明　細　書

発明の名称 ： 抗NR10抗体、およびその利用

技術分野

[0001] 本発明は、抗NR10抗体、並びに、抗NR10抗体を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 種々の細胞の増殖分化、あるいは分化成熟した細胞の機能の賦活化に関与する液性因子として、数多くのサイトカインの存在が知られている。生体では、サイトカイン刺激を受けた細胞が別のサイトカインを産生し、複数のサイトカインによるネットワークが形成されている。生体の恒常性は、このネットワークが互いに調節し合うことによって、微妙なバランスの上に保たれている。多くの免疫炎症性の疾患は、これらのサイトカイン・ネットワークの破綻により生じると考えられ、モノクローナル抗体による抗サイトカイン療法が注目されている。例えば、抗TNF抗体や抗IL-6受容体抗体は、臨床で高い効果を示している。しかし一方で、実際の病態では代償経路が働き、IL-4等ひとつのサイトカインを遮断しただけでは治療効果が得られず、失敗した例も多い。

[0003] 本発明者らは、IL-6のシグナル伝達受容体gp130に相同性の高い、新規サイトカイン受容体NR10の単離に成功した（特許文献１）。NR10は、オンコスタチンM受容体（OSMR）とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能する（非特許文献１）。IL-31については、IL-31を過剰発現させたトランスジェニック・マウスが掻痒性皮膚炎を自然発症することが報告されている（特許文献２）。

[0004] NR10に結合し、IL-31とNR10の結合を阻害する抗体は炎症性疾患の治療に有効であると考えられるが、抗NR10抗体を臨床で用いる為には、免疫原性の低い抗体が必要とされる。又、高い治療効果を発揮する為、NR10への結合活性又は中和活性が高い抗体が望まれる。

[0005] なお、本発明の先行技術文献を以下に示す。

特許文献1：WO00/75314

特許文献2：WO03/060090

非特許文献1：IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis., J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb;117(2):418-25.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は上述の背景に鑑みてなされたものであり、本発明は抗NR10抗体、並びに、抗NR10抗体を含む医薬組成物の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決すべく、鋭意研究を行った。本発明者らは、NR10に対して有効な中和活性を有する抗NR10抗体を取得することに成功した。さらに本発明者らは、抗体の活性を維持したまま抗体をヒト化することに成功した。さらに本発明者らは、薬物動態が向上した、抗原への結合活性が増強した、安定性が向上した、および／または免疫原性のリスクが低減した抗体を作製することに成功した。該抗体は炎症性疾患治療剤として有用である。

[0008] 本発明は、抗NR10抗体、並びに、抗NR10抗体を含む医薬組成物に関し、より具体的には、以下の〔１〕～〔１５〕の発明を包含する。

[0009] 〔１〕 NR10のドメイン１を認識する抗体。

〔２〕 中和活性を有することを特徴とする〔１〕に記載の抗体。

〔３〕 ヒト化抗体である〔１〕又は〔２〕に記載の抗体。

〔４〕 以下の(1)～(8)のいずれかに記載の抗NR10抗体；

(1) 配列番号：１に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：２に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：３に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体、

(2) 配列番号：４に記載の重鎖可変領域を有する抗体、

(3) 配列番号：５に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：６に記載

のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：７に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体、

(4)　配列番号：８に記載の軽鎖可変領域を有する抗体、

(5)　(1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(6)　(2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(7)　(1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(8)　(1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔５〕　以下の(1)～（8）のいずれかに記載の抗NR10抗体；

(1)　配列番号：９に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：１０に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：１１に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体、

(2)　配列番号：１２に記載の重鎖可変領域を有する抗体、

(3)　配列番号：１３に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：１４に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：１５に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体、

(4)　配列番号：１６に記載の軽鎖可変領域を有する抗体、

(5)　(1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(6)　(2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(7)　(1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(8)　(1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔６〕　以下の(1)～（8）のいずれかに記載の抗NR10抗体；

(1)　配列番号：１７に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：１８に

記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：１９に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体、

(2)　配列番号：２０に記載の重鎖可変領域を有する抗体、

(3)　配列番号：２１に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：２２に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：２３に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体、

(4)　配列番号：２４に記載の軽鎖可変領域を有する抗体、

(5)　(1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(6)　(2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(7)　(1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(8)　(1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔７〕　以下の(1)～ (8) のいずれかに記載の抗NR10抗体；

(1)　配列番号：２５に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：２６に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：２７に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体、

(2)　配列番号：２８に記載の重鎖可変領域を有する抗体、

(3)　配列番号：２９に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：３０に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：３１に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体、

(4)　配列番号：３２に記載の軽鎖可変領域を有する抗体、

(5)　(1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(6)　(2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体、

(7)　(1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔８〕 以下の(1)～(20) のいずれかに記載の抗体可変領域、又は抗体；

(1) 配列番号：１９６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１１に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H17）、

(2) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１１に記載のCDR３を含む重鎖可変領域（H19）、

(3) 配列番号：１９６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H28、H42）、

(4) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H30、H44）、

(5) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H34、H46）、

(6) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９８に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H57、H78）、

(7) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９８に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H71、H92）、

(8) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９９に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H97、H98）、

(9) 配列番号：２００に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L11）、

(10) 配列番号：２０１に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L12）、

(11) 配列番号：２０２に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L17）、

(12) 配列番号：２０３に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L50）、

(13) (3)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(14) (4)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(15) (5)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(16) (6)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(17) (7)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(18) (8)の重鎖可変領域と(12)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(19) (13)～(18)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(13)～(18)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(20) (13)～(18)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔９〕 以下の(1)～(32)のいずれかに記載の抗体可変領域または抗体；

(1) 配列番号：２０４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H17）、

(2) 配列番号：２０５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H19）、

(3) 配列番号：２０６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H28）、

(4) 配列番号：２０７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H30）、

(5) 配列番号：２０８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H34）、

(6) 配列番号：２０９に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H42）、

(7) 配列番号：２１０に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H44）、

(8) 配列番号：２１１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H46）、

(9) 配列番号：２１２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H57）

、

(10) 配列番号：２１３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H71）

、

(11) 配列番号：２１４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H78）

、

(12) 配列番号：２１５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H92）

、

(13) 配列番号：２１６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H97）

、

(14) 配列番号：２１７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H98）

、

(15) 配列番号：２１８に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L11）

、

(16) 配列番号：２１９に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L12）

、

(17) 配列番号：２２０に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L17）

、

(18) 配列番号：２２１に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L50）

、

(19) (3)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H28L17）、

(20) (4)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H30L17）、

(21) (5)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H34L17）、

(22) (6)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H42L17）、

(23) (7)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H44L17）、

(24) (8)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H46L17）、

(25) (9)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H57L17）、

(26) (10)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H71L17）、

(27) (11)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H78L17）、

(28) (12)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H92L17）、

(29) (13)の重鎖可変領域と(18)の軽鎖可変領域を含む抗体（H97L50）、

(30) (14)の重鎖可変領域と(18)の軽鎖可変領域を含む抗体（H98L50）、

(31) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(19)～(30)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(32) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔１０〕 ヒト化抗体である、〔４〕から〔９〕のいずれかに記載の抗NR10抗体。

〔１１〕 以下の(1)～(32)のいずれかの抗体重鎖、抗体軽鎖、または抗体；

(1) 配列番号：２２２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H17）、

(2) 配列番号：２２３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H19）、

(3) 配列番号：２２４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H28）、

(4) 配列番号：２２５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H30）、

(5) 配列番号：２２６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H34）、

(6) 配列番号：２２７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H42）、

(7) 配列番号：２２８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H44）、

(8) 配列番号：２２９に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H46）、

(9) 配列番号：２３０に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H57）、

(10) 配列番号：２３１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H71）、

(11) 配列番号：２３２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H78）、

(12) 配列番号：２３３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H92）、

(13) 配列番号：２３４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H97）、

(14) 配列番号：２３５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H98）、

(15) 配列番号：２３６に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L11）、

(16) 配列番号：２３７に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L12）、

(17) 配列番号：２３８に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L17）、

(18) 配列番号：２３９に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L50）、

(19) (3)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H28L17）、

(20) (4)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H30L17）、

(21) (5)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H34L17）、

(22) (6)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H42L17）、

(23) (7)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H44L17）、

(24) (8)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H46L17）、

(25) (9)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H57L17）、

(26) (10)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H71L17）、

(27) (11)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H78L17）、

(28) (12)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H92L17）、

(29) (13)の重鎖と(18)の軽鎖を含む抗体（H97L50）、

(30) (14)の重鎖と(18)の軽鎖を含む抗体（H98L50）、

(31) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(19)～(30)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(32) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

〔１２〕 〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の抗体を含む医薬組成物。

〔１３〕 炎症性疾患治療剤である〔１２〕に記載の医薬組成物。

〔１４〕 〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の抗体を投与する工程を含む、炎症性疾患の治療もしくは予防方法。

〔１５〕 〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の抗体の炎症性疾患治療剤の製造における使用。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]マウス抗体NS18、NS22、NS23、NS33の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。

[図2]マウス抗体NS18、NS22、NS23、NS33の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示

す図である。

[図3]hNR10/hOSMR/BaF3細胞増殖に対するハイブリドーマ培養上清の阻害について示すグラフである。

[図4]cynNR10/cynOSMR/BaF3細胞増殖に対するハイブリドーマ培養上清の阻害について示すグラフである。

[図5]キメラNS22の活性評価（BaF）について示すグラフである。

[図6]キメラNS22の活性評価（DU-145）について示すグラフである。

[図7]キメラNS22のIL-31競合活性評価について示すグラフである。

[図8]抗NR10抗体のNR10結合競合活性について示すグラフである。

[図9]ヒト化NS22（HOLO）のIL-31競合活性について示すグラフである。

[図10]ヒト化抗NR10抗体HOLOの定常領域の及ぼすヘテロジェニティーへの影響を陽イオン交換クロマトグラフィーにより評価した図である。

[図11]ヒト化抗NR10抗体のNR10への結合を大きく低下させることなく、可変領域の等電点を低下させることのできる変異体のIL-31競合活性評価を示すグラフである。

[図12]抗IL-6レセプター抗体の定常領域の及ぼすヘテロジェニティーへの影響を陽イオン交換クロマトグラフィーにより評価した図である。

[図13]抗IL-6レセプター抗体の定常領域の及ぼす変性ピークへの影響をDSCにより評価した図である。

[図14]抗IL-6レセプター抗体において、新規定常領域M14の及ぼすヘテロジェニティーへの影響を陽イオン交換クロマトグラフィーにより評価した図である。

[図15]抗IL-6レセプター抗体において、新規定常領域M58の及ぼすヘテロジェニティーへの影響を陽イオン交換クロマトグラフィーにより評価した図である。

[図16]抗IL-6レセプター抗体において、新規定常領域M58の及ぼす変性ピークへの影響をDSCにより評価した図である。

[図17]huPM1-IgG1およびhuPM1-M58のヒトFcRnトランスジェニックマウスにお

ける血漿中滞留性の評価結果を示す図である。

[図18]各抗体について、BaF/NR10を用いた生物活性を示すグラフである。

[図19]得られた各改変抗体の熱加速品（点線）および未加速品（実線）を陽イオン交換クロマトグラフィーで分析し、熱加速前後での分解物生成を比較した図である。矢印は変化を認めた塩基性成分ピーク位置を示す。

[図20]各改変体の活性評価（BaF）について示すグラフである。

[図21]Ha401La402、HOLOの活性評価（BaF）について示すグラフである。

[図22]H17L11、HOLOの活性評価（BaF）について示すグラフである。

[図23]H19L12、HOLOの活性評価（BaF）について示すグラフである。

[図24]HOL12およびHOL17について、BaF/NR10を用いた生物活性を示すグラフである。

[図25-1]各改変体の活性評価（BaF）について示すグラフである。

[図25-2]図２５－１の続きの図である。

[図26]ヒト・マウス野生型およびキメラNR10-ECDの模式図である。

[図27]結合ドメインをウェスタンブロットを用いて検出した写真である。Aはヒト化抗ヒトNR10抗体によって検出した結果を示す写真であり、Bはマウス抗ヒトNR10抗体によって検出した結果を示す写真であり、Cは抗Myc抗体によって検出した結果を示す写真である。抗ヒトNR10抗体によっては、hhh、hhm、hmmにのみ結合抗原が検出され、mmm、mmh、mhmは結合が確認できなかった。

[図28-1]HO（配列番号：５０）の各改変体のアミノ酸配列を示す図である。

[図28-2]図２８－１の続きの図である。

[図28-3]図２８－２の続きの図である。

[図29-1]LO（配列番号：５２）の各改変体のアミノ酸配列を示す図である。

[図29-2]図２９－１の続きの図である。

[0011] 〔発明を実施するための形態〕

NR10

NR10は、オンコスタチンM受容体（OSMR）とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能するタンパク質である。glm-r（J Biol Chem 277, 1683

1-6, 2002）、GPL（J Biol Chem 278, 49850-9, 2003）、IL31RA（Nat Immunol 5, 752-60, 2004）などの名称としても知られており、本発明のNR10には、このような名称で呼ばれるタンパク質も含まれる。

[0012] 本発明のNR10（IL31RA、GPLまたはglm-rとも呼ばれる）の由来は特に限定されず、ヒト、マウス、サル、その他の哺乳動物に由来するNR10が含まれるが、好ましくはヒト、マウスまたはサル由来のNR10であり、特に好ましくはヒト由来のNR10である。

[0013] ヒト由来のNR10として、複数のスプライシングバリアントが知られている（WO00/075314）。上記スプライシングバリアントのうち、NR10.1は662アミノ酸からなり、細胞膜貫通領域を有することを特徴とする。また、NR10.2は、252アミノ酸配列からなる膜貫通領域を持たない可溶性受容体様タンパク質である。一方、細胞膜貫通型受容体タンパク質として機能するNR10スプライシングバリアントとして、NR10.3およびIL31RAv3が知られている。本発明におけるヒトNR10は、オンコスタチンM受容体（OSMR）とヘテロダイマーを形成し、IL-31の受容体として機能するものであれば特に制限されるものではないが、好ましいNR10としてはNR10.3（ILRAv4とも呼ばれる（Nat Immunol 5, 752-60, 2004））およびIL31RAv3を挙げることができる。NR10.3(IL31RAv4)は662アミノ酸からなり（WO00/075314, Nat Immunol 5, 752-60, 2004）、IL31RAv3は、732アミノ酸からなる（GenBank ACCESSION No: NM_139017）。IL31RAv4のアミノ酸配列を配列番号：７９に、IL31RAv3のアミノ酸配列を配列番号：８０に示す。一方、マウス由来のNR10としては、例えば、配列番号：８１に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。又、カニクイザル由来のNR10としては、例えば配列番号：６６に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0014] 抗体（配列）

本発明の抗NR10抗体の好ましい態様として、下記の（A）～（D）における(1)～(8)のいずれかに記載の抗NR10抗体を挙げることができる。

[0015] （A）NS18

(1) 配列番号：１(HCDR1)に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：２(HCDR2)に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：３(HCDR3)に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体

(2) 配列番号：４(VH)に記載の重鎖可変領域を有する抗体

(3) 配列番号：５(LCDR1)に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：６(LCDR2)に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：７(LCDR3)に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体

(4) 配列番号：８(VL)に記載の軽鎖可変領域を有する抗体

(5) (1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体

(6) (2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)から(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体

[0016] (B) NS22

(1) 配列番号：９(HCDR1)に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：１０(HCDR2)に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：１１(HCDR3)に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体

(2) 配列番号：１２ (VH) に記載の重鎖可変領域を有する抗体

(3) 配列番号：１３(LCDR1)に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：１４(LCDR2)に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：１５(LCDR3)に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体

(4) 配列番号：１６(VL)に記載の軽鎖可変領域を有する抗体

(5) (1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体

(6) (2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いず

れかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体

[0017] 上述の１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入の具体的な例としては、特に限定されないが、以下の改変を挙げることができる。

[0018] 配列番号：９の重鎖CDR1において３番目のIleの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてValを挙げることができる。

[0019] 配列番号：９の重鎖CDR1において４番目のMetの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてIleを挙げることができる。

[0020] 配列番号：９の重鎖CDR1において４番目のMetの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてLeuを挙げることができる。

[0021] 配列番号：９の重鎖CDR1において３番目のIleの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAlaを挙げることができる。

[0022] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１番目のLeuの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGluを挙げることができる。

[0023] 配列番号：１０の重鎖CDR2において３番目のAsnの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0024] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１３番目のGlnの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0025] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１４番目のLysの他のアミノ酸への置換

。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGlnを挙げることができる。

[0026] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１６番目のLysの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGlnを挙げることができる。

[0027] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１７番目のGlyの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0028] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１６番目のLysおよび１７番目のGlyの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例として１６番目のLysのGln、１７番目のGlyのAspへの置換を挙げることができる。

[0029] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１４番目のLys、１６番目のLysおよび１７番目のGlyの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例として１４番目のLysのGln、１６番目のLysのGln、１７番目のGlyのAspへの置換を挙げることができる。

[0030] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１３番目のGln、１４番目のLys、１６番目のLysおよび１７番目のGlyの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例として１３番目のGlnのAsp、１４番目のLysのGln、１６番目のLysのGln、１７番目のGlyのAspへの置換を挙げることができる。

[0031] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１０番目のSerの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0032] 配列番号：１０の重鎖CDR2において１３番目のGlnの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてProを挙げることができる。

[0033] 配列番号：１１の重鎖CDR3において３番目のTyrの他のアミノ酸への置換。

置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてLeuを挙げることができる。

[0034] 配列番号：１１の重鎖CDR3において１０番目のMetの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてLeuを挙げることができる。

[0035] 配列番号：１１の重鎖CDR3において１１番目のAspの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGluを挙げることができる。

[0036] 配列番号：１１の重鎖CDR3において１２番目のTyrの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてThr又はSerを挙げることができる。

[0037] 配列番号：１１の重鎖CDR3において、１０番目のMet、１１番目のAspおよび１２番目のTyrの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、好ましい例として、１０番目のMetのLeu、１１番目のAspのGlu、および１２番目のTyrのThrへの置換を挙げることができる。

[0038] 配列番号：１１の重鎖CDR3において、１１番目のAspおよび１２番目のTyrの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、好ましい例として、１１番目のAspのGlu、および１２番目のTyrのThrへの置換を挙げることができる。

[0039] 配列番号：１１の重鎖CDR3において、３番目のTyr、１１番目のAspおよび１２番目のTyrの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、好ましい例として、３番目のTyrのLeu、１１番目のAspのGlu、および１２番目のTyrのThr又はSerへの置換を挙げることができる。

[0040] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において１番目のArgの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGlnを挙げることができる。

[0041] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において５番目のAsnの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることが

できる。

[0042] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において１番目のArgおよび5番目のAsnの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例として１番目のArgのGln、5番目のAsnのAspへの置換を挙げることができる。

[0043] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において８番目のSerの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてArgを挙げることができる。

[0044] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において１０番目のLeuの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてValを挙げることができる。

[0045] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において８番目のSerおよび１０番目のLeuの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例として８番目のSerのArg、１０番目のLeuのValへの置換を挙げることができる。

[0046] 配列番号：１３の軽鎖CDR1において２番目のThrの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAla又はSerを挙げることができる。

[0047] 配列番号：１４の軽鎖CDR2において１番目のAsnの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0048] 配列番号：１４の軽鎖CDR2において３番目のLysの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGlnを挙げることができる。

[0049] 配列番号：１４の軽鎖CDR2において５番目のLeuの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGluを挙げることができる。

[0050] 配列番号：１４の軽鎖CDR2において７番目のLysの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてGlnまたはAspを挙

げることができる。

[0051] 配列番号：１４の軽鎖CDR2において3番目のLys、5番目のLeuおよび7番目のLysの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例として3番目のLysのGln、5番目のLeuのGlu、7番目のLysのGlnへの置換を挙げることができる。

[0052] 配列番号：１５の軽鎖CDR3において５番目のGluの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0053] 配列番号：１５の軽鎖CDR3において６番目のSerの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてAspを挙げることができる。

[0054] 配列番号：１５の軽鎖CDR3において９番目のThrの他のアミノ酸への置換。置換後のアミノ酸は特に限定されないが好ましい例としてPheを挙げることができる。

[0055] 上述の置換は単独で行ってもよいし、複数の置換を組み合わせてもよい。又、上述の置換と上述以外の置換を組み合わせてもよい。これらの置換により抗体の薬物動態（血漿中滞留性）の向上、抗原への結合活性の増強、安定性の向上、および／または免疫原性のリスクの低減が可能である。

[0056] 本発明において上述の置換を組み合わせた可変領域の具体例としては、配列番号：１６７のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域または配列番号：１６８のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を挙げることができる。さらに、上述の置換を組み合わせた抗体の例として、配列番号：１６７のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：１６８のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体を挙げることができる。

[0057] 又、上述の置換を組み合わせた重鎖可変領域または軽鎖可変領域の具体例として、以下の可変領域を挙げることができる。

(a) 配列番号：１９６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１１に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H17）

(b) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１１に記載のCDR３を含む重鎖可変領域（H19）

(c) 配列番号：１９６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H28、H42）

(d) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H30、H44）

(e) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H34、H46）

(f) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９８に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H57、H78）

(g) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９８に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H71、H92）

(h) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９９に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H97、H98）

(i) 配列番号：２００に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域。（L11）

(j) 配列番号：２０１に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域。（L12）

(k) 配列番号：２０２に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域。（L17）

(l) 配列番号：２０３に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域。（L50）

[0058] さらに、上述の置換を組み合わせた抗体の具体例として、以下の抗体を挙げることができる。

(i) (c)の重鎖可変領域と(k)の軽鎖可変領域を含む抗体

(ii) (d)の重鎖可変領域と(k)の軽鎖可変領域を含む抗体

(iii) (e) の重鎖可変領域と(k)の軽鎖可変領域を含む抗体

(iv) (f) の重鎖可変領域と(k)の軽鎖可変領域を含む抗体

(v) (g) の重鎖可変領域と(k)の軽鎖可変領域を含む抗体

(vi) (h) の重鎖可変領域と(l)の軽鎖可変領域を含む抗体

[0059] (C) NS23

(1) 配列番号：１７（HCDR1）に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：１８（HCDR2）に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：１９（HCDR3）に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体

(2) 配列番号：２０（VH）に記載の重鎖可変領域を有する抗体

(3) 配列番号：２１（LCDR1）に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：２２（LCDR2）に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：２３（LCDR3）に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体

(4) 配列番号：２４（VL）に記載の軽鎖可変領域を有する抗体

(5) (1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体

(6) (2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体

[0060] (D) NS33

(1) 配列番号：２５（HCDR1）に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：２６（HCDR2）に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：２７（HCDR3）に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域を有する抗体

(2) 配列番号：２８（VH）に記載の重鎖可変領域を有する抗体

(3) 配列番号：２９（LCDR1）に記載のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号：３０（LCDR2）に記載のアミノ酸配列を有するCDR2、配列番号：３１（LCDR3）に記載のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を有する抗体

(4) 配列番号：３２（VL）に記載の軽鎖可変領域を有する抗体

(5) (1)の重鎖可変領域および(3)の軽鎖可変領域を有する抗体

(6) (2)の重鎖可変領域および(4)の軽鎖可変領域を有する抗体

(7) (1)～(6)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(1)～(6)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体

[0061] 上述の(1)または(3)に記載の抗体においては如何なるフレームワーク領域（FR）が用いられてもよいが、ヒト由来のFRが用いられることが好ましい。又、上述の(1)～(8)に記載の抗体において、定常領域は如何なる定常領域が用いられてもよいが、ヒト由来の定常領域が用いられることが好ましい。本発明の抗体に用いられるFRまたは定常領域のアミノ酸配列は、由来となる元のFRまたは定常領域のアミノ酸配列をそのまま用いてもよいし、１または複数のアミノ酸を置換、欠失、付加および／または挿入等して異なるアミノ酸配列にして用いてもよい。

[0062] 上述のNS18の重鎖のアミノ酸配列を配列番号：３４に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：３３に示す。また軽鎖のアミノ酸配列を配列番号：３６、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：３５に示す。

[0063] NS22の重鎖のアミノ酸配列を配列番号：３８に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：３７に示す。また軽鎖のアミノ酸配列を配列番号：４０、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：３９に示す。

[0064] NS23の重鎖のアミノ酸配列を配列番号：４２に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：４１に示す。また軽鎖のアミノ酸配列を配列番号：４４、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：４３に示す。

[0065] NS33の重鎖のアミノ酸配列を配列番号：４６に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：４５に示す。また軽鎖のアミノ酸配列を配列番

号：４８、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：４７に示す。

[0066] 本発明において、「(1)～(6)のいずれかに記載の抗体と同等の活性」とは、NR10（例えばヒトNR10）への結合活性および／または中和活性が同等であることを意味する。本発明において、「同等」とは、必ずしも同程度の活性である必要はなく、活性が増強されていてもよいし、又、活性を有する限り活性が減少していてもよい。活性が減少している抗体としては、例えば、もとの抗体と比較して30%以上の活性、好ましくは50%以上の活性、より好ましくは80%以上の活性を有する抗体を挙げることができる。

[0067] 上述の(1)～(6)のいずれかに記載の抗体は、NR10に対する結合活性および／または中和活性を有する限り、可変領域（CDR配列および／またはFR配列）のアミノ酸配列に１または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。アミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されており、NR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体のアミノ酸配列を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer,W, Drutsa,V, Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492）などを用い

て、NR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、NR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体と機能的に同等な変異体を調製することができる。このように、可変領域において、1もしくは複数のアミノ酸が変異しており、NR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体もまた本発明の抗体に含まれる。

[0068] アミノ酸残基を改変する場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、及び、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。これらの各グループ内のアミノ酸の置換を保存的置換と称す。あるアミノ酸配列に対する１又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1984)81:5662-6; Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res.(1982)10:6487-500; Wang, A. et al., Science(1984)224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1982)79:6409-13）。このような変異体は、本発明の可変領域（例えばCDR配列、FR配列、可変領域全体）のアミノ酸配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有する。本明細書において配列の同一性は、配列同一性が最大となるように必要に応じ配列を整列化し、適宜ギャップ導入した後、元と

なった重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列の残基と同一の残基の割合として定義される。アミノ酸配列の同一性は、後述の方法により決定することができる。

[0069] また、可変領域（CDR配列および／またはFR配列）のアミノ酸配列において、１または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されており、NR10に対する結合活性および／または中和活性を有する可変領域のアミノ酸配列は、該可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸から得ることも可能である。可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離するための、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、6M 尿素、0.4% SDS、0.5 x SSC、37℃の条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を例示できる。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1 x SSCの条件、42℃を用いれば、より相同性の高い核酸の単離を期待することができる。単離した核酸の配列の決定は、後述の公知の方法によって行うことが可能である。単離された核酸の相同性は、塩基配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を有する。

[0070] 上記ハイブリダイゼーション技術を利用する方法にかえて、可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を利用して、可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離することも可能である。

[0071] 塩基配列及びアミノ酸配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST（Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:5873-7）によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている（Altschul et al.,J.Mol.Biol.(1990)215:403-10

）。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である（NCBI （National Center for Biotechnology Information）の BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）のウェブサイトを参照；http://www.ncbi.nlm.nih.gov）。

[0072] また本発明は、(1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体も提供する。

[0073] ある抗体が他の抗体と同じエピトープを認識するか否かは、両者のエピトープに対する競合によって確認することができる。抗体間の競合は、競合結合アッセイによって評価することができ、その手段としてELISA、蛍光エネルギー転移測定法（FRET）や蛍光微量測定技術（FMAT(登録商標)）などが挙げられる。抗原に結合した該抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体（被検抗体）の結合能に間接的に相関している。すなわち、同じエピトープに対する被検抗体の量や親和性が大きくなるほど、該抗体の抗原への結合量は低下し、抗原への被検抗体の結合量は増加する。具体的には、抗原に対し、適当な標識をした該抗体と評価すべき抗体を同時に添加し、標識を利用して結合している該抗体を検出する。抗原に結合した該抗体量は、該抗体を予め標識しておくことで、容易に測定できる。この標識は特には制限されないが、手法に応じた標識方法を選択する。標識方法は、具体的には蛍光標識、放射標識、酵素標識などが挙げられる。

[0074] 例えば、NR10を発現させた動物細胞に蛍光標識した該抗体と、非標識の該抗体あるいは被検抗体を同時に添加し、標識された該抗体を蛍光微量測定技術によって検出する。

[0075] ここでいう「同じエピトープを認識する抗体」とは、標識該抗体に対して、非標識の該抗体の結合により結合量を50%低下させる濃度（IC_{50}）に対して

、被検抗体が非標識該抗体のIC_{50}の通常、100倍、好ましくは80倍、さらに好ましくは50倍、さらに好ましくは30倍、より好ましくは10倍高い濃度で少なくとも50%、標識該抗体の結合量を低下させることができる抗体である。

[0076] 上述の(1)～(7)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープに結合する抗体は、特に高い中和活性を有する点で有用である。

[0077] 上述の(1)～(8)のいずれかに記載の抗体は特に限定されないが、ヒト化抗体であることが好ましい。

[0078] さらに、本発明は上述の(A)～(D)における(1)～(8)のいずれかに記載の抗NR10抗体をコードする遺伝子を提供する。本発明の遺伝子は如何なる遺伝子であってもよく、例えばDNAでもよいし、RNAでもよい。

[0079] 抗体（ヒト化）

本発明における抗体の好ましい態様の一つとして、NR10に結合するヒト化抗体を挙げることができる。ヒト化抗体は当業者に既知の方法を用いて製造することができる。

[0080] 抗体の可変領域は、通常、４つのフレーム（FR）にはさまれた３つの相補性決定領域（complementarity determining region ; CDR）で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相同性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるといわれている。

[0081] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体のCDRをヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照）。

[0082] 具体的には、例えばCDRがマウス抗体由来である場合には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region ; FR）とを連結するように設計したDNA配列を、CDRおよびFR両方の末端領域にオーバーラップする

部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する(WO98/13388号公報に記載の方法を参照）。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。

[0083] CDRと連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換、欠失、付加および／または挿入等してもよい。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択できる（Sato, K.etal., CancerRes. (1993) 53, 851-856）。

[0084] ヒト化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、Cγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4、Cμ、Cδ、Cα1、Cα2、Cεを、L鎖ではCκ、Cλを使用することができる。Cκのアミノ酸配列を配列番号：５８に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：５７に示す。Cγ1のアミノ酸配列を配列番号：６０に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：５９に示す。Cγ2のアミノ酸配列を配列番号：６２に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：６１に示す。Cγ4のアミノ酸配列を配列番号：６４に、当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：６３に示す。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。修飾されたヒト抗体Ｃ領域の例としては後述するＣ領域を挙げることができる。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDなど如何なるアイソタイプのヒト抗体でもよいが、本発明においてはI

gGを用いることが好ましい。IgGとしては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などを用いることが可能である。

[0085] なお、ヒト化抗体を作製した後に、可変領域（例えば、CDR、FR）や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換、欠失、付加および／または挿入等してもよく、本発明のヒト化抗体には、そのようなアミノ酸置換等されたヒト化抗体も含まれる。

[0086] ヒト化抗体におけるCDRの由来は特に限定されず、どのような動物由来でもよい。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体などの配列を用いることが可能であるが、好ましくはマウス抗体のCDR配列である。

[0087] 抗体のヒト化において、通常、由来となった抗体の結合活性や中和活性を維持したままヒト化を行うことは困難であるが、本発明においては、由来となったマウス抗体と同等の結合活性および／または中和活性を有するヒト化抗体の取得に成功した。ヒト化抗体はヒト体内における免疫原性が低下しているため、治療目的などでヒトに投与する場合に有用である。

[0088] 本発明においてヒト化抗NR10抗体の好ましい例としては、例えば、以下の(a)～(e)のいずれかに記載の抗体を挙げることができる。

(a) 配列番号：５０（H0-VH）のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含むヒト化抗体

(b) 配列番号：１１２（H1-VH）のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含むヒト化抗体

(c) 配列番号：５２（L0-VL）のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒト化抗体

(d) 配列番号：５０（H0-VH）のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：５２（L0-VL）のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒト化抗体

(e) 配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含むヒト抗体

[0089] なお、配列番号：５０（H0-VH）に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領

域、配列番号：１１２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：５２（L0-VL）に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域は、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されていてもよい。アミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入はCDRまたはFRにおいて行われてもよく、又、CDRとFRの両方において行われてもよい。

[0090] 従って、本発明においてヒト化抗NR10抗体の好ましい他の態様として、例えば、以下の(f)～(j)のいずれかに記載の抗体を挙げることができる。

(f) 配列番号：５０（H0-VH）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体

(g) 配列番号：１１２（H1-VH）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体

(h) 配列番号：５２（L0-VL）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体

(i) 配列番号：５０（H0-VH）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号：５２（L0-VL）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体

(j) 配列番号：１１２（H1-VH）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号：５２（L0-VL）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体

[0091] 特に限定されないが(f)～(j)のいずれかに記載の抗体は、(a)～(e)のいずれかに記載の抗体と同様の活性を有していることが好ましい。

[0092] アミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入は特に限定されないが、具体的な例として、例えば上述したアミノ酸置換を行うことが可能である。

より具体的には、例えば以下のアミノ酸置換を挙げることができる。

[0093] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR1（配列番号：９）の３番目のIleのValへの置換（配列番号：１７３）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：９のアミノ酸配列を有するCDR１が配列番号：１７３のアミノ酸配列を有するCDR１に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0094] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR1（配列番号：９）の４番目のMetのIleへの置換（配列番号：１７４）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：９のアミノ酸配列を有するCDR１が配列番号：１７４のアミノ酸配列を有するCDR１に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0095] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR1（配列番号：９）の４番目のMetのLeuへの置換（配列番号：１７５）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：９のアミノ酸配列を有するCDR１が配列番号：１７５のアミノ酸配列を有するCDR１に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0096] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR1（配列番号：９）の３番目のIleのAlaへの置換（配列番号：１７６）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：９のアミノ酸配列を有するCDR１が配列番号：１７６のアミノ酸配列を有するCDR１に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0097] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１番目のLeuのGluへの置換（配列番号：１１３）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１３のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供す

る。

[0098] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の３番目のAsnのAspへの置換（配列番号：１１４）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１４のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0099] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１３番目のGlnのAspへの置換（配列番号：１１５）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１５のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0100] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１４番目のLysのGlnへの置換（配列番号：１１６）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１６のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0101] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１６番目のLysのGlnへの置換（配列番号：１１７）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１７のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0102] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１７番目のGlyのAspへの置換（配列番号：１１８）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する

重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１８のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0103] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１６番目のLysのGlnへの置換および１７番目のGlyのAspへの置換（配列番号：１１９）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１１９のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0104] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１４番目のLysのGlnへの置換、１６番目のLysのGlnへの置換および１７番目のGlyのAspへの置換（配列番号：１６７）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１７１のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0105] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１３番目のGlnのAspへの置換、１４番目のLysのGlnへの置換、１６番目のLysのGlnへの置換および１７番目のGlyのAspへの置換（配列番号：１７２）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１７２のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0106] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１０番目のSerのAspへの置換（配列番号：１７７）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１７７のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0107] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１０）の１３番目のGlnのProへの置換（配列番号：１７８）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１０のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１７８のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0108] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の３番目のTyrのLeuへの置換（配列番号：１７９）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１７９のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0109] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の１０番目のMetのLeuへの置換（配列番号：１８０）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８０のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0110] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の１１番目のAspのGluへの置換（配列番号：１８１）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８１のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0111] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の１２番目のTyrのThrへの置換（配列番号：１８２）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列

番号：１８２のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0112] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の１２番目のTyrのSerへの置換（配列番号：１８３）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８３のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0113] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の１０番目のMetのLeuへの置換、１１番目のAspのGluへの置換および１２番目のTyrのThrへの置換（配列番号：１８４）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８４のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0114] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の１１番目のAspのGluへの置換および１２番目のTyrのThrへの置換（配列番号：１８５）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８５のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0115] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の３番目のTyrのLeuへの置換、１１番目のAspのGluへの置換および１２番目のTyrのThrへの置換（配列番号：１８６）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８６のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0116] 配列番号：５０又は配列番号：１１２の重鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１１）の３番目のTyrのLeuへの置換、１１番目のAspのGluへの置換

および１２番目のTyrのSerへの置換（配列番号：１８７）。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：１１のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１８７のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0117] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の１番目のArgのGlnへの置換（配列番号：１２１）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１２１のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0118] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の５番目のAsnのAspへの置換（配列番号：１２２）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１２２のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0119] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の８番目のSerのArgへの置換（配列番号：１８８）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１８８のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0120] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の１０番目のLeuのValへの置換（配列番号：１８９）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１８９のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0121] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の８番目のSerのArgへの置換および１０番目のLeuのValへの置換（配列番号：１９０）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１９

０のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0122] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の２番目のThrのAlaへの置換（配列番号：１９１）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１９１のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0123] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の２番目のThrのSerへの置換（配列番号：１９２）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１９２のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0124] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１４）の１番目のAsnのAspへの置換（配列番号：１２３）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１４のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１２３のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0125] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１４）の３番目のLysのGlnへの置換（配列番号：１２４）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１４のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１２４のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0126] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１４）の５番目のLeuのGluへの置換（配列番号：１２５）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１４のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１２５のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0127] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１４）の７番目のLysのGlnへの置換（配列番号：１２６）。従って、本発明は配列番号：

５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１４のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１２６のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0128] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１４）の７番目のLysのAspへの置換（配列番号：１２７）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１４のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１２７のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0129] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR1（配列番号：１３）の１番目のArgのGlnへの置換および5番目のAsnのAspへの置換（配列番号：１６９）。従って、本発明は配列番号：５２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域において、配列番号：１３のアミノ酸配列を有するCDR1が配列番号：１６９のアミノ酸配列を有するCDR1に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0130] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR2（配列番号：１４）の3番目のLysのGlnへの置換、5番目のLeuのGluへの置換および7番目のLysのGlnへの置換（配列番号：１７０）。従って、本発明は配列番号：５２の軽鎖可変領域において、配列番号：１４のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１７０のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0131] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１５）の５番目のGluのAspへの置換（配列番号：１９３）。従って、本発明は配列番号：５２の軽鎖可変領域において、配列番号：１５のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１９３のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0132] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１５）の６番目のSerのAspへの置換（配列番号：１９４）。従って、本発明は配列番号：５２の軽鎖可変領域において、配列番号：１５のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１９４のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0133] 配列番号：５２の軽鎖可変領域において、CDR3（配列番号：１５）の９番目のThrのPheへの置換（配列番号：１９５）。従って、本発明は配列番号：５２の軽鎖可変領域において、配列番号：１５のアミノ酸配列を有するCDR3が配列番号：１９５のアミノ酸配列を有するCDR3に置換された軽鎖可変領域を提供する。

[0134] さらに、上述のアミノ酸置換以外の置換として、配列番号：９７のアミノ酸配列を有する重鎖FR2において３番目のArgの他のアミノ酸への置換を挙げることができる。置換後のアミノ酸は特に限定されないが、好ましい例としてGlnを挙げることができる。さらに、配列番号：９７の3番目のArgをGlnに置換した場合、5番目のAlaをSerに置換して、FR2をヒト配列にすることも可能である。配列番号：９７のアミノ酸配列において、3番目のArgをGlnに、5番目のAlaをSerに置換したアミノ酸配列を配列番号：１２０に示す。従って、本発明は配列番号：５０又は配列番号：１１２のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域において、配列番号：９７のアミノ酸配列を有するFR2が配列番号：１２０のアミノ酸配列を有するFR2に置換された重鎖可変領域を提供する。

[0135] 上述のアミノ酸置換は単独で用いてもよいし、上述の他のアミノ酸置換と組み合わせてもよい。又、上述以外のアミノ酸置換と組み合わせてもよい。

[0136] 上述の置換が行われた抗体の具体的な例として、配列番号：１６７のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体、配列番号：１６８のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体、配列番号：１６７のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号：１６８のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体などを挙げることができる。

[0137] 又、上述の置換が行われた重鎖可変領域の具体例として、以下の重鎖可変領域を挙げることができる。

(1) 配列番号：２０４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H17）

(2) 配列番号：２０５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H19）

(3) 配列番号：２０６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H28）

(4) 配列番号：２０７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H30）

(5) 配列番号：２０８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H34）

(6) 配列番号：２０９に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H42）

(7) 配列番号：２１０に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H44）

(8) 配列番号：２１１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H46）

(9) 配列番号：２１２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H57）

(10) 配列番号：２１３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H71）

(11) 配列番号：２１４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H78）

(12) 配列番号：２１５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H92）

(13) 配列番号：２１６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H97）

(14) 配列番号：２１７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H98）

[0138] 又、上述の置換が行われた軽鎖可変領域の具体例として、以下の軽鎖可変領域を挙げることができる。

(15) 配列番号：２１８に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L11）

(16) 配列番号：２１９に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L12）

(17) 配列番号：２２０に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L17）

(18) 配列番号：２２１に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L50）

[0139] さらに、上述の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体の具体例として、以下の抗体を挙げることができる。

(19) (3)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H28L17）

(20) (4)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H30L17）

(21) (5)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H34L17）

(22) (6)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H42L17）

(23) (7)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H44L17）

(24) (8)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H46L17）

(25) (9)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H57L17）

(26) (10)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H71L17）

(27) (11)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H78L17）

(28) (12)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H92L17）

(29) (13)の重鎖可変領域と(18)の軽鎖可変領域を含む抗体（H97L50）

(30) (14)の重鎖可変領域と(18)の軽鎖可変領域を含む抗体（H98L50）

[0140] 本発明のヒト化抗体に用いられる定常領域は、ヒト抗体由来の如何なる定常領域でもよい。ヒト抗体由来の定常領域の好ましい例としては、IgG1またはIgG2由来の定常領域を挙げることができる。又、ヒト抗体由来の定常領域において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された定常領域を用いてもよい。

[0141] ヒト抗体由来の定常領域において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された定常領域は特に限定されないが、例えば、以下の定常領域を挙げることができる。

配列番号：１２８に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（M58）

配列番号：１２９に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（M14）

配列番号：６２に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（SKSC）

[0142] 上述の定常領域を用いた重鎖または抗体の具体的な例としては、例えば以下の重鎖または抗体を挙げることができる。

(1) 配列番号：１６７のアミノ酸配列を有する可変領域および配列番号：１２８のアミノ酸配列を有する定常領域を含む重鎖

(2) (1)の重鎖において、配列番号：１７１のアミノ酸配列を有するCDR2が配列番号：１７２のアミノ酸配列を有するCDR2に置換された重鎖

(3) (1)の重鎖と配列番号：１５２のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(4) (2)の重鎖と配列番号：１５２のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

[0143] 本発明のヒト化抗NR10抗体のより具体的な例として、例えば、以下の(k)～(o)のいずれかに記載の抗体を挙げることができる。

(k) 配列番号：５４（H0-VH+定常領域）のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(l) 配列番号：１３０（H1-VH＋定常領域）のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(m) 配列番号：５６（L0-VL+定常領域）のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(n) 配列番号：５４（H0-VH+定常領域）のアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号：５６（L0-VL+定常領域）のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(o) 配列番号：１３０（H1-VH＋定常領域）のアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号：５６（L0-VL+定常領域）のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

[0144] なお、配列番号：５４（H0-VH+定常領域）に記載のアミノ酸配列を有する

重鎖および配列番号：５６（L0-VL+定常領域）に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖は、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されていてもよい。アミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入は可変領域または定常領域において行われてもよいし、可変領域と定常領域の両方で行われてもよい。

[0145] 従って、本発明は以下の(p)～(t)のいずれかに記載の抗体を提供する。

(p) 配列番号：５４（H0-VH+定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(q) 配列番号：１３０（H1-VH＋定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(r) 配列番号：５６（L0-VL+定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(s) 配列番号：５４（H0-VH+定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号：５６（L0-VL+定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(t) 配列番号：１３０（H1-VH＋定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号：５６（L0-VL+定常領域）のアミノ酸配列において１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

[0146] 特に限定されないが(p)～(t)いずれかに記載の抗体は、(k)～(o)いずれかに記載の抗体と同様の活性を有していることが好ましい。

[0147] アミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入は特に限定されないが、

具体的な例として、例えば上述したアミノ酸置換を行うことが可能である。

[0148] また上述のヒト化重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：５０）をコードする塩基配列を配列番号：４９に、ヒト化軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号：５２）をコードする塩基配列を配列番号：５１に、ヒト化重鎖のアミノ酸配列（配列番号：５４）をコードする塩基配列を配列番号：５３に、ヒト化軽鎖のアミノ酸配列（配列番号：５６）をコードする塩基配列を配列番号：５５に示す。

[0149] さらに、本発明は上述の(a)～(t)のいずれかに記載の抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体を提供する。同じエピトープへの結合については既に記載している通りである。

[0150] さらに、本発明は以下の(u)～(w)のいずれかに記載の抗体を提供する。

(u) 配列番号：１５１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体

(v) 配列番号：１５２に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体

(w) (u)の重鎖と(v)の軽鎖を含む抗体

[0151] さらに本発明は以下のいずれかに記載の重鎖、軽鎖、又は抗体を提供する。

(1) 配列番号：２２２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H17）

(2) 配列番号：２２３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H19）

(3) 配列番号：２２４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H28）

(4) 配列番号：２２５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H30）

(5) 配列番号：２２６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H34）

(6) 配列番号：２２７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H42）

(7) 配列番号：２２８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H44）

(8) 配列番号：２２９に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H46）

(9) 配列番号：２３０に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H57）

(10) 配列番号：２３１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H71）

(11) 配列番号：２３２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H78）

(12) 配列番号：２３３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H92）

(13) 配列番号：２３４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H97）

(14) 配列番号：２３５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H98）

(15) 配列番号：２３６に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L11）

(16) 配列番号：２３７に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L12）

(17) 配列番号：２３８に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L17）

(18) 配列番号：２３９に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L50）

(19) (3)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H28L17）

(20) (4)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H30L17）

(21) (5)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H34L17）

(22) (6)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H42L17）

(23) (7)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H44L17）

(24) (8)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H46L17）

(25) (9)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H57L17）

(26) (10)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H71L17）

(27) (11)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H78L17）

(28) (12)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H92L17）

(29) (13)の重鎖と(18)の軽鎖を含む抗体（H97L50）

(30) (14)の重鎖と(18)の軽鎖を含む抗体（H98L50）

(31) (1)～(14)のいずれかに記載の重鎖において、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する重鎖

(32) (15)～(18)のいずれかに記載の軽鎖において、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する軽鎖

(33) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体において、１又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を有する抗体

(34) (19)～(33)のいずれかに記載の抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体。

[0152] アミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入については上述の通りである。又、ある抗体が認識するエピトープと同じエピトープを認識する抗体

は上述の通りである。

[0153] さらに本発明は、本発明の可変領域、本発明の重鎖、本発明の軽鎖または本発明の抗体をコードする遺伝子を提供する。

[0154] さらに本発明は、上述の遺伝子を含むベクターを提供する。

[0155] さらに本発明は、上述のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

[0156] さらに本発明は、上述の宿主細胞を培養する工程を含む、本発明の可変領域、本発明の重鎖、本発明の軽鎖または本発明の抗体を製造する方法に関する。

[0157] ベクター、宿主細胞、宿主細胞の培養については後述するとおりである。

[0158] ドメイン認識抗体

本発明における抗NR10抗体の好ましい態様の一つとしてドメイン1を認識する抗体、またはドメイン2を認識する抗体を挙げることができる。本発明においてドメイン1とは配列番号：７６に記載のヒトNR10のアミノ酸配列においてシグナルペプチドを含んでいる状態での番号で21番目のアミノ酸から120番目のアミノ酸までの領域（LPAKP～LENIA）をいう。又、本発明においてドメイン2とは配列番号：７６に記載のヒトNR10のアミノ酸配列においてシグナルペプチドを含んでいる状態での番号で121番目のアミノ酸から227番目のアミノ酸までの領域（KTEPP～EEEAP）をいう。

[0159] このような抗体は特に限定されないが、通常、中和活性を有している抗体であり、好ましくはヒト化抗体である。

[0160] 本発明において好ましい抗体の例として、ドメイン１を認識する抗体を挙げることができる。ドメイン１を認識する抗体は高い中和活性を有しており、医薬品として特に有用である。

[0161] 抗体（中和活性）

本発明はさらに中和活性を有する抗NR10抗体を提供する。

[0162] 本発明においてNR10に対する中和活性とは、NR10とそのリガンドであるIL-31との結合を阻害する活性であり、好ましくはNR10に基づく生理活性を抑制

する活性である。

[0163] NR10中和活性を有する抗体の選別は、例えば、IL-31依存性細胞株に候補の抗体を添加したときの、該IL-31依存性細胞株の増殖抑制効果を観察する方法により行うことが可能である。上記方法においてIL-31依存性細胞株の増殖を抑制する抗体は、NR10に対する中和活性を有する抗体であると判断される。

[0164] 抗体（一般）

本発明の抗体は、その由来で限定されず、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、如何なる動物由来の抗体でもよい。又、キメラ（chimeric）抗体やヒト化（humanized）抗体などの組換え抗体でもよい。上述のように、本発明の好ましい抗体としてヒト化抗体を挙げることができる。

[0165] キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体である。キメラ抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。例えば、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入することによって行うことが可能である（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望のヒト抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、ヒト抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、キメラ抗体を発現させることができる。

[0166] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所

望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

[0167] さらに、ヒト抗体ファージライブラリーを用いて、パニング法によりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388などを参考にすることができる。

[0168] 本発明の抗体には、NR10への結合活性および／または中和活性を有する限り、IgGに代表される二価抗体だけでなく、一価抗体、若しくはIgMに代表される多価抗体、もしくは異なる抗原に結合することができるBispecific抗体も含まれる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。本発明の抗体は、抗体の全長分子に限らず、NR10タンパク質に結合する限り、低分子化抗体またはその修飾物であってもよい。

[0169] また本発明における抗体は、低分子化抗体であってもよい。低分子化抗体は、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含む抗体であり、NR10への結合活性および／または中和活性を有する限り特に限定されない。本発明において低分子化抗体は、全長抗体の一部分を含む限り特に限定されないが、重鎖可変領域（VH）又は軽鎖可変領域（VL）を含んでいることが好ましく、特に好ましくはVHとVLの両方を含む低

分子化抗体である。又、本発明の低分子化抗体の他の好ましい例として、抗体のCDRを含む低分子化抗体を挙げることができる。低分子化抗体に含まれるCDRは抗体の６つのCDR全てが含まれいてもよいし、一部のCDRが含まれていてもよい。

[0170] 本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

[0171] 抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fvなどを挙げることができる。また、低分子化抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv (single chain Fv) 、Diabody、sc(Fv)2 (single chain (Fv)2) などを挙げることができる。これら抗体の多量体（例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー）も、本発明の低分子化抗体に含まれる。

[0172] 抗体断片は、例えば、抗体を酵素で処理して抗体断片を生成させることによって得ることができる。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミンなどが公知である。あるいは、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることができる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照）。

[0173] 消化酵素は、抗体断片の特定の位置を切断し、次のような特定の構造の抗体断片を与える。このような酵素的に得られた抗体断片に対して、遺伝子工学的手法を利用すると、抗体の任意の部分を欠失させることができる。

[0174] 上述の消化酵素を用いた場合に得られる抗体断片は以下のとおりである。

パパイン消化：F(ab)2またはFab

ペプシン消化：F(ab')2またはFab'

プラスミン消化：Facb

[0175] 本発明における低分子化抗体は、NR10への結合活性および／または中和活性を有する限り、任意の領域を欠失した抗体断片を含むことができる。

[0176] ダイアボディーは、遺伝子融合により構築された二価（bivalent）の抗体断片を指す（Holliger P et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448（1993)、EP404,097号、WO93/11161号等）。ダイアボディーは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーである。通常、ダイマーを構成するポリペプチド鎖は、各々、同じ鎖中でVL及びVHがリンカーにより結合されている。ダイアボディーにおけるリンカーは、一般に、VLとVHが互いに結合できない位に短い。具体的には、リンカーを構成するアミノ酸残基は、例えば、5残基程度である。そのため、同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、単鎖可変領域フラグメントを形成できず、別の単鎖可変領域フラグメントと二量体を形成する。その結果、ダイアボディーは2つの抗原結合部位を有することとなる。

[0177] scFv抗体は、重鎖可変領域（［VH］）及び軽鎖可変領域（［VL］）をリンカー等で結合して一本鎖ポリペプチドにした抗体である(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、 Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenburg 及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に記載されたいずれの抗体由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーには、特に制限はない。例えば３から２５残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。具体的には、たとえば後述のペプチドリンカー等を用いることができる。

[0178] 両鎖のV領域は、例えば上記のようなPCR法によって連結することができる。PCR法によるV領域の連結のために、まず次のDNAのうち、全部あるいは所望の部分アミノ酸配列をコードするDNAが鋳型として利用される。

抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA配列、および

抗体のL鎖またはL鎖V領域をコードするDNA配列

[0179] 増幅すべきDNAの両端の配列に対応する配列を有するプライマーの一対を用いたPCR法によって、H鎖とL鎖のV領域をコードするDNAがそれぞれ増幅される。次いで、ペプチドリンカー部分をコードするDNAを用意する。ペプチドリンカーをコードするDNAもPCRを利用して合成することができる。このとき利用するプライマーの5'側に、別に合成された各V領域の増幅産物と連結できる塩基配列を付加しておく。次いで、［H鎖V領域DNA］－［ペプチドリンカーDNA］－［L鎖V領域DNA］の各DNAと、アセンブリーPCR用のプライマーを利用してPCR反応を行う。

[0180] アセンブリーPCR用のプライマーは、［H鎖V領域DNA］の5'側にアニールするプライマーと、［L鎖V領域DNA］の3'側にアニールするプライマーとの組み合わせからなる。すなわちアセンブリーPCR用プライマーとは、合成すべきscFvの全長配列をコードするDNAを増幅することができるプライマーセットである。一方［ペプチドリンカーDNA］には各V領域DNAと連結できる塩基配列が付加されている。その結果、これらのDNAが連結され、さらにアセンブリーPCR用のプライマーによって、最終的にscFvの全長が増幅産物として生成される。一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された組換え細胞が常法に従って取得できる。また、その結果得られる組換え細胞を培養して該scFvをコードするDNAを発現させることにより、該scFvが取得できる。

[0181] 結合される重鎖可変領域と軽鎖可変領域の順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよく、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

［VH］リンカー［VL］

［VL］リンカー［VH］

[0182] sc(Fv)2は、2つのVH及び2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である（Hudson et al、J Immunol. Methods 1999；231：177-189）

。sc(Fv)2は、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。

[0183] また２つのVH及び２つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL（［VH］リンカー［VL］リンカー［VH］リンカー［VL］）の順に並んでいることを特徴とする抗体が好ましいが、2つのVHと2つのVLの順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような配置も挙げることができる。

［VL］リンカー［VH］リンカー［VH］リンカー［VL］

［VH］リンカー［VL］リンカー［VL］リンカー［VH］

［VH］リンカー［VH］リンカー［VL］リンカー［VL］

［VL］リンカー［VL］リンカー［VH］リンカー［VH］

［VL］リンカー［VH］リンカー［VL］リンカー［VH］

[0184] 低分子抗体中の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

[0185] 本発明において、抗体の可変領域を結合するリンカーは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカーを用いることができる。

[0186] 本発明において好ましいリンカーはペプチドリンカーである。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1～100アミノ酸、好ましくは3～50アミノ酸、更に好ましくは5～30アミノ酸、特に好ましくは12～18アミノ酸（例えば、15アミノ酸）である。

[0187] ペプチドリンカーのアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる。

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：８２）

Ser・Gly・Gly・Gly（配列番号：８３）

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：８４）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：８５）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：８６）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：８７）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：８８）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：８９）

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：８４）)n

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：８５）)n

［ｎは１以上の整数である］等を挙げることができる。

[0188] ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。たとえば上記のペプチドリンカーの長さを決定するｎは、通常１～５、好ましくは１～３、より好ましくは１または２である。

[0189] 合成化合物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホーEGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホーDST）、ビス［2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（BSOCOES）、ビス［2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホーBSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0190] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となる。複数のリンカーは、同じでもよいし、異なるリンカーを用いることもできる。

[0191] 本発明の抗体には、本発明の抗体のアミノ酸配列に１又は複数個のアミノ酸残基が付加された抗体も含まれる。また、これら抗体と他のペプチド又はタンパク質とが融合した融合タンパク質も含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと他のペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の抗体との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、例えば、FLAG（Hopp, T. P. et al., Bio Technology (1988) 6, 1204-1210 ）、6個のHis（ヒスチジン）残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素（HA）、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、α-tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の抗体との融合に付される他のポリペプチドとしては、例えば、GST（グルタチオンーSートランスフェラーゼ）、HA（インフルエンザ凝集素）、イムノグロブリン定常領域、βーガラクトシダーゼ、MBP（マルトース結合タンパク質）等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと融合させ、これにより調製された融合ポリヌクレオチドを発現させることにより、融合ポリペプチドを調製することができる。

[0192] また本発明の抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）やヒアルロン酸などの高分子物質、放射性物質、蛍光物質、発光物質、酵素、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている（例えば、U

S5057313、US5156840）。本発明における「抗体」にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

[0193] さらに、本発明で使用される抗体は二重特異性抗体（bispecific antibody）であってもよい。二重特異性抗体とは、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体を言う。本発明において、二重特異性抗体はNR10分子上の異なるエピトープを認識する二重特異性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がNR10を認識し、他方の抗原結合部位が他の物質を認識する二重特異性抗体とすることもできる。

[0194] 二重特異性抗体を製造するための方法は公知である。たとえば、認識抗原が異なる２種類の抗体を結合させて、二重特異性抗体を作製することができる。結合させる抗体は、それぞれがH鎖とL鎖を有する１／２分子であっても良いし、H鎖のみからなる１／４分子であっても良い。あるいは、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体が作製できる。

[0195] 本発明の抗体は、後述する抗体を産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた抗体が、本発明の抗体と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明の抗体はこのような抗体も包含する。

[0196] 抗体の製造

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。NR10に対する結合活性および／または中和活性を有するモノクローナル抗体は、たとえば、ヒトやマウス等の哺乳動物に由来するNR10またはその断片ペプチドを免疫原として、公知方法によって抗NR10モノクローナル抗体を調製した後、得られた抗NR10モノクローナル抗体の中からNR10結合活性および／または中和活性を有する抗体を選別することにより、得るこ

とが出来る。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫する。得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって、抗NR10モノクローナル抗体を作製することが可能である。免疫される動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、サル、ヤギ、ロバ、ウシ、ウマ、ブタなどの哺乳動物を用いることができる。抗原の調製は、公知NR10遺伝子配列を用い、公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法（WO98/46777など）等に準じて行うことができる。

[0197] ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46 ）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行ってもよい。

[0198] 本発明のNR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体の一態様として、ヒトNR10に対する結合活性および／または中和活性を有するモノクローナル抗体が挙げられる。ヒトNR10に対する結合活性および／または中和活性を有するモノクローナル抗体を作製するための免疫原としては、ヒトNR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体を作製できる限り、特に限定されない。例えばヒトNR10には複数のバリアントの存在が知られるが、ヒトNR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体を作製できる限り、いずれのバリアントを免疫原としてもよい。または同様の条件のもとに、NR10の断片ペプチドや、天然のNR10配列に人為的な変異を加えたものを免疫原としてもよい。ヒトNR10.3は、本発明のNR10に対する結合活性および／または中和活性を有する抗体を作製するうえで、好ましい免疫原の一つである。

[0199] また、抗体のNR10に対する結合活性および／または中和活性の測定は、例えば、実施例記載の、該IL-31依存性細胞株の増殖抑制効果を観察する方法に

よって行うことができる。

[0200] 一方、モノクローナル抗体は、DNA免疫（DNA Immunization）によっても得ることができる。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現できるような態様で構築されたベクターDNAを当該免疫動物に投与し、免疫抗原を免疫動物の生体内で発現させることによって、免疫刺激を与える方法である。蛋白質抗原を投与する一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性を期待できる。

－膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激を与えることができる

－免疫抗原を精製する必要が無い

しかし一方で、DNA免疫においては、アジュバントなどの免疫刺激手段と組み合わせることが困難である。

[0201] DNA免疫によってモノクローナル抗体を得るには、まず、NR10をコードするDNAを免疫動物に投与する。NR10をコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成することができる。得られたDNAを適当な発現ベクターに挿入し、免疫動物に投与する。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターを利用することができる。ベクターを生体に投与する方法も、一般に用いられている方法を利用することができる。たとえば、発現ベクターを吸着させた金粒子を、遺伝子銃（gene gun）で細胞内に打ち込むことによってDNA免疫を行うことができる。DNA免疫後に、NR10発現細胞による追加免疫（boost）を行うことは、モノクローナル抗体を得る好ましい方法である。

[0202] このように哺乳動物が免疫され、血清中における所望の抗体量の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に付される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用できる。

[0203] 上記の免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサン

チンーグアニンーホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチンーアミノプテリンーチミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0204] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5'ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択することができる。正常な細胞はこれらのピリミジンアナログをDNA中に取り込んでしまうので死滅するが、これらの酵素を欠損した細胞は、これらのピリミジンアナログを取り込めないので選択培地の中で生存することができる。この他、G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプタミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0205] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法（Kohler. G. and Milstein, C.、Methods Enzymol.（1981）73, 3-46）等に準じて、免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0206] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、細胞融合が実施できる。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等を使用することができる。更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤を加えることもできる。

[0207] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定できる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。細胞融合に用いる培養液としては、例えば、ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液を利用することができる。さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を培養液に

添加することができる。

[0208] 細胞融合は、免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液を混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。細胞融合法においては、例えば平均分子量1000から6000程度のPEGを、通常30から60%（w/v）の濃度で添加することができる。続いて、上記に挙げた適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去される。

[0209] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択することができる。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択できる。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞を選択的に増殖させることができる。目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、目的とするハイブリドーマを選択することができる。ついで、通常の限界希釈法を実施することによって、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施できる。あるいは、NR10を認識する抗体を国際公開WO03/104453に記載された方法によって作製することもできる。

[0210] 目的とする抗体のスクリーニングおよび単一クローニングは、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施できる。例えば、ポリスチレン等でできたビーズや市販の96ウェルのマイクロタイタープレート等の担体に抗原を結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させる。次いで担体を洗浄した後に酵素で標識した二次抗体等を反応させる。もしも培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗体が含まれる場合、二次抗体はこの抗体を介して担体に結合する。最終的に担体に結合する二次抗体を検出

することによって、目的とする抗体が培養上清中に存在しているかどうかが決定できる。抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等によりクローニングすることが可能となる。この際、抗原としては免疫に用いたものを始め、実質的に同質なNR10タンパク質が好適に使用できる。たとえばNR10を発現する細胞株、NR10の細胞外ドメイン、あるいは当該領域を構成する部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを、抗原として利用することができる。

[0211] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫することによって上記ハイブリドーマを得る方法以外に、ヒトリンパ球を抗原感作して目的とする抗体を得ることもできる。具体的には、まずインビトロにおいてヒトリンパ球をNR10タンパク質で感作する。次いで免疫感作されたリンパ球を適当な融合パートナーと融合させる。融合パートナーには、たとえばヒト由来であって永久分裂能を有するミエローマ細胞を利用することができる（特公平1-59878号公報参照）。この方法によって得られる抗体は、NR10タンパク質への結合活性を有するヒト抗体である。

[0212] 上述の方法等により取得された抗NR10抗体をコードする塩基配列、アミノ酸配列は当業者に公知の方法により得ることが可能である。なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

[0213] 得られた抗NR10抗体の配列を基に、当業者に公知の遺伝子組換え技術を用いて抗NR10抗体を作製することが可能である。具体的には、NR10を認識する抗体の配列を基に抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and S

kerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

[0214] ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明の抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5α、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（ファルマシア製）、「QIAexpress system」（キアゲン製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

[0215] また、ベクターには、抗体分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0216] 大腸菌以外にも、例えば、本発明の抗体を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロゲン社製）や、pEF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression

system」（ギブコBRL製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

[0217] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら, Nature (1979) 277, 108）、MMLV-LTRプロモーター、EF1αプロモーター（Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0218] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pSV2-dhfr（「Molecular Cloning 2nd edition」 Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)）など）を導入し、メトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、ジヒドロ葉酸還元

酵素（dhfr）遺伝子等を含むことができる。

従って、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが導入されたベクターを含む宿主細胞を培養する工程を含む、本発明のポリペプチド又は本発明のポリペプチドをコードする遺伝子によりコードされるポリペプチドを製造する方法を提供する。

より具体的には、以下の工程を含む本発明のポリペプチドの製造方法を提供する。

(a) 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子が導入されたベクターを含む宿主細胞を培養する工程、

(b) 当該遺伝子によりコードされるポリペプチドを取得する工程。

[0219] これにより得られた本発明の抗体は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体を分離、精製することができる。

[0220] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose FF（GE Amersham Biosciences）等が挙げられる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された抗体も

包含する。

[0221] 得られた抗体のNR10に対する結合活性の測定は、当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、抗原をコーティングしたプレートに、抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

[0222] 医薬組成物

また本発明は、上述の抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。さらに本発明は上述の抗体を有効成分とする炎症性疾患の治療剤を提供する。

[0223] 本発明において炎症性疾患とは、物理的、化学的、または生物学的作用物質による損傷や異常刺激によって、罹患した血管および隣接した組織に起こる細胞学的・組織学的反応に関する病理学上の所見を伴う疾患（ステッドマン医学大辞典第5版、株式会社メジカルレビュー社、2005年）を言う。一般的に炎症性疾患は皮膚炎（アトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、等）、炎症性腸疾患（大腸炎、等）、喘息、関節炎（関節リウマチ、変形性関節症、等）、気管支炎、Th-2型自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、慢性GVHD、クローン病、変形性脊椎炎、腰痛、痛風、手術外傷後の炎症、腫脹の緩解、神経痛、咽喉頭炎、膀胱炎、肝炎（非アルコール性脂肪性肝炎、アルコール性肝炎、等）、B型肝炎、C型肝炎、動脈硬化、掻痒などが挙げられる。

[0224] 本発明の対象となる炎症性疾患の好ましい例として、アトピー性皮膚炎、慢性皮膚炎、リウマチ、変形性関節症、慢性喘息、掻痒が挙げられる。

[0225] 抗NR10抗体を「有効成分として含有する」とは、抗NR10抗体を活性成分の

少なくとも１つとして含むという意味であり、その含有率を制限するものではない。また、本発明の炎症性疾患の治療剤は、上述の抗NR10抗体と合わせて他の炎症性疾患の治療を促進する成分を含有してもよい。

[0226] なお、本発明の治療剤は予防目的で用いられてもよい。

[0227] 本発明の抗NR10抗体は、常法に従って製剤化することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）。さらに、必要に応じ、医薬的に許容される担体及び/または添加物を供に含んでもよい。例えば、界面活性剤（PEG、Tween等）、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、キレート剤（EDTA等）、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含むことができる。しかしながら、本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜含んでいてもよい。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン及び免疫グロブリン等の蛋白質、並びに、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸を含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、抗NR10抗体を、例えば、生理食塩水、ブドウ糖またはその他の補助薬を含む等張液に溶解する。補助薬としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、さらに、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HCO-50）等と併用してもよい。

[0228] また、必要に応じ抗NR10抗体をマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル）に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる（Remington's Pharmaceutical Science 16th edition &, Oslo Ed. (1980)等参照）。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、抗体NR10抗体に適用し得る（Langer et al., J.Biomed.Mater.Res.(1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982)12: 98-105;米国特許第3,773,919号;欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers(1983)22 :547-56;EP第133,988号）。

[0229] 本発明の医薬組成物は、経口または非経口のいずれでも投与可能であるが、好ましくは非経口投与される。具体的には、注射及び経皮投与により患者に投与される。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射または皮下注射等により全身又は局所的に投与することができる。炎症を抑制したい部位またはその周辺に局所注入、特に筋肉内注射してもよい。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、1回につき体重1kgあたり活性成分が0.0001 mg～100 mgの範囲で選ぶことが可能である。または、例えば、ヒト患者に投与する場合、患者あたり活性成分が0.001～1000 mg/kg・body・weightの範囲を選ぶことができ、1回当たり投与量としては、例えば、本発明の抗体が0.01～50mg/kg・body・weight程度の量が含まれることが好ましい。しかしながら、本発明の炎症性疾患の予防または治療剤は、これらの投与量に制限されるものではない。

[0230] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0231] 以下本発明を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって制限されるものではない。

[0232] 〔実施例１〕 ハイブリドーマ作製

1.1. DNA免疫用ヒトNR10プラスミド、カニクイザルNR10プラスミドの調製

1.1.1. hNR10、cynNR10発現ベクターの調製

マウスβ-アクチンのプロモーター制御下に蛋白を発現するベクターpMacII (WO2005/054467)に、ヒトNR10（塩基配列配列番号：７５、アミノ酸配列配列番号：７６）を組み込みhNR10発現ベクターとした。同様に、カニクイザルNR10（塩基配列配列番号：６５、アミノ酸配列配列番号：６６）からcynNR10発現ベクターを構築した。

[0233] 1.1.2. DNAカートリッジの作製

1.1.1で作製したhNR10あるいはcynNR10発現ベクターをマウスへのDNA免疫に用いるためHerios Gene Gun用カートリッジキット（BIO-RAD社製）を用いて、それぞれのDNAについて1回当たり1μgのDNAが免疫できるDNAカートリッジを作製した。

[0234] 1.2. 抗ヒトNR10抗体産生ハイブリドーマの作製

1.2.1. ヒトNR10及びカニクイザルNR10免疫マウスを用いたハイブリドーマの作製

Balb/cマウス（雌、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー）10匹に、ヒトNR10あるいはカニクイザルNR10を以下の通り免疫した。初回免疫としてhNR10発現ベクターで作製したDNAカートリッジをHerios Gene Gunシステム（BIO-RAD）を用いて免疫した。2回目免疫は1週間後にcynNR10発現ベクターで作製したDNAカートリッジをHerios Gene Gunシステムで投与して行った。3回目以降からは1週間隔でhNR10とcynNR10発現ベクターを交互に免疫した。ヒトNR10に対する血清抗体価の上昇を確認後、最終免疫としてPBS(-)に希釈したヒトNR10タンパク（細胞外領域）（参考例４）を10μg/head静脈内投与した。最終免疫の4日後、マウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞P3X63Ag8U.1（P3U1と称す、ATCC CRL-1597）とを、PEG1500（Roche Diagnostics）を用いた常法に従い細胞融合した。融合細胞、すなわちハイブリドーマは、10%FBSを含むRPMI1640培地（以下、10%FBS/RPMI1640と称す)にて培養した。

[0235] 1.2.2. ハイブリドーマの選抜

融合の翌日に、(1)融合細胞を半流動培地（StemCells）に懸濁し、ハイブリドーマの選択培養を行うと共に、ハイブリドーマのコロニー化を実施した。

[0236] 融合後9日目または10日目にハイブリドーマのコロニーをピックアップし、HAT選択培地（10% FBS/RPMI1640, 2 vol% HAT 50x concentrate（大日本製薬）, 5 vol% BM-Condimed H1（Roche Diagnostics））の入った96-ウェルプレートに、1ウェル当り1コロニーを播種した。3～4日培養後、各ウェルの培養上清を回収し、培養上清中のマウスIgG濃度を測定した。マウスIgGが確認できた培養上清について、ヒトIL-31依存性細胞株（hNR10/hOSMR/BaF3細胞；参考例２）を用いた中和活性で評価し、高いNR10中和活性を有するいくつかのクローンを得た（図３）。ヒトIL-31刺激による細胞増殖を濃度依存的に抑制するクローンで、かつカニクイザルIL-31刺激による細胞（cynNR10/cynOSMR/BaF3細胞；参考例２）増殖を濃度依存的に抑制するクローンを得た（図４）。

[0237] 〔実施例２〕 キメラ抗体の作製

<u>キメラ抗体発現ベクターの作製</u>

ハイブリドーマ細胞から、RNeasy Mini Kits（QIAGEN）を用いてトータルRNAを抽出し、SMART RACE cDNA Amplification Kit（BD Biosciences）によりcDNAを合成した。SMART RACE cDNA Amplification Kit（BD Biosciences）に添付の10X Universal Primer A Mixと抗体のそれぞれの定常領域に設定したプライマー（H鎖：mIgG1-rnot、L鎖mIgK-rnot）を用い、PrimeSTAR HS DNA polymerase（TaKaRa）によってPCRを行い、抗体の可変領域遺伝子を単離した。単離した各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3730xL DNA SequencerまたはABI PRISM 3700 DNA Sequencer（Applied Biosystems）にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。得られたNS18、NS22、NS23ならびにNS33のマウス抗体のアミノ酸配列の、H鎖可変領域を図１、L鎖可変領域を図２に示す。

[0238] 得られたH鎖、L鎖各断片に対し、表１に記載の組合せのPrimerを用いてPrimeSTAR HS DNA Polymerase（TaKaRa）によりPCRを行い、得られた増幅断片を定常領域（それぞれ、ヒトγ1もしくはγ2、ヒトκ）と結合し、動物細胞発現ベクターに挿入した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用い、DNAシークエンサーABI PRISM 3730xL DNA SequencerまたはABI PRISM 3700 DNA Sequencer（Applied Biosystems）にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。

[0239] [表1]

	Sequence（5’→3’）	配列番号
mIgG1-rnot	TAATAGCGGCCGCTCATTATTTACCAGGAGAGTGGGAGAG	９０
mIgK-rnot	TAATAGCGGCCGCTCATTAACACTCATTCCTGTTGAAGCT	９１
mNS18H-feco	GACGAATTCCACCATGGGATGGAGCTGGATCTT	９２
mNS18L-feco	GACGAATTCCACCATGAGTGTGCCCACTCAGGT	９３
mNS33H-feco	GACGAATTCCACCATGGAATGTAACTGGATACT	９４
mNS33L-feco	GACGAATTCCACCATGGATTTTCTGGTGCAGAT	９５

	Forward primer	Reverse primer
NS18 H鎖	mNS18H-feco	mIG1-rnot
NS18 L鎖	mNS18L-feco	mIGK-rnot
NS22 H鎖	Mns18H-feco	mIG1-rnot
NS22 L鎖	mNS18L-feco	mIGK-rnot
NS23 H鎖	mNS18H-feco	mIG1-rnot
NS23 L鎖	mNS18L-feco	mIGK-rnot
NS33 H鎖	mNS33H-feco	mIG1-rnot
NS33 L鎖	mNS33L-feco	mIGK-rnot

[0240] キメラ抗体の作製

ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株（Invitrogen）を10% Fetal Bovine Serum（Invitrogen）を含むDMEM培地（Invitrogen）へ懸濁し、6 × 10^5個 /mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ（直径10 cm, CORNING）の各ディッシュへ10 mLずつ蒔きこみCO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）内で一昼夜培養した後に、培地を吸引除去し、CHO-S-SFMII（Invitrogen）培地6.9 mLを添加した。調製したプラスミドDNA混合液（合計13.8μg）にCHO-S-SFMII培地を加え700 μLとし、1μg/mL Polyethylenimine（Polysciences Inc.）20.7μLを加え混合して室温10分間静置したものを各ディッシュの細胞へ投入し、4～5時間、C

O_2インキュベーター（37℃にて5% CO_2）内でインキュベートした。その後、CHO-S-SFMII（Invitrogen）培地6.9 mLを添加して、3～4日間 CO_2インキュベーター内で培養した。培養上清を回収した後、遠心分離（約2000 g、5分間、室温）して細胞を除去し、さらに0.22μmフィルターMILLEX(登録商標)-GV（Millipore）を通した。各サンプルは使用するまで4℃で保存した。この上清からProtein G Sepharose（Amersham Biosciences）を用いて抗体を精製した。精製した抗体は、Amicon Ultra 15（Millipore）を用いて濃縮し、さらにPD-10 Desalting columns（Amersham Biosciences）を用いて0.05%のNaN_3を含むPBS(-)に溶媒を置換した。280 nmの吸光度をND-1000 Spectrophotometer（NanoDrop）で測定し、Paceらの方法（Protein Science（1995）4: 2411-2423）にて濃度を算出した。

[0241] キメラNS22の活性評価

hIL-31用量依存的に増殖するhNR10/hOSMR/BaF3細胞株を用いて、以下に示す通りhIL-31中和活性を評価した。

[0242] hNR10/hOSMR/BaF3細胞を10% FBS（MOREGATE）、1%Penicillin-Streptomycin（Invitrogen）を含むRPMI1640培地（GIBCO）で1.5 x 10^5cells/mLとなるように調製した。その一部をとり、hIL-31（R&D Systems）を4 ng/mLとなるように添加した（IL-31(+), final conc.;2 ng/mL）。残りの細胞懸濁液をIL-31(-)とした。精製したNS22を培地にて2μg/mLに調整し、さらに希釈公比3、合計8系列の希釈液を調製した（final conc.;≦1μg/mL）。96well flat bottom plate（CORNING）の各wellに細胞懸濁液とキメラNS22（ヒトγ1,κ）希釈溶液それぞれ50μLを播種し、37℃、5% CO_2インキュベーターにて2日間培養した。培養終了後、各wellにCell Counting Kit-8（Dojindo）とPBSを等量混合した溶液を20μL添加し、吸光度（450 nm/620 nm）を測定した（TECAN, SUNRISE CLASSIC）。37℃、5% CO_2インキュベーターにて2時間反応させた後、再度、吸光度を測定した。NS22の中和活性は2時間値から0時間値を差し引いた値を用いて、阻害率であらわした。その結果、NS22はhNR10/hOSMR/BaF3細胞株において、濃度依存的にIL-31刺激による細胞増殖を抑制することが明らかに

なり、ヒトIL-31シグナリングに対して中和活性を有することが証明された（図５）。

[0243] IL-31刺激によりIL-6産生誘導を示すDU145細胞株（ヒト前立腺癌細胞株）を用いて、以下に示す通り、IL-31中和活性を評価した。

[0244] DU145を10% FBS（MOREGATE）、2 mmol/L L-glutamine（Invitrogen）、1 mmol/L sodium pyruvate（SIGMA）を含むMEM培地（Invitrogen）で2.5 x 10^5cells/mLとなるように調製し、48 well-plate（CORNING）の各wellに200μLずつ分注して、37℃、5% CO_2条件下、一夜培養した。精製したキメラNS22（ヒトγ1,κ）を100μg/mLになるように10% FBS、2 mmol/L L-glutamine、sodium pyruvateを含むMEM培地に希釈し、この溶液を用いて希釈公比5、合計6系列の希釈液を調製して、それぞれを100 ng/mLのhuman interleukin-31（R&D systems）と1：1で混合し、各wellに50μLずつ添加した。37℃、5% CO_2条件下で2日間培養した後の培養上清中IL-6濃度をDuoSet ELISA Development kit（R&D systems）を用いて測定した。NS22の中和活性は阻害率（%）として評価した。すなわち、IL-31非存在下でのIL-6濃度（Ａ）を最大の阻害活性（100%阻害）、IL-31添加下かつNS22非添加下でのIL-6濃度（Ｂ）を阻害活性なし（0%阻害）として、IL-31添加下かつNS22添加下のIL-6濃度（Ｃ）を、次式より算出した。

[0245] 阻害率（%）＝（Ｂ－Ｃ）／（Ｂ－Ａ） x 100

[0246] その結果、NS22はDU145細胞株において、濃度依存的にIL-31刺激によるIL-6産生を抑制することが明らかになり、ヒトIL-31シグナリングに対して中和活性を有することが証明された（図６）。

[0247] <u>キメラ抗NR10抗体のIL-31競合活性評価</u>

Human IL-31（R&D Systems）に対してFMAT Blue Monofunctional Reactive Dye（Applied Biosystems）による標識を行った。50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 8.0）にて0.5 mg/mLに調製したhIL-31 100μLに対して、DMSO（Junsei）に溶解した25 nmoles FMAT Blue 5.25μLを添加し、Vortexを行った後、常温で15分間静置した。1 M Tris-HCl（pH 7.4）5μLおよび10% Tween20

1.1μLを添加することで、hIL-31へのFMAT Blueの導入反応を停止した後、Superdex 75 (GE Healthcare, 17-0771-01) をColumnとして用いたゲルろ過により、0.1 % Tween20/PBS展開液上でFMAT Blue-labeled hIL-31および未反応のFMAT Blueを分離した。

[0248] hNR10発現CHO細胞を用いて、以下に示す通り抗体のIL-31／NR10結合阻害活性を評価した。

[0249] NS22およびNA633（それぞれ定常領域はγ1, κ）をAssay buffer（10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 2% FBS, 0.01% NaN_3）を用いて適当な濃度に希釈し、さらに希釈公比2、合計7系列の希釈液を調製し、40μL/wellにてプレート（96-Well FMAT Plates, Applied Biosystems）に添加した。続いて、FMAT Blue-labeled hIL-31をAssay bufferにて400倍希釈し、20μL/wellにて添加した。最後に、Assay bufferにて2.5 x 10^5 /mLに調整した細胞懸濁液を40μL/wellで添加した（final 1 x 10^4 /well）。細胞を添加してから2時間後に8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems) にて蛍光（FL1）を測定した。その結果、NS22はhIL-31/hNR10の結合を用量依存的に阻害することが示され、その活性はNA633よりも優れていることが証明された（図７）。

[0250] 〔実施例３〕 抗NR10抗体のNR10に対する競合

Hybridoma培養上清より精製したNS22抗体に対してFMAT Blue (Applied Biosystems, 4328853) による標識を行った。1 mg/ml-PBSに調製したNS22 170μLに対して、17μL 1 M $NaHCO_3$溶液およびDMSOに溶解した17 nmoles FMAT Blue 3.4μLを添加し、Vortexを行った後、常温で30分間静置した。8μL 1 M Tris-HCl (pH 7.4)および1.9μL 1 % Tween 20を添加することで、NS22へのFMAT Blueの導入反応を停止した後、Superdex 75 (GE Healthcare, 17-0771-01) をColumnとして用いたゲルろ過により、0.01 % Tween20/PBS展開液上でFMAT Blue標識NS22 (FMAT Blue-NS22) および未反応のFMAT Blueを分離した。

[0251] 得られたFMAT Blue-NS22のhNR10発現CHO細胞（参考例３）の結合に対する各種抗体による阻害を8200 Cellular Detection System (Applied Biosystem

s, 4342920) を用いて検討した。$8.8\times10^{-2}\mu g/mL$ FMAT Blue-NS22、7500 cells/wellに対して、種々濃度のキメラ抗NR10抗体（それぞれ定常領域は$\gamma1,\kappa$）を添加し、暗所、4時間静置後の細胞に結合したFMAT Blue由来の蛍光シグナルを測定した。反応は、2.5 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl, 2 % FBS, 0.01 % $NaNO_3$を含む10 mM Hepes-KOH中で行った。結果を図８に示す。NS22とNS23抗体の濃度が上昇するにつれて、FMAT Blue-NS22のNR10発現細胞に対する結合を表す蛍光値FL1が減少した。一方、NA633抗体（参考例６）の濃度の上昇に伴うFL1の低下はほとんど認められなかった（図８）。

[0252] 〔実施例４〕 NS22抗体のヒト化

各フレームワーク配列の選定

マウスNS22抗体の可変領域とヒトのgermline配列を比較した。その中で、ヒト化の際に用いるFR配列を表２にまとめた。CDR、FRの決定はKabat numberingに従って行われた。ヒト化した可変領域として、H鎖は表２に記載されているFR1,FR2,FR3_1,FR4からなる配列をH0-VH（配列番号：５０）、FR1,FR2,FR3_2,FR4からなる配列をH1-VH（配列番号：１１２）とした。また、L鎖はFR1,FR2,FR3,FR4からなる配列をL0（配列番号：５２）とした。

[0253] ヒト化NS22 H0L0の可変領域の作製

ヒト化の際に用いたFR領域にNS22のCDR領域を移植したヒト化NS22の可変領域を作製するため、合成オリゴDNAをH鎖、L鎖それぞれ設計した。各合成オリゴDNAを混和し、アッセンブルPCRによりヒト化NS22の可変領域をコードする遺伝子を作成した。アッセンブルPCRはKOD-Plus（TOYOBO）を用いて行い、以下の条件に従ってPCR法によって実施した。添付のPCR Buffer,dNTPs,$MgSO_4$, KOD-Plusおよび10 pmolの合成オリゴDNAからなる反応混合物を、94℃にて5分加熱した後、94℃にて2分、55℃にて2分、68℃にて2分から構成されるPCR反応サイクルを2回実施した後、可変領域の5'末端に制限酵素サイトとコザック配列を付加したプライマー、及び3'末端に制限酵素サイトを付加したプライマーをそれぞれ10 pmol添加し、94℃にて30秒、55℃にて30秒、68℃にて1分から構成されるPCR反応サイクルを35回実施し増幅断片を得た。得られた増幅

断片をTOPO TA Cloningベクター（TOYOBO）にクローニングし、シークエンスにより塩基配列を確認した。作製した可変領域と定常領域を組み合わせ、H0-SKSC（配列番号：５４）、L0（配列番号：５６）を作製し、動物細胞において挿入遺伝子を発現可能ならしめる発現ベクターに組み込んだ。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用い、DNAシークエンサーABI PRISM 3730xL DNA SequencerまたはABI PRISM 3700 DNA Sequencer（Applied Biosystems）にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。

[0254] ヒト化NS22 H1の可変領域の作製

H1-SKSC（配列番号：１３０）の作製はH0-SKSC（配列番号：５４）のFR3に存在するkabat numberingの73番目のグルタミン(E)をリジン(K)に置換することによって行った。変異体の作製は市販のQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）を用いて行い、添付説明書の方法に従って変異体を作成した。

[0255] IgG化した抗体の発現

抗体の発現は以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株（Invitrogen）を10 % Fetal Bovine Serum（Invitrogen）を含むDMEM培地（Invitrogen）へ懸濁し、5～6 × 10^5個 /mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ（直径10 cm, CORNING）の各ディッシュへ10 mLずつ蒔きこみCO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）内で一昼夜培養した後に、培地を吸引除去し、CHO-S-SFMII（Invitrogen）培地6.9 mLを添加した。調製したプラスミドDNA混合液（合計13.8μg）を1μg/mL Polyethylenimine（Polysciences Inc.）20.7μLとCHO-S-SFMII培地 690μLと混合して室温10分間静置したものを各ディッシュの細胞へ投入し、4～5時間、CO_2インキュベーター（37℃にて5% CO_2）内でインキュベートした。その後、CHO-S-SFMII（Invitrogen）培地6.9 mLを添加して、3日間 CO_2インキュベーター内で培養した。培養上清を回収した後、遠心分離（約2000 g、5分間、室温）して細胞を除去し、さらに0.22μmフィルターMILLEX(R)-GV（Millipore）を通して滅菌した。各サンプルは使用するまで

4℃で保存した。

[0256] IgG化した抗体の精製

得られた培養上清にTBS中に懸濁させた50μLのrProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) を添加し、4℃で4時間以上転倒混和した。その溶液を0.22μmのフィルターカップUltrafree(登録商標)-MC (Millipore) に移し、TBS 500μLにて3回洗浄後、rProtein A Sepharose™樹脂に100μLの50 mM酢酸ナトリウム水溶液、pH 3.3に懸濁して3分間静置したのち、抗体を溶出させた。直ちに、6.7μLの1.5 M Tris-HCl、pH 7.8を加えて中和した。溶出は2回行い、200μLの精製抗体を得た。抗体を含む溶液2μLをND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop社) (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific社)) 、あるいは50μLを分光光度計DU-600 (BECKMAN) に供し、280 nmでの吸光度を測定しPaceらの方法 (Protein Science (1995) 4: 2411-2423) により抗体濃度を算出した。

[0257] FMATを用いたIL-31競合活性の測定

hNR10発現CHO細胞を用いて、以下に示す通り抗体のIL-31／NR10結合阻害活性を評価した。NS22キメラ抗体およびNS22_HOLO (H鎖 HO-SKSC/配列番号：５４、L鎖 LO/配列番号：５６) をAssay buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 2% FBS, 0.01% NaN_3, pH7.4) を用いて適当な濃度に希釈し、さらに希釈公比2、合計8系列の希釈液を調製し、40μL/wellにてプレート (96-Well FMAT Plates, Applied Biosystems) に添加した。続いて、FMAT Blue-labeled hIL-31をAssay bufferにて400倍希釈し、20μL/wellにて添加した。最後に、Assay bufferにて2.5 x 10^5 /mLに調整した細胞懸濁液を40μL/wellで添加した (final 1 x 10^4 /well) 。細胞を添加してから2時間後に8200 Cellular Detection System (Applied Biosystems) にて蛍光 (FL1) を測定した。

[0258] その結果、ヒト化NS22抗体、HOLO (H鎖 HO-SKSC／配列番号：５４、L鎖 LO／配列番号：５６) 、H1LO (H鎖H1-SKSC／配列番号：１３０、L鎖 LO／配列番号：５６) は図９に示すとおりキメラ抗体とほぼ同等の競合活性を示した

ことから、H0L0,H1L0ヒト化抗IL-31レセプター抗体といえる。また、H0L0,H1L0に用いたFRは、いずれもヒト化の際にFRとして使用できると考えられる。

[0259] そのため、以降の実施例で示すCDRに対する変異箇所はH0,H1いずれにも導入することができると考えられる。

[0260] [表2]

H0	生殖細胞系列	ヒトFR配列
FR1	Germline:hVH_1_46(Accession No.X92343)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (配列番号：96)
FR2	Germline:hVH_1_46 (Accession No.X92343)	WVRQAPGQGLEWMG (配列番号：97)
FR3_1	Germline:hVH_1_69 (Accession No.L22582)	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (配列番号：98)
FR3_2	Germline:hVH_1_69 (Accession No.Z27506)	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (配列番号：131)
FR4	Germline:JH1	WGQGTLVTVSS (配列番号：99)

L0	生殖細胞系列	ヒトFR配列
FR1	Germline:hVK_1_39 (Accession No.X59315)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (配列番号：100)
FR2	Germline:hVK_1_39 (Accession No.X59315)	WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号：101)
FR3	Germline:hVK_1_39 (Accession No.X59315)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (配列番号：102)
FR4	Germline:JK4	FGGGTKVEIK (配列番号：103)

[0261] 〔実施例５〕ヒト化抗IL31レセプター抗体における新規定常領域M14及びM58によるヘテロジェニティー低減効果

参考例７～９に示すとおり、ヒト化抗IL-6レセプター抗体であるhuPM1抗体において、定常領域をIgG2からM14またはM58に変換することにより、安定性を低下させることなく、IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーを低減できることが確認された。そこで、ヒト化抗IL-31レセプター抗体においても、定常領域を野生型IgG2からM14またはM58に変換することでヘテロジェニティーを低減できるかどうかを検討した。

[0262] H鎖として、参考例８および９で作製したM14（配列番号：１２９）、M58（配列番号：１２８）を含む、IgG1（配列番号：６０）、およびIgG2（配列番号：１３２）と実施例４で作製したヒト化抗IL-31レセプター抗体のH鎖の可

変領域H0（H0-VH／配列番号：５０）を組み合わせたH0-M14、H0-M58、H0-IgG1及びH0-IgG2、L鎖として実施例４で作製したL0（L0／配列番号：５６）を用いて、H0L0-IgG1（H鎖　H0-IgG1／配列番号：１３３、L鎖　L0／配列番号：５６）、H0L0-IgG2（H鎖　H0-IgG2／配列番号：１３４、L鎖　L0／配列番号：５６）、H0L0-M14（H鎖 H0-M14／配列番号：１３５、L鎖 L0／配列番号：５６）及びH0L0-M58（H鎖　H0-M58／配列番号：１３６、L鎖　L0／配列番号：５６）を作製した。各抗体の発現・精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0263] ヘテロジェニティーの評価方法として、陽イオン交換クロマトグラフィーによる評価を行った。作製した抗体のヘテロジェニティーの評価は、カラムとしてProPac WCX-10（Dionex）を用い、移動相Ａとして20 mM Sodium Acetate, pH5.0、移動相Ｂとして20 mM Sodium Acetate, 1 M NaCl, pH5.0を使用し、適切な流速およびグラジエントを用いて実施した。陽イオン交換クロマトグラフィー(IEC)による評価を行った結果を図１０に示した。

[0264] 図１０に示したとおり、抗IL-31レセプター抗体においても、定常領域をIgG1からIgG2に変換することでヘテロジェニティーが増大し、定常領域をM14またはM58に変換することで、いずれの抗体においてもヘテロジェニティーを低減できることが確認された。

[0265] 〔実施例６〕抗IL-31レセプター抗体における新規定常領域M58による薬物動態改善効果

参考例９に示したとおり、抗IL-6レセプター抗体であるhuPM1抗体において、定常領域をIgG1からM58に変換することにより、ヒトFcRnへの結合性が向上し、ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて薬物動態が向上することが見出された。そこで、抗IL-31レセプター抗体に対しても、定常領域をM58に変換することで薬物動態を向上できるかどうかを検討した。

[0266] 実施例４および実施例5で作製したH0L0-IgG1（H鎖H0-IgG1／配列番号：１３３、L鎖 L0／配列番号：５６）、H0L0-M58（H鎖H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L0／配列番号：５６）を参考例９に示した方法でヒトFcRnへの結合性

を評価した。その結果を表３に示した。

[0267] [表3]

	KD(μM)
H0L0-IgG1	1.07
H0L0-M58	0.91

[0268] 表３に示したとおり、抗IL-31レセプター抗体であるH0L0においても、定常領域をIgG1からM58に変換することで、抗IL-6レセプター抗体であるhPM1同様、ヒトFcRnへの結合性が向上することが確認された。これより、定常領域をIgG1からM58に変換することで、抗IL-31レセプターにおいてもヒトで薬物動態が向上する可能性が示された。

[0269] 〔実施例７〕等電点を低下させる変異箇所の同定

変異体の作製

各変異体の作製は実施例４に準ずる方法、またはPCRを用いたAssemble PCRを行うことによって行われた。Assemble PCRを用いて行う方法は、改変部位を含む順鎖および逆鎖の配列に基づいて設計したオリゴDNAの合成を行う。改変部位を含む順鎖のオリゴDNAと改変を行う遺伝子が挿入されているベクターに結合する逆鎖のオリゴDNA、改変部位を含む逆鎖のオリゴDNAと改変を行う遺伝子が挿入されているベクターに結合する順鎖のオリゴDNAをそれぞれ組み合わせ、PrimeSTAR(TAKARA)を用いてPCRを行うことによって、改変部位を含む断片を5'末端側と3'末端側の2つを作製した。その2つの断片をAssemble PCRによりつなぎ合わせることによって、各変異体を作製した。作製された変異体を動物細胞において挿入遺伝子を発現可能ならしめる発現ベクターに挿入し、得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定した。抗体の作製および精製は実施例４の方法に従って行った。

[0270] 変異箇所の同定

H0L0（H鎖H0-SKSC／配列番号：５４、L鎖 L0／配列番号：５６）の薬物動態を向上させるために、可変領域の等電点を低下させることのできる改変箇所の検討を行った。立体構造モデルから推察された可変領域変異箇所をスク

リーニングした結果、NR10への結合を大きく低下させることなく可変領域の等電点を低下させる箇所を見出し、それらを表４にまとめた（Hp5-VH／配列番号：１３７、Hp7-VH／配列番号：１３８、Hp8-VH／配列番号：１３９、Hp6-VH／配列番号：１４０、Hp9-VH／配列番号：１４１、Hp1-VH／配列番号：１４２、Hp13-VH／配列番号：１４３、Lp1-VL／配列番号：１４４、Lp2-VL／配列番号：１４５、Lp3-VL／配列番号：１４６、Lp4-VL／配列番号：１４７、Lp7-VL／配列番号：１４８、Lp5-VL／配列番号：１４９、Lp6-VL／配列番号：１５０）。各改変体の作製、精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0271] 各改変体のhIL-31/hNR10結合阻害活性をFMATを用いて評価した。方法は実施例４の方法に従って行った。図１１に示したとおり、各改変体の競合活性はHOLOのそれと比較して大きな低下は示されなかった。

[0272]

[表4]

名前	分類	H0配列	変異箇所 (kabat No)	H0の配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
Hp5	FR2	WVRQAPGQGLEWMG (配列番号：97)	38	R	Q	WVQQSPGQGLEWMG (配列番号：120)
			40	※A	S	
Hp7	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：10)	50	L	E	EINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：113)
Hp8	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：10)	52	N	D	LIDPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：114)
Hp6	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：10)	61	Q	D	LINPYNGGTSYNDKFKG (配列番号：115)
Hp9	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：10)	62	K	Q	LINPYNGGTSYNQQFKG (配列番号：116)
Hp1	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：10)	64	K	Q	LINPYNGGTSYNQKFQG (配列番号：117)
Hp13	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号：10)	64	K	Q	LINPYNGGTSYNQKFQD (配列番号：119)
			65	G	D	

名前	分類	L0配列	変異箇所 (kabat No)	L0の配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
Lp1	CDR1	RTSENIYSFLA (配列番号：13)	24	R	Q	QTSENIYSFLA (配列番号：121)
Lp2	CDR1	RTSENIYSFLA (配列番号：13)	28	N	D	RTSEDIYSFLA (配列番号：122)
Lp3	CDR2	NAKTLAK (配列番号：14)	50	N	D	DAKTLAK (配列番号：123)
Lp4	CDR2	NAKTLAK (配列番号：14)	52	K	Q	NAQTLAK (配列番号：124)
Lp7	CDR2	NAKTLAK (配列番号：14)	54	L	E	NAKTEAK (配列番号：125)
Lp5	CDR2	NAKTLAK (配列番号：14)	56	K	Q	NAKTLAQ (配列番号：126)
Lp6	CDR2	NAKTLAK (配列番号：14)	56	K	D	NAKTLAD (配列番号：127)

[0273] 上記表４中における※は、ヒト配列にするために等電点には関係ないが改変した箇所である。

[0274] これらの改変を組み合わせた等電点を低下させたヒト化NS22抗体の例として、Hp3Lp15（H鎖 Hp3-SKSC／配列番号：１５１、L鎖 Lp15／配列番号：１５２）があげられる。Hp3Lp15のNR10に対するアフィニティー、等電点、およびマウスにおける血漿中滞留性をH0L0と比較した。

[0275] アフィニティーの測定

各抗体のNR10に対するアフィニティーを参考例10の方法に従って行った。

測定したアフィニティーの結果を表５に示した。Hp3Lp15のアフィニティーはH0L0のそれとほぼ同等であることがしめされた。

[0276] [表5]

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H0L0	3.7E+05	1.2E-03	3.3E-09
Hp3Lp15	4.2E+05	1.6E-03	3.9E-09

[0277] 等電点の測定

可変領域のアミノ酸改変による全長抗体の等電点の変化について評価するために、各抗体の等電点電気泳動による分析を実施した。等電点電気泳動の方法は以下に準じた。

[0278] Phastsystem Cassette (Amersham Biosciences社製) を用いて以下の膨潤液で30 minほどPhast-Gel Dry IEF (Amersham Biosciences社製)ゲルを膨潤させた。

ミリQ水 1.5 mL

Pharmalyte 5-8 for IEF (Amersham Biosciences社製) 100 μL

[0279] 膨潤したゲルを用いてPhastSystem(Amersham Biosciences社製)により以下のプログラムで電気泳動を行った。サンプルはStep 2でゲルに添加した。plマーカーとして、Calibration Kit for pI(Amersham Biosciences社製)を使用した。

Step 1: 2000 V	2.5 mA	3.5 W	15℃	75 Vh
Step 2: 200 V	2.5 mA	3.5 W	15℃	15 Vh
Step 3: 2000 V	2.5 mA	3.5 W	15℃	410 Vh

[0280] 泳動後のゲルは20 % TCAで固定した後、Silver staining Kit, protein(Amersham Biosciences社製)を用い、キットに添付されているプロトコールに従い銀染色を行った。染色後、plマーカーの既知等電点からサンプル（全長抗体）の等電点を算出した。

[0281] 等電点電気泳動により等電点を測定した結果、HOLOの等電点は約7.8であり、Hp3Lp15の等電点は約5.5であることから、Hp3Lp15の等電点はHOLOの等電点と比較して約2.3低下した。また、可変領域VH/VLの理論等電点をGENETYX（GENETYX CORPORATION）により計算したところ、HOLOの可変領域の理論等電点は7.76であり、Hp3Lp15の可変領域の理論等電点は4.63であり、Hp3Lp15はHOLOと比較して理論等電点が3.13低下した。

[0282] マウスを用いた等電点を低下させた抗体の薬物動態の評価

等電点を低下させた改変抗体、Hp3Lp15の血漿中滞留性を評価するために、HOLOとHp3Lp15の正常マウスにおける血漿中滞留性の比較を行った。HOLOおよびHp3Lp15をマウス（C57BL/6J、日本チャールズリバー）に1 mg/kgで静脈内に単回投与し血漿中濃度推移を比較した。血漿中濃度測定はELISA法にて測定した。適当な濃度の検量線試料および血漿測定試料をAnti-human IgG(Fc-specific) antibody (Sigma社製)で固相化したイムノプレート（Nunc-Immuno Plate,MaxiSorp(Nalge nunc International社製)）に分注し、室温で1時間静置後した。Goat Anti-Human IgG-ALP(Sigma社製)を室温で1時間反応させた後、BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System(Kirkegaard & Perry Laboratories社製)を基質として用い発色反応を行い、マイクロプレートリーダーにて650 nmの吸光度を測定した。血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO（Molecular Devices社製）を用いて算出した。

[0283] 得られた血漿中濃度推移のデータを薬物動態解析ソフトWinNonlin（Pharsight社製）を用いて薬物動態学的パラメーター（AUC、全身クリアランス（CL））を算出し表６に示した。HOLOに対し、Hp3Lp15の静脈内投与後のAUCは約14%増加し、クリアランスが約12%低下した。このように、HOLOの等電点を低下させたHp3Lp15は、その薬物動態が向上することが見出された。

[0284] [表6]

	AUC(μg･d/kg)		CL(ml/d/kg)	
	平均	SD	平均	SD
HOLO	281.8	13.1	3.6	0.2
Hp3Lp15	321.1	26.1	3.1	0.3

[0285] 〔実施例８〕可変領域と定常領域の組み合わせによる生物活性への影響

異なる定常領域を用いることによる生物活性への影響を評価するために以下の改変体を作製した。

[0286] H鎖として、定常領域を参考例７および９で作製したSKSC(配列番号：６２)、M58（配列番号：１２８）可変領域を実施例７で作製した可変領域Hp3（Hp3-VH／配列番号：１６７）を組み合わせHp3-M58（配列番号：２４０）、Hp3-SKSC（配列番号：１５１）を作製した。作製したH鎖と実施例７で作製したL鎖Lp15（Lp15／配列番号：１５２）を組み合わせHp3Lp15-SKSC(H鎖Hp3-SKSC／配列番号：１５１、L鎖Lp15／配列番号：１５２)及びHp3Lp15-M58（H鎖Hp3-M58／配列番号：２４０、L鎖Lp15／配列番号：１５２）を作製した。各抗体の発現・精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0287] 上記で作製した各抗体と、参考例７に記載した定常領域SKSC(配列番号：６２)を用いたHOLO-SKSC(H鎖　HO-SKSC／配列番号：５４、L鎖　LO／配列番号：５６)、実施例５で作製したHOLO-M58（H鎖　HO-M58／配列番号：１３６、L鎖　LO／配列番号：５６）およびHOLO-IgG2（H鎖　HO-IgG2／配列番号：１３４、L鎖　LO／配列番号：５６）ついて、BaF/NR10を用いた生物活性を実施例２に記載した方法で行い、その結果を図１８にまとめた。

[0288] 図１８に示すように、定常領域間で大きな生物活性の差は検出されなかった。2つの可変領域HO,Hp3と各定常領域と組み合わせても生物活性に影響を与えなかったことから、今後作製する可変領域において、どの定常領域と組み合わせも生物活性は変化しないと考えられる。

[0289] 〔実施例９〕熱加速試験による分解を抑える変異箇所の同定

医薬品に使用する抗体は、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られるモノクローナル抗体であるにも関わらず、ヘテロジェニティーが存在する。そのような抗体のヘテロジェニティーは酸化、脱アミド化などの修飾により起こり、長期間の保存中や熱ストレス、光ストレスといったストレス条件下にさらされることで増加することが知られている(参考文献：Heterogeneity of Monoclonal Antibodies:Journal of pharmaceutical sciences, vo

l.97,No.7,2426-2447)。しかしながら、抗体を医薬品として開発するにあたり、そのタンパク質の物性、中でも均一性と安定性は極めて重要であり、目的物質／関連物質のヘテロジェニティーを低減し、可能な限り単一物質であることが望まれる。そこで、ストレス条件下における抗体のヘテロジェニティーを評価し、そのヘテロジェニティーを低減するために以下の実験を行った。

[0290] 分解物を評価するため、HOLO(H鎖 HO-SKSC/配列番号：５４、L鎖 LO/配列番号：５６)の熱加速品を以下の方法で調製した。調製した熱加速品および未加速品（initial）について、以下の方法で陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析を行った。

[0291] ・熱加速品の調製方法

緩衝液：PBS

抗体濃度：0.2-1.0 mg/mL

加速温度：60℃

加速期間：1日間

[0292] ・陽イオン交換クロマトグラフィーの分析方法

カラム：ProPac WCX-10, 4×250 mm (Dionex)

移動相： (A) 25 mmol/L MES/NaOH, pH 6.1

(B) 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L NaCl, pH 6.1

流速：0.5 mL/min

カラム温度：40℃

グラジエント：%B 0 to 0(0-5 min)→0 to 30 (5-80 min)

検出：280 nm

[0293] HOLOの熱加速前、後のサンプルのクロマトグラムの結果を図１９に示した。HOLOの熱加速後のサンプルにおいて、塩基性のピークが増加する傾向が得られた。

[0294] そこで、このピークを低減させるために、スクリーニングを行った結果Ha355、Ha356、Ha360、Ha362を見出し、それらH鎖改変体とLOを組み合わせたHa3

55LO(H鎖 Ha355-SKSC／配列番号：２４２　L鎖 LO／配列番号：５６)、Ha356 LO(H鎖 Ha356-SKSC／配列番号：２４３　L鎖 LO／配列番号：５６)、Ha360LO (H鎖 Ha360-SKSC／配列番号：２４４　L鎖 LO／配列番号：５６)、Ha362LO(H鎖 Ha362-SKSC／配列番号：２４５　L鎖 LO／配列番号：５６)を作製した。各改変体の配列を表７にまとめた。

[0295] [表7]

名前	分類	HO配列	変異箇所 (kabat No)	HOの配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
Ha355	CDR3	DGYDDGPYTMDY (配列番号:265)	100d 101 102	M D Y	L E T	DGYDDGPYTLET (配列番号:266)
Ha356	CDR3	DGYDDGPYTMDY (配列番号:265)	101 102	D Y	E T	DGYDDGPYTMET (配列番号:267)
Ha360	CDR3	DGYDDGPYTMDY (配列番号:265)	97 101 102	Y D Y	L E T	DGLDDGPYTMET (配列番号:268)
Ha362	CDR3	DGYDDGPYTMDY (配列番号:265)	97 101 102	Y D Y	L E S	DGLDDGPYTMES (配列番号:269)

[0296] 見出した各抗体の発現・精製は実施例４に記載した方法で行った。作製した各抗体をHOLOと同様に、熱加速品を調製し、陽イオン交換クロマトグラフィーで分析し、その結果を図１９に示した。

[0297] この結果、H鎖101番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換された改変を含む改変抗体では、熱加速後に増加する塩基性ピークの生成がHOLOに比べて少なかった。これら改変抗体をBaF/NR10を用いた生物活性を実施例２に記載した方法で行い、その結果を図２０に示す。図２０に示すように、これらの改変の生物活性はHOLOのそれと比較してほぼ同等、またはそれ以上を示した。以上のことより、Ha355,Ha356,Ha360,Ha362の改変が熱加速によって生成する分解物を抑制し、抗体の安定性を高める上で効果的であることを見出した。

[0298] 〔実施例１０〕アフィニティーを増加させる変異箇所の同定

HOLOのNR10への親和性を向上させるために、CDR配列に変異を導入したライブラリーを作製し検討した。CDRに変異を導入したライブラリーをスクリーニングした結果、NR10への親和性を向上する変異を見出し、それらを表８にまとめた。それぞれのH鎖改変体Ha101-SKSC（配列番号：２４６）、Ha103-SKSC（配列番号：２４７）、Ha111-SKSC（配列番号：２４８）、Ha204-SKSC（配列番号：２４９）、Ha219-SKSC（配列番号：２５０）とLO(LO／配列番号：５６）、それぞれのL鎖改変体La134（配列番号：２５１）、La130（配列番号：２５２）、La303（配列番号：２５３）、La328（配列番号：２５４）とHO（HO-SKSC／配列番号：５４）をそれぞれ組み合わせ、各抗体を作製した。各改変体の作製、精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0299] 各改変体のNR10に対するアフィニティーをBiacoreを用いて評価し、表９に示した。方法は参考例１０に記載した方法で行った。表９に示した通り、各改変体のKD値はHOLO(H鎖　HO-SKSC／配列番号：５４、L鎖　LO／配列番号：５６)のそれと比較して向上していることを見出した。

[0300]

[表8]

名前	分類	H0配列	変異箇所 (kabat No)	H0の配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
Ha101	CDR1	GYIMN (配列番号:270)	33	I	V	GYVMN (配列番号:272)
Ha103	CDR1	GYIMN (配列番号:270)	34	M	I	GYIIN (配列番号:273)
Ha111	CDR1	GYIMN (配列番号:270)	34	M	L	GYILN (配列番号:274)
Ha204	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号:271)	58	S	D	LINPYNGGTDYNQKFKG (配列番号:275)
Ha219	CDR2	LINPYNGGTSYNQKFKG (配列番号:271)	61	Q	P	LINPYNGGTSYNPKFKG (配列番号:276)

名前	分類	L0配列	変異箇所 (kabat No)	L0の配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
La134	CDR1	RTSENIYSFLA (配列番号:277)	31	S	R	RTSENIYRFLA (配列番号:279)
La130	CDR1	RTSENIYSFLA (配列番号:277)	31 33	S L	R V	RTSENIYRFVA (配列番号:280)
Ls303	CDR3	QHHYESPLT (配列番号:278)	93	E	D	QHHYDSPLT (配列番号:281)
La328	CDR3	QHHYESPLT (配列番号:278)	94	S	D	QHHYEDPLT (配列番号:282)
La326	CDR3	QHHYESPLT (配列番号:278)	97	T	F	QHHYESPLF (配列番号:283)

[0301]

[表9]

名前	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	1.9E+05	6.2E-04	3.2E-09
Ha101L0	2.0E+05	3.1E-04	1.5E-09
Ha103L0	2.2E+05	5.3E-04	2.4E-09
Ha111L0	2.6E+05	5.6E-04	2.1E-09
Ha204L0	3.7E+05	4.8E-04	1.3E-09
Ha219L0	3.2E+05	9.6E-04	3.0E-09

名前	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	1.5E+05	7.4E-04	5.1E-09
H0La134	2.5E+05	4.4E-04	1.8E-09
H0La130	2.6E+05	4.0E-04	1.5E-09
H0La303	2.2E+05	4.6E-04	2.1E-09
H0La328	1.8E+05	5.2E-04	2.9E-09
H0La326	1.4E+05	5.2E-04	3.7E-09

[0302] これらのアフィニティーを向上させた変異と実施例７で作製した等電点を低下させる変異を組み合わせた例として、Ha401La402（H鎖 Ha401-SKSC／配列番号：２５５、L鎖 La402／配列番号：２５６）、またはH17L11（H鎖 H17-M58／配列番号：２２２、L鎖 L11／配列番号：２３６）が挙げられる。各改変体の作製、精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0303] Ha401La402（H鎖 Ha401-SKSC／配列番号：２５５、L鎖 La402／配列番号：２５６）のNR10に対するアフィニティーおよびBaF/NR10を用いた生物活性を参考例１０および実施例２に記載した方法で行い、H0L0(H鎖 H0-SKSC／配列番号：５４、L鎖 L0／配列番号：５６)と比較した。測定したアフィニティーの結果を表１０、BaF/NR10を用いた生物活性を図２１に示した。アフィニティー、生物活性ともにH0L0(H鎖 H0-SKSC／配列番号：５４、L鎖 L0／配列番号：５６)のそれより向上していることを見出した。

[0304] [表10]

	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	2.9E+05	9.1E-04	3.2E-09
Ha401La402	5.8E+05	2.9E-04	5.0E-10

[0305] また、H17L11（H鎖 H17-M58／配列番号：２２２、L鎖 L11／配列番号：２３６）のNR10に対するアフィニティーおよびBaF/NR10を用いた生物活性を実施例7および実施例２に記載した方法で行い、H0L0(H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L0／配列番号：５６)と比較した。測定したアフィニティーの結果を表１１、BaF/NR10を用いた生物活性を図２２に示した。アフィニティー、生物活性ともにH0L0(H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L0／配列番号：５６)のそれより向上していることを見出した。

[0306] [表11]

	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	1.4E+05	6.9E-04	4.8E-09
H17L11	4.3E+05	2.6E-04	6.2E-10

[0307] 〔実施例１１〕免疫原性のリスクを低下させるための変異箇所の同定

<u>H鎖CDR1の免疫原性のリスクの低減</u>

H0L0の可変領域配列に存在するT-cellエピトープをTEPITOPE（Methods. 2004 Dec;34(4):468-75）を用いて解析を行った。その結果、H鎖CDR1に多くのHLAに結合するT-cellエピトープが存在する（免疫原性のリスクが高い配列が存在する）ことが予測された。そこで、TEPITOPE解析においてH鎖CDR1の免疫原性のリスクを低減させる改変を検討したところ、kabat numbering 33番目のイソロイシン(I)をアラニン(A)に置換することによって、免疫原性のリスクが大きく減少することが改変を見出した（表１２）。この改変を実施例１０で作成したH17に対して加えたH19（H19-M58／配列番号：２２３）を作製した。作製したH19をL12と組み合わせH19L12（H鎖 H19-M58／配列番号：２２３、L鎖 L12／配列番号：２３７）を作製した。各改変体の作製、精製は実施例4に記載した方法で行った。

[0308] NR10に対するアフィニティーおよびBaF/NR10を用いた生物活性を参考例１０および実施例２に記載した方法で行い、H0L0(H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L0／配列番号：５６)と比較した。測定したアフィニティーの結果を表１３、BaF/NR10を用いた生物活性を図２３に示した。アフィニティー、生

物活性ともにH0L0のそれとほぼ同等の活性を示すことが示された。

[0309] [表12]

名前	分類	H0配列	変異箇所 (kabat No)	H0の配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
H19	CDR1	GYIMN (配列番号:270)	33	I	A	GYAMN (配列番号:284)

[0310] [表13]

	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	1.8E+05	8.7E-04	4.8E-09
H19L12	2.3E+05	1.2E-03	5.1E-09

[0311] L鎖CDR1の免疫原性のリスクの低減

L鎖のCDR1に存在するkabat numbering 25番目のスレオニン(T)は生殖細胞系列配列ではアラニン(A)またはセリン(S)である。そこで、25番目のスレオニン(T)をアラニン(A),またはセリン(S)に改変するほうが免疫原性のリスクが低いことが予想される(表１４)。そこで、L12に対して上記の改変を加えたL17(配列番号：２３８)を作製した。作製したL17とH0を組み合わせH0L17（H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L17／配列番号：２３８）を作製した。改変体の作製、精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0312] 各改変体のNR10に対するアフィニティーおよびBaF/NR10を用いた生物活性を参考例１０および実施例２に記載した方法で行い、H0L0(H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L0／配列番号：５６)、およびH0L12(H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L12／配列番号：２３７)と比較した。L12はアフィニティーが向上する配列を含むため、H0L0と比較して約2倍高いアフィニティーを示している。測定したアフィニティーの結果を表１５、BaF/NR10を用いた生物活性を図２４に示した。アフィニティー、生物活性ともにH0L12のそれとほぼ同等のアフィニティーおよび生物活性を示すことが示された。

[0313]

[表14]

名前	分類	L0配列	変異箇所 (kabat No)	L0の配列	変異後のアミノ酸	変異後の配列
Ld-1	CDR1	RTSENIYSFLA (配列番号:277)	25	T	A	RASENIYSFLA (配列番号:285)
Ld-2	CDR1	RTSENIYSFLA (配列番号:277)	25	T	S	RSSENIYSFLA (配列番号:286)

[0314] [表15]

	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	1.6E+05	7.8E-04	4.8E-09
H0L12	3.8E+05	7.4E-04	2.0E-09
H0L17	3.9E+05	8.1E-04	2.1E-09

[0315] 〔実施例１２〕完全ヒト化NS22抗体の作製

上記実施例で見出されたpIを低下させる改変、アフィニティーを上昇させる改変、H鎖の分解を抑える改変、免疫原性のリスクを低下させる改変をH0(H0-M58／配列番号：１３６)、H1(H1-M58／配列番号：２５７)、またはL0(L0／配列番号：５６)に対して複数組み合わせNS22改変体の可変領域を作成し、各種スクリーニングを実施した結果、H28L17(H鎖H28-M58／配列番号：２２４、L鎖L17／配列番号：２３８)、H30L17(H鎖H30-M58／配列番号：２２５、L鎖L17／配列番号：２３８)、H34L17(H鎖H34-M58／配列番号：２２６、L鎖L17／配列番号：２３８)、H42L17(H鎖H42-M58／配列番号：２２７、L鎖L17／配列番号：２３８)、H44L17(H鎖H44-M58／配列番号：２２８、L鎖L17／配列番号：２３８)、H46L17(H鎖H46-M58／配列番号：２２９、L鎖L17／配列番号：２３８)、H57L17(H鎖H57-M58／配列番号：２３０、L鎖L17／配列番号：２３８)、H71L17(H鎖H71-M58／配列番号：２３１、L鎖L17／配列番号：２３８)、H78L17(H鎖H78-M58／配列番号：２３２、L鎖L17／配列番号：２３８)、H92L17(H鎖H92-M58／配列番号：２３３、L鎖L17／配列番号：２３８)、H97L50(H鎖H97-M58／配列番号：２３４、L鎖L50／配列番号：２３９)、H98L50(H鎖H98-M58／配列番号：２３５、L鎖L50／配列番号：２３９)を見出した。改変体の作製、

精製は実施例4に記載した方法で行った。

[0316] 各改変体のNR10に対するアフィニティーおよびBaF/NR10を用いた生物活性を参考例１０および実施例２に記載した方法で行い、H0L0(H鎖 H0-M58／配列番号：１３６、L鎖 L0／配列番号：５６)と比較した。測定したアフィニティーの結果を表１６、BaF/NR10を用いた生物活性を図２５－１および図２５－２に示した。いずれの抗体のアフィニティー、生物活性ともにH0L0のそれとほぼ同等またはそれ以上を示すことが示された。

[0317] [表16]

サンプル	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
H0L0	2.1E+05	8.8E-04	4.2E-09
H28L17	6.4E+05	3.3E-04	5.2E-10
H30L17	6.8E+05	5.7E-04	8.3E-10
H34L17	3.4E+05	1.2E-03	3.6E-09
H42L17	5.7E+05	3.7E-04	6.5E-10
H44L17	6.1E+05	7.2E-04	1.2E-09
H46L17	2.9E+05	1.3E-03	4.6E-09
H57L17	7.1E+05	5.5E-04	7.7E-10
H71L17	3.7E+05	1.2E-03	3.3E-09
H78L17	6.1E+05	7.0E-04	1.1E-09
H92L17	3.1E+05	1.3E-03	4.1E-09
H97L50	3.6E+05	1.3E-03	3.5E-09
H98L50	2.9E+05	1.3E-03	4.6E-09

[0318] 〔実施例１３〕抗NR10中和抗体の結合ドメインの解析

（１）ヒト・マウス　野生型及びキメラ抗原の調製

ヒトとマウスの野生型及びキメラNR10細胞外領域（hhh（配列番号：２５８）、mmm（配列番号：２５９）、hhm（配列番号：２６０）、mmh（配列番号：２６１）、hmm（配列番号：２６２）、mhm（配列番号：２６３）、mhh（配列番号：２６４））をコードする遺伝子を、C末端にHisタグとMycタグ（HHHHHHEQKLISEEDL／配列番号：２８７）を付して動物細胞発現ベクターに挿入し、FreeStyle 293 Expression System（invitrogen™）で一過性発現させた。これらヒト・マウス野生型およびキメラNR10-ECDの模式図を図２６に示す。

[0319] 培養上清からのヒト・マウス野生型及びキメラ抗原（hhh、mmm、hhm、mmh、hmm、mhm、mhh）の精製は、Ni-NTA Superflowカラムクロマトグラフィーで行った。すなわち、Ni-NTA Superflow（QIAGEN）1 mLをポリプレップエンプティカラム（BioRad）に充填し、各30 mLの培養上清を添加し、150 mM塩化ナトリウムと20 mMイミダゾールを含むD-PBS（Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines）で洗浄したのち、150 mM塩化ナトリウムと250 mMイミダゾールを含むD-PBSで溶出した。溶出画分は分画分子量10 KのAmicon-Ultra（Millipore）でD-PBSに置換したのち、濃縮した。

[0320] （２）Western Blotによる結合抗原の検出

調製したヒト・マウス野生型及びキメラ抗原を各0.5μg/lane相当、4-20%ポリアクリルアミドゲル（第一化学）3枚にて電気泳動した。セミドライ型ブロッティング装置にてPVDF膜（Millipore）に電気的に転写し、5% SkimMilkを含むTBSにてブロッキングした。1枚（ヒト化抗ヒトNR10抗体検出系）は5μg/mLのH44M58L17にて、1枚（マウス抗ヒトNR10抗体検出系）は5μg/mLのND41にて、1枚（Mycタグ検出系）は5 % SkimMilkを含むTBSで500倍に希釈した抗Myc抗体（SantaCruz、Cat.#sc-789）にて室温で１時間反応させた。

[0321] 0.05% Tween™ 20を含むTBSで3分間3回洗浄したのち、二次抗体を反応させた。ヒト化抗ヒトNR10抗体検出系にはアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgGγ（BIOSOURCE、Cat.#AHI0305）を、マウス抗ヒトNR10抗体検出系にはアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG（SantaCruz、Cat.#sc-2008）を、Mycタグ検出系にはアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG（SantaCruz、Cat.#sc-2057）を用い、室温で1時間反応させた。0.05% Tween™ 20を含むTBSで3分間4回洗浄したのち、BCIP/NBT Phosphatase substrate, 1-Component System（KPL）により発色させた。ここで用いたTBS（Tris-Buffered Saline）は、TBS（Tris-Buffered-Saline）powder（TaKaRa）1包を蒸留水1 Lに溶解して調製した。結果を図２７に示す。

[0322] ヒト化抗体、マウス抗体を用いた場合は、NR10の細胞外領域であるhhh、hhm、hmmにのみ結合が検出された。

[0323] 〔参考例１〕カニクイザルNR10、OSMR、IL-31遺伝子の単離

前臨床段階での安全性評価のため、カニクイザルへの交差性・中和活性は重要であると考え、カニクイザルNR10遺伝子、OSMR遺伝子の単離を試みた。公開されているアカゲザルゲノム情報などからプライマーを設計し、PCR法によりカニクイザル膵臓cDNAからNR10遺伝子、OSMR遺伝子の増幅に成功した。単離したカニクイザルNR10、OSMR、IL-31の遺伝子配列を、配列番号：６５、６９、６７に示す。またカニクイザルNR10、OSMR、IL-31のアミノ酸配列を、配列番号：６６、７０、６８に示す。

[0324] 〔参考例２〕NR10およびOSMR発現Ba/F3細胞株の樹立

ヒト全長NR10 cDNA（配列番号：７５）を発現ベクターpCOS1（Biochem Biophys Res Commun. 228, p838-45, 1996）に組み込み、pCosNR10.3とした。オンコスタチンM受容体 cDNA（OSMR, GenBank accession No. NM003999）をヒト胎盤ライブラリーからPCR法により単離し、同様に、発現ベクターpCos1-hOSMRを構築した。マウスIL-3依存性pro-B細胞由来細胞株Ba/F3に、それぞれのベクター10μgずつを同時にエレクトロポレーション法で導入した（BioRad Gene Pulser, 960μF, 0.33 kV）。導入後は、ヒトIL-31（R&D Systems）を添加・培養し、IL-31依存性に増殖を示す細胞株（hNR10/hOSMR/BaF3細胞）を得た。また、カニクイザルIL-31遺伝子（配列番号：６７）を哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込み、CHO細胞株DG44に導入して、その培養上清としてカニクイザルIL-31を得た。この培養上清を用いて、hNR10/hOSMR/BaF3と同様に、カニクイザル全長NR10およびカニクイザルOSMR遺伝子を発現ベクターpCOS1にそれぞれ挿入し、Ba/F3細胞に発現させてカニクイザルIL-31依存性細胞株（cynNR10/cynOSMR/BaF3細胞）を樹立した。

[0325] 〔参考例３〕NR10発現CHO細胞株の樹立

細胞内領域欠失型ヒトNR10遺伝子（配列番号：７３）ならびに細胞内領域欠失型カニクイザルNR10遺伝子（配列番号：７１）をそれぞれ哺乳動物細胞用発現ベクターに挿入し、このベクターを制限酵素にて直鎖状にしたのち、CHO細胞株DG44にエレクトロポレーション法にて導入した（BioRad Gene Pulse

r, 25μF, 1.5 kV）。薬剤で選抜し、抗ヒトNR10抗体を用いてFCM解析によりNR10発現細胞を選択し、樹立した。なお細胞内領域欠失型ヒトNR10遺伝子の塩基配列（配列番号：７３）によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：７４、細胞内領域欠失型カニクイザルNR10遺伝子の塩基配列（配列番号：７１）によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：７２に示す。

[0326] 〔参考例４〕NR10蛋白（細胞外領域）の調製

ヒトNR10 cDNAを鋳型に、PCR法により細胞外領域のみを増幅し、またC末端にFLAGタグ配列を付加し、哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込んだ。直鎖状にしたこのベクター10μgをチャイニーズハムスター卵巣細胞株DG44へエレクトロポレーション法によって導入し（BioRad Gene PulserII, 25μF, 1.5 kV）、高発現を示す細胞株を得た。この細胞株を大量培養した培養上清から抗FLAG抗体カラム（SIGMA製）、ゲル濾過法により精製し可溶型NR10を得た。可溶型NR10の塩基配列を配列番号：７７に、アミノ酸配列を配列番号：７８に示す。

[0327] 〔参考例５〕抗ヒトNR10抗体の作製

ヒトNR10蛋白（細胞外領域）〔参考例４に記載〕をマウスに免疫し、通常の方法によりハイブリドーマを作製した。これらのハイブリドーマの培養上清を、参考例２で示したヒトIL-31依存性細胞株（hNR10/hOSMR/BaF3細胞）を用いた中和活性で評価し、NR10中和活性を有するNA633を得た。

[0328] また、ヒトNR10全長遺伝子（配列番号：７５）を挿入した哺乳動物用発現ベクターを用い、Heガス射出遺伝子銃を用いてDNA免疫を行い、通常の方法によりハイブリドーマを作製した。これらのハイブリドーマの培養上清を、参考例２で示したヒトIL-31依存性細胞株（hNR10/hOSMR/BaF3細胞）を用いた中和活性で評価し、NR10中和活性を有するND41を得た。

[0329] 〔参考例６〕ヒト・キメラ抗体の作成

NA633の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：１０４に、軽鎖鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：１０８に示す。又、NA633の重鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号：１０５に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号：

１０６に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号：１０７に、軽鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号：１０９に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号：１１０に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号：１１１に示す。さらに、常法にしたがい、これらマウス可変領域と、ヒト定常領域（H鎖はγ1，L鎖はκ）とのキメラ抗体を作製した。

[0330] 〔参考例７〕安定性を低下させること無く野生型IgG2のヘテロジェニティーを低減したhuPM1-SKSCの作製

NS22抗体はNR10中和抗体であることから、免疫原性や副作用を考慮した場合、Fcγレセプターへの結合は好ましくない可能性が考えられる。Fcγレセプターへの結合を減らすために、定常領域のアイソタイプをIgG1ではなく、IgG2あるいはIgG4を選択する方法が考えられ（Ann Hematol. 1998 Jun;76(6):231-48.）、Fcγレセプターlおよび血漿中滞留性の観点からはIgG4よりはIgG2が望ましいと考えられた（Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1369-72）。一方、抗体を医薬品として開発するにあたり、そのタンパク質の物性、中でも均一性と安定性は極めて重要であり、IgG2アイソタイプは、ヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーが極めて多いことが報告されている（J Biol Chem. 2008 Jun 6;283(23):16206-15.）。これに由来する目的物質/関連物質のヘテロジェニティーの製造間差を維持しつつ医薬品として大量に製造することは容易ではなくコスト増につながり、可能な限り単一物質であることが望まれる。よってIgG2アイソタイプの抗体を医薬品として開発する上には安定性を低下させることなくジスルフィド結合由来のヘテロジェニティーが低減されていることが望ましい。

[0331] 野生型IgG2のヘテロジェニティーを低減することを目的にIgG2のヒンジ部分のシステインおよびCH1ドメインに存在するシステインの改変を行った。各種改変体の検討の結果、野生型IgG2定常領域配列のうち、H鎖のCH1ドメインに存在するEUナンバリング(Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242)131番目のシステインと133番目のアルギニンをそれぞれセリンとリジンに改変し、H鎖のupper hingeに存在するEUナ

ンバリング219番目のシステインをセリンに改変した定常領域であるSKSC（配列番号：６２）によって、安定性を低下させることなくヘテロジェニティーを低減することが可能であると考えられる。一方、ヘテロジェニティーを低減する方法として、H鎖のupper hingeに存在するEUナンバリング219番目のシステインのみをセリンに改変する方法、および220番目のシステインのみをセリンに改変する方法が考えられる。そこで、IgG2のEUナンバリング219番目のシステインをセリンに改変した定常領域であるSC（配列番号：１５３）、およびIgG2のEUナンバリング220番目のシステインをセリンに改変した定常領域であるCS（配列番号：１５４）を作製した。

[0332] H鎖として、上記で作製した各定常領域とIgG1（配列番号：６０）、およびIgG2（配列番号：１３２）とヒト化抗IL-6レセプター抗体の可変領域（H鎖可変領域huPM1-VH／配列番号：１５５、L鎖可変領域huPM1-VL／配列番号：１５６）（Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6.）を組み合わせたhuPM1-SC（配列番号：１５７）、huPM1-CS（配列番号：１５８）、huPM1-IgG1（配列番号：１５９）、huPM1-IgG2（配列番号：１６０）及びhuPM1-SKSC（配列番号：１６１）を使用し、L鎖としてhuPM1-L（配列番号：１６２）を用いて各抗体を作製した。各抗体の発現・精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0333] それぞれの抗体のヘテロジェニティーの比較を行った。huPM1-IgG1、huPM1-IgG2、huPM1-SC、huPM1-CS、huPM1-SKSCのヘテロジェニティーの評価方法として、陽イオン交換クロマトグラフィーによる評価を行った。カラムとしてProPac WCX-10（Dionex）を使用し、移動相Ａとして20 mM Sodium Acetate, pH5.0、移動相Ｂとして20 mM Sodium Acetate, 1 M NaCl, pH5.0を使用し、適切な流量およびグラジエントを用いて実施した。陽イオン交換クロマトグラフィーによる評価を行った結果を図１２に示した。

[0334] その結果、図１２に示すとおり、定常領域をIgG1からIgG2に変換することでヘテロジェニティーが増大したが、定常領域をSKSCに変換することでヘテロジェニティーが大幅に低減された。一方、定常領域をSCにした場合は定常領域をSKSCとした場合と同様にヘテロジェニティーが大幅に低減されたが、

定常領域をCSにした場合は十分にヘテロジェニティーが改善しなかった。

[0335] 一般に抗体を医薬品として開発するためにはヘテロジェニティーが少ないことに加えて、安定な製剤を調製するため高い安定性を有することが望ましい。そこで安定性の評価方法として、示走差査型熱量測定（DSC）による熱変性中間温度（Tm値）の評価を行った（VP-DSC、Microcal社製）。熱変性中間温度（Tm値）は安定性の指標であり、医薬品として安定な製剤を作製するためには、熱変性中間温度（Tm値）が高いことが望ましい（J Pharm Sci. 2008 Apr;97(4):1414-26.）。そこで、huPM1-IgG1、huPM1-IgG2、huPM1-SC、huPM1-CS、huPM1-SKSCを20 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, pH6.0の溶液に対して透析（EasySEP, TOMY）を行い、約0.1 mg/mLのタンパク質濃度で、40℃から100℃まで1℃/minの昇温速度でDSC測定を行った。得られたDSCの変性曲線を図１３に、Fab部分のTm値を以下の表１７に示した。

[0336] [表17]

名称	Tm/℃
huPM1-IgG1	94.8
huPM1-IgG2	93.9
huPM1-SC	86.7
huPM1-CS	86.4
huPM1-SKSC	93.7

[0337] huPM1-IgG1およびhuPM1-IgG2のTm値はほぼ同等で約94℃程度（IgG2のほうが約1℃低い）であったのに対して、huPM1-SCおよびhuPM1-CSのTm値は約86℃であり、huPM1-IgG1およびhuPM1-IgG2と比較して著しくTm値が低下していた。一方、huPM1-SKSCのTm値は約94℃であり、ほぼhuPM1-IgG1およびhuPM1-IgG

2と同等であった。huPM1-SCおよびhuPM1-CSは安定性がIgG2と比較して著しく低いことから、医薬品として開発するためには、CH1ドメインのシステインもセリンに改変したhuPM1-SKSCのほうが好ましいと考えられた。huPM1-SCおよびhuPM1-CSのTm値がIgG2と比較して大幅に低下した理由として、huPM1-SCおよびhuPM1-CSはIgG2のジスルフィド結合パターンとは異なる様式を取っているためと考えられた。

[0338] また、DSC変性曲線を比較した場合、huPM1-IgG1およびhuPM1-SKSCのFab部分の変性ピークはシャープであったのに対して、huPM1-SCおよびhuPM1-CSはこれらと比較して、Fab部分の変性ピークがブロードであり、huPM1-IgG2はFab部分の変性ピークの低温側にショルダーピークが認められた。DSCの変性ピークは単一成分の場合は通常シャープな変性ピークを示すが、Tmが異なる複数成分（つまりヘテロジェニティー）が存在する場合、変性ピークはブロードになると考えられる。すなわち、huPM1-IgG2、huPM1-SCおよびhuPM1-CSには複数成分存在し、huPM1-SCおよびhuPM1-CSは、天然型IgG2のヘテロジェニティーが十分低減されていない可能性が示唆された。このことから、天然型IgG2のヘテロジェニティーはヒンジ部分のシステインのみならず、CH1ドメインに存在するシステインの両方が関与していると考えられ、DSC上のヘテロジェニティーを低減するためにはヒンジ部分のシステインのみならず、CH1ドメインのシステインも改変する必要があると考えられた。また、上述のとおり、ヒンジ部分のシステインのみならず、CH1ドメインのシステインを改変することで初めて天然型IgG2と同等の安定性を有することが可能である。

[0339] 以上より、IgG2のヒンジ領域に由来するヘテロジェニティーを低減した定常領域として、ヒンジ部分のシステインのみをセリンに置換した定常領域であるSCとCSはヘテロジェニティーおよび安定性の観点で不十分であると考えられ、CH1ドメインに存在するEUナンバリング131番目のシステインもセリンに置換することで初めてIgG2と同等の安定性を維持しつつヘテロジェニティーを大幅に低減することが可能であることが見出された。そのような定常領域としては、SKSCが挙げられた。

[0340] 〔参考例８〕Fcγレセプター非結合の最適化定常領域M14の作製と評価

IgG2の定常領域はFcγレセプター結合部位のうちEUナンバリング：２３３、２３４、２３５、２３６が非結合型であるが、Fcγレセプター結合部位のうちEUナンバリング：３２７、３３０、３３１番目は非結合型のIgG4とは異なる配列であるため、EUナンバリング：３２７、３３０、３３１番目のアミノ酸をIgG4の配列に改変する必要がある（Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24におけるG2Δa）。しかしながら、IgG4はEUナンバリング：３３９番目のアミノ酸がアラニンであるのに対して、IgG2はスレオニンであるため、EUナンバリング：３２７、３３０、３３１番目のアミノ酸をIgG4の配列に改変しただけでは天然には存在しないT-cellエピトープペプチドとなりうる９アミノ酸の新しいペプチド配列が出現してしまい、免疫原性のリスクが生じる。そこで、上述の改変に加えて新たにIgG2のEUナンバリング：３３９番目のスレオニンをアラニンに改変することで、新しいペプチド配列の出現を防ぐことが可能であることを見出した。これらの変異に加えて、IgG2の酸性条件下での安定性を向上させるIgG2のEUナンバリングの397番目のメチオニンからバリンへの変異を導入した。さらに、参考例７で作製したヒンジ領域のジスルフィド結合に由来するヘテロジェニティーを改善させるSKSC（配列番号：６２）は131番目と133番目の変異導入に伴い天然には存在しないT-cellエピトープペプチドとなりうる９アミノ酸の新しいペプチド配列が出現してしまい免疫原性リスクが生じることから、EUナンバリングの137番目のグルタミン酸からグリシンへの変異、138番目のセリンからグリシンへの変異を導入することで、131番目から139番目付近のペプチド配列をIgG1と同一のものとした。これらの変異を全て導入した定常領域配列M14（配列番号：１２９）を作成した。

[0341] H鎖としてhuPM1-M14、L鎖としてhuPM1-L（配列番号：１６２）を用いたhuPM1-M14の発現・精製は参考例７に記載した方法で行った。作製したhuPM1-M14（配列番号：１６３）およびhuPM1-IgG1、huPM1-IgG2のヘテロジェニティーの評価を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて、参考例７に記載した方

法で実施した。

図１４に示すとおり、huPM1-M14においてもhuPM1-SKSCと同様ヘテロが低減された。

[0342] 〔参考例９〕H鎖C末端側のヘテロジェニティーを低減させ、薬物動態を向上したhuPM1-M58の作製

huPM1-M58分子の作製

huPM1はIgG1抗体である。IgG抗体のH鎖C末端配列のヘテロジェニティーとして、C末端アミノ酸のリジン残基の欠損、および、C末端の２アミノ酸のグリシン、リジン両方の欠損によるC末端アミノ基のアミド化が報告されている（Anal Biochem. 2007 Jan 1;360(1):75-83.）。huPM1においても、その主成分は塩基配列上存在するC末端アミノ酸のリジンが翻訳後修飾により欠損した配列であるが、リジンが残存している副成分およびグリシン、リジン両方の欠損によるC末端アミノ基のアミド化された副成分もヘテロジェニティーとして存在する。目的物質/関連物質のヘテロジェニティーの製造間差を維持しつつ医薬品として大量に製造することは容易ではなくコスト増につながり、可能な限り単一物質であることが望まれ、抗体を医薬品として開発する上にはこれらのヘテロジェニティーが低減されていることが望ましい。よって医薬品として開発する上ではH鎖C末端のヘテロジェニティーは存在しないことが望ましい。また、抗体の投与量を減らすためには、抗体の血漿中半減期を長くすることが望ましい。

[0343] そこで、H鎖C末端側のヘテロジェニティーを低減させ、huPM1-IgG1より薬物動態が改善し、且つ、野生型IgG2に由来するヘテロジェニティーを安定性を低下させること無く低減させた新規定常領域を作製することを目的に以下の改変を導入した。

[0344] 具体的には、高い安定性を有しIgG2アイソタイプの定常領域の抗体に関する上述のヘテロジェニティーが低減されたhuPM1-SKSCに対して、EUナンバリング137番目のグルタミン酸をグリシンに138番目のセリンをグリシンに、268番目のヒスチジンをグルタミンに、355番目のアルギニンをグルタミンに、41

9番目のグルタミンをグルタミン酸に置換し、これに加えてH鎖C末端のヘテロジェニティーを低減するために446番目のグリシンおよび447番目のリジンを欠損させたhuPM1-M58（配列番号：１６４）を見出した。H鎖としてhuPM1-M58、L鎖としてhuPM1-L（配列番号：１６２）を用いたhuPM1-M58の発現・精製は実施例４に記載した方法で行った。

[0345] 作製したhuPM1-M58およびhuPM1-IgG1、huPM1-IgG2のヘテロジェニティーの評価を陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて、安定性の評価をDSCを用いて、それぞれ実施例５に記載した方法で実施した。

[0346] DSCの結果を表１８に示す。また図１３および１６に示すとおり、huPM1-M58においてもhuPM1-SKSCと同様、安定性を損なうことなくヘテロジェニティーが低減されている。

[0347] [表18]

名称	Tm/℃
huPM1-IgG1	94.8
huPM1-IgG2	93.9
huPM1-SKSC	93.7
huPM1-M58	93.7

[0348] huPM1-M58の血漿中滞留性評価

IgG分子の血漿中滞留性が長い（消失が遅い）のは、IgG分子のサルベージレセプターとして知られているFcRnが機能しているためである（Nat Rev Immunol. 2007 Sep;7(9):715-25）。ピノサイトーシスによってエンドソームに取り込まれたIgG分子は、エンドソーム内の酸性条件下（pH6.0付近）においてエンドソーム内に発現しているFcRnに結合する。FcRnに結合できなかったIgG分子はライソソームへ進みライソソームで分解されるが、FcRnへ結合したI

gG分子は細胞表面へ移行し血漿中の中性条件下（pH7.4付近）においてFcRnから解離することで再び血漿中に戻る。

[0349] IgGタイプの抗体として、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4のアイソタイプが知られているが、これらのヒトでの血漿中半減期は、IgG1、IgG2が約36日、IgG3が約29日、IgG4が16日であることが報告されており（Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1369-72.）、IgG1およびIgG2の血漿中滞留性が最も長いと考えられている。一般に抗体医薬のアイソタイプはIgG1、IgG2、IgG4であるが、これらのIgG抗体の薬物動態をさらに向上する方法として、IgGの定常領域の配列を改変することで上述のヒトFcRnへの結合性を向上させる方法が報告されている（J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1709-17、J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56）。

[0350] マウスFcRnとヒトFcRnでは種差が存在することから（Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 5;103(49):18709-14）、定常領域の配列を改変したIgG抗体のヒトにおける血漿中滞留性を予測するためには、ヒトFcRnへの結合評価およびヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて血漿中滞留性を評価することが望ましいと考えられた（Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69）。

[0351] ヒトFcRnへの結合評価

FcRnはFcRnとβ2-microglobulinの複合体である。公開されているヒトFcRn遺伝子配列（J. Exp. Med. 180 (6), 2377-2381 (1994)）を元に、オリゴDNAプライマーを作製した。ヒトcDNA（Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech）を鋳型とし、作製したプライマーを用いPCR法により遺伝子全長をコードするDNA断片を調整した。得られたDNA断片を鋳型に、PCR法によりシグナル領域を含む細胞外領域（Met1-Leu290）をコードするDNA断片を増幅し、動物細胞発現ベクターへ挿入した（ヒトFcRnアミノ酸配列／配列番号：１６５）。同様に、公開されているヒトβ2-microglobulin遺伝子配列（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002)）を元に、オリゴDNAプライマーを作製した。ヒトcDNA（Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH）を鋳型とし、作製したプライマーを用いPCR法により遺伝子全長をコー

ドするDNA断片を調製した。得られたDNA断片を鋳型に、PCR法によりシグナル領域を含むβ2-microglobulin全長（Met1-Met119）をコードするDNA断片を増幅し、動物細胞発現ベクターへ挿入した（ヒトβ2-microglobulinアミノ酸配列／配列番号：１６６）。

[0352] 可溶型ヒトFcRnの発現はヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株（Invitrogen）を10% Fetal Bovine Serum（Invitrogen）を用いて、調製したヒトFcRnおよびヒトβ2-microglobulinのプラスミドをlipofection法により細胞へ導入した。得られた培養上清を回収した後、IgG Sepharose 6 Fast Flow（Amersham Biosciences）を用い、（J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80.）の方法に従い精製を行った。その後、HiTrap Q HP（GE Healthcare）により精製を行った。

[0353] ヒトFcRnへの結合評価にはBiacore 3000を用い、センサーチップに固定化したProtein Lあるいはウサギ抗ヒトIgG Kappa chain抗体へ結合させた抗体に、アナライトとしてヒトFcRnを相互作用させた際のヒトFcRnの結合量よりaffinity（KD）を算出した。具体的には、ランニングバッファーとして150 mM NaClを含む50 mM Na-phosphate buffer、pH6.0を用い、アミンカップリング法によりセンサーチップCM5（BIACORE）にProtein Lを固定化した。その後、抗体を0.02% Tween20を含むランニングバッファーで希釈してインジェクトしチップに抗体を結合させた後、ヒトFcRnをインジェクトし、抗体のヒトFcRnへの結合性を評価した。

[0354] Affinityの算出にはソフトウエア、BIAevaluationを用いた。得られたセンサーグラムより、ヒトFcRnインジェクト終了直前の抗体へのhFcRn結合量を求め、これをsteady state affinity法でフィッティングして抗体へのヒトFcRnのaffinityを算出した。

[0355] <u>huPM1-IgG1、huPM1-M58のヒトFcRnを用いたヒトにおける血漿中滞留性の予測評価</u>

huPM1-IgG1およびhuPM1-M58のヒトFcRnへの結合性の評価をBIAcoreにより行った。表１９に示すとおり、huPM1-M58の結合性はhuPM1-IgG1よりも約1.4

倍程度優れていた。

[0356] [表19]

	KD(μM)
huPM1-IgG1	1.62
huPM1-M58	1.17

[0357] ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性の評価

ヒトFcRnトランスジェニックマウス（B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 276 +/+ マウス、Jackson Laboratories）における薬物動態の評価は以下の通り行った。抗体をマウスに1 mg/kgの投与量で静脈内に単回投与し適時採血を行った。採取した血液は直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存した。血漿中濃度はELISA法を用いて測定した。

[0358] huPM1-IgG1、huPM1-M58のヒトFcRnトランスジェニックを用いたヒトにおける血漿中滞留性の予測評価

huPM1-IgG1およびhuPM1-M58のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性の評価を行った。その結果、図１７に示すとおり、huPM1-M58はhuPM1-IgG1と比較して薬物動態の改善が確認された。ヒトFcRnへの結合性とヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中滞留性は相関することが示唆された。

[0359] 〔参考例１０〕Biacore を用いた抗原抗体反応のアフィニティ測定

Biacore T100（GEヘルスケア　バイオサイエンス）を用いて、抗原抗体反応の速度論的解析を行った。センサーチップ上にrec-Protein A（ZYMED）（以下、Protein A）を固定化し、この固定化Protein Aに抗体を捕捉し、さらに抗原をアナライトとして反応させ、抗体と抗原の相互作用を測定した。抗原には種々の濃度に調製した rhNR10を用いた。測定で得られたセンサーグラ

ムから、カイネティクスパラメターである結合速度定数 k_a (1/Ms) 、および解離速度定数 k_d (1/s) を算出し、その値をもとに K_D (M) を算出した。各パラメターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software version 1.1 (GEヘルスケア　バイオサイエンス) を用いた。

[0360] センサーチップへの Protein A の固定化

アミンカップリング法によりセンサーチップCM5 (GEヘルスケア　バイオサイエンス) のすべてのフローセルにProtein Aを固定化した。ランニングバッファーにはHBS-EP+ (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% v/v Surfactant P20) を用い、流速 10 μL/min で実験を行った。センサーチップ上のカルボキシメチルデキストランのカルボキシル基を75 mg/mL EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) と11.5 mg/mL NHS (N-hydroxysuccinimide) の 1:1 混合液　100μLにより活性化し、そこへ10 mM 酢酸バッファー (pH4.5) で50μg/mL に調製したProtein A を流し、反応させた。その後、1 M ethanolamine hydrochloride (pH8.5) を100μL流し、未反応の活性基を不活化した。最終的に約4000-5000 RU固定化した。実験はすべて25℃で行った。

[0361] Protein A に捕捉させた抗体とrhNR10の抗原抗体反応のアフィニティ測定

ランニングバッファーにはHBS-EP+ を用いた。各抗体は0.25μg/mL、あるいは、Protein Aに約100 RU結合するように調製した。アナライトとして用いたrhNR10はHBS-EP+ を用いて0、38.5、77.0、154 nM、あるいは、0、19.25、77.01 nMに調製した。測定はまず抗体溶液をProtein Aに捕捉させ、さらに流速20μL/minにて、アナライト溶液を 3 min反応させ、その後HBS-EP+ に切り替え5 min解離相を測定した。解離相の測定終了後、10 mM glycine-HCl (pH1.5) で洗浄し、センサーチップを再生した。得られたセンサーグラムから、Biacore専用のデータ解析ソフトウェアである Biacore T100 Evaluation Software Version 1.1を用いて速度論的な解析を行った。

産業上の利用可能性

[0362] 本発明者によって取得された抗NR10抗体は、NR10に対して有効な中和活性

を示し、例えば炎症性疾患治療剤として有用である。

請求の範囲

[請求項1] 以下の(1)～(20)のいずれかに記載の抗体可変領域、又は抗体；

(1) 配列番号：１９６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１１に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H17）、

(2) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１１に記載のCDR３を含む重鎖可変領域（H19）、

(3) 配列番号：１９６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H28、H42）、

(4) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H30、H44）、

(5) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９７に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H34、H46）、

(6) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９８に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H57、H78）、

(7) 配列番号：１７６に記載のCDR1、配列番号：１９８に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域。（H71、H92）、

(8) 配列番号：９に記載のCDR1、配列番号：１９９に記載のCDR2、配列番号：１８４に記載のCDR3を含む重鎖可変領域（H97、H98）、

(9) 配列番号：２００に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L11）、

(10) 配列番号：２０１に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L12）、

(11) 配列番号：２０２に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCDR2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L17）、

(12) 配列番号：２０３に記載のCDR1、配列番号：１７０に記載のCD

R2、配列番号：１９３に記載のCDR3を含む軽鎖可変領域（L50）、

(13) (3)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(14) (4)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(15) (5)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(16) (6)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(17) (7)の重鎖可変領域と(11)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(18) (8)の重鎖可変領域と(12)の軽鎖可変領域を含む抗体、

(19) (13)～(18)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(13)～(18)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(20) (13)～(18)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[請求項2] 以下の(1)～(32)のいずれかに記載の抗体可変領域または抗体；

(1) 配列番号：２０４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H17）、

(2) 配列番号：２０５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H19）、

(3) 配列番号：２０６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H28）、

(4) 配列番号：２０７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H30）、

(5) 配列番号：２０８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H34）、

(6) 配列番号：２０９に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H42）、

(7) 配列番号：２１０に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H44）、

(8) 配列番号：２１１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

（H46）、

(9) 配列番号：２１２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H57）、

(10) 配列番号：２１３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H71）、

(11) 配列番号：２１４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H78）、

(12) 配列番号：２１５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H92）、

(13) 配列番号：２１６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H97）、

(14) 配列番号：２１７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H98）、

(15) 配列番号：２１８に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L11）、

(16) 配列番号：２１９に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L12）、

(17) 配列番号：２２０に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L17）、

(18) 配列番号：２２１に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L50）、

(19) (3)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H28L17）、

(20) (4)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H30L17）、

(21) (5)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H34L17）、

(22) (6)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H42L17

）、

(23) (7)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H44L17）、

(24) (8)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H46L17）、

(25) (9)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H57L17）、

(26) (10)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H71L17）、

(27) (11)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H78L17）、

(28) (12)の重鎖可変領域と(17)の軽鎖可変領域を含む抗体（H92L17）、

(29) (13)の重鎖可変領域と(18)の軽鎖可変領域を含む抗体（H97L50）、

(30) (14)の重鎖可変領域と(18)の軽鎖可変領域を含む抗体（H98L50）、

(31) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(19)～(30)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(32) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[請求項3] ヒト化抗体である、請求項１または２に記載の抗NR10抗体。

[請求項4] 以下の(1)～(32)のいずれかの抗体重鎖、抗体軽鎖、または抗体；

(1) 配列番号：２２２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H17）、

(2) 配列番号：２２３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H19）、

(3) 配列番号：２２４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H28）、

(4) 配列番号：２２５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H30）、

(5) 配列番号：２２６に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H34）、

(6) 配列番号：２２７に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H42）、

(7) 配列番号：２２８に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H44）、

(8) 配列番号：２２９に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H46）、

(9) 配列番号：２３０に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H57）、

(10) 配列番号：２３１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H71）

、

(11) 配列番号：２３２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H78）

、

(12) 配列番号：２３３に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H92）

、

(13) 配列番号：２３４に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H97）

、

(14) 配列番号：２３５に記載のアミノ酸配列を有する重鎖（H98）

、

(15) 配列番号：２３６に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L11）

、

(16) 配列番号：２３７に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L12）

、

(17) 配列番号：２３８に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L17）

、

(18) 配列番号：２３９に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖（L50）

、

(19) (3)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H28L17）、

(20) (4)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H30L17）、

(21) (5)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H34L17）、

(22) (6)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H42L17）、

(23) (7)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H44L17）、

(24) (8)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H46L17）、

(25) (9)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H57L17）、

(26) (10)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H71L17）、

(27) (11)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H78L17）、

(28) (12)の重鎖と(17)の軽鎖を含む抗体（H92L17）、

(29) (13)の重鎖と(18)の軽鎖を含む抗体（H97L50）、

(30) (14)の重鎖と(18)の軽鎖を含む抗体（H98L50）、

(31) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入された抗体であって、(19)～(30)いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(32) (19)～(30)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[請求項5] 請求項１～４のいずれかに記載の抗体を含む医薬組成物。

[請求項6] 炎症性疾患治療剤である請求項５に記載の医薬組成物。