

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6794448号
(P6794448)

(45) 発行日 令和2年12月2日(2020.12.2)

(24) 登録日 令和2年11月13日(2020.11.13)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00
C O 7 K 14/54 (2006.01)	C O 7 K 14/54
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46

請求項の数 22 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-528732 (P2018-528732)	(73) 特許権者	504389991
(86) (22) 出願日	平成28年12月1日(2016.12.1)		ノバルティス アーゲー
(65) 公表番号	特表2019-505173 (P2019-505173A)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
(43) 公表日	平成31年2月28日(2019.2.28)		35
(86) 国際出願番号	PCT/IB2016/057283	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02017/093947		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成29年6月8日(2017.6.8)	(74) 代理人	100095360
審査請求日	平成30年8月17日(2018.8.17)		弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号	62/263,008	(74) 代理人	100120134
(32) 優先日	平成27年12月4日(2015.12.4)		弁理士 大森 規雄
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100141195
			弁理士 西澤 恵美子
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体サイトカイングラフト組成物および免疫調節のための使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 193 の HCDR1、(b) 配列番号 194 の HCDR2、(c) 配列番号 195 の HCDR3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 196 の LCDR1、(e) 配列番号 197 の LCDR2 および (f) 配列番号 198 の LCDR3 を含む軽鎖可変領域

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項 2】

配列番号 205 を含む重鎖可変領域 (VH) および配列番号 206 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項 3】

低下したエフェクター機能に対応する修飾 Fc 領域をさらに含む、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項 4】

前記修飾 Fc 領域が、D265A、P329A、P329G、N297A、L234A および L235A の 1 つまたは複数から選択される突然変異を含む、請求項 3 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項 5】

前記修飾 Fc 領域が、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L

10

20

235Aからなる群から選択される、請求項4に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質であって、r h I L 1 0と比較すると、T細胞またはN細胞の活性化が少ない抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項7】

前記CDRの結合特異性がヒト以外の標的に対するものである、請求項1～6のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項8】

r h I L 1 0よりも長い半減期を有する、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【請求項9】

配列番号246の重鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列および配列番号247の軽鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列を含む単離核酸。

【請求項10】

抗体サイトカイングラフトタンパク質の重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドをコードする請求項9に記載の核酸と、場合により分泌シグナルとを含む、抗体サイトカイングラフトタンパク質の産生に適した組換え宿主細胞。

【請求項11】

前記細胞が哺乳類細胞である、請求項10に記載の宿主細胞。

【請求項12】

請求項1から8のいずれかに記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項13】

(a) 配列番号193のHC DR 1、(b) 配列番号194のHC DR 2、(c) 配列番号195のHC DR 3を含む重鎖可変領域ならびに(d) 配列番号196のLC DR 1、(e) 配列番号197のLC DR 2および(f) 配列番号198のLC DR 3を含む軽鎖可変領域

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む、免疫関連障害の治療のための医薬組成物。

【請求項14】

前記免疫関連障害が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病(GVHD)からなる群から選択される、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記抗体サイトカイングラフトタンパク質が別の治療剤と組み合わせて投与される、請求項13～14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

前記治療剤が、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブおよびベドリズマブからなる群から選択される抗TNF剤である、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

前記治療剤が、スルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンおよび5-アミノサリチル酸の他の誘導体からなる群から選択されるアミノサリチル酸剤である、請求項15に記載の組成物。

【請求項18】

前記治療剤が、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソド、メサラミンおよびデキサメタゾンからなる群から選択される副腎皮質ステロイドであ

10

20

30

40

50

る、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記治療剤が抗菌剤である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 20】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む、それを必要とする患者の単球を活性化する剤。

【請求項 21】

単球が活性化され、T細胞もNK細胞も活性化されない、請求項 20 に記載の剤。

【請求項 22】

前記抗体サイトカイングラフトタンパク質がTNF α 産生を減少させる、請求項 20 に記載の剤。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、インターロイキン10受容体(IL10R)に結合し、この受容体を通してシグナル伝達を刺激する抗体-サイトカイングラフト組成物(antibody-cytokine engrafted composition)に関する。

【背景技術】

【0002】

インターロイキン10(IL10)は、Th1ヘルパー細胞および抗原提示細胞(APC)に効果を及ぼすサイトカイン合成阻害因子として同定された。ドメイン交換非共有結合ホモ二量体として存在する161アミノ酸タンパク質であるIL10は、1個のホモ二量体：4個のIL-10RIサブユニットの化学量論で高親和性IL-10受容体I(IL-10RI)に結合し、この高親和性IL-10受容体Iは、IL-10R2を動員し、JAK1/TYK2経路を通してシグナル伝達を活性化する。IL10は、炎症性サイトカイン、例えばIL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 、GM-CSF、ならびに反応性酸素および窒素中間体の単球およびマクロファージ合成を阻害し、自己免疫の多数の前臨床モデルにおいて強力な有効性を示している。IL10有効性は、単球、マクロファージおよびT細胞の活性化およびエフェクター機能を阻害するその能力に起因すると考えられている。しかしながら、IL10は極めて広い範囲の生物学的活性を有する多面的免疫調節性サイトカインである。IL10はまた、B細胞、NK細胞、細胞傷害性およびヘルパーT細胞、肥満細胞、顆粒球、樹状細胞、角化細胞およびさらに内皮細胞の増殖および分化を促進することが示されており、これが炎症促進機能も有することを示している(Moore et al., Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765)。

20

30

【0003】

自己免疫および炎症状態、具体的には炎症性腸疾患(IBD)を治療するための治療剤としてのIL10は、動物モデル系ならびに遺伝学で支持されている。例えば、マウスにおけるIL10のノックアウトおよびIL-10R欠損を有するマウスは、大腸炎を自然発症する。ヒトでは、クローン病患者の9~16%がIL10産生欠陥または減少に関連するNOD2突然変異を有し、潰瘍性大腸炎(UC)患者の20%が3'UTR中に疾患関連IL10 SNPを有する。最後に、ヒトにおけるIL-10R1の一定の突然変異が、まれな重症型のクローン病を引き起こす(Glocker et al., N Engl J Med. 2009; 361(21):2033-45)。

40

【0004】

強力な遺伝連鎖データにもかかわらず、組換えヒトIL10は、最大25 μ g/kgまで健康なボランティアおよび特定の患者集団における耐容性および安全性、ならびに最大100 μ g/kgまでレシピエントのサブセットで軽度の効果を実証したが、特定の患者集団ではごく軽度の臨床的有効性しか見られず、臨床的開発は有効性の欠如のために中断された。試験の再調査が試みられ、結果のいくつかの可能性が確認された。例えば、限られた有効性は、IL10の短い半減期による標的器官(結腸)の乏しい曝露、高用量で現

50

れ、低用量 I L 1 0 の抗炎症有効性を相殺する I L 1 0 の炎症促進効果のためである (Lindsay and Hodgson, Aliment Pharmacol Ther. 2001; 15(11) 1709-1716)。この可能性と一致して、高用量の I L 1 0 は、炎症増加に関連する全身 I F N γ 、グランザイムおよびネオプテリンレベルの上昇と関連していた (Tilg et al., Gut 2002; 50(2)191-5)。

【0005】

組換えヒト I L 1 0 の臨床的失敗に対処する改善したプロファイルを与えるより有効な I L 1 0 治療剤を生成するために、抗体サイトカイングラフトタンパク質が開発された。この改善した治療プロファイルには、炎症促進活性の著しい低下、延長した半減期、投与の容易さおよび安定性を含む強力な抗炎症性 I L 1 0 効力が含まれる。よって、本開示は、改善した I L 1 0 抗体サイトカイングラフトタンパク質および免疫関連障害を治療する

10

【発明の概要】

【0006】

本開示は、公知であり、診療所で使用されている組換え I L 1 0 および I L 1 0 構築物に対して好ましい治療プロファイルを有する抗体-サイトカイングラフトタンパク質を提供する。特に、天然または組換えヒト I L 1 0 の所望の抗炎症活性を維持しているが、炎症促進活性の著しい低下が保持されている抗体サイトカイングラフトタンパク質が提供される。さらに、抗体サイトカイングラフトタンパク質は、組換えヒト I L 1 0 タンパク質 (r h I L 1 0) に対して改善した半減期、安定性および投与の容易さを有する。これらの組成物の好ましい特性は、診療所で以前から使用され、文献に記載されているものよりも好ましい治療組成物をもたらす。よって、本開示は、I L 1 0 受容体に結合し、I L 1 0 受容体を通してシグナル伝達を促進し、一定の細胞型を刺激する抗体サイトカイングラフトタンパク質を提供する。(i) 重鎖可変領域 (V H) ならびに C H 1、C H 2 および C H 3 領域を含む重鎖定常領域を含む免疫グロブリン重鎖配列と、(i i) 軽鎖可変領域 (V L) および軽鎖定常領域 (C L) を含む免疫グロブリン軽鎖配列とを含む抗体サイトカイングラフトタンパク質であって、単量体 I L 1 0 分子が V H または V L の相補性決定領域 (C D R) にグラフトされている、抗体サイトカイングラフトタンパク質が提供される。

20

【0007】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 3 を含む可変重鎖と配列番号 1 4 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 2 9 を含む可変重鎖と配列番号 3 0 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 4 5 を含む可変重鎖と配列番号 4 6 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 6 1 を含む可変重鎖と配列番号 6 2 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 7 7 を含む可変重鎖と配列番号 7 8 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 9 3 を含む可変重鎖と配列番号 9 4 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 0 9 を含む可変重鎖と配列番号 1 1 0 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 2 5 を含む可変重鎖と配列番号 1 2 6 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 4 1 を含む可変重鎖と配列番号 1 4 2 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 5 7 を含む可変重鎖と配列番号 1 5 8 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 7 3 を含む可変重鎖と配列番号 1 7 4 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 1 8 9 を含む可変重鎖と配列番号 1 9 0 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 2 0 5 を含む可変重鎖と配列番号 2 0 6 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実

30

40

50

施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 222 を含む可変重鎖と配列番号 223 を含む可変軽鎖とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、配列番号 238 を含む可変重鎖と配列番号 239 を含む可変軽鎖とを含む。

【0008】

特定の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、IgG クラス抗体Fc 領域を含む。特定の実施形態では、免疫グロブリンがIgG1、IgG2 またはIgG4 サブクラスFc 領域から選択される。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、場合により抗体または抗体断片とFc 受容体の結合を調節する（すなわち、増加させるまたは減少させる）少なくとも1つの修飾を含む。抗体サイトカイングラフトタンパク質の免疫グロブリン重鎖は、場合により修飾されたエフェクター機能を与える修飾を含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される、低下したエフェクター機能を与える突然変異を含む。

10

【0009】

関連する態様では、本開示はさらに、本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質の少なくとも重鎖および／または軽鎖タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。別の関連する態様では、本開示はさらに、本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質の産生に適した宿主細胞を提供する。特定の実施形態では、宿主細胞が、抗体サイトカイングラフトタンパク質の重鎖および／または軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を含む。さらに別の態様では、本明細書に記載される提供される宿主細胞を抗体サイトカイングラフトタンパク質の発現、形成および分泌に適した条件下で培養するステップと、培養物から抗体サイトカイングラフトタンパク質を回収するステップとを含む、本開示の抗体サイトカイングラフトタンパク質を製造する方法が提供される。さらなる態様では、本開示はさらに、本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質を含むキットを提供する。

20

【0010】

別の関連する態様では、本開示はさらに、本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、固体に投与するための、本開示の抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む医薬組成物を提供する。

30

【0011】

別の態様では、本開示は、治療上有効量の本明細書に記載される本開示の抗体サイトカイングラフトタンパク質を個体に投与するステップを含む、治療を必要とする個体の免疫関連障害を治療する方法を提供する。さらなる態様では、本開示は、個体の免疫関連障害の治療または予防に使用するための抗体サイトカイングラフトタンパク質を提供する。

【0012】

いくつかの実施形態では、患者が免疫関連障害、例えば炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I 型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病（GVHD）を有する。特定の実施形態では、炎症性腸疾患がクローン病または潰瘍性大腸炎である。

40

【0013】

いくつかの実施形態では、本開示が、
（a）相補性決定領域（CDR）HCDR1、HCDR2、HCDR3 を含む重鎖可変領域（VH）と；
（b）LCDR1、LCDR2、LCDR3 を含む軽鎖可変領域（VL）と；
（c）VH または VL の CDR にグラフトしたインターロイキン10（IL10）単量体分子と

50

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質を提供する。

【0014】

I L 1 0 単量体分子が重鎖 C D R にグラフトされている、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0015】

重鎖 C D R が H C D R 1、H C D R 2 または H C D R 3 から選択される、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0016】

I L 1 0 単量体分子が H C D R 1 にグラフトされている、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

10

【0017】

I L 1 0 単量体分子が軽鎖 C D R にグラフトされている、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0018】

軽鎖 C D R が L C D R 1、L C D R 2 または L C D R 3 から選択される、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0019】

I L 1 0 単量体分子が L C D R 1 にグラフトされている、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0020】

20

I L 1 0 と比較すると T 細胞または N K 細胞の活性化が少ない、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0021】

r h I L 1 0 よりも長い半減期を有する抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0022】

I L 1 0 単量体分子が配列番号 2 0 9 からなる、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0023】

I g G クラス抗体重鎖をさらに含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0024】

30

I g G クラス重鎖が I g G 1、I g G 2 または I g G 4 から選択される、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0025】

C D R と標的タンパク質の結合特異性がグラフト I L 1 0 単量体分子の存在によって低下している、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0026】

C D R と標的タンパク質の結合特異性がグラフト I L 1 0 単量体分子の存在下で保持されている、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0027】

C D R の結合特異性が I L 1 0 単量体分子のサイトカイン受容体結合特異性とは異なる標的タンパク質に対するものである、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

40

【0028】

C D R の結合特異性がヒト以外の標的に対するものである、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0029】

ヒト化またはヒトである、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0030】

(i) (a) 配列番号 1 9 3 の H C D R 1、(b) 配列番号 1 9 4 の H C D R 2、(c) 配列番号 1 9 5 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 1 9 6 の L C D R 1、(e) 配列番号 1 9 7 の L C D R 2 および (f) 配列番号 1 9 8 の L C D R 3 を

50

含む軽鎖可変領域；

(i i) (a) 配列番号 97 の H C D R 1、(b) 配列番号 98 の H C D R 2、(c) 配列番号 99 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 100 の L C D R 1、(e) 配列番号 101 の L C D R 2 および (f) 配列番号 102 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i i i) (a) 配列番号 1 の H C D R 1、(b) 配列番号 2 の H C D R 2、(c) 配列番号 3 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 4 の L C D R 1、(e) 配列番号 5 の L C D R 2 および (f) 配列番号 6 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i v) (a) 配列番号 17 の H C D R 1、(b) 配列番号 18 の H C D R 2、(c) 配列番号 19 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 20 の L C D R 1、(e) 配列番号 21 の L C D R 2 および (f) 配列番号 22 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

10

(v) (a) 配列番号 33 の H C D R 1、(b) 配列番号 34 の H C D R 2、(c) 配列番号 35 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 36 の L C D R 1、(e) 配列番号 37 の L C D R 2 および (f) 配列番号 38 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(v i) (a) 配列番号 49 の H C D R 1、(b) 配列番号 50 の H C D R 2、(c) 配列番号 51 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 52 の L C D R 1、(e) 配列番号 53 の L C D R 2 および (f) 配列番号 54 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

20

(v i i) (a) 配列番号 65 の H C D R 1、(b) 配列番号 66 の H C D R 2、(c) 配列番号 67 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 68 の L C D R 1、(e) 配列番号 69 の L C D R 2 および (f) 配列番号 70 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(v i i i) (a) 配列番号 81 の H C D R 1、(b) 配列番号 82 の H C D R 2、(c) 配列番号 83 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 84 の L C D R 1、(e) 配列番号 85 の L C D R 2 および (f) 配列番号 86 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i x) (a) 配列番号 113 の H C D R 1、(b) 配列番号 114 の H C D R 2、(c) 配列番号 115 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 116 の L C D R 1、(e) 配列番号 117 の L C D R 2 および (f) 配列番号 118 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

30

(x) (a) 配列番号 129 の H C D R 1、(b) 配列番号 130 の H C D R 2、(c) 配列番号 131 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 132 の L C D R 1、(e) 配列番号 133 の L C D R 2 および (f) 配列番号 134 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(x i) (a) 配列番号 145 の H C D R 1、(b) 配列番号 146 の H C D R 2、(c) 配列番号 147 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 148 の L C D R 1、(e) 配列番号 149 の L C D R 2 および (f) 配列番号 150 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

40

(x i i) (a) 配列番号 161 の H C D R 1、(b) 配列番号 162 の H C D R 2、(c) 配列番号 163 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 164 の L C D R 1、(e) 配列番号 165 の L C D R 2 および (f) 配列番号 166 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(x i i i) (a) 配列番号 177 の H C D R 1、(b) 配列番号 178 の H C D R 2、(c) 配列番号 179 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 180 の L C D R 1、(e) 配列番号 181 の L C D R 2 および (f) 配列番号 182 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(x i v) (a) 配列番号 210 の H C D R 1、(b) 配列番号 211 の H C D R 2、(c) 配列番号 212 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 213 の L

50

C D R 1、(e) 配列番号 2 1 4 の L C D R 2 および (f) 配列番号 2 1 5 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；ならびに

(x v) (a) 配列番号 2 2 6 の H C D R 1、(b) 配列番号 2 2 7 の H C D R 2、(c) 配列番号 2 2 8 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 2 2 9 の L C D R 1、(e) 配列番号 2 3 0 の L C D R 2 および (f) 配列番号 2 3 1 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0031】

(i) 配列番号 2 0 5 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 2 0 6 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

10

(i i) 配列番号 1 0 9 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 1 0 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(i i i) 配列番号 1 3 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 4 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(i v) 配列番号 2 9 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 3 0 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(v) 配列番号 4 5 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 4 6 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(v i) 配列番号 6 1 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 6 2 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

20

(v i i) 配列番号 7 7 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 7 8 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(v i i i) 配列番号 9 3 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 9 4 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(i x) 配列番号 1 2 5 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 2 6 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(x) 配列番号 1 4 1 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 4 2 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(x i) 配列番号 1 5 7 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 5 8 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

30

(x i i) 配列番号 1 7 3 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 7 4 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(x i i i) 配列番号 1 8 9 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 1 9 0 を含む軽鎖可変領域 (V L)；

(x i v) 配列番号 2 2 2 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 2 2 3 を含む軽鎖可変領域 (V L)；ならびに

(x v) 配列番号 2 3 8 を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 2 3 9 を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0032】

40

低下したエフェクター機能に対応する修飾 F c 領域をさらに含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0033】

修飾 F c 領域が、D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、L 2 3 4 A および L 2 3 5 A の 1 つまたは複数から選択される突然変異を含む、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0034】

修飾 F c 領域が、D 2 6 5 A / P 3 2 9 A、D 2 6 5 A / N 2 9 7 A、L 2 3 4 A / L 2 3 5 A、P 3 2 9 A / L 2 3 4 A / L 2 3 5 A および P 3 2 9 G / L 2 3 4 A / L 2 3 5 A からなる群から選択される、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

50

【0035】

配列番号193のHC DR 1、配列番号194のHC DR 2、配列番号195のHC DR 3、配列番号196のLC DR 1、配列番号197のLC DR 2、配列番号198のLC DR 3、突然変異D265A/P329Aを含む修飾Fc領域からなる抗体サイトカイングラフトタンパク質であって、IL10と比較すると、T細胞またはN細胞の活性化が少ない抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0036】

CDRの結合特異性がヒト以外の標的に対するものである、抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0037】

rhIL10よりも長い半減期を有する抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0038】

(i) 配列番号246の重鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列および配列番号247の軽鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列；

(ii) 配列番号248の重鎖コードポリヌクレオチド配列および配列番号249の軽鎖コードポリヌクレオチド配列；

(iii) 配列番号242の重鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列および配列番号243の軽鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列；または

(iv) 配列番号244の重鎖コードポリヌクレオチド配列および配列番号245の軽鎖コードポリヌクレオチド配列

を含む単離核酸。

【0039】

抗体サイトカイングラフトタンパク質の重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドをコードする核酸と、場合により分泌シグナルとを含む抗体サイトカイングラフトタンパク質の産生に適した組換え宿主細胞。

【0040】

哺乳動物である宿主細胞。

【0041】

抗体サイトカイングラフトタンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【0042】

治療上有効量の抗体サイトカイングラフトタンパク質を個体に投与するステップを含む、治療または予防を必要とする個体の免疫関連障害を治療または予防する方法。

【0043】

免疫関連障害が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病（GVHD）からなる群から選択される、方法。

【0044】

抗体サイトカイングラフトタンパク質が別の治療剤と組み合わせて投与される、方法。

【0045】

治療剤が、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブおよびベドリズマブからなる群から選択される抗TNF剤である、方法。

【0046】

治療剤が、スルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンおよび5-アミノサリチル酸の他の誘導体からなる群から選択されるアミノサリチル酸剤である、方法。

【0047】

治療剤が、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソニド、メサラミンおよびデキサメタゾンからなる群から選択される副腎皮質ステロイドである、方法。

【0048】

10

20

30

40

50

治療剤が抗菌剤である、方法。

【0049】

抗体サイトカイングラフトタンパク質を投与するステップを含む、それを必要とする患者の単球を活性化する方法。

【0050】

単球が活性化され、T細胞もNK細胞も活性化されない、方法。

【0051】

抗体サイトカイングラフトタンパク質の投与がTNF α 産生を減少させる、方法。

【0052】

免疫関連障害の治療における、

(i) (a) 配列番号193のHC DR1、(b) 配列番号194のHC DR2、(c) 配列番号195のHC DR3を含む重鎖可変領域ならびに(d) 配列番号196のLC DR1、(e) 配列番号197のLC DR2および(f) 配列番号198のLC DR3を含む軽鎖可変領域；ならびに

(ii) (a) 配列番号97のHC DR1、(b) 配列番号98のHC DR2、(c) 配列番号99のHC DR3を含む重鎖可変領域ならびに(d) 配列番号100のLC DR1、(e) 配列番号101のLC DR2および(f) 配列番号102のLC DR3を含む軽鎖可変領域

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質の使用。

【0053】

炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病(GVHD)からなる群から選択される免疫関連障害の治療において治療剤として使用するための抗体サイトカイングラフトタンパク質。

【0054】

抗体サイトカイングラフトタンパク質が別の治療剤と組み合わせて投与される、使用。

【0055】

治療剤が、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブおよびベドリズマブからなる群から選択される抗TNF剤である、使用。

【0056】

治療剤が、スルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンおよび5-アミノサリチル酸の他の誘導体からなる群から選択されるアミノサリチル酸剤である、使用。

【0057】

治療剤が、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソニド、メサラミンおよびデキサメタゾンからなる群から選択される副腎皮質ステロイドである、使用。

【0058】

治療剤が抗菌剤である、使用。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】IL10の生物学的効果、これが作用する細胞型および生物学的効果が抗炎症性であるか炎症促進性であるかを示す図である。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、図表の右側に描かれる炎症促進性生物学的効果を低減する。

【図2】IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質の構造を示す図である。挿入パネルは抗体のLC DR1に挿入された単量体IL10を示している。暗色残基は抗体サイトカイングラフトタンパク質の場合により組み込まれる例示的なFc修飾を示している。

【図3】図3A～図3Bは、組換えヒトIL10(rhIL10、灰色正方形)およびIgGIL10M13抗体サイトカイングラフトタンパク質(黒色三角形)のインビトロ生物学的アッセイの結果を示す図である。図3Aは、IgGIL10M13が、CD8 T

10

20

30

40

50

細胞アッセイでIFN γ 誘導によって測定される、rhIL10と比較して低下した炎症促進活性を実証したことを示す図である。読み出し測定としてグランザイムBを使用しても、ヒト始原NK細胞、B細胞および肥満細胞で同様の差次的活性が見られた。図3Bは、rhIL10とIgGIL10M13が、全血アッセイでTNF α の阻害によって測定される同様の抗炎症活性を実証することを示す図である。

【図4】等モル量の組換えヒトIL10 rhIL10（左側パネル）またはIgGIL10M13（右側パネル）で刺激したヒト全血中のIL10依存性pSTAT3シグナル伝達のCyTOF分析の結果を示す図である。IL10は単球において抗炎症活性を誘導し；T、BまたはNK細胞の活性化は炎症性サイトカインを誘導する。非刺激に対する細胞の活性化の倍数変化の結果をヒートマップ（陰影の変化）によって示す。左側パネルは、rhIL10が全てのIL10感受性細胞型（輪郭線有り）にわたる刺激を与えることを示しているが、右側パネルに見られるように、IgGIL10M13は、非刺激細胞と同様またはそれよりわずかに上のレベルで、T、BおよびNK細胞に対するあまり強力でない刺激を与え；IgGIL10MおよびrhIL10で、単球（輪郭線有り）およびmDC細胞の刺激の同様の効果が実証された。これらの関連する細胞型（単球、mDC）は、炎症性腸疾患で腸恒常性を維持するための重要な細胞である。

【図5】図5A～5Dは、インビボアッセイで抗体サイトカイングラフトタンパク質IgGIL10M13の改善した特性を示す図である。図5A～Bは、rhIL10およびIgGIL10M13の薬物動態試験の結果を示す図である。静脈内投与後、抗体サイトカイングラフトタンパク質が4、4日後に依然として検出可能であったので（図5B）、IgGIL10M13は延長した薬物動態（半減期）を実証している一方、rhIL10は約1時間の半減期を有していた（図5A）。図5Cおよび図5Dは、抗体サイトカイングラフトタンパク質のインビボ活性の薬力学的アッセイの結果を示している。図5Cは、投薬72時間後にpSTAT3シグナル伝達によって測定される結腸組織のインビボ活性を示す図である。図5Dは、IgGIL10M13の投与後のLPS曝露に応じたTNF α の阻害によって測定される、rhIL10と比較して改善したIgGIL10M13のインビボ応答の持続期間を示す図である。

【図6】IgGIL10M13がLPS曝露48時間後のTNF α 誘導を減少させることを実証する、LPS曝露モデルの結果を示す図である。

【図7】IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質の改善したC_{MAX}%を表すグラフである。

【図8】rhIL10またはIgGIL10M13で刺激した場合の健康な対象および患者の種々の免疫細胞におけるpSTAT3活性のCyTOFデータを示す図である。

【図9A】図9A～9Cは、IgGIL10M13がrhIL10と比較して低下したPHA刺激ヒト全血における炎症促進活性を有することを実証するグラフ表示である。

【図9B】図9A～9Cは、IgGIL10M13がrhIL10と比較して低下したPHA刺激ヒト全血における炎症促進活性を有することを実証するグラフ表示である。

【図9C】図9A～9Cは、IgGIL10M13がrhIL10と比較して低下したPHA刺激ヒト全血における炎症促進活性を有することを実証するグラフ表示である。

【図9D】図9Dは、rhIL10およびIgGIL10M13を用いた滴定実験のグラフである。

【図10A】図10A～10Bは、抗体サイトカイングラフトタンパク質の凝集特性と比較した、リンカーを介してFcに結合した場合のIL10野生型または単量体の凝集特性を示す図である。

【図10B】図10A～10Bは、抗体サイトカイングラフトタンパク質の凝集特性と比較した、リンカーを介してFcに結合した場合のIL10野生型または単量体の凝集特性を示す図である。

【図11】IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質が依然としてRSVに結合することを示すELISAデータを示す図である。

【図12】IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質の作用機序の図である。左側パ

10

20

30

40

50

ネルは、どのように正常な r h I L 1 0 二量体が I L - 1 0 R 1 に結合し、強力な p S T A T 3 シグナル伝達を開始するかを示している。右側パネルは、どのように抗体の C D R にグラフトした I L 1 0 単量体が I L - 1 0 R 1 とのあまり効率的でない結合を有するように強制され、弱い p S T A T 3 シグナルを生成するのかわを示している。

【図 1 3】図 1 3 A ~ C は、パリビズマブの L C D R 1 にグラフトした I L 1 0 単量体の結晶構造分析を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0060】

定義

「抗体」は、四量体構造単位を含む免疫グロブリンファミリーの分子を指す。各四量体は、ポリペプチド鎖の 2 つの同一の対で構成され、各対はジスルフィド結合を通して接続された 1 本の「軽」鎖（約 25 k D）と 1 本の「重」鎖（約 50 ~ 70 k D）を有する。認識される免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ および μ 定常領域遺伝子ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は κ または λ として分類される。重鎖は γ 、 μ 、 α 、 δ または ϵ として分類され、今度はこれらがそれぞれ免疫グロブリンクラス、I g G、I g M、I g A、I g D および I g E を定義する。抗体は、いずれかのアイソタイプ／クラス（例えば、I g G、I g M、I g A、I g D および I g E）またはいずれかのサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2）のものであり得る。

【0061】

軽鎖と重鎖の両方が構造的および機能的相同性の領域に分割される。「定常」および「可変」という用語は構造的および機能的に使用される。各鎖の N 末端は、抗原認識を主に担う約 100 ~ 110 個またはそれを超えるアミノ酸の可変（V）領域またはドメインを規定する。可変軽鎖（ V_L ）および可変重鎖（ V_H ）という用語は、それぞれ軽鎖および重鎖のこれらの領域を指す。 V_H と V_L の対形成によって、単一の抗原結合部位が形成される。V 領域に加えて、重鎖と軽鎖の両方が定常（C）領域またはドメインを含む。免疫グロブリン C 領域の分泌型は、3 つの C ドメイン、C H 1、C H 2、C H 3、場合により C H 4（ C_μ ）およびヒンジ領域から構成される。免疫グロブリン C 領域の膜結合型も膜および細胞内ドメインを有する。各軽鎖は N 末端の V_L 、引き続いて他端の定常領域（C）を有する。軽鎖（C L）および重鎖（C H 1、C H 2 または C H 3）の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動性、F c 受容体結合、相補的結合等などの重要な生物学的特性を与える。慣例では、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠位になるにつれて増加する。N 末端は可変領域であり、C 末端は定常領域であり；C H 3 および C L ドメインはそれぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端ドメインを実際に含む。 V_L は V_H と一列に整列し、C L は重鎖の第 1 の定常ドメインと一列に整列する。本明細書で使用される場合、「抗体」は従来の抗体構造および抗体の変異型を包含する。よって、全長抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体およびこれらの抗体断片が本概念の範囲内にある。

【0062】

抗体は、完全免疫グロブリン鎖としてまたは種々のペプチダーゼによる消化によって産生された、いくつかの十分特徴付けられた抗体断片として存在する。本明細書で使用される「抗体断片」という用語は、抗原のエピトープと特異的に相互作用する（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布により）能力を保持する抗体の 1 つまたは複数の部分を指す。よって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域のジスルフィド結合下で抗体を消化して、それ自体ジスルフィド結合によって $V_H - C_H 1$ と連結した軽鎖である $F(a b)'_2$ 、 $F a b'$ の二量体を産生する。 $F(a b)'_2$ はヒンジ領域のジスルフィド結合を破壊する温和な条件下で還元さし、それによって $F(a b)'_2$ 二量体を $F a b'$ 単量体に変換することができる。 $F a b'$ 単量体は本質的にヒンジ領域の一部を有する $F a b$ である。Paul, Fundamental Immunology 3d ed. (1993)。種々の抗体断片が完全抗体の消化の点で定義されているが、当業者であれば、このような断片を化学的にまたは組換え

10

20

30

40

50

DNA方法論を用いて新規に合成することができることを認識するだろう。本明細書で
使用される場合、「抗体断片」とは、結合特異性および機能的活性を保持した、抗体全体の
修飾によって産生された抗体、または組換えDNA方法論を用いて新規に合成された抗体
の1つまたは複数の部分を指す。抗体断片の例としては、同じ結合特異性を有するFv断
片、単鎖抗体(ScFv)、Fab、Fab'、Fd(VhおよびCH1ドメイン)、d
Ab(Vhおよび単離CDR)；およびこれらの断片の多量体版(例えば、F(ab')₂)
が挙げられる。抗体断片をサイトカイングラフトタンパク質に組み込んで、本開示で
提供される結合特異性および活性を達成することもできる。

【0063】

本明細書で使用される「Fab」ドメインは、重鎖可変ドメイン、定常領域CH1ドメ
イン、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常領域CLドメインを含む。ドメインの相互作用は
、CH1とCLドメインとの間のジスルフィド結合によって安定化される。いくつかの実
施形態では、Fabの重鎖ドメインが、N末端からC末端に、VH-CHの順であり、F
abの軽鎖ドメインが、N末端からC末端に、VL-CLの順である。いくつかの実施形
態では、Fabの重鎖ドメインが、N末端からC末端に、CH-VHの順であり、F
abの軽鎖ドメインがCL-VLの順である。Fabは歴史的に完全免疫グロブリンのパパ
イン消化によって同定されたが、本開示の文脈では、「Fab」は典型的には任意の方法に
よって組換え的に産生される。各Fab断片は抗原結合に関して一価である、すなわち、
単一抗原結合部位を有する。

【0064】

「相補性決定ドメイン」または「相補性決定領域」(「CDR」)は、互換的にVLお
よびVHの超可変領域を指す。CDRは、このような標的タンパク質に対する特異性を持
つ抗体鎖の標的タンパク質結合部位である。各ヒトVLまたはVHには、可変ドメインの
約15~20%を構成する3つのCDR(CDR1~3、N末端から順次番号付け)が存在する。
CDRは、標的タンパク質のエピトープと構造的に相補的であり、よって、結合
特異性を直接担う。VLまたはVHの残りの伸長、いわゆるフレームワーク領域(FR)
は、示すアミノ酸配列の変動が少ない(Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. F
reeman & Co., New York, 2000)。

【0065】

CDRおよびフレームワーク領域の位置は、当技術分野における種々の周知の定義、例
えばKabatt、Chothia、国際ImMunoGeneTicsデータベース(IMGT)およびAbM(例えば、Johnson et al., Nucleic Acids Res., 29:205-206 (20
01); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature
 , 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazi
kani et al., J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)参照)を用いて決定することができる。
抗原結合部位の定義も以下に記載されている: Ruiz et al., Nucleic Acids Res., 28:21
9-221 (2000); およびLefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCal
lum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); およびMartin et al., Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin et al., Methods Enzymol., 203:121-15
3 (1991); およびRees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Predic
tion, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

【0066】

Kabattでは、VHのCDRアミノ酸残基を31~35(HCDR1)、50~65
(HCDR2)および95~102(HCDR3)と番号付けし; VLのCDRアミノ酸
残基を24~34(LCDR1)、50~56(LCDR2)および89~97(LCD
R3)と番号付けする。Chothiaでは、VHのCDRアミノ酸を26~32(HC
DR1)、52~56(HCDR2)および95~102(HCDR3)と番号付けし;
VLのCDRアミノ酸残基を26~32(LCDR1)、50~52(LCDR2)およ
び91~96(LCDR3)と番号付けする。KabattとChothiaの両方のCD
R定義を組み合わせることにより、CDRはヒトVH中アミノ酸残基26~35(HCD

10

20

30

40

50

R 1)、50～65 (H C D R 2) および 95～102 (H C D R 3) ならびにヒト V L 中アミノ酸残基 24～34 (L C D R 1)、50～56 (L C D R 2) および 89～97 (L C D R 3) からなる。

【0067】

本明細書で使用される「抗体可変軽鎖」または「抗体可変重鎖」は、それぞれ V_L または V_H を含むポリペプチドを指す。内因性 V_L は遺伝子セグメント V (可変) および J (接合) によってコードされ、内因性 V_H は V、D (多様性) および J によってコードされる。V_L または V_H の各々が C D R ならびにフレームワーク領域 (F R) を含む。「可変領域」または「V 領域」という用語は互換的に F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 を含む重鎖または軽鎖を指す。V 領域は天然、組換えまたは合成であり得る。本出願では、抗体軽鎖および／または抗体重鎖が時々、「抗体鎖」と一括して呼ばれ得る。本明細書で提供され、さらに記載されるように、「抗体可変軽鎖」もしくは「抗体可変重鎖」および／または「可変領域」および／または「抗体鎖」は場合により、C D R にグラフトしたサイトカインポリペプチド配列を含む。

10

【0068】

例えば、C H 2 および C H 3 ドメインを含む、本明細書で開示される免疫グロブリン重鎖の C 末端部分は「F c」ドメインである。本明細書で使用される「F c 領域」は第 1 の定常領域 (C H 1) 免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を指す。F c は、I g A、I g D および I g G の最後の 2 つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびに I g E および I g M の最後の 3 つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにこれらのドメインに対して N 末端の可撓性ヒンジを指す。I g A および I g M については、F c が J 鎖を含み得る。I g G については、F c が免疫グロブリンドメイン C γ 2 および C γ 3 ならびに C γ 1 と C γ 2 との間のヒンジを含む。F c 領域の境界は変化し得るが、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は通常、K a b a t ら (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.) の通りの E U 指針による番号付けを用いて、そのカルボキシ末端に対して残基 C 226 または P 230 を含むと定義されることが当技術分野で理解される。「F c 領域」は、単離におけるこの領域、または抗体もしくは抗体断片の文脈におけるこの領域を指し得る。「F c 領域」は、例えばエフェクター機能を調節する修飾を含む、例えば C H 2 および C H 3 領域中の F c 領域の天然対立遺伝子変異型を含む。F c 領域はまた、生物学的機能に対する変化をもたらさない変異型も含む。例えば、1 個または複数のアミノ酸が、生物学的機能を実質的に喪失することなく、免疫グロブリンの F c 領域の N 末端または C 末端から欠失される。例えば、特定の実施形態では、C 末端リジンが修飾、置き換えまたは除去される。特定の実施形態では、F c 領域の 1 個または複数の C 末端残基が変化させられるまたは除去される。特定の実施形態では、F c の 1 個または複数の C 末端残基 (例えば、末端リジン) が欠失される。一定の他の実施形態では、F c の 1 個または複数の C 末端残基が、代替のアミノ酸で置換される (例えば、末端リジンが置き換えられる)。このような変異型は、活性に対してもたらす効果が最小となるように当技術分野で公知の一般的規則に従って選択される (例えば、Bowie, et al., Science 247:306-1310, 1990 参照)。F c ドメインは F c R などの細胞受容体によって認識され、相補的活性化タンパク質 C 1 q が結合する免疫グロブリン (I g) の部分である。C H 2 エクソンの 5' 部分にコードされる下側ヒンジ領域は、F c R 受容体との結合のために抗体内の可撓性を提供する。

20

30

40

【0069】

「キメラ抗体」は、(a) 抗原結合部位 (可変領域) が、異なるもしくは変化させたクラス、エフェクター機能および／または種の定常領域、あるいはキメラ抗体に新たな特性を与える完全に異なる分子、例えば酵素、毒素、ホルモン、成長因子および薬物と結合するように、定常領域またはその一部が変化させられ、置き換えられまたは交換されている；または (b) 可変領域またはその一部が、異なるまたは変化させた抗原特異性を有する可変領域を用いて変化させられ、置き換えられまたは交換されている抗体分子である。

【0070】

50

「ヒト化」抗体は、ヒト以外の抗体の反応性（例えば、結合特異性、活性）を保持しながら、ヒトにおける免疫原性が少ない抗体である。これは、例えば、ヒト以外のCDR領域を保持し、抗体の残りの部分をヒト対応物で置き換えることによって達成することができる。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994)を参照されたい。

【0071】

「ヒト抗体」は、フレームワークとCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域もこのようなヒト配列、例えばヒト生殖系列配列、またはヒト生殖系列配列の変異型または例えばKnappik et al., J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000に記載されるようなヒトフレームワーク配列解析から得られた抗体含有コンセンサスフレームワーク配列に由来する。ヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダムもしくは部位特異的変異によって、またはインビボで体細胞突然変異によって、または安定性もしくは製造を促進するための保存的置換によって導入される突然変異）を含んでもよい。

【0072】

「対応するヒト生殖系列配列」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン可変領域配列によってコードされる他の全ての他の全ての公知の可変領域アミノ酸配列と比較して、基準可変領域アミノ酸配列または部分列と最も高い決定されたアミノ酸配列同一性を共有するヒト可変領域アミノ酸配列または部分列をコードする核酸配列を指す。対応するヒト生殖系列配列はまた、他の全ての評価された可変領域アミノ酸配列と比較して、基準可変領域アミノ酸配列または部分列と最も高いアミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列または部分列も指し得る。対応するヒト生殖系列配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワークと相補性決定領域、可変セグメント（上で定義される）、または可変領域を含む配列もしくは部分列の他の組合せであり得る。配列同一性は、本明細書に記載される方法を用いて、例えばBLAST、ALIGNもしくは当技術分野で公知の別のアラインメントアルゴリズムを用いて2つの配列を整列させて決定することができる。対応するヒト生殖系列核酸またはアミノ酸配列は、基準可変領域核酸またはアミノ酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有することができる。対応するヒト生殖系列配列は、例えば、公的に入手可能な国際Immunogeneticsデータベース（IMGT）およびVベースを通して決定することができる。

【0073】

本明細書で使用される「価数」は、ポリペプチド中の潜在的な標的結合部位の数を指す。各標的結合部位は、1個の標的分子または標的分子上の特異的部位と特異的に結合する。ポリペプチドが2つ以上の標的結合部位を含む場合、各標的結合部位は、同じまたは異なる分子と特異的に結合することができる（例えば、異なる分子、例えば異なる抗原、または同じ分子上の異なるエピトープに結合することができる）。例えば、慣用的な抗体は、2つの結合部位を有し、二価である；「三価」および「四価」は、抗体分子中の、それぞれ3個の結合部位および4個の結合部位の存在を指す。抗体サイトカイングラフトタンパク質は一価（すなわち、1個の標的分子と結合する）、二価または多価（2個以上の標的分子と結合する）であり得る。

【0074】

「特異的に結合する」または「結合特異性」という句は、サイトカイングラフトする前後の元の抗体標的（例えば、抗原）と抗体サイトカイングラフトタンパク質との間の相互作用を記載する文脈で使用される場合。一定の指定される条件下、特定の結合特異性を有する抗体サイトカイングラフトタンパク質は、バックグラウンドの少なくとも2倍、元の標的に結合し、試料中に存在する他の標的には、有意な量で実質的には結合しない。一実施形態では、指定される条件下、特定の結合特異性を有する抗体サイトカイングラフトタ

10

20

30

40

50

ンパク質が、バックグラウンドの少なくとも10倍、元の標的に結合し、試料中に存在する他の標的には、有意な量で実質的には結合しない。このような条件下での抗体サイトカイングラフトタンパク質の特異的結合は、抗体サイトカイングラフトタンパク質を特定の標的に対するその特異性について選択することを要求し得る。結合特異性を決定する方法は、例えば、タンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択するために日常的に使用される固相ELISA免疫測定法である（例えば、特異的免疫反応性を決定するために使用することができる免疫測定法フォーマットおよび条件の記載については、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)参照）。

【0075】

本明細書で使用される場合、「サイトカイン受容体結合特異性」または「サイトカイン受容体特異性」は、IL10受容体に選択的に結合する抗体サイトカイングラフトタンパク質を含み、他のサイトカイン受容体スーパーファミリーメンバーと交差反応する抗体サイトカイングラフトタンパク質を含まない。いくつかの実施形態では、ヒトIL10Rに選択的に結合し、ヒト以外の霊長類IL10R（例えば、カニクイザルIL10R）と交差反応する抗体サイトカイングラフトタンパク質が選択される。いくつかの実施形態では、ヒトIL10R1に選択的に結合する抗体グラフトタンパク質が選択される。

【0076】

「平衡解離定数 (K_D , M)」という用語は、解離速度定数 (k_d , 時間⁻¹) ÷ 会合速度定数 (k_a , 時間⁻¹, M⁻¹) を指す。平衡解離定数は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて測定することができる。本開示の抗体サイトカイングラフトタンパク質は、一般的に約 10^{-7} または 10^{-8} M未満、例えば約 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満、いくつかの実施形態では、約 10^{-11} M、 10^{-12} Mまたは 10^{-13} M未満の平衡解離定数を有する。

【0077】

「IL10」または「インターロイキン10」または「インターロイキン-10 (IL-10)」という用語は、互換的に、マクロファージの活性化を下方制御すると同時に、抗原提示および樹状細胞の成熟を減少させることができる強力な抗炎症性サイトカインを指す。全長天然ヒトの残基19～178を含むIL10がアゴニスト抗体サイトカイングラフトタンパク質の構築に利用されている。本明細書で開示されているヒトIL10は、その全長にわたって、GenBank受託番号NP_000563として公開されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。IL10タンパク質をコードするヒトIL10核酸は、その全長にわたって、GenBank受託番号NM_000572で公開されている核酸配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。

【0078】

「単量体IL10」または「IL10M」は、配列番号209のアミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する分子を指す。いくつかの実施形態では、単量体IL10分子が配列番号209の配列を含む。いくつかの実施形態では、単量体IL10分子が配列番号209の配列からなる。

【0079】

「アゴニスト」という用語は、受容体を活性化して完全なまたは部分的な受容体媒介応答を誘導することができる抗体サイトカイングラフトタンパク質を指す。例えば、IL10RのアゴニストはIL10Rに結合し、IL10R媒介細胞内シグナル伝達および／または細胞活性化を誘導する。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、いくつかの点で天然リガンド、ヒトIL10と同様にIL10Rを通してシグナル伝達を刺激する。hIL10とIL10Rの結合は、I κ Bの分解によりNF κ B活性化を誘導する。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質アゴニストが、IL10Rに結合し、STAT3リン酸化を誘導し、炎症性サイトカイン（例えば、TNF α 、IL1、IL

10

20

30

40

50

6、IL12、IFN γ)の産生ならびに／あるいはマクロファージの分化および増殖を誘導し；T細胞（例えば、CD8⁺CTLまたはCD4⁺Th細胞）増殖、生存、細胞溶解活性および／またはサイトカイン産生（例えば、IFN γ 、IL10、IL13、TNF α ）を誘導するその能力によって、あるいは本明細書に記載されるように同定され得る。

【0080】

核酸またはタンパク質に適用する場合の「単離」という用語は、核酸またはタンパク質が、自然の状態で会合している他の細胞成分を本質的に含まないことを表す。これは好ましくは均質な状態である。これは無水溶液または水溶液であり得る。純度および均質性は、典型的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を用いて決定される。調製物中に存在する主な種であるタンパク質が実質的に精製される。特に、単離遺伝子は、その遺伝子に隣接し、対象となる遺伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離される。「精製」という用語は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲル中に本質的に1つのバンドを生じることを表す。特に、これは、核酸またはタンパク質が少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、最も好ましくは少なくとも99%純粋であることを意味する。

【0081】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖型のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)およびこれらのポリマーを指す。特に限定しない限り、この用語は、基準核酸と類似の結合特性を有し、天然ヌクレオチドと類似の様式で代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に指示しない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾された変異型（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNPsおよび相補的配列ならびに明示的に示される配列を包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成され得る(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); およびRossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

【0082】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書において互換的に使用される。これらの用語を、1個または複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的な化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用する。

【0083】

「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびに後で修飾されるアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造、すなわち水素に結合した α -炭素、カルボキシル基、アミノ基およびR基を有する化合物、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。このような類似体は修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同じ基本的化学構造を保持している。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と類似の様式で機能する化学化合物を指す。

【0084】

「保存的に修飾された変異型」をアミノ酸配列と核酸配列の両方に適用する。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異型は、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指す、また核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝暗号の縮重のために、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全てアミノ

10

20

30

40

50

酸アラニンをコードする。よって、アラニンがコドンによって指定される全ての位置で、コードされるポリペプチドを変化させることなく、コドンを記載される対応するコドンのいずれかに変化させることができる。このような核酸変異型は、保存的に修飾された変異型のある種である「サイレント変異型」である。ポリペプチドをコードする本明細書の全ての核酸配列は、核酸の全ての可能なサイレント変異型も記載する。当業者であれば、核酸の各コドン（通常はメチオニンについての唯一のコドンであるAUG、および通常はトリプトファン唯一のコドンであるTGGを除く）を修飾して機能的に同一の分子を得ることができることを認識するだろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異型は各記載される配列に暗示されている。

【0085】

アミノ酸配列に関して、当業者であれば、変化が化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす場合、コードされる配列中の単一アミノ酸またはアミノ酸の少ない割合を変化、付加または欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加が、「保存的に修飾された変異型」であることを認識するだろう。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野で周知である。このような保存的に修飾された変異型は、多型変異型、種間ホモログおよび対立遺伝子に加えたものであり、これらを除外しない。以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リジン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、スレオニン (T)；および8) システイン (C)、メチオニン (M)（例えば、Creighton, Proteins (1984)参照）。

【0086】

「配列同一性の割合」は、比較窓に対して2つの最適に整列した配列を比較することによって決定され、比較窓中のポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適アラインメントのための付加も欠失も含まない基準配列（例えば、ポリペプチド）と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでよい。割合は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両配列中に生じる位置の数を決定して、一致した位置の数を得て、一致した位置の数を比較窓の位置の総数で割って、結果に100を掛けて、配列同一性の割合を得ることによって計算される。

【0087】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一」または「同一性」%という用語は、同じ配列である2つ以上の配列または部分列を指す。以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いてまたは手動のアラインメントおよび目視によって測定して最大の対応となるように比較および整列させた場合に、比較窓または指定される領域にわたって同じである（すなわち、指定された領域、または指定されていない場合、基準配列の配列全体にわたって少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%配列同一性）、指定された割合のアミノ酸残基またはヌクレオチドを2つの配列が有する場合、2つの配列は「実質的に同一」である。本開示は、それぞれ本明細書で例示されるポリペプチドまたはポリヌクレオチドと実質的に同一なポリペプチドまたはポリヌクレオチドを提供する（例えば、配列番号13、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号45、配列番号46、配列番号61、配列番号62、配列番号77、配列番号78、配列番号93、配列番号94、配列番号109、配列番号110、配列番号125、配列番号126、配列番号141、配列番号142、配列番号157、配列番号158、配列番号173、配列番号174、配列番号189、配列番号190、配列番号205、配列番号206；配列番号222、配列番号223、配列番号238、配列番号239のいずれか1つに例示される可変領域；配列番号15、配列番号16、配列番号31、配列番号32、配列番号47、配列番号48、配列番号63、配列番号64、配列番号79、配列番号80、配列番号95、配列番号96、配列番号111、配列番号112、配列番

号127、配列番号128、配列番号143、配列番号144、配列番号159、配列番号160、配列番号175、配列番号176、配列番号191、配列番号192、配列番号207、配列番号208、配列番号224、配列番号225、配列番号240、配列番号241のいずれか1つに例示される可変領域；配列番号13、配列番号14、配列番号29、配列番号30、配列番号45、配列番号46、配列番号61、配列番号62、配列番号77、配列番号78、配列番号93、配列番号94、配列番号109、配列番号110、配列番号125、配列番号126、配列番号141、配列番号142、配列番号157、配列番号158、配列番号173、配列番号174、配列番号189、配列番号190、配列番号205、配列番号206、配列番号222、配列番号223、配列番号238および配列番号239のいずれか1つに例示されるCDR。場合により、少なくとも約15、25または50ヌクレオチド長である領域にわたって、より好ましくは100～500または1000以上のヌクレオチド長である領域にわたって、または基準配列の全長にわたって、同一性が存在する。アミノ酸配列に関して、少なくとも5、10、15または20アミノ酸長、場合により少なくとも約25、30、35、40、50、75または100アミノ酸長、場合により少なくとも約150、200または250アミノ酸長である領域にわたって、または基準配列の全長にわたって、同一性または実質的同一性が存在し得る。より短いアミノ酸配列、例えば20個以下のアミノ酸のアミノ酸配列に関して、本明細書で定義される保存的置換に従って、1個または2個のアミノ酸残基が保存的に置換されている場合、実質的同一性が存在する。

10

【0088】

20

配列比較のために、典型的には1つの配列が、試験配列を比較する基準配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列と基準配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、後の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用することができる、あるいは代わりのパラメータを指定することができる。次いで、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づいて、基準配列に対する試験配列の配列同一性%を計算する。

【0089】

本明細書で使用される「比較窓」は、20～600、通常約50～約200、さらに通常約100～約150からなる群から選択されるいずれか1つの数の連続する位置の (of any one of the number of contiguous positions selected from) セグメントであって、配列を、同じ数の連続する位置の基準配列と、それら2つの配列を最適に整列させた後に比較することができる、セグメントを参照することを含む。比較のために配列を整列させる方法は当技術分野で周知である。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性のための検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA) または手動アラインメントおよび目視 (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)) によって行うことができる。

30

40

【0090】

配列同一性および配列類似性%を決定するために適したアルゴリズムの2つの例は、それぞれAltschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されているBLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムである。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センターを通して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合に、ある正の値の閾値スコアTに一致するまたはこれを満たすクエリー配列中の長さWの短いワードを同定することによって、高スコア

50

配列ペア (H S P) を最初に同定することを含む。T は近隣ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschul et al., 上記)。これらの初期近隣ワードヒットが、それらを含むより長い H S P を見つけるための検索を開始するための種として作用する。累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、ワードヒットを各配列に沿って両方向に拡張する。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータ M (一致残基のペアについての報酬スコア; 常に > 0) および N (ミスマッチ残基についてのペナルティスコア; 常に < 0) を用いて計算する。アミノ酸配列については、スコアリングマトリクスを使用して累積スコアを計算する。累積アラインメントスコアがその最大達成値から量 X 減った場合; 1 つまたは複数の負のスコアの残基アラインメントの蓄積のために累積スコアが 0 以下になった場合; または各配列の端に達した場合、各方向のワードヒットの拡張を停止する。B L A S T アルゴリズムパラメータ W、T および X は、アラインメントの感度および速度を決定する。B L A S T N プログラム (ヌクレオチド配列について) は、デフォルトとして、ワード長 (W) 11、期待値 (E) または 10、M = 5、N = 4 および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、B L A S T P プログラムは、デフォルトとして、ワード長 3、および期待値 (E) 10、および B L O S U M 6 2 スコアリングマトリクス (Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 参照) アラインメント (B) 50、期待値 (E) 10、M = 5、N = 4、および両鎖の比較を使用する。

【0091】

B L A S T アルゴリズムはまた、2 つの配列間の類似性の統計解析も行う (例えば、Karlín and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5783-5787 参照)。B L A S T アルゴリズムによって提供される類似性の 1 つの尺度は最小和確率 (P (N)) であり、これは 2 つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の一致が偶然に起こる確率の指標を提供する。例えば、試験核酸と基準核酸の比較における最小和確率が約 0.2 未満、より好ましくは約 0.01 未満、最も好ましくは約 0.001 未満である場合に、核酸を基準配列と類似とみなす。

【0092】

2 つの核酸配列またはポリヌクレオチドが実質的に同一である指標は、第 1 の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に記載されるように、第 2 の核酸によってコードされるポリペプチドに対して生じる抗体と免疫学的に交差反応性であることである。よって、例えば、2 個のペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、ポリペプチドは第 2 のポリペプチドと典型的に実質的に同一である。2 つの核酸配列が実質的に同一である別の指標は、2 個の分子またはその相補物が以下に記載されるようなストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2 つの核酸配列が実質的に同一であるさらに別の指標は、同じプライマーを使用して配列を増幅することができることである。

【0093】

「抗体サイトカイングラフトタンパク質」または「抗体サイトカイングラフト」または「グラフトした」という用語は、少なくとも 1 つのサイトカインを抗体の C D R に直接組み込んで、C D R の配列を中断することを意味する。サイトカインを H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2 または L C D R 3 に組み込むことができる。サイトカインを H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2 または L C D R 3 に組み込むことができ、C D R の N 末端配列に向けてまたは C D R の C 末端配列に向けて組み込むことができる。C D R に組み込まれたサイトカインは抗体部分とその標的タンパク質の特異的結合を減少させることができる、または抗体サイトカイングラフトタンパク質はその標的タンパク質との特異的結合を保持することができる。

【0094】

「免疫関連障害」または「免疫疾患」とは、体の自身の免疫系が健康な組織を攻撃する免疫系の機能障害を指す。機能障害は、免疫細胞の成分にあり得、過活動免疫系と不活発免疫系の両方を含む。

【0095】

「対象」、「患者」および「個体」という用語は、互換的に哺乳動物、例えば、ヒトま

10

20

30

40

50

たはヒト以外の霊長類哺乳動物を指す。哺乳動物は、実験室哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスターであってもよい。いくつかの実施形態では、哺乳動物が農業用哺乳動物（例えば、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ラクダ）または家庭用哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ）であり得る。

【0096】

本明細書で使用される場合、任意の疾患または障害の「治療する」、「治療すること」または「治療」という用語は、一実施形態では、疾患または障害を改善する（すなわち、疾患の発達またはその臨床症状の少なくとも1つを遅延または停止または低減する）ことを指す。別の実施形態では、「治療する」、「治療すること」または「治療」が、患者によって認識され得ないものを含む、少なくとも1つの物理パラメータを緩和または改善することを指す。さらに別の実施形態では、「治療する」、「治療すること」または「治療」が、物理的（例えば、認識可能な症状の安定化）、生理的（例えば、物理パラメータの安定化）またはその両方で、疾患または障害を調節することを指す。さらに別の実施形態では、「治療する」、「治療すること」または「治療」または「予防」が、疾患または障害の発症または発達または進行を防止するまたは遅延させることを指す。

【0097】

「治療的に許容される量」または「治療上有効用量」という用語は、互換的に所望の結果（すなわち、炎症の減少、疼痛の抑制、炎症の予防、炎症反応の抑制または予防）を及ぼすために十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療的に許容される量が、望ましくない副作用を誘発もせず、引き起こしもしない。治療的に許容される量は、最初に低用量を投与し、次いで、所望の効果が達成されるまで、その用量を徐々に増加させることによって決定することができる。「予防上有効投与量」および「治療上有効投与量」のIL10抗体サイトカイングラフトタンパク質は、免疫関連障害に関連する症状を含む疾患症状を、それぞれ、その開始を防止する、またはその重症度の低下をもたらすことができる。

【0098】

「同時投与する」という用語は、個体における2種（またはそれよりも多く）の活性剤の同時の存在を指す。同時投与される活性剤は同時にまたは順次送達することができる。

【0099】

本明細書で使用される場合、「～から本質的になる」という句は、方法または組成物に含まれる活性医薬剤、ならびに方法または組成物の意図した目的のための任意の不活性担体または賦形剤の属または種を指す。いくつかの実施形態では、「～から本質的になる」という句が、IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質以外の1種または複数の追加の活性剤の包含を明示的に除外する。いくつかの実施形態では、「～から本質的になる」という句が、IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質および第2の同時投与薬剤以外の追加の活性剤の包含を明示的に除外する。

【0100】

「a」、「an」および「the」という用語は、特に文脈上明確に指示しない限り、複数指示対象を含む。

【0101】

詳細な説明

IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質

インターロイキン-10（IL10）は、免疫刺激活性と免疫抑制活性の両方を有する多機能性ホモ二量体免疫調節性サイトカインである。IL10は、活性化単球およびマクロファージ中のいくつかの炎症性サイトカインを誘導するが、未成熟および成熟リンパ球、肥満細胞ならびにB細胞の補助刺激分子である（Mosmann, Adv. Immunol. 1994; 56:1-26; Moore et al., Annu Rev Immunol. 2001;19:683-765に概説）。抗体の相補性決定領域（CDR）にグラフトした単量体IL10を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質が本明細書で提供される。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、ヒト患者で使用するのに適した特性を示す、例えば、これらは天然または組換えヒトIL10と類似の免疫抑

制活性を保持しているが、炎症促進効果は減少している。

【0102】

したがって、本開示は、選択的活性プロファイルを有する I L 1 0 受容体のアゴニストである抗体サイトカイングラフトタンパク質を提供する。提供される抗体サイトカイングラフトタンパク質は、免疫グロブリン重鎖配列および免疫グロブリン軽鎖配列を含む。各免疫グロブリン重鎖配列は重鎖可変領域 (V H) および重鎖定常領域 (C H) を含み、重鎖定常領域は C H 1、C H 2 および C H 3 定常領域からなる。各免疫グロブリン軽鎖配列は軽鎖可変領域 (V L) および軽鎖定常領域 (C L) を含む。各抗体サイトカイングラフトタンパク質では、単量体 I L 1 0 分子が V H または V L 領域の相補性決定領域 (C D R) にグラフトされている。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が重鎖 C D R にグラフトした単量体 I L 1 0 を含む。特定の実施形態では、単量体 I L 1 0 が重鎖相補性決定領域 1 (H C D R 1) にグラフトされている。特定の実施形態では、単量体 I L 1 0 が重鎖相補性決定領域 2 (H C D R 2) にグラフトされている。特定の実施形態では、単量体 I L 1 0 が重鎖相補性決定領域 3 (H C D R 3) にグラフトされている。

【0104】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が軽鎖 C D R にグラフトした単量体 I L 1 0 を含む。特定の実施形態では、単量体 I L 1 0 が軽鎖相補性決定領域 1 (L C D R 1) にグラフトされている。特定の実施形態では、単量体 I L 1 0 が軽鎖相補性決定領域 2 (L C D R 2) にグラフトされている。特定の実施形態では、単量体 I L 1 0 が軽鎖相補性決定領域 3 (L C D R 3) にグラフトされている。好ましい実施形態では、単量体 I L 1 0 が軽鎖相補性決定領域 1 (L C D R 1) にグラフトされている。

20

【0105】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が C D R にグラフトした単量体 I L 1 0 を含み、I L 1 0 配列が C D R 配列に挿入されている。グラフトした I L 1 0 は C D R の N 末端部分もしくはその近く、C D R の中心領域または C D R の C 末端部分もしくはその近くにあり得る。他の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が C D R に組み込まれた単量体 I L 1 0 を含み、I L 1 0 配列が C D R 配列の全てまたは一部に置き換わっている。置換は C D R の開始もしくはその近く、C D R の中央領域または C D R の末端もしくはその近くにあり得る。置換は C D R 配列のわずか 1 個もしくは 2 個のアミノ酸、または C D R 配列全体ほどであり得る。

30

【0106】

いくつかの実施形態では、単量体 I L 1 0 がペプチドリinkerなしに C D R に直接グラフトされている。

【0107】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が I g G クラス抗体重鎖の免疫グロブリン重鎖を含む。特定の実施形態では、I g G 重鎖が I g G 1、I g G 2 または I g G 4 サブクラスのいずれか 1 つである。

【0108】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、公知の、臨床的に利用される免疫グロブリン配列から選択される重鎖免疫グロブリン配列および軽鎖免疫グロブリン配列を含む。特定の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、ヒト化配列である重鎖免疫グロブリン配列および軽鎖免疫グロブリン配列を含む。他の特定の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、ヒト配列である重鎖免疫グロブリン配列および軽鎖免疫グロブリン配列を含む。

40

【0109】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、生殖系列免疫グロブリン配列から選択される重鎖免疫グロブリン配列および軽鎖免疫グロブリン配列を含む。

50

【0110】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、I L 1 0単量体のサイトカイン受容体結合特異性とは異なる、標的に対する免疫グロブリン可変ドメインの結合特異性を有する重鎖免疫グロブリン配列および軽鎖免疫グロブリン配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン可変ドメインの結合特異性がグラフトしたサイトカインの存在下で保持されている。特定の実施形態では、抗体結合特異性がヒト以外の抗原に対するものである。他の実施形態では、結合特異性がI L 1 0療法と併せた治療上の有用性を有する標的に対するものである。特定の実施形態では、免疫グロブリンの結合特異性を調節することがI L 1 0成分に追加の治療上の利益をもたらす。特定の実施形態では、免疫グロブリンの結合特異性が、I L 1 0単量体との相乗的活性をもたらす。

10

【0111】

さらに他の実施形態では、免疫グロブリンの結合特異性が、I L 1 0グラフトサイトカインの存在下で低下している。

【0112】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質がヒトI L 1 0または組換えヒトI L 1 0と類似の抗炎症特性を与え、グラフトタンパク質がヒトI L 1 0または組換えヒトI L 1 0と比較して低下した相対的炎症促進活性を与える。いくつかの実施形態では、相対的（proportional）炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも25%低下している。いくつかの実施形態では、相対的炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも35%低下している。いくつかの実施形態では、相対的炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも50%低下している。いくつかの実施形態では、相対的炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも65%低下している。いくつかの実施形態では、相対的炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも75%低下している。いくつかの実施形態では、相対的炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも80%低下している。いくつかの実施形態では、相対的炎症促進活性がI L 1 0と比較して少なくとも80%低下している。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、修飾されたエフェクター機能を与える修飾されたFcを有する修飾された免疫グロブリンIgGを含む。特定の実施形態では、修飾されたFc領域が、D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、L 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aの1つまたは複数から選択される突然変異を含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A/P 3 2 9 A、D 2 6 5 A/N 2 9 7 A、L 2 3 4 A/L 2 3 5 A、P 3 2 9 A/L 2 3 4 A/L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含み得る。

30

【0114】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、（i）配列番号13の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、（ii）配列番号14の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A/P 3 2 9 A、D 2 6 5 A/N 2 9 7 A、L 2 3 4 A/L 2 3 5 A、P 3 2 9 A/L 2 3 4 A/L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

40

【0115】

50

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 29 の重鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 30 の軽鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

10

【0116】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 45 の重鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 46 の軽鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

20

【0117】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 61 の重鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 62 の軽鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 77 の重鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 78 の軽鎖可変領域と少なくとも 85 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを

40

50

含む。

【0119】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 93 の重鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 94 の軽鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 109 の重鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 110 の軽鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 125 の重鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 126 の軽鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235A および P329G/L234A/L235A のいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

30

40

【0122】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号 141 の重鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号 142 の軽鎖可変領域と少なくとも 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2 または IgG4 から選択される IgG クラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合により D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A

50

、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0123】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号157の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号158の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号173の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号174の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

20

【0125】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号189の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号190の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

30

40

【0126】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号205の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号206の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施

50

形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号222の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号223の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

10

【0128】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号238の重鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖可変領域と、(ii) 配列番号239の軽鎖可変領域と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖可変領域とを含む。免疫グロブリン鎖は、IgG1、IgG2またはIgG4から選択されるIgGクラスである。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

20

30

【0129】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号15と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号16と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

40

【0130】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号31と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号32と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7

50

A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号47と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号48と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号63と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号64と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号79と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号80と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

30

【0134】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号95と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号96と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A／P 3 2 9 A、D 2 6 5 A／N 2 9 7 A、L 2 3 4 A／L 2 3 5 A、P 3 2 9 A／L 2 3 4 A／L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G／L 2 3 4 A／L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

40

【0135】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号111と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

50

96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号112と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号127と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号128と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0137】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号143と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号144と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0138】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号159と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号160と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329G/L234A/L235Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0139】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号175と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号176と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234A/L235A、P329A/L234A/L235AおよびP329

G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号191と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号192と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A/P 3 2 9 A、D 2 6 5 A/N 2 9 7 A、L 2 3 4 A/L 2 3 5 A、P 3 2 9 A/L 2 3 4 A/L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

10

【0141】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号207と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号208と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A/P 3 2 9 A、D 2 6 5 A/N 2 9 7 A、L 2 3 4 A/L 2 3 5 A、P 3 2 9 A/L 2 3 4 A/L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

20

【0142】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号224と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号225と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A/P 3 2 9 A、D 2 6 5 A/N 2 9 7 A、L 2 3 4 A/L 2 3 5 A、P 3 2 9 A/L 2 3 4 A/L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

30

【0143】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、(i) 配列番号240と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する重鎖と、(ii) 配列番号241と少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%アミノ酸配列同一性を有する軽鎖とを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、場合によりD 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、D 2 6 5 A/P 3 2 9 A、D 2 6 5 A/N 2 9 7 A、L 2 3 4 A/L 2 3 5 A、P 3 2 9 A/L 2 3 4 A/L 2 3 5 AおよびP 3 2 9 G/L 2 3 4 A/L 2 3 5 Aのいずれかから選択される低下したエフェクター機能を与える突然変異または突然変異の組合せを含む。

40

【0144】

操作および修飾された抗体サイトカイングラフトタンパク質

抗体サイトカイングラフトタンパク質は、単量体 I L 1 0 配列を免疫グロブリン足場の C D R 領域にグラフトすることによって生成される。重鎖免疫グロブリンと軽鎖免疫グロ

50

ブリンの両方を製造して最終的な抗体グラフトタンパク質を生成する。抗体サイトカイングラフトタンパク質は I L 1 0 の好ましい治療上の抗炎症特性を与えるが、抗体サイトカイングラフトタンパク質は、天然または組換えヒト I L 1 0 (r h I L 1 0) と比較して低下した相対的炎症促進活性を有する。

【 0 1 4 5 】

グラフト構築物を設計するために、全長 I L 1 0 の残基 1 9 ~ 1 7 8 および残基 1 3 4 と 1 3 5 との間の 6 つのアミノ酸配列を含む単量体 I L 1 0 (I L 1 0 M、配列番号 2 0 9) を、免疫グロブリン足場の C D R ループにグラフトした。グラフト構築物は、種々の臨床設定で利用されている公知の免疫グロブリン配列、現在発見および／または臨床開発中の公知の免疫グロブリン配列、ヒト生殖系列抗体配列、ならびに新規な抗体免疫グロブリン鎖の配列のいずれかを用いて調製することができる。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、関連する配列をコードする組換え D N A を利用する標準的な分子生物学方法論を用いて生成される。G F T X 1 および G F T X 3 と呼ばれる 2 つの例示的な足場中の I L 1 0 M の配列を表 1 に示す。I L 1 0 単量体の挿入点は、入手可能な構造的または相同性モデルデータに基づいてループの中心点となるよう選択したが、C D R ループの一端または他端に向けて挿入点を調節してもよい。

【 0 1 4 6 】

よって、本開示は、抗体サイトカイングラフトタンパク質を生成するために種抗体タンパク質またはポリペプチドに組換え的に挿入された I L 1 0 M タンパク質を含む、サイトカイン受容体が I R 1 0 R タンパク質に特異的に結合する抗体サイトカイングラフトタンパク質またはその断片を提供する。特に、本開示は、本明細書に記載される抗体もしくは抗体の抗原結合断片、または任意の他の関連する足場抗体ポリペプチド（例えば、完全抗体免疫グロブリンタンパク質、F a b 断片、F d 断片、F v 断片、F (a b) 2 断片、V H ドメイン、V H C D R、V L ドメイン、V L C D R 等）および異種サイトカインタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド、例えば I L 1 0 M を含むグラフトタンパク質を提供する。タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを抗体または抗体断片に結合する方法は当技術分野で公知である。例えば、米国特許第 5 3 3 6 6 0 3 号明細書、第 5 6 2 2 9 2 9 号明細書、第 5 3 5 9 0 4 6 号明細書、第 5 3 4 9 0 5 3 号明細書、第 5 4 4 7 8 5 1 号明細書および第 5 1 1 2 9 4 6 号明細書；欧州特許第 3 0 7 4 3 4 号明細書および欧州特許第 3 6 7 1 6 6 号明細書；国際公開第 9 6 / 0 4 3 8 8 号パンフレットおよび国際公開第 9 1 / 0 6 5 7 0 号パンフレット；Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539；Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600；および Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 を参照されたい。さらに、抗体サイトカイングラフトタンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリングおよび／またはコドンシャフリング（まとめて「D N A シャフリング」と呼ぶ）の技術を通して生成することができる。D N A シャフリングを使用して、抗体サイトカイングラフトタンパク質を調製するおよび／または抗体もしくはその断片の活性を変化させることができる（例えば、高い親和性および低い解離速度を有する抗体またはその断片）。概して、米国特許第 5 6 0 5 7 9 3 号明細書、第 5 8 1 1 2 3 8 号明細書、第 5 8 3 0 7 2 1 号明細書、第 5 8 3 4 2 5 2 号明細書および第 5 8 3 7 4 5 8 号明細書；Patten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33；Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76；および Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313（これらの特許および刊行物はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。抗体もしくはその断片、またはコードされた抗体もしくはその断片をランダム突然変異誘発に供する、エラープローン P C R、ランダムヌクレオチド挿入または組換え前の他の方法により変化させることができる。対象となる抗原タンパク質に特異的に結合する抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチドを、本明細書で提供される抗体サイトカイングラフトタンパク質を調製するために、1 個または複数の異種サイトカイン分子、例えば I L 1 0 M の 1 つまたは複数の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片等で組み換え

ることができる。

【0147】

抗体Fabは、サイトカインタンパク質の潜在的な挿入部位として役立ち得る6つのCDRループ、軽鎖の3つ(CDR L1、CDR L2、CDR L3)および重鎖の3つ(CDR H1、CDR H2、CDR H3)を含む。どのCDRループ(複数可)にサイトカインを挿入するかを決定するために、構造的および機能的検討を考慮する。CDRループサイズおよびコンフォメーションは様々な抗体で大いに変化するので、挿入のための最適なCDRは、各特定の抗体／タンパク質組合せについて経験的に決定することができる。さらに、サイトカインタンパク質をCDRループに挿入するので、これはサイトカインタンパク質の構造にさらなる制約を課し得る。例えば、サイトカインタンパク質のアミノおよびカルボキシ末端は、空間的に比較的近くに(約25 Å)限定される可能性を許すべきである。さらに、抗体サイトカイングラフトタンパク質は、生物学的活性についてオリゴマー化に依拠すべきでない。

10

【0148】

IL10はドメイン交換構造を使用するホモ二量体サイトカインである。天然型では、ドメイン交換構造が形成され得ない(すなわち、N末端とC末端の両方がループに束縛されている)ので、IL10は抗体グラフトに適さないだろう。しかしながら、DヘリックスとEヘリックスとの間に6個の残基配列((GGGSGG)(配列番号251))を挿入することによって作製された設計された単量体IL10(IL10M)は、EヘリックスとFヘリックス(天然二量体構造では、交換により他のIL10単量体中にある)が同じ単量体に折り重なって(Josephson et al J. Biol.Chem. 2000; 275(18) 13552-7)、図2および図13に示される抗体サイトカイングラフトタンパク質中に存在する構造を作り出すことを可能にする。Josephsonらは、6個のアミノ酸挿入を有するIL10単量体が野生型二量体よりも熱安定性であり、IL10受容体鎖(IL10R1)と1:1相互作用を形成することもできることを実証した。IL10Mはまた、野生型IL10より9~18倍活性が低い、インビトロ活性を有する。IL10Mの別の特徴は、N末端とC末端が互いに空間的に近く、これによって修飾されたサイトカインタンパク質が抗体グラフトに適したものになっているということである。

20

【0149】

本開示の抗体サイトカイングラフトタンパク質は、出発抗体から変化した特性を有していてもよい修飾抗体サイトカイングラフトタンパク質を設計するために、出発材料として本明細書(例えば、表1)に示されるCDRおよび／またはVHおよび／またはVL配列の1つまたは複数を有する抗体を用いて調製することができる。あるいは、任意の公知の抗体配列を足場として利用して修飾された抗体サイトカイングラフトタンパク質を設計してもよい。例えば、任意の公知の、臨床的に利用される抗体を、抗体サイトカイングラフトタンパク質を調製するための出発材料足場として利用することができる。公知の抗体および対応する免疫グロブリン配列は、例えばパリスズマブ、アリロクマブ、メポリズマブ、ネシツムマブ、ニボルマブ、ジヌツキシマブ、セクキヌマブ、エボロクマブ、ブリナツモマブ、ペンブロリズマブ、ラムシルマブ、ベドリズマブ、シルツキシマブ、オビヌツズマブ、トラスツズマブ、ラキシバクマブ、ベルツズマブ、ベリムマブ、イピリムマブ、デノスマブ、トシリズマブ、オフアツムマブ、カナキヌマブ、ゴリムマブ、ウスデキヌマブ、セルトリズマブ、カツマキソマブ、エクリズマブ、ラニビズマブ、パニツムマブ、ナタリズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、エファリズマブ、オマリズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、アダリムマブ、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、インフリキシマブ、バシリキシマブ、ダクリズマブ、リツキシマブ、アブシキシマブ、ムロモナブまたはこれらの修飾を含む。公知の抗体および免疫グロブリン配列はまた、生殖系列抗体配列も含む。フレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公的DNAデータベースまたは公開されている参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース、ならびにKabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Protei

30

40

50

ns of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Biol. 227:776-798; および Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J. Immunol. 24:827-836に見出すことができる。さらに他の例では、早期の発見および／または薬物開発であり得る他の公知の実体からの抗体および対応する免疫グロブリン配列を同様に出発材料として適合させて、修飾された抗体サイトカイングラフトタンパク質を設計することができる。

【0150】

得られるポリペプチドがサイトカイン（例えば、IL10M）の組み込みを受け容れる少なくとも1つの結合領域を含む限り、多種多様な抗体／免疫グロブリンフレームワークまたは足場を使用することができる。このようなフレームワークまたは足場は、ヒト免疫グロブリンまたはその断片の5つの主要なイデオタイプを含み、好ましくはヒト化および／またはヒト側面を有する他の動物種の免疫グロブリンを含む。新規な抗体、フレームワーク、足場および断片が当業者によって発見および開発され続けている。

10

【0151】

抗体は当技術分野で公知の方法を用いて生成することができる。モノクローナル抗体を調製するために、当技術分野で公知の任意の技術を使用することができる（例えば、Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985参照）。単鎖抗体を製造するための技術（米国特許第4946778号明細書）を適合させて、本開示の抗体グラフトタンパク質に使用するための抗体を製造することができる。また、トランスジェニックマウスまたは他の生物（他の哺乳動物など）を使用して、霊長類化またはヒト化またはヒト抗体を発現させ、同定することができる。あるいは、ファージディスプレイ技術を使用して、抗体サイトカイングラフトタンパク質に使用するために選択された抗原に特異的に結合する抗体およびヘテロマーFab断片を同定することができる（例えば、McCafferty et al., 上記; Marks et al., Biotechnology, 10:779-783, (1992)参照）。

20

【0152】

ヒト以外の抗体を霊長類化またはヒト化する方法は当技術分野で周知である。一般的に、霊長類化またはヒト化抗体は、霊長類以外またはヒト以外の供給源からそこに導入された1個または複数のアミノ酸残基を有する。このような霊長類以外またはヒト以外のアミノ酸残基はしばしばインポート残基と呼ばれ、典型的にはインポート可変ドメインからとられる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の対応する配列の代わりにげっ歯類CDRまたはCDR配列を用いることによって、Winterおよび共同研究者の方法（例えば、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)参照）に従って行うことができる。したがって、このようなヒト化抗体はキメラ抗体（米国特許第4816567号明細書）であり、完全ヒト可変ドメインより実質的に少ないものがヒト以外の種の対応する配列によって置換されている。実際、霊長類化またはヒト化抗体は、典型的にはある相補性決定領域（「CDR」）残基およびおそらくはあるフレームワーク（「FR」）残基が元の種（例えば、げっ歯類抗体）の類似の部位の残基によって置換されて結合特異性を与える霊長類またはヒト抗体である。

30

40

【0153】

あるいはまたはさらに、ヒト以外の抗体と同じ結合特性を維持するまたはこれより優れた結合特性を提供しながら、抗体においてヒト以外の抗体可変領域をヒト可変領域で置き換えるインビボ法を利用して、ヒト以外の抗体を設計されたヒト抗体に変換することができる。例えば、米国特許出願公開第20050008625号明細書、米国特許出願公開第2005/0255552号明細書を参照されたい。あるいは、基準抗体Vセグメントの一部のみを最初にヒト配列のライブラリーによって置き換え、次いで、残りの基準抗体アミノ酸配列において結合を支持する同定されたヒト「カセット」を第2のライブラリースクリーンで組み換えて、ヒトVセグメントを完全に生成する順次カセット置換によって

50

、ヒトVセグメントライブラリーを生成することができる（米国特許出願公開第2006／0134098号明細書参照）。

【0154】

抗体サイトカイングラフトタンパク質の調製に使用するための種々の抗体または抗原結合断片は、完全抗体の酵素的もしくは化学的修飾によって製造することができる、または組換えDNA方法論（例えば、単鎖Fv）を用いて新規に合成することができる、またはファージディスプレイライブラリーを用いて同定することができる（例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990参照）。例えば、当技術分野、例えばVaughan and Söllazzo, Comb Chem High Throughput Screen. 4:417-30 2001で記載されている方法を用いて、ミニ抗体（minibody）を生成することができる。二重特異性抗体は、ハイブリドーマのグラフトまたはFab'断片の連結を含む種々の方法によって製造することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelný et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)を参照されたい。単鎖抗体は、ファージディスプレイライブラリーまたはリボソームディスプレイライブラリー、遺伝子シャッフルライブラリーを用いて同定することができる。このようなライブラリーは、合成、半合成または天然および免疫適格供給源から構築することができる。よって、選択された免疫グロブリン配列を本明細書で提供される抗体サイトカイングラフトタンパク質の調製に利用することができる。

10

【0155】

本開示で使用する抗体または抗原結合分子は、二重特異性抗体をさらに含む。二重特異性または二官能性抗体は、2つの異なる重／軽鎖ペアおよび2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。他の抗原結合断片または抗体部分には、二価scFv（ダイアボディ）、二重特異性scFv抗体（抗体分子が2つの異なるエピトープを認識する）、単一結合ドメイン（dAb）およびミニ抗体が含まれる。選択された免疫グロブリン配列を本明細書で提供される抗体サイトカイングラフトタンパク質の調製に利用することができる。

20

【0156】

抗体の抗原結合断片、例えばFab断片、scFvを、抗体サイトカイングラフトタンパク質を構築するための構築ブロックとして使用することができ、これらは場合により多価フォーマットを含む。いくつかの実施形態では、このような多価分子が、抗体の定常領域（例えば、Fc）を含む。

30

【0157】

抗体サイトカイングラフトタンパク質は、抗体の一方または両方の可変領域（すなわち、VHおよび／またはVL）内、例えば1つまたは複数のCDR領域内の1個または複数の残基を修飾することによって設計することができ、このような適合VHおよび／またはVL領域配列を、抗体サイトカイングラフトタンパク質を調製するためのサイトカインの組み込みに利用することができる。行うことができる1つのタイプの可変領域設計はCDRグラフトである。抗体は主に6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域（CDR）に位置するアミノ酸残基を通して標的抗原と相互作用する。この理由のために、CDR内のアミノ酸配列はCDRの外側の配列よりも個々の抗体間で多様である。CDR配列はほとんどの抗体-抗原相互作用を担い、異なる特性を有する異なる抗体のフレームワーク配列上にグラフトした特異的抗体のCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現することが可能である（例えば、Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; Winterの米国特許第5225539号明細書ならびにQueenらの米国特許第5530101号明細書；第5585089号明細書；第5693762号明細書および第6180370号明細書参照）。一定の例では、フレームワーク内の残基を突然変異させて抗体の抗原結合能力を維持または増強することが有益である（例えば、Queenらの米国特許第5530101号明細書；第5585089号明細書；第5693762号明細書および第618

40

50

0370号明細書参照)。

【0158】

いくつかの態様では、「親和性成熟」として知られている、対象となる抗体の1つまたは複数の結合特性(例えば、親和性)を改善するためのVHおよび/またはVL CDR1、CDR2および/またはCDR3領域内のアミノ酸残基の突然変異が、例えば、サイトカイングラフトタンパク質の状況と併せて抗体の抗原結合を最適化するのに有益となり得る。部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発を行って、突然変異(複数可)および抗体結合に対する効果を導入することができる、または対象となる他の機能的特性を本明細書に記載されるインビトロまたはインビボアッセイで評価し、実施例および/または当技術分野で公知の代替もしくは追加のアッセイで提供することができる。保存的修飾を導入することができる。突然変異はアミノ酸置換、付加または欠失であり得る。さらに、典型的にはCDR領域内の1個、2個、3個、4個または5個以下の残基を変化させる。

10

【0159】

設計された抗体または抗体断片は、例えば抗体の特性を改善するために、VHおよび/またはVL内のフレームワーク残基に修飾がなされたものである。いくつかの実施形態では、このようなフレームワーク修飾を行って抗体の免疫原性を低下させる。例えば、1つの手法は、1個または複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列へと「復帰突然変異(backmutate)」させることである。より具体的には、体細胞突然変異を経験した抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含む。このような残基は、抗体フレームワーク配列を抗体が由来する生殖系列配列と比較することによって同定することができる。フレームワーク領域配列をその生殖系列構成に戻すために、例えば、部位特異的突然変異誘発によって、体細胞突然変異を生殖系列配列に「復帰突然変異」させることができる。このような「復帰突然変異」抗体も本開示によって包含されることを意図している。さらなるフレームワーク修飾は、フレームワーク領域内または1つもしくは複数のCDR領域内の1個または複数の残基を突然変異させてT細胞エпитープを除去し、それによって抗体の潜在的な免疫原性を低下させることを含む。この手法はまた「脱免疫化(deimmunization)」とも呼ばれ、Carraによる米国特許出願公開第2003/0153043号明細書にさらに詳細に記載されている。

20

【0160】

抗体サイトカイングラフトタンパク質の調製に利用される抗体または抗体断片の定常領域は、適宜、任意のタイプまたはサブタイプであってよく、本方法によって治療される対象の種(例えば、ヒト、ヒト以外の霊長類または他の哺乳動物、例えば農業用哺乳動物(例えば、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ラクダ)、家庭用哺乳動物(例えば、イヌ、ネコ)またはげっ歯類(例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ))のものとなるよう選択することができる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質に利用される抗体がヒト化またはHumanized(登録商標)抗体を生成するように設計される。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質に利用される抗体がヒト抗体である。いくつかの実施形態では、抗体定常領域アイソタイプがIgG、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4である。特定の実施形態では、定常領域アイソタイプがIgG₁である。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質がIgGを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質がIgG1Fcを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質がIgG2Fcを含む。

30

40

【0161】

フレームワークまたはCDR領域内になされた修飾に加えてまたはその代わりに、抗体サイトカイングラフトタンパク質の調製に利用される抗体または抗体断片を、典型的には抗体の1つまたは複数の機能的特性、例えば血清中半減期、補体結合、Fc受容体結合および/または抗原依存性細胞傷害性を変化させるためにFc領域内に修飾を含むように設計することができる。さらに、抗体または抗体断片を化学的に修飾する(例えば、1つま

50

たは複数の化学的部分を抗体に結合させることができる) またはそのグリコシル化を変化させるよう修飾して、抗体サイトカイングラフトタンパク質の1つまたは複数の機能的特性を同様に变化させることができる。

【0162】

一実施形態では、ヒンジ領域中のシステイン残基の数を変化させる、例えば増加または減少させるように、CH1のヒンジ領域を修飾する。例えば、Bodmerらによって米国特許第5677425号明細書にさらに記載されている手法では、CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数が、例えば、軽鎖および重鎖の集合を容易にする、または抗体サイトカイングラフトタンパク質の安定性を増加もしくは減少させるよう変化させられる。別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域が抗体サイトカイングラフトタンパク質の生物学的半減期を変化させるよう突然変異させられる。より具体的には、抗体サイトカイングラフトタンパク質が天然Fc-ヒンジドメインSpA結合に対して損なわれたブドウ球菌(Staphylococcy)タンパク質(SpA)結合を有するように、1つまたは複数のアミノ酸突然変異がFcヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域に導入される。この手法はWardらによる米国特許第6165745号明細書にさらに詳細に記載されている。

【0163】

本開示は、インビボで延長した半減期を有するIL10Rタンパク質に特異的に結合する抗体サイトカイングラフトタンパク質を提供する。別の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、その生物学的半減期を増加させるよう修飾される。種々の手法が可能である。インビボで増加した半減期を有する抗体サイトカイングラフトタンパク質は、1つまたは複数のアミノ酸修飾(すなわち、置換、挿入または欠失)をIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合断片(好ましくは、FcまたはヒンジFcドメイン断片)に導入して生成することもできる。例えば、Wardらの米国特許第6277375号明細書に記載されるように、以下の突然変異の1つまたは複数を導入することができる: T252L、T254S、T256F。例えば、国際公開第98/23289号パンフレット; 国際公開第97/34631号パンフレット; および米国特許第6277375号明細書を参照されたい。あるいは、Prestaらの米国特許第5869046号明細書および第6121022号明細書に記載されるように、抗体サイトカイングラフトタンパク質を、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループからとられるサルベージ受容体結合エピトープを含むようにCH1またはCL領域内を変化させる。さらに他の実施形態では、少なくとも1個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることによってFc領域を変化させて、抗体サイトカイングラフトタンパク質のエフェクター機能を変化させる。例えば、抗体サイトカイングラフトタンパク質がエフェクターリガンドに対して変化した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、1個または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性を変化させるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体(FcR)または補体のC1成分であり得る。この手法は、共にWinterらによる米国特許第5624821号明細書および第5648260号明細書にさらに詳細に記載されている。

【0164】

別の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が変化したC1q結合および/または減少もしくは消滅した補体依存性細胞傷害(CDC)を有するように、アミノ酸残基から選択される1個または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。この手法はIdusogieらによる米国特許第6194551号明細書にさらに詳細に記載されている。

【0165】

このような突然変異を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)または補体依存性細胞傷害(CDC)をあまり媒介しないまたは全く媒介しない。いくつかの実施形態では、IgG1定常領域のアミノ酸残基L234およびL235がAla234およびAla235に置換している。いくつかの実施形態では、IgG1定常領域のアミノ酸残基N267がAla267に置換している。

【0166】

別の実施形態では、1個または複数のアミノ酸残基を変化させ、それによって抗体サイトカイングラフトタンパク質が補体を結合する能力を変化させる。この手法はBodmerらによる国際公開第94/29351号パンフレットにさらに記載されている。

【0167】

さらに別の実施形態では、Fc領域を、1個または複数のアミノ酸を修飾することによって、抗体が抗体依存性細胞傷害(ADCC)を媒介する能力を増加させるおよび/またはFcγ受容体に対する抗体サイトカイングラフトタンパク質の親和性を増加させるよう修飾する。この手法はPrestaによる国際公開第00/42072号パンフレットにさらに記載されている。さらに、FcγR1、FcγRII、FcγRIIIおよびFcRnについてのヒトIgG1上の結合部位がマッピングされており、結合が改善した変異型が記載されている(Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604参照)。

10

【0168】

さらに別の実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質のグリコシル化を修飾する。例えば、非グリコシル化抗体サイトカイングラフトタンパク質を作製することができる(すなわち、抗体サイトカイングラフトタンパク質がグリコシル化を欠いている)。グリコシル化を変化させて、例えば、「抗原」に対する抗体の親和性を高めることができる。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つまたは複数の部位を変化させることによって達成することができる。例えば、1つまたは複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらす1つまたは複数のアミノ酸置換を行い、それによってその部位のグリコシル化を除去することができる。このような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高めることができる。このような手法はCoraによる米国特許第5714350号明細書および第6350861号明細書にさらに詳細に記載されている。

20

【0169】

さらにまたはあるいは、変化したグリコシル化型を有する抗体サイトカイングラフトタンパク質、例えばフコシル残基の量が減少した低フコシル化(hypofucosylated)抗体サイトカイングラフトタンパク質または二分GlcNac構造が増加した抗体を作製することができる。このような変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC活性を増加させることが実証されている。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体サイトカイングラフトタンパク質を、グリコシル化機構が変化した宿主細胞中で発現させることによって達成することができる。グリコシル化機構が変化した細胞は、当技術分野で記載されており、組換え抗体サイトカイングラフトタンパク質を発現し、それによってグリコシル化が変化した抗体サイトカイングラフトタンパク質を製造する宿主細胞として使用することができる。例えば、Hangらによる欧州特許第1176195号明細書は、細胞株中で発現する抗体サイトカイングラフトタンパク質が低フコシル化を示すように、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が機能的に破壊された細胞株を記載している。Prestaによる国際公開第03/035835号パンフレットは、フコースをAsn(298)結合炭水化物に結合させる能力が低下して、同様に宿主細胞中で発現する抗体サイトカイングラフトタンパク質の低フコシル化をもたらす変異型CHO細胞株、Lec13細胞を記載している(Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照)。Umanaらによる国際公開第99/54342号パンフレットは、設計された細胞株中で発現する抗体サイトカイングラフトタンパク質が抗体のADCC活性増加をもたらす二分GlcNac構造の増加を示すように、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、β(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するよう設計された細胞株を記載している(Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180も参照)。

30

40

【0170】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質の1つまたは複数のド

50

メインまたは領域がリンカー、例えばペプチドリンカー、例えば当技術分野で周知のものを介して接続されている（例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123参照）。ペプチドリンカーは長さが増減し得る、例えば、リンカーは1～100アミノ酸長であり得、典型的にはリンカーは5～50アミノ酸長、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50アミノ酸長である。

【0171】

いくつかの実施形態では、単量体 IL10 を場合により1つまたは複数のペプチドリンカー配列と共に CDR 配列に組み込む。特定の実施形態では、1つまたは複数のペプチドリンカーが、 $(Gly_n - Ser)_m$ 配列、 $(Gly_n - Ala)_m$ 配列または $(Gly_n - Ser)_m / (Gly_n - Ala)_m$ 配列（式中、各 n は独立に1～5の整数であり、各 m は独立に0～10の整数である）の任意の組合せから独立に選択される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーが $(Gly_4 - Ser)_m$ （式中、 m は0～10の整数である）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーが $(Gly_4 - Ala)_m$ （式中、 m は0～10の整数である）である。リンカーの例としては、それだけに限らないが、1つまたは複数のリンカーが G_4S 反復、例えば $Gly - Ser$ リンカー $GGGS$ （配列番号252）または $(GGGS)_m$ （式中、 m は1以上の正の整数である）を含む特定の実施形態が挙げられる。例えば、 $m=1$ 、 $m=2$ 、 $m=3$ 、 $m=4$ 、 $m=5$ および $m=6$ 、 $m=7$ 、 $m=8$ 、 $m=9$ および $m=10$ である。いくつかの実施形態では、リンカーが、それだけに限らないが、 $(GGGS)_3$ または $(GGGS)_4$ を含む $GGGS$ （配列番号252）の複数の反復を含む。いくつかの実施形態では、 Ser を Ala で置き換えることができ、これは例えば $(GGGA)$ （配列番号253）または $(GGGA)_m$ （式中、 m は1以上の正の整数である）などのリンカー G/A となる。いくつかの実施形態では、リンカーが $GGGA$ （配列番号253）の複数の反復を含む。他の実施形態では、リンカーが $GGGS$ （配列番号252）および $GGGA$ （配列番号253）の組合せおよび倍数を含む。

【0172】

さらに、抗体サイトカイングラフトタンパク質をマーカー配列、例えば抗体サイトカイングラフトタンパク質の精製を容易にするペプチドに結合することができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列がヘキサヒスチジンペプチド、例えば中でもその多くが商業的に入手可能である pQEベクター（QIAGEN, Inc.、9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）で提供されるタグである。例えば、Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載されるように、ヘキサヒスチジンはグラフトタンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグには、それだけに限らないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質（Wilson et al., 1984, Cell 37:767）に由来するエプトープに相当するヘマグルチニン（「HA」）タグおよび「flag」タグが含まれる。

【0173】

抗体を、標的抗原の免疫測定法または精製に特に有用な固体支持体に付着させることもできる。このような固体支持体には、それだけに限らないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが含まれる。

【0174】

抗体サイトカイングラフトタンパク質活性についてのアッセイ

抗体サイトカイングラフトタンパク質を同定するためのアッセイは当技術分野で公知であり、本明細書に記載されている。抗体サイトカイングラフトタンパク質は IL10 受容体（IL10R）に結合し、抗炎症効果ならびに免疫刺激効果をもたらす細胞内シグナル

10

20

30

40

50

伝達を促進、誘導および刺激する。

【0175】

抗体サイトカイングラフトタンパク質とIL-10Rの結合は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて測定することができる。例えば、IL-10Rとの結合は、限定されないが、ELISA、ウェスタンブロット法、表面プラズモン共鳴法（例えば、BIACore）およびフローサイトメトリーを含む公知の技術を用いて測定することができる。

【0176】

IL-10Rを通じた細胞内シグナル伝達は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて測定することができる。例えば、IL-10Rを通じた活性化はSTAT3リン酸化およびシグナル伝達を促進する。STAT3活性化を測定する方法は当技術分野で標準的である（例えば、STAT3タンパク質のリン酸化状態、レポーター遺伝子アッセイ、下流シグナル伝達アッセイ等）。IL-10Rを通じた活性化は、炎症性サイトカインの抑制ならびにマクロファージの分化および増殖を含む抗炎症効果を有する。さらに、IL-10Rを通じた活性化は、B細胞増殖、肥満細胞増殖（例えば、MC/9）およびナチュラルキラー（NK）細胞増殖の刺激ならびに一定の炎症性サイトカインの誘導を含む炎症刺激効果を有する。細胞の増殖を測定する方法は当技術分野で標準的である（例えば、³H-チミジン組み込みアッセイ、CFSE標識）。サイトカイン産生を測定する方法は当技術分野で周知である（例えば、ELISAアッセイ、ELISpotアッセイ）。インビトロアッセイを行う場合、アゴニスト抗体サイトカイングラフトタンパク質と接触した試験細胞または試験細胞からの培養物上清を、アゴニスト抗体サイトカイングラフトタンパク質と接触させていない対照細胞または対照細胞からの培養物上清ならびに／あるいは組換えヒトIL10（rhIL10）と接触させたものと比較することができる。

【0177】

抗体サイトカイングラフトタンパク質のIL10受容体アゴニスト活性を体外および／またはインビボで測定することもできる。いくつかの態様では、未処理動物および／またはrhIL10と同様に処理した動物と比較した、抗体サイトカイングラフトタンパク質で処理した動物の体外での種々の細胞型にわたるSTAT3活性化を測定する方法を使用して、細胞型にわたる抗体グラフトタンパク質の示差活性を示すことができる。好ましい抗体サイトカイングラフトタンパク質は、単球を活性化および増殖する能力を有する。例えば、単球のインビボ活性化および増殖は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて、例えばフローサイトメトリーによって測定することができる。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、刺激後の炎症促進応答のレベルを抑制するのに治療上有効となり得る。炎症性サイトカインのレベルは、刺激剤（例えば、LPS）による処理前、中および／または後に、抗体サイトカイングラフトタンパク質で処理した動物から単離した試料において、当技術分野で公知の任意の方法を用いて測定することができ、結果を未処理対照動物および／または組換えヒトIL10（rhIL10）療法で同様に処理した動物と比較することができる。好ましいアゴニスト抗体サイトカイングラフトタンパク質は、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病（GVHD）を予防、低減、阻害または排除するのに治療上有効となり得る。アゴニスト抗体サイトカイングラフトタンパク質の有効性は、治療上有効量の抗体サイトカイングラフトタンパク質を対象に投与し、抗体サイトカイングラフトタンパク質の投与前後の対象を比較することによって決定することができる。炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病（GVHD）のための療法におけるアゴニスト抗体サイトカイングラフトタンパク質の有効性も、治療上有効量の抗体サイトカイングラフトタンパク質を試験対象に投与し、試験対象を、抗体サイトカイングラフトタンパク質を投与しなかった対照の対象と比較するおよび／またはrhIL10で同様に処理した対象と比較することによって決定することができる。

【0178】

抗体サイトカイングラフトタンパク質をコードするポリヌクレオチド

別の態様では、抗体サイトカイングラフトタンパク質の重鎖タンパク質および軽鎖タンパク質をコードする単離核酸が提供される。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、それだけに限らないが、組換え発現、化学合成および抗体四量体の酵素的消化を含む当技術分野で公知の任意の手段によって製造することができる。組換え発現は、当技術分野で公知の任意の適当な宿主細胞、例えば哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞等からであり得る。

【0179】

配列番号109、配列番号110、配列番号205および配列番号206のいずれか1つに例示される可変領域；配列番号111、配列番号112、配列番号207、配列番号208のいずれか1つに例示される可変領域、配列番号109、配列番号110、配列番号205および配列番号206のいずれか1つに例示されるCDR；配列番号111、配列番号112、配列番号207および配列番号208のいずれか1つに例示される重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチドが本明細書で提供される。

10

【0180】

よって、本開示は、本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質の重鎖および／または軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば本明細書に記載される相補性決定領域を含む重鎖または軽鎖可変領域またはセグメントをコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドが、配列番号242のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドが、配列番号243のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する配列を含む。

20

【0181】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドが、配列番号246のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドが、配列番号247のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する配列を含む。

30

【0182】

いくつかの実施形態では、重鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号244のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、軽鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号245のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する。

40

【0183】

いくつかの実施形態では、重鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号248のポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、軽鎖をコードするポリヌクレオチドが、配列番号249の選択されたポリヌクレオチドと少なくとも85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%核酸配列同一性を有する。

【0184】

ポリヌクレオチドは、抗体サイトカイングラフトタンパク質の可変領域配列をコードす

50

ることができる。これらはまた、抗体サイトカイングラフトタンパク質の可変領域と定常領域の両方をコードすることができる。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、抗体サイトカイングラフトタンパク質の1つの重鎖と軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードする。いくつかの他のポリヌクレオチドは、抗体タンパク質グラフトタンパク質の1つの重鎖および軽鎖の可変領域とそれぞれ実質的に同一の2つのポリペプチドセグメントをコードする。

【0185】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸がDNAを含む。他の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸がRNAを含み、これが一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

10

【0186】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のサイトカイングラフトタンパク質またはその断片と、場合により分泌シグナルとをコードする核酸を含む組換え宿主細胞が提供される。特定の実施形態では、組換え宿主細胞が、抗体サイトカイングラフトタンパク質またはその断片と、分泌シグナルとをコードするベクターを含む。他の特定の実施形態では、組換え宿主細胞が、抗体サイトカイングラフトタンパク質の2本の免疫グロブリンタンパク質鎖と分泌シグナルとをコードする1つまたは複数のベクターを含む。いくつかの実施形態では、組換え宿主細胞が、抗体サイトカイングラフトタンパク質の2本の免疫グロブリンタンパク質鎖と分泌シグナルとをコードする単一ベクターを含む。いくつかの実施形態では、組換え宿主細胞が、1つは抗体サイトカイングラフトタンパク質のヘテロ二量体の重鎖免疫グロブリンタンパク質鎖をコードし、もう1つは抗体サイトカイングラフトタンパク質のヘテロ二量体の軽鎖免疫グロブリンタンパク質鎖をコードし、それぞれが分泌シグナルを含む2つのベクターを含む。組換え宿主細胞は原核細胞であっても真核細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、宿主細胞が真核細胞株である。いくつかの実施形態では、宿主細胞が哺乳動物細胞株である。

20

【0187】

抗体サイトカイングラフトタンパク質を製造する方法がさらに提供される。いくつかの実施形態では、本方法が、(i) 抗体サイトカイングラフトタンパク質の免疫グロブリンタンパク質鎖をコードする1つまたは複数のベクターを含む宿主細胞を、抗体サイトカイングラフトタンパク質の発現、形成および分泌に適した条件下で培養するステップと、(ii) 抗体サイトカイングラフトタンパク質を回収するステップとを含む。

30

【0188】

ポリヌクレオチド配列は、新規な固相DNA合成または抗体サイトカイングラフトタンパク質のポリペプチド鎖をコードする既存の配列（例えば、本明細書に記載される配列）のPCR突然変異誘発によって製造することができる。核酸の直接化学合成は、当技術分野で公知の方法、例えばNarang et al., Meth. Enzymol. 68:90, 1979のホスホトリエステル法；Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979のホスホジエステル法；Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981のジエチルホスホロアミダイト法；および米国特許第4458066号明細書の固体支持体法によって達成することができる。PCRにより突然変異をポリヌクレオチド配列に導入することは、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, N Y, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19: 967, 1991；およびEckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991に記載されるように行うことができる。

40

【0189】

上記の抗体サイトカイングラフトタンパク質を製造するための発現ベクターおよび宿主細胞も本開示で提供される。種々の発現ベクターを使用して、抗体サイトカイングラフトタンパク質の免疫グロブリンポリペプチド鎖または断片をコードするポリヌクレオチドを発現させることができる。ウイルス発現ベクターと非ウイルス発現ベクターの両方を使用

50

して、哺乳動物宿主細胞で免疫グロブリンタンパク質を製造することができる。非ウイルスベクターおよび系には、典型的にはタンパク質またはRNAを発現するための発現カセットを含むプラスミド、エピソームベクター、およびヒト人工染色体が含まれる（例えば、Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997参照）。例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞中での抗体サイトカイングラフトタンパク質ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの発現に有用な非ウイルスベクターには、pThioHis A、BおよびC、pCDNA3.1/His、pEBVHis A、BおよびC（Invitrogen、Sandiego、CA）、MPSVベクター、および他のタンパク質を発現するための当技術分野で公知の多数の他のベクターが含まれる。有用なウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスに基づくベクター、SV40、パピローマウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルスに基づくベクター、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林ウイルス（SFV）が含まれる。Brent et al., 上記；Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995；およびRosenfeld et al., Cell 68:143, 1992を参照されたい。

【0190】

発現ベクターの選択は、ベクターを発現させる、意図する宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、プロモーターと、抗体サイトカイングラフトタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結した他の調節配列（例えば、エンハンサー）を含む。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターを使用して誘導条件下以外での挿入した配列の発現を防ぐ。誘導性プロモーターには、例えば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモーターまたはヒートショックプロモーターが含まれる。形質転換生物の培養物を、その発現産物が宿主細胞によってよりよく耐えられるコード配列に集団を偏らせることなく、非誘導条件下で増殖させることができる。プロモーターに加えて、抗体サイトカイングラフトタンパク質の免疫グロブリン鎖または断片の効率的な発現のために他の調節要素も要求され得るまたは望まれ得る。これらの要素には、典型的にはATG開始コドンおよび隣接リボース結合部位または他の配列が含まれる。さらに、使用している細胞系に適したエンハンサーを含めることによって、発現の効率を増強することができる（例えば、Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994；およびBittnner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987参照）。例えば、SV40エンハンサーまたはCMVエンハンサーを使用して哺乳動物宿主細胞中での発現を増加させることができる。

【0191】

発現ベクターはまた、抗体サイトカイングラフトタンパク質配列によってコードされる配列に加えて、異種タンパク質を形成するための分泌シグナル配列も提供することができる。しばしば、抗体サイトカイングラフトタンパク質の挿入された免疫グロブリン配列はベクターに包含される前にシグナル配列と作動可能に連結している。免疫グロブリン軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードする配列を受け入れるために使用されるベクターは、定常領域またはその一部もコードする。このようなベクターは、定常領域を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質としての可変領域の発現を可能にし、それによって完全抗体サイトカイングラフトタンパク質またはその断片の製造をもたらす。典型的には、このような定常領域はヒトである。

【0192】

抗体サイトカイングラフトタンパク質鎖を有し、発現するための宿主細胞は原核生物であっても真核生物であってもよい。大腸菌（E. coli）が本開示のポリヌクレオチドをクローニングおよび発現するための有用な1つの原核生物宿主である。使用するのに適した他の微生物宿主には、桿菌、例えば枯草菌（Bacillus subtilis）および他の腸内細菌科、例えばサルモネラ属（Salmonella）、セラチア属（Serratia）および種々のシュードモナス属（Pseudomonas）種が含まれる。これらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性の発現制御配列（例えば、複製起点）を含む発現ベクターを作製することもできる。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、β

ーラクタマーゼプロモーター系またはファージλのプロモーター系などの任意の数の種々の周知のプロモーターが存在するだろう。プロモーターは、典型的には場合によりオペレーター配列と共に発現を制御し、転写および翻訳を開始および完了するためのリボソーム結合部位配列などを有する。酵母などの他の微生物を使用して抗体サイトカイングラフトタンパク質を発現させることもできる。バキュロウイルスベクターと組み合わせた昆虫細胞も使用することができる。

【0193】

いくつかの好ましい実施形態では、哺乳動物宿主細胞を使用して本開示の抗体サイトカイングラフトタンパク質を発現し、製造する。例えば、これらは外因性発現ベクターを有する哺乳動物細胞株であり得る。これらには、任意の正常な致死の、または正常なもしくは異常な不死の動物またはヒト細胞が含まれる。例えば、CHO細胞株、種々のCos細胞株、HeLa細胞、骨髓腫細胞株、形質転換B細胞およびハイブリドーマを含む、完全免疫グロブリンを分泌することができるいくつかの適切な宿主細胞株が開発されている。ポリペプチドを発現させるための哺乳動物組織細胞培養物の使用は、一般的に、例えば、Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987に論じられている。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、例えば複製起点、プロモーターおよびエンハンサー（例えば、Queen et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986）、ならびに必要なプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列を含むことができる。これらの発現ベクターは通常、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターを含む。適切なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、段階特異的および／または調節可能もしくは制御可能であり得る。有用なプロモーターには、それだけに限らないが、メタロチオネインプロモーター、構成型アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性MMTVプロモーター、SV40プロモーター、MRP pol IIIプロモーター、構成型MPSVプロモーター、テトラサイクリン誘導性CMVプロモーター（ヒト最初期CMVプロモーターなど）、構成型CMVプロモーターおよび当技術分野で公知のプロモーター-エンハンサー組合せが含まれる。

【0194】

対象となるポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する方法は、細胞宿主型に応じて変化する。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクションが一般的に利用されるが、他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理または電気穿孔が使用され得る（一般的に上記のSambrook et al.参照）。他の方法には、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム処理、リボソーム媒介形質転換、注入および微量注入、衝撃法、ビロゾーム、イムノリポソーム（immunoliposome）、ポリカチオン：核酸複合体、ネイキッドDNA、人工ビリオン、ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22へのグラフト（Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997）、DNAの薬剤増強取り込み、および体外形質導入が含まれる。組換えタンパク質の長期の高収率の製造のために、安定な発現が通常望まれる。例えば、抗体サイトカイングラフトタンパク質免疫グロブリン鎖を安定に発現する細胞株は、ウイルス複製起点または内因性発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを使用して調製することができる。ベクターの導入後、細胞を富化培地で1～2日間増殖させた後、これらを選択培地に切り替える。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を与えることであり、その存在によって、選択培地中で、導入配列の発現に成功した細胞の増殖が可能になる。耐性の安定にトランスフェクトした細胞は、細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0195】

抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む組成物

薬学的に許容される担体と併せて製剤化された抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む医薬組成物が提供される。場合により、医薬組成物は、所与の障害を治療または予防するのに適した他の治療剤をさらに含む。薬学的に許容される担体は組成物を増強もしくは安定化する、または組成物の調製を促進する。薬学的に許容される担体には、生理学的

に適合性の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などが含まれる。

【0196】

本開示の医薬組成物は、当技術分野で公知の種々の方法によって投与することができる。投与の経路および／または様式は所望の結果に応じて変化する。投与が非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、髄腔内、動脈内または皮下）による、または標的部位の近位に投与されることが好ましい。薬学的に許容される担体は、静脈内、筋肉内、腹腔内、髄腔内、動脈内、皮下、鼻腔内、吸入、脊髄または表皮投与（例えば、注射または注入による）のいずれか1つまたは複数による投与に適している。投与経路に応じて、活性化化合物、例えば抗体サイトカイングラフトタンパク質を材料で保護して、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物が静脈内投与のために製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物が皮下投与のための製剤である。

10

【0197】

抗体サイトカイングラフトタンパク質は、単独でまたは他の適切な成分と組み合わせて、吸入を介して投与するためのエアゾール製剤に加工することができる（すなわち、これらを「噴霧する」ことができる）。エアゾール製剤は加圧された許容される噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などに入れることができる。

【0198】

いくつかの実施形態では、医薬組成物が滅菌および流体である。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散の場合、必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、ポリアルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）、および塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを組成物に含めることによってもたらしすることができる。特定の実施形態では、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥型で貯蔵するための組成物を調製することができる。

20

【0199】

医薬組成物は、当技術分野で周知の日常的に実施される方法に従って調製することができる。薬学的に許容される担体は、一部は、投与している具体的な組成物ならびに組成物を投与するために使用される具体的な方法によって決定される。したがって、本開示の医薬組成物の多種多様な適切な製剤が存在する。抗体サイトカイングラフトタンパク質を製剤化し、適切な投与およびスケジュールを決定するための適用可能な方法は、例えば、その各々が参照により本明細書に組み込まれる、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005); および Martindale: The Complete Drug Reference, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press., および Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 31st Edition., 1996, Amer Pharmaceutical Assn, and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978に見出すことができる。医薬組成物は、好ましくはGMP条件下で製造される。典型的には、治療上有効用量または効果の用量の抗体サイトカイングラフトタンパク質が医薬組成物に使用される。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、当業者に公知の慣用的な方法によって薬学的に許容される剤形に製剤化される。投薬レジメンは、所望の応答（例えば、治療的応答）をもたらすよう調整される。治療上または予防上有効用量を決定する場合、低用量を投与し、次いで、望ましくない副作用が最小であるまたは全くなしに所望の応答が達成されるまで、漸増することができる。例えば、単一ボラスを投与してもよいし、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよいし、または用量を緊急の治療状況によって指示されるように相対的に減少もしくは増加させてもよい。投与の容易さおよび投薬の均一性のために親組成物を投薬単位形態に製剤化することが特に有

30

40

50

利である。本明細書で使用される投薬単位形態は、治療する対象のための一体型投薬として適した物理的に分離した単位を指す；各単位は、要求される医薬担体と合わせて所望の治療効果をもたらすよう計算された所定の量の活性化化合物を含む。

【0200】

本開示の医薬組成物中の有効成分の実際の投薬レベルは、患者に有毒となることなく、特定の患者、組成物および投与様式に望ましい治療応答を達成するのに有効な量の有効成分を得るために変化させることができる。選択される投薬レベルは、使用される本開示の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、使用している特定の化合物の排泄速度、治療の持続期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物および／または物質、治療している患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態および以前の病歴ならびに同様の因子を含む種々の薬物動態因子に依存する。

10

【0201】

第2の薬剤との共製剤化 (co-formulation)

いくつかの実施形態では、薬理的組成物が、抗体サイトカイングラフトタンパク質と、1種または複数の追加の薬理的薬剤（複数可）との混合物を含む。本抗体サイトカイングラフトタンパク質との混合物に含めるための例示的な第2の薬剤には、限定されないが、抗炎症剤、免疫調節剤、アミノサリチル酸および抗生物質が含まれる。適切な選択は、好ましい製剤、投薬および／または送達方法に依存し得る。

【0202】

20

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が抗炎症剤と共製剤化される（すなわち、混合物として提供されるまたは混合物で調製される）。特定の実施形態では、副腎皮質ステロイド抗炎症剤が抗体サイトカイングラフトタンパク質と併せて使用され得る。使用するための副腎皮質ステロイドは、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソニド、メサラミンおよびデキサメタゾンのいずれかから選択され得る。適切な選択は、製剤および送達の選択に依存する。

【0203】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が免疫調節剤と共製剤化される。特定の実施形態では、免疫調節剤が、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、シクロスポリンA、タクロリムスおよびメトトレキサートのいずれかから選択される。特定の実施形態では、免疫調節剤が、抗TNF剤（例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ）、ナタリズマブおよびベドリズマブから選択される。

30

【0204】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質がアミノサリチル酸剤と共製剤化される。特定の実施形態では、アミノサリチル酸がスルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンまたは5-アミノサリチル酸の他の誘導体から選択される。

【0205】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が抗菌剤と共製剤化される。例示的な抗菌剤には、限定されないが、スルホンアミド（例えば、スルファニルアミド、スルファジアジン、スルファメトキサゾール、スルフィソキサゾール、スルファセタミド）、トリメトプリム、キノロン（例えば、ナリジクス酸、シノキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシン、ペルロキサシン、レボフロキサシン、ガレノキサシンおよびゲミフロキサシン）、メテナミン、ニトロフラントイン、ペニシリン（例えば、ペニシリンG、ペニシリンV、メチシリンオキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、アンピシリン、アモキシシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メズロシリンおよびピペラシリン）セファロsporin（例えば、セファゾリン、セファレキシン、セファドロキシル、セフォキシチン、セファクロル、セフプロジル、セフロキシム、セフロキシムアセチル、ロラカル

40

50

ベフ、セフォテタン、セフォラニド、セフォタキシム、セフポドキシムプロキセチル、セフィブテン、セフジニル、セフジトレンピボルキシム、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフタジジムおよびセフェピン）、カルバペネム（例えば、イミペネム、アズトレオナム）およびアミノグリコシド（例えば、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トラマイシン、ネチルマイシンおよびアミカシン）が含まれる。

【0206】

製品／キット

いくつかの態様では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が製品（すなわち、キット）で提供される。抗体サイトカイングラフトタンパク質は、一般的にバイアルまたは容器中にある。よって、製品は、容器と、容器上または容器に随伴したラベルまたは添付文書とを含む。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、溶液バッグ等が含まれる。適宜、抗体サイトカイングラフトタンパク質は液体形態または乾燥（例えば、凍結乾燥）形態であり得る。容器は、単独でまたは別の組成物と組み合わせて、免疫関連障害を治療、予防および／または改善するための組成物を調製するのに有効な組成物を保持する。ラベルまたは添付文書は、組成物が免疫関連障害を治療、予防および／または改善するために使用されることを示す。本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む製品（キット）は、場合により1種または複数の追加の薬剤を含む。いくつかの実施形態では、製品（キット）が抗体サイトカイングラフトタンパク質と、薬学的に許容される希釈剤とを含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、同じ製剤で（例えば、混合物として）、1種または複数の追加の活性剤を含む製品（キット）で提供される。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、別個の製剤で（例えば、別個の容器で）、第2または第3の薬剤を含む製品（キット）で提供される。特定の実施形態では、製品（キット）が、抗体サイトカイングラフトタンパク質のアリコートを含み、アリコートが1回または複数回用量を提供する。いくつかの実施形態では、用量が均一であるまたは異なる複数回投与のためのアリコートが提供される。特定の実施形態では、変化する投薬レジメンは適宜、漸増または漸減投薬レジメンである。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質および第2の薬剤の投与量が独立に均一であるまたは独立に変化する。特定の実施形態では、製品（キット）が、抗炎症剤、免疫調節剤、アミノサリチル酸および抗生物質のいずれかから選択される追加の薬剤を含む。1種または複数の追加の薬剤の選択は、投薬量、送達および治療される疾患状態に依存する。

【0207】

免疫関連障害の治療方法および免疫関連障害における抗体サイトカイングラフトタンパク質の使用

治療または予防の対象となる状態

抗体サイトカイングラフトタンパク質は、免疫関連障害の治療、改善または予防において用途を見出している。一態様では、本開示は、治療上有効量の本明細書に記載される抗体サイトカイングラフトタンパク質を個体に投与するステップを含む、治療を必要とする個体の免疫関連障害を治療する方法を提供する。本開示はまた、一態様で、治療剤として使用するための抗体サイトカイングラフトタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、個体の免疫関連障害の治療または予防において治療剤として使用するための抗体サイトカイングラフトタンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、治療を必要とする個体の免疫関連障害を治療するための医薬品を製造するための抗体サイトカイングラフトタンパク質の使用が提供される。さらなる態様では、本開示は、治療または改善を必要とする個体の免疫関連障害の治療または改善に使用するためのこのような抗体サイトカイングラフトタンパク質を含む組成物を提供する。

【0208】

治療目的については、個体が免疫関連障害を有し得る。防止または予防目的については、個体は免疫関連障害の活性状態からの寛解にあり得る、または将来の発症が予想され得

る。いくつかの実施形態では、患者が免疫関連障害を有する、免疫関連障害を有する疑いがある、または免疫関連障害からの寛解にある。抗体サイトカイングラフトタンパク質による治療の対象となる免疫関連障害は通常、本明細書に記載される I L 1 0 受容体シグナル伝達の活性化からの利益を得る。治療の対象となる免疫関連障害には、限定されないが、症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I 型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病 (G V H D) が含まれる。

【0209】

抗体サイトカイングラフトタンパク質の投与

医師または獣医師は、所望の治療効果を達成するのに必要とされるより低いレベルで医薬組成物に使用される抗体サイトカイングラフトタンパク質の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで、投与量を徐々に増加させることができる。一般に、本開示の組成物の有効用量は、治療される具体的な疾患または状態、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の医薬品、および治療が予防的であるか治療的であるかを含む多くの異なる因子に応じて変化する。治療投与量は、典型的には安全性および有効性を最適化するために滴定を要する。抗体サイトカイングラフトタンパク質の投与のために、投薬は約 $0.0001 \sim 100 \text{ mg/kg}$ 、より通常は $0.01 \sim 5 \text{ mg/kg}$ 宿主体重に及ぶ。例えば、投薬は 1 mg/kg 体重または 10 mg/kg 体重または $1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ の範囲内にあり得る。投薬は、毎日、毎週、隔週、毎月または必要もしくは所望により多かれ少なかれ頻繁にすることができる。例示的な治療レジメンは、1 週間に 1 回、2 週間毎に 1 回、または 1 ヶ月に 1 回、または 3 ～ 6 ヶ月毎に 1 回の投与を伴う。

【0210】

抗体サイトカイングラフトタンパク質は、単一用量または分割用量で投与することができる。抗体サイトカイングラフトタンパク質は通常、複数の時に投与される。単一投薬間の間隔は、必要または所望により、毎週、隔週、毎月または毎年とすることができる。間隔はまた、患者の抗体サイトカイングラフトタンパク質の血中レベルを測定することによって示されるように不規則とすることもできる。いくつかの方法では、投薬量が $1 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ の血漿中抗体サイトカイングラフトタンパク質濃度、いくつかの方法では $25 \sim 300 \mu\text{g/ml}$ を達成するように調整される。あるいは、抗体サイトカイングラフトタンパク質を徐放製剤として投与することができ、この場合、あまり頻繁でない投与が要求される。投薬量および頻度は、患者中の抗体サイトカイングラフトタンパク質の半減期に応じて変化する。一般に、抗体サイトカイングラフトタンパク質は天然サイトカイン (例えば、I L 1 0) よりも長い半減期を示す。投薬量および投与頻度は、治療が予防的であるか治療的であるかに応じて変化し得る。一般に、予防的適用については、比較的低い投薬量が長期間にわたって比較的まれな間隔で投与される。生涯にわたって治療を受け続ける患者もいる。一般に、治療的適用については、疾患の進行が減少または停止するまで、好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、比較的短い間隔での比較的高い投薬量がしばしば要求される。その後、患者に予防的レジメンを投与することができる。

【0211】

第 2 の薬剤との同時投与

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、1 種または複数の追加の薬理学的薬剤と同時に投与される。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質と追加の 1 種または複数の薬剤が混合物として投与される。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質と追加の 1 種または複数の薬剤が別個の製剤として投与される。別個の製剤が利用される特定の実施形態では、投与が同時である。別個の製剤が利用される特定の実施形態では、投与が連続的である。別個の製剤が利用される特定の実施形態では、投与が同じ経路を介する。別個の製剤が利用される特定の実施形態では、投与が異なる経路を介する。抗体サイトカイングラフトタンパク質と同時

投与するための例示的な追加の薬剤には、限定されないが、抗炎症剤、免疫調節剤、アミノサリチル酸および抗生物質が含まれる。適切な選択は好ましい製剤、投薬量および／または送達方法に依存し得る。抗体サイトカイングラフトタンパク質はまた、免疫関連障害状態を治療するための追加の確立された処置、例えば外科手術との併用療法に用途を見出している。

【0212】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が抗炎症剤と同時投与される。特定の実施形態では、副腎皮質ステロイド抗炎症剤が抗体サイトカイングラフトタンパク質と併せて使用され得る。使用するための副腎皮質ステロイドは、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソニド、メサラミンおよびデキサメタゾンのいずれかから選択され得る。適切な選択は製剤および送達の選択に依存する。

10

【0213】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が免疫調節剤と同時投与される。特定の実施形態では、免疫調節剤が、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、シクロスポリンA、タクロリムスおよびメトトレキサートのいずれかから選択される。特定の実施形態では、免疫調節剤が、抗TNF剤（例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ）、ナタリズマブおよびベドリズマブから選択される。

【0214】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質がアミノサリチル酸剤と同時投与される。特定の実施形態では、アミノサリチル酸剤が、スルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンまたは5-アミノサリチル酸の他の誘導体から選択される。

20

【0215】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイングラフトタンパク質が抗菌剤と同時投与される。例示的な抗菌剤には、限定されないが、スルホンアミド（例えば、スルファニルアミド、スルファジアジン、スルファメトキサゾール、スルフィソキサゾール、スルファセタミド）、トリメトプリム、キノロン（例えば、ナリジクス酸、シノキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン、フレロキサシン、ペルロキサシン、レボフロキサシン、ガレノキサシンおよびゲミフロキサシン）、メテ

ナミン、ニトロフラントイン、ペニシリン（例えば、ペニシリンG、ペニシリンV、メチシリンオキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、アンピシリン、アモキシシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メズロシリンおよびピペラシリン）セ

ファロスポリン（例えば、セファゾリン、セファレキシン、セファドロキシル、セフォキシチン、セファクロル、セフprozil、セフロキシム、セフロキシムアセチル、ロラカルベフ、セフォテタン、セフォラニド、セフォタキシム、セフポドキシムプロキセチル、セフィブテン、セフジニル、セフジトレンピボルキシル、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフトジジムおよびセフェピン）、カルバペネム（例えば、イミペネム、アズトレオナム）およびアミノグリコシド（例えば、ネオマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トラマイシン、ネチルマイシンおよびアミカシ

30

40

【実施例】

【0216】

実施例1：免疫グロブリン-I L 10 グラフト構築物の作製

単量体 I L 10 配列を種々の免疫グロブリン足場の C D R 領域中に操作することによって、グラフト構築物 I g G I L 10 M 1、I g G I L 10 M 2、I g G I L 10 M 3、I g G I L 10 M 4、I g G I L 10 M 5、I g G I L 10 M 6、I g G I L 10 M 7、I g G I L 10 M 8、I g G I L 10 M 9、I g G I L 10 M 10、I g G I L 10 M 11、I g G I L 10 M 12、I g G I L 10 M 13、I g G I L 10 M 14 および I g G I L 10 M 15 を生成し、次いで、重鎖免疫グロブリン鎖と軽鎖免疫グロブリン鎖の両方を

50

製造して最終的なタンパク質構築物を生成した。I g G I L 1 0 Mグラフト構築物はI L 1 0の好ましい治療的抗炎症特性を与えるが、I g G I L 1 0 Mグラフト構築物はr h I L 1 0と比較して低下した相対的炎症促進活性を有する。

【0217】

抗体サイトカイングラフトタンパク質を作製するために、残基134と135との間に6アミノ酸リンカーを有する全長I L 1 0（配列番号209）の残基19～178を含む単量体I L 1 0（I L 1 0 M）を免疫グロブリン鎖足場の種々のCDRループに挿入した。グラフト構築物を、臨床設定で利用されている種々の公知の免疫グロブリン配列ならびに生殖系列抗体配列を用いて調製した。G F T X 1およびG F T X 3と呼ばれる2つの例示的な足場のI L 1 0 Mの配列を表1に示す。挿入点を、入手可能な構造的または相同性

10

【0218】

例えば、6つのCDRの1つに挿入されたI L 1 0 Mを含む各抗体の可変領域を合成した。可変領域をコードするDNAを、PCRを介して増幅し、得られた断片を、軽鎖定常領域または重鎖定常領域のいずれかとFc領域を含むベクターにサブクロニングした。このようにして、I L 1 0 Mの6 CDR（L1、L2、L3、H1、H2、H3）の各々への挿入に対応するI L 1 0 M抗体サイトカイングラフトタンパク質を作製した。得られた構築物を表1に示す。重鎖および軽鎖ベクターの適切な組合せのトランスフェクション

20

【0219】

どのCDRをサイトカイングラフトに選択するかという選択を、必要な生物学、生物物理学特性および好ましい発達プロファイルのパラメータで選択する。この時、モデル化ソフトウェアは、どのCDRおよびCDR内のどの位置が所望のパラメータを提供するかを予測することにおいて部分的に有用であるにすぎず、そのため、6個全ての可能な抗体サイトカイングラフトを作製し、次いで、生物学的アッセイで評価する。必要な生物学的活性が達成されたら、抗体サイトカイングラフト分子の構造分析などの生物物理学特性を

30

【0220】

I L 1 0をCDRにグラフトすることによって、抗体サイトカイングラフトタンパク質の抗体部分は、以下に論じられるようにI L 1 0受容体との結合に影響を及ぼす独特の構造を有するI L 1 0単量体を提供する。抗体部分によるオフターゲット効果はない。さらに、抗体サイトカイングラフトタンパク質のFc部分を、ADCC（抗体依存性細胞傷害）およびCDC（補体依存性細胞傷害）に関して完全にサイレントとなるよう修飾した。

【0221】

要約すると、各CDRへの挿入点を、CDRへのグラフトがあるレベルの立体障害をI L 1 0受容体の個々のサブユニットに提供するという仮説を用いた構造原則で選択した。どのCDRグラフトが特定のサイトカインにとって最良であるかの最終的な選択は、所望の生物学および生物物理学特性に基づく。サイトカイン受容体の性質、サイトカイン／受容体相互作用およびシグナル伝達の機構も役割を果たし、これを、それぞれの特性について各個々の抗体サイトカイングラフト分子を比較することによって解明した。例えば、I L 1 0の軽鎖CDR1（CDRL1）へのグラフトは、活性化単球の所望の生物学的活性をもたらしたが、NK細胞などの他の細胞についてはもたらさなかった。これは、例示的な抗体サイトカイングラフトタンパク質I g G I L 1 0 M7およびI g G I L 1 0 M13で見られた。

40

【0222】

【表 1 - 1】

表 1

配列番号	説明		コメント
1	IgGIL10M1 の CDRH1 (Chothia)	GFTFSSY	GFTX1
2	IgGIL10M1 の CDRH2 (Chothia)	SGSGGS	GFTX1
3	IgGIL10M1 の CDRH3 (Chothia)	TRTKRF	GFTX1
4	IgGIL10M1 の CDRL1 (Chothia)	<u>SQSVSPGOGTQSENSCTHFPGNLPNML</u> <u>RDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLK</u> <u>ESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYEEV</u> <u>MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRL</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGSGGKSKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE</u> <u>AYMTMKIRNSSSY</u>	GFTX1 CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、

10

20

【 0 2 2 3 】

【表 1 - 2】

配列番号	説明		コメント
			下線
5	IgGIL10M1 の CDRL2 (Chothia)	GAS	GFTX1
6	IgGIL10M1 の CDRL3 (Chothia)	YGSSPL	GFTX1
7	IgGIL10M1 の CDRH1(Kabat)	SYAMS	GFTX1
8	IgGIL10M1 の CDRH2(Kabat)	AISGSGGSTYYGDSVKG	GFTX1
9	IgGIL10M1 の CDRH3(Kabat)	TRTKRF	GFTX1
10	IgGIL10M1 の CDRL1(Kabat)	<u>RASQSVSPGQGTQSENSCTHFPGNLPN</u> <u>MLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>LKESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLE</u> <u>EVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLCTL</u> <u>RLRLRRCHRFLPCEGGSGGNKSKAV</u> <u>EQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN</u> <u>YIEAYMTMKIRNSSSYLA</u>	GFTX1 CDRL1 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
11	IgGIL10M1 の CDRL2(Kabat)	GASSRAT	GFTX1
12	IgGIL10M1 の CDRL3(Kabat)	QQYGSSPLT	GFTX1
13	IgGIL10M1 の VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQGT LVT VSS	GFTX1
14	IgGIL10M1 の VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSV <u>S</u> <u>PGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRD</u> <u>AFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLED</u>	GFTX1 CDRL1 に グラフト

【表 1 - 3】

配列番号	説明		コメント
		<u>FKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>QDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFINYIE</u> <u>AYMTMKIRNSSSYLAWYQQKPGQAPRL</u> LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEI K	した単量体 IL10。
15	IgGIL10M1 の 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX1
16	IgGIL10M1 の 軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS <u>PGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRD</u> <u>AFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLED</u> <u>FKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>QDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA	GFTX1 CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。

【表 1 - 4】

配列番号	説明		コメント
		VYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	
17	IgGIL10M2 の CDRH1 (Chothia)	GFTFSSY	GFTX1
18	IgGIL10M2 の CDRH2 (Chothia)	SGSGGS	GFTX1
19	IgGIL10M2 の CDRH3 (Chothia)	TRTKRF	GFTX1
20	IgGIL10M2 の CDRL1(Chothia)	SQSVSSSY	GFTX1
21	IgGIL10M2 の CDRL2 (Chothia)	<u>GASSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML</u> <u>RDRLDAFSRVKTFFQMKGDLNLLK</u> <u>ESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEE</u> <u>MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGSGGKSKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN</u> <u>YIEAYMTMKIRN</u>	GFTX1 CDRL2 に グラフト した 単量体 IL10。 IL10 は太 字、下線
22	IgGIL10M2 の CDRL3 (Chothia)	YGSSPL	GFTX1
23	IgGIL10M2 の CDRH1(Kabat)	SYAMS	GFTX1
24	IgGIL10M2 の CDRH2(Kabat)	AISGSGGSTYYGDSVKG	GFTX1
25	IgGIL10M2 の CDRH3(Kabat)	TRTKRF	GFTX1

【表 1 - 5】

配列番号	説明		コメント
26	IgGIL10M2 の CDRL1(Kabat)	RASQSVSSSYLA	GFTX1
27	IgGIL10M2 の CDRL2(Kabat)	<u>GASSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML</u> <u>RDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLK</u> <u>ESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEE</u> <u>MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>RLRRCHRFPCENGSGGSKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFIN</u> <u>YIEAYMTMKIRNRAT</u>	GFTX1 CDRL2 に グラフト した 単量体 IL10。 IL10 は太 字、下線
28	IgGIL10M2 の CDRL3(Kabat)	QQYGSSPLT	GFTX1
29	IgGIL10M2 の VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQGLVT VSS	GFTX1
30	IgGIL10M2 の VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS <u>SPGQ</u> <u>GTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFS</u> <u>RVKTFFQMKDQLDNLLKESLLEDFK</u> <u>GYLGCOALSEMIQFYLEEVMPOAENQ</u> <u>DPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>RLRLRRCHRFPCENGSGGSKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFIN</u> <u>YIEAYMTMKIRNRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK	GFTX1 CDRL2 に グラフト した単量体 IL10。
31	IgGIL10M2 の 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA	GFTX1

【表 1 - 6】

配列番号	説明		コメント
		VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
32	IgGIL10M2 の 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS <u>SPGQ</u> <u>GTOSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFS</u> <u>RVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK</u> <u>GYLGCAALSEMIQFYLEEVMPPQAENQ</u> <u>DPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR</u> <u>FLPCENGGSGGKSKAVEQVKNAFNK</u> <u>LOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKI</u> <u>RN</u> RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC	GFTX1 CDRL2 に グラフト した 単量体 IL10。 IL10 は 太字、下線
33	IgGIL10M3 の CDRH1 (Chothia)	GFTFSSY	GFTX1
34	IgGIL10M3 の CDRH2 (Chothia)	SGSGGS	GFTX1
35	IgGIL10M3 の CDRH3 (Chothia)	TRTKRF	GFTX1

【表 1 - 7】

配列番号	説明		コメント
36	IgGIL10M3 の CDRL1(Chothia)	SQSVSSSY	GFTX1
37	IgGIL10M3 の CDRL2 (Chothia)	GAS	GFTX1
38	IgGIL10M3 の CDRL3 (Chothia)	<u>YGSSPGOGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRL</u> <u>RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAY</u> <u>MTMKIRNSPL</u>	GFTX1 CDRL3 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
39	IgGIL10M3 の CDRH1(Kabat)	SYAMS	GFTX1
40	IgGIL10M3 の CDRH2(Kabat)	AISGSGGSTYYGDSVKG	GFTX1
41	IgGIL10M3 の CDRH3(Kabat)	TRTKRF	GFTX1
42	IgGIL10M3 の CDRL1(Kabat)	RASQSVSSSYLA	GFTX1
43	IgGIL10M3 の CDRL2(Kabat)	GASSRAT	GFTX1
44	IgGIL10M3 の CDRL3(Kabat)	<u>QQYGSSPGOGTQSENSCTHFPGNLPNM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLL</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNSPLT</u>	GFTX1 CDRL3 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
45	IgGIL10M3 の VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS	GFTX1

【表 1 - 8】

配列番号	説明		コメント
		TYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQGLVT VSS	
46	IgGIL10M3 の VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGS <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL</u> <u>LESLEDFKGYLGCAELSEMIQFYLEE</u> <u>VMPOAENODPDIAHVNSLGENLKT</u> <u>LRRLRRCHRFLPCENGSGSGGSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNSPLTFGGGTKVEIK</u>	GFTX1 CDRL3 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
47	IgGIL10M3 の 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX1
48	IgGIL10M3 の 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGS <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPM</u>	GFTX1 CDRL3 に グラフト した単量体

【表 1 - 9】

配列番号	説明		コメント
		<u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLR</u> <u>LRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>OVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNSPLTFGGGTKVEIKRTVA</u> APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	IL10。
49	IgGIL10M4 の CDRH1 (Chothia)	GFTF <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML</u> <u>RDRLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u> <u>ESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRL</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE</u> <u>AYMTMKIRNSSY</u>	GFTX1 CDRH1 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
50	IgGIL10M4 の CDRH2 (Chothia)	SGSGGS	GFTX1
51	IgGIL10M4 の CDRH3 (Chothia)	TRTKRF	GFTX1
52	IgGIL10M4 の CDRL1 (Chothia)	SQSVSSSY	GFTX1
53	IgGIL10M4 の CDRL2 (Chothia)	GAS	GFTX1
54	IgGIL10M4 の CDRL3 (Chothia)	YGSSPL	GFTX1

【表 1 - 1 0】

配列番号	説明		コメント
55	IgGIL10M4 の CDRH1(Kabat)	<u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLR</u> <u>DAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE</u> <u>DFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPPQAE</u> <u>NQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRC</u> <u>HRFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAF</u> <u>NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMT</u> <u>MKIRN</u> SSYAMS	GFTX1 CDRH1 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
56	IgGIL10M4 の CDRH2(Kabat)	AISGSGGSTYYGDSVKG	GFTX1
57	IgGIL10M4 の CDRH3(Kabat)	TRTKRF	GFTX1
58	IgGIL10M4 の CDRL1(Kabat)	RASQSVSSSYLA	GFTX1
59	IgGIL10M4 の CDRL2(Kabat)	GASSRAT	GFTX1
60	IgGIL10M4 の CDRL3(Kabat)	QQYGSSPLT	GFTX1
61	IgGIL10M4 の VH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLR</u> <u>DAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE</u> <u>DFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPPQAE</u> <u>NQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRC</u> <u>HRFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAF</u> <u>NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMT</u> <u>MKIRN</u> SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARTRTKRFGWGQ GTLVTVSS	GFTX1 CDRH1 に グラフト した単量体 IL10
62	IgGIL10M4 の VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPLTFGGGTKVEIK	GFTX1

【表 1 - 1 1】

配列番号	説明		コメント
63	IgGIL10M4 の 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLR</u> <u>DAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE</u> <u>DFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPOAE</u> <u>NQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRC</u> <u>HRFLPCENGGGSGGKSKAVEQVKNAF</u> <u>NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMT</u> <u>MKIRN</u> SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYGDSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARTRTKRFWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX1 CDRH1 に グラフト した単量体 IL10
64	IgGIL10M4 の 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	GFTX1
65	IgGIL10M5 の CDRH1(Chothia)	GFTFSSY	GFTX1
66	IgGIL10M5 の	SGSG <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML</u>	GFTX1

【表 1 - 1 2】

配列番号	説明		コメント
	CDRH2 (Chothia)	<u>RDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u> <u>ESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEE</u> <u>MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLL</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE</u> <u>AYMTMKIRNGS</u>	CDRH2 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
67	IgGIL10M5 の CDRH3 (Chothia)	TRTKRF	GFTX1
68	IgGIL10M5 の CDRL1 (Chothia)	SQSVSSSY	GFTX1
69	IgGIL10M5 の CDRL2 (Chothia)	GAS	GFTX1
70	IgGIL10M5 の CDRL3 (Chothia)	YGSSPL	GFTX1
71	IgGIL10M5 の CDRH1(Kabat)	SYAMS	GFTX1
72	IgGIL10M5 の CDRH2(Kabat)	<u>AISGSGSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLL</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNGSTYYGDSVKG</u>	GFTX1 CDRH2 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は太 字、 下線
73	IgGIL10M5 の CDRH3(Kabat)	TRTKRF	GFTX1
74	IgGIL10M5 の CDRL1(Kabat)	RASQSVSSSYLA	GFTX1

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

配列番号	説明		コメント
75	IgGIL10M5 の CDRL2(Kabat)	GASSRAT	GFTX1
76	IgGIL10M5 の CDRL3(Kabat)	QQYGSSPLT	GFTX1
77	IgGIL10M5 の VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPPQAEN</u> <u>ODPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNGSTYYGDSVKGRFTISRDNKNTLY</u> LQMNSLRAEDTAVYYCARTRTKRFGWQ GTLTVTVSS	GFTX1 CDRH2 に グラフト した単量体 IL10
78	IgGIL10M5 の VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPLTFGGGTKVEIK	GFTX1
79	IgGIL10M5 の 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPPQAEN</u> <u>ODPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNGSTYYGDSVKGRFTISRDNKNTLY</u> LQMNSLRAEDTAVYYCARTRTKRFGWQ GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHT	GFTX1 CDRH2 に グラフト した単量体 IL10

【表 1 - 1 4】

配列番号	説明		コメント
		CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
80	IgGIL10M5 の 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	GFTX1
81	IgGIL10M6 の CDRH1 (Chothia)	GFTFSSY	GFTX1
82	IgGIL10M6 の CDRH2 (Chothia)	SGSGGS	GFTX1
83	IgGIL10M6 の CDRH3 (Chothia)	TRT <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRL</u> <u>RRCHRFPCENGSGGSKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFYIEAY</u> <u>MTMKIRN</u> KRF	GFTX1 CDRH3 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
84	IgGIL10M6 の CDRL1 (Chothia)	SQSVSSSY	GFTX1

【表 1 - 1 5】

配列番号	説明		コメント
85	IgGIL10M6 の CDRL2 (Chothia)	GAS	GFTX1
86	IgGIL10M6 の CDRL3 (Chothia)	YGSSPL	GFTX1
87	IgGIL10M6 の CDRH1(Kabat)	SYAMS	GFTX1
88	IgGIL10M6 の CDRH2(Kabat)	AISGSGGSTYYGDSVKG	GFTX1
89	IgGIL10M6 の CDRH3(Kabat)	TRT <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL</u> <u>RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAY</u> <u>MTMKIRNKRF</u>	GFTX1 CDRH3 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
90	IgGIL10M6 の CDRL1(Kabat)	RASQSVSSSYLA	GFTX1
91	IgGIL10M6 の CDRL2(Kabat)	GASSRAT	GFTX1
92	IgGIL10M6 の CDRL3(Kabat)	QQYGSSPLT	GFTX1
93	IgGIL10M6 の VH	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRT <u>SPGQGTQSENSC</u> <u>THFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQM</u> <u>KDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCGQALS</u> <u>EMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNS</u> <u>LGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENGSGS</u> <u>GGKSKAVEQVKNAFNKLOEKGIYKAM</u>	GFTX1 CDRH3 に グラフト した単量体 IL10

【表 1 - 1 6】

配列番号	説明		コメント
		<u>SEFDIFINYIEAYMTMKIRN</u> KRFGWGQT LVTVSS	
94	IgGIL10M6 の VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPLTFGGGTKVEIK	GFTX1
95	IgGIL10M6 の 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARTRT <u>SPGOGTQSENSC</u> <u>THFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFEQM</u> <u>KDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCOALS</u> <u>EMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNS</u> <u>LGENLKTLLRLRRCHRFLPCENGGS</u> <u>GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAM</u> <u>SEFDIFINYIEAYMTMKIRN</u> KRFGWGQT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX1 CDRH3 に グラフト した単量体 IL10
96	IgGIL10M6 の 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ	GFTX1

10

20

30

40

【表 1 - 1 7】

配列番号	説明		コメント
		WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
97	IgGIL10M7 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSSTSGM	GFTX3
98	IgGIL10M7 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
99	IgGIL10M7 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYDV	GFTX3
100	IgGIL10M7 の CDRL1 (Chothia)	<u>QLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCCQALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRL</u> <u>RRCHRFPCENGSGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFYIEAY</u> <u>MTMKIRNVGY</u>	CDRL1 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
101	IgGIL10M7 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3
102	IgGIL10M7 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
103	IgGIL10M7 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
104	IgGIL10M7 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
105	IgGIL10M7 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYDV	GFTX3
106	IgGIL10M7 の CDRL1(Kabat)	<u>KAQLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u>	CDRL1 に グラフト

【表 1 - 1 8】

配列番号	説明		コメント
		<u>KESLLEDFKGYLGCAQALSEMIOFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLR</u> <u>LRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNVGYMH</u>	した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
107	IgGIL10M7 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
108	IgGIL10M7 の CDRL3(Kabat)	FQSGGYPT	GFTX3
109	IgGIL10M7 の VH	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTVSS	GFTX3
110	IgGIL10M7 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIOFYLEEVMPQAEN</u> <u>QDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGGTAFITLTISSLQPDD FATYYCFQSGGYPTFTGGGTKLEIK	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。
111	IgGIL10M7 の 重鎖	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT	GFTX3

【表 1 - 1 9】

配列番号	説明		コメント
		EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPVDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
112	IgGIL10M7 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQ PDDFATYYCFQGSQYPFTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	CDRL1 に グラフト した単量 体IL10。
113	IgGIL10M8 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSSTSGM	GFTX3
114	IgGIL10M8 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
115	IgGIL10M8 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYFDV	GFTX3
116	IgGIL10M8 の CDRL1 (Chothia)	QLSVGY	GFTX3

【表 1 - 2 0】

配列番号	説明		コメント
117	IgGIL10M8 の CDRL2 (Chothia)	<u>DTSPGOGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD</u> <u>LRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESL</u> <u>LEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPO</u> <u>AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLR</u> <u>RCHRFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKN</u> <u>AFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYM</u> <u>TMKIRNS</u>	GFTX3 CDRL2 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
118	IgGIL10M8 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
119	IgGIL10M8 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
120	IgGIL10M8 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
121	IgGIL10M8 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYDV	GFTX3
122	IgGIL10M8 の CDRL1(Kabat)	KAQLSVGYMH	GFTX3
123	IgGIL10M8 の CDRL2(Kabat)	<u>DTSPGOGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD</u> <u>LRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESL</u> <u>LEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPO</u> <u>AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLR</u> <u>RCHRFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKN</u> <u>AFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYM</u> <u>TMKIRNS</u> SKLAS	GFTX3 CDRL2 に グラフト した単量体 IL10。 IL10 は太 字、 下線
124	IgGIL10M8 の CDRL3(Kabat)	FQSGGYPFT	GFTX3
125	IgGIL10M8 の VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYDVWGAG	GFTX3

【表 1 - 2 1】

配列番号	説明		コメント
		TTVTVSS	
126	IgGIL10M8 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDT <u>SPGOGT</u> <u>OSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRV</u> <u>KTFFQMKDQOLDNLLLKESLLEDFKGYL</u> <u>GCOALSEMIOFYLEEVMPOAENODPDI</u> <u>KAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC</u> <u>ENGSGSGGKSKAVEQVKNFAFNKLOEK</u> <u>GIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNSK</u> LASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDFF ATYYCFQSGGYPTFGGGTKLEIK	GFTX3 CDRL2 に グラフトし た単量体 IL10。
127	IgGIL10M8 の 重鎖	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPVAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX3
128	IgGIL10M8 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDT <u>SPGOGT</u> <u>OSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRV</u> <u>KTFFQMKDQOLDNLLLKESLLEDFKGYL</u> <u>GCOALSEMIOFYLEEVMPOAENODPDI</u> <u>KAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC</u>	GFTX3 CDRL2 に グラフトし た単量体 IL10。

10

20

30

40

【表 1 - 2 2】

配列番号	説明		コメント
		<u>ENG</u> <u>GGSGGKSKAVEQVKN</u> <u>AFNKLQEK</u> <u>GIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNSK</u> LASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDDF ATYYCFQSGGYPTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
129	IgGIL10M9 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSTSGM	GFTX3
130	IgGIL10M9 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
131	IgGIL10M9 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYDV	GFTX3
132	IgGIL10M9 の CDRL1 (Chothia)	QLSVGY	GFTX3
133	IgGIL10M9 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3
134	IgGIL10M9 の CDRL3 (Chothia)	GSG <u>SPGQGTQSENSCTH</u> <u>FPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL</u> <u>RRCHRFLPCENG</u> <u>GGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAY</u> <u>MTMKIRN</u> YPF	GFTX3 CDRL3 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
135	IgGIL10M9 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3

【表 1 - 2 3】

配列番号	説明		コメント
136	IgGIL10M9 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
137	IgGIL10M9 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYFDV	GFTX3
138	IgGIL10M9 の CDRL1(Kabat)	KAQLSVGYMH	GFTX3
139	IgGIL10M9 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
140	IgGIL10M9 の CDRL3(Kabat)	<u>FQGS</u> <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCOALSEMIOFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>LRRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNYPFT</u>	GFTX3 CDRL3 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
141	IgGIL10M9 の VH	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTVSS	GFTX3
142	IgGIL10M9 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDEFATYY CFQGS <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPM</u> <u>MLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>LKESLLEDFKGYLGCOALSEMIOFYLEE</u> <u>EVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>LRRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAV</u> <u>EQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFIN</u> <u>YIEAYMTMKIRNYPFTFGGGTKLEIK</u>	GFTX3 CDRL3 に グラフトし た単量体 IL10。
143	IgGIL10M9 の 重鎖	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD	GFTX3

【表 1 - 2 4】

配列番号	説明		コメント
		KKDYNP SLK SRLTISKDT SANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
144	IgGIL10M9 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYY CFQGSGL <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPN</u> <u>MLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>LKESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLE</u> <u>EVMPOAENQDPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>RLRLRRCHRFLPCENGSGGSKAV</u> <u>EQVKNAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFIN</u> <u>YIEAYMTMKIRN</u> YPFTFGGGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC	GFTX3 CDRL3 に グラフトし た単量体 IL10。
145	IgGIL10M10 の CDRH1 (Chothia)	GFSLS <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNML</u> <u>RDRLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLK</u> <u>ESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEV</u> <u>MPOAENQDPDIKAHVNSLGENLKT</u> <u>RLRLRRCHRFLPCENGSGGSKAVEQ</u>	GFTX3 CDRH1 に グラフトし た単量体 IL10。

【表 1 - 2 5】

配列番号	説明		コメント
		<u>VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE</u> <u>AYMTMKIRNSTSGM</u>	IL10 は 太字、 下線
146	IgGIL10M10 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
147	IgGIL10M10 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYFDV	GFTX3
148	IgGIL10M10 の CDRL1 (Chothia)	QLSVGY	GFTX3
149	IgGIL10M10 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3
150	IgGIL10M10 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
151	IgGIL10M10 の CDRH1(Kabat)	<u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLR</u> <u>DAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE</u> <u>DFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPOAE</u> <u>NQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRC</u> <u>HRFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAF</u> <u>NKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMT</u> <u>MKIRNSTSGMSVG</u>	GFTX3 CDRH1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
152	IgGIL10M10 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
153	IgGIL10M10 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYFDV	GFTX3
154	IgGIL10M10 の CDRL1(Kabat)	KAQLSVGYMH	GFTX3
155	IgGIL10M10 の	DTSKLAS	GFTX3

【表 1 - 2 6】

配列番号	説明		コメント
	CDRL2(Kabat)		
156	IgGIL10M10 の CDRL3(Kabat)	FQGS GYPFT	GFTX3
157	IgGIL10M10 の VH	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL <u>S</u> <u>PGOGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRD</u> <u>AFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLED</u> <u>FKGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRN</u> STSGMSVGWIRQPPGKALEWLADI WWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVV LKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYD VWGAGTTVTVSS	GFTX3 CDRH1 に グラフトし た単量体 IL10
158	IgGIL10M10 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYY CFQGS GYPFTFGGGTKLEIK	GFTX3
159	IgGIL10M10 の 重鎖	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL <u>S</u> <u>PGOGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRD</u> <u>AFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLED</u> <u>FKGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRN</u> STSGMSVGWIRQPPGKALEWLADI WWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVV LKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYD VWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT	GFTX3 CDRH1 に グラフトし た単量体 IL10

【表 1 - 2 7】

配列番号	説明		コメント
		LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
160	IgGIL10M10 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYY CFQGSQGYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTCSFNRGEC	GFTX3
161	IgGIL10M11 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSSTSGM	GFTX3
162	IgGIL10M11 の CDRH2 (Chothia)	WWD <u>SPGOGTQSENSCTHFPGNLPNML</u> <u>RDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLK</u> <u>ESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYEEV</u> <u>MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTRL</u> <u>RLRRCHRFLPCENGSGGSKKAVEQ</u> <u>VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIE</u> <u>AYMTMKIRNDK</u>	GFTX3 CDRH2 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
163	IgGIL10M11 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYFDV	GFTX3
164	IgGIL10M11 の CDRL1 (Chothia)	QLSVGY	GFTX3
165	IgGIL10M11 の	DTS	GFTX3

【表 1 - 2 8】

配列番号	説明		コメント
	CDRL2 (Chothia)		
166	IgGIL10M11 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
167	IgGIL10M11 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
168	IgGIL10M11 の CDRH2(Kabat)	DIWWD <u>SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLR</u> <u>LRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNDKKDYNPSLKS</u>	GFTX3 CDRH2 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
169	IgGIL10M11 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYDV	GFTX3
170	IgGIL10M11 の CDRL1(Kabat)	KAQLSVGYMH	GFTX3
171	IgGIL10M11 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
172	IgGIL10M11 の CDRL3(Kabat)	FQSGYPFT	GFTX3
173	IgGIL10M11 の VH	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLS TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWD <u>SP</u> <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMPQAEN</u> <u>QDPDIKAHVNSLGENLKTLRRLRRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNDKKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVV</u> LKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYD	GFTX3 CDRH2 に グラフトし た単量体 IL10

【表 1 - 2 9】

配列番号	説明		コメント
		VWGAGTTVTVSS	
174	IgGIL10M11 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYY CFQGSQGYPTFTGGGKLEIK	GFTX3
175	IgGIL10M11 の 重鎖	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWD <u>SP</u> <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNDKKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVV</u> LKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYD VWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX3 CDRH2 に グラフトし た単量体 IL10
176	IgGIL10M11 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYY CFQGSQGYPTFTGGGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS	GFTX3

【表 1 - 3 0】

配列番号	説明		コメント
		LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGEC	
177	IgGIL10M12 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSSTSGM	GFTX3
178	IgGIL10M12 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
179	IgGIL10M12 の CDRH3 (Chothia)	<u>SMITSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRL</u> <u>RRCHRLFPCENGGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLOEKGIYKAMSEFDIFINYIEAY</u> <u>MTMKIRNNWYFDV</u>	GFTX3 CDRH3 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
180	IgGIL10M12 の CDRL1 (Chothia)	QLSVGY	GFTX3
181	IgGIL10M12 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3
182	IgGIL10M12 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
183	IgGIL10M12 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
184	IgGIL10M12 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
185	IgGIL10M12 の CDRH3(Kabat)	<u>SMITSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRL</u>	GFTX3 CDRH3 に グラフトし た単量体

【表 1 - 3 1】

配列番号	説明		コメント
		<u>RRCHRFLPCENGSGGSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFYIEAY</u> <u>MTMKIRN</u> NWYFDV	IL10。 IL10 は 太字、 下線
186	IgGIL10M12 の CDRL1(Kabat)	KAQLSVGYMH	GFTX3
187	IgGIL10M12 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
188	IgGIL10M12 の CDRL3(Kabat)	FQGSGYPFT	GFTX3
189	IgGIL10M12 の VH	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMIT <u>SPGQGTQSENS</u> <u>CTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQ</u> <u>MKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCA</u> <u>LSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHV</u> <u>NSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENG</u> <u>GSGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYK</u> <u>AMSEFDIFYIEAYMTMKIRN</u> NWYFD VWGAGTTVTVSS	GFTX3 CDRH3 に グラフトし た単量体 IL10
190	IgGIL10M12 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDFFATYY CFQGSGYPFTFGGGTKLEIK	GFTX3
191	IgGIL10M12 の 重鎖	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMIT <u>SPGQGTQSENS</u> <u>CTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQ</u> <u>MKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCA</u> <u>LSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHV</u> <u>NSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENG</u>	GFTX3 CDRH3 に グラフトし た単量体 IL10

10

20

30

40

【表 1 - 3 2】

配列番号	説明		コメント
		<u>GSGGKSKAVEQVKNAFNKLOEKGIYK</u> <u>AMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN</u> NWYFD VWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
192	IgGIL10M12 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSV GYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASG VPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYY CFQGSGLYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	GFTX3 30
193	IgGIL10M13 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSSTSGM	GFTX3
194	IgGIL10M13 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
195	IgGIL10M13 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWYFDV	GFTX3 40
196	IgGIL10M13 の CDRL1	QLSS <u>SPGOGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKES</u>	CDRL1 に グラフトし

【表 1 - 3 3】

配列番号	説明		コメント
	(Chothia)	<u>LEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRL</u> <u>RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAY</u> <u>MTMKIRNVGY</u>	た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
197	IgGIL10M13 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3
198	IgGIL10M13 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
199	IgGIL10M13 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
200	IgGIL10M13 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
201	IgGIL10M13 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYDV	GFTX3
202	IgGIL10M13 の CDRL1(Kabat)	<u>KAQLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEE</u> <u>VMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLL</u> <u>RRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNVGYMH</u>	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、下線 GFTX3
203	IgGIL10M13 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
204	IgGIL10M13 の CDRL3(Kabat)	FQSGGYPFT	GFTX3
205	IgGIL10M13 の VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYDVWGAG TTVTVSS	GFTX3

【表 1 - 3 4】

配列番号	説明		コメント
206	IgGIL10M13 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPD FATYYCFQGSQGYPTFTGGGKLEIK	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10 GFTX3
207	IgGIL10M13 の 重鎖	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPVDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC S VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX3
208	IgGIL10M13 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u>	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10 GFTX3

【表 1 - 3 5】

配列番号	説明		コメント
		<u>KIRN</u> VGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDD FATYYCFQGSQGYPTFTGGGKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC	
209	単量体 IL10 (IL10M)	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRD AFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFK GYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDP DIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFLPC ENGGGSGGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGI YKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	内部 G3SG2 スパーサー を有する、 IL10 の 成熟型
210	IgGIL10M14 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSSTSGM	GFTX3
211	IgGIL10M14 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
212	IgGIL10M14 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYDV	GFTX3
213	IgGIL10M14 の CDRL1 (Chothia)	<u>QLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVM</u> <u>PPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRL</u> <u>RRCHRFLPCENGGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAY</u> <u>MTMKIRN</u> VGY	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線 GFTX3
214	IgGIL10M14 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3

【表 1 - 3 6】

配列番号	説明		コメント
215	IgGIL10M14 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
216	IgGIL10M14 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
217	IgGIL10M14 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
218	IgGIL10M14 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYDV	GFTX3
219	IgGIL10M14 の CDRL1(Kabat)	<u>KAQLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLR</u> <u>LRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u> <u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNVGYMH</u>	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線 GFTX3
220	IgGIL10M14 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
221	IgGIL10M14 の CDRL3(Kabat)	FQSGYPFT	GFTX3
222	IgGIL10M14 の VH	QVTLRSEGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYDVWGAG TTVTVSS	GFTX3
223	IgGIL10M14 の VL	<u>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSSP</u> <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMMPQAEN</u> <u>QDPDIKAHVNSLGENLKTLRRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u>	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10 GFTX3

10

20

30

40

【表 1 - 3 7】

配列番号	説明		コメント
		<u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDD FATYYCFQGSQGYPTFTGGGKLEIK	
224	IgGIL10M14 の 重鎖	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS TSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTN MDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GFTX3 LALA
225	IgGIL10M14 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPPQAE</u> <u>NQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLOEKGIYKAMSEFDIFYIEAYMTM</u> <u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDD FATYYCFQGSQGYPTFTGGGKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	GFTX3 LALA CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。

【表 1 - 3 8】

配列番号	説明		コメント
226	IgGIL10M15 の CDRH1 (Chothia)	GFSLSTSGM	GFTX3
227	IgGIL10M15 の CDRH2 (Chothia)	WWDDK	GFTX3
228	IgGIL10M15 の CDRH3 (Chothia)	SMITNWFYFDV	GFTX3
229	IgGIL10M15 の CDRL1 (Chothia)	<u>QLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR</u> <u>DLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLKES</u> <u>LLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVM</u> <u>QAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRL</u> <u>RRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVEQVK</u> <u>NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFYIEAY</u> <u>MTMKIRNVGY</u>	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
230	IgGIL10M15 の CDRL2 (Chothia)	DTS	GFTX3
231	IgGIL10M15 の CDRL3 (Chothia)	GSGYPF	GFTX3
232	IgGIL10M15 の CDRH1(Kabat)	TSGMSVG	GFTX3
233	IgGIL10M15 の CDRH2(Kabat)	DIWWDDKKDYNPSLKS	GFTX3
234	IgGIL10M15 の CDRH3(Kabat)	SMITNWFYFDV	GFTX3
235	IgGIL10M15 の CDRL1(Kabat)	<u>KAQLSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNM</u> <u>LRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL</u> <u>KESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEE</u> <u>VMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLL</u> <u>RRLRRCHRFLPCENGSGGSGGKSKAVE</u>	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は太字、

【表 1 - 3 9】

配列番号	説明		コメント
		<u>QVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI</u> <u>EAYMTMKIRNVGYMH</u>	下線 GFTX3
236	IgGIL10M15 の CDRL2(Kabat)	DTSKLAS	GFTX3
237	IgGIL10M15 の CDRL3(Kabat)	FQSGYPFT	GFTX3
238	IgGIL10M15 の VH	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSS	GFTX3
239	IgGIL10M15 の VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSSP <u>GOGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPPAEN</u> <u>QDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPD FATYYCFQSGYPFTFGGGTKLEIK	CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。IL10 は太字、 下線 GFTX3
240	IgGIL10M15 の 重鎖	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSANQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	GFTX3 NEM

【表 1 - 4 0】

配列番号	説明		コメント
		GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWVSNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VIHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
241	IgGIL10M15 の 軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKAQLSP <u>GQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA</u> <u>FSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDF</u> <u>KGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMPOAEN</u> <u>ODPDIAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCH</u> <u>RFLPCENGSGSGGKSKAVEQVKNAFN</u> <u>KLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM</u> <u>KIRNVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTS</u> KLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPD FATYYCFQGSQYPFTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	GFTX3 NEM CDRL1 に グラフトし た単量体 IL10。 IL10 は 太字、 下線
242	IgGIL10M7 の VH	CAGGTCACACTGAGAGAGTCAGGCCCT GCCCTGGTCAAGCCTACTCAGACCCTGA CCCTGACCTGCACCTTTAGCGGCTTTAG CCTGAGCACTAGCGGAATGAGCGTGGG CTGGATTAGACAGCCCCCTGGTAAAGC CCTGGAGTGGCTGGCCGATATTTGGTGG GACGATAAGAAGGACTATAACCCTAGC CTGAAGTCTAGGCTGACTATCTCTAAGG ACACTAGCGCTAATCAGGTGGTGCTGA AAGTGACTAATATGGACCCCGCCGACA CCGCTACCTACTACTGCGCTAGATCTAT GATCACTAACTGGTACTTCGACGTGTGG GGCGCTGGCACTACCGTGACCGTGTCTA GC	
243	IgGIL10M7 の VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGCA	

配列番号	説明		コメント
		CCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAG TGA CTATCACCTGTAAAGCTCAGCTGTC TAGCCCAGGTCAGGGA ACTCAGTCAGA GAATAGCTGCACTCACTTCCCCGGTAAC CTGCCTAATATGCTGAGAGATCTGAGG GACGCCTTCTCTAGGGTCAAGACCTTCT TTCAGATGAAGGATCAGCTGGATAACC TGCTGCTGAAAGAGTCACTGCTGGAGG ACTTTAAGGGCTACCTGGGCTGTCAGGC CCTGAGCGAGATGATTCA GTTCTACCTG GAAGAAGTGATGCCCCAGGCCGAGAAT CAGGACCCCGATATTAAGGCTCACGTG AACTCACTGGGCGAGAACCTGAAAACC CTGAGACTGAGGCTGAGGCGGTGTCAC CGGTTTCTGCCCTGCGAGAACGGCGGA GG TAGCGGCGGTAAATCTAAGGCCGTG GAACAGGTCAAAAACGCCTTTAACAAG CTGCAGGAAAAGGGAATCTATAAGGCT ATGAGCGAGTTCGACATCTTTATTA ACT ATATCGAGGCCTATATGACTATGAAGA TTAGGAACGTGGGCTATATGCACTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTA AGCTGCTGATCTACGACACCTCTAAGCT GGCTAGTGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC GG TAGCGGTAGTGGCACCGCCTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGACG ACTTCGCTACCTACTACTGTTTTTCAGGG TAGCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGA GGC ACTAAGCTGGAGATTAAG	
244	IgGIL10M7 の 重鎖	CAGGTCACACTGAGAGAGTCAGGCCCT GCCCTGGTCAAGCCTACTCAGACCCTGA CCCTGACCTGCACCTTTAGCGGCTTTAG CCTGAGCACTAGCGGAATGAGCGTG GG	

40

【表 1 - 4 3】

配列番号	説明		コメント
		ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGG GAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCC AGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCT TCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGG CAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGC CCCGGCAAG	10
245	IgGIL10M7 の 軽鎖	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGCA CCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAG TGAATATCACCTGTAAAGCTCAGCTGTC TAGCCCAGGTCAGGGAACTCAGTCAGA GAATAGCTGCACTCACTTCCCCGGTAAC CTGCCTAATATGCTGAGAGATCTGAGG GACGCCTTCTCTAGGGTCAAGACCTTCT TTCAGATGAAGGATCAGCTGGATAACC TGCTGCTGAAAGAGTCACTGCTGGAGG ACTTTAAGGGCTACCTGGGCTGTCAGGC CCTGAGCGAGATGATTCAGTTCTACCTG GAAGAAGTGATGCCCCAGGCCGAGAAT CAGGACCCCGATATTAAGGCTCACGTG AACTCACTGGGCGAGAACCTGAAAACC CTGAGACTGAGGCTGAGGCGGTGTCAC CGGTTTCTGCCCTGCGAGAACGGCGGA GGTAGCGGCGGTAAATCTAAGGCCGTG GAACAGGTCAAAAACGCCTTTAACAAG CTGCAGGAAAAGGGAATCTATAAGGCT ATGAGCGAGTTCGACATCTTTATTAAC	30 40

40

【表 1 - 4 5】

配列番号	説明		コメント
		GATCACTAACTGGTACTTCGACGTGTGG GGCGCTGGCACTACCGTGACCGTGTCTA GC	
247	IgGIL10M13 の VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGCA CCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAG TGA CTATCACCTGTAAAGCTCAGCTGTC TAGCCCAGGTCAGGGA ACTCAGTCAGA GAATAGCTGCACTCACTTCCCCGGTAAC CTGCCTAATATGCTGAGAGATCTGAGG GACGCCTTCTCTAGGGTCAAGACCTTCT TTCAGATGAAGGATCAGCTGGATAACC TGCTGCTGAAAGAGTCACTGCTGGAGG ACTTTAAGGGCTACCTGGGCTGTCAGGC CCTGAGCGAGATGATTCA GTTCTACCTG GAAGAAGTGATGCCCCAGGCCGAGAAT CAGGACCCCGATATTAAGGCTCACGTG AACTCACTGGGCGAGAACCTGAAAACC CTGAGACTGAGGCTGAGGCGGTGTCAC CGGTTTCTGCCCTGCGAGAACGGCGGA GGTAGCGGCGGTAAATCTAAGGCCGTG GAACAGGTCAAAAACGCCTTTAACAAG CTGCAGGAAAAGGGAATCTATAAGGCT ATGAGCGAGTTCGACATCTTTATTA ACT ATATCGAGGCCTATATGACTATGAAGA TTAGGAACGTGGGCTATATGCACTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTA AGCTGCTGATCTACGACACCTCTAAGCT GGCTAGTGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC GGTAGCGGTAGTGGCACCGCCTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGACG ACTTCGCTACCTACTACTGTTTT CAGGG TAGCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGA GGCACTAAGCTGGAGATTAAG	10 20 30 40

配列番号	説明		コメント
248	IgGIL10M13 の 重鎖	CAGGTCACACTGAGAGAGTCAGGCCCT GCCCTGGTCAAGCCTACTCAGACCCTGA CCCTGACCTGCACCTTTAGCGGCTTTAG CCTGAGCACTAGCGGAATGAGCGTGGG CTGGATTAGACAGCCCCCTGGTAAAGC CCTGGAGTGGCTGGCCGATATTTGGTGG GACGATAAGAAGGACTATAACCCTAGC CTGAAGTCTAGGCTGACTATCTCTAAGG ACACTAGCGCTAATCAGGTGGTGCTGA AAGTGACTAATATGGACCCCGCCGACA CCGCTACCTACTACTGCGCTAGATCTAT GATCACTAACTGGTACTTCGACGTGTGG GGCGCTGGCACTACCGTGACCGTGTCTA GCGCTAGCACTAAGGGCCCCCTCCGTGTT CCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACC TCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGT GACAGTGTCTCTGGAAGTCTGGCGCCCTG ACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCG TGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCT GTCCTCCGTGGTCAAGTGCCTTCAAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGC AACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACC AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAG TCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTC CCTGCCCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGG CCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGG ACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GCCGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTG AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT CGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC	

配列番号	説明		コメント
		CGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCC TGGCCGCCCCTATCGAAAAGACAATCT CCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAAC CCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCC GGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTA CCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGA GTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTA CAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAAC TGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGC AAG	
249	IgGIL10M13 の 軽鎖	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGCA CCCTGAGCGCTAGTGTGGGCGATAGAG TGA CTATCACCTGTAAAGCTCAGCTGTC TAGCCCAGGTCAGGGAACTCAGTCAGA GAATAGCTGCACTCACTTCCCCGGTAAC CTGCCTAATATGCTGAGAGATCTGAGG GACGCCTTCTCTAGGGTCAAGACCTTCT TTCAGATGAAGGATCAGCTGGATAACC TGCTGCTGAAAGAGTCACTGCTGGAGG ACTTTAAGGGCTACCTGGGCTGTCAGGC CCTGAGCGAGATGATTCAGTTCTACCTG GAAGAAGTGATGCCCCAGGCCGAGAAT CAGGACCCCGATATTAAGGCTCACGTG AACTCACTGGGCGAGAACCTGAAAACC CTGAGACTGAGGCTGAGGCGGTGTCAC CGGTTTCTGCCCTGCGAGAACGGCGGA	

配列番号	説明		コメント
		GGTAGCGGCGGTAAATCTAAGGCCGTG GAACAGGTCAAAAACGCCTTTAACAAG CTGCAGGAAAAGGGAATCTATAAGGCT ATGAGCGAGTTCGACATCTTTATTAAGT ATATCGAGGCCTATATGACTATGAAGA TTAGGAACGTGGGCTATATGCACTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGTAAAGCCCCTA AGCTGCTGATCTACGACACCTCTAAGCT GGCTAGTGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGC GGTAGCGGTAGTGGCACCGCCTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGACG ACTTCGCTACCTACTACTGTTTTAGGG TAGCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGA GGCACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACG GTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCG GCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGA ACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGG TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGC AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCA CCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGG TGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTT CAACAGGGGCGAGTGC	
250	単量体 IL10	AGTCCCGGTCAGGGAAGTCAAGTCAAG AATAGCTGCACTCACTTCCCCGGTAACC TGCCTAATATGCTGAGAGATCTGAGGG ACGCCTTCTCTAGGGTCAAGACCTTCTT TCAGATGAAGGATCAGCTGGATAACCT GCTGCTGAAAGAGTCACTGCTGGAGGA CTTTAAGGGCTACCTGGGCTGTCAGGCC	

【表 1 - 4 9】

配列番号	説明		コメント
		CTGAGCGAGATGATTTCAGTTCTACCTGG AAGAAGTGATGCCCCAGGCCGAGAATC AGGACCCCGATATTAAGGCTCACGTCA ACTCACTGGGCGAGAACCTGAAAACCC TGAGACTGAGGCTGAGGCGGTGTCACC GGTTTCTGCCCTGCGAGAACGGCGGAG GTAGCGGCGGTAAATCTAAGGCCGTGG AACAGGTCAAAAACGCCTTTAACAAGC TGCAGGAAAAGGGAATCTATAAGGCTA TGAGCGAGTTTCGACATCTTTATTAATA TATCGAGGCCTATATGACTATGAAGATT AGGAAC	
251	リンカー	GGGSGG	
252	リンカー	GGGGS	
253	リンカー	GGGGA	

【0271】

実施例 2：抗体サイトカイングラフトタンパク質は抗炎症活性を有する

診療所において r h I L 1 0 の炎症促進活性の裏付けで開発されたアッセイ (Lauw et al., J Immunol. 2000; 165(5):2783-9) を用いて、ヒト全血中の I g G I L 1 0 M 1 3 の炎症促進活性を評価した。炎症促進活性を評価するために、抗体サイトカイングラフトタンパク質を、活性化一次ヒト C D 8 T 細胞においてインターフェロン γ (I F N γ) またはグランザイム B を誘導するその能力について特性を明らかにした。I g G I L 1 0 M 1 3 などの抗体サイトカイングラフトタンパク質が、I F N γ 産生によって測定されたとき、組換えヒト I L 1 0 (r h I L 1 0) よりも有意に低い炎症促進活性を示すことが分かった。このデータを図 3 A に示す。同様の結果が、グランザイム B を測定するアッセイ (データは示さず) ならびに他の例示的な抗体サイトカイングラフトタンパク質 (I g G I L 1 0 M 7) でも見られた。r h I L 1 0 と比較して有意に低下した、I g G I L 1 0 M 1 3 によって示される炎症促進活性は、I g G I L 1 0 M 1 3 をより広い用量範囲にわたって投与することができるので、I g G I L 1 0 M 1 3 が免疫関連障害を治療するのに r h I L 1 0 よりも優れていることを示している。

【0272】

抗炎症活性を調べるため、抗体サイトカイングラフトタンパク質および r h I L 1 0 を、ヒト全血中で L P S 誘導 T N F α を阻害するその能力について試験した。このデータを図 3 B に示す (r h I L 1 0 または I g G I L 1 0 M 1 3 の濃度が上昇すると T N F α 産生が減少した)。r h I L 1 0 および I g G I L 1 0 M 1 3 曲線が類似であり、両分子が強力な抗炎症活性を有していたことを示していることに留意されたい。

【0273】

要約すると、これらの結果は、抗体サイトカイングラフトタンパク質が、I L 1 0 と同様の抗炎症特性を有するが、用量制限がなく、不要な炎症促進特性もないという所望の特性を有することを示している。

【0274】

実施例 3：IL10 依存性シグナル伝達

ヒト PBMC および全血におけるインビトロシグナル伝達試験は、IgG IL10M13 などの抗体サイトカイングラフトタンパク質が、rh IL10 と比較するとより特異的なシグナル伝達プロファイルを示したことを示す。CyTOF、質量分析を利用する FACS に基づく方法を用いて、全血中の複数の異なる細胞集団の抗体サイトカイングラフトタンパク質シグナル伝達を pSTAT3 検出によって評価した (図 4)。IgG IL10M13 などの抗体サイトカイングラフトタンパク質は、 μM 濃度より上 (最大 $1.8 \mu\text{M}$) で単球、マクロファージおよび形質細胞様樹状細胞上でのみ pSTAT3 シグナルを誘導した。これらの細胞型の全てが IL10 受容体の発現増加を有することが知られている。rh IL10 は、単球上だけでなく、T 細胞、B 細胞および NK 細胞などのさらなる細胞型上でも pSTAT3 シグナルを誘導した。これは、低い nM 濃度の rh IL10 でさえ見られた。100 nM の濃度の rh IL10 で処理した全血では、pSTAT3 シグナルが単球および骨髄樹上細胞で見られ、T、NK、B 細胞および顆粒球のさらなる中程度の活性化が見られた。pSTAT3 シグナル伝達の機能的な重要性は、CD8⁺ T 細胞および NK 細胞からの IFN γ およびグランザイム B の産生増加をもたらす。rh IL10 シグナル伝達に応答した B 細胞の増殖も存在する。ヒト全血における rh IL10 のこの炎症促進活性は、抗炎症 IC90 より上の 5 倍未満の曝露で観察される。IgG IL10M13 などの抗体サイトカイングラフトタンパク質のより選択的な細胞プロファイルは、より優れた抗炎症有効性につながる炎症促進活性の低下をもたらした。

【0275】

実施例 4：種々の種における抗体サイトカイングラフトタンパク質シグナル伝達

rh IL10 は、ヒト単球、PBMC および全血において LPS 誘導炎症性サイトカイン産生を強力に阻害する。抗体サイトカイングラフトタンパク質 IgG IL10M13 は、標的細胞上で pM 効力を示すが、rh IL10 よりも効果が 10 倍少ない。表 2 は、ヒト全血ならびに選択された毒性種の全血における IL10 または IgG IL10M13 活性についての効力比較である。

【0276】

効力計算は、マウス、カンクイザルまたはヒトからの体外全血アッセイに基づく。試験する各種について、IgG IL10M13 または rh IL10 を滴定し、LPS 誘導 TNF α 産生を阻害する能力について評価した。IC50 を、全 TNF α シグナルの 50% 阻害をもたらす分子レベルとして計算した。IC90 および IC30 を、以下の式を用いて、各アッセイについての Hill 勾配値を考慮して計算した：

$$\log EC_{50} = \log EC_F - (1 / \text{Hill 勾配}) * \log (F / (100 - F))$$

(ECF は全 TNF α シグナルの F% の応答を与える濃度である)。

【0277】

【表 2】

表 2

		IgGIL10M13 (CV%)	IL10 (CV%)
マウス	IC30	2.2 pM (プールされた血液)	0.57 pM (プールされた血液)
	IC50	12 pM	1.7 pM
	IC90	108 pM	15 pM
カンクイザル	IC30	4.13 pM (48% n=3)	0.44 pM (28% n=3)
	IC50	6.67 pM (53%)	0.65 pM (31%)
	IC90	24 pM (73%)	1.9 pM (43%)
ヒト	IC30	10.8 pM (76% n=48)	1.3 pM (96% n=48)
	IC50	25.2 pM (76%)	2.8 pM (98%)
	IC90	262 pM (94%)	22.8 pM (79%)

【0278】

実施例5：抗体サイトカイングラフトタンパク質薬物動態の評価

rhIL10は半減期が短いため、その標的組織曝露は限定され、患者が複数回投薬を受けることが要求される。抗体サイトカイングラフトタンパク質の半減期をC57BL/6マウスで評価した。抗体サイトカイングラフトタンパク質（例えば、IgGIL10M13）を0.2mg/kgで皮下注射し、注射5分後に開始し、注射144時間後まで血液をサンプリングした。IgGIL10M13は、約1時間の半減期を有するrhIL10（図5A）と比較して、約4.4日の有意な半減期延長（図5B）を有していた。

【0279】

実施例6：抗体サイトカイングラフトタンパク質薬力学の評価

半減期延長と一致して、抗体サイトカイングラフトタンパク質はまた、薬力学の改善も実証した。IL10受容体活性化およびシグナル伝達のマーカーであるホスホ-STAT3（pSTAT3）を、IgGIL10M13の皮下投与後にマウス結腸で監視した。少なくとも最大投与72時間後にpSTAT3シグナル増強が検出され、投与144時間後までには存在しなくなった。図5Cを参照されたい。このプロファイルは、投与24時間後までにはシグナルが存在しなくなるrhIL10に対する劇的な改善である。図5Dは、抗体サイトカイングラフトタンパク質投薬後のLPS曝露に応じた血中のTNFαの阻害によって測定されるとき、rhIL10と比較して改善したIgGIL10M13のインビボ応答の持続時間を示している。

【0280】

実施例7：マウスモデルにおける抗体サイトカイングラフトタンパク質の有効性

LPS曝露後のTNFα阻害についての有効性の直接比較を行った。C57/BL6マウスに、ビヒクル、または組換えIL10とIgGIL10M13の両方について計算した110nmol/マウスの等モルレベルのIL10を皮下投与した。次いで、マウスに腹腔内送達されるLPSを曝露して、TNFαレベルのIL10依存性阻害を評価した。IgGIL10M13は、TNFα産生によって測定されたとき、0.5時間の最初の評価時間でrhIL10に匹敵する有効性を実証したが、少なくとも投与48時間後まで、IgGIL10M13はrhIL10に対して優れた有効性を維持した。このデータを図6に示す。

【0281】

実施例8：抗体サイトカイングラフトタンパク質は改善した曝露を有する

抗体サイトカイングラフトタンパク質のピーク血清濃度（Cmax）をC57BL/6マウスで評価した。抗体サイトカイングラフトタンパク質を0.9%食塩水中0.2mg/kg（10ml/kg用量体積）で皮下注射し、注射1時間後に開始し、注射144時間後まで血液をサンプリングした。各時点で、全血をヘパリン処理管に回収し、4℃で10分間、12500rpmで遠心分離した。血漿上清を回収し、全時点を回収するまで-80℃で保存した。血漿中の抗体サイトカイングラフトタンパク質レベルを2つの異なる免疫測定法を用いて測定して、抗体サイトカイングラフトタンパク質のIL10と抗体ドメインの両方の検出を可能にした。図7に示されるように、抗体サイトカイングラフトタンパク質（例えば、IgGIL10M13）は、過去100時間60%超のCmaxを維持した。対照的に、rhIL10レベルは3.5時間以内に20%未満のCmaxに低下した。

【0282】

実施例9：抗体サイトカイングラフトタンパク質はヒト患者において一定の細胞型にのみ作用する

ヒトの健康なドナーおよびクローン病の患者の免疫細胞に対して、CyTOFを前記のように実行した（実施例3ならびに以下の材料および方法参照）。図8のグラフに示されるように、IgGIL10M13は単球のみを刺激し、pSTAT3レベルによって測定される刺激はrhIL10に匹敵する。単球はクローン病および潰瘍性大腸炎などの炎症関連障害に関する標的細胞であり、非常に高レベルのIL10受容体を発現する。しかし

10

20

30

40

50

ながら、図9はまた、r h I L 1 0の不要な炎症促進効果、例えば、C D 4 T細胞、C D 8 T細胞およびN K細胞でのp S T A T 3シグナル伝達増加を示す。I g G I L 1 0 M 1 3が、正常なヒト細胞またはクローン病患者からとった細胞のいずれにおいてもこの望ましくない炎症促進効果を示さないことは注目に値する。このことは、抗体サイトカイングラフトタンパク質の投与が所望の細胞型にのみ作用し、クローン病および潰瘍性大腸炎などの免疫関連障害を悪化させるにすぎないC D 8 T細胞などの他の細胞型には作用しないので、I g G I L 1 0 M 1 3がより大きく、安全な治療指数を有することを実証している。

【0283】

実施例10：I g G I L 1 0 M 1 3は、r h I L 1 0と比較して低下したP H A刺激ヒト全血中での炎症促進活性を有する

10

遺伝的I L 1 0欠損とI B D感受性を関連付ける広範な臨床データにもかかわらず、r h I L 1 0はI B D臨床試験において軽度の有効性しか示さなかった(Herfarth et al., Gut 2002: 50(2):146-147)。試験データの遡及的分析は、r h I L 1 0の有効性が、I F N γ の産生増加などのその固有の炎症促進活性によって限定されることを示唆している。前に論じられるように、ヒト機能的細胞ベースアッセイで、r h I L 1 0シグナル伝達は、T細胞およびN K細胞からのI F N γ およびグランザイムBの産生をもたらす。

【0284】

クローン病の患者から全血を採取し、r h I L 1 0、I g G I L 1 0 M 1 3およびP H A単独による刺激後にI F N γ レベルを測定した。このデータを図9A～図9Cに示す。r h I L 1 0の用量増加はI F N γ の鋭い増加を引き起こし、次いでこれが定常に達する。対照的に、I g G I L 1 0 M 1 3によるこれらの細胞の処理では、I F N γ の産生がごくわずかしか～全く見られず、I g G I L 1 0 M 1 3がT細胞またはN K細胞からI F N γ 産生を誘導しなかったまたはごく低レベルでしか誘導しなかったことを示している。

20

【0285】

これらの患者ドナー試料を用いて追加の滴定実験を行った。この実験では、ドナー患者血清からのI L 1 0レベルを測定し、これが1.5～5フェムトモル濃度(fM)の範囲にあることを見出したが、科学文献は、患者のI L 1 0レベルが20fMにもなり得ると報告している(Szkaradkiewicz et al., Arch. Immunol. Ther Exp 2009: 57(4):291-294)。r h I L 1 0を2フェムトモル濃度(fM)、2pM、2nMおよび200nMの固定濃度でドナー患者細胞に投与した。これらの固定濃度のr h I L 1 0に、増加する濃度の抗体サイトカイングラフトタンパク質I g G I L 1 0 M 1 3を投与し、I F N γ 産生をアッセイした。データを図9Dに示す。2fMおよび2pMの固定濃度では、I g G I L 1 0 M 1 3はr h I L 1 0に競合し、I F N γ 産生をベースラインレベルに低下させた。2nMの固定濃度では、I F N γ 産生がナノモル濃度のI g G I L 1 0 M 1 3によって減少した。最終的に、200nM r h I L 1 0の固定過剰濃度では、I g G I L 1 0 M 1 3によるI F N γ 産生のごくわずかな減少しか見られなかった。このことは、生理学的レベルのI L 1 0で、I g G I L 1 0 M 1 3がI L 1 0と競合し、I F N γ の産生および不要な炎症促進効果を減少させることを示している。

30

【0286】

実施例11：抗体サイトカイングラフトタンパク質の凝集特性

40

I B Dに関する臨床試験では、r h I L 1 0が極めて短い半減期を有することが認められた；しかしながら、半減期を延ばすためのI L 1 0二量体との単一F c融合物は、このような分子には凝集特性があるので、追求されなかった。図10Aは、F cと結合したI L 1 0野生型とF cと結合したI L 1 0単量体の両方の凝集を示している。しかしながら、図10Bに示されるように、抗体サイトカイングラフトタンパク質の抗体構造はI L 1 0凝集を防ぐので、投与の容易さを促進する。さらに、凝集の低下は、治療剤に対する免疫反応および抗薬物抗体の産生を減らすという利益を有する。

【0287】

実施例12：抗体サイトカイングラフトタンパク質の保持された結合

50

パリビズマブは抗RSV抗体であり、これをサイトカイングラフトのための抗体構造として選択した。この抗体は公知の構造という利点を有し、その標的がヒト以外の標的であるRSVであった。ヒト以外の標的の選択は、オフターゲットヒト抗原との抗体サイトカイングラフトタンパク質結合に関連する毒性がないことを保障するためであった。IL10Mのパリビズマブへのグラフト後も、最終的なIL10抗体サイトカイングラフトタンパク質がRSV標的タンパク質に依然として結合するかどうかは不確定であった。ELISAによって分析されるように、IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質は、IL10Mの存在にもかかわらず、RSV標的タンパク質に依然として結合していた。このデータを図11に示す。

【0288】

実施例13：抗体サイトカイングラフトタンパク質の構造的コンフォメーションは細胞型にわたる示差的活性をもたらす

抗体サイトカイングラフトタンパク質（例えば、IgGIL10M13）では、単量体IL10（配列番号209）が抗体の軽鎖CDR1に組み込まれている（図2）。IL10のDヘリックスとEヘリックスとの間の6アミノ酸グリシン-セリンリンカーの挿入によって、通常はヘテロ二量体の分子が、ドメイン交換二量体化できなくなる。よって、IL10Mの抗体へのグラフトによって、2個の単量体IL10分子を有する抗体サイトカイングラフトタンパク質が得られる。しかしながら、抗体Fabアームの可撓性のために、IL10単量体間の角度および距離は野生型IL10二量体のように固定されないので、IL10R1/R2受容体複合体との相互作用に影響を及ぼす。これを図12に図表で示す。具体的には、抗体グラフトのために、グラフトIL10二量体の角度がより大きく、可変的になり、CD4およびCD8⁺ T細胞、B細胞およびNK細胞などの炎症促進性細胞型で見られるように低いIL10R1およびR2の発現レベルを有する細胞上のシグナル伝達があり効率的でなくなる。対照的に、抗体サイトカイングラフトタンパク質は、単球などの高いIL-10R1およびR2発現を有する細胞上でより効率的にシグナル伝達する。IgGIL10M13のクラス平均陰性株EM試験は、さらなる可撓性および単量体間のより広い角度を強調し、rhIL10と比較して幾何学が変化したことを確認している。IgGIL10M13中のIL10二量体のより制限された幾何学は、IL10R複合体との相互作用を変化させる。結果として、IgGIL10M13抗体サイトカイングラフトタンパク質の構造が、高レベルのIL10R1およびR2発現を有する細胞型上で増殖性シグナルを生成するだけであるという生物学的効果をもたらす。

【0289】

実施例14：IgGIL10M13の結晶構造

IgGIL10M13 Fabを、20mM HEPES pH8.0、150mM NaCl中16.2mg/mlに濃縮し、懸滴蒸気拡散結晶化試験に直接使用した。結晶化スクリーンを、タンパク質溶液0.2μlをリザーバー溶液0.2μlと混合し、同じリザーバー溶液50μlに対して平衡化することによって設定した。データ収集のための結晶が、20%PEG3350、200mM酢酸マグネシウム、pH7.9のリザーバー溶液から20℃で3~4週間後に現れた。データ収集前に、結晶を、20%エチレングリコールを補充したリザーバー溶液に浸漬し、液体窒素にフラッシュ冷却した。回折データを、ADSC Quantum 315R検出器を用いてALSベースライン5.0.3で収集した。HKL2000ソフトウェアパッケージを用いてデータを索引付けおよびスケリングした (Otwinowski and Minor, (1997) Methods in Enzymology, Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A, p.307-326)。IgGIL10M13 Fabについてのデータを、セル寸法 $a = 80.6 \text{ \AA}$ 、 $b = 104.7 \text{ \AA}$ 、 $c = 82.8 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 115.3^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ の空間群 $P2_1$ 中 $2.40 \text{ \AA}$ に処理した。探索モデルとしてのパリビズマブFab構造 (PDBコード: 2HWZ) および単量体IL10構造 (PDBコード: 1LK3鎖A) により、PHASER (McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674) を用いて分子置換によって構造を解明した。分子置換により解かれた最上位の構造 (the top molecular replacement solution) は、非対称単位

10

20

30

40

50

の2分子の I g G I L 1 0 M 1 3 F a b を含んでいた。最終的なモデルを C O O T (Em
sley & Cowtan (2004) Acta Cryst. D60:2126-2132) で構築し、P H E N I X (Adams et
al., (2010) Acta Cryst. D66, 213-221) で精緻化した。R_{w o r k} および R_{f r e e}
値はそれぞれ 18.8% および 23.9% であり、理想結合長および結合角度の二乗平均
平方根 (r. m. s) 偏差値はそれぞれ 0.005 Å および 0.882° であった。

【0290】

全体構造

I g G I L 1 0 M 1 3 F a b は、非対称単位であるが、共に類似のコンフォメーション
を有する2つの分子で結晶化した。電子密度図は両分子で類似であった。全体構造 (図
13A) は、F a b およびグラフト単量体 I L 1 0 (I L 1 0 M) が共線配置をとり得る
ことを示している (F a b 軽鎖は白色、F a b 重鎖は黒色、I L 1 0 M は暗灰色)。図 1
3 B は、C D R - L 1 のグラフト点のより近い図を示している。3個の隣接 C D R 残基が
暗灰色バーで示されている。破線は、おそらくこれらの領域の構造的可撓性による、電子
密度の欠如のために、モデルに当てはまることができなかった構造の部分を示している。
2つの領域は、グラフト点の直後の I L 1 0 M のN末端の6個残基および I L 1 0 M 中の
ヘリックス4とヘリックス5との間の8個の残基を含み、挿入された6残基リンカー (G
G S G G) (配列番号251) を包含する。グラフト I L 1 0 M 分子と F a b 重鎖の部分
との間に3対の水素結合相互作用も存在する (図13C)。これらには、R138とN
104 (側鎖)、R135とD56 (側鎖)、およびN38とK58 (主鎖/側鎖) が含
まれる。

【0291】

材料および方法

抗炎症アッセイ (LPS曝露ヒト全血)

アッセイ培地 (グルタミン (Hyclone)、10% 熱不活性化 FBS (Omega
Scientific)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、50
μM 2-メルカプトエタノール (Gibco)、10mM Hepes pH7.4 (Hyclone)、0.1mM 非必須アミノ酸 (Hyclone)、1mM ピルビン酸ナ
トリウム (Hyclone) および 1×ヒトインスリン/トランスフェリン/セレン (G
ibco) を含む RPMI 1640) 中 1000ng/ml で、10倍で I L 1 0 抗体サ
イトカイングラフトタンパク質を調製した。アッセイ培地中各10倍ストックの I L 1 0
抗体サイトカイングラフトタンパク質を 1:3 系列希釈して 11 点の用量滴定を作製した
。

【0292】

ヒト全血をアッセイ培地中90%に希釈し、穏やかに混合した。非刺激希釈全血を n =
3 ウェルに蒔き (45 μl/ウェル)、アッセイ培地を添加して (5 μl/ウェル)、最
終ウェル体積を 50 μl とした。リポ多糖 (LPS、Invivogen ストック 100
μg/ml) を希釈全血に 220ng/ml でスパイクとして添加し、穏やかに混合した
。次いで、LPS スパイク全血を蒔き、I L 1 0 タンパク質を各それぞれのウェルに添加
し、次いで、穏やかに混合し、37℃ インキュベーター、5% CO₂ 中で約 20 時間イン
キュベートした。次いで、プレートを穏やかに混合し、室温で 5 分間、1400 rpm で
遠心分離し、製造業者の指示に従ってヒト TNFα HTRF キット (Cisbio (登
録商標)) を用いて TNFα 検出するために、アッセイプレートから代用プレートに 10
μl/ウェル移すことによって上清を収集し、結果を、製造業者によって提供される対照
を用いて作成した標準曲線と比較した。

【0293】

炎症促進アッセイ (ヒト一次 CD8⁺ T 細胞活性化)

末梢血単核球 (PBMC) を Blutspende Zentrum Basel のバ
フィーコートから単離した。バフィーコート 1 つ当たり 8 本の Leucosep チューブ
(Greiner, 227290) にそれぞれ Ficoll-Paque PLUS (登
録商標) (GE Healthcare, 17-1440-03) 15ml を充填し、遠

心分離した（1分、1000g、20℃）。パフィーコートリン酸緩衝食塩水（PBS）pH7.4（Gibco、10010-015）に1:4希釈し、35mlを各Ficoll勾配上に置いた。遠心分離（800g、20分、20℃）後、リンパ球が白血球層に分離する。この細胞層を新しいチューブに移し、PBSで洗浄した。細胞ペレットを1チューブ当たり2mlのGeyの赤血球溶解緩衝液（155mM NH₄Cl、10mM KHCO₃、0.1mM EDTA）に再懸濁することによって、赤血球を溶解した。5分間インキュベートした後、細胞をPBSで2回洗浄した。最後の洗浄後、PBMCをT細胞培地（TCM）に再懸濁した。TCMはRPMI1640（Gibco、21875-034）、10%ウシ胎児血清（Gibco、10082147）、1%ペニシリン-ストربتマイシン（Gibco、15070063）、2mM GlutaMax（Gibco、35050-038）および50U/mlペニシリン、50μg/mlストربتマイシンを含んでいる。PBMCを40μmセルストレーナー（BD Falcon、734-0002）を通して濾過して単一細胞懸濁液を得て、計数した。CD8⁺T細胞を、Big Easy Magnet（登録商標）（StemCell、18001）についての製造業者のプロトコルに従って、ヒトCD8⁺T細胞濃縮キット（StemCell、19053）を用いてPBMCから精製した。単離後、細胞を洗浄し、計数し、TCMに1.8×10⁶個細胞/mlの濃度で再懸濁した。抗CD3/CD28コーディングプレート（2.1.1節参照）を1ウェル当たり2mlのTCMで1回洗浄し、引き続いて1ウェル当たり1ml中1.8×10⁶個CD8⁺T細胞を添加した。プレートを遠心分離（5分、520g、20℃）、37℃、5%CO₂、湿度95%のセルインキュベーター（Binder）で3日間インキュベートした。

【0294】

IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質による刺激

3日間のインキュベーション後、活性化CD8⁺T細胞を24ウェルプレートからブールし、TCMで1回洗浄した。細胞を計数し、TCMに3×10⁶個細胞/mlで再懸濁し、100μl中300000個細胞/ウェルをNunc lon Delta Surface（登録商標）96ウェル丸底プレート（Thermo Scientific、163320）に添加した。最終濃度の2倍のIL10抗体サイトカイングラフトタンパク質予備希釈物を、以下の濃度で別個のプレート中TCMに調製した：40、4、0.4、0.04、0.004および0nM。これらの予備希釈物100μlを、細胞懸濁液100μlに繰り返して添加して、20、2、0.2、0.02、0.002および0nMの抗体サイトカイングラフトタンパク質の最終濃度を得た。プレートを37℃で48時間インキュベートした。

【0295】

PMAおよび抗CD3刺激およびGolgi stop

インキュベーション期間後、プレートを遠心分離（2分、970g、20℃）、上清を捨てた。細胞ペレットを、2ng/ml酢酸ミリスチン酸ホルボール（PMA、Sigma Aldrich、79346）、2.5μg/ml抗CD3（BD、555336）および1:1500Golgi Stop（BD、554724）を含むTCM200μlに再懸濁した。プレートを37℃で5時間インキュベートして細胞を再刺激した。その後、プレートを遠心分離（2分、970g、20℃）、上清を捨て、氷冷PBS200μlを添加して細胞ペレットを洗浄した。遠心分離（2分、970g、20℃）後、PBSを除去し、細胞を、2%Triton X-100（Serva、39795）を含む氷冷200mM Tris-HCl緩衝液（pH8.1）200μlに再懸濁して細胞を溶解した。プレートを15分間氷上に放置し、遠心分離して（10分、970g、4℃）細片を除去した。上清を新たな96ウェルプレートに慎重に移し、保存のために凍結した。インターフェロン-γ（上清中のIFN-γ）を検出するために、ヒトIFN-γ DuoSet（登録商標）ELISA（R&D systems、DY285）を製造業者のプロトコルに従って使用した。2.1.5節に記載されるように得られた上清を、推奨されるアッセイ希釈剤に1:2希釈した。上清中のグランザイムB（GrzB）を検出す

るために、ヒトグランザイムB（登録商標）ELISA（Mabtech、3485-1H-20）を製造業者のプロトコルに従って使用した。上清を推奨されるアッセイ希釈に1:50希釈した。ELISAプレートの光学濃度（OD）をSpectraMax（登録商標）340PCプレートリーダー（Molecular Devices）によって取得し、自動的に作成される標準曲線に従ってSoftMax（登録商標）ソフトウェアにより濃度に変換した。データをMicrosoft Excelにエクスポートし、ここで濃度をその希釈計数に関して逆算した。

【0296】

IL10依存性シグナル伝達

CyTOFは、単一因子による複数の細胞集団の活性化を同時に評価するためのFACS/質量分析技術である。抗体サイトカイングラフトタンパク質をヒト全血と20分間インキュベートした。刺激後、PBMCを、細胞特異的表面受容体CD14、HLA-DR、CD4、CD8、CD19、CD56およびシグナル伝達マーカーpSTAT3に対する金属コンジュゲート抗体で処理し、CyTOFによって分析した。結果は、全ての用量のIgGIL10M13が単球およびマクロファージ細胞集団を主に活性化し、T細胞、B細胞、NK細胞および樹状細胞集団の活性化はほとんどなかったことを示している。逆に、rhIL10は、試験した全ての細胞集団をある程度まで活性化した。

【0297】

薬物動態評価

抗体サイトカイングラフトタンパク質の半減期をC57Bl/6マウスで評価した。抗体サイトカイングラフトタンパク質を0.9%生理食塩水中0.2mg/kg（10ml/kg用量体積）で皮下注射し、注射1時間後に開始し、注射144時間後まで血液をサンプリングした。各時点で、全血をヘパリン処理管に回収し、4℃で10分間、12500rpmで遠心分離した。血漿上清を回収し、全時点を回収するまで-80℃で保存した。血漿中の抗体サイトカイングラフトタンパク質レベルを2つの異なる免疫測定法を用いて測定して、抗体サイトカイングラフトタンパク質のIL10と抗体ドメインの両方の検出を可能にした。第1の方法は、推奨されるように使用される商業的に入手可能なIL-10 ELISAキットを利用した（BD OptEIA（登録商標）ヒトIL10 ELISAセット、捕捉：rhIL10/検出：ビオチン-rhIL10）。第2の方法は、Gyrolab（登録商標）xPワークステーション（Gyros AB Uppsala、スウェーデン）で実行されるIL10に基づく捕捉およびFcに基づく検出免疫測定法からなっていた。具体的には、使用される試薬が、ビオチン化ヒトIL10捕捉（R&D Systems BAF217）およびAlexafluor 647ヤギ抗ヒトIgG、Fcγ特異的検出（Jackson ImmunoResearch#109-605-098）からなっていた。アッセイは、Gyros承認ウィザート法を用いて200nL CD（Gyros#P0004180）で実行した。使用した緩衝液は、標準についてはRexxip A（登録商標）（Gyros#P0004820）、検出調製については試料希釈物およびRexxip（登録商標）（Gyros#P0004825）とした。Gyrolab（登録商標）データ分析ソフトウェアを用いて結果の分析を行った。

【0298】

薬力学評価

半減期延長と一致して、抗体サイトカイングラフトタンパク質はまた、薬力学の改善も実証した。IL10R活性化のマーカーであるホスホ-stat3（pSTAT3）を、皮下投与後に標的組織（血液および結腸）で監視した。抗体サイトカイングラフトタンパク質を0.9%生理食塩水中0.2mg/kg（10ml/kg用量体積）で皮下注射した。末端全血および結腸組織（回盲連結部2cm）を、注射1時間後に開始し、注射144時間後まで採取した。全血を、1×ホスファターゼ阻害剤（Pierce Haltホスファターゼ阻害剤カクテル）を含むヘパリン処理管に回収し、ホスホ-Stat3アッセイまで氷上に保持した。結腸組織を、冷PBSおよび1×ホスファターゼ阻害剤を含む

チューブに回収した。いったん全ての組織を時点で回収したら、結腸組織を、銅ビーズならびに10 μ M DTT、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル、10×ホスファターゼ阻害剤カクテルおよび10×細胞溶解緩衝液(Active Motif Nuclear Extraction Kit)と共にPBSを含む完全細胞溶解緩衝液700 μ lを含むチューブに移した。結腸組織を室温で5分間、30 rpsで組織ライザーによってホモジナイズした。溶解組織を4℃で10分間14000×gで遠心分離した。上清を回収し、ホスホSTAT3アッセイまで氷上で保存した。

【0299】

ホスホSTAT3アッセイプレート(Meso Scale Discovery (登録商標) pSTAT3 (Tyr705)アッセイ)を、全血および結腸組織の回収および処理と同じ日に実行した。用意した1×ホスファターゼ阻害剤2、1×ホスファターゼ阻害剤3および1×ホスファターゼ阻害剤を含む1×MSD溶解緩衝液を用いて、氷冷全血を溶解した。全血の各チューブを4℃で10分間、12500 rpmで遠心分離した。血漿を回収し、捨てた。ペレット化全血をMSD溶解緩衝液+阻害剤220 μ lに再懸濁し、徹底的にボルテックスした。溶解した全血を50 μ l/ウェルでホスホSTAT3アッセイプレートのそれぞれのウェルに蒔いた。Bradford Assay (Pierce)を用いて結腸組織上清タンパク質検出を行った。次いで、結腸タンパク質を50 μ l/ウェルでホスホSTAT3アッセイプレートに蒔いた。プレートを室温で2時間インキュベートし、洗浄し、ホスホSTAT3または全STAT3抗体(Meso Scale Discovery)で処理した。MSD Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery)でプレートを相対蛍光単位(RFU)について分析した。全血ホスホSTAT3 RFUを全STAT3 RFUに正規化した。結腸タンパク質ホスホSTAT3 RFUを充填タンパク質濃度に正規化した。増強されたpSTAT3シグナルは、少なくとも最大投与72時間後に両組織で検出され、投与144時間後までに存在しなくなる。図5を参照されたい(図示せず)。このプロファイルは、そのシグナルが投与24時間後までに存在しなくなるrhIL10に対する劇的改善である。

【0300】

体外有効性

LPS曝露後のTNF α 阻害についての有効性の直接比較を行った。アッセイでは、C57/B16マウスにビヒクル、0.2 mg/kgのIgG IL10M13 (10 mg/kg用量体積)または等モルレベルのrhIL10を皮下投与した。全血を投与前、投与1.5時間後および最大投与144時間後に回収した。全血をヘパリン処理チューブに回収した。血液回収前に、アッセイ培地を調製した。アッセイ培地は、10%熱不活性化FBS (Omega Scientific)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (Gibco)、10 mM HEPES pH7.4 (Hyclone)、0.1 mM非必須アミノ酸 (Hyclone)および1 mMピルビン酸ナトリウム (Hyclone)を含むグルタミン (Hyclone)を含むRPMI 1640を含んでいた。マウス全血を384ウェルプレート上25 μ l/ウェル/複製/マウスに蒔いた。アッセイ培地を非刺激対照ウェルに添加して(25 μ l/ウェル)、最終ウェル体積を50 μ lにした。LPS曝露のために、LPS (Invitrogen、ストック100 μ g/ml)を200 ng/ml [アッセイ中100 ng/ml最終]でアッセイ培地にスパイクとして添加し、穏やかに混合した。次いで、LPSスパイクBCMを、マウス全血を含む各必要なウェルに25 μ l/ウェルで蒔いた。プレートを穏やかに混合し、37℃インキュベーター、5%CO₂で21時間インキュベートした。翌日、アッセイプレートを室温で5分間、1400 rpmで遠心分離した。各ウェルからの上清を回収し、全ての時点のアッセイするまで-80℃で凍結した。いったん全時点を分析することができたら、上清をMSD V-plex (登録商標)マウス炎症性トカインアッセイプレート(Meso Scale Discovery)に蒔いた。MSD Sector Imager 2400 (登録商標) (Meso Scale

10

20

30

40

50

Discovery)でプレートをTNF α (pg/ml)について分析した。

【0301】

免疫刺激アッセイ

MC/9細胞増殖

MC/9 (マウス胎仔肝に由来する肥満細胞株)細胞増殖を刺激する能力を調べることによって、IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質の免疫刺激活性を評価した。第1に、IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質を、T-S-TIMを含まない増殖培地中7 $\times$ で別個の384ウェルプレートに希釈した(7 $\times$ =700ng/ml)。IL-4を陽性対照として含めた(7 $\times$ =1000ng/ml、[最終]=143ng/ml)。第2に、1.67 $\times$ 10⁴個細胞/ml MC/9細胞30 μ lを、T-S-TIMを含まない培地中384ウェルTC処理プレート(500個細胞/ウェル)に蒔いた(アッセイ前の細胞の洗浄は必要なかった)。第3に、希釈IL10抗体サイトカイングラフトタンパク質5 μ lを細胞に添加した。プレートを、プレートミキサーを用いて手短に混合し、次いで、1000rpmでパルス回転させた。プレートをカスタム多孔質蓋で覆って細胞に通気した。第4に、プレートを37 $^{\circ}$ Cで72時間インキュベートした。第5に、Promega Cell Titer Glo (登録商標)30 μ lを細胞に添加し、室温で10分間インキュベートし、Envision (登録商標)で読み取った(0.1秒間の読み取り)。

【0302】

B細胞増殖

PBMCを上記のようにヒトバフィーコートから単離した。B細胞を単離するために、ヒトB細胞濃縮キット(登録商標)(Stemcell、19054)を、Big Easy Magnet (登録商標)(Stemcell、18001)についての製造業者のプロトコルに従って使用した。単離後、B細胞をB細胞培地(BCM)で洗浄し、計数し、4 $\times$ 10⁵個細胞/mlの濃度で再懸濁した。BCMは、RPMI1640、10%ウシ胎児血清(Gibco 10082147)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco、15070063)および2mM GlutaMax (Gibco、35050-038)、1%非必須アミノ酸(Gibco、11140035)および1mM ピルビン酸ナトリウム(Gibco、11360-039)、50U/mlペニシリンおよび50 μ g/mlストレプトマイシンを含んでいる。単離B細胞を計数し、4 $\times$ 10⁵個細胞/mlの濃度でBCMに再懸濁した。B細胞を刺激するために、8.4 μ g/ml抗CD40および40U/ml組換えヒトIL-2(R&D systems、202-IL-50)を懸濁液に添加した。次いで、B細胞を100 μ l中4 $\times$ 10⁴個細胞の濃度でNunc lon Delta Surface (登録商標)96ウェル丸底プレート(Thermo Scientific、163320)のウェルに添加した。最終濃度の2倍でのIL10抗体グラフトタンパク質予備希釈物を別個のプレートに調製した。以下の濃度を得て、化合物の滴定を行った:40、4、0.4、0.04、0.004および0nM。これらの予備希釈物100 μ lを、細胞懸濁液100 μ lに繰り返して添加して、20、2、0.2、0.02、0.002および0nMの化合物の最終濃度ならびに4.2mg/ml抗CD40および20U/ml組換えIL-2の最終濃度を得た。プレートを細胞培養液インキュベーター(37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度95%)中で5日間インキュベートした。5日間のインキュベーション後、チミジン組み込みアッセイによってB細胞の増殖を測定した。細胞に、37 $^{\circ}$ Cで培養期間の最後の16時間、BCM20 μ l中、1ウェル当たり0.5 μ Ci 3H-チミジン(ANAWA、ART-178)を瞬間適用した。TomTec 9600 (登録商標)ハーベスターを用いて、細胞を製造業者のプロトコルに従って膜上に収穫した。膜をバッグに密封し、シンチレーション液を添加し、シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。抗体グラフトタンパク質の各々について、20nMでの増殖の割合(「上部」)を、それぞれのバックグラウンドサイトカイン産生(「下部」)に関して、等モル量のrhIL10での増殖に対して計算した。得られた最大の%値を以下の式を用いて計算した:

10

20

30

40

50

最大の% = (上部_{化合物} - 下部_{化合物}) / (上部_{r h i l - 1 0} - 下部_{r h i l - 1 0})
* 100

化合物を3人以上のドナーで測定した場合、異なる実験系列の平均値を決定し、平均値の標準誤差 (SEM) を計算した。

【0303】

本明細書に記載される実施例および実施形態は例示目的であること、およびこれに照らした種々の修正または変更が当業者によって示唆され、本出願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれることが理解される。本明細書で引用される全ての刊行物、配列受託番号、特許および特許出願は、全ての目的のために全体が参照により組み込まれる。

10

本発明は以下の態様を含み得る。

[1]

(a) 相補性決定領域 (CDR) HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む重鎖可変領域 (VH) と；

(b) LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域 (VL) と；

(c) 前記VHまたは前記VLのCDRにグラフトしたインターロイキン10 (IL10) 単量体分子と

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[2]

前記IL10単量体分子が重鎖CDRにグラフトされている、請求項1に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

20

[3]

前記重鎖CDRがHCDR1、HCDR2またはHCDR3である、請求項2に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[4]

前記IL10単量体分子が前記HCDR1にグラフトされている、請求項3に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[5]

前記IL10単量体分子が軽鎖CDRにグラフトされている、請求項1に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

30

[6]

前記軽鎖CDRがLCDR1、LCDR2またはLCDR3である、請求項5に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[7]

前記IL10単量体分子が前記LCDR1にグラフトされている、請求項6に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[8]

組換えヒトIL10と比較すると、T細胞またはNK細胞のより少ない活性化が可能である、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

40

[9]

r h i l 1 0 よりも長い半減期を有する、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[10]

前記IL10単量体分子が配列番号209からなる、請求項1に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[11]

I g Gクラス抗体重鎖をさらに含む、請求項1に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[12]

50

前記 I g G クラス重鎖が I g G 1、I g G 2 または I g G 4 から選択される、請求項 1 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[1 3]

前記 C D R の標的タンパク質への結合特異性が前記グラフト I L 1 0 単量体分子の存在下で低下している、請求項 1 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[1 4]

前記 C D R の標的タンパク質への結合特異性が前記グラフト I L 1 0 単量体分子の存在下で保持されている、請求項 1 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[1 5]

前記 C D R の結合特異性が前記 I L 1 0 単量体分子のサイトカイン受容体結合特異性とは異なる、請求項 1 4 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

10

[1 6]

前記 C D R の結合特異性がヒト以外の標的に対するものである、請求項 1 4 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[1 7]

前記 V H または V L がヒト化またはヒトである、請求項 1 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[1 8]

(i) (a) 配列番号 1 9 3 の H C D R 1、(b) 配列番号 1 9 4 の H C D R 2、(c) 配列番号 1 9 5 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 1 9 6 の L C D R 1、(e) 配列番号 1 9 7 の L C D R 2 および (f) 配列番号 1 9 8 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

20

(i i) (a) 配列番号 9 7 の H C D R 1、(b) 配列番号 9 8 の H C D R 2、(c) 配列番号 9 9 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 1 0 0 の L C D R 1、(e) 配列番号 1 0 1 の L C D R 2 および (f) 配列番号 1 0 2 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i i i) (a) 配列番号 1 の H C D R 1、(b) 配列番号 2 の H C D R 2、(c) 配列番号 3 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 4 の L C D R 1、(e) 配列番号 5 の L C D R 2 および (f) 配列番号 6 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i v) (a) 配列番号 1 7 の H C D R 1、(b) 配列番号 1 8 の H C D R 2、(c) 配列番号 1 9 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 2 0 の L C D R 1、(e) 配列番号 2 1 の L C D R 2 および (f) 配列番号 2 2 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

30

(v) (a) 配列番号 3 3 の H C D R 1、(b) 配列番号 3 4 の H C D R 2、(c) 配列番号 3 5 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 3 6 の L C D R 1、(e) 配列番号 3 7 の L C D R 2 および (f) 配列番号 3 8 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(v i) (a) 配列番号 4 9 の H C D R 1、(b) 配列番号 5 0 の H C D R 2、(c) 配列番号 5 1 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 5 2 の L C D R 1、(e) 配列番号 5 3 の L C D R 2 および (f) 配列番号 5 4 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

40

(v i i) (a) 配列番号 6 5 の H C D R 1、(b) 配列番号 6 6 の H C D R 2、(c) 配列番号 6 7 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 6 8 の L C D R 1、(e) 配列番号 6 9 の L C D R 2 および (f) 配列番号 7 0 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(v i i i) (a) 配列番号 8 1 の H C D R 1、(b) 配列番号 8 2 の H C D R 2、(c) 配列番号 8 3 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 8 4 の L C D R 1、(e) 配列番号 8 5 の L C D R 2 および (f) 配列番号 8 6 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

(i x) (a) 配列番号 1 1 3 の H C D R 1、(b) 配列番号 1 1 4 の H C D R 2、(c

50

）配列番号 1 1 5 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 1 1 6 の L C D R 1、（e）配列番号 1 1 7 の L C D R 2 および（f）配列番号 1 1 8 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

（x）（a）配列番号 1 2 9 の H C D R 1、（b）配列番号 1 3 0 の H C D R 2、（c）配列番号 1 3 1 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 1 3 2 の L C D R 1、（e）配列番号 1 3 3 の L C D R 2 および（f）配列番号 1 3 4 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

（x i）（a）配列番号 1 4 5 の H C D R 1、（b）配列番号 1 4 6 の H C D R 2、（c）配列番号 1 4 7 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 1 4 8 の L C D R 1、（e）配列番号 1 4 9 の L C D R 2 および（f）配列番号 1 5 0 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

（x i i）（a）配列番号 1 6 1 の H C D R 1、（b）配列番号 1 6 2 の H C D R 2、（c）配列番号 1 6 3 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 1 6 4 の L C D R 1、（e）配列番号 1 6 5 の L C D R 2 および（f）配列番号 1 6 6 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

（x i i i）（a）配列番号 1 7 7 の H C D R 1、（b）配列番号 1 7 8 の H C D R 2、（c）配列番号 1 7 9 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 1 8 0 の L C D R 1、（e）配列番号 1 8 1 の L C D R 2 および（f）配列番号 1 8 2 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；

（x i v）（a）配列番号 2 1 0 の H C D R 1、（b）配列番号 2 1 1 の H C D R 2、（c）配列番号 2 1 2 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 2 1 3 の L C D R 1、（e）配列番号 2 1 4 の L C D R 2 および（f）配列番号 2 1 5 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；または

（x v）（a）配列番号 2 2 6 の H C D R 1、（b）配列番号 2 2 7 の H C D R 2、（c）配列番号 2 2 8 の H C D R 3 を含む重鎖可変領域ならびに（d）配列番号 2 2 9 の L C D R 1、（e）配列番号 2 3 0 の L C D R 2 および（f）配列番号 2 3 1 の L C D R 3 を含む軽鎖可変領域

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[1 9]

（i）配列番号 2 0 5 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 2 0 6 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（i i）配列番号 1 0 9 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 1 0 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（i i i）配列番号 1 3 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 4 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（i v）配列番号 2 9 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 3 0 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（v）配列番号 4 5 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 4 6 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（v i）配列番号 6 1 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 6 2 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（v i i）配列番号 7 7 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 7 8 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（v i i i）配列番号 9 3 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 9 4 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（i x）配列番号 1 2 5 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 2 6 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（x）配列番号 1 4 1 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 4 2 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（x i）配列番号 1 5 7 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 5 8 を含む軽鎖可

10

20

30

40

50

変領域（V L）；

（x i i）配列番号 1 7 3 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 7 4 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（x i i i）配列番号 1 8 9 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 1 9 0 を含む軽鎖可変領域（V L）；

（x i v）配列番号 2 2 2 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 2 2 3 を含む軽鎖可変領域（V L）；または

（x v）配列番号 2 3 8 を含む重鎖可変領域（V H）および配列番号 2 3 9 を含む軽鎖可変領域（V L）

を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質。

10

[2 0]

低下したエフェクター機能に対応する修飾 F c 領域をさらに含む、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[2 1]

前記修飾 F c 領域が、D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、P 3 2 9 G、N 2 9 7 A、L 2 3 4 A および L 2 3 5 A の 1 つまたは複数から選択される突然変異を含む、請求項 2 0 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[2 2]

前記修飾 F c 領域が、D 2 6 5 A / P 3 2 9 A、D 2 6 5 A / N 2 9 7 A、L 2 3 4 A / L 2 3 5 A、P 3 2 9 A / L 2 3 4 A / L 2 3 5 A および P 3 2 9 G / L 2 3 4 A / L 2 3 5 A からなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

20

[2 3]

配列番号 1 9 3 の H C D R 1、配列番号 1 9 4 の H C D R 2、配列番号 1 9 5 の H C D R 3、配列番号 1 9 6 の L C D R 1、配列番号 1 9 7 の L C D R 2、配列番号 1 9 8 の L C D R 3、突然変異 D 2 6 5 A / P 3 2 9 A を含む修飾 F c 領域からなる抗体サイトカイングラフトタンパク質であって、r h I L 1 0 と比較すると、T 細胞または N 細胞の活性化が少ない抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[2 4]

前記 C D R の結合特異性がヒト以外の標的に対するものである、請求項 2 3 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

30

[2 5]

r h I L 1 0 よりも長い半減期を有する、請求項 2 3 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質。

[2 6]

（i）配列番号 2 4 6 の重鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列および配列番号 2 4 7 の軽鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列；

（i i）配列番号 2 4 8 の重鎖コードポリヌクレオチド配列および配列番号 2 4 9 の軽鎖コードポリヌクレオチド配列；

（i i i）配列番号 2 4 2 の重鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列および配列番号 2 4 3 の軽鎖可変領域コードポリヌクレオチド配列；または

（i v）配列番号 2 4 4 の重鎖コードポリヌクレオチド配列および配列番号 2 4 5 の軽鎖コードポリヌクレオチド配列

を含む単離核酸。

40

[2 7]

抗体サイトカイングラフトタンパク質の重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドをコードする請求項 2 6 に記載の核酸と、場合により分泌シグナルとを含む、抗体サイトカイングラフトタンパク質の産生に適した組換え宿主細胞。

[2 8]

前記細胞が哺乳類細胞である、請求項 2 7 に記載の宿主細胞。

50

[2 9]

請求項 1 から 2 6 のいずれかに記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

[3 0]

治療上有効量の請求項 1 に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質を個体に投与するステップを含む、治療または予防を必要とする個体の免疫関連障害を治療または予防する方法。

[3 1]

前記免疫関連障害が、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I 型糖尿病、急性膵炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病（GVHD）からなる群から選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

10

[3 2]

前記抗体サイトカイングラフトタンパク質が別の治療剤と組み合わせて投与される、請求項 3 0 に記載の方法。

[3 3]

前記治療剤が、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブおよびベドリズマブからなる群から選択される抗 TNF 剤である、請求項 3 2 に記載の方法。

20

[3 4]

前記治療剤が、スルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンおよび 5-アミノサリチル酸の他の誘導体からなる群から選択されるアミノサリチル酸剤である、請求項 3 2 に記載の方法。

[3 5]

前記治療剤が、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソド、メサラミンおよびデキサメタゾンからなる群から選択される副腎皮質ステロイドである、請求項 3 2 に記載の方法。

[3 6]

前記治療剤が抗菌剤である、請求項 3 2 に記載の方法。

[3 7]

請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質を投与するステップを含む、それを必要とする患者の単球を活性化する方法。

30

[3 8]

単球が活性化され、T 細胞も NK 細胞も活性化されない、請求項 3 7 に記載の方法。

[3 9]

前記抗体サイトカイングラフトタンパク質の投与が TNF α 産生を減少させる、請求項 3 7 に記載の方法。

[4 0]

免疫関連障害の治療における、
 (i) (a) 配列番号 193 の HCDR1、(b) 配列番号 194 の HCDR2、(c) 配列番号 195 の HCDR3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 196 の LCDR1、(e) 配列番号 197 の LCDR2 および (f) 配列番号 198 の LCDR3 を含む軽鎖可変領域；または
 (ii) (a) 配列番号 97 の HCDR1、(b) 配列番号 98 の HCDR2、(c) 配列番号 99 の HCDR3 を含む重鎖可変領域ならびに (d) 配列番号 100 の LCDR1、(e) 配列番号 101 の LCDR2 および (f) 配列番号 102 の LCDR3 を含む軽鎖可変領域
 を含む抗体サイトカイングラフトタンパク質の使用。

40

[4 1]

炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬、I 型糖尿病、急性膵

50

炎、ブドウ膜炎、シェーグレン病、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび移植片対宿主病（GVHD）からなる群から選択される免疫関連障害の治療における請求項40に記載の抗体サイトカイングラフトタンパク質の使用。

[42]

前記抗体サイトカイングラフトタンパク質が別の治療剤と組み合わせて投与される、請求項40に記載の使用。

[43]

前記治療剤が、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ、ナタリズマブおよびベドリズマブからなる群から選択される抗TNF剤である、請求項42に記載の使用。

[44]

前記治療剤が、スルファサラジン、メサラミン、バルサラジド、オルサラジンおよび5-アミノサリチル酸の他の誘導体からなる群から選択されるアミノサリチル酸剤である、請求項42に記載の使用。

[45]

前記治療剤が、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、ブデニソド、メサラミンおよびデキサメタゾンからなる群から選択される副腎皮質ステロイドである、請求項42に記載の使用。

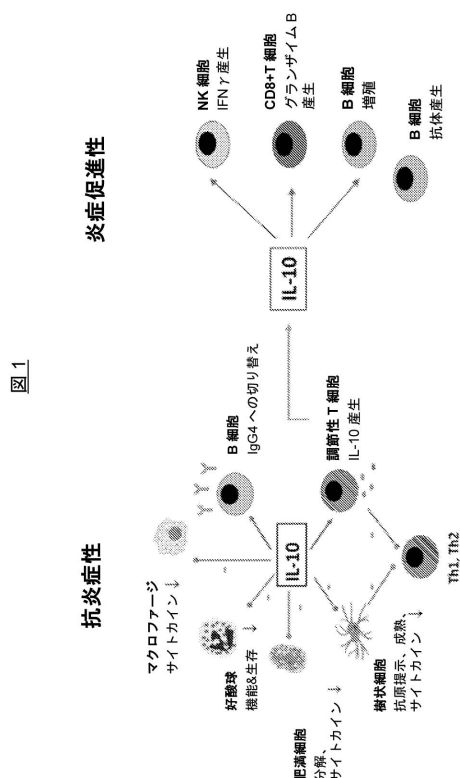
[46]

前記治療剤が抗菌剤である、請求項42に記載の使用。

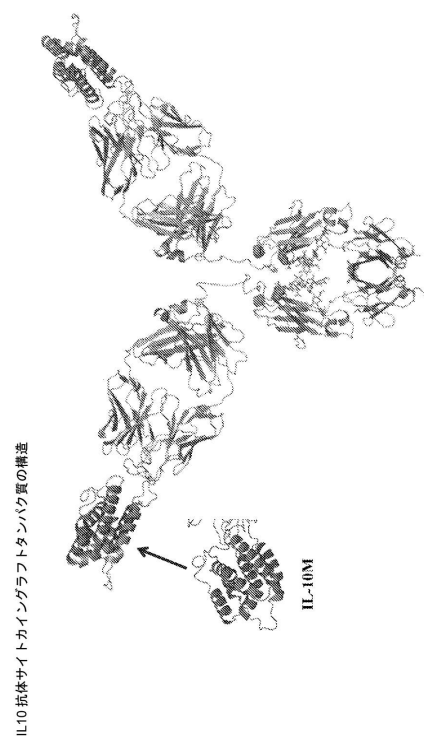
10

20

【図1】



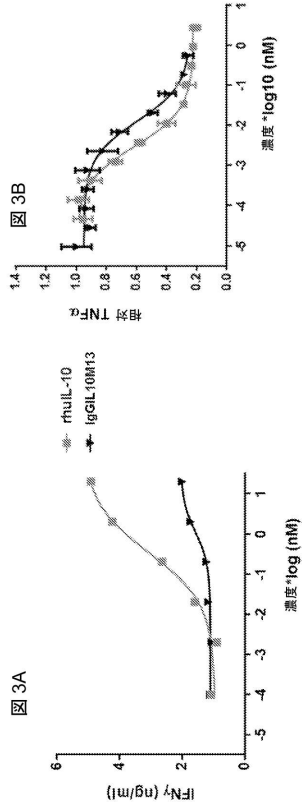
【図2】



【図 3】

図 3A~3B

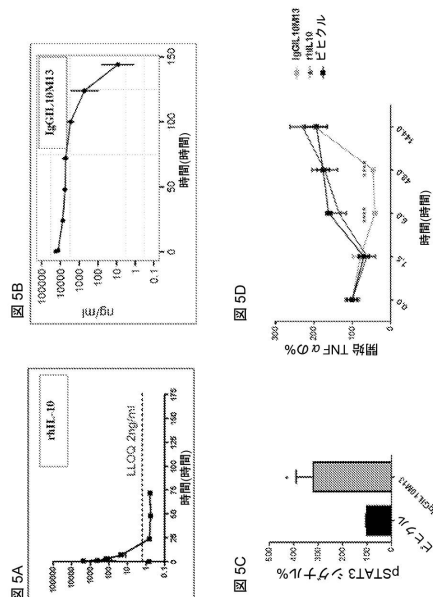
rhIL10 および IgGIL10M13 の薬物動態試験



【図 5】

図 5A~5D

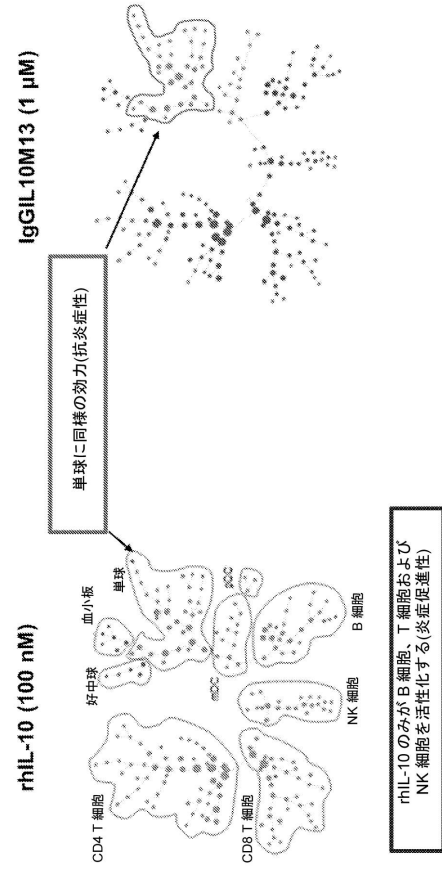
rhIL10 および IgGIL10M13 の薬物動態試験



【図 4】

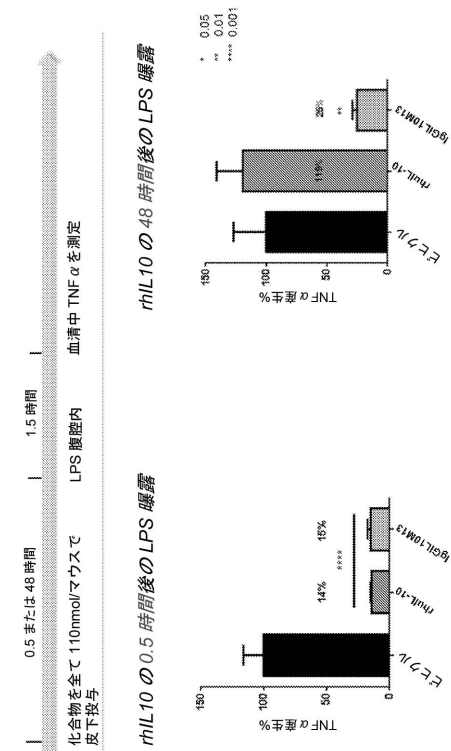
図 4

rhIL10(左側パネル)または IgGIL10M13(右側パネル)で刺激したヒト全血における IL10 依存性 pSTAT3 シグナル伝達の CyTOF 分析

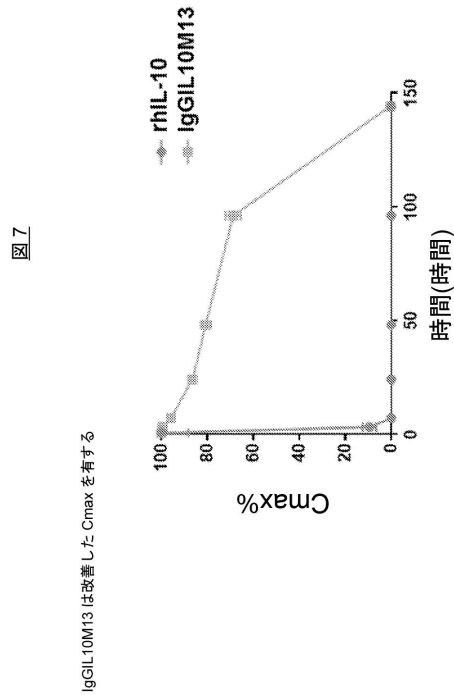


【図 6】

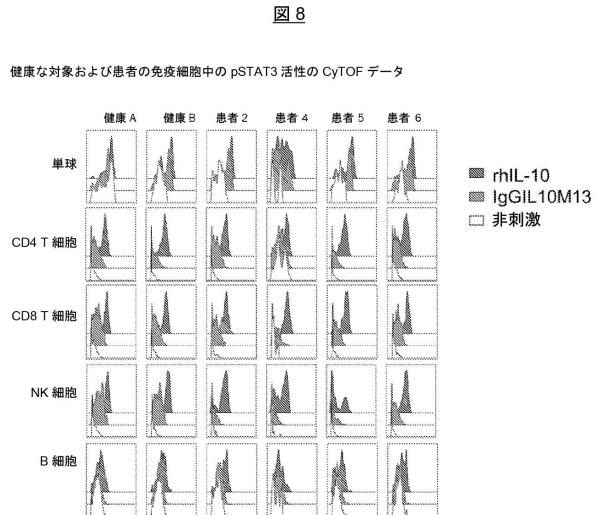
図 6



【図 7】



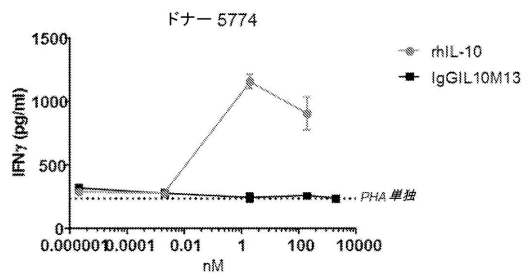
【図 8】



【図 9 A】

図 9A

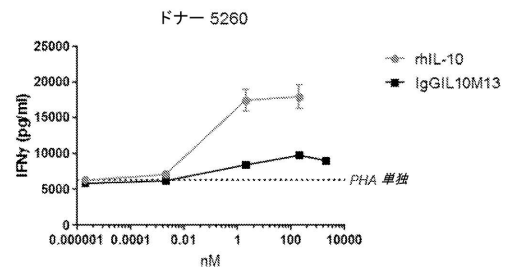
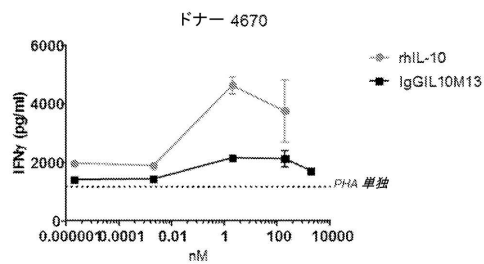
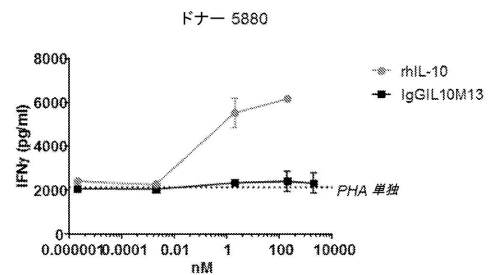
IgGIL10M13 は、rhIL-10 と比較して低下した PHA 刺激ヒト全血中の炎症促進活性を有する



【図 9 B】

図 9B

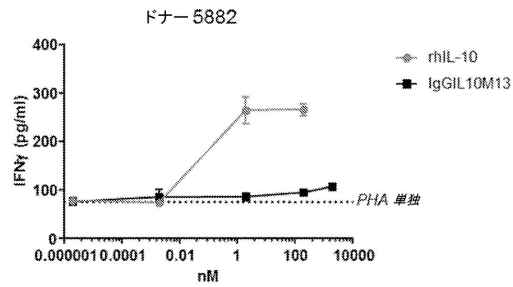
IgGIL10M13 は、rhIL-10 と比較して低下した PHA 刺激ヒト全血中の炎症促進活性を有する



【図 9 C】

図 9C

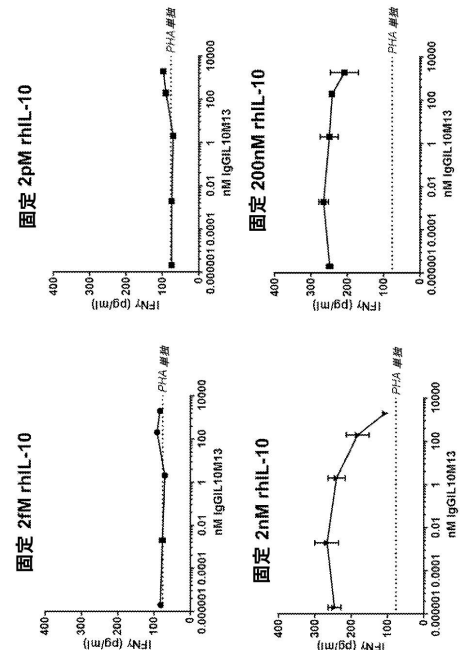
IgGIL10M13 は、rhIL-10 と比較して低下した PHA 刺激ヒト全血中の炎症促進活性を有する



【図 9 D】

図 9D

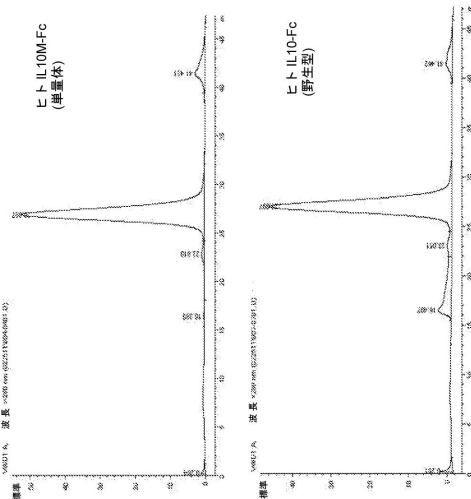
IgGIL10M13 は rhIL-10 と競合することができる



【図 10 A】

図 10A

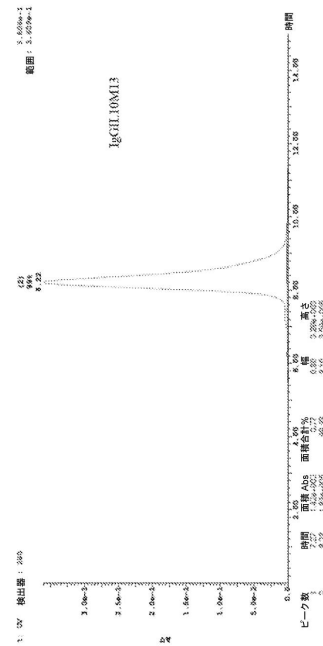
IL10 野生型または単量体は Fc 断片と結合すると凝集する



【図 10 B】

図 10B

IL10 抗体サイトカイングラフトタンパク質は凝集しない



【図 1 1】

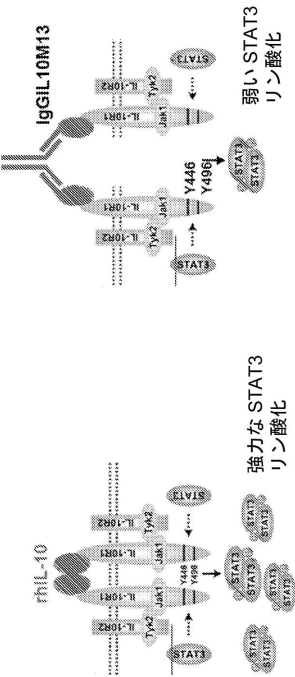
図 11

PBS 中 RSV コート	○	2.74	0.99	1.10
	◇	2.46	0.74	0.84
Carb/Bi pH9.6 中 RSV コート	○	2.41	1.11	0.78
	◇	2.66	1.20	0.93
PBS 中陰性コート	○	0.04	0.04	0.04
	◇	0.04	0.04	0.04
一次検出器				
		グラフトしていない Ab 主鎖		
		CDR-L1 中 IL10M		
		CDR-L1 DAPA 中 IL10M		

【図 1 2】

図 12

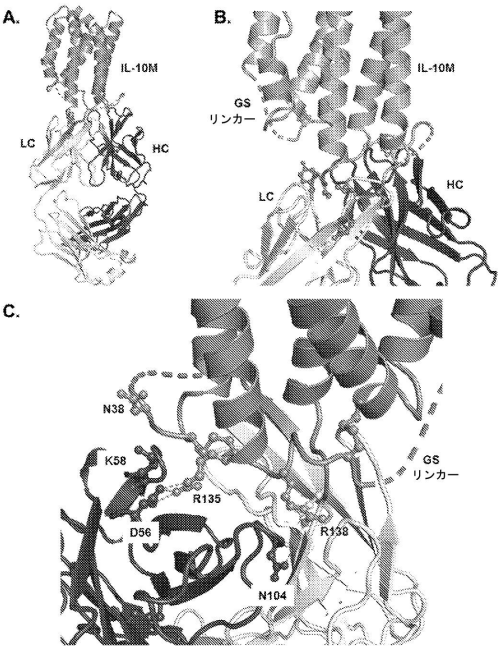
抗体サイトカイングラフトタンパク質の作用機序の提示



【図 1 3】

図 13A~13D

CDR にグラフトした IL10 の結晶構造



【配列表】

0006794448000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	31/4402	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/606	(2006.01)	A 6 1 K	31/4402	
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	31/606	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
			A 6 1 P	43/00	1 2 1

(72)発明者 デイドナート, マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクショナル ジェ
ノミクス, インコーポレイテッド ディービーイー ジェノミクス インスティテュート オブ
ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション

(72)発明者 クヌース, マーク

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクショナル ジェ
ノミクス, インコーポレイテッド ディービーイー ジェノミクス インスティテュート オブ
ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション

(72)発明者 メーウセン, シェリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクショナル ジェ
ノミクス, インコーポレイテッド ディービーイー ジェノミクス インスティテュート オブ
ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション

(72)発明者 スブラッゴン, グレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクショナル ジェ
ノミクス, インコーポレイテッド ディービーイー ジェノミクス インスティテュート オブ
ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション

(72)発明者 トラウガー, ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニ
ュー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレイテッド

(72)発明者 ガイアースタンガー, バーンハート ヒューバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクショナル ジェ
ノミクス, インコーポレイテッド ディービーイー ジェノミクス インスティテュート オブ
ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション

- (72)発明者 シンプソン, カロライナ ニコル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92121, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 10675, ノバルティス インスティテュート フォー ファンクショナル ジェ
ノミクス, インコーポレイテッド ディーピーイー ジェノミクス インスティテュート オブ
ザ ノバルティス リサーチ ファウンデーション
- (72)発明者 ジュント, トビアス
スイス国 4002 バーゼル, ポストファッハ, ノバルティス インスティテューツ フォー
バイオメディカル リサーチ, ノバルティス ファーマ アーゲー内

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 特表2015-530983 (JP, A)
特表2015-504896 (JP, A)
国際公開第2015/117930 (WO, A1)
J. Am. Chem. Soc., 2014年, Vol.136, p.10557-10560
Angew. Chem. Int. Ed., 2013年, Vol.52, p.8295-8298
ACS Chem. Biol., 2013年, Vol.8, p.2117-2121

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
C07K
C12Q
C12P
MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/REGISTRY/CAPLUS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq