

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4970258号  
(P4970258)

(45) 発行日 平成24年7月4日(2012.7.4)

(24) 登録日 平成24年4月13日(2012.4.13)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 11/06 (2006.01)

A 6 1 P 17/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 U

A 6 1 P 11/06

A 6 1 P 17/00

A 6 1 P 11/00

請求項の数 31 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-527694 (P2007-527694)  
 (86) (22) 出願日 平成17年6月9日(2005.6.9)  
 (65) 公表番号 特表2008-502366 (P2008-502366A)  
 (43) 公表日 平成20年1月31日(2008.1.31)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/020160  
 (87) 国際公開番号 W02005/123126  
 (87) 国際公開日 平成17年12月29日(2005.12.29)  
 審査請求日 平成20年6月9日(2008.6.9)  
 (31) 優先権主張番号 60/578,473  
 (32) 優先日 平成16年6月9日(2004.6.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/578,736  
 (32) 優先日 平成16年6月9日(2004.6.9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 309040701  
 ワイス・エルエルシー  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O  
 7940. マジソン, ファイブ ジラルダ  
 ファームズ  
 (74) 代理人 100096666  
 弁理士 室伏 良信  
 (74) 代理人 100131934  
 弁理士 ▲高▼橋 宏次  
 (74) 代理人 100137040  
 弁理士 宮澤 純子  
 (74) 代理人 100133927  
 弁理士 四本 能尚  
 (74) 代理人 100147186  
 弁理士 佐藤 真紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトインターロイキン-13に対する抗体およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖免疫グロブリン可変ドメインおよび軽鎖免疫グロブリン可変ドメインを含む精製抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、表面プラズモン共鳴 (SPR) により決定された場合に  $10^{-7}$  M未満の  $K_D$  で IL-13 と結合し、軽鎖免疫グロブリン可変ドメインが下記：

(i) CDR1 において K A S E S V D N Y G K S L M H (配列番号19)；

(ii) CDR2 において R A S N L E S (配列番号20)；および

(iii) CDR3 において Q Q S N E D P W T (配列番号21)

で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、重鎖免疫グロブリン可変ドメインが下記：

(i) CDR1 において I S Y A M S (配列番号22)；

(ii) CDR2 において S I S S G G N T Y Y P D S V K G (配列番号23)；および

(iii) CDR3 において L D G Y Y F G F A Y (配列番号24)

で示されるアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項2】

F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> または s c F v である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項3】

ヒトフレームワーク領域、ヒト F c 領域またはその両方を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 4】

重鎖免疫グロブリン可変領域が、配列番号 7、8 または 34 のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 5】

軽鎖免疫グロブリン可変領域が、配列番号 3、4 または 33 のヌクレオチド配列を含む核酸によりコードされるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 6】

重鎖免疫グロブリン可変ドメインが、配列番号 15、16 または 36 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

10

## 【請求項 7】

軽鎖免疫グロブリン可変ドメインが、配列番号 11、12 または 35 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 8】

さらに配列番号 17 のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 9】

さらに配列番号 18 のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

20

## 【請求項 10】

Fc 受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基数、エフェクター細胞機能または補体機能のうちの 1 つまたはそれ以上を減少させるために変異された定常領域を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 11】

さらに配列番号 17 の 1 つまたはそれ以上の残基 116 および 119 において変異されたヒト IgG1 定常領域を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

## 【請求項 12】

重鎖免疫グロブリン可変ドメインが、配列番号 15、16 または 36 のアミノ酸 SER50 (CDR2)、SER53 (CDR2)、TYR101 (CDR3) および TYR102 (CDR3) において水素結合を介して IL-13 と接触し、軽鎖免疫グロブリン可変ドメインが、配列番号 11、12 または 35 の ASN31 (CDR1)、TYR32 (CDR1)、LYS34 (CDR1)、ASN96 (CDR3) および ASP98 (CDR3) において水素結合を介して IL-13 と接触する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

30

## 【請求項 13】

軽鎖免疫グロブリン可変ドメインが、配列番号 11、12 または 35 の ASN31 (CDR1)、TYR32 (CDR1)、LYS34 (CDR1)、ARG54 (CDR2)、ASN96 (CDR3)、ASP98 (CDR3) および TRP100 (CDR3) において IL-13 と接触し、重鎖免疫グロブリン可変ドメインが、配列番号 15、16 または 36 の ILE30、SER31 (CDR1)、ALA33 (CDR1)、TRP47、SER50 (CDR2)、SER52 (CDR2)、SER53 (CDR2)、TYR58 (CDR2)、LEU98 (CDR3)、ASP99 (CDR3)、GLY100 (CDR3)、TYR101 (CDR3)、TYR102 (CDR3) および PHE103 (CDR3) において IL-13 と接触する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

40

## 【請求項 14】

配列番号 32 の GLU49、ASN53、GLY69、PRO72、HIS73、LYS74 および ARG86 において IL-13 と接触する、請求項 1 に記載の抗体またはそ

50

の抗原結合性フラグメント。

【請求項 15】

表面プラズモン共鳴 (SPR) により決定された場合に  $90 \sim 120 \text{ pM}$  の  $K_D$  でヒト IL-13 と結合する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 16】

表面プラズモン共鳴 (SPR) により決定された場合に  $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の  $K_{on}$  かつ  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  未満の  $K_{off}$  でヒト IL-13 と結合する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、下記：

(a) 以下のアミノ酸残基：配列番号 32 の 49 位のグルタミン酸、53 位のアスパラギン、69 位のグリシン、72 位のプロリン、73 位のアスチジン、74 位のリジンおよび 86 位のアルギニンのうちの 1 つまたはそれ以上またはそれらの保存的アミノ酸置換を含むヒト IL-13 のエピトープと特異的に結合すること、

(b) IL-13 と IL-13R 1 の複合体と結合すること、

(c) IL-13 と IL-4R の間の結合相互作用を妨害すること、

(d) IL-13 と IL-13R 1 の複合体と IL-4R の間の結合相互作用を妨害すること、

(e) 末梢血単球において低親和性 IgE 受容体 (CD23) の細胞表面発現を低減させること、

(f) 培養 B 細胞において IL-13 仲介 IgE アイスotypスウィッチを低減させること、

(g) STAT6 の IL-13 依存性リン酸化を低減させること、または

(h) 抗原誘発性気道炎症を有するマウスにおいて好酸球の気道中への流入を中和すること；

で示される特性の 1 つまたはそれ以上を有する、抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 18】

2 つの免疫グロブリン鎖、すなわち、配列番号 12 を含む軽鎖および配列番号 16 を含む重鎖を含む、単離された組換え IgG 抗体。

【請求項 19】

精製されるか、もしくは組み換えられた、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 20】

請求項 1 から 17 および 19 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントおよび薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 21】

皮下、吸入または局所投与に適合している、請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

1 つまたはそれ以上のさらなる治療剤を含む、請求項 20 または 21 に記載の医薬組成物であって、1 つまたはそれ以上のさらなる治療剤が、吸入ステロイド；アゴニスト；ロイコトリエンアンタゴニストまたはロイコトリエン受容体アンタゴニスト；IgE 阻害剤；ホスホジエステラーゼ阻害剤；キサンチン；抗コリン薬；肥満細胞安定化薬；IL-4 阻害剤；IL-5 阻害剤；エオタキシン / CCR3 阻害剤；抗ヒスタミン薬；TNF アンタゴニスト；TNF 酵素アンタゴニスト；TGF- $\beta$  アンタゴニスト；インターフェロンガンマ；ペルフェニドン (perfenidone)；化学療法剤；NSAID；免疫調節薬；p38 阻害剤および NF- $\kappa$ B 阻害剤からなる群から選択されるものである、医薬組成物。

【請求項 23】

有効成分として請求項 1 から 17 および 19 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗

10

20

30

40

50

原結合性フラグメントを含む I L - 1 3 関連障害の治療用医薬組成物であって、該 I L - 1 3 関連障害が、呼吸器障害、アトピー性障害、アレルギー性鼻炎、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D )、気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む状態、炎症性状態、自己免疫性状態、腫瘍または癌、ウイルス感染ならびに防御性 1 型免疫応答の発現の抑制からなる群から選択される、医薬組成物。

【請求項 2 4】

障害が、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

インビトロにおいてサンプル中の I L - 1 3 の存在を検出する方法であって、  
( i ) サンプルを、請求項 1 から 1 7 および 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントと接触させること、および  
( i i ) 抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントとサンプルの間の複合体の形成を検出すること  
を含み、サンプルにおける複合体の形成がサンプルにおける I L - 1 3 の存在を示す、方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 1 7 および 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸配列を含む、核酸。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の核酸配列を含む、発現ベクター。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 1 7 および 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸配列を含む、インビトロ宿主細胞。

【請求項 2 9】

組換え抗体を提供する方法であって、  
請求項 2 8 に記載の宿主細胞を提供すること、および  
抗体またはその抗原結合性フラグメントが発現される条件下で細胞を維持することを含む方法。

【請求項 3 0】

さらに、宿主細胞または宿主細胞が維持されている培地からタンパク質を単離することを含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する重鎖定常領域、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域を含む、抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2004年6月9日に出願した米国特許出願第60/578,473号、2004年6月22日に出願した第60/581,375号および2004年6月9日に出願した第60/578,736号の優先権を主張するものである。それらすべての全内容は、参照により本明細書に組み込まれるものとする。「Anti-IL13 Antibodies and Complexes」という表題が付けられ、Parris, K. D. 他の名前で2005年6月9日に出願され、代理人整理番号16163-029001/AM101750(本明細書において「出願16163-029001」と呼ばれる)で表記される米国一般特許出願も、参照により組み込まれる。

【0002】

本出願は、インターロイキン-13 ( I L - 1 3 )、特に、ヒト I L - 1 3 と結合する

10

20

30

40

50

抗体、例えば、ヒト化抗体およびそれらの抗原結合性フラグメント、ならびにIL-13により仲介される免疫応答を調節する際のそれらの使用に関する。本明細書に開示されている抗体は、対象、例えば、ヒト患者において、1つまたはそれ以上のIL-13関連障害、例えば、呼吸器障害（例えば、喘息）；アトピー性障害（例えば、アレルギー性鼻炎）；皮膚（例えば、アトピー性皮膚炎）および胃腸器官（例えば、炎症性腸疾患（IBD））の炎症性および/または自己免疫性状態、ならびに線維性および癌性障害を診断、予防および/または治療するのに有用である。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

インターロイキン-13（IL-13）は、Tリンパ球および肥満細胞により分泌されるサイトカインである（McKenzie他（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3735-39；Bost他（1996）Immunology 87:663-41）。IL-13は、IL-4といくつかの生物学的活性を共有している。例えば、IL-4かIL-13のどちらかは、B細胞においてIgEアイソタイプスイッチングを引き起こすことがある（Tomkinson他（2001）J. Immunol. 166:5792-5800）。さらに、喘息患者では、細胞表面CD23および血清CD23（sCD23）のレベル増加が報告されている（Sanchez-Guerrero他（1994）Allergy 49:587-92；Di Lorenzo他（1999）Allergy Asthma Proc. 20:119-25）。さらに、IL-4かIL-13のどちらかは、B細胞および単球上のMHCクラスIIおよび低親和性IgE受容体（CD23）の発現をアップレギュレートすることがあり、これは、抗原提示を増強しマクロファージ機能を調節する結果になる（Tomkinson他、前掲書）。重要なことに、IL-4かIL-13のどちらかは、内皮細胞上のVCAM-1の発現を高めることがあり、これは、気道組織への好酸球（およびT細胞）の優先的動員を容易にする（Tomkinson他、前掲書）。また、IL-4かIL-13のどちらかは、気道粘液分泌を増加させることがあり、これは、気道反応性を悪化させることがある（Tomkinson他、前掲書）。これらの知見は、IL-13が、Th2発生を誘導するのに必要ないか、あるいはTh2発生を誘導することができても、IL-13は、気道好酸球増加症およびAHRの発生におけるキープレイヤーであることを示唆している（Tomkinson他、前掲書；Wills-Karp他（1998）Science 282:2258-61）。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0004】

本出願は、とりわけ、高い親和性および特異性でIL-13、特に、ヒトIL-13と結合する、抗体およびそれらの抗原結合性フラグメントが含まれるIL-13アンタゴニストであるIL-13結合性物質を提供する。また、本開示の抗体およびそれらの抗原結合性フラグメントは、本明細書においてそれぞれ「抗IL-13抗体」および「それらのフラグメント」と呼ばれる。一実施形態において、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、少なくとも1つのIL-13関連活性を低減、中和および/またはアンタゴニズする。例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13、例えば、IL-13のエピトープと結合し、相互作用、例えば、IL-13とIL-13受容体複合体（「IL-13R」）、例えば、IL-13受容体 1（「IL-13R 1」）およびインターロイキン-4受容体 鎖（「IL-4R」）、またはそれらのサブユニット（例えば、個別にIL-13R 1またはIL-4R）を含む複合体との間の結合を妨害することができる。したがって、本明細書に記載されている抗体およびそれらのフラグメントを用い、相互作用、例えば、IL-13とIL-13受容体複合体、またはそのサブユニットとの間の結合を妨害し、それによって機能性シグナル伝達複合体の形成を妨害することができる。

#### 【0005】

さらに、我々は、中和抗IL-13抗体の投与が、とりわけ、抗原誘発性肺炎症、例えば、それぞれ非ヒト霊長類およびヒツジにおいて好酸球増加症および気管支収縮を改善することを明らかにした。したがって、IL-13アンタゴニスト、例えば、中和抗IL-13抗体およびそれらのフラグメントを用い、インビボで少なくとも1つのIL-13関連活性、例えば、炎症性状態（例えば、肺炎症）を改善することができる。さらに中和抗IL-13抗体およびそれらのフラグメントを用い、アトピー患者由来の細胞のIL-13に対する感受性増強を改善することができる。したがって、抗体またはそれらのフラグメントは、季節性アレルギー、例えば、アレルギー性鼻炎の治療に使用することができる。抗IL-13抗体またはそれらのフラグメント（本明細書に記載されているフラグメントが含まれる）は、対象、例えば、ヒト患者において、1つまたはそれ以上のIL-13関連障害、例えば、呼吸器障害（例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）が含まれる喘息）、ならびに気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む状態（例えば、嚢胞性線維症および肺線維症）；アトピー性障害（例えば、アレルギー性鼻炎）；皮膚（例えば、アトピー性皮膚炎）、胃腸器官（例えば、炎症性腸疾患（IBD））、肝臓（例えば、肝硬変）の炎症性および/または自己免疫性状態；ウイルス感染；強皮症および肝線維症などの他の器官の線維症を診断、治療および/または予防するのに有用である。

#### 【0006】

したがって、一態様において、本出願は、IL-13アンタゴニストなどのIL-13結合性物質を扱う。IL-13結合性物質は、IL-13、特に、哺乳類IL-13、例えば、ヒト、ヒツジ、または非ヒト霊長類IL-13と相互作用する、例えば、それらと結合しかつ/またはそれらを中和するタンパク質、例えば、抗体またはその抗原結合性フラグメント、ペプチド、または骨格ドメインであってよい。抗体は、単離抗体であってよい。一実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、中和抗体であり、例えば、中和抗体は、とりわけ、CD23発現の誘導；ヒトB細胞によるIgEの産生；転写因子、例えば、STATタンパク質（例えば、STAT6タンパク質）のリン酸化；インビボでの抗原誘発性好酸球増加症；インビボでの抗原誘発性気管支収縮；またはインビボでの薬物誘発性気道過反応性が含まれるがこれらに限定されない1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を低減および/または阻害する。

#### 【0007】

本明細書に記載されているIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、高い親和性で、例えば、 $10^{-7}$  M未満、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$  Mまたはより優れたKdでIL-13と結合することができる。例えば、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、50~500 pM、例えば、90~120 pM、例えば、95~105 pMの親和性でIL-13と結合することができる。一実施形態において、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、少なくとも約50 nM~5 pM、通常は約100~250 pMまたはより強いIC<sub>50</sub>で1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和することができる。他の実施形態において、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、 $10^3 \sim 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>、通常は $10^4 \sim 10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>の範囲の速度でIL-13と会合する。例えば、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、 $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>の範囲の速度でIL-13と会合することがある。さらに別の実施形態において、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、 $10^{-2} \sim 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>、通常は $10^{-3} \sim 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>の範囲の、例えば、 $5 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup>より遅い、例えば、9、8、 $6 \times 10^{-5}$  s<sup>-1</sup>の解離速度を有する。一実施形態において、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントは、モノクローナル抗体13.2（「mAb 13.2」）、またはその修飾形態、例えば、キメラ形態（例えば、「ch 13.2」）、またはそのヒト化形態（例えば、「h 13.2 v 1」、「h 13.2 v 2」または「h 13.2 v 3」）と類似した親和性および/または速度でIL-13、例えば、ヒトIL-13と結合する。抗IL-13抗体またはそのフラグメントの親和性および結合速度は、例えば、バイオセンサー技術（B

10

20

30

40

50

I A C O R E ( 商 標 ) ) を用いて試験することができる ( 以下の実施例 1 . 2 を参照 ) 。

【 0 0 0 8 】

一実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメント ( 例えば、F a b、F ( a b ' ) <sub>2</sub>、F v、または単鎖 F v フラグメント ) は、モノクローナル抗体または単一の特異性を持つ抗体である。また、抗体またはそのフラグメントは、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはインビトロ生成抗体であってよい。一実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントは、ヒト化抗体である。一実施形態において、抗体は、効率的にヒトである。

【 0 0 0 9 】

抗 I L - 1 3 抗体の重鎖および軽鎖は、完全長であってよい ( 例えば、ある抗体には、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの完全な重鎖および少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの完全な軽鎖が含まれてよい )、あるいは抗原結合性フラグメント ( 例えば、F a b、F ( a b ' ) <sub>2</sub>、F v、または単鎖 F v フラグメント ) が含まれてよい。さらに他の実施形態において、抗体は、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g D および I g E の重鎖定常領域から選択される ; 特に、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 の重鎖定常領域、より詳細には、I g G 1 ( 例えば、ヒト I g G 1 ) の重鎖定常領域から選択される重鎖定常領域を有する。別の実施形態において、抗体は、または、好ましくは ( 例えば、ヒト ) の軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域を有する。一実施形態において、定常領域は、抗体の特性を修飾するため ( 例えば、F c 受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基数、エフェクター細胞機能、または補体機能のうちの 1 つまたはそれ以上を増減するため )、改変、例えば、変異される。例えば、ヒト I g G 1 定常領域は、1 つまたはそれ以上の残基、例えば、配列番号 1 7 の残基 2 3 4 および 2 3 7 ( 例えば、位置番号 1 のセリンが、残基番号 1 1 9 ( 例えば、V H 鎖の 1 1 8 個のアミノ酸に続く ) にシフトしている場合の残基 2 3 4 および 2 3 7 ; 配列番号 1 7 に示されるように、位置番号 1 のセリンにより、これらの同一残基は、1 1 6 番および 1 1 9 番である ) のうちの 1 つまたはそれ以上において変異させることができる。一実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 1 7 として示されるヒト I g G 1 定常領域を含む。別の実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 1 8 として示されるヒト 配列を含む。

【 0 0 1 0 】

別の実施形態において、I L - 1 3 アンタゴニスト、例えば、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントは、I L - 1 3、特に、哺乳類の、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、またはヒト I L - 1 3 ( 例えば、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を有するヒト I L - 1 3 ( 図 1 1 ) )、または配列番号 3 1 ( 図 1 1 ) の約アミノ酸 2 0 ~ 1 3 2 由来の成熟ヒト I L - 1 3 配列 ( 成熟ヒト I L - 1 3 配列ナンバリングについての配列番号 3 2 も参照 )、またはそれらと少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 以上一致する配列と特異的に結合する。一実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントは、ヒト I L - 1 3 の変異体、例えば、配列番号 3 1 ( 図 1 1 ) の 1 3 0 位においてアルギニン ( R ) の代わりにグルタミン ( Q ) を有するヒト I L - 1 3 の変異体と結合する。他の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、I L - 1 3 のフラグメント、例えば、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 0、2 0、5 0、7 5、1 0 0、1 2 0、または 1 3 0 個の隣接アミノ酸のフラグメント、またはそれと少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % またはそれ以上一致する配列と特異的に結合する。一実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントは、ヒト I L - 1 3 と特異的に結合し、非ヒト種由来の I L - 1 3 と交差反応しない。他の実施形態において、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントは、哺乳類の I L - 1 3、例えば、ヒト、ヒツジおよび / または非ヒト霊長類 I L - 1 3 のうちの 2 つ以上の形態と結合する。

【 0 0 1 1 】

一実施形態において、I L - 1 3 アンタゴニスト、例えば、抗 I L - 1 3 抗体またはそのフラグメントは、エピトープ、例えば、I L - 1 3、例えば、特に、哺乳類の、例えば

、ヒトIL-13の直線状または立体構造エピトープと特異的に結合する。一実施形態において、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、ヒトIL-13（配列番号31）の残基81～93および/または114-132を含むエピトープ、またはその修飾形態（例えば、そのフラグメントまたは置換（例えば、保存的置換）体）と結合する。別の実施形態において、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、以下のアミノ酸残基、すなわち、配列番号31〔成熟配列における位置；配列番号32〕の68〔49〕位のグルタミン酸、72〔53〕位のアスパラギン、88〔69〕位のグリシン、91〔72〕位のプロリン、92〔73〕位のアスチジン、93〔74〕位のリジンおよび105〔86〕位のアルギニンのうちの1つまたはそれ以上、またはそれらの保存的アミノ酸置換を含むヒトIL-13のエピトープと特異的に結合する。

10

#### 【0012】

別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、例えば、IL-13およびIL-13R 1（「IL-13/IL-13R 1」）；IL-13およびIL-4R（「IL-13/IL-4R」）；ならびにIL-13、IL-13R 1およびIL-4R（「IL-13/IL-13R 1/IL-4R」）から選択される複合体と結合する。一実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13とIL-13受容体複合体、例えば、IL-13R 1およびIL-4Rを含む複合体との間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さなければ低減）する。他の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13とIL-13受容体複合体のサブユニット、例えば、個別にIL-13R 1またはIL-4Rとの間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さなければ低減）する。さらに別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13/IL-13R 1とIL-4Rとの間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さなければ低減）する。別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13/IL-4RとIL-13R 1との間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さなければ低減）する。通常、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、相互作用、例えば、IL-13/IL-13R 1のIL-4Rとの結合を妨害（例えば、阻害、遮断さなければ低減）する。例示的抗体は、三元複合体、IL-13/IL-13R 1/IL-4Rの形成を阻害または妨害する。

20

30

#### 【0013】

IL-13がIL-13R（例えば、IL-13受容体複合体）、またはそのサブユニットと結合するのを妨害するIL-13抗体の例には、「mAb13.2」およびその修飾形態、例えば、キメラ形態またはヒト化形態が含まれる。本明細書において、mAb13.2の重鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号13および配列番号5として示される。本明細書において、mAb13.2の軽鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号9および配列番号1として示される。本明細書において、例示的キメラ形態（例えば、mAb13.2の重鎖および軽鎖可変領域を含む形態）は、「ch13.2」と呼ばれる。本明細書において、ch13.2の重鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号14（例えば、図15）および配列番号6として示される。本明細書において、ch13.2の軽鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号10（例えば、図16）および配列番号2として示される。本明細書において「h13.2v1」と呼ばれるmAb13.2のヒト化形態は、本明細書においてそれぞれ配列番号15（図15）および配列番号7として示される重鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列を有する。本明細書において、h13.2v1の軽鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号11（図16）および配列

40

50



番号3として示される。本明細書において「h13.2v2」と呼ばれるmAb13.2の別のヒト化形態は、本明細書においてそれぞれ配列番号16(図17)および配列番号8として示される重鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列を有する。本明細書において、h13.2v2の軽鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号12(図18)および配列番号4として示される。本明細書において「h13.2v3」と呼ばれるmAb13.2の別のヒト化形態は、本明細書においてそれぞれ配列番号36(図27)および配列番号34として示される重鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列を有する。本明細書において、h13.2v3の軽鎖可変領域についてのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号35(図28)および配列番号33として示される。

10

**【0014】**

一実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗体またはそのフラグメントは、IL-13、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、またはヒッジIL-13と特異的に結合し、二次抗体がIL-13、例えば、IL-13(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ヒッジIL-13)上の標的エピトープと結合するのを競合的に阻害する。二次抗体は、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体であってよい。

**【0015】**

一実施形態において、IL-13抗体またはそのフラグメントは、注射後少なくとも6週目に、ヒツジモデルにおいて回虫属(Ascaris)抗原への暴露に対する注射後防

20

**【0016】**

別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、少なくとも1個の抗原結合性領域、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体由来の、例えば、可変領域を含む。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体由来の少なくとも1、2、3または4個の可変領域が含まれる。別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体由来の少なくとも1または2個の重鎖可変領域が含まれる。別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体の重鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個の相補性決定領域(CDR)、または少なくとも特に、IL-13と接触するCDR由来のアミノ酸が含まれる。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体の軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個のCDRが含まれるか、あるいはIL-13と接触するCDR由来のアミノ酸が少なくとも含まれる。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体の重鎖および軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2、3、4、5または6個のCDRが含まれる。

30

40

**【0017】**

1つの好ましい実施形態において、タンパク質には、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3由来の6個のCDRすべ

50

て、または密接に関連するCDR、例えば、一致するか、あるいは少なくとも1個のアミノ酸改変であるが、2、3または4個以下の改変（例えば、置換、欠失、または挿入、例えば、保存的置換）を有するCDRが含まれる。所望により、タンパク質には、本明細書に記載されている任意のCDRが含まれてよい。

#### 【0018】

さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体の重鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個のChothia超可変ループか、あるいは、少なくとも特に、IL-13と接触する超可変ループ由来のアミノ酸が含まれる。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体の軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個の超可変ループが含まれるか、あるいは、IL-13と接触する超可変ループ由来のアミノ酸が少なくとも含まれる。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントには、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3から選択される抗体の重鎖および軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2、3、4、5または6個の超可変ループが含まれる。

#### 【0019】

1つの好ましい実施形態において、タンパク質には、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3由来の6個の超可変ループすべて、または密接に関連する超可変ループ、例えば、一致するか、あるいは少なくとも1個のアミノ酸改変であるが、2、3または4個以下の改変（例えば、置換、欠失、または挿入、例えば、保存的置換）を有する超可変ループが含まれる。所望により、タンパク質には、本明細書に記載されている任意の超可変ループが含まれてよい。

#### 【0020】

さらに別の実施形態において、タンパク質には、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3の対応する超可変ループと同一のカノニカル構造、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3の重鎖および/または軽鎖可変ドメインの少なくともループ1および/またはループ2と同一のカノニカル構造を有する少なくとも1、2または3個の超可変ループが含まれる。例えば、超可変ループカノニカル構造の説明についてのChothia他(1992)J. Mol. Biol. 227: 799-817; Tomlinson他(1992)J. Mol. Biol. 227: 776-798を参照されたい。これらの構造は、これらの参考文献に記載されている表の閲覧により決定することができる。

#### 【0021】

一実施形態において、軽鎖または重鎖可変フレームワーク（例えば、少なくともFR1、FR2、FR3、および所望によりFR4を包含する領域）は、(a) ヒト軽鎖または重鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基のうちの少なくとも80%、85%、87%、90%、92%、93%、95%、97%、98%、または好ましくは100%が含まれる軽鎖または重鎖可変フレームワーク、例えば、ヒト成熟抗体、ヒト生殖系列配列、ヒトコンセンサス配列、または本明細書に記載されているヒト抗体由来の軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基；(b) ヒト軽鎖または重鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基のうちの20%~80%、40%~60%、60%~90%、または70%~95%が含まれる軽鎖または重鎖可変フレームワーク、例えば、ヒト成熟抗体、ヒト生殖細胞系配列、ヒトコンセンサス配列由来の軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基；(c) 非ヒトフレームワーク（例えば、げっ歯類フレームワーク）；または(d) 例えば、抗原決定基または細胞傷害性決定基を除去するために修飾された、例えば、脱免疫化された、または部分的にヒト化された非ヒトフレームワークから選択することができる。一実施形態にお

いて、軽鎖または重鎖可変フレームワーク領域（特に、F R 1、F R 2 および / または F R 3）には、ヒト生殖系列遺伝子の V H セグメント、例えば、D P - 5 4 または D P K 9 のフレームワークと少なくとも 7 0、7 5、8 0、8 5、8 7、8 8、9 0、9 2、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 % 一致するか、あるいはそれらと一致する軽鎖または重鎖可変フレームワーク配列が含まれる。一実施形態において、重鎖可変領域には、以下の位置、すなわち、（軽鎖の可変ドメインの F R における）4 L、3 5 L、3 6 L、3 8 L、4 3 L、4 4 L、5 8 L、4 6 L、6 2 L、6 3 L、6 4 L、6 5 L、6 6 L、6 7 L、6 8 L、6 9 L、7 0 L、7 1 L、7 3 L、8 5 L、8 7 L、9 8 L および / または（重鎖の可変ドメインの F R における）2 H、4 H、2 4 H、3 6 H、3 7 H、3 9 H、4 3 H、4 5 H、4 9 H、5 8 H、6 0 H、6 7 H、6 8 H、6 9 H、7 0 H、7 3 H、7 4 H、7 5 H、7 8 H、9 1 H、9 2 H、9 3 H および / または 1 0 3 H（K a b a t ナンバリングに従う）のうちの 1 個またはそれ以上（好ましくは、少なくとも 5、1 0、1 2 個、またはすべて）におけるヒト残基またはヒトコンセンサス配列残基が含まれる。

#### 【 0 0 2 2 】

一実施形態において、タンパク質には、少なくとも 1 つの非ヒト C D R、例えば、マウス C D R、例えば、m A b 1 3 . 2 由来の C D R、またはその変異体および少なくとも 1 個のアミノ酸、例えば、少なくとも 5、8、1 0、1 2、1 5 または 1 8 個のアミノ酸により m A b 1 3 . 2 のフレームワークと異なる少なくとも 1 つのフレームワークが含まれる。例えば、タンパク質には、1、2、3、4、5 または 6 個のそのような非ヒト C D R が含まれ、H C F R 1、H C F R 2、H C F R 3、L C F R 1、L C F R 2 および L C F R 3 のうちの少なくとも 3 個における少なくとも 1 個のアミノ酸差が含まれる。

#### 【 0 0 2 3 】

一実施形態において、抗体の重鎖または軽鎖可変ドメインには、本明細書に記載されている抗体、例えば、m A b 1 3 . 2、c h 1 3 . 2、h 1 3 . 2 v 1、h 1 3 . 2 v 2 および / または h 1 3 . 2 v 3 の可変領域と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれ以上一致するか；あるいは、本明細書に記載されている抗体、例えば、m A b 1 3 . 2、c h 1 3 . 2、h 1 3 . 2 v 1、h 1 3 . 2 v 2 および / または h 1 3 . 2 v 3 の可変領域と少なくとも 1 または 5 個の残基だが、4 0、3 0、2 0、または 1 0 未満の残基において異なるアミノ酸配列が含まれる。

#### 【 0 0 2 4 】

一実施形態において、可変ドメインのうちの 1 つまたは両方には、非ヒト抗体（例えば、m A b 1 3 . 2 などのマウス抗体）とヒト抗体または生殖系列配列の両方から様々に誘導されるフレームワーク領域内のアミノ酸位置が含まれる。例えば、可変ドメインには、アミノ酸残基が、非ヒト抗体とヒト抗体（または、ヒト生殖系列配列）の両方と一致する多くの位置が含まれるはずであるのは、2 つがその位置で一致するためである。非ヒトおよびヒトが異なる残りのフレームワーク位置のうち、可変ドメインの位置のうちの少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0、または 9 0 % は、非ヒトではなくヒト抗体（または、ヒト生殖系列配列）と一致することが好ましい。例えば、そのような残りのフレームワーク位置のうちのどれも、ヒトではなく非ヒト抗体と一致しないか、または少なくとも 1、2、3、または 4 個が、ヒトではなく非ヒト抗体と一致してよい。例えば、H C F R 1 において、1 または 2 個のそのような位置は、非ヒトであってよく；H C F R 2 において、1 または 2 個のそのような位置は、非ヒトであってよく；F R 3 において、1、2、3、または 4 個のそのような位置は、非ヒトであってよく；L C F R 1 において、1、2、3、または 4 個のそのような位置は、非ヒトであってよく；L C F R 2 において、1 または 2 個のそのような位置は、非ヒトであってよく；L C F R 3 において、1 または 2 個のそのような位置は、非ヒトであってよい。

#### 【 0 0 2 5 】

一実施形態において、タンパク質の重鎖または軽鎖可変領域には、本明細書に記載されている核酸配列、または低い厳密性、中間の厳密性、高い厳密性、もしくは極めて高い厳

10

20

30

40

50

密性条件、または本明細書に記載されている他のハイブリダイゼーション条件の下で本明細書に記載されている核酸配列（例えば、特異的核酸配列または本明細書に記載されているアミノ酸配列をコードする核酸配列）またはその相補体とハイブリダイズする核酸によりコードされるアミノ酸が含まれる。

【0026】

別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、少なくとも1、2、3、または4個の抗原結合性領域、例えば、表3に示されているようなアミノ酸配列（VHについては、配列番号13、14、15、16、または36および/または、VLについては、配列番号9、10、11、12または35）、またはそれと実質的に一致する配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致するか、あるいは、配列番号9、10、11、12、13、14、15、16、35、または36と1、2、5、10、または15個以下のアミノ酸残基が異なる配列）を有する可変領域を含む。別の実施形態において、抗体には、表2に示されているようなヌクレオチド配列（VHについては、配列番号5、6、7、8、または34および/または、VLについては、配列番号1、2、3、4、または33）、またはそれと実質的に一致する配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致するか、あるいは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、33または34と3、6、15、30または45個以下のヌクレオチドが異なる配列）を有する核酸によりコードされるVHおよび/またはVLドメインが含まれる。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、表1に示されているようなアミノ酸配列（それぞれ、VH CDR1~3について配列番号22、23または24）、またはそれと実質的に相同な配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致し、かつ/または1つまたはそれ以上の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する重鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個のCDRを含む。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、表1に示されているようなアミノ酸配列（それぞれ、VL CDR1~3について配列番号19、20または21）、またはそれと実質的に相同な配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致し、かつ/または1つまたはそれ以上の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個のCDRを含む。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、表1に示されているようなアミノ酸配列（それぞれ、VH CDR1~3について配列番号22、23または24；および、それぞれ、VL CDR1~3について配列番号19、20または21）、またはそれと実質的に相同な配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致し、かつ/または1つまたはそれ以上の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する重鎖および軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2、3、4、5または6個のCDRを含む。

【0027】

さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、それぞれ、VH Ch o t h i a 超可変ループ1~3のアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同な配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致し、かつ/または1つまたはそれ以上の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する重鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個のCh o t h i a 超可変ループを含む。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、それぞれ、Ch o t h i a 超可変ループ1~3のアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同な配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致し、かつ/または1つまたはそれ以上の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する軽鎖可変領域由来の少なくとも1、2または3個のCh o t h i a 超可変ループを含む。

【0028】

別の実施形態において、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、配列番号17に示されているようなアミノ酸配列またはそれと実質的に相同な配列（例えば、それと少な

10

20

30

40

50

くとも約 85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致するか、あるいは、配列番号 17 と 1、2、5、10、50 または 100 個以下のアミノ酸残基が異なる配列)を、または対応する位置において有するヒト IgG1 定常領域を含む。別の実施形態において、抗 IL-13 抗体は、配列番号 18 に示されているようなアミノ酸配列またはそれと実質的に相同な配列(例えば、それと少なくとも約 85%、90%、95%、99%またはそれ以上一致するか、あるいは、配列番号 18 と 1、2、5、10、20 または 50 個程度のアミノ酸残基が異なる配列)を有するヒト 定常鎖を含む。さらに別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、例えば、本明細書に記載されているように、ヒト IgG1 定常領域およびヒト 定常鎖を含む。

#### 【0029】

さらに別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、直線配列ナンバリングスキーム(例えば、図 17 も参照)に従って図 29 に示される重鎖可変領域の、または重鎖可変ドメイン内のそのようなアミノ酸残基に対応する位置における、例えば、セリン 50 (CDR2)、セリン 53 (CDR2)、チロシン 101 (CDR3)、チロシン 102 (CDR3)、またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3 または 4 個の残基において水素結合を介して IL-13、通常はヒト IL-13 と接触する重鎖可変ドメインを含む。一実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、直線配列ナンバリングスキーム(例えば、図 17 も参照)に従って図 29 に示される重鎖可変領域の、または重鎖可変ドメイン内のそのようなアミノ酸残基に対応する位置における、例えば、イソロイシン 30 (CDR1)、セリン 31 (CDR1)、アラニン 33 (CDR1)、トリプトファン 47、セリン 50 (CDR2)、セリン 52 (CDR2)、セリン 53 (CDR2)、チロシン 58 (CDR2)、ロイシン 98 (CDR3)、アスパラギン酸 99 (CDR3)、グリシン 100 (CDR3)、チロシン 101 (CDR3)、チロシン 102 (CDR3)、フェニルアラニン 103 (CDR3)、またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 個の残基においてファンデルワールス力を介して IL-13、通常はヒト IL-13 と接触する重鎖可変領域を含む。別の実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、直線配列ナンバリングスキーム(例えば、図 17 も参照)に従って図 29 に示される重鎖可変領域の、または重鎖可変ドメイン内のそのようなアミノ酸残基に対応する位置における、例えば、セリン 50 (CDR2)、セリン 53 (CDR2)、チロシン 101 (CDR3)、チロシン 102 (CDR3)、またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3 または 4 個の残基において水素結合を介しおよび、例えば、イソロイシン 30 (CDR1)、セリン 31 (CDR1)、アラニン 33 (CDR1)、トリプトファン 47、セリン 50 (CDR2)、セリン 52 (CDR2)、セリン 53 (CDR2)、チロシン 58 (CDR2)、ロイシン 98 (CDR3)、アスパラギン酸 99 (CDR3)、グリシン 100 (CDR3)、チロシン 101 (CDR3)、チロシン 102 (CDR3)、フェニルアラニン 103 (CDR3)、またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 個の残基においてファンデルワールス力を介して IL-13、通常はヒト IL-13 と接触する重鎖可変領域を含む。

#### 【0030】

別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、直線配列ナンバリングスキーム(例えば、図 18 も参照)に従って図 30 に示される軽鎖可変領域の、例えば、アスパラギン 31 (CDR1)、チロシン 32 (CDR1)、リジン 34 (CDR1)、アスパラギン 96 (CDR3)、アスパラギン酸 98 (CDR3)、またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3、4 または 5 個の残基において水素結合を介して IL-13、通常はヒト IL-13 と接触する軽鎖可変領域を含む。さらに別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、直線配列ナンバリングスキーム(例えば、図 18 も参照)に従って図 30 に示される軽鎖可変領域の、例えば、アスパラギン 31 (CDR1)、チロシン 32 (CDR1)、リジン 34 (CDR1)

10

20

30

40

50

、アルギニン 54 (CDR2)、アスパラギン 96 (CDR3)、アスパラギン酸 98 (CDR3)、トリプトファン 100 (CDR3) またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6 または 7 個の残基においてファンデルワールス力を介して IL-13、通常はヒト IL-13 と接触する軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、直線配列ナンバリングスキーム (例えば、図 18 も参照) に従って図 30 に示される軽鎖可変領域の、例えば、アスパラギン 31 (CDR1)、チロシン 32 (CDR1)、リジン 34 (CDR1)、アスパラギン 96 (CDR3)、アスパラギン酸 98 (CDR3)、またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3、4 または 5 個の残基において水素結合を介し、および軽鎖可変領域の、例えば、アスパラギン 31 (CDR1)、チロシン 32 (CDR1)、リジン 34 (CDR1)、アルギニン 54 (CDR2)、アスパラギン 96 (CDR3)、アスパラギン酸 98 (CDR3)、トリプトファン 100 (CDR3) またはそれらの保存的置換から選択される少なくとも 1、2、3、4、5、6 または 7 個の残基においてファンデルワールス力を介して IL-13、通常はヒト IL-13 と接触する軽鎖可変領域を含む。

10

#### 【0031】

別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載されているような水素結合を介して IL-13、例えば、ヒト IL-13 と接触する重鎖および軽鎖可変領域を含む。さらに別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載されているようなファンデルワールス力を介して IL-13、例えば、ヒト IL-13 と接触する重鎖および軽鎖可変領域を含む。一実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載されているような水素結合およびファンデルワールス力を介して IL-13、例えば、ヒト IL-13 と接触する重鎖および軽鎖可変領域を含む。

20

#### 【0032】

さらに別の実施形態において、IL-13 アンタゴニスト、例えば、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、配列番号 14 の 13、19、40、42、44、75、77、83、87、92 または 113 位に 1 つまたはそれ以上の変異を有する重鎖可変領域を含む。別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントの重鎖可変領域は、配列番号 14 の 3 位の変異をさらに含む。一実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントの重鎖可変領域は、以下の置換、すなわち、配列番号 14 の 3 位におけるグルタミンによるリジンの置換、13 位におけるグルタミンによるリジンの置換、19 位におけるアルギニンによるリジンの置換、40 位におけるアラニンによるスレオニンの置換、42 位におけるグリシンによるグルタミン酸の置換、44 位におけるグリシンによるアルギニンの置換、75 位におけるリジンによるアルギニンの置換、77 位におけるセリンによるイソロイシンの置換、83 位におけるアスパラギンによるセリンの置換、87 位におけるアラニンによるセリンの置換、92 位におけるバリンによるメチオニンの置換、または 113 位におけるロイシンによるスレオニンの置換のうちの 1 つまたはそれ以上を含む。

30

#### 【0033】

別の実施形態において、IL-13 アンタゴニスト、例えば、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントは、配列番号 10 の 3、9、12、13、15、17、19、22、46、47、62、64、80、81、82、83、84、85、87 または 108 位に 1 つまたはそれ以上の変異を有する軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントの軽鎖可変領域は、配列番号 10 の 4 または 72 位に 1 つまたはそれ以上の変異をさらに含む。一実施形態において、抗 IL-13 抗体またはそのフラグメントの軽鎖可変領域は、以下の置換、すなわち、配列番号 10 の 3 位におけるグルタミンによるバリンの置換、4 位におけるメチオニンによるロイシンの置換、9 位におけるセリンによるアラニンの置換、12 位におけるセリンによるアラニンの置換、13 位におけるアラニンによるバリンの置換、15 位におけるバリンによるロイシンの置換、

40

50

17位におけるアスパラギン酸によるグルタミンの置換、19位におけるバリンによるアラニンの置換、22位におけるスレオニンによるセリンの置換、46位におけるリジンによるグルタミンの置換、47位におけるアラニンによるセリンの置換、62位におけるバリンによるイソロイシンの置換、64位におけるセリンによるアラニンの置換、72位におけるグリシンによるアルギニンの置換、80位におけるセリンによるアスパラギンの置換、81位のセリンによるプロリンの置換、82位におけるロイシンによるバリンの置換、83位におけるグルタミンによるグルタミン酸の置換、84位におけるプロリンによるアラニンの置換、85位におけるグルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、87位におけるフェニルアラニンによるバリンの置換、または108位におけるバリンによるロイシンの置換のうちの1つまたはそれ以上を含む。

10

#### 【0034】

別の実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントには、表10（出願16163-029001の） $\pm 1.5$ 、1.2、1.1または1.0オングストローム以下の二乗平均平方根偏差（RMSD）、表11（出願16163-029001の） $\pm 1.5$ 、1.2、1.1または1.0オングストローム以下のRMSDまたは表12（出願16163-029001の） $\pm 1.5$ 、1.2、1.1または1.0オングストローム以下のRMSDに記載されている骨格コンホメーションを有する1つまたはそれ以上のCDRが含まれる。例えば、重鎖可変ドメインのCDR（例えば、特にCDR3における、または少なくとも2個のCDR、例えば、CDR1とCDR3、CDR2とCDR3における、または3個のCDRすべてにおける）のうちの1、2または3個は、それらの構造に対して1.5、1.2、1.1または1.0オングストローム以下のRMSDを有する。例えば、軽鎖可変ドメインのCDR（例えば、特にCDR1における、または少なくとも2個のCDR、例えば、CDR1とCDR3、CDR1とCDR2における、または3個のCDRすべてにおける）のうちの1、2または3個は、それらの構造に対して1.5、1.2、1.1または1.0オングストローム以下のRMSDを有する。実施形態において、抗体またはその抗原結合性フラグメントには、全体として、表10（出願16163-029001の） $\pm 1.5$ 、1.2、1.1または1.0オングストローム以下の二乗平均平方根偏差（RMSD）、表11（出願16163-029001の） $\pm 1.5$ 、1.2、1.1または1.0オングストローム以下のRMSDまたは表12（出願16163-029001の） $\pm 1.5$ 、1.2、1.1または1.0オングストローム以下のRMSDに記載されているCDRの骨格コンホメーションを有する可変ドメインが含まれる。また、可変ドメインは、例えば、CDR領域および/またはフレームワーク領域において、本明細書に記載されている抗体と少なくとも70%、80%、85%、87%、90%、92%、93%、95%、96%、97%、98%または99%一致してよい。

20

30

#### 【0035】

さらに別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、配列番号14の3、13、19、40、42、44、75、77、83、87、92または113位において1つまたはそれ以上の変異（例えば、本明細書に記載されているような変異）を有する重鎖可変領域および配列番号10の3、4、9、12、13、15、17、19、22、46、47、62、64、72、80、81、82、83、84、85、87または108位において1つまたはそれ以上の変異（例えば、本明細書に記載されているような変異）を有する軽鎖可変領域を含む。

40

#### 【0036】

IL-13アンタゴニスト、例えば、本明細書に記載されている抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、誘導体化するか、あるいは、別の機能分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質（例えば、Fabフラグメント）と連結することができる。例えば、融合タンパク質もしくは抗体または抗原結合性部分は、とりわけ、抗体（例えば、二重特異性抗体または多重特異性抗体）、毒素、放射性同位元素、細胞傷害性または細胞増殖抑制性物質などの1つまたはそれ以上の他の分子の実体と機能的に（例えば、化学的カップ

50

リング、遺伝子融合、非共有結合性会合または別の方法により)連結することができる。

#### 【0037】

さらに別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、本明細書に記載されている抗IL-13抗体もしくはそのフラグメントは、またはそれらの医薬組成物は、単独で投与されるか、あるいは組合せ療法において、すなわち、他の物質、例えば、IL-13関連障害を治療するのに有用である治療薬と組み合わせられる。IL-13関連障害の例には、本明細書に記載されているように、呼吸器障害、例えば、喘息(例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息(例えば、低年齢の小児における、例えば、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)の感染による喘息))、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、ならびに気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む他の状態、例えば、細胞性線維症および肺線維症；アトピー性障害、例えば、IL-13に対する感受性増加に起因する(例えば、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、湿疹、アレルギー性鼻炎およびアレルギー性胃腸炎)；皮膚(例えば、アトピー性皮膚炎)、胃腸器官(例えば、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病などの炎症性腸疾患(IBD))、肝臓(例えば、肝硬変、肝細胞癌)および強皮症の炎症性および/または自己免疫性状態；白血病、神経膠芽腫およびリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫などの腫瘍または癌(例えば、軟組織または固形腫瘍)；ウイルス感染(例えば、HTLV-1から)；他の器官の線維症、例えば、肝臓の線維症(例えば、B型および/またはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる線維症)；ならびに防御性1型免疫応答の発現の抑制(例えば、ワクチン接種中の)のうちの1つまたはそれ以上から選択される障害が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0038】

組合せ療法には、本明細書にさらに記載されているように、1つまたはそれ以上の追加治療薬、例えば、1つまたはそれ以上のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫抑制薬、抗炎症薬(例えば、全身性抗炎症薬)、代謝阻害剤、酵素阻害剤および/または細胞傷害性もしくは細胞増殖抑制性物質と同時調剤されかつ/または同時投与される1つまたはそれ以上のIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントが含まれてよい。

#### 【0039】

1つまたはそれ以上のIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントと同時投与および/または同時調剤することができる好ましい追加治療薬の例には、吸入ステロイド；アゴニスト、例えば、短時間作用型または長時間作用型アゴニスト；ロイコトリエンまたはロイコトリエン受容体のアンタゴニスト；ADV AIR(登録商標)などの配合剤；IgE阻害剤、例えば、抗IgE抗体(例えば、XOLAIR(登録商標))；ホスホジエステラーゼ阻害剤(例えば、PDE4阻害剤)；キサンチン；抗コリン薬；クロモリンなどの肥満細胞安定化薬；IL-4阻害剤；IL-5阻害剤；エオタキシン/CCR3阻害剤；および抗ヒスタミン薬のうちの1つまたはそれ以上が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような組合せを用い、喘息および他の呼吸器障害を治療することができる。1つまたはそれ以上の抗IL-13抗体またはそのフラグメントと同時投与および/または同時調剤することができる治療薬の追加例には、とりわけ、TNFアンタゴニスト(例えば、TNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば、75kd TNFR-IgG(75kd TNF受容体-IgG融合タンパク質、ENBREL(商標))；TNF酵素アンタゴニスト、例えば、TNF変換酵素(TACE)阻害剤；ムスカリン受容体アンタゴニスト；TGF-アンタゴニスト；インターフェロンガンマ；ペルフェニドン(perfenidone)；化学療法剤、例えば、メトトレキセート、レフルノミドまたはシロリムス(ラパマイシン)もしくはその類縁体、例えば、CCI-779；COX2およびcPLA2阻害剤；NSAID；免疫調節薬；p38阻害剤、TPL-2、Mk-2およびNFB阻害剤のうちの1つまたはそれ以上が含まれる。

#### 【0040】

別の態様において、本出願は、組成物、例えば、薬学的に許容できる担体および少なく

10

20

30

40

50



とも1つのIL-3アンタゴニスト、例えば、本明細書に記載されている抗IL-13抗体またはそのフラグメントが含まれる医薬組成物を提供する。一実施形態において、組成物、例えば、医薬組成物は、前記のIL-3アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントのうちの2つまたはさらに1つの組合せを含む。IL-3アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントと薬物、例えば、治療薬（例えば、本明細書に記載されているように、1つまたはそれ以上のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫抑制薬、抗炎症薬（例えば、全身性抗炎症薬）、代謝阻害剤、酵素阻害剤および/または細胞傷害性もしくは細胞増殖抑制性物質）との組合せも、本発明の範囲内にある。

#### 【0041】

10

また、本出願は、本明細書に記載されているように、抗IL-13抗体およびそれらのフラグメントの重鎖および軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を扱う。例えば、本出願は、本明細書に記載されているように、例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3のうちの1つまたはそれ以上から選択される抗IL-13抗体の、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域をコードする第一および第二の核酸を扱う。

#### 【0042】

別の態様において、本出願は、本明細書に記載されている核酸を含む宿主細胞およびベクターを扱う。

#### 【0043】

20

例えば、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2および/またはh13.2v3のうちの1つまたはそれ以上により認識されるIL-13、例えば、ヒトIL-13のエピトープが扱われる。一実施形態において、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、ヒトIL-13（配列番号31）の残基81~93および/または114~132を含むエピトープまたはその修飾形態（例えば、そのフラグメントまたは置換（例えば、保存的置換）形態）と結合する。一実施形態において、ヒトIL-13のエピトープは、配列番号32の49位のグルタミン酸、53位のアスパラギン、69位のグリシン、72位のプロリン、73位のヒスチジン、74位のリジンおよび86位のアルギニンのうちの1つまたはそれ以上、またはそれらの保存的アミノ酸置換を含む。

#### 【0044】

30

別の態様において、本出願は、相互作用、例えば、IL-13と同族のIL-13結合性タンパク質、例えば、IL-13受容体複合体、例えば、IL-13R $\alpha$ 1およびIL-4R $\alpha$ を含む複合体またはそのサブユニットとの間の結合を変調する、例えば、妨害する（例えば、阻害する、遮断するか、さもなければ低減する）方法を扱う。変調することは、インビボまたはインビトロで行うことができる。他の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13とIL-13受容体複合体のサブユニット、例えば、個別にIL-13R $\alpha$ 1またはIL-4R $\alpha$ との間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さもなければ低減）する。さらに別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13/IL-13R $\alpha$ 1とIL-4R $\alpha$ との間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さもなければ低減）する。別の実施形態において、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、IL-13と結合し、相互作用、例えば、IL-13/IL-4R $\alpha$ とIL-13R $\alpha$ 1との間の結合を妨害（例えば、阻害、遮断さもなければ低減）する。通常、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、相互作用、例えば、IL-13/IL-13R $\alpha$ 1のIL-4R $\alpha$ との結合を妨害（例えば、阻害、遮断さもなければ低減）する。

40

#### 【0045】

本方法は、インビトロで（例えば、無細胞系で）、培養液中で、例えば、インビトロまたはエクスピボで細胞上に使用することができる。例えば、IL-13受容体を発現する

50

細胞を、培養培地中インビトロで培養することができ、接触工程を、培養培地に1つまたはそれ以上の抗IL-13抗体またはそれらのフラグメント、例えば、本明細書に記載されているような抗IL-13抗体またはそれらのフラグメントを添加することにより行うことができる。あるいは、この方法を、例えば、インビボ（治療的または予防的）プロトコルの一部として、対象に存在する細胞上で行うことができる。

#### 【0046】

別の態様において、本出願は、対象において、IL-13関連障害を治療する（例えば、治す、抑制する、改善する、その発現を遅らせるか予防する、またはその再発または再燃を予防する）、または予防する方法を扱う。この方法には、IL-13結合性物質（特に、アンタゴニスト）、例えば、本明細書に記載されているような抗IL-13抗体またはそのフラグメントを、IL-13関連障害を治療または予防するのに十分な量で対象に投与することが含まれる。IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、単独で、または本明細書に記載されているような他の治療法と組み合わせで対象に投与することができる。一実施形態において、対象は、哺乳類、例えば、本明細書に記載されているような呼吸器障害（例えば、喘息（例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、ならびに気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む他の状態；アトピー性障害（例えば、アトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎）；皮膚、胃腸器官（例えば、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病などの炎症性腸疾患（IBD））および肝臓（例えば、肝硬変、線維症）の炎症性および/または自己免疫性状態；強皮症；腫瘍または癌、例えば、ホジキンリンパ腫が含まれるIL-13関連障害の1つまたはそれ以上に苦しむヒトである。したがって、本開示には、本明細書に記載されている治療のためのIL-13結合性物質（本明細書に記載されている抗IL-13抗体またはそのフラグメントなど）の使用および本明細書に記載されている治療のための薬物を調製するためのIL-13結合性物質（本明細書に記載されている抗IL-13抗体またはそのフラグメントなど）の使用が含まれる。

#### 【0047】

IL-13関連障害の例には、本明細書に記載されているように、呼吸器障害、例えば、喘息（例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息（例えば、低年齢の小児における、例えば、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）の感染による喘息））、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、ならびに気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む他の状態、例えば、嚢胞性線維症および肺線維症；アトピー性障害、例えば、IL-13に対する感受性増加に起因する（例えば、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、湿疹、アレルギー性鼻炎およびアレルギー性胃腸炎）；皮膚（例えば、アトピー性皮膚炎）、胃腸器官（例えば、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病などの炎症性腸疾患（IBD））、肝臓（例えば、肝硬変、肝細胞癌）および強皮症の炎症性および/または自己免疫性状態；白血病、神経膠芽腫およびリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫などの腫瘍または癌（例えば、軟組織または固形腫瘍）；ウイルス感染（例えば、HTLV-1から）；他の器官の線維症、例えば、肝臓の線維症（例えば、B型および/またはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる線維症）；ならびに防御性1型免疫応答の発現の抑制（例えば、ワクチン接種中の）のうちの1つまたはそれ以上から選択される障害が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0048】

他の実施形態において、本出願は、呼吸器障害、例えば、喘息（例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息）；アレルギー；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む他の状態、例えば、嚢胞性線維症および肺線維症に伴う1つまたはそれ以上の症状を治療する（例えば、低減する、改善する）または予防する方法を提供する。例えば、喘息の症状には、喘鳴、息切れ、気管支収縮、気道過反応性、肺気量減少、線維症、気道炎症および粘液産生が含まれるが、これらに限定されるものではない。本方法は、IL-13アンタゴニスト、例えば、IL-13抗体またはそのフラグメントを、1つまたはそれ以上の症状を治療（例えば、低減、改善）ま

たは予防するのに十分な量で対象に投与することを含む。IL - 13 抗体は、治療的もしくは予防的に、または両方で投与することができる。IL - 13 アンタゴニスト、例えば、抗 IL - 13 抗体またはそのフラグメントを、単独で、または本明細書に記載されているような他の治療法と組み合わせて対象に投与することができる。対象は、哺乳類、例えば、本明細書に記載されているような IL - 13 関連障害に苦しむヒトであることが好ましい。

#### 【0049】

別の態様において、本出願は、インビトロでサンプル（例えば、血清、血漿、組織、生検などの生物学的サンプル）における IL - 13 の存在を検出するための方法を提供する。本方法を用い、障害、例えば、免疫細胞関連障害を診断することができる。本方法には、（i）サンプルまたは対照サンプルを、本明細書に記載されているような抗 IL - 13 抗体またはそのフラグメントと接触させること；および（ii）抗 IL - 13 抗体またはそのフラグメントとサンプルまたは対照サンプルとの間の複合体の形成を検出することが含まれ、ここで、対照サンプルに比べてサンプル中の複合体の形成における統計的に有意な変化は、サンプル中の IL - 13 の存在を示す。

10

#### 【0050】

さらに別の態様において、本出願は、インビボで（例えば、対象におけるインビボイメージング）IL - 13 の存在を検出するための方法を提供する。本方法を用い、障害、例えば、IL - 13 関連障害を診断することができる。本方法には、（i）抗体またはフラグメントが IL - 13 と結合することができる条件の下で、対象または対照対象に本明細書に記載されているような抗 IL - 13 抗体またはそのフラグメントを投与すること；および（ii）抗体またはフラグメントと IL - 13 の間の複合体の形成を検出することが含まれ、ここで、対照対象に比べて対象における複合体の形成における統計的に有意な変化は、IL - 13 の存在を示す。

20

#### 【0051】

抗体またはそのフラグメントは、結合または非結合抗体の検出を容易にするため、検出可能な物質で直接的または間接的に標識されることが好ましい。適当な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料および放射性材料が含まれる。

#### 【0052】

インビボで IL - 13 を発現する細胞に物質、例えば、治療薬または細胞傷害性物質を送達するか、あるいは標的とするための方法も開示される。

30

#### 【0053】

治療的および診断的使用のための本明細書に記載されている IL - 13 アンタゴニスト、例えば、抗 IL - 13 抗体またはそれらのフラグメントを含むキットも、本出願の範囲内にある。

#### 【0054】

別の態様において、本出願は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインが含まれる抗体を提供するための方法を提供する。この方法には、DP - 54 および DP K - 9 由来の1つまたはそれ以上のフレームワーク領域または DP - 54 および DP K - 9 のうちの1つまたはそれ以上のフレームワーク領域と少なくとも75、80、82、85、88、90、92、94、95、96、97または98%一致するフレームワーク領域を用いることにより抗体（または、そのような抗体をコードする核酸）を調製することが含まれる。一実施形態において、この方法には、それぞれ重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインに DP - 54 および DP K - 9 フレームワークが含まれる可変ドメインまたは DP - 54 および DP K - 9 のうちの1つまたはそれ以上のフレームワーク領域と少なくとも75、80、82、85、88、90、92、94、95、96、97または98%一致するフレームワーク領域が含まれる可変ドメインのコンテキスト中に非ヒト抗体由来の CDR または CDR の部分を操作することが含まれる。そのような可変ドメインが含まれるタンパク質鎖をコードする配列が含まれる核酸は、哺乳類の細胞、例えば、組織培養細胞において発現させることができる。

40

50

## 【 0 0 5 5 】

関連態様において、本出願は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインが含まれ、重鎖可変ドメインには、D P - 5 4 由来の 1 つまたはそれ以上のフレームワーク領域または D P - 5 4 のうちの 1 つまたはそれ以上のフレームワーク領域と少なくとも 7 5、8 0、8 2、8 5、8 8、9 0、9 2、9 4、9 5、9 6、9 7 または 9 8 % 一致するフレームワーク領域を用いることが含まれ、軽鎖可変ドメインには、D P K - 9 由来の 1 つまたはそれ以上のフレームワーク領域または D P K - 9 のうちの 1 つまたはそれ以上のフレームワーク領域と少なくとも 7 5、8 0、8 2、8 5、8 8、9 0、9 2、9 4、9 5、9 6、9 7 または 9 8 % 一致するフレームワーク領域を用いることが含まれる抗体、例えば、人工抗体を扱う。一般的に、C D R および / または超可変ループのうちの 1 つまたはそれ以上は、非ヒト、例えば、マウス抗体などの非ヒト抗体由来である。一実施形態において、抗体は、ヒト抗原、例えば、I L - 1 3 または I L - 1 3 以外の抗原と結合する。

10

## 【 0 0 5 6 】

他の特徴および利点は、以下の詳細にわたる説明および特許請求の範囲から明らかになるはずである。

## 【 0 0 5 7 】

( 図面の簡単な記載 )

図 1 : ヒト I L - 1 3 と結合する m A b 1 3 . 2 の速度パラメーター。6 9 R U ストレプトアビジンチップに固定化されたビオチン化 I L - 1 3 とモノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2、モノクローナル抗体 m A b 1 3 . 4 またはモノクローナル抗体 m A b 1 3 . 9 との間の結合相互作用を、経時的 ( x 軸 ) なレゾナンスユニット ( R U ; y 軸 ) として示す。m A b 1 3 . 2 の速度定数も示す。

20

## 【 0 0 5 8 】

図 2 : I L - 1 3 と結合する m A b 1 3 . 2 の速度パラメーター。様々な投与量のヒト I L - 1 3 と B I A C O R E ( 商標 ) チップに固定化されたモノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2 との間の結合相互作用を、経時的 ( x 軸 ) なレゾナンスディファレンス ( R U ; y 軸 ) として示す。m A b 1 3 . 2 の速度定数も示す。

## 【 0 0 5 9 】

図 3 : モノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2 は、天然ヒト I L - 1 3 と結合する。図は、漸増濃度 ( x 軸 ) の組換えヒト I L - 1 3 ( )、組換えマウス I L - 1 3 ( ) またはマイトジェン活性化、T h 2 優性型、臍帯血単核細胞から単離された天然ヒト I L - 1 3 ( ) の存在下で F L A G - ヒト I L - 1 3 と結合しているビオチン化 m A b 1 3 . 2 の平均吸光度値 ( A <sub>450</sub> ; y 軸 ) を示す。

30

## 【 0 0 6 0 】

図 4 : モノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2 は、ヒト I L - 1 3 の A R G 変異体と結合し、中和する。( A ) B I A C O R E ( 商標 ) チップに固定化されたビオチン化 m A b 1 3 . 2 を通過させたヒト I L - 1 3 または組換えで発現させた I L - 1 3 の A R G 変異体の応答 ( y 軸 ) を、時間 ( x 軸 ) の関数として示す。( B ) 漸増濃度の m A b 1 3 . 2 ( x 軸 ) および組換えヒト I L - 1 3 と組換えで発現させた I L - 1 3 の A R G 変異体のどちらかと共にインキュベートされた T F 1 細胞の増殖 ( y 軸 ) を示す。

40

## 【 0 0 6 1 】

図 5 : モノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2 は、可溶性 I L - 1 3 受容体の I C 5 0 に匹敵する I C 5 0 でヒト I L - 1 3 の生物活性を阻害する。<sup>3</sup> H - チミジン取り込みにより決定されるように、I L - 1 3 依存性 T F 1 細胞系の増殖を、I L - 1 3 および漸増濃度 ( x 軸 ) の m A b 1 3 . 2 が可溶性 I L - 1 3 受容体 ( r h u I L - 1 3 R a 2 ) のどちらかとの 3 日のインキュベーション後に c p m ( y 軸 ) として測定する。

## 【 0 0 6 2 】

図 6 : モノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2 は、正常なヒト単球上で、I L - 1 3 仲介性 C D 2 3 発現を阻害するが、I L - 4 仲介性 C D 2 3 発現は阻害しない。( A ) 健康なドナーから単離された末梢血単核細胞 ( P B M C ) を、指示濃度 ( x 軸 ) の組換えヒト I L

50

- 13 ( ) または IL - 4 ( ) で一夜処理した後に細胞表面 CD 23 を発現した単球の百分率 ( y 軸 ) を示す。 ( B ) 健康なドナーから単離された P B M C を、 IL - 13 および指示濃度の精製マウス m A b 13 . 2 ( x 軸 ) で処理した後に細胞表面 CD 23 を発現した単球の百分率 ( y 軸 ) を示す。 ( C ) 健康なドナーから単離された P B M C を、 IL - 4 および指示濃度の精製マウス m A b 13 . 2 ( x 軸 ) で一夜処理した後に細胞表面 CD 23 を発現した単球の百分率 ( y 軸 ) を示す。

#### 【 0 0 6 3 】

図 7 : モノクローナル抗体 m A b 13 . 2 は、ヒト B 細胞による IL - 13 依存性 I g E 産生を阻害する。培地単独で、または P H A、 IL - 13、対照抗体 ( m s I g G )、 m A b 13 . 2 および m A b 13 . 8 の様々な組合せで培養された P B M C から単離された上清中の I g E の濃度 ( x 軸 ) を、 450 nm における吸光度 ( I g E ( O . D . 450 ) ; y 軸 ) として示す。

10

#### 【 0 0 6 4 】

図 8 : モノクローナル抗体 m A b 13 . 2 は、ヒト上皮細胞による IL - 13 仲介性 S T A T 6 リン酸化を阻害する。 ( A ) 指示濃度の IL - 13 で処理された H T - 29 細胞から単離された細胞ライセート中のリン酸化 S T A T 6 についてのウエスタンブロット分析を示す。 ( B ) グラフは、フローサイトメトリー分析により決定される H T - 29 細胞の数 ( カウント ; y 軸 ) 示し、細胞を、 IL - 13 で処理せず ( フィールドヒストグラム ) または処理し ( アンフィールドヒストグラム )、リン酸化 S T A T 6 に対する A L E X A ( 商標 ) F l u o r 488 標識モノクローナル抗体で染色した後の蛍光 ( ホスホ - S T A T 6 ; x 軸 ) を示した。 ( C ) グラフは、フローサイトメトリー分析により決定される H T - 29 細胞の数 ( カウント ; y 軸 ) 示し、細胞を、未処理のままにするか ( フィールドヒストグラム ) ; あるいは IL - 13 ( 左上のグラフ )、 IL - 13 および m A b 13 . 8 ( 左下のグラフ )、 IL - 13 および m A b 13 . 2 ( 右上のグラフ ) または IL - 13 および対照抗体 ( m s G 1 ) ( 右下のグラフ ) で処理し、 A L E X A ( 商標 ) F l u o r 488 で染色した後の蛍光 ( ホスホ - S T A T 6 ) を示した。

20

#### 【 0 0 6 5 】

図 9 : モノクローナル抗体 m A b 13 . 2 は、インビボで回虫属 ( A s c a r i s ) 誘発性肺好酸球増加症を予防する。図は、未処置のカニクイザル ( 回虫 / P B S ) ( 、 )、 m A b 13 . 2 で前処置されたカニクイザル ( 回虫 / m A b 13 . 2 ) ( 、 ) または、 m A b 13 . 2 で前もって処置してブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) 抗原をチャレンジした ( 回虫 / A b から約 3 カ月後の再チャレンジ ) カニクイザル ( 、 ) から、ブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) 抗原によるチャレンジ ( 暗記号 ) 前、またはチャレンジまたは再チャレンジから 24 時間後 ( 明記号 ) に採取された気管支肺胞洗浄液 ( B A L ) サンプル中に見い出された好酸球の百分率 ( y 軸 ) を示す。

30

#### 【 0 0 6 6 】

図 10 : m A b 13 . 2 F a b フラグメントのヒト IL - 13 との共結晶構造。 m A b 13 . 2 F a b フラグメントの X 線結晶学は、軽鎖を暗い影で、重鎖を明るい陰で示す。 IL - 13 構造も示す ( 右に )。また、図は、 IL - 13 の C - ヘリックスと抗体の C D R ループとの相互作用を示す。

40

#### 【 0 0 6 7 】

図 11 : m A b 13 . 2 接触部位を示すヒト IL - 13 配列分析。パネルは、ヒト IL - 13 のアミノ酸配列を示しており、ここで、矢印は、シグナルペプチド切断部位を示し、4 個のヘリックスには下線が引かれ、 m A b 13 . 2 F a b - IL - 13 共結晶構造由来の抗体接触部位は、明るい長方形で強調表示され、 A R G 変異体残基は、暗い長方形で強調表示されている。

#### 【 0 0 6 8 】

図 12 : m A b 13 . 2 の F a b フラグメントは、ヒト IL - 13 と結合する。図は、 ( A ) p M 抗体または ( B ) p M 結合部位として発現される漸増濃度 ( x 軸 ) の競合する非標識 m A b 13 . 2 ( )、 m A b 13 . 2 F a b フラグメント ( ) または無関係な

50

抗体（＊）の存在下でＦＬＡＧ－ヒトＩＬ－１３と結合しているビオチン化ｍＡｂ１３．２の平均吸光度値（４５０ｎｍ；ｙ軸）を示す。

【００６９】

図１３：ｍＡｂ１３．２のＦａｂフラグメントは、ヒト単球によるＩＬ－１３仲介性ＴＦ１増殖およびＩＬ－１３仲介性ＣＤ２３発現を中和する。（Ａ）グラフは、ＩＬ－１３およびｍＡｂ１３．２（ ）がｍＡｂ１３．２ Ｆａｂフラグメント（ ）のどちらかにより提供される漸増濃度のコンペティター結合部位（ｘ軸）との３日間のインキュベーション後に得られるＩＬ－１３依存性ＴＦ１細胞系による最大増殖の百分率（ｙ軸）を示す。（Ｂ）図は、健康なドナーから単離された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、１ｎｇ／ｍｌ

10

【００７０】

図１４：マウスモノクローナル抗体ｍＡｂ１３．２のキメラバージョン（ｃｈ１３．２）は、ＩＬ－１３と結合して中和する。（Ａ）ＥＬＩＳＡにより決定される、ＩＬ－１３－ＦＬＡＧおよびビオチン化ｍＡｂ１３．２のみを含有するサンプル（－）ならびにＩＬ－１３－ＦＬＡＧ、ビオチン化ｍＡｂ１３．２および漸増濃度（ｘ軸）のｍＡｂ１３．８（ ）、ｍＡｂ１３．２（ ）またはキメラｍＡｂ１３．２（ｃｈ１３．２； ）を含有するサンプルの４５０ｎｍにおける吸光度（ $A_{450}$ ；ｙ軸）を示す。（Ｂ）健康なド

20

【００７１】

図１５：ヒトＤＰ－５４生殖系列遺伝子とｍＡｂ１３．２のキメラバージョンおよびｍＡｂ１３．２の部分ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）の可変重（ＶＨ）鎖アミノ酸配列との比較。図は、アラインメントされ、ＳＥＱＷＥＢ（商標）により比較されているＤＰ－５４、ｍＡｂ１３．２のキメラバージョン（キメラ１３．２）の可変重領域およびｍＡｂ１３．２の部分ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）の可変重領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）（四角形で囲まれた領域）およびアミノ酸配列を示し、ここで、ｍＡｂ１３．２の部分ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）について行われたアミノ酸置換は、陰影付きの四角形で示され、未変化のままの残基には下線が引かれている。

30

【００７２】

図１６：ヒトＤＰＫ９生殖系列遺伝子とｍＡｂ１３．２のキメラバージョンおよびｍＡｂ１３．２の部分ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）の可変軽（ＶＬ）鎖アミノ酸配列との比較。図は、アラインメントされ、ＳＥＱＷＥＢ（商標）により比較されているＤＰＫ－９、ｍＡｂ１３．２のキメラバージョン（キメラ１３．２）の可変軽領域およびｍＡｂ１３．２の部分ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）の可変軽領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）（四角形で囲まれた領域）およびアミノ酸配列を示し、ここで、ｍＡｂ１３．２の部分ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）について行われたアミノ酸置換は、陰影付きの四角形で示され、未変化のままの残基には下線が引かれている。

40

【００７３】

図１７：ヒトＤＰ－５４生殖系列遺伝子とｍＡｂ１３．２のキメラバージョンおよびｍＡｂ１３．２の完全ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ２）の可変重（ＶＨ）鎖アミノ酸配列との比較。図は、アラインメントされ、ＳＥＱＷＥＢ（商標）により比較されているＤＰ－５４、ｍＡｂ１３．２のキメラバージョン（キメラ１３．２）の可変重領域およびｍＡｂ１３．２の完全ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ２）の可変重領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）（四角形で囲まれた領域）およびアミノ酸配列を示し、ここで、ｍＡｂ１３．２の完全ヒト化バージョン（ｈ１３．２ｖ１）について行われたアミノ酸置換は、陰影付きの四角形で示され、未変化のままの残基には下線が引かれている。

50

## 【 0 0 7 4 】

図 18：ヒト D P K 9 生殖系列遺伝子と m A b 1 3 . 2 のキメラバージョンおよび m A b 1 3 . 2 の部分ヒト化バージョン ( h 1 3 . 2 v 2 ) の可変軽 ( V L ) 鎖アミノ酸配列との比較。図は、アラインメントされ、S E Q W E B ( 商標 ) により比較されている D P K 9、m A b 1 3 . 2 のキメラバージョン ( キメラ 1 3 . 2 ) の可変軽領域および m A b 1 3 . 2 の完全ヒト化バージョン ( h 1 3 . 2 v 2 ) の可変軽領域の相補性決定領域 ( C D R ) ( 四角形で囲まれた領域 ) およびアミノ酸配列を示し、ここで、m A b 1 3 . 2 の完全ヒト化バージョン ( h 1 3 . 2 v 2 ) について行われたアミノ酸置換は、陰影付きの四角形で示され、未変化のままの残基には下線が引かれている。

## 【 0 0 7 5 】

図 19：完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) は、I L - 1 3 に対して完全な結合活性を保持する。( A ) I L - 1 3 - F L A G およびビオチン化 m A b 1 3 . 2 のみを含むサンプル ( - - ) ならびに I L - 1 3 - F L A G、ビオチン化 m A B 1 3 . 2 および漸増濃度 ( x 軸 ) の m A b 1 3 . 2 ( )、キメラ m A b 1 3 . 2 ( )、部分ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 1 ; ) または完全ヒト化 m A B 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ; ) を含むサンプルの、E L I S A により決定された 4 5 0 n m における吸光度 ( A <sub>450</sub> ; y 軸 ) を示す。( B ) 様々な投与量範囲のヒト I L - 1 3 と B I A C O R E ( 商標 ) チップに固定化された完全ヒト化抗体 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) との間の結合相互作用を、経時的 ( x 軸 ) なレゾナンスディフアレンス ( R U ; y 軸 ) として示す。h 1 3 . 2 v 2 の速度定数も示す。

## 【 0 0 7 6 】

図 20：キメラ m A b 1 3 . 2 ( c h 1 3 . 2 )、部分ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 1 ) および完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) は、I L - 1 3 仲介性 C D 2 3 発現および S T A T 6 の I L - 1 3 仲介性リン酸化を中和することができる。( A ) 健康なドナーから単離された P B M C を、1 n g / m l I L - 1 3 および指示濃度 ( x 軸 ) のキメラ m A b 1 3 . 2 ( c h 1 3 . 2 ; )、部分ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 1 ; ) または完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ; ) で一夜処理した後に細胞表面 C D 2 3 を発現した単球の百分率 ( y 軸 ) を示す。( B ) フローサイトメトリー分析により決定された I L - 1 3 および指示濃度 ( x 軸 ) のキメラ m A b 1 3 . 2 ( c h 1 3 . 2 ; )、部分ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 1 ; ) または完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ; ) とのインキュベーション後にリン酸化 S T A T 6 を発現した H T - 2 9 細胞の百分率を示す。

## 【 0 0 7 7 】

図 21：ヒト I L - 1 3 仲介性 C D 2 3 発現を中和する完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) の能力は、同じことをする m A b 1 3 . 2 の能力に匹敵する。( A ) 組換えヒト I L - 1 3 または ( B ) 天然ヒト I L - 1 3 および漸増濃度 ( x 軸 ) の m A b 1 3 . 2 ( ) または完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ; ) とのインキュベーション後に細胞表面 C D 2 3 を発現するゲーテッド単球の数を、I L - 1 3 のみとのインキュベーション後に細胞表面 C D 2 3 を発現する単球の最大数の百分率として表す ( % M a x . R e s p o n s e ; y 軸 ) 。

## 【 0 0 7 8 】

図 22：非ヒト霊長類またはヒツジ I L - 1 3 仲介性 C D 2 3 発現を中和する完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) の能力は、同じことをする m A b 1 3 . 2 の能力に匹敵する。( A ) 組換え非ヒト霊長類 I L - 1 3 ( r e c N H P I L - 1 3 ) または ( B ) 組換えヒツジ I L - 1 3 ( r e c S h e e p I L - 1 3 ) および漸増濃度 ( x 軸 ) の m A b 1 3 . 2 ( ) または完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ; ) とのインキュベーション後に細胞表面 C D 2 3 を発現するゲーテッド単球の数を、I L - 1 3 のみとのインキュベーション後に細胞表面 C D 2 3 を発現する単球の最大数の百分率として表す ( % M a x . R e s p o n s e ; y 軸 ) 。

## 【 0 0 7 9 】

図23：完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、ヒツジにおける遅発相気管支収縮を低減する。ブタ回虫(*Ascaris suum*)チャレンジの24時間前(ベースライン)、チャレンジ(回虫)中、およびチャレンジ後数時間(x軸)にわたり測定された気道抵抗百分率(y軸)を、処置されなかった(対照； )か、あるいは(A)20mg/kgまたは(B)5mg/kg用量にて完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2； )により予防的に処置されたヒツジについて示す。示されるデータは、1群につき3頭のヒツジのサンプルサイズについての平均±s.d.である。

#### 【0080】

図24：完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、ヒツジにおける気道過反応性を予防する。所与の大きさの応答を引き起こすのに必要とされるカルバコールの用量百分率(PC400；y軸)を、(A)20mg/kgまたは(B)5mg/kgの完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2； )により予防的に処置されたヒツジまたはブタ回虫(*Ascaris suum*)チャレンジ前および後に処置されないままであったヒツジ(対照； )について示す(x軸)。示されるデータは、1群につき3頭のヒツジのサンプルサイズについての平均±s.d.である。

#### 【0081】

図25：完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、非ヒト霊長類における抗原誘発性肺炎症を予防する。図は、食塩水を静脈内に処置された対照カニクイザル( )、2mg/kgのデキサメタゾンを筋肉内に処置された陽性対照カニクイザル(\*)、8mg/kgの無関係なヒトIgG(IVIG)で前処置された陰性対照カニクイザル( )または完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)を静脈内に前処置されたカニクイザル( )から、ブタ回虫(*Ascaris suum*)抗原によるチャレンジ前(0)またはチャレンジの24時間後(24)に採取された気管支肺胞洗浄液(BAL)サンプル中に見い出された細胞の総数(y軸)を示す。また、バーは、各群のBALサンプル中に見い出された細胞の平均数を示す。対応のないT検定を用いて得られたp値も示す。

#### 【0082】

図26：mAb13.2のヒト化は、V-BASEのVH Group3における他のヒト生殖系列遺伝子との配列相同性を基にすることができる。データベース、VベースのVHグループ3内のヒト生殖系列アミノ酸配列に対するmAb13.2のアミノ酸配列のアラインメントを示す。太字の配列は、mAb13.2のヒト化が基にすることができる配列として提案される。

#### 【0083】

図27：ヒトDP-77生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)の可変重(VH)鎖アミノ酸配列との比較。図は、アラインメントされ、SEQWEB(商標)により比較されているDP-77、mAb13.2のキメラバージョン(キメラ13.2)の可変重領域およびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)の可変重領域の相補性決定領域(CDR)(四角形で囲まれた領域)およびアミノ酸配列を示し、ここで、mAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)について行われたアミノ酸置換は、陰影付きの四角形で示され、未変化のままの残基には下線が引かれている。

#### 【0084】

図28：ヒトB1生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)の可変軽(VL)鎖アミノ酸配列との比較。図は、アラインメントされ、SEQWEB(商標)により比較されているB1、mAb13.2のキメラバージョン(キメラ13.2)の可変軽領域およびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)の可変軽領域の相補性決定領域(CDR)(四角形で囲まれた領域)およびアミノ酸配列を示し、ここで、mAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)について行われたアミノ酸置換は、陰影付きの四角形で示され、未変化のままの残基には下線が引かれている。

#### 【0085】



図29：様々なスキームによるモノクローナル抗体mAb13.2の可変重鎖アミノ酸配列における各残基についての番号構成。直線配列ナンバリングスキーム、Chothia構造ナンバリングスキームおよびKabatt配列ナンバリングスキームによるmAb13.2の可変重鎖領域のアミノ酸配列における各残基についての番号構成を示す。

【0086】

図30：様々なスキームによるモノクローナル抗体mAb13.2の可変軽鎖アミノ酸配列における各残基についての番号構成。直線配列ナンバリングスキーム、Chothia構造ナンバリングスキームおよびKabatt配列ナンバリングスキームによるmAb13.2の可変軽鎖領域のアミノ酸配列における各残基についての番号構成を示す。

【0087】

図31：回虫(Ascaris)チャレンジ後8週目の回虫(Ascaris)特異的IgEの力価は、抗ヒトIL-13抗体(h13.2v2)により処置されたカニクイザルにおいて減少した。グラフは、ブタ回虫(Ascaris suum)抗原のチャレンジ前および8週後のカニクイザルにおける回虫(Ascaris)特異的IgEの相対力価(y軸)を示す。チャレンジ前値を「100」に規格化した。(A)動物を、ヒト化抗IL-13抗体(h13.2v2)で静脈内に処置した。(B)対照動物には、食塩水または無関係なヒトIgG(IVIg)を静脈内投与した。

【0088】

図32：抗IL-13抗体(h13.2v2)は、インビボのアレルゲンチャレンジの後で起こる好塩基球感受性の上昇を予防した。(A)代表的対照動物および抗体処置動物の血液からの最大値の百分率としての投与量依存性ヒスタミン放出(y軸)を、処置前および回虫(Ascaris)抗原チャレンジ後24時間および8週の動物について示す。(B)(a)に示される投与量範囲にわたる総ヒスタミン放出を、各時点で各動物について決定した。図は、対照群および抗IL-13処置群についての各時点での規格化されたヒスタミン放出の平均および標準誤差を示す。Pre = 抗体処置前。時間0 = 抗体後24時間、回虫(Ascaris)肺チャレンジ前。24時間、8週および4カ月時点は、回虫(Ascaris)チャレンジ後の時間を指す。

【0089】

図33：IL-13をロードしたA375細胞とのビオチン化h13.2v2の結合。ヒストグラムは、フローサイトメトリー分析により決定された、3ng/mlヒトIL-13とのプレインキュベーション後にビオチン化h13.2v2(0.1μg/ml、1μg/mlまたは10μg/ml)の結合(蛍光;x軸)を示したA375ヒトメラノーマ細胞の数(カウント;y軸)を示す。

【0090】

図34：h13.2v2の野生型Fc復帰変異体は、IL-13の存在下でADCCを仲介する。(A)指示濃度(x軸)のh13.2v2(L234A/G237A;)またはその野生型Fc復帰変異体( )により処理されたA375ヒトメラノーマ細胞のクロミウム51放出の百分率(y軸)を示す。(B)放出されたクロミウム51の百分率(y軸)を、IL-13の存在または非存在下でh13.2v2の野生型Fc復帰変異体により処理されたIL-13をロードされたA375細胞について示す。

【0091】

図35：h13.2v2の野生型Fc復帰変異体は、IL-13R2を発現するA375細胞のADCCを仲介するが、IL-13R1を発現するHT-29細胞のADCCは仲介しない。(A)指示濃度(x軸)のh13.2v2(L234A/G237A;)またはその野生型Fc復帰変異体( )により処理されたIL-13をロードされたA375ヒトメラノーマ細胞のクロミウム51放出の百分率(y軸)を示す。(B)指示濃度(x軸)のh13.2v2(L234A/G237A;)またはその野生型Fc復帰変異体( )により処理されたIL-13をロードされたHT-29ヒト上皮細胞のクロミウム51放出の百分率(y軸)を示す。

【0092】

10

20

30

40

50

IL - 13 結合性物質、例えば、抗 IL - 13 抗体およびそれらの抗原結合性フラグメント、その医薬組成物、前記抗体をコードする核酸、ならびに前記核酸配列を含むベクターおよび宿主細胞を開示する。また、前記抗体を作成する方法、ならびに IL - 13、例えば、ヒト IL - 13 と結合する抗体を用いて 1 つまたはそれ以上の IL - 13 関連活性を変調し、IL - 13 がその受容体と結合するのを低減または妨害するための方法を開示する。抗 IL - 13 抗体を、IL - 13 仲介性障害を緩和するため、例えば、呼吸器障害（例えば、喘息）；アトピー性障害（例えば、アレルギー性鼻炎）；皮膚（例えば、アトピー性皮膚炎）、胃腸器官（例えば、炎症性腸疾患（IBD））の炎症性および/または自己免疫性状態、ならびに線維性および癌性障害を治療するために使用することができる。抗 IL - 13 抗体は、単独で用いるか、あるいは他の療法と組み合わせて用い、それらの疾患または別の疾患、例えば、アレルギー性反応を治療することができる。

10

#### 【0093】

とりわけ、機能性 IL - 13 シグナル伝達複合体の形成を妨害する本明細書に記載されている抗体を用いることによる IL - 13 活性の低下は、ブタ回虫（*Ascaris suum*）に対して生まれつきアレルギーのあるカニクイザルにおける気道炎症を低減することが見い出された（以下の実施例 1、4 および 3、5）。さらに、本明細書に記載されている抗ヒト IL - 13 抗体は、ブタ回虫（*Ascaris suum*）に対して生まれつきアレルギーのあるヒツジにおける遅発相気管支収縮を予防し、ヒツジにおけるカルバコール誘発性気道過敏反応性を予防する（以下の実施例 3、5）。したがって、1 つまたはそれ以上の IL - 13 関連活性を中和する抗 IL - 13 抗体を用い、インビボで 1 つまたはそれ以上の IL - 13 関連活性を低減し、例えば、IL - 13 仲介性障害（例えば、喘息、気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生）を治療または予防することができる。

20

#### 【0094】

抗ヒト IL - 13 抗体

結合して 1 つまたはそれ以上の IL - 13 関連活性、特に IL - 13 のシグナル伝達活性を中和および/または阻害することができる抗体は、アレルギー性喘息、非アレルギー性喘息などの IL - 13 仲介性疾患、ならびに線維症、好酸球増加症および粘液産生などの喘息関連病変を治療するのに有用である。

#### 【0095】

一実施形態において、本明細書に開示されている抗 IL - 13 抗体は、単離または精製される。「単離」または「精製」ポリペプチドまたはタンパク質、例えば、「単離抗体」は、それが天然に存在する状態を越える状態まで精製される。例えば、「単離」または「精製」ポリペプチドまたはタンパク質、例えば、「単離抗体」は、タンパク質が由来する細胞もしくは組織源由来の細胞材料または他の夾雑汚染タンパク質のうちの少なくとも 1 つの成分から分離されるか、あるいは化学的に合成される場合の化学的前駆体もしくは他の化学物質のうちの少なくとも 1 つの成分から分離されるタンパク質を指す。例えば、単離タンパク質は、他のタンパク質、他の細胞材料または化学的前駆体を実質的に含まないことがある。一部の実施形態において、約 50 % 未満の非抗体タンパク質（本明細書において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）または化学的前駆体を有する抗体タンパク質の調製は、「実質的に含まれない」と見なされる。他の実施形態において、40 %、30 %、20 %、10 %、より好ましくは 5 %（乾燥重量で）の非抗体タンパク質または化学的前駆体は、実質的に含まれないと見なされる。抗体タンパク質またはその生物学的活性部分が組換え産生される場合、培養培地が実質的に含まれないことも好ましく、例えば、培養培地は、タンパク質調製物の容量または質量の約 30 % 未満、20 % 未満、より好ましくは約 10 % 未満、最も好ましくは約 5 % 未満に相当する。本明細書において「組換え体」と呼ばれるタンパク質またはポリペプチドは、組換え体核酸の発現によって産生されるタンパク質またはポリペプチドである。タンパク質は、標準的方法（例えば、イオン交換および親和性クロマトグラフィーが含まれる）により精製され、特定のタンパク質が、他のタンパク質に対して、または他の生物学的活性成分に対して少なくとも 5、10、20、2

30

40

50

5、50、75、80、90、95、98、99%の純度である調製物を提供することができる。

#### 【0096】

本明細書で使用する用語「抗体」には、インタクト抗体、抗体のフラグメント、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、dAbおよびscFvフラグメント、ならびにそれらの定常領域および/または可変領域において変異した(例えば、キメラ、部分ヒト化または完全ヒト化抗体を作成するため、ならびに望ましい特色、例えば、IL-13結合性増強および/またはFcR結合低下のある抗体を作成するための変異)インタクト抗体およびフラグメントが含まれる。例示的抗体は、IL-13と特異的に結合し、例えば、機能的IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害し、かつ/または1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和または阻害することがある。

10

#### 【0097】

本明細書に記載されている抗体は、効率的にヒトであってよい。「効率的ヒト」抗体は、抗体が、正常なヒトにおいて免疫原性応答を引き起こさないように十分な数のヒトアミノ酸位置が含まれる抗体である。タンパク質は、中和抗体応答、例えば、ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答を誘起しないことが好ましい。HAMAは、多くの環境、例えば、抗体を、例えば、慢性または再発疾患状態の治療において反復投与することが望ましい場合には問題のあることがある。HAMA応答は、血清からの抗体クリアランス増加のため(例えば、Saleh他、Cancer Immunol. Immunother., 32:180-190(1990)を参照)および潜在的なアレルギー反応のため(例えば、LoBuglio他、Hybridoma, 5:5117-5123(1986)を参照)反復抗体投与を潜在的に無効にすることがある。

20

#### 【0098】

通常、保存的置換には、類似の特徴を持つ別のアミノ酸によるあるアミノ酸の置換、例えば、以下の群、すなわちバリン、グリシン、;グリシン、アラニン;バリン、イソロイシン、ロイシン;アスパラギン酸、グルタミン酸;アスパラギン、グルタミン;セリン、スレオニン;リジン、アルギニン;およびフェニルアラニン、チロシン内の置換が含まれる。

#### 【0099】

免疫グロブリンとしても知られる抗体は、通常、各々約25kDaの2本の軽(L)鎖および各々約50kDaの2本の重(H)鎖からなる四量体グリコシル化タンパク質である。およびと名付けられた2タイプの軽鎖が抗体に見い出されることがある。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを、5個の主要なクラス、すなわち、A、D、E、GおよびMに割り当てることができ、それらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>にさらに分けることができる。各軽鎖には、N末端可変(V)ドメイン(VL)および定常(C)ドメイン(CL)が含まれる。各重鎖には、N末端Vドメイン(VH)、3または4個のCドメイン(CH)およびヒンジ領域が含まれる。VHに最も近いCHドメインは、CH1と表される。VHおよびVLドメインは、フレームワーク領域と呼ばれ、超可変配列の3つの領域(相補性決定領域、CDR)の骨格を形成する比較的保存された配列の4領域(FR1、FR2、FR3およびFR4)からなる。CDRは、抗体と抗原の特異的相互作用を担う大部分の残基を含む。CDRは、CDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれる。したがって、重鎖上のCDR構成要素は、H1、H2およびH3と呼ばれ、一方、軽鎖上のCDR構成要素は、L1、L2およびL3と呼ばれる。通常、CDR3は、抗体結合部位の範囲内で最も大きな分子多様性源である。例えば、H3は、2個のアミノ酸残基ほどの短さか、あるいは26個を超えるアミノ酸であってよい。異なるクラスの免疫グロブリンについてのサブユニット構造および三次元立体配置は、当技術分野においてよく知られている。抗体構造の総説については、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Harlow他編、1988を参照されたい。当業者は、各サブユニッ

30

40

50

ト構造、例えば、CH、VH、CL、VL、CDR、FR構造が、活性フラグメント、例えば、抗原と結合するVH、VLまたはCDRサブユニットの部分、すなわち、抗原結合性フラグメント、または、例えば、Fc受容体および/または補体と結合しかつ/またはそれらを活性化するCHサブユニットの部分を含むことを認識しているはずである。通常、CDRは、Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Department of Health and Human Services (1991)、Kabat他編に記載されているように、Kabat CDRを指す。抗原結合部位を特徴付けるための別の基準は、Chothiaにより記載されているような超可変ループを参照することである。例えば、Chothia, D. 他 (1992) J. Mol. Biol. 227: 799 - 817; および Tomlinson 他 (1995) EMBO J. 14: 4628 - 4638 を参照されたい。さらに別の基準は、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより使用されるAbM定義である。一般的には、例えば、Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. (Antibody Engineering Lab Manual (Duebel, S. および Kontermann, R 編、Springer-Verlag、Heidelberg) を参照されたい。あるいは、Kabat CDRに関して記載されている実施形態は、Chothia超可変ループまたはAbM定義ループに関して同様に記載されている関係を用いて実施することができる。

#### 【0100】

抗体の用語「抗原結合性フラグメント」内に包含される結合性フラグメントの例には、(i) Fabフラグメント、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価フラグメント; (ii) F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結されている2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント; (iii) VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント; (iv) 抗体の単腕のVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント、(v) VHドメインからなるdAbフラグメント (Ward 他 (1989) Nature 341: 544 - 46); および (vi) 単離相補性決定領域 (CDR) が含まれる。ラクダ抗体およびラクダ化抗体も使用することができる。そのような抗体には、例えば、本明細書に記載されているたった1個の可変ドメイン由来のCDRが含まれてよい。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン、VLおよびVHは、別々の遺伝子によりコードされるが、組換え方法を用い、それらを、VLおよびVH領域がペアを組んで一価分子を形成する単一タンパク質鎖 (単鎖Fv (scFv)) として知られる; 例えば、Bird 他 (1988) Science 242: 423 - 26; Huston 他 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879 - 83 を参照) とすることができる合成リンカーによりVLおよびVHをつなげることができる。また、そのような単鎖抗体は、抗体の用語「抗原結合性フラグメント」に包含されることが意図されている。これらの抗体フラグメントは、当業者に知られている従来の技法を用いて得られ、フラグメントは、インタクト抗体と同様にして機能が評価される。

#### 【0101】

自然系における抗体多様性は、可変領域をコードする複数の生殖系列遺伝子および様々な体細胞イベントの使用により作り出される。体細胞イベントには、完全VH領域を作るための多様性 (D) を持つ可変遺伝子セグメントおよび結合 (J) 遺伝子セグメントの組換え、ならびに完全VL領域を作るための可変および結合遺伝子セグメントの組換えが含まれる。組換えプロセス自体は、不正確であってよく、V(D)J結合部においてアミノ酸の喪失または付加をもたらす。これらの多様性機構は、抗原暴露前の発現中のB細胞で起きる。抗原刺激後、B細胞内で発現した抗体遺伝子は、体細胞変異を受ける。生殖系列遺伝子セグメントの推定数に基づき、 $1.6 \times 10^7$  個までの異なる抗体にこれらのセグメントのランダム組換えおよびランダムVH-VL対合が生成する可能性がある (Fun

damental Immunology、第3版(1993) Paul 編、Raven Press、New York、NY)。抗体多様性の一因となる他のプロセス(体細胞変異など)を考慮に入れる場合、 $10^{10}$  個以上の異なる抗体が生成すると考えられる(Immunoglobulin Genes、第2版(1995)、Jonio 他編、Academic Press、San Diego、CA)。抗体多様性の生成に關与する多くのプロセスのため、同一の抗原特異性を持つ独立して誘導されるモノクローナル抗体が、同一のアミノ酸配列を有することはあり得ない。

#### 【0102】

したがって、本開示は、とりわけ、IL-13と結合し、例えば、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害する抗体およびそれらの抗原結合性フラグメントを提供する。一般に、本明細書に記載されている抗原結合性フラグメント、例えば、CDRを含む構造は、抗体重鎖もしくは軽鎖配列またはその活性フラグメントであり、CDRは、天然に存在するVHおよびVLのCDRに対応する位置に置かれるものとする。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Sequences of Proteins of Immunological Interest、U.S. Department of Health and Human Services(1991)、Kabat 他編に記載されているように決定することができる。

#### 【0103】

本明細書に開示されている抗体分子(抗原結合性フラグメントが含まれる)、すなわち、IL-13と結合し、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害する抗体分子には、マウスモノクローナル抗体、mAb13.2およびその変異体、具体的には、キメラ変異体ch13.2、部分ヒト化変異体h13.2v1および完全ヒト化変異体h13.2v2およびh13.2v3が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの抗体分子は、喘息(アレルギー性と非アレルギー性の両方)、ならびに喘息関連病変を予防または治療するのに有用である。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号9、10、11、12および35に示す。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の重鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号13、14、15、16および36に示す。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の可変軽鎖内の3つの相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を、配列番号19、20および21に示す。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の可変重鎖内の3つのCDRのアミノ酸配列を、配列番号22、23および24に示す。

#### 【0104】

上記に記載されているように、CDRは、抗原との特異的相互作用を担う大部分の残基を含み、VHおよびVLドメイン、すなわち、それぞれ重鎖可変領域および軽鎖可変領域内に含まれる。例示的抗体には、配列番号19~24に示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのCDRまたは選択された残基、特にそのようなCDR由来のIL-13接触残基が含まれる。また、そのような抗体は、IL-13と結合し、例えば、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害することができる。本明細書に記載されているCDRの活性フラグメントのアミノ酸配列、すなわち、最小コアCDR配列を、配列番号25~30に示し、表1に開示する。抗体には、配列番号19~21または配列番号25~27に示されるようなVL鎖のうちの1つまたはそれ以上のCDRが含まれてよい。抗体には、配列番号22~24または配列番号28~30に示されるようなVH鎖のうちの1つまたはそれ以上のCDRが含まれてよい。さらに、抗体には、配列番号19~30に示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有するVLおよびVH鎖のうちの1つまたはそれ以上のCDRが含まれてよい。示されるように、Xは、任意のアミノ酸、例えば、非システインアミノ酸または表1の左欄内の対応する位置におけるアミノ酸と類似した電荷、疎水性および/または側鎖長を有するアミノ酸であってよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 5 】

表 1 . 例示的 C D R

【表 1】

CDR配列	最小コアCDR配列
軽鎖CDR1(L1) 配列番号19 24-KASEVDNYGKSLMH-38 <sup>1</sup>	配列番号25 24-xxxxxxxNYxKxxxx-38
軽鎖CDR2(L2) 配列番号20 54-RASNLES-60	配列番号26 54-Rxxxxxx-60
軽鎖CDR3(L3) 配列番号21 93-QQSNEDPWT-101	配列番号27 93-xxxNx DxWx-101
重鎖CDR1(H1) 配列番号22 30-ISYAMS-35 <sup>2</sup>	配列番号28 30-ISxAxx-35
重鎖CDR2(H2) 配列番号23 50-SISSGGNTYYPDSVKG-65	配列番号29 50-SxSSxxxxxYxxxxxx-65
重鎖CDR3(H3) 配列番号24 98-LDGYFYGfAY-107	配列番号30 98-LDGYFfxxxx-107

<sup>1</sup> V L C D R のナンバリングは、図 3 0 におけるように直線配列ナンバリングスキームに従う。

<sup>2</sup> V H C D R のナンバリングは、図 2 9 におけるように直線配列ナンバリングスキームに従う。

## 【 0 1 0 6 】

上記に記載されているように、抗原結合性フラグメントは、F v フラグメントであってよく、V H および V L ドメインが含まれる。したがって、m A b 1 3 . 3、c h 1 3 . 2、h 1 3 . 2 v 1、h 1 3 . 2 v 2 または h 1 3 . 2 v 3 の F v フラグメントは、本明細書に記載されている抗体を構成することがある。それは、I L - 1 3 と結合し、機能性 I L - 1 3 シグナル伝達複合体の形成を妨害する。他のフラグメントには、F v フラグメント、例えば、m A b 1 3 . 3、c h 1 3 . 2、h 1 3 . 2 v 1、h 1 3 . 2 v 2 または h 1 3 . 2 v 3 抗体または配列番号 1 9 ~ 3 0 に示されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つまたはそれ以上の C D R が含まれる抗体の s c F v フラグメント、F a b フラグメントおよび F ( a b ' ) 2 フラグメントが含まれる。

## 【 0 1 0 7 】

そのような抗体分子は、当業者に知られている方法により作成することができる。例えば、モノクローナル抗体は、知られている方法に従い、ハイブリドーマの作成により産生することができる。次いで、このように形成されるハイブリドーマを、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) および表面プラズモン共鳴 ( B i a c o r e ( 商 標 ) ) 分析などの標準的方法を用いてスクリーニングし、I L - 1 3 と結合し、機能性 I L - 1 3 シグナル伝達複合体の形成を妨害し、1 つまたはそれ以上の I L - 1 3 関連活性を中和する抗体を産生する 1 つまたはそれ以上のハイブリドーマを同定する。組換え I L - 1 3、天然に存在する I L - 1 3 ( すなわち、プロセッシングを受けた成熟形態の I L - 1 3 )、その任意の変異体および I L - 1 3 の抗原ペプチドフラグメントを、免疫原として使用することができる。

## 【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

50

IL - 13 の抗原ペプチドフラグメントは、少なくとも 7 個の連続するアミノ酸残基を含み、ペプチドに対して産生される抗体が、IL - 13 との特異的免疫複合体を形成するように、エピトープを包含することができる。抗原ペプチドは、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 15 個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 20 個のアミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも 30 個のアミノ酸残基を含むことが好ましい。さらに、IL - 13 の抗原ペプチドフラグメントは、IL - 13 受容体結合部位または IL - 4 受容体結合部位を含むことが好ましい。

#### 【0109】

モノクローナル抗体分泌性ハイブリドーマを調製することの代替案として、モノクローナル抗体を、変異体および/またはそれらの部分が含まれる IL - 13 により組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることにより同定および単離し、それにより、IL - 13 と結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作成およびスクリーニングするための技法および市販キットは、当業者に知られている。さらに、抗体ディスプレイを作成およびスクリーニングする際に使用するのに特に適している方法および試薬の例には、米国特許第 5,658,727 号、米国特許第 5,667,988 号および米国特許第 5,885,793 号に記載されている方法および試薬が含まれる。

#### 【0110】

本明細書に記載されているポリクローナル血清および抗体は、IL - 13、その変異体および/またはそれらの部分により適当な対象を免疫化することにより作成することができる。免疫化された対象における抗体価は、固定化された IL - 13 または他のマーカートンパク質（例えば、FLAG）を用い、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）などの標準的技法により経時的にモニターすることができる。抗体は、動物または培養培地から単離することができる。IgG 分画を得るためのタンパク質アクロマトグラフィーの使用などのよく知られている技法が含まれる様々な方法を用いて抗体を精製することができる。

#### 【0111】

特定の実施形態は、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 または h13.2v3 の Fv フラグメントの VH および/または VL ドメインを含む。抗体のフラグメント、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd および dAb フラグメントは、抗体の切断により、または組換え操作により作成することができる。例えば、免疫学的に活性な Fab および F(ab')<sub>2</sub> フラグメントは、ペプシンなどの酵素で抗体を処理することにより作成することができる。

#### 【0112】

他の実施形態は、配列番号 19 ~ 30 に示されるように、これらの VH および VL ドメインのいずれかのうちの 1 つまたはそれ以上の相補性決定領域（CDR）を含む。一実施形態は、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 または h13.2v3 の VH ドメインの H3 フラグメントを含む。

#### 【0113】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている VH および VL ドメインを生殖系列化することができ、すなわち、これらのドメインのフレームワーク領域（FR）を、1 つまたはそれ以上の位置において、従来の分子生物学技法を用いて変化させ、ヒト生殖系列遺伝子またはヒト生殖系列遺伝子産物のコンセンサスアミノ酸配列と一致させることができる（例えば、フレームワーク位置のうちの少なくとも 70、80、85、90、95、97、98 または 99 % で）。他の実施形態において、フレームワーク配列は、生殖系列と異なったままである。

#### 【0114】

ヒト生殖系列配列は、例えば、Tomlinson, I. A. 他 (1992) J. Mol. Biol. 227: 776 - 798; Cook, G. P. 他 (1995) Immun

10

20

30

40

50

ol. Today Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. 他 (1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; および Tomlinson 他 (1995) EMBO J. 14: 4628-4638 に開示されている。V BASE ディレクトリーは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の総括的ディレクトリーを提供する (Tomlinson, I. A. 他 MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK により収集された)。これらの配列は、ヒト配列源として、例えば、フレームワーク領域および CDR のために使用することができる。例えば、米国特許第 6,300,064 号に記載されているように、コンセンサスヒトフレームワーク領域も使用することができる。

#### 【0115】

さらに、ヒト部分と非ヒト部分の両方を含む本明細書に記載されているキメラ、ヒト化および単鎖抗体は、実施例により詳細に記載されているように、標準的組換え DNA 技法を用いて作成することができる。ヒト化抗体は、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現するが、内因性マウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができないトランスジェニックマウスを用いて作成することもできる。

#### 【0116】

さらに、本明細書に記載されている抗体には、IL-13 と結合し、機能性 IL-13 シグナル伝達複合体の形成を妨害し、重鎖および軽鎖の定常領域に変異を有する抗体も含まれる。定常領域の特定のフラグメントを変異させ不活性化することが望ましいことがある。例えば、重定常領域における変異を行い、Fc 受容体 (FcR) および / または補体との結合性が低下した抗体を作成することができ、そのような変異は、当技術分野においてよく知られている。IgG の重鎖の定常領域のアミノ配列へのそのような変異の例を配列番号 17 に示す。CL および CH サブユニット (例えば、CH1) の特定の活性フラグメントをお互いと共有結合させる。他の態様は、機能性 IL-13 シグナル伝達複合体の形成を助ける IL-13 のドメインに特異的な抗体抗原結合性ドメインを得るための方法を提供する。

#### 【0117】

例示的抗体には、配列番号 9、10、11、12 または 35 に示されるような VL 鎖および / または配列番号 13、14、15、16 または 36 に示されるような VH 鎖の配列が含まれてよいが、抗原結合能力を保持するこれらの配列の変異体も含まれてよい。そのような変異体は、当技術分野において知られている技法を用い、提供された配列から誘導することができる。アミノ酸置換、欠失または付加は、FR か CDR のどちらかにおいて行うことができる。フレームワーク領域における変化は、通常、抗体の安定性を改善し抗体の免疫原性を低減するように設計されるが、CDR における変化は、通常、その標的に対する抗体の親和性を高めるように設計される。そのような親和性を高める変化は、通常、CDR 領域を改変し抗体を試験することにより経験的に決定される。そのような改変は、Antibody Engineering、第 2 版 (1995) Borrebaeck 編、Oxford University Press に記載されている方法に従って行うことができる。

#### 【0118】

本明細書に記載されている VH ドメインのアミノ酸配列変異体である VH ドメインを作成するための例示的方法は、本明細書に開示されている VH ドメインのアミノ酸配列において 1 つまたはそれ以上のアミノ酸を付加、欠失、置換または挿入し、所望により、そのようにして提供された VH ドメインを 1 つまたはそれ以上の VL ドメインと組み合わせ、IL-13 との特異的結合について VH ドメインまたは 1 つまたはそれ以上の VH / VL 組合せを試験し、(好ましくは) 1 つまたはそれ以上の IL-13 関連活性を変調するそのような抗原結合性ドメインの能力を試験する工程を含む。VL ドメインは、実質的に本明細書に記載されているようなアミノ酸配列を有することができる。本明細書に開示されている VL ドメインのうちの 1 つまたはそれ以上の配列変異体を 1 つまたはそれ以上の VH ドメインと組み合わせる類似の方法を用いることができる。



## 【0119】

本発明の他の態様は、IL-13と特異的に結合する抗原結合性フラグメントを調製する方法を提供する。この方法は、(a)置換されるCDR3が含まれるか、CDR3コード化領域を欠くVHドメインをコードする核酸の出発レパートリーを提供すること；(b)そのレパートリーを、配列番号24の活性フラグメントを含むドナーCDRをコードするドナー核酸、例えば、配列番号30に示されるアミノ酸配列をコードするドナー核酸と、VHドメインをコードする核酸の生成物レパートリーを提供するため、ドナー核酸がレパートリー内のCDR3領域内に挿入されるように組み合わせること；(c)生成物レパートリーの核酸を発現させること；(d)IL-13に特異的な特異抗体または抗原結合性フラグメントを選択すること；および(e)特異抗体もしくは抗原結合性フラグメントまたはそれをコードする核酸を回収することを含む。

10

## 【0120】

別の実施形態において、本明細書に記載されているVL CDR3(すなわち、L3)を、置換されるCDR3が含まれるか、CDR3コード化領域を欠くVLドメインをコードする核酸のレパートリーと組み合わせる類似方法を用いることができる。本明細書に記載されているCDR(例えば、CDR3)のコーディング配列は、組換えDNA技術を用い、CDR(例えば、CDR3)を欠く可変ドメインのレパートリー中に導入することができる。例えば、Marks他(Bio/Technology(1992)10:779-83)は、可変ドメイン領域の5'末端に向いているか、あるいはそれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトVH遺伝子の第三のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと併せて使用し、CDR3を欠くVH可変ドメインのレパートリーを提供する、抗体可変ドメインのレパートリーを作成する方法について記載している。レパートリーは、特定の抗体のCDR3と組み合わせることができる。類似技法を用い、CDR3由来の配列を、CDR3を欠くVHまたはVLドメインのレパートリーと入れ換え、混合した完全VHまたはVLドメインを同族のVLまたはVHドメインと組み合わせ、特異抗原結合性フラグメントを提供することができる。次いで、レパートリーを、WO92/01047のファージディスプレイシステムなどの適当な宿主系において提示させ、適当な抗原結合性フラグメントを選択することができる。類似のシャフリングまたはコンビナトリアル技法は、Stemmer(Nature(1994)370:389-91)によっても開示されている。他の代替案は、1つまたはそれ以上の選択されたVHおよび/またはVL遺伝子のランダム変異誘発を用い、改変されたVHまたはVL領域を作成し、全可変ドメイン内の変異を作成することである。例えば、Gram他Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.(1992)89:3576-80を参照されたい。

20

30

## 【0121】

使用することができる別の方法は、VHまたはVL遺伝子のCDR領域に変異誘発を向けることである。そのような技法は、例えば、Barbas他(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.(1994)91:3809-13)およびSchier他(J.Mol.Biol.(1996)263:551-67)により開示されている。同様に、1つまたはそれ以上、または3つのCDRすべてを、VHもしくはVLドメイン、または他の骨格(フィブロンネクチンドメインなど)のレパートリー中に移植することができる。得られるタンパク質を、IL-13と結合する能力について評価する。

40

## 【0122】

一実施形態において、標的と結合する結合性タンパク質を、例えば、変異誘発により修飾し、修飾された結合性タンパク質のプールを提供する。次いで、修飾された結合性タンパク質を評価し、改変された機能特性(例えば、結合性の改善、安定性の改善、インビボでの長期安定性)を有する1つまたはそれ以上の改変された結合性タンパク質を同定する。一実施において、ディスプレイライブラリー技術を用い、修飾された結合性タンパク質のプールを選択またはスクリーニングする。次いで、第二のライブラリーから、例えば、より高い厳密性またはより競合性の結合および洗浄条件を用いることにより、より高い親和性の結合性タンパク質を同定する。他のスクリーニング技法も使用することができる。

50

## 【 0 1 2 3 】

一部の実施形態において、変異誘発は、結合界面にあることが知られているか、あるいはその可能性のある領域を標的とする。例えば、同定された結合性タンパク質が抗体である場合、変異誘発を、本明細書に記載されているような重鎖または軽鎖のCDR領域に向けることができる。さらに、変異誘発を、CDRに近いか、あるいは隣接するフレームワーク領域、例えば、CDR接合部の10、5または3アミノ酸内のフレームワーク領域に向けることができる。抗体の場合、変異誘発を1個または数個のCDRに限定し、例えば、段階的改善を行うことができる。

## 【 0 1 2 4 】

一実施形態において、変異誘発を用い、1つまたはそれ以上の生殖系列配列とより類似した抗体を作成する。1つの例示的生殖系列化方法には、単離抗体の配列と類似した（例えば、特定のデータベースにおいて最も類似した）1つまたはそれ以上の生殖系列配列を同定することが含まれてよい。次いで、変異（アミノ酸レベルで）を、増加的に、組み合わせて、または両方で、単離抗体において行うことができる。例えば、一部のまたはすべての可能な生殖系列変異をコードする配列が含まれる核酸ライブラリーを作成する。次いで、変異抗体を評価し、例えば、単離抗体に比べ、1つまたはそれ以上の追加生殖系列残基を有し、依然として有用である（例えば、機能活性を有する）抗体を同定する。一実施形態において、可能な限り多くの生殖系列残基が単離抗体中に導入される。

10

## 【 0 1 2 5 】

一実施形態において、変異誘発を用い、CDR領域中に1つまたはそれ以上の生殖系列残基を置換または挿入する。例えば、生殖系列CDR残基は、修飾されている可変領域と類似した（例えば、最も類似した）生殖系列配列由来であってよい。変異誘発後、抗体の活性（例えば、結合または他の機能活性）を評価し、1つまたはそれ以上の生殖系列残基が耐容性であるかどうかを決定する。類似の変異誘発を、フレームワーク領域において行うことができる。

20

## 【 0 1 2 6 】

生殖系列配列を選択することは、様々な方法で行うことができる。例えば、生殖系列配列を、それが、選択性または類似性についての所定の基準、例えば、少なくとも特定の同一性百分率、例えば、少なくとも、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または99.5%の同一性を満たせば選択することができる。選択は、少なくとも2、3、5または10個の生殖系列配列を用いて行うことができる。CDR1およびCDR2の場合、類似生殖系列配列を同定することには、1個のそのような配列を選択することが含まれてよい。CDR3の場合、類似生殖系列配列を同定することには、1個のそのような配列を選択することが含まれてよいが、アミノ末端部分およびカルボキシ末端部分に対し別々に寄与する2つの生殖系列配列を用いることが含まれてよい。他の実施において、2つを超えるまたは2つの生殖系列配列を用い、例えば、コンセンサス配列を形成する。

30

## 【 0 1 2 7 】

一実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載されている抗体のCDR配列と実質的には異なるCDR配列を有する。実質的でない差には、CDR、例えば、ChothiaまたはKabatt CDRの配列における通常は5～7個のアミノ酸のいずれかのうちの1または2個の置換などのわずかなアミノ酸変化が含まれる。通常、アミノ酸は、類似の電荷、疎水的または立体化学的特徴を有する関連アミノ酸により置換される。そのような置換は、当業者の範囲内にあるであろう。CDRと異なり、構造フレームワーク領域（FR）におけるより実質的な変化は、抗体の結合特性に悪影響を及ぼすことなく行うことができる。FRへの変化には、非ヒト由来のフレームワークをヒト化すること、または抗原接触にとって、または結合部位を安定化するのに重要である特定のフレームワーク残基を操作すること、例えば、定常領域のクラスまたはサブクラスを変えること、Fc受容体結合などのエフェクター機能を改変するかもしれない特定のアミノ酸残基を変えること（Lund他（1991）J. Immunol. 147: 265

40

50

7 - 62 ; Morgan 他 ( 1995 ) Immunology 86 : 319 - 24 ) または定常領域の由来する種を変えることが含まれるが、これらに限定されるものではない。抗体は、エフェクター機能、例えば、Fc 受容体結合および補体活性化を低減または改変する重鎖のCH2 領域に変異を有することができる。例えば、抗体は、米国特許第5, 624, 821 号および第5, 648, 260 号に記載されている変異などの変異を有することができる。例えば、IgG1 またはIgG2 重鎖において、そのような変異を行い、配列番号17 に示されるアミノ酸配列に似せることができる。また、抗体は、当技術分野において開示されているように、IgG4 のヒンジ領域における変異などの、免疫グロブリンの2つの重鎖間をジスルフィド結合で安定化する変異を有することができる(例えば、Angal 他 ( 1993 ) Mol . Immunol . 30 : 105 - 08 )。

10

#### 【0128】

IL - 13 結合性タンパク質は、インタクト抗体、抗体のフラグメント、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、dAb および scFv フラグメント、ならびにそれらの定常領域および/または可変領域において変異した(例えば、キメラ、部分ヒト化または完全ヒト化抗体を作成するため、ならびに望ましい特色、例えば、IL - 13 結合性増強および/またはFcR 結合性低下のある抗体を作成するための変異)インタクト抗体およびフラグメントの形態であってよい。

#### 【0129】

一部の実施形態において、免疫グロブリン可変ドメインの実質的部分は、CDR 領域のうちの少なくとも1つ、および所望により、本明細書に記載されているような可変領域由来のそれらの介在性フレームワーク領域を含むことができる。その部分には、FR1 か FR4 のどちらか、またはFR1 と FR4 の両方のうちの少なくとも約50、60、70、80、85、87、88、90、92、94、95、96、97、98% が含まれることとする。例えば、連続または不連続であってよい部分には、FR1 のC 末端50% および FR4 のN 末端50% が含まれてよい。可変ドメインの実質的部分のN 末端またはC 末端における追加残基は、天然に存在する可変ドメイン領域と通常は関係のない残基であってよい。例えば、組換えDNA 技法により作成される特異抗原結合性フラグメントの構築は、クローニングまたは他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによりコードされるN またはC 末端残基の導入をもたらすことがある。他の操作工程には、以下でより詳細に議論するように、本明細書に記載されている可変ドメインを、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン(例えば、ダイアボディの作成において)が含まれる他のタンパク質配列またはタンパク質標識に結合するためのリンカーの導入が含まれる。

20

30

#### 【0130】

実施例に例示されている実施形態は、VH ドメインとVL ドメインの「マッチング」ペアを含むが、本発明は、VH ドメイン配列かVL ドメイン配列のどちらか、特にVH ドメインに由来する単一の可変ドメインを含む結合性フラグメントも包含する。単鎖特異結合性ドメインのどちらかの場合、これらのドメインを用い、IL - 13 と結合することができる2ドメイン特異抗原結合性ドメインを形成することができる相補ドメインをスクリーニングすることができる。これは、いわゆる階層的デュアルコンビナトリアルアプローチ(例えば、WO 92 / 01047 に開示されているような)を用いるファージディスプレイスクリーニング方法により行うことができ、H 鎖クローンかL 鎖クローンのどちらかを含む個々のコロニーを用い、他の鎖(L またはH)をコードするクローンの完全ライブラリーに感染させ、参考文献に記載されている技法などのファージディスプレイ技法に従い、得られる2重鎖特異抗原結合性ドメインを選択する。この技法は、Marks 他、前掲書にも開示されている。抗体は、放射性核種、薬物、巨大分子または他の物質と化学的方法によりコンジュゲートすることができ、または本明細書に記載されている1つまたはそれ以上のCDR を含む融合タンパク質として作成することができる。

40

#### 【0131】

抗体融合タンパク質は、VH - VL ペアを含有し、これらの鎖(通常VH)のうちの1つおよび別のタンパク質は、単一ポリペプチド鎖として合成される。これらのタイプの生

50

成物は、それらが、一般的に、追加の機能要素、例えば、小分子の活性部分またはコンジュゲートされた、あるいは縮合された巨大分子の主要な分子構造的特徴を有する点で抗体と異なる。

#### 【0132】

上記で概略が説明されたアミノ酸配列への変化の他に、抗体を、グリコシル化、ペグ化するか、あるいはアルブミンまたは非タンパク質ポリマーに連結することができる。例えば、本明細書に開示されている抗体を、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号；または第4,179,337号に示されるように、様々な非タンパク質ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンのうちの1つと連結することができる。抗体は、ポリマーとの共有結合コンジュゲーションにより化学的に修飾され、例えば、それらの循環半減期を増加させる。例示的ポリマーおよびそれらをペプチドに接続する方法は、米国特許第4,766,106号；第4,179,337号；第4,495,285号；および第4,609,546号にも示されている。

#### 【0133】

他の実施形態において、抗体を、改変されたグリコシル化パターンを有する（例えば、本来の、すなわち天然グリコシル化パターンから改変された）ように修飾することができる。この文脈で使用する「改変された」は、除去される1つまたはそれ以上の炭水化物部分を有することおよび/または本来の抗体に追加された1つまたはそれ以上のグリコシル化部位を有することを意味する。本明細書に開示されている抗体へのグリコシル化部位の追加は、グリコシル化部位コンセンサス配列を含むようにアミノ酸配列を改変することにより行うことができ、そのような技法は、当技術分野においてよく知られている。抗体上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、抗体のアミノ酸残基へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによる。これらの方法は、例えば、WO87/05330およびApplinおよびWriston((1981)CRC Crit. Rev. Biochem. 22:259-306)に記載されている。抗体上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、当技術分野において記載されているように、化学的または酵素的に行うことができる(Hakimuddin他(1987)Arch. Biochem. Biophys. 259:52; Edge他(1981)Anal. Biochem. 118:131; およびThotakura他(1987)Meth. Enzymol. 138:350)。例えば、サルベージ受容体結合性エピトープを提供することによりインビボ半減期を増加させる修飾についての米国特許第5,869,046号を参照されたい。

#### 【0134】

本明細書に記載されている抗体は、検出可能な、または機能性標識でタグ付けすることもできる。検出可能な標識には、 $^{131}\text{I}$ または $^{99}\text{Tc}$ などの放射性標識が含まれ、これらは、当技術分野において知られている従来の化学反応を用い、本明細書に記載されている抗体に接続することができる。標識には、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素標識も含まれる。標識には、ビオチンなどの化学的部分がさらに含まれ、これは、特異的同族の検出可能な部分、例えば、標識アビジンとの結合を介して検出することができる。

#### 【0135】

本明細書に開示されている抗体の結合特性は、以下の方法、すなわち、以下の実施例に記載されているようなBiacore分析、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、X線結晶学、配列分析および走査変異誘発、ならびに当技術分野においてよく知られている他の方法が含まれる任意の適当な方法により測定することができる。1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和および/または阻害する本明細書に記載されている抗体の能力は、以下の方法、すなわち、以下の実施例に記載されているように、IL-13依存性細胞系、例えば、TFIの増殖を測定するためのアッセイ；IL-13仲介性ポリペプチドの発現を測定するためのアッセイ、例えば、CD23の発現のフローサイトメトリー

分析；下流シグナル伝達分子、例えば、STAT6の活性を測定するアッセイ；関連動物モデル、例えば、カニクイザルにおいて喘息を予防する本明細書に記載されている抗体の効率を試験するアッセイ、ならびに当技術分野においてよく知られている他のアッセイにより測定することができる。

#### 【0136】

関心のあるタンパク質と標的（例えば、IL-13）の結合相互作用は、SPRを用いて分析することができる。SPRまたは生体分子相互作用解析（BIA）は、相互作用物のいずれにも標識することなく、リアルタイムに生体特異性相互作用を検出する。BIAチップの結合表面における質量の変化（結合事象を示す）は、表面近くで光の屈折率の変化をもたらす（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学現象）。屈折率の変化は、検出可能なシグナルを生じ、生物学的分子間のリアルタイム反応の徴候として測定される。SPRを用いるための方法については、例えば、米国特許第5,641,640号；Raether（1988）Surface Plasmons Springer Verlag；SjolanderおよびUrbaniczky（1991）Anal.Chem.63:2338-2345；Szabo他（1995）Curr.Opin.Struct.Biol.5:699-705およびBIACore International AB（Uppsala, Sweden）により提供されるオンラインリソースに記載されている。

#### 【0137】

SPRからの情報を用い、生体分子の標的との結合について、平衡解離定数（Kd）、ならびにKonおよびKoffが含まれる速度パラメーターの正確かつ定量的測度を提供することができる。そのようなデータを用い、様々な生体分子を比較することができる。例えば、多様な鎖のライブラリーから選択される核酸によりコードされるタンパク質を比較し、標的に対して高い親和性を有するか、あるいは遅いKoffを有する個々のタンパク質を同定することができる。また、この情報を用い、構造活性相関（SAR）を展開することができる。例えば、親タンパク質の成熟したバージョンの速度パラメーターおよび平衡結合パラメーターを、親タンパク質のパラメーターと比較することができる。特定の結合パラメーター、例えば、高い親和性および遅いKoffと相関関係がある所与の位置における変異アミノ酸を同定することができる。この情報を、構造モデリングと組み合わせることができる（例えば、ホモロジーモデリング、エネルギー最小化またはX線結晶学またはNMRによる構造決定）。結果として、タンパク質とその標的との間の物理的相互作用に対する理解を定式化し、他の設計プロセスを導くために使用することができる。

#### 【0138】

他の態様において、本開示は、IL-13と結合することができる抗体を選択し、1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和および/または阻害する方法を提供する。この方法は、a)複数の抗体または抗原結合性フラグメントをIL-13と接触させること；b)IL-13と結合する抗体または抗原結合性フラグメントを選択すること；c)IL-13がIL-13受容体と結合するのを妨げる選択した抗体または抗原結合性フラグメントの能力を試験すること；およびd)IL-13がその受容体と結合するのを妨げることができる1つまたはそれ以上の抗体または抗原結合性フラグメントを選択することを含む。望ましい場合、1つまたはそれ以上の抗体をさらに修飾することができる。1つまたはそれ以上のそのような抗体を、例えば、医薬組成物として調剤することができる。

#### 【0139】

本明細書に開示されている抗IL-13抗体は、上清、細胞ライセート中で、または細胞表面上でIL-13を単離、精製および/または検出するのにも有用である。本明細書に開示されている抗体を診断的に使用し、臨床試験手順の一部としてIL-13タンパク質レベルをモニターすることができる。さらに、本明細書に開示されている抗体を、1つまたはそれ以上のIL-13関連活性の中和および/または阻害を必要とする治療、例えば、アレルギー性または非アレルギー性喘息および関連病変において使用することができる。また、本開示は、ヒトIL-13を対象とする新規な抗体に関連する新規な単離およ

び精製ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを提供する。本明細書に開示されている遺伝子、ポリヌクレオチド、タンパク質およびポリペプチドには、IL-13に対するマウス抗体(mAb13.2)およびその変異体が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0140】

抗IL-13抗体ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

例えば、本開示は、1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を変調する(例えば、IL-13生物活性を中和する)、IL-13に対するマウス抗体(mAb13.2)、mAb13.2のキメラバージョン(ch13.2)、mAb13.2の部分ヒト化バージョン(h13.2v1)およびmAb13.2の2つの完全ヒト化バージョン(h13.2v2およびh13.2v3)の可変領域をコードする精製および単離ポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0141】

ヌクレオチド配列には、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の軽鎖可変領域をコードし、それぞれ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号33に示される配列が含まれてよい。また、ヌクレオチド配列には、mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の重鎖可変領域をコードし、それぞれ配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号34に示される配列が含まれてよい。また、ポリヌクレオチドには、配列番号1~8、33および34に示される配列のいずれか、またはそれらの相補体と厳密な条件下でハイブリダイズし、かつ/またはこれらの配列によりコードされる可変領域の実質的生物学的活性を保持するポリペプチド(すなわち、活性フラグメント)をコードするポリヌクレオチドが含まれてよい。また、ポリヌクレオチドには、少なくとも21個の連続したヌクレオチドを含む配列番号1~8、33および34に示される配列のいずれかのうちの連続部分が含まれてよい。表2は、いくつかの例示的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列についての配列番号を要約している。

#### 【0142】

表2：本発明のポリヌクレオチドの配列同定番号(配列番号)

【表2】

	mAb13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL領域	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号33
VH領域	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8	配列番号34

#### 【0143】

mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号、9、10、11、12および35に示す。mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の重鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号、13、14、15、16および36に示す。本明細書に開示されているポリペプチドには、少なくとも4個の連続するアミノ酸を含み、これらの可変領域の実質的な生物学的活性を保持する(すなわち、活性フラグメント)配列番号9~16、35および36に示される配列のいずれかのうちの連続部分も含まれる。本出願のポリペプチドには、5~7個のアミノ酸を含む配列番号9~16、35および36に示される配列のいずれかのうちの連続部分が含まれることが好ましい。本出願のより好ましいポリペプチドには、それぞれmAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2およびh13.2v3の実質的な生物学的活性を保持する配列番号9および13、配列番号10および14、配列番号11および15、配列番号12および16、ならびに配列番号35および36に示される配列のいずれかの

うちの任意の連続部分が含まれる。本明細書に開示されているポリヌクレオチドには、上記に記載されているポリヌクレオチドの他に、配列番号 9 ～ 16、35 および 36 に示されるアミノ酸配列のいずれか、またはそれらの連続部分をコードし、遺伝コードのよく知られている縮重のためだけで上記に記載されているポリヌクレオチドと異なるポリヌクレオチドも含まれる。表 3 は、本明細書に開示されているポリペプチドのいくつかのアミノ酸配列についての配列番号を要約している。例えば、表 3 は、抗体 mAb13.2、ch13.2、h13.2v1、h13.2v2 および h13.2v3 の可変軽鎖 (VL)、可変重鎖 (VH)、定常重鎖 (CH)、定常軽鎖 (CL)、可変軽鎖の CDR1 (L1)、可変軽鎖の CDR2 (L2)、可変軽鎖の CDR3 (L3)、可変重鎖の CDR1 (H1)、可変重鎖の CDR2 (H2) および可変重鎖の CDR3 (H3) のアミノ酸配列についての配列番号を要約している。

10

## 【0144】

表 3：例示的ポリペプチドの配列 ID 番号 (配列番号)

## 【表 3】

	mAb13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号12	配列番号35
VH	配列番号13	配列番号14	配列番号15	配列番号16	配列番号36
CH		配列番号17	配列番号17	配列番号17	配列番号17
CL		配列番号18	配列番号18	配列番号18	配列番号18
L1	配列番号19	配列番号19	配列番号19	配列番号19	配列番号19
L2	配列番号20	配列番号20	配列番号20	配列番号20	配列番号20
L3	配列番号21	配列番号21	配列番号21	配列番号21	配列番号21
H1	配列番号22	配列番号22	配列番号22	配列番号22	配列番号22
H2	配列番号23	配列番号23	配列番号23	配列番号23	配列番号23
H3	配列番号24	配列番号24	配列番号24	配列番号24	配列番号24

20

## 【0145】

本明細書に開示されている単離ポリヌクレオチドは、開示されているポリヌクレオチドをコードする配列と一致するか、あるいは類似した配列を有する核酸を同定および単離するためのハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用することができる。核酸を同定および単離するためのハイブリダイゼーション方法には、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、サザンハイブリダイゼーション、in situ ハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーションが含まれ、当業者にはよく知られている。

30

## 【0146】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる厳密性の条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーション反応の厳密性には、任意の 2 つの核酸分子がお互いとハイブリダイズする困難さが含まれる。各々のハイブリダイズするポリヌクレオチドは、厳密性の低い条件、より好ましくは厳密な条件、最も好ましくは極めて厳密な条件下で、その対応するポリヌクレオチドとハイブリダイズすることが好ましい。厳密性条件の例を以下の図 4 に示す。

40

極めて厳密な条件は、少なくとも、例えば、条件 A ～ F のように厳密であり、厳密な条件は、少なくとも、例えば、条件 G ～ L のように厳密であり、厳密性の低い条件は、少なくとも、例えば、条件 M ～ R のように厳密である。

## 【0147】

表 4

【表 4】

厳密性 条件	ポリヌクレオチド ハイブリッド	ハイブリ ッド長(bp) <sup>1</sup>	ハイブリダイゼーショ ン温度および緩衝液 <sup>2</sup>	洗浄温度および緩 衝液 <sup>2</sup>
A	DNA:DNA	>50	65°C; 1X SSCまたは 42°C; 1X SSC,50%ホル ムアミド	65°C; 0.3X SSC
B	DNA:DNA	<50	T <sub>B</sub> *; 1X SSC	T <sub>B</sub> *; 1X SSC
C	DNA:RNA	>50	67°C; 1X SSCまたは 45°C; 1X SSC,50%ホル ムアミド	67°C; 0.3X SSC
D	DNA:RNA	<50	T <sub>D</sub> *; 1X SSC	T <sub>D</sub> *; 1X SSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1X SSCまたは 50°C; 1X SSC,50%ホル ムアミド	70°C; 0.3X SSC
F	RNA:RNA	<50	T <sub>F</sub> *; 1X SSC	T <sub>F</sub> *; 1X SSC
G	DNA:DNA	>50	65°C; 4X SSCまたは 42°C; 4X SSC,50%ホル ムアミド	65°C; 1X SSC
H	DNA:DNA	<50	T <sub>H</sub> *; 4X SSC	T <sub>H</sub> *; 4X SSC
I	DNA:RNA	>50	67°C; 4X SSCまたは 45°C; 4X SSC,50%ホル ムアミド	67°C; 1X SSC
J	DNA:RNA	<50	T <sub>J</sub> *; 4X SSC	T <sub>J</sub> *; 4X SSC
K	RNA:RNA	>50	70°C; 4X SSCまたは 50°C; 4X SSC,50%ホル ムアミド	67°C; 1X SSC
L	RNA:RNA	<50	T <sub>L</sub> *; 2X SSC	T <sub>L</sub> *; 2X SSC
M	DNA:DNA	>50	50°C; 4X SSCまたは 40°C; 6X SSC,50%ホル ムアミド	50°C; 2X SSC
N	DNA:DNA	<50	T <sub>N</sub> *; 6X SSC	T <sub>N</sub> *; 6X SSC
O	DNA:RNA	>50	55°C; 4X SSCまたは 42°C; 6X SSC,50%ホル ムアミド	55°C; 2X SSC
P	DNA:RNA	<50	T <sub>P</sub> *; 6X SSC	T <sub>P</sub> *; 6X SSC
Q	RNA:RNA	>50	60°C; 4X SSCまたは 45°C; 6X SSC,50%ホル ムアミド	60°C; 2X SSC
R	RNA:RNA	<50	T <sub>R</sub> *; 4X SSC	T <sub>R</sub> *; 4X SSC

<sup>1</sup> ハイブリッド長は、ハイブリダイズするポリヌクレオチドの1つまたはそれ以上のハイブリダイズした領域について予想される長さである。あるポリヌクレオチドを未知の配列の標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズする場合、ハイブリッド長は、ハイブリダイズするポリヌクレオチドの長さであると考えられる。既知の配列のポリヌクレオチドがハイブリダイズされる場合、ハイブリッド長は、ポリヌクレオチドの配列をアラインメントし、最適な配列相補性の1つまたはそれ以上の領域を同定することにより決定することができる。

10

20

30

40

50



$2 \times \text{SSPE}$  ( $1 \times \text{SSPE}$ は、 $0.15 \text{ M NaCl}$ 、 $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$  および  $1.25 \text{ mM EDTA}$ 、 $\text{pH } 7.4$ である)は、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液において  $\text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC}$ は、 $0.15 \text{ M NaCl}$  および  $15 \text{ mM}$  クエン酸ナトリウムである)の代用にすることができる; 洗浄は、ハイブリダイゼーション終了後 15 分間行われる。

$T_B^* - T_R^*$ : 長さが 50 塩基対未満であると予想されるハイブリッドについてのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 ( $T_m$ ) よりも 5 ~ 10 低くしなければならず、 $T_m$  は、下式に従って決定される。長さが 18 塩基対未満のハイブリッドについては、 $T_m (^\circ\text{C}) = 2 (A + T \text{ 塩基数}) + 4 (G + C \text{ 塩基数})$ 。長さが 18 ~ 49 塩基対のハイブリッドについては、 $T_m (^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} \text{Na}^+) + 0.41 (\% G + C) - (600 / N)$  であり、ここで、 $N$  は、ハイブリッド中の塩基数であり、 $\text{Na}^+$  は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である ( $1 \times \text{SSC}$  の  $\text{Na}^+ = 0.165 \text{ M}$ )。

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションについての厳密性条件の追加例は、参照により本明細書に組み込まれている Sambrook 他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) および Ausubel 他、編、Current Protocols in Molecular Biology, Sects. 2.10 & 6.3 - 6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995) に提供されている。

#### 【0148】

本明細書に開示されている単離ポリヌクレオチドは、開示されているポリヌクレオチドの対立遺伝子変異体をコードする配列を有する DNA を同定および単離するためのハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用することができる。対立遺伝子変異体は、開示されているポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドと一致するか、あるいは有意な類似性を有するポリペプチドをコードする、開示されているポリヌクレオチドの天然に存在する代替形態である。対立遺伝子変異体は、開示されているポリヌクレオチドと少なくとも 90 % の配列同一性 (より好ましくは、少なくとも 95 % の同一性; 最も好ましくは、少なくとも 99 % の同一性) を有することが好ましい。

#### 【0149】

また、本明細書に開示されている単離ポリヌクレオチドは、開示されているポリヌクレオチドと相同なポリペプチドをコードする配列を有する DNA を同定および単離するためのハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用することができる。これらの相同体は、開示されているポリペプチドおよびポリヌクレオチドの種とは異なる種から、または同じ種内から単離されるが、開示されているポリヌクレオチドおよびポリペプチドと有意な配列類似性を持つポリヌクレオチドおよびポリペプチドである。ポリヌクレオチド相同体は、開示されているポリヌクレオチドの少なくとも 50 %、70 %、75 %、80 %、85 %、87 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % 配列を有することが好ましい。

#### 【0150】

また、本明細書に開示されている単離ポリヌクレオチドは、抗体を発現する細胞および組織ならびに抗体が発現される条件を同定するためのハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用することができる。

#### 【0151】

本明細書に開示されている単離ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されているポリペプチドの組換え産生のための発現制御配列と動作可能に連結することができる。ポリヌクレオチドは、定常領域、例えば、様々な抗体アイソタイプのうちの 1 つの定常領域をコードするヌクレオチド配列と動作可能に連結することができる。例えば、本明細書に開示されている軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド (例えば、配列番号 1 ~ 4 および 3

3 に示されるポリヌクレオチドのうちのいずれか 1 個) を、 軽鎖 (例えば、配列番号 18 に示されるような) か 軽鎖のどちらかの定常領域をコードするヌクレオチド配列 (またはその誘導体) と、連結されたヌクレオチドの発現が、IL - 13 と特異的に結合し、機能性 IL - 13 シグナル伝達複合体の形成を妨害し、1 つまたはそれ以上の IL - 13 関連活性を中和するように動作可能に連結することができる。同様に、本明細書に開示されている重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド (例えば、配列番号 5 ~ 8 および 34 に示されるポリヌクレオチドのうちのいずれか) を、重鎖アイソタイプ、例えば、Ig M、Ig D、Ig E、Ig G および Ig A の定常領域をコードするヌクレオチド配列 (またはその誘導体) と動作可能に連結することができる。組換えタンパク質を発現する一般的方法は、当技術分野においてよく知られている。そのような組換えタンパク質は、IL - 13 仲介性シグナル伝達に起因する障害 (例えば、アレルギー性または非アレルギー性喘息) の治療において使用するために可溶形態で発現することができる。

10

#### 【0152】

本明細書に開示されている組換え発現ベクターは、宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列 (例えば、複製起点) および選択可能なマーカー遺伝子などの追加配列を運ぶことができる。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする (例えば、米国特許第 4,399,216 号、第 4,634,665 号および第 5,179,017 号を参照)。例えば、通常、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞上で、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択可能なマーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (メトトレキセート選択 / 増幅により dhfr<sup>r</sup> 宿主細胞において使用するため) および neo 遺伝子 (G418 選択のため) が含まれる。

20

#### 【0153】

多くの細胞系は、組換え体発現に適している宿主細胞である。哺乳類宿主細胞系には、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、293T 細胞、A431 細胞、3T3 細胞、CV - 1 細胞、HeLa 細胞、L 細胞、BHK 21 細胞、HL - 60 細胞、U937 細胞、HaK 細胞、ジャーカット細胞、ならびに一次組織および初代移植片のインビトロ培養液に由来する細胞株が含まれる。

#### 【0154】

あるいは、酵母などの下等真核生物 (例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、ピキア (*Pichia*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 菌株およびカンジダ (*Candida*) 菌株) または原核生物 (例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) およびサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)) においてポリペプチドを組換え的に産生することが可能なことがある。酵母または細菌で作られたポリペプチドを修飾することができる。例えば、適切な部位のグリコシル化。

30

#### 【0155】

また、ポリペプチドを、動物細胞、例えば、昆虫または哺乳類細胞において製造することができる。例えば、ポリペプチドをコードする配列を、バキュロウイルスベクターなどの昆虫発現ベクター中に挿入し、昆虫細胞発現系 (例えば、MAXBAC (登録商標) キット、Invitrogen、Carlsbad、CA) において使用することができる。

40

#### 【0156】

次いで、本明細書に開示されているポリペプチドを、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーなどの知られている精製プロセスを用いて培養培地または細胞抽出物から精製することができる。また、精製には、本明細書に開示されているポリペプチドと結合することが知られている物質による親和性クロマトグラフィーが含まれてよい。

#### 【0157】

あるいは、本明細書に開示されているポリペプチドを、精製を容易にする形態で組換え的に発現させることができる。例えば、ポリペプチドを、マルトース結合性タンパク質 (

50

M B P )、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T )、もしくはチオレドキシン ( T R X ) などのタンパク質との融合物として、またはヘキサ - ヒスチジン、ペンタ - ヒスチジン、または小さなエピトープタグ、例えば、F L A G エピトープとの融合物として発現させることができる。

#### 【 0 1 5 8 】

また、本明細書に開示されているポリペプチドは、開示されているポリペプチドと構造的に異なるが (例えば、わずかに改変された配列を有する)、開示されているポリペプチドと実質的に同一の生化学的特性を有する (例えば、機能的に非必須なアミノ酸残基においてのみ改変されている) 分子を包含する。そのような分子には、改変、置換、置き換え、挿入または欠失を含む天然に存在する対立遺伝子変異体および意図的に操作された変異体が含まれる。そのような改変、置換、交換、挿入または欠失のための技法は、当業者によく知られている。

#### 【 0 1 5 9 】

##### I L - 1 3 結合性物質

抗体およびそれらのフラグメントである結合性物質以外の、I L - 1 3 と結合する結合性物質、特に、I L - 1 3 との結合について m A b 1 3 . 2 および本明細書に記載されている他の抗体と競合する結合性物質も提供される。例えば、それらの結合性物質は、I L - 1 3 上で m A b 1 3 . 2 と同一のエピトープまたは重複するエピトープと結合することができる。結合性物質は、I L - 1 3 活性を阻害または中和することが好ましい。例えば、結合性物質は、I L - 1 3 の I L - 4 R との結合を阻害し、例えば、I L - 1 3 の I L - 1 3 R 1 との結合を妨げない。そのような結合性物質は、本明細書に記載されている方法、例えば、障害を治療および予防する方法において使用することができる。本明細書に記載されているすべての実施形態は、I L - 1 3 結合性物質との使用に適合させることができる。

#### 【 0 1 6 0 】

結合性物質は、本明細書に記載されている可変ドメインを修飾すること、または本明細書に記載されている可変ドメインのうちの 1 つまたはそれ以上の C D R を別の骨格上に移植することが含まれる多くの手段により同定することができる。また、結合性物質は、例えば、スクリーニングにより、多様なライブラリーから同定することができる。タンパク質ライブラリーをスクリーニングするための一方法は、ファージディスプレイを用いる。タンパク質の特定の領域を改変し、I L - 1 3 と相互作用するタンパク質を、例えば、固体支持体上の保持により、または他の物理的会合により同定する。I L - 1 3 上で m A b 1 3 . 2 と同一のエピトープまたは重複するエピトープと結合する特定の結合性物質を同定するため、結合性物質を、m A b 1 3 . 2 (または、関連抗体) を添加することにより溶出するか、あるいは、結合性物質を、m A b 1 3 . 2 (または、関連抗体) との競合実験で評価することができる。また、ライブラリーを、I L - 1 3 および m A b 1 3 . 2 (または、関連抗体) を含む複合体と接触させることにより、他のエピトープと結合する物質のライブラリーを減少させることが可能である。次いで、わずかになったライブラリーを、I L - 1 3 と接触させ、I L - 1 3 と結合するが、m A b 1 3 . 2 と結合している場合には I L - 1 3 と結合しない結合性物質を得ることができる。また、標的として m A b 1 3 . 2 エピトープを含む I L - 1 3 由来のペプチドを使用することが可能である。

#### 【 0 1 6 1 】

ファージディスプレイについては、例えば、米国特許第 5 , 2 2 3 , 4 0 9 号 ; S m i t h ( 1 9 8 5 ) S c i e n c e 2 2 8 : 1 3 1 5 - 1 3 1 7 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 1 / 1 7 2 7 1 ; W O 9 2 / 2 0 7 9 1 ; W O 9 2 / 1 5 6 7 9 ; W O 9 3 / 0 1 2 8 8 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 0 9 6 9 0 ; W O 9 0 / 0 2 8 0 9 ; W O 9 4 / 0 5 7 8 1 ; F u c h s 他 ( 1 9 9 1 ) B i o / T e c h n o l o g y 9 : 1 3 7 0 - 1 3 7 2 ; H a y 他 ( 1 9 9 2 ) H u m A n t i b o d H y b r i d o m a s 3 : 8 1 - 8 5 ; H u s e 他 ( 1 9 8 9 ) S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 - 1 2 8 1 ; G r i f f i t h s 他 ( 1 9 9 3 ) E M B O J 1 2 : 7 2 5 - 7 3 4 ; H a w k

10

20

30

40

50

ins 他 (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson 他 (1991) Nature 352:624-628; Gram 他 (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard 他 (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Rebar 他 (1996) Methods Enzymol. 267:129-49; および Barbas 他 (1991) PNAS 88:7978-7982 に記載されている。酵母表面ディスプレイについては、例えば、Boder および Wittup (1997) Nat. Biotechnol. 15:553-557 に記載されている。ディスプレイの別の形態は、リボソームディスプレイである。例えば、Mattheakis 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022 および Hanes 他 (2000) Nat. Biotechnol. 18:1287-92; Hanes 他 (2000) Methods Enzymol. 328:404-30. および Schaffitzel 他 (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35 を参照されたい。

#### 【0162】

IL-13 と結合する結合性物質は、1つの骨格タンパク質の構造的特徴、例えば、折り畳みドメインを有することがある。ある抗体に基づいた例示的骨格ドメインは、モノクローナル抗体の重鎖可変ドメインから3個の鎖を除去することにより設計された「ミニボディー」骨格である (Tramontano 他、1994、J. Mol. Recognit. 7:9; および Martin 他、1994、The EMBO Journal 13, pp. 5303-5309)。このドメインには、61個の残基が含まれ、このドメインを用いて、2個の超可変ループ、例えば、本明細書に記載されている可変ドメインまたは本明細書に記載されている変異体の1つまたはそれ以上の超可変ループを提供することができる。別のアプローチにおいて、結合性物質には、V様ドメインである骨格ドメインが含まれる (Coia 他 WO99/45110)。V様ドメインは、抗体の可変重 (VH) または可変軽 (VL) ドメインと類似した構造的特徴を有するドメインを指す。別の骨格ドメインは、2個のジスルフィド結合によりつなぎ合わされている74個の残基の6鎖シートサンドイッチのテングミスタチン (tendamistatin) に由来する (McConnell および Hoess、1995、J. Mol. Biol. 250:460)。この親タンパク質には3つのループが含まれる。これらのループを修飾 (例えば、本明細書に記載されているCDRまたは超可変ループを用い) または改変し、例えば、IL-13 と結合するドメインを選択することができる。WO00/60070 は、天然に存在するCTLA-4の細胞外ドメインに由来する サンドイッチ構造について記載しており、骨格として使用している。

#### 【0163】

IL-13 結合性物質のためのさらに別の骨格ドメインは、フィブロネクチンDII型メインまたは関連するフィブロネクチン様タンパク質に基づくドメインである。フィブロネクチンDII型 (Fn3) ドメインの全体的な折り畳みは、最小の機能的抗体フラグメントである抗体重鎖の可変領域の全体的な全折り畳みと密接に関連している。Fn3 は、Fn3 が、9個ではなく7個の鎖を有していることを除いては、抗体VHドメインのサンドイッチと類似した サンドイッチである。Fn3の末端には3つのループがあり、BC、DE および FG ループの位置は、抗体のVHドメインのCDR1、2 および 3の位置にほぼ対応している。Fn3 が有利なのは、ジスルフィド結合を有していないためである。したがって、Fn3 は、抗体およびそれらのフラグメントと異なり、還元条件下で安定である (WO98/56915; WO01/64942; WO00/34784 を参照)。Fn3 ドメインを、修飾 (例えば、本明細書に記載されているCDRまたは超可変ループを用い) または改変し、例えば、IL-13 と結合するドメインを選択することができる。

#### 【0164】

さらに他の例示的骨格ドメインには、T細胞受容体; MHCタンパク質; 細胞外ドメイン (例えば、フィブロネクチンDII型リピート、EGFリピート); プロテアーゼ阻害

10

20

30

40

50

剤（例えば、クニツドメイン、エコチン（*ecotin*）、BPTIなど）；TPRリピーター；トレフォイル構造；亜鉛フィンガードメイン；DNA結合性タンパク質；特に、単量体DNA結合性タンパク質；RNA結合性タンパク質；酵素、例えば、プロテアーゼ（特に、不活性化プロテアーゼ）、RNA分解酵素；シャペロン、例えば、チオレドキシンおよび熱ショックタンパク質；および細胞内シグナル伝達ドメイン（SH2およびSH3ドメインなど）が含まれる。US20040009530は、いくつかの代替骨格の例について記載している。

#### 【0165】

小さな骨格ドメインの例には、クニツドメイン（58個のアミノ酸、3個のジスルフィド結合）、セイヨウカボチャ（*Cucurbita maxima*）トリプシン阻害剤ドメイン（31個のアミノ酸、3個のジスルフィド結合）、グアニリンに関連するドメイン（14個のアミノ酸、2個のジスルフィド結合）、グラム陰性菌由来の耐熱性エンテロトキシンI Aに関連するドメイン（18個のアミノ酸、3個のジスルフィド結合）、EGFドメイン（50個のアミノ酸、3個のジスルフィド結合）、クリングルドメイン（60個のアミノ酸、3個のジスルフィド結合）、真菌の炭水化物結合ドメイン（35個のアミノ酸、2個のジスルフィド結合）、エンドセリンドメイン（18個のアミノ酸、2個のジスルフィド結合）および連鎖球菌G IgG結合ドメイン（35個のアミノ酸、ジスルフィド結合なし）が含まれる。小さな細胞内骨格ドメインの例には、SH2、SH3およびEVHドメインが含まれる。

一般に、細胞内または細胞外の任意のモジュールドメインを使用することができる。

#### 【0166】

骨格ドメインを評価するための例示的基準には、（1）アミノ酸配列、（2）いくつかの相同ドメインの配列、（3）三次元構造および/または（4）一連のpH、温度、塩分、有機溶媒、酸化剤濃度にわたる安定性データが含まれてよい。一実施形態において、骨格ドメインは、小さく安定なタンパク質ドメイン、例えば、100、70、50、40または30個未満のアミノ酸のタンパク質である。ドメインには、1つまたはそれ以上のジスルフィド結合が含まれるか、あるいは、金属、例えば、亜鉛をキレートすることがある。

#### 【0167】

さらに他の結合性物質は、ペプチド、例えば、30、25、24、20、18、15または12個未満のアミノ酸であるアミノ酸配列のタンパク質に基づく。ペプチドを、より大きなタンパク質、通常は、IL-13、例えば、本明細書に記載されているエピトープと独立して結合することができる領域に組み入れることができる。ペプチドを、ファージディスプレイにより同定することができる。

#### 【0168】

IL-13結合性物質には、非ペプチド結合および他の化学修飾が含まれてよい。例えば、結合性物質の一部またはすべてを、ペプチドミメティック、例えば、ペプトイドとして合成することができる（例えば、Simon他（1992）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367-71およびHorwell（1995）*Trends Biotechnol.* 13:132-4を参照）。結合性物質には、1つまたはそれ以上の（例えば、すべてが）非加水分解性の結合が含まれてよい。多くの非加水分解性ペプチド結合は、そのような結合を含むペプチドを合成するための手順と共に、当技術分野において知られている。例示的非加水分解性結合には、- - [CH<sub>2</sub>NH] - - 還元型アミドペプチド結合、- - [COCH<sub>2</sub>] - - ケトメチレンペプチド結合、- - [CH(CN)NH] - - (シアノメチレン)アミノペプチド結合、- - [CH<sub>2</sub>CH(OH)] - - ヒドロキシエチレンペプチド結合、- - [CH<sub>2</sub>O] - - ペプチド結合および- - [CH<sub>2</sub>S] - - チオメチレンペプチド結合が含まれる（米国特許第6,172,043号を参照）。

#### 【0169】

医薬組成物、用量および投与方法

10

20

30

40

50

抗IL-13抗体（または、他のIL-13結合性物質）は、例えば、薬学的に許容できる担体との組合せにより、医薬組成物中に組み入れることができる。また、そのような組成物は、例えば、様々な希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤および当技術分野においてよく知られている他の材料を含有することができる。用語「薬学的に許容できる」は、1つまたはそれ以上の活性成分の生物学的活性の有効性を妨害しない非毒性材料を意味する。担体の特徴は、投与の経路によって異なることがある。

#### 【0170】

また、医薬組成物は、以下でより詳細に記載されるような他の抗サイトカイン抗体または他の抗炎症薬などであるがこれらに限定されない他の要素を含有することができる。そのような追加の要素および/または物質を医薬組成物に含め、本明細書に記載されている抗体との相乗効果を生み出すことができる。例えば、アレルギー性喘息の治療において、医薬組成物には、例えば、抗IL-4抗体またはアレルギー反応を軽減することが知られている薬物も含まれてもよい。

10

#### 【0171】

一実施形態において、医薬組成物には、唯一の生物製剤（例えば、唯一のタンパク質成分）として、または唯一の生物学的活性成分として抗IL-13抗体が含まれる。例えば、組成物には、w/wベースで25、20、15、10、5、3、2、1、0.4または0.1%の他のタンパク質成分が含まれてよい。

#### 【0172】

医薬組成物は、抗体が、他の薬学的に許容できる担体の他に、水溶液中でミセル、不溶性単層、液晶またはラメラ層として凝集した形態で存在する脂質などの両親媒性物質と組み合わされているリポソームの形態であってよい。リポソーム調剤に適している脂質には、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが含まれるが、これらに限定されるものではない。そのようなリポソーム調剤の調製は、例えば、米国特許第4,235,871号；第4,501,728号；第4,837,028号；および第4,737,323号に開示されているように、当業者のレベルの範囲内にあり、これらの特許はすべて、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

20

#### 【0173】

本明細書で使用する用語「治療有効量」は、意味のある患者の有益性、例えば、そのような状態の症状の改善、そのような状態の治癒またはそのような状態の治癒の速度増加を示すのに十分である医薬組成物または方法の各活性成分の総量を意味する。単独で投与される個々の活性成分に当てはめた場合、この用語は、その成分単独を指す。組合せに当てはめた場合、この用語は、組み合わせて、連続してまたは同時に投与されるか否かにかかわらず、治療効果をもたらす活性成分を合わせた量を指す。

30

#### 【0174】

本明細書に記載されている例示的な治療方法または使用方法を実施するにあたり、IL-13と結合し、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害し（例えば、1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和または阻害する）治療有効量の抗体を対象、例えば、哺乳類（例えば、ヒト）に投与することができる。抗体を、記載されている方法に従い、単独か、サイトカイン、リンホカインもしくは他の造血因子または抗炎症薬を用いる治療などの他の療法と組み合わせて投与することができる。1つまたはそれ以上の物質と同時投与する場合、抗体を、第二の物質と同時か、または別々に、例えば、順次に投与することができる。別々に、例えば、順次に投与する場合、主治医は、他の物質と組み合わせて抗体を投与する適切な順序を決めるものとする。

40

#### 【0175】

医薬組成物（例えば、IL-13と結合する抗体を含有する医薬組成物）の投与は、経口摂取、吸入または皮膚、皮下、もしくは静脈内注射などの様々な従来法で行うことができる。患者への皮下投与が好ましい。

#### 【0176】

50

IL - 13 と結合し、機能性 IL - 13 シグナル伝達複合体の形成を妨害する治療有効量の抗体を経口投与する場合、結合性物質は、錠剤、カプセル、粉末、溶液またはエリキシルの形態とする。錠剤形態で投与する場合、医薬組成物は、ゼラチンなどの固体担体または補助剤をさらに含有することができる。錠剤、カプセルおよび粉末は、約 5 ~ 95 % の結合性物質、好ましくは約 25 ~ 90 % の結合性物質を含有する。液体形態で投与する場合、水、石油、ピーナッツ油、鉱油、ダイズ油、もしくはゴマ油などの動物もしくは植物起源の油または合成油を加えることができる。液体形態の医薬組成物は、生理的食塩水、ブドウ糖もしくは他のサッカリド溶液またはエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールなどのグリコールをさらに含有することができる。液体形態で投与する場合、医薬組成物は、約 0.5 ~ 約 95 重量 % の結合性物質、好ましくは約 1 ~ 50 % の結合性物質を含有する。

10

#### 【0177】

IL - 13 と結合する治療有効量の抗体を静脈内、皮膚または皮下注射により投与する場合、結合性物質は、パイロジェンフリーの非経口的に許容できる水溶液の形態とする。pH、等張性、安定性などを十分に顧慮し、そのような非経口的に許容できるタンパク質溶液の調製は、当業者の範囲内にある。静脈内、皮膚または皮下注射に好ましい医薬組成物は、結合性物質の他に、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、ブドウ糖注射液、ブドウ糖および塩化ナトリウム注射液、乳酸リンゲル注射液または当技術分野において知られているような他のビヒクルを含有するべきである。また、医薬組成物は、安定剤、保存剤、緩衝液、抗酸化剤または当業者に知られている他の添加剤を含有することができる。

20

#### 【0178】

医薬組成物における抗体（または、他の IL - 13 結合性物質）の量は、治療されている状態の性質および重症度および患者が受けた前治療の性質によって異なることがある。最終的に、主治医は、個々の患者を治療するための抗体の量を決定することとする。初めに、主治医は、低用量の抗体を投与し、患者の反応を観察することとする。患者に最適な治療効果が得られるまで、より高用量の抗体を投与することができ、その時点で、用量をさらに増加するのは一般的ではない。例えば、体重 1 kg 当たり 0.1 ~ 50 mg、0.5 ~ 50 mg、1 ~ 100 mg、0.5 ~ 25 mg、0.1 ~ 15 mg または 1 ~ 8 mg の範囲の用量を投与することができる。医薬組成物は、正常な患者または症状を示さない患者に、例えば、予防的方法で投与することができる。

30

#### 【0179】

##### 吸入

IL - 13 抗体またはそのフラグメントが含まれる組成物は、吸入または肺デリバリーの他の方法のために調剤することができる。したがって、本明細書に記載されている化合物は、肺組織へ吸入により投与することができる。本明細書で使用する用語「肺組織」は、呼吸器管の任意の組織を指し、他に指示されている場所を除いて、上部呼吸器管と下部呼吸器管の両方が含まれる。IL - 13 抗体またはそのフラグメントは、肺疾患を治療するための既存の方法のうちの 1 つまたはそれ以上と組み合わせることで投与することができる。

#### 【0180】

一例において、化合物は、ネブライザー用に調剤される。一実施形態において、化合物は、凍結乾燥形態（例えば、室温にて）で保存し、吸入に先立って溶液に再構成することができる。

40

#### 【0181】

医療装置、例えば、インヘイラーを用いる吸入のために化合物を調剤することも可能である（例えば、米国特許第 6,102,035 号（粉末インヘイラー）および第 6,012,454 号（乾燥粉末インヘイラー）を参照）。インヘイラーには、保存に適している pH の活性化合物用の区切られた区画および中和緩衝液用の別の区画、ならびにアトマイゼーションの直前に化合物を中和緩衝液と混ぜ合わせるための機構が含まれてよい。一実施形態において、インヘイラーは、定量インヘイラーである。

#### 【0182】

50

薬物を局所的に肺気道に送達するのに使用される3つの一般的システムには、乾燥粉末インヘイラー（DPI）、定量インヘイラー（MDI）およびネブライザーが含まれる。吸入投与の最も人気のある方法において使用されるMDIを用い、可溶化形態で、または分散液として薬物を送達することができる。通常、MDIは、装置の活性化によりエアゾール化した薬物を呼吸器官中に送り込むフレオンまたは他の比較的高い蒸気圧の噴射剤を含む。MDIと異なり、DPIは、通常、薬物を乾燥粉末形態で肺に導入するための患者の吸気努力に全面的に頼っている。ネブライザーは、液体溶液にエネルギーを付与することにより、吸入される薬物エアゾールを形成する。フッ素化学媒体を用いる液体換気または肺洗浄中の薬物の直接肺デリバリーも検討されている。これらおよび他の方法を用い、IL-13抗体またはそのフラグメントを送達することができる。一実施形態において、IL-13抗体またはそのフラグメントは、ポリマー、例えば、化合物の半減期を安定化または増加させるポリマーと結び付けられる。

10

#### 【0183】

例えば、吸入による投与の場合、IL-13抗体またはそのフラグメントは、適当な噴射剤を含む加圧容器もしくはディスペンサーまたはネブライザーからエアゾールスプレーの形態で送達される。化合物は、乾燥粒子または液体の形態であってよい。化合物が含まれる粒子は、例えば、噴霧乾燥により、IL-13抗体またはそのフラグメントの水溶液を電荷中和剤と共に乾燥し、次いで乾燥粉末から粒子を作成することにより、または有機修飾剤中で水溶液を乾燥し、次いで乾燥粉末から粒子を作成することにより調製することができる。

20

#### 【0184】

化合物は、適当な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスの使用により、加圧パックまたはネブライザーからのエアゾールスプレー提供の形態で好都合に送達することができる。加圧エアゾールの場合、用量単位は、一定量を送達するためのバルブを提供することにより決定することができる。粒子が、調剤された粒子である場合には、IL-13抗体またはそのフラグメントとラクトースまたはデンプンなどの適当な粉末基剤の粉末ミックスを含有するインヘイラーまたはインサフレーターにおいて使用するためのカプセルおよびカートリッジを調剤することができる。調剤または非調剤化合物の他に、100% DPPCまたは他の界面活性物質などの他の材料を、IL-13抗体またはそのフラグメントと混合し、調剤または非調剤化合物のデリバリーおよび分散を促進することができる。乾燥粒子を調製する方法については、例えば、PCT公開WO 02/32406に記載されている。

30

#### 【0185】

IL-13抗体またはそのフラグメントは、投与した場合、速やかに吸収され、速やかな局所的または全身的な治療結果を生み出すことができるように、エアゾールデリバリー用に、例えば、乾燥エアゾール粒子として調剤することができる。投与を調整し、投与から2分、5分、1時間または3時間以内に検出可能な活性を提供することができる。一部の実施形態において、ピーク活性は、さらに速く、例えば、30分以内または10分以内にさえ達成することができる。IL-13抗体またはそのフラグメントは、より長い生物学的半減期のために調剤することができ（例えば、PEGなどのポリマーとの会合により）、例えば、化合物が肺から循環に入り、他の器官または特定の標的器官に分布されるように、他の投与方法の代用品として使用することができる。

40

#### 【0186】

一実施形態において、IL-13抗体またはそのフラグメントは、ポリペプチドの量の少なくとも5%が、下部呼吸器管または深部肺に送達されるような量で送達される。深部肺は、極めて豊富な毛細血管網を有する。毛細管腔を肺胞空域から分ける呼吸器膜は、極めて薄くかつ極めて透過性である。さらに、肺胞表面の内側を覆う液体層は、肺表面活性物質に富む。他の実施形態において、IL-13抗体またはそのフラグメントの組成物の少なくとも、2%、3%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、7

50



0 % または 80 % が、下部呼吸器管または深部肺に送達される。これらの組織のどちらか、または両方へのデリバリーは、化合物の十分な吸収および高いバイオアベイラビリティをもたらす。一実施形態において、化合物は、例えば、インヘイラーまたはネブライザーを用いて一定量で提供される。例えば、化合物は、1 パフ当たり少なくとも約 0.02、0.1、0.5、1、1.5、2、5、10、20、40 または 50 mg 以上の用量単位形態で送達される。パーセントバイオアベイラビリティは、以下の通り、パーセントバイオアベイラビリティ = (AUC 非侵襲的 / AUC i.v. または s.c.) × (投与量 i.v. または s.c. / 投与量非侵襲的) × 100 で計算することができる。

#### 【0187】

必要ではないにしても、界面活性物質などのデリバリーエンハンサーを用い、肺デリバリーをさらに増強することができる。本明細書で使用する「界面活性物質」は、2つの不混和相間の界面と相互作用することにより薬物の吸収を促進する親水性および疎水性部分を有する化合物を指す。界面活性物質は、いくつかの理由、例えば、粒子凝集の低下、マクロファージ食作用の低下などのため、乾燥粒子に有用である。肺界面活性物質と組み合わせる場合、化合物のより十分な吸収が達成できるのは、DPPCなどの界面活性物質が、化合物の拡散を容易にするためである。界面活性物質は、当技術分野においてよく知られており、ホスホグリセリド、例えば、ホスファチジルコリン、ジパルミトイル L - - ホスファチジルコリン (DPPC) およびジホスファチジルグリセロール (DPPG) ; ヘキサデカノール ; 脂肪酸 ; ポリエチレングリコール (PEG) ; ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル ; パルミチン酸 ; オレイン酸 ; ソルビタントリオレエート (SPAN (商標) 85) ; グリココール酸塩 ; サーフアクチン ; ポロキサマー ; ソルビタン脂肪酸エステル ; ソルビタントリオレエート ; チロキサポール ; およびリン脂質が含まれるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0188】

##### 安定化および保持

一実施形態において、IL-13 抗体またはそのフラグメントは、循環における、例えば、血液、血清、リンパ、気管支肺もしくは気管支肺胞洗浄液または他の組織におけるその安定化および/または保持を、例えば、少なくとも 1.5、2、5、10 または 50 倍改善する部分と物理的に連結される。例えば、IL-13 抗体またはそのフラグメントを、ポリマー、例えば、ポリアルキレンオキシドまたはポリエチレンオキシドなどの実質的に非抗原性のポリマーと連結することができる。適当なポリマーは、重量によって実質的に異なるはずである。約 200 ~ 約 35,000 (または約 1,000 ~ 約 15,000 または約 2,000 ~ 約 12,500) の数平均分子量を有するポリマーを使用することができる。例えば、IL-13 抗体またはそのフラグメントを、水溶性ポリマー、例えば、親水性ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンにコンジュゲートさせることができる。そのようなポリマーの非限定的リストには、ポリエチレングリコール (PEG) またはポリプロピレングリコールなどのポリアルキレンオキシド、ポリオキシエチル化されたポリオール、それらのコポリマーおよびそれらのブロックコポリマーが含まれるが、ただし、ブロックコポリマーの水溶性は、維持されるものとする。

#### 【0189】

ポリマーの分子量は、約 500,000 Da まで及ぶことができ、好ましくは、少なくとも約 20,000 Da または少なくとも約 30,000 Da または少なくとも約 40,000 Da である。選択される分子量は、得られるコンジュゲートの有効サイズ、ポリマーの性質 (例えば、直鎖または分岐) および誘導体化の程度によって異なることがある。共有結合を用い、IL-13 抗体またはそのフラグメントを、ポリマー、例えば、抗体の N 末端アミノ基および抗体のリジン残基上に見い出される アミノ基、ならびに他のアミノ、イミノ、カルボキシル、スルフヒドリル、ヒドロキシルまたは他の親水基と架橋するポリマーに接続することができる。IL-13 抗体またはそのフラグメントに接続することができる官能基付きの PEG ポリマーは、例えば、Shearwater Polym

ers, Inc. (Huntsville, AL) から入手できる。PEG および他のポリマーをカップリングするための反応条件は、IL-13 抗体またはそのフラグメント、PEG 化の望ましい程度および利用されるポリマーに応じて変わることがある。PEG 誘導体の選択に關与するいくつかの要素には、望ましい接続点（リジンまたはシステイン R 基など）、誘導体の加水分解安定性および反応性、安定性、結合の毒性および抗原性、分析に於ける適合性などが含まれる。特定の誘導体の具体的な使用説明書は、製造者から入手できる。

#### 【0190】

IL-13 抗体またはそのフラグメントとポリマーのコンジュゲートは、例えば、ゲル濾過またはイオン交換カラムクロマトグラフィー、例えば、HPLC により、未反応出発材料から分離することができる。コンジュゲートの異種分子種は、同じ様にお互いから精製される。異なる分子種（例えば、1 つまたはそれ以上の PEG 残基を含む）の分割も、未反応アミノ酸のイオン特性の差により可能である（例えば、WO 96 / 34015 を参照）。

#### 【0191】

抗 IL-13 抗体の治療的および予防的使用

さらに別の態様において、本開示は、IL-13 と結合しかつ / または IL-13 を中和する抗体、例えば、本明細書に記載されている抗体を、その活性を阻害するのに十分な量で投与することによる、インビボで IL-13 の 1 つまたはそれ以上の関連活性を中和および / または阻害するための方法を扱う。また、そのような抗体を、IL-13 仲介性炎症反応の阻害を必要とする対象に投与することができる。これらの状態には、例えば、気道炎症、喘息、線維症、好酸球増加症および粘液産生の増加が含まれる。

#### 【0192】

我々は、IL-13 と結合する抗体が、アレルゲンブタ回虫 (*Ascaris suum*) に暴露されたカニクイザルにおける気道炎症を低減することを明らかにした（実施例 3.6）。また、我々は、ヒト末梢血単球における CD23 の IL-13 によるアップレギュレーションを立証した。したがって、IL-13 と結合し、機能性 IL-13 シグナル伝達複合体の形成を妨害し、1 つまたはそれ以上の IL-13 関連活性を中和することができる本明細書に開示されている抗体を用い、喘息および / またはその関連症状および / またはアトピー性障害（例えば、IL-13 に対する感受性増加に起因する）が含まれる IL-13 関連病変を治療または予防するため、インビボで IL-13 仲介性炎症を低減することができる。

#### 【0193】

したがって、本明細書に開示されている抗体を用い、本明細書に記載されているように、IL-13 関連障害、例えば、呼吸器障害、例えば、喘息（例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息（例えば、低年齢の小児における、例えば、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) の感染による喘息））、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、ならびに気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む他の状態、例えば、嚢胞性線維症および肺線維症；アトピー性障害、例えば、IL-13 に対する感受性の増加に起因する（例えば、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、湿疹、アレルギー性鼻炎およびアレルギー性胃腸炎）；皮膚（例えば、アトピー性皮膚炎）、胃腸器官（例えば、潰瘍性大腸炎および / またはクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD)）、肝臓（例えば、肝硬変、肝細胞癌）および強皮症の炎症性および / または自己免疫性状態；白血病、神経膠芽腫およびリンパ腫、例えば、ホジキンリンパ腫などの腫瘍または癌（例えば、軟組織または固形腫瘍）；ウイルス感染（例えば、HTLV-1 から）；他の器官の線維症、例えば、肝臓の線維症（例えば、B 型および / または C 型肝炎ウイルスによって引き起こされる線維症）；ならびに防御性 1 型免疫応答の発現の抑制（例えば、ワクチン接種中の）のうちの 1 つまたはそれ以上から選択される障害を治療することができる。

#### 【0194】

呼吸器障害

IL - 13 アンタゴニスト（例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどの IL - 13 結合性物質）を用い、喘息（例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息（例えば、低年齢の小児における、例えば、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）の感染による））；気管支炎（例えば、慢性気管支炎）；慢性閉塞性肺疾患（COPD）（例えば、肺気腫（例えば、タバコ誘発性肺気腫））；気道炎症、好酸球増加症、線維症および過剰な粘液産生を含む状態、例えば、嚢胞性線維症、肺線維症およびアレルギー性鼻炎が含まれるがこれらに限定されない呼吸器障害を治療または予防することができる。

#### 【0195】

喘息は、無数の条件、例えば、アレルゲンの吸入、上気道感染または耳感染の存在などにより引き起こされることがある（Oppenwall (2003) Nurs. Clin. North Am. 38: 697 - 711）。アレルギー性喘息は、様々な特異的および非特異的刺激に対する気道過敏性（AHR）、血清免疫グロブリン E（IgE）の上昇、過剰な気道粘液産生、浮腫および気管支上皮傷害を特徴とする（Willis - Karp、前掲書）。アレルギー性喘息は、アレルゲンが最初期の気道応答を引き起こす時に始まり、遅延性の遅延相気道応答（LAR）によりその後数時間続くことが多い（Henderson 他（2000）J. Immunol. 164: 1086 - 95）。LARの間には、気道壁および気管支液の至る所に好酸球、リンパ球およびマクロファージの流入が存在する（Henderson 他、前掲書）。肺好酸球は、アレルギー性喘息の特徴であり、呼吸器上皮への損傷の大半を負っている（Li 他（1999）J. Immunol. 162: 2477 - 87）。

#### 【0196】

CD4<sup>+</sup>Tヘルパー（Th）細胞は、喘息に伴う慢性炎症にとって重要である（Henderson 他、前掲書）。いくつかの研究は、2型Tヘルパー（Th2）細胞に対するCD4<sup>+</sup>細胞の関与とそれに続く2型サイトカイン（例えば、IL - 4、IL - 5、IL - 10およびIL - 13）の産生が、AHRにつながるアレルギー性炎症反応において重要であることを明らかにしている（Tomkinson 他（2001）J. Immunol. 166: 5792 - 5800、その中に引用されている参考文献）。第一に、CD4<sup>+</sup>T細胞は、マウスモデルにおけるアレルギー誘発性喘息に必要なことが明らかにされた。第二に、2型サイトカインを産生するCD4<sup>+</sup>T細胞は、これらの動物においてばかりではなく、アレルギー性喘息患者においても拡大を起こす。第三に、2型サイトカインレベルは、動物モデルおよび喘息患者の気道組織において増加する。第四に、Th2サイトカインは、アレルギー性喘息のマウスモデルにおける好酸球動員において中心的役割を果たすことに関係があり、養子移入されたTh2細胞は、肺ならびに肺好酸球増加症におけるエオタキシン（強力な好酸球化学誘引物質）のレベル増加と関連していた（Willis - Karp 他、前掲書；Li 他、前掲書）。

#### 【0197】

本明細書に記載されている喘息を治療または予防するための方法には、外因性喘息（アレルギー性喘息またはアトピー性喘息としても知られる）、内因性喘息（非アレルギー性喘息または非アトピー性喘息としても知られる）または混合型喘息と呼ばれている両方の組合せのための方法が含まれる。外因性すなわちアレルギー性喘息には、例えば、花粉、孢子、牧草または雑草、ペット鱗屑、粉塵、ダニなどのアレルゲンによって引き起こされるか、あるいはそれらに関係する出来事が含まれる。アレルゲンおよび他の刺激物は、それ自体、年間を通じて様々な時点で存在するため、これらのタイプの出来事は、季節性喘息とも呼ばれる。気管支喘息およびアレルギー性気管支肺アスペルギルス症も外因性喘息の群に含まれる。

#### 【0198】

本明細書に記載されている物質により治療または軽減することができる障害には、ウイルス（例えば、風邪およびインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、パラミクソウイルス、ライノウイルスおよびインフルエンザウイルス）などの感染物質に

より引き起こされる呼吸器障害および喘息が含まれる。RSV、ライノウイルスおよびインフルエンザウイルス感染は、小児によく見られ、幼児および低年齢の小児における呼吸器管の病気の1つの主要原因である。ウイルス性気管支炎の小児は、慢性の喘鳴および喘息を発症することがあり、それらを、本明細書に記載されている方法を用いて治療することができる。運動および/または冷氣により一部の喘息患者において引き起こされることがある喘息状態も含まれる。これらの方法は、煙暴露（例えば、タバコ誘発性および工場煤煙）、ならびに煙、オゾン、毒ガス、二酸化イオウ、亜酸化窒素、塗料、プラスチック、ポリウレタン、ワニスなどからのイソシアネートを含む煙霧、木材、植物または他の有機粉塵などに関係する喘息に有用である。また、これらの方法は、食品添加物、保存剤または薬理作用のある物質に関係する喘息性の出来事に有用である。サイレント喘息または咳型喘息と呼ばれる喘息のタイプを治療、抑制または軽減するための方法も含まれる。

10

#### 【0199】

本明細書に開示されている方法は、気管支収縮を刺激することがある胃食道逆流（GERD）に伴う喘息の治療および軽減にも有用である。GERDは、身体分泌物の停滞、咳の抑制および寝室におけるアレルゲンおよび刺激物への暴露と並び、喘息状態の一因となることがあり、まとめて夜間（nighttime）喘息または夜間（nocturnal）喘息と呼ばれている。GERDに伴う喘息の治療、抑制または軽減の方法において、本明細書に記載されているように、治療有効量のIL-13アンタゴニストを、GERDを治療するための治療有効量の物質と組み合わせて使用することができる。これらの物質には、PROTONIX（登録商標）ブランドの遅延放出性パントプラゾールナトリウム錠剤、PRILOSEC（登録商標）ブランドのオメプラゾール遅延放出性カプセル剤、ACIPHEX（登録商標）ブランドのレベプラゾール（rebeprazole）ナトリウム遅延放出性錠剤またはPREVACID（登録商標）ブランドの遅延放出性ランソプラゾールカプセル剤のようなプロトンポンプ阻害薬が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

#### 【0200】

アトピー性障害およびそれらの症状

「アトピー性の」は、アレルギー反応を発症する遺伝的傾向が存在することが多い一群の疾患を指す。アトピー性障害の例には、アレルギー、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、喘息および枯草熱が含まれる。喘息は、例えば、気管支過敏性および可逆的気流閉塞などの間欠性呼吸器症状に伴う表現型的に異種性の障害である。喘息の免疫病理組織学的特徴には、例えば、気道上皮の裸出、基底膜下のコラーゲン沈着、浮腫、肥満細胞活性化および炎症性細胞浸潤（例えば、好中球、好酸球およびリンパ球による）が含まれる。さらに、気道炎症は、気道過敏性、気流制限、急性気管支収縮、粘液栓形成、気道壁リモデリングおよび他の呼吸器症状の一因となることがある。IL-13アンタゴニスト（例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどのIL-13結合性物質）を投与し、これらの症状のうちの1つまたはそれ以上を改善することができる。

30

#### 【0201】

アレルギー性鼻炎（枯草熱）の症状には、痒い、鼻水が垂れている、くしゃみを起こす、または詰まった鼻および痒い眼が含まれる。IL-13アンタゴニストを投与し、これらの症状のうちの1つまたはそれ以上を改善することができる。アトピー性皮膚炎は、皮膚に影響を及ぼす慢性（持続性）疾患である。アトピー性皮膚炎に関する情報は、例えば、NIH Publication No. 03-4272から入手できる。アトピー性皮膚炎において、皮膚は、極めて痒くなり、発赤、腫脹、ひび割れ、透明液の浸出および最終的には、痂皮および落屑につながる。多くの場合、疾患が悪化する期間（増悪またはフレアと呼ばれる）に続いて、皮膚が完全に好転または治癒する時期（寛解と呼ばれる）が存在する。アトピー性皮膚炎は、いくつかのタイプの皮膚の炎症についての一般用語である「湿疹」と呼ばれることが多い。アトピー性皮膚炎は、多くのタイプの湿疹のうちで最も一般的である。アトピー性皮膚炎の例には、アレルギー性接触湿疹（皮膚

40

50

炎：皮膚が、ツタウルシまたはクリーム剤およびローション剤中の特定の保存剤などの、免疫系が異物として認識する物質と接触した場所の赤色で、痒く、滴を垂らす反応）；接触湿疹（皮膚が、アレルゲン（アレルギーを引き起こす物質）または酸、洗浄剤、もしくは他の化学物質などの刺激物に接触した場所の発赤、痒みおよび灼熱感が含まれる限局性反応）；発汗異常性湿疹（痒く火照る透明な深い疱疹を特徴とする手のひらおよび足の裏の皮膚の刺激）；神経皮膚炎（引っかいた場合に激しくヒリヒリする限局性の痒み（昆虫咬傷など）によって引き起こされる頭部、下肢、手首または前腕の皮膚の鱗屑性斑点）；貨幣状湿疹（炎症を起こした皮膚の貨幣形斑点 - 痂皮形成性、落屑性および極めて掻痒性になることがある腕、背部、臀部および下肢に最もよく見られる）；脂漏性湿疹（頭皮、顔面およびたまに身体他の部分の皮膚の黄色がかった油状の鱗屑性斑点）が含まれる。追加の特定の症状には、うっ滞性皮膚炎、アトピー性プリーツ（デニーモルガンひだ）、口唇炎、超直線状手掌（hyperlinear palms）、色素沈着過剰眼瞼（炎症または枯草熱により暗黒色となった眼瞼）、魚鱗癬、毛孔性角化症、苔癬化、丘疹および蕁麻疹が含まれる。IL - 13 アンタゴニスト（例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどのIL - 13 結合性物質）を投与し、これらの症状のうちの1つまたはそれ以上を改善することができる。

10

#### 【0202】

アレルギー性鼻炎または他のアレルギー性障害を治療するための例示的方法には、アレルゲンへの暴露に先立つ、例えば、アレルゲンへの季節的暴露に先立つ、例えば、アレルゲン開花に先立つIL - 13 アンタゴニストによる開始療法が含まれてよい。そのような療法には、1回またはそれ以上の投与、例えば、一定の間隔をおく投与が含まれてよい。

20

#### 【0203】

##### 癌

IL - 13 およびその受容体は、少なくとも一部のタイプの癌、例えば、造血細胞に由来する癌または脳もしくは神経細胞に由来する癌（例えば、神経膠芽腫）の発生に関与することがある。例えば、IL - 13 シグナル伝達経路の遮断は、例えば、可溶性IL - 13 受容体またはSTAT6 - / - 欠損マウスの使用を介して、それぞれホジキンリンパ腫細胞系または転移性乳癌の腫瘍発症および/または増殖の遅延につながる（Trieu他（2004）Cancer Res. 64:3271 - 75；Ostrand - Rosenberg他（2000）J. Immunol. 165:6015 - 6019）。IL - 13 R<sub>2</sub>を発現する癌（HusainおよびPuri（2003）J. Neurooncol. 65:37 - 48；Mintz他（2003）J. Neurooncol. 64:117 - 23）は、本明細書に記載されている抗IL - 13 抗体により特異的に標的とされることがある。IL - 13 アンタゴニスト、例えば、抗IL - 13 抗体およびそれらのフラグメントは、癌細胞増殖または他の癌細胞活性を阻害するのに有用なことがある。癌は、正常な増殖制御に対する反応性を失い、通常は、対応する正常細胞に比べて調節低下を伴って増殖する1つまたはそれ以上の細胞を指す。

30

#### 【0204】

IL - 13 アンタゴニスト（例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどのIL - 13 結合性物質）を治療に使用することができる癌の例には、白血病、例えば、B細胞慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病およびヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV - 1）形質転換T細胞；リンパ腫、例えば、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫；神経膠芽腫；脾臓癌；腎細胞癌；卵巣癌；およびAIDSカポジ肉腫が含まれる。

40

#### 【0205】

##### 線維症

IL - 13 アンタゴニスト（例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどのIL - 13 結合性物質）は、炎症および線維症、例えば、肝臓の線維症を治療するのににも有用である。IL - 13 産生は、肝臓炎症（例えば、ウイルス性肝炎）の肝硬変およびおそらく肝細胞癌への進行と相関関係があるとされている（de La

50

11a他(2004)J. Immunol. 173:1417-1425)。線維症は、例えば、正常な組織が、炎症後に多い瘢痕組織により置き換えられる場合に起きる。B型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルスは共に、肝臓において線維形成反応を引き起こし、肝硬変に進行することがある。次いで、肝硬変は、肝不全または肝細胞癌などの重症な合併症に発展することがある。本明細書に記載されているIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体を用いてIL-13活性を遮断することは、炎症および線維症、例えば、肝疾患、特にB型肝炎およびC型肝炎に伴う炎症、線維症および肝硬変を低減することができる。

#### 【0206】

##### 炎症性腸疾患

炎症性腸疾患(IBD)は、腸の炎症を引き起こす疾患の一般名である。炎症性腸疾患の2つの例は、クローン病および潰瘍性大腸炎である。IL-13/STAT6シグナル伝達は、炎症性腸疾患のモデルであるマウス平滑筋の炎症誘発性収縮性亢進(hypercontractivity)に関与していることが見い出されている(Akaho他(2002)Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 282:G226-232)。IL-13アンタゴニスト(例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどのIL-13結合性物質)は、炎症性腸疾患または炎症性腸疾患の1つまたはそれ以上の症状を治療、予防または軽減するのに有用なことがある。

#### 【0207】

一実施形態において、本明細書に記載されている抗体、例えば、その医薬組成物は、組合せ療法で投与され、すなわち、他の物質、例えば、アレルギー性および炎症性障害などの病的状態または障害を治療するのに有用である治療薬と組み合わせられる。この文脈における用語「組合せで」は、物質が、実質的に同時に、同時に、あるいは順次にどちらかで与えられることを意味する。順次に与える場合、第二の化合物の投与が始まる時に、2つの化合物のうち第一の化合物が、治療部位において有効な濃度で依然として検出可能であることが好ましい。

#### 【0208】

例えば、組合せ療法には、本明細書に記載されている、すなわち、IL-13と結合し、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害し、以下でより詳細に記載されているように、1つまたはそれ以上の追加治療薬、例えば、1つまたはそれ以上のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫抑制薬、抗炎症薬、代謝阻害剤、酵素阻害剤および/または細胞傷害性または細胞増殖抑制性物質と同時調剤および/または同時投与される1つまたはそれ以上の抗体が含まれてよい。さらに、本明細書に記載されている1つまたはそれ以上の抗IL-13抗体は、本明細書に記載されている治療薬のうちの2つまたはそれ以上との組合せで使用することができる。そのような組合せ療法は、低用量の投与治療薬を有利に利用するため、様々な単独療法に伴う可能な毒性または合併症を避けることができる。さらに、本明細書に開示されている治療薬は、IL-13/IL-13受容体経路と異なる経路に作用するため、IL-13抗体の効果を増強しかつ/またはIL-13抗体の効果と相乗することが予想される。

#### 【0209】

1つまたはそれ以上のIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはこれらのフラグメントと同時投与および/または同時調剤することができる好ましい追加治療薬の例には、吸入ステロイド；アゴニスト、例えば、短時間作用型または長時間作用型アゴニスト；ロイコトリエンアンタゴニストまたはロイコトリエン受容体アンタゴニスト；ADV AIR(登録商標)などの配合剤；IGE阻害剤、例えば、抗IGE抗体(例えば、XOLAIR(登録商標))；ホスホジエステラーゼ阻害剤(例えば、PDE4阻害剤)；キサンチン；抗コリン薬；クロモリンなどの肥満細胞安定化薬；IL-4阻害剤；IL-5阻害剤；エオタキシン/CCR3阻害剤；および抗ヒスタミン薬のうちの1つまたはそれ以上が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような組合せを

10

20

30

40

50

用い、喘息および他の呼吸器障害を治療することができる。1つまたはそれ以上の抗IL-13抗体またはそのフラグメントと同時投与および/または同時調剤することができる治療薬の追加例には、とりわけ、TNFアンタゴニスト（例えば、TNF受容体の可溶性フラグメント、例えば、p55またはp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば、75kd TNFR-IgG（75 kD TNF受容体-IgG融合タンパク質、ENBREL（商標））；TNF酵素アンタゴニスト、例えば、TNF変換酵素（TACE）阻害剤；ムスカリン受容体アンタゴニスト；TGF- $\alpha$ アンタゴニスト；インターフェロンガンマ；ペルフェニドン（perfenidone）；化学療法剤、例えば、メトトレキセート、レフルノミドまたはシロリムス（ラパマイシン）もしくはその類縁体、例えば、CCI-779；COX2およびcPLA2阻害剤；NSAID；免疫調節薬；p38阻害剤、TPL-2、Mk-2およびNF- $\kappa$ B阻害剤のうちの1つまたはそれ以上が含まれる。

10

#### 【0210】

1つまたはそれ以上の他の治療化合物とのIL-13抗体の併用投与を行うため、またはELISAキットなどの、生物学的サンプルにおいてIL-13の存在および/またはレベルを決定するための研究または治療ツールとして抗IL-13抗体を用いるためのキットを提供することも可能である。一実施形態において、キットは、医薬担体に調剤される1つまたはそれ以上の抗IL-13抗体、および、必要に応じて、1つまたはそれ以上の別々の医薬調製物に調剤される少なくとも1つの物質、例えば、治療薬を含む。

#### 【0211】

20

##### ワクチン調剤

IL-13アンタゴニスト（例えば、本明細書に記載されている抗体または抗原結合性フラグメントなどのIL-13結合性物質）を用い、対象を免疫化するためのワクチン調剤の有効性を高めることができる。例えば、IL-13アンタゴニストを、免疫化の前、免疫化中および/または免疫化後に投与し、ワクチン有効性を高めることができる。一実施形態において、ワクチン調剤は、1つまたはそれ以上のIL-13アンタゴニストおよび抗原、すなわち、免疫原を含有する。別の実施形態において、IL-13アンタゴニストおよび免疫原は、お互いに、例えば、1時間、3時間、1日または2日以内に別々に投与される。

#### 【0212】

30

IL-13の阻害は、例えば、細胞ワクチン、例えば、癌およびウイルス感染、例えば、レトロウイルス感染、例えば、HIV感染などの疾患に対するワクチンの有効性を改善することができる。ワクチンによるCD8<sup>+</sup>細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の誘導は、おそらくサイトカインIL-13を介し、CD4<sup>+</sup>T細胞により抑制的に調節される。IL-13の阻害は、CTL応答のワクチン誘導を亢進することが明らかにされている（Ahlers他（2002）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:13020-13025）。IL-13アンタゴニスト、例えば、本明細書に記載されている抗IL-13抗体またはそのフラグメント、抗体をワクチンと併せて使用し、ワクチン有効性を高めることができる。癌およびウイルス感染（レトロウイルス（例えば、HIV）感染など）は、細胞性ワクチン応答が有効なことがある例示的障害である。ワクチン有効性は、ワクチン接種時にIL-13シグナル伝達を遮断することにより増強される（Ahlers他（2002）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:13020-13025）。

40

#### 【0213】

ワクチン調剤は、医薬組成物または治療組成物の形態で対象に投与することができる。本明細書に記載されているIL-13アンタゴニストおよび抗原を含む医薬組成物は、従来の混合、溶解、顆粒化、糖剤製造、粉末化、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥プロセスにより製造することができる。医薬組成物は、本明細書に記載されている抗原およびアンタゴニストを、薬学的に使用することができる調製物への加工するのを容易にする1つまたはそれ以上の薬学的に許容できる担体、希釈剤、賦形剤または補助剤を用い、従

50

来の方法で調剤することができる。適切な調剤は、選択される投与経路によって異なる。全身性調剤には、注射、例えば、皮下、皮内、筋肉内または腹腔内注射による投与のために設計される調剤が含まれる。注射の場合、ワクチン調製物は、水溶液、好ましくは、ハanks液、リンゲル液、リン酸緩衝食塩水などの生理学的に適合する緩衝液またはその他の生理食塩水緩衝液で調剤することができる。溶液は、懸濁化、安定化および/または分散剤などの調剤物質を含有することができる。あるいは、タンパク質は、使用前の、適当なビヒクル、例えば、滅菌したパイロジェンフリーの水による構成のための粉末形態であってよい。

#### 【0214】

有効投与量は、初めに動物モデルを用いて推定することができる。例えば、ある投与量を動物モデルで調剤し、当技術分野においてよく知られている技法を用いて免疫応答の誘導を行うことができる。用量および間隔は、個別に調整することができる。例えば、ワクチンとして使用する場合、ワクチン調剤は、1～36週の間約1～3回の投与で投与することができる。1または2回の投与を約3週から約4カ月の間隔で投与し、その後ブースターワクチン接種を定期的に与えることが好ましい。代替プロトコルは、個々の動物にふさわしいことがある。適当な投与量は、上記に記載されているように投与する場合、少なくとも4～12カ月間、対象を感染から守るのに十分な免疫応答を、免疫化された対象で産生することができるワクチン調剤の量である。一般に、抗原の量は、宿主1kg当たり約1pg～約100mg、通常は、約10pg～約1mg、好ましくは約100pg～約1μgの用量範囲である。適当な用量範囲は、注射の経路および患者のサイズによって変わるが、通常、約0.1mL～約5mLであろう。

#### 【0215】

障害を診断、予知およびモニターするための方法

本明細書に記載されているIL-13と結合するタンパク質、例えば、抗体は、インビトロおよびインビボでの診断上の有用性を有する。例示的方法には、(i)IL-13抗体を対象に投与すること；および(ii)対象においてIL-13抗体を検出することが含まれる。検出することには、対象におけるIL-13抗体の位置を決定することが含まれてよい。別の例示的方法には、IL-13抗体をサンプル、例えば、対象からのサンプルに接触させることが含まれる。

#### 【0216】

別の態様において、本発明は、インビトロ（例えば、組織、生検などの生物学的サンプル）またはインビボ（例えば、対象におけるインビボイメージング）でIL-13の存在を検出するための診断方法を提供する。この方法には、(i)サンプルをIL-13抗体と接触させること；および(ii)IL-13抗体とサンプルの間の複合体の形成を検出することが含まれる。また、この方法には、参考サンプル（例えば、対照サンプル）をリガンドと接触させること、および参考サンプルと比べて、リガンドとサンプルの間の複合体の形成の程度を決定することが含まれてよい。対照サンプルまたは対象と比べて、サンプルまたは対象における複合体の形成の変化、例えば、統計的に有意な変化は、サンプルにおけるIL-13の存在を示すことがある。

#### 【0217】

IL-13抗体は、結合または非結合タンパク質の検出を容易にするため、検出可能な物質で直接的または間接的に標識することができる。適当な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料および放射性材料が含まれる。

#### 【0218】

IL-13抗体とIL-13の間の複合体形成は、IL-13と結合しているリガンドが非結合リガンドのどちらかを測定または可視化することにより検出することができる。従来の検出アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)または組織の免疫組織化学を使用することができる。IL-13抗体を標識することに加え、IL-13の存在は、検出可能な物質で標識された標準品および非標識IL-13抗体を利用する競合イムノアッセイによりサンプル中でアッセイするこ



とができる。

【0219】

喘息の進行を診断、予知およびモニターするための方法

生物学的サンプル中のIL-13のレベルを測定することにより、喘息および/またはアトピー性障害（例えば、IL-13に対する感受性増加に起因する）の進行を診断、予知および/またはモニターすることも可能である。特に、本明細書に開示されている抗体は、ある患者が、アレルギー性喘息を患っているか非アレルギー性喘息を患っているかを区別する方法において使用することができる。

【0220】

アレルギー性および非アレルギー性喘息を診断するためのそのような方法には、生物学的サンプル、例えば、血清、血漿、気管支肺胞洗浄液、喀痰などにおけるIL-13の変動（例えば、増加または減少）を検出することが含まれてよい。「診断的」すなわち「診断すること」は、病的状態の有無を同定することを意味する。診断的方法是、対象（ヒトまたは非ヒト哺乳類）由来の生物学的サンプル、例えば、気管支肺胞洗浄液中のIL-13ポリペプチドの試験量を決定し、試験量を、IL-13ポリペプチドの正常な量または範囲（すなわち、喘息を患っていないことが知られている1つまたはそれ以上の個体由来の量または範囲）と比較することによりIL-13の存在を検出するものである。特定の診断的方法是、喘息の確定診断を提供しないこともあるが、この方法が、診断を助ける陽性徴候を提供すれば十分である。

【0221】

喘息および/またはアトピー性障害を予知するための方法には、mRNAまたはタンパク質レベルでIL-13のアップレギュレーションを検出することが含まれてよい。「予知的」すなわち「予知すること」は、病的状態のあり得る発生および/または重症度を予測することを意味する。予知的方法是、対象由来の生物学的サンプル中のIL-13の試験量を決定し、試験量を、IL-13の予知的量または範囲（すなわち、喘息の様々な重症度の個体由来の量または範囲）と比較するものである。試験サンプルにおけるIL-13の様々な量は、喘息についての特定の予後と一致する。特定の予知的レベルにおけるIL-13の量の検出は、対象に予後を提供する。

【0222】

また、本発明は、IL-13のアップレギュレーションを検出することにより喘息および/またはアトピー性障害の経過をモニターするための方法を提供する。モニターする方法は、第一および第二の時点で対象から採取された生物学的サンプル中のIL-13の試験量を決定し、それらの量を比較するものである。第一と第二の時点間のIL-13の量の変化は、喘息および/またはアトピー性障害の経過の変化を示し、量の減少は、喘息の寛解を示し、量の増加は、喘息および/またはアトピー性障害の進行を示す。そのようなモニタリングアッセイは、喘息および/またはアトピー性障害を治療されている患者において特定の治療的介入（例えば、疾患の減弱および/または逆転）の有効性を評価するのにも有用である。

【0223】

蛍光団および発色団で標識されたタンパク質リガンドを調製することができる。抗体および他のタンパク質は、約310nmまでの波長を有する光を吸収するため、蛍光性部分は、310nm以上、好ましくは400nm以上の波長で実質的吸収を有するように選択されなければならない。様々な適当な蛍光剤および発色団は、Stryer (Science (1968) 162: 526) およびBrand他 (Annual Rev. Biochem. (1972) 41: 843-868) により記載されている。タンパク質リガンドは、米国特許第3,940,475号、第4,289,747号および第4,376,110号に開示されている手順などの従来に手順により、蛍光性発色団基で標識することができる。上記に記載されている多くの望ましい特性を有する蛍光剤の一群は、キサンテン色素であり、フルオレセインおよびローダミンが含まれる。蛍光性化合物の別の群は、ナフチルアミンである。蛍光団または発色団で標識すれば、タンパク質リガンドを用い

、例えば、蛍光顕微鏡（共焦点顕微鏡またはデコンボリューション顕微鏡）を用い、サンプル中のIL-13の存在または局在化を検出することができる。

【0224】

免疫組織化学は、本明細書に記載されているタンパク質リガンドを用いて行うことができる。例えば、抗体の場合、抗体を、標識（精製タグまたはエピトープタグなど）と一緒に合成するか、あるいは、例えば、標識または標識結合基をコンジュゲートすることにより検出可能に標識することができる。例えば、キレート剤を抗体に接続することができる。次いで、抗体を、組織プレパラート、例えば、顕微鏡スライド上にある組織の固定切片と接触させる。結合のためのインキュベーション後、調製物を洗浄し、非結合抗体を除去する。次いで、調製物を、例えば、顕微鏡を用いて解析し、抗体が調製物と結合したかどうかを同定する。

10

【0225】

抗体（または他のポリペプチドまたはペプチド）は、結合の時点で非標識であってよい。結合および洗浄後、検出可能にするために抗体を標識する。

【0226】

また、IL-13抗体をタンパク質アレイ上に固定化することができる。タンパク質アレイを診断ツールとして使用し、例えば、医学的サンプル（単離細胞、血液、血清、生検など）をスクリーニングすることができる。また、タンパク質アレイには、例えば、IL-13または他の標的分子と結合する他のリガンドが含まれてよい。

【0227】

20

ポリペプチドアレイを作成する方法については、例えば、De Wildt他（2000）Nat. Biotechnol. 18:989-994；Lueking他（1999）Anal. Biochem. 270:103-111；Ge（2000）Nucleic Acids Res. 28、e3、I-VII；MacBeathおよびSchreiber（2000）Science 289:1760-1763；WO01/40803およびWO99/51773A1に記載されている。アレイのためのポリペプチドは、例えば、Genetic MicrosystemsまたはBioRobotics製の市販のロボット装置を用い、高速でスポットとすることができる。アレイ基板は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば、表面修飾ガラスであってよい。また、アレイには、多孔性マトリックス、例えば、アクリルアミド、アガロースまたは別のポリマーが含まれてよい。

30

【0228】

例えば、アレイは、例えば、De Wildt、前掲書に記載されているように、抗体のアレイであってよい。タンパク質リガンドを産生する細胞は、アレイ化フォーマットのフィルター上で生育することができる。ポリペプチド産生が誘導され、発現したポリペプチドは、細胞の位置でフィルターに固定化される。

【0229】

タンパク質アレイを標識標的と接触させ、多様性鎖ライブラリーから、各々の固定化ポリペプチドに対する標的の結合の程度を決定することができる。標的が非標識である場合、例えば、標識プローブを用い、サンドイッチ法を使用して非標識標的の結合を検出することができる。

40

【0230】

アレイの各アドレスにおける結合の程度に関する情報は、例えば、コンピューターデータベース中に、プロファイルとして保存することができる。タンパク質アレイを複製で作成して使用し、例えば、標的および非標的の結合プロファイルを比較することができる。したがって、タンパク質アレイを用い、1つまたはそれ以上の分子に関して望ましい結合特性を有する多様性鎖ライブラリーの個々のメンバーを同定することができる。

【0231】

IL-13抗体を用い、細胞、例えば、サンプル（例えば、患者サンプル）中の細胞を標識することができる。また、リガンドは、蛍光性化合物に接続されるか、接続可能であ

50

る。次いで、細胞を、選別された（例えば、Becton Dickinson Immunocytometry Systems、San Jose CAから入手できる選別機を用い；米国特許第5,627,037号；第5,030,002号；および第5,137,809号も参照）蛍光性活性化細胞を用いて選別することができる。細胞が選別機を通過すると、レーザービームは、蛍光性化合物を励起し、一方、検出器は、通過する細胞をカウントし、蛍光を検出することにより蛍光性化合物が細胞と接続しているか否かを決定する。各細胞と結合している標識の量を定量して分析し、サンプルを特徴付けることができる。

#### 【0232】

また、選別機は、細胞を一方にそらせ、リガンドが結合している細胞をリガンドが結合していない細胞から分離することができる。分離した細胞を培養しかつ／または特徴付けることができる。

#### 【0233】

さらに別の実施形態において、本発明は、インビボで対象内のIL-13の存在を検出するための方法を提供する。この方法には、(i)検出可能なマーカーとコンジュゲートされた抗IL-13抗体を対象（例えば、IL-13関連障害を有する患者）に投与すること；(ii)検出可能なマーカーを検出するための手段に対象を暴露することが含まれる。例えば、対象は、例えば、NMRまたは他の断層撮影手段により、撮像される。

#### 【0234】

診断イメージングに有用な標識の例には、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ および $^{188}\text{Re}$ などの放射性標識、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光性標識、核磁気共鳴活性標識、ポジトロン放出断層撮影（「PET」）スキャナーにより検出可能なポジトロン放出同位体、ルシフェリンなどの化学発光剤およびペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素マーカーが含まれる。短距離検出器プローブにより検出可能な同位体などの短距離放射線エミッターも用いることができる。タンパク質リガンドは、知られている技法を用い、そのような試薬で標識することができる。例えば、抗体の放射標識に関する技法についてのWensellおよびMeares (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy、Elsevier、New YorkおよびColcher他 (1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816を参照されたい。

#### 【0235】

放射標識リガンドは、インビトロの診断テストにも使用することができる。同位体標識リガンドの比活性は、半減期、放射性標識の同位体純度および標識が抗体に組み入れられた方法によって異なる。

#### 【0236】

放射性同位体（ $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ および $^{131}\text{I}$ など）でポリペプチドを標識するための手順は、一般的に知られている。例えば、米国特許第4,302,438号；Goding, J. W. (Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 第2版 London; Orlando: Academic Press, 1986. pp124-126) およびその中に引用されている参考文献；ならびにA. R. Bradwell他、「Developments in Antibody Imaging」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、R. W. Baldwin他、(編)、pp65-85 (Academic Press 1985)を参照されたい。

#### 【0237】

本明細書に記載されているIL-13抗体は、磁気共鳴イメージング（MRI）造影剤

10

20

30

40

50

にコンジュゲートすることができる。一部のMRI技法は、E P - A - 0 5 0 2 8 1 4 に要約されている。

【0238】

これらの緩和時間定数の差を造影剤によって増強することができる。そのような造影剤の例には、多くの磁気物質、常磁性物質（主にT1を変える）および強磁性または超常磁性（主にT2応答を変える）が含まれる。キレート（例えば、EDTA、DTPAおよびNTAキレート）を用い、一部の常磁性物質（例えば、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Gd}^{3+}$ ）に接続し（それらの毒性を軽減）することができる。他の物質は、例えば、直径10nm未満～約10nmで強磁性、反強磁性または超常磁性を有する粒子の形態であってよい。

【0239】

また、IL-13抗体を、NMR活性な $^{19}\text{F}$ 原子またはPykett((1982)Scientific American 246:78-88)により記載されているような複数の原子を含む指示基で標識し、IL-13分布を見つけて撮像することができる。

【0240】

また、本明細書に記載されている範囲内には、IL-13と結合するタンパク質リガンドおよび診断的使用、例えば、インビトロで、例えば、サンプル、例えば、IL-13関連障害を有する患者由来の生検または細胞において、または、例えば、対象を撮像することによりインビボでIL-13を検出するためのIL-13抗体（例えば、抗体またはその抗原結合性フラグメントまたは他のポリペプチドもしくはペプチド）の使用のための説明書を含むキットが含まれる。キットは、標識または追加の診断薬などの少なくとも1つの追加試薬を含むことができる。インビボ使用の場合、リガンドは、医薬組成物として調剤することができる。

【0241】

キット

IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントは、キットにおいて、例えば、キットの構成要素として提供することができる。例えば、キットには、(a)IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメント、例えば、IL-13抗体またはそのフラグメントが含まれる組成物および、所望により、(b)情報材料が含まれる。情報材料は、本明細書に記載されている方法のための、記述的材料、教育的材料、マーケティング材料または本明細書に記載されている方法および/またはIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントの使用に関する他の材料であってよい。

【0242】

キットの情報材料は、その形態に限定されるものではない。一実施形態において、情報材料には、化合物の製造、化合物の分子量、濃度、使用期限、バッチまたは製造地情報などに関する情報が含まれてよい。一実施形態において、情報材料は、本明細書に記載されている障害を治療、予防、診断、予知またはモニターするためにリガンドを使用することに関する。

【0243】

一実施形態において、情報材料には、本明細書に記載されている方法を行うのに適している方法で、例えば、適当な投与量、剤形または投与方法（例えば、本明細書に記載されている投与量、剤形または投与方法）でIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントを投与するための説明書が含まれてよい。別の実施形態において、情報材料には、適当な対象、例えば、ヒト、例えば、アレルギー性喘息、非アレルギー性喘息または他のIL-13仲介性障害、例えば、アレルギー性および/または炎症性障害またはHTLV-1感染を有するか、それらの危険性のあるヒトにIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントを投与するための説明書が含まれてよい。IL-13産生は、HTLV-1感染と相関関係があるとされている（Chung他、(2003)Blood 102:4130-36）。

## 【0244】

例えば、材料には、アレルギー性喘息、非アレルギー性喘息またはIL-13仲介性障害、例えば、アレルギー性および/または炎症性障害またはHTLV-1感染があるか、それらの危険性のあるヒトにIL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントを投与するための説明書が含まれてよい。

## 【0245】

キットには、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントを含有する組成物のための1つまたはそれ以上の容器が含まれてよい。一部の実施形態において、キットは、組成物および情報材料のための別々の容器、仕切りまたは区画を含む。例えば、組成物は、ビン、バイアルまたは注射器に入れることができ、情報材料は、プラスチックのスリーブまたはポケットに入れることができる。他の実施形態において、キットの別々の要素は、単一の分割されていない容器内に入れる。例えば、組成物を、ラベルの形態の情報材料を貼り付けたビン、バイアルまたは注射器に入れる。一部の実施形態において、キットには、各々が、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントの1つまたはそれ以上の単位剤形（例えば、本明細書に記載されている剤形）を含む複数（例えば、一組）の個別容器が含まれる。例えば、キットには、各々が、IL-13アンタゴニスト、例えば、抗IL-13抗体またはそのフラグメントの単一単位投与量または複数の単位投与量を含む複数の注射器、アンプル、ホイルパッケージ、アトマイザーまたは吸入装置が含まれる。

## 【0246】

所望により、キットには、組成物の投与に適している装置、例えば、注射器、吸入器、ピペット、ピンセット、測定スプーン、点滴器（例えば、点眼器）、綿棒（例えば、木綿製綿棒または木製綿棒）または任意のそのようなデリバリー装置が含まれる。好ましい実施形態において、装置は、リガンドの一定量を分配する埋め込み可能な装置である。

## 【0247】

以下に続く実施例は、本発明の理解を助けるために示されるものであり、決して、本発明の範囲を限定しようと意図するものではなく、限定すると解釈されるべきではない。

## 【0248】

## 実施例1

ヒトIL-13に特異的なマウスモノクローナル抗体の作成

実施例1.1: ヒトIL-13と結合するマウスモノクローナル抗体(mAb13.2)の単離

ポリクローナル抗血清は、組換えヒトIL-13(R&D Systems、Minneapolis、MN)による雌性BALB/cマウスの免疫化により調製した。血清を、ELISAにより、ヒトIL-13との結合についてスクリーニングした。高い血清抗体価を示すマウス由来の脾細胞を、P3X63-AG8.653骨髓腫(ATCC)と融合させ、選択培地にプレートした。融合物を、限界希釈による3回のサブクローニングで単離し、ヒトIL-13に対する結合親和性を有する抗体の産生についてスクリーニングした。3種のモノクローナル抗体は、IL-13と結合し、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害し、1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和および/または阻害することができ、抗体mAb13.2(IgG1)をさらなる研究のために選択した。

## 【0249】

実施例1.2: マウスモノクローナル抗体、mAb13.2は、高い親和性および特異性でヒトIL-13と結合する

実施例1.1において単離されたマウスモノクローナル抗体、すなわち、mAb13.2が、ヒトIL-13と高い親和性および特異性で結合することを確認するためのいくつかの措置を講じた。第一に、ヒトIL-13に対する3種のモノクローナル抗体(mAb13.2、mAb13.4およびmAb13.9)のBIAcore(商標)分析を、ビオチン化IL-13が固定化されている69 RUSTREPTABIZINチップを用いて行

った。3種の抗体を個別にチップ上へ通すと、各々は、速やかな結合を示した(図1)。緩衝液交換すると、解離は遅かった(図1)。第二に、mAb13.2のBIAcore(商標)分析を、mAb13.2が固定化されているBiacoreチップを用いて行った。様々な濃度のIL-13をチップ上へ通した。この場合も、速やかな結合および遅い解離が見られた(図2)。第三に、ELISAによる分析は、mAb13.2が、臍帯血T細胞に由来する天然IL-13が含まれる試験されたすべての形態のヒトIL-13と結合することを決定した(図3)。プレートは、抗FLAG(商標) M2抗体でコーティングした。FLAG-ヒトIL-13の結合は、ビオチン化mAb13.2およびストレプトアビジン-ペルオキシダーゼで検出した。ELISAは、mAb13.2とIL-13の間の結合が、マイトジェン活性化、Th2優性型、臍帯血単核細胞から単離された天然ヒトIL-13および組換えヒトIL-13と競合することを立証した(図3)。mAb13.2の組換えマウスIL-13との検出可能な結合は認められなかった(図3)。ELISAにより見い出された結果を確認するため、モノクローナル抗体、mAb13.2を、Biacoreチップ上にコーティングし、組換えヒトIL-13または喘息に苦しむ患者において高頻度で発現される(Heinzmann他(2000)Hum.Mol.Genet.9:594)多形態のIL-13(ARG変異体)を含有する溶液をチップ上へ通した。両形態は、速やかな結合および抗体からの検出不可能な解離を示した(図4A)。最後に、GLP(優良実験室規範)条件下で行われた予備的な交差反応性研究に、mAb13.2は、剖検または生検で得られた37種の正常なヒト組織の一群、すなわち、DC CPMP Guideline III/5271/94 Draft 5、「モノクローナル抗体の製造および品質管理(Production and quality control of monoclonal antibodies)」のAnnex II中の「交差反応の免疫組織化学的検討に使用すべきヒト組織の提案リスト(suggested list of human tissues to be used for immunohistochemical investigations of cross-activity)」上のすべての組織および1997 US FDA/CBER「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」の表2に推奨されているすべての組織が含まれる組織の一群に対して有意な交差反応性を示さなかった。

#### 【0250】

実施例1.3:マウスモノクローナル抗体mAb13.2は、インビトロでIL-13関連活性を中和する

インビトロで1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和するmAb13.2の能力を、TF1パイオアッセイ、ヒト末梢血単球およびヒト末梢血B細胞を用いて確認した。適切な条件下、ヒトTF1赤白血病細胞系の増殖を、IL-13依存性に行うことができる。第一に、最適以下の濃度の組換えヒトIL-13かヒトIL-13のARG変異体のどちらかで誘発されるサイトカイン依存性TF1細胞系の増殖がmAb13.2により阻害されるか否かを決定した。図4Bは、mAb13.2が、TF1増殖を刺激する組換えヒトIL-13とヒトIL-13のARG変異体の両方の能力を阻害したことを示している。第二に、TF1細胞系をIL-13不足とし、次いで、最適以下の濃度の組換えヒトIL-13に暴露し、精製マウスmAb13.2か可溶性IL-13受容体(rhuIL-13R<sub>2</sub>)のどちらかの存在下で増殖を誘導した。細胞を3日間インキュベートし、最後の4時間にわたる<sup>3</sup>H-チミジン取り込みを、液体シンチレーションカウンティングにより測定した。最適以下のIL-13濃度において、mAb13.2は、TF1増殖の用量依存的阻害を引き起こした(図5)。この効果のIC<sub>50</sub>、250pMは、可溶性rhuIL-13R<sub>2</sub>のIC<sub>50</sub>に極めて匹敵する(図5)。例示的抗体は、この効果について、約50~500pMまたは120~300pMまたは240~350pMのIC<sub>50</sub>を有する。

#### 【0251】

ヒト末梢血単球は、低親和性 I g E 受容体 ( C D 2 3 ) の細胞表面発現を増加させることにより用量依存的に I L - 1 3 または I L - 4 に反応するため ( 図 6 A )、ヒト単球を用い、この I L - 1 3 関連活性を中和する m A b 1 3 . 2 の能力を確認した。m A b 1 3 . 2 が、単球による I L - 1 3 仲介性 C D 2 3 細胞表面発現を中和するか否かを決定するため、末梢血単核細胞を健康なドナーから単離し、漸増量の I L - 1 3 のみ、漸増量の I L - 4 のみ、1 n g / m l の I L - 1 3 と漸増量の m A b 1 3 . 2 または 0 . 3 n g / m l の I L - 4 と漸増量の m A b 1 3 . 2 と共にインキュベートした。翌日、細胞を収集し、C Y C H R O M E ( 商標 ) 標識抗 C D 1 1 b ( 単球マーカー ) および P E 標識抗 C D 2 3 で染色した。ゲートされた C D 1 1 b + 単球を、フローサイトメトリーにより C D 2 3 発現についてアッセイした。予想通り、m A b 1 3 . 2 は、I L - 1 3 仲介性 C D 2 3 発現を阻害したが ( 図 6 B )、I L - 4 誘発性 C D 2 3 発現を阻害しなかった ( 図 6 C )。

#### 【 0 2 5 2 】

また、m A b 1 3 . 2 の効果を、ヒト末梢血 B 細胞による I L - 1 3 仲介性 I g E 産生のモデルで試験した。I L - 1 3 および T 細胞マイトジェン、P H A に反応し、ヒト B 細胞は、I g E に対する I g アイソタイプスイッチ組換えを受け、培養液中により高い I g E レベルをもたらす。この効果は、I g E 産生 B 細胞の頻度増加として観察することができる。健康なドナー由来の P B M C を、フィーダーとしての自家放射線照射 P B M C の存在下、マイクロタイターウエル中で培養し、P H A および I L - 1 3 で刺激した。3 週間後、各ウエルを、E L I S A により I g E 濃度についてアッセイした。P H A + I L - 1 3 は、I g E 産生 B 細胞クローンの頻度を増加させた ( 図 7 )。この効果は、m A b 1 3 . 2 により阻害されたが、I L - 1 3 特異的非中和抗体 ( m A b 1 3 . 8 ) または対照マウス I g G ( m s I g G ) により阻害されず ( 図 7 )、m A b 1 3 . 2 が、培養 B 細胞による I L - 1 3 仲介性 I g E アイソタイプスイッチングを効率的に遮断したことを示した。

#### 【 0 2 5 3 】

最後に、I L - 1 3 に対する初期細胞応答を遮断する m A b 1 3 . 2 の能力を、シグナル伝達性転写因子 ( S T A T ) 6 リン酸化に対するその効果を調べることにより試験した。その細胞表面受容体との I L - 1 3 相互作用により、S T A T 6 は、二量体化し、リン酸化され、細胞質から核に転位し、その場所で、サイトカイン応答性遺伝子の転写を活性化する ( M u r a t a 他 ( 1 9 9 5 ) J . B i o l . C h e m . 2 7 0 : 3 0 8 2 9 - 3 6 )。リン酸化 S T A T 6 に対する特異抗体は、I L - 1 3 暴露の 3 0 分以内のウエスタンブロットおよび / またはフローサイトメトリー分析により、この活性化を検出することができる。

#### 【 0 2 5 4 】

H T - 2 9 ヒト上皮細胞系を用い、S T A T 6 リン酸化をアッセイした。H T - 2 9 細胞を、3 7 °C にて 3 0 分間、漸増濃度の I L - 1 3 中でインキュベートした。細胞ライセートのウエスタンブロット分析は、S T A T 6 の用量依存的 I L - 1 3 仲介性リン酸化を立証した ( 図 8 A )。同様に、フローサイトメトリー分析は、3 7 °C で 3 0 分間、飽和濃度の I L - 1 3 で処理し、固定し、透過化処理し、ホスホ - S T A T 6 に対して A L E X A ( 商標 ) F l u o r 4 8 8 標識 m A b で染色した H T - 2 9 細胞におけるリン酸化 S T A T 6 を立証した ( 図 8 B )。アイソタイプ対照抗体で染色した処理細胞は、蛍光を示さなかった。最後に、細胞を、最適以下の濃度の I L - 1 3 のみ、I L - 1 3 と m A b 1 3 . 8、I L - 1 3 と m A b 1 3 . 2 または I L - 1 3 と対照 m s I g G 1 抗体で処理した場合、フローサイトメトリー分析は、細胞を、m A b 1 3 . 2 の存在下で処理した場合にのみ S T A T 6 リン酸化の完全な抑止を示し、すなわち、m A b 1 3 . 2 は、S T A T 6 リン酸化を遮断したが、I L - 1 3 特異的非中和抗体 ( m A b 1 3 . 8 ) および対照マウス I g G 1 には、効果がなかった ( 図 8 C )。これらの研究は、m A b 1 3 . 2 が、I L - 1 3 仲介性 S T A T 6 リン酸化を阻害することを立証した。

#### 【 0 2 5 5 】

実施例 1 . 4 : マウスモノクローナル抗体 m A b 1 3 . 2 は、インビボで I L - 1 3 関

10

20

30

40

50

連活性を中和する

インビボで1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和するマウスmAb13.2の有効性を、ブタ回虫(*Ascaris suum*)に対して生まれつきアレルギーのあるカニクイザルにおける抗原誘発性気道炎症のモデルを用いて試験した。このモデルにおいて、ブタ回虫(*Ascaris suum*)抗原によるアレルギー性サルのチャレンジは、炎症細胞、特に、好酸球の気道中への流入をもたらす。細胞のこの流入を予防するmAb13.2の能力を試験するため、ブタ回虫(*Ascaris suum*)抗原によるチャレンジの24時間前に抗体を投与した。チャレンジの日に、ベースラインの気管支肺胞洗浄液(BAL)サンプルを、左肺から採取した。次いで、抗原を、右肺中に気管内注入した。24時間後、右肺を洗浄し、8mg/kgの腹水-精製mAb13.2で静脈内処置した動物由来のBAL液を、未処置の動物由来のBAL液と比較した。好酸球数は、チャレンジ後に5頭の未処置動物のうちの4頭で増加し、それと比較して、mAb13.2で処置した6頭の動物のうち1頭で増加した(図9)。BAL好酸球百分率は、未処置群については有意に増加したが( $p < 0.02$ )、抗体処置群については有意に増加しなかった。これらの結果は、mAb13.2が、アレルゲンをチャレンジされたアレルギー性動物における気道好酸球増加症を効率的に予防することを裏付けた。

【0256】

マウスmAb13.2の平均血清半減期は、サルにおいて1週間未満であった。痕跡のmAb13.2すべてが血清から消えたであろう3カ月時点で、mAb13.2処置動物にブタ回虫(*Ascaris suum*)を再チャレンジし、これらの個体の回虫(*Ascaris*)応答性を確認した。処置群における6頭のサルのうちの2頭は、ノンレスポonderであることが見い出された。

【0257】

実施例1.5:マウスモノクローナル抗体mAb13.2は、通常はIL-4Rと結合するIL-13の領域に結合する

おそらく、IL-13関連活性は、IL-13R1およびIL-4R鎖からなる受容体複合体を介して仲介される。まず、サイトカインは、細胞の表面上で、比較的低親和性のIL-13R1との相互作用を起こす。次いで、IL-13/IL-13R1複合体は、IL-4Rを動員し、完全IL-13受容体を形成し、高い親和性でそのリガンド(IL-13)と結合する(Zurawski他(1993)EMBO J. 12: 2663; Zurawski他(1995)J. Biol. Chem. 270: 23869)。次いで、IL-13の高親和性受容体との結合は、ヤヌスキナーゼ-シグナル伝達性転写因子(JAK-STAT)経路が関わるIL-4R鎖を介し、例えば、IL-13に対する初期細胞応答のうちの1つとしてモニターすることができるSTAT6のリン酸化を介して下流シグナルを送る(Murata他、前掲書)。エピトープマッピング、X線結晶学、さらにはBIACORE(商標)分析などのいくつかのアプローチを用い、マウスmAb13.2とヒトIL-13の間の相互作用を解明し、さらに、1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を変調するmAb13.2の能力の根底にある基盤を調べた。

【0258】

mAb13.2とIL-13の間の相互作用は、X線結晶学により研究した。腹水由来の全IgGを、タンパク質Aカラム上で単離し、パパインで消化し、mAb13.2 Fabフラグメントを作成し、次いで、高度に精製した。Fabフラグメント自体を結晶化し、構造解析を、シンクロトロン放射を用い、2.8 Åの解像度で入手した。さらに、mAb13.2 Fabフラグメントを、ヒトIL-13と共結晶化し、この結晶構造を、1.8 Åの解像度で解析した。mAb13.2とIL-13の間の主要な接触部位は、主に、抗体のCDRLープおよびIL-13のCヘリックスのC末端領域において集まっていると識別された(図10)。成熟IL-13タンパク質、すなわち、シグナルペプチドが切断されているIL-13タンパク質について図11に示されるナンバリング配列によると、mAb13.2と接触するIL-13の主要な残基は、配列番号32のGLU49



、ASN53、GLY69、PRO72、HIS73、LYS74およびARG86である。

【0259】

ヒトIL-13と結合するmAb13.2 Fabフラグメントの能力は、ELISAにより確認された。抗FLAG(商標) M2抗体で一夜コーティングされたELISAプレートへのFLAG-ヒトIL-13の結合は、ビオチン化mAb13.2を用いて検出した。非標識mAb13.2、単離mAb13.2 Fabフラグメントまたは無関係な抗体を導入し、FLAG-ヒトIL-13に対するビオチン化mAb13.2の結合と競合させた。データは、非標識mAb13.2およびmAb13.2 Fabフラグメントが、FLAG-ヒトIL-13との結合についてビオチン化mAb13.2と競合することができたことを示している(図12)。さらに、非標識mAb13.2と類似した競合の程度を達成するには、より高濃度のFabフラグメントが必要であるように見えるが(図12A)、この相違は、競合を結合部位の濃度の関数として分析した場合、例えば、各単離Fabフラグメント当たり1つの結合部位および各非標識mAb13.2当たり2つの結合部位を仮定すれば解決する(図12B)。非標識mAb13.2およびmAb13.2 Fabフラグメントと対照的に、無関係な抗体は、FLAG-ヒトIL-13との結合についてビオチン化mAb13.2と競合することができなかった(図12)。

10

【0260】

インビトロで1つまたはそれ以上のIL-13関連活性を中和するmAb13.2 Fabフラグメントの能力は、mAb13.2 Fabフラグメントの非存在下また存在下、上記に記載されているように、ヒト末梢血単球によるTF1細胞の増殖およびCD23の発現を測定することにより確認された。図13Aは、mAb13.2 Fabフラグメントが、mAb13.2と同様に、結合部位濃度依存的にTF1増殖を刺激する組換えヒトIL-13の能力を阻害したことを示している。さらに、mAb13.2 Fabフラグメントは、mAb13.2と同様に、結合部位濃度依存的にCD23のIL-13仲介性発現を阻害した(図13B)。

20

【0261】

上記に記載されているX線結晶学、エピトープマッピング、ELISA、TF1増殖およびCD23発現分析は、mAb13.2が、IL-13ヘリックスのC末端領域、すなわち、IL-4R結合領域に結合することを示した。この分析を確認するため、mAb13.2とIL-13の間の相互作用を、BIACORE(商標)チップで分析した。この分析は、いくつかのフォーマットで行った。第一に、IL-4RをBIACORE(商標)チップに結合させ、IL-13R1に予め結合させたIL-13の複合体をチップ上へ流した。mAb13.2の非存在下では、3分子複合体の形成が立証された。しかしながら、IL-13R1に予め結合させたIL-13の混合物へのmAb13.2の添加は、チップ上のIL-4Rとの結合を妨害した。第二に、mAb13.2をチップ上に固定化し、結合IL-13を溶液相に加えた。IL-13R1は、結合IL-13と相互作用することが認められたが、IL-4Rと結合IL-13との相互作用は認められなかった。第三に、mAb13.2は、チップ上に固定化されたIL-13R1-FcまたはIL-13R1単量体と結合しているIL-13と結合することが立証された。これらの知見は、mAb13.2が、IL-13R1とのIL-13相互作用を阻害しないが、IL-13R1のIL-4Rとの相互作用を分断することを裏付けている。この分断は、機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨害すると考えられる。これらの知見は、この抗体の中和活性についての理論モデルを提供する。

30

40

【0262】

mAb13.2のIL-13およびIL-13R1との複合体のインビトロでの証明は、mAb13.2が、細胞表面において受容体結合型のIL-13と結合している可能性を示唆している。細胞に結合したmAb13.2が、受容体に結合したIL-13が飽和している条件下で検出することができるか否かを判定するため、HT-29ヒト上皮細胞系を、4にて様々な濃度のIL-13で処理し、続いて、モノクローナル抗体mAb

50

13.2、mAb13.8または対照マウスIgG1を添加した。結合は、ビオチン化抗マウスIgG1およびPE-ストレプトアビジンを用いるフローサイトメトリー分析により検出した。HT-29細胞は、IL-13R1を発現するが、細胞表面に結合したIL-13とのmAb13.2の結合は、2mg/mlまでのmAb13.2の濃度にて検出されなかった。この知見は、mAb13.2が1つまたはそれ以上のIL-13関連活性の強力な中和物であるという証明と共に、IL-13シグナル伝達複合体、すなわち、IL-13受容体の正常な機能が、mAb13.2により分断されることを示している。

#### 【0263】

上記に記載されている知見は、マウスモノクローナル抗体mAb13.2が、高い親和性および特異性でIL-13と結合し、強力な中和活性を示すこと、すなわち、mAb13.2が、試験されたすべてのIL-13関連活性を効率的に遮断することを裏付けている。これらの知見は、ヒトIL-13についての、mAb13.2が、IL-4R結合部位と相互作用するが、IL-13R1結合部位とは相互作用しないという知見と関連している。

#### 【0264】

##### 実施例2

キメラmAb13.2抗体(ch13.2)の作成

実施例2.1:キメラmAb13.2抗体(ch13.2)の単離

mAb13.2をコードする可変重(VH)および可変軽(VL)遺伝子を、抗体を産生するハイブリドーマから単離されたmRNAからクローン化し配列決定した。VH配列は、ヒトFc受容体および補体成分との結合を低減するための2つの点変異(L234AおよびG237A)を含むヒトIgG1をコードするpED6-huIgG1\_\_mut発現ベクター(配列番号17; Morgan他(1995) Immunology 86: 319-24; Shields他(2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-604)中にサブクローニングした。mAb13.2のVL配列は、pED6-Kappa発現ベクター中にサブクローニングした。mAb13.2のVHおよびVL配列を含む発現ベクターをCOS-1細胞中に同時形質移入し、キメラmAb13.2抗体(ch13.2)を馴化培地から精製した。

#### 【0265】

実施例2.2:キメラmAb13.2抗体(ch13.2)は、インビトロでIL-13関連活性を中和する

キメラ抗体、ch13.2を、IL-13結合について試験した。モノクローナル抗体mAb13.2、mAb13.2のキメラ形態(ch13.2)および対照抗体(13.8)を、抗FLAG抗体と共にELISAプレート上に固定化されたヒトIL-13-FLAGとの結合についてビオチン化マウスmAb13.2と競合するそれらの能力について試験した。キメラ抗体、ch13.2は、mAb13.2と同様に、IL-13と競合的に結合することができた(図14A)。別の試験において、ヒト末梢血単球を、IL-13で一夜処理し、様々な濃度のマウスmAb13.2またはch13.2の存在下でCD23発現を誘導した。図14Bに示されるように、ch13.2は、mAb13.2と同程度に、単球によるIL-13仲介性CD23発現を妨害した。

#### 【0266】

##### 実施例3

部分および完全ヒト化mAb13.2抗体(h13.2v1およびh13.2v2)の作成

実施例3.1:部分ヒト化mAb13.2抗体(h13.2v1)の単離

mAb13.2のヒト化は、アミノ酸配列相同性、CDRクラスター分析、発現ヒト抗体の中での使用頻度およびヒト抗体の結晶構造に関する入手可能な情報に基づいた。ヒト化は、ヒトDP-54可変重(VH)およびDPK-9可変軽(VL)生殖系列遺伝子(それぞれ、例えば、図16および17に示す)に基づいた。抗体結合、VH-VL対合および他の要素に対する可能な影響を考慮に入れ、マウス残基を、若干の例外はあるものの

10

20

30

40

50

、マウスおよびヒトフレームワーク残基が異なるヒト残基に変異させた。c h 1 3 . 2 V H鎖アミノ酸配列のヒトD P - 5 4生殖系列遺伝子の予想アミノ酸配列および得られた部分ヒト化h 1 3 . 2 v 1 V H鎖アミノ酸配列との比較を図1 5に示す。c h 1 3 . 2 V L鎖アミノ酸配列のヒトD P K - 9の予想アミノ酸配列および得られた部分ヒト化h 1 3 . 2 v 1 V L鎖との比較を図1 6に示す。図1 6および1 7に見られるように、h 1 3 . 2 v 1 V HおよびV L鎖は、それぞれc h 1 3 . 2 V HおよびV L鎖の相補性決定領域(C D R)、すなわち抗原結合性領域を保持していた。さらに、V Hフレームワーク中の1つの残基およびV Lフレームワーク中の2つの残基のみをマウスに保ち、抗原結合性領域およびV H - V L対合を劇的に変化させる危険性を軽減した(図1 6および1 7)。

10

#### 【0 2 6 7】

m A b 1 3 . 2の部分ヒト化は、ヒト生殖系列遺伝子に対応するアミノ酸が、指示されたフレームワーク位置で置換されるように、(マウス)m A b 1 3 . 2をコードするヌクレオチド配列を変異させることにより行った。導入される各アミノ酸変化について、C H O細胞における発現に最適化されたコドンによる適切なヌクレオチド置換を考案した。V Hのヒト化は、P C R変異誘発のプロセスにより行い、一度に1つまたは2つのアミノ酸について変異を組み入れるオリゴヌクレオチドプライマーを用い、マウステンプレート遺伝子配列を増幅した。部分ヒト化を行うには、数回のP C R変異誘発が必要であった。V Lのヒト化は、適切なヌクレオチド置換のあるマウスV L配列に対応する9個の重複オリゴヌクレオチドの一団を用い、P C Rにより行った。テンプレートの役割を果たす重複領域およびP C Rを用い、センスおよびアンチセンス鎖上のプライマー間のギャップを埋めた。得られた部分ヒト化抗体をh 1 3 . 2 v 1と名付けた。h 1 3 . 2 v 1のV LおよびV Hをコードするヌクレオチド配列を、それぞれ配列番号3および配列番号7と命名する。

20

#### 【0 2 6 8】

実施例3 . 2：完全ヒト化m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) の単離

図1 5および図1 6に示すように、h 1 3 . 2 v 1は、フレームワーク領域中に3つのマウス残基、すなわちV H鎖に1つおよびV L鎖に2つを保持していた。m A b 1 3 . 2 F a bとヒトI L - 1 3の共結晶構造についての予備的作業および分析は、3つの残基すべてをヒトに変異させ得ることを裏付けた。これらは、V H鎖における3番残基(マウスではK、ヒトではQ)、V L鎖における4番残基(マウスではL、ヒトではM)およびV L鎖における7 2番残基(生殖系列では6 8番；マウスではR、ヒトではG)であった。したがって、m A b 1 3 . 2の完全ヒト化バージョン、h 1 3 . 2 v 2を作成するため、P C R変異誘発を用い、h 1 3 . 2 v 1のV H鎖における変異K 3 Qおよびh 1 3 . 2 v 1のV L鎖におけるL 4 MおよびR 7 2 Gを導入した。h 1 3 . 2 v 2の最終V HおよびV L配列を、それぞれ図1 7および図1 8に示す。h 1 3 . 2 v 2のV LおよびV Hをコードするヌクレオチド配列を、それぞれ配列番号4および配列番号8と命名する。

30

#### 【0 2 6 9】

図2 9に示す配列に従い(直線ナンバリングスキームを用い)、I L - 1 3との水素結合接触を作るm A b 1 3 . 2重鎖の主要な残基は、S E R 5 0 ( C D R 2 )、S E R 5 3 ( C D R 2 )、T Y R 1 0 1 ( C D R 3 )およびT Y R 1 0 2 ( C D R 3 )であることが決定された。さらに、I L - 1 3とのファンデルワールス接触を作るm A b 1 3 . 2重鎖の主要な残基は、I L E 3 0 ( C D R 1 )、S E R 3 1 ( C D R 1 )、A L A 3 3 ( C D R 1 )、T R P 4 7、S E R 5 0 ( C D R 2 )、S E R 5 2 ( C D R 2 )、S E R 5 3 ( C D R 2 )、T Y R 5 8 ( C D R 2 )、L E U 9 8 ( C D R 3 )、A S P 9 9 ( C D R 3 )、G L Y 1 0 0 ( C D R 3 )、T Y R 1 0 1 ( C D R 3 )、T Y R 1 0 2 ( C D R 3 )およびP H E 1 0 3 ( C D R 3 )であることが決定された(直線ナンバリングスキームを用いる図2 9に基づく)。

40

#### 【0 2 7 0】

図3 0に示す配列に従い(直線ナンバリングスキームを用い)、I L - 1 3との水素結

50

合接触を作る mAb 13.2 軽鎖の主要な残基は、ASN31 (CDR1)、TYR32 (CDR1)、LYS34 (CDR1)、ASN96 (CDR3) および ASP98 (CDR3) であることが決定された。さらに、IL-13 とのファンデルワールス接触を作る mAb 13.2 軽鎖の主要な残基は、ASN31 (CDR1)、TYR32 (CDR1)、LYS34 (CDR1)、ARG54 (CDR2)、ASN96 (CDR3)、ASP98 (CDR3) および TRP100 (CDR3) であることが決定された (直線ナンバリングスキームを用いる図30に基づく)。

#### 【0271】

実施例3.3: 完全ヒト化 mAb 13.2 (h13.2v2) は、IL-13 との完全な結合活性を保持する

10

IL-13-FLAG との結合についてピオンチン化 mAb 13.2 と競合する完全ヒト化 mAb 13.2 (h13.2v2) の能力は、実施例2に記載されているような ELISA により判定した。データは、mAb 13.2 のキメラ (ch13.2)、部分ヒト化 (h13.2v1) および完全ヒト化バージョンが、同程度まで FLAG-ヒト IL-13 との結合について、ピオチン化 mAb 13.2 と競合することができることを立証した (図19A)。BIACORE 分析も、IL-13 が、固定化 h13.2v2 に対する速やかな結合および遅い解離を有することを裏付けた (図19B)。

#### 【0272】

実施例3.4: 完全ヒト化 mAb 13.2 (h13.2v2) は、インビトロで IL-13 関連活性を中和する

20

さらに、ヒト単球による CD23 の IL-13 仲介性細胞表面発現を阻害し、HT-29 細胞における IL-13 誘発性 STAT6 リン酸化を低減する mAb 13.2 のキメラ (ch13.2)、部分ヒト化 (h13.2v1) および完全ヒト化 (h13.2v2) バージョンの能力を、実施例1.3に記載されているように、フローサイトメトリー分析により判定した。手短に言うと、ヒト末梢血単球を、漸増濃度の ch13.2、h13.2v1 または h13.2v2 の存在下、最適以下の濃度の組換えヒト IL-13 と共に一夜インキュベートした。単球をゲートし、IL-13 応答性の指標としての CD23 発現についてアッセイした。フローサイトメトリー分析は、mAb 13.2 の3種のバージョン、すなわち、ch13.2、h13.2v1 および h13.2v2 のすべてが、用量依存的に単球による IL-13 仲介性 CD23 発現を低減することができることを立証した (図20A)。

30

#### 【0273】

STAT6 リン酸化について試験するため、HT-29 ヒト上皮細胞系を、最適以下の用量の組換えヒト IL-13 および漸増濃度の ch13.2、h13.2v1 または h13.2v2 と共に、37℃にて30分間インキュベートし、次いで、リン酸化 STAT6 に対する ALEXA (商標) Fluor 488 標識モノクローナル抗体を用い、リン酸化 STAT6 発現についてアッセイした。フローサイトメトリー分析は、mAb 13.2 の3種のバージョン、すなわち、ch13.2、h13.2v1 および h13.2v2 のすべてが、IL-13 仲介性 STAT6 リン酸化を軽減することができることを立証した (図20B)。

40

#### 【0274】

h13.2v2 が、インビトロで組換え IL-13 関連および天然ヒト IL-13 関連活性を阻害することできたことから (図21)、動物モデルにおいて IL-13 関連障害を阻害するその能力について試験した。完全ヒト化 mAb 13.2、h13.2v2 を試験することに備えて、呼吸器疾患の非ヒト霊長類 (NHP) およびヒツジモデルにおいて、カニクイザル由来またはヒツジ由来の組換え IL-13 を中和する抗体の能力をアッセイした。IL-13 を、カニクイザルまたはヒツジからクローン化した。NHP IL-13 は、大腸菌 (E. coli) において発現させ、精製し、組換えヒト IL-13 用としてリフォールディングした。対照的に、組換えヒツジ IL-13 は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞において発現させた。IL-13 の組換え NHP カニクイザル

50

形態または I L - 1 3 の組換えヒツジ形態に関係する 1 つまたはそれ以上の活性を阻害する m A b 1 3 . 2 または h 1 3 . 2 v 2 の能力をインビトロで試験した。図 2 2 は、h 1 3 . 2 v 2 が、ヒト単球による C D 2 3 の細胞表面発現を誘導するカニクイザル N H P I L - 1 3 の能力を強力に中和したことを示している。しかしながら、ヒツジ I L - 1 3 関連活性の中和が、かなり高濃度の抗体を必要としたように、h 1 3 . 2 v 2 は、ヒツジ I L - 1 3 を弱く中和したに過ぎなかった ( 図 2 2 ) 。

【 0 2 7 5 】

実施例 3 . 5 : 完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) は、喘息のヒツジモデルにおいて I L - 1 3 活性を中和する

I L - 1 3 のヒツジ形態の生物活性を中和する際の比較的低い効力にもかかわらず、回虫 ( A s c a r i s ) 誘発性気道過反応性のヒツジモデルにおける有効性について h 1 3 . 2 v 2 を試験した。ヒツジを、自然暴露により、線虫寄生虫、ブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) に感作させた。回虫 ( A s c a r i s ) 抗原による肺チャレンジを与える、動物は、抗原チャレンジに対する喘息のヒトの応答と類似した気管支収縮を起こす。この応答は、即時型反応と、続く、チャレンジの 4 ~ 5 時間後に始まる晩期応答からなる。初期相は、平滑筋応答であると考えられるが、晩期は、炎症反応である。

【 0 2 7 6 】

回虫 ( A s c a r i s ) 誘発性気管支収縮を低減する h 1 3 . 2 v 2 の能力を試験するため、ヒツジに、2 0 m g / k g 、5 m g / k g または 2 m g / k g の抗体を静脈内 ( i . v . ) 注入により投与した。注入の 2 4 時間後、動物に、ブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) 抗原による気管内チャレンジを行った。結果は、2 0 m g / k g または 5 m g / k g における h 1 3 . 2 v 2 が、抗原に対する晩期応答を減弱することを示した ( 図 2 3 ) 。2 m g / k g の h 1 3 . 2 v 2 には、おそらく、ヒツジ I L - 1 3 に対する h 1 3 . 2 v 2 の弱い中和活性により、対照と比べて抗原応答に対する有意な効果はなかった。

【 0 2 7 7 】

さらに、ヒツジにおいて、コリン作動薬、カルバコールの気道チャレンジによって誘発される気道過反応性を低減する h 1 3 . 2 v 2 の能力を試験した。カルバコールは、強制呼気容量 ( F E V ) の減少として測定される気管支収縮を誘発し、所与の応答の大きさを誘発するのに必要とされる刺激の用量 ( P C 4 0 0 ) は、通常、健康な対象の場合よりも喘息患者の場合の方が低い。ヒツジは、未処置のままとするか、カルバコール吸入チャレンジの 2 4 時間前に 2 0 m g / k g 、5 m g / k g または 2 m g / k g の h 1 3 . 2 v 2 を静脈内投与し、P C 4 0 0 を、ブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) のチャレンジ前後にヒツジで決定した。データは、2 0 m g / k g または 5 m g / k g における h 1 3 . 2 v 2 が、ブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) のチャレンジによって引き起こされる P C 4 0 0 の低下を防いだことを示している ( 図 2 4 ) 。抗原応答実験の結果と同様、2 m g / k g の h 1 3 . 2 v 2 には、対照と比べて P C 4 0 0 に対する有意な効果はなかった。

【 0 2 7 8 】

実施例 3 . 6 : 完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 ( h 1 3 . 2 v 2 ) は、喘息の非霊長類モデルにおいて I L - 1 3 活性を中和する

非ヒト霊長類における回虫 ( A s c a r i s ) 誘発性肺炎症を予防する h 1 3 . 2 v 2 の能力を試験するため、対照カニクイザルを、食塩水、8 m g / k g の無関係なヒト I g G ( I V I G ) または 2 m g / k g のデキサメタゾン ( 陽性対照として ) で筋肉内処置した。試験カニクイザルには、1 0 m g / k g の h 1 3 . 2 v 2 を静脈内投与した。翌日、チャレンジ前の B A L サンプルを左肺から集め、動物の右肺にブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) を気管内にチャレンジした。チャレンジの 2 4 時間後、B A L サンプルを右肺から集め、細胞浸潤物についてアッセイした。結果は、h 1 3 . 2 v 2 による動物の前処置が、ブタ回虫 ( A s c a r i s s u u m ) 抗原によって引き起こされる気道炎症を予防することを示した ( 図 2 5 ) 。並行実験において、I L - 5 およびエオタキシンが、回虫 ( A s c a r i s ) チャレンジ後の B A L 中に誘導された。h 1 3 . 2 v 2 による動物の

前処置は、I L - 5 とエオタキシンの両方の誘導のレベルを低減した。

#### 【0279】

ブタ回虫 (*Ascaris suum*) に感作された非ヒト霊長類は、回虫 (*Ascaris*) 抗原に対する I g E を発現する。この I g E は、循環する好塩基球上の R c R I と結合するため、回虫 (*Ascaris*) 抗原による末梢血好塩基球のインビトロチャレンジは、脱顆粒およびヒスタミンの放出を引き起こす。繰り返される抗原暴露は、好塩基球過敏化を高め、ヒスタミン放出応答の増強をもたらす。このプロセスに対する h 1 3 . 2 v 2 の効果を試験するため、h 1 3 . 2 v 2 もしくは食塩水または記載されているような I V I G 対照を投与したカニクイザルから、回虫 (*Ascaris*) チャレンジの 8 週後に採血し、血漿中の全 I g E および回虫 (*Ascaris*) 特異的 I g E のレベルを、E L I S A により測定した。回虫 (*Ascaris*) 特異的 I g E のレベルは、食塩水または I V I G で処置した対照動物において、チャレンジの 8 週後に増加した (図 3 1 B)。対照的に、h 1 3 . 2 v 2 で処置した動物は、回虫 (*Ascaris*) に特異的な循環 I g E のレベルに有意な低下を示した (図 3 1 A)。処置群のいずれについても全 I g E 力価の有意な変化は認められなかった。

#### 【0280】

好塩基球ヒスタミン放出に対する効果を評価するため、動物から、回虫 (*Ascaris*) チャレンジの 24 時間後、8 週後および 4 カ月後に採血した。全血に、37 にて 30 分間、回虫 (*Ascaris*) 抗原をチャレンジし、上清中に放出されるヒスタミンを、E L I S A (Beckman Coulter, Fullerton, CA) により定量化した。図 3 2 A に示すように、これらの感作動物は、部分的抗原チャレンジ前でさえある程度の回虫 (*Ascaris*) 誘発性好塩基球ヒスタミン放出を示した。チャレンジ後、対照動物は、好塩基球応答性の予想された増加を示した。対照的に、h 1 3 . 2 v 2 で処置された動物は、好塩基球感作におけるこの増加を起こすことなく、チャレンジの 2 ~ 4 カ月後に、動物の回虫 (*Ascaris*) に対するインビトロのヒスタミン放出応答は有意に低かった (図 3 2 B)。したがって、h 1 3 . 2 v の単回投与は、このモデルにおいて長期の疾患修飾活性を有していた。

#### 【0281】

##### 実施例 4

様々なヒト生殖系列遺伝子に基づく m A b 1 3 . 2 のヒト化

実施例 3 は、D P - 5 4 および D P K 9 生殖系列遺伝子に基づいて m A b 1 3 . 2 をヒト化するための方法および結果を提供した。本実施例では、他の生殖系列遺伝子に基づく m A b 1 3 . 2 のヒト化について手短に詳述する。

#### 【0282】

追加のヒト化戦略を、マウス抗体可変領域の実際のアミノ酸配列に対して高度の相同性、すなわち、配列類似性を有するヒト生殖系列抗体配列、またはそれらのサブグループの分析に基づいて設計した。例えば、V - B A S E の V H グループ 3 は、m A b 1 3 . 2 と高度な類似性を示した。m A b 1 3 . 2 の重鎖可変領域の C D R は、V H グループ 3 内の生殖系列遺伝子のサブグループ、すなわち、3 - 5 3 (D P - 4 2)、3 - 4 8 (D P - 5 1)、3 - 0 9 (D P - 3 1)、3 - 1 3 (D P - 4 8)、3 - 1 5 (D P - 3 8)、3 - 2 0 (D P - 3 2)、3 - 2 1 (D P - 7 7)、3 - 2 3 (D P - 4 7)、3 - 3 0 および 3 - 3 0 . 5 (D P - 4 9)、3 - 6 4 (D P - 4 5)、3 - 6 6 (D P - 8 6) および 3 - 7 3 (Y A C - 9) のうちのどの 1 つにも移動できると判断した (図 2 6)。m A b 1 3 . 2 をヒト化するためにも使用することができる D P - 6 1 の配列も図 2 6 に示す。以下の共通アミノ酸置換、すなわち、K 3 Q、K 1 3 Q または K 1 3 R、K 1 9 R、T 4 0 A、E 4 2 G、R 4 4 G、R 7 5 K、I 7 7 S または I 7 7 T、S 8 3 N、S 8 7 A または S 8 7 D、M 9 2 V または M 9 2 L および T 1 1 3 L を、m A b 1 3 . 2 中に導入し、その V H フレームワークを、提案されているヒト生殖系列化フレームワークのいずれかに変換できると判断した。特定の生殖系列遺伝子に基づくヒト化のための個々のアミノ酸置換も描かれており、例えば、D P - 4 7 に基づくヒト化は、V 5 L、A 4 9 S お

よび A 7 4 S の追加変異を含み、D P - 4 2 に基づくヒト化は、V 1 2 I、A 4 9 S および A 7 4 S の追加変異を含み、D P - 5 1 に基づくヒト化は、A 4 9 S の追加変異を含み、D P - 4 8 に基づくヒト化は、P 4 1 T、D 7 2 E および E 8 8 G の追加変異を含み、D P - 5 3 に基づくヒト化は、E 4 6 V および A 4 9 S の追加変異を含み、D P - 3 2 に基づくヒト化は、L 1 1 V、A 4 9 S および Y 9 4 H の追加変異を含み、D P - 3 8 に基づくヒト化は、A 4 9 G、A 7 4 D、R 7 5 S、N 7 6 K、R 8 6 K および S 8 7 T の追加変異を含み、D P - 3 1 に基づくヒト化は、G 1 6 R、A 4 9 S および R 9 7 K の追加変異を含み、D P - 6 1 に基づくヒト化は、W 4 7 Y、A 4 9 S、A 7 4 S および T 9 0 M の追加変異を含み、D P - 4 5 に基づくヒト化は、E 6 Q、A 2 4 G、A 4 9 S および T 9 0 M の追加変異を含むことがある。例えば、m A b 1 3 . 2 のヒト化が、7 9 % の配列同一性を有するヒト生殖系列遺伝子 D P - 4 7 に基づく場合、以下の変異、K 3 Q、V 5 L、K 1 3 Q、K 1 9 R、T 4 0 A、E 4 2 G、R 4 4 G、A 4 9 S、A 7 4 S、R 7 5 K、I 7 7 T、S 8 3 N、S 8 7 A、M 9 2 V および T 1 1 3 L を、m A b 1 3 . 2 中に導入することができる。ヒト化の間の m A b 1 3 . 2 中への共通アミノ酸置換の単独、または特定のヒト生殖系列遺伝子に基づく個々のアミノ酸置換と組み合わせた導入は、活性な抗体をもたらすはずである。例えば、活性抗体、h 1 3 . 2 v 3 は、以下に記載するように、m A b 1 3 . 2 のヒト化が 3 - 2 1 ( D P - 7 7 ) に基づく場合に得られる。

#### 【 0 2 8 3 】

m A b 1 3 . 2 の代替ヒト化は、生殖系列遺伝子 D P - 7 7 および B 1 に基づく。D P - 7 7 の予想アミノ酸配列、c h 1 3 . 2 の可変重鎖アミノ酸配列および完全ヒト化 m A b 1 3 . 2 抗体 ( h 1 3 . 2 v 3 ) の重鎖アミノ酸配列の間のアラインメントを図 2 7 に示す。B 1 の予想アミノ酸配列、c h 1 3 . 2 の可変軽鎖アミノ酸配列および h 1 3 . 2 v 3 の可変軽鎖アミノ酸配列の間のアラインメントを図 2 8 に示す。D P - 7 7 および B 1 の予想アミノ酸配列は、それぞれ m A b 1 3 . 2 の可変重鎖と 8 0 . 4 % のアミノ酸同一性を、m A b 1 3 . 2 の可変軽鎖と 7 7 . 5 % のアミノ酸同一性を示した。D P - 7 7 と m A b 1 3 . 2 の重鎖 ( その上に c h 1 3 . 2 の重鎖 ) の間および B 1 と m A b 1 3 . 2 の軽鎖 ( その上に c h 1 3 . 2 の軽鎖 ) の間のアミノ酸差は、フレームワーク領域と相補性決定領域の両方に見い出されたが、C D R における差は、未変化のままであった。対照的に、重鎖 m A b 1 3 . 2 のフレームワーク領域に見い出されるアミノ酸が、D P - 7 7 の同じ位置におけるアミノ酸と異なった場合、m A b 1 3 . 2 の可変重鎖のアミノ酸を、D P - 7 7 中のアミノ酸に変化させた。同様に、m A b 1 3 . 2 の軽鎖のフレームワーク領域に見い出されるアミノ酸が、B 1 の同じ位置におけるアミノ酸と異なった場合、m A b 1 3 . 2 の可変軽鎖のアミノ酸を、B 1 におけるアミノ酸に変化させた。2 回の P C R 変異誘発は、上記に記載されているように、それらの変化を導入した。重鎖および軽鎖における 1 回目の変化後、実施例 2 に記載されているように E L I S A を行い、変化が、I L - 1 3 と結合する抗体の能力に影響を及ぼさないことを保証した。第 2 回目の変化後、m A b 1 3 . 2 の重鎖および軽鎖内のフレームワーク領域のアミノ酸配列は、それぞれ D P - 7 7 および B 1 のフレームワーク領域のアミノ酸配列と一致した。

#### 【 0 2 8 4 】

ヒト化 m A b 1 3 . 2 抗体、h 1 3 . 2 v 3 も、インビトロで I L - 1 3 関連活性を阻害することができた。h 1 3 . 2 v 3 を、E L I S A および T F 1 増殖アッセイにより試験し、結合して 1 つまたはそれ以上の I L - 1 3 関連活性を阻害するその能力を判定した。h 1 3 . 2 v 3 は、c h 1 3 . 2 および h 1 3 . 2 v 1 と比較した場合、I L - 1 3 との結合について m A b 1 3 . 2 と同様に競合することが立証された。さらに、h 1 3 . 2 v 3 は、m A b 1 3 . 2 および h 1 3 . 2 v と同程度に T F 1 増殖を阻害することができた。

#### 【 0 2 8 5 】

##### 実施例 5

h 1 3 . 2 v 2 の野生型 F c 復帰変異体により仲介されるエフェクター活性

I L - 1 3 R 1 および I L - 4 R ポリペプチドが含まれる I L - 1 3 受容体の細胞

シグナル伝達形態は、サイトカインに反応する細胞タイプの表面上に見い出される。IL-13R<sub>2</sub>は、IL-13応答性細胞の表面上には通常発現されないが、脳、頭部および頸部の腫瘍で報告されている(Kawakami他(2003)Clin. Cancer Res. 9:6381-8; Mintz他(2002)Neoplasia 4:388-99; Liu他(2000)Cancer Immunol. Immunother. 49:319-24)。また、IL-13R<sub>2</sub>発現は、IFNで処理した初代ヒト単球(Daines他(2002)J. Biol. Chem. 277:10387-93)またはTNFまたはIL-13で処理した初代ヒト線維芽細胞(Yoshikawa他(2003)Biochem. Biophys. Res. Commun. 312:1248-55)上で誘発されることがある。この受容体は、IL-13に対するシグナル伝達応答を仲介する能力はないが(Kawakami他(2001)Blood 97:2673-9)、代わりに、おとり受容体としての役割を果たし、IL-13R<sub>1</sub>との生産的IL-13相互作用に競合するように見える(Feng他(1998)Lab. Invest. 78:591-602)。IL-13R<sub>2</sub>は、IL-13に対して高い親和性を有し(Andrews他(2002)J. Biol. Chem. 277:46073-8)、h13.2v2結合部位が含まれるとは予測されていないサイトカインのC末端領域と主に相互作用するように見える(Madhankumar他(2002)J. Biol. Chem. 277:43194-205)。したがって、h13.2v2が、細胞表面上のIL-13R<sub>2</sub>により捕捉されたIL-13と相互作用するか否かを調べた。A375は、IL-13R<sub>2</sub>を発現するヒトメラノーマ細胞系である。組換えヒトIL-13(3 ng/ml)を、4にて20分間、これらの細胞と接触させた。細胞を洗浄し、ビオチン化h13.2v2の結合について試験した。結果は、IL-13の存在下でこれらの細胞への抗体の用量依存的結合を示し、IL-13に結合しているh13.2v2は、その受容体に結合していることを示している(図33)。

#### 【0286】

h13.2v2が、Fc依存的エフェクター機能を促進するか否かを判定するため、h13.2v2の変異Fc残基(L234A/G237A;配列番号17の残基116および119)を野生型に戻し、野生型または変異Fcを発現する抗体を発現させ精製した。エフェクター機能は、標的として、IL-13をロードしたA375細胞を用い、抗体依存性細胞傷害アッセイ(ADCC)で試験した。A375標的細胞をクロミウム51で標識し、10 ng/mlの組換えヒトIL-13と共にインキュベートした。ROSETT ESEP(登録商標)Human NK Enrichment Cocktail(StemCell Technologies、Seattle、WA)の処理によりナチュラルキラー(NK)細胞を富化させたヒトPBMCをエフェクターとして使用した。エフェクターと標的細胞と一緒に、漸増濃度のh13.2v2またはその野生型Fc復帰変異体の存在下で37にて5時間インキュベートした。細胞傷害性は、上清中へのクロミウム51の放出として測定し、TRITON(登録商標)X-100でA375標的細胞を溶解することにより測定される最大放出の百分率として表した。

#### 【0287】

結果は、野生型Fc復帰変異体は、IL-13をロードしたA375標的細胞のADCCを仲介することができるが、h13.2v2は仲介することができないことを示した(図34A)。IL-13の非存在下では、細胞傷害性は観察されなかった(図34B)。同様な結果は、3人の異なるドナー由来のエフェクター細胞を用いても認められた。これらの結果は、L234AおよびG237A Fc変異の存在により、h13.2v2は、たとえ最適なインピトロ条件下であってもADCCを仲介できないことを示している。

#### 【0288】

まとめると、これらの知見は、h13.2v2が、IL-13R<sub>2</sub>を発現する細胞と結合することができるが(図33)、IL-13R<sub>1</sub>を発現する細胞とは結合することができないことを示している。実験を行い、h13.2v2野生型復帰変異体が、たとえ検出可能な結合が存在しなくても、IL-13R<sub>1</sub>を発現するHT-29細胞のADCC

10

20

30

40

50



Cを仲介するか否かを試験した。HT-29細胞を、上記に記載されているように行ったADCCアッセイにおける標的として使用した。結果は、IL-13R<sub>2</sub>を発現するA375細胞の細胞溶解につながる条件下で、IL-13R<sub>1</sub>を発現するHT-29細胞は溶解されないことを示した(図35)。また、これらの結果は、L234AおよびG237A Fc変異が含まれる抗体はADCCを誘導しないが、野生型Fcエフェクター機能を持つ抗体は、IL-13R<sub>2</sub>を発現する特定の癌の治療に有用であることを示している。

【0289】

#### 実施例6

COS細胞におけるヒト化13.2抗体の発現

哺乳類組換え系におけるヒト化抗IL-13抗体の発現を評価するため、マウス13.2(配列番号9および配列番号13)、hu13.2V1(配列番号11および配列番号15)およびhu13.2V2(配列番号12および配列番号16)の可変領域を、ヒトおよびIgG1mut定常領域を含むpED6発現ベクター中にサブクローニングした。サル腎臓COS-1細胞を、10%の熱失活したウシ胎児血清、1mMのグルタミンおよび0.1mg/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを含有するDMEM培地(Gibco)中で生育させた。COS細胞の形質移入は、供給業者により推奨されているプロトコルに従い、TRANSITIT(登録商標)-LT1 Transfection試薬(Mirus Bio Corp., Madison, WI)を用いて行った。形質移入されたCOS細胞を、10%CO<sub>2</sub>の存在下、37℃にて24時間インキュベートし、無菌PBSで洗浄し、次いで、無血清培地R1CD1(Gibco)中で48時間生育させ、馴化培地における抗体の分泌およびその蓄積を可能にした。13.2抗体の発現は、標準品として精製されたヒトIgG1/抗体を用いる全ヒトIgG ELISAにより定量化した。キメラ13.2抗体ならびに両方のヒト化バージョンは、COS細胞において十分に発現した。

【0290】

表5. COS細胞におけるヒト化13.2抗体の一過性発現

【表5】

N	構築物	発現 μg/ml、48時間
1	キメラ13.2	14.5
2	部分ヒト化13.2(V1)	13.2
3	完全ヒト化13.2.2 (V2)	14.9

【図面の簡単な説明】

【0291】

【図1】ヒトIL-13と結合するmAb13.2の速度パラメーターを示す図である。

【図2】IL-13と結合するmAb13.2の速度パラメーターを示す図である。

【図3】モノクローナル抗体mAb13.2は、天然ヒトIL-13と結合することを示す図である。

【図4】モノクローナル抗体mAb13.2は、ヒトIL-13のARG変異体と結合し、中和することを示す図である。

【図5】モノクローナル抗体mAb13.2は、可溶性IL-13受容体のIC<sub>50</sub>に匹敵するIC<sub>50</sub>でヒトIL-13の生物活性を阻害することを示す図である。

【図6】モノクローナル抗体mAb13.2は、正常なヒト単球上で、IL-13仲介性CD23発現を阻害するが、IL-4仲介性CD23発現は阻害しないことを示す図である。

【図7】モノクローナル抗体mAb13.2は、ヒトB細胞によるIL-13依存性IgE産生を阻害することを示す図である。

【図8】モノクローナル抗体mAb13.2は、ヒト上皮細胞によるIL-13仲介性STAT6リン酸化を阻害することを示す図である。

【図9】モノクローナル抗体mAb13.2は、インビボで回虫属(Ascaris)誘発性肺好酸球増加症を予防することを示す図である。

【図10】mAb13.2 FabフラグメントのヒトIL-13との共結晶構造を示す図である。

【図11】mAb13.2 接触部位を示すヒトIL-13配列分析を示す図である。

【図12】mAb13.2のFabフラグメントは、ヒトIL-13と結合することを示す図である。

【図13】mAb13.2のFabフラグメントは、ヒト単球によるIL-13仲介性TF1増殖およびIL-13仲介性CD23発現を中和することを示す図である。

【図14】マウスモノクローナル抗体mAb13.2のキメラバージョン(ch13.2)は、IL-13と結合して中和することを示す図である。

【図15】ヒトDP-54生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の部分ヒト化バージョン(h13.2v1)の可変重(VH)鎖アミノ酸配列との比較を示す図である。

【図16】ヒトDPK9生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の部分ヒト化バージョン(h13.2v1)の可変軽(VL)鎖アミノ酸配列との比較を示す図である。

【図17】ヒトDP-54生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v2)の可変重(VH)鎖アミノ酸配列との比較を示す図である。

【図18】ヒトDPK9生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の部分ヒト化バージョン(h13.2v2)の可変軽(VL)鎖アミノ酸配列との比較を示す図である。

【図19】完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、IL-13に対して完全な結合活性を保持することを示す図である。

【図20】キメラmAb13.2(ch13.2)、部分ヒト化mAb13.2(h13.2v1)および完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、IL-13仲介性CD23発現およびSTAT6のIL-13仲介性リン酸化を中和することができることを示す図である。

【図21】ヒトIL-13仲介性CD23発現を中和する完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)の能力は、同じことをするmAb13.2の能力に匹敵することを示す図である。

【図22】非ヒト霊長類またはヒツジIL-13仲介性CD23発現を中和する完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)の能力は、同じことをするmAb13.2の能力に匹敵することを示す図である。

【図23】完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、ヒツジにおける遅発相気管支収縮を低減することを示す図である。

【図24】完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、ヒツジにおける気道過反応性を予防することを示す図である。

【図25】完全ヒト化mAb13.2(h13.2v2)は、非ヒト霊長類における抗原誘発性肺炎症を予防することを示す図である。

【図26】mAb13.2のヒト化は、V-BASEのVH Group3における他のヒト生殖系列遺伝子との配列相同性を基にすることができることを示す図である。

【図27】ヒトDP-77生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)の可変重(VH)鎖アミノ酸配列との比較を示す図である。

【図28】ヒトB1生殖系列遺伝子とmAb13.2のキメラバージョンおよびmAb13.2の完全ヒト化バージョン(h13.2v3)の可変軽(VL)鎖アミノ酸配列との

10

20

30

40

50

比較を示す図である。

【図29】様々なスキームによるモノクローナル抗体mAb13.2の可変重鎖アミノ酸配列における各残基についての番号構成を示す図である。

【図30】様々なスキームによるモノクローナル抗体mAb13.2の可変軽鎖アミノ酸配列における各残基についての番号構成を示す図である。

【図31】回虫(Ascaris)チャレンジ後8週目の回虫(Ascaris)特異的IgEの力価は、抗ヒトIL-13抗体(h13.2v2)により処置されたカニクイザルにおいて減少したことを示す図である。

【図32】抗IL-13抗体(h13.2v2)は、インビボのアレルゲンチャレンジの後で起こる好塩基球感受性の上昇を予防したことを示す図である。

【図33】IL-13をロードしたA375細胞とのビオンチン化h13.2v2の結合を示す図である。

【図34】h13.2v2の野生型Fc復帰変異体は、IL-13の存在下でADCCを仲介することを示す図である。

【図35】h13.2v2の野生型Fc復帰変異体は、IL-13R2を発現するA375細胞のADCCを仲介するが、IL-13R1を発現するHT-29細胞のADCCは仲介しないことを示す図である。

10

【図1】

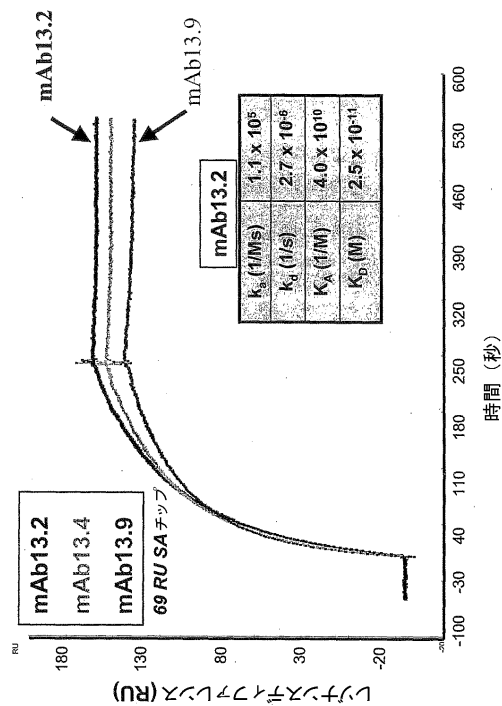


Figure 1

【図2】

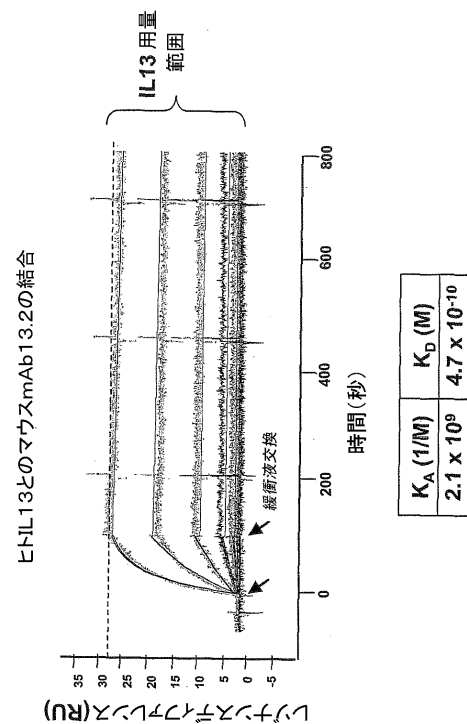


Figure 2

【図3】

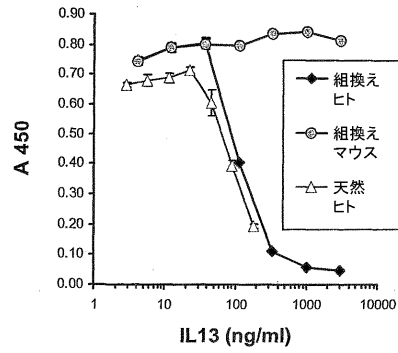


Figure 3

【図4】

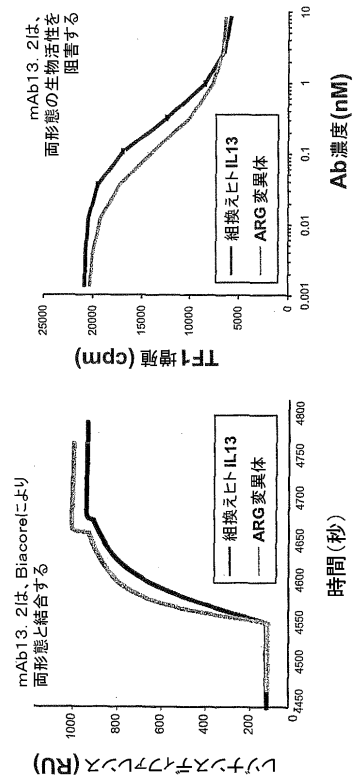


Figure 4B

Figure 4A

【図5】

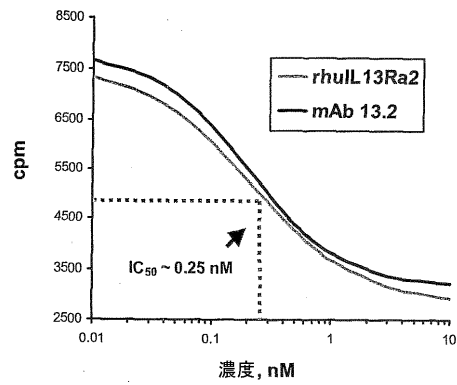


Figure 5

【図6】

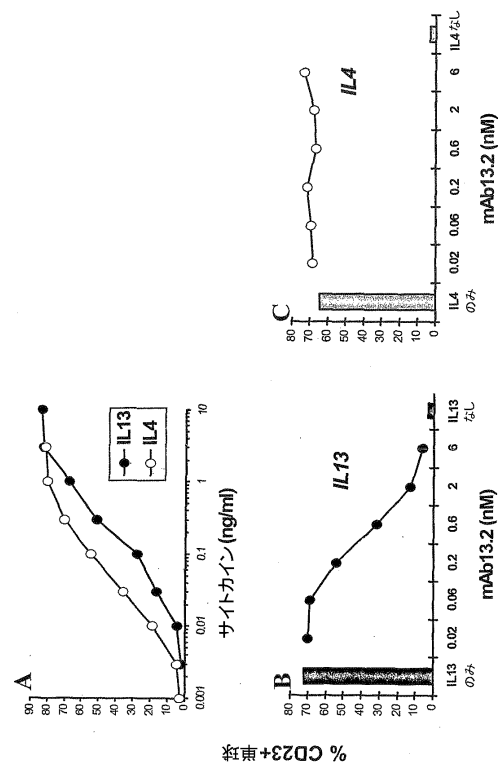


Figure 6

【図 7】

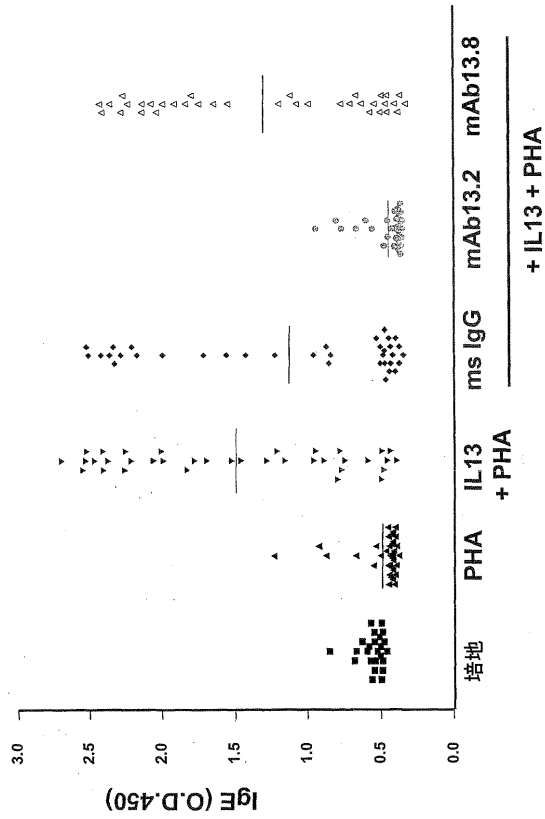


Figure 7

【図 8】

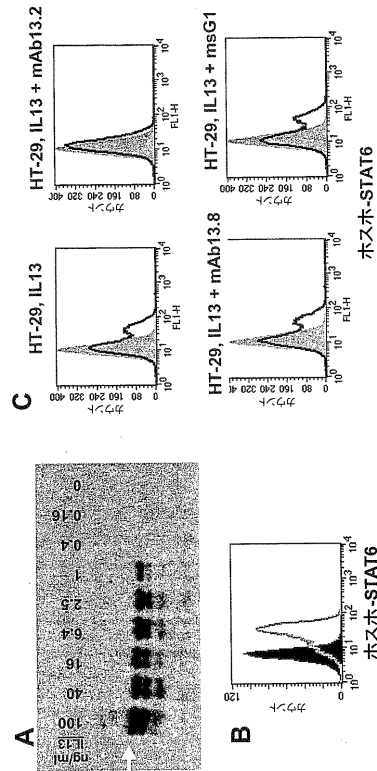


Figure 8

【図 9】

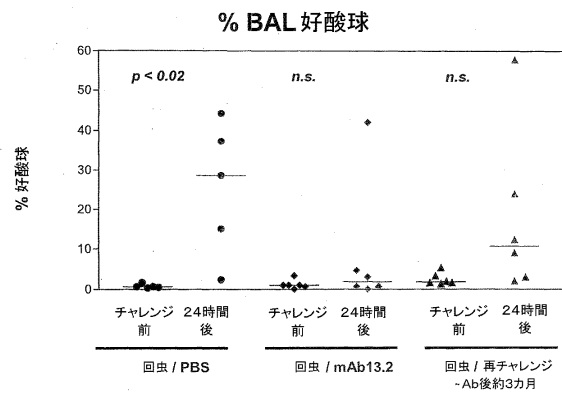


Figure 9

【図 10】

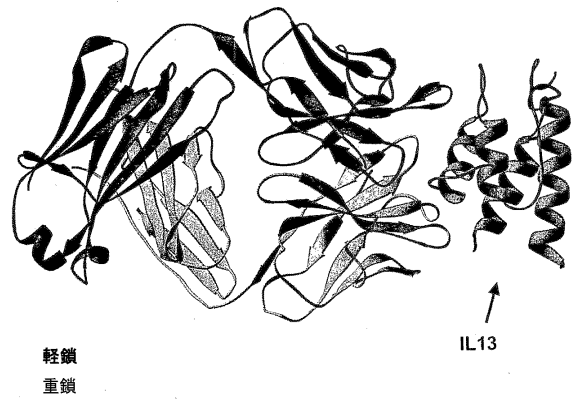


Figure 10

【図 1 1】

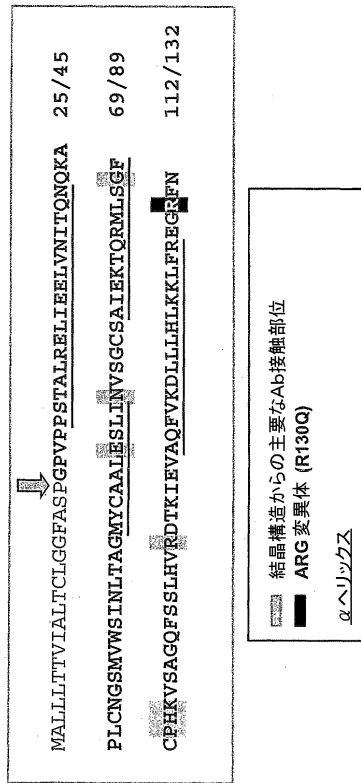


Figure 11

【図 1 2】

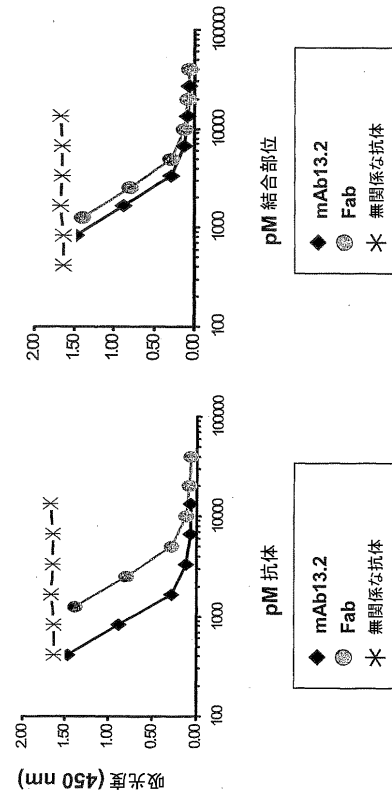


Figure 12A

Figure 12B

【図 1 3】

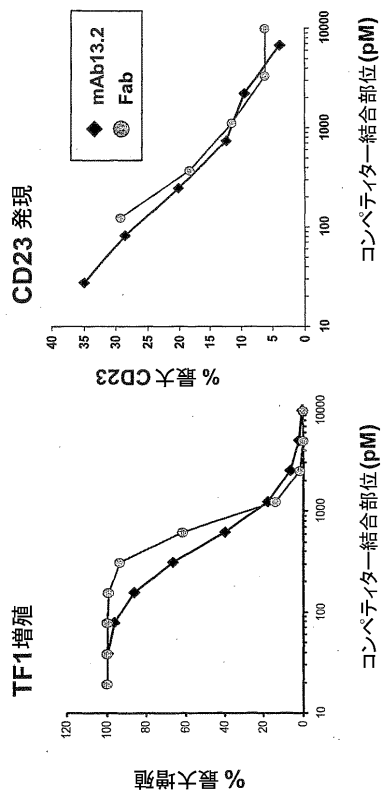


Figure 13A

Figure 13B

【図 1 4】

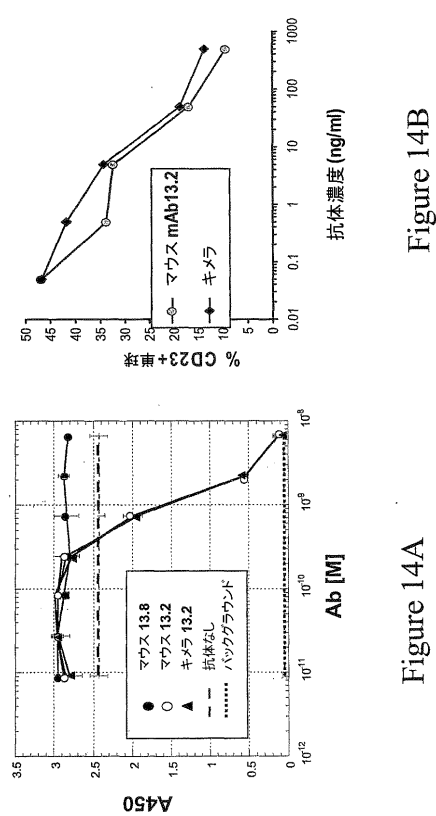


Figure 14A

Figure 14B

【 図 1 5 】

DP-54 hu ger マウス13.2 h13.2v1	CDR1		EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVROA PKGLEWVAN EVKLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMS <del>WVRQ</del> <del>PKGLEWVAS</del> EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMS <del>WVRQ</del> <del>PKGLEWVAS</del>
	CDR2		IKQDSEKYY VDSVKGRFTI SRD <del>NAKNSLY</del> LQ <del>NSLRAED</del> TAVYICARV. I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRD <del>NAKNSLY</del> LQ <del>NSLRAED</del> TAVYICARLD I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRD <del>NAKNSLY</del> LQ <del>NSLRAED</del> TAVYICARLD
	CDR3		RRGGDS.WG QGTLVTVSS GYIFGFA <del>YWG</del> QGTLVTVSS GYIFGFA <del>YWG</del> QGTLVTVSS

\*アミノ酸変化  
未変化

Figure 15

【 図 1 6 】

DPK9 hu ger マウス13.2 h13.2v1	CDR1		DIOMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSIS SY...LNWY QOKPGKAPKL DI <del>VL</del> TQSPSS IAVS <del>LCQ</del> AT <del>ICK</del> ASEVD NYGKSLMH <del>WY</del> QOKP <del>Q</del> SPKL DIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASEVD NYGKSLMH <del>WY</del> QOKPGKAPKL
	CDR2		LIY <del>AA</del> SSLQS GVP <del>S</del> RFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFATY YCOOSYSTLL LIYRASNL <del>ES</del> GVP <del>S</del> RFSGSG SRTDFTLTIN PVEAD <del>I</del> VATY YCOOSNEDPW LIYRASNL <del>ES</del> GVP <del>S</del> RFSGSG SRTDFTLTIS SLOPEDFATY YCOOSNEDPW
	CDR3		TFGGGTKVEI K TFGGGTK <del>VEI</del> K TFGGGTKVEI K

\*アミノ酸変化  
未変化

Figure 16

【 図 1 7 】

DP-54 hu ger マウス13.2 h13.2v2	CDR1		EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMSWVROA PKGLEWVAN EVKLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMS <del>WVRQ</del> <del>PKGLEWVAS</del> EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFI SYAMS <del>WVRQ</del> <del>PKGLEWVAS</del>
	CDR2		IKQDSEKYY VDSVKGRFTI SRD <del>NAKNSLY</del> LQ <del>NSLRAED</del> TAVYICARV. I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRD <del>NAKNSLY</del> LQ <del>NSLRAED</del> TAVYICARLD I.SSGGNTYY PDSVKGRFTI SRD <del>NAKNSLY</del> LQ <del>NSLRAED</del> TAVYICARLD
	CDR3		RRGGDS.WG QGTLVTVSS GYIFGFA <del>YWG</del> QGTLVTVSS GYIFGFA <del>YWG</del> QGTLVTVSS

\*アミノ酸変化  
未変化

Figure 17

【 図 1 8 】

DPK9 hu ger マウス13.2 h13.2v2	CDR1		DIOMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQSIS SY...LNWY QOKPGKAPKL DI <del>VL</del> TQSPSS IAVS <del>LCQ</del> AT <del>ICK</del> ASEVD NYGKSLMH <del>WY</del> QOKP <del>Q</del> SPKL DIOMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASEVD NYGKSLMH <del>WY</del> QOKPGKAPKL
	CDR2		LIY <del>AA</del> SSLQS GVP <del>S</del> RFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFATY YCOOSYSTLL LIYRASNL <del>ES</del> GVP <del>S</del> RFSGSG SRTDFTLTIN PVEAD <del>I</del> VATY YCOOSNEDPW LIYRASNL <del>ES</del> GVP <del>S</del> RFSGSG SGTDFTLTIS SLOPEDFATY YCOOSNEDPW
	CDR3		TFGGGTKVEI K TFGGGTK <del>VEI</del> K TFGGGTKVEI K

\*アミノ酸変化  
未変化

Figure 18

【図19A】

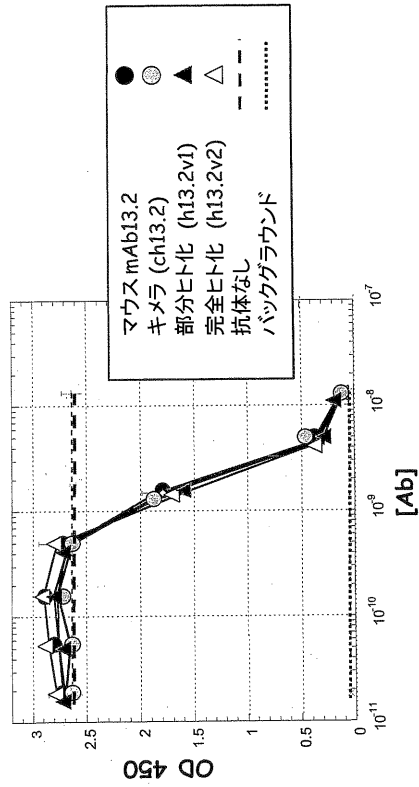


Figure 19A

【図19B】

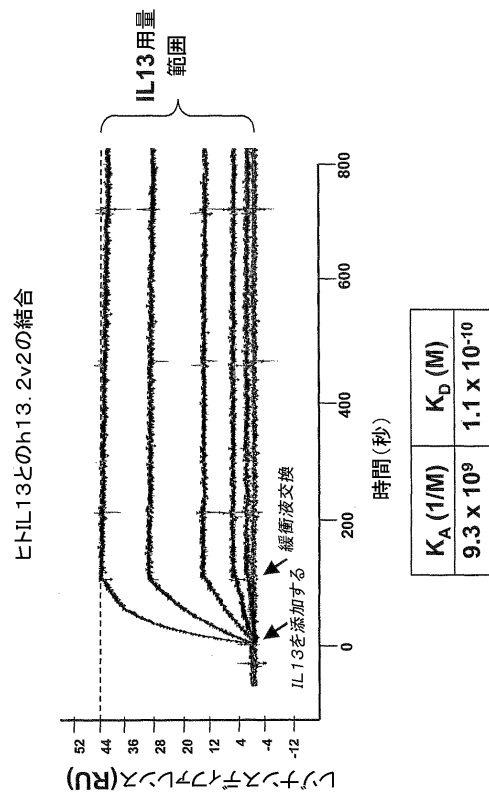


Figure 19B

【図20】

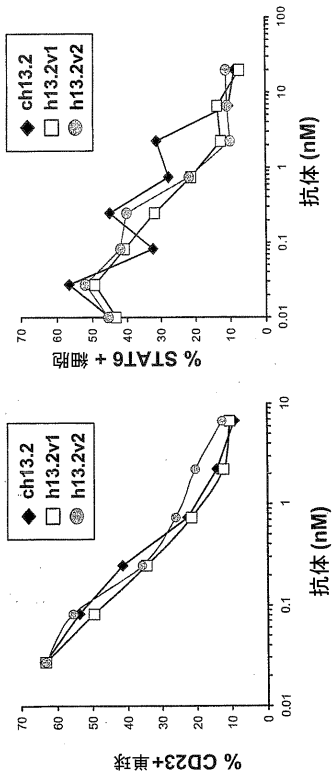


Figure 20B

Figure 20A

【図21】

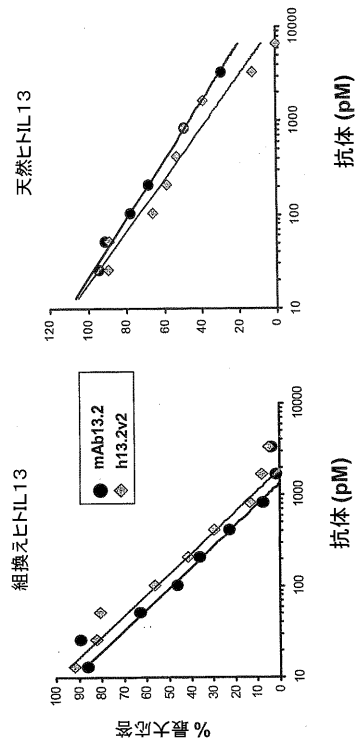


Figure 21B

Figure 21A



【図 22】

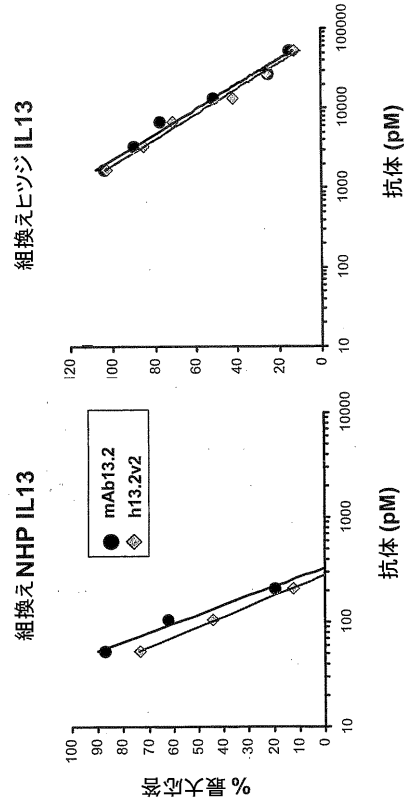


Figure 22B

Figure 22A

【図 23】

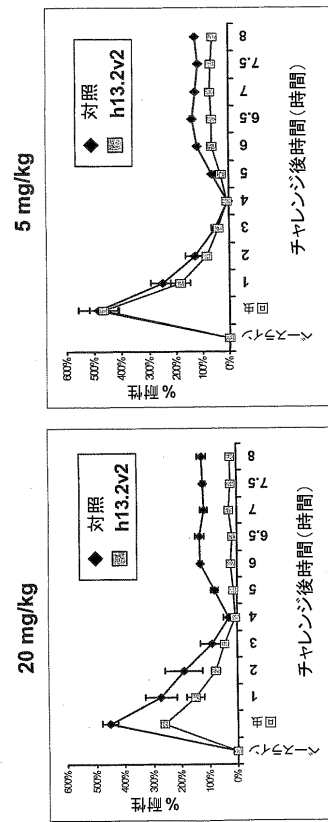


Figure 23B

Figure 23A

【図 24】

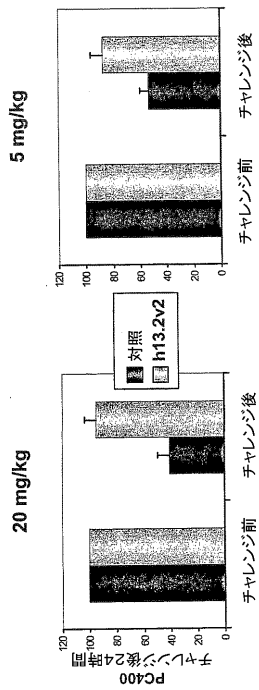


Figure 24B

Figure 24A

【図 25】

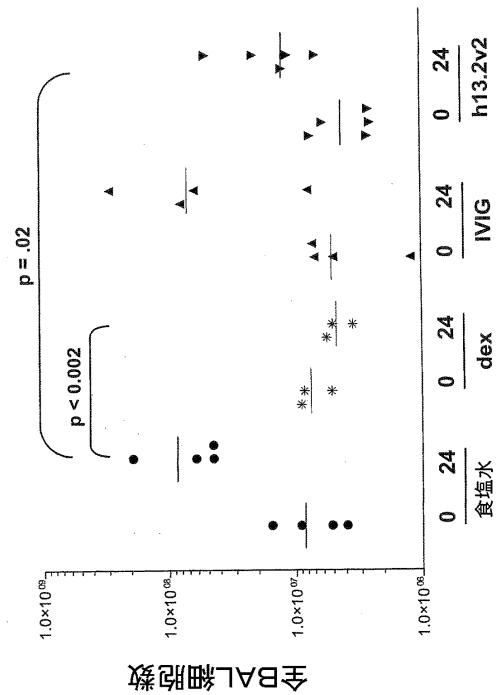


Figure 25

【 図 2 6 】

[illegible]

Figure 26

【圖 27】

[illegible]

Figure 27

【 図 2 8 】

CDR1

DIVLTQSPAS LAVSFGQ<sup>1</sup>Q<sup>2</sup>RAT ITT<sup>1</sup>CRASESVS FLIGINLIHWY QOKPGQ<sup>1</sup>PPKL  
DIVLTQSPAS LAVSFGQ<sup>1</sup>Q<sup>2</sup>RAT ITT<sup>1</sup>CRASESV<sup>2</sup> NYGKSLIMHWY QOKPGQ<sup>1</sup>PPKL  
DIVLTQSPAS LAVSFGQ<sup>1</sup>Q<sup>2</sup>RAT ITT<sup>1</sup>CRASESV<sup>2</sup> NYGKSLIMHWY QOKPGQ<sup>1</sup>PPKL

CDR3

CDR2

LIVYQASNKDT  
LIVYQASNKLES  
LIVYQASNKLES

GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEADTANY YCLOSKNFPP  
GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEADTANY YQOQSNEDPW  
GVPARFSGSG SGTDFTLTIN PVEADTANY YQOQSNEDPW

B1 hu ger  
マウス13.2  
hi13.2v3

B1 hu ger  
マウス13.2  
hi13.2v3

Figure 28

【圖 29】

英基	直線配列番号	Chotia構造番号	英基	直線配列番号	Chotia構造番号	英基	直線配列番号	Chotia構造番号	英基	直線配列番号	Chotia構造番号
M	1	1	A	33	33	R	97	94	L	98	95
V	2	2	M	34	34	D	98	96	G	100	97
K	3	3	S	35	35	L	98	96	Y	101	98
L	4	4	V	36	36	G	100	97	Y	102	99
V	5	5	W	37	37	F	103	100	G	104	100A
B	6	6	R	38	38	G	104	100A	F	105	100B
S	7	7	Q	39	39	F	106	101	Y	107	102
G	8	8	T	40	40	W	108	103	G	109	104
G	9	9	P	41	41	Q	110	105	G	111	106
G	10	10	E	42	42	T	112	107	T	113	108
L	11	11	K	43	43	T	113	108	V	114	109
V	12	12	R	44	44	T	115	110	V	116	111
K	13	13	L	45	45	S	117	112	S	118	113
P	14	14	B	46	46	S	118	113			
G	15	15	W	47	47						
G	16	16	V	48	48						
S	17	17	A	49	49						
L	18	18	S	50	50						
K	19	19	I	51	51						
L	20	20	S	52	52						
S	21	21	S	53	53						
C	22	22	G	54	54						
A	23	23	G	55	55						
A	24	24	N	56	56						
S	25	25	T	57	57						
G	26	26	Y	58	58						
F	27	27	Y	59	59						
T	28	28	P	60	60						
F	29	29	D	61	61						
I	30	30	S	62	62						
S	31	31	V	63	63						
Y	32	32	K	64	64						

様々なスキームによるmAb13. 2可変重鎖のナンバリング  
Figure 29

【図 30】

残基	直線配列番号	Chothia構造番号	Kabat配列番号	残基	直線配列番号	Chothia構造番号	Kabat配列番号
D	1	1	1	K	33	30C	29
H	2	2	2	K	34	30D	30
V	3	3	3	S	35	31	31
L	4	4	4	L	36	32	32
T	5	5	5	K	37	33	33
Q	6	6	6	H	38	34	34
S	7	7	7	W	39	35	35
P	8	8	8	Y	40	36	36
A	9	9	9	Q	41	37	37
S	10	10	10	Q	42	38	38
L	11	11	11	K	43	39	39
A	12	12	12	P	44	40	40
V	13	13	13	G	45	41	41
S	14	14	14	Q	46	42	42
L	15	15	15	S	47	43	43
Q	16	16	16	P	48	44	44
G	17	17	17	K	49	45	45
R	18	18	18	L	50	46	46
A	19	19	19	L	51	47	47
T	20	20	20	H	52	48	48
I	21	21	21	Y	53	49	49
S	22	22	22	R	54	50	50
C	23	23	23	A	55	51	51
K	24	24	24	S	56	52	52
A	25	25	25	N	57	53	53
S	26	26	26	L	58	54	54
E	27	27	27	E	59	55	55
S	28	28	28	S	60	56	56
V	29	29	29	G	61	57	57
D	30	30	30	I	62	58	58
N	31	30A	27D	P	63	59	59
Y	32	30B	28	A	64	60	60

残基	直線配列番号	Chothia構造番号	Kabat配列番号
M	65	61	61
W	66	62	62
G	67	63	63
G	68	64	64
S	69	65	65
G	70	66	66
S	71	67	67
R	72	68	68
T	73	69	69
D	74	70	70
F	75	71	71
T	76	72	72
L	77	73	73
T	78	74	74
I	79	75	75
N	80	76	76
P	81	77	77
V	82	78	78
E	83	79	79
A	84	80	80
D	85	81	81
D	86	82	82
V	87	83	83
A	88	84	84
T	89	85	85
Y	90	86	86
Y	91	87	87
C	92	88	88
Q	93	89	89
Q	94	90	90
S	95	91	91
N	96	92	92

様々なスキームによるmAb13、2可変領域のナンバリング  
Figure 30

【図 31】

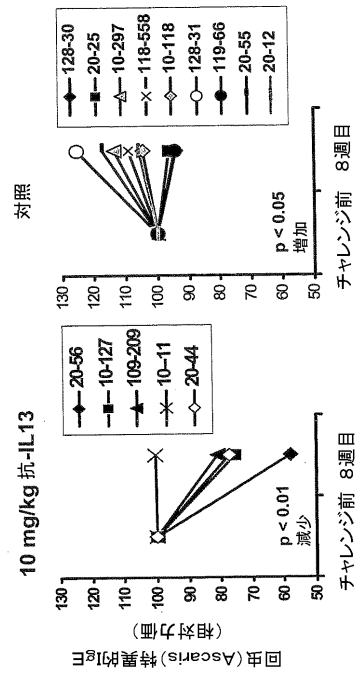


Figure 31A

Figure 31B

【図 32A】

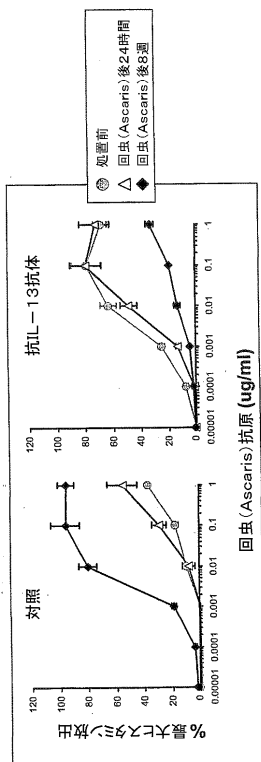


Figure 32A

【図 32B】

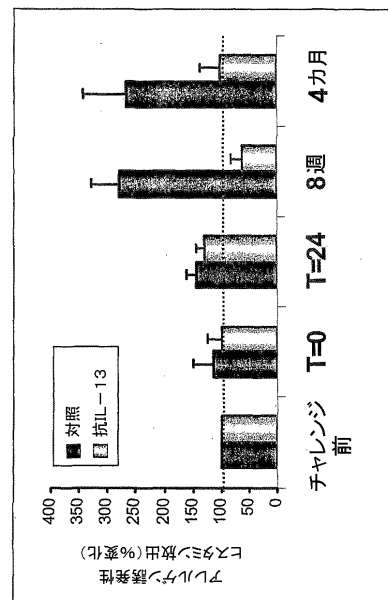


Figure 32B

【図 3 3】

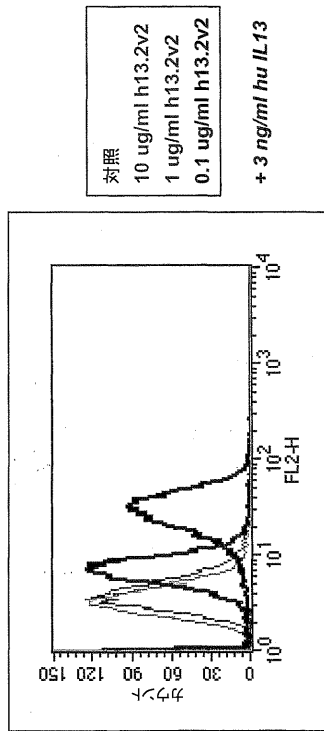


Figure 33

【図 3 4】

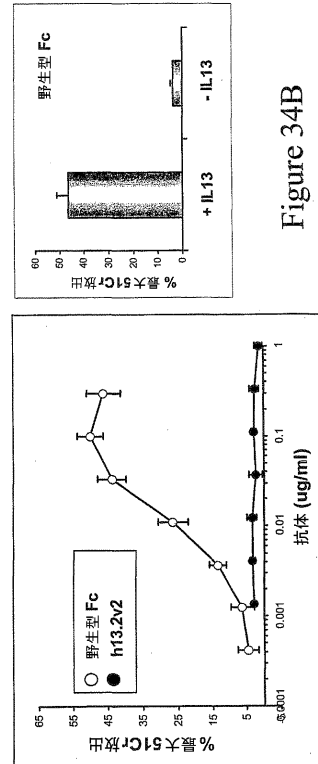


Figure 34A

Figure 34B

【図 3 5】

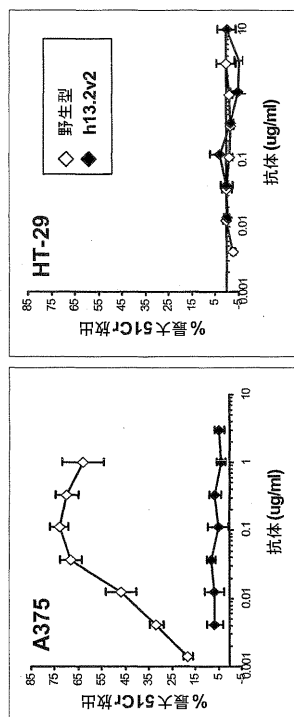


Figure 35A

Figure 35B

【配列表】

0004970258000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 0 7 K 16/24	(2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	P

(31)優先権主張番号 60/581,375

(32)優先日 平成16年6月22日(2004.6.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100174447

弁理士 龍田 美幸

(72)発明者 マリオン・ティ・カサイアン

アメリカ合衆国 0 2 1 2 9 マサチューセッツ州チャールズタウン、ナンバー 1、コンコード・ストリート 1 8 番

(72)発明者 リュードミラ・チスティアコワ

アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、アボット・ブリッジ・ドライブ 1 9 番

(72)発明者 ヘールトライダ・エム・フェルトマン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 6 マサチューセッツ州サドベリー、ウッドミア・ドライブ 6 0 番

(72)発明者 キンバリー・アン・マーケット

アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州サマービル、アパートメント 1、スプリングフィールド・ストリート 6 6 番

(72)発明者 シャン・ヤン・タン

アメリカ合衆国 0 1 8 6 7 マサチューセッツ州レディング、ガゼボ・サークル 8 1 1 番

(72)発明者 デブラ・ディ・ドナルドソン

アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州メドフォード、ブレイクリー・ロード 1 0 8 番

(72)発明者 ローラ・ロング・リン

アメリカ合衆国 0 2 4 9 3 マサチューセッツ州ウェストン、ゴールデン・ボール・ロード 5 0 番

(72)発明者 タニア・シェーン

アメリカ合衆国 0 2 4 6 1 マサチューセッツ州ニュートン、ウィンチェスター・ストリート 3 3 2 番

(72)発明者 エイミー・セプイ・タム

アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州メドフォード、スタージス・ストリート 2 9 番

(72)発明者 エリク・フェイファン

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州レキシントン、ケンドール・ロード 4 1 番

(72)発明者 ナンシー・エル・ウッド

アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州サマービル、アサートン・ストリート 1 8 7 番

(72)発明者 ロリ・ジェイ・フィッツ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 4 マサチューセッツ州サマービル、ナンバー 2、コンウェル・アベニュー

54番

(72)発明者 アンジェラ・エム・ウィダム

アメリカ合衆国01720マサチューセッツ州アクトン、チェロキー・ロード19番

(72)発明者 ケビン・ディ・パリス

アメリカ合衆国02466マサチューセッツ州オーバーンデイル、ウッドバイン・ストリート112番

(72)発明者 サミュエル・ジェイ・ゴールドマン

アメリカ合衆国01720マサチューセッツ州アクトン、モーホーク・ドライブ9番

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第03/035847(WO, A1)

国際公開第2004/019975(WO, A1)

米国特許第05596072(US, A)

J. Immunol., 165(2000) p.4505-4514

J. Immunol., 166(2001) p.5219-5224

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

专利名称(译)	针对人白细胞介素-13的抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP4970258B2</a>	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	JP2007527694	申请日	2005-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
当前申请(专利权)人(译)	魏斯, LLC		
[标]发明人	マリオンティカサイアン リュードミラチスティアコワ ヘールトライダエムフェルトマン キンバリーアンマーケット シャンヤンタン デブラディドナルドソン ローラロングリン タニアシェーン エイミーセプイタム エリクフェイファン ナンシーエルウッド ロリジェイフィッツ アンジェラエムウィダム ケビンディパリス サミュエルジェイゴールドマン		
发明人	マリオン・ティ・カサイアン リュードミラ・チスティアコワ ヘールトライダ・エム・フェルトマン キンバリー・アン・マーケット シャン・ヤン・タン デブラ・ディ・ドナルドソン ローラ・ロング・リン タニア・シェーン エイミー・セプイ・タム エリク・フェイファン ナンシー・エル・ウッド ロリ・ジェイ・フィッツ アンジェラ・エム・ウィダム ケビン・ディ・パリス サミュエル・ジェイ・ゴールドマン		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P11/06 A61P17/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/08 A61P37/00 A61P35/00 A61P31/12 C07K16/24 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 C07K16/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P11/08 A61P17/00 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C07K16/244 C07K2299/00 C07K2317/24 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA A61K39/395.U A61P11/06 A61P17/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/08 A61P37/00 A61P35/00 A61P31/12 C07K16/24 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/53.P		



代理人(译)	枸杞庆喜 宫泽顺子 四本 能尚 佐藤 真纪
优先权	60/578473 2004-06-09 US 60/578736 2004-06-09 US 60/581375 2004-06-22 US
其他公开文献	JP2008502366A JP2008502366A5
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>

摘要(译)

本申请涉及结合白细胞介素-13 ( IL-13 )，特别是人IL-13的抗体，例如人源化抗体及其抗原结合片段，以及它们在调节由IL-介导的免疫应答中的用途。13。本文公开的抗体可用于诊断，预防和/或治疗受试者，例如人类患者，一种或多种IL-13相关病症，例如呼吸病症 ( 例如哮喘 ) ;特异性疾病 ( 如过敏性鼻炎 ) ;皮肤炎症和/或自身免疫疾病 ( 例如特应性皮炎 ) 和胃肠器官 ( 例如炎症肠病 ( IBD ) )，以及纤维化和癌性疾病。

	mAb13.2	ch13.2	h13.2v1	h13.2v2	h13.2v3
VL领域	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4	配列番号33
VH领域	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8	配列番号34