

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-500803
(P2008-500803A)

(43) 公表日 平成20年1月17日(2008.1.17)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N	1/19	4 B 0 6 3
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	4 B 0 6 4
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N	5/00	B 4 B 0 6 5
C 12 P 21/02	(2006.01)	C 12 P	21/02	C 4 C 0 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 136 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2006-518636 (P2006-518636)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC.
(86) (22) 出願日	平成16年6月2日 (2004.6.2)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成18年3月10日 (2006.3.10)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/017581	(72) 発明者	アルノ, デイビッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 944 03, サンマテオ, イースト 40 ス アヴェニュー 366
(87) 國際公開番号	W02005/010044		
(87) 國際公開日	平成17年2月3日 (2005.2.3)		
(31) 優先権主張番号	60/485,599		
(32) 優先日	平成15年7月8日 (2003.7.8)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/486,457		
(32) 優先日	平成15年7月11日 (2003.7.11)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-17異種ポリペプチドとその治療上の用途

(57) 【要約】

本発明は、本明細書においてインターロイキン17A/F (IL-17A/F) と命名するインターロイキン17とインターロイキン17Fのヘテロ二量体を含む新規な天然発生のヒトサイトカインを目的としている。また、これらの核酸配列を含んでなるベクター及び宿主細胞、異種ポリペプチド配列に融合した本発明のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドに結合する特異的抗体、並びに本発明のポリペプチドを製造する方法が提供される。更には、変性軟骨障害及びその他炎症性疾患の治療方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；
 (c) 配列番号5及び配列番号6を有するヌクレオチド配列；又は
 (d) 配列番号5及び配列番号6の完全長コード化配列を含むヌクレオチド配列に対し、少なくとも80%の核酸配列同一性を有する単離された核酸分子。

【請求項 2】

前記IL-17A/Fポリペプチドが、配列番号3及び配列番号4を含む共有結合したヘテロ二量体複合体である、請求項1に記載の単離された核酸。

【請求項 3】

前記共有結合したヘテロ二量体複合体が、配列番号3と配列番号4の間に2つの鎖間ジスルフィド結合を有する、請求項2に記載の単離された核酸。

【請求項 4】

- (a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；
 (c) 配列番号5及び配列番号6を有するヌクレオチド配列；又は
 (d) 配列番号5及び配列番号6の完全長コード化配列を含むヌクレオチド配列に対し、少なくとも85%の核酸配列同一性を有する、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

- (a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；
 (c) 配列番号5及び配列番号6を有するヌクレオチド配列；又は
 (d) 配列番号5及び配列番号6の完全長コード化配列を含むヌクレオチド配列に対し、少なくとも90%の核酸配列同一性を有する、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

- (a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；
 (c) 配列番号5及び配列番号6を有するヌクレオチド配列；又は
 (d) 配列番号5及び配列番号6の完全長コード化配列を含むヌクレオチド配列に対し、少なくとも95%の核酸配列同一性を有する、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項 7】

- (a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 (b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；
 (c) 配列番号5及び配列番号6を有するヌクレオチド配列；又は
 (d) 配列番号5及び配列番号6の完全長コード化配列を含むヌクレオチド配列に対し、少なくとも99%の核酸配列同一性を有する、請求項1に記載の単離された核酸

10

20

30

40

50

分子。

【請求項 8】

(a) 配列番号 3 及び配列番号 4 を有する IL - 17A / F ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 3 及び配列番号 4 を有する IL - 17A / F ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

(c) 配列番号 5 及び配列番号 6 を有するヌクレオチド配列；又は

(d) 配列番号 5 及び配列番号 6 の完全長コード化配列を含むヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 9】

前記 IL - 17A / F ポリペプチドが、配列番号 3 及び配列番号 4 を含む共有結合したヘテロ二量体複合体である、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

前記共有結合したヘテロ二量体複合体が、配列番号 3 と配列番号 4 の間に 2 つの鎖間ジスルフィド結合を有する、請求項 9 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 11】

配列番号 3 及び配列番号 4 を有する IL - 17A / F ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 12】

配列番号 3 及び配列番号 4 を有する IL - 17A / F ポリペプチドでその関連シグナルペプチドを欠いているものをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 13】

配列番号 5 及び配列番号 6 を有する、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 14】

配列番号 5 及び配列番号 6 の完全長コード化配列を含む、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 16】

前記ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能にリンクする、請求項 15 に記載のベクター。

【請求項 17】

請求項 15 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

前記細胞が、CHO 細胞、大腸菌細胞、酵母細胞又はバキュロウイルスに感染した昆虫細胞である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の宿主細胞を、前記 IL - 17A / F の発現に適した条件下で培養し、前記 IL - 17A / F ポリペプチドを細胞培養物から回収することを含む、IL - 17A / F ポリペプチド生成方法。

【請求項 20】

(a) 配列番号 3 及び配列番号 4 を有する IL - 17A / F ポリペプチドのアミノ酸配列；又は

(b) 配列番号 3 及び配列番号 4 を有する IL - 17A / F ポリペプチドのアミノ酸でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

に対し、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有する単離されたポリペプチド。

【請求項 21】

前記 IL - 17A / F ポリペプチドが、配列番号 3 と配列番号 4 を含むヘテロ二量体複合体を有する、請求項 20 に記載の単離されたポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

前記ヘテロ二量体複合体が、配列番号3と配列番号4の間に2つの鎖間ジスルフィド結合を有する、請求項21に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 2 3】

(a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸配列；又は

(b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

に対し、少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項20に記載の単離されたポリペプチド。

10

【請求項 2 4】

(a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸配列；又は

(b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

に対し、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項20に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 2 5】

(a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸配列；又は

(b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

に対し、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項20に記載の単離されたポリペプチド。

20

【請求項 2 6】

(a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸配列；又は

(b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

に対し、少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項20に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項 2 7】

(a) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸配列；又は

(b) 配列番号3及び配列番号4を有するIL-17A/Fポリペプチドのアミノ酸でその関連シグナルペプチドを欠いているもの；

を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 2 8】

前記IL-17A/Fポリペプチドが、配列番号3及び配列番号4を含むヘテロ二量体複合体を含む、請求項27に記載の単離されたポリペプチド。

40

【請求項 2 9】

前記ヘテロ二量体複合体が、配列番号3と配列番号4の間に2つの鎖間ジスルフィド結合を有する、請求項28に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3 0】

配列番号3及び配列番号4を含む、請求項27に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3 1】

配列番号3及び配列番号4でその関連シグナルペプチドを欠いているものを含む、請求項27に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3 2】

異種アミノ酸配列に融合した請求項27に記載のポリペプチドを含むキメラ分子。

50

【請求項 3 3】

前記異種アミノ酸配列が、免疫グロブリンの Fc 領域又はエピトープタグ配列である、請求項 3 2 に記載のキメラ分子。

【請求項 3 4】

(a) 配列番号 3 及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む IL-17A / F ポリペプチド；(b) 前記 IL-17A / F ポリペプチドのアゴニスト；(c) 前記 IL-17A / F ポリペプチドのアンタゴニスト、又は(d) 前記 IL-17A / F ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、担体と組み合わせて含む組成物。

【請求項 3 5】

請求項 2 0 に記載のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

10

【請求項 3 6】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体又は一本鎖抗体である、請求項 3 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 3 7】

前記抗体がモノクローナル抗体であり、好適には非ヒト相補性決定領域 (CDR) 残基及びヒトフレームワーク領域 (FR) 残基を有する、請求項 3 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 3 8】

標識され、固体支持体上に固定された請求項 3 5 に記載の単離された抗体。

20

【請求項 3 9】

前記抗体が抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、又は抗イディオタイプ抗体である、請求項 3 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 4 0】

抗体断片又は一本鎖抗体が、図 6 に配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、及び配列番号 42 として示されているアミノ酸配列からなる群から選択された Fab 断片を含み、前記 Fab 断片が、配列番号 9 ~ 42 のアミノ酸残基 7 ~ 16 で構成される CDR-H1、配列番号 9 ~ 42 のアミノ酸残基 30 ~ 46 で構成される CDR-H2、及び配列番号 9 ~ 42 のアミノ酸残基 78 ~ 少なくとも 96 で構成される CDR-H3 を含む 3 つの重鎖可変領域を更に含み、前記単離された Fab 断片が IL-17A / F に対する結合能を有する、請求項 3 9 に記載の単離された抗体。

30

【請求項 4 1】

抗体断片又は一本鎖抗体が、図 6 に配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、及び配列番号 42 として示されているアミノ酸配列からなる群から選択された Fab 断片を含み、前記 Fab 断片が、配列番号 9 ~ 42 のアミノ酸残基 7 ~ 16 で構成される CDR-H1、及び配列番号 9 ~ 42 のアミノ酸残基 30 ~ 46 で構成される CDR-H2 を少なくとも含む重鎖可変領域をさらに含み、前記 Fab 断片が IL-17A / F に対する結合能を有する、請求項 3 9 に記載の単離された抗体。

40

【請求項 4 2】

抗体断片又は一本鎖抗体が、図 6 に配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配

50

列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、及び配列番号 42として示されているアミノ酸配列からなる群から選択されたF ab断片を含み、前記F ab断片が、配列番号9～42のアミノ酸残基7～16で構成されるCDR-H1、及び配列番号9～42のアミノ酸残基78～少なくとも96で構成されるCDR-H3を少なくとも含む重鎖可変領域をさらに含み、前記F ab断片がIL-17A/Fに対する結合能を有する、請求項39に記載の単離された抗体。

【請求項43】

抗体断片又は一本鎖抗体が、図6に配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、及び配列番号42として示されているアミノ酸配列からなる群から選択されたF ab断片を含み、前記F ab断片が、配列番号9～42のアミノ酸残基30～46で構成されるCDR-H2、及び配列番号9～42のアミノ酸残基78～少なくとも96で構成されるCDR-H3を少なくとも含む重鎖可変領域をさらに含み、前記F ab断片がIL-17A/Fに対する結合能を有する、請求項39に記載の単離された抗体。

【請求項44】

抗体断片又は一本鎖抗体が、図6に配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、及び配列番号42として示されているアミノ酸配列からなる群から選択されたF ab断片を含み、前記F ab断片が、配列番号9～42のアミノ酸残基7～16で構成されるCDR-H1、配列番号9～42のアミノ酸残基30～46で構成されるCDR-H2、及び配列番号9～42のアミノ酸残基78～少なくとも96で構成されるCDR-H3の内、少なくとも1つの重鎖可変領域を更に含み、前記単離されたF ab断片がIL-17A/Fに対する結合能を有する、請求項39に記載の単離された抗体。

【請求項45】

配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、又は配列番号42の前記CDR-H1領域が、配列番号77として示されるアミノ酸配列に対応するアミノ酸残基7～10を少なくとも含み、前記配列番号77がIL-17A/Fに対する結合能を有する、請求項39に記載の単離された抗体。

【請求項46】

配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37

10

20

30

40

50

37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、又は配列番号42の前記CDR-H2領域が、配列番号78として示されるアミノ酸配列に対応するアミノ酸残基41～46を少なくとも含み、前記配列番号78がIL-17A/Fに対する結合能を有する、請求項39に記載の単離された抗体。

【請求項47】

前記抗体が抗IL-17A/Fアゴニスト抗体である、請求項39に記載の単離された抗体。

【請求項48】

前記抗体が抗IL-17A/Fアンタゴニスト抗体である、請求項39に記載の単離された抗体。

10

【請求項49】

配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75及び配列番号76のヌクレオチド配列からなる群から選択された単離された核酸分子であって、前記核酸分子が、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、又は配列番号42として示すFab断片をコードし、前記Fab断片がIL-17A/Fに対する結合能を有する単離された核酸分子。

20

【請求項50】

前記担体が製薬的に許容可能な担体である、請求項34に記載の組成物。

【請求項51】

哺乳動物の免疫関連疾患の治療に有用である、請求項34に記載の組成物。

30

【請求項52】

(a)、(b)又は(d)は、(i)哺乳動物のTリンパ球の増殖を亢進する、又は(ii)哺乳動物の組織への炎症性細胞の浸潤を亢進することができる、請求項34に記載の組成物。

【請求項53】

(c)又は(d)は、(i)哺乳動物のTリンパ球の増殖を阻害する、又は(ii)哺乳動物の組織への炎症性細胞の浸潤を減退させることができる、請求項34に記載の組成物。

【請求項54】

治療的有効量の(a)、(b)、(c)又は(d)を含む、請求項34に記載の組成物。

40

【請求項55】

容器；

前記容器に貼付されるラベル；及び

前記容器内に収容される請求項34に記載の組成物であって、前記容器に貼付されるラベルにより、免疫関連疾患の治療に使用できることが示される組成物を含む製造品。

【請求項56】

治療が必要な哺乳動物の免疫関連疾患の治療法であって、前記哺乳動物に対して治療的有用量の(a)請求項20に記載のポリペプチド、(b)前記ポリペプチドのアゴニスト

50

、(c)前記ポリペプチドのアンタゴニスト、又は(d)前記ポリペプチドに特異的に結合する抗体を投与することを含む方法。

【請求項 5 7】

免疫関連疾患が、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、変形性関節症、若年性慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症誘発性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、甲状腺炎、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患、中枢及び抹消神経系の脱髓性疾患、特発性脱髓性多発神経障害、ギランバレー症候群、慢性炎症脱髓性多発神経障害、肝胆道疾患、感染性又は自己免疫慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、硬化性胆管炎、炎症誘発性腸疾患、グルテン感受性腸疾患、フィップル疾患、自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、水泡性皮膚疾患、多形滲出性紅斑、接触皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症、蕁麻疹、肺の免疫学的疾患、好酸球性肺炎、特発性肺線維症、高感受性間質性肺炎、移植関連疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主疾患である、請求項 5 6 に記載の方法。

10

【請求項 5 8】

IL-17A/F ポリペプチドの存在が疑われる試料中における前記ポリペプチドの存在を決定する方法であって、前記試料を抗 IL-17A/F 抗体に接触させること、及び前記試料の成分に対する前記抗体の結合を測定することを含む方法。

20

【請求項 5 9】

哺乳動物の免疫関連疾患を診断する方法であって、(a)哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、及び(b)同じ細胞型の既知の正常細胞のコントロール試料における IL-17A/F ポリペプチドをコードする遺伝子の発現レベルを検出することを含み、コントロール試料と比較して試験試料中の前記遺伝子の発現レベルが高いか、又は低い場合に、試験組織細胞を採取した哺乳動物における免疫関連疾患の存在が示される方法。

20

【請求項 6 0】

哺乳動物の免疫関連疾患を診断する方法であって、(a)哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料に抗 IL-17A/F 抗体を接触させ、(b)試験試料中における抗体とポリペプチドの複合体の形成を検出することを含み、前記複合体の形成が、試験組織細胞を採取した哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す方法。

30

【請求項 6 1】

IL-17A/F ポリペプチドの活性を阻害する化合物を同定する方法であって、通常は前記ポリペプチドに応答する細胞を(a)前記ポリペプチド、及び(b)候補化合物と接触させ、前記細胞の(a)に対する応答性の欠乏を測定することを含む方法。

30

【請求項 6 2】

IL-17A/F ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する化合物を同定する方法であって、通常は前記ポリペプチドを発現する細胞を候補化合物と接触させ、前記遺伝子の発現の欠乏を測定することを含む方法。

30

【請求項 6 3】

前記候補化合物がアンチセンス核酸である、請求項 6 2 に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

IL-17A/F ポリペプチドの活性を模倣する化合物を同定する方法であって、通常は前記ポリペプチドに応答する細胞を候補化合物と接触させ、前記細胞の前記候補化合物に対する応答性を測定することを含む方法。

40

【請求項 6 5】

Tリンパ球の増殖を刺激する方法であって、(a)IL-17A/F ポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストの有効量にTリンパ球を接触させることを含み、よってTリンパ球の増殖を刺激する方法。

【請求項 6 6】

Tリンパ球の増殖を阻害する方法であって、IL-17A/F ポリペプチドのアンタゴニストの有効量にTリンパ球を接触させることを含み、よってTリンパ球の増殖を阻害す

50

る方法。

【請求項 6 7】

哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を高める方法であって、(a) IL-17A/F ポリペプチド又は(b)(a)のアゴニストの有効量を前記哺乳動物へ投与することを含み、よって前記浸潤を高める方法。

【請求項 6 8】

哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を減少させる方法であって、IL-17A/F ポリペプチドのアンタゴニストの有効量を前記哺乳動物へ投与することを含み、よって前記浸潤を減少させる方法。

【請求項 6 9】

前記炎症細胞が単核細胞、好酸球又は多形核好中球(PMN)である、請求項 6 7 又は 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

配列番号 3 及び配列番号 4 のアミノ酸配列を含む IL-17A/F ポリペプチド複合体を作製する方法であって、

(a) 等量の、配列番号 3 に示すヒト IL-17 ポリペプチドをコードする cDNA 発現ベクター及び配列番号 4 に示すヒト IL-17F ポリペプチドをコードする cDNA 発現ベクターを宿主細胞に同時形質移入することと、

(b) 前記 IL-17A/F ポリペプチド複合体の発現に適した条件下で宿主細胞を培養し、前記 IL-17A/F ポリペプチド複合体を細胞培養物から回収することとを含む方法。

【請求項 7 1】

請求項 4 9 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 7 2】

ベクターで形質転換した宿主細胞によって認識されるコントロール配列に作用可能にリンクする請求項 7 1 に記載のベクター。

【請求項 7 3】

請求項 7 1 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7 4】

前記細胞が、CHO 細胞、大腸菌細胞、酵母細胞、又はバキュロウイルスに感染した昆虫細胞である、請求項 7 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 7 5】

請求項 7 4 に記載の宿主細胞を、前記抗体の発現に適した条件下で培養し、前記抗体を細胞培養物から回収することを含む、請求項 4 9 に記載の抗体製造方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、概して、ここでインターロイキン 17A/F (IL-17A/F) と命名した新規ヒトサイトカインの同定と単離に関する。

【0002】

細胞外タンパク質は、多細胞生物の形成、分化及び維持において重要な役割を担っている。多くの個々の細胞の運命、例えば増殖、遊走、分化又は他の細胞との相互作用は、典型的には、他の細胞及び/又は直接の環境から受け取る情報に支配される。この情報は、しばしば分泌ポリペプチド(例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞障害性因子、分化因子、神経ペプチド、及びホルモン)により伝達され、これが、次に多様な細胞レセプター又は膜結合タンパク質により受け取られ解釈される。これらの分泌ポリペプチド又はシグナル分子は、通常は細胞分泌経路を通過して、細胞外環境におけるその作用部位に到達する。

分泌タンパク質は、製薬、診断、バイオセンサー及びバイオリアクターを含む、様々な

10

20

30

40

50

産業上の利用性を有している。血栓溶解剤、インターフェロン、インターロイキン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、及び種々の他のサイトカインのような、現在入手可能な大抵のタンパク質薬物は分泌タンパク質である。これらのレセプターは、膜タンパク質であり、治療又は診断用薬としての可能性をも有している。

【 0 0 3 】

膜結合タンパク質及びレセプターは、多細胞生物の形成、分化及び維持において重要な役割を担っている。多くの個々の細胞の運命、例えば増殖、遊走、分化又は他の細胞との相互作用は、典型的には他の細胞及び/又は直接の環境から受け取られる情報に支配される。この情報は、しばしば分泌ポリペプチド(例えば、分裂促進因子、生存因子、細胞障害性因子、分化因子、神経ペプチド、及びホルモン)により伝達され、これが次に多様な細胞レセプター又は膜結合タンパク質により受け取られ解釈される。このような膜結合タンパク質及び細胞レセプターは、これらに限定されるものではないが、サイトカインレセプター、レセプターキナーゼ、レセプターホスファターゼ、細胞-細胞間相互作用に関与するレセプター、及びセレクチン及びインテグリンのような細胞接着分子を含む。例えば、細胞の増殖及び分化を調節するシグナルの伝達は、様々な細胞タンパク質のリン酸化により部分的に調節される。そのプロセスを触媒する酵素であるプロテインチロシンキナーゼはまた成長因子レセプターとしても作用する。例えば、纖維芽細胞増殖因子及び神経成長因子レセプターが含まれる。

膜結合タンパク質及びレセプター分子は、製薬及び診断薬を含む、様々な産業上の利用性を有している。例えば、レセプターイムノアドヘシンはレセプター-リガンド間相互作用を阻止する治療薬として使用することができる。膜結合タンパク質はまた、関連するレセプター/リガンド間相互作用の可能性のあるペプチド又は小分子インヒビターをスクリーニングするために使用することもできる。

【 0 0 4 】

新規な天然の分泌及び膜結合レセプタータンパク質を同定するための努力が産業界と学術界の両方によってなされている。多くの努力が新規な分泌及び膜結合レセプタータンパク質に対するコード化配列を同定するために哺乳動物の組換えDNAライブラリをスクリーニングすることに注がれている。スクリーニング方法及び技術の例は文献に記載されている[例えば、Kleinら, I L - 17 A / F c. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); 米国特許5,536,637を参照されたい]。

この点から、本発明は、免疫媒介及び炎症疾患に関連することが示されているインターロイキン17(I L - 17)ファミリーの新規分泌ポリペプチドの同定に関する。免疫関連及び炎症疾患は、完全な複合現象の症状又は結果であり、これらの殆どは複合的に関連した生物学的経路であり、正常な生理機能において、発作又は損傷へ応答すること、発作又は損傷からの回復を開始すること、並びに外来生物に対する先天性及び後天性の防御を増すことにおいて絶対不可欠である。疾患や病理現象は、これら正常な生理学的経路が付加的発作や損傷を、応答の強度と直接に関連しているものとして、異常な制御又は過度の刺激の結果として、自己への反応として、又はこれらの組み合わせの何れかとして生じせしめる場合に起こる。

これら疾患の起源には、殆どにおいて多段階経路及び複数の異なった生物学的系/経路が関与しているが、これらの一つ又は複数の経路の重要なポイントでの介入は、改善的又は治療的效果をもたらすことができる。治療的介入は、有害なプロセス/経路の拮抗作用又は有益なプロセス/経路の刺激の何れかによって生じることができる。

【 0 0 5 】

多くの免疫関連疾患は知られていて、広く研究されてきた。このような疾患には、免疫媒介炎症疾患(例えば、リウマチ様関節炎、免疫媒介腎疾患、肝胆道疾患、炎症性腸疾患(IBD)、乾癬、及び喘息)、非免疫媒介炎症疾患、感染症、免疫不全症、腫瘍症などが含まれる。

Tリンパ球(T細胞)は、哺乳動物の免疫応答の重要な構成物である。T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)領域中の遺伝子によってコードされている自己分子と結

合する抗原を認識する。該抗原は、MHC分子とともに抗原提示細胞、ウイルス感染細胞、癌細胞、移植片などの表面に表示されうる。T細胞系は、宿主哺乳動物の健康へ脅威を与えるこれら改変細胞を除去する。T細胞には、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞(キラーT細胞)が含まれる。ヘルパーT細胞は、抗原表示細胞上の抗原-MHC複合体の認識の後に大々的に増殖する。また、ヘルパーT細胞は、種々のサイトカイン、すなわちB細胞、細胞傷害性T細胞及び免疫応答に関与する種々の他の細胞の活性化において中心的な役割を担うリンフォカインを分泌する。

体液性及び細胞性免疫応答の双方における中心的現象は、ヘルパーT細胞の活性化とクローン性増殖である。ヘルパーT細胞活性化は、抗原表示細胞の表面におけるT細胞レセプター(TCR)-CD3複合体と抗原-MHCの相互作用によってはじまる。該相互作用は、生成ヘルパーT細胞が細胞周期(G0からG1への移行)へ入ること、並びにIL-2及び時にはIL-4のための高親和性レセプターの発現が生じることを含む、生化学現象のカスケードを媒介する。活性化T細胞は、記憶細胞(免疫記憶細胞、メモリー細胞)又はエフェクター細胞へ増殖及び分化する周期を通して発達する。

【0006】

TCRを通して媒介されるシグナルに加えて、T細胞の活性化には、抗原提示細胞によって、或いは抗原提示細胞上の膜結合分子とT細胞の相互作用を通してのサイトカイン放出によって誘導される付加的な共刺激が含まれる。サイトカインIL-1及びIL-6が、共刺激のシグナルを示すことが示されている。また、抗原提示細胞の表面に発現するB7分子とT細胞表面に発現するCD28及びCTL-4分子の間の相互作用は、T細胞活性化に作用する。活性化T細胞は、かなりの量のICAM-1、インテグリン、VLA-4、LFA-1、CD56等の細胞接着分子を発現する。

リンパ球混合培養又は混合リンパ球培養反応(MLR)におけるT細胞増殖は、免疫系を刺激する化合物の能力の定着した指標である。多くの免疫応答では、炎症細胞は損傷又は感染の部分へ浸潤する。この遊走細胞は、感染組織の組織学的検査によって判定することができる好中球、好酸球、単球又はリンパ球性の細胞でありうる。Current IL-17A / Protocols in Immunology, John E. Coliganら編, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

免疫関連疾患は、免疫応答を抑制することで治療することができる。免疫刺激活性を有する分子を阻害する中和抗体を用いることは、免疫媒介及び炎症疾患の治療において有益である。免疫応答を阻害する分子は、免疫応答を阻害するのに利用することが可能であり(直接に、或いは抗体アゴニストの利用を経由するタンパク質)、それ故に免疫関連疾患を改善する。

【0007】

インターロイキン17(IL-17)は、上皮細胞、内皮細胞、及び線維芽細胞を刺激し、IL-6、IL-8、G-CSF、及びMCP-1を含む他の炎症性サイトカイン及びケモカインを生成するT細胞由来の炎症促進性分子である[Yao, Z.等、J. Immunol., 122(12):5483-5486 (1995); Yao, Z.等、Immunity, 3(6):811-821 (1995); Fossiez, F.等、J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996); Kennedy, J.等、J. Interferon Cytokine Res., 16(8):611-7 (1996); Cai, X. Y.等、Immunol. Lett., 62(1):51-8 (1998); Jovanovic, D.V.等、J. Immunol., 160(7):3513-21 (1998); Laan, M.等、J. Immunol., 162(4):2347-52 (1999); Linden, A等、Eur Respir J, 15(5):973-7 (2000); 及びAggarwal, S.及びGurney, A.L., J Leukoc Biol, 71(1):1-8 (2002)参照]。IL-17はまた、TNF-α及びIL-1を含むほかのサイトカインと共同してさらにケモカインの発現を誘発する(Chabaud, M等、J. Immunol. 161(1):409-14 (1998))。インターロイキン17(IL-17)は、様々な種類の細胞上に多面的な生物学的活性を示す。IL-17は、ICAM-1の表面発現、T細胞の増殖、及びCD34⁺ヒト前駆体の成長と好中球への分化を誘発することもできる。IL-17は、骨代謝にも関連していると思われており、更には活性T細胞の存在及びTNF-αの生成を特徴とする、リウマチ様関節炎や骨移植片の緩みのような病態に重要な役割を担っていることが示されている。(Van Bezooven等、J. Bone Miner. Res., 14: 1513-1521 [1999])。リウマチ様関節炎患者由来の骨

10

20

30

40

50

膜組織の活性T細胞は、正常な個体又は骨関節炎患者由来の組織よりもIL-17を多量に分泌することが判明した(Chabaud等、*Arthritis Rheum.*, 42: 963-970 [1999])。炎症促進性のサイトカインがリウマチ様関節炎における骨膜の炎症に大きく寄与していることが示された。炎症を促進するという役割とは別に、IL-17はまた別のメカニズムによってリウマチ様関節炎の病態に寄与していると思われる。例えば、IL-17は、骨芽細胞における破骨細胞分化因子(ODF)mRNAの発現を誘発することが分かっている(Kotake等、*J. Clin. Invest.*, 103: 1345-1352 [1999])。ODFは、骨の再吸収に関与する細胞である破骨細胞への前駆細胞の分化を刺激する。リウマチ様関節炎患者の骨液中ではIL-17のレベルが大きく上昇するので、IL-17により誘発された破骨細胞形成がリウマチ様関節炎患者の骨再吸収に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。また、IL-17は、多発性硬化症(Matusevicius等、*Mult. Scler.*, 5: 101-104 (1999); Kurasawa, K.等、*Arthritis Rheu* 43(11):2455-63 (2000))及び乾癬(Teunissen, M. B. 等、*J Invest Dermatol* 111(4):645-9 (1998); Albanesi, C. 等、*J Invest Dermatol* 115(1):81-7 (2000); 及びHomey, B. 等、*J. Immunol.* 164(12):6621-32 (2000))など他の特定の自己免疫疾患において鍵となる役割を果たしていると考えられている。

更に、IL-17は、細胞内シグナル伝達によってヒトマクロファージにおけるCa²⁺の流入と[cAMP]_iの減少を刺激することが示されている(Jovanovic等、*J. Immunol.*, 160:3513 [1998])。IL-17で処理された纖維芽細胞はNF-Bの活性化を誘発し[Yao等、*Immunity*, 3:811 (1995), Jovanovic等、上掲]、一方IL-17で処置されたマクロファージはNF-B及びマイトジエン活性化プロテインキナーゼを活性化する(Shalom-Barek等、*J. Biol. Chem.*, 273:27467 [1998])。加えて、IL-17は、骨及び軟骨の成長に関わる哺乳動物のサイトカイン様因子7と配列類似性を有する。IL-17ポリペプチドと配列類似性を有するほかのタンパク質は、ヒトの胚由来のインターロイキン関連因子(EDIRF)及びインターロイキン20である。

【0008】

IL-17の広範囲にわたる効果と呼応して、IL-17の細胞表面レセプターは多くの組織及び細胞型に広く発現されることが見出された(Yao等、*Cytokine* 9:794 (1997))。ヒトIL-17レセプター(IL-R)(866アミノ酸)のアミノ酸配列は、単一の膜貫通ドメインと長い525アミノ酸細胞内ドメインを持つタンパク質を予測するが、レセプター配列は独特であり、サイトカイン/成長因子レセプターファミリーからの何れのレセプターのものとも類似していない。このことは、他の既知のタンパク質とのIL-17の類似性の欠如と併せて、IL-17とそのレセプターがシグナル伝達タンパク質及びレセプターの新規なファミリーの一部でありうることを示している。IL-17の活性は、それに特有の細胞表面レセプター(本明細書でIL-17Rと呼ぶ)への結合を通して媒介されることが判明しており、これまでの研究により、T細胞をIL-17レセプターポリペプチドの可溶形態と接触させることにより、PHA、コンカナバリンA及び抗TCRモノクローナル抗体に誘発されたIL-2の生成及びT細胞の増殖が阻害されることが示されている(Yao等、*J. Immunol.*, 155:5483-5486 [1995])。このように、既知のサイトカインレセプター、特にIL-17レセプターとの相同性を有する新規ポリペプチドを同定し、特徴付けることに重大な関心が寄せられている。

インターロイキン17は、サイトカインの新興ファミリーの原型メンバーである。ヒト及びその他脊椎動物のゲノムの大規模な配列決定により、明らかにIL-17に関連しているタンパク質をコードする遺伝子の存在が新しく明らかになり、これによりサイトカインの新規ファミリーが定義された。ヒト及びマウスにIL-17ファミリーの少なくとも6つのメンバーがあり、それらにはIL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E及びIL-17F、並びに新規レセプターIL-17RH1、IL-17RH2、IL-17RH3、及びIL-17RH4が含まれる(2001年6月28日公開のW001/46420参照)。そのようなIL-17メンバーの1つ(IL-17Fと呼ぶ)は、ヒトIL-17レセプター(IL-17R)に結合することが示されている(Yao等、*Cytokine*, 9(11):794-800(1997))。最初の特徴付けにより、IL-17と同様、これら新規に同定された

10

20

30

40

50

分子のいくつかが免疫機能変調能を有することが示唆された。これら因子の一部に強力な起炎作用が確認されたこと、及びヒトの主要な疾患との関連性が明らかになってきたことにより、これらのタンパク質が炎症のプロセスに重要な役割を有し、治療的処置の機会に繋がる可能性が示唆されている。

【0009】

ヒトIL-17Fをコードする遺伝子は、IL-17に隣接して位置している (Hymowitz, S.G.等、*Embo J.*, 20(19):5332-41 (2001))。IL-17とIL-17Fは44%のアミノ酸同一性を共有しているが、IL-17ファミリーの他のメンバーは15~27%というもっと限定されたアミノ酸同一性を有しているのみであり、これはIL-17とIL-17FがIL-17ファミリーの中で個別のサブグループを形成していることを示す (Starnes, T.等、*J Immunol.*, 167(8):4137-40 (2001); Aggarwal, S.及びGurney, A.L., *J. Leukoc Biol.*, 71(1):1-8 (2002))。IL-17FはIL-17に類似の生物学的作用を有していると思われ、幅広い種類の細胞からIL-6、IL-8及びG-CSFの生成を促進することが出来る。IL-17と同様に、IL-17Fは軟骨基質の遊離を誘発し、新規軟骨基質の合成を阻害することができる (2002年11月28日公開のUS-2002-0177188-A1参照)。よって、IL-17と同様に、IL-17Fは炎症性疾患の病態に寄与している可能性がある。最近になって、インターロイキン23 (IL-23)の作用により、T細胞中にIL-17とIL-17Fの両方が誘発されることが観察された (Aggarwal, S.等、*J. Biol. Chem.*, 278(3):1910-4 (2003))。IL-17とIL-17Fが、類似した染色体の局在性と有意な配列同一性とを有するという知見、並びにIL-17とIL-17Fが特定の刺激に応じて同じ細胞集団によって誘発されるという知見は、IL-17とIL-17Fの共有結合性ヘテロ二量体 (ここではIL-17A/Fと呼ぶ) からなる新規ヒトサイトカインを導くものである。ヒトIL-17A/Fは、タンパク質構造アッセイと細胞に基づく活性アッセイの両方において、ヒトIL-17とIL-17Fから区別することが可能な個別の新規サイトカインである。精製された組換えヒトIL-17A/Fを基準として用いることにより、ヒトIL-17A/F専用ELISAを開発した。この特別なELISAを使用することにより、誘発されたヒトIL-17A/Fの発現を検出し、IL-17A/Fが培養培地中において活性のヒトT細胞から天然に生成されるものであることを確認した。したがって、IL-17A/Fは個別の新規サイトカインであり、単離された活性ヒトT細胞の天然産物として検出可能であり、その組換え形態は、タンパク質構造アッセイと細胞に基づくアッセイの両方において、関連するサイトカインとは異なるもので、区別可能であると特徴付けられている。よって、これらの研究は、免疫系に免疫追加し、これまで免疫学的に活性でなかった特定の抗原に応答する新規免疫刺激 (つまりIL-17A/F) を提供及び同定するものである。このように、新規に同定された免疫刺激は重要な臨床的用途を有する。したがって、この新規IL-17A/Fサイトカイン又はそのアゴニストは、免疫刺激として実用的な有用性を有し、一方IL-17A/Fの活性を阻害する分子 (アンタゴニスト) は、自己免疫疾患など、免疫反応の抑制が必要な場合に実用的有用性を有すると思われる。具体的には、IL-17A/Fの免疫学的活性を模倣する (アゴニスト抗体) か、又は阻害する (アンタゴニスト抗体) この新規サイトカインには、治療的資質が認められる。この新規サイトカインの活性を阻害するように作用する小分子も治療的使用の可能性を有する。

【0010】

(発明の概要)

A. 実施態様

本発明は、ヒトを含む、哺乳動物における免疫関連疾患の診断及び治療にとって有用な組成物及び方法に関する。本発明は、哺乳動物の免疫応答を刺激又は阻害するタンパク質 (アゴニスト及びアンタゴニスト抗体) の同定に基づいている。免疫関連疾患は、免疫応答を抑制又は高めることによって治療することができる。免疫応答を高める分子は、抗原に対する免疫応答を刺激又は増強する。免疫応答の向上が有益である場合には、免疫応答を刺激する分子は治療的に用いることができる。あるいは、免疫応答の緩和が有益である

10

20

30

40

50

場合には（例えば炎症）、抗原に対する免疫応答を和らげる又は減じる免疫応答を抑制する分子（例えば中和抗体）を治療的に用いることができる。従って、本発明の IL-17A/F ポリペプチド、並びにそのアゴニスト及びアンタゴニストもまた、免疫関連及び炎症疾患の治療のための医薬及び薬剤を調製するために有用である。特別な態様では、そのような医薬及び薬剤は、製薬的に許容可能な担体を有する IL-17A/F ポリペプチド、アゴニスト又はそのアンタゴニストの治療的有効量を含む。好ましくは、混合物は無菌である。

更なる実施態様では、本発明では、IL-17A/F ポリペプチドと候補化合物を接触させ、前記 IL-17A/F ポリペプチドによって媒介される生物活性をモニタリングすることを含む、IL-17A/F ポリペプチドのアゴニスト又は IL-17A/F ポリペプチドに対するアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、IL-17A/F ポリペプチドは、天然配列 IL-17A/F ポリペプチドである。特別な態様では、IL-17A/F アゴニスト又はアンタゴニストは、抗-IL-17A/F 抗体である。

【0011】

別の実施形態では、本発明は、IL-17A/F ポリペプチド、或いは担体又は賦形剤との混合物中のポリペプチドと結合するアゴニスト又はアンタゴニスト抗体を含んでなる組成物に関する。一態様では、組成物が免疫刺激分子を含む場合には、(a)それを必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を高めること、(b)それを必要とする哺乳動物での免疫応答を刺激又は高めること、(c)抗原に対する応答において、それを必要とする哺乳動物でのTリンパ球の増殖を増加させること、(e)血管透過性を増加させることのために、この組成物は有用である。更なる態様では、この組成物が免疫阻害分子を含む場合には、(a)それを必要とする哺乳動物の組織への炎症細胞の浸潤を低下させること、(b)それを必要とする哺乳動物での免疫応答を阻害又は減じること、(c)Tリンパ球の活性を低下させること、或いは(d)抗原に対する応答において、それを必要とする哺乳動物でのTリンパ球の増殖を低下させることのために、この組成物は有用である。その他の態様では、この組成物は更に活性成分を含み、それは、例えば、更なる抗体、或いは細胞毒性又は化学療法剤であってもよい。好ましくは、この組成物は無菌である。

別の実施態様では、本発明は、治療を必要とする哺乳動物における免疫関連疾患を治療する方法に関する。この方法は、IL-17A/F ポリペプチド、そのアゴニスト、又はそれに対するアンタゴニストの治療的有効量を哺乳動物へ投与することを含んでなる。好ましい態様では、免疫関連疾患は、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、変形関節炎、若年型慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症、特発性炎症性筋疾患、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、糖尿病、免疫媒介腎疾患、中枢及び末梢神経系の脱髓疾患例えば多発性硬化症、特発性脱髓多発神経障害又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症性脱髓性多発神経障害、肝胆道疾患例えば感染性、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患、グルテン過敏性腸疾患、及びウィップル病、水疱性皮膚病を含む自己免疫性又は免疫媒介皮膚疾患、多形滲出性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患例えば喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹、肺の免疫疾患例えば好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主病を含む移植関連疾患から成る群から選択される。

【0012】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記に記載のポリペプチドの何れかに特異的に結合する抗体を提供する。随意的には、この抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。一態様では、本発明は、IL-17A/F ポリペプチドと結合する単離された抗体に関する。その他の態様では、抗体は IL-17A/F ポリペプチド（アゴニスト抗体）の活性を模倣するか、或いは逆に抗体は IL-17A/F ポリペプチド（アンタゴニスト抗体）の活性を阻害又は中和する。その他の態様では、この抗体はモノクローナル抗体であり、それは好ましくは非ヒトの相補性決定領域（CDR）及びヒトフレームワーク領域（FR）残基を有する。抗体はラベル化されてもよいし、固

10

20

30

40

50

体支持体へ固定されてもよい。更なる態様では、抗体は抗体断片、モノクローナル抗体、一本鎖抗体、又は抗-イディオタイプ抗体である。

別の態様において、抗体断片又は一本鎖抗体は、図6の配列番号9、配列番号10；配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、及び配列番号42に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されたF_{ab}断片を含み、前記F_{ab}断片は更に、配列番号9～42のアミノ酸残基7～16から構成されるCDR-H1、配列番号9～42のアミノ酸残基30～46から構成されるCDR-H2、及び配列番号9～42のアミノ酸残基78～少なくとも96から構成されるCDR-H3よりなる3つの重鎖可変領域を含み、前記F_{ab}断片はIL-17A/Fに対する結合能を有する。

別の態様では、抗体断片又は一本鎖抗体は、図6の配列番号9、配列番号10；配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、及び配列番号42に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されたF_{ab}断片を含み、前記F_{ab}断片は更に、配列番号9～42のアミノ酸残基7～16から構成されるCDR-H1、及び配列番号9～42のアミノ酸残基30～46から構成されるCDR-H2を含む重鎖可変領域を少なくとも含み、前記F_{ab}断片はIL-17A/Fに対する結合能を有する。

別の態様では、抗体断片又は一本鎖抗体は、図6の配列番号9、配列番号10；配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、及び配列番号42に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されたF_{ab}断片を含み、前記F_{ab}断片は更に、配列番号9～42のアミノ酸残基7～16から構成されるCDR-H1、及び配列番号9～42のアミノ酸残基78～少なくとも96から構成されるCDR-H3を含む重鎖可変領域を少なくとも含み、前記F_{ab}断片はIL-17A/Fに対する結合能を有する。

別の態様では、抗体断片又は一本鎖抗体は、図6の配列番号9、配列番号10；配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、及び配列番号42に示されるアミノ酸配列からなる群から選択されたF_{ab}断片を含み、前記F_{ab}断片は更に、配列番号9～42のアミノ酸残基30～46から構成されるCDR-H2、及び配列番号9～42のアミノ酸残基78～少なくとも96から構成されるCDR-H3を含む重鎖可変領域を少なくとも含み、前記F_{ab}断片はIL-17A/Fに対する結合能を有する。

別の態様では、抗体断片又は一本鎖抗体は、図6の配列番号9、配列番号10；配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、

10

20

30

40

50

配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、及び配列番号 4 2 に示されるアミノ酸配列からなる群から選択された F a b 断片を含み、前記 F a b 断片は更に、配列番号 9 ~ 4 2 のアミノ酸残基 7 ~ 1 6 から構成される C D R - H 1、配列番号 9 ~ 4 2 のアミノ酸残基 3 0 ~ 4 6 から構成される C D R - H 2、及び配列番号 9 ~ 4 2 のアミノ酸残基 7 8 ~ 少なくとも 9 6 から構成される C D R - H 3 を含む重鎖可変領域のうち少なくとも 1 つを含み、前記 F a b 断片は I L - 1 7 A / F に対する結合能を有する。

別の態様では、配列番号 9、配列番号 1 0；配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、又は配列番号 4 2 の前記 C D R - H 1 領域は、アミノ酸配列 G F T I に対応するアミノ酸残基 7 ~ 1 0 (本明細書で配列番号 7 7 と示す) を少なくとも含み、前記配列番号 7 7 は I L - 1 7 A / F に対する結合能を有する。

別の態様では、配列番号 9、配列番号 1 0；配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、又は配列番号 4 2 の前記 C D R - H 2 領域は、アミノ酸配列 Y A D S V K に対応するアミノ酸残基 4 1 ~ 4 6 (本明細書配列番号 7 8 と示す) を少なくとも含み、前記配列番号 7 8 は I L - 1 7 A / F に対する結合能を有する。

【 0 0 1 3 】

また別の実施形態では、本発明は、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 8、配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 3、配列番号 7 4、配列番号 7 5 及び配列番号 7 6 のスクレオチド配列よりなる群から選択された单離された核酸分子に関し、前記核酸分子は配列番号 9、配列番号 1 0；配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、又は配列番号 4 2 に示された F a b 断片をコードし、前記 F a b 断片は I L - 1 7 A / F に対する結合能を有する。

別の態様では、本発明は上述したようなアミノ酸配列をコードする核酸によってコードされる I L - 1 7 A / F に対する結合能を有する单離された F a b 断片を提供する。そのような F a b 断片の生産方法も開示され、それら方法では、適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を前記 F a b 断片の発現に適した条件下で培養し、細胞培養物から前記 F a b 断片を回収する。

【 0 0 1 4 】

また別の実施態様では、本発明は、製薬的に許容可能な担体との混合物である抗 - I L

- 17 A / F 抗体を含んでなる組成物を提供する。一態様では、この組成物は治療的に有効量の抗体を含む。好ましくは、この組成物は無菌である。この組成物は、液体である製薬的製剤の形で投与され、それは貯蔵安定性を完遂できるように保存されてもよい。あるいは、この抗体は、モノクローナル抗体、抗体断片、ヒト化抗体、又は一本鎖抗体である。

さらなる実施態様において、本発明は：

- (a) IL - 17 A / F ポリペプチド又はアゴニスト、アンタゴニスト、或いはその前記ポリペプチドと特異的に結合する抗体；
- (b) 前記組成物を収容する容器；並びに
- (c) 前記容器に添付されるラベル、又は免疫関連疾患の治療における前記 IL - 17 A / F ポリペプチド又はアゴニスト又はそのアンタゴニストの使用を記した前記製薬品に含まれる包装挿入物を含んでなる製造品に関する。この組成物は、IL - 17 A / F ポリペプチド、或いはアゴニスト又はそのアンタゴニストの治療的有効量を含みうる。

【0015】

また別の実施態様では、本発明は、(a) 哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料、並びに(b) 同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料から IL - 17 A / F ポリペプチドをコードする遺伝子の発現のレベルを検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法に関する。この方法では、コントロール試料と比較して試験試料でのより高い又は低い発現レベルが、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

別の実施態様では、本発明は、試験試料において、(a) 哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料と抗-IL - 17 A / F 抗体を接触せしめ、並びに(b) この抗体とIL - 17 A / F ポリペプチド間の複合体の形成を検出することを含んでなる、哺乳動物における免疫疾患を診断する方法に関する。この方法では、前記複合体の形成が、前記疾患の存在の有無を示す。検出は定性的又は定量的であってもよく、同じ細胞型の既知の正常組織細胞のコントロール試料における複合体の形成のモニターリングと比較して行われる。試験試料における多量の形成された複合体は、試験組織細胞が得られた哺乳動物における免疫疾患の存在の有無を示す。抗体は、好ましくは検出可能なラベルを有する。複合体の形成は、例えば、光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、或いは当該分野で知られている他の技術によってモニターすることができる。試験試料は、通常は、免疫系に欠損又は異常を有する個人から得られる。

【0016】

その他の実施態様では、本発明は、IL - 17 A / F ポリペプチドを含有すると思われる細胞の試験試料を抗-IL - 17 A / F 抗体へ曝露し、前記抗体の前記細胞試料への結合を測定することを含んでなる、試料中のIL - 17 A / F ポリペプチドの存在を測定する方法を示す。特別な態様では、この試料はIL - 17 A / F ポリペプチドを含有すると思われる細胞を含み、抗体は細胞へ結合する。この抗体は、好ましくは検出可能にラベルされていて並びに/又は固体支持体へ結合している。

別の実施態様では、本発明は、抗-IL - 17 A / F 抗体並びに適切な包装体に含まれる担体を含んでなる、免疫関連疾患診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、IL - 17 A / F ポリペプチドを検出するために抗体を用いるための指示書を含む。好ましくは、この担体は製薬的に許容可能である。

【0017】

別の実施態様では、本発明は、適切な包装体に含まれる抗-IL - 17 A / F 抗体を含有する診断用キットに関する。このキットは、好ましくは、この抗体をIL - 17 A / F ポリペプチドを検出するために用いるための指示書を含む。

別の実施態様では、本発明は、哺乳動物から得られた組織細胞の試験試料におけるIL - 17 A / F ポリペプチドの存在有無を検出することを含む、哺乳動物における免疫関連疾患を診断する方法を示し、その方法では、前記試験試料におけるIL - 17 A / F ポリペプチドの存否を検出することが、前記哺乳動物における免疫関連疾患の存在を示す。

10

20

30

40

50

【0018】

別の実施態様では、本発明は：

(a) 通常は、IL-17A/Fポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導のために適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させること；並びに

(b) 前記細胞応答が有効アゴニストである前記試験化合物の徴候である場合に、試験化合物が有効アゴニストであるかどうかを確定するために、前記細胞応答の誘導を測定することを含んでなる、IL-17A/Fポリペプチドのアゴニストを同定する方法に関する。

その他の実施態様では、本発明は、候補化合物とIL-17A/Fポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡ってこの二つの成分を接触させること、並びにIL-17A/Fポリペプチドの活性が阻害されるかどうかを測定することを含んでなる、IL-17A/Fポリペプチドの活性を阻害することが可能な化合物を同定する方法に関する。特別な態様では、候補化合物又はIL-17A/Fポリペプチドのいずれかが固体支持体上に固定されている。その他の態様では、非固定化成分は検出可能なラベルを有する。好ましい態様では、この方法は：

(a) 通常は、IL-17A/Fポリペプチドによって誘導される細胞応答の誘導のために適した条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させること；並びに

(b) 試験化合物が有効アンタゴニストであるかどうかを確定するために、前記細胞応答の誘導を測定する段階を含む。

【0019】

別の実施態様では、本発明は、細胞と試験化合物を接触せしめて、IL-17A/Fポリペプチドの発現が阻害されるかどうかを確定することを方法が含む場合に、通常はポリペプチドを発現する細胞において、IL-17A/Fポリペプチドの発現を阻害する化合物を同定する方法を示す。好ましい態様では、この方法は：

(a) IL-17A/Fポリペプチドの発現を可能にする条件下でスクリーニングされる試験化合物と細胞を接触させること；並びに (b) 前記ポリペプチドの発現の阻害を測定する段階を含む。

また別の実施形態では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、(b) IL-17A/Fポリペプチドのアゴニスト、又は(c) IL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストのいずれかをコードする核酸分子を哺乳動物へ投与することを含んでなる、免疫関連疾患を患っている哺乳動物においてこの疾患を治療する方法に関する。この方法では、アゴニスト及びアンタゴニストが抗-IL-17A/Fポリペプチドであってもよい。好ましい実施態様では、この哺乳動物はヒトである。別の好ましい実施態様では、この核酸はエキソビオ(生体外)遺伝子治療を経由して投与される。更なる好ましい実施態様では、この核酸は、ベクター、より好ましくはアデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レンチウイルス又はレトロウイルスベクターである。

【0020】

また別の態様では、本発明は、プロモーター、(a) IL-17A/Fポリペプチド、(b) IL-17A/Fポリペプチドのアゴニスト、又は(c) IL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列で必須として構成されるウイルスベクターを含んでなる組み換えウイルス粒子を提供する。この方法では、ウイルスベクターがウイルス構造タンパク質に関連する。好ましくは、シグナル配列は哺乳動物、例えば天然IL-17A/Fポリペプチドからのものである。

更なる実施態様では、本発明は、レトロウイルス構造タンパク質を発現する核酸作成物を含んでなるエキソビオ産生細胞に関する。そしてプロモーター、(a) IL-17A/Fポリペプチド、(b) IL-17A/Fポリペプチドのアゴニスト、又は(c) IL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストをコードする核酸、並びにポリペプチドの細胞分泌のためのシグナル配列で必須として構成されるレトロウイルスベクターをも含み、この方法では、前記産生細胞は、組み換えレトロウイルス粒子を生産するように、構造タン

10

20

30

40

50

パク質と関連するレトロウイルスベクターを包み込んでいる。

【0021】

更なる実施態様では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、又は(b) IL-17A/Fポリペプチドのアゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなる、哺乳動物の組織への脈管構造からの炎症性細胞の浸潤を高める方法を提供する。この方法では、哺乳動物における脈管構造からの炎症性細胞の浸潤が高まる。

更なる実施態様では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、又は(b) IL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなる、哺乳動物の組織への脈管構造からの炎症性細胞の浸潤を減少させる方法を提供する。この方法では、哺乳動物における脈管構造からの炎症性細胞の浸潤が減少する。

10

【0022】

更なる実施態様では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、又は(b) IL-17A/Fポリペプチドのアゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の活性を増加させる方法を提供する。この方法では、哺乳動物におけるTリンパ球の活性が増加する。

更なる実施態様では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、又は(b) IL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の活性を減少させる方法を提供する。この方法では、哺乳動物におけるTリンパ球の活性が減少する。

20

【0023】

更なる実施態様では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、又は(b) IL-17A/Fポリペプチドのアゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖を増加させる方法を提供する。この方法では、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖が増加する。

更なる実施態様では、本発明は、(a) IL-17A/Fポリペプチド、又は(b) IL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストを哺乳動物へ投与することを含んでなる、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖を減少させる方法を提供する。この方法では、哺乳動物におけるTリンパ球の増殖が減少する。

【0024】

更なる実施態様では、IL-17A/Fポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニスト(例えば、抗-IL-17A/F)に対して応答性のある症状の治療に有用である薬剤の調製のための、IL-17A/Fポリペプチド、或いは前文に記載のそのアゴニスト又はアンタゴニスト、或いは抗-IL-17A/F抗体の利用に関する。特定の態様では、退行性軟骨性疾患を治療するための方法における、IL-17A/Fポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストの利用に関する。

30

更なる実施態様では、本発明は、退行性軟骨性疾患を患う哺乳動物へIL-17A/Fポリペプチド、アゴニスト、又はそのアンタゴニストの治療的有効量を投与することを含んでなる、前記哺乳動物における前記疾患を治療する方法に関連する。

更なる実施態様では、本発明は、退行性軟骨性疾患の治療において、製薬的に許容可能な担体との混合物であるIL-17A/Fポリペプチド、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニスト、前記組成物を含有する容器、並びに前記組成物の利用に言及する前記容器に添付されたラベルを含んでなる、キットに関連する。

40

【0025】

B. 更なる実施態様

本発明の他の実施態様では、本発明は、IL-17A/Fポリペプチドをコードする核酸配列を含んでなる単離された核酸分子を提供する。

一態様では、単離された核酸分子は、(a)ここに開示された完全長アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有するIL-17A/FポリペプチドをコードするDNA分子、或いは(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約

50

80 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を含む。

【0026】

一態様では、単離された核酸分子は、(a) ここに開示された完全長 I L - 17 A / F ポリペプチド c D N A のコード化配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く I L - 17 A / F ポリペプチドのコード化配列、或いはここに開示された完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片のコード化配列を含んでなる D N A 分子、或いは (b) (a) の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 80 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 99 % の核酸配列同一性を有しているヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を含む。

【0027】

更なる態様では、本発明は、本発明は、(a) ここに開示した A T C C へ寄託されているヒトタンパク質 c D N A のいずれかによってコードされているのと同じ成熟ポリペプチドをコードする D N A 分子、或いは (b) (a) の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 80 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 82 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 83 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 84 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 85 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 86 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 87 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 88 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 89 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 90 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 91 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 92 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 93 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 94 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 95 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 96 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 97 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 98 % の核酸配列同一性、さらにあるいは少なくとも約 99 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子に関する。

【0028】

別の実施態様は、I L - 17 A / F ポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体に關し、それらは、例えれば、場合によっては抗-I L - 17 A / F 抗体に対する結合部位を

含むポリペプチドをコードする I L - 1 7 A / F ポリペプチドのコード化断片のハイブリダイゼーションプローブとして、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブとしての用途が見いだされ得る。このような核酸断片は、通常は少なくとも約 2 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 3 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 4 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 7 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 8 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 9 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 1 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 2 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 3 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 4 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 6 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 7 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 8 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 9 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 2 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 2 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 3 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 3 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 4 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 4 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 5 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 7 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 8 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 9 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 0 0 0 ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参考する長さのプラス又はマイナス 1 0 % のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。I L - 1 7 A / F ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規な断片は、多くの良く知られた配列アラインメントプログラムの任意のものを用いて I L - 1 7 A / F ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、いずれのポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することにより、日常的な手法で同定してもよい。このようなポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の全ては、ここで考慮される。また、これらのヌクレオチド分子断片、好ましくは抗 - I L - 1 7 A / F 抗体に対する結合部位を含む I L - 1 7 A / F ポリペプチド断片によってコードされるポリペプチド断片も考慮される。

他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列の何れかによってコードされる単離された I L - 1 7 A / F ポリペプチドを提供する。

【 0 0 2 9 】

或る態様では、本発明は、ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、或いはここに開示した完全長アミノ酸配列のその他の具体的に定義された断片を有する I L - 1 7 A / F ポリペプチドに対して、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 4 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 5 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 6 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 7 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 8 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 9 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 1 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 2 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 3 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 4 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 5 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 6 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 7 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 8 % のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離された I L - 1 7 A / F ポリペプチドに関する。

さらなる態様では、本発明は、ここに開示した A T C C に寄託されているヒトタンパク質 c D N A のいずれかによってコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % のアミノ酸配列同

10

20

30

40

50

一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたIL-17A/Fポリペプチドに関する。 10

【0030】

さらなる態様では、本発明は、ここに開示した完全長アミノ酸配列、ここに開示したシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、或いはここに開示した完全長アミノ酸配列の他の具体的に定義された断片を有するIL-17A/Fポリペプチドと比較し、少なくとも約80%ポジティブ、あるいは少なくとも約81%ポジティブ、あるいは少なくとも約82%ポジティブ、あるいは少なくとも約83%ポジティブ、あるいは少なくとも約84%ポジティブ、あるいは少なくとも約85%ポジティブ、あるいは少なくとも約86%ポジティブ、あるいは少なくとも約87%ポジティブ、あるいは少なくとも約88%ポジティブ、あるいは少なくとも約89%ポジティブ、あるいは少なくとも約90%ポジティブ、あるいは少なくとも約91%ポジティブ、あるいは少なくとも約92%ポジティブ、あるいは少なくとも約93%ポジティブ、あるいは少なくとも約94%ポジティブ、あるいは少なくとも約95%ポジティブ、あるいは少なくとも約96%ポジティブ、あるいは少なくとも約97%ポジティブ、あるいは少なくとも約98%ポジティブ、そして、あるいは少なくとも約99%ポジティブのスコアとされるアミノ酸配列を含んでなる単離されたIL-17A/Fポリペプチドに関する。 20

特別な実施態様では、本発明は、N-末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを有しない、上記したようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる単離されたIL-17A/Fポリペプチドを提供する。それらを製造する方法もここに記載され、それらの方法は、適したなコード化核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞をIL-17A/Fポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養培地からIL-17A/Fポリペプチドを回収することを含む。 30

【0031】

別の実施態様では、本発明は、ここで定義される天然IL-17A/Fポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特別な実施態様では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-IL-17A/F抗体或いは小分子である。

さらなる実施態様では、本発明は、IL-17A/Fポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関し、それは、IL-17A/Fポリペプチドを候補分子と接触させ、前記IL-17A/Fポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターすることを含む。好ましくは、IL-17A/Fポリペプチドは天然IL-17A/Fポリペプチドである。 40

【0032】

またさらなる実施態様では、本発明は、IL-17A/Fポリペプチド、或いはここに記載したIL-17A/Fポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-IL-17A/F抗体を、担体と組み合わせて含んでなる組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容される担体である。

本発明のその他の実施態様は、IL-17A/Fポリペプチド、又は上記したようなそのアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗-IL-17A/F抗体を、IL-17A/Fポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴニスト又は抗-IL-17A/F抗体に対して反応する症状の治療において有用な医薬の調製のために用いることに関する。 50

【0033】

本発明のさらなる実施態様では、本発明は、ここに記載するポリペプチドの任意のいずれかをコードするDNAを含んでなるベクターを提供する。また、そのようなベクターのいずれかを含む宿主細胞が提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又はバキュウロウイルス感染昆虫細胞でもよい。ここに記載した任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供され、それは、宿主細胞を所望のポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、細胞培地から所望のポリペプチドを回収することを含む。

他の実施態様では、本発明は、異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合した、ここに記載した任意のポリペプチドを含んでなるキメラ分子を提供する。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列或いは免疫グロブリンのFc領域に融合したここに記載の任意のポリペプチドを含む。

【0034】

他の実施態様では、本発明は、任意の上記又は下記のポリペプチドと特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、この抗体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗体断片又は一本鎖抗体である。

さらに他の実施態様では、本発明は、ゲノム及びcDNAヌクレオチド配列又はアンチセンスプローブを単離するために有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供し、それらのプローブは上記又は下記のヌクレオチド配列の任意のものから誘導され得る。

【0035】

(好みしい実施態様の詳細な説明)

10

20

I. 定義

「天然配列IL-17A/Fポリペプチド」は、天然由来の対応するIL-17A/Fポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列IL-17A/Fポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列IL-17A/Fポリペプチド」という用語には、特に、特定のIL-17A/Fポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、自然に生じる変異形態(例えば、選択的にスプライシングされた形態)及びそのポリペプチドの自然に生じる対立遺伝子変異体が含まれる。本発明の種々の実施態様において、ここに開示されている天然配列IL-17A/Fポリペプチドは、関連する図に示されている完全長アミノ酸配列を含有する成熟又は完全長天然配列ポリペプチドである。開始及び終止コドンは、太い書体及び下線で図中に示されている。しかし、関連する図に開示されているIL-17A/Fポリペプチドがメチオニン残基で開始すると図のアミノ酸位置1において示されている一方で、図のアミノ酸位置1より上流又は下流のいずれかに位置する他のメチオニン残基が、IL-17A/Fポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられることが考えられるし可能である。

ここに開示する種々のIL-17A/Fポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書と添付の図面に示される。しかし、注記するように、シグナルペプチドのC-末端境界は変化しうるが、ここで最初に定義したようにシグナルペプチドC-末端境界のいずれかの側で約5アミノ酸未満である可能性が最も高く、シグナルペプチドのC-末端境界は、そのような型のアミノ酸配列成分を同定するのに日常的に使用される基準に従って同定しうる(例えば、Nielsenら, IL-17A/F t. Eng. 10: 1-6 (1997)及びvon Heijneら, Nucl. Acids. Res. 14: 4683-4690 (1986))。さらに、幾つかの場合には、分泌ポリペプチドからのシグナルペプチドの切断は完全に均一ではなく、1つ以上の分泌種をもたらすことも認められる。シグナルペプチドがここに定義されるシグナルペプチドのC-末端境界の何れかの側の約5アミノ酸未満内で切断されるこれらの成熟ポリペプチド、及びそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明で考慮される。

30

40

【0036】

「IL-17A/Fポリペプチド変異体」とは、上記又は下記に定義されるように、ここに開示される完全長天然配列IL-17A/Fポリペプチド、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列IL-17A/Fポリペプチド配列、又はここに開示さ

50

れた完全長 I L - 1 7 A / F ポリペプチドの他の断片と、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性を有する活性 I L - 1 7 A / F ポリペプチドを意味する。このような I L - 1 7 A / F ポリペプチド変異体には、例えば、完全長天然アミノ酸配列の N - 又は C - 末端において一つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失された I L - 1 7 A / F ポリペプチドが含まれる。通常、I L - 1 7 A / F ポリペプチド変異体は、ここに開示される完全長天然アミノ酸配列、ここに開示されたシグナルペプチドを欠く完全長天然配列 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列、又はここに開示された完全長 I L - 1 7 A / F ポリペプチドの特に同定された他の断片と、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 4 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 5 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 6 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 7 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 8 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 9 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 0 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 1 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 2 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 3 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 4 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 5 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 6 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 7 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 8 % のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有している。通常は、I L - 1 7 A / F 変異体ポリペプチドは、少なくとも約 1 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 2 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 3 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 4 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 5 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 6 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 7 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 8 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 9 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 1 0 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 1 5 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 2 0 0 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 3 0 0 アミノ酸長、又はそれ以上である。

ここに定義される I L - 1 7 A / F ポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、I L - 1 7 A / F ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウエアのような公に入手可能なコンピュータソフトウエアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表 1 に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、下記の表 1 に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510 0 87の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表 1 に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標) V4.0 Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【 0 0 3 7 】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与え

10

20

30

40

50

られたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の % アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる) は次のように計算される:

分率 X / Y の 100 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 の A 及び B のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さと異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた % アミノ酸配列同一性の計算の例として、表 2 及び 3 には、対象となる仮説的ポリペプチドのアミノ酸配列に対する、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の % アミノ酸配列同一性の計算方法が示されており、ここで「比較タンパク質」とは、対象となるポリペプチドの比較対象であるアミノ酸配列を表し、「X」、「Y」及び「Z」の各々は異なる仮説的アミノ酸残基を表す。

特に断らない限りは、ここでの全ての % アミノ酸配列同一性値は上記のように ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、% アミノ酸配列同一性値は、WU-BLAST-2 コンピュータプログラム (Altschulら, Methods in Enzymology 266: 10 460-480 (1996)) を用いて決定してもよい。さらに、殆どの WU-BLAST-2 検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する: オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値 (T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST2 が用いられた場合には、% アミノ酸配列同一性値は、(a) 天然ポリペプチドから誘導された配列を有する対象とするポリペプチドのアミノ酸配列と、対象とする比較アミノ酸配列 (即ち、対象とする I L - 17 A / F ポリペプチドの比較対象である配列であり、ポリペプチド変異体であってもよい)との間の、WU-BLAST-2 によって決定した一致する同一アミノ酸残基の数を、(b) 対象とするポリペプチドの残基の総数で除した商によって決定される。例えば、「アミノ酸配列 B に対して少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を持つ又は持っているアミノ酸配列 A を含んでなるポリペプチド」という表現では、アミノ酸配列 A は対象である「比較タンパク質」のアミノ酸配列であり、アミノ酸配列 B が対象であるポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0038】

また、% アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラム NCBI-BLAST2 (Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2 配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスタ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2 は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパス e-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62 を含む。

アミノ酸配列比較に NCBI-BLAST2 が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する % アミノ酸配列同一性 (あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の % アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言うこともできる) は次のように計算される:

分率 X / Y の 100 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム NCBI-BLAST2 の A 及び B のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さと異なる場合、A の B に対する % アミノ酸配列同一性は、B の A に対する % アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0039】

「I L - 17 A / F 変異体ポリヌクレオチド」又は「I L - 17 A / F 変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性 I L - 17 A / F ポリペプチドをコードし、且つ

10

20

30

40

50

ここに開示する完全長天然配列 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列、又はここに開示する完全長 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列の他の任意の断片をコードする核酸配列と少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性を有する核酸分子である。通常、 I L - 1 7 A / F 変異体ポリペプチドは、ここに開示する完全長天然配列 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列、ここに開示するシグナルペプチドを欠いた完全長天然配列 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列、又はここに開示する完全長 I L - 1 7 A / F ポリペプチド配列の他の任意の断片と、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、好ましくはあるいは少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有している。変異体は、天然ヌクレオチド配列を含まない。

通常は、 I L - 1 7 A / F 変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約 3 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 9 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 2 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 1 8 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 2 1 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 2 4 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 2 7 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 3 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 4 5 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 6 0 0 ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約 9 0 0 ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【 0 0 4 0 】

ここで同定される I L - 1 7 A / F コード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、 I L - 1 7 A / F 配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2プログラム用の完全なソースコードが下記の表1に提供されている配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、下記の表1に示したソースコードは米国著作権事務所、ワシントン D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510 087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテク社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能であり、下記の表1に提供されたソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標) V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

核酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられた核酸配列 C の、与えられた核酸配列 D との、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列 D と、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列 C と言うこともできる)は次のように計算される:

分率 W / Z の 1 0 0 倍

ここで、 W は配列アラインメントプログラムALIGN-2の C 及び D のアラインメントによっ

10

20

30

40

50

て同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さがアミノ酸配列Dの長さと異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%核酸配列同一性の計算の例として、表4及び5には、「IL-17A/F-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法が示され、ここで「IL-17A/F-DNA」は、仮説的IL-17A/Fコード化核酸配列を表し、「比較DNA」は、対象となる「IL-17A/F-DNA」核酸分子の比較対象である核酸分子のヌクレオチド配列を表し、「N」、「L」及び「V」の各々は異なる仮説的ヌクレオチドを表す。

【0041】

10

特に断らない限りは、ここでの全ての%核酸配列同一性値は、直上のパラグラフに示したようにALIGN-2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られる。しかしながら、%核酸配列同一性値は、WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschulら, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996))を用いて決定してもよい。さらに、殆どのWU-BLAST-2検索パラメータは初期値に設定される。初期値に設定されない、即ち調節可能なパラメータは以下の値に設定する：オーバーラップスパン = 1、オーバーラップフラクション = 0.125、ワード閾値(T) = 11、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62。WU-BLAST-2が用いられた場合、%核酸配列同一性値は、(a)天然配列IL-17A/Fポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有する対象とするIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列と、対象とする比較核酸配列(即ち、対象とするIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子が比較されるIL-17A/Fポリペプチド変異体であってもよい配列)との間の、WU-BLAST-2によって決定した一致する同一核酸残基の数を、(b)対象とするIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子のヌクレオチドの総数で除した商によって決定される。例えば、「核酸配列Bに対して少なくとも80%の核酸配列同一性を持つ又は持っている核酸配列Aを含んでなるポリペプチド」という表現では、核酸配列Aが対象とする比較核酸配列であり、核酸配列Bが対象とするIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

20

また、%核酸配列同一性は、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997))を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードでき、又は別な方法で米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 10、最小低複合長 = 15 / 5、マルチパスe-値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM62を含む。

30

【0042】

40

核酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される：

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

他の実施態様では、IL-17A/F変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性IL-17A/Fポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する完全長IL-17A/Fポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。IL-17A/F変異体ポリペプチドは、IL-17A/F変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

50

【0043】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたポリペプチドを意味する。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、(1)スピニングカップシーケンサーを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(2)クーマシープルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、IL-17A/Fポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサルツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

「単離された」IL-17A/Fポリペプチドコード化核酸は、同定され、IL-17A/Fポリペプチドをコードする核酸の天然源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離されたIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在するIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたIL-17A/Fポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるIL-17A/Fポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるIL-17A/Fポリペプチド核酸分子を含む。

【0044】

「コントロール配列」という表現は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、ブレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するブレタンパク質として発現されているなら、そのポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0045】

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的鎖がその融点に近いがそれより低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にすると、低い温度は緊縮性を低下させる。さらに、緊縮性は塩濃度に逆比例する。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubelら, Current IL-17A/F protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこ

10

20

30

40

50

と。

ここで定義される「ストリンジエント条件」又は「高度のストリンジエンシー条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温度を用いる、例えば、50度で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、42度で、50% (v/v) ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム；又は(3)42度で、50%ホルムアミド、5×SSC (0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50 μg/ml)、0.1% SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液を用い、42度で、0.2×SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中にて洗浄及び55度の50%ホルムアミド、ついで55度で、EDTAを含む0.1×SSCからなる10分間高ストリンジエンシー洗浄を用いるものによって同定される。

「中程度のストリンジエント条件」は、Sambrook等、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジエントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び% SDS)の使用を含む。中程度のストリンジエント条件は、20%ホルムアミド、5×SSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて37度の終夜インキュベーション、次いで1×SSC中にて約37-50度のフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識する。

【0046】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したIL-17A/Fポリペプチド、又はそれらのドメイン配列を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープ、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするIL-17A/Fポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～約50のアミノ酸残基(好ましくは約10～約20の残基)を有する。

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA (IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【0047】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然IL-17A/Fポリペプチドの生物学的活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然IL-17A/Fポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を指す。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然IL

10

20

30

40

50

- 17 A / F ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子、などを含む。IL-17 A / F ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、IL-17 A / F ポリペプチドを候補アンタゴニスト又はアゴニストと接触させ、IL-17 A / F ポリペプチドに通常は関連している一つ又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含んでもよい。

「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味し、患者は標的とする病理学的状態又はしつかんを防止又は低下（減少）させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。

【0048】

「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤を投与し、初期の治療効果（活性）を長時間に渡って維持することを意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ウサギなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0049】

一つ又は複数の治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時（同時期）及び任意の順序での連続した投与を含む。

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又は祖ルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商品名）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商品名）を含む。

【0050】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、例えば、単一の抗IL-17 A / F モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、多エピトープ（polyepitopic）特異性を持つ抗IL-17 A / F 抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗IL-17 A / F 抗体、及び所望する生物学的又は免疫学的活性を示す限りは抗IL-17 A / F 抗体の断片（下記を参照）を包含する。「免疫グロブリン」（Ig）という用語は、ここでの抗体と相互に置き換え可能に用いられる。

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、（1）ローリー（Lowry）法によって定量して95重量%以上の、最も好ましくは99重量%以上の抗体まで、（2）スピニングカップシーケンエーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは（3）クーマシープルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサルツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0051】

基本的な4-鎖抗体ユニットは2つの同一の軽（L）鎖と2つの同一の重（H）鎖から構成

10

20

30

40

50

されるヘテロ四量体の糖タンパクである(IgM抗体は、基本的なヘテロ四量体ユニットとそれに付随するJ鎖と称される付加的なポリペプチドの5つからなり、よって10の抗原結合部位を有するが、分泌されたIgA抗体は重合して、基本的4-鎖ユニットとそれ付随するJ鎖のうち2-5つを含む多価集合を形成可能である)。IgGの場合、4-鎖ユニットは一般的に約150000ダルトンである。それぞれのL鎖は1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に結合するが、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれのH及びL鎖はまた規則的な間隔を持った鎖内ジスルフィド結合を持つ。それぞれのH鎖は、及び鎖の各々に対しては3つの定常ドメイン(C_H)が、 μ 及びアイソタイプに対しては4つの C_H ドメインが続く可変ドメイン(V_H)をN末端に有する。それぞれのL鎖は、その他端に定常ドメイン(C_L)が続く可変ドメイン(V_L)をN末端に有する。 V_L は V_H と整列し、 C_L は重鎖の第一定常ドメイン(C_H 1)と整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。 V_L と V_H は共同して対になって、単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性は、例えばBasic and Clinical Immunology, 8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow(編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁及び6章を参照のこと。

任意の脊椎動物種からのL鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に区別される型の一つを割り当てることができる。また、その重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンには異なったクラス又はアイソタイプを割り当てることができる。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという免疫グロブリンの5つの主要なクラスがあり、それぞれ、 μ 及び γ 及び α と呼ばれる重鎖を有する。さらに γ 及び α のクラスは、 C_H 配列及び機能等の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えば、ヒトにおいては次のサブクラス:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2が発現する。

【0052】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が抗体の間で配列が広範囲に異なることを意味する。 V ドメインは抗原結合性を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110-アミノ酸スパンを通して均等には分布されていない。代わりに、 V 領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と称される極度の可変性を有するより短い領域によって分離された15-30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメイン各々は、大きな β -シート配置をとり、3つの高頻度可変領域により接続された4つのFR領域を含み、それはループ状の接続を形成し、 β -シート構造の一部を形成することもある。各鎖の高頻度可変領域はFRにより他の鎖からの高頻度可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ED. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係ないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害(ADCC)における抗体の寄与を示す。

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性の原因となる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(すなわち、 V_L においては、およそ残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及び V_H においては、およそ1-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))及び/又は「高度可変ループ」からの残基(例えば、 V_L においては、およそ残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)、及び V_H においては、およそ26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。

【0053】

10

20

30

40

50

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる自然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler等, *Nature* 256, 495 (1975)により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法によって、細菌、真核細胞動物又は植物細胞から作ることができる(例えば、米国特許第4 8 1 6 5 6 7号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson等, *Nature* 352:624-628(1991)、及びMarks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブリーから単離することもできる。

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4 8 1 6 5 6 7号; 及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984))。ここで対象のキメラ抗体には、非ヒト靈長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)から由来する可変ドメイン抗原-結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ(primatized)」抗体を含む。

【0054】

「無傷」の抗体は、抗原-結合部位、並びにC_L及び少なくとも重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2及びC_H3を含むものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、無傷の抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、F_ab、F_ab'、F(a b')₂、及びF_v断片；ダイアボディ(diabodies)；直鎖状抗体(米国特許第5 6 4 1 8 7 0号、実施例2；Zapata等, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995])；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0055】

抗体のペパイン消化は、「F_ab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残留「F_c」断片を産生する。F_ab断片は全長L鎖とH鎖の可変領域ドメイン(V_H)、及び一つの重鎖の第一定常ドメイン(C_H1)からなる。各F_ab断片は抗原結合性に関して一価である、すなわち単一の抗原-結合部位を有する。抗体のペプシン処理により、単一の大きなF(a b')₂断片が生じ、これは2価の抗原結合部位を持つ2つのジスルフィド結合されたF_ab断片にほぼ対応し、抗原を交差結合させることができるものである。F_ab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含むC_H1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりF_ab断片と相違する。F_ab'-S_Hは、ここでは定常ドメインのシステイン残基(類)が遊離のチオール基を持つF_ab'を表す。F(a b')₂抗体断片は、通常はF_ab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

F_c断片はジスルフィドにより一緒に保持されている双方のH鎖のカルボキシ末端部位を含む。抗体のエフェクター機能は、F_c領域の配列により決定され、その領域は、所定の型の細胞に見出されるF_cレセプター(F_cR)によって認識される部位である。

【0056】

10

20

30

40

50

「Fv」は、完全な抗原-認識及び-結合部位を含む最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの高頻度可変ループ(H及びL鎖から、それぞれ3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内に結合したV_H及びV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 以下を参照のこと。
。

【0057】

「ダイアボディ(diabodies)」という用語は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、V_HとV_Lドメインとの間に、短いリンカー(約5-10残基)を持つsFv断片(前の段落を参照)を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは2つの「交差」sFv断片のヘテロダイマーであり、そこでは2つの抗体のV_H及びV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号; 国際公開93/11161号; 及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により十分に記載されている。

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986); Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

【0058】

「種依存性抗体」、例えば哺乳動物抗-ヒトIgE抗体は、二番目の哺乳動物種からの抗原の相同体に対して有している結合親和性よりも、一番目の哺乳動物種からの抗原に対してより強力な結合親和性を有する抗体である。通常、種依存性抗体は、ヒト抗原(すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} 以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(Kd)値を有する)と「特異的に結合」するが、そのヒト抗原に対する結合親和性よりも、少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、二番目の非ヒト哺乳動物種からの抗原の相同体に対する結合親和性を有する。種依存性抗体は、上にて定義した種々の型の抗体のいずれでもあることが可能だが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

「IL-17A/F結合オリゴペプチド」はここで記載される様なIL-17A/Fポリペプチドに好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。IL-17A/F結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成方法論を用いて化学的に合成することがで

10

20

30

40

50

き、あるいは組み換え技術を用いて調製及び精製することができる。IL-17A/F結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、1-73、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なIL-17A/Fポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。IL-17A/F結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定することができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号；PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号；Geysen等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，81:3998-4002 (1984)；Geysen等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，82:178-182 (1985)；Geysen等，in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等，J. Immunol. Meth.，102:259-274 (1987)；Schoofs等，J. Immunol.，140:611-616 (1988)；Cwirla, S.E.等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman, H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks, J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。 10 20 30

【0059】

「IL-17A/F結合有機分子」とは、ここに記載されるようなIL-17A/Fポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。IL-17A/F結合有機分子は既知の方法（例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照）を用いて同定され、化学的に合成されうる。IL-17A/F結合有機分子は通常、約2000ダルトン未満の大きさであり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトン未満の大きさであり、ここに記載される様なIL-17A/Fポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのようない有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えばPCT公開第WO00/00823号及びWO00/39585号参照）。 40

対象の抗原、例えば腫瘍関連ポリペプチド抗原標的と「結合する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、その抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子がその抗原を発現している細胞又は組織を標的とする診断及び/又は治療剤として有用であり、他のタンパク質と有意には交差反応しないように十分な親和性でその抗原と結合するものである。そのような実施態様では、抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の「非標的」タンパク質との結合の程度は、蛍光標示式細胞分取器（FACS）分析又は放射免疫沈降（RIA）によって定量して、その特定の標的タンパク質との抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合の約10%よりも低い。標的分子への抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の結合に関して、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的な相互作用とは測定して異なる結合を意味する。特異的な結合は、例えば、一般に結合活性を持たない類似した構造の分子であるコントロール分子の結合性と比較して、分子の結合性を定量することによって測定することができる。例えば、特異的な結合性は 50

、標的、例えば過剰の非標識標的に類似したコントロール分子とも競合にとって定量することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されるならば、特異的結合が表示される。ここで使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープと「特異的に結合」又は「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、例えば標的に対して少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、あるいはそれ以上の K_d を持つ分子によって示されうる。一実施態様では、「特異的に結合する」という用語は、如何なる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへ実質的に結合することなく分子が特定のポリペプチド又は特定のポリペプチドのエピトープに結合する結合を意味する。

10

20

【0060】

「IL-17A/Fポリペプチドを発現する腫瘍細胞の成長を阻害する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子、又は「成長阻害」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、適切なIL-17A/Fポリペプチドを発現又は過剰発現する癌細胞の測定可能な程の成長阻害を引き起こすものである。好ましい成長阻害抗IL-17A/F抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、一般的には、試験された抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理されていない腫瘍細胞であるコントロールである、適切なコントロールと比較して、20%より多く、好ましくは約20%から約50%、そしてさらに好ましくは50%よりも多く（例えば、約50%から約100%）でIL-17A/F発現腫瘍細胞の成長を阻害する。一実施態様では、成長阻害は、細胞培養で約0.1から30μg/ml又は約0.5nMから200nMの抗体濃度で測定することができ、抗体への腫瘍細胞の曝露の後、成長阻害を1-10日で確かめる。インビボでの腫瘍細胞の成長阻害は、種々の方法で確かめることができる。約1μg/kgから約100mg/kg体重の抗IL-17A/F抗体の投与が、最初の抗体の投与から約5日から3ヶ月内、好ましくは約5から30日内に腫瘍の大きさ又は腫瘍細胞増殖に減少を引き起こす場合、抗体はインビボで成長阻害性である。

30

「アポトーシスを誘発する」抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び/又は膜小胞の形成（アポトーシス体と呼ばれる）等により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常、IL-17A/Fポリペプチドを過剰発現しているものである。好ましくは、細胞は腫瘍細胞、例えば前立腺、乳房、卵巣、胃、子宮内膜、肺、腎臓、結腸、膀胱細胞である。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン（PS）転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化はDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核/クロマチン凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、アネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子は、未処理細胞の約2~50倍、好ましくは約5~50倍、最も好ましくは約10~50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである。

40

40

【0061】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域（天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域）に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンリギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するFcレセプター（FcRs）と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗

50

原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害細胞を「備えて」おり、これはこのような死滅には絶対に必要なものである。ADCを媒介する主要な細胞NK細胞はFcR_{II}Iのみを発現するのに対し、単球はFcR_I、FcR_{II}I及びFcR_{II}Iを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADC活性は、例えば、Clynes等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビオで評価することが可能である。

10

20

30

【0062】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。好適なFcRは天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcR_I、FcR_{II}I及びFcR_{II}Iサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcR_{II}Iレセプターには、FcR_{II}A(「活性型レセプター」)及びFcR_{II}B(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcR_{II}Aは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcR_{II}Bは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。また、該用語には、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性レセプターFcRn(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976) Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994))も含まれる。

40

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。その細胞が少なくともFcR_{II}Iを発現し、ADCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

40

【0063】

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、「標識」抗体が生成されるように、抗体に直接又は間接的に抱合している検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身検出可能でもよく(例えば、放射性標識又は蛍光標識)、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

50

【0064】

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することができる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス(例えば、孔制御ガラス)

、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ；その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第4,275,149号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（IL-17A/Fポリペプチド又はその抗体など）の輸送に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

10

【0065】

用語「調節」手段とは、シグナル伝達経路のレベルに作用（例えば上方制御する、下方制御する、又はその他の方法で制御する）ことを意味する。シグナル伝達の制御下における細胞プロセスは、これらに限定されるものではないが、特異的遺伝子の転写、正常細胞機能、例えば代謝、増殖、分化、接着、アボトーシス及び生存、並びに形質転換、分化の遮断及び転移等の異常プロセスを含む。

ここでの目的に対する「活性な」又は「活性」とは、天然又は天然に生じるIL-17A/Fポリペプチドの生物学的及び／又は免疫学的活性を保持するIL-17A/Fポリペプチドの形態を意味し、その中で、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生IL-17A/Fポリペプチドが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力以外の、天然又は天然発生IL-17A/Fポリペプチドによって引き起こされる生物機能（阻害又は刺激）を意味し、「免疫」活性とは、天然又は天然発生IL-17A/Fポリペプチドが保持する抗原性エピトープに対する抗体の生産を誘発する能力を意味する。好みの生物活性には、NF-Bの活性化を誘導すること、並びに炎症誘発性ケモカインIL-8の生産の刺激が含まれる。その他の好みの生物活性には、末梢血単核細胞又はCD4⁺の刺激が含まれる。その他の生物活性には、例えば、THP1細胞からのTNF-の放出が含まれる。その他の活性には、関節軟骨でのマトリックス合成の増大が含まれる。あるいは、その他の活性には、マトリックス合成の阻害と並んで関節軟骨マトリックスの破壊の促進が含まれる。その他の好みの生物活性には、炎症性腸疾患の軽度から重度の段階の間、又は発作中のインターロイキン17シグナル伝達経路のレベルを調節することが含まれる。

20

【0066】

「免疫学的」活性とは、単に、天然又は天然発生IL-17A/Fポリペプチドによって保持されている抗原性エピトープに対する抗体の生成を誘導する能力を意味する。

「変性軟骨性疾患」は主に軟骨マトリックスの破壊によって特徴づけられる多くの疾患を記述している。更なる症状には、一酸化窒素の生成及びプロテオグリカン分解の上昇が含まれる。この定義に包含される疾患の例には、例えば関節炎（例えば、変形性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎）が含まれる。

30

【0067】

「免疫関連疾患」という用語は、哺乳動物の免疫系の構成成分が哺乳動物の病的状態を引き起こし、媒介し、或いは寄与する疾患を意味する。また、免疫反応の刺激又は処置が、疾患の進行に対して改善的な効果を有するような疾患をも含む。この用語には、免疫媒介炎症誘発性疾患、非免疫媒介炎症誘発性疾患、感染性疾患、免疫不全性疾患、腫瘍形成等が含まれる。

40

「T細胞媒介疾患」という用語は、T細胞が哺乳動物の病的状態を直接、又は間接に媒介する、或いは寄与する疾患を意味する。T細胞媒介疾患は、細胞媒介効果、リンホカイン媒介効果等、そして例えば、T細胞によって分泌されたリンホカインによってB細胞が刺激された場合に、B細胞と関連している効果にさえも関連している。

【0068】

そのうちの免疫又はT細胞媒介であり、本発明によって治療することが可能な免疫関連

50

及び炎症性疾患の例には、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、若年型慢性関節炎、脊椎関節症、全身性硬化症（強皮症）、特発性炎症性筋疾患（皮膚筋炎、多発性筋炎）、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間ヘモグロビン尿症）、自己免疫性血小板減少症（溶血性血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症）、甲状腺炎（バセドウ病、橋本甲状腺炎、若年型リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）、糖尿病、免疫媒介腎疾患（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）、中枢及び末梢神経系の脱髓疾患例えは多発性硬化症、特発性脱髓多発神経障害又はギラン・バレー症候群、及び慢性炎症性脱髓性多発神経障害、肝胆道疾患例えは感染性肝炎（A、B、C、D、E型肝炎、及び他の非肝親和性ウイルス）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎：クローン病）、グルテン過敏性腸疾患、及びウイップル病、水疱性皮膚病を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患、多形滲出性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬、アレルギー性疾患例えは喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び荨麻疹、肺の免疫疾患例えは好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺炎、拒絶反応及び移植片対宿主病を含む移植関連疾患が含まれる。感染症疾患には、ウイルス性疾患、例えはAIDS（HIV感染）、A、B、C、D及びE型肝炎、ヘルペス等、細菌感染症、真菌感染症、原虫感染症及び寄生虫症が含まれる。

10

20

30

40

50

【0069】

「有効量」とは、特に定まった目的を達成することを引き起こすIL-17A/Fポリペプチド及び/又はアゴニスト/アンタゴニストの濃度又は量である。更には、「治療的有効量」とは、定まった治療的有効量を達成するために効果的なIL-17A/Fポリペプチド及び/又はアゴニスト/アンタゴニストの濃度又は量である。また、この量は実験的に確定してもよい。

ここで用いられる「細胞傷害性剤」は、細胞の機能を阻害又は抑制し、及び/又は細胞破壊を起こす物質を意味する。この用語は、放射性同位元素（例えは、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰及びRe¹⁸⁶）、化学治療薬、及び細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素又はその断片を意味する。

【0070】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテバ、ブスルファン、タキソイド類、例えはパクリタキセル（タキソール、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）及びドセタキセル（docetaxel）（タキソール（Taxotere）、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）、トキソテール、メトトレキセート、シスプラチン、メルファラン、ビンプラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン（vinorelbine）、カルボプラチニン、テニポシド（teniposide）、ダウノマイシン、カルミノマイシン（carminomycin）、アミノブテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラミシン（esperamicins）（米国特許第4,675,187号参照）、メルファラン、及び他の関連したナイトロジエンマスターが含まれる。またこの定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働くホルモン剤、例えはタモキシフェン及びオナプリストーン（onapristone）も含まれる。

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、特にここで同定された任意の遺伝子を過剰発現する細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指すものである。よって、成長阻害剤とは、S期におけるそのような遺伝子の過剰発現細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。成長阻害剤の例には、細胞分裂周期の進行をブロックする薬剤（S期以外の場所において）、例えはG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ブロッカーには、ビンカ（ビンクリスチン及びビンプラスチン）、タキソール、及びトポI-IIインヒビター、例えはドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。G1を停止させるこれらの薬剤、例えはDNAアルキル化剤、例えはタモキシフェン、ブレド

ニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-CがS期停止へ波及する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞分裂周期の調節、オンコジーン、及び抗新生物薬(Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs)」と題された、癌の分子的基礎(The Molecular Basis of Cancer)、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

【0071】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えはヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)；肝臓成長因子；纖維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壞死因子-₁及び-₂；ミュラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF-₁等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF-₁あるいはTGF-₂のような形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-I及び-II；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン-₁、-₂、-₃、及び-₄のようなインターフェロン；マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)及び顆粒球CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1_a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、又はIL-17等のインターロイキン(IL)；腫瘍壞死因子、例えはTNF-₁又はTNF-₂；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0072】

表1

表1(続き)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define J MPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for delay) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
    /* limits seq to 2^16-1 */
};

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[J MPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[J MPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                main      20
{
    int      ac;
    char    *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    scqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    scqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;
30

    endgaps = 0;                                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";                         /* output file */

    nw();          /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();    /* get the actual jmps */
    print();       /* print stats, alignment */

    cleanup(0);      /* unlink any tmp files */
}

```

表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
    int       ndlx, delx;    /* keep track of delx */
    int       *tmp;          /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;           /* score for each type */
    int       ins0, ins1;    /* insertion penalties */
    register  id;           /* diagonal index */
    register  ij;           /* jmp index */
    register  *col0, *col1;  /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;       /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_malloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndlx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndlx = 0;
        }
    }
}

```

nw 10 20 30 40

表1(続き)

```

...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongoing del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

10

20

30

表1(続き)

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
```

10 20 30 40

表1(続き)

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

```

10

```
#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256      /* maximum output line */
#define P_SPC    3         /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;          /* set output line length */
FILE   *fx;            /* output file */

```

```
print()
{
    int      ix, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    ix = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) {                  /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) {             /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        ix -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) {                  /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        ix -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {             /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(ix, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int      lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap; /* leading/trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register int n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while (*p0 && *p1) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }
    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match% in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

10

20

30

40

WO 2005/010044

PCT/US2004/017581

表1(続き)

```

sprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);                                ...getmat
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",                                              10
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "": "s");
    sprintf(fx,"%s", outx);

    sprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",                                              20
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "": "s");
        sprintf(fx,"%s", outx);
    }
    if (dna)
        sprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        sprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        sprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "": "s",
            lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "": "s");
    else
        sprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */                                              30

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align() {                                              40
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].n[i]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[i]++;
                while (ni[i] == pp[i].n[i])
                    siz[i] += pp[i].n[i]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

```

...pr_align

10

20

30

dumpblock

40

表1(続き)

```

...dumpblock
(void)putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
{
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char  *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void)putc(*pn, fx);
    (void)putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int      ix;
{

```

10

nums

20

30

40

putline

表1(続き)

```

...putline
int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from i:
 * ni[] is current element (from i)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dma && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = ':';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

stars 20 30 40

10

表1(続き)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

10

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * geiseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
FILE *fj;

int cleanup();                         /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

cleanup
getseq

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

...getseq
py = pseq + 4;
*tlen = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
    char    *msg;           /* program, calling routine */
    int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char        *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int          fd = -1;
    int          siz, i0, i1;
    register int i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++ ) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].jmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

10

20

30

40

g_calloc

readjmps

表1(続き)

...readjmps

```

if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
    (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
    dx[dmax].jmp = MAXJMP-1;
}
else
    break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
    }
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
    i1++;
}
else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
    pp[0].n[i0] = siz;
    pp[0].x[i0] = xx;
    gapx++;
    ngapx += siz;
}
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
i0++;
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jmps
 */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
    int      ix;
{
    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

【 0 0 7 3 】

表2

IL-17A/F タンパク質	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数) ÷
 (IL-17A/F タンパク質の全アミノ酸残基の数) =

5 ÷ 15 = 33.3%

表3

IL-17A/F タンパク質	XXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

$$\frac{(\text{ALIGN-2} \text{によって決定した二つのポリペプチド配列間で等しく一致するアミノ酸残基の数})}{(\text{IL-17A/F タンパク質の全アミノ酸残基の数})} =$$

$$5 \div 10 = 50\%$$

表4

IL-17A/F-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ = 14 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(長さ = 16 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

$$\frac{(\text{ALIGN-2} \text{によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数})}{(\text{IL-17A/F-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数})} =$$

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

表5

IL-17A/F-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較DNA	NNNNLLLVV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

$$\frac{(\text{ALIGN-2} \text{によって決定した二つの核酸配列間で等しく一致するヌクレオチドの数})}{(\text{IL-17A/F-DNA 核酸配列の全ヌクレオチドの数})} =$$

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

【 0 0 7 4 】

I I . 本発明の組成物及び方法

10

20

30

40

50

A. 完全長 I L - 17 A / F ポリペプチド

本発明は、本出願で I L - 17 A / F ポリペプチドと呼ばれるポリペプチドをコードする新規に同定され単離された核酸配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、種々の I L - 17 A / F ポリペプチドをコードする c D N A が同定され単離された。

【0075】

B. I L - 17 A / F ポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列 I L - 17 A / F ポリペプチドに加えて、 I L - 17 A / F 变異体も調製できると考えられる。 I L - 17 A / F 变異体は、 I L - 17 A / F ポリペプチド D N A に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、あるいは所望の I L - 17 A / F ポリペプチドを合成することにより調製できる。当業者は、グリコシリ化部位の数又は位置の変化あるいは膜固着特性の変化などのアミノ酸変化が I L - 17 A / F ポリペプチドの翻訳後プロセスを変えうることを理解するであろう。

天然完全長配列 I L - 17 A / F 又はここに記載した I L - 17 A / F ポリペプチドの種々のドメインにおける変異は、例えば、米国特許第 5,364,934 号に記載されている保存的及び非保存的変異についての任意の技術及び指針を用いてなすことができる。変異は、結果として天然配列 I L - 17 A / F と比較して I L - 17 A / F ポリペプチドのアミノ酸配列が変化する I L - 17 A / F ポリペプチドをコードする一つ又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも 1 つのアミノ酸の I L - 17 A / F ポリペプチドの一つ又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。いずれのアミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されるかの指針は、 I L - 17 A / F ポリペプチドの配列を相同性の知られたタンパク質分子の配列と比較し、相同性の高い領域内でなされるアミノ酸配列変化を最小にすることによって見出される。アミノ酸置換は、 1 つのアミノ酸の類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができます。挿入及び欠失は、場合によっては 1 から 5 のアミノ酸の範囲内とすることができます。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、得られた変異体を下記の実施例に記載するインビトロアッセイの任意のもので活性について試験することにより決定される。

【0076】

I L - 17 A / F ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば、完全長天然タンパク質と比較した際に、 N - 末端又は C - 末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。或る種の断片は、 I L - 17 A / F ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

I L - 17 A / F 断片は、多くの従来技術の任意のものによって調製してよい。所望のペプチド断片は化学合成してもよい。代替的方法は、酵素的消化、例えば特定のアミノ酸残基によって決定される部位のタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素で D N A を消化して所望の断片を単離することによる I L - 17 A / F 断片の生成を含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により、所望のポリペプチド断片をコードする D N A 断片を単離し増幅することを含む。 D N A 断片の所望の末端を決定するオリゴヌクレオチドは、 P C R の 5' 及び 3' プライマーで用いられる。好ましくは、 I L - 17 A / F ポリペプチド断片は、ここに開示した天然 I L - 17 A / F ポリペプチドと少なくとも 1 つの生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

特別の実施態様では、対象とする保存的置換を、好ましい置換を先頭にして表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に例示的置換と名前を付けた又は以下にアミノ酸分類でさらに記載するように、より置換的な変化が導入され生成物がスクリーニングされる。

【0077】

表6

<u>元の残基</u>	<u>例示的置換</u>	<u>好ましい置換</u>
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

20

30

40

ポリペプチドの機能及び免疫学的同一性の置換的修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の嵩を維持しながら、それらの効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然発生残基は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, I L - 17 A / F；及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

【0078】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された（非保存）部位に導入される。

変異は、オリゴヌクレオチド媒介（部位特異的）突然変異誘発、アラニンスキャニング、及びPCR突然変異誘発 [Carterら, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zollerら, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)]、カセット突然変異誘発 [Wellsら, Gene, 34: 315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発 [Wellsら, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] 等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができ、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施してIL-17A/F変異体DNAを作成することもできる。

【0079】

また、隣接配列に沿って一つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャニングアミノ酸は比較的小さく、中性の

50

アミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させていくので、この群の中で典型的に好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham及びWells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い [Creighton, *The IL-17A / Fteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

【0080】

C. IL-17A / Fの修飾

10

IL-17A / Fポリペプチドの共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の1つの型は、IL-17A / Fポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、IL-17A / Fポリペプチドの選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応できる有機誘導体化試薬と反応させることである。二官能性試薬での誘導体化が、例えばIL-17A / Fを水不溶性支持体マトリクスあるいは抗-IL-17A / F抗体の精製方法又はその逆で用いるための表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダート等の試薬を含む。

20

【0081】

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の-N-アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, *IL-17A / Fteins: Structure and Molecular IL-17A / F properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

30

本発明の範囲内に含まれるIL-17A / Fポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」とは、ここで意図されるのは、天然配列IL-17A / Fに見られる一つ又は複数の炭水化物部分の欠失(存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び/又は天然配列IL-17A / Fに存在しない一つ又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。さらに、この文節は、存在する種々の炭水化物部分の性質及び特性の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

30

【0082】

IL-17A / Fポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴つてもよい。この変更は、例えば、一つ又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列IL-17A / F(O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。IL-17A / Fアミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、IL-17A / FポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

40

IL-17A / Fポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に発行されたWO87/05330、及びAppln及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0083】

IL-17A / Fポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的

50

に、あるいはグルコシル化の標的として提示されたアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、この分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)により、及びEdgarら, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら, Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

本発明のIL-17A/Fの共有結合的修飾の他の型は、IL-17A/Fポリペプチドの、種々の非タンパク質様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンの一つへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法での結合を含む。
10

また、本発明のIL-17A/Fポリペプチドは、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したIL-17A/Fポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法で修飾してもよい。

【0084】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとIL-17A/Fポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般的にはIL-17A/Fポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に位置する。このようなIL-17A/Fポリペプチドのエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってIL-17A/Fポリペプチドを容易に精製できるようになる。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体はこの分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン(ポリ-his)又はポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Fieldら, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evanら, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Paborskyら, IL-17A/Ftein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hoppら, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martinら, Science, 255:192-194 (1992)]；-チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら, IL-17A/Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。
20

【0085】

それに換わる実施態様では、キメラ分子はIL-17A/Fの免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも1つの可変領域に換えてIL-17A/Fポリペプチドの可溶化(膜貫通ドメイン欠失又は不活性化)形態を含む。特に好みの実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。
40

より更なる実施態様では、本発明のIL-17A/Fポリペプチドは、ロイシンジッパーに融合したIL-17A/Fポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法でも修飾してもよい。種々のロイシンジッパーポリペプチドがこの分野で記載されている。例えば、Landschulz等, Science, 240: 1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe等, FEBS Letters, 344: 1991 (1994); Maniatis等, Nature, 341: 24 (1989)を参照。IL-17A/F364ポリペプチドに融合したロイシンジッパーの使用は、溶液中の可溶性IL-17A/Fポリペプチドの二量体化又は三量体化を助けると考えられる。当業者は、ロイシンジッパー
50

ーが I L - 1 7 A / F 分子の N - 又は C - 末端のいずれかに融合することを認めるであろう。

【 0 0 8 6 】

D . I L - 1 7 A / F の調製

以下の説明は、主として、I L - 1 7 A / F 核酸を含むベクターで形質転換又はトランスフェクションされた細胞を培養することにより I L - 1 7 A / F を生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いて I L - 1 7 A / F を調製することができると考えられる。例えば、I L - 1 7 A / F 配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成によって生産してもよい [例えば、Stewartら, Solid -Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サン フランシスコ, カリフォルニア (1969) ; Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) 参照] 。手動技術又は自動によるインビトロタンパク質合成を行ってもよい。自動合成は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機 (フォスター シティー, カリフォルニア) を用いて、製造者の指示により実施してもよい。I L - 1 7 A / F の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて完全長 I L - 1 7 A / F を生産してもよい。

【 0 0 8 7 】

1 . I L - 1 7 A / F をコードする D N A の単離

I L - 1 7 A / F をコードする D N A は、I L - 1 7 A / F m R N A を保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製された c D N A ライブリから得ることができる。従って、ヒト I L - 1 7 A / F D N A は、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製された c D N A ライブリから簡便に得ることができる。また I L - 1 7 A / F - コード化遺伝子は、ゲノムライブリから又は公知の合成方法 (例えば、自動化核酸合成) により得ることもできる。

ライブリは、対象となる遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ (I L - 1 7 A / F に対する抗体又は少なくとも約 2 0 - 8 0 塩基のオリゴヌクレオチド等) によってスクリーニングできる。選択されたプローブによる c D N A 又はゲノムライブリのスクリーニングは、例えば Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989) に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。所望の I L - 1 7 A / F ポリペプチドをコードする遺伝子を単離する他の方法は P C R 法を使用するものである [Sambrookら, 上掲 ; Dieffenbachら, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)] 。

【 0 0 8 8 】

下記の実施例には、c D N A ライブリのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブリ内の D N A とのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³ ² P 標識された A T P のような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲の Sambrookら, に示されている。

このようなライブリースクリーニング法において同定された配列は、Genbankら, の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は完全長に渡っての (アミノ酸又は核酸レベルのいずれかでの) 配列同一性は、当該分野で知られた、及びここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード化配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、c D N A に逆転写されていない m R N A の生成中間体及び先駆物質を検出する上掲の Sambrookら, に記述されているような従来のプライマー伸展法を使

10

20

30

40

50

用して選択されたcDNA又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる。

【0089】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したIL-17A/F生産のための発現又はクローニングベクターでトランスフェクション又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991)及びSambrookら, 上掲に見出すことができる。 10

原核生物細胞トランスフェクション及び真核生物細胞トランスフェクションの方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrookら, に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トウメファシエンスによる感染が、Shawら, Gene, 23:315(1983)及び1989年6月29日公開のWO89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)のリン酸カルシウム沈降法が好ましい。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977)及びHsiaoら, IL-17A/F c. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)及びMansourら, Nature, 336:348-352 (1988)を参照のこと。 20

【0090】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446)；大腸菌X1776 (ATCC31,537)；大腸菌株W3110 (ATCC27,325)及びK5772 (ATCC53,635)である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、*E. coli*、エンテロバクター、エルビニア(Erwinia)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(IL-17A/F teus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス(Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿菌、例えばバチルス・スブチルス(*B. subtilis*)及びバチルス・リチエニフォルミス(*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266,710に記載されたバチルス・リチエニフォルミス41P)、シユードモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定的なものではなく、例示的である。株W3110は、組換えIL-17A/F産物発酵のための共通の宿主株であるので一つの特に好ましい宿主又は親宿主である。好ましくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型tonA ptr3を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lacZ)169 de 40

g P ompT kan'を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244) ; 完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan'を有する大腸菌W3110株37D6 ; 非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4 ; 及び1990年8月7日発行米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインピット法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

【0091】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、IL-17A/Fポリペプチドコード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシアは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセス・プロンブ(Schizosaccharomyces IL-17A/F mbe) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985年5月2日発行のEP139,383) ; クルベロミセス宿主(Kluveromyces hosts) (米国特許第4,943,529号; Fleerら, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクルベロミセスラクチス(K. lactis) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourtら, J. Bacteriol. 154(2): 737-742 [1983])、クルベロミセス・フラギリス(K. fragilis) (ATCC 12,424)、クルベロミセス・ブルガリクス(K. bulgaricus) (ATCC 16,045)、クルベロミセス・ウィケラミイ(K. wickeramii) (ATCC 24,178)、クルベロミセスワルチイ(K. waltii) (ATCC 56,500)、クルベロミセス・ドロソフィラルム(K. drosophilae) (ATCC 36,906; Van den Bergら, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クルベロミセス・テモトレラヌス(K. thermotolerans)及びクルベロミセス・マルキシアナス(K. marxi) ; ヤロウイア(yarrowia) (EP 402,226) ; ピチア・パストリス(Pichia pastoris) (EP 183,070; Sreekrishnaら, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]) ; カンジダ；トリコデル・マレーシア(Trichoderma reesia) (EP 244,234) ; アカパンカビ(Caseら, IL-17A/Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]) ; シュワニオマイセス(Schwanniomyces)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis) (1990年10月31日発行のEP394,538) ; 及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ペニシリウム、トリポクラジウム(Tolypocladium) (1991年1月10日発行のWO91/00357) ; 及びアスペルギルス宿主、例えばアスペルギルス・ニダランス(Ballanceら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburnら, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yeltonら, IL-17A/Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー(Kelly及びHynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985])が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック(C1化合物資化性、Methylotropic)酵母は、これらに限られないが、ハンセヌラ(Hansenula)、カンジダ、クロエケラ(Kloeckera)、ピチア(Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス(Torulopsis)、及びロドトルラ(Rhodotorula)からなる属から選択されたメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)に記載されている。

【0092】

グリコシリ化IL-17A/Fの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエS2及びスプドスペラSf9等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)及びCOS細胞を含む。より詳細な例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Grahamら, J. Gen Virol., 36:59 (1977)) ;チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHF R(CHO, Urlaub及びChasin, IL-17A/Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. ReIL-17A/Fd., 23:243-251 (1980))ヒト肺細胞(W1

10

20

30

40

50

38, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51)を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0093】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

IL-17A/Fポリペプチドをコードする核酸(例えば、cDNA又はゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができます。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNAはこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、一つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、一つ又は複数のマークー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の一つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

IL-17A/Fポリペプチドは直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入されるIL-17A/F-コード化DNAの一部である。シグナル配列は、例えばアルカリフォスファターゼ、ペニシリナーゼ、1ppあるいは熱安定性エンテロトキシンリーダーの群から選択された原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー(サッカロミセス(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces)因子リーダーを含み、後者は米国特許第5,010,182号に記載されている)、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー(1990年4月4日発行のEP 362179)、又は1990年11月15日に公開されたWO 90/13646に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

【0094】

発現及びクローニングベクターは、共に一つ又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、HSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選べるマークーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素、例えば桿菌のD-アラニンラセマーゼをコードしている遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

【0095】

哺乳動物細胞に適切な選べるマークーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのようにIL-17A/F-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することができるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、UrlaubらによりIL-17A/F c. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcombら, Nature, 282: 39(1979); Kingsmanら, Gene, 7: 141(1979); Tschemperら, Ge

10

20

30

40

50

ne, 10 : 157 (1980)]。trp 1 遺伝子は、例えば、ATCC 番号 44076 あるいは PEP 4-1 のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

発現及びクローニングベクターは、通常、IL-17A / F-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA 合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識される好適なプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは - ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系 [Changら, Nature, 275:615 (1978); Goeddelら, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリフォスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えば tac プロモーター [deBoerら, IL-17A / Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] を含む。細菌系で使用するプロモータもまた IL-17A / F ポリペプチドをコードする DNA と作用可能に結合したシヤイン - ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

【0096】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ [Hitzemanら, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 又は他の糖分解酵素 [Hessら, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1987)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸フォスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモータは EP 73, 657 に更に記載されている。

【0097】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの IL-17A / F ポリペプチド転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス (1989年7月5日公開の UK 2, 211, 504)、アデノウィルス (例えばアデノウィルス 2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B 型肝炎ウィルス及びサルウィルス 40 (SV 40) のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

より高等の真核生物による所望の IL-17A / F ポリペプチドをコードする DNA の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約 10 から 300 塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強する DNA のシス作動要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている (グロビン、エラスターーゼ、アルブミン、-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の SV 40 エンハンサー (100 - 270 塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、IL-17A / F コード化配列の 5' 又は 3' 位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから 5' 位に位置している。

【0098】

また、真核生物宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞) に用いられる発現ベクターは、転写の終結及び mRNA の安定化に必要

10

20

30

40

50

な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの通常は5'、時には3'の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、IL-17A/FポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養でのIL-17A/Fポリペプチドの合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, *Nature*, 293:620-625 (1981); Manteiら, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP117, 060; 及びEP117, 058に記載されている。

【0099】

4. 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び/又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, IL-17A/F c. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、ドットプロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることもできる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点での二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び/又はアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列IL-17A/Fポリペプチドに対して、又はここで提供されるDNA配列をベースとした合成ペプチドに対して、又はIL-17A/F DNAに融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【0100】

5. ポリペプチドの精製

IL-17A/Fポリペプチドの形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液(例えばトリトン-X100)又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。IL-17A/Fポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

IL-17A/Fポリペプチドを、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えばDEAEによるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックスG-75を用いるゲルfiltration；IgGのような汚染物を除くプロテインAセファロースカラム；及びIL-17A/Fポリペプチドのエピトープ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutscher, *Methodes in Enzymology*, 182(1990); Scopes, *IL-17A/F protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982)に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定のIL-17A/Fの性質に依存する。

【0101】

E. IL-17A/Fの用途

IL-17A/Fをコードする核酸配列(又はそれらの補体)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンスRNA及びDNAの生成において種々の用途を有している。また、IL-17A/F核酸も、ここに記載される組換え技術によるIL-17A/F

10

20

30

40

50

ポリペプチドの調製に有用である。

完全長天然配列 I L - 1 7 A / F 遺伝子又はその一部は、完全長 I L - 1 7 A / F c D N A の単離又はここに開示した I L - 1 7 A / F 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の遺伝子（例えば、I L - 1 7 A / F の天然発生変異体又は他の種からの I L - 1 7 A / F をコードするもの）の単離のための c D N A ライブライアリ用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約 20 ~ 約 50 塩基である。ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に完全長天然ヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列 I L - 1 7 A / F のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。例えば、スクリーニング法は、I L - 1 7 A / F ポリペプチド遺伝子のコード化領域を周知の D N A 配列を用いて単離して約 40 塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、³² P 又は³⁵ S 等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン / ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明の I L - 1 7 A / F ポリペプチド遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒト c D N A、ゲノム D N A 又は m R N A のライブライアリをスクリーニングし、そのライブライアリの何れのメンバーがプローブにハイブリッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

【 0 1 0 2 】

本出願で開示する任意の E S T はプローブと同様に、ここに記載した方法で用いることができる。

I L - 1 7 A / F 核酸の他の有用な断片は、標的 I L - 1 7 A / F m R N A (センス) 又は I L - 1 7 A / F D N A (アンチセンス) 配列に結合できる一本鎖核酸配列 (R N A 又は D N A のいずれか) を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によると、I L - 1 7 A / F D N A のコード化領域の断片を含む。このような断片は、一般的には少なくとも約 14 ヌクレオチド、好ましくは約 14 から 30 ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードする c D N A 配列に基づく、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを制御する可能性は、例えば、Stein 及び Cohen (Cancer Res. 48: 2659: 1988) 及び van der Krol ら, (BioTechniques 6: 958, 1988) に記載されている。

【 0 1 0 3 】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の期外停止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、I L - 1 7 A / F タンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格 (又は他の糖結合、W O 9 1 / 0 6 6 2 9 に記載のもの等) を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが (即ち、酵素分解に耐えうるが) 、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、W O 9 0 / 1 0 0 4 8 に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ - (L - リジン) に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤、アルキル化剤又は金属作体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

【 0 1 0 4 】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、C a P O₄ - 媒介 D N A トランسفェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン - バーウイルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列

10

20

30

40

50

を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルスM-MuLVから誘導されるもの、N2(M-MuLVから誘導されたレトロウイルス)、又はDCT5A、DCT5B及びDCT5Cと命名されたダブルコピーベクター(WO90/13641参照)を含む。

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO91/04753に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

【0105】

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO90/10448に記載されたように、オリゴヌクレオチド-脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド-脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

アンチセンスRNA又はDNA分子は一般に少なくとも約5塩基長、約10塩基長、約15塩基長、約20塩基長、約25塩基長、約30塩基長、約35塩基長、約40塩基長、約45塩基長、約50塩基長、約55塩基長、約60塩基長、約65塩基長、約70塩基長、約75塩基長、約80塩基長、約85塩基長、約90塩基長、約95塩基長、約100塩基長、あるいはそれ以上である。

また、プローブは、PCR技術に用いて、密接に関連したIL-17A/Fコード化配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、IL-17A/Fをコードするヌクレオチド配列は、そのIL-17A/Fをコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサイツハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリーでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

【0106】

IL-17A/Fのコード化配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合(例えば、タンパク質がレセプターである場合)、タンパク質は、そのリガンドを同定するアッセイに用いることができる。このような方法により、レセプター/リガンド結合性相互作用の阻害剤を同定することができる。このような結合性相互作用に含まれるタンパク質も、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプタータンパク質は関連するリガンドの単離にも使用できる。スクリーニングアッセイは、天然IL-17A/F又はIL-17A/Fのレセプターの生物学的活性に似たリード化合物の発見のために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングにも用いられ、小分子候補薬剤の同定に特に適したものとする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く特徴付けられているされているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。

【0107】

また、IL-17A/F又はその任意の修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物のいずれかを产生することに使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えばマ

10

20

30

40

50

ウス又はラット)とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれたDNAである。一実施形態では、IL-17A/FをコードするcDNAは、IL-17A/FをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用するゲノム配列及び確立された技術に基づいて、IL-17A/FをコードするゲノムDNAをクローニングするために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を產生する方法は、当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第4,736,866号や第4,870,009号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでのIL-17A/F導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入されたIL-17A/Fコード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物はIL-17A/FをコードするDNAの増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスター動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療上の処置の可能性が示される。

【0108】

あるいは、IL-17A/Fの非ヒト相同体は、動物の胚性細胞に導入されたIL-17A/Fをコードする変更ゲノムDNAと、IL-17A/Fをコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、IL-17A/Fをコードする欠陥又は変更遺伝子を有するIL-17A/F「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、IL-17A/FをコードするcDNAは、確立された技術に従い、IL-17A/FをコードするゲノムDNAのクローニングに使用できる。IL-17A/FをコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みをモニターするために使用する選択可能なマーカーをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランкиングDNA(5' と 3' 末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについてはThomas及びCapecchi, Cell, 51:503(1987)を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択された[例えば、Liら, Cell, 69:915(1992)参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152参照のこと]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間を経て「ノックアウト」動物を作り出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、IL-17A/Fポリペプチドの欠乏によるある種の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0109】

また、IL-17A/Fポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的有効量の遺伝子産物のインビオ合成を達成するために遺伝子が導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビオ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnikら, IL-17A/F c. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、それらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【0110】

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビボで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した方法は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、D E A E - デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビボ遺伝子移入技術は、ウイルス（典型的にはレトロウイルス）ベクターでのトランスフェクション及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションである（Dzauら, Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993)）。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び／又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシスは、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987)；及びWagnerら, I L - 17 A / F c. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記述されている。遺伝子作成及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Andersonら, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

10

20

30

40

【0111】

ここに記載したI L - 17 A / F ポリペプチドをタンパク質電気泳動目的の分子量マークターとして用いてもよく、単離された核酸配列を、これらのマークターを組み換え発現に用いてもよい。

ここに記載したI L - 17 A / F ポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。この点において、実際の配列に基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、新規な染色体マークターの同定の必要である。本発明の各I L - 17 A / F 核酸分子は染色体マークターとして使用できる。

また、本発明のI L - 17 A / F ポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングに使用でき、本発明のI L - 17 A / F ポリペプチドは、好ましくは同じ型の正常組織に比較して疾患性組織において、一方の組織で他方に比較して異なる発現をする。I L - 17 A / F 核酸分子には、P C R、ノーザン分析、サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【0112】

ここに記載したI L - 17 A / F ポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明のI L - 17 A / F ポリペプチドは、製薬的に有用な組成物を調製するのに知られた方法に従って製剤され、これにより、このI L - 17 A / F 生成物は製薬的に許容される担体媒体と混合される。治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能なキャリア、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する活性成分とを混合することにより（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed., [1980]）、調製され保管される。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（残基数10個未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリン等の单糖類、二糖類又は他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、マンニトール又はソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／又はTWEEN（商品名）、PLURONICS（商品名）又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0113】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及

50

び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。

ここで、本発明の製薬組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

投与経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内又は病巣内経路での注射又は注入、局所投与、又は徐放系による。

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できるガイダンスを提供する。有効量の種間スケーリングは、Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら, 編, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96のMordenti, J. 及びChappell, W. 「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」に記載された原理に従って実施できる。 10

【0114】

IL-17A/Fポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストのインビボ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり1日に約10ng/kgから100mg/kgまで、好ましくは約1μg/kg/日から10mg/kg/日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、又は第5,225,212号参照。異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又は組織を標的とする投与には、他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することが必要であることが予想される。 20

【0115】

IL-17A/Fポリペプチドの投与を必要とする任意の疾患又は疾病的治療に適した放出特性を持つ製剤でIL-17A/Fポリペプチドの持続放出が望まれる場合、IL-17A/Fポリペプチドのマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン-(rhIFN-)、インターロイキン-2、及びMN rgp120で成功裏に実施されている。Johnsonら, Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Horaら, Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, 「Design and IL-17A/F induction of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems」Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant API L-17A/Fach, Powell 及び Newman編, (Plenum Press: New York, 1995), p.439-462; WO 97/03692, 30 WO 96/40072, WO 96/07399; 及び米国特許第5,564,010号。 30

これらのタンパク質の持続放出製剤は、ポリ-乳酸-コグリコール酸(PLGA)ポリマーを用い、その生体適合性及び広範囲の生分解特性に基づいて開発された。PLGAの分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト身体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から数年まで調節できる。Lewis, 「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」: M. Chasin及びR. Langer(編), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41。 40

【0116】

本発明は、IL-17A/Fポリペプチドに類似する(アゴニスト)又はIL-17A/Fポリペプチドの効果を阻害する(アンタゴニスト)ものを同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされるIL-17A/Fポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドの他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリの高スループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

該アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイで、この分野で知られたものを含む種々 50

の方式で実施される。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされるIL-17A/Fポリペプチドと、これら2つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

【0117】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるIL-17A/Fポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばミクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をIL-17A/Fポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化されるIL-17A/Fポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄によって除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【0118】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定のIL-17A/Fポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するために良く知られている方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質-タンパク質相互作用は、Chevray及びNathans [IL-17A/F c.Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789-5793 (1991)]に開示されているように、Fields及び共同研究者ら [Fields及びSong, Nature(London) 340, 245-246 (1989); Chienら, IL-17A/F c.Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 (1991)]に記載された酵母ベースの遺伝子系を用いることによってモニターすることができる。酵母GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。前出の文献に記載された酵母発現系(一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる)は、この特性の長所を利用し、並びに2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1a c Zリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER(商品名))は、Clontechから商業的に入手可能である。また、この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこれら相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定へ拡大適用することができる。

【0119】

ここで同定されたIL-17A/Fポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる:通常、反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、これら2つの生成物の相互作用及び結合が可能な条件下及び時間に渡って含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第3の反応混合物に添加してポジティブコントロールを提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合(複合体形成)は上記のようにモニターされる。試験化合物を含有する反応混合物ではなく、コントロール反応における複合体の形

10

20

30

40

50

成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

【0120】

アンタゴニストをアッセイするためには、特定の活性についてスクリーニングされる化合物とともにIL-17A/Fポリペプチドを細胞へ添加してもよく、IL-17A/Fポリペプチド存在下における対象活性を阻害する化合物の能力は、化合物がIL-17A/Fポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、IL-17A/Fポリペプチドと膜結合IL-17A/Fポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを有する潜在的アンタゴニストを競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることによって、アンタゴニストを検出してもよい。放射活性などでIL-17A/Fポリペプチドを標識することが可能であり、潜在的アンタゴニストの有効性を判断するためにレセプターに結合したIL-17A/Fポリペプチドの数を利用することができる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及びFACSソートによって同定できる。Coliganら、Current IL-17A/F protocols in Immun., 1(2): 第5章(1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化RNAがIL-17A/Fポリペプチドに反応性の細胞から調製され、このRNAから生成されたcDNAライブラリがプールに分配され、COS細胞又はIL-17A/Fポリペプチド反応性でない他の細胞のトランスフェクションに使用される。スライドガラスで成長させたトランスフェクション細胞を、標識したIL-17A/Fポリペプチドで暴露する。このIL-17A/Fポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の封入を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再トランスフェクションし、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0121】

レセプター同定の代替的方法として、標識化IL-17A/Fポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料をPAGEで溶解させ、X線フィルムへ暴露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片へ分解し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列決定から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定するcDNAライブラリをスクリーニングする縮重オリゴヌクレオチドプローブの一組の設計に用いられる。

アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識IL-17A/Fポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンとIL-17A/Fポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペプチド及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでいる。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与えず、従ってIL-17A/Fポリペプチドの作用を競合的に阻害するIL-17A/Fポリペプチドの変異形態であってもよい。

【0122】

他の潜在的なIL-17A/Fポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンスRNA又はDNA作成物であり、例えば、アンチセンスRNA又はDNAは、標的mRNAにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することによりmRNAの翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンスDNA又はRNAを通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリペプチドヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟IL-17A/Fポリペプチドをコードするポリペプチド

10

20

30

40

50

チドヌクレオチド配列の 5' コード化部分は、約 10 から 40 塩基対長のアンチセンス RNA オリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNA オリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され（トリプルヘリックス - Lee ら, Nucl. Acid Res., 6: 3073 (1979); Cooney ら, Science, 241: 456 (1988); Dervan ら, Science, 251: 1360 (1991) 参照）、それにより IL-17A / F ポリペプチドの転写及び生成を防止する。アンチセンス RNA オリゴヌクレオチドはインビボで mRNA にハイブリダイゼーションして mRNA 分子の IL-17A / F ポリペプチドへの翻訳を阻止する（アンチセンス - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (SRS Press: Boca Raton, FL, 1988)）。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に輸送され、アンチセンス RNA 又は DNA をインビボで発現させて、IL-17A / F ポリペプチドの生産を阻害することもできる。アンチセンス DNA が用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の -10 から +10 位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

10

【0123】

潜在的アンタゴニストは、IL-17A / F ポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それにより IL-17A / F ポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。

20

リボザイムは、RNA の特異的切断を触媒できる酵素的 RNA 分子である。リボザイムは、相補的標的 RNA への配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切斷的切斷により作用する。潜在的 RNA 標的内の特異的リボザイム切斷部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994) 及び PCT 公報、番号 WO 97/33551 (1997 年 9 月 18 日公開) を参照。

20

【0124】

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシリボヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT 公報、番号 WO 97/33551、上掲を参照。

30

これらの小分子は、上記で検討したスクリーニングアッセイの一つ又は複数の任意のものにより及び／又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

また、ここで開示されている分子の診断的及び治療的利用は、下記に開示及び記載のポジティブ機能アッセイヒットに基づいている。

【0125】

F. 組織分布

本発明の IL-17A / F を発現する組織の位置は、種々のヒト組織での mRNA 発現の測定により確認できる。そのような遺伝子の位置は、IL-17A / F ポリペプチドの活性の刺激及び阻害によって最も影響を受けやすい組織に関する情報を提供する。また、特定の組織中の遺伝子の位置は、下記において論じる活性遮断アッセイのための試料組織を提供する。

40

上記したように、種々の組織における遺伝子増幅又は遺伝子発現は、mRNA の転写の定量化のための従来のサザンプロット、ノーザンプロット (Thomas, IL-17A / F c. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 [1980])、ドットプロット (DNA 分析)、又はインサイツハイブリダイゼーションによって、ここに提供する配列に基づき、適切な標識プローブを用いて測定できる。あるいは、DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、及び DNA - RNA ハイブリッド二重鎖又は DNA - タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識する抗体を用いてもよい。

あるいは、種々の組織における遺伝子発現は、遺伝子産物を直接定量化するための、組

50

織断片及び細胞培地又は体液の免疫組織学的染色などの免疫的方法によっても測定できる。免疫組織学的染色又は試料液のアッセイに有用な抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の動物から調製される。都合良く、抗体は、IL-17A/Fポリペプチドの天然配列に対して、又は本発明のポリペプチドをコードするDNA配列に基づく合成ペプチドに対して、或いはIL-17A/Fポリペプチドをコードし、特異的抗体エピトープをコードするDNAと融合した外来配列に対して調製してもよい。下記に、抗体を生成するための一般的な技術、並びにノーザンプロット及びインサイツハイブリダイゼーションのプロトコールを提供する。

【0126】

G. 抗体結合の研究

10

本発明のIL-17A/Fポリペプチドの活性は、組織細胞に対するIL-17A/Fポリペプチドの効果を阻害する抗-IL-17A/F抗体の能力が試験される抗体結合の研究によって更に確認できる。例示的な抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体を含み、その調製は以下に記載する。

抗体結合の研究は、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチャッセイ、及び免疫沈降アッセイなどの既知のアッセイ法で実施してよい。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)。

競合的結合アッセイは、標識標準物の、限られた量の抗体との結合について試験分析物と競合する能力による。試験試料中の（腫瘍細胞で増幅された遺伝子にコードされる）標的タンパク質の量は、抗体に結合し始める標準物の量に逆比例する。結合し始める標準物の量の測定を促進するために、抗体は好ましくは競合の前又は後に固定化し、抗体に結合した標準品及び分析物が未結合で残っている標準物及び分析物から容易に分離できるようする。

20

【0127】

サンドウィッチャッセイは2つの抗体の使用を含み、各々が検出すべきタンパク質の異なる免疫原部分、又はエピトープに結合できる。サンドウィッチャッセイにおいて試験試料分析物は固体支持体上に固定化された第1の抗体に結合し、その後第2の抗体が分析物に結合し、よって不溶性の3成分複合体が形成される。例えば米国特許第4,376,110号参照。第2の抗体は検出可能部分で標識され（直接サンドウィッチャッセイ）、あるいは検出可能部分で標識された抗-免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接サンドウィッチャッセイ）。例えば、サンドウィッチャッセイの一形態はELISAアッセイであり、この場合の検出可能部分は酵素である。

30

免疫組織学のためには、腫瘍試料は新鮮でも凍結したものでもよく、パラフィンに包埋して、例えばホルマリン等の保存剤で固定してもよい。

【0128】

H. 細胞ベースアッセイ

細胞ベースアッセイ及び免疫関連疾患の動物モデルを、ここで同定された遺伝子とポリペプチド、並びに免疫関連疾患の発達と病原性との関係をさらに理解するのに用いることができる。

40

異なる方法では、ここに記載されたcDNAを特定の免疫関連疾患に関与することが知られているある細胞型の細胞へトランスフェクションし、これらのcDNAの免疫機能を刺激又は阻害する能力を分析する。適当な細胞は所望の遺伝子でトランスフェクションし、そして免疫機能をモニターすることができる。このようなトランスフェクション株化細胞は、例えばT細胞の増殖又は炎症性細胞の浸潤を調節する免疫機能を阻害又は刺激するポリ-又はモノクローナル抗体又は抗体組成物の能力を試験するのに用いることができる。ここに同定した遺伝子のコード化配列でトランスフェクションした細胞は、さらに、免疫関連疾患の治療の候補薬の同定に用いることができる。

さらには、安定な株化細胞が好ましいが、トランスジェニック動物から誘導された一次培地を（下記のような）、ここでの細胞ベースアッセイに使用することができる。トランスジェニック動物から連続株化細胞を誘導する技術は、この分野で良く知られている（S

50

allら, Mol. Cell. Biol. 5, 642-648 [1985]参照)。

【0129】

一つの適切な細胞ベースアッセイは、混合リンパ球反応(MLR)である。Current IL-17A/F tocols in Immunology, unit3.12; J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober編, 国立衛生研究所, John Wiley & Sons, Inc. このアッセイでは、活性T細胞の増殖を刺激又は阻害する試験化合物の能力が評価される。レスポンダーT細胞の懸濁液を同種刺激細胞と培養し、T細胞の増殖をトリチウム化チミジンの取り込みによって測定する。このアッセイは、T細胞反応性の一般的な測定法である。活性化によって、T細胞の大多数がIL-2へ応答し、IL-2を生産することから、このアッセイでの応答性の相違の一部は、応答細胞によるIL-2生産の違いを反映する。MLRの結果は、標準的なリンフォカイン(IL-2)検出アッセイによって確かめられる。Current IL-17A/F tocols in Immunology, 上掲, 3.15, 6.3。

【0130】

MLRアッセイにおける増殖性のT細胞応答は、アッセイされた分子の直接的な分裂促進特性又は外来性の抗原誘導活性化に起因する。本発明のポリペプチドのT細胞刺激性活性の更なる確認は、同時刺激アッセイによって得ることができる。T細胞活性化には、T細胞レセプター(TCR)を通して媒介される抗原特異性シグナルと二番目のリガンド結合による相互作用を通して媒介される同時刺激シグナル、例えばB7(CD80, CD86)/CD28結合相互作用が必要される。CD28架橋は、活性化T細胞によるリンフォカインの分泌を増加させる。T細胞活性化は、ネガティブ又はポジティブ効果のあるリガンド結合を通して、ネガティブ及びポジティブコントロールの両方を有する。CD28及びCTL A-4はB7と結合するIgスーパーファミリーの関連する糖タンパク質である。B7へのCD28の結合には、T細胞活性化のポジティブ同時刺激効果がある; 逆を言えば、B7へのCTL A-4の結合には、ネガティブなT細胞非活性化効果がある。Chambers, C.A.及びAllison, J.P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9:396; Schwartz, R.H., Cell (1992) 71: 1065; Linsey, P.S.及びLedbetter, J.A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191; June, C.H.ら., Immunol. Today (1994) 15:321; Jenkins, M.K., Immunity (1994) 1:405。同時刺激アッセイでは、T細胞同時刺激性又は阻害活性について本発明のIL-17A/Fポリペプチドをアッセイする。

【0131】

本発明の他の化合物と並んで、T細胞増殖の刺激剤(同時刺激剤)及びアゴニスト、例えばアゴニスト抗体あり、その上にMLR及び同時刺激アッセイによって確定されたように、IL-17A/Fポリペプチドは、例えば、弱く、最適状態には及ばない、或いは不十分な免疫機能として特徴付けられる免疫関連疾患の治療に有用である。これらの疾患は、T細胞(並びにT細胞媒介免疫)の増殖及び活性化を刺激すること、並びに刺激IL-17A/Fポリペプチドのような刺激性化合物の投与を通して哺乳動物の免疫応答を高めることによって治療される。この刺激ポリペプチドは、例えば、IL-17A/Fポリペプチド又はそのアゴニスト抗体でもよい。

本発明におけるような刺激化合物の直接的用途は、初期T細胞上に発現するリガンド(4-1BB-L)と結合し、T細胞活性化と成長の信号を伝達する、腫瘍壞死因子レセプターファミリーのメンバーである4-1BB糖タンパク質をともなう実験において確かめられている。Alderson, M.E.ら., J. Immunol. 24:2219(1994)。

【0132】

アゴニスト刺激性化合物の用途も実験的に確かめられている。アゴニスト抗-4-1BB抗体による治療での4-1BBの活性化は、腫瘍の根絶を促進する。Hellstrom, I.及びHellstrom, K.E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18:1。下記により詳しく記載されている免疫吸着剤療法による腫瘍の治療は、本発明の刺激性化合物の用途のもう一つの例である。MLRアッセイにおいて阻害することが見出されているIL-17A/Fの活性と拮抗する、或いはそれを遮断することによって、免疫刺激又は促進効果も達成することができる。化合物の阻害活性を打ち消すことは、正味の刺激性効果を生み出す。適切なアンタゴニ

10

20

30

40

50

スト／遮断化合物は、阻害性タンパク質を認識してそれと結合するその抗体又は断片であり、このタンパク質のレセプターとの効果的な相互作用を遮断して、レセプターを通してのシグナル伝達を阻害する。恐らくは C T L A - 4 の結合による阻害シグナルを除くことによって T 細胞の増殖を促進する抗 - C T L A - 4 抗体を用いる実験において、この効果は確認されている。Walunas, T.L. ら, *Immunity*(1994) 1:405。

あるいは、免疫刺激又は増強効果は、また、血管透過性を高める特性を有する I L - 1 7 A / F ポリペプチドの投与によって達成することができる。高まった血管透過性は、免疫細胞（例えば、単球、好酸球、P M N ）の局所的な浸潤によって和らげることが可能な疾患に対して有益である。

【 0 1 3 3 】

一方では、T 細胞増殖／活性化、リンフォカイン分泌、及び／又は血管透過性の直接的阻害剤である本発明の他の化合物と同様に I L - 1 7 A / F ポリペプチドは、免疫応答を抑制へ直接に用いることができる。これらの化合物は、免疫応答の程度を減じること、並びに異常に活発な、並外れに最適な、又は自己免疫性の応答によって特徴付けられる免疫関連疾患を治療するのに有用である。本発明のこの化合物の用途は、レセプター B 7 への C T L A - 4 の結合が T 細胞を不活性化させる上記に記載の実験によって確認されている。本発明の直接的阻害性化合物は、類似の方法で機能する。血管透過性を抑制する化合物の用途は、炎症を減じることが期待できる。そのような用途は、過度の炎症に関連する症状を治療するのに有益である。

あるいは、例えば、本発明の刺激 I L - 1 7 A / F ポリペプチドと結合し、これら分子の刺激効果を遮断する抗体は、正味の阻害性効果を生成し、T 細胞増殖／活性化及び／又はリンフォカイン分泌を阻害することによって T 細胞性免疫応答を抑制することに用いることができる。このポリペプチドの刺激効果を遮断することは、哺乳動物の免疫応答を抑制する。この用途は、抗 - I L 2 抗体を用いる実験において確認されている。これらの実験では、抗体は I L 2 と結合し、I L 2 のそのレセプターとの結合を遮断することで T 細胞阻害効果を達成する。

【 0 1 3 4 】

I . 動物モデル

細胞ベースインビトロアッセイの結果は、インビトロ動物モデル及び T 細胞機能向けのアッセイを用いてさらに確かめることができる。免疫関連疾患の発達及び病理におけるここで同定される遺伝子の役割を更に理解するために、そして抗体、及び小分子アゴニストを含む天然ポリペプチドの他のアゴニストを含む候補治療薬の有効性を試験するために、種々の良く知られた動物モデルが使用できる。このようなモデルのインビオの性質によって、特にヒト患者における反応を予測できる。免疫関連疾患の動物モデルは、非組換え及び組換え（トランスジェニック）動物の両方を含む。非組換え動物モデルは、例えば、齧歯類、例えばマウスモデルを含む。このようなモデルは、標準的な技術、例えば、皮下注射、尾部静脈注射、脾臓移植、腹膜内移植、腎被膜下移植などにより、細胞を導入することによって作成される。

移植片対宿主疾患は、免疫担当細胞が免疫抑制又は寛容（トランス）な患者に移植された際に起こる。ドナー細胞が宿主抗原を認識し、これへ応答する。この応答には、生命を脅かす重篤な炎症から下痢及び体重減少の穏やかな場合にまで変化し得る。移植片対宿主疾患モデルは、M H C 抗原及び微量の移植抗原に対する T 細胞の反応性を評価する手段を提供する。好適な手法は、上記の *Current I L - 1 7 A / F tocols in Immunology unit 4.3* に詳しく記載されている。

皮膚移植片拒絶の動物モデルは、T 細胞がインビオ組織破壊を媒介する能力を試験する手段であり、移植片拒絶におけるそれらの役割の基準である。最も普通で許容されるモデルは、マウスの尾の皮膚移植である。繰り返し実験により、皮膚同種移植片拒絶は T 細胞、ヘルパー T 細胞尾キラー効果 T 細胞に媒介され、抗体ではないことが示された。Auchincloss, H. Jr. 及び Sachs, D.H., *Fundamental Immunology*, 2版, W.E. Paul編, Raven Press, NY, 1989, 889-992。好適な手法は、上記の *Current I L - 1 7 A / F tocols in Im*

10

20

30

40

50

munology, unit 4.4に詳細に記載されている。本発明の化合物の試験に使用できる他の移植片拒絶モデルは、Tanabe, M.ら, *Transplantation* (1994) 58: 23及びTinubu, S.A.ら, *J. Immunol.* (1994) 4330-4338に記載されている同種心臓移植モデルである。

【0135】

遅延型過敏症の動物モデルは、同様に細胞媒介免疫機能のアッセイ法を提供する。詳細な型の過敏症反応は、抗原負荷後時間が経過するまでピークに達しない炎症を特徴とするT細胞媒介免疫反応である。これらの反応はまた、組織特異的自己免疫疾患、例えば多発性硬化症(MS)及び実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE、MSのモデル)を起こす。好適な手法は、上記のCurrent IL-17A / F tocols in Immunology, unit 4.5に詳細に記載されている。

EAEは、T細胞及び単核球炎症、及びその結果生じた中枢神経系の軸索の脱髓によって特徴付けられるT細胞性自己免疫疾患である。EAEは、一般的には、ヒトのMSの関連する動物モデルであると考えられる。Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1: 143。急性及び再発性軽減モデルの両方が開発されている。Current IL-17A / F tocols in Immunology, unit 15.1及び15.2に記載のプロトコールを用いて、本発明の化合物は、免疫性脱髓疾患に対するT細胞刺激性又は阻害性活性について試験することができる。Duncan, I.D.ら, *Molec. Med. Today* (1997) 554-561に記載されている、オリゴデンドログリア又はシュワン細胞が中枢神経系へ移植されるミエリン疾患のモデルも参照のこと。

【0136】

接触過敏症は、細胞性免疫機能の単純な遅延型過敏症インビボアッセイである。この手法では、遅延型過敏症反応を引き起こす外来性ハプテンへの皮膚被爆が測定そして定量化される。接触過敏症には、誘発期が後に続く初期感作期が含まれる。この誘発期は、Tリシンパ球が以前に接触した抗原と遭遇する際に起こる。腫れと炎症が起こり、それをヒトアレルギー性接触皮膚炎の優れたモデルにする。好適な手法は、Current IL-17A / F tocols in Immunology, Eds. J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach及びW. Strober, *John Wiley & Sons, Inc.*, 1994, unit 4.2に詳しく記載されている。Grabbe, S. 及びSchwarz, T, *Immun. Today* 19(1): 37-44(1998)も参照のこと。

関節炎の動物モデルはコラーゲン誘発関節炎である。このモデルは、ヒトの自己免疫性慢性関節リウマチと臨床的、組織学的及び免疫学的特徴を共有し、ヒトの自己免疫性関節炎の許容されるモデルである。マウス及びラットモデルは、滑膜炎、軟骨及び肋軟骨下骨の浸食を特徴とする。本発明の化合物は、上記のCurrent IL-17A / F tocols in Immunology, unit 15.5に記載されているプロトコールを用いて、自己免疫性関節炎に対する活性について試験できる。また、Issekutz, A.C.ら, *Immunology* 88: 569 (1996)に記載されているCD18及びVLA-4インテグリンに対するモノクローナル抗体を用いたモデルも参照のこと。

【0137】

喘息のモデルは記載され、そこでは抗原誘発気道過剰反応性、肺性好酸球増加症及び炎症が、動物をオボアルブミンで感作し、次いで動物にエアロゾルで運ばれる同じタンパク質を負荷することにより誘発される。幾つかの動物モデル(モルモット、ラット、非ヒト霊長類)は、エアロゾル抗原で負荷した際にヒトのアトピー性喘息に似た徴候を示す。マウスモデルは、ヒト喘息の多くの特徴を持つ。本発明の化合物の喘息治療における活性及び有効性を試験するための好適な方法は、Wolyniec, W.W.ら, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 18: 777(1998) 及びその引用文献に記載されている。

さらに、本発明の化合物は、乾癬様疾患の動物モデルでも試験できる。証拠は、乾癬についてのT細胞病原を示唆している。本発明の化合物は、Schon, M.P.ら, *Nat. Med.* (1997) 3: 183によって記載された、マウスが乾癬に類似する組織病原学的皮膚疾患を示すscid/scidマウスモデルでも試験できる。他の好適なモデルは、Nickoloff, B.J.ら, *Am. J. Pathol.* (1995) 146: 580に記載されたように調製されるヒト皮膚 / scidマウスキメラである。

【0138】

10

20

30

40

50

組換え（トランスジェニック）動物モデルは、ここに同定された遺伝子のコード部分を、トランスジェニック動物作成のための標準的技術を用いて、対象とする動物のゲノムに導入することにより加工できる。トランスジェニック操作の標的として提供できる動物は、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、及び非ヒト靈長類、例えばヒヒ、チンパンジー及びサルを含む。これらの動物に導入遺伝子を導入するのにこの分野で知られた技術は、全核マイクロインジェクション（Hoppe及びWanger, 米国特許第4,873,191号）；胚系列へのレトロウイルス媒介遺伝子転移（例えば、Van der Puttenら, I L - 17 A / F c. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]）；胚性肝細胞での遺伝子標的化（Thompsonら, Cell 56, 313-321 [1989]）；胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]）；精子媒介遺伝子転移（Lavitranoら, Cell 57, 717-73 [1989]）を含む。概説としては、例えば、米国特許第4,736,866号を参照のこと。10

本発明の目的のために、トランスジェニック動物は、その一部にのみ導入遺伝子を有するもの（「モザイク動物」）を含む。導入遺伝子は、単一の導入遺伝子として、又はコンカテマー、例えば頭部と頭部又は頭部と尾部の直列型として組み込まれる。特定の細胞型への導入遺伝子の選択的導入も、例えば、Laskoら, I L - 17 A / F c. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992)の技術に従って可能である。

【0139】

トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現は、標準的技術によってモニターできる。例えば、導入遺伝子の組み込みの確認にサザンプロット分析又はPCR增幅が用いられる。次いで、mRNA発現のレベルは、インサイツハイブリダイゼーション、ノーザンプロット分析、PCR、又は免疫組織化学などの技術を用いて分析できる。20

例えば免疫細胞の特定の細胞への浸潤を確定するための組織学的検査によって、免疫疾患病理の兆候に関してこの動物を更に調べてもよい。本発明の化合物によるT細胞増殖の刺激又は阻害の程度を確定するために、この化合物で処理したトランスジェニック動物で遮断実験をも行うことができる。これらの実験では、上記に記載のようにして調製した本発明のポリペプチドと結合する遮断抗体が動物へ投与され、そして免疫機能への影響が測定される。

【0140】

あるいは、「ノックアウト」動物は、ここで同定されたポリペプチドをコードする内在性の遺伝子と、動物の胚性細胞へ導入されたそのポリペプチドをコードする改変ゲノムDNAとの間の相同組み換えの結果として、ここで同定されたポリペプチドをコードする欠陥又は改変遺伝子を有するものとして構築することができる。例えば、ある特定ポリペプチドをコードするcDNAは、確立されている技術によって、そのポリペプチドをコードするゲノムDNAのクローニングに利用できる。ある特定のポリペプチドをコードするゲノムDNAの一部は、その他の遺伝子、例えば組み込みをモニターするために利用できる選択可能なマークをコードする遺伝子によって置き換え又は除去できる。概して、ベクターは無変化のフランкиングDNA（5' と 3' 末端の両方）を数キロベース含む [例えば、相同的組換えベクターについては Thomas 及び Capecchi, Cell, 51:503 (1987) を参照のこと]。ベクターを胚性幹細胞へ (例えば電気穿孔法等によって) 導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞を選択する [例えば、Liほか, Cell, 69:915 (1992) 参照]。選択された細胞は次に動物 (例えばマウス又はラット) の胚盤胞内に注入され、集合キメラを形成する [例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach - 17 A / Fach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152 参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間をおいて「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、例えば腫瘍の発達を含む、ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状態及びその病理的状態の発達に対する防御能力によって特徴付けられる。304050

【0141】

J. 免疫アジュバンド療法

一実施態様では、本発明の免疫刺激化合物を腫瘍（癌）治療のための免疫アジュバンド療法に利用することができる。T細胞がヒト腫瘍の特異的抗原を認識することは、現在は立証されている。MAGE、BAGE及びGAGEファミリーの遺伝子によってコードされている腫瘍抗原の一群は、すべての成人の正常組織では沈黙しているが、腫瘍、例えばメラノーマ、肺癌、頭頸部腫瘍、及び膀胱癌においてかなりの量が発現している。DeSmet. C.ら., IL-17A / Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7149(1996)。インピトロとインビオの双方において、T細胞の同時刺激によって腫瘍の退行と抗腫瘍応答が誘導されることが示されている。Melerio, I.ら., Nature Medicine, 3: 682(1997) ; Kwon, E.D.ら.,

10

IL-17A / Fc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8099(1997) ; Lynch, D.H.ら., Nature Medicine, 3:625(1997) ; Finn, O.J.及びLotze, M.T., J. Immunol., 21:114(1998)。本発明の刺激性化合物は、アジュバンドとして、T細胞増殖／活性化及び腫瘍抗原への抗腫瘍応答を刺激するために、単独又は成長制御剤、細胞傷害性剤又は化学療法剤とともに投与することができる。既知の投与処方によって、成長制御、細胞傷害性、又は化学療法剤を従来量で投与してもよい。本発明の化合物による免疫刺激活性によって、成長制御、細胞傷害性、又は化学療法剤の減量が可能となり、それによって患者の毒性が潜在的に低下する。

20

【0142】

K. 候補薬ためのスクリーニングアッセイ

候補薬のスクリーニングアッセイは、ここで同定された遺伝子によってコードされているポリペプチド、或いはその生物活性断片と結合又は複合化する化合物、或いはそうでなければコードされているポリペプチドと他の細胞性タンパク質の相互作用を妨害する化合物を同定するように設計されている。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライプラリの高スループットスクリーニングに従うアッセイを含み、特に、小分子候補薬の同定に適している。考えられる小分子には、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合物を含む合成有機又は無機化合物を含み、そして特に限定することなく、ヒト抗体及び抗体断片と並んで、ポリ-及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗-イディオタイプ抗体、及びそのような抗体又は断片のキメラ又はヒト化異形を含む抗体を含む。このアッセイは、この分野で良く特徴付けられているタンパク質-タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施される。すべてのアッセイは、候補薬とここで同定された核酸によってコードされているポリペプチドの相互作用を可能にする条件下及び十分な時間に渡って、これら二つの分子を接触させることを必要とするという点で共通である。

30

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、或いは反応混合物中で検出することができる。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされるポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイタープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化すべきペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、そのペプチドを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

40

【0143】

候補化合物が相互作用するが特定のタンパク質に結合しない場合、そのレセプターとの

50

相互作用は、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。そのようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用は、Fields及び共同研究者等 [Fields及びSong, *Nature*(London) 340, 245-246 (1989); Chienら, *I L - 17 A / Fc.Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray及びNathans [*I L - 17 A / Fc.Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991)] に開示されているようにモニターすることができる。酵母菌GAL4などの多くの転写活性化剤は、2つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方はDNA結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2-ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1-1a c Zリポーター遺伝子のGAL4活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を介したGAL4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、-ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2-ハイブリッド技術を用いた2つの特定なタンパク質間のタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット（MATCHMAKER（商品名））は、Clontechから商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

ここで同定された遺伝子の相互作用を妨害する化合物と、試験が可能な他の細胞内又は細胞外成分を見出すために、二つの産物の相互作用と結合を可能にする条件と時間の下で、遺伝子の生産物、並びに細胞内又は細胞外成分を含有するように、反応混合物は、通常は調製される。試験化合物の結合を阻害する能力を試験するためには、反応を試験化合物が存在する場合と存在しない場合で実施する。さらに、第3の反応混合物へプラシーボを添加してポジティブコントロールとしてもよい。コントロール反応において複合体の形成があり、試験化合物を含有しない反応混合物では複合体の形成がないことは、試験化合物が、試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0144】

30

L. 免疫関連疾患治療のための組成物及び方法

免疫関連疾患の治療に有用な組成物は、限定されないが、タンパク質、抗体、小有機分子、ペプチド、ホスホペプチド、アンチセンス及びリボザイム分子、三重螺旋分子などを含み、免疫機能、例えばT細胞増殖 / 活性化、リンフォカイン放出、又は免疫細胞浸潤を阻害又は刺激する。

例えば、アンチセンスRNA及びRNA分子は、標的mRNAにハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を防止することによりmRNAの翻訳を直接阻止する。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0145】

40

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切斷的切斷により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切斷部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, *Current Biology* 4: 469-471 (1994)及びPCT公報、番号WO 97/33551 (1997年9月18日発行) を参照。

転写阻害に用いられる三重螺旋形成における核酸分子は一本鎖でデオキシリボヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスチン塩基対則を介する三重螺旋形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT公報、番号WO 97/33551, 上掲を参照。

50

これらの分子は上記のスクリーニングアッセイの任意のもの又は任意の組み合わせにより、又は当業者に知られた他のスクリーニング技術により同定できる。

【0146】

M. 抗-I L - 17 A / F 抗体

一実施形態では、本発明は、ここで治療薬及び/又は診断薬としての用途が見出され得る抗-I L - 17 A / F 抗体を提供する。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

【0147】

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連する抗原及びアジュバントを複数回皮下注射 (s.c.) 又は腹腔内注射することにより、動物内で発生させることができが好ましい。(特に合成ペプチドを使用する場合) 免疫化された種において免疫原性であるタンパク質に関連抗原を抱合させるのが有用である。例えば、二機能性剤又は誘導体化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシニミドエステル(システィン残基により抱合)、N-ヒドロキシスクシニミド(リシン残基により抱合)、グルタルアルdehyド、無水コハク酸、S O C l₂、又はR¹N = C = N R (R 及び R¹ は異なるアルキル基)を用いて、鍵穴カサガイヘモシアニン(K L H)、血清アルブミン、ウシチログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに抗原を抱合させることができる。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート 100 μg 又は 5 μg (それぞれウサギ又はマウスの場合) を完全フロイントアジュバント 3 容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の 1/5 ないし 1/10 のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7 ないし 14 日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0148】

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler 等, *Nature*, 256:495 (1975) により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4 8 1 6 5 6 7 号)によって作成することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫化の後、リンパ球を単離し、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞(融合のパートナーとも呼ばれる)の増殖または生存を阻害する—又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシリルトランスフェラーゼ(H G P R T 又は H P R T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、H G P R T - 欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジンを含有するであろう(H A T 培地)。

【0149】

好ましい融合のパートナーである骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、

10

20

30

40

50

マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、U S A より入手し得るM O P C - 2 1 およびM P C - 1 1 マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、U S A より入手し得るS P - 2 又はX 6 3 - A g 8 - 6 5 3 細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス・ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の產生のために開示されている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 5 1-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の產生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ (R I A) 又は酵素結合免疫吸着検定 (E L I S A) によって測定する。

【 0 1 5 0 】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキヤッチャード分析によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を產生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローニングを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-10 3頁 (Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D - M E M 又はR P M I - 1 6 4 0 培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。

サブクローニングにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー (例えばプロテイン A 又はプロテイン G - セファロースを用いる) 又はイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

モノクローナル抗体をコードするD N A は、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなD N A の好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、D N A を発現ベクターに入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を產生しない大腸菌細胞、サルC O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするD N A の細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

【 0 1 5 1 】

更なる実施態様では、モノクローナル抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して產生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性 (n M 範囲) のヒト抗体の生成 (Marks等, Bio/Technology, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え (Waterhouse等, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

抗体をコードするD N A は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン (C_H 及びC_L) の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第4,816,5

10

20

30

40

50

67号; Morrison等, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド(異種ポリペプチド)のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0152】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗-IL-17A/F抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えはマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えはFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる [Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者 [Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, Science, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0153】

抗体がヒトの治療用途を意図している場合、抗原性及びHAMA反応(ヒト抗-マウス抗体)を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒトVドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(FR)をヒト化抗体のために受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト

10

20

30

40

50

化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

10

【0154】

ヒト化抗 I L - 17 A / F 抗体の種々の形態が考えられる。例えばヒト化抗体は、免疫結合体を生成するために、状況に応じて一又は複数の細胞傷害剤(類)と結合していてよい抗体断片、例えば F a b であってもよい。また、ヒト化抗体は無傷抗体、例えば無傷 I g G 1 抗体であってもよい。

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの產生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを產生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体產生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の產生がおこる。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggeman等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第 5 5 4 5 8 0 6 号、同 5 5 6 9 8 2 5 号、同 5 5 9 1 6 6 9 号(全てジェンファーム(GenPharm)) ; 同 5 5 4 5 8 0 7 号; 及び国際公開第 97 / 17852 号を参照されたい。

20

【0155】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348: 552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体 V ドメイン遺伝子を、フレーム単位で、纖維状バクテリオファージ、例えば M 13 又は fd の大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。纖維状粒子がファージゲノムの一本鎖 DNA コピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージは B 細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えば Johnson, Kevin S. 及び Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571(1993)を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, Nature, 352: 624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来の V 遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーの V 遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)、又は Griffith等, EMBO J. 12: 725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第 5 5 6 5 3 3 2 号及び同 5 5 7 3 9 0 5 号を参照のこと。

30

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化した B 細胞により產生することができる(米国特許第 5 5 6 7 6 1 0 号及び同 5 2 2 9 2 7 5 号)。

40

【0156】

4. 抗体断片

ある状況下では、抗体全体よりも、抗体断片を用いることに利点がある。より小さな大

50

きさの断片によって迅速なクリアランスが可能となり、固体腫瘍への接近の改良につながり得る。

抗体断片を產生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennan等, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接產生することができる。F_{a b}、F_v及びS_{c F v}抗体断片は、すべて大腸菌で発現させ分泌させることができ、従って、大量のこれら断片の產生が容易となった。抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブライリーから単離することができる。別法として、F_{a b}'-S_H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF_(a b')₂断片を形成することができる(Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F_(a b')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。インビボ半減期が増した、サルベージレセプター結合性エピトープ残基を含むF_{a b}及びF_(a b')₂が、米国特許第5 8 6 9 0 4 6号に記載されている。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖F_v断片(s_{c F v})である。国際公開9 3 / 1 6 1 8 5号;米国特許第5 5 7 1 8 9 4号;及び米国特許第5 5 8 7 4 5 8号を参照のこと。F_v及びs_{F v}は、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である;従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。s_{F v}融合タンパク質は、s_{F v}のアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5 6 4 1 8 7 0号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は单一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0157】

5. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、IL-17A/Fタンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体では他のタンパク質に対する結合部位とIL-17A/F結合部位とが結合しうる。あるいは、抗IL-17A/Fアームは、IL-17A/F-発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させ局在させるように、Fc_RI(CD64)、Fc_RI I(CD32)及びFc_RI I I(CD16)等のIgG(Fc_R)に対するFc_cレセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばCD3)等の白血球上のトリガーモノクローナル抗体に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はIL-17A/Fを発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はIL-17A/F結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片(例えばF_(a b')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

国際公開第9 6 / 1 6 6 7 3号には、二重特異性抗-E_{r b B 2}/抗-F_c_RI I I抗体が記載されており、米国特許第5 8 3 7 2 3 4号には、二重特異性抗-E_{r b B 2}/抗-F_c_RI抗体が開示されている。二重特異性抗-E_{r b B 2}/F_c抗体は国際公開第9 8 / 0 2 4 6 3号に示されている。米国特許第5 8 2 1 3 3 7号は、二重特異性抗-E_{r b B 2}/抗-CD3抗体を教示するものである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な產生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, *Nature*, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を產生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第9 3

10

20

30

40

50

/ 0 8 8 2 9 号及びTraunecker等、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0158】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C_H2及びC_H3領域を含むIg重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C_H1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランسفエクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が所望の二重特異性抗体の最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が所望の鎖の結合にあまり影響がないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

この手法の好ましい実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を產生する更なる詳細については、例えばSuresh等、Methods in Enzymology, 1-7:210 (1986)を参照されたい。

【0159】

米国特許第5731168号に記載された他の手法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面を作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

二重特異性抗体は、架橋した又は「ヘテロコンジュゲート」抗体もまた含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の一方はアビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、不要の細胞に対する免疫系細胞をターゲティングするため(米国特許第4676980号)、及びHIV感染の治療のために提案された(国際公開第91/00360号、同92/200373号、及び欧州特許第03089号)。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる簡便な架橋法を用いて作製することができる。好適な架橋剤は当該分野において良く知られており、幾つかの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

【0160】

抗体断片から二重特異性抗体を產生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等、Science, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を產生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。產生されたF(ab')₂断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F(ab')₂-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF(ab')₂-チオールに再変換し、他のF(ab')₂-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

10

20

30

40

50

最近の進歩により、大腸菌からの F a b ' - S H 断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体 F (a b ')₂ 分子の製造を記述している。各 F a b ' 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒト T 細胞、及び E r b B 2 レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

【 0 1 6 1 】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b ' 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の 2 つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより V_L に V_H を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、よって 2 つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994) を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttle 等, J. Immunol. 147:60 (1991)。

【 0 1 6 2 】

6. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2 つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第 4,676,980 号] 及び H I V 感染の治療のために [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第 4,676,980 号に開示されたものが含まれる。

【 0 1 6 3 】

7. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び / 又は異化)されうる。本発明の抗体は、3 又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体 (I g M クラス以外のもの) であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと 3 又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインは F c 領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体は F c 領域と、F c 領域のアミノ末端に 3 又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は 3 ないし 8 、好ましくは 4 の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも 1 つのポリペプチド鎖(好ましくは 2 つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は 2 又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)は V D 1 - (X 1) n - V D 2 - (X 2) n - F c を有し、ここで V D 1 は第 1 の可変ドメインであり、V D 2 は第 2 の可変ドメインであり、F c は F c 領域のポリペプチド鎖の一つであり、X 1 及び X 2 はアミノ酸又はポリペプチドを表し、n は 0 又は

10

20

30

40

50

1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：V H - C H 1 - 柔軟なリンカー - V H - C H 1 - F c 領域鎖；又はV H - C H 1 - V H - C H 1 - F c 領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはC L ドメインを更に有する。

【0164】

8. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞障害性(A D C C)及び/又は補体依存細胞障害性(C D C)を向上させることは望ましい。これは、抗体のF c 領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされる。あるいは又はさらに、システイン残基をF c 領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性(A D C C)を有する可能性がある。Caron等, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, *B. J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのF c 領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びA D C C能力を向上させることもできる。Stevenson等, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5 7 3 9 2 7 7号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、I g G分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるI g G分子(例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃又はI g G₄)のF c 領域のエピトープを意味する。

【0165】

9. 免疫複合体

また、本発明は、化学治療薬、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapao naria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricotecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、^{2 1 2} Bi、^{1 3 1} I、^{1 3 1} In、^{9 0} Y及び^{1 8 6} Reが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カッピング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238: 1098 (1990)に記載されている。

10

20

30

40

50

87)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。国際公開94/11026参照。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコセン(trichothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【0166】

メイタンシン及びメイタンシノイド

好ましい一実施態様では、本発明の抗IL-17A/F抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している。 10

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。 20

【0167】

メイタンシノイド-抗体コンジュゲート

治療指標を改善する試みにおいて、メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧州特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合している免疫コンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインピトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。 30

【0168】

抗IL-17A/Fポリペプチド抗体-メイタンシノイドコンジュゲート(免疫コンジュゲート)

抗IL-17A/F抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗IL-17A/F抗体を化学的に結合させることにより調製される。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当た 40

10

20

30

40

50

り、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第5208020号又は歐州特許第0425235B1号、及びChar¹⁰i等、Cancer Research, 52: 127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【0169】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD²⁰P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(ITT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD³⁰P)(Carlsson等、Biochem. J. 173: 723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好ましい実施態様において、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0170】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した抗IL-17A/F抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、^I、₁^I、₂^I、₃^I、N-アセチル-₁^I、PSAG及び₁^I(Hinman等、Cancer Research⁴⁰, 53: 3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58: 2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0171】

他の細胞障害剤

10

20

30

40

50

本発明の抗 I L - 1 7 A / F 抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、B C N U、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5 0 5 3 3 9 4号、同5 7 7 0 7 1 0号に記載されており、集合的にL L - E 3 3 2 8 8複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5 8 7 7 2 9 6号)が含まれる。

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolaca americana*)プロテイン(P A P I、P A P I I及びP A P - S)、モモルディカ・キャランティア(*momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(*sapaonaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第9 3 / 2 1 2 3 2号を参照のこと。

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【0172】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗 I L - 1 7 A / F 抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、A t^{2 1 1}、I^{1 3 1}、I^{1 2 5}、Y^{9 0}、R e^{1 8 6}、R e^{1 8 8}、S m^{1 5 3}、B i^{2 1 2}、P^{3 2}、P b^{2 1 2}及びL uの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えばt c^{9 9 m}又はI^{1 2 3}、又は核磁気共鳴(N M R)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-1 2 3、ヨウ素-1 3 1、インジウム-1 1 1、フッ素-1 9、炭素-1 3、窒素-1 5、酸素-1 7、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-1 9を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えばt c^{9 9 m}又はI^{1 2 3}、R e^{1 8 6}、R e^{1 8 8}及びI n^{1 1 1}は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-9 0はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)は、ヨウ素-1 2 3の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0173】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カッティング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ビリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, *Science* 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-1 4 標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(M X - D T P A)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第9 4 / 1 1 0 2 6号を

10

20

30

40

50

参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であつてよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, *Cancer Research*, 52: 127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

別法として、抗IL-17A/F抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

他の実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプター-コンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0174】

10. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗IL-17A/F抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688(1985); Hwang等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, *J. Biol. Chem.* 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizon等, *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484(1989)を参照されたい。

【0175】

N. IL-17A/F結合オリゴペプチド

本発明のIL-17A/F結合オリゴペプチドはここで記載される様なIL-17A/Fポリペプチドに、好ましくは特異的に、結合するオリゴペプチドである。IL-17A/F結合オリゴペプチドは、既知のオリゴペプチド合成法を用いて化学的に合成することができ、あるいは組換え技術を用いて調製及び生成することができる。IL-17A/F結合オリゴペプチドは通常、少なくとも約5のアミノ酸長であり、或いは少なくとも約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100のアミノ酸長以上であり、このようなオリゴペプチドはここに記載される様なIL-17A/Fポリペプチドに対して好ましくは特異的に結合する能力がある。IL-17A/F結合オリゴペプチドは、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定す

10

20

30

40

50

ことができる。この点において、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるオリゴペプチドのオリゴペプチドライブラーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する（例えば、米国特許第5556762号、同第5750373号、同第4708871号、同第4833092号、同第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、同第5663143号；PCT公開第WO84/03506号、及びWO84/03564号；Geysen等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等、in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等、J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等、J. Immunol., 140:611-616 (1988)；Cwirla,S.E.等(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman,H.B.等 (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.等 (1991) Nature, 352:624；Marks,J.D.等 (1991) J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363、及びSmith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668参照）。

【0176】

この点において、バクテリオファージ（ファージ）ディスプレイは、大きなオリゴペプチドライブラーを検索して、ポリペプチド標的に特異的に結合する能力のあるこれらライブラーのメンバーを同定することを可能にするよく知られた技術の一つである。ファージディスプレイは、様々なポリペプチドがバクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質に融合タンパク質として表示されることによる技術である（Scott,J.K.及びSmith, G. P. (1990) Science 249:386）。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異体（又はランダムクローンcDNA）の大きなライブラーを標的分子に高い親和性で結合するこれらの配列について素早く効果的に分類することができる点にある。ファージでのペプチド（Cwirla,S.E.等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378）又はタンパク質（Lowman,H.B.ら (1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson,T.ら (1991) Nature, 352: 624；Marks,J.D.等 (1991), J. Mol. Biol., 222:581；Kang,A.S.等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363）ライブラーのディスプレイは、特異的に結合する特性を有するものについて無数のポリペプチド又はオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている（Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668）。ランダム突然変異体のファージライブラーの分類は、多数の変異体を構築して増殖させる方法、標的レセプターを用いた親和性精製の方法、及び結合増強の結果を評価する手段を必要とする。米国特許第5223409号、同第5403484号、同第5571689号、及び同第5663143号。

【0177】

ほとんどのファージディスプレイ法は纖維状ファージを使用していたが、ファージディスプレイシステム（WO95/34683；米国特許第5627024号）、T4ファージディスプレイシステム（Ren, Z-J等(1998) Gene, 215:439；Zhu, Z. (1997) CAN 33:534；Jiang, J等 (1997) can 128:44380；Ren, Z-J等 (1997) CAN 127:215644；Ren, Z-J. (1996) Protein Sci., 5:1833；Efimov, V.P.等 (1995) Virus Genes 10:173及びT7ファージディスプレイシステム（Smith, G.P.及びScott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257；米国特許第5766905号）も知られている。

現在、基礎的なファージディスプレイ構造の多くの他の改良及び変形が開発されている。これらの改良は、選択された標的分子への結合についてペプチドライブラーをスクリーニングするための、及びこれらのタンパク質が所望の特性をスクリーニングする潜在能力で機能性タンパク質をディスプレイするためのディスプレイシステムの能力を増強する。ファージディスプレイ反応のための組み換え反応手段について記載があり（WO98/14277）及びファージディスプレイライブラーは二分子相互作用（WO98/20169；WO98/20159）及び拘束性ヘリックスペプチドの特性（WO98/20036）を分析及び制御するために使用されている。WO97/35196は、リガンドが標的分子に結合しうる第一の溶液、及び親和性リガンドが標的分子に結合しない第二の溶液とファージディスプレイライブラーを接触させて結合リガンドを選択的に単離する

10

20

30

40

50

、親和性リガンドの単離方法を記載する。WO 97 / 46251は、親和性精製抗体でランダムファージディスプレイライブラリーをバイオパニングし、次いで結合ファージを単離し、続いてマイクロプレートのウェルでマイクロパニングして高親和性結合ファージを単離する方法を記載する。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) タンパク質Aの親和性タグとしての使用も報告されている (Li等, (1998) *Mol Biotech.*, 9:187)。WO 97 / 47314は、ファージディスプレイライブラリーでもよいコンビナトリアルライブラリーを用いて酵素特異性を識別するための基質サブトラクションライブラリーの使用を記載している。ファージディスプレイに用いる洗浄剤における使用に適した酵素を選択する方法はWO 97 / 09446に記載される。特異的に結合するタンパク質を選択する更なる方法は、米国特許第5498538号、同第5432018号、及びWO 98 / 15833に記載されている。

ペプチドライブラリーの作製及びこれらのライブラリーのスクリーニングの方法は、米国特許第5723286号、同第5432018号、同第5580717号、同第5427908号、同第5498530号、同第5770434号、同第5734018号、同第5698426号、同第5763192号、及び同第5723323号に記載される。

【0178】

O. IL - 17A / F 結合有機分子

IL - 17A / F 結合有機分子とは、ここに記載されるようなIL - 17A / F ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する、ここに定義されるようなオリゴペプチド又は抗体以外の有機分子である。IL - 17A / F 結合有機分子は既知の方法 (例えばPCT公開第WO 00 / 00823及びWO 00 / 39585号参照) を用いて同定され、化学的に合成されうる。IL - 17A / F 結合有機分子は通常、約2000ダルトンの大きさ未満であり、あるいは約1500、750、500、250又は200ダルトンの大きさであり、ここに記載される様なIL - 17A / F ポリペプチドに、好ましくは特異的に結合する能力のあるこのようない有機分子は、よく知られた技術を用いて過度の実験をすることなしに同定されうる。この点において、ポリペプチド標的に結合する能力のある分子の有機分子ライブラリーを検索する技術は当分野でよく知られていることを注記する (例えばPCT公開第WO 00 / 00823及びWO 00 / 39585号参照)。IL - 17A / F 結合有機分子は、例えばアルデヒド、ケトン、オキシム、ヒドラゾン、セミカルバゾン、カルバジド、一級アミン、二級アミン、三級アミン、N置換ヒドラジン、ヒドラジド、アルコール、エーテル、チオール、チオエーテル、ジスルフィド、カルボン酸、エステル、アミド、尿素、カルバミン酸塩、炭酸塩、ケタール、チオケタール、アセタール、チオアセタール、ハロゲン化アリール、アリールスルホン酸、ハロゲン化アルキル、アルキルスルホン酸、芳香族化合物、複素環化合物、アニリン、アルケン、アルキン、ジオール、アミノアルコール、オキサゾリジン、オキサゾリン、チアゾリジン、チアゾリン、エナミン、スルホニアミド、エポキシド、アジリジン、イソシアニ酸塩、塩化スルホニル、ジアゾ化合物、酸塩化物等であり得る。

【0179】

P. 所望する特性を有する抗IL - 17A / F 抗体、IL - 17A / F 結合オリゴペプチド及びIL - 17A / F 結合有機分子のスクリーニング

IL - 17A / F ポリペプチドに結合する抗体、オリゴペプチド及び有機分子を生成する技術を、上記にて記載した。所望するような、所定の生物学的特性を有する抗体、オリゴペプチド又は有機分子をさらに選択することができる。

本発明の抗IL - 17A / F 抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子の成長阻害効果を、例えば、内因的又はIL - 17A / F 遺伝子によるトランスフェクション後のいずれかでIL - 17A / F ポリペプチドを発現する細胞を用いる当該分野で周知の方法によって評価することができる。例えば、適切な腫瘍細胞株及びIL - 17A / F 形質移入細胞は、数日間 (例えば、2 - 7) 、種々の濃度の本発明の抗IL - 17A / F モノクローナル抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子で処理し、クリスタル・バイオレット又はMTTで染色、又は幾つかの他の比色アッセイによって分析し得る。増殖を測定するその他の方

10

20

30

40

50

法は、本発明の抗 I L - 1 7 A / F 抗体、 I L - 1 7 A / F 結合オリゴペプチド又は I L - 1 7 A / F 結合有機分子の存在又は非存在下で処理した細胞の ³ H - チミジン取り込みを比較することによる。処理の後、細胞を収集し、 D N A へ取り込まれた放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。適切なポジティブコントロールには、細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体でその選択した細胞株を処理することが含まれる。インビボでの成長阻害は、当該分野で知られている種々の方法で確かめることができる。好ましくは、腫瘍細胞は、 I L - 1 7 A / F ポリペプチドを過剰発現するものである。好ましくは、抗 I L - 1 7 A / F 抗体、 I L - 1 7 A / F 結合オリゴペプチド又は I L - 1 7 A / F 結合有機分子は、ある実施態様では約 0 . 5 から 3 0 μ g / m l の抗体濃度で、未処理腫瘍細胞と比べて約 2 5 - 1 0 0 % 、より好ましくは約 3 0 - 1 0 0 % 、そしてさらにより好ましくは約 5 0 - 1 0 0 % 又は 7 0 - 1 0 0 % の I L - 1 7 A / F 発現腫瘍細胞の増殖をインビトロ又はインビボで阻害する。成長阻害は、細胞培養で、約 0 . 5 から 3 0 μ g / m l 又は 0 . 5 n M から 2 0 0 n M の抗体濃度で測定することができ、その成長阻害は、抗体への腫瘍細胞の曝露後 1 - 1 0 日で確かめられる。約 1 μ g / k g から約 1 0 0 m g / k g 体重での抗 I L - 1 7 A / F 抗体の投与が、抗体の最初の投与から約 5 日から 3 ヶ月、好ましくは約 5 から 3 0 日以内に腫瘍の大きさの減少又は腫瘍細胞増殖の減少を引き起こすならば、抗体はインビボで成長阻害作用がある。

【 0 1 8 0 】

細胞死を誘発する抗 I L - 1 7 A / F 抗体、 I L - 1 7 A / F 結合オリゴペプチド又は I L - 1 7 A / F 結合有機分子を選択するために、例えばヨウ化プロピジウム (P I) 、トリパンブルー又は 7 A A D の取り込みにより示される膜インテグリティの損失度合いを対照と比較して求める。 P I 取込みアッセイは、補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる。 I L - 1 7 A / F ポリペプチド発現細胞腫瘍細胞を、培地のみ、又は適切な抗 I L - 1 7 A / F 抗体 (例えば約 1 0 μ g / m l) 、 I L - 1 7 A / F 結合オリゴペプチド又は I L - 1 7 A / F 結合有機分子を含有する培地でインキュベートする。細胞を 3 日間インキュベートする。各処理に続いて、細胞を洗浄し、細胞凝塊除去のために 3 5 m m のストレーナキャップ付き 1 2 × 7 5 チューブ (チューブ当たり 1 m l 、処理グループ当たり 3 チューブ) に等分する。次いで、チューブへ P I (1 0 μ g / m l) を与える。サンプルを F A C S C A N (登録商標) フローサイトメータと F A C S C O N V E R T (登録商標) セルクエスト (CellQuest) ソフトウェア (Becton Dickinson) を使用して分析してもよい。 P I 取込みによって測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗 I L - 1 7 A / F 抗体、 I L - 1 7 A / F 結合オリゴペプチド又は I L - 1 7 A / F 結合有機分子は、細胞死誘発抗 I L - 1 7 A / F 抗体、 I L - 1 7 A / F 結合オリゴペプチド又は I L - 1 7 A / F 結合有機分子として選択することができる。

関心のある抗体が結合した I L - 1 7 A / F ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子をスクリーニングするために、 Antibodies, A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 及び David Lane 編 (1988) に記載されているような通常の交差プロッキングアッセイを実施することができる。既知の抗 I L - 1 7 A / F 抗体のように、試験抗体、オリゴペプチド又は他の有機分子が同じ部位又はエピトープと結合するならば、このアッセイを確定するために用いることができる。あるいは、又は付加的に、エピトープマッピングを、当該分野で周知の方法によって行うことができる。例えば、接触残基を同定するために、例えばアラニンスキャンニングによって抗体配列を変異させることができる。この変異体抗体は、適切なフォールディングを確かめるために、最初にポリクローナル抗体との結合について試験される。異なる方法では、 I L - 1 7 A / F ポリペプチドの異なる領域と一致するペプチドを、試験抗体群又は試験抗体及び特徴付けられた又は既知のエピトープを有する抗体による競合アッセイで用いることができる。

【 0 1 8 1 】

Q . 製薬的組成物

本発明の活性 I L - 1 7 A / F 分子 (例えば、 I L - 1 7 A / F ポリペプチド、抗 - I

10

20

30

40

50

L - 17 A / F 抗体、及び / 又は各変異体) 並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、免疫関連疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。活性 I L - 17 A / F 分子の治療製剤、好ましくは本発明のポリペプチド又は抗体は、所望される程度の純度を持つ活性成分を、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で、最適な製薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより調製され保存される (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；及び m-クレゾールなど)；低分子量 (約 10 残基未満) ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物、E D T A 等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体 (例えば、Zn-タンパク質錯体) 及び / 又はトゥイーン (TWEEN) (商品名)、プルロニクス (PLURONICS) (商品名)、及びポリエチレングリコール (P E G) 等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 2 】

本発明のスクリーニングアッセイによって同定された化合物は、当該分野において良く知られた技術を用いて、類似の方法で製剤化することができる。

また、リポフェクション又はリポソームを I L - 17 A / F 分子を細胞に導入するため利用することができる。抗体断片が用いられる場合には、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び / 又は組換え D N A 技術によって生成できる。例えば、Marascoら, I L - 17 A / F c. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993) 参照。

【 0 1 8 3 】

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に一つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ (メタクリル酸メチル) マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系 (例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル) 中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

インビオ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【 0 1 8 4 】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル (例えば、ポリ (2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) 又はポリ (ビニルアルコール))、ポリアクチド (米国特許第 3,773,919 号)、L-グルタミン酸及び -エチル-

L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUI L - 17 A / FN DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

10

【0185】

R. 治療方法

本発明のポリペプチド、抗体及び他の活性化合物は、例えば、組織への炎症性細胞の浸潤、T細胞増殖の刺激、T細胞増殖の阻害、増加又は減少した血管透過性又はその阻害によって特徴付けられるものを含む、T細胞媒介疾患のような種々の免疫関連疾患及び症状を治療するのに利用することが可能であると考えられている。

20

本発明のポリペプチド、抗体及び他の化合物によって治療される例示的症状又は疾患には、限定されないが、全身性エリテマトーデス、慢性関節リュウマチ、若年性慢性関節炎、変形性関節症、脊椎関節症、全身性硬化症(強皮症)、特発性炎症誘発性筋疾患(皮膚筋炎、多発性筋炎)、シェーグレン症候群、全身性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性溶血性貧血(免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿)、自己免疫性血小板減少症(特発的血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症)、甲状腺炎(グレーブ疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎)、真性糖尿病、免疫性腎臓疾患(糸状体腎炎、尿細管間質性腎炎)、特発性脱髓性多発神経障害、Guillain-Barre症候群、及び慢性炎症誘発性脱髓性多発神経障害のような中枢及び抹消神経系の脱髓性疾患、感染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎及び他の非肝炎性ウィルス)のような肝胆道疾患、自己免疫性慢性活性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎、及び硬化性胆管炎、炎症誘発性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン疾患)のような炎症誘発性及び線維性肺疾患、グルテン感受性腸疾患、及びフィップル疾患、水泡性皮膚疾患を含む自己免疫性又は免疫媒介性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触皮膚炎、乾癬、喘息のようなアレルギー性疾患、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及びジンマシン、好酸球性肺炎のような肺の免疫学的疾患、特発性肺線維症及び高感受性間質性肺炎、移植片拒絶及び移植片対宿主の疾患を含む、移植関連疾患が含まれる。

30

【0186】

全身性エリテマトーデスでは、疾患の中心媒介物は自己タンパク質/組織に対する自己反応性抗体の生成、及び引き続き起こる免疫媒介炎症である。抗体は、直接又は間接的のいずれかによって組織傷害を媒介する。Tリンパ球が直接に組織傷害へ関与していることは示されていないが、Tリンパ球は自己反応性抗体の発生において必須である。従って、疾患の発生はTリンパ球へ依存する。腎臓、肺、筋骨格系、粘膜皮膚、眼、中枢神経系、心臓血管系、胃腸管、骨髄及び血液を含む多臓器及び系が、臨床的に病気で冒される。

40

慢性関節リュウマチ(RA)は、主に複数の関節の滑膜に係る慢性全身性自己免疫疾患であり、結果として関節軟骨に傷害が生じる。病原はTリンパ球依存であり、リウマチ因子、自己IgGに指向する自己抗体の生成を付随し、結果として関節体液及び血液において高レベルに達する免疫複合体が形成される。関節におけるこれらの複合体は、滑膜へのリンパ球及び単球の顕著な浸潤と、続いての顕著な滑膜変化を誘発する;多数の好中球の添加により同様の細胞で浸潤されるならば関節空間/体液でもある。影響を受けている組織は、多くの場合対称的なパターンで主に関節である。しかしながら、2つの主な形態の関節外疾患も生じる。一方の形態は進行中の進行性関節疾患及び肺線維症の局部的障害

50

、血管炎、及び皮膚潰瘍を伴う関節外障害の発達である。関節外疾患の第2の形態はいわゆるフェルティー症候群であり、R A疾患経路の末期、時々は関節疾患が鎮静した後に生じ、好中球減少、血小板減少及び脾肥大の存在に関与する。これは、梗塞、皮膚潰瘍及び壞疽の形成を伴う多数の器官及び血管炎に付随する。多くの場合、患者では、発病している関節上にある皮下組織にリウマチ様小結節が発達し；小結節は、混合炎症細胞浸潤に包囲された壞死性中心を有する。R Aで生じる可能性のある他の徵候には：心外膜炎、胸膜炎、冠動脈炎、肺線維症を伴う間質性肺炎、乾性角結膜炎、及びリウマチ様小結節が含まれる。

【0187】

若年性慢性関節炎は、多くの場合16才以下で発症する慢性特発性炎症疾患である。その表現型はR Aといいくつかの類似点があり；リウマチ因子がポジティブである患者の中には若年性リウマチ様関節炎に分類されるものもいる。この疾患は主な3つのカテゴリー：小関節(pauciarticular)、多関節(polyarticular)及び全身性ものに亜分類される。関節炎は重度で局所的な破壊が生じ、関節強直症及び遅延成長に至るおそれもある。他の徵候には慢性前ブドウ膜炎及び全身性アミロイド症が含まれる。

脊椎関節症は、一般的にH L A - B 2 7 遺伝子生成物の発現に関連した、いくつかの共通した臨床的特徴を有する疾患のグループである。疾患には：強直症、脊椎炎(spondylitis)、ライター症候群(反応性関節炎)、炎症性大腸疾患に関連した関節炎、乾癬に関連した脊椎炎、若年発生脊椎関節症及び未分化脊椎関節症が含まれる。区別する特徴には、脊椎炎を伴うか伴わない仙腸関節炎；H L A - B 2 7 (血清学的には、クラスI M H CのH L A - B 座位にある定義された対立遺伝子)を伴う炎症非対称性関節炎；眼の炎症、及び他のリウマチ疾患に関連した自己抗体の不在が含まれる。疾患の誘導における鍵として関わるほとんどの細胞はC D 8⁺ Tリンパ球であり、クラスI M H C分子により付与される抗原を標的としている細胞である。C D 8⁺ T細胞は、M H CクラスI分子により発現した外来ペプチドであるかのように、クラスI M H C対立遺伝子H L A - B 2 7 と反応する。H L A - 2 7 のエピトープが細菌性又は他の微生物の抗原エピトープを模倣し、よってC D 8⁺ 細胞の反応が誘発されると仮定されている。

【0188】

全身性硬化症(強皮症)は病因がよく知られていない。疾患の特徴は皮膚の硬化であり；これは活性化炎症プロセスにより誘発される。強皮症は局部的又は全身的であり：血管障害が一般的で、微小血管系における内皮細胞傷害は全身性硬化症の発達における初期の重要な事象であり；血管傷害は免疫媒介される。免疫学的基準では、皮膚障害における単核細胞浸潤の存在、多くの患者において抗細胞核抗体の存在を意味する。多くの場合、I C A M - 1 は皮膚障害における線維芽細胞の細胞表面をアップレギュレーションし、これらの細胞と相互作用するT細胞が疾患の病因における役割を担っていることが示唆される。関連する他の器官には：胃腸管：萎縮症及び線維症があり、結果として異常なぜん動/運動性となっている平滑筋；腎臓：小弓形及び小葉間動脈に影響を及ぼし、結果として腎皮質の血流が低下し、タンパク尿、高窒素血尿及び高血圧になる同心性内皮下内膜増殖；骨格筋：萎縮、間質性線維症；炎症；肺：間質性肺炎及び間質性線維症；及び心臓：収縮バンド壊死、瘢痕/線維症が含まれる。

皮膚筋炎、多発性筋炎及び他のものを含む特発性炎症ミオパシーは病因がよく知られていない慢性筋肉炎症疾患であり、筋肉の弱化に至る。筋肉損傷/炎症は多くの場合対称的で進行性である。自己抗体は多くの形態と関連している。これらの筋炎特異的自己抗体は、タンパク質合成に係る成分、タンパク質及びR N Aに対しても産生されてその機能を阻害する。

シェーグレン症候群は、免疫媒介炎症、続く涙腺及び唾液腺の機能破壊によるものである。この疾患は炎症結合組織疾患を伴うか又は伴わない。この疾患は、双方ともが小R N A - タンパク質複合体であるR o及びL a抗原に対する抗体産出に関連している。障害により、結果として乾性角結膜炎、biliary硬変を含む他の徵候又は会合を伴う口内乾燥、末梢又は感覚ニューロパシー、及び明白な紫斑病に至る。

10

20

30

40

50

【0189】

全身性血管炎症症は主な障害が炎症で、続いて血管にダメージを受け、結果として影響を受けた脈管により供給される組織に虚血／壞死／変性が生じ、最終的な末端器官ではいくつかのケースで機能障害になるといった疾患である。また、第2の障害として血管炎(vasculitides)、又は他の免疫炎症媒介疾患、例えばリウマチ様関節炎、全身性硬化症等、特に免疫複合体の形成に関連した疾患等の続発症が生じるおそれがある。主な全身性血管炎症症グループの疾患には：全身壞死性血管炎：多動脈炎結節(polyarteritis nodosa)、アレルギー性脈管炎、及び肉芽腫症、多脈管炎：ヴェグナー肉芽腫症；リンパ腫様肉芽腫症：及び巨細胞動脈炎が含まれる。種々の血管炎には：粘膜皮膚リンパ節症候群(MLN S又は川崎病)、単離したCNS血管炎、ベヘット(Behet's)病、閉塞性血栓性血管炎(バージャー病)及び皮膚壞死性細静脈炎(venulitis)が含まれる。列举した血管炎のほとんどの種類の病原メカニズムは、主に脈管壁に免疫グロブリン複合体が付着し、続いてADC、補体活性又は双方を介して炎症反応が誘発されることによると考えられている。

サルコイドーシスは、体内的ほとんど任意の組織中に類上皮細胞肉芽腫が存在し、肺ではほとんど一般的に包含されることにより特徴付けられる、病因がよく知られていない病状である。病原には疾患部位に活性マクロファージ及びリンパ球が残留していることに関連しており、続いてこれらの細胞種より放出される局部的又は全身的活性物質の放出の結果として慢性続発症が生じる。

【0190】

自己免疫性溶血性貧血、免疫再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿を含む自己免疫性溶血性貧血は、赤血球細胞(いくつかのケースにおいては、血小板を含む他の血液細胞)表面で発現する抗原と反応する抗体が産出される結果によるものであり、補体媒介溶解及び/又はADC/C/Fc-レセプター-媒介メカニズムを介して、その抗体被覆細胞の除去に反映される。

他の臨床的セッティング(setting)における血小板減少性紫斑病及び免疫介在血小板減少を含む自己免疫性血小板減少では、抗体又は補体が血小板に接合し、続いて補体溶解、ADC/C又はFc-レセプター-媒介メカニズムによる除去の結果として生じる。

【0191】

グレーブス疾患、ハシモト甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎を含む甲状腺炎は、甲状腺内に多くの場合特異的に存在するタンパク質と反応する抗体の産出を伴う、甲状腺抗原に対する自己免疫反応の結果によるものである。実験用モデルには：内在的モデルラット(BUF及びBBラット)及びチキン(肥満チキン種)；誘導性モデル：チログロブリン、甲状腺ミクロソーム抗原(甲状腺ペルオキシダーゼ)を用いた動物の免疫化が含まれる。

I型真性糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病は膵臓小島細胞の自己免疫破壊であり；この破壊は自己抗体及び自己反応性T細胞により媒介される。また、インシュリン又はインシュリン様レセプターに対する抗体は、インシュリン-非-反応性の表現型を産出することができる。

【0192】

糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を含む免疫介在腎疾患は、腎抗原に対する自己反応性抗体又はT細胞が産出される結果により直接的に、又は他の非腎抗原に対して反応する、腎臓における抗体及び/又は免疫複合体の沈着の結果により間接的に、腎組織に抗体又はT細胞媒介傷害が生じることによるものである。よって、免疫複合体の形成の結果生じる他の免疫媒介疾患により、間接的続発症等の免疫媒介腎疾患が誘発される。直接的及び間接的免疫メカニズムの双方により、結果として腎組織における障害発達が産出/誘発されるといった炎症反応が生じ、器官機能が損なわれ、いくつかのケースでは腎臓機能不全が進行する。体液及び細胞免疫メカニズムに双方が障害の病原に関与している。

多発性硬化症のような中枢及び末梢神経系の脱髓鞘疾患、特発性脱髓性多発神経障害、又はギラン-バレー症候群；及び慢性炎症脱髓性多発神経障害は、自己免疫基準であり、神経脱髓が生じて、オリゴデンドロサイト又はミエリンに直接的に起因するダメージの結果

によるものと考えられている。MSにおいて、疾患の誘発及び進行はTリンパ球に依存すると示唆される証拠がある。多発性硬化症は、Tリンパ球依存性であり、再発性弛緩経路又は慢性進行経路のいずれかを有する脱髓疾患である。病因はよく知られていないが、ウイルス感染、遺伝的素因、環境及び自己免疫性の全てが寄与している。障害はT細胞媒介小膠細胞の優先的潤滑、及びマクロファージの浸潤を含み；CD4⁺ Tリンパ球は障害において優先的な細胞型であった。オリゴデンドロサイトの細胞死及び続く脱髓のメカニズムはよく知られていないが、Tリンパ球の駆動によると思われる。

【0193】

好球性肺炎；特発性肺線維症及び過敏性肺炎のような炎症及び線維症の肺疾患には、調節されない免疫炎症反応が関連している。反応を阻害することは治療的に有益である。10

水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎を含む自己免疫又は免疫媒介皮膚疾患は自己抗体により媒介され、Tリンパ球に依存して発生する。

乾癬はTリンパ球媒介炎症疾患である。障害はTリンパ球、マクロファージ及び抗原プロセシング細胞及びある種の好中球の浸潤が含まれる。

【0194】

喘息；アレルギー性鼻炎；アトピー性皮膚炎；食物過敏症及び蕁麻疹等を含むアレルギー性疾患はT細胞依存性である。この疾患は炎症により誘発されるTリンパ球、及びIgE媒介炎症、又は双方の組合せにより主に媒介される。

拒絶反応及び移植片対宿主疾患(GVHD)を含む移植関連疾患は、Tリンパ球依存性であり；Tリンパ球の機能を阻害することで改善される。20

【0195】

免疫及び/又は炎症反応への介在が有益である他の疾患には、限定するものではないがウイルス感染(限定するものではないがAIDS、A型、B型、C型、D型及びE型肝炎、ヘルペス)、細菌感染、真菌感染、原生動物感染及び寄生虫感染(MLRを刺激する分子(又は誘導体/アゴニスト)を治療に利用し、感染要因に対する免疫反応性を増強することができる)、MLRを刺激する(分子/誘導体/アゴニスト)を治療に利用し、受け継ぎ、獲得し、感染誘発された(例えばHIV感染)又は医原性(例えば化学療法)免疫欠損疾患の病状に対する免疫反応を増強することができる免疫欠損疾患、及び異常増殖が含まれる。

幾つかのヒト癌患者において、腫瘍性細胞上の抗原に対する抗体及び/又はTリンパ球が発生することが示されている。また、免疫応答の増加によって、その特定の腫瘍の拒絶又は退行を引き起こすことができるが、腫瘍形成の動物モデルにおいて示されている。MLRにおけるTリンパ球の応答を高める分子(又はアゴニストの方法で同じレセプターへ影響を与える小分子アゴニスト又は抗体)を、癌治療へ治療的に用いることができる。また、MLRにおいてリンパ球の応答を阻害する分子は、腫瘍形成の間に、インビボにおいて腫瘍に対する免疫応答を抑制する；このような分子は、腫瘍性細胞そのものによって発現されるか、或いは他の細胞の腫瘍がその発現を誘導できる。このような分子の拮抗効果(抗体、小分子又は他の手段の何れかとともに)は、免疫性腫瘍拒絶反応を高める。30

【0196】

その上に、炎症誘発性特性を有する分子の阻害作用は、再灌流傷害；発作；心筋梗塞；アテローム性動脈硬化症；急性肺障害；出血性ショック；火傷；敗血症/敗血性ショック；急性腎尿細管壞死；子宮内膜症；変形性関節疾患及び肺炎にとって治療的に有益である。本発明の化合物、例えばポリペプチド又は抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトに、周知の方法、例えば、ボーラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入(鼻腔内、肺内)経路などにより投与される。ポリペプチド及び抗体の静脈内又は吸入投与が好ましい。免疫アジュバント療法では、抗癌剤の投与のような他の治療的養生法を本発明のタンパク質、抗体又は化合物の投与と組み合わせてもよい。また、本発明の免疫アジュバントで治療される患者は、抗癌剤(化学療法剤)又は放射線治療を受けてもよい。このような化学治療剤の調製法及び用量スケジュールは、製造者の指示に従って使用されるか、熟練4050

した実務者により経験的に決定される。そのような化学治療に対する調製法及び用量スケジュールはまたChemotherapy Service M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。化学治療剤は、免疫アジュバンドの投与に先立って、又は続いて投与してもよく、あるいはそれらと同時に投与してもよい。その上に、抗-エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン等の抗エストロゲン化合物又はオナブリストンなどの抗-プロゲステロン (EP 616812参照) を、これらの分子について知られた用量で与えてもよい。また、他の免疫疾患関連又は腫瘍関連抗原に対する抗体、例えばCD20、CD11a、CD18、Erbb2、EGFR、Erbb3、Erbb4、又は血管内皮因子 (VEGF) に結合する抗体を投与することも好ましい。あるいは、又はその上に、ここで開示される同じ又は二つ以上の異なる抗原と結合する二つ以上の抗体を、患者へ同時投与してもよい。時折、患者にサイトカインを投与することも有利である。好ましい実施態様では、本発明のポリペプチドを、成長阻害剤と同時投与する。例えば、まず最初に成長阻害剤を投与し、続いて本発明のポリペプチドを投与する。しかしながら、同時投与、又は最初に投与することも考えられる。成長阻害剤についての適切な用量は、現在用いられている量であり、成長阻害剤と本発明のポリペプチドとの組み合わせ (相乗) 効果により減少させてもよい。免疫関連疾患の治療又は感度の縮小のためには、本発明の化合物の適切な用量は、上記に定義したような治療される疾患の型、疾患の重篤さ及び経過、防止又は治療目的で薬剤が投与されるか否か、従前の治療、患者の臨床履歴及び薬剤に対する反応、及び主治医の裁量に依存する。薬剤は、患者に一回又は一連の治療に渡って適切に投与される。

10

20

30

40

【0197】

例えば、1又はそれ以上の別々の投与あるいは連続注入のどちらでも、例えば、疾患の型及び重篤さに応じて、約1 μ g/kgから15mg/kg (例えば、0.1-20mg/kg) のポリペプチド又は抗体が、患者に投与するための最初の候補用量である。典型的な1日の用量は、上記の要因に応じて、約1 μ g/kgから100mg/kg又はそれ以上であろう。数日以上に渡る繰り返し投与のためには、状態に応じて、疾患の徴候に所望の抑制が現れるまで治療が続けられる。しかしながら、他の用量計画が有用であることもある。従来の技術及びアッセイによって、この治療の進行は容易にモニターされる。

【0198】

S. 製造品

本発明のその他の実施態様では、上記の疾患の診断又は治療に有用な物質を含む製造品が提供される。この製造品は容器とラベルとを含んでなる。好適な容器は、例えば、ピン、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、ガラス又はプラスチックなどの材料から形成されてよい。容器は、状態を診断し治療するのに有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る (例えば、容器は皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の活性剤は本発明のポリペプチド又は抗体である。容器上又は添付されるラベルは、組成物が選択した状態の診断又は治療のために使用されることを示す。製造品はさらに、リン酸緩衝塩水、リンガー液及びデキストロース溶液などの製薬的に許容される緩衝液を含む第2の容器を具備してもよい。さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を付けたパッケージ挿入物を含む商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0199】

T. 免疫関連疾患の診断及び予後

細胞表層タンパク質、例えばある免疫関連疾患において過剰発現するタンパク質は、候補薬や疾患療法にとって優れた標的である。免疫関連疾患で増幅した遺伝子によってコードされている分泌タンパク質に加えて、これと同じタンパク質には、これら疾患の診断及び予後において更なる用途があることが見出されている。例えば、多発性硬化症、リュウマチ関節炎、又はその他の免疫関連疾患において増幅した遺伝子のタンパク質生産物に対する抗体は、診断上に又は予後兆候として利用できる。

例えば、抗体断片を含む抗体は、増幅又は過剰発現した遺伝子 (「マーカー遺伝子産物

50

」)によってコードされたタンパク質の発現の定性的又は定量的検出に用いることができる。抗体は、好ましくは検出可能な、例えば蛍光標識を備え、結合は光学顕微鏡、フローサイトメトリー、蛍光定量法、又はこの分野で知られた他の技術によってモニターできる。過剰発現している遺伝子が細胞表層タンパク質をコードする場合には、これらの技術は特に適している。このような結合アッセイは、上記に記載のように原則的に実施される。

【0200】

マーカー遺伝子産物に結合する抗体のインไซツ検出は、例えば、免疫蛍光又は免疫電子顕微鏡によって実施できる。この目的のために、組織学的試料を患者から取り出し、好ましくは生物学的試料に抗体を被せることにより、標識抗体をそれに適用する。また、この手法によって、試験される組織におけるマーカー遺伝子産物の分布の決定を可能にする。当業者には、インサイツ検出のために広範な組織学的方法が容易に利用できることは明らかであろう。

【0201】

以下の実施例は例示目的のためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献は、その全体を出典明示によりここに取り入れる。

【0202】

(実施例)

実施例で言及されている全ての他の市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカン・タイプ・カルチャ・コレクション、マナッサス、バージニアである。

【0203】

実施例1: IL-17A/Fとして同定された新規IL-17サイトカインの組換え発現
IL-17及びIL-17FをコードするcDNA発現ベクターによるヒト293腎臓細胞の形質移入

リン酸カルシウム沈降手順を用いることにより、ヒト293腎臓細胞に、IL-17、IL-17C及びIL-17F遺伝子をコードする等量のプラスミドを形質移入した。それぞれ集密度50%~80%のT-150フラスコに、50μgずつのプラスミドを混合することにより、細胞の上に沈降層を形成した。形質移入から1日後、10%のFCS、5mMのL-グルタミン、ペニシリン-ストレプトマイシンを含むF12:D MEM(50:50)を除去して無血清のPS24培地で置換し、さらに4日間培養した。4日後、条件培地を回収して遠心分離し、無菌フィルターにかけ、その後精製した。

【0204】

組換えIL-17A/Fの精製

A. 最初の分画ステップ1:

ヒト293腎臓細胞の過渡的培養物から得た2.5リットルの組換えIL-17A/F条件培地を濃縮し、480ミリリットルの容積に対して10キロダルトンのカットオフ膜を用いることにより、20mMの酢酸ナトリウム(pH5.0)、1mMのアジ化ナトリウム(バッファーA)に透析し、次いで6ml/分でPharmacia HiLoad S-Sephadex 26/10カラムに適用した。カラムを100%のバッファーB(20mMの酢酸ナトリウム、1MのNaCl、1mMのアジ化ナトリウム、pH5.0)に、1%/分の割合及び6ml/分の流速で、線形勾配で溶出し、12mlの分画を回収した。このカラムから回収した分画に対し、SDS PAGE分析を実施した。銀染色によりタンパク質を可視化した。分画25~37を含むゲルに分子量マーカーで標識した(図2)。分画31及び32は、IL-17A/Fと一致する見かけ上の分子量約33kDを有するタンパク質を含んでいた。

【0205】

B. IL-17A/Fの精製

10

20

30

40

50

4 ml の分画 32 (図 2) を 0.1% のトリフルオロ酢酸を用いて酸性化し、次いで 0.1% のトリフルオロ酢酸 (バッファー C) で平衡化したバイダック C4 カラムに 0.5 ml / 分で適用し、100% のバッファー D (0.1% トリフルオロ酢酸を含む 100% アセトニトリル) に 3 段階の勾配 (0 - 35% D : 10 分間、35 - 50% D : 35 分間、50 - 100% D : 10 分間) に分けて徐々に溶出した。図 2 には、214 nm 及び 280 nm で測定された溶出タンパク質を示す。プロファイルにアセトニトリルステップ勾配を重ねている。分画 38 のタンパク質濃度は、アミノ酸分析により 0.536 mg / ml と判明した。この分画に対し、ゲルアッセイ、プロットアッセイ、アミノ酸配列アッセイ及び活性アッセイを行った。

Hi Load S Sepharoseを行った分画 31 及び分画 32 の残余容積をプールし、10 kD のカットオフ膜を用いて 8 時間に亘りバッファー A に透析し、0.2 ミクロンのフィルタに通した。バッファー A で平衡化した Mono S カラムに、1 ml / 分の流速でこの物質を充填し、3 段階の勾配 (0 - 30% B : 10 カラム容量、30 - 75% B : 45 カラム容量、75 - 100% B : 10 カラム容量) を用いて 100% のバッファー B に溶出し、1 ml / 分画を回収した。分画 26 - 43 をアッセイし、アミノ酸分析によりタンパク質濃度を測定した。分画 31、32 及び 33 の濃度は、それぞれ 0.258 mg / ml、0.359 mg / ml 及び 0.291 mg / ml であった。ゲルアッセイ、プロットアッセイ、アミノ酸配列アッセイ、質量分光光度法及び活性化アッセイを主に分画 32 及び 33 に対して行った。ウェスタンプロットティングを用いて、クロマトグラフィーによって生成された分画の IL-17 及び IL-17F 含有量をアッセイした。IL-17 又は IL-17F に対するモノクローナル抗体を 1 μg / ml 使用して、試料中の IL-17 又は IL-17F の存在を検出した。

【0206】

IL-17A / F の質量分光分析

成熟 IL-17A / F のアミノ酸配列及び鎖間ジスルフィド結合を、質量分光分析により決定した (図 4A 参照 ; 鎖間及び鎖内ジスルフィド結合を有する IL-17A / F ヘテロ二量体ポリペプチドを示す)。2 つの鎖間ジスルフィド結合が、IL-17F と IL-17 ポリペプチド鎖の間 [それぞれ残基 47_{IL-17F} と残基 129_{IL-17} の間 ; 及び残基 137_{IL-17F} と残基 33_{IL-17} の間 (図 4A の太線)] に検出された。加えて、2 つの鎖内ジスルフィド結合がホモ二量体ポリペプチド鎖 IL-17 [残基 102 と 152 の間 ; 及び残基 107 と 154 の間] 及び IL-17F [残基 94 と 144 の間 ; 及び残基 99 と 146 の間] (図 4A の細線) にそれぞれ形成されていた。アミノ酸の、各前駆ポリペプチド鎖の開始メチオニンと相対的に番号を付した (図 4A)。図 4B は、トリプシンによる IL-17A / F の消化によって予測される、IL-17 と IL-17F 鎖の間にジスルフィド結合を含む IL-17A / F ペプチド断片を図式的に示す [それぞれ、IL-17A / F ジスルフィド結合断片 #1 を配列番号 7 と、IL-17A / F ジスルフィド結合断片 #2 を配列番号 8 と命名する]。これらの断片に含まれるアミノ酸の、各鎖の開始メチオニンを示し、相対的に番号を付している。

質量分光法により観察されるこれら断片の計算による凡その分子量を、図 4B に 3410.58 Da 及び 2420.05 Da と示す [それぞれ IL-17A / F ジスルフィド結合断片 #1 及び #2]。マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 - 飛行時間型質量分析法 (MALDI - TOF) によるペプチドマッピングを行った (図 4C)。400 mM の NaCl、20 mM の NaOAc バッファー (pH 5) 中で、プロメガ配列決定グレードトリプシンを用いて 55 pmol の IL-17A / F を 37° で一晩消化させた。マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 - 飛行時間型質量分析 (MALDI - TOF) を実行し、その後 2', 4', 6' - トリヒドロキシアセトフェノンマトリックスを用いた陽イオン反射モードで抽出した。その結果得られたペプチドマップにおけるピーク [M + H] は、断片 #2 が 2420.12 Da、断片 #1 が 3410.60 Da であり、ジスルフィド結合ペプチドと呼応していた (図 4C)。ジチオスレイトールによるジスルフィド結合の低減及びヨードアセトアミドによるスルフィドリル基のアルキル化を行った後、第 2 の

10

20

30

40

50

試料の一定分量を pH 8 で消化した。この試料の M A L D I - T O F スペクトルには消化のピークが無く、それらジスルフィド結合の配置が示された。液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化マップ質量分析 (L C - E S I - M S) により、更に非還元試料の特徴付けを行った (図 4 D)。イオンクロマトグラムは (順に) イオンクロマトグラム全体、 I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 2 [M + 2 H] 2 + の再構築されたイオンクロマトグラム (R I C) 、及び I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 1 [M + 2 H] 3 + の再構築されたイオンクロマトグラム (R I C) を表す。両方のヘテロ二量体に一貫性のあるピークが観察された一方、ホモ二量体ペプチドの予測質量において背景の化学ノイズ上にはピークは観察されず、 I L - 1 7 又は I L - 1 7 F ホモ二量体の不在が示された。次いで、ジスルフィド結合ヘテロ二量体の成分をタンデム質量分析法によって確認した。 m / z 1 2 1 0 . 9 において二重に荷電された前駆体の衝突誘発性解離は、 I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 2 に対応しており、 m / z 1 1 3 8 . 0 で三重に荷電された前駆体は I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 1 に対応していた。予測された b - 及び y - イオンシリーズ断片のピークが、対応するスペクトルに観察された。

【 0 2 0 7 】

I L - 1 7 A / F に結合する抗体のファージライブリスクリーニング

I L - 1 7 A / F に結合する抗体を同定するため、合成 F a b 抗体のファージライブリをスクリーニングした。別個の F a b 抗体配列をコードする 3 4 の独立したクローンを同定した。これらは I L - 1 7 A / F への結合を媒介することができた。ヒト抗体配列のファージライブリを調製し、前述の方法 (Gerstner, R. B. 等、 J. Mol. Biol., 321(5) : 851-62 (2002)) と同様にして抗原特異性 F a b についてスクリーニングした。簡単に説明すると、ヒト化モノクローナル抗体 4 D 5 、抗 H E R 2 抗体を足場として用いてファージディスプレイされた F a b ライブリを構築した。一価的に、及び / 又はホモ二量体化可能なロイシンジッパーへの融合により二価的に、これらの F a b をファージに表示した。ライブリに多様性を持たせるため、本発明者は、天然抗体配列の K a b a t データベースにおいても非常に多様で、近接パッチを形成することが分かっている表面露出重鎖 C D R 残基をランダム化するように選択した。さらに、目的に合わせて変性させたコドンを有する部位特異的突然変異誘発を用いることにより、各 C D R 部位において天然免疫レパートリーを模倣するアミノ酸多様性を作り出した。重鎖の最初の 2 つの C D R である H 1 及び H 2 はハーセプチンと同じ長さに制限され、多様性が限定されていたが、 H 3 は 7 ~ 1 9 の長さを有し、高い縮重度を有するように設計されている。最初のライブリ選択から生成された全ての抗体は同じ軽鎖を有する。所望のアイソタイプ特異的定常領域配列を有するベクターに重鎖可変ドメインを第一工程クローニングすることにより、完全長 I g G 又は F a b を生成することができた。重鎖ライブリからの結合剤の親和性をさらに向上させるため、軽鎖 C D R の第二工程のランダム化を行った。 I L - 1 7 A / F に結合する F a b 由来の 3 つの C D R [H 1 ~ H 3] を含む重鎖の可変ドメインの領域のアミノ酸配列を図 6 に示す。図示されているのは、 I L - 1 7 A / F に結合することができる個別の抗体重鎖配列をコードする 3 4 の F a b クローンに予測されるアミノ酸配列の領域を整列させたものである。 3 つの重鎖 C D R 領域は、それぞれ C D R - H 1 、 C D R - H 2 及び C D R - H 3 と示されている。各クローンに対応する配列番号は以下の通りである。

クローン # 1 = 配列番号 9 ; クローン # 2 = 配列番号 1 0 ; クローン # 3 = 配列番号 1 1 ; クローン # 4 = 配列番号 1 2 ; クローン # 5 = 配列番号 1 3 ; クローン # 6 = 配列番号 1 4 ; クローン # 7 = 配列番号 1 5 ; クローン # 8 = 配列番号 1 6 ; クローン # 9 = 配列番号 1 7 ; クローン # 1 0 = 配列番号 1 8 ; クローン # 1 1 = 配列番号 1 9 ; クローン # 1 2 = 配列番号 2 0 ; クローン # 1 3 = 配列番号 2 1 ; クローン # 1 4 = 配列番号 2 2 ; クローン # 1 5 = 配列番号 2 3 ; クローン # 1 6 = 配列番号 2 4 ; クローン # 1 7 = 配列番号 2 5 ; クローン # 1 8 = 配列番号 2 6 ; クローン # 1 9 = 配列番号 2 7 ; クローン # 2 0 = 配列番号 2 8 ; クローン # 2 1 = 配列番号 2 9 ; クローン # 2 2 = 配列番号 3 0 ; クローン # 2 3 = 配列番号 3 1 ; クローン # 2 4 = 配列番号 3 2 ; クローン # 2 5 = 配列番号 3 3 ; クローン # 2 6 = 配列番号 3 4 ; クローン # 2 7 = 配列番号 3 5 ; クローン #

10

20

30

40

50

28 = 配列番号36 ; クローン#29 = 配列番号37 ; クローン#30 = 配列番号38 ; クローン#31 = 配列番号39 ; クローン#32 = 配列番号40 ; クローン#33 = 配列番号41 ; クローン#34 = 配列番号42。

加えて、34のクローンの各々に対応するコード化DNA配列を以下の表7に示す（それぞれ配列番号43～76）。

【0208】

表7

配列番号43 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAGTGATTCCGCTATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 10
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTGGGATTACTCCTTATAGCGGTTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGAAAGAGGCCGAGGGCTACGACGTCGGCTACGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号44 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAGTGATTCCCTATATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 20
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTGAAATTCTCCTGGCGCGATACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGTCTTGTGGTGGGGACTGGGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号45 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTACTAATACTGGATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 30
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTTATTACTCCTTATGGCGGTCTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGAAAGAGAGATGTGGAGTAAGTTGACTACTGGGTCAA
配列番号46 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAAATAGTCTGCTATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 40
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGGTTATTACTCCTGATAACGGTACTAACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGCGGCCACGGCAACTTCTACGGTACCTGGCGGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号47 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAGTGGTTCTGATATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 50
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTTATTACTCCTTATGGCGGTCTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGTGCACGGAGATGTGGTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号48 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTACTAATTCTGGATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 60
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGGTTATTACTCCTCTAGCGGTTCTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGTGAGGTCTTCCCCGACATCGGGACTGCAGCAACGCCACTGCTACGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号49 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTACTAGTACTTATATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 70
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTGGATTCTCCTTATAGCGGTTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGTGAGGCCAGGGCTGTACCGACTCGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号50 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAGTGGTTCTGGATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 80
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTGGATTCTCCTTATGACGGTTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGTGGGTCTACTTGGGGCTACGATATGGACTACTGGGTCAA
配列番号51 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTACTAGTACTTATATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 90
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTGGATTCTCCTGCTGACGGTCTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCTCGTGGGTCTACTTGGGGCTACGATATGGACTACTGGGTCAA
配列番号52 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAAATGATTCTGATATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 100
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGGTATTCTCCTTATGACGGTTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT
TATTGTGCAAGAAGCAACCTGGACAACAATTGTTGACTACTGGGTCAA
配列番号53 : TTGTCCCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCCATTAAATGGTTACTGGATAACACTGGGTGCGTCAGGCC 110
GGGTAAGGCCCTGGAATGGGTTGCTGATATTAACTCCTAATGGCGGTCTACTAATGCCGATAGCGTCAAGGCCGTT
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTAT

TATTGTGCTCGCCTACCGGTGCGCGGGCTGCCGACTGGGCCGGGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 5 4 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTAGTGGTTCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTATTACTCCTCTGGCGTAATACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGTGGGTCTCGCCGTGCGACCGCCGGTACCCCTGGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 5 5 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTACTGATTCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTCTATTACTCCTATAACGTAATACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGCAGGGGGAGTCCGACGAGGCCAACAGCAGCTTACCGCCTCCAGTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 5 6 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTAGTGTCCGATATAACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTACTATTACCTGCTAGCGGTTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGCGCGCCAACAGCAGCTTACCGCCTCCAGTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 5 7 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTACTGATAATTATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGGATTCTCCTATAGCGGTTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGTGGACCCCTTCTACGACAAGGACAGTACTCCTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 5 8 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTAGTGTCTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTCTCCTTATAGCGGTTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGCGAGGGACACCTGGAAGTGGACGCCGTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 6 0 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTACTAATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTCTCCTTATAGCGGTTACTGACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGCGAGATCTGCTGGACTACGTTCCGCCGTACGCTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 6 1 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTACTAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTATTACTCCTACTAACGGTTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGCGAGGTGTTGGGGCGACGGCCACGGTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 6 2 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTAGTGTCTTATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGGGATTACTCCTGCTAGCGGTTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
TCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
TATTGTGCTCGCTGCCGGGGTGTTCGACGGGGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 6 3 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTAGTGTATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTAGGATTAATCCTCTGGCGTTACTAACGCTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
ATTGTGCTCGTACCGCGTACACCACTACGTTGGCGACTGGTTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 6 4 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTATTACTCCTTACCGTTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
ATTGTGCTCGCGTACGTACTACGTTACAGGCACGACTGGGTACGGGCTACGTTATGGACTACTGGGTCAA
配列番号 6 5 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTACTGATACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCC
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTATTACTCCTTACGGTTACTTACTATGCCGATAGCGTCAAGGCC
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCC
ATTGTGCAAGAGACGGGGCTTCTCGATTACTGGGTCAA
配列番号 6 6 : TTGTCCTGTGAGCTTCTGGCTTACCAATTAGTGTATTCTTACACTGGGTGCGTCAGGCC 50

GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTTTATTTACTAGCGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGACGTGCCTCGTACGGGTGAGCAAGTGGACCTTGACTACTGGGTCAA

配列番号 6 7 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACGGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTGGATTTCCTCTAACGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGCGTCAGCTACTACGTCTACAGGACACTGGTCAAGGGCTACGTTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 6 8 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTTATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTGGATTTCCTCTAACGGTTACTAACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCAAGAGAGGCCCCCTCGTTGAGCGCGACTACGCTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 6 9 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTGGATTTCCTCTAACGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGTAGTCCGGCTCTCCCGTGCAACACGCGGGCGTACGCTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 7 0 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTGATTCTGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGGTTCTATTACTCCTAACGGTAATACTGACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGCAGGGGGAGTCCGACGAGGCCTACCCCGGGTTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 7 1 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTAGTACCGCTATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTGGATTACTCCTATGACGGTTACTGACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACTAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGTACGTGGTCACGCTGGCTCGGCTATGAACTACTGGGTCAA

配列番号 7 2 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTGAACTGGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTGGATTTCCTACTAACGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGTAGGGTCGACTACCAGGTCTACACGACCGCTCGAGGAGGGTACGCTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 7 3 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTGAACTGGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTTCCTGATAACGGTACTAACACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGTAAGTTCTGGGCTGGACTGGGGGTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 7 4 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTGAACTGGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGGGTGATATTACTCCTACTGACGGTTACTGACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGTAACTGATGTGGTGGACTCGTCGGCTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 7 5 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTGAACTGGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGGTTTTATTTACTCCTAACGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCTCGTATGTCGTTGATCGGTTCTCGTACGCTATGGACTACTGGGTCAA

配列番号 7 6 : TTGTCCGTGAGCTCTGGCTCACCATTAAGGTTACTGAACTGGGATACACTGGTGCCTCAGGGCCCG
GGTAAGGCCTGGAATGGGTTGCTGGATTACCTAACGGTTACTTACTATGCCAATAGCGTCAAGGGCGTT
CACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAGCTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATT
ATTGTGCAAGAGACTGTGACTACGACATCGGTTGACTACTGGGTCAA

【 0 2 0 9 】

細胞に基づくアッセイ - IL - 17A / F は IL - 8 及び IL - 6 の生成を誘発する。

上記のバイダック C 4 精製ステップ (図 3) から単離された分画を IL - 17A / F の IL - 8 生成誘発能についてアッセイした。TK - 10 細胞を用いた 24 時間に亘るインキュベーション (細胞培養培地 1 m l につき 0.033 マイクロリットルの分画) により分画を試験した。条件培地を回収し、ELISA により IL - 8 及び IL - 6 の濃度測定

10

20

30

40

50

を各分画について行った。分画 3 8 は強い活性を有していることが判明した。アミノ酸分析により、分画 3 8 のタンパク質濃度は 0 . 5 3 6 mg / ml であることが分かった。ゲルアッセイ、プロットアッセイ、アミノ酸配列アッセイ及び活性アッセイをこの分画に実施した(図 3)。これとは別に、Hi Load S Sepharoseを行った分画 3 1 及び分画 3 2 の残余容積をプールし、10 kD のカットオフ膜を用いて 8 時間に亘りバッファー A にて透析し、0 . 2 ミクロンのフィルタに通した。バッファー A で平衡化した Mono S カラムに、1 ml / 分の流速でこの物質を充填し、100 % のバッファー B まで 3 段階の勾配(0 - 30 % B : 10 カラム容量、30 - 75 % B : 45 カラム容量、75 - 100 % B : 10 カラム容量)を用いて溶出し、その間に 1 ml / 分画を回収した。分画 26 - 43 をアッセイし、アミノ酸分析によりタンパク質濃度を測定した。分画 3 1 - 33 において、見かけ上の分子量 30 ~ 35 kD を有する単一タンパク質として純粋な IL - 17 A / F が同定された。分画 3 1 、3 2 及び 3 3 の濃度は、それぞれ 0 . 25 8 mg / ml 、0 . 359 mg / ml 及び 0 . 291 mg / ml であった。ゲル分析及びタンパク質配列分析により、この物質が、C4 カラム(上記)により精製された IL - 17 A / F と同一であることが示された。IL - 17 A / F 、IL - 17 及び IL - 17 F による IL - 8 と IL - 6 の誘発を比較する容量反応曲線を図 5 に示す。図示された濃度で 24 時間に亘り、TK - 10 細胞を用いて IL - 17 A / F 、IL - 17 、及び IL - 17 F をインキュベートした。TK - 10 条件培地を回収し、IL - 8 E L I S A 及び IL - 6 E L I S A により分析した。

10

20

【0210】

考察

IL - 17 及び IL - 17 F の m R N A の同時発現により、IL - 17 に対する結合能を有する特定の抗体と、IL - 17 に対する結合能を有する特定の抗体の両方に結合可能な新規タンパク質種が分泌される。この新規タンパク質種を本明細書ではインターロイキン 17 A / F (IL - 17 A / F) と呼ぶ。この種は、ヒト腎臓 293 細胞が IL - 17 又は IL - 17 F の一方のみを発現するようにした場合には見られない。図 1 A 及び 1 B に示すように、IL - 17 (レーン 1 ~ 5) 又は IL - 17 F (レーン 6 ~ 10) を認識できる抗体を用いて形質移入した細胞由来の条件培地を免疫沈降 (I P) した。次いで免疫沈降したタンパク質をウェスタンプロッティング分析により分解し、抗体を用いて IL - 17 (図 1 A) 又は IL - 17 F (図 1 B) にプロットした。IL - 17 A / F の検出を、IL - 17 F との二量体複合体における IL - 17 の存在により、図 1 A のレーン 8 及び図 1 B のレーン 3 に示す。この種の分子量は、非還元 S D S - P A G E によって測定したところ、約 30 ~ 35 kD であり、共有結合により連結した 1 分子の IL - 17 と 1 分子の IL - 17 F から構成される種と一致する。この新種 (IL - 17 A / F) の存在は、IL - 17 又は IL - 17 F のいずれか一方しか発現しない場合に観察されるものとは異なる電気泳動移動度を有するタンパク質として認識することもできる。したがって、従来のタンパク質染色技術などのほかのタンパク質検出法の使用によって抗体を使用することなしに、この新種を可視化することができる。

30

IL - 17 と IL - 17 F の同時発現によって生成される新規タンパク質種の存在は、逆相クロマトグラフィにより条件培地に存在する分泌タンパク質を分解することによっても観察された。IL - 17 又は IL - 17 F を生成する細胞に観察されたパターンで IL - 17 と IL - 17 F を同時発現する細胞により生成された分泌タンパク質に観察されるタンパク質分画の比較により、また別のタンパク質種の存在が明らかになった。このタンパク質種、IL - 17 A / F を精製し、カラムクロマトグラフィにより均一に単離した(図 2 及び 3)。

40

50

【0211】

非還元 S D S - P A G E により測定したところ、精製したタンパク質は約 30 ~ 35 k d の単一バンドに集中していた(図 3 A)。しかしながら、還元状態では、見かけ上の分子量約 15 ~ 18 kD に、2 つの明らかに別個のバンドがみられた(図示せず)。よって、IL - 17 A / F は共有結合二量体である。新規タンパク質の組成を評価するための独

立した手段であるN末端ペプチド配列分析によつても、単離されたIL-17A/FがIL-17及びIL-17Fペプチドの両方を含むことが明らかに示された(図3B)。検出されたペプチド配列は、IL-17とIL-17FのN末端内に含まれる配列と同一である(図3C)。ウェスタンプロッティング分析により、この新規タンパク質種はまた、IL-17に対する結合能を有する抗体、及びIL-17Fに対する結合能を有する抗体の両方と相互作用可能であることが示された。これら知見のそれぞれ、及び単離された新規タンパク質種に特徴的な分子量は、単離されたタンパク質IL-17A/Fが、IL-17とIL-17Fの共有結合からなる新規タンパク質種であることを示唆するものである。

IL-17A/FのIL-17及びIL-17F鎖を連結するジスルフィド結合の存在及び位置を、質量分析を用いてさらに特徴付けした。IL-17A/F内におけるジスルフィド結合の位置を模式図4Aに示す。2つの鎖間ジスルフィド結合により、IL-17A/FのIL-17及びIL-17Fが連結されている。トリプシンによるIL-17A/Fの消化により、鎖間ジスルフィド結合(IL-17A/Fジスルフィド結合断片#1及び#2；それぞれ配列番号7及び8)を含む2つの個別のペプチド断片が生成されると予測される。これらペプチドをそれぞれに予測される分子量と共に模式的に(図4Bに)示す。これらペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF)(図4C)及び液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化マップ質量分析(LC-ESI-MS)(図4D)により観察した。IL-17又はIL-17Fのホモ二量体に対応するペプチドのピークは観察されず、精製されたIL-17A/FがIL-17とIL-17F鎖からなる共有結合ヘテロ二量体から構成されており、IL-17又はIL-17Fのホモ二量体を検出可能なレベルで含まないことが示された。

【0212】

加えて、合成F_ab抗体のファージライブリをスクリーニングすることにより、IL-17A/Fに結合する抗体が同定された。個別のF_ab抗体配列をコードする34の独立したクローニングが同定され、それらはIL-17A/Fへの結合を媒介することができた。IL-17A/Fに結合するF_abの3つのCDR[H1-H3]を含む重鎖の可変ドメインの領域のアミノ酸配列を図6に示す。図示されているのは、IL-17A/Fに対する結合能を有する個別の抗体の重鎖配列をコードする34のF_abクローニングに予測されるアミノ酸配列の領域を整列させたものである。3つの重鎖CDR領域を、それぞれCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3として示す。34のクローニング各々に対応するアミノ酸配列を、配列番号9~42と識別する。加えて、同定された34のクローニングの各々に対応するコード化DNA配列を表7に示す(それぞれ配列番号43~76)。よつて、IL-17A/Fの新規ヘテロ二量体複合体に選択的に結合する特異的抗体が同定され、これらはこの新規サイトカインの活性を調節することができる。

TK-10ヒト腎臓細胞系を用いてIL-17A/Fが持つ前炎症性反応の刺激能を分析した(図5)。この細胞系は、IL-8の生成により、IL-17とIL-17Fの両方に応答する。IL-17A/Fはまた、この細胞系におけるIL-8の生成を強力に誘発する(図5A)。興味深いことに、IL-17A/FはIL-17ともIL-17Fとも異なる特有の効能を持つことが観察された。いずれの場合も、IL-17及びIL-17Fと比較した場合の活性の差異は、凡そ1オーダーの大きさであった。このアッセイにおいて、IL-17FよりもIL-17A/Fの活性が実質的に大きかったことにより、IL-17A/Fが、IL-17F遺伝子産物に起因するサイトカイン活性の必須成分を含み得ることが示された。この特有の効能により、分子がインビボにおいて個別の作用範囲を有し得る。IL-17A/Fはまた、この細胞系からのIL-6の生成を誘発した(図5B)。また、IL-17A/Fは、インビボでレセプターサブユニットの動態及び利用を変更させることにより、独特の生物学的結果をもたらし得るその新規ヘテロ二量体成分の結果として、IL-17又はIL-17Fに無い別の特徴を持っていると思われる。

【0213】

10

20

30

40

50

実施例 2：活性ヒトT細胞に生成される新規IL-17サイトカインの同定

本明細書では、活性ヒトTリンパ球細胞に天然に生成される新規ヒトIL-17サイトカイン（ここではヒトIL-17A/Fと同定した）を初めて開示する。ヒトTリンパ球細胞の単離及び活性化を実施し、以下に示すようにIL-17A/F E L I S AによりIL-17A/Fの生成を検出し、定量的に測定した。

ヒトT-細胞の単離及び活性化

正常な健常ドナーから新鮮なヒト血液を採取してヘパリン処理（0.5ml/50cc）したものを、生理食塩水で1:1に希釈し、次いでLSMリンパ球分離培地（ICN）上に層状に積み重ね、製造者（ICN）の推奨に従って遠心分離した。回収した単核リンパ球を、完全なRPMI（RPMI、10%FCS、2mMのLグルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン（GIBCO））中の組織培養フラスコに37℃で1時間にわたって蒔き、単球を枯渇させた。培養物の上清を遠心分離して残りの細胞をペレット状にした。次いでCD4+T細胞単離キット（MACS）を用いたネガティブ選択によりヒトリンパ球を単離した。単離したT細胞を活性化するため、組織培養フラスコを抗CD3（BD Bioscience）と抗CD28（BD Bioscience）をそれぞれ5μg/mlを含むPBSを用いて4℃で一晩覆った。コーティング培地を回収した後、培地1ミリリットルにつき細胞約2百万個の密度で単離したヒトリンパ球を完全RPMIに蒔いた。ブレーティングの後、様々な時点で培地の試料を回収し、ELISAによりIL-17A/Fについてアッセイした。抗CD3及び抗CD28で覆わなかつたフラスコの細胞上清から非活性化コントロール上清を回収した。

10

20

30

40

【0214】

抗CD3/抗CD28によって活性化したヒトT細胞におけるヒトIL-17A/F生成のELISA測定

ヒトIL-17A/Fの値をELISAにより測定した。マウスの抗ヒトIL-17をコーティングバッファー（0.05Mの炭酸ナトリウムバッファー、pH9.6）に希釈し、2~8℃で12~15時間に亘り96ウェルマイクロタイタプレート（Nunc）にコーティングした。後続のステップは全て室温で行った。ウェルを空にし、遮断（ブロック）バッファー（PBS、0.5%BSA、10ppmプロクリン300）を加えることにより、非特異的な結合を遮断した。1時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄バッファー（PBS、0.05%Tween20、10ppmプロクリン300）で洗浄した。次いで、アッセイバッファー（PBS、0.5%BSA、0.05%Tween20、10ppmプロクリン300）に希釈したヒトIL-17A/Fの参考基準及び試料を加えた。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄バッファーで洗浄した。ビオチニン標識したマウス抗ヒトIL-17Fをアッセイバッファーで希釈したものを加え、1時間インキュベートした。洗浄バッファーでプレートを洗浄した後、アッセイバッファーで希釈したストレプトアビジン-HRP（西洋わさびペルオキシダーゼ）（Amer sham）を加え、1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで洗浄した後、基質溶液のTMB（テトラメチルベンジジン）-ペルオキシダーゼ（R&D Systems）を加えた。2Nの硫酸の添加により発色を止めた。次いでプレートを、540nmの減算プランクにて450nmでマイクロタイタプレートリーダ（LST）上で読み取った。検量線の生成には4パラメータのカーブフィッティングプログラムを使用し、試料濃度は曲線の線形部分からの内挿により得た。IL-17A及びIL-17FをコントロールとしてELISAに含めることにより、IL-17A/Fのアッセイ特異性を示した（図12）。

40

【0215】

結論

IL-17A/F生成のELISA測定の結果を図11に示す。これらの研究により、IL-17A/Fの生成が検出されなかつた非活性化ヒトT細胞とは対照的に、抗CD3/抗CD28によって活性化されたヒトリンパ球細胞から新規サイトカインIL-17A/Fが生成されることが示された。これらの結果は、ヒトリンパ球の活性化に応答し

50

て生成及び放出される新規サイトカインの天然発生を初めて示すものである。加えて、同時に行ったアッセイで、3つの試料（#31～#33）に殆ど等量のIL-17A/Fが観察されたことにより、ELISAアッセイの特異性が示された。このIL-17A/F特異的ELISAにおいて検出されたIL-17A及びIL-17Fの量は、いずれも無視できる程度であった（図12）。

本明細書の実施例1及び2に開示する研究は、組換えヒトIL-17A/Fが明らかに新規のサイトカインであり、タンパク質構造アッセイと細胞に基づく活性化アッセイの両方においてヒトIL-17及びIL-17Fから区別可能であることを立証するものである。精製組換えヒトIL-17A/Fを標準として使用することにより、ヒトIL-17A/F特異的ELISAを開示した（図11に示す）。この特異的ELISAの使用により、誘発されたヒトIL-17A/Fの発現が検出され、これにより培養物中の活性化ヒトT細胞からIL-17A/Fが自然に生成されることが確認された。したがって、IL-17A/Fは明らかに新規のサイトカインであり、単離された活性化ヒトT細胞から天然に生成されるものとして検出可能であり、その組換え形態は、タンパク質構造アッセイと細胞に基づくアッセイの両方で関連サイトカインとは異なり、それらから区別可能なものとして特徴付けされている。

【0216】

この新規サイトカインはインビボでのIL-17の活性を調節する機能を有し、IL-17又は関連サイトカインの結合部位に対して競合的阻害剤として作用する。IL-17A/Fはまた、それ自体の結合部位及び/又はその他関連サイトカインの結合部位を下方制御することにより、その他関連サイトカインの活性を調節する。IL-17A/Fは、それ自体のシグナル伝達活性又はその他関連サイトカインのシグナル伝達活性に影響するように作用するシグナル伝達分子又は細胞内アダプターにより、活性を示すことができる。IL-17A/Fは、細胞表面又は細胞内区画に見られるレセプター及びコレセプターの対形成に作用することができる。

よって、これらの研究により、それまでは免疫学的に活性では無かった特定の抗原に対する免疫系を追加免疫することができる新規の免疫刺激薬（つまりIL-17A/F）を提供し、同定するものである。したがって、新規に同定された免疫刺激薬は重要な臨床用途を有する。IL-12などの他の既知の免疫刺激薬が同定されている[Gubler等 PNAS 88, 4143(1991)]。最近の癌ワクチン治験では、シカゴ大学及びGenetic Institute（マサチューセッツ州ケンブリッジ）の研究者が、黒色腫の治療にIL-12の免疫刺激的活性に期待をかけている。[Peterson等 Journal of Clinical Oncology 21 (12). 2342-48 (2003)] 彼等は、黒色腫細胞の1以上のマーカーを有する循環白血球細胞を抽出し、抗原を単離し、そしてそれらを患者に戻した。通常患者は自身のヒト抗原に対して免疫反応を持たない。次いで、樹状細胞により同時刺激したT細胞の増殖を誘発できる免疫刺激薬であるIL-12を、異なる投与量で患者に処置した。患者自身の樹状細胞を末梢血単核細胞（PBMC）から調整し、抗原処理してからインビトロで培養し、患者に戻して抗癌反応を刺激するというこれまでの作業と比較して、IL-12の免疫刺激的作用により、本治療によって優れた結果がもたらされた。[Turner等 J. Exp. Med. 190(11), 1669-78 (1999)] したがって、これと同様に、この新規IL-17A/Fサイトカイン又はそのアゴニストは、免疫刺激薬として実用的な用途を見出しえると思われる。一方、IL-17A/F活性を阻害する分子（アンタゴニスト）は、免疫反応の阻害が必要な場合、例えば自己免疫疾患において、実用性を見出すことができる期待される。

このように、IL-17A/Fの免疫学的活性を模倣する（アゴニスト抗体）か又は阻害する（アンタゴニスト抗体）この新規サイトカインは、治療的資質を有している。この新規サイトカインを阻害するように作用する小分子も治療的使用の可能性を有している。

【0217】

実施例3：ハイブリダイゼーションプローブとしてのIL-17A/Fの利用

以下の方法は、IL-17A/Fをコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての利用を示している。

ここに開示されている完全長又は成熟 I L - 1 7 A / F をコード化配列を含む D N A は、ヒト組織 c D N A ライブリ又はヒト組織ゲノムライブリの相同意的な D N A (I L - 1 7 A / F の天然発生変異体をコードするもの等) のスクリーニングのためのプローブとして用いられる。

ハイブリダイゼーション及びいずれかのライブリ D N A を含有するフィルターの洗浄を、次の高緊縮性条件下において実施する。放射標識 I L - 1 7 A / F 誘導プローブのフィルターへのハイブリダイゼーションを、5 0 % ホルムアミド、5 × S S C、0 . 1 % S D S、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 8、2 × デンハード液、及び 1 0 % デキストラント硫酸の溶液中において 4 2 ℃ で 2 0 時間に渡って実施する。フィルターの洗浄は、0 . 1 × S S C 及び 0 . 1 % S D S 水溶液中において 4 2 ℃ で実施する。

次いで、完全長天然配列をコードする D N A と所望の配列同一性を有する D N A は、この分野で知られている標準的技術を用いて同定することができる。

【 0 2 1 8 】

実施例 4 : 大腸菌における I L - 1 7 A / F の発現

この実施例は、大腸菌中における組み換え発現による I L - 1 7 A / F の非グリコシル化型の調製を例証する。

D N A 配列コード化は選択された P C R プライマーを利用して最初に増幅される。このプライマーは、選択された発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含まなければならない。様々な発現ベクターを使用することができる。適したベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性に対する遺伝子を含む p B R 3 2 2 (大腸菌由来 ; Bolivarら, Gene, 2:95 (1997) を参照のこと) がある。ベクターは制限酵素によって消化され、脱リン酸化される。次いで、P C R 増幅配列をベクターにライゲーションする。ベクターは好ましくは抗生物質耐性遺伝子、t r p プロモーター、ポリ H i s リーダー (最初の 6 つの S T I I コドン、ポリ H i s リーダー、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、I L - 1 7 A / F コード領域、ラムダ転写集結因子及び a r g U 遺伝子をコードする配列を含む。

【 0 2 1 9 】

次いで、Sambrookら、上記に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換するために、このライゲーション混合物を利用した。形質転換体を L B 部レート上でのその成長能力によって同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミド D N A を単離し、それを制限分析及び D N A 配列決定によって確認することができる。

選択されたクローニングを、抗生物質が補填された L B プロスのような液体培地で一晩かけて成長させることができる。この一晩の培養を、次により大きなスケールでの培養を播種するために使用してもよい。そして、細胞を所望の光学密度になるまで成長させ、その間に発現プロモーターが作用し始める。

更に数時間、細胞を培養した後に、遠心分離によって細胞を収集することが可能である。遠心分離によって得られた細胞ペレットは、当該分野で公知の様々な薬剤を使用して可溶化でき、次いで、この溶解した I L - 1 7 A / F タンパク質を、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下において金属キレート化カラムを用いて精製すること可能である。

【 0 2 2 0 】

以下の手法を用いて、ポリ - H i s タグ形態で I L - 1 7 A / F を大腸菌で発現させてよい。I L - 1 7 A / F をコードする D N A を、選択した P C R プライマーを用いて最初に増幅した。このプライマーは、選択された発現ベクターの制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び効率的で信頼性のある翻訳開始、金属キレートカラムでの迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク質分解的除去を与える他の有用な配列を含む。次いで、P C R 増幅されたポリ - H i s タグ配列を発現ベクターへ結合させ、これを株 5 2 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)) に基づく大腸菌宿主の形質転換に使用した。形質転換体を、最初に 5 0 m g / m l のカルベニシリンを含有する L B 中で、3 0 ℃ で振盪しながら 3 - 5 の O . D . 6 0 0 に達するまで成長させた。ついで培養液を

10

20

30

40

50

C R A P 培地 (3 . 5 7 g の (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 0 . 7 1 g のクエン酸ナトリウム・ 2 H ₂ O 、 1 . 0 7 g の K C l 、 5 . 3 6 g の Difco 酵母抽出物、 5 0 0 m L 水中の 5 . 3 6 g の Sheffield hycase SF 、並びに 1 1 0 m M の M P O S 、 pH 7 . 3 、 0 . 5 5 % (w / v) のグルコース及び 7 m M の M g S O ₄ の混合で調製) 中にて 5 0 - 1 0 0 倍希釈し、 3 0 で振盪によって約 2 0 - 3 0 時間成長させた。 S D S - P A G E により発現を確認するために試料を取り出し、細胞がペレットとなるようにバルク培地を遠心分離した。精製及びリフォールディング (再折りたたみ) まで、細胞ペレットを凍結させた。

0 . 5 から 1 L の発酵 (6 - 1 0 g ペレット) からの大腸菌ペーストを、 7 M のグアニジン、 2 0 m M のトリス、 pH 8 バッファー中で 1 0 容量 (w / v) で再懸濁させた。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオニ酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々 0 . 1 M 及び 0 . 0 2 M とし、溶液を 4 で終夜攪拌した。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸によりブロックされた変性タンパク質が生じる。溶液を Beckman Ultracentrifuge 中で 4 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間濃縮した。上清を金属キレートカラムバッファー (6 M のグアニジン、 2 0 m M のトリス、 pH 7 . 4) の 3 - 5 容量で希釈し、透明にするために 0 . 2 2 ミクロンフィルターを通して濾過する。透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた 5 m l の Qiagen N i - N T A 金属キレートカラムに負荷した。カラムを 5 0 m M のイミダゾール (Calbiochem, Utrol grade) を含む添加バッファー、 pH 7 . 4 で洗浄した。タンパク質を 2 5 0 m M のイミダゾールを含有するバッファーで溶離した。所望のタンパク質を含有する画分をプールし、 4 で保存した。タンパク質濃度は、そのアミノ酸配列に基づいて計算した吸光係数を用いて 2 8 0 n m におけるその吸収により見積もった。

【 0 2 2 1 】

試料を 2 0 m M のトリス、 pH 8 . 6 、 0 . 3 M の N a C l 、 2 . 5 M の尿素、 5 m M のシステイン、 2 0 m M のグリシン及び 1 m M の E D T A からなる新たに調製した再生バッファー中で徐々に希釈することによって、タンパク質を再生させた。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が 5 0 ~ 1 0 0 マイクログラム / m l となるように選択した。リフォールディング溶液を 4 で 1 2 - 3 6 時間ゆっくりと攪拌した。リフォールディング反応は T F A を採取濃度 0 . 4 % (約 3 の pH) で添加することにより停止させた。タンパク質をさらに精製する前に、溶液を 0 . 2 2 ミクロンフィルターを通して濾過し、アセトニトリルを最終濃度 2 - 1 0 % で添加した。再生したタンパク質を、 Poros R1 / H 逆相カラムで、 0 . 1 % T F A の移動バッファーと 1 0 ~ 8 0 % のアセトニトリル勾配での溶離を用いてクロマトグラフにかけた。 A 2 8 0 吸収を持つ画分のアリコートを S D S ポリアクリルアミドゲルで分析し、相同な再生タンパク質を含有する画分をプールした。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が最もコンパクトであり、その疎水性内面が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されているので、アセトニトリルの最低濃度で溶離される。凝集した種は通常、より高いアセトニトリル濃度で溶離される。誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くのに加えて、逆相工程は試料からエンドトキシンも除去する。

所望の再生した I L - 1 7 A / F ポリペプチドを含有する画分をプールし、溶液に向けた窒素の弱い気流を用いてアセトニトリルを除去した。タンパク質を、透析又は調製バッファーで平衡化した G 2 5 Superfine (Pharmacia) 樹脂でのゲル濾過及び滅菌濾過により、 0 . 1 4 M の塩化ナトリウム及び 4 % のマンニトールを含む 2 0 m M の H e p e s 、 pH 6 . 8 に調製した。

【 0 2 2 2 】

実施例 5 : 哺乳動物細胞における I L - 1 7 A / F の発現

この実施例は、哺乳動物細胞における組み換え発現による潜在的にグリコシル化した形態の I L - 1 7 A / F の調製を例証する。

発現ベクターとしてベクター p R K 5 (1 9 8 9 年 3 月 1 5 日公開の E P 3 0 7 , 2 4 7 参照) を用いた。場合によっては、 I L - 1 7 A / F D N A を選択した制限酵素を持つ p R K 5 に結合させ、上記の Sambrook 等に記載されたようなライゲーション方法を用い

10

20

30

40

50

て I L - 1 7 A / F D N A を挿入させる。得られたベクターは、 p R K 5 - I L - 1 7 A / F と呼ばれる。

【 0 2 2 3 】

一実施態様では、選択された宿主細胞は 2 9 3 細胞とすることができます。ヒト 2 9 3 細胞 (ATCC CCL 1573) は、ウシ胎児血清及び場合によっては滋養成分及び / 又は抗生物質を添加した D M E M などの培地の中で組織培養プレートにおいて成長させて集密化した。約 1 0 μ g の p R K 5 - I L - 1 7 A / F D N A を約 1 μ g の V A R N A 遺伝子コード化 D N A [Thimmappayaら, Cell, 31:543 (1982)] と混合し、5 0 0 μ l の 1 mM トリス-H C l 、0 . 1 mM E D T A 、0 . 2 2 7 M C a C l ₂ に溶解させた。この混合物に、滴状の 5 0 0 μ l の 5 0 mM H E P E S (p H 7 . 3 5) 、2 8 0 mM N a C l 、1 . 5 mM N a P O ₄ を添加し、2 5 で 1 0 分間析出物を形成させた。析出物を懸濁し、2 9 3 細胞に加えて 3 7 で約 4 時間定着させた。培地を吸引し、2 m l の P B S 中 2 0 % グリセロールを 3 0 秒間添加した。2 9 3 細胞は、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、細胞を約 5 日間インキュベートした。

トランスフェクションの約 2 4 時間後、培地を除去し、培地 (のみ) 又は 2 0 0 μ C i / m l ³ ⁵ S - システイン及び 2 0 0 μ C i / m l ³ ⁵ S - メチオニンを含む培地で置換した。1 2 時間のインキュベーションの後、条件培地を回収し、スピノフィルターで濃縮し、1 5 % S D S ゲルに添加した。処理したゲルを乾燥させ、I L - 1 7 A / F ポリペプチドの存在を現す選択された時間にわたってフィルムにさらした。形質転換した細胞を含む培地に、更なるインキュベーションを施し (無血清培地で) 、培地を選択されたバイオアッセイで試験した。

【 0 2 2 4 】

これに換わる技術において、I L - 1 7 A / F は、Sompanyacら, I L - 1 7 A / F c. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981) に記載されたデキストラン硫酸法を用いて 2 9 3 細胞に一過的に導入される。2 9 3 細胞は、スピナーフラスコ内で最大密度まで成長させ、7 0 0 μ g の p R K 5 - I L - 1 7 A / F D N A を添加する。細胞は、まずスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、P B S で洗浄した。D N A - デキストラン沈殿物を細胞ペレット上で 4 時間インキュベートした。細胞を 2 0 % グリセロールで 9 0 秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5 μ g / m l ウシインシュリン及び 0 . 1 μ g / m l ウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコに再度導入した。約 4 日後に、条件培地を遠心分離して濾過し、細胞及び細胞片を除去した。次いで発現 I L - 1 7 A / F ポリペプチドを含む試料を、透析及び / 又はカラムクロマトグラフィー等の選択した方法によって濃縮し精製することが可能である。

他の実施態様では、I L - 1 7 A / F を C H O 細胞で発現させることができる。p R K 5 - I L - 1 7 A / F は、C a P O ₄ 又は D E A E - デキストランなどの公知の試薬を用いて C H O 細胞にトランスフェクションすることができる。上記したように、細胞培地をインキュベートし、培地を培養培地 (のみ) 又は ³ ⁵ S - メチオニン等の放射性標識を含む培地に置換することができる。I L - 1 7 A / F ポリペプチドの存在を同定した後、培地を無血清培地に置換してもよい。好ましくは、培地を約 6 日間インキュベートし、次いで条件培地を収集する。次いで、発現 I L - 1 7 A / F ポリペプチドを含む培地を、任意の選択した方法によって濃縮し精製することができる。

【 0 2 2 5 】

また、エピトープタグ I L - 1 7 A / F は、宿主 C H O 細胞において発現させてもよい。I L - 1 7 A / F は p R K 5 ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローニング挿入物は、P C R を施してバキュロウイルス発現ベクター中のポリ-hisタグ等の選択されたエピトープタグを持つ枠に融合できる。ポリ-hisタグ I L - 1 7 A / F 挿入物は、次いで、安定なクローニングの選択のための D H F R 等の選択マーカーを含む S V 4 0 誘導ベクターにサブクローニングできる。最後に、C H O 細胞を S V 4 0 誘導ベクターで (上記のように) トランスフェクションした。発現を確認するために、上記のように標識化を行ってもよい。発現されたポリ-hisタグ I L - 1 7 A / F を含む培地は、次いで濃縮し、N i ² 50

⁺ -キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択された方法により精製できる。

また I L - 1 7 A / F は、一過性発現法により C H O 及び / 又は C O S 細胞で、他の安定な発現方法により C H O 細胞で発現させてもよい。

C H O 細胞における安定な発現は以下の方法を用いて実施された。タンパク質は、それぞれのタンパク質の可溶化形態のコード配列（例えば、細胞外ドメイン）が I g G 1 のヒンジ、C H 2 及び C H 2 ドメインを含む定常領域配列に融合した I g G 作成物（イムノアドヘシン）、又はポリ-Hisタグ形態として発現された。

【 0 2 2 6 】

P C R 増幅に続いて、対応する D N A を、Ausubelら, Current I L - 1 7 A / F tocols of Molecular Biology, Unit 3.26, John Wiley and Sons (1997)に記載されたような標準的技術を用いて C H O 発現ベクターにサブクローニングした。C H O 発現ベクターは、対象とする D N A の 5' 及び 3' に適合する制限部位を有し、c D N A の便利なシャトル化ができるように作成される。ベクターは、Lucasら, Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774-1779 (1996)に記載されたように C H O 細胞での発現を用い、対象とする c D N A 及びジヒドロフォレートレダクターゼ (D H F R) の発現の制御に S V 4 0 初期プロモーター / エンハンサーを用いる。D H F R 発現は、トランスフェクションに続くプラスミドの安定な維持のための選択を可能にする。

所望のプラスミド D N A の 1 2 マイクログラムを、市販のトランスフェクション試薬 Superfect(登録商標)(Quiagen), Dosper(登録商標)及びFugene(登録商標)(Boehringer Mannheim) 約 1 千万の C H O 細胞に導入する。細胞は、上記のLucas等に記載されているように成長させた。約 3×10^7 細胞を、下記のような更なる成長及び生産のためにアンプル中で凍結させた。

【 0 2 2 7 】

プラスミド D N A を含むアンプルを水槽に配して解凍し、ボルテックスにより混合した。内容物を 1 0 m L の媒質を含む遠心管にピペットして、1 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。上清を吸引して細胞を 1 0 m L の選択培地 (0 . 2 μ m 濾過 P S 2 0 、 5 % の 0 . 2 μ m 透析濾過ウシ胎児血清を添加) 中に懸濁させた。次いで細胞を 9 0 m L の選択培地を含む 1 0 0 m L スピナーに分ける。1 - 2 日後、細胞を 1 5 0 m L の選択培地を満たした 2 5 0 m L スピナーに移し、3 7 度インキュベートする。さらに 2 - 3 日後、2 5 0 m L 、 5 0 0 m L 及び 2 0 0 0 m L のスピナーを 3×10^5 細胞 / m L で播種した。細胞培地を遠心分離により新鮮培地に交換し、生産培地に再懸濁させた。任意の適切な C H O 培地を用いてもよいが、実際には 1 9 9 2 年 6 月 1 6 日に発行された米国特許第 5 , 1 2 2 , 4 6 9 号に記載された生産培地を使用した。3 L の生産スピナーを $1 . 2 \times 10^6$ 細胞 / m L で播種した。0 日目に、細胞数と p H を測定した。1 日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気での散布を実施した。2 日目に、スピナーをサンプルし、温度を 3 3 に変え、3 0 m L の 5 0 0 g / L のグルコース及び 0 . 6 m L の 1 0 % 消泡剤（例えば 3 5 % ポリジメチルシロキサンエマルション、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion）をとった。生産を通して、p H は 7 . 2 近傍に調節し維持した。1 0 日後、又は生存率が 7 0 % を下回るまで、細胞培地を遠心分離で回収して 0 . 2 2 μ m フィルターを通して濾過した。濾過物は、4 度貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

ポリ-Hisタグ作成物に関して、タンパク質を N i - N T A カラム (Qiagen) を用いて精製した。精製の前に、イミダゾールを条件培地に 5 m M の濃度まで添加した。条件培地を、0 . 3 M の N a C 1 及び 5 m M イミダゾールを含む 2 0 m M の H e p e s , p H 7 . 4 バッファーで平衡化した 6 m l の N i - N T A カラムへ 4 - 5 m l / 分の流速によって 4 度でポンプ供給した。充填後、カラムをさらに平衡バッファーで洗浄し、タンパク質を 0 . 2 5 M イミダゾールを含む平衡バッファーで溶離した。高度に精製されたタンパク質は、続いて 1 0 m M の H e p e s 、 0 . 1 4 M の N a C 1 及び 4 % のマンニトール , p H 6 . 8 を含む貯蔵バッファー中で 2 5 m l の G 2 5 Superfine (Pharmacia) を用いて脱塩し、- 8 0 度貯蔵した。

イムノアドヘシン (F c 含有) 作成物を、以下通りに条件培地から精製した。条件培地

10

20

30

40

50

を、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8で平衡化した5 mlのプロテインAカラム(Pharmacia)へポンプ注入した。充填後、カラムを平衡バッファーで強く洗浄した後、100 mMのクエン酸、pH 3.5で溶離した。溶離したタンパク質は、1 mlの画分を275 µLの1 Mトリスバッファー、pH 9を含む管に回収することにより即座に中性化した。高度に精製されたタンパク質は、続いてポリ-Hisタグタンパク質について上記した貯蔵バッファー中で脱塩した。均一性は SDSポリアクリルアミドゲルとエドマン(Edman)分解によるN-末端アミノ酸配列決定により評価した。

【0228】

実施例6：酵母菌でのIL-17A/Fの発現

以下の方法は、酵母菌中のIL-17A/Fポリペプチドの組換え発現を記載する。

10

第1に、ADH2/GAPDHプロモーターからのIL-17A/Fの細胞内生産又は分泌のための酵母菌発現ベクターを作成する。IL-17A/FポリペプチドをコードするDNA及びプロモーターを選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入してIL-17A/Fポリペプチドの細胞内発現を指示する。分泌のために、IL-17A/FをコードするDNAを選択したプラスミドに、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然IL-17A/Fシグナルペプチド又は他の哺乳動物シグナルペプチド、又は、例えば酵母菌因子又はインベルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)IL-17A/Fの発現のためのリンカー配列とともにクローニングすることができる。

20

酵母菌株AB110等の酵母菌は、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択された発酵培地中で培養できる。形質転換した酵母菌上清は、10%トリクロロ酢酸での沈降及びSDS-PAGEによる分離で分析し、次いでクマシーブルー染色でゲルの染色をすることができる。

20

続いて組換えIL-17A/Fポリペプチドは、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することによって単離及び精製できる。IL-17A/Fポリペプチドを含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィー樹脂を用いてさらに精製してもよい。

【0229】

実施例7：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのIL-17A/Fの発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞中におけるIL-17A/Fの組換え発現を記載する。

30

IL-17A/Fコードする配列を、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流に融合させた。このようなエピトープタグは、ポリ-hisタグ及び免疫グロブリンタグ(IgGのFc領域など)を含む。pVL1393(Navagen)などの市販されているプラスミドから誘導されるプラスミドを含む種々のプラスミドを用いることができる。簡単には、IL-17A/F又はIL-17A/Fコード配列の所定部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列又はタンパク質が細胞外である場合の成熟タンパク質をコードする配列などが、5'及び3'領域に相補的なプライマーでのPCRにより増幅される。5'プライマーは、隣接する(選択された)制限酵素部位を包含していてもよい。生産物は、次いで、選択された制限酵素で消化され、発現ベクターにサブクローニングされる。

40

組換えバキュロウイルスは、上記のプラスミド及びBaculoGold(商品名)ウイルスDNA(Pharmingen)を、Spodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)中にリポフェクチン(GIBCO-BRLから市販)を用いて同時トランスフェクションすることにより作成される。28で4-5日インキュベートした後、放出されたウイルスを回収し、更なる増幅に用いた。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilleyら、Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press(1994)に記載されているように実施した。

【0230】

次に、発現されたポリ-hisタグIL-17A/Fは、例えばNi²⁺-キレートアフィ

50

ニティクロマトグラフィーにより次のように精製される。抽出は、Rupertら、Nature, 36 2:175-179 (1993)に記載されているように、ウイルス感染した組み換えS f 9細胞から調製した。簡単には、S f 9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes, pH 7.9; 12.5mMのMgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKC1)中に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理した。超音波処理物を遠心分離で透明化し、上清を負荷バッファー(50mMリン酸塩、300mMのNaCl、10%グリセロール、pH 7.8)で50倍希釈し、0.45μmフィルターで濾過した。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を5mLの総容積で調製し、25mLの水で洗浄し、25mLの負荷バッファーで平衡させた。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに負荷した。カラムを、分画回収が始まる点であるA₂₈₀のベースラインまで負荷バッファーで洗浄した。次に、カラムを、結合タンパク質を非特異的に溶離する二次洗浄バッファー(50mMリン酸塩; 300mMのNaCl、10%グリセロール、pH 6.0)で洗浄した。A₂₈₀のベースラインに再度到達した後、カラムを二次洗浄バッファーの中で0から500mMイミダゾール勾配で展開した。1mLの分画を回収し、SDS-PAGE及び銀染色又はアルカリホスファターゼ(Qiagen)に複合したNi²⁺-NTAでのウェスタンプロットで分析した。溶離したHis₁₀-タグIL-17A/Fを含む画分をプールして負荷バッファーで透析した。

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)IL-17A/Fの精製は、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む公知のクロマトグラフィー技術を用いて実施できる。

【0231】

実施例8：IL-17A/Fに結合する抗体の調製

この実施例は、IL-17A/Fに特異的に結合できるモノクローナル抗体の調製を例示する。

モノクローナル抗体の生産のための技術は、この分野で知られており、例えば、上記のGodingに記載されている。用いられ得る免疫原は、精製IL-17A/Fポリペプチド、IL-17A/Fポリペプチドを含む融合タンパク質、細胞表面に組換えIL-17A/Fポリペプチドを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者が過度の実験をすることなくなすことができる。

Balb/c等のマウスを、完全フロイントアジュvantに乳化して皮下又は腹腔内に1-100マイクログラムで注入したIL-17A/F免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュvant(Ribi Immunochemical Research, ハミルトン, モンタナ)に乳化し、動物の後足蹠に注入してもよい。免疫化したマウスは、次いで10から12日後に、選択したアジュvant中に乳化した付加的免疫源で追加免疫する。その後、数週間、マウスをさらなる免疫化注射で追加免疫する。抗IL-17A/F抗体の検出のためのELISAアッセイで試験するために、レトロオービタル出血からの血清試料をマウスから周期的に採取してもよい。

【0232】

適当な抗体力値が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、IL-17A/F静脈内注射の最後の注入をることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出した。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、ACTTから番号CRL1597で入手可能なP3X63AgU.1等の選択されたマウス骨髄腫株化細胞に融合させた。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートに蒔き、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、及び脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害した。

ハイブリドーマ細胞は、IL-17A/Fに対する反応性についてのELISAでスクリーニングされる。IL-17A/Fに対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「ポジティブ(陽性)」ハイブリドーマ細胞の決定は、技術常識の範囲内である。

10

20

30

40

50

陽性ハイブリドーマ細胞を同系の B a l b / c マウスに腹腔内注入し、抗 I L - 1 7 A / F モノクローナル抗体を含む腹水を生成させる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコ又はローラーボトルで成長させることもできる。腹水中に生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈降、それに続くゲル排除クロマトグラフィーを用いて行うことができる。あるいは、抗体のプロテイン A 又はプロテイン G への親和性に基づくアフィニティクロマトグラフィーを用いることもできる。

【 0 2 3 3 】

実施例 9 : 特異的抗体を用いた I L - 1 7 A / F ポリペプチドの精製

天然又は組換え I L - 1 7 A / F ポリペプチドは、この分野の種々の標準的なタンパク質精製方法によって精製できる。例えば、プロ - I L - 1 7 A / F ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ - I L - 1 7 A / F ポリペプチドは、対象とする I L - 1 7 A / F ポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一般に、免疫親和性カラムは抗 I L - 1 7 A / F ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂に共有結合させて作成される。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムでの沈殿又は固定化プロテイン A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.) での精製のいずれかにより免疫血清から調製される。同様に、モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿又は固定化プロテイン A でのクロマトグラフィーによりマウス腹水液から調製される。部分的に精製された免疫グロブリンは、C n B r - 活性化セファロース (商品名) (Pharmacia LKB Biotechnology) 等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂がロックされ、誘導体樹脂は製造者の指示に従って洗浄される。

【 0 2 3 4 】

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態の I L - 1 7 A / F ポリペプチドを含有する細胞からの画分を調製することによる I L - 1 7 A / F ポリペプチドの精製において利用される。この調製物は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法により微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分画分の可溶化により誘導される。あるいは、シグナル配列を含む可溶化 I L - 1 7 A / F ポリペプチドは、細胞が成長する培地中に有用な量で分泌される。

可溶化 I L - 1 7 A / F ポリペプチド含有調製物は、免疫親和性カラムを通され、カラムは I L - 1 7 A / F ポリペプチドの好ましい吸着をさせる条件下 (例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー) で洗浄される。次いで、カラムは、抗体 / I L - 1 7 A / F ポリペプチド結合を分解する条件下 (例えば、約 2 - 3 といった低 pH、高濃度の尿素又はチオシアノ酸イオン等のカオトロープ) で溶離され、I L - 1 7 A / F ポリペプチドが回収される。

【 0 2 3 5 】

実施例 10 : 薬物スクリーニング

本発明は、I L - 1 7 A / F ポリペプチド又はその結合断片を種々の薬物スクリーニング技術において使用することによる化合物のスクリーニングとて特に有用である。そのような試験に用いられる I L - 1 7 A / F ポリペプチド又は断片は、溶液中の自由状態でも、固体支持体に固定されても、細胞表面に担持されていても、或いは細胞内に位置していてもよい。薬剤スクリーニングの 1 つの方法では、I L - 1 7 A / F ポリペプチド又は断片を発現する組換え核酸で安定にトランスフェクションされる真核生物又は原核生物宿主細胞を利用する。薬剤は、そのようなトランスフェクション細胞に対して、競合的結合アッセイによってスクリーニングされる。生存可能又は固定化形態のいずれかによって、このような細胞は標準的な結合アッセイで使用できる。例えば、I L - 1 7 A / F ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間での複合体の形成を測定してよい。あるいは、試験する試薬によって生ずる I L - 1 7 A / F ポリペプチドとその標的細胞との間の複合体形成における減少を試験することもできる。

従って、本発明は、I L - 1 7 A / F ポリペプチド関連疾患又は障害に影響を与える薬剤又は任意の他の試薬のスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、その試薬を

10

20

30

40

50

IL-17A/Fポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とIL-17A/Fポリペプチド又は断片との間の複合体の存在について、又は(ii)IL-17A/Fポリペプチド又は断片と細胞との間の複合体の存在について、検定することを含む。これらの競合結合アッセイでは、IL-17A/Fポリペプチド又は断片が典型的には標識される。適切なインキュベーションの後、自由なIL-17A/Fポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、自由又は未複合の標識の量が、特定の試薬がIL-17A/Fポリペプチドに結合する又はIL-17A/Fポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

【0236】

薬剤スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドに対して適当な結合親和性を持つ化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、1984年9月13日に公開されたWO84/03564に詳細に記載されている。簡単に述べれば、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチックピン等の固体支持体又は幾つかの他の表面上で合成される。IL-17A/Fポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はIL-17A/Fポリペプチドと反応して洗浄される。結合したIL-17A/Fポリペプチドはこの分野で良く知られた方法により検出される。精製したIL-17A/Fポリペプチドは、上記の薬剤スクリーニング技術に使用するためにプレート上に直接被覆することができる。さらに、非中和抗体は、ペプチドを捕捉し、それを固体支持体上に固定化するのに使用できる。

また、本発明は、IL-17A/Fポリペプチドに結合可能な中和抗体がIL-17A/Fポリペプチド又はその断片について試験化合物と特異的に競合する競合薬剤スクリーニングアッセイも考慮する。この方法において、抗体は、IL-17A/Fポリペプチドで、1つ又は複数の抗原決定基を持つ任意のペプチドの存在を検出するのに使用できる。

【0237】

実施例11：合理的薬物設計

合理的薬物設計の目的は、対象とする生物学的活性ポリペプチド（例えば、IL-17A/Fポリペプチド）又はそれらが相互作用する小分子、例えばアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターの構造的類似物を製造することである。これらの例の任意のものが、IL-17A/Fポリペプチドのより活性で安定な形態又はインビボでIL-17A/Fポリペプチドに機能を促進又は阻害する薬物の創作に使用できる（参考、Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)）。

1つの方法において、IL-17A/Fポリペプチド、又はIL-17A/Fポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造が、X線結晶学により、コンピュータモデル化により、最も典型的には2つの方法の組み合わせにより決定される。分子の構造を解明し活性部位を決定するためには、IL-17A/Fポリペプチドの形状及び電荷の両方が確認されなければならない。数は少ないが、IL-17A/Fポリペプチドの構造に関する有用な情報が相同タンパク質の構造に基づいたモデル化によって得られることもある。両方の場合において、関連する構造情報は、類似IL-17A/Fポリペプチド様分子の設計又は効果的なインヒビターの同定に使用される。合理的な薬剤設計の有用な例は、Braxton及びWells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992)に示されているような向上した活性又は安定性を持つ分子、又はAthaoudaら, J. Biochem., 113: 742-746 (1993)に示されているような天然ペプチドのインヒビター、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する分子を含む。

【0238】

また、上記のような機能アッセイによって選択された標的特異的な抗体を単離しその結晶構造を解明することもできる。この方法は、原理的には、それに続く薬剤設計が基礎をおくことのできるファーマコア(pharmacore)を生成する。機能的な薬理学的に活性な抗体に対する抗-イディオタイプ抗体（抗-ids）を生成することにより、タンパク質結晶学をバイパスすることができる。鏡像の鏡像として、抗-idsの結合部位は最初のレセプターの類似物であると予測できる。抗-idは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチド

10

20

30

40

50

のバンクからペプチドを同定及び単離するのに使用できる。単離されたペプチドは、ファーマコアとして機能するであろう。

本発明によって、X線結晶学などの分析実験を実施するために十分な量のIL-17A/Fポリペプチドが入手可能である。さらに、ここに提供したIL-17A/Fポリペプチドアミノ酸配列の知識は、X線結晶学に代わる又はそれに加わるコンピュータモデル化技術で用いられるガイダンスを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0239】

【図1】本明細書でIL-17A/Fと命名した新規ヒトサイトカインの発現及び単離の結果を示す。ヒトIL-17及びIL-17FをコードするcDNA発現ベクターを単独で、又は図1A及び1Bに示すように組み合わせて用いることにより、ヒト293腎臓細胞に形質移入した。図1A及び1Bに示すように、IL-17(レーン1~5)、又はIL-17F(レーン6~10)を認識することができる抗体を用いて形質移入された細胞由来の条件培地を免疫沈降(IP)した。ウェスタンプロッティング分析により、図1Aのレーン8及び図1Bのレーン3に二量体IL-17A/F複合体の存在が示されている。二量体IL-17A/F複合体の大きさは、IL-17のポリペプチド鎖1つとIL-17Fのポリペプチド鎖1つからなる共有結合性ヘテロ二量体種と同じである。

【図2A】組換えIL-17A/Fの精製を示す。図2Aは、S-SephadoseカラムでのIL-17A/Fの最初の分画から得られたタンパク質分画の銀染色SDS-PAGEの結果を示す。分画31及び32は、IL-17A/Fと同じ、見かけ上の分子量約33kDを持つタンパク質を含む。

【図2B-1】組換えIL-17A/Fの精製を示す。図2Bは、ボイダックC4カラムクロマトグラフィを用いてIL-17A/Fをさらに精製した結果を示す。図示されているのは、214nm及び280nmで測定した溶出タンパク質のクロマトグラフである。

【図2B-2】組換えIL-17A/Fの精製を示す。図2Bは、ボイダックC4カラムクロマトグラフィを用いてIL-17A/Fをさらに精製した結果を示す。図示されているのは、214nm及び280nmで測定した溶出タンパク質のクロマトグラフである。

【図2C】組換えIL-17A/Fの精製を示す。図2Cは、ボイダックC4精製カラム由来の精製されたIL-17A/Fタンパク質の分画がTK-10細胞にIL-8生成を誘発することを示す。

【図3A】IL-17A/Fのアミノ酸配列分析の結果を示す。図3Aは精製されたIL-17A/Fの非還元SDS-PAGE分析を示す。分解したタンパク質をPVDF膜に写し、クーマシーブルータンパク質染色により染色した。分子量マーカーの位置を右側に示す。

【図3B】IL-17A/Fのアミノ酸配列分析の結果を示す。図3Bは、单離されたIL-17A/FのN末端配列分析の結果を示す(図3Aに示す帯域のN末端配列分析から検出されたアミノ酸残基)。配列分析により、2つのN末端配列(配列1を配列番号1とし、配列2を配列番号2とする)が明らかになった。

【図3C】IL-17A/Fのアミノ酸配列分析の結果を示す。図3Cは、ヒトIL-17のアミノ酸配列(図3C及び図8の両方に、配列番号3として示す)及びヒトIL-17Fのアミノ酸配列(図3C及び図10の両方に配列番号4として示す)を示す。IL-17及びIL-17Fのシグナル配列を下線で示す。IL-17A/F中に存在する、2つのN末端ペプチド配列(配列番号1及び2)に一致する配列を太字でIL-17及びIL-17Fポリペプチド配列に示した。

【図4A】IL-17A/Fの質量分析を示す。図4Aは成熟IL-17A/Fヘテロ二量体の鎖間及び鎖内ジスルフィド結合を有するアミノ酸配列を示す(配列番号77)。このジスルフィド結合に関与するシステインをアスタリスク(*)、及び残基番号で示す。ジスルフィド結合は結合されたシステインを繋ぐ線で示されている。鎖間ジスルフィド結合を形成するこれらのジスルフィド結合は太線で強調する。

【図4B】IL-17A/Fの質量分析を示す。図4Bは、IL-17A/Fのトリプシ

10

20

30

40

50

ンによる消化により生成されると思われる I L - 1 7 鎖と I L - 1 7 F 鎖の間のジスルフィド結合を含む I L - 1 7 A / F ペプチド断片 # 1 及び # 2 を概略的に示す [I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 1 を配列番号 7 とし、 I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 2 を配列番号 8 とする] 。これらの断片に含まれるアミノ酸の、各鎖の開始メチオニンが示され、相対的に番号が付されている。また、質量分析により観察されることが予想されるこれら断片の計算による凡そ分子量も示されている。

【図 4 C】 I L - 1 7 A / F の質量分析を示す。図 4 C は、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 - 飛行時間型質量分析法 (M A L D I - T O F) による I L - 1 7 A / F のペプチドマップを示す。結果として得られたペプチドマップには、ジスルフィド結合したペプチドと一致するピーク、 $[M + H] ^{+} = 2420.12 \text{ D a}$ 及び 3410.60 D a が含まれる。

【図 4 D - 1】 I L - 1 7 A / F の質量分析を示す。図 4 D は、液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化イオントラップ質量分析 (L C - E S I - M S) によって明らかになった I L - 1 7 A / F の非還元試料の特徴をさらに示すものである。図 4 D - 1 は、全体的イオンクロマトグラム、を示す。両方のヘテロ二量体と一致するピークが観察されたが、ホモ二量体ペプチドに予測される質量では、背景の化学的ノイズ上にピークが観察されなかった。

【図 4 D - 2】 I L - 1 7 A / F の質量分析を示す。図 4 D は、液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化イオントラップ質量分析 (L C - E S I - M S) によって明らかになった I L - 1 7 A / F の非還元試料の特徴をさらに示すものである。図 4 D - 2 は、 I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 2 $[M + 2 H] ^{2+}$ の再構築されたイオンクロマトグラム (R I C) を示す。両方のヘテロ二量体と一致するピークが観察されたが、ホモ二量体ペプチドに予測される質量では、背景の化学的ノイズ上にピークが観察されなかった。

【図 4 D - 3】 I L - 1 7 A / F の質量分析を示す。図 4 D は、液体クロマトグラフィー - エレクトロスプレーイオン化イオントラップ質量分析 (L C - E S I - M S) によって明らかになった I L - 1 7 A / F の非還元試料の特徴をさらに示すものである。図 4 D - 3 は、 I L - 1 7 A / F ジスルフィド結合断片 # 1 $[M + 2 H] ^{3+}$ を示す。両方のヘテロ二量体と一致するピークが観察されたが、ホモ二量体ペプチドに予測される質量では背景の化学的ノイズ上にピークが観察されなかった。

【図 5 A】 図 5 A は、 I L - 1 7 A / F 、 I L - 1 7 及び I L - 1 7 F によって誘発される前炎症反応を比較する容量反応曲線を示す。 I L - 1 7 A / F 、 I L - 1 7 及び I L - 1 7 F を、 T K - 1 0 細胞を用いて図示の濃度で 24 時間インキュベートした。 I L - 1 7 A / F は、サブ - n M 濃度で見られる実質的活性を有する活性を誘発する強力な I L - 8 を有することが示された。

【図 5 B】 図 5 B は、 I L - 1 7 A / F 、 I L - 1 7 及び I L - 1 7 F によって誘発される I L - 6 を比較する容量反応曲線を示す。 T K - 1 0 細胞とともに、 I L - 1 7 A / F 、 I L - 1 7 及び I L - 1 7 F を図示の濃度で 24 時間インキュベートした。 T K - 1 0 条件培地を回収し、 I L - 6 E L I S A により分析した。

【図 6】 I L - 1 7 A / F に結合する F a b 由来の C D R H 1 - H 3 を含む重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。図示されているのは、 I L - 1 7 A / F に結合可能な個別の抗体重鎖配列をコードする 3 4 のクローン (配列番号 9 ~ 4 2) に予測されるアミノ酸配列の領域を整列化したものである。 3 つの重鎖 C D R 領域 (C D R - H 1 、 C D R - H 2 、 C D R - H 3) を斜線で示す。

【図 7】 天然配列 I L - 1 7 c D N A のヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。

【図 8】 図 7 に示す配列番号 5 のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列 (配列番号 3) を示す。

【図 9】 天然配列 I L - 1 7 F c D N A のヌクレオチド配列 (配列番号 6) を示す。

【図 10】 図 9 に示す配列番号 6 のコード化配列から誘導されたアミノ酸配列 (配列番号 4) を示す。

10

20

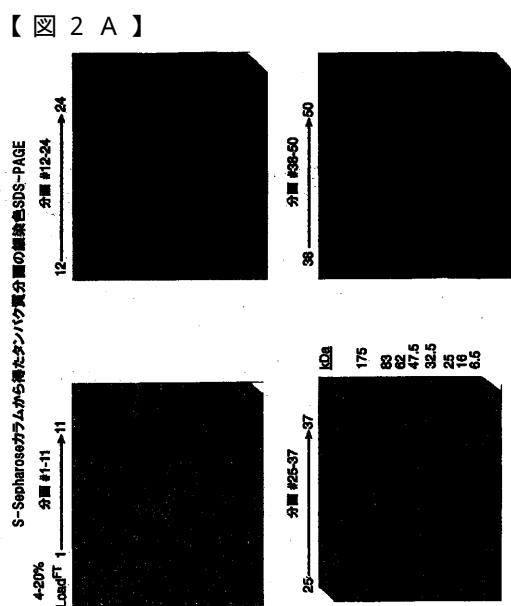
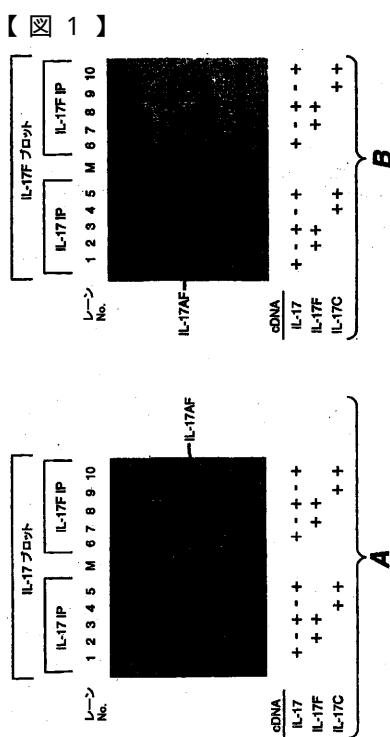
30

40

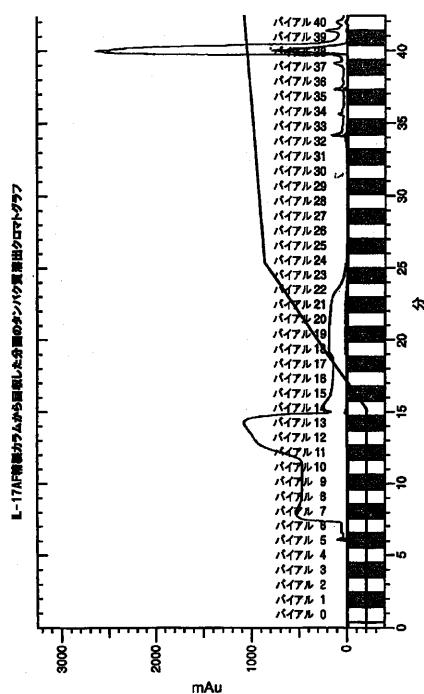
50

【図11】抗CD3 / 抗CD28によって活性化されたヒトT細胞から生成されたIL-17A / FのIL-17A / F E L I S A測定を示す。

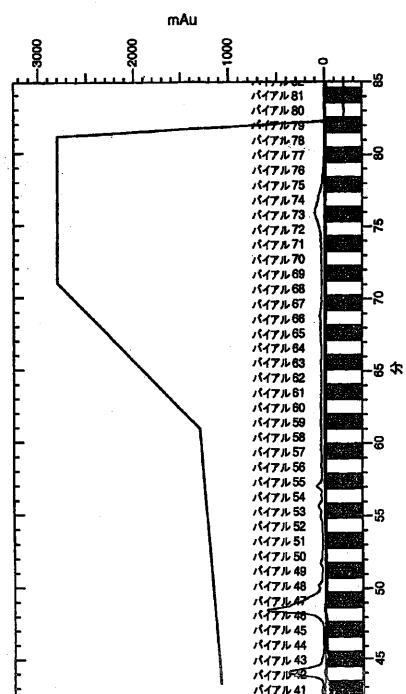
【図12】同時にアッセイした3つの分画#31～#33が殆ど等量のIL-17A / F E L I S Aの特異性を示す(コントロールとしてIL-17A及びIL-17Fを使用した)。



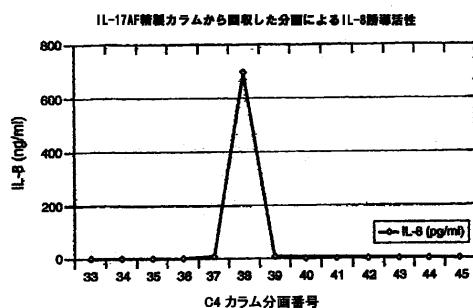
【図2B-1】



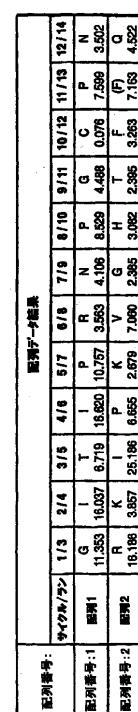
【図2B-2】



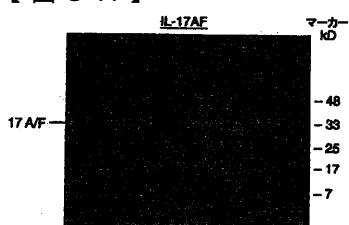
【図2C】



【図3B】



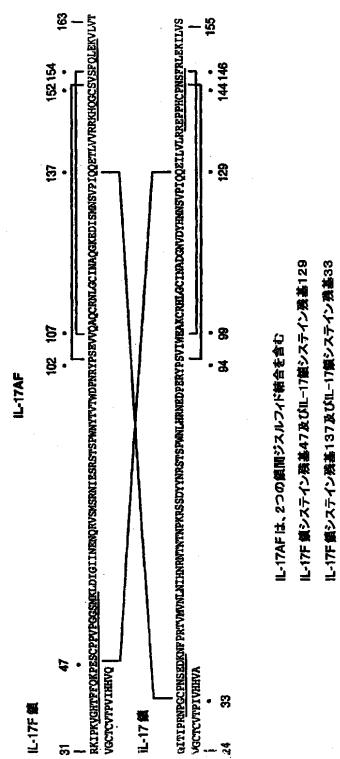
【図3A】



【図3C】

IL-17
 MPPGCPGK (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖36-50)
 EPPPCPNSPR (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖125-134)
 IL-17F
 HQGCSVSPQLEK (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖134-146)
 NPQCPNSEDK (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖30-39)
 IL-17F
 DIGITENKQVYVNSRISATISIISPSIPIVPPDIDPDKYKSEPVNDACRHEPQD
 NSPZ-LQDPELIVREROCSPFQLEKIVVTPGCGCTPTEHIIQ (蛋白番号:1)

【図4A】



IL-17AFは、2つの側面ジスルフィド結合を含む
 IL-17F 錠ステイク残基137及びIL-17F 錠ステイク残基129
 IL-17F 錠ジスルフィド結合137及びIL-17F 錠ジスルフィド結合129

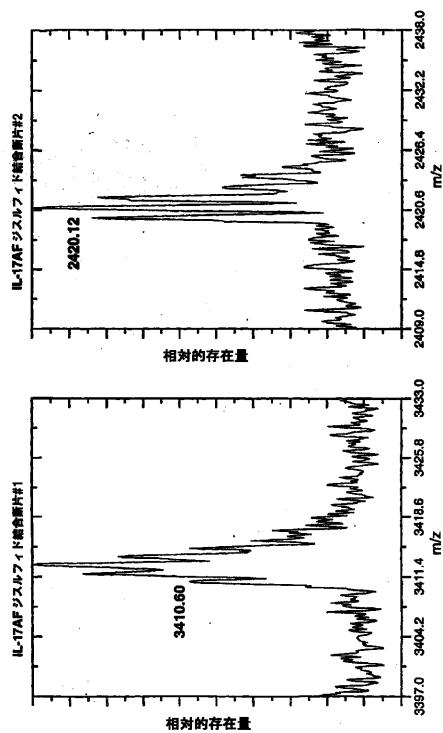
【図4B】

IL-17AFジスルフィド結合断片#1
 VGHTEFPQKPESCPPEVPGSMK (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖36-50)
 EPPPCPNSPR (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖125-134)
 単一同位体 $[M+H]^+$ = 3410.58 Da

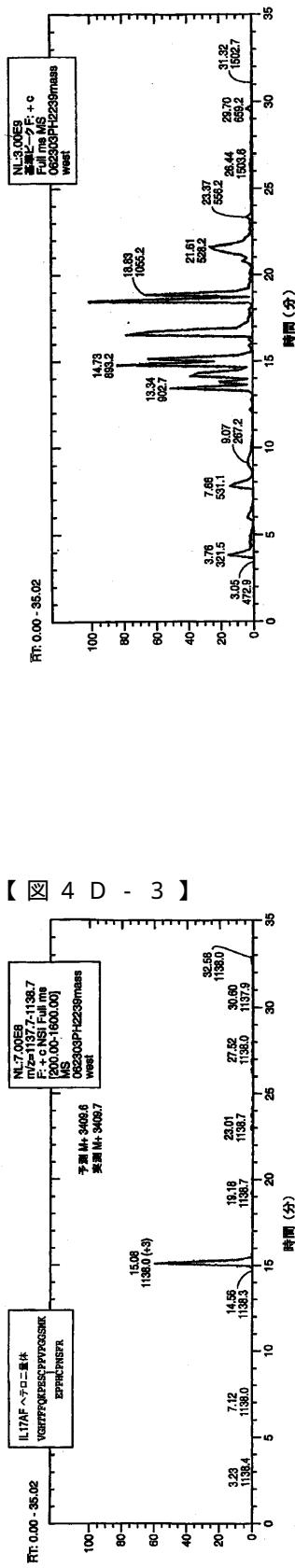
IL-17AFジスルフィド結合断片#2
 HQGCSVSPQLEK (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖134-146)
 NPQCPNSEDK (IL-17F 錠トリプシン消化ペプチドアミ/鎖30-39)

単一同位体 $[M+H]^+$ = 2420.05 Da

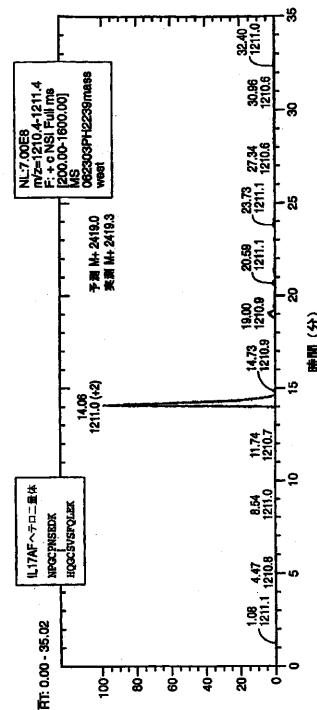
【図4C】



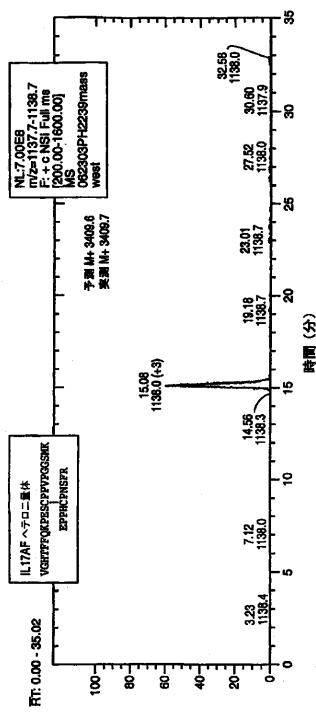
【 図 4 D - 1 】



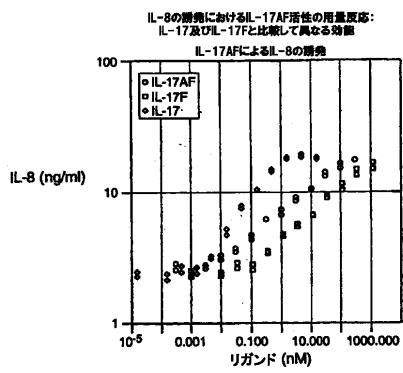
【図4D-2】



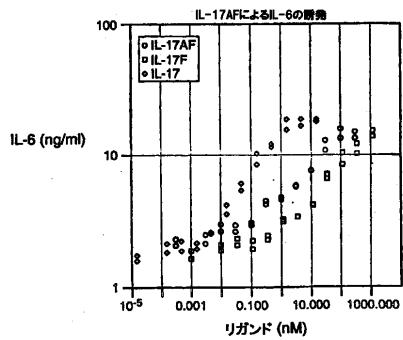
【 図 4 D - 3 】



【図5A】



【 図 5 B 】



【 四 6 】

ロード		CDR H1		CDR H2		CDR H3	
1.	1-17AFに接続する由来のCDR	1	1	1	1	1	1
2		2	2	2	2	2	2
3		3	3	3	3	3	3
4		4	4	4	4	4	4
5		5	5	5	5	5	5
6		6	6	6	6	6	6
7		7	7	7	7	7	7
8		8	8	8	8	8	8
9		9	9	9	9	9	9
10		10	10	10	10	10	10
11		11	11	11	11	11	11
12		12	12	12	12	12	12
13		13	13	13	13	13	13
14		14	14	14	14	14	14
15		15	15	15	15	15	15
16		16	16	16	16	16	16
17		17	17	17	17	17	17
18		18	18	18	18	18	18
19		19	19	19	19	19	19
20		20	20	20	20	20	20
21		21	21	21	21	21	21
22		22	22	22	22	22	22
23		23	23	23	23	23	23
24		24	24	24	24	24	24
25		25	25	25	25	25	25
26		26	26	26	26	26	26
27		27	27	27	27	27	27
28		28	28	28	28	28	28
29		29	29	29	29	29	29
30		30	30	30	30	30	30
31		31	31	31	31	31	31
32		32	32	32	32	32	32
33		33	33	33	33	33	33
34		34	34	34	34	34	34
35		35	35	35	35	35	35

【 9 】

CAACTGCACCTCGCTCTATCGATGCCAACCGCGCRACTGAGCTGAAQRCCTCAG
GGCCGGACCGCTCGCTGAGCTTCTGCTGCTGCTATGGGGCTTCGCTTCTCTGAG
GGCGCAGGGCTGGATGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
CCGGCTCTGGCGAGGAGTGTGATGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
GTTGGCTCTGGCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
TGGCGRCCTCCAGCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
ATCAATGCTCAAGGGAAGGAGAGCAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
CTGGTCTGCGGGGGAGGAGCAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
GTGAGCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAGCTTCTGAG
ATCACTCGAGCTGAGGAG

【 図 1 0 】

MTVKTLLHGPAMVKYLLLS1ILGLAFLSEAAARK1PKVGHTFPQKPCSCPVPQGSMLKIDIG
IINENQRVSMRMSR1ESRSTSPWNYTV1WDPNRYPSEVVQACRNLGCINAQGKEDISMNS
VPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQLEKVLTVGCTCVTPV1IHVQ

シグナル配列:	アミノ酸 1-30
N-グリコシル化部位:	アミノ酸 83-86
N-ミリストイル化部位:	アミノ酸 106-111, 136-141

【 义 1 1 】

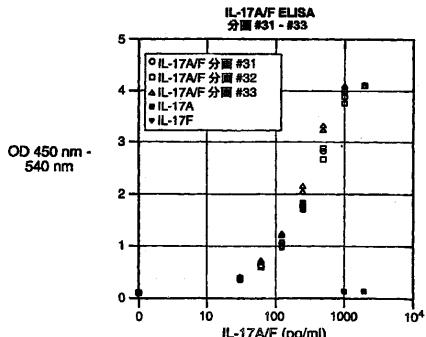
抗CD3/抗CD28活性化ヒトT細胞から生成された IL-17A/FのIL-17A/F ELISAによる測定

【 図 7 】

〔 四 8 〕

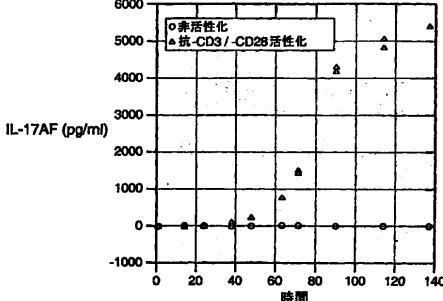
MTPGKTSLSVSLLLSLEAIVKAGITIPRNPGENSEDKNPPRTVMVNLIHNRNTNTNP
KRSDDYNNRSTSFWNLHRNEDPERYPSVIWEAKRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQBIL
VLRREPPHCNSFRLEKLLIVSGCTCTVTPIVHHVA

【 図 1 2 】



【 义 1 1 】

抗CD3/抗CD28活性化ヒトT細胞から生成された IL-17A/FのIL-17A/F ELISAによる測定



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/017581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/54 C12N15/24 C07K16/24 C12N15/13 A61K38/20 A61K38/17 A61K39/395 G01N33/563 G01N33/53 C12P21/02														
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) IPC 7 C07K C12N A61K														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">AGGARWAL S ET AL: "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 3, 17 January 2003 (2003-01-17), pages 1910-1914, XP002294203 ISSN: 0021-9258 abstract; figures 2B,2C</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">59</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">----- -/-</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-34, 50-58, 60-70</td> </tr> </tbody> </table>						Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	AGGARWAL S ET AL: "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 3, 17 January 2003 (2003-01-17), pages 1910-1914, XP002294203 ISSN: 0021-9258 abstract; figures 2B,2C	59	Y	----- -/-	1-34, 50-58, 60-70
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	AGGARWAL S ET AL: "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 3, 17 January 2003 (2003-01-17), pages 1910-1914, XP002294203 ISSN: 0021-9258 abstract; figures 2B,2C	59												
Y	----- -/-	1-34, 50-58, 60-70												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.											
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed														
T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *g* document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the International search			Date of mailing of the International search report											
11 May 2005														
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Moonen, P											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/017581

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HYMOWITZ SARAH G ET AL: "IL-17s adopt a cystine knot fold: Structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 19, 1 October 2001 (2001-10-01), pages 5332-5341, XP002321610 ISSN: 0261-4189 Abstract; Figures 1 and 5; Discussion	1-34, 50-58, 60-70
X	WO 01/46420 A (GENENTECH, INC) 28 June 2001 (2001-06-28)	35-39
Y	page 6; claims 24,26; example 15	40-49, 71-75
Y	GERSTNER R B ET AL: "Sequence plasticity in the antigen-binding site of a therapeutic anti-HER 2 antibody" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 321, 2002, pages 851-862, XP002972421 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	40-49, 71-75
A	AGGARWAL S ET AL: "IL-17: PROTOTYPE MEMBER OF AN EMERGING CYTOKINE FAMILY" JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL, US, vol. 71, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 1-8, XP008005877 ISSN: 0741-5400 the whole document	
A	MOSELEY T A ET AL: "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS, vol. 14, no. 2, April 2003 (2003-04), pages 155-174, XP002321611 ISSN: 1359-6101 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/017581

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/017581

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**Continuation of Box II.1**

Although claims 56-57 and 65-69 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.

Although claims 61-64 are also directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compounds.

International Application No. PCT/US2004/017581

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-34 and 50-70

Heterodimeric IL-17A/F, DNA encoding this protein, antibodies binding only to this heterodimer (and not to either IL-17A or -17F), IL-17A/F specific assays; uses of the compounds.

2. claims: 35-49 and 71-75

Antibodies directed against dimers of IL-17A and/or -17F, and encoding nucleic acids.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/017581

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0146420	A 28-06-2001	AU 2590901 A	03-07-2001
		CA 2391374 A1	28-06-2001
		EP 1240325 A2	18-09-2002
		JP 2003527104 T	16-09-2003
		US 2002182673 A1	05-12-2002
		WO 0146420 A2	28-06-2001
		US 2003008815 A1	09-01-2003
		US 2003003546 A1	02-01-2003
		US 2002177188 A1	28-11-2002
		US 2003054442 A1	20-03-2003
		AU 2055401 A	12-06-2001
		AU 2224800 A	28-09-2000
		AU 2596700 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		CA 2361840 A1	14-09-2000
		CA 2362427 A1	14-09-2000
		CA 2391455 A1	07-06-2001
		CA 2490853 A1	07-06-2001
		CA 2490909 A1	07-06-2001
		CA 2491258 A1	07-06-2001
		CA 2491433 A1	07-06-2001
		CA 2491610 A1	07-06-2001
		CA 2492049 A1	07-06-2001
		CA 2492070 A1	07-06-2001
		EP 1263948 A2	11-12-2002
		EP 1220905 A2	10-07-2002
		EP 1250426 A2	23-10-2002
		JP 2004513602 T	13-05-2004
		JP 2004516227 T	03-06-2004
		JP 2004522404 T	29-07-2004
		US 2003148373 A1	07-08-2003
		WO 0053754 A1	14-09-2000
		WO 0053756 A2	14-09-2000
		WO 0053758 A2	14-09-2000
		WO 0140466 A2	07-06-2001
		US 2004063921 A1	01-04-2004
		US 2003211091 A1	13-11-2003
		US 2004006219 A1	08-01-2004
		US 2003068648 A1	10-04-2003
		US 2003195345 A1	16-10-2003
		US 2003216305 A1	20-11-2003
		US 2003216560 A1	20-11-2003
		US 2003187241 A1	02-10-2003
		US 2003216561 A1	20-11-2003
		US 2003215905 A1	20-11-2003
		US 2003072745 A1	17-04-2003
		US 2003073131 A1	17-04-2003
		US 2003049684 A1	13-03-2003
		US 2003148376 A1	07-08-2003
		US 2003203402 A1	30-10-2003

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 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
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	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
	C 1 2 P 21/02	K
	G 0 1 N 33/15	Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,M,A,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ガーニー, オースティン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, デビー レーン 1

(72)発明者 ハス, フィリップ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94038, モス ビーチ, シエラ ストリート 558

(72)発明者 リー, ジェームス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94066, サン ブルーノ, シェルター クリーク レーン 705

(72)発明者 ウー, ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティー, チャレンジ コート
101

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA26 CA02 CA05 DA02 DA03 DA06 EA02 HA11
4B063 QA06 QA08 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33
4B064 AG03 AG27 CA19 CA20 CC24 CE07 DA01 DA13
4B065 AA26X AA90X AA91X AA93X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA17 BA01 BA02 DA12 NA14 ZA362
ZA552 ZA592 ZA662 ZA752 ZA892 ZA942 ZB022 ZB072 ZB082 ZB092
ZB112 ZB132 ZB152 ZC352
4C085 AA13 AA14
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA02 DA76 EA22
EA54 FA74 GA22

专利名称(译)	IL-17异源多肽及其治疗用途		
公开(公告)号	JP2008500803A	公开(公告)日	2008-01-17
申请号	JP2006518636	申请日	2004-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アルノデイビッド ガーニーオースティン ハスフィリップ リージェームス ウーヤン		
发明人	アルノ, デイビッド ガーニー, オースティン ハス, フィリップ リー, ジェームス ウー, ヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12P21/08 C07K14/54 C07K16/24 C07K16/00 C12Q1/02 C07K19/00 A61K38/00 A61K45/00 A61K39/395 A61P37/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P9/00 A61P7/06 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/02 A61P1/16 A61P1/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P37/06 G01N33/53 G01N33/15 C12N15/13 C12N15/24 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/54 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/565 G01N33/6869 Y02A50/463 Y02A50/473 C07K2317/24 C07K2317/32 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2317/75 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.B C12P21/02.C C12P21/08 C07K14/54 C07K16/24 C07K16/00 C12Q1/02 C07K19/00 A61K37/02 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/00 A61P37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P21/00 A61P9/00 A61P7/06 A61P3/10 A61P13/12 A61P25/00 A61P25/02 A61P1/16 A61P1/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P11/06 A61P27/16 A61P37/06 G01N33/53.P C12P21/02.K G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/HA11 4B063/QA06 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B064/AG03 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/DA12 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZB022 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA74 4H045/GA22		
优先权	60/485599 2003-07-08 US 60/486457 2003-07-11 US		
其他公开文献	JP5340537B2		

摘要(译)

本发明涉及一种新的天然存在的人细胞因子，其由白细胞介素-17和白细胞介素-17F的异二聚体组成，在本文中称为白细胞介素17A / F (IL-17A / F)。本文还提供了包含那些核酸序列的载体和宿主细胞，包含与异源多肽序列融合的本发明多肽的嵌合多肽分子，与本发明多肽结合的特异性抗体以及产生该多肽的多肽的方法。本发明。本文进一步提供了治疗退行性软骨疾病和其他炎性疾病的方法。

