

(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2015-505244

(P2015-505244A)

(43) 公表日 平成27年2月19日 (2015. 2. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 2 9
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 172 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-549503 (P2014-549503)	(71) 出願人	514165130
(86) (22) 出願日	平成25年1月2日 (2013. 1. 2)		イムノキュア アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月15日 (2014. 8. 15)		I M M U N O Q U R E A G
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/050024		ドイツ連邦共和国、8 2 1 5 2 マーティ
(87) 国際公開番号	W02013/098419		ンスリード、フラウンホフェルストラッセ
(87) 国際公開日	平成25年7月4日 (2013. 7. 4)		1 3
(31) 優先権主張番号	61/580, 837		F r a u n h o f e r s t r . 1 3 , 8
(32) 優先日	平成23年12月28日 (2011. 12. 28)		2 1 5 2 M a r t i n s r i e d , G E
(33) 優先権主張国	米国 (US)		R M A N Y
(31) 優先権主張番号	11195952.4	(74) 代理人	100114362
(32) 優先日	平成23年12月28日 (2011. 12. 28)		弁理士 萩野 幹治
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ヘイデイ、エイドリアン
			イギリス、オーピントン ケント BR 6
			9 DR、1 3 ゴッディントン レーン
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 所望の特異性を有するモノクローナル自己抗体を提供する方法

(57) 【要約】

例えば、免疫反応、自己免疫性障害、炎症性疾患、代謝障害、血管機能、神経変性疾患または腫瘍に関連する天然の内因性タンパク質などの抗原を認識するヒト起源の新規な結合分子、特にヒト抗体ならびにその断片、誘導体および変異体が提供される。より具体的には、ヒト自己イムノソームおよび対応するモノクローナル抗体リザーバが提供される。加えて、診断および治療に使用するための医薬組成物、キットおよび方法が記載されている。

。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所望の抗原特異性を有するモノクローナル抗体を単離する方法であって、中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患している哺乳動物から得られた試料から、前記モノクローナル抗体を発現する B 細胞が単離される、方法。

【請求項 2】

前記障害が、自己寛容の発生障害または無秩序な発生に関連する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記障害が単一遺伝子性である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記障害が、自己免疫調節因子 (A I R E : A u t o i m m u n e R e g u l a t o r) 遺伝子の少なくとも 1 つの突然変異に関連する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物がヒト患者である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記障害が自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ (A P E C E D) である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記哺乳動物が、慢性粘膜皮膚カンジダ症 (C M C)、副甲状腺機能低下症および自己免疫性副腎不全 (アディソン病) からなる群より選択される 1 つ以上の症候を患っている、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記哺乳動物がマウスである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記マウスが A I R E 欠損マウスである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料が末梢血単核細胞 (P B M C) を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記試料が記憶 B 細胞を含むか、または記憶 B 細胞に由来する、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料が、炎症、自己免疫性障害、細胞の成長および分化、筋肉機能、ならびに神経変性に関与する分泌型タンパク質または膜貫通型タンパク質の少なくとも 1 つのメンバーを含む抗原パネルに対して血清反応性を示す、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料が、図 1 に示されているものと実質的に同じ血清反応性を示す、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記抗体が立体構造エピトープを認識する、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗体がヒト抗原を認識する、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体がマウス抗原を実質的に認識しない、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記抗体が抗原の生物学的活性を中和することができる、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

(i) 所望の特異性の抗体を含有すると同定された試料から、B細胞またはB記憶細胞を精製する工程；および

(ii) B細胞を培養し、モノクローナル抗体を単離する工程；または

(iii) 前記B細胞またはB記憶細胞から、前記抗体の免疫グロブリン遺伝子レパートリを得る工程；および

(iv) 前記レパートリを使用して、宿主細胞で前記抗体または抗原結合断片を発現させ、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を単離する工程

をさらに含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

工程 (iii) が、

(iv) 前記B細胞または記憶B細胞からmRNAを得る工程；

(v) 工程 (iv) のmRNAからcDNAを得る工程；および

(vi) プライマー伸長反応を使用して、前記cDNAから、前記抗体の重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) に対応する断片を増幅する工程

を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記宿主が、酵母細胞、植物細胞または動物細胞である、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記抗原が、分泌型、膜会合型もしくは膜結合型、または膜貫通型の、細胞外タンパク質およびタンパク質、多糖、リポポリタンパク質ならびにリポ多糖からなる群より選択される、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗原が、ロイコトリエン、リンホカイン、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロンおよびケモカインからなる群より選択される、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記単離されたモノクローナル抗体を薬学的に許容し得る担体と混合する工程をさらに含む、請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

好ましくは、AIRE遺伝子における少なくとも1つの突然変異を特徴とする、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項で定義されたB細胞。

【請求項 25】

慢性炎症および免疫性疾患の治療または診断に使用するための、抗体、またはそれらの可変領域および前記抗体のCDRの少なくとも1つをコードする核酸をそれぞれ単離するためのAPCED患者由来のB細胞の使用。

【請求項 26】

組換え細胞を調製するための方法であって、

(i) 請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法によって、B細胞クローンを調製する工程；

(ii) 前記B細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を得る工程；および

(iii) 前記核酸を発現宿主に挿入して、その宿主で目的の抗体を発現させる工程を含む、方法。

【請求項 27】

組換え細胞を調製するための方法であって、

(i) 請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法によって、B細胞クローンを調製する工程；

10

20

30

40

50

(i i) 前記 B 細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を配列決定する工程；
および

(i i i) 工程 (i i) からの配列情報を使用して、発現宿主に挿入するための核酸を調製して、その宿主で目的の抗体を発現させる工程を含む、方法。

【請求項 28】

前記発現宿主が、酵母細胞、植物細胞または動物細胞である、請求項 26 または 27 に記載の方法。

【請求項 29】

目的の抗体をコードする核酸分子を調製するための方法であって、

(i) 請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法によって、B 細胞クローンを調製する工程；

(i i) 前記 B 細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を得る工程を含む、方法。

【請求項 30】

目的の抗体をコードする核酸配列を得るための方法であって、

(i) 請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法によって、B 細胞クローンを調製する工程；

(i i) 前記 B 細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を配列決定する工程を含む、方法。

【請求項 31】

医薬用途用の、または治療介入標的としての抗体を調製するための方法であって、

(i) 請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法によって、目的の抗体を産生する B 細胞を選択する工程；

(i i) 選択された B 細胞から、目的の抗体をコードする核酸を得、および／またはこれを配列決定する工程；

(i i i) 前記核酸を挿入するか、または前記核酸を使用して、目的の抗体を発現することができる発現宿主を調製する工程；

(i v) 目的の抗体が発現される条件下で、前記発現宿主を培養または継代培養する工程；および場合により、

(v) 目的の抗体を精製する工程を含む、方法。

【請求項 32】

工程 (i i) と (i i i) との間において前記核酸を操作して、制限部位を導入し、コドン使用頻度を変化させ、および／または転写および／または翻訳調節配列を付加または最適化する、請求項 26 ～ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

抗体が、

(i) インターロイキン-17A (I L - 17 A)、および／またはインターロイキン-17F (I L - 17 F) ；

(i i) インターロイキン-22 (I L - 22) ；または

(i i i) I L - 17 A / I L - 17 F ヘテロ二量体
に対するものである、請求項 1 ～ 23 または 26 ～ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

請求項 1 ～ 22 または 31 ～ 33 のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 35】

ヒト抗体である、請求項 34 に記載の抗体。

【請求項 36】

(i) A I R E 遺伝子の突然変異に関連する障害に罹患しているヒト被験体の試料から

10

20

30

40

50

、目的の抗体を産生するB細胞を選択すること；

(i i) 選択されたB細胞から、目的の抗体をコードする核酸を得、および／またはこれを配列決定すること；

(i i i) 前記核酸を挿入するか、または前記核酸を使用して、目的の抗体を発現することができる発現宿主を調製すること；

(i v) 目的の抗体が発現される条件下で、前記発現宿主を培養または継代培養すること；および、

(v) 目的の抗体を精製すること

によって得られる、請求項 3 4 または 3 5 に記載の抗体。

【請求項 3 7】

立体構造エピトープを特異的に認識し、抗原の生物学的活性を中和することができるヒト抗体である、請求項 3 4 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 8】

その可変領域に、

(a) (i) 図 1 5 (V_H) (配列番号 7、1 5、2 3、3 1、3 9、4 7、5 5) ；および

(i i) 図 1 5 (V_L) (配列番号 9、1 7、2 5、3 3、4 1、4 9、5 7)

に示されている V_H および／または V_L 可変領域アミノ酸配列の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) ；

(b) 図 1 5 に示されている V_H および／または V_L 領域のアミノ酸配列；

(c) (a) のアミノ酸配列のいずれか 1 つの部分的な変化から生じるアミノ酸配列からなる少なくとも 1 つの C D R ；

(d) (b) のアミノ酸配列の部分的な変化から生じるアミノ酸配列を含む重鎖および／または軽可変領域；

(e) (a) のアミノ酸配列のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの C D R ；

(f) (b) のアミノ酸配列と少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 3 4 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 3 9】

表 1 7 に示されている C_H および C_L アミノ酸配列 (配列番号 1 1、1 3、1 9、2 1、2 7、2 9、3 5、3 7、4 3、4 5、5 1、5 3、5 9、6 1) から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む C_H および／または C_L 定常領域を含む、請求項 3 4 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 4 0】

請求項 3 4 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片の一方の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 4 1】

場合により、前記抗体の他方の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードする請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチドと組み合わせて、請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクタ。

【請求項 4 2】

請求項 4 0 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 1 に記載のベクタを含む、宿主細胞。

【請求項 4 3】

検出可能に標識されているか、または薬物に結合している、請求項 3 4 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 4 4】

検出可能な標識が、酵素、放射性同位体、フルオロフォアおよび重金属からなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 4 5】

10

20

30

40

50

請求項 34～39 のいずれか一項に記載の抗体の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 46】

請求項 34～39 のいずれか一項に記載の抗体によって特異的に認識されるエピトープを含む、合成ペプチドまたはペプチド系化合物。

【請求項 47】

請求項 1～9 のいずれか一項で定義された障害の処置に使用するための、請求項 45 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 46 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物。

【請求項 48】

請求項 34～39、43 または 44 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、請求項 40 に記載のポリヌクレオチド、請求項 41 に記載のベクタ、請求項 42 に記載の細胞、請求項 45 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 46 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物を含む、組成物。

【請求項 49】

好ましくは異なる特異性を有する少なくとも 2 種の前記抗体を含む、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記少なくとも 2 種の抗体が、好ましくは異なるエピトープで同じ抗原を認識する、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 51】

医薬組成物であり、薬学的に許容し得る担体をさらに含む、請求項 48～50 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 52】

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)、コルチコステロイド、抗ヒスタミンおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、炎症または自己免疫性障害を処置するのに有用なさらなる薬剤をさらに含む、請求項 51 に記載の医薬組成物。

【請求項 53】

診断組成物であり、免疫診断法または核酸ベースの診断法に通常使用される試薬をさらに含む、請求項 48～50 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 54】

炎症もしくは自己免疫性障害の進行を処置または予防するうえで使用するための、炎症もしくは自己免疫性障害に関連する症候を改善するための、炎症もしくは自己免疫性障害の存在について被験体を診断またはスクリーニングするための、または炎症もしくは自己免疫性障害を発症する被験体のリスクを決定するための、請求項 34～39、43 または 44 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、請求項 45 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 46 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物。

【請求項 55】

静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、非経口投与、またはエアロゾルとして投与されるように設計されている、請求項 34～39、43 または 44 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、請求項 45 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 46 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物。

【請求項 56】

炎症または自己免疫性障害に関連する障害を処置する方法であって、治療有効量の請求項 34～39、43 または 44 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、請求項 45 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 46 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

【請求項 57】

前記障害が、尋常性座瘡；関節炎、例えば、痛風性関節炎、全身性エリテマトーデス (SLE)、変形性関節症、乾癬性関節炎、関節リウマチ；喘息；セリアック病；慢性前立腺炎；皮膚炎；真性糖尿病 1 型；糸球体腎炎；過敏症；心筋炎；多発性硬化症；炎症性腸

10

20

30

40

50

疾患；骨盤内炎症性疾患；多発性筋炎；乾癬；サルコイドーシス；血管炎；間質性膀胱炎または再灌流障害もしくは移植拒絶反応により生じる炎症からなる群より選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

静脈内的に、筋肉内的に、皮下的に、腹腔内的に、鼻腔内的に、非経口的に、局所的に、経皮的にまたはエアロゾルとして投与を実施する、請求項 5 6 または 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

炎症または自己免疫性障害に関係する障害を診断および／または処置する方法であって、

(i) 請求項 3 4 ～ 3 9、4 3 または 4 4 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片の少なくとも 1 つの C D R；または

(i i) 少なくとも 1 つの請求項 4 5 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 4 6 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物を含む治療有効量のリガンド結合分子を被験体に投与することを含む、方法。

【請求項 6 0】

ペプチドの請求項のいずれか 1 つで定義された障害関連タンパク質の存在を伴う障害を診断するためのキットであって、請求項 3 4 ～ 3 9、4 3 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、請求項 4 5 に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項 4 6 に記載のペプチドもしくはペプチド系化合物を、場合により使用のための試薬および／または説明書と共に含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、一般に、例えば、免疫反応、自己免疫性障害、炎症性疾患、代謝障害、血管機能、神経変性疾患または腫瘍に関連する天然の内因性タンパク質などの抗原を認識する哺乳動物（好ましくは、ヒト）起源の新規な結合分子、特にヒトモノクローナル抗体ならびにその断片、誘導体および変異体に関する。加えて、このような結合分子およびその模倣体を含む組成物、障害の処置および診断に有用な新規な結合分子（これは抗体でもよいし、または抗体でなくてもよい）、標的および薬物をスクリーニングする方法が記載されている。さらに、本発明は、免疫療法に使用するための薬剤としての、ならびに自己免疫性障害および自己炎症性障害および悪性腫瘍の治療介入標的としての自己抗体に関する。より具体的には、本発明は、免疫調節に関与する遺伝子における突然変異に通常起因する中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患している被験体由来の B 細胞から単離されたモノクローナル自己抗体に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫系の不適切な反応は、関連生物にストレス症候を引き起こし得る。動物またはヒトの健康に対して通常は有意な影響を与えない外来物質または物理的状态に対する過剰な免疫応答は、皮膚炎などの軽度な反応から、アナフィラキシーショックまたは様々な種類の血管炎などの生命を脅かす状況に及ぶ症候を伴うアレルギーにつながり得る。内因性抗原に対する免疫応答は、自己免疫性障害、例えば、全身性エリテマトーデス、特発性自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、1 型真性糖尿病、水疱性皮膚疾患および様々な種類の関節炎を引き起こし得る。

【0 0 0 3】

免疫反応は協調的に起こるものであり、いくつかの細胞が関与し、関与する細胞間のシグナル伝達分子（例えば、サイトカイン）による情報伝達を必要とする。この情報伝達は、例えば、シグナルの妨害または各受容体の遮断によって影響され得るかまたは阻害され得る。

【0 0 0 4】

サイトカインは、ナノモル濃度～ピコモル濃度で体液性調節因子として作用する分泌型可溶性タンパク質、ペプチドおよび糖タンパク質であり、全身レベルで作用し、正常または病理学的条件下のいずれかで個々の細胞および組織の機能活性を調節するという点で、古典的なホルモンのように振る舞う。サイトカインは、特殊な腺内の組織化された特殊な細胞によって産生されないという点で、ホルモンとは異なる。すなわち、それらは、先天性免疫および適応免疫に関与する実質的にすべての細胞、例えば、上皮細胞、マクロファージ、樹状細胞（DC）、ナチュラルキラー（NK）細胞によって、特にT細胞（その中でもとりわけTヘルパー（Th）リンパ球）によって発現されるので、これらのメディエータの単一の器官または細胞源は存在しない。現時点では、Th1、Th2、Th17およびiTregのT細胞サブクラスは、発現されるサイトカインの特定のスペクトル、およびそれらによって調節される各免疫反応に応じて定義されている。

10

【0005】

これに関して、Th1細胞の主要サイトカイン産物は、IFN- γ 、リンホトキシン- α およびインターロイキン-2（IL-2）である。Th1細胞は、細胞内病原体に対する免疫反応を媒介し、いくつかの自己免疫性疾患の一因である（非特許文献1、非特許文献2）。Th2細胞は、主にIL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13、IL-25およびアンフィレグリンを産生する。Th2細胞は、細胞外寄生虫に対する免疫反応を媒介し、自己免疫およびアレルギー、例えば、喘息、1型真性糖尿病、多発性硬化症（MS）および関節リウマチ（RA）に関与する（例えば、前掲の非特許文献1および非特許文献2を参照のこと）。

20

【0006】

いくつかのリンパ球、例えば、ガンマデルタT細胞およびナチュラルキラーT（NKT）細胞のサブセットは、Th1およびTh2サイトカインの両方を産生する。誘導された制御性（iTreg）細胞の主要産物は、IL-10、IL-35およびTGF- β である。iTreg細胞は、免疫寛容、リンパ球のホメオスタシスおよび免疫反応の調節に関与する。

【0007】

Th17細胞の主要サイトカイン産物は、IL-17およびIL-22である；Th17細胞は、細胞外の細菌および真菌に対する免疫反応を媒介し、炎症の媒介および乾癬などの自己免疫性疾患にも関与する（非特許文献3、非特許文献4）。サイトカイン産生病態生理学的活性のこのスペクトルは、ガンマデルタT細胞のサブセットで非常に類似している。

30

【0008】

サイトカインは、それらの各機能に応じて、3つの機能カテゴリー：先天性免疫反応の調節、適応免疫反応の調節、および造血の刺激に分類することができる。例えば、細胞活性化、増殖、分化、動員、または他の生理学的応答（例えば、標的細胞による炎症に特徴的なタンパク質の分泌）に関する、前記3つのカテゴリー内に含まれるそれらの多面的活性により、サイトカイン産生の異常調節によって媒介される細胞シグナル伝達障害が、免疫反応不全に関連する多くの障害、例えば、炎症および癌の原因であることが判明している。炎症および自己免疫性疾患の中心は、サイトカインIL-17AおよびIL-17F、IL-22、IL-12、IL-23ならびにIFN- α およびIFN- ω のサブタイプである。IL-12、IL-23およびIFNを除いて、前記サイトカインは、いくつかの自己免疫性障害およびアレルギー性障害ならびに腫瘍免疫学において十分に説明されている役割を有するエフェクタT細胞サブセットTh17によって発現される。

40

【0009】

無秩序なTh17反応は、慢性炎症および重度の免疫病理学的症状に関連する。動物モデルおよび罹患患者の組織における研究により、Th17経路が、慢性炎症性疾患、例えば、尋常性座瘡；関節炎、例えば、痛風性関節炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、変形性関節症、乾癬性関節炎、関節リウマチ（RA）；喘息；セリアック病；クローン病（CD）；慢性前立腺炎；皮膚炎（例えば、アトピー性皮膚炎）；真性糖尿病1型；糸球

50

体腎炎；過敏症；心筋炎；多発性硬化症；炎症性腸疾患；骨盤内炎症性疾患；多発性筋炎；乾癬（P S）；サルコイドーシス；血管炎；間質性膀胱炎または再灌流障害もしくは移植拒絶反応により生じる炎症に関与することが確認された。I L－1 7 Aは、炎症促進性サイトカイン、ケモカインおよびマトリックスメタロプロテインの産生を誘導する。これは、炎症性細胞の浸潤および細胞外マトリックスの破壊を引き起こす。I L－1 7 Aに加えて、I L－1 7 Aとヘテロ二量体化することができる関連サイトカインI L－1 7 Fは、R AおよびC Dの病因であると最近では暗示されている。

【0 0 1 0】

第3のT h－1 7 関連サイトカインであるI L－2 2（非特許文献5）は、上皮細胞上で主に作用するサイトカインである。皮膚では、それは、ケラチノサイトの増殖および表皮過形成を媒介し、乾癬などの炎症性疾患において中心的な役割を果たす。I L－2 2はT h 1 7 細胞の特徴的産物であり、I L－2 3 刺激後に、他の免疫細胞、特にN K p 4 4 / N K p 4 6 を発現するナチュラルキラー（N K）細胞およびリンパ組織インデューサ細胞によっても機能的に有意なレベルで分泌される。インターロイキン2 2（I L－2 2）は、上皮性免疫を媒介する抗炎症性サイトカインのI L－1 0 ファミリーのメンバーである。I L－2 2 の発現は、炎症性腸疾患を有する個体の炎症を起こした性結腸粘膜で増強されている。重要なことに、I L－2 2 は、免疫細胞間の情報伝達には役立たない。それは上皮細胞（例えば、肝細胞）上で主に作用し、そこで、抗菌防御、再生、および損傷に対する保護を支援し、急性期反応物質およびいくつかのケモカインを誘導する（非特許文献6）。

【0 0 1 1】

I L－2 3 は慢性炎症の促進に重要なサイトカインであり、マクロファージおよび樹状細胞のような活性化炎症細胞から分泌される（総説については、非特許文献7、非特許文献8、さらに非特許文献9、非特許文献1 0、非特許文献1 1を参照のこと）。最初、I L－2 3 は、T h 1 7 細胞の増殖および維持を支持する役割を有することが見出された（非特許文献1 2、非特許文献1 3）。しかしながら、それは、F o x p 3 陽性制御性T細胞の活性（腸蓄積）の抑制（非特許文献1 4、非特許文献1 5、非特許文献1 6）、および非T細胞源由来のT h 1 7 型サイトカインの発現の誘導（非特許文献1 7、非特許文献1 8）を含め、免疫反応に対する複数の効果を有することが示された。それは、例えば、乾癬および炎症性腸疾患における炎症に寄与している（前掲の刊行物および非特許文献1 9を参照のこと）。I L－2 3 は、2つのサブユニットp 1 9 およびp 4 0 から構成される。後者のサブユニットは、I L－1 2 と共通している。

【0 0 1 2】

I L－1 7 A、I L－2 2、オンコスタチンM、T N F－ α およびI L－1 α は、皮膚浸潤性免疫細胞および／またはケラチノサイトによって産生される強力なサイトカインであり、皮膚炎症を誘導する（非特許文献2 0、非特許文献2 1、非特許文献2 2）。

【0 0 1 3】

重度のR AおよびP Sなどの慢性炎症性疾患に対する最近の治療アプローチは、腫瘍壊死因子－ α （T N F－ α ）の遮断を含む。この方法はいくつかの症例では非常に有効であるが、多くの患者は「非応答者」である。さらに、T N F－ α の持続的中和は、微生物感染に対する感受性を増強し得るものであり、このことは、代替的かつより特異的な治療アプローチの必要性を強調している。これまでに、T h－1 7 細胞の機能および／または分化の調節は、I L－1 2 のp 4 0 に対するモノクローナル抗体（これは、I L－1 2（p 3 5 とp 4 0 とのヘテロ二量体）およびI L－2 3（p 1 9 とp 4 0 とのヘテロ二量体、T h 1 7 細胞の成長因子）の両方を標的とする）を用いて最も成功している。I L－1 2 のp 4 0 を標的とするこのような抗体、ウステキヌマブおよびA B T－8 7 4 により、重度の慢性尋常性乾癬およびC Dの緩和に成功している（非特許文献2 3、非特許文献2 4）。

【0 0 1 4】

T h 1 7 細胞および関連特性を有する細胞（例えば、I L－1 7 産生ガンマデルタT細胞

10

20

30

40

50

胞)の生物学的作用を制御する最も実行可能な方法は、それら、およびそれらが産生するエフェクタサイトカインの選択を標的とすることであろう。この新規なアプローチは、病原体と闘うための(I L-22の場合は、その組織修復および抗菌機能を発揮するための)他の非病原性アームをインタクトな状態にしつつ、P SにおけるI L-22、ならびにR AおよびC DにおけるI L-17 A(およびI L-17 F)の遮断を可能にする。また、何人かの初期応答者では、抗T N F治療薬の有効性は経時的に弱まる。したがって、単剤療法に反応しない重度の症例は、2つ以上の生物学的薬物による併用療法を必要とし得る。I L-17 Aに対するモノクローナル抗体が、臨床応用のために開発されている。P S、C Dおよび乾癬性関節炎のためのI L-17 Aに対するモノクローナル抗体(A I N 4 5 7)の第2相試験が進行中である。これまでに、I L-22の阻害剤は、自己免疫性疾患の前臨床モデルでのみ試験されている(非特許文献23、非特許文献24)。

10

【0015】

ヒトにおけるマウス抗体のような外来抗体に対する免疫反応により(H A M A 反応; 非特許文献25、非特許文献26)、現在の治療アプローチでは、大部分がヒト化されたバージョンの抗体が使用されている(非特許文献27、非特許文献28)。このような抗体を得るための1つのアプローチは、相補性決定領域(C D R)を完全ヒトフレームワークに移植すること(これは、抗体のヒト化として公知の工程である)であった(非特許文献29)。このアプローチは、マウスC D Rがヒト可変ドメインフレームワークに容易に移行しないという事実によって複雑であることが多く、その結果、ヒト化抗体親和性はそれらの親マウス抗体よりも低くなる。したがって、そのように人為操作された抗体の親和性を増加させるためには、多くの場合、さらなるおよび複雑な突然変異誘発実験が必要とされる。ヒト化抗体を達成するための別のアプローチは、その本来の抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子で置換したマウスに免疫付与し、これらの動物によって産生される抗体を単離することである。しかしながら、この方法には抗原による免疫付与が依然として必要であり、いくつかの抗原には毒性があるので、すべての抗原で可能ではない。さらに、この方法は、特異株のトランスジェニックマウスによる産生に限定されている。

20

【0016】

別の方法は、例えば、I L-13特異的抗体の作製について特許文献1に記載されているように、ファージディスプレイなどのヒト抗体ライブラリを使用することである。ここでは、ヒト抗体遺伝子をファージ集団に挿入することによって、ヒトs c F v / F a b 断片をその表面上に提示するようにバクテリオファージを人為操作する。残念ながら、多価ディスプレイの場合にはタンパク質配列のサイズ制限があること、細菌からタンパク質(すなわち、抗体のs c F v / F a b 断片)を分泌させる必要があること、ライブラリのサイズ制限があること、産生および試験可能な抗体の数が限られること、自然免疫付与によって生じる体細胞超変異を有する抗体の割合が減少すること、ファージによってコードされるすべてのタンパク質が融合タンパク質であること(これは、いくつかのタンパク質の結合に関する活性またはアクセス性を制限し得る)を含め、この方法にも多数の欠点がある。同様に、特許文献2には、ファージ上に提示された抗体セグメントレパートリからの自己抗体の産生が記載されている。これに関して、ファージライブラリは、免疫付与されていないヒトから作製されている(例えば、実施例1;第16頁43~51行目;実施例2、第17頁、段落[0158]、57~58行目)。しかしながら、この特許出願に記載されている方法は、哺乳動物、すなわちヒトの体内で産生および成熟された抗体と比較して、ファージライブラリから作製された抗体の上記一般的な欠点に悩まされている。

30

40

【0017】

上記を考慮すると、単剤療法または組み合わせアプローチのいずれかのために、ヒトで許容可能な高特異性結合分子のようなさらなるおよび新たな化合物の必要性が依然として存在する。

【0018】

特許請求の範囲に特徴が記載されており、本明細書に開示されており、さらに以下の実施例で例証されている本発明の実施形態によって、この問題の解決手段が提供される。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】国際公開第2005/007699号

【特許文献2】欧州特許出願公開第0616640号明細書

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】Mosmann et al., Annu. Rev. Immunol. 7 (1989), 145-173

【非特許文献2】Paul and Seder, Cell 76 (1994), 241-251 10

【非特許文献3】Zhu and Paul, Blood 112 (2008), 1557-1569

【非特許文献4】Shevach, Immunity 25 (2006), 195-201

【非特許文献5】Zenewicz and Flavell, Eur. J. Immunol. 38 (2008), 3265-3268

【非特許文献6】Wolk et al., Semin. Immunopathol. 32 (2010), 17-31

【非特許文献7】Langrish et al., Immunological Reviews 202 (2004), 96-105 20

【非特許文献8】Ferraccioli and Zizzo, Discov. Med. 60 (2011), 413-24

【非特許文献9】Langrish et al., J. Exp. Med. 201 (2005), 233-40

【非特許文献10】Vaknin-Dembinsky et al., J. Neuroimmunol. 195 (2008), 140-145

【非特許文献11】Melis et al., Ann. Rheum. Dis. 69 (2010), 618-23

【非特許文献12】Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 278 (2003), 1910-1914 30

【非特許文献13】Weaver et al., Annu. Rev. Immunol. 25 (2007), 821-852

【非特許文献14】Barnes and Powrie, Immunity 31 (2009), 401-411

【非特許文献15】Izcue et al., Immunity 28 (2008), 559-570

【非特許文献16】Ahern. Immunity 33 (2010), 279-88

【非特許文献17】Buonocore et al., Nature 464 (2010), 1371-1375 40

【非特許文献18】Morrison et al., Immunology 133 (2011), 397-408

【非特許文献19】Duvallet et al., Ann. Med. 43 (2011), 503-511

【非特許文献20】Boniface et al., J. Immunol. 178 (2007), 4615-4622

【非特許文献21】Nograles et al., Br. J. Dermatol. 159 (2008), 1092-1102

【非特許文献22】Guilloteau et al., J. Immunol. 184 (2010), 5263-5270 50

【非特許文献23】Miossec et al., N. Engl. J. Med. 361 (2009), 888-898

【非特許文献24】Steinman, Nat. Immunol. 11 (2010), 41-44

【非特許文献25】HAMA-response; Schroff et al., Cancer Res. 45 (1985), 879-885

【非特許文献26】Shawler et al., J. Immunol. 135 (1985), 1530-1535

【非特許文献27】Chan et Carter, Nature Reviews Immunology 10 (2010), 301-316

【非特許文献28】Nelson et al., Nature Reviews Drug Discovery 9 (2010), 767-774

【非特許文献29】Jones et al., Nature 321 (1986), 522-525

【発明の概要】

【0021】

本発明は、一般に、自己寛容の発生障害または無秩序な発生に起因または関連し得る、好ましくは、単一遺伝子性自己免疫性障害によって引き起こされる中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患している哺乳動物（特に、ヒト）から、自己抗原結合分子（すなわち、抗体）を単離するための手段および方法に関する。本発明にしたがって特に適切な自己抗体源を提供する哺乳動物の例は、AIRE（自己免疫調節）遺伝子における突然変異に関連する障害、例えば、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群1型（APS1）（Peterson et al., Nat. Rev. Immunol. 8 (2008), 948-957）を有する哺乳動物（例えば、ヒト）である。

【0022】

本発明は、一般に、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群1型（APS1）を有する患者が、上記各サイトカインまたは他の分子が病原性免疫反応の開始および維持に大きく関与する自己免疫性疾患または自己炎症性疾患、例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節炎、1型真性糖尿病（T1DM）または上記および下記に詳細に示されている他のものに、単独でまたは共同して関与し、および／またはこの自己免疫性疾患または自己炎症性疾患に関連する、タンパク質に対するモノクローナル自己抗体源を提供するという驚くべき知見に基づくものである。また、本発明は、原則としてあらゆる自己抗原に対して哺乳動物（特に、ヒト）で誘導されるモノクローナル抗体の完全なリザーバを提示および単離する手段を初めて提供するものであり、これらについて、本発明は、それぞれ「自己イムノソーム」および「Mab自己イムノソーム」という用語を作った（以下、「Mab自己イムノソーム」、「Mab自己イムノソーム」、「Mab自己イムノソーム」または「MAI」とも称される）。したがって、本発明によって提供される抗体の血清活性に関して表1～14および図1～4に詳細に示されているように、本発明にしたがって「Mab自己イムノソーム」を提供することによって、代謝障害、血管機能、神経変性疾患または腫瘍を含む自己免疫および炎症に関連する障害を処置するための新たな手段が想定される。上記観察結果に基づく本発明の基本概念（すなわち、自己寛容の発生障害または無秩序な発生に起因または関連し得る中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患しているヒトからの、治療上有用なヒト抗体の単離）は、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群2型（APS2）およびX連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群（IPEX）を有する患者由来の試料を用いて確認することができた（実施例17および表29～31を参照のこと）。

【0023】

一態様では、本発明は、いくつかのサイトカインに対する高親和性中和モノクローナル抗体に関する。したがって、本発明の方法によって、以下に詳細に記載されるいくつかのサイトカインに対するモノクローナルヒト抗体（mAb、またはMAB）であって、所定

の被験体の自然成熟体液性免疫反応に由来するモノクローナルヒト抗体が提供され、これらは、そのサイトカインが関与する障害の安全かつ有効な治療薬であると考えられる。

【0024】

特に、実施例に示されている抗体について概説されている免疫学的結合特性および／または生物学的特性を示す抗IL-17FおよびIL-22抗体ならびにそれらの抗原結合断片が提供される。存在する場合、抗体の抗原との「免疫学的結合特性」または他の結合特性という用語は、そのすべての文法の形式で、抗体の特異性、親和性、交差反応性および他の結合特性を指す。

【0025】

当然のことながら、本発明は、抗体産生細胞株および組換え細胞に及ぶ。本発明はさらに、本発明にしたがって単離された抗体によって認識される結合分子またはペプチドを含む医薬組成物、診断アッセイおよびキット、ならびにそれらに基づく治療方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】A：組織の生理学的機能またはヒト疾患の病態生理に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者で測定された反応性の示された総数の割合）。B：組織の生理学的機能またはヒト疾患の病態生理に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者の血清によって認識される異なるタンパク質の総数）。

【図2】A：組織の生理学的機能に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者で測定された反応性の示された総数の割合）。血清反応性は、図1AおよびBに示されているものに無関係である。B：組織の生理学的機能に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者の血清によって認識される異なるタンパク質の総数）。血清反応性は、図1AおよびBに示されているものに無関係である。

【図3】A：炎症および自己免疫関連経路に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者で測定された反応性の示された総数の割合）。B：炎症および自己免疫関連経路に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者の血清によって認識される異なるタンパク質の総数）。

【図4】A：神経変性疾患に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者で測定された反応性の示された総数の割合）。B：神経変性疾患に関与している細胞外タンパク質に対するAPS1患者の血清反応性（少なくとも1人の患者の血清によって認識される異なるタンパク質の総数）。

【図5】本発明の組換え抗体のインビトロ中和能。A：ヒトIL-22に対する中和能。0.5 ng/mlのIL-22を使用すると、組換え抗体30G1のIC50は2.5 ng/mlであり、組換え抗体35G11のIC50は4 ng/mlである。組換え抗体41D11および51G4は、試験濃度で中和していない。B：マウスIL-22に対する中和能。0.3 ng/mlのマウスIL-22を使用すると、組換え抗体30G1のIC50は1.5 ng/mlである。組換え抗体35G11、41D11および51G4は、試験濃度で中和していない。C：IL17A/IL-17Fヘテロ二量体に対する中和能。10 ng/mlのIL17A/IL-17Fヘテロ二量体を使用すると、組換え抗体24D3のIC50は6 ng/mlであり、組換え抗体17E3のIC50は12 ng/mlである。組換え抗体9A2は、試験濃度で中和していない。D：IL17Fに対する中和能。10 ng/mlのIL17Fを使用すると、組換え抗体24D3のIC50は12 ng/mlであり、組換え抗体17E3のIC50は15 ng/mlであり、組換え抗体9A2のIC50は45 ng/mlである。

【図6】APS1患者におけるIFN-α1に対する抗体反応（A：APS患者1-01～1-07、B：患者1-08～1-14、C：患者1-15～1-17）。X軸に示されているように、1:50～1:156250の範囲の異なる希釈のELISAアッセイ

10

20

30

40

50

で、遺伝的症候APS1/APECEDを患っている患者から得られた試験血清をIFN- α 1抗体の存在について試験した。患者と年齢がマッチしている健康な研究所員から対照血清を得た。Y軸はOD値を示す。

【図7】インターフェロン α 1b (IFN α 1b) およびCCL2 (A) ; IFN α 2b (B) ; IL-17F (C) ; IL-17A (D) ; ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド21 (CCL21)、CCL2およびケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド11 (CXCL11) (E) ; IFN- ω (F) およびIL-5 (G) に対する、選択APS1患者から単離した血清のELISA滴定。X軸は試験血清の希釈を示し、Y軸はOD値を示す。

【図8】IL-22に対する、APS1患者 (APS1-1~APS1-22 ; 黒ひし形) および対照者 (健康被験者 ; C1~C8 ; 黒四角) から単離した血清のELISA力価。X軸は被験者の年齢を示し、Y軸は対数10のスケールで見た力価を示す。大きな白ひし形および白四角は、2つの被験者群の平均力価を示す。対照者および患者の年齢の中央値は類似しているが、患者の力価は、対照者のものよりも約100倍高いことに留意する。各個体の年齢はX軸上に示されており、力価 (常用対数10のスケール) はY軸上に示されている。

【図9】IL-17Fに対する、APS1患者 (APS1-1~APS1-22 ; 黒ひし形) および対照者 (健康被験者 ; C1~C6 ; 黒四角) から単離した血清のELISA力価。X軸は被験者の年齢を示し、Y軸は (常用対数10のスケールで) 見た力価を示す。大きな白四角および白ひし形は、2つの被験者群の平均力価を示す。対照者および患者の年齢の中央値は類似しているが、患者の力価は、対照者のものよりも約20倍高いことに留意する。

【図10】IFN- α 1bに対する、APS1患者 (APS1-1~APS1-22 ; 黒ひし形) および対照者 (健康被験者 ; C1~C6 ; 黒四角) から単離した血清のELISA力価。X軸は被験者の年齢を示し、Y軸は (常用対数10のスケールで) 見た力価を示す。大きな白ひし形および白四角は、2つの被験者群の平均力価を示す。対照者および患者の年齢の中央値は類似しているが、患者の力価は、対照者のものよりも約100倍高いことに留意する。

【図11】APS1血清によって認識されるいくつかの抗原の存在を示す、APS1/APECED患者由来の血清を用いた正常な腺様組織に対するウェスタンブロット反応。

【図12】組換えヒトおよびマウスIL17Fに対する9A2抗体の反応性。ヒトIL17Fに対する9A2抗体の反応性について非常に強い選択性を観察することができる。

【図13】組換えヒトおよびマウスIL17Fに対するAPS1-22血清の交差反応性。マウス抗原に対する交差反応性はない。

【図14】pPK-CMV-F4 (PromoCell GmbH, Heidelberg ; Germany) 哺乳動物発現ベクタを使用して、全長IL-22 (34-179aa)、N末端短縮 (74-179aa) またはC末端短縮 (34-116aa) IL-22配列をクローニングし、そのC末端でホタルルシフェラーゼと融合させた。HEK293細胞へのトランスフェクションの後、免疫沈降アッセイにおいて、粗タンパク質抽出物を抗原として使用した。この図は、IL-22に対して特異的な組換え抗体が全長IL-22に最も効率的に結合していることを示しており、立体構造エピトープの優位性を示す。LU-光単位。

【図15】本発明のIL-17A、IL17FまたはIL-22特異的ヒト抗体の可変領域 (すなわち、重鎖およびカッパ/ラムダ軽鎖 (VH、VL)) のアミノ酸配列。A : IL-17F特異的抗体9A2 : IgG1、カッパ (VH3 ; G1m17 ; VK1、Km3)。B : IL-17FおよびIL-17A特異的抗体17E3 : IgG1、カッパ (VH1、G1m17 ; VK1、Km3)。C : IL-17F特異的抗体24D3 : IgG1、ラムダ (VH3、G1m17 ; VL3)。D : IL-22特異的抗体30G1 : IgG1、カッパ (VH3、G1m17 ; VK3、Km3またはKm1、2)。E : IL-22特異的抗体35G11 : IgG4、ラムダ (VH7、IGHG4*01 ; VL1)、F : I

10

20

30

40

50

L-22 特異的抗体 41D11: IgG1、ラムダ (VH4、G1m3 L410F; VL4) および G: IL-22 特異的抗体 51G4: IgG2、ラムダ (VH1、IGHG2*01; VL3)。フレームワーク (FR) および相補性決定領域 (CDR) が示されており、CDRには下線が付されている。クローニング戦略により、重鎖および軽鎖のN末端のアミノ酸配列は、FR1におけるプライマー誘導性変化を潜在的に含有し得るが、これは抗体の生物学的活性に実質的な影響を与えない。コンセンサスヒト抗体を提供するために、元のクローンのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、データベース内の適切なヒト生殖系列可変領域配列とアライメントし、それにしたがって調整する; 例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) が提供する Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>) を参照のこと。

10

【図16】インビボ研究における抗IL-22+イミキモドの乾癬病変。C57BL/6Jマウスの抗IL-22抗体およびイミキモド (IMQ) 処置の実験プロトコールおよびタイムライン。剃毛時の年齢は9週間、非処置対照DOB: 10週間。A: 4つの動物群の処置組成物を示す表。B: 動物に適用した対照および抗IL-22抗体の量。C: 実験のタイムライン。VAS=ワセリン

【図17】5日間にわたるC57BL/6Jマウスの発赤臨床スコア (0~4の尺度で盲検でスコア化)。スコアのグラフ形式-実線 (赤/ピンク) はIgG+IMQマウスであり、点 (青) 線は抗IL-22+IMQであり、非IMQ処置マウスのスコアはすべて一貫して0である。

20

【図18】5日間にわたるC57BL/6Jマウスの硬度臨床スコア (0~4の尺度でスコア化した)。スコアのグラフ形式-実 (赤/ピンク) 線はIgG+IMQマウスであり、点 (青) 線は抗IL-22+IMQであり、非IMQ処置マウスのスコアはすべて一貫して0である。

【図19】5日間にわたるC57BL/6Jマウスの累計臨床スコア (発赤+硬度+鱗屑) (合計して0~4の尺度でスコア化した)。スコアのグラフ形式-実 (赤/ピンク) 線はIgG+IMQマウスであり、点 (青) 線は抗IL-22+IMQであり、非IMQ処置マウスのスコアはすべて一貫して0である。

【図20】5日間にわたるC57BL/6Jマウスの皮膚厚み臨床測定結果 (2回の測定結果の平均を、0日目の時点と比較した増加倍率として表した)。スコアのグラフ形式-実 (赤/ピンク) 線はIgG+IMQマウスであり、点 (青) 線は抗IL-22+IMQである。

30

【図21】処置の4日目。A: ワセリン+IgG対照。B: IMQ+IgG対照。C: ワセリン+抗IL-22。D: IMQ+抗IL-22

【図22】処置の5日目。A: ワセリン+IgG対照。B: IMQ+IgG対照。C: ワセリン+抗IL-22。D: IMQ+抗IL-22

【図23】0日目からスタートの実験中の動物の体重推移。A: すべての実験群における体重推移。B: ワセリン対照のみを用いないIMQ群の体重推移。すべての時点で非有意 (ns)。

【図24】IgG+IMQ投与マウスは、4日目における皮膚が抗IL-22+IMQと比較して有意に厚い。動物の背部の厚みを経時的にmm単位で示す。* $p < 0.05$ (2元配置分散分析; 他のすべての時点でns)

40

【図25】a IL-22 (30G1) による処置は、IMQ処置マウスにおける臨床乾癬スコアを有意に減少させる。乾癬面積重症度指数 (PASI) スコアにしたがって、プラークの発赤、硬度および鱗屑を評価した。4を最悪として0~4の数字を乾癬の三徴にそれぞれ割り当てた。(A) および (B) において、*** $p < 0.001$ (2元配置分散分析)。(C) すべての時点でns (2元配置分散分析)。

【図26】a-IL-22+IMQ投与マウスは、4日目および5日目における臨床重症度、特に皮膚紅斑 (盲検でスコア化) および硬度が有意に異なる (減少している)。*** $p < 0.001$ (2元配置分散分析)

50

【図 27】IMQ 投与マウスは、脾臓がワセリン処置マウスと比較して有意に大きい。IgG + IMQ 処置マウスと抗 IL-22 + IMQ 処置マウスとの間には有意差がない。A：異なる処置群および対照群の脾臓重量；対応のない両側 t 検定。B：異なる処置群および対照群の脾臓サイズの概要。

【図 28】IMQ 処置マウス由来のリンパ節（LN：Lymph node）細胞は、生存能力がワセリン処置マウスよりも低い。IgG + IMQ 処置マウスと抗 IL-22 + IMQ 処置マウスとの間には、LN 細胞の生存率に有意差がある；対応のない両側 t 検定、 $**p < 0.005$ 。

【図 29】IgG + IMQ 処置マウスと抗 IL-22 + IMQ 処置マウスとの間には、生存能力のある生 LN 細胞の総数に有意差がある。対応のない両側 t 検定； $**p < 0.005$ 。

10

【図 30】APECED 患者の血清は、IL-22（A）、IFN- ω （B）および IFN- α （C）と強く反応する。IFN- α サブユニット（IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5 および IFNA6）、IFN- ω および IL-22 サイトカインについて、Protoarray の結果を示す。このデータは、フィンランド人 APECED 患者 23 人（APECED）の血清および健常対照者 7 人（Ctrl）の血清でプローブした、本明細書で提供される Invitrogen Protoarray の蛍光値を示す（対数スケール）。各患者／対照者群の SEM 付きの平均値を示す。

【図 31】APECED 患者由来の血清と以下のものとの自己免疫反応性：列（A）—以前に報告されている APECED 自己抗原 GAD2（グルタミン酸デカルボキシラーゼ 2）、DDC（ドーパデカルボキシラーゼ）（芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ）および GAD1（グルタミン酸デカルボキシラーゼ 1）；列（B）—新規な（未報告の）自己抗原 SULT4A1（スルホトランスフェラーゼファミリー 4A メンバー 1）、CCDC40（コイルドコイルドメイン含有 40）、NAP1L（ヌクレオソームアセンブリタンパク質 1 様 1）；ならびに列（C）—癌抗原 ABL1（c-abl 癌遺伝子 1）、非受容体チロシンキナーゼ）、MAGEA3（黒色腫抗原ファミリー A3）および SSX4（滑膜肉腫 X ブレークポイント 4）。フィンランド人 APECED 患者 23 人（APECED）の血清および健常対照者 7 人（Ctrl）の血清でプローブした、本明細書で提供される Invitrogen Protoarray の蛍光値として、Protoarray の結果を示す。各患者／対照者群の SEM 付きの平均値を示す。

20

30

【図 32】APECED 抗原の細胞内局在。認識されたタンパク質は、主に核タンパク質（38%）または細胞質タンパク質（32%）、続いて分泌タンパク質（7%）および細胞膜タンパク質（5%）である。

【図 33】インビボ研究における抗 IL-22（30G1）+ IMQ の乾癬病変。C57BL/6J マウスでの IMQ 誘導の前後（24 時間後）両方における抗 IL-22 抗体投与についての詳細な実験プロトコールおよびタイムライン。剃毛時の年齢は 9 週間、非処置対照 DOB（誕生日）：10 週間。A：動物群 A～G の処置組成物を示す表。B：動物に適用した対照および抗 IL-22 抗体の量。C：実験のタイムライン。VAS = ワセリン。LN stim = リンパ節刺激。動物 # 19 の臨床データは、重度の体重減少により分析から除外した。ここに示されている兆候は、図 16 に示されている実験と同じものである。

40

【図 34】例示的な a IL-22 抗体 30G1 の投与は、イミキモドで処置したマウスにおいて皮膚厚みを有意に減少させ、IMQ 誘導後に 30G1 IL-22 抗体を投与したマウスでは、臨床乾癬スコアの減少によって暗示されているように、治療効果を観察することができる。より読みやすくするために、図中ではグラフの線をナンバリングしている。

【図 35】インビボ研究における抗 IL-22（30G1）+ IMQ の乾癬病変。C57BL/6J マウスでの IMQ 誘導後（24 時間後）における抗 IL-22 抗体投与についての詳細な実験プロトコールおよびタイムライン。一試験動物の数を増加させた。副図 A、B および C は、図 34 について上記に記載されているとおりである。

50

【図36】例示的なaIL-22抗体30G1の投与は、「治療的に」（IMQ誘導前ではなくIMQ誘導の24時間後に）投与した場合でも、IMQで誘導したマウスにおいて皮膚厚みを有意に減少させる。4日目において、IgG+IMQ処置群とaIL-22+IMQ処置群との間に、皮膚厚みの有意差を観察することができた。A：処置動物の背部の皮膚厚みの2回反復測定結果（mm単位）。B：前記動物の皮膚厚みの変化倍率。より読みやすくするために、図中ではグラフの線をナンバリングしている。

【図37】例示的なaIL-22抗体30G1の投与は、「治療的に」投与した場合でも、IMQで誘導したマウスにおいて皮膚紅斑臨床乾癬スコアを有意に減少させる。（A～C）4日目および5日目において、IgG+IMQ処置群とaIL+IMQ処置群との間に、皮膚紅斑の有意差を観察することができた。乾癬面積重症度指数（PASI）スコアにしたがって、プラークの発赤（A）、鱗屑（B）および硬度（C）を評価した。4を最悪として0～4の数字を乾癬の三徴にそれぞれ割り当てた。（A）において、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ （2元配置分散分析）。（B）および（C）すべての時点でns（2元配置分散分析）。（D）4日目において、累計臨床スコアの有意差を観察することができた。より読みやすくするために、図中ではグラフの線をナンバリングしている。線1および2はX軸と一致している。

【図38】IMQ誘導性乾癬における本発明の例示的な抗IL-22抗体30G1の用量依存的効果。3つの異なる用量—200 μ g、20 μ gおよび2 μ gをIMQ誘導後に投与した。先の図に記載されているように、プラークの（A）皮膚紅斑および（B）硬度を評価した。（C）および（D）は、それぞれaIL-22または対照処置の値を示す。（E）は、異なる処置の累計スコアを示す。本発明の例示的なマウス交差反応性抗IL-22抗体30G1は用量依存的な兆候を示しており、初期用量の1/100に減らして滴定すると有効性が低くなることを証明している。

【図39】2回の独立したCyt to Ear実験の統合結果—耳の厚みの経時的な測定結果は、本発明の例示的なaIL-17 24D3抗体の注射によるIL17F誘導性耳炎表現型の軽減を示す。（A）結果の概要。（B）対照実験—PBSの注射。（C）IL17A注射による炎症の誘導。（D）IL17F注射による炎症の誘導—24D3注射による誘導の軽減。（E）は、図BおよびCを統合したグラフを示す。（F）は図BおよびDを統合したグラフを示す。IL-17Fを投与しIgGまたは24D3で処置したマウスでは、C群とF群との間に、耳の厚みの有意差（8日目）を観察することができた（D、F）。（DおよびF）2元配置ANOVA、ns（0日目～7日目）、** $p < 0.01$ （8日目）。図G～Lは、PBSに対して標準化した後の対応する図A～Fのデータを示す。（JおよびL）2元配置分散分析：ns（7日目）；* $p < 0.1$ （3～5日目）；** $p < 0.01$ （8日目）；*** $p < 0.001$ （1日目および2日目）。

【図40】Cyt to Ear実験—本発明の例示的な抗IL-17抗体24D3を用いた処置による耳炎表現型の軽減について試験した動物の体重のモニタリング。（A）実験結果の概要。（B）予備データは、C群およびF群で観察された体重差に基づいて処置効果の可能性を示唆している。

【図41】エピトープマッピング。異なる結合部位に対する本発明の例示的なIL-17およびaIL-22 MABのデファレンシャルな結合。交差競合実験は、抗IL-17抗体17E3および24D3が互いに競合するが、抗体9A2に対しては競合しないこと示しており、後者の結合部位が異なることを示している（A）。同様に、抗IL-22抗体30G1、35G11および41D11は互いに競合するが、抗体51G4に対しては競合せず、このことは同様に2つの結合部位（1つ目は最初の抗体群のもの、および2つ目は抗体51G4のもの）を示している（B）。本発明の例示的な抗IL-22抗体についての結果を、サンドイッチELISA実験によって検証した（C）。抗体9A5は、IL-17およびIL-22と非反応性のMAGEA3特異的抗体であり、ここでは陰性対照として使用している（A、B）。

【図42】各抗原—IL17Fに対するMABの結合領域のPeptide（商標）分析の結果。マイクロアレイ上にスポットした20merのオーバーラップペプチド（15ア

10

20

30

40

50

ミノ酸のオーバーラップ) に対する結合が示されており、すべての公知の変異体と全長 I L-17F (最後のカラム) を含む I L-17F が網羅されている。低いシグナル強度またはシグナルの欠如は、抗原を固定化するための表面リシンの方向および使用によっても起こり得るので、全長抗原に対する結合に関して観察された低いシグナル強度は、結合の欠如と必ずしも相関しない。しかしながら、全長 I L-17F に対する観察された結合は、立体構造エピトープに対する例示的な抗体 24D3 (A)、9A2 (B) および 17E3 (C) の選択的結合を示唆している。X 軸の左から右に: 1~23 とナンバリングされたペプチドおよび全長 I L-17F

【図 43】各抗原-I L-22 に対する M A B の結合領域の P e p S t a r (商標) 分析の結果。すべての抗体が、マイクロアレイ結合ペプチドに対して非常に弱い結合パターンを示しており、このことは、それらの特定の抗原に由来する線状ペプチドを認識することができないことを示す。観察された低いシグナル強度は、図 42 に示されているのと同じ原因を有し得る。試験した抗 I L-22 抗体はすべて、立体構造エピトープに選択的に結合すると思われる。抗 I L-22 抗体について、予備的な結合結果を示す: (A) 30G1、(B) 35G11、(C) 41D11 および (D) 51G4。X 軸の左から右に: 1~27 とナンバリングされたペプチドおよび全長 I L-22。Y 軸-10000 ステップで 10000~60000 の強度分布。

【図 44】抗体親和性についての P r o t e O n X P R 36 ベースの分析結果。I L-22 の注入濃度は、A1: 100 nM、A2: 33.33 nM、A3: 11.11 nM、A4: 3.70 nM、A5: 1.23 nM および A6: 0 nM (ランニング緩衝液のみ)。識別子 A1~A6 の前に接頭辞 L1~L6 を付す (L1A1 など)。以下の図 45~46 では、同じ濃度を使用した。センサーチップのインタースポット領域を使用して、データを参照した。本発明の例示的な a I L-22 抗体 30G1 および 35G11 でコーティングした表面は、特異的な濃度依存的リガンド結合反応を示す。

【図 45】本発明の a I L-22 30G1 抗体に対する I L-22 の結合に関するセンサグラムの詳細な分析。(A) ラングミュアフィットのオーバーレイグラフおよび結合反応の実験データは、1.1 ラングミュアモデルに対する優れたフィットを示す。残差プロット (B) は、ノイズレベルの大きさによるランダム散乱を示しており、優れた残差フィットを示している。図の下にある表は、会合 (k_a)、解離 (k_d)、 R_{max} および計算解離定数 K D の近似曲線から導き出された動態パラメータを示す。

【図 46】図 45 に記載されているような、本発明の a I L-22 35G11 抗体に対する I L-22 の結合に関するセンサグラムの詳細な分析。

【図 47】試料セット全体について評価したタンパク質アレイ上での抗体反応。30 個の試料および各試料について最大 54 回の測定を使用した対数正規化データによる階層的クラスタリング。距離計算では、欠測値 (0 プローブはそれらを含む) を除外した。距離メトリックは、ユークリッドである。平均連結法による凝集クラスタリングを使用して、クラスタリングを行う。

【図 48】女性患者の対数正規化データによるクラスタリング。24 個の試料および各試料について最大 39 回の測定を使用した階層的クラスタリング。距離計算では、欠測値 (0 プローブはそれらを含む) を除外した。距離メトリックは、ユークリッドである。完全連結法による凝集クラスタリングを使用して、クラスタリングを行う。

【図 49】(A) 男性患者の対数正規化データによるクラスタリング。13 個の試料および各試料について最大 25 回の測定を使用した階層的クラスタリング。距離計算では、欠測値 (0 プローブはそれらを含む) を除外した。距離メトリックは、ユークリッドである。平均連結法による凝集クラスタリングを使用して、クラスタリングを行う。(B) 共通集合: 試料の統合、女性および男性。

【図 50】抗体分泌細胞の短期オリゴクローナル培養物を提供するための本発明の方法を含む、中枢性および/もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患している患者、特に、ヒト自己抗原に結合し、および/またはこれを中和する I g G 抗体を分泌する A P E C E D / A P S 1 患者から得られたヒト記憶 B 細胞由来の組換えヒトモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体を単離および産生するための一般的な好ましい方法の概略図。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、一般に、所望の抗原特異性を有するモノクローナル自己抗体を単離する方法であって、中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失（これは、自己寛容の発生障害または無秩序な発生に通常関連する障害である）に罹患している哺乳動物から得られた試料から、該モノクローナル抗体を発現するB細胞を単離する方法に関する。

【0028】

ヒト抗体をクローニングする主な試みは、当技術分野において公知である。例えば、Traggiaiet alを参照すると、SARSコロナウイルスを中和することができる記憶B細胞から、ヒトモノクローナル抗体を作製する効率的な方法が記載されており（Nature Medicine (Traggiaiet al., Nat. Med. 10 (2004), 871-875)）、国際公開第2008/081008号、国際公開第2010/069603号および国際公開第2008/110372号には、ヒト抗体、特に、 β -アミロイドペプチド、 α -シヌクレインおよび腫瘍特異的抗原NY-ESOタンパク質を認識するヒト抗体のクローニングが記載されている。これらのアプローチのすべておよび他の過去の試みにおいて、健常ボランティア、または感染性病原体によって引き起こされるか、またはある特定の抗原に関連する疾患を患っているが、保護的自己抗体の存在の指標として異常に安定した軽度の疾患状態を有する患者が、ヒト抗体源として使用されている。

【0029】

このアプローチは、原則として、目的の各抗原について、適切な抗体を産生する対応する患者のプールを同定しなければならないが、このような患者が常に利用可能であるとは限らないという欠点に悩まされている。さらに、このようにして同定された抗体は、それらが単離された患者では保護的であり得るが、異なる患者集団では、例えば、異なるネオエピトープが存在するという理由から、それらは有効ではない場合もあるし、または抗原を認識しない場合さえある。さらに、上記に示されているようないくつかの障害または臨床像では、各抗原または抗原群が依然として不明な場合がある。

【0030】

このような状況において、本発明にしたがって実施した実験により、驚くべきことに、APCED/APSS1患者は、自己イムノソーム（すなわち、その多様性が顕著な自己抗体プロファイルであって、自己免疫反応を誘導する傾向があり、および／または望ましくない自己免疫反応に関係する障害に潜在的に関連するタンパク質に特異的な結合分子の広範なスペクトルをその多様性が表す自己抗体プロファイル）を示すことが明らかになった。したがって、本発明にしたがって同定された自己イムノソームの分子メンバーを提供することは、このような障害の治療介入および診断のための新規な標的および手段についての道を切り開き得る。APSS1は、自己免疫調節因子(AIRE)遺伝子における突然変異によって引き起こされる珍しい自己免疫性疾患である。AIREタンパク質は、胸腺髄質上皮におけるMHCによって提示される多くの末梢自己抗原（例えば、インスリン）の発現を支配して、発達中の胸腺細胞を寛容化する。APSS1では、AIRE突然変異は、自己反応性T細胞が末梢に逃れることを可能にする陰性選択異常を引き起こす。

【0031】

APSS1における臨床的特徴のスペクトルは非常に変わりやすいが、通常は、内分泌組織のいくつかの自己免疫性障害である。APSS1の定義的三徴には、慢性粘膜皮膚カンジダ症、副甲状腺機能低下症および副腎不全が含まれる（Perheentupa, Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 31 (2002), 295-320）。APCED患者で見られる他の臨床症状としては、甲状腺自己免疫性疾患、真性糖尿病、性腺機能不全、白斑、脱毛症、慢性肝炎、慢性胃炎および悪性貧血ならびに様々な形態の他の消化器症候が挙げられる。重要なことに、患者は、いくつかの自己免

疫性の臨床症候および疾患を示したが、多数の患者の報告調査により、患者は、いくつかの一般的な自己免疫性または炎症性疾患を示さなかったことが明らかになった。したがって、A P E C E D患者で独自に発達した本発明の自己抗体の生物学的活性は、これらの自己抗体が以下の疾患から保護するという観察結果と一致する。

- －エリテマトーデス（すべてのサブタイプ）；
- －シェーグレン症候群；
- －強皮症（局所型または全身型）；
- －多発性硬化症（M S）および他の自己免疫性神経疾患；
- －関節リウマチ；
- －乾癬；
- －グルテン不耐症（セリアック病）；
- －炎症性腸疾患（I B D）；
- －水疱性自己免疫性皮膚疾患（天疱瘡；類天疱瘡）；
- －口腔癌を除く癌；および
- －アトピー性湿疹、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎のようなアレルギー性疾患。

10

【0032】

驚くべきことに同様の高力価の自己抗体を伴うことが見出された別の胸腺関連障害は、胸腺上皮細胞の腫瘍である胸腺腫であり、これは多くの場合、おそらくは胸腺細胞の機能障害により、A P S 1と同様に自己抗体の陰性選択が障害され得る自己免疫性疾患重症筋無力症（M G）に関連する。全胸腺腫症例のうち、患者の30～45%がM Gを有する。さらなる関連自己免疫性症状としては、赤芽球癆およびグッド症候群（複合型免疫不全および低ガンマグロブリン血症を伴う胸腺腫）が挙げられる。他には、急性心膜炎、アジソン病、無顆粒球症、円形脱毛症、潰瘍性大腸炎、クッシング病、溶血性貧血、辺縁脳障害、心筋炎、ネフローゼ症候群、汎下垂体機能低下症、悪性貧血、多発性筋炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、感覚神経根障害、全身硬直症候群、全身性エリテマトーデスおよび甲状腺炎との疾患関連性が報告されている。

20

【0033】

以下にさらに記載される本発明の知見を考慮して、理論に縛られるものではないが、本発明者らは、関連障害、特にA P E C E D/A P S 1患者で観察された自己抗体の高力価および多様性プロファイルが、それぞれ中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に起因するものであり、体液性免疫反応（すなわち、このような患者の感染症（例えば、カンジダ症）に対する感受性の一因になり得る「自己攻撃的」自己抗体、しかし同時に、一般的な自己免疫性または炎症性起源の障害ならびに腫瘍疾患（例えば、癌）に対する一種の自己ワクチンを提供する「保護的」抗体の産生の両方を含む）と仮説した。加えて、本発明の範囲内で実施した実験により、驚くべきことに、A P E C E D患者で観察された自己抗体（これは、同時に、カンジダ感染症に対する適切な免疫反応を抑制する一因であると思われる）は、慢性炎症性疾患および免疫学的疾患の処置において治療有用性を有することが明らかになった（実施例5、6および12を参照のこと）。

30

【0034】

本発明にしたがって、自己抗体の存在が既に説明されているインターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫反応のメディエータだけではなく、代謝障害、血管機能、神経変性疾患および腫瘍に関連する抗原に対する自己抗体について、A P E C E D/A P S 1患者の血清をスクリーニングすることによって仮説を実証することができた。これらの実験により、驚くべきことに、A P E C E D/A P S 1患者はまた、例えば、腫瘍細胞または細胞の腫瘍性成長を媒介するタンパク質に対する自己抗体の存在により、疾患の臨床経過が安定している腫瘍患者でむしろ予想される自己抗体を産生することが明らかになった。

40

【0035】

特に、本発明にしたがって、タンパク質マイクロアレイ（P r o t o A r r a y（登録

50

商標) ; Invitrogen, Carlsbad USA) を、APECED / APS 1 患者の血清に対してスクリーニングし、3000 個ほどの自己抗原の完全なセット (これは、「自己イムノソーム」とも称され得る) を同定した (実施例 7 および表 1 ~ 13 を参照のこと)。特に、APECED 患者 23 人および健常対照被験者 7 人由来の血清を、合計 9000 個の組換えタンパク質を含むタンパク質アレイに対して試験した。対照と比較した APECED 血清の抗体活性は、3000 個の標的抗原に対して陽性であった。実施例で実証されているように、本発明にしたがって実施した実験により、公知の自己抗原候補が血清反応性を示したことも確認した。

【0036】

本発明にしたがって実施したさらなる実験では、選択した自己抗原、すなわち、IL-17F および IL-22 に対する自己抗体のクローニングに成功した (実施例 2 を参照のこと)。特に、すなわち、上記自己イムノソームの同定した自己抗原のいずれかに対する所望の特異性の自己抗体をクローニングするための方法が開示され、それにより、一般的な「MAB 自己イムノソーム」、すなわち、自己抗体の完全なセット、そしてそれ故に、自己免疫性障害、ならびに自己抗原の異常発現または存在によって引き起こされるかまたはこれらに関連する疾患の治療および診断に有用な抗体および結合分子のリザーバを初めて提供する。

【0037】

これまで、APECED / APS 1 患者は幅広い血清反応性を示すことが公知であったが、これは、むしろ非特異的免疫反応、そしてそれ故に、いかなる特定の顕著な生物学的活性、特異性および親和性も有さないポリクローナル抗体に起因するとも推測され得る。これは、好ましくは本発明にしたがって選択され、実施例で例証されている患者のプールについて特に当てはまり、これらの患者は、一般的な自己抗体障害の臨床像から公知の症候だけではなく、歯のエナメル質欠損、爪および髪の変異、皮膚色素の消失 (白斑)、脱毛 (脱毛症)、精神の抑鬱によって示される一般的な身体的および / または精神的健康状態不良を患っている。

【0038】

したがって、APECED / APS 1 患者のむしろ深刻な健康状態にもかかわらず、これらの患者はそれでもなお、実施例で抗 IL-17F および IL-22 抗体について例証されているように高特異性中和モノクローナル抗体の供給源を提供し、そしてさらにより驚くべきことに、非常に多くの自己抗原に対するモノクローナル自己抗体のリザーバを提供することは驚くべきことであった。

【0039】

本文脈では、APECED / APS 1 患者は、インターフェロン (IFN) α / ω ならびにインターロイキン IL-17A / F および IL-22 などの免疫反応のメディエータに対する体液性反応を示すので、本発明の一実施形態では、慢性炎症性障害および免疫障害、例えば限定されないが、慢性炎症性疾患、例えば、尋常性座瘡；関節炎、例えば、痛風性関節炎、全身性エリテマトーデス (SLE)、変形性関節症、乾癬性関節炎、関節リウマチ (RA)；喘息；セリアック病；クローン病 (CD)；慢性前立腺炎；皮膚炎；真性糖尿病 1 型；糸球体腎炎；過敏症；心筋炎；多発性硬化症；炎症性腸疾患；骨盤内炎症性疾患；多発性筋炎；乾癬 (PS)；サルコイドーシス；血管炎；間質性膀胱炎、家族性地中海熱 (FMF)、化膿性関節炎・壊疽性膿皮症・座瘡 (PAPA)、クリオピリン関連周期性症候群 (CAPS)、高 IgD 症候群 (HIDS)、成人性および若年性スティル病、シュニッツラー症候群、TNF 受容体関連周期性症候群 (TRAPS)、ブラウ症候群；スウィート症候群、IL-1 受容体アンタゴニスト欠乏症 (DIRA)、再発性特発性心膜炎、マクロファージ活性化症候群 (MAS)、蕁麻疹血管炎、抗シンテターゼ症候群、再発性軟骨炎、ベーチェット病、エルドハイム・チェスター症候群 (組織球症)、滑膜炎・座瘡・膿疱症・過骨症・骨炎 (SAPHO)、関節リウマチ、周期熱・アフタ性口内炎・咽頭炎・腺炎症候群 (PFAPA)、尿酸結晶性関節炎 (痛風)、2 型糖尿病、くすぶり型多発性骨髄腫、心筋梗塞後心不全、変形性関節症または再灌流傷害もしくは移

10

20

30

40

50

植拒絶により生じる炎症の治療または診断において、または自己寛容の発生障害もしくは無秩序な発生に関連する疾患（例えば、APS1）の処置において使用するために、モノクローナル抗体は、このような患者から得られたB細胞から単離される。

【0040】

本文脈では、臨床症状の類似性にもかかわらず、自己免疫の調節および／または発達に関与する遺伝子（例えば、a i r e 遺伝子）における突然変異によって引き起こされるものと、いわゆるリスクHLAハプロタイプを有する個体に影響を与える環境因子の共同作用によって引き起こされる疾患（例えば、アジソン病および真性糖尿病）の孤立性成分との間には明確な区別があることに留意する。例えば、APS1は、その粘膜皮膚カンジダ症、副甲状腺機能低下症およびアジソン病と共に、自己免疫調節因子遺伝子（A I R E）の突然変異に起因する単一遺伝子性障害であるが、対照的に、APS2は、最も一般的な自己免疫性障害と同様に、主要組織適合複合体（MHC）内の6番染色体上の優性感受性遺伝子座による多遺伝子性疾患である。APS2は、クラス1のヒト白血球抗原（HLA）対立遺伝子B8に関連することが報告された。クラスII HLA対立遺伝子およびそれらの1型糖尿病との強い関連性、ならびにHLA-DR3とHLA-B8との連鎖不平衡が発見されて、HLA-B8とアジソン病との関連性は、1型糖尿病およびセリアック病の場合のように、HLA-DR3とDQB1*0201との会合に主に起因すると推測された（総説については、例えば、Baker et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 95 (2010), E263-E270を参照のこと）。

【0041】

それぞれリスクHLAハプロタイプおよび多遺伝子性障害による自己免疫性障害を有する患者の試料は、本発明にしたがって使用することができるが、自己免疫調節因子（A I R E）またはフォークヘッドボックスタンパク質3（FOX P3）遺伝子などの特定の遺伝子における1つ以上の突然変異による障害を患っている患者の試料を使用することが好ましい。

【0042】

上記で説明したように、および実施例で実証されているように、APCED/APS1、すなわち、A I R E 遺伝子における突然変異によって引き起こされる珍しい単一遺伝子性自己免疫性疾患を患っている患者由来のB細胞試料を用いて、本発明の基礎をなす概念を実証した。本文脈では、単一遺伝子性により、患者間における障害の臨床像は非常に信頼できるものになり、本発明の方法を容易に再現可能にするので、中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失の一因である単一遺伝子性障害を患っている患者由来のB細胞試料を使用することは、例えば、多遺伝子性障害（例えば、APS2）または胸腺腫を患っている患者由来の試料よりも有利であり好ましい。さらに、単一遺伝子性障害は、例えば、対応する遺伝子（例えば、A I R E）における実質的に同じ突然変異を誘導することによって、対応する動物モデル（例えば、マウス）をより容易に作製することを可能にする。したがって、本発明の方法の好ましい一実施形態では、生物学的試料を提供する患者の障害は単一遺伝子性であり、好ましくは、自己免疫調節因子（A I R E）遺伝子の少なくとも1つの突然変異に関連する障害である（上記も参照のこと）。あるいは、または加えて、単一遺伝子性障害は、フォークヘッドボックスタンパク質3（FOX P3）遺伝子における少なくとも1つの突然変異に関連し得る（下記も参照のこと）。それにもかかわらず、本発明の方法は、特定の状況下では、単一遺伝子性障害に罹患している患者から得られたB細胞試料を用いて実施されることが好ましいが、胸腺腫患者は、特にa i r e 欠損表現型を示す場合には、目的の抗体を発現するB細胞の等価な供給源として使用することができる。しかしながら、本発明による腫瘍の性質による体液性免疫反応は様々であるので、胸腺腫などの腫瘍に関連するいかなる障害も患っていない哺乳動物を選択することが好ましい。

【0043】

いくつかの場合では、例えば、動物実験における研究ツールとして、または所定の疾患の動物モデルにおける前臨床試験のために、ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル自

10

20

30

40

50

己抗体を提供することが望ましい場合がある。したがって、本発明の方法の一実施形態では、哺乳動物は、ヒトではなく動物、好ましくは、実験調査および動物試験で一般的に使用される動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、好ましくは齧歯類、例えばラット、スナネズミおよびマウスである。最も好ましくは、非ヒト動物は、マウス、好ましくはAIREまたはFOXP3欠損マウスである(AIRE: Ramsey et al., Hum. Mol. Genet. 11 (2002), 397-409; Kuroda et al., J. Immunol. 174 (2005), 1862-1870; FOXP3: Brunckow et al., Nat. Genet. 27 (2001), 68-73; Wildin et al., Nature Genetics 27, (2001) 18-20)。本出願で仮定し、一方でKarner et al. in Clin. Exp. Immunol. (2012); doi:10.1111/cei.12024 (この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる)によって確認されているように、aire欠損マウスは、APCED患者のように、Th17関連サイトカインに結合して中和するAb (抗体)を生成するが、このことは、ヒトおよびマウスにおけるAIRE欠損との病原的関連性を実証している。特に、高齢のaire欠損BALB/cマウスにおいて、IL-17Aに対する中和自己抗体は、ヒトおよびマウスの両方のAIRE欠損状態に特徴的であることが見出された。

【0044】

それにもかかわらず、実施例で例証されているように、好ましくは、本発明の方法における哺乳動物は、ヒト患者、好ましくは、自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ(APCED)またはX連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸疾患(IPEX)のような自己免疫疾患を患っている患者である。IPEX(X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群は、攻撃的自己免疫および早期死亡をもたらす珍しいX連鎖劣性疾患であり、以下のセクション「定義および実施形態」により詳細に記載されている。APCEDの場合、哺乳動物は、典型的には、慢性粘膜皮膚カンジダ症(CMC)、副甲状腺機能低下症および自己免疫性副腎不全(アジソン病)からなる群より選択される1つ以上の症候を患っている(上記も参照のこと)。

【0045】

実施例で例証されているように、本発明の方法によれば、目的の抗体を単離するための試料は、可能な抗体反応性の検出のために、末梢血単核細胞(PBMC)および血清を含むか、またはこれらからなる。被験体由来の試料は、例えば、所望の抗原の1つ以上に対する血清反応性を試験するのに直接使用してもよいし、またはさらに加工してもよい(例えば、Bリンパ球について濃縮してもよい)。特に、試料は、目的の抗体を産生するB細胞、最も好ましくは記憶B細胞を含むか、またはこれらに由来することが好ましい。

【0046】

以下のセクション「B細胞の不死化」に詳細に記載されているように、原則として、抗体を産生するB細胞を不死化し、抗体をクローニングすることができる。しかしながら、好ましい実施形態では、本発明の方法は、B細胞の不死化の工程を含まない。むしろ、実施例に記載されているように、ボランティア被験体の末梢血由来の末梢血単球細胞から記憶B細胞を単離し、所望の抗原に対して反応性であるB細胞培養物から細胞を選び出すまで、一定寿命のB細胞のみを可能にする条件下で、典型的には1~2週間以下にわたって培養し、続いて、前記抗体の免疫グロブリン遺伝子レパートリを得るために単一選別細胞のRT-PCRを行う(実施例、特に実施例2も参照のこと)。

【0047】

実施例に示されているように、最初に、第1のポリクローナルB細胞活性化因子を用いて(すなわち、B95-8細胞から得られた上清を含有するEBVと共にインキュベートすることによって)、記憶B細胞を刺激し、次いで、第2ポリクローナルB細胞活性化因子(すなわち、CpG2006)を含む様々な培地に播種することによって分離した。

【0048】

実際、本発明の範囲内で実施した実験中に、目的の抗体を産生するB細胞クローンを提

供するためのB細胞の不活化を目的とするこれまでの方法（例えば、国際公開第2004/076677号に記載されているもの）は、A P E C E Dまたは他の自己免疫性疾患を患っている患者のB細胞の場合には、全く上手く機能しないことが判明した。理論に縛られるものではないが、これは免疫系の寛容の異常または自己寛容の喪失により、B細胞（特に、本発明による目的であるもの）が、アポトーシスを誘導するかまたはアポトーシスの誘導に関連するシグナル伝達経路を介して予備活性化またはトリガーされたためであると考えられ、この理由により、それらの細胞は限られた寿命しか有さず、少なくともEBV媒介性不活化についてこれまでに報告されている条件下にない場合は、もはや不活化に効果的に適したものではない。本発明にしたがって実施した実験で得られた知見を考慮して、理論に縛られるものではないが、A P E C E D/A P S 1患者で観察されたようなサイトカインおよび抗サイトカイン抗体の同時発生は、B細胞に結合してそれらを活性化することができる免疫複合体の形成をもたらすと考えられ、それにより、A P S 1患者由来のB細胞が活性化状態であること、およびそれらが老化に対して脆弱であることが説明される。

10

【0049】

しかしながら、実施例で例証されているように、および上述のように、本発明にしたがって、活性化中に、一定寿命のB細胞のみを可能にする短期オリゴクローナル培養条件下で、記憶B細胞を処理および培養し、続いて目的の抗体を産生するオリゴクローナル培養物をオリゴまたは単一細胞回収し、抗体の可変領域のcDNAをクローニングすることによって、ヒト抗体を単離する方法が提供される。本発明のヒト抗体を単離するための好ましい方法の概略図を図50に示す。

20

【0050】

したがって、好ましい実施形態および特定の態様では、本発明は、所望の抗原特異性を有するヒト抗体またはその結合断片を生産する方法であって、IgGアイソタイプ抗体を分泌する活性化B細胞の短期オリゴクローナル培養物から、B細胞を単離することの特徴とし、連続で以下の工程：

（a）1つ以上の生物学的試料から、目的のタンパク質に対する抗体を発現するB細胞を選択すること；

（b）細胞培養条件下で、第1のポリクローナルB細胞活性化因子を用いて、選択された細胞を刺激すること；

30

（c）前記活性化因子から細胞を分離すること；

（d）細胞培養条件下で、第2のポリクローナルB細胞活性化因子を用いて、刺激された細胞を活性化すること；

（e）目的のIgGアイソタイプ抗体を発現する活性化細胞をスクリーニングすること、および好ましくは；

（e'）目的の抗体を産生するオリゴクローナル培養物を単一細胞回収すること；

（f）目的の抗体の少なくとも可変軽鎖および重鎖領域ならびに場合により定常領域のcDNAを配列決定および／またはクローニングすること

を含む方法に関する。

【0051】

40

用語「オリゴクローナル培養物」は、活性化された1つまたは少数の細胞に由来する目的の抗体を産生する細胞の培養物を指す。好ましくは、オリゴクローナル培養物は、1つの単一B細胞（これは、「B細胞クローン」とも称され得る）に由来する。上述のように、特に指定がない限り、用語「オリゴクローナル」および「クローン」は、不活化細胞を暗示または意味しない。実施例で例証されているように、生物学的試料は、好ましくは、目的のタンパク質に対する自己抗体の存在について血清をスクリーニングした患者の末梢血単核細胞に由来する。

【0052】

典型的には、目的のタンパク質に対する抗体を発現するB細胞は、少なくとも1つのB細胞表面膜マーカー（例えば、好ましくはCD22）の発現に基づいて選択される。しかし

50

ながら、加えてまたはあるいは、B細胞は、例えばE L I S P O Tに使用して、抗原に対するそれらの結合に基づいて選択される。

【0053】

好ましくは、B細胞は、記憶B細胞、特にヒト記憶B細胞であり、例えば、適切なB細胞表面膜マーカー特異的抗体を使用したF A C Sによって、第1のポリクローナル活性化因子に曝露する前に、既にI g Mおよび／またはI g Dアイソタイプを除去する（実施例も参照のこと）。

【0054】

抗体産生細胞を単離し、刺激し、本発明の方法にしたがって、バルク培養物中で、様々な時間（例えば1～最大6時間、またはあまり好ましくないがより長い時間、例えば、6～12時間）にわたって増殖させてから、第2のポリクローナル活性化因子による刺激のために、培養物あたり約10個の細胞のいくつかのプール（それぞれが、別個に培養される細胞の集団を表す）に細分化する（例えば、96－、384－または1536ウェルプレート）。細胞の存在を確認するために、ドナーを選択するために血清で既に実施したアッセイ、または細胞の将来の使用に関連する任意の他のアッセイを使用して、細胞培養条件下で維持された細胞のバルクポリクローナル集団を試験することができる。さらに、細胞のポリクローナル集団のいくつかのアリコートバイアルに入れ、凍結細胞として保存して（通常は、確立された哺乳動物細胞株の場合に行う）、その後で再度解凍および培養することができる。本文脈では、いくつかの異なる抗原で、可能であれば、例えばp r o t o a r r a yにおいて生物学的試料の血清反応性が決定されたすべての抗原で、同じ培養上清を試験することができることを意図する。

【0055】

並列実験において、可能であれば、系列希釈された培養上清または部分的に精製された抗体調製物（例えば、プロテインAカラムでのアフィニティクロマトグラフィによって得られたもの）を用いた用量反応分析を使用して、所望の活性を示す陽性ウェルを同定するために、細胞培養上清のアリコートを、それらの結合および／または機能活性についてハイスループット様式でスクリーニングすることができる。場合により、次いで、スクリーニングを単一細胞培養物のレベルにさらに制限するために、陽性の細胞プール（すなわち、所望の抗原特異性および／または生物学的活性を示すもの）を使用して新たな一連の細胞プールを作製し、その結果として、少なくとも最初のスクリーニングアッセイのレベルで、所望の特異性および活性を有するモノクローナル抗体を分泌する選択された細胞から、抗体可変領域のc D N Aを単離することができる。次いで、B細胞に適用可能な組換えD N A技術を使用してそれらを単離した後、他のより厳しい機能アッセイを使用して、選択されたモノクローナル抗体を再評価し、アイソタイプおよびV_H／V_L配列のレベルで特性決定するべきである。

【0056】

実施例でさらに例証されているように、第1のポリクローナルB細胞活性化因子は、好ましくは、エプスタインバーウイルス（E B V）であり、および／または第2のポリクローナルB細胞活性化因子は、好ましくは、C p Gベースのオリゴヌクレオチドである。

【0057】

E B VおよびC p G、特にC p G 2 0 0 6（H a r t m a n n e t a l . , J . I m m u n o l . 1 6 4（2000）, 1 6 1 7－1 6 2 4によればO D N 2 0 0 6）は、それぞれ好ましい第1および第2のポリクローナルB細胞活性化因子として使用されるが、他のポリクローナルB細胞活性化因子が当業者に公知である；例えば、欧州特許第1 9 7 4 0 2 0号明細書、特に、本発明による第1のポリクローナルB細胞活性化因子については第13頁の段落[0115]～第14頁の段落[0126]（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）、C p Gと同様の特性を有する第2のポリクローナルB細胞活性化因子（例えば、T L Rアゴニスト）については第12頁の段落[0096]～第13頁の段落[0104]、特に、段落[0177]で配列番号1によって示されているC p G 2 0 0 6、および欧州特許第1 5 9 7 2 8 0号明細書の第5頁の段落[0014

〕～〔００２２〕（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【００５８】

本文脈では、EBVは、B細胞を不死化するために従来技術で使用されているが、EBVおよび類似のウイルス不死化剤は、二重活性（すなわち、適切な細胞培養条件下でB細胞を不死化するのに加えて、増殖およびIg分泌の両方を誘導するB細胞を独立して活性化する能力）を有することに留意する。Tsuchiya et al., Hum. Antibodies 8 (1997), 43-47によって示されているように、EBVのこの初期機能は、B細胞株を不死化するその後期機能とは異なるものである。したがって、本発明は、EBVおよび同様のウイルス不死化剤のポリクローナルB細胞活性化因子としての初期機能のみを使用し、細胞培養液中で数カ月間維持可能な不死化B細胞株を作製することができる形質転換ウイルスとしての後期機能を使用せず、それにより、以下にさらに記載されているように、限られた寿命の活性化B細胞の短期オリゴクローナル培養物のみを提供および使用する。EBVおよび類似薬剤の初期機能のみを使用することは、EBVのみの存在下で細胞を培養する時間を、細胞の刺激（すなわち、細胞の増殖および抗体の分泌）を達成するのに必要な程度に調整し、続いて、EBVおよび類似薬剤から細胞を分離する（その逆もまた同様である）ことによって達成することができる。

10

【００５９】

本発明の範囲内で実施した実験でさらに判明したように、および実施例で例証されているように、欧州特許第1974020号明細書および欧州特許第1597280号明細書で教示されているようなインターロイキン-2（IL-2）などのサイトカイン、またはトランスフェリンなどの他の共刺激分子の存在は必要ない。むしろ、おそらくはB細胞における前記予備活性化またはシグナル伝達により、本発明の方法では、B細胞培養物中にサイトカインが存在することには有益な効果が実質的にないことが判明した。したがって、本発明の方法の好ましい実施形態では、工程（b）および／または工程（d）における培養条件は、サイトカインを含まない。

20

【００６０】

典型的には、第1ポリクローナルB細胞活性化因子による選択された細胞の刺激を8時間未満、好ましくは6時間未満持続し、本発明の方法の特に好ましい実施形態では、工程（b）において、選択された細胞を約3～5時間刺激する。

30

【００６１】

活性化後、工程（c）において、第1のポリクローナルB細胞活性化因子からB細胞を分離し、ここで、例えば、希釈または洗浄することによって活性化因子を除去する。本文脈では、本発明にしたがって実施した実験により、刺激された細胞を第2のポリクローナルB細胞活性化因子に供する前に、複数の洗浄工程を使用してそれらを確実に完全に除去することによって、第1のポリクローナルB細胞活性化因子の存在は実際にはもはや必要ないことが確認された。それにもかかわらず、本発明の方法の目的のためには、希釈する（すなわち、新鮮な培養培地にB細胞を播種する）ことによって、第1のポリクローナルB細胞活性化因子を除去することが、通常は効率的である。したがって、第1のポリクローナルB細胞活性化因子に供した細胞培養物を、第2のポリクローナル活性化因子を含有する新鮮な培養培地に入れ、それにより、第1のポリクローナル活性化因子を含む培地を最大約10%、好ましくは5%、より好ましくは1%、最も好ましくは実質的に1%未満、例えば、0.5%、0.1%またはそれ以下に希釈し得る。

40

【００６２】

典型的には、第2のポリクローナル活性化因子の存在下での培養中に、培養物あたり低細胞濃度で、例えば、マイクロタイター培養プレートのウェルにB細胞を播種する。好ましくは、1ウェルあたりの細胞濃度は、5～20個、より好ましくは5～15個、最も好ましくは10個である。

【００６３】

上記のように、および実施例で例証されているように、工程（d）において、所望の抗

50

原に対して反応性であるB細胞培養物から細胞を選び出すまで、第2のポリクローナルB細胞活性化因子（例えば、CpG）の存在下で、刺激されたB細胞を1～2週間以下にわたって培養する。本発明の方法の好ましい実施形態では、工程（d）において、移された選択された細胞を第2のポリクローナル活性化因子に約8～14日間曝露する。好ましくは、工程（d）および／または（e）において、オリゴクローナル条件下、1ウェルあたり約10個の細胞、8～14日間の短期培養で、細胞を培養する。

【0064】

目的のヒトモノクローナル抗体を単離および生産するための本発明の方法において、B細胞を単離および培養する上記本発明の方法は有利でありしたがって好ましいが、当業者はそれでもなお、従来技術に記載されているものなどの代替的な手段および方法を、たとえそれらが非効率的であり、本明細書に開示されている好ましい方法ほど多くの目的の抗体を産生するB細胞クローンを提供することができないとしても使用することができる。

10

【0065】

ハイブリドーマ技術、末梢B細胞のクローン性増殖、単一細胞PCR、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイおよび哺乳動物細胞ディスプレイに基づく方法を使用してヒトモノクローナル抗体を単離するさらなる方法が当業者に公知であり、例えば、Beerli and Rader, Landes Bioscience 2 (2010), 365-378に概説されている。単一細胞RT-PCRおよび発現ベクタのクローニングによって単一ヒトB細胞からモノクローナル抗体を効率的に作製する方法は、Tiller et al., in J. Immunol. Methods 329 (2008), 112-124によって記載されている。

20

【0066】

本発明によれば、ELISAなどの当技術分野において公知の技術を用いて、目的の抗原に対する血清反応性について、個体から採取された試料を個別にまたはバッチで合わせて試験する（実施例も参照のこと）。特定の抗原またはいくつかの抗原に対する血清反応性について、試料を一度にまたは連続的に試験することができ、特定の分子群を表すように抗原を選択することができる前記分子群は、例えば、発生、分化、成体組織の維持または疾患などの特定の生物学的過程における分子の関与に応じて選択することができる。本発明の一実施形態では、表1～14および図1～4に示されているように、試料は、炎症、自己免疫性障害、細胞の成長および分化、筋肉機能ならびに神経変性に関与する分泌型または膜貫通型タンパク質の少なくとも1つのメンバーを含む抗原パネルに対して実質的に同じ血清反応性を示す。好ましくは、本発明の方法にしたがって抗体を得るための試料または試料プールは、図1に示されているのと実質的に同じ血清反応性を示す。

30

【0067】

好ましくは、本発明の方法にしたがって単離すべき抗体は、protoArrayアッセイにおける抗体反応の頻度、結合強度および／または抗体の力価に基づいて、好ましくはその潜在的な生理学的効果について選択される。例えば、被験体の試料の>10%で、所定の標的タンパク質に対する血清反応性が観察される場合、推定モノクローナル抗体をさらに追求することを決定することができる。好ましくは、異なる被験体の試料の>20%、より好ましくは>30%、さらにより好ましくは40%、さらにより好ましくは>50%、特に好ましくは>75%、最も好ましくは>90%が、所望の標的抗原に対する血清反応性を示す。典型的には、試料プールは、10人の異なる被験体、より好ましくは少なくとも15人の被験体、最も好ましくは少なくとも20人の被験体由来の試料を少なくとも含む。本発明の知見を考慮して、試料の血清反応性は、APECD患者などの被験体に見られる珍しい臨床症状に対応する（上記も参照のこと）。

40

【0068】

一方、本発明の好ましい実施形態のように、上記単一遺伝子性自己免疫性障害（特に、APECD）を患っている患者から得られた試料を使用することは、定義された表現型および症候により、対応する患者が明確に定義されるがそれでもなお、遺伝的背景、発達、環境、感染性病原体への負荷についての個体差により抗体の多様性をもたらすというさ

50

らなる利点を提供する。このため、特定の症状を有する1人の患者または複数の患者によってのみ特異的に産生される抗体であって、個体のみを試験する場合には別の方法で得ることができない抗体を決定および単離するために、患者由来の試料プールを試験する。したがって、本発明の方法の好ましい一実施形態では、目的の抗原に対する血清反応性について、患者由来の試料プールを試験する。所望の抗原に対する血清反応性について試料プールを試験した後、所望の抗体を単離するために、対応するプールをさらに加工することもできるし、または試料プールの血清反応性に実際に寄与する試料の患者を同定するために、試料プールを絞り込むこともできる。対応するプールを作製する患者のサブグループは、患者の異なる臨床状態基準、例えば、性別、年齢、疾患症候の量および／または重症度に応じて選択することができる。実施例16に例示的に示されているように、抗体反応における性差が、A P E C E D患者から得られたp r o t e o a r r a yデータで観察することができた。表28に示されているように、いくつかの抗体は、女性または男性患者のみから特異的に得ることができた。さらに、男性患者では、これらの差次的に発現された抗体から、可溶性タンパク質に対する抗体を実質的には観察することができなかった。したがって、一実施形態では、所望の抗原特異性を有するモノクローナル抗体を単離するための本発明の方法が提供され、ここで、中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失を有する被験体であって、異なる臨床状態基準、例えば、性別、年齢、疾患症候の量および／または重症度に応じて選択された被験体から、抗体が特異的に単離される。一実施形態では、被験体は、その性別に応じて選択される。すなわち、抗体は、男性または女性被験体のみから単離される。

10

20

【0069】

添付の実施例に記載されているように、本発明の方法にしたがって単離された抗体は、好ましくは、立体構造エピトープを認識する。したがって、これは、体液性免疫反応がその生理学および細胞環境で天然抗原に対して誘導されたという事実により、抗原の立体構造エピトープを認識する自己抗体が通常産生され、例えば他の細胞成分によるその提示、細胞表面膜上での提示、および／または受容体との結合により単離することができるという点において、本発明の方法のさらなる利点である。対照的に、マウスモノクローナル、そのヒト化バージョン、またはファージディスプレイから得られた抗体などのモノクローナル抗体を作製する従来の方法は、典型的には、それぞれ非ヒト哺乳動物の免疫感作および検出のために標的タンパク質の抗原性断片を用いるが、これにより通常は、その生理学および細胞環境における天然タンパク質の存在ではなく、直線状エピトープまたは免疫原の二次構造に限定された立体構造エピトープを認識する抗体が得られる。したがって、本発明の方法にしたがって単離された自己抗体は、そのエピトープ特異性の点で固有であると予想するのが賢明である。したがって、本発明はまた、本発明の方法にしたがって単離された自己抗体と実質的に同じ結合特異性を示す抗体および類似結合分子に関する。例えば、競合E L I S Aによって、またはより適切には参照抗体として本発明の自己抗体およびそのモノクローナル誘導体をそれぞれ使用した細胞ベースの中和アッセイにおいて、および実施例に記載されているかもしくは当業者に公知の免疫学的試験において、このような抗体を容易に試験することができる。

30

【0070】

実施例でさらに例証されているように、好ましくはヒトのドナーから本発明の方法にしたがって単離された自己抗体は、好ましくは、ヒト抗原のみを認識するか、またはマウスなどの他の種由来の対応する抗原よりも少なくとも選択的にヒト抗原を認識する。したがって、本発明の一実施形態では、所望の抗体は、それが由来する種（特に、ヒト抗原）に対して特異的であり、好ましくは、別種（例えばマウス起源、例えばヒト抗体の場合にはマウス）の対応する抗原を実質的に認識しない。実施例7、8、11、13および14に詳細に記載されているように、いくつかの実験的アッセイにおいて、本発明の抗体の結合特性（例えば、特異性および親和性）を試験した。例えば、誘導性乾癬様皮膚炎（実施例6）および誘導性耳炎（実施例12）における本発明の例示的な抗体の治療潜在力についての試験のインビボ実験データから、さらなる示唆を得ることができた。これに関連して

40

50

、実施例 12 に記載されているように、ヒト IL-17F 注射によって誘導される耳炎実験で観察された治療効果、および実施例 7 に示されているように、IMQ 誘導性乾癬様皮膚炎における有意な効果の欠如によって（マウス IL-17F によって媒介される炎症に対しては有意な効果がない）、本発明の例示的な抗 IL-17 抗体 24D3 のヒト IL-17F に対する特異性を確認することができた。比較では、マウス交差反応性の例示的な抗 IL-22 抗体 30G1 は、IMQ 誘導性乾癬病変の臨床症候を軽減することによってその治療効果を示した。

【0071】

加えて、実施例 9 で例証されているように、APCED 関連自己抗原では、コイルドコイル構造が、健常ボランティアの抗原レパートリよりも多く存在する。コイルドコイル構造は、2～7 本の α -ヘリックスが共にらせん状になっている構造的なモチーフであり、最も一般的には二量体および三量体である。それは、ヘプタッド反復 HxxHCxC（H-疎水性；C-荷電アミノ酸（aa））の反復パターンを含有する。コイルドコイルドメインタンパク質は、主に細胞内酵素である。本発明の proteoarray アッセイにおいて APCED 関連自己抗原であることが見出されたコイルドコイルドメインを含む例示的なタンパク質は、実施例 9 の表 21 で特定されており、それらのうちの 2 つに関する Proteoarray の結果は図 31 にある（CCDC40 および NAPI1）。一実施形態では、本発明の抗体は、コイルドコイル構造を示す抗原を認識する。

【0072】

本発明の方法にしたがって単離された抗体についてさらに実証されているように、それらは、それらの標的タンパク質の生物学的活性を中和することができる。本文脈では、用語「中和」は、本発明の主題抗体の存在下で各アッセイを実施することによって評価することができるように、本発明の抗体が、生化学的または細胞ベースのアッセイにおいて、その標的タンパク質の生物学的活性に干渉することができることを意味し、ここで、標的タンパク質の生物学的活性は、アッセイに供した本発明の抗体のレベルを増加させるにつれて、本発明の抗体の非存在下における、および標的タンパク質の生物学的活性に同じく影響を与えないことが公知の化合物（例えば、対照抗体）の存在下におけるタンパク質の生物学的活性と比較して減少する。このような生化学的およびインビトロベースのアッセイはまた、本発明の抗 IL-17 および IL-22 抗体について示されているような標的タンパク質の生物学的活性を中和することができることが公知の参照抗体を使用して、候補抗体を試験試料に供することによって実施することができ、ここで、参照および候補抗体の複合活性に起因する相加的中和効果が観察され得るか、またはいずれかの抗体を標識することによって決定され得る候補抗体および参照抗体の競合が観察される。加えて、本発明の方法は、内因性タンパク質および細胞構造に対する自己抗体を単離するのに特に適切であるが、それにもかかわらず、有効な抗ウイルス免疫を提供する自己抗体を得ることも可能である。したがって、本発明の好ましい実施形態では、本発明の方法によって得られた抗体は、その抗原（例えば、IL-17 および IL-22）の生物学的活性を中和することができる。

【0073】

実施例で例証されているように、本発明の方法は、典型的には、

(i) 所望の特異性の抗体を含有すると同定された試料から、B 細胞または B 記憶細胞を精製する工程；および

(ii) B 細胞を培養し、該モノクローナル抗体を単離する工程；または好ましくは

(iii) 前記 B 細胞または B 記憶細胞から、前記抗体の免疫グロブリン遺伝子レパートリを得る工程；および

(iv) 前記レパートリを使用して、宿主細胞で前記抗体または抗原結合断片を発現させ、該モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を単離する工程を含む。

【0074】

より具体的には、本発明の上記方法は、工程 (iii) において、

(i v) 前記 B 細胞または記憶 B 細胞から mRNA を得る工程；

(v) 工程 (i v) の mRNA から cDNA を得る工程；および

(vi) プライマー伸長反応を使用して、前記 cDNA から、前記抗体の重鎖 (HC) およびカップ軽鎖 (LC) に対応する断片を増幅する工程を含む。

【0075】

不死化ヒト B 細胞および B 記憶リンパ球のクローンを生産する方法であって、ポリクローナル B 細胞活性化因子の存在下で、エプスタインバーウイルス (EBV) を使用したヒト B 記憶リンパ球を形質転換する工程を含む方法は、国際公開第 2004/076677 号に要約されており、さらに以下のセクション「B 細胞の不死化」により詳細に記載されている。しかしながら、同定された抗原に特異的な EBV 形質転換ヒト記憶 B 細胞を細胞クローニングする最初の試みは成功せず、このことは、細胞の大部分が形質転換および不死化されていないことを示唆している。したがって、前記抗体の免疫グロブリン遺伝子レパートリを得るために、好ましくは、単一選別細胞の RT-PCR が用いられる (実施例も参照のこと)。とりわけ単一細胞 RT-PCR を使用してヒト抗体を得る別の方法は、例えば、国際公開第 2008/110372 号 (この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる) の特に補足方法のセクションおよび実施例 2 に記載されている。加えて、不死化ヒト B 記憶リンパ球のクローンを生産するための改善された方法であって、ポリクローナル B 細胞活性化因子の存在下で B リンパ球内のテロメラーゼ活性を誘導または増強する工程を含む方法は、国際公開第 2010/003529 号 (この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0076】

上記のように、本発明の抗体または抗原結合断片、例えば、ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質は、例えば、宿主細胞またはインビトロの無細胞翻訳系における発現によって提供され得る。宿主細胞でペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質を発現させるために、前記ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸分子を、適切な発現ベクタ (すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクタ) に挿入することができる。当業者に周知の方法を使用して、目的のポリペプチドをコードする配列ならびに適切な転写および翻訳制御要素を含む発現ベクタを構築することができる。これらの方法としては、インビトロ組換え DNA 技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが挙げられる。このような技術は、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)、および Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1989) に記載されている；これに関するさらなる詳細については、さらに以下のセクション「ポリヌクレオチド」および「発現」、ならびに実施例のセクションで引用されている文献も参照のこと。

【0077】

産物の発現に適切な宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞；例えば、細菌細胞、例えば、大腸菌または枯草菌、昆虫細胞 (バキュロウイルス)、酵母細胞、植物細胞または動物細胞であり得る。しかしながら、効率的な処理のためには、哺乳動物細胞が好ましい。この目的に有用な典型的な哺乳動物細胞株としては、CHO 細胞、HEK 293 細胞、COS 細胞および NSO 細胞が挙げられる。

【0078】

公知のまたは推定上の病態生理学的な機能にしたがって分析し、表 1～13 に示されている治療上興味深い分泌型膜結合型/会合型化合物を本発明の範囲内の目的の分子として絞り込んだところ、APS1 の患者において、様々な抗原に対する血清反応性が見出された。さらなる実験セットにおいて、APS1 患者に関して、および APS2 および IPEX 患者に関して、様々な抗原に関するさらなるデータが見出された (実施例 17 および表 29～31 を参照のこと)。本発明の方法の一実施形態では、抗原は、分泌型、膜会合型もしくは膜結合型、または膜貫通型の、細胞外タンパク質およびタンパク質、多糖、リポ

ポリタンパク質ならびにリポ多糖からなる群より選択される。しかしながら、原則として、本発明の方法は、任意の所望の抗原に対する自己抗体を提供することができる。前に既に説明したように、これは、本発明にしたがって使用されるのが好ましい被験体、すなわち、その中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失が特定の遺伝子型によって引き起こされている者（すなわち、それぞれ一方ではそれらの体液性免疫反応の一般的な反応性、ならびに遺伝性障害、毒素、感染症、加齢性障害などの素因を含む異なる内部および外部刺激および条件へのそれらの曝露による単一遺伝子性自己免疫性障害）は、一方では、すべての被験体ではないが大部分に共通する自己抗体から、個々の疾患または症状に対して特異的な自己抗体に及ぶ自己抗体プールを提供するからである。本発明の方法の一実施形態における試料プールで一般的に見られる自己抗体について、抗原は、ロイコトリエン、リンホカイン、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロンおよびケモカインからなる群より選択される。

10

【0079】

自己抗体の抗原標的の別の興味深いクラスは、三モチーフ含有タンパク質（TRIM）であり、ウイルス制限因子として、またはウイルスRNAの下流経路の調節因子およびDNAセンサーおよびインフラマソームとして、抗ウイルス免疫において重要な役割を有するものとして登場した。特に、自己炎症性障害の範囲の病原におけるインフラマソーム過活性化の役割を考慮すると、これらの標的に対する本発明の方法にしたがって同定された抗体は、インフラマソーム活性に関連する疾患の治療介入および処置に有用なツールを提供する予想することが賢明である。したがって、一実施形態では、本発明の方法にしたがって単離すべき自己抗体が血清反応性を示す抗原は、アミノ末端RINGドメイン（これは、E3リガーゼ活性に重要である）、中央Bボックスおよびコイルドコイルドメインならびに可変カルボキシル末端ドメイン（これは、基質相互作用に重要である）を通常含有するいわゆるTRIMファミリーメンバーに属する；総説については、例えば、Jeffries et al., Nature 11 (2011), 617-625（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）、特に、自己免疫性障害および自己炎症性障害におけるTRIMの関与に関する第619頁の表1およびそこで引用されている参考文献を参照のこと。

20

【0080】

さらに、本発明の方法に使用するための非ヒト動物モデルに関して、AIRE欠損マウスなどの被験体動物を試験化合物、放射線、非生物的または生物的ストレスなどの外部刺激に曝露して、前記外部刺激に対して特異的な自己抗体を単離することも考えられる。例えば、ストレス特異的自己抗体または食品もしくは医薬品に反応して誘導される自己抗体を同定および単離するために、本発明の方法を、このような曝露が倫理および道徳の法律に準拠している程度に、ヒト被験体で同様に実施することができる。

30

【0081】

当然のことながら、単離された本発明の抗体をそれ自体で患者に適用することはできず、通常は、例えば、患者におけるその安定性、受容性およびバイオアベイラビリティを保証するために、薬学的に製剤化しなければならない。したがって、一実施形態では、単離されたモノクローナル抗体を薬学的に許容され得る担体と混合する工程をさらに含む本発明の方法が提供される。薬学的に許容される担体は、以下でさらに詳細に説明する。

40

【0082】

上記のように、本発明は、例えば、AIRE遺伝子における突然変異により、自己免疫の発生障害または無秩序な発生に関連する障害を患っている哺乳動物が常に、いくつかの目的の分子に対する高力価の特異的抗体を産生するという知見に基づくものである。これに関して、本発明によれば、前記抗体を産生するB細胞は、このような哺乳動物から単離される。したがって、一実施形態では、好ましくは、AIRE遺伝子における少なくとも1つの突然変異を特徴とする上記に定義されたB細胞が提供される。

【0083】

本発明の結合分子の安定的かつ恒久的な供給源を得るための方策として、直接クローニ

50

ング、PCR増幅または人工合成によって、これらの結合分子をコードする異種遺伝子を単離し、適切な宿主細胞または生物に導入して発現させることができる。したがって、一実施形態では、本発明の目的はまた、組換え細胞を調製するための方法であって、

(i) 上記本発明の方法によって、B細胞クローンを調製する工程；

(ii) 該B細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を得る工程；および

(iii) 該核酸を発現宿主に挿入して、その宿主で目的の抗体を発現させることを可能にする工程

を含む方法を提供することである。

【0084】

別の実施形態では、組換え細胞を調製するための方法であって、

(i) 上記本発明の方法によって、B細胞クローンを調製する工程；

(ii) 該B細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を配列決定する工程；および

(iii) 工程(ii)からの配列情報を使用して、発現宿主に挿入するための核酸を調製して、その宿主で目的の抗体を発現させることを可能にする工程

を含む方法が提供される。

【0085】

本明細書のセクション「宿主」で詳細に記載されているように、上記宿主細胞は、前記2つの方法で同様に使用することができる。これに関して、一実施形態では、発現宿主が酵母細胞、植物細胞または動物細胞である上記2つの方法が提供される。組換え細胞の他に、一実施形態では、目的の抗体をコードする核酸分子を調製するための方法であって、

(i) 上記本発明の方法によって得られるB細胞クローンを調製する工程；

(ii) 核酸を配列決定し、および／または該B細胞クローンから、目的の抗体をコードする核酸を得る工程

を含む方法を提供することも本発明の範囲内である。

【0086】

一実施形態では、本発明の目的はまた、医薬用途用の、または治療介入標的としての抗体を調製するための方法であって、

(i) 上記本発明の方法によって、目的の抗体を産生するB細胞を選択する工程；

(ii) 選択されたB細胞から、目的の抗体をコードする核酸を得、および／またはこれを配列決定する工程；

(iii) 該核酸を挿入するか、または該核酸を使用して、目的の抗体を発現することができる発現宿主を調製する工程；

(iv) 目的の抗体が発現される条件下で、該発現宿主を培養または継代培養する工程；および場合により、

(v) 目的の抗体を精製する工程

を含む方法を提供することである。

【0087】

目的の各抗体を生産するための上記方法に関して、一実施形態では、本発明は、上記工程(ii)および(iii)の間において核酸を操作して、制限部位を導入し、コドン使用頻度を変化させ、ならびに／または転写および／もしくは翻訳調節配列を付加または最適化する方法を提供する。

【0088】

本発明の方法の代替的な実施形態では、国際公開第92/13065号にしたがって、(a) 上記に定義されたドナー個体由来のリンパ球を免疫不全哺乳動物投与すること、(b) 前記哺乳動物の少なくとも1つにおいて免疫細胞の再構成を可能にするのに十分な時間が経過した後、所望の自己抗体を産生する再構成哺乳動物を選択すること、(c) そこからリンパ球を単離する前または後に、選択された哺乳動物のBリンパ球を不死化すること、および(d) それらが所望の自己抗体を産生するのを可能にする条件下で、不死化Bリンパ球を培養し、得られた自己抗体を回収し、得られた自己抗体を培養物から回収する

こと、を含む方法によって、患者の試料由来の血清反応性自己抗体を生産する。

【0089】

本発明の方法のさらなる代替的な実施形態では、欧州特許出願公開第1394183号明細書（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているような固体支持体に結合したリガンドでアフィニティクロマトグラフィを使用して患者試料から得られた静脈内免疫グロブリン調製物（IVIg）から、自己抗体を精製することができる。

【0090】

上記で説明したように、目的の特定の抗原に特異的に結合する結合分子を提供することは本発明の範囲内であった。このような結合分子に関して、上記のように、および実施例に詳細に記載されているように、本発明はさらに、本発明の方法によって得ることができる抗体またはその抗原結合断片を提供する。特に好ましい実施形態では、この抗体は、ヒト抗体である。本発明の一実施形態では、抗体は、（i）インターロイキン-17A（IL-17A）および／またはインターロイキン-17F（IL-17F）；（ii）インターロイキン22（IL-22）；または（iii）IL-17A／IL-17Fヘテロ二量体に対するものである。

【0091】

添付の実施例4および6で実証されているように、低阻害濃度（IC50）で、試験サイトカインIL-17FおよびIL-22に対して特に高いインビトロ中和活性を示す結合分子（すなわち、抗体）を同定およびクローニングした。これに関して、本発明の一実施形態では、各標的分子（例えば、IL-17またはIL-22）に対する高親和性を有する抗体であって、100ng/ml未満、好ましくは10ng/ml未満の濃度でED50を示す抗体が提供される。本発明の抗体の結合親和性に関するさらなる詳細については、例えば、さらに以下のセクション「結合特性」を参照のこと。

【0092】

本発明は、それらの可変領域（すなわち、結合ドメイン）に、図15に示されているアミノ酸配列（V_H）（配列番号7、15、23、31、39、47、55）および（V_L）（配列番号9、17、25、33、41、49、57）を含む可変領域のV_Hおよび／またはV_Lの少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含むことを特徴とし得るこのような結合分子（すなわち、抗体およびその結合断片）を例示する。図15で下線が付されている例示的なCDR配列を参照のこと。しかしながら、以下で議論されているように、当業者であれば、加えてまたはあるいは、特にCDR2およびCDR3の場合には、アミノ酸配列が図15に示されているものとは1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸またはそれ以上異なるCDRを使用することができるという事実を十分に認識している。したがって、一実施形態では、その可変領域に、

（a）図15（V_H）（配列番号7、15、23、31、39、47、55）；および

（b）図15（V_L）（配列番号9、17、25、33、41、49、57）

に示されているアミノ酸配列のいずれか1つを含む可変領域のV_Hおよび／またはV_Lの少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む本発明の抗体または抗原結合断片が提供される。

【0093】

さらに、一実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、図15に示されているV_Hおよび／またはV_L領域のアミノ酸配列を含む。あるいは、本発明の抗体は、IL-17またはIL-22抗体に対する結合について、図15に示されているかまたは表17に示されている対応する核酸によってコードされるV_Hおよび／またはV_L領域を有する抗体の少なくとも1つと競合する抗体またはその抗原結合断片である。

【0094】

したがって、本発明は、一般に、上記機能特性の1つ以上を有し、その可変領域に、

（a）（i）図15（V_H）（配列番号7、15、23、31、39、47、55）；および

10

20

30

40

50

(i i) 図 15 (V_L) (配列番号 9、17、25、33、41、49、57) に示されている V_H および／または V_L 可変領域アミノ酸配列の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) ;

(b) 図 15 に示されている V_H および／または V_L 領域のアミノ酸配列 ;

(c) (a) のアミノ酸配列のいずれか 1 つの部分的な変化から生じる (a) 由来のアミノ酸配列からなる少なくとも 1 つの CDR ;

(d) (b) のアミノ酸配列の部分的な変化から生じる (b) 由来のアミノ酸配列を含む重鎖および／または軽可変領域 ;

(e) (a) のアミノ酸配列のいずれか 1 つと少なくとも 80 % の同一性を有する (a) 由来のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの CDR ;

(f) (b) のアミノ酸配列と少なくとも 60 % の同一性を有する (b) 由来のアミノ酸配列

を含む抗体、好ましくはヒト抗体およびその抗原結合断片に関する。

【0095】

完全ヒト抗体およびそのネイティブな Fab 断片を提供するために、本発明のヒト抗体は、好ましくは、表 17 に示されている C_H および C_L アミノ酸配列 (配列番号 11、13、19、21、27、29、35、37、43、45、51、53、59、61) から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 60 % の同一性を有するそれら由来のアミノ酸配列を含む C_H および／または C_L 定常領域をさらに含む。

【0096】

誘導体配列の場合、前記配列は、配列表で特定されている上記配列からなる群の配列と少なくとも 60 % の同一性、より好ましくは (以下の順序で) 少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、最も好ましくは 95 %、少なくとも 96 ~ 99 %、またはさらに 100 % の同一性を示す。2 つの配列間の % 同一性は、2 つの配列を最適にアライメントするために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、これらの配列が共有する同一位置の数の関数である。配列の比較および 2 つの配列間の % 同一性の決定は、当業者に周知の数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。本明細書で以下にさらに言及されているように、本明細書で言及される同一性は、BLAST プログラムを使用して決定されるべきものである。

【0097】

上記で説明したように、これらの抗体もマウスのものであり得るが、治療用途には、ヒト化、異種またはキメラヒトマウス抗体、特に完全ヒト抗体が好ましい。抗体の抗原結合断片は、例えば、単鎖 Fv 断片 (scFv)、F(ab') 断片、F(ab) 断片、F(ab')₂ 断片または単ドメイン抗体断片 (sdAB) であり得る。

【0098】

前述のように、好ましい実施形態では、本発明は、ラムダまたはカッパと組み合わせて、少なくとも定常重鎖 I (C_H1) および対応する定常領域軽鎖 (すなわち $\gamma-1$ 、 $\gamma-2$ 、 $\gamma-3$ または $\gamma-4$) を含む実質的に完全なヒト抗体、好ましくは IgG に関する。特に好ましい実施形態では、以下の表 17 および配列番号 10 ~ 13、18 ~ 21、26 ~ 29、34 ~ 37、42 ~ 45、50 ~ 53 および 58 ~ 61 に示されているように、実施例で例証されている主題抗体の単離されたこれらの定常領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列が使用される。

【0099】

上記にしたがって、一実施形態では、本発明はまた、本発明の抗体または抗原結合断片の一方の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。典型的には、ポリヌクレオチドによってコードされる前記可変領域は、前記抗体の可変領域の V_H および／または V_L の少なくとも 1 つの相補性決定領域 (CDR) を含む。抗体の可変領域および定常領域は、以下のセクション「IgG の構造」により詳細に記載されている。本発明の好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドは、以下の表 17 に示さ

10

20

30

40

50

れている本発明の抗体の V_H または V_L 領域のポリヌクレオチド配列を有する核酸を含むか、これから本質的になるか、またはこれからなる。これに関して、当業者であれば、軽鎖および／または重鎖の少なくとも可変ドメインをコードするポリヌクレオチドは、免疫グロブリン鎖またはそれらの一方のみのいずれかの可変ドメインをコードし得ることを容易に認識するであろう。

【0100】

【表 17-1】

表 17：本発明の I L-17A、I L17F または I L-22 特異的抗体の可変領域および定常領域（V_H、V_L、C_H、C_L）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。

I L-17F 特異的抗体 9A2：I g G 1、カッパ（VH3；G 1 m 1 7；VK1、Km3）。I L-17F および I L-17A 特異的抗体 17E3：I g G 1、カッパ（VH1、G 1 m 1 7；VK1、Km3）。I L-17F 特異的抗体 24D3：I g G 1、ラムダ（VH3、G 1 m 1 7；VL3）。I L-22 特異的抗体 30G1：I g G 1、カッパ（VH3、G 1 m 1 7；VK3、Km3 または Km1、2）。I L-22 特異的抗体 35G11：I g G 4、ラムダ（VH7、IGHG4*01；VL1）；35G11-C_L：211 位～213 位において、TAC は TAT でもよく、両方とも Tyr をコードする。I L-22 特異的抗体 41D11：I g G 1、ラムダ（VH4、G 1 m 3 L410F；VL4）。I L-22 特異的抗体 51G4：I g G 2、ラムダ（VH1、IGHG2*01；VL3）；41D11-C_H：ヌクレオチド配列の 877 位～879 位は t t c に代えて c t c でもよく、対応するアミノ酸配列の 293 位は P h e に代えて L e u でもよい（下線）。下線太字のヌクレオチドまたはアミノ酸は、可変鎖配列内の C D R コード領域を示す。下線イタリック体のヌクレオチドは、配列決定されていないがデータベースから得られた定常鎖配列内の配列を示す。

抗体	可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）、定常重鎖（CH）および定常軽鎖（CL）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。
9A2-V _H	G A G G T G C A A T T G G A G G A G T C T G G C G G A G G C T T G G T T C A G C C T G G A G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C C C C T T C A G C <u>A A C T A T</u> <u>G A A A T G A A T</u> T G G G T C C G C C A G G C T C C C G G G A A G G G A C T G G A G T G G A T T T C A T <u>A C A T T A G T G T G A</u> <u>G C G G T G G T C C C G C T C A C T A C G C A G A C T C T G T G</u> <u>A A G G G C C G A T T C A C C A T T T C C A G A G A C G A C G C</u> C A C A A A G T C A C T G T T T C T G C A A A T G A A C C G C C T G A G A G C C G A C G A C A C G G C A G T T T A T T A C T G T G T G C G C <u>C G C G A A T A T G T C A C T G G C C G C A A T T A</u> <u>C A A C T A C T A C C C C T A C A T G G A C G T C</u> T G G G G C A C T G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C C C A 配列番号：6
9A2-V _H	E V Q L E E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F P F S <u>N Y</u> <u>E M N W V R Q A P G K G L E W I S Y I S V S G G P A H Y A D S V</u> <u>K G R F T I S R D D A T K S L F L Q M N R L R A D D T A V Y Y C</u> V R <u>R E Y V T G R N Y N Y Y P Y M D V</u> W G T G T T V T V S P 配列番号 7
9A2-V _L カッパ型	G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C G T C C T C C C T G T C T G C T T T C T G T T G G G G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G C <u>C G G G C A A G T C A G A C C A T A A G T G A T T A T</u> <u>T T A A A T</u> T G G T A C C A G C A C A A A C C A G G G G A A G C C C C T A A A C T C C T A A T C T A T <u>T C T G C A T C C A C C T</u> <u>T G C A A C G T</u> T G G G T G C C T T C A C G G T T C A G T G G C A G T G G A T C T G G G A C A G A T T T C G T T T T C A C C A T T A G T A G T C T G C A G T C T G A T G A T T T T G C G A C T T A C T A C T G T <u>C A A C A G A C T T C C A G T A C C G C C C T C</u> <u>A C T</u> T T C G G C G G A G G G A C C A A G G T G G A G G T C A A A 配列番号：8

【表 17-2】

9A2-V _L カッパ型	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR <u>ASQTISD</u> <u>YLN</u> WYQHKPGEAPKLLIY <u>SASTLQR</u> GVPSRF SSGSGSGTDFVFTISSLQSDDFATYYC <u>QQTSS</u> <u>TALT</u> FGGGTKVEVK 配列番号：9
9A2-C _H	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGGTGTCTGTGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTCCCCGGCTGTCTCTACAGTCTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAAGC ACCTGAACCTCCTGGGGGGGACCGTCACTCTC CTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCA TGATCTCCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCAACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAAACAACCTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A 配列番号：10
9A2-C _H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK 配列番号：11

10

20

30

40

【表 17-3】

9A2-C _L カップ型	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACTC CCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCCGTCAACAAGAGCTTCAACA <u>GGGGAGAGTGTTAG</u> 配列番号 12	10
9A2-C _L カップ型	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC 配列番号 : 13	
17E3-V _H	CAGGTGCAACTTGGTCCAGTCTGGGGCTGAAG TGGCGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAGACTTTTC CTGCAAGGCGTCTGGATTTCAGTTTTATCAAG <u>TATTATATGCAC</u> TGGGTGCGACAGGCCCTTG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGG <u>GTCATCGA</u> <u>GCCCACCGGTGGTGGCACAAGCTCCGCACAG</u> <u>AAGTTCCGAGAC</u> AGAGTCAACCTTGAGCAGGG ACACGTCCACGGCCACTGTCCATTTGGAAGT GAGTAGGCTGACTCTTGAGGACACGGGCATT TATTTCTGTGTGAGAGACTCCATATATTGTA <u>AACATGGGACCTGTCATCGGACTGTGATCGA</u> <u>TGCTTTTGACATT</u> TGGGGGCCAAGGGACGGCG GTCACCGTCTCTTCA 配列番号 : 14	20
17E3-V _H	QVQLVQSGAEVAKPGASVRLSCKASGFSFIK <u>YYMH</u> WVRQAPGQGLEWMGVIEPTGGGTSSAQ <u>KFRD</u> RVTLSRDTSTATVHLEVSRLTLEDTG I YFCVR <u>DSIYCKHGTCHRTVIDAFDI</u> WGQGTA VTVSS 配列番号 : 15	30
17E3-V _L カップ型	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGTCTGCATCAGTAGGAGACCGAGTCACCAT CACTTGCCCGGTCAAGTCAAGGACATAAAAAAT <u>GATTTAGCC</u> TGGTATCAGCAGAAAGCCAGGAA AAGCCCCCTGAGCGCCTGATCTAT <u>GCTGCATC</u> <u>CAATTTGCAGAGT</u> TGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGCTCTGGGACAGAAATTCAGTC TTACAATCAGTGGCCTGCAGCCTGAAGATTT TGCAACTTATTACTGT <u>CTACAGCATAATAGT</u> <u>TACCCTCTGCTCACT</u> TTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAA 配列番号 : 16	40

【表 17-4】

17E3-V _L カップ型	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR <u>SSQDIKND</u> <u>LA</u> WYQQKPGKAPERLIY <u>AA</u> <u>SNLQS</u> GVPSRFSG SSGSGTEFSLTISGLQPEDFATYYC <u>LQHNSYPL</u> <u>LT</u> FGGGTKVEIK 配列番号：17
17E3-C _H	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGGTGTCTGTGGAACCTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGACACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA CACATGCCCAACCGTGGCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCC CCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCGAGCCGGAGAACAACTACAAAGACCACGC CTCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A 配列番号：18
17E3-C _H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK 配列番号：19

10

20

30

40

【表 17-5】

17E3-C _L カップ型	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCAACA <u>AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG</u> <u>TTAG</u> 配列番号：20	10
17E3-C _L カップ型	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC 配列番号：21	
24D3-V _H	GAGGTGAAGTTGGAGGAGTCTGGGGGAGACCT GGTAAAGCCTGGGGGGTCTCTTAGACTCTCCT GTGTAGCCTCTGGATTCACTTTCGGGC <u>ACCGCC</u> <u>TGGATGAGC</u> TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAGTGGGTGGGC <u>CGTATTAGCAACA</u> <u>AAGACACTGGTGGGAGAATAGACTACGCCGCA</u> <u>CCCGTGAGAGGC</u> AGATTTCGCCATCTCAAGAGA TGATTTCGAAAGCCACCCTGTTTCTGCAAATGA ACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCCGTGTAT TTTTTGTACTACA <u>AATTTTTTACGATGTTTTGAC</u> <u>TGGTGATCATGTTGACTAT</u> TGGGGGCCAGGGAA CCGTGGTTCGTCTCTCCTCA 配列番号：22	20
24D3-V _H	EVKLEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFGTA <u>WMS</u> WVRQAPGKGLEWVG <u>RISNKDTGGRIDYAA</u> <u>PVRGR</u> FAISRDDSKATLFLQMNSLKTEDTAVY FCTT <u>NFYDVL</u> TGDHVDYWGQGTVVVVSS 配 列番号：23	30
24D3-V _L ラムダ型	TCCTATGAGCTGACACAGCCACCCTCGGTGTC AGTGTCCCCAGGAGAGACGGCCAGGATCCCCCT GC <u>TCTGGAGAAACATTGCCAAAGAACTTGTT</u> <u>TAT</u> TGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCC TGTATTGATGATTTAT <u>AAAGACAGTGAGAGGC</u> <u>CCTCA</u> CGAATATCTGAGCGATTCTCTGGCTCC AACTCAGGGACAATGGCCTCCTTGACCATCAG TGGAGTCCAGGCAGAAAGACGAGGCTGACTATT ACTGT <u>CAAACATCAGACAGCAGTGGTGTGGTT</u> TTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCTTA 配列番号：24	40
24D3-V _L ラムダ型	SYELTQPPSVSVSPGETARIPC <u>SGETLPKKLV</u> <u>YWYQQKPGQAPVLM</u> IY <u>KDSERPS</u> RISERFSGS NSGTMASLTISGVQAEDEADYYC <u>QTS</u> DSSGVV FGGGTKLTVL 配列番号：25	

【表 17-6】

24D3-C _H	G C C T C C A C C A A G G G C C C A T C G G T C T T C C C C C T G G C A C C C T C C T C C A A G A G C A C C T C T G G G G G C A C A G C G G C C C T G G G C T G C C T G G T C A A G G A C T A C T T C C C C G A A C C G G T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G C G C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T T C C C G G C T G T C C T A C A G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C G T G G T G A C C G T G C C C T C C A G C A G C T T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A C G T G A A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A A A G T T G A G C C C A A A T C T T G T G A C A A A A C T C A C A C A T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C T G A A C T C C T G G G G G G A C C G T C A G T C T T C C T C T T C C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T G G T G G A C G T G A G C C A C G A A G A C C C T G A G G T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G C G G G A G G A G C A G T A C A A C A G C A C G T A C C G T G T G G T C A G C G T C C T C A C C G T C C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A A G G A G T A C A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G C C C T C C C A G C C C C C A T C G A G A A A A C C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A T G A G C T G A C C A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T A T C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G A A C A A A C T A C A A G A C C A C G C C T C C C G T G C T G G A C T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T G G A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T A A A T G A 配列番号：26	10
24D3-C _H	A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 配列番号：27	20
24D3-C _L ラムダ型	G G T C A G C C C A A G G C T G C C C C C T C G G T C A C T C T G T T C C C G C C C T C C T C T G A G G A G C T T C A A G C C A A C A A G G C C A C A C T G G T G T G T C T C A T A A G T G A C T T C T A C C C G G G A G C C G T G A C A G T G G C C T G G A A G G C A G A T A G C A G C C C C G T C A A G G C G G G A G T G G A G A C C A C C A C A C C C T C C A A A C A A A G C A A C A A C	30
		40

【表 17-7】

	AAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGAC GCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA <u>AGCTACA</u> <u>GCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG</u> <u>GAGAAAGACAGTGGCCCCCTACAGAAATGTTCTATA</u> <u>G</u> 配列番号：28
24D3-C _L ラムダ型	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKT VAPTECS 配列番号：29
30G1-V _H	GAGGTGCAGCTGTTTGGAAATCGGGGGGAGGCTT GGTTCAGCCGGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGT <u>ACCTAT</u> <u>GCCATGAGT</u> TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAGTGGGTCTCA <u>ACTATAACTAGCA</u> <u>GTGGTGGTGCCACTTACCACGCAGACTCCGTG</u> <u>AAGGGC</u> CGGCTCACCATCTCCAGAGACAATT CAAGAACACGCTGTATTTGGAGATGAACAGCC TGAGAGTCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGT GCGAAAGATTGGGGGAAGAACGGTTTATGCGGT <u>GATCAAGGACCTTGACATC</u> TGGGGCCAGGGAA CCCTGGTTCACCGTCTCCTCA 配列番号：30
30G1-V _H	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY <u>AMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>TI TSSGGATYHADS</u> <u>V</u> <u>KGR</u> LTISRDN SKNTLYLEMNSLRVEDTAVYYC AK <u>DWGR</u> TVYAVIKDLDIWGQGTLVTVSS 配 列番号：31
30G1-V _L カップ型	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCATCCT GTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGC <u>AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTAC</u> <u>TTAGCC</u> TGGTTCCAACAAAAGCCTGGCCAGGC TCCCAGGCTCCTCATCTAT <u>GACACATCTAAGA</u> <u>GGGCCACT</u> TGGCACCCCCGCCAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT ATTTCTGT <u>CAGCAGCGTAGCGACTGGCCTCAG</u> <u>TACACT</u> TTTGGCCAGGGGACCAAACTGGAGAT CAAA 配列番号：32
30G1-V _L カップ型	EIVMTQSPA ILSVSPGERATLS C <u>RASQSVSNY</u> <u>LAW</u> FQQKPGQAPRLLIY <u>DTSKRAT</u> GTTPARFSG SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFC <u>QQRSDWPQ</u> <u>YTF</u> GQGTKLEIK 配列番号：33
30G1-C _H	GCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG

10

20

30

40

【表 17-8】

	CTTGGGCGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCA CACATGCCCCACCGTGCCCAAGCACCTGAACCTCC TGGGGGGGACCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAGGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCCTGTGTGGTCAAGCGTCTTCAACCGTCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCC CCCATCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAG GTGGCGAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A 配列番号：34	10
30G1-C _H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLSPGK 配列番号：35	30
30G1-C _L カップ型	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACA <u>AAAGTCTACG</u> <u>CCTGCGAAGTCA</u> <u>CCCCATCAGGGCCTGAGCTCG</u> <u>CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG</u> <u>TTAG</u> 配列番号：36	40

【表 17-9】

30G1-C _L カッパ型	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC 配列番号：37
35G11-V _H	CAGGTGCAGCTGGTTCAATCTGGGTCTGAGTT GAGGAGGCCTGGGGCCTCAGTGAACATTTCTCT GCAAGGCTTCTGGTTACGGCTTCAAT <u>ACTTAT</u> <u>GCTATGAAT</u> TGGGTGCGACAGGCCCTGGACA AGGGCCTGAGTGGATGGGAT <u>TGGATCAACACCG</u> <u>ACACTGGGGACCCAAACGTACGCCCAGGGGTTC</u> <u>ACGGGA</u> CGGTTTTCCTTCTTCTTGGACACGTC TGCCAGCACGGCATTTCTGTCAGATCACTCGCC TAACGGGTGAGGACACTGCCGTGTATTTCTGT GCGAGAA <u>ACTCGGAACA</u> ACTGGAAACGGCGTTTA <u>CTATCACTACTCCGGTTTGGACGTC</u> TGGGGCC AAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCA 配列番 号：38
35G11-V _H	QVQLVQSGSELRPGASVNI SCKASGYGFNTY <u>AMN</u> WVRQAPGQGPEWMG <u>WINTDTGDPTYAQGF</u> <u>TGRFA</u> FFLDTSASTAFLQITRLTGEDTAVYFC ART <u>RNNWNGVYYHYSGLDV</u> WGQGTTVTVSS 配列番号：39
35G11-V _L ラムダ型	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCTGCGTC TGGGACCCCCGGGCAGACGGTCACCATCTCCT GT <u>TCTTGGAAAGCAGCCCCAACCTCGGAGACAAT</u> <u>TATGTATACT</u> TGGTACCACCAAGTCCCAGGAAC GGCCCCCAAACCTCCTCATTTTTT <u>AGGAATACTC</u> <u>AGCGGCCCTCA</u> AGGGGTCACTGACCGATTCTCT GGCTCCAAGTATGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATAAGTGATCTCCGGTCCGACGATGAAGGTG ATTTTTTACTGT <u>GCTTCGTGGGATGACCGCCTG</u> <u>AGTCGTCTGGTG</u> TTCCGGCGGAGGGACCAAGCT GACCGTCTCTA 配列番号：40
35G11-V _L ラムダ型	QSVLTQPPSASGTPGQTVTISCS <u>SGSSPNLGDN</u> <u>YVY</u> WYHQVPGTAPKLLIF <u>RNTQRPS</u> GVTD RFS GSKYGTSA SLAISDLRSDDEGDFYC <u>ASWDDR</u> L <u>SR</u> <u>LV</u> FGGGTKLTVL 配列番号：41
35G11-C _H	GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCT GGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA CAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TCCCCGAAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTC AGGCGCCTTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCAACGAAGACCTACACCTGCAACGTA ATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCC

10

20

30

40

【表 17-10】

	ATCATGCCCAGCACCTGAGTTCTCTGGGGGGGAC CATCAGTCTTCTCTGTTCCCCCCCCAAACCCCAAG GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAT GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTG TGGTCAAGCGTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCTCCATCGAGA AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCA GGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGA CCTGCCCTGGTCAAAGGCCTTCTACCCCAAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCC GGAGAACAACTACAAGACCAACGCCTCCCGTG TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC AGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGA GGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCTGGGGTAAATGA 配列番号：4 2	10
35G11-C _H	ASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR EPQVYITLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK 配列番号：43	30
35G11-C _L ラムダ型	GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCT GTTCCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCA ACAAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAGTGAC TTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAA GGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGG AGACCACACACCCTCCAAACAAAGCAACAAC AAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC GCCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAAGCTACA <u>GCTGCCAGGTCAACGCATGAAGGGAGCACCGTG</u> <u>GAGAAAGACAGTGGCCCCCTACAGAAATGTTCTATA</u> <u>G</u> 配列番号：44	40
35G11-C _L ラムダ型	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVA PTECS 配列番号：45	

【表 17-11】

41D11-V _{II}	CAGGTGCAACTACATGAGTCGGGCCCAGGACT GGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCGTAACT GCAGTCTCTCTGGTGGCTCCATCAGT <u>AGTAGT</u> <u>AGTCACCTGTGGGCC</u> TGGATCCGCCAGCCCC AGAGAAGGGACTGGAATATATCGGG <u>CGTATTC</u> <u>ATTATAGGGGCAGTGTGTCTCTACAATCCGTCC</u> <u>CTCAAGAGT</u> TCGCGCCGCCATTTCGTGACAC GGCCAAGAACCAAGTTCTCCCTGACGTTGAGTG CTGTGACCGCCGCAGACACGTCTTTTATTAC TGTGCGAGAC <u>CTGGACATGGGGGCAATAGACAA</u> <u>G</u> TGGGGCCAGGGAACCCCTGGTTCATCGTCTCCT CA 配列番号：46	10
41D11-V _H	QVQLHESGPGLVKPSSETLSVTCSLSGGSSISS <u>SS</u> <u>SHLWAWIRQPPEKGL EYIGRIHYRGSVSYNPS</u> <u>LKS</u> RAAISVD TAKNQFSLT LSAVTAADTSFY CAR <u>LDMGAIDK</u> WGQGTLVIVSS 配列番号：47	20
41D11-V _L ラムダ型	CAGCCTGTGCTGACTCAATCGCCCTCTGCCTC TGCCCTCCCTGGGAGCCTCGATCAAACCTCACCT GC <u>ACTCTGAGCAGTGGACACAGCAACTACGAC</u> <u>ATCGCT</u> TGGCATCAACAGCAGTCGGGGGAAGGG CCCTCGATTCTTGATGAGAGTTAACAATGGTG GAAGCCACAACAAGGGGGGACGGGATCCCTGAT CGTTTCTCAGGCTCCAGCTCTGGGGGCAGAGCG CTACCTCACAAATCTCCAGTCTCCAGTCTGAGG ATGAGGCTGACTATTATTGT <u>CAGACATGGGGC</u> <u>ACTGGCACTCATGTCT</u> TTCGGCACTGGGACTAA GGTCACCGTCCTG 配列番号：48	30
41D11-V _L ラムダ型	QPVL TQSP SASASLGASIKLTCT <u>TLSSGHSNYD</u> <u>I</u> AWHQQQSGKGRFLMR <u>VNNGGSHNKGD</u> GIPD RFSGSSSSGAERYLTISSSLQSEDEADYYC <u>QTWG</u> <u>TGTHV</u> FVFGTGTKVTVL 配列番号：49	40
41D11-C _H	GCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGCCCAAATCTTGTTGACAAAACCTCA CACATGCCCAACCGTGCACAGCCTGAACCTCC TGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA	40

【表 17-12】

	CGTACCGTGTTGGTTCAGCGTCTCACCGTCTCTG CACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGG TCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTATAGCAAGT <u>TT</u> CACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATG A 配列番号：50	10
41D11-C _H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSK <u>ET</u> VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLSPGK 配列番号：51	20
41D11-C _L ラムダ型	GGTCAGCCCCAAGGCCCAACCCCACTGTCACTCT GTTCCCGCCCTCCTCTGTAGGAGCTCCAAGCCA ACAAGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGAC TTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAA GGCAGATGGCAGCCCCGTCAAAGGCGGGAGTGG AGACCACCAAAACCCCTCCAACAGAGCAACAAC AAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC GCCCGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAA <u>AGCTACA</u> <u>GCTGCCAGGTCAACGCATGAAGGGAGCACCGGTG</u> <u>GAGAAAGACAGTGGCCCCCTACAGAAATGTTCTATA</u> <u>G</u> 配列番号：52	30
41D11-C _L ラムダ型	GQPKANPTVTTLFPSSSEELQANKATLVCLISD FYPGA VTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKT VAPTECS 配列番号：53	40
51G4-V _H	<u>GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGT</u> <u>GAAGAAGCCTGGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCAT</u> <u>GTAAAACCTTCTGGATACAAATTCGCTCTCTAT</u> <u>GATATTCA</u> TGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACA AGGGCTTGAGTGGATGGGC <u>TGGATCAACGCTG</u> <u>CCAATGGTGACACAGAATATTCACAGAAGTTT</u> <u>GAGGGCAGAGTCAACCATTAACAGGGACACATC</u> <u>GGCGACTACAGTCTACATGGAGTTGAACAGTC</u>	

【表 17-13】

	TGACATATGGCGACACGGCCGTGTACTACTGT GCGAGAGAGGAAGGTCTCTACAACCTGGTTTCGA CCCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCT CCTCA 配列番号：54
51G4-V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYKFALY DIHWVRQAPGQGLEWMGWINAANGDTEYSQKF EGRVTITRDTSATTVYMEINSLTYGDTAVYYC AREEGLYNWFDPWGQGTLVTVSS 配列番号：55
51G4-V _L	TCCTATGAGCTGACACAGGACCCCTGCTGTGTC TGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACAT GCCAAGGAGACAGCCTCAGAAATCTATTATGCA AACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCC TGTTCCTTGTCATCTATGGTAAAAGCAACCGGC CCTCAGGGATCCCAGACCCGATTCTCTGCCTCC AGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCAC TGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATT ACTGTAACTCCCGGGACAGCAGTGATAAGCAT CCGGTGCCTTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGAC CGTCCTA 配列番号：56
51G4-V _L	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRIYYA NWYQQKPGQAPVLVIYGKSNRPSGIPDRFSAS SSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS SDKH PVPFGGGTKLTVL 配列番号：57
51G4-C _H	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTC AGGTGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CAGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAA CTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAG ATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG ACAGTTGAGCGCAAAATGTTGTGTGAGTGCCC ACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCACAACCCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACG GGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGG TCAGCGTCTTCAACCGTTGTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAACCAAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGG

10

20

30

40

【表 17-14】

	A C T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T G G A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T A A A T G A 配列番号：58
51G4-C _H	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 配列番号：59
51G4-C _L	<u>A G T C A G C C C A A G G C T G C C C C C T C G G T C A C T C T</u> <u>G T T C C C G C C C T C C T C T G A G G A G C T T C A A G C C A</u> <u>A C A A G G C C A C A C T G G T G T G T C T C A T A A G T G A C</u> <u>T T C T A C C C G G G A G C C G T G A C A G T G G C C T G G A A</u> <u>G G C A G A T A G C A G C C C C G T C A A G G C G G G A G T G G</u> <u>A G A C C A C C A C A C C C T C C A A A C A A A G C A A C A A C</u> <u>A A G T A C G C G G C C A G C A G C T A T C T G A G C C T G A C</u> <u>G C C T G A G C A G T G G A A G T C C C A C A G A A G C T A C A</u> <u>G C T G C C A G G T C A C G C A T G A A G G G A G C A C C G T G</u> <u>G A G A A G A C A G T G G C C C C T A C A G A A T G T T C A T A</u> <u>G</u> 配列番号：60
51G4-C _L	S Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S 配列番号：61

【0101】

当業者であれば、所望の特異性および生物学的機能の他のポリペプチドまたは抗体を構築するために、上記可変ドメインを有する抗体の可変ドメインを使用することができることを容易に認識するであろう。したがって、本発明はまた、上記可変ドメインの少なくとも1つのCDRを含むポリペプチドおよび抗体であって、有利には、添付の実施例に記載されている抗体と実質的に同じかまたは類似の結合特性を有するポリペプチドおよび抗体を包含する。当業者であれば、該可変ドメインまたはCDRを使用して、例えば、欧州特許出願公開第0451216号明細書および欧州特許出願公開第0549581号明細書に記載されている当技術分野において公知の方法にしたがって、本明細書に記載される抗体を構築することができることを容易に認識するであろう。さらに、当業者であれば、Kabatによって定義されているCDRと部分的にオーバーラップするCDR内または超可変ループ内にアミノ酸置換を作ることによって（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917）、結合親和性を増強することができることを理解している。したがって、本発明はまた、上記CDRの1つ以上が、1つ以上、好ましくは2つ以下のアミノ酸置換を含む抗体に関する。好ましくは、本発明の抗体は、その免疫グロブリン鎖の一方または両方に、配列番号7、9、15、17、23、25、31、33、39、41、47、49、55または57に示されているか、

または図15に示されている可変領域の2つまたは全3つのCDRを含む。

【0102】

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

【0103】

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

【0104】

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

【0105】

同様に、前記ポリヌクレオチドは同じプロモータの制御下にあってもよいし、または別個に発現制御されてもよい。原核生物宿主細胞における発現を可能にする有望な調節要素は、例えば、大腸菌の場合には P_L 、 lac 、 trp または tac プロモータを含み、真核生物宿主細胞における発現を可能にする調節要素の例は、酵母の場合にはAOX1またはGAL1プロモータ、または哺乳動物および他の動物細胞の場合にはCMV-、SV40-、RSV-プロモータ、CMV-エンハンサ、SV40-エンハンサまたはグロビンイントロンである。

【0106】

転写開始に関与する要素に加えて、このような調節要素は、ポリヌクレオチドの下流に、SV40-ポリA部位またはtk-ポリA部位などの転写終止シグナルも含み得る。さらに、使用される発現系に応じて、ポリペプチドを細胞区画に方向付けるかまたはそれを培地に分泌させることができるリーダ配列を本発明のポリヌクレオチドのコード配列に付加することができ、当技術分野において周知である。リーダ配列は、翻訳、開始および終止配列と適切な段階で会合し、好ましくは、リーダ配列は、翻訳されたタンパク質またはその一部を周辺腔または細胞外培地に分泌させることができる。場合により、異種配列は、所望の特徴、例えば、発現された組換え産物の安定化または簡単な精製を付与するC末端またはN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。本文脈では、Okayama-Berg cDNA発現ベクタpcDV1 (Pharmacia)、pcDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen) またはpSPORT1 (GIBCO BRL) などの適切な発現ベクタが当技術分野において公知である。

【0107】

好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクタ中の真核生物プロモータ系であるが、原核生物宿主用の制御配列も使用し得る。ベクタが適切な宿主に組み込まれたら、ヌクレオチド配列の高レベルの発現に適切な条件下で宿主を維持し、所望により、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、軽鎖／重鎖二量体またはインタクトな抗体、結合断片または他の免疫グロブリン形態を回収および精製する； Beychok, Cells of Immunoglobulin Synth

10

20

30

40

50

esis, Academic Press, N. Y., (1979) を参照のこと。

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

結合分子、抗体またはその断片は、治療薬として直接使用することができる。しかしながら、一実施形態では、本発明によって提供される抗体または抗原結合断片は、検出可能に標識されるか、または薬物に結合され、ここで、検出可能な標識は、酵素、放射性同位体、フルオロフォア、ペプチドおよび重金属からなる群より選択される。標識された本発明の抗体または抗原結合断片は、「免疫化学／免疫標識」のようなインビトロアッセイを含め、インビボまたはインビトロで特定の標的を検出するのに使用することができる。インビボにおいて、それらは、目的の抗原を発現する組織、細胞または他の物質を検出するために、核医学イメージング技術と同様の方法で使用することができる。標識、それらの診断での使用、およびそれらと本発明の結合分子とのカップリングは、さらに以下のセクション「標識および診断」により詳細に記載されている。

【0112】

本発明の抗体は、自己免疫性障害に罹患している動物またはヒトから単離される。内因性分子（例えば、表1～14または表29～31に含まれるタンパク質）に結合することによって、それらのいくつかは、腫瘍または神経変性疾患の処置に使用することができる。一方、本発明で同定された抗体は、上記および下記により詳細に記載されているように、炎症を誘導に関与し得るか、または例えば、APCED患者で観察される症候に関連

する罹患個体の免疫系を重度に障害し得る。したがって、本発明のさらなる態様は、罹患ヒト患者または動物における自己抗体の数および／またはその作用を最小限に抑えるための手段および方策を提供することによって、自己免疫性障害を患っている被験体の病理学的反応を消滅または少なくとも軽減することである。したがって、一実施形態では、本発明はまた、本発明の自己抗体の抗イディオタイプ抗体を提供する。競合抗原を適用し、それにより、自己抗体とそれらの各標的とを隔絶してその結合を防止することによって、同様の効果を得ることができる。したがって、一実施形態では、本発明はまた、すなわち、本発明の方法にしたがって単離された本発明の自己抗体によって特異的に認識されるエピトープを含む合成ペプチドまたはペプチド系化合物に関する。

【0113】

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

【0114】

自己免疫性疾患関連自己抗体（複数の自己抗体）のイディオタイプを模倣する分子を提供する方法は、当技術分野において説明されている；例えば、国際公開第03/099868号（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。例えば、このような方法は、以下の工程：（a）本発明の方法にしたがって自己抗体を提供すること；（b）該自己抗体を固相に結合してアフィニティマトリックスを形成すること；（c）免疫グロブリンを含むプールした血漿もしくはB細胞を該アフィニティマトリックスと接触させ、次いで未結合の血漿成分を除去すること；（d）自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体（抗Id）である結合した免疫グロブリンをマトリックスから溶出すること；（e）複数の分子メンバーを含む分子ライブラリを提供すること；ならびに（e）該抗Idを該分子ライブラリと接触させ、該抗Idが結合した結合分子を単離すること（該結合分子は、自己抗体のイディオタイプを模倣する分子である）を含み得る。自己抗体を単離する方法は、国際公開第2010/136196号（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に開示されており、自己免疫性疾患および免疫系障害を処置するための、正常ヒト血清（NHS）から単離された天然ポリクローナルIgG反応性抗体（Ab）を含有する免疫グロブリン調製物が記載されている。IgG反応性Abは、抗原結合部位内またはその付近（例えば、オーバーラップしている）のいずれかに位置するそれらの抗原決定基に結合することによって、自己免疫性疾患を患っている患者の血清中に存在する疾患関連または病原性自己抗体を強力に中和する。

【0115】

さらに、本発明はまた、上記抗体もしくは抗原結合断片、ポリヌクレオチド、ペクタ、細胞、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド系化合物を含む組成物に関する。一実施形態では組成物は医薬組成物であり、薬学的に許容し得る担体をさらに含む、薬学的に許容し得る担体、投与経路および投与計画は、当業者に公知の対応する文献から選ぶことができ、さらに以下のセクション「薬学的に許容し得る担体」および「投与計画」にもより詳細に記載されている。

【0116】

生化学的および細胞ベースのインビトロアッセイの他に、本発明の抗体の治療有用性は、乾癬、IBD、カンジダ症などの適切な動物モデルで検証することができる；実施例5および6、ならびに炎症性腸疾患IBD（DSS大腸炎）モデルについてはWirtz et al, Nature Protocols 2（2007）, 541-546；乾癬（イミキモド）モデルについてはvan der Fits et al, J Immunol 182（2009）, 5836-5845；多発性硬化症（実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルについてはMiller, S. D. and Karpus, W. J., Current Protocols in Immunology. 78（2007.）, 15.1.1-15.1.18および<http://hookelabs.com/products/eae/>；関節リウマチ（コラーゲン誘導性関節炎）モデルについてはJulia J Inglis et al, Nature Protocols 3（2008）, 612-618を参照のこと。

10

【0117】

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

【0118】

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

20

【0119】

さらに、本発明は、炎症もしくは自己免疫性障害の進行を処置または予防するのに使用するための；炎症もしくは自己免疫性障害に関連する症候を改善するための；炎症もしくは自己免疫性障害の存在について被験体を診断またはスクリーニングするための、または炎症もしくは自己免疫性障害を発症する被験体のリスクを決定するための、上記抗体もしくは抗原結合断片、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド系化合物を提供する。

【0120】

これに関して、いくつかの適用経路を用いることができる。本発明の一実施形態では、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、非経口投与、またはエアロゾルとして投与されるように設計されている、上記抗体もしくは抗原結合断片、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド系化合物が提供される。

30

【0121】

例えば、炎症に関連する障害の処置に適切な多数の分子により、本発明はまた、このような障害のいくつかの処置方法を提供する。一実施形態では、炎症または自己免疫性障害に関連する障害を処置する方法であって、治療有効量の上記抗体もしくは抗原結合断片、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド系化合物を、それを必要とする被験体に投与することを含む方法が提供される。

40

【0122】

この方法の一実施形態では、前記障害は、尋常性座瘡；関節炎、例えば、痛風性関節炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、変形性関節症、乾癬性関節炎、関節リウマチ；喘息；セリアック病；慢性前立腺炎；皮膚炎；真性糖尿病1型；糸球体腎炎；過敏症；心筋炎；多発性硬化症；炎症性腸疾患；骨盤内炎症性疾患；多発性筋炎；乾癬；サルコイドーシス；血管炎；APS1；間質性膀胱炎または再灌流障害もしくは移植拒絶反応により生じる炎症からなる群より選択される（上記を参照のこと）。

【0123】

さらに、一実施形態では、本発明は、炎症または自己免疫性障害に関係する障害を診断および／または処置する方法であって、

50

(i) 上記抗体もしくは抗原結合断片の少なくとも1つのCDR；または

(ii) 少なくとも1つの上記抗イディオタイプ抗体および／またはペプチドもしくはペプチド系化合物

を含む治療有効量のリガンド結合分子を被験体に投与することを含む方法に関する。

【0124】

疾患に関係するかまたはこれを引き起こしている特定の抗原のエピトープに対して特異的な1つのモノクローナル抗体のみの使用に基づく処置方法は、いくつかの欠点に悩まされる場合がある。例えば、処置の困難性およびおそらくは非効率性は、いくつかの抗原を同時に標的化することを必要とする特定の障害を引き起こす病原性機構の多様性に起因し得る。さらに、異なるまたは1人の患者のいずれかでは、例えば、多型、グリコシル化の不均一性、または所定の抗原のわずかな変性に関して患者集団の固有の多様性を考慮しなければならず、これらは、少なくとも使用されるモノクローナル抗体の結合効率の低下につながり得る。これらの欠点のいくつかは、例えば、処置しようとする患者に抗原が免疫学的に関連しているか、および特定の患者において任意のエピトープ変化があるかを決定する前処理スクリーニングによって回避することができる。しかしながら、このようなスクリーニングは、処置の緊急性またはコスト的な制約のいずれかにより省略されることが多い。したがって、本発明はさらに、2種以上の結合分子を患者に同時に適用することに基づく方法に関する。これらの結合分子は、異なるエピトープで1つの抗原に特異的に結合し得るか、または適用される結合分子はそれぞれ、別の疾患関連抗原に特異的に結合する。本発明の結合分子が1つの抗原に対するものである（特異的に結合する）場合、それらの結合特異性は、前記抗原の異なるエピトープに対するものである。自己免疫性障害（例えば、APS1）を患っている患者であって、約3000種の内因性抗原に対する自己抗体の存在を考慮すると、1つ特定の抗体による単剤療法が多くの場合に適さない患者を処置するために、このようなカクテルの使用が特に想定される。このような場合において、同じかまたは異なる抗原特異性を有する2つ以上の本発明のモノクローナル抗体ならびに／またはペプチドおよびペプチド系化合物による併用療法は、症候の少なくともいくつかの軽減を達成すると予想される。

【0125】

したがって、一実施形態では、障害を処置するさらなる方法であって、

—表1～14および29～31ならびに図1～4に示されているような、炎症、自己免疫性障害、細胞の成長および分化、筋肉機能、ならびに神経変性に関与する分泌型タンパク質または膜貫通型タンパク質の群の抗原に特異的に結合する本発明の抗体またはその抗原結合断片；および／または

—本発明の抗イディオタイプ抗体、および／または本発明の抗体もしくはその抗原結合断片によって特異的に認識されるエピトープを含む本発明のペプチドもしくはペプチド系化合物

からなる群より選択される少なくとも2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の成分から本質的になる治療有効量のカクテルを被験体に投与することを含む方法が提供される。

【0126】

別の実施形態では、本発明は、ペプチドの請求項のいずれか1つで定義された障害関連タンパク質の存在を伴う障害を診断するためのキットであって、上記抗体もしくは抗原結合断片、抗イディオタイプ抗体またはペプチドもしくはペプチド系化合物、ポリヌクレオチド、ベクタまたは細胞を、場合により使用のための試薬および／または説明書と共に含むキットに関する。例えば、キットを含む容器内には、薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を監督する官庁が規定する形態の通知書を本発明のキットに付随させることができ、その通知書は製造、使用または販売についての上記官庁によるヒトへの投与に対する認可を反映する。加えてまたはあるいは、キットは、適切な診断アッセイでの使用のための試薬および／または説明書を含む。当然のことながら、組成物（すなわち、本発明のキット）は、上記に定義された炎症関連抗原の存在を伴う障害の診断、予防および処置に特に適切であり、上記疾患の処置に特に適用可能である。

【0127】

別の実施形態では、本発明は、上記本発明の結合分子、抗体、抗原結合断片、ペプチドもしくはペプチド系化合物、ポリヌクレオチド、ペクタまたは細胞のうちのいずれか1つ、および場合により、免疫診断法または核酸ベースの診断法で通常使用される試薬などの検出に適切な手段を含む診断組成物に関する。本発明の抗体は、例えば、それらを液相でまたは固相担体に結合して利用することができるイムノアッセイで使用するのに適切である。本発明の抗体を利用することができるイムノアッセイの例は、直接または間接フォーマットのいずれかの競合および非競合イムノアッセイである。このようなイムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ（RIA）、サンドイッチ（イムノメトリックアッセイ）、フローサイトメトリおよびウェスタンブロットアッセイである。本発明の抗原および抗体を多くの異なる担体に結合させ、それらに特異的に結合した細胞を単離するのに使用することができる。周知の担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトが挙げられる。担体の性質は、本発明の目的のために、可溶性または不溶性のいずれかであり得る。当業者に公知の多くの異なる標識および標識方法がある。本発明に使用することができる標識の種類例としては、酵素、放射性同位体、コロイド状金属、蛍光化合物、化学発光化合物および生物発光化合物が挙げられる（上記実施形態も参照のこと）。

10

【0128】

本文脈では、本発明はまた、この目的のために特別に設計される手段に関する。例えば、自己免疫性疾患、特に関節炎、I型糖尿病またはAPECED/APS1を患っている患者内に存在し得る自己抗体を検出するためには、炎症関連抗原を含有する上記障害関連タンパク質由来の抗原、またはそれらの炎症関連抗原のいずれか1つを特異的に認識する本発明の自己抗体もしくは同等の抗原結合分子のいずれかが負荷されたタンパク質または抗体ベースのアレイを使用することができる。マイクロアレイイムノアッセイの設計は、Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696に要約されている。したがって、本発明はまた、本発明にしたがって同定された結合分子または抗原が負荷されたマイクロアレイに関する。

20

【0129】

定義および実施形態

特に指定がない限り、本明細書で使用される用語には、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997、2000年改訂および2003年再版、ISBN0198506732で提供されている定義が与えられる。

30

【0130】

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

【0131】

用語「中和する」および「中和抗体」はそれぞれ、当技術分野では共通して、抗原または生きている微生物の生物学的活性を減少させるか、または少なくともいくつかの消失させる抗体を意味するものとして使用されている。例えば、本発明の抗IL-17F抗体は、例えば実施例に記載されているアッセイにおいて、適切な量でサイトカイン活性を消失させる場合には中和抗体である。中和は、50%阻害濃度（IC50）によって一般に定義され、中和滴定曲線下面積（AUC）に基づいて統計的に評価することができる。腫瘍疾患の場合、中和は、例えば、腫瘍成長の阻害を測定することによって評価することができる。例えば、発癌性移植片誘導性のインターロイキン-6分泌が腫瘍形成に必要であること、および対応する癌治療に抗IL-6抗体を使用することができることが公知である；例えば、Ancrile et al., 「Genes and developme

40

50

nt」21(2007), 1714-1719を参照のこと。ウイルスなどの感染性病原体の中和は、例えば、ウイルスの受容体を遮断して感染細胞を減少させることによって、ウイルスまたはその標的細胞の反応を介した感染性を喪失させることと定義され、当業者に公知の適切な細胞ベースのアッセイで容易に決定することができる。当業者であれば、本発明の抗体によって「中和」され得る他の生物学的活性を容易に確認することができる。

【0132】

中枢性および末梢性寛容

自己寛容は、免疫系が、その生物の構成成分である抗原に反応しない過程である。自己寛容は、自己反応性T細胞およびB細胞の死滅または不活性化によって達成され、中心的(生成的)な免疫器官(胸腺または骨髄)における中枢性寛容の一部として、または最も一般的に二次免疫組織とみなされるもの(例えば、脾臓、リンパ節、腸)における末梢性寛容として起こり得る。自己寛容は、正常な免疫系の中心的な特徴である。自己寛容を確立および／または維持することができないと自己免疫になり、宿主生物の健康に深刻な影響を及ぼす自己免疫性疾患をもたらす得る。

【0133】

中枢性寛容は、胸腺および骨髄などの中心的な免疫器官で誘導される自己寛容の一形態である。中枢性寛容の過程において、自己抗原を認識する新たに発達したT細胞およびB細胞は、細胞死によって、不活性化の他の形態によって、または免疫抑制調節リンパ球への発達の変換によって自己抗原非反応性になる。T細胞の中枢性寛容は胸腺で誘導され、そこで、高親和性で自己ペプチド-MHC複合体を認識する発達中の胸腺細胞(胸腺内のT細胞)の大部分が除かれる。B細胞の中枢性寛容は、骨髄で誘導される。胸腺および骨髄における分化の間に、T細胞およびB細胞は、T細胞受容体遺伝子およびB細胞受容体遺伝子をそれぞれ含有するそれらのゲノム領域を再編成する。V(D)J組換えとも称される体細胞遺伝子再編成は、T細胞受容体および抗体の多様性を生み出す。この多様性は、T細胞およびB細胞クローンのレパートリーの基礎となる。V(D)J組換えの後、成熟T細胞および成熟B細胞は、抗原を認識することができる。この段階で抗原を認識することによって、その抗原受容体が生成的な免疫器官内に存在する自己抗原に強く結合する発達中のT細胞およびB細胞を排除または改変する陰性選択が可能になる。T細胞およびB細胞は両方とも、T細胞受容体およびB細胞受容体がそれぞれ細胞表面上に最初に現れた後短期間に陰性選択を受けやすい。

【0134】

T細胞およびB細胞は、生成的な免疫器官内に存在する抗原に対して中枢性寛容を発達させることができる。骨髄では、B細胞は、遍在的に発現している骨髄特異的抗原に対して、および血液の循環によって取り込まれた抗原に対して寛容を発達させる。胸腺では、胸腺髄質上皮細胞は、発達中のT細胞に提示される数百の自己抗原を発現することができる。胸腺髄質上皮細胞における自己抗原の広範な発現に関与する遺伝子は、AIRE(自己免疫調節因子)である。AIREは、特定の末梢器官でのみ通常発現している複数の組織特異的遺伝子(例えば、膵臓のランゲルハンス島におけるインスリン)を活性化する。機能的AIRE遺伝子の非存在下では、抗原が提示されず、T細胞が不活性化されず、自己抗原に対する自己免疫が発達して、APCED患者およびAire欠損マウスでは病変をもたらす。

【0135】

中枢性寛容は、細胞が依然として生成的な免疫器官内に存在する間に、末梢に移行する前に、細胞が末梢に到達してから末梢性寛容が生じる間に起こるという点で末梢性寛容と区別される。

【0136】

末梢性寛容は、T細胞およびB細胞が末梢組織内の抗原に反応しない自己寛容の一形態である。末梢性寛容は、リンパ球活性化に必要な共刺激シグナルの非存在下、もしくは共阻害シグナルの存在下における抗原の認識によって、またはこれらの抗原によって繰り返

される永続的な刺激によって誘導される。これらの抗原は、直接的な免疫学的監視下にな
い免疫学的特権組織、例えば、脳、眼、精巣および胎児で発現されるので、末梢性寛容は
、自己反応性リンパ球が活性化されない免疫学的無視を含む。末梢性寛容はまた、制御性
T細胞による自己反応性細胞の抑制を含む。

【0137】

AIRE発現は、胸腺外で、リンパ節におけるAIRE発現細胞の小集団で報告されて
いる。したがって、AIREは、末梢における自己反応性T細胞の削除を介して、自己寛
容において重要な役割を果たし得る。リンパ節における珍しいAIRE発現細胞は、プロ
フェッショナル抗原提示細胞として作用し、組織特異的抗原を発現するように、胸腺髄質
上皮細胞といくつかの特徴を共有する。これにもかかわらず、リンパ節におけるAIRE
調節組織特異的抗原のセットは、胸腺のAIRE調節抗原とほとんどオーバーラップしな
い。オーバーラップの欠如は、胸腺とリンパ節との間の組織特異的抗原発現について、様
々な順序のAIRE依存性転写調節が存在し得ることを示唆している。

【0138】

寛容の誘導に重要な別の遺伝子は、foxp3である。これは、胸腺およびおそらくは
末梢における自己抗原と会合するTリンパ球の免疫抑制調節的な方向付けを誘導する転写
因子をコードする。機能的foxp3遺伝子をコードすることができないのは、その結果
として幅広い自己免疫性疾患も患っているIPEX患者の特徴である。

【0139】

ペプチドおよびポリペプチド：

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

【0140】

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

【0141】

用語「ポリペプチド」はまた、限定されないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化
、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解による切断、ま
たは天然に存在しないアミノ酸による改変を含むポリペプチドの発現後修飾産物を指すこ
とを意図する。ポリペプチドは天然の生物学的供給源に由来するものでもよいし、または
組換え技術によって生産されるものでもよいが、必ずしも指定の核酸配列から翻訳される
ものではない。それは、化学合成を含む任意の方法で作製され得る。

【0142】

本発明のポリペプチドは、約3個以上、5個以上、10個以上、20個以上、25個以

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

10

【0143】

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

【0144】

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

20

【0145】

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

30

40

【0146】

用語「断片」、「変異体」、「誘導体」および「類似体」は、本発明の抗体または抗体ポリペプチドに言及する場合、対応する天然結合分子、抗体またはポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチド断

50

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

10

【0147】

抗イディオタイプ抗体：

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

20

【0148】

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

30

【0149】

米国特許出願公開第20020142356号明細書には、抗体をコートとしておよび抗イディオタイプ抗体を検出として使用した（その逆もまた同様である）抗原の競合イムノアッセイが記載されている。抗イディオタイプ抗体を代理抗原として使用することが開示されている他の参考文献としては、Losman et al., Cancer Research, 55 (1995) (23 suppl. S): S5978-S5982; Becker et al., J. of Immunol. Methods 192 (1996), 73-85; Baral et al., International J. of Cancer, 92 (2001), 88-95; および Kohen et al., Food and Agriculture Immunology, 12 (2000), 193-201 が挙げられる。疾患の処置においてまたは寄生虫に対して抗イディオタイプ抗体を使用することは、当技術分野において公知である；例えば、Sacks et al., J. Exper. Medicine, 155 (1982), 1108-1119 を参照のこと。

40

【0150】

分子の類似性および／または同一性の決定：

2つのペプチド間の「類似性」は、第1のペプチドのアミノ酸配列を第2のペプチドの

50

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

10

【0151】

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

【0152】

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

20

【0153】

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

30

【0154】

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

40

【0155】

ポリヌクレオチド：

用語「ポリヌクレオチド」は、単数の核酸および複数の核酸を包含することを意図し、単離された核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) またはプラスミドDNA (pDNA) を指す。ポリヌクレオチドは、通常ホスフォジエステル結合または非通常型結合 (例えば、ペプチド核酸 (PNA) に見られるようなアミド結合) を含むことができる。用語「核酸」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つ以上の

50

核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNA断片を指す。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドは、その天然環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAを意図する。例えば、ベクタに含まれる抗体をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されたとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞で維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の（部分的または実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子としては、本発明のポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロRNA転写産物が挙げられる。本発明にしたがって単離されたポリヌクレオチドまたは核酸としてはさらに、合成的に生産されたこのような分子が挙げられる。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモータ、リボソーム結合部位または転写ターミネータなどの調節要素でもよいし、またはこれらを含んでもよい。

10

【0156】

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

20

【0157】

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

30

40

【0158】

様々な転写制御領域が当業者に公知である。これらとしては、限定されないが、脊椎動物細胞で機能する転写制御領域、例えば限定されないが、サイトメガロウイルス（イントロン-Aを含む前初期プロモータ）、シミアンウイルス40（初期プロモータ）および（ラウス肉腫ウイルスなどの）レトロウイルス由来のプロモータおよびエンハンサセグメントが挙げられる。他の転写制御領域としては、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモンおよびウサギβグロビンなどの脊椎動物遺伝子由来のもの、ならびに真核細胞

50

での遺伝子発現を制御することができる他の配列が挙げられる。他の適切な転写制御領域としては、組織特異的プロモータおよびエンハンサ、ならびにリンホカイン誘導性プロモータ（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導可能なプロモータ）が挙げられる。

【0159】

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

【0160】

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

【0161】

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

【0162】

発現：

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

【0163】

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

10

20

30

40

50

バコモザイクウイルス、TMV：）もしくは細菌発現ベクタ（例えば、TiもしくはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。

【0164】

ペプチド、ポリペプチドまたは融合タンパク質（以下、「産物」と称される）を宿主細胞中で発現させるために、以下のような手順を使用することができる。前記産物をコードするDNA配列を含有する制限断片を、宿主細胞で機能する複製起点および適切な選択可能マーカを含有する適切な組換えプラスミドにクローニングすることができる。プラスミドは、産物の誘導性発現用のプロモータ（例えば、pTrc（Amann et al., Gene 69 (1988), 301-315）およびpET11d（Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990), 60-89）を含むことができる。組換えプラスミドを、例えば、エレクトロポレーションによって宿主細胞に導入することができ、組換えプラスミドを含有する細胞を、プラスミド上のマーカについて選択することによって特定することができる。産物に対して特異的なアッセイを使用して、産物の発現を宿主細胞で誘導および検出することができる。

【0165】

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

【0166】

あるいは、産物の発現は、無細胞抽出物中でのインビトロタンパク質合成によって実施することができ、これは、機能的な研究のための改変または非天然アミノ酸の導入にも特に適している（下記も参照のこと）。過剰発現産物が宿主細胞に対して毒性である場合、産物が不溶性であるかまたは封入体を形成する場合、またはタンパク質が細胞内プロテアーゼによって急速なタンパク質分解を受ける場合、インビトロ翻訳系の使用は、インビボ遺伝子発現よりも利点を有し得る。最も頻繁に使用される無細胞翻訳系は、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽および大腸菌由来の抽出物からなる。すべてが、外因性RNAの翻訳に必要なすべての高分子成分（70Sまたは80Sリボソーム、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素、開始、伸長および終結因子など）を含む粗抽出物として調製される。効率的な翻訳を確実にするためには、アミノ酸、エネルギー源（ATP、GTP）、エネルギー再生系（真核生物系の場合にはクレアチンリン酸およびクレアチンホスホキナーゼ、ならびに大腸菌溶解物の場合にはホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼ）、および当技術分野において公知の他の補因子（ Mg^{2+} 、 K^{+} など）を各抽出物に補充しなければならない。適切な転写／翻訳系は、例えば、Promega Corporation、Roche Diagnostics、およびAmbion、すなわち、Applied Biosystemsから市販されている（Anderson, C. et al., Meth. Enzymol. 101 (1983), 635-644; Arduengo, M. et al. (2007), The Role of Cell-Free Rabbit Reticulocyte Expression Systems in Functional Proteomics in, Kudlicki, Katzen and Bennett eds., Cell-Free Expression Vol. 2007. Austin, Tx: Landes Bioscience, pp. 1-18; Chen and Zubay, Meth. Enzymol. 101 (1983), 674-90; Ezure et al., Biotechnol. Prog. 22 (2006), 1570-1577)。

【0167】

宿主細胞：

本発明に関して、宿主細胞は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物またはヒト細胞などの原

10

20

30

40

50

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

【0168】

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

【0169】

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

し、またはアッセイ手順の開発および実施に使用してもよい。

【0170】

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

【0171】

ELISAアッセイ：

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

【0172】

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

【0173】

結合分子：

本発明との関連で使用される場合、「結合分子」は主に、抗体およびその断片に関するが、表1～14および28～31に含まれる本発明の「目的の分子」に結合する他の非抗体分子を指す場合もあり、ここで、目的の分子は、タンパク質、ペプチド、多糖、リポポリタンパク質およびリポ多糖、例えば限定されないが、ロイコトリエン、リンホカインおよびサイトカイン、例えば、インターロイキンおよびインターフェロンである。本発明の目的の分子は、以下の本発明の特定の実施形態の説明内でさらに詳細に定義される。本発明の結合分子としては、限定されないが、ホルモン、受容体、リガンド、主要組織適合複合体（MHC）分子、シャペロン、例えば、熱ショックタンパク質（HSP）および細胞間接着分子、例えば、カドヘリン、インテグリン、C型レクチンおよび免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリのメンバーが挙げられる。したがって、単に明確にするために、本発明の範囲を限定するものではないが、以下の実施形態の大部分では、治療剤および診断剤の開発に好ましい結合分子の代表的なものである抗体および抗体様分子に関して議論する。

【0174】

抗体：

用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、本明細書では互換的に使用される。抗体または免疫グロブリンは、上記および下記に定義される本発明の目的の分子に結合する分子であって、少なくとも重鎖の可変ドメインを含み、通常、少なくとも重鎖および軽鎖の可変ドメインを含む分子である。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリンの構造は、比較的よく理解されている；例えば、Harlow and Lane, Antibodi

es: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)を参照のこと。用語「結合する」および「認識する」は、本発明の結合分子（例えば、抗体）の結合親和性に関して互換的に使用される。

【0175】

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

【0176】

本発明の抗体またはその抗原結合断片、免疫特異的断片、変異体もしくは誘導体としては、限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、マウス化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、Fv、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、V_LドメインまたはV_Hドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリによって生産された断片、ならびに抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本明細書で開示される抗体に対する抗Id抗体を含む）が挙げられる。ScFv分子は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号明細書に記載されている。これに関して、抗体の抗原結合断片は、単一ドメイン抗体(sdAB)またはnanobodies（商標）(Ablynx, Gent, Belgium)としても公知のドメイン抗体(dAb)でもあり得る。例えば、De Haard et al., J. Bacteriol. 187(2005), 4531-4541; Holt et al., Trends Biotechnol. 21(2003), 484-490を参照のこと。以下により詳細に議論されるように、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に区別することができる様々な広いクラスのポリペプチドを含む。当業者であれば、重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロン(γ, μ, α, δ, ε)に分類され、それらの中にいくつかのサブクラスがある（例えば、γ1~γ4）ことを認識するであろう。この鎖の性質が抗体の「クラス」をそれぞれIgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgYと決定するものである。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などはよく特徴付けられており、機能分化を付与することが公知である。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、任意の種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2など）またはサブクラスの免疫グロブリン分子であり得る。当業者であれば、本開示を考慮して、これらのクラスおよびアイソタイプのそれぞれの改変型を容易に識別可能であり、したがってこれらは本発明の範囲内である。すべての免疫グロブリンのクラスが明らかに本発明の範囲内にあり、以下の議論は、一般に、IgGクラスの免疫グロブリン分子を対象とする。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量約23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000~70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。典型的には、4本の鎖がジスルフィド結合によって「Y」構造で結合され、ここで、「Y」の入り口で始まり可変領域を通じて継続する重鎖と軽鎖がひとまとまりに繋がっている。上記表17に含まれる本発明の例示的な抗IL-17A、IL-17FおよびIL-22抗体の分類から明らかなように（例えば、IgG1クラスのIL-22特異的抗体30G1およびIgG4クラスの35G11）、本発明の抗体の主要サブタイプはIgG1およびIgG4であると思われ、おそらくは、制御性T細胞反応および／または上皮がこれらのAIRE欠損状態の開始に関与している。これらの知見は、Karner et al., in Clin. Exp. Immunol. (2012); doi:10.1111/cei.12024（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）によって記載されているAIRE欠損マウスで見られる対応する自己抗体の分類によって裏付けられている。したがって、本発明の好ましい実施形態では、本発明のヒト抗体は、IgG型、特にIgG1

10

20

30

40

50

または I g G 4 である。

【0177】

I g G の構造：

軽鎖は、カッパまたはラムダ (κ 、 λ) のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合することができる。一般に、ハイブリドーマ、B細胞または遺伝子操作した宿主細胞のいずれかによって免疫グロブリンが産生される場合、軽鎖および重鎖は互いに共有結合し、2本の重鎖の「テール」部分は共有結合性ジスルフィド結合または非共有結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y構造のフォークヘッド末端にあるN末端から各鎖の下部にあるC末端へと延びている。

【0178】

軽鎖および重鎖の両方が、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。用語「定常」および「可変」は、機能的に使用される。これに関して、軽鎖部分および重鎖部分の両方の可変ドメイン (V_L および V_H) は、抗原認識および抗原特異性を決定することが認識されよう。反対に、軽鎖の定常ドメイン (C_L) および重鎖の定常ドメイン ($CH1$ 、 $CH2$ または $CH3$) は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例では、定常領域ドメインが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠ざかるにつれて、定常領域ドメインのナンバリングが増加する。N末端部分は可変領域であり、定常領域はC末端部分にある； $CH3$ および C_L ドメインは、実際には、それぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0179】

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

【0180】

天然に存在する抗体では、抗体は、各抗原結合ドメイン中に存在する「相補性決定領域」または「CDR」とも称される6つの超可変領域を含み、それらは、水性環境での抗体の三次元構造を想定して、抗原結合ドメインを形成するように特別に配置されている短い非連続的なアミノ酸配列である。「CDR」は、より少ない分子間の多様性を示す4つの比較的保存された「フレームワーク」領域または「FR」に隣接する。フレームワーク領域は主として β シート立体構造をとり、CDRは、 β シート構造と連結し、いくつかの場合では、その一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間非共有結合性相互作用によってCDRの正しい方向での配置を提供する足場を形成するように作用する。配置されたCDRによって形成された抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補的な表面を規定する。この相補性表面は、抗体のその同種エピトープへの非共有結合を促進する。それぞれCDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸は、正確に定義されているので、当業者であれば、任意の所定の重鎖または軽鎖可変領域についてそれらを容易に同定することができる；「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, Kabat, E., et al., U. S. Department of Health and Human Services, (1983)；およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 (これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

【0181】

当技術分野において使用されており、および／または認められている用語の定義が2つ以上ある場合、本明細書で使用する用語の定義は、特に明確な反対の指定がない限り、

10

20

30

40

50

すべてのこのような意味を含むことを意図する。具体例は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続的な抗原結合部位を説明する用語「相補性決定領域」(「CDR」)の使用である。この特定の領域は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(1983)およびChothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 (これらは、参照により本明細書に組み込まれる)によって記載されており、ここで、これらの定義は、互いに比較するとアミノ酸残基のオーバーラップまたはサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体またはその変異体のCDRを指すいずれかの定義の適用は、本明細書で定義および使用される用語の範囲内にあることを意図する。上記で引用した各参考文献によって定義されるCDRを包含する適切なアミノ酸残基を、比較として以下の表16に示す。特定のCDRを包含する正確な残基数は、CDRの配列およびサイズに応じて変化する。当業者であれば、どの残基がヒトIgGサブタイプの抗体の特定の超可変領域またはCDRを含むかを、その抗体の可変領域のアミノ酸配列を考慮してルーチンに決定することができる。

【表16】

表16: CDRの定義¹

	K a b a t	C h o t h i a
V H C D R 1	3 1 - 3 5	2 6 - 3 2
V H C D R 2	5 0 - 6 5	5 2 - 5 8
V H C D R 3	9 5 - 1 0 2	9 5 - 1 0 2
V L C D R 1	2 4 - 3 4	2 6 - 3 2
V L C D R 2	5 0 - 5 6	5 0 - 5 2
V L C D R 3	8 9 - 9 7	9 1 - 9 6

¹表16におけるすべてのCDRの定義のナンバリングは、Kabat et al. (以下を参照のこと)

に示されているナンバリング慣例によるものである。

【0182】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列のナンバリングシステムを定義した。当業者であれば、配列それ自体以外のいかなる実験データにも頼ることなく、任意の可変ドメイン配列にこの「Kabatナンバリング」システムを明確に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「Kabatナンバリング」は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」(1983)によって示されるナンバリングシステムを指す。特に明記されない限り、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくはは誘導体における特定のアミノ酸残基の位置のナンバリングについての言及は、Kabatナンバリングシステムに従うものであるが、それは理論上のものであり、本発明のあらゆる抗体に等しく適用することはできない。例えば、最初のCDRの位置に応じて、以降のCDRがいずれかの方向にシフトする場合がある。

【0183】

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

【0184】

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

【0185】

抗体断片、動物化：

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

【0186】

本発明の特に好ましい実施形態では、抗体は、ヒト被験体からクローニングされた天然に存在するヒトモノクローナル抗体またはその結合断片、誘導体および変異体であって、以下の表1～14、28～31、図1～4および実施例で詳細に定義される本発明の分子に特異的に結合するものである。

【0187】

場合により、ヒト抗体のフレームワーク領域を、データベース内の適切なヒト生殖系列可変領域配列とアライメントし、それにしたがって採用する。例えば、MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, UK) が提供する Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) を参照のこと。例えば、真の生殖系列配列から潜在的に逸脱しているとみなされるアミノ酸は、クローニング工程の間に組み込まれたPCRプライマーの配列によるものであり得る。したがって、本発明によれば、用語「ヒトモノクローナル抗体」、「ヒトモノクローナル自己抗体」、「ヒト抗体」などは、本発明の目的の分子に結合するヒト起源の結合分子（すなわち、B細胞またはそのハイブリドーマなどのヒト細胞から単離されたものであるか、またはそのcDNAがヒト細胞、例えば、ヒト記憶B細胞のmRNAから直接クローニングされたものである）を表すのに使用される。ヒト抗体は、例えば、結合特性を改善するためにアミノ酸置換をその抗体に行った場合でも、依然として「ヒト」である。

【0188】

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

【0189】

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

【0190】

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

【0191】

移植抗体（等価物）

本発明はまた、それぞれ I L - 1 7 および I L - 2 2 抗体などの本発明の抗体由来の C D R を含む移植抗体（互換的に、等価物と称される）を提供する。このような移植 C D R としては、本発明の抗体の C D R が移植されたか、または 1 つ以上のアミノ酸置換を含む C D R が移植される動物化抗体が挙げられる。C D R は、上記のように、ヒトフレームワークまたは動物起源由来の抗体フレームワークに直接移植され得る。所望により、フレームワークライブラリを作製することによって、フレームワーク変化も組み込まれ得る。以下により詳細に記載されるように、C D R および／またはフレームワーク配列の最適化を独立しておよび連続的に組み合わせることもできるし、または同時に実施することもできる。

【0192】

移植抗体を作製するために、本発明の抗体のドナー C D R を、抗体アクセプタ可変領域フレームワークに移植する。活性を最適化するために抗体を移植して C D R 変異体作製するための方法は、以前に記載されている（例えば、国際公開第 9 8 / 3 3 9 1 9 号；国際公開第 0 0 / 7 8 8 1 5 号；国際公開第 0 1 / 2 7 1 6 0 号を参照のこと）。この手順を実施して、ドナー C D R の移植および親和性の再獲得を同時プロセスで達成し得る。可変領域の結合親和性を改変または最適化するために、この方法を単独でまたは C D R 移植と組み合わせて同様に使用することができる。ドナー C D R の結合親和性をアクセプタ可変領域に付与するための方法は、重鎖および軽鎖可変領域の両方に適用可能であり、それ自体を使用して抗体可変領域を移植し、それと同時に抗体可変領域の結合親和性を最適化することができる。

【0193】

ドナー C D R 内の全位置または選択位置に複数の異なるアミノ酸残基変化を含むように、ドナー C D R を改変することができる。C D R 種の様々な集団を生産するために、例えば、20 種の天然に存在するアミノ酸残基または予め選択されたサブセットのランダムな組み込みまたは偏った組み込みをドナー C D R に導入することができる。C D R 変異体種を可変領域の様々な集団に含めることにより、所定の抗原に対して最適化された結合親和性を示す変異体種の作製が可能になる。一定範囲の可能な変化をドナー C D R の位置で行うことができる。変化のために選択され得る可能な変化の一部または全部を、移植ドナー C D R の集団に導入することができる。変化を導入するために C D R 内の単一位置を選択することもできるし、またはアミノ酸を改変した様々な位置が組み合わせて活性についてスクリーニングすることもできる。

【0194】

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

【0195】

1 つ以上の改変位置を有する C D R 変異体種の集団を、可変領域の結合ポケットを構成する C D R のいずれかまたはすべてと組み合わせることができる。したがって、重鎖または軽鎖における 1 つ、2 つまたは全 3 つのレシピエント C D R 位置にドナー C D R 変異体集団を同時に組み込むために、アクセプタ可変領域フレームワークを標的とすることができる。アミノ酸位置変化で標的とするための C D R または C D R の数の選択は、例えば、

アクセプタへの完全なCDR移植が望ましいか、または結合親和性の最適化のためにこの方法が実施されるかに依存するであろう。

【0196】

ドナーCDRの結合親和性を抗体アクセプタ可変領域フレームワークに付与するために変化のためのドナーCDRアミノ酸を選択するための別のアプローチは、公知のまたは容易に同定可能なCDR位置であって非常に変わりやすいものを選択することである。例えば、可変領域CDR3は、一般に、非常に変わりやすい。したがって、結合親和性の再獲得もしくは増強を単独でまたは関連アクセプタ可変フレームワーク変化と一緒に確実にする移植手順では、この領域をアミノ酸位置変化の選択的な標的とすることができる。

【0197】

マウス化抗体：

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

【0198】

抗体断片：

本明細書で使用される場合、用語「重鎖部分」は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、CH1ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中部および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインまたはその変異体もしくは断片の少なくとも1つを含む。例えば、本発明に使用される結合ポリペプチドは、CH1ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部およびCH2ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメインおよびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部およびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、またはCH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含むことができる。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、CH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明に使用される結合ポリペプチドは、CH2ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2ドメインの全部または一部）を欠くことができる。上記のように、当業者であれば、これらのドメイン（例えば、重鎖部分）のアミノ酸配列が天然に存在する免疫グロブリン分子と異なるように、これらのドメインを改変することができると理解するであろう。

【0199】

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

【0200】

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

【0201】

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

10

【0202】

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

【0203】

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

20

【0204】

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

【0205】

本明細書で使用される場合、用語「C H 2ドメイン」は、例えば、従来のナンバリングスキームを使用すれば抗体の約残基244～残基360（K a b a tナンバリングシステムでは残基244～360；およびE Uナンバリングシステムでは残基231～340、K a b a t E A e t a l. 前掲書を参照のこと）に及ぶ重鎖分子の部分を含む。C H 2ドメインは、別のドメインと密接に対合していないという点が固有である。どちらかといえば、2つのN-結合分岐炭水化物鎖が、インタクトな天然I g G分子の2つのC H 2ドメイン間に挿入される。C H 3ドメインはC H 2ドメインからI g G分子のC末端に及び、約108個の残基を含むこともまた詳細に記載されている。

30

【0206】

本明細書で使用される場合、用語「ヒンジ領域」は、C H 1ドメインをC H 2ドメインに結合する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は約25個の残基を含み、柔軟であり、したがって2つのN末端抗原結合領域が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域を3つの異なるドメイン：上部、中部および下部ヒンジドメインに細分化することができる；R o u x e t a l. , J. I m m u n o l. 161 (1998), 4083を参照のこと。

40

【0207】

本明細書で使用される場合、用語「ジスルフィド結合」は、2個の硫黄原子間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成することができるか、または第2のチオール基と架橋することができるチオール基を含む。天然に存在するI g G分子の大部分では、C H 1およびC_L領域はジスルフィド結合によって連結され、2本の重鎖は、K a b a tナンバリングシステムを使用すれば239位および242位に

50

対応する位置で（E Uナンバリングシステムでは、226位または229位）2つのジスルフィド結合によって連結される。

【0208】

本明細書で使用される場合、用語「連結された」、「融合された」または「融合」は、互換的に使用される。これらの用語は、化学的コンジュゲーションまたは組換え手段を含むあらゆる手段によって2つ以上の要素または部分を一緒に結合することを指す。「インフレイム融合」は、元のORFの正しい翻訳上の読み枠が維持されるように、2つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ORF）を結合してより長い連続的なORFを形成することを指す。したがって、組換え融合タンパク質は、元のORFによってコードされるポチペプチドに対応する2つ以上のセグメント（このセグメントは、天然では通常そのように結合していない）を含有する単一タンパク質である。したがって、融合セグメント全体を通して読み枠を連続的にするが、例えば、インフレイムリンカ配列によってセグメントを物理的または空間的に分離してもよい。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドをインフレイムで融合してもよいが、「融合」CDRが連続的なポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域またはさらなるCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって分離してもよい。

【0209】

エピトープ：

抗体のペプチドエピトープまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約4～5個のアミノ酸であると考えられている。ペプチドエピトープまたはポリペプチドエピトープは、好ましくは少なくとも7個、より好ましくは少なくとも9個、最も好ましくは少なくとも約15～約30個のアミノ酸を含有する。CDRは、その三次形態の抗原性ペプチドまたはポリペプチドを認識することができるので、エピトープを含むアミノ酸は連続的である必要はなく、いくつかの場合では、同じペプチド鎖上に存在していなくてもよい。本発明では、本発明の抗体によって認識されるペプチドエピトープまたはポリペプチドエピトープは、表1～14、28～31、図1～4および実施例で定義される本発明の目的の分子の少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、より好ましくは少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、または約15～約30個の連続的または非連続的なアミノ酸からなる配列を含有する。

【0210】

結合特性：

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

【0211】

存在する場合、抗体の抗原との「免疫学的結合特性」または他の結合特性という用語は、そのすべての文法の形式で、抗体の特異性、親和性、交差反応性および他の結合特性を指す。「選択的に結合する」は、結合分子、例えば、抗体が、関連する、同様の、相同な、または類似のエピトープに結合する場合よりも容易にエピトープに特異的に結合することを意味する。したがって、所定のエピトープに「選択的に結合する」抗体は、このような抗体が関連エピトープと交差反応することができる場合でも、関連エピトープよりもそのエピトープに結合する可能性が高いであろう。

【0212】

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

【0213】

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

【0214】

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

【0215】

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

【0216】

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

。

10

20

30

40

50

【0217】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、結合分子、例えば、個々のエピトープと、免疫グロブリン分子のCDRとの結合強度の程度を指す。例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) の第27頁～第28頁を参照のこと。本明細書で使用される場合、用語「結合活性」は、免疫グロブリンの集団と抗原との間の複合体の総合的な安定性、すなわち、免疫グロブリン混合物と抗原との機能的結合強度を指す。例えば、Harlow の第29頁～第34頁を参照のこと。結合活性は、集団中の個々の免疫グロブリン分子と特異的エピトープとの親和性、およびさらに免疫グロブリンおよび抗原の結合価の両方に関連する。例えば、2価のモノクローナル抗体と、ポリマーなどの高頻度反復エピトープ構造を有する抗原との間の相互作用は、高い結合活性の1つであろう。任意の適切な方法を使用して抗原に対する抗体の親和性または結合活性を実験的に決定することができる。例えば、Berzofsky et al., 「Antibody-Antigen Interactions」 In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, NY (1984)、Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, NY (1992)、および本明細書に記載される方法を参照のこと。抗原に対する抗体の親和性を測定するための一般的な技術としては、ELISA、RIA および表面プラズモン共鳴が挙げられる。異なる条件下（例えば、塩濃度、pH）で測定する場合、特定の抗体抗原間相互作用の測定された親和性は変化し得る。したがって、標準化した抗体抗原溶液および標準化した緩衝液を用いて、親和性および他の抗原結合パラメータ、例えば、 K_D 、 IC_{50} を測定することが好ましい。

【0218】

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

【0219】

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

【0220】

本発明の結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変異体もしくは誘導体はまた、本発明の目的の分子に対する結合親和性に関して記載または明示され得る。好ましい結合親和性には $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ 、 $10^{-4} M$ 、 $5 \times 10^{-5} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 5×1

10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、または 10^{-15} M未満の解離定数または K_D を有するものが含まれる。典型的には、抗体は、 10^{-7} M以下の解離定数 (K_D) で、その所定の抗原に結合する。好ましくは、抗体は、 10^{-9} M以下の解離定数 (K_D) で、さらにより好ましくは 10^{-11} M以下の解離定数 (K_D) で、その同種抗原に結合する。

【0221】

抗体の改変：

免疫グロブリンまたはそれをコードするcDNAをさらに改変することができる。したがって、さらなる実施形態では、本発明の方法は、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、Fab断片、二重特異性抗体、融合抗体、標識抗体またはこれらのいずれか1つの類似体を生産する工程のいずれか1つを含む。対応する方法が当業者に公知であり、例えば、Harlow and Lane「Antibodies, A Laboratory Manual」, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988に記載されている。ファージディスプレイ技術によって前記抗体の誘導体を得る場合、本発明に提供される抗体のいずれか1つのものと同じエピトープに結合するファージ抗体の効率性を上昇させるために、BIAcoreシステムにおいて用いられるように、表面プラズモン共鳴を使用することができる (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。例えば、国際公開第89/09622号には、キメラ抗体の生産が記載されている。欧州特許出願公開第0239400号明細書および国際公開第90/07861号には、ヒト化抗体の生産方法が記載されている。本発明にしたがって用いられる抗体のさらなる供給源は、いわゆるゼノジニック抗体である。例えば、国際公開第91/10741号、国際公開第94/02602号、国際公開第96/34096号および国際公開第96/33735号には、マウスにおけるヒト抗体などのゼノジニック抗体の生産についての一般的原理が記載されている。上記のように、本発明の抗体は、完全抗体の他に、例えば、Fv、FabおよびF(ab)₂を含む様々な形態で、ならびに単鎖形態で存在し得る。例えば、国際公開第88/09344号を参照のこと。

【0222】

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

抗原を発現する細胞／組織に特異的に結合するので、診断用途および治療用途を有し得る。

【0223】

試料：

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

【0224】

B細胞の同定および単離：

表１～１４に含まれており、IL17またはIL-22について例示的に示されている本発明の目的の特定の分子に対して特異的なＢ細胞の同定、ならびに目的の特異性を示す抗体の分子クローニング、ならびにそれらの組換え発現および機能特性決定は、特に実施例２に記載されているように一般に実施することができる。目的の特異性の抗体を発現するＢ細胞の同定方法、ならびに目的の特異性を示す抗体の分子クローニング、ならびにそれらの組換え発現および機能特性決定が、本出願内で提供される。以下に詳細に記載されているように、本発明の一実施形態では、単一またはオリゴクローナルＢ細胞の培養物を培養し、前記Ｂ細胞によって産生された抗体を含有する培養物の上清を、本発明の目的の分子（例えば、表１～１４に含まれており、実施例に記載されている分子）、または被験体における炎症に関与するかもしくは自己免疫性疾患に関係する特定の分子（例えば、IL17またはIL-22）に対して特異的な新たな抗体の存在および親和性についてスクリーニングする。別の実施形態では、Ｂ細胞培養物ではなく患者の血清を、目的の分子に対する自己抗体の存在について最初にスクリーニングし、次いで、高力価のものを末梢血単核細胞の単離のために選択する（実施例２を参照のこと）。スクリーニング工程は、目的の特定の分子の断片、ペプチドまたは誘導体に対する結合についてスクリーニングすることを含む。続いて、結合が検出された抗体または前記抗体を産生する細胞を単離する（実施例３を参照のこと）。したがって、予備スクリーニングは、抗体分泌細胞を含有する試料（例えば、全末梢血または血清）を使用して、候補ドナーのパネルで行うことができる。特に、末梢血単核細胞（PBMＣ）を単離するための標準的な分離技術（例えば、勾配遠心分離）を使用して、血液またはリンパ組織から単核細胞を単離することができる。この分離工程の後および／または前に、抗体および抗体分泌細胞の存在を検出するための標準的な技術（例えば、ELISA、BIACORE、ウェスタンブロット、FACS、SERPA、抗原アレイ、細胞培養系におけるウイルス感染の中和、またはELISPOTアッセイ）を使用して、血清（または血漿）、細胞培養上清または細胞の試料（異なる患者から、異なる組織からおよび／または異なる時点で得られたもの）をプレスクリーニングすることができる。文献には、これらの技術のいくつかの例が提供されており、例えば、ワクチン接種したドナーの免疫反応を特性決定するためにELISPOTを使用すること（Crotty et al., Immunol Meth. 286 (2004), 111-122）、新たに感染した患者用の診断ツールとして抗原マイクロアレイを使用すること（Mezzasoma et al., Clin Chem. 48 (2002), 121-130）、および抗原特異的免疫反応を測定するための他の技術（Kern et al., Trends Immunol. 26 (2005), 477-484）が示されている。

【0225】

B細胞の不死化：

発癌性エプスタインバーウイルス（EBV；Sugimoto et al., Cancer Res. 64（2004），3361-3364；Counter et al., J. Virol. 68（1994），3410-3414）などのウイルスを感染させるか、またはCD40リガンド／IL-4刺激（Wiesner et al., PLoS ONE. 3（2008），e1464.）を長期間反復することによって、抗体を産生するB細胞を不死化することができる。不死化ヒトB細胞およびB記憶リンパ球のクローンを生産する方法であって、ポリクローナルB細胞活性化因子の存在下で、エプスタインバーウイルス（EBV）を使用してヒトB記憶リンパ球を形質転換する工程を含む方法は、国際公開第2004／076677号に要約されている。この国際出願には、目的の抗体をコードする核酸配列を得るための方法であって、不死化B細胞クローンを調製する工程、および目的の抗体をコードするB細胞クローンから核酸を得る／配列決定する工程、および該核酸をさらに挿入するかまたは該核酸を使用して、目的の抗体を発現することができる発現宿主を調製する工程、目的の抗体が発現される条件下で発現宿主を培養または継代培養する工程、および場合により、目的の抗体を精製する工程を含む方法も記載されている。その間において核酸を操作して、制限部位を導入し、コドン使用頻度を変化させ、ならびに／または転写および／もしくは翻訳調節配列を付加または最適化することができることは言うまでもない。これらの技術はすべて技術水準であり、当業者であれば、過度の負担なく実施することができる。例えば、重鎖定常領域を異なるアイソタイプのものに交換することもできるし、または完全に排除することもできる。単鎖Fv領域をコードするように、可変領域を連結することができる。複数のFv領域を連結して2つ以上の標的への結合能を付与することもできるし、またはキメラ重鎖および軽鎖の組み合わせを用いることもできる。遺伝物質が利用可能になると、所望の標的へのそれらの結合能の両方を保持する上記類似体の設計は簡単である。抗体可変領域のクローニングおよび組換え抗体の作製の方法は当業者に公知であり、例えば、Gilliland et al., Tissue Antigens 47（1996），1-20；Doenecke et al., Leukemia 11（1997），1787-1792に記載されている。

【0226】

疾患および障害：

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

【0227】

本明細書で使用される場合、「自己免疫性障害」は、器官特異的疾患（すなわち、免疫反応が、内分泌系、造血系、皮膚、循環器系、胃腸および肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などの器官系に対して特異的である）または複数の器官系に影響し

得る全身性疾患（例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ、多発性筋炎、自己免疫性多腺性内分泌不全症症候群1型（APS1）／自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ（APCED）など）であり得る。好ましい前記疾患としては、自己免疫性リウマチ学疾患（例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、SLEおよびループス腎炎などの狼瘡、多発性筋炎／皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、および乾癬の関節炎など）、自己免疫性胃腸および肝臓疾患（例えば、炎症性腸疾患（例えば潰瘍性大腸炎およびクローン病）、自己免疫性胃炎および悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、および小児脂肪便病など）、血管炎（例えば、チャンゲーシュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症および多発動脈炎を含むANCA陰性血管炎およびANCA関連血管炎）、自己免疫性神経学的疾患（例えば、多発性硬化症（MS）、眼球クロウヌスミオクロウヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、および自己免疫性多発性神経炎など）、腎臓疾患（例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、およびベルガー病など）、自己免疫性皮膚科疾患（例えば、乾癬、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、天疱瘡群疾患、および皮膚紅班性狼瘡疾患など）、血液系疾患（例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後の紫斑病、および自己免疫溶血性貧血など）、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患（例えば、内耳疾患および聴力障害など）、ベーチェット病、レイノー症候群、器官移植および自己免疫性内分泌系疾患（例えば、インスリン依存型真性糖尿病（IDDM）などの糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病、自己免疫性甲状腺疾患（例えばグレーブス病および甲状腺炎）など）および自己免疫性の発生に影響を与える疾患、例えば、自己免疫性多腺性内分泌不全症症候群1型（APS1）／自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ（APCED）重症筋無力症（MG／胸腺腫が挙げられる。好ましい疾患としては、例えば、RA、IBD、例えばクローン病および潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、狼瘡、MS、シェーグレン症候群、グレーブス病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎および糸球体腎炎、およびAPS1が挙げられる。またより好ましくはRA、IBD、狼瘡、およびMS、より好ましくはRAおよびIBD、最も好ましくはRAである。

【0228】

場合により上記のものを包含する本明細書で定義される他の自己免疫性障害の具体例としては、限定されないが、関節炎（急性および慢性の関節リウマチ、例えば若年発症関節リウマチおよび段階、例えば関節リウマチ関節滑膜炎、痛風または痛風性関節炎、急性の免疫学的な関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、II型コラーゲン誘導性の関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、スティル病、椎骨関節炎、骨関節炎、慢性関節炎プログレディエンテ、変形性関節炎、慢性多発性関節炎プリマリア、反応性関節炎、閉経期の関節炎、エストロゲン枯渇関節炎、および強直性脊椎炎／リウマチ様脊椎炎）、自己免疫性リンパ系増殖性疾患、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例えばプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬および爪乾癬、アトピー、例えばアトピー性疾患、例えば花粉症およびジョブ症候群、アトピー性皮膚炎、アレルギー性および毒性接触皮膚炎（急性および慢性）、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、蕁麻疹、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、x連鎖過剰IgM症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例えば慢性アレルギー性蕁麻疹および慢性特発性蕁麻疹、寒冷蕁麻疹、例えば慢性自己免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎／皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症（局所型および全身型の強皮症を含む）、多発性硬化症（MS）、例えば脊髄視神経MS、原発性進行性MS（PPMS）、および再発性寛解型MS（RRMS）、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、皮膚硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎（NMO）、炎症性腸疾患（IBD）（例えば、クローン病、自己免疫媒介性胃腸疾患、胃腸炎症、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸炎潰瘍、顕微鏡的大腸炎、膠原性大腸炎、多発性大腸炎、壊死性全腸炎、および経壁性大腸炎、および自己免疫性炎症性腸疾患）、腸炎症、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例えば、成人または急性の呼吸窮迫症候群（ARDS）、髄膜炎、

葡萄膜の全部または一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液疾患、移植片対宿主病、遺伝性血管性浮腫などの血管性浮腫、髄膜炎の脳神経損傷、妊娠ヘルペス、妊娠性類天疱瘡群疾患、天疱瘡群疾患、陰囊掻痒、自己免疫性早期卵巣機能不全、自己免疫性症状による急性聴力損失、I g E 媒介性疾患、例えばアナフィラキシーおよびアレルギー性鼻炎およびアトピー性鼻炎、様々な形態の喘息、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎および辺縁および／または脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例えば、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎または自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有するまたは有さない糸球体腎炎（G N）、例えば、慢性または急性の糸球体腎炎、例えば原発性 G N、免疫媒介性 G N、膜性 G N（膜性ネフロパシ）、特発性膜性 G N または特発性膜性ネフロパシ、膜または膜性増殖性 G N（M P G N）（タイプ I およびタイプ I I を含む）、急速進行性 G N（R P G N）、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、龟头炎、例えば形質細胞限局性龟头炎、龟头包皮灸、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形性紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、表皮剥離性角質増殖症、前癌性角化症（例えば、光線性角化症）、膿皮症壊疽、アレルギー性状態および応答、食物アレルギー、薬剤アレルギー、昆虫アレルギー、希なアレルギー性疾患、例えば様々な形態の肥満細胞症、アレルギー性応答、湿疹、例えばアレルギー性またはアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、異常発汗剤湿疹、掌蹠膿疱症、小胞の掌蹠湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息および自己免疫喘息、T 細胞の浸潤を伴う症状および慢性炎症反応、妊娠中の胎児の A B O 式血液型など外来性抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、エリテマトーデス（L E）、慢性および急性皮膚型の両方（例えば、慢性皮膚 L E（C C L E）、円板状エリテマトーデス（D L E）、亜急性皮膚 L E（S C L E）および全身型（例えば、S L E）、例えばループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、新生児期ループス症候群（N L E）、若年性開始型（I 型）真性糖尿病、例えば小児 I D D M、成人発症型真性糖尿病（I I 型糖尿病）、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシ、糖尿病性大腸炎、糖尿病性大動脈疾患、サイトカインおよび T リンパ球によって媒介される急性および遅発性過敏症と関係する免疫反応、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例えばリンパ腫肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎（例えば大脈管脈管炎、例えばリウマチ性多発性筋痛および巨細胞（高安）動脈炎、中脈管脈管炎、例えば川崎病および結節性多発動脈炎／結節性動脈周囲炎、免疫血管炎、C N S 血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、全身性壊死性血管炎などの壊死性血管炎、A N C A 陰性脈管炎、および A N C A 関連脈管炎、例えばチャージェストラウス症候群（C S S）、ウェゲナー肉芽腫症、および顕微鏡的多発血管炎）、白血球破碎性血管炎、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイヤモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血または免疫溶血性貧血、例えば自己免疫溶血性貧血（A I H A）、悪性貧血（貧血症悪性熱）、アジソン病、純粋な赤血球貧血症または形成不全（P R C A）、第 V I I 因子欠損症、血友病 A、自己免疫好中球減少症、例えば汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、C N S 炎症性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多器官損傷症候群、例えば敗血症、外傷または出血の二次症状、抗原抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、単神経炎、アレルギー性神経炎、ベーチェット病／症候群、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスージョンソン症候群、類天疱瘡または天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡、瘢痕性（粘膜）類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常性天疱瘡、腫瘍随伴性天疱瘡、落葉状天疱瘡、ペンフィグス粘液膜類天疱瘡、および天疱瘡エリテマトーデス、後天性表皮水疱症、眼炎症、好ましくはアレルギー性結膜炎などのアレルギー性眼炎症、線上水疱性疾患、自己免疫誘導結膜炎、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病または症候群、自己免疫性状態による熱性損傷、子癇前症、免疫複合体疾患、例えば免疫複合体腎炎、抗体が媒介する腎炎、神経炎症性疾患、多発性神経炎、慢性神経障害、例えば I g M 多発性神経炎または I g M 媒介性神経障害、血小板減少（例えば心筋梗塞患者によるもの

）、例えば血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、輸血後紫斑病（PTP）、ヘパリン誘導性血小板減少および自己免疫性または免疫媒介性血小板減少、例えば慢性および急性のITPを含む特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、強膜炎、例えば特発性のセラト強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎および卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎（橋本甲状腺炎）または亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、グレーブス眼症（眼疾患または甲状腺眼症）、多腺性症候群、例えば自己免疫多腺性症候群、例えばタイプI（または、多腺性内分泌障害症候群）、腫瘍随伴症候群、例えば神経系新生物関連症候群、例えばランバートーイトン筋無力症候群またはイートンーランバート症候群、スティッフマンまたはスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例えばアレルギー性脳脊髄炎または脳脊髄炎性アレルギーおよび実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クロヌスまたは眼球クロヌス筋硬直症候群（OMS）、および感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫慢性活動性肝炎、間質性肺炎、例えばリンパ系間隙間質性肺炎（LIP）、閉塞性細気管支炎（非移植）対NSIP、ギラン・バレー症候群、ベルガー病（IgAネフロパシ）、特発性IgAネフロパシ、線状IgA皮膚病、急性発熱性好中性皮膚病、角層下膿疱症、一過性棘融解皮膚病、肝硬変、例えば原発性胆管萎縮症および肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアックまたはコエリアック病、脂肪便症（グルテン腸疾患）、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、例えば混合性クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症（ALS；ルーゲーリック病）、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例えば自己免疫内耳疾患（AIED）、自己免疫聴力障害、多発性軟骨炎、例えば抵抗性または再発性または再発する多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、角膜炎、例えばコーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎、ベル麻痺、スウィート病／症候群、自己免疫性酒さ、帯状ヘルペス関連疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症、これにはモノクローナルB細胞リンパ球増多症（例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症および意義不明の単クローン性γグロブリン血症、MGUS）が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺およびCNSのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性または分節性または限局性分節性糸球体硬化症（FSGS）、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例として、自己免疫脱髄性病および慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、完全脱毛症、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症および毛細管拡張症）、雌雄自己免疫性不妊性、例えば、抗精子抗体によるもの、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎および繊維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫病、例としてリーシュマニア症、トリパノソーマ症、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、間質性肺線維形成、繊維化縦隔炎、肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア症、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎（急性または慢性）またはFuchの毛様体炎、ヘーノホーシェーライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染、SCID、後天性免疫不全症候群（AIDS）、エコーウィルス感染、敗血症（全身性炎症反応症候群（SIRS）、内毒血症、瘧疾、甲状腺炎、パルボウィルス感染、風疹ウィルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウィルス感染、耳下腺炎、エヴァンス症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞

性血栓性血管炎、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎、例として、春季カタル、乾性角結膜炎、および流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性および乏血—再灌流障害、移植器官再灌流、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道／肺性疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患（大脳血管性不足）、例として動脈硬化脳症および動脈硬化症網膜症、アスペルマトジェネシス（*aspermato genesis*）、自己免疫性溶血、

ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、癩性結節性紅斑、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感音性聴力障害、血色素尿症発作、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフローゼ、交感性眼炎、新生児眼球炎、視神経炎、精巣炎肉芽腫症、腓炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、ケルバン甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、リンパ濾胞性胸腺炎、白斑、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う症状、白血球—粘着力欠損、サイトカインおよびTリンパ球に媒介される急性および遅発性過敏症関連免疫反応、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、腓島炎、多内分泌性不全、自己免疫多腺性症候群、例えば多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）、心筋症、例えば拡張型心筋症、後天性表皮水疱症（EBA）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨または蝶形骨副鼻腔炎、アレルギー性副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症—筋肉痛症候群、レフラ—症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギロームまたは好酸球性を含む肉芽腫、アナフィラキシー、脊椎関節症、血清陰性脊椎関節炎、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブルトン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコット—アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関係する自己免疫性疾患、リウマチ、例えば慢性関節リウマチ、リンパ節炎、血圧応答の減退、血管機能不全、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、および脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、虚血性再灌流障害、心筋または他の組織の再灌流損傷、リンパ腫気管支炎、炎症性皮膚病、急性炎症性成分を有する皮膚病、多器官不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系炎症性疾患、眼性および眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘導性毒性、ナルコレプシ、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、および子宮内膜症が挙げられる。

【0229】

単一遺伝子性障害

A P E C E D

10

20

30

【表 3 2】

表 3 2 : A P E C E D 徴候および関連自己抗体

徴候および自己抗体の標的	有病率 (%)	
副甲状腺機能低下症 ^a	8 5	
<i>N A C H T</i> ロイシンリッチ反復タンパク質 5 (<i>N A L P 5</i>)	3 2 - 4 9	
カルシウム感知受容体 (<i>C a S R</i>)	8 6 ^b	
アジソン病	7 8	
ステロイド 1 7- α -ヒドロキシラーゼ (<i>P 4 5 0 c 1 7</i>)	4 4	
ステロイド 2 1-ヒドロキシラーゼ (<i>P 4 5 0 c 2 1</i>)	6 0 - 6 6	10
側鎖切断酵素 (<i>P 4 5 0 s c c</i>)	3 8 - 5 2	
卵巣障害	6 0	
<i>P 4 5 0 s c c</i> および <i>P 4 5 0 c 1 7</i>		
真性糖尿病	1 3	
膵島抗原-2 (<i>I A - 2</i>)	7	
グルタミン酸デカルボキシラーゼ (<i>G A D 6 5</i>) ^c	2 7 - 3 6	
甲状腺機能低下症	1 4	
サイログロブリン (<i>T G</i>)	1 5 - 1 8	
甲状腺ペルオキシダーゼ (<i>T P O</i>)	2 1 - 3 6	
精巣障害	8	
精巣特異的遺伝子 1 0 タンパク質 (<i>T S G A 1 0</i>) ^c	8	20
下垂体機能低下症	5	
チューダードメイン含有タンパク質 6 (<i>T D R D 6</i>)	4 9	
胃炎/悪性貧血	2 0	
因子 (<i>I F</i>)	1 5 - 3 0	
自己免疫性肝炎	1 8	
芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ (<i>A A D C</i>)	3 9 - 5 1	
シトクロム <i>P 4 5 0 1 A 2</i> (<i>P 4 5 0 1 A 2</i>)	8	
腸機能不全	2 2	
トリプトファンヒドロキシラーゼ (<i>T P H</i>)	4 8	
ヒスチジンデカルボキシラーゼ (<i>H D C</i>)	3 7	30
脱毛症	3 9	
チロシンヒドロキシラーゼ (<i>T H</i>)	4 4	
白斑	2 7	
<i>S O X 9</i> / <i>S O X 1 0</i>	1 5 - 2 2	
発熱を伴う発疹	1 4	
肺徴候	稀	
カリウムチャネル調節タンパク質 (<i>K C N R G</i>)	6	
尿細管間質性腎炎	9	
無脾症	2 0	
角結膜炎	2 2	40
歯のエナメル質形成不全	7 7	
爪ジストロフィ	5 0	

【 0 2 3 0 】

【表 3 3】

表 3 3 : A P E C E D および胸腺腫患者におけるサイトカインに対して特異的な自己抗体の有病率。

自己抗体	有病率 (%)	
	A P E C E D	胸腺腫/MG
I F N - ω	1 0 0	6 0
I F N - α	9 5	7 0
I F N - β	2 2	稀
I F N - λ	1 4	稀
I L - 2 2	9 1	5 - 1 0
I L - 1 7 F	7 5	5 - 1 0
I L - 1 7 A	4 1	5 - 1 0

10

【0 2 3 1】

I P E X :

X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群 (I P E X) は、珍しいX連鎖劣性疾患である。臨床表現型を有する男性の25%において、FOX P 3 遺伝子 (フォークヘッドボックス P 3) ; 転写調節因子のフォークヘッド/ウイングーヘリックスファミリーのメンバー) における突然変異が見られ得るが、同定された突然変異を有しないいくつかの症例では、FOX P 3 発現細胞による発現が低いかまたはFOX P 3 発現細胞の数が少ないことが認められたことから (T o r g e r s o n、未発表の結果—GeneReviews; NCBI Bookshelf)、おそらくは同じ経路からの少なくとも1つのさらなる常染色体遺伝子座がFOX P 3 機能障害に関与し得ることを示唆するデータ (O w e n e t a l., J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003; 88: 6034-6039) が示されている。I P E X 症候群は、末梢性寛容障害によって引き起こされる疾患のプロトタイプとみなされ得る。Fox P 3 遺伝子における突然変異は、制御性T細胞の抑制、およびそれに続いて自己攻撃性T細胞の過活性化および自己抗体の形成につながる。臨床所見としては、以下を含む基本的な臨床三徴 (P o w e l l e t a l., J. Pediatr. 100 (1982), 731-737; O c h s e t a l., Immunol. Rev. 203 (2005), 156-164) が挙げられる:

20

30

甲状腺機能低下症または甲状腺機能亢進症につながる1型真性糖尿病または自己免疫性甲状腺疾患を最も多く伴う内分泌障害 (W i l d i n e t a l., J. Med. Genet. 39 (2002), 537-545; G a m b i n e r i e t a l., J. Allergy Clin. Immunol. 122 (2008), 1105-1112)

慢性水様性下痢を伴う腸疾患

最も一般的には湿疹、爪ジストロフィ、紅皮症、乾癬病変および全身性脱毛症を伴う皮膚炎も報告されている。処置しなければ、ほとんどの患者は生後12~24カ月以内に死亡し、免疫抑制レジメンおよび骨髄移植は生存を延長するが、軽度の疾患症例では生後20年または30年を超えない (P o w e l l e t a l., J. Pediatr. 100 (1982); K o b a y a s h i e t a l., J. Med. Genet. 38 (2001), 874-876; L e v y - L a h a d a n d W i l d i n, J. Pediatr. 138 (2001), 577-580; T a d d i o e t a l., Eur. J. Pediatr. 166 (2007), 1195-1197)。

40

【0 2 3 2】

胸腺腫:

胸腺腫は胸腺の腫瘍であり、胸骨のすぐ後ろの上縦隔に位置する。それは前縦隔の最も一般的な腫瘍であり、胸腺由来の上皮細胞から生じる。この腫瘍は、皮質および髄質上皮

50

細胞の両方から生じ得るか、またはこれらの細胞型の両方から生じた細胞を含み得る。組織学に基づいて、この腫瘍をこれらのカテゴリーに分けることができる：

A型は、上皮細胞が楕円形または紡錘状の形状を有する場合である；（リンパ球数はより少ない）

B型は、それらが上皮様形態を有する場合である（B型は、3つのサブタイプB1（リンパ球リッチ）、B2（皮質）およびB3（上皮）を有する。）

AB型は、この腫瘍が両方の細胞型の組み合わせを含有する場合である。

（Dadmanesh et al., Chest Surg Clin N Am 11（2001）, 407-420.）この腫瘍の3分の1～半分は無症候性であり、最も一般的な症候は、腫瘍増殖による隣接器官の圧迫によって引き起こされる。胸腺腫のごく一部は悪性であり、局所浸潤を示すが、転移は稀である。

10

【0233】

胸腺腫の重要な特徴は、この腫瘍に関連する様々な全身性疾患である。これらの胸腺腫関連症状のほとんどは、自己免疫に関連している。最も周知なのは、シナプス後神経筋接合部に位置するアセチルコリン受容体に対する自己抗体によって引き起こされる比較的珍しい神経筋疾患の重症筋無力症である。これらの抗体は、神経伝達物質アセチルコリンの作用を遮断するので、筋肉疲労を引き起こすであろう。胸腺腫を有する患者の半分近く（30～45%）は、重症筋無力症を有する。胸腺腫に関連する他の自己免疫性疾患は、急性心膜炎、アジソン病（副腎皮質不全）、円形脱毛症、潰瘍性大腸炎、溶血性貧血、悪性貧血、関節リウマチ、強皮症、全身性エリテマトーデスおよび甲状腺炎である。

20

【0234】

標識および診断：

標識剤は、本発明の抗体または抗原に直接的または間接的のいずれかでカップリングされ得る。間接的カップリングの一例は、スパーサ部分の使用によるものである。さらに、本発明の抗体は、共有結合または非共有結合によって連結されているさらなるドメインを含み得る。この連結は、当技術分野において公知の上記方法による遺伝的融合に基づくものでもよいし、または例えば国際公開第94/04686号に記載されている化学的架橋によって実施することもできる。本発明の抗体を含む融合タンパク質中に存在するさらなるドメインは、好ましくは、可撓性リンカー、有利にはポリペプチドリンカーによって連結され得、前記ポリペプチドリンカーは、前記さらなるドメインのC末端と本発明の抗体のN末端との間（またはその逆も同様である）の距離に及ぶのに十分な長さの、複数の親水性ペプチド結合アミノ酸を含む。治療的または診断的に活性な薬剤が、様々な方法によって、本発明の抗体またはその抗原結合断片にカップリングされ得る。これとしては、例えば、共有的な方法、例えばペプチド結合によって、治療的または診断的に活性な薬剤にカップリングされた、本発明の抗体の可変領域を含む単鎖融合タンパク質が挙げられる。さらなる例としては、さらなる分子に共有結合または非共有結合によってカップリングされた抗原結合断片を少なくとも含む分子が挙げられ、以下の非限定的な例示的リスト中のものが挙げられる。Trauneker, Int. J. Cancer Surp. Su DP 7（1992）, 51-52には、CD3に対するFv領域が、可溶性CD4または他のリガンド、例えばOVCAおよびIL-7にカップリングされている、二重特異性試薬ヤヌシンが記載されている。同様に、本発明の抗体の可変領域をFv分子に構築して、引用文献に示されている代替的リガンドにカップリングすることができる。Higgins, J. Infect. Disease 166（1992）, 198-202には、GP120のV3領域中の特定の配列に対する抗体に架橋されたOKT3からなるヘテロコンジュゲート抗体が記載されている。このようなヘテロコンジュゲート抗体はまた、本発明の方法の抗体中に含まれる少なくとも可変領域を使用して構築され得る。特異的抗体のさらなる例としては、Fanger, Cancer Treat. Res. 68（1993）, 181-194およびFanger, Crit. Rev. Immunol. 12（1992）, 101-124に記載されている抗体が挙げられる。従来の抗体を含む免疫毒素であるコンジュゲートは、当技術分野において広く記載されている。従来のカップ

30

40

50

リング技術によって毒素を抗体にカップリングしてもよいし、またはタンパク質毒素部分を含む免疫毒素を融合タンパク質として生産してもよい。本発明の抗体は、このような免疫毒素を得るための対応する方法で使用され得る。このような免疫毒素の例示は、Byers, Seminars Cell Biol. 2 (1991), 59-70およびFanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54によって記載されているものである。

【0235】

上記融合タンパク質は、プロテアーゼにより切断可能なリンカーまたは切断部位をさらに含み得る。これらのスペーサ部分は順に不溶性でもよいしまたは可溶性でもよく (Dienker et al., Science 231 (1986), 148)、標的部位における抗原からの薬物放出を可能にするように選択され得る。免疫療法のための本発明の抗体および抗原にカップリングされ得る治療剤の例は、ケモカイン、ホーミング分子、薬物、放射性同位体、レクチンおよび毒素である。本発明の抗体および抗原にコンジュゲートされ得る薬物は、コンジュゲート分子を使用しようとする疾患状況に依存する。例えば、腫瘍疾患の処置に有用な標的に対して特異的な抗体を、古典的には抗腫瘍薬物と称される化合物、例えば、マイトマイシンC、ダウノルビシンおよびビンブラスチンにコンジュゲートすることができる。例えば、腫瘍免疫療法のために、放射性同位体とコンジュゲートした本発明の抗体または抗原を使用する際には、特定の同位体が、白血球分布ならびに安定性および放射などの因子に応じて、他の同位体よりも好ましい場合がある。自己免疫反応に応じて、いくつかの放射体が、他の放射体よりも好ましい場合がある。一般に、 α 粒子および β 粒子を放射する放射性同位体が、免疫療法では好ましい。ショートレンジの高エネルギー放射体、例えば ^{212}Bi が好ましい。治療目的では、本発明の抗体または抗原に結合され得る放射性同位体の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{212}At 、 ^{211}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd および ^{188}Re である。本発明の抗体または抗原にカップリングされ得る他の治療剤、ならびにエクスピボおよびインビボの治療プロトコールは公知であるか、または当業者であれば容易に確認することができる。標識するのに適切な放射性核種の非限定的な例は、 ^{198}Au 、 ^{212}Bi 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^3H 、 ^{197}Hg 、 ^{166}Ho 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{203}Pb 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{35}S 、 ^{153}Sm および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ である。標識するのに適切な他の分子は、蛍光色素または発光色素、磁気粒子、金属、および二次的な酵素または結合工程によって検出可能な分子、例えば、酵素またはペプチドタグである。本発明で標識として使用するのに適切な市販の蛍光プローブは、Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 8th Edition (この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる) に列挙されている。磁気粒子ベースのアッセイ(MPA)に使用するのに適切な磁気粒子は、常磁性物質、反磁性物質、強磁性物質、強磁性物質および超常磁性物質から選択され得る。

【0236】

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

【0237】

処置および薬物：

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

10

【0238】

特に指定がなければ、用語「薬物」、「医薬」または「医薬品」は、本明細書では互換的に使用され、限定されないが、（A）内用または外用の物品、医薬および調製物、ならびにヒトまたは他の動物のいずれかの疾患の診断、治癒、緩和、処置または予防に使用することを目的とする任意の物質または物質の混合物；ならびに（B）ヒトまたは他の動物の体の構造または任意の機能に影響を与えることを目的とする物品、医薬および調製物（食品を除く）；ならびに（C）項目（A）および（B）で指定された任意の物品の成分として使用することを目的とする製品を含むものである。用語「薬物」、「医薬」または「医薬品」は、1つ以上の「薬剤」、「化合物」、「物質」または「（化学）組成物」、ならびにいくつかの他の文脈ではさらに充填剤、崩壊剤、潤滑剤、流動促進剤、結合剤のような他の薬学的に不活性な賦形剤、またはヒトもしくは他の動物の体内の目的の標的部位（例えば、皮膚、胃または腸内）における「薬物」、「医薬」もしくは「医薬品」の容易な運搬、崩壊、分解、溶解および生物学的アベイラビリティを確保するものを含有する、ヒトまたは他の動物のいずれかで使用することを目的とする調製物の製剤一式を含むものである。用語「薬剤」、「化合物」または「物質」は、本明細書では互換的に使用され、より具体的な文脈では、限定されないが、すべての薬理学的に活性な薬剤（すなわち、所望の生物学的または薬理学的効果を誘導するか、または本発明の方法によってこのような可能な薬理学的効果を誘導する能力について調査または試験される薬剤）を含むものである。

20

30

【0239】

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

40

【0240】

「非ステロイド系抗炎症薬」または「NSAID」の例としては、アスピリン、アセチルサリチル酸、イブプロフェンおよびイブプロフェン遅延剤、フェノプロフェン、ピロキシカム、フルルビプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、ナプロキセン、テノキシカム、ベノリレート、ジクロフェナク、ナプロキセン、ナブメトン、インドメタシン、ケトプロフェン、メフェナム酸、ジクロフェナク、フェンブフェン、アザプロパゾン、アセメタシン、チアプロフェン酸、インドメタシン、スリンダク、トルメチン、フェニルブタゾン、ジクロフェナクおよびジクロフェナク遅延剤、GR253035などのシクロオキ

50

シゲナーゼ（COX）－2インヒビター、MK966、セレコキシブ（CELEBREX（登録商標）；4－（5－（4－メチルフェニル）－3－（トリフルオロメチル）－1H－ピラゾロー1－イル）ベンゼンスルホンアミドおよびバルデコキシブ（BEXTRA（登録商標））、およびメロキシカム（MOBIC（登録商標））が挙げられ、これらの塩および誘導体などを含む。好ましくは、これらは、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、インドメタシンまたはトルメチンである。このようなNSAIDは、場合により、鎮痛剤、例えば、コデイン、トラマドール、および／またはジヒドロコデインまたは麻酔剤、例えば、モルヒネと共に使用される。

【0241】

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

【0242】

医薬担体：

薬学的に許容し得る担体および投与経路は、当業者に公知の対応文献から採用することができる。当技術分野において周知の方法にしたがって本発明の医薬組成物を製剤化することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols. 2nd Edition by Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylor and Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8を参照のこと。適切な医薬担体の例は当技術分野において周知であり、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、様々な種類の湿潤剤、滅菌溶液などが挙げられる。周知の従来の方法によってこのような担体を含む組成物を製剤化することができる。適切な用量で被験体にこれらの医薬組成物を投与することができる。様々な方法で、適切な組成物の投与をもたらしすることができる。例としては、薬学的に許容し得る担体を含む組成物を、経口、鼻腔内、直腸、局所、腹腔内、静脈内、筋肉内、皮下、皮下、経皮、くも膜下および頭蓋内の方法により投与することが挙げられる。点鼻薬製剤などのエアロゾル製剤は、保存剤および等張剤を有する、活性薬剤の精製した水溶液または他の溶液を含む。このような製剤は、好ましくは、鼻粘膜に適合するpHおよび等張状態に調節される。経口投与用医薬組成物、例えば、単一ドメイン抗体分子（例えば、「nanobodies（登録商標）」なども本発明で想定される。このような経口製剤は、錠剤、カプセル剤、粉末、液体または半固体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体担体を含むことができる。直腸投与用または経腔投与用の製剤は、適切な担体を有する坐剤として提供され得る；O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735も参照のこと。様々な種類の投与に適切な製剤に関するさらなる指針は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985) および対応する最新版に見ることができる。薬物送達方法の簡単な総説については、Langer, Science 249 (1990), 1527-1533を参照のこと。

【0243】

投与計画：

投与計画は、担当の医師および臨床的要因によって決定される。医学分野で周知であるように、任意のある患者への投与量は、その患者のサイズ、体表面、年齢、投与される特

10

20

30

40

50

定の化合物、性別、投与時間および経路、一般的健康状態、同時に投与されている他の薬物を含む多数の要因に依存する。典型的な用量は、例えば、 $0.001 \sim 1000 \mu\text{g}$ の範囲内であり得る（すなわち、この範囲内の、発現のためのまたは発現阻害のための核酸）；しかしながら、この例示的な範囲よりも少ないかまたは多い用量が、特に前述の要因を考慮して想定される。一般に、医薬組成物の定期投与としての計画は、 $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg}$ 単位／日の範囲内とするべきである。計画が持続注入である場合も、それぞれ $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg}$ 単位／キログラム体重／分の範囲内とするべきである。定時的評価によって経過をモニタリングすることができる。非経口投与用の製剤は、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびエチルオレエートなどの注射可能な有機エステルである。水性担体としては、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール溶液／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられる。非経口投与用のビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルブドウ糖液、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸化リンゲル液、または固定化油が挙げられる。静脈内投与用のビヒクルとしては、体液および栄養補充液、（リンゲルブドウ糖液に基づくものなどの）電解質補充液などが挙げられる。例えば、抗微生物薬、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどの保存剤および他の添加物も存在し得る。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の目的用途に応じて、抗腫瘍剤および細胞毒性薬物などの薬剤をさらに含むことができる。

【0244】

加えて、他の薬剤の同時投与または連続投与が望ましい場合がある。治療有効用量または治療有効量は、症候または症状を改善するのに十分な有効成分の量を指す。細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順、例えば、ED50（集団の50％で治療的に有効な用量）およびLD50（集団の50％に致死的な用量）によって、このような化合物の治療有効性および毒性を決定することができる。治療効果と毒性効果との間の用量比が治療指数であり、それはLD50／ED50の比と表すことができる。

【0245】

好ましくは、組成物中の治療薬は、炎症の予防または免疫反応の抑制に十分な量で存在する。

【0246】

これらおよび他の実施形態は、本発明の記載および実施例によって開示および包含される。本発明にしたがって用いられる材料、方法、使用法および化合物のうちのいずれか1つに関するさらなる文献は公開ライブラリおよびデータベースから、例えば、電子機器を使用して検索され得る。例えば、National Center for Biotechnology Informationおよび／またはNational Library of Medicine at the National Institutes of Healthが主催する公開データベース「Medline」を活用することができる。European Molecular Biology Laboratory（EMBL）の一部であるEuropean Bioinformatics Institute（EBI）のデータベースとアドレスなどのさらなるデータベースとウェブアドレスが当業者に公知であり、インターネットの検索エンジンを用いてそれらを得ることもできる。遡及的な検索および現状の認識に有用な生物学の特許情報の概要、および関連する特許情報の供給源の調査は、Berks, TIBTECH 12（1994）、352-364において与えられる。

【0247】

上記開示は、一般に、本発明を説明する。特に指定がない限り、本明細書で使用される用語には、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997、2000年改編および2003年再版、ISBN0198506732で提供されている定義が与えられる。いくつかの文書が本明細書の本文を通して引用される。本明細書の末尾、特許請求の範囲の直前に、完全な書誌引用を見出すことができ

る。引用されているすべての参考文献（本出願を通して引用されている参考文献、発行特許、公開特許出願、および製造業者の仕様書、説明書などを含む）の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる；しかしながら、引用されているいかなる文書も実に本発明に対する従来技術であると認めるものではない。

【0248】

以下の具体的な実施例を参照することにより、さらに完全な理解を得ることができるが、これらは例証のみを目的として本明細書に提供するものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0249】

以下の実施例1～17および対応する図1～50は本発明をさらに例証するが、本発明の範囲を何ら限定するものと解釈するべきではない。本明細書で用いられるものなどの従来の方法についての詳細な説明は、引用されている文献に見出すことができる；「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」Seventeenth Ed. ed. by Beers and Berkow (Merck & Co., Inc., 2003)も参照のこと。

【0250】

本発明の実施は、特に指示がない限り、当技術分野の技術の範囲内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子導入生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技術を用いる。

【0251】

分子遺伝学および遺伝子工学の方法は、一般に、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel et al., eds.); および Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986)の最新版に記載さ

10

20

30

40

50

れている。この開示で言及されている遺伝子操作のための試薬、クローニングベクタおよびキットは、BioRad、Stratagene、InvitrogenおよびClontechなどの商業ベンダーから入手可能である。細胞培養および培地回収の一般的な技術は、Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); および Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251) に概説されている。 10

【0252】

材料および方法

本発明の患者選択および疾患関連性

自己抗体について研究し、本発明に関する特異的Bリンパ球クローニングの供給源となるフィンランド人APECED患者33人の群は、以下の特徴を有する。患者のうち21人が女性であり、12人が男性であり、平均年齢は38歳であった（女性38.3歳；男性37.8歳）。最初のAPECED症候時の平均年齢は、6.2歳であった。男性の平均体重は69.75kgであり、女性の平均体重は59.4kgであった。これら33人の患者は、患者らの臨床症候に関するアンケートに回答した。一般的な症候としては、患者の30%が発熱期間を経験し、67%が無力症を経験した。患者のうち30人が血液を提供し、図6～10に示されているように、患者らの血清をELISAによって分析した。これら患者23人および健常対照者7人（C1～C7）の血清をprotoparraysクリーニングのために選択した。 20

【0253】

器官特異的症候および疾患

AIRE遺伝子欠損の結果としてのAPECED患者における器官特異的症候および疾患は以前に記載されており、組織特異的自己抗原の大部分が公知である (Betterle et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 83 (1998) 1049-1055; Husebye, E. S., Perheentupa et al., J. Intern. Med. 265 (2009), 514-529; Soderbergh et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 89 (2004), 557-562; Uibo et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 78 (1994), 323-328)。本患者コホートは、以下の器官特異的自己免疫症候を示した（カッコ内は公知の自己抗原）： 30

【0254】

81%でアジソン病（副腎21ヒドロキシラーゼ；17 α -ヒドロキシラーゼ；側鎖切断酵素（SCC）、79%で随伴性副甲状腺機能低下症（副甲状腺、NALP5（NACHTロイシンリッチ反復タンパク質5）および45%で甲状腺機能低下症（甲状腺ペルオキシダーゼ；チログロブリン）。後者の患者15人のうち12人は、副甲状腺機能低下症およびアジソン病も有していた。30%で不妊症（男性1人および女性10人で精巣／卵巣不全／萎縮症；17 α -ヒドロキシラーゼおよびSCC）、24%で無脾症、18%で下垂体／GH欠損症（ほとんどが男性；チューダードメイン含有タンパク質6（TDRD6）、12%で真性糖尿病（膵臓GAD65；インスリン；チロシンホスファターゼIA2）、12%で悪性貧血（自己抗原として胃粘膜、内因子、胃壁細胞）、9%で自己免疫性肝炎（抗LKM1+しかし異なる抗原：シトクロムP450 1A2、P450 2A6、P450 1A1、P450 2B6）および9%で腎炎（女性全員）が記録された。 40

【0255】

42%で抜け毛（女性ではより少ない）、33%で脱毛症（女性ではより少ない；自己 50

抗原候補は、チロシンヒドロキシラーゼである）が起こった。15%で白斑が存在した（抗メラノサイト；SOX9；SOX10；ADC）

【0256】

原因不明の臨床徴候：

APECED患者はまた、その病態生理が依然として不明の外胚葉欠損症を有する。このようなものとして、歯ジストロフィ（72%）および爪ジストロフィ（33%）が本患者コホートに存在していた。64%で眼感染症、79%でドライアイ、および55%で光過敏性が見られた。

【0257】

大部分が機能的および吸収不良である腸症候は、本APECEDコホートでは一般的である。56%で腹痛エピソード、39%で下痢エピソード、39%で便秘エピソードが報告され、18%が腹痛＋下痢＋便秘を有していた。33%で胸骨後面痛／高嚥下障害が報告された。

【0258】

腸細胞によるIL-7発現は、インサイチュー（腸上皮内）におけるTCR-ガンマデルタ細胞の胸腺外発達、および粘膜リンパ組織の組織化に必須であるので（Lakya et al, JEM 2000）、患者の抗IL7自己抗体またはET-1変換酵素（ECE1：）に対する自己抗体は、観察された腸症候に寄与している可能性がある。

【0259】

APECED患者では見られない疾患（すなわち、これらの疾患に対する保護）

APECED患者で固有に発生し、大部分が本研究で初めて同定された抗サイトカインおよび抗ケモカインおよび他の自己抗体（表2～表14を参照のこと）は、以下の疾患から患者を保護する可能性がある：

【0260】

本APECED患者では見られない自己免疫性および自己炎症性の器官非特異的疾患：

エリテマトーデス；シェーグレン症候群；強皮症（局所型または全身型）；抗リン脂質症候群；多発性硬化症（MS）；関節リウマチ。フィンランドでは、RAの全国的な有病率は0.8%である；乾癬。フィンランドでは、乾癬の全国的な有病率は2～4%である；グルテン不耐症（セリアック病）。フィンランドでは、セリアック病の全国的な有病率は2%である；炎症性腸疾患（IBD）；水疱性自己免疫性皮膚疾患（天疱瘡；類天疱瘡）；グッドパスチャー症候群；溶血性貧血；自己免疫性血小板減少症；後天性血友病；自己免疫性神経障害

【0261】

理論に縛られるものではないが、本明細書で同定されたようにAPECED患者で自然に誘発され、上記疾患に対して保護的なヒト抗体について、以下のように予想するのが賢明である：

－抗インターフェロン抗体：エリテマトーデスに対して保護的。

－抗IL17：乾癬および炎症性腸疾患（IBD）に対して保護的

－抗IL-5、IL-7（胸腺、皮膚、腸）、IL-10、IL-11：アトピー性疾患に対して保護的

－抗IL-10抗体：（様々な種類の癌で）抗腫瘍免疫反応を増強するのに使用することができる

－抗IL-7抗体：ヒトT細胞急性リンパ性白血病に対して保護的

－抗IL-28、IL-29：特にDCで広く産生、抗ウイルスおよび細胞増殖抑制、上皮細胞および肝細胞を標的、TLR2および3をアップレギュレート、TLR-誘導性IL-12

－抗CCL-17、CCL-22（好酸球、基底細胞、Th-2によって発現）：喘息、RA、CNS炎症に対して保護的。

－抗IL-17A/F、IL-22、またCCL-20および抗IL-36：乾癬に対して保護的

10

20

30

40

50

【0262】

アレルギー性疾患

アレルギー性疾患の発生率はAPECED患者で減少しているが、本発明者らは、このことが部分的には、APECED患者で自然に誘発され、アレルギー性疾患の中心的な炎症媒介経路を標的とする自己抗体に起因すると提案する。フィンランドでは、一般集団における様々なアレルギー性疾患の有病率は、以下のとおりである：アトピー性湿疹：（A E）の有病率は子供では15～20％であり、成人の25～30％が一生のある時点でA Eを経験している。一方、APECED患者コホートでは、症例のわずか12％でアトピー性発疹、12％で鼻アレルギー、15％で眼アレルギー、10％で気道アレルギー／喘息、および6％で接触アレルギーが見られた。例えば、CCL17およびCCL22はA E（参照）でアップレギュレートしていることが公知であり、同様にCCL19、CCL21は喘息：iBALT（感染／慢性感染症）でアップレギュレートしていることが公知であるので、CCL17、CCL19、CCL21およびCCL22に対する本発明にしたがって見出された自己抗体は、アレルギー徴候に対して保護的である。

10

【0263】

微生物感染症

上記自己免疫反応を有するAPECED患者は、カンジダ酵母の粘膜異常増殖を除いて一般的な微生物感染症に対して抵抗性である。本患者コホートでは、27％で蹄（爪）カンジダ感染症、50％で爪感染症に関連する蹄ジストロフィ、64％で口腔カンジダ症（確認済）、30％で食道カンジダ症（ほとんどが口腔カンジダ症も有していた）、36％で歯肉炎が示された。

20

【0264】

癌

APECEDでは、癌は、口腔扁平上皮細胞癌を除いて稀である。本発明の基礎となる実験内で試験した患者コホートでは、患者の9％で口腔癌が見られた。CRLF3、CCL7、CCL20、CCL22およびCCL17に対する患者の自己抗体は、この関連では保護的であり得る。

【0265】

AIRE遺伝子の突然変異解析：

国際公開第99／15559号の第12頁～第13頁の実施例2（この開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、AIRE（APECED）遺伝子における各突然変異の遺伝子型決定を実施する。特に、突然変異分析のために、（Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. CSH Pressにしたがって）APECED患者、およびAPECED保因者と疑われる者、および正常健常対照者由来の末梢血単核細胞から、DNA試料を精製し、同定されたすべてのエクソンに対して特異的なプライマーを使用したPCRに供する。

30

【0266】

突然変異エクソンを配列決定するために、以下の条件のPCRによって、PCR断片、エクソン6の6F／6Rおよびエクソン2の49300F／49622Rを増幅する：それぞれ、95℃で9分間、そして94℃で30秒間、60℃で30秒間および72℃で30秒間を35サイクル、ならびに94℃で3分間、そして94℃で30秒間、60℃で30～25秒間および68℃で30秒間を35サイクル。特異的プライマーを使用して、PCR産物を配列決定する：

40

6F：5'－TGCAAGGCTGTGGGAACCTCCA－3'（配列番号1）

6R：5'－AGAAAAAGAGCTGTACCCCTGTG－3'（配列番号2）

3R：5'－TGCAAGGAAGAGGGGCGTCAGC－3'（配列番号3）

49300F：5'－TCCACCCACAAGCCGAGGAGAT－3'（配列番号4）

および49622R：5'－ACGGGCTCCTCAAAACACCACT－3'（配

50

列番号5)。

【0267】

国際公開第99/15559号の第13頁5行目～第14頁13行目の実施例3（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、AIRE遺伝子のエクソン2および6における突然変異を確認するために、各領域のPCR増幅産物の制限酵素分析を実施する。

【0268】

Protoarrayチップ：

血清活性試験用のInvitrogen protoarrayチップ：ProtoArray（登録商標）Human Protein Microarray v5.0 slides（Invitrogen）をブロッキングし、次いで、PBST緩衝液で希釈した各血清試料の1：500希釈物でプローブした。次いで、アレイを穏やかに攪拌しながら4℃で90分間インキュベートした。インキュベーション後、PBST緩衝液でスライドを5回洗浄した。次いで、PBST緩衝液で希釈したAlexa Fluor（登録商標）647コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG抗体を各アレイに追加し、穏やかに振盪しながら4℃で90分間インキュベートした。インキュベーション後、二次抗体を除去し、上記のようにアレイを洗浄し、回転させることによって乾燥した。最後に、Axon GenePix 4000B蛍光マイクロアレイスキャナを使用して、アレイをスキャンした。

【0269】

記憶B細胞の培養

フィコエリトリンコンジュゲートmAb抗ヒトIgD、APCコンジュゲートmAb抗ヒトIgM、CD3、CD56、CD8およびFITCコンジュゲートmAb抗ヒトCD22（Becton Dickinson, Basel, Switzerland）を使用した段階プロトコールによって、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群1型（APS1）とも称される自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ（APECED, OMIM 240300）を有するボランティアフィンランド人患者の末梢血由来のヒト末梢血単球細胞から、記憶B細胞を単離した。MoFlo XDPセルソータ（Beckman Coulter）を使用して、細胞選別を行った。次いで、（10%ウシ胎児血清を補充したRPMI 1640を含有するB細胞培地で）CD22陽性およびIgM⁺、IgD陰性B細胞を、B95-8細胞から得られた上清を含有するEBVと共に3～5時間（好ましくは、3.5時間）インキュベートした。ボランティアドナーから調製した30,000個の照射フィーダPBL上で、CpG2006を補充したIMDM培地に、1ウェルあたり細胞10個で細胞を播種した。培養の8～14日後に、ELISAによって、目的の抗原（例えば、IL-17、IL-22）に特異的な抗体の存在について、記憶B細胞培養物の馴化培地をスクリーニングした。

【0270】

IL-17、IL-22のELISA

96ウェルマイクロプレート（Costar, USA）を、ヒトIL-17AもしくはIL-17F（両方ともBioLegend製）、またはIL-22（ImmunoTools）でコーティングした。PBSTでプレートを洗浄し、2%BSA（Sigma, Buchs, Switzerland）を含有するPBSを用いて室温で1時間ブロッキングした。患者の血清、B細胞馴化培地、または組換え抗体調製物を室温で2時間インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトFc-γ特異的抗体（Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Cambridgeshire, UK）を使用して、目的の抗原に対するヒトIgGの結合を決定し続いて、TMB基質溶液（TMB, Sigma, Buchs, Switzerland）を使用して、HRP活性を測定した。

【0271】

実施例1：APECED/APPS1患者からのヒト末梢血単核細胞（PBMC）の単離

完全ヒト抗体のクローニングのための出発物質として、自己免疫性多腺性内分泌不全症候群1型 (APS1) とも称される自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ (APCED, OMIM 240300) を有するボランティアフィンランド人患者23人から得られたヒトリンパ球を使用した。フィンランドのAPCEDおよびアジソン患者会を通じて供血のためにこれらのボランティアを募集した。患者全員から書面によるインフォームドコンセントを得て、Medicine Ethical Review Board of the Joint Authority of HelsinkiおよびUusimaa hospital districtによって研究が承認された。APCEDは、21番染色体 (21q22.3) に位置するAIRE (自己免疫調節因子) 遺伝子における突然変異によって引き起こされる常染色体劣性障害であり、APCEDは、創始者効果によりフィンランドで流行している (1/25, 000)。APCED患者は、主に副腎不全および副甲状腺機能低下症を含む様々な内分泌免疫機能障害を示すが、様々な性腺機能低下症、真性糖尿病、甲状腺炎および下垂体炎も示す。他の主な症候は、慢性粘膜皮膚カンジダ症、脱毛症および白斑である (上記も参照のこと)。血清中の抗原特異的IgGレベルと、末梢血単核細胞の記憶プールにおける抗原特異的B細胞の頻度との間の強い相関関係が報告されているので (Bernasconi et al. 2002, Lanzavecchia et al. 2006)、最初に、(IFN、IL-17、IL-22のような) 目的のタンパク質に対する自己抗体の存在について患者の血清をスクリーニングし、次いで、以下のように、末梢血単核細胞 (PBMC) を単離するために、高力価 (>1:5000) のAPCED症例を選択した。ヘパリン添加末梢血を得て、2容量の1×PBSを用いて室温で希釈し、Lympholyte H上に細胞をオーバーレイし、2000rpm (805rcf)、室温で20分間遠心分離した。間期に細胞を回収し、洗浄緩衝液フィル中で混合し、1,500rpm (453rcf)、4℃で15分間遠心分離し、10mlの洗浄緩衝液と共に穏やかにフリックすることによって再懸濁した。その後、1,000rpm (201rcf)、4℃で細胞を10分間遠心分離し、洗浄緩衝液でもう1回洗浄した。次いで、氷上で、細胞を適切な容量のFBSに穏やかに再懸濁した。FBSを追加して容量を20mio/mlに調整した後、1容量の凍結培地 (80%FBS (Hyclone, Thermo Scientific) および20%DMSO, #154938, Sigma) を攪拌しながらゆっくりと追加し、再懸濁し、氷上に置いたクライオバイアルに分注した。クライオバイアルをMr. Frostyボックス内に置き、-80℃の冷凍庫に最大5日間移してから、実施例2に記載されているようにさらに処理した。あるいは、クライオバイアルを液体窒素中に保存した。

【0272】

実施例2: IL-17またはIL-22に対して特異的なヒト抗体の分子クローニング

好ましくは、目的の抗体を産生する活性化記憶B細胞の短期オリゴクローナル培養物由来の単一細胞選別細胞から得られた免疫グロブリン遺伝子の分子クローニングによって、IL-17またはIL-22に対して特異的な抗体を単離した。

【0273】

フィコエリトリンコンジュゲートmAb抗ヒトIgD、APCコンジュゲートmAb抗ヒトIgM、CD3、CD56、CD8およびFITCコンジュゲートmAb抗ヒトCD22 (Becton Dickinson, Basel, Switzerland) を使用した一段階プロトコールによって、APCEDを有するボランティアフィンランド人患者の末梢血由来のPBMCから、記憶B細胞を単離した。MoFlo XDPセルソータ (Beckman Coulter) を使用して、細胞選別を行った。(10%ウシ胎児血清を補充したRPMI 1640を含有するB細胞培地で) CD22陽性-およびIgM-、IgD陰性B細胞を、B95-8細胞から得られた上清を含有するEBVで刺激した。ボランティアドナーから調製した30,000個の照射フィーダPBMC上で、1ウェルあたり細胞10個で、CpG2006を補充したIMDM培地に細胞を播種した。刺激の10~14日後に、目的の標的 (例えば、IL-17、IL-22) に対して特異的

な抗体の存在について、培養物の上清をスクリーニングした。スクリーニング工程には、例えば、ELISAによって、目的の特定の分子の断片、ペプチドまたは誘導体に対する結合についてスクリーニングすることが含まれていた。続いて、結合が検出された抗体または前記抗体を産生する細胞を単離する。

【0274】

IL-17/IL-22反応性記憶B細胞培養物から得られた単一細胞を、第1鎖緩衝液 (Invitrogen, LuBioscience, Switzerland) を含有する96ウェルPCRプレートに置く。ランダムヘキサマープライマ (Invitrogen, LuBioscience, Switzerland) を使用して、cDNAを調製する。標準的なプロトコル (Wardemann et al., Science

301, 2003, 1374-1377) にしたがって、免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域のPCR増幅を実施する。ネストPCR法を使用して、免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域を増幅する。IgG定常領域に対して特異的なプライマーと、重鎖および軽鎖Ig可変領域ファミリーのすべてのシグナルペプチドに対して特異的なプライマーミックスとを用いて、第1ラウンドのPCRを実施する (Wardemann et al., Science 301, 2003, 1374-1377)。続いて、免疫グロブリンJ領域ならびに重鎖および軽鎖Ig可変領域ファミリーのフレームワーク1の5'領域に対して特異的なプライマーミックスを使用して、ネストPCRを実施する。選択されたB細胞培養物中に存在する個々の抗体クローンを同定するために、配列分析を行う。続いて、各抗体クローンのIg可変重領域および軽鎖領域を発現ベクタにクローニングして、ヒトIgG1の定常領域、ヒトIg-カッパまたはヒトIg-ラムダを得る。Ig重および軽鎖発現ベクタをHEK293細胞にコトランスフェクトすると、抗体クローンが産生される。IL-17/IL-22および対照ELISAで組換え抗体クローンを再スクリーニングすることによって、親B細胞培養物のIL-17/IL-22反応性に関与すると思われる抗体クローンの同定を実施する。

【0275】

プライマーがコードするIg可変領域内の配列ミスマッチを同定および訂正するために、Ig重鎖および軽鎖定常領域の保存領域に対して特異的な2つのプライマー対を3'プライマーとして、ならびにIgシグナルペプチドに対して特異的なプライマーミックスを5'プライマーとして用いて、半ネストプロトコルを使用したさらなるPCR増幅を実施する。PCR産物をTOPO (商標) ベクタ (Invitrogen, LuBioscience, Lucerne, Switzerland) にクローニングする。完全Ig可変領域の配列決定を行い、この情報を使用して、オーセンティックなヒト抗体配列を抗体発現ベクタにクローニングするための特異的なプライマーを設計する。このアプローチは、患者内で生じたIg可変領域の完全抗体配列の同定を可能にする。この配列をこれらの抗体の組換え生産に使用し、次いで、これらの抗体をこの後の特性決定工程で使用する。

【0276】

実施例3：抗体の生産および精製

ポリエチレンイミントランスフェクション法 (PEI, Polyscience Warrington, USA) を使用して、抗体発現ベクタを293-Tヒト胎児腎臓細胞またはチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) にトランスフェクトすることによって、ヒト抗体の一過性遺伝子発現を達成する。トランスフェクションの後、無血清培地 (GluutaMAX-I Gibcoを補充したOPTI-MEM) で細胞を培養する。培養の3~6日後に上清を収集し、高速タンパク質液体クロマトグラフィ装置 (FPLC) (GE Healthcare, Sweden) でプロテインAカラム (GE Healthcare, Sweden) を使用してIgGを精製する。

【0277】

実施例4：インビトロ細胞ベースの中和アッセイ

試験サイトカインに反応する (すなわち、必要な受容体を有する) 細胞株で中和アッセイを行う。受容体へのリガンド結合は、対応するシグナル伝達経路、転写因子の核移行を

活性化し、応答遺伝子の転写、翻訳および該当する場合には産物の分泌をアップレギュレートする。アッセイの感度を最大にするために、使用するサイトカイン濃度を、用量反応曲線の直線開始部分から選択する。抗体の中和能を試験するために、最適濃度の標的サイトカインを、系列希釈の血清、上清または精製抗体試料と共にプレインキュベートする。陽性対照と陰性対照との間の中間値を示す抗体の力価または濃度として、結果を表す。

【0278】

IL-22中和アッセイ

96ウェル組織培養プレート中、37℃で、系列希釈の血清試料、培養上清または精製抗体を、0.5 ng/mlのIL-22と共にコインキュベートする。コインキュベーションの2時間後に、Colo205細胞株を、細胞 3×10^4 個/ウェルで、10%熱不活性化FBSを含むRPMI-1640に追加する。37℃で16~20時間インキュベートした後、上清を回収し、ELISAによってIL-10産生について分析した。陽性対照と陰性対照との間の中間値をもたらし血清または上清力価または抗体濃度として、ELISA吸光度のグラフから結果を評価する。ED50は、試験試料のサイトカイン活性を半減させるのに必要な濃度または力価と定義する。

10

【0279】

IL-17A中和アッセイ

10%不活性化FBSを含むDMEM中で、IL-17-A (2 ng/ml)を系列希釈した血清、上清または抗体試料に予め2時間曝露したものに対して、細胞 1×10^4 個/ウェルで、1BR. 3. Gヒト皮膚線維芽細胞を播種する。37℃で16~20時間インキュベートした後、上清を回収し、ELISAによって成長関連癌遺伝子(GRO)- α 産生について分析する。陽性対照と陰性対照との間の中間値をもたらし血清または上清力価または抗体濃度として、ELISA吸光度のグラフから結果を評価する。ED50は、試験試料のサイトカイン活性を半減させるのに必要な濃度または力価と定義する。

20

【0280】

IL-17F中和アッセイ

10%不活性化FBSを含むDMEM中で、NCTC 2544ケラチノサイトをTNF- α (0.1 ng/ml)で3時間前処理する。96ウェル組織培養プレート中、37℃で、系列希釈の血清試料、培養上清または精製抗体を、10 ng/mlのIL-17Fと共にコインキュベートする。コインキュベーションの2時間後に、ケラチノサイトを、細胞 1×10^4 個/ウェルで追加する。37℃で16~20時間インキュベートした後、上清を回収し、ELISAによって成長関連癌遺伝子(GRO)- α 産生について分析する。陽性対照と陰性対照との間の中間値をもたらし血清または上清力価または抗体濃度として、ELISA吸光度のグラフから結果を評価する。ED50は、試験試料のサイトカイン活性を半減させるのに必要な濃度または力価と定義する。

30

【0281】

IL-17A/IL-17Fヘテロ二量体中和アッセイ

10%不活性化FBSを含むDMEM中で、NCTC 2544ケラチノサイトをTNF- α (0.1 ng/ml)で3時間前処理する。96ウェル組織培養プレート中、37℃で、系列希釈の血清試料、培養上清または精製抗体を、5 ng/mlのIL-17A/IL-17Fヘテロ二量体と共にコインキュベートする。コインキュベーションの2時間後に、ケラチノサイトを、細胞 1×10^4 個/ウェルで追加する。37℃で16~20時間インキュベートした後、上清を回収し、ELISAによって成長関連癌遺伝子(GRO)- α 産生について分析する。陽性対照と陰性対照との間の中間値をもたらし血清または上清力価または抗体濃度として、ELISA吸光度のグラフから結果を評価する。ED50は、試験試料のサイトカイン活性を半減させるのに必要な濃度または力価と定義する。

40

【0282】

実施例5：主題抗体の検証

1. 選択動物モデルにおけるイミキモド誘導性乾癬様皮膚炎のためのプロトコール

イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎に対するAPECED由来抗IL-17、抗IL-22

50

自己抗体および他の A P E C E D 由来自己抗体の効果をアッセイするために、マウスモデルを使用した。処置の 48～72 時間前に、C57B1/6 マウスの背部を麻酔下で剃毛した。イミキモド適用の 24 時間前または後に、抗 I L - 17、抗 I L - 22 および他の A P E C E D 由来自己抗体をマウスに腹腔内注射し、2 日間隔でさらに投与した。対照マウスには、ヒト I g 対照を注射した。1 日局所用量 62.5 mg の市販 I M Q クリーム (5%) (A l d a r a ; 3 M P h a r m a c e u t i c a l s) を処置マウスに 5 日間連続で投与した。対照マウスをワセリンで処置した。臨床的な乾癬面積重症度指数 (P A S I) に基づく客観的なスコアリングシステムを使用して、マウスを毎日スコア化した。0～4 の尺度 (0、なし; 1、軽度; 2、中度; 3、顕著; 4、非常に顕著) で、紅斑、鱗屑および厚みを別々にスコア化した。脾臓を計量し、フローサイトメトリによる分析のためにリンパ節由来の T 細胞を一晩刺激した。

10

【0283】

2. 抗 I L - 7 および抗 I F N 抗体で同時処置した A i r e 欠損マウスにおける E A E 誘導

M O G₃₅₋₅₅ C F A エマルジョン (M O G を発現する神経細胞の自己免疫破壊を誘導する免疫原性ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質ペプチド断片; 完全フロイントアジュバント) による E A E (実験的アレルギー性脳脊髄炎) 誘導に対する抗 I L - 17、抗 I F N および他の A P E C E D 患者由来自己抗体の潜在的保護効果を調査するために、A i r e タンパク質をコードする能力が破壊された (これは、自己免疫を引き起こすと予測される) A i r e^{-/-} マウスモデルを使用した。例えば、これに関して、1 mg の M O G₃₅₋₅₅ / m L エマルジョンおよび 2 mg の死菌マイコバクテリウム・ツベルクロシス H 37 R a / m L エマルジョンを含有する完全フロイントアジュバント (C F A) エマルジョンプレフィルシリンジを使用した。E A E 誘導開始の 24 時間前に、抗体 (例えば、抗 I L - 7 および抗 I F N 抗体) の腹腔内注射によって、A i r e^{-/-} および野生型対照雌性マウスを前処置し、2 日間隔でさらに投与した。対照マウスには、対照免疫グロブリンを注射した。初回抗体投与の 24 時間後に、ストレスを最小限に抑えた (少なくとも 7 日間の馴化、静的ケージ、静かな環境) A i r e^{-/-} および野生型対照雌性マウスに、M O G₃₅₋₅₅ C F A エマルジョンを (上背部および下背部に) 皮下注射して、E A E を引き起こした。2 時間以内に、百日咳毒素を処置マウスに腹腔内注射して E A E 誘導を増幅し、22～26 時間の時点で、百日咳毒素をさらに皮下投与した。E A E 表現型の重症度を 0～5 の尺度でスコア化する標準的な H o o k e L a b 臨床観察尺度を使用して、開始の 7 日後およびそれ以降に、E A E 誘導をスコア化した。スコア 0 の表現型は明らかな変化がないことを表し、後肢および前脚の完全麻痺を示すスコア 5 の表現型に及ぶ。

20

30

【0284】

3. マウスモデルで E A E を誘導するためのプロトコール

M O G₃₅₋₅₅ (M O G を発現する神経細胞の自己免疫破壊を引き起こす免疫原性 M O G ペプチド) C F A エマルジョンによる E A E 誘導に対する抗 I L - 17、抗 I L - 22 および他の A P E C E D 由来自己抗体の効果を調査するために、マウスモデルを使用した。E A E 誘導開始の 24 時間前に、抗 I L - 17、抗 I L - 22 抗体の腹腔内注射によって、A i r e^{-/-} および野生型対照雌性マウスを前処置し、2 日間隔でさらに投与した。対照マウスには、I g 対照を注射した。初回抗体投与の 24 時間後に、ストレスを最小限に抑えた (少なくとも 7 日間の馴化、静的ケージ、静かな環境) A i r e^{-/-} および野生型対照雌性マウスに、M O G₃₅₋₅₅ C F A エマルジョンを (上背部および下背部に) 皮下注射して、E A E を引き起こした。2 時間以内に、百日咳毒素を処置マウスに腹腔内注射して E A E 誘導を増幅し、22～26 時間の時点で、百日咳毒素をさらに皮下投与した。E A E 表現型の重症度を 0～5 の尺度でスコア化する標準的な H o o k e L a b 臨床観察尺度を使用して、開始の 7 日後およびそれ以降に、E A E 誘導をスコア化した。スコア 0 の表現型は明らかな変化がないことを表し、後肢および前脚の完全麻痺を示すスコア 5 の表現型に及ぶ。

40

50

【0285】

4. マウスモデルでコラーゲン誘導性関節炎を誘導するためのプロトコール

コラーゲン誘導性関節炎（CIA）の誘導に対する抗IL-17、抗IL-22および他のAPCED由来自己抗体の効果を調査するために、マウスモデルを使用した。CIA誘導の24時間前に、APCED由来自己抗体の腹腔内注射によって、C57BL/6マウスを前処置し、2日間隔でさらに投与した（Igを対照として使用した）。ニワトリ胸骨の軟骨から抽出したニワトリII型コラーゲン（CFAで1:1調製したもの）の皮内注射（尾の基部に2回注射）によって、コラーゲン誘導性関節炎を引き起こした。誘導の14日後に、追加免疫用（further boost）のニワトリII型コラーゲン1:1IFAを皮内注射した。マウスをモニタリングし、一次免疫の2週間後から関節炎について毎日スコア化し（典型的な関節炎の発症は、免疫の3～6週間後に起こる）、臨床モニタリング（キャリパーを使用して腫れている後脚をスコア化）、抗コラーゲン抗体の測定（コラーゲンをコーティングしたプレートを使用したELISA）、T細胞反応（³Hチミジンの取り込みを使用して測定した場合のニワトリコラーゲンに対するT細胞増殖）、またはサイトカインELISAのいずれかによってスコア化した。

10

【0286】

5. マウスモデルでDSS大腸炎を誘導するためのプロトコール

DSS大腸炎の誘導に対する抗IL-17、抗IL-22および他のAPCED由来自己抗体の効果をアッセイするために、マウスモデルを使用した。DSS大腸炎誘導の24時間前に、APCED由来自己抗体の腹腔内注射によって、C57BL/6マウスを前処置し、2日間隔でさらに投与した（Igを対照として使用した）。2%DSSを含む飲料水を5日間、続いてDSSを含まない加熱滅菌飲料水を14日間のサイクルを3サイクル反復することによって、慢性DSS大腸炎を誘導した。対照マウスには、加熱滅菌飲料水のみを投与した。組織学的評価（パラフィン切片上でのヘマトキシリンおよびエオシン染色）、全層器官培養（サイトカイン分析のために24時間の時点で上清を収集）、またはqPCRもしくはイムノブロットイングのための直接的な組織サンプリングによって、DSS誘導性大腸炎の誘導および重症度を測定した。また、大腸炎は消耗性疾患に強く関連しているので、体重減少の程度を決定するために、DSS誘導性大腸炎に供したマウスを毎日計量した。

20

【0287】

例えば、Sagoo et al., Sci Transl Med 3 (2011) : 83ra42によって記載されているように、ヒト組織を移植した免疫不全マウス系統における炎症に対するこのような抗体（例えば、抗IL-17Fおよび抗IL-22）の効果によって、サイトカインまたは他の関連分子に対するヒト由来抗体の有効性も評価する。

30

【0288】

実施例6：イミキモド誘導性乾癬様皮膚炎の結果

イミキモドで局所処置して乾癬様皮膚炎を誘導したマウスでは（実験のタイムラインおよび処置スキームについては、図16を参照のこと）、APCED由来30G1抗IL-22 [HD-MAB] 抗体は、乾癬面積重症度指数（PASI）のスコアを対照IgG抗体と比べて有意に減少させる。0～4の尺度（0、なし；1、軽度；2、中度；3、顕著；4、非常に顕著）で、紅斑（発赤）、鱗屑および厚み（硬度）を別々にスコア化した。図17、18、20～22に見られるように、紅斑（発赤）、鱗屑および皮膚厚み（硬度）のPASIスコアによって測定した場合、イミキモド処置は、対照抗体で処置したマウスと比べて、乾癬様皮膚炎を誘導する。例示的な30G1抗体などの本発明の抗IL-22 HDMA Bで処置したマウスは、対照IgGで処置したマウスと比較して、測定の累計スコアおよび個々のスコアの両方について減少を示した（実線で示されているデータ（IgG+IMQ）と、点線で示されているデータ（aIL22+IMQ）とを比較（図17、18、20）。背部の皮膚は、IgG+IMQで処置した動物の病変および赤い皮膚領域（スポット）の拡大を示す（図20～21（B））。30G1抗IL-22および

40

50

I M Qで処置した動物の背部では、このような病変の拡大が存在しないかまたはより小さい（図20～21（C））。I g G + I M Qの各値とa I L 2 2 + I M Qの各値との対比（以下の表18および19）。さらに、リンパ節由来のT細胞のフローサイトメトリ分析により、抗I L - 2 2 H D M A B処置マウスでは、エフェクタの活性化状態が、対照I g Gで処置したマウスと比較して減少していることが示された。

【0289】

イミキモド処置の5日後に、対照ヒトI g Gで処置したマウスは、発赤＝3.75（スコア0～4）、硬度＝3および鱗屑＝2.25の平均臨床スコアを示したが、I M Qおよび抗I L - 2 2 3 0 G 1抗体で処置したマウスは、発赤＝1.75、硬度＝1.75および鱗屑＝2のスコアを有していた（以下の表18および19を参照のこと）。これらは有意差であると思われる。I g G + I M Qで処置したマウスはまた、抗I L - 2 2 + I M Qで処置したマウスと比較して増加した皮膚厚みを示した。

【0290】

【表18】

表18：5日間にわたるB L 6マウスの発赤臨床スコア（0～4の尺度で盲検でスコア化）
V a s＝ワセリン，I M Q＝イミキモド

		0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
I g G + V a s	I g G + V a s 1	0	0	0	0	0	0
I g G + V a s	I g G + V a s 2	0	0	0	0	0	0
I g G + V a s	I g G + V a s 3	0	0	0	0	0	0
I g G + I M Q	I g G + I M Q 1	0	0	0	2	3	4
I g G + I M Q	I g G + I M Q 2	0	0	1	1	3	3
I g G + I M Q	I g G + I M Q 3	0	0	1	3	4	4
I g G + I M Q	I g G + I M Q 4	0	0	0	2	4	4
a I L 2 2 + V a s	a I L 2 2 + V a s 1	0	0	0	0	0	0
a I L 2 2 + V a s	a I L 2 2 + V a s 2	0	0	0	0	0	0
a I L 2 2 + V a s	a I L 2 2 + V a s 3	0	0	0	0	0	0
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 1	0	0	0	1	2	2
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 2	0	0	1	2	2	2
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 3	0	0	0	1	1	1
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 4	0	0	0	2	2	2

【0291】

【表 19】

表 19：5 日間にわたる B L 6 マウスの硬度臨床スコア（0～4 の尺度で盲検でスコア化）

		0 日 目	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目
I g G + V a s	I g G + V a s 1	0	0	0	0	0	0
I g G + V a s	I g G + V a s 2	0	0	0	0	0	0
I g G + V a s	I g G + V a s 3	0	0	0	0	0	0
I g G + I M Q	I g G + I M Q 1	0	0	1	2	3	3
I g G + I M Q	I g G + I M Q 2	0	0	1	2	3	3
I g G + I M Q	I g G + I M Q 3	0	0	1	2	4	3
I g G + I M Q	I g G + I M Q 4	0	0	1	2	4	3
a I L 2 2 + V a s	a I L 2 2 + V a s 1	0	0	0	0	0	0
a I L 2 2 + V a s	a I L 2 2 + V a s 2	0	0	0	0	0	0
a I L 2 2 + V a s	a I L 2 2 + V a s 3	0	0	0	0	0	0
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 1	0	0	1	2	2	2
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 2	0	0	1	2	2	2
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 3	0	0	1	1	2	1
a I L 2 2 + I M Q	a I L 2 2 + I M Q 4	0	0	0	2	2	2

10

20

【0292】

I g G および抗 I L - 2 2 （30G1）の両方で処置したマウスは、時間経過の 2 日目までに発熱症候、および 5 日目に脾臓サイズの増加を示した（図 27 を参照のこと）。しかしながら、1 日目において、抗 I L - 2 2 で処置したマウスにおける発熱症候は、対照ヒト I g G で処置したマウスよりもはるかに少なかった。このデータは、例えば、抗体 30G1 に関して示されているように、本発明の抗 I L - 2 2 抗体が、C57. B L / 6 マウスにおけるイミキモド誘導性乾癬状病変の臨床症候の重症度を軽減することを示している。

30

【0293】

抗 I L - 2 2 30G1 抗体による処置が処置マウスで治療効果を示したことは、ヒト抗原に加えてマウスに対するこの抗体の交差反応性を示すが、例示的なヒト特異的抗 I L - 1 7 抗体 24D3 を用いて同様に実施した実験では、イミキモド誘導性乾癬病変に対して効果がなく、このことは、ヒト抗原に対する 24D3 抗体の特異性を立証している。

【0294】

さらに、本発明の抗 I L - 2 2 抗体の治療有効可能性を調査するために、イミキモド誘導の前後両方に抗体を投与したイミキモド誘導性乾癬アッセイで、および誘導後のみの第 2 の実験で、例示的な抗体 30G1 を試験した（実験のタイムラインおよび処置スキームについては、図 33 を参照のこと）。

40

【0295】

I M Q 処置の前後いずれかに投与した場合、A P E C E D 由来 30G1 抗 I L - 2 2 抗体は、乾癬面積重症度指数（P A S I）スコアを、対照 I g G 抗体と比べて有意に減少させる。例示的な 30G1 抗体などの本発明の抗 I L - 2 2 H D M A B で処置したマウスは、予防的処置および治療的処置のいずれの状況においても、対照 I g G で処置したマウスと比較して、対照 I g G 抗体と比べて、皮膚厚みスコアの指標である皮膚厚みの減少を

50

示した；予防的処置については図38A（前）、およびIMQ誘導の24時間後の治療的処置については図38Bに示されている皮膚厚みの測定結果を参照のこと。動物の数を増加させた第2の実験で、治療効果をさらに検証した（実験のタイムラインおよび処置スキームについては、図35を参照のこと）。例示的な30G1抗体などの本発明の抗IL-22 HDMA Bで処置したマウスは、対照IgGで処置したマウスと比較して、測定の累計スコアおよび個々のスコアの両方について減少を示した（図36および37を参照のこと）。また、IMQ誘導性乾癬におけるその用量依存性の観点から、マウス交差反応性の例示的な抗IL-22抗体30G1の治療効果を試験した。3つの異なる用量、200 μ g、20 μ gおよび2 μ gをIMQ誘導後に投与し、プラークの皮膚紅斑および硬度を上記のように評価した。図38に見られるように、例示的な抗IL-22抗体30G1による処置は、個々のスコアおよび累計スコアが用量依存的である傾向を示しており、初期用量の1/100に減らして滴定すると有効性が低くなることを証明している。

10

【0296】

その後、表皮厚み測定のために、光干渉断層撮影（OCT：）イメージング（Morsey et al., Arch. Dermatol. Res. 302 (2010), 105-111; Phillips et al., J. Biomed. Opt. 16 (2011), 040503.）などのさらなるスクリーニングを実施し、動物の皮膚からRNAを単離し、例えば、組織炎症反応の疾患特異的パターンを同定するために、この試料の遺伝子発現を分析する。さらに、乾癬性皮膚DC（樹状細胞）または末梢血単核細胞集団などの異なる細胞型を分類および／または表現型特性決定するために、動物から単離された皮膚単一細胞懸濁液、全血または血清で、FACS解析を実施する。

20

【0297】

実施例7：APECED/APSS1の患者で同定した血清活性のデータ分析

APECED/APSS1患者23人において、患者らの血清をProtoArrayチップ（Invitrogen）にアプライした後に、以下の表2～13の血清反応性を同定した。Invitrogenが提供する血清反応性のデータ（excel表計算シート）を、以下の分析の基準として用いた。

【0298】

各タンパク質スポットの生データを、各カットオフ（バックグラウンド）値に対して再計算した。この結果を、バックグラウンドと比較した「倍差」と称する。

30

フィルタ#1：次いで、バックグラウンドよりも5倍超の値のみを選択することによって、倍差をフィルタリングした。

フィルタ#2：次いで、タンパク質が（a）分泌型、（b）膜結合型または（c）細胞質型であるかに基づいて、5倍超の血清反応性のリストを再検討した。

【0299】

いくつかの例外を除いて、さらなる分析から細胞質タンパク質を除外した。

【0300】

次いで、フィルタ1および2の後に残った372の血清反応性（表2～13）を、公知または推定病態生理学的機能にしたがって分析した。得られたリストは本明細書に示されており、表1に含まれている病態生理学的兆候に関与する分子一般から構成されている。

40

【0301】

【表 1】

表 1 : P r o t o A r r a y 分析からの 3 7 2 の血清反応性の概要

病態生理学的意義	血清反応陽性を示す抗原の数
自己免疫および炎症症状	8 9
内分泌および代謝障害	1 4
血管機能	3 4
神経変性疾患	3 9
腫瘍学、細胞成長および分化	5 4
皮膚、骨および粘膜病状	1 8
腎機能、腎炎	1 1
細胞接着	2 4
シナプス局在タンパク質	2 6
脂質層	2 7
タンパク質分解	1 0
ウイルスタンパク質の細胞カウンターパート	2 6

【 0 3 0 2 】

【表 2 - 1】

表 2 : 自己免疫および炎症症状

患者数	説明	
2 3	インターフェロン α 8 (I F N A 8)	
2 2	インターフェロン α - 1 4	
2 2	インターフェロン α - 4	
2 2	インターフェロン、 α 2 (I F N A 2)	
2 1	インターフェロン、 α - 1 / 1 3	
2 0	インターフェロン、 α 1 (I F N A 1)	
2 0	インターロイキン 2 2 (I L 2 2)	10
1 7	インターフェロン α 5 (I F N A 5)	
1 6	インターフェロン、 α 6 (I F N A 6)	
1 4	インターフェロン、 α 2 1 (I F N A 2 1)	
1 1	インターフェロン ω 1 (I F N W 1)	
6	インターロイキン 1 5 (I L 1 5)、転写変異体 3	
6	インターロイキン - 1 ファミリーメンバー 6	
5	サイトカイン受容体様因子 3 (C R L F 3)	
5	NKG 2 - E 1 I 型内在性膜タンパク質	
5	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 A 7 A (S 1 0 0 A 7 A)	20
4	線維芽細胞成長因子 1 2 (F G F 1 2)、転写変異体 1	
4	インターフェロン、 α 1 6 (I F N A 1 6)	
4	インターロイキン 1 7 A (I L 1 7 A)	
4	インターロイキン 3 2 (I L 3 2)	
3	ケモカイン (C - C モチーフ) リガンド 2 6 (C C L 2 6)	
3	シスタチン F (ロイコシスタチン) (C S T 7)	
3	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリー、メンバー 1 4 (T N F S F 1 4)、転写変異体 2	
3	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 6	
3	インターロイキン 2 3、 α サブユニット p 1 9 (I L 2 3 A)	
3	L Y N X 1	30
3	組換えヒト間質細胞由来因子 - 1 a (S D F - 1 a)	
3	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 A 7 (S 1 0 0 A 7)	
3	セレクチン P リガンド (S E L P L G)	
2	C - X - C モチーフケモカイン 9	
2	C D 3 0 0 分子様ファミリーメンバー g (C D 3 0 0 L G)	
2	C D 4 0 分子、T N F 受容体スーパーファミリーメンバー 5 (C D 4 0)	
2	ケモカイン (C - X - C モチーフ) リガンド 5 (C X C L 5)	
2	コロニー刺激因子 1 (マクロファージ) (C S F 1)、転写変異体 1	
2	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質 1 (9 - 2 7) (I F I T M 1)	
2	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質 2 (1 - 8 D) (I F I T M 2)	40
2	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質 3 (1 - 8 U) (I F I T M 3)	
2	E D A 2 R	
2	I F I 3 0	
2	インターロイキン 1、 β (I L 1 B)	
2	インターロイキン 1 2 A (ナチュラルキラー細胞刺激因子 1、細胞傷害性リンパ球成熟因子 1、p 3 5) (I L 1 2 A)	

【表 2 - 2】

2	インターロイキン 3 2 (I L 3 2)、転写変異体 2	
2	インターロイキン-1 α	
2	キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3ドメイン、X1 (K I R 3 D X 1)	
2	小誘導性サイトカインサブファミリーE、メンバー1 (内皮単球活性化) (S C Y E 1)	
1	C-Cモチーフケモカイン 2 4	
1	カルメニン (C A L U)	
1	CD 5 3 分子 (C D 5 3)	
1	CD 7 4 分子、主要組織適合複合体、クラス I I インバリアント鎖 (C D 7 4)	10
1	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 2 8 (C C L 2 8)、転写変異体 1	
1	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 1 4 (C X C L 1 4)	
1	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 2 (C X C L 2)	
1	エオタキシン	
1	インターフェロン誘導膜貫通タンパク質 3	
1	インターフェロン、 κ (I F N K)	
1	インターロイキン 1 ファミリーメンバー 8 (η) (I L 1 F 8)、転写変異体 2	
1	インターロイキン 1 1 受容体 α (I L 1 1 R A)、転写変異体 1	
1	インターロイキン 1 7 受容体 E (I L 1 7 R E)	
1	インターロイキン 2 (I L 2)	20
1	インターロイキン 2 0 受容体 β (I L 2 0 R B)	
1	インターロイキン 2 1 (I L 2 1)	
1	インターロイキン 2 6 (I L 2 6)	
1	インターロイキン 4 (I L 4)、転写変異体 1	
1	インターロイキン-1 ファミリーメンバー 1 0	
1	インターロイキン-2 4	
1	インターロイキン-6	
1	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 A 1 1 (S 1 0 0 A 1 1)	
1	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 A 1 4 (S 1 0 0 A 1 4)	
1	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 A 1 6 (S 1 0 0 A 1 6)	30
1	S 1 0 0 カルシウム結合タンパク質 A 2 (S 1 0 0 A 2)	
1	T細胞受容体 γ 可変 9、mRNA (c DNA クローン M G C : 9 0 4 8 6 I M A G E : 5 7 5 5 3 5 2)、完全 c d s	
1	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリー、メンバー 1 3 b (T N F S F 1 3 B)	
1	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリーメンバー、1 5 (T N F S F 1 5)	
1	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリーメンバー、8 (T N F S F 8)	
1	腫瘍壊死因子 (TNF スーパーファミリーメンバー 2) (TNF)	
1	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 9 (T N F R S F 1 9)、転写変異体 2	40
1	終末糖化産物特異的受容体 (A G E R)、転写変異体 1	
1	フィブロモジュリン (F M O D)	
1	Gタンパク質共役型受容体 7 7 (G P R 7 7)	
1	グレムリン-1	
1	ヒスタミン受容体 H 1 (H R H 1)、転写変異体 4	
1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーD、メンバー 1 (K L R D 1)、転写変異体 1	

【表 2 - 3】

1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーG、メンバー1 (KLRG1)
1	KITリガンド (KITLG)、転写変異体 b
1	マクロファージ刺激タンパク質受容体
1	オンコスタチンM (OSM)
1	血小板塩基性タンパク質前駆体 (ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 7) (PPBP)
1	SLAMファミリー 8

10

【0303】

【表 3】

表 3 : 内分泌および代謝症状

患者数	説明
3	胃内因子 (ビタミンB合成) (GIF)
3	グレリン/オベスタチンプレプロホルモン (GHRH)
2	絨毛性ゴナドトロピン、 β ポリペプチド (CGB)
2	CFHR 2
2	Gタンパク質共役型受容体 78 (GPR78)
2	成長ホルモン 1
2	プロオピオメラノコルチン (POMC)、転写変異体 2
2	甲状腺ホルモン受容体、 α (v-e-r-b-a) 癌遺伝子ホモログ、鳥類
2	ウロコルチン-3
1	絨毛性ソマトマンモトロピンホルモン 1 (胎盤ラクトゲン) (CSH1)
1	ニューロメジンB (NMB)
1	神経ペプチドY受容体Y2 (NPY2R)
1	甲状腺ホルモン受容体 α
1	甲状腺ホルモン受容体、 α (v-e-r-b-a) 癌遺伝子ホモログ、鳥類) 変異体 1

20

30

【0304】

【表 4】

表 4：血管機能

患者数	説明	
7	f m s 関連チロシンキナーゼ 1 (F L T 1)	
7	マルカベルニン	
5	エンドセリン変換酵素 1 (E C E 1)	
5	組換えヒト V E G F	
5	バソヒビン 1 (V A S H 1)	
4	アンギオポエチン 1 (A N G P T 1)	
4	アンギオテンシン I I 受容体関連タンパク質 (A G T R A P)	10
4	リラキシシン／インスリン様ファミリーペプチド受容体 3 (R X F P 3)	
3	エンドセリン 2 (E D N 2)	
2	エンドセリン受容体 B 型 (E D N R B)、転写変異体 1	
2	エフリン受容体 B 4 (E P H B 4)	
2	E G F 様ドメイン含有タンパク質 7	
2	線維芽細胞成長因子 1 6 (F G F 1 6)	
2	プラスミノゲン活性化因子阻害因子 2	
2	ウロテンシン 2 ドメイン含有	
1	内皮分化スフィンゴ脂質 G タンパク質共役受容体、3 (E D G 3)	20
1	エンドセリン 3 (E D N 3)	
1	エンドセリン変換酵素 2 (E C E 2)、転写変異体 3	
1	エンドセリンー 1	
1	エフリン受容体 B 4 (E P H B 4)	
1	バソヒビンー 2	
1	アドレノメデュリン (A D M)	
1	A H S G	
1	G パッチおよび F H A ドメインを含む血管新生因子 1	
1	アンギオポエチン様 7 (A N G P T L 7)	
1	エフリン B 型受容体 1	
1	線維芽細胞成長因子 1 (酸性) (F G F 1)、転写変異体 1	30
1	f m s 関連チロシンキナーゼ 4 (F L T 4)、転写変異体 2	
1	マトリックスメタロペプチダーゼ 1 9 (M M P 1 9)、転写変異体 1	
1	ノストリン	
1	シンデカン 1 (S D C 1)	
1	タファジン	
1	トロンプモジュリン	
1	組織因子経路阻害因子 2 (T F P I 2)	

【 0 3 0 5 】

【表 5】

表 5：神経変性疾患

患者数	説明
7	エルミン
6	カルパスタチン
5	GABA (A) 受容体関連タンパク質様 1 (GABARAPL1)
5	シンフィリン-1
4	アタキシシン 3 (ATXN3)
4	プレセニリン 1 (アルツハイマー病 3) (PSEN1)
3	クロライドチャネル 2 (CLCN2)
3	ハンチンチン相互作用タンパク質 1 (HIP1)
3	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質 (MOBP)
2	ニンジュリン 2 (NINJ2)
2	パラレミン-2
2	コロニー刺激因子 1 受容体、以前はマクドナフ f エライン肉腫ウイルス (v-fms) 癌遺伝子ホモログ (CSF1R)
2	筋萎縮性側索硬化症 2 染色体領域候補遺伝子 4 タンパク質
2	シスタチン B (ステフィン B) (CSTB)
2	ハンチンチン相互作用タンパク質 1 関連タンパク質
2	ミエリン関連糖タンパク質 (MAG)、転写変異体 2
2	ニューレンシン 1 (NRSN1)
2	パーキン共調節遺伝子タンパク質
2	ラウンドアバウト軸索ガイダンス受容体ホモログ 3 (ショウジョウバエ) (ROBO3)
2	血清アミロイド A 4、構成的 (SAA4)
1	パラレミン 2 (PALM2)
1	セレベリン-4
1	アタキシシン 7 様タンパク質 3
1	内皮分化スフィンゴ脂質 G タンパク質共役受容体 1 (EDG1)
1	パーキンソン病 (常染色体劣性、早期発症) 7 (PARK7)
1	アミロイド β (A4) 前駆体タンパク質 (ペプチダーゼネキシシン-1 I、アルツハイマー病)
1	筋萎縮性側索硬化症 2 (若年性) (ALS2)
1	DBI 1
1	グルタミン酸受容体イオンチャネル型 N-メチル D-アスパラギン酸様 1 A (GRINL1A)、転写変異体 1
1	ハンチンチン相互作用タンパク質 M
1	カリリン
1	ミエリンタンパク質ゼロ様タンパク質 1
1	ニューリチン 1 (NRN1)
1	ニューロプラスチン
1	ニンジュリン 1 (NINJ1)
1	ノエリン
1	パラレミン (PALM)
1	プレプロノシセプチン (PNOC)
1	トランスサイレチン (プレアルブミン、アミロイドーシス I 型) (TTR)

【表 6 - 1】

表 6 : 腫瘍学、細胞成長および分化

患者数	説明	
7	上皮成長因子受容体 (v-e-r-b-b) (EGFR)	
7	PDGFA 関連タンパク質 1 (PDAP1)	
6	黒色腫抗原ファミリー B、2 (MAGEB2)	
6	SPANX ファミリー、メンバー B1 (SPANXB1)	
5	黒色腫関連抗原 3	
4	黒色腫関連抗原 2	10
4	血清学的に定義された大腸癌抗原 3	
4	SPANX ファミリー、メンバー C (SPANXC)	
3	抗原 p 97 (黒色腫関連) 転写変異体 2	
3	線維芽細胞成長因子 13 (FGF13)、転写変異体 1 B	
3	線維芽細胞成長因子結合タンパク質 2 (FGFBP2)	
3	白血病抑制因子 (コリン作動性分化因子) (LIF)	
3	黒色腫抗原ファミリー A、12 (MAGEA12)	
3	ポドプラニン	
3	前立腺幹細胞抗原	
3	TIMP1	20
2	B 型黒色腫抗原 2	
2	癌/精巣抗原ファミリー 45、メンバー A1 (CT45A1)、mRNA.	
2	アクチビン A 受容体 IB 型 (ACVR1B)、転写変異体 1	
2	アクチビン受容体 2 B 型	
2	成長因子受容体結合タンパク質 7	
2	黒色腫関連抗原 2	
2	血小板由来成長因子 β ポリペプチド (v-s-i-s) 変異体 1	
2	TIMP4	30
2	X 抗原ファミリー、メンバー 2 (XAGE2)	
1	癌/精巣抗原 CT45-3 (CT45-3)	
1	エフリン受容体 A3 (EPHA3)、転写変異体 1	
1	エフリン-A1 (EFNA1)	
1	上皮成長因子受容体 (v-e-r-b-b)、鳥類 (EGFR)	
1	上皮成長因子受容体 (v-e-r-b-b)) (EGFR)	
1	黒色腫抗原ファミリー H、1 (MAGEH1)	
1	アクチビン A 受容体、IC 型 (ACVR1C)	
1	ALK チロシンキナーゼ受容体	40
1	EGF 様反復およびジスコイジン I 様ドメイン 3 (EDIL3)	
1	EGF 様ドメインマルチプル 8 (EGFL8)	
1	EGF 様フィブロネクチン III 型およびラミニン G ドメイン変異体 4	
1	線維芽細胞成長因子 12 (FGF12)	
1	線維芽細胞成長因子 13 (FGF13)、転写変異体 1 A	
1	線維芽細胞成長因子 18	
1	線維芽細胞成長因子結合タンパク質 1 (FGFBP1)	

【表 6 - 2】

1	線維芽細胞成長因子受容体 4
1	線維芽細胞成長因子受容体基質 3 (F R S 3)
1	フォリスタチン (F S T)、転写変異体 F S T 3 4 4
1	G 抗原 4
1	G 抗原 7 (G A G E 7)
1	成長因子、肝再生のオーグメンタ (E R V 1 ホモログ)
1	白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 変異体 a
1	ムチン様 1 (M U C L 1)
1	M P P 1
1	P 抗原ファミリーメンバー 2 (前立腺関連) (P A G E 2)
1	癌原遺伝子チロシンプロテインキナーゼ受容体 r e t
1	r e t 癌原遺伝子 (R E T)、転写変異体 4
1	テスミン
1	トレフォイル因子 2 (鎮座性タンパク質 1) (T F F 2)

10

【 0 3 0 7】

20

【表 7】

表 7 : 皮膚、骨および粘膜病状

患者数	説明
5	サイエリン (S C E L)
5	スプラバシン
5	チロシンプロテインキナーゼ膜貫通受容体 R O R 2
4	歯性エナメル芽細胞関連 (O D A M)
3	ビタミン D 受容体
2	エクトジスプラシン A 2 受容体 (E D A 2 R)
2	ケラチン 1 5
2	ケラチノサイト成長因子
1	ディフェンシン - 5
1	副甲状腺関連タンパク質
1	骨形成タンパク質 3 b
1	骨形成タンパク質 7 (骨形成タンパク質 1) (B M P 7)
1	骨形成タンパク質 8 a、mRNA (cDNA クローン I M A G E : 7 9 3 9 5 8 8)、完全 c d s .
1	C L C F 1
1	線維芽細胞成長因子 1 0 (F G F 1 0)
1	破骨細胞刺激因子 1 (O S T F 1)
1	オステオグリシン (O G N)、転写変異体 1
1	T f f 2

30

40

【 0 3 0 8】

【表 8】

表 8：腎機能および腎炎

患者数	説明
20	尿細管間質性腎炎抗原様 1 (T I N A G L 1)
4	アクアポリン 2 (集合管) (A Q P 2)
3	アルギニンバソプレシン誘導 1 (A V P I 1)
2	血小板由来成長因子受容体、 α ポリペプチド (P D G F R A) ;
1	アクアポリン 8 (A Q P 8)
1	アクアポリン 8 (A Q P 8)
1	β 2 ミクログロブリン
1	C F H R 1
1	血小板由来成長因子受容体、 α ポリペプチド (P D G F R A) ;
1	血小板由来成長因子受容体、 α ポリペプチド (P D G F R A) ;
1	ウロモジュリン

10

【0309】

【表 9】

表 9 : 細胞接着

患者数	説明	
10	ラジニン 1 (LAD1)	
4	エズリン	
3	フィブロネクチン 1	
3	ギャップ結合タンパク質、 $\beta 5$ (GJB5)	
3	糖タンパク質 IX (血小板) (GP9)	
3	ネフロシスチン-1	10
3	シンプレキン (SYMPK)	
3	ビトロネクチン (VTN)	
2	インテグリン $\beta 3$ 結合タンパク質 ($\beta 3$ -エンドネキシン) (ITGB3BP)	
2	β サルコグリカン	
2	デルマトポンチン (DPT)	
2	EGF 含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質 1 (EFEMP1)、転写変異体 2	
2	インテグリン結合キナーゼ関連セリン/スレオニンホスファターゼ 2C (ILKAP)	20
1	ギャップ結合 $\alpha - 4$ タンパク質	
1	ギャップ結合 $\beta - 2$ タンパク質	
1	ギャップ結合タンパク質、 $\alpha 10$ 、59 kDa (GJA10)	
1	ギャップ結合タンパク質、 $\beta 4$ (GJB4)	
1	ギャップ結合タンパク質、 $\beta 7$ (GJB7)	
1	インテグリン $\beta 1$ 結合タンパク質 3 (ITGB1BP3)	
1	インテグリン結合タンパク質キナーゼ	
1	ラトロフィリン 1 (LPHN1)、転写変異体 2	
1	MPP 7	30
1	ウロプラキシン 3A (UPK3A)	
1	ウロプラキシン 3B (UPK3B)、転写変異体 2	

【0310】

【表 10】

表 10 : シナプス局在タンパク質

患者数	説明	
14	シンタキシン結合タンパク質 1	
9	セクレトグラニン I I I (SCG3)	
9	SNAP25 転写変異体 1	
5	シンタキシン 3 (STX3)	
5	SNAP23	
4	ニューロピリンおよび tollod 様タンパク質 2	10
4	シンタキシン-1B	
4	シンタキシン-2	
3	シンタキシン結合タンパク質 5	
3	シンタキシン-10	
2	カリウム電位依存性チャネル、シェーカー関連サブファミリー、 β メンバー 3 (KCNA3)	
2	カリウム電位依存性チャネル、シェーカー関連サブファミリー、メンバー 2 (KCNA2)	
2	コンプレキシン 1 (CPLX1)	20
2	コンプレキシン 2 (CPLX2)、転写変異体 2	
2	コピン-6	
2	セクレタゴジン	
2	シナプトブレビン 1	
2	シナプトタグミン IX (SYT9)	
1	KCTD6	
1	KCTD7	
1	カリウム内向き整流チャネル、サブファミリー J、メンバー 15 (KCNJ15)、転写変異体 2	
1	ナトリウムチャネル電位依存性 II 型、 β (SCN2B)	30
1	シンタキシン結合タンパク質 1	
1	2 シナプトブレビン	
1	シナプトタグミン I (SYT1)	
1	シナプトタグミン VI (SYT6)	
1	シンデカン-1	
1	コピン II (CPNE2)	
1	γ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体、 $\alpha 4$ (GABRA4)	
1	γ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体、 ϵ (GABRE)	
1	シンタキシン 11 (STX11)	40
1	シンタキシン 5 (STX5)	

【0311】

【表 1 1】

表 1 1 : 脂質層

患者数	説明	
5	アネキシン A 1 1 (ANXA 1 1)、転写変異体 a	
2	アポリポタンパク質 A-I 結合タンパク質	
2	アポリポタンパク質 L 2	
2	アポリポタンパク質 O 様 (APOOL)	
2	カリウムチャネル、サブファミリー K、メンバー 5 (KCNK 5)	
2	カリウムチャネルテトラダイマリゼーション 6	
1	アポリポタンパク質 C-IV (APOC 4)	10
1	アポリポタンパク質 H (β -2-糖タンパク質 I) (APOH)	
1	アネキシン A 1 0 (ANXA 1 0)	
1	アネキシン A 2 (ANXA 2)	
1	アネキシン A 2 (ANXA 2)	
1	フロチリン 2 (FLOT 2)	
3	アネキシン A 2 (ANXA 2)、転写変異体 3	
1	内皮リパーゼ	
1	プラスモリピン	
1	リポカリリン 1 (涙プレアルブミン) (LCN 1)	20
1	ホスホリパーゼ B 1 (PLB 1)	
1	ホスホリパーゼ C、 δ 4 (PLCD 4)	
1	ホスホリパーゼ D 1	

【0 3 1 2】

【表 1 2】

表 1 2 : タンパク質分解

患者数	説明	
4	PEX 1 2	30
3	l e t M 2	
3	セクエルニン-3	
2	カリクレイン 1 (KLK 1)	
1	カリクレイン-1	
1	カリクレイン-6	
1	カリクレイン関連ペプチダーゼ 1 3 (KLK 1 3)	
1	カリクレイン関連ペプチダーゼ 2 (KLK 2), 転写変異体 3	
1	カリクレイン関連ペプチダーゼ 6 (KLK 6), 転写変異体 A	
1	ミエロブラスチン	40

【0 3 1 3】

【表 1 3】

表 1 3 : ウイルスタンパク質の細胞カウンターパート

患者数	説明
8	B細胞におけるカッパ軽ポリペプチド遺伝子エンハンサの v - r e l 核因子 3、P 6 5 (R E L A)
6	v - a b l (A B L 1)、転写変異体 a
4	v - a b l (A B L 1)、転写変異体 a
4	v - a b l (a r g、アベルソン関連遺伝子)(A B L 2)、転写変異体 a
4	v - e t s 赤芽球症ウイルス E 2 6 癌遺伝子ホモログ 2 (鳥類)(E T S 2)
3	v - a k t マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ 1 (A K T 1)
3	v - e t s 赤芽球症ウイルス E 2 6 癌遺伝子ホモログ 1 (鳥類)(E T S 1)
2	v - a b l (A B L 1)、転写変異体 a
2	v - a k t マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ 2 (A K T 2)
2	v - a k t (プロテインキナーゼ B γ)(A K T 3)、転写変異体 2
2	v - c r k 肉腫ウイルス C T 1 0 癌遺伝子ホモログ (鳥類) 様 (C R K L)
2	v - e t s 赤芽球症ウイルス E 2 6 癌遺伝子ホモログ (鳥類)(E R G)、転写変異体 2
2	v - f o s F B J マウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ (F O S)
2	v - r a f マウス肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ B 1 (B R A F)
2	H I V - 1 R e v 結合タンパク質 (H R B)
1	v - a b l (A B L 1)、転写変異体 a
1	v - a b l (A B L 1)、転写変異体 a
1	v - a k t (プロテインキナーゼ B、 γ)(A K T 3)、転写変異体 1
1	v - e r b - b 2 癌遺伝子ホモログ (E R B B 2)、転写変異体 2
1	v - k i t ハーディ・ズッカーマン 4 (K I T)、転写変異体 1
1	v - r a f マウス肉腫 3 6 1 1 ウイルス癌遺伝子ホモログ (A R A F)
1	v - r a f - 1 マウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 1 (R A F 1)
1	v - r a l B (r a s 関連; G T P 結合タンパク質)(R A L B)
1	H I V - 1 R e v 結合タンパク質様 (H R B L)
1	H I V - 1 T a t 相互作用タンパク質、6 0 k D a (H T A T I P)
1	H I V - 1 T a t 相互作用タンパク質、6 0 k D a (H T A T I P)、転写変異体 2

10

20

30

【0 3 1 4】

【表 2 4 - 1】

表 2 4 : 例示的なコイルドコイルタンパク質をコードする遺伝子配列のヒト染色体上の局在

UniGene/EntrezGene—各タンパク質のデータベース識別番号、EnsemblChr.—Ensembl—Databaseで示される場合の各遺伝子配列のヒト染色体上の局在であり、開始/終了の列に、染色体上の詳細な局在を塩基対単位で示す。鎖—染色体のセンス（1）またはアンチセンス/相補鎖（-1）上の遺伝子局在。

遺伝子名称	Uni Gene	Entrez Gene	説明	Ensembl Chr.	開始 (b p)	終了 (b p)	鎖
AFAP1L2	Hs. 501106	84632	アクチンフィラメント関連タンパク質 1 様 2	10	116044575	116154505	-1
ANKRD13A	Hs. 528703	88455	アンキリン反復ドメイン 1 3 A	12	108921618	108961614	1
APPL1	Hs. 476415	26060	アダプタータンパク質、ホスホチロシン相互作用、PHドメインおよびロイシンジッパー含有 1	3	57236805	57282539	1
ARGLU1	Hs. 508644	55082	仮想タンパク質 F L J 1 0 1 5 4	13	105992022	106018513	-1
ARHGEF1	Hs. 631550	9138	R h o グアニンヌクレオチド交換因子 (G E F) 1	19	47079106	47103437	1
ASZ1	Hs. 352412	136991	アンキリン反復、S A M および塩基性ロイシンジッパードメイン含有 1	7	116790512	116854779	-1
ATF6	Hs. 492740	22926	活性化転写因子 6	1	160194974	160199592	1
BBX	Hs. 124366	56987	ボビーソックスホモログ (ショウジョウバエ)	3	108724480	109007396	1
C10orf118	Hs. 159066	55088	1 0 番染色体オープンリーディングフレーム 1 1 8	10	115871964	115924354	-1
C10orf80	Hs. 253576	159686	1 0 番染色体オープンリーディングフレーム 8 0	10	106103513	106204855	1
C3orf44	Hs. 147128	131831	3 番染色体オープンリーディングフレーム 4 4	3	151860367	151904432	-1
C6orf65	Hs. 582993	221336	6 番染色体オープンリーディングフレーム 6 5	6	56928047	57000099	1
CCDC12	Hs. 631918	151903	コイルドコイルドメイン含有 1 2	3	46938225	46993242	-1
CCDC25	Hs. 445512	55246	コイルドコイルドメイン含有 2 5	8	27646756	27686089	-1

10

20

30

40

【表 2 4 - 2】

CCDC40	Hs. 202542	55036	コイルドコイルドメイン含有 4 0	17	75625033	75689007	1
CEP290	Hs. 150444	80184	中心体タンパク質 2 9 0 k D a	12	86966922	87060124	-1
CHCHD6	Hs. 518119	84303	コイルドコイルヘリックス-コイルドコイルヘリックスドメイン含有 6	3	127908884	127910183	1
CORO2A	Hs. 113094	7464	コロニン、アクチン結合タンパク質 2 A	9	99926299	99994743	-1
CRLF3	Hs. 370168	51379	サイトカイン受容体様因子 3	17	26133852	26175826	-1
DBNL	Hs. 436500	28988	ドレブリン様	3	10265372	10297900	1
FAM133A	Hs. 110069	286499	配列類似性 1 3 3 を有するファミリー、メンバー A	X	92815861	92853917	1
FAM76B	Hs. 288304	143684	配列類似性 7 6 を有するファミリー、メンバー B	11	95141765	95162429	-1
FOSL2	Hs. 220971	2355	F O S 様抗原 2	2	28469173	28493683	1
GNL3L	Hs. 654677	54552	グアニンヌクレオチド結合タンパク質様 3 (核小体) 様	X	54570464	54608698	1
HDAC9	Hs. 196054	9734	ヒストンデアセチラーゼ 9	7	18584321	19003509	1
HELLS	Hs. 655830	3070	ヘリカーゼ、リンパ特異的	8	29249539	29264104	-1
HIRIP3	Hs. 592046	8479	H I R A 相互作用タンパク質 3	16	29911818	29914888	-1
HOMER3	Hs. 410683	9454	ホーマーホモログ 3 (ショウジョウバエ)	19	18901012	18912983	-1
KIAA0562	Hs. 509017	9731	K I A A 0 5 6 2	1	3721204	3763657	-1
KIF20A	Hs. 73625	10112	キネシンファミリーメンバー 2 0 A	5	137542586	137551303	1
KIF3A	Hs. 43670	11127	キネシンファミリーメンバー 3 A	5	132056222	132101164	-1
KIF3B	Hs. 369670	9371	キネシンファミリーメンバー 3 B	20	30329128	30386468	1
KLC3	Hs. 298079	147700	キネシン軽鎖 3	19	50535838	50546618	1
MED4	Hs. 181112	29079	メディエータ複合体サブユニット 4	13	47548093	47567268	-1
NAP1L1	Hs. 524599	4673	ヌクレオソームアセンブリタンパク質 1 様 1	12	74726227	74764717	-1
NFE2	Hs. 75643	4778	核因子 (赤血球系由来 2)、4 5 k D a	1	226679169	226679649	-1
NRBF2	Hs. 449628	29982	核内受容体結合因子 2	10	64563056	64584789	1

10

20

30

40

【表 2 4 - 3】

PHF11	Hs. 369039	51131	P H D フィンガー タ ンパク質 1 1	13	48967817	49001118	1	10
PIBF1	Hs. 441926	10464	プロゲステロン免疫 調節結合因子 1	10	16672616	16899468	-1	
PKNX2	Hs. 696454	63876	P B X / ノット 1 ホ メオボックス 2	11	124539769	124808495	1	
RBM17	Hs. 498548	84991	R N A 結合モチーフ タンパク質 1 7	10	6171013	6198843	1	
SCYL1	Hs. 238839	57410	S C Y 1 様 1 (S. セ レビスエ)	11	65049124	65062758	1	
SEPT2	Hs. 335057	4735	セプチン 2	6	27941013	27941585	1	
SLU7	Hs. 435342	10569	S L U 7 スプライシ ング因子ホモログ (S. セレビスエ)	18	59473412	59480119	-1	
SMTNL2	Hs. 441709	342527	スムーセリン様 2	17	4434043	4458363	1	20
SNCAIP	Hs. 426463	9627	シヌクレイン、 α 相互 作用タンパク質 (シン フィリン)	5	121675719	121827693	1	
STX2	Hs. 437585	2054	シンタキシン 2	12	129840102	129889764	-1	
ZMYND11	Hs. 292265	10771	ジンクフィンガー、M Y N D ドメイン含有 1 1	1	148161834	148166860	-1	
TEKT2	Hs. 127111	27285	テクチン 2 (精巢)	1	36322263	36326462	1	
TLE3	Hs. 287362	7090	スプリット 3 のトラ ンスデューシン様エ ンハンサ (E (s p 1) ホモログ、ショウジョ ウバエ)	c6_QB	31500463	31516090	1	
TRIM15	Hs. 591789	89870	三モチーフ含有 1 5	c6_CO	30268170	30277650	1	30
TRIM22	Hs. 501778	10346	三モチーフ含有 2 2	11	5667495	5688668	1	
TRIM29	Hs. 504115	23650	三モチーフ含有 2 9	11	119487205	119514073	-1	
TRIM69	Hs. 489254	140691	三モチーフ含有 6 9	15	42832407	42847317	+	
TTLL7	Hs. 445826	79739	チューブリンチロシ ンリガーゼ様ファミ リー、メンバー 7	1	84107645	84237421	-1	
UBE20	Hs. 16130	63893	ユビキチン結合酵素 E 2 O	17	71897491	71960883	-1	
USP47	Hs. 577256	55031	ユビキチン特異的ペ プチダーゼ 4 7	11	11819546	11937448	1	
VAPA	Hs. 699980	9218	V A M P (小胞関連膜 タンパク質) 関連タン パク質 A、3 3 k D a	13	78071237	78075696	-1	40
WTAP	Hs. 446091	9589	ウィルムス腫瘍 1 関 連タンパク質	6	160068142	160097339	1	

【表 14-1】

表 14 : E L I S A アッセイによって示された、A P S 1 患者における指示標的に結合する自己抗体の存在

標的	同義語	最高 e l i s a 力価 (逆数)	この力価を有する患者
I L - 1 α		1 2 5 0	A P S 1 - 2
I L - 1 F 6	I L - 3 6 α	1 2 5 0	A P S 1 - 5
I L - 1 F 9	I L - 3 6 γ	1 2 5 0	A P S 1 - 7 , - 2 3
I L - 5		6 2 5 0	A P S 1 - 1 8
I L - 7		1 2 5 0	A P S 1 - 1 , - 3 , - 1 6
I L - 1 1		> 2 5 0	A P S 1 - 7
I L - 1 7 A	C T L A - 8	6 2 5 0	A P S 1 - 1 3 , - 1 8 , - 2 0 , - 2 2
I L - 1 7 F		6 2 5 0	A P S 1 - 0 8 , - 1 3 , - 1 4 , - 1 6 , - 1 8
I L - 2 2		3 1 2 5 0	A P S 1 - 2 , - 1 0 , - 1 4 , - 1 6 , - 1 9 , - 2 2
I L - 3 2 α		> 4 0 0 0	A P S 1 - 2 , A P S 1 - 2 8
I L - 3 2 γ		> 4 0 0 0	A P S 1 - 2 , A P S 1 - 2 8
I F N - α 1 β		3 1 2 5 0	A P S 1 - 0 8 , - 1 4 , - 1 5 - 1 6 , - 1 7 , - 1 9 , - 2 2
I F N A 2		> 1 2 8 0 0 0	A P S 1 - 0 5 , A P S 1 - 0 9 , A P S 1 - 1 6 , A P S 1 - 1 7 , A P S 1 - 1 8 , A P S 1 - 1 9 , A P S 1 - 2 2 , A P S 1 - 2 3 , A P S 1 - 2 4 , A P S 1 - 2 6 , A P S 1 - 2 8
I F N A 4		> 1 3 5 0 0 0	A P S 1 - 0 5 , A P S 1 - 1 4 , A P S 1 - 1 5 , A P S 1 - 1 6 , A P S 1 - 1 9 , A P S 1 - 2 2 , A P S 1 - 2 4 , A P S 1 - 2 8
I F N A 1 4		> 1 3 5 0 0 0	A P S 1 - 0 7 , A P S 1 - 0 8 , A P S 1 - 0 9 , A P S 1 - 1 0 , A P S 1 - 1 4 , A P S 1 - 1 5 , A P S 1 - 1 6 , A P S 1 - 1 7 , A P S 1 - 1 8 , A P S 1 - 1 9 , A P S 1 - 2 0 , A P S 1 - 2 1 , A P S 1 - 2 2 , A P S 1 - 2 3 , A P S 1 - 2 4 , A P S 1 - 2 6 , A P S 1 - 2 7 , A P S 1 - 2 8 , A P S 1 - 3 0
C C L 2	M C P - 1	> 2 5 0	A P S 1 - 2
C C L 1 3	M C P - 4	> 2 5 0	A P S 1 - 4 , A P S 1 - 5
C C L 4	M I P - 1 - α	> 2 5 0	A P S 1 - 4

10

20

30

40

【表 14-2】

CCL15	MIP-5	>250	APS1-11, APS1-13, APS1-14
CCL22	MDC	>250	APS1-6
CCL25	TECK	>250	APS1-5, APS1-7
CCL11	エオタキシン	>250	APS1-9, APS1-10, APS1-13
CCL21	エクソダス2	>250	APS1-9, APS1-10
CXCL9	MIG	12800	APS1-09
CXCL10	IP-10	>4000	APS1-04
CXCL11	I-TAC	>4000	APS1-09
スクレロスチン	SOST	6400	APS1-03, APS1-12
BlyS	BAFF	>16000	APS1-05
S100A7	PSOR1	1000	APS1-17
TMEFF2		6400	APS1-05

10

【0316】

【表 15-1】

表15: Elisaアッセイに使用した組換えタンパク質のリスト

標的	同義語	供給業者	カタログ番号	供給源	凍結乾燥した溶液が含むもの	コメント
アスポリン	ASPN	Novus Biologicals	H00054829-P01	小麦胚芽発現系	50mM Tris-HCl, 10mM還元グルタチオン、pH8, 0溶出緩衝液中	ヒトASPN全長ORF (AAH63114.1, 1a.a.-384a.a.) N末端にGSTタグを有する組換えタンパク質。
BAFF	BlyS, CD257	Immunotools	11343430	大腸菌	PBS, pH7, 0	
BAFF	BlyS, CD257	R&D	2149-BF-010/CF	マウス骨髓腫細胞株、NS0由来		
CCL1	I-309	Immunotools	11343843	大腸菌	添加物なし	
CCL2	MCP-1	Immunotools	11343384	大腸菌	添加物なし	
CCL3	MIP1- α	Immunotools	11343204	大腸菌	添加物なし	
CCL4	MIP1- β	Immunotools	11343223	大腸菌	添加物なし	
CCL7	MCP-3	Immunotools	11343903	大腸菌	添加物なし	
CCL8	MCP-2	Immunotools	11343893	大腸菌	添加物なし	
CCL11	エオタキシン	Immunotools	11343213	大腸菌		

30

40

【表 15-2】

CCL13	MCP-4	Immunotools	11343923	大腸菌	20mM PB, pH7.4, 130mM NaCl	
CCL15	MIP-5	Immunotools	11343864	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 100mM NaCl	
CCL16	LEC/NCC-4	Immunotools	11344164	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 0.15M塩化ナトリウム	
CCL17	TARC	Immunotools	11344504	大腸菌	20mM PBS, 150mM NaCl, pH7.4	
CCL18	MIP4	Immunotools	11343253	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 100mM NaCl	
CCL19	MIP-3β	Immunotools	11343244	大腸菌	添加物なし	
CCL20	MIP-3α	Immunotools	11343264	大腸菌	添加物なし	
CCL21	エクソダス-2	Immunotools	11343184	大腸菌	添加物なし	
CCL22	MDC	Immunotools	11344334	大腸菌	20mM PB, 500mM NaCl, pH7.4	
CCL24	エオタキシン-2	Immunotools	11344174	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 150mM NaCl	
CCL25	TECK	Immunotools	11344374	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 150mM NaCl	
CCL26	エオタキシン-3	R&D Systems	346-E3-025CF	大腸菌	30% (v/v) アセトニトリル, 0.1% (v/v) TFA	
CCCL26	エオタキシン-3	Creative Biomart	CCL26-72H	大腸菌		
CCL28	Mec	Immunotools	11344204	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 150mM NaCl	

10

20

【表 15-3】

CTLA-4		Immunotools	11348025	Sf9細胞	添加物なし	濃度500ug/ml
CXCL1	GRO-α	Immunotools	11343704	大腸菌	添加物なし	
CXCL2	GROβ	Immunotools	11343713	大腸菌	添加物なし	
CXCL3	GRO-γ	Immunotools	11343723	大腸菌	添加物なし	
CXCL5	ENA-78	Immunotools	11344344	大腸菌	添加物なし	
CXCL7	NAP-2	Immunotools	11343393	大腸菌	添加物なし	
CXCL8	IL-8	Immunotools	11340084	大腸菌		
CXCL9	MIG	R&D Systems	392-MG-010/CF	大腸菌	PBS, pH7.4	
CXCL9	MIG	BioLegend	578108	大腸菌		
CXCL10	IP-10	Immunotools	11343884	大腸菌	添加物なし	
CXCL10		Creative Biomart	CXCL10-08H	大腸菌	20mM PB, pH7.4, 50mM NaClの0.2μmフィルタ濃縮(0.5mg/ml)溶液から凍結乾燥した大腸菌	
CXCL11	IP-10	Immunotools	11343374	大腸菌	添加物なし	

30

40

【表 15-4】

CXCL11	I-TA C	Creative Biomar t	CXCL1 1-09H	大腸菌	20mM PB, pH 7.4, 100mM NaClの0.2μmフィルタ濃縮(0.5mg/ml)溶液から凍結乾燥した大腸菌。純度>97%	
CXCL12a	SDF- 1a	Immunot ools	11343 363	大腸菌	添加物なし	
CXCL12b	SDF- 1b	Immunot ools	11343 933	大腸菌	添加物なし	
CXCL13	BCA- 1	Immunot ools	11344 184	大腸菌	20mM PBS, 150mM NaCl pH7.4	
CXCL14	BRAC	R&D Sys tems	866-C X-025	大腸菌	PBS	濃度0, 5mg/ml
CXCL16		R&D Sys tems	1164- CX/CF	マウス骨髄腫細胞、Hisタグ	細胞外ドメイン aa49-224	
CXCL16		R&D	1164- CX/CF	マウス骨髄腫細胞株、NS0由来	Asn49-Thr224細胞外ドメイン(AAH44930, sp1-29, 膜貫通206-226)	
H1P-1タンパク質	ハンチン チン相互 作用タン パク質	Novus B iologic als/Abn ova	H0000 3092- P01	大腸菌、GSTタグ		GSTタグ、WB ja ELISA an
IL-1α (IL1A)	IL1F 1	Immunot ools	11349 013	大腸菌	20mM Tris-HCl pH8, 5mM MgCl2, 10%グリセロール	
IL-1β (IL1B)	IL1F 2	Immunot ools	11340 013	大腸菌	25mMリン酸緩衝液 pH7.1, 100mM NaCl	

10

20

【表 15-5】

IL1F6	IL-3 6α	R&D Sys tems	1078- IL-02 5/CF	大腸菌	PBS, 500mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH7.4	
IL1F6	IL-3 6α	R&D Sys tems	1078- IL/CF	大腸菌	PBS, 500mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH7.4	
IL1F7	FIL- 1Z	R&D Sys tems	1975- IL-02 5	大腸菌	PBS, 1mM DTT	
IL1F8	IL-3 6β	R&D Sys tems	1099- IL-02 5/CF	大腸菌	PBS	
IL1F9	IL-3 6γ, IL- 1H1	R&D Sys tems	2320- IL-02 5/CF	大腸菌	PBS	
IL1F9	IL-3 6γ, IL- 1H1	R&D Sys tems	2320- IL/CF	大腸菌	PBS	
IL1F10		ProSpec	CYT-0 12	大腸菌		
IL2	TCGF	Immunot ools	11340 023	大腸菌	0.17mgの第一リン酸ナトリウムおよび0.89mgの第二リン酸ナトリウム緩衝液に対して大規模透析してpH7.5にした後に凍結乾燥した。20mM酢酸中で再構成した。	
IL3		Immunot ools	11340 033	大腸菌	PBS	
IL4	BSF- 1	Immunot ools	11340 043	大腸菌	25mM Tris-HCl pH8.0	

30

40

【表 15-6】

IL5		Immunotools	11340053	大腸菌	添加物なし	
IL6		Immunotools	11340064	大腸菌	PBS pH7.5, 0.25M NaCl	
IL7		Immunotools	11340073	大腸菌	25mMリン酸ナトリウム, 200mM NaCl, pH6.5	
IL8	CXCL-8	Immunotools	11340084	大腸菌	20mM PBS pH7.4, 50mM NaCl	
IL9	P40	Immunotools	11340093	大腸菌	添加物なし	濃度0, 068mg/ml
IL10	CSIF (IL10A)	Immunotools	11340103	大腸菌	25mMリン酸ナトリウム pH6.5, 200mM NaCl	
IL-11		Immunotools	11340113	大腸菌	添加物なし	
IL12		Immunotools	11340123	CHO細胞	PBS, pH7.4	IL-12A (p35) + IL-12B (p40) サブユニットを含有するヘテロ二量体
IL13	NC30	Immunotools	11340133	大腸菌	50mM Tris, 50mM NaCl, pH8.0	
IL15		Immunotools	11340153	大腸菌	5mM Tris, pH8.0	
IL-17	CTLA-8, IL-17A	Immunotools	11340174	大腸菌	添加物なし	
IL17	CTLA-8, IL-17A	Biolegend	570506	大腸菌		

10

20

【表 15-7】

IL-17C		R&D Systems	1234-IL-025/CF	大腸菌	アセトニトリルおよびTFA、滅菌4mM HCl中、100μg/mlで再構成。	
IL-17E	IL25	R&D Systems	1258-IL-025-CF	大腸菌		
IL17F		Immunotools	11349174	大腸菌	25mMリン酸ナトリウム, 200mM NaCl, pH7.0	
IL17F		Biolegend	570606	大腸菌		
IL19		Immunotools	11340193	大腸菌	添加物なし	
IL20		Immunotools	11340203	大腸菌	添加物なし	
IL21		Immunotools	11340213	大腸菌	20mM NaP, pH7.5	
IL-22		Immunotools	11340223	大腸菌	25mMリン酸ナトリウム, 200mM NaCl, pH6.0	
IL23		Sino Biological Inc.	CT12-H08H	ヒト細胞		IL-23AおよびIL-12Bヘテロ二量体、濃度0.25mg/ml
IL-24		Immunotools	11340243	S.セレビスエ*, マウス骨髄腫細胞株	50ug BSA/1mg IL-24	R&D Systems製品は、C末端にHisタグを有する
IL-24		R&D Systems	1965-IL-025/CF	マウス骨髄腫細胞株、NS0由来		
IL25	IL-17E	R&D Systems	1258-IL-025/CF	大腸菌	35% (v/v) アセトニトリル, 0.1% (v/v) TFA	

30

40

【表 15-8】

IL26	AK155二量体	R&D Systems	1870-11010 / CF (dimer)	大腸菌	20mM NaH ₂ PO ₄ , 700mM NaCl 10% (v/v) グリセロール, pH6.5	濃度0.187mg/ml
IL27		R&D Systems	2526-IL-010 / CF	マウス骨髄腫細胞株	PBS, 300mM NaCl, pH7.0	C末端Hisタグ、濃度0.155mg/ml
IL-28A		Immunotools	11340284	大腸菌	添加物なし	
IL-29		Immunotools	11340294	大腸菌	添加物なし	
IL-31		Immunotools	11340312	大腸菌	大腸菌、リン酸緩衝液、NaCl	
IL-31		GenScript	Z02717	大腸菌		
IL-32 α		Immunotools	11340323	大腸菌	50mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.5	
IL-32 γ		R&D Systems	4690-IL-025 / CF	大腸菌	PBS, 1mM DTT, pH7.0	
IL-32 γ		R&D Systems	4690-IL / CF	大腸菌		
IL-34		R&D Systems	5265-IL-010 / CF	マウス骨髄腫細胞株、NS0由来	PBS, 500mM NaCl, pH6.0	C末端Hisタグ
IL-35 α	IL1-F6	R&D Systems	1078-IL / CF	大腸菌		
IFN- α 1 β		Immunotools	11343596	大腸菌	4%マンニトールおよび1% HSA	
IFN- α 2 β		Immunotools	11343516	大腸菌		

10

20

【表 15-9】

IFN- α 4b	IFNA4	Sino Biological	10336-H01H	ヒト細胞		hFcIgG1と融合したIFN- α 4b / Fcキメラ (1.1.11)!
IFNA2		Immunotools	11343516	大腸菌		IFN- α 2 β , 166aa
IFNA4		Abnova	H00003441-P01	小麦胚芽発現系		濃度100ug/ml
IFNA4		Novus Biologicals	H00003441-P01	小麦胚芽発現系	50mM Tris-HCl、10mM還元グルタチオン、pH8.0、溶出緩衝液中	~26kD N末端GSTタグ
IFNA4		Sino Biological	10336-H08B	バキュロウイルス昆虫細胞		
IFNA5		Abnova	H00003442-P01	小麦胚芽発現系		濃度80ug/ml
IFNA6		Novus Biologicals	H00003443-P01	小麦胚芽発現系		~26kD N末端GSTタグ
IFNA8		Novus Biologicals	H00003445-P01	小麦胚芽発現系		~26kD N-terminal GST tag
IFNA14		Novus Biologicals	H00003448-P01	小麦胚芽発現系	50mM Tris-HCl、10mM還元グルタチオン、pH8.0、溶出緩衝液中	~26kD N-terminal GST tag

30

40

【表 15-10】

IFNA14		ATGen	ATGP1500	大腸菌	液体。50%グリセロール、0.2M NaCl、2mM DTTを含有する20mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)	IFNA14, 24-189aa Hisタグ
IFN- ω 1		ProSpec	CYT-040	大腸菌		
IFN- γ		Immunotools	11343536	大腸菌		
ドーパドカルボキシラーゼ	ドーパドカルボキシラーゼ、aadcdcc	Nordic Biosite	PAT-80291-1	大腸菌、hisタグ		
MIF		Immunotools	11344263	大腸菌	10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5	
NGF	神経成長因子	Immunotools	11343350	CHO		
NY-ESO-1		Thermo Scientific	RP-39227	細菌で発現		10mM レーグルタチオン(還元)を含む50mM Tris-HCl, pH7.5
OSM		Immunotools	11344023	大腸菌		ニコラス
PDGF-A	PDGF-1	Immunotools	11343683	大腸菌	10mM酢酸	

10

20

【表 15-11】

レタキシン		R&D	6586-RN/CF	大腸菌	酢酸ナトリウムの0.2 μ m フィルタ処理溶液から凍結乾燥した大腸菌	Asp25Ser53 (B鎖)およびGln162Cys185、(A鎖)、P04090、全長成熟はB鎖25-53およびA鎖162-185から構成される
S100A7/PSOR1		Sinobiologicals	11141-HNAE	大腸菌		
S100A7/PSOR1		ATGen	ATGP0991	大腸菌		
SCF		Immunotools	11344323	昆虫細胞	10mM酢酸中で再構成して濃度を0.1mg/mlにした	
スクレロスチン		R&D Systems	1406-ST/CF	NS0細胞、凍結乾燥CF		7xHis, N末端
SNAP25	シナプトソーム関連タンパク質	Novus Biologicals/Abnova	NBC1-18333	大腸菌、hisタグ		WB, Elisa
SNCAIP		Abnova	H00009627-P01	小麦胚芽発現系	50mM Tris-HCl、10mM還元グルタチオン、pH=8.0、溶出緩衝液中。	ヒトSNCAIP全長ORF(AAH94759.1, la.a.-603a.a.) N末端にGSTタグを有する組換えタンパク質
SPG20		Origene/BioNordika	TP307971	ヒトHEK293細胞	緩衝液:10%グリセロール、100mMグリシン、25mM Tris-HCl、pH7.3	C末端Myc-DDK、濃度0.229 μ g/ml

30

40

【表 15-12】

STXB P1		Abnova	H00006812-P01	小麦胚芽発現系	50mM Tris-HCl、10mM還元グルタチオン、pH=8.0、溶出緩衝液中。	ヒトSTXB P1全長ORF (NP_003156.1, 1a.a. -603a.a.) N末端にGSTタグを有する組換えタンパク質
TGF-β1		Immunotools	11343160	ヒト293細胞	10mM HCl, 50ug BSA	
TGF-β3		Immunotools	11343153	大腸菌	20%エタノール、0.12%酢酸	
TINAGL1		Novus Biologicals	H00064129-P01	小麦胚芽発現系	Tris-HCl+グルタチオン、pH8, 0	ヒトTINAGL1全長ORF (AAH09048.1, 1a.a. -218a.a.) N末端にGSTタグを有する組換えタンパク質
TMEFF-1	トモレグリン-1	Novus Biologicals	H00008577-P01	小麦胚芽発現系		26 kDa N末端GSTタグ、いかなる機能性についても試験されていない、濃度120ug/ml
TMEFF-2		Novus Biologicals	H00023671	小麦胚芽発現系		約26kD N末端GSTタグ
TNFα		Immunotools	11343015	大腸菌	20mM PBS, pH7.2, 10mM NaCl	濃度500ug/ml
TROY		Novus Biologicals	H00055504-P01	小麦胚芽発現系		ヒトTNFRSF19全長ORF (NP_683760.1, 1a.a. -417a.a.) N末端にGSTタグを有する組換えタンパク質
VEGF		Immunotools	11343663	大腸菌		

10

20

【表 15-13】

ビリン1		Novus Biologicals	H00007429-P01	小麦胚芽発現系		ヒトVIL1全長ORF (AAH17303, 1a.a. -421a.a.) N末端にGSTタグを有する組換えタンパク質。
------	--	-------------------	---------------	---------	--	---

【0317】

30

実施例8：ELISAによる患者の血清中のサイトカイン特異的抗体の検出

自己免疫性多腺性内分泌不全症症候群1型（APS1）とも称される遺伝的症候APECED（自己免疫性多腺性内分泌不全症・カンジダ症・外胚葉ジストロフィ）を患っている患者の血清中の様々なサイトカイン特異的抗体の存在および相対濃度を試験するために、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）を使用した。全体で、APS1-1～APS1-23のコードによって示されている患者23人由来の血清をアッセイで使用した。患者と年齢がマッチしている健康な研究所員から対照血清8種を入手し、C1～C8のコードを付けた。加えて、APS1-24～APS1-33のコードによって示されているさらなる患者10人の血清もアッセイで使用した。

【0318】

40

機器

EIA/RIA PLATE（酵素-ラジオイムノアッセイ）、96ウェルハーフエリアプレート、高結合フラットボトム（Costar cat. 3690）；デジタルマルチチャンネルピペット50～1200μl（Biohit, Helsinki, Finland）；デジタルマルチチャンネルピペット10～250μl（Biohit, Helsinki, Finland）；オービタルシェーカーElisaリーダ（Multiskan FC）。

【0319】

試薬：

ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG Fc（Jackson cat.

50

109-035-098) ; コーティング緩衝液 (炭酸-重炭酸緩衝液、Sigma cat. C3041-50CAP) ; 洗浄緩衝液 (Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水、pH7, 4 Sigma cat. P-3563) ; BSA、ウシ血清由来アルブミン (Sigma cat. A7030-50G) ; ブロッキング緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水中、2% BSA、pH7, 4) ; 希釈緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水中、0, 5% BSA、pH7, 4) ; 1-step ultra TMB-ELISA (Thermo cat. 34028) ; TMP基質用の停止試薬 (Sigma cat. S5814) ; 2M H_2SO_4

【0320】

試験抗原

組換えサイトカイン、リンホカイン、ケモカインおよび他の抗原は、商業的供給源から入手した (表14を参照のこと)。

【0321】

手順

ーコーティング緩衝液中、0.75、1.0または2.0 $\mu g/ml$ の濃度で試験抗原溶液を調製する

ー30 μl の抗原溶液を96ウェルCostar EIS/RIAプレートの各ウェルに追加し、+4℃で一晩 (16時間) インキュベートする。

ー抗原溶液を除去し、150 μl /ウェルの洗浄緩衝液でプレートを3回洗浄する。

ー100 μl /ウェルの2% BSA/PBSブロッキング緩衝液を追加し、150 rpmで振盪しながら室温で2時間インキュベートする。

ーブロッキング緩衝液を除去する。

ー30 μl /ウェルの患者血清を追加し、150 rpmで混合することによってプレートを室温で2時間インキュベートする。

ー血清希釈溶液を除去し、150 μl /ウェルの洗浄緩衝液でプレートを4回洗浄する。

ー0.5% BSA/PBS緩衝液で1:50000希釈した30 μl /ウェルのヤギ抗ヒト-HRP二次抗体を追加し、150 rpmで振盪することによって室温で1時間インキュベートする。

ー溶液から二次抗体を除去し、150 μl /ウェルの洗浄緩衝液でプレートを4回洗浄する。

ー30 μl /ウェルの室温TMB溶液を追加し、室温で15分間インキュベートする。

ー30 μl /ウェルの停止溶液または2M H_2SO_4 溶液を追加することによって発色を停止し、ELISAリーダーで吸光度450 nmを読む。

【0322】

抗体力価

抗体価は、同じ希釈の対照血清が示すODの3倍以上のOD (光学密度) 値を示す最高希釈 (最低濃度) の試験血清と定義する。これまでに、表14に示されている患者の試験血清は、各指示標的に対する免疫反応性を示している。

【0323】

実施例9：自己抗原タンパク質種の存在に関する統計異常の分析

本発明者の実験で提供されたProtoarrayデータの分析により、APCED患者で見られる抗体によって認識されるタンパク質の細胞局在 (図32を参照のこと) は、均一に分布していないことが示された。加えて、様々な経路に関係するタンパク質も均一に発現しておらず、特定の経路で過剰発現していることが見出された (上記表1および以下の表20も参照のこと)。

【0324】

10

20

30

40

【表 20】

表 20 : A P E C E D 患者における特定の経路に関するタンパク質の発現

上方発現経路		下方発現経路	
G O 経路	P 値	G O 経路	P 値
核	4 . 2 1 e - 2 1	膜に固有	1 . 9 3 e - 5 2
核酸結合	1 . 1 2 e - 1 5	膜部分	1 . 0 1 e - 4 7
遺伝子発現	1 . 1 5 . 1 4	膜	3 . 0 0 . 3 4
核内腔	2 . 8 2 e - 1 1	受容体活性	5 . 3 2 e - 1 3
核酸代謝	2 . 5 9 e - 1 0	膜貫通受容体	3 . 8 6 e - 1 2
R N A 代謝過程	3 . 8 8 e - 1 0	シグナル伝達物質の活動	8 . 1 3 e - 1 2
D N A 結合	7 . 2 7 e - 1 0	固有の原形質膜	3 . 2 8 e - 1 0

10

【0325】

さらなる分析のために、A P E C E D 関連の自己抗原における特定の構造モチーフの存在を評価した。コイルドコイル構造は、2～7本の α -ヘリックスが共にらせん状になっている構造的なモチーフであり、最も一般的には二量体および三量体である。それは、ヘプタッド反復H x x H C x C (H-疎水性; C-荷電アミノ酸 (a a)) の反復パターンを含有する。例示的なコイルドコイルドメイン含有タンパク質の染色体局在を表 24 に示す。

20

【0326】

コイルドコイル含有タンパク質の存在に関して、本発明の実験で得られたデータを以下のように分析した。フィンランド人A P E C E D 患者23人および健常対照者7人由来の血清のInvitrogen Protoarrayの結果の蛍光シグナルを使用した。(Invitrogenが示しているように) 反応性をP値にしたがってリスト化した。少なくとも1種のA P E C E D 患者血清によって認識される推定抗原であって、(Invitrogenが提供している) カットオフ値よりも少なくとも10倍高いシグナル値を有するものを含めた(全体では1797種のタンパク質)。このリストから、重複(いくつかのタンパク質はアレイ上で二重または三重に重複していた)を排除してSwissprotアクセッション番号を有していたもののみを含め、1型IFNおよびIL-22を非定型自己抗原として除外した。GeneTrailプログラム(<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/> [49、51])を初期設定で用いて、コイルドコイルタンパク質分析を行った。GeneTrailプログラムにより、固有のヒトタンパク質1517種をアノテーションする(これらのタンパク質とのマッチを見出す)ことができた。上位1500種のリストからは16.7%が、および上位250種のリストからは24.4%がコイルドコイル構造を含有していた。本発明のprotoarrayアッセイで試験したA P E C E D 患者の血清によって認識される例示的なコイルドコイルタンパク質の上位60種のリストを以下の表21に示し、例示的なCCDC40(コイルドコイルドメイン含有40)およびNAP1L1(ヌクレオソームアセンブリタンパク質1様1)タンパク質に対する免疫反応性を図31に示す(B列、上および中央のチャート)。

30

40

【0327】

【表 2 1 - 1】

表 2 1 : 本発明の P r o t e o a r r a y アッセイで免疫反応性を示す例示的なコイルドコイルタンパク質の上位 6 0 種のリスト。

遺伝子名称	説明
A F A P 1 L 2	アクチンフィラメント関連タンパク質 1 様 2
A N K R D 1 3 A	アンキリン反復ドメイン 1 3 A
A P P L 1	アダプタータンパク質、ホスホチロシン相互作用、P H ドメインおよびロイシンジッパー含有 1
A R G L U 1	仮想タンパク質 F L J 1 0 1 5 4
A R H G E F 1	R h o グアニンヌクレオチド交換因子 1 (GEF)
A S Z 1	アンキリン反復、S A M および塩基性ロイシンジッパードメイン含有 1
A T F 6	活性化転写因子 6
B B X	ボビーソックスホモログ (ショウジョウバエ)
C 1 0 o r f 1 1 8	1 0 番染色体オープンリーディングフレーム 1 1 8
C 1 0 o r f 8 0	1 0 番染色体オープンリーディングフレーム 8 0
C 3 o r f 4 4	3 番染色体オープンリーディングフレーム 4 4
C 6 o r f 6 5	6 番染色体オープンリーディングフレーム 6 5
C C D C 1 2	コイルドコイルドメイン含有 1 2
C C D C 2 5	コイルドコイルドメイン含有 2 5
C C D C 4 0	コイルドコイルドメイン含有 4 0
C E P 2 9 0	中心体タンパク質 2 9 0 k D a
C H C H D 6	コイルドコイルヘリックス-コイルドコイルヘリックスドメイン含有 6
C O R O 2 A	コロニン、アクチン結合タンパク質、2 A
C R L F 3	サイトカイン受容体様因子 3
D B N L	ドレブリン様
F A M 1 3 3 A	配列類似性 1 3 3 を有するファミリー、メンバー A
F A M 7 6 B	配列類似性 7 6 を有するファミリー、メンバー B
F O S L 2	F O S 様抗原 2
G N L 3 L	グアニンヌクレオチド結合タンパク質様 3 (核小体) 様
H D A C 9	ヒストンデアセチラーゼ 9
H E L L S	ヘリカーゼ、リンパ特異的
H I R I P 3	H I R A 相互作用タンパク質 3
H O M E R 3	ホーマーホモログ 3 (ショウジョウバエ)
K I A A 0 5 6 2	K I A A 0 5 6 2
K I F 2 0 A	キネシンファミリーメンバー 2 0 A
K I F 3 A	キネシンファミリーメンバー 3 A
K I F 3 B	キネシンファミリーメンバー 3 B
K L C 3	キネシン軽鎖 3
M E D 4	メディエータ複合体サブユニット 4
N A P 1 L 1	ヌクレオソームアセンブリタンパク質 1 様 1
N F E 2	核因子 (赤血球系由来 2)、4 5 k D a
N R B F 2	核内受容体結合因子 2

10

20

30

40

【表 2 1 - 2】

PHF 1 1	PHDフィンガータンパク質 1 1
P I B F 1	プロゲステロン免疫調節結合因子 1
P K N O X 2	P B X / ノット 1 ホメオボックス 2
R B M 1 7	R N A 結合モチーフタンパク質 1 7
S C Y L 1	S C Y 1 様 1 (S. セレビスエ)
S E P T 2	セプチン 2
S L U 7	S L U 7 スプライシング因子ホモログ (S. セレビスエ)
S M T N L 2	スムーセリン様 2
S N C A I P	シヌクレイン、 α 相互作用タンパク質 (シンフィリン)
S T X 2	シntaxin 2
Z M Y N D 1 1	ジンクフィンガー、MYNDドメイン含有 1 1
T E K T 2	テクチン 2 (精巢)
T L E 3	スプリット 3 のトランスデュースイン様エンハンサ (E (s p 1) ホモログ、ショウジョウバエ)
T R I M 1 5	三モチーフ含有 1 5
T R I M 2 2	三モチーフ含有 2 2
T R I M 2 9	三モチーフ含有 2 9
T R I M 6 9	三モチーフ含有 6 9
T T L L 7	チューブリンチロシンリガーゼ様ファミリーメンバー 7
U B E 2 O	ユビキチン結合酵素 E 2 O
U S P 4 7	ユビキチン特異的ペプチダーゼ 4 7
V A P A	V A M P (小胞関連膜タンパク質) 関連タンパク質 A、3 3 k D a
W T A P	ウィルムス腫瘍 1 関連タンパク質

10

20

【0 3 2 8】

比較では、固有のおよび SwissProt でアノテーションされている Protoarray タンパク質すべてを並行して分析した；これら（固有のおよび Swissprot でアノテーションされている 7010 種）のうち、12.5% のタンパク質がコイルドコイル構造を含有していた（以下の表 2 2 を参照のこと）。

30

【0 3 2 9】

【表 2 2】

表 2 2：本発明の Invitrogen Protoarray アッセイで同定された自己抗原に関する APECED におけるコイルドコイルドメインの多さ。

	APECED (上位 250)	APECED (上位 1500)	Protoarray タンパク質
コイルドコイルド メイン	24.4%	16.7%	12.5%
<i>P</i> 値	$7.5e-08$	$6.38e-08$	

40

【0 3 3 0】

理論によって縛れるものではないが、APECED 血清によって認識されるタンパク質のリストには、コイルドコイル構造を有するタンパク質が、健常ボランティアにおける分布を表す Protoarray 上のすべてのタンパク質のリストよりも多く含まれると結

50

論付けることができる。比較では、すべてのヒトゲノムタンパク質（23253種のタンパク質のうち約11.4%）がコイルドコイル構造を含むとすると、すべてのProtomarrayタンパク質（12.5%）のリストに近似する。このデータは、自己抗原タンパク質が、ランダムに予想されるよりも多くの頻度でコイルドコイル構造を含有するという、自己抗原におけるコイルドコイル構造の過剰発現に関する先の推論（Plotz P H. 「The autoantibody repertoire: searching for order.」Nat. Rev. Immunol. 3（2003）, 73-78を参照のこと）を立証および拡大するものである。

【0331】

実施例10：APECEDにおけるサイトカインを中和する主要Igサブクラスの同定

10

実施例10および11に記載されている実験については、特に指示されていないかまたは追加で拡大されていない場合には、上記実施例に記載されている対応する方法に加えてまたはこれに代えて、以下の材料および方法を使用するかまたはこれらを使用した。実質的に同じ方法を使用したか、これは、Karner et al. in Clin. Exp. Immunol.（2012）; doi:10.1111/cei.12024（この開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）によって、APECED患者と比較するためのaire欠損マウスにおける抗サイトカイン自己抗体の調査について詳細に記載されている。

【0332】

患者および対照者

20

上記に定義された中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患している患者（例えば、APECED、APS2またはIPEX患者）由来のならびに適合健常対照者由来の血清を平行して採取し、使用まで-20℃、-80℃または液体窒素中で保存する。上記実施例に記載されているように、患者および対照者の血清から免疫グロブリンを単離する。対応する遺伝子の突然変異分析および所定の疾患に関連することが公知の自己抗体の存在によって、遺伝性疾患の診断を確認する（例えば、AIRE遺伝子の突然変異分析およびこの疾患に関連する特定のタンパク質（例えば、表32または33に定義されているタンパク質）に対する自己抗体の存在によって、APECEDを確認する）。好ましくは、高頻度に見られる自己抗体の存在をマーカーとして使用する（例えば、APECEDの場合には、IFN- ω に対する自己抗体の存在を試験する）。

30

【0333】

免疫グロブリンの精製

プロテインG Sepharose 4 Fast Flow（GE Healthcare, Biosciences, Little Chalfont, UK）を使用した高速タンパク質液体クロマトグラフィを用いて全IgG画分を分離し、iCon（商標）濃縮器7ml/20Kチューブ（Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA）を用いて濃縮してPBSに緩衝液交換する。アガロース結合ジャカリンレクチン（Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA）を使用して全IgAを分離し、Spectra/Por透析膜（分子量カットオフ（MWCO）12~14000）（Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA）を使用して1×PBSに対して透析する。ウシ γ グロブリンを標準として使用するBradford法に基づくBio-Rad Protein Assay（Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA）によって、タンパク質濃度を測定する。

40

【0334】

SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングによって、単離したIgGおよびIgAの純度を評価する。特異的Abを用いて、IgHバンドの同一性を確認する。Cobas Integra 400 Plus（Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland）を用いた免疫比濁法によって、単離したIgA調製物

50

中の I g G の混入を検出する。

【0335】

ウエスタンブロット

ウエスタンブロットによって、患者または対照者の血清中の目的のタンパク質に対する自己抗体の存在を試験するために、ヒト I F N - α 2 について例示的に記載されている以下の実験手順を使用する。還元試料緩衝液（3 % S D S、10 % グリセロール、0.1 M D T T、0.02 % プロモフェノールブルーおよび 6.25 mM T r i s - H C l、p H 6.8）中で、ヒト I F N - α 2（P B L I n t e r f e r o n S o u r c e）を5分間煮沸し、12 % S D S - P A G E を行って P V D F フィルタ上にブロットした。ブロッキング後、フィルタのストリップを、患者もしくは対照者の血清（1 : 100）またはマウス抗 I F N - α 2 b 抗体（1 : 1000, A b c a m）と共にインキュベートし、続いて、二次抗体（抗ヒト H R P 1 : 100, 000 および抗マウス H R P 1 : 30, 000, J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h I n c）と共にインキュベートする。製造業者のプロトコル（G E H e a l t h c a r e）を使用して増強化学発光（E C L）によって、反応を可視化する。

【0336】

細胞ベースのサイトカイン中和アッセイ

以前に記載されているように [13]、抗ウイルス中和アッセイ（A V I N A）を行う。簡潔に言えば、系列希釈の I g G または I g A 試料（12.5 μ g / ml から開始）と共に2時間プレインキュベートした目的の免疫調節サイトカイン（例えば、I F N - α 2 a（H o f f m a n n - L a R o c h e）または I F N - ω （B e n d e r a n d C o., V i e n n a, A u s t r i a））の希釈調製物（10 研究室単位 / ml）と共に、ヒト神経膠芽腫細胞株 2 D 9 をプレインキュベートする。次いで、脳心筋炎ウイルスで細胞を24時間負荷してから0.05 % アミドブラックで染色し、酢酸緩衝液中、4 % ホルムアルデヒドで固定し、0.15 ml の 0.05 M 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄してから、吸光度を 620 nm で読む。

【0337】

ヒト I L - 17 A、I L - 17 F および I L - 22 中和アッセイ

以前に記載されているように [19]、アッセイを行う。簡潔に言えば、I L - 17 A の場合、I L - 17 A（2 ng / ml、R & D S y s t e m s I n c., M i n n e a p o l i s, M N, U S A）を系列希釈の I g G または I g A と共に2時間プレインキュベートしたものに、H F B 4 ヒト包皮線維芽細胞（S c h e r i n g - P l o u g h C o r p o r a t i o n, R e n o, N V, U S A）を細胞 1×10^4 個 / ウェルで播種する。I L - 17 F の場合、0.1 ng / ml T N F（B i o l e g e n d, S a n D i e g o, C A, U S A）と共にプレインキュベートした N C T C 2 5 4 4 ケラチノサイト（I n t e r l a b C e l l L i n e C o l l e c t i o n, G e n o v a, I t a l y）を H F B 4 の代わりに使用する。37 °C で 16 ~ 20 時間インキュベートした後、上清を回収し、E L I S A（R & D S y s t e m s）によって C X C L 1 についてアッセイする。ヒト I L - 22 の場合、細胞株 C o l o 2 0 5 を使用する。I L - 22（2 ng / ml、R & D S y s t e m s）を系列希釈の患者血清または I g G または I g A と共に2時間プレインキュベートしたものに、細胞を細胞 3×10^4 個 / ウェルで播種する。37 °C で 24 ~ 30 時間インキュベートした後、上清を回収し、E L I S A（R & D S y s t e m s I n c.）によって I L - 10 について分析する。E D₅₀ 値（試験試料のサイトカイン活性を半減させるのに必要な I g 濃度）として、すべてのサイトカイン中和アッセイの結果を E L I S A 吸光度のグラフから評価し、タンパク質 1 μ g あたりのサイトカイン中和単位（N U）としてグラフで表す。

【0338】

目的の全長または短縮組換えタンパク質に融合したルシフェラーゼ（L U C）をコードする構築物（C o n s t r u c t s e n c o d i n g l u c i f e r a s e）

2 つの例示的なサイトカインについて以下に記載されているように、目的の全長または

短縮組換えタンパク質に融合したルシフェラーゼ（LUC）をコードする構築物を作製することができる。使用したすべての全長および短縮ヒトIFN- α 2aおよびIL-22タンパク質ならびにプライマー配列の概要を以下の表23に示す。

【0339】

シグナル配列を用いないポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、ヒトIFN- α 2aおよびIL-22をコードする配列を増幅した。T4リガーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用して、pPK-CMV-F4（PromoCell GmbH, Heidelberg; Germany）哺乳動物発現ベクターのBamHI/NotI部位に、PCR産物をライゲーションした。従来の方法を使用して、正しいインサート（DNAの配列決定によって確認）を含むすべてのプラスミドを大腸菌N O V A X G細胞で増殖させ、増幅し、抽出し、精製した。最後に、HEK293細胞をこのプラスミドでトランスフェクトした；48時間後、1×受動溶解緩衝液（Promega, Madison, WI, USA）を使用して、粗タンパク質抽出物を調製した。

【0340】

【表 2 3 - 1】

表 2 3 : すべての全長および短縮ヒト I F N - α 2 a および I L - 2 2 タンパク質ならびに使用したプライマー配列の概要

抗原	断片		プライマー配列	
I L - 2 2	3 4 - 7 6 a a	F 1	5' TTTGGGATCCTCGCGCCCATC AGCTCCCACTGCA 3'	10
			配列番号 6 2	
		R 1	5' TTTGCGGCCGCTCACCCAAATG AGACGAACGTCTGT 3'	
			配列番号 : 6 3	
	7 4 - 1 1 4 a a	F 2	5' TTTGGGATCCTCCTCATTTGGG GAGAAACTGTTC 3'	20
			配列番号 : 6 4	
		R 2	5' TTTGCGGCCGCTCAATAAGGC TGGAACCTATCAGA 3'	
			配列番号 : 6 5	
	1 1 3 - 1 7 9 a a	F 3	5' TTTGGGATCCTCCCTTATATG CAGGAGGTGGT 3'	30
			配列番号 : 6 6	
		R 3	5' TTTGCGGCCGCTCAAATGCAG GCATTTCTCAGA 3'	
			配列番号 : 6 7	
	3 4 - 1 1 4 a a	F 1	5' TTTGGGATCCTCGCGCCCATC AGCTCCCACTGCA 3'	40
			配列番号 : 6 8	
		R 2	5' TTTGCGGCCGCTCAATAAGGC TGGAACCTATCAGA 3'	
			配列番号 : 6 9	
	7 4 - 1 7 9 a a	F 2	5' TTTGGGATCCTCCTCATTTGGG GAGAAACTGTTC 3'	50
			配列番号 : 7 0	
		R 3	5' TTTGCGGCCGCTCAAATGCAG GCATTTCTCAGA 3'	
			配列番号 : 7 1	
I F N - α 2 a	2 4 - 6 9 a a	F 1	5' TTTGGGATCCTCTGTGATCTG CCTCAAACCCACA 3'	60
			配列番号 : 7 2	
		R 1	5' TTTGCGGCCGCTCACTGGTTG CCAAACTCCTCCTG 3'	
			配列番号 : 7 3	
	6 7 - 1 2 4 a a	F 2	5' TTTGGGATCCTCGGCAACCAG TTCCAAAGGCT 3'	70
			配列番号 : 7 4	
		R 2	5' TTTGCGGCCGCTCACTGTATC ACACAGGCTTCCAG 3'	
			配列番号 : 7 5	

【表 2 3 - 2】

1 2 3 - 1 8 8	F 3	5' TTTGGGATCCTCATACAGGGG	
		GTGGGGGTGACA 3'	
		配列番号：7 6	
	R 3	5' TTTGCGGCGCTTACTTCTTA	
		AACTTTCTTGCA 3'	
		配列番号：7 7	
2 4 - 1 2 4	F 1	5' TTTGGGATCCTCTGTGATCTG	10
		CCTCAAACCCACA 3'	
		配列番号：7 8	
	R 2	5' TTTGCGGCGCTCACTGTATC	
		ACACAGGCTTCCAG 3'	
		配列番号：7 9	
6 7 - 1 8 8	F 2	5' TTTGGGATCCTCGGCAACCAG	
		TTCCAAAAGGCT 3'	
		配列番号：8 0	
	F 3	5' TTTGCGGCGCTTACTTCTTA	20
		AACTTTCTTGCA 3'	
		配列番号：8 1	

【0 3 4 1】

ルシフェラーゼ免疫沈降システム (LIPS) アッセイ

Burbe l o らにしたがって、96 ウェルマルチスクリーンフィルタ HTS プレート (Millipore, Bedford, MA, USA) 中、室温で、すべての希釈に緩衝液 A (50mM Tris、pH7.5、100mM NaCl、5mM MgCl₂、1% Triton X-100) を使用して [30]、LIPS アッセイを行った。試験血清由来の Ig (1:25 希釈、2 つ平行して試験) をプロテイン G Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (25 μl の 4% 懸濁液; GE Healthcare) 上に捕捉し、次いでこれを、発現サイトカインまたはそれらの断片を含む抽出物と共にインキュベートした。例えば、上記のように作製した IL-22、IFN-α2a などのサイトカインまたはそれらの断片 (10⁵ 発光単位 (LU) を使用した。1 時間後、洗浄し、ルシフェラーゼ基質 (Promega) と共にインキュベートし、1450 MicroBeta TriLux 液体シンチレーションカウンタおよび照度計 (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) で発光強度を測定した。自己抗体のサブタイプを検出するために、ビーズ (1 μl のストレプトアビジンアガロース樹脂、Invitrogen) を、ビオチンコンジュゲートヒトサブタイプ特異的 Ab (BD Pharmingen、現在は BD Biosciences Heidelberg, Germany (現在は Becton, Dickinson and Company の一部) の抗 IgG1、抗 IgG2、抗 IgG4、抗 IgE; Invitrogen; Carlsbad USA の抗 IgG3) と共にインキュベートする。同時に、APECED または対照者の血清 (1:25) を、抗原調製物 (10⁵ LU のルシフェラーゼ結合 IL-22 または IFN-α2a) と共にインキュベートした。最後に、免疫複合体をコーティングビーズ上に捕捉してから、上記のように LU を読んだ。あるいはまたは加えて、抗ヒト IgA アガロース (Sigma) を捕捉に使用してから、LU を読む。

【0 3 4 2】

ELISA

以前に記載されているように [13]、ヒト画分 / 抗体について実施例 1 の前に記載さ

れているのと同様に、マウス由来の精製画分中の I 型 I F N 特異的 I g G を検出するための結合 E L I S A を行う。I g G 調製物を $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ で試験する。好ましくは、 $1 \sim 2 \mu\text{g}$ タンパク質/ ml (P B S、p H 7. 0) の無担体組換えマウス I L - 1 7 A、I L - 1 7 F または I L - 2 2 (B i o l e g e n d) を用いて、マイクロタイターウェルを 4°C で一晚コーティングする。ブロッキング後、 $1:10$ 希釈したマウス血清を 4°C で一晚インキュベートしてから洗浄し、抗マウス I g G [γ 鎖特異的] - アルカリホスファターゼコンジュゲート (S i g m a - A l d r i c h C o r p o r a t i o n, M i s s o u r i, U S A) または抗マウス I g G サブクラス特異的 (I g G 1、I g G 2 b、I g G 2 b、I g G 3) ビオチン化抗体 (B i o l e g e n d) のいずれか、続いて、ストレプトアビジンコンジュゲート西洋ワサビペルオキシダーゼおよび適切な酵素基質を用いて現像し、O D を読む。対照群 (野生型 (w t) およびヘテロ接合体マウス) の平均を 2 標準偏差以上上回る任意の値を陽性であるとみなす。

【0343】

統計分析

スピアマン相関係数を計算するために、G r a p h P a d ソフトウェア (C a l i f o r n i a, U S A) を使用する。群間の中央値を比較するために、マン・ホイットニーまたはクラスカル・ワリス検定を使用する。 $P < 0. 01$ を統計学的に有意とみなした。

【0344】

中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失に罹患している患者におけるサイトカインを中和する主要サブクラスの同定

最初に、罹患 (例えば、A P E C E D) 患者におけるサイトカインを中和する主要 I g サブクラスを同定するために、患者および対照者の血清由来の I g G および I g A を単離する。上記のように、E L I S A によって、I g サブクラスの同定を実施する。自己免疫環境をさらに特性決定するために、次に、抗サイトカイン自己抗体のうちの主な I g A および／または I g G サブクラスを決定する。

【0345】

実施例 11：目的のタンパク質の免疫優性エピトープのマッピング

K a r n e r e t a l. i n C l i n. E x p. I m m u n o l. (2012), d o i : 10. 1111 / c e i. 12024 において、I L - 2 2 などのサイトカインに対する自己抗体について記載されているように、自己抗体の中和能をよく理解するために、目的のタンパク質のいくつかの c D N A 断片をクローニングして、それらの免疫優性エピトープをマッピングすることができる。

【0346】

例えば、上記に定義された中枢性および／もしくは末梢性寛容の異常または自己寛容の喪失を有する患者由来の、またはこれらの疾患の各マウスモデル由来の血清中の自己抗体が全長または短縮ポリペプチドに対して結合する能力の比較を使用して、これらの抗体によって認識されるエピトープが立体構造的であるかを決定する。このような選択性が観察される場合、変性全長構築物を用いてウエスタンブロットによってさらなる試験を実施する。

【0347】

それらの中和能を予測／確認するために、標的タンパク質の特定の領域に対する試験抗体の結合特異性を使用する。例えば、I F N - α 2 a および I L - 2 2 の C 末端領域は、より β - ターンを作る傾向があり親水性のアミノ酸を含有する。これらは、インタクトなタンパク質を認識する特異的 A b を誘導するのに重要な 2 つの性質である [45]。これらの領域に対する任意の自己抗体は、中和する可能性がある。

【0348】

実施例 12：誘導性耳炎表現型の結果

ヒトサイトカイン I L - 1 7 A もしくは I L - 1 7 F または P B S を各耳に隔日で (1 日目、3 日目、5 日目および 7 日目) に皮内注射することによって [$20 \text{ u l} / \text{耳}$ 、 $500 \text{ n g} / \text{耳}$ 、 $1 \mu\text{g} / \text{マウス} / \text{日}$]、8 週齢 C 5 7 B L / 6 J (野生型 (W T)) マウ

10

20

30

40

50

スで耳炎表現型を誘導した。誘導性耳炎表現型を軽減するその中和能に関して、本発明の例示的な抗 I L - 1 7 2 4 D 3 抗体による処置をこれらの動物で試験した。耳炎誘導前の 0 日目に 1 回目の腹腔内注射 (I P) を開始して、2 4 D 3 または対照ヒト I g G の 4 回の腹腔内 (I P) 注射 [2 0 0 μ g / 腹腔内注射 (I P)] を隔日で 8 日間にわたって動物に施した。本発明の抗体の潜在的な治療効果を試験するために、抗体投与の間に、動物の体重および耳の厚みをモニタリングした。さらに、耳の H & E (ヘマトキシリンおよびエオシン ; [5 2 , 5 3]) 組織学的染色を実施した。

【 0 3 4 9 】

2 回の独立した実験の組み合わせは、ヒト I L - 1 7 F の皮内注射による耳腫脹の誘導が 2 4 D 3 中和抗体の存在下では軽減され、これは 8 日目において有意であることを示している (図 3 9 A 、 D および F を参照のこと) 。ヒト I L - 1 7 A の皮内注射による耳腫脹の誘導は、2 4 D 3 処置によって影響を受けておらず、このことは、ヒト I L - 1 7 F に対するこの抗体の特異性をさらに立証している (図 3 9 A および C ならびに図 3 9 E を参照のこと) 。 P B S 対照を連続皮内注射した後の耳腫脹レベルは、I g G または 2 4 D 3 の存在によって影響を受けていない (図 3 9 A 、 B および F を参照のこと) 。得られたデータを P B S 対照で得られた値に対して標準化することにより、例示的な抗 I L - 1 7 F 抗体の治療効果を示す値に関する有意性がより高くなる (特に、図 3 9 J および L を参照のこと) 。 I L - 1 7 F 注射による炎症誘導後の体重減少がほぼ無いかまたは少なくとも大きく軽減している 2 4 D 3 処置動物の体重をモニタリングすることにより得られた予備データによって、本発明の例示的な抗 I L - 1 7 F 抗体の治療効果がさらに裏付けられている (図 4 0 を参照のこと) 。

【 0 3 5 0 】

実施例 1 3 : 例示的な a - I L 1 7 および a I L - 2 2 抗体のエピトープマッピング

マッピングの最初の工程として、異なる結合部位の数を決定するために、区別可能な抗原結合部位に対する a - I L 1 7 および a - I L - 2 2 M A B の差次的結合を調べた。

【 0 3 5 1 】

この目的のために、2 つのアプローチを使用した。第 1 のアプローチでは、ヒト (h M A B) またはマウス (h m M A B) F c のいずれかと共に M A B を発現させ、抗原をプレート上にコーティングし、大過剰のヒト M A B の存在下で h m M A B の結合を検出することによって、交差競合実験を行った。一次抗体の F c 部分に対する H R P コンジュゲート二次抗体によって、リガンドに結合した h m M A B の検出を行った。図 4 1 A から分かるように、本発明の例示的な a - I L - 1 7 抗体 1 7 E 3 および 2 4 D 3 は互いに競合するが、抗体 9 A 2 とは競合せず、このことは、9 A 2 が 1 7 E 3 および 2 4 D 3 とは別の部位に結合することを示している。第 1 のアプローチの結果はまた、本発明の a - I L - 2 2 抗体 3 0 G 1 、 3 5 G 1 1 および 4 1 D 1 1 が互いに競合するが、抗体 5 1 G 4 とは競合しないことを示している (図 4 1 B を参照のこと) 。

【 0 3 5 2 】

第 2 のアプローチではサンドイッチ E L I S A 実験を実施したところ、h m M A B については第 1 のアプローチのように構築したが、交差競合実験については、ヒト M A B をプレート上にコーティングし、抗原を捕捉し、ヒト M A B に結合した抗原を h m M A B で検出することによって行った (結果については、図 4 1 C を参照のこと) 。この第 2 のアプローチも同様に、抗体 3 0 G 1 、 3 5 G 1 1 および 4 1 D 1 1 が互いに競合するが、5 1 G 4 とは競合しないことを示しており、a - I L - 2 2 抗体 3 0 G 1 、 3 5 G 1 1 および 4 1 D 1 1 ならびに a - I L - 2 2 抗体 5 1 G 4 が 2 つの異なる部位に結合することを裏付けている。続いて、P e p S t a r (商標) 分析を使用して、各抗原に対する M A B の結合領域をマッピングすることを試みた。ここで、I L - 1 7 A 、 I L - 1 7 F および I L - 2 2 (公知の変異体すべてを含む) を包含するように 2 0 m e r のオーバーラップペプチド (1 5 個のアミノ酸のオーバーラップ) を設計し、ペプチドおよび全長抗原 (陽性対照として) をマイクロアレイ上にスポットし、ペプチドマイクロアレイを一次抗体と共にインキュベートし、続いて、一次抗体の F c 部分に対する蛍光標識二次抗体と共にイン

キュベートした。立体障害によって引き起こされる偽陰性を回避するために、最適化された親水性リンカー部分を、ガラス表面と抗原由来ペプチド配列との間に挿入した。

【0353】

例示的な a-IL-17 MAB のマッピング結果を図 42 に示し、a-IL-22 MAB の結果を図 43 に示す。同時にスポットした全長抗原は、一般に、ペプチドマイクロアレイ (IL-22 のカラム) 上でよく認識されていた。すべての a-IL-17 および a-IL-22 MAB が明らかな結合を示しているわけではないが、ペプチドとは異なり、抗原を固定化する表面リシンの方向および使用により、低いシグナル強度またはシグナルの欠如は、結合の欠如に必ずしも関連していない。特定のペプチドへの結合時に観察されるべき予想結合強度は、60, 000 の範囲内である。すべての抗体が、ペプチド結合マイクロアレイに対して非常に弱い結合パターンを示しているが、このことは、それらの特定抗原由来の直線状ペプチドを認識することができないことを示している。これらのデータは、IL-17 および IL-22 MAB が立体構造エпитープに結合することを示唆している (抗体の特性の概要については、実施例 14 の表 25 および 26 を参照のこと)。

【0354】

実施例 14：表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術を使用した抗体親和性測定

本発明の抗体の親和性を測定するために、製造業者 (BIO-RAD; Hercules CA, USA) の説明書にしたがって ProteOn (商標) XPR36 機器を使用して、SPR 測定を実施した。最初に、EDC/NHS 化学反応によって、GLC センサーチップからなる 6×6 相互作用アレイの 5 面上に抗ヒト IgG を同時にカップリングし、第 6 面上には抗体を固定化しなかったが、他の 5 面と同じ活性化および非活性化プロトコルで処理した。その後、試験するべき MAB (リガンド) をチップの 6 つのチャンネルに (垂直方向に) 注入し、よく似た捕捉効率および活性割合で同時に捕捉した。次いで、チップを 90 度回転させ、試験するべき分析物を、100 nM ~ 1.23 nM の範囲の異なる濃度で水平方向に注入した (図 44 ~ 46 において、各会合/解離曲線は、異なる濃度 (A1-赤、100 nM、A2-シアン 33.33 nM、A3-青 11.11 nM、A4-緑 3.70 nM、A5-ピンク 1.23 nM、A6-オレンジ ランニング緩衝液のみ) を表す)。図 44 のセンサグラムは、IL-22 に対する本発明の例示的な抗 IL-22 抗体 30G1 および 35G11 の結合特異性を裏付けている。フローチャンネル間のインタースポット領域を使用して、データを参照した。図 45 および 46 に示されているセンサグラムの詳細な分析は、得られたデータが 1:1 ラングミュアモデルによく合致することを示している。結合実験を 2 回反復し、データを 2 回の独立した実験の平均として表す。SPR データから計算した抗体の親和性は、ピコモル範囲 (すなわち、それぞれ a-IL-22 抗体 30G1、および a-IL-22 抗体 35G11 について、 $KD = 36.5 \pm 1.5$ pM および 39 ± 7 pM) であることが示された。

【0355】

IL-17F の注射は、抗体 9A2、17E3 および 24D3 を固定化した表面上で濃度依存的反応を示し、このことは、IL-17 に対するそれらの結合特異性を裏付けているのに対して、a-IL-22 抗体 30G1 および 35G11 を固定化した表面は非特異的リガンド結合を示さないか、または多くとも最小限の非特異的リガンド結合 (これは、抗ヒト IgG 捕捉抗体を表面上に固定化せずにリガンドとして 24D3 で処理した対照チャンネルと同程度である) を示した。解離段階では、反応の「増加」を観察することができたが、これは、この段階における同時会合および解離を反映していると思われる。この潜在的な原因は、抗体表面上への抗原の凝集、または機器チューブからの抗原の補充である。解離段階のデータが複雑であるため、kd そしてそれ故に動態を正確に決定することは不可能であるが、「解離」データの大部分を除外すると親和性は非常に高いと思われ、約 3×10^5 (17E3) から約 6×10^5 1/Ms (24D3) を超えて約 8×10^5 1/Ms (9A2) までの範囲の ka を算出することができる。挙動が 1:1 ではない証拠は存在しない (すなわち、不均一なリガンドの証拠はない)。

【0356】

【表25】

表25：本発明の例示的なa-IL-17抗体9A2、17E3および24D3の特徴の概要。F-IL-17F、A-IL17A、h-ヒト

M A B	a - I L 1 7 - 9 A 2	a - I L 1 7 - 1 7 E 3	a - I L 1 7 - 2 4 D 3
患者番号	A P S 1 - 1 8	A P S 1 - 1 6	A P S 1 - 1 6
E L I S A 結合	I L - 1 7 F (h)	I L - 1 7 A I L - 1 7 F (h)	I L - 1 7 F (h)
アイソタイプ	I g G 1 , κ	I g G 1 , κ	I g G 1 , λ
E C ₅₀ (n g / m l)	3 (F)	2 (F) ; 8 2 4 (A)	2 (F)
交差競合部位	I	I I	I I
エピトープマッピング	立体構造	立体構造	立体構造
親和性 (S P R)	(高親和性)	(高親和性)	(高親和性)
I C ₅₀ 中和 (n g / m l)	I L - 1 7 F : 4 5	I L - 1 7 F : 1 5	I L - 1 7 F : 1 2 - 2 2
	I L - 1 7 A / F : n o t n e u t r	I L - 1 7 A / F : 1 2	I L - 1 7 A / F : 6 - 1 4

10

20

【0357】

【表 2 6】

表 2 6：本発明の例示的な a - I L - 2 2 抗体 3 0 G 1、3 5 G 1 1、4 1 D 1 1 および 5 1 G 4 の特徴の概要。h - ヒト，m - マウス I L - 2 2 に対するアゴニスト活性（E C 5 0）

M A B	a - I L - 2 2 - 3 0 G 1	a - I L - 2 2 - 3 5 G 1 1	a - I L - 2 2 - 4 1 D 1 1	a - I L - 2 2 - 5 1 G 4
患者番号	A P S 1 - 1 6	A P S 1 - 1 6	A P S 1 - 1 6	A P S 1 - 1 6
E L I S A 結合	I L - 2 2 (h, m)	I L - 2 2 (h)	I L - 2 2 (h, m)	I L - 2 2 (h)
アイソタイプ	I g G 1, κ	I g G 4, λ	I g G 1, λ	I g G 2, λ
E C ₅₀ (n g / m l)	3 (h); 1 5 (m)	7 (h)	5 (h); 6 0 (m)	6 7 - 1 4 8 (h)
交差競合部位	I	I	I	I I
エピトープマッピング	立体構造	立体構造	立体構造	立体構造
親和性 (S P R)	3 6 . 5 ± 1 . 5 p M	3 9 ± 7 p M	未決定	未決定
I C ₅₀ 中和 (n g / m l)	2 . 1 - 2 . 5 (h); 1 . 5 (m)	3 . 8 - 4	3 8	—

【0 3 5 8】

実施例 1 5：L I P S アッセイにおけるガウシア抗原構築物

海洋カイアシ類ガウシア・プリンケプス由来のガウシアルシフェラーゼ（G l u c）を目的の全長または短縮組換え抗原（例えば、I L - 2 2、I L - 1 7 A または I L - 1 7 F）に融合したものをコードする構築物を作製し、（フォティナス・ピラリス由来の）ホタルルシフェラーゼを含有する構築物について実施例 1 0 に記載されているように、ルシフェラーゼアッセイに使用した。以下の説明に加えて、対応する遺伝子を有する融合構築物の作製に使用したプライマー配列に関する表 2 3、および実施例 1 の対応するクローニング戦略（ここでは、サイトカイン遺伝子断片をガウシアベクタにクローニングするために同様に使用した）の説明を参照のこと。

【0 3 5 9】

ガウシア全長遺伝子は、University of Tartu の Andres M e r i t s 教授から贈与されたものであり、T 4 リガーゼ（Invitrogen, C a r l s b a d, C A, U S A）を使用して、これを p P K - C M V - F 4（PromoCell GmbH, H e i d e l b e r g; G e r m a n y）哺乳動物発現ベクタの E c o R I 部位にクローニングし、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を置換した。サイトカイン遺伝子の全長断片（シグナルペプチド配列を除く）を、ガウシアベクタの B a m H I および N o t I 部位にクローニングした。セレンテラジンを基質として使用した以外は、ホタルルシフェラーゼ構築物を用いるのと本質的には同様に L I P S アッセイを実施した。簡潔に言えば、B u r b e l o らにしたがって、9 6 ウェルマルチスクリーンフィルタ H T S プレート（Millipore, B e d f o r d, M A, U S A）中、室温で、すべての

希釈に緩衝液 A (50 mM Tris、pH 7.5、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、1% Triton X-100) を使用して [30]、LIPS アッセイを行った。試験血清由来の Ig (1:25 希釈、2 つ平行して試験) をプロテイン G Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (25 μl の 4% 懸濁液; GE Healthcare) 上に捕捉し、次いでこれを、発現サイトカイン (10⁵ 発光単位 (LU) を含む抽出物と共にインキュベートした。1 時間後、洗浄し、ルシフェラーゼ基質セレンテラジン (Targeting Systems; El Cajon, CA, USA; <http://www.targetingsystems.net/>) と共にインキュベートし、1450 MicroBeta TriLux 液体シンチレーションカウンタおよび照度計 (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA) で発光強度を測定した。以下の表 27 は、ホタルおよび／またはガウシアルシフェラーゼを使用した LIPS アッセイで観察された血清反応性を示す。

【0360】

【表 27】

表 27: ホタルおよび／またはガウシアルシフェラーゼを使用した LIPS アッセイによって示された、APS 1 患者における指示標的に結合する自己抗体の存在。

標的	血清反応性の患者
IFNA2	全員
IFNA8	全員
IL1A	APS1-01, APS1-02, APS1-13, APS1-23
IL1F10	APS1-13
IL5	APS1-03, APS1-08, APS1-13, APS1-18, APS1-25
IL6	APS1-01, APS1-03, APS1-10, APS1-13, APS1-17, APS1-19, APS1-23, APS1-24, APS1-25, APS1-29, APS1-30
IL17A	APS1-03, APS1-11, APS1-12, APS1-13, APS1-14, APS1-18, APS1-19, APS1-20, APS1-21, APS1-22, APS1-23
IL17F	APS1-03, APS1-05, APS1-12, APS1-17, APS1-19, APS1-25, APS1-27 を除く全員
IL20	APS1-02, APS1-09, APS1-13, APS1-23, APS1-29
IL22	全員
IL27	APS1-23
IL28A	APS1-07, APS1-15, APS1-16, APS1-23, APS1-24, APS1-25, APS1-26
IL28B	APS1-07, APS1-15, APS1-16, APS1-24, APS1-25
IL29	APS1-04, APS1-07, APS1-13, APS1-15, APS1-18, APS1-21, APS1-24, APS1-25, APS1-26, APS1-28, APS1-29

【0361】

実施例 16: タンパク質アレイデータの分析

全試料セット (図 47) について、ならびに女性患者および男性患者について別々に (図 48 および 49)、タンパク質アレイ上における抗体反応を評価した。3 つの分析すべてにおいて、反応タンパク質は、対照者を保因者と区別している。

【0362】

保因者を対照者と区別するタンパク質の75%が、より高量の女性試料の代わりに女性患者によって駆動される。3つの分析すべてにおいて、11種のタンパク質がオーバーラップしている。14種のタンパク質が男性特異的であることを示し、28種のタンパク質が女性特異的であると判定することができる（表28および図49Bを参照のこと）。

【0363】

全試料セットにおいて、単語「可溶性」を含む遺伝子オントロジー（GO）用語に2種のタンパク質をアノテーションすることができ、GO用語「膜」に16種のタンパク質をアノテーションすることができた。2種の可溶性タンパク質および1種のさらなるタンパク質は、女性のみ分析でも明らかであった。男性特異的タンパク質には、可溶性にアノテーションされるものはなかった；男性では明らかに、膜にアノテーションされる反応タンパク質の選好性がある。

【0364】

この予備分析によって、抗体反応と患者の年齢との間に明確な関係性を認めることはできなかった。

【0365】

【表28】

表28：患者試料と対照者試料とを区別して性別パラメータを統合するタンパク質。男性特異的タンパク質および女性特異的タンパク質ならびに反応者に共通のタンパク質。GO用語「可溶性」にアノテーションしたタンパク質－イタリック体；「膜」－太字；「可溶性」でも「膜」でもないタンパク質－下線。患者ではCFL2（骨格筋活性、コフィリン－2）抗体レベルが低下し、すべての他のタンパク質に対する抗体レベルが上昇した。

群	タンパク質
女性特異的 (n = 28)	<i>ABHD10</i> , <i>ADAM5P</i> , <i>AQP2</i> , <i>ARFGAP3</i> , <i>c3orf52</i> , <i>CBX1</i> , <i>CCDC40</i> , <i>CKAP2</i> , <i>CRYGD</i> , <i>DDC</i> , <i>GGA2</i> , <i>GAD2</i> , <i>HSBP1</i> , <i>ICAIL1</i> , <i>IFNA17</i> , <i>IFNW1</i> , <i>IL36A</i> , <i>KCTD10</i> , <i>MAPK9</i> , <i>MED4</i> , <i>NAP1L1</i> , <i>OXNAD1</i> , <i>PHKG2</i> , <i>PSMB5</i> , <i>RPL12</i> , <i>S100A11</i> , <i>SMNDC1</i> , <i>SPANXB1</i>
男性特異的 (n = 14)	<i>ABHD1</i> , <i>C14orf79</i> , <i>CLDN20</i> , <i>ERO1LB</i> , <i>GLRX2</i> , <i>GPAM</i> , <i>LOC402176</i> , <i>LYPLAL1</i> , <i>MAX</i> , <i>PDK3</i> , <i>TPH1</i> , <i>TPSD1</i> , <i>TRIM5</i> , <i>USE1</i>
共通 (n = 11)	<i>CFL2</i> , <i>IFNA1</i> , <i>IFNA13</i> , <i>IFNA14</i> , <i>IFNA2</i> , <i>IFNA21</i> , <i>IFNA4</i> , <i>IFNA5</i> , <i>IFNA6</i> , <i>IFNA8</i> , <i>IL22</i>

【0366】

実施例17：APS1およびIPEX患者からのヒトリンパ球の単離

完全ヒト抗体のクローニング用の出発物質として、実施例1に記載されている33人のフィンランド人APECED患者群に加えて、X連鎖自己免疫アレルギー性調節異常症候群（XLAAD）またはIDDM分泌性下痢症候群（DMSD）とも称されるX連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群（IPEX, OMIM 304790）と診断されたフィンランド人患者1人；およびシュミット症候群または多腺性自己免疫症候群II型（PGA II）とも称される自己免疫性多内分泌（または多腺）不全症候群2型（APS2, OMIM 269200）と診断されたフィンランド人患者31人の末梢血から得られたヒトのリンパ球を使用する；Medicine Ethical Review

w Board of Helsinki and Uusimaa Joint Authority (dnro 8/13/03/01/2009、研究許可 IAS09 APS1 6209/T101060071) から研究の承認が得られ、各参加者がインフォームドコンセントに署名した。

【0367】

APECED患者群は、以下の特徴を有していた。患者のうち21人が女性であり、12人が男性であり、平均年齢は38歳であった（女性38.3歳；男性37.8歳）。最初のAPECED症候時の平均年齢は、6.2歳であった。男性の平均体重は69.75kgであり、女性の平均体重は59.4kgであった。これら33人の患者は、患者らの臨床症候に関するアンケートに回答した。一般的な症候としては、患者の30%が発熱期間を経験し、67%が無力症を経験した。

10

【0368】

IPEX（X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症候群）は、攻撃的自己免疫および早期死亡をもたらす珍しいX連鎖劣性疾患であり、上記セクション「定義および実施形態」内の段落「IPEX」により詳細に記載されている。

【0369】

APS2は、上記により詳細に記載されている主要組織適合複合体（MHC：major histocompatibility complex）内の6番染色体上に優性感受性遺伝子座がある多遺伝子性疾患である；総説については、例えば、Baker et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 95 (2010), E263-E270を参照のこと。APS IIの有病率は、100,000人あたり1.4~2.0人と推定されている（Betterle et al., Endocr Rev. 23 (2002), 327-64）。それは30~40歳の患者で最も多く発生し、女性は、男性よりも3倍多く罹患している（Schatz and Winter, Endocrinol Metab Clin North Am. 31 (2002), 339-52）。

20

【0370】

APS1/APECEDで単離された抗体に関して対応する実施例に記載されているように、目的のタンパク質に対する自己抗体の存在についての患者の血清のスクリーニング、高力価のIPEX/APS2症例の事前選択、PBMC単離、ならびに例えば、抗体の生産および精製、インビトロ細胞ベースの中和アッセイ、検証アッセイに関するさらなる手順を実施する（特に、PBMC単離のための高力価患者血清の事前選択については実施例1を、血清のさらなる加工については実施例2を参照のこと）。

30

【0371】

上記実施例8に記載されているように、ELISAによって、APS2、各IPEX患者の血清中のサイトカイン特異的抗体の検出を実施した。APS2患者をAPS2-1~APS2-31とコードし、IPEX患者をIPEXヘルシンキとコードした。

【0372】

抗体スクリーニングの結果。

約100種の選択抗原のアセットに対して患者および対照被験者の血清をスクリーニングすることによって得られた結果を、APS1については表29に、各APS2については表30に、IPEX患者については表31において以下に示す。

40

【0373】

【表 29-1】

表 29：ELISA アッセイによって示された、APS1 患者における指示標的に結合する自己抗体の存在に関する表 14 に対する追加データ。

表は、(1:500 希釈の試験血清で 0.5 超の OD 値を示す) 患者の血清によって認識される抗原を示す。抗原を炭酸-重炭酸塩緩衝液に 0.75 µg/ml で溶解し、二次抗体を 0.5% BSA/PBS で 1:10000 希釈した。抗原 IFNα6、IFNα8、IFNα14、PSOR1 および Troy については、二次抗体を 0.5% BSA/PBS で 1:4000 希釈した。

標的	血清反応性を有する患者
CCL13	APS1-23
CCL21	APS1-9
CCL22	APS1-6
CXCL3	APS1-27
CXCL11	APS1-9
CXCL12a	APS1-17
IFN-α 1β	APS1-1~10、APS1-13~-18、APS1-20~-30
IFN-α 2β	APS1-1~-10、APS1-12~-30
IFNα4	APS1-1~-10、APS1-12~-30
IFNα5	APS1-1~-30
IFNω1	APS1-4~-9、APS1-14~-16、APS1-18、APS1-19、APS1-21~-28 および APS1-30
IL1F9	APS1-7
IL1F10	APS1-23
IL5	APS1-3、-8、-13、-18、-25
IL10	APS1-12
IL11	APS1-29
IL17	APS1-13、-18、-20
IL17C	APS1-1、-29
IL17F	APS1-1~-4、APS1-6~-11、APS1-13~-16、APS1-18、APS1-20~-26 および APS1-28~-30
IL-22	APS1-1~-11、-13、-14、APS1-16~-22、APS1-24~-26 および APS1-28~-30
IL-32α	APS1-2、-4、-14、-18、-19、-21、-23、-24、-26、-28、-30
IL-32γ	APS1-2、-28
NY-ESO-1	APS1-3、-4、-7、-8、APS1-17~-19、-21、-23、-25、-30
SNCAIP	APS1-5
TGF-β1	APS1-22
TMEFF2	APS1-5
TMEFF2 ペプチド	APS1-6
TMEFF1	APS1-5

10

20

30

40

【表 29-2】

SPG20	APS1-2~-4, -9, -14, -18, -29, -30
スクレロスチン	APS1-3, -9, -12, -13
CXCL16	APS1-9
IL-24 (R&D)	APS1-3, -13
IFN α 6	APS1-5, -16
IFN α 8	APS1-1, APS1-3~-10, APS1-13~-30
IFNA14	APS1-5, -9
TROY	APS1-5

10

【0374】

【表 30】

表30：ELISAアッセイによって示された、APS2患者における指示標的に結合する自己抗体の存在。

表は、(1:500希釈の試験血清で0.5超のOD値を示す)患者の血清によって認識される抗原を示す。抗原を炭酸-重炭酸塩緩衝液に0.75 μ g/mlで溶解し、二次抗体を0.5%BSA/PBSで1:10000希釈した。抗原IFNA14およびPSORをPBSに1 μ g/mlで溶解し、二次抗体を0.5%BSA/PBSで1:4000希釈した。

20

標的	血清反応性を有する患者
CCL4	APS2-217
CCL28	APS2-224
IL-1F6	APS2-227
IL-1F9	APS2-221, 224
IL-7	APS2-221, 224, 225
IL-11	APS2-218
IL-23	APS2-224
IL-24	APS2-216, 217, 224
IL-27	APS2-216, 224
IL-28A	APS2-218, 220, 230
IL-29	APS2-218, 220, 230
IL-32 α	APS2-218, 222, 223, 231
IL-32 γ	APS2-218
TMEFF-2	APS2-225
IFNA14	APS2-216, 228
PSOR1	APS2-228

30

40

【0375】

【表 3 1】

表 3 1 : E L I S A アッセイによって示された、I P E X ヘルシンキ患者における指示標的に結合する自己抗体の存在およびその測定 O D 値。

抗原を炭酸－重炭酸塩緩衝液に 0 , 7 5 u g / m l で溶解した。二次抗体を 0 , 5 % B S A / P B S で 1 : 1 0 0 0 0 希釈した。

標的	1 : 5 0 0 血清希釈での O D 値
I L - 3 2 α	2 . 6 8
I L - 3 2 γ	1 . 3 6
I F N A 4	2 . 0 6
I F N A 5	2 , 7 1
N Y - E S O - 1	1 . 1 5
S N C A I P	1 . 7 0
T M E F F - 1	1 . 5 2
T M E F F - 2	2 , 9 5
C X C L 1 6	1 . 2 6

10

【 0 3 7 6 】

参考文献

1. Peterson P, Org T, Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:948-57. 20
2. Mathis D, Benoist C. Aire. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:287-312.
3. Nagamine K, Peterson P, Scott HS et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 1997; 17:393-8.
4. Finnish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 1997; 17:399-403.
5. Husebye ES, Perheentupa J, Rautemaa R et al. Clinical manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *J Intern Med* 2009; 265:514-29.
6. Kisand K, Lilic D, Casanova JL et al. Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: clinical and pathogenetic implications. *Eur J Immunol* 2011; 41:1517-27. 30
7. Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L et al. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 2002; 11:397-409.
8. Kuroda N, Mitani T, Takeda N et al. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* 2005; 174:1862-70.
9. Jiang W, Anderson MS, Bronson R et al. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J Exp Med* 2005; 202:805-15. 40
10. Pontynen N, Miettinen A, Arstila TP et al. Aire deficient mice do not develop the same profile of tissue-specific autoantibodies as APECED patients. *J Autoimmun* 2006; 27:96-104.
11. Kekalainen E, Miettinen A, Arstila TP. Does the deficiency of Aire in mice really resemble human APECED? *Nat Rev Immunol* 2007; 7:1.
12. Hubert FX, Kinkel SA, Crewther PE et al. Aire-deficient C57BL/6 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only a mild autoimmune phenotype. *J Immunol* 2009; 182:3902-18.
13. Meager A, Visvalingam K, Peterson P et al. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med* 2006; 3:e289. 50

14. Toth B, Wolff AS, Halasz Z et al. Novel sequence variation of AIRE and detection of interferon-omega antibodies in early infancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72:641-7.
15. Meloni A, Furcas M, Cetani F et al. Autoantibodies against type I interferons as an additional diagnostic criterion for autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:4389-97.
16. Kisand K, Link M, Wolff AS et al. Interferon autoantibodies associated with AIRE deficiency decrease the expression of IFN-stimulated genes. *Blood* 2008; 112:2657-66.
17. Kisand K, Peterson P. Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy: known and novel aspects of the syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1246:77-91. 10
18. Meager A, Vincent A, Newsom-Davis J et al. Spontaneous neutralising antibodies to interferon--alpha and interleukin-12 in thymoma-associated autoimmune disease. *Lancet* 1997; 350:1596-7.
19. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 2010; 207:299-308.
20. Burbelo PD, Browne SK, Sampaio EP et al. Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia. *Blood* 2010; 116:4848-58. 20
21. Holbro A, Jauch A, Lardinois D et al. High prevalence of infections and autoimmunity in patients with thymoma. *Hum Immunol*; 73:287-90.
22. Puel A, Doffinger R, Natividad A et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 2010; 207:291-7.
23. Oftedal BE, Kampe O, Meager A et al. Measuring autoantibodies against IL-17F and IL-22 in autoimmune polyendocrine syndrome type I by radioligand binding assay using fusion proteins. *Scand J Immunol* 2011; 74:327-33.
24. Wolk K, Witte E, Witte K et al. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 2010; 32:17-31. 30
25. Puel A, Picard C, Cypowyj S et al. Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: a role for IL-17 cytokines? *Curr Opin Immunol* 2010; 22:467-74.
26. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202:8-32.
27. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* 2010; 120:1762-73.
28. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* 2010; 12:518-27. 40
29. Wolff AS, Erichsen MM, Meager A et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 in Norway: phenotypic variation, autoantibodies, and novel mutations in the autoimmune regulator gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:595-603.
30. Burbelo PD, Ching KH, Klimavicz CM et al. Antibody profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). *J Vis Exp* (2009); 32:1549.
31. Hassler S, Ramsey C, Karlsson MC et al. Aire-deficient mice develop hematopoietic irregularities and marginal zone B-cell lymphoma. *Blood* 2006; 108:1941-8.
32. Teesalu K, Agardh D, Panarina M et al. A modified ELISA for improved detection of autoantibodies against type I interferons. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 92:1549-55. 50

ction of IgA, IgG, and IgM anti-tissue transglutaminase antibodies in celiac disease. *Clin Chim Acta* 2009; 403:37-41.

33. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797-801.

34. Kisand KE, Kisand KV, Karvonen AL et al. Antibodies to pyruvate dehydrogenase in primary biliary cirrhosis: correlation with histology. *Apmis* 1998; 106:884-92.

35. Brozzetti A, Marzotti S, La Torre D et al. Autoantibody responses in autoimmune ovarian insufficiency and in Addison's disease are IgG1 dominated and suggest a predominant, but not exclusive, Th1 type of response. *Eur J Endocrinol* 2010; 163:309-17. 10

36. Boe AS, Bredholt G, Knappskog PM et al. Autoantibodies against 21-hydroxylase and side-chain cleavage enzyme in autoimmune Addison's disease are mainly immunoglobulin G1. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:49-56.

37. Aalberse R. The role of IgG antibodies in allergy and immunotherapy. *Allergy* 2011; 66 Suppl 95:28-30.

38. van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007; 317:1554-7.

39. Mobs C, Slotosch C, Loffler H et al. Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147:171-8. 20

40. Muller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:343-7.

41. Aoki V, Sousa JX, Jr., Diaz LA. Pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *Dermatol Clin* 2011; 29:413-8, viii.

42. Zen Y, Nakanuma Y. Pathogenesis of IgG4-related disease. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23:114-8.

43. Wang X, Laan M, Bichele R et al. Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immun* 2011; 3:doi: 10.3389/fimmu.2012.00019. 30

44. Vincent AC, McConville J, Newsom-Davis J. Is "seronegative" MG explained by autoantibodies to MuSK? *Neurology* 2005; 64:399; author reply

45. Grant GA. Synthetic peptides for production of antibodies that recognize intact proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 2002; Chapter 18:Unit 18 3.

46. Quadt-Akabayov SR, Chill JH, Levy R et al. Determination of the human type I interferon receptor binding site on human interferon-alpha2 by cross saturation and an NMR-based model of the complex. *Protein Sci* 2006; 15:2656-68.

47. Bleicher L, de Moura PR, Watanabe L et al. Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS Lett* 2008; 582:2985-92. 40

48. Ahlgren KM, Moretti S, Lundgren BA et al. Increased IL-17A secretion in response to *Candida albicans* in autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and its animal model. *Eur J Immunol* 2011; 41:235-45.

49. Backes, C., Keller, A., Kuentzer, J., Kneissl, B., Comtesse, N., Elnakady, Y.A., Muller, R., Meese, E., and Lenhof, H.P. GeneTrail - advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acid Research, Web Server Issue* 2007.

50. Keller, A., Backes, C., Al-Awadhi, M., Gerasch, A., Kuentzer, J., Kohlbacher, O., Kaufmann, M., and Lenhof, H.P. GeneTrailExpress: a web-based pipeline for the statistical evaluation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2008 50

, 9:552

51. Keller, A., Backes, C., and Lenhof, H.P. Computation of significance scores of unweighted Gene Set Enrichment Analyses. BMC Bioinformatics, 2007
52. Harris H.F.: On the rapid conversion of hematoxylin into haematein in staining reactions. Journal of Applied Microscopic Laboratory Methods 1900; 3:777.
53. Mallory F.B.: Pathological technique. Philadelphia, Saunders, 1938.
54. Aranda, B. et al. 2010. The IntAct molecular interaction database in 2010. Nucleic acids research 38: D525-D531.
55. Ashburner, M. et al. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature genetics 25: 25.
56. Cerami, E.G., Gross, B.E., Demir, E., Rodchenkov, I., Babur, O., Anwar, N., Schultz, N., Bader, G.D., and Sander, C. 2011. Pathway Commons, a web resource for biological pathway data. Nucleic acids research 39: D685-D690.
57. Flicek, P. et al. 2009. Ensembl's 10th year. Nucleic Acids Research.
58. Kelder, T., van Iersel, M.P., Hanspers, K., Kutmon, M., Conklin, B.R., Evelo, C.T., and Pico, A.R. 2012. WikiPathways: building research communities on biological pathways. Nucleic Acids Research 40: D1301-D1307.
59. Laakso, M., and Hautaniemi, S. 2010. Integrative platform to translate gene sets to networks. Bioinformatics 26: 1802-1803.
60. Zanzoni, A., Montecchi-Palazzi, L., Quondam, M., Ausiello, G., Helmer-Citterich, M., and Cesareni, G. 2002. MINT: a Molecular INTERaction database. FEBS letters 513: 135-140.

10

20

【図 1】

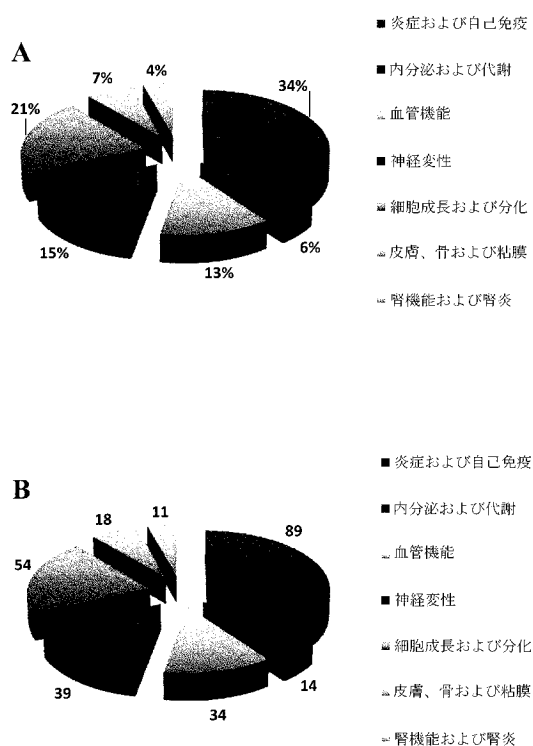


Fig.1

【図 2】

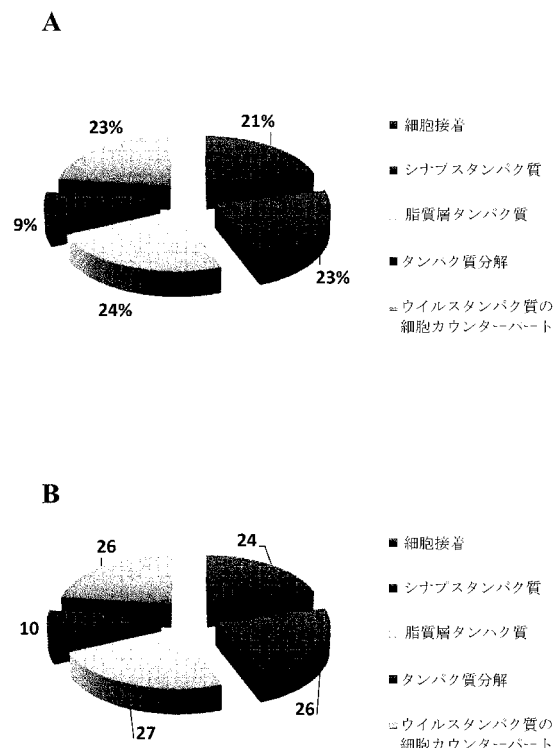


Fig.2

【図 3】

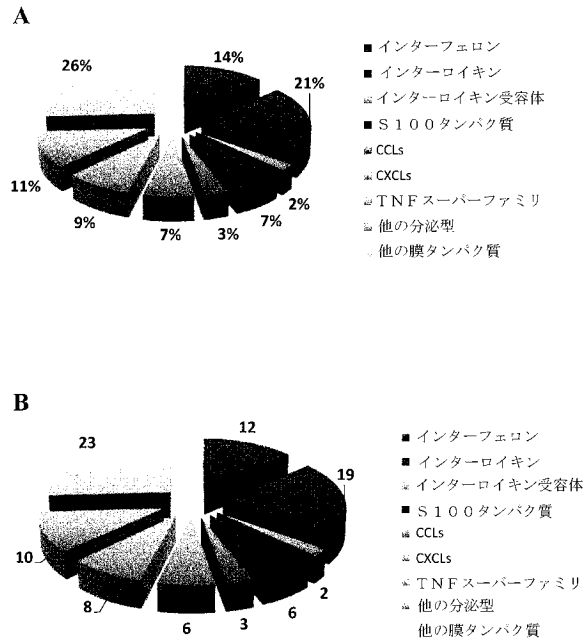


Fig.3

【図 4】

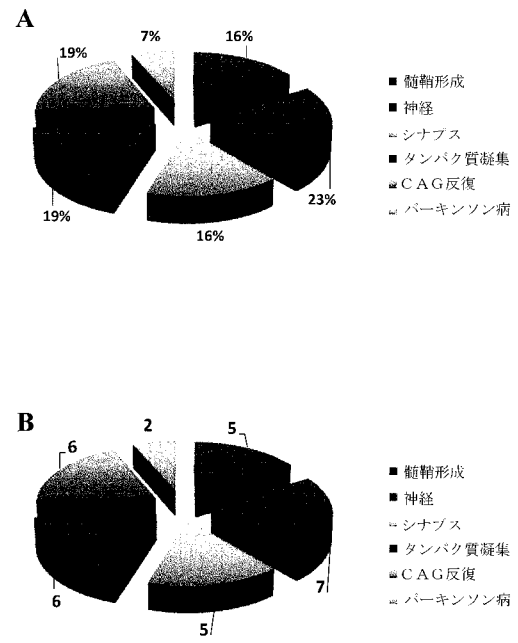


Fig.4

【図 5】

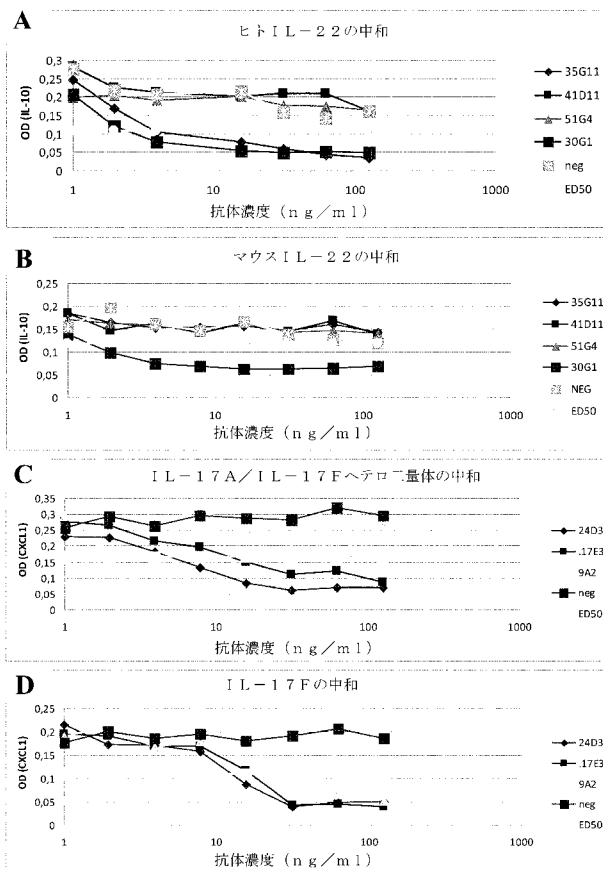


Fig.5

【図 6】

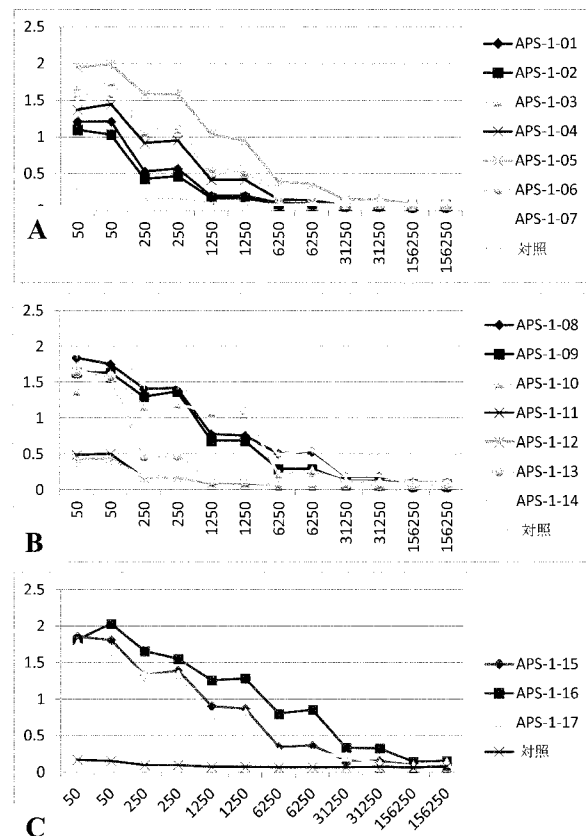
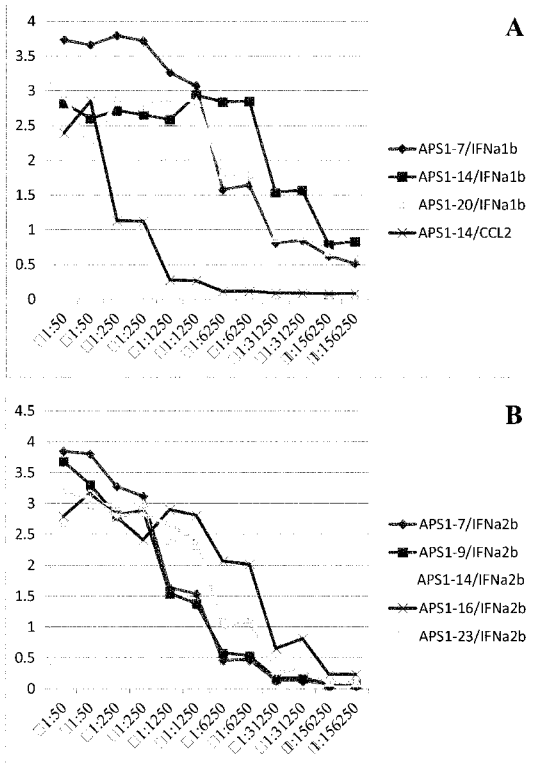
APS-1 患者における IFN- α 1 に対する抗体反応

Fig.6

【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

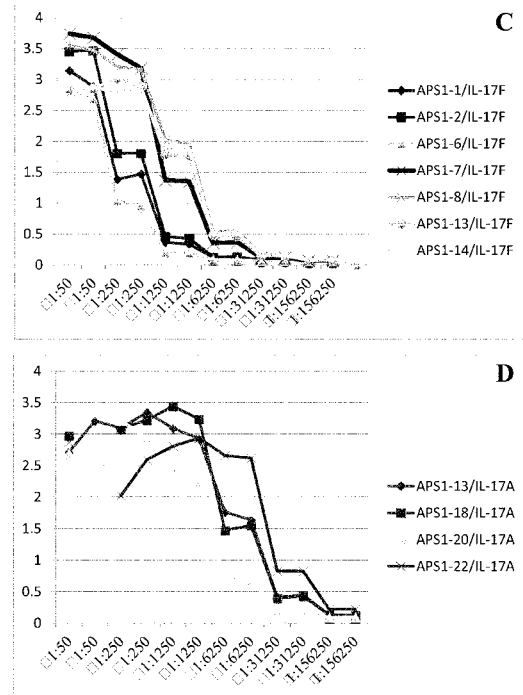
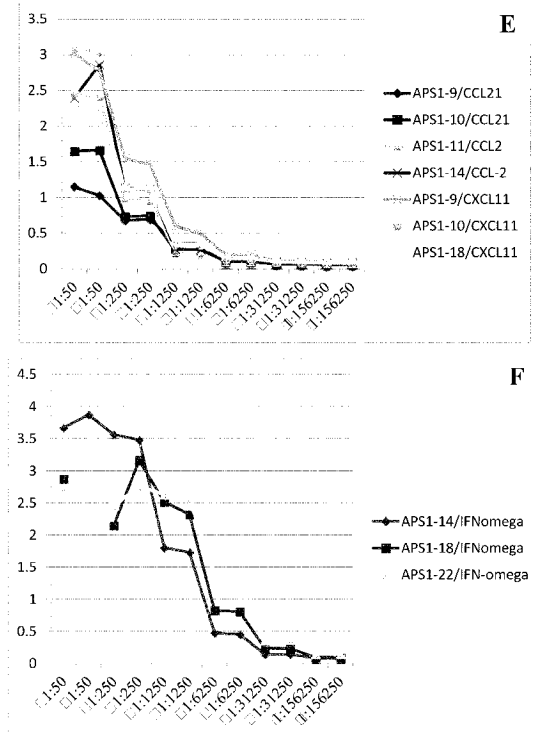


Fig.7 (続き)

Fig.7

【図 7 - 3】



【図 7 - 4】

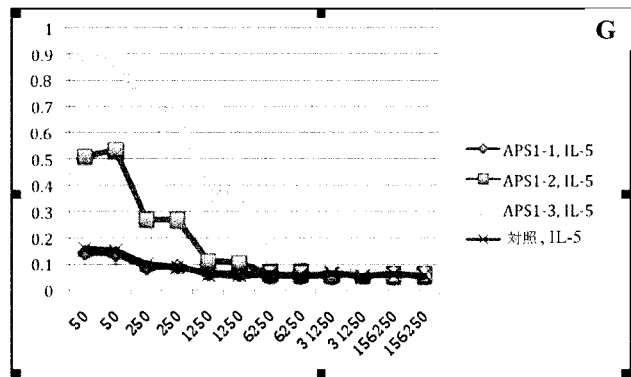


Fig.7 (続き)

Fig.7 (続き)

【図 8】

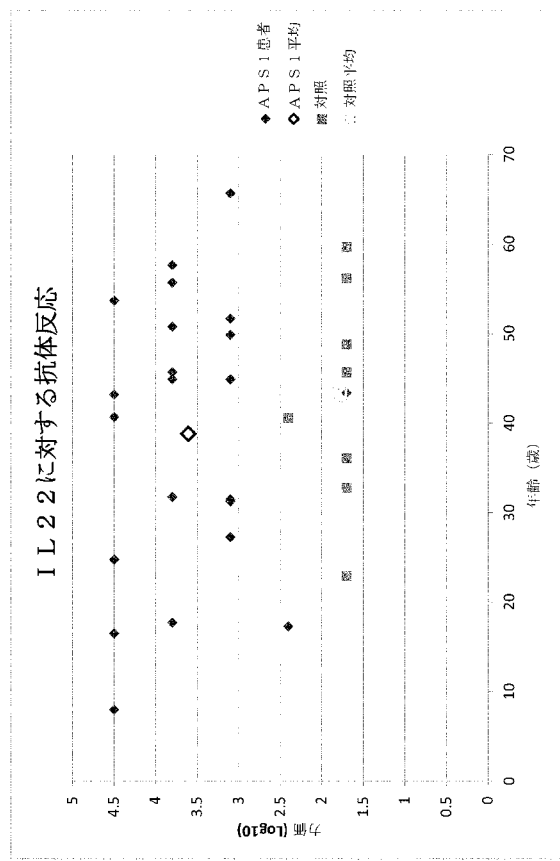


Fig.8

【図 9】

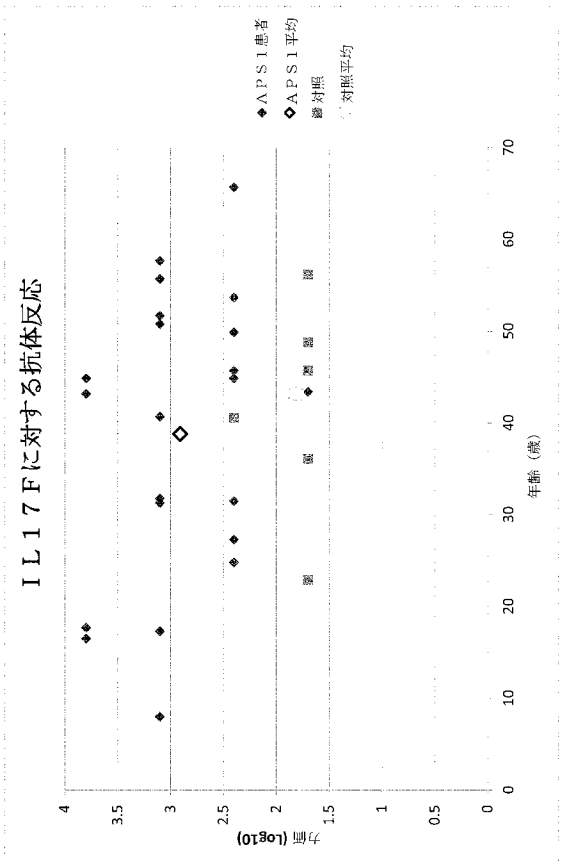


Fig.9

【図 10】

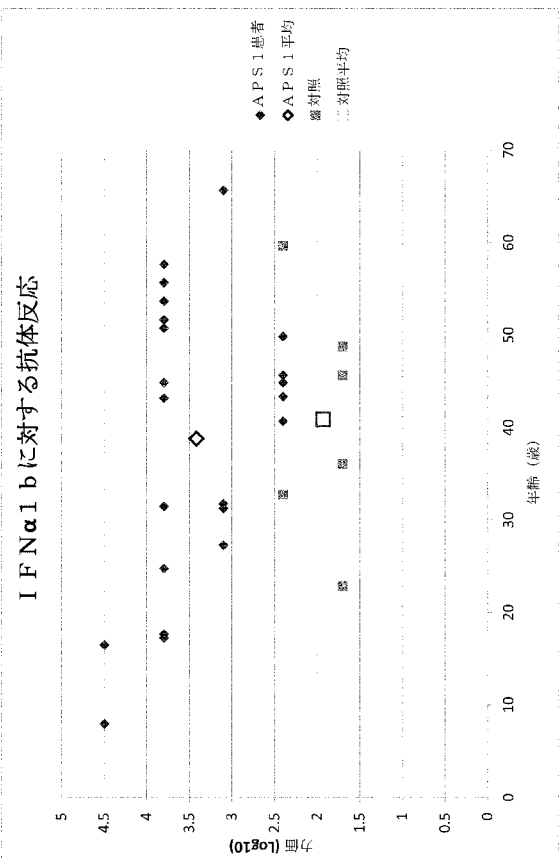


Fig.10

【図 11】

正常腺様組織に対するウェスタンブロット

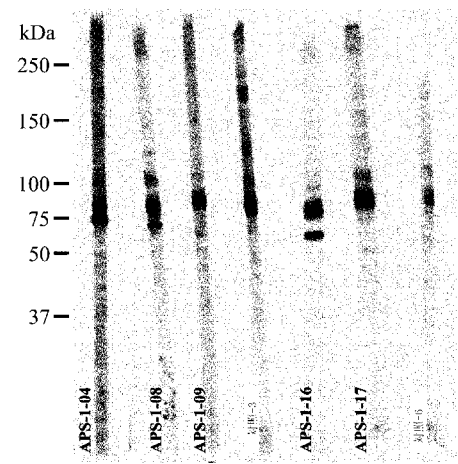


Fig.11

【図 12】

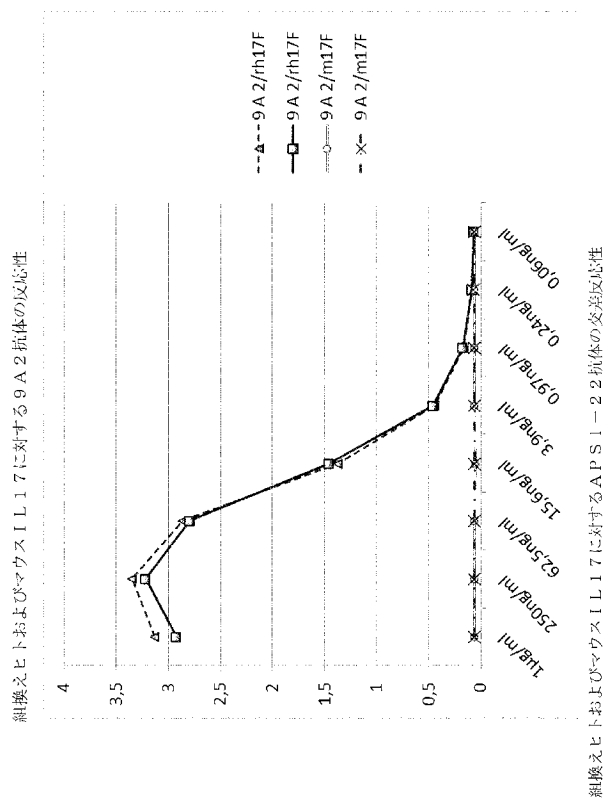


Fig.12

【図 13】

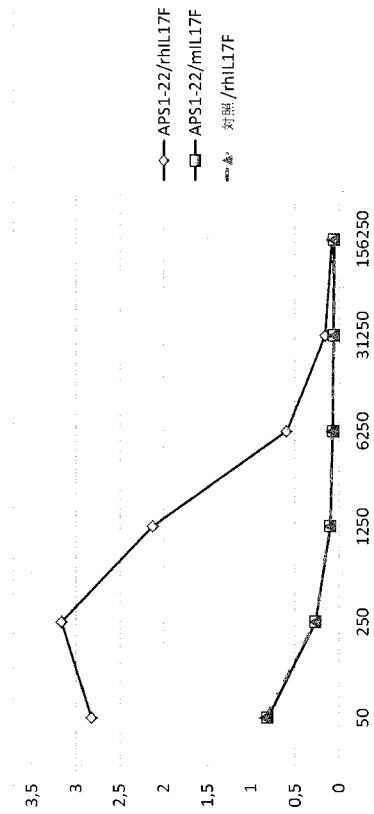


Fig.13

【図 14】

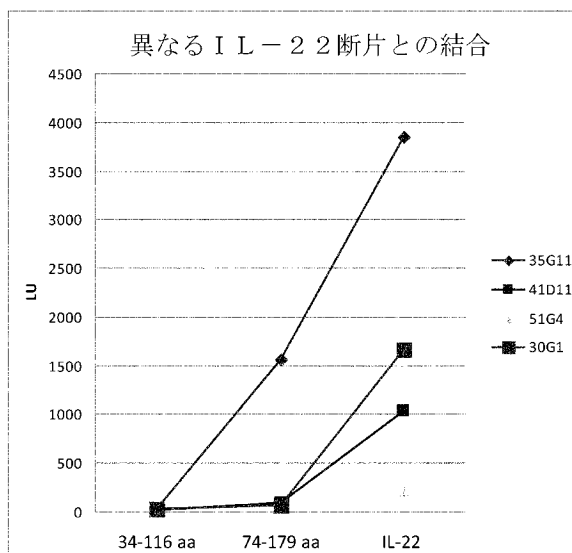


Fig.14

【図 15 - 1】

A 9A2 (可変重鎖配列 VH) - 配列番号 7

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYEMNWVRQAPGKLEWISYISVSGGFAEYADSVKG
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 RFTISRDDATKSLFLQMNRLRADDATVAVYCVREYVTGRNYYYPYMDVWGTGTVTVPSP

9A2 (可変カッパ鎖配列 VL) - 配列番号 9

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTTCRASQTISDYLNWYQKPGAPKLLIYASATLQF
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 GVPSTRFSGSGSGTDFVFTISSLSQSDDFATYYCQQTSSALTFFGGGKTKVEK

B**17E3 (可変重鎖配列 VH) - 配列番号 15**

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAFVAKPGASVRLSCKASGFSFTXYMHVWRQAPGQGLEWVGVIPTGGGTSSAQRFRD
 FR2-----CDR3-----FR4-----
 RVTLSRDTSTATVHLEVSRLCLEDTGIFVFCVRDSIYCKHGTCHRTVIDAFDIWQCGTAVTVSS

17E3 (可変カッパ鎖配列 VL) - 配列番号 17

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 DIQMTQSPSSI SASVGRVTTCRSSQDIKNDLAWYQQKPKAPERITYAASNLQS
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 GVPSTRFSGSGSGTFTSLTISGLQPEDFATYYCLOHNSYPLTFGGGKTKVEIK

C**24D3 (可変重鎖配列 VH) - 配列番号 23**

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVKLEESGGDLVQPGGSLRLSCVASGFTFTANMSVWRQAPGKLEWVGIRSNKDTGGRIDYAAPVRG
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 RFAISRDDSKATLFLQMNLSKTEDTAVYFCTTFNYFVLTGDIHVDYWGQGTVVVVS

24D3 (可変ラムダ鎖配列 VL) - 配列番号 25

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 SYELTQPPSVSVSPGETARIPCSGETLPKLLVYVYQQKPGAPVLMYIKDSERPS
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 RISERFSGSGSGTMASTISGVQAEDEADYYCQTSDDSGVVVFGGKTLTVL

Fig. 15

【図 15-2】

D 30G1 (可變重鎖配列VH) — 配列番号31

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYAMSIVRQAPGKGLEWVSTITSSGGATYHADSVKG
FR3-----CDR3-----FR4-----
RLTISRDNKNTLYLEMLNSLRVEDTAVYYCAKDWGRTTVYAVYKDDTWGGQGLTVTVSS

30G1 (可変カップ鎖配列VL) - 配列番号33

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
EIVMTQSPAILSVSPPGERATLSCRASQSVSNYLAWFQQKPGQAPELLIYDI¹SKRAT
FR3-----CDR3-----FR4-----
GTPARFSGSGSGTDFLTLTISSELPEDFAVYFCQ²QRSDWVQYTFGQGTKLEIK

E 35G11 (可変重鎖配列VH) - 配列番号39

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGSELRRPGASVNI¹CKASGYGFTNTYAMNWVRQAPGQGPEWGWINTDITGDPITYAQGFTG
FR3-----CDR3-----FR4-----
RFAFFLDTSASTAFLQITRLTGEDTAVYFCARTRNWNGVYHYSGLDVWGQGTITVTVSS

35G11 (可変ラムダ鎖配列VL) - 配列番号41

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QSVLTQPPSASGTPGQTVTISCSGSSPNLGDNYVYWHQVPGTAPKLLIFRNTQRP
FR3-----CDR3-----FR4-----
GVTDRFSGSKYGTSAISDLRSDDEGDFYCASWDDRLRLVFGGGTKLTVL

F 4 1 D 1 1 (可變重鎖配列VH) — 配列番号 4 7

FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----
 QVQLHESGPGLVKPSSETLSVTCSLSGGS1SSSSHLWAWIQPPEKGLEYIGRIHYRGSVSYNPSLKS
 FR3-----CDR3---FR4-----
 RAAISVDATAKNQFSLTSLSAVTAADTSFYFCARLDMAIDKWKQGTLLIVSS

41D11 (可変ラムダ鎖配列VL) - 配列番号49

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QPVLTSPPSASASLGASIKLTCTLLSGHSNYDI~~A~~HWQQSGKGKPRFLMRVNNGGSHNKGK
FR3-----CDR3-----FR4-----
GIPDRFGSSSSGAERYLTISLQSEAD~~E~~AYYCQ~~T~~WGTGTHVFGTGKVTVL

【例 15-3】

G 5 1 G 4 (可變重鎖配列VH) — 配列番号 5 5

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSYKFKALYDIHWVRCAFGQGLEWMGWINAANGCTEYSQKFEQ
FR3-----CDR3-----FR4-----
RVTITRDTSAITVYMEINLSLYGDTAVYYCAREGLYNWFDPMWGQGLTVTVSS

51G4 (可変ラムダ鎖配列VL) - 配列番号57

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRIYANWYQQKFGQAPVLVIYGKSNRPS
FR3-----CDR3-----FR4-----
GIPDRFSASSSGNTASLTITGAQAEADYYCNSRDSSEKHPVPVFGGGTKLTVL

Fig. 15 (続き)

Fig. 15 (続き)

【図 16】

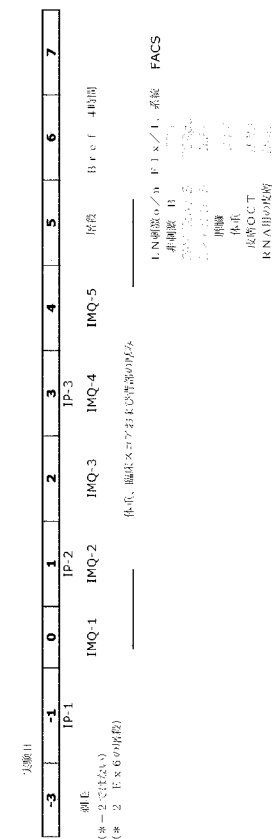
	濃度	容量/腹腔内	量 数/片	合計	合計
ヒト1g	1mg/mL	200ul	200ug	7x3x200ug	4.2mg
aIL-22	1mg/mL	200ul	200ug	7x3x200ug	4.2mg

3

MY #	短記	群
1	IgG+Vas	A
2	IgG+Vas	A
3	IgG+Vas	A
7	IgG+IMQ	B
8	IgG+IMQ	B
9	IgG+IMQ	B
10	IgG+IMQ	B
4	aIL22+Vas	C
5	aIL22+Vas	C
6	aIL22+Vas	C
11	aIL22+IMQ	D
12	aIL22+IMQ	D
13	aIL22+IMQ	D
14	aIL22+IMQ	D

A

Fig. 16



【図 17】

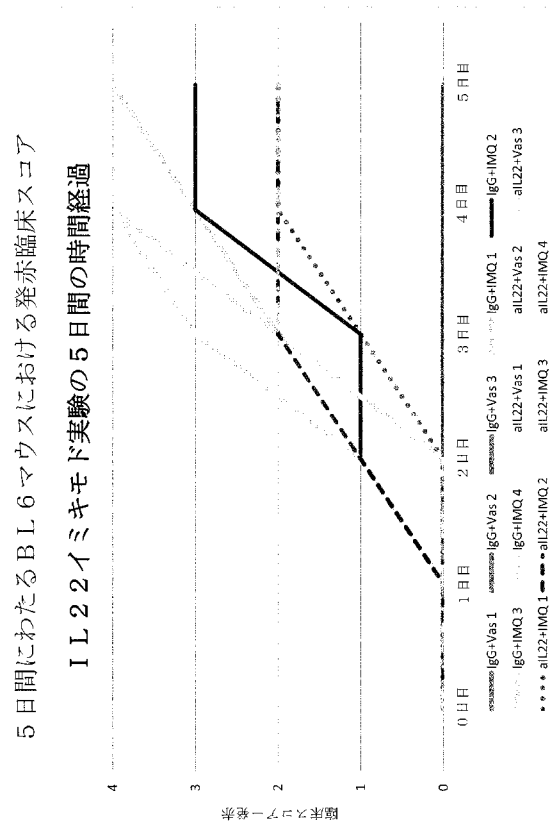


Fig. 17

【図 18】

5 日間にわたる B L 6 マウスにおける硬度臨床スコア

I L 2 2 イミキモド実験の 5 日間の時間経過

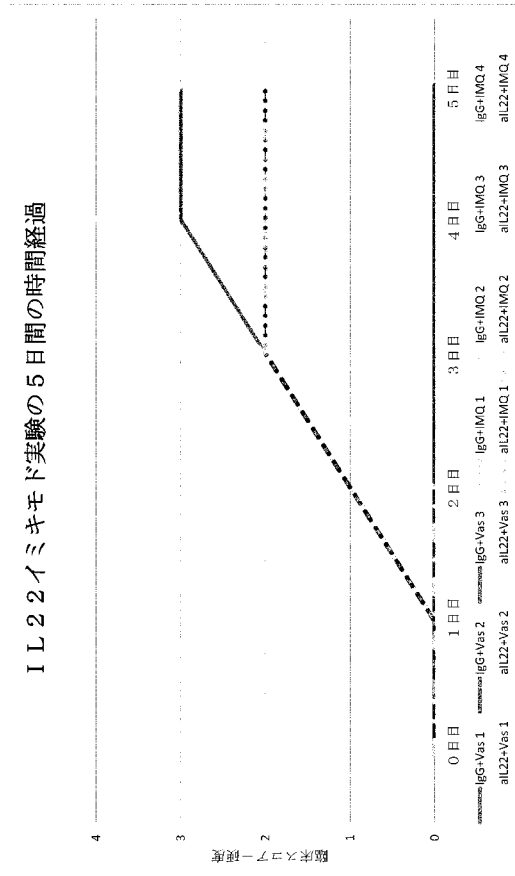


Fig. 18

【図 20】

5 日間にわたる B L 6 マウスにおける皮膚厚み臨床測定結果

抗 I L - 2 2 イミキモド実験 - 皮膚厚みグラフ

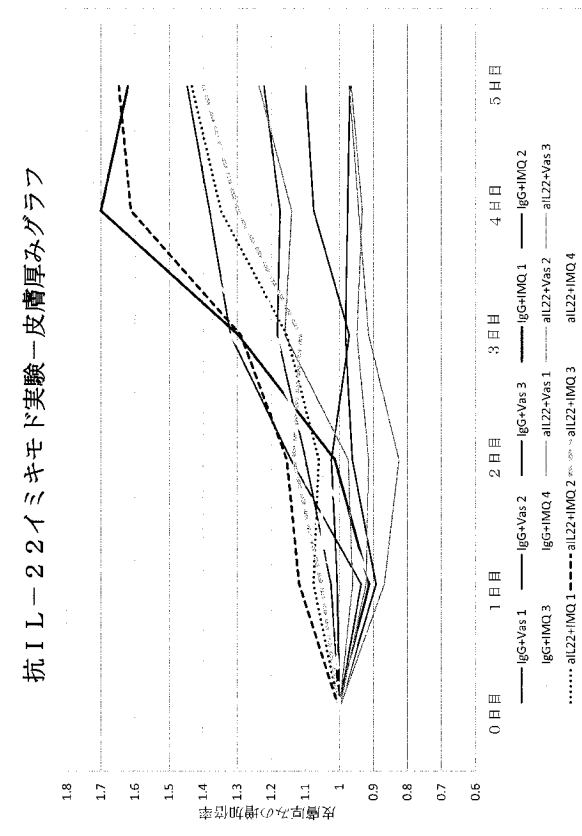


Fig. 20

【図 19】

5 日間にわたる B L 6 マウスにおける累計臨床スコア (発赤 + 硬度 + 鱗屑) (合計して 0 ~ 4 の尺度でスコア化した)

I L 2 2 イミキモド実験の 5 日間の時間経過

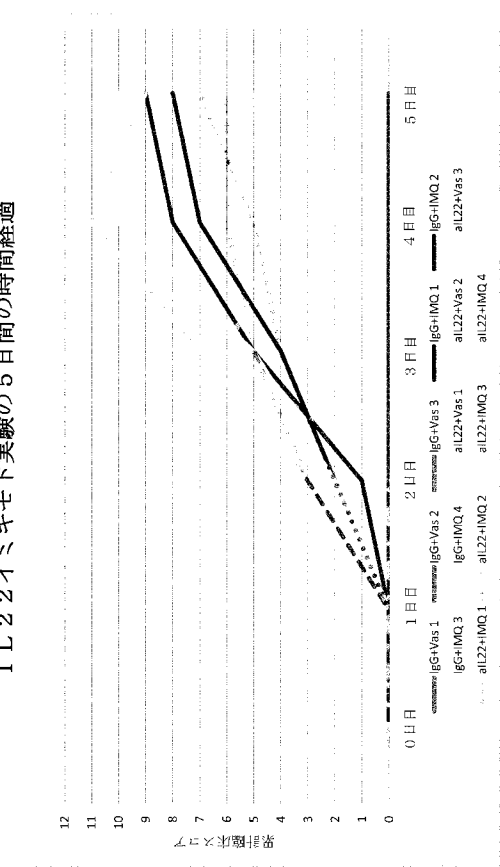


Fig. 19

【図 21】

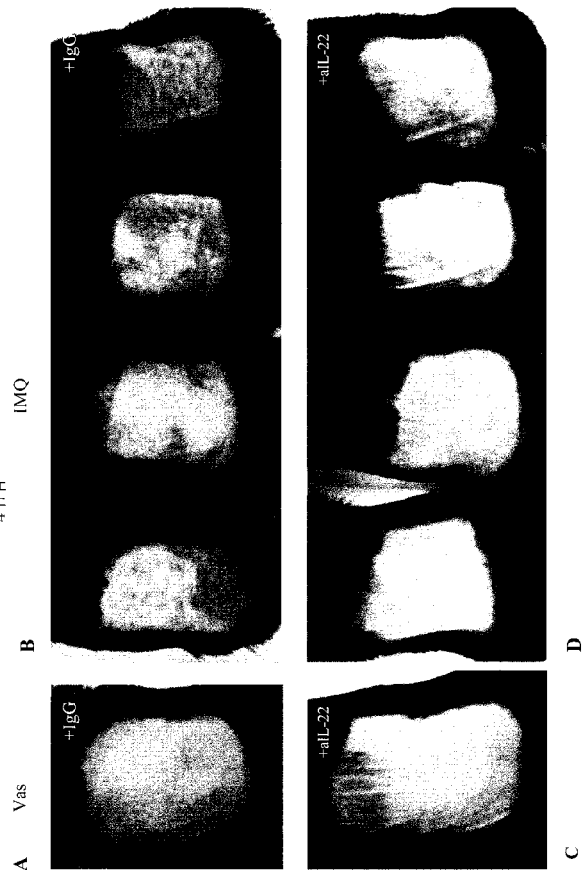


Fig. 21

【図 22】

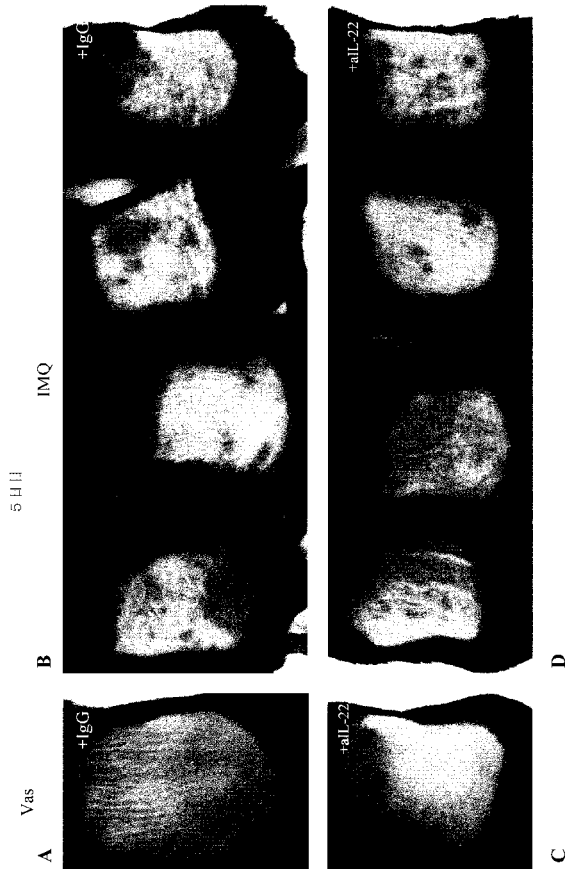


Fig. 22

【図 24】

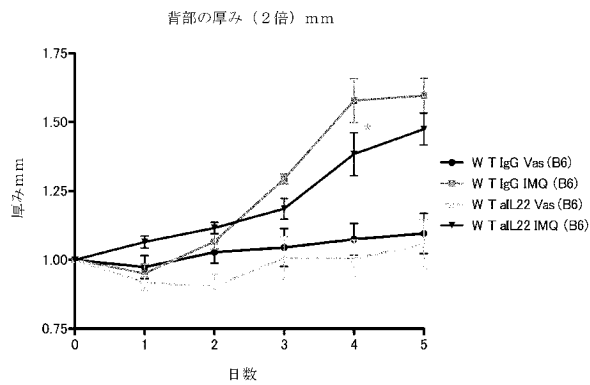


Fig. 24

【図 23】

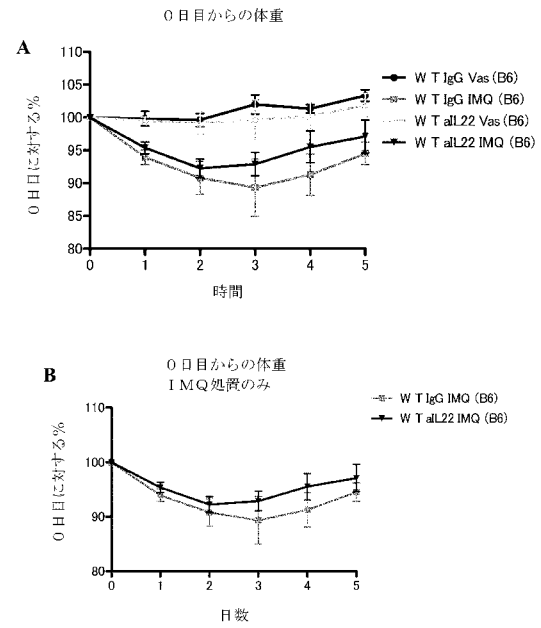


Fig. 23

【図 25】

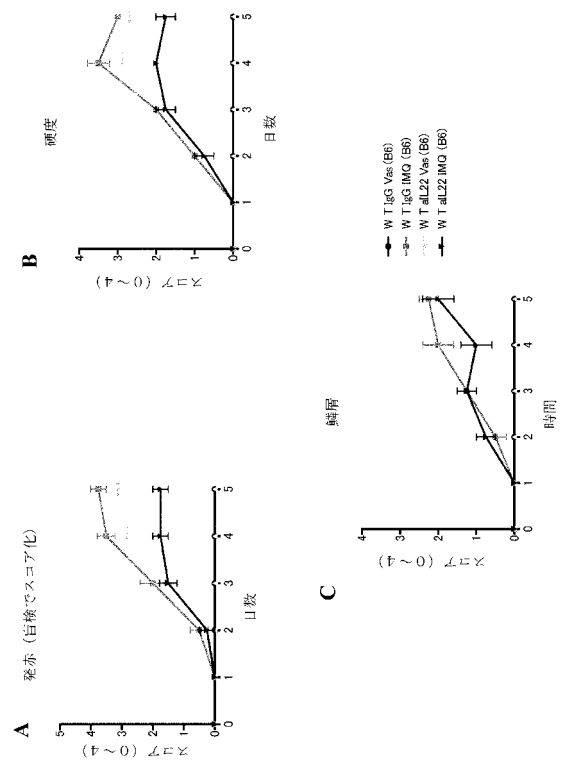


Fig. 25

【図 26】

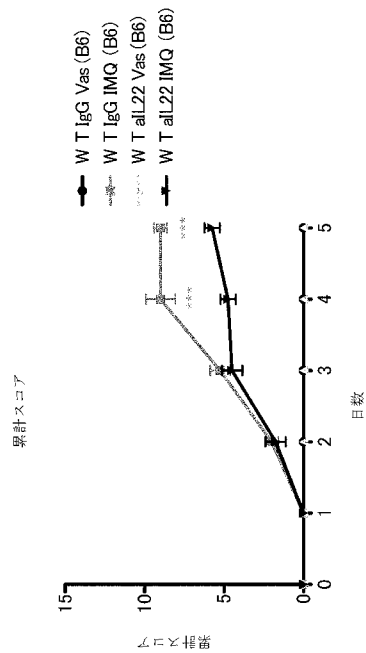


Fig. 26

【図 27】

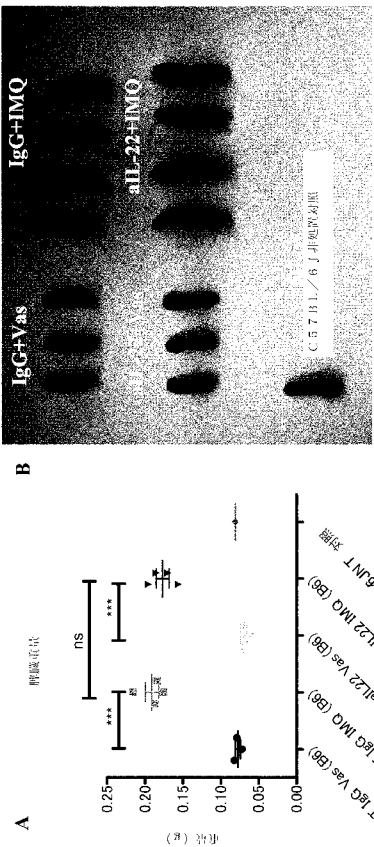


Fig. 27

【図 28】

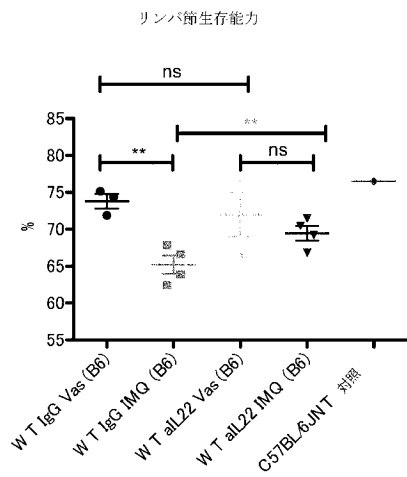


Fig. 28

【図 29】

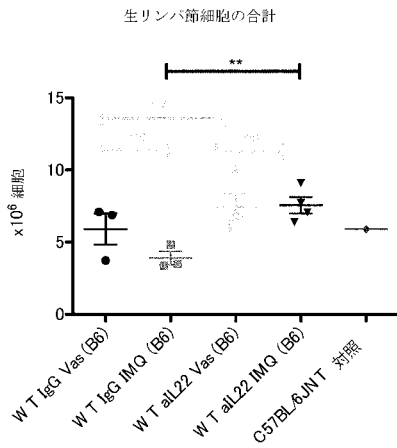


Fig. 29

【図 30】

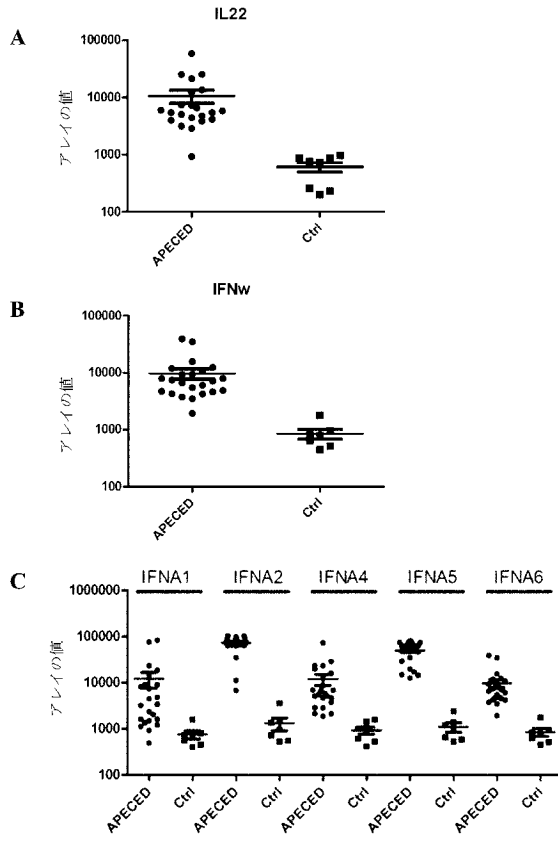


Fig. 30

【図 32】

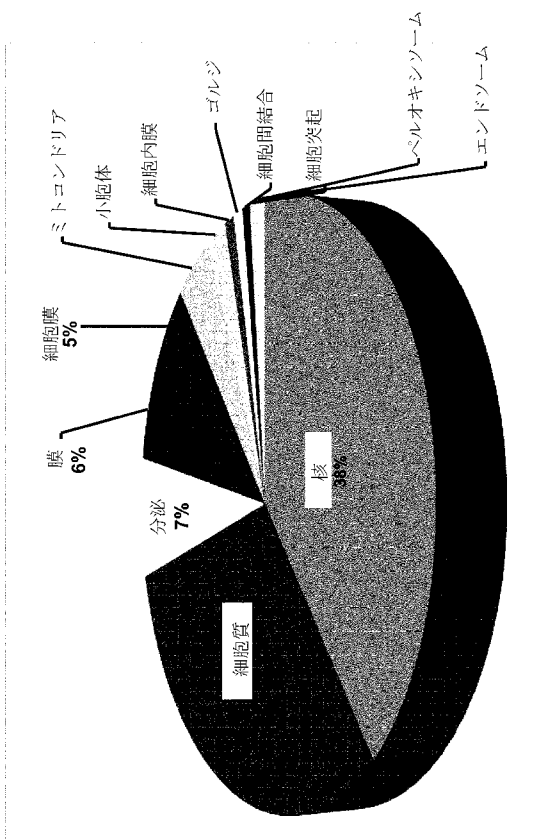


Fig. 32

【図 31】

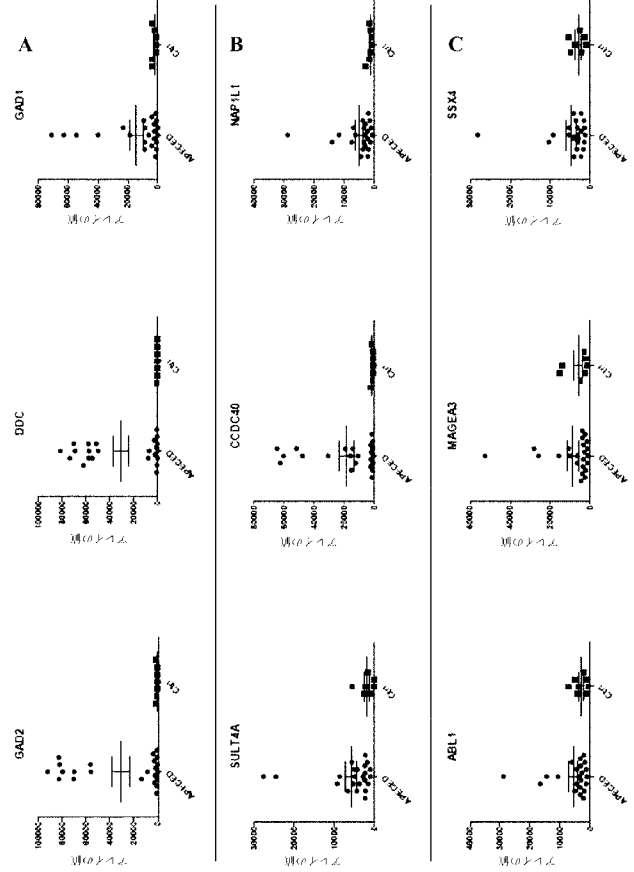


Fig. 31

【図 33】

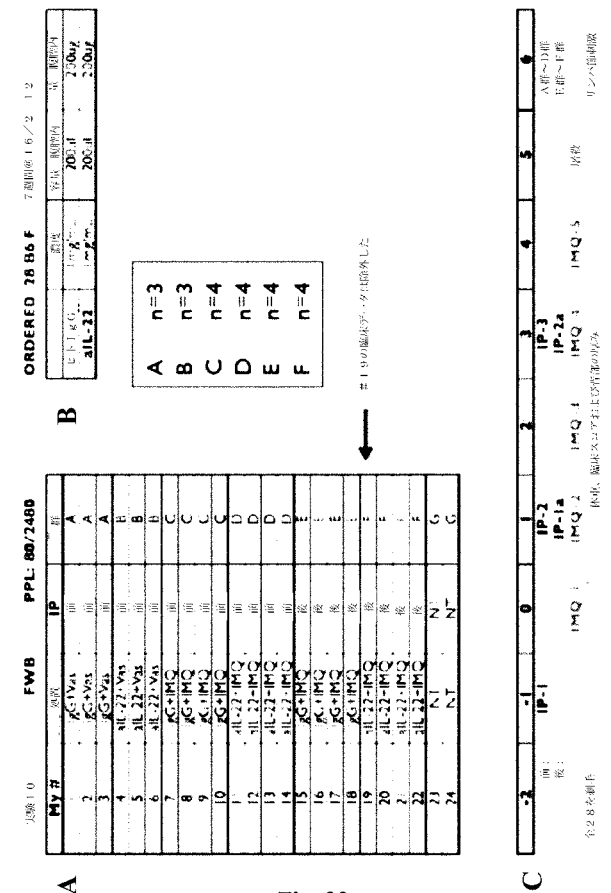


Fig. 33

【図 38-1】

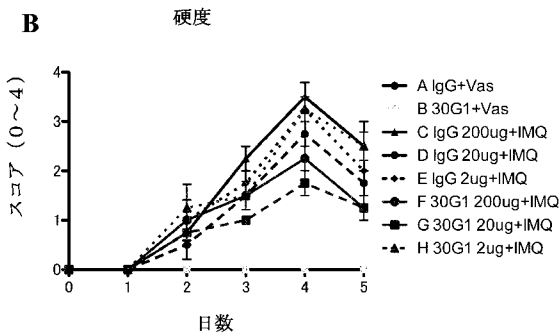
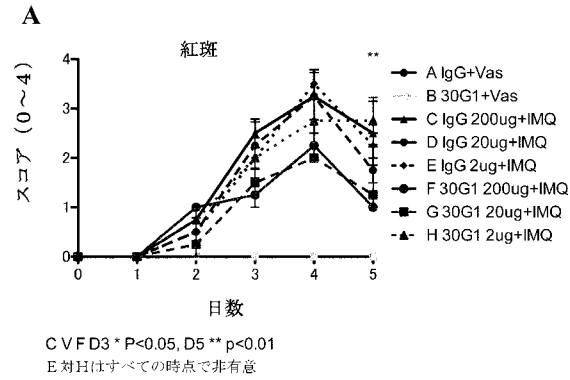


Fig. 38

【図 39-1】

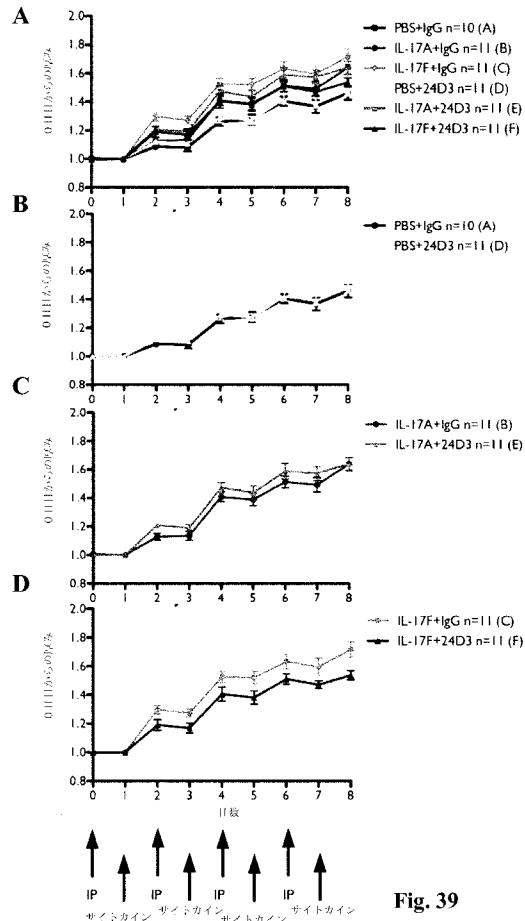


Fig. 39

【図 38-2】

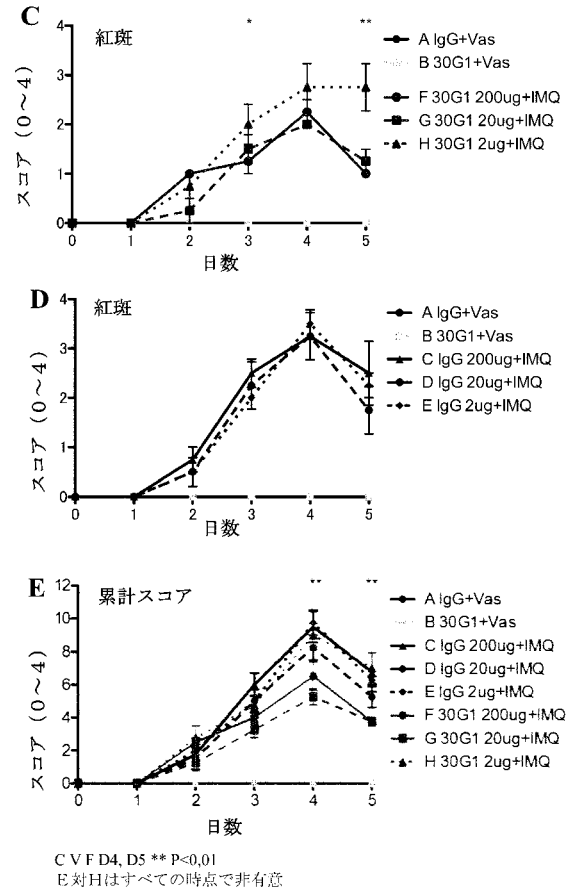


Fig. 38 (続き)

【図 39-2】

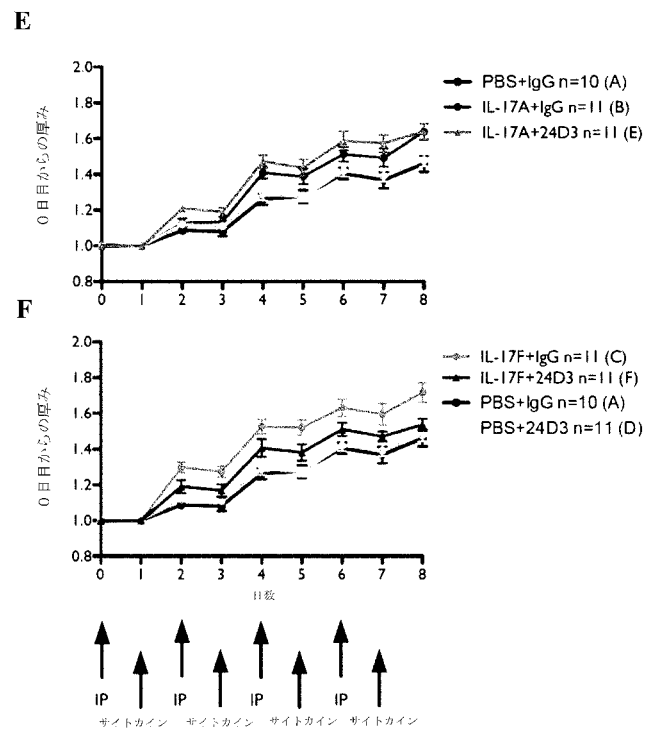
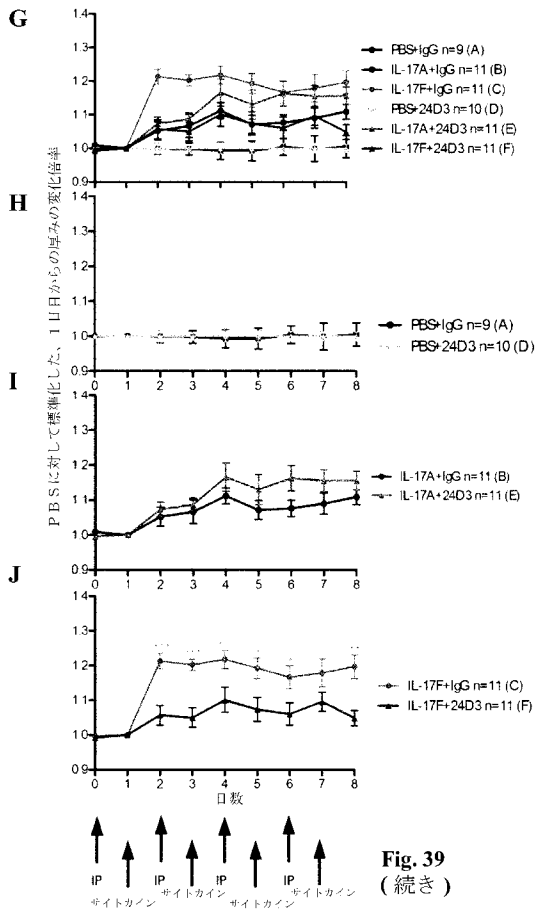


Fig. 39 (続き)

【図 39-3】

Fig. 39
(続 き)

【図 40】

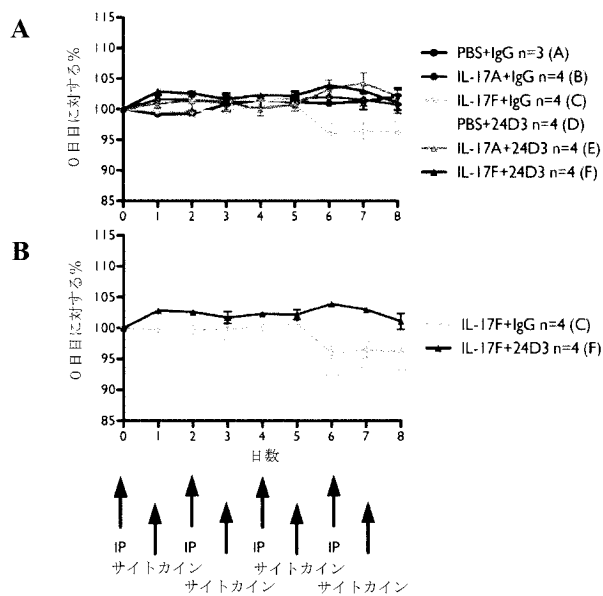


Fig. 40

【図 39-4】

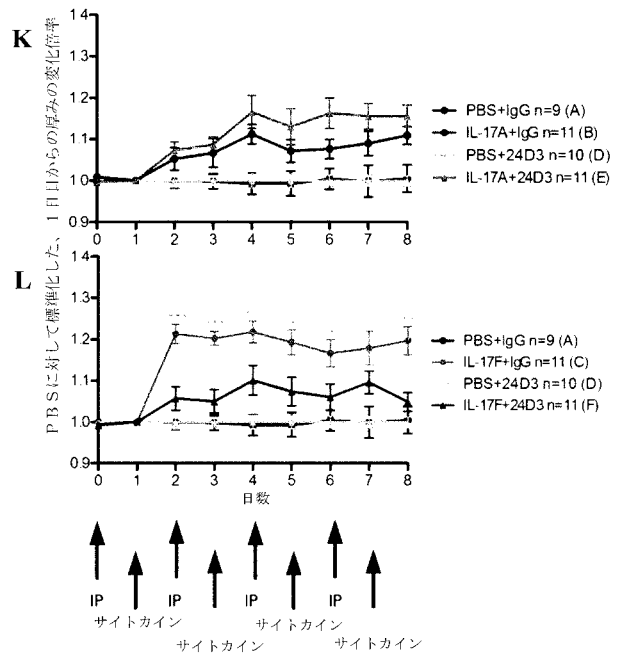


Fig. 39 (続 き)

【図 41】

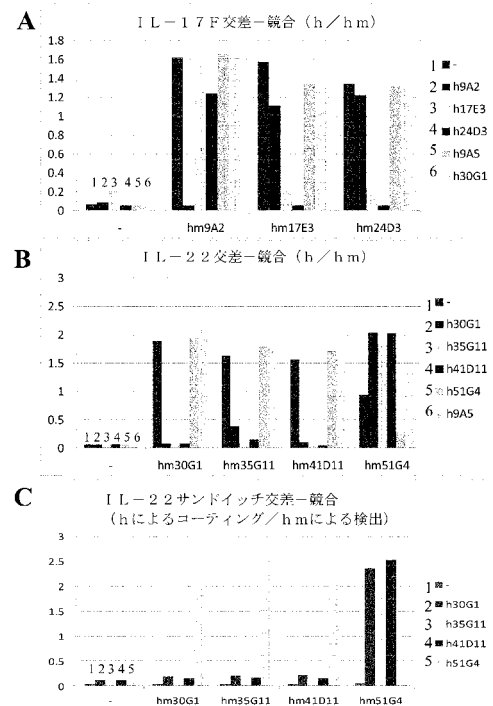


Fig. 41

【図 4 2】

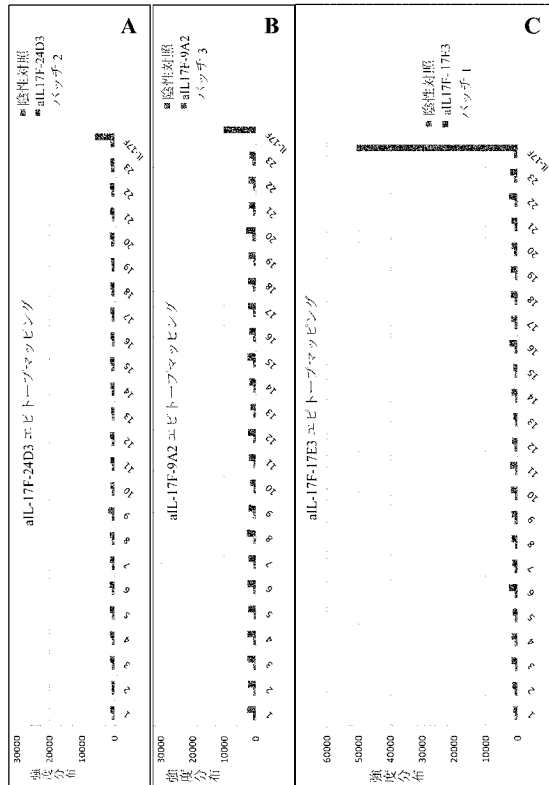


Fig. 42

【図 4 3】

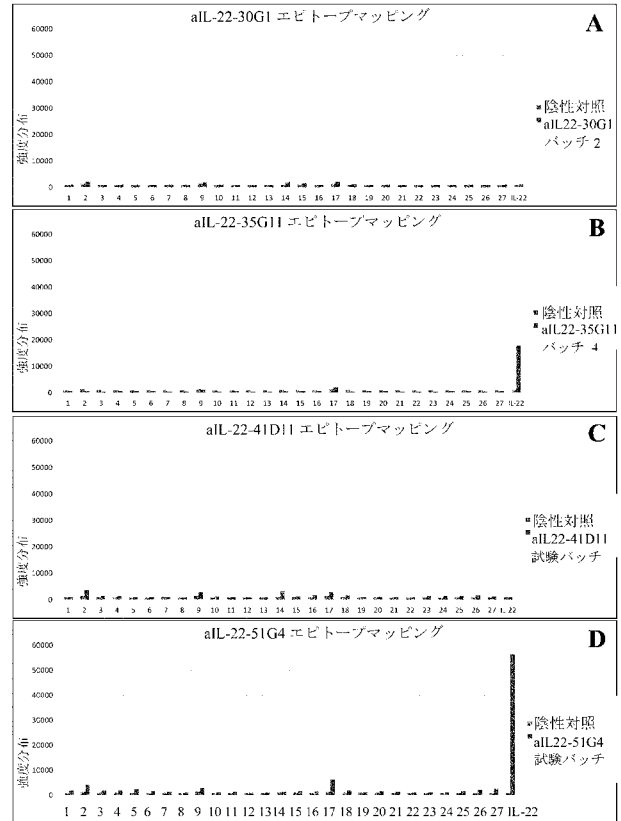


Fig. 43

【図 4 4】

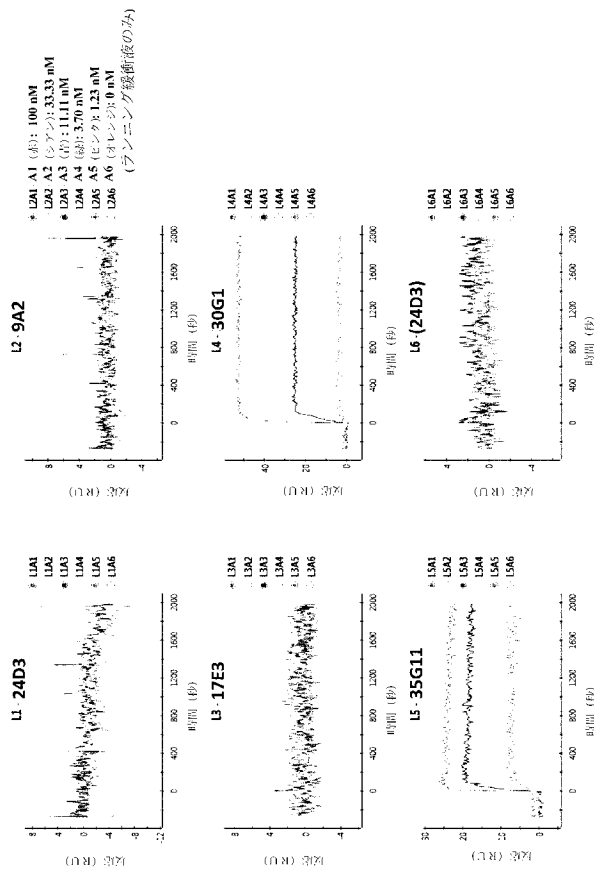


Fig. 44

【図 4 5】

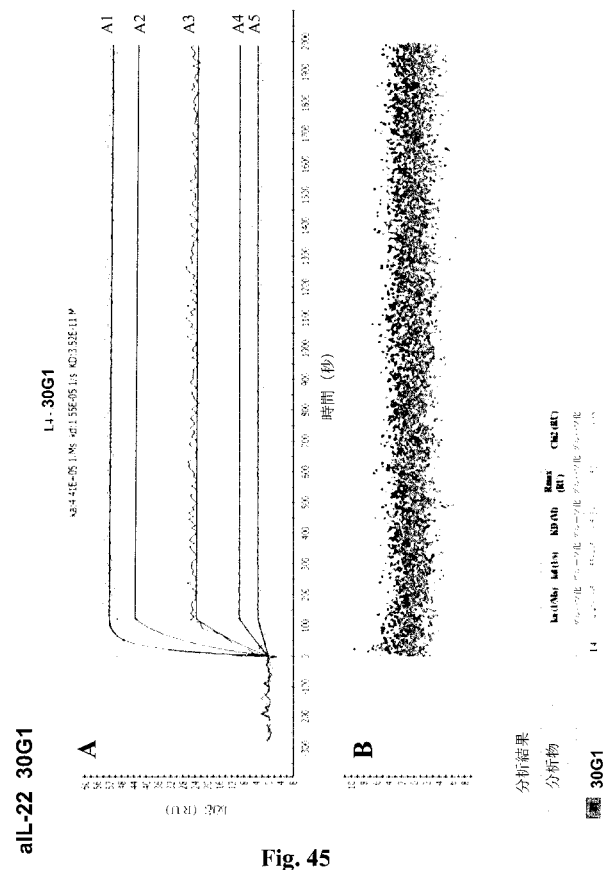


Fig. 45

【図 46】

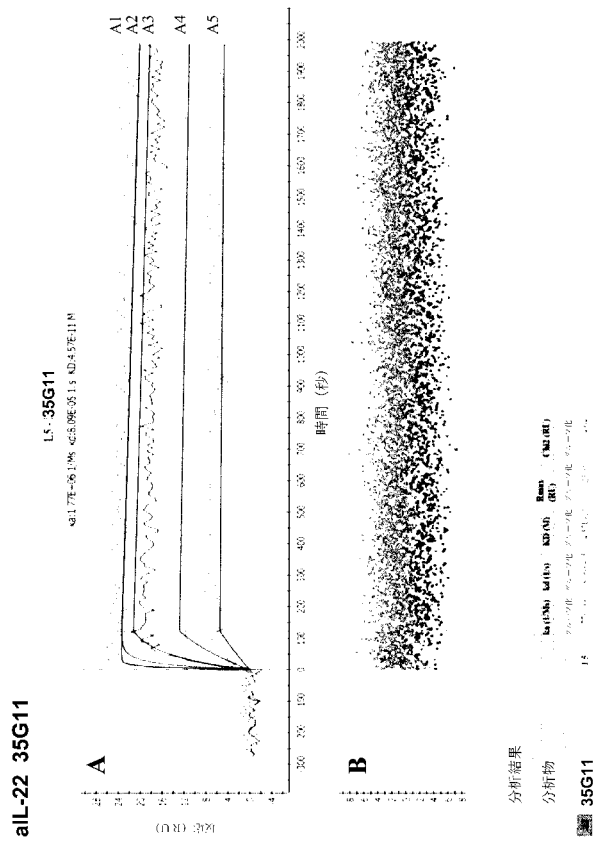


Fig. 46

【図 48】

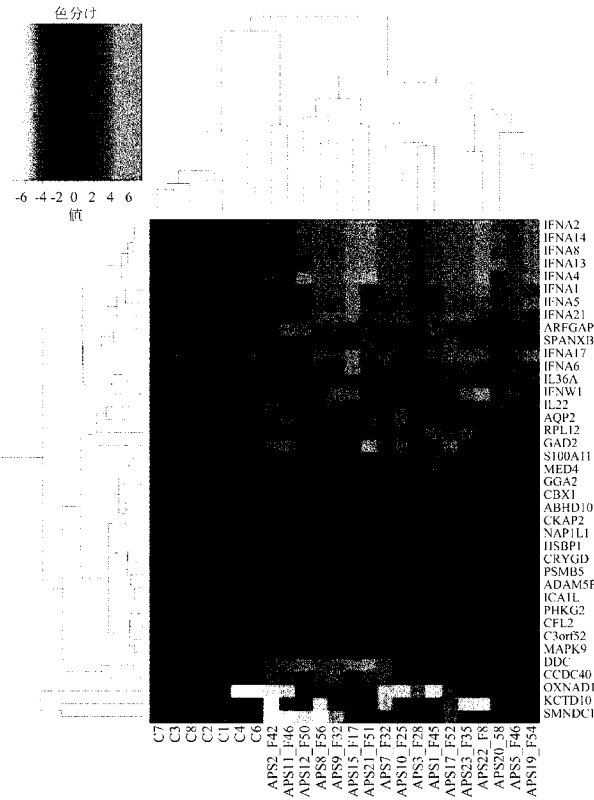


Fig. 48

【図 47】

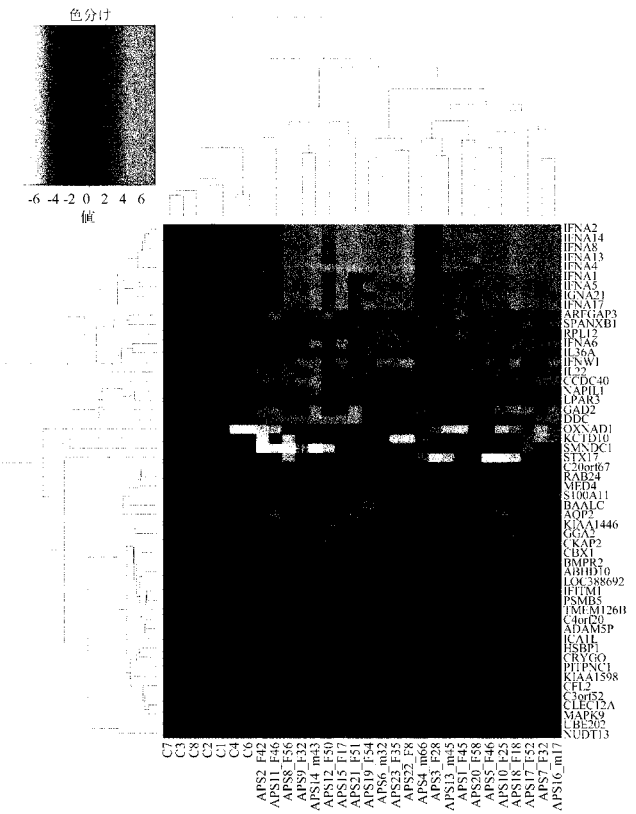


Fig. 47

【図 49】

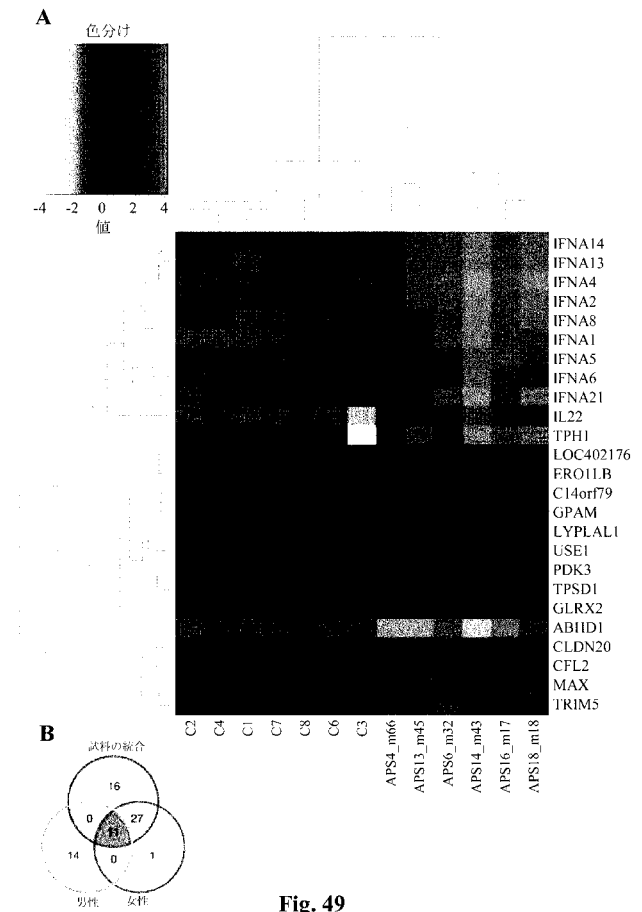


Fig. 49

【図 50】

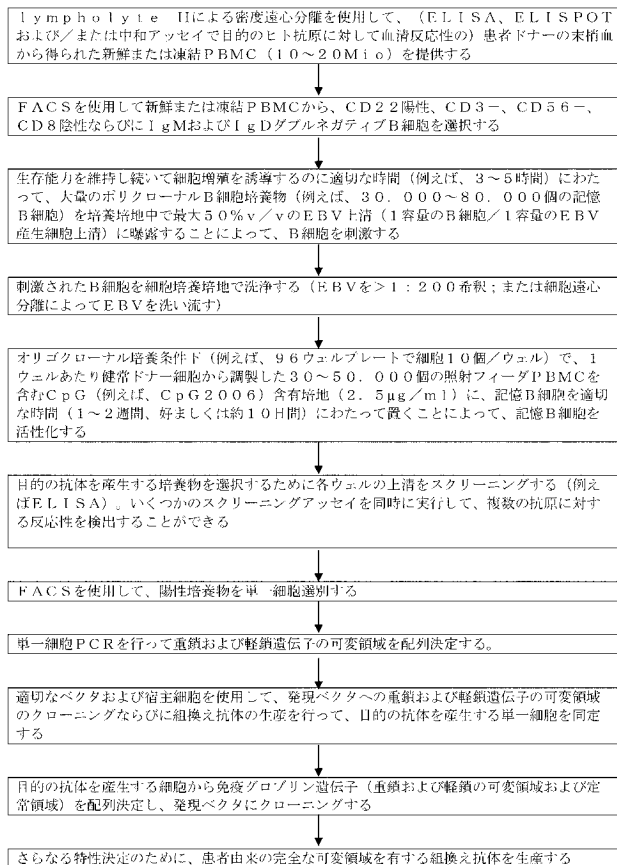


Fig. 50

【配列表】

2015505244000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/050024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/06 C07K16/18 C12N5/0781 C12N15/13 A61K39/395
A61P37/00

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MADEC A ET AL: "Four IgG anti-islet human monoclonal antibodies isolated from a type 1 diabetes patient recognize distinct epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and are somatically mutated", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 156, no. 9, 1 May 1996 (1996-05-01), pages 3541-3549, XP002123339, ISSN: 0022-1767	1-3,5,7,8,10-23,26-37,40-58,60
Y	the whole document ----- -/--	4,6,9,25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 May 2013

Date of mailing of the international search report

11/06/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weigl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/050024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIMPSON J ET AL: "Autoantibodies to Alzheimer and normal brain structures from virus-transformed lymphocytes", JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, XX, vol. 13, no. 1, 1 November 1986 (1986-11-01), pages 1-8, XP023789576, ISSN: 0165-5728, DOI: 10.1016/0165-5728(86)90045-7 [retrieved on 1986-11-01]	1-3,5,7, 8,10-23, 26-37, 40-58,60
Y	the whole document	4,6,9,25
X	JURY K ET AL: "Isolation and Functional Characterization of Recombinant GAD65 Autoantibodies Derived by IgG Repertoire Cloning From Patients With Type 1 Diabetes", DIABETES, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, US, vol. 50, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 1976-1982, XP002988209, ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/DIABETES.50.9.1976	1-3,5,7, 8,10-23, 26-37, 40-58,60
Y	the whole document	4,6,9,25
X	KISAND KAI ET AL: "Interferon autoantibodies associated with AIRE deficiency decrease the expression of IFN-stimulated genes", BLOOD, vol. 112, no. 7, October 2008 (2008-10), pages 2657-2666, XP002675598, ISSN: 0006-4971	34-37, 40-58,60
Y	the whole document	4,6,9,25
X	MEAGER ANTHONY ET AL: "Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1", PLOS MEDICINE, vol. 3, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 1152-1164, XP002675599,	34-37, 40-58,60
Y	the whole document	4,6,9,25
X	PUEL ANNE ET AL: "Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 207, no. 2, February 2010 (2010-02), pages 291-297, XP002697261, ISSN: 0022-1007	34-60
Y	the whole document	4,6,9,25

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/056024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KISAND KAI ET AL: "Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 207, no. 2, February 2010 (2010-02), pages 299-308, XP002697262, ISSN: 0022-1007	34-60
Y	the whole document	4,6,9,25
A	US 2003/099649 A1 (JACOBS KENNETH [US] ET AL) 29 May 2003 (2003-05-29) the whole document	47,54, 56-58
A	WO 2007/149032 A1 (ASTRAZENECA AB [SE]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; COCHRANE DUNCAN [GB] 27 December 2007 (2007-12-27) the whole document	47,54, 56-58
A	HU YAN ET AL: "The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases.", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES JAN 2011, vol. 1217, January 2011 (2011-01), pages 60-76, XP002697263, ISSN: 1749-6632 the whole document	47,54, 56-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/EP2013/050024

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-23, 25-60

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2013/ 050024

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-23, 25-33

Claims relating to methods of isolating monoclonal (auto)antibodies from B cells of patients with impaired self-tolerance (i.e. autoimmune diseases).

2. claim: 24

Claim relating to a B cell producing monoclonal (auto)antibodies

3. claims: 34-60

Claims relating to autoantibodies, encoding nucleic acids, vectors, anti-idiotypic antibodies and therapeutic uses of these compounds

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/050024

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003099649	A1	29-05-2003	US 7951372 B1 31-05-2011
			US 2003099649 A1 29-05-2003
			US 2003157106 A1 21-08-2003
			US 2005238648 A1 27-10-2005
			US 2010260767 A1 14-10-2010
			US 2011262390 A1 27-10-2011

WO 2007149032	A1	27-12-2007	AR 061568 A1 03-09-2008
			AU 2007261748 A1 27-12-2007
			BR PI0713382 A2 29-05-2012
			CA 2655976 A1 27-12-2007
			CN 101611057 A 23-12-2009
			EP 2041176 A1 01-04-2009
			ES 2399475 T3 01-04-2013
			JP 2009540824 A 26-11-2009
			KR 20090029272 A 20-03-2009
			TW 200815469 A 01-04-2008
			US 2008044423 A1 21-02-2008
			UY 30430 A1 31-01-2008
			WO 2007149032 A1 27-12-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/0781	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 K	4 C 0 8 4	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 5	
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 0 7 K	16/24		4 H 0 4 5	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18			
C 0 7 K	16/42	(2006.01)	C 0 7 K	16/42			
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08			
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A		
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06			
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10			
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	1 0 1		
A 6 1 P	5/18	(2006.01)	A 6 1 P	5/18			
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00			
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H		
A 6 1 P	17/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/10			
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/06			
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06			
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	13/08			
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/00			
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	3/10			
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28			
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/00			
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04			
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/06			
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	21/00			
			A 6 1 K	39/395	U		
			G 0 1 N	33/53	D		

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

- (72)発明者 クローン, カイ
フィンランド、F I-3 6 4 5 0 サメンタカ、サルメンターンティエ 7 5 1
- (72)発明者 ランキ, アンナマリ
フィンランド、F I-0 0 2 5 0 ヘルシンキ、シベリウクセンカツ 1 1. B. 2 8
- (72)発明者 ピーターソン, パート
エストニア共和国、E E-1 0 9 1 2 タリン、スビラ 2 7 A-1
- (72)発明者 キサンド, カイ
エストニア共和国、E E-5 0 4 1 2 タルツ、ツルビストリート 9

(72)発明者 スチュアート, エドワード
ドイツ連邦共和国、4 0 4 8 9 デュッセルドルフ、アム ヒュッテンホフ 1 a

(72)発明者 マカグノ, アンナリサ
スイス国、CH-8 9 5 2 シュリーレン、ステインヴィーゼンストラッセ 2 2

(72)発明者 オヌオハ, シモビ
スイス国、CH-8 9 0 2 ウルドルフ、イン デア フラドマット 1 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA15 BA44 CA04 DA02 DA03 EA04 GA13 GA23
HA15
4B029 AA07 BB15 BB17 CC01 CC02 FA12
4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR72
QS02 QS33 QS34 QX01
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA93X AA94X AA94Y AB01 AC14 BA05 BA06 BD15 CA25 CA44
CA46
4C084 AA13 MA13 MA55 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA15 ZA36 ZA66
ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB35 ZC06
ZC35
4C085 AA03 AA14 AA15 BB11 BB17 BB18 BB24 BB41 BB42 BB43
BB44 CC21 CC23 DD62 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA70 BA71 BA72 CA40 DA76
DA86 EA22 EA50 EA54 FA20 FA74 GA15 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015505244A5	公开(公告)日	2016-01-21
申请号	JP2014549503	申请日	2013-01-02
[标]申请(专利权)人(译)	免疫治疗AG 因美诺克股份公司		
申请(专利权)人(译)	Imunokya AG		
[标]发明人	ヘイデイエイドリアン クローンカイ ランキアンナマリ ピーターソンパート キサンドカイ スチュアートエドワード マカグノアンナリサ オヌオハシモビ		
发明人	ヘイデイ,エイドリアン クローン,カイ ランキ,アンナマリ ピーターソン,パート キサンド,カイ スチュアート,エドワード マカグノ,アンナリサ オヌオハ,シモビ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/0781 C07K16/46 C07K16/24 C07K16/18 C07K16/42 C12P21/08 C12M1/00 C12M1/34 C12Q1/68 A61K39/395 A61P37/06 A61P31/10 A61P17/00 A61P5/18 A61P13/12 A61K48/00 A61K39/00 A61P17/10 A61P19/06 A61P11/06 A61P13/08 A61P3/10 A61P25/28 A61P9/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P21/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P11/06 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/10 A61P19/06 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P37/00 C07K16/065 C07K16/18 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K45/06 A61K2039/505 A61K2039/507 C07K16/00 C07K16/4241 C07K2317/14 C12N2501/599 G01N33/56972 G01N33/6869 G01N2333/54		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.101 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.202.K C07K16/46 C07K16/24 C07K16/18 C07K16/42 C12P21/08 C12M1/00.A C12M1/34.F C12Q1/68.A A61K39/395.N A61P37/06 A61P31/10 A61P17/00.101 A61P5/18 A61P13/12 A61K48/00 A61K39/00.H A61P17/10 A61P19/06 A61P11/06 A61P13/08 A61P17/00 A61P3/10 A61P25/28 A61P9/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P21/00 A61K39/395.U G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA15 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA23 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA05 4B065/BA06 4B065/BD15 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA13 4C084/MA55 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA15 4C084/ZA36 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZB35 4C084/ZC06 4C084/ZC35 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/BB24 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC21		

	4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/FA20 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26
代理人(译)	萩野 干治
优先权	61/580837 2011-12-28 US 2011195952 2011-12-28 EP
其他公开文献	JP2015505244A JP6242808B2

摘要(译)

识别抗原的新型人源结合分子，例如与免疫反应，自身免疫性疾病，炎症性疾病，代谢紊乱，血管功能，神经退行性疾病或肿瘤相关的天然内源蛋白，特别是人抗体及其片段，衍生物和变体。更具体地，提供了人自身免疫体和相应的单克隆抗体储库。此外，描述了用于诊断和治疗用途的药物组合物，试剂盒和方法。