

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-527262

(P2017-527262A)

(43) 公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 120 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-575766 (P2016-575766)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月3日 (2015.7.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/065244
 (87) 国際公開番号 W02016/001424
 (87) 国際公開日 平成28年1月7日 (2016.1.7)
 (31) 優先権主張番号 14175585.0
 (32) 優先日 平成26年7月3日 (2014.7.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 14175673.4
 (32) 優先日 平成26年7月3日 (2014.7.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 514165130
 イムノキュア アーゲー
 IMMUNOQUIRE AG
 ドイツ連邦共和国、40212 デュッセル
 ルドルフ、ケーニヒスアレー 90
 Königsallee 90, 402
 12 Düsseldorf, GERMA
 NY
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 マイヤー, ステフェン
 ドイツ連邦共和国、81476 ミュンヘ
 ン、フィルヒナーストラッセ 13

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト由来抗 IL-20 抗体および抗サイトカイン抗体同定アッセイ

(57) 【要約】

ヒト起源の新規なインターロイキン - 20 (IL - 20) 結合分子、具体的にはヒト由来抗ヒト IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、それらの誘導体および生物工学的変異体が提供される。加えて、診断および治療において使用されるための医薬組成物、キットおよび方法が記載される。加えて、細胞型の酵素連結リガンド結合アッセイが、薬学的使用のための抗体およびその生物工学的誘導体を単離するために、具体的には組換え型のヒト由来抗ヒトサイトカイン抗体を単離するために記載される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

好ましくはその可変領域に、

(a) 下記に示される V_H 可変領域アミノ酸配列および/または V_L 可変領域アミノ酸配列の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)、

(i) 図1(V_H) (配列番号2、配列番号10、配列番号18および配列番号26)、および

(ii) 図1(V_L) (配列番号4、配列番号12、配列番号20および配列番号28)

(b) 図1に示されるような V_H 領域および/または V_L 領域のアミノ酸配列、

(c) (a)の前記アミノ酸配列のいずれか1つの部分的変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも1つのCDR、あるいは

(d) (b)のアミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域、

を含む、ヒト由来モノクローナル抗ヒトインターロイキン-20(IL-20)抗体またはそのIL-20結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体。

【請求項 2】

IL-20の生物学的活性を低下または中和することができる、請求項1に記載の抗体またはIL-20結合断片。

【請求項 3】

アミノ酸配列101-PDHYTLRKISSSLANSFLT-118(配列番号69)、アミノ酸配列102-DHYTLRKISSSLANSF-116(配列番号70)またはアミノ酸配列101-PDHYTLRKISSSLANSFL-117(配列番号72)からなるIL-20由来ペプチドを認識し(ただし、前記配列において、P101、I109、S110および/またはL117のみが別のアミノ酸によって置換されることがあり、好ましくはアラニンによって置換されることがある)、かつ、アミノ酸配列97-NYQTPDHYTLRKISSSLAN-114(配列番号71)からなるペプチドを認識しない、または実質的に認識しない、請求項1または2に記載の抗体あるいはIL-20結合断片、合成または生物工学的誘導体。

【請求項 4】

マウスIL-20と実質的に結合しない、かつ/またはマウスIL-20を実質的に中和しない、請求項1または2に記載の抗体またはIL-20結合断片。

【請求項 5】

前記生物活性が、

(a) 細胞ベースのSTAT(シグナル伝達・転写活性化因子)活性化アッセイにおけるヒトIL-20シグナル伝達、

(b) IL-20サイトカイン細胞表面受容体結合の障害、

(c) ヒトIL20RのI型/II型の受容体複合体のヒトIL-20媒介活性化、および/または

(d) ヒトIL-20の前炎症性活性

である、請求項2~4のいずれか一項に記載の抗体またはIL-20結合断片。

【請求項 6】

少なくとも前記CDRが、図1に示される対応するCDRに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性を有し、ならびに/あるいは、前記 V_H 可変領域および/または V_L 可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸配列が、図1に示される対応するフレームワーク領域に対して少なくとも70%の同一性、好ましくは80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性を有する、請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体またはIL-20結合断片。

【請求項 7】

Ig1またはIgG4である、請求項1~6のいずれか一項に記載の抗体またはIL-

10

20

30

40

50

20 結合断片。

【請求項 8】

表 1 において示される C_H アミノ酸配列および C_L アミノ酸配列（配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22 および配列番号 30）から選択されるアミノ酸配列または少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を含む C_H 定常領域および / または C_L 定常領域を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体または IL - 20 結合断片。

【請求項 9】

ヒト IL - 20 に対する結合について、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載される抗体と競合する抗体または抗原結合分子。

【請求項 10】

単鎖 Fv 断片 (scFv)、F(ab')断片、F(ab)断片および F(ab')₂断片からなる群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される抗体または抗原結合断片の 1 つの免疫グロブリン鎖の可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 11 に記載されるポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 13】

請求項 11 に記載されるポリヌクレオチドまたは請求項 12 に記載されるベクターを含む宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 12 に記載されるポリヌクレオチドによってコードされる抗体またはその免疫グロブリン鎖。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載される抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片、あるいは、請求項 13 に記載される細胞を培養することによって得られる抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片を含む免疫コンジュゲートであって、好ましくは、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光性マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、重金属、磁気粒子、薬物または毒素を含む免疫コンジュゲート。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 10 または 14 のいずれか一項に記載される抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片、請求項 15 に記載される免疫コンジュゲート、請求項 11 に記載されるポリヌクレオチド、請求項 12 に記載されるベクター、あるいは請求項 13 に記載される細胞を含む組成物であって、好ましくは、

(a) 医薬組成物であり、かつ、薬学的に許容され得る担体をさらに含み、かつ、必要な場合には、炎症性疾患を処置するために有用であるさらなる薬剤をさらに含む、組成物、あるいは、

(b) 診断組成物またはキットであり、かつ、免疫または核酸ベースの診断方法において従来から使用される試薬をさらに含む、組成物。

【請求項 17】

目的とするリガンドのリガンド結合ドメインへの結合を評価するための方法であって、

(a) 細胞内機能的領域 (2) を必要に応じて含む前記リガンド結合ドメインを発現する標的細胞 (1) を、レポーター (4) により標識される目的とする前記リガンドを含むサンプル (3) と接触させること、および

(b) レポーター活性 (6) を測定すること
を含み、

コントロールと比較した場合のレポーター活性の増大が、目的とする前記リガンドが前記リガンド結合ドメインに結合することの指標となる、方法。

【請求項 18】

前記結合ドメインが受容体または抗リガンド抗体に由来し、かつ / あるいは、前記リガ

10

20

30

40

50

ンドがサイトカインであり、好ましくはインターフェロンまたはインターロイキンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記リガンド結合ドメインおよび/または前記リガンドが生物学的に活性である、請求項 17 または 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記細胞、リガンドおよび/またはリガンド結合ドメインが哺乳動物起源のものであり、好ましくはヒト起源のものである、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記レポーターが、検出可能な酵素であり、好ましくは、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択され、最も好ましくは G a u s s i a ルシフェラーゼまたは N a n o L u c ルシフェラーゼである、請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記標識されたリガンドが組換え融合タンパク質であり、好ましくは、宿主細胞によって発現され、かつ、分泌される組換え融合タンパク質である、請求項 17 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記標的細胞が前記リガンド結合ドメインを内在性に、一過性に、または安定的に発現する、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法、ならびに/あるいは、前記宿主細胞が前記融合タンパク質を一過性に発現する、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記サンプルが前記宿主細胞の培養物の上清を含み、好ましくは、前記コントロールが、前記上清を伴わない培養培地、または、前記融合タンパク質の発現および分泌を伴わない同じ種類の細胞の培養物の上清である、請求項 22 または 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記標的細胞および/または宿主細胞が、H E K 2 9 3 T M S R 細胞または C O L O 2 0 5 結腸直腸ガン細胞であり、好ましくは、(i) 前記標的細胞が、I 型および I I 型の I L - 2 0 受容体を一過性に発現する H E K 2 9 3 T M S R 細胞であり、かつ、前記サンプルが、I L - 2 0 - ルシフェラーゼ融合タンパク質を発現する H E K 2 9 3 T 細胞の上清を含むか、または、(i i) 前記標的細胞が、膜貫通型の抗インターフェロンオメガ (I F N W) 抗体を一過性に発現する H E K 2 9 3 T M S R 細胞であり、かつ、前記サンプルが、I F N W - ルシフェラーゼ融合タンパク質を発現する H E K 2 9 3 T 細胞の上清を含む、請求項 17 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

試験サンプルが、目的とするリガンドのそのコグネイトリガンド結合ドメインへの結合のアゴニストまたはアンタゴニストを含むかどうかを明らかにするためのアッセイであって、請求項 17 ~ 25 のいずれか一項に記載される方法の前記工程を含み、ただし、工程 (a) の前または期間中において、前記リガンドおよび/または前記標的細胞が前記試験サンプル (7) に供され、かつ、工程 (b) において、前記試験サンプルの非存在下またはコントロールの存在下における前記レポーター活性と比較と比較した場合の、

40

(i) レポーター活性の増大がアゴニストの指標となり、かつ

(i i) レポーター活性の低下がアンタゴニストの指標となる、

アッセイ。

【請求項 27】

前記試験サンプルが、(i) 抗リガンド抗体、そのリガンド結合断片、またはそれらの合成または生物工学的誘導体、あるいは、(i i) 抗リガンド受容体 (L R) 抗体、その L R 結合断片、またはそれらの合成または生物工学的誘導体を含み、好ましくは、前記抗体がヒト由来抗体であり、かつ、必要な場合には、前記コントロールが非リガンド結合抗体または非 L R 結合抗体である、請求項 26 に記載のアッセイ。

50

【請求項 28】

前記サンプルが体液に由来し、好ましくは、抗リガンド抗体または抗LR抗体を含有することが疑われる被験体から得られる血清であり、好ましくは、前記被験体が、自己免疫障害もしくは炎症性障害、病原体感染、またはガンに罹患する、請求項26または27に記載のアッセイ。

【請求項 29】

前記リガンドが前記試験サンプルとプレインキュベーションされ、あるいは、コントロールとして、非リガンド結合分子もしくは非LR結合分子または過剰濃度の標識されていないリガンドとプレインキュベーションされる、請求項26～28のいずれか一項に記載のアッセイ。

10

【請求項 30】

ヒト由来モノクローナル抗リガンド抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物学的誘導体を調製する方法であって、前記モノクローナル抗体を発現するB細胞が、哺乳動物から得られるサンプルから単離され、好ましくは、前記哺乳動物が、損なわれた中枢性寛容および/または末梢性寛容あるいは自己寛容の喪失、例えば、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー(APECED)に冒されており、

(a) 前記サンプルを抗リガンド抗体の存在についてアッセイすること、

(b) B細胞(好ましくはメモリーB細胞)を、抗リガンド抗体を含有することが特定されているサンプルから精製すること、

20

(c) 前記B細胞を培養し、必要な場合には、前記B細胞のサンプルを前記抗体の生物学的活性についてアッセイし、かつ

(i) 前記モノクローナル抗体を単離すること、または

(ii) 前記抗体の少なくとも可変領域についての免疫グロブリン遺伝子レポーターを前記B細胞またはメモリーB細胞から得ること、および

(d) 前記レポーターを使用して、前記抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物学的誘導体を宿主細胞において発現させ、前記抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物学的誘導体を単離すること、

(e) 前記抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物学的誘導体のサンプルの生物学的活性をアッセイすること

30

を含み、必要な場合にはさらに下記の工程

(f) 前記単離された抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物学的誘導体を薬学的に許容される担体と混合する工程を含み、

前記リガンドが、前記請求項のいずれか一項で定義されるようなりガンドであり、かつ、前記サンプルを、工程(a)、工程(c)および/または工程(e)においてアッセイすることが、請求項26～29のいずれか一項に記載されるアッセイに従って行われることを特徴とする、方法。

【請求項 31】

自己免疫障害、炎症性障害、がん、または、受容体に対するリガンド結合によって媒介される障害を処置する際に使用されるための、抗リガンド抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物学的誘導体を含む医薬組成物を調製するための方法であって、

40

(a) 抗リガンド抗体を提供すること、

(b) 前記抗体を請求項26～29のいずれか一項に記載されるアッセイに供すること、および

(c) 前記抗体がアンタゴニストまたはアゴニストであることが明らかにされる場合にだけ、前記抗体またはその誘導体を医薬組成物に製剤することを含む、方法。

【請求項 32】

50

請求項 17 ~ 25、30 または 31 のいずれか一項に記載される方法あるいは請求項 26 ~ 29 のいずれか一項に記載されるアッセイを行うために有用であるキットであって、

(a) レポーター (4) により標識される目的とするリガンドを含有するサンプル (3)、または、その調製のための手段、

(b) 細胞内機能的領域 (2) を必要な場合には含む前記リガンド結合ドメインを発現する標的細胞 (1)、または、その調製のための手段、

(c) 必要な場合にはレポーター活性 (6) を明らかにするための手段 (5) を含み、

好ましくはさらに、請求項 17 ~ 25、30 または 31 のいずれか一項に記載される方法あるいは請求項 26 ~ 29 のいずれか一項に記載されるアッセイを行うための説明書を含む、キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、哺乳動物起源の、好ましくはヒト起源のインターロイキン - 20 (IL - 20) と結合する新規な分子、具体的にはヒトモノクローナル抗体、ならびに、その断片、誘導体および変異体に関連する。具体的には、本発明は、組換えによるヒト患者由来の抗 IL - 20 抗体、ならびに、IL - 20 を認識するその断片、誘導体および合成または生物工学的変異体に関連する。加えて、様々な障害の処置および診断において有用であるそのような結合分子、抗体およびその模倣体を含む組成物が記載される。さらには、本発明は、自己免疫障害および自己炎症性障害、ならびに、悪性腫瘍、例えば、様々な形態の関節炎、血管炎症、アテローム性動脈硬化、乾癬、アトピー性皮膚炎、全身性エリテマトーデス (SLE) およびガンなどの免疫療法において使用されるための抗 IL - 20 抗体およびその言及された等価物、ならびに、それらの治療的介入における標的に関連する。より具体的には、本発明は、免疫調節に關与する遺伝子における変異に典型的には起因する損なわれた中枢性寛容および/または末梢性寛容あるいは自己寛容の喪失に冒された被験体に由来する B 細胞から単離されているモノクローナル自己抗体に関連する。

20

【0002】

さらなる局面において、本発明は、目的とするリガンドのリガンド結合ドメインへの結合を評価し、試験サンプルに存在する化合物 (具体的には、前記リガンド結合を妨げることができる抗体) を特定するための方法に関連する。より具体的には、本発明は、目的とするリガンドの、前記リガンドに対する関連性のある受容体を発現する細胞への結合を評価するための新規な細胞アッセイ、および、候補化合物 (例えば、抗体) が、前記リガンドが細胞表面のそのコグネイト受容体に結合することを妨げるかどうか、または補助するかどうか、したがって、アンタゴニスト活性またはアゴニスト活性を有するかどうかを評価するためのこのアッセイの使用に関連する。さらに下記に記載され、また、実施例および図において例示されるこのアッセイの最も好ましい実施形態によれば、本発明のアッセイはまた、本明細書中では発光法細胞結合アッセイ (LCBA) と呼ばれることがある。

30

【背景技術】

【0003】

インターロイキン - 20 (IL - 20、インターロイキン - 10D または ZCYT010 としても知られている) は、細胞成長に影響を及ぼす炎症性機能および免疫調節機能を有する多面発現性サイトカインである (非特許文献 1)。ヒト IL - 20 遺伝子 (NCBI 参照配列: NM_018724) が染色体 1q32.1 に位置しており、この遺伝子には、176 個のアミノ酸 (aa) を含むタンパク質がコードされる (UniProtKB/SwissProt 識別子: Q9NYY1)。IL - 20 は、下記の 9 つのメンバーからなる IL - 10 ファミリーに属する: IL - 10、IL - 19、IL - 20、IL - 22、IL - 24、IL - 26、ならびに、より遠縁の IL - 28A、IL - 28B および IL - 29 (非特許文献 2)。IL - 10 ファミリーのサイトカインは、組織上皮層の完全性および恒常性を維持するために不可欠である。このファミリーのメンバーは、組織

40

50

上皮からの自然免疫応答を、ウイルス感染および細菌感染によって引き起こされる損傷を制限するために促進させることができる。状況に依存して、IL-20は、強力な炎症性特性（非特許文献3）、血管形成特性（非特許文献4）および化学誘引特性（非特許文献5）を有する。しかしながら、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による感染の期間中におけるIL-19およびIL-24と協働したIL-20についての免疫抑制的役割もまた確認されている（非特許文献6）。IL-20が下記の5つの主要な細胞タイプにおいて優先的に発現される：上皮細胞、筋上皮細胞、内皮細胞、単球および骨格筋細胞（非特許文献7）。

【0004】

IL-20が低酸素刺激および炎症性刺激（例えば、IL-1 およびリポ多糖（LPS）など）によって調節される（非特許文献8、非特許文献9）。IL-20により、シグナル伝達・転写活性化因子（STAT）1および3の活性化が、IL-20受容体（R）複合体のIL-20RA/IL-20RB（I型）を介して、または、IL-20受容体複合体IL-22RA/IL-20RB（II型）を介してそのどちらでも誘導される（非特許文献10、非特許文献11）。両方の受容体複合体が皮膚において発現され、乾癬性皮膚およびアトピー性皮膚炎において劇的にアップレギュレーションされている（非特許文献1、非特許文献12）。トランスジェニックマウスにおけるIL-20の過剰発現では、異常な表皮分化を含む皮膚異常を伴う新生児の致死が生じている（非特許文献1、非特許文献13）。IL-20は、ケラチノサイト、内皮細胞および滑膜細胞を標的とし、乾癬に関連する（非特許文献14、非特許文献15）。

10

20

【0005】

さらには、IL-20およびその受容体が関節リウマチ（RA）滑膜組織生検物および強直性脊椎炎（AS）において過剰発現されることが認められており（非特許文献16）、この場合、IL-20およびその受容体の発現レベルが炎症の重篤度との正の相関を有した（非特許文献5）。IL-20は、単球走化性タンパク質（MCP）-1、IL-6およびIL-8を分泌するようにRA滑膜線維芽細胞（RASFC）を誘導し、また、好中球走化性、RASFC遊走および内皮細胞増殖を促進させた。コラーゲン誘発関節炎（CIA）ラットモデルにより、可溶性のIL-20RAがCIAのラットにおいて有意に減少したので、IL-20が関節炎の病理発生に関与していることが明らかにされた（非特許文献5）。

30

【0006】

関節リウマチ（RA）および乾癬の進行時におけるその促進役割のほかに、IL-20は、下記のいくつかの他の障害と機能的に関連することが見出された：例えば、アテローム性動脈硬化（非特許文献4）、急性腎不全（非特許文献17）、潰瘍性大腸炎（非特許文献18）、虚血性発作（非特許文献9）、ならびに、骨減少症および骨粗鬆症（非特許文献19）。さらに、IL-20は造血細胞の発達において役割を果たしている（非特許文献13）。

【0007】

IL-20遺伝子の調節不全の発現が、非小細胞肺（NSCL）ガンにおいて（非特許文献20）、また、筋浸潤性膀胱ガンにおいて認められている（非特許文献21）。IL-20は、膀胱ガン細胞の遊走を、p21（WAF1）タンパク質発現のアップレギュレーションを誘導することにより核因子（NF- κ B）の活性化を引き起こす細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）媒介のMMP-9タンパク質発現を介して促進させている（非特許文献22）。IL-20およびその受容体サブユニットの発現が、臨床口腔腫瘍組織では乳ガン組織と同様に、非腫瘍組織の場合よりも大きかった（非特許文献23、非特許文献24）。インビトロでは、IL-20は、活性化されたSTAT3シグナルおよびAKT/JNK/ERKシグナルを介して、腫瘍壊死因子（TNF）- α 、IL-1、MCP-1、CCR4およびCXCR4を増進させ、また、口腔ガン細胞の増殖、遊走、活性酸素種（ROS）産生およびコロニー形成を増大させた。インビボでは、IL-20を、マウス抗ヒトIL-20モノクローナル抗体7Eを使用して中和することにより、口腔

40

50

ガン細胞における腫瘍成長および炎症が軽減された（非特許文献23）。

【0008】

まとめると、IL-20は、非常に異なる疾患状況において、異常な細胞成長、細胞遊走を促進させる可能性があり、炎症の局所的部位において作用する。したがって、IL-20は、未だ十分には理解されていないが、重要な新しい治療標的を表しており、IL-20の生物学的な活性および機能を中和することができるIL-20特異的な結合分子であって、有害なIL-20活性に伴う障害または状態の処置および診断において有用であり、かつ、ヒトに対して寛容なIL-20特異的な結合分子が求められている。

【0009】

この問題に対する解決策が、請求項において特徴づけられ、かつ、さらには下記における説明において開示され、また、実施例および図において例示されるような本発明の実施形態によって提供される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Blumberg他、Cell 104(2001)、9~19

【非特許文献2】Ouyang他、Annu. Rev. Immunol. 29(2011)、71~109

【非特許文献3】Hsieh他、Genes Immun. 7(2006)、2434~242

【非特許文献4】Chen他、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26(2006)、2090~2095

【非特許文献5】Hsu他、Arthritis Rheum. 54(2006)、2722~2733

【非特許文献6】Myles他、Nature Immunol. 14(2013)、804~811

【非特許文献7】Hsing他、Cytokine 35(2006)、44~52

【非特許文献8】Otkjaer他、J. Invest. Dermatol. 127(2007)、1326~1336

【非特許文献9】ChenおよびChang、J. Immunol. 182(2009)、5003~12

【非特許文献10】Parish-Novak他、J. Biol. Chem. 277(2002)、47517~47523

【非特許文献11】Logsdon他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(2012)、12704~9

【非特許文献12】Toyhama他、Eur. J. Immunol. 39(2009)、2779~88

【非特許文献13】Liu他、Blood 102(2003)、3206~3209

【非特許文献14】Wei他、Clin. Immunol. 117(2005)、65~72

【非特許文献15】Sa他、J. Immunol. 178(2007)、2229~2240

【非特許文献16】Kragstrup他、Cytokine 41(2008)、16~23

【非特許文献17】Li他、Genes Immun. 9(2008)、395~404

【非特許文献18】Fonseca-Camarillo他、J. Clin. Immunol. 33(2013)、640~8

【非特許文献19】Hsu他、J. Exp. Med. 208(2011)、1849~1861

【非特許文献20】Baird他、Eur. J. Cancer 47(2011)、19

10

20

30

40

50

08 ~ 18

【非特許文献21】Lee他、P L o S O n e 7 (2 0 1 2) 、 e 4 0 2 6 7

【非特許文献22】Lee他、J . B i o l . C h e m . 2 8 8 (2 0 1 3) 、 5 5 3 9 ~ 5 2

【非特許文献23】H s u他、M o l . C a n c e r R e s . 1 0 (2 0 1 2) 、 1 4 0 3 ~ 9

【非特許文献24】H s u他、J . I m m u n o l . 1 8 8 (2 0 1 2) 、 1 9 8 1 ~ 9 1

【発明の概要】

【0011】

本発明は、IL-20 特異的なヒト由来モノクローナル抗体、ならびに、IL-20 を認識するその断片、誘導体および合成または生物工学的変異体に関連する。具体的には、IL-20 に対する選択的結合プロファイルを有し、かつ、添付された実施例および図において示されるような結合活性および中和活性を示す様々なヒトモノクローナル抗IL-20 抗体が提供される。それらの中和特性のために、本発明の抗体は、治療、予後判定および診断での有用性を有しており、これらの有用性により、本発明の抗体は、望まれない免疫応答の開始および/または維持におけるIL-20 活性に伴う/を伴う自己免疫性および炎症性の多種多様な障害および状態との関連性での様々な適用について、例えば、様々な形態の関節炎（例えば、関節リウマチ（RA）または脊椎関節炎など）、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、乾癬、血管炎症およびアテローム性動脈硬化、アトピー性皮膚炎およびガンなどとの関連性での様々な適用について特に有益になっている。治療および診断でのこれらおよびさらなる可能な抗IL-20 適応については上記の背景技術の節もまた参照のこと。

【0012】

本発明の抗体は、AIRE（自己免疫調節因子）遺伝子における変異に起因する自己免疫性多腺性内分泌不全症候群タイプ1（APS1）に冒されたヒトから単離されている（総説については、Peterson他、Nat. Rev. Immunol. 8（2008）、948~957、および、国際出願公開WO2013/098419を参照のこと）。

【0013】

これに関連して、本発明に従って行われた実験の範囲内において、最も強力な中和候補抗体を特定し、単離し、かつ特徴づけし、これにより、特に選択するための最初の試みは、面倒であるようであった。例えば、今日まで、ならびに、本発明に従って行われた最初の実験では、ルシフェラーゼ免疫沈殿システム（LIPS）アッセイが、所望された抗原IL-20 に対抗するIgG抗体を検出するために使用されており、このアッセイは、ELISAによって見逃されるが、可能性のある立体配座エピトープに対する抗体を、中和活性を評価するためにモニターすることができるという潜在的な可能性を有することが報告された。Burbello他、Expert Rev. Vaccines 9（2010）、567~578（著者原稿；PMC（2012年8月13日）において入手可能）を参照のこと。しかしながら、本発明に従って行われた実験において、LIPSアッセイは中和抗体と非中和抗体とを識別しなかったので、抗体をこの方法に従って特定し、選択することでは、その中和活性に関しての実際の最も強力な抗体は得られていないかもしれない。

【0014】

したがって、図7に例示され、また、実施例5に記載されるように、本発明によれば、目的とするリガンドの、関連性のある受容体を発現するように誘導される細胞への結合を評価するための新規なアッセイが、このリガンドに対する候補抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかどうかを明らかにする際に使用するために開発されている。例として、目的とするリガンドがレポーターとして、すなわち、ルシフェラーゼ融合タンパク質として使用されるので、リガンドの

10

20

30

40

50

細胞結合が細胞会合レポーターによって、すなわち、ルシフェラーゼ活性によって測定される。このアッセイは、リガンドに対する抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかどうかを、レポーター活性における変化を観測することによって、すなわち、ルシフェラーゼによる低下した光放射を観測することによって評価することを可能にする。したがって、本発明によれば、新規な発光法細胞結合アッセイ(LCBA)が確立された。この新規なアッセイのおかげで、強力なIL-20中和抗体を特定することが可能であった。

【0015】

よって、実施例において例示される主題抗体を、(i)患者(これはAPS1-9と呼ばれる)が抗IL-20抗体の高産生体であること、および(ii)新規な細胞リガンド結合レポーターアッセイの使用のおかげで単離し、特定することができた。

10

【0016】

詳しくは、本発明は下記のものに関する。

[1]その可変領域に、

(a)下記に示されるV_H可変領域アミノ酸配列および/またはV_L可変領域アミノ酸配列の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)、

(i)図1(V_H) (配列番号2、配列番号10、配列番号18および配列番号26)、および

(ii)図1(V_L) (配列番号4、配列番号12、配列番号20、配列番号28)

20

(b)図1に示されるようなV_H領域および/またはV_L領域のアミノ酸配列、

(c)(a)のアミノ酸配列のいずれか1つの部分的変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも1つのCDR、あるいは

(d)(b)のアミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域、

を含み、好ましくは、前記抗体はIL-20の生物学的活性を低下または中和することができる、ヒト由来モノクローナル抗ヒトインターロイキン-20(IL-20)抗体またはそのIL-20結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体。

[2](1)アミノ酸配列101-PDHYTLRKISSLANSLFLT-118(配列番号69)、アミノ酸配列102-DHYTLRKISSLANSLF-116(配列番号70)および/またはアミノ酸配列101-PDHYTLRKISSLANSLF-117(配列番号72)からなるIL-20由来ペプチドを認識し(ただし、前記配列において、P101、I109、S110および/またはL117のみが別のアミノ酸によって置換されることがあり、好ましくはアラニンによって置換されることがある)、かつ、(2)アミノ酸配列97-NYQTPDHYTLRKISSLAN-114(配列番号71)からなるペプチドを認識しない、または実質的に認識しない、[1]に記載の抗体またはIL-20結合断片。

30

[3]マウスIL-20と結合することおよび/またはマウスIL-20を中和することが可能である、[1]または[2]に記載の抗体またはIL-20結合断片。

[4]前記生物活性が、

40

(a)細胞ベースのSTAT(シグナル伝達・転写活性化因子)活性化アッセイにおけるヒトIL-20シグナル伝達、

(a)IL-20サイトカイン細胞表面受容体結合の阻害、

(c)ヒトIL20R1/IL20R2受容体複合体のヒトIL-20媒介活性化、および/または

(d)ヒトIL-20の前炎症性活性

である、[2]または[3]に記載の抗体またはIL-20結合断片。

[5]少なくとも前記CDRが、図1に示される対応するCDRに対して少なくとも70%の同一性、好ましくは80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性を有し、ならびに/あるいは、前記V_H可変領域および/またはV_L可変領域のフレームワ

50

ーク領域のアミノ酸配列が、図 1 に示される対応するフレームワーク領域に対して少なくとも 70% の同一性、好ましくは 80% の同一性、より好ましくは少なくとも 90% の同一性を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の抗体または IL - 20 結合断片。

[6] Ig 1 または Ig G 4 である、[1] ~ [5] のいずれか 1 つに記載の抗体または IL - 20 結合断片。

[7] 表 1 に示される C_H アミノ酸配列および C_L アミノ酸配列 (配列番号 6、配列番号 14、配列番号 22 および配列番号 30) から選択されるアミノ酸配列または少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を含む C_H 定常領域および / または C_L 定常領域を含む、[1] ~ [6] のいずれか 1 つに記載の抗体または IL - 20 結合断片。

[8] ヒト IL - 20 に対する結合について (例えば、実施例 2 に従って求められることとなる) [1] ~ [7] のいずれか 1 つに記載される抗体と競合するヒト抗体またはその抗原結合分子。

[9] 単鎖 Fv 断片 (s c F v)、F (a b ') 断片、F (a b) 断片および F (a b ')₂ 断片からなる群から選択される、[1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載の抗体。

[10] [1] ~ [9] のいずれか 1 つに記載される抗体または抗原結合断片の 1 つの免疫グロブリン鎖の可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチドであって、好ましくは、前記可変領域と、前記定常ドメインの少なくとも一部とをコードする c D N A である、ポリヌクレオチド。

[11] [10] に記載されるポリヌクレオチドを含むベクター。

[12] [10] に記載されるポリヌクレオチドまたは [11] に記載されるベクターを含む宿主細胞。

[13] 抗 IL - 20 抗体またはその免疫グロブリン鎖を調製するための方法であって、

(a) [12] に記載される細胞を培養すること、および

(b) 抗体またはその免疫グロブリン鎖を培養物から単離すること

を含み、好ましくは、前記抗 IL - 20 抗体が、上記でそれぞれ定義されるような、また、説明における下記の実施形態においてそれぞれ記載されるような抗ヒト IL - 20 抗体またはその IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体である、方法。

[14] [11] に記載されるポリヌクレオチドによってコードされるか、または、[13] に記載される方法によって得ることができる抗体またはその免疫グロブリン鎖。

[15] [1] ~ [9] または [14] のいずれか 1 つに記載される抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片、あるいは、[12] に記載される細胞を培養することによって得られる抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片を含む免疫コンジュゲートであって、好ましくは、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光性マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、重金属、磁気粒子、薬物または毒素を含む免疫コンジュゲート。

[16] [1] ~ [9] または [14] のいずれか 1 つに記載される抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片、[15] に記載される免疫コンジュゲート、[10] に記載されるポリヌクレオチド、[11] に記載されるベクター、あるいは [12] に記載される細胞を含む組成物であって、好ましくは、

(a) 医薬組成物であり、かつ、薬学的に許容され得る担体をさらに含み、かつ、必要な場合には、炎症性疾患を処置するために有用であるさらなる薬剤をさらに含む、組成物、あるいは、

(b) 診断組成物またはキットであり、かつ、免疫または核酸ベースの診断方法において従来から使用される試薬をさらに含む、組成物。

[17] 下記の方法において使用されるための [1] ~ [9] または [14] のいずれか 1 つに記載される抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片、[15] に記載される免疫コンジュゲート、あるいは、[16] に記載される組成物。

(a) 免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態を処置するか、または、免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態の進行を妨げる方法、

10

20

30

40

50

(b) 免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態に伴う症状を改善する方法、ならびに / あるいは

(c) 患者における IL - 20 の発現および活性に伴う免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態の存在について、または、該疾患もしくは状態を発症する被験体の危険性を明らかにするために、被験体を診断するか、またはスクリーニングする方法、

ただし、これらの方法において、好ましくは、前記疾患が、炎症性腸疾患 (IBD ; クロウン病、潰瘍性大腸炎およびセリアック病を含む)、強直性脊椎炎および他の形態の脊椎関節炎、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨粗鬆症、シェルグン (Sjorgens) 症候群、多発性硬化症 (MS)、全身性エリテマトーデス (SLE)、ループス腎炎またはこれらの組合せ、がん (皮膚、舌、食道または肺の扁平上皮がんを含む) および血管炎症からなる群から選択される。

[18] IL - 20 の発現および活性に伴う障害を処置することにおいて使用されるための医薬組成物を調製する方法であって、

(a) [12] に記載される細胞を培養すること、

(b) 抗体、その生物工学的誘導体、またはそれらの免疫グロブリン鎖を培養物から医薬品グレードにまで精製すること、および

(c) 前記抗体またはその生物工学的誘導体を薬学的に許容される担体と混合することを含む、方法。

[19] IL - 20 の発現に伴う被験体における免疫媒介または自己免疫性の疾患または状態を診断するための方法であって、被験体細胞の生物学的サンプルを、[1] ~ [9]、[14] または [15] のいずれかに記載される抗 IL - 20 抗体または IL - 20 結合断片と接触させること、および、IL - 20 の存在を検出することを含む、方法。

[20] 単離された生物学的サンプルにおいて IL - 20 を検出するか、または測定する方法であって、前記サンプルを、[1] ~ [9]、[14] または [15] のいずれかに記載される抗体と混合すること、前記抗体が、混合物に存在する IL - 20 との複合体を形成することを可能にすること、および、前記混合物に存在する前記複合体を検出することを含む、方法。

【0017】

本発明ではまた、本明細書中に開示されるヒト由来モノクローナル抗ヒト IL - 20 抗体またはその IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体を使用することにより本発明に従って適合化される IL - 20 アンタゴニスト (例えば、先行技術において記載される抗 IL - 20 抗体) の様々な実施形態が使用され、また、その様々な実施形態に関連する。例えば、IL - 20 活性を、とりわけ抗 IL - 20 モノクローナル抗体を使用して打ち消すことが、様々な炎症状態を処置するための有望な取り組みとして記載されている。例えば、国際出願公開 WO 99 / 27103、同 WO 01 / 46261、同 WO 03 / 051384、同 WO 2004 / 085475 および同 WO 2006 / 086396 を参照のこと。ヒト IL - 20 と結合するラットまたはマウスのモノクローナル抗体もまた記載されている。例えば、国際出願公開 WO 2005 / 052000、同 WO 2007 / 081465 および同 WO 2010 / 000721 を参照のこと。しかしながら、患者処置のために好適であるヒト由来抗体は今までのところ何ら提供されていない。本発明は、この技術分野におけるこれらの要求および他の要求に対処するものである。

【0018】

さらに、図に例示されるように、また、実施例に記載されるように、本発明はまた、目的とするリガンドのそのコグネイト受容体への結合を評価するための新規なアッセイを、試験物質 (例えば、候補化合物、例えば、リガンドに対する抗体など) により、この試験物質がそのそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかどうかを明らかにすることにおいて使用するために、ならびに、候補の抗リガンド抗体のための競合アッセイおよび交差競合アッセイとして使用するために提供する。

【0019】

10

20

30

40

50

この新規なアッセイでは、関連性のある受容体または抗体が細胞において発現させられ、ただし、この場合、好ましくは少なくともリガンド結合ドメインが細胞表面に露出させられ、かつ、リガンドが融合分子として、すなわち、レポーターに連結されて、またはレポーターにより標識されて提供される。明白ではあるが、この新規なアッセイは、候補化合物（例えば、抗体）により、リガンドが細胞表面のそのコグネイト受容体に結合することが妨げられるかどうか、したがって、候補化合物（例えば、抗体）がアンタゴニスト活性を有するかどうかの評価を可能にするだけでなく、候補化合物が、例えば、リガンド-受容体の結合を安定化させることによってリガンド結合を高め得るかどうか、したがって、レポーター活性を高め得るかどうかの評価もまた可能にし、それにより、リガンド結合のアゴニストを特定することを可能にする。これに関連して、当業者は、本発明のこの新規なアッセイが、抗リガンド結合分子のスクリーニングのために有用であるだけでなく、コグネイト結合ドメイン（すなわち、リガンドの受容体）と結合し、リガンド結合を妨害する物質のスクリーニングのためにもまた有用であることを理解するであろう。したがって、抗リガンド抗体を試験するために本明細書中に記載される実施形態と、実施例とは、抗リガンド結合ドメイン（具体的には受容体、好ましくは、細胞外のリガンド結合部分を有する受容体）に同等に適用され得るであろう。

10

【0020】

例として、目的とするリガンドがレポーターとして、すなわち、ルシフェラーゼ融合タンパク質として使用されるので、リガンドの細胞結合が細胞会合レポーターによって、すなわち、ルシフェラーゼ活性によって測定される。このアッセイは、リガンドに対する抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるか、または強化されるかどうかを、レポーター活性における変化を観測することによって、すなわち、ルシフェラーゼによる低下した光放射または増大した光放射を観測することによって評価することを可能にする。

20

【0021】

従来、Luker 他 (*Bio techniques* 47 (2009)、625~632) は、ケモカイン-ケモカイン受容体の結合についてのルミネセンススペースのアッセイを記載し、そして、ケモカイン受容体をプローブ探査するために、また、ケモカイン-ケモカイン受容体の結合の小分子調節因子を特定するために、生物発光レポーターを使用することを示唆した。このアッセイはさらに、共培養後の生細胞および動物におけるインビボでのリガンド受容体相補アッセイにまで進展させられた。Luker 他、*Nature Medicine* 18 (2012)、172~177を参照のこと。

30

【0022】

しかしながら、添付された実施例において例示されるようなロバストな生物発光法細胞型インビトロアッセイ、ならびに、標的タンパク質中和抗体（具体的にはインターフェロンまたはインターロイキンのアンタゴニスト）の特定、単離および/または検証のためのその使用は記載も、示唆もされていない。したがって、この局面において、本発明は、目的とするリガンドの、このリガンドに対する関連性のある受容体を発現する細胞への結合を評価するための新規な細胞アッセイに関連する。その最も広い局面において、本発明は下記の方法に関する。

40

【0023】

[21] 目的とするリガンドのリガンド結合ドメインへの結合を評価するための方法であって、

(a) 細胞内機能的領域(2)を必要に応じて含む前記リガンド結合ドメインを発現する標的細胞(1)を、好ましくは検出可能な酵素であるレポーター(4)により標識される目的とする前記リガンドを含むサンプル(3)と接触させること、および

(b) レポーター活性(5)、好ましくは化学発光を測定することを含み、

コントロールと比較した場合のレポーター活性の増大が、目的とする前記リガンドが前記リガンド結合ドメインに結合することの指標となり、かつ前記リガンド結合ドメインが

50

受容体または抗リガンド抗体に由来し、好ましくは前記リガンドがインターフェロンまたはインターロイキンである、方法。

【0024】

用語「リガンド」は、本明細書中で使用される場合、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Oxford University Press、1997年、2000年改訂および2003年再版、ISBN 0198506732)において提供されるような定義で示される。リガンドには、目的とするどのような小分子、核酸、タンパク質または抗原も含まれ、例えば、限定されないが、CDマーカーリガンド(例えば、CD48、CD40L、CD40、CD122など)、サイトカインおよびケモカイン(例えば、IL-2、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-6、TNF- α 、IL-10、IP-10など)、増殖因子(例えば、ITAC、MIG、EGF、VEGFなど)、共刺激リガンド(例えば、ICOS-L、OX-40-25L、CD137-Lなど)、シグナル伝達経路の成分、および、実際には、どのような抗原であれ、目的とする抗原が含まれる。リガンドにまた、抗体が含まれる。本発明の方法において、リガンドは最も好ましくは可溶性リガンドである。

10

【0025】

レポーターは検出可能部分(moiety)であり、直接的または間接的のどちらであれ、追跡することができるどのような種類のものであってもよい。多くのそのような部分がこの技術分野では広く知られており、これらには、生化学、細胞生物学および医学的診断用途において日常的に使用される標準的な標識、例えば、放射能、蛍光、化学発光、コロイド状金属のプラズモン共鳴、または、酵素比色検出に基づく標識などが含まれる。

20

【0026】

「リガンド結合ドメイン」はどのような分子であってもよく、ただし、この分子は、所与のリガンド(例えば、本明細書中上記で定義されるリガンドなど)と結合することができるものである。典型的には、リガンド結合ドメインは、タンパク質またはポリペプチド(例えば、受容体分子)に由来する場合がある。しかしながら、原理的にはまた、非タンパク質性の結合分子も、本発明によるリガンド結合ドメインを提供する場合がある。例えば、合成による結合分子、例えば、Zeng他、ACS Nano、4(2010)、199~204を参照のこと(これは、親水性ペプチドに対する抗体様親和性を有する合成ポリマーナノ粒子を記載する)。それにもかかわらず、好ましい実施形態において、リガンド結合ドメインは受容体または抗体(典型的には抗リガンド抗体)に由来するであろう。リガンド結合ドメインはどのようなポリペプチドまたはその一部分であってもよく、ただし、それらは、所与のリガンド(例えば、本明細書中上記で定義されるリガンドなど)と結合することができるものである。受容体は、遺伝子発現を含むシグナル伝達経路を調節する、リガンドにより活性化される結合タンパク質である。これらの受容体についての作用機構は、リガンドが結合することを介した第一段階の活性化として、また、遺伝子発現の調節を結果的にはもたらす下流側のシグナル伝達カスケードを受容体が誘発するか、または阻害することによって伝達される第二段階のシグナルとして関わる。リガンド結合を担うドメインがリガンド結合ドメイン(LBD)である。このドメインは、リガンド結合ならびにホモ二量体化および/またはヘテロ二量体化を含むいくつかの活性に関与する。受容体のリガンド結合型形態とリガンド非結合型形態との間における移行に付随して生じる立体配座変化により、他のタンパク質に対するそれらの親和性が劇的な影響を受ける(Edwards、J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 5(2000)、307~24; Thomas-Chollier他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110(2013)、17826~31)。

30

40

【0027】

しかしながら、本発明の方法およびアッセイの目的のためには、細胞膜において細胞外に存在するリガンド結合ドメインの存在は十分であり、これは、先行技術分野におけるほとんどのアッセイとは対照的に、本発明の方法およびアッセイは、レポーター活性を記録

50

するために細胞内のシグナル伝達に依存していないからである。それにもかかわらず、リガンド結合ドメインは、1つまたは複数の機能的領域への融合または結合が行われる場合があり、例えば、膜貫通領域への融合または結合が行われる場合がある。

【0028】

膜貫通領域は概して、受容体を細胞膜に固定するために役立つものであり（したがって、細胞外のリガンド結合ドメインは膜結合型であり）、膜貫通領域には、どのようなタンパク質であれ、そのようなことが可能であるタンパク質（または、どのような核酸であれ、そのようなタンパク質をコードする核酸）が含まれる。そのような領域は広範囲の様々な供給源に由来することができ、例えば、T細胞受容体（TCR）、CD28、CD4、CD5、CD8、CD3a、CD16、CD22、CD23、CD45、CD80、CD86、CD64、CD9、CD37、CD122、CD137またはCD154、サイトカイン受容体（例えば、インターロイキン受容体、TNF-Rなど）、チロシンキナーゼ受容体またはインターフェロン受容体あるいはコロニー刺激因子受容体のアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖の全体または一部などに由来することができる。代替において、膜貫通領域は、合成されたものである場合がある。好適な合成された膜貫通領域は、主に疎水性アミノ酸（例えば、ロイシンおよびバリンなど）を含むであろう。

10

【0029】

用語「標的細胞」には、本発明との関連で使用される場合、どのような細胞も含まれ、ただし、この場合、この細胞は、目的とする1つまたは複数のリガンド結合ドメインを発現することができるものである。具体的には、目的とするリガンドに結合することができる1つまたは複数の受容体を内在性に発現するか、あるいは、1つまたは複数の前記受容体を発現するようにトランスフェクションまたは形質転換を行うことができる哺乳動物細胞および哺乳動物細胞株が使用される場合がある。しかしながら、一方では、リガンド結合を研究するために受容体を挿入することができる人工的な細胞および細胞膜が開発されている。例えば、総説については、HammerおよびKamat、FEB S Letters、586（2012）、2882～2890、ならびに、May他、Angewandte Chemie, International Edition 52（2013）、749 DOI: 10.1002/anie.201204645を参照のこと。

20

【0030】

本発明の方法およびアッセイは、細胞内機能的領域（2）を必要に応じて含むリガンド結合ドメインを発現する標的細胞（1）を、レポーター（4）により標識される目的とするリガンドを含むサンプル（3）と接触させることによって行われる場合がある。コグネイトリガンドが存在するならば、複合体が2つの結合性試薬の間で形成され、リガンドが標的細胞に結合する。結合していない目的とするリガンドが、例えば、洗浄によって、反応混合物から分離され、そして、標的細胞に結合したリガンドの存在が、レポーター部分（6）を介して、例えば、基質（5）に対するその酵素活性のために検出される。標的細胞-リガンド複合体におけるレポーター活性の存在（または大きさ）は、リガンドの存在（または濃度）を示すものである。本発明の方法およびアッセイは、どのような容器、バイアル、培養ディッシュ、マルチプルウェルプレート、液体毛管システムおよび同様なものであれ、好適なものにおいて行うことができる。代替において、本発明の方法およびアッセイは、リガンド-レポーターがリガンド結合ドメインに結合している細胞が、例えば、蛍光部分をレポーターとして使用するときには蛍光活性化細胞選別（FACS）によって選択的に検出されるように行われる場合がある。

30

40

【0031】

実施例において例示されるように、本発明の方法およびアッセイは、受容体のリガンド結合をアッセイするために、具体的には、サイトカイン（最も好ましくはインターフェロンまたはインターロイキン）のそのコグネイト受容体との相互作用をアッセイするために特に好適である。

【0032】

サイトカインは、小さい糖タンパク質メッセンジャーであり、これらは、統一された分

50

類システムがない場合には、発見順の数字、所与の機能的活性、炎症応答における速度論的または機能的な役割、起源となる最初の細胞、あるいは、関連した分子と共有される構造的ホモログによって様々に特定されていた。例えば、McInnes、Kelley's Textbook of Rheumatology、Elsevier Health Sciences 第9版、第1巻 (Firestein他(2012)、パート3、23章、367~377)を参照のこと。本発明に従って使用されるサイトカインおよび受容体が下記のものに記載されるが、本発明に従って使用されるサイトカインおよび受容体は、下記のものに記載されるサイトカインおよび受容体に限定されない。McInnes(2012)(パート3、23章、367~377)(表23-1~表23-8に示されるものが、その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)、ならびに、国際出願公開WO2013/098419および出願人の同時係属中の国際出願公開WO2015/001047に開示されるサイトカイン列挙を参照のこと。好ましくは、サイトカインはヒトのサイトカインである。好ましい実施形態において、サイトカインは、ロイコトリエン、リンホカイン、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、および、TNFファミリーのメンバーからなる群から選択される。しかしながら、原理的には、リガンドは、ホルモンおよび増殖因子、しかし、同様に、小分子(例えば、コグネイト結合ドメイン(例えば、受容体または抗体など)との相互作用が可能である炭水化物など)を含めて、事実上どのような可溶性分子であってもよい。

10

【0033】

したがって、本発明に従って行われた実験により、驚くべきことに、LBCAアッセイが、候補の抗リガンド抗体を試験するために特に適していることが明らかにされた。この場合、その膜貫通型の発現として、抗リガンド抗体が抗リガンド結合ドメインとして働いている。IFN-アルファおよびIFN-に対する抗体26B9の、293T MSR細胞における発現と、この抗体が、ルシフェラーゼによりタグ化されたIFN-に効率的に結合することを記載する実施例9および図17を参照のこと。したがって、本発明の方法およびアッセイはまた、抗体-リガンド結合をアッセイするために特に好適である。したがって、さらなる好ましい実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

20

[22]前記リガンド結合ドメインが抗体またはそのリガンド/抗原結合断片、あるいはそれらの誘導體である、[21]に記載の方法。

【0034】

この実施形態ではまた、リガンド/抗原は好ましくはサイトカインである場合があり、しかしながら、一方で、明らかに、どのような他のリガンド/抗原相互作用であっても同様にアッセイされる場合がある。

30

【0035】

背景の節で議論されるように、また、実施例において例示されるように、所望される特異性を有する抗体の最初のスクリーニングでは、例えば、リガンドに対する抗体の特異的な結合を明らかにするために通常の場合には十分である様々な生化学的アッセイ(例えば、ELISAアッセイおよびLIPSアッセイなど)が使用される。しかしながら、それらのアッセイはほとんど常に、非細胞性の条件のもとで、すなわち、非生理学的な条件のもとで行われるので、そのような生化学的アッセイでは、所与の抗体がまた、インピボにおいてリガンドに結合し、その生物学的活性を妨げることが可能であり得るかどうかが、例えば、シグナル伝達経路がそれによりトリガーされる、受容体へのリガンドの結合を阻害することが可能であり得るかどうかが確実に予測されない場合がある。

40

【0036】

対照的に、実施例5において明らかにされるように、本発明の細胞型アッセイでは、リガンド結合が細胞状況でアッセイされるので、本発明の細胞型アッセイは、実施例5に記載される機能的STAT3アッセイによって確認されるような抗リガンド分子の中和活性を明らかにすることにおいて信頼性がある。したがって、本発明の細胞型リガンド結合アッセイでは、そのような機能的アッセイを行う必要性がなくなり、それにより、実験室設備、時間および費用が軽減される。したがって、1つの実施形態において、本発明は下記

50

の方法に関連する。

[2 3] 前記リガンド結合ドメインおよび/または前記リガンドが生物学的に活性である、[2 1] または [2 2] に記載の方法。

【 0 0 3 7 】

原理的には、どのような細胞、リガンドおよびリガンド結合ドメインであっても調べられるかもしれないが、本発明のアッセイは、哺乳動物、具体的にはヒトのリガンドおよびリガンド結合ドメインを評価するために特に好適であり、そのため、同様に、哺乳動物の標的細胞、具体的にはヒトの標的細胞の使用も好ましい。したがって、さらなる好ましい実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

[2 4] 前記標的細胞、リガンドおよび/またはリガンド結合ドメインが哺乳動物起源のものであり、好ましくはヒト起源のものである、[2 1] ~ [2 3] のいずれか 1 つに記載の方法。しかしながら、標的細胞は、必ずしも哺乳動物起源のものである必要はなく、原核生物を含めて、どのような細胞であっても可能であるかもしれない。リガンド結合ドメインはまた、非生細胞様の粒子の一部であることも可能であり、これには、ウイルス様粒子 (V L P)、合成細胞または他の細胞様粒子が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

細胞外のリガンド結合ドメインは、タンパク質リガンドと結合することができるどのようなタンパク質 (または、そのようなタンパク質をコードする核酸) であっても含む。最も好ましくは、リガンドは可溶性リガンドである。膜に結合した細胞外のリガンド結合ドメインは、例えば、表面の膜受容体、例えば、キナーゼ受容体、Gタンパク質共役受容体 (G P C R)、増殖因子受容体、サイトカイン受容体、例えば、インターロイキン受容体 (例えば、I L - I R (I 型および I I 型)、I L - 2 R (サブユニット、サブユニットおよび サブユニット)、I L - 3 R、I L - 4 R、I L - 5 R、I L - 6 R ; g p 1 3 0、I L - 8 R、I L - 1 3 R a I、I L - 4 R a、I L - 3 0 R、I L - 1 5 R (サブユニット、サブユニットおよび サブユニット)、I L - 1 7 R ; T N F 受容体 (T N F - R I および T N F - R I I) ; I L - 、 I L - 2、I L - 1 0、I L - 1 5、G - C S F、C S F - 1、M - C S F、G M - C S F、H G F、E G F、P D G F、I G F、F G F、T G F - 、I P - 1 0、I T A C、M I G および V E G F に対する受容体 ; C D マーカー (例えば、C D 2、C D 4、C D 5、C D 7、C D 8、C D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c、C D 1 1 d、C D 1 6、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 2 4、C D 2 8、C D 3 3、C D 4 0、C D 4 8、C D 6 9、C D 7 0、C D 1 2 2 および C D 2 4 4 など) ; ならびに、I C O S - L、O X - 4 0 - L、C D 4 0 L および C D 1 3 7 - L に対する受容体を含むか、または、それらに由来する。本発明の方法およびアッセイにおいて使用されるための、膜に結合した細胞外のリガンド結合ドメインはまた、細胞膜の表面または内部に通常の場合には見出されない分子を結合ドメインとして含むことができ、例えば、細胞質性のタンパク質または可溶性のタンパク質、例えば、限定されないが、通常の場合には分泌されるタンパク質を含むことができる。したがって、細胞外のリガンド結合ドメインはまた、膜貫通領域 (下記を参照のこと) のために細胞外に呈示される S O S T および L D L 関連タンパク質 (例えば、L R P 5 および L R P 6 など)、サイトカインおよび増殖因子を含むことができる。好ましくは、細胞外のリガンド結合ドメインを細胞表面に標的化するシグナル配列が、リガンド結合ドメインおよび受容体をそれぞれコードするベクターの D N A 配列に含まれることが、当業者によって理解されるであろう。様々なそのようなシグナル配列がこの技術分野では知られており、これらには、細胞外のリガンド結合ドメインと生来的に会合する配列 (シグナル配列 / リーダー配列) が含まれる。シグナル配列は概して、細胞外のリガンド結合ドメインが細胞表面にトラフィッキングされる期間中にプロセッシングされ、除かれるであろう。

【 0 0 3 9 】

1 つの実施形態において、細胞外のリガンド結合ドメインは、このリガンド結合ドメインが 1 つまたは複数の他の細胞外のリガンド結合ドメインと相互作用して、リガンドを認

識することができる（リガンドに結合することができる）多重に会合した細胞外のリガンド結合ドメインを達成するように選ぶことができる。したがって、1つの実施形態において、本発明の方法およびアッセイにおける標的細胞は、2つ以上の膜結合した細胞外のリガンド結合ドメインを含む。より好ましくは、2つまたはそれ以上の異なるリガンド結合ドメインが、リガンドを認識することができる（リガンドに結合することができる）多重に会合した細胞外のリガンド結合ドメインを達成するために標的細胞において発現させられる場合がある。

【0040】

図7Aの説明文において説明されるように、レポーターはどのような検出可能部分であってもよい。レポーター部分には、測定可能（検出可能）なシグナルを生成することができる化合物が含まれ、例えば、また、限定されないが、ルシフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ（SEAP）、緑色蛍光タンパク質または赤色蛍光タンパク質などが含まれる。したがって、レポーターシグナルの測定には、光放射、蛍光生成またはアルカリホスファターゼ産生の測定が含まれる。適切なレポーター分子の総説については、例えば、Lesner、Biochem. Anal. Biochem. 4 (2012)、1~2；KainおよびGanguly、Curr. Protoc. Mol. Biol. (2001)、9章、ユニット9.6を参照のこと。したがって、1つの実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

[25] 前記レポーターが、検出可能な酵素であり、好ましくは、ルシフェラーゼ、SEAP、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択され、好ましくは、前記検出可能なレポーターの活性が光放射（ルミネセンス、化学ルミネセンス）である、[21]~[24]のいずれか1つに記載の方法。

【0041】

ウミシイタケルシフェラーゼ（本明細書中では「Luc」と略記される）が特に好ましい。最も好ましくは、実施例において例示されるように、レポーターは、高感度であり、生来的に分泌され、かつ、培養における細胞の馴化培地において、同様に、エクスピボでの動物の血液において検出することができ、これにより、細胞変数のリアルタイムでのモニタリングを可能にするGaussialルシフェラーゼである（Tannus他、Mol. Ther.、11 (2005)、435~43；Wurdinger他、Nat. Methods 5 (2008)、171~3）。代替において、レポーターはまた、NanoLuc（登録商標）ルシフェラーゼであることが可能である。例えば、Hall他、ACS Chem. Biol. 7 (2012)、1848~1857を参照のこと。別の実施形態において、検出可能部分は、検出可能な酵素の多数コピーを含む。そのようなことが、例えば、そのような酵素の多数コピー（これらは直列に連結されてもよく、または結合ドメインのどちらの側に位置してもよい）をコードするクローニングベクターの使用によって達成される場合がある。他の検出可能部分として、例えば、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質など）、および、様々な他の着色タンパク質、例えば、ClontechによってそれらのLiving Colors（商標）製品ラインで販売される着色タンパク質が含まれる。

【0042】

しかしながら、言及されたように、ルシフェラーゼおよび同等な発光酵素が特に好ましい。例えば、蛍光標識されたりリガンドを用いるアッセイでは、細胞、プラスチック容器および緩衝液のバックグランド自己蛍光に悩まされる。対照的に、本発明のLCBAアッセイでは、バックグランドでの光放射が何ら認められず、これは、ルシフェラーゼが少数の非常に特殊化された動物において見出されるだけであり、哺乳動物では見出されないからである。さらなる利点として、LCBAアッセイはまた、応答性の細胞株が存在する限り、細胞受容体が不明であるときにも機能する。最後に、本発明の細胞結合アッセイの1つの大きな利点が、このアッセイは、例えば、抗体の機能を、最大限に上流側にあるシグナル伝達カスケード内の所与の地点において評価することを可能にするという事実である。したがって、このアッセイは、例えば、反応混合物に存在する他のシグナル伝達分子（こ

10

20

30

40

50

れは、下流側のシグナル伝達事象を妨害することを誘発するかもしれない)によって影響されない。したがって、非常に複雑な混合物(例えば、血清など)を中和抗体の存在についてアッセイすることができる。

【0043】

先行技術分野において記載されるいくつかのアッセイでは、レポーター-抗原融合タンパク質が分泌されるのではなく、細胞内に発現させられ、このため、細胞を溶解して、融合タンパク質を集めることが要求される。このことは、かなり時間がかかることであるので、本発明のアッセイの好ましい実施形態では、標識されたりリガンドは、好ましくは分泌される組換え融合体である。したがって、1つの実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

[26]前記標識されたりリガンドが組換え融合タンパク質であり、好ましくは、宿主細胞によって発現され、かつ分泌される組換え融合タンパク質である、[21]~[25]のいずれか1つに記載の方法。

【0044】

本発明の方法において使用される標的細胞は、1つまたは複数のリガンド結合ドメインを生来的に、または遺伝子操作されて発現するどのような細胞であってもよい。例えば、目的とするリガンド結合ドメインを構成的に、または誘導時のどちらかで発現する遺伝子操作された細胞株(具体的には哺乳動物細胞株)が確立される場合がある。様々な好適な誘導体系(例えば、TETリプレッサー系など)が当業者には広く知られている。代替において、数種類のリガンド結合相互作用を調べるという観点では特に、標的細胞は、リガンド結合ドメインを発現させるときに遺伝子操作される場合があり、例えば、本発明の方法を実施することを始めるとき、リガンド結合ドメインをコードする適切な発現ベクターのトランスフェクションによって遺伝子操作される場合がある。同様に、リガンド-レポーター融合分子はまた、要求されるときに、例えば、融合型のリガンド-レポータータンパク質の場合には、融合タンパク質を宿主細胞において一過性に発現させることによって調製される場合がある。添付された実施例5もまた参照のこと。

【0045】

哺乳動物の標的細胞および宿主細胞は、任意の好適な技術を使用して、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーブローディング(scrape loading)、弾道学的導入または感染などを使用して発現ベクターによりトランスフェクションされる場合がある(例えば、Davis他、Basic Methods in Molecular Biology(1986)、および、Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版(Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989)を参照のこと)。ベクター発現を宿主細胞内において誘導するための様々な好適な条件がこの技術分野では広く知られている。トランスフェクションは一過性である場合があり、または、代替において、リガンド結合ドメインを安定的に発現する細胞株が、この技術分野では知られているように作製される場合がある。具体的には、Methods in Molecular Biology 7. Gene Transfer and Expression Protocols(编者: E. J. Murray, 1991年)を参照のこと。他方で、目的とするリガンド結合ドメインを内因的に発現する標的細胞もまた使用される場合がある。例えば、実施例5で使用されるHEK293T MSR細胞およびCOLO205結腸直腸ガン細胞を参照のこと。例えば、増殖因子受容体またはサイトカイン受容体を発現する細胞および細胞株をそれぞれ使用することができる(例えば、インターロイキン依存性細胞株など)。さらには、リガンド結合ドメインとしての膜結合型抗体に関する実施例9に記載される実験を考慮すると、抗原結合ドメインを発現する細胞が、膜結合型抗体およびT細胞受容体をそれぞれ発現するB細胞およびT細胞を含む標的細胞

10

20

30

40

50

胞として使用される場合がある。

【0046】

したがって、さらなる好ましい実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

[27] 前記標的細胞が前記リガンド結合ドメインを内在性に、一過性に、または安定的に発現する、[21]～[26]のいずれか1つに記載の方法、ならびに/あるいは、前記宿主細胞が前記融合タンパク質を一過性に発現する、[26]に記載の方法。

【0047】

原理的には、リガンド-レポーター融合体は、例えば、目的とするリガンドをレポーター部分とともにインビトロ翻訳することにより、または、目的とするリガンドをレポーター部分と化学的に連結することによって、別個に、また、生化学的手段によりそれぞれ作製される場合がある。代替において、レポーター部分を、物理的相互作用を介して、例えば、高親和性の系（例えば、ストレプトアビジン/ビオチン、または、金属（例えば、好ましくはコロイド状金など）による直接的な標識化など）を介して間接的に目的とするリガンドに連結することもまた可能である。原理的には、このことはまた、融合タンパク質についても、例えば、単離された固体形態で提供することができるサイトカインおよびリシフェラーゼの融合体などについても可能であろう。

10

【0048】

しかしながら、化学的に作製された融合タンパク質および/または単離された融合タンパク質を使用することの短所が、それらの調製のために、ならびに/あるいは、例えば、単離プロセス、乾燥および/または凍結乾燥の期間中において、リガンド成分が、当該リガンドがその結合ドメインにインビトロで結合することを反映するために必要なネイティブな立体配座をもはや有しないということ、そして、ネイティブな構造がまた、液体サンプルにおいて復元されないということであるかもしれない。このことは、システイン残基およびジスルフィド架橋を有するサイトカインおよびホルモン（例えば、G-CSFなど）についてはそれぞれ、特に当てはまる。これは、これらのサイトカインおよびホルモンは、それらの調製の期間中において変性する傾向があり、また、再折り畳みが過酷な条件のもとでのみ可能であるからである。

20

【0049】

対照的に、実施例において例示されるように、本発明によれば、リガンド-レポーター融合タンパク質を宿主細胞において一過性に発現させ、培養培地に分泌させることができる。目的とするリガンドをそのネイティブ形態で含むと考えられる融合タンパク質を含有する培養培地および培養物の上清はそれぞれ、すみやかな精製工程を何ら伴うことなく、本発明の方法においてそのまま使用することができる。実施例5を参照のこと。この実施形態では、融合タンパク質の発現および分泌を行わない宿主細胞、または、異なるリガンドとの融合タンパク質を発現し、分泌する宿主細胞から得られる培養培地および上清をそれぞれコントロールとして使用することが最も適している。したがって、特に好ましい実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

30

[28] 前記サンプルが前記宿主細胞の培養物の上清を含み、好ましくは、前記コントロールが、前記上清を伴わない培養培地、または、前記融合タンパク質の発現および分泌を伴わない同じ種類の細胞の培養物の上清である、[26]または[27]に記載の方法

40

【0050】

原理的には、どのような種類の細胞であれ、リガンド結合ドメインを発現すること、および、融合タンパク質を分泌することがそれぞれ可能である細胞が本発明の方法において使用される場合があり、ただし、この場合、哺乳動物細胞が標的細胞および宿主細胞としての使用のために好適である。Jurkat細胞、HEK293細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞、NSO細胞、Cos-7細胞、Hela細胞、MCF-7細胞、HL-60細胞、EL4細胞、A549細胞およびK562細胞を含む哺乳動物宿主細胞、ならびに、リガンド結合ドメインをコードするDNA、すなわち、リガンドに結合することができる細胞外のリガンド結合ドメインと、膜貫通領域とを有するバイオアッセイ受容体をコ

50

ードするDNAを含有し、かつ発現するように構成される適切な発現ベクターが、例えば、国際出願公開WO2007/060406に記載される（その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる）。しかしながら、国際出願公開WO2007/06040に開示されるバイオアッセイとは対照的に、本発明の方法に従って使用されるための受容体は、レポーター領域と、シグナルを伝えることができる1つまたは複数の細胞内のシグナル伝達領域とを含有する必要がない。むしろ、細胞外のリガンド結合ドメインと、必要な場合には膜貫通領域または別の膜固定ポリペプチド（これらのどちらかまたは両方が細胞外のリガンド結合ドメインに対して同種または異種であってもよい）との発現が、本発明の方法の目的のためには十分である。

【0051】

好ましくは、宿主細胞および標的細胞はそれぞれ、添付された実施例において使用される細胞であり、すなわち、ヒト胚性腎臓（HEK）293T MSR細胞、または、COLO205結腸直腸ガン細胞である。したがって、別の好ましい実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

[29]前記標的細胞および/または宿主細胞が、HEK293T MSR細胞、または、COLO205結腸直腸ガン細胞である、[21]～[28]のいずれか1つに記載の方法。好ましくは、標的細胞は、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞であり、かつ、サンプルは、IL-20-ルシフェラーゼ融合タンパク質を発現するHEK293T細胞の上清を含む、または、標的細胞は、膜貫通型の抗インターフェロンオメガ（IFNW）抗体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞であり、かつ、サンプルは、IFNW-ルシフェラーゼ融合タンパク質を発現するHEK293T細胞の上清を含む。

【0052】

実施例において示されるように、本発明の方法では、類似する結果が、標的細胞が工程（b）に先立って溶解されるか、または溶解されないかどうかにかかわらず得られる。このことは好都合であり、これは、標的細胞を、レポーターと連結される目的とするリガンドと接触させるための工程（a）においては、標的細胞は生存可能であること、そして、細胞膜は非変性状態であることがそれぞれ必要なだけであるからである。この工程の後、本発明の方法は、比較的ロバスタな条件のもとでの生化学的アッセイ（例えば、ELISAまたはLIPSアッセイなど）と類似する様式で行うことができる。したがって、代替

[30]前記標的細胞が工程（b）に先立って溶解されるか、または溶解されない、[21]～[29]のいずれか1つに記載の方法。

【0053】

図7に例示され、また、本明細書中前記で議論されるように、インビボでのリガンド結合を反映すること、そして、その感度を考慮すると、本発明の方法はまた、試験物質がリガンド結合に干渉することができること、すなわち、肯定的または否定的に干渉することができ、したがって、目的とするリガンドのそのコグネイトリガンド結合ドメインへの結合のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するかどうかを明らかにするために特に適している。したがって、さらなる重要な局面において、本発明は下記のアッセイに関連

[31]試験サンプルが、目的とするリガンドのそのコグネイトリガンド結合ドメインへの結合のアゴニストまたはアンタゴニストを含むかどうかを明らかにするためのアッセイであって、[21]～[30]のいずれか1つに記載される方法の工程を含み、ただし、工程（a）の前または期間中において、前記リガンドおよび/または前記標的細胞が前記試験サンプル（7）に供され、かつ、工程（b）において、前記試験サンプルの非存在下またはコントロールの存在下におけるレポーター活性と比較した場合の、

（i）レポーター活性の増大がアゴニストの指標となり、かつ

（ii）レポーター活性の低下がアンタゴニストの指標となる、アッセイ。

【0054】

10

20

30

40

50

本発明のアッセイが図7に例示され、実施例5においてさらに記載される。簡単に記載すると、本発明の上記方法では、試験物質、または、例えば、目的とするリガンドに対する抗体により、前記リガンドが標的細胞表面のそれぞれのリガンド結合ドメイン（例えば、前記リガンドのコグネイト受容体など）に結合できることが妨げられるかどうかの評価される。したがって、目的とするリガンドが工程（a）の前に、試験サンプルおよび試験物質とそれぞれ接触させられる場合があり、ただし、この場合、試験物質が目的とするリガンドに結合したときには、リガンド結合ドメインへのその結合が阻止される。その結果、リガンド-レポーター融合分子が結合したときには通常、観測可能であろうレポーター活性が、すべて一緒になって低下するか、または消失しており、したがって、このことはリガンド結合のアンタゴニストの存在を示している。代替において、標的細胞が工程（a）の前に、試験サンプルおよび試験物質とそれぞれ接触させられる場合があり、ただし、この場合、試験物質がリガンド結合ドメインに結合したとき、目的とするリガンドと結合するその能力が阻止されるであろうし、このことは結果的にはレポーター活性の低下または消失さえも再び引き起こし、したがって、アンタゴニストの存在を示している。さらに、特にリガンド結合のアゴニストを明らかにするためには、試験サンプルおよび試験物質がそれぞれ、工程（a）の期間中に試験細胞および目的とするリガンドと接触させられ、ただし、この場合には、例えば、目的とするリガンドのそのコグネイトリガンド結合ドメインとの複合体に試験物質が結合したとき、目的とするリガンドの結合ドメインへの結合が安定化される場合があり、結果として、リガンドの定量的なより大きい結合をもたらす。したがって、アゴニストの存在を示すレポーター活性の増大をもたらす。まとめると、当業者は、目的とするリガンドのそのコグネイトリガンド結合ドメインへの結合のアゴニストまたはアンタゴニストを明らかにするために本発明のアッセイを使用することの様々な可能性を十分に認識するであろう。

10

20

30

40

50

【0055】

用語「アゴニスト」および用語「アンタゴニスト」はそれぞれ、本発明に関連して使用される場合、抗体およびその生物工学的誘導体により例示されるが、目的とするリガンドに対する結合、そのコグネイトリガンド結合ドメインに対する結合、または両者の複合体に対する結合が可能であり、それにより、リガンド-受容体の結合を刺激する（例えば、補助する）こと、または、リガンドのその結合ドメインとの相互作用を打ち消す（例えば、妨げる）ことが可能である他の非抗体分子もまた包含する。したがって、試験サンプルにおける化合物には、抗体、小分子（例えば、NCEなど）および他の薬物、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチド、ペプチド模倣体、脂質、炭水化物および核酸、アンキリン、受容体、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子、シャペロン（例えば、熱ショックタンパク質（HSP）など）、ならびに、細胞-細胞接着分子（例えば、カドヘリンスーパーファミリー、インテグリンスーパーファミリー、C型レクチンスーパーファミリーおよび免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのメンバーなど）が含まれる。それにもかかわらず、明瞭性だけのために、また、本発明の範囲を限定することなく、下記の実施形態のほとんどが、治療剤および診断剤を開発するための好ましい「アゴニスト」および「アンタゴニスト」を代表する抗体および抗体様分子に関して議論される。最も好ましくは、試験サンプルに存在する目的とする化合物は抗体である。

【0056】

加えて、実施例9を参照して上記で説明されるように、本発明のアッセイはまた、例えば、候補の抗リガンド抗体が所与のリガンドの同じエピトープまたは異なったエピトープに結合するかどうかを調べるために競合アッセイおよび交差競合アッセイとしてそれぞれ適用される場合がある。本発明による交差競合アッセイを例示する実施例9および図18を参照のこと（この場合、2つの抗インターフェロン抗体（8H1および26B9）がインターフェロン- γ の異なったエピトープに結合することが示される）。その結果、本発明のアッセイの1つの実施形態において、標的細胞は膜結合型抗体またはそのリガンド結合ドメインを発現し、かつ、目的とするリガンドの結合のアゴニストおよびアンタゴニストはそれぞれ、同じ種類の抗リガンド抗体または似ている候補の抗リガンド抗体である場

合がある。したがって、この実施形態において、本発明のアッセイは競合アッセイおよび交差競合アッセイとしてそれぞれ使用され、ただし、この場合、リガンド結合ドメインおよびアゴニスト/アンタゴニストは、同じリガンド結合分子に由来する。

【0057】

実施例および図において、本発明のアッセイが抗リガンド抗体の特定および単離に関して例示される。しかしながら、当業者によって理解されるであろうように、本発明のアッセイはまた、リガンド結合ドメインと相互作用する化合物、例えば、リガンドの受容体と相互作用する化合物を特定し、単離することが可能である。例えば、受容体のリガンド結合ドメインを認識する抗体は、リガンドが受容体に結合することを妨げる場合があり、それにより、このことは、分析されるサンプルからレポータータグ化リガンドが失われるためにレポーター活性の低下を生じさせ、したがって、アンタゴニスト抗体の存在を示している。

10

【0058】

別途示される場合を除き、用語「試験サンプル」は、用語「試験物質」または用語「試験化合物」と本明細書中では交換可能に使用される場合があり、通常の場合には、試験物質が典型的にはサンプルとして提供されること、例えば、溶媒中に存在し、かつ/または、試験物質の所与の回分物から採取されることを示している。同様に、本発明のアッセイは、例えば、薬物開発のどの段階においても使用することができるので、試験サンプルは、例えば、化学合成からの反応混合物、天然供給源のサンプル（例えば、土壌サンプル、水サンプル、微生物の調製物、体液およびその他）、食品製造および薬物製造の中間段階から採取されるサンプル、ならびに、薬学的使用前の薬物の前臨床回分物からのサンプルであることが可能である。したがって、「試験サンプル」は、推定されるアゴニストまたはアンタゴニストを単独で、または他の成分との関連でのどちらであっても含有するどのような種類のものであり得る。実施例において例示されるように、試験サンプルは好ましくは、目的とするリガンド、リガンド結合ドメインおよび/またはこれらの複合体と結合することができる抗体または同等な分子を含有する体液（例えば、血漿など）である場合がある。

20

【0059】

したがって、特定の好ましい実施形態において、本発明は下記のアッセイに関連する。

[32] 前記試験サンプルが、(i) 抗リガンド抗体、そのリガンド結合断片、またはそれらの合成または生物工学的誘導体、あるいは、(ii) 抗リガンド受容体(LR)抗体、そのLR結合断片、またはそれらの合成または生物工学的誘導体を含み、好ましくは、前記抗体がヒト由来抗体であり、かつ、必要な場合には、前記コントロールが非リガンド結合抗体または非LR結合抗体である、[31]に記載のアッセイ。

30

【0060】

下記でさらに説明されるように、本発明のアッセイは、所望される特異性を有する抗体または同等な結合分子が、被験体（例えば、抗原（例えば、目的とするリガンド）により免疫化されている哺乳動物、あるいは、他の場合には、例えば、内部刺激または外部刺激（例えば、障害または病原体感染、ストレスおよび中毒など）によって惹起される哺乳動物における免疫応答のために、抗リガンド抗体を産生することが予想されるかもしれない哺乳動物）に由来するサンプルに存在することを明らかにするために特に適している。他方で、あるレベルの運動または効果的ストレスは免疫系を活性化し、そして、一般的な疾患（例えば、風邪、流感およびガンなど）からの保護をもたらす場合があることが知られているので、被験体は、対応する経験をサンプル採取前に十分に行っていたかもしれない。したがって、好ましい実施形態において、本発明は下記のアッセイに関連する。

40

[33] 前記サンプルが体液に由来し、好ましくは、抗リガンド抗体または抗LR抗体を含有することが疑われる被験体から得られる血清であり、好ましくは、前記被験体が、自己免疫障害もしくは炎症性障害、病原体感染、またはガンに罹患する、[31]または[32]に記載のアッセイ、ただし、この場合、顕著な疾患経過を有する被験体、すなわち、安定な疾患を有する被験体は、疾患と闘う抗体の存在が示されることがあるように、

50

あるいは、前記被験体は運動を行っているか、または効果的ストレスを経験しているように、寛解状態にあるか、または、疾患を克服している。

【0061】

実施例5に例示され、また、図7、図8および図14に示されるように、本発明の方法およびアッセイを行うための異なる様々な方法が存在する。例えば、リガンド結合の特異性を明らかにするために、また、競合性阻害剤を特定するためにそれぞれ、細胞でのリガンド結合レポーターアッセイが競合剤（例えば、リガンドまたは阻害剤）の存在下で行われる場合があり、例えば、異なるが、目的とするリガンドに対して近縁であり、かつ、非標識であり得るか、または、目的とするリガンドに連結されるレポーターとは異なるレポーターにより標識され得るかのどちらかであるレポーターまたはリガンドを有しないことを除いて同じリガンドの存在下で行われる場合がある。下記で、具体的には二重ルシフェラーゼアッセイに関して記載される実施形態もまた参照のこと。例えば、目的とするリガンドの親和性または競合性リガンドの生物学的活性に関する情報を得るために、例えば、競合性リガンドがリガンド結合の後で目的とするリガンドに取って代わることができるかどうかに関する情報を得るために、試験細胞が目的とするレポータータグ化リガンドに供される前に、または供されるのと同時に、または供された後で、（推定される）競合性リガンドが加えられる場合がある。同様に、代替において、または加えて、試験物質を有する試験サンプルは、標的細胞をリガンドと接触させる前に、または標的細胞をリガンドと接触させるのと同時に、または標的細胞をリガンドと接触させた後で加えられる場合がある。試験物質が、目的とするリガンドに結合すること、または、標的細胞表面に存在するリガンド結合ドメインに結合すること、または両方が疑われるかどうかに依存して、目的とするリガンドまたは標的細胞のどちらかが試験物質とブレインキューベーションされる場合がある。これに関連して、リガンドおよびリガンド結合ドメインとそれぞれ結合しない分子が、目的とするリガンドおよび標的細胞を試験サンプルとインキュベーションする前に、またはインキュベーションしている期間中に、またはインキュベーションした後で、好ましくは過剰に加えられる場合がある。したがって、1つの実施形態において、本発明は下記のアッセイに関連する。

[34] 前記リガンドまたは前記標的細胞が試験サンプルとブレインキューベーションされ、あるいは、コントロールとして、非リガンド結合分子もしくは非LR結合分子または過剰濃度の非標識リガンド、および/または、異なり、かつ、非標識であるか、もしくは異なるレポーターにより標識されるリガンドとブレインキューベーションされる、[31]~[33]のいずれか1つに記載のアッセイ。好ましくは、コントロールのリガンドは、目的とするリガンドに対して近縁のものであり、かつ/あるいは、コントロールの非リガンド結合分子または非LR結合分子は試験物質に対して近縁のものである。

【0062】

これに関連して、本発明のアッセイではまた、試験サンプルおよび試験物質がそれぞれ、例えば、類似するが、異なるサイトカインに対する結合、ならびに/あるいは、例えば、1つまたは複数のサイトカイン受容体におけるリガンド結合ドメインの異なる部位に対するそれらの結合を識別することができることを明らかにすることができる。そのようなことを行うために、好ましい実施形態において、目的とする1つまたは複数の異なる抗原（例えば、サイトカイン）が使用され、そして、例えば、異なるルシフェラーゼまたは蛍光タンパク質がレポーターとして使用される場合には異なる波長の光が放射されるために、連続的または同時に好ましくは評価することができる異なるシグナルを生じさせるレポーター部分により標識される。この実施形態では、例えば、Promega Corporation (2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711, 米国)によって提供されるルシフェラーゼレポーターアッセイ系(The Dual-Luciferase (登録商標) Reporter (DLR (商標)) Assay System)が本発明に従って適合化され、使用されることが可能であり、ただし、この場合、1つのサイトカインがホタルルシフェラーゼにタグ化され、第2のサイトカインがウミシイタケルシフェラーゼにタグ化される。本発明のアッセイに従って、目

10

20

30

40

50

的とする第1のリガンドに融合されるホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼの活性と、目的とする第2のリガンドに融合されるウミシイタケ (*Renilla reniformis*、または、*sea pansy*) ルシフェラーゼの活性とが、1個のサンプルから連続して測定される。ホタルルシフェラーゼレポーターが、ルシフェラーゼの基質 (例えば、ルシフェラーゼアッセイ試薬 I I (LAR I I)) を加えて、少なくとも1分間持続するルミネセンスシグナルを生じさせることによって最初に測定される。ホタルルミネセンスを定量した後、この反応は停止させられ、ウミシイタケルシフェラーゼの反応が、Stop & Glo (登録商標) 試薬を反応液に加えることによって同時に開始される。

【0063】

したがって、この実施形態では、所与の試験物質 (例えば、抗サイトカイン抗体) が、1つのサイトカインに対する、別のサイトカインよりも優先的な結合、または、1つのサイトカインについての受容体のリガンド結合部位に対する優先的な結合を示し、その一方で、存在するならば、別のリガンド結合ドメインを本質的には影響されないままにするかどうかを容易に明らかにすることが可能である。

【0064】

原理的には、候補抗体または同等なヒトサイトカイン結合剤が、どのような供給源であれ、古典的なハイブリドーマ法、ならびに、コンビナトリアルライブラリーを含めて、合成抗体および抗体様のサイトカイン結合分子を製造するための可能な供給源によって提供され得るかもしれない。したがって、抗体工学は、十分に発達した領域となっており、天然型および非天然型のヒト抗体レパートリーのための発見法、作製戦略および改変技術、ならびに、非コンビナトリアル戦略およびコンビナトリアル戦略によるそれらのマイニングを包含する。これにはまた、ハイブリドーマ技術、末梢B細胞のクローン増殖、単細胞PCR、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、哺乳動物細胞ディスプレイおよびインシリコ設計に基づく方法を使用する、ナイーブなヒト抗体レパートリー、免疫性のヒト抗体レパートリー、遺伝子組換えヒト抗体レパートリーおよび合成ヒト抗体レパートリーからのヒト抗体 (mAb) の製造および選択が含まれる。天然型および非天然型のヒト抗体レパートリーの特徴、ならびに、非コンビナトリアル戦略およびコンビナトリアル戦略によるそれらのマイニングの総説については、例えば、BeerliおよびRader、Mining human antibody repertoires、mAbs 2 (2010)、365~378、ならびに、Campbell他、British Journal of Pharmacology 162 (2011)、1470~1484を参照のこと (それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。

【0065】

しかしながら、以前に言及されたように、本発明の方法の好ましい実施形態において、候補の抗ヒトサイトカイン抗体またはそのサイトカイン結合断片は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を単離することを含み、前記モノクローナル抗体を発現するB細胞が、被験体哺乳動物から得られるサンプルから単離される方法によって提供されるヒト抗体に由来する。過去数十年間において、いくつかの技術が、モノクローナル抗体を単離するために、また、ヒト化抗体または完全にヒト抗体を作製するために開発されている。例えば、欧州特許EP 1974020 B1としてもまた特許付与される国際出願公開WO 2007/068758において、特に[0002]節~[0027]節において引用される参考文献を参照のこと (それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。典型的には、抗体の単離、例えば、モノクローナル抗体をB細胞から単離することは、免疫グロブリン遺伝子のクローニングおよび発現に依拠している。このことを、B細胞から得られるスクランブル化されたV_H 遺伝子およびV_L 遺伝子のファージディスプレイライブラリーを使用することによって、あるいは、単細胞PCRを使用してただ1個のB細胞から得られる、または、不死化されたB細胞クローンから得られる対形成させたV_H 遺伝子およびV_L 遺伝子の単離によって行うことができる。

【0066】

本発明によれば、自己免疫疾患および/または炎症性疾患に罹患する患者のB細胞に起源を有した候補の抗ヒトサイトカイン抗体を使用することは特に有益であること、すなわち、特にヒト抗体を提供するために特に有益であることが判明した。したがって、1つの実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

[3 5] ヒト由来モノクローナル抗リガンド抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体を調製する方法であって、前記モノクローナル抗体を発現するB細胞が、哺乳動物から得られるサンプルから単離され、好ましくは、前記哺乳動物が、損なわれた中枢性寛容および/または末梢性寛容あるいは自己寛容の喪失、例えば、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー (A P E C E D) に冒されており、

- (a) 前記サンプルを抗リガンド抗体の存在についてアッセイすること、
 - (b) B細胞 (好ましくはメモリーB細胞) を、抗リガンド抗体を含有することが特定されているサンプルから精製すること、
 - (c) 前記B細胞を培養し、必要な場合には、前記B細胞のサンプルを前記抗体の生物学的活性についてアッセイし、かつ
 - (i) 前記モノクローナル抗体を単離すること、または
 - (i i) 前記抗体の少なくとも可変領域についての免疫グロブリン遺伝子レパートリーを前記B細胞またはメモリーB細胞から得ること、および
 - (d) 前記レパートリーを使用して、前記抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体を宿主細胞において発現させ、前記抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体を単離すること、
 - (e) 前記抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体のサンプルの生物学的活性をアッセイすること
- を含み、必要な場合にはさらに下記の工程、
- (f) 前記単離された抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体を薬学的に許容される担体と混合する工程
- を含み、

前記リガンドが、前記項 [2 1] ~ 項 [3 4] のいずれか一項で定義されるようなりガンドであり、かつ、前記サンプルおよび抗体を、工程 (a)、工程 (c) および/または工程 (e) においてそれぞれアッセイすることが、[3 1] ~ [3 4] のいずれか1つに記載されるアッセイに従って行われることを特徴とする、方法。

【 0 0 6 7 】

抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体の組換え製造を、この技術分野では広く知られている方法によって行うことができる。必要な場合には、免疫グロブリン遺伝子レパートリー、すなわち、前記抗リガンド抗体の少なくとも可変領域をコードするDNAが、制限部位を導入するために、コドン使用頻度を変更するために、機能的領域またはペプチドリンカーのためのコード配列を導入するために、かつ/あるいは、転写調節配列および/または翻訳調節配列を加え、または最適化するために操作される。ただ1個の選別された細胞のRT-PCRが好ましくは、前記抗体のための免疫グロブリン遺伝子レパートリーを得るために用いられる。とりわけ単細胞RT-PCRを使用してヒト抗体を得る方法が、例えば、国際出願公開WO2008/110372に記載され (その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)、具体的には補足方法の節および実施例2に記載される。本明細書中で使用される場合、用語「cDNA」および用語「mRNA」はすべての形態の核酸を包含し、これには、ゲノムDNA、cDNAおよびmRNAが含まれるが、これらに限定されない。抗体または抗体断片のクローニングおよび異種発現を、当業者の範囲内にある分子生物学および組換えDNAの従来技術を使用して行うことができる (Wrammert 他、Nature、453 (2008)、667~671、および、Meijer 他、J. Mol. Bio. 358 (2006)、764~772)。そのような様々な技術が、文献において、例えば、Sambrook、1989 Molecular Cloning; A Laboratory

10

20

30

40

50

Manual第2版において詳しく説明されている。VH/VL配列の回収および発現については、Tiller他の方法(J. Immunol. Methods、329(2008)、112~124)を使用することができる。組換えヒト抗体を発現させるための適切な宿主細胞はどれも使用されてよく、例えば、酵母、植物細胞または動物細胞が使用されてよい。好ましくは、哺乳動物宿主細胞、例えば、CHO細胞およびHEK細胞などが使用される；例えば、欧州特許EP1974020B1もまた[0164]節~[0171]節において参照のこと(その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。

【0068】

1つの実施形態において、本発明の抗体の定常領域またはその一部(具体的にはCH2ドメインおよび/またはCH3ドメイン、しかし、必要な場合にはCH1ドメインもまた)は、本発明の方法に従って単離されるネイティブのヒトモノクローナル抗体の可変領域に対して異種である。これに関連して、異種の定常領域は、本発明の抗体の治療適用の場合には好ましくはヒト起源であり、しかし、動物研究の場合には、例えば、齧歯類起源であり得る。

10

【0069】

被験体哺乳動物の使用に関して、特に、自己免疫障害および/または炎症性障害に罹患するヒト患者の使用に関して、候補抗体は好ましくは、自己寛容の乱された発生または脱調節された発生(好ましくは、一遺伝子性の自己免疫障害によって引き起こされるもの)に起因することがある、あるいは伴うことがある損なわれた中枢性寛容および/または末梢性寛容あるいは自己寛容の喪失に冒される哺乳動物(具体的にはヒト)から単離される。本発明による自己抗体のための特に好適な供給源を提供する動物の例が哺乳動物であり、例えば、AIRE(自己免疫調節因子)遺伝子における変異に伴う障害を有するヒト、例えば、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群タイプ1(APS1)および自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー(APECED)をそれぞれ有するヒト(Peterson他、Nat. Rev. Immunol. 8(2008)、948~957)、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群タイプ2(APS2)を有するヒト(Baker他、J. Clin. Endocrinol. Metab. 95(2010)、E263~E270)、ならびに、X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群(IPEX)を有するヒト(Powell他、J. Pediatr. 100(1982)、731~737; Ochs他、Immunol. Rev. 203(2005)、156~164)などである。好ましくは、候補抗体が単離される被験体哺乳動物は、所定のヒトサイトカインに対する血清反応性を呈示し続けている。APECED/ASP1患者およびそれらのオートイムノソームのスクリーニングに関するさらなる詳細については、本出願人の国際出願公開WO2013/098419の記載(その開示内容はその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)、そして、それに記載される実施例、特に、112頁~117頁における「材料および方法」の節、117頁~118頁における実施例1、ならびに、128頁における実施例7および続く表1~表14、ならびに、168頁~171頁における実施例17を参照のこと(それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。

20

30

40

【0070】

これに関連して、原理的には言及されるように、ヒト抗体の生成がいくつかの抗原クラス(例えば、アミロイド-ベータ抗原およびウイルス抗原など)について報告されているにもかかわらず、ヒト生体において成熟化した、単離されたおよび組換えのヒト抗サイトカイン抗体の提供は未だ報告されていないようであることは注目される。したがって、本発明によれば、ヒトの候補抗ヒトサイトカイン抗体が好ましくは、ヒト抗体を単離する新規かつ独占権下の方法によってクローン化される；なお、この方法は本出願人の国際出願公開WO2013/098420に開示されており、その開示内容はその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。簡単に記載すると、目的とする抗体を単離するためのサンプルは、生じ得る可能な抗体反応性を検出するために、末梢血単核細胞(PBMC)と

50

、血清とを含むか、または、末梢血単核細胞（P B M C）と、血清とからなる。被験体に由来するサンプルは、例えば、所望される抗原（1つまたは複数）の1つまたは複数に対する血清反応性を試験するためにそのまま使用される場合があり、あるいは、さらに処理される場合があり、例えば、Bリンパ球について富化される場合がある。具体的には、サンプルは、目的とする抗体を産生するB細胞を含むこと、最も好ましくはメモリーB細胞を含むこと、または、そのようなB細胞に由来すること、最も好ましくはメモリーB細胞に由来することが好ましい。メモリーB細胞は、B細胞の一定の寿命のみを可能にする条件のもと、典型的にはわずか1週間～2週間、所望される抗原に対して反応性である細胞をB細胞培養物から選抜するまで培養され、その後、続いて、単一の選別された細胞のR T - P C Rが、免疫グロブリン遺伝子レポーターを得るために行われる；詳細な記載については、国際出願公開W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 1 9 の 1 1 8 頁～120頁における実施例1および実施例2、ならびに、特に、国際出願公開W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 2 0 の 2 7 頁～31頁における実施例1～実施例4、ならびに、図1および図6を参照のこと（それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる）。

10

【0071】

実際、自己免疫障害および/または炎症性障害（例えば、A P E C E D など）に罹患する患者の使用に関して、本出願人の国際出願公開W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 1 9 および同W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 2 0 に開示される方法は、抗ヒトサイトカイン抗体を単離するために特に好適であることが判明した。

20

【0072】

本発明の単離された抗体は、当然のことながら、そのままの状態、患者に適用されるのではなく、通常の場合には、例えば、患者におけるその安定性、受容性および生物学的利用能を保証するために薬学的に製剤されなければならない。したがって、1つの実施形態において、本発明の方法はさらに、単離され、かつ検証された候補抗体またはそのサイトカイン結合断片を薬学的に許容され得る担体と混合する工程を含む。薬学的に許容され得る担体の綿密な議論が、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N. J., 1991)、および、Gennaro (2000)、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第20版、ISBN: 0683306472)において得ることができる。投与のための好ましい形態には、非経口投与のために好適である形態が含まれ、例えば、注射または注入による非経口投与、例えば、ポラス注射または連続注入による非経口投与のために好適である形態が含まれる。製造物が注射または注入のためのものである場合、製造物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルにおける懸濁物、溶液またはエマルジョンの形態を取る場合があり、また、医薬配合物において一般に使用される薬剤（例えば、懸濁化剤、保存剤、安定化剤および/または分散化剤など）を含有する場合がある。代替において、抗体分子は、適切な無菌液体により使用前に再構成されるために乾燥形態である場合がある。製剤されると、組成物は被験体に直接に投与することができる。組成物は、ヒト被験体への投与のために適合化されることが好ましい。医薬組成物は、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路、動脈内経路、髄内経路、腹腔内経路、クモ膜下腔内経路、脳室内経路、経皮 (transdermal) 経路、経皮 (transcutaneous) 経路、局所的経路、皮下経路、鼻腔内経路、経腸経路、舌下経路、膻内経路または直腸経路（これらに限定されない）を含めて、いくつかの経路によって投与される場合がある。

30

40

【0073】

本発明の抗体またはその断片は治療剤として直接に使用される場合がある。しかしながら、1つの実施形態において、本発明によって提供されるヒト抗ヒトサイトカイン抗体またはそのサイトカイン結合断片は検出可能に標識され、または薬物に結合させられ、ただし、この場合、例えば、検出可能な標識が、酵素、放射性同位体、蛍光団および重金属からなる群から選択される。本発明の標識されたヒト抗ヒトサイトカイン抗体またはサイトカイン結合断片は、特異的な標的を、インビトロでのアッセイのような「免疫化学/免疫

50

標識化」を含めてインビボまたはインビトロで検出するために使用される場合がある。インビボにおいて、本発明の標識されたヒト抗ヒトサイトカイン抗体またはサイトカイン結合断片は、目的とする抗原を発現する組織、細胞または他の材料を検出するために、核医学画像化技術と類似するような様式で使用される場合がある。様々な標識、診断学におけるそれらの使用、および、本発明のヒトサイトカイン結合分子へのそれらのカップリングが、当業者には知られている。これに関連して、1つの実施形態において、薬学的使用の用語には、インビボでの診断使用、具体的にはヒトにおけるインビボ画像化が含まれる。

【0074】

したがって、本発明はまた、ヒト抗ヒトサイトカイン抗体またはそのサイトカイン結合断片を、上記で特定された自己免疫性および/または炎症性の障害および疾患のいずれか1つの処置における薬学的使用のために、または治療的介入のための標的として調製する方法であって、本発明の上記方法のいずれかのその工程を含み、必要な場合には、前記ヒト抗ヒトサイトカイン抗体またはそのサイトカイン結合断片が検出可能に標識され、あるいは機能的領域または薬物に結合させられ、好ましくは、前記検出可能な標識が、酵素、放射性同位体、蛍光団および重金属からなる群から選択される、方法に関連する。

10

【0075】

当然のことながら、当業者は、本明細書中先におよび実施例において記載されるような本発明の方法およびアッセイが概して、リガンド結合を妨げる薬物の所与の回分物 (batch) を、例えば、品質検査のために検証し、薬学的使用のためのそのような回分物を選択すること、例えば、本発明のアッセイにおいて十分に活性であること、すなわち、リガンド結合を効果的に打ち消すことまたは刺激することにおいて十分に活性であることが判明するそのような回分物を選択することのために適用され得ることを理解するであろう。したがって、さらなる実施形態において、本発明は下記の方法に関連する。

20

[36] 自己免疫障害、炎症性障害、がん、または、受容体に対するリガンド結合によって媒介される障害を処置する際に使用されるための、抗リガンド抗体またはそのリガンド結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体を含む医薬組成物を調製するための方法であって、

(a) 抗リガンド抗体を提供すること、

(b) 前記抗体を [31] ~ [34] のいずれか1つに記載されるアッセイに供すること、および

30

(c) 前記抗体がアンタゴニストまたはアゴニストであることが明らかにされる場合にだけ、前記抗体またはその誘導体を医薬組成物に製剤することを含む、方法。

【0076】

本発明ではまた、本明細書中に記載される方法およびアッセイにおいて使用されるための試薬がキットの形態で含有されることが意図される。そのようなキットは、好適な包装材に含有されて、第1の結合試薬およびレポーター（これらは別々であっても、または連結されていてもどちらであってもよい）と、第2の結合試薬とを含むであろう（両者は上記で記載される通りである）。キットは必要な場合にはさらに、他の構成要素、例えば、キットの使用のための説明資料、第1の結合試薬のレポーターを検出するための試薬（例えば、緩衝液、検出可能な酵素と接触させられたときに光を生じさせる化合物など）、比較目的または校正目的のための陽性コントロールなどを含む場合がある。

40

したがって、さらなる実施形態において、本発明は下記のキットに関連する。

[37] [21] ~ [30] のいずれか1つに記載される方法または [31] ~ [34] のいずれか1つに記載されるアッセイを行うために有用であるキットであって、

(a) レポーター (4) により標識される目的とするリガンドを含有するサンプル (3)、および/または、リガンド-レポーター融合タンパク質を発現し、かつ、好ましくは分泌することができる宿主 (レポーター) 細胞、または、そのための調製のための手段、

(b) 細胞内機能的領域 (2) を必要な場合には含む前記リガンド結合ドメインを発現する標的細胞 (1)、または、その調製のための手段、

50

(c) レポーター活性(5)を明らかにするための手段(6)を含み、

好ましくは、前記方法およびアッセイをそれぞれ行うための説明書を含む、キット。

【0077】

適切な標的細胞および宿主細胞、ベクター、リガンド、受容体ならびにレポーターが、本明細書中前記および実施例において記載されている。ウミシイタケルシフェラーゼ融合体のためのプラスミドが、以前に、例えば、Burbellio他、BMC Biotechnol.、5(2005)、22、および、国際出願公開WO2006/071970に記載されている。Promega Corporation(2800 Woods Hollow Road、Madison、WI 53711、米国)によって提供されるpRLウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター、および、そのようなレポーターベクターを使用するための対応する技術冊子もまた参照のこと。

10

【0078】

さらに、InvivoGen(5、rue Jean Rodier、F-31400 Toulouse、フランス)によって提供されるレポーター検出キット、すなわち、その分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーター遺伝子系(この場合、SEAPが、比色アッセイのQUANTI-Blue(商標)DetectionおよびHEK-Blue(商標)Detectionを使用して(InvivoGenレポーター細胞のような)培養細胞の上清における酵素活性を測定することによって容易に定量される);分泌型の合成セレンテラジンルシフェラーゼLucialレポーター遺伝子系(この場合、Lucialルシフェラーゼを、すぐに使用できる生物発光アッセイ試薬QUANTI-Luc(商標)および-galactosidase(LacZ)レポーター遺伝子系を使用して細胞培養上清において直接に測定することができる)が、本発明に従って適合化され、使用される場合がある:例えば、InvivoGenレポーター細胞とは対照的に、本発明によるレポーター(上記で定義されるような宿主細胞)細胞株はリガンド-レポーター融合タンパク質(例えば、SEAPまたはLucialルシフェラーゼに融合されるサイトカイン)を発現し、好ましくは分泌する。第2の、すなわち、標的細胞株は、1つまたは複数のリガンド結合ドメインを発現し、例えば、膜固定ポリペプチドに好ましくは連結される1つまたは複数のサイトカイン受容体または少なくともそれらのリガンド結合ドメインを発現する。加えて、または代替において、本発明のキットは、レポーター(宿主)細胞および標的細胞の一方または両方のために、適切な細胞にトランスフェクションされたとき、所望されるレポーター細胞および標的細胞をそれぞれ生じさせる対応する発現ベクターを含む。

20

30

【0079】

したがって、好ましい実施形態において、本発明は下記のキットに関連する。

[38]方法およびアッセイを[21]~[37]のいずれか1つに従ってそれぞれ行うために有用であるキットであって、

(a) [6]に記載される組換え融合タンパク質をコードするDNA、または、前記レポーターをコードするDNA配列、および、目的とするリガンドをコードするDNAまたはその断片のための挿入部位を含む少なくとも1つの第1の発現ベクター、ならびに/あるいは

40

(b) 必要な場合には、目的とする前記リガンドの1つまたは複数のリガンド結合ドメインをコードするDNAを含む少なくとも1つの第2の発現ベクター、

(c) 陽性コントロールとして使用される前記レポーターを単独でコードするDNAを含む少なくとも1つの第3の発現ベクター、

(d) 工程(c)の前記レポーターを中和する少なくとも1つのコントロール抗体、または、代替において、レポーター結合の競合性阻害剤としての非標識の組換えリガンド、

(e) 少なくとも1つの希釈緩衝液、

(f) 少なくとも1つのアッセイ緩衝液、

(g) 前記レポーターの基質を含む少なくとも1つの染色溶液、

50

(h) 必要な場合には、バイオルミネセンス生成系によって生じる光のスペクトルを変化させるスペクトルシフト剤である化合物、および、必要な場合には、前記レポーターの存在または活性を検出するための手段

を含み、

好ましくは、前記方法およびアッセイをそれぞれ行うための説明書を含む、キット。

【0080】

本発明のキットには、例えば、キットを含む容器の内部に、医薬品または生物学的製造物の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められる形式での通知が伴い得る(ただし、そのような通知は、ヒト投与のための製造、使用または販売の当局による承認を反映する)。加えて、または、代替において、キットは、適切な診断アッセイにおいて使用されるための試薬および/または説明書を含む。本発明の組成物、すなわち、キットは、当然のことながら、本発明による方法およびアッセイを行うために特に好適であり、具体的には、目的とするリガンドの上記で述べられるようなりガンド結合ドメインへの結合を評価するために適用可能である。

【0081】

診断目的のために有用である分子生化学および細胞生化学における様々な一般的方法を下記のような標準的な教本において見出すことができる: Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版 (Sambrook 他、Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology 第4版 (Ausubel 他編、John Wiley & Sons、1999); Protein Methods (Bollag 他、John Wiley & Sons、1996)。診断目的のための様々な試薬、検出手段およびキットが、様々な商業的販売者から、例えば、Pharmacia Diagnostics、Amersham、BioRad、Stratagene、Invitrogen および Sigma-Aldrich などから、ならびに、本明細書中に引用される参考文献(特に特許文献)のいずれか1つに与えられる供給源から入手可能である。

【0082】

本発明の方法およびアッセイ、ならびに、キットの構成成分が、下記の図および実施例において例示される。

【0083】

図、図の説明文および実施例において開示される特徴のどれもが個々に、または組合せて、請求項および上記に記載される実施形態 [21] ~ [38] における特徴を例示していることを理解しなければならない。したがって、請求項および対応する上記の実施形態における特徴のどれもが、図、図の説明文および実施例において使用される対応する特徴の具体的な実施形態の1つまたは複数によって置き換えられる場合がある。このことは、リガンド結合ドメイン(例えば、サイトカイン受容体)およびリガンド-レポーター(例えば、サイトカイン-ルシフェラーゼ)融合タンパク質を発現させるための標的細胞および宿主細胞、ならびに、それらを使用するための発現ベクターに関して特に当てはまる。加えて、本発明はまた、本発明の方法およびアッセイの実施形態のいずれか1つで使用されるための、図、図の説明文および実施例に記載される材料および方法のいずれにも関連することを理解しなければならない。完全性のために、当業者は、説明、実施例および図が、本出願において開示されるのと同じ発明に関連し、かつ、本出願が優先権を主張する欧州特許出願 EP 1 4 1 7 5 5 8 5 . 0 および同 EP 1 4 1 7 5 6 7 3 . 4 の開示内容(特に実施例および図)により補足され得ることを理解するであろう。

本発明のさらなる実施形態が下記の説明および実施例から明らかであろう。交換可能に使用されるとき、また、別途示されないならば、「モノクローナル抗体」、「mAb」、「MAB」および「MAb」の用語は本明細書中では交換可能に使用される。そのうえ、本発明は、最初は本発明に従って行われる、実施例に記載される実験において得られるヒト由来抗体に言及することによって例示され、また、記載されるが、本発明の抗体または

10

20

30

40

50

抗体断片には、主題抗体の機能的性質の1つまたは複数保持する、具体的にはIL-20に対するその中和活性を保持する操作された抗体または抗体様のIL-20結合分子（これらは化学的技術または組換え技術によって合成される）をどのようなものであっても意味する抗体の合成および生物工学的誘導体が含まれることを理解しなければならない。したがって、本発明は、簡潔さのために、抗体に言及することによって記載されることがあるが、別途述べられる場合を除き、その合成および生物工学的誘導体、ならびに、同等なIL-20結合分子が同様に意味され、抗体の用語の意味で含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】本発明のIL-20特異的ヒト抗体の可変領域、すなわち、重鎖およびカッパ/ラムダ軽鎖（VH、VL）のアミノ酸配列。A：抗体20A10（IgG4、カッパ）；B：抗体2A11（IgG1、ラムダ）；C：抗体7D1（IgG1、ラムダ）；D：抗体6E11（IgG1、ラムダ）。フレームワーク領域（FR）および相補性決定領域（CDR）が示され、CDRには下線が引かれる。斜体字のアミノ酸は、配列決定がなされていないが、データベースから得られている配列を示している。

10

【図2】APS1患者から単離される血清におけるIL-20のLIPS血清反応性の比較。個々の患者がX軸に示され、MAB結合のRLU測定値がY軸に示される。患者APS1-2および患者APS1-9の血清により、高まったIL-20反応性が示される。

【図3】GaussialシフェラーゼにN末端またはC末端のどちらかで融合されるIL-20構築物（N末端：g1 IL-20、C末端：g2 IL-20）に対する例示的な抗IL-20抗体の結合のEC50のELISA決定。A：2A11；B：6E11；C：6H2；D：7D1；E：20A10；F：IL-20非特異的モノクローナル抗体が非特異的結合のためのコントロールとして使用される。2A11、6E11および20A10の各抗体が両方のIL-20構築物に対して大きい親和性で結合し、対照的に、残る抗体6H2および抗体7D1は、g2 IL-20に対してより低い親和性で結合する。

20

【図4】ヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体により、組換えIL-20媒介のSTAT3活性化が、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞において中和される。どちらの細胞も非処置のままにしたが、あるいは、示されるように抗体の非存在下またはヒト由来IL-20モノクローナル抗体もしくはヒトコントロールIgG（huIgG）の存在下、組換えヒトIL-20または組換えマウスIL-20により刺激した。細胞溶解物をSDS-PAGEに供し、pSTAT3レベルをウエスタンブロットで可視化した。STAT3、アルファ-チューブリンおよびIL-20RBの総レベルが負荷コントロールとなる。抗体濃度：5 μg/ml。A：コントロール：rhIL-20およびrmIL-20により、STAT3の用量依存的なリン酸化が、I型またはII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞において誘導される。STAT3およびIL-20RB-Myc-DDKの総レベルおよびリン酸化体レベルの検出。B：rhIL-20（10 ng/ml）またはrmIL-20（25 ng/ml）による刺激。例示的抗体の2A11、20A10および7D1により、rhIL-20が中和され、これに対して、20A10でも、rmIL-20が強力に中和される。

30

40

【図5】ヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体により、KZ136-NLucレポーター構築物のrhIL-20媒介の誘導が、IL-20受容体およびKZ136-NLucにより一過性にトランスフェクションされたHEK293T MSR細胞において中和される。細胞を、示されるようにヒト由来IL-20モノクローナル抗体またはコントロールのヒトIgG（huIgG）の存在下、120 ng/mlのrhIL-20または200 ng/mlのrmIL-20により刺激した。A：KZ136-NLucレポーター構築物の概略図。B：コントロール：rhIL-20およびrmIL-20により、KZ136-NLucレポーター構築物が、I型IL-20受容体およびKZ136-NLucにより一過性にトランスフェクションされたHEK293T MSR細胞において誘導

50

される。C、D：20A10、7D1および2A11の各例示的抗体のrhIL-20 IC50分析。E：例示的抗体20A10およびコントロールのヒトIgGのrmIL-20 IC50分析。F：20A10、7D1および2A11の各例示的抗体のIC50値。

【図6】pSTAT3ウエスタンブロットアッセイにおける、rmIL-20に対抗するヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体20A10のIC50分析。A：I型IL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞を非処置のままにしたか、あるいは、示されるように抗体の非存在下(-)または例示的抗体20A10の存在下(+)、25ng/mlのrmIL-20により刺激した。細胞溶解物をSDS-PAGEに供し、pSTAT3レベルをウエスタンブロットで可視化した。総STAT3レベルが負荷コントロールとなる。B：pSTAT3ウエスタンブロットアッセイにおける、rmIL-20に対抗する例示的抗体20A10のIC50値。

【図7】目的とするリガンドの、このリガンドに対する関連性のある受容体を発現する細胞への結合を評価するための新しいアッセイ。目的とするリガンドがルシフェラーゼ融合タンパク質として使用されるので、リガンドの細胞結合が細胞会合のルシフェラーゼ活性によって測定される。このアッセイはまた、リガンドに対する抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかの評価を可能にする。ヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体により、IL-20-Gaussianルシフェラーゼ融合タンパク質が、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞に結合することが中和される。細胞を、IL-20-Gaussianルシフェラーゼ融合タンパク質を発現するHEK293T細胞の上清とともに、示されるように抗体の非存在下(-)、あるいは、ヒト由来IL-20モノクローナル抗体、ヒトのコントロールIgG(huIgG)または1μg/mlのrhIL-20の存在下でインキュベーションした。抗体濃度：5μg/ml。A：目的とするリガンドの、このリガンドに対する関連性のある受容体を発現する細胞への結合を評価するための新しいアッセイを記載する概略図。目的とするリガンドがレポーターとして、すなわち、ルシフェラーゼ融合タンパク質として使用されるので、リガンドの細胞結合が細胞会合レポーターによって、例えば、ルシフェラーゼ活性によって測定される。結合していない融合タンパク質を除いた後、ルシフェラーゼの基質が加えられ、光の放射が記録される。出力された光が、結合した融合タンパク質の量に比例している。B：ルシフェラーゼに基づくこの化学発光法細胞結合アッセイはまた、試験物質、例えば、リガンドに対する抗体などにより、リガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかの評価を可能にする。参照符号1：リガンド結合ドメインを発現する標的細胞2：リガンド結合ドメイン(例えば、サイトカイン受容体など、例えば、I型またはII型のIL-20受容体)3：リガンド(例えば、サイトカインなど、例えば、IL-20)4：レポーター(例えば、酵素など、例えば、ヒトIL-20-Gaussianルシフェラーゼ融合タンパク質)5：必要な場合にはレポーターのための基質(例えば、ルシフェラーゼのための基質など)6：検出可能なレポーター活性(例えば、光放射など)7：試験物質(例えば、抗体など、例えば、IL-20抗体)レポーターのための基質は、例えば、レポーターが酵素ではなく、それ自体が検出可能である分子、例えば、重金属(例えば、金)、放射性同位体または蛍光タンパク質などであって、リガンドがリガンド結合ドメインに結合したときのレポーター活性における変化が、例えば、放射の消滅、波長の変化および遮蔽などであり得る場合には必須でなくてもよい。C：コントロール：IL-20-Gaussianルシフェラーゼ融合タンパク質(g1 IL-20)が機能的に活性である。IL-20-Gaussianルシフェラーゼ融合タンパク質を含有するHEK293Tの上清により、STAT3が、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞において活性化される。細胞を、g1 IL-20の上清の連続希釈物と、またはコントロール培地(NC)とインキュベーションした。STAT3、IL-20RB-Myc-DDK、IL-20RA-Myc-DDKおよびIL-22RA(RAサブユニット)の総量およびリン酸化体のウエスタンブロットでの検出

10

20

30

40

50

。D：コントロール：g1 IL-20融合タンパク質が、IL-20受容体I型の両方のサブユニットを発現するHEK293T MSR細胞に特異的に結合する。結合が非標識のrhIL-20(3 μ g/ml)によって取り消される。E：コントロール：g1 IL-20が、I型IL-20受容体を発現するHEK293T MSR細胞に結合することが、rhIL-20、rmIL-20および例示的なヒト由来IL-20モノクローナル抗体20A10によって用量依存的様式で阻害される。結合が、無関係のrhIL-32およびコントロールのヒトIgG(huIgG)によって影響されない。F：例示的抗体の2A11、20A10および7D1により、g1 IL-20が、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞に結合することが中和される。非標識のrhIL-20(1 μ g/ml)が陽性コントロールとして役立つ。抗体濃度：5 μ g/ml。G：IFNA5-Gaussian融合タンパク質(g1 IFNA5)の、HEK293T MSR細胞への結合が、非標識のrhIFNA2(3 μ g/ml)によって、また、例示的なヒト由来モノクローナルIFN抗体19D11(1.7 μ g/ml)によって阻害される。ヒトコントロール抗体(huIgG、15 μ g/ml)は影響を何ら示さない。H：g1 IFNA2、A4、A5、A6、A7、A8、A10、A14、A16、A17およびA21の各融合タンパク質の、HEK293T MSR細胞への結合が、例示的なヒト由来モノクローナルIFN抗体19D11によって阻害される。g1 IFNBおよびWの結合は19D11によって影響されない。すべてのg1 IFNの結合が、コントロールのヒト抗体(huIgG)によって影響されない。抗体濃度：5 μ g/ml。

【図8】化学発光法細胞結合アッセイにおけるヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体のIC50分析。I型またはII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞を、ヒト由来IL-20モノクローナル抗体の存在下(A：20A10、B：7D1、および、C：2A11)、g1 IL-20の上清とインキュベーションした。D：例示的抗体の20A10、7D1および2A11のIC50値。

【図9】交差競合。A：実験構成：96ウェルマイクロプレート(Costar、米国)を、PBSにおいて1/250で希釈されるウサギ抗GLuc特異的抗体(NEB、E8023S)により被覆した(O/N、4)。プレートをPBS-Tにより洗浄し、2%のBSA(Sigma、Buchs、スイス)を含有するPBSによる室温での1時間のブロッキング処理に供した。30 μ lのGLuc-IL-20を 2×10^6 LU/ウェルの最終濃度で加え、室温で2時間インキュベーションした。キメラ抗体が、ヒト競合剤抗体と、30 μ lのPBSにおいて0.5 μ g/ml対3 μ g/mlの最終濃度で事前に混合され、プレートに加えられる。室温での2時間のインキュベーションを行ったとき、プレートをPBS-Tにより洗浄し、ヒト-マウスキメラ抗体の結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲート化されたヤギ抗マウスIgG Fc-特異的抗体(Jackson Immuno Research、0.5%BSA-PBSでの1:500)を使用して求め、その後、HRP活性の測定を、TMB基質溶液(Sigma、Buchs、スイス)を使用して行った。本発明の例示的なヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体の、異なった結合部位に対するヒト-マウス(hm)キメラ構築物による示差的な結合を、B：20A10hm、C：2A11hm、D：7D1hm、および、E：6E11hmを用いた交差競合実験で調べた。F：IL-20非結合コントロールとして、無関係の抗原に結合するヒト抗体を使用した。ヒト由来の抗IL-20MAbの20A10、2A11および6E11は、他のヒト-マウスキメラ抗IL-20MAbのいずれとも競合せず、しかし、ヒト6H2はヒトキメラ型7D1の結合と競合した。

【図10】交差反応性 - 本発明の例示的なヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体の6E11、2A11および20A10の、マウスIL-20およびヒトIL-20への結合のGLucサンドイッチELISAによる決定および比較。A：交差反応性を試験するための実験構成：96ウェルマイクロプレート(Costar、米国)を、PBSにおいて1/250で希釈されるウサギ抗GLuc抗体(NEB、E8023S)により被覆した(O/N、4)。プレートをPBS-Tにより洗浄し、2%のBSA(Sigma、B

10

20

30

40

50

uchs、スイス)を含有するPBSによる室温での1時間のブロッキング処理に供した。30 μ lのGLuc-IL-20を2 \times 10⁶LU/ウエルの最終濃度で加え、室温で2時間インキュベーションした。競合剤抗原の組換えhIL-20および組換えマウスIL-20を、試験される抗体(1 μ g/mlの固定された濃度)に対して、10 μ g/mlから4.6ng/mlにまで及ぶ連続希釈で力価測定した。混合物のウエルあたり30 μ lをウエルにおいて室温で1.5時間インキュベーションした。プレートをPBS-Tにより洗浄し、競合剤の存在下における目的とする抗原へのヒトIgGの結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲート化されたヤギ抗ヒトFcガンマ特異的抗体(Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Cambridge, 英国)を使用して明らかにし、その後、HRP活性の測定を、TMB基質溶液(TMB, Sigma, Buchs, スイス)を使用して行った。B、C、D:ヒトIL-20により、g2 IL-20に対するすべての試験された抗IL-20抗体の結合が阻害される。マウスIL-20は、g2 IL-20に対する、6E11を除くすべての試験された抗体の結合を阻害することができる。

【図11】IL-20の耳炎症アッセイCyt_oEar。本発明の異なるIL-20阻止抗体の影響をhIL-20誘導炎症の後で試験する。炎症を誘導するために、IL-20を、125ng、250ng、500ngおよび1000ngの異なる濃度を滴定した後で最適な実験結果を与えた20 μ lの容量での1000ngの濃度で注入した。A:例示的な10日間の実験予定表。B:実験動物群(A~M)の実験的処置の概観。それぞれのコホートについて、関連性のあるPBSコントロールに対して正規化される0日目の測定に対する変化倍数として計算されるCyt_oEar耳厚さ測定。C:すべての正規化された測定の影響の概略。D:すべての正規化された測定の影響の概略。E:IL-20の結果を明瞭性のためだけに示す、すべての正規化された測定の影響の概略。本発明の抗体20A10および抗体7D1による処置(それぞれ6日目~10日目における、2A11については8日目~10日目における耳厚さの有意な減少)は、(結合特異性がIL-20に関連づけられない)IgGによるコントロール処置と比較して、IL-20注入から生じる耳厚さの顕著な減少を引き起こす。平均+/-SEM、ID=皮内へのサイトカイン注入、M=測定-耳厚さ、S=動物の屠殺;ID-サイトカイン注入;試験抗体(2A11、20A10、7D1)およびコントロールIgGを0日目および6日目に注入した(IP)。IP=腹腔内への抗体注入、ID=皮内耳注入。

【図12】SPR分析。A:本発明の例示的抗体に対するヒトIL-20およびマウスIL-20の結合に関するセンソグラム(sensogram)の詳細な分析。1:1の結合速度論が認められた。抗原を、1.5nM、3.125nM、6.25nM、12.5nM、25nM、50nMおよび100nMの濃度で注入した。計算された親和性(KD値[M])が図中に示される。B:プロットは、すべての試験された抗体の会合(オン速度ka)および解離(オフ速度kd)についての適合化曲線から導かれる速度論パラメータを示す。点線の対角線により、親和性(KD)が示される。C:ビオチン-ストربتアビジン結合のSPR文献値との比較での本発明の例示的抗体のKD値。20A0および2A11のヒトIL-20に対する親和性が、マウスIL-20についてそれぞれ、サブピコモル濃度範囲およびサブナノモル濃度範囲にある。

【図13】本発明のヒト抗IL-20抗体のエピトープのマッピング。A:マイクロアレイに結合させた全長型抗原に対する本発明の抗体の結合。Y軸は、Cy5コンジュゲート二次抗体により検出されたときの蛍光強度(RFU)を示した。B:本発明のすべての抗体に対するヒトIL-20の18merペプチドの一次ペプチドアレイ。C:本発明のすべての抗体に対するマウスIL-20の18merペプチドの一次ペプチドアレイ。D:20A10に対するヒトIL-20の一次ペプチドアレイ。下段パネルには、リシン89からメチオニン129までの配列を網羅するペプチドが示される。例示的抗体20A10はペプチド20に特異的に結合する。E:残基P101~残基L129を含む例示的抗体20A10のエピトープのアラニンスキャン。D102、H103、Y104、T105、L106、R107、K108、S111、N114、S115およびF116の位

10

20

30

40

50

置におけるアラニン置換により、m A B 結合の破壊がもたらされた。

【図 1 4】ヒト I L - 2 2 - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質は C O L O 2 0 5 細胞に特異的に結合する。細胞を、I L - 2 2 - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質 (g 2 I L - 2 2) を発現する H E K 2 9 3 T 細胞の上清とともに、示されるように阻害剤の非存在下 (-) または競合性阻害剤の存在下でインキュベーションした。A : g 2 I L - 2 2 の C O L O 2 0 5 細胞への結合が非標識の r h I L - 2 2 によって阻害され、無関係の r h I F N A 2 によって阻害されない。C O L O 2 0 5 細胞を、H E K 2 9 3 T 細胞の g 2 I L - 2 2 含有上清とともに、示されるように阻害剤の非存在下あるいは非標識の r h I L - 2 2 または r h I F N A 2 (それぞれ 1 μ g / m l) の存在下でインキュベーションした。細胞を、光出力が記録される前に溶解したが、または溶解しなかった。B : g 2 I L - 2 2 の C O L O 2 0 5 細胞への結合が、例示的なヒト由来 I L - 2 2 モノクローナル抗体 3 0 G 1 によって用量依存的様式で阻害される。結合がコントロールのヒト抗体 (h u I g G) によって影響されない。

【図 1 5】抗体 2 6 B 9 の膜貫通 (2 6 B 9 - T M) 構築物の設計。m y c エピトープと、ヒト血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) ベータの膜貫通ドメイン (データベースアクセション番号 u n i p r o t P 0 9 6 1 9 、アミノ酸 5 1 3 ~ 5 6 1) とを含む断片が、重鎖定常ドメインの C 末端部分に融合される (A) 。カッパ軽鎖の定常領域は変更されないままである (B) 。H E K 2 9 3 T M S R 細胞の共トランスフェクションが行われたとき、適正に組み立てられた I g G が、抗ヒト I g G - H C - F I T C 標識の検出抗体および抗ヒト I g カッパ - A P C 標識の検出抗体を使用する F A C S 分析によって細胞表面に検出される。

【図 1 6】2 6 B 9 - T M 膜貫通領域の配列 (配列番号 6 7) 。D N A 塩基 1 ~ 3 0 に由来する m y c エピトープと、D N A 塩基 3 4 ~ 1 8 3 に由来する P D G F R 膜貫通ドメインとを含む 2 6 B 9 - T M 膜貫通領域の D N A 配列およびアミノ酸配列。

【図 1 7】ヒト I F N W - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質は、膜貫通型の抗 I F N W m A b を発現する H E K 2 9 3 T M S R 細胞に特異的に結合する。H E K 2 9 3 T M S R 細胞を、示された量の抗 I F N W m A b の 2 6 B 9 の膜結合型 (2 6 B 9 - T M) をコードする c D N A 、または、空ベクター (モック) によりリバーストランスフェクションした。トランスフェクションの 4 8 時間後、I F N W - G a u s s i a ルシフェラーゼを加え (g 1 I F N W) 、結合を化学発光法細胞結合アッセイで分析した。A : コントロール : 2 6 B 9 - T M が、トランスフェクションされた H E K 2 9 3 T M S R 細胞の細胞表面で発現される。表面の抗体発現をトランスフェクションの 4 8 時間後、細胞に基づく E L I S A で分析した。B : g 1 I F N W は、発光法細胞結合アッセイにおいて、2 6 B 9 - T M を発現する細胞に特異的に結合する。

【図 1 8】抗 I F N W 抗体の交差競合アッセイ。g 1 I F N W の 2 6 B 9 - T M への結合が、可溶性の 2 6 B 9 によって、また、クローン的に関連した 3 1 B 4 抗体によって用量依存的な競合を受ける。対照的に、結合が、コントロール I g G によっても、例示的な抗 I F N W 抗体 8 H 1 によっても影響されない。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 5 】

第 1 の局面において、本発明は概して、哺乳動物起源 (好ましくはヒト起源) の I L - 2 0 と結合する新規な分子に関連する。したがって、本発明は、組換えによるヒト由来モノクローナル抗インターロイキン - 2 0 (I L - 2 0) 抗体、I L - 2 0 結合断片、それらの合成および生物工学的変異体、ならびに、添付された実施例および図において例示される抗 I L - 2 0 抗体の 2 0 A 1 0 、2 A 1 1 、7 D 1 または 6 E 1 1 のいずれか 1 つの免疫学的特徴 (例えば、I L - 2 0 結合特徴) および / またはそのような抗体のいずれか 1 つの生物学的活性の 1 つもしくは複数を示す同等な I L - 2 0 結合分子に関連する。本発明の特に好ましい実施形態において、述べられた抗 I L - 2 0 結合分子はヒトにおいて実質的に非免疫原性である。

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

実施例 2 および実施例 6 に記載されるように、同様にまた、図 3 および図 10 において例示されるように、本発明は、ヒト IL - 20 と選択的または優先的に結合する抗 IL - 20 抗体（例えば、抗体 20 A 1 1 および抗体 7 D 1）、ならびに、ヒト IL - 20 およびマウス IL - 20 とは同程度に結合する抗 IL - 20 抗体（すなわち、抗体 20 A 1 0）を提供する。したがって、1つの実施形態において、本発明のヒトモノクローナル抗 IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、それらの合成または生物工学的変異体は、組換え型マウス IL - 20 と結合することができ、その一方で、別の実施形態において、マウス IL - 20 とは実質的に結合しない。両方の実施形態は様々な利点を有している。例えば、治療用抗体の開発のために、リード抗体は、特定の疾患に対する治療活性について、また、毒性学研究を行うために動物モデルにおいて試験されなければならないことが一般に知られている。この場合、マウスが、疾患モデルのための最も一般に使用されている動物であり、そして、マウスはまた、予備的なスクリーニングを毒性学研究および長期間の生殖毒性学研究のために行うための最も一般に使用されている動物である。したがって、マウス IL - 20 とのそれらの交差反応性のため、抗体 20 A 1 0 に由来する IL - 20 抗体および類似した IL - 20 結合分子により、代用マウス抗体が必要なくなる。

10

【0087】

他方で、抗体 20 A 1 1 または抗体 7 D 1 に由来する抗 IL - 20 抗体および類似した IL - 20 結合分子は、ヒト IL - 20 と選択的に結合するという利点を有しており、そのため、所与の状態が組換え型ヒト IL - 20 によって誘導される動物モデルにおいては、例えば、本出願人の同時係属中の国際出願公開 WO 2015 / 001047 に記載される HuCytoMab - Assay（それにおける実施例 2 および実施例 3 もまた参照のこと）などでは、結果が動物の内因性 IL - 20 によって影響されない。そのうえ、ヒト IL - 20 および対応する動物種を識別する抗 IL - 20 抗体および類似した IL - 20 結合分子は診断使用のために好都合である。したがって、本発明のヒトモノクローナル抗 IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、それらの合成または生物工学的変異体の両実施形態はそれらの長所を有している。

20

【0088】

好ましい実施形態において、上記ヒトモノクローナル抗 IL - 20 抗体またはその IL - 20 結合断片は IL - 20 の生物学的活性を中和することができ、ただし、この場合、好ましくは、前記生物学活性は下記のものである。

30

(a) 細胞ベースの STAT（シグナル伝達・転写活性化因子）活性化アッセイにおける IL - 20 シグナル伝達（例えば、実施例 3 に従って求められることになる IL - 20 シグナル伝達）、

(b) IL - 20 サイトカイン細胞表面受容体結合の阻害（例えば、実施例 4 に従って求められることになる阻害）、

(c) ヒト IL 20 R 1 / IL 20 R 2 受容体複合体のヒト IL - 20 媒介の活性化（例えば、実施例 5 に従って求められることになる活性化）、および / または

(d) ヒト IL - 20 の前炎症性活性（例えば、実施例 7 に従って求められることになる前炎症性活性）。

【0089】

40

好ましくは、本発明の抗ヒトインターロイキン - 20（IL - 20）抗体、IL - 20 結合断片、それらの合成または生物工学的変異体は、その可変領域において、

(a) 下記に示される V_H 可変領域アミノ酸配列および / または V_L 可変領域アミノ酸配列の少なくとも 1 つの相補性決定領域（CDR）、

(i) 図 1（V_H）（配列番号 2、配列番号 10、配列番号 18 および配列番号 26）、および

(ii) 図 1（V_L）（配列番号 4、配列番号 12、配列番号 20、配列番号 28）

(b) 図 1 に示されるような V_H 領域および / または V_L 領域のアミノ酸配列、

(c) (a) のアミノ酸配列のいずれか 1 つの部分的変化から生じるアミノ酸配列から

50

なる少なくとも1つのCDR、ならびに

(d)(b)のアミノ酸配列の部分的変化から生じるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。

【0090】

本明細書中下記においてより詳しく記載されるように、本発明の抗IL-20抗体、IL-20結合断片、それらの合成または生物工学的変異体は、免疫グロブリン分子のどのようなタイプ、クラスまたはサブクラスのものでも可能であり、あるいは、免疫グロブリン分子のどのようなタイプ、クラスまたはサブクラスにも由来することができる。しかしながら、好ましい実施形態において、本発明の抗体はIgGイソタイプのものであり、最も好ましくはIgG1サブクラスまたはIgG4サブクラスのものである。

10

【0091】

これに関連して、本発明の抗IL-20抗体、IL-20結合断片、それらの合成または生物工学的変異体は好ましくは、表1に示されるC_Hアミノ酸配列およびC_Lアミノ酸配列(配列番号6、配列番号8、配列番号14、配列番号16、配列番号22、配列番号24、配列番号30および配列番号32)から選択されるアミノ酸配列、あるいは、言及された参照配列に対する少なくとも60%の同一性、好ましくは70%の同一性、より好ましくは80%の同一性、なお一層より好ましくは90%の同一性、特に好ましくは少なくとも91%の同一性、92%の同一性、93%の同一性、94%の同一性、95%の同一性、96%の同一性、97%の同一性、98%の同一性または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むC_H定常領域および/またはC_L定常領域を含む。

20

【0092】

上記で記載されるように、IL-20は、STAT3の活性化を、IL-20受容体(R)複合体IL-20RA/IL-20RB(I型)の結合を介して、または、IL-20受容体複合体IL-22RA/IL-20RB(II型)の結合を介してそのどちらでも誘導することが見出されている(Parish-Novak他、J. Biol. Chem. 277(2002)、47517~47523; Logsdon他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(2012)、12704~9)。そのうえ、IL-20は様々な前炎症性サイトカイン(例えば、単球走化性タンパク質(MCP)-1、IL-6およびIL-8など)を誘導することができる(Hsieh他、Genes Immun. 7(2006)、2434~242; Hsu他、Arthritis Rheum. 54(2006)、2722~2733(上掲)を参照のこと)。この活性化機構が、IL-20活性を明らかにするためのインビトロアッセイおよびインビボアッセイ(実施例3および実施例4を参照のこと)を設計するために、同様にまた、実施例5に記載される新規な細胞リガンド受容体結合アッセイにおいて、ならびに、実施例7、ならびに、図4、図5、図6、図7E、図7Fおよび図8に記載されるような耳炎症アッセイをモニターして、本発明の抗体の中和特性をモニターするために本発明において使用されている。それらにおいて詳しく記載されるように、本発明の抗体は、IL-20、IL-20媒介のSTAT3活性化、および、I型IL-20受容体に対する、ならびに、II型IL-20受容体に対する強力な中和活性を有することが見出されている。したがって、1つの実施形態において、本発明のIL-20抗体またはそのIL-20結合断片はヒトIL-20の生物学的活性を低下させることができる。好ましい実施形態において、生物学的活性は、ヒトIL-20により誘導される炎症である。そのうえ、本発明の1つの実施形態において、生物学的活性がSTATレポーターアッセイおよび/または耳炎症アッセイにおいて明らかにされる。そのうえ、本発明の抗体の結合親和性が、本明細書中(例えば、実施例2)に記載されるように、また、図3および図10に示されるようにELISAおよびヒトIL-20-Gaussianシフェラーゼ融合タンパク質によって試験されている。これらの実験の結果に従って、本発明は、IL-20に対する示差的な結合親和性を示すいくつかの例示的な抗IL-20抗体およびそのIL-20結合断片を提供する。なお、これらの抗IL-20抗体およびそのIL-20結合断片により、本明細書

30

40

50

中に提供される IL - 20 結合分子の結合特性および中和特性が例示される。そのうえ、実施例 10 に記載され、また、図 13 に示されるように、本発明の例示的抗体 20A10 は大きいエピトープビン (epitope bin) を有しており、このことは、18mer の IL - 20 ペプチドのアミノ酸配列における多数のアミノ酸が抗体の結合のために必須であり、かつ要求されることを意味している。

【0093】

したがって、本発明の 1 つの実施形態において、本発明の抗体または IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体であって、アミノ酸配列 101 - PDHYTLRKISSLANSLF - 118 (配列番号 69)、アミノ酸配列 102 - PDHYTLRKISSLANSLF - 116 (配列番号 70) および / またはアミノ酸配列 101 - PDHYTLRKISSLANSLF - 117 (配列番号 72) からなる IL - 20 由来ペプチドを認識する抗体または IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的誘導体が提供され、ただし、前記配列において、P101、I109、S110 および / または L117 のみがアラニンによって置換されることがあり、かつ、前記抗体は、アミノ酸配列 97 - NYQTPDHYTLRKISSLAN - 114 (配列番号 71) からなるペプチドを認識しない、または実質的に認識しない。

10

【0094】

興味深いことに、抗体 20A10 は、そのアミノ酸配列においてヒト IL - 20 の 101 - 118 - ペプチドとは Y104H および T118I の位置 (後者は 20A10 結合のために必須でない) でのみ異なるマウス IL - 20 に由来する対応したペプチドには結合せず、また、この抗体は全長型マウス IL - 20 に結合することができるにもかかわらず、どのような他のマウス IL - 20 由来 18mer ペプチドに対しても結合しない。例えば、図 13 を参照のこと。したがって、20A10 抗体により、ヒト IL - 20 およびマウス IL - 20 の立体配座エピトープ (これはまた、ヒト IL - 20 由来ペプチドの 101 - PDHYTLRKISSLANSLF - 118 (配列番号 69) および 101 - PDHYTLRKISSLANSLF - 117 (配列番号 72) によって形成または模倣され得る) が認識されると仮定することは、興味をそそるものである。

20

【0095】

実施例において明らかにされ、また、図に示されるように、本発明を例示する抗 IL - 20 抗体は、10ng 未満にまで達する μ M 範囲における EC および IC によってそれぞれ特徴づけられる (抗 IL - 20 抗体 2A11)。したがって、好ましくは、本発明の抗 IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体は、ELISA アッセイによって求められるような EC50 が、g1 IL - 20 および / または g2 IL - 20 については約 100ng/ml 未満であり、好ましくは 50ng/ml 未満であり、最も好ましくは 10ng/ml 未満である。実施例 2 および図 3 を参照のこと。加えて、または、代替において、本発明の抗 IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体は、KZ136 - NLuc レポータアッセイによって求められるような IC50 が、rhIL - 20 については約 1000ng/ml 未満であり、好ましくは 500ng/ml 未満である。実施例 3 および実施例 4 を参照のこと、また、図 5F に示される。本発明の抗体の結合親和性に関してより詳しくは、例えば、さらには下記の節「結合特徴」を参照のこと。

30

40

【0096】

治療的適用のために特に有用である抗体を提供するために、すなわち、外来抗体 (例えば、ヒトにおけるマウス抗体など) について認められるような本発明の抗体に対する免疫学的応答 (HAMM 応答) を回避するために、本発明は好ましくは、完全なヒト抗体またはヒト由来の抗体に関連する。なぜならば、例示的な抗 IL - 20 抗体が、本発明を例示する実施例において記載されるが、これらは、ヒト患者に由来するものであるからである。

【0097】

これに関連して、ヒト化抗体および他の場合にはヒト様抗体に反して、下記の議論もま

50

た参照のこと。本発明のヒト由来抗体は、ヒト身体によって認められているCDRを含むことによって特徴づけられ、したがって、免疫原性である危険性を実質的に有していない。したがって、本発明の抗体は、抗体の可変軽鎖および可変重鎖の一方または両方の少なくとも1つのCDR、好ましくは2つのCDR、最も好ましくは3つすべてのCDRが、本明細書中に例示されるヒト抗体に由来するならば、依然として、ヒト由来であると示される場合がある。

【0098】

本発明のヒト由来抗体はまた、そのような抗体が、実際に被験体によって最初に発現されたものであり、例えば、ヒト免疫グロブリンを発現するファージライブラリによって生じるインビトロ選択された構築物、または、ヒト免疫グロブリンレパートリーの一部を発現するトランスジェニック動物において生じる異種抗体でないことを強調するために、「ヒト自己抗体」と呼ばれる場合がある（なお、それらはこれまで、ヒト様抗体を提供するために試みるための最も一般的な方法を表していた）。他方で、本発明のヒト由来抗体は、プロテインAカラムまたは親和性カラムによって精製される場合があるヒト血清抗体そのものから区別するために、合成（的）、組換え（型）および/または生物工学的（的）であると示される場合がある。

10

【0099】

しかしながら、本発明では、本発明の抗体のさらなる研究が動物モデルにおいて、例えば、ヒトIL-20を発現するトランスジェニックマウスにおいて使用され、また、想定される。ヒトにおけるHAMM応答と類似した実験動物における免疫原性影響を避けるために、1つの局面において、本発明の抗体は、ヒト化抗体、異種抗体またはヒト-マウスのキメラ抗体、好ましくは齧歯類-ヒトのキメラ抗体または齧歯類化抗体、最も好ましくはマウス-ヒトのキメラ抗体またはマウス化抗体である場合がある。

20

【0100】

1つの実施形態において、本発明の抗IL-20抗体またはIL-20結合分子は、図1に示されるようなV_H領域および/またはV_L領域のアミノ酸配列、あるいは、表1に示されるような対応する核酸によってコードされるようなV_H領域および/またはV_L領域のアミノ酸配列を含む。加えて、別の実施形態において、本発明は、ヒトIL-20に対する特異的結合について、本明細書中上記で定義されるような本発明の抗体と競合する抗IL-20抗体またはIL-20結合分子に関連する。実施例6および実施例7、ならびに、図9~図10を参照のこと。具体的には、実施例および図において例示される抗体について概説されるような免疫学的結合特徴および/または生物学的性質を明らかにする抗IL-20抗体が提供される。存在する場合、抗原との抗体の用語「免疫学的結合特徴」または他の結合特徴はその文法的形態のすべてで、抗体の特異性、親和性、交差反応性および他の結合特徴を示す。

30

【0101】

さらなる実施形態において、本発明の抗IL-20抗体は抗体断片である。例えば、本発明の抗体または抗体断片は、単鎖Fv断片(scFv)、F(ab')断片、F(ab)断片、F(ab')₂断片および単ドメイン抗体断片(sdAB)からなる群から選ばれる場合がある。

40

【0102】

本発明の抗体のさらなる利点が、体液性免疫応答がその生理学的環境および細胞環境においてネイティブ抗原に対して誘発されているという事実のために、典型的には、当該抗原の立体配座エピトープを、例えば、他の細胞成分を伴う状況でのその提示、細胞表面膜におけるその提示、および/または、受容体に対するその結合に起因して認識する自己抗体が産生され、かつ、この自己抗体を単離することができることである。対照的に、モノクローナル抗体（例えば、マウスのモノクローナル体など）、そのヒト化型、または、ファージディスプレイから得られる抗体を作製する従来の方法では典型的に、標的タンパク質の抗原性断片が、非ヒト哺乳動物を免疫化することおよび検出のためにそれぞれ用いられ、このときには通常、ネイティブタンパク質の存在をその生理学的状況および細胞状況

50

において認識するのではなく、むしろ、免疫原の二次元構造に限定される線状エピトープまたは立体配座エピトープを認識する抗体が得られる。それによれば、本発明の自己抗体がそのエピトープ特異性の面で独特であると予想することは慎重なことである。したがって、本発明はまた、本発明の方法に従って単離される自己抗体と実質的に同じ結合特異性を示す抗体および同様な結合分子に関連する。そのような抗体は、例えば、競合的 E L I S A によって、または、より適切には、細胞に基づいた中和アッセイによって、本発明の自己抗体およびそのモノクローナル誘導体を参照抗体としてそれぞれ使用して容易に試験することができ、また、実施例に記載されるか、または、そうでない場合には当業者に知られている免疫学的試験によって容易に試験することができる。

【0103】

本発明では、その可変領域において、すなわち、結合ドメインにおいて、(V_H) (配列番号 2、配列番号 10、配列番号 18 および配列番号 26) および (V_L) (配列番号 4、配列番号 12、配列番号 20 および配列番号 28) の図 1 に示されるアミノ酸配列を含む可変領域の V_H および / または V_L の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含むことによって概して特徴づけられることがある IL - 20 結合分子、すなわち、抗体およびその結合断片が例示される - 図 1 において下線が引かれ、表 1 において特定される例示的な CDR 配列を参照のこと。しかしながら、下記で議論されるように、当業者は、加えて、または、代替として、図 1 に示されるアミノ酸配列から、特に CDR 2 および CDR 3 の場合には 1 つ、2 つ、3 つ、または、それどころか、それ以上のアミノ酸置換によってそれらのアミノ酸配列が異なる様々な CDR が使用されてもよいという事実を十分に承知している。

【0104】

本発明の抗体についてさらに明らかにされているように、本発明の様々な抗体はそれらの標的タンパク質の生物学的活性を中和することができる。例えば、実施例 3 および図 4、図 5、図 6、図 7 E、図 7 F、ならびに、実施例 7 および図 11 において記載される S T A T 3 阻害アッセイおよび耳炎症アッセイの結果を参照のこと。これに関連して、用語「中和(する)」は、本発明の抗 IL - 20 抗体またはその IL - 20 結合断片が、生化学的な細胞型アッセイまたはインビボアッセイにおけるその標的タンパク質の生物学的活性を、それぞれのアッセイを本発明の主題抗体の存在下で行うことによって評価され得るように妨害することができることを意味し、ただし、この場合、本発明の抗体が存在しないときの当該タンパク質の生物学的活性と比較して、また、標的タンパク質の生物学的活性を本質的に影響されないままにしておくことが知られている化合物 (例えば、コントロール抗体) の存在下での当該タンパク質の生物学的活性と比較して、標的タンパク質の生物学的活性は、アッセイに供される本発明の抗体のレベルを増大させるのと同時に低下する。そのような生化学的なインビトロ型アッセイおよびインビボ型アッセイはまた、例えば、本発明の抗 IL - 20 抗体について示されているような標的タンパク質の生化学的活性を中和できることが知られている参照抗体を使用して、また、候補抗体を試験サンプルに供して行うことができ、ただし、この場合、参照抗体および候補抗体の組み合わせられた活性から生じる付加的な中和活性が認められる場合があり、または、どちらかの抗体を標識することによって明らかにされることがある候補抗体および参照抗体の競合が認められる。したがって、本発明の好ましい実施形態において、本発明の抗 IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体は、その抗原の生物学的活性を中和することができる。中和作用は、例えば、IL - 20 活性を低下させる量の観点から、または、そのような低下を本発明の IL - 20 結合分子の導入の後で認めることができる時間によって、または、当然のことではあるが、両者の組み合わせられた観点から評価される場合がある。

【0105】

本発明の抗 IL - 20 抗体、IL - 20 結合断片、それらの合成または生物工学的変異体、ならびに以下で更に説明される免疫複合体が、以下で詳述するように、例えば、宿主細胞における発現またはインビトロ無細胞翻訳系における発現によって提供される場合が

10

20

30

40

50

ある。ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質を宿主細胞において発現させるために、前記抗IL-20抗体、IL-20結合断片、その合成または生物工学的変異体、免疫複合体をコードする核酸分子が、適切な発現ベクターに、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳のための必要なエレメントを含有するベクターに挿入される場合がある。当業者によく知られている様々な方法が、目的とするポリペプチドをコードする配列ならびに適切な転写制御エレメントおよび翻訳制御エレメントを含有する発現ベクターを構築するために使用される場合がある。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術およびインビボ遺伝子組換えが含まれる。そのような技術が、Sambrook他、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)、および、Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology (1989)に記載される；さらには下記の「ポリヌクレオチド」および「発現」のセクション、ならびに、この点についてのさらなる詳細については実施例のセクションで引用される参考文献を参照のこと。

10

【0106】

生成物の発現のための好適な宿主細胞は、どのような原核生物細胞または真核生物細胞であってもよい；例えば、細菌細胞（例えば、大腸菌または枯草菌など）、昆虫細胞（バキュロウイルス）、酵母細胞、植物細胞または動物細胞。しかしながら、効率的なプロセッシングのためには、哺乳動物細胞が好ましい。この目的のために有用である典型的な哺乳動物細胞株には、CHO細胞、HEK293細胞、COS細胞およびNSO細胞が含まれる。

20

【0107】

本発明の単離された抗体は、当然のことながら、そのようなものとして、患者に適用され得るのではなく、通常の場合には、例えば、患者におけるその安定性、受容性および生物学的利用能を保証するために薬学的に配合されなければならない。したがって、1つの実施形態において、前記抗IL-20抗体、IL-20結合断片、その合成または生物工学的変異体、ならびに免疫複合体を薬学的に許容され得る担体と混合する工程をさらに含む本発明の方法が提供される。薬学的に許容され得る担体がさらに下記において詳しく記載される。

【0108】

本発明はまた、本発明の抗体または抗原結合断片の免疫グロブリン鎖の可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチドに関連する。好ましくは、前記可変領域は、図1に示されるような可変領域のV_Hおよび/またはV_Lの少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

30

【0109】

導出されたまたは同等の配列の場合、前記配列は、少なくとも60%の同一性、より好ましくは（次の順で）少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、最も好ましくは95%、少なくとも96%~99%、または、さらには、100%の同一性を、上記で言及され、また、配列表において特定されるそのような配列からなる群の配列に対して示す。2つの配列の間におけるパーセント同一性は、ギャップの数を考慮に入れた場合のこれらの配列によって共有される同一位置の数、および、それぞれのギャップの長さの関数であり、この場合、ギャップは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要がある。配列の比較および2つの配列の間におけるパーセント同一性の決定を、当業者にはよく知られている数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。本明細書中で言及される同一性は、本明細書中下記でさらに言及されるようなBLASTプログラムを使用して決定されなければならない。

40

【0110】

上記で述べられるように、好ましい実施形態において、本発明は、実質的に完全なヒト抗体に関連し、好ましくは、定常重鎖I(C_H1)と定常領域の対応する軽鎖とを少なくとも含むIgG、すなわち、-1、-2、-3または-4をラムダまたはカッパとの組合せで含むIgGに関連する。特に好ましい実施形態において、実施例において例

50

示される本件抗体について単離されるそのような定常領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が、下記の表 1 において、また、ヌクレオチド配列に関しては配列番号 5、配列番号 7、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 29、および配列番号 31 において、ならびに / あるいは、アミノ酸配列に関しては配列番号 6、配列番号 8、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 30 および配列番号 32 において、または、前記で示されるこれらに対して少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列において示されるように使用される。

【0111】

上記によれば、1つの実施形態において、本発明はまた、本発明の抗体または抗原結合断片の1つの免疫グロブリン鎖の可変領域を少なくともコードするポリヌクレオチドを提供する。典型的には、このポリヌクレオチドによってコードされる前記可変領域は、前記抗体の可変領域の V_H および / または V_L の少なくとも1つの相補性決定領域 (CDR) を含む。抗体の可変領域および定常領域が下記の節「IgG構造」においてより詳しく記載される。本発明の好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、下記の表 1 に示されるような本発明の抗体の V_H 領域または V_L 領域をコードするポリヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、あるいは、そのような核酸から本質的になるか、あるいは、そのような核酸からなる。この点に関して、当業者は、軽鎖および / または重鎖の可変ドメインを少なくともコードするポリヌクレオチドが様々な免疫グロブリン鎖またはそれらの1つのみのどちらかの可変ドメインをコードし得ることを容易に理解するであろう。好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書中上記で定義されるような抗 IL-20 抗体またはその IL-20 結合断片をコードする。

10

20

【0112】

表 1：本発明の IgG 4 型かつラムダ型の IL-20 特異的な 20A10 抗体、本発明の IgG 1 型かつラムダ型の IL-20 特異的な 2A11 抗体、7D1 抗体および 6E11 抗体の可変領域および定常領域 (V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L) 領域のヌクレオチド配列、ならびに本発明において用いられる IgG 1 型かつカッパ型の IFN- γ 特異的な 26B9 抗体、31B4 抗体、8H1 抗体および 19D11 抗体の可変領域および定常領域 (V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L) 領域のヌクレオチド配列。下線が引かれた太字のヌクレオチドまたはアミノ酸により、可変鎖配列における CDR コード領域が示される。下線が引かれた斜体字のヌクレオチドまたはアミノ酸により、配列決定がなされていないが、データベースから得られている配列が示される。定常鎖において、そのような 15 領域がデータベースにおける該当するヒト生殖系列可変領域配列とアライメントされ、それらと一致させられる；例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge、英国) によって管理される Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>) を参照のこと。

30

【表 1 - 1】

抗体	可変重鎖 (VH) および可変軽鎖 (VL)、定常重鎖 (CH) および定常軽鎖 (CL) のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列。	配列番号
20A10 VH DNA	caggtgcagctggtgcaatctgggctgaggtgaagaagcctgggtcctcagtgaaggtctct gcaagacttctggaggcaccctcagcaccctactctcagctgggtgcgacagggccctggaca ggctcttgagtggctgggaggaatgatccctatccttagtagaacaacgtacgcgcagaagttt cagggcagactcagcattaccgaggacgaaccacgagcagctctacatggaactgagcagcc tgaatctgaggacacggcctctattactgtgagaccgagggggaagttcttgcgcgcacaa ctactactacggaatggacgtctggggccaagggaccaggtcaccgtctctca	1
20A10 VH アミノ酸	qvqlvqsgaevkpkpssvksvsktsstlswvrqapggglewlggmipilsrttyaqkf qgrlritadeptstsymelsslksedtavyycategevsaaahnyygmdivwqggtvtvss	2
20A10 VL κ DNA	gatattgtgctgactcagctcaccctcactctaccctgcccctgagagccggcctccatct cctgcaggctctagtcagagcctcctgcatggaatggacacaactatttggattggtacctgca gaagccagggcagctcaccagctcctgatctatttgggttctaategggcctccggggtcct gacaggttcagtgagcagtgatcagcagcagattttacactgaaaatcagcagagtgaggctg aggatgttgggtttattactgcatgcaaacctacatactgtattcacttccggcctgggac cagagtgatatcaaa	3
20A10 VL κ アミノ酸	divltqsplylvpvtgpepasiscrssqslhghnhyldwylqkpgqspqlliylgnsrasgvp drfsgsgsgtdftlkisrveaedvgyyvcmtlhtvftfpgptrvdik	4
20A10 CH DNA	gcttcaccaaggcccatcggtcttcccccctggcgccctgctccaggagcactccgagagca cagccgccctgggtgctggtcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtctacagctcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtag atcacaagcccagcaacaccaaggtgacaagagagttgagtcacaataggtccccatgccc atcatgcccagcactgagttcctggggggaccatcagcttctctgttcccccaaaacccag gacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtgagcgtgagccaggaag accccagggtccagttcaactggtaactggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcc gcgggaggagcagltcaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgaccaggac tggtgtaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaggcctcccgtctccatcgaga aaaccatctccaaagcacaaggcagccccagagccacaggtgtacacctgccccatccca ggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggtcttaccaccagcagc atcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgc tggactccgacggctcttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcagga ggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagc ctctcctgtctctgggtaaa	5
20A10 CH アミノ酸	astkpgsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlsqsglys lssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdkrveskygpppcspapeflggpsvflfppkpk dtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevfqnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvsvltvlhqd wlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqeemtknqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykttppvlstdsgsflysrlltvdksrwqegnvfscsvmhealhhnytqks lslslgk	6
20A10 CL κ DNA	cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaa ctgcctctgttgtgctgctgaataactcttatcccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaaagtctacg cctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcggcgtcacaagagcttcaacaggggagagtg t	7
20A10 CL κ アミノ酸	rtvaapsvfifpdsdeqlksgtasvvelnnfyprvakvqkvdnalqsgnsqesvteqdsksd tyslsstltlksadyekkhkyacevthqglsspvtkfsnrgec	8

10

20

30

40

【表 1 - 2】

2A11 VH DNA	Caggtgcatctgggtcagtcctggggctgaggtgaagaagcctgggtccctcggigaaggtctcct gcaagccttctggaggcacctcaacaattttcccatgagttgggtgcacagccctggacg aggccttgagtgatggcagggatcatccctgtatttgggtcggcaaacatgcacagcagttt <u>cacggcagagtcaccattagcgcggacatatccacagcagcgggtccatggaactgaatgact</u> tgaatctgaggacacgggcgtttattattgtgcgattagtgagatgaggacaactggatcat <u>gaacttttggggccagggaaacctggtcaccgtctctca</u>	9
2A11 VH アミノ酸	qvhlvqsgaevkpkpssvkvscasggtfnnfpmswvrqapgrglewmagiipvfgsanyaqqf <u>hgrvtisadiststvsmeIndlksedtgvyycaisgdednwimnfwgqgtltvss</u>	10
2A11 VL λ DNA	cagtccttgetgacgcagccgcccctcagtgctcggggcccagggcagagagtcaccatctcct <u>gcactgggagcagctccaacatcggggcaggttatgatgtgcact</u> tggtaccagcaagtccagg gacagcccccacacccctcatctatggaacacagaaatcggcccctcaggggtccctgaccgattc tctggctccaagtctggcagctcagcctcccggccatcactgggctccaggctgaggatgagg ctgattattactgc <u>cagtcctatgacagcagcctgagtggtcatcggtgttcggcggaggac</u> caagtgaccgtcctcagtcagcccaaggctgcccctcggtcactctgttcccggcc	11
2A11 VL λ アミノ酸	qslltqppsvsgapqrvrtisctgsssnigagydhwyqqvpgtapklliygnrnrpsgvpdrf sgsksgtsaslaigtlaeadeadyycqsydsslshgavfgggktvtvlrqpkaapsvtlfpp	12
2A11 CH DNA	gcctccaccaaggcccctcgggtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggca cagcggcccctgggtgctgctggtcaaggactacttcccgaaccggtgacggtgctcgtggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaactga atcacaagcccagcaacaccaagtgagacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactca cacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagtcctctcttccccca aaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtga gccacaagaccctgaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagccgaggagcagtagacaacagcagcaccgtggtgagcgtcctcaccgtcctg caccagactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcacaacaaagccctccagccc ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcc cccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaggctcttat cccagcagatcgcctggagtgaggagacaatgggcagccggagacaactacaagaccagc ctcccgtgctgactccagcggctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaagctctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag cagaagagcctctccctgtcccgggtaaa	13
2A11 CH アミノ酸	astkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglys lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfpp kpkdtlmsrtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakqprepqvvtlppsreemtknqvslctlvkgfy psdiaewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhyt qkslslspgk	14
2A11 CL λ DNA	tctctgaggagcttcaagccaacaagccacactgggtgtgtctcataagtgactcttaccgg gagcctgacagtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcggagtgagaccaccac acctccaacaaagcaacaacaagtagcggccagcagctacctgagcctgacgctgagcag tggaagteccacagaagctacagctgccaggtcacg <u>catgaaggagcaccgtggagaagacag</u> <u>tggcccctacagaatgttca</u>	15
2A11 CL λ アミノ酸	sseelqankatlvelisdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnkyaassyisltpaq wkshrsyscqvt <u>hegstvektvaptecs</u>	16

10

20

30

40

【表 1 - 3】

7D1 VH DNA	gaagtgcaactggggtgctctgggggagacttcatacagcctggcaggctccctgagactctcct gtgcagcctctggattcaagtttgatgattatgccatgttctgggtccggcaagtccagggag ggccttgagtggtctcagggattagttggagtagtgataagatggcctatgtggactctgtg <u>aagggccgctttaccatctccagagacaacccaagaacacctctatttgcaaatgacaatc</u> tgagacctgacgacacggccttctactactgtgcaaggcgggatttagcagtgctggaacta <u>ctttgacttctggggccagggaacctggtcaccgtctctca</u>	17	
7D1 VH アミノ酸	evqlvasgdfiqgrslrlscaasgfkfddyamfwvrqvpgrglewvsgiswssdkmayvds <u>kgfrftisrdnakntllylqmnlnrpdtdafyycakggfssvnyfdfwgqgtlvtvss</u>	18	
7D1 VL λ DNA	cagctctgttctgactcaaccacctcagcgtctgggacccccggcagacagtcacatctctt <u>gttctggaaccacctccaacatcggcagtaactgtaagctggtaaccggcaactcccagggc</u> ggccccaaactctctctcttacttataatcagcggccctcagggttccctgaccgattctct ggctccaagtctggcaccctcgtctcctggccatcagtgacctccagctgacgatgagctg attatctctgtg <u>cccggtgggatgacgccctgggtggttgggtgttcggcggaggaccaagct</u> gaccgtctca	19	10
7D1 VL λ アミノ酸	qsvltqppsasgtpgqvtviise <u>sgttsnigsntvswyrqlpgaapkliftynqrpsgvpdrfs</u> gsksgtsaslaigllqsddeadyycavwddalggwvfgggtklvtl	20	
7D1 CH DNA	gcctccaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggca cagcggccctgggtcgcctggtaaggactacttccccgaaccggtagcgggtctctggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcttacagctcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtga atcacaagcccagacaaccaagtgagacaagagagttgagcccaactctgtgacaaaactca cacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagctctctcttccccca aaaccaagagacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtga gccacaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaaagccgaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggctccaacaagccctcccagccc ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcc ccatccccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaagctcttat cccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacgc ctccccgtctggactccgacggctctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtctctctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaacaacctacacg cagaagagcctctccctgtccccgggtaaa	21	20
7D1 CH アミノ酸	astkgpsvflpsskstsggtaalglvkdyfpepvtvswngalstgvhtfpavlqssglys lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepksekthtppcpapelggpsvflfpp kpkdtlmsirtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvslctlvkgfy psdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnyht qkslslspgk	22	
7D1 CL λ DNA	ggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttccccctcctctgaggacttcaagcca acaagccacactgggtgtctcataagtacttctaccgggagccgtgacagtgacctggaa ggcagatagcagccccgtcaaggcgggagtgagaccaccacacctccaacaaagcaacaac aagtacggccagcagctacctgagcctgacgcctgagcagtggaagtcacacaaaagctaca gctgccaggtcac <u>gcatgaaggagcaccgtggagaagacagtgggccctacagaatgttca</u>	23	
7D1 CL λ アミノ酸	gqpkaapsvtilfppsseelqankatlvelisdfypgavtvawkadsspvkagvettpskqsnn kyaassylsltpeqwkshksyscqvthegstvektvaptecs	24	40

【表 1 - 4】

6E11 VH DNA	cagggtcagctggcagctctggggcagaggtgaagaagcctgggtccctcagtgaaggtctcct gcaaggcctctggcggcaccttccgcaactatgcgatcaactgggtgcggcagccccagaca aggacttgagtggatgggaagcctcgtccctatggtttaccaccacaacgtacgcacagaagttt cggggcagagtcacgataagcgcggacgagtcacagccacatcctccatggaactgaccagcc tgacatctgaagacacggcctctacttctgttctgcagatggctacaagggcggcctctttta cggtatgaaatgctcggggccaagggaccacggtcaccgtctcttca	25
6E11 VH アミノ酸	qvqlvqsgaevkpkpssvkvsvckasggtfrnyainwvrqaprqlwmgslvpmftsptyaqkf rgrvtisadestatssmeltsltsedtavyfcsadgykkgglfygmnyvqqgtvtvss	26
6E11 VL κ DNA	gacatcgtgttgaccagtcctccagaatccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatca actgcagctctagccagagtggtttatcacagctccaacagtaagaactacttagcttggtcca gcagaaacctggacagcctcctaaacttctcattttatgggcatctaccgggaatccggggtc cctgatcgttcagtggcagcgggtctgggacagattcactctaccatcaccagcctgcagg ctgaagatgtggcagtttattactgtcaccaatatcatactctacctcgaacgttcggccacgg gaccaaggttgagatcaaa	27
6E11 VL κ アミノ酸	divltqspeslavslgeratinekssqsvlyssnsknylawfqkpgqppklliywastresgv pdrfsgsgsgtdftltititslqaedvavyychqvhtlprtfghgkveik	28
6E11 CH DNA	gcctccaccaagggcccacatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggca cagcggccctgggtgcctggtaaggactacttcccggaaccgggtgacgggtgctggaactc aggcgccttgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgacctgcccctccagcagcttgggcccagacctacatctgcaacgtga atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagtcccaaatcttgacaaaactcacac atgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaa cccgaagcacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggactgagcc acgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagac aaagccgcgggaggagcagtagacaacagcagctaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaagccctcccagccccc tcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccc atccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcttggctcaaaggcttctatccc agcgacatcgcctggagtgggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccagcctc cctgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg gcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtctgcacaaccactacacgcag aagagcctctcctgtctcgggtaaa	29
6E11 CH アミノ酸	astkgpsvflapsskstsgttaalglvkdyp pepvtvswngaltsgvhtfpav lqssglvs lssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdktht ppcpapel lggpsvflfpp kpkdtlmsrtpevtcvvdvshedpevkfnwvvdgvevhnakt preeqynstyrvsvl tl hdwlngkeykcvnsnalpapiektiskakgprepqvylppsrdeltknqvs l tlvkgyf psdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskl tvdk srwqqgnvfscsvmheal hnhyt qkslslspgk	30
6E11 CL κ DNA	cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccccaictgatgagcagttgaaatctggaa ctgcctctgttgtgtgcctgtgaataactcttatccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgccctccaatcgggtaactccagagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacg cctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtg t	31
6E11 CL κ アミノ酸	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfybreakvqkvdnalqsgnsqesvteqdsksd tyslssltltskadyekkhvyacevthqlsspvtksfnrgec	32

10

20

30

40

【表 1 - 5】

26B9 VH DNA	cagatactactgcaggagtcgggcccaggactggggaagcccacggagaccctgtccctcaccct gtagtgtctctggtgactccatcagtgatagtagtcaactactgggctggattgccagecccc agggaaggaccagagtgattggcagtgctatcttttagtctgatgacccactacaaccctcc ctcaaaagtgcgctcagcatctccgttgacaagccaagaaccagttctctttaaagtgaacct ctgtgactgtgccgacacggccacatattactgtgcgagacaagcccttgcccagtcggaggc catgaattggctcgacccctggggccaggatctctggtcacagtcctctca	35
26B9 VH アミノ酸	qillqesgpglvkptetlsltesvsgdsidssshYWawirpppgkpwewigsvyfssmthynps lksrvsisvdkpnqfslkvtsvtvadatyycarqalarvgamnwfdpwgqgslvtvss	36
26B9 VL κ DNA	gacatcataatgaccagtcctcagaacctccctgctgtgctctgggcgagggggtcaccatca actgcaagtcaccagcagagcgtcttttccacctccagtaataagagttgttttagcttggtatca gcagaagccaggaaagtctcccaaattgctcatcttactgggcatcaaccgcccaatccggggtc cctgaccgattcagaggcaggggtctgggacagattctctctcaccatcaccagctctgcagg ctgaagatgtggctgtttattctgtcagcagtgctcagacatccctccactttcgccggagg gaccaggttgagatcaaa	37
26B9 VL κ アミノ酸	diimtqspdslpvsllgevtinckssqsvfftsnksclawyqqkpgkspklliywastrqsgv pdrfrgsgsgtdfsltitslqaedvavyfcqqcqtspptfgggrleik	38
26B9 CH DNA	gctccaccaaggcccacatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggca cagcgccctgggctgctggtaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctgtggaactc aggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtaaccgtgcccctcagcagcttgggcaaccagacctacatctgcacaagtgga atcacaagcccagcaacaccaaggaggacaagagagttgagcccacatctgtgacaaaactca cacatgcccaccgtgcccagcactgaactctctgggggaccgctcagctctctcttcccccca aaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtga gccacgaagaccctgaggtaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagcccggggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggctcagcgtcctcaccgtctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctccagccc ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcc cccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaaagctcttat cccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgc ctcccgtgtggaactccagcggctctcttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaagctctctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccactacag cagaagagcctctccctgtcccgggtaaatga	39
26B9 CH アミノ酸	astkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglys lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfpp kpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakqprepqvylppsreemtknqvsltlcivkgfy psdiavewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhhht qkslslspgk	40
26B9 CL κ DNA	cgaaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccccccatctgatgagcagttgaaatctggaa ctgctctgttgtgtgctgctgaataactcttatcccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgcccctcaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacg cctgcgaagtcaccatcagggctgagctcgcctcacaagagcttcaacaggggagagtg ttag	41
26B9 CL κ アミノ酸	rtvaapsvfifppsdeqlksqtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksd tyslsstltlksadyekkhkvyacevthqglsspvtkfsnrgec	42

10

20

30

40

【表 1 - 6】

31B4 VH DNA	cagatacagctgcaggagtcgggcccaggactggtaggcccacggagacctgtccctcactt gtagtgtctctggtagctccatcagtcagagtagtcattactgggctggattgccagecccc agggaaggaccagaatggattggcagtgctctatttagctcagatgacccaactacaaccgctcc ctcacaagtcgcgtcagcatctccattgacaaggccatgaataagttctcttaaaagtgaacct ctgtgactgtgccgacacggccacatattactgtgcgagacaggcccttgcccagtcggagc catgaattggttcgacctggggcccaggatctctggtcacagtcctctca	43
31B4 VH アミノ酸	qiqlqesgpglvrptetlsltsvsgdsisqssshywawirppgkpwigsvyvfssmthynps ltsrvsisidkamnksflkvtsvtvadtatyycaqalarvgamnwfdpwwqgslvtvss	44
31B4 VL κ DNA	gacatcataatgaccagtcctccagagtcctgctgtgtctctgggcgagggggtccacatca actgcaagtcaccagccagcagcgtcttttccacctccagtaataggagttgttttagcttggatca gcagaagccaggacagtcctccaaattgctcatttactgggcatcaaccgccaatccggggtc cctgaccgattcacaggcagcgggtctgggacagattctctctcaccatgccggctctgcagg ttgaagatgtggctgtttatttctgtcagcagtgtcacgcacccctcccaacttctggcggcgg gaccaggttggagctcaga	45
31B4 VL κ アミノ酸	diimtqspeslvpvslgegtvtnckssqsvfftsnrsclawyqqkpgqspklliywastrqsgv pdrftgsgsgtdfsltiagllqvcdvavyfcqqchaspptfgggrlelr	46
31B4 CH DNA	gcctccaccaaggcccacatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggca cagcggccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgctgtggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtctacagtcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtagcctgcccctccagcagcttgggcaaccagacctacatctgcaacgtga atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactca cacatgcccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctctcttccccca aaaccaaggaacacctcatgatctcccggacccccgaggtcacatgctggtgggtggagctga gccacaagacctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggaggtgcataatgcaa gacaaaagccgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtagcagctcaccgctctg caccaggactggctgaatggcaaggagtaeaagtcaaggctccaacaagaccctcccagccc ccatcgagaaaaccatctccaaagcaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaaagctcttat cccagcagatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagc ctccccgtgtggactccgacggctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtctctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag cagaagagcctctcctgtccccgggtaaatga	47
31B4 CH アミノ酸	astkgpsvflpapskstsrgtaalglvkdyfpepvtvswngalstgvhtfpavlqssglys lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfpp kpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsllclvkgyf psdiawewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwwqgnvfscsvmhealhnhyt qkslslspgk	48
31B4 CL κ DNA	cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccccccatctgatgagcagttgaaatctggaa ctgcctctgttgtgtgcctgctgaataactcttatcccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgcccctcaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaacacaaaagtctacg cctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcggccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg ttag	49
31B4 CL κ アミノ酸	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfybreakvqkvdnalqsgnsqesvteqdsksds tyslslstltskadyekhkvyacev <thqglsspvtksfnrgec< th=""></thqglsspvtksfnrgec<>	50

10

20

30

40

【表 1 - 7】

8H1 VH DNA	caggtgcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcct gcaagccttctggacagaccctcaccagtgatgataatcaactgggtgcacagccctggaca ggggctagagtggatgggatggaggaaccctaacactcaggacacgggctatgcacagaagttc cacggcagactcaccttgaccagcaacagttccataagttacatctctctggagttgagcggcc tgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagagcggggacttcgaccttgaccggcca ctacttcgctttggggctctggggccaggggaccacggctcatctctcctca	51
8H1 VII アミノ酸	qvqlvqsgaevkkgpvasvkvsckasgqfttsddinwvrqapggglewmgrnpntqdtgyaqkf hgrltltsnssistsylelsgrlsedtavyycaragtstltghyfalgvwqggttvivss	52
8H1 VL κ DNA	gacatccagctgaccagctctccatctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatca cttgtcaggcgactcaggatattagcaaatatttaattgggtatcagcagaaaccagggaaagt ccctaaactctgatctacgaaacatccaatttggagtaggggtcccatcaaggttcagtgga agtgggtctgggacacattttactctccatcagcagcctgcaggctgaagattttgcaacat attactgtcaacagtatgagaatttcccgcttacttctggcggagggaccaaggtggagatcaa a	53
8H1 VL κ アミノ酸	diqltqspsslsasvgrvtitcquatdiskylnwyqqkpgkvpklliyetsnlevgvpsrfsfsg sgsgthftltisslqaedfatyyccqyvenfpftfgggtkveik	54
8H1 CH DNA	gectccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacctctgggggca cagcggccctgggtgctgctggtaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtctctacagctctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtga atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagattgagccaaatcttggacaaaactca cacatgcccaccgtgccagcaccctgaactctctggggggaccgtcagttctcttcccccca aaaccaaggacacctctatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtga gccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagccggaggagcagtagacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggctcacaacaaagccctccagccc ccatcgagaaaaccatctccaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcc ccatcccgaggagagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcttggtaaaaggtctctat cccagcagatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcgggagacaactacaagaccacgc ctcccgtgtgactccagcggctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaagctctctctatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag cagaagagcctctcctctgccccgggtaaa	55
8H1 CH アミノ酸	astkgpsvfplapsskstsggtaalglvkdypfpvptvswnsгалtsgvhtfpavlqssglys lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvpksedkthtppcpapellggpsvflfpp kpkdtlmlisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakqprepqvvtlppsreemtknqvsltclvkgyf psdiawewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhyt qkslsispkg	56
8H1 CL κ DNA	cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaa ctgctctgttgtgtgctgctgaataactcttatccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaacacaaagtctacg cctgcgaagtcaccatcagggctgagctcggcgtcacaagagcttcaacaggggagagtg ttag	57
8H1 CL κ アミノ酸	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfyreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksds tyslsstltlksadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec	58

10

20

30

40

【表 1 - 8】

19D11 VH DNA	<u>gagggtgcagctgttggagctctggggctgagggtgaagaggcctgggtcgtcggtaggggtctcct</u> gcagggtctctggagacaccttcagcagttaccctatcagttgggtgcacagccctggaca aggccttgagtggatgggaaggatcctccctgcccttgggtgcacaaactacgctcagaacttc cggggcagaatcacgattaccgcggacaagtcgccctcacagcctacttggactgagtagcc tcagatttgaggacacggcctgtattactgtgcaggtccagtgccggacataattccttcgat tttggggacgacctctttgcctctctggggccagggaagcctgggtcaccgtctcctca	59
19D11 VH アミノ酸	<u>evqllesgaevkrpgssvrvscrasgdtfssypiswvrqapggglewmgrilpalgvtnyaqnf</u> rgrititadkspltaylelsslrfedtavyycaspsadiipsilgttlfawgqgslytvss	60
19D11 VL κ DNA	<u>gaaatgtgttgacgcagctc</u> tcaggcaccctgtctctgtctccggggaaggggccacctct cctgcaggggccagtcagaatgttagcagacactacttaacctgggtaccagcagaaacctggcca gtctccccggctcctcctatgggtggctccagcaggggccactggcgtcccagacaggttcagt ggcgttgggtctgggacagacttcactctaccatcagcaggctggagcctgaagactttgcag tgttttactgccagagctatcatagcccacctcctgtgtacacttcggccaggggaccaaggt ggagatcaaa	61
19D11 VL κ アミノ酸	<u>eivltqspgtlslspgegatlscrasqnvrsrhyltwyqqkpgqsprlliyggsratgvpdrfs</u> ggsgtdftltisrlepedfavfycqsyhspppvtyfgqgtkveik	62
19D11 CH DNA	<u>gcctccaccaagggcccatcggctctccccctggc</u> accctcctccaagagcaccctctgggggca cagcggccctgggtgctcgtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc aggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggtgtcctacagtcctcaggactctactcc ctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagcttgggcaccacagacctacatctgcaacgtga atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactca cacatgccaccctgcccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagctctcctctcccccca aaaccaaggacaccctcatgatctccccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtagctga gccacgaagaccctgaggtaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagccgcgggaggagcagtaacaacagcagctaccgtgtggctcagcgtcctcaccgtctg caccaggactggctgaalggcaaggagtaacaagtgaaggtctccaacaaagccctccagccc ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcc ccatccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggteaaggtctctat cccagcgacatgccctggagtgaggagacaatgggcagccggagaacaactacaagaccaagc ctcccgtgtggaactcagcaggtcctctctctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag cagaanancctctcctctgccccgggtaaatga	63
19D11 CH アミノ酸	<u>astkqpsvfp/apsskstsgttaalglvkdyppevtvswngaltsgvhtfpavllqssglys</u> lssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfpp kpkdtlmsirtpevtcvvvdvshdepvkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfy psdiawewesngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhhnyt qxxlslspgk	64
19D11 CL κ DNA	cgaaactgtggctgeaccatctgtcttcatcttccccccatctgatgagcagttgaaacttgaa ctgctctgttgtgtgctgctgaataactcttatccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagc acctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacagactacagagaacacaaagtctacg cctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtg ttag	65
19D11 CL κ アミノ酸	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfybreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksd tyslsslslskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec	66

10

20

30

40

【 0 1 1 3 】

当業者は、上記可変ドメインを有する抗体の可変ドメインが、所望される特異性および生物学的機能の他のポリペプチドまたは抗体を構築するために使用され得ることを容易に理解するであろう。したがって、本発明はまた、上記で記載された可変ドメインの少なくとも1つのCDRを含み、かつ、好都合には、添付された実施例において記載される抗IL-20抗体のいずれかと実質的に同じ結合特性または類似する結合特性を有するポリペ

50

プチドおよび抗体を包含する。当業者は、本明細書中に記載される可変ドメインまたはCDRを使用して、様々な抗体が、この技術分野において知られている方法に従って、例えば、欧州特許出願EP0451216A1および同EP0549581A1に記載されるように構築され得ることを容易に理解するであろう。

【0114】

さらに、当業者は、結合親和性が、アミノ酸置換をCDR内において、または、Kabatahによって定義されるようなCDRと部分的に重なる超可変ループ(ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol. 196(1987)、901~917)の内部において行うことによって強化されることがあることを知っている。したがって、本発明はまた、述べられたCDRの1つまたは複数、あるいは複数のアミノ酸置換を含み、好ましくは2つ以下のアミノ酸置換を含む抗体に関連する。好ましくは、本発明の抗体は、その免疫グロブリン鎖の一方または両方において、V_H領域については配列番号2、配列番号10および配列番号26に示されるような可変領域、ならびに、V_L領域については配列番号4、配列番号12、配列番号20および配列番号28に示されるような可変領域、あるいは、図1に示されるような可変領域の2つのCDRまたは3つすべてのCDRを含む。

10

【0115】

好ましくは、1つまたは複数のアミノ酸変化(例えば、置換)を有する述べられたCDRのいずれか1つを含む抗体またはそのIL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体は、実施例において例示される抗体のいずれか1つの結合特徴を示す。特に好ましい実施形態において、そのような抗体またはそのIL-20結合断片あるいはそれらの生物工学的誘導体は、アミノ酸配列101-PDHYTLRKISSSLANSFLT-118(配列番号69)またはアミノ酸配列102-DHYTLRKISSSLANSF-116(配列番号70)および/またはアミノ酸配列101-PDHYTLRKISSSLANSFL-117(配列番号72)からなるIL-20由来ペプチドを認識し、ただし、前記配列において、P101、I109、S110および/またはL117のみが別のアミノ酸によって置換されることがあり、好ましくはアラニンによって置換されることがあり、その一方で、T118を除く他のアミノ酸位置は変わらない。実施例10ならびに図13Dおよび図13Eもまた参照のこと。したがって、この実施形態では、抗体はまた、欠けているS115およびF116を考慮すると、アミノ酸配列97-NYQTPDHYTLRKISSLAN-114(配列番号71)からなるペプチドを認識しない、または実質的に認識しない。加えて、実施例10および図13Cにおいて例示されるように、そのような抗体またはそのIL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体は好ましくは、マウスIL-20に由来する対応した18merペプチドとは結合せず、好ましくは、その一方で、全長型のヒトIL-20およびマウスIL-20とは結合することができる。これに関連して、本発明の抗体またはそのIL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体の述べられた結合特徴を明らかにすることが好ましくは、添付された実施例に記載されるように行われること、例えば、実施例10に記載され、また、図10に示されるようなマイクロアレイで行われることが理解される。

20

30

【0116】

上記抗体をコードする本発明のポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、RNAまたは合成的に生産されたDNAもしくはRNA、またはそれらのポリヌクレオチドのいずれかを単独でまたは組み合わせて含む組換え的に生産されたキメラ核酸分子であり得る。好ましい実施形態では、場合により、前記抗体の他方の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードする前記ポリヌクレオチドと組み合わせて、上記ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。このようなベクターは、適切な宿主細胞中、適切な条件下で前記ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子などのさらなる遺伝子を含み得る。

40

【0117】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、原核細胞または真核細胞における発現を可能にする発現制御配列に機能的に連結される。前記ポリヌクレオチドの発現は、翻訳可能

50

な mRNA へのポリヌクレオチドの転写を含む。真核細胞、好ましくは、哺乳動物細胞における発現を確実にする調節要素は、当業者に周知である。それらは、通常、転写開始を確実にする調節配列と、場合により、転写終止および転写産物の安定化を確実にするポリ A シグナルとを含む。さらなる調節要素は、転写および翻訳エンハンサ、ならびに / または本来的に結合しているプロモータ領域もしくは異種プロモータ領域を含み得る。

【0118】

これに関して、当業者であれば、軽鎖および / または重鎖の少なくとも可変ドメインをコードするポリヌクレオチドは、両方の免疫グロブリン鎖または一方の鎖のみの可変ドメインをコードし得ることを容易に認識するであろう。

【0119】

同様に、前記ポリヌクレオチドは同じプロモータの制御下にあってもよいし、または別個に発現制御されてもよい。原核生物宿主細胞における発現を可能にする有望な調節要素は、例えば、大腸菌の場合には P_L 、 $l a c$ 、 $t r p$ または $t a c$ プロモータを含み、真核生物宿主細胞における発現を可能にする調節要素の例は、酵母の場合には $A O X 1$ または $G A L 1$ プロモータ、または哺乳動物および他の動物細胞の場合には $C M V -$ 、 $S V 4 0 -$ 、 $R S V -$ プロモータ、 $C M V -$ エンハンサ、 $S V 4 0 -$ エンハンサまたはグロビンイントロンである。

【0120】

転写開始に関与する要素に加えて、このような調節要素は、ポリヌクレオチドの下流に、 $S V 4 0 -$ ポリ A 部位または $t k -$ ポリ A 部位などの転写終止シグナルも含み得る。さらに、使用される発現系に応じて、ポリペプチドを細胞区画に方向付けるかまたはそれを培地に分泌させることができるリーダ配列を本発明のポリヌクレオチドのコード配列に付加することができる。当技術分野において周知である。リーダ配列は、翻訳、開始および終止配列と適切な段階で会合し、好ましくは、リーダ配列は、翻訳されたタンパク質またはその一部を周辺腔または細胞外培地に分泌させることができる。場合により、異種配列は、所望の特徴、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡単な精製を付与する C 末端または N 末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。本文脈では、 $O k a y a m a - B e r g$ cDNA 発現ベクター $p c D V 1$ ($P h a r m a c i a$)、 $p C D M 8$ 、 $p R c / C M V$ 、 $p c D N A 1$ 、 $p c D N A 3$ ($I n v i t r o g e n$) または $p S P O R T 1$ ($G I B C O B R L$) などの適切な発現ベクターが当技術分野において公知である。

【0121】

好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクター中の真核生物プロモータ系であるが、原核生物宿主用の制御配列も使用し得る。ベクターが適切な宿主に組み込まれたら、ヌクレオチド配列の高レベルの発現に適切な条件下で宿主を維持し、所望により、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、軽鎖 / 重鎖二量体またはインタクトな抗体、結合断片または他の免疫グロブリン形態を回収および精製する; $B e y c h o k$, $C e l l s$ $o f$ $I m m u n o g l o b u l i n$ $S y n t h e s i s$, $A c a d e m i c$ $P r e s s$, $N . Y .$, (1979) を参照のこと。

【0122】

さらに、本発明は、場合により、本発明の抗体の他方の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードする本発明のポリヌクレオチドと組み合わせて、抗原または好ましくは本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子工学で通常使用されるベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージに関する。好ましくは、前記ベクターは、発現ベクターおよび / または遺伝子導入もしくは標的化ベクターである。

【0123】

レトルウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルスまたはウシ乳頭腫ウイルスなどのウイルス由来の発現ベクターを、標的細胞集団への本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの送達に使用することができる。組換えウイルスベクター

10

20

30

40

50

を構築するために、当業者に周知の方法を使用することができる；例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994) に記載されている技術を参照のこと。あるいは、標的細胞への送達のために、本発明のポリヌクレオチドおよびベクターをリポソームに再構成することができる。本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター（例えば、免疫グロブリン鎖の重および/または軽可変ドメインをコードする配列および発現制御配列）を、周知方法（これは、細胞宿主の種類に応じて変化する）によって宿主細胞に導入することができる。例えば、原核細胞の場合には塩化カルシウムトランスフェクションが一般的に用いられるのに対して、他の細胞宿主の形質転換の場合にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用され得る（Sambrook、上記を参照のこと）。

10

20

30

40

50

【0124】

上記に関して、本発明はさらに、前記ポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞に関する。前記宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。宿主細胞中に存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るか、または染色体外で維持され得る。宿主細胞は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物またはヒト細胞などの任意の原核細胞または真核細胞であり得る；本発明の抗体を生産するのに適切な宿主細胞および方法は、以下のセクション「宿主細胞」により詳細に記載されている。

【0125】

上述の宿主細胞を使用して、本発明の抗体を、例えば、薬学的使用のために、または、治療的介入のための標的として産生させ、また調製することが可能である。したがって、1つの実施形態において、抗IL-20抗体またはそのIL-20結合断片を調製するための方法であって、下記の工程を含む方法を提供することもまた、本発明の目的である：

- (a) 本明細書中上記で定義されるような細胞を培養する工程；および
- (b) 前記抗体またはそのIL-20結合断片を培養物から単離する工程。

【0126】

したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる、あるいは、抗IL-20抗体またはその免疫グロブリン鎖を調製するための上述の方法によって得ることができる組換え抗体、好ましくはヒト由来抗IL-20抗体およびそのIL-20結合断片、その免疫グロブリン鎖に関連する。

【0127】

抗体およびその模倣体の組換え産生のための様々な手段および方法、ならびに、競合する結合分子（これは抗体である場合があり、または、抗体でない場合がある）についてスクリーニングする様々な方法がこの技術分野において知られている。しかしながら、本明細書中に記載されるように、特にヒトにおける治療的適用に関しては、本発明の抗体は、前記抗体の適用が、キメラ抗体について、また、さらには、ヒト化抗体について他の場合には認められるそのような抗体に対する免疫応答を実質的に有していないという意味で、ヒト抗体である。

【0128】

抗IL-20抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体は、治療剤として直接に使用される場合がある。しかしながら、1つの実施形態において、本発明によって提供される抗IL-20抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体は、検出可能に標識され、または薬物に結合させられ、ただし、この場合、好ましくは、検出可能な標識が、例えば、酵素、放射性同位体、蛍光団、ペプチドおよび重金属からなる群から選択される。治療剤または検出可能な標識をそれぞれ含む抗体または他の場合には免疫グロブリン成分、および、治療剤または検出可能な標識にそれぞれコンジュゲート化される抗体または他の場合には免疫グロブリン成分はま

た、「免疫コンジュゲート」と呼ばれる。

【0129】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、本発明のヒト由来モノクローナル抗ヒトIL-20抗体またはその述べられた誘導体を含む免疫コンジュゲートであって、好ましくは、機能的部分（例えば、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光性マーカー、化学発光マーカー、ペプチドタグ、重金属、磁気粒子、薬物または毒素など）を含む免疫コンジュゲートに関連する。1つの実施形態において、本発明の免疫コンジュゲートは、例えば、ヒト身体における抗体の半減期および生物学的利用能を改善するためにペグ化される。免疫コンジュゲートの調製、ならびに、適切な検出可能な標識、薬物および毒素がこの技術分野では知られており、例えば、国際出願公開WO2005/052000に記載される。

10

【0130】

標識された本発明の抗体または抗原結合断片は、「免疫化学/免疫標識」のようなインビトロアッセイを含め、インビボまたはインビトロで特定の標的を検出するのに使用することができる。インビボにおいて、それらは、目的の抗原を発現する組織、細胞または他の物質を検出するために、核医学イメージング技術と同様の方法で使用することができる。標識、それらの診断での使用、およびそれらと本発明の結合分子とのカップリングは、さらに以下のセクション「標識および診断」により詳細に記載されている。

【0131】

本発明において特定されるIL-20特異的抗体は、罹患個体の免疫系（例えば、APCED患者において認められる症状に関連する免疫系）を重度に損なうことに関与する可能性がある。したがって、自己免疫性障害に罹患する被験体の病理学的反応を、自己抗体の数および/またはその影響を罹患したヒト患者または動物において最小限に抑えるための手段および対策を提供することによって消滅させること、または少なくとも緩和することが、本発明のさらなる局面である。したがって、1つの実施形態において、本発明はまた、本発明の自己抗体によって特異的に認識されるエピトープを含むペプチドまたはペプチド型化合物に関連する。競合的抗原の適用による場合と同様な効果で、それにより、様々な自己抗体がそれらのそれぞれの標的に結合しないようにすること、また、様々な自己抗体がそれらのそれぞれの標的に結合することを妨げることが、さらに下記で詳しく記載されるように抗イディオタイプ抗体によって得られる可能性がある。したがって、1つの実施形態において、本発明はまた、本発明の自己抗体の抗イディオタイプ抗体を提供する。

20

30

【0132】

既に上述したように、本発明はまた、上記に定義された障害（すなわち、自己寛容の発生障害または無秩序な発生に関連する障害）の処置に使用するための、本発明の抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド系化合物に関する。これらの単離された本発明の抗体またはその断片は、モノクローナル抗イディオタイプのパネルを作製するために免疫原として使用することができる。抗イディオタイプ抗体を作製するのに適切な方法については、Raychadhuri et al., J. Immunol. 137 (1986), 1743を参照し、T細胞については、Ertl et al., J. Exp. Med. 159 (1985), 1776を参照のこと。Raychaudhuri et al., J. Immunol. 137 (1986), 1743によって詳細に記載されているように、当技術分野においてルーチンに実施される標準的なアッセイを使用すれば、抗イディオタイプ抗体は、内部イメージおよび非内部イメージイディオタイプの表示を特徴とするであろう。抗イディオタイプ抗体が、それが結合するかまたは結合される抗体の抗原を構造的に模倣する場合、その抗原の「内部イメージ」と称される。

40

【0133】

自己免疫性疾患関連自己抗体（複数の自己抗体）のイディオタイプを模倣する分子を提供する方法は、当技術分野において説明されている；例えば、国際公開第03/099868号（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。例えば、このような方法は、以下の工程：（a）本発明の方法にしたがって自己抗体を提供するこ

50

と；(b) 該自己抗体を固相に結合してアフィニティマトリックスを形成すること；(c) 免疫グロブリンを含むプールした血漿もしくはB細胞を該アフィニティマトリックスと接触させ、次いで未結合の血漿成分を除去すること；(d) 自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体(抗Id)である結合した免疫グロブリンをマトリックスから溶出すること；(e) 複数の分子メンバーを含む分子ライブラリを提供すること；ならびに(e) 該抗Idを該分子ライブラリと接触させ、該抗Idが結合した結合分子を単離すること(該結合分子は、自己抗体のイディオタイプを模倣する分子である)を含み得る。自己抗体を単離する方法は、国際公開第2010/136196号(この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる)に開示されており、自己免疫性疾患および免疫系障害を処置するための、正常ヒト血清(NHS)から単離された天然ポリクローナルIgG反応性抗体(Ab)を含有する免疫グロブリン調製物が記載されている。IgG反応性Abは、抗原結合部位内またはその付近(例えば、オーバーラップしている)のいずれかに位置するそれらの抗原決定基に結合することによって、自己免疫性疾患を患っている患者の血清中に存在する疾患関連または病原性自己抗体を強力に中和する。

10

20

30

40

50

【0134】

本発明はまた、上述の抗IL-20抗体、IL-20結合断片、それらの合成または生物工学的変異体、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、細胞、ペプチドまたはペプチド型化合物、ならびに/あるいは、組合せで本発明の抗IL-20抗体またはそのIL-20結合断片の特徴を示す抗IL-20抗体またはそのIL-20結合断片のカクテルのうちのいずれか1つを含む組成物に関連する。加えて、または、代替として、1つの実施形態において、本発明の組成物またはキットは本発明の抗イディオタイプ抗体を含む。1つの実施形態において、組成物は医薬組成物であり、かつ、薬学的に許容され得る担体をさらに含む。薬学的に許容され得る担体、投与経路および投薬計画は、当業者に知られている対応する文献から採用することができ、さらには下記の「薬学的担体」および「投薬計画」のセクションにおいてもより詳しく記載される。

【0135】

加えて、本発明は、抗IL-20モノクローナル抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体を含む組成物を製造するためのプロセスに関連し、ただし、この場合、その製造は、当該抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体を、当該抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体をコードする形質転換用DNAの組換え宿主生物における発現によって調製する工程を含む。1つの実施形態において、組成物は医薬組成物であり、ただし、この場合、抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体を調製する工程の後には、必要な場合には間における1つまたは複数の工程の後で、抗体、IL-20結合断片、あるいはそれらの生物工学的誘導体を医薬組成物の製造において薬学的に許容され得る担体と混合することが続く。例えば、医薬組成物に製剤する前に、抗体またはそのIL-20結合断片が細胞培養物から医薬用グレードに精製される場合があり、かつ/または、誘導体化され、例えば、ペグ化され、または、診断用標識もしくは薬物にコンジュゲート化され、その結果、医薬組成物を得るようにされる場合がある。

【0136】

生化学的アッセイおよび細胞型インビトロアッセイのほかに、本発明の抗体の治療的有用性は、適切な動物モデルにおいて、例えば、RA、乾癬、SLEまたはT1DMなどについての動物モデルにおいて確認することができる。下記の実施例において詳しく説明される。

【0137】

一実施形態では、医薬組成物は、好ましくは、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)、コルチコステロイド、抗ヒスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、炎症または自己免疫性障害を処置するのに有用なさらなる薬剤をさらに含む。加えてまたはあるいは、さらなる実施形態では、医薬組成物は、免疫抑制薬および抗炎症または「抗リウマチ」薬からなる群より選択される、炎症関連疾患を処置するのに有用なさらな

る薬剤をさらに含む。

【0138】

別の実施形態では、組成物は診断組成物又はキットであり、免疫診断法または核酸ベースの診断法に通常使用される試薬をさらに含む。

【0139】

さらに、本発明は、下記の方法において使用されるための上述の抗IL-20抗体、IL-20結合断片、それらの合成または生物工学的変異体、あるいは、上記で定義されるような組成物を提供する：

(a) 免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態を処置するか、または、免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態の進行を妨げる方法；

(b) 免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態に伴う症状を改善する方法；ならびに/あるいは

(c) 免疫媒介もしくは自己免疫性の疾患もしくは状態の存在について、または、該疾患もしくは状態を発症する被験体の危険性を明らかにするため、に被験体を診断するか、またはスクリーニングする方法；ただし、前記疾患または状態は患者におけるIL-20の発現、IL-20の上昇したおよび/または有害な活性、に伴うおよび/または引き起こされる。

【0140】

上記で示されるように、それらの結合特異性のために、本発明のIL-20結合分子(例えば、抗体およびその断片など)は好ましくは、IL-20の発現、IL-20の上昇したおよび/または有害な活性、に伴うおよび/または引き起こされる免疫媒介または自己免疫性の障害または状態の処置、改善、診断および/またはスクリーニングの上記で規定される方法において使用される場合がある。

【0141】

例えば、発現、上昇したIL-20活性および/または有害なIL-20活性が、関節リウマチ(RA)滑膜組織生検物、乾癬皮膚病変部および強直性脊椎炎(AS)において認められており、この場合、IL-20発現のレベルが炎症の重篤度との正の相関関係を有していた(Kragstrup他、Cytokine 41(2008)、16~23; Blumberg他、Cell 104(2001)、9~19; Toyhama他、Eur. J. Immunol. 39(2009)、2779~88、上掲)。関節リウマチ(RA)、乾癬および強直性脊椎炎(AS)のほかに、IL-20が、例えば、下記のいくつかの他の障害と機能的に関連することが見出された：アテローム性動脈硬化(Chen他、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26(2006)、2090~2095、上掲)、急性腎不全(Li他、Genes Immun. 9(2008)、395~404、上掲)、潰瘍性大腸炎(Fonseca-Camarillo他、J. Clin. Immunol. 33(2013)、640~8、上掲)、虚血性発作(ChenおよびChang、J. Immunol. 182(2009)、5003~12、上掲)、ならびに、骨減少症および骨粗鬆症(Hsu他、J. Exp. Med. 208(2011)、1849~1861、上掲)。

【0142】

また、IL-20の増大した転写が、非小細胞肺(NSCL)ガンにおいて(Baird他、Eur. J. Cancer 47(2011)、1908~18、上掲)、また、筋浸潤性膀胱ガンにおいて認められている(Lee他、PLoS One 7(2012)、e40267、上掲)。IL-20およびその受容体サブユニットの発現が、臨床口腔腫瘍組織では乳ガン組織と同様に、非腫瘍組織よりも大きかった(Hsu他、Mol. Cancer Res. 10(2012)、1403~9; Hsu他、J. Immunol. 188(2012)、1981~91、すべて上掲)。

【0143】

したがって、1つの実施形態において、上述の方法において使用されるための本明細書中上記で定義されるような抗IL-20抗体またはIL-20結合断片、あるいはそれら

10

20

30

40

50

の合成もしくは生物工学的変異体あるいは組成物が提供され、ただし、この場合、前記疾患は、自己免疫疾患、好ましくは、関節リウマチ（RA）、強直性脊椎炎および他の形態の脊椎関節炎（乾癬性関節炎を含むが、これに限定されない）、乾癬、血管炎症およびアテローム性動脈硬化、アトピー性皮膚炎およびガン（非小細胞肺癌（NSCL）を含む）、筋浸潤性膀胱がん、口腔腫瘍および乳ガンからなる群から選択される自己免疫疾患である。

【0144】

処置において好適である分子、例えば、本明細書中に示される炎症に伴う障害の処置において好適である分子の多さのために、本発明はまた、そのような障害（好ましくは、自己免疫性の疾患または状態は、IL-20の発現、IL-20の上昇したおよび/または有害な活性に伴う）の処置、そのような障害の診断、ならびに/あるいは、そのような障害の起こりそうな経過および結果を予後判定する方法に関連し、また、本発明の分子の使用に関連する。1つの実施形態において、そのような障害を処置するための方法が提供され、この方法は、その必要性のある被験体に、治療有効量の上述の抗IL-20抗体、IL-20結合断片、その合成または生物工学的変異体、組合せで本発明の抗体の特徴を示す抗体のカクテル、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド型化合物を投与することを含む。

10

【0145】

さらに、1つの実施形態において、本発明は、IL-20の発現、IL-20の上昇したおよび/または有害な活性に伴う免疫媒介または自己免疫性の疾患または状態を処置する方法であって、被験体に、

20

(a) 本発明の抗IL-20抗体またはIL-20結合断片の少なくとも1つのCDR；あるいは

(b) 本明細書中上記で定義されるような少なくとも1つの抗イディオタイプ抗体および/またはペプチドもしくはペプチド型化合物を含むリガンド結合分子の治療有効量を投与することを含む方法に関連する。

【0146】

疾患に関連づけられるか、または疾患を引き起こす特定の抗原のエピトープについて特異的であるただ1つのモノクローナル抗体を使用することに基づく処置方法は、いくつかの欠点に悩まされる場合がある。例えば、処置の困難さおよびおそらくは非効率性が、いくつかの抗原を同時に標的とすることを必要とする特定の障害を引き起こす病原性機構の多さから生じる場合がある。そのうえ、患者集団の本来的な多様性を、少なくとも使用されるモノクローナル抗体の低下した結合効率を引き起こすことがある異なる患者または一人の患者のどちらにおいても、例えば、所与抗原の多型、グリコシル化の不均一性またはわずかな変性に関して考慮に入れなければならない。これらの欠点のいくつかは、例えば、抗原が、処置されることが意図される患者に免疫学的に関連しているかどうかを、また、どのようなエピトープ変化であれ、エピトープ変化が特定の患者において存在するかどうかを判定するための処置前のスクリーニングによって回避される場合がある。しかしながら、そのようなスクリーニングは多くの場合、処置の緊急性のために、または、費用抑制のために省かれる。したがって、本発明はさらに、2つ以上のタイプの結合分子を一度に患者に適用することに基づく方法、すなわち、結合分子のカクテルを適用することに基づく方法に関連する。これらの結合分子は、異なるエピトープにおいてIL-20に特異的に結合する場合があります、この場合、適用される結合分子のそれぞれがIL-20と特異的に結合する場合があります、または、IL-20のいくつかのエピトープに結合するいくつかの結合分子が使用される。本発明の様々な結合分子が抗原としてのIL-20に向けられる（特異的に結合する）場合、それらの結合特異性は前記抗原の異なったエピトープに向けられる。そのようなカクテルの使用が、自己免疫性障害（例えば、APS1など）に罹患する患者を処置するために特に想定される。これは、そのような患者は、約3000の内因性抗原に対する自己抗体の存在を考慮すると、1つの特定の抗体による単独療法を受け入れないことが多いからである。そのような場合には、同じ抗原特異性または異なる

30

40

50

る抗原特異性を有する本発明の2つ以上のモノクローナル抗体および/またはペプチドおよびペプチド型化合物による併用療法は、症状の少なくとも何らかの軽減を達成することが予想される。

【0147】

したがって、1つの実施形態において、障害を処置するさらなる方法であって、

(a) 上記で定義されるようなIL-20抗体、IL-20結合断片、それらの合成または生物工学的変異体；ならびに/あるいは

(b) 本発明の抗イディオタイプ抗体および/または本発明のペプチドもしくはペプチド型化合物(ただし、そのようなペプチドもしくはペプチド型化合物は、本発明の抗体および抗原結合断片によって特異的に認識されるエピトープを含む)

10

からなる群から選択される少なくとも2つ、3つ、4つ、5つおよびそれ以上の成分から本質的になるカクテルの治療有効量を被験体に投与することを含む方法が提供される。

【0148】

本発明は当然のことながら、IL-20の発現、IL-20の上昇したおよび/または有害な活性に伴う免疫媒介または自己免疫性の状態および障害を診断することに向けられる診断方法および予後方法、ならびに/あるいは、そのような疾患の発症の予後、すなわち、その進行、処置に対する応答または回復にもまた及ぶ。したがって、1つの実施形態において、本発明は、IL-20の発現、IL-20の上昇したおよび/または有害な活性に伴う被験体における免疫媒介または自己免疫性の疾患または状態を診断するための方法であって、被験体の生物学的サンプルを本発明の抗IL-20抗体またはそのIL-20結合断片と接触させること、ならびに、IL-20の存在を検出することを含む方法に関連する。さらに、1つの実施形態において、本発明は、単離された生物学的サンプルにおいてIL-20を検出するか、または測定する方法であって、該サンプルを本発明の抗IL-20抗体と混合すること、当該抗体により、混合物に存在するIL-20との複合体を形成させること、ならびに、該混合物に存在する該複合体を検出することを含む方法に関連する。

20

【0149】

既に上記で述べられたように、1つの実施形態において、本発明は、IL-20の発現に伴う免疫媒介または自己免疫性の疾患または状態を診断するためのキットであって、上述の抗IL-20抗体、IL-20結合断片、それらの合成または生物工学的変異体、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド型化合物、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞を、必要な場合には使用のための試薬および/または説明書と一緒に含むキットに関連する。

30

【0150】

本発明のキットには、例えば、キットを含む容器の内部に、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められる形式での通知が伴い得る(そのような通知は、ヒト投与のための製造、使用または販売の当局による承認を反映する)。加えて、または、代替において、キットは、適切な診断アッセイにおいて使用されるための試薬および/または説明書を含む。本発明の組成物、すなわち、キットは、当然のことではあるが、上記で述べられるような疾患を処置するために特に適用可能である、IL-20の発現に伴う障害の診断、防止および処置のために特に適している。特に好ましい実施形態において、障害はIL-20の発現に伴う。

40

【0151】

別の実施形態では、本発明は、上記本発明のIL-20結合分子、抗体、抗原結合断片、ペプチドもしくはペプチド系化合物、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞のうちのいずれか1つ、および場合により、免疫診断法または核酸ベースの診断法で通常使用される試薬などの検出に適切な手段を含む診断組成物に関する。本発明の抗体は、例えば、それらを液相でまたは固相担体に結合して利用することができるイムノアッセイで使用するのに適切である。本発明の抗体を利用することができるイムノアッセイの例は、直接または間接フォーマットのいずれかの競合および非競合イムノアッセイである。このようなイ

50

ムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）、サンドイッチ（イムノメトリックアッセイ）、フローサイトメトリおよびウェスタンブロットアッセイである。本発明の抗原および抗体を多くの異なる担体に結合させ、それらに特異的に結合した細胞を単離するのに使用することができる。周知の担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトが挙げられる。担体の性質は、本発明の目的のために、可溶性または不溶性のいずれかであり得る。当業者に公知の多くの異なる標識および標識方法がある。本発明に使用することができる標識の種類例としては、酵素、放射性同位体、コロイド状金属、蛍光化合物、化学発光化合物および生物発光化合物が挙げられる（上記実施形態も参照のこと）。

10

【0152】

これに関連して、本発明はまた、この目的のために特に設計される手段に関連する。例えば、タンパク質または抗体に基づくアレイであって、例えば、自己免疫疾患に罹患する患者に存在するかもしれない自己抗体を検出するために、IL-20に由来する抗原および疾患関連抗原を含有する抗原のどちらでも装荷されるアレイが使用される場合がある。マイクロアレイでの免疫アッセイの設計が、Kusnezow他、Mol. Cell Proteomics 5 (2006)、1681~1696において要約されている。したがって、本発明はまた、本発明に従って特定される結合分子または抗原が装荷されるマイクロアレイに関連する。

20

【0153】

本発明はまた、本発明のヒト由来モノクローナル抗ヒトIL-20抗体またはそのIL-20結合断片、あるいはそれらの合成または生物工学的変異体のために適用可能であり、また有用であるIL-20アンタゴニスト（例えば、先行技術において記載される抗IL-20抗体）の様々な実施形態の使用をもたらし、これらの実施形態に関連する。例えば、国際出願公開WO2005/052000にはとりわけ、ラットの抗ヒトIL-20モノクローナル抗体、ならびに、抗IL-20RAモノクローナル抗体および抗IL-20RBモノクローナル抗体が、インビトロおよびインビボにおけるそれらの特徴づけのための手段および方法、ならびに、その使用を含めて記載されており、これらもまた、本発明のヒト由来モノクローナル抗ヒトIL-20抗体および述べられたその誘導体に従って適用することができる。

30

【0154】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、造血細胞および造血細胞前駆体のIL-20誘導の増殖または分化を低下させ、または阻害するためのインビトロ方法であって、骨髓細胞または末梢血細胞を、本発明のヒト由来モノクローナル抗ヒトIL-20抗体および述べられたその誘導体を含む組成物、免疫コンジュゲートまたは医薬組成物（これらは本明細書中に開示される通りである）と一緒に培養することを含み、前記低下または阻害が、可溶性サイトカインの非存在下で培養される骨髓細胞または末梢血細胞と比較して、前記骨髓細胞または末梢血細胞における前記造血細胞の増殖または分化として測定される、インビトロ方法に関連する。造血細胞および造血前駆体細胞はリンパ系細胞である場合があり、好ましくは、前記リンパ系細胞はマクロファージまたはT細胞である。

40

【0155】

したがって、原理的には、本明細書中に開示されるような本発明のヒト由来モノクローナル抗ヒトIL-20抗体および述べられたその誘導体、免疫コンジュゲートおよび医薬組成物は、特に国際出願公開WO2005/052000に記載されるようなIL-20アンタゴニストおよび抗IL-20抗体の様々な治療的使用法のいずれかに従って適用することができる。

【0156】

定義および実施形態

別途記載される場合を除き、本明細書中で使用されるような用語および実施形態には、

50

国際出願公開WO2013/098419および国際出願公開WO2013/098420において提供されるような、また、使用されるような定義が与えられる。補充として、本明細書中で使用されるような一般的な用語には、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Oxford University Press、1997年、2000年改訂および2003年再版、ISBN 0198506732)において提供されるような定義が与えられる。

【0157】

用語「a」または「an」の実体は、その実体の1つ以上を指すことに留意する；例えば、「抗体」は、1つ以上の抗体を表すと理解される。したがって、用語「a」（または「an」）、「1つ以上」および「少なくとも1つ」は、本明細書で互換的に使用され得る。

10

【0158】

用語「中和する」および用語「中和抗体」はそれぞれ、抗原または生きている微生物の少なくとも何らかの生物学的活性を低下させるか、または無効にする抗体が意味されるという点でこの技術分野において一般的であるように使用される。例えば、本発明の抗IL-20抗体は、十分な量で、IL-20の活性を、例えば、実施例に記載されるようなアッセイにおいて無効にするか、または低下させるならば、中和抗体である。中和は50%阻害濃度(IC50)によって一般に定義され、中和滴定曲線下面積(AUC)に基づいて統計学的に評価することができる。本発明の例示的な抗IL-20抗体のIC50値が示される。例えば、例示的な20A10抗体のヒトIL-20のIC50値はKZ136-NLucレポータアッセイにおいて329.7 ng/ml、化学発光細胞結合アッセイにおいて4.03 ng/mlである(それぞれ、図5Fの左柱、及び図8D)。

20

【0159】

ペプチドおよびポリペプチド：

用語「ペプチド」は、用語「ポリペプチド」および「タンパク質」（これは、本明細書では時には互換的に使用され得る）、ならびにその意味の範囲内で、任意のアミノ酸配列、例えば、本発明の重鎖および軽鎖可変領域ならびに定常領域のアミノ酸配列を含むと理解される。同様に、タンパク質およびポリペプチドの断片も意図され、本明細書では「ペプチド」と称され得る。それにもかかわらず、用語「ペプチド」は、好ましくは、少なくとも5個の連続するアミノ酸、好ましくは少なくとも10個の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも15個の連続するアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも20個の連続するアミノ酸、特に好ましくは少なくとも25個の連続するアミノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味する。加えて、本発明によるペプチドは、典型的には、100個以下の連続するアミノ酸、好ましくは80個未満の連続するアミノ酸、より好ましくは50個未満の連続するアミノ酸を有する。

30

【0160】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」および複数の「ポリペプチド」、例えば、本発明の抗体を包含することを意図し、(ペプチド結合としても公知である)アミド結合によって直線的に連結したモノマー(アミノ酸)から構成される分子を指す。用語「ポリペプチド」は、2個以上のアミノ酸からなる任意の1つまたは複数の鎖を指し、特定の長さの産物を指さない。したがって、「ペプチド」、「ジペプチド」、「トリペプチド」、「オリゴペプチド」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または2個以上のアミノ酸からなる1つまたは複数の鎖を指すのに使用される他の任意の用語が「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかに代えてまたはこれと互換的に使用され得る。

40

【0161】

用語「ポリペプチド」はまた、限定されないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解による切断、または天然に存在しないアミノ酸による改変を含むポリペプチドの発現後修飾産物を指すこ

50

とを意図する。ポリペプチドは天然の生物学的供給源に由来するものでもよいし、または組換え技術によって生産されるものでもよいが、必ずしも指定の核酸配列から翻訳されるものではない。それは、化学合成を含む任意の方法で作製され得る。

【0162】

本発明のポリペプチドは、約3個以上、5個以上、10個以上、20個以上、25個以上、50個以上、75個以上、100個以上、200個以上、500個以上、1,000個以上または2,000個以上のアミノ酸のサイズであり得る。それにもかかわらず、用語「ポリペプチド」は、好ましくは、少なくとも100個のアミノ酸を含むアミノ酸ポリマーを意味する。ポリペプチドは一定の三次元構造を有し得るが、それらは必ずしもこのような構造を有するものではない。一定の三次元構造を有するポリペプチドは折り畳まれていると称され、一定の三次元構造を持たず、むしろ多数の異なる立体構造をとり得るポリペプチドは折り畳まれていないと称される。本明細書で使用される場合、糖タンパク質という用語は、アミノ酸残基、例えば、セリン残基またはアスパラギン残基の酸素含有側鎖または窒素含有側鎖を介してタンパク質に結合する少なくとも1つの炭水化物部分に結合したタンパク質を指す。

10

【0163】

「単離された」ポリペプチドまたはその断片、変異体もしくは誘導体は、その自然環境下でないポリペプチドを意図する。特定の精製レベルは必要とされない。例えば、単離されたポリペプチドは、その天然または自然の環境から取り出され得る。宿主細胞で発現された組換的に生産されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技術によって分離、分画または部分的もしくは実質的に精製された天然ポリペプチドまたは組換えポリペプチドがそうであるように、本発明の目的のために単離されたとみなされる。

20

【0164】

「組換えペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質」は、組換えDNA技術によって生産された（すなわち、所望のペプチドを含む融合タンパク質をコードする外因性の組換えDNA発現構築物によって形質転換された細胞、微生物または哺乳動物から産生された）ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を指す。ほとんどの細菌培養物で発現されたタンパク質またはペプチドは、典型的には、グリカンを含まないであろう。酵母で発現されたタンパク質またはポリペプチドは、哺乳動物細胞で発現されたものとは異なるグリコシル化パターンを有し得る。

30

【0165】

本発明のポリペプチドには、上記ポリペプチドの断片、誘導体、類似体および変異体ならびにそれらの任意の組み合わせも含まれる。用語「断片」、「変異体」、「誘導体」および「類似体」は、天然ペプチドのアミノ酸配列と十分に類似のアミノ酸配列を有するペプチドおよびポリペプチドを含む。用語「十分に類似の」は、第1および第2のアミノ酸配列が共通の構造ドメインおよび/または共通の機能活性を有するように、第1のアミノ酸配列が、第2のアミノ酸配列と同一または同等のアミノ酸残基の十分数または最小数を含有することを意味する。例えば、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%同一の共通の構造ドメインを含むアミノ酸配列が、本明細書では十分に類似のものと定義される。好ましくは、変異体は、本発明の好ましいペプチドのアミノ酸配列と、特に抗体もしくは抗体断片と、または本発明の抗体もしくはそれらのいずれかの断片、変異体、誘導体もしくは類似体によって認識されるエピトープを含む合成ペプチドもしくはペプチド系化合物と十分に類似である。このような変異体は、一般に、本発明のペプチドの機能活性を保持する（すなわち、本発明の抗体によって結合される）。変異体は、1個以上のアミノ酸の欠失、付加、および/または置換によって、アミノ酸配列がそれぞれ天然および野生型(wt)ペプチドとは異なるペプチドを含

40

50

む。これらは、天然に存在する変異体および人工的に設計されたものであり得る。

【0166】

用語「断片」、「変異体」、「誘導体」および「類似体」は、本発明の抗体または抗体ポリペプチドに言及する場合、対応する天然結合分子、抗体またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチド断片は、本明細書の他の箇所で議論される特定の抗体断片に加えて、タンパク質分解断片および欠失断片を含む。本発明の抗体および抗体ポリペプチドの変異体は、上記断片、およびさらにアミノ酸の置換、欠失または挿入によりアミノ酸配列を改変したポリペプチドを含む。変異体は天然に存在するものでもよいし、または天然に存在しないものでもよい。天然に存在しない変異体は、当技術分野において公知の突然変異誘発技術を使用して生産され得る。変異体ポリペプチドは、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。本発明の結合分子、例えば、本発明の抗体および抗体ポリペプチドの誘導体は、天然ポリペプチドでは見られないさらなる特徴を示すように改変されたポリペプチドである。例としては、融合タンパク質が挙げられる。変異体ポリペプチドは、本明細書では「ポリペプチド類似体」とも称され得る。本明細書で使用される場合、結合分子もしくはその断片、抗体または抗体ポリペプチドの「誘導体」は、官能側基の反応によって化学的に誘導体化された1つ以上の残基を有する主題ポリペプチドを指す。「誘導体」としては、20種の標準的アミノ酸の1個以上の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むペプチドも挙げられる。例えば、プロリンを4-ヒドロキシプロリンに置換することができる；リシンを5-ヒドロキシリシンに置換することができる；ヒスチジンを3-メチルヒスチジンに置換することができる；セリンをホモセリンに置換することができる；そして、リシンをオルニチンに置換することができる。

10

20

【0167】

抗イディオタイプ抗体：

用語「抗イディオタイプ抗体」は、抗体または他の結合分子に言及する場合、抗原結合部位付近におけるまたは抗原結合部位における抗体の可変領域上に位置する固有の抗原性ペプチド配列に結合して、これによって、所定の自己抗体により別の方法で引き起こされる特異的免疫反応を阻害する分子を含む。同様に、本発明の抗体によって特異的に認識されるエピトープを含む合成ペプチドまたはペプチド系化合物を使用することができる。

30

【0168】

抗イディオタイプ抗体は、他の抗体と同様の方法で得ることができる。特定の抗イディオタイプ抗体は、凝集（比濁法アッセイまたは比濁分析アッセイ）、沈殿（放射免疫拡散）、またはサンドイッチイムノアッセイ、例えば、ELISAによって、任意の種類の架橋により検出される。米国特許出願公開第20020142356号明細書は、高濃度高分子量の標的抗原に対して特異的な抗体に対する抗イディオタイプモノクローナル抗体集団を得るための方法であって、前記抗イディオタイプ抗体集団が、前記標的抗原に対して特異的な選択抗体に対して多種多様な結合親和性を有し、特定の用途に必要な親和性を有する前記抗イディオタイプ抗体集団のサブセットが選択され得る方法を提供する。

40

【0169】

米国特許出願公開第20020142356号明細書には、抗体をコートとしておよび抗イディオタイプ抗体を検出として使用した（その逆もまた同様である）抗原の競合イムノアッセイが記載されている。抗イディオタイプ抗体を代理抗原として使用することが開示されている他の参考文献としては、Losman et al., *Cancer Research*, 55 (1995) (23 suppl. S) : S5978 - S5982 ; Becker et al., *J. of Immunol. Methods* 192 (1996), 73 - 85 ; Baral et al., *International J. of Cancer*, 92 (2001), 88 - 95 ; および Kohen et al., *Food and Agriculture Immunology*, 12 (2000), 193 - 201 が挙げられる。疾患の処置においてまたは寄生虫に対して抗イディオタイプ抗体を使用することは、当技術分野において公知である；例えば、Sacks

50

et al., J. Exper. Medicine, 155 (1982), 1108 - 1119を参照のこと。

【0170】

分子の類似性および/または同一性の決定:

2つのペプチド間の「類似性」は、第1のペプチドのアミノ酸配列を第2のペプチドの配列と比較することによって決定される。第1のペプチドのアミノ酸は、それが同一または保存的アミノ酸置換である場合、第2のペプチドの対応するアミノ酸と類似する。保存的置換としては、Dayhoff, M.O., ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978)、およびArgos, EMBO J. 8 (1989), 779 - 785に記載されているものが挙げられる。例えば、以下の群の1つに属するアミノ酸は、保存的变化または置換を表す: - Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; - Cys, Ser, Tyr, Thr; - Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; - Lys, Arg, His; - Phe, Tyr, Trp, His; および - Asp, Glu。

10

【0171】

2つの配列間の%同一性または類似性の決定は、好ましくは、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877の数学的アルゴリズムを使用して達成される。このようなアルゴリズムは、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)で利用可能なAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410のBLASTnおよびBLASTpプログラム中に組み込まれている。

20

【0172】

%同一性または類似性の決定は、BLASTnおよびBLASTpプログラムの標準的パラメータを用いて実施される。

【0173】

BLASTポリヌクレオチド検索は、BLASTnプログラムを用いて実施される。一般的パラメータについて、「最大標的配列」のボックスを100に設定し得、「ショートクエリ」のボックスにチェックマークを付け得、「予測閾値」のボックスを10に設定し得、「ワードサイズ」のボックスを28に設定し得る。スコアリングパラメータについて、「一致/不一致スコア」を1, -2に設定し得、「ギャップコスト」のボックスを線形に設定し得る。フィルタおよびマスキングパラメータについて、「低複雑度領域」のボックスにチェックマークを付け得、「種特異的反復」のボックスにはチェックマークを付けなくてもよく、「ルックアップテーブルのみについてマスク」のボックスにチェックマークを付け得、「小文字をマスク」のボックスにはチェックマークを付けなくてもよい。

30

【0174】

BLASTタンパク質検索は、BLASTpプログラムを用いて実施される。一般的パラメータについて、「最大標的配列」のボックスを100に設定し得、「ショートクエリ」のボックスにチェックマークを付け得、「予測閾値」のボックスを10に設定し得、「ワードサイズ」のボックスを「3」に設定し得る。スコアリングパラメータについて、「マトリックス」のボックスを「BLOSUM62」に設定し得、「ギャップコスト」のボックスを「存在: 11 伸長: 1」に設定し得、「組成調整」のボックスを「条件的組成スコアマトリックス調整」に設定し得る。フィルタおよびマスキングパラメータについて、「低複雑度領域」のボックスにはチェックマークを付けなくてもよく、「ルックアップテーブルのみについてマスク」のボックスにはチェックマークを付けなくてもよく、「小文字をマスク」のボックスにはチェックマークを付けなくてもよい。

40

【0175】

ポリヌクレオチド:

50

用語「ポリヌクレオチド」は、単数の核酸および複数の核酸を包含することを意図し、単離された核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはプラスミドDNA（pDNA）を指す。ポリヌクレオチドは、通常のホスフォジエステル結合または非通常型結合（例えば、ペプチド核酸（PNA）に見られるようなアミド結合）を含むことができる。用語「核酸」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNA断片を指す。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドは、その天然環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAを意図する。例えば、ベクターに含まれる抗体をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されたとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞で維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の（部分的または実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子としては、本発明のポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロRNA転写産物が挙げられる。本発明にしたがって単離されたポリヌクレオチドまたは核酸としてはさらに、合成的に生産されたこのような分子が挙げられる。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモータ、リボソーム結合部位または転写ターミネータなどの調節要素でもよいし、またはこれらを含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0176】

本明細書で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の部分である。「停止コドン」（TAG、TGAまたはTAA）はアミノ酸に翻訳されないがコード領域の一部とみなされ得るが、例えば、プロモータ、リボソーム結合部位、転写ターミネータ、イントロンなどの任意の隣接配列はコード領域の一部ではない。本発明の2つ以上のコード領域が単一のポリヌクレオチド構築物内に、例えば、単一のベクター上に、または別々のポリヌクレオチド構築物内に、例えば、別々の（異なる）ベクター上に存在することができる。また、任意のベクターは、単一のコード領域を含有することもできるし、または2つ以上のコード領域を含むことができ、例えば、単一のベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードすることができる。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチドまたは核酸は、結合分子、抗体またはそれらの断片、変異体もしくは誘導体をコードする核酸に融合しているかまたは融合していない異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域は、限定されないが、分泌シグナルペプチドまたは異種機能性ドメインなどの特別な要素またはモチーフを含む。

【0177】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸は、DNAである。DNAの場合では、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つ以上のコード領域と機能的に結合されたプロモータおよび/または他の転写もしくは翻訳制御要素を含むことができる。機能的な結合は、遺伝子産物（例えば、ポリペプチド）のコード領域が、遺伝子産物の発現を調節配列の影響下または制御下に置くような方法で1つ以上の調節配列と結合している場合である。プロモータ機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、および2つのDNA断片間の結合の性質が遺伝子産物の発現を指令する発現調節配列の能力を妨害しないか、または鋳型DNAの転写される能力を妨害しない場合、2つのDNA断片（例えば、ポリペプチドコード領域およびそれと結合するプロモータ）は、「機能的に結合されている」かまたは「機能的に連結されている」。したがって、プロモータがポリペプチドをコードする核酸の転写をもたらすことができる場合、プロモータ領域はその核酸と機能的に結合されているであろう。プロモータは、所定の細胞でのみDNAの実質的な転写を指令する細胞特異的プロモータであり得る。プロモータの他に、例えば、エンハンサ、オペレータ、リプレッサおよび転写終結シグナルなどの他の転写制御要素が、細胞特異的転写を指令するためにポリヌクレオチドと機能的に結合され得る。適切なプロモータおよび他の転写制御領域は、本明細書で開示される。

【0178】

様々な転写制御領域が当業者に公知である。これらとしては、限定されないが、脊椎動

物細胞で機能する転写制御領域、例えば限定されないが、サイトメガロウイルス（イントロン - A を含む前初期プロモータ）、シミアンウイルス 40（初期プロモータ）および（ラウス肉腫ウイルスなどの）レトロウイルス由来のプロモータおよびエンハンサセグメントが挙げられる。他の転写制御領域としては、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモンおよびウサギ グロビンなどの脊椎動物遺伝子由来のもの、ならびに真核細胞での遺伝子発現を制御することができる他の配列が挙げられる。他の適切な転写制御領域としては、組織特異的プロモータおよびエンハンサ、ならびにリンホカイン誘導性プロモータ（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導可能なプロモータ）が挙げられる。

【0179】

同様に、様々な翻訳制御要素が当業者に公知である。これらとしては、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始および停止コドン、ならびにピコルナウイルス由来の要素（特に、CITE配列とも称される内部リボソーム侵入部位またはIRES）が挙げられる。

【0180】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA：messenger RNA）、小ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）または任意の他のRNA産物の形態のRNAである。

【0181】

本発明のポリヌクレオチドコード領域および核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指令する分泌またはシグナルペプチドをコードするさらなるコード領域と結合することができる。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されたタンパク質は、成長中のタンパク質鎖が粗面小胞体通って輸送され始めると成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチドまたは分泌リーダ配列を有する。当業者であれば、脊椎動物細胞によって分泌されたポリペプチドは、一般に、前記ポリペプチドのN末端に融合したシグナルペプチドを有し、これが完全または「全長」ポリペプチドから切断されて分泌型または「成熟」型ポリペプチドが産生されることを理解している。ある実施形態では、天然のシグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖のシグナルペプチド、またはその配列の機能性誘導体であって、それと機能的に結合されたポリペプチドの分泌を指令する能力を保持している機能性誘導体を使用される。あるいは、異種哺乳動物シグナルペプチドまたはその機能性誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダ配列をヒト組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）またはマウス - グルクロニダーゼのリーダ配列で置換することができる。しかしながら、ポリペプチド、特に本発明の免疫グロブリン及びその断片の細胞内生産もまた可能である。

【0182】

発現：

用語「発現」は、本明細書で使用される場合、遺伝子が生化学物質、例えば、RNAまたはポリペプチドを生成する過程を指す。この過程は、限定されないが、遺伝子ノックダウンならびに一過性発現および安定発現の両方を含む、細胞内における遺伝子の機能的存在の任意の顕在化を含む。それとしては、限定されないが、遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、小ヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）または任意の他のRNA産物への転写、およびこのようなmRNAのポリペプチドへの翻訳が挙げられる。所望の最終産物が生化学物質である場合、発現は、その生化学物質および任意の前駆体の作製を含む。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を生成する。本明細書で使用される場合、遺伝子産物は、核酸、例えば、低分子干渉RNA（siRNA）、遺伝子の転写によって生成されるメッセンジャーRNA、または転写産物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物としてはさらに、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を受けた核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質付加、他のタンパク質サブユニッ

10

20

30

40

50

トとの会合、タンパク質分解切断などを受けたポリペプチドが挙げられる。

【0183】

様々な発現ベクター/宿主系を用いて、ポリヌクレオチド配列を含有および発現させることができる。これらとしては、限定されないが、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV；）もしくは細菌発現ベクター（例えば、TiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。

10

【0184】

ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質（以下、「産物」と称される）を宿主細胞中で発現させるために、以下のような手順を使用することができる。前記産物をコードするDNA配列を含有する制限断片を、宿主細胞で機能する複製起点および適切な選択可能マーカを含有する適切な組換えプラスミドにクローニングすることができる。プラスミドは、産物の誘導性発現用のプロモータ（例えば、pTrc (Amann et al., Gene 69 (1988), 301-315) および pET1-Id (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990), 60-89) を含むことができる。組換えプラスミドを、例えば、エレクトロポレーションによって宿主細胞に導入することができ、組換えプラスミドを含有する細胞を、プラスミド上のマーカについて選択することによって特定することができる。産物に対して特異的なアッセイを使用して、産物の発現を宿主細胞で誘導および検出することができる。

20

【0185】

いくつかの実施形態では、産物/ペプチドをコードするDNAを宿主細胞での発現のために最適化することができる。例えば、DNAは、1つ以上のアミノ酸に対するコドンであって、この同じアミノ酸に対する他のコドンと比べて宿主細胞において優勢なコドンを含むことができる。

【0186】

あるいは、産物の発現は、無細胞抽出物中でのインビトロタンパク質合成によって実施することができる。これは、機能的な研究のための改変または非天然アミノ酸の導入にも特に適している（下記も参照のこと）。過剰発現産物が宿主細胞に対して毒性である場合、産物が不溶性であるかまたは封入体を形成する場合、またはタンパク質が細胞内プロテアーゼによって急速なタンパク質分解を受ける場合、インビトロ翻訳系の使用は、インビボ遺伝子発現よりも利点を有し得る。最も頻繁に使用される無細胞翻訳系は、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽および大腸菌由来の抽出物からなる。すべてが、外因性RNAの翻訳に必要なすべての高分子成分（70Sまたは80Sリボソーム、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素、開始、伸長および終結因子など）を含む粗抽出物として調製される。効率的な翻訳を確実にするためには、アミノ酸、エネルギー源（ATP、GTP）、エネルギー再生系（真核生物系の場合にはクレアチンリン酸およびクレアチンホスホキナーゼ、ならびに大腸菌溶解物の場合にはホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼ）、および当技術分野において公知の他の補因子（ Mg^{2+} 、 K^{+} など）を各抽出物に補充しなければならない。適切な転写/翻訳系は、例えば、Promega Corporation、Roche Diagnostics、およびAmbion、すなわち、Applied Biosystemsから市販されている (Anderson, C. et al., Meth. Enzymol. 101 (1983), 635-644; Arduengo, M. et al. (2007), The Role of Cell-Free Rabbit Reticulocyte Expression Systems in Functional Proteomics in, Kudlicki, Katz

30

40

50

en and Bennett eds., Cell-Free Expression Vol. 2007. Austin, Tx: Landes Bioscience, pp. 1-18; Chen and Zubay, Meth. Enzymol. 101 (1983), 674-90; Ezure et al., Biotechnol. Prog. 22 (2006), 1570-1577)。

【0187】

宿主細胞：

本発明に関して、宿主細胞は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物またはヒト細胞などの原核細胞または真核細胞であり得る。好ましい真菌細胞は、例えば、サッカロマイセス属のもの、特に、*S. セレピシ* 種のものである。用語「原核生物の」は、本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖の発現のためのDNAまたはRNA分子で形質転換またはトランスフェクトされ得るすべての細菌を含むことを意味する。原核生物宿主としては、例えば、大腸菌 (*E. coli*)、ネズミチフス菌、セラチア・マルセッセンズおよび枯草菌などのグラム陰性ならびにグラム陽性細菌が挙げられ得る。用語「真核生物の」は、酵母、高等植物、昆虫および好ましくは哺乳動物細胞、最も好ましくはHEK293、NSO、CSOおよびCHO細胞を含むことを意味する。組換え生産手順で用いられる宿主に応じて、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる抗体または免疫グロブリン鎖は、グリコシル化され得るか、または非グリコシル化され得る。本発明の抗体、または対応する免疫グロブリン鎖も、最初のメチオニンアミノ酸残基を含み得る。本発明のポリヌクレオチドは、当業者に一般に公知の技術のいずれかを使用して、宿主を形質転換またはトランスフェクトするのに使用され得る。さらに、機能的に連結された融合遺伝子を調製し、それらを、例えば、哺乳動物細胞および細菌で発現させるための方法は、当技術分野において周知である (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。そこに記載されている遺伝子構築物および方法は、真核生物または原核生物の宿主における本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖の発現に用いられ得る。一般に、挿入されたポリヌクレオチドの効率的な転写を促進するプロモータ配列を含有する発現ベクターが、宿主と併せて使用される。発現ベクターは、典型的には、複製起点、プロモータ、およびターミネータ、ならびに形質転換細胞の表現型選択を提供することができる特定の遺伝子を含む。DNA配列に適切な細胞源ならびに免疫グロブリンの発現および分泌用の宿主細胞は、American Type Culture Collection (「Catalogue of Cell Lines and Hybridomas」, Fifth edition (1985) Rockville, Maryland, U.S.A. (これは、参照により本明細書に組み込まれる)) などの多数の供給源から得ることができる。さらに、本発明の細胞を含むトランスジェニック動物、好ましくは哺乳動物は、本発明の抗体の大規模生産に使用され得る。

【0188】

発酵槽で形質転換宿主を成長させ、当技術分野において公知の技術にしたがって培養して、最適な細胞成長を達成し得る。発現されたら、本発明の全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を、硫酸アンモニウム沈降法、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィ、ゲル電気泳動などを含む当技術分野の標準手順にしたがって精製し得る; Scopes, 「Protein Purification」, Springer Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと。次いで、本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖を、成長培地、細胞溶解物、または細胞膜画分から単離し得る。例えば、本発明の組換え発現された抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、任意の従来手段、例えば、本発明の抗体の定常領域に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用を含むものなどの分取クロマトグラフィ分離および免疫学的分離によるものであり得る。例えば、薬物標的化およびイメージング用途のために、本発明の抗体を他の部分にさらにカップリングし得ることは、当業者に明ら

かである。結合部位に対する抗体または抗原の発現後にこのようなカップリングを化学的に行ってもよいし、またはカップリング産物をDNAレベルで本発明の抗体または抗原に人為操作してもよい。次いで、DNAを適切な宿主系で発現させ、必要な場合、発現タンパク質を収集および変性させる。

【0189】

医薬用途の場合、少なくとも約90～95%の同質性の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98～99%またはそれ以上の同質性が最も好ましい。部分的にまたは所望により同質性まで精製したら、次いで、抗体を治療的(体外的を含む)に使用してもよいし、またはアッセイ手順の開発および実施に使用してもよい。

【0190】

本発明はまた、本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖を発現することができる細胞を生産するための方法であって、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを用いて、細胞を遺伝子操作することを含む方法に関する。本発明の方法によって得ることができる細胞は、例えば、本発明の抗体とその抗原との相互作用を試験するのに使用され得る。

【0191】

ELISAアッセイ:

様々な抗原のための酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)としては、比色分析、化学発光および蛍光測定ベースのものが挙げられる。ELISAは、薬物、ならびに血漿および尿試料中の他の抗原性成分が低量の検出に上手く適用されており、抽出工程を伴わず、実施が簡単である。タンパク質抗原に対する抗体の検出のためのELISAでは、短い合成ペプチドをマイクロタイタープレートのプラスチック表面に直接結合する使用が多い。ペプチドは、一般に、それらの合成的性質および高速液体クロマトグラフィを使用した効率的な精製方法により非常に純粋である。短いペプチドの欠点は、それらが通常は、立体構造または不連続エピトープではなく直鎖状エピトープを表すことである。立体構造エピトープを提示するためには、長いペプチドまたは完全な天然タンパク質のいずれかを使用する。タンパク質抗原をプレートの疎水性ポリスチレン支持体に直接結合すると、結合したタンパク質が部分的または完全に変性し、立体構造エピトープが失われ得る。抗原の固定化(捕捉ELISA)を媒介する抗体でプレートをコーティングすることにより、この影響を回避することができる。

【0192】

しかしながら、多くの場合、過剰発現された組換えタンパク質は不溶性であり、立体構造エピトープに対する抗体を分析しようとする場合には変性条件下での精製および復元を必要とする。例えば、コートタンパク質として組換え融合タンパク質を使用した一般的なELISAについては、米国特許出願公開第20030044870号明細書を参照のこと。

【0193】

結合分子:

「結合分子」は、本発明との関連で使用される際には、主に抗体およびその断片に関連し、しかし、本発明の「目的とする分子」に結合する他の非抗体分子もまた指すことがあり、この場合、目的とする分子は、サイトカインとして知られている糖タンパク質のクラスタンパク質であり、特に、IL-20である。本発明の目的とする分子は、上記および下記における本発明の特定の実施形態の記載の範囲内においてさらに詳しく定義される。本発明の結合分子には、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合性複合体(MHC)分子、シャペロン(例えば、熱ショックタンパク質(HSP)など)、ならびに、細胞間接着分子(例えば、カドヘリンスーパーファミリー、インテグリンスーパーファミリー、C型レクチンスーパーファミリーおよび免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのメンバーなど)が含まれるが、これらに限定されない。したがって、明瞭性だけのために、また、本発明の範囲を限定することなく、下記の実施形態のほとんどが、治療剤および診断剤を開発するための好ましい結合分子を代表する抗体および抗体様分子に関して議論

10

20

30

40

50

される。

【0194】

抗体：

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、本明細書では互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、上記および下記に定義される本発明の目的の分子に結合する分子であって、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む分子である。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリンの構造は、比較的よく理解されている；例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)を参照のこと。用語「結合する」および「認識する」は、本発明の結合分子（例えば、抗体）の結合親和性に関して互換的に使用される。

10

【0195】

上記および下記に定義されているように、目的の分子に特異的に結合するのに十分な構造を含む任意の抗体または免疫グロブリン断片は、本明細書では、「結合分子」、「結合断片」または「免疫特異的断片」と互換的に表される。

【0196】

本発明の抗体または抗原結合断片、免疫特異的な断片、あるいはそれらの変異体または誘導体には、ポリクローナル性、モノクローナル性、多特異性、ヒト型、ヒト化型、霊長類化型、マウス化型またはキメラ型の抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片（例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂）、Fd、Fv、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、V_LドメインまたはV_Hドメインのどちらかを含む断片、Fab発現ライブラリーによって作製される断片、ならびに、抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本明細書中に開示される抗体に対する抗Id抗体を含む）が含まれるが、これらに限定されない。様々なscFv分子がこの技術分野では知られており、例えば、米国特許第5,892,019号に記載される。この点において、抗体の抗原結合断片もまた、単ドメイン抗体(sdAb)またはナノボディー（商標）(Ablynx、Gent、ベルギー)としてもまた知られているドメイン抗体(dAb)であることが可能である。例えば、De Haard他、*J. Bacteriol.* 187(2005)、4531~4541；Holt他、*Trends Biotechnol.* 21(2003)、484~490を参照のこと。より詳しくは下記で議論されるように、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に識別することができる様々な幅広いクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロン(、μ、、)として、それらの中のいくつかのサブクラス（例えば、1~4）で分類されることを理解するであろう。抗体の「クラス」を、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgYとしてそれぞれ決定するのが、この鎖の性質である。免疫グロブリンのサブクラス（イソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などが十分に特徴づけられており、これらは、機能的な特殊化を与えることが知られている。本発明の免疫グロブリン分子または抗体分子は、免疫グロブリン分子のどのようなタイプのものも（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、どのようなクラスのものも（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2など）またはどのようなサブクラスのものも可能である。これらのクラスおよびイソタイプのそれぞれの様々な改変された型が、本開示を考慮して当業者には容易に認識可能であり、従って、本発明の範囲の範囲内である。すべての免疫グロブリンクラスが明らかに本発明の範囲内であるが、下記の議論は概して、免疫グロブリン分子のIgGクラスに関するものになる。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量がおよそ23,000ダルトンである2つの同一の軽鎖ポリペプチドと、分子量が53,000~70,000である2つの同一の重鎖ポリペプチドとを含む。これら4つの鎖は典型的には、軽鎖が、“Y”の口部から始まり、可変領域の終わりまで続く重鎖を腕木として支える“Y”字型の立体配置でジスルフィド結合によってつながれる。

20

30

40

50

【0197】

上記の表1に列記される本発明の例示的な抗IL-20抗体の分類から明白であるように、本発明の例示的抗体はIgG4またはIgG1クラスのものであり、このことから、調節性T細胞応答および/または上皮が場合によっては、これらのAIRE欠乏状態におけるそれらの開始において暗示される。これらの知見が、Karner他によってClin. Exp. Immunol. (2012) (doi: 10.1111/cei.12024)に記載されるAIRE欠損マウスにおいて見出される対応する自己抗体の分類によって確認される(その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。したがって、本発明の好ましい実施形態において、本発明の抗体はIgGタイプのものであり、一層より好ましくはIgG4またはIgG1である。

10

【0198】

IgGの構造:

軽鎖は、カッパまたはラムダ(、)のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。一般に、ハイブリドーマ、B細胞または遺伝子操作した宿主細胞のいずれかによって免疫グロブリンが産生される場合、軽鎖および重鎖は互いに共有結合し、2本の重鎖の「テール」部分は共有結合性ジスルフィド結合または非共有結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y構造のフォークヘッド末端にあるN末端から各鎖の下部にあるC末端へと延びている。軽鎖および重鎖の両方が、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。用語「定常」および「可変」は、機能的に使用される。これに関して、軽鎖部分および重鎖部分の両方の可変ドメイン(V_LおよびV_H)は、抗原認識および抗原特異性を決定することが認識されよう。反対に、軽鎖の定常ドメイン(C_L)および重鎖の定常ドメイン(C_H1、C_H2またはC_H3)は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学特性を付与する。慣例では、定常領域ドメインが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠ざかるにつれて、定常領域ドメインのナンバリングが増加する。N末端部分は可変領域であり、定常領域はC末端部分にある; C_H3およびC_Lドメインは、実際には、それぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。

20

【0199】

上記のように、可変領域は、抗体が抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することを可能にする。すなわち、抗体のV_LドメインおよびV_Hドメインまたは相補性決定領域(CDR)のサブセットが組み合わさって、三次元の抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この四要素の抗体構造が、Yの各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、V_H鎖およびV_L鎖それぞれの3つのCDRによって規定される。本発明の目的の分子に特異的に結合するのに十分な構造を含有する任意の抗体または免疫グロブリン断片は、本明細書では「結合断片」または「免疫特異的断片」と互換的に表される。

30

【0200】

天然に存在する抗体では、抗体は、各抗原結合ドメイン中に存在する「相補性決定領域」または「CDR」とも称される6つの超可変領域を含み、それらは、水性環境での抗体の三次元構造を想定して、抗原結合ドメインを形成するように特別に配置されている短い非連続的なアミノ酸配列である。「CDR」は、より少ない分子間の多様性を示す4つの比較的保存された「フレームワーク」領域または「FR」に隣接する。フレームワーク領域は主としてシート立体構造をとり、CDRは、シート構造と連結し、いくつかの場合では、その一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間非共有結合性相互作用によってCDRの正しい方向での配置を提供する足場を形成するように作用する。配置されたCDRによって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補的な表面を規定する。この相補性表面は、抗体のその同種エピトープへの非共有結合を促進する。それぞれCDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸は、正確に定義されているので、当業者であれば、任意の所定の重鎖または軽鎖可変領域についてそれらを容易に同定することができる;「Sequences of

40

50

Proteins of Immunological Interest」, Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); および Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 (これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

【0201】

当技術分野において使用されており、および/または認められている用語の定義が2つ以上ある場合、本明細書で使用される用語の定義は、特に明確な反対の指定がない限り、すべてのこのような意味を含むことを意図する。具体例は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続的な抗原結合部位を説明する用語「相補性決定領域」(「CDR」)の使用である。この特定の領域は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(1983) および Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 (これらは、参照により本明細書に組み込まれる)によって記載されており、ここで、これらの定義は、互いに比較するとアミノ酸残基のオーバーラップまたはサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体またはその変異体のCDRを指すいずれかの定義の適用は、本明細書で定義および使用される用語の範囲内にあることを意図する。上記で引用した各参考文献によって定義されるCDRを包含する適切なアミノ酸残基を、比較として以下の表2に示す。特定のCDRを包含する正確な残基数は、CDRの配列およびサイズに応じて変化する。当業者であれば、どの残基がヒトIgGサブタイプの抗体の特定の超可変領域またはCDRを含むかを、その抗体の可変領域のアミノ酸配列を考慮してルーチンに決定することができる。

【0202】

表2：CDRの定義¹

【表2】

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹ 表2におけるすべてのCDR定義の番号表記は、Kabat他によって示される番号表記慣例に従う(下記を参照のこと)。

【0203】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列のナンバリングシステムを定義した。当業者であれば、配列それ自体以外のいかなる実験データにも頼ることなく、任意の可変ドメイン配列にこの「Kabatナンバリング」システムを明確に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「Kabatナンバリング」は、Kab

at et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」(1983)によって示されるナンバリングシステムを指す。特に明記されない限り、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくは誘導体における特定のアミノ酸残基の位置のナンバリングについての言及は、Kabattナンバリングシステムに従うものであるが、それは理論上のものであり、本発明のあらゆる抗体に等しく適用することはできない。例えば、最初のCDRの位置に応じて、以降のCDRがいずれかの方向にシフトする場合がある。

【0204】

一実施形態では、本発明の抗体は、IgMまたは5価構造を有するその誘導体ではない。特に、本発明の特定の用途、特に治療用途では、IgMは、その5価構造および親和性成熟の欠如のために非特異的な交差反応性および非常に低い親和性を示すことが多いので、IgMは、IgGおよび他の2価抗体または対応する結合分子よりも有用ではない。

【0205】

特に好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ポリクローナル抗体ではない。すなわち、それは、血漿免疫グロブリン試料から得られる混合物ではなく1つの特定の抗体種から実質的になる。

【0206】

抗体断片、動物化：

単鎖抗体を含む抗体断片は、可変領域を単独で、または以下のものの全部もしくは一部と組み合わせて含むことができる：ヒンジ領域、CH1、CH2およびCH3ドメイン。本発明の目的の分子に結合する断片であって、可変領域と、ヒンジ領域、CH1、CH2およびCH3ドメインとの任意の組み合わせをまた含む断片も本発明に含まれる。本発明の方法にしたがって単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体と同等の本発明の抗体またはその免疫特異的断片は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源であり得る。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、リヤマ、ウマまたはニワトリ抗体である。別の実施形態では、可変領域は、起源がコンドリクトイド（例えば、サメ由来）であり得る。

【0207】

本発明の特に好ましい実施形態において、抗体は、ヒト被験体からクローン化される天然に産出するヒトモノクローナル抗体またはその結合断片、誘導体および変異体であり、ただし、これらは、上記および下記において、例えば、表1、図（具体的には図3～図10）および実施例（例えば、実施例2および実施例5）において詳しく定義されるように本発明のIL-20に特異的に結合するものである。

【0208】

場合により、ヒト抗体のフレームワーク領域がデータベースにおける該当するヒト生殖系列可変領域配列に従ってアライメントされ、また、取り入れられる；例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge、英国)によって提供されるVbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)を参照のこと。例えば、真の生殖系列配列から潜在的に逸脱すると見なされるアミノ酸は、クローニング過程の期間中に組み込まれるPCRプライマー配列に起因し得ると思われる。人為的に作製されたヒト様抗体、例えば、ファージディスプレイされた抗体ライブラリまたは異種マウスに由来する単鎖抗体断片(scfv)などと比較した場合、本発明のヒトモノクローナル抗体は、(i)代理動物の免疫応答ではなく、むしろ、ヒトの免疫応答を使用して得られること、すなわち、抗体が、ヒト体内におけるその関連する立体配座における天然型IL-20に対する応答で作製されていること、(ii)個体を疾患（例えば、SLE）の症状の存在から保護しているか、または、疾患（例えば、SLE）の症状の存在を少なくとも有意に最小限に抑えていること、そして、(iii)抗体がヒト起源であるので、自己抗原に対する交差反応性の危険性が最小限に抑えられることによって特徴づけられる。したがって、本発明によれば、用語「ヒトモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体」、用語「ヒトモノクローナル自己抗体」および用語「ヒト抗体」などは、ヒト起源のものであるIL-20結合分子を示すために、すなわち、ヒト細胞（例えば、B細胞またはそのハイブリドーマなど）から単離されているか、あるいは、cDNAがヒト細胞（例えば、ヒトメモリーB細胞）のmRNAから直接にクローン化されているIL-20結合分子を示すために使用される。ヒト抗体は、アミノ酸置換がたとえ、例えば、その結合特徴を改善するために、当該抗体において行われるにしても、依然として「ヒト」であると見なされる。

【0209】

下記の、および例えば、Kucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号明細書に記載されているように、ヒト免疫グロブリンライブラリ由来の抗体、または内在性免疫グロブリンを発現しない1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックな動物由来の抗体は、それらを本発明の真のヒト抗体から区別するためにヒト様抗体と表される。

10

【0210】

例えば、典型的にはファージディスプレイから単離された合成および半合成抗体などのヒト様抗体の重鎖および軽鎖の対合は、それらが元のヒトB細胞で生じたような元の対合を必ずしも反映しない。したがって、従来技術で一般的に使用されている組換え発現ライブラリから得られたFabおよびscFv断片は、免疫原性および安定性に対するすべての可能な関連効果に関して人工的であるとみなされ得る。

20

【0211】

対照的に、本発明は、ヒトにおけるその治療有用性を特徴とする、選択されたヒト被験体から単離された親和性成熟抗体を提供する。

【0212】

移植抗体（等価物）

本発明はまた、それぞれ抗IL-20抗体などの本発明の抗体由来のCDRを含む移植抗体（互換的に、等価物と称される）を提供する。このような移植CDRとしては、本発明の抗体のCDRが移植されたか、または1つ以上のアミノ酸置換を含むCDRが移植される動物化抗体が挙げられる。CDRは、上記のように、ヒトフレームワークまたは動物起源由来の抗体フレームワークに直接移植され得る。所望により、フレームワークライブラリを作製することによって、フレームワーク変化も組み込まれ得る。以下により詳細に記載されるように、CDRおよび/またはフレームワーク配列の最適化を独立しておよび連続的に組み合わせて実施することもできるし、または同時に実施することもできる。

30

【0213】

移植抗体を作製するために、本発明の抗体のドナーCDRを、抗体アクセプタ可変領域フレームワークに移植する。活性を最適化するために抗体を移植してCDR変異体作製するための方法は、以前に記載されている（例えば、国際公開第98/33919号；国際公開第00/78815号；国際公開第01/27160号を参照のこと）。この手順を実施して、ドナーCDRの移植および親和性の再獲得を同時プロセスで達成し得る。可変領域の結合親和性を改変または最適化するために、この方法を単独でまたはCDR移植と組み合わせて同様に使用することができる。ドナーCDRの結合親和性をアクセプタ可変領域に付与するための方法は、重鎖および軽鎖可変領域の両方に適用可能であり、それ自体を使用して抗体可変領域を移植し、それと同時に抗体可変領域の結合親和性を最適化することができる。

40

【0214】

ドナーCDR内の全位置または選択位置に複数の異なるアミノ酸残基変化を含むように、ドナーCDRを改変することができる。CDR種の様々な集団を生産するために、例えば、20種の天然に存在するアミノ酸残基または予め選択されたサブセットのランダムな組み込みまたは偏った組み込みをドナーCDRに導入することができる。CDR変異体種を可変領域の様々な集団に含めることにより、所定の抗原に対して最適化された結合親和性を示す変異体種の作製が可能になる。一定範囲の可能な変化をドナーCDRの位置で行

50

うことができる。変化のために選択され得る可能な変化の一部または全部を、移植ドナー C D R の集団に導入することができる。変化を導入するために C D R 内の単一位置を選択することもできるし、またはアミノ酸を改変した様々な位置が組み合わせて活性についてスクリーニングすることもできる。

【0215】

1つのアプローチは、例えば、全20種の天然に存在するアミノ酸を各位置で置換することによって、C D R に沿ってすべてのアミノ酸位置を変化させることである。C D R の大部分が基準のドナー C D R 配列を維持し、したがってドナー C D R の結合親和性を維持するように、他のドナー C D R アミノ酸位置との関連で各位置の置換を行うことができる。例えば、アクセプタ可変領域フレームワーク（天然または改変フレームワークのいずれか）に、C D R 内の各位置に単一位置の置換を含む C D R の集団を移植することができる。同様に、全20種のアミノ酸残基またはアミノ酸のサブセットを組み込むように変化した2個以上の位置を含む C D R の集団による移植のために、アクセプタ可変領域フレームワークを標的とすることができる。移植すべき C D R 内または C D R 群内の1つ以上のアミノ酸位置を改変し、アクセプタ可変領域フレームワークに移植して移植抗体の集団を作製することができる。1つ以上の改変位置を有する C D R は、所望により、1つ以上の改変位置を有する1つ以上の他の C D R と組み合わせることができると理解される。

10

【0216】

1つ以上の改変位置を有する C D R 変異体種の集団を、可変領域の結合ポケットを構成する C D R のいずれかまたはすべてと組み合わせることができる。したがって、重鎖または軽鎖における1つ、2つまたは全3つのレシピエント C D R 位置にドナー C D R 変異体集団を同時に組み込むために、アクセプタ可変領域フレームワークを標的とすることができる。アミノ酸位置変化で標的とするための C D R または C D R の数の選択は、例えば、アクセプタへの完全な C D R 移植が望ましいか、または結合親和性の最適化のためにこの方法が実施されるかに依存するであろう。

20

【0217】

ドナー C D R の結合親和性を抗体アクセプタ可変領域フレームワークに付与するために変化のためのドナー C D R アミノ酸を選択するための別のアプローチは、公知のまたは容易に同定可能な C D R 位置であって非常に変わりやすいものを選択することである。例えば、可変領域 C D R 3 は、一般に、非常に変わりやすい。したがって、結合親和性の再獲得もしくは増強を単独でまたは関連アクセプタ可変フレームワーク変化と一緒に確実にする移植手順では、この領域をアミノ酸位置変化の選択的な標的とすることができる。

30

【0218】

マウス化抗体：

上記のように、移植によって作製される抗体の例は、マウス化抗体である。本明細書で使用される場合、用語「マウス化抗体」または「マウス化免疫グロブリン」は、本発明のヒト抗体由来の1つ以上の C D R、およびマウス抗体配列に基づくアミノ酸置換および/または欠失および/または挿入を含有するヒトフレームワーク領域を含む抗体を指す。C D R を提供するヒト免疫グロブリンは「親」または「アクセプタ」と称され、フレームワーク変化をもたらすマウス抗体は「ドナー」と称される。定常領域は存在する必要がないが、存在する場合、それらは、通常、マウス抗体の定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85~90%、好ましくは約95%またはそれ以上同一である。したがって、いくつかの実施形態では、全長マウス化ヒト重鎖免疫グロブリンまたは軽鎖免疫グロブリンは、マウス定常領域、ヒト C D R、および多数の「マウス化」アミノ酸置換を有する実質的にヒトのフレームワークを含有する。典型的には、「マウス化抗体」は、マウス化可変軽鎖および/またはマウス化可変重鎖を含む抗体である。例えば、キメラ抗体の可変領域全体は非マウスであるため、マウス化抗体は典型的なキメラ抗体を包含しないであろう。「マウス化」の工程によって「マウス化」された改変抗体は、C D R を提供する親抗体と同じ抗原に結合し、マウスでは親抗体と比較して免疫原性が通常低い。

40

【0219】

50

抗体断片：

本明細書で使用される場合、用語「重鎖部分」は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、C H 1 ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中部および/または下部ヒンジ領域）ドメイン、C H 2 ドメイン、C H 3 ドメインまたはその変異体もしくは断片の少なくとも1つを含む。例えば、本発明に使用される結合ポリペプチドは、C H 1 ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部およびC H 2 ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1 ドメインおよびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖；C H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部およびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖、またはC H 1 ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、C H 2 ドメインおよびC H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖を含むことができる。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、C H 3 ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明に使用される結合ポリペプチドは、C H 2 ドメインの少なくとも一部（例えば、C H 2 ドメインの全部または一部）を欠くことができる。上記のように、当業者であれば、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）のアミノ酸配列が天然に存在する免疫グロブリン分子と異なるように、これらのドメインを改変することができるという。

10

【0220】

本明細書で開示される特定の抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくは誘導体では、多量体の1つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体の第2のポリペプチド鎖上の重鎖部分と同一である。あるいは、本発明の重鎖部分含有単量体は同一ではない。例えば、各単量体は、異なる標的結合部位を含むことができ、例えば、二重特異性抗体または二特異性抗体を形成する。

20

【0221】

別の実施形態では、本明細書で開示される抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくは誘導体は、s c F vなどの単一ポリペプチド鎖から構成され、潜在的なインビボ治療用途および診断用途のために細胞内に発現され得る（細胞内抗体）。

【0222】

本明細書で開示される診断方法および治療方法に使用される結合ポリペプチドの重鎖部分は、様々な免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、I g G 1分子に由来するC H 1 ドメイン、およびI g G 3分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例では、重鎖部分は、I g G 1分子に部分的に由来するヒンジ領域、およびI g G 3分子に部分的に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例では、重鎖部分は、I g G 1分子に部分的に由来するキメラヒンジ、およびI g G 4分子に部分的に由来するキメラヒンジを含むことができる。

30

【0223】

したがって、実施例にも例示されているように、一実施形態では、本発明の抗体の定常領域またはその一部、特にC H 2 および/またはC H 3 ドメイン、しかし場合によりC H 1 ドメインは、本発明の方法にしたがって単離されたネイティブなヒトモノクローナル抗体の可変領域に対して異種性である。本文脈では、異種定常領域は、本発明の抗体の治療用途の場合には、好ましくはヒト起源のものであるが、動物研究の場合には、例えば齧歯類起源のものであり得る（実施例も参照のこと）。

40

【0224】

本明細書で使用される場合、用語「軽鎖部分」は、免疫グロブリン軽鎖由来のアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖部分は、V_LまたはC_Lドメインの少なくとも1つを含む。

【0225】

先に示したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および三次元構造が周知である。本明細書で使用される場合、用語「V_Hドメイン」は免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、用語「C H 1 ドメイン」は免疫グロブリン重鎖の第1の（最もアミノ末端の）定常領域ドメインを含む。C H 1 ドメインはV_Hドメ

50

インに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に対してアミノ末端側にある。

【0226】

本明細書で使用される場合、用語「CH2ドメイン」は、例えば、従来のナンバリングスキームを使用すれば抗体の約残基244～残基360（Kabataナンバリングシステムでは残基244～360；およびEUNナンバリングシステムでは残基231～340、Kabata EA et al. 上掲を参照のこと）に及ぶ重鎖分子の部分を含む。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対合していないという点が固有である。どちらかといえば、2つのN-結合分岐状炭水化物鎖が、インタクトな天然IgG分子の2つのCH2ドメイン間に挿入される。CH3ドメインはCH2ドメインからIgG分子のC末端に及び、約108個の残基を含むこともまた詳細に記載されている。

10

【0227】

本明細書で使用される場合、用語「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに結合する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は約25個の残基を含み、柔軟であり、したがって2つのN末端抗原結合領域が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域を3つの異なるドメイン：上部、中部および下部ヒンジドメインに細分化することができる；Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083を参照のこと。

【0228】

本明細書で使用される場合、用語「ジスルフィド結合」は、2個の硫黄原子間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成することができるか、または第2のチオール基と架橋することができるチオール基を含む。天然に存在するIgG分子の大部分では、CH1およびCL領域はジスルフィド結合によって連結され、2本の重鎖は、Kabataナンバリングシステムを使用すれば239位および242位に対応する位置で（EUNナンバリングシステムでは、226位または229位）2つのジスルフィド結合によって連結される。

20

【0229】

本明細書中で使用される場合、用語「連結される」、「融合される」または「融合」は交換可能に使用される。これらの用語は、化学的コンジュゲート化または組換え手段を含むどのような手段によってでも、2つ以上の要素または成分を一緒につなぐことを示す。

「読み枠を合わせた融合」は、2つ以上のポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム（ORF）を、これらの元々のORFの正しい翻訳読み枠を維持する様式で、連続したより長いORFを形成するためにつなぐことを示す。したがって、組換え融合タンパク質は、元々のORFによってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含有する単一タンパク質である（そのようなセグメントは通常、自然界ではそのようにつながれない）。したがって、読み枠が、融合されたセグメントの全体にわたって連続にされるにもかかわらず、これらのセグメントは、例えば、読み枠を合わせたリンカー配列によって物理的または空間的に隔てられる場合がある。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドが、読み枠を合わせて融合される場合があり、しかし、「融合された」CDRが、連続したポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域またはさらなるCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって隔てられる場合がある。

30

40

【0230】

エピトープ：

抗体のためのペプチドまたはポリペプチドのエピトープの最小サイズは約4～5個のアミノ酸であると考えられる。ペプチドまたはポリペプチドのエピトープは好ましくは、少なくとも7個のアミノ酸を含有し、より好ましくは少なくとも9個のアミノ酸を含有し、最も好ましくは少なくとも約15～約30個の間のアミノ酸を含有する。CDRは抗原性のペプチドまたはポリペプチドをその三次形態で認識することができるので、エピトープを構成するアミノ酸は連続している必要はなく、いくつかの場合には、同じペプチド鎖に存在していないことさえある。本発明において、本発明の抗体によって認識されるペプチ

50

ドまたはポリペプチドのエピトープは、抗体が2つ以上のサブタイプを認識する場合には、本発明の目的とする分子、すなわち、IL-20の相同的配列の少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、より好ましくは少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、約15～約30個の間または約30～約50個の間の連続したアミノ酸または不連続なアミノ酸からなる配列を含有する。好ましくは、本発明の抗体によって認識されるペプチドは15～18個のアミノ酸を含む。好ましい実施形態では、前記ペプチドは、ヒトIL-20由来の連続した18個のアミノ酸からなる配列PDHYTLRKISSSLANSFLT(配列番号69)を含む。好ましい別の実施形態では、前記ペプチドエピトープは、配列DHYTLRKISSSLANSF(配列番号70)からなる15個アミノ酸を含む。

10

【0231】

結合特性：

本明細書で互換的に使用される「結合する」または「認識する」は、一般に、結合分子、例えば、抗体がその抗原結合ドメインを介して所定のエピトープに結合すること、およびその結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間のある程度の相補性を必要とすることを意味する。この定義によれば、抗体がランダムな無関係のエピトープに結合するよりも容易に、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合する場合、その抗体はそのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書では、ある特定の抗体がある特定のエピトープに結合する相対的親和性を特定するのに使用される。例えば、抗体「A」が抗体「B」よりも所定のエピトープに対して高い特異性を有するとみなしてもよいし、または抗体「A」が、関連エピトープ「D」に対して有するよりも高い特異性でエピトープ「C」に結合するということもできる。無関係のエピトープは、通常、所定の結合分子の結合特異性の評価に使用され得る非特異的抗原(例えば、BSA、カゼインまたは任意の他の特定のポリペプチド)の一部である。これに関して、用語「特異的結合」は、抗体が、非特異的抗原に対する結合のその K_D よりも少なくとも2倍低い K_D で、所定の抗原に結合することを指す。本明細書で使用される場合、用語「高特異的」結合は、特定の標的エピトープに対する抗体の相対 K_D が、他のリガンドに対するその抗体の結合の K_D よりも少なくとも10倍低いことを意味する。

20

【0232】

存在する場合、抗体の抗原との「免疫学的結合特性」または他の結合特性という用語は、そのすべての文法の形式で、抗体の特異性、親和性、交差反応性および他の結合特性を指す。

30

【0233】

「優先的に結合する」によって、結合分子、例えば、抗体が、関連したエピトープ、類似したエピトープ、相同的なエピトープまたは相似的なエピトープに結合するであろうよりも容易に、ある1つのエピトープに特異的に結合することが意味される。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、そのような抗体が関連のエピトープと交差反応することがあるとしても、そのエピトープに結合する可能性が、関連したエピトープに結合することができる場合よりも大きいであろう。

40

【0234】

非限定的な例として、結合分子、例えば、抗体が、その抗体の第2のエピトープに対する解離定数(K_D)よりも低い K_D で第1のエピトープに結合する場合、それは第1のエピトープに選択的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2のエピトープに対する K_D よりも少なくとも1桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、抗体は前記第1の抗原に選択的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2のエピトープに対する K_D よりも少なくとも2桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、抗体は前記第1のエピトープに選択的に結合するとみなされ得る。

【0235】

別の非限定的な例では、結合分子、例えば、抗体が、その抗体の第2のエピトープに対

50

する解離速度 ($k(\text{off})$) よりも低い $k(\text{off})$ で第1のエピトープに結合する場合、それは第1のエピトープに選択的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2のエピトープに対する $k(\text{off})$ よりも少なくとも1桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、抗体は第1のエピトープに選択的に結合するとみなされ得る。別の非限定的な例では、抗体が、その抗体の第2のエピトープに対する $k(\text{off})$ よりも少なくとも2桁低い親和性で第1のエピトープに結合する場合、抗体は第1のエピトープに選択的に結合するとみなされ得る。

【0236】

本明細書で開示される結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片、変異体または誘導体は、 $5 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-2}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ または 10^{-3}秒^{-1} 以下の解離速度 ($k(\text{off})$) で、本発明の目的の分子またはその断片もしくは変異体と結合すると言うことができる。より好ましくは、本発明の抗体は、 $5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-4}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 、または 10^{-5}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-6}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{秒}^{-1}$ または 10^{-7}秒^{-1} 以下の解離速度 ($k(\text{off})$) で、本発明の目的の分子またはその断片もしくは変異体と結合すると言うことができる。

10

【0237】

本明細書で開示される結合分子、例えば、抗体または抗原結合断片、変異体または誘導体は、 $10^3 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ または $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上の結合速度 ($k(\text{on})$) で、本発明の目的の分子またはその断片もしくは変異体と結合すると言うことができる。より好ましくは、本発明の抗体は、 $10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ または $10^7 \text{M}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 以上の結合速度 ($k(\text{on})$) で、本発明の目的の分子またはその断片もしくは変異体と結合すると言うことができる。

20

【0238】

結合分子、例えば、抗体が、所定のエピトープに対する基準抗体の結合をいくらか遮断する程度にそのエピトープに選択的に結合する場合、所定のエピトープに対する基準抗体の結合を競合的に阻害すると言われる。当技術分野において公知の任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイによって競合的阻害を判定することができる。抗体は、所定のエピトープに対する基準抗体の結合を少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害すると言うことができる。

30

【0239】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、結合分子、例えば、個々のエピトープと、免疫グロブリン分子のCDRとの結合強度の程度を指す。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)の第27頁~第28頁を参照のこと。本明細書で使用される場合、用語「結合活性」は、免疫グロブリンの集団と抗原との間の複合体の総合的な安定性、すなわち、免疫グロブリン混合物と抗原との機能的結合強度を指す。例えば、Harlowの第29頁~第34頁を参照のこと。結合活性は、集団中の個々の免疫グロブリン分子と特異的エピトープとの親和性、およびさらに免疫グロブリンおよび抗原の結合価の両方に関連する。例えば、2価のモノクローナル抗体と、ポリマーなどの高頻度反復エピトープ構造を有する抗原との間の相互作用は、高い結合活性の1つであろう。任意の適切な方法を使用して抗原に対する抗体の親和性または結合活性を実験的に決定することができる。例えば、Berzofsky et al., 「Antibody - Antigen Interactions」In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, NY (1984)、Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, NY (1992)、および本明細書に記載される方法を参照

40

50

のこと。抗原に対する抗体の親和性を測定するための一般的な技術としては、ELISA、RIAおよび表面プラズモン共鳴が挙げられる。異なる条件下（例えば、塩濃度、pH）で測定する場合、特定の抗体抗原間相互作用の測定された親和性は変化し得る。したがって、標準化した抗体抗原溶液および標準化した緩衝液を用いて、親和性および他の抗原結合パラメータ、例えば、 K_D 、 IC_{50} を測定することが好ましい。

【0240】

本発明の結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくは誘導体はまた、それらの交差反応性に関して記載または明示され得る。本明細書で使用される場合、用語「交差反応性」は、第1の抗原に対して特異的な抗体の第2の抗原と反応する能力；2つの異なる抗原性物質間の関連性の程度を指す。したがって、抗体が、その抗体の形成を誘導したエピトープと異なるエピトープに結合する場合、その抗体は交差反応性である。交差反応性エピトープは、一般に、抗体を誘導したエピトープと同じ相補的な構造的特徴の多くを含み、いくつかの場合では、実際には元のエピトープよりも適合する可能性がある。

10

【0241】

例えば、ある特定の抗体が、関連するが同一ではないエピトープ、例えば、基準エピトープに対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、および少なくとも50%の（当技術分野において公知の、および本明細書に記載される方法を使用して計算されるような）同一性を有するエピトープに結合するという点で、それらはある程度の交差反応性を有する。抗体が基準エピトープに対して95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、および50%未満の（当技術分野において公知の、および本明細書に記載される方法を使用して計算されるような）同一性を有するエピトープに結合しない場合、それは交差反応性をほとんど、または全く持たないと言うことができる。抗体があるエピトープの他の任意の類似体、オソログまたは相同体に結合しない場合、それはそのエピトープに対して「非常に特異的である」とみなすことができる。

20

【0242】

本発明の結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくは誘導体はまた、本発明の目的の分子に対する結合親和性に関して記載または明示され得る。好ましい結合親和性には $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ 、 $10^{-4} M$ 、 $5 \times 10^{-5} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-13} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $5 \times 10^{-14} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $5 \times 10^{-15} M$ 、または $10^{-15} M$ 未満の解離定数または K_D を有するものが含まれる。典型的には、抗体は、 $10^{-7} M$ 以下の解離定数（ K_D ）で、その所定の抗原に結合する。好ましくは、抗体は、 $10^{-9} M$ 以下の解離定数（ K_D ）で、さらにより好ましくは $10^{-11} M$ 以下の解離定数（ K_D ）で、その同種抗原に結合する。

30

【0243】

抗体の改変：

免疫グロブリンまたはそれをコードするcDNAをさらに改変することができる。したがって、さらなる実施形態では、本発明の方法は、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、Fab断片、二重特異性抗体、融合抗体、標識抗体またはこれらのいずれか1つの類似体を生産する工程のいずれか1つを含む。対応する方法が当業者に公知であり、例えば、Harlow and Lane「Antibodies, A Laboratory Manual」, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988に記載されている。ファージディスプレイ技術によって前記抗体の誘導体を得る場合、本発明に提供される抗体のいずれか1つのものと同じエピトープに結合するファージ抗体の効率性を上昇させるために、BIAcoreシステムにおいて用いられるように、表面プ

40

50

ラズモン共鳴を使用することができる (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。例えば、国際公開第 89/09622 号には、キメラ抗体の生産が記載されている。欧州特許出願公開第 0239400 号明細書および国際公開第 90/07861 号には、ヒト化抗体の生産方法が記載されている。本発明にしたがって用いられる抗体のさらなる供給源は、いわゆるゼノジニック抗体である。例えば、国際公開第 91/10741 号、国際公開第 94/02602 号、国際公開第 96/34096 号および国際公開第 96/33735 号には、マウスにおけるヒト抗体などのゼノジニック抗体の生産についての一般的原理が記載されている。上記のように、本発明の抗体は、完全抗体の他に、例えば、Fv、Fab および F(ab)₂ を含む様々な形態で、ならびに単鎖形態で存在し得る。例えば、国際公開第 88/09344 号を参照のこと。

10

【0244】

当技術分野において公知の従来技術を使用して、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加、および/または組換えおよび/または当技術分野において公知の任意の他の改変を単独でまたは組み合わせて使用することによって、本発明の抗体またはそれらの対応する免疫グロブリン鎖をさらに改変することができる。免疫グロブリン鎖アミノ酸配列の基礎となる DNA 配列にこのような改変を導入する方法は当業者に周知である；例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994) を参照のこと。本発明の抗体の改変としては、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化、および炭水化物もしくは脂質部分、補因子などの結合を含む、側鎖改変、骨格改変、ならびに N 末端および C 末端改変を含む、1 つ以上の構成アミノ酸における化学的および/または酵素的誘導体化が挙げられる。同様に、本発明は、標識または薬物などの異種性分子がアミノ末端に融合された記載される抗体またはそのいくつかの断片を含むキメラタンパク質の生産を包含する。このようにして作製された抗原結合分子は、それぞれ罹患細胞および組織の適切な表面構造を発現する細胞への薬物局在化に使用することができる。この標的化および細胞への結合は、治療的または診断的に活性な薬剤の送達および遺伝子治療/遺伝子送達に有用であり得る。本発明の抗体を有する分子/粒子は、目的の特定の抗原を発現する細胞/組織に特異的に結合するので、診断用途および治療用途を有し得る。

20

30

【0245】

試料：

本明細書で使用される場合、用語「試料」又は「生物学的試料」は、被験体または患者から得られる任意の生物学的物質を指す。一態様では、試料は、血液、脳脊髄液（「CSF」）または尿を含み得る。他の態様では、試料は、全血、血漿、末梢血から濃縮された単核細胞（PBMC）、例えば、リンパ球（すなわち、T 細胞、NK 細胞または B 細胞）、単球、マクロファージ、樹状細胞および好塩基球；および培養細胞（例えば、被験体由来の B 細胞）を含み得る。試料はまた、腫瘍組織を含む生検または組織試料を含み得る。さらに他の態様では、試料は、全細胞および/または細胞溶解物を含み得る。一実施形態では、試料は、末梢血単核細胞（PBMC）を含む。当技術分野において公知の方法によって試料を採取することができる。

40

【0246】

疾患および障害：

特に指定がない限り、用語「障害」および「疾患」は、本明細書では互換的に使用される。本明細書で使用される場合、用語「自己免疫性障害」は、個体自身の組織または器官またはその同時分離体または徴候またはそれらから生じる症状から生じるかまたそれらに

50

対する疾患または障害である。自己免疫性疾患は適応免疫反応の脱調節によって主に引き起こされ、自己構造に対する自己抗体または自己反応性T細胞が形成される。ほぼすべての自己免疫性疾患は、炎症性成分を有する。自己炎症性疾患は主に炎症性であり、いくつかの古典的な自己炎症性疾患は、先天性炎症経路の遺伝的欠陥によって引き起こされる。自己炎症性疾患では、自己反応性T細胞または自己抗体は見られない。これらの自己免疫性および自己炎症性障害の多くにおいて、限定されないが、高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原抗体複合体沈着、副腎皮質ステロイドまたは免疫抑制性処置から恩恵を受けるもの、および罹患組織中のリンパ系細胞凝集塊を含む多くの臨床用および研究用のマーカーが存在し得る。B細胞媒介性自己免疫性障害に関する理論に限定されないが、B細胞は、自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状およびT細胞活性化、サイトカイン合成、ケモカインの直接放出、および異所性新リンパ形成に対しての病巣の提供を含む、多くの機能的な経路によりヒト自己免疫性疾患において病原性効果を示すことが考えられる。これらの経路のそれぞれが、自己免疫性疾患の病状に異なった度合いで寄与し得る。

10

【0247】

本明細書中で使用される場合、「自己免疫障害」は、器官特異的疾患であること（すなわち、免疫応答が、器官系に対して、例えば、内分泌系、造血系、皮膚、心肺系、胃腸系および肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などに対して特異的に向けられる）、または、多数の器官系を冒し得る全身性疾患（これには、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、多発性筋炎、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群1型（APS1）/自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー（APECED）などが含まれるが、これらに限定されない）であることが可能である。好ましいそのような疾患には、多発性硬化症（MS）、炎症性腸疾患（IBD）、様々な形態の自己免疫性のリウマチ学的障害（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、脊椎関節炎、乾癬性関節炎、シェーグレン症候群、強皮症、狼瘡（SLEおよびループス腎炎を含むが、これらに限定されない）、多発性筋炎/皮膚筋炎および乾癬性関節炎を含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されない）、自己免疫性の皮膚科学的障害（乾癬、天疱瘡群疾患、水疱性類天疱瘡疾患および皮膚エリテマトーデスを含むが、これらに限定されない）、および、自己免疫性の内分泌障害（糖尿病関連の自己免疫疾患（例えば、1型糖尿病またはインスリン依存性糖尿病（T1DMまたはIDDM）など）、自己免疫性の甲状腺疾患（グレーブス病および甲状腺炎を含むが、これらに限定されない）、および、自己免疫の生成に影響を及ぼす疾患（自己免疫性多腺性内分泌不全症候群1型（APS1）/自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィー（APECED）および重症筋無力症（MG/胸腺腫）を含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されない。好ましい疾患には、例えば、SLE、RA、脊椎関節炎、乾癬性関節炎、乾癬、シェーグレン症候群、グレーブス病、甲状腺炎、糸球体腎炎およびAPS1が含まれる。一層より好ましいものが、RAおよびSLEであり、最も好ましいものがSLEである。

20

30

【0248】

IL-20アンタゴニスト（例えば、抗IL-20抗体など）のさらなる医学的使用が近年には、例えば、関節リウマチおよび骨粗鬆症を防止または処置するために国際出願公開WO2010/042634において、肝線維症を軽減させるために国際出願公開WO2014/025767において、アレルギー性気道障害（例えば、喘息または気管支気道閉塞など）を処置するために国際出願公開WO2014/025775において、また、骨折を有する被験体において骨折治癒を促進させるために国際出願公開WO2014/036384において記載されている。

40

【0249】

標識および診断：

標識剤は、例えば、免疫複合体を調製するために、本発明の抗体または抗原に直接的または間接的のいずれかでカップリングされ得る。間接的カップリングの一例は、スパーサ

50

部分の使用によるものである。さらに、本発明の抗体は、共有結合または非共有結合によって連結されているさらなるドメインを含み得る。この連結は、当技術分野において公知の上記方法による遺伝的融合に基づくものでもよいし、または例えば国際公開第94/04686号に記載されている化学的架橋によって実施することもできる。本発明の抗体を含む融合タンパク質中に存在するさらなるドメインは、好ましくは、可撓性リンカー、有利にはポリペプチドリンカーによって連結され得、前記ポリペプチドリンカーは、前記さらなるドメインのC末端と本発明の抗体のN末端との間（またはその逆も同様である）の距離に及ぶのに十分な長さの、複数の親水性ペプチド結合アミノ酸を含む。治療的または診断的に活性な薬剤が、様々な方法によって、本発明の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされ得る。これとしては、例えば、共有的な方法、例えばペプチド結合によつて、治療的または診断的に活性な薬剤にカップリングされた、本発明の抗体の可変領域を含む単鎖融合タンパク質が挙げられる。さらなる例としては、さらなる分子に共有結合または非共有結合によってカップリングされた抗原結合断片を少なくとも含む分子が挙げられ、以下の非限定的な例示的リスト中のものが挙げられる。Trauneker, Int. J. Cancer Supp. SUDP 7 (1992), 51-52には、CD3に対するFv領域が、可溶性CD4または他のリガンド、例えばOVCAおよびIL-7にカップリングされている、二重特異性試薬ヤヌシンが記載されている。同様に、本発明の抗体の可変領域をFv分子に構築して、引用文献に示されている代替的リガンドにカップリングすることができる。Higgins, J. Infect. Disease 166 (1992), 198-202には、GP120のV3領域中の特定の配列に対する抗体に架橋されたOKT3からなるヘテロコンジュゲート抗体が記載されている。このようなヘテロコンジュゲート抗体はまた、本発明の方法の抗体中に含まれる少なくとも可変領域を使用して構築され得る。特異的抗体のさらなる例としては、Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194およびFanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124に記載されている抗体が挙げられる。従来の抗体を含む免疫毒素であるコンジュゲートは、当技術分野において広く記載されている。従来のカップリング技術によって毒素を抗体にカップリングしてもよいし、またはタンパク質毒素部分を含む免疫毒素を融合タンパク質として生産してもよい。本発明の抗体は、このような免疫毒素を得るための対応する方法で使用され得る。このような免疫毒素の例示は、Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70およびFanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54によって記載されているものである。

【0250】

上記融合タンパク質は、プロテアーゼにより切断可能なリンカーまたは切断部位をさらに含み得る。これらのスペーサ部分は順に不溶性でもよいしまたは可溶性でもよく(Diener et al., Science 231 (1986), 148)、標的部位における抗原からの薬物放出を可能にするように選択され得る。免疫療法のための本発明の抗体および抗原にカップリングされ得る治療剤の例は、ケモカイン、ホーミング分子、薬物、放射性同位体、レクチンおよび毒素である。本発明の抗体および抗原にコンジュゲートされ得る薬物は、コンジュゲート分子を使用しようとする疾患状況に依存する。例えば、腫瘍疾患の処置に有用な標的に対して特異的な抗体を、古典的には抗腫瘍薬物と称される化合物、例えば、マイトマイシンC、ダウノルピシンおよびピンブラスチンにコンジュゲートすることができる。例えば、腫瘍免疫療法のために、放射性同位体とコンジュゲートした本発明の抗体または抗原を使用する際には、特定の同位体が、白血球分布ならびに安定性および放射などの因子に応じて、他の同位体よりも好ましい場合がある。自己免疫反応に応じて、いくつかの放射体が、他の放射体よりも好ましい場合がある。一般に、粒子および粒子を放射する放射性同位体が、免疫療法では好ましい。ショートレンジの高エネルギー放射体、例えば ^{212}Bi が好ましい。治療目的では、本発明の抗体または抗原に結合され得る放射性同位体の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{212}At 、 ^{211}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd および ^{188}Re である。本発

10

20

30

40

50

明の抗体または抗原にカップリングされ得る他の治療剤、ならびにエクスビボおよびインビボの治療プロトコールは公知であるか、または当業者であれば容易に確認することができる。標識するのに適切な放射性核種の非限定的な例は、 ^{198}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{111}C 、 ^{14}C 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^3H 、 ^{197}Hg 、 ^{166}Ho 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{203}Pb 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{35}S 、 ^{153}Sm および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ である。標識するのに適切な他の分子は、蛍光色素または発光色素、磁気粒子、金属、および二次的な酵素または結合工程によって検出可能な分子、例えば、酵素またはペプチドタグである。本発明で標識として使用するのに適切な市販の蛍光プローブは、Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 8th Edition (この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる)に列挙されている。磁気粒子ベースのアッセイ(MPA)に使用するのに適切な磁気粒子は、常磁性物質、反磁性物質、強磁性物質、強磁性物質および超常磁性物質から選択され得る。

【0251】

診断目的に有用な分子および細胞生化学の一般的な方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996)などの標準的な教科書に見られ得る。診断目的用の試薬、検出手段およびキットは、Pharmacia Diagnostics、Amersham、BioRad、Stratagene、Invitrogen、およびSigma-Aldrichなどの商業ベンダー、ならびに本明細書で引用されている参考文献、特に特許文献のいずれか1つに示されている供給源から市販されている。

【0252】

処置および薬物：

本明細書で使用される場合、用語「処置する」または「処置」は、自己免疫性疾患および/または自己炎症性疾患の発症などの望ましくない生理的变化または障害を防止するか、または遅延(減少)させることを目的とする治療的処置および予防的または防止的手段の両方を指す。有益なまたは所望の臨床結果としては、限定されないが、検出可能であるかまたは検出不可能であるかにかかわらず、症候の軽減、疾患の程度の縮小、安定化した(すなわち、悪化していない)疾患状態、疾患進行の遅延または緩慢化、疾患状態の寛解または緩和、および(部分的であるかまたは完全であるかにかかわらず)寛解が挙げられる。「処置」はまた、処置を受けない場合に予想される生存期間と比較して生存期間を延長させることを意味し得る。処置を必要とする者としては、症状または障害を既に有する者、ならびに症状または障害を有する傾向がある者、または症状または障害の徴候を防止すべき者が挙げられる。

【0253】

特に指定がなければ、用語「薬物」、「医薬」または「医薬品」は、本明細書では互換的に使用され、限定されないが、(A)内用または外用の物品、医薬および調製物、ならびにヒトまたは他の動物のいずれかの疾患の診断、治療、緩和、処置または予防に使用することを目的とする任意の物質または物質の混合物；ならびに(B)ヒトまたは他の動物の体の構造または任意の機能に影響を与えることを目的とする物品、医薬および調製物(食品を除く)；ならびに(C)項目(A)および(B)で指定された任意の物品の成分として使用することを目的とする製品を含むものである。用語「薬物」、「医薬」または「医薬品」は、1つ以上の「薬剤」、「化合物」、「物質」または「(化学)組成物」、ならびにいくつかの他の文脈ではさらに充填剤、崩壊剤、潤滑剤、流動促進剤、結合剤のような他の薬学的に不活性な賦形剤、またはヒトもしくは他の動物の体内の目的の標的部

(例えば、皮膚、胃または腸内)における「薬物」、「医薬」もしくは「医薬品」の容易な運搬、崩壊、分解、溶解および生物学的アベイラビリティを確保するものを含有する、ヒトまたは他の動物のいずれかで使用することを目的とする調製物の製剤一式を含むものである。用語「薬剤」、「化合物」または「物質」は、本明細書では互換的に使用され、より具体的な文脈では、限定されないが、すべての薬理的に活性な薬剤(すなわち、所望の生物学的または薬理的効果を誘導するか、または本発明の方法によってこのような可能な薬理的効果を誘導する能力について調査または試験される薬剤)を含むものである。

【0254】

「抗リウマチ薬」および免疫抑制薬の例としては、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、ミオクリシン、オーラノフィン、スルファサラジン、メトトレキセート、レフルノミド、エタネルセプト、インフリキシマブ(プラス経口および皮下用メトトレキセート)、アダリムマブなど、アザチオプリン、D-ペニシラミン、ゴールド塩類(経口)、ゴールド塩類(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリンAおよび局所性シクロスポリンを含むシクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、シクロホスファミド、ブドウ球菌プロテインA (Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197(2003), 125-39)が挙げられ、これらの塩および誘導体などを含む。

10

【0255】

「非ステロイド系抗炎症薬」または「NSAID」の例としては、アスピリン、アセチルサリチル酸、イブプロフェンおよびイブプロフェン遅延剤、フェノプロフェン、ピロキシカム、フルルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、ナプロキセン、テノキシカム、ベノリレート、ジクロフェナク、ナプロキセン、ナブメトン、インドメタシン、ケトプロフェン、メフェナム酸、ジクロフェナク、フェンブフェン、アザプロバゾン、アセメタシン、チアプロフェン酸、インドメタシン、スリンダク、トルメチン、フェニルブタゾン、ジクロフェナクおよびジクロフェナク遅延剤、GR253035などのシクロオキシゲナーゼ(COX)-2インヒビター、MK966、セレコキシブ(CELEBREX(登録商標); 4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾロ-1-イル)ベンゼンスルホンアミドおよびバルデコキシブ(BEXTRA(登録商標))、およびメロキシカム(MOBIC(登録商標))が挙げられ、これらの塩および誘導体などを含む。好ましくは、これらは、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、インドメタシンまたはトルメチンである。このようなNSAIDは、場合により、鎮痛剤、例えば、コデイン、トラマドール、および/またはジヒドロコデインまたは麻酔剤、例えば、モルヒネと共に使用される。

20

30

【0256】

「被験体」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後予測、予防または治療に望ましい任意の被験体、特に哺乳動物被験体、例えば、ヒト患者を意味する。

【0257】

医薬担体:

薬学的に許容し得る担体および投与経路は、当業者に公知の対応文献から採用することができる。当技術分野において周知の方法にしたがって本発明の医薬組成物を製剤化することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols. 2nd Edition by Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylo

40

50

r and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8を参照のこと。適切な医薬担体の例は当技術分野において周知であり、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが挙げられる。周知の従来の方法によってこのような担体を含む組成物を製剤化することができる。適切な用量で被験体にこれらの医薬組成物を投与することができる。様々な方法で、適切な組成物の投与をもたらすことができる。例としては、薬学的に許容し得る担体を含む組成物を、経口、鼻腔内、直腸、局所、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、皮下、経皮、くも膜下および頭蓋内の方法により投与することが挙げられる。点鼻薬製剤などのエアロゾル製剤は、保存剤および等張剤を有する、活性薬剤の精製した水溶液または他の溶液を含む。このような製剤は、好ましくは、鼻粘膜に適合するpHおよび等張状態に調節される。経口投与用医薬組成物、例えば、単一ドメイン抗体分子（例えば、「nanobodies（登録商標）」なども本発明で想定される。このような経口製剤は、錠剤、カプセル剤、粉末、液体または半固体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体担体を含むことができる。直腸投与用または経腔投与用の製剤は、適切な担体を有する坐剤として提供され得る；O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9)(2003), 727-735も参照のこと。様々な種類の投与に適切な製剤に関するさらなる指針は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)および対応する最新版に見ることができる。薬物送達方法の簡単な総説については、Langer, Science 249(1990), 1527-1533を参照のこと。

10

20

【0258】

投薬計画：

投薬計画は、主治医および様々な臨床上的要因によって決定されるであろう。医療技術分野では広く知られているように、どのような患者であれ、一人の患者のための投薬量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与されるべき具体的な化合物、性別、投与時間および投与経路、全身の健康状態、ならびに、他の薬物が同時に投与されることを含めて、多くの要因に依存する。典型的な用量が、例えば、0.001 μ g~1000 μ gの範囲（あるいは、この範囲における発現または発現阻害のための核酸の範囲）であることが可能である。しかしながら、この例示的な範囲よりも少ない用量または大きい用量が、とりわけ上述の要因を考慮して想定される。一般に、医薬組成物の定期的な投与としての投与計画は1日あたり1 μ g単位~10mg単位の範囲でなければならない。投与計画が連続注入であるならば、投与計画はまた、体重1キログラムあたり1分につきそれぞれ、1 μ g単位~10mg単位の範囲でなければならない。進行を定期的な評価によってモニターすることができる。非経口投与のための調製物には、無菌の水性または非水性の溶液、懸濁物およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油など）および注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）が挙げられる。水性キャリアには、生理的食塩水および緩衝化媒体を含めて、水、アルコール性/水性の溶液、エマルジョンまたは懸濁物が含まれる。非経口用ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲルまたは固定油が含まれる。静脈内用ビヒクルには、流体および栄養補充液、電解質補充液（例えば、リンゲルブドウ糖に基づくものなど）などが含まれる。保存剤および他の添加剤もまた存在する場合がある（例えば、抗菌剤、酸化剤、キレート化剤および不活性ガスなど）。さらには、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の意図された使用に依存して、さらなる薬剤（例えば、抗腫瘍剤および細胞傷害性薬物など）を含んでもよい。

30

40

【0259】

加えて、他の薬剤の共投与または逐次投与が望ましい場合がある。治療効果的な用量または量は、症状または状態を改善するために十分である有効成分のそのような量を示す。

50

そのような化合物の治療効力および毒性を細胞培養物または実験動物における標準的な薬学手順によって求めることができ、例えば、ED50（集団の50%において治療効果的な用量）およびLD50（集団の50%に対して致死的な用量）によって求めることができる。治療効果と毒性影響との間における用量比が治療指数であり、これはLD50/ED50の比率として表すことができる。好ましくは、組成物における治療剤は、炎症を防止するために、または免疫応答を抑制するために十分である量で存在する。

【0260】

これらの実施形態および他の実施形態が本発明の記載および実施例によって開示され、また、包含される。本発明に従って用いられるための材料、方法、使用法および化合物のいずれか1つに関するさらなる文献が、公開されている図書館およびデータベースから、例えば、電子デバイスを使用して検索される場合がある。例えば、公開されているデータベースの「PubMed」が利用される場合がある（このデータベースは国立バイオテクノロジー情報センターおよび/または国立衛生研究所の国立医学図書館によって提供される）。さらなるデータベースおよびウェブアドレスが、例えば、欧州バイオインフォマティクス研究所（EBI）（これは欧州分子生物学研究所（EMBL）の一部である）のデータベースなどが当業者には知られており、これらもまた、インターネット検索エンジンを使用して得ることができる。バイオテクノロジーにおける特許情報、ならびに、遡及的検索および現在の認識のために有用な特許情報の関連原典の調査の概略が、Berk's, TIBTECH 12 (1994)、352~364に示される。

10

【0261】

上記開示により、本発明が概して記載される。いくつかの文書が本明細書の本文を通して引用される。完全な書誌的引用が請求項の直前において明細書の最後に見出される場合がある。すべての引用された参考文献（背景の節における開示を含めて本出願明細書を通して引用されるような文献参照物、発行された特許、公開された特許出願、および、製造者の仕様書、説明書などを含む）の内容が、本明細書により明示的に、参照によって組み込まれる。しかしながら、どのような文書であれ、引用される文書は実際に本発明に関して先行技術であることを何ら認めるものではない。

20

【0262】

より完全な理解を、例示のみの目的のために本明細書中に提供される下記の具体的な実施例を参照することによって得ることができる。

30

【実施例】

【0263】

以下の実施例1~10および対応する図1~18は本発明をさらに例証するが、本発明の範囲を何ら限定するものと解釈するべきではない。本明細書で用いられるものなどの従来の方法についての詳細な説明は、引用されている文献に見出すことができる；「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」Seventeenth Ed. ed. by Beers and Berkow (Merck & Co., Inc., 2003)も参照のこと。本発明の実施は、特に指示がない限り、当技術分野の技術の範囲内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子導入生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を用いる。

40

【0264】

分子遺伝学および遺伝子工学の方法は、一般に、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds

50

. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.); および Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986)の最新版に記載されている。この開示で言及されている遺伝子操作のための試薬、クローニングベクターおよびキットは、BioRad、Stratagene、InvitrogenおよびClontechなどの商業ベンダーから入手可能である。細胞培養および培地回収の一般的な技術は、Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); および Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251)に概説されている。

【0265】

実施例1: LIPSアッセイによる患者の血清におけるヒトサイトカイン特異的抗体の検出、候補抗IL-20抗体のクローニングおよび組換え発現

LIPSアッセイを、APECED(自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・表皮異形成、これは自己免疫性多腺性内分泌不全症1型(APS1)とも呼ばれる)の遺伝子状態に罹患する患者の血清におけるIL-20抗体の示差的分析のために使用した。IL-20を、本出願人の国際出願公開WO2013/098419における158頁の実施例10および165頁~167頁の実施例15に記載されるように(それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)、下記の表3に示されるプライマーを使用してN末端においてGaussialシフェラーゼと融合し、HEK293細胞の一過性トランスフェクションによって発現させた。

【0266】

このプロトコルには、抗体をルシフェラーゼ免疫沈殿システム(LIPS)技術によって検出するための実験手順が記載される。

【0267】

材料:

- ・ Multi Screen HTS フィルタープレート、Millipore、#MSB VN1B50
- ・ 組換えプロテインGアガロースビーズ、Exalpha、#X1197

- ・緩衝液 A (50 mM Tris (pH 7.5)、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1% Triton X-100)
- ・ルシフェラーゼアッセイシステム、Promega、#E1501
- ・Gaussialルシフェラーゼアッセイ試薬、標的化システムGAR-2B
- ・Luc抗原 (-80 °Cでの貯蔵、濃度 (LU/ml))
- ・PBS

【0268】

ハードウエア：

- ・回転式振とう機
- ・MultiScreen HTS 真空マニホールド、Millipore、#MSVMHTS00
- ・1450 MicroBeta TriLux 液体シンチレーションカウンター & ルミノメーター、Perkin Elmer
- ・Victor X5 マルチラベルプレートリーダー、Perkin Elmer
- ・マルチチャンネルピペット：Biohit 30~300 μl
- ・Eppendorf 遠心分離機 5415D

10

【0269】

方法：

- ・プロテインGアガロースを注意深く再懸濁し、必要量を取る (1枚のプレートあたり、100 μl の排液媒体を作製するおおよそ200 μl の懸濁物)。遠心分離し (300 g、5分間)、排液体積を調べ、緩衝液 A (3倍体積) により1回洗浄する (300 g、5分)。25 μl の懸濁物により、1 μl の排液プロテインGアガロースが含有されるであろうことを考慮して、緩衝液 A に再懸濁する。(プロテインGアガロースを、通常の場合には必要とされる量でチューブに小分けすることは有用であろう。)
- ・25 μl / ウェルの患者血清の1 : 100 希釈物 (緩衝液 A で希釈される) を加える。
- ・25 μl / ウェルのプロテインGアガロース懸濁物を加える。
- ・プレートを回転式振とう機において室温で1時間インキュベーションする。
- ・Luc抗原を希釈し、10⁶ (5 * 10⁵) の光ユニット (LU) が50 μl の緩衝液 A において加えられるであろうようにする。50 μl / ウェルのLuc抗原希釈物を加える。
- ・プレートを回転式振とう機において室温で1時間インキュベーションする。
- ・プレートを真空マニホールドで洗浄する。それぞれのウェルを200 μl の緩衝液 A により5回洗浄し、その後、200 μl のPBSにより2回洗浄する。プレートの上部および底部の水分を確実に除く積み重ねたペーパータオルまたはろ紙を使用してプレートから水分を拭き取る。
- ・Gaussia構築物を使用する場合、Gaussia基質を加え (10 μl / ウェル)、2秒間振とうする。ルミネセンスを装置のマニュアルにおける説明に従って直ちに5秒の間読み取る。ホタルの構築物を使用する場合、ルシフェラーゼ基質を加え (20 μl / ウェル)、2秒間振とうする。ルミネセンスを装置のマニュアルにおける説明に従って直ちに5秒の間読み取る。

20

30

40

【0270】

【表 3】

遺 伝 子	AA	プ ラ イ マ ー 名	配列および配列番号
IL-20	25-176	IL20-F	TTTGGATCCTA*CTGAAGACACTCAATTTGGGAAGCTG (IL20特異的な26bp、EcoRI部位が隣接する)、配列 番号33
		IL20-R	TTTGGCGCCGC*CTATTCTGTCTCCTCCATCCATTGCA (IL20特異的な26bp、NotI部位が隣接する)、配列番 号34

10

表 3 : G a u s s i a ルシフェラーゼをその N 末端に有する I L - 2 0 。 シグナル配列を有しない全長型 I L - 2 0 (2 5 ~ 1 7 6 a a) を、 p G a u s s i a 1 (M o l e c u l a r P a t h o l o g y , T a r t u 大学、エストニア) 哺乳動物発現ベクターを使用して (E c o R I 部位および N o t I 部位に) I L - 2 0 の N 末端において G a u s s i a ルシフェラーゼ遺伝子との融合体にクローン化した。 H E K 2 9 3 細胞へのトランスフェクションの後、細胞培養上清をルシフェラーゼに基づく免疫沈殿アッセイにおいて抗原として使用した。

【 0 2 7 1 】

20

合計で 3 0 名の患者から得られる血清 (これらは A P S 1 - 1 から A P S 1 - 3 0 までの符号によって示される) をアッセイにおいて使用した。図 2 に示されるように、患者 A P S 1 - 9 から得られる血清により、抗 I L - 2 0 抗体の最も大きい力価が明らかにされた。したがって、患者 A P S 1 - 9 を、候補の抗 I L - 2 0 抗体をクローニングするためのメモリー B 細胞の供給源として使用した。メモリー B 細胞単離、培養および抗体単離を、国際出願公開 W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 1 9 および同 W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 2 0 に記載されるように、そして、単離および分析された抗体の特異性が、これらの述べられた国際出願において具体的に使用された I L - 1 7 および I L - 2 2 の代わりに本明細書中上記および下記で定義されるような I L - 2 0 に対してであったという違いを伴って行った。それらにおける実施例の節を参照のこと、具体的には、国際公開 W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 1 9 の 1 1 7 頁 ~ 1 2 0 頁における実施例 1 および実施例 2 ならびに 1 6 8 頁 ~ 1 7 1 頁における実施例 1 7、そして、国際公開 W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 2 0 の 2 7 頁 ~ 3 1 頁における実施例 1 ~ 実施例 4 を参照のこと (それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる) 。

30

【 0 2 7 2 】

実施例 2 : 候補の抗 I L - 2 0 抗体の E L I S A での E C 5 0 決定

本発明のヒト抗体の分子クローニングならびにその後の抗体産生および抗体精製を国際出願公開 W O 2 0 1 3 / 0 9 8 4 1 9 に記載されるように行った。その出願明細書の実施例の節を参照のこと、具体的には、その 1 1 7 頁 ~ 1 2 0 頁における実施例 1 ~ 実施例 3 を参照のこと (それらの開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる) 。ヒト I L - 2 0 の G a u s s i a ルシフェラーゼとの融合タンパク質 (g 1 I L - 2 0 および g 2 I L - 2 0) に対する本発明の例示的な抗 I L - 2 0 抗体の E C 5 0 結合を G L u c サンドイッチ E L I S A によって求めた。プレートを抗 G l u c A b (1 μ g / m l) により被覆し、 G l u c 抗原を結合させ、そして、様々な M A B の連続希釈物を 2 時間結合させた。プレートを続いて洗浄し、 M A B の結合を、抗ヒト H R P コンジュゲート二次抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , E u r o p e L t d . , C a m b r i d g e s h i r e , 英国) を用いて検出した。それぞれの抗原に対する最大結合の半分をもたらす M A B の濃度 (E C 5 0 , n g / m l) を、濃度の対数を O D の 4 5 0 n m での測定値に対してプロットすることによって得られる S 字形の用量応答曲線 (可変スロープ、 4 パラメーター) において、 P r i s m 4 G r a p h P a d ソフトウエ

40

50

アを使用して計算した。結果については図3および下記の表4を参照のこと。

【0273】

【表4】

	EC ₅₀ (ng/ml)				
	2A11	6E11	6H2	7D1	20A10
g1 IL-20	9.8	128	8548	5868	18.6
g2 IL-20	6.5	347	42.2	27.1	21.0

10

表4：g1 IL-20およびg2 IL-20に対するMABの結合のEC50値のまとめ。2A11、6E11、6H2、7D1および20A10の各MABは、g1 IL-20およびg2 IL-20に結合しなかった。7D1のMABは、EC50結合が5 μg/mlよりも大きいことを示す非常に高い濃度でのみ、g1 IL-20に結合した。

20

【0274】

実施例3：ヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体は組換えIL-20および組換えIL-20受容体媒介STAT3活性化を中和する

中和アッセイが、研究されたサイトカインに应答する細胞株を用いて行われる。受容体に対するリガンド結合は一般に、対応するシグナル伝達経路、核への転写因子の移行を活性化し、应答因子遺伝子の転写、翻訳、および、適用可能であるならば、生成物分泌をアップレギュレーションする。使用されるサイトカイン濃度が、アッセイの感度を最大にするために用量应答曲線の直線部分の開始部から選択される。抗体の中和能を試験するために、標的サイトカインの最適な濃度が、血清、上清または精製抗体のサンプルの連続希釈物とプレインキュベーションされる。結果が、陽性コントロールと陰性コントロールとの間において中間の値を示す抗体の力価または濃度として表される。

30

【0275】

最初の一組の実験において、ヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体を、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞における組換えIL-20媒介STAT3活性化に対するその中和活性を評価するためにホスホ-STAT3アッセイに供した(図4)。

【0276】

ホスホ-STAT3アッセイ

20,000個のHEK293T MSR細胞(Cat.No.R79507、Invitrogen、Carlsbad、CA、米国)を96ウエル組織培養プレート(Corning Inc.、Corning、NY、米国)に播種した。翌日、細胞を、IL20RA-Myc-DDKおよびIL20RB-Myc-DDKの発現プラスミド(I型IL-20受容体；Cat.No.RC212546および同RC213197、OriGene、Rockville、MD、米国)またはIL22RA発現プラスミド(Cat.No.SC322566、OriGene)およびIL20RB-Myc-DDK発現プラスミド(II型IL-20受容体)のどちらかと共トランスフェクションした。トランスフェクションの翌日、組換えIL-20を抗IL-20mAbまたはコントロールIgGと混合し、37℃で1時間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、混合物を使用して、IL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞を37℃で40分間刺激した。刺激後、細胞を、プロテアーゼ阻害剤およびホスファタ

40

50

ーゼ阻害剤 (Cat. No. C2978、同P5726、同P0044、同P8340、SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、米国) が補充される Cellytic (商標) M 溶解緩衝液を用いて溶解し、回収された溶解物を卓上型遠心分離機において 13,000 RPM で、4 で清澄化した。溶解物を還元 SDS-PAGE に供し、ニトロセルロースメンブラン上にプロットした。メンブランを、0.25% ウシゼラチン、150 mM NaCl、5 mM EDTA、50 mM Tris/HCl (pH 7.5)、0.05% Triton X-100 を含有する緩衝液による室温での 1 時間のブロッキング処理に供し、その後、リン酸化 STAT3 に対するウサギモノクローナル抗体 (Tyr705、ブロッキング緩衝液で 1:2000 希釈、Cat. No. 9145、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、米国)、または、アルファ-チューブリン (1:2500 希釈、Cat. No. 2125、Cell Signaling Technology) とのインキュベーションを 4 で一晩行った。翌日、プロットをブロッキング緩衝液により 3 回洗浄し、その後、ウサギ IgG に対する西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体 (ブロッキング緩衝液で 1:20,000 希釈、Cat. No. 111-035-144、Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA、米国) とのインキュベーションを行った。3 回のさらなる洗浄工程の後、ECL 基質を加え (Cat. No. 34087、Thermo Fisher Scientific、Rockford、IL、米国)、反応性のバンドをオートラジオグラフィーにより可視化した。結合した抗体を、Restore Western Blot Stripping 緩衝液 (Cat. No. 21059、Thermo Fisher Scientific) におけるインキュベーションによって除き、ウサギモノクローナル抗 STAT3 血清を使用して、総 STAT3 レベルを可視化した (1:1000 希釈、Cat. No. 12640、Cell Signaling Technology)。IL-20 受容体サブユニットの発現を、マウスモノクローナル抗 DDK 血清 (1:1000 希釈、Cat. No. TA50011、OriGene)、ならびに、IL-20RA および IL-22RA に対するウサギポリクローナル血清 (それぞれ、1:500 希釈および 1:1000 希釈、Cat. No. 06-1073 および同 06-1077、Millipore、Billerica、MA、米国) により可視化した。

10

20

30

【0277】

【表 5】

タンパク質	提供者	Cat. No.
rhIL-20	R&D Systems	1102-IL/CF
rmIL-20	R&D Systems	1204-ML/CF
g2 IL-22	ヒト IL-22 の Gaussian シフェラーゼとの融合タンパク質	
g1 IL-20	ヒト IL-20 の Gaussian シフェラーゼとの融合タンパク質	

40

表 5 : 中和アッセイで使用される組換えタンパク質 (インターロイキン) のリスト

【0278】

コントロールとして、rhIL-20 および rmIL-20 により、STAT3 の用量依存的なリン酸化が、I 型または II 型の IL-20 受容体を一過性に発現する HEK 293T MSR 細胞において誘導される。STAT3 および IL-20RB-Myc-DDK の総レベルおよびリン酸化体レベルの検出 (図 4A)。

【0279】

図 4B に示されるように、抗体 20A10 および抗体 7D1 ならびに抗体 2A11 が同様に、最も強力な中和抗体である。しかしながら、このことは、実施例 2 において得られ、図 3 に示される結果 (図 3 では、例えば、抗体 6E11 が抗体 7D1 よりも大きい結合

50

親和性を示し、抗体 2 A 1 1 が抗体 7 D 1 よりも実質的に良好な成績をもたらした) から予想されていたかもしれないことと部分的には対照的である。

【0280】

次に、pSTAT3 ウェスタンブロットアッセイにおける rmIL-20 に対抗する 20A10 の力価測定を行った。I 型 IL-20 受容体を一過性に発現する HEK293T MSR 細胞を非処置のままにしたか、あるいは、示されるように抗体の非存在下 (-) または例示的抗体 20A10 の存在下 (+)、25 ng/ml の rmIL-20 により刺激した (図 6 A)。細胞溶解物を SDS-PAGE に供し、pSTAT3 レベルをウェスタンブロットで可視化した。総 STAT3 レベルが負荷コントロールとして役立つ。用量応答曲線をプロットし、IL-20 活性を取り消すことに対する IL-20 抗体 20A10 の力価測定を調べることによって、1,867 ng/ml の IC50 が計算され、この IC50 は、I 型 IL-20 受容体への rmIL-20 結合に対抗する MA b 20A10 の大きい中和活性を裏づけている (図 6 B)。

10

【0281】

実施例 4 : ヒト由来抗 IL-20 モノクローナル抗体は rhIL-20 および KZ136-NLuc 受容体遺伝子の IL-20 受容体媒介誘導を中和する

実施例 2 において得られ、図 3 に示される候補抗 IL-20 抗体の ELISA での EC50 決定の結果と、実施例 3 において得られ、図 4 B に示されるホスホ-STAT3 アッセイの結果との不一致 (上記) を考慮して、また、IL-20 受容体の IL-20 媒介誘導を中和することにおける、候補抗 IL-20 抗体の 7D1、20A10 および 2A11 の効力を検証するために、KZ136-NLuc レポーター中和アッセイを確立した。

20

【0282】

KZ136-NLuc レポーターアッセイ

KZ136-NLuc レポーター構築物の作製

Poulsen および共同研究者 (Poulsen 他、Signal Transduction via the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Induced by Binding of Coagulation Factor VIIa to Tissue Factor、JBC、1998) によって最初に記載されるような KZ136 レポーター構築物には、誘導可能なホタルルシフェラーゼがコードされ、その上流には、c-fos プロモーターの断片 (ヌクレオチド 649~747、GenBank TM アクセション番号 K00650) が存在する。すぐ上流側において、この構築物は、血清応答エレメントと一緒に、c-fos の 4 つの STAT 結合エレメント、p21WAF1、 β -カゼインおよび FcgRI の遺伝子の特徴とする。この最初の KZ136 構築物は主として、安定な細胞株を作製するために使用された。本明細書中に記載される KZ136-NLuc レポーターは、かなりより明るい Nano ルシフェラーゼをコードしており、一過性の共トランスフェクション実験のために好適である。NheI 制限部位および XhoI 制限部位が隣接する KZ136 プロモーター配列を含有する構築物を遺伝子合成により作製した。KZ136 プロモーター配列を、NheI および XhoI の二重制限を使用して切り出し、その後、同じ制限酵素により消化される Nano ルシフェラーゼをコードする pNL2.1 標的ベクター (Cat.No.N1061、Promega) に連結した (図 5 A における構築物のスキームを参照のこと)。

30

40

【0283】

KZ136-NLuc レポーター中和アッセイ

10,000 個の HEK293T MSR 細胞を、半分の領域が白色である 96 ウェル組織培養プレート (Cat.No.3688、Corning Inc.) に播種した。翌日、細胞を、Fugene HD (Cat.No.E2311、Promega、Madison、WI、米国) を使用して 20 ng の KZ136-Nano ルシフェラーゼレポーター構築物および 80 ng の IL-20 レポーター構築物により共トランスフェクションした。トランスフェクションの翌日、細胞を、抗 IL-20 mAb またはコントロ

50

ールのヒトIgG (huIgG)を伴う、または伴わない120ng/mlの組換えヒト(rh)IL-20(図5C、図5D)または200ng/mlの組換えマウス(rm)IL-20(図5E)の混合物を含有し、37℃での1時間のプレインキュベーションが行われた培地により24時間刺激した。24時間の刺激の後、ルシフェラーゼアッセイを製造者の説明書(Cat.No.N1130、Promega)に従って展開させた。

【0284】

コントロールとして、rhIL-20およびrmIL-20により、KZ136-NLucレポーター構築物が、I型IL-20受容体およびKZ136-NLucにより一過性にトランスフェクションされたHEK293TMSR細胞において誘導される(図5B)。rhIL-20(図5C、図5D)またはrmIL-20(図5E)を使用するKZ136-NLucレポーターアッセイによる例示的なヒト由来のIL-20mAbの20A10、7D1および2A11のIC50分析。結果が図5Fにまとめられており、20A10のIL-20中和能が明らかにされている。ホスホ-STAT3アッセイ(図4B)で既に認められるように、抗体20A10は、抗体7D1および抗体2A11と比較して、最も大きい中和能を示し、I型IL-20受容体へのrhIL-20結合に対するより大きい効力を伴っていた(図5F、左欄)。

10

【0285】

実施例5：ヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体は、IL-20がIL-20受容体に結合することを化学発光法細胞結合アッセイにおいて中和する

LIPSアッセイは、候補抗体の拮抗活性、すなわち、候補抗体の中和活性について予測的ではなかったため、目的とするリガンドの、関連性のある受容体を発現する細胞への結合を評価するための新しいアッセイが、リガンドに対する候補抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかどうかを明らかにする際にける使用のために本発明に従って開発されている。

20

【0286】

図7Aにおいて例示されるように、本発明の新規な方法によれば、目的とするリガンドが標識され、レポーターを含む融合タンパク質として、すなわち、ルシフェラーゼ融合タンパク質(例えば、Gaussialルシフェラーゼなど)として提供される。リガンドの細胞結合が細胞会合レポーターによって、すなわち、ルシフェラーゼ活性によって測定される。このアッセイは、リガンドに対する抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかどうかの評価を可能にする(図7Gおよび図7H)。

30

【0287】

【表 6】

タンパク質	提供者	Cat. No.
r h I L - 2 0	R&D S y s t e m s	1 1 0 2 - I L / C F
r m I L - 2 0	R&D S y s t e m s	1 2 0 4 - M L / C F
r h I L - 2 2	I m m u n o T o o l s	1 1 3 4 0 2 2 7
r h I F N A 2 b	I m m u n o T o o l s	1 1 3 4 3 5 1 6
r h I L - 3 2 γ	R&D S y s t e m s	4 6 9 0 - I L / C F
g 1 I F N A 2, A 4, A 5, A 6, A 7, A 8, A 1 0, A 1 4, A 1 6, A 1 7, A 2 1, B, W	様々なヒトIFNのG a u s s i a ルシフェラーゼとの融合タンパク質	
g 2 I L - 2 2	ヒトIL-22のG a u s s i a ルシフェラーゼとの融合タンパク質	
g 1 I L - 2 0	ヒトIL-20のG a u s s i a ルシフェラーゼとの融合タンパク質	
g 1 I F N W	ヒトIFNWのG a u s s i a ルシフェラーゼとの融合タンパク質	

10

20

表 6 : 中和アッセイで使用される組換えタンパク質 (すべてのタンパク質) のリスト
【 0 2 8 8 】

最初に、ヒト由来抗IFN-アルファモノクローナル抗体が単離され、これらは、受容体結合において、また、様々なヒトIFNのG a u s s i a ルシフェラーゼとの融合タンパク質を中和することにおいて好適であることが発光法細胞結合アッセイ(LCBA)で証明された。例示的な抗IFN-アルファ抗体ならびにIFNAサブタイプおよびIFNA分子の詳細な記載については、本出願人の同時係属中の国際出願公開WO2015/001013(その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)、具体的には、IgG1、カッパ、IFNA(例えば、IFNA2、IFNA4およびIFNA14)認識抗体の5D1、13B11、19D11、25C3および31B4、同様に、IFNAサブタイプのほかに、IFNW(インターフェロンオメガ)を効果的に認識する抗体26B9および抗体8H1的可変領域および定常領域(VH、VL、CH、CL領域)のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに、IFNAサブタイプ分子の供給源を含めてこれらの機能的な特徴づけを開示する実施例1~実施例9、表1および図1を参照のこと。

G a u s s i a - ルシフェラーゼ - IFN融合構築物およびG a u s s i a - ルシフェラーゼ - IL - 2 2 融合構築物をクローニングするために使用されるプライマー配列については、本出願人の国際出願公開WO2013/098419(2013年7月04日公開)を参照のこと(その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。

30

40

【 0 2 8 9 】

インターフェロン - G a u s s i a ルシフェラーゼ

30,000個のHEK293T MSR細胞を、半分の領域が白色である96ウエル組織培養プレート(Cat.No.3688、Corning Inc.)に播種した。翌日、ヒトIFN-G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質を一過性に発現するHEK293T細胞の上清を、抗IFNA mAb、コントロールIgGまたは過剰濃度の標識されていない組換えIFNA2と混合し、37で1時間ブレインキュベーションし

50

た。ブレインキュベーション後、混合物を使用して、HEK293T MSR細胞を37で40分間刺激した。結合すると、細胞をPBSにより3回洗浄し、Gaussialシフェラーゼアッセイを、Gaussia Flash Assay Kitを製造者の説明書に従って使用して展開させた(Cat. No. 16159、Thermo Fisher Scientific)。

【0290】

図7Gに示されるこの実験の結果は、IFNA5-Gaussialシフェラーゼ融合タンパク質(g1 IFNA5)の、HEK293T MSR細胞への結合が、非標識の組換えヒト(rh)IFNA2(3µg/ml)によって、また、例示的なヒト由来モノクローナルIFN抗体19D11(1.7µg/ml)によって阻害されることを明らかにする。そのうえ、g1 IFNA2、A4、A5、A6、A7、A8、A10、A14、A16、A17およびA21の各融合タンパク質の、HEK293T MSR細胞への結合が、例示的なヒト由来モノクローナルIFN抗体19D11によって阻害される。対照的に、g1 IFNBおよびWの結合は19D11によって影響されず、また、すべてのg1 IFNの結合がコントロールのヒト抗体(huIgG)によって影響されない(図7H)。抗体濃度：5µg/ml。

【0291】

次に、ヒト由来IL-22モノクローナル抗体が単離され、これらは、受容体結合において、また、ヒトIL-22のGaussialシフェラーゼとの融合タンパク質を中和することにおいて好適であることが発光法細胞結合アッセイ(LCBA)で証明された。例示的な抗IL-22抗体および抗IL-22分子の詳細な記載については、本出願人の国際出願公開WO2013/098419を参照のこと(その開示内容は参照によって本明細書中に組み込まれる)。

【0292】

IL-22-Gaussialシフェラーゼ

COLO205結腸直腸ガン細胞を製造者の説明書に従ってVerseneにより剥離させ(Cat. No. 15040-066、Invitrogen)、PBSにより2回洗浄した。8x10⁵個の細胞を、ウエルあたり200µlのCOLO205完全培養培地(RPMI1640 GlutaMAX、10%ウシ胎児血清、Cat. No. 61870-044および同10109155、それぞれInvitrogen)による1時間のブロッキング処理が施されたV底の96ウエルプレート(Cat. No. 24957、Thermo Fisher Scientific)に移した。ヒトIL-22-Gaussialシフェラーゼ融合タンパク質を一過性に発現するHEK293T細胞の上清を、抗IL-22 mAb、コントロールIgGまたは過剰濃度の標識されていない組換えIL-22と混合し、37で1時間ブレインキュベーションした。ブレインキュベーション後、混合物を使用して、COLO205細胞をV底の96ウエルプレートにおいて37で1時間刺激した。結合すると、細胞をPBSにより3回洗浄し、Gaussialシフェラーゼアッセイを、Gaussia Flash Assay Kitを製造者の説明書に従って使用して展開させた(Cat. No. 16159、Thermo Fisher Scientific)。細胞はルシフェラーゼ基板の添加の前に溶解されたか、または溶解されなかった。

【0293】

ヒトIL-22-Gaussialシフェラーゼ融合タンパク質はCOLO205細胞に特異的に結合する。細胞を、IL-22-Gaussialシフェラーゼ融合タンパク質(g2 IL-22)を発現するHEK293T細胞の上清とともに、示されるように阻害剤の非存在下(-)または競合性阻害剤の存在下でインキュベーションした。図14Aに示されるこの実験の結果は、g2 IL-22のCOLO205細胞への結合が、非標識のrhIL-22によって阻害され、無関係のrhIFNA2によって阻害されないことを明らかにする。COLO205細胞を、HEK293T細胞のg2 IL-22含有上清とともに、示されるように阻害剤の非存在下あるいは非標識のrhIL-22また

10

20

30

40

50

は r h I F N A 2 (それぞれ 1 μ g / ml) の存在下でインキュベーションした。細胞を、光出力が記録される前に溶解したか、または溶解しなかった。図 1 4 B は、g 2 I L - 2 2 の C O L O 2 0 5 細胞への結合が例示的なヒト由来 I L - 2 2 モノクローナル抗体 3 0 G 1 によって用量依存的様式で阻害されることを明らかにする。結合は、コントロールのヒト抗体 (h u I g G) によって影響されない。

【 0 2 9 4 】

次に、L I P S アッセイは、候補抗体の拮抗活性、すなわち、候補抗体の中和活性について予測的ではなかったため、目的とするリガンドの、関連性のある受容体を発現する細胞への結合を評価するための新しいアッセイが、リガンドに対する候補抗体により、このリガンドが細胞表面のそれぞれの受容体に結合することができることが妨げられるかどうかを明らかにする際における使用のために本発明に従って開発されている。

10

【 0 2 9 5 】

このため、最初に、実施例 3 に記載されるホスホ - S T A T 3 アッセイが、両方の受容体、すなわち、I 型および I I 型の I L - 2 0 受容体、ならびに、レポーターにより標識されるリガンド、すなわち、I L - 2 0 - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質がアッセイにおいて生化学的に活性であるかどうかを調べるために適用されている。図 7 C および図 7 D に示されるように、I L - 2 0 - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質 (g 1 I L - 2 0) は機能的に活性である。細胞を、g 1 I L - 2 0 の上清の連続希釈物と、またはコントロール培地 (N C) とインキュベーションした。S T A T 3 、 I L - 2 0 R B - M y c - D D K 、 I L - 2 0 R A - M y c - D D K および I L - 2 2 R A (R A サブユニット) の総量およびリン酸化体のウエスタンブロットでの検出 (図 7 A) 。コントロールとして、I L - 2 0 融合タンパク質は、I L - 2 0 受容体 I 型の両方のサブユニットを発現する H E K 2 9 3 T M S R 細胞に特異的に結合することが示されている (図 7 D) 。結合が、非標識の r h I L - 2 0 (3 μ g / ml) によって取り消される。したがって、I L - 2 0 - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質を含有する H E K 2 9 3 T の上清により、S T A T 3 が、I 型および I I 型の I L - 2 0 受容体を一過性に発現する H E K 2 9 3 T M S R 細胞において活性化される。

20

【 0 2 9 6 】

したがって、リガンドおよびリガンド結合ドメインの結合特徴は、インビボでのそれらの結合特徴に実質的に類似しているにちがいない。そのため、本発明のアッセイを用いて特定され、また得られる活性化因子およびアンタゴニストもまた、インビボにおいて生物学的に活性であると予想することは、控え目なことである。

30

【 0 2 9 7 】

次の段階として、候補抗体を、その中和活性を評価するために化学発光法細胞結合アッセイに供した。

【 0 2 9 8 】

化学発光法細胞結合アッセイ

I L - 2 0 の化学発光法細胞結合アッセイのために、1 0 , 0 0 0 個の H E K 2 9 3 T M S R 細胞を、半分の領域が白色である 9 6 ウエル組織培養プレート (C a t . N o . 3 6 8 8 、 C o r n i n g I n c .) に播種した。翌日、細胞を、I L 2 0 R A - M y c - D D K および I L 2 0 R B - M y c - D D K の発現プラスミド (I 型 I L - 2 0 受容体 ; C a t . N o . R C 2 1 2 5 4 6 および同 R C 2 1 3 1 9 7 、 O r i G e n e 、 R o c k v i l l e 、 M D 、 米 国) または I L 2 2 R A 発現プラスミド (C a t . N o . S C 3 2 2 5 6 6 、 O r i G e n e) および I L 2 0 R B - M y c - D D K 発現プラスミド (I I 型 I L - 2 0 受容体) のどちらかと共トランスフェクションした。トランスフェクションの翌日、ヒト I L - 2 0 - G a u s s i a ルシフェラーゼ融合タンパク質を一過性に発現する H E K 2 9 3 T 細胞の上清を、抗 I L - 2 0 m A b 、コントロール I g G または過剰濃度の標識されていない組換え I L - 2 0 と混合し、3 7 ° C で 1 時間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、混合物を使用して、I L - 2 0 受容体を一過性に発現する H E K 2 9 3 T M S R 細胞を 3 7 ° C で 3 0 分間刺激した。結合すると、

40

50

細胞をPBSにより3回洗浄し、Gaussianシフェラーゼアッセイを、Gaussian Flash Assay Kitを製造者の説明書に従って使用して展開させた (Cat. No. 16159, Thermo Fisher Scientific)。

【0299】

図7Eおよび図7Fに示されるように、細胞結合アッセイにおける認められた影響は、実施例3および実施例4、ならびに、図4～図6において候補抗体について認められる中和活性のレベルを密接に反映する。コントロールとして、g1 IL-20が、I型IL-20受容体を発現するHEK293T MSR細胞に結合することが、rhIL-20、rmIL-20および例示的なヒト由来IL-20モノクローナル抗体20A10によって用量依存的様式で阻害される(図7E)。結合は、無関係のrhIL-32およびコントロールのヒトIgG(huIgG)によって影響されない。例示的な抗IL-20抗体の2A11、20A10および7D1により、g1 IL-20が、I型およびII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞に結合することが中和される。非標識のrhIL-20(1μg/ml)が陽性コントロールとして役立つ。抗体濃度: 5μg/ml(図7F)。ホスホ-STAT3アッセイの結果(実施例3)およびKZ136-NLucレポーター中和アッセイの結果(実施例4)と一致して、抗IL-20抗体20A10は最も大きい阻害活性(すなわち、中和活性)を示し、これに対して、2A11および7D1のMAbは、I型およびII型の両方のIL-20受容体に対するg1 IL-20結合のわずかにより弱い中和能を示しただけであった。対照的に、抗IL-20抗体6E11では、I型IL-20受容体に対するg1 IL-20結合のそれほど大きくない中和能が明らかにされ、しかし、II型IL-20受容体に対する中和能の喪失が明らかにされた。中和能がないことまたははるかに低下した中和能が、MAb 6H2に関して認められ得るであろう。

【0300】

したがって、本発明のこの新規な細胞リガンド受容体結合アッセイは、候補化合物の生物学的活性(すなわち、中和活性)、具体的には抗リガンド抗体の生物学的活性(すなわち、中和活性)を予測するための信頼できる手段であって、他の場合にはまず最初に求められていなかったかもしれない、または特定されていなかったかもしれない治療的に有用な抗体を特定し、得ることを著しく簡略化する信頼できる手段を提供する。

【0301】

実際、化学発光法細胞結合アッセイにおけるヒト由来抗IL-20モノクローナル抗体のさらなるIC50(半最小(50%)阻害濃度)分析では、例示的なIL-20抗体の20A10、7D1および2A11によるIL-20の効果的な中和能が明らかにされた(図8)。この目的を達成するために、I型またはII型のIL-20受容体を一過性に発現するHEK293T MSR細胞を、示されるようなヒト由来IL-20モノクローナル抗体の存在下、g1 IL-20の上清とインキュベーションした。図8、A: 20A10、B: 7D1、および、C: 2A11。図8Dには、20A10、7D1および2A11の例示的抗体のIC50値がまとめられており、これは、抗IL-20抗体20A10が最も大きい中和活性を示したホスホ-STAT3アッセイ(実施例3)およびKZ136-NLucレポーター中和アッセイ(実施例4)によって得られるデータを裏づけている。MAb 2A11は、20A10よりもわずかに弱い中和能を示しただけであった。対照的に、MAb 7D1は、I型IL-20受容体またはII型IL-20受容体への、g1 IL-20の結合を阻害するために、最も大きいIC50を必要とするように思われる。

【0302】

実施例6: 抗IL-20抗体(20A10、2A11、7D1および6E11)のヒト-マウスキメラ構築物との交差競合および交差反応性

異なる結合部位の数を求めるために、異なった抗原結合部位に対する様々な抗IL-20 MABの示差的結合が調べられる。この目的のために、MABがヒト(hMAB)Fcまたはマウス(hmMAB)Fcのどちらかとともに発現させられ、交差競合実験がG

10

20

30

40

50

LucサンドイッチELISAによって行われる。GLuc-IL20が、事前に被覆されたウサギ抗GLuc抗体によって捕獲される。大過剰のヒトMAbの存在下におけるhmMAbの結合が、一次抗体のFc部分に対するHRPコンジュゲート化二次抗体によって検出される(図9Aにおける実験構成のスキームを参照のこと)。

【0303】

方法：

96ウェルマイクロプレート(Costar、米国)を、PBSにおいて1/250で希釈されるウサギ抗GLuc抗体(NEB、E8023S)により被覆した(30 μ l/ウェル、一晚、4)。プレートをPBS-Tにより洗浄し、2%のBSA(Sigma、Buchs、スイス)を含有するPBSによる室温での1時間のブロック処理に供した。30 μ lのGLuc-IL-20を2 \times 10⁶LU/ウェルの最終濃度に加え、室温で2時間インキュベーションした。キメラ抗体を30 μ lのPBSにおいて0.5 μ g/ml対3 μ g/mlの最終濃度でヒト競合剤抗体と事前に混合し、プレートに加えた。室温での2時間のインキュベーションを行ったとき、プレートをPBS-Tにより洗浄し、ヒト-マウスキメラ抗体の結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲート化されたヤギ抗マウスIgG Fc-ガンマ特異的抗体(Jackson ImmunoResearch、0.5%BSA-PBSでの1:500)を使用して求め、その後、HRP活性の測定を、TMB基質溶液(Sigma、Buchs、スイス)を使用して行った。

10

【0304】

図9B~図9Fおよび下記の表7から認められ得るように、キメラな抗IL-20抗体の20A10(hm)、2A11(hm)および6E11(hm)は、それらのコグネイトヒト対応体のみと競合しており、このことは、これらのヒト由来抗IL-20抗体(20A10、2A11および6E11)のそれぞれがIL-20の異なる結合部位を認識することを示している。対照的に、キメラな抗IL-20抗体の7D1(hm)はそのヒト対応体と競合するだけでなく、ヒト由来IL-20抗体6H2とも競合しており、このことは、これらの抗体の部分的に重なり得るエピトープを示している。

20

【0305】

しかしながら、実施例3~実施例5における機能的アッセイ、ならびに、図4B、図7Fおよび図8Dに示される機能的アッセイを考慮すると、抗体7D1は、IL-20活性を効果的に中和するように思われる。したがって、抗体7D1および抗体6H2のエピトープは同一ではなく、重複すること、または、これらの抗体では、IL-20への結合が立体障害のために妨げられることが推測される。

30

【0306】

本発明に従って行われた実験を考慮して、とりわけ、結合親和性/特異性と中和活性との間には関係性がないことを明らかにする実験を考慮すると、本発明の新規な細胞リガンド結合アッセイは、抗IL-20抗体を治療的使用のために選択し、提供することにおいて有用かつ必須であることが明らかである。それにもかかわらず、IL-20活性を効果的に中和するには思われない本発明のIL-20抗体はまた、例えば、診断適用において有用である。

40

【0307】

【表 7】

g2 IL-20		Human MAb competitor				
		2A11	6E11	6H2	7D1	20A10
hm-MAB	2A11	+++++	-	-	-	-
	6E11	-	+++++	-	-	-
	6H2	-	-	+++++	+++++	-
	7D1	-	-	+++++	+++++	-
	20A10	-	-	-	-	+++++

10

表 7：本発明の例示的抗体の交差競合実験の結果。ヒト M A B (h M A B) を、マウス F c を有する M A B (h m M A B) を加える前に、それぞれの抗原により被覆されるプレートに大過剰で加えた。

【 0 3 0 8 】

加えて、本発明の例示的なヒト由来抗 I L - 2 0 モノクローナル抗体の 6 E 1 1、2 A 1 1 および 2 0 A 1 0 の、マウス I L - 2 0 およびヒト I L - 2 0 への結合を、マウス I L - 2 0 およびヒト I L - 2 0 のエピトープに対する交差反応性を明らかにし、比較するために G L u c サンドイッチ E L I S A によって調べた (図 1 0 A における実験構成のスキームを参照のこと) 。

20

【 0 3 0 9 】

方法：

9 6 ウェルマイクロプレート (C o s t a r、米国) を、P B S において 1 / 2 5 0 で希釈されるウサギ抗 G L u c 抗体 (N E B、E 8 0 2 3 S) により被覆した (3 0 μ l / ウェル、一晚、4) 。プレートを P B S - T により洗浄し、2 % の B S A (S i g m a、B u c h s、スイス) を含有する P B S による室温での 1 時間のブロック処理に供した。3 0 μ l の G L u c - I L - 2 0 を 2 × 1 0 ⁶ L U / ウェルの最終濃度で加え、室温で 2 時間インキュベーションした。競合剤抗原の組換えヒト I L - 2 0 および組換えマウス I L - 2 0 を、試験される抗体 (1 μ g / m l の固定された濃度) に対して、1 0 μ g / m l から 4 . 6 n g / m l にまで及ぶ連続希釈で力価測定した。混合物のウェルあたり 3 0 μ l をウェルにおいて室温で 1 . 5 時間インキュベーションした。プレートを P B S - T により洗浄し、競合剤の存在下における目的とする抗原へのヒト I g G の結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲート化されたヤギ抗ヒト I g G F c ガンマ特異的抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h、E u r o p e L t d .、C a m b r i d g e s h i r e、英国) を使用して明らかにし、その後、H R P 活性の測定を、T M B 基質溶液 (T M B、S i g m a、B u c h s、スイス) を使用して行った。

30

40

【 0 3 1 0 】

図 1 0 B ~ 図 1 0 D に示されるように、ヒト I L - 2 0 は、g 2 I L - 2 0 に対するすべての試験された抗 I L - 2 0 抗体の結合を阻害することができる。マウス I L - 2 0 は、g 2 I L - 2 0 に対する、6 E 1 1 を除くすべての試験された抗 I L - 2 0 抗体の結合を阻害することができる。したがって、例示的な抗 I L - 2 0 抗体の 2 A 1 1 および 2 0 A 1 0 は種交差反応性を示し、これに対して、M A b 6 E 1 1 は h I L - 2 0 を認識するだけである。しかしながら、実施例 3 ~ 実施例 5 における機能的アッセイおよび図 4 B に示される機能的アッセイを考慮すると、抗体 2 A 1 1 は、m I L - 2 0 を中和することにおいて、M A b 2 0 A 1 0 ほどには効果的でない。2 A 1 1 は強力な結合剤であるが、明らかに、I L - 2 0 とその受容体との間における相互作用に参与しない I L - 2

50

0の領域を認識している。2A11および7D1はrhIL-20を弱く中和するが、GLUCIL-20のより良好な中和を示す。この結果はさらに、とりわけ、結合親和性/特異性と中和活性との間には関係性がないことを明らかにする。本発明の新規な細胞リガンド結合アッセイは、抗IL-20抗体を治療的使用のために選択し、提供することにおいて有用かつ必須であることが明らかである。それにもかかわらず、IL-20活性を効果的に中和するには思われない本発明のIL-20抗体はまた、例えば、診断適用において有用である。

【0311】

実施例7：主題抗体の検証

本発明によって提供される様々な抗体が、動物疾患モデルにおいてヒトIL-20に対するそれらの中和活性に関して試験される。そのような実験を行うときには、ヒトIL-20が病的表現型をマウスにおいて誘導すること、および、交差反応が本発明の試験されたIL-20抗体とマウスIL-20ホモログとの間において生じないことが保証されなければならない。IL-20についての適切なモデル系が先行技術では利用可能でなかったため、本実施例では、マウスIL-20と交差反応しないIL-20中和抗体を試験するためのそのような系が記載され、提供される。

10

【0312】

耳炎症アッセイ

耳炎症の表現型を、それぞれの耳へのヒトサイトカインIL-20またはPBSコントロールの皮内注入が、30ゲージのニードルを使用して、1日目、3日目、6日目および8日目での1日おきに与えられること(20 μ l/耳、1000ng/耳、2000ng/マウス/日)によって8週齢のC57BL/6J(WT)マウス(Charles Riverから得られる)において誘導した。本発明の例示的な抗IL-20抗体の2A11、7D1および20A10による処置を、誘導された耳炎症表現型を軽減させるそれらの中和能に関してこれらの動物について試験した。2A11、7D1および20A10またはコントロールのヒトIgG[200 μ g]の2回のIP注入を0日目および6日目に動物に施した。マウスを10日目に屠殺した。

20

【0313】

本発明の抗体の潜在的な治療効果を試験するために、動物の耳厚さ測定を、IL-20注入前における毎日の測定によってIL-20投与の期間中、Mitutoyoデジタルマイクロメーターにより行った。そのうえ、体重が処置期間中にモニターされており、しかしながら、有意な体重変化が、加えられた処置に起因して動物群のいずれにおいても認められていない。加えて、動物の屠殺の後、耳のH&E(ヘマトキシリンおよびエオシン)組織学染色(Harris, H.F., J. Appl. Microscopy III (1900)、777~781、および、Mallory, F.B., Pathological technique, Philadelphia, Saunders (1938)を参照のこと)が行われる。これらの実験は、ヒトIL-20の皮内注入による耳腫大の誘導が、2A11、7D1および20A10の各中和抗体の存在下で軽減されることを示す。図11を参照のこと。このことは、様々な程度の統計学的有意性で6日目以降は顕著である。例示的な抗IL-20抗体の2A11、7D1および20A10は、注射されたIL-20をマウスモデルにおいて中和することができる。したがって、本明細書中に示されるデータは、本発明の抗IL-20抗体がサイトカイン誘導の耳炎症実験においてIL-20に対抗して効果的であることを示しており、このことは、本発明のIL-20特異的な結合分子の治療的価値を明らかにしている。

30

40

【0314】

実施例8：表面プラズモン共鳴(SPR)技術を使用する抗体親和性測定

本発明の抗体の親和性決定のために、表面プラズモン共鳴SPR測定を、Biacore T200 SPR装置(GE Healthcare)を製造者の説明書に従って使用して行った。CM5チップを、抗huIgG FcマウスIgG1 mAb(GE Healthcare)とカップリングし、抗IL-20抗体を飽和するまで捕獲させた。

50

分析物として、ヒトIL20およびマウスIL20を1.5 nM ~ 100 nMの濃度で反復操作で加えた。オン速度およびオフ速度ならびに得られるKDを、1:1の結合での適合を使用して装置の分析ソフトウェアによって求めた(図12)。

【0315】

実施例9：主題抗体の膜貫通型をリガンド結合ドメインとして使用するLCBAアッセイ

主題抗体26B9の構築物、配列情報、および、その血小板由来増殖因子受容体(PDGF R) - 膜貫通(TM)媒介表面発現に対する参照が図15および図16に示される。さらなる詳細については、それらの図の説明文(上掲)もまた参照のこと。

【0316】

膜貫通抗体に対するリガンド結合

30,000個のHEK293T MSR細胞を、半分の領域が白色である96ウエル組織培養プレート(Cat.No.3688、Corning Inc.)に播種した。播種期間中に、細胞を、Fugene HD(Cat.No.E2311、Promega、Madison、WI、米国)を使用して、抗IFN mAbの26B9の膜貫通型(26B9-TM)(配列番号67、Ho他、Proc.Natl.Acad.Sci.、103(2006)、9637~9642; Zhou他、Mabs、2(2010)、508~518)をコードする100 ngのcDNAによりトランスフェクションした(図17、図18)。表面の抗体(26B9-TM)発現をトランスフェクションの48時間後、細胞に基づくELISAで分析した(図17A)。トランスフェクション後48時間後、ヒトIFN γ -Gaussianシフェラーゼ融合タンパク質(g1 IFN γ)を一過性に発現するHEK293T細胞の上清を使用して、事前にトランスフェクションされたHEK293T MSR細胞を37°Cで40分間刺激した。代替として、g1 IFN γ の上清を抗IFN mAbまたはコントロールIgGと混合し、37°Cで1時間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、混合物を使用して、26B9-TMを一過性に発現するHEK293T MSR細胞を37°Cで40分間刺激した。結合すると、細胞をPBSにより3回洗浄し、Gaussianシフェラーゼアッセイを、Gaussian Flash Assay Kitを製造者の説明書に従って使用して展開させ(Cat.No.16159、Thermo Fisher Scientific)、これにより、g1 IFN γ が、26B9-TMを発現する細胞に特異的に結合することが示された(図17B)。モノマーFvのPDGF R媒介の表面発現、および、PDGF Rドメインのさらなる参考文献が、Ho他、Proc.Natl.Acad.Sci.、103(2006)、9637~9642に記載される。完全なIgGのPDGF R媒介の表面発現が、Zhou他、Mabs、2(2010)、508~518に記載される。

【0317】

抗IFN γ 抗体の交差競合アッセイ。

上記実験構成はまた、本発明の例示的抗体の26B9、31B4および8H1との間での交差競合を試験するために使用されている(図18を参照のこと)。HEK293T MSR細胞を、26B9-TMをコードするcDNAによりリバーストランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、g1 IFN γ を可溶性抗IFN γ 抗体(26B9、31B4、8H1)またはコントロールIgG(huIgG)と混合し、1時間プレインキュベーションした。インキュベーション後、混合物を、トランスフェクションされた細胞に加え、結合を化学発光法細胞結合アッセイで分析した。図18に示されるように、g1 IFN γ の26B9-TMへの結合が、可溶性の26B9によって、また、クローン的に関連した31B4抗体によって用量依存的な競合を受ける。対照的に、結合が、コントロールIgGによっても、例示的な抗IFN γ 抗体8H1によっても影響されない。これらの結果は、例示的抗体の26B9および31B4が、類似するエピトープを共有し、一方、8H1は、異なったエピトープに結合するようであることを示している。

。

10

20

30

40

50

【0318】

実施例10：抗IL-20モノクローナル抗体の抗原マッピング

それらのそれぞれの抗原に対するMABの結合領域を、例えば、PepStar（商標）分析によってマッピングすることができる。したがって、重複する18merペプチド（14アミノ酸の重複）を、すべての知られている変異体を含めて、ヒトIL-20およびマウスIL-20をそれぞれ覆うために設計した。これらのペプチド（図13B-ヒトIL-21および図13C-マウスIL-20）および（陽性コントロールとしての）全長型抗原（図13A）をマイクロアレイにスポットし、このペプチドマイクロアレイを一次抗体とインキュベーションし、その後、一次抗体のFc部分に対して向けられる蛍光標識された二次抗体とインキュベーションする。立体障害によって引き起こされる偽陰性を避けるために、最適化された親水性リンカー部分がガラス表面と抗原由来ペプチド配列との間に挿入される。

10

【0319】

そのうえ、ヒトIL-20の配列101-PDHYTLRKISSLANSEFL-117（配列番号72）を含む17個のペプチドの一群を、アラニンスキャンによるエピトープ特徴づけのために合成した。この場合、それぞれの個々のアミノ酸が、抗体結合に対するその寄与を評価するためにアラニンによって別々に置換される。

【0320】

サンプルを1 μ g/mlの濃度によりマイクロアレイスライド上に印刷した。続いて、マイクロアレイを本発明の抗体とブロッキング処理緩衝液において30で60分間インキュベーションした。検出のために、Cy5-抗ヒトIgG二次抗体（JIR 209-175-082）を、ブロッキング緩衝液で希釈される1 μ g/mlの濃度で使用し、30で60分間インキュベーションした。加えて、蛍光標識された二次抗体のみとのインキュベーションを、潜在的に偽陽性のシグナルを検出するためのコントロール実験として行った。それぞれの工程の前に、マイクロアレイを洗浄緩衝液により洗浄した。分析のために、シグナル強度を、線状エピトープの特定を可能にするためにタンパク質配列の上にマッピングした。

20

【0321】

緩衝液および溶液

50mM TBS緩衝液（0.1%のTween 20を含む）（JPT）、pH7.2
3mM SSC緩衝液（JPT）、pH7.0
ブロッキング緩衝液（Pierce International、Superblock TBS T20、オーダー#37536）

30

【0322】

ハードウェアおよびソフトウェア

ペプチドマイクロアレイ（JPT Peptide Technologies GmbH、Berlin、ドイツ；パッチ#2611）
Axon Genepix Scanner 4200AL
スポット認識ソフトウェアGenePix

【0323】

そのようなペプチドマッピングが、本発明の例示的抗体の20A10、2A11、6E11および7D1について、ヒトIL-20およびマウスIL-20のそれぞれ18merペプチドのペプチドアレイで行われている。アッセイの結果が図13に示される。例示的抗体20A10はIL-20のペプチド20（PDHYTLRKISSLANSEFLT、配列番号69）に対して特異的に結合し（図13D）、しかしながら、アミノ酸配列NYQTPDHYTLRKISSLAN（配列番号71）からなるペプチド19には結合しない。したがって、抗体20A10の結合特異性は、国際出願公開WO2010/000721に記載される抗IL-20抗体の15D2および5B7の結合特異性とは異なる。なお、抗体15D2および抗体5B7はともに、IL-20のペプチド19およびペプチド20に結合する（これらのペプチドは本出願では、抗体5B7についてはペプチド25

40

50

およびペプチド 26 と称され、抗体 15D2 についてはペプチド 86 およびペプチド 87 と称される。WO2010/000721 (図 6A、図 6B、図 7A および図 7B) を参照のこと)。

【0324】

例示的抗体 2A11 は交差競合アッセイにおいてマウス IL-20 に結合する (図 10C) が、マイクロアレイでは結合せず (図 13A)、一方、本発明の例示的な抗 IL-20 抗体 20A10 は両方の場合においてマウス IL-20 およびヒト IL-20 に結合する (図 10D および図 13A)。アラニンスキャン (図 13G) によって示されるように、ペプチド 20 の配列の内部における数残基が、例示的抗体 20A10 と相互作用するために非常に重要であり、しかし、これらの重要なアミノ酸が置換されるならば、例示的抗体 20A10 の結合が取り消されるか、少なくとも大幅に低下する。

10

【0325】

これらの特定のアミノ酸が例示的抗体 20A10 の結合のために重要であることが、15aa のエピートープの下記の記載でまとめられる：101-PDHYTLRKISSLLANSLFLT-118、式中、例示的抗体 20A10 による結合のために非常に重要であるアミノ酸が太字かつ斜体字で示され、かつ、これらには下線が引かれ、相互作用するが、それほど重要でないアミノ酸が下線によって示される。対照的に、末端欠失およびアラニンスキャンでのエピートープマッピングにおいて、WO2010/000721 に記載される抗体 5B7 および抗体 15D2 については、H103 から N114 までの 12 アミノ酸のより小さい線状エピートープが示唆され、しかしながら、これらのアミノ酸において、3つのアミノ酸位置 (H103、S111 および N114) のみが、抗体 5B7 および抗体 15D2 による結合のために不変であり、かつ、非常に重要であることが見出された。WO2010/000721 において実施例 7 および実施例 8、ならびに、図 7 および図 8 におけるアラニンスキャンのデータを参照のこと。

20

【0326】

さらなる興味深い発見が、抗体 20A10 は全長型のヒト IL-20 およびマウス IL-20 に結合する (図 10D、図 12C、および、マイクロアレイの関連では図 13A) が、アレイでの抗原マッピングアッセイでは、マウス IL-20 に由来する対応したペプチド (これはそのアミノ酸配列においてヒト IL-20 の 101-118-ペプチドとは Y104H および T118I の位置でのみ異なり、この場合、後者は、20A10 結合のために必須であるように思われる) には結合せず、また、どのような他のマウス IL-20 由来 18mer ペプチドにも結合しないということである (図 13C)。したがって、抗体 20A10 は、ヒト IL-20 およびマウス IL-20 の立体配座エピートープで、ヒト IL-20 由来ペプチドの 101-PDHYTLRKISSLLANSLFLT-118 (配列番号 69) によってもまた形成され得るか、または模倣され得る立体配座エピートープ、あるいは、このペプチドのアミノ酸配列がこの立体配座エピートープの主要な構成要素を表す立体配座エピートープを認識するかもしれない。したがって、抗体 20A10 の大きいエピートープピン、および、マウス IL-20 に由来するペプチドに対する結合を抗体 20A10 は有していないことは、この抗体を IL-20 に対して非常に特異的にしており、そのため、他のサイトカインとの交差反応、例えば、IL-10 および IL-10 様サイトカインなどとの交差反応は起こりそうにない。

30

40

【 図 1 - 1 】

A 20A10 (IgG4, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 2
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2
 QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSKTSGGTFSTLSLWVRQAPGGLEWLGMP
 -----FR3-----CDR3-----
 ILSRTTYAQKFGRLTI TADEPTSTSYMELSSLKSEDTAVYYCAT EGEVSAAH
 -----FR4-----
NYYYGMDVWGQGTTVTVSS

20A10 (IgG4, 可変カッパ鎖配列 VK) – 配列番号 : 4
 FR1-----CDR1-----FR2-----
 DIVLTQSPFLYLPVTPCFPASISCRSSQSLHGNCHNYLDWYIQKPGQSPQLLT
 -CDR2--FR3-----CDR3-----FR4--
 YLGSNRRASGVDPDRFSGSGSDTFLTKISRVAEDVGVYYC MQTLHTVFTFGFG

 TRVDIK

B 2A11 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 10
 FR1-----CDR1--FR2-----
 QVHLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCASGGTFNNFPMSWVRQAPGRGLEWMA
 CDR2-----FR3-----
 GILPVFGSANYAQPFHGRVITISADISTSTVSMELNDLKS EDTGVYYCAI
 CDR3-----FR4-----
SGDEDNWIMNFWGQGLTVTVSS

2A11 (IgG1, 可変ラムダ鎖配列 VL) – 配列番号 : 12
 FR1-----CDR1--FR2-----
 QSLLTQSPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLL
 -CDR2--FR3-----CDR3-----
 IYGNRRNRPSPVDPDRFSGSKGTSASLAITGLQAEDEADYYC QSYDSSLS
 -----FR4-----
GHAVFGGKTAVTLRQPKAAPSVTLFPP

Fig. 1

【 図 1 - 2 】

C 7D1 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 18
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2
 EVQLVASGGDFIQGRSLRLSCAASGKFFDYAMFWVRQVPRGLEWVSGISW
 -----FR3-----CDR3-----
SSDKMAYVDSVKGRPTISRDNAKNTLYLQMNLRPDATFYCAK GGFSSVWN
 -----FR4-----
YDFWGQGLTVTVSS

7D1 (IgG1, 可変ラムダ鎖配列 VL) – 配列番号 : 20
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR
 QSVLTQPPSASGTFGQTVIISC SGTSTNIGSNSTVSYRQLPGAAPKLLI F**TYN**
 2--FR3-----CDR3-----FR4----
QRPSGVDPDRFSGSKGTSASLAISGLQSDDEADYYC AVWDDALGGHVFGGKTK

 LTVL

D 6E11 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 26
 FR1-----CDR1-FR2-----CDR2
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCASGGTFNNYAINWVRQAPRQGLEWMMGSLVP
 -----FR3-----CDR3-----FR4----
MFTSPTYAQKFRGRVTISADESTATSSMELTSLTSEDTAVYFCSAD DGYKGGLE
 -----FR4-----
YGMNVWGQGTTVTVSS

6E11 (IgG1, 可変カッパ鎖配列 VK) – 配列番号 : 28
 FR1-----CDR1--FR2-----
 DIVLTQSPESLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLAWFQQKPGQPPKLL
 -CDR2--FR3-----CDR3-----FR4--
 IYWASTRESGVDPDRFSGSGSDTFLTIISLQAEDEVAVYYC HQYHTLPRTFGH

 GTRVEIK

Fig. 1 (続き)

【 図 1 - 3 】

E 26B9 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 35
 FR1-----CDR1--FR2-----
 QILLQESGPGLVKPTETLSLTCSVSGDSIS DSSHYWAWIRQPPGKGP
 -CDR2-----FR3-----
 IGSVYFSSMTHYINP SLKSRVSVISVDKPKNQPSLKVTSVTVADTATYYCA
 -CDR3-----FR4-----
RQALARVGAMNWFDPWGQGS LTVTVSS

26B9 (IgG1, 可変カッパ鎖配列 VL) – 配列番号 : 37
 FR1-----CDR1-----FR2-----
 DIIMTQSPDLSLVSLGEGVTINCKSSQSVFF TSSNKSLAWYQQKPGKGS
 -----CDR2--FR3-----CDR3-----
 PKLLIYWASTROSGVDPDRFSGSGSDTFLTITSLQAEDEVAVYYC QQCQ
 -----FR4-----
TSPPTFGGTRLELR

F 31B4 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 43
 FR1-----CDR1--FR2-----
 QIQLQESGPGLVLRPTETLSLTCSVSGDSIS QSSHYWAWIRQPPGKGP
 -CDR2-----FR3-----
 IGSVYFSSMTHYINP SLTSRVSISIDKAMNKFS LKVTSVTVADTATYYCA
 -CDR3-----FR4-----
RQALARVGAMNWFDPWGQGS LTVTVSS

31B4 (IgG1, 可変カッパ鎖配列 VL) – 配列番号 : 45
 FR1-----CDR1-----FR2-----
 DIIMTQSPESLPSLVSLGEGVTINCKSSQSVFF TSSNRSLAWYQQKPGQS
 -----CDR2--FR3-----CDR3-----
 PKLLIYWASTROSGVDPDRFSGSGSDTFLTIAGLQVEDVAVYYC QQCH
 -----FR4-----
ASPPTFGGTRLELR

Fig. 1 (続き)

【 図 1 - 4 】

G 8H1 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 51
 FR1-----CDR1--FR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKCASGQFTT SDDINWVRQAPGQGLEWMMG
 CDR2-----FR3-----
WRNPNTQDTGYAQKFHGRRLTSSNSIS TSYLELSGLRSEDTAVYYCAR
 CDR3-----FR4-----
AGTSTLTGHYFALGVWGQGTTVTVSS

8H1 (IgG1, 可変カッパ鎖配列 VL) – 配列番号 : 53
 FR1-----CDR1-----FR2-----
 DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC QATQDISKYLNWYQQKPGKVPKLLIY
 CDR2--FR3-----CDR3-----
ETSNLEVGVPSRFSGSGSDTFLTIISLQAEDEVAVYYC QQYENFPPT

 GGGTKVEIK

H 19D11 (IgG1, 可変重鎖配列 VH) – 配列番号 : 59
 FR1-----CDR1-FR2-----
 EVQLLESgaeVKKRPGSSVVRSCRASGDTFSSYPISWVRQAPGQGLEWMMG
 CDR2-----FR3-----
 RILPALGVTNYAQNFRGRITITADKSP LTAYLELSLRFEDTAVYYCAS
 CDR3-----FR4-----
 PSADIIP SILGTTLFAFWGQGS LTVTVSS

19D11 (IgG1, 可変カッパ鎖配列 VL) – 配列番号 : 61
 FR1-----CDR1-----FR2-----
 EIVLTQSPGTLSLSPGEGATLSCRASQ NSVRHYLTWYQQKPGQSPRLLI
 -CDR2--FR3-----CDR3-----
 YGSSSRATGVDPDRFSGSGSDTFLTISRLEPEDFAVYFCQSYHSPPPV
 ---FR4-----
 YTFGGTKVEIK

Fig. 1 (続き)

【 図 2 】

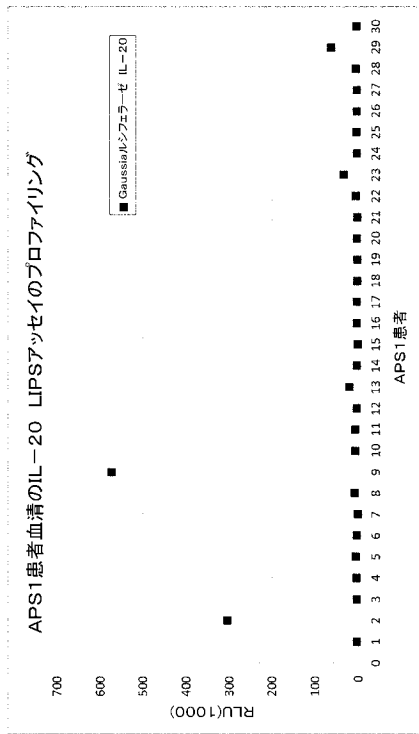


Fig. 2

【 図 3 】

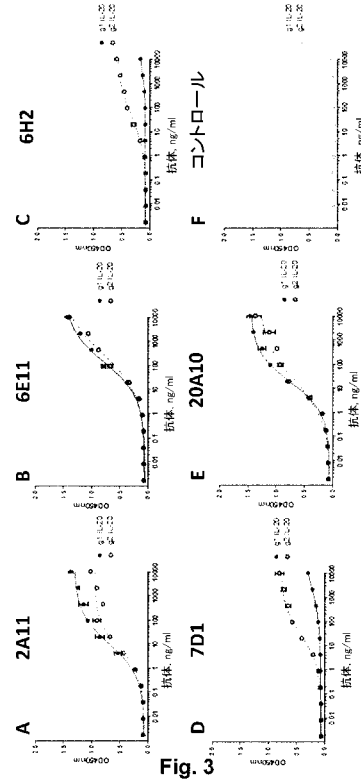


Fig. 3

【 図 4 】

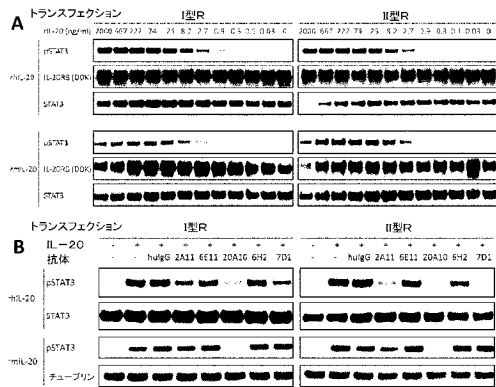


Fig. 4

【 図 5 - 2 】

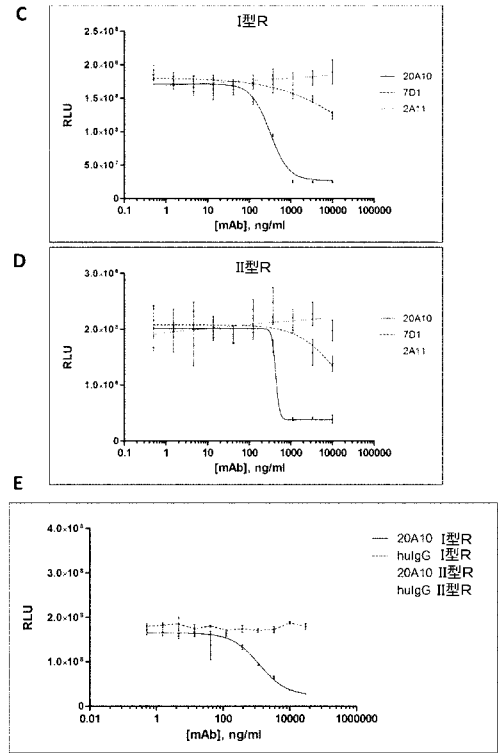


Fig. 5 (続き)

【 図 5 - 1 】

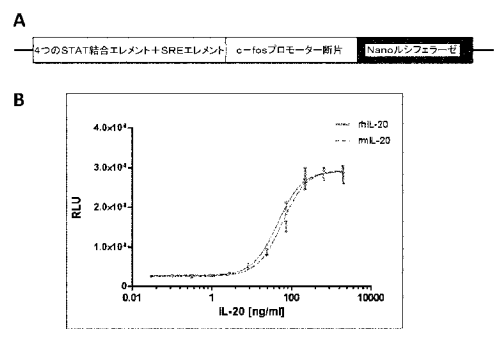


Fig. 5

【 図 5 - 3 】

F

リガンド	I型R		II型R	
	329.7	425.6	1196	3005
20A10	329.7	425.6	1196	3005
7D1	-	>10,000	N.D.	N.D.
2A11	-	-	N.D.	N.D.

Fig. 5 (続き)

【 図 6 】

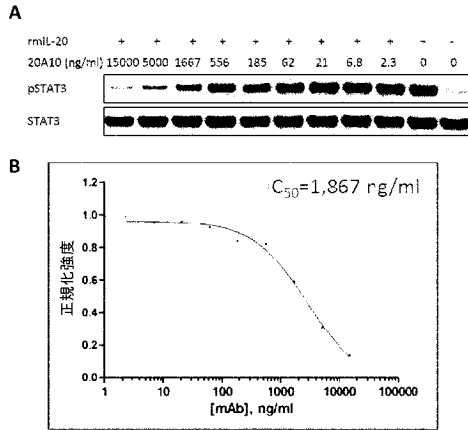


Fig. 6

【 図 7 - 1 】

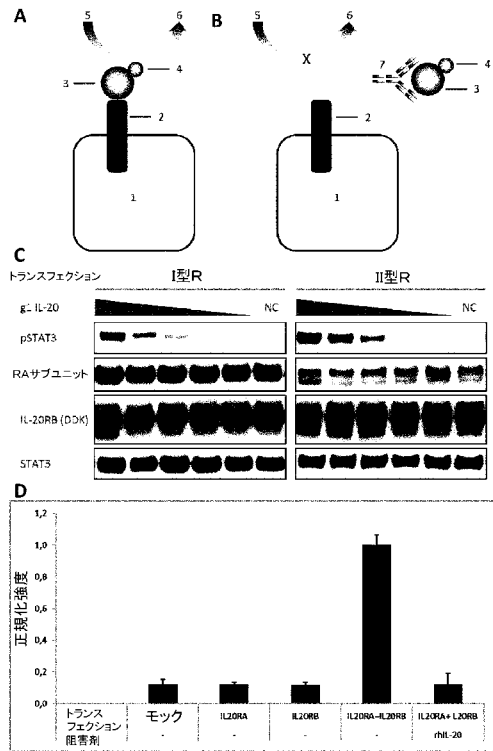


Fig. 7

【 図 7 - 2 】

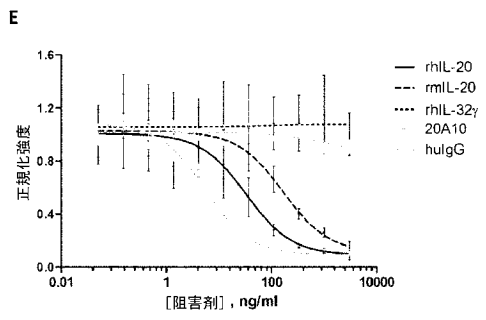


Fig. 7 (続き)

【 図 7 - 3 】

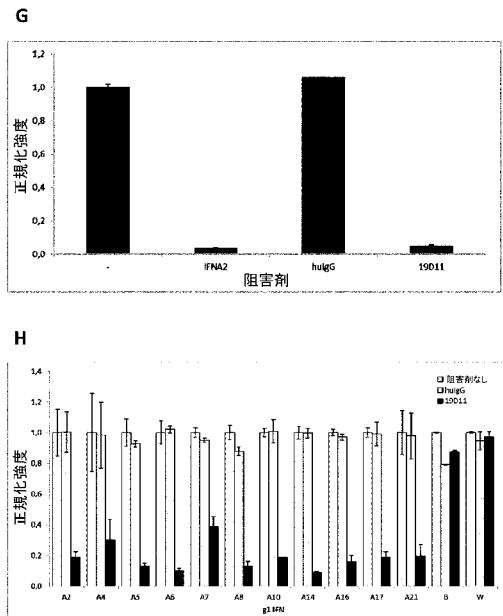


Fig. 7 (続き)

【 図 8 】

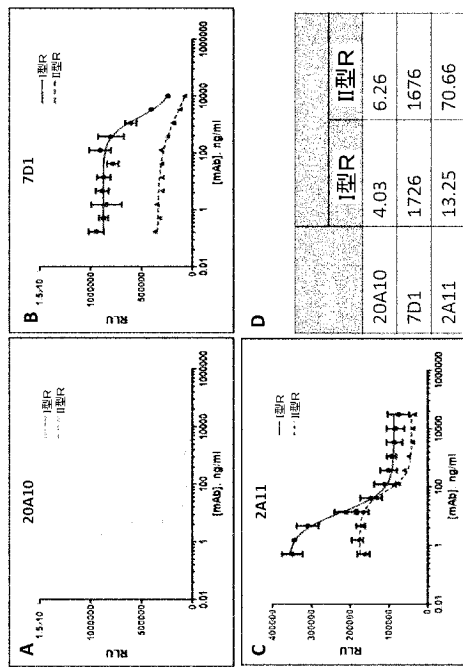


Fig. 8

【 図 9 - 1 】

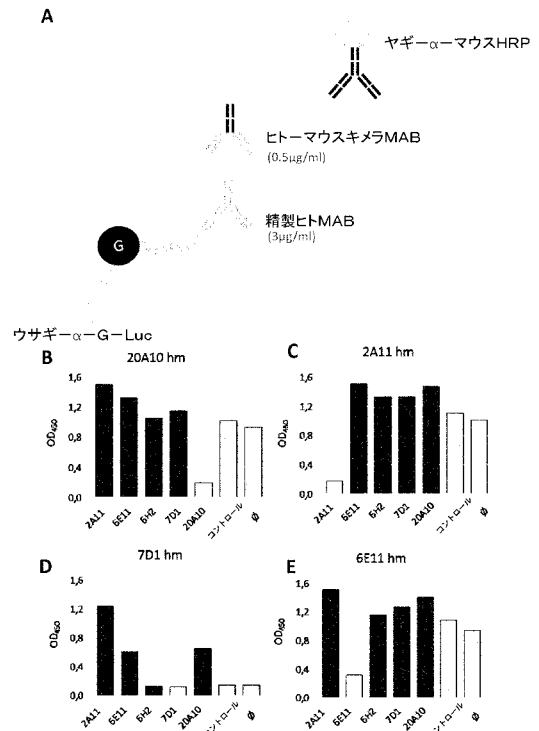


Fig. 9

【 図 9 - 2 】

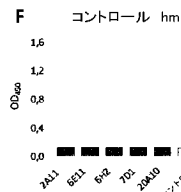


Fig. 9 (続き)

【 図 10 - 2 】

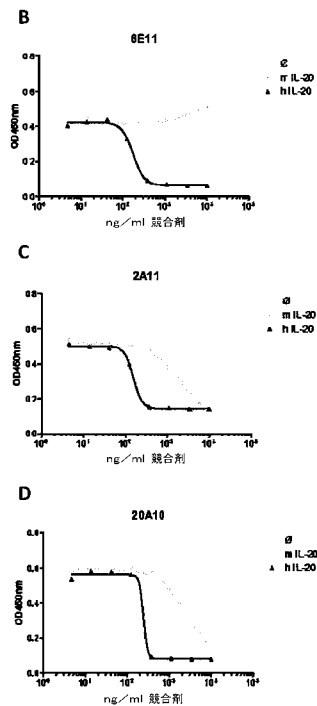


Fig. 10 (続き)

【 図 10 - 1 】

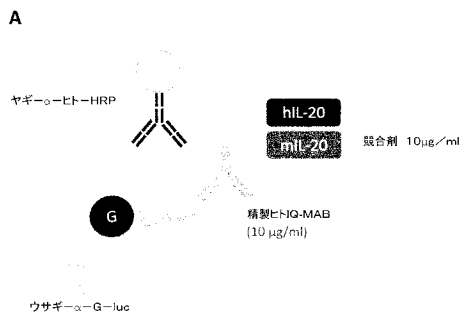
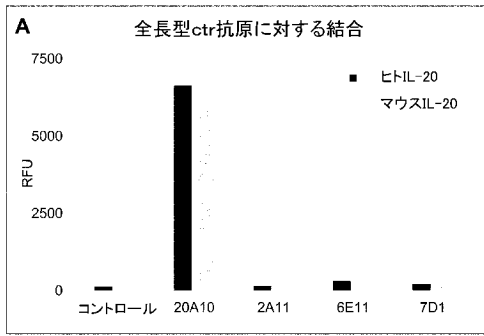


Fig. 10

【 図 1 3 - 1 】



【 図 1 3 - 2 】

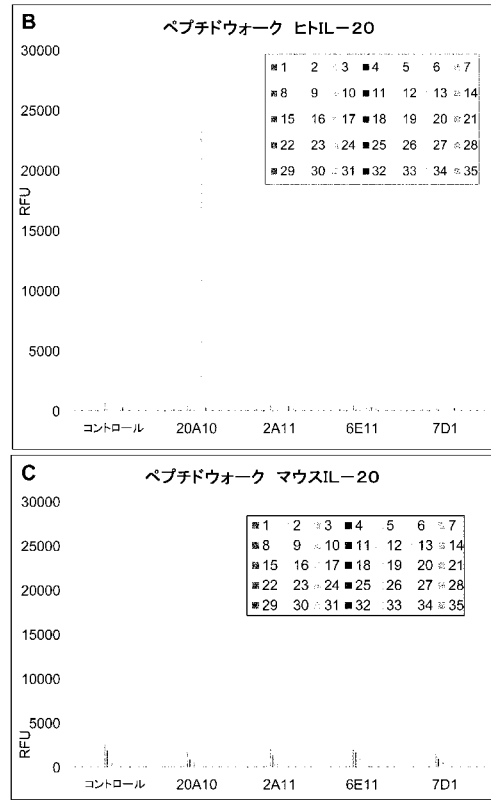


Fig. 13

Fig. 13 (続き)

【 図 1 3 - 3 】

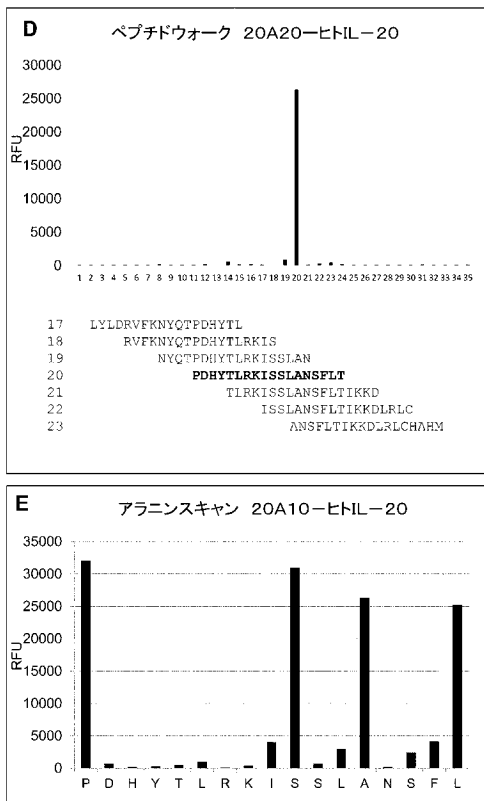


Fig. 13 (続き)

【 図 1 4 】

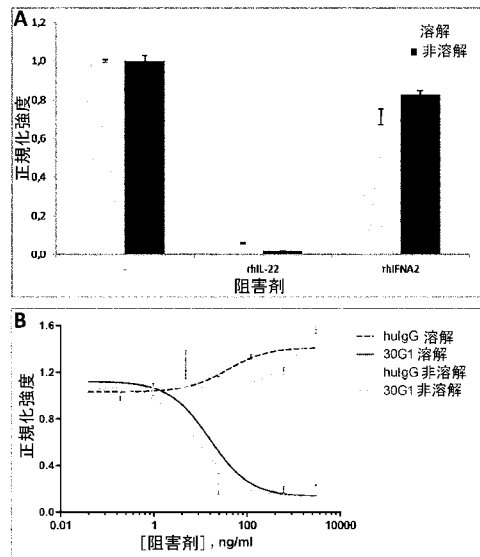


Fig. 14

【配列表】

2017527262000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/065244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 C07K16/24 G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/177157 A1 (UNIV NAT CHENG KUNG; CHANG MING-SHI) 28 November 2013 (2013-11-28) See e.g. the abstract; claims 1-3, 9-14; page 2, lines 17 and 18; pages 16-18; page 20 lines 5-31 -----	1-16
X	WO 2013/098419 A1 (IMMUNOQUIRE AG [DE]) 4 July 2013 (2013-07-04) cited in the application	1-16
Y	See e.g. page 7, lines 4-8; Tables 25 and 26; Table 27 on pages 166 and 167, see in particular last line of said Table 27 on page 166; page 156, lines 16-20; page 166, lines 6-22; claims 1,6 and 18 ----- -/--	17-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 February 2016		09/03/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Valcárcel, Rafael

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/065244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/052000 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; XU WENFENG [US]; KINDSVOGEL WAYNE R [US]; CHEN) 9 June 2005 (2005-06-09) See e.g. claims 7, 8 and 10; see also from page 84, line 18 to page 86, line 9; see also page 89, lines 20-22 -----	1-16
X	KATHRYN LUKER ET AL: "Bioluminescent CXCL12 fusion protein for cellular studies of CXCR4 and CXCR7", BIOTECHNIQUES, vol. 47, no. 1, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 625-632, XP55160932, ISSN: 0736-6205, DOI: 10.2144/000113126 See e.g. figures 4 and 5; page 626, first column, second paragraph -----	17-24, 26,27, 29,32
Y A	See e.g. figures 4 and 5; page 626, first column, second paragraph -----	17-32 1-16
X	KATHRYN E LUKER ET AL: "In vivo imaging of ligand receptor binding with Gaussia luciferase complementation", NATURE MEDICINE, vol. 18, no. 1, 4 December 2011 (2011-12-04), pages 172-177, XP55160732, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.2590 See e.g. figures 1, 2 and 3 -----	17-24, 26,27,29
Y A	See e.g. figures 1, 2 and 3 -----	17-32 1-16
X	CHIZZONITE R ET AL: "IL-12 MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE 40-KDA SUBUNIT BLOCK RECEPTOR BINDING AND BIOLOGIC ACTIVITY ON ACTIVATED HUMAN LYMPHOBLASTS", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 147, no. 5, 1 September 1991 (1991-09-01), pages 1548-1556, XP002945155, ISSN: 0022-1767 See e.g. page 1553 and figure 4 -----	17-24, 26,27,29
Y A	See e.g. page 1553 and figure 4 -----	17-32 1-16
X	A. G. ROLINK ET AL: "Monoclonal antibodies reactive with the mouse interleukin 5 receptor", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 169, no. 5, 1 May 1989 (1989-05-01), pages 1693-1701, XP55160963, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.169.5.1693 See e.g. figure 2 -----	17-24, 26,27,29
Y A	See e.g. figure 2 -----	17-32 1-16
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/065244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHOU CHEN ET AL: "Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 2, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 508-518, XP009162612, ISSN: 1942-0870 cited in the application See e.g. the abstract; or Figure 3 -----	30-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2015/065244**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2015/ 065244

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16

A human-derived monoclonal anti-human IL-20 antibody or an IL-binding fragment or derivative thereof, according to claims 1-10. A polynucleotide, a vector, host cell, an antibody, an immunoconjugate or a composition as defined in claims 11-16.

2. claims: 17-25

A method for the assessment of binding of a ligand of interest to a ligand-binding domain according to claims 17-25.

3. claims: 26-29

An assay for determining whether a test sample comprises an agonist or antagonist of binding of a ligand of interest to its cognate ligand-binding domain according to claims 26-29.

4. claim: 30

A method of preparing a human-derived monoclonal anti-ligand antibody according to claim 30.

5. claim: 31

A method for preparing a pharmaceutical composition according to claim 31.

6. claim: 32

A kit according to claim 32.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/065244

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013177157 A1	28-11-2013	US 2013315893 A1	28-11-2013
		US 2014056886 A1	27-02-2014
		US 2015118711 A1	30-04-2015
		WO 2013177157 A1	28-11-2013

WO 2013098419 A1	04-07-2013	AU 2013206788 A1	10-07-2014
		AU 2013206789 A1	17-07-2014
		CA 2861695 A1	04-07-2013
		CA 2861793 A1	04-07-2013
		EP 2797951 A1	05-11-2014
		EP 2797952 A1	05-11-2014
		JP 2015505244 A	19-02-2015
		US 2014335098 A1	13-11-2014
		US 2014363422 A1	11-12-2014
		WO 2013098419 A1	04-07-2013
		WO 2013098420 A1	04-07-2013

WO 2005052000 A2	09-06-2005	AT 447587 T	15-11-2009
		CA 2542546 A1	09-06-2005
		CA 2545867 A1	09-06-2005
		EP 1692180 A2	23-08-2006
		EP 1697418 A2	06-09-2006
		EP 2143733 A1	13-01-2010
		ES 2334140 T3	05-03-2010
		JP 4991307 B2	01-08-2012
		JP 2007535490 A	06-12-2007
		JP 2007537993 A	27-12-2007
		JP 2012036204 A	23-02-2012
		US 2005136004 A1	23-06-2005
		US 2005170468 A1	04-08-2005
		US 2008247945 A1	09-10-2008
		WO 2005052000 A2	09-06-2005
		WO 2005052001 A2	09-06-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	49/16 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	49/16	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
G 0 1 N	33/536 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	P
		G 0 1 N	33/536	C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ブライク, フィリップ

ドイツ連邦共和国、 8 2 2 3 9 アリング、キルヒストラッセ 1 4

(72)発明者 マカゲノ, アンナリサ

スイス国、 C H - 8 9 5 2 シュリーレン、ステインヴィーゼンストラッセ 2 2

(72)発明者 ピーターソン, パート

エストニア共和国、 E E - 1 0 9 1 2 タリン、スピラ 2 7 A - 1

(72)発明者 キサンド, カイ

エストニア共和国、 E E - 5 0 4 1 2 タルツ、ツルビ 9

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ79 QR48 QS33 QX02
 4B065 AA90X AB01 BA01 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA13 MA13 MA16 MA27 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52
 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA36 ZA45 ZA89 ZA96
 ZB08 ZB11 ZB13 ZB26 ZC41
 4C085 AA14 AA25 AA27 CC01 CC08 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04
 GG05 GG06 GG08 GG10 HH03 HH07 HH11 HH13 KA04 KA27
 KA28 KB07 LL18 LL20
 4C087 AA01 AA02 BB65 CA12 MA13 MA17 MA22 MA23 MA27 MA35
 MA37 MA43 MA52 MA56 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA36 ZA45

ZA89	ZA96	ZB07	ZB08	ZB11	ZB13	ZB26	ZC41			
4H045	AA11	AA30	BA10	BA17	BA41	CA40	DA76	EA20	EA50	FA74

专利名称(译)	人源抗IL-20抗体和抗细胞因子抗体鉴定试验		
公开(公告)号	JP2017527262A	公开(公告)日	2017-09-21
申请号	JP2016575766	申请日	2015-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	免疫治疗AG 因美诺克股份公司		
申请(专利权)人(译)	Imunokyuua AG		
[标]发明人	マイヤーステフェン ブライクフィリップ マカグノアンナリサ ピーターソンパート キサンドカイ		
发明人	マイヤー,ステフェン ブライク,フィリップ マカグノ,アンナリサ ピーターソン,パート キサンド,カイ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C07K19/00 C12Q1/02 A61K39/395 A61K48/00 A61K49/00 A61K49/16 A61K35/76 A61K35/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P35 /00 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P37/08 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/76 G01N33/5008 G01N2500/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P29/00 A61K39/3955 C07K2317/33 G01N33/6863		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C07K19/00 C12Q1/02 A61K39/395.U A61K39/395.L A61K48/00 A61K49/00 A61K49/16 A61K35/76 A61K35/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P37/08 G01N33/53.P G01N33 /536.C		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063 /QX02 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA27 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084 /MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA45 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084 /ZB26 4C084/ZC41 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA27 4C085/CC01 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085 /GG10 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KB07 4C085/LL18 4C085/LL20 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/CA12 4C087 /MA13 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA27 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA43 4C087/MA52 4C087/MA56 4C087/MA60 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087 /ZA45 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB26 4C087/ZC41 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	萩野 干治		
优先权	2014175585 2014-07-03 EP 2014175673 2014-07-03 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了人源的新型白细胞介素-20 (IL-20) 结合分子，特别是人源抗人 IL-20抗体，IL-20结合片段，衍生物和其生物技术变体。此外，描述了用于诊断和治疗的药物组合物，试剂盒和方法。此外，细胞类型的酶联配体结合试验用于分离抗体及其生物技术衍生物用于药物，特别是分离重组人源抗人细胞因子抗体这样做。

(5) Int. Cl.	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-575766 (P2016-575766)	(71) 出願人	514165130
(86) (22) 出願日	平成27年7月3日 (2015.7.3)		イムノキュア アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		IMMUNOQURE AG
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/065244		ドイツ連邦共和国、40212 デュッセルドルフ、ケーニヒスアレー 90
(87) 国際公開番号	W02016/001424		Königsallee 90, 40212 Düsseldorf, GERMAN Y
(87) 国際公開日	平成28年1月7日 (2016.1.7)		
(31) 優先権主張番号	14175585.0	(74) 代理人	100114362
(32) 優先日	平成26年7月3日 (2014.7.3)		弁理士 萩野 幹治
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		マイヤー、ステフエン
(31) 優先権主張番号	14175673.4		ドイツ連邦共和国、81476 ミュンヘン、フィルヒナーストラッセ 13
(32) 優先日	平成26年7月3日 (2014.7.3)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト由来抗 IL-20 抗体および抗サイトカイン抗体同定アッセイ