

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-502224

(P2010-502224A)

(43) 公表日 平成22年1月28日 (2010.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 130 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-527451 (P2009-527451)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成19年9月7日 (2007.9.7)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成21年4月27日 (2009.4.27)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/019660		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(87) 国際公開番号	W02008/127271		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開日	平成20年10月23日 (2008.10.23)		O
(31) 優先権主張番号	60/843, 249	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成18年9月8日 (2006.9.8)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋
		(74) 代理人	100119253
			弁理士 金山 賢教
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インターロイキン13結合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、IL - 13 結合タンパク質を包含する。具体的には、本発明は、キメラ、CDR グラフト及びヒト化抗体である、抗体に関する。好ましい抗体は、h IL - 13 に対して高い親和性を有し、h IL - 13 活性をインビトロ及び生体内で中和する。本発明の抗体は、完全長抗体又はその抗原結合性部分であり得る。本発明の抗体を製造する方法、及び本発明の抗体を使用する方法も提供する。本発明の抗体又は抗体部分は、例えば h T L - 13 活性が有害である障害に罹患したヒト対象における、h IL - 13 の検出、及び h IL - 13 活性の阻害に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

結合タンパク質が I L - 1 3 に結合可能であり、抗原結合ドメインが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 個の C D R を含む、抗原結合ドメインを含む結合タンパク質。

C D R - H 1 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 6 4) (式中、

X_1 は、T、D、G 又は S であり、

X_2 は S であり、

X_3 は D であり、

X_4 は、M、S、Y、L 又は H であり、

X_5 は、G、W、Y、A、S 又は N であり、

X_6 は、V、I 又は M であり、

X_7 は、D、H、S、Y、N 又は G である。)、

C D R - H 2 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号 6 5) (式中、

X_1 は、M、E、H、R、S、G 又は L であり、

X_2 は、I であり、又は存在せず、

X_3 は、H、Y、A、D、S 又は W であり、

X_4 は、P、S、W 又は G であり、

X_5 は、S、G、E 又は D であり、

X_6 は、D、G、S、E 又は N であり、

X_7 は、S、Y 又は G であり、

X_8 は、E、N、Y、V 又は R であり、

X_9 は、T、I 又は K であり、

X_{10} は、R、Y、I、D 又は A であり、

X_{11} は、L、Y、D 又は F であり、

X_{12} は、N、P、S 又は D であり、

X_{13} は、Q、E、D、P 又は S であり、

X_{14} は、K、M、S、T、A 又は V であり、

X_{15} は、F、L、V 又は M であり、

X_{16} は、K、R 又は Q であり、

X_{17} は、D、G 又は S である。)、

C D R - H 3 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号 6 6) (式中、

X_1 は、W、T、G、Y、D 又は I であり、

X_2 は、R、A、S、G 又は V であり、

X_3 は、T、F、Y 又は S であり、

X_4 は、S、T 又は Y であり、

X_5 は、Y、F 又は G であり、

X_6 は、F 又は Y であり、

X_7 は、S、Y、I 又は F であり、

X_8 は、D、L、Y 又は P であり、

X_9 は Y であり、

X_{10} は G であり、

X_{11} は、Y、A、P 又は E であり、

X_{12} は、F、M、S、L 又は I であり、

X_{13} は、D、V、N 又は K であり、

X_{14} は、Y 又は F である。)、

C D R - L 1 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} -$

10

20

30

40

50

$X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} \quad X_{16} - X_{17}$ (配列番号 67) (式中、

X_1 は、K 又は R であり、

X_2 は、S 又は A であり、

X_3 は、S 又は T であり、

X_4 は、Q、K 又は I であり、

X_5 は、N、S、T、G 又は E であり、

X_6 は、L、T 又は S であり、

X_7 は、L、Q 又は V であり、

X_8 は、Y、N、H、D 又は T であり、

X_9 は、S、I 又は T であり、

10

X_{10} は、S、D、N、H 又は Y であり、

X_{11} は、N 又は G であり、

X_{12} は Q であり、

X_{13} は、K、F、N、E 又は S であり、

X_{14} は、N、T 又は S であり、

X_{15} は、Y 又は F であり、

X_{16} は、L、A 又は M であり、

X_{17} は、A、D、E、H 又は N である。)、

C D R - L 2 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 68) (式中

20

X_1 は、L、S、K、T、W 又は Y であり、

X_2 は、V、T 又は A であり、

X_3 は、S 又は N であり、

X_4 は、N、K、T、M 又は R であり、

X_5 は、R、K 又は L であり、

X_6 は、F、D、E、H、P 又は A であり、

X_7 は、S、R 又は P である。)、及び

C D R - L 3 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9$ (配列番号

69) (式中、

X_1 は、F、W、Q 又は A であり、

30

X_2 は、Q 又は L であり、

X_3 は、H、G、Y、W 又は N であり、

X_4 は、N、S、T、L 又は Y であり、

X_5 は、Y、T、S、E 又は H であり、

X_6 は、L、V、F、Y、N、G、P 又は D であり、

X_7 は、P 又は H であり、

X_8 は、L、F、Y、W 又は R であり、

X_9 は、T 又は V である。)

【請求項 2】

前記少なくとも 1 個の C D R が、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、
請求項 1 に記載の結合タンパク質。

40

配列番号 32 の残基 31 - 35、

配列番号 32 の残基 50 - 66、

配列番号 32 の残基 99 - 105、

配列番号 33 の残基 24 - 39、

配列番号 33 の残基 55 - 61、

配列番号 33 の残基 94 - 102、

配列番号 34 の残基 31 - 35、

配列番号 34 の残基 50 - 66、

配列番号 34 の残基 99 - 105、

50

配列番号 35 の残基 24 - 39、	
配列番号 35 の残基 55 - 61、	
配列番号 35 の残基 94 - 102、	
配列番号 36 の残基 31 - 35、	
配列番号 36 の残基 50 - 66、	
配列番号 36 の残基 99 - 109、	
配列番号 37 の残基 24 - 39、	
配列番号 37 の残基 55 - 61、	
配列番号 37 の残基 94 - 102、	
配列番号 38 の残基 31 - 35、	10
配列番号 38 の残基 50 - 66、	
配列番号 38 の残基 99 - 109、	
配列番号 39 の残基 31 - 35、	
配列番号 39 の残基 50 - 66、	
配列番号 39 の残基 99 - 112、	
配列番号 40 の残基 24 - 39、	
配列番号 40 の残基 55 - 61、	
配列番号 40 の残基 94 - 102、	
配列番号 41 の残基 31 - 35、	
配列番号 41 の残基 50 - 66、	20
配列番号 41 の残基 99 - 112、	
配列番号 42 の残基 31 - 35、	
配列番号 42 の残基 50 - 66、	
配列番号 42 の残基 99 - 100、	
配列番号 43 の残基 24 - 39、	
配列番号 43 の残基 55 - 61、	
配列番号 43 の残基 94 - 102、	
配列番号 44 の残基 31 - 35、	
配列番号 44 の残基 50 - 65、	
配列番号 44 の残基 98 - 106、	30
配列番号 45 の残基 24 - 40、	
配列番号 45 の残基 56 - 62、	
配列番号 45 の残基 95 - 103、	
配列番号 46 の残基 32 - 38、	
配列番号 46 の残基 52 - 67、	
配列番号 46 の残基 100 - 112、	
配列番号 47 の残基 24 - 34、	
配列番号 47 の残基 50 - 56、	
配列番号 47 の残基 89 - 97、	
配列番号 48 の残基 31 - 37、	40
配列番号 48 の残基 52 - 67、	
配列番号 48 の残基 100 - 112、	
配列番号 49 の残基 24 - 34、	
配列番号 49 の残基 50 - 56、	
配列番号 49 の残基 89 - 97、	
配列番号 50 の残基 31 - 37、	
配列番号 50 の残基 52 - 67、	
配列番号 50 の残基 100 - 112、	
配列番号 51 の残基 24 - 34、	
配列番号 51 の残基 60 - 66、	50

配列番号 5 1 の残基 8 9 - 9 7、
配列番号 5 2 の残基 3 1 - 3 5、
配列番号 5 2 の残基 5 0 - 6 6、
配列番号 5 2 の残基 9 9 - 1 0 7、
配列番号 5 3 の残基 2 3 - 3 6、
配列番号 5 3 の残基 5 2 - 5 8、
配列番号 5 3 の残基 9 1 - 9 9、
配列番号 5 4 の残基 3 1 - 3 5、
配列番号 5 4 の残基 5 0 - 6 5、
配列番号 5 4 の残基 9 8 - 1 0 7、
配列番号 5 5 の残基 2 4 - 3 8、
配列番号 5 5 の残基 5 4 - 6 0、
配列番号 5 5 の残基 9 3 - 1 0 1、
配列番号 5 6 の残基 3 1 - 3 5、
配列番号 5 6 の残基 5 0 - 6 5、
配列番号 5 6 の残基 9 8 - 1 0 7、
配列番号 5 7 の残基 2 4 - 3 8、
配列番号 5 7 の残基 5 4 - 6 0、
配列番号 5 7 の残基 9 3 - 1 0 1、
配列番号 5 8 の残基 3 1 - 3 5、
配列番号 5 8 の残基 5 0 - 6 5、
配列番号 5 8 の残基 9 8 - 1 0 7、
配列番号 5 9 の残基 2 4 - 3 8、
配列番号 5 9 の残基 5 4 - 6 0、
配列番号 5 9 の残基 9 3 - 1 0 1、
配列番号 6 0 の残基 3 1 - 3 5、
配列番号 6 0 の残基 5 0 - 6 5、
配列番号 6 0 の残基 9 8 - 1 0 7、
配列番号 6 1 の残基 2 4 - 3 8、
配列番号 6 1 の残基 5 4 - 6 0、
配列番号 6 1 の残基 9 3 - 1 0 1、
配列番号 6 2 の残基 3 1 - 3 5、
配列番号 6 2 の残基 5 0 - 6 5、
配列番号 6 2 の残基 9 8 - 1 0 7、
配列番号 6 3 の残基 2 4 - 3 8、
配列番号 6 3 の残基 5 4 - 6 0、及び
配列番号 6 3 の残基 9 3 - 1 0 1

10

20

30

40

【請求項 3】

前記結合タンパク質が、少なくとも 3 個の C D R を含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

前記少なくとも 3 個の C D R が、以下からなる可変ドメイン C D R セットから選択される、請求項 3 に記載の結合タンパク質。

【表 25】

VH 25C8 CDRセット	
VH 25C8 CDR-H1	配列番号32の残基31-35
VH 25C8 CDR-H2	配列番号32の残基50-66
VH 25C8 CDR-H3	配列番号32の残基99-105
VL 25C8 CDRセット	
VL 25C8 CDR-L1	配列番号33の残基24-39
VL 25C8 CDR-L2	配列番号33の残基55-61
VL 25C8 CDR-L3	配列番号33の残基94-102
VH 9C11 CDRセット	
VH 9C11 CDR-H1	配列番号34の残基31-35
VH 9C11 CDR-H2	配列番号34の残基50-66
VH 9C11 CDR-H3	配列番号34の残基99-105
VL 9C11 CDRセット	
VL 9C11 CDR-L1	配列番号35の残基24-39
VL 9C11 CDR-L2	配列番号35の残基55-61
VL 9C11 CDR-L3	配列番号35の残基94-102
VH 21D9 CDRセット	
VH 21D9 CDR-H1	配列番号36の残基31-35
VH 21D9 CDR-H2	配列番号36の残基50-66
VH 21D9 CDR-H3	配列番号36の残基99-109
VL 21D9 CDRセット	
VL 21D9 CDR-L1	配列番号37の残基24-39
VL 21D9 CDR-L2	配列番号37の残基55-61
VL 21D9 CDR-L3	配列番号37の残基94-102
VH 22D10 CDRセット	
VH 22D10 CDR-H1	配列番号38の残基31-35
VH 22D10 CDR-H2	配列番号38の残基50-66
VH 22D10 CDR-H3	配列番号38の残基99-109
VL 22D10 CDRセット	
VL 22D10 CDR-L1	配列番号37の残基24-39
VL 22D10 CDR-L2	配列番号37の残基55-61
VL 22D10 CDR-L3	配列番号37の残基94-102
VH 5F1 CDRセット	
VH 5F1 CDR-H1	配列番号39の残基31-35
VH 5F1 CDR-H2	配列番号39の残基50-66
VH 5F1 CDR-H3	配列番号39の残基99-112
VL 5F1 CDRセット	
VL 5F1 CDR-L1	配列番号40の残基24-39
VL 5F1 CDR-L2	配列番号40の残基55-61
VL 5F1 CDR-L3	配列番号40の残基94-102

10

20

30

40

VH 5G1 CDRセット	
VH 5G1 CDR-H1	配列番号41の残基31-35
VH 5G1 CDR-H2	配列番号41の残基50-66
VH 5G1 CDR-H3	配列番号41の残基99-112
VL 5G1 CDRセット	
VL 5G1 CDR-L1	配列番号40の残基24-39
VL 5G1 CDR-L2	配列番号40の残基55-61
VL 5G1 CDR-L3	配列番号40の残基94-102
VH 3H7 CDRセット	
VH 3H7 CDR-H1	配列番号42の残基31-35
VH 3H7 CDR-H2	配列番号42の残基50-66
VH 3H7 CDR-H3	配列番号42の残基99-100
VL 3H7 CDRセット	
VL 3H7 CDR-L1	配列番号43の残基24-39
VL 3H7 CDR-L2	配列番号43の残基55-61
VL 3H7 CDR-L3	配列番号43の残基94-102
VH 14B2 CDRセット	
VH 14B2 CDR-H1	配列番号44の残基31-35
VH 14B2 CDR-H2	配列番号44の残基50-65
VH 14B2 CDR-H3	配列番号44の残基98-106
VL 14B2 CDRセット	
VL 14B2 CDR-L1	配列番号45の残基24-40
VL 14B2 CDR-L2	配列番号45の残基56-62
VL 14B2 CDR-L3	配列番号45の残基95-103
VH 13C5 CDRセット	
VH 13C5 CDR-H1	配列番号46の残基32-38
VH 13C5 CDR-H2	配列番号46の残基52-67
VH 13C5 CDR-H3	配列番号46の残基100-112
VL 13C5 CDRセット	
VL 13C5 CDR-L1	配列番号47の残基24-34
VL 13C5 CDR-L2	配列番号47の残基50-56
VL 13C5 CDR-L3	配列番号47の残基89-97
VH 29G5 CDRセット	
VH 29G5 CDR-H1	配列番号48の残基31-37
VH 29G5 CDR-H2	配列番号48の残基52-67
VH 29G5 CDR-H3	配列番号48の残基100-112
VL 29G5 CDRセット	
VL 29G5 CDR-L1	配列番号49の残基24-34
VL 29G5 CDR-L2	配列番号49の残基50-56
VL 29G5 CDR-L3	配列番号49の残基89-97

10

20

30

40

VH 33C3 CDRセット	
VH 33C3 CDR-H1	配列番号50の残基31-37
VH 33C3 CDR-H2	配列番号50の残基52-67
VH 33C3 CDR-H3	配列番号50の残基100-112
VL 33C3 CDRセット	
VL 33C3 CDR-L1	配列番号51の残基24-34
VL 33C3 CDR-L2	配列番号51の残基60-66
VL 33C3 CDR-L3	配列番号51の残基89-97
VH 4A8 CDRセット	
VH 4A8 CDR-H1	配列番号52の残基31-35
VH 4A8 CDR-H2	配列番号52の残基50-66
VH 4A8 CDR-H3	配列番号52の残基99-107
VL 4A8 CDRセット	
VL 4A8 CDR-L1	配列番号53の残基23-36
VL 4A8 CDR-L2	配列番号53の残基52-58
VL 4A8 CDR-L3	配列番号53の残基91-99
VH 1B6 CDRセット	
VH 1B6 CDR-H1	配列番号54の残基31-35
VH 1B6 CDR-H2	配列番号54の残基50-65
VH 1B6 CDR-H3	配列番号54の残基98-107
VL 1B6 CDRセット	
VL 1B6 CDR-L1	配列番号55の残基24-38
VL 1B6 CDR-L2	配列番号55の残基54-60
VL 1B6 CDR-L3	配列番号55の残基93-101
VH 3E5 CDRセット	
VH 3E5 CDR-H1	配列番号56の残基31-35
VH 3E5 CDR-H2	配列番号56の残基50-65
VH 3E5 CDR-H3	配列番号56の残基98-107
VL 3E5 CDRセット	
VL 3E5 CDR-L1	配列番号57の残基24-38
VL 3E5 CDR-L2	配列番号57の残基54-60
VL 3E5 CDR-L3	配列番号57の残基93-101
VH 6C8 CDRセット	
VH 6C8 CDR-H1	配列番号58の残基31-35
VH 6C8 CDR-H2	配列番号58の残基50-65
VH 6C8 CDR-H3	配列番号58の残基98-107
VL 6C8 CDRセット	
VL 6C8 CDR-L1	配列番号59の残基24-38
VL 6C8 CDR-L2	配列番号59の残基54-60
VL 6C8 CDR-L3	配列番号59の残基93-101

10

20

30

40

VH 5D3 CDRセット	
VH 5D3 CDR-H1	配列番号60の残基31-35
VH 5D3 CDR-H2	配列番号60の残基50-65
VH 5D3 CDR-H3	配列番号60の残基98-107
VL 5D3 CDRセット	
VL 5D3 CDR-L1	配列番号61の残基24-38
VL 5D3 CDR-L2	配列番号61の残基54-60
VL 5D3 CDR-L3	配列番号61の残基93-101
VH 8B6 CDRセット	
VH 8B6 CDR-H1	配列番号62の残基31-35
VH 8B6 CDR-H2	配列番号62の残基50-65
VH 8B6 CDR-H3	配列番号62の残基98-107
VL 8B6 CDRセット	
VL 8B6 CDR-L1	配列番号63の残基24-38
VL 8B6 CDR-L2	配列番号63の残基54-60
VL 8B6 CDR-L3	配列番号63の残基93-101

10

【請求項5】

少なくとも2個の可変ドメインCDRセットを含む、請求項4に記載の結合タンパク質

20

【請求項6】

前記少なくとも2個の可変ドメインCDRセットが、以下からなる群から選択される、請求項5に記載の結合タンパク質。

VH 25C8 CDRセットとVL 25C8 CDRセット、
 VH 9C11 CDRセットとVL 9C11 CDRセット、
 VH 21D9 CDRセットとVL 21D9 CDRセット、
 VH 22D10 CDRセットとVL 22D10 CDRセット、
 VH 5F1 CDRセットとVL 5F1 CDRセット、
 VH 5G1 CDRセットとVL 5G1 CDRセット、
 VH 3H7 CDRセットとVL 3H7 CDRセット、
 VH 14B2 CDRセットとVL 14B2 CDRセット、
 VH 13C5 CDRセットとVL 13C5 CDRセット、
 VH 29G5 CDRセットとVL 29G5 CDRセット、
 VH 33C3 CDRセットとVL 33C3 CDRセット、
 VH 4A8 CDRセットとVL 4A8 CDRセット、
 VH 1B6 CDRセットとVL 1B6 CDRセット、
 VH 3E5 CDRセットとVL 3E5 CDRセット、
 VH 6C8 CDRセットとVL 6C8 CDRセット、
 VH 5D3 CDRセットとVL 5D3 CDRセット、及び
 VH 8B6 CDRセットとVL 8B6 CDRセット

30

40

【請求項7】

ヒト受容体フレームワークを更に含む、請求項6に記載の結合タンパク質。

【請求項8】

前記ヒト受容体フレームワークが、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の結合タンパク質。

配列番号6
 配列番号7
 配列番号8
 配列番号9

50

配列番号 1 0

配列番号 1 1

配列番号 1 2

配列番号 1 3

配列番号 1 4

配列番号 1 5

配列番号 1 6

配列番号 1 7

配列番号 1 8

配列番号 1 9

10

配列番号 2 0

配列番号 2 1

配列番号 2 2

配列番号 2 3

配列番号 2 4

配列番号 2 5

配列番号 2 6

配列番号 2 7

配列番号 2 8

配列番号 2 9

20

配列番号 3 0 及び

配列番号 3 1

【請求項 9】

前記ヒト受容体フレームワークが、少なくとも 1 個のフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、前記フレームワークのアミノ酸配列が、前記ヒト受容体フレームワークの配列と少なくとも 65 % 同一であり、前記ヒト受容体フレームワークと同一である少なくとも 70 個のアミノ酸残基を含む、請求項 7 (又は 9) に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

前記ヒト受容体フレームワークが、重要な残基における少なくとも 1 個のフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、前記重要な残基が、

30

C D R に隣接する残基、

グリコシル化部位残基、

希少残基、

ヒト I L - 1 3 と相互作用可能な残基、

C D R と相互作用可能な残基、

正準 (c a n o n i c a l) 残基、

重鎖可変領域と軽鎖可変領域の接触残基、

バーニア (V e r n i e r) ゾーン内の残基、及び

C h o t h i a によって定義された可変重鎖 C D R 1 と K a b a t によって定義された第 1 の重鎖フレームワークとの重複領域中の残基

40

からなる群から選択される、請求項 8 に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

重要な残基が、2 L、15 L、22 L、41 L、42 L、44 L、49 L、50 L、51 L、62 L、71 L、73 L、10 H、44 H、46 H、48 H、67 H、68 H、70 H、72 H、74 H、76 H、83 H、84 H、86 H、87 H 及び 97 H からなる群から選択される、請求項 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

前記結合タンパク質が、コンセンサスヒト可変ドメインである、請求項 11 に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

50

前記結合タンパク質が、

配列番号 7 0

配列番号 7 1

配列番号 7 2

配列番号 7 3

配列番号 7 4

配列番号 7 5

配列番号 7 6

配列番号 7 7

配列番号 7 8

10

配列番号 7 9

配列番号 8 0

配列番号 8 1

配列番号 8 2

配列番号 8 3

配列番号 8 4

配列番号 8 5

配列番号 9 2

配列番号 9 3 及び

配列番号 9 4

20

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 個の可変ドメインを含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 4】

前記結合タンパク質が 2 個の可変ドメインを含み、前記 2 個の可変ドメインが、

配列番号 7 0 と配列番号 7 1、

配列番号 7 2 と配列番号 7 3、

配列番号 7 4 と配列番号 7 5、

配列番号 7 6 と配列番号 7 7、

配列番号 7 8 と配列番号 7 9、

配列番号 8 0 と配列番号 8 1、

配列番号 8 2 と配列番号 8 3、

配列番号 8 4 と配列番号 8 5

配列番号 8 0 と配列番号 9 2、

配列番号 8 0 と配列番号 9 3 及び

配列番号 8 0 と配列番号 9 4

30

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 3 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 5】

前記結合タンパク質が、

配列番号 7 0

配列番号 7 1

配列番号 7 2

配列番号 7 3

配列番号 7 4

配列番号 7 5

配列番号 7 6

配列番号 7 7

配列番号 7 8

配列番号 7 9

配列番号 8 0

配列番号 8 1

40

50

配列番号 8 2
 配列番号 8 3
 配列番号 8 4
 配列番号 8 5
 配列番号 9 2
 配列番号 9 3 及び
 配列番号 9 4

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 個の可変ドメインを含む、請求項 1 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 6】

10

前記結合タンパク質が I L - 1 3 に結合する、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 7】

前記結合タンパク質が I L - 1 3 に結合する、請求項 1 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 8】

前記結合タンパク質が I L - 1 3 の生物学的機能を調節可能である、請求項 1 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 9】

前記結合タンパク質が I L - 1 3 を中和可能である、請求項 1 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 0】

20

前記結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定して、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、及び少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される、前記標的に対するオン速度定数 (K_{on}) を有する、請求項 1 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 1】

前記結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-3} s^{-1} 以下、約 10^{-4} s^{-1} 以下、約 10^{-5} s^{-1} 以下及び約 10^{-6} s^{-1} 以下からなる群から選択される、前記標的に対するオフ速度定数 (K_{off}) を有する、請求項 1 7 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 2 2】

前記結合タンパク質が、約 10^{-7} M 以下、約 10^{-8} M 以下、約 10^{-9} M 以下、約 10^{-10} M 以下、約 10^{-11} M 以下、約 10^{-12} M 以下及び 10^{-13} M 以下からなる群から選択される、前記標的に対する解離定数 (K_D) を有する、請求項 1 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 3】

抗体構築物が、リンカーポリペプチド又は免疫グロブリン定常ドメインを更に含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質を含む抗体構築物。

【請求項 2 4】

40

前記結合タンパク質が、
 免疫グロブリン分子、
 モノクローナル抗体、
 キメラ抗体、
 C D R グラフト抗体、
 ヒト化抗体、
 F a b、
 F a b'、
 F (a b') 2、
 F v、
 ジスルフィド結合 F v、

50

s c F v、
 単ドメイン抗体、
 二重特異性抗体 (d i a b o d y)、
 多重特異性抗体、
 二重特異性 (d u a l s p e c i f i c) 抗体及び
 二重特異性 (b i s p e c i f i c) 抗体

からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の抗体構築物。

【請求項 2 5】

前記結合タンパク質が、
 ヒト I g M 定常ドメイン、
 ヒト I g G 1 定常ドメイン、
 ヒト I g G 2 定常ドメイン、
 ヒト I g G 3 定常ドメイン、
 ヒト I g G 4 定常ドメイン、
 ヒト I g E 定常ドメイン及び
 ヒト I g A 定常ドメイン

からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 2 3 に記載の抗体構築物。

10

【請求項 2 6】

配列番号 2
 配列番号 3
 配列番号 4 及び
 配列番号 5

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項 2 3 に記載の抗体構築物。

20

【請求項 2 7】

抗体複合体が、免疫接着 (i m m u n o a d h e n s i o n) 分子、造影剤、治療薬及び細胞毒性薬からなる群から選択される薬剤を更に含む、請求項 2 4 に記載の抗体構築物を含む抗体複合体。

30

【請求項 2 8】

前記薬剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁性標識及びビオチンからなる群から選択される造影剤である、請求項 2 7 に記載の抗体複合体。

【請求項 2 9】

前記造影剤が、³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho 及び ¹⁵³Sm からなる群から選択される放射性標識である、請求項 2 7 に記載の抗体複合体。

【請求項 3 0】

前記薬剤が、代謝拮抗物質、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、血管新生阻害剤、有糸分裂阻害剤、アントラサイクリン、毒素及びアポトーシス剤からなる群から選択される治療薬又は細胞毒性薬である、請求項 2 7 に記載の抗体複合体。

40

【請求項 3 1】

前記結合タンパク質がヒトグリコシル化パターンを有する、請求項 2 4 に記載の抗体構築物。

【請求項 3 2】

前記結合タンパク質が、結晶化結合タンパク質である、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3 3】

前記抗体構築物が、結晶化抗体構築物である、請求項 2 3 に記載の抗体構築物。

【請求項 3 4】

前記結晶化抗体構築物が、担体を含まない医薬制御放出結晶化抗体構築物である、請求

50

項 3 3 に記載の抗体構築物。

【請求項 3 5】

前記抗体構築物が、前記抗体構築物の可溶性対応物よりも長い生体内半減期を有する、請求項 3 4 に記載の抗体構築物。

【請求項 3 6】

前記抗体構築物が生物活性を保持する、請求項 3 4 に記載の抗体構築物。

【請求項 3 7】

請求項 1 に記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする、単離核酸。

【請求項 3 8】

請求項 2 3 に記載の抗体構築物アミノ酸配列をコードする、単離核酸。

10

【請求項 3 9】

請求項 3 8 に記載の単離核酸を含む、ベクター。

【請求項 4 0】

前記ベクターが、p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V 及び p B J からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載のベクター。

【請求項 4 1】

請求項 3 9 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 4 2】

前記宿主細胞が原核細胞である、請求項 4 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 3】

前記宿主細胞が E . コリ (E . c o l i) である、請求項 4 2 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 4 4】

前記宿主細胞が真核細胞である、請求項 4 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 5】

前記真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 6】

前記真核細胞が、ほ乳動物細胞、トリ細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される動物細胞である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 4 7】

前記宿主細胞が C H O 細胞である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 8】

前記宿主細胞が C O S である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 9】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 0】

前記酵母細胞がサッカロミセス・セレビスエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) である、請求項 4 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 1】

前記宿主細胞が昆虫 S f 9 細胞である、請求項 4 4 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 5 2】

請求項 4 1 に記載の宿主細胞を、I L - 1 3 に結合可能な結合タンパク質の製造に十分な条件下で、培地中で培養することを含む、I L - 1 3 に結合可能なタンパク質を製造する方法。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の方法によって製造されるタンパク質。

【請求項 5 4】

(a) 請求項 3 3 に記載の結晶化結合タンパク質と成分とを含む製剤、及び
(b) 少なくとも 1 種類の重合体担体
を含む、結合タンパク質の放出用組成物。

50

【請求項 55】

前記重合体担体が、ポリアクリル酸、ポリシアノアクリレート、ポリアミノ酸、ポリ無水物、ポリデブシペプチド、ポリエステル、ポリ乳酸、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)又はPLGA、ポリb-ヒドロキシブチレート、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン; ポリエチレングリコール、ポリ(ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ(オルガノ)ホスファゼン、ポリオルトエステル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテルコポリマー、Pluronicポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロース及びセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリコサミノグリカン(glycaminoglycan)、硫酸化多糖(polyeacccharide)、これらの混合物及びコポリマーからなる群の1種類以上から選択されるポリマーである、請求項54に記載の組成物。

10

【請求項 56】

前記成分が、アルブミン、スクロース、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールからなる群から選択される、請求項54に記載の組成物。

【請求項 57】

請求項54に記載の組成物の有効量をほ乳動物に投与する段階を含む、ほ乳動物を治療する方法。

【請求項 58】

請求項1に記載の結合タンパク質と薬学的に許容される担体とを含む、薬剤組成物。

20

【請求項 59】

前記薬学的に許容される担体が、前記結合タンパク質の吸収又は分散の増大に有用であるアジュバントとして機能する、請求項58に記載の薬剤組成物。

【請求項 60】

前記アジュバントがヒアルロニダーゼである、請求項59に記載の薬剤組成物。

【請求項 61】

IL-13活性が有害である障害を治療するための少なくとも1種類の追加の治療薬を更に含む、請求項58に記載の薬剤組成物。

【請求項 62】

前記追加の薬剤が、治療薬、造影剤、細胞毒性薬、血管新生阻害剤; キナーゼ阻害剤; 同時刺激分子遮断薬; 接着分子遮断薬; 抗サイトカイン抗体又はその機能的断片; メトトレキサート; シクロスポリン; ラパマイシン; FK506; 検出可能な標識又はレポーター; TNF拮抗物質; 抗リウマチ薬; 筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド抗炎症薬(NSAID)、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤、乾せん治療薬、コルチコステロイド、タンパク質同化ステロイド、エリスロポイエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神病薬、刺激薬、ぜん息治療薬、ベータ作動物質、吸入ステロイド、経口ステロイド、エビネフリン又は類似体、サイトカイン及びサイトカイン拮抗物質からなる群から選択される、請求項61に記載の薬剤組成物。

30

40

【請求項 63】

ヒトIL-13活性が低下するように、ヒトIL-13を請求項1に記載の結合タンパク質と接触させることを含む、ヒトIL-13活性を低下させる方法。

【請求項 64】

IL-13活性が有害である障害に罹患したヒト対象におけるヒトIL-13活性が低下するように、請求項1に記載の結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む、ヒト対象におけるヒトIL-13活性を低下させる方法。

【請求項 65】

治療が達成されるように、請求項1に記載の結合タンパク質を対象に投与することによって、IL-13活性が有害である疾患又は障害について対象を治療する方法。

50

【請求項 6 6】

前記障害が、呼吸器障害；ぜん息；アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息；感染によるぜん息；呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染によるぜん息；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気道炎症を伴う他の症状；好酸球増加症；線維症及び過剰粘液産生；嚢胞性線維症；肺線維症；アトピー性障害；アトピー性皮膚炎；じんま疹；湿疹；アレルギー性鼻炎；及びアレルギー性胃腸炎；皮膚の炎症性及び／又は自己免疫性症状；胃腸器官の炎症性及び／又は自己免疫性症状；炎症性腸疾患（IBD）；潰瘍性大腸炎；クローン病；肝臓の炎症性及び／又は自己免疫性症状；肝硬変；肝線維症；B及び／又はC型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝線維症；強皮症；腫瘍又は癌；肝細胞癌；グリア芽細胞腫；リンパ腫；ホジキンリンパ腫；ウイルス感染；（例えば、HTLV-1による）HTLV-1感染；1型防御免疫応答（protective type 1 immune response）の発現抑制並びにワクチン接種中の1型防御免疫応答の発現抑制からなる群から選択される、請求項 6 5 に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

前記障害が、リウマチ様関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾せん性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、ぜん息、アレルギー疾患、乾せん、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に付随する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、グレーブス病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性多内分泌腺機能低下 I 型及び多内分泌腺機能低下 II 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸窮迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾せん性関節症、潰瘍性結腸炎性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラに関連した関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水ぼうそう、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 Ig A 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、原因不明性線維化肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織病関連間質性肺疾患、混合性結合組織病関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、リウマチ様関節炎関連間質性肺疾患、全身性エリテマトーデス関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連肺疾患、薬剤性間質性肺疾患、線維症、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ性浸潤性肺疾患、感染後の間質性肺疾患、痛風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫又はルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗 L K M 抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫に付随する B 型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に付随する急性免疫疾患、臓器移植に付随する慢性免疫疾患、骨関節症、原発性硬化性胆管炎、乾せん 1 型、乾せん 2 型、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、NOS 腎疾患、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状エリテマトーデス、特発性又は NOS 男性不妊症、精子自己免疫、多発性硬化症（全サブタイプ）、交感性眼炎、結合組織病に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、ステイル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、

20

30

40

50

甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体原性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑 急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（choleostasis）、特異体質性肝疾患、薬剤性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギー及びぜん息、B群レンサ球菌（GBS）感染、精神障害（例えば、うつ病及び統合失調症）、Th2型及びTh1型媒介性疾患、急性及び慢性痛（とう痛の異なる形態）、肺癌、乳癌、胃癌、ぼうこう癌、結腸癌、すい臓癌、卵巣癌、前立腺癌、直腸癌、造血器悪性腫瘍（白血病及びリンパ腫）などの癌、無ベータリポタンパク質血症（abetalipoproteinemia）、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性過程、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性又は慢性細菌感染、急性すい炎、急性腎不全、腺癌、空気異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植片拒絶、アルファ-1-抗トリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3療法、抗リン脂質抗体症候群、抗受容体過敏反応、大動脈（aortic）及び末梢動脈リゅう、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈ろう、運動失調、（持続性又は発作性）心房細動、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心臓不整脈、心臓不全（stun）症候群、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性症、小脳疾患、無秩序型又は多源性心房頻拍、化学療法関連障害、クロム（chromic）骨髄性白血病（CML）、慢性アルコール依存症、慢性炎症性症状、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連障害、ボクサー認知症、脱髄疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化症、びまん性レヴィー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の障害、中年のダウン症候群、CNSドパミン受容体を遮断する薬物によって誘発される薬剤性運動障害、薬剤感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタインバーウイルス感染症、紅痛症、錐体外路障害及び小脳疾患、家族性食血細胞リンパ組織球増多症、胎児胸腺移植片拒絶、フリードライヒ失調症、末梢動脈機能障害、真菌性敗血症、ガス壊死、胃潰瘍、糸球体腎炎、任意の器官又は組織の移植片拒絶、グラム陰性菌敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物体による肉芽腫、有毛細胞白血病、Hallerrorden-Spatz病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解性血小板減少性紫斑病、出血、肝炎（A）、ヒス束不整脈、HIV感染／HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰症、過敏（hypersensitivity）反応、過敏性肺炎、高血圧症、運動低下症（hypokinetic movement disorder）、視床下部-下垂体-副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞傷害性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性脳卒中、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ライ病、皮質脊髄系の病変、脂肪性浮腫、肝移植拒絶、リンパ浮腫、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症、代謝性／特発性片頭痛、ミトコンドリア多系統障害、混合性結合組織病、モノクローナル免疫グロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性症（Mencel Dejerine-Thomas Shi-Drager and Machado-Joseph）、重症筋無力症、トリ型マイコバクテリウム イントラセルラーレ（Mycobacterium avium intracellulare）、マイコバクテリウム テュバキュローシス（Mycobacterium tuberculosis）、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血性障害、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈及びその枝の閉塞、閉塞性動脈障害、ok

10

20

30

40

50

t 3 療法、睾丸炎／精巣上体炎、睾丸炎／精管復元術、臓器肥大、骨粗しょう症、すい臓移植拒絶、すい癌、腫瘍に伴う症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢動脈硬化性疾患、末梢血管障害、腹膜炎、悪性貧血、カリニ肺炎、肺炎、P O E M S 症候群（多発性神経障害、臓器肥大、内分泌疾患、モノクローナル免疫グロブリン血症及び皮膚変化症候群）、体外灌流後（p o s t p e r f u s i o n）症候群、体外循環後（p o s t p u m p）症候群、心筋梗塞後の開心術症候群、子かん前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧症、放射線療法、レイノー現象及び疾患、Raynoud 病、レフス病、規則正しい幅の狭いQRS 頻拍、腎血管性高血圧、再灌流傷害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老人性舞蹈病、レヴィー小体型老年認知症、血清反応陰性関節症、ショック、鎌状赤血球貧血、皮膚同種移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、特異的不整脈、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性症、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症型若年性関節リウマチ、T 細胞又はF A B A L L、末梢血管拡張、閉塞性血栓性血管炎、血小板減少症、毒性、移植片、外傷／出血、I I I 型過敏反応、I V 型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんま疹、心臓弁膜症、静脈リゅう、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルス及び真菌感染、致命的な脳炎／無菌性髄膜炎、生命に関連する血球貪食症候群、ウェルニッケ コルサコフ症候群、ウィルソン病、任意の器官又は組織の異種移植片拒絶、急性冠動脈症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根筋障害、急性虚血、成人スティル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、ストレプトコッカス（S t r e p t o c o c c u s）感染に付随する自己免疫異常、自己免疫性腸疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ球増殖性症候群（A L P S）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣機能不全、眼けん炎、気管支拡張症、水ぼうそう、循環器疾患、破局的な抗リン脂質抗体症候群、セリアック病、頸椎症、慢性虚血、はん痕性類天ほうそう、多発性硬化症のリスクがある、最初のエピソードからなる症候群（c l i n i c a l l y i s o l a t e d s y n d r o m e）（C I S）、結膜炎、小児期発症型精神障害、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、涙腺炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物性免疫溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症多形性紅斑、妊娠性類天ほうそう、ギランバレー症候群（G B S）、枯草熱、H u g h e s 症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E 媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼球炎症性疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F / U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎（K e r a t o j u n t i v i t i s s i c c a）、クスマウル病又はK u s s m a u l - M e i e r 病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性症、顕微鏡的多発性血管炎、B e c h t e r e v 病、運動ニューロン障害、粘膜類天ほうそう、多臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A型非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、少関節性J R A、末梢動脈閉塞性疾患（P A O D）、末梢血管疾患（P V D）、末梢動脈疾患（P A D）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（又は結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発筋痛、白毛症、多関節性J R A、多内分泌腺機能低下症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛（P M R）、体外循環後症候群、原発性パーキンソン症、前立腺炎、赤芽球ろう、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、S A P H O（滑膜炎、アケネ、膿ほう症、骨過形成及び骨髄炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経症、続発性副腎不全、シリコン関連結合組織病、スネドン・ウィルキンソン皮膚疾患、強直性脊椎炎（s p o n d i l i t i s a n k y l o s a n s）、ステープルス ジョンソン症候群（S J S）、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキシプラズマ性網膜炎、中毒性表皮壊死症、横断性脊髄炎、T R A P S（腫瘍壊死因子受容体、1型アレルギー反応、I I 型糖尿病、じんま疹、通常型間質性肺炎（U I P）、血管炎

10

20

30

40

50

、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト - 小柳 - 原田症候群（V K H 症候群）、しん出型黄斑変性症並びに創傷治癒からなる群から選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

第 2 の薬剤の投与前、投与と同時に、又は投与後に、請求項 1 に記載の結合タンパク質を投与する段階を含み、第 2 の薬剤が、吸入ステロイド；ベータ作動物質；短時間作用性又は長時間作用性ベータ作動物質；ロイコトリエン又はロイコトリエン受容体の拮抗物質；A D V A I R；I g E 阻害剤；抗 I g E 抗体；X O L A I R；ホスホジエステラーゼ阻害薬；P D E 4 阻害剤；キサンチン；抗コリン作用薬；肥満細胞安定剤；クロモリン；I L - 4 阻害剤；I L - 5 阻害剤；エオタキシン / C C R 3 阻害剤；ヒスタミン又は H 1、H 2、H 3 及び H 4 を含めたその受容体の拮抗物質；プロスタグランジン D 又はその受容体 D P 1 及び C R T H 2 の拮抗物質；T N F 拮抗物質；T N F 受容体の可溶性断片；E N B R E L；T N F 酵素拮抗物質；T N F 変換酵素（T A C E）阻害剤；ムスカリン受容体拮抗物質；T G F ベータ拮抗物質；インターフェロンガンマ；ビルフェニドン；化学療法剤、メトトレキサート；レフルノミド；シロリムス（ラバマイシン）又はその類似体、C C I - 7 7 9；C O X 2 又は c P L A 2 阻害剤；N S A I D；免疫調節物質；p 3 8 阻害剤；T P L - 2、M K - 2 及び N F k B 阻害剤；ブデノシド（b u d e n o s i d e）；上皮成長因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチル酸；6 - メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リボキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジド；抗酸化剤；トロンボキサン阻害剤；I L - 1 受容体拮抗物質；抗 I L - 1 抗体；抗 I L - 6 抗体；成長因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル - イミダゾール化合物；T N F、L T、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 19、I L - 20、I L - 21、I L - 22、I L - 23、I L - 24、I L - 25、I L - 26、I L - 27、I L - 28、I L - 29、I L - 30、I L - 31、I L - 32、I L - 33、E M A P - I I、G M - C S F、F G F 又は P D G F の抗体又は作動物質；C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 25、C D 28、C D 30、C D 40、C D 45、C D 69、C D 90 又はこれらのリガンドの抗体；F K 5 0 6；ラバマイシン；ミコフェノール酸モフェチル；イブプロフェン；プレドニゾロン；ホスホジエステラーゼ阻害薬；アデノシン作動物質；抗血栓薬；補体阻害剤；アドレナリン作動薬；I R A K、N I K、I K K、p 3 8 又は M A P キナーゼ阻害剤；I L - 1 変換酵素阻害剤；T N F 変換酵素阻害剤；T 細胞シグナル伝達阻害剤；メタロプロテイナーゼ阻害剤；6 - メルカプトプリン；アンジオテンシン変換酵素阻害薬；可溶性サイトカイン受容体；可溶性 p 5 5 T N F 受容体；可溶性 p 7 5 T N F 受容体；s I L - 1 R I；s I L - 1 R I I；s I L - 6 R；抗炎症性サイトカイン；I L - 4；I L - 10；I L - 11 並びに T G F からなる群から選択される、I L - 13 が有害である障害に罹患した患者を治療する方法。

【請求項 6 9】

対象に投与することが、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内（i n t r a a b d o m i n a l）、嚢内、軟骨内、腔内（i n t r a c a v i t a r y）、腔内（i n t r a c e l l i a l）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内（i n t r a p e r i t o n e a l）、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、ぼうこう内、ポース、膈、直腸、頬、舌下、鼻腔内及び経皮から選択される少なくとも 1 つの様式による、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 0】

ヒト I L - 13 に結合し、細胞表面に基づく受容体結合アッセイにおいて、約 1.5×10^{-8} から 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} から 1×10^{-9} M、 10^{-9} から 10^{-10} M、及び 10^{-10} から 10^{-11} M からなる群から選択される I C₅₀ で、又は E L I S A に基づく受容体結合アッセイにおいて、約 1.8×10^{-8} から 1×10^{-8} M、

10

20

30

40

50

1×10^{-8} から 1×10^{-9} M、 10^{-9} から 10^{-10} M、及び 10^{-10} から 10^{-11} M からなる群から選択される IC_{50} で、IL-13 受容体に対する前記 IL-13 の結合を阻止する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 71】

ヒト IL-13 に結合し、ヒト IL-13 誘発性ぜん息モデルにおいて AHR を約 50 % 抑制する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 72】

前記抗体がヒト IL-13 誘発性ぜん息モデルにおいて AHR を約 80 % 抑制する、請求項 70 に記載の抗体。

【請求項 73】

前記抗体が 13C5.5 である、請求項 72 に記載の抗体。

【請求項 74】

ヒト IL-13 に結合し、ヒト IL-13 誘発性ぜん息モデルにおいて、AHR を約 50 % 抑制し、粘液産生を約 40 % 抑制する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 75】

前記抗体が 13C5.5 である、請求項 74 に記載の抗体。

【請求項 76】

ヒト IL-13 に結合し、細胞表面に基づく受容体結合アッセイにおいて、又は ELISA に基づく受容体結合アッセイにおいて、IL-13 受容体に対する前記 IL-13 の結合を 100 nM の濃度で約 70 - 100 % 阻害する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 77】

前記抗体が BAK502G9 でも、mAb13.2 でも、MJ2-7 でもない、請求項 70 に記載の抗体。

【請求項 78】

前記抗体が 13C5.5 である、請求項 70 に記載の抗体。

【請求項 79】

前記抗体が 13C5.5 である、請求項 76 に記載の抗体。

【請求項 80】

a) 約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、

b) 表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、及び

c) 約 1.5×10^{-10} から 1×10^{-10} M、又は約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D)

からなる群から選択される結合特性で IL-13 に結合する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 81】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、 $6.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $7.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $8.35 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $8.69 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $9.15 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.26 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 及び $2.51 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される IL-13 に対するオン速度定数 (k_{on}) を有する、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 82】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、表面プラズモン共鳴によって測定して、 $1.23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $4.74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.91 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $2.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $3.82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $8.81 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 及び $9.65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される IL-13 に対するオフ速度定数 (K_{off}) を有する、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結

10

20

30

40

50

合性フラグメント。

【請求項 83】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、 1.05×10^{-10} M、 7.10×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 2.20×10^{-11} M、 2.72×10^{-11} M、 4.17×10^{-11} M、 5.68×10^{-11} M、 7.01×10^{-11} M、 7.10×10^{-11} M 及び 9.79×10^{-11} M からなる群から選択される IL-13 に対する解離定数 (K_D) を有する、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 84】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが IL-13 の生物学的機能を調節可能である、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 85】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが IL-13 を中和可能である、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 86】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDR グラフト抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合 Fv、scFv、単ドメイン抗体、二重特異性抗体 (diabody)、多重特異性抗体、二重特異性 (dual specific) 抗体及び二重特異性 (bispecific) 抗体からなる群から選択される、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

20

【請求項 87】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントがヒト化抗体である、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 88】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが 13C5.5 抗体である、請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 89】

請求項 80 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントと薬学的に許容される担体とを含む、薬剤組成物。

【請求項 90】

IL-13 活性が有害である障害を治療するための少なくとも 1 種類の追加の治療薬を更に含む、請求項 89 に記載の薬剤組成物。

30

【請求項 91】

配列番号 1 の局所領域 Ser 26 - Thr 27 - Ala 28 - Leu 29 - Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 - Glu 34 - Glu 35 - Leu 36 - Val 37 - Asn 38 及び Lys 123 - Lys 124 - Leu 125 - Phe 126 - Arg 127 - Glu - 128 - Gly 129 - Arg 130 によって定義されたエピトープに結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

40

【請求項 92】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、配列番号 1 の局所領域 Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 - Glu 34 - Glu 35 - Leu 36 - Val 37 - Asn 38 及び Lys 123 - Lys 124 - Leu 125 - Phe 126 - Arg 127 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する、請求項 91 に記載の単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 93】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、配列番号 1 の局所領域 Ser 26 - Thr 27 - Ala 28 - Leu 29 - Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 -

50

G l u 3 4 - G l u 3 5 - L e u 3 6 - V a l 3 7 - A s n 3 8 及び L y s 1 2 3 - L y s 1 2 4 - L e u 1 2 5 - P h e 1 2 6 - A r g 1 2 7 - G l u - 1 2 8 - G l y 1 2 9 - A r g 1 3 0 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する I L - 1 3 が I L - 1 3 2 受容体との結合を阻止されるように、ヒト I L - 1 3 に結合する、請求項 9 1 に記載の単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 9 4】

前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、配列番号 1 の局所領域 S e r 2 6 - T h r 2 7 - A l a 2 8 - L e u 2 9 - A r g 3 0 - G l u 3 1 - L e u 3 2 - I l e 3 3 - G l u 3 4 - G l u 3 5 - L e u 3 6 - V a l 3 7 - A s n 3 8 及び L y s 1 2 3 - L y s 1 2 4 - L e u 1 2 5 - P h e 1 2 6 - A r g 1 2 7 - G l u - 1 2 8 - G l y 1 2 9 - A r g 1 3 0 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する I L - 1 3 が I L - 1 3 2 受容体との結合を阻止されるように、ヒト I L - 1 3 に結合し、ただし前記抗体が B A K 5 0 2 G 9 でも M J 2 - 7 でもない、請求項 9 1 に記載の単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 9 5】

前記抗体が 1 3 C 5 . 5 である、請求項 9 1 に記載の抗体。

【請求項 9 6】

配列番号 1 のアミノ酸 1 0 4 - 1 3 0 に結合する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

20

【請求項 9 7】

前記抗体が 1 3 C 5 . 5 である、請求項 9 6 に記載の抗体。

【請求項 9 8】

a . ヘリックス A 及び D を含めて、I L - 1 3 上のエピトープとの結合、
b . 約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、
c . 表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、及び
d . 約 1.5×10^{-10} から $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、又は約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D)

30

からなる群から選択される結合特性で、I L - 1 3 に結合しおよび I L - 1 3 2 受容体に対する I L - 1 3 の結合を阻止する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 9 9】

a . ヘリックス A 及び D を含めて、I L - 1 3 上のエピトープとの結合、
b . 約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、
c . 表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、及び
d . 約 1.5×10^{-10} から $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、又は約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D)

40

からなる群から選択される結合特性で変種 I L - 1 3 に結合する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 0 0】

a . ヘリックス A 及び D を含めて、I L - 1 3 上のエピトープとの結合、
b . 約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、
c . 表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、及び
d . 約 1.5×10^{-10} から $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、又は約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D)

50

からなる群から選択される結合特性で野生型 I L - 1 3 及び変種 I L - 1 3 に結合する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 0 1】

前記抗体がヒト I L - 1 3 誘発性ぜん息モデルにおいて A H R を約 5 0 % 抑制する、請求項 9 4 に記載の単離抗体。

【請求項 1 0 2】

前記抗体がヒト I L - 1 3 誘発性ぜん息モデルにおいて粘液産生を約 5 0 % 抑制する、請求項 9 4 に記載の単離抗体。

【請求項 1 0 3】

前記抗体がヒト I L - 1 3 誘発性ぜん息モデルにおいて T A R C を約 5 0 % 抑制する、請求項 9 4 に記載の単離抗体。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2 0 0 6 年 9 月 8 日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 8 4 3 , 2 4 9 号の優先権の利益を主張するものである。

【0 0 0 2】

本発明は、I L - 1 3 結合タンパク質に関し、詳細には、ぜん息、アレルギー、C O P D、線維症及び癌を含めた種々の疾患の予防及び / 又は治療におけるその使用に関する。

20

【0 0 0 3】

共同研究契約の参照

本願の内容は、P r o t e i n D e s i g n L a b s , I n c . と A b b o t t L a b o r a t o r i e s によって、また、両者間で 2 0 0 5 年 1 2 月 1 4 日に締結された共同研究契約に属し、I L - 1 3 に対する組換え操作された抗体を対象とする。

【背景技術】

【0 0 0 4】

ヒト I L - 1 3 は、活性化 T 細胞からクローン化された 1 7 k D a の糖タンパク質であり (Z u r a w s k i a n d d e V r i e s 1 9 9 4 I m m u n o l T o d a y 1 5 1 9 - 2 6)、T h 2 系列の活性化 T 細胞によって産生されるが、T h 0 及び T h 1 C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、並びに肥満細胞などの幾つかの非 T 細胞集団も I L - 1 3 を産生する (Z u r a w s k i a n d d e V r i e s 1 9 9 4 I m m u n o l T o d a y 1 5 1 9 - 2 6)。I L - 1 3 の機能としては、ヒト B 細胞における I g E への免疫グロブリンアイソタイプスイッチング (P u n n o n e n , A v e r s a e t a l . 1 9 9 3 P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 0 3 7 3 0 - 4)、ヒトとマウスの両方における炎症性サイトカイン産生の抑制 (d e W a a l M a l e f y t , F i g d o r e t a l . 1 9 9 3 J I m m u n o l 1 5 1 6 3 7 0 - 8 1 ; D o h e r t y , K a s t e l e i n e t a l . 1 9 9 3 J I m m u n o l 1 5 1 7 1 5 1 - 6 0) などが挙げられる。I L - 1 3 は、その細胞表面受容体、I L - 1 3 R アルファ 1 及び I L - 1 3 R アルファ 2 に結合する。I L - 1 3 R アルファ 1 は、I L - 1 3 と低親和性 (K D 約 1 0 n M) で相互作用し、続いて I L - 4 R α を動員して、高親和性 (K D 約 0 . 4 n M) シグナル伝達ヘテロ 2 量体受容体複合体を形成する (A m a n , T a y e b i e t a l . 1 9 9 6 J B i o l C h e m 2 7 1 2 9 2 6 5 - 7 0 ; H i l t o n , Z h a n g e t a l . 1 9 9 6 P r o c N a t l A c a d S c i U S A 9 3 4 9 7 - 5 0 1)。I L - 4 R / I L - 1 3 R アルファ 1 複合体は、B 細胞、単球 / マクロファージ、樹状細胞、好酸球、好塩基球、線維芽細胞、内皮細胞、気道上皮細胞、気道平滑筋細胞などの多数の細胞タイプ上で発現される (G r a b e r , G r e t e n e r e t a l . 1 9 9 8 E u r J I m m u n o l 2 8 4 2 8 6 - 9 8 ; M u r a t a , H u s a i n e t a l . 1 9 9 8 I n t I m m u n

30

40

50

ol 10 1103 - 10 ; Akaiwa , Yu et al . 2001 Cytokine 13 75 - 84) 。 IL - 13 R アルファ 1 / IL - 4 R 受容体複合体の連結は、シグナル伝達性転写因子 (STAT6) 及びインスリン受容体基質 2 (IRS - 2) 経路を含めた種々のシグナル伝達経路を活性化する (Wang , Michaeli et al . 1995 Blood 86 4218 - 27 ; Takeda , Kamanaka et al . 1996 J Immunol 157 3220 - 2) 。 IL - 13 R アルファ 2 鎖は単独で IL - 13 に対して高親和性 (KD 約 0 . 25 - 0 . 4 nM) を有し、IL - 13 結合の負の調整をするおとり受容体として (Donaldson , Whitters et al . 1998 J Immunol 161 2317 - 24) 、また、マクロファージ及び場合によっては他の細胞タイプにおいて AP - 1 経路を介して TGF - β 合成及び線維症を誘発するシグナル伝達受容体として (Fichtner - Feigl , Strober et al . 2006 Nat Med 12 99 - 106) 、機能する。

【 0005 】

ぜん息の前臨床動物モデルにおいて実施された幾つかの研究によれば、IL - 13 はぜん息において重要な役割を果たす。これらのデータとしては、IL - 13 ノックアウトマウスにおけるぜん息に対する抵抗性、種々のマウスモデルにおける IL - 13 拮抗物質 (可溶性 IL - 13 受容体、抗 IL - 13 mAb など) を用いたぜん息表現型の阻害などが挙げられる (Sela 1999 Harefuah 137 317 - 9 ; Wills - Karp and Chiaramonte 2003 Curr Opin Pulm Med 9 21 - 7 ; Wills - Karp 2004 Immunol Rev 202 175 - 90) 。複数の研究によれば、マウス及びモルモットの肺に組換え IL - 13 を薬理的に投与すると、気道粘液の分泌過多、好酸球増加症及び AHR が誘発される (Grunig , Warnock et al . 1998 Science 282 2261 - 3 ; Wills - Karp , Luyimbazi et al . 1998 Science 282 2258 - 61 ; Kibe , Inoue et al . 2003 Am J Respir Crit Care Med 167 50 - 6 ; Vargaftig and Singer 2003 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 L260 - 9 ; Vargaftig and Singer 2003 Am J Respir Cell Mol Biol 28 410 - 9) 。 IL - 13 のこれらの効果は、IL - 13 の恒常的又は誘導性発現を有するトランスジェニックマウス系において再現される (Zhu , Homer et al . 1999 J Clin Invest 103 779 - 88 ; Zhu , Lee et al . 2001 Am J Respir Crit Care Med 164 S67 - 70 ; Lanone , Zheng et al . 2002 J Clin Invest 110 463 - 74) 。遺伝子導入による IL - 13 の慢性的過剰発現は、上皮下の線維症及び気腫も誘発する。IL - 13 (及び IL - 4) シグナル伝達分子 STAT6 を欠くマウスは、アレルゲンによって誘発される AHR 及び粘液過剰産生を示さない (Kuperman , Huang et al . 2002 Nat Med 8 885 - 9) 。可溶性 IL - 13 受容体融合タンパク質 (sIL - 13 R アルファ 2 Fc) を用いた研究は、アレルゲン卵白アルブミン (OVA) によって誘発される実験的気道疾患におけるこのサイトカインの枢要な役割を実証した (Grunig , Warnock et al . 1998 Science 282 2261 - 3 ; Wills - Karp , Luyimbazi et al . 1998 Science 282 2258 - 61 ; Taube , Duez et al . 2002 J Immunol 169 6482 - 9) 。抗 IL - 13 治療の効力は、ネズミぜん息の慢性モデルでも実証された。粘液の分泌過多及び AHR の特徴を示すことに加えて、この慢性ぜん息モデルは、それよりも急性的なモデルにおいては欠けている、ヒト疾患の幾つかの顕著な特徴を示す。これらの特徴としては、上皮間に位置する肺組織の好酸球増加、コラーゲン沈着の増加によって判断される平

10

20

30

40

50

滑筋線維症などが挙げられる。慢性ぜん息モデルは、O V Aによって感作されたマウスにおいて、週1回合計4週間のO V Aのエアロゾル投与を繰り返すことによって誘導される。(36日目から)O V A投与の最後の2週間に投与された抗IL - 13抗体は(有効性の読み出しは、試験の53日目に評価された。)、A H R、肺炎症、杯細胞過形成、粘液分泌過多及び気道線維症をかなり抑制する(Yang, Li et al. 2005 J Pharmacol Exp Ther)。さらに、IL - 13拮抗物質の治療効果は、ぜん息の霊長類モデルにおいてA H Rを抑制することも実証された[Abstract, American Thoracic Society 2005]。

【0006】

疾患の重症度と相関する高レベルのIL - 13 mRNA及びタンパク質がぜん息患者の肺において検出され、IL - 13は、ヒトぜん息の病原に関係している(Huang, Xiao et al. 1995 J Immunol 155 2688 - 94)。また、高いIL - 13レベルをもたらすヒトIL - 13遺伝的多型が確認され、ぜん息及びアトピーと関連する(Heinzmann, Mao et al. 2000 Hum Mol Genet 9 549 - 59; Hoerauf, Kruse et al. 2002 Microbes Infect 4 37 - 42; Vercelli 2002 Curr Opin Allergy Clin Immunol 2 389 - 93; Heinzmann, Jerkic et al. 2003 J Allergy Clin Immunol 112 735 - 9; Chen, Ericksen et al. 2004 J Allergy Clin Immunol 114 553 - 60; Vladich, Brazille et al. 2005 J Clin Invest)。高いIL - 13レベルは、ぜん息患者の肺において検出された(Huang, Xiao et al. 1995 J Immunol 155 2688 - 94; Arima, Umeshita - Suyama et al. 2002 J Allergy Clin Immunol 109 980 - 7; Berry, Parker et al. 2004 J Allergy Clin Immunol 114 1106 - 9)。より高い血しょうIL - 13レベルを生じるIL - 13遺伝子の多形を有する個体は、アトピー及びぜん息のリスクが高く、IL - 13とぜん息の遺伝的関連性(genetic linkage)も実証された(Wills - Karp 2000 Respir Res 1 19 - 23)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Zurawski and de Vries、Immunol Today 15、1994年、p. 19 - 26

【非特許文献2】Punnonen, Aversa他、Proc Natl Acad Sci USA 90、1993年、p. 3730 - 4

【非特許文献3】de Waal Malefyt, Figdor他、J Immunol 151、1993年、p. 6370 - 81

【非特許文献4】Doherty, Kastelein他、J Immunol 151、1993年、p. 7151 - 60

【非特許文献5】Aman, Tayebi他、J Biol Chem 271、1996年、p. 29265 - 70

【非特許文献6】Hilton, Zhang他、Proc Natl Acad Sci USA 93、1996年、p. 497 - 501

【非特許文献7】Grabber, Gretener他、Eur J Immunol 28、1998年、p. 4286 - 98

【非特許文献8】Murata, Husain他、Int Immunol 10、1998年、p. 1103 - 10

【非特許文献9】Akaiwa, Yu他、Cytokine 13、2001年、p. 7

10

20

30

40

50

5 - 8 4

- 【非特許文献10】Wang, Michieli 他、Blood 86、1995年、p. 4218 - 27
- 【非特許文献11】Takeda, Kamanaka 他、J Immunol 157、1996年、p. 3220 - 2
- 【非特許文献12】Donaldson, Whitters 他、J Immunol 161、1998年、p. 2317 - 24
- 【非特許文献13】Fichtner - Feigl, Strober 他、Nat Med 12、2006年、p. 99 - 106
- 【非特許文献14】Sela、Harefuah 137、1999年、p. 317 - 9 10
- 【非特許文献15】Wills - Karp and Chiaramonte、Curr Opin Pulm Med 9、2003年、p. 21 - 7
- 【非特許文献16】Wills - Karp、Immunol Rev 202、2004年、p. 175 - 90
- 【非特許文献17】Grunig, Warnock 他、Science 282、1998年、p. 2261 - 3
- 【非特許文献18】Wills - Karp, Luyimbazi 他、Science 282、1998年、p. 2258 - 61
- 【非特許文献19】Kibe, Inoue 他、Am J Respir Crit Care Med 167、2003年、p. 50 - 6 20
- 【非特許文献20】Vargaftig and Singer、Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284、2003年、p. 260 - 9
- 【非特許文献21】Vargaftig and Singer、Am J Respir Cell Mol Biol 28、2003年、p. 410 - 9
- 【非特許文献22】Zhu, Homer 他、J Clin Invest 103、1999年、p. 779 - 88
- 【非特許文献23】Zhu, Lee 他、Am J Respir Crit Care Med 164、2001年、p. 67 - 70
- 【非特許文献24】Lanone, Zheng 他、J Clin Invest 110 30
、2002年、p. 463 - 74
- 【非特許文献25】Kuperman, Huang 他、Nat Med 8、2002年、p. 885 - 9
- 【非特許文献26】Taube, Duez 他、J Immunol 169、2002年、p. 6482 - 9
- 【非特許文献27】Yang, Li 他、J Pharmacol Exp Ther、2005年
- 【非特許文献28】Abstract, American Thoracic Society、2005年
- 【非特許文献29】Huang, Xiao 他、J Immunol 155、1995年 40
、p. 2688 - 94
- 【非特許文献30】Heinzmann, Mao 他、Hum Mol Genet 9、2000年、p. 549 - 59
- 【非特許文献31】Hoerauf, Kruse 他、Microbes Infect 4、2002年、p. 37 - 42
- 【非特許文献32】Vercelli、Curr Opin Allergy Clin Immunol 2、2002年、p. 389 - 93
- 【非特許文献33】Heinzmann, Jerkic 他、J Allergy Clin Immunol 112、2003年、p. 735 - 9
- 【非特許文献34】Chen, Erickson 他、J Allergy Clin I 50

mmunol 114、2004年、p.553-60

【非特許文献35】Vladich, Brazillie 他、J Clin Invest、2005年

【非特許文献36】Arima, Umeshita-Suyama 他、J Allergy Clin Immunol 109、2002年、p.980-7

【非特許文献37】Berry, Parker 他、J Allergy Clin Immunol 114、2004年、p.1106-9

【非特許文献38】Willis-Karp、Respir Res 1、2000、p.19-23

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ヒトIL-13が多様なヒト障害において役割を果たすために、治療方針はIL-13活性を阻害又は相殺するように設計される。特に、IL-13に結合し、中和する抗体は、IL-13活性を阻害する手段として求められている。しかし、IL-13に結合可能な改善された抗体が当分野では必要とされる。好ましくは、抗体はヒトIL-13に結合する。好ましくは、抗体は、ヒトIL-13を中和可能である。本発明は、ヒトIL-13に結合可能であり、高親和性で結合可能であり、ヒトIL-13に結合して中和可能である、結合タンパク質、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体及びこれらの断片の新規ファミリーを提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の要旨

本発明は、IL-13結合タンパク質に関する。本発明の結合タンパク質としては、ヒトIL-13に結合可能な抗体、抗原結合性部分、及び他の抗原結合タンパク質が挙げられるが、これらだけに限定されない。さらに、本発明は、IL-13結合タンパク質を製造及び使用する方法を提供する。

【0010】

本発明の一態様は、IL-13に結合可能な結合タンパク質に関する。好ましい一実施形態においては、結合タンパク質はヒトIL-13に結合する。好ましくは、結合タンパク質は、IL-13の生物学的機能を調節可能である。より好ましくは、結合タンパク質はIL-13を中和可能である。

30

【0011】

本発明の一態様においては、結合タンパク質は、IL-13に結合可能であり、IL-13 1受容体に対するIL-13の結合を阻止可能である。本発明の別の態様においては、結合タンパク質は、IL-13に結合可能であり、IL-13 2受容体に対するIL-13の結合を阻止可能である。好ましい一実施形態においては、結合タンパク質はIL-13に結合可能であり、IL-13 1受容体とIL-13 2の両方に対するIL-13の結合を阻止可能である。

【0012】

40

本発明の一実施形態は、ヒトIL-13に結合し、細胞表面に基づく受容体結合アッセイにおいて、約 1.5×10^{-8} から 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} から 1×10^{-9} M、 10^{-9} から 10^{-10} M、及び 10^{-10} から 10^{-11} Mからなる群から選択されるIC₅₀で、又はELISAに基づく受容体結合アッセイにおいて、約 1.8×10^{-8} から 1×10^{-8} M、 1×10^{-8} から 1×10^{-9} M、 10^{-9} から 10^{-10} M、及び 10^{-10} から 10^{-11} Mからなる群から選択されるIC₅₀で、IL-13 2受容体に対する前記IL-13の結合を阻止する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。好ましくは、抗体は、ヒトIL-13に結合し、細胞表面に基づく受容体結合アッセイにおいて 2.7×10^{-9} MのIC₅₀で、また、ELISAに基づく受容体結合アッセイにおいて 1.1×10^{-9} MのIC₅₀で、IL-13 2受容体に対

50

する前記 IL - 13 の結合を阻止する。好ましくは、単離抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト IL - 13 に結合し、細胞表面に基づく受容体結合アッセイにおいて、又は ELISA に基づく受容体結合アッセイにおいて、IL - 13 受容体に対する前記 IL - 13 の結合を 100 nM の濃度で約 70 - 100 % 阻害する。好ましくは、抗体は 13C5 . 5 である。より好ましくは、抗体は、BAK502G9 でも、mAb13 . 2 でも、MJ2 - 7 でもない。

【0013】

別の一態様においては、本発明は、ヒト IL - 13 に結合し、ヒト IL - 13 誘発性ぜん息モデルにおいて AHR を約 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % 抑制する、単離抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。好ましくは、抗体は、ヒト IL - 13 誘発性ぜん息モデルにおいて AHR を 86 % を超えて抑制する。別の一実施形態においては、単離抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト IL - 13 に結合し、ヒト IL - 13 誘発性ぜん息モデルにおいて、AHR を約 50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % 抑制し、粘液産生を約 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % 抑制する。好ましくは、抗体は 13C5 . 5 である。より好ましくは、抗体は、BAK502G9 でも、mAb13 . 2 でも、MJ2 - 7 でもない。

10

【0014】

一実施形態においては、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定して、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 又は少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の IL - 13 に対するオン速度定数 (k_{on}) を有する。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定して、 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の IL - 13 に対するオン速度定数 (k_{on}) を有する。

20

【0015】

別の一実施形態においては、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-3} s^{-1} 以下、約 10^{-4} s^{-1} 以下、約 10^{-5} s^{-1} 以下又は約 10^{-6} s^{-1} 以下の IL - 13 に対するオフ速度定数 (K_{off}) を有する。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定して、 10^{-3} s^{-1} から 10^{-4} s^{-1} 、 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} の IL - 13 に対するオフ速度定数 (K_{off}) を有する。

30

【0016】

別の一実施形態においては、本発明の結合タンパク質は、約 10^{-7} M 以下、約 10^{-8} M 以下、約 10^{-9} M 以下、約 10^{-10} M 以下、約 10^{-11} M 以下、約 10^{-12} M 以下又は 10^{-13} M 以下の IL - 13 に対する解離定数 (K_D) を有する。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、 10^{-7} M から 10^{-8} M 、 10^{-8} M から 10^{-9} M 、 10^{-9} M から 10^{-10} M 、 10^{-10} から 10^{-11} M 、 10^{-11} M から 10^{-12} M 、又は 10^{-12} M から 10^{-13} M の IL - 13 に対する解離定数 (K_D) を有する。

40

【0017】

好ましくは、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、a) 約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、若しくは約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、b) 表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、若しくは約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、又は c) 約 1.5×10^{-10} から $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、若しくは約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D) からなる群から選択される結合特性で IL - 13 に結合する。好ましくは、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、 $6.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $7.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $8.35 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $8.69 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $9.15 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.26 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.7 \times$

50

$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 及び $2.51 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される IL-13 に対するオン速度定数 (k_{on}) を有する。好ましくは、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表面プラズモン共鳴によって測定して、 $1.23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $4.74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.91 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $2.14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $3.82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $8.81 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 及び $9.65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される IL-13 に対するオフ速度定数 (K_{off}) を有する。好ましくは、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、 $1.05 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $7.10 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $2.20 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $2.72 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $4.17 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $5.68 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $7.01 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $7.10 \times 10^{-11} \text{ M}$ 及び $9.79 \times 10^{-11} \text{ M}$ からなる群から選択される IL-13 に対する解離定数 (K_D) を有する。

10

【0018】

本発明の一態様は、IL-13 上の特異的エピトープに結合可能な結合タンパク質に関する。好ましくは、特異的エピトープは、ヒト IL-13 の C 末端ヘリックス D 領域を含む。より好ましくは、特異的エピトープは、配列番号 1 のアミノ酸 104 - 130 に対応するアミノ酸配列 VRDTK I E V A Q F V K D L L L H L K K L F R E G R を含む。別の一態様においては、この抗体又は抗原結合性部分は、ヒト IL-13 の C 末端ヘリックス D 領域及び N 末端ヘリックス A 領域を含むエピトープに結合する。好ましくは、この抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 1 の局所領域 Ser 26 - Thr 27 - Ala 28 - Leu 29 - Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 - Glu 34 - Glu 35 - Leu 36 - Val 37 - Asn 38 及び Lys 123 - Lys 124 - Leu 125 - Phe 126 - Arg 127 - Glu - 128 - Gly 129 - Arg 130 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する。好ましくは、この抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 1 の局所領域 Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 - Glu 34 - Glu 35 - Leu 36 - Val 37 - Asn 38 及び Lys 123 - Lys 124 - Leu 125 - Phe 126 - Arg 127 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する。好ましくは、この抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 1 の局所領域 Ser 26 - Thr 27 - Ala 28 - Leu 29 - Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 - Glu 34 - Glu 35 - Leu 36 - Val 37 - Asn 38 及び Lys 123 - Lys 124 - Leu 125 - Phe 126 - Arg 127 - Glu - 128 - Gly 129 - Arg 130 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 2 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する。より好ましくは、この抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 1 の局所領域 Ser 26 - Thr 27 - Ala 28 - Leu 29 - Arg 30 - Glu 31 - Leu 32 - Ile 33 - Glu 34 - Glu 35 - Leu 36 - Val 37 - Asn 38 及び Lys 123 - Lys 124 - Leu 125 - Phe 126 - Arg 127 - Glu - 128 - Gly 129 - Arg 130 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 2 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合し、ただし、前記抗体は、BAK 502 G 9 でも MJ 2 - 7 でもない。最も好ましくは、抗体は 13 C 5 . 5 である。

20

30

40

【0019】

一態様においては、単離抗体又はその抗原結合性フラグメントは、IL-13 に結合し、ヘリックス A 及び D を含めて、IL-13 上のエピトープとの結合、約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、及

50

び約 1.5×10^{-10} から 1×10^{-10} M、又は約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D) からなる群から選択される結合特性で IL-13 2 受容体に対する IL-13 の結合を阻止する。別の一態様においては、この単離抗体又はその抗原結合性フラグメントは、変種 IL-13 に結合し、ヘリックス A 及び D を含めて、IL-13 上のエピトープとの結合、約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数 (k_{on})、表面プラズモン共鳴によって測定して、約 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} 、又は約 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} のオフ速度定数 (k_{off})、及び約 1.5×10^{-10} から 1×10^{-10} M、又は約 10^{-10} から 10^{-11} M の解離定数 (K_D) からなる群から選択される結合特性で IL-13 2 受容体に対する変種 IL-13 の結合を阻止する。

10

【0020】

本発明の一態様においては、IL-13 に結合可能な結合タンパク質、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも 1 個の CDR を含む前記抗原結合ドメイン。

【0021】

CDR-H1 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 64) (式中、

X_1 は、T、D、G 又は S であり、
 X_2 は S であり、
 X_3 は D であり、
 X_4 は、M、S、Y、L 又は H であり、
 X_5 は、G、W、Y、A、S 又は N であり、
 X_6 は、V、I 又は M であり、
 X_7 は、D、H、S、Y、N 又は G である。)、

20

CDR-H2 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号 65) (式中、

X_1 は、M、E、H、R、S、G 又は L であり、
 X_2 は、I であり、又は存在せず、
 X_3 は、H、Y、A、D、S 又は W であり、
 X_4 は、P、S、W 又は G であり、
 X_5 は、S、G、E 又は D であり、
 X_6 は、D、G、S、E 又は N であり、
 X_7 は、S、Y 又は G であり、
 X_8 は、E、N、Y、V 又は R であり、
 X_9 は、T、I 又は K であり、
 X_{10} は、R、Y、I、D 又は A であり、
 X_{11} は、L、Y、D 又は F であり、
 X_{12} は、N、P、S 又は D であり、
 X_{13} は、Q、E、D、P 又は S であり、
 X_{14} は、K、M、S、T、A 又は V であり、
 X_{15} は、F、L、V 又は M であり、
 X_{16} は、K、R 又は Q であり、
 X_{17} は、D、G 又は S である。)、

30

CDR-H3 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14}$ (配列番号 66) (式中、

X_1 は、W、T、G、Y、D 又は I であり、
 X_2 は、R、A、S、G 又は V であり、
 X_3 は、T、F、Y 又は S であり、
 X_4 は、S、T 又は Y であり、
 X_5 は、Y、F 又は G であり、

40

50

- X_6 は、F 又は Y であり、
 X_7 は、S、Y、I 又は F であり、
 X_8 は、D、L、Y 又は P であり、
 X_9 は Y であり、
 X_{10} は G であり、
 X_{11} は、Y、A、P 又は E であり、
 X_{12} は、F、M、S、L 又は I であり、
 X_{13} は、D、V、N 又は K であり、
 X_{14} は、Y 又は F である。)、
 C D R - L 1 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} -$ 10
 $X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17}$ (配列番号 67) (式中、
 X_1 は、K 又は R であり、
 X_2 は、S 又は A であり、
 X_3 は、S 又は T であり、
 X_4 は、Q、K 又は I であり、
 X_5 は、N、S、T、G 又は E であり、
 X_6 は、L、T 又は S であり、
 X_7 は、L、Q 又は V であり、
 X_8 は、Y、N、H、D 又は T であり、
 X_9 は、S、I 又は T であり、 20
 X_{10} は、S、D、N、H 又は Y であり、
 X_{11} は、N 又は G であり、
 X_{12} は Q であり、
 X_{13} は、K、F、N、E 又は S であり、
 X_{14} は、N、T 又は S であり、
 X_{15} は、Y 又は F であり、
 X_{16} は、L、A 又は M であり、
 X_{17} は、A、D、E、H 又は N である。)、
 C D R - L 2 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7$ (配列番号 68) (式中
 、 30
 X_1 は、L、S、K、T、W 又は Y であり、
 X_2 は、V、T 又は A であり、
 X_3 は、S 又は N であり、
 X_4 は、N、K、T、M 又は R であり、
 X_5 は、R、K 又は L であり、
 X_6 は、F、D、E、H、P 又は A であり、
 X_7 は、S、R 又は P である。)、及び
 C D R - L 3 . $X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9$ (配列番号
 69) (式中、 40
 X_1 は、F、W、Q 又は A であり、
 X_2 は、Q 又は L であり、
 X_3 は、H、G、Y、W 又は N であり、
 X_4 は、N、S、T、L 又は Y であり、
 X_5 は、Y、T、S、E 又は H であり、
 X_6 は、L、V、F、Y、N、G、P 又は D であり、
 X_7 は、P 又は H であり、
 X_8 は、L、F、Y、W 又は R であり、
 X_9 は、T 又は V である。)
【0022】
 好ましくは、抗原結合ドメインは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む 50

少なくとも 1 個の C D R を含む。

【 0 0 2 3 】

配列番号 3 2 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 3 2 の残基 5 0 - 6 6、	
配列番号 3 2 の残基 9 9 - 1 0 5、	
配列番号 3 3 の残基 2 4 - 3 9、	
配列番号 3 3 の残基 5 5 - 6 1、	
配列番号 3 3 の残基 9 4 - 1 0 2、	
配列番号 3 4 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 3 4 の残基 5 0 - 6 6、	10
配列番号 3 4 の残基 9 9 - 1 0 5、	
配列番号 3 5 の残基 2 4 - 3 9、	
配列番号 3 5 の残基 5 5 - 6 1、	
配列番号 3 5 の残基 9 4 - 1 0 2、	
配列番号 3 6 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 3 6 の残基 5 0 - 6 6、	
配列番号 3 6 の残基 9 9 - 1 0 9、	
配列番号 3 7 の残基 2 4 - 3 9、	
配列番号 3 7 の残基 5 5 - 6 1、	
配列番号 3 7 の残基 9 4 - 1 0 2、	20
配列番号 3 8 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 3 8 の残基 5 0 - 6 6、	
配列番号 3 8 の残基 9 9 - 1 0 9、	
配列番号 3 9 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 3 9 の残基 5 0 - 6 6、	
配列番号 3 9 の残基 9 9 - 1 1 2、	
配列番号 4 0 の残基 2 4 - 3 9、	
配列番号 4 0 の残基 5 5 - 6 1、	
配列番号 4 0 の残基 9 4 - 1 0 2、	
配列番号 4 1 の残基 3 1 - 3 5、	30
配列番号 4 1 の残基 5 0 - 6 6、	
配列番号 4 1 の残基 9 9 - 1 1 2、	
配列番号 4 2 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 4 2 の残基 5 0 - 6 6、	
配列番号 4 2 の残基 9 9 - 1 0 0、	
配列番号 4 3 の残基 2 4 - 3 9、	
配列番号 4 3 の残基 5 5 - 6 1、	
配列番号 4 3 の残基 9 4 - 1 0 2、	
配列番号 4 4 の残基 3 1 - 3 5、	
配列番号 4 4 の残基 5 0 - 6 5、	40
配列番号 4 4 の残基 9 8 - 1 0 6、	
配列番号 4 5 の残基 2 4 - 4 0、	
配列番号 4 5 の残基 5 6 - 6 2、	
配列番号 4 5 の残基 9 5 - 1 0 3、	
配列番号 4 6 の残基 3 2 - 3 8、	
配列番号 4 6 の残基 5 2 - 6 7、	
配列番号 4 6 の残基 1 0 0 - 1 1 2、	
配列番号 4 7 の残基 2 4 - 3 4、	
配列番号 4 7 の残基 5 0 - 5 6、	
配列番号 4 7 の残基 8 9 - 9 7、	50

配列番号 48 の残基 31 - 37、
 配列番号 48 の残基 52 - 67、
 配列番号 48 の残基 100 - 112、
 配列番号 49 の残基 24 - 34、
 配列番号 49 の残基 50 - 56、
 配列番号 49 の残基 89 - 97、
 配列番号 50 の残基 31 - 37、
 配列番号 50 の残基 52 - 67、
 配列番号 50 の残基 100 - 112、
 配列番号 51 の残基 24 - 34、
 配列番号 51 の残基 60 - 66、
 配列番号 51 の残基 89 - 97、
 配列番号 52 の残基 31 - 35、
 配列番号 52 の残基 50 - 66、
 配列番号 52 の残基 99 - 107、
 配列番号 53 の残基 23 - 36、
 配列番号 53 の残基 52 - 58、
 配列番号 53 の残基 91 - 99、
 配列番号 54 の残基 31 - 35、
 配列番号 54 の残基 50 - 65、
 配列番号 54 の残基 98 - 107、
 配列番号 55 の残基 24 - 38、
 配列番号 55 の残基 54 - 60、
 配列番号 55 の残基 93 - 101、
 配列番号 56 の残基 31 - 35、
 配列番号 56 の残基 50 - 65、
 配列番号 56 の残基 98 - 107、
 配列番号 57 の残基 24 - 38、
 配列番号 57 の残基 54 - 60、
 配列番号 57 の残基 93 - 101、
 配列番号 58 の残基 31 - 35、
 配列番号 58 の残基 50 - 65、
 配列番号 58 の残基 98 - 107、
 配列番号 59 の残基 24 - 38、
 配列番号 59 の残基 54 - 60、
 配列番号 59 の残基 93 - 101、
 配列番号 60 の残基 31 - 35、
 配列番号 60 の残基 50 - 65、
 配列番号 60 の残基 98 - 107、
 配列番号 61 の残基 24 - 38、
 配列番号 61 の残基 54 - 60、
 配列番号 61 の残基 93 - 101、
 配列番号 62 の残基 31 - 35、
 配列番号 62 の残基 50 - 65、
 配列番号 62 の残基 98 - 107、
 配列番号 63 の残基 24 - 38、
 配列番号 63 の残基 54 - 60、及び
 配列番号 63 の残基 93 - 101

10

20

30

40

【0024】

好ましい一実施形態においては、結合タンパク質は、以下からなる可変ドメイン C D R

50

セットから選択される少なくとも３個のＣＤＲを含む。

【 0 0 2 5 】

【 表 １ 】

VH 25C8 CDRセット	
VH 25C8 CDR-H1	配列番号32の残基31-35
VH 25C8 CDR-H2	配列番号32の残基50-66
VH 25C8 CDR-H3	配列番号32の残基99-105
VL 25C8 CDRセット	
VL 25C8 CDR-L1	配列番号33の残基24-39
VL 25C8 CDR-L2	配列番号33の残基55-61
VL 25C8 CDR-L3	配列番号33の残基94-102
VH 9C11 CDRセット	
VH 9C11 CDR-H1	配列番号34の残基31-35
VH 9C11 CDR-H2	配列番号34の残基50-66
VH 9C11 CDR-H3	配列番号34の残基99-105
VL 9C11 CDRセット	
VL 9C11 CDR-L1	配列番号35の残基24-39
VL 9C11 CDR-L2	配列番号35の残基55-61
VL 9C11 CDR-L3	配列番号35の残基94-102
VH 21D9 CDRセット	
VH 21D9 CDR-H1	配列番号36の残基31-35
VH 21D9 CDR-H2	配列番号36の残基50-66
VH 21D9 CDR-H3	配列番号36の残基99-109
VL 21D9 CDRセット	
VL 21D9 CDR-L1	配列番号37の残基24-39
VL 21D9 CDR-L2	配列番号37の残基55-61
VL 21D9 CDR-L3	配列番号37の残基94-102
VH 22D10 CDRセット	
VH 22D10 CDR-H1	配列番号38の残基31-35
VH 22D10 CDR-H2	配列番号38の残基50-66
VH 22D10 CDR-H3	配列番号38の残基99-109
VL 22D10 CDRセット	
VL 22D10 CDR-L1	配列番号37の残基24-39
VL 22D10 CDR-L2	配列番号37の残基55-61
VL 22D10 CDR-L3	配列番号37の残基94-102
VH 5F1 CDRセット	
VH 5F1 CDR-H1	配列番号39の残基31-35
VH 5F1 CDR-H2	配列番号39の残基50-66
VH 5F1 CDR-H3	配列番号39の残基99-112
VL 5F1 CDRセット	
VL 5F1 CDR-L1	配列番号40の残基24-39
VL 5F1 CDR-L2	配列番号40の残基55-61
VL 5F1 CDR-L3	配列番号40の残基94-102

10

20

30

40

VH 5G1 CDRセット	
VH 5G1 CDR-H1	配列番号41の残基31-35
VH 5G1 CDR-H2	配列番号41の残基50-66
VH 5G1 CDR-H3	配列番号41の残基99-112
VL 5G1 CDRセット	
VL 5G1 CDR-L1	配列番号40の残基24-39
VL 5G1 CDR-L2	配列番号40の残基55-61
VL 5G1 CDR-L3	配列番号40の残基94-102
VH 3H7 CDRセット	
VH 3H7 CDR-H1	配列番号42の残基31-35
VH 3H7 CDR-H2	配列番号42の残基50-66
VH 3H7 CDR-H3	配列番号42の残基99-100
VL 3H7 CDRセット	
VL 3H7 CDR-L1	配列番号43の残基24-39
VL 3H7 CDR-L2	配列番号43の残基55-61
VL 3H7 CDR-L3	配列番号43の残基94-102
VH 14B2 CDRセット	
VH 14B2 CDR-H1	配列番号44の残基31-35
VH 14B2 CDR-H2	配列番号44の残基50-65
VH 14B2 CDR-H3	配列番号44の残基98-106
VL 14B2 CDRセット	
VL 14B2 CDR-L1	配列番号45の残基24-40
VL 14B2 CDR-L2	配列番号45の残基56-62
VL 14B2 CDR-L3	配列番号45の残基95-103
VH 13C5 CDRセット	
VH 13C5 CDR-H1	配列番号46の残基32-38
VH 13C5 CDR-H2	配列番号46の残基52-67
VH 13C5 CDR-H3	配列番号46の残基100-112
VL 13C5 CDRセット	
VL 13C5 CDR-L1	配列番号47の残基24-34
VL 13C5 CDR-L2	配列番号47の残基50-56
VL 13C5 CDR-L3	配列番号47の残基89-97
VH 29G5 CDRセット	
VH 29G5 CDR-H1	配列番号48の残基31-37
VH 29G5 CDR-H2	配列番号48の残基52-67
VH 29G5 CDR-H3	配列番号48の残基100-112
VL 29G5 CDRセット	
VL 29G5 CDR-L1	配列番号49の残基24-34
VL 29G5 CDR-L2	配列番号49の残基50-56
VL 29G5 CDR-L3	配列番号49の残基89-97

10

20

30

40

VH 33C3 CDRセット	
VH 33C3 CDR-H1	配列番号50の残基31-37
VH 33C3 CDR-H2	配列番号50の残基52-67
VH 33C3 CDR-H3	配列番号50の残基100-112
VL 33C3 CDRセット	
VL 33C3 CDR-L1	配列番号51の残基24-34
VL 33C3 CDR-L2	配列番号51の残基60-66
VL 33C3 CDR-L3	配列番号51の残基89-97
VH 4A8 CDRセット	
VH 4A8 CDR-H1	配列番号52の残基31-35
VH 4A8 CDR-H2	配列番号52の残基50-66
VH 4A8 CDR-H3	配列番号52の残基99-107
VL 4A8 CDRセット	
VL 4A8 CDR-L1	配列番号53の残基23-36
VL 4A8 CDR-L2	配列番号53の残基52-58
VL 4A8 CDR-L3	配列番号53の残基91-99
VH 1B6 CDRセット	
VH 1B6 CDR-H1	配列番号54の残基31-35
VH 1B6 CDR-H2	配列番号54の残基50-65
VH 1B6 CDR-H3	配列番号54の残基98-107
VL 1B6 CDRセット	
VL 1B6 CDR-L1	配列番号55の残基24-38
VL 1B6 CDR-L2	配列番号55の残基54-60
VL 1B6 CDR-L3	配列番号55の残基93-101
VH 3E5 CDRセット	
VH 3E5 CDR-H1	配列番号56の残基31-35
VH 3E5 CDR-H2	配列番号56の残基50-65
VH 3E5 CDR-H3	配列番号56の残基98-107
VL 3E5 CDRセット	
VL 3E5 CDR-L1	配列番号57の残基24-38
VL 3E5 CDR-L2	配列番号57の残基54-60
VL 3E5 CDR-L3	配列番号57の残基93-101
VH 6C8 CDRセット	
VH 6C8 CDR-H1	配列番号58の残基31-35
VH 6C8 CDR-H2	配列番号58の残基50-65
VH 6C8 CDR-H3	配列番号58の残基98-107
VL 6C8 CDRセット	
VL 6C8 CDR-L1	配列番号59の残基24-38
VL 6C8 CDR-L2	配列番号59の残基54-60
VL 6C8 CDR-L3	配列番号59の残基93-101

10

20

30

40

VH 5D3 CDRセット	
VH 5D3 CDR-H1	配列番号60の残基31-35
VH 5D3 CDR-H2	配列番号60の残基50-65
VH 5D3 CDR-H3	配列番号60の残基98-107
VL 5D3 CDRセット	
VL 5D3 CDR-L1	配列番号61の残基24-38
VL 5D3 CDR-L2	配列番号61の残基54-60
VL 5D3 CDR-L3	配列番号61の残基93-101
VH 8B6 CDRセット	
VH 8B6 CDR-H1	配列番号62の残基31-35
VH 8B6 CDR-H2	配列番号62の残基50-65
VH 8B6 CDR-H3	配列番号62の残基98-107
VL 8B6 CDRセット	
VL 8B6 CDR-L1	配列番号63の残基24-38
VL 8B6 CDR-L2	配列番号63の残基54-60
VL 8B6 CDR-L3	配列番号63の残基93-101

10

【0026】

好ましくは、少なくとも2個の可変ドメインCDRセットを含む、結合タンパク質。好ましくは、少なくとも2個の可変ドメインCDRセットは、以下からなる群から選択される。

20

【0027】

VH 25C8 CDRセットとVL 25C8 CDRセット、
 VH 9C11 CDRセットとVL 9C11 CDRセット、
 VH 21D9 CDRセットとVL 21D9 CDRセット、
 VH 22D10 CDRセットとVL 22D10 CDRセット、
 VH 5F1 CDRセットとVL 5F1 CDRセット、
 VH 5G1 CDRセットとVL 5G1 CDRセット、
 VH 3H7 CDRセットとVL 3H7 CDRセット、
 VH 14B2 CDRセットとVL 14B2 CDRセット、
 VH 13C5 CDRセットとVL 13C5 CDRセット、
 VH 29G5 CDRセットとVL 29G5 CDRセット、
 VH 33C3 CDRセットとVL 33C3 CDRセット、
 VH 4A8 CDRセットとVL 4A8 CDRセット、
 VH 1B6 CDRセットとVL 1B6 CDRセット、
 VH 3E5 CDRセットとVL 3E5 CDRセット、
 VH 6C8 CDRセットとVL 6C8 CDRセット、
 VH 5D3 CDRセットとVL 5D3 CDRセット、及び
 VH 8B6 CDRセットとVL 8B6 CDRセット

30

40

【0028】

別の一実施形態においては、上で開示した結合タンパク質は、ヒト受容体フレームワークを更に含む。好ましくは、ヒト受容体フレームワークは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0029】

配列番号6
 配列番号7
 配列番号8
 配列番号9
 配列番号10

50

配列番号 1 1
 配列番号 1 2
 配列番号 1 3
 配列番号 1 4
 配列番号 1 5
 配列番号 1 6
 配列番号 1 7
 配列番号 1 8
 配列番号 1 9
 配列番号 2 0
 配列番号 2 1
 配列番号 2 2
 配列番号 2 3
 配列番号 2 4
 配列番号 2 5
 配列番号 2 6
 配列番号 2 7
 配列番号 2 8
 配列番号 2 9
 配列番号 3 0 及び
 配列番号 3 1

10

20

【 0 0 3 0 】

好ましい一実施形態においては、結合タンパク質は、IL - 13 に結合可能な CDR グラフト抗体又はその抗原結合性部分である。好ましくは、CDR グラフト抗体又はその抗原結合性部分は、上で開示した 1 個以上の CDR を含む。好ましくは、CDR グラフト抗体又はその抗原結合性部分は、ヒト受容体フレームワークを含む。より好ましくは、ヒト受容体フレームワークは、上で開示したヒト受容体フレームワークのいずれか 1 つである。

【 0 0 3 1 】

好ましい一実施形態においては、結合タンパク質は、IL - 13 に結合可能なヒト化抗体又はその抗原結合性部分である。好ましくは、ヒト化抗体又はその抗原結合性部分は、ヒト受容体フレームワークのヒト抗体可変ドメインに組み込まれた、上で開示した 1 個以上の CDR を含む。好ましくは、ヒト抗体可変ドメインはコンセンサスヒト可変ドメインである。より好ましくは、ヒト受容体フレームワークは、重要な残基における少なくとも 1 個のフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、重要な残基は、CDR に隣接する残基、グリコシル化部位残基、希少残基、ヒト IL - 13 と相互作用可能な残基、CDR と相互作用可能な残基、正準 (canonical) 残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の接触残基、バーニア (Vernier) ゾーン内の残基、及び Chothia によって定義された可変重鎖 CDR 1 と Kabat によって定義された第 1 の重鎖フレームワークとの重複領域中の残基からなる群から選択される。好ましくは、ヒト受容体フレームワークヒト受容体フレームワークは、少なくとも 1 個のフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、フレームワークのアミノ酸配列は、前記ヒト受容体フレームワークの配列と少なくとも 65 % 同一であり、前記ヒト受容体フレームワークと同一である少なくとも 70 個のアミノ酸残基を含む。好ましくは、重要な残基におけるフレームワーク領域アミノ酸置換は、2 L、15 L、22 L、41 L、42 L、44 L、49 L、50 L、51 L、62 L、71 L、73 L、10 H、44 H、46 H、48 H、67 H、68 H、70 H、72 H、74 H、76 H、83 H、84 H、86 H、87 H 及び 97 H からなる群から選択される。

30

40

【 0 0 3 2 】

好ましい一実施形態においては、結合タンパク質は、IL - 13 に結合可能なヒト化抗体又はその抗原結合性部分である。好ましくは、ヒト化抗体又はその抗原結合性部分は、

50

上で開示した 1 個以上の C D R を含む。より好ましくは、ヒト化抗体又はその抗原結合性部分は、上で開示した 3 個以上の C D R を含む。最も好ましくは、ヒト化抗体又はその抗原結合性部分は、上で開示した 6 個の C D R を含む。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の実施形態においては、ヒト化抗体又はその抗原結合性部分は、以下からなる群から選択される群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも 1 個の可変ドメインを含む。

【 0 0 3 4 】

配列番号 7 0

配列番号 7 1

配列番号 7 2

配列番号 7 3

配列番号 7 4

配列番号 7 5

配列番号 7 6

配列番号 7 7

配列番号 7 8

配列番号 7 9

配列番号 8 0

配列番号 8 1

配列番号 8 2

配列番号 8 3

配列番号 8 4

配列番号 8 5

配列番号 9 2

配列番号 9 3 及び

配列番号 9 4

10

20

【 0 0 3 5 】

より好ましくは、ヒト化抗体又はその抗原結合性部分は、上で開示した群から選択される 2 個の可変ドメインを含む。より好ましくは、結合タンパク質は、2 個の可変ドメインを含み、前記 2 個の可変ドメインは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 3 6 】

配列番号 7 0 と配列番号 7 1、

配列番号 7 2 と配列番号 7 3、

配列番号 7 4 と配列番号 7 5、

配列番号 7 6 と配列番号 7 7、

配列番号 7 8 と配列番号 7 9、

配列番号 8 0 と配列番号 8 1、

配列番号 8 2 と配列番号 8 3、

配列番号 8 4 と配列番号 8 5

配列番号 8 0 と配列番号 9 2、

配列番号 8 0 と配列番号 9 3 及び

配列番号 8 0 と配列番号 9 4

40

【 0 0 3 7 】

本発明の一実施形態は、上で開示した結合タンパク質のいずれか 1 つとリンカーポリペプチド又は免疫グロブリンとを含む抗体構築物を提供する。好ましい一実施形態においては、抗体構築物は、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D R グラフト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b')²、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、単ドメイン抗体、二重特異性抗体 (d i a b o d y)、多重特異性抗体

50

、二重特異性 (d u a l s p e c i f i c) 抗体、及び二重特異性 (b i s p e c i f i c) 抗体からなる群から選択される。好ましい一実施形態においては、抗体構築物は、ヒト I g M 定常ドメイン、ヒト I g G 1 定常ドメイン、ヒト I g G 2 定常ドメイン、ヒト I g G 3 定常ドメイン、ヒト I g G 4 定常ドメイン、ヒト I g E 定常ドメイン及びヒト I g A 定常ドメインからなる群から選択される重鎖免疫グロブリン定常ドメインを含む。より好ましくは、抗体構築物は、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 及び配列番号 5 を含む。別の一実施形態においては、本発明は、上で開示した抗体構築物と、免疫接着分子、造影剤、治療薬及び細胞毒性薬からなる群から選択される薬剤とを含む抗体複合体を提供する。好ましい一実施形態においては、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁性標識及びビオチンからなる群から選択される造影剤。より好ましくは、造影剤は、³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho 及び ¹⁵³Sm からなる群から選択される放射性標識である。好ましい一実施形態においては、治療薬又は細胞毒性薬は、代謝拮抗物質、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、血管新生阻害剤、有糸分裂阻害剤、アントラサイクリン、毒素及びアポトーシス剤からなる群から選択される。

10

【 0 0 3 8 】

別の一実施形態においては、抗体構築物はグリコシル化されている。好ましくは、グリコシル化はヒトグリコシル化パターンである。

【 0 0 3 9 】

別の一実施形態においては、上で開示した結合タンパク質、抗体構築物又は抗体複合体は、結晶として存在する。好ましくは、結晶は、担体を含まない医薬制御放出結晶である。好ましい一実施形態においては、結晶化結合タンパク質、結晶化抗体構築物、又は結晶化抗体複合体は、その可溶性対応物よりも長い生体内半減期を有する。別の好ましい一実施形態においては、結晶化結合タンパク質、結晶化抗体構築物、又は結晶化抗体複合体は、結晶化後も生物活性を保持する。

20

【 0 0 4 0 】

本発明の一態様は、I L - 1 3 に結合可能な結合タンパク質を含む D V D 結合タンパク質に関する。好ましくは、D V D 結合タンパク質は、I L - 1 3 及び第 2 の標的に結合可能である。第 2 の標的は、C S F 1 (M C S F)、C S F 2 (G M - C S F)、C S F 3 (G C S F)、F G F 2、I F N 1、I F N 1、I F N 、ヒスタミン及びヒスタミン受容体、I L - 1 、I L - 1 、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 2 、I L - 1 2 、I L - 1 4、I L - 1 5、I L - 1 6、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 1 9、K I T L G、P D G F B、I L - 2 R 、I L - 4 R、I L - 5 R 、I L - 8 R 、I L - 8 R 、I L - 1 2 R 1、I L - 1 2 R 2、I L - 1 3 R 1、I L - 1 3 R 2、I L - 1 8 R 1、T S L P、C C L 1、C C L 2、C C L 3、C C L 4、C C L 5、C C L 7、C C L 8、C C L 1 3、C C L 1 7、C C L 1 8、C C L 1 9、C C L 2 0、C C L 2 2、C C L 2 4、C X 3 C L 1、C X C L 1、C X C L 2、C X C L 3、X C L 1、C C R 2、C C R 3、C C R 4、C C R 5、C C R 6、C C R 7、C C R 8、C X 3 C R 1、G P R 2、X C R 1、F O S、G A T A 3、J A K 1、J A K 3、S T A T 6、T B X 2 1、T G F B 1、T N F S F 6、Y Y 1、C Y S L T R 1、F C E R 1 A、F C E R 2、L T B 4 R、T B 4 R 2、L T B R 並びにキチナーゼからなる群から選択される。より好ましくは、D V D タンパク質は、I L - 1 3 及び I L - 1 、I L - 1 3 及び I L - 9 ; I L - 1 3 及び I L - 4 ; I L - 1 3 及び I L - 5 ; I L - 1 3 及び I L - 2 5 ; I L - 1 3 及び T A R C ; I L - 1 3 及び M D C ; I L - 1 3 及び M I F ; I L - 1 3 及び T G F - ; I L - 1 3 及び L H R 作動物質 ; I L - 1 3 及び C L 2 5 ; I L - 1 3 及び S P R R 2 a ; I L - 1 3 及び S P R R 2 b 又は I L - 1 3 及び A D A M 8 を認識可能である。最も好ましくは、D V D タンパク質は、I L - 1 3 及び T N F に結合可能である。

30

40

【 0 0 4 1 】

50

本発明の一態様は、上で開示した結合タンパク質、抗体構築物又は抗体複合体のいずれか1つをコードする単離核酸に関する。更なる一実施形態は、上で開示した単離核酸を含むベクターを提供する。前記ベクターは、p c D N A、p T T (Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 2)、p T T 3 (追加のマルチクローニング部位を有するp T T、p E F B O S (Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17)、p B V、p J V及びp B Jからなる群から選択される。

【0042】

別の一態様においては、宿主細胞は、上で開示したベクターで形質転換される。好ましくは、宿主細胞は原核細胞である。より好ましくは、宿主細胞はE. コリ (E. coli) である。関連した一実施形態においては、宿主細胞は真核細胞である。好ましくは、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される。より好ましくは、宿主細胞は、CHO及びCOSを含めて、ただしこれらだけに限定されないほ乳動物細胞、サッカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) などの真菌細胞、又はSf9などの昆虫細胞である。

【0043】

本発明の別の一態様は、IL-13に結合する結合タンパク質の製造に十分な条件下で、上で開示した宿主細胞のいずれか1つを培地中で培養することを含む、IL-13に結合する結合タンパク質を製造する方法を提供する。別の一実施形態は、上で開示した方法によって製造された結合タンパク質を提供する。

【0044】

一実施形態は、結合タンパク質の放出用組成物を提供する。該組成物は、上で開示した結晶化結合タンパク質、結晶化抗体構築物又は結晶化抗体複合体及び成分を含む製剤と、少なくとも1種類の重合体担体とを含む。好ましくは、重合体担体は、ポリアクリル酸、ポリシアノアクリレート、ポリアミノ酸、ポリ無水物、ポリデブシペプチド、ポリエステル、ポリ乳酸、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)又はPLGA、ポリb-ヒドロキシブチレート、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン；ポリエチレングリコール、ポリ(ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ(オルガノ)ホスファゼン、ポリオルトエステル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテルコポリマー、Pluronicポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロース及びセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリコサミノグリカン (glycaminoglycan)、硫酸化多糖 (polysaccharide)、これらの混合物及びコポリマーからなる群の1つ以上から選択されるポリマーである。好ましくは、成分は、アルブミン、スクロース、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールからなる群から選択される。別の一実施形態は、上で開示した組成物の有効量をほ乳動物に投与する段階を含む、ほ乳動物を治療する方法を提供する。

【0045】

本発明は、上で開示した結合タンパク質、抗体構築物又は抗体複合体と薬学的に許容される担体とを含む薬剤組成物も提供する。更なる一実施形態においては、薬剤組成物は、IL-13活性が有害である障害を治療する少なくとも1種類の追加の治療薬を含む。好ましくは、追加の薬剤は、治療薬、造影剤、細胞毒性薬、(抗VEGF抗体又はVEGF捕捉剤 (VEGF-trap) を含めて、ただしこれらだけに限定されない) 血管新生阻害剤；(KDR及びTIE-2阻害剤を含めて、ただしこれらだけに限定されない) キナーゼ阻害剤；(抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig、抗CD20を含めて、ただしこれらだけに限定されない) 同時刺激分子遮断薬；(抗LFA-1 Ab、抗E/LセレクチンAb、小分子阻害剤を含めて、ただしこれらだけに限定されない) 接着分子遮断薬；(抗IL-18、抗TNF、抗IL-6/サイトカイン受容体抗体を含めて、ただし

これらだけに限定されない) 抗サイトカイン抗体又はその機能的断片; メトトレキサート; シクロスポリン; ラパマイシン; F K 5 0 6; 検出可能な標識又はレポーター; T N F 拮抗物質; 抗リウマチ薬; 筋弛緩薬、麻薬、非ステロイド抗炎症薬 (N S A I D)、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤、乾せん治療薬、コルチコステロイド、タンパク質同化ステロイド、エリスロポイエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神病薬、刺激薬、ぜん息治療薬、ベータ作動物質、吸入ステロイド、エピネフリン又は類似体、サイトカイン、及びサイトカイン拮抗物質からなる群から選択される。

【 0 0 4 6 】

別の一態様においては、本発明は、ヒト I L - 1 3 活性が阻害されるようにヒト I L - 1 3 を上で開示した結合タンパク質と接触させることを含む、ヒト I L - 1 3 活性を阻害する方法を提供する。関係する一態様においては、本発明は、ヒト対象におけるヒト I L - 1 3 活性が阻害され、治療が達成されるように、上で開示した結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む、I L - 1 3 活性が有害である障害に罹患したヒト対象において、ヒト I L - 1 3 活性を阻害する方法を提供する。

10

【 0 0 4 7 】

別の一態様においては、本発明は、対象における I L - 1 3 関連障害を治療 (例えば、治癒、抑制、改善、発症の遅延若しくは防止、又は回帰 (r e c u r r e n c e) 若しくは再発 (r e l a p s e) の防止) 又は予防する方法を提供する。この方法は、I L - 1 3 関連障害の治療又は予防に十分な量の I L - 1 3 結合剤 (特に、拮抗物質)、例えば、本明細書に記載の抗 I L - 1 3 抗体又はその断片を対象に投与することを含む。I L - 1 3 拮抗物質、例えば、抗 I L - 1 3 抗体又はその断片は、単独で、又は本明細書に記載の他の治療様式と組み合わせて、対象に投与することができる。

20

【 0 0 4 8 】

一実施形態においては、対象は、1種類以上の I L - 1 3 関連障害 (本明細書に記載の、例えば、呼吸器障害 (例えば、ぜん息 (例えば、アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息)、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、気道炎症を伴う他の症状、好酸球増加症、線維症及び過剰粘液産生; アトピー性障害 (例えば、アトピー性皮膚炎及びアレルギー性鼻炎); 皮膚、胃腸器官 (例えば、潰瘍性大腸炎及び/又はクローン病などの炎症性腸疾患 (I B D)) 及び肝臓 (例えば、硬変、線維症) の炎症性及び/又は自己免疫性症状; 強皮症; 腫瘍又は癌、例えば、ホジキンリンパ腫) に罹患したほ乳動物、例えばヒトである。したがって、開示は、本明細書に記載の治療のための I L - 1 3 結合剤 (本明細書に記載の抗 I L - 1 3 抗体又はその断片など) の使用、及び本明細書に記載の治療用医薬品を調製するための I L - 1 3 結合剤 (本明細書に記載の抗 I L - 1 3 抗体又はその断片など) の使用を含む。I L - 1 3 関連障害の例としては、本明細書に記載の、呼吸器障害、例えば、ぜん息 (例えば、アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息 (例えば低年齢小児における、例えば呼吸器合胞体ウイルス (R S V) による、感染に起因するぜん息など))、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)、気道炎症を伴う他の症状、好酸球増加症、線維症及び過剰粘液産生、例えば、嚢胞性線維症及び肺線維症; 例えば I L - 1 3 に対する感受性の増加に起因する、アトピー性障害 (例えば、アトピー性皮膚炎、じんま疹、湿疹、アレルギー性鼻炎及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、潰瘍性大腸炎及び/又はクローン病などの炎症性腸疾患 (I B D))、肝臓 (例えば、硬変、肝細胞癌) の炎症性及び/又は自己免疫性症状、及び強皮症; 白血病、グリア芽細胞腫、リンパ腫 (例えば、ホジキンリンパ腫) などの腫瘍又は癌 (例えば、軟部組織又は固形腫瘍); (例えば、H T L V - 1 による) ウイルス感染; 他の器官の線維症、例えば、肝臓の線維症 (例えば、B 及び/又は C 型肝炎ウイルスによって引き起こされる線維症) 並びに (例えば、ワクチン接種中の) 1 型防御免疫応答の発現抑制のうちの 1 つ以上から選択される障害が挙げられるが、これらだけに限定されない。

30

40

【 0 0 4 9 】

別の実施形態においては、本願は、呼吸器障害に関連する 1 つ以上の症候、例えば、ぜ

50

ん息（例えば、アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息）；アレルギー；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気道炎症を伴う症状、好酸球増加症、線維症及び過剰粘液産生、例えば、嚢胞性線維症及び肺線維症を治療（例えば、低減、改善）又は予防する方法を提供する。例えば、ぜん息の症候としては、喘鳴音、呼吸促迫、気管支収縮、気道過敏、肺気量減少、線維症、気道炎症及び粘液産生が挙げられるが、これらだけに限定されない。この方法は、1つ以上の症候の治療（例えば、低減、改善）又は予防に十分な量のIL-13拮抗物質、例えば、IL-13抗体又はその断片を対象に投与することを含む。IL-13抗体は、治療的に、若しくは予防的に、又は治療と予防の両方で投与することができる。IL-13拮抗物質、例えば、抗IL-13抗体又はその断片は、単独で、又は本明細書に記載の他の治療様式と組み合わせて、対象に投与することができる。好ましくは、対象は、本明細書に記載のIL-13関連障害に罹患したほ乳動物、例えばヒトである。

10

【0050】

別の一態様においては、本願は、試料（例えば、血清、血しょう、組織、生検などの生物試料）中のIL-13の存在をインビトロで検出する方法を提供する。この方法は、障害、例えば、免疫細胞関連障害の診断に使用することができる。この方法は、(i)試料又は対照試料を本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片と接触させること、及び(ii)抗IL-13抗体又はその断片と試料又は対照試料との複合体の形成を検出することを含み、対照試料と比較して、試料中の複合体形成の統計的に有意な変化によって、試料中のIL-13の存在が示される。

20

【0051】

更に別の一態様においては、本願は、IL-13の存在を生体内で検出する方法（例えば、対象における生体内(in vivo)イメージング)を提供する。この方法は、障害、例えば、IL-13関連障害の診断に使用することができる。この方法は、(i)本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片を、抗体又は断片とIL-13の結合を可能にする条件下で、対象又は対照対象に投与すること、及び(ii)抗体又は断片とIL-13の複合体の形成を検出することを含み、対照対象と比較して、対象における複合体形成の統計的に有意な変化によって、IL-13の存在が示される。

30

【0052】

別の一態様においては、本発明の結合タンパク質は、関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾せん性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、ぜん息、アレルギー疾患、乾せん、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に付随する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、グレーブス病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホシェーンライン紫斑病、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫症、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性多内分泌腺機能低下I型及び多内分泌腺機能低下II型、シュミット症候群、成人(急性)呼吸窮迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清陰性関節症、関節症、ライター病、乾せん性関節症、潰瘍性結腸炎性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラに関連した関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患/動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水ぼうそう症、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎/ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症(分類不能型低ガンマグロブリン血症)、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、原因不明性線維化肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織病関連間質性肺疾患、混合性結合組織病関連肺

40

50

疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、リウマチ様関節炎関連間質性肺疾患、全身性エリテマトーデス関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連肺疾患、薬剤性間質性肺疾患、線維症、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ性浸潤性肺疾患、感染後の間質性肺疾患、痛風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫又はルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫に付随するB型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に付随する急性免疫疾患、臓器移植に付随する慢性免疫疾患、骨関節症、原発性硬化性胆管炎、乾せん1型、乾せん2型、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、NOS腎疾患、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状エリテマトーデス、特発性又はNOS男性不妊症、精子自己免疫、多発性硬化症（全サブタイプ）、交感性眼炎、結合組織病に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発性動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ様脊椎炎、スティル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体原性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑 急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（choleostasis）、特異体質性肝疾患、薬剤性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギー及びぜん息、B群レンサ球菌（GBS）感染、精神障害（例えば、うつ病及び統合失調症）、Th2型及びTh1型媒介性疾患、急性及び慢性痛（とう痛の異なる形態）、肺癌、乳癌、胃癌、ぼうこう癌、結腸癌、すい臓癌、卵巣癌、前立腺癌、直腸癌、造血器悪性腫瘍（白血病及びリンパ腫）などの癌、無ベータリポタンパク質血症（abetalipoproteinemia）、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性過程、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性又は慢性細菌感染、急性すい炎、急性腎不全、腺癌、空気異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植片拒絶、アルファ-1-抗トリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3療法、抗リン脂質抗体症候群、抗受容体過敏反応、大動脈（aortic）及び末梢動脈りゅう、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈ろう、運動失調、（持続性又は発作性）心房細動、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心臓不整脈、心臓不全（stun）症候群、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性症、小脳疾患、無秩序型又は多源性心房頻拍、化学療法関連障害、クロム（chromic）骨髄性白血病（CML）、慢性アルコール依存症、慢性炎症性症状、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連障害、ボクサー認知症、脱髄疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化症、びまん性レヴィー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の障害、中年のダウン症候群、CNSドパミン受容体を遮断する薬物によって誘発される薬剤性運動障害、薬剤感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタインバーウイルス感染症、紅痛症、錐体外路障害及び小脳疾患、家族性食血細胞リンパ組織球増多症、胎児胸腺移植片拒絶、フリードライヒ失調症、末梢動脈機能障害、真菌性敗血症、ガス壊そ、胃潰瘍、糸球体腎炎、任意の器官又は組織の移植片拒絶、グラム陰性菌敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物体による肉芽腫、有毛細胞白血病、Hallerrorden-Spatz病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解性血小板減少性紫斑病、出血、肝炎（A）、ヒス束不整脈、HIV感染／HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰症、過敏（hypersensitivity）反応、過敏性肺炎、高血圧症、運動低下症（hypokinetic movement disorde

r)、視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞傷害性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性脳卒中、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ライ病、皮質脊髄系の病変、脂肪性浮腫、肝移植拒絶、リンパ浮腫、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症、代謝性/特発性片頭痛、ミトコンドリア多系統障害、混合性結合組織病、モノクローナル免疫グロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性症(Mencel Dejerine - Thomas Shi - Drager and Machado - Joseph)、重症筋無力症、トリ型マイコバクテリウム イントラセルラーレ(Mycobacterium avium intracellulare)、マイコバクテリウム テュバキュローシス(Mycobacterium tuberculosis)、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血性障害、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈及びその枝の閉塞、閉塞性動脈障害、okt3療法、睾丸炎/精巣上体炎、睾丸炎/精管復元術、臓器肥大、骨粗しょう症、すい臓移植拒絶、すい癌、腫瘍随伴症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢動脈硬化性疾患、末梢血管障害、腹膜炎、悪性貧血、カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群(多発性神経障害、臓器肥大、内分泌疾患、モノクローナル免疫グロブリン血症及び皮膚変化症候群)、体外灌流後(post perfusion)症候群、体外循環後(post pump)症候群、心筋梗塞後の開心術症候群、子かん前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧症、放射線療法、レイノー現象及び疾患、Raynaud病、レフス病、規則正しい幅の狭いQRS頻拍、腎血管性高血圧、再灌流傷害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老人性舞蹈病、レヴィー小体型老年認知症、血清反応陰性関節症、ショック、鎌状赤血球貧血、皮膚同種移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、特異的不整脈、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性症、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症型若年性関節リウマチ、T細胞又はFAB ALL、末梢血管拡張、閉塞性血栓性血管炎、血小板減少症、毒性、移植片、外傷/出血、III型過敏反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんま疹、心臓弁膜症、静脈リゅう、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルス及び真菌感染、致命的な脳炎/無菌性髄膜炎、生命に関連する血球貪食症候群、ウェルニッケ コルサコフ症候群、ウィルソン病、任意の器官又は組織の異種移植片拒絶、急性冠動脈症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根筋障害、急性虚血、成人スティル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、ストレプトコッカス(Streptococcus)感染に付随する自己免疫異常、自己免疫性腸疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ球増殖性症候群(ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣機能不全、眼けん炎、気管支拡張症、水ぼうそう性類天ほうそう、循環器疾患、破局的な抗リン脂質抗体症候群、セリアック病、頸椎症、慢性虚血、はん痕性類天ほうそう、多発性硬化症のリスクがある、最初のエピソードからなる症候群(clinically isolated syndrome)(CIS)、結膜炎、小児期発症型精神障害、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、涙囊炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物性免疫溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症多形性紅斑、妊娠性類天ほうそう、ギラン バレー症候群(GBS)、枯草熱、Hughes症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、IGE媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼球炎症性疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、IPF/UIP、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎(Keratoconjunctivitis sicca)、クスマウル病又はKussmaul - Meier病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性症、顕微鏡的多発性血管炎、Bec

t e r e v 病、運動ニューロン障害、粘膜類天ほうそう、多臓器不全、重症筋無力症、骨髓異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非 A 型非 B 型肝炎、視神経炎、骨溶解、少関節性 J R A、末梢動脈閉塞性疾患 (P A O D)、末梢血管疾患 (P V D)、末梢動脈疾患 (P A D)、静脈炎、結節性多発性動脈炎 (又は結節性動脈周囲炎)、多発性軟骨炎、リウマチ性多発筋痛、白毛症、多関節性 J R A、多内分泌腺機能低下症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発筋痛 (P M R)、体外循環後症候群、原発性パーキンソン症、前立腺

炎、赤芽球ろう、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、S A P H O (滑膜炎、アクネ、膿ほう症、骨過形成及び骨髄炎)、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経症、続発性副腎不全、シリコン関連結合組織病、スネドン - ウィルキンソン皮膚疾患、強直性脊椎炎 (s p o n d i l i t i s a n k y l o s a n s)、スティーブンス ジョンソン症候群 (S J S)、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮壊死症、横断性脊髄炎、T R A P S (腫よう壊死因子受容体、1 型アレルギー反応、I I 型糖尿病、じんま疹、通常型間質性肺炎 (U I P)、血管炎、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト - 小柳 - 原田症候群 (V K H 症候群)、しん出型黄斑変性症、並びに創傷治癒からなる群から選択される障害の治療に有用である。

【 0 0 5 3 】

別の一態様においては、本発明の結合タンパク質は、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、肛門癌、虫垂癌、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫、基底細胞癌、胆管癌、肝臓外 (e x t r a h e p a t i c)、ぼうこう癌、骨癌、骨肉腫 / 悪性線維性組織球腫 脳幹神経こう腫、脳腫よう、脳幹神経こう腫、大脳星細胞腫 (s t r o c y t o m a) / 悪性神経こう腫、上衣細胞腫、髄芽腫、テント上未分化神経外胚葉性腫よう、視覚路及び視床下部神経こう腫、乳癌、気管支腺腫 / カルチノイド、カルチノイド腫よう、カルチノイド腫よう、原発不明胃腸癌、中枢神経系リンパ腫、原発性小脳星細胞腫、子宮頸癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病 慢性骨髄増殖性疾患、結腸癌、結腸直腸癌、皮膚 T 細胞リンパ腫、子宮体癌、上衣細胞腫、食道癌、ユーイング腫よう (E w i n g f a m i l y o f t u m o u r)、頭蓋外胚細胞腫よう、性腺外胚細胞腫よう、肝外胆管癌、眼癌、眼球内黒色腫 網膜芽細胞腫、胆嚢癌、胃 (胃部) 癌、消化管カルチノイド腫よう、消化管間質腫よう (G I S T)、頭蓋外胚細胞腫よう、性腺外胚細胞腫よう、卵巣胚細胞腫よう、妊娠性じゅう毛性腫よう、神経こう腫、脳幹神経こう腫、大脳星細胞腫 神経こう腫、小児視覚路及び視床下部神経こう腫、有毛細胞白血病、頭頸部癌、肝細胞性 (肝臓) 癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼球内黒色腫、すい島細胞癌 (すい内分泌部)、カボジ肉腫、腎臓 (腎細胞) 癌、喉頭癌、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、有毛細胞白血病、口唇癌と口腔癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、A I D S 関連リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚 T 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫 / 骨肉腫、髄芽腫、黒色腫、眼内 (眼) 黒色腫、メルケル細胞癌、悪性中皮腫、原発不明の転移性へん平上皮性頸部癌、口腔癌、多発性内分泌腫よう症候群、多発性骨髄腫 / 形質細胞腫よう、菌状息肉腫、骨髓異形成症候群、骨髓異形成 / 骨髓増殖性疾患、骨髓性白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、骨髓増殖性疾患、鼻腔及び副鼻腔癌、上咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔癌、口腔の癌、口唇癌と中咽頭癌、骨肉腫 / 骨の悪性線維性組織球腫、卵巣癌、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫よう、境界悪性卵巣腫よう、すい癌、島細胞すい癌、副鼻腔及び鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、クロム親和細胞腫、松果体芽腫及びテント上未分化神経外胚葉性腫よう、下垂体腫よう、形質細胞腫よう / 多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞 (腎臓) 癌、腎う及び尿管移行上皮癌、網膜芽細胞腫、唾液腺癌、肉腫、ユーイング腫よう、カボジ肉腫、軟部組織肉腫、子宮肉腫、セザリー症候群、(非黒色腫性) 皮膚癌、皮膚癌 (黒色腫)、メルケル細胞皮膚癌、小腸癌、へん平上皮癌、原発不明の転移性へん平上皮性頸部癌、胃 (胃部) 癌、テント上未分化神経外胚葉性腫よ

10

20

30

40

50

う、皮膚T細胞リンパ腫、精巣癌、咽頭癌、胸腺腫、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺癌、腎う及び尿管の移行上皮癌、妊娠性じゅう毛性腫瘍、尿管及び腎う移行上皮癌、尿道癌、子宮癌、子宮内膜肉腫、膣癌、視覚路及び視床下部神経こう腫、外陰癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍からなる群から選択される障害の治療に有用である。

【0054】

別の態様においては、本発明は、上述したように、第2の薬剤の投与前、投与と同時に、又は投与後に、上で開示した結合タンパク質のいずれか1つを投与する段階を含む、ヒトIL-13が有害である障害に罹患した患者を治療する方法を提供する。好ましい一実施形態においては、1種類以上のIL-13拮抗物質（例えば、抗IL-13抗体又はその断片）と同時に投与及び/又は同時処方することができる追加の治療薬としては、吸入ステロイド；経口ステロイド；ベータ作動物質、例えば、短時間作用性又は長時間作用性ベータ作動物質；ロイコトリエン又はロイコトリエン受容体の拮抗物質；ADV AIRなどの複合薬；IGE阻害剤、例えば、抗IGE抗体（例えば、XOLAIR）；ホスホジエステラーゼ阻害薬（例えば、PDE4阻害剤）；キサンチン；抗コリン作用薬；クロモリンなどの肥満細胞安定剤；IL-4阻害剤；IL-5阻害剤；エオタキシン/CCR3阻害剤；ヒスタミン又はH1、H2、H3及びH4を含めたその受容体の拮抗物質、並びにプロスタグランジンD又はその受容体（DP1及びCRTH2）の拮抗物質のうちの1種類以上が挙げられるが、これらだけに限定されない。かかる組合せは、ぜん息及び他の呼吸器障害の治療に使用することができる。1種類以上の抗IL-13抗体又はその断片と同時投与及び/又は同時処方することができる治療薬の追加の例としては、とりわけ、TNF拮抗物質（例えば、TNF受容体（例えば、p55若しくはp75ヒトTNF受容体又はその誘導体）の可溶性断片、例えば、75kD TNFR-IGG（75kD TNF受容体-IGG融合タンパク質、ENBREL））；TNF酵素拮抗物質、例えば、TNF変換酵素（TACE）阻害剤；ムスカリン受容体拮抗物質；TGFベータ拮抗物質；インターフェロンガンマ；ビルフェニドン；化学療法剤、例えば、メトトレキサート、レフルノミド若しくはシロリムス（ラパマイシン）又はその類似体、例えば、CCI-779；COX2及びcPLA2阻害剤；NSAID；免疫調節物質；p38阻害剤、TPL-2、MK-2及びNFkB阻害剤のうちの1種類以上が挙げられる。追加の第2の薬剤は、ブデノシド（budenoside）、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リポキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、IL-1受容体拮抗物質、抗IL-1モノクローナル抗体、抗IL-6モノクローナル抗体、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及びPDGFの抗体又は作動物質、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90又はこれらのリガンドの抗体、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、コルチコステロイド、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデノシン作動物質、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、可溶性サイトカイン受容体、可溶性p55 TNF受容体、可溶性p75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、IL-11並びにTGFからなる群から選択される。

【0055】

好ましい一実施形態においては、上で開示した薬剤組成物を、非経口、皮下、筋肉内、

10

20

30

40

50

静脈内、関節内、気管支内、腹腔内 (i n t r a a b d o m i n a l)、嚢内、軟骨内、腔内 (i n t r a c a v i t a r y)、腔内 (i n t r a c e l l i a l)、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内 (i n t r a p e r i t o n e a l)、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、ぼうこう内、ポース、膺、直腸、頬、舌下、鼻腔内及び経皮から選択される少なくとも1つの様式によって、対象に投与する。

【 0 0 5 6 】

本発明の一態様は、本発明の少なくとも1種類のIL-13結合タンパク質に対する少なくとも1種類のIL-13抗イディオタイプ抗体を提供する。抗イディオタイプ抗体としては、本発明の結合タンパク質に組み入れることができる、重鎖若しくは軽鎖の少なくとも1個の相補性決定領域 (C D R) 又はそのリガンド結合部分、重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク領域、又はその任意の部分など、ただしこれらだけに限定されない、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む分子を含む任意のタンパク質又はペプチドが挙げられる。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 5 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、IL-13に結合するヒトIL-13結合タンパク質、特に抗IL-13抗体又はその抗原結合性部分に関する。本発明の種々の態様は、抗体及び抗体断片、その薬剤組成物、並びにかかる抗体及び断片を製造するための核酸、組換え発現ベクター及び宿主細胞に関する。本発明の抗体を使用して、ヒトIL-13を検出し、インビトロ又は生体内でヒトIL-13活性を阻害し、また、遺伝子発現を調整する各方法も本発明に包含される。

【 0 0 5 8 】

別段の記載がない限り、本発明に関連して用いられる科学及び技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味を有するものとする。これらの用語の意味及び範囲は明確であるはずであるが、潜在的な多義性が万一発生した場合には、本明細書の定義が辞書又は外部からの定義よりも先行する。また、状況が必要としない限り、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含むものとする。本願では、特段の記載がない限り、「又は」を使用するときには「及び/又は」を意味する。また、「含めて」という用語、及び「含む」、「含まれる」などの他の形態の使用は、限定的なものではない。また、「要素」、「成分」などの用語は、特段の記載がない限り、1個の単位を含む要素及び成分と、1個を超える亜単位を含む要素及び成分の両方を包含する。

【 0 0 5 9 】

一般に、本明細書に記載の細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質・核酸化学並びにハイブリダイゼーションに関連して用いられる命名法及びその技術は、当分野で周知であり、一般に用いられるものである。本発明の方法及び技術は、別段の記載がない限り、当分野で周知の従来法によって一般に実施され、本明細書を通して引用及び考察される種々の一般的参考文献及びより具体的な参考文献に記載のように実施される。酵素反応及び精製技術は、製造者の仕様書に従って実施され、当分野で一般に実施されるとおりに実施され、又は本明細書に記載のとおり実施される。本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、医薬品化学及び製薬化学に関連して使用される命名法並びにその実験手順及び技術は、当分野で一般に使用される周知のものである。化学合成、化学分析、調剤、処方、送達、及び患者の治療には標準技術を使用する。

【 0 0 6 0 】

本発明をより容易に理解することができる。選択された用語を以下に定義する。

【 0 0 6 1 】

本明細書では「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の任意の重合体鎖を指す。「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、ポリペプチドという用語と区別なく使用され、アミノ酸の重合体鎖も指す。「ポリペプチド」という用語は、未変性又は人工タンパク

質、タンパク質断片、及びタンパク質配列のポリペプチド類似体を包含する。ポリペプチドは、単量体でも重合体でもよい。

【0062】

「単離タンパク質」又は「単離ポリペプチド」という用語は、その由来の起源若しくは出所のために、その天然状態でそれに伴う天然に付随する成分が付随しないタンパク質若しくはポリペプチド、同じ種由来の他のタンパク質を実質的に含まないタンパク質若しくはポリペプチド、異なる種由来の細胞によって発現されるタンパク質若しくはポリペプチド、又は天然に存在しないタンパク質若しくはポリペプチドである。したがって、ポリペプチドが天然に生ずる細胞とは異なる細胞系中で化学合成又は合成されたポリペプチドは、その天然に付随する成分から「単離」されていることになる。タンパク質は、当分野で周知のタンパク質精製技術を用いて、単離によって、天然に付随する成分を実質的に含まなくすることもできる。

【0063】

本明細書では「回収」という用語は、ポリペプチドなどの化学種を、例えば、当分野で周知のタンパク質精製技術を用いて、単離によって、天然に付随する成分を実質的に含まなくするプロセスを指す。

【0064】

本明細書では「ヒトIL-13」及び「ヒトIL-13野生型」（本明細書ではhIL-13、hIL-13wtと略記する。）という用語は、Tヘルパー2細胞によって主に分泌されるヒトサイトカインを含む。この用語は、13kDaポリペプチドの単量体タンパク質を含む。ヒトIL-13の構造は、例えば、(Moy, Diblasio et al. 2001 J Mol Biol 310 219-30)に更に記載されている。ヒトIL-13という用語は、標準組換え発現方法によって調製することができる組換えヒトIL-13(rhIL-13)を含むものとする。表1に、当分野で公知であるヒトIL-13のアミノ酸配列(配列番号1)を示す。

【0065】

【表2】

表1：ヒトIL-13の配列

タンパク質	配列識別名	配列
		12345678901234567890123456789012
ヒトIL-13	配列番号1	MALLLTTVIALTCLGGFASPGVPPSTALREL TEELVNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMYC AALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVS AQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHLKKLFRE GRFN

【0066】

本明細書では「ヒトIL-13変種」（本明細書ではhIL-13vと略記する。）という用語は、配列番号1のアミノ酸残基130がアルギニンからグルタミンに変化したヒトIL-13の変種(R130Q)を含む。

【0067】

本明細書では「生物活性」は、サイトカインの固有の全生物学的特性を指す。IL-13の生物学的特性としては、結合IL-13受容体が挙げられるが、これだけに限定されない(他の例としては、ヒトB細胞におけるIgEへの免疫グロブリンアイソタイプスイッチング、及び抑制性の炎症性サイトカイン産生が挙げられる。)。

【0068】

抗体、タンパク質又はペプチドと第2の化学種との相互作用に関連して、本明細書では「特異的結合」又は「特異的に結合」という用語は、相互作用が、化学種上の特別な構造(例えば、抗原決定基又はエピトープ)の存在に依存すること、例えば、抗体が、タンパク質一般ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合することを意味する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識された「A」と抗体を含む反応物中に、エ

ピトープ A を含む分子（又は遊離の標識されていない A）が存在すると、抗体に結合した標識 A の量が減少する。

【0069】

本明細書では「抗体」という用語は、4本のポリペプチド鎖、すなわち2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖で構成される任意の免疫グロブリン（Ig）分子、又はIg分子のエピトープ結合の本質的特徴を保持するその任意の機能的断片、変異体、変種若しくは誘導体（derivation）を広く指す。かかる変異体、変種又は誘導抗体の形式は当分野で公知である。その非限定的実施形態を以下に考察する。

【0070】

完全長抗体においては、各重鎖は、HCVR又はVHと略記する重鎖可変領域と重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3個のドメインCH1、CH2及びCH3で構成される。各軽鎖は、LCVR又はVLと略記する軽鎖可変領域と軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1個のドメインCLで構成される。VH及びVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称されるより保存的である領域が散在する、相補性決定領域（CDR）と称される超可変領域に更に細分することができる。各VH及びVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順序、すなわちFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で整列する3個のCDRと4個のFRで構成される。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであり得る。

10

20

【0071】

本明細書では、抗体の「抗原結合性部分」（又は単に「抗体部分」）という用語は、抗原（例えば、hIL-13）に特異的に結合する能力を保持する1個以上の抗体断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって発揮され得ることが示された。かかる抗体の実施形態は、2個以上の異なる抗原に特異的に結合する、二重特異性（bispecific）、二重特異性（dual specific）、又は多重特異性形式でもあり得る。抗体の「抗原結合性部分」という用語に包含される結合断片の例としては、（i）Fab断片、すなわちVL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価の断片、（ii）F（ab'）₂断片、すなわちヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2個のFab断片を含む二価の断片、（iii）VHとCH1ドメインからなるFd断片、（iv）抗体の単一の腕のVLとVHドメインからなるFv断片、（v）単一の可変ドメインを含むdAb断片（参照により本明細書に組み入れる、Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546、Winter他、国際公開第90/05144号A1）、及び（vi）単離された相補性決定領域（CDR）が挙げられる。また、Fv断片の2個のドメインVLとVHは別々の遺伝子によってコードされるが、VLとVHは、VL領域とVH領域が一对になって一価の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 et al., (1988) Science 242: 423-426及びHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい。）として生成させることができる合成リンカーを用いて組換え方法によって連結することができる。かかる単鎖抗体も、抗体の「抗原結合性部分」という用語に包含されるものとする。二重特異性抗体（diabody）などの単鎖抗体の他の形態も包含される。二重特異性抗体（diabody）は、VHドメインとVLドメインが単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、短かすぎて同じ鎖上の2個のドメインの対形成が不可能であるリンカーを用いることによって、これらのドメインを別の鎖の相補的ドメインと対形成させ、2個の抗原結合部位を生成させた、二価の二重特異的な抗体である（例えば、Holliger, P., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak R. J., et al., (1994) Structure 2: 1121-1123参照）。かかる抗体結合部分は当分野で公知である（Konterm

30

40

50

nn and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)。

【0072】

本明細書では「抗体構築物」という用語は、リンカーポリペプチド又は免疫グロブリン定常ドメインに結合した本発明の1個以上の抗原結合性部分を含むポリペプチドを指す。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合によって連結された2個以上のアミノ酸残基を含み、1個以上の抗原結合性部分を連結するのに使用される。かかるリンカーポリペプチドは当分野で周知である（例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123参照）。免疫グロブリン定常ドメインとは、重鎖又は軽鎖定常ドメインを指す。ヒトIgG重鎖及び軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列は、当分野で周知であり、表2に示す。

【0073】

【表3】

表2：ヒトIgG重鎖定常ドメイン及び軽鎖定常ドメインの配列

タンパク質	配列識別名	配列
Igガンマ1定常領域	配列番号2	12345678901234567890123456789012 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Igガンマ1定常領域 変異体	配列番号3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKHTCTPCPAPAAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Igカッパ定常領域	配列番号4	TVAAPSVPFIFFPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Igラムダ定常領域	配列番号5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

【0074】

さらに、抗体又はその抗原結合性部分は、抗体又は抗体部分と1種類以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性会合によって形成される、より大きい免疫接着分子の一部であり得る。かかる免疫接着分子の例としては、4量体scFv分子を生成するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101）、並びに二価のビオチン化scFv分子を生成するためのシステイン残基、マーカーペプチド及びC末端ポリヒスチジンタグの使用（K

p r i y a n o v , S . M . , e t a l . (1 9 9 4) M o l . I m m u n o l . 3 1 , 1 0 4 7 - 1 0 5 8) が挙げられる。F a b 断片、F (a b ') ₂ 断片などの抗体部分は、抗体全体のそれぞれパepsin消化、ペプシン消化などの従来技術を用いて、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分及び免疫接着分子は、本明細書に記載の標準組換えDNA技術によって得ることができる。

【0075】

本明細書では「単離抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すものとする（例えば、h I L - 1 3 に特異的に結合する単離抗体は、h I L - 1 3 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない。）。しかし、h I L - 1 3 に特異的に結合する単離抗体は、他の種由来の I L - 1 3 分子などの他の抗原に対して交差反応性を有し得る。さらに、単離抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まない場合もある。

10

【0076】

本明細書では「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域及び定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体は、例えばC D R 中、特にC D R 3 中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでの無作為若しくは部位特異的変異誘発によって、又は生体内での体細胞変異によって、導入される変異）を含み得る。しかし、本明細書では「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別のほ乳動物種の生殖系列に由来するC D R 配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされた抗体を含まないものとする。

20

【0077】

本明細書では「組換えヒト抗体」という用語は、（下記セクションI I Cで更に記述する）宿主細胞に移入された組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（H o o g e n b o o m H . R . , (1 9 9 7) T I B T e c h . 1 5 : 6 2 - 7 0 ; A z z a z y H . , a n d H i g h s m i t h W . E . , (2 0 0 2) C l i n . B i o c h e m . 3 5 : 4 2 5 - 4 4 5 ; G a v i l o n d o J . V . , a n d L a r r i c k J . W . (2 0 0 2) B i o T e c h n i q u e s 2 9 : 1 2 8 - 1 4 5 ; H o o g e n b o o m H . , a n d C h a m e s P . (2 0 0 0) I m m u n o l o g y T o d a y 2 1 : 3 7 1 - 3 7 8)、ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入した動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、T a y l o r , L . D . , e t a l . (1 9 9 2) N u c l . A c i d s R e s . 2 0 : 6 2 8 7 - 6 2 9 5 ; K e l l e r m a n n S - A . , a n d G r e e n L . L . (2 0 0 2) C u r r e n t O p i n i o n i n B i o t e c h n o l o g y 1 3 : 5 9 3 - 5 9 7 ; L i t t l e M . e t a l (2 0 0 0) I m m u n o l o g y T o d a y 2 1 : 3 6 4 - 3 7 0 参照）など、組換え手段によって調製、発現、作製若しくは単離されたすべてのヒト抗体、又は他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製若しくは単離された抗体を含むものとする。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変及び定常領域を有する。しかし、ある実施形態においては、かかる組換えヒト抗体は、インビトロでの変異誘発（又はヒトI g 配列を導入した動物を使用するときには、生体内での体細胞変異誘発）を受け、したがって組換え抗体のV H及びV L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V H及びV L配列に由来し、関係するものの、生体内でのヒト抗体生殖系列レパートリーに天然には存在し得ない配列である。一実施形態は、J e r m u t u s 他、国際公開第2 0 0 5 / 0 0 7 6 9 9 号A 2に開示されたライブラリーなどのヒトI g ファージライブラリーの使用など、ただしこれだけに限定されない当分野で周知の技術によって生成することができる、ヒトI L - 1 3 に結合可能な完全ヒト抗体を提供する。

30

40

【0078】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に結合したネズミ重鎖及び軽鎖可変領域を

50

有する抗体など、ある種由来の重鎖及び軽鎖可変領域配列と、別の種由来の定常領域配列とを含む抗体を指す。

【0079】

「CDRグラフト抗体」という用語は、ネズミCDRの1個以上（例えば、CDR3）がヒトCDR配列で置換されたネズミ重鎖及び軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種由来の重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又はVLのCDR領域の1個以上の配列が別の種のCDR配列で置換された抗体を指す。

【0080】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種（例えば、マウス）由来の重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又はVL配列の少なくとも一部がより「ヒト様」に変化した、すなわち、ヒト生殖系列可変配列により類似した、抗体を指す。ヒト化抗体の1タイプは、ヒトCDR配列が非ヒトVH及びVL配列に導入されて、対応する非ヒトCDR配列を置換した、CDRグラフト抗体である。一実施形態においては、ヒト化抗ヒトIL-13抗体及び抗原結合性部分を提供する。かかる抗体は、伝統的ハイブリドーマ技術を用いてネズミ抗ヒトIL-13モノクローナル抗体を得、続いてKasaiian他、国際公開第2005/123126号A2に開示されたものなどのインビトロでの遺伝子操作によってヒト化することによって作製された。

【0081】

「Kabatt付番」、「Kabatt定義及び「Kabatt標識化」という用語は、本明細書では区別なく使用される。当分野で認識されるこれらの用語は、抗体又はその抗原結合性部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基よりも可変（すなわち超可変）であるアミノ酸残基に付番するシステムを指す（Kabatt et al. (1971)

Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391、及びKabatt, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1ではアミノ酸位置31から35、CDR2ではアミノ酸位置50から65、CDR3ではアミノ酸位置95から102の範囲である。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1ではアミノ酸位置24から34、CDR2ではアミノ酸位置50から56、CDR3ではアミノ酸位置89から97の範囲である。

【0082】

本明細書では「受容体」及び「受容体抗体」という用語は、1個以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は100%を与える、又はコードする、抗体又は核酸配列を指す。一部の実施形態においては、「受容体」という用語は、定常領域を与える、又はコードする、抗体アミノ酸又は核酸配列を指す。更に別の一実施形態においては、「受容体」という用語は、フレームワーク領域及び定常領域の1個以上を与える、又はコードする、抗体アミノ酸又は核酸配列を指す。特定の一実施形態においては、「受容体」という用語は、1個以上のフレームワーク領域のアミノ酸配列の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は100%を与える、又はコードする、ヒト抗体アミノ酸又は核酸配列を指す。この実施形態に従って、受容体は、ヒト抗体の1個以上の特定の位置に存在しない、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、又は少なくとも10個のアミノ酸残基を含み得る。受容体フレームワーク領域及び/又は受容体定常領域は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能的抗体（例えば、当分野で周知の抗体、開発中の抗体、又は市販の抗体）に由来し、又はこれらから得ることができる。

【0083】

本明細書では「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖

及び軽鎖の可変領域の各々には、可変領域の各々に対して、CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 と命名される 3 個の CDR がある。本明細書では「CDR セット」という用語は、抗原に結合可能な単一の可変領域中に存在する 3 個の CDR の一群を指す。これらの CDR の正確な境界は、異なるシステムごとに異なって定義される。Kabat によって記述されたシステム (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) は、抗体の任意の可変領域に適用可能である明確な残基付番システムを提供するだけでなく、3 個の CDR を規定する正確な残基境界も提供する。これらの CDR は Kabat CDR とも称される。Chothia 及び共同研究者 (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、並びに Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) は、Kabat CDR 内のある下位部分 (sub-portion) が、アミノ酸配列レベルでの多様性が大きいにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格高次構造をとることを見いだした。これらの下位部分は、L1、L2 及び L3、又は H1、H2 及び H3 と命名された。ここで、「L」及び「H」は、それぞれ軽鎖及び重鎖領域を示す。これらの領域は、Kabat CDR と重複する境界を有する Chothia CDR とも称される。Kabat CDR と重複する CDR を規定する別の境界は、Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) 及び MacCallum (J. Mol. Biol. 262 (5): 732-45 (1996)) によって記述された。更に別の CDR 境界規定は、上記システムの 1 つに厳密に従わなくてもよいが、それでも Kabat CDR と重複する。ただし、それらの境界規定は、特定の残基又は残基群、さらには CDR 全体が抗原結合にさほど影響を及ぼさないという予測又は実験上の知見に照らして、短縮され、又は延長され得る。本明細書において使用する方法は、これらのシステムのいずれかによって規定された CDR を利用することができるが、好ましい実施形態は、Kabat 又は Chothia によって定義された CDR を使用する。

10

20

30

40

50

【0084】

本明細書では「正準」残基という用語は、Chothia 等によって定義された特別な正準 CDR 構造を規定する、CDR 又はフレームワーク中の残基を指す (参照により本明細書に組み入れる、J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992))。Chothia 等によれば、多数の抗体の CDR の重要な部分は、アミノ酸配列レベルでの多様性が大きいにもかかわらず、ほぼ同一のペプチド骨格確認を有する。各正準構造は、第一に、ループを形成するアミノ酸残基の隣接セグメントに対して、一組みのペプチド骨格ねじれ角を規定する。

【0085】

本明細書では「ドナー」及び「ドナー抗体」という用語は、1 個以上の CDR を与える抗体を指す。好ましい一実施形態においては、ドナー抗体は、フレームワーク領域が得られる、又は由来する抗体とは異なる種からの抗体である。ヒト化抗体に関連して、「ドナー抗体」という用語は、1 個以上の CDR を与える非ヒト抗体を指す。

【0086】

本明細書では「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」という用語は、可変領域から CDR を除いた残りの配列を指す。CDR 配列の正確な定義は、様々なシステムによって決定され得るので、フレームワーク配列の意味は、それに応じて解釈が異なる。6 個の CDR (軽鎖の CDR - L1、CDR - L2 及び CDR - L3、並びに重鎖の CDR - H1、CDR - H2 及び CDR - H3) も、軽鎖及び重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の 4 個の小領域 (FR1、FR2、FR3 及び FR4) に分割し、CDR 1 は、FR1 と FR2 の間に位置し、CDR 2 は FR2 と FR3 の間に位置し、CDR 3 は FR3 と FR4 の間に位置する。FR1、FR2、FR3 又は FR4 として特別な小領域を指定せずに、他のフレームワーク領域によって参照される 1 フレームワーク領域は、単一の天然免

疫グロブリン鎖の可変領域内の混合FRである。本明細書では、1個のFRは、4個の小領域の1個を表し、複数のFRは、フレームワーク領域を構成する4個の小領域の2個以上を表す。

【0087】

ヒト重鎖及び軽鎖受容体配列は当分野で公知である。本発明の一実施形態においては、ヒト重鎖及び軽鎖受容体配列は、表3及び表4に記載の配列から選択される。

【0088】

【表4】

表3：重鎖受容体配列

配列番号	タンパク質領域	配列
		12345678901234567890123456789012
6	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
7	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
8	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
9	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTITVTVSS
6	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
10	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLWMG
11	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
12	21/28&JH4 FR4	WGQGTITVTVSS
13	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL
14	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
15	VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
9	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTITVTVSS
16	M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTLYGFSLS
17	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
18	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAR
12	M60&JH4 FR4	WGQGTITVTVSS

配列番号	タンパク質領域	配列
		12345678901234567890123456789012
6	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
7	VH1-46&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
19	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
9	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTITVTVSS

【0089】

【表 5】

表 4 軽鎖受容体配列

配列番号	タンパク質領域	配列
		12345678901234567890123456789012
20	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC
21	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
22	A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
23	A20&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
20	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC
24	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
25	III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFITISLQPEDVATYYC
23	III-3R&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
26	A1&JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
27	A1&JK4 FR2	WFQQRPQGSPRRLIY
28	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
23	A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
29	01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISIC
30	01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
28	01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
31	01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

10

【0090】

20

本明細書では「生殖系列抗体遺伝子」又は「遺伝子断片」という用語は、特別な免疫グロブリンを発現するための遺伝子再構成及び変異をもたらす成熟プロセスを受けなかった非リンパ球によってコードされた免疫グロブリン配列を指す。（例えば、Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001) 参照）。本発明の種々の実施形態によって提供される利点の一つは、生殖系列抗体遺伝子は、種の個体に特有である必須アミノ酸配列構造を保存する可能性が成熟抗体遺伝子よりも高く、したがって該種における治療に使用したときに、外来源由来と認識される可能性が低いという認識から生じる。

【0091】

30

本明細書では「重要な」残基という用語は、抗体、特にヒト化抗体の結合特異性及び/又は親和性により大きな影響を及ぼす、可変領域内のある種の残基を指す。重要な残基としては、CDRに隣接する残基、(N-又はO-グリコシル化部位であり得る)潜在的グリコシル化部位、希少残基、抗原と相互作用可能な残基、CDRと相互作用可能な残基、正準残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域の接触残基、バーニアゾーン内の残基、及び可変重鎖CDR1のChothia定義と第1の重鎖フレームワークのKabatt定義との重複領域中の残基のうちの1種類以上が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0092】

本明細書では「ヒト化抗体」という用語は、目的抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域と、非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域(CDR)とを含む、抗体又はその変種、誘導体、類似体若しくは断片である。CDRに関連して、本明細書では「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するCDRを指す。ヒト化抗体は、CDR領域の全部又は実質的に全部が非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のCDR領域に対応し、フレームワーク領域の全部又は実質的に全部がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である、少なくとも1個、典型的には2個の可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)の実質的に全部を含む。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一

40

50

部も含む。一部の実施形態においては、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインとを含む。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3及びCH4領域も含み得る。一部の実施形態においては、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含む。一部の実施形態においては、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含む。特定の実施形態においては、ヒト化抗体は、軽鎖及び/又はヒト化重鎖のヒト化可変ドメインのみを含む。

【0093】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含めた免疫グロブリンの任意のクラス、並びにIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含めて、ただしこれらだけに限定されない任意のアイソタイプから選択することができる。ヒト化抗体は、1を超えるクラス又はアイソタイプに由来する配列を含み得、特別な定常ドメインを選択し、当分野で周知の技術を用いて、所望のエフェクター機能を最適化することができる。

10

【0094】

ヒト化抗体のフレームワーク及びCDR領域は、親配列に正確に対応する必要はなく、例えば、ドナー抗体CDR又はコンセンサスフレームワークは、少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失によって変異誘発され、その部位のCDR又はフレームワーク残基がドナー抗体にもコンセンサスフレームワークにも対応しない場合がある。しかし、好ましい実施形態においては、かかる変異は大規模ではない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%は、親のFR及びCDR配列の残基に対応する。本明細書では「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域を指す。本明細書では「コンセンサス免疫グロブリン配列」という用語は、関連する免疫グロブリン配列のファミリーにおいて最も頻繁に出現するアミノ酸(又はヌクレオチド)で形成された配列を指す(例えば、Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)参照。免疫グロブリンのファミリーにおいては、コンセンサス配列中の各位置は、ファミリー中の該位置において最も頻繁に出現するアミノ酸によって占有される。2個のアミノ酸が同じ頻度で出現する場合、どちらをコンセンサス配列に含めてもよい。

20

【0095】

本明細書では「バーニア」ゾーンとは、CDR構造を調節することができ、Footé及びWinter(参照により本明細書に組み入れる1992, J. Mol. Biol. 224:487-499)によって記述された抗原に一致するように微調整することができる、フレームワーク残基の1サブセットを指す。バーニアゾーン残基は、CDRの下層を形成し、CDRの構造、及び抗体の親和性に影響を及ぼし得る。

30

【0096】

「多価結合タンパク質」という用語は、本明細書では、2個以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を示すのに用いられる。多価結合タンパク質は、好ましくは、3個以上の抗原結合部位を有するように操作され、一般に天然の抗体ではない。「多重特異性結合タンパク質」という用語は、2個以上の関係する標的、又は無関係の標的に結合可能である結合タンパク質を指す。本明細書では二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、2個以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質であり、四価又は多価の結合タンパク質である。かかるDVDは、単一特異的、すなわち1個の抗原に結合可能であっても、多重特異的、すなわち2個以上の抗原に結合可能であってもよい。2種類の重鎖DVDポリペプチドと2種類の軽鎖DVDポリペプチドとを含むDVD結合タンパク質をDVD Igと称する。DVD Igの各半分は、重鎖DVDポリペプチド、軽鎖DVDポリペプチド、及び2個の抗原結合部位を含む。各結合部位は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、抗原結合部位1個あたり抗原結合に関与する合計6個のCDRを有する。

40

【0097】

本明細書では「中和」という用語は、結合タンパク質がサイトカインに特異的に結合するときのサイトカインの生物活性の中和を指す。好ましくは、中和結合タンパク質は、h

50

IL - 13 及び / 又は hIL - 13 に結合して、hIL - 13 及び / 又は hIL - 13 の生物活性を阻害する中和抗体である。好ましくは、中和結合タンパク質は、hIL - 13 及び / 又は hIL - 13 に結合し、IL - 13 及び / 又は hIL - 13 の生物学的活性を少なくとも約 20 %、40 %、60 %、80 %、85 % 又はそれ以上低下させる。中和結合タンパク質による hIL - 13 及び / 又は hIL - 13 の生物活性の阻害は、当分野で周知である hIL - 13 及び / 又は hIL - 13 生物活性の 1 種類以上の指標を測定することによって評価することができる。例えば、A - 549 細胞による TARC (CCL - 17) のヒト IL - 13 誘導性産生の抑制 (実施例 1.1. C 参照)。

【0098】

「活性」という用語は、抗原に対する抗体の結合特異性 / 親和性、例えば、IL - 13 抗原に結合する抗 hIL - 13 抗体、及び / 又は抗体の中和効力、例えば、hIL - 13 と結合して hIL - 13 の生物活性を阻害する抗 hIL - 13 抗体、例えば、A - 549 細胞による TARC (CCL - 17) のヒト IL - 13 誘導性産生の抑制 (実施例 1.1. C 参照) などの活性を含む。

10

【0099】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリン又は T 細胞受容体に特異的に結合可能な任意のポリペプチド決定因子を含む。ある実施形態においては、エピトープ決定因子は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、スルホニルなどの分子の化学的に活性な表面グルーピング (grouping) を含み、ある実施形態においては、特定の 3 次元構造特性及び / 又は特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、抗体が結合する、抗原の領域である。ある実施形態においては、抗体は、タンパク質及び / 又は巨大分子の複雑な混合物中のその標的抗原を優先的に認識するときに、抗原に特異的に結合するとされる。

20

【0100】

本明細書では「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば BIAcore システム (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ) を用いて、バイオセンサマトリックス内のタンパク質濃度の変動を検出することによって、実時間での生体分子特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。更に詳細な説明は、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19 - 26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620 - 627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125 - 131、及び Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268 - 277 を参照されたい。

30

【0101】

本明細書では「 k_{on} 」という用語は、抗体と抗原が会合して、当分野で公知の抗体 / 抗原複合体を形成するオン速度定数を指すものとする。

【0102】

本明細書では「 K_{off} 」という用語は、当分野で公知の抗体 / 抗原複合体からの抗体の解離のオフ速度定数を指すものとする。

40

【0103】

本明細書では「 K_D 」という用語は、当分野で公知の特定の抗体 - 抗原相互作用の解離定数を指すものとする。

【0104】

本明細書では「標識結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質を特定する標識が組み込まれたタンパク質を指す。好ましくは、標識は、検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識アミノ酸の組み入れ、又は標識アビジン (例えば、光学的方法又は比色定量法によって検出することができる蛍光性マーカー又は酵素活性を含むストレプトアビジン) によって検出することができるビオチン部分のポリペプチドへの付加である。ポリペプチドに対する標識の例としては、放射性同位体又は放射性核種 (例えば、 3H 、 ^{14}C

50

、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho又は¹⁵³Sm)、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカー、ビオチン基、二次レポーター(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体用結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)によって認識される所定のポリペプチドエピトープ、及びガドリニウムキレートなどの磁性剤(magnetic agent)が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0105】

「抗体複合体」という用語は、治療薬、細胞毒性薬などの第2の化学部分に化学的に結合した、抗体などの結合タンパク質を指す。「薬剤」という用語は、化学物質、化学物質の混合物、生物学的巨大分子、又は生体材料から製造される抽出物を表すのに本明細書では使用される。好ましくは、治療薬又は細胞毒性薬としては、百日咳毒素、Taxol、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド(tenoposide)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン並びにこれらの類似体又は同族体が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0106】

本明細書では「結晶」及び「結晶化」という用語は、結晶の形で存在する抗体又はその抗原結合性部分を指す。結晶は、アモルファス固体状態、液晶状態などの他の形態とは異なる、物質の固体状態の一形態である。結晶は、原子、イオン、分子(例えば、抗体などのタンパク質)又は分子集合体(例えば、抗原/抗体複合体)の規則的な繰り返しの3次元配列で構成される。これらの3次元配列は、当分野でよく理解されている特定の数学的關係に従って配置される。結晶中で繰り返される基本単位又は構成要素を非対称単位と称する。所与の明確な結晶学的対称性に従う配置で非対称単位が繰り返されて、結晶の「単位格子」を与える。全3次元の規則的並進によって単位格子が繰り返されて、結晶を与える。Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)を参照されたい。

【0107】

本明細書では「ポリヌクレオチド」という用語は、2個以上のヌクレオチド(リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチド、又はヌクレオチドのどちらかのタイプの改変形態)の重合体を意味する。この用語は、DNAの一本鎖及び二本鎖体を含むが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0108】

本明細書では「単離ポリヌクレオチド」という用語は、(例えば、ゲノム、cDNA若しくは合成由来、又はこれらの組合せの)ポリヌクレオチドを意味するものとする。その起源によって、「単離ポリヌクレオチド」は、「単離ポリヌクレオチド」と一緒に天然に存在するポリヌクレオチドの全部若しくは一部を伴わず、自然には結合していないポリヌクレオチドに作動可能に結合し、又はより大きい配列の一部として天然に存在しない。

【0109】

本明細書では「ベクター」という用語は、それに結合した別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すものとする。ベクターの1タイプは「プラスミド」である。プラスミドは、追加のDNAセグメントを連結することができる環状二重鎖DNAループである。ベクターの別のタイプはウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。ある種のベクターは、ベクターが導入された宿主細胞中で自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター、及びエビ

10

20

30

40

50

ソームほ乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソームほ乳動物ベクター)は、宿主細胞に導入すると宿主細胞のゲノム中に組み込むことができ、それによって宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、ある種のベクターは、それが作用可能に連結された遺伝子の発現を誘導することができる。かかるベクターを本明細書では「組換え発現ベクター」(又は単に「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA技術に有用な発現ベクターはプラスミドの形態であることが多い。本明細書においては、プラスミドが最も一般的に使用されるベクター形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を区別なく使用することができる。しかし、本発明は、ウイルスベクター(例えば、複製欠損のレトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)など、等価な機能を果たす発現ベクターの他の形態も含むものとする。

10

【0110】

「作動可能に結合し」という用語は、記述する成分が意図した様式で機能し得る関係にある近位を指す。コード配列に「作動可能に結合し」た制御配列は、制御配列に適合した条件下でコード配列が発現されるように連結される。「作動可能に結合した」配列は、目的遺伝子に隣接する発現制御配列と、トランスで、又は目的遺伝子を制御する距離で作用する発現制御配列との両方を含む。本明細書では「発現制御配列」という用語は、連結したコード配列の発現及びプロセッシングを起こすのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列は、適切な転写開始、終結、プロモーター及びエンハンサー配列; スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナルなどの効率的RNAプロセッシングシグナル; 細胞質mRNAを安定化させる配列; 翻訳効率を向上させる配列(例えば、コザックコンセンサス配列); タンパク質の安定性を向上させる配列、並びに所望のときには、タンパク質分泌を増大させる配列を含む。かかる制御配列の性質は、宿主生物によって異なる。原核生物では、かかる制御配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列を含む。真核生物では、一般に、かかる制御配列はプロモーター及び転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、その存在が発現及びプロセッシングに必須である成分を含むものとし、その存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列も含むことができる。本発明のタンパク質構築物は、発現カセット、ベクター、組換え宿主細胞を含めて、当分野で公知の発現ベクター及び宿主細胞を用いて発現させ、精製することができ、また、単一オープンリーディングフレームからの組換えポリタンパク質及び前タンパク質の組換え発現及びタンパク質分解プロセッシングのための方法を用いて発現させ、精製することができる(例えば、参照により本明細書に組み入れる国際公開第2007/014162号)。

20

30

【0111】

本明細書では「形質転換」とは、外来DNAが宿主細胞に入る任意のプロセスを指す。形質転換は、当分野で周知の種々の方法によって、自然又は人工条件下で起こり得る。形質転換は、外来核酸配列を原核又は真核宿主細胞に挿入する任意の公知の方法に依拠し得る。この方法は、形質転換される宿主細胞に基づいて選択され、ウイルス感染、電気穿孔法、リポフェクション及び微粒子銃が挙げられるが、これらだけに限定されない。かかる「形質転換された」細胞としては、挿入されたDNAが、自己複製プラスミドとして、又は宿主染色体の一部として、複製可能である、安定に形質転換された細胞などが挙げられる。「形質転換された」細胞としては、挿入されたDNA又はRNAを有限の時間一過性に発現する細胞も挙げられる。

40

【0112】

本明細書では「組換え宿主細胞」(又は単に「宿主細胞」という用語は、外来DNAを導入した細胞を指すものとする。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなく、かかる細胞の子孫も指すものであることを理解すべきである。変異又は環境の影響のためにある種の改変が後継世代に起こり得るので、かかる子孫は、親細胞と実際には同一でないこともあるが、それでも本明細書の「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。好ましくは、宿主細胞としては、生物界のいずれかから選択される原核及び真核細胞などが挙げられる。好ましい真核細胞としては、原生生物、真菌、植物、動物細胞などが挙げられる。最も

50

好ましくは、宿主細胞としては、原核細胞系 E. コリ、ほ乳動物細胞系 CHO、HEK 293 及び COS、昆虫細胞系 Sf9、並びに真菌細胞サッカロミセス・セレビシエが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0113】

組換え DNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養及び形質転換（例えば、電気穿孔法、リポフェクション）には、標準技術を使用することができる。酵素反応及び精製技術は、製造者の仕様書に従って、又は当分野で一般に実施されるとおりに、又は本明細書に記載のとおり、実施することができる。上記技術及び手順は、一般に、当分野で周知の従来法によって実施することができ、また、本明細書を通して引用及び考察する種々の一般的参考文献及びより具体的な参考文献に記載のように実施することができる。例えば、参照により本明細書に組み入れる、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) を参照されたい。

10

【0114】

当分野で公知であり、本明細書で用いる「トランスジェニック生物体」とは、導入遺伝子を含む細胞を有する生物体を指し、生物体（又は生物体の祖先）に導入された導入遺伝子は、生物体中で自然には発現されないポリペプチドを発現する。「導入遺伝子」は、トランスジェニック生物体を生成する細胞のゲノムに安定に作動可能に組み込まれた DNA 構築物であり、トランスジェニック生物体の 1 つ以上の細胞タイプ又は組織中のコードされた遺伝子産物の発現を誘導する。

20

【0115】

「調整する」と「調節する」という用語は、区別なく使用され、本明細書では、目的分子の活性（例えば、hIL-13 の生物活性）の変化又は変動を指す。調節は、目的分子のある活性又は機能の程度の増加又は減少であり得る。分子の例示的活性及び機能としては、結合特性、酵素活性、細胞受容体活性化及びシグナル伝達が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0116】

同様に、本明細書では「調節物質」という用語は、目的分子の活性又は機能（例えば、hIL-13 の生物活性）を変化又は変動させ得る化合物である。例えば、調節物質は、分子のある活性又は機能の程度を、調節物質の非存在下で認められる活性又は機能の程度よりも増加又は減少させ得る。ある実施形態においては、調節物質は、分子の少なくとも 1 つの活性又は機能の程度を減少させる阻害剤である。例示的阻害剤としては、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディ (peptibodies)、炭水化物又は低分子有機分子が挙げられるが、これらだけに限定されない。ペプチボディは、例えば、国際公開第 01/83525 号に記載されている。

30

【0117】

本明細書では「作動物質」という用語は、目的分子と接触すると、分子のある活性又は機能の程度を、作動物質の非存在下で認められる活性又は機能の程度よりも増加させる調節物質を指す。対象となる特別な作動物質としては、IL-13 ポリペプチド若しくはポリペプチド、核酸、炭水化物、又は hIL-13 に結合する任意の他の分子が挙げられるが、これらだけに限定されない。

40

【0118】

本明細書では「拮抗物質」又は「阻害剤」という用語は、目的分子と接触すると、分子のある活性又は機能の程度を、拮抗物質の非存在下で認められる活性又は機能の程度よりも低下させる調節物質を指す。対象となる特定の拮抗物質としては、hIL-13 及び / 又は hIL-13 の生物学的又は免疫学的活性を遮断又は調節する拮抗物質などが挙げられる。hIL-13 及び / 又は hIL-13 の拮抗物質及び阻害剤としては、hIL-13 及び / 又は hIL-13 に結合するタンパク質、核酸、炭水化物又は任意の他の分子が挙げられるが、これらだけに限定されない。

50

【 0 1 1 9 】

「受容体との結合を阻止する」という用語は、IL - 13 とその受容体の 1 個以上との結合を防止する結合タンパク質の能力を指す。受容体との結合のかかる阻止によって、IL - 13 とその受容体又は複数の受容体との結合によって媒介される生物活性が低下又は消滅する。

【 0 1 2 0 】

本明細書では「有効量」という用語は、障害若しくはその 1 つ以上の症候の重症度及び / 又は期間の減少若しくは改善、障害の進行の防止、障害の後退、障害に付随する 1 つ以上の症候の再発、発生、発症若しくは進行、障害の検出、又は別の療法（例えば、予防薬又は治療薬）の予防若しくは治療効果の増大若しくは改善に十分な治療の量を指す。

10

【 0 1 2 1 】

本明細書では「試料」という用語は、その最も広い意味で使用される。本明細書では「生物試料」としては、生物から、又はかつては生きていたものから得られる任意の量の物質が挙げられるが、これらだけに限定されない。かかる生物としては、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギ及び他の動物が挙げられるが、これらだけに限定されない。かかる物質としては、血液、血清、尿、滑液、細胞、器官、組織、骨髄、リンパ節及び臓器が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【 0 1 2 2 】

I . ヒト IL - 13 に結合する抗体

本発明の一態様は、高親和性、低オフ速度及び高中和能で IL - 13 に結合する単離ネズミモノクローナル抗体又はその抗原結合性部分を提供すること。本発明の第 2 の態様は、IL - 13 に結合するキメラ抗体を提供すること。本発明の第 3 の態様は、IL - 13 に結合するヒト化抗体又はその抗原結合性部分を提供すること。好ましくは、抗体又はその一部は単離抗体である。好ましくは、本発明の抗体は、1 種類及び / 又は複数種類のヒト抗 IL - 13 抗体を中和している。

20

【 0 1 2 3 】

A . 抗 IL - 13 抗体の作製方法

本発明の抗体は、当分野で公知の幾つかの技術のいずれかによって作製することができる。

【 0 1 2 4 】

1 . ハイブリドーマ技術を用いた抗 IL - 13 モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術又はこれらの組合せの使用を含めて、当分野で公知の多種多様な技術を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当分野で公知の技術、及び、例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) に教示された技術を含めたハイブリドーマ技術を用いて製造することができる（前記参考文献を参照によりその全体を本明細書に組み入れる。）。本明細書では「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって製造された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物、原核生物又はファージクローンを含めて、単一クローンに由来する抗体を指し、モノクローナル抗体が製造される方法ではない。

30

40

【 0 1 2 5 】

ハイブリドーマ技術を用いて特異抗体を製造及びスクリーニングする方法は、定常的なものであり、当分野で周知である。一実施形態においては、本発明は、モノクローナル抗体の作製方法、及び本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞の培養を含む方法によって製造された抗体を提供すること。好ましくは、ハイブリドーマは、本発明の抗原で免疫されたマウスから単離された細胞を骨髓腫細胞と融合させ、次いで融合から生じるハイブリ

50

ドーマを、本発明のポリペプチドに結合可能な抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることによって作製される（実施例 1、2 参照）。手短に述べると、マウスを IL - 13 抗原で免疫することができる。好ましい一実施形態においては、IL - 13 抗原をアジュバントと一緒に投与して、免疫応答を刺激する。かかるアジュバントとしては、完全又は不完全フロイントアジュバント、RIBI（ムラミルジペプチド）、ISCOM（免疫賦活複合体）などが挙げられる。かかるアジュバントは、ポリペプチドを局所的堆積物中に隔離することによってポリペプチドを急速な分散から保護することができ、又は宿主を刺激してマクロファージ及び免疫系の他の成分に対して走化性である因子を分泌させる物質を含み得る。好ましくは、ポリペプチドが投与されている場合、免疫化スケジュールは、数週間にわたるポリペプチドの 2 回以上の投与を含む。

10

【0126】

動物を IL - 13 抗原で免疫化した後、抗体及び / 又は抗体産生細胞を動物から得ることができる。抗 IL - 13 抗体含有血清を動物から採血して、又は動物を屠殺して、動物から得る。血清を動物から得られたままで使用することができ、免疫グロブリン画分を血清から得ることができ、又は抗 IL - 13 抗体を血清から精製することができる。このようにして得られた血清又は免疫グロブリンはポリクローナルであり、したがって不均一な諸性質を有する。

【0127】

免疫応答を検出した後、例えば、抗原 IL - 13 に特異的な抗体をマウス血清中に検出した後、マウス臓器を収集し、細胞を単離する。次いで、細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髓腫細胞、例えば、ATCC から入手可能な細胞系 SP20 由来の細胞と融合させる。ハイブリドーマを選択し、限界希釈（limited dilution）によってクローン化する。次いで、ハイブリドーマクローンを、当分野で公知の方法によって、IL - 13 に結合可能な抗体を分泌する細胞について評価する。高レベルの抗体を一般に含む腹水は、陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫することによって生成させることができる。

20

【0128】

別の一実施形態においては、抗体産生不死化ハイブリドーマを免疫動物から調製することができる。免疫化後、動物を屠殺し、当分野で周知のように、臓器 B 細胞を不死化骨髓腫細胞と融合させる。例えば、Harlow and Lane（上掲）を参照されたい。好ましい一実施形態においては、骨髓腫細胞は、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない（非分泌性細胞系）。融合及び抗生物質選択後、IL - 13 若しくはその一部、又は IL - 13 を発現する細胞を用いて、ハイブリドーマをスクリーニングする。好ましい一実施形態においては、初期スクリーニングを酵素結合免疫測定法（ELISA）又は放射性免疫測定法（RIA）、好ましくは ELISA によって実施する。ELISA スクリーニングの例は、参照により本明細書に組み入れる国際公開第 00 / 37504 号に記載されている。

30

【0129】

抗 IL - 13 抗体産生ハイブリドーマを選択し、クローン化し、以下に更に考察する、堅牢なハイブリドーマ成長、高抗体産生、及び望ましい抗体特性を含めて、望ましい特性について更にスクリーニングする。ハイブリドーマは、同一遺伝子型動物、免疫系を欠く動物（例えば、ヌードマウス）において生体内で、又はインビトロでの細胞培養において、培養し、拡大させることができる。ハイブリドーマを選択し、クローン化し、拡大させる方法は、当業者に周知である。

40

【0130】

好ましい一実施形態においては、ハイブリドーマは、上述したようにマウスハイブリドーマである。別の好ましい一実施形態においては、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマなどの非ヒト非マウス種において製造される。別の一実施形態においては、ハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髓腫が、抗 IL - 13 抗体を発現するヒト細胞と融合した、ヒトハイブリドーマである。

50

【0131】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知技術によって生成させることができる。例えば、本発明のFab及びF(ab')₂断片は、(Fab断片を生成させるための)パパイン、(F(ab')₂断片を生成させるための)ペプシンなどの酵素を用いた免疫グロブリン分子のタンパク質切断によって、生成させることができる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域、及び重鎖のCH1ドメインを含む。

【0132】

2. SLAMを用いた抗IL-13モノクローナル抗体

本発明の別の一態様においては、組換え抗体は、米国特許第5,627,052号、国際公開第92/02551号及びBabcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848に記載のように、選択リンパ球抗体(selected lymphocyte antibody)方法(SLAM)と当分野で称される手順によって、単一の単離リンパ球から生成される。この方法においては、目的抗体を分泌する単細胞、例えば、セクション1に記載の免疫動物のいずれか1種類に由来するリンパ球を、抗原特異的溶血斑形成法によってスクリーニングする。抗原特異的溶血斑形成法では、抗原IL-13、IL-13のサブユニット、又はその断片を、ビオチンなどのリンカーを用いてヒツジ赤血球に連結し、それを使用して、IL-13に対して特異性を有する抗体を分泌する単細胞を特定する。目的とする抗体分泌細胞を特定した後、重鎖及び軽鎖可変領域cDNAを逆転写酵素PCRによって細胞から取り戻し、次いで、これらの可変領域を、適切な免疫グロブリン定常領域(例えば、ヒト定常領域)に関連して、COS、CHO細胞などのほ乳動物宿主細胞中で発現させることができる。次いで、生体内で選択されたリンパ球に由来する、増幅された免疫グロブリン配列を移入した宿主細胞を、更なる分析にかけ、例えば、移入細胞をパニングしてIL-13に対する抗体を発現する細胞を単離することによって、インビトロで選択することができる。増幅された免疫グロブリン配列は、国際公開第97/29131号及び国際公開第00/56772号に記載の方法などのインビトロ親和性成熟方法などによって、インビトロで更に操作することができる。

【0133】

3. トランスジェニック動物を用いた抗IL-13モノクローナル抗体

本発明の別の一実施形態においては、抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部又は全部を含む非ヒト動物をIL-13抗原で免疫することによって製造される。好ましい一実施形態においては、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大きい断片を含むマウス系統であって、マウス抗体産生が欠乏している操作されたマウス系統である、XENOMOUSEトランスジェニックマウスである。例えば、Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994)並びに米国特許第5,916,771号、同5,939,598号、同5,985,615号、同5,998,209号、同6,075,181号、同6,091,001号、同6,114,598号及び同6,130,364号を参照されたい。1991年7月25日に公開された国際公開第91/10741号、1994年2月3日に公開された国際公開第94/02602号、共に1996年10月31日に公開された国際公開第96/34096号及び同96/33735号、1998年4月23日に公開された国際公開第98/16654号、1998年6月11日に公開された国際公開第98/24893号、1998年11月12日に公開された国際公開第98/50433号、1999年9月10日に公開された国際公開第99/45031号、1999年10月21日に公開された国際公開第99/53049号、2000年2月24日に公開された国際公開第00/09560号、及び2000年6月29日に公開された国際公開第00/037504号も参照されたい。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、完全ヒト抗体の成体様ヒトレパトリを産生し、抗原特異的ヒトMabを生成する。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座及びx軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖系列構造(germline configuration)YAC断片の導入によって、ヒト抗体レパトリ

一の約80%を含む。その開示を参照により本明細書に組み入れる、Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156(1997)、Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495(1998)を参照されたい。

【0134】

4. 組換え抗体ライブラリーを用いた抗IL-13モノクローナル抗体

抗体ライブラリーをスクリーニングして、所望の結合特異性を有する抗体を特定するインビトロ方法によって、本発明の抗体を作製することもできる。組換え抗体ライブラリーのかかるスクリーニング方法は、当分野で周知であり、例えば、その各々の内容を参照により本明細書に組み入れる、Ladner他、米国特許第5,223,409号; Kang他、国際公開第92/18619号; Dower他、国際公開第91/17271号; Winter他、国際公開第92/20791号; Markland他、国際公開第92/15679号; Breitling他、国際公開第93/01288号; McCafferty他、国際公開第92/01047号; Garrard他、国際公開第92/09690号; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137、並びにBarbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982、米国特許出願公開第20030186374号及び国際公開第97/29131号記載の方法が挙げられる。

【0135】

組換え抗体ライブラリーは、IL-13若しくはIL-13、又はIL-13若しくはIL-13の一部で免疫された対象からのものであり得る。或いは、組換え抗体ライブラリーは、未処置の対象、すなわち、ヒトIL-13で免疫されていないヒト対象由来のヒト抗体ライブラリーなど、IL-13で免疫されていない対象からのものであり得る。本発明の抗体は、ヒトIL-13を含むペプチドを用いて組換え抗体ライブラリーをスクリーニングし、それによってIL-13を認識する抗体を選択することによって、選択される。かかるスクリーニング及び選択を実施する方法は、前段落の参考文献に記載のものなど、当分野で周知である。ヒトIL-13から特定の k_{off} 速度定数で解離する抗体など、hIL-13に対して特定の結合親和性を有する本発明の抗体を選択するために、当分野で公知の表面プラズモン共鳴方法を使用して、所望の k_{off} 速度定数を有する抗体を選択することができる。特定の IC_{50} を有する抗体など、hIL-13に対して特定の中和活性を有する本発明の抗体を選択するために、hIL-13活性の阻害を評価する当分野で公知の標準方法を使用することができる。

【0136】

一態様においては、本発明は、ヒトIL-13に結合する単離抗体又はその抗原結合性部分に関する。好ましくは、抗体は中和抗体である。種々の実施形態においては、抗体は、組換え抗体又はモノクローナル抗体である。

【0137】

例えば、本発明の抗体は、当分野で公知である種々のファージディスプレイ法を用いて生成させることもできる。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、該ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子表面に提示される。特に、

かかるファージを利用して、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はネズミ）から発現される抗原結合ドメインを表示することができる。目的抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原（例えば、標識抗原、又は固体表面若しくはビーズに結合した、若しくは捕捉された抗原）を用いて、選択又は特定することができる。これらの方法に用いられるファージは、典型的には、ファージ遺伝子 I I I 又は遺伝子 V I I I タンパク質に組換え融合された F a b、F v 又はジスルフィド安定化 F v 抗体ドメインを有するファージから発現される f d 及び M 1 3 結合ドメインを含む繊維状ファージである。本発明の抗体の作製に使用することができるファージディスプレイ法の例としては、その各々を参照によりその全体を本明細書に組み入れる、B r i n k m a n e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 2 : 4 1 - 5 0 (1 9 9 5)、A m e s e t a l . , J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 4 : 1 7 7 - 1 8 6 (1 9 9 5)、K e t t l e b o r o u g h e t a l . , E u r . J . I m m u n o l . 2 4 : 9 5 2 - 9 5 8 (1 9 9 4)、P e r s i c e t a l . , G e n e 1 8 7 9 - 1 8 (1 9 9 7)、B u r t o n e t a l . , A d v a n c e s i n I m m u n o l o g y 5 7 : 1 9 1 - 2 8 0 (1 9 9 4)、P C T 出願第 P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 号、国際公開第 9 0 / 0 2 8 0 9 号、同 9 1 / 1 0 7 3 7 号、同 9 2 / 0 1 0 4 7 号、同 9 2 / 1 8 6 1 9 号、同 9 3 / 1 1 2 3 6 号、同 9 5 / 1 5 9 8 2 号、同 9 5 / 2 0 4 0 1 号、並びに米国特許第 5 , 6 9 8 , 4 2 6 号、同 5 , 2 2 3 , 4 0 9 号、同 5 , 4 0 3 , 4 8 4 号、同 5 , 5 8 0 , 7 1 7 号、同 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号、同 5 , 7 5 0 , 7 5 3 号、同 5 , 8 2 1 , 0 4 7 号、同 5 , 5 7 1 , 6 9 8 号、同 5 , 4 2 7 , 9 0 8 号、同 5 , 5 1 6 , 6 3 7 号、同 5 , 7 8 0 , 2 2 5 号、同 5 , 6 5 8 , 7 2 7 号、同 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号及び同 5 , 9 6 9 , 1 0 8 号に開示されたファージディスプレイ法が挙げられる。

【 0 1 3 8 】

上記参考文献に記載のように、ファージ選択後、ファージからの抗体コード領域を単離し、それを用いてヒト抗体を含めた抗体全体、又は任意の他の所望の抗原結合性フラグメントを生成させ、例えば、以下に詳述するように、ほ乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含めて、任意の所望の宿主中で発現させることができる。例えば、F a b、F a b ' 及び F (a b ') 2 断片を組換え製造する技術は、国際公開第 9 2 / 2 2 3 2 4 号、M u l l i n a x e t a l . , B i o T e c h n i q u e s 1 2 (6) : 8 6 4 - 8 6 9 (1 9 9 2)、S a w a i e t a l . , A J R I 3 4 : 2 6 - 3 4 (1 9 9 5)、及び B e t t e r e t a l . , S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 4 1 - 1 0 4 3 (1 9 8 8) に開示された方法などの当分野で公知の方法を用いて、使用することもできる（前記参考文献を参照によりその全体を本明細書に組み入れる）。単鎖 F v 及び抗体の製造に使用することができる技術の例としては、米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号及び同 5 , 2 5 8 , 4 9 8 号、H u s t o n e t a l . , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 2 0 3 : 4 6 - 8 8 (1 9 9 1)、S h u e t a l . , P N A S 9 0 : 7 9 9 5 - 7 9 9 9 (1 9 9 3)、並びに S k e r r a e t a l . , S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 3 8 - 1 0 4 0 (1 9 8 8) に記載の技術が挙げられる。

【 0 1 3 9 】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーのスクリーニングの代替法、大きいコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする当分野で公知の他の方法を、本発明の二重特異性 (d u a l s p e c i f i c i t y) 抗体の特定に適用することができる。代替発現系の 1 タイプは、S z o s t a k 及び R o b e r t s、国際公開第 9 8 / 3 1 7 0 0 号、並びに R o b e r t s , R . W . a n d S z o s t a k , J . W . (1 9 9 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 : 1 2 2 9 7 - 1 2 3 0 2 に記載のように、組換え抗体ライブラリーが R N A - タンパク質融合物として発現されるタイプである。この系では、共有結合性融合物は、ペプチジル受容体抗生物質であるピューロマイシンを 3 ' 末端に有する合成 m R N A のインビトロでの翻訳

によってコードする、mRNAとペプチド又はタンパク質との間で形成される。したがって、特定のmRNAは、コードされたペプチド又はタンパク質（例えば、抗体又はその一部）の諸性質（二重特異性（dual specificity）抗原に対する抗体又はその一部の結合性など）に基づいて、mRNAの複雑な混合物（例えば、コンビナトリアルライブラリー）から濃縮することができる。かかるライブラリーのスクリーニングから回収される、抗体又はその一部をコードする核酸配列は、（例えば、ほ乳動物宿主細胞において）上述した組換え手段によって発現させることができ、さらに、上述したように、最初に選択した配列に変異を導入したmRNA-ペプチド融合物の追加のラウンドのスクリーニングによって、又は組換え抗体のインビトロでの他の親和性成熟方法によって、更なる親和性成熟に供することができる。

10

【0140】

別の手法では、本発明の抗体を、当分野で公知である酵母ディスプレイ法を用いて生成させることもできる。酵母ディスプレイ法では、遺伝学的方法を使用して、抗体ドメインを酵母の細胞壁につなぎ、酵母表面で抗体ドメインを提示させる。特に、かかる酵母を利用して、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はネズミ）から発現される抗原結合性ドメインを提示することができる。本発明の抗体の作製に使用することができる酵母ディスプレイ法の例としては、参照により本明細書に組み入れる、Witttrup他、米国特許第6,699,658号に開示された方法が挙げられる。

【0141】

B. 組換えIL-13抗体の製造

20

本発明の抗体は、当分野で公知の幾つかの技術のいずれかによって製造することができる。例えば、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターを宿主細胞に標準技術によって移入した、宿主細胞からの発現。「移入」という用語の様々な形態は、外来DNAを原核生物又は真核生物宿主細胞に導入するのに一般に使用される多種多様な技術、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン移入などを包含するものとする。原核生物宿主細胞でも真核生物宿主細胞でも本発明の抗体を発現することは可能であるが、真核細胞における抗体の発現が好ましく、ほ乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。というのは、かかる真核細胞（特にほ乳動物細胞）は、適切に折りたたまれた免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞よりも高いからである。

【0142】

30

本発明の組換え抗体を発現するのに好ましいほ乳動物宿主細胞としては、（例えばR. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載の、DHFR選択マーカーと一緒に使用される、Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載のdhfr- CHO細胞を含めた）チャイニーズハムスター卵巢（CHO細胞）、NSO骨髓腫細胞、COS細胞、SP2細胞などが挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターをほ乳動物宿主細胞に導入するときには、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現に十分な期間、より好ましくは宿主細胞が成長する培地中に抗体を分泌するのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって製造される。抗体は、標準タンパク質精製法によって培地から回収することができる。

40

【0143】

宿主細胞を使用して、Fab断片、scFv分子などの機能的抗体断片を製造することもできる。上記手順の変形も本発明の範囲内であることを理解されたい。例えば、本発明の抗体の軽鎖及び/又は重鎖の機能的断片をコードするDNAを宿主細胞に移入することが望ましい場合もある。組換えDNA技術を使用して、目的抗原との結合に不要である、軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードするDNAの一部又は全部を除去することもできる。かかる切断型DNA分子から発現される分子も本発明の抗体に包含される。また、一方の重鎖と一方の軽鎖が本発明の抗体であり、他方の重鎖と軽鎖が目的抗原以外の抗原に特異的である二官能性抗体を、本発明の抗体を第2の抗体に標準化学架橋法によって架橋す

50

ることによって製造することができる。

【 0 1 4 4 】

本発明の抗体又はその抗原結合性部分の組換え発現の好ましい系においては、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウムを用いた移入によって d h f r - C H O 細胞に導入する。組換え発現ベクター内では、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子は、高レベルの遺伝子転写をもたらす C M V エンハンサー / A d M L P プロモーター調節エレメントに各々作用可能に連結される。組換え発現ベクターは、ベクターが移入された C H O 細胞をメトトレキセート選択 / 増幅によって選択することができる D H F R 遺伝子も含む。選択した形質転換宿主細胞を培養して、抗体重鎖及び軽鎖を発現させ、完全抗体を培地から回収する。標準分子生物学技術を使用して、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞に移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、抗体を培地から回収する。さらに、本発明は、本発明の宿主細胞を適切な培地中で本発明の組換え抗体が合成されるまで培養することによる、本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。方法は、組換え抗体を培地から単離することを更に含み得る。

10

【 0 1 4 5 】

1 . 抗 I L - 1 3 抗体

表 5 は、本発明の好ましい抗 h I L - 1 3 抗体の V H 及び V L 領域のアミノ酸配列リストである。

【 0 1 4 6 】

【 表 6 】

20

表 5 V H 及び V L 領域のアミノ酸配列リスト

配列番号	タンパク質領域		配 列
			123456789012345678901234567890
32	VH 25C8		QVQLQQPGAELVRPGASVQLSCKASGYTFT SSWIHWVNQRPGGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSSED SAVYYCASTATDFDYWGQGTTLTVSS
	VH 25C8 CDR-H1	配列番号 32 の残基 31-35	SSWIH
	VH 25C8 CDR-H2	配列番号 32 の残基 50-66	MIHPSDSETRLNQKFKD
	VH 25C8 CDR-H3	配列番号 32 の残基 99-105	TATDFDY
33	VL 25C8		DVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGAPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQHNYLPLTFGAGTNLELKR
	VL 25C8 CDR-L1	配列番号 33 の残基 24-39	KSTKSLLNSDGFTYLD
	VL 25C8 CDR-L2	配列番号 33 の残基 55-61	LVSNRFS

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VL 25C8 CDR-L3	配列番号33の残基 94-102	FQHNYLPLT
34	VH 9C11		QVRLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT SSWIHWVNQRPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCASTATDFDYWGQGTTLTVSS
	VH 9C11 CDR-H1	配列番号34の残基 31-35	SSWIH
	VH 9C11 CDR-H2	配列番号34の残基 50-66	MIHPDSETRLNQKFKD
	VH 9C11 CDR-H3	配列番号34の残基 99-105	TATDFDY
35	VL 9C11		DVVLQTPTPLSLPVNIGDQASISCRSTQTL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADLGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLELKR
	VL 9C11 CDR-L1	配列番号35の残基 24-39	RSTQTLNNSDGFTYLD
	VL 9C11 CDR-L2	配列番号35の残基 55-61	LVSNRFS
	VL 9C11 CDR-L3	配列番号35の残基 94-102	FQNNYLPLT
36	VH 21D9		QVQLQQSGDDLKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKORPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMPKDKAKLTVDTSSTAYIHLSSLSSD SAVYFCARGSFYFFYAMDYWGQGTSTVTVSS
	VH 21D9 CDR-H1	配列番号36の残基 31-35	SYWIN
	VH 21D9 CDR-H2	配列番号36の残基 50-66	HIAPGSGETYDNEMPKD
	VH 21D9 CDR-H3	配列番号36の残基 99-109	GSFTFFYAMDY
37	VL 21D9		DVLMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNI HSNGKTYLEWYLQRPQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADLGV YYCFQGSHPVPTTFGGGTKLEIKR
	VL 21D9 CDR-L1	配列番号37の残基 24-39	RSSQNIHHSNGKTYLE
	VL 21D9 CDR-L2	配列番号37の残基 55-61	KVSNRFS
	VL 21D9 CDR-L3	配列番号37の残基 94-102	FQGSHPVPT
38	VH 22D10		QVQLQQSGDDLKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKORPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMPKDKAKLTVDTSSTAYIHLSSLSSD SAVYFCARGSFYFFYAMDYWGQGTSTVTVSS

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VH 22D10 CDR-H1	配列番号38の残基 31-35	SYWIN
	VH 22D10 CDR-H2	配列番号38の残基 50-66	HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 22D10 CDR-H3	配列番号38の残基 99-109	GSFTFFYAMDY
37	VL 22D10		DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQRPQSPKLLIYKVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKR
	VL 22D10 CDR-L1	配列番号37の残基 24-39	RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 22D10 CDR-L2	配列番号37の残基 55-61	KVS N RFS
	VL 22D10 CDR-L3	配列番号37の残基 94-102	FQGSHPVPT
39	VH 5F1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGISWVKQRTGQGLEWIGELIYPGSYNTYY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTTLT VSS
	VH 5F1 CDR-H1	配列番号39の残基 31-35	TYGIS
	VH 5F1 CDR-H2	配列番号39の残基 50-66	EIYPGSYNTYYNEKFRG
	VH 5F1 CDR-H3	配列番号39の残基 99-112	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5F1		DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVS NRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR
	VL 5F1 CDR-L1	配列番号40の残基 24-39	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5F1 CDR-L2	配列番号40の残基 55-61	TVS N RFS
	VL 5F1 CDR-L3	配列番号40の残基 94-102	SQSTHVPYTT
41	VH 5G1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGVSWVKQRTGQGLEWIGELIYPGNYNNTYY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTTLT VSS
	VH 5G1 CDR-H1	配列番号41の残基 31-35	TYGVS
	VH 5G1 CDR-H2	配列番号41の残基 50-66	EIYPGNYNNTYYNEKFRG

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VH 5G1 CDR-H3	配列番号41の残基 99-112	WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5G1		DVVMQTPTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR
	VL 5G1 CDR-L1	配列番号40の残基 24-39	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5G1 CDR-L2	配列番号40の残基 55-61	TVSNRFS
	VL 5G1 CDR-L3	配列番号40の残基 94-102	SQSTHVPYT
42	VH 3H7		EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFS TYAMSWVRQTPPEKRLWVAGISSGGSYTTY PETMKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSED TAIYYCTRGSWGQGTSTVSS
	VH 3H7 CDR-H1	配列番号42の残基 31-35	TYAMS
	VH 3H7 CDR-H2	配列番号42の残基 50-66	GISSGGSYTTYPETMKG
	VH 3H7 CDR-H3	配列番号42の残基 99-100	GS
43	VL 3H7		DVVLQTPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLL DSDGETYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCWQGTHTFPWTFGGGTKLEIKR
	VL 3H7 CDR-L1	配列番号43の残基 24-39	KSSQSLLDSDGETYLN
	VL 3H7 CDR-L2	配列番号43の残基 55-61	LVSKLDS
	VL 3H7 CDR-L3	配列番号43の残基 94-102	WQGTHTFPWT
44	VH 14B2		EVKLVESGGGLVLRPGGSLKLSAASGFTFS SYAMNWVRQTPPEKRLWVASISSGGNIYYS DSVKGRFTISRDNARNTLHLQMSSLRSED AMYCARDGYLYAMDYWGQGTSTVSS
	VH 14B2 CDR-H1	配列番号44の残基 31-35	SYAMN
	VH 14B2 CDR-H2	配列番号44の残基 50-65	SISSGGNIYYSDSVKG
	VH 14B2 CDR-H3	配列番号44の残基 98-106	DGYLYAMDY
45	VL 14B2		DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQNLL YSSNQKNYLAWYQKPGQSPKLLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLA VYYCQQYYSYFPFTFGSGTKLEIKR

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VL 14B2 CDR-L1	配列番号45の残基 24-40	KSSQNLLYSSNQKNYLA
	VL 14B2 CDR-L2	配列番号45の残基 56-62	WASTRES
	VL 14B2 CDR-L3	配列番号45の残基 95-103	QQYYSYPFT
46	VH 13C5		QVTLKESGPGIQLPSQTLSTCSFSGFSLSTSDMGVDWIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRILTISKDTSSSQVFLMLASVDTADTATYYCARTVSSGGYIYYAMDYWGQGTSTVTVSS
	VH 13C5 CDR-H1	配列番号46の残基 32-38	SDMGVDW
	VH 13C5 CDR-H2	配列番号46の残基 52-67	HIWDDVKRYNPALKS
	VH 13C5 CDR-H3	配列番号46の残基 100-112	TVSSGGYIYYAMDY
47	VL 13C5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQRKPDGTVKLLIFYTSKLHSGVPSRFGSGSGTDYSLTIRNLEQEDIATYFCQQGNTLPLTFGGGKLEIKR
	VL 13C5 CDR-L1	配列番号47の残基 24-34	RASQDIRNYLN
	VL 13C5 CDR-L2	配列番号47の残基 50-56	YTSKLHS
	VL 13C5 CDR-L3	配列番号47の残基 89-97	QQGNTLPLT
48	VH 29G5		QVTLKESGPGIQLPSQTLSTCSFSGFSLSTSDMGVDWIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRILTISKDTSSSQVFLMLASVDTADTATYYCARIVSSGGYIYYALDYWGQGTSTVTVSS
	VH 29G5 CDR-H1	配列番号48の残基 31-37	TSDMGVD
	VH 29G5 CDR-H2	配列番号48の残基 52-67	HIWDDVKRYNPALKS
	VH 29G5 CDR-H3	配列番号48の残基 100-112	TVSSGGYIYYALDY
49	VL 29G5		DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQRKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPLTFGGGKLEIKR
	VL 29G5 CDR-L1	配列番号49の残基 24-34	RASQDIRNYLN
	VL 29G5 CDR-L2	配列番号49の残基 50-56	YTSRLHS

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VL 29G5 CDR-L3	配列番号49の残基 89-97	QQGNTLPLT
50	VH 33C3		QVTLKESGPGILQPSQTLSTLTCFSGFSL TSDLGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSSSQVFLMIASVDTA DTATYYCARIGSSGYIYYEMDYGQTSVT VSS
	VH 33C3 CDR-H1	配列番号50の残基 31-37	TSDLGVG
	VH 33C3 CDR-H2	配列番号50の残基 52-67	HIWDDVKRYNPALKS
	VH 33C3 CDR-H3	配列番号50の残基 100-112	IGSSGYIYYEMDY
51	VL 33C3		DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDIR NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQ GNTLPLTFGGGTRLEIKR
	VL 33C3 CDR-L1	配列番号51の残基 24-34	RASQDIRNYLN
	VL 33C3 CDR-L2	配列番号51の残基 60-66	YTSRLHS
	VL 33C3 CDR-L3	配列番号51の残基 89-97	QQGNTLPLT
52	VH 4A8		EVQLQQSGAEFVRPGALVKLSCKASGFNIK DYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPENGNTIY DPKFQKASITGDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARYAAYGPFDDYWGQGTTLTVSS
	VH 4A8 CDR-H1	配列番号52の残基 31-35	DYMY
	VH 4A8 CDR-H2	配列番号52の残基 50-66	RIDPENGNTIYDPKFQK
	VH 4A8 CDR-H3	配列番号52の残基 99-107	YAYGPFDDY
53	VL 4A8		QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSIGTVT TNNYANWVQEKPDHLFTGLIGSTNNRAPGV PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWVFGGKLTVLG
	VL 4A8 CDR-L1	配列番号53の残基 23-36	RSSIGTVTTNNYAN
	VL 4A8 CDR-L2	配列番号53の残基 52-58	STNNRAP
	VL 4A8 CDR-L3	配列番号53の残基 91-99	ALWYSNHWV
54	VH 1B6		QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLT GYGVNWRQPPGKLEWLGMIWGDERTIDYN SALKSRLSITKDNKSQVFLKMNLSQTDDT GRYFCARDGYFPYAMDYGQTSVTVSS

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VH 1B6 CDR-H1	配列番号54の残基 31-35	GYGVN
	VH 1B6 CDR-H2	配列番号54の残基 50-65	MIWGDERIDYNSALKS
	VH 1B6 CDR-H3	配列番号54の残基 98-107	DGYFFPYAMDY
55	VL 1B6		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVDSYGKSYLHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLIIDPVEADDAATY YCQQNNEGPRTFGGGKLEIKR
	VL 1B6 CDR-L1	配列番号55の残基 24-38	RASETVDSYGKSYLH
	VL 1B6 CDR-L2	配列番号55の残基 54-60	LASNLES
	VL 1B6 CDR-L3	配列番号55の残基 93-101	QQNNEGPRT
56	VH 3E5		QVQLKESGPGLVAPSQSLSTICTVSGFSLTGSSINWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGRIDYNSVLKSRSLISKDSSKSOVFLKMNSLQADDT ARYYCARDGYFFPYAMVYWGQGTSTVTVSS
	VH 3E5 CDR-H1	配列番号56の残基 31-35	GSSIN
	VH 3E5 CDR-H2	配列番号56の残基 50-65	MIWGDGRIDYNSVLKS
	VH 3E5 CDR-H3	配列番号56の残基 98-107	DGYFFPYAMVY
57	VL 3E5		NIVLTQSPASLAVSLGQRATIFCRASEVDSYGNFSFMHWYQQKSGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATFYCQQNNENPRTFGGGKLEIKR
	VL 3E5 CDR-L1	配列番号57の残基 24-38	RASEVDSYGNFSFMH
	VL 3E5 CDR-L2	配列番号57の残基 54-60	LASNLES
	VL 3E5 CDR-L3	配列番号57の残基 93-101	QQNNENPRT
58	VH 6C8		QVQLKESGPGLVAPSQSLSTICTVSEFSLTGSSVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGRIDYNSALKSRSLISKDNSKSOVFLKMNSLQTDDET ARYYCARDGYFFPYAMNYWGQGTSTVTVSS
	VH 6C8 CDR-H1	配列番号58の残基 31-35	GSSVN
	VH 6C8 CDR-H2	配列番号58の残基 50-65	MIWGDGRIDYNSALKS

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VH 6C8 CDR-H3	配列番号58の残基 98-107	DGYYPYAMNY
59	VL 6C8		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD SYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRADFTLTIDPVEADDAATY YCQNNENPRTFGGGTKLEIKR
	VL 6C8 CDR-L1	配列番号59の残基 24-38	RASESVDSYGNSFMH
	VL 6C8 CDR-L2	配列番号59の残基 54-60	LASNLES
	VL 6C8 CDR-L3	配列番号59の残基 93-101	QQNNENPRT
60	VH 5D3		QVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLT GYNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGNTAFN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDT ARYYCARDGYYPYAIKYWGQGTSTVTVSS
	VH 5D3 CDR-H1	配列番号60の残基 31-35	GYNIN
	VH 5D3 CDR-H2	配列番号60の残基 50-65	LIWGDGNTAFNSALKS
	VH 5D3 CDR-H3	配列番号60の残基 98-107	DGYYPYAIKY
61	VL 5D3		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQNNEDPRTFGGGTKLEIKR
	VL 5D3 CDR-L1	配列番号61の残基 24-38	RASETVD SYGNSFMH
	VL 5D3 CDR-L2	配列番号61の残基 54-60	LASNLES
	VL 5D3 CDR-L3	配列番号61の残基 93-101	QQNNEDPRT
62	VH 8B6		QVQLKESGPGLVAPSQLSITCTVSGFSLT GHNINWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGNTDFN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDT ARYYCARDGYYPYAIKFWGQGTSTVTVSS
	VH 8B6 CDR-H1	配列番号62の残基 31-35	GHNIN
	VH 8B6 CDR-H2	配列番号62の残基 50-65	MIWGDGNTDFNSALKS
	VH 8B6 CDR-H3	配列番号62の残基 98-107	DGYYPYAIKF
63	VL 8B6		HIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD SYGSSFLHWYQQKPGQPPKLLIYLASKLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQNNNEGPRTFGGGSKLEIKR

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
	VL 8B6 CDR-L1	配列番号63の残基 24-38	RASETVDSYGSSFLH
	VL 8B6 CDR-L2	配列番号63の残基 54-60	LASKLES
	VL 8B6 CDR-L3	配列番号63の残基 93-101	QQNNEGPRT

10

【0147】

上記単離抗IL-13抗体CDR配列は、本発明に従って単離される新規IL-13結合タンパク質ファミリーであって、下記表6に記載のCDR配列を含むポリペプチドを含む新規IL-13結合タンパク質ファミリーを樹立する。hIL-13及び又はhIL-13に対して好ましいIL-13結合及び/又は中和活性を有する本発明のCDRを生成させ、選択するために、本明細書に具体的に記載する方法を含めて、ただしそれだけに限定されない、本発明の結合タンパク質を生成させ、結合タンパク質のIL-13及び又はIL-13結合及び/又は中和特性を評価する当分野で公知の標準方法を使用することができる。

20

【0148】

【表7】

表6 コンセンサスIL-13 CDR親和性リガンド（代替の残基を各アミノ酸位置の下に記載する。－は残基が存在し得ないことを示す。）。

CDR 領域	配列識別名	コンセンサス配列																
CDR-H1	配列番号 64	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇										
		T	S	D	M	G	V	D										
		D			S	W	I	H										
		G			Y	Y	M	S										
		S			L	A		Y										
					H	S		N										
				N		G												
CDR-H2	配列番号 65	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇
		M	I	H	P	S	D	S	E	T	R	L	N	Q	K	F	K	D
		E	-	Y	S	G	G	Y	N	I	Y	Y	P	E	M	L	R	G
		H		A	W	E	S	G	Y	K	I	D	S	D	S	V	Q	S
		R		D	G	D	E		V		D	F	D	P	T	M		
		S		S			N		R		A			S	A			
		G		W												V		
		L																

30

40

CDR 領域	配列識別名	コンセンサス配列
CDR-H3	配列番号 66	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ W R T S Y F S D Y G Y F D Y T A F T F Y Y L A M V F G S Y Y G I Y P S N Y G S F P E L K D V I
CDR-L1	配列番号 67	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ K S S Q N L L Y S S N Q K N Y L A R A T K S T Q N I D G F T F A D I T S V H T N N S M E G D H E H E T Y S N
CDR-L2	配列番号 68	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ L V S N R F S S T N K L D P K A T K E R T R H W M A Y P
CDR-L3	配列番号 69	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ F Q H N Y L P L T W L G S T V H F V Q Y T S F Y A W Y E Y W N L H N R G D P

10

20

【 0 1 4 9 】

2. 抗 I L - 1 3 キメラ抗体

30

キメラ抗体は、ネズミモノクローナル抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体など、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体を製造する方法は、当分野で公知であり、実施例 2 . 1 で詳細に考察する。例えば、参照によりその全体を本明細書に組み入れる、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202、米国特許第5,807,715号、同4,816,567号及び同4,816,397号を参照されたい。また、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒にスプライシングすることによって「キメラ抗体」を製造するために開発された技術（参照によりその全体を本明細書に組み入れる、Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454）を使用することができる。

40

【 0 1 5 0 】

一実施形態においては、本発明のキメラ抗体は、セクション 1 に記載のネズミモノクローナル抗ヒト I L - 1 3 抗体の重鎖定常領域をヒト I g G 1 定常領域で置換することによって製造される。特定の一実施形態においては、本発明のキメラ抗体は、配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可

50

変領域 (V_H) と、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 43 又は配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L) とを含む。

【0151】

3. 抗 IL-13 ヒト化抗体

ヒト化抗体は、非ヒト種由来の 1 個以上の相補性決定領域 (CDR) とヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する所望の抗原に結合する、非ヒト種抗体由来の抗体分子である。公知のヒト Ig 配列は、例えば、参照によりその全体を本明細書に組み入れる、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about/pedro/research_tools.html; www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about/mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about/hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/about/hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about/yasuhiro-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about/fcccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/about/jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat__aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgip/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr/roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dep

10

20

30

40

50

t. Health (1983)に開示されている。かかる移入された配列を使用して、当分野で公知のように、免疫原性を低下させることができ、又は結合、親和性、オン速度、オフ速度、結合活性、特異性、半減期、若しくは任意の他の適切な特性を低減、増強若しくは改変することができる。

【0152】

ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基を、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換して、抗原結合性を変化させることができ、好ましくは改善することができる。これらのフレームワーク置換は、当分野で周知の方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定する、CDRとフレームワーク残基の相互作用のモデリング、及び特別な位置における異常なフレームワーク残基を特定する配列比較によって、特定される。(例えば、参照によりその全体を本明細書に組み入れる、Queen他、米国特許第5,585,089号、Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)を参照されたい。)3次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者によく知られている。選択した免疫グロブリン配列候補の有望な3次元高次構造を図示し、表示するコンピュータープログラムを利用することができる。これらの表示を詳しく調べることによって、免疫グロブリン配列候補の機能における残基の可能な役割を分析することができ、すなわち、免疫グロブリン候補がその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基を分析することができる。このようにして、FR残基をコンセンサスから選択し、組み合わせ、標的抗原に対する親和性の増大などの所望の抗体特性が得られるように配列を移入することができる。一般に、CDR残基は、抗原結合への作用に直接的かつ最も実質的に関与する。抗体は、その中で引用されている参考文献を含めて、参照によりその全体を本明細書に組み入れる、Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988); Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993); Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)、国際公開第91/09967号、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755;国際公開第90/14443号、同90/14424号、同90/14430号、欧州特許第229246号、同592,106号、同519,596号、同239,400号、米国特許第5,565,332号、同5,723,323号、同5,976,862号、同5,824,514号、同5,817,483号、同5814476号、同5763192号、同5723323号、同5,766886号、同5,714,352号、同6,204,023号、同6,180,370号、同5,693,762号、同5,530,101号、同5,585,089号、同5,225,539号、同4,816,567号に記載の技術など、ただしこれらだけに限定されない当分野で公知の種々の技術によってヒト化することができる。

【0153】

C. 抗体及び抗体産生細胞系の製造

好ましくは、本発明の抗IL-13抗体は、例えば、当分野で公知の幾つかのインビトロ及び生体内アッセイのいずれか一つによって評価して、IL-13活性を低下させる、又は中和する、高い能力を示す(例えば、実施例1.1.C参照)。例えば、これらの抗体は、A-549細胞によるTARCのIL-13誘導性産生を、少なくとも約 10^{-8} M、約 10^{-9} M又は約 10^{-10} Mの範囲のIC₅₀値で中和する。

10

20

30

40

50

【0154】

好ましい実施形態においては、単離抗体又はその抗原結合性部分は、ヒトIL-13に結合し、抗体又はその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴によって測定して、ヒトIL-13から約 0.1 s^{-1} 以下の k_{off} 速度定数で解離し、又はヒトIL-13及び/又はヒトIL-13活性を約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 以下の IC_{50} で阻害する。或いは、抗体又はその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴によって測定して、ヒトIL-13から約 $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数で解離し得、又はヒトIL-13及び/又はヒトIL-13活性を約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 以下の IC_{50} で阻害し得る。或いは、抗体又はその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴によって測定して、ヒトIL-13から約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数で解離し得、又はヒトIL-13及び/又はヒトIL-13を約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 以下の IC_{50} で阻害し得る。或いは、抗体又はその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴によって測定して、ヒトIL-13から約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数で解離し得、又はIL-13及び/又はヒトIL-13活性を約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下の IC_{50} で阻害し得る。或いは、抗体又はその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴によって測定して、ヒトIL-13から約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数で解離し得、又はIL-13及び/又はヒトIL-13活性を約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 以下の IC_{50} で阻害し得る。或いは、抗体又はその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴によって測定して、ヒトIL-13から約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の k_{off} 速度定数で解離し得、又はIL-13及び/又はヒトIL-13活性を約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 以下の IC_{50} で阻害し得る。

10

20

【0155】

IL-13は、細胞表面のIL-13受容体(IL-13R)に結合することによってその作用を発揮する。ヘテロ2量体は、IL-13R α 鎖(IL-13R α 1)とIL-4R鎖(IL-4R)で構成される。IL-13は、IL-13R α 1にまず低親和性($K_D = 2 - 10 \text{ nM}$)で結合し、次いでIL-4Rを複合体に動員して、高親和性受容体($K_D = 0.03 - 0.4 \text{ nM}$)を生成する(Aman, M. J., et al. 1996 J. Biol. Chem. 271, 29265 - 29270; Miloux, et al. 1997 FEBS Lett. 401, 163 - 166; Andrews, et al. 2002 J. Biol. Chem. 277, 46073 - 46078)。IL-13Rのヘテロ2量体化は、それぞれIL-13R α 1及びIL-4Rに恒常的に付随するヤヌスキナーゼTYK2及びJAK1を活性化し、続いて活性化シグナル伝達性転写因子6(STAT6)を活性化する(Izuhara, K., and Arima, K. 2004 Drug News Perspect. 17, 91 - 98)。IL-13に高親和性($0.25 - 1.2 \text{ nM}$)で結合する別のIL-13結合単位であるIL-13R α 2鎖(IL-13R α 2)がある(Caput, et al. 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921 - 16926; Donaldson et al. 1998 J. Immunol. 161, 2317 - 2324)。IL-13・IL-13R α 2複合体に関与する他の受容体分子は知られていない。IL-13R α 2は、非シグナル伝達「おとり」受容体として作用すると当初は考えられた。しかし、IL-13R α 2は、IL-13に結合し得、AP-1経路を介してシグナル伝達し、マクロファージを含めたある細胞タイプにおいてTNFベータ産生をもたらす、TNFベータ産生は肺線維症をもたらすことがその後に見られた(Fichtner-Feigl, 2006 Nat Med 12:99 - 106)。したがって、IL-13R α 1/IL-4RとIL-13R α 2の両方の経路は、ぜん息及び他の肺炎症性症状の病態生理全般の一因になる。したがって、両方の受容体に対するIL-13の結合を阻止する治療用抗IL-13抗体は、一方の受容体のみを阻止する抗IL-13抗体よりも有効である。

30

40

【0156】

本発明者らは、IL-13R α 1とIL-13R α 2の両方に対するIL-13の結合を阻止する単離モノクローナル抗体を有する。ELISAに基づく受容体結合アッセイと

50

細胞表面の 125I 標識 IL-13 結合アッセイの両方によって、ネズミバージョンとヒト化バージョン（すなわち 13C5.5）の両方の 13C5 は、両方の受容体に対する IL-13 の結合を有効に阻止できることが実証された。25C8 及び 33C3 を含めて、13C5 と同じ系列の抗体も、両方の受容体に対する IL-13 の結合を阻止することができた。13C5 のエピトープマッピングによれば、その結合部位は、ヒト IL-13 の C 末端ヘリックス D 領域（配列番号 1 のアミノ酸 104 - 130 に対応する残基 V R D T K I E V A Q F V K D L L L H L K K L F R E G R）を含んだ。C 末端ヘリックス D 領域は、IL-13 受容体との相互作用に参与すると提唱された（Zuegg et al 2001 Immunol Cell Biol. 79:332-9）。13C5.5 抗体の Fab 部分と複合化されたヒト IL-13 の結晶構造によれば、13C5.5 は、ヒト IL-13 の C 末端ヘリックス D 領域及び N 末端ヘリックス A 領域に結合する。好ましくは、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 1 の局所領域 Ser26 - Thr27 - Ala28 - Leu29 - Arg30 - Glu31 - Leu32 - Ile33 - Glu34 - Glu35 - Leu36 - Val37 - Asn38 及び Lys123 - Lys124 - Leu125 - Phe126 - Arg127 - Glu128 - Gly129 - Arg130 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する。好ましくは、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号 1 の局所領域 Arg30 - Glu31 - Leu32 - Ile33 - Glu34 - Glu35 - Leu36 - Val37 - Asn38 及び Lys123 - Lys124 - Leu125 - Phe126 - Arg127 によって定義されたエピトープに結合した前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを有する IL-13 が IL-13 受容体との結合を阻止されるように、ヒト IL-13 に結合する。

【0157】

ある実施形態においては、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、IgD 定常領域などの重鎖定常領域を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、IgG1 重鎖定常領域又は IgG4 重鎖定常領域である。また、抗体は、カッパ軽鎖定常領域又はラムダ軽鎖定常領域のどちらかの軽鎖定常領域を含み得る。好ましくは、抗体はカッパ軽鎖定常領域を含む。或いは、抗体部分は、例えば、Fab 断片又は単鎖 Fv 断片であり得る。

【0158】

Fc 部分のアミノ酸残基を置換して抗体のエフェクター機能を変化させることは、当分野で公知である（Winter 他、米国特許第 5,648,260 号、同 5,624,821 号）。抗体の Fc 部分は、幾つかの重要なエフェクター機能、例えば、抗体及び抗原 - 抗体複合体のサイトカイン誘導、ADCC、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）及び半減期 / クリアランス速度を媒介する。これらのエフェクター機能は、治療抗体に望ましい場合もあるが、治療目的によっては不必要であり、さらには有害な場合もある。ある種のヒト IgG アイソタイプ、特に IgG1 及び IgG3 は、それぞれ Fc Rs 及び補体 C1q との結合を介して、ADCC 及び CDC を媒介する。新生児型 Fc 受容体（FcRn）は、抗体の循環半減期を決定する重要な成分である。更に別の実施形態においては、少なくとも 1 個のアミノ酸残基は、抗体のエフェクター機能が変化するように、抗体の定常領域、例えば抗体の Fc 領域において置換される。

【0159】

一実施形態は、本発明の抗体又は抗体部分が誘導体化された又は別の機能分子（例えば、別のペプチド又はタンパク質）と結合した、標識結合タンパク質を提供する。例えば、本発明の標識結合タンパク質を、本発明の抗体又は抗体部分を 1 種類以上の他の分子実体（別の抗体（例えば、二重特異性（bispecific）抗体又は二重特異性抗体（diabody））、検出可能薬剤、細胞毒性薬、薬剤及び / 又は抗体若しくは抗体部分と（ストレプトアビジンコア領域、ポリヒスチジンタグなどの）別の分子との会合（associate）を媒介し得るタンパク質若しくはペプチドなど）と化学カップリング、遺

10

20

30

40

50

伝子融合、非共有結合性会合などによって機能的に連結することによって誘導することができる。

【0160】

本発明の抗体又は抗体部分を誘導体化し得る有用な検出可能な薬剤としては、蛍光性化合物などが挙げられる。例示的な蛍光性検出可能な薬剤としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、塩化5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル、フィコエリトリンなどが挙げられる。抗体は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素を用いて誘導体化することもできる。検出可能な酵素で抗体を誘導体化したときは、検出可能な反応生成物を生成するために、酵素が使用する追加の試薬を添加することによって抗体を検出する。例えば、検出可能な薬剤の西洋ワサビペルオキシダーゼが存在するときは、過酸化水素及びジアミノベンジジンを添加することによって、検出可能な着色反応生成物がもたらされる。抗体は、ビオチンを用いて誘導体化し、アビジン又はストレプトアビジン結合を間接的に測定することによって検出することもできる。

10

【0161】

本発明の別の一実施形態は、結晶化結合タンパク質を提供する。好ましくは、本発明は、本明細書に開示する抗IL-13抗体全体及びその断片の結晶並びにかかる結晶を含む製剤及び組成物に関する。一実施形態においては、結晶化結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性対応物よりも長い生体内半減期を有する。別の一実施形態においては、結合タンパク質は、結晶化後も生物活性を保持する。

20

【0162】

本発明の結晶化結合タンパク質は、当分野で公知の方法、及び参照により本明細書に組み入れる国際公開第02072636号に開示されている方法によって製造することができる。

【0163】

本発明の別の一実施形態は、抗体又はその抗原結合性部分が1種類以上の炭水化物残基を含む、グリコシル化結合タンパク質を提供する。新生生体内タンパク質の生成は、翻訳後修飾として知られる更なるプロセッシングを受け得る。特に、糖(グリコシル)残基が酵素的に付加され得る(グリコシル化として知られるプロセス)。共有結合したオリゴ糖側鎖を有する生成タンパク質は、グリコシル化タンパク質又は糖タンパク質として知られる。抗体は、Fcドメイン中の1種類以上の炭水化物残基と可変ドメインとを有する糖タンパク質である。Fcドメイン中の炭水化物残基は、Fcドメインのエフェクター機能に対して重要な効果を有し、抗体の抗原結合又は半減期に対しては最低限の効果しか持たない(R. Jeffers, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pp. 11-16)。これに対し、可変ドメインのグリコシル化は、抗体の抗原結合活性に対して効果を有し得る。可変ドメインにおけるグリコシル化は、恐らくは立体障害のために、抗体結合親和性に対して負の効果を有し得る(Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30:1361-1367)、又は抗原に対する親和性を増大させ得る(Wallick, S.C., et al., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., EMBO J. (1991) 10:2717-2723)。

30

40

【0164】

本発明の一態様は、結合タンパク質のO又はN結合グリコシル化部位が変異したグリコシル化部位変異体の生成を対象とする。当業者は、かかる変異体を周知の標準技術によって生成させることができる。生物活性を保持するが、結合活性が増大又は低下したグリコシル化部位変異体は、本発明の別の目的である。

【0165】

更に別の一実施形態においては、本発明の抗体又は抗原結合性部分のグリコシル化を改変する。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる(すなわち、グリコシル化

50

されていない抗体)。グリコシル化は、例えば抗原に対する抗体の親和性を増大させるように、変化させることができる。かかる炭水化物修飾は、例えば抗体配列内の1個以上のグリコシル化部位を変化させることによって、実施することができる。例えば、1個以上の可変領域グリコシル化部位を除去し、それによって該部位におけるグリコシル化を除去する、1つ以上のアミノ酸置換を実施することができる。かかる非グリコシル化(aglycosylation)は、抗原に対する抗体の親和性を増大させ得る。かかる手法は、その各々を参照によりその全体を本明細書に組み入れる、国際公開第2003016466号A2並びに米国特許第5,714,350号及び同6,350,861号に更に詳細に記載されている。

【0166】

それに加えて、又はその代わりに、フコシル残基の量が減少した低フコシル化(hypofucosylated)抗体、バイセクトGlcNAc構造の増加した抗体など、変化したグリコシル化タイプを有する本発明の修飾抗体を作製することができる。かかる変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増大させることが実証された。かかる炭水化物修飾は、例えば、変化したグリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることによって、実施することができる。変化したグリコシル化機構を有する細胞は、当分野で記述されており、本発明の組換え抗体を発現し、それによって変化したグリコシル化を含む抗体を生成する宿主細胞として使用することができる。例えば、その各々を参照によりその全体を本明細書に組み入れる、Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1、並びに欧州特許第1,176,195号、国際公開第03/035835号、同99/5434280号を参照されたい。

【0167】

タンパク質のグリコシル化は、対象のタンパク質のアミノ酸配列、及びタンパク質が発現される宿主細胞に依存する。異なる生物体は、異なるグリコシル化酵素(例えば、糖転移酵素及びグリコシダーゼ)を産生し得、利用可能な異なる基質(ヌクレオチド糖)を有し得る。かかる要因のために、タンパク質のグリコシル化パターン及びグリコシル残基の組成は、特定のタンパク質が発現される宿主系に応じて異なり得る。本発明に有用であるグリコシル残基としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、n-アセチルグルコサミン及びシアル酸が挙げられるが、これらだけに限定されない。好ましくは、グリコシル化結合タンパク質は、グリコシル化パターンがヒトであるようなグリコシル残基を含む。

【0168】

タンパク質のグリコシル化が異なるとタンパク質特性が異なり得ることは当業者に知られている。例えば、酵母などの微生物宿主中で産生され、酵母の内在性経路を利用してグリコシル化された治療用タンパク質の有効性は、CHO細胞系などのほ乳動物細胞中で発現される同じタンパク質の有効性よりも低下し得る。かかる糖タンパク質は、ヒトにおいて免疫原性でもあり得、投与後に生体内半減期が短縮し得る。ヒト及び他の動物における特異的受容体は、特定のグリコシル残基を認識し、血流からのタンパク質の急速なクリアランスを促進し得る。別の有害作用としては、タンパク質折りたたみ、溶解性、プロテアーゼに対する感受性、細胞内輸送、輸送、区画化、分泌、他のタンパク質若しくは因子による認識、抗原性、アレルゲン性などの変化が挙げられる。したがって、実務家は、グリコシル化の特定の組成及びパターン(例えば、ヒト細胞において、又は意図する対象動物の種特異的細胞において、産生されるものと同一又は少なくとも類似したグリコシル化組成及びパターン)を有する治療用タンパク質を好み得る。

【0169】

宿主細胞のグリコシル化タンパク質とは異なるグリコシル化タンパク質の発現は、宿主細胞を遺伝子改変して、異種グリコシル化酵素を発現させることによって、実施することができる。当分野で公知の技術を用いて、実務家は、ヒトタンパク質グリコシル化を示す

10

20

30

40

50

抗体又はその抗原結合性部分を生成させることができる。例えば、酵母系統は、これらの酵母系統において産生されるグリコシル化タンパク質（糖タンパク質）が、動物細胞、特にヒト細胞のタンパク質グリコシル化と同一のタンパク質グリコシル化を示すように、遺伝子改変されて、非天然グリコシル化酵素を発現する（米国特許出願公開第20040018590号及び同20020137134号並びに国際公開第2005100584号A2）。

【0170】

結合タンパク質に加えて、本発明は、本発明のかかる結合タンパク質に特異的である抗イディオタイプ（抗Id）抗体も対象とする。抗Id抗体は、別の抗体の抗原結合領域に一般に関連する独特の決定因子を認識する抗体である。抗Idは、動物を結合タンパク質又はそのCDR含有領域で免疫することによって調製することができる。免疫された動物は、免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識し、それに応答して、抗Id抗体を産生する。抗Id抗体は、更に別の動物における免疫応答を誘導する「免疫原」としても使用することができ、いわゆる抗抗Id抗体を産生する。

10

【0171】

また、当業者は、ライブラリーのメンバー宿主細胞が、異なるグリコシル化パターンを有する目的タンパク質を産生するように、種々のグリコシル化酵素を発現するように遺伝子操作された宿主細胞のライブラリーを用いて目的タンパク質を発現させ得ることを理解されたい。次いで、実務家は、特定の新規グリコシル化パターンを有する目的タンパク質を選択し、単離することができる。好ましくは、特に選択された新規グリコシル化パターンを有するタンパク質は、改善された又は変化した、生物学的性質を示す。

20

【0172】

D. 抗IL-13抗体の使用

ヒトIL-13に結合するその能力を考慮に入れると、本発明の抗ヒトIL-13抗体又はその一部は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、放射性免疫測定法（RIA）、組織免疫組織化学などの従来の免疫測定法を用いて、（例えば、血清、血しょうなどの生物試料中の）ヒトIL-13を検出するのに使用することができる。本発明は、生物試料を本発明の抗体又は抗体部分と接触させること、及びヒトIL-13に結合した抗体（又は抗体部分）又は結合していない抗体（又は抗体部分）を検出し、それによって生物試料中のヒトIL-13を検出することを含む、生物試料中のヒトIL-13を検出する方法を提供する。検出可能な物質で抗体を直接的又は間接的に標識して、結合した又は結合していない抗体の検出を容易にする。適切な検出可能物質としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、放射性材料などが挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられる。適切な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンが挙げられる。発光材料の例としてはルミノールが挙げられる。適切な放射性材料の例としては、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 又は ^{153}Sm が挙げられる。

30

40

【0173】

抗体の標識化の代わりに、検出可能物質で標識されたrhIL-13標準及び非標識抗ヒトIL-13抗体を利用した競合免疫測定法によって、体液中のヒトIL-13を評価することができる。このアッセイでは、生物試料、標識rhIL-13標準及び抗ヒトIL-13抗体を組み合わせ、非標識抗体に結合した標識rhIL-13標準の量を測定する。生物試料中のヒトIL-13の量は、抗IL-13抗体に結合した標識rhIL-13標準の量に逆比例する。同様に、検出可能物質で標識されたrhIL-13標準及び非標識抗ヒトIL-13抗体を利用した競合免疫測定法によって、体液中のヒトIL-13を評価することもできる。

50

【0174】

本発明の抗体及び抗体部分は、好ましくは、インビトロと生体内の両方でヒトIL-13活性を中和可能である。したがって、本発明のかかる抗体及び抗体部分を使用して、例えば、hIL-13を含む細胞培養物において、本発明の抗体が交差反応するIL-13を有するヒト対象において又は他のほ乳動物対象において、hIL-13活性を阻害することができる。一実施形態においては、本発明は、hIL-13活性が阻害されるように、hIL-13を本発明の抗体又は抗体部分と接触させることを含む、hIL-13活性を阻害する方法を提供する。例えば、hIL-13を含む又は含む疑いがある、細胞培養物において、本発明の抗体又は抗体部分を培地に添加して、培養物中のhIL-13活性を阻害することができる。

10

【0175】

別の一実施形態においては、本発明は、対象における、有利にはIL-13活性が有害である疾患又は障害に罹患した対象から、hIL-13活性を低下させる方法を提供する。本発明は、対象におけるIL-13活性が低下するように本発明の抗体又は抗体部分を対象に投与することを含む、かかる疾患又は障害に罹患した対象におけるIL-13活性を低下させる方法を提供する。好ましくは、IL-13はヒトIL-13であり、対象はヒト対象である。或いは、対象は、本発明の抗体が結合可能であるIL-13を発現するほ乳動物であり得る。さらに、対象は、(例えば、IL-13の投与又はIL-13導入遺伝子の発現によって)IL-13が導入されたほ乳動物であり得る。本発明の抗体は、ヒト対象に治療目的で投与することができる。さらに、本発明の抗体は、抗体が結合可能であるIL-13を発現する非ヒトほ乳動物に、獣医学目的で、又はヒト疾患の動物モデルとして、投与することができる。後者に関して、かかる動物モデルは、本発明の抗体の治療効果を評価するのに有用であり得る(例えば、投与量及び投与の時間的経過の試験)。

20

【0176】

本明細書では「IL-13活性が有害である障害」という用語は、障害に罹患した対象におけるIL-13の存在が、障害の病態生理の原因又は障害の悪化に寄与する要因であることが判明した又はその疑いがある、疾患及び他の障害を含むものとする。したがって、IL-13活性が有害である障害は、IL-13活性の低下によって障害の症候及び/又は進行が軽減されると予想される障害である。かかる障害は、例えば、障害に罹患した対象の体液のIL-13濃度の上昇(例えば、対象の血清、血しょう、滑液などのIL-13濃度の上昇)によって明らかになり得る。IL-13濃度の上昇は、例えば、上述した抗IL-13抗体を用いて検出することができる。本発明の抗体を用いて治療することができる障害の非限定的例としては、本発明の抗体の薬剤組成物に関して下記セクションで考察する障害が挙げられる。

30

【0177】

IL-13は、ぜん息に付随する病理学的反応を引き起こす枢要な役割を有するとされてきた。しかし、免疫学的経路の異なる他の媒介物質もぜん息の原因に関与し、IL-13に加えて、これらの媒介物質を遮断することは、更なる治療効果を与え得る。したがって、本発明の結合タンパク質をDVD-Igタンパク質に組み込むことができる。DVDは、IL-13と炎症誘発性サイトカイン(腫瘍壊死因子(TNF)など)を含めて、ただしこれだけに限定されない標的対に結合可能である。TNFは、ぜん息における炎症反応を増幅し得、疾患の重症度と関連づけることができる(McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250)。これは、IL-13とTNFの両方を遮断することが、特に重度の気道疾患において、有益な効果を有し得ることを示唆している。好ましい一実施形態においては、本発明のDVD-Igは、標的IL-13とTNFに結合し、ぜん息治療に使用される。

40

【0178】

50

別の一実施形態においては、本発明の結合タンパク質を使用して、IL - 13 及び IL - 1 ベータ、IL - 13 及び IL - 9 ; IL - 13 及び IL - 4 ; IL - 13 及び IL - 5 ; IL - 13 及び IL - 25 ; IL - 13 及び TARC ; IL - 13 及び MDC ; IL - 13 及び MIF ; IL - 13 及び TGF - ; IL - 13 及び LHR 作動物質 ; IL - 13 及び CL25 ; IL - 13 及び SPRR2a ; IL - 13 及び SPRR2b ; 並びに IL - 13 及び ADAM8 に結合する DVD - Ig 分子を生成させることができる。本発明は、IL - 13 と、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、FGF2、IFNA1、IFNB1、IFNG、ヒスタミン及びヒスタミン受容体、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、IL - 20、IL - 21、IL - 22、IL - 23、IL - 24、IL - 25、IL - 26、IL - 27、IL - 28、IL - 30、IL - 31、IL - 32、IL - 33、KITLG、PDGFB、IL2RA、IL4R、IL5RA、IL8RA、IL8RB、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL18R1、TSLP、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL22、CCL24、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、XCL1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CX3CR1、GPR2、XCR1、FOS、GATA3、JAK1、JAK3、STAT6、TBX21、TGFB1、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBR 及び キチナーゼ からなる群から選択される、ぜん息に關与する 1 種類以上の標的とに結合可能な DVD - Ig も提供する。

【0179】

D . 薬剤組成物

本発明は、本発明の抗体又はその抗原結合性部分と薬学的に許容される担体とを含む薬剤組成物も提供する。本発明の抗体を含む薬剤組成物は、これらだけに限定されないが、障害の診断、検出若しくは監視、障害若しくはその 1 つ以上の症候の予防、治療、管理若しくは改善及び / 又は研究に使用される。特定の一実施形態においては、これらの組成物は、本発明の 1 種類以上の抗体を含む。別の一実施形態においては、この薬剤組成物は、本発明の 1 種類以上の抗体と、IL - 13 活性が有害である障害を治療するための本発明の抗体以外の 1 種類以上の予防薬又は治療薬とを含む。好ましくは、障害又はその 1 つ以上の症候の予防、治療、管理又は改善に有用であることが知られている又は使用されてきた又は現在使用されている、予防薬又は治療薬。これらの実施形態によれば、組成物は、担体、希釈剤又は賦形剤を更に含み得る。

【0180】

本発明の抗体及び抗体部分は、対象への投与に適切な薬剤組成物に組み込むことができる。典型的には、薬剤組成物は、本発明の抗体又は抗体部分と薬学的に許容される担体とを含む。本明細書では「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合する、任意及びすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張化剤、吸収遅延剤などを含む。薬学的に許容される担体の例としては、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノールなどの 1 つ以上、及びこれらの組合せが挙げられる。組成物中に等張化剤（例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウム）を含むことが好ましい場合が多い。薬学的に許容される担体は、抗体又は抗体部分の品質保持期間又は有効性を向上させる、湿潤剤、乳化剤、防腐剤、緩衝剤などの補助物質の少量を更に含み得る。

【0181】

種々の送達系が公知であり、これらを使用して、障害又はその 1 つ以上の症候の予防、管理、治療又は改善に有用である、本発明の 1 種類以上の抗体、又は本発明の 1 種類以上の抗体と予防薬若しくは治療薬との組合せを投与することができる（例えば、リボソーム封入、微粒子、マイクロカプセル、抗体又は抗体断片を発現可能な組換え細胞、受容体に

よって媒介されるエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987) 参照）、レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築など）。本発明の予防薬又は治療薬を投与する方法としては、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）、硬膜外投与、腫よう内投与及び粘膜投与（例えば、鼻腔内及び経口経路）が挙げられるが、これらだけに限定されない。また、例えば、吸入器又はネブライザーの使用、及びエアロゾル化剤を用いた処方によって、肺投与することもできる。例えば、その各々を参照によりその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第6,019,968号、同5,985,320号、同5,985,309号、同5,934,272号、同5,874,064号、同5,855,913号、同5,290,540号及び同4,880,078号、並びに国際公開第92/19244号、同97/32572号、同97/44013号、同98/31346号及び同99/66903号参照されたい。一実施形態においては、本発明の抗体、併用療法、又は本発明の組成物を Alkermes AIR（登録商標）肺薬物送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.）によって投与する。特定の一実施形態においては、本発明の予防薬又は治療薬を筋肉内、静脈内、腫よう内、経口的、鼻腔内、肺又は皮下投与する。予防薬又は治療薬は、任意の好都合な経路によって、例えば、注入又は大量瞬時投与によって、上皮又は粘膜皮膚内膜（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜、腸管粘膜など）を介した吸収によって、投与することができ、他の生物活性薬剤と一緒に投与することができる。投与は、全身的でも局所的でもよい。

10

20

【0182】

特定の一実施形態においては、本発明の予防薬又は治療薬を治療を必要とする部分に局所的に投与することが望ましい場合がある。投与は、これらだけに限定されないが、例えば、局所注入、注射又は移植片によって実施することができる。前記移植片は、sialastic膜、ポリマー、繊維マトリックス（例えば、Tissue1（登録商標））、コラーゲンマトリックスなどの膜及びマトリックスを含めた、多孔質又は非多孔質材料である。一実施形態においては、本発明の1種類以上の抗体の有効量拮抗物質を対象の患部に局所的に投与して、障害又はその症候を予防、治療、管理及び/又は改善する。別の一実施形態においては、本発明の1種類以上の抗体の有効量を、本発明の抗体以外の1種類以上の療法（例えば、1種類以上の予防薬又は治療薬）の有効量と組み合わせ、対象の患部に局所的に投与して、障害又はその1つ以上の症候を予防、治療、管理及び/又は改善する。

30

【0183】

別の一実施形態においては、本発明の予防薬又は治療薬を制御放出系又は徐放系で送達することができる。一実施形態においては、ポンプを使用して、制御放出又は徐放性を実現することができる（Langer、上掲；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Sauddek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574）。別の一実施形態においては、ポリマー材料を使用して、本発明の療法の制御放出又は徐放性を実現することができる（例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61参照。Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105）、米国特許第5,67

40

50

9, 377号、同5, 916, 597号、同5, 912, 015号、同5, 989, 463号、同5, 128, 326号、国際公開第99/15154号及び同99/20253号も参照されたい。徐放性製剤に用いられるポリマーの例としては、ポリメタクリル酸2-ヒドロキシエチル、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリル酸、ポリ(エチレン-co-酢酸ビニル)、ポリメタクリル酸、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸(PLA)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)及びポリオルトエステルが挙げられるが、これらだけに限定されない。好ましい一実施形態においては、徐放性製剤に用いられるポリマーは、不活性であり、ろ過可能な不純物を含まず、貯蔵時に安定であり、無菌であり、生分解性である。更に別の一実施形態においては、制御放出系又は徐放系は、予防又は治療標的の近くに配置することができ、したがって全身的投与量の一部のみを必要とする(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, (上掲) vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照)。

【0184】

制御放出系は、Langerによる総説で考察されている(1990, Science 249: 1527-1533)。当業者に公知の任意の技術を使用して、本発明の1種類以上の治療薬を含む徐放性製剤を製造することができる。例えば、その各々を参照によりその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第4, 526, 938号、国際公開第91/05548号、国際公開第96/20698号、Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39: 179-189、Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397、Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854、及びLam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760を参照されたい。

【0185】

特定の一実施形態においては、本発明の組成物が予防薬又は治療薬をコードする核酸である場合、核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、核酸が細胞内になるように核酸を投与することによって(例えば、レトロウイルスベクターの使用によって(米国特許第4, 980, 286号参照)、又は直接注射によって、又は微粒子銃(例えば、遺伝子銃、Biolistic、Dupont)の使用によって、又は脂質、細胞表面受容体若しくは移入剤を含むコーティング、又は核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドに結合した核酸を投与することによって(例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868参照))、核酸を生体内投与して、そのコードされた予防薬又は治療薬の発現を促進することができる。或いは、核酸を細胞内に導入することができ、相同組換えによる発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

【0186】

本発明の薬剤組成物は、その意図された投与経路に適合するように処方される。投与経

10

20

30

40

50

路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、鼻腔内（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜及び直腸投与が挙げられるが、これらだけに限定されない。特定の一実施形態においては、この組成物を、ヒトへの静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻腔内又は局所投与に適した薬剤組成物として、定常的手順に従って処方する。典型的には、静脈内投与用組成物は、無菌等張性緩衝水溶液である。必要に応じて、この組成物は、可溶化剤、及び注射部位のとう痛を緩和するリグノカイン（*lignocaine*）などの局所麻酔薬を含むこともできる。

【0187】

本発明の組成物を局所投与する場合、組成物を軟膏剤、クリーム剤、皮膚貼付剤、ローション剤、ゲル剤、シャンプー剤、噴霧剤、エアロゾル剤、溶液剤、乳濁液剤、又は当業者に周知の他の剤形で処方することができる。例えば、*Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)を参照されたい。噴霧不可能な局所剤形の場合、局所適用に適合した担体又は1種類以上の賦形剤であって、好ましくは水よりも高い動粘性係数を有する担体又は1種類以上の賦形剤を含む、粘ちゅう性から半固体又は固体の剤形が典型的に使用される。適切な剤形としては、溶液剤、懸濁液剤、乳濁液剤、クリーム剤、軟膏剤（*ointment*）、散剤、リニメント剤、軟膏剤（*salve*）などが挙げられるが、これらだけに限定されない。これらは、必要に応じて、滅菌され、又は例えば浸透圧などの諸性質に影響を及ぼす助剤（例えば、防腐剤、安定剤、湿潤剤、緩衝剤又は塩）と混合される。他の適切な局所剤形としては、活性成分が、好ましくは固体又は液体不活性担体と組み合わせて、加圧された揮発性物質（例えば、フレオンなどのガス状噴霧剤）との混合物中に、又は中身を絞り出すことができる容器に、充填された、噴霧可能なエアロゾル製剤が挙げられる。必要に応じて、保湿剤又は湿潤剤を薬剤組成物及び剤形に添加することもできる。かかる追加の成分の例は当分野で周知である。

【0188】

本発明の方法が組成物の鼻腔内投与を含む場合、組成物をエアロゾル剤、噴霧剤、ミスト剤又はドロップ剤として処方することができる。特に、本発明に従って使用される予防薬又は治療薬は、適切な噴霧剤（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、二酸化炭素又は他の適切なガス）を使用して、加圧容器又はネブライザーからエアロゾル噴霧の形で好都合には送達することができる。加圧エアロゾルの場合には、単位用量は、計量された量を送達する弁を備えることによって、決定することができる。化合物とラクトース、デンプンなどの適切な粉末基剤との混合粉末を含む、吸入器又は散布器用の（例えばゼラチンで構成された）カプセル剤及びカートリッジ剤を処方することができる。

【0189】

[0257] 本発明の方法が経口投与を含む場合、組成物を錠剤、カプセル剤、カシェ剤、ジェルキャップ剤、溶液剤、懸濁液剤などの経口用に処方することができる。錠剤又はカプセル剤は、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロース又はリン酸水素カルシウム）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク又はシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプン又はデンプングリコール酸ナトリウム）又は湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの薬学的に許容される賦形剤を用いて、従来手段によって調製することができる。錠剤は、当分野で周知の方法によって被覆することができる。経口投与用液体調製物は、溶液剤、シロップ剤、懸濁液剤など、ただしこれらだけに限定されない剤形をとり得、又は使用前に水若しくは他の適切なビヒクルで構成するための乾燥製品として提供することができる。かかる液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体又は水素化食用脂）、乳化剤（例えば、レシチン又はアラビアゴム）、非水系ビヒクル（例えば、アーモンド油、

油状エステル、エチルアルコール、又は分留された植物油)、防腐剤(例えば、メチル若しくはプロピル - p - ヒドロキシ安息香酸又はソルビン酸)などの薬学的に許容される添加剤を用いて、従来の手段によって調製することができる。調製物は、緩衝剤塩、香味剤、着色剤及び甘味剤を適宜含むこともできる。経口投与用調製物は、予防薬又は治療薬の緩効性放出、制御放出又は徐放用に適切に処方することができる。

【0190】

[0258] 本発明の方法は、エアロゾル化剤を用いて処方された組成物の、例えば吸入器又はネブライザーを用いた、肺投与を含み得る。例えば、その各々を参照によりその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第6,019,968号、同5,985,320号、同5,985,309号、同5,934,272号、同5,874,064号、同5,855,913号、同5,290,540号及び同4,880,078号、並びに国際公開第92/19244号、同97/32572号、同97/44013号、同98/31346号及び同99/66903号を参照されたい。特定の一実施形態においては、本発明の抗体、併用療法、及び/又は本発明の組成物を Alkermes AIR (登録商標) 肺薬物送達技術 (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.) によって投与する。

10

【0191】

本発明の方法は、非経口投与用に処方された組成物の注射(例えば、大量瞬時投与又は連続注入)による投与を含み得る。注射用製剤は、添加された防腐剤と一緒に、単位剤形(例えば、アンプル又は複数回投与容器)中に存在し得る。組成物は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液剤、溶液剤又は乳濁液剤のような剤形をとり得、懸濁剤、安定化剤及び/又は分散剤などの調合 (formulatory) 剤を含み得る。或いは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル(例えば、発熱物質を含まない滅菌水)で構成するための粉末の形であり得る。

20

【0192】

[0260] 本発明の方法は、デポ製剤として処方された組成物の投与を更に含み得る。かかる長時間作用性製剤は、移植(例えば、皮下又は筋肉内)又は筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、組成物は、適切な高分子若しくは疎水性材料(例えば、許容される油中の乳濁液として)又はイオン交換樹脂を用いて、又はやや難溶性の誘導体(例えば、やや難溶性の塩)として、処方することができる。

30

【0193】

本発明の方法は、中性又は塩の形として処方された組成物の投与を包含する。薬学的に許容される塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導される陰イオンなどの陰イオンと一緒に形成された塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化鉄 (III)、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2 - エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導される陽イオンなどの陽イオンと一緒に形成された塩などが挙げられる。

【0194】

[0262] 一般に、組成物の成分は、例えば、活性薬量を示すアンプル、サシェなどの密閉容器中の凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別々に、又は単位剤形と一緒に混合して、供給される。投与方法が注入である場合、組成物は、無菌医薬品等級の水又は食塩水を含む注入瓶を用いて調製することができる。投与方法が注射による場合、投与前に成分を混合できるように、無菌注射用水又は食塩水のアンプルを提供することができる。

40

【0195】

特に、本発明は、本発明の予防薬、治療薬又は薬剤組成物の1種類以上が、薬量を示すアンプル、サシェなどの密閉容器に充填されることも提供する。一実施形態においては、本発明の予防薬、治療薬又は薬剤組成物の1種類以上は、密閉容器中の無菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、対象への投与に適切な濃度に(例えば、水又は食塩水を用いて)戻すことができる。好ましくは、本発明の予防薬、治療薬又は薬剤組成物の1

50

種類以上は、密閉容器中の無菌凍結乾燥粉末として、少なくとも5mg、より好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、少なくとも75mg、又は少なくとも100mgの単位投与量で供給される。本発明の凍結乾燥予防薬、治療薬又は薬剤組成物は、その最初の容器中で2 から8 で貯蔵すべきである。本発明の予防薬、治療薬又は薬剤組成物は、戻した後、1週間以内、好ましくは5日以内、72時間以内、48時間以内、24時間以内、12時間以内、6時間以内、5時間以内、3時間以内又は1時間以内に投与すべきである。別の一実施形態においては、本発明の予防薬、治療薬又は薬剤組成物の1種類以上は、薬剤の量及び濃度を示す密閉容器中の液剤として供給される。好ましくは、投与される組成物の液剤は、密閉容器中で少なくとも0.25mg/ml、より好ましくは少なくとも0.5mg/ml、少なくとも1mg/ml、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも75mg/ml又は少なくとも100mg/mlで供給される。液剤は、その最初の容器中で2 から8 で貯蔵すべきである。

10

20

30

40

【0196】

本発明の抗体及び抗体部分は、非経口投与に適切な薬剤組成物に組み入れることができる。好ましくは、抗体又は抗体部分は、0.1 - 250mg/ml抗体を含む注射液として調製される。注射液は、フリント又はこはく色のバイアル、アンプル又は前もって充填されたシリンジ中の液体又は凍結乾燥剤形で構成され得る。緩衝剤は、pH5.0から7.0（最適にはpH6.0）のL-ヒスチジン（1 - 50mM）、最適には5 - 10mMであり得る。他の適切な緩衝剤としては、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウムが挙げられるが、これらだけに限定されない。塩化ナトリウムを0 - 300mM（液体剤形の場合、最適には150mM）の濃度で使用して、溶液の毒性を変化させることができる。凍結保護物質、主に0 - 10%スクロース（最適には0.5 - 1.0%）を凍結乾燥剤形のために含めることができる。他の適切な凍結保護物質としては、トレハロース及びラクトースが挙げられる。充填剤、主に1 - 10%マンニトール（最適には2 - 4%）を凍結乾燥剤形のために含めることができる。安定剤、主に1 - 50mM L-メチオニン（最適には5 - 10mM）を液剤と凍結乾燥剤形の両方に使用することができる。他の適切な充填剤としてはグリシン、アルギニンが挙げられ、0 - 0.05%ポリソルベート-80（最適には0.005 - 0.01%）として含めることができる。別の界面活性剤としては、ポリソルベート20、BRIJ界面活性剤などが挙げられるが、これらだけに限定されない。非経口投与用注射液として調製される本発明の抗体及び抗体部分を含む薬剤組成物は、治療用タンパク質（例えば、抗体）の吸収又は分散を増大させるのに使用される薬剤など、アジュバントとして有用である薬剤を更に含み得る。特に有用であるアジュバントは、Hylenex（登録商標）（組換えヒトヒアルロニダーゼ）などのヒアルロニダーゼである。注射液にヒアルロニダーゼを添加すると、非経口投与、特に皮下投与後のヒト生物学的利用能が向上する。ヒアルロニダーゼは、少ない痛み及び不快感で、かつ最小限の注射部位反応発生率で、より大きい（すなわち、1mlを超える）注射部位体積も可能にする（参照により本明細書に組み入れる、国際公開第2004078140号、米国特許出願公開第2006104968号参照）。

【0197】

本発明の組成物は、種々の剤形であり得る。剤形としては、例えば、溶液剤（例えば、注射液及び注入液）、分散液剤又は懸濁液剤、錠剤、丸剤、散剤、リボソーム剤、坐剤などの液体、半固体及び固体剤形が挙げられる。好ましい剤形は、意図する投与方法及び治療用途に応じて決まる。典型的な好ましい組成物は、他の抗体と一緒にヒトの受動免疫に使用される組成物に類似した組成物など、注射液又は注入液の剤形である。好ましい投与方法は非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい一実施形態においては、抗体を静脈内注入又は注射によって投与する。別的好ましい一実施形態におい

50

ては、抗体を筋肉内又は皮下注射によって投与する。治療用組成物は、典型的には、製造及び貯蔵条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散物、リポソーム、又は高薬物濃度に適切な他の秩序構造 (ordered structure) として処方することができる。無菌注射液は、必要量の活性化化合物 (すなわち、抗体又は抗体部分) を適切な溶媒中で上記成分の 1 種類又は組合せと混合し、必要に応じて、続いて過滅菌して調製することができる。一般に、分散物は、基本分散媒と上記成分から選択される他の必要成分とを含む無菌ビヒクル中に活性化化合物を混合することによって調製される。無菌注射液を調製するための無菌凍結乾燥粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分と任意の所望の追加成分との粉末を、あらかじめ無菌ろ過したその溶液から生成する、真空乾燥及び噴霧乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合には必要な粒径を維持することによって、また、界面活性剤を使用することによって、維持することができる。注射用組成物の吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物に含めることによって延長することができる。

10

20

30

40

50

【0198】

本発明の抗体及び抗体部分は、当分野で公知である種々の方法によって投与することができるが、多くの治療用途では、好ましい経路/投与方法は皮下注射、静脈内注射又は注入である。当業者には明らかなように、投与の経路及び/又は方法は所望の結果に応じて変わる。ある実施形態においては、活性化化合物は、移植片、皮膚貼付剤及びマイクロカプセル送達系を含めて、制御放出製剤などの急速放出に対して化合物を保護する担体と一緒に調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤を調製する多数の方法が特許化され、又は当業者に一般に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0199】

ある実施形態においては、本発明の抗体又は抗体部分を、例えば、不活性希釈剤、又は同化可能な食用担体と一緒に、経口投与することができる。化合物 (及び必要に応じて他の成分) は、硬又は軟ゼラチンカプセルに封入することもでき、圧縮して錠剤とすることもでき、又は対象の食事に直接混合することもできる。経口治療投与の場合、化合物は、賦形剤と一緒に混合することができ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤、ウェーハ剤などの剤形で使用することができる。本発明の化合物を非経口投与以外で投与するために、その不活性化を防止する材料で化合物を被覆することが必要な場合もあり、又はその不活性化を防止する材料と化合物を同時投与することが必要な場合もある。

【0200】

補充の活性化化合物を組成物に混合することもできる。ある実施形態においては、本発明の抗体又は抗体部分を、IL-13 活性が有害である障害の治療に有用である 1 種類以上の追加の治療薬と同時処方及び/又は同時投与する。例えば、本発明の抗 hIL-13 抗体又は抗体部分を、他の標的に結合する 1 種類以上の追加の抗体 (例えば、他のサイトカインに結合する抗体、又は細胞表面分子に結合する抗体) と同時処方及び/又は同時投与することができる。また、本発明の 1 種類以上の抗体を上記治療薬の 2 種類以上と併用することもできる。かかる併用療法は、投与治療薬のより少ない投与量を有利に利用することができ、したがって種々の単独療法に付随して起こり得る毒性又は合併症を回避することができる。

【0201】

ある実施形態においては、IL-13 又はその断片に対する抗体は、当分野で公知の半減期延長ビヒクルと結合している。かかるビヒクルとしては、Fcドメイン、ポリエチレ

ングリコール及びデキストランが挙げられるが、これらだけに限定されない。かかるビヒクルは、例えば、参照により本明細書に組み入れる、米国特許出願第09/428,082号及び国際公開第99/25044号に記載されている。

【0202】

特定の一実施形態においては、本発明の抗体又は発明の別の予防薬若しくは治療薬をコードするヌクレオチド配列を含む核酸配列を投与して、遺伝子療法として、障害又はその1つ以上の症候を治療、予防、管理又は改善する。遺伝子療法とは、発現される、又は発現可能な核酸を対象に投与することによって実施される療法を指す。本発明のこの実施形態においては、核酸は、核酸がコードする、予防又は治療効果を媒介する本発明の抗体、予防薬又は治療薬を生成する。

10

【0203】

当分野で利用可能な遺伝子療法のいずれでも、本発明に従って使用することができる。遺伝子療法の一般的総説については、Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932 (1993)、及びMorgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215を参照されたい。使用することができる組換えDNA技術の当分野で一般に公知の方法は、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)、及びKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。種々の遺伝子療法の詳細な説明は、参照により本明細書に組み入れる米国特許出願公開第20050042664号A1に開示されている。

20

【0204】

別の一態様においては、本願は、対象におけるIL-13関連障害を治療（例えば、治療、抑制、改善、発症の遅延若しくは防止、又は回帰若しくは再発の防止）又は予防する方法を特徴とする。この方法は、IL-13関連障害の治療又は予防に十分な量のIL-13結合剤（特に、拮抗物質）、例えば、本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片を対象に投与することを含む。IL-13拮抗物質、例えば、抗IL-13抗体又はその断片は、単独で、又は本明細書に記載の他の治療様式と組み合わせて、対象に投与することができる。

30

【0205】

一実施形態においては、対象は、1種類以上のIL-13関連障害（本明細書に記載の、例えば、呼吸器障害（例えば、ぜん息（例えば、アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気道炎症を伴う他の症状、好酸球増加症、線維症及び過剰粘液産生；アトピー性障害（例えば、アトピー性皮膚炎及びアレルギー性鼻炎）；皮膚、胃腸器官（例えば、潰瘍性大腸炎及び／又はクローン病などの炎症性腸疾患（IBD））及び肝臓（例えば、硬変、線維症）の炎症性及び／又は自己免疫性症状；強皮症；腫瘍又は癌、例えば、ホジキンリンパ腫）に罹患したほ乳動物、例えばヒトである。したがって、開示は、本明細書に記載の治療のためのIL-13結合剤（本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片など）の使用、及び本明細書に記載の治療用医薬品を調製するためのIL-13結合剤（本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片など）の使用を含む。

40

【0206】

IL-13関連障害の例としては、本明細書に記載の、呼吸器障害、例えば、ぜん息（例えば、アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息（例えば低年齢小児における、例えば呼

50

吸器合胞体ウイルス（RSV）による、感染に起因するぜん息など）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気道炎症を伴う他の症状、好酸球増加症、線維症及び過剰粘液産生、例えば、嚢胞性線維症及び肺線維症；例えばIL-13に対する感受性の増加に起因する、アトピー性障害（例えば、アトピー性皮膚炎、じんま疹、湿疹、アレルギー性鼻炎及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、潰瘍性大腸炎及び／又はクローン病などの炎症性腸疾患（IBD））、肝臓（例えば、硬変、肝細胞癌）の炎症性及び／又は自己免疫性症状、及び強皮症；白血病、グリア芽細胞腫、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫）などの腫瘍又は癌（例えば、軟部組織又は固形腫瘍）；（例えば、HTLV-1による）ウイルス感染；他の器官の線維症、例えば、肝臓の線維症（例えば、B及び／又はC型肝炎ウイルスによって引き起こされる線維症）並びに（例えば、ワクチン接種中の）1型防御免疫応答の発現抑制のうちの1つ以上から選択される障害が挙げられるが、これらだけに限定されない。

10

【0207】

別の実施形態においては、本願は、呼吸器障害に関連する1つ以上の症候、例えば、ぜん息（例えば、アレルギー性及び非アレルギー性ぜん息）；アレルギー；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気道炎症を伴う症状、好酸球増加症、線維症及び過剰粘液産生、例えば、嚢胞性線維症及び肺線維症を治療（例えば、低減、改善）又は予防する方法を提供する。例えば、ぜん息の症候としては、喘鳴音、呼吸促迫、気管支収縮、気道過敏、肺気量の減少、線維症、気道炎症、及び粘液産生が挙げられるが、これらだけに限定されない。この方法は、1つ以上の症候の治療（例えば、低減、改善）又は予防に十分な量のIL-13拮抗物質、例えば、IL-13抗体又はその断片を対象に投与することを含む。IL-13抗体は、治療的に、若しくは予防的に、又は治療と予防の両方で投与することができる。IL-13拮抗物質、例えば、抗IL-13抗体又はその断片は、単独で、又は本明細書に記載の他の治療様式と組み合わせて、対象に投与することができる。好ましくは、対象は、本明細書に記載のIL-13関連障害に罹患したほ乳動物、例えばヒトである。

20

【0208】

別の一態様においては、本願は、試料（例えば、血清、血しょう、組織、生検などの生物試料）中のIL-13の存在をインビトロで検出する方法を提供する。この方法は、障害、例えば、免疫細胞関連障害の診断に使用することができる。この方法は、（i）試料又は対照試料を本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片と接触させること、及び（ii）抗IL-13抗体又はその断片と試料又は対照試料との複合体の形成を検出することを含み、対照試料と比較して、試料中の複合体形成の統計的に有意な変化によって、試料中のIL-13の存在が示される。

30

【0209】

更に別の一態様においては、本願は、IL-13の存在を生体内で検出する方法（例えば、対象における生体内イメージング）を提供する。この方法は、障害、例えば、IL-13関連障害の診断に使用することができる。この方法は、（i）本明細書に記載の抗IL-13抗体又はその断片を、抗体又は断片とIL-13の結合を可能にする条件下で、対象又は対照対象に投与すること、及び（ii）抗体又は断片とIL-13の複合体の形成を検出することを含み、対照対象と比較して、対象における複合体形成の統計的に有意な変化によって、IL-13の存在が示される。

40

【0210】

本発明の抗体又はその抗原結合性部分は、かかる疾患の治療に単独で、又は組み合わせて使用することができる。本発明の抗体又はその抗原結合性部分は、単独で、又は追加の薬剤（例えば、治療薬）と組み合わせて、使用できることを理解すべきである。追加の薬剤は、その意図する目的に合わせて、当業者によって選択される。例えば、追加の薬剤は、本発明の抗体によって治療される疾患又は症状の治療に有用であると当分野で認識されている治療薬であり得る。追加の薬剤は、治療用組成物に有益な特質を付与する薬剤、例えば、組成物に粘性をもたらす薬剤でもあり得る。

【0211】

50

さらに、本発明に包含される組合せは、その意図する目的に有用である組合せであることを理解すべきである。以下の薬剤は、説明のためのものであって、限定的なものではない。本発明の一部である組合せは、本発明の抗体と、下表から選択される少なくとも1種類の追加の薬剤であり得る。組合せは、形成される組成物がその意図した機能を果たすことができるような組合せである場合、1種類を超える追加の薬剤、例えば、2又は3種類の追加の薬剤も含み得る。

【0212】

併用療法は、本明細書に更に記載するように、1種類以上の追加の治療薬、例えば、1種類以上のサイトカイン及び成長因子阻害剤、免疫抑制薬、抗炎症薬（例えば、全身的抗炎症薬）、抗線維薬、代謝阻害剤、酵素阻害剤、及び/又は細胞傷害剤若しくは細胞分裂阻害剤と同時処方及び/又は同時投与される、1種類以上のIL-13拮抗物質、例えば抗IL-13抗体又はその断片を含み得る。

10

【0213】

1種類以上のIL-13拮抗物質、例えば抗IL-13抗体又はその断片と同時投与及び/又は同時処方することができる好ましい追加の治療薬の例としては、吸入ステロイド；ベータ作動物質、例えば、短時間作用性又は長時間作用性ベータ作動物質；ロイコトリエン又はロイコトリエン受容体の拮抗物質；ADVAIRなどの複合薬；IgE阻害剤、例えば、抗IgE抗体（例えば、XOLAIR）；ホスホジエステラーゼ阻害薬（例えば、PDE4阻害剤）；キサンチン；抗コリン作用薬；クロモリンなどの肥満細胞安定剤；IL-4阻害剤；IL-5阻害剤；エオタキシン/CCR3阻害剤；ヒスタミン又はH1、H2、H3及びH4を含めたその受容体の拮抗物質、並びにプロスタグランジンD又はその受容体（DP1及びCRTH2）の拮抗物質、の1つ以上が挙げられるが、これらだけに限定されない。かかる組合せは、ぜん息及び他の呼吸器障害の治療に使用することができる。1種類以上の抗IL-13抗体又はその断片と同時投与及び/又は同時処方することができる治療薬の追加の例としては、とりわけ、TNF拮抗物質（例えば、TNF受容体（例えば、p55若しくはp75ヒトTNF受容体又はその誘導体）の可溶性断片、例えば、75kD TNFR-IgG（75kD TNF受容体-IgG融合タンパク質、ENBRELV））；TNF酵素拮抗物質、例えば、TNF変換酵素（TACE）阻害剤；ムスカリン受容体拮抗物質；TGFベータ拮抗物質；インターフェロンガンマ；ビルフェニドン；化学療法剤、例えば、メトトレキサート、レフルノミド若しくはシロリムス（ラパマイシン）又はその類似体、例えば、CCI-779；COX2及びcPLA2阻害剤；NSAID；免疫調節物質；p38阻害剤、TPL-2、MK-2及びNFkB阻害剤、の1つ以上が挙げられる。

20

30

【0214】

他の好ましい組合せは、サイトカイン抑制性抗炎症薬（CSAID）、他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-31、インターフェロン、EMAP-II、GM-CSF、FGF、EGF、PDGF及びエンドセリン（edothelin）-1）、並びにこれらのサイトカイン及び成長因子の受容体に対する抗体又は拮抗物質である。本発明の抗体又はその抗原結合性部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80（B7.1）、CD86（B7.2）、CD90、CTLA、又はCD154（gp39又はCD40L）を含めたこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。

40

【0215】

治療薬の好ましい組合せは、炎症カスケードの異なるポイントにおいて干渉し得る。好ましい例としては、キメラ、ヒト化又はヒトTNF抗体、D2E7（国際公開第97/29131号）、CA2（Remicade（商標））、CDP 571、及び可溶性p55又はp75 TNF受容体、その誘導体（p75 TNFR1gG（Enbrel（商標））又はp55 TNFR1gG（Lenercept））のようなTNF拮抗物質、並びに

50

TNF変換酵素(TACE)阻害剤が挙げられる。同様に、IL-1阻害剤(インターロイキン1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど)も同じ理由で有効であり得る。他の好ましい組合せとしては、インターロイキン4が挙げられる。更に別の好ましい組合せは、IL-13機能と並行して、IL-13機能に依存して、又はIL-13機能と協調して作用し得る、ぜん息反応の別の重要なプレーヤーである。IL-9抗体を含むIL-9拮抗物質は特に好ましい。IL-13とIL-9は、重複するが、別個の機能を有し、IL-13とIL-9の両方に対する拮抗物質の組合せが最も有効であり得ることが判明した。更に別の好ましい組合せは、抗IL-5抗体である。更に別の好ましい組合せとしては、MCP-1、MCP-4、エオタキシン、RANTES、MDC、CCL-12及びCCL-17(TARC)を含めたケモカインの拮抗物質、並びにCCR2、CCR3、CCR4及びCXCR4を含めたケモカイン受容体の拮抗物質が挙げられる。更に別の組合せとしては、ほ乳類酸性キチナーゼ、CRHT2、キマーゼ、S1P1、S1P2、Tyk2、ROCKII、Stat6、p38、NFkB、ホスホジエステラーゼ4(PDE-4)、肥満細胞トリプターゼ(tryptase)、NO、アデノシン、IKK2、GATA3、ICAM-1、VCAM-1及びICOSを含めたぜん息媒介物質に対する拮抗物質が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0216】

本発明の薬剤組成物は、本発明の抗体又は抗体部分の「治療有効量」又は「予防有効量」を含み得る。「治療有効量」とは、必要な投与量及び期間で、所望の治療成果を得るのに有効な量を指す。抗体又は抗体部分の治療有効量は、当業者が決定することができ、個体の病態、年齢、性別及び体重、抗体又は抗体部分が個体において所望の応答を誘発する能力などの要因に応じて変わり得る。治療有効量は、抗体又は抗体部分の任意の毒性効果又は有害効果よりも治療上有益な効果がまさる量でもある。「予防有効量」とは、必要な投与量及び期間で、所望の予防成果を得るのに有効な量を指す。典型的には、予防投与量は疾患前又は初期に対象に使用されるので、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

【0217】

投与計画は、所望の最適応答(例えば、治療反応又は予防反応)が得られるように調節することができる。例えば、単一ボラスを投与することができ、幾つかの分割用量をある期間にわたって投与することができ、又は投与量を治療状況の緊急性に比例して増減することができる。投与を容易にし、投与量を均一にするために、非経口組成物を単位用量形態で処方することが特に有利である。本明細書では単位用量形態とは、治療すべきほ乳動物対象に対する単位投与量として適切な物理的に分離した単位を指す。各単位は、必要な薬剤担体と共に、所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化化合物を含む。本発明の単位用量形態の仕様は、(a)活性化化合物特有の特性、及び達成すべき特定の治療又は予防効果と、(b)個体における感受性の処置のためにかかる活性化化合物を配合する技術に固有の制約とに従い、かつ直接左右される。

【0218】

本発明の抗体又は抗体部分の治療又は予防有効量の例示的な非限定的範囲は、0.1-20mg/kg、より好ましくは1-10mg/kgである。投与量は、軽減すべき症状のタイプ及び重症度とともに変わり得ることに留意されたい。さらに、任意特定の対象に対して、具体的投与計画は、個々の必要性、及び組成物の投与者又は投与管理者の専門的判断に従って、経時的に調節すべきであり、本明細書に記載する投与量範囲は単なる例示にすぎず、特許請求の範囲に記載の組成物の範囲又は実施を限定するものではないことを理解されたい。

【0219】

本明細書に記載する本発明の方法の他の適切な改変及び手直しは、自明であり、本発明の範囲、又は本明細書に開示する実施形態から逸脱することなく、適切な均等物を用いて実施できることは、当業者に容易に理解できるはずである。本発明を詳細に記述したが、本発明は、以下の実施例を参照することによってより明確に理解されるはずである。以下の実施例は、単なる説明のためのものにすぎず、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0220】

(実施例1)

抗ヒトIL-13モノクローナル抗体の生成及び単離

(実施例1.1)

抗ヒトIL-13抗体を特定するアッセイ

別段の記載がない限り、実施例1を通して、以下のアッセイによって、抗ヒトIL-13抗体を特定し、特徴づけた。

【0221】

(実施例1.1.A)

ELISA

ヒトIL-13に結合する抗体をスクリーニングする酵素結合免疫吸着検定法を以下のように実施した。

【0222】

ELISAプレート(Corning Costar、Acton、MA)を、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の5 µg/mlヤギ抗マウスIgG Fc特異的(Pierce # 31170、Rockford、IL)50 µL/ウェルで終夜4で被覆した。0.05% Tween-20を含むPBSでプレートを1回洗浄した。PBSで2%に希釈されたブロッキング溶液(BioRad # 170-6404、Hercules、CA)200 µL/ウェルを室温で1時間添加して、プレートをブロックした。ブロッキング後、0.05% Tween-20を含むPBSでプレートを1回洗浄した。

【0223】

0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで希釈されたマウス血清又はハイブリドーマ上清(Sigma、St. Louis、MO)50マイクロリットル/ウェルを、上述したように調製したELISAプレートに添加し、室温で1時間温置した。0.05% Tween-20を含むPBSでウェルを3回洗浄した。0.1% BSAを含むPBSで100 ng/mlに希釈されたビオチン化組換え精製ヒトIL-13変種(R110Q)50マイクロリットルを各ウェルに添加し、室温で1時間温置した。0.05% Tween-20を含むPBSでプレートを3回洗浄した。ストレプトアビジンHRP(Pierce # 21126、Rockland、IL)を0.1% BSAを含むPBSで1:20000希釈した。50 µL/ウェルを添加し、プレートを室温で1時間温置した。0.05% Tween-20を含むPBSでプレートを3回洗浄した。TMB溶液(Sigma # T0440、St. Louis、MO)50マイクロリットルを各ウェルに添加し、室温で10分間温置した。1N硫酸を添加して反応を停止した。プレートを波長450 nmで分光光度的に読み取った。

【0224】

(実施例1.1.B)

BIACORE技術による親和性測定

BIACOREアッセイ(Biacore, Inc、Piscataway、NJ)は、オン、オフ速度定数の動力学的測定によって抗体の親和性を測定する。抗体と組換え精製ヒトIL-13又は組換え精製ヒトIL-13変種(R110Q)との結合を、ランニングHBS-EP(10 mM HEPES [pH 7.4]、150 mM NaCl、3 mM EDTA及び0.005%界面活性剤P20)を用いたBiacore(登録商標)3000装置(Biacore(登録商標)AB、Uppsala、Sweden)を用いて、表面プラズモン共鳴測定によって25で求めた。すべての化学物質をBiacore(登録商標)AB(Uppsala、Sweden)又は本明細書に記載の別の供給源から得た。10 mM酢酸ナトリウム(pH 4.5)で希釈されたヤギ抗マウスIgG(Fc)断片特異的ポリクローナル抗体(Pierce Biotechnology Inc、Rockford、IL)約5000 RUを、標準アミンカップリングキットを製造者の指示及び手順に従って用いて、25 µg/mlでCM5研究等級バイオセンサ

10

20

30

40

50

ーチップ全体に直接固定した。バイオセンサー表面の未反応部分をエタノールアミンでブロックした。フローセル2及び4における改変カルボキシメチルデキストラン表面を反応表面として用いた。フローセル1及び3におけるヤギ抗マウスIgGを含まない非改変カルボキシメチルデキストランを基準表面として用いた。動力学的分析のために、1:1ラングミュア結合モデルから誘導された速度式を、Biaevaluation 4.0.1ソフトウェアを用いて(全体的一致(global fit)分析によって)全8回の注射の会合及び解離段階に同時にあてはめた。ヤギ抗マウスIgG特異的の反応表面全体で捕捉するために、精製抗体をHEPES緩衝食塩水で希釈した。リガンドとして捕捉するマウス抗体(25 µg/ml)を反応基質の上に流量5 µl/minで注入した。会合及び解離速度定数 K_{on} (単位 $M^{-1} s^{-1}$)及び K_{off} (単位 s^{-1})を連続流量25 µl/minで求めた。速度定数は、10-200 nMの範囲の10個の異なる抗原濃度で動力学的結合測定によって導出された。次いで、マウス抗体と組換え精製ヒトIL-13又は組換え精製ヒトIL-13との反応の平衡解離定数(単位M)を、動力学的速度定数から式 $K_D = K_{off} / k_{on}$ によって計算した。結合を時間の関数として記録し、動力学的速度定数を計算する。このアッセイでは、 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ と高いオン速度及び $10^{-6} s^{-1}$ と低いオン速度を測定することができる。

10

【0225】

(実施例1.1.C)

抗ヒトIL-13抗体の機能活性

本発明の抗ヒトIL-13抗体の機能活性を調べるために、抗体のIL-13活性阻害能力を測定する以下のアッセイに抗体を使用した。

20

【0226】

(実施例1.1.C1)

A-549バイオアッセイ

A-549細胞によるTARC(CCL-17)のヒトIL-13誘導性産生を抑制する抗ヒトIL-13抗体の能力を以下のように分析した。1日目にA-549細胞を96ウェルプレート(2E5細胞/ウェル)の(10%FBSを含む)RPMI増殖培地に蒔いた。2日目に、400 ng/ml rhTNF(100 µl/ウェル)を含む新しいRPMI増殖培地で培地を置換した。一方、種々の濃度の免疫マウス血清、ネズミハイブリドーマ上清又は精製抗ヒトIL-13抗体を、10 ng/ml組換え精製ヒトIL-13又はIL-13変種と一緒に、マイクロタイタープレート(U底、96ウェル、Costar)中のRPMI完全培地100 µL中で37 °Cで1時間前温置した。次いで、抗体と組換え精製ヒトIL-13の混合物を、TNFで処理したA-549細胞に添加し(100 µl/ウェル)、最終体積を200 µl/ウェルとし(最終IL-13及びTNF濃度は、それぞれ5 ng/ml及び200 ng/mlであった。)、37 °Cで18時間温置した。温置後、無細胞上清150 µLを各ウェルから抜き取り、産生されたヒトTARCのレベルをヒトTARCELISA(R&D Systems Cat#DDN00)によって測定した。

30

【0227】

A-549細胞は、カニクイザル、マウス、ラット及びヒツジを含めた他の種のIL-13にも、ヒトIL-13のED₅₀値と類似したED₅₀値で応答する。したがって、A-549細胞を、同じ実験手順によって、他の種のIL-13に対する抗hIL-13 mAbの交差反応性分析に使用した。

40

【0228】

(実施例1.2)

抗ヒトIL-13モノクローナル抗体の生成

抗ヒトIL-13マウスモノクローナル抗体を以下のように得た。

【0229】

(実施例1.2.A)

ヒトIL-13抗原によるマウスの免疫化

50

1 日目に、完全フロイントアジュバント又は Immuno easy アジュバント (Q i a g e n 、 V a l e n c i a 、 C A) と混合された組換え精製ヒト I L - 1 3 変種 (P e p r o t e c h) 2 0 マイクログラムを 5 匹の 6 - 8 週齢 B a l b / C 、 5 匹の C 5 7 B / 6 マウス、及び 5 匹の A J マウスに皮下注射した。2 4、3 8 及び 4 9 日目に、不完全フロイントアジュバント又は Immuno easy アジュバントと混合された組換え精製ヒト I L - 1 3 変種 2 0 マイクログラムを同じマウスに皮下注射した。8 4、1 1 2 又は 1 4 4 日目に、マウスに組換え精製ヒト I L - 1 3 変種 1 μ g を静脈内注射した。

【 0 2 3 0 】

(実施例 1 . 2 . B)

ハイブリドーマの作製

10

実施例 1 . 2 . A に記載の免疫マウスから得られたひ細胞を、K o h l e r , G . and M i l s t e i n 1 9 7 5 , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 に記載の確立された方法に従って S P 2 / O - A g - 1 4 細胞と 5 : 1 の比で融合して、ハイブリドーマを作製した。融合生成物を、9 6 ウェルプレート中のアゼセリン及びヒポキサンチンを含む選択培地に $2 . 5 \times 1 0 ^ 6$ ひ臓細胞 / ウェルの密度で蒔いた。融合から 7 から 1 0 日後、巨視的なハイブリドーマコロニーが観察された。ハイブリドーマコロニーを含む各ウェルの上清を、(実施例 1 . 1 . A に記載のように) I L - 1 3 変種に対する抗体の存在について E L I S A によって試験した。次いで、I L - 1 3 変種特異的活性を示す上清を、(実施例 1 . 1 . C に記載のように) I L - 1 3 変種及び I L - 1 3 野生型を中和する能力について T A R C の A - 5 4 9 バイオアッセイによって試験した。

20

【 0 2 3 1 】

(実施例 1 . 2 . C)

抗ヒト I L - 1 3 モノクローナル抗体の特定及び特性分析

実施例 1 . 2 . B 及び 1 . 2 . C に従って作製した、I L - 1 3 変種に結合する抗体を産生するハイブリドーマ、及び I L - 1 3 変種に特異的に結合可能な抗体を産生するハイブリドーマ、特に A - 5 4 9 バイオアッセイにおいて 5 n M 又は 5 n M 未満の I C ₅₀ 値を有する抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈によってスケールアップし、クローン化した。

【 0 2 3 2 】

ハイブリドーマ細胞を 1 0 % 低 I g G ウシ胎児血清 (H y c l o n e # S H 3 0 1 5 1、L o g a n、U T .) を含む培地に拡大した。H a r l o w , E . and L a n e , D . 1 9 8 8 " A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l " に記載のように、平均して、(クローン集団から得られる) 各ハイブリドーマ上清 2 5 0 m L を収集し、濃縮し、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。精製 m A b の I L - 1 3 活性阻害能力を、実施例 1 . 1 . C に記載のように A - 5 4 9 バイオアッセイによって求めた。表 7 に、A - 5 4 9 バイオアッセイから得られた、1 7 種類のモノクローナル抗体の I C ₅₀ 値を示す。

30

【 0 2 3 3 】

【表 8】

表 7 : A-549 バイオアッセイにおける抗 IL-13 mAb による
IL-13 の中和

ネズミモノク ローナル抗体	アイソ タイプ	平均 IC ₅₀ (nM) ヒト IL-13 野生型	平均 IC ₅₀ (nM) ヒト IL-13 変種	平均 IC ₅₀ (nM) カニクイザル IL-13
4A8	IgG1λ	ND	2.70E-10	ND
6C8	IgG1κ	7.20E-10	3.40E-10	1.61E-10
5F1	IgG1κ	9.70E-11	9.00E-11	1.88E-09
1B6	IgG1κ	8.40E-10	2.40E-10	5.21E-10
5G1	IgG1κ	7.60E-11	4.80E-11	6.12E-10
29G5	IgG2ακ	2.90E-10	2.00E-10	4.39E-09
33C3	IgG1κ	1.50E-10	1.00E-10	8.47E-10
25C8	IgG1κ	2.30E-10	2.60E-10	1.88E-10
13C5	IgG1κ	1.90E-10	1.70E-10	5.00E-09
3E5	IgG2ακ	1.30E-10	3.00E-10	1.61E-10
3H7	IgG2ακ	NA	5.80E-10	7.97E-10
5D3	IgG1κ	7.05E-10	2.90E-10	2.91E-10
8B6	IgG1κ	ND	4.80E-10	3.95E-10
21D9	IgG2bκ	6.82E-11	1.36E-10	3.40E-10
14B2	IgG1κ	ND	4.36E-10	NA
9C11	IgG1κ	1.06E-10	1.70E-10	6.40E-10
22D10	IgG1κ	2.84E-10	5.40E-10	6.11E-09

10

20

【0234】

組換え精製ヒト IL-13 変種及び野生型に対するモノクローナル抗体の結合親和性を、実施例 1.1.B に記載のように、表面プラズモン共鳴 (Biacore (登録商標)) 測定によって求めた。表 8 に、ヒト IL-13 に対する 18 種類の上記モノクローナル抗体の親和性を示す。

【0235】

30

【表 9】

表 8 : ヒト野生型及び変種 IL-13 に対する抗 IL-13 mAb の親和性

mAb	ヒト野生型 IL-13			ヒト変種 IL-13		
	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
4A8			8.90E-11			1.57E-10
6C8	1.45E+06	7.02E-04	4.84E-10	9.78E+05	3.94E-04	4.03E-10
5F1	7.74E+05	2.24E-05	2.89E-11	5.02E+05	1.57E-05	3.14E-11
1B6	9.51E+05	5.18E-04	5.45E-10	1.06E+05	2.22E-04	2.10E-10
5G1	6.26E+05	5.49E-06	8.77E-12	1.57E+05	2.05E-05	1.30E-10
29G5	8.59E+05	1.75E-04	2.04E-10	3.16E+05	1.04E-04	3.29E-10
33C3	2.33E+06	1.49E-04	6.39E-11	7.70E+05	9.59E-05	1.24E-10
25C8	3.45E+05	2.60E-05	7.54E-11	1.34E+05	8.45E-06	6.31E-11
13C5	1.25E+06	9.31E-05	7.45E-11	5.74E+05	4.35E-05	7.59E-11
3E5	1.44E+06	6.58E-04	4.57E-10	1.85E+06	4.68E-04	2.53E-10
3H7	NB			2.54E+05	5.58E-05	2.20E-10
5D3	1.63E+06	4.83E-04	2.96E-10	1.51E+06	5.84E-04	3.87E-10
8B6	1.16E+06	6.07E-04	5.23E-10	9.83E+05	9.60E-04	9.76E-10
21D9	8.52E+05	6.58E-05	7.72E-11	8.31E+05	6.18E-05	7.44E-11
14B2	6.69E+05	1.84E-04	2.75E-10	8.08E+05	2.79E-04	3.46E-10
9C11	5.79E+05	6.50E-05	1.12E-10	6.37E+05	5.86E-05	9.21E-11
22D10	1.82E+05	6.50E-05	3.56E-10	2.45E+05	1.55E-04	6.32E-10

【0236】

(実施例 1 . 2 . C . 1)

ネズミモノクローナル抗ヒト IL - 13 抗体の種特異性

17 種類の上記モノクローナル抗体がネズミ IL - 13 を認識するかどうかを判定するために、ELISA プレートに 5 μ g / ml ヤギ抗マウス Ig G、Fc 断片特異抗体 (Pierce # 31170、Rockland、IL) で被覆することによって間接的 ELISA を準備した。ネズミ抗ヒト IL - 13 mAb を、0 . 1 % BSA を含む PBS 中で 0 . 1 から 100 ng / ml の範囲の種々の濃度で調製した。各抗体希釈物 50 μ l を被覆 ELISA プレートに添加し、室温で 1 時間温置した。0 . 05 % Tween - 20 を含む PBS でウェルを 3 回洗浄した。組換えビオチン化マウス IL - 13 (R&D Systems) を 0 . 1 % BSA を含む PBS で 0 . 1 μ g / ml に希釈した。50 μ l / ウェルを添加し、プレートを室温で 1 時間温置した。0 . 05 % Tween - 20 を含む PBS でウェルを 3 回洗浄した。ストレプトアビジン HRP (Pierce # 21126、Rockland、IL) を 0 . 1 % BSA を含む PBS で 1 : 2000 希釈した。50 μ l / ウェルを添加し、プレートを室温で 1 時間温置した。0 . 05 % Tween - 20 を含む PBS でプレートを 3 回洗浄した。TMB 溶液 (Sigma # T0440、St. Louis、MO) 50 マイクロリットルを各ウェルに添加し、室温で 10 分間温置した。1 N 硫酸を添加して反応を停止した。プレートを波長 450 nm で分光光度的に読み取った。間接的 ELISA の結果によれば、mAb 3H7 は mIL - 13 に結合することができた。その後のバイオアッセイにおいて、3H7 は、mIL - 13 によって刺激される TARC 産生を 2 . 4 nM の IC₅₀ で用量依存的に阻害できることが判明した。Biacore 分析によっても、mIL - 13 に対して 3H7 が 12 nM の K_D で陽性結合することが実証された。表 8 の他の mAb はすべて、マウス IL - 13 に対して陽性結合を示さなかった。

【0237】

非ヒト霊長類 (カニクイザル) IL - 13 及びヒツジ IL - 13 に対する抗 hIL - 13 mAb の中和効力も A - 548 バイオアッセイにおいて測定した。カニクイザル及びヒツジ IL - 13 を作製するために、各タンパク質の cDNA を、ヒト IL - 13 配列に基づく縮重プライマーを用いてゲノム DNA 鋳型上で PCR によって得た。続いて、組換

えカニクイザル及びヒツジ IL - 13 タンパク質を、一過性導入された COS 細胞中で発現させた。すべての機能試験において、野生型ヒト IL - 13 も対照として並行して作製した。A - 549 細胞は、カニクイザルとヒツジの両方の IL - 13 に対して、ヒト IL - 13 に類似した ED₅₀ で応答した。mAb の大部分は、カニクイザル IL - 13 の活性を中和し、カニクイザル IL - 13 に対して交差反応性を示した (表 7)。しかし、どの抗体もヒツジ IL - 13 を有意には中和しなかった。

【0238】

(実施例 1.2.C.2)

ネズミモノクローナル抗ヒト IL - 13 抗体は、IL - 13 受容体 (IL - 13 R₁ 及び IL - 13 R₂) に対する IL - 13 の結合を阻止する。

10

【0239】

IL - 13 活性は、IL - 13 R₁ 鎖と IL - 4 R₁ 鎖とからなる受容体複合体によって媒介される。サイトカインは、まず、細胞表面で IL - 13 R₁ と比較的低親和性の相互作用をする。次いで、IL - 13 / IL - 13 R₁ 複合体は、IL - 4 R₁ を動員して、完全 IL - 13 受容体を形成する。完全 IL - 13 受容体は、そのリガンド (IL - 13) と高親和性で結合する (Zurawski et al. (1993) EMBO J. 12:2663; Zurawski et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:23869)。次いで、IL - 13 と高親和性受容体の結合は、ヤヌスキナーゼ - シグナル伝達性転写因子 (JAK - STAT) 経路を含む IL - 4 R₁ 鎖を介して、例えば、IL - 13 に対する最も早い細胞応答の 1 つとして

20

【0240】

IL - 13 に高親和性 (0.25 - 1.2 nM) で結合する別の IL - 13 結合受容体である IL - 13 R₂ 鎖 (IL - 13 Ra2) がある (Caputi, et al 1996 J. Biol. Chem. 271, 16921 - 16926; Donaldson et al 1998 J. Immunol. 161, 2317 - 2324)。IL - 13 / IL - 13 R₂ 複合体に関与する他の受容体分子は知られていない。IL - 13 R₂ は、非シグナル伝達「おとり」受容体として作用すると当初は考えられた。しかし、IL - 13 R₂ は、IL - 13 に結合し得、AP - 1 経路を介してシグナル伝達し、マクロファージを含めたある細胞タイプにおいて TGFβ 産生をもたらす。TGFβ 産生は肺線維症をもたらすことがその後に発見された (Fichtner - Feigl, 2006 Nat Med 12:99 - 106)。したがって、IL - 13 R₁ / IL - 4 R₁ 複合体と IL - 13 R₂ の両方の経路は、ぜん息及び他の IL - 13 媒介性疾患の病態生理全般の一因になる。エピトープマッピング、受容体結合アッセイ、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、更に BIACORE 分析などの幾つかの手法を用いて、本発明の抗 IL - 13 抗体とヒト IL - 13 の相互作用を説明した。

30

【0241】

上記モノクローナル抗体が、IL - 13 受容体 (IL - 13 R₁ 及び IL - 13 R₂) に対する IL - 13 の結合を阻止することができるかどうかを判定するために、受容体結合 ELISA を以下のように開発した。高結合性 96 ウェル ELISA プレートに、コーティング緩衝剤 (炭酸塩 - 炭酸水素塩緩衝剤、Pierce) 100 µl / ウェル中の 4 µg / ml 組換え IL - 13 R₁ / Fc 又は IL - 13 R₂ / Fc (R&D Systems) で 4 回被覆した。16 時間後、プレート内容物を流しにはじき落とすことによってコーティング溶液を除去し、プレートを洗浄し、Superblock Blocking Buffer (240 µl / ウェル) (Pierce) で 4 回ブロックした。抗 IL - 13 mAb (40 µg / ml から 1 : 4 段階希釈、50 µl / ウェル) 及びビオチン - IL - 13 (50 µl / ウェル、hIL - 13 R₁ / Fc の最終濃度 5 nM、及び hIL - 13 R₂ / Fc の最終濃度 0.5 nM) を添加し、室温 (RT) で 2 時

40

50

間温置した。プレートに0.1%PBST 300ulで5回洗浄し、次いで1:5000希釈されたマウス抗ビオチンMAb (Jackson Immunosciences) 100ulを添加し、室温で45分間温置した。プレートに0.1%PBST 300ulで再度5回洗浄し、続いてTMB基質試薬 (100ul/ウェル、Pharmingen) を添加し、5分間発色させ、2M H₂SO₄ (VWR) 50ulを添加して停止した。450nmのODを分光測光法によって測定した。

【0242】

さらに、mAbの受容体遮断性も、IL-13R₂を移入したCOS細胞を用いた受容体結合アッセイによって評価した。以前に記述された (Obiri Nii et al., (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804) IODO-GEN試薬 (Pierce, Rockford, IL) を用いて、組換えヒトIL-13を¹²⁵I (Amersham, Arlington Heights, IL) で標識した。放射性標識IL-13の比活性は、158μCi/μgタンパク質と推定された。標識IL-13は、A-549パイオアッセイで評価して、非標識IL-13と類似した生理活性を示した。結合実験では、COS細胞にLipofectamine 2000 (Invitrogen) によってヒトIL-13R₂を一過性導入し、48時間温置した。形質移入されたCOS細胞 (結合緩衝剤100μL中5×10⁵細胞: 0.2%ヒト血清アルブミン及び10mmol HEPESを含むRPMI 1640) を、1μM非標識IL-13を含む、又は含まない、1.0nM ¹²⁵I-IL-13と一緒に4℃で2時間温置した。細胞に結合した¹²⁵I-IL-13を、フタル酸エステル油勾配の遠心分離によって、結合していない¹²⁵I-IL-13から分離し、放射能をガンマ線計数器 (Wallac, Gaithersburg, MD) によって測定した。抗体置換 (displacement) アッセイでは、形質移入されたCOS細胞を、上述したように、漸増濃度 (最高50μg/ml) の抗IL-13抗体を含む、又は含まない、¹²⁵I-IL-13 (1.0nM) と一緒に温置した。両方の形態の受容体結合アッセイによって以下のことが実証された。第1に、13C5及び9C11はIL-13R₁に対するIL-13の結合を阻止した。第2に、13C5は、IL-13R₂に対するIL-13の結合を強く阻止したが (細胞表面RBAとRBE LISAの両方においてIC₅₀ 約1-3nM)、9C11はIL-13R₂のIL-13結合をより低い効力 (IC₅₀ > 10nM) で阻止した。第3に、5G1及び3E5は、IL-13R₁とIL-13R₂のどちらに対してもIL-13の結合を阻止しなかった。3種類の他の抗IL-13抗体、BAK502G9 (CAT 国際公開第2005/007699号)、mAb13.2 (Wyeth 国際公開第2005/123126号A2) 及びMJ2-7 (Wyeth 国際公開第2006/0073148号A1) についても、受容体結合ELISAと細胞表面RBAの両方で、ヒトIL-13R₂に対するヒトIL-13の結合を阻止する能力を分析した。抗体mAb13.2は、IL-13R₁とIL-13R₂のどちらに対してもIL-13の結合を阻止しなかった。BAK502G9及びMJ2-7は、IL-13R₁に対するIL-13の結合を阻止することができた。しかし、BAK502G9及びMJ2-7は、IL-13R₂に対するIL-13の結合を阻止する効力が低く、抗体濃度は最高50μg/ml (330nM) であった。

【0243】

抗IL-13 mAbの存在下でIL-13とIL-13R₁/2の相互作用もBIACOREによって分析した。この分析を幾つかの形式で行った。第1に、IL-13R₁/FcをBiacoreチップに結合させ、抗IL-13 mAbの存在下及び非存在下で、IL-13をチップ上に流した。とりわけ、MAb 13C5及び9C11は、IL-13R₁に対するIL-13の結合を阻止することができたが、5G1及び3E5は、IL-13R₁に対するIL-13結合を阻止せず、受容体結合アッセイと一致した。第2に、IL-4RをBIACOREチップに結合させ、IL-13R₁に前もって結合したIL-13の複合体をチップ上に流した。抗IL-13 mAbの非存在下で、3分子複合体の形成が実証された。しかし、IL-13R₁に前もって結合した

IL-13の混合物に抗IL-13抗体5G1を添加すると、チップ上のIL-4Rに対する結合が阻止された。これは、5G1が、IL-13R₁に対してはIL-13の結合を阻止することができなかったが、IL-4Rに対してはIL-13の結合を阻止することができたことを示しており、そのIL-13中和活性機構の根拠を与えるものである。これらの知見をサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって更に確認した。すなわち、5G1ではヘテロ3量体複合体(mAb-IL-13-IL-13R₁/Fc)が観察されたが、13C5では観察されなかった。mAb-IL-13複合体のプロテイナーゼプロセッシングを利用したその後のエピトープマッピング研究と、それに続く質量分析によって以下のことが示された。第1に、5G1は、N末端11-aaペプチド(GPVPPSTALRE)を含むIL-13残基に結合して、IL-4Rと相互作用することが判明したヘリックスA領域の一部を覆う(Moy et al 2001 J Mol Biol. 310:219及びHorita et al., (2001) J Mol Biol. 310:231)。第2に、抗体9C11は、ヘリックスCとヘリックスDの間の領域(VSAGQFSSLHVR)と相互作用する。第3に、抗体13C5は、ヘリックスDを覆う領域を含むIL-13残基と相互作用する(配列番号1のアミノ酸104-130に対応するVRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFREGR)。ヘリックスDは、IL-13受容体と相互作用することが判明した(Moy et al 2001 J Mol Biol. 310:219、Horita et al 2001 J Mol Biol. 310:231、及びMadhankumar et al 2002 JBC 277:43194)。13C5は、カニクイザルIL-13($K_D = 1800$ pM)よりもはるかに強くヒトIL-13変種($K_D = 50$ pM)に結合するので、また、この潜在的13C5エピトープ領域内のヒトIL-13変種とカニクイザルIL-13の配列差は、120位がヒトではLであるが、カニクイザルIL-13ではVであるにすぎないので、本発明者らはV120L変異カニクイザルIL-13を作製し、この変異体が13C5に対して野生型カニクイザルIL-13よりも高い結合親和性を有するかどうか試験した。Biacore及びバイオアッセイ結果に基づいて、V120L変異カニクイザルIL-13の場合の13C5の結合親和性及び中和効力は、野生型カニクイザルIL-13の場合と同等であり、C末端領域内の120位のこのV/L差がヒトIL-13変種とカニクイザルIL-13の13C5親和性の差の一因ではなく、ヒトとカニクイザルIL-13に対する13C5の結合親和性の差の一因となる他の残基がC末端領域外にあるにちがいないことを示している。これは、13C5がウエスタンブロット分析によって変性ヒトIL-13を認識しないという知見と一致し、ヒトIL-13上の13C5の結合エピトープが高度に立体配置的(conformational)であることを示している。

【0244】

結合及びエピトープマッピング研究によれば、5G1は、IL-13とIL-13R₁の相互作用を阻害しなかったが、IL-13/IL-13R₁とIL-4Rの相互作用を妨害した。この妨害は、機能的IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨げると考えられる。これらの知見は、A-549細胞など、IL-13R₁/IL-4Rによって媒介される系において、この抗体の中和活性に対する理論的モデルを与える。これに対し、13C5は、IL-13R₁とIL-13R₂の両方に対するIL-13の結合を阻止した。興味深いことに、9C11は、IL-13R₁に対するIL-13の結合を阻止することができたが、IL-13R₂に対するIL-13の結合を部分的に(又は低効力で)しか阻止しなかった。IL-13R₁とR₂は、類似した3次元折りたたみ及びIL-13結合配向をとるが、配列相同性が低く、したがってIL-13結合の原因である特異的残基が異なり得る(Arima 2005 JBC 280:24915、及びMadhankumar et al 2002 JBC 277:43194)。その結果、IL-13R₁とIL-13R₂に結合するIL-13上の特異的残基が異なり得る。これは、9C11の差異のある受容体遮断性を説明し得るものである。

【0245】

10

20

30

40

50

上記受容体結合アッセイ、エピトープマッピング、B i a c o r e 及びバイオアッセイは総合して、中和抗 I L - 1 3 抗体が I L - 1 3 関連活性を以下の機序によって阻害し得ることを示している。

【 0 2 4 6 】

1) I L - 1 3 R 1 と I L - 1 3 R 2 の両方に対する受容体結合に關与する領域において I L - 1 3 と相互作用することによって、I L - 1 3 R 1 と I L - 1 3 R 2 の両方に対する I L - 1 3 の結合を阻止する。かかる抗体の例は 1 3 C 5 である。かかる抗体は、I L - 1 3 R 1 / I L - 4 R 複合体と I L - 1 3 R 2 の両方を介した I L - 1 3 シグナル伝達を阻害する。

【 0 2 4 7 】

2) I L - 1 3 R 1 と I L - 1 3 R 2 のどちらに対しても I L - 1 3 の結合を阻止しない。しかし、抗体は、I L - 4 受容体との相互作用を阻害し、したがって、I L - 1 3 R 1 / I L - 4 R 複合体を介した I L - 1 3 シグナル伝達を阻害する。かかる抗体は、I L - 1 3 R 2 シグナル伝達を阻害しない可能性がある。かかる抗体の例は 5 G 1 及び m A b 1 3 . 2 (W y e t h 国際公開第 2 0 0 5 / 1 2 3 1 2 6 号) である。

【 0 2 4 8 】

3) I L - 1 3 R 1 に対する I L - 1 3 の結合を阻止するが、I L - 1 3 R 2 に対する I L - 1 3 の結合を効果的に阻止しない。これは以下の理由によって生じ得る。a) エピトープ: I L - 1 3 R 1 結合に關与するが、I L - 1 3 R a 2 結合に關与しない、又は I L - 1 3 R 2 結合に強くは關与しない、領域。例は 9 C 1 1 である。b) 親和性: I L - 1 3 R 2 は、I L - 1 3 に対して I L - 1 3 R 1 よりもはるかに高い親和性を有するので、低親和性抗体は、治療抗体の生理的濃度で、I L - 1 3 1 に対する I L - 1 3 の結合を阻止し得るが、I L - 1 3 R 2 に対しては阻止し得ない。例は B A K 5 0 2 G 9 である。B A K 5 0 2 G 9 は、B i a c o r e によって評価して、組換え野生型ヒト I L - 1 3 に対して 2 . 1 1 n M の親和性を示した (C A T 国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 7 6 9 9 号) 。別の例は M J 2 - 7 である。M J 2 - 7 は、B i a c o r e によって評価して、組換え野生型ヒト I L - 1 3 に対して 1 . 4 n M の親和性を示し、サル I L - 1 3 に対してより高い親和性 (4 3 p M) を示した (W y e t h 国際公開第 2 0 0 6 / 0 0 7 3 1 4 8 号 A 1) 。この親和性の相違のために、この m A b は、I L - 1 3 R 2 に対するサル I L - 1 3 の結合を有効に阻止し得るが、同じ受容体に対するヒト I L - 1 3 の結合を、はるかに低い効力でしか阻止しない。

【 0 2 4 9 】

m A b B A K 5 0 2 G 9 と M J 2 - 7 は、類似したエピトープ (C A T 国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 7 6 9 9 号及び W y e t h 国際公開第 2 0 0 6 / 0 0 7 3 1 4 8 号 A 1) を有し、競合 E L I S A によって評価して、I L - 1 3 に対する結合を競合する。手短に述べると、B A K 5 0 2 G 9 を E L I S A プレートに固定し、続いて洗浄し、ブロックした。次いで、ピオチン化ヒト I L - 1 3 (1 0 n g / m l) を、種々の濃度の M J 2 - 7 (0 . 2 n g / m l から 2 0 u g / m l) の存在下でプレートに添加し、続いて洗浄し、H R P 複合化抗ピオチン抗体を用いて検出した。この試験によれば、M J 2 - 7 は、ヒト I L - 1 3 に対する結合を B A K 5 0 2 G 9 と用量依存的に競合した。負の対照 I g G は、B A K 5 0 2 G 9 と競合しなかった。

【 0 2 5 0 】

(実施例 1 . 2 . D)

各ネズミ抗ヒト I L - 1 3 m A b の可変領域のアミノ酸配列の決定

各アミノ酸配列を決定するために、約 10×10^6 個のハイブリドーマ細胞を遠心分離によって単離し、処理して、T r i z o l (G i b c o B R L / I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A .) を製造者の指示に従って用いて全 RNA を単離した。S u p e r S c r i p t F i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S y s t e m (I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A) を製造者の指示に従って用いて、全 RNA を第 1 鎖 DNA 合成に供した。オリゴ (d T) を用いて、第 1 鎖合成を準備して (p

10

20

30

40

50

prime)、ポリ(A)⁺RNAを選択した。次いで、ネズミ免疫グロブリン可変領域の増幅用に設計されたプライマー(Ig-Primer Sets、Novagen、Madison、WI)を用いたPCRによって、第1鎖cDNA産物を増幅した。PCR産物をアガロースゲル上で分離し、切り出し、精製し、次いでTOPO Cloningキットを用いてpCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen、Carlsbad、CA)にサブクローニングし、TOP10 chemically competent E. coli(Invitrogen、Carlsbad、CA)に転換した。形質転換体のコロニーPCRを実施して、挿入断片を含むクローンを特定した。QIAprep Miniprepキット(Qiagen、Valencia、CA)を用いて、挿入断片を含むクローンからプラスミドDNAを単離した。プラスミド中の挿入断片を、M13フォワードプライマー及びM13リバースプライマー(Fermentas Life Sciences、Hanover MD)を用いて、両方の鎖上で配列決定して、可変重鎖又は可変軽鎖DNA配列を決定した。実施例1.2.Cに記載した17種類のモノクローナル抗体の可変重鎖及び可変軽鎖配列を表5に示す。

10

【0251】

(実施例2)

組換え抗ヒトIL-13抗体

(実施例2.1)

組換えキメラ抗ヒトIL-13抗体の構築及び発現

ネズミ抗ヒトIL-13モノクローナル抗体5G1、13C5、9C11、21D9及び3H7の重鎖定常領域をコードするDNAを、細菌中で相同組換えによって、2つのヒンジ領域アミノ酸変異を含むヒトIgG1定常領域をコードするcDNA断片で置換した。これらの変異は、234位(EU付番)におけるロイシンからアラニンへの変化、及び235位におけるロイシンからアラニンへの変化である(Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657)。これらの抗体の各々の軽鎖定常領域をヒトカッパ定常領域で置換した。pBOS発現プラスミドに連結されたキメラ重鎖及び軽鎖cDNAの同時形質移入によって、完全長キメラ抗体をCOS細胞中で一過性に発現させた(Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322)。組換えキメラ抗体を含む細胞上清を、Protein A Sepharoseクロマトグラフィーによって精製し、結合した抗体を、酸緩衝剤を添加して溶出させた。抗体を中和し、PBSで透析した。

20

30

【0252】

次いで、精製キメラ抗ヒトIL-13モノクローナル抗体を、実施例1.1.C2及び1.1.C3に記載のように、A-549細胞によるTARCのIL-13誘導性産生を抑制する能力について試験した。表12に、A-549バイオアッセイから得られた、3種類のキメラ抗体のIC₅₀値を示す。

【0253】

【表10】

表9 A-549バイオアッセイにおける抗IL-13キメラ抗体による

40

rhIL-13wtの中和

キメラ	平均IC ₅₀ (M)
5G1-Chim	4.10E-11
13C5-Chim	1.91E-10
9C11-Chim	1.23E-10

【0254】

(実施例2.2)

ヒト化抗ヒトIL-13抗体の構築及び発現

50

(実施例 2 . 2 . 1)

ヒト抗体フレームワークの選択

(表 3 に記載の) 各ネズミ可変重鎖及び可変軽鎖遺伝子配列を、Vector NTI ソフトウェアを用いて、(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>のNCBI Ig Blastウェブサイトから得られた) 44 個のヒト免疫グロブリン生殖系列可変重鎖、又は 46 個の生殖系列可変軽鎖配列に対して別々に整列させた。

【0255】

ヒト化は、アミノ酸配列相同性、CDR クラスター分析、発現されるヒト抗体間の使用頻度、及びヒト抗体の結晶構造に関する利用可能な情報に基づいた。抗体結合、VH - VL 対形成、及び他の要因に対する可能な効果を考慮して、ネズミ残基をヒト残基に変異させた。ネズミとヒトのフレームワーク残基は、少数の例外を除いて、異なる。別のヒト化戦略を、ネズミ抗体可変領域の実際のアミノ酸配列に高度の相同性、すなわち、配列類似性を有するヒト生殖系列抗体配列又はそのサブグループの分析に基づいて設計した。

10

【0256】

相同性モデリングを用いて、抗体結合部位(CDR)の構造に重要であると予測される、ネズミ抗体配列に特有の残基を特定した。相同性モデリングは、近似の三次元座標がタンパク質に対して生成される計算方法である。最初の座標、及びその更なる改良のためのガイダンスの出所は、三次元座標が既知であり、その配列が第 1 のタンパク質の配列に関連する、基準タンパク質の第 2 のタンパク質である。2 種類のタンパク質の配列間の関係を使用して、基準タンパク質と、座標が所望とされるタンパク質、すなわち標的タンパク質とを対応させる。基準及び標的タンパク質の各一次配列を、基準タンパク質から標的タンパク質に直接転移される、2 種類のタンパク質の同一部分の座標と整列させる。例えば、残基の変異、挿入又は欠失に起因する、2 種類のタンパク質のミスマッチ部分の座標を、既に移行されたモデル座標との一貫性を確保するために改良された一般構造テンプレート及びエネルギーから構築する。この計算によるタンパク質構造は、更に改良することができ、又はモデリング研究に直接使用することができる。モデル構造の品質が、基準及び標的タンパク質が関連する競合(contention)の確度、並びに配列アラインメントが構築される精度によって決まることは、この記述から明白であるはずである。

20

【0257】

ネズミ配列 5 G 1、1 3 C 5 及び 9 C 1 1 の場合、BLAST 検索と目視検査の組合せを用いて、適切な基準構造を特定した。基準と標的アミノ酸配列の 25 % の配列相同性は、相同性モデリング演習を試みるのに最低限必要であると考えられる。配列アラインメントを手作業で構築し、モデル座標をプログラム Jackal を用いて生成した(Petrey, D., Xiang, Z., Tang, C.L., Xie, L., Gimpellev, M., Mitros, T., Soto, C.S., Goldsmith-Fischman, S., Kernytsky, A., Schlessinger, A., et al. 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. Proteins 53 (Suppl. 6): 430 - 435 参照)。

30

40

【0258】

選択された抗体のネズミとヒトフレームワーク領域の一次配列は、かなりの同一性を共有する。異なる残基位置は、ネズミ抗体の観察された結合効力を保持するために、ヒト化配列にネズミ残基を含めるための候補である。ヒトとネズミ配列で異なるフレームワーク残基のリストを手作業で作成した。

【0259】

所与のフレームワーク残基が抗体の結合性に影響を及ぼす可能性は、CDR 残基に対するその近接によって決まる。したがって、モデル構造を用いて、ネズミとヒト配列で異な

50

る残基を、CDR中の任意の原子からの距離に応じて順位付けした。任意のCDR原子の4.5以内にある残基は、最も重要とみなされ、ヒト化抗体においてネズミ残基を保持するための候補であることが推奨された(すなわち復帰変異)。

【0260】

5G1可変領域のヒト化の場合、本発明で提供する一般的手法に従った。まず、5G1可変領域の分子モデルを、コンピュータプログラムABMOD及びENCADを用いて構築した(Levitt, M., J. Mol. Biol. 168:595-620(1983))。次に、ヒトV及びJセグメント配列に対する相同性検索に基づいて、VHセグメント21/28(Dersimonian, H., et al., J. Immunol. 139:2496-2501(1987))及びJセグメントJH4(Ravetch, J.V., et al., Cell 27:583-591(1981))を選択して、Hu5G1重鎖可変領域にフレームワークを設けた。5G1軽鎖可変領域の場合、VLセグメントHF-21/28(Chastagner, P., et al., Gene 101:305-306(1991))及びJセグメントJK4(Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257:1516-1522(1982))を使用した。5G1 VHと受容体ヒト21/28及びJH4セグメントとのフレームワークアミノ酸の同一性は72%であり、5G1 VLと受容体ヒトHF21/28及びJK4セグメントとの同一性は83%であった。CDRとの有意な接触をコンピュータモデルが示唆したフレームワーク位置において、最初のヒトフレームワークアミノ酸をマウスV領域由来のアミノ酸で置換した。これは重鎖の残基48、67、68、70、72、74及び97でなされた。軽鎖の場合、置換は残基50でなされた。対応するヒトV領域サブグループ中のそれぞれの位置においてまれにしか存在しないフレームワーク残基を、該位置においてヒトコンセンサスアミノ酸で置換した。これは、重鎖の残基44及び76、並びに軽鎖の残基2、15、41、42、44及び51においてなされた。

10

20

【0261】

13C5可変領域のヒト化のために、本発明で提供する一般的手法に従った。まず、13C5可変領域の分子モデルを、コンピュータプログラムABMOD及びENCADを用いて構築した(Levitt, M., J. Mol. Biol. 168:595-620(1983))。次に、ヒトV及びJセグメント配列に対する相同性検索に基づいて、VHセグメントM60(Schroeder, Jr., H.W. and Wang, J. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6146-6150(1990))及びJセグメントJH4(Ravetch, J.V., et al., Cell 27:583-591(1990))を選択して、Hu13C5重鎖可変領域にフレームワークを設けた。Hu13C5軽鎖可変領域の場合、VLセグメントIII-3R(Manheimer-Lory, A., et al., J. Exp. Med. 174:1639-1652(1991))及びJセグメントJK4(Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257:1516-1522(1982))を使用した。13C5 VHと受容体ヒトM60及びJH4セグメントとのフレームワークアミノ酸の同一性は74%であり、13C5 VLと受容体ヒトIII-3R及びJK4セグメントとの同一性は75%であった。

30

40

【0262】

CDRとの有意な接触をコンピュータモデルが示唆したフレームワーク位置において、最初のヒトフレームワークアミノ酸をマウスV領域由来のアミノ酸で置換した。これは、軽鎖の残基22、49及び71においてなされた。対応するヒトV領域サブグループ中のそれぞれの位置においてまれにしか存在しないフレームワーク残基を、該位置においてヒトコンセンサスアミノ酸で置換した。これは、重鎖の残基10、46、83、84、86及び87、並びに軽鎖の残基62及び73においてなされた。

【0263】

50

ヒト化mAbのVL及びVHのアミノ酸配列を表10に示す。

【0264】

【表11】

表10： ヒト化mAbのアミノ酸配列リスト

配列 番号	タンパク質領域		配 列
			123456789012345678901234567890
70	VH 5G1.1		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGE IYPGNYNTYY NEKFRG KATMTTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCSRWR TSYFSDYGYFDY WGQGT VSS
71	VL 5G1.1		DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCR SSQSLV HSHGNTYL HWYQQRPGQSPRLLIY TVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC SQSTHVPYTF GGG TKVEIKR
72	VH 5G1.2		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGE IYPGNYNTYY NEKFRG KATLTADKSTSTAYMELSSLRSD TAVYFCRW TSYFSDYGYFDY WGQGT VSS
73	VL 5G1.2		DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCR SSQSLV HSHGNTYL HWYQQRPGQSPRLLIY TVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YFC SQSTHVPYTF GGG TKVEIKR
74	VH 5G1.3		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGE IYPGNYNTYY NEKFRG KATLTADKSTSTAYMELSSLRSD TAVYYCSRWR TSYFSDYGYFDY WGQGL VSS
75	VL 5G1.3		DIVMTQSPSLSPVTPGQPASISCR SSQSLV HSHGNTYL HWYLQKPGQSPKLLIY TVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC SQSTHVPYTF GGG TKVEIK
76	VH 13C5.1		EVTLKESGPVLVKPTETLTCTFSGFSL TSDMGVDW IRQPPGKALEWLA HIWDDV KNPALK SRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPV DTATYYCART VSSGYIYYAMDY WGQGT VSS
77	VL 13C5.1		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQDIR NYLN WYQRKPGKVVKLLIY YTSKLH SGVPS RFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDV ATYYC QQ GNTLPLTF GGG TKVEIKR
78	VH 13C5.2		EVTLKESGPVLVKPTETLTCTFSGFSL TSDMGVDW IRQPPGKALEWLA HIWDDV KNPALK SRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPV DTATYYCART VSSGYIYYAMDY WGQGT VSS

10

20

30

40

配列 番号	タンパク質領域		配 列
			123456789012345678901234567890
79	VL 13C5.2		DIQMTQTPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQRKPGKVVKLLIFYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDVATYFCQQ GNTLPLTFGGGKVEIKR
80	VH 13C5.5		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLVT VSS
81	VL 13C5.5		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDVATYFCQQ GNTLPLTFGGGKVEIK
82	VH 9C11.1		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SSWIHWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKDRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGQGTTVTVSS
83	VL 9C11.1		DVLTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSTQTLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLEIKR
84	VH 9C11.2		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SSWIHWVRQAPGQGLEWIGMIHPSDSETRL NQKFKDKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGQGTTVTVSS
85	VL 9C11.2		DVLTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSTQTLL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLEIKR
90	VH 5G1.5		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGIEIYPGNYNTYY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSRWRYSYFSDYGYFDYWGQGLVT VSS
91	VL 5G1.5		DIVMTQSPLSLPVTGPQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGKVEIK
80	VH 13C5.5L2E		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLVT VSS
92	VL 13C5.5L2E		DIQ MTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIRNYL NWYQQKPGKAPKLLIFYTSMKPRGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSSLQPEDVATYFCQQNT LPLTFGGGKVEIK
80	VH 13C5.5L3F		EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLVT VSS
93	VL 13C5.5L3F		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDVATYFCQQ GLTPPLTFGGGKVEIK

10

20

30

40

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
80	VH 13C5.5L2EL3F		EVTLRESGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHTIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNOVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTLT VSS
94	VL 13C5.5L2EL3F		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSMKPRGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDATYYCQQ GLTPPLTFGGGKVEIK

10

【0265】

(実施例2.2.2)

ヒト化抗体の構築

コンピューターで構築された上記ヒト化抗体を、オリゴヌクレオチドを用いて新規に構築した。各可変領域cDNAの場合、各60-80ヌクレオチドの6個のオリゴヌクレオチドを、各オリゴヌクレオチドの5'及び/又は3'末端において互いに20ヌクレオチド重複するように設計した。アニーリング反応においては、全6個のオリゴを組み合わせ、沸騰させ、dNTPの存在下でアニールした。次いで、DNAポリメラーゼI、Large (クレノー)断片(New England Biolabs #M0210、Beverly, MA.)を添加して、重複オリゴヌクレオチド間の約40bpの間隙を埋めた。次いで、改変pBOSベクター中のマルチクロニング部位に相補的である突出配列を含む2個の最外側プライマーを用いてPCRを実施して、可変領域遺伝子全体を増幅した(Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17)。各cDNAの組立てから誘導されるPCR産物をアガロースゲル上で分離し、予測される可変領域cDNAサイズに対応するバンドを切り出し、精製した。細菌中で相同組換えによって、2つのヒンジ領域アミノ酸変異を含むヒトIgG1定常領域をコードするcDNA断片に、可変重鎖領域をインフレームで挿入した。これらの変異は、234位(EU付番)におけるロイシンからアラニンへの変化、及び235位におけるロイシンからアラニンへの変化である(Lund et al., 1991, J. Immunol., 147: 2657)。可変軽鎖領域を、相同組換えによって、ヒトカッパ定常領域と一緒にインフレームで挿入した。細菌コロニーを単離し、プラスミドDNAを抽出し、cDNA挿入断片全体の配列を決定した。各抗体に対応する正確なヒト化重鎖及び軽鎖をCOS細胞に同時移入して、完全長ヒト化抗ヒトIL-13抗体を一過性に産生した。13C5の場合、13C5重鎖にグラフトしたcDNA及び13C5軽鎖にグラフトしたcDNAを含むpBOSベクターをCOS細胞に同時移入した。組換えキメラ抗体を含む細胞上清を、Protein A Sepharoseクロマトグラフィーによって精製し、結合した抗体を、酸緩衝剤を添加して溶出させた。抗体を中和し、PBSで透析した。幾つかのヒト化抗体を表10に示す。

20

30

40

【0266】

精製ヒト化抗体のIL-13活性阻害能力を、実施例1.1.Cに記載のようにA-549バイオアッセイによって求めた。組換えヒトIL-13に対するヒト化抗体の結合親和性を、実施例1.1.Bに記載のように、表面プラズモン共鳴(Biacore(登録商標))測定によって求めた。表11にA-549バイオアッセイから得られたIC₅₀値、並びに表10に記載した最初の6種類のヒト化抗体のヒトIL-13wt及び変種に対する親和性を示す。

【0267】

【表 1 2】

表 1 1 : ヒト化抗 I L - 1 3 m A b の中和効力及び親和性

mAb	効力 (IC ₅₀), M		hIL-13wt に対する親和性		
	hIL-13wt	hIL-13v	k _{on} (1/M·s)	k _{off} (1/s)	K _D (M)
5G1-Chim	7.69E-11	6.92E-11	9.15E+05	3.82E-05	4.17E-11
5G1.1	2.90E-11	7.41E-11	7.86E+05	2.14E-05	2.72E-11
5G1.2	2.95E-11	5.53E-11	8.35E+05	8.81E-05	1.05E-10
5G1.5	1.14E-10	6.55E-11	8.69E+05	1.91E-05	2.20E-11
13C5-Chim	1.07E-10	3.70E-11	1.70E+06	9.65E-05	5.68E-11
13C5.1	8.68E-10	3.69E-10	6.68E+05	4.74E-04	7.10E-10
13C5.2	1.93E-10	1.30E-10	1.26E+06	1.23E-04	9.79E-11
13C5.5	1.24E-10	6.90E-11	2.51E+06	1.76E-04	7.01E-11

10

【0 2 6 8】

ヒト化抗体 1 3 C 5 . 5 の C D R 配列を当分野で公知の技術によって更に変異させ、3 種類の追加のヒト化抗体を作製した。これらの追加のヒト化抗体がヒト、カニクイザル及びアカゲザル I L - 1 3 活性を阻害する能力を、実施例 1 . 1 . C に記載のように A - 5 4 9 バイオアッセイによって求めた。組換えヒト、カニクイザル及びアカゲザル I L - 1 3 に対する追加のヒト化抗体の結合親和性を、実施例 1 . 1 . B に記載のように、表面プラズモン共鳴 (B i a c o r e (登録商標)) 測定によって求めた。ヒト I L - 1 3 の結合及び阻害に加えて、これら 3 種類の追加の抗体は、カニクイザル及びアカゲザル I L - 1 3 に対して高い親和性を示した。表 1 2 に、A - 5 4 9 バイオアッセイから得られた I C₅₀ 値を示す。表 1 3 に、ヒト、カニクイザル及びアカゲザル I L - 1 3 に対する追加のヒト化抗体の親和性を示す。

20

【0 2 6 9】

【表 1 3】

表 1 2 : 追加のヒト化抗 I L - 1 3 m A b の中和効力

m A b	効力 (I C ₅₀ , n M)		
	ヒト I L - 1 3	カニクイザル I L - 1 3	アカゲザル I L - 1 3
13C5.5L2E	0. 1 8	1. 2 0	0. 4 0
13C5.5L3F	0. 1 5	0. 4 6	0. 1 4
13C5.5L2EL3F	0. 1 2	0. 4 8	0. 2 6

30

【0 2 7 0】

【表 1 4】

表 1 3 : 追加のヒト化抗 I L - 1 3 m A b の結合親和性

m A b	親和性 (K _D , n M)		
	ヒト I L - 1 3	カニクイザル I L - 1 3	アカゲザル I L - 1 3
13C5.5L2E	0. 1 2	0. 5 2	0. 2 9
13C5.5L3F	0. 2 4	0. 1 9	0. 1 1
13C5.5L2EL3F	0. 2 5	0. 3 2	0. 1 3

40

【0 2 7 1】

(実施例 2 . 2 . 3)

ヒト化抗 I L - 1 3 抗体の特性分析

本発明者らは、I L - 1 3 R 1 と I L - 1 3 R 2 の両方に対する I L - 1 3 の結合を阻止する単離モノクローナル抗体を有する。E L I S A に基づく受容体結合アッセイと細胞表面の 1 2 5 I 標識 I L - 1 3 結合アッセイの両方によって、ネズミバージョンとヒ

50

ト化バージョン（すなわち 13C5.5）の両方の 13C5 は、両方の受容体に対する IL-13 の結合を有効に阻止できることが実証された。25C8 及び 33C3 を含めて、13C5 と同じ系列の抗体も、両方の受容体に対する IL-13 の結合を阻止することができた。

【0272】

（実施例 2.2.3.a）

ヒト化抗 IL-13 抗体は、IL-13 受容体に対する IL-13 の結合を阻止する。

【0273】

ヒト化抗体 13C5.5 が IL-13 受容体（IL-13R₁ 及び IL-13R₂）に対する IL-13 の結合を阻止する能力を求めるために、ELISA に基づく受容体結合アッセイを使用した。高結合性 96 ウェル ELISA プレート（コーティング緩衝剤（炭酸塩 - 炭酸水素塩緩衝剤、Pierce）100 µl / ウェル中の 4 µg / ml 組換えヒト IL-13Ra1 / Fc 又は IL-13Ra2 / Fc（R&D Systems）で 4 で被覆した。16 時間後、プレート内容物を流しにはじき落とすことによってコーティング溶液を除去し、プレートを洗浄し、Superblock Blocking Buffer（240 µl / ウェル）（Pierce）で 4 回ブロックした。ヒト化抗 IL-13 mAb 13c5.5、対照 mAb（40 µg / ml から 1 : 4 段階希釈、50 µl / ウェル）及びビオチン - IL-13（50 µl / ウェル、hIL-13Ra1 / Fc の最終濃度 5 nM、及び hIL-13Ra2 / Fc の最終濃度 0.5 nM）を添加し、室温（RT）で 2 時間温置した。プレートを 0.1 % PBST 300 µl で 5 回洗浄し、次いで 1 : 5000 希釈されたマウス抗ビオチン MAb（Jackson Immunosciences）100 µl を添加し、室温で 45 分間温置した。プレートを 0.1 % PBST 300 µl で再度 5 回洗浄し、続いて TMB 基質試薬（100 µl / ウェル、Pharmingen）を添加し、5 分間発色させ、2 M H₂SO₄（VWR）50 µl を添加して停止した。450 nm の OD を分光測光法によって測定した。結果を表 14 に示す。

【0274】

さらに、ヒト化 mAb の受容体遮断性も、IL-13R₂ を移入した COS 細胞を用いた、細胞表面に基づく受容体結合アッセイによって評価した。以前に記述された（Obiri Nii et al., (1995) J Biol Chem. 270: 8797 - 8804）IODO-GEN 試薬（Pierce, Rockford, IL）を用いて、組換えヒト IL-13 を ¹²⁵I（Amersham, Arlington Heights, IL）で標識した。放射性標識 IL-13 の比活性は、158 µCi / µg タンパク質と推定された。標識 IL-13 は、A-549 バイオアッセイで評価して、非標識 IL-13 と類似した生理活性を示した。結合実験では、COS 細胞に Lipofectamine 2000（Invitrogen）によってヒト IL-13Ra2 を一過性導入し、48 時間温置した。移入された COS 細胞（結合緩衝剤 100 µL 中 5 × 10⁵ 細胞：0.2 % ヒト血清アルブミン及び 10 mmol HEPES を含む RPMI 1640）を、1 µM 非標識 IL-13 を含む、又は含まない、1.0 nM ¹²⁵I - IL-13 と一緒に 4 で 2 時間温置した。細胞に結合した ¹²⁵I - IL-13 を、フタル酸エステル油勾配の遠心分離によって、結合していない ¹²⁵I - IL-13 から分離し、放射能をガンマ線計数器（Wallac, Gaithersburg, MD）によって測定した。抗体置換アッセイでは、形質移入された COS 細胞を、上述したように、漸増濃度（最高 50 µg / ml）のヒト化抗 IL-13 抗体 13C5.5 を含む、又は含まない、125 I - IL-13（1.0 nM）と一緒に温置した。結果を表 14 に示す。

【0275】

【表 15】

表 14： 細胞表面に基づく受容体結合アッセイ及びELISAに基づく受容体結合アッセイにおける、ヒトIL-13R α 2に対するヒトIL-13 (wt) の結合を阻止するmAbの効力

mAb	効力 (IC ₅₀ , nM)	
	細胞表面	ELISA
13C5.5	2.7	1.1
BAK502G9	75.8	34.3
5G1.5	P. B.	P. B.
mAb 13.2	P. B.	P. B.
MJ2-7	17.6	19.0

P. B. 50%阻害に達しない部分的遮断

【0276】

表 15 に、ヒト化 13C5.5 抗体及び他の抗 IL-13 抗体の結合親和性を示す。

【0277】

【表 16】

表 15： Biacoreによって評価された抗 IL-13 mAbの結合親和性

mAb	親和性 (K _D , nM)	
	ヒトIL-13wt	ヒトIL-13変種
13C5.5	0.07	0.05
BAK502G9	2.10	0.17
mAb 13.2	0.11	0.20
MJ2-7	1.14	0.79

【0278】

細胞表面に基づく受容体結合アッセイとELISAに基づく受容体結合アッセイの両方において、13C5.5は、ヒトIL-13R α 2に対するヒトIL-13の結合を阻止する高い効力を示し、IC₅₀は1から3nMであった。BAK502G9とMJ2-7のどちらも結合シグナルを低下させることができたが、少なくとも部分的にはヒトwt IL-13 (表 15 参照) に対する低親和性のために、その効力は13C5.5よりもはるかに低かった (表 14 参照)。MAb 13.2は、IL-13R α 2に対するIL-13の結合を阻止することができ、そのエピトープと一致した。また、13C5.5は、両方のアッセイにおいて100nM (又は15 μ g/ml) の濃度で100%阻害を達成することができた。同じ濃度において、BAK502G9及びMJ2-7は、細胞表面に基づく受容体結合アッセイにおいて、それぞれわずか40%及び70%の阻害しか示さず、ELISAに基づく受容体結合アッセイにおいて、どちらもわずか60%の阻害しか示さなかった。

【0279】

ヒトにおいて10から20日の血清中半減期を有する治療用mAbの場合、血清中濃度は、通常は5-15 μ g/mlであり、毎週又は隔週のIV又はSC 3mpk以下の投与計画である。この計算に基づく、13C5.5は、従来のモノクローナル抗体投与計画下で、血清中濃度100nM (又は15 μ g/ml) で、治療用mAbとして生体内でIL-13R α 2に対するヒトIL-13の結合を完全に (100%) 阻止する可能性がある現在唯一の抗 IL-13 mAbである。

【0280】

(実施例 2.2.3.b)

IL-13上の特異的エピトープへの抗 IL-13 抗体の結合

抗 I L - 1 3 m A b 1 3 C 5、1 3 C 5 . 5、9 C 1 1 及び 5 G 1 が結合するヒト I L - 1 3 上のエピトープの地図を、エピトープ切除技術、続いて質量分析法 (M S) によるペプチド分析を用いて作成した。エピトープ切除においては、タンパク質をまず固定化 m A b に結合させ、次いでタンパク質分解酵素で消化した。タンパク質上のエピトープ領域を M S 及び M S / M S を用いて決定して、エピトープ含有ペプチドを特定した。C N B r 活性化 S e p h a r o s e ビーズ (A m e r s h a m B i o s c i e n c e s、1 0 m g / 反応) を 0 . 1 M H C l 5 0 0 u L に懸濁させ、1 5 分間平衡にした。ビーズを小型反応カラム (U S B C o r p o r a t i o n) に移し、0 . 1 M H C l、続いて 0 . 1 M N a H C O 3 カップリング緩衝剤で洗浄した。m A b (1 0 0 u g) を懸濁液に添加し、ゆっくり回転させながら室温で 2 時間温置した。共有結合した m A b を有するビーズを p H 約 8 . 0 の 0 . 1 M T r i s - H C l 緩衝剤で洗浄した。p H 約 8 . 0 の 0 . 1 M T r i s - H C l 緩衝剤と一緒に 2 時間温置することによって、C N B r S e p h a r o s e ビーズ上の未反応基をブロックした。p H の異なる 2 種類の緩衝剤、すなわち、1) p H 約 4 . 0 の 0 . 1 M 酢酸 N a、0 . 5 M N a C l 緩衝剤、及び 2) p H 約 8 . 0 の 0 . 1 M T r i s - H C l、0 . 5 M N a C l 緩衝剤で連続洗浄して、脱離した m A b を除去した。ビーズを P B S 約 0 . 1 4 M N a C l、2 . 7 m M K C l、4 . 3 m M N a 2 H P O 4、1 . 5 m M K H 2 P O 4、p H 7 . 2 中で平衡にし、I L - 1 3 と一緒に、又は I L - 1 3 なしで、室温で 2 時間温置した。ビーズを p H 約 7 . 2 の P B S で洗浄後、一定分量の懸濁液を M A L D I - T O F 分析用に取り出した。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 1 】

親和性結合したタンパク質を異なるプロテアーゼ (1 : 1 0 0 - 1 : 2 0 の酵素 : 基質比) で 1 2 時間消化した。使用したプロテアーゼは、トリプシン、G l u C、キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ Y、アミノペプチダーゼ M などであった。タンパク質分解後、ビーズを消化緩衝剤 5 0 0 u L で洗浄した。最後の洗浄液 1 0 0 u L を対照として保存した。2 % T F A 約 1 0 0 u L をビーズに添加し、収集した。対照と酸洗浄液の両方をまず約 2 0 u L に減圧濃縮した。次いで、C 1 8 z i p t i p を用いてペプチドを脱塩した。V o y a g e r D E 又は V o y a g e r D E - P r o システムを用いて、M A L D I - T o F M S によって試料を分析した。S c i e x Q - S t a r P u l s a r i M S システムに接続された A g i l e n t 1 1 0 0 C a p i l l a r y H P L C システムを用いて、n a n o - E S I - L C - M S / M S による分析を実施した。

【 0 2 8 2 】

1 3 C 5 のエピトープの試験においては、連続して使用した 2 種類のプロテアーゼが最良の結果を与えた。キモトリプシンを用いて、配列番号 1 のアミノ酸残基 1 0 0 - 1 3 0 からなる主要なペプチドが検出され、このペプチドがエピトープを含み得ることが示された。配列番号 1 のアミノ酸残基 1 0 3 - 1 3 0 及び 1 0 4 - 1 3 0 の少量のペプチドも検出された。キモトリプシン消化後に、アミノペプチダーゼ M を使用した。検出された主要なペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸残基 1 0 4 - 1 3 0 であり、4 個の N 末端アミノ酸残基 (8 0 - 8 3) がエピトープの一部ではないことが示唆された。カルボキシペプチダーゼ Y で更に消化すると、親和性が低下した。消化及び洗浄後に、ペプチドは観察されなかった。すべてのペプチド配列を n a n o - E S I - L C - M S / M S によって確認した。

【 0 2 8 3 】

1 3 C 5 及び 1 3 C 5 . 5 のエピトープマッピングによれば、その結合部位は、ヒト I L - 1 3 の C 末端ヘリックス D 領域 (配列番号 1 のアミノ酸 1 0 4 - 1 3 0 に対応する残基 V R D T K I E V A Q F V K D L L L H L K K L F R E G R) を含んだ。C 末端ヘリックス D 領域は、I L - 1 3 受容体との相互作用に関与すると提唱された (Z u e g g e t a l 2 0 0 1 I m m u n o l C e l l B i o l . 7 9 : 3 3 2 - 9) 。

【 0 2 8 4 】

(実施例 2.3)

IL-13 と複合化された抗 IL-13 の結晶化

13C5.5 の Fab 部分は、ヒト IL-13 と複合体を形成し、複合体の結晶は、以下のように生成した。

【0285】

(実施例 2.3.1)

13C5.5 Fab 断片の調製及び精製

13C5.5 Fab 断片を調製するために、Ultrafree-15 Bioma
x 10kDa 分子量カットオフ (MWCO) 遠心ろ過装置 (Millipore) を用
いて、0.15M PBS 緩衝剤中の 13C5.5 IgG を 2mg/ml にまず濃縮し
た。パインゲルスラリー (Pierce) を予洗し、緩衝剤 A (20mM Na₂HP
O₄、10mM EDTA、20mM シス테인) を体積比 1:1 で用いて、2-3X で
充填した。次いで、濃縮抗体を 50% パインゲルスラリーと混合し、激しく振とうしな
がら 37 で 24 時間温置した。抗体 / スラリー混合物を遠心分離し (Beckman
6KR)、PBS であらかじめ平衡にした Superdex 75 に上清を充填した。主
要なピークが溶出し、タンパク質をプールした。25mL Protein A Sep
harose 4 Fast Flow アフィニティーカラム (Amersham Ph
armacia) を PBS 100mL で洗浄して準備した。プールした抗体断片をアフ
ィニティーカラム (流量 2mL/min) にかけた。(280nm の UV 吸光度によって
モニターされた) 13C5.5 Fab 断片を含む画分をフロースルー (flow-th
ru) に収集した。(280nm の UV 吸光度によって測定して) 0.3mg/mL より
も高い 13C5.5 Fab 断片濃度を含む画分をプールし、-80 で凍結させた。試
料純度を SDS-PAGE によって評価した。

10

20

30

40

【0286】

(実施例 2.3.2)

IL-13 / 13C5.5 Fab 複合体の調製

組換えヒト IL-13 をほ乳動物発現系で発現させ、続いて当分野で周知の技術を用い
て精製した。組換えヒト IL-13 と 13C5.5 Fab タンパク質をモル比 1:1 で
混合し、4 で 1 時間温置した。複合体試料を、あらかじめ平衡にした (20mM Tr
is pH 7.5、150mM NaCl) Superdex 200 カラムに 0.5m
l/min で充填した。複合体をプールし、Ultrafree-15 Bioma
x 10kDa 分子量カットオフ (MWCO) 遠心ろ過装置 (Millipore) を用いて
24mg/mL に濃縮し、-80 で凍結させた。試料純度を SDS-PAGE によって
評価した。

【0287】

(実施例 2.3.3)

IL-13 / 13C5.5 Fab 複合体の結晶化

凍結した IL-13 / 13C5.5 複合体貯蔵物 (約 24mg/mL) を氷上で解凍し
た。複合体 (1.0μL) を貯蔵溶液 (1.75M 硫酸アンモニウム、100mM ME
S pH 6.5、10mM CaCl₂) 1.0μL と混合した。生成した液滴を貯蔵器
上のシッティングドロップウェル (Cryschem シッティングドロッププレート) 中
で約 18 で混合した。ダイヤモンド状結晶が 1 週間以内に出現した。

【0288】

(実施例 2.3.4)

IL-13 / 13C5.5 Fab 複合体結晶の凍結保護及び急速冷却

IL-13 / 13C5.5 Fab 複合体の結晶を母液 + 20% グリセリン中で繊維ル
ープを用いて収集した。続いて、結晶を液体窒素に投げ込むことによって急速冷却した。

【0289】

(実施例 2.3.5)

IL-13 / 13C5.5 Fab 複合体の X 線回折データ収集

50

IL - 13 / 13C5.5 Fab 結晶からの X 線回折データを、米国イリノイ州アルゴンヌの Advanced Photon Source における IMCA ビームラインにおいて収集した。データ収集中、Oxford Cryosystems Cryostream 冷却器を用いて、結晶を温度 100 K に維持した。合計 180 フレームを 1.0° の振動範囲で収集した。データを HKL 2000 プログラムスイート (Otwinski and Minor, 1997) によって処理した。結晶方位を決定した後、データを DENZO によって積分し、SCALEPACK によってスケールリング及びマージングを行い、絶対目盛り上に配置し、TRUNCATE によって構造因子振幅に換算した (French and Wilson, 1978)。フリー R 因子 (R free) を計算するために、特有反射 (unique reflection) の 5 パーセントを「フリー」セットに無作為に割り当てた (Brunger, 1992)。反射の残りの 95% は、R 因子 (R) を計算するための「作用 (working)」セットを構成した。X 線回折データを表 16 に要約する。以下は、結晶形の指標付け (indexing) である：(1) IL - 13 / 13C5.5 Fab : 空間群 P2 (1) 2 (1) 2 (1)、a = 163.578、b = 163.318、c = 228.627、 $\beta = 90.0^\circ$ 、 $\gamma = 90.0^\circ$ 、 $\alpha = 90.0^\circ$ 。表 17 に、データセットの X 線回折統計を示す。

10

【0290】

【表 17】

表 16 : IL - 13 / 13C5.5 Fab 複合体の結晶単位格子情報の要約

20

結晶	空間群	a (Å)	b (Å)	c (Å)
1	P2 (1) 2 (1) 2 (1)	163.578	163.318	228.627

【0291】

【表 18】

表 17 : IL - 13 / 13C5.5 Fab 複合体の X 線回折データ統計の要約

結晶	空間群	分解能 (Å)	特有反射	Rsym (%) *	被覆率 (%) *	多重度 *
1	P2 (1) 2 (1) 2 (1)	47.1-2.60	188,937	0.085 (0.562)	100.0 (100.0)	7.3 (7.3)

30

* 括弧内は Highest resolution shell

【0292】

(実施例 2.3.6)

IL - 13 / 13C5.5 Fab 複合体結晶構造の分子置換解析及び精密化
最尤分子置換解析をプログラム PHASER によって求めた (Read, 2001)。合計 6 種類の 13C5.5 モノマーを空間群 P2 (1) 2 (1) 2 (1) において分解能 3.0 Å で解析した。検索モデルは、既報の Fab の結晶構造であった (Protein Data Bank 登録 1BJ1; Muller et al., 1998)。座標を分子置換解析に基づいて作成した。

40

【0293】

IL - 13 / 13C5.5 Fab 複合体結晶構造の精密化を、空間群 P2 (1) 2 (1) 2 (1) において、上記分子置換解析座標で開始した。CCP4 プログラムスイート (Murshudov et al., 1997, Collaborative Computational Project, 1994) において利用可能なプログラム REFMAC によって、剛体精密化 (rigid-body refinement) を用いて、精密化を開始し、2.6 Å において以下の統計結果、すなわち 40.00% の R (R free 39.00%) を得た。新規 IL - 13 電子密度を観察した。6 種類の IL - 13 モノマーの手作業による構築は、分子グラフィックスプログラム O (Jones

50

s et al., 1991)を用い、2Fo - Fc及びFo - Fc電子密度図を検討して、公開IL - 13 NMR構造1IJZ (Moy et al., 2001)によって誘導された。精密化プログラムREFMAC (Murshudov et al., 1997)を繰り返しの拘束精密化 (restrained refinement) に用いて、以下の統計結果、すなわち25.8%のR (Rfree 30.5%)を得た。結果を表18に示す。

【0294】

【表19】

表18： 結晶学的精密化統計の要約 IL-13/13C5.5 Fab複合体

結晶	分解能 (Å)	Rfree (%)	R (%)
1	1.00-1.50	30.5	25.8

10

【0295】

(実施例2.3.6)

IL - 13 / 13C5.5 Fab複合体構造

ヒトIL - 13と複数の13C5.5 CDRの間で、広範な接触が認められる。抗体 - 抗原界面において埋められた表面積は1415.50²である。接触は、重要な水素結合、及び界面を安定化する疎水的相互作用で構成される。界面接触の大部分を構成する2個の最小配列セグメントは、IL - 13らせんA及びD上にある (IL - 13の構造については、参照により本明細書に組み入れる米国特許出願公開第2003 - 0013851号A1を参照されたい。)。これらの接触は、CDRのL1とL3及びH2とH3を連結する。上記に基づいて、エピトープ13C5.5結合範囲は、配列番号1のSer26 - Asn38、Lys123 - Arg130によって規定される局所 (topographical) 領域を含む。より好ましくは、エピトープ13C5.5結合範囲は、配列番号1のArg30 - Asn38、Lys123 - Arg127によって規定される局所領域を含む。

20

【0296】

(実施例2.4)

ヒト化IL - 13抗体の生体内での有効性

抗hIL - 13抗体の生体内での有効性を以下のように評価した。

30

【0297】

(実施例2.4.1)

ヒトIL - 13誘発性ぜん息モデルにおけるヒト化IL - 13抗体の生体内での有効性
抗hIL - 13抗体5G1、13C5及び13C5.5の有効性を、マウスのヒトIL - 13誘発性ぜん息モデルにおいて試験した。マウスに組換えヒトIL - 13を無菌PBS 50 µl中1 µgの用量で、微小噴霧器を用い、気管の開口を可視化するげっ歯類用喉頭鏡を用いて、気管に送達して、投与した。合計2回のIL - 13を試験1及び2日目に投与し、気道過敏性 (AHR; Hoymann, H.G.; J Pharmacol Toxicol Methods. 2007 Jan - Feb; 55(1): 16 - 26)、粘液、酸性ほ乳動物キチナーゼ (AMCase, Donnelly LE, Barnes PJ., 1: Trends Pharmacol Sci. 2004 Oct; 25(10): 509 - 11)、並びに胸腺及び活性化調整ケモカイン (thymus and activation regulated chemokine) (TARC; Bisset LR, Schmid - Grendelmeier P., Curr Opin Pulm Med. 2005 Jan; 11(1): 35 - 42)を気管支肺胞洗浄液中で最終投与から24時間後に測定した。抗体用量100、300及び1000 µgを、最初のIL - 13投与の1日前に腹腔内注射によって投与した。結果を表19に要約する。IL - 13R1とIL - 13R2のどちらに対してもIL - 13の結合を阻止しない5G1抗体は、このインビボモデルにおいてIL - 13生理活性を中和することができず、5G1で処理した動物において検出されたAHR、

40

50

A M C a s e 及び M u c 5 a c のレベルは、P B S で処理した対照動物と類似した。これに対し、1 と 2 の両方の受容体に対する結合を阻止する 1 3 C 5 抗体は、すべてのパラメータを軽減するのに有効であった。I L - 1 3 で処理すると、気道抵抗が 3 . 6 c m H₂O / m l / s e c から 5 . 7 c m H₂O / m l / s e c に増加した。1 3 C 5 (1 0 0 0 μ g) で処理すると、気道抵抗は 4 . 3 c m H₂O / m l / s e c に低下した。m u c 5 a c レベルによって測定される粘液分泌過多は、3 5 6 . 5 単位から最大 2 1 1 U に低下し、4 0 % の低下に相当する抗体処理であった。同様に、A M C a s e レベルは、2 0 2 U から 6 8 U に低下し、6 6 % の低下に相当し、T A R C レベルで見られる低下と類似していた (n = 1 0 、 p < . 0 5 、すべての用量) 。組換えヒト化抗体 1 3 C 5 . 5 は、このモデルにおいて類似の結果を示した。I L - 1 3 は、3 0 μ g / m l メタコリン投与後の気道抵抗を 3 . 9 から 5 . 5 c m H₂O / m l / s e c に増加させた。抗体 1 3 C 5 . 5 は、用量 1 0 0 、3 0 0 及び 1 0 0 0 μ g において気道抵抗をそれぞれ 4 . 1 、4 . 4 5 及び 4 . 3 c m H₂O / m l / s e c に抑制した。m u c 5 a c レベルによって測定される粘液分泌過多は、I L - 1 3 処理によって抗体処理用量 1 0 0 、3 0 0 及び 1 0 0 0 μ g において 2 4 7 U からそれぞれ 1 5 4 、3 0 . 2 及び 1 1 . 1 U に低下した。これは、この抗体による粘液産生の 3 8 、8 8 及び 9 6 % 抑制を表す。I L - 1 3 処理は、抗体処理 (用量 1 0 0 、3 0 0 及び 1 0 0 0 μ g) によって、1 4 、2 4 及び 6 8 % 抑制を示す 1 1 3 、9 8 及び 5 5 U に低下した 1 3 0 U A M C a s e 活性を誘導した。これらのデータによれば、I L - 1 3 R 1 と 2 の両方に対する I L - 1 3 の結合を阻止する 1 3 C 5 及び組換えヒト化抗体 1 3 C 5 . 5 は、A H R 、粘液、及び肺における A M C a s e 産生の I L - 1 3 誘導性反応を中和することができるのに対して、1 及び 2 受容体に対する I L - 1 3 の結合を阻止しない抗体は、これらの生物学的反応のいずれを阻止するのにも有効ではない。

【 0 2 9 8 】

【 表 2 0 】

表 1 9 : I L - 1 3 誘発性ぜん息モデルにおける抗ヒト I L - 1 3 抗体の効力

抗体	用量	AHR		粘液		AMCase		TARC	
		抵抗 (SEM)	抑制 %	Muc5ac 単位 (SEM)	抑制 %	任意の単位 (SEM)	抑制 %	pg/ml (SEM)	抑制 %
5G1	0	5.7(0.38)	-0-	258(37.2)	-0-	314.9(26.1)	-0-	63.2(14)	-0-
	100			315(61)	-0-	225.2(17.1)	9	111(34.5)	-0-
	300			367.2(63.2)	-0-	277(21.3)	12	94.1(24.2)	-0-
	1000	5.3(0.35)	7	345.9(61.6)	-0-	255.1(18.6)	19	90.2(17.1)	-0-
13C5	0	5.7(0.38)		356.5(15.8)	-0-	202.2(18.8)	-0-	91.7(41.7)	-0-
	100			246(30.6)	31	146.6(17.9)**	28	36(10.3)	61
	300			243.2(36.7)	32	97.2(10.8)**	52	23.3(4.1)	75
	1000	4.3(0.77)*		211.6(28)***	41	68.3(9.2)***	66	34.4(12.1)	62
13C5.5	0	5.54(0.53)	-0-	247.1(96.4)	-0-	130.4(20.6)	-0-	NT	
	100	4.16(0.29)*	89	153.8(67.6)	38	113.4(18)	13	NT	
	300	4.45(0.41)*	70	30.2(15.2)**	88	98.9(10.6)	24	NT	
	1000	4.3(0.27)*	79	11.1(5.8)***	96	55.5(6.4)***	57	NT	

* p < 0 . 0 5 、スチューデントの t 検定

** p < 0 . 0 5 、A N O V A 、ボンフェローニ

*** p < 0 . 0 1 、A N O V A 、ボンフェローニ

別の試験では、抗 h I L - 1 3 抗体 B A K 5 0 2 G 9 、M J 2 - 7 及び 1 3 C 5 . 5 の

有効性を、マウスのヒトIL-13誘発性ぜん息モデルにおいて比較した。マウスに組換えヒトIL-13を無菌PBS 50 μ l 中1 μ gの用量で、軽い鎮静状態で鼻腔内送達して、投与した。合計2回のIL-13を試験1及び2日目に投与し、気道過敏性、粘液、及びAMCaseを気管支肺胞洗浄液中で最終投与から24時間後に測定した。抗体用量1000 μ gを、最初のIL-13投与の1日前に腹腔内注射によって投与した。試験結果を表20に要約する。IL-13 1と2受容体の両方に対するIL-13の結合を阻止する13C5.5抗体は、すべてのパラメータを有意に低下させるのに有効であった。IL-13処理は、30 mg/mlメタコリン投与後の気道抵抗を4.2 cm H₂O/ml/secから7.2 cm H₂O/ml/secに増加させた。13C5.5 (1000 μ g)で処理すると、気道抵抗は4.6 cm H₂O/ml/secに86.8 %低下した。muc5acレベルによって測定される粘液分泌過多は、768.2単位から412.9 Uに低下し、58.8 %の低下に相当する抗体処理であった。同様に、AMCaseレベルは316.5 Uから147 Uに低下し、52 %の低下に相当した (n = 10、p < .001)。IL-13 R₁に対するIL-13の結合を阻止するが、IL-13 R₂に対するIL-13の結合を有効に阻止しない、BAK502G9とMJ2-7の両方の抗体は、このモデルにおいて類似したIL-13誘導性AHR中和能力を示した。抗体BAK502G9及びMJ2-7は、気道抵抗を7.2からそれぞれ5.96 cm H₂O/ml/sec及び5.93 cm H₂O/ml/secに抑制し、AHRの42 %及び41.5 %の低下しか示さなかった。muc5acレベルによって測定される粘液分泌過多は、IL-13処理によって抗体用量1000 μ gにおいて、BAK502G9又はMJ2-7抗体それぞれ768.2 Uから627.8及び380 Uに低下し、23 %及び64 %の抑制に相当した。BAK502G9抗体は、AMCaseを抑制する効果が13C5.5又はMJ2-7抗体よりも低かった。IL-13処理は、BAK502G9又はMJ2-7抗体処理 (用量1000 μ g)によって、それぞれ8 %及び45 %抑制を示す279及び169 Uに低下する316.5 U AMCase活性を誘導した。これらのデータによれば、IL-13 R₁と2の両方に対するIL-13の結合を阻止する組換えヒト化抗体13C5.5は、AHR、粘液、及び肺におけるAMCase産生のIL-13誘導性反応を中和するのに極めて有効であるのに対して、IL-13 2受容体に対するIL-13の結合をより低親和性でしか阻止しない抗体は、ぜん息の一因になるこれらの生物学的反応を阻止するのにさほど有効ではない。

【0299】

【表21】

表20： IL-13誘発性ぜん息モデルにおける13C5.5、BAK502G9及びMJ2-7抗体の比較

抗体	用量 (μ g)	AHR		粘液		AMCase	
		抵抗 (SEM)	抑制%	Muc5ac 単位 (SEM)	抑制%	任意の単位 (SEM)	抑制%
PBS	0	7.2 (0.77)	-0-	768.2 (108)	-0-	316.5 (43)	-0-
13C5.5	1000	4.6 (0.3)	86.8	412.9 (77.3)	46	147 (27)	54
BAK502G9	1000	5.9 (0.38)	41.7	627.8 (59.7)	18	279.4 (28.5)	12
MJ2-7	1000	5.9 (0.67)	42.5	380 (48.5)	50.5	169 (20)	47

【0300】

(実施例2.4.2)

OVA誘発性ぜん息マウスモデルにおけるIL-13抗体の生体内での有効性

(特に、IL-13 R₂に関する)受容体遮断性がmAbの生体内での有効性に影響を及ぼすかどうかをぜん息マウスモデルにおいて判定するために、mIL-13 R₁/Fc及びmIL-13 R₂/Fcタンパク質 (R&D Systems)を用いた受容

体結合 E L I S A によって測定して異なる受容体遮断性を示すラット抗マウス I L - 1 3 抗体のパネルを作製した (表 2 1 参照)。抗 h I L - 1 3 m A b 3 H 7 は、マウス I L - 1 3 と交差反応するので、その抗 m I L - 1 3 特性も表 2 1 に示した。マウス I L - 1 3 に対する抗体の結合親和性を組換えマウス I L - 1 3 (R & D S y s t e m s) に対する B I A C O R E アッセイによって測定し、マウス I L - 1 3 に対する抗体の効力 (I C 5 0) を組換えマウス I L - 1 3 に対する A - 5 4 9 バイオアッセイによって求めた。5 1 D 9 及び 4 8 D 3 の可変ドメイン配列を表 2 2 に示す。

【 0 3 0 1 】

【表 2 2】

表 2 1. 抗 m I L - 1 3 モノクローナル抗体の特性分析

クローン#	アイソタイプ	K _D (M)	I C ₅₀ (M)	に対するマウス IL-13 の結合を 阻止	
				mIL-13Rα1	mIL-13Rα2
3H7	マウス IgG1	1.12E-08	2.43E-9	阻止	阻止
51D9	ラット IgG1 κ	1.45E-10	3.43E-10	阻止	阻止
48D3	ラット IgG1 κ	1.05E-10	4.91E-11	阻止	阻止せず
53F5	ラット IgG1 κ	2.82E-10	2.89E-10	阻止せず	阻止せず
74H2	ラット IgG2a κ	3.92E-10	9.76E-10	阻止せず	阻止せず
25C7	ラット IgG2a λ	4.22E-10	6.09E-10	阻止	阻止
54D1	ラット IgG1 κ	3.40E-11	2.40E-11	阻止	阻止

【 0 3 0 2 】

【表 2 3】

表 2 2. ラット抗 m I L - 1 3 m A b の V H 及び V L 領域のアミノ酸配列リスト

配列 番号	タンパク質領域	配 列
		123456789012345678901234567890
86	VH 51D9	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFT DYAMHWVKQAPGKGLKWMWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLEASASTATLQISNLKNE TATYFCAR AGRTEGTHYYAMDAWGQ TSVT VSS
87	VL 51D9	DIVLTQSPVLAIVSLGQRATISCRASQSVSI SSSDLMHWYQQRPGHQPKLLIYRTSNLVSG IPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIAAYY CQQGRES PWTFGGG TKLE LKR
88	VH 48D3	EVQLVESGGDLVQPGRLSLKLSKAASGFTFS DYYMAWVRQAPTKGLEWVASISNDGISTYY RDSVKGRFTISREKAKSSLYLQMDSLRSED TATYYCTT WNWEFGFFDY WGQGVMTVSA
89	VL 48D3	DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTI SRYNRMHWYQQRPGQPKLLIYRSSYLASG IPARFSGSGSGTDFTLTITYPVQADDIATYY CQONRES PWTFGGG TKLE LNLR

【 0 3 0 3 】

ネズミゼン息モデルにおける生体内での有効性の試験では、動物 (雌性 B a l b / c マウス) を T a c o n i c から購入し、A b b o t t B i o r e s e a r c h C e n t e r で飼育し、8 - 1 2 週齢で利用した。プロトコルはすべて I A C U C によって認可された。ミョウバン (P i e r c e) 2 m g 中の O V A (S i g m a 、 D e t o x i G e l (P i e r c e) を製造者の手順に従って用いて内毒素を卵白アルブミンから除去し、最

10

20

30

40

50

終材料中のタンパク質は0.1 EU/mg未満であった。) 8 µgの腹腔内注射によって、マウスを0及び7日目にOVAに対して感作させた。14及び16日目に、無菌PBS 50 ml中のOVA 0.3 mgを動物に鼻腔内投与した。(標準手順に従ってハイブリドーマクローン51D9及び48D3の上清から精製し、タンパク質含量が0.1 EU/mg未満であり、PCR試験によってげっ歯類病原体に対して陰性であった) 抗体51D9及び48D3を、無菌PBS中の単一腹腔内注射として13日目に投与した。デキサメタゾン(Sigma)を13-17日目に用量3 mg/kgで1日1回経口投与した。全エンドポイントを17日目に、2回目のOVA投与から24時間後に分析した。気道過敏性(AHR)を全身プレチスモグラフィによって評価した。手短に述べると、外科的麻酔レベル(surgical plane of anesthesia)をケタミン及びキシラジンの腹腔内注射によって誘導した。気管カニューレを第3気管輪と第4気管輪の間に外科的に挿入した。臭化パンクロニウムの頸静脈注射によって自発呼吸を停止させ、動物を全身プレチスモグラフ(Buxco)中に配置し、従量式人工呼吸器(Harvard Apparatus)を用いて室内気0.2 mlを150呼吸/分で人工呼吸した。肺の圧力、及びプレチスモグラフ内の流れを変換器によって測定し、Biosystem Xaソフトウェアを用いて圧力/流れとして肺抵抗を計算した。ベースライン抵抗、及びインライン超音波ネブライザーによって送達されたメタコリン(3、10及び30 mg/ml)投与後の抵抗を測定した。肺機能試験終了後、肺を無菌PBS 0.5 mlで4回洗浄した。洗浄液をTARC、AMCase及び細胞浸潤物について分析した。試験の終局において抗体レベルの定量化のために血清を収集した。

10

20

【0304】

ネズミTARCレベルをELISA(R&D)によって製造者の手順に従って測定した。AMCase活性を、80 µM 4-メチルウンベリフェリル-D-N, N'-ジアセチルキトピオシドの存在下で、気管支肺泡洗浄(BAL)液(0.01% BSAで1から10希釈、30 mMクエン酸ナトリウム、60 mMリン酸ナトリウム、pH 5.2中で測定した。反応物を室温で15分間温置し、1 Mグリシン/NaOH pH 10.6 100 µLを添加してクエンチした。Fluoroskan Ascent 蛍光光度計を用いて、385 nmで励起し、460 nmにおける蛍光発光によって、生成物の形成を測定した。杯細胞過形成を評価するために、肺を10%中性緩衝ホルマリンで高さ22 cmに15分間膨張させて、肺表面の面積を一定にした。切片をパラフィンに包埋し、薄片にし、過ヨウ素酸シッフ(PAS)で染色した。左肺の主気管支に沿ったPAS陽性細胞の面積を、ImagePro Plus Softwareを用いて定量した。Muc5acレベルをELISAによって測定した。96ウェルプレートにBAL液で被覆し、終夜乾燥させ、次いでビオチン化抗Muc5ac抗体を添加し、HRP複合ストレプトアビジンを用いて検出し、続いて比色基質TMBを開裂させた。

30

【0305】

ぜん息の病原に対するIL-13R 1と2の相対寄与度を、マウスにおける卵白アルブミン誘発性ぜん息の標準モデルで試験した。1と2の両方の受容体に対するIL-13の結合を阻止した抗体(それぞれ340、24及び2430 pMの効力を有する51D9、54D1及び3H7)、及び1受容体のみに対するIL-13の結合を阻止した抗体(48D3、50 pMの効力)を、卵白アルブミンの局所投与の1日前に動物を抗体で処理することによって試験した。結果を表23に示す。OVA投与は、メタコリン投与後の肺抵抗、BAL液中のMuc5acレベルの増加によって測定される粘液分泌過多の増加を誘導し、組織学的評価による上皮細胞のPAS陽性染色の増加、肺の好酸球及びT細胞浸潤、並びにぜん息関連タンパク質AMCase及びTARCの産生を誘導した。

40

【0306】

IL-13R 1と2の両方に対するIL-13の結合を阻止した抗体はすべて、試薬の有効性及び生体内での効力が、測定されたインビトロでの効力に従って変化することが実証された。51D9を100、300及び1000 µg/マウスの用量で試験した。OVA処理によって、30 mg/mlメタコリン投与後の気道抵抗は、非ぜん息性動物に

50

おける $3.6 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ と比較して、 $6.2 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ に増加した。マウスを 51D9 で処理すると、肺抵抗の増加は、非ぜん息性対照動物において認められた値である用量 100 、 300 及び $1000 \mu\text{g}$ に対してそれぞれ 4.1 、 4.0 及び $3.5 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ ($n = 8 - 10$ / 群、 $p < .05$) に類似した値で完全に防止された。 51D9 を用いて認められた抑制量は、ステロイド処置で得られた抑制量に匹敵した ($3.3 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$)。 51D9 処理は、 $51\text{D9} \quad 1000 \mu\text{g}$ で処理した動物において、粘液分泌過多も 404 単位 Muc5ac から 55U に用量依存的に抑制した。粘液分泌過多の抑制は、 PAS 反応性上皮細胞の組織学的評価によっても認められた。陽性細胞率の面積は、 51D9 抗体の用量 300 及び $1000 \mu\text{g}$ で 1.0% からそれぞれ 0.6% 及び 0.5% に減少し、 $47 - 65\%$ の減少を示した ($n = 8$ 、 $p < .01$)。 51D9 処理は、 TARC 及び AMCase も抑制した。 OVA 投与は、 $1000 \mu\text{g}$ の 51D9 処理によって 7.8 pg/ml に減少する $\text{TARC} \quad 61 \text{ pg/ml}$ を誘導した ($n = 10$ 、 $p < .05$)。 OVA 投与は、 51D9 を用いて抗体 100 、 300 及び $1000 \mu\text{g}$ でそれぞれ 52 、 45 及び 21U に用量依存的に減少した AMCase 活性 96 (任意の単位) を誘導した ($n = 9 - 10$ 、 $p < .01$)。 10 倍のインビトロ効力 (24 pM) を有する 54D1 は、用量 $30 \mu\text{g}$ で AHR を抑制し、気道抵抗は $6.58 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ から $4.4 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ に減少し、最大抑制は、抗体 $300 \mu\text{g}$ の処理で認められ、気道抵抗は $3.65 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ の値に減少した。類似の効力は、粘液、 AMCase 及び TARC 産生の抑制においても認められた。 2.5 nM の効力を有する第3の抗体 3H7 も、 AHR 、粘液及び AMCase レベルを抑制したが、用量 $1000 \mu\text{g}$ の抗体処理においてのみであり、インビトロバイオアッセイにおいて記述した効力の 10 倍の変化と一致した。

【0307】

$\text{IL-13R} \quad 1$ のみに対する IL-13 の結合を阻止する抗体の有効性を、抗体 48D3 を用いて試験した。動物を 30 、 100 、 300 及び $1000 \mu\text{g}$ / マウスで処理した。 OVA 投与によって、気道抵抗は、 PBS で処理した非ぜん息性動物における $4.1 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ に比較して、 $5.69 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ に上昇した。 $48\text{D3} \quad 30 \mu\text{g}$ による処理は、 OVA によって誘発される肺抵抗に効果がなかったが、 $48\text{D3} \quad 100$ 、 300 及び $1000 \mu\text{g}$ による処理は、 OVA によって誘発される肺抵抗の変化を、最大 $4.4 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ に、又は OVA 対照レベルの約 80% に抑制した ($n = 10$ 、 $p < .05$)。 51D9 で認められた効果とは対照的に、 48D3 は、 Muc5ac ELISA 又は PAS 反応性上皮細胞によって測定して、 OVA によって誘発される粘液分泌過多を抑制しなかった。わずかではあるが統計学的に有意な粘液の減少 (30%) が $30 \mu\text{g}$ 用量の 48D3 処理で認められたのに対して、他の用量はすべて、 OVA を投与した動物と同等であった。 PAS 陽性染色の組織学的定量化は、 OVA を投与した動物において 0.6% であり、 OVA を投与し、 $48\text{D3} \quad 1000 \mu\text{g}$ で処理した動物において 0.8% であった。これらの試験においては、 48D3 は、 OVA によって誘発される AMCase の発現を、 OVA で処理した動物において検出された 196U から用量 30 、 100 、 300 及び $1000 \mu\text{g}$ においてそれぞれ 63 、 90 、 87 及び 96U に抑制した。抗体レベルの分析によれば、類似レベルの 48D3 と 51D9 が、抗体で処理したマウスの血清と BAL 液の両方で検出可能であった。 48D3 抗体の効力が 51D9 抗体の 7 倍であり、これら2種類の抗体の曝露が同等であるにもかかわらず、 48D3 抗体は、 $\text{IL-13R} \quad 1$ 及び 2 に対する IL-13 の結合を阻止した抗体と同程度には AHR 又は AMCase を抑制することができず、粘液産生を低下させることができなかった。まとめると、これらのデータは、 $\text{IL-13R} \quad 2$ が、 OVA によって誘発される粘液分泌過多の媒介に中心的役割を果たし、 $\text{IL-13R} \quad 2$ がぜん息性表現型の生体内での調整に寄与することを示唆している。

【0308】

【表 2 4】

表 2 3 : 卵白アルブミン誘発性ぜん息のネズミモデルにおける抗マウス I L - 1 3
抗体の効力

抗体	用量	AHR		粘液		AMCase		TARC	
		抵抗	抑制 %	Muc5ac 単位	抑制 %	任意の単位	抑制 %	pg/ml	抑制 %
54D1	0	6.585 (.89)	-0-	573 (96.2)	-0-	112.1 (19.3)	-0-	141 (43.2)	-0-
	30	4.486 (0.3)*	34	203 (22)*	65	30.8 (4.8)*	72.5	38.3 (10.6)*	63
	100	4.2 (0.32)*	37	153 (44)*	74	14.4 (2.7)*	87.3	23.8 (7.3)*	83
	300	3.65 (0.22)*	45	77.3 (6.9)*	87	11.0 (1.5)*	90.2	17.2 (4.5)*	88
	1000	3.58 (0.34)*	46	79 (8.5)*	87	10.4 (1.2)*	90.1	20 (12.3)*	86
51D9	0	6.24 (1.4)	-0-	409.2 (36.4)	-0-	97.6 (11)	-0-	61.8 (12.1)*	-0-
	100	4.13 (0.91)*	33.8	188.8 (24.8)*	54	52.9 (10.9)*	46	25.2 (12.8)*	60
	300	4.06 (0.32)*	34.8	180.8 (32.4)*	56	45.8 (13.7)*	53	23.1 (12.9)*	62
	1000	3.57 (0.78)*	43	55.1 (23.4)*	87	21.2 (7.8)*	79	7.8 (4.2)*	87
3H7	0	7.9 (1.2)	-0-	965 (59.9)	-0-	129.7 (17.2)	-0-	173.9 (32.0)	-0-
	1000	6.02 (0.31)*	24	587 (48.4)*	40	78.18 (12.3)*	40	77.3 (18.5)*	56
48D3	0	5.69 (0.42)	-0-	666.7 (74.7)	-0-	196.6 (35.5)	-0-	NT	
	30	5.288 (0.43)	8.1	445.4 (33.8)*	34	63.1 (18.2)*	68	NT	
	100	4.5 (0.42)*	19.5	567.5 (62.6)	15	90.4 (15.4)*	54	NT	
	300	5.25 (0.42)	14.1	606.3 (71.2)	9	87.4 (19.6)*	55	NT	
	1000	4.4 (0.33)*	20.7	534.9 (31)	20	96.5 (10.4)*	51	NT	

* は、 $p < .05$ 、ANOVAを示す。

【配列表】

[2010502224000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/19660																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 21/08; C07H 21/00 (2009.01) USPC - 530/388.23; 536/23.53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12P 21/08; C07H 21/00 (2009.01) USPC - 530/388.23; 536/23.53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/158.1; 435/243; 435/252.33; 435/254.11; 435/254.2; 435/254.21; 435/325; 435/348; 435/349; 435/358; 435/365; 435/419; 435/69.6; 514/12; 530/350; 530/387.1; 530/387.3; 530/388.1; 530/391.3; 530/391.7; 536/23.53; 424/145.1; 530/388.23 435/69.1; 435/320 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Interleukin-13, IL-13, antibody, binding protein, inhibitor, agonist, ligand, immunoglobulin, constant domain, light chain, heavy chain, crystallized antibody, carrier-free, controlled release, adjuvant, hyaluronidase, GenCore version 6.3 (all DB); SEQ ID NO:32, 33, 4, 6, 46, 47, 70, 71, 80, 81																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2008/0063228 A1 (Kasarian, et al) 23 Mar 2006 (23.03.2006); abstract; SEQ ID NO: 23, 21, Table 1, pg 14, col 2; SEQ ID NO: 29, 27, pg 46, 47; claims 33, 43; Fig 19; para [0010], [0014], [0029], [0042], [0055], [0056], [0076], [0094], [0097], [0101], [0107], [0131], [0134], [0147], [0150], [0153], [0154], [0170], [0172], [0177], [0178], [0189], [0197]-[0199], [0206], [0212], [0216]-[0218], [0246], [0271], [0287], [0302]</td> <td>1, 2, 16, 23-25, 27-33, 37-50, 52, 53, 58, 59, 61-69 26, 34-36, 40, 51, 54-57, 60</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2004/0096452 A1 (Denney) 20 May 2004 (20.03.2004); SEQ ID NO: 49 pg 53, 54; para [0336]</td> <td>26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2003/0175261 A1 (Welckmann) 18 Sep 2003 (18.09.2003); para [0060]</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2005/0147610 A1 (Ghayur, et al.) 07 Jul 2005 (07.07.2005); para [0104], [0105]</td> <td>34-36, 40, 51, 54-57</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2005/0065327 A1 (Monk, et al.) 24 Mar 2005 (24.03.2005)</td> <td>1-69</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2008/0063228 A1 (Kasarian, et al) 23 Mar 2006 (23.03.2006); abstract; SEQ ID NO: 23, 21, Table 1, pg 14, col 2; SEQ ID NO: 29, 27, pg 46, 47; claims 33, 43; Fig 19; para [0010], [0014], [0029], [0042], [0055], [0056], [0076], [0094], [0097], [0101], [0107], [0131], [0134], [0147], [0150], [0153], [0154], [0170], [0172], [0177], [0178], [0189], [0197]-[0199], [0206], [0212], [0216]-[0218], [0246], [0271], [0287], [0302]	1, 2, 16, 23-25, 27-33, 37-50, 52, 53, 58, 59, 61-69 26, 34-36, 40, 51, 54-57, 60	Y	US 2004/0096452 A1 (Denney) 20 May 2004 (20.03.2004); SEQ ID NO: 49 pg 53, 54; para [0336]	26	Y	US 2003/0175261 A1 (Welckmann) 18 Sep 2003 (18.09.2003); para [0060]	60	Y	US 2005/0147610 A1 (Ghayur, et al.) 07 Jul 2005 (07.07.2005); para [0104], [0105]	34-36, 40, 51, 54-57	A	US 2005/0065327 A1 (Monk, et al.) 24 Mar 2005 (24.03.2005)	1-69
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X — Y	US 2008/0063228 A1 (Kasarian, et al) 23 Mar 2006 (23.03.2006); abstract; SEQ ID NO: 23, 21, Table 1, pg 14, col 2; SEQ ID NO: 29, 27, pg 46, 47; claims 33, 43; Fig 19; para [0010], [0014], [0029], [0042], [0055], [0056], [0076], [0094], [0097], [0101], [0107], [0131], [0134], [0147], [0150], [0153], [0154], [0170], [0172], [0177], [0178], [0189], [0197]-[0199], [0206], [0212], [0216]-[0218], [0246], [0271], [0287], [0302]	1, 2, 16, 23-25, 27-33, 37-50, 52, 53, 58, 59, 61-69 26, 34-36, 40, 51, 54-57, 60																		
Y	US 2004/0096452 A1 (Denney) 20 May 2004 (20.03.2004); SEQ ID NO: 49 pg 53, 54; para [0336]	26																		
Y	US 2003/0175261 A1 (Welckmann) 18 Sep 2003 (18.09.2003); para [0060]	60																		
Y	US 2005/0147610 A1 (Ghayur, et al.) 07 Jul 2005 (07.07.2005); para [0104], [0105]	34-36, 40, 51, 54-57																		
A	US 2005/0065327 A1 (Monk, et al.) 24 Mar 2005 (24.03.2005)	1-69																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 03 Feb 2009 (03.02.2009)		Date of mailing of the international search report 09 FEB 2009																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/19660

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

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

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

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

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

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

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

Group I, claims 1-69, wherein claim 2 is limited to residues 31-35 of SEQ ID NO: 32; claim 4 - to the VH 25C8 variable domain CDR set; claim 6 - to VH 25C8 and VL 25C8 CDR sets; claim 8 - to SEQ ID NO: 6; claims 13 and 15 - to SEQ ID NO: 70; claim 14- SEQ ID NO: 70 and 71.

Group II+, claims 1-69. Should additional fee be paid, Applicant is invited to make an election of SEQ ID NOs of claims 4, 6, 8, 13-15 to be searched.

Group III, claims 70-103, drawn to an anti-IL13 isolated antibody or antigen binding fragment thereof.

***** SEE SUPPLEMENTAL PAGE TO CONTINUE *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Claims 1-69, limited to VH 25C8 CDR, VH 13CS CDR, VL 13CS CDR Sets and SEQ ID NO: 70, 71, 80, 81.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 07/19660

***** SUPPLEMENTAL PAGE *****

BOX III. Observations where unity of invention is lacking:

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Although Groups I-III do share the technical feature of an anti-IL13 isolated antibody or antigen binding fragment thereof, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of US 2006/0140948 A1 to Foltz, et al. (29 Jun 06) that teaches fully human monoclonal anti-IL-13 antibodies (abstract) inhibiting binding of IL-13 to IL-13 receptor alpha 1 (para [0008]). As the above antibody were known at the time of the invention, as evidenced by the teaching of Foltz et al., this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, the sequences of groups I and II+ are patentably distinct because they are unrelated sequences and antibodies comprising said sequences differ in structure and in biological activity.

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

4 H 0 4 5

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	A
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	38/43	(2006.01)	A 6 1 K	37/48	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/14	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	15/08	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	

A 6 1 P 25/32	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/30	(2006.01)	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 33/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 19/10	(2006.01)	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P 33/06	
G 0 1 N 33/566	(2006.01)	A 6 1 P 19/10	
G 0 1 N 33/543	(2006.01)	A 6 1 P 13/08	
C 0 7 K 14/54	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
		G 0 1 N 33/566	
		G 0 1 N 33/543	5 9 5
		C 0 7 K 14/54	

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

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ウー , チヨンビン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 5 4 5、シユールズベリー、プロスペクト・ストリート・ 3 8 6

(72)発明者 デイクソン , リチャード・ダブリュ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 5 2 2、ジェファアソン、ノッティンガム・ドライブ・ 1 9

(72)発明者 ベルク , ジヨナサン・ピー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 5 6 4、スターリング、ピーマン・ロード・ 8 9

(72)発明者 イン , ホワ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 5 2 0、ホールデン、タイラー・ドライブ・ 1 5

(72)発明者 アーヅリアデイ , マリア・エイ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 7 7 8、ウエイランド、メイン・ストリート・ 2 7 3

(72)発明者 カフ , キヤロリン・エイ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 5 1 9、グラフトン、エリオット・トレール・ 2 3

(72)発明者 ヒントン , ボール・アール
アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 0 8 5、サニーバイル、ダンスミュー・テラス・ 3 2 1・ナンバー・ 4

(72)発明者 クマール , シャンカール
アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 5 8 8、プレゼントン、クラル・プレイス・ 3 9 3 0

(72)発明者 メリム , テリー・エル
アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・ 0 3 0 3 8、デリー、サニーサイド・レイン・ 1 6・ピー

(72)発明者 チエン , ヤン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・ 9 4 5 3 6、フリモント、セントラル・アベニュー・ 4 8 6 1、アパートメント・ 2 0 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA44 BA56 BA61 BA63 CA04 CA07 CA20
DA02 EA04 GA03 GA08 GA09 GA11 GA18 GA25 HA01 HA03
HA20
4B064 AG26 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 CE12 DA01
DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA90X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02
BA16 BD14 CA24 CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA19 BA02 BA03 BA44 CA62 DC01 DC50 MA02 NA14
ZA022 ZA122 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA332 ZA342 ZA362 ZA402
ZA422 ZA452 ZA532 ZA552 ZA592 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA922
ZA942 ZA962 ZA972 ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272
ZB332 ZB352 ZB382 ZC022 ZC062 ZC312 ZC352 ZC392 ZC552
4C085 AA13 AA14 AA16 BB17 CC02 DD23
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA42 BA50 BA70 BA71 BA72
CA40 DA50 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	白细胞介素13结合蛋白		
公开(公告)号	JP2010502224A	公开(公告)日	2010-01-28
申请号	JP2009527451	申请日	2007-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ウーチヨンビン デイクソンリチャードダブリュ ベルクジヨナサンピー インホワ アーヅリアデイマリアエイ カフキャロリンエイ ヒントンポールアール クマールシャンカール メリムテリーエル チエンヤン		
发明人	ウー,チヨンビン デイクソン,リチャード・ダブリュ ベルク,ジヨナサン・ピー イン,ホワ アーヅリアデイ,マリア・エイ カフ,キャロリン・エイ ヒントン,ポール・アール クマール,シャンカール メリム,テリー・エル チエン,ヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 A61K38/43 A61K45/00 A61K39/395 A61P43/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P37/08 A61P31 /12 A61P17/00 A61P27/16 A61P1/04 A61P29/00 A61P37/02 A61P1/16 A61P35/00 A61P31/18 A61P19 /02 A61P31/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P17/06 A61P9/10 A61P7/04 A61P33/00 A61P25/14 A61P25 /16 A61P25/28 A61P7/06 A61P9/04 A61P17/14 A61P31/20 A61P15/08 A61P19/06 A61P25/24 A61P35 /02 A61P13/12 A61P21/04 A61P9/12 A61P37/06 A61P17/02 A61P9/06 A61P25/02 A61P25/32 A61P25 /30 A61P27/02 A61P33/06 A61P19/10 A61P13/08 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/543 C07K14/54		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9 /00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P13/12 A61P15 /08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P25/32 A61P27 /02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14 /47 C07K16/244 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317 /92 Y02A50/385 Y02A50/401 Y02A50/409 Y02A50/411 Y02A50/463 Y02A50/473 Y02A50/478 Y02A50 /481 A61K39/3955 C07K2317/14 C07K2317/56 C12N15/63 C12P21/00 A61K39/39558 A61K2300/00 C07K14/4702 A01H1/02 A01H1/08 A61K45/06 C07K14/415 C12N15/8218 C12N15/8287		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C A61K37/02 A61K37/48 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P11/00 A61P11/06 A61P37/08 A61P31/12 A61P17/00 A61P27/16 A61P1/04 A61P29/00 A61P37 /02 A61P1/16 A61P35/00 A61P31/18 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P31/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P17/06 A61P9/10.101 A61P7/04 A61P33/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P7/06 A61P9		

/04 A61P9/10 A61P17/14 A61P31/20 A61P15/08 A61P19/06 A61P25/24 A61P35/02 A61P13/12
A61P21/04 A61P9/12 A61P37/06 A61P17/02 A61P9/06 A61P25/02 A61P25/32 A61P25/30 A61P27/02
A61P33/06 A61P19/10 A61P13/08 G01N33/53.P G01N33/566 G01N33/543.595 C07K14/54

F-TERM分类号 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA44 4B024/BA56 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024
/CA04 4B024/CA07 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA08 4B024/GA09
4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA25 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA20 4B064/AG26 4B064
/AG27 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12
4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X
4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA16 4B065/BD14 4B065
/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA19 4C084/BA02 4C084/BA03
4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/DC01 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084
/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084
/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084
/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA922 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084
/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084
/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB382 4C084/ZC022 4C084/ZC062 4C084/ZC312 4C084
/ZC352 4C084/ZC392 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB17 4C085
/CC02 4C085/DD23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA42
4H045/BA50 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045
/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26

代理人(译) 小野 诚
金山 贤教
Masarushin大崎

优先权 60/843249 2006-09-08 US

其他公开文献 JP2010502224A5

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明包括IL-13结合蛋白。具体地，本发明涉及嵌合，CDR移植和人源化抗体的抗体。优选的抗体对hIL-13具有高亲和力并在体外和体内中和hIL-13活性。本发明的抗体可以是全长抗体或其抗原结合部分。还提供了制备方法和使用本发明抗体的方法。本发明的抗体或抗体部分可用于检测hIL-13和抑制hIL-13活性，例如，在患有hIL-13活性有害的病症的人类受试者中。

VH 25C8 CDRセット	
VH 25C8 CDR-H1	配列番号32の残基31-35
VH 25C8 CDR-H2	配列番号32の残基50-66
VH 25C8 CDR-H3	配列番号32の残基99-105
VL 25C8 CDRセット	
VL 25C8 CDR-L1	配列番号33の残基24-39
VL 25C8 CDR-L2	配列番号33の残基55-61
VL 25C8 CDR-L3	配列番号33の残基94-102
VH 9C11 CDRセット	
VH 9C11 CDR-H1	配列番号34の残基31-35
VH 9C11 CDR-H2	配列番号34の残基50-66
VH 9C11 CDR-H3	配列番号34の残基99-105
VL 9C11 CDRセット	
VL 9C11 CDR-L1	配列番号35の残基24-39
VL 9C11 CDR-L2	配列番号35の残基55-61
VL 9C11 CDR-L3	配列番号35の残基94-102
VH 21D9 CDRセット	
VH 21D9 CDR-H1	配列番号36の残基31-35
VH 21D9 CDR-H2	配列番号36の残基50-66
VH 21D9 CDR-H3	配列番号36の残基99-109
VL 21D9 CDRセット	
VL 21D9 CDR-L1	配列番号37の残基24-39
VL 21D9 CDR-L2	配列番号37の残基55-61
VL 21D9 CDR-L3	配列番号37の残基94-102
VH 22D10 CDRセット	
VH 22D10 CDR-H1	配列番号38の残基31-35
VH 22D10 CDR-H2	配列番号38の残基50-66
VH 22D10 CDR-H3	配列番号38の残基99-109
VL 22D10 CDRセット	
VL 22D10 CDR-L1	配列番号37の残基24-39
VL 22D10 CDR-L2	配列番号37の残基55-61
VL 22D10 CDR-L3	配列番号37の残基94-102
VH 5F1 CDRセット	
VH 5F1 CDR-H1	配列番号39の残基31-35
VH 5F1 CDR-H2	配列番号39の残基50-66
VH 5F1 CDR-H3	配列番号39の残基99-112
VL 5F1 CDRセット	
VL 5F1 CDR-L1	配列番号40の残基24-39
VL 5F1 CDR-L2	配列番号40の残基55-61
VL 5F1 CDR-L3	配列番号40の残基94-102