

(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2004-520811

(P2004-520811A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7115</b>	A 6 1 K 31/7115	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
<b>A 6 1 P 1/18</b>	A 6 1 P 1/18	4 B O 6 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 183 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-522282 (P2002-522282)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌイー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成13年5月30日 (2001.5.30)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月24日 (2003.2.24)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/017443	(72) 発明者	アガーワル, スディープタ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94066, サンプルノ, パークシャー ドライブ 2981
(87) 国際公開番号	W02002/016611		
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		
(31) 優先権主張番号	PCT/US00/23328		
(32) 優先日	平成12年8月24日 (2000.8.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-22ポリペプチド、それをコードする核酸並びに腫瘍疾患の治療方法

## (57) 【要約】

本発明は、インターロイキン-22ポリペプチド及びそれらポリペプチドをコードする核酸に関する。また、ここで提供されているのは、ベクター及びこれら核酸配列を含む宿主細胞、異種ポリペプチド配列と融合した本発明のポリペプチドを含むキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドと結合する抗体、そして本発明のポリペプチドを産生する方法である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 配列番号：2 のアミノ酸 1 - 179、又は (b) X が (配列番号：2) の 29 - 38 の任意のアミノ酸であるアミノ酸 X - 179 をコードするヌクレオチド配列と、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、又はその相補鎖。

## 【請求項 2】

図 1 (配列番号：1) に示すヌクレオチド配列と、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、又はその相補鎖。

## 【請求項 3】

図 1 (配列番号：1) に示す完全長コード化配列のヌクレオチド配列と、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、又はその相補鎖。 10

## 【請求項 4】

1999年12月7日に ATCC 番号 PTA - 1031 として寄託された DNA の完全長コード化配列と少なくとも 80% の核酸配列同一性を有する単離された核酸、又はその相補鎖。

## 【請求項 5】

配列番号：1 に示す 1152 ヌクレオチド長の単離された核酸、及びその相補鎖。

## 【請求項 6】

請求項 1 の核酸を含んでなるベクター。

## 【請求項 7】

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と作用可能に結合している、請求項 6 のベクター。 20

## 【請求項 8】

請求項 7 のベクターを含んでなる宿主細胞。

## 【請求項 9】

前記細胞が CHO 細胞、大腸菌又は酵母細胞である、請求項 8 の宿主細胞。

## 【請求項 10】

請求項 8 の宿主細胞を IL - 22 ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、培養細胞から前記 IL - 22 ポリペプチドを回収することを含んでなる、前記 IL - 22 ポリペプチドを産生するための工程。 30

## 【請求項 11】

アミノ酸 1 から約 33 を欠く、図 2 (配列番号：2) に示すアミノ酸配列、又は図 2 (配列番号：2) に示すアミノ酸配列と少なくとも 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 12】

1999年12月7日に ATCC 番号 PTA - 1031 として寄託された DNA の完全長コード化配列によってコードされるアミノ酸配列と、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 13】

異種アミノ酸配列と融合した請求項 12 に記載のポリペプチドを含んでなるキメラ分子。 40

## 【請求項 14】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である、請求項 13 のキメラ分子。

## 【請求項 15】

前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンの Fc 領域である、請求項 14 のキメラ分子。

## 【請求項 16】

請求項 11 に記載のポリペプチドと結合する抗体。

## 【請求項 17】

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 16 の抗体。

## 【請求項 18】

前記抗体が IL - 22 のレセプターとの結合を阻止する、請求項 15 の抗体。 50

## 【請求項 19】

膵臓細胞を含んでなる系において、前記膵臓細胞によって P A P 1 の I L - 2 2 誘導発現を阻害するための方法であって、前記系を I L - 2 2 アンタゴニストと接触させることを含んでなり、それによって前記膵臓細胞によって前記 P A P 1 発現を阻害する前記方法。

## 【請求項 20】

前記アンタゴニストが抗 - I L - 2 2 抗体である、請求項 19 の方法。

## 【請求項 21】

前記アンタゴニストが I L - 2 2 アンチセンス核酸である、請求項 19 の方法。

## 【請求項 22】

接触の段階がインピトロでおこる、請求項 19 の方法。

10

## 【請求項 23】

哺乳動物へ I L - 2 2 アンタゴニストの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膵臓疾患を治療する方法。

## 【請求項 24】

膵臓疾患が急性膵炎、慢性膵炎、腺房細胞癌又は混合細胞集団膵癌を含む膵癌である、請求項 23 の方法。

## 【請求項 25】

哺乳動物へ I L - 2 2 アンタゴニストの有効量を投与することを含んでなる、哺乳動物における膵臓の活性化又は炎症症状を和らげる方法。

## 【請求項 26】

前記アンタゴニストが抗 - I L - 2 2 抗体である、請求項 25 の方法。

20

## 【請求項 27】

前記アンタゴニストが I L - 2 2 アンチセンス核酸である、請求項 25 の方法。

## 【請求項 28】

哺乳動物へ I L - 2 2 ポリペプチド結合を阻害する I L - 2 2 R / I L - 1 0 R 複合体アンタゴニスト、アンタゴニスト抗体、又はその断片の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膵臓の活性化又は炎症症状を和らげる方法。

## 【請求項 29】

哺乳動物へ I L - 2 2 R / I L - 1 0 R 複合体アンタゴニストの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膵臓疾患の発症を予防するための方法。

30

## 【請求項 30】

前記アンタゴニストがアンタゴニスト抗体である、請求項 29 の方法。

## 【請求項 31】

前記アンタゴニストが抗体断片である、請求項 29 の方法。

## 【請求項 32】

哺乳動物における膵臓の活性化又は炎症状態を診断する方法であって、哺乳動物の膵臓から得た生物学的試料を I L - 2 2 と接触させて S T A T 3 ポリペプチドスーパーシフトを測定することを含んでなり、スーパーシフトの存在が前記疾患の存在を示す前記方法。

## 【請求項 33】

I L - 2 2 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、I L - 2 2 ポリペプチドを正常に発現する細胞を候補化合物と接触させ、前記遺伝子の発現を欠くことを確かめることを含んでなる方法。

40

## 【請求項 34】

前記候補化合物が I L - 2 2 アンチセンス核酸を含む、請求項 33 の方法。

## 【請求項 35】

組成物が哺乳動物の急性又は慢性膵炎のいずれかを和らげるために効果的であり、容器上の標識が組成物が膵臓疾患を治療することに使用することが可能であることを示し、及び組成物中の活性剤が I L - 2 2 ポリペプチドの活性又は発現を阻害する薬剤である、容器

；  
容器に付した標識；及び

50

容器内に含有されている活性剤を含んでなる組成物を含んでなる製造品。

【請求項 36】

IL-22 ポリペプチドを含有すると思われる試料から IL-22 ポリペプチドを検出する方法であって、コンジュゲートの形成が前記試料中での IL-22 ポリペプチドの存在を示す、前記試料と IL-10R ポリペプチド（配列番号：3）又は IL-22R ポリペプチド（配列番号：4）を接触させ、前記試料中における IL-22 / IL-10R ポリペプチドコンジュゲート又は IL-22 / IL-22R ポリペプチドコンジュゲートの形成を確かめることを含んでなる前記方法。

【請求項 37】

前記試料が前記 IL-22 ポリペプチドを発現すると思われる細胞を含む、請求項 36 に記載の方法。 10

【請求項 38】

前記 IL-10R ポリペプチドが検出可能な標識で標識されているか、又は固体支持体に付着している、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

IL-22R ポリペプチドが検出可能な標識で標識されているか、又は固体支持体に付着している、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

IL-22R ポリペプチド又は IL-10R ポリペプチドを含有すると思われる試料中での IL-22R ポリペプチド又は IL-10R ポリペプチドを検出する方法であって、コンジュゲートの形成が前記試料中での IL-22R ポリペプチド又は IL-10R ポリペプチドの存在を示す、前記試料を IL-22 ポリペプチドと接触させ、前記試料中での IL-22R / IL-22 ポリペプチドコンジュゲート又は IL-10R / IL-22 ポリペプチドコンジュゲートの形成を確かめることを含んでなる前記方法。 20

【請求項 41】

前記試料が IL-22R ポリペプチド又は IL-10R ポリペプチドを発現すると思われる細胞を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 IL-22 ポリペプチドが検出可能な標識で標識されるか、又は固体支持体に付着している、請求項 40 に記載の方法。 30

【請求項 43】

生物活性分子を IL-22 ポリペプチドを発現する細胞と結合させる方法であって、前記細胞を生物活性分子と結合している IL-22R ポリペプチド又は IL-10R ポリペプチドと接触させて、前記 IL-22 ポリペプチドと前記 IL-22R ポリペプチド、又は前記 IL-22 ポリペプチドと前記 IL-10R ポリペプチドの結合を可能にすることを含んでなり、それによって前記生物活性分子と前記細胞を結合させる前記方法。

【請求項 44】

前記生物活性分子が毒素、放射標識又は抗体である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記生物活性分子が前記細胞の死を引き起こす、請求項 43 に記載の方法。 40

【請求項 46】

生物活性分子を IL-22R ポリペプチド又は IL-10R ポリペプチドを発現する細胞と結合させる方法であって、前記細胞を前記生物活性分子と結合している IL-22 ポリペプチドと接触させ、前記 IL-22 ポリペプチドと前記 IL-22R、又は前記 IL-22 ポリペプチドと前記 IL-10R ポリペプチドの結合を可能にすることを含んでなり、それによって前記生物活性分子と前記細胞を結合させる前記方法。

【請求項 47】

前記生物活性分子が毒素、放射標識又は抗体である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記生物活性分子が前記細胞の死を引き起こす、請求項 47 に記載の方法。 50

## 【請求項 49】

IL-22 ポリペプチドを発現する細胞の少なくとも1つの生物学的活性を調節する方法であって、前記細胞を (a) IL-22 R ポリペプチド、(b) IL-10 R ポリペプチド又は (c) 抗-IL-22 ポリペプチド抗体と接触させ、これによって前記 (a) IL-22 R ポリペプチド、(b) IL-10 R ポリペプチド又は (c) 抗-IL-22 ポリペプチド抗体が前記 IL-22 ポリペプチドと結合することを含んでなり、その結果前記細胞の少なくとも1つの生物活性を調節する前記方法。

## 【請求項 50】

前記細胞が死滅する、請求項 49 に記載の方法。

## 【請求項 51】

IL-22 R ポリペプチド又は IL-10 R ポリペプチドを発現する細胞の少なくとも1つの生物学的活性を調節する方法であって、前記細胞を (a) IL-22 ポリペプチド、(b) 抗-IL-22 R ポリペプチド抗体又は (c) 抗-IL-10 R ポリペプチド抗体と接触させ、それによって前記 (a) IL-22 ポリペプチド、(b) 抗-IL-22 R ポリペプチド抗体又は (c) 抗-IL-10 R ポリペプチド抗体が前記 IL-22 R ポリペプチド又は IL-10 R ポリペプチドと結合することを含んでなり、その結果前記細胞の少なくとも1つの生物活性を調節する前記方法。

10

## 【請求項 52】

前記細胞が死滅する、請求項 51 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般的にインターロイキン-22 (IL-22) の同定及び単離、そして膵臓疾患の治療の方法に関する。

## 【0002】

(本発明の背景)

膵臓は、胃の後及び十二指腸の近くに位置する大きな腺である。それは、管を通して小腸に入る消化酵素を分泌する。これらの酵素は、タンパク質、脂肪及び炭水化物の消化を促進する。消化酵素に加えて、膵臓は、また、糖代謝において重要な役割を担うインシュリン及びグルカゴンを遊離する。

30

膵炎は、膵臓が炎症をおこす疾患である。膵臓への損傷は、消化酵素が活性化して腺を攻撃し始めると生じる。重傷の場合には、腺への出血、組織損傷、感染及び嚢胞形成があり得る。2つの形態の膵炎がある。突然に起こる急性型は、生命を脅かし得る。膵炎の慢性型は、患者が、膵臓の機能低下及びひどい痛みと体重減少を引き起こすアルコール飲酒を持続した場合に起こり得る。アメリカ合衆国では、毎年、およそ50,000から80,000ケースの急性膵炎が起こっている。それは、女性よりも男性によく見られる。

## 【0003】

現在、膵炎の診断は難しい。通常、医者が十分な膵臓酵素が生成されているかを確認めることに膵臓機能試験が役立っている。CATスキャンによって、例えば胆石のような、頻りに疾病と関わっている腺そのものの異常があるかを確認めることができる。慢性膵炎は膵臓癌への主要な危険因子であるので、診断がなされた直ぐにそれは処置されるべきである。

40

膵臓は、約80%の腺房細胞、1-2%の島細胞及び10-15%の立方骨管細胞で構成されている。腺房細胞癌は膵癌の1-2%を占め、膵癌のさらに10-15%は腺房細胞及び他の細胞型で構成されている [Nomuraら., Ultra. Path. (1992) 16: 317-329]。急性膵炎のすべてのケースは、消化酵素の活性化及び滞留を引き起こす形で腺房細胞に作用し、それによって腺房細胞を傷つけ、サイトカインの遊離を引き起こす。サイトカインは、炎症細胞、特に好中球を誘引し、これがさらなるサイトカインの分泌につながる。遊離した炎症分子が膵臓水腫、及び局所的壊死を誘導することが示されている。ある研究によって、特定の臨床的状況では、サイトカインが膵

50

炎の経過を改善し得ることが示唆されている。

【0004】

インターロイキン-22 (IL-22) は、新しく同定された活性化T細胞によって産生されるサイトカインであり、インターロイキン-10 (IL-10) に関連する。レセプター複合体を介するIL-22シグナルは、IL-10R としても知られているCRF2-4、及びクラスIIサイトカインレセプターファミリーの新規メンバーであるインターロイキン-22レセプター (IL-22R) からなる [Xieら., J. Biol. Chem. (2000) 275, 31355-31339]。このレセプター複合体のメンバーとして、IL-22Rの発現は完全に限定されているが、膵臓での高発現を含めてIL-10R は幾つかの組織で発現しており、このことはIL-22RがIL-22の作用部位をコントロールしていることを示唆している。例としては、マウスIL-22は、急性膵炎にて過剰発現する遺伝子である膵炎関連タンパク質 (PAP1) を含む膵臓腺房細胞の幾つかの遺伝子の遺伝子発現における変化を誘導する [Iovannaら., J. Biol. Chem. (1991) 266, 24664-24669]。膵臓で高発現するレセプター複合体を介するIL-22シグナル伝達は、IL-22シグナル伝達が膵臓での免疫/炎症応答を調節することができ、膵炎を含む膵臓の疾患に関わり得ることを示唆している。

10

【0005】

(本発明の要約)

一実施態様では、本発明は、インターロイキン-22 (IL-22) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。

20

一側面では、単離された核酸分子は、(a) 図2 (配列番号: 2) の約1又は約33から約179を含むアミノ酸残基の配列を有するインターロイキン-22 (IL-22) ポリペプチドをコードするDNA分子、(b) Xが図2 (配列番号: 2) の29から38の任意のアミノ酸である、約アミノ酸1からXのシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、又はここで開示する完全長アミノ酸配列のその他の特に確定済みの断片、又は(c) (a) のDNA分子の相補鎖に対して、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するヌクレオチド配列を含む。

30

【0006】

他の側面では、単離された核酸分子は、(a) 図1 (配列番号: 1) に開示したcDNAのヌクレオチド約58又は約157から約594を含むの配列を含んでなるDNA分子、又は(b) (a) のDNA分子の相補鎖に対して、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9

40

50

5%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む。

【0007】

さらなる側面では、本発明は、(a)1999年12月7日にATCC寄託番号PTA-1031(DNA1251-2806)としてATCCへ寄託したヒトタンパク質cDNAによってコードされている同じ成熟ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、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む単離された核酸分子に関する。

10

20

【0008】

その他の実施態様は、IL-22ポリペプチドコード化配列の断片、又はその補体に関し、それらには、例えば、場合によっては抗-IL-22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IL-22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10ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約15ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約20ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約40ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約50ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約70ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約80ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約100ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約110ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約130ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約140ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約160ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約170ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約190ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約200ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約250ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約350ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約400ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約500ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約700ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約800ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約1000ヌクレオチド長であり、ここで「約」という語の内容は参照する長さのプラス又はマイナス10%のヌクレオチド配列長を指すことを意味する。IL-22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IL-22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IL-22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IL-22ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列のすべては、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-IL-22抗体に対する結合部位を含むIL-22ポリペチ

30

40

50

ド断片によってコードされる I L - 2 2 ポリペプチド断片も考慮される。

【 0 0 0 9 】

その他の実施態様では、本発明は、上記で特定された単離された核酸配列のいずれかによってコードされている単離された I L - 2 2 ポリペプチドを提供する。

或る側面では、本発明は、( a ) 図 2 ( 配列番号 : 2 ) に開示された完全長アミノ酸配列を有する I L - 2 2 ポリペプチド、( b ) X が図 2 ( 配列番号 : 2 ) の 2 9 から 3 8 の任意のアミノ酸である、約 1 から X のシグナルペプチドを欠くアミノ酸配列、又はここで開示する完全長アミノ酸配列のその他の特に確定済みの断片に対して、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む単離された I L - 2 2 ポリペプチドに関する。

10

20

【 0 0 1 0 】

さらなる態様では、本発明は、1999年12月7日にATCC寄託番号PTA-1031 ( DNA 1 2 5 1 - 2 8 0 6 ) としてATCCへ寄託したヒトタンパク質cDNAによってコードされてい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む単離された I L - 2 2 ポリペプチドに関する。

30

【 0 0 1 1 】

特別な側面では、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持たず、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 I L - 2 2 ポリペプチドを提供する。これらを製造する方法もここに記載され、これらの方法は、適当なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を I L - 2 2 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 I L - 2 2 ポリペプチドを回収することを含む。

40

さらに他の実施態様では、本発明は、ここで同定される天然 I L - 2 2 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 - I L - 2 2 抗体又は小分子である。

【 0 0 1 2 】

さらなる実施態様では、本発明は、I L - 2 2 ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニ

50

ストを同定する方法に関し、それは、IL-22ポリペプチドを候補分子と接触させ、前記IL-22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-22ポリペプチドは天然IL-22ポリペプチドである。

またさらなる実施態様では、本発明は、IL-22ポリペプチド、又はここに記載するIL-22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-22抗体を担体と組み合わせを含む組成物に関する。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-22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-22抗体の、IL-22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-22抗体に応答性のある症状の治療に有用な医薬の調製のための使用に関する。

10

#### 【0013】

本発明のさらなる実施態様では、本発明は、ここに記載の任意のポリペプチドをコードするDNAを含むベクターを提供する。任意のそのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例としては、その宿主細胞はCHO細胞、大腸菌、又は酵母であってもよい。ここに記載の任意のポリペプチドの製造方法がさらに提供されており、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、ここに記載の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、エピトプタグ配列又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。

20

#### 【0014】

その他の実施態様では、本発明は、上記又は下記のポリペプチドの任意のものに特異的に結合する抗体を提供する。場合によっては、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ヌクレオチド配列の単離、関連する遺伝子の発現を測定及び検出することによって、又はアンチセンスプローブとして有用であり得る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。

30

他の実施態様では、本発明は、膵臓疾患の疑いがある生物学的試料を接触させることによって膵臓疾患を検出、診断及び治療する方法を提供する。生物学的試料中の膵臓疾患を検出及び治療することには、IL-22発現のレベルを確かめること、PAP1に対するIL-22発現の効果、又はIL-22で生物学的試料を探索することを含めてもよい。治療には、生物学的試料をIL-22に対するアンタゴニストと接触させること、IL-22発現の低下、又はレセプターへのIL-22結合の阻害を含めてもよい。

#### 【0015】

(好適な実施態様の詳細な説明)

##### I. 定義

ここで使用される際の「IL-22ポリペプチド」及び「IL-22」という用語は、ここで記載されている特定のポリペプチド配列を指す。ここで記載されているIL-22ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、組換え又は合成方法によって調製してもよい。例えば、調製の、精製の、誘導の、抗体の形成、投与の、含有する組成物、疾患の治療、などの記述は、本発明の各ポリペプチドに個別に関係する。また、「IL-22ポリペプチド」という用語には、ここに開示されているIL-22ポリペプチドの変異体が含まれる。

40

#### 【0016】

「天然配列IL-22ポリペプチド」は、天然由来の対応するIL-22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-22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産生する

50

こともできる。「天然配列 IL - 22 ポリペプチド」という用語には、特に、特定の IL - 22 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。本発明の一実施態様では、図 2（配列番号：2）のアミノ酸 1 から 179 を含む天然配列 IL - 22 ポリペプチドは、完全長アミノ酸配列を含む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 1（配列番号：1）に示している。しかし、図 2（配列番号：2）に開示されている IL - 22 ポリペプチドがメチオニン残基で開始することが図 2（配列番号：2）のアミノ酸位置 1 において示されているが、図 2（配列番号：2）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 - 22 ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられ得ることが考えられるし可能であり得る。

10

## 【0017】

ここに開示する種々の IL - 22 ポリペプチドの「シグナルペプチド」の適切な位置は、本明細書及び/又は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 - 末端境界は変化し得るが、それは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エレメント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得る（例えば、Nielsenら, Prot. Eng. 10: 1 - 6 (1997) 及び von Heinjeら, Nucl. Acids. Res. 14: 4683 - 4690 (1986)）。さらに、幾つかの場合には、分泌

20

## 【0018】

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。

「IL - 22 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 - 22 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 - 22 ポリペプチド配列、ここに開示された完全長 IL - 22 の他の断片と少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性を有する活性 IL - 22 ポリペプチドを意味する。このような IL - 22 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 1 つ又は複数のアミノ酸残基が付加、もしくは欠失した IL - 22 ポリペプチドが含まれる。通常、IL - 22 ポリペプチド変異体は、(a) 図 2（配列番号：2）に開示している IL - 22 ポリペプチド配列のアミノ酸約 1 又は約 33 から約 179、(b) X が図 2（配列番号：2）の 29 から 38 の任意のアミノ酸である、図 2（配列番号：2）に示す IL - 22 ポリペプチド配列の X から 179、(c) 図 2（配列番号：2）に示す完全長 IL - 22 ポリペプチド配列の他の特に確定済みの断片と少なくとも約 80% のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81% のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 82% のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 83% のアミノ酸配列同一性、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 96% 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している。通常は、IL - 22 変異体ポリペプチドは、少なくとも約 10 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 20 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 30 アミノ酸長、ある

30

40

50

いは少なくとも約40アミノ酸長、あるいは少なくとも約50アミノ酸長、あるいは少なくとも約60アミノ酸長、あるいは少なくとも約70アミノ酸長、あるいは少なくとも約80アミノ酸長、あるいは少なくとも約90アミノ酸長、あるいは少なくとも約100アミノ酸長、あるいは少なくとも約150アミノ酸長、あるいは少なくとも約200アミノ酸長、あるいは少なくとも約300アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0019】

ここに定義されるIL-22ポリペプチドに関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」とは、最大のパーセント配列同一性を得るために、必要ならば配列を整列させ間隙を導入した後に、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えない、特定のIL-22ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列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。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ッ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TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、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オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX 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。

10

20

【0020】

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：

30

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のプログラム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の長さとは異なる場合、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、「IL-22」が対象となる仮説的IL-22ポリペプチドのアミノ酸配列を表し、「比較タンパク質」が対象となる「比較」タンパク質が比較されているアミノ酸配列を表し、そして「X」、「Y」及び「Z」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表2及び3は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「IL-22」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性の計算方法を示す。

40

【0021】

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: 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

50

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 = B L O S U M 6 2。W U - B L A S T 2 が用いられた場合には、%アミノ酸配列同一性値は、(a)天然 I L - 2 2 ポリペプチドから誘導された配列を有する対象とする I L - 2 2 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 - 2 2 ポリペプチドが比較される I L - 2 2 ポリペプチド変異体であってもよい配列) との間の、W U - B L A S T - 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 I L - 2 2 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 が対象である比較アミノ酸配列であり、アミノ酸配列 B が対象である I L - 2 2 ポリペプチドのアミノ酸配列である。

#### 【0022】

また、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラム N C B I - B L A S T 2 ( A l t s c h u l r , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 ( 1 9 9 7 ) ) を用いて決定してもよい。N C B I - B L A S T 2 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。N C B I - B L A S T 2 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 = B L O S U M 6 2 を含む。

#### 【0023】

アミノ酸配列比較に N C B I - B L A S T 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 N C B I - B L A S T 2 の A 及び B のプログラム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 の長さとは異なる場合、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。

#### 【0024】

「I L - 2 2 変異体ポリヌクレオチド」又は「I L - 2 2 変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように活性 I L - 2 2 ポリペプチドをコードし、ここで開示する完全長天然配列 I L - 2 2 ポリペプチド配列をコードする核酸配列、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 - 2 2 ポリペプチド配列、又はここに開示する完全長 I L - 2 2 ポリペプチド配列の任意の他の断片と少なくとも約 80%の核酸配列同一性を有する核酸分子を意味する。通常、I L - 2 2 変異体ポリペプチドは、ここで開示する完全長天然配列 I L - 2 2 ポリペプチド配列をコードする核酸配列、ここで開示するシグナルペプチドを欠く完全長天然配列 I L - 2 2 ポリペプチド配列、ここで開示するシグナルペプチドを有するか又は有しない I L - 2 2 ポリペプチドの細胞外ドメイン、又はここに開示する完全長天然配列 I L - 2 2 ポリペプチド配列のその他の断片と、少なくとも約 80%の核酸配列同一性、好ましくは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 8

9%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、そして、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。

#### 【0025】

通常は、IL-22変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約210ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約240ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約270ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

#### 【0026】

ここで同定されるIL-22コード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」とは、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば配列を整列させ間隙を導入した後に、対象であるIL-22核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列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ッ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TXU510087で登録されている。ALIGN-2はジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、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オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX 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。

#### 【0027】

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100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のプログラムのアラインメントによって同一であるとして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の長さとは異なる場合、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、「IL-22-DNA」が対象となる仮説的IL-22コード化核酸配列を表し、「比較DNA」が対象となる「IL-22-DNA」核酸分子が比較されている核酸配列を表し、そして「N」、「L」及び「V」の各々が異なった仮説的アミノ酸残基を表し、表4及び5が「比較DNA」と称される核酸配列の「IL-22-DNA」と称される核酸配列に対する%核酸配列

10

20

30

40

50

同一性の計算方法を示す。

【0028】

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、%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-22ポリペプチドコード化核酸から誘導された配列を有している対象とするIL-22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-22ポリペプチドコード化核酸分子が比較されるIL-22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-22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-22ポリペプチドコード化核酸分子の核酸配列である。

10

20

【0029】

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、マルチパス値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアライ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

【0030】

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のプログラム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の長さとは異なる場合、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。

40

【0031】

他の実施態様では、IL-22変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性IL-22ポリペプチドをコードし、好ましくはストリンジェントな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-22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-22変異体ポリペプチドは、IL-22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。

「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、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

50

味する。その自然環境の夾雑成分とは、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クエネータ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十分なほど、あるいは、(2)クーマシーブ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-22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イ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。

10

#### 【0032】

「単離された」IL-22ポリペプチドコード化核酸又は他のポリペプチド核酸とは、同定され、ポリペプチドコード化核酸の天然源に通常は付随している少なくとも1つの夾雑核酸分子から分離した核酸分子である。単離されたIL-22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特定のポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、ポリペプチドを通常は発現する細胞に含まれるポリペプチドコード化核酸分子を含み、例えば、その核酸分子は天然細胞のものとは異なった染色体位置にある。

「コントロール配列」という用語は、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。原核生物に適したコントロール配列は、例えば、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。

20

#### 【0033】

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、プ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プ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。

30

「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-22ポリペプチド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)、多エピトープ特異性を持つ抗-IL-22抗体組成物、一本鎖抗-IL-22抗体、及び抗-IL-22抗体の断片を包含している(下記参照)。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、すなわち、構成する個々の抗体が、少量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集団から得られる抗体を称する。

40

#### 【0034】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」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ホモロジーの程度が高くな

50

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、反応条件をよりストリンジェントにするが、低い温度はストリンジェンシーを低下させる。さらに、ストリンジェンシーは塩濃度に逆比例する。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明は、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【0035】

ここで定義される「ストリンジェントな条件」又は「高いストリンジェントな条件」とは、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温、例えば、50℃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を用いる；(2)ハイブリダイゼーションの間にホルムアミド等の変性剤、例えば、42℃で750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含むpH6.5の0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMのリン酸ナトリウムバッファーによる50%(v/v)ホルムアミドを用いる；(3)0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)による42℃での、及び50%ホルムアミドによる55℃での洗浄に50%ホルムアミド、5xSSC(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(pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5xデンハード液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸を用い、その後55℃でのEDTAを含む0.1xSSCから成る高いストリンジェンシーによる洗浄が続くことによって同定され得る。

【0036】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrookら、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、上記のストリンジェンシー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ェントな条件とは、37℃で、20%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mLの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液での終夜にわたるインキュベーション、それに続く37-50℃で1xSSCでのフィルターの洗浄である。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。

【0037】

「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-22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-22ポリペプチドの活性を阻害しないよう十分に短い。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。

【0038】

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、I

g A ( I g A - 1 及び I g A - 2 を含む )、 I g E、 I g D 又は I g M などの任意の免疫グロブリンから得ることができる。

【 0 0 3 9 】

ここで意図している「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生 I L - 2 2 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 I L - 2 2 の形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生 I L - 2 2 によって生ずる ( 阻害性又は刺激性の ) 生物学的機能であって、天然又は天然発生 I L - 2 2 が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生 I L - 2 2 が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を意味する。好ましい生物学的活性とは、 P A P 1 発現の誘導である。 P A P 1 は、栄養因子の R E G ファミリーに関連する分泌タンパク質であり、膵炎で高発現しているタンパク質として最初に特徴付けられた ( I o v a n n a ら . , ( 1 9 9 1 ) J B i o l C h e m . , 2 6 6 , 2 4 6 6 4 - 2 4 6 6 9 ) 。 I L - 2 2 のインピボでの注入によって、膵臓での P A P 1 発現の急速な誘導が起こる。

10

【 0 0 4 0 】

「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 I L - 2 2 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 I L - 2 2 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 I L - 2 2 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。 I L - 2 2 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、 I L - 2 2 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、 I L - 2 2 ポリペプチドに通常は関連している 1 つ又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含み得る。

20

【 0 0 4 1 】

ここで使用される「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、目的は標的とする病理学的状態又は疾患を防止又は低下 ( 減少 ) させることである。治療が必要なものとは、疾患に罹りやすいもの又は疾患が予防されるものだけでなく、既に疾患に罹っているものを含む。

「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。

30

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。

1 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。

【 0 0 4 2 】

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 p H 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 1 0 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単糖類、二糖類、及び他の炭水化物； E D T A 等のキレート剤；マンニトール又は祖ルピ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、 T W E E N ( 商品名 )、ポリエチレングリコール ( P E G )、及び P L U R O N I C S ( 商品名 ) を含む。

40

【 0 0 4 3 】

50

「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 a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、及びF v断片；ダイアボディ ( d i a b o d i e s )；直鎖状抗体 ( Z a p a t a ら , P r o t e i n E n g . 8 ( 1 0 ) : 1 0 5 7 - 1 0 6 2 [ 1 9 9 5 ] )；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「F c」断片と命名される。ペプシン処理はF ( a b' )<sub>2</sub>断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0044】

「F v」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。この領域は、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。この配置において各ドメインの3つのCDRが相互作用してV<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>に量体の表面に抗原結合部位を決定する。正しくは、6つのCDRが抗体に対する抗原結合特異性を与える。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F v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。

【0045】

また、F a b断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン ( C H 1 ) も含む。F a b断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖C H 1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ってF a b'断片と相違する。ここで、F a b' - S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つF a b'を表す。F ( a b' )<sub>2</sub>抗体断片は、最初はF a b'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。

【0046】

任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それら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二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、それらの幾つかは更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A及びI g A 2に分類される。

「一本鎖F v」又は「s F v」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体断片を含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F vポリペプチドは、s F vが抗原結合にとって望ましい構造の形成を可能にする、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン間のポリペプチドリッカーを更に含む。s F vの概説については、The P h a r m a c o l o g y o f M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , v o l . 1 1 3 , R o s e n b u r g 及び M o o r e 編 , S p r i n g e r - V e r l a g , N e w Y o r k , p p . 2 6 9 - 3 1 5 ( 1 9 9 4 ) の P l u c k t h u n を 参 照 の こと。

【0047】

用語「ダイアボディ ( d i a b o d i e s )」は、二つの抗原結合部位を持つ小型の抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖 ( V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> ) 内で軽鎖可変ドメイン ( V<sub>L</sub> ) に結合した重鎖可変ドメイン ( V<sub>H</sub> ) を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号；国際公開93/11161；及びH o l l i n g e r ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ( 1 9 9 3 ) で十分に記載されている。

【0048】

10

20

30

40

50

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び/又は回収されたものである。その自然環境の夾雑成分とは、その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。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー法で測定した場合95%を越える抗体、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネータ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十分なほど、又は(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元又は還元条件下でのSDS-PAGEによって均一となるまで精製される。単離された抗体には、抗体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イツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

10

## 【0049】

「特異的に結合する」又は「に対して特異的」抗体、又は特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ特異的な抗体とは、他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープとは実質的に結合せずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープへ結合するものである。

「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。

20

## 【0050】

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することの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号に記載のような、別々の粒子の不連続な固相も含む。

## 【0051】

「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-22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。

30

「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。ここで開示されたポリペプチドの「有効量」、或いはそのアゴニスト又はアンタゴニストとは、特別に言及された目的を実行するために十分な量のことである。「有効量」とは、言及された目的に関連して、経験的及び常套的方法によって決定することができる。ここで定義される「活性化した膵臓」とは、膵臓の消化酵素が活性化して膵臓組織を攻撃し始める場合をである。

「生物活性分子」とは、ここで毒素、放射標識又は抗体として定義される。

## 【0052】

40

表1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */      { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0 },
/* B */      { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1 },
/* C */      { -2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5 },
/* D */      { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2 },
/* E */      { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3 },
/* F */      { -4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5 },
/* G */      { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0 },
/* H */      { -1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2 },
/* I */      { -1, -2, -2, -2, 2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2 },
/* J */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* K */      { -1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0 },
/* L */      { -2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2 },
/* M */      { -1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1 },
/* N */      { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1 },
/* O */      { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M },
/* P */      { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0 },
/* Q */      { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3 },
/* R */      { -2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0 },
/* S */      { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0 },
/* T */      { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0 },
/* U */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* V */      { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2 },
/* W */      { -6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6 },
/* X */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* Y */      { -3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4 },
/* Z */      { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4 }
};

```

10

20

【 0 0 5 3 】

表1(続)

```

/*
*/
#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 JMPS 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 DINSO 8       /* penalty for a gap */
#define DINS1 1       /* penalty per base */
#define PINSO 8       /* penalty for a gap */
#define PINS1 4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short      n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
    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[JMPS];       /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPS];       /* 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

【 0 0 5 4 】

表1(続)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: prog 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)
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];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";
    nw();
    readjumps();
    print();
    cleanup(0);
}

```

10

20

30

【 0 0 5 5 】

表1(続)

```

/* 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           ndelx, 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_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("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;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

【 0 0 5 6 】

表1(続)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= lenk; 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 ongong 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 ongong 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

【 0 0 5 7 】

表1(続)

...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) {
            writejumps(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) {
            writejumps(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);
}

```

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

## 表1(続)

```

/*
 *
 * 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
 */

#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() print
{
    int lx, 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;
    lx = 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);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

【 0 0 5 9 】

```

表1(続)

```

/*
 * 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 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%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

【 0 0 6 0 】

表1(続)

```

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

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(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
        fprintf(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() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    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];
    }
}

```

...getmat

10

20

pr\_align

30

40

【 0 0 6 1 】

## 表1(続)

```

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].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[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';
}

【 0 0 6 2 】

```

...pr\_align

10

20

30

dumpblock

40

## 表1(続)

```

                                ...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)                                nums
{
    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)                                putline
    int      ix;        {

```

10

20

30

40

【 0 0 6 3 】

表1(続)

```

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 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * 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] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[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 (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A']]
                cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = ':';
        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

```

...putline

10

stars

20

30

[ 0 0 6 4 ]

表1(続)

```

/*
 * 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));
}

```

stripname

40

50

【 0 0 6 5 】

## 表1(続)

```

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

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

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup()                                cleanup
{
    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)                        getseq
{
    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';
}

```

【 0 0 6 6 】

40

表1(続)

```

py = pseq + 4;
*len = 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_alloc(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_alloc() 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 i, j, xx;

    if (!f) {
        (void) fclose(f);
        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].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

10

20

30

40

【 0 0 6 7 】

表1(続)

```

...readjumps
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].ijmp = 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 jumps
*/
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;
}
}
}

【 0 0 6 8 】

```

10

20

30

40

表1(続)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    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 6 9 】

表 2

I L-2 2	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(長さ = 15 アミノ酸)	
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYYYY	(長さ = 12 アミノ酸)	20

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つのポリペプチド配列間で一致するアミノ酸残基の数) ÷ (I L-2 2  
ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

$$5 \div 15 = 33.3\%$$

【 0 0 7 0 】

表 3

I L-2 2	XXXXXXXXXXXX	(長さ = 10 アミノ酸)	
比較タンパク質	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(長さ = 15 アミノ酸)	30

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つのポリペプチド配列間で一致するアミノ酸残基の数) ÷ (I L-2 2  
ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

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

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

表 4

I L-2 2-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 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つの核酸配列間で一致するヌクレオチドの数) ÷ (I L-2 2-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数) =

10

$6 \div 14 = 42.9\%$

【 0 0 7 2 】

表 5

I L-2 2-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ = 12 ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLVV	(長さ = 9 ヌクレオチド)

20

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 によって確かめられた 2 つの核酸配列間で一致するヌクレオチドの数) ÷ (I L-2 2-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数) =

30

$4 \div 12 = 33.3\%$

【 0 0 7 3 】

I I . 本発明の組成物と方法

A . 完全長 I L - 2 2 ポリペプチド

本発明は、本出願で I L - 2 2 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 - 2 2 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。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なる I L - 2 2 番号が与えられるが、U N Q 番号は全ての与えられた D N A 及びコード化タンパク質に独特であり、変わることはないことを記しておく。しかし、単純化のために、本明細書において、ここに開示した完全長天然核酸分子にコードされるタンパク質並びに上記の I L - 2 2 の定義に含まれるさらなる天然相同体及び変異体は、それらの起源又は調製形式に関わらず「I L - 2 2」で呼称する。

40

【 0 0 7 4 】

下記の実施例に開示するように、種々の c D N A クローンが A T C C に寄託されている。これらのクローンの正確なヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンを配列決定することにより容易に決定することができる。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した I L -

50

22ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、現時点で入手可能な配列情報と最も良く一致するリーディングフレームであると考えられるものを同定した。

【0075】

B. IL-22ポリペプチド変異体

ここに記載した完全長天然配列IL-22ポリペプチドに加えて、IL-22変異体も調製できると考えられる。IL-22変異体は、IL-22DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び/又は所望のIL-22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、グリコシル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IL-22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。

10

【0076】

ここに記載した天然完全長配列IL-22又はIL-22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関する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IL-22と比較してIL-22ポリペプチドのアミノ酸配列が変化するIL-22ポリペプチドをコードする1つ又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。場合によっては、変異はIL-22ポリペプチドの1つ又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による少なくとも1つのアミノ酸の置換である。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、IL-22ポリペプチドの配列をホモロジーの知られたタンパク質分子の配列と比較し、ホモロジー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る。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る。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、得られた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって決定し得る。

20

【0077】

IL-22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、IL-22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。

30

IL-22断片は、任意の多数の従来技術によって調製してもよい。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DNAを消化して所望の断片を単離することによるIL-22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(PCR)により、所望のポリペプチド断片をコードするDNA断片を単離し増幅することを含む。DNA断片の所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドは、PCRの5'及び3'プライマーで用いられる。好ましくは、IL-22ポリペプチド断片は、ここに開示した天然IL-22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。

40

【0078】

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。

【0079】

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換
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; ノロイシン	leu
Leu(L)	ノロイシン; 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; ノロイシン	leu

10

20

## 【0080】

IL-22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、例えばシート又はらせん構造、(b)標的部位の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持しながら、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：

30

- (1) 疎水性：ノロイシン, 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, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

## 【0081】

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)部位に導入され得る。

40

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、アラニンスキャンニング、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 Ser A, 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-22変異体DNAを作成することもできる。

50

## 【0082】

また、隣接配列に沿って1つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。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にくいので、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)]。最もありふれたアミノ酸であるために、アラニンも典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた位置及び露出した位置の両方に見出されることが多い [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換によって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。

## 【0083】

## C. IL-22の修飾

IL-22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-22ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、IL-22ポリペプチドの選択した側鎖又は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。例えば、抗-IL-22抗体精製方法に使用、あるいはその逆の用途を目的としてIL-22を水不溶性支持体マトリクス又は表面と架橋させるために、二官能性試薬による誘導体化が有用である。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。

## 【0084】

他の修飾は、グルタミル及びアスパラギン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-アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular 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。

本発明の範囲内に含まれるIL-22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-22に見られる1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-22に存在しない1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。

## 【0085】

IL-22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ってもよい。この変更は、例えば、1又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列IL-22(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-22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-22ポリペプチドをコードするDNAを予め選択し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じて変更されてもよい。

IL-22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1日に発行された国際公開87/05330、及びApplin及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0086】

IL-22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Edge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-22の共有結合的修飾の他の型は、IL-22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。

また、本発明のIL-22ポリペプチドを、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したIL-22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。

【0087】

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-22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-22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-22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-22ポリペプチドを容易に精製できるようにする。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, Protein 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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]を含む。

【0088】

それに換わる実施態様では、キメラ分子はIL-22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-22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。特に好ましい実施態様

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。

#### 【0089】

##### D・IL-22の調製

以下の説明は、主として、IL-22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した細胞を培養することによりIL-22を産生する方法に関する。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IL-22を調製することができると考えられる。例えば、IL-22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産生してもよい[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]。手動技術又は自動化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。IL-22の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的な方法を用いて結合させて完全長IL-22を産生してもよい。

#### 【0090】

##### 1. IL-22をコードするDNAの単離

IL-22をコードするDNAは、IL-22 mRNAを保有し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cDNAライブラリから得ることができる。従って、ヒトIL-22 DNA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cDNAライブラリから簡便に得ることができる。またIL-22-コード化遺伝子は、ゲノムライブラ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。

ライブラリは、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(IL-22に対する抗体又は少なくとも約20-80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。選択したプローブによるcDNA又はゲノムライブラ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。IL-22をコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR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)]。

#### 【0091】

下記の実施例には、cDNAライブラ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したオリゴヌクレオチド配列は、十分な長さで、疑陽性が最小化されるよう十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ラリ内のDNA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、<sup>32</sup>P標識されたATPのような放射線標識、ピオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度のストリンジェンシー及び高度のストリンジェンシー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。

このようなライブラリ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。

10

20

30

40

50

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、cDNAに逆転写されていないmRNA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張法を使用して選択した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。

#### 【0092】

##### 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-22産生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。

#### 【0093】

真核生物細胞トランスフェクション及び原核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl<sub>2</sub>、CaPO<sub>4</sub>、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・トゥ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日公開の国際公開89/05859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。酵母への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946(1977)及びHsiaoら, Proc. 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もできる。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。

#### 【0094】

ここに記載のベクターのDNAをクローニング又は発現するために適した宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適した原核生物は、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(Proteus)、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)、及び赤痢菌などの腸内細菌科、並びに桿菌、例えばバチルス・サブチリス(B. subtilis)及びバチルス・リチェニフォルミス(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・リチェニフォルミス41P)

10

20

30

40

50

、シュドモナス、例えば緑膿菌及びストレプトマイセスを含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生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-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>を有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>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日発行の米国特許第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ビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好ましい。

#### 【0095】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母のような真核微生物は、IL-22コード化ベクターのために適したクローニング又は発現宿主である。サッカロマイセス・セレビジエは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロマイセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981]；1985年5月2日発行の欧州特許第139, 383号)；クリュイペロミセス宿主 (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4, 943, 529号；Fleer<sup>r</sup>, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばクリュイペロミセス・ラクティス (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574；Louvencourt<sup>r</sup>, J. Bacteriol. 154(2): 737-742 [1983])、クリュイペロミセス・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、クリュイペロミセス・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、クリュイペロミセス・ウイケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、クリュイペロミセス・ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、クリュイペロミセス・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906；Vanden Berg<sup>r</sup>, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、クリュイペロミセス・テモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びクリュイペロミセス・マルキシアナス (*K. marxianus*)；ヤロウイア (*yarrowia*) (欧州特許第402, 226号)；ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (欧州特許第183, 070号；Sreekrishna<sup>r</sup>, J. Basic Microbiol, 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマ・レーシア (*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244, 234号)；アカパンカビ (Case<sup>r</sup>, Proc. 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日発行の欧州特許第394, 538号)；及び糸状真菌、例えば、ニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム (*Tolyposcladium*) (1991年1月10日発行の国際公開91/00357)；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<sup>r</sup>, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]*)；Tilburn<sup>r</sup>, Gene, 26: 205-221 [1983]；Yelton<sup>r</sup>, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及びアスペルギルス・ニガー (Kelly 及びH

ynes, 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、ハンセンラ (Hansenula)、カンジダ、クロエケラ (Kloeckera)、ピキア (Pichia)、サッカロマイセス、トルロプシス (Torulopsis)、及びロドトルラ (Rhodotorula) からなる属から選択し、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。

#### 【0096】

グリコシル化 IL-22 の発現に適した宿主細胞は、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、植物細胞だけでなくショウジョウバエ (Drosophila) S2 及びスポドベトラ (Spodoptera) Sf9 等の昆虫細胞が含まれる。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ン化された 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 / -DHFR (CHO, Urlaub 及び Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)) ヒト肺細胞 (W138, 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。適した宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

#### 【0097】

##### 3. 複製可能なベクターの選択及び使用

IL-22 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る。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、1つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、1つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1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。

#### 【0098】

IL-22 は直接的に組換え手法によって産生されるだけでなく、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産生される。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-22-コード化 DNA の一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1pp あるいは熱安定性エンテロトキシン II リーダーの群から選択し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 (サッカロマイセス (Saccharomyces) 及びクлуй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・アルピカンス (C. albicans) グルコアミラーゼリーダー (1990年4月4日発行の欧州特許第 362179号)、又は1990年11月15日に公開された国際公開 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。

【0099】

発現及びクローニングベクターは共に1つ又は複数の選択し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、2 $\mu$ 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、VSV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、選択可能なマーカ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、メトトレキサ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を供給するタンパク質をコードしており、例えばバシリのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子である。

【0100】

哺乳動物細胞に適した選択可能なマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのようにIL-22-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のできるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urlaubらにより Proc. 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, Gene, 10:157 (1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファンで成長する能力を欠く酵母の突然変異株のための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-22-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。原核生物宿主で使用するのに適したプロモーターは -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)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); 欧州特許第36,776号]、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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で使用するプロモーターもまたIL-22をコードするDNAと作用可能に結合したシャイン-ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

【0101】

酵母宿主で使用するのに適した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、酸ホスファターゼ、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。酵母での発現に好適に用いられるベクターとプロモータは欧州特許第73,657号に更に記載されている。

#### 【0102】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのIL-22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UK2,211,504)、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(SV40)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-22をコードするDNAの転写は、ベクター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、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -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SV40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-22コード化配列の5'又は3'位でベクター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。

#### 【0103】

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-22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-22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); Manteiraら, Nature, 281:40-46(1979); 欧州特許第117,060号; 及び欧州特許第117,058号に記載されている。

#### 【0104】

##### 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、従来よりのサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205(1980)]、ドットブロット法(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そ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。

#### 【0105】

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、抗体を、天然配列 IL - 22 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 - 22 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してもよい。

#### 【0106】

##### 5. ポリペプチドの精製

IL - 22 の形態は、培養培地又は宿主細胞可溶化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 - 22 の発現に用いられた細胞は、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。

10

#### 【0107】

IL - 22 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。次の方法は、適切な精製手法の典型である：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 を用いるゲル濾過；IgG のような夾雑物を除くプロテイン A セファロースカラム；及び IL - 22 のエピトープタグ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, Methods in Enzymology, 182 (1990)；Scopes, 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産生される特定の IL - 22 の性質に依存する。

20

#### 【0108】

##### E. IL - 22 の用途

IL - 22 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 - 22 核酸も、ここに記載される組換え技術による IL - 22 ポリペプチドの調製に有用である。

30

#### 【0109】

完全長天然配列 IL - 22 遺伝子又はその一部は、全長 IL - 22 cDNA の単離又はここに開示した天然 IL - 22 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の cDNA（例えば、他の種からの IL - 22 の天然発生変異体又は IL - 22 をコードするもの）の単離のための cDNA ライブラ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 IL - 22 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、周知の DNA 配列を用いて IL - 22 遺伝子のコード化領域を単離し、約 40 塩基の選抜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、<sup>32</sup>P 又は <sup>35</sup>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してもよい。本発明の IL - 22 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 cDNA、ゲノム DNA 又は mRNA のライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーがプローブにハイブ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。

40

50

## 【0110】

本出願で開示する任意のEST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。

IL-22核酸の他の有用な断片は、標的IL-22 mRNA(センス)又はIL-22 DNA(アンチセンス)配列に結合できる一本鎖核酸配列(RNA又はDNA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、IL-22 DNA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cDNA配列に基づいて、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例えば、Stein及びCohen(Cancer Res. 48: 2659: 1988)及びvan der Kroelら、(BioTechniques 6: 958, 1988)に記載されている。

10

## 【0111】

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、IL-22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、国際公開91/06629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ラーゼ耐性である。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。

20

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、国際公開90/10048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錯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。

## 【0112】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO<sub>4</sub>-媒介DNAトランスフェクション、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(国際公開90/13641参照)を含む。

30

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、国際公開91/04753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。

40

## 【0113】

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、国際公開90/10448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

50

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。

アンチセンス又はセンス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。

#### 【0114】

密接に関連したIL-22コード化配列の同定のための配列のプールを作成するために、このプローブもPCR技術に用いてもよい。

IL-22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のために、IL-22をコードするヌクレオチド配列も使用することができる。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連鎖分析、及びライブラリー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、ここに提供されるヌクレオチド配列はを染色体及び染色体の特定領域にマッピングし得る。

#### 【0115】

IL-22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、IL-22がレセプターである場合）、IL-22を結合相互作用に参与している他のタンパク質又は分子を同定するための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IL-22は関連するリガンドの単離にも使用できる。天然IL-22又はIL-22のレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために、スクリーニングアッセイを設計することができる。そ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従うアッセイを含み、そのアッセイを小分子候補薬剤の同定に特に適したものにす。予想される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。このアッセイは、この分野で良く知られ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。

#### 【0116】

また、IL-22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」動物のいずれかを産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とって有用である。トランスジェニック動物（例えばマウス又はラット）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-22をコードするcDNAは、IL-22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-22をコードするゲノムDNAをクローン化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産生する方法は、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、特定の細胞が組織特異的エンハンサーを伴うIL-22導入遺伝子の導入の標的であろう。胚段階で動物の生殖系列に導入されたIL-22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-22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

10

20

30

40

50

の可能性が示される。

【0117】

あるいは、動物の胚幹細胞に導入されたIL-22をコードする改変ゲノムDNAと、IL-22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-22をコードする欠陥又は変更遺伝子を有するIL-22「ノックアウト」動物を作成するために、IL-22の非ヒト相同体を使用できる。例えば、確立された技術に従ってIL-22をコードするゲノムDNAのクローニングするために、IL-22をコードするcDNAを使用できる。IL-22をコードするゲノムDNAの一部を欠失させたり、又は組み込みを監視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キングDNA(5'と3'末端の両方)を数千ベース含む[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]。ベクターは胚幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入され、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、Lira, Cell, 69:915(1992)参照]。選択した細胞が次に動物(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、期間において「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。ノックアウト動物を、IL-22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ることができる。

【0118】

IL-22ポリペプチドをコードする核酸も遺伝子治療に使用してもよい。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ボ合成を達成するために遺伝子が細胞へ導入される。「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ボ発現を阻止する治療薬として用いることができる。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、短いアンチセンスオリゴヌクレオチドをそれが阻害剤として作用する細胞に移入できることは既に示されている(Zamecnikら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146[1986])。オリゴヌクレオチドの取り込みを促進するために、例えば、そ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、オリゴヌクレオチドを修飾することができる。

【0119】

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、意図する宿主の細胞において、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは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、DEAE-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))。ある状況では、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等の標的細胞を標的とする薬剤、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等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

10

20

30

40

50

片、サイクルにおいてインターナリゼーション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, *Proc. 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。

#### 【0120】

ここに記載したIL-22ポリペプチドをタンパク質電気泳動目的の分子量マーカーとして用いてもよく、単離された核酸配列を、これらのマーカーを組み換え発現に用いてもよい。 10

ここに記載したIL-22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、新規な染色体マーカーの同定が必要である。本発明の各IL-22核酸分子は染色体マーカーとして使用できる。

また、本発明のIL-22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IL-22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。IL-22核酸分子には、PCR、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。 20

#### 【0121】

ここに記載したIL-22ポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明のIL-22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IL-22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、所望の純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版, Osol, A. 編., [1980])、保管ために調製される。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単糖類、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。 30

#### 【0122】

インピ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。 40

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。

#### 【0123】

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ルリングは、*Toxicokinetics and New Drug Deve* 50

lopment, 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。

【0124】

IL-22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。特定の用量及び送達方法の指針は文献に提供されている；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送達することを必要とし得るとが予想される。

10

【0125】

IL-22ポリペプチドの投与を必要とする任意の疾患又は疾病の治療に適した放出特性を持つ製剤でIL-22ポリペプチドの持続放出が望まれる場合、IL-22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MNRgp120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 Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems」 Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman 編, (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; 国際公開97/03692, 国際公開96/40072, 国際公開96/07399; 及び米国特許第5,654,010号。

20

【0126】

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。

30

本発明は、IL-22ポリペプチドを模倣する(アゴニスト)又はIL-22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、ここで同定した遺伝子にコードされているIL-22ポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又はそうでなければコードされたポリペプチドと他の細胞性タンパク質との相互作用を妨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、化学的ライブ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、それらアッセイを特に小分子候補薬の同定に適したものにす。

40

【0127】

このアッセイは、この分野で良く特徴付けられた、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、免疫アッセイ、及び細胞ベースのアッセイを含む

50

種々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-22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。

【0128】

結合アッセイでは、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、ここで同定された遺伝子によってコードされるIL-22ポリペプチド又は候補薬は、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイ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-22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-22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。

10

【0129】

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ている特定のIL-22ポリペプチドと結合しない場合、候補化合物の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ー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 [Proc. 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, Proc. 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などの多くの転写アクチベーターは、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。前出の文献に記載の酵母発現系（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。GAL4活性化プロモーターの制御下でのGAL1-1lacZリポーター遺伝子の発現は、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、-ガラクトシダーゼのための色素産生基質で検出される。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成キット(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関わ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。

20

30

40

【0130】

ここで同定されたIL-22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と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非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

50

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。

#### 【0131】

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-22ポリペプチドを細胞へ添加してもよく、IL-22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-22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-22ポリペプチドと膜結合IL-22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-22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-22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 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-22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-22ポリペプチドに対して反応性では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-22ポリペプチドで曝露する。このIL-22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。

10

20

#### 【0132】

レセプター同定の代替的方法として、標識IL-22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で分離し、X線フィルムへ曝露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分解し、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ための一組のデジェネレートオリゴヌクレオチドプローブの設計に用いられる。

30

アンタゴニストの他のアッセイでは、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-22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。

#### 【0133】

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-22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-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-22ポリペプチドの作用を競合的に阻害するIL-22ポリペプチドの変異形態であってもよい。

40

#### 【0134】

他の潜在的なIL-22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分子は、標的mRNAにハイブリッド形成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、

50

それらの方法はともに、ポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでの成熟IL-22ポリペプチドをコードするポリ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-22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ピボでmRNAにハイブリッド形成してmRNA分子のIL-22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* (CRC Press: ボカラトーン, フロリダ, 1988))。アンチセンスRNA又はDNAがインピボで発現してIL-22ポリペプチドの産生を阻害し得るよう、上記のオリゴヌクレオチドは細胞に輸送される。アンチセンスDNAが用いられる場合、翻訳開始部位から誘導されるオリゴデオキシヌクレオチド、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10から+10位置の間が好ましい。

10

#### 【0135】

潜在的アンタゴニストは、IL-22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-22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、及び合成非ペプチジル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ッド形成、次いで内ヌクレオチド結合分解性切断により作用する。潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、上掲のRossi, *Current Biology* 4: 469-471 (1994)及びPCT公報番号国際公開97/33551(1997年9月18日公開)を参照。

#### 【0136】

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あり、デオキシ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、一般的に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのかなり大きな伸長を必要とするフーグスティ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ている。さらなる詳細は、例えば、PCT公報番号、国際公開97/33551、上掲を参照。

30

これらの小分子は、上記で検討した任意のスクリーニングアッセイの1つ又は複数のものにより及び/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。

ここで開示されている分子の診断的及び治療的利用も、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。

40

#### 【0137】

F. 抗-IL-22抗体

本発明は、さらに抗-IL-22抗体を提供する。典型的な抗体は、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む。

#### 【0138】

1. ポリクローナル抗体

抗-IL-22抗体はポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物において、ポリクローナル抗体は、例えば免疫剤、及び所望するのであればアジュバントを、1つ又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、

50

哺乳動物に注射する。免疫剤は、IL-22ポリペプチド又はその融合タンパク質を含み得る。免疫剤を、免疫性が与えられた哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質にコンジュゲートさせることは有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターを含む。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート)が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択され得る。

【0139】

## 2. モノクローナル抗体

あるいは、抗-IL-22抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature, 256:495 (1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫剤により免疫化することで、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するか或いは生成可能なリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

【0140】

免疫剤は、典型的には対象とするIL-22ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般的に、ヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBLs」)が使用され、又は非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養してもよい。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノプチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、これら物質がHGPRT欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0141】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択した抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支え、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのソーック研究所セルディストリビューションセンターやヴァージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている[Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、IL-22に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキヤッチャード解析法によって測定することができる。

【0142】

10

20

30

40

50

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で成長させてもよい [ Goding, 上掲 ]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地及び RPMI - 1640 培地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物の腹水のように、インビボで成長させてもよい。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製してもよい。

#### 【 0 1 4 3 】

モノクローナル抗体は、組換え DNA 法、例えば米国特許第 4, 816, 567 号に記載された方法によっても作成し得る。本発明のモノクローナル抗体をコードする DNA は、常套的な方法を用いて (例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのような DNA の好ましい供給源となる。ひとたび単離されると、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をするために、後に宿主細胞、例えばサル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は別な方法では免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髓腫細胞にトランスフェクションされる発現ベクター内に、この DNA を配してもよい。また、この DNA は、例えば、相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより [ 米国特許第 4, 816, 567 号; Morrisonら, 上掲 ]、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のコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾してもよい。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインを置換し、あるいは本発明の抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインを置換し、キメラ性二価抗体を生成することができる。

#### 【 0 1 4 4 】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られてる。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、一般的に、重鎖の架橋を防止するように Fc 領域の任意の点で切断されている。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか、又は欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製には、インビトロ法も適している。抗体の断片、特に Fab 断片の生成のための抗体の消化は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

#### 【 0 1 4 5 】

### 3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗 - IL - 22 抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト (例えばマウス) 抗体のヒト化形態とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片 (例えば Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列) 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。一般的に、ヒト化抗体は、全て又は実質的には全ての CDR 領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て又は実質的には全ての 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は全てを含む。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も含む [ Jonesら, Nature, 321: 522 - 525 (1986); Riechmann

10

20

30

40

50

ら, Nature, 332:323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

【0146】

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、非ヒトである源由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、大体は「移入」可変ドメインに由来する「移入」残基としばしば称される。ヒト化は、基本的には齧歯動物の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って、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)]の方法に従って実施される。よって、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)あり、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に由来する対応する配列で置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、幾つかのCDR残基とおそらくは幾つかのFR残基が齧歯類抗体にある類似部位の残基によって置換されたヒト抗体である。

10

20

30

【0147】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリ [Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。Coleら及びBoernerらの方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる [Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985) 及び Boernerら, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されているマウスにヒト免疫グロブリン座位を導入することによって産生することができる。厳密に調べると、ヒト抗体の産生が観察され、それは遺伝子再構成、アセンブリ、及び抗体レパートリーを含むあらゆる点においてヒトに見られるものに極めて類似している。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号、及び次の科学文献に記載されている: Marksら, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonbergら, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwildら, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)。

30

40

【0148】

また、抗体は、上記に記載のような既知の選択及び/又は突然変異誘発法を利用して親和的に成熟し得る。好ましい親和性成熟抗体は、5倍、より好ましくは10倍、さらにより好ましくは20又は30倍も成熟抗体の調製の元である出発抗体(一般的には、マウス、ヒト化又はヒト)より高い親和性を有する。

【0149】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合では、結合特異性の一方はIL-22に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え産生は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/

50

軽鎖対の同時発現に基づく [M i l s t e i n 及び C u e l l o , N a t u r e , 3 0 5 : 5 3 7 - 5 3 9 ( 1 9 8 3 ) ]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の無作為な組み合わせのため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する10種の異なる抗体分子の入った潜在的混合物を生成する。正しい分子の精製は、通常はアフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順が1993年5月13日公開の国際公開93/08829、及びTraunackerら, E M B O J . , 1 0 : 3 6 5 5 - 3 6 5 9 ( 1 9 9 1 ) に開示されている。

#### 【0150】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合することができる。この融合は、好ましくは、少なくともヒンジ部、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとでおこる。少なくとも一つの融合に軽鎖結合に必要な部位を含む第一重鎖定常領域(CH<sub>1</sub>)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合、そして所望するならば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクションする。二重特異性抗体の作成に関する更なる詳細については、例えばSureshら, M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 2 1 : 2 1 0 ( 1 9 8 6 ) を参照されたい。

#### 【0151】

国際公開96/27011に記載の他の方法によると、一对の抗体分子間の境界面を操作して、組換え細胞培養から回収する異種二量体の割合を最大にすることができる。好ましい境界面は、抗体定常ドメインのCH<sub>3</sub>領域の少なくとも一部を含む。この方法では、1番目の抗体分子の境界面の1つ又は複数の小さな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)で置き換えられる。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って、大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的な「キャピティ」を、二番目の抗体分子の境界面上に作り出す。これは、ホモダイマーのような不要な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を提供する。

#### 【0152】

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術は文献に記載されている。例えば、化学結合を利用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, S c i e n c e , 2 2 9 : 8 1 ( 1 9 8 5 ) には無傷の抗体をタンパク分解的に切断してF(ab')<sub>2</sub>断片を産生する手順が記載されている。近接する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ために、これらの断片を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する。次いで、産生されたFab'断片をチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換する。次いで、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'-TNB誘導体の一つをFab'-チオールに再転換し、他のFab'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成させる。この生成し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。

#### 【0153】

Fab'断片を大腸菌から直接回収し、これを化学的に結合して二重特異性抗体を形成してもよい。Shalabyら, J . E x p . M e d . , 1 7 5 : 2 1 7 - 2 2 5 ( 1 9 9 2 ) には、完全にヒト化した二重特異性抗体F(ab')<sub>2</sub>分子の製造が記載されている。各Fab'断片は大腸菌から別々に分泌され、インビトロで定方向化学共役を施され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、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の細胞溶解活性を誘因すると同時に、正常なヒトT細胞及びErB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能である。

#### 【0154】

組換え細胞培養から直接に二重特異性抗体断片を作成して分離する様々な方法も記述されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Ko

10

20

30

40

50

stelnyら, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって二つの異なる抗体のFab'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、次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、抗体ホモダイマーの産生にも使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に記載されている「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作成するもう一つの仕組みを提供した。断片は、短すぎて同一鎖上の2つのドメイン間の対形成をできない短いリンカーによって結合している軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む。従って、一つの断片のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは、他の断片の相補的V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインとの対形成せざるおえず、そのために2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fv(sFv)ダイマーを利用して二重特異性抗体断片を製造する他の方策も報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。二価より多い抗体が考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttlら J. Immunol. 147:60 (1991)。

10

#### 【0155】

典型的な二重特異性抗体は、ここで示されたIL-22ポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合し得る。あるいは、特定のIL-22ポリペプチド発現細胞に細胞防御機構を集中させるように、抗-IL-22ポリペプチドのアームは、T細胞レセプター分子(例えばCD2、CD3、CD28、又はB7)等の白血球上のトリガー分子又はFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプターに結合するアームと結合し得る。特定のIL-22ポリペプチドを発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるために、二重特異性抗体も使用してもよい。これらの抗体は、IL-22結合アーム及び細胞毒性薬又はEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETA等の放射性キレート化剤と結合するアームを有する。対象である他の二重特異性抗体はIL-22ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

20

#### 【0156】

##### 5. 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本発明の範囲内にある。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]、そしてHIV感染の治療のために[国際公開91/00360;国際公開92/200373;欧州特許第03089号]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、インピ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。この目的に適した試薬の例には、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。

30

#### 【0157】

##### 6. エフェクター機能の加工

例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるために、本発明の抗体をエフェクター機能について改変することは望ましくであろう。例えば、システイン残基をFc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の能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有する可能性がある。Caronら, J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992)及びShopes, J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照せよ。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolfら, Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されてい

40

50

る異種二官能性架橋を用いても調製してもよい。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工することができ、それにより向上した補体溶解及びADCC能力を有し得る。Stevensonら, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989) 参照。

#### 【0158】

##### 7. 免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、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）などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）とコンジュゲートしている抗体を含む免疫コンジュゲートに関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は、上に記載されている。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（modecicin）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（*Phytolacca 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（*sapaonaria 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（*tricothecene*）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、<sup>212</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>131</sup>In、<sup>90</sup>Y及び<sup>186</sup>Reが含まれる。抗体及び細胞毒性薬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-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、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HCL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ら, *Science* 238: 1098 (1987)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コンジュゲーションのためのキレート剤の典型例である。国際公開94/11026を参照せよ。

#### 【0159】

他の実施態様では、抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、次いで清澄化剤を用いて未結合コンジュゲートを循環から除去し、次に細胞毒性薬（例えば、放射性ヌクレオチド等）にコンジュゲートされた「リガンド」（アビジン等）を投与する腫瘍の予備標的化で用いるために、抗体を「レセプター」（ストレプトアビジン等）にコンジュゲートしてもよい。

#### 【0160】

##### 8. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwangら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載のような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている

10

20

30

40

50

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-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物による逆相蒸発法によって生成できる。所望の径を有するリポソームを生成するために、リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出される。本発明の抗体のFab'断片は、Martinら、J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載のように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームとコンジュゲートさせてよい。化学治療薬(ドキシソルピシン等)は、場合によってはリポソーム内に含有される。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)を参照せよ。

10

## 【0161】

## 9. 抗体の製薬組成物

上記に開示したスクリーニングアッセイによって同定された他の分子だけでなく、ここで同定されるIL-22ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、種々の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。

IL-22ポリペプチドが細胞内にあり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、インターナリゼーションされる抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも、抗体、又は抗体断片を細胞に導入するために使用できる。抗体断片が用いられる場合、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したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的及び/又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7889-7893 (1993)参照。

20

## 【0162】

ここでの製剤は、治療すべき特定の徴候に必要な場合に複数の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含んでもよい。あるいは、又はその上に、組成物はその機能を高める薬剤、例えば細胞毒性薬、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、意図する目的に有効な量の組み合わせによって適切に存在する。

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、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルジョン中に包括されてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science, 上掲に開示されている。インビボ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。

30

## 【0163】

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)、ポリルラクチド(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、LUIL-22 DEPOSIT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リユープロリドで構成される注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-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の水分へ曝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

40

50

こり得る免疫原性の変化が生じる。合理的な方法は、関与する機構に基づいた安定化のために、合理的な戦略を考案することが可能である。例えば、凝集機構がチオ - ジスルフィド交換を介する分子間 S - S 結合形成であると見出された場合、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得る。

#### 【0164】

##### G. 抗 - I L - 2 2 抗体の用途

本発明の抗 - I L - 2 2 抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗 - I L - 2 2 抗体は、I L - 2 2 の診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現（及びある場合には、特異的発現）の検出に用いてもよい。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ [ Z o l a , Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147 - 158 ] 等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用されてもよい。診断アッセイで用いられる抗体を、検出可能な部位で標識できる。検出可能な部位は、直接又は間接的に、検出可能なシグナルを発生することができなければならない。例えば、検出可能な部位は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S 又は <sup>125</sup>I 等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、又はアルカリホスファターゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってもよい。抗体に検出可能な部位をコンジュゲートさせるためにこの分野で知られた任意の方法を用いてもよく、その方法には Hunter ら, Nature 144: 945 (1962); David ら, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain ら, J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); 及び Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407 (1982) に記載の方法が含まれる。

#### 【0165】

また、抗 - I L - 2 2 抗体は、組換え細胞培養又は天然供給源から I L - 2 2 のアフィニティー精製にとっても有用である。この工程では、当該分野でよく知られている方法を使用して、セファデックス樹脂や濾紙のような適切な支持体に I L - 2 2 に対する抗体を固定化する。次に、固定化抗体を精製すべき I L - 2 2 を含む試料と接触させ、その後で、試料中の固定化抗体と結合した I L - 2 2 を除く全ての物質をしっかりと除去するのに適した溶媒で支持体を洗浄する。最後に、抗体から I L - 2 2 を脱離させるのに適した他の溶媒でこの支持体を洗浄する。I L - 2 2 との結合にも用途が見出され、従って P A P 1 発現を阻害する抗 - I L - 2 2 抗体は、膵臓疾患の重症度を軽減することができる。

#### 【0166】

以下の実施例は例示する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の全体を、出典明示によりここに取り込む。

#### 【0167】

##### (実施例)

実施例で言及されている全ての市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。A T C C 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・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニアである。

#### 【0168】

##### 実施例 1: I L - 2 2 のクローニング

公的 (例えば、GenBank) 及び / 又は私有の (L I F E S E Q (登録商標), インサイト・ファーマスーティカルス, インコーポレーテッド, パロアルト, カリフォルニア) データベースからクラスターし、アセンブルした E S T 断片だけでなく、E S T s にもジェネンテック・インコーポレーテッド (サウス サンフランシスコ, カリフォルニ

10

20

30

40

50

ア) が独自に開発した配列発見アルゴリズムを適用することで、インターロイキン - 22 (DNA 125185 - 2806) を同定した。このシグナル配列アルゴリズムは、検討中の配列又は配列断片の 5' 末端にある第 1、場合によっては第 2 のメチオニンコドン (ATG) の周囲の DNA ヌクレオチドの文字に基づいて分泌シグナル開始点を計算する。第 1 の ATG に続くヌクレオチドには、停止コドンを持たない少なくとも 35 のはっきりとしたアミノ酸がコードされていなければならない。第 1 の ATG が必須のアミノ酸を有する場合、第 2 のものは検討しない。何れも要件を満たさない場合、候補配列に刻み線を付けない。EST 配列が真正のシグナル配列を含むか否かを決定するために、分泌シグナルに関連することが知られている 7 つのセンサー (評価パラメータ) の一組を用いて、ATG コドンの周囲の DNA 及び対応するアミノ酸配列に刻み線を付ける。

10

## 【0169】

上記のシグナル配列アルゴリズムの使用によって、Incyte データベースからのここで 5086173H1 と命名された EST クラスター配列の同定が可能となった。この EST クラスター配列を、次に、公的 EST データベース (例えば GenBank) 及び私有の EST DNA データベース LIFESEQ (登録商標)、インサイト・ファーマシューティカルズ、インコーポレーテッド、パロアルト、カリフォルニア) を含む種々の発現配列タグ (EST) データベースと比較し、存在するホモロジーを同定した。このホモロジー検索は、コンピュータープログラム BLAST 又は BLAST2 (Altschulら、Methods in Enzymology 266: 460 - 480 (1996)) を用いておこなった。既知のタンパク質をコードしない 70 (又はある場合は 90) 又はそれより大きい BLAST スコアをもたらしたこれらの比較を、プログラム「pharp」(Phil Green, ワシントン大学、シアトル、ワシントン) でコンセンサス DNA ヘクスター化及びアセンブルした。それから得られたコンセンサス配列は、DNA 110880 とここで命名されている。

20

## 【0170】

DNA 110880 配列とインサイト データベースのクローン第 5088384 号に含まれる EST 配列との間で観察される配列ホモロジーを考慮して、クローン第 5088384 号を購入し、cDNA 挿入部分を得て配列を決定した。ここで、その cDNA 挿入部分が完全長タンパク質をコードすることが見出された。この cDNA 挿入部分の配列は図 1 に示され、ここで IL-22 (DNA 1251 - 2806) と命名されている。

30

## 【0171】

クローン DNA 125185 - 2806 は、はっきりとした翻訳開始部位をヌクレオチド位置 58 - 60 に有し、そしてヌクレオチド位置 595 - 597 の終止コドンで終止する単一のオープンリーディングフレームを含む (図 1, 配列番号: 1)。予想されるポリペプチド前駆体は 179 アミノ酸長である (図 2, 配列番号: 2)。図 2 に示す完全長 IL-22 タンパク質は、約 20,011 ダルトンの推定分子量と約 8.10 の pI を有する。図 2 (配列番号: 2) に示す完全長 IL-22 配列の分析によって、図 2 に示す種々の重要なポリペプチドドメインの存在が明らかにされ、これら重要なポリペプチドドメインの位置は上記に示すようにおおよそのものである。IL-22 (DNA 1251 - 2806) は、1999 年 12 月 7 日に ATCC へ寄託され、ATCC 寄託番号 PTA-1031 が割り当てられている。

40

## 【0172】

実施例 2: レセプター/リガンド相互作用の同定

本アッセイでは、レセプター/リガンド相互作用を同定する目的で、潜在的なレセプター又はリガンド分子の一団と結合する能力に関して、種々の IL-22 ポリペプチドを試験した。既知のレセプターに対するリガンド、既知のリガンドに対するレセプター、或いは新規のレセプター/リガンド対の同定は、例えばレセプター又はリガンドを発現することが知られている細胞へ生物活性分子 (リガンド又はレセプター) を標的化すること、組成物がリガンド又はレセプターを発現すると思われる細胞を含んでなるであろう場合に、リガンド又はレセプターを含むと思われる組成物中からリガンド又はレセプターの存在を検

50

出するためにリガンド又はレセプターを試薬として利用すること、レセプター又はリガンドを発現或いはそれらへ応答することが知られている細胞の成長、又はその他の生物学的又は免疫活性を調節すること、細胞の免疫応答、或いはレセプター又はリガンドを発現する細胞に対する免疫応答を調節すること、レセプター又はリガンドを発現している細胞の成長又は生物学的又は免疫活性を調節するレセプター又はリガンドに対する アゴニスト、アンタゴニスト及び/又は抗体の調製を可能にすること、並びに当業者にとって直ぐに明らかである種々の他の徴候を含む種々の徴候にとって有用である。

#### 【0173】

このアッセイは、次のようにして行われた。レセプターに対するリガンドであると思われる本発明のIL-22ポリペプチドは、ヒトIgGのFcドメイン(イムノアドヘシン)を含有する融合タンパク質として発現する。レセプター-リガンド結合は、候補IL-22ポリペプチドレセプターを発現する細胞(例えばCos細胞)とイムノアドヘシンポリペプチドの相互作用、Fc融合ドメインに対する蛍光試薬による結合イムノアドヘシンの視覚化、そして顕微鏡による検査を可能にすることによって検出される。候補レセプターを発現する細胞は、同時に、レセプター分子として機能し得るIL-22ポリペプチドをコードするcDNA発現ベクターライブラリの明かなサブセットの一過性トランスフェクションによって産生される。次いで、起こり得るレセプター結合に関して試験したIL-22ポリペプチドイムノアドヘシンの存在下で、細胞を1時間に渡ってインキュベートする。そして、この細胞を洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定化する。次いで、この細胞を、IL-22ポリペプチドイムノアドヘシンのFc部分に対する蛍光コンジュゲート抗体(FITCコンジュゲート抗体(ヤギ抗-ヒト-Fc抗体)とインキュベートする。そして、この細胞を再び洗浄し、顕微鏡で検査した。ポジティブな相互作用は、特定のIL-22ポリペプチドレセプター又はレセプターのプールをコードするcDNAでトランスフェクションした細胞では蛍光標識化が認められること、及び同じように蛍光標識された他のcDNA又はcDNAのプールでトランスフェクションした同じように調製された細胞では同じような蛍光標識化が認められないことによって判定される。IL-22ポリペプチドイムノアドヘシンの相互作用に関して、cDNA発現ベクターの確定されたプールがポジティブと判定されたならば、IL-22ポリペプチドイムノアドヘシンと相互作用することが可能なレセプターをコードする特定のcDNAを確定するために、プールを構成する個々のcDNA種が別々に試験される(プールは「分解」される)。

#### 【0174】

本アッセイのその他の実施態様では、エピトープタグした潜在的なIL-22ポリペプチド(例えば、8ヒスチジン「His」タグ)は、ヒトIgGのFcドメイン(イムノアドヘシン)との融合体として発現した潜在的なレセプターIL-22ポリペプチド分子の一団と相互作用することが可能である。1時間に渡るエピトープタグIL-22ポリペプチドとの同時インキュベーションに続いて、候補レセプターをそれぞれプロテインAビーズによって免疫沈降させ、そのビーズを洗浄した。潜在的なリガンド相互作用は、エピトープタグに対する抗体による免疫沈降複合体のウェスタンブロット分析によって確かめられる。候補化合物によるウェスタンブロット分析においてエピトープタグタンパク質の期待される分子量のバンドが観察されるが、潜在的レセプターの一団の他のメンバーによっては起こらないことが観察されるならば、相互作用は起こるものと判断される。

これらのアッセイを利用し、以下のレセプター/リガンド相互作用が同定されている：

1. IL-22がIL-10Rと結合。図10(配列番号：3)

2. IL-22がIL-22Rと結合。図11(配列番号：4)

(また、[Xieら., J. Biol. Chem. (2000) 275, 31335-31339]を参照せよ)

#### 【0175】

実施例3： 複数のヒト組織でのIL-22レセプターの発現

複数の組織のノーザンブロットを、Clontech(パロアルト, カリフォルニア)から得た。<sup>3</sup> <sup>2</sup> P-ATP及びT4ポリヌクレアーゼキナーゼを使用した50-mer

10

20

30

40

50

IL-22レセプター特異的オリゴヌクレオチドの末端を標識することによって、これらのプロットをプローブとハイブリダイゼーションさせた。次いで、42℃で2XSSC/0.2%SDSにより3X、そして0.2XSSC/0.1%SDSにより1X、プロットを洗浄した。次いで、このプロットを16時間にわたって増感紙でX-OMATフィルムに曝した。その結果は図3に示されている。その図は、IL-22レセプターが膵臓で高発現し、小腸、肝臓、腎臓及び結腸では低いレベルのIL-22レセプターが観察されたことを示す。

#### 【0176】

実施例4： Taqman (商標名) 分析

組織を溶解バッファーでホモジナイズし、その溶解物を塩化セシウム(5.7M CsCl / 50mM EDTA)の上に層状にし、そして16時間にわたって35,000Xgで遠心分離することによって全RNAを得た。次いで、この細胞ペレットをRNAフリーの水に懸濁させた。次に、50ナノグラムのRNAをTaqman (商標名) 分析に用いた。発現の評価は、ハウスキーピング遺伝子のGAPDHと関連して設定した。

#### 【0177】

TaqMan (商標名) 反応とは、TaqDNAポリメラーゼ酵素の5'ヌクレアーゼ活性を利用して増幅をリアルタイムでモニターする蛍光PCR-ベース技術である。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR反応に特有なアンプリコンを生成する。三番目のオリゴヌクレオチド、又はプローブを設計して、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチドを検出する。このプローブは、TaqDNAポリメラーゼ酵素によって伸長可能ではなく、レポーター蛍光色素及びクエンチャー蛍光色素で標識される。この2つの色素がプローブ上においてそれらが近接して位置する場合には、このレポーター色素からの何れのレーザー誘導発光もクエンチャー色素で消光する。増幅反応の間、TaqDNAポリメラーゼ酵素は、テンプレートに依存した様式でプローブを切断する。この結果で生じたプローブ断片は、溶液中で解離し、遊離したレポーター色素からのシグナルは、二番目のフルオロフォアの消光効果の作用を受けない。各新規分子が合成されるとレポーター色素の1分子が遊離し、非消光レポーター色素の検出によってデータの定量的解釈の基礎が示される。

#### 【0178】

TaqMan (商品名) の結果は、デルタ( ) Ct単位によって報告する。TaqMan (商品名) 分析データは、最初はCt、又は閾値サイクルで表された。これは、レポーター信号が蛍光のバックグラウンドレベルを超えて蓄積するサイクルとして定義される。

Ct値は、癌の結果を正常なヒトの結果と比較する場合に、核酸試料中の特定の標的配列の開始コピーの相対数の定量的測度として用いられる。1単位は、1PCRサイクル、又は標準に対しておよそ2倍の相対増幅に一致し、2単位は4倍相対増加に一致し、3単位は8倍相対増加に一致する等々である。定量化はプライマー及びIL-22レセプター(IL-22R)コード化遺伝子から誘導したTaqMan (商品名) 蛍光プローブを用いて得た。最も独特な核酸配列を含むと思われる、スプライシングされたイントロンを最も有しないと思われるIL-22Rの領域は、プライマー及びプローブ誘導、例えば3-非翻訳領域にとって好ましい。IL-22遺伝子の増幅分析に使用されるプライマー及びプローブ(正、逆及びプローブ)の配列は次の通り：

165608.tm.f1 (正方向プライマー)

5' TGCAACCTGACGGTGGAGA 3' (配列番号：5)

165608.tm.r1 (逆方向プライマー)

5' AGAGAGCTGAACCTGTCAATCTT 3' (配列番号：6)

165608.tm.p1 (プローブ)

5' CAGTGC GGAGGCCGGTCA 3' (配列番号：7)

#### 【0179】

TaqMan (商品名) 手法は、ABI Prism 7700TM のようなリアルタイム定量PCR装置でおこなわれる。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷

結合素子 (CCD) カメラ、及びコンピュータからなる。このシステムは、サーモサイクラーの 96 ウェルフォーマットで試料を増幅する。増幅の間、レーザー励起した蛍光シグナルが、96 ウェル全ての光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで収集され、CCD で検出される。このシステムは、装置を作動し、データを分析するソフトウェアを装備している。

#### 【0180】

次いで、蛍光定量的に測定された mRNA の濃度を用いて、各試料を ddH<sub>2</sub>O で 10 ng / μl に希釈した。これは、幾つかのアッセイをおこなうのに十分な材料で、単一 TaqMan (商品名) プレートアッセイのための全てのテンプレート試料上で同時におこなわれた。この試料は、TaqMan (商品名) プライマー、及び正常ヒト mRNA、逆転写酵素を添加せず、テンプレートコントロールが無い単一プレート上の B-アクトリン及び GAPDH の双方のプローブで 3 通りで試験された。使用された逆転写酵素は、SuperScript II (ライフ テクノロジー・インコーポレーテッド, グランドアイランド, ニューヨーク) であった。Taq ポリメラーゼ、バッファー、及び dNTP については、パーキンエルマー (パーキンエルマー, Applied Biosystems Division, フォスター シティ, カリフォルニア) からの供給を受けた。サーモサイクラーの条件は次の通りである。

- |              |     |      |     |
|--------------|-----|------|-----|
| a. 1 サイクルの:  | 逆転写 | 48℃, | 30分 |
| b. 1 サイクルの:  | 変性  | 95℃, | 10分 |
| c. 40 サイクルの: | 変性  | 95℃, | 30秒 |
|              | 伸長  | 60℃, | 90秒 |

結果:

この結果は、図 4 に示す。

インターロイキン - 22 レセプターは膵臓で最も高く発現し、胎児肝臓、成人肝臓、腎臓、腸及び結腸で発現が検出された。

#### 【0181】

実施例 5: 膵臓腺房細胞での STAT 活性化

266-6 はマウス膵臓腺房細胞から誘導した細胞株で、ATCC (ATCC 寄託番号 CRL-2151) から得た。これらの細胞を 10% FBS ペニシリン/ストレプトマイシン及び 2 mM L-グルタミン (ライフ テクノロジーズ ゲーサーズバーク, メリーランド) を補充した DMEM で培養し、5% CO<sub>2</sub> 加湿チャンバーで維持した。266-6 細胞を、37 で 10 分間、パキユロウイルス上清 (10% vol/vol) を含む his-タグマウス IL-22 のコントロールで刺激した。STAT スーパーシフト実験の使用される抗体は、サンタ クルーズ バイオテクノロジー (サンタ クルーズ, カリフォルニア) から購入した。マウス IL-22 によって誘導された STAT 結合タンパク質は、図 5 に示すように、抗体で STAT3 ヘスーパーシフトすることができる。これは、Janus Kinase (JAK-STAT) 経路の活性化によって、そして特に STAT3 を介して、膵臓腺房細胞細胞株 266-6 がマウス IL-22 へ応答することを示している。膵臓ベータ細胞株 (NIT-1) は、JAK-STAT 経路を利用しない (データは示さず)。

#### 【0182】

実施例 6: IL-22 は、膵炎関連タンパク質 (PAP1) の発現を増す。

膵炎関連タンパク質 (PAP1) は分泌タンパク質であり、急性膵炎で過剰発現し、正常膵臓では発現レベルが殆ど完全でない [Iovanna ら., J Biol. Chem. (1991), 266, 24664-24669]。PAP1 の正確な機能は知られていないが、それは c-型レクチンの炭水化物認識ドメインと構造的に関連し、REG ファミリーの分子のメンバーである。報告は、REG ファミリーのメンバーの栄養活性を示唆している [Nishimune ら., (2000) Nat Cell Biol 2 (12), 906-14]。他のサイトカインによる PAP1 の誘導、例えば IL-1 又は IL-6 のいずれか単独又は組み合わせでは、PAP1 をアップレギュレーションで

10

20

30

40

50

きない [Dusettilら, (1995) J. Biol Chem 270, 22417-22421]。PAP1が増加した血清レベルは、小腸疾患であるセリアック病 [Carrocciら, (1997) Digestion 58, 98-103] の患者、そして嚢胞性線維症 [Iovannaら, (1994) C. R. Acad. Sci 317, 561-564] の患者に見られる。

#### 【0183】

266-6細胞を、6時間にわたって精製his-タグマウスIL-22で処理した。溶解バッファーで細胞をホモジナイズし、この塩化セシウム(5.7M CsCl/50mM EDTA)を含む細胞可溶化物を層状にすることによって、全RNAを抽出した。この細胞可溶化物を16時間にわたって35,000Xgで遠心分離した。細胞ペレットを、リボヌクレアーゼのない水に再懸濁した。RNAの20マイクログラムをホルムアルデヒド変性ゲルを用いて溶解し、ニトロセルロース膜上へ移した。ハイブリダイゼーションは、PAP1-特異的<sup>32</sup>P-ATP標識オリゴヌクレオチドプローブを使用しておこなった。42で、2XSSC/0.2%SDSによって3X、そして0.2XSSC/0.1%SDSによって1X、プロットを洗浄した。プロットを、16時間にわたって増感紙でX-OMATフィルムに曝した。このプロットを、次いで剥ぎ取り、そして<sup>32</sup>P-ATP標識GAPDH特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いて再プローブした。この結果を図6Aに示す。266-6細胞のマウスIL-22とのインキュベーションは、PAP1遺伝子発現の劇的な誘導を引き起こした。原発性膵臓腺房細胞がマウスIL-22に対しても応答することができるかどうかを確かめるために、コラゲナーゼ消化によって原発性腺房細胞をマウス膵臓から単離し、精製マウスIL-22とともに又はそれなしで、6時間にわたってインキュベーションした。RNAを上記のようにして調製し、PAP1発現を調べた。266-6細胞株のように、マウスIL-22は、単離した原発性膵臓腺房細胞におけるPAP1発現の実質的なアップレギュレーションを誘導した。

#### 【0184】

実施例7: IL-22は、インビボでのPAP1遺伝子発現を誘導する。マウスIL-22のインビボでの効果を調べるために、マウスの3つのグループへ25マイクログラムのマウスIL-22又はPBSを腹腔内に注射した。マウスを注射後の2, 6又は24時間目に収集し、それらの膵臓を取り出して即冷凍した。この組織のRNAを調製し、PAP1遺伝子特異的プローブを用いて実施例5に記載のノーザンブロッティング分析をおこなった。図7に示すように、PAP1は、2時間のマウスIL-22注射の間にアップレギュレーションされ、約6時間で発現ピークに達し、そして24時間でもまだ誘導された。

#### 【0185】

実施例8: IL-22膵臓応答  
観察された膵臓の応答が、組み換えタンパク質の非特異的毒性よりもIL-22レセプター媒介シグナル伝達に起因していることを確かめるために、mIL-22をIL-10R欠損マウスへ注射した。これらのマウスは、IL-22シグナル伝達に関わるIL-10R/IL-22Rの1つの機能鎖を欠いている。IL-10R欠損マウスは、以前、IL-10に対する応答性を欠くことが報告されていた。IL-10R欠損マウスから単離した脾臓の単球は、リポ多糖(LPS)の誘導によるIL-6分泌(図8)又はTNF-アルファ(示されず)のIL-10媒介阻害を示さない。以前に知られていたように、IL-22は、LPSへの単球の応答に作用するとは思われない(Xieら, (2000) J. Biol. Chem., 275, 31335-31339)。IL-22は、LPSへの単球の応答に作用するとは思われない。

#### 【0186】

実施例9: IL-10R欠損マウスでのIL-22の応答  
IL-10Rを欠いている又は「ロックアウト」しているマウスは、IL-22シグナル伝達にとって必要なIL-22R/IL-10Rレセプター複合体の1つの機能鎖を欠き、そしてIL-10R欠損マウスは、以前、IL-10応答性を欠くものと報告さ

れた。IL-10R 欠損マウス及び野生型マウスを、マウスIL-22で又はそれ無しで腹腔内に注射し、注射の16時間後に収集し、そして以前に記載のようにPAP1プローブを用いて脾臓RNAについてノーザンブロット分析をおこなった。IL-10R マウスが細胞内シグナルを伝達するのに必要な1つの鎖を欠くように、PAP1の誘導がないことが図9にはっきりと示されている。対照的に、野生型マウスは、同じく図9に示されているように、PAP1発現の強力な誘導を示した。

#### 【0187】

実施例10： ハイブリダイゼーションプローブとしてのIL-22の用途

以下の方法は、IL-22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用途を示す。

ここに開示されている完全長又は成熟IL-22のコード化配列を含むDNAは、ヒト組織cDNAライブラリ又はヒト組織ゲノムライブラリでの同種DNA (IL-22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ラリDNAを含むフィルターの洗浄は、次の高いストリンジентな条件によって実施する。放射標識IL-22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、50%ホルムアミド、5xSSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2xデンハード液、及び10%デキストラン硫酸の溶液中で42℃、20時間おこなう。フィルターの洗浄は、0.1xSSC及び0.1%SDS水溶液中で42℃で実施する。

次いで、完全長天然配列IL-22をコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNA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。

#### 【0188】

実施例11： 大腸菌におけるIL-22の発現

この実施例は、大腸菌における組み換え発現によるIL-22の非グリコシル化型の調製を例証する。

IL-22をコードするDNA配列を、選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅する。このプライマーは、選択し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してもよい。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関する遺伝子を含むpBR322 (大腸菌由来; Bolivarら, Gene, 2:95 (1997)を参照のこと)がある。ベクターを制限酵素によって消化し、脱リン酸化する。次いで、PCRで増幅した配列をベクターへライゲーションする。ベクターには、好ましくは抗生物質耐性遺伝子、trpプロモーター、ポリhisリーダー(最初の6つのSTIIコドン、ポリhisリーダー、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、IL-22コード領域、ラムダ転写ターミネーター及びargU遺伝子をコードする配列が含まれる。

#### 【0189】

次いで、Sambrookら, 上記に記載されている方法を用いて、このライゲーション混合物を利用して選択した大腸菌株を形質転換した。LB部レート上で成長する能力によって形質転換体を同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAは、単離して制限分析とDNAシーケンシングによって確認することができる。

選択したクローンは、例えば抗生物質を補充したLBブロス等の液体培地で一晩にわたって成長させることができる。より大きなスケールの培養を接種するために、引き続いてこの一晩にわたる培養液を使用してもよい。そして、細胞を所望の光学密度に達するまで成長させ、その間までに発現プロモーターが作動する。

さらに数時間、細胞を培養した後、遠心分離によって細胞を収集することができる。当該分野で公知の様々な薬剤を使用して、遠心分離で得られた細胞ペレットを可溶化することができる。次いで、タンパク質の堅固な結合を可能にする条件下で金属キレート化カラムを用いて、この可溶性IL-22タンパク質を精製すること可能である。

#### 【0190】

以下の手法を用いて、ポリ-Hisタグ形態のIL-22を大腸菌で発現させてもよい。

10

20

30

40

50

IL-22をコードするDNAを、選択したPCRプライマーを用いて最初に増幅する。このプライマーには、選択し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のための他の有用な配列が含まれる。次いで、PCRで増幅したポリ-Hisタグ配列を発現ベクターへ結合させ、これを株52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoH ts(htpR ts) clpP(lacI q))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50 mg/mlのカルベニシリンを含有するLB中で、30 で振盪しながら3-5のO.D. 600に達するまで成長させる。ついで培養液をCRAP培地(3.57 gの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.71 gのクエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O、1.07 gのKCl、5.36 gのDifco酵母抽出物、500 mL水中の5.36 gのSheffield hycase SF、並びに110 mMのMPOS、pH 7.3、0.55% (w/v)のグルコース及び7 mMのMgSO<sub>4</sub>の混合して調製)で50-100倍希釈し、30 で振盪によって約20-30時間成長させた。SDS-PAGEにより発現を確認するために試料を取り出し、バルク培地を遠心分離して細胞をペレットにする。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する。

#### 【0191】

0.5から1 Lの発酵(6-10 gペレット)による大腸菌ペーストを、7 Mのグアニジン、20 mMのトリス、pH 8 バッファーで10容量(w/v)に再懸濁した。固体硫酸ナトリウム及びテトラチオン酸ナトリウムを添加して最終濃度を各々0.1 M及び0.02 Mとし、溶液を4 で終夜攪拌する。この工程により、すべてのシステイン残基が亜硫酸でブロックされた変性タンパク質が生じる。この溶液をベックマン 超遠心機で40,000 rpmで30分間濃縮する。その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、20 mMのトリス、pH 7.4)の3-5容量で希釈し、0.22ミクロンフィルターで濾過して透明にする。その透明抽出物を、金属キレートカラムバッファーで平衡化した5 mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに負荷する。そのカラムを、50 mMのイミダゾール(カルバイオケム, Utrol grade)を含む添加バッファー、pH 7.4で洗浄する。タンパク質を250 mMのイミダゾールを含有するバッファーで溶離する。所望のタンパク質を含有する分画をプールし、4 で保存する。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、280 nmにおけるその吸収から推定する。

#### 【0192】

試料を20 mMのトリス、pH 8.6、0.3 MのNaCl、2.5 Mの尿素、5 mMのシステイン、20 mMのグリシン及び1 mMのEDTA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る。リフォールディング容量は、最終的なタンパク質濃度が50-100マイクログラム/mlとなるように選択する。そのリフォールディング溶液を4 で12-36時間ゆっくり攪拌する。リフォールディング反応は、TFAを最終濃度が0.4% (約3のpH)となるように添加することで停止させる。タンパク質のさらなる精製の前に、その溶液を0.22ミクロンフィルターで濾過し、アセトニトリルを最終濃度が2-10%となるように添加する。再生したタンパク質を、Poros R1/H逆相カラムで、10-80%のアセトニトリル勾配での溶離による0.1% TFAの移動バッファーを用いるクロマトグラフにかける。A280に吸収を示す分画のアリコートでSDSポリアクリルアミドゲルで分析し、均一な再生タンパク質を含有する分画をプールする。一般的に、殆どの正しく再生したタンパク質種は、これらの種が逆相樹脂との相互作用から遮蔽されている疎水性内部で最もコンパクトであるために、最低濃度のアセトニトリルで溶離される。凝集した種は、通常はより高いアセトニトリル濃度で溶離する。逆相工程は、誤って再生したタンパク質を所望の形態から除くことの他に、試料からエンドトキシンも除去する。

#### 【0193】

所望の再生したIL-22ポリペプチドを含有する分画をプールし、この溶液に窒素の弱

い気流を直接あてることでアセトニトリルを除去する。タンパク質は、透析又は調製バッファーで平衡化した G 2 5 Superfine (ファルマシア) 樹脂及び滅菌濾過を用いて、0.14 M の塩化ナトリウム及び 4 % のマンニトールを含む 20 mM の H e p e s 、pH 6.8 に調製する。

ここで開示された多くの I L - 2 2 ポリペプチドは、上記の方法によって成功裏に発現した。

#### 【0194】

実施例 12 : 哺乳動物細胞における I L - 2 2 の発現

この実施例は、哺乳動物細胞での組み換え発現によって潜在的にグリコシル化した形態の I L - 2 2 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 (1989年3月15日公開の欧州特許第307,247号参照)を用いる。場合によっては、上記の S a m b r o o k 等に記載のようなライゲーション方法を用いて、選択した制限酵素で、I L - 2 2 D N A を p R K 5 にライゲーションして I L - 2 2 D N A を挿入する。得られたベクターを、p R K 5 - I L - 2 2 と称する。

#### 【0195】

一実施態様では、選択する宿主細胞を 293 細胞にしてもよい。ヒト 293 細胞 (A T C C C C L 1573) を、ウシ胎児血清及び場合によっては栄養成分及び/又は抗生物質を補充した D M E M などの培地の組織培養プレートでコンフルエントになるまでに成長させる。約 10  $\mu$ g の p R K 5 - I L - 2 2 D N A を、約 1  $\mu$ g の V A R N A 遺伝子コード化 D N A [ T h i m m a p p a y a ら , C e l l , 31:543 (1982) ] と混同させ、500  $\mu$ l の 1mM トリス - H C l 、0.1mM E D T A 、0.227M C a C l <sub>2</sub> に溶解させる。この混合物に、滴状の 500  $\mu$ l の 50mM H E P E S (pH 7.35)、280mM N a C l 、1.5mM N a P O <sub>4</sub> を添加し、25、10分間で析出物を形成させる。この析出物を懸濁し、293細胞に加えて 37、約4時間で定着させる。培地を吸引し、2ml の 20% グリセロールの P B S を 30 秒間添加する。293細胞を、次いで無血清培地で洗浄し、新鮮な培地を添加し、その細胞を約5日間インキュベートする。

#### 【0196】

トランスフェクションの約24時間後、培地を除去し、培地(のみ)又は 200  $\mu$ Ci / ml <sup>35</sup>S - システイン及び 200  $\mu$ Ci / ml <sup>35</sup>S - メチオニンを含む培地で置換した。12時間のインキュベーションの後、馴化培地を回収し、スピンフィルターで濃縮し、15% SDS ゲルに添加する。その処理ゲルを乾燥させ、I L - 2 2 ポリペプチドの存在が明らかになるように選定時間の間フィルムに曝してもよい。トランスフェクト細胞を含む培地をさらにインキュベーションしてもよく(無血清培地で)、この培地を選択したバイオアッセイで試験する。

#### 【0197】

これに換わる技術では、S o m p a r y r a c ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 12:7575 (1981) に記載のデキストラン硫酸法を用いて、I L - 2 2 を 293 細胞へ一過的に導入してもよい。293細胞をスピナーフラスコで最大密度に達するまで生育させ、700  $\mu$ g の p R K 5 - I L - 2 2 D N A を添加する。細胞を、まずはスピナーフラスコから遠心分離によって濃縮し、P B S で洗浄する。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する。細胞を 20% グリセロールで 90 秒間処理し、組織培地で洗浄し、組織培地、5  $\mu$ g / ml ウシインシュリン及び 0.1  $\mu$ g / ml 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する。約4日後に、この馴化培地を遠心分離及び濾過し、細胞及び細胞片を除去する。次いで発現した I L - 2 2 を含む試料を濃縮し、透析及び/又はカラムクロマトグラフィー等の任意の選択した方法によって精製することができる。

#### 【0198】

他の実施態様では、I L - 2 2 を C H O 細胞で発現させることができる。p R K 5 - I L

10

20

30

40

50

- 22 は、 $CaPO_4$  又は DEAE - デキストランなどの公知の試薬を用いて CHO 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  $^{35}S$  - メチオニン等の放射性標識を含む培地で置換することができる。IL - 22 ポリペプチドの存在を確かめた後、培地を無血清培地で置換してもよい。好ましくは、培地を約 6 日間インキュベートし、次いで馴化培地を収集する。次いで、発現した IL - 22 を含む培地は、濃縮し、任意の選択した方法によって精製することができる。

#### 【0199】

また、エピトープタグ IL - 22 は、宿主 CHO 細胞で発現させてもよい。IL - 22 は、pRK5 ベクターからサブクローニングしてもよい。サブクローン挿入物は、PCR を施して、バキュロウイルス発現ベクター中のポリ - his タグ等の選択したエピトープタグを持つ枠に融合できる。このポリ - his タグ IL - 22 挿入物は、次いで、安定なクローンの選択用の選択マーカー、例えば DHFR を含む SV40 誘導ベクターにサブクローニングできる。最終的に、SV40 誘導ベクターで CHO 細胞をトランスフェクション (上記のように) することができる。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 IL - 22 を含む培地は、次いで濃縮し、 $Ni^{2+}$  - キレートアフィニティクロマトグラフィー等の選択した方法により精製できる。

また、IL - 22 は、一過性発現法により CHO 及び / 又は COS 細胞で、又は他の安定な発現方法により CHO 細胞で発現させてもよい。

CHO 細胞での安定な発現は、以下の方法を用いて実施する。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 IgG1 のヒンジ、CH2 及び CH2 ドメインを含む定常領域配列に融合した IgG 作成物 (イムノアドヘンシ)、又はポリ - His タグ形態として発現する。

#### 【0200】

PCR 増幅に続いて、対応する DNA を、Ausubel ら、Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997) に記載のような標準的技術を用いて CHO 発現ベクターにサブクローニングする。CHO 発現ベクターは、対象とする DNA の 5' 及び 3' に適合する制限部位を有し、cDNA の便利なシャトル化ができるように作成される。CHO 細胞での発現を用いるベクターは、Lucas ら、Nucl. Acids Res. 24: 9, 1774 - 1779 (1996) に記載の通りであり、対象とする cDNA 及びジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の発現の制御には SV40 初期プロモーター / エンハンサーを用いる。DHFR 発現は、トランスフェクション後のプラスミドの安定な維持に関する選択を可能にする。

所望するプラスミド DNA の 12 マイクログラムを、市販のトランスフェクション試薬である Superfect (登録商標) (Qiagen), Dospere (登録商標) 及び Eugene (登録商標) (Boehringer Mannheim) を用いて、約 1 千万の CHO 細胞へ導入する。細胞は、上記の Lucas 等に記載のように成長させる。約  $3 \times 10^7$  細胞を、下記のような更なる成長及び産生のためにアンプル中で凍結させる。

#### 【0201】

プラスミド DNA 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する。内容物を 10 mL の培地を含む遠心管にピペットして、1000 rpm で 5 分間遠心分離する。その上清を吸引して細胞を 10 mL の選択培地 (5% の 0.2  $\mu$ m 透析濾過ウシ胎児血清を含む 0.2  $\mu$ m 濾過 PS20 を添加) 中に懸濁する。次いで、その細胞を 90 mL の選択培地を含む 100 mL スピナーに等分する。1 - 2 日後、細胞を 150 mL の選択培地で満たした 250 mL スピナーに移し、37 でインキュベートする。さらに 2 - 3 日後、250 mL、500 mL 及び 2000 mL のスピナーを  $3 \times 10^5$  細胞 / mL で接種する。遠心分離及び産生培地での再懸濁により、細胞培地を新鮮培地と交換する。どんな適切な CHO 培地を用いてもよいが、実際には 1992 年 6 月 16 日に発行された米

10

20

30

40

50

国特許第5,122,469号に記載の産生培地を使用する。3Lの生産スピナーを $1.2 \times 10^6$ 細胞/mLで接種する。0日目に、細胞数とpHを測定する。1日目に、スピナーをサンプルし、濾過空気による散布を実施する。2日目に、スピナーをサンプルし、温度を33℃に変え、30mLの500g/Lのグルコース及び0.6mLの10%消泡剤（例えば35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン、ダウ・コーニング365医療用グレードエマルジョン）を用いる。この産生を通して、pHは7.2近傍に調節し維持する。10日後、又は生存率が70%を下回るまで、その細胞培地を遠心分離で回収し、0.22 $\mu$ mフィルターで濾過する。濾過物は、4℃で貯蔵するか、即座に精製用カラムに充填した。

#### 【0202】

ポリ-Hisタグ作成物に関しては、そのタンパク質をNi-NTAカラム(Qiagen)を用いて精製する。精製の前に、イミダゾールを馴化培地へ5mMの濃度まで添加する。馴化培地を、0.3MのNaCl及び5mMイミダゾールを含む20mMのHepes, pH7.4バッファーで平衡化した6mlのNi-NTAカラムへ4-5ml/分の流速によって4℃でポンプ供給する。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0.25Mイミダゾールを含む平衡バッファーで溶離する。高度に精製されたタンパク質は、続いて10mMのHepes、0.14MのNaCl及び4%のマンニトール、を含むpH6.8の貯蔵バッファーにより25mlのG25 Superfine(ファルマシア)を用いて脱塩し、-80℃で貯蔵する。

#### 【0203】

イムノアドヘシン(Fc含有)作成物を、以下の通りに馴化培地から精製する。馴化培地を、20mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH6.8で平衡化した5mlのプロテインAカラム(ファルマシア)へポンプ注入する。充填後、カラムを平衡バッファーで十分に洗浄した後、100mMのクエン酸、pH3.5で溶離する。溶離したタンパク質は、1mlの分画を275 $\mu$ LのpH9の1Mトリスバッファーを含む管で回収することにより即座に中性化する。高度に精製されたタンパク質を、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で脱塩する。その均一性は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する。ここに開示したIL-22ポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現した。

#### 【0204】

実施例13：酵母でのIL-22の発現

以下の方法は、酵母でのIL-22の組換え発現を記載する。

最初に、酵母発現ベクターを、ADH2/GAPDHプロモーターによるIL-22の細胞内生産又は分泌のために作成する。IL-22をコードするDNA、及びプロモーターを、IL-22の細胞内発現を指示するように、選択したプラスミドの適当な制限酵素部位に挿入する。分泌のために、IL-22をコードするDNAを選択したプラスミドへ、ADH2/GAPDHプロモーターをコードするDNA、天然IL-22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、例えば酵母因子又はインペルターゼ分泌シグナル/リーダー配列、及び(必要ならば)IL-22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。

#### 【0205】

酵母菌株AB110等の酵母を、次いで上記の発現プラスミドで形質転換し、選択し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、それに続くクマシーブルー染色によるゲルの染色による分離によって分析することができる。

続いて組換えIL-22は、発酵培地から遠心分離により酵母菌細胞を除去し、次いで選択し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-22を含む濃縮物は、選択し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。

ここに開示したIL-22ポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現した。

10

20

30

40

50

## 【0206】

実施例14：バキュロウイルス感染昆虫細胞でのIL-22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-22の組換え発現を記載する。

IL-22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る。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(Novagen)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-22又はIL-22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によるPCRで増幅する。5'プライマーは、隣接する(選択した)制限酵素部位を包含していてもよい。この生産物を、次いで、選択した制限酵素で消化し、発現ベクターへサブクローニングする。

10

## 【0207】

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、更なる増幅に用いる。ウイルス感染及びタンパク質発現は、O'Reilly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する。

20

## 【0208】

次に、発現したポリ-hisタグIL-22を、例えばNi<sup>2+</sup>-キレートアフィニティークロマトグラフィーにより次のように精製することができる。抽出は、Rupertら, Nature, 362:175-179(1993)に記載のように、ウイルス感染した組み換えSf9細胞から調製する。簡単には、Sf9細胞を洗浄し、超音波処理用バッファー(25mLのHepes, pH7.9; 12.5mMのMgCl<sub>2</sub>; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1%のNP-40; 0.4MのKCl)に再懸濁し、氷上で2回20秒間超音波処理する。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、pH7.8)で50倍希釈し、0.45µmフィルターで濾過する。Ni<sup>2+</sup>-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する。濾過した細胞抽出物は、毎分0.5mLでカラムに負荷する。カラムを、分画回収が始まる点であるA<sub>280</sub>のベースラインまで負荷バッファーで洗浄する。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、pH6.0)で洗浄する。A<sub>280</sub>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)で複合したNi<sup>2+</sup>-NTAでのウェスタンブロットで分析する。溶離したHis<sub>10</sub>-タグIL-22を含む画分をプールして負荷バッファーで透析する。

30

40

あるいは、IgGタグ(又はFcタグ)IL-22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。

ここに開示したIL-22ポリペプチドの多くが上記のようにして成功裏に発現した。

## 【0209】

実施例15：IL-22に結合する抗体の調製

50

この実施例は、IL-22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産生のための技術は、この分野で知られていて、例えば、上記のG o d i n gに記載されている。用いてもよい免疫原は、精製IL-22、IL-22を含む融合タンパク質、細胞表面に組換えIL-22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することができる。

B a l b / c等のマウスを、完全フロイントアジュバント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-22免疫原で免疫化する。あるいは、免疫原をM P L - T D Mアジュバント ( R i b i I m m u n o c h e m i c a l R e s e a r c h , 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、選択したアジュバント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-22抗体の検出のためのE L I S A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。

10

#### 【0210】

適当な抗体力価が検出された後、抗体に「ポジティブ(陽性)」な動物に、IL-22静脈内注射の最後の注入をすることができる。3から4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を取り出す。次いで脾臓細胞を(35%ポリエチレングリコールを用いて)、A T C Cから番号C R L 1 5 9 7で入手可能なP 3 X 6 3 A g U . 1等の選択したマウス骨髄腫株化細胞に融合させる。融合によりハイブリドーマ細胞が生成され、次いで、これを非融合細胞、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するようにH A T (ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートにプレートすることができる。

20

ハイブリドーマ細胞は、IL-22に対する反応性に関するE L I S Aによってスクリーニングされる。IL-22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。

陽性ハイブリドーマ細胞を、抗IL-22モノクローナル抗体を含む腹水を生成するように、同系のB a l b / cマウスに腹腔内注入することができる。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。腹水で生成し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。

30

#### 【0211】

実施例16： 特異的抗体を用いたIL-22ポリペプチドの精製

天然又は組換えIL-22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-IL-22ポリペプチド、成熟ポリペプチド、又はプレ-IL-22ポリペプチドは、対象とするIL-22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。一般的に、免疫親和性カラムは、抗IL-22ポリペプチド抗体を活性化クロマトグラフィー樹脂へ共有結合することで作成する。

ポリクローナル免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムによる沈殿又は固定化プロテインA (ファルマシア L K B バイオテクノロジー, ピスカタウェイ, ニュージャージー)による精製のいずれかにより免疫血清から調製する。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する。部分精製し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)(ファルマシア L K B バイオテクノロジー)等のクロマトグラフィー樹脂に共有結合する。抗体が樹脂に結合し、樹脂がブロックされ、そして誘導体樹脂を製造者の指示に従って洗浄する。

40

#### 【0212】

このような免疫親和性カラムは、可溶化形態のIL-22ポリペプチドを含有する細胞から分画を調製をすることによるIL-22ポリペプチドの精製で利用される。この調製物

50

は、洗浄剤の添加又はこの分野で公知の方法による微分遠心分離を介して得られる全細胞又は細胞成分分画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IL-22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得る。

可溶化IL-22ポリペプチド含有調製物を免疫親和性カラムへ流し、そのカラムをIL-22ポリペプチドの優先的吸着を可能にする条件下（例えば、洗浄剤存在下の高イオン強度バッファー）で洗浄する。次いで、このカラムを抗体/IL-22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ン酸イオン等のカオトロップ）で溶離し、IL-22ポリペプチドを回収する。

#### 【0213】

#### 実施例17：薬物スクリーニング

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術でIL-22ポリペプチド又はその結合断片を使用することによって化合物のスクリーニングすることによって特に有用である。そのような試験に用いられるIL-22ポリペプチド又は断片は、溶液中での遊離状態でも、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、IL-22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す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、IL-22ポリペプチド又は断片と試験される試薬の間の複合体の形成を測定してもよい。あるいは、試験する試薬によって生ずるIL-22ポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプター間の複合体形成の減少を試験することができる。

#### 【0214】

従って、本発明は、IL-22ポリペプチド関連疾患又は障害に作用することのでき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、当該分野で良く知られており、その試薬をIL-22ポリペプチド又は断片に接触させ、(i)試薬とIL-22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-22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-22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、遊離型IL-22ポリペプチド又は断片を結合形態のものから分離し、遊離型又は未複合の標識の量が、特定の試薬がIL-22ポリペプチドに結合する又はIL-22ポリペプチド/細胞複合体を阻害する能力の尺度となる。

#### 【0215】

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日に公開された国際公開84/03564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-22ポリペプチドに適用すると、ペプチド試験化合物はIL-22ポリペプチドと反応して洗浄される。結合したIL-22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-22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もできる。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-22ポリペプチドに結合可能な中和抗体がIL-22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-22ポリペプチドと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。

#### 【0216】

#### 実施例18：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-22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

10

20

30

40

50

はインヒビターの構造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-22ポリペプチドのより活性で安定な形態又はインヒビターでIL-22ポリペプチドの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))。

【0217】

1つの方法において、IL-22ポリペプチド、又はIL-22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-22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-22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-22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Athauda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。

10

【0218】

また、上記のような機能アッセイによって選択した標的の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-イデオタイプ抗体(anti-id)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、anti-id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。anti-idは、次いで、化学的又は生物学的に製造したペプチド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。

20

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-22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-22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。

30

【0219】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 10801 ユニバーシティー・ブルバード, マナサッス, バージニア, 20110-2209 アメリカ合衆国(ATCC)に寄託した:

材料	ATCC寄託番号	寄託日
DNA125185-2806	PTA-1031	1999年12月7日

【0220】

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号886 OG 638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に子孫を入手可能とすることを保証するものである。

40

【0221】

本出願の譲受人は、寄託した材料が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同

50

意する。寄託材料の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

【0222】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号：1がここで「DNA125185-2806」と命名したクローンである、天然配列IL-22cDNAのヌクレオチド配列（配列番号：1）を示す。

【図2】図1に示す配列番号：1のコード化配列から誘導したアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

【図3】インターロイキン-22レセプタープローブでプローブしたノーザンプロットを示す。

【図4】Ta q m a n（商品名）分析によって分析した、種々のヒト組織のインターロイキン-22レセプターRNAの発現を示す。

20

【図5】IL-22で刺激した膵臓腺房細胞株でのSTAT活性化を示す。

【図6A】ノーザンプロットによって分析した、IL-22で刺激した膵臓腺房細胞株での膵炎関連タンパク質（PAP1）RNAのアップレギュレーションを示す。

【図6B】ノーザンプロットによって分析した、IL-22で刺激した単離された初期膵臓腺房細胞でのPAP1及びオステオポンチンRNAのアップレギュレーションを示す。

【図7】IL-22を注射したマウスを用い、そしてノーザンプロット分析によって追跡したインビボでの膵臓におけるPAP1のアップレギュレーションを示す。

【図8】野生型及びIL-10レセプターベータ（IL-10R）欠損マウスでのインターロイキン-6（IL-6）産生のレベルを示す。

30

【図9】ノーザンプロットによって分析した、IL-22で治療したIL-10R欠損マウスのインビボでの膵臓では、PAP1の発現がアップレギュレーションされていないことを示す。

【図10】IL-10Rポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図11】IL-22Rポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 図 1 】

```

CTTCAGAACAGGTTCTCTCCCTCCCGAGTTCACCCAGTTCGCTGAGATTAGAAATTTGCTGCAAGC
GCCGCCCTGCAGAAATCTGTGAGCTCTTTCCCTATGSSGACCTGGCCACCCAGCTGCTC
CTTCTCTTGGCCCTCTTGGTACAGGGAGGAGCAGCTGGCCCATCAGCTCCCACTGCAGG
CTTGACAAGTCCCACTTCCAGCAGCCCTATATCAACCAACCCACCTTCATGCTGGCTAAG
GAGGCTAGCTTGGCTGATAACACACACAGCTTTCGCTCATTGGGGAGAACTGTCCAC
GGACTCAGTATGAGTGGCGCTCTATCTGATGAAGCAGGTGCTGAACTTCAACCTTGAA
GAACTGCTGTTCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCCTTATATGCRAGAGTGGTGCCTTC
CTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTTANGCACATGTCATATTGAAGGTGACGACCTGCATATC
CAGAGGAATGTGCAAAAGCTGAAGGACACAGTGA AAAAGCTTGGAGAGTGGAGATC
AANGCAATTGGAGACTGGATTTCCTGTTTATGCTCTCTGAGAAATGCCCTGCATTTGCA
GAGCAAGCTGAAAATGAATTAACCTAACCCCTTCCCTGCTAGAAAACAAATAGATG
CCCCAAAGCGATTTTTTAAACCAAAAGGAAGTGGGAAGCCAACTTCATCATGATGGG
TGGATTCCAAATGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGAAACCAATGCCATTTTGTATATA
AGACCAGAGGTAGACTTCTTAGCATAGATATTTATGATACACTTCATTTGTAAGTGG
TGTTCATACACAGAAAACAATTTATTTTAAATATTGCTCTTTCCATAAAAAGAT
TACTTCCACTCCTTAGGGGAAAAAACCCCTAAATAGCTTCATGTTCCATAATCAGCA
CTTATATTTAATAATGATTTATTTATTTAATAAGACGATTTTATTTAATCATTTT
ATFATCAGGATTTATTTATAGAACATCATTCGATATTGCTACTTGHGTGARGGCTAA
TATGATATTTATGACAATAATATAGAGCTATAACATGTTTATTTGACCTCAATAACA
CTTGGATATCCC

```

【 図 2 】

```

MRAIQKSVSSFFLMGTLATSCILLALLVQGGAAPISSHCRLDKSNFQYIINRPFMLA
KEASLADNNTDVRLIGELKFRGVMSERCYLMKQVLFNFTLEVLFPQSDRFQPYMOEYVVP
FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKATGELDLPMSLRNACT

```

シグナル ペプチド:  
1-33

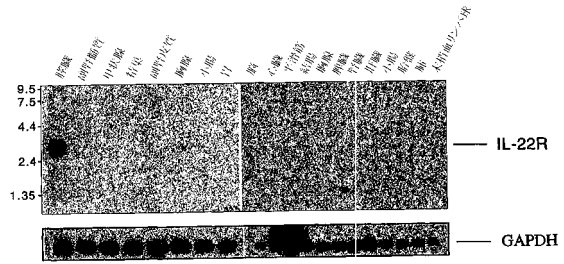
N-グリコシル化 部位:

54-58  
68-72  
97-101

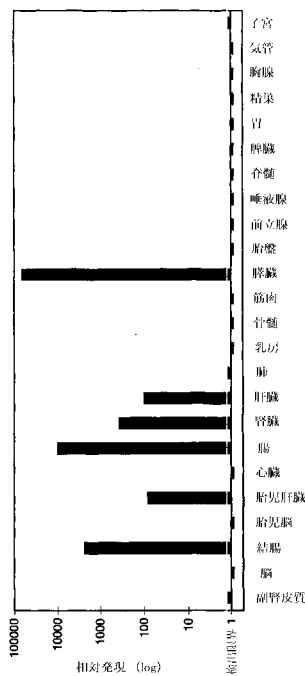
N-アミノ酸化 部位:

14-20  
82-88

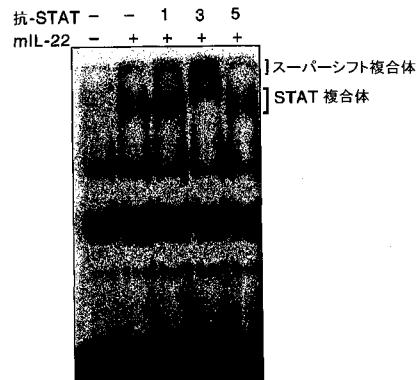
【 図 3 】



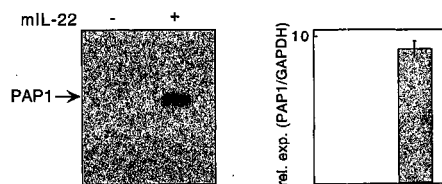
【 図 4 】



【 図 5 】

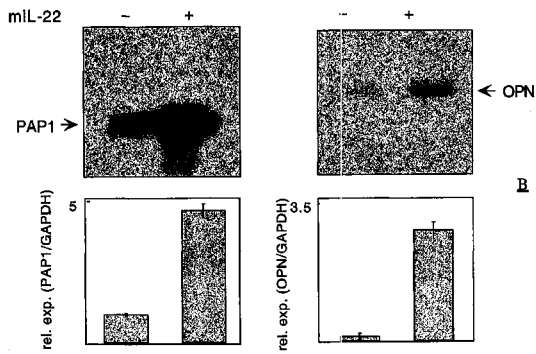


【 図 6 A 】

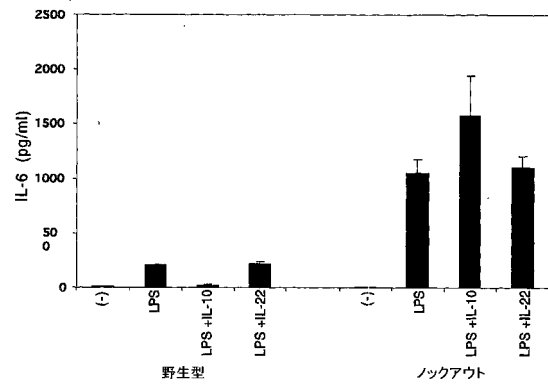


△

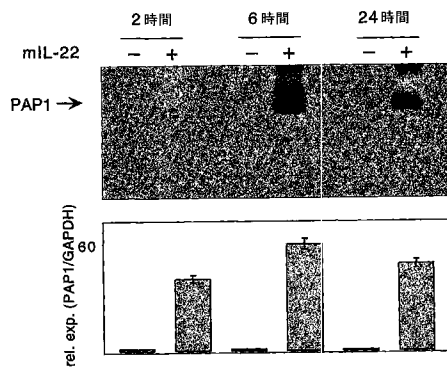
【 図 6 B 】



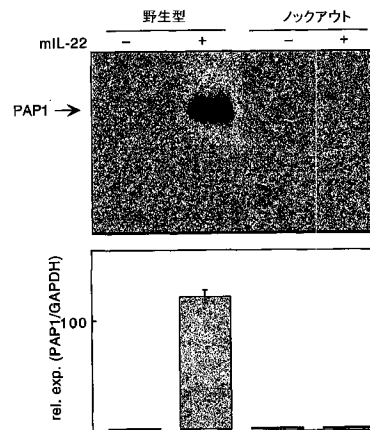
【 図 8 】



【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 10 】

IL-10Rβ

```

MWSLGSWLGCLLVSALGMVPPFNVRMNSVNFKNILQWESPAFANGNLIFFAQLLSYR
IFQDKCMNTLITCEDPSSLSKYGDHTRVRAEFADHSDWVNIIFCPVDDTIIGPGMGV
EVLADSLHMRFLAFKLENEYETWTKNKNVNSWYVQYKNGTDEKFIITFQYDFEVLRN
LEFWITCYCVQVGFLEDRNKAGSEPVCSQTHDETFVSWMVAVILMASVEMVCLALLG
CFSLWCVYKTKYAFSPRNSLPOHLKEFLGHPHNTLLFFSPLSDENDVDFKLSVIAE
DSESGKQNPQDSCSLGTPPGGQPS

```

【 図 11 】

IL-22R

```

MRTLILITVGSAAHAPEDPSDLQHVKFSNFFENILTWDSGPEGTPTVYSIEYKTY
GERDWAKKGCQRITRKSCNLIIVETCNLTGLYARVAVSAGGRSATKMDRFSSLQRTT
LKFPDVTICISKRSIQMIVBPTFTPIRAGDGHRLTLEDIFHDLFYHLELQVNRTYQHLG
GQREYEFFGLTPTTEFLGTIMLCVPTWAKESAFYMCVRVTLDPRTWTYSFGALFSMG
FLVAVLCYLSRYVYTKPPAPPNSLVORVLTFOPLRPIQEHVLLIPVFDLSGESSLAQPVQ
YSQIRVSGPREPAGAPQRHSLSEITYLGPDISILQPSNVFPQQLSPLSYAPNAAPEVG
PFSYAPQVTPENQFPFYAPQAIKSVQPSYAPQATPDSNFPYSYGVCMESGSKDPTGTL
SFKALRPKGLQKEPPAGSCMLGGLSLQZVTSLAMEESQEAQSLHQPLGICTDRTSDPNV
LHSGEGTTPQYLKQLPLLSSVQIEGHPMSLFLQPPSPGSPSDQGPSEWGLLESVCEK
DEAKSPAPETSLEQPTLELDSLFRGLALTQWES

```

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/16611 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/24,  
C07K 14/54, C12N 1/21, 5/10, 1/19, 15/62, A61K 39/395,  
31/77088, G01N 33/68, C07K 16/24Ming-Hong [US/US]; 2055 32nd Avenue, San Francisco,  
CA 94116 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/17443

(74) Agents: CARPENTER, David, A. et al.; c/o Genentech,  
Inc., MS-49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-  
4990 (US).

(22) International Filing Date: 30 May 2001 (30.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
PCT/US00/23328 24 August 2000 (24.08.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-  
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,  
CA 94080-4990 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, 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, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NI, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): AGGARWAL,  
Sudeepa [IN/US]; 2981 Berkshire Drive, San Bruno,  
CA 94066 (US). FOSTER, Jessica, S. [US/US]; #609,  
26970 Hayward Boulevard, Hayward, CA 94542 (US).  
GODDARD, Audrey [CA/US]; 110 Congo Street,  
San Francisco, CA 94131 (US). GURNEY, Austin, I.  
[US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US).  
MARUOKA, Ellen, M. [US/US]; 2487 43rd Avenue, San  
Francisco, CA 94116 (US). WOOD, William, I. [US/US];  
35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US). XIE,

Published:

- without international search report and to be republished  
upon receipt of that report
- entirely in electronic form (except for this front page) and  
available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/16611 A2

(54) Title: INTERLEUKIN-22 POLYPEPTIDES, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME AND METHODS FOR THE  
TREATMENT OF PANCREATIC DISORDERS(57) Abstract: The present invention is directed to interleukin-22 polypeptides and nucleic acid molecules encoding those polypep-  
tides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules  
comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the  
polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

**INTERLEUKIN-22 POLYPEPTIDES, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME AND METHODS  
FOR THE TREATMENT OF PANCREATIC DISORDERS**

**FIELD OF THE INVENTION**

5 The present invention relates generally to the identification and isolation of interleukin-22 (IL-22) and to methods of treatment of pancreatic disorders.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

10 The pancreas is a large gland located behind the stomach and close to the duodenum. It secretes digestive enzymes that enter the small intestine via a duct. These enzymes facilitate the digestion of proteins, fats and carbohydrates. In addition to the digestive enzymes the pancreas also releases insulin and glucagon, which play an important role in sugar metabolism.

15 Pancreatitis is a disease in which the pancreas becomes inflamed. Damage to the pancreas occurs when digestive enzymes are activated and begin attacking the gland. In severe cases, there may be bleeding into the gland, tissue damage, infection and cyst formation. There are two forms of pancreatitis. An acute form which occurs suddenly and may be life threatening. A chronic form of pancreatitis may arise if the patient persists in drinking alcohol, which results in the reduction of pancreatic function and severe pain and weight loss. There are approximately 50,000 to 80,000 cases of acute pancreatitis in the United States each year. It is more common in men than in women.

20 Currently, diagnosis of pancreatitis is difficult. Usually pancreatic function tests help the physician determine if there are enough pancreatic enzymes being made. CAT scan can determine if there are abnormalities in the gland itself, such as gallstones, which are frequently associated with this disorder. As chronic pancreatitis is a leading risk factor for pancreatic cancer, it should be treated as soon as the diagnosis is made.

25 The pancreas is comprised of about 80% acinar cells, 1%-2% islet cells and 10%-15% of cuboidal ductal cells. Acinar cell carcinoma accounts for 1%-2% of pancreatic carcinoma, with an additional 10%-15% of pancreatic carcinoma comprised of acinar cells and other cell types [Nomura et al., *Ultra. Path.* (1992) 16:317-329]. All of the causes of acute pancreatitis affect the acinar cells in a way that results in the activation and retention of the digestive enzymes, which injure the acinar cell and cause the release of cytokines. The cytokines attract inflammatory cells, especially neutrophils, leading to further secretion of cytokines. It is proposed that the released inflammatory molecules induce pancreatic edema, and local necrosis. Certain studies have suggested that cytokine inhibitors may improve the course of pancreatitis in specific clinical settings.

30 Interleukin-22 (IL-22) is a newly identified cytokine produced by activated T cells and is related to interleukin-10 (IL-10). IL-22 signals through a receptor complex comprised of CRF2-4, also known as IL-10RB, and a new member of the class II cytokine receptor family, interleukin-22 receptor (IL-22R) [Xie et al., *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 31335-31339]. Of the members of this receptor complex, IL-10RB is expressed in several tissues

WO 02/16611

PCT/US01/17443

while the expression of IL-22R is fairly restricted, with high expression in the pancreas, suggesting that IL-22R is controlling the site of action of IL-22. As an example, murine IL-22 induces changes in gene expression in pancreatic acinar cells of several genes including pancreatitis associated protein (PAP1), a gene overexpressed in acute pancreatitis [Iovanna et al. J. Biol. Chem. (1991) 266, 24664-24669]. IL-22 signaling through a receptor complex that is highly expressed in pancreas, suggests that IL-22 may modulate an immune/inflammatory response in the pancreas, and may be involved in diseases of the pancreas including pancreatitis.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

In one embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes an interleukin-22 (IL-22) polypeptide.

10 In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89%  
15 nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98%  
20 nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule encoding an IL-22 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about 1 or about 33 to about 179, inclusive; of Figure 2 (SEQ ID NO: 2), (b) an amino acid sequence lacking the signal peptide of about amino acids 1 to X, wherein X is any amino acid from 29 to 38 of Figure 2 (SEQ ID NO:2) or any other specifically  
25 defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein, or (c) the complement of the DNA molecule of (a).

In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity,  
30 alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity,  
35 alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98%

WO 02/16611

PCT/US01/17443

nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule comprising the sequence of nucleotides from about 58 to about 157 to about 594, inclusive, of the cDNA as disclosed in Figure 1 (SEQ ID NO: 1), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on December 7, 1999 under the ATCC deposit number PTA-1031 (DNA125185-2806) or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

Another embodiment is directed to fragments of an IL-22 polypeptide coding sequence, or the complement thereof, that may find use as, for example, hybridization probes, for encoding fragments of an IL-22 polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-IL-22 antibody or as antisense oligonucleotide probes. Such nucleic acid fragments are usually at least about 10 nucleotides in length, alternatively at least about 15 nucleotides in length, alternatively at least about 20 nucleotides in length, alternatively at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 40 nucleotides in length, alternatively at least about 50 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 70 nucleotides in length, alternatively at least about 80 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 100 nucleotides in length, alternatively at least about 110 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 130 nucleotides in length, alternatively at least about 140 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 160 nucleotides in length, alternatively at least about 170 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 190 nucleotides in length, alternatively at least about 200 nucleotides in length, alternatively at least about 250 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 350 nucleotides in length, alternatively at least about 400 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 500 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 700 nucleotides in length, alternatively at least about 800 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length and alternatively at least about 1000 nucleotides in length, wherein in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that

WO 02/16611

PCT/US01/17443

referenced length. It is noted that novel fragments of an IL-22 polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the IL-22 polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which IL-22 polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such IL-22 polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein. Also contemplated are the IL-22 polypeptide fragments encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those IL-22 polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-IL-22 antibody.

In another embodiment, the invention provides isolated IL-22 polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences herein above identified.

In a certain aspect, the invention concerns an isolated IL-22 polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to (a) an IL-22 polypeptide having a full-length amino acid sequence as disclosed in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), (b) an amino acid sequence lacking the signal peptide from about 1 to X, wherein X is any amino acid from about 29 to about 38 as disclosed in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), or any other specifically defined fragment of the full-length amino acid sequence as disclosed herein.

In a further aspect, the invention concerns an isolated IL-22 polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the IL-22 cDNA deposited with the ATCC on December 7, 1999 under the ATCC

WO 02/16611

PCT/US01/17443

deposit number PTA-1031 (DNA125185-2806).

In a specific aspect, the invention provides an isolated IL-22 polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the IL-22 polypeptide and recovering the IL-22 polypeptide from the cell culture.

In yet another embodiment, the invention concerns agonists and antagonists of a native IL-22 polypeptide as defined herein. In a particular embodiment, the agonist or antagonist is an anti-IL-22 antibody or a small molecule.

10 In a further embodiment, the invention concerns a method of identifying agonists or antagonists to an IL-22 polypeptide which comprise contacting the IL-22 polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said IL-22 polypeptide. Preferably, the IL-22 polypeptide is a native IL-22 polypeptide.

15 In a still further embodiment, the invention concerns a composition of matter comprising an IL-22 polypeptide, or an agonist or antagonist of an IL-22 polypeptide as herein described, or an anti-IL-22 antibody, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

Another embodiment of the present invention is directed to the use of an IL-22 polypeptide, or an agonist or antagonist thereof as hereinbefore described, or an anti-IL-22 antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the IL-22 polypeptide, an agonist or antagonist thereof or an anti-IL-22 antibody.

20 In other embodiments of the present invention, the invention provides vectors comprising DNA encoding any of the herein described polypeptides. Host cell comprising any such vector are also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, or yeast. A process for producing any of the herein described polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of the desired polypeptide and recovering the desired polypeptide from the cell culture.

25 In other embodiments, the invention provides chimeric molecules comprising any of the herein described polypeptides fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence. Example of such chimeric molecules comprise any of the herein described polypeptides fused to an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

30 In another embodiment, the invention provides an antibody which binds, preferably specifically, to any of the above or below described polypeptides. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, humanized antibody, antibody fragment or single-chain antibody.

35 In yet other embodiments, the invention provides oligonucleotide probes which may be useful for isolating genomic and cDNA nucleotide sequences, measuring or detecting expression of an associated gene or as antisense probes, wherein those probes may be derived from any of the above or below described nucleotide sequences. Preferred probe lengths are described above.

In other embodiments, the invention provides for methods of detecting, diagnosing and treating pancreatic disorders by contacting biological samples suspected of pancreatic disorders. Detection and diagnosis of a pancreatic

WO 02/16611

PCT/US01/17443

disorder in the biological sample may include determining level of IL-22 expression, effects of IL-22 expression on PAPI, or probing the biological sample with IL-22. Treatment may include contacting the biological sample with antagonists to IL-22, reduction of IL-22 expression or inhibition of IL-22 binding to a receptor.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- 5 Figure 1 shows a nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a native sequence IL-22 cDNA, wherein SEQ ID NO:1 is a clone designated herein as "DNA125185-2806".
- Figure 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) derived from the coding sequence of SEQ ID NO:1 shown in Figure 1.
- Figure 3 shows Northern Blots probed with an interleukin-22 receptor probe.
- 10 Figure 4 shows the expression of interleukin-22 receptor RNA from various human tissues as analyzed by Taqman<sup>TM</sup> analysis.
- Figure 5 shows STAT activation in a pancreatic acinar cell line stimulated with IL-22.
- Figure 6A shows the upregulation of Pancreatitis Associated Protein (PAPI) RNA in a pancreatic acinar cell line stimulated with IL-22 as analyzed by Northern Blot.
- 15 Figure 6B shows the upregulation of PAPI and Osteopontin RNA in isolated primary pancreatic acinar cells stimulated with IL-22 as analyzed by Northern Blot.
- Figure 7 shows the upregulation of PAPI in pancreas in vivo using mice injected with IL-22 and followed by Northern Blot analysis.
- Figure 8 shows the levels of interleukin-6 (IL-6) production in wild type and IL-10 receptor beta (IL-10R $\beta$ )
- 20 deficient mice.
- Figure 9 shows that PAPI expression is not upregulated in pancreas in vivo in IL-10R $\beta$  deficient mice treated with IL-22 as analyzed by Northern Blot.
- Figure 10 shows the amino acid sequence of the IL-10R $\beta$  polypeptide.
- Figure 11 shows the amino acid sequence of the IL-22R polypeptide.

25

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

##### I. Definitions

The terms "IL-22 polypeptide" and "IL-22" as used herein refers to specific polypeptide sequences as described herein. The IL-22 polypeptides described herein may be isolated from a variety of sources, such as from

30 human tissue types or from another source, or prepared by recombinant or synthetic methods. For example, descriptions of the preparation of, purification of, derivation of, formation of antibodies to or against, administration of, compositions containing, treatment of a disease with, etc., pertain to each polypeptide of the invention individually. The term "IL-22 polypeptide" also includes variants of the IL-22 polypeptides disclosed herein.

A "native sequence IL-22 polypeptide" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as

35 the corresponding IL-22 polypeptide derived from nature. Such native sequence IL-22 polypeptides can be isolated from nature or can be produced by recombinant or synthetic means. The term "native sequence IL-22 polypeptide" specifically encompasses naturally-occurring truncated or secreted forms of the specific IL-22 polypeptide, naturally-

WO 02/16611

PCT/US01/17443

occurring variant forms (e.g., alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the polypeptide. In one embodiment of the invention, the native sequence IL-22 polypeptide comprising amino acids 1 to 179 of Figure 2 (SEQ ID NO: 2) are mature or full-length native sequence polypeptides comprising the full-length amino acids sequences. Start and stop codons are shown in bold font and underlined in Figure 1 (SEQ ID NO: 1). However, while the IL-22 polypeptide disclosed in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) is shown to begin with methionine residues designated herein as amino acid position 1 in Figure 2 (SEQ ID NO: 2), it is conceivable and possible that other methionine residues located either upstream or downstream from the amino acid position 1 in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) may be employed as the starting amino acid residue for the IL-22 polypeptides.

The approximate location of the "signal peptides" of the various IL-22 polypeptides disclosed herein are shown in the present specification and/or the accompanying figures. It is noted, however, that the C-terminal boundary of a signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen et al., *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) and von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These mature polypeptides, where the signal peptide is cleaved within no more than about 5 amino acids on either side of the C-terminal boundary of the signal peptide as identified herein, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention.

"IL-22 polypeptide variant" means an active IL-22 polypeptide as defined above or below having at least about 80% amino acid sequence identity with a full-length native sequence IL-22 polypeptide sequence as disclosed herein, an IL-22 polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, or any other fragment of a full-length IL-22 polypeptide sequence as disclosed herein. Such IL-22 polypeptide variants include, for instance, IL-22 polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- or C-terminus of the full-length native amino acid sequence. Ordinarily, an IL-22 polypeptide variant will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity with (a) amino acids about 1 or about 33 to about 179 of the IL-22 polypeptide sequence as disclosed in Figure 2 (SEQ ID NO: 2) (b) X to 179 of the IL-22 polypeptide sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any amino acid from 29 to 38 of Figure 2 (SEQ ID NO:

WO 02/16611

PCT/US01/17443

2), or (c) any other specifically defined fragment of a full-length IL-22 polypeptide sequence as shown in Figure 2 (SEQ ID NO: 2). Ordinarily, IL-22 variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20 amino acids in length, alternatively at least about 30 amino acids in length, alternatively at least about 40 amino acids in length, alternatively at least about 50 amino acids in length, alternatively at least about 60 amino acids in length, alternatively at least about 70 amino acids in length, alternatively at least about 80 amino acids in length, alternatively at least about 90 amino acids in length, alternatively at least about 100 amino acids in length, alternatively at least about 150 amino acids in length, alternatively at least about 200 amino acids in length, alternatively at least about 300 amino acids in length, or more.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the IL-22 polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in the specific IL-22 polypeptide sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations using this method, Tables 2 and 3 demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the

WO 02/16611

PCT/US01/17443

amino acid sequence designated "IL-22", wherein "IL-22" represents the amino acid sequence of a hypothetical IL-22 polypeptide of interest, "Comparison Protein" represents the amino acid sequence of a polypeptide against which the "IL-22" polypeptide of interest is being compared, and "X," "Y" and "Z" each represent different hypothetical amino acid residues.

5 Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program. However, % amino acid sequence identity values may also be obtained as described below by using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, i.e., the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. When WU-BLAST-2 is employed, a % amino acid sequence identity value is determined by dividing 10 (a) the number of matching identical amino acid residues between the amino acid sequence of the IL-22 polypeptide of interest having a sequence derived from the native IL-22 polypeptide and the comparison amino acid sequence of interest (i.e., the sequence against which the IL-22 polypeptide of interest is being compared which may be an IL-22 variant polypeptide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of amino acid residues of the IL-22 polypeptide of interest. For example, in the statement "a polypeptide comprising an the amino acid sequence 15 A which has or having at least 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence B", the amino acid sequence A is the comparison amino acid sequence of interest and the amino acid sequence B is the amino acid sequence of the IL-22 polypeptide of interest.

Percent amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final 25 gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

30 
$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It 35 will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

"IL-22 variant polynucleotide" or "IL-22 variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule

WO 02/16611

PCT/US01/17443

which encodes an active IL-22 polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with a nucleotide acid sequence encoding a full-length native sequence IL-22 polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence IL-22 polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, or any other fragment of a full-length IL-22 polypeptide sequence as disclosed herein. Ordinarily, an IL-22 variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity with a nucleic acid sequence encoding a full-length native sequence IL-22 polypeptide sequence as disclosed herein, a full-length native sequence IL-22 polypeptide sequence lacking the signal peptide as disclosed herein, an extracellular domain of an IL-22 polypeptide, with or without the signal sequence, as disclosed herein or any other fragment of a full-length IL-22 polypeptide sequence as disclosed herein. Variants do not encompass the native nucleotide sequence.

Ordinarily, IL-22 variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 210 nucleotides in length, alternatively at least about 240 nucleotides in length, alternatively at least about 270 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length, or more.

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to IL-22-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in the IL-22 nucleic acid sequence of interest, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN or Megalign (DNASTAR) software. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are generated using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 below has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXUS10087. The ALIGN-2 program is publicly

WO 02/16611

PCT/US01/17443

available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1 below. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

In situations where ALIGN-2 is employed for nucleic acid sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

100 times the fraction W/Z

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 4 and 5, demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "IL-22-DNA", wherein "IL-22-DNA" represents a hypothetical IL-22-encoding nucleic acid sequence of interest, "Comparison DNA" represents the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule against which the "IL-22-DNA" nucleic acid molecule of interest is being compared, and "N", "L" and "V" each represent different hypothetical nucleotides.

Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described in the immediately preceding paragraph using the ALIGN-2 computer program. However, % nucleic acid sequence identity values may also be obtained as described below by using the WU-BLAST-2 computer program (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Most of the WU-BLAST-2 search parameters are set to the default values. Those not set to default values, i.e., the adjustable parameters, are set with the following values: overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11, and scoring matrix = BLOSUM62. When WU-BLAST-2 is employed, a % nucleic acid sequence identity value is determined by dividing (a) the number of matching identical nucleotides between the nucleic acid sequence of the IL-22 polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest having a sequence derived from the native sequence IL-22 polypeptide-encoding nucleic acid and the comparison nucleic acid molecule of interest (i.e., the sequence against which the IL-22 polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest is being compared which may be a variant IL-22 polynucleotide) as determined by WU-BLAST-2 by (b) the total number of nucleotides of the IL-22 polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest. For example, in the statement "an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence A which has or having at least 80% nucleic acid sequence identity to the nucleic acid sequence B", the nucleic acid sequence A is the comparison nucleic acid molecule of interest and the nucleic acid sequence B is the nucleic acid sequence of the IL-22 polypeptide-encoding nucleic acid molecule of interest.

Percent nucleic acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program

WO 02/16611

PCT/US01/17443

NCBI-BLAST2 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } W/Z$$

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

In other embodiments, IL-22 variant polynucleotides are nucleic acid molecules that encode an active IL-22 polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding a full-length IL-22 polypeptide as disclosed herein. IL-22 variant polypeptides may be those that are encoded by an IL-22 variant polynucleotide.

"Isolated," when used to describe the various polypeptides disclosed herein, means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the IL-22 polypeptide natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" IL-22 polypeptide-encoding nucleic acid or other polypeptide-encoding nucleic acid is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the polypeptide-encoding nucleic acid. An isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecules therefore are distinguished from the specific polypeptide-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated polypeptide-encoding nucleic acid molecule includes polypeptide-encoding nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express the polypeptide

WO 02/16611

PCT/US01/17443

where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

5 Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

10 The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for example, single anti-IL-22 monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies), anti-IL-22 antibody compositions with polyepitopic specificity, single chain anti-IL-22 antibodies, and fragments of anti-IL-22 antibodies (see below). The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

15 "Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

20 "Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, may be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising an IL-22 polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (i.e., is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

"Active" or "activity" for the purposes herein refers to form(s) of an IL-22 polypeptide which retain a biological and/or an immunological activity of native or naturally-occurring IL-22, wherein "biological" activity refers to a biological function (either inhibitory or stimulatory) caused by a native or naturally-occurring IL-22 other than the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring IL-22 and an "immunological" activity refers to the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring IL-22. A preferred biological activity is induction of PAP1 expression. PAP1 is a secreted protein related to the REG family of trophic factors and was initially characterized as a protein with elevated expression in pancreatitis (Iovanna et al., (1991) J Biol Chem., 266, 24664-24669). *In vivo* injection of IL-22 resulted in rapid induction of PAP1 expression in pancreas.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native IL-22 polypeptide disclosed herein. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics a biological activity of a native IL-22 polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments or amino acid sequence variants of native IL-22 polypeptides, peptides, antisense oligonucleotides, small organic molecules, etc. Methods for identifying agonists or antagonists of an IL-22 polypeptide may comprise contacting an IL-22 polypeptide with a candidate agonist or antagonist

WO 02/16611

PCT/US01/17443

molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the IL-22 polypeptide.

"Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathologic condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented.

"Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, cats, cattle, horses, sheep, pigs, goats, rabbits, etc. Preferably, the mammal is human.

Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN™, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS™.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')<sub>2</sub> fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1)

WO 02/16611

PCT/US01/17443

of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

5 The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda, based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2.

10 "Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv, see Pluckhahn in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

15 The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (V<sub>H</sub>) connected to a light-chain variable domain (V<sub>L</sub>) in the same polypeptide chain (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

20 An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

30 An antibody that "specifically binds to" or is "specific for" a particular polypeptide or an epitope on a particular polypeptide is one that binds to that particular polypeptide or epitope on a particular polypeptide without substantially binding to any other polypeptide or polypeptide epitope.

35 The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which the antibody of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well of an assay plate; in others it is a purification column (e.g., an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

5

A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as an IL-22 polypeptide or antibody thereto) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

10

A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

An "effective amount" of a polypeptide disclosed herein or an agonist or antagonist thereof is an amount sufficient to carry out a specifically stated purpose. An "effective amount" may be determined empirically and in a routine manner, in relation to the stated purpose.

15

An "activated pancreas" as defined herein is when the digestive enzymes of the pancreas are activated and begin to attack pancreatic tissue.

A "bioactive molecule" is defined herein as a toxin, a radiolabel or an antibody.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1

```

/*
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of BQ
5  * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

10 int _day[26][26] = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ {2,0,-2,0,0,4,1,-1,1,0,-1,-2,-1,0,_M,1,0,-2,1,1,0,0,-6,0,-3,0},
/* B */ {0,3,-4,3,2,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,2,_M,-1,1,0,0,0,-2,-5,0,-3,1,1},
/* C */ {-2,4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2,0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4,0,-2,-2,-8,0,0,-5},
15 /* D */ {0,3,-5,4,3,-6,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,2},
/* E */ {0,2,-5,3,4,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,1,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,3},
/* F */ {-4,-5,-4,-6,-5,9,-5,-2,1,0,-5,2,0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3,0,-1,0,0,7,-5},
/* G */ {1,0,-3,1,0,-5,5,-2,-3,0,-2,-4,-3,0,_M,-1,-1,-3,1,0,0,-1,-7,0,-5,0},
/* H */ {-1,1,-3,1,1,-2,-2,6,-2,0,0,-2,-2,2,_M,0,3,2,-1,-1,0,-2,-3,0,0,2},
20 /* I */ {-1,-2,-2,-2,1,-3,-2,5,0,-2,2,2,-2,_M,-2,-2,-2,-1,0,0,4,-3,0,-1,-2},
/* J */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* K */ {-1,0,-5,0,0,-5,-2,0,-2,0,5,-3,0,1,_M,-1,1,3,0,0,0,-2,-3,0,-4,0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3,2,-4,-2,2,0,3,6,4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1,0,2,-2,0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1},
25 /* N */ {0,2,-4,2,1,-4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0},
/* Q */ {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3},
/* R */ {2,0,-4,-1,-1,-4,-3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0},
30 /* S */ {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0,1},
/* T */ {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0},
/* U */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* V */ {0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,-2,-2,-5,0,-6,17,0,-6},
35 /* X */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* Y */ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,0,10,-4},
/* Z */ {0,1,-5,2,3,-3,0,2,-2,0,0,-2,-1,1,_M,0,3,0,0,0,0,-2,-6,0,-4,4}
};

```

40  
45  
50  
55

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
5
#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jumps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */
10
#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 */
15
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
20
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for delj) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16-1 */

struct diag {
25
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short jmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jumps */
};

30
struct path {
    int spe; /* number of leading spaces */
    short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

35
char *ofile; /* output file name */
char *names[2]; /* seq names; getseq() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqs[2]; /* seqs; getseq() */
40
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
45
int gaps, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngaps, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
50
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();
55
char *getseq(), *g_alloc();

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
5 * usage: prog file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
10 * 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
*/
15 #include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
20 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] = {
25 1, 2((1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A'))), 4, 8, 16, 32, 64,
128, 256, 0x7FFFFFFF, 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'))
);

30 main(ac, av)          main
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
35     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");
40         exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqp[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqp[1] = getseq(namex[1], &len1);
45     xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

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

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

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

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

/* 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
5  * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
10 {
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;   /* keep track of delx */
    int       *trp;         /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;          /* score for each type */
15     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_calloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
25     col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("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;
35         }
        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;
            ndelx = xx;
50         }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
55         }
    }

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

```

```

for (yy = seq[1], yy = 1; yy <= lenk; yy++, 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
   */

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

...HW

```

5      id = xx - yy + len1 - 1;
      if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
          col1[yy] = mis;
      else if (delx >= dely[yy]) {
10         col1[yy] = delx;
          ij = dx[id].ijmp;
          if (dx[id].jp.n[0] &&& (idna || (ndelx >= MAXJMP
          &&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX)) || mis > dx[id].score+DINSO) {
              dx[id].ijmp++;
              if (++ij >= MAXJMP) {
15                 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;
          }
20         else {
              col1[yy] = dely[yy];
              ij = dx[id].ijmp;
              if (dx[id].jp.n[0] &&& (idna || (ndely[yy] >= MAXJMP
              &&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX)) || mis > dx[id].score+DINSO) {
30                 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];
35                 }
            }
            if (xx == len0 &&& yy < len1) {
                /* last col
                 */
45                 if (endgaps)
                    col1[yy] = ins0+ins1*(len1-yy);
                    if (col1[yy] > smax) {
                        smax = col1[yy];
                        dmax = id;
                    }
            }
50         }
            if (endgaps &&& xx < len0)
                col1[yy-1] = ins0+ins1*(len0-xx);
            if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
55         }
            tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
60     }
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);
}

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
5  * 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()
10 * numx() -- 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
 */

15 #include "nw.h"

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

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

25 print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
30         fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, outfile);
        cleanup(1);
    }

    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", names[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", names[1], len1);
35     olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;

    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
40         pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }

    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
45         pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }

    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
50         lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }

    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
55     }

    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

5  /*
   * trace back the best path, count matches
   */
   static
   getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
10  {
       int          firstgap, lastgap;          /* "core" (minus endgaps) */
                                               /* leading trailing overlap */
       int          nm, i0, i1, siz0, siz1;
       char         outx[32];
       double       pct;
15  register char   n0, n1;
       register char *p0, *p1;

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

25  nm = 0;
       while ( *p0 && *p1 ) {
           if (siz0) {
30               p1++;
                   n1++;
                   siz0--;
           }
           else if (siz1) {
                   p0++;
                   n0++;
                   siz1--;
           }
           else {
40               if (xcmp[*p0-'A']&xcmp[*p1-'A'])
                   nm++;
                   if (n0++ == pp[0].n[0])
                       siz0 = pp[0].n[0]++;
                   if (n1++ == pp[1].n[1])
                       siz1 = pp[1].n[1]++;
45               p0++;
                   p1++;
           }
       }

50  /* 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;
55  else
           lx = (lx < ly)? lx : ly;
       pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
       fprintf(stderr, "%d\n", nm);
60  fprintf(stderr, "%d matches in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
           nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

5      fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gaps);
      if (gaps) {
          (void) sprintf(outx, "%d %s",
10             ngaps, (dna)? "base":"residue", (ngaps == 1)? "" : "s");
          fprintf(fx, "%s", outx);

          fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gaps);
15          if (gaps) {
              (void) sprintf(outx, "%d %s",
                  ngaps, (dna)? "base":"residue", (ngaps == 1)? "" : "s");
              fprintf(fx, "%s", outx);
          }
          if (dna)
20             fprintf(fx,
                "u-score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
            else
                fprintf(fx,
25                 "u-score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
            if (endgaps)
                fprintf(fx,
30                 "<endgaps penalized. left endgap: %d %s, right endgap: %d %s\n",
                    firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                    lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
                else
                    fprintf(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 */
35      static nc[2];        /* number at start of current line */
        static ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
        static siz[2];      /* ptr to current element */
        static char *ps[2]; /* ptr to next output char slot */
40      static char out[2][P_LINE]; /* output line */
        static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

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

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

                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                pe[i] = out[i];
60            }

```

pr\_align

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont.)

```

for (nn = mn = 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[j[i]] {
                /* we need to merge all gaps
                * at this location
                */
                siz[i] = pp[i].n[j[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].n[j[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[j[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
        }
        if (++mn == olen || !more && mn) {
            dumpblock();
            for (i = 0; i < 2; i++)
                po[i] = out[i];
            mn = 0;
        }
    }
}
/* dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align
*/
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

dumpblock



WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

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

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

      /* these count from 1:
      * ni[] is current element (from 1)
      * nc[] is number at start of current line
      */
15     for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) puts(*px & 0x7F, fx);
      (void) puts("\n", fx);
}

20 /*
   * put a line of stars (segs always in out[0], out[1]): dumpblock()
   */
25 static
   stars()
   {
       int          i;
       register char *p0, *p1, cx, *px;

30     if (*out[0] || (*out[0] == ' ' && *p0[0] == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *p0[1] == ' '))
           return;
       px = stars;
35     for (i = lmax + P_SPC; i; i--)
           *px++ = ' ';

       for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
           if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
40                 if (xbrn[*p0-'A'] & xbrn[*p1-'A'])
                       cx = '*';
                       nm++;
                   }
                   else if (lma && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
45                         cx = '.';
                   else
                       cx = ' ';
               }
           else
50                 cx = ' ';
           *px++ = cx;
       }
       *px++ = '\n';
55     *px = '\0';
   }

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table J (cont)

```
5  /*  
   * strip path or prefix from pn, return len: pc_align()  
   */  
   static  
   stripname(pn)                               stripname  
10  {  
     char *pn; /* file name (may be path) */  
     register char *px, *py;  
     py = 0;  
     for (px = pn; *px; px++)  
15     if (*px == '/')  
         py = px + 1;  
     if (py)  
         (void) strcpy(pn, py);  
     return(strlen(pn));  
20 }  
  
25  
  
30  
  
35  
  
40  
  
45  
  
50  
  
55  
  
60
```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont')

```

/*
 * cleanup() - cleanup any tmp file
 * getseq() - read in seq, set dna, len, maxlen
5  * g_malloc() - calloc with error checkin
 * readjumps() - get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() - write a filled array of jumps to a tmp file: rw()
 */
10 #include "aw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/hongXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

15 int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long beack();

/*
20 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup()
{
    int i;
    if (fj)
25     (void) unlink(jname);
    exit(0);
}

/*
30 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
35 char *
getseq(file, len)
char *file; /* file name */
int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
40     register char *px, *py;
    int natge, den;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "fs: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    den = natge = 0;
50     while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                den++;
55     }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(den*6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "fs: malloc failed to get %d bytes for %s\n", prog, den*6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
60

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table I (cont')

```

5      py = pseq + 4;
      *len = flen;
      rewind(fp);

      while ((fgets(line, 1024, fp)) {
10         if (*line == '\t' || *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)))
                    natge++;
            }
20         *py++ = '\0';
         *py = '\0';
         (void) fclose(fp);
         dna = natge > (flen/3);
         return(pseq+4);
25     }

char *
g_malloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
30 {
    char *px, *calloc;

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
35         if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
        return(px);
40     }
}

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

50     if (f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
60         }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
            while (1) {
                for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jpx[j] >= xx; j--)

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

```

                    Table 1 (cont.)
...readjumps
5         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;
10    }
    if (j >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
15    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) {
20            /* gap in second seq */
            pp[1].n[i] = -siz;
            xx += siz;
            /* jd = xx - yy + len1 - 1
            */
            pp[1].x[i] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
25            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) {
30            /* gap in first seq */
            pp[0].n[i] = siz;
            pp[0].x[i] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
35            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
40 }
}
}
45 /* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0 = j < i0; j++, i0--) {
50     i = pp[0].n[i]; pp[0].n[i] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[i]; pp[0].x[i] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1 = j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[i]; pp[1].n[i] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
55     i = pp[1].x[i]; pp[1].x[i] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (!f) {
60     (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 1 (cont.)

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nwo
 */
5 writejumps(ix)                                writejumps
{
  int ix;
  {
    char *mktemp0;
10     if (!f) {
        if (mktemp0(issue) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp0 %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
15         if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
20     }
    (void) fwrite((char *)&ds[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&ds[ix].offset, sizeof(ds[ix].offset), 1, fj);
}
25
30
35
40
45
50
55
60
```

WO 02/16611

PCT/US01/17443

**Table 2**

IL-22	XXXXXXXXXXXXXXXX	(Length = 15 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXXXYYYYYY	(Length = 12 amino acids)

5 % amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the IL-22 polypeptide) =

10 5 divided by 15 = 33.3%

**Table 3**

IL-22	XXXXXXXXXX	(Length = 10 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Length = 15 amino acids)

15 % amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the IL-22 polypeptide) =

20 5 divided by 10 = 50%

**Table 4**

IL-22-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Length = 14 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(Length = 16 nucleotides)

25 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the IL-22-DNA nucleic acid sequence) =

30 6 divided by 14 = 42.9%

WO 02/16611

PCT/US01/17443

**Table 5**

IL-22-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 12 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNLLLVV	(Length = 9 nucleotides)

5 % nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the IL-22-DNA nucleic acid sequence) =

10 4 divided by 12 = 33.3%

## II. Compositions and Methods of the Invention

### A. Full-Length IL-22 Polypeptides

15 The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as IL-22 polypeptides. In particular, cDNAs encoding various IL-22 polypeptides have been identified and isolated, as disclosed in further detail in the Examples below. It is noted that proteins produced in separate expression rounds may be given different IL-22 numbers but the UNQ number is unique for any given DNA and the encoded protein, and will not be changed. However, for sake of simplicity, in the present specification the protein encoded by the full length native nucleic acid molecules disclosed herein as well as all further native homologues and variants included in the foregoing definition of IL-22, will be referred to as "IL-22", regardless of their origin or mode of preparation.

20 As disclosed in the Examples below, various cDNA clones have been deposited with the ATCC. The actual nucleotide sequences of those clones can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited clone using routine methods in the art. The predicted amino acid sequence can be determined from the nucleotide sequence using routine skill. For the IL-22 polypeptides and encoding nucleic acids described herein, Applicants have identified what is believed to be the reading frame best identifiable with the sequence information available at the time.

### B. IL-22 Polypeptide Variants

30 In addition to the full-length native sequence IL-22 polypeptides described herein, it is contemplated that IL-22 variants can be prepared. IL-22 variants can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the IL-22 DNA, and/or by synthesis of the desired IL-22 polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the IL-22, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

35 Variations in the native full-length sequence IL-22 or in various domains of the IL-22 described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the IL-22 that results in a change in the amino acid sequence of the IL-22 as compared with

WO 02/16611

PCT/US01/17443

the native sequence IL-22. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the IL-22. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the IL-22 with that of homologous known protein molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, i.e., conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

10 IL-22 polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example, when compared with a full length native protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the IL-22 polypeptide.

15 IL-22 fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating IL-22 fragments by enzymatic digestion, e.g., by treating the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, IL-22 polypeptide fragments share at  
20 least one biological and/or immunological activity with the native IL-22 polypeptide disclosed herein.

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 6 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary substitutions in Table 6, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.  
25

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Table 6

	Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
5	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
10	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; norleucine	leu
15	Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
20	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
25	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

30 Substantial modifications in function or immunological identity of the IL-22 polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- 35 (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;  
 (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;  
 (3) acidic: asp, glu;  
 (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;  
 (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and  
 (6) aromatic: trp, tyr, phe.

40 Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

45 The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, alanine scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, **13**:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, **10**:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells et al., *Gene*, **34**:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, **317**:415 (1986)] or other

WO 02/16611

PCT/US01/17443

known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the IL-22 variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isosteric amino acid can be used.

#### C. Modifications of IL-22

Covalent modifications of IL-22 are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of an IL-22 polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C- terminal residues of the IL-22. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking IL-22 to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-IL-22 antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, e.g., 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimide.

Other modifications include deamidation of glutamyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the  $\alpha$ -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the IL-22 polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence IL-22 (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence IL-22. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the IL-22 polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence IL-22 (for O-linked glycosylation sites). The IL-22 amino acid sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the IL-22 polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the IL-22 polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330

WO 02/16611

PCT/US01/17443

published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the IL-22 polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and by Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981).

5 Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of IL-22 comprises linking the IL-22 polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

10 The IL-22 of the present invention may also be modified in a way to form a chimeric molecule comprising IL-22 fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the IL-22 with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl-terminus of the IL-22. The presence of such epitope-tagged forms of the IL-22 can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the IL-22 to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the fln HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; an  $\alpha$ -tubulin epitope peptide [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the IL-22 with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of an IL-22 polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 1995.

#### D. Preparation of IL-22

15 The description below relates primarily to production of IL-22 by culturing cells transformed or transfected with a vector containing IL-22 nucleic acid. It is, of course, contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare IL-22. For instance, the IL-22 sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart et al., *Solid-Phase Peptide*

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963). *In vitro* protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the IL-22 may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length IL-22.

5 1. Isolation of DNA Encoding IL-22

DNA encoding IL-22 may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the IL-22 mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human IL-22 DNA can be conveniently obtained from a cDNA library prepared from human tissue, such as described in the Examples. The IL-22-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

10 Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the IL-22 or oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding IL-22 is to use PCR methodology [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al.,  
15 PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of radiolabels like <sup>32</sup>P-labeled ATP,  
20 biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook et al., supra.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the  
25 full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook et al., supra, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may not have been reverse-transcribed into cDNA.

30 2. Selection and Transformation of Host Cells

Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for IL-22 production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general,  
35 principles, protocols, and practical techniques for maximizing the productivity of cell cultures can be found in Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook et al., supra.

Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily

WO 02/16611

PCT/US01/17443

skilled artisan, for example, CaCl<sub>2</sub>, CaPO<sub>4</sub>, liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook et al., supra, or electroporation is generally used for prokaryotes. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw et al., Genes, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfections have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) and Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, e.g., polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) and Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 pheA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 pheA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for  $\beta$ -22-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer et al., BioTechnology, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178),

WO 02/16611

PCT/US01/17443

*K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilaram* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., BioTechnology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium*

5 (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Methylotrophic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candido*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list

10 of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated IL-22 are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific

15 examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells/DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the

20 appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

### 3. Selection and Use of a Replicable Vector

The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding IL-22 may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence

25 may be inserted into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

The IL-22 may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the IL-22-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*  $\alpha$ -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April

30

35

WO 02/16611

PCT/US01/17443

1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 $\mu$  plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the IL-22-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the IL-22-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the  $\beta$ -lactamase and lactose promoter systems [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding IL-22.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Fitzerman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Res.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

IL-22 transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

Transcription of a DNA encoding the IL-22 by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin,  $\alpha$ -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the IL-22 coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding IL-22.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis of IL-22 in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantel et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

#### 4. Detecting Gene Amplification/Expression

Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence IL-22 polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to IL-22 DNA and encoding a specific antibody epitope.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

5. Purification of Polypeptide

Forms of IL-22 may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (e.g. Triton-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of IL-22 can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

5 It may be desired to purify IL-22 from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the IL-22. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular IL-22 produced.

E. Uses for IL-22

15 Nucleotide sequences (or their complement) encoding IL-22 have various applications in the art of molecular biology, including uses as hybridization probes, in chromosome and gene mapping and in the generation of anti-sense RNA and DNA. IL-22 nucleic acid will also be useful for the preparation of IL-22 polypeptides by the recombinant techniques described herein.

The full-length native sequence IL-22 gene, or portions thereof, may be used as hybridization probes for a cDNA library to isolate the full-length IL-22 cDNA or to isolate still other cDNAs (for instance, those encoding naturally-occurring variants of IL-22 or IL-22 from other species) which have a desired sequence identity to the native IL-22 sequence disclosed herein. Optionally, the length of the probes will be about 20 to about 50 bases. The hybridization probes may be derived from at least partially novel regions of the full length native nucleotide sequence wherein those regions may be determined without undue experimentation or from genomic sequences including promoters, enhancer elements and introns of native sequence IL-22. By way of example, a screening method will comprise isolating the coding region of the IL-22 gene using the known DNA sequence to synthesize a selected probe of about 40 bases. Hybridization probes may be labeled by a variety of labels, including radionucleotides such as <sup>32</sup>P or <sup>35</sup>S, or enzymatic labels such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems. Labeled probes having a sequence complementary to that of the IL-22 gene of the present invention can be used to screen libraries of human cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of such libraries the probe hybridizes to. Hybridization techniques are described in further detail in the Examples below.

Any EST sequences disclosed in the present application may similarly be employed as probes, using the methods disclosed herein.

35 Other useful fragments of the IL-22 nucleic acids include antisense or sense oligonucleotides comprising a single-stranded nucleic acid sequence (either RNA or DNA) capable of binding to target IL-22 mRNA (sense) or IL-22 DNA (antisense) sequences. Antisense or sense oligonucleotides, according to the present invention, comprise a fragment of the coding region of IL-22 DNA. Such a fragment generally comprises at least about 14 nucleotides,

WO 02/16611

PCT/US01/17443

preferably from about 14 to 30 nucleotides. The ability to derive an antisense or a sense oligonucleotide, based upon a cDNA sequence encoding a given protein is described in, for example, Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) and van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988).

5 Binding of antisense or sense oligonucleotides to target nucleic acid sequences results in the formation of duplexes that block transcription or translation of the target sequence by one of several means, including enhanced degradation of the duplexes, premature termination of transcription or translation, or by other means. The antisense oligonucleotides thus may be used to block expression of IL-2 proteins. Antisense or sense oligonucleotides further comprise oligonucleotides having modified sugar-phosphodiester backbones (or other sugar linkages, such as those described in WO 91/06629) and wherein such sugar linkages are resistant to endogenous nucleases. Such oligonucleotides with resistant sugar linkages are stable *in vivo* (i.e., capable of resisting enzymatic degradation) but retain sequence specificity to be able to bind to target nucleotide sequences.

10 Other examples of sense or antisense oligonucleotides include those oligonucleotides which are covalently linked to organic moieties, such as those described in WO 90/10048, and other moieties that increases affinity of the oligonucleotide for a target nucleic acid sequence, such as poly-(L-lysine). Further still, intercalating agents, such as ellipticine, and alkylating agents or metal complexes may be attached to sense or antisense oligonucleotides to modify binding specificities of the antisense or sense oligonucleotide for the target nucleotide sequence.

15 Antisense or sense oligonucleotides may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by any gene transfer method, including, for example, CaPO<sub>4</sub>-mediated DNA transfection, electroporation, or by using gene transfer vectors such as Epstein-Barr virus. In a preferred procedure, an antisense or sense oligonucleotide is inserted into a suitable retroviral vector. A cell containing the target nucleic acid sequence is contacted with the recombinant retroviral vector, either *in vivo* or *ex vivo*. Suitable retroviral vectors include, but are not limited to, those derived from the murine retrovirus M-MuLV, N2 (a retrovirus derived from M-MuLV), or the double copy vectors designated DCTS<sub>A</sub>, DCTS<sub>B</sub> and DCTS<sub>C</sub> (see WO 90/13641).

20 Sense or antisense oligonucleotides also may be introduced into a cell containing the target nucleotide sequence by formation of a conjugate with a ligand binding molecule, as described in WO 91/04753. Suitable ligand binding molecules include, but are not limited to, cell surface receptors, growth factors, other cytokines, or other ligands that bind to cell surface receptors. Preferably, conjugation of the ligand binding molecule does not substantially interfere with the ability of the ligand binding molecule to bind to its corresponding molecule or receptor, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

25 Alternatively, a sense or an antisense oligonucleotide may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by formation of an oligonucleotide-lipid complex, as described in WO 90/10448. The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

30 Antisense or sense RNA or DNA molecules are generally at least about 5 bases in length, about 10 bases in length, about 15 bases in length, about 20 bases in length, about 25 bases in length, about 30 bases in length, about 35 bases in length, about 40 bases in length, about 45 bases in length, about 50 bases in length, about 55 bases in length, about 60 bases in length, about 65 bases in length, about 70 bases in length, about 75 bases in length, about 80 bases in length, about 85 bases in length, about 90 bases in length, about 95 bases in length, about 100 bases in length, or more.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

The probes may also be employed in PCR techniques to generate a pool of sequences for identification of closely related IL-22 coding sequences.

Nucleotide sequences encoding an IL-22 can also be used to construct hybridization probes for mapping the gene which encodes that IL-22 and for the genetic analysis of individuals with genetic disorders. The nucleotide sequences provided herein may be mapped to a chromosome and specific regions of a chromosome using known techniques, such as *in situ* hybridization, linkage analysis against known chromosomal markers, and hybridization screening with libraries.

When the coding sequences for IL-22 encode a protein which binds to another protein (example, where the IL-22 is a receptor), the IL-22 can be used in assays to identify the other proteins or molecules involved in the binding interaction. By such methods, inhibitors of the receptor/ligand binding interaction can be identified. Proteins involved in such binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction. Also, the receptor IL-22 can be used to isolate correlative ligand(s). Screening assays can be designed to find lead compounds that mimic the biological activity of a native IL-22 or a receptor for IL-22. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic compounds. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and cell based assays, which are well characterized in the art.

Nucleic acids which encode IL-22 or its modified forms can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, cDNA encoding IL-22 can be used to clone genomic DNA encoding IL-22 in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding IL-22. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for IL-22 transgene incorporation with tissue-specific enhancers. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding IL-22 introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding IL-22. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression. In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the pathological condition, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the pathological condition.

Alternatively, non-human homologues of IL-22 can be used to construct an IL-22 "knock out" animal which has a defective or altered gene encoding IL-22 as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding IL-22 and altered genomic DNA encoding IL-22 introduced into an embryonic stem cell of the animal. For example, cDNA encoding IL-22 can be used to clone genomic DNA encoding IL-22 in accordance with

WO 02/16611

PCT/US01/17443

established techniques. A portion of the genomic DNA encoding IL-22 can be deleted or replaced with another gene, such as a gene encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see e.g., Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined with the endogenous DNA are selected [see e.g., Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras [see e.g., Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance, for their ability to defend against certain pathological conditions and for their development of pathological conditions due to absence of the IL-22 polypeptide.

Nucleic acid encoding the IL-22 polypeptides may also be used in gene therapy. In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve *in vivo* synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA. Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes *in vivo*. It has already been shown that short antisense oligonucleotides can be imported into cells where they act as inhibitors, despite their low intracellular concentrations caused by their restricted uptake by the cell membrane. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). The oligonucleotides can be modified to enhance their uptake, e.g. by substituting their negatively charged phosphodiester groups by uncharged groups.

There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. The currently preferred *in vivo* gene transfer techniques include transfection with viral (typically retroviral) vectors and viral coat protein-liposome mediated transfection (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g. capsid proteins or fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu et al., J. Biol. Chem., 262, 4429-4432 (1987); and Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). For review of gene marking and gene therapy protocols see Anderson et al.,

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Science 256, 808-813 (1992).

The IL-22 polypeptides described herein may also be employed as molecular weight markers for protein electrophoresis purposes and the isolated nucleic acid sequences may be used for recombinantly expressing those markers.

5 The nucleic acid molecules encoding the IL-22 polypeptides or fragments thereof described herein are useful for chromosome identification. In this regard, there exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since relatively few chromosome marking reagents, based upon actual sequence data are presently available. Each IL-22 nucleic acid molecule of the present invention can be used as a chromosome marker.

10 The IL-22 polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may also be used diagnostically for tissue typing, wherein the IL-22 polypeptides of the present invention may be differentially expressed in one tissue as compared to another, preferably in a diseased tissue as compared to a normal tissue of the same tissue type. IL-22 nucleic acid molecules will find use for generating probes for PCR, Northern analysis, Southern analysis and Western analysis.

15 The IL-22 polypeptides described herein may also be employed as therapeutic agents. The IL-22 polypeptides of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the IL-22 product thereof is combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Therapeutic formulations are prepared for storage by mixing the active ingredient having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations 20 employed, and include buffers such as phosphate, citrate and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone, amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> or PEG.

25 The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution.

Therapeutic compositions herein generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

30 The route of administration is in accord with known methods, e.g. injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial or intralesional routes, topical administration, or by sustained release systems.

Dosages and desired drug concentrations of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill of an ordinary physician. Animal experiments provide reliable guidance for the determination of effective doses for human therapy. Interspecies scaling of effective doses can be performed following the principles laid down by Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

When *in vivo* administration of an IL-22 polypeptide or agonist or antagonist thereof is employed, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 µg/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is anticipated that different formulations will be effective for different treatment compounds and different disorders, that administration targeting one organ or tissue, for example, may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue.

Where sustained-release administration of an IL-22 polypeptide is desired in a formulation with release characteristics suitable for the treatment of any disease or disorder requiring administration of the IL-22 polypeptide, microencapsulation of the IL-22 polypeptide is contemplated. Microencapsulation of recombinant proteins for sustained release has been successfully performed with human growth hormone (rhGH), interferon- (rhIFN- ), interleukin-2, and MN rgp120. Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Poly(lactide Polyglycolide) Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010.

The sustained-release formulations of these proteins were developed using poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) polymer due to its biocompatibility and wide range of biodegradable properties. The degradation products of PLGA, lactic and glycolic acids, can be cleared quickly within the human body. Moreover, the degradability of this polymer can be adjusted from months to years depending on its molecular weight and composition. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

This invention encompasses methods of screening compounds to identify those that mimic the IL-22 polypeptide (agonists) or prevent the effect of the IL-22 polypeptide (antagonists). Screening assays for antagonist drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the IL-22 polypeptides encoded by the genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates.

The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays, and cell-based assays, which are well characterized in the art.

All assays for antagonists are common in that they call for contacting the drug candidate with an IL-22 polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the IL-22 polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, e.g., on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the IL-22

WO 02/16611

PCT/US01/17443

polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, e.g., a monoclonal antibody, specific for the IL-22 polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized component, e.g., the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, e.g., by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

5  
10  
15  
20  
25  
If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular IL-22 polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays include traditional approaches, such as, e.g., cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers (Fields and Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Many transcriptional activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, the other one functioning as the transcription-activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL1-*lacZ* reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for  $\beta$ -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKER<sup>TM</sup>) for identifying protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

30  
35  
Compounds that interfere with the interaction of a gene encoding an IL-22 polypeptide identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the product of the gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a candidate compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the interaction of the test compound and its reaction partner.

To assay for antagonists, the IL-22 polypeptide may be added to a cell along with the compound to be screened for a particular activity and the ability of the compound to inhibit the activity of interest in the presence of the IL-22 polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the IL-22 polypeptide. Alternatively,

WO 02/16611

PCT/US01/17443

antagonists may be detected by combining the IL-22 polypeptide and a potential antagonist with membrane-bound IL-22 polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The IL-22 polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of IL-22 polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the IL-22 polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not responsive to the IL-22 polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to labeled IL-22 polypeptide. The IL-22 polypeptide can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

As an alternative approach for receptor identification, labeled IL-22 polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro-sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the gene encoding the putative receptor.

In another assay for antagonists, mammalian cells or a membrane preparation expressing the receptor would be incubated with labeled IL-22 polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

More specific examples of potential antagonists include an oligonucleotide that binds to the fusions of immunoglobulin with IL-22 polypeptide, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the IL-22 polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby competitively inhibiting the action of the IL-22 polypeptide.

Another potential IL-22 polypeptide antagonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide sequence, which encodes the mature IL-22 polypeptides herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:

WO 02/16611

PCT/US01/17443

456 (1988); Dervan et al., *Science*, 251:1360 (1991)), thereby preventing transcription and the production of the IL-22 polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and blocks translation of the mRNA molecule into the IL-22 polypeptide (antisense-Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit

5 production of the IL-22 polypeptide. When antisense DNA is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the IL-22 polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the

10 IL-22 polypeptide. Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further

15 details see, e.g., Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or

20 pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

Diagnostic and therapeutic uses of the herein disclosed molecules may also be based upon the positive functional assay hits disclosed and described below.

25 F. Anti-IL-22 Antibodies

The present invention further provides anti-IL-22 antibodies. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies.

1. Polyclonal Antibodies

The anti-IL-22 antibodies may comprise polyclonal antibodies. Methods of preparing polyclonal antibodies

30 are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the IL-22 polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins

35 include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be

WO 02/16611

PCT/US01/17443

selected by one skilled in the art without undue experimentation.

2. Monoclonal Antibodies

The anti-IL-22 antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the IL-22 polypeptide or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against IL-22. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods [Goding, supra]. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences [U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., supra] or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

*In vitro* methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly, Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

### 3. Human and Humanized Antibodies

The anti-IL-22 antibodies of the invention may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino

WO 02/16611

PCT/US01/17443

acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. The techniques of Cole et al. and Boerner et al. are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)). Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks et al., *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

The antibodies may also be affinity matured using known selection and/or mutagenesis methods as described above. Preferred affinity matured antibodies have an affinity which is five times, more preferably 10 times, even more preferably 20 or 30 times greater than the starting antibody (generally murine, humanized or human) from which the matured antibody is prepared.

#### 4. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the IL-22, the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities [Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first

WO 02/16611

PCT/US01/17443

heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

5 According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

10 Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. Fab')<sub>2</sub> bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')<sub>2</sub> fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

15 Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')<sub>2</sub> molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

20 Various technique for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V<sub>H</sub>) connected to a light-chain variable domain (V<sub>L</sub>) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of one fragment are forced to pair with the complementary V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains

WO 02/16611

PCT/US01/17443

of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Grüber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

5 Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given IL-22 polypeptide herein. Alternatively, an anti-IL-22 polypeptide arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell  
10 expressing the particular IL-22 polypeptide. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular IL-22 polypeptide. These antibodies possess a IL-22-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the IL-22 polypeptide and further binds tissue factor (TF).

5. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies  
15 are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable  
20 reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

6. Effector Function Engineering

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to  
25 enhance, e.g., the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.*, Cancer Research, 53: 2560-2565  
30 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

7. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent  
35 such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active

WO 02/16611

PCT/US01/17443

fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , and  $^{186}\text{Re}$ . Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridylthiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyl-diethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionucleotide).

#### 8. Immunoliposomes

The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

#### 9. Pharmaceutical Compositions of Antibodies

Antibodies specifically binding an IL-22 polypeptide identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of various disorders in the form of pharmaceutical compositions.

If the IL-22 polypeptide is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody,

WO 02/16611

PCT/US01/17443

peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, e.g., Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 7889-7893 (1993).

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and  $\gamma$  ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUJIL-22N DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

#### G. Uses for anti-IL-22 Antibodies

The anti-IL-22 antibodies of the invention have various utilities. For example, anti-IL-22 antibodies may be used in diagnostic assays for IL-22, e.g., detecting its expression (and in some cases, differential expression) in specific cells, tissues, or serum. Various diagnostic assay techniques known in the art may be used, such as competitive binding assays, direct or indirect sandwich assays and immunoprecipitation assays conducted in either heterogeneous or homogeneous phases [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. The antibodies used in the diagnostic assays can be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety should be capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the

WO 02/16611

PCT/US01/17443

detectable moiety may be a radioisotope, such as  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , or  $^{125}\text{I}$ , a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin, or an enzyme, such as alkaline phosphatase, beta-galactosidase or horseradish peroxidase. Any method known in the art for conjugating the antibody to the detectable moiety may be employed, including those methods described by Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407 (1982).

Anti-IL-22 antibodies also are useful for the affinity purification of IL-22 from recombinant cell culture or natural sources. In this process, the antibodies against IL-22 are immobilized on a suitable support, such as Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized antibody then is contacted with a sample containing the IL-22 to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the IL-22, which is bound to the immobilized antibody. Finally, the support is washed with another suitable solvent that will release the IL-22 from the antibody. Anti-IL-22 antibodies also find use in binding to IL-22 and thereby inhibiting PAP1 expression, may alleviate the severity of pancreatic disorders.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

#### EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

##### EXAMPLE 1: Cloning of IL-22

Interleukin-22 (DNA125185-2806) was identified by applying a proprietary signal sequence finding algorithm developed by Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) upon ESTs as well as clustered and assembled EST fragments from public (e.g., GenBank) and/or private (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA) databases. The signal sequence algorithm computes a secretion signal score based on the character of the DNA nucleotides surrounding the first and optionally the second methionine codon(s) (ATG) at the 5'-end of the sequence or sequence fragment under consideration. The nucleotides following the first ATG must code for at least 35 unambiguous amino acids without any stop codons. If the first ATG has the required amino acids, the second is not examined. If neither meets the requirement, the candidate sequence is not scored. In order to determine whether the EST sequence contains an authentic signal sequence, the DNA and corresponding amino acid sequences surrounding the ATG codon are scored using a set of seven sensors (evaluation parameters) known to be associated with secretion signals.

Use of the above described signal sequence algorithm allowed identification of an EST cluster sequence from the Incyte database, designated herein as 5086173H1. This EST cluster sequence was then compared to a

WO 02/16611

PCT/US01/17443

variety of expressed sequence tag (EST) databases which included public EST databases (e.g., GenBank) and a proprietary EST DNA database (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) to identify existing homologies. The homology search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). Those comparisons resulting in a BLAST score of 70 (or in some cases 90) or greater that did not encode known proteins were clustered and assembled into a consensus DNA sequence with the program "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). The consensus sequence obtained therefrom is herein designated DNA110880.

In light of an observed sequence homology between the DNA110880 sequence and an EST sequence encompassed within clone no. 5088384 from the Incyte database, clone no. 5088384 was purchased and the cDNA insert was obtained and sequenced. It was found herein that that cDNA insert encoded a full-length protein. The sequence of this cDNA insert is shown in Figure 1 and is herein designated as IL-22 (DNA125185-2806).

Clone DNA125185-2806 contains a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 58-60 and ending at the stop codon at nucleotide positions 595-597 (Figure 1, SEQ ID NO 1). The predicted polypeptide precursor is 179 amino acids long (Figure 2, SEQ ID NO: 2). The full-length IL-22 protein shown in Figure 2 has an estimated molecular weight of about 20,011 daltons and a pI of about 8.10. Analysis of the full-length IL-22 sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figure 2, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. IL-22 (DNA125185-2806) has been deposited with ATCC on December 7, 1999 and is assigned ATCC deposit No. PTA-1031.

#### 20 EXAMPLE 2: Identification of Receptor/Ligand Interactions

In this assay, various IL-22 polypeptides are tested for ability to bind to a panel of potential receptor or ligand molecules for the purpose of identifying receptor/ligand interactions. The identification of a ligand for a known receptor, a receptor for a known ligand or a novel receptor/ligand pair is useful for a variety of indications including, for example, targeting bioactive molecules (linked to the ligand or receptor) to a cell known to express the receptor or ligand, use of the receptor or ligand as a reagent to detect the presence of the ligand or receptor in a composition suspected of containing the same, wherein the composition may comprise cells suspected of expressing the ligand or receptor, modulating the growth of or another biological or immunological activity of a cell known to express or respond to the receptor or ligand, modulating the immune response of cells or toward cells that express the receptor or ligand, allowing the preparation of agonists, antagonists and/or antibodies directed against the receptor or ligand which will modulate the growth of or a biological or immunological activity of a cell expressing the receptor or ligand, and various other indications which will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan.

The assay is performed as follows. An IL-22 polypeptide of the present invention suspected of being a ligand for a receptor is expressed as a fusion protein containing the Fc domain of human IgG (an immunoadhesin). Receptor-ligand binding is detected by allowing interaction of the immunoadhesin polypeptide with cells (e.g. Cos cells) expressing candidate IL-22 polypeptide receptors and visualization of bound immunoadhesin with fluorescent reagents directed toward the Fc fusion domain and examination by microscope. Cells expressing candidate receptors are produced by transient transfection, in parallel, of defined subsets of a library of cDNA expression vectors

WO 02/16611

PCT/US01/17443

encoding IL-22 polypeptides that may function as receptor molecules. Cells are then incubated for 1 hour in the presence of the IL-22 polypeptide immunoadhesin being tested for possible receptor binding. The cells are then washed and fixed with paraformaldehyde. The cells are then incubated with fluorescent conjugated antibody directed against the Fc portion of the IL-22 polypeptide immunoadhesin (e.g. FITC conjugated goat anti-human-Fc antibody). The cells are then washed again and examined by microscope. A positive interaction is judged by the presence of fluorescent labeling of cells transfected with cDNA encoding a particular IL-22 polypeptide receptor or pool of receptors and an absence of similar fluorescent labeling of similarly prepared cells that have been transfected with other cDNA or pools of cDNA. If a defined pool of cDNA expression vectors is judged to be positive for interaction with a IL-22 polypeptide immunoadhesin, the individual cDNA species that comprise the pool are tested individually (the pool is "broken down") to determine the specific cDNA that encodes a receptor able to interact with the IL-22 polypeptide immunoadhesin.

In another embodiment of this assay, an epitope-tagged potential ligand IL-22 polypeptide (e.g. 8 histidine "His" tag) is allowed to interact with a panel of potential receptor IL-22 polypeptide molecules that have been expressed as fusions with the Fc domain of human IgG (immunoadhesins). Following a 1 hour co-incubation with the epitope tagged IL-22 polypeptide, the candidate receptors are each immunoprecipitated with protein A beads and the beads are washed. Potential ligand interaction is determined by western blot analysis of the immunoprecipitated complexes with antibody directed towards the epitope tag. An interaction is judged to occur if a band of the anticipated molecular weight of the epitope tagged protein is observed in the western blot analysis with a candidate receptor, but is not observed to occur with the other members of the panel of potential receptors.

Using these assays, the following receptor/ligand interactions have been herein identified:

1. IL-22 binds to IL-10R $\beta$ . Figure 10 (SEQ ID NO: 3)
  2. IL-22 binds to IL-22R Figure 11 (SEQ ID NO: 4)
- (See also [Xie et al., J. Biol. Chem (2000) 275, 31335-31339] )

**EXAMPLE 3: Expression of IL-22 receptor in multiple human tissues.**

Multiple tissue Northern Blots were obtained from Clontech (Palo Alto, CA). These blots were hybridized with a probe made by end labeling a 50-mer IL-22 receptor specific oligonucleotide using <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP and T4 polynucleotide kinase. Blots were washed 3X with 2XSSC/0.2%SDS and 1X with 0.2XSSC/0.1%SDS at 42 C. The blots were then exposed to X-OMAT film with intensifying screens for 16 hours. The result is shown in Figure 3. This shows that IL-22 receptor is expressed highly in pancreas, with lower level of IL-22 receptor observed in small intestine, liver, kidney and colon.

**EXAMPLE 4: Taqman™ analysis**

Total RNA was obtained by homogenizing tissues in lysis buffer and layering the lysate over cesium chloride (5.7 M CsCl/50 mM EDTA.) and centrifugation at 35,000 X g for 16 hours. The cell pellets were then resuspended in RNase free water. 50 nanograms of RNA was then used to perform Taqman™ analysis. The value of expression was set relative to a housekeeping gene GAPDH.

The TaqMan™ reaction is a fluorescent PCR-based technique which makes use of the 5' exonuclease

WO 02/16611

PCT/US01/17443

activity of Taq DNA polymerase enzyme to monitor amplification in real time. Two oligonucleotide primers are used to generate an amplicon typical of a PCR reaction. A third oligonucleotide, or probe, is designed to detect nucleotide sequence located between the two PCR primers. The probe is non-extendible by Taq DNA polymerase enzyme, and is labeled with a reporter fluorescent dye and a quencher fluorescent dye. Any laser-induced emission from the reporter dye is quenched by the quenching dye when the two dyes are located close together as they are on the probe. During the amplification reaction, the Taq DNA polymerase enzyme cleaves the probe in a template-dependent manner. The resultant probe fragments disassociate in solution, and signal from the released reporter dye is free from the quenching effect of the second fluorophore. One molecule of reporter dye is liberated for each new molecule synthesized, and detection of the unquenched reporter dye provides the basis for quantitative interpretation of the data.

The results of the TaqMan™ reaction are reported in delta ( $\Delta$ ) Ct units. TaqMan™ assay data are initially expressed as Ct, or the threshold cycle. This is defined as the cycle at which the reporter signal accumulates above the background level of fluorescence. The  $\Delta$ Ct values are used as quantitative measurement of the relative number of starting copies of a particular target sequence in a nucleic acid sample when comparing cancer results to normal human results. One unit corresponds to 1 PCR cycle or approximately a 2-fold amplification relative to normal, two units corresponds to 4-fold, 3 units to 8-fold amplification and so on. Quantitation was obtained using primers and a TaqMan™ fluorescent probe derived from the IL-22 receptor (IL-22R) encoding gene. Regions of IL-22R which are most likely to contain unique nucleic acid sequences and which are least likely to have spliced out introns are preferred for the primer and probe derivation, e.g., 3'-untranslated regions. The sequences for the primers and probes (forward, reverse and probe) used for the IL-22R gene amplification analysis were as follows:

165608.tm.f1(forward primer)  
5'TGCAACCTGACGGTGGAGA 3' (SEQ ID NO: 5)

165608.tm.r1(reverse primer)  
5'AGAGAGCTGAACCTGTCAATCTT 3' (SEQ ID NO: 6)

165608.tm.p1(probe)  
5' CAGTGC GGAGGCCGGTCA 3' (SEQ ID NO: 7)

The TaqMan™ procedure is run on a real-time quantitative PCR device such as the ABI Prism 7700™. The system consists of a thermocycler, laser, charge-coupled device (CCD) camera and computer. The system amplifies samples in a 96-well format on a thermocycler. During amplification, laser-induced fluorescent signal is collected in real-time through fiber optics cables for all 96 wells, and detected at the CCD. The system includes software for running the instrument and for analyzing the data.

The fluorometrically determined concentration of mRNA was then used to dilute each sample to 10 ng/ $\mu$ l in ddH<sub>2</sub>O. This was done simultaneously on all template samples for a single TaqMan™ plate assay, and with enough material to run several assays. The samples were tested in triplicate with Taqman™ primers and probe both B-actin

WO 02/16611

PCT/US01/17443

and GAPDH on a single plate with normal human mRNA, no Reverse Transcriptase added and no-temple controls. The reverse transcriptase used was SuperScript II (Life Technologies Inc., Grand Island, NY). The Taq Polymerase, Buffers, and dNTPs were supplied by Perkin Elmer (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA). The thermocycler conditions were as follows.

- 5
- |    |               |                       |       |            |
|----|---------------|-----------------------|-------|------------|
| a. | 1 cycle of:   | Reverse transcription | 48°C, | 30 minutes |
| b. | 1 cycle of:   | Denature              | 95°C, | 10 minutes |
| c. | 40 cycles of: | Denature              | 95°C, | 30 seconds |
|    |               | Extend                | 60°C, | 90 seconds |

10 Results:

The results of this are shown in Figure 4. Interleukin-22 receptor was expressed highest in pancreas, with expression detected in fetal liver, adult liver, kidney, intestine and colon.

EXAMPLE 5: STAT activation in pancreatic acinar cells.

15 266-6 is a cell line derived from mouse pancreatic acinar cells and was obtained from ATCC (ATCC deposit No. CRL-2151). These cells were cultured in DMEM supplemented with 10%FBS penicillin/streptomycin and 2mM L-glutamine (Life Technologies Gaithersburg, MD) and maintained in 5% CO<sub>2</sub> humidified chamber. 266-6 cells were stimulated with control of his-tagged mouse IL-22 containing baculovirus supernatant (10% vol/vol) for 10 minutes at 37 °C. Cell lysates were prepared and gel shift assays were performed. Antibodies used for STAT  
20 supershift experiments were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). STAT binding proteins induced by murine IL-22 could be supershifted with antibodies to STAT 3, as shown in Figure 5. This demonstrates that the pancreatic acinar cell line 266-6 responds to murine IL-22 by activation of the Janus Kinase (JAK-STAT) pathway, and through STAT3 specifically. The pancreatic beta cell line (NIT-1), does not utilize the JAK-STAT pathway (data not shown).

25

EXAMPLE 6: IL-22 increases expression of Pancreatitis Associated Protein (PAP1).

Pancreatitis Associated Protein (PAP1) is a secreted protein and is overexpressed in acute pancreatitis, with expression levels almost completely absent in normal pancreas [Iovanna et al., J Biol Chem.(1991), 266, 24664-24669]. The exact function of PAP1 is unknown, although it is structurally related to the carbohydrate recognition domain of c-type lectins and is a member of the REG family of molecules. Reports have suggested trophic activities for members of the REG family [Nishimune et al., (2000) Nat Cell Biol 2(12), 906-14]. Induction of PAP1 with other cytokines have such as IL-1 or IL-6 either alone or in combination failed to upregulate PAP1 [Dusetti et al., (1995) J. Biol Chem 270, 22417-22421]. Increased serum levels of PAP1 is seen in patients with Celiac disease, [Carroccio et al., (1997) Digestion 58, 98-103] a small bowel disorder, and in patients with cystic fibrosis [Iovanna et al., (1994) C.R. Acad. Sci 317, 561-564].

35

266-6 cells were treated with purified his-tagged murine IL-22 for 6 hours. Total RNA was extracted by homogenizing cells in lysis buffer and layering the cell lysates of cesium chloride (5.7 M CsCl/ 50 mM EDTA ). The cell lysates were centrifuged at 35,000X g for 16 hours. The cell pellets were resuspended in RNase free water. 20 microgram of RNA was resolved using a formaldehyde denaturing gel and transferred on to nitrocellulose

WO 02/16611

PCT/US01/17443

membranes. Hybridization was performed using a PAPI-specific <sup>32</sup>P-γ-ATP labeled oligonucleotide probe. Blots were washed 3X with 2XSSC/0.2% SDS and 1X with 0.2XSSC/0.1% SDS at 42 °C. Blots were exposed to X-OMAT film with intensifying screens for 16 hours. The blots were then stripped and reprobed using a <sup>32</sup>P-γ-ATP labeled GAPDH specific oligonucleotide probe. This result is shown in Figure 6A. Incubation of the 266-6 cells with murine IL-22 resulted in dramatic induction of PAPI gene expression. To determine if primary pancreatic acinar cells are also

5 able to respond to murine IL-22, primary acinar cells were isolated from mouse pancreas by collagenase digestion and incubated for 6 hours with or without purified murine IL-22. RNA was prepared as above and PAPI expression was examined. As with the 266-6 cell line, murine IL-22 induced substantial upregulation of PAPI expression in the isolated primary pancreatic acinar cells.

10 EXAMPLE 7: IL-22 induces PAPI gene expression in vivo.

In order to examine the effects of murine IL-22 *in vivo*, three groups of mice were injected intraperitoneally with 25 micrograms murine IL-22 or PBS. The mice were harvested at 2, 6 or 24 hours following injection, and their pancreas removed and quick frozen. RNA from this tissue was prepared and Northern Blotting analysis as described in Example 5 was performed using a PAPI gene specific probe. As shown in Figure 7, PAPI was upregulated within

15 2 hours of murine IL-22 injection, reaching a peak expression at about 6 hours, and was still induced at 24 hours.

EXAMPLE 8: IL-22 pancreatic response.

To confirm that the observed pancreas response was due to IL-22 receptor mediated signaling rather than a non-specific toxicity of the recombinant protein, mIL-22 was injected into IL-10Rβ (-/-) deficient mice. These mice lack one functional chain of the IL-10Rβ/IL-22R complex for IL-22 signaling. IL-10Rβ deficient mice were previously reported to lack responsiveness to IL-10. Splenic monocytes isolated from IL-10Rβ deficient mice do not exhibit IL-10 mediated inhibition of lipopolysaccharide (LPS) induced IL-6 secretion (Figure 8) or TNF-alpha (not shown). As had been noted previously, IL-22 does not appear to effect monocyte response to LPS (Xie et al., (2000) J. Biol. Chem., 275, 31335-31339). IL-22 does not appear to effect monocyte response to LPS.

20

25

EXAMPLE 9: IL-22 response in IL-10Rβ deficient mice.

Mice that are deficient or "knocked out" for IL-10Rβ, lack one functional chain of the IL-22R/IL-10Rβ receptor complex necessary for IL-22 signaling, and IL-10Rβ deficient mice were previously reported to lack IL-10 responsiveness. IL-10Rβ deficient mice and wild type mice were injected intraperitoneally with or without murine IL-22 and harvested 16 hours post injection and Northern Blot analysis performed on pancreatic RNA using PAPI probes as previously described. As the IL-10Rβ mice lack one of the chains necessary to transduce an intracellular signal, no induction of PAPI was evident shown in Figure 9. In contrast, wild type mice showed a strong induction of PAPI expression also shown in Figure 9.

30

35 EXAMPLE 10: Use of IL-22 as a hybridization probe

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding IL-22 as a hybridization probe. DNA comprising the coding sequence of full-length or mature IL-22 as disclosed herein is employed as a

WO 02/16611

PCT/US01/17443

probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of IL-22) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.

Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled IL-22-derived probe to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence IL-22 can then be identified using standard techniques known in the art.

10 EXAMPLE 11: Expression of IL-22 in *E. coli*

This example illustrates preparation of an unglycosylated form of IL-22 by recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding IL-22 is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a *trp* promoter, a polyhis leader (including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase cleavage site), the IL-22 coding region, lambda transcriptional terminator, and an *argU* gene.

The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook et al., supra. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized IL-22 protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

IL-22 may be expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA encoding IL-22 is initially amplified using selected PCR primers. The primers will contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by

WO 02/16611

PCT/US01/17443

mixing 3.57 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.71 g sodium citrate $\cdot$ 2H $_2$ O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM  $\text{MgSO}_4$  and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

5 *E. coli* paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitolization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole. Fractions containing the desired protein are pooled and stored at 4°C. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

15 The proteins are refolded by diluting the sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution is stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution is filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros RI/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin from the samples.

25 Fractions containing the desired folded IL-22 polypeptide are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM Hepes, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

30 Many of the IL-22 polypeptides disclosed herein were successfully expressed as described above.

#### EXAMPLE 12: Expression of IL-22 in mammalian cells

35 This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of IL-22 by recombinant expression in mammalian cells.

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Optionally, the IL-22 DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the IL-22 DNA using ligation methods such as described in Sambrook et al., supra. The resulting vector is called pRK5-IL-22.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 µg pRK5-IL-22 DNA is mixed with about 1 µg DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya et al., Cell, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 µl of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl<sub>2</sub>. To this mixture is added, dropwise, 500 µl of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO<sub>4</sub>, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-cysteine and 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of IL-22 polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

In an alternative technique, IL-22 may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Sompariyac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 µg pRK5-IL-22 DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 µg/ml bovine insulin and 0.1 µg/ml bovine transferrin. After about four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed IL-22 can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

In another embodiment, IL-22 can be expressed in CHO cells. The pRK5-IL-22 can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO<sub>4</sub> or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as <sup>35</sup>S-methionine. After determining the presence of IL-22 polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed IL-22 can then be concentrated and purified by any selected method.

Epitope-tagged IL-22 may also be expressed in host CHO cells. The IL-22 may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged IL-22 insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged IL-22 can then be concentrated

WO 02/16611

PCT/US01/17443

and purified by any selected method, such as by  $\text{Ni}^{2+}$ -chelate affinity chromatography.

IL-22 may also be expressed in CHO and/or COS cells by a transient expression procedure or in CHO cells by another stable expression procedure.

5 Stable expression in CHO cells is performed using the following procedure. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (e.g. extracellular domains) of the respective proteins are fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or is a poly-His tagged form.

10 Following PCR amplification, the respective DNAs are subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA's. The vector used expression in CHO cells is as described in Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

15 Twelve micrograms of the desired plasmid DNA is introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents Superfect® (Qiagen), Dospert® or Fugene® (Boehringer Mannheim). The cells are grown as described in Lucas et al., supra. Approximately  $3 \times 10^7$  cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.

The ampules containing the plasmid DNA are thawed by placement into water bath and mixed by vortexing. The contents are pipetted into a centrifuge tube containing 10 mLs of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 20 minutes. The supernatant is aspirated and the cells are resuspended in 10 mL of selective media (0.2  $\mu\text{m}$  filtered PS20 with 5% 0.2  $\mu\text{m}$  diafiltered fetal bovine serum). The cells are then aliquoted into a 100 mL spinner containing 90 mL of selective media. After 1-2 days, the cells are transferred into a 250 mL spinner filled with 150 mL selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 mL, 500 mL and 2000 mL spinners are seeded with  $3 \times 10^6$  cells/mL. The cell media is exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension 25 in production medium. Although any suitable CHO media may be employed, a production medium described in U.S. Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 may actually be used. A 3L production spinner is seeded at  $1.2 \times 10^6$  cells/mL. On day 0, the cell number and pH is determined. On day 1, the spinner is sampled and sparging with filtered air is commenced. On day 2, the spinner is sampled, the temperature shifted to 33°C, and 30 mL of 500 g/L glucose and 0.6 mL of 10% antifoam (e.g., 35% polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) 30 taken. Throughout the production, the pH is adjusted as necessary to keep it at around 7.2. After 10 days, or until the viability dropped below 70%, the cell culture is harvested by centrifugation and filtering through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter. The filtrate was either stored at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

For the poly-His tagged constructs, the proteins are purified using a Ni-NTA column (Qiagen). Before 35 purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is

WO 02/16611

PCT/US01/17443

subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fc-containing) constructs are purified from the conditioned media as follows. The conditioned medium is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 1 ml fractions into tubes containing 275 µL of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

Many of the IL-22 polypeptides disclosed herein were successfully expressed as described above.

10

**EXAMPLE 13: Expression of IL-22 in Yeast**

The following method describes recombinant expression of IL-22 in yeast.

First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or secretion of IL-22 from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding IL-22 and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of IL-22. For secretion, DNA encoding IL-22 can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native IL-22 signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of IL-22.

15

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

20

Recombinant IL-22 can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing IL-22 may further be purified using selected column chromatography resins.

25

Many of the IL-22 polypeptides disclosed herein were successfully expressed as described above.

**EXAMPLE 14: Expression of IL-22 in Baculovirus-Infected Insect Cells**

The following method describes recombinant expression of IL-22 in Baculovirus-infected insect cells.

The sequence coding for IL-22 is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding IL-22 or the desired portion of the coding sequence of IL-22 such as the sequence encoding the extracellular domain of a transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

30

35

WO 02/16611

PCT/US01/17443

Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGold™ virus DNA (Pharming) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

5 Expressed poly-his tagged IL-22 can then be purified, for example, by Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected Sf9 cells as described by Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993). Briefly, Sf9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 µm filter. A Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose column (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A<sub>280</sub> with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A<sub>280</sub> baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni<sup>2+</sup>-NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His<sub>6</sub>-tagged IL-22 are pooled and dialyzed against loading buffer.

15 Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) IL-22 can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

20 Many of the IL-22 polypeptides disclosed herein were successfully expressed as described above.

#### EXAMPLE 15: Preparation of Antibodies that Bind IL-22

This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind IL-22.

25 Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are described, for instance, in Goding, supra. Immunogens that may be employed include purified IL-22, fusion proteins containing IL-22, and cells expressing recombinant IL-22 on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

30 Mice, such as Balb/c, are immunized with the IL-22 immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-IL-22 antibodies.

35 After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a final intravenous injection of IL-22. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are

WO 02/16611

PCT/US01/17443

harvested. The spleen cells are then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

5 The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against IL-22. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against IL-22 is within the skill in the art.

10 The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic Balb/c mice to produce ascites containing the anti-IL-22 monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

EXAMPLE 16: Purification of IL-22 Polypeptides Using Specific Antibodies

15 Native or recombinant IL-22 polypeptides may be purified by a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-IL-22 polypeptide, mature IL-22 polypeptide, or pre-IL-22 polypeptide is purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the IL-22 polypeptide of interest. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the anti-IL-22 polypeptide antibody to an activated chromatographic resin.

20 Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CNBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody is coupled to the resin, the resin is blocked, and the derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

25 Such an immunoaffinity column is utilized in the purification of IL-22 polypeptide by preparing a fraction from cells containing IL-22 polypeptide in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other methods well known in the art. Alternatively, soluble IL-22 polypeptide containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

30 A soluble IL-22 polypeptide-containing preparation is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of IL-22 polypeptide (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody/IL-22 polypeptide binding (e.g., a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a high concentration of a chaotrope such as urea or thiocyanate ion), and IL-22 polypeptide is collected.

35 EXAMPLE 17: Drug Screening

This invention is particularly useful for screening compounds by using IL-22 polypeptides or binding fragment thereof in any of a variety of drug screening techniques. The IL-22 polypeptide or fragment employed in

WO 02/16611

PCT/US01/17443

such a test may either be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant nucleic acids expressing the IL-22 polypeptide or fragment. Drugs are screened against such transformed cells in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may measure, for example, the formation of complexes between IL-22 polypeptide or a fragment and the agent being tested. Alternatively, one can examine the diminution in complex formation between the IL-22 polypeptide and its target cell or target receptors caused by the agent being tested.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs or any other agents which can affect an IL-22 polypeptide-associated disease or disorder. These methods comprise contacting such an agent with an IL-22 polypeptide or fragment thereof and assaying (i) for the presence of a complex between the agent and the IL-22 polypeptide or fragment, or (ii) for the presence of a complex between the IL-22 polypeptide or fragment and the cell, by methods well known in the art. In such competitive binding assays, the IL-22 polypeptide or fragment is typically labeled. After suitable incubation, free IL-22 polypeptide or fragment is separated from that present in bound form, and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of the particular agent to bind to IL-22 polypeptide or to interfere with the IL-22 polypeptide/cell complex.

Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to a polypeptide and is described in detail in WO 84/03564, published on September 13, 1984. Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. As applied to an IL-22 polypeptide, the peptide test compounds are reacted with IL-22 polypeptide and washed. Bound IL-22 polypeptide is detected by methods well known in the art. Purified IL-22 polypeptide can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. In addition, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on the solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding IL-22 polypeptide specifically compete with a test compound for binding to IL-22 polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with IL-22 polypeptide.

#### EXAMPLE 18: Rational Drug Design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptide of interest (*i.e.*, an IL-22 polypeptide) or of small molecules with which they interact, *e.g.*, agonists, antagonists, or inhibitors. Any of these examples can be used to fashion drugs which are more active or stable forms of the IL-22 polypeptide or which enhance or interfere with the function of the IL-22 polypeptide *in vivo* (*cf.*, Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)).

In one approach, the three-dimensional structure of the IL-22 polypeptide, or of an IL-22 polypeptide-inhibitor complex, is determined by x-ray crystallography, by computer modeling or, most typically, by a combination of the two approaches. Both the shape and charges of the IL-22 polypeptide must be ascertained to elucidate the structure and to determine active site(s) of the molecule. Less often, useful information regarding the structure of the IL-22 polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous proteins.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

In both cases, relevant structural information is used to design analogous IL-22 polypeptide-like molecules or to identify efficient inhibitors. Useful examples of rational drug design may include molecules which have improved activity or stability as shown by Braxton and Wells, *Biochemistry*, 31:7796-7801 (1992) or which act as inhibitors, agonists, or antagonists of native peptides as shown by Athauda *et al.*, *J. Biochem.*, 113:742-746 (1993).

5 It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by functional assay, as described above, and then to solve its crystal structure. This approach, in principle, yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original receptor. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

10 By virtue of the present invention, sufficient amounts of the IL-22 polypeptide may be made available to perform such analytical studies as X-ray crystallography. In addition, knowledge of the IL-22 polypeptide amino acid sequence provided herein will provide guidance to those employing computer modeling techniques in place of or in addition to x-ray crystallography.

15

#### Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
20 DNA125185-2806	PTA-1031	December 7, 1999

These deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposits will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC § 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR § 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

25 The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

30 The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are

WO 02/16611

PCT/US01/17443

functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

5

WO 02/16611

PCT/US01/17443

WHAT IS CLAIMED IS:

1. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence that encodes (a) amino acids 1-179 of SEQ ID NO: 2, or (b) amino acids X-179 wherein X is any amino acid from 29-38 of (SEQ ID NO:2), or the complement thereof.
- 5 2. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), or the complement thereof.
3. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to a nucleotide sequence of the full-length coding sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1), or the complement thereof.
- 10 4. Isolated nucleic acid having at least 80% nucleic acid sequence identity to the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number PTA-1031, on December 7, 1999, or the complement thereof.
- 15 5. Isolated nucleic acid 1152 nucleotides long as shown in SEQ ID NO: 1, and the complement thereof.
6. A vector comprising the nucleic acid of Claim 1.
- 20 7. The vector of Claim 6, operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.
8. A host cell comprising the vector of Claim 7.
- 25 9. The host cell of Claim 8, wherein said cell is a CHO cell, an E. coli bacterium or a yeast cell.
10. A process for producing an IL-22 polypeptides comprising culturing the host cell of Claim 8 under conditions suitable for expression of said IL-22 polypeptide and recovering said IL-22 polypeptide from the cell culture.
- 30 11. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), or the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), lacking amino acids 1 to about 33.
- 35 12. An isolated polypeptide having at least 80% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the full-length coding sequence of the DNA deposited under ATCC accession number PTA-1031, on December 7, 1999.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

13. A chimeric molecule comprising a polypeptide according to Claim 12 fused to a heterologous amino acid sequence.
14. The chimeric molecule of Claim 13, wherein said heterologous amino acid sequence is an epitope tag sequence.
- 5 15. The chimeric molecule of Claim 14, wherein said heterologous amino acid sequence is a Fc region of an immunoglobulin.
- 10 16. An antibody which binds to a polypeptide according to Claim 11.
17. The antibody of Claim 16, wherein said antibody is a monoclonal antibody, a humanized antibody or a single-chain antibody.
- 15 18. The antibody of Claim 15, wherein said antibody blocks the binding of IL-22 to a receptor.
19. A method for inhibiting IL-22 induced expression of PAPI by pancreatic cells in a system comprising said cells, said method comprising contacting said system with an IL-22 antagonist, thereby inhibiting said PAPI expression by said pancreatic cells.
- 20 20. The method of Claim 19, wherein said antagonist is anti-IL-22 antibody.
21. The method of Claim 19, wherein said antagonist is IL-22 antisense nucleic acid.
22. The method of Claim 19, wherein step of contacting occurs *in vitro*.
- 25 23. A method of treating a pancreatic disorder in a mammal, comprising administering to said mammal, an effective amount of an IL-22 antagonist.
24. The method of Claim 23, wherein the pancreatic disorder is acute pancreatitis, chronic pancreatitis, pancreatic carcinoma, including acinar cell carcinoma or mixed cell population pancreatic carcinoma.
- 30 25. A method of reducing the activated or inflamed condition of the pancreas in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of an IL-22 antagonist.
- 35 26. The method of Claim 25 wherein said antagonist is an anti-IL-22 antibody.
27. The method of Claim 25 wherein said antagonist is an IL-22 antisense nucleic acid.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

28. A method of reducing the activated or inflamed condition of the pancreas in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of an IL-22R/IL-10R $\beta$  complex antagonist, antagonist antibody, or a fragment thereof that inhibits IL-22 polypeptide binding.
29. A method for preventing the onset of a pancreatic disorder in a mammal, comprising administering to said mammal an effective amount of an IL-22R/IL-10R $\beta$  complex antagonist.
30. The method of Claim 29 wherein said antagonist is an antagonist antibody.
31. The method of Claim 29 wherein said antagonist is an antibody fragment.
32. A method of diagnosing the activated or inflammatory state of the pancreas in a mammal, comprising contacting a biological sample obtained from the pancreas of said mammal with IL-22 and measuring STAT3 polypeptide supershift, wherein the presence of the supershift is indicative of the presence of said disorder.
33. A method of identifying a compound that inhibits the expression of a gene encoding IL-22 polypeptide, said method comprising contacting cells which normally express said IL-22 polypeptide with a candidate compound, and determining the lack of expression of said gene.
34. The method of Claim 33, wherein said candidate compound comprises an IL-22 antisense nucleic acid.
35. An article of manufacture, comprising:  
a container;  
a label on the container; and  
a composition comprising an active agent contained within the container; wherein the composition is effective for reducing either acute or chronic pancreatitis in a mammal, the label on the container indicates that the composition can be used for treating a pancreatic disorder, and the active agent in the composition is an agent inhibiting the activity or expression of an IL-22 polypeptide.
36. A method of detecting IL-22 polypeptide in a sample suspected of containing an IL-22 polypeptide, said method comprising contacting said sample with an IL-10R $\beta$  polypeptide (SEQ ID NO: 3) or an IL-22R polypeptide (SEQ ID NO: 4) and determining the formation of a IL-22/IL-10R $\beta$  polypeptide conjugate or a IL-22/IL-22R polypeptide conjugate in said sample, wherein the formation of a conjugate is indicative of the presence of an IL-22 polypeptide in said sample.
37. The method according to Claim 36, wherein said sample comprises cells suspected of expressing said IL-22 polypeptide.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

38. The method according to Claim 36, wherein said IL-10R $\beta$  polypeptide is labeled with a detectable label or is attached to a solid support.
39. The method according to Claim 36, wherein said IL-22R polypeptide is labeled with a detectable label or is attached to a solid support.
- 5
40. A method of detecting an IL-22R polypeptide or an IL-10R $\beta$  polypeptide in a sample suspected of containing an IL-22R polypeptide or an IL-10R $\beta$  polypeptide, said method comprising contacting said sample with an IL-22 polypeptide and determining the formation of an IL-22R/IL-22 polypeptide conjugate or an IL-10R $\beta$ /IL-22 polypeptide conjugate in said sample, wherein the formation of a conjugate is indicative of the presence of an IL-22R polypeptide or IL-10R $\beta$  polypeptide in said sample.
- 10
41. The method according to Claim 40, wherein said sample comprises cells suspected of expressing an IL-22R polypeptide or an IL-10R $\beta$  polypeptide.
- 15
42. The method according to Claim 40, wherein said IL-22 polypeptide is labeled with a detectable label or attached to a solid support.
43. A method of linking a bioactive molecule to a cell expressing an IL-22 polypeptide, said method comprising contacting said cell with an IL-22R polypeptide or an IL-10R $\beta$  polypeptide that is bound to said bioactive molecule and allowing binding of said IL-22 polypeptide and said IL-22R polypeptide or said IL-22 polypeptide and said IL-10R $\beta$  polypeptide, thereby linking said bioactive molecules to said cell.
- 20
44. The method according to Claim 43, wherein said bioactive molecule is a toxin, a radiolabel or an antibody.
- 25
45. The method according to Claim 43, wherein said bioactive molecule causes the death of said cell.
46. A method of linking a bioactive molecule to a cell expressing IL-22R polypeptide or IL-10R $\beta$  polypeptide said method comprising contacting said cell with an IL-22 polypeptide that is bound to said bioactive molecule and allowing binding of said IL-22 polypeptide and said IL-22R or said IL-22 polypeptide and the IL-10R $\beta$  polypeptide, thereby linking said bioactive molecules to said cell.
- 30
47. The method according to Claim 46, wherein said bioactive molecule is a toxin, a radiolabel or an antibody.
- 35
48. The method according to Claim 47, wherein said bioactive molecule causes the death of said cell.

WO 02/16611

PCT/US01/17443

49. A method of modulating at least one biological activity of a cell expressing an IL-22 polypeptide, said method comprising contacting said cell with (a) an IL-22 R polypeptide, (b) an IL-10R $\beta$  polypeptide or (c) an anti-IL-22 polypeptide antibody, whereby said (a) IL-22 R polypeptide, (b) IL-10R $\beta$  polypeptide or (c) anti-IL-22 polypeptide antibody binds to said IL-22 polypeptide, thereby modulating at least one biological activity of said cell.

5 50. The method according to Claim 49, wherein said cell is killed.

51. A method of modulating at least one biological activity of a cell expressing IL-22R polypeptide or IL-10R $\beta$  polypeptide wherein, said method comprising contacting said cell with (a) an IL-22 polypeptide, (b) an anti-IL-22R polypeptide antibody or (c) an anti-IL-10R $\beta$  polypeptide antibody, whereby said (a) IL-22 polypeptide,  
10 (b) anti-IL-22R polypeptide antibody or (c) anti-IL-10R $\beta$  polypeptide antibody binds to said IL-22R polypeptide or IL-10R $\beta$  polypeptide, thereby modulating at least one biological activity of said cell.

52. The method according to Claim 51, wherein said cell is killed.

15

WO 02/16611

PCT/US01/17443

1/11

**FIGURE 1**

CTTCAGAACAGGTTCTCCTTCCCCAGTCACCAGTTGCTCGAGTTAGAATTGTCTGCPATG  
 GCGGCCCTGCAGAAATCTGTGAGCTCTTCCCTTATGSGGACCCCTGGCCACCAGCTGCCTC  
 CTTCTCTTGGCCCTCTTGGTACAGGGGAGGAGCAGCTGGGCCATCAGCTCCCACTGCAGG  
 CTTGACBAAGTCCAACCTTCCAGCAGCCCTATAATCACCACCCGACCTTCATGCTGGCTAAG  
 GAGGCTAGCTTGGCTGATAACAAACACAGAGTTCGTCTCATTGGGGAGAACTGTTCCAC  
 GGAGTCAGTATGAGTGAAGCGCTGCTATCTGATGAGCAGGTGCTGAACTTCACCCCTGAA  
 GAAGTGTCTTCCCTCANTCTGATAGGTTCCAGCCTTATATGACAGGAGGTGGTCCCTTC  
 CTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATGACCTGCATATC  
 CAGAGGAATGTGCAAAAGCTGAAAGGACACAGTGAAAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATC  
 AAGCAATTGGAACTGGATTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCTGCATTGACCA  
 GAGCAAGCTGAAAAATGATAACTAACCCCTTCCCTGCTAGAAATACCAATTAGATG  
 CCCCAAAGCGATTTTTTTTAAACCAAGGAGATGGGAAGCCAACTCCATCATGATGG  
 TGGATTCCAAATGAACCCCTGCGTTAGTTACAAAGGAACCAATGCCACTTTTGTTTATA  
 AGACCAAGGTAGACTTCTAAGCATAGATATTTATGATAACATTCATTGTAACTGG  
 TGTCTATACACAGAAACAAATTTATTTTTTAAATAATGTCCTTTCCATAAAAAGAT  
 TACTTTCCATTCCTTTAGGGGAAAAACCCCTAAATAGCTTCATGTTCCATAAATCAGTA  
 CTTTATATTTATAAATGTAATTTATTTATATAAAGACTGCATTTTATTTATATCATTT  
 ATTAATATGGATTTATTTATAGAAACATCATTCGATATTTGCTACTTGAGTGAAGGCTAA  
 TATTGATATTTATGACAAATAATTTATAGAGCTATAACATGTTTTTATTTGACCTCAATAAACA  
 CTGGATATFCCC

WO 02/16611

PCT/US01/17443

2/11

**FIGURE 2**

MPALQKSVSSFLMGTLATSCILLALLVQGGAAPISSHCRLDKSNFQOPYITNRTFMLA  
KEASLADNNTDVRLLIGKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPOSDRFQPYMQEVVP  
FLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLDTVKKLGESGEIKAI GELDLLFMSLRNACI

Signal peptide:  
1-33

N-glycosylation site.

54-58  
68-72  
97-101

N-myristoylation site.

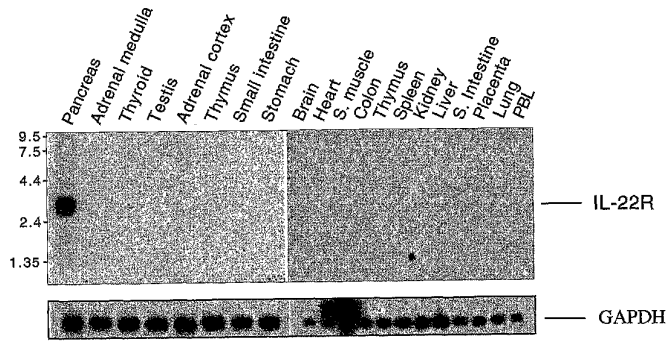
14-20  
82-88

WO 02/16611

PCT/US01/17443

3/11

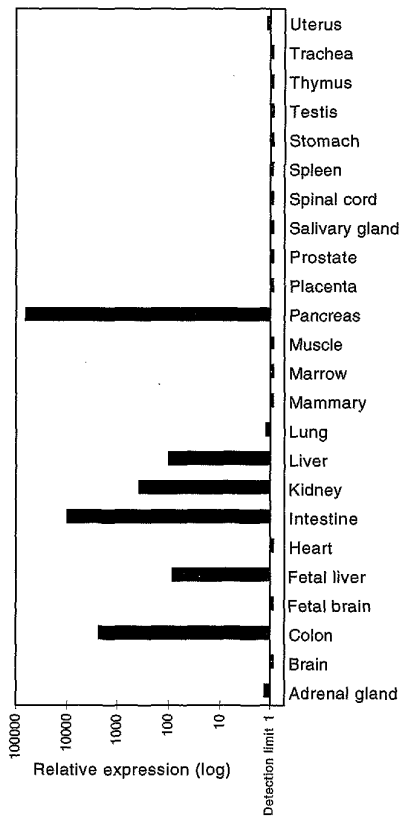
FIGURE 3



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

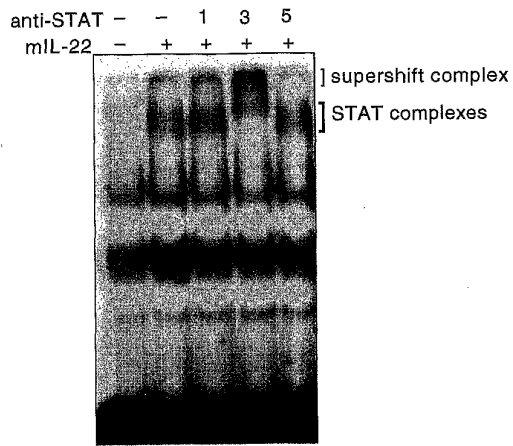
4/11

FIGURE 4



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIGURE 5

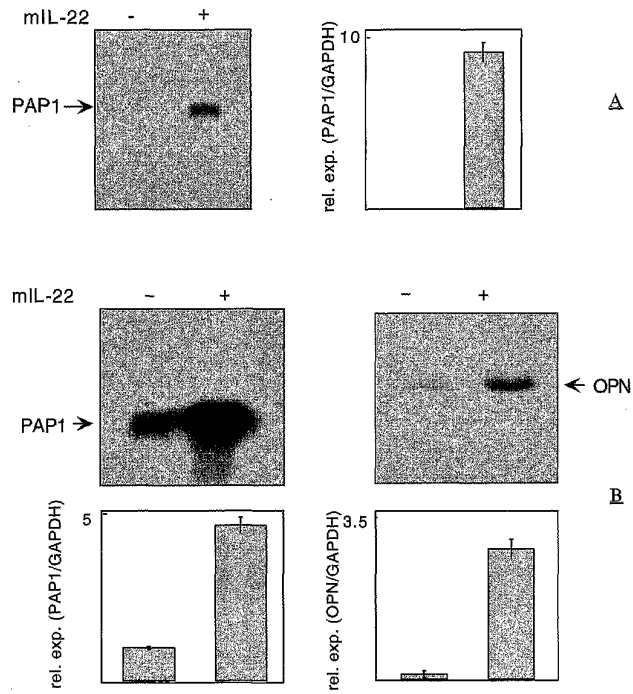


WO 02/16611

PCT/US01/17443

6/11

FIGURE 6



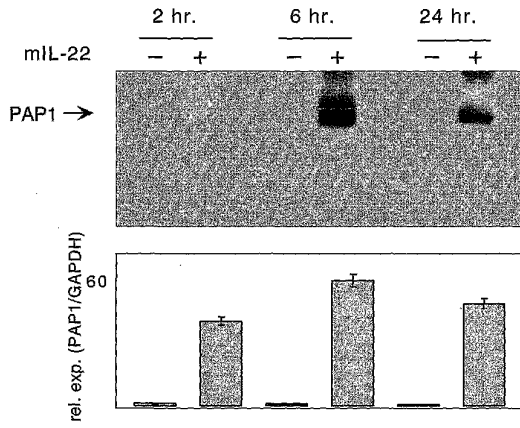
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/16611

PCT/US01/17443

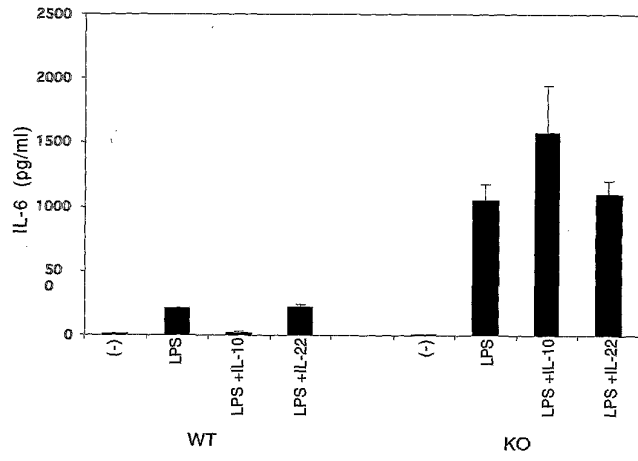
7/11

FIGURE 7



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIGURE 8

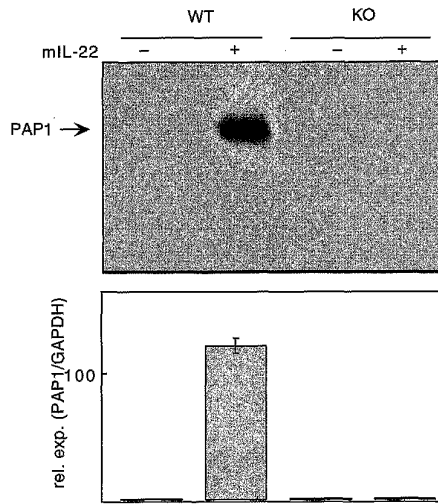


WO 02/16611

PCT/US01/17443

9/11

FIGURE 9



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/16611

PCT/US01/17443

10/11

**FIGURE 10**

IL-1OR $\beta$

MAWSLGSWLGCCLLVSAIGMVPPFENVRMNSVNFKNILQWESPAFAKGNLFTAQYLSYR  
IFQDKCMNTLTECDFSSLSKYGOHLRVRAEFADENSOVNVITFCPVDDTIIGPPGMQV  
EVLADSLHMRFLAPKLENEYETWIMKNVNSWTYVQYWKNGTDEKFPQITPQYDFEVLRN  
LEPWITYCVQVRGFLFDRNKAGEWSEFVCEQTTTDETVPSWVAVILMASVFMVCLALLG  
CFSLLWCVYKTKYAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHNTLLFFSFFLSDENDVFDKLSVIAE  
DSESGKQNPGDSCSLGTFPGGQPS

WO 02/16611

PCT/US01/17443

11/11

**FIGURE 11**

IL-22R

MRTLLTILTVGSLAAHAFEDPSDLLQHVKFSQSSNFENILTWDSGPEGTPDVTYSIEYKTY  
GERDWVAKKGCQRITRKSCNLTVEGNTLEYARVTVASAGGRSATKMTDRFSSLQHTT  
LKPPDVTCISKVRSIQMIVHPTPTPIRAGDGHRLTLEDIFHDLFYHLELQVNRITYQMHLG  
GKQREYEFFGLTPDTEFLGTIMICVPTWAKESAPYMCRVKTLPDRTWYTFSGAFLFSMG  
FLVAVLCYLSYRYVTKPPAPFNSLNVRVLTFFQPLRFIQEHLIIPVFDLGGPSSLAQFVQ  
YSQIRVSGPREFAGAPQRHSLSEITYLQDPDISILQFSNVPPPQILSPLSYAPNAAPEVG  
PPSYAPQVTPEAQFFFYAFQAIKVKQSSYAPQATPDSWPPSYGVCMEGSGKDSPTGILS  
SPKHLRPGQLKKEPPAGSCMLGGLSLOEVTSLAMEESQEAHSLHQPPLGICTDRTSDPNV  
LHSGEECTPQYLKGLPLLSVQIEGHMMSLPLQPPSGPCSPSDQGPSFWGILESIVCPK  
DEAKSPAPETSdleqptelDslFRGLALTvQWES

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/016611 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/24,  
C07K 14/54, C12N 1/21, 5/10, 1/19, 15/62, A61K 39/395,  
31/7088, G01N 33/68, C07K 16/24Ming-Hong [US/US]; 2055 32nd Avenue, San Francisco,  
CA 94116 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/17443

(74) Agents: CARPENTER, David, A. et al.; c/o Genentech,  
Inc., MS49, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-  
4990 (US).

(22) International Filing Date: 30 May 2001 (30.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
PCT/US00/23328 24 August 2000 (24.08.2000) US(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, 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, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(71) Applicant (for all designated States except US): GENEN-  
TECH, INC. [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco,  
CA 94080-4990 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): AGGARWAL,  
Sandeepa [IN/US]; 2981 Berkshire Drive, San Bruno,  
CA 94066 (US); FOSTER, Jessica, S. [US/US]; #609,  
26970 Haywood Boulevard, Hayward, CA 94542 (US);  
GODDARD, Audrey [CA/US]; 110 Congo Street,  
San Francisco, CA 94131 (US); GURNEY, Austin, L.  
[US/US]; 1 Debbie Lane, Belmont, CA 94002 (US);  
MARUOKA, Ellen, M. [US/US]; 2487 43rd Avenue, San  
Francisco, CA 94116 (US); WOOD, William, I. [US/US];  
35 Southdown Court, Hillsborough, CA 94010 (US); XIE,

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:  
26 September 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/016611 A3

(54) Title: INTERLEUKIN-22 POLYPEPTIDES, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME AND METHODS FOR THE  
TREATMENT OF PANCREATIC DISORDERS(57) Abstract: The present invention is directed to interleukin-22 polypeptides and nucleic acid molecules encoding those polypep-  
tides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules  
comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the  
polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/17443
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/24 C07K14/54 C12N1/21 C12N5/10 C12N1/19 C12N15/62 A61K39/395 A61K31/7088 G01N33/68 C07K16/24		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N 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, EMBL, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  A	WO 00 24758 A (RENAULD JEAN CHRISTOPHE ;LOUHED JANILA (BE); DUMOUTIER LAURE (BE);) 4 May 2000 (2000-05-04) claims; figure 1; example 22 sequence ID no.28 and 24  ---  --- --	1-18,33, 34  19-27, 35-52
<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 claims) 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 ** 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 May 2002	05/06/2002	
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) 340-2016	Authorized officer  Le Cornec, N	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17443

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUMOUTIER L ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF IL-10-RELATED T CELL-DERIVED INDUCIBLE BY IL-9" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, GB, vol. 164, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 1814-1819, XP000946156 ISSN: 0019-2805 the whole document	1-18, 33, 34
A	---	19-27, 35-52
P, X	XIE M-H ET AL: "Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 275, no. 40, 6 October 2000 (2000-10-06), pages 31335-31339, XP002164307 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-52
A	SPENCER S D ET AL: "THE ORPHAN RECEPTOR CRF2-4 IS AN ESSENTIAL SUBUNIT OF THE INTERLEUKIN 10 RECEPTOR" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 187, no. 4, 16 February 1998 (1998-02-16), pages 571-578, XP002922011 ISSN: 0022-1007	
P, X	WO 00 70049 A (INCYTE GENOMICS INC ; PATTERSON CHANDRA (US); AZIMZAI YALDA (US); Y) 23 November 2000 (2000-11-23) sequences ID no.18 and 44 claims	1-18
P, X	WO 00 77037 A (ASHKENAZI AVI J; GENENTECH INC) 21 December 2000 (2000-12-21) sequences ID no.125 and no.126 claims; figures 63,64 page 21 -page 22	1-52
P, X	WO 00 65027 A (GENETICS INST) 2 November 2000 (2000-11-02) sequence ID no.1 and 2 claims	1-18
	---	
	--- --	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/17443

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 73457 A (SCHERING CORP) 7 December 2000 (2000-12-07) sequences ID no.1 and 2 claims	1-18
P, A	---	49, 51
P, X	KOTENKO SERGEI V ET AL: "Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex. The IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 4, 26 January 2001 (2001-01-26), pages 2725-2732, XP002186669 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-52
P, X	DUMOUTIER L ET AL: "HUMAN INTERLEUKIN-10-RELATED T CELL-DERIVED INDUCIBLE FACTOR: MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AS AN HEPATOCYTE-STIMULATING FACTOR" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 97, no. 18, 29 August 2000 (2000-08-29), pages 10144-10149, XP000946025 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-52
E	WO 01 46422 A (ZYMOGENETICS INC) 28 June 2001 (2001-06-28) sequences ID no.1 and no.2 claims	1-52
E	WO 01 40467 A (ZYMOGENETICS INC) 7 June 2001 (2001-06-07) sequences ID no.14 and 15 page 97 -page 100 claims	1-52

International Application No. PCT/US 01 17443

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 19, 23-25, 28, 35 all partially

Claim 19 refers to a method for inhibiting il-22 induced expression of PAP1by pancreatic cells using an Interleukin-22 antagonist without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claim is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. But a partial search has been carried out as far as the il-22 antagonist is an anti-il-22 antibody, an il-22 antisense nucleic acid or a ribozyme.

Claim 23-25 refer to a method of treating a pancreatic disorder in a mammal by administering an il-22 antagonist and claim 28 refers to a method of reducing the activated or inflamed condition of the pancreas and claim 29 to a method of preventing the onset of a pancreatic disorder using il-22R/il-10Rbeta complex antagonist without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. But a partial search has been carried out as far as the il-22 antagonist is an anti-il-22 antibody, an il-22 antisense nucleic acid or a ribozyme and as far as the complex antagonist is an antibody.

Claim 35 refers to a composition comprising an agent inhibiting the activity or expression of an il-22 polypeptide without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claim is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. But a partial search has been carried out as far as the agent is an antibody, an antisense nucleic acid or a ribozyme.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/17443		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0024758	A	04-05-2000	US 6274710 B1	14-08-2001
			US 6359117 B1	19-03-2002
			AU 6520699 A	15-05-2000
			BR 9914777 A	03-07-2001
			CN 1332748 T	23-01-2002
			EP 1131333 A1	12-09-2001
			WO 0024758 A1	04-05-2000
			US 6331613 B1	18-12-2001
			US 2001024652 A1	27-09-2001
			WO 0070049	A
EP 1179066 A2	13-02-2002			
WO 0070049 A2	23-11-2000			
WO 0077037	A	21-12-2000	AU 5152700 A	02-01-2001
			WO 0077037 A2	21-12-2000
			AU 1748200 A	19-06-2000
			AU 1749800 A	04-10-2000
			AU 1749900 A	12-07-2000
			AU 2390700 A	05-02-2001
			AU 2495200 A	28-09-2000
			AU 2600800 A	28-09-2000
			AU 2879400 A	31-07-2001
			AU 2883600 A	28-09-2000
			AU 2883700 A	09-01-2001
			AU 2883900 A	30-01-2001
			AU 3107000 A	19-06-2000
			AU 3246100 A	28-12-2000
			AU 3381600 A	28-09-2000
			AU 3514400 A	28-09-2000
			AU 3774300 A	18-12-2000
			AU 5441200 A	18-12-2000
			EP 1173563 A1	23-01-2002
			EP 1159419 A1	05-12-2001
			EP 1135485 A2	26-09-2001
			EP 1141284 A2	10-10-2001
			EP 1135491 A2	26-09-2001
			WO 0053753 A2	14-09-2000
			WO 0053755 A2	14-09-2000
			WO 0153486 A1	26-07-2001
			WO 0053756 A2	14-09-2000
			WO 0078961 A1	28-12-2000
			WO 0104311 A1	18-01-2001
			WO 0075327 A1	14-12-2000
			WO 0053757 A2	14-09-2000
			WO 0053758 A2	14-09-2000
			WO 0073454 A1	07-12-2000
			WO 0073445 A2	07-12-2000
			WO 0032221 A2	08-06-2000
			WO 0032778 A2	08-06-2000
			WO 0055319 A1	21-09-2000
			WO 0037638 A2	29-06-2000
			WO 0105836 A1	25-01-2001
			US 2002010137 A1	24-01-2002
			AU 4851900 A	28-12-2000
			EP 1185642 A2	13-03-2002
			WO 0075317 A2	14-12-2000
AU 2192800 A	12-07-2000			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/17443

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0077037	A	AU 3107700	A 28-09-2000
		AU 5460100	A 18-12-2000
		AU 5590899	A 21-03-2000
		AU 5591100	A 18-12-2000
		AU 7079300	A 26-03-2001
		AU 7573000	A 26-03-2001
WO 0065027	A	02-11-2000	AU 4676100 A 10-11-2000
		BR 0010097	A 13-02-2002
		EP 1177312	A2 06-02-2002
		WO 0065027	A2 02-11-2000
WO 0073457	A	07-12-2000	AU 5047600 A 18-12-2000
		WO 0073457	A1 07-12-2000
WO 0146422	A	28-06-2001	AU 2292601 A 03-07-2001
		WO 0146422	A1 28-06-2001
WO 0140467	A	07-06-2001	AU 2253301 A 12-06-2001
		WO 0140467	A1 07-06-2001
		US 2002012669	A1 31-01-2002

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/52	C 0 7 K 14/52	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 16/24	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 6
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	K
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 33/58	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, 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, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

U N I X

- (72) 発明者 フォスター, ジェシカ, エス.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 4 2, ハイワード, ハイワード ブールバード 2 6 9  
 7 0 6 0 9号
- (72) 発明者 ゴッダード, オードリー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サンフランシスコ, コンゴ ストリート 1 1 0
- (72) 発明者 ガーニー, オースティン, エル.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2, ベルモント, デビー レーン 1
- (72) 発明者 ムラオカ, エレン, エム.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 6, サンフランシスコ, 4 3 番アベニュー 2 4 8 7
- (72) 発明者 ウッド, ウィリアム, アイ.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, サウスダウン コート 3 5
- (72) 発明者 シー, ミン - ホン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 6, サンフランシスコ, 3 2 番アベニュー 2 0 5 5

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB05 BB10 BB14 BB20 BB29 BB46 BB50 BB51  
 CB01 DA13 FA29 FB02 FB03 FB06 FB12 GC10 GC15  
 4B024 AA01 AA11 BA26 CA02 CA04 DA02 DA06 DA12 HA17  
 4B063 QA18 QA19 QQ43 QR55 QR77 QR80 QS34  
 4B064 AG03 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA26 AA72 AA90 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA17 DC50 NA14 ZA661  
 4C085 AA14 BB11 CC02 CC21  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05 NA14 ZA66

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA02 DA76 EA27  
FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004520811A5</a>	公开(公告)日	2006-03-23
申请号	JP2002522282	申请日	2001-05-30
[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	アガーワルスディープタ フォスタージェシカエス ゴッダードオードリー ガーニーオースティンエル ムラオカエレンエム ウッドウィリアムアイ シーミンホン		
发明人	アガーワル,スディープタ フォスター,ジェシカ,エス. ゴッダード,オードリー ガーニー,オースティン,エル. ムラオカ,エレン,エム. ウッド,ウィリアム,アイ. シー,ミン-ホン		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7115 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/18 C07K14/52 C07K16/24 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/20 C07K14/54 C07K14/7155 C12N15/1136 C12N2310/11 C12N2310/12 C12N2310/15		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7115 A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/18 C07K14/52 C07K16/24 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.K C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53. D G01N33/566 G01N33/58.Z C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB05 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FA29 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB12 2G045/GC10 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS34 4B064/AG03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26 4B065/AA72 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA661 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC21 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA03 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA66 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA76 4H045/EA27 4H045/FA74		
优先权	PCT/US2000/023328 2000-08-24 WO		
其他公开文献	JP2004520811A JP3886899B2		

摘要(译)

在胰腺疾病的预防性或治疗性治疗中，IL-22拮抗剂是IL-22变体，肽，反义寡核苷酸，核酶和核酸分子在三螺旋形成中的用途。

