの成熟型（即ち、残基24-155）、および天然起源の変異体およびそれらの多型をいう。

2) 本明細書で、用語「rhIL-17A」とは、遺伝子組換えヒトIL-17Aをいい、この命名法はIL-17Aの種々の型を言及するのに簡便のために採用し、文献における用法にマッチしないかもしれない。

3) 本明細書で、用語「His-huIL-17A」とは、Hisタグが付加したN末端をもった遺伝子組換えヒトIL-17Aをいい、「FLAG-huIL-17A」とは、FLAGタグが付加したN末端をもった遺伝子組換えヒトIL-17Aをいう。いくつかの試験において、FLAG-huIL-17Aはビオチン標識されている。

4) 本明細書で述べるR&D SystemsヒトIL-17Aは、R&D Systemsから購入した遺伝子組換えヒトIL-17Aである。

【0015】

本明細書において、用語「モノクローナル抗体」とは、単一細胞に由来するクローンによって分泌された抗体をいう。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一のエピトープに対して作られる。細胞は真核細胞、原核細胞、またはファージクローン細胞株に限られない。

ここでモノクローナル抗体は具体的には、Hおよび/またはL鎖の部分が特定の種に由来する抗体の対応する配列と同一または相同であるかまたは特定の抗体のタイプまたはサブタイプに属し、一方残りの鎖は他の種に由来する抗体の対応する配列と同一または相同であるかまたは他の抗体のタイプまたはサブタイプに属する、「キメラ」抗体、ならびに望みの生物活性を示す限り、そのような抗体のフラグメントが挙げられる。

【0016】

本明細書において、用語「ヒト化抗体」とは、本発明によるマウス抗体の可変部改変型であり、非ヒト抗体（好ましくはマウスのモノクローナル抗体）由来（または実質的に由来）のCDR領域、およびヒト抗体に実質的に由来するFR領域および定常領域を有する；即ち、マウス抗体のCDR領域配列が異なるタイプのヒト生殖系抗体フレームワーク配列に移植されている。そのようなフレームワーク配列は、生殖系抗体遺伝子配列を含む公的なデータベースや出版物から得ることができる。例えば、ヒトH鎖可変領域遺伝子およびL鎖可変領域遺伝子の生殖系DNA配列は、Kabat, EA, etc. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edで見られるだけでなく、ヒト生殖系配列データベース「VBase」（Internet www.mrccpe.com.ac.uk/vbaseで利用できる）でも見ることができる。CDR配列は殆どの抗体-抗原相互作用の原因となっているので、これは天然起源の抗体の特定の特徴を模倣することができる遺伝子組換え抗体を発現する発現ベクターを作成するのに適している。

【0017】

「任意の」または「任意に」は、続く出来事や状況が生じて、必ずしも生じなくてもよいことを意味し、その記載は出来事や状況が生じて、生じなくてもよい場合を含んでいる。例えば、「1-3抗体H鎖可変領域を任意に含む」は、特定の配列を持った抗体H鎖可

10

20

30

40

50

変領域が存在しても、または必ずしも存在しなくてもよく、存在する場合、1, 2 または 3 であることを意味する。

遺伝子組換えDNAでの宿主細胞の形質転換は当該技術分野の当業者によく知られた慣用的な技術により行うことができる。得られた形質転換体は本発明の遺伝子によりコードされたポリペプチドを発現する慣用的な方法を用いることにより培養される。培地は用いる宿主細胞に基づいて種々の慣用の培地から選択できる。宿主細胞は適当な条件下で成長する。

【0018】

II. ヒトIL-17Aに特異的な抗体

本発明は設計された抗IL-17A抗体および関節リウマチ(RA)、変形性関節炎、関節リウマチ骨粗鬆症、炎症性線維症(例、強皮症、肺線維症、および硬変症)、炎症性腸障害(例、クローン病、潰瘍性大腸炎および炎症性腸疾患)、喘息(アレルギー性喘息を含む)、アレルギー、COPD、多発性硬化症、乾癬および癌などの種々の炎症性、免疫性および増殖性疾患を治療するためのそれらの使用を提供する。

モノクローナル抗体を作成するためのどのような適切な方法も本発明の抗IL-17A抗体を作成するために用いられる。例えば、動物レシピエントを、リンクしたまたは、例えば天然起源のIL-17Aホモ二量体、またはそれらのフラグメントで免疫化する。どのような適切な免疫化の方法も用いることができる。そのような方法としては免疫賦活剤、他の免疫賦活薬、繰り返しブースター免疫化、および1以上の免疫化ルートの使用などが挙げられる。

IL-17Aのどのような適切な形態もIL-17Aに特異的な非ヒト抗体の作成のための免疫原(抗原)として用いることができ、抗体はその生物活性でスクリーニングできる。誘発免疫原は連鎖の天然起源ホモ二量体、単一のエピトープまたは複数のエピトープを包含するそれらのペプチドなどの、全長の成熟ヒトIL-17Aでよい。免疫原は単独でまたは当該技術分野で公知の免疫原性増強剤と組み合わせて使用してもよい。免疫原は天然原料または遺伝子組換えの細胞で作成したものから精製してもよい。免疫原をコードするDNAはゲノムまたは非ゲノム(例、cDNA)DNAから誘導できる。適切な遺伝子ベクターが免疫原をコードするDNAを発現させるために用いられ、該ベクターとしては、これらに限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、プラスミド、および非ウイルスベクターが挙げられる。

本発明の抗ヒトIL-17A抗体の代表的製造方法を実施例1で説明する。

【0019】

III. IL-17A特異的な抗体のヒト化

ヒト化抗体はIgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEなどの、どのタイプの免疫グロブリンからも選択することができる。1つの実施態様において、抗体はIgG抗体である。IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含め、どんなIgGのアイソタイプも使用することができる。IgGアイソタイプの変異体もまた考えられる。ヒト化抗体は1以上のタイプまたはアイソタイプから誘導された配列を含んでいる。望みの生物活性を作成するための必要な定常領域の配列の最適化は以下の実施例に記載した生物試験で抗体をスクリーニングすることにより容易に達成できる。

同様に、L鎖のどのようなタイプも化合物および本明細書の方法において使用することができる。具体的には、カッパー(κ)、ラムダ(λ)、またはそれらの変異体は本明細書の化合物および方法において有用である。

本発明の抗ヒトIL-17A抗体の代表的なヒト化方法を実施例2で説明する。

【発明を実施するための形態】

【0020】

発明の詳細な説明

以下、本発明を実施例を参照してさらに説明する；しかしながら、本発明の範囲はそれらに限定されるものではない。

本発明の実施例において、特定の条件が記載されていない場合、試験は慣用的な条件下

10

20

30

40

50

、または物質または製造物製造者により提示されている条件下で一般的に行っている。Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al, Greene Publishing Associates, Wiley Interscience, NY参照。試薬の供給源が具体的に記載されていない場合、試薬は商業的に入手できる慣用の試薬である。

【実施例 1】

【0021】

マウス抗ヒトIL-17Aモノクローナル抗体

ヒトIL-17Aに対するモノクローナル抗体は以下のようにして得た。6-8週令雌BALB/c マウス (Shanghai Super B&K Laboratory Animal Corp. Ltd, laboratory animal producti
on Certificate No: SCXK (HM) 2008-0016) および6-8週令雌SJLマウス (Beijing Weito
ng Lihua Experimental Animal Technology Co. Ltd, laboratory animal production Ce
rtificate No: SCXK (Beijing) 2012-0001) を高用量群と低用量群の2群に分けた。各群
に10匹のBALB/c マウスと10匹のSJLマウスを入れた。

10

高および低用量群は、さらにN末端にHisタグをつけ、そしてHEK293E (293-EBNA, Invit
rogen, Lot Num: 493985) 発現系で作成した天然のhIL-17A変異体 (His-hIL-17A、hIL-17
Aのアミノ酸配列はヒトIL-17AタンパクGenbank受入番号NP-002181参照、得られたタンパ
クはNiアフィニティカラム (Superdex) 75SECで順次精製した) で連続的に免疫化した。
接種は0, 14, 35および56日目に行った。

0日目に、高用量群に皮下 (s.c.) 注射によりHis-huIL-17A、500 µg/マウスを投与し
、同時に腹腔内 (i.p.) 注射によりフロイント完全アジュバント (CFA) を投与した。1
4および35日目に、25 µg/マウスHis-hIL-17Aをs.c. 注射により投与し、同時にフロイ
ント不完全アジュバント (IFA) をi.p. 注射により投与した。56日目に、脾細胞を融合
する前に、生理食塩水に溶解した25 µg/マウスHis-hIL-17Aをi.p. 注射することにより追
加免疫を行った。低用量群の免疫化のタイムスケジュールと方法は、0日目のHis-hIL-17
Aの投与用量は10 µg/マウスであり、14、35、および56日目のHis-hIL-17Aの投与用
量は5 µg/マウスであったことを除き、高用量群のものと同一である。

20

血液試験は22日目と43日目に行った。マウス血清は実施例1に記載のELISA Testに
より試験して血清の抗体価を測定した。56日目に、血清の高い抗体価を持つマウスを脾
細胞融合のために選別した。最適化したPEG媒介融合法を用いて脾臓リンパ細胞を骨髓腫
細胞Sp2/0 cells (ATCC(登録商標)CRL-8287TM) と融合することによりハイブリドーマが
得られた。

30

免疫化の方法は次の通りであった：

スキーム1、高用量、10 Balb/cマウスおよび10 SJLマウス、方法は次の通り：

Day 0	前血 (Pre-blood) サンプルング 15-30 μ L serum/mouse ; 一次免疫 (primary immunization), IP, CFA 50 μ g/mouse
14	Boost 1 (追加免疫 1): IP, IFA 25 μ g/mouse
21	血液サンプルング(15-30 μ L serum/mouse)
22	ELISA テスト
35	Boost 2 (追加免疫 2): IP, IFA 25 μ g/mouse
42	血液サンプルング(15-30 μ L serum/mouse)
43	ELISA テスト
44	データ分析および中間結論
56	融合前追加免疫, IP, 25 μ g/mouse of saline

10

スキーム 2、低用量、方法は次の通り：

Day 0	Pre-blood sampling 15-30 μ L serum/mouse; primary immunization, IP, CFA 10 μ g/mouse
14	Boost 1 (追加免疫 1): IP, IFA 5 μ g/mouse
21	血液サンプルング(15-30 μ L serum/mouse)
22	ELISA テスト
35	Boost 2 (追加免疫 2): IP, IFA 5 μ g/mouse
42	血液サンプルング(15-30 μ L serum/mouse)
43	ELISA テスト
44	データ分析および中間結論
56	融合前追加免疫, IP, 5 μ g/mouse of saline

20

30

【 0 0 2 2 】

得られたハイブリドーマの一次スクリーニングは試験例1の抗原-抗体間接ELISAテストにより行った。モノクローナル細胞株は陽性細胞株の限界希釈により得た。

得られたモノクローナル細胞株は、以下を含めてさらにスクリーニングを行った：

40

1．レセプターブロック試験、試験例 2 参照、結果は表 5 に示した、陽性コントロールより優れているモノクローナル細胞株 IL17-mAb049 をスクリーニングして、得た；

2．親和性試験：試験例 3 参照、結果は表 6 に示したが、本発明でスクリーニングし、得られたモノクローナル細胞株 IL17-mAb049 は陽性コントロールに比べて同等またはより良い活性を示すことが明らかになった。

3．細胞レベルでのバイオアッセイ (GRO α 分析)：試験例 4 参照、結果は表 8 に示したが、本発明でスクリーニングし、得られたモノクローナル細胞株 IL17-mAb049 は陽性コントロールに比べて同等またはより良い活性を示すことが明らかになった。

最初と 2 回目のスクリーニング後に 1 2 のモノクローンをさらに調べた。IL17-mAb049 の 1 つのリードモノクローン (lead mAb) がエピトープグループ化、生物活性試験により

50

選択された。マウスのIL-17Aマウス抗体mAb049 (IL-17mAb) のH鎖 (VH) とL鎖 (VL) の特異的配列は次の通りであった：

IL-17 mAb049 VH 配列番号：1

HVQLQQSGADLVRPGASVTLSCKASGYIFTDYEVHWWKQTPVHGLEWIGVIDPGTGGVAYNQKFEGKATLTADDSSNTAY
MELRSLTSEDSAVYYCTRYSLFYGSSPYAMDYWGQGTSTVTVSS

IL-17mAb049 VL 配列番号：2

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVNYMHWFQKPKGTSPKLWIYRTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAE
DAATYYCQQRSSYPWTFGGGTNLEIK

【実施例2】

【0023】

マウス抗ヒトIL-17A抗体のヒト化

マウス抗ヒトIL-17Aモノクローナル抗体mAb049のヒト化は当該技術分野で公知になっている多くの文献に記載されているものと実質的に同様にして行った。要するに、ヒト定常領域ドメインを用いて親 (マウス抗体) の定常領域ドメインを置換した。ヒト化に用いたヒト生殖系列配列は、マウス抗体とヒト抗体の間の相同性に従って選択した。

1. マウス抗IL-17A抗体のCDR領域

VH/VL CDRアミノ酸残基はKabatナンバリングシステムにより同定し、注釈した。本発明のマウスmAb049のCDR配列は次の表にリストした：

マウス抗IL-17A抗体のCDR配列

【表1】

ドメイン		mAb049	
		配列	配列番号
VH	CDR1	DYEVH	10
	CDR2	VIDPGTGGVAYNQKFEG	11
	CDR3	YSLFYGSSPYAMDY	12
VL	CDR1	SASSSVNYMH	13
	CDR2	RTSNLAS	14
	CDR3	QQRSSYPWT	15

【0024】

2. ヒト生殖系列FR配列の選択

得られたマウス抗体VH/VL CDRの典型的な構造に基づいて、HおよびL鎖可変領域の配列を抗体データベースと比較した。高い相同性を持つヒト生殖系H鎖VH1-18 (配列番号3) とL鎖A10 (配列番号4) が得られ、ヒト化FR配列として用いた。特異的配列は次の通りであった：

VH1-18 配列番号3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAY
MELRSLRSDDTAVYYCAR

A10 配列番号4

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA
EDAATYYCHQSSSLP

【0025】

3. ヒト化抗体のデザイン：

環状構造を形成するアミノ酸残基とVHインターフェイスを決定した。以下の因子を考慮すると、Q1E変異はN末端のピログルタミン酸生成を除去するものであった。変異は、また

10

20

30

40

50

CDRの典型的構造とVH/VL選択したVHインターフェイスを維持し、そしてヒト化構造に存在するN-グルコシル化パターン（N-{P}-S/T）を回避するためにファミリー内で一貫性を維持するものを含んでいる。

マウス抗体mAb049の可変領域におけるヒト化変異のデザインを以下にまとめた：

マウス抗体mAb049にデザインしたヒト化部位

【表 2】

H 鎖にデザインしたヒト化部位		L 鎖にデザインしたヒト化部位	
VH (VH1-18) + JH4/FW4		Vk(A10) + JK2/FW4	
変異タイプ	ヒト化逆突然変異部位	変異タイプ	ヒト化逆突然変異部位
Hu049 VH.1	CDR・移植*	Hu049 Vk.1	CDR・移植*
Hu049 VH.1A	A93T	Hu049 Vk.1A	F71Y
Hu049 VH.1B	A93T, T71A	Hu049 Vk.1B	F71Y, K49Y
Hu049 VH.1C	A93T, T71A, M48I	Hu049 Vk.1C	F71Y, K49Y, Y36F, L47W
Hu049 VH.1D	A93T, T71A, M48I, V67A, M69L, T73D, S76N		

注：例えば、Kabatナンバリングシステムに従い、A93Tは93AからTへの逆突然変異を示す。

*マウス抗体CDRはヒト生殖系列FR配列に移殖したことを示している。

マウス抗体mAb049ヒト化配列

【表 3】

	Hu049 VH.1	Hu049 VH.1A	Hu049 VH.1B	Hu049 VH.1C	Hu049 VH.1D
Hu049 VK.1	Hu049-1	Hu049-2	Hu049-3	Hu049-4	Hu049-5
Hu049 VK.1A	Hu049-6	Hu049-7	Hu049-8	Hu049-9	Hu049-10
Hu049 VK.1B	Hu049-11	Hu049-12	Hu049-13	Hu049-14	Hu049-15
Hu049 VK.1C	Hu049-16	Hu049-17	Hu049-18	Hu049-19	Hu049-20

注：この表は異なる変異の種々の配列組み合わせを示している。例えば、Hu049-8はヒト化マウス抗体mAb049に存在する2つの変異（Hu049 VK.1AおよびHu049 VH.1B）を示す、などである。

4．ヒト化抗体の発現と精製

上記抗体を遺伝子組み換え法によりクローン化し、発現し、そして精製した。良い性能を持つヒト化抗体をELISA、レセプター結合阻害試験、ピアコア、細胞生存率試験等により最終的に選択した。特異的抗体を次の表に示す。

ヒト化IL-17A抗体の構成要素

【表 4】

抗体	H 鎖	配列番号	L 鎖	配列番号
Hu049-17	Hu049-17.VH	配列番号 5	Hu049 VL	配列番号 9
Hu049-18	Hu049-18.VH	配列番号 6		
Hu049-19	Hu049-19.VH	配列番号 7		
Hu049-20	Hu049-20.VH	配列番号 8		

ヒト化抗体mAb049の特定配列を以下にリストする：

Hu049-17.VH 配列番号5
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEHWVRQAPGQGLEWMGVIDPGTGGVAYNQKFEGRVMTTDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCTRYSLFYGSSPYAMDYWGQGLTVTVSS

Hu049-18.VH 配列番号6
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEHWVRQAPGQGLEWMGVIDPGTGGVAYNQKFEGRVMTADTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCTRYSLFYGSSPYAMDYWGQGLTVTVSS

Hu049-19.VH 配列番号7
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEHWVRQAPGQGLEWIGVIDPGTGGVAYNQKFEGRVMTADTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCTRYSLFYGSSPYAMDYWGQGLTVTVSS

Hu049-20.VH 配列番号8
 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEHWVRQAPGQGLEWIGVIDPGTGGVAYNQKFEGRATLTADDSTNTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCTRYSLFYGSSPYAMDYWGQGLTVTVSS

Hu049VL 配列番号9
 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVNYMHWFQKPKDQSPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAE
 DAATYYCQQRSSYPWTFGQGTKLEIKR

【実施例3】

【0026】

ヒト化抗IL-17抗体のin vivo薬物動態および薬力学試験

ヒトIL-17はマウスIL-17受容体に結合して刺激し、雄のマウスKC (CXCL1) においてケモカインの増加とそれに続く分泌に導くことができる。種々の時間と種々の用量での試験を、マウスKCを誘起するためのヒトIL-17の最適用量とベストの時間を同定するために行った(試験例5参照)。これらの試験は150mg/kgのヒトIL-17とIL-17投与後2時間が、マウス血清で最も高いレベルのKCを誘起することを示している。本発明の全長の抗体をヒトIL-17の皮下注射20時間前に3、30、300、3000 μg/kgの濃度でマウスに静脈内投与した。ヒトIL-17投与2時間後に、マウスを屠殺して、市販のキットを用い、製造者の仕様書によるELASA (Mouse CXCL1 / KC Quantikine ELISA Kit, R & D SYSTEM, # SMKC00B) によりKCレベルを測定した。アイソタイプ適合抗体をネガティブコントロールとして用いた。抗体はヒトIL-17の能力をブロックしてマウスIL-17受容体を刺激し、マウスにおいて用量依存的様式でKC増加を阻害する結果をもたらす。無効なコントロール抗体に比べ、本発明の抗体Hu049-18は3000 μg/マウスの用量で平均KCレベルを記載した条件下で約1/6に減少させた。

ラットおよびアカゲザルにおける血清薬力学は本発明の抗体Hu049-18の静脈内または皮下投与後に測定した(試験例6参照)。ラットにおいて、半減期は5mg/kgの静脈内投与後9.91日であり、半減期は5mg/kgの皮下投与後11.5日であった。アカゲザルにおいては、1mg/kgの静脈内投与後24.4日であった。

【試験例】

【0027】

【試験例1】

【0028】

間接ELISA

目的:

間接ELISA法をエピトープの立体構造を認識することができる抗体の選択を確実にし、そして本発明の実施例1のマウスハイブリドーマをスクリーニングするために選択した。

物質:

ヒトIL-17A (hIL-17A) をGenbank Accession No. NP-002181を持つヒトIL-17Aタンパク配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

ヒトIL-17A/F (ヘテロ二量体、hIL-17A/F) をGenbank Accession No. NP-002181を持つヒトIL-17Aタンパク配列およびGenbank Accession No. NP_443104を持つヒトIL-17Fタンパク配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現の

10

20

30

40

50

ため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

陽性コントロールとして、LillyとNovartisの Maus 抗 IL-17 抗体 (Lilly mAb、Novartis mAb) をそれぞれ MS7,838,638B2 (LY 2439821) と MS 7,807,155B2 (AIN 457) に開示の Maus の配列によりクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

Maus 抗体 mAb は本発明の実施例 1 に開示の Maus ハイブリドーマから誘導した。

プロトコール：

1 . マイクロ滴定プレートは 4 で終夜 1 μ g/ml のストレプトアビジンで直接コーティングした；

2 . マイクロ滴定プレートは 2 % BSA (v/v) を含有する 300 μ l の PBST でブロックし、恒温槽で 1 時間 37 でインキュベートした。一方、コーティングしていないウェルはコントロールとしてブロックした；

3 . PBST で 3 回洗浄。全ての洗浄操作は Biotek (Elx 405) automatic washer で行った；

4 . hIL-17A または hIL-17A/F (1 μ g/ml) を含有する PBS 100 μ l を各ウェルに添加し、恒温槽で 1 時間 37 でインキュベートした；

5 . 3 回の PBST 洗浄。

6 . 陽性コントロール Lilly mAb および Novartis mAb または本発明の Maus 抗体 mAb を 1 : 5 の希釈下で滴定した、最初の濃度は 1 μ g / ml である。100 μ l の希釈した陽性コントロールまたは本発明の Maus 抗体を各ウェルに添加し、恒温槽で 1 時間 37 でインキュベートした。各濃度は重複ウェルで滴定した；

7 . 3 回の PBST 洗浄；

8 . 100 μ l の HRP 抗 Maus 二次抗体 (Santa Cruz Cat.No.sc-2005) (1 : 5000) を各ウェルに添加し、恒温槽で 1 時間 37 でインキュベートした；

9 . 3 回の PBST 洗浄。100 μ l の TMB 基質を各ウェルに添加し、恒温槽で 5 分間 37 でインキュベートした。次いで、各ウェルに 100 μ l の 2M H_2SO_4 を添加して反応を停止した。

10 . 450nm 波長での OD 値を ELISA マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Spectra Max) で読み取った。

11 . Maus 抗体 mAb の OD 値を陽性コントロールのものと比較した。IL17-mAb049 が含まれている、1 以上の比率を持つモノクローナル細胞株をスクリーニングした。

【試験例 2】

【0029】

IL-17 受容体ブロック試験

目的：

受容体ブロック試験の目的は IL-17 の IL-17 受容体 (例、hIL-17RA) への結合をブロックすることができる抗体を選別することである。試験は機能検査に基づいており、ハイブリドーマのハイスループットスクリーニングに用いることができる。

物質と機器：

抗ヒト Fc 抗体 (ヤギ抗ヒト IgG-Fc フラグメント特異的抗体 (Jackson ImmunoResearch から入手、109-005-008))

ここで用いたヒト IL-17RA-Fc は、Genbank ID No. ADY18334.1 のヒト IL-17A 受容体アミノ酸配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的に HEK293E 細胞にトランスフェクトした。ここで Fc フラグメントはヒト IgG1 から得た。

陽性コントロールとして、Lilly と Novartis の Maus 抗 IL-17 抗体 (Lilly mAb、Novartis mAb) を MS7,838,638B2 (LY 2439821) と MS 7,807,155B2 (AIN 457) に開示の Maus の配列によりクローン化し、発現のため過渡的に HEK293E 細胞にトランスフェクトした。

mIgG：Maus IgG (Millipore Cat.No.PP54)、ブランクコントロールとして使用した

ELISA プレートリーダー：Molecular Devices, Spectra Max

本発明の実施例 1 から得られた Maus モノクローナル細胞株。

プロトコール：

- 1 . マイクロ滴定プレートは10 μ g/mlの抗ヒトFc抗体で直接コーティングし、4 で終夜インキュベートした；
- 2 . マイクロ滴定プレートは2 %BSA (v/v) を含有する300 μ lのPBSTでブロックし、恒温槽で1時間37 でインキュベートした。一方、コーティングしていないウェルはコントロールとしてブロックした；
- 3 . PBSTで3回洗浄。全ての洗浄操作はBiotek (Elx 405) automatic washerで行った；
- 4 . IL-17 RA-Fc (60ng/ ml)を含有するPBS100 μ lを各ウェルに添加し、恒温槽で2時間37 でインキュベートした；
- 5 . 3回のPBST洗浄。
- 6 . 陽性コントロールLilly mAbおよびNovartis mAbまたは本発明の抗体mAbを1 : 5の比率で希釈し、最初の濃度は40 μ g / mlであった。mIgGを同じ方法で希釈した。50 μ lの希釈した陽性コントロールまたは本発明のマウス抗体またはmIgGを各ウェルに添加し、一方、50 μ lの0.2nM ビオチン標識のIL-17Aを希釈した陽性コントロールまたは本発明の抗体に添加し、穏やかに攪拌して恒温槽で1時間37 でインキュベートした。
- 7 . 3回のPBST洗浄；
- 8 . 100 μ lのHRP標識のストレプトアビジン錯体(1 : 5000)を各ウェルに添加し、恒温槽で1時間37 でインキュベートした；
- 9 . 3回のPBST洗浄。100 μ lのTMB基質を各ウェルに添加し、恒温槽で5分間37 でインキュベートした。次いで、各ウェルに100 μ lの2M H₂SO₄を添加して反応を停止した。
- 10 . 450nm波長でのOD値をELISAマイクロプレートリーダーで読み取った。
- 11 . 試験する抗体のIC₅₀値はIL-17のIL-17受容体への結合のブロックに対して計算した。

IC₅₀値(OD値が50%に減少した時の抗体濃度、即ち、RBA)は、OD値に対する抗体濃度の勾配曲線から得た。

試験結果：

上記の方法に従って、実施例1で得られたハイブリドーマをスクリーニングし、IL17-mAb049と名付けられたマウスモノクローナル抗体を得た、結果は次の通りである：

【表5】

抗体	huIL-17 RBA(nM)
Lilly mAb	0.17
Novartis mAb	1.56
IL17-mAb049	0.07

結論：

ハイブリドーマからスクリーニングしたマウス抗体IL17-mAb049は陽性抗体Lilly mAbおよびNovartis mAbよりも良い活性を示した。

【試験例3】

【0030】

親和性試験

目的：

ピアコア(BIACORE)法を抗原-抗体結合動態および親和性を測定するための試験に用いた。

物質と機器：

1 . 1タンパク：

ヒトIL-17A(hIL-17A)をGenbank Accession No. NP-002181のヒトIL-17Aタンパク配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

ヒトIL-17A/F（ヘテロ二量体、hIL-17A/F）をGenbank Accession No. NP-002181のヒトIL-17Aタンパク配列およびGenbank Accession No. NP_443104のヒトIL-17Fタンパク配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

マウスIL-17A（Mu IL-17A）およびラットIL-17A（Rat IL-17A）を、それぞれGenbank Accession No. NP_034682のマウスIL-17AタンパクおよびGenbank Accession No. NP_00110367のラットIL-17Aタンパクを利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

陽性コントロールとして、LillyとNovartisのマウス抗IL-17抗体（Lilly mAb、Novartis mAb）をそれぞれMS7,838,638B2（LY 2439821）とMS 7,807,155B2（AIN 457）に開示のマウスの配列に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

10

陽性コントロールとして、Lillyヒト化抗IL-17抗体（Lilly mAb(hu)）を、MS7,838,638B2（LY 2439821）に開示のヒト化配列に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

マウスのモノクローナル抗体は本発明の実施例 1 から得た。

ヒト化IL-17抗体は本発明の実施例 2 から得た。

1. 2 ビアコアモデル：BIAcore X 100, GE；

1. 3 ビアコアチップおよび試薬（商品名を以下にリストした、翻訳は認められない）

物質と試薬	会社	製品リスト
1. Sensor Chip CM5 Research Grade	GE Healthcare	BR-1000-14
2. Amine Coupling Kit	GE Healthcare	BR-1000-50
3. HBS buffer BIA Certified	GE Healthcare	BR-1001-88
4. Acetate (100ml)	GE Healthcare	BR-1003-51
5. Mouse Antibody Capture Kit	GE Healthcare	BR-1008-38
6. Regeneration buffer Glycine 1.5	GE Healthcare	BR-1003-54
7. BIA maintenance Kit	GE Healthcare	BR-1006-66

20

30

プロトコール：

1. 本発明の抗体をCM5チップに固定化した：1:1 50mM NHS：200mM EDCを調製し、10 μ l/分の速度でFC2（Flow cell 2）チャンネルに7分間注入してCM5センサーチップを活性化した。本発明の抗体を10mM酢酸ナトリウムバッファーに30 μ g/mlの濃度で溶解し、pH5.0、そして活性化したチップ（HBS-EP移動相バッファー：10mM HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005%界面活性剤P20、pH7.4）に5 μ l/分の速度で注入した。1Mエタノールアミンを10 μ l/分の速度で7分間注入し、残っている活性化カップリング箇所をシールした。約8000 RMが生じた。

40

2. 結合動態試験：FC1（Flow cell 1）をリファレンスチャンネルとして用いた、FC2（Flow cell 2）をサンプルチャンネルとして用いた、マウスまたはヒトコントロール抗体または本発明の抗体を300RMにFC2チャンネルで捕捉し、次いで異なる濃度のIL-17（hIL-17A、MuIL-17、Rat IL-17を含む）を注入した。サイクル条件は：アナライトを全てのFCチャンネルに30 μ l/分で3分間注入し、20分間解離し、表面再生のため10mMグリシン、pH1.5、を60秒間（10 μ l/分の速度で）注入した。捕捉された抗体のシグナルと捕捉された抗体の無いシグナルの間の差をBiacore X100 evaluation software ver 2.0（Biacore）で計算した、ランニングバッファーは10mM Hepes、650mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Tween-20であった。

50

試験結果：

１．上記方法に従って、実施例1で得たハイブリドーマをスクリーニングした、結果は次の通りである。

【表 6】

抗体	ヒト IL-17A□ KD (M)
Lilly mAb	2.18E-11
Novartis mAb	4.24E-10
IL17-mAb049	2.62E-11

10

結論：ハイブリドーマからスクリーニングしたマウス抗体IL17-mAb049の親和性は、陽性抗体Lilly mAbのものと同等であり、Novartis mAbのものよりも良い。

２．上記方法に従って、実施例 2 から得られたヒト化IL-17抗体を試験した、結果は次の通りである。

【表 7】

ヒト化抗体	Human IL-17A□ KD (M)	Mu IL-17 KD (M)	Rat IL-17□KD (M)
Lilly's mAb (hu)	1.48E-11		
Hu049-17	<1pM	1.37E-10	1.06E-09
Hu049-18	<1pM	6.81E-11	4.77E-10
Hu049-19	2.68E-12	7.71E-11	6.00E-11

20

結論：ヒト化抗体の親和性はLillyの陽性抗体（1.48E-11）のものより 1 0 倍増加した。

【試験例 4】

【 0 0 3 1 】

細胞レベルでのバイオアッセイ（GRO α アッセイ）

目的：

以下の試験は抗IL-17A抗体についてHs27細胞からのIL-17刺激によるGRO α の分泌を阻害することにより抗IL-17A抗体の細胞生物活性を検出することを目的とした。

30

物質と機器：

Hs27細胞：ATCC Cat.No.CRL-1634（注：6週間以上培養した細胞はバイオアッセイには推奨できない）；

Hs27細胞培養液：DMEM + 10% FBS

DMEM：ATCC Cat.No.30-2002；

FBS：GIBCO Cat.No.10099、lot 8122818；

組換えヒトIL-17A（rhIL-17A）：R&D Systems Cat.No.317-ILB、lot SOA161109B；

組換えヒトIL-17A/F（rhIL-17A/F）：R&D System Cat No.5194-IL/CF、lot RXT101109A

；

ヒトCXCL1/GRO α Quantikine PharmPak kit：R&D system Cat. No. PDGR00

機器：Biotek ELx808 microplate reader。

本発明の実施例1から得られたマウスモノクローナル細胞株。

本発明の実施例 2 から得られたヒト化IL-17抗体。

40

プロトコール：

１．Hs27細胞培養：

Hs27細胞をT175フラスコ中で50mlのDMEM +10%FBS培地で培養した；細胞（約90%の密度）は3日毎に1：3の比率で希釈培養した；細胞は1ヶ月以内にバイオアッセイに使用するか、または液体窒素から再解凍した；再解凍した細胞はバイオアッセイ前にほぼ一週間培養すべきである。

50

2. バイオアッセイ試験方法 (IL-17A)

2. 1 Hs27細胞を950rpmで4分間遠心分離して(トリプシン-EDTAの完全な除去)、集めた。細胞生存率はトリパンブルー染色により分析し、80%以上の生存率を持つ細胞のみを試験に用いた；

2. 2 培地を50 μ l/ウェルで96穴プレートに添加した；

2. 3 Hs27細胞をDMEM +10%FBSで希釈し、10000 細胞/50 μ l/ウェルの密度で96穴プレートに添加した；

2. 4 25 μ lのIL-27ヒト抗体を各重複ウェルに添加した；抗体は最初の濃度の10nMで1:3の比率で希釈した；

2. 5 25 μ lの組換えヒトIL-17Aを最終濃度0.3nMで各ウェルに添加した。96穴プレートは500rpmで1分間遠心分離した；

2. 6 細胞は恒温槽で17時間37℃でインキュベートした。

2. 7 細胞培養の上澄みを集め、上澄み中のGRO α の濃度をヒトCACL1/GRO α Quantikine kitにより検出した(製造者のインストラクションに従う)；

3. バイオアッセイ試験方法 (IL-17A/F)

IL-17A/Fバイオアッセイの方法は、IL-17AをIL-17A/Fで置き換えた以外は、IL-17Aバイオアッセイのものと同様である。

試験結果：

1. 上記方法に従って、実施例1で得られたハイブリドーマをスクリーニングした、結果は次の通りである。

【表8】

抗体	huIL-17 Bioassay (IC ₅₀ , nM)	huIL-17A/F Bioassay (IC ₅₀ , nM)
Lilly mAb	0.04	0.69
Novartis mAb	0.22	1.15
IL17-mAb049	0.04	0.46

結論：ハイブリドーマから得られた抗体IL17-mAb049の生物活性は、陽性抗体Lilly mAbのものと同等であり、Novartis mAbのものより良い。

2. 上記方法に従って、実施例2で得られたヒト化抗体を検出した、結果は次の通りである。

【表9】

抗体	huIL-17 Bioassay (IC ₅₀ , nM)	huIL-17A/F Bioassay (IC ₅₀ , nM)	Cyno IL-17A
Lilly's mAb (hu)	0.033	0.83	
Hu049-17	0.061	0.406	0.03
Hu049-18	0.04	0.684	0.033
Hu049-19	0.066	0.411	0.039
Hu049-20	0.065	0.674	0.028

結論：これらの結果は、全てのヒト化抗体が細胞生物活性を示すことを示している。Hu049-17、18、19および20は陽性抗体のもの(0.04nM)と同様のIC₅₀(0.04nM-0.066nM)を有

している。また、これらの抗体はカニクイザルIL-17Aと交差反応を示す（IC₅₀は0.03nM-0.039nMである）。ヒトIL-17A/Fに対する活性はIL-17Aに対するものより10倍弱い。

【試験例5】

【0032】

ヒトIL-17のin vivo中和試験

目的：in vivo中和試験の目的は、本発明の抗体がin vivoでIL-17のIL-17受容体（例、hIL-17RA）への結合をブロックし、それによりIL-17により誘起されたCXCR1発現を阻害することができることを検証することである。

物質と機器：

タンパク：ヒトIL-17A（hIL-17A）をGenbank Accession No. NP-002181を持つヒトIL-17Aタンパク配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

陽性コントロールとして、Lillyヒト化抗IL-17抗体（Lilly mAb(hu)）を、MS7,838,638B2（LY 2439821）に開示のヒト化配列に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

ヒトIgG（HuIgG）：（Millipore Cat.No.AG711）。

動物：7週令C57/B6雄マウス（SINO-BRITISH SIPPR/BK LAB. ANIMAL LTD., CO, Certificate No.: SCXK (Shanghai) 2008-0016から購入した）、各群6マウス。

試薬：Ab希釈溶液：クエン酸緩衝液（pH 5.0）：10mMクエン酸ナトリウム、50mM NaCl
hIL-17A希釈用液：PBS（リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2）。

マウスCXCL1/KC Quantikine ELISA Kit、6ウェルプレート、R&D SYSTEM、#SMKC00B。
プロトコール：

- 1）マウスは各群6匹、15群に分けた。
- 2）100μlのHu049-18またはコントロール抗体（HuIgGまたはLilly mAb(hu)）または希釈した溶液を各マウスに腹腔内（I.P.）投与した。薬物の投与量は、それぞれ3000μg/kg、300μg/kg、30μg/kgおよび3μg/kgであった。
- 3）20時間後、hIL-17Aを150μg/kgで皮下注射（SC）した、各マウスは100μlで注射した。
- 4）2時間後、血液サンプルを集め、血液凝固まで室温で2時間、または血液凝固まで2-8で終夜置いて、次いで20分間2000x gで遠心分離した。上澄みを捨て、検出を直ちに行うか、またはサンプルの一定分量を-20で保存した。凍結と解凍の繰り返しは避ける。
- 5）工程4から得られたサンプルはマウスCXCL1/KC Quantikine ELISA Kitで測定した。

試験結果：

上記方法に従って、実施例2から得られたヒト化抗体Hu049-18を試験した、結果は次の通りである。

【表10】

抗体（注射投与量 3000μg/マウス）	KC 平均値 (pg/ml)
HuIgG	937
Lilly mAb(hu)	158
Hu049-18	145

結論：無効なコントロール抗体に比べ、本発明のHu-049-18抗体は平均KCレベルを、記載した条件下、3000μg/マウスの用量で約1/6に減少する。コントロール抗体に比べ、本発明のHu-049-18抗体は、記載した条件下、3000μg/マウスの用量でKCを抑制する同じ能力を示す。

【試験例6】

【0033】

in vivoでの抗体の半減期 (T1/2) の測定

目的：

in vivoでのラットまたはカニクイザルにおける本発明の抗体Hu049-18の薬物動態パラメータを測定すること。

物質と試薬：

タンパク：ヒトIL-17A (hIL-17A) をGenbank Accession No. NP-002181のヒトIL-17Aタンパク配列を利用することにより当該技術分野で公知の方法に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

陽性コントロールとして、Lillyヒト化抗IL-17抗体 (Lilly mAb(hu)) を、MS7,838,63 8B2 (LY 2439821) に開示のヒト化配列に従ってクローン化し、発現のため過渡的にHEK293E細胞にトランスフェクトした。

ヒトIgG (HuIgG)：ヒトIgG、ポリクローナル、Millipore Cat.No.AG711

動物：230-250g SD雄ラット (Shanghai SLAC laboratory Animal Co., Ltd., Certificate No: SCXK (Shanghai) 2007-0005から購入した) を静脈内注射 (IV) 群 (足の背側) と皮下注射 (SC) 群の2群、各群5ラット、に分けた。

マカク：2-3kgカニクイザル (Hainan Jingang Biotechnology Co., Ltd. Certificate No: SCXK (HN) 2010-0001, 0000152.)

試薬：抗体希釈溶液：クエン酸緩衝液 (pH 5.0)：10mMクエン酸ナトリウム、50mM NaCl

hIL-17A希釈溶液：PBS (リン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2)

ヤギ抗ヒトIgG (Fab特異的) ペルオキシダーゼ共役抗体、Sigma Cat.No.121M4811

プロトコール：

1. ラットでの検出方法

(1) in vivo投与

SDラットはランダムに2群 (静脈内注射 (IV) 群 (足の背側) と皮下注射 (SC) 群)、各群5ラット、に分けた。

無菌条件下で、Hu049-18をクエン酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解して最終濃度を2.5mg/mLにした；

各ラットに5mg/kgの用量でIVまたはSC投与した；

IV群に対して、血液サンプルを投与後0分、5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、2日、4日、7日、10日、14日、21日、28日に、各時200 μ l (80 μ l血清に相当) を尻尾の静脈から採取した；SC群に対しては、血液サンプルを投与後0分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、2日、4日、7日、10日、14日、21日、28日に、各時200 μ l (80 μ l血清に相当) を尻尾の静脈から採取した；血液サンプルを集めて血液凝固まで半時間室温で置き、次いで4℃で5分間10000×gで遠心分離した。直ちに試験するために上澄みを集め、またはサンプルの一定分量を-80℃で保存した。凍結と解凍の繰り返しは避ける。

(2) 工程(1)で得た血清サンプルをELISAにより検出した

1) 標準曲線

a) マイクロ滴定プレートは4℃で終夜1 μ g/mlのストレプトアビジンで直接コーティングした；

b) マイクロ滴定プレートは2%BSA (v/v) を含有する300 μ lのPBSTでブロックし、恒温槽で1時間37℃でインキュベートした。一方、コーティングしていないウェルはコントロールとしてブロックした；

c) PBSTで3回洗浄。全ての洗浄工程はBiotek (Elx 405) automatic washerで行った；

d) hIL-17A (0.2 μ g/ml) を含有するPBS100 μ lを各ウェルに添加し、恒温槽で1時間37℃でインキュベートした；

e) 3回のPBST洗浄。

f) Hu049-18滴定：抗体希釈液で1:2の比率で希釈した、初期濃度は0.8 μ g/mlであ

10

20

30

40

50

った。100 μ l の希釈したHu049-18を各ウェルに添加し、標準曲線をプロットした。96穴プレートは恒温槽で1時間37 でインキュベートした。

g) 3回のPBST洗浄；

h) 100 μ l のヤギ抗ヒトIgG (Fab特異的) ペルオキシダーゼ共役抗体 (Sigma Cat.No.121M4811) (1:5000) を各ウェルに添加し、恒温槽で1時間37 でインキュベートした。

i) 3回のPBST洗浄。100 μ l のTMB基質を各ウェルに添加し、恒温槽で5分間37 でインキュベートした。次いで、反応は各ウェルに100 μ l の1M HClを添加して停止した。

j) 450nm/630nm波長のOD値をELISA microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max)で読み取った。

2) サンプル試験

a) マイクロ滴定プレートは4 で終夜1 μ g/mlのストレプトアビジンで直接コーティングした；

b) マイクロ滴定プレートは2 %BSA (v/v) を含有する300 μ l のPBSTでブロックし、恒温槽で1時間37 でインキュベートした。一方、コーティングしていないウェルはコントロールとしてブロックした；

c) PBSTで3回洗浄。全ての洗浄工程はBiotek (Elx 405) automatic washerで行った；

d) hIL-17A (0.2 μ g/ml)を含有するPBS 100 μ l を各ウェルに添加し、恒温槽で1時間37 でインキュベートした；

e) 3回のPBST洗浄。

f) 血清サンプル滴定：試験前に、ラット血清サンプルを異なる比率で希釈し、血清中の抗体濃度がちょうど標準曲線の中央になる最適希釈比を得た。血清サンプルは最適希釈比に従って希釈し、一方Hu049-18は25ng/mLに希釈した。100 μ l の希釈した血清サンプルとHu049-18は各ウェルに添加し、恒温槽で1時間37 でインキュベートした。各濃度は重複ウェルで滴定した；

g) 3回のPBST洗浄；

h) 100 μ l のヤギ抗ヒトIgG (Fab特異的) ペルオキシダーゼ共役抗体 (Sigma Cat.No.121M4811) (1:5000) を各ウェルに添加し、恒温槽で1時間37 でインキュベートした。

i) 3回のPBST洗浄。100 μ l のTMB基質を各ウェルに添加し、恒温槽で5分間37 でインキュベートした。次いで、反応は各ウェルに100 μ l の1M HClを添加して停止した。

j) 450nm/630nm波長のOD値をELISA microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max)で読み取った。

2. マカクについての検出方法

マカク (カニクイザル) に対するin vivo検出方法はラットに対するものと同様であり、違いは次の通りである：カニクイザルへの投与は1mg/kgの用量での静脈内注射 (IV) のみであり、血液サンプルは投与後0分、5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、24時間、32時間、3日、4日、5日、6日、9日、12日、14日、17日、21日、28日、35日に、各時500 μ l を尻尾の静脈から採取した。遠心分離後の血清サンプルは3つに分割し (2つの夫々は60 μ l のサンプルを含有することを確実にする)、試験のために - 80 で凍結した。

試験結果：

上記方法に従って、実施例2から得られたヒト化抗体Hu049-18を検出した、結果は次の通りである。

【表11】

動物	投与ルート	T1/2(Hu049-18) (日)	T1/2(Lilly mAb(hu)) (日)
SD ラット	IV (5 mg/kg)	9.91	5.05
	SC (5 mg/kg)	11.5	5.53
カニクイザル	IV (1 mg/kg)	24.4	

結論：これらの結果は、Lillyのコントロール抗体（カニクイザルにおける陽性抗体のT1/2値は6.5日（iv）と10.3日（sc）と報告されている）に比べ、本発明の抗体Hu049-18は記載した条件下でin vivo半減期が著しく長くなった。

【配列表】

0006513657000001.app

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
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(73)特許権者 510166892

ジエンス ヘンルイ メディシンカンパニー リミテッド
 J I A N G S U H E N G R U I M E D I C I N E C O . , L T D .
 中華人民共和国 ジエンス 2 2 2 0 0 2 リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジー
 カル・ディベロップメント・ゾーン クンルンシャン ロード ナンバー 7

(74)代理人 100153394

弁理士 謝 卓峰

(74)代理人 100116311

弁理士 元山 忠行

(72)発明者 ジャン、リアンシャン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード N
 o . 2 7 9

(72)発明者 リュウ、ジアジエン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード N
 o . 2 7 9

(72)発明者 サオ、グオチン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード N
 o . 2 7 9

(72)発明者 スン、ピアオヤン

中華人民共和国 2 2 2 0 4 7 ジエンス リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジー
 カル・ディベロップメント・ゾーン クンルンシャン ロード No . 7

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 1 9 7 0 8 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 3 1 1 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 0 8 / 0 2 1 1 5 6 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 1 / 0 5 3 7 6 3 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 6 2 8 6 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 0 7 / 0 7 0 7 5 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 4 4 4 3 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 3 1 0 7 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 0 8 / 0 4 7 1 3 4 (W O , A 2)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 2 4

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 1 7 / 0 6

A 6 1 P 1 9 / 0 2

A 6 1 P 2 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 1 2 P 2 1 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / R E G I S T R Y

(STN)
UniProt/GeneSeq