(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2018-516853

(P2018-516853A)

(43)公表日　平成30年6月28日(2018.6.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/54	(2006.01)	C07K	14/54	ZNA	4B063
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B064
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4B065
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C084
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 225 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-551294 (P2017-551294)
(86)(22)出願日　平成28年3月30日 (2016.3.30)
(85)翻訳文提出日　平成29年10月20日 (2017.10.20)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/056973
(87)国際公開番号　WO2016/156440
(87)国際公開日　平成28年10月6日 (2016.10.6)
(31)優先権主張番号　62/140,913
(32)優先日　平成27年3月31日 (2015.3.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

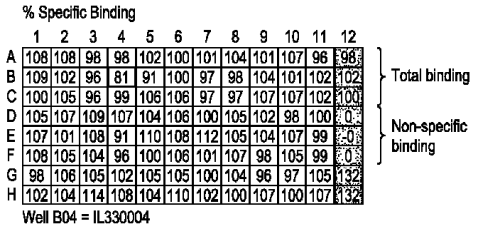
(71)出願人　508098350
メドイミューン・リミテッド
Ｍｅｄｌｍｍｕｎｅ　Ｌｉｍｉｔｅｄ
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジ、グランタ・パーク、ミルスタイン・ビルディング
Ｍｉｌｓｔｅｉｎ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ，Ｇｒａｎｔａ　Ｐａｒｋ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　ＣＢ２１　６ＧＨ，Ｅｎｇｌａｎｄ
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井　陽子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規ＩＬ３３型、変異型のＩＬ３３、抗体、アッセイ及びそれらの使用方法

(57)【要約】
本発明は、単離ＩＬ－３３タンパク質、その活性断片及びＩＬ－３３タンパク質に対する抗体、その抗原結合断片を提供する。また、例えば免疫障害及び炎症障害の治療のため、サイトカイン活性を調節する方法も提供される。

FIG. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＩＬ－３３タンパク質内の天然システイン間のジスルフィド架橋の形成を低減し又は消失させる修飾によって還元型で安定化した単離ＩＬ－３３タンパク質又はその活性断片。
【請求項２】
（ｉ）１つ以上の天然システインが代替アミノ酸に置換されている；
（ｉｉ）１つ以上の天然システインが欠失している；
（ｉｉｉ）１つ以上の天然システインが化学的実体にコンジュゲートしている、
修飾によって還元型で安定化した単離ＩＬ－３３タンパク質又はその活性断片。
【請求項３】
１つ以上のシステインが非システインアミノ酸に置換され、例えばＣｙｓ－２０８、Ｃｙｓ－２２７、Ｃｙｓ－２３２及びＣｙｓ－２５９から選択される１、２、３又は４個のシステインが置換されるように前記タンパク質が突然変異している、請求項１又は２に記載の単離ＩＬ－３３タンパク質又はその活性断片。
【請求項４】
１つ以上のシステイン残基がセリン残基に置換されている、請求項３に記載の単離ＩＬ－３３タンパク質又はその活性断片。
【請求項５】
ｒｅｄＩＬ－３３タンパク質の活性を減弱させ又は阻害する結合分子。
【請求項６】
ｒｅｄＩＬ－３３からＩＬ－３３　ＤＳＢへの酸化を触媒する、請求項５に記載の結合分子。
【請求項７】
ＩＬ－３３－ＤＳＢに結合する、請求項６に記載の結合分子。
【請求項８】
抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項５～７のいずれか一項に記載の結合分子。
【請求項９】
配列番号１８３、配列番号１８４及び配列番号１８５のＶＨ　ＣＤＲ１～３を有する可変重鎖ドメイン（ＶＨ）及び可変軽鎖ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項５～８のいずれか一項に記載の結合分子であって、１つ以上のＶＨＣＤＲが３個以下の単一アミノ酸置換を有する、結合分子。
【請求項１０】
配列番号１８３、配列番号１８４及び配列番号１８５のＶＨＣＤＲ１～３を含む、請求項８に記載の結合分子。
【請求項１１】
配列番号１８８、配列番号１８９及び配列番号１９０のＶＬＣＤＲ１～３を有するＶＬ及びＶＨを含む、請求項５～１０のいずれか一項に記載の結合分子であって、１つ以上のＶＬＣＤＲが３個以下の単一アミノ酸置換を有する、結合分子。
【請求項１２】
配列番号１８８、配列番号１８９及び配列番号１９０のＶＬＣＤＲ１～３を含む、請求項１１に記載の結合分子。
【請求項１３】
配列番号１８３の配列を有するＶＨＣＤＲ１、配列番号１８４の配列を有するＶＨＣＤＲ２、配列番号１８５の配列を有するＶＨＣＤＲ３、配列番号１８８の配列を有するＶＬＣＤＲ１、配列番号１８９の配列を有するＶＬＣＤＲ２、及び配列番号１９０の配列を有するＶＬＣＤＲ３を含む、請求項５～１２のいずれか一項に記載の結合分子。
【請求項１４】
ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片であって、前記抗体又はその抗原結合断片のＶＨ及びＶＬが、それぞれ配列番号１８２及び配列番号１８７と少なくとも９５％、９０％、又は８５％同一のアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合断

片。
【請求項１５】
配列番号１８２の配列を有するＶＨ及び配列番号１８７の配列を有するＶＬを含む、請求項１４に記載の抗体又はその抗原結合断片。
【請求項１６】
請求項１～４のいずれか一項に記載のＩＬ－３３タンパク質に結合する、請求項５に記載の結合分子。
【請求項１７】
野生型ｒｅｄＩＬ－３３に対して交差反応性を有する、請求項５又は１６に記載の結合分子。
【請求項１８】
野生型ｒｅｄＩＬ－３３に特異的に結合する、請求項１７に記載の結合分子。
【請求項１９】
配列番号５４３、配列番号５４４及び配列番号５４５のＶＨ　ＣＤＲを有する可変重鎖ドメイン（ＶＨ）及び可変軽鎖ドメイン（ＶＬ）を含む、請求項５又は１６～１８のいずれか一項に記載の結合分子であって、前記ＶＨＣＤＲの１つ以上が３個以下の単一アミノ酸置換を有する、結合分子。
【請求項２０】
配列番号５４３、配列番号５４４及び配列番号５４５のＶＨＣＤＲ１～３を含む、請求項１９に記載の結合分子。
【請求項２１】
配列番号５４８、配列番号５４９及び配列番号５５０のＶＬＣＤＲ１～３を有するＶＬ及びＶＨを含む、請求項５、１６～２０のいずれか一項に記載の結合分子であって、１つ以上のＶＬＣＤＲが３個以下の単一アミノ酸置換を有する、結合分子。
【請求項２２】
配列番号５４８、配列番号５４９及び配列番号５５０のＶＬＣＤＲ１～３を含む、請求項２１に記載の結合分子。
【請求項２３】
配列番号５４３の配列を有するＶＨＣＤＲ１、配列番号５４４の配列を有するＶＨＣＤＲ２、配列番号５４５の配列を有するＶＨＣＤＲ３、配列番号５４８の配列を有するＶＬＣＤＲ１、配列番号５４９の配列を有するＶＬＣＤＲ２、及び配列番号５５０の配列を有するＶＬＣＤＲ３を含む、請求項２０又は２２の結合分子。
【請求項２４】
ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片であって、前記抗体又はその抗原結合断片のＶＨ及びＶＬが、それぞれ配列番号５４２及び配列番号５４７と少なくとも９５％、９０％、又は８５％同一のアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。
【請求項２５】
配列番号５４２の配列を有するＶＨ及び配列番号５４７の配列を有するＶＬを含む、請求項２４に記載の抗体又はその抗原結合断片。
【請求項２６】
ＩＬ－３３ＤＳＢタンパク質の活性を減弱させる結合分子。
【請求項２７】
ＩＬ－３３　ＤＳＢが終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）に結合するのを阻止又は低減する、請求項２６に記載の結合分子。
【請求項２８】
抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項２６又は２７に記載の結合分子。
【請求項２９】
請求項５～８及び１６～２５のいずれか一項に記載の結合分子である、請求項２５～２７のいずれか一項に記載の結合分子。

【請求項３０】
ヒト抗体、キメラ抗体、及びヒト化抗体からなる群から選択される、請求項５～２９のいずれか一項に記載の結合分子又はその抗原結合断片。
【請求項３１】
天然に存在する抗体、ｓｃＦｖ断片、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及び一本鎖抗体からなる群から選択される、請求項５～２９のいずれか一項に記載の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片。
【請求項３２】
モノクローナル抗体である、請求項５～２９のいずれか一項に記載の結合分子、又は抗体又はその抗原結合断片。
【請求項３３】
請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド。
【請求項３４】
請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子、その抗原結合断片のＶＨをコードするポリヌクレオチド。
【請求項３５】
請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子、その抗原結合断片のＶＬをコードするポリヌクレオチド。
【請求項３６】
請求項３３～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項３７】
請求項３３～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド又は請求項３６に記載のベクターを含む組成物。
【請求項３８】
請求項３３～３５のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド又は請求項３６に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項３９】
少なくとも第１及び第２のベクターを含む宿主細胞であって、前記第１のベクターと前記第２のベクターとが同一でなく、前記第１のベクターが、免疫グロブリン重鎖可変領域をコードする請求項３４に記載のポリヌクレオチドを含み、及び前記第２のベクターが、免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードする請求項３５に記載のポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。
【請求項４０】
抗ＩＬ３３抗体又はその抗原結合断片の作製方法であって、請求項３８又は３９に記載の宿主細胞を培養する工程と、前記抗体又はその抗原結合断片を回収する工程とを含む、方法。
【請求項４１】
請求項４０に記載の方法によって作製される抗ＩＬ３３抗体又はその抗原結合断片。
【請求項４２】
試料中のｒｅｄＩＬ－３３発現の検出方法であって、
（ａ）細胞含有試料を単離する工程と；
（ｂ）前記試料を請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子、又はその抗原結合断片に接触させる工程と；
（ｃ）前記試料中における前記結合分子の結合を検出する工程と
を含む方法。
【請求項４３】
請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子又はその抗原結合断片と担体とを含む医薬組成物。
【請求項４４】

請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子又はその抗原結合断片と第２の治療剤とを含む併用製剤。
【請求項４５】
請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子若しくはその抗原結合断片又は請求項４３に記載の医薬組成物又は請求項４４に記載の併用製剤の、治療における使用。
【請求項４６】
炎症病態を有する対象の治療方法であって、請求項５～３２のいずれか一項に記載の結合分子若しくはその抗原結合断片又は請求項４３に記載の組成物の有効量を前記対象に投与する工程を含む方法。
【請求項４７】
前記結合分子又はその抗原結合断片がＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する、請求項４６に記載の対象の治療方法。
【請求項４８】
前記結合分子又はその抗原結合断片がＲＡＧＥ媒介効果を阻害する、請求項４６又は４７に記載の対象の治療方法。
【請求項４９】
前記結合分子又はその抗原結合断片がＩＬ－３３駆動サイトカイン産生及び／又はＲＡＧＥ媒介効果を阻害する、請求項４６～４８のいずれか一項に記載の対象の炎症反応の予防方法。
【請求項５０】
前記炎症病態がアレルギー性障害である、請求項４６～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記炎症病態が喘息又はＣＯＰＤである、請求項４６～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記炎症反応が前記対象の気道におけるものである、請求項４６～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
治療用抗体又はその抗原結合断片を同定する方法であって、ｒｅｄＩＬ－３３に結合する抗体又はその抗原結合断片を選択する工程を含み、前記抗体又はその抗原結合断片がｒｅｄＩＬ－３３タンパク質の活性を減弱させる、方法。
【請求項５４】
前記治療用抗体又はその抗原結合断片が、ヒト抗体、キメラ抗体、及びヒト化抗体からなる群から選択される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記治療用抗体又はその抗原結合断片が、天然に存在する抗体、ｓｃＦｖ断片、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及び一本鎖抗体からなる群から選択される、請求項５３又は５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記治療用抗体又はその抗原結合断片がモノクローナル抗体である、請求項５３～５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記治療用抗体又はその抗原結合断片が対象の炎症病態の治療又は予防に有効である、請求項５３～５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
前記炎症病態が喘息又は慢性閉塞性肺疾患である、請求項５７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本開示は、新規ＩＬ－３３型；ＩＬ－３３の新規突然変異体；前記タンパク質のいずれか一つに特異的な抗体などの結合タンパク質、詳細には前記型の存在量を調節することが可能な結合タンパク質；本開示に係るタンパク質又は抗体などの結合タンパク質を含む組成物；及びこれらのいずれか一つの、特に療法、例えば炎症性疾患の予防の治療における使用に関する。本明細書における開示はまた、異なるＩＬ－３３型を同定及び／又は定量化するためのアッセイにも関する。

【背景技術】

【０００２】

インターロイキン－３３（ＩＬ－３３）は、ＩＬ－１Ｆ１１とも称され、２型免疫応答に特有の細胞、サイトカイン、及び免疫グロブリンの生成を刺激するＩＬ－１サイトカインファミリーのメンバーである。ＩＬ－３３は、２つのドメイン、ホメオドメインとサイトカイン（ＩＬ－１様）ドメインとからなる２７０アミノ酸のタンパク質である。ホメオドメインには核移行シグナル（ＮＬＳ）が含まれる。ＩＬ－３３は、Ｔｈ２細胞、マスト細胞及び多種多様な他の細胞型に発現する受容体であるＳＴ２を介してシグナル伝達を媒介する。

【０００３】

Ｓｃｈｍｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．が、初めてＩＬ－３３をオーファン受容体ＳＴ２（ＩＬ－１Ｒ４とも称される）のリガンドとして同定した（Ｓｃｈｍｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２３（５）４７９－９０（２００５））。ＩＬ－３３受容体はヘテロ二量体分子で形成される。ＳＴ２とＩＬ－１Ｒアクセサリータンパク質（ＩＬ－１ＲＡｃＰ）とが二量化してＩＬ－３３受容体（ＳＴ２：ＩＬ－１ＲＡｃＰ）を形成する。ＩＬ－１ＲＡｃＰは、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－１Ｆ６、ＩＬ１Ｆ８、及びＩＬ１Ｆ９に対する受容体に共通する構成要素である。ＩＬ－１ＲＡｃＰは結合には必要ないが、シグナル伝達に決定的に重要である。ＩＬ－３３受容体のＴＩＲドメインが$MyD88$及びＴＲＡＦ６を動員し、この受容体シグナルがＮＦκＢ及びＭＡＰキナーゼ経路の活性化をもたらす（Ｏｂｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｌｌｅｒｇｏｌｏｇｙ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　５９：１４３－１６０（２０１０））。ＩＬ－３３受容体は他の受容体に関連している可能性もあり、マスト細胞上のｃ－ｋｉｔと相互作用することが報告されている（Ｄｒｕｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１１５：３８９９－３９０６（２０１０））。

【０００４】

最近になって、ＩＬ－３３は第２のＩＬ－３３受容体ヘテロ二量体複合体に結合することが示されている：ＳＴ２はまた、別のＩＬ－１Ｒファミリー分子、「シングルＩｇ　ＩＬ－１Ｒ関連分子」（ＳＩＧＩＲＲ）（Ｔｏｌｌ　ＩＬ－１Ｒ８（ＴＩＲ８）とも称される）とも複合体を形成してＳＴ２：ＳＩＧＩＲＲを形成する。ＳＩＧＩＲＲ／ＴＩＲ８は、ＩＬ－１Ｒ及びＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）媒介免疫応答の負の調節因子として働くと考えられている（Ｇａｒｌａｎｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：４３９－４６（２００９））。ＳＴ２：ＩＬ－１ＲＡｃＰとは対照的に、ＳＴ２：ＳＩＧＩＲＲはＩＬ－３３の負の調節因子として働くように見える（Ｏｂｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０））。

【０００５】

ＳＴ２受容体の唯一知られているリガンドがＩＬ－３３である（例えば、Ｓｃｈｍｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　２３（５）４７９－９０（２００５）；Ｃｈａｃｋｅｒｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７９（４）：２５５１－５（２００７）を参照のこと）。ＳＴ２受容体はベースライン時のＴｈ２細胞及びマスト細胞に発現し、両細胞型ともアレルギー性喘息の重要なメディエーターであることが知られている。細胞外型のＩＬ－３３はＳＴ２に結合することによって標的細胞を刺激し、続いてＮＦκＢ及びＭＡＰキナーゼ経路を活性化させ、これがサイトカイン及びケモカインの産生を含めた様々な機能的応答につながる。可溶性ＳＴ２（ｓＳＴ２）はデコイ受容体であって、ＩＬ－３３シグナル伝達を妨げると考えられている。

【０００６】

ヒトでは、ＩＬ－３３は平滑筋及び気管支上皮で恒常的に発現することが見出された。肺及び皮膚線維芽細胞ではＩＬ－１β及びＴＮＦ－αによって発現が誘導され得る（Ｓｃｈｍｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（２００５））。喘息患者の血清及び組織中では、可溶性ＳＴ２タンパク質及びＩＬ－３３　ｍＲＮＡ／タンパク質のレベルが増加する（Ｏｂｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｌｌｅｒｇｏｌｏｇｙ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　５９：１４３－１６０（２０１０））。

【０００７】

インビボでは、ＩＬ－３３はＩＬ－４、ＩＬ－５、及びＩＬ－１３の発現を誘導し、粘膜器官の重篤な病変を引き起こす。マウスへのＩＬ－３３の投与は、重度の血中好酸球増加、ＩＬ－５及びＩｇＥ血清値の上昇、及び粘膜表面の杯細胞過形成を含め、強力な炎症効果を有する（Ｓｃｈｍｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．（２００５））。ＩＬ－３３をマウスに腹腔内投与又は鼻腔内投与すると、ＩＬ－１３及びＳＴＡＴ６依存性経路を介した肺及び腸粘膜の好酸球性炎症の誘導につながった（Ｏｂｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０））。従って、ＩＬ－３３は、喘息などのアレルギー性疾患及び他の炎症性気道疾患において役割を果たし得る。

【０００８】

文献の報告の中には、杯細胞がＣＸＣＬ８／ＩＬ－８を分泌し、これがＳＴ２Ｒ－ＥＲＫ経路を介してＩＬ－３３によって増加することを示唆するものもあり、杯細胞化生を伴う喘息気道における気道炎症の亢進機構が示唆される（Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ａｌｌｅｒｇｙ．２０１４　Ａｐｒ；４４（４）：５４０－５２）。

【０００９】

従って、ＩＬ－３３は治療標的として関心が持たれている。しかしながら、現在まで、この治療標的を遮断することの治療利益は完全には実現していない。本発明者らは、ＩＬ－３３が還元型（本明細書ではｒｅｄＩＬ－３３とも称される）及び酸化型で存在することを初めて確立した。本発明者らは、本明細書に記載するとおり、初めてＩＬ－３３の酸化型を特徴付けた。本発明者らによるインビトロ及びインビボ研究により、ｒｅｄＩＬ－３３（還元型）の消失が酸化ＩＬ－３３の出現と相関することが明らかになっている。インビトロの生理液中では、ｒｅｄＩＬ－３３は急速に酸化されてジスルフィド結合型を形成する。酸化型（本明細書ではＩＬ－３３－ＤＳＢとも称される）は、群Ｃｙｓ２０８、Ｃｙｓ２２７、Ｃｙｓ２３２及びＣｙｓ２５９（ＵｎｉＰｒｏｔＯ９７５６０に開示されるとおりの完全長ヒトＩＬ－３３（そのうちの残基１１２～２７０が配列番号６３２内に記載される）を基準に付番する）から選択されるシステインの間に少なくとも１つ（例えば２つの）ジスルフィド結合を有する。これまで、市販のアッセイが主にこの酸化型を検出するものと思われる点が十分に認識されていなかった。従って本発明者らは、ＳＴ２との相互作用及びＩＬ－３３放出に関連する生物学的活性の駆動に関与するｒｅｄＩＬ－３３を選択的に検出するアッセイを考案する必要があった。

【００１０】

還元型は、シグナルカスケードを生じさせる活性型のタンパク質であるものと見られ、実際、インビボでは、ＳＴ２を介したシグナル伝達を終結させる機構として、還元型が酸化型に変換されるものと見られる。本発明者らは、ｒｅｄＩＬ－３３がＳＴ２に結合することを見出した（図２４Ａ）。対照的に、ＩＬ－３３－ＤＳＢはＳＴ２結合を示さなかった（図２４Ｂ）。このことから、本発明者らは、インビボでの酸化がＩＬ－３３－ＳＴ２活性をオフにする機構であり得ると仮定するに至った。加えて、本発明者らは、酸化型のＩＬ－３３（ＩＬ－３３－ＤＳＢ）が終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）に結合し、この代替経路（図５６）を介してシグナルを送ることを初めて確立した。

【００１１】

本発明者らは、この理解を利用して一層有効な治療剤を作成し得ると考える。一実施形態において、本発明者らは、酸化型に優先的に（ｐｒｅｆｅｒｎｔｉｌｌａｙ）結合するが、意外にも、本質的に還元型から酸化型への変換を触媒することによって還元型の活性を減弱させる抗体を同定した。有利には、この機構は単に、ＳＴ２を介したシグナル伝達

を終結させるインビボ機構を増強するものである。
【００１２】
別の実施形態において、本発明者らは、還元型のＩＬ－３３（ｒｅｄＩＬ－３３）とフェムトモルの親和性で優先的に（ｐｒｅｆｅｒｎｔｉｌｌａｙ）結合し、ＳＴ２を介したＩＬ－３３媒介シグナル伝達を減弱させる及び／又は阻害する抗体を同定した。この抗体は、ＩＬ－３３／ＳＴ２媒介炎症反応を治療又は予防する機構を初めて提供するものである。
【００１３】
更に別の実施形態において、本発明の抗体は、これまで認識されていないＲＡＧＥを介したＩＬ－３３－ＤＳＢのシグナル伝達経路、及び任意のＩＬ－３３／ＲＡＧＥ媒介効果を減弱させ又は阻害することができる。本発明の抗体は、ＩＬ－３３－ＤＳＢに直接結合してＲＡＧＥとのリガンド／受容体相互作用を減弱させ又は阻害することにより作用し得るか、或いは、ｒｅｄＩＬ－３３に結合してＩＬ－３３－ＤＳＢへのその変換を阻止又は低減し、それによってＲＡＧＥとのリガンド／受容体相互作用を間接的に減弱させ又は阻害し得る。
【発明の概要】
【００１４】
従って第１の態様において、還元型（ｒｅｄｕｃｅｄ　ｆｒｏｍ）の単離ＩＬ－３３（ｒｅｄＩＬ－３３）又はその結合断片が提供される。
【００１５】
一態様において、天然システイン間のジスルフィド架橋の形成を妨げる修飾によって還元型で安定化した単離ＩＬ－３３タンパク質が提供される。かかる修飾には、１つ以上のシステイン残基の欠失、１つ以上の天然システインを代替アミノ酸に置換する突然変異及び／又は化学的実体とのコンジュゲーションが含まれ得る。
【００１６】
一実施形態において、本明細書に記載されるとおりの、詳細には配列番号６３４～６４８に示されるとおりの変異型のＩＬ－３３が提供される。
【００１７】
一実施形態において、化学的実体はビオチンであり、ビオチンは、ｒｅｄＩＬ－３３がＩＬ－３３－ＤＳＢに変換される能力を低減し又は消失させる。
【００１８】
一態様において、突然変異体ＩＬ－３３が提供され、ここでは１つ以上のシステインが非システインアミノ酸に置換されており、例えば、Ｃｙｓ－２０８、Ｃｙｓ－２２７、Ｃｙｓ－２３２及びＣｙｓ－２５９から選択される１、２、３、４つ又はそれ以上のシステインが、例えばセリンなどのアミノ酸に置換されている。一実施形態において、システイン残基は、Ｃｙｓ－２０８、Ｃｙｓ－２２７、Ｃｙｓ－２３２及びＣｙｓ－２５９から独立して選択される。従って一実施形態において、本開示に係る突然変異体は、ＩＬ－３３－ＤＳＢのジスルフィド結合の一方又は両方を形成することができない。
【００１９】
一実施形態において本開示は、本開示に係るその安定化型を含めた、ｒｅｄＩＬ－３３の活性を減弱させ、例えば前記活性を阻害する単離結合分子に関する。一実施形態において、減弱はｒｅｄＩＬ－３３との特異的結合による。一実施形態において、減弱はＩＬ－３３－ＤＳＢとの結合と、例えばｒｅｄＩＬ－３３からＩＬ－３３－ＤＳＢへの変換の触媒又は促進による。
【００２０】
一実施形態において、この減弱により、ＳＴ２依存シグナル伝達が下方制御され又はオフになる。
【００２１】
特定の実施形態において、本開示の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片は、例えばマスト細胞の、ＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【００２２】
一実施形態において、この減弱により、ＳＴ２経路からのＩＬ－５放出が下方制御され又は妨げられる。
【００２３】
一実施形態において、この減弱により、好酸球活性化が下方制御され又は妨げられる。
【００２４】
一実施形態において、この減弱により、ＮＦκＢ放出が下方制御され又は妨げられる。一実施形態において、この減弱により、ＩＬ－４放出が下方制御され又は妨げられる。一実施形態において、この減弱により、ＩＬ－６放出が下方制御され又は妨げられる。一実施形態において、この減弱により、ＩＬ－８放出が下方制御され又は妨げられる。一実施形態において、この減弱により、ＩＬ－１３放出が下方制御され又は妨げられる。
【００２５】
特定の実施形態において、本開示の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３／ＲＡＧＥ媒介シグナル伝達を減弱させ又は阻害する。ＲＡＧＥ媒介シグナル伝達の減弱又は阻害により、調節されていないＩＬ－３３駆動炎症反応で見られるものと比べて上皮移動が亢進し得る（図５８を参照）。かかる上皮移動の亢進は、特に肺上皮などの肺組織で組織修復及び創傷治癒において役割を果たし得る。
【００２６】
一実施形態において、本開示は、ｒｅｄＩＬ－３３に特異的に結合する単離結合分子又はｒｅｄＩＬ－３３結合断片に関する。
【００２７】
一実施形態において、本開示は、ｒｅｄＩＬ－３３に特異的に結合してそのＳＴ２への結合を阻害する単離結合分子に関する。
【００２８】
一実施形態において、本開示は、ｒｅｄＩＬ－３３に特異的に結合してＩＬ－３３のその受容体との相互作用を物理的に遮断することによりｒｅｄＩＬ－３３のシグナル伝達を阻害する単離結合分子に関する。
【００２９】
一実施形態において、本開示は、ＩＬ－３３と結合してｒｅｄＩＬ－３３からＩＬ－３３－ＤＳＢへの変換を触媒し、それによりＳＴ－２シグナル伝達を下方制御し又はオフにする分子に関する。
【００３０】
一実施形態において、本開示は、競合的作用様式の結合分子に関する。
【００３１】
一実施形態において、本開示は、アロステリックな作用様式の結合分子に関する。
【００３２】
一部の実施形態において、本発明の結合分子には抗体又はその抗原結合断片が含まれる。
【００３３】
以下の式は一文字アミノ酸コードを用いる。
【００３４】
一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１を含む：
【化１】

$$\mathrm{SYAMX} \quad (\mathrm{I})$$

［式中、Ｘはアミノ酸、例えばＳ又はＮ、例えばＳである］。
【００３５】
一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２を含む：

【化２】

$$X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}YADX_{12}VKG \qquad (II)$$

［式中：
X_1は、Ａ、Ｇ又はＳ、特にＡ又はＧ、例えばＡであり；
X_2は、Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｎ、Ｓ、特にＡ、Ｄ又はＳ、例えばＳであり；
X_3は、Ａ、Ｄ又はＧ、特にＡ又はＧ、例えばＧであり
X_4は、存在しないか又はＤであり、特に存在せず；
X_5は、存在しないか又はＧであり、特に存在せず；
X_6は、Ｄ、Ｉ又はＳ、特にＩ又はＳ、例えばＳであり；
X_7は、Ｄ、Ｆ、Ｇ又はＳ、特にＤ又はＧ、例えばＧであり；
X_8は、Ｄ、Ｇ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、特にＧ、Ｑ又はＴ、例えばＧであり；
X_9は、Ｒ又はＳ、特にＳであり；
X_{10}は、Ｐ又はＴ、特にＰであり；
X_{11}は、Ｈ又はＹ、特にＹであり；且つ
Ｘ１２は、Ｐ又はＳ、特にＳである］。

【００３６】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３を含む：

【化３】

$$X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}GGLRYPX_{22} \qquad (III)$$

［式中：
X_{13}は、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｌ又はＱ、特にＤ又はＱ、例えばＤであり；
X_{14}は、Ｋ又はＬ、特にＫであり；
X_{15}は、Ｆ又はＷ、特にＦであり；
X_{16}は、Ｉ又はＭ、特にＭであり；
X_{17}は、Ｑ又はＥ、特にＱであり；
X_{18}は、Ｌ又はＮ、特にＬであり；
X_{19}は、Ｗ又はＹ、特にＷであり；
X_{20}は、Ａ、Ｇ又はＶ、特にＧであり；且つ
X_{21}は、Ｆ又はＬ、特にＦである］。

【００３７】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（Ｉ）のＣＤＲＨ１及び式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２を含む。

【００３８】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（Ｉ）のＣＤＲＨ１及び式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３を含む。

【００３９】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３を含む。

【００４０】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（Ｉ）のＣＤＲＨ１及び式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、及び式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３を含む。

【００４１】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む：

【化４】

$$SGEX_{22}X_{23}GDKYAA \quad (IV)$$

［式中：
X_{22}は、アミノ酸、例えばＲ又はＧ、特にＲであり；且つ
X_{23}は、アミノ酸、例えばＭ又はＩ、特にＭである］。

【００４２】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む：

【化５】

$$X_{24}DTKRPS \quad (V)$$

［式中：
X_{24}は、アミノ酸、例えばＱ又はＲ、特にＲである］。

【００４３】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む：

【化６】

$$X_{25}VX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}X_{33} \quad (VI)$$

［式中：
X_{25}は、Ｅ、Ｇ又はＱ、特にＧ又はＱ、例えばＧであり；
X_{26}は、Ｉ、Ｋ、Ｌ又はＷ、特にＬ又はＷ、例えばＷであり；
X_{27}は、Ａ、Ｄ、Ｋ、Ｑ、Ｒ又はＶ、特にＤ又はＫ、例えばＫであり；
X_{28}は、Ａ、Ｄ、Ｋ、Ｑ又はＳ、特にＱ又はＳ、例えばＳであり；
X_{29}は、Ｄ、Ｎ又はＳ、特にＤ又はＳ、例えばＤであり；
X_{30}は、Ｄ、Ｓ又はＴ、特にＤ又はＳ、例えばＤであり；
X_{31}は、存在しないか又はＴであり、特に存在せず；
X_{32}は、Ｇ又はＰ、特にＧであり；且つ
X_{33}は、Ｉ又はＶ、特にＶである］。

【００４４】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００４５】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００４６】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（Ｖ）のＣＤＲＬ２及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００４７】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、上記に定義するとおりの式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２、及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００４８】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む。

【００４９】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００５０】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００５１】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む。

【００５２】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００５３】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００５４】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む。

【００５５】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００５６】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００５７】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む。

【００５８】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００５９】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００６０】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む。

【００６１】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００６２】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００６３】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１を含む。

【００６４】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００６５】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００６６】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１

を含む。

【００６７】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００６８】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ３及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００６９】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３、式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１及び式（Ｖ）のＣＤＲＬ２を含む。

【００７０】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩＩ）のＣＤＲＨ３、式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００７１】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ３、式（Ｖ）のＣＤＲＬ２及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００７２】

一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、式（Ｉ）のＣＤＲＨ１、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ２、式（ＩＩ）のＣＤＲＨ３、式（ＩＶ）のＣＤＲＬ１、式（Ｖ）のＣＤＲＬ２及び式（ＶＩ）のＣＤＲＬ３を含む。

【００７３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、例えば重鎖可変領域の、配列番号３、４、５、１３、１４、１５、２３、２４、２５、３３、３４、３５、４３、４４、４５、５３、５４、５５、６３、６４、６５、７３、７４、７５、８３、８４、８５、９３、９４、９５、１０３、１０４、１０５、１１３、１１４、１１５、１５３、１５４、１５５、１６３、１６４、１６５、１７３、１７４、１７５、１８３、１８４、１８５、１９３、１９４、１９５、２０３、２０４、２０５、２１３、２１４、２１５、２２３、２２４、２２５、２３３、２３４、２３５、２４３、２４４、２４５、２５３、２５４、２５５、２６３、２６４、２６５、２７３、２７４、２７５、２８３、２８４、２８５、２９３、２９４、２９５、３０３、３０４、３０５、３１３、３１４、３１５、３５３、３５４、３５５、３６３、３６４、３６５、３７３、３７４、３７５、３８３、３８４、３８５、３９３、３９４、３９５、４０３、４０４、４０５、４１３、４１４、４１５、４５３、４５４、４５５、４６３、４６４、４６５、４７３、４７４、４７５、４８３、４８４、４８５、４９３、４９４、４９５、５０３、５０４、５０５、５１３、５１４、５１５、５５３、５５４、５５５、５６３、５６４、５６５、５７３、５７４、５７５、５８３、５８４及び５８５から独立して選択される３つのＣＤＲを含む。

【００７４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、例えば軽鎖可変領域の、配列番号８、９、１０、１８、１９、２０、２８、２９、３０、３８、３９、４０、４８、４９、５０、５８、５９、６０、６８、６９、７０、７８、７９、８０、８８、８９、９０、９８、９９、１００、１０８、１０９、１１８、１１９、１２０、１５８、１５９、１６０、１６８、１６９、１７０、１７８、１７９、１８０、１８８、１８９、１９０、１９８、１９９、２００、２０８、２０９、２１０、２１８、２１９、２２０、２２８、２２９、２３０、２３８、２３９、２４０、２４８、２４９、２５０、２５８、２５９、２６０、２６８、２６９、２７０、２７８、２７９、２８０、２８８、２８９、２９０、２９８、２９９

、３００　３０８、３０９、３１０、３１８、３１９、３２０、３２８、３２９、３３０、３３８、３３９、３４０、３４８、３４９、３５０、３５８、３５９、３６０、３６８、３６９　３７０　３７８、３７９、３８０、３８８、３８９、３９０、３９８、３９９、４００、４０８、４０９、４１０、４１８、４１９、４２０、４２８、４２９、４３０、４３８、４３９、４４０、４４８、４４９、４５０、４５８、４５９、４６０、４６８、４６９、４７０、４７８、４７９、４８０、４８８、４８９、４９０、４９８、４９９、５００　５０８、５０９、５１０、５１８、５１９、５２０、５２８、５２９、５３０、５３８、５３９、５４０、５４８、５４９、５５０、５５８、５５９、５６０、５６８、５６９、５７０、５７８、５７９、５８０、５８８、５８９、及び５９０から独立して選択される３つのＣＤＲを含む。

【００７５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、例えば重鎖可変領域の、配列番号３、４、５、１３、１４、１５、２３、２４、２５、３３、３４、３５、４３、４４、４５、５３、５４、５５、６３、６４、６５、７３、７４、７５、８３、８４、８５、９３、９４、９５、１０３、１０４、１０５、１１３、１１４、１１５、１５３、１５４、１５５、１６３、１６４、１６５、１７３、１７４、１７５、１８３、１８４、１８５、１９３、１９４、１９５、２０３、２０４、２０５、２１３、２１４、２１５、２２３、２２４、２２５、２３３、２３４、２３５、２４３、２４４、２４５、２５３、２５４、２５５、２６３、２６４、２６５、２７３、２７４、２７５、２８３、２８４、２８５、２９３、２９４、２９５、３０３、３０４、３０５、３１３、３１４、３１５、３５３、３５４、３５５、３６３、３６４、３６５、３７３、３７４、３７５、３８３、３８４、３８５、３９３、３９４、３９５、４０３、４０４、４０５、４１３、４１４、４１５、４５３、４５４、４５５、４６３、４６４、４６５、４７３、４７４、４７５、４８３、４８４、４８５、４９３、４９４、４９５、５０３、５０４、５０５、５１３、５１４、５１５、５５３、５５４、５５５、５６３、５６４、５６５、５７３、５７４、５７５、５８３、５８４及び５８５から独立して選択される３つのＣＤＲ、及び例えば軽鎖可変領域の、配列番号８、９、１０、１８、１９、２０、２８、２９、３０、３８、３９、４０、４８、４９、５０、５８、５９、６０、６８、６９、７０、７８、７９、８０、８８、８９、９０、９８、９９、１００、１０８、１０９、１１８、１１９、１２０、１５８、１５９、１６０、１６８、１６９、１７０、１７８、１７９、１８０、１８８、１８９、１９０、１９８、１９９、２００、２０８、２０９、２１０、２１８、２１９、２２０、２２８、２２９、２３０、２３８、２３９、２４０、２４８、２４９、２５０、２５８、２５９、２６０、２６８、２６９、２７０、２７８、２７９、２８０、２８８、２８９、２９０、２９８、２９９、３００　３０８、３０９、３１０、３１８、３１９、３２０、３２８、３２９、３３０、３３８、３３９、３４０、３４８、３４９、３５０、３５８、３５９、３６０、３６８、３６９　３７０　３７８、３７９、３８０、３８８、３８９、３９０、３９８、３９９、４００、４０８、４０９、４１０、４１８、４１９、４２０、４２８、４２９、４３０、４３８、４３９、４４０、４４８、４４９、４５０、４５８、４５９、４６０、４６８、４６９、４７０、４７８、４７９、４８０、４８８、４８９、４９０、４９８、４９９、５００　５０８、５０９、５１０、５１８、５１９、５２０、５２８、５２９、５３０、５３８、５３９、５４０、５４８、５４９、５５０、５５８、５５９、５６０、５６８、５６９、５７０、５７８、５７９、５８０、５８８、５８９、及び５９０から独立して選択される３つのＣＤＲを含む。

【００７６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３、４及び５、例えば、配列番号３及び４、配列番号３及び５、又は配列番号４及び５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３、ＣＤＲＨ２について配列番号４及びＣＤＲＨ３について配列番号５を含む重鎖可変領域を含む。

【００７７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１３、１４及び１５、例えば、配

列番号１３及び１４、配列番号１３及び１５、又は配列番号１４及び１５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１３、ＣＤＲＨ２について配列番号１４及びＣＤＲＨ３について配列番号１５を含む重鎖可変領域を含む。

【００７８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２３、２４及び２５、例えば、配列番号２３及び２４、配列番号２３及び２５、又は配列番号２４及び２５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２３、ＣＤＲＨ２について配列番号２４及びＣＤＲＨ３について配列番号２５を含む重鎖可変領域を含む。

【００７９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３３、３４及び３５、例えば、配列番号３３及び３４、配列番号３３及び３５、又は配列番号３４及び３５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３３、ＣＤＲＨ２について配列番号３４及びＣＤＲＨ３について配列番号３５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４３、４４及び４５、例えば、配列番号４３及び４４、配列番号４３及び４５、又は配列番号４４及び４５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４３、ＣＤＲＨ２について配列番号４４及びＣＤＲＨ３について配列番号４５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５３、５４及び５５、例えば、配列番号５３及び５４、配列番号５３及び５５、又は配列番号５４及び５５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５３、ＣＤＲＨ２について配列番号５４及びＣＤＲＨ３について配列番号５５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６３、６４及び６５、例えば、配列番号６３及び６４、配列番号６３及び６５、又は配列番号６４及び６５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号６３、ＣＤＲＨ２について配列番号６４及びＣＤＲＨ３について配列番号６５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号７３、７４及び７５、例えば、配列番号７３及び７４、配列番号７３及び７５、又は配列番号７４及び７５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号７３、ＣＤＲＨ２について配列番号７４及びＣＤＲＨ３について配列番号７５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号８３、８４及び８５、例えば、配列番号８３及び８４、配列番号８３及び８５、又は配列番号８４及び８５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号８３、ＣＤＲＨ２について配列番号８４及びＣＤＲＨ３について配列番号８５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号９３、９４及び９５、例えば、配列番号９３及び９４、配列番号９３及び９５、又は配列番号９４及び９５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号９３、ＣＤＲＨ２について配列番号９４及びＣＤＲＨ３について配列番号９５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１０３、１０４及び１０５、例えば、配列番号１０３及び１０４、配列番号１０３及び１０５、又は配列番号１０４及び１０５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１０３、ＣＤＲＨ２について配列番号１０４及びＣＤＲＨ３について配列番号１０５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１１３、１１４及び１１５、例えば、配列番号１１３及び１１４、配列番号１１３及び１１５、又は配列番号１１４及び１１５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１１３、ＣＤＲＨ２について配列番号１１４及びＣＤＲＨ３について配列番号１１５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２３、１２４及び１２５、例えば、配列番号１２３及び１２４、配列番号１２３及び１２５、又は配列番号１２４及び２５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１２３、ＣＤＲＨ２について配列番号１２４及びＣＤＲＨ３について配列番号１２５を含む重鎖可変領域を含む。

【００８９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１３３、１３４及び１３５、例えば、配列番号１３３及び１３４、配列番号１３３及び１３５、又は配列番号１３４及び１３５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１３３、ＣＤＲＨ２について配列番号１３４及びＣＤＲＨ３について配列番号１３５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１４３、１４４及び１４５、例えば、配列番号１４３及び１４４、配列番号１４３及び１４５、又は配列番号１４４及び１４５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１４３、ＣＤＲＨ２について配列番号１４４及びＣＤＲＨ３について配列番号１４５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１５３、１５４及び１５５、例えば、配列番号１５３及び１５４、配列番号１５３及び１５５、又は配列番号１５４及び１５５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１５３、ＣＤＲＨ２について配列番号１５４及びＣＤＲＨ３について配列番号１５５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１６３、１６４及び１６５、例えば、配列番号１６３及び１６４、配列番号１６３及び１６５、又は配列番号１６４及び１６５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１６３、ＣＤＲＨ２について配列番号１６４及びＣＤＲＨ３について配列番号１６５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１７３、１７４及び１７５、例えば、配列番号１７３及び１７４、配列番号１７３及び１７５、又は配列番号１７４及び１７５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１７３、ＣＤＲＨ２について配列番号１７４及びＣＤＲＨ３について配列番号１７５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１８３、１８４及び１８５、例えば、配列番号１８３及び１８４、配列番号１８３及び１８５、又は配列番号１８４及び１８５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１８３、ＣＤＲＨ２について配列番号１８４及びＣＤＲＨ３について配列番号１８５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１９３、１９４及び１９５、例えば、配列番号１９３及び１９４、配列番号１９３及び９５、又は配列番号１９４及び１９

５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号１９３、ＣＤＲＨ２について配列番号１９４及びＣＤＲＨ３について配列番号１９５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２０３、２０４及び２０５、例えば、配列番号２０３及び２０４、配列番号２０３及び２０５、又は配列番号２０４及び２０５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２０３、ＣＤＲＨ２について配列番号２０４及びＣＤＲＨ３について配列番号２０５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２１３、２１４及び２１５、例えば、配列番号２１３及び２１４、配列番号２１３及び２１５、又は配列番号２１４及び２１５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２１３、ＣＤＲＨ２について配列番号２１４及びＣＤＲＨ３について配列番号２１５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２３、２２４及び２２５、例えば、配列番号２２３及び２２４、配列番号２２３及び２２５、又は配列番号２２４及び２２５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２２３、ＣＤＲＨ２について配列番号２２４及びＣＤＲＨ３について配列番号２２５を含む重鎖可変領域を含む。

【００９９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２３３、２３４及び２３５、例えば、配列番号２３３及び２３４、配列番号２３３及び２３５、又は配列番号２３４及び２３５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２３３、ＣＤＲＨ２について配列番号２３４及びＣＤＲＨ３について配列番号２３５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１００】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２４３、２４４及び２４５、例えば、配列番号２４３及び２４４、配列番号２４３及び２４５、又は配列番号２４４及び２４５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２４３、ＣＤＲＨ２について配列番号２４４及びＣＤＲＨ３について配列番号２４５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１０１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２５３、２５４及び２５５、例えば、配列番号２５３及び２５４、配列番号２５３及び２５５、又は配列番号２５４及び２５５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２５３、ＣＤＲＨ２について配列番号２５４及びＣＤＲＨ３について配列番号２５５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１０２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２６３、２６４及び２６５、例えば、配列番号２６３及び２６４、配列番号２６３及び２６５、又は配列番号２６４及び２６５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２６３、ＣＤＲＨ２について配列番号２６４及びＣＤＲＨ３について配列番号２６５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１０３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２７３、２７４及び２７５、例えば、配列番号２７３及び２７４、配列番号２７３及び２７５、又は配列番号２７４及び２７５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２７３、ＣＤＲＨ２について配列番号２７４及びＣＤＲＨ３について配列番号２７５を含む重

鎖可変領域を含む。
【０１０４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２８３、２８４及び２８５、例えば、配列番号２８３及び２８４、配列番号２８３及び２８５、又は配列番号２８４及び２８５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２８３、ＣＤＲＨ２について配列番号２８４及びＣＤＲＨ３について配列番号２８５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１０５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２９３、２９４及び２９５、例えば、配列番号２９３及び２９４、配列番号２９３及び２９５、又は配列番号２９４及び２９５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号２９３、ＣＤＲＨ２について配列番号２９４及びＣＤＲＨ３について配列番号２９５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１０６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３０３、３０４及び３０５、例えば、配列番号３０３及び３０４、配列番号３０３及び３０５、又は配列番号３０４及び３０５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３０３、ＣＤＲＨ２について配列番号３０４及びＣＤＲＨ３について配列番号３０５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１０７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３１３、３１４及び３１５、例えば、配列番号３１３及び３１４、配列番号３１３及び３１５、又は配列番号３１４及び３１５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３１３、ＣＤＲＨ２について配列番号３１４及びＣＤＲＨ３について配列番号３１５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１０８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２３、３２４及び３２５、例えば、配列番号３２３及び３２４、配列番号３２３及び３２５、又は配列番号３２４及び３２５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３２３、ＣＤＲＨ２について配列番号３２４及びＣＤＲＨ３について配列番号３２５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１０９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３３３、３３４及び３３５、例えば、配列番号３３３及び３３４、配列番号３３３及び３３５、又は配列番号３３４及び３３５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３３３、ＣＤＲＨ２について配列番号３３４及びＣＤＲＨ３について配列番号３３５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１１０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３４３、３４４及び３４５、例えば、配列番号３４３及び３４４、配列番号３４３及び３４５、又は配列番号３４４及び３４５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３４３、ＣＤＲＨ２について配列番号３４４及びＣＤＲＨ３について配列番号３４５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１１１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３５３、３５４及び３５５、例えば、配列番号３５３及び３５４、配列番号３５３及び３５５、又は配列番号３５４及び３５５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３５３、ＣＤＲＨ２について配列番号３５４及びＣＤＲＨ３について配列番号３５５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１１２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３６３、３６４及び３６５、例えば、配列番号３６３及び３６４、配列番号３６３及び３６５、又は配列番号３６４及び３６５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３６３、ＣＤＲＨ２について配列番号３６４及びＣＤＲＨ３について配列番号３６５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３７３、３７４及び３７５、例えば、配列番号３７３及び３７４、配列番号３７３及び３７５、又は配列番号３７４及び３７５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３７３、ＣＤＲＨ２について配列番号３７４及びＣＤＲＨ３について配列番号３７５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３８３、３８４及び３８５、例えば、配列番号３８３及び３８４、配列番号３８３及び３８５、又は配列番号３８４及び３８５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３８３、ＣＤＲＨ２について配列番号３８４及びＣＤＲＨ３について配列番号３８５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３９３、３９４及び３９５、例えば、配列番号３９３及び３９４、配列番号３９３及び３９５、又は配列番号３９４及び３９５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号３９３、ＣＤＲＨ２について配列番号３９４及びＣＤＲＨ３について配列番号３９５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４０３、４０４及び４０５、例えば、配列番号４０３及び４０４、配列番号４０３及び４０５、又は配列番号４０４及び４０５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４０３、ＣＤＲＨ２について配列番号４０４及びＣＤＲＨ３について配列番号４０５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４１３、４１４及び４１５、例えば、配列番号４１３及び４１４、配列番号４１３及び４１５、又は配列番号４１４及び４１５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４１３、ＣＤＲＨ２について配列番号４１４及びＣＤＲＨ３について配列番号４１５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４２３、４２４及び４２５、例えば、配列番号４２３及び４２４、配列番号４２３及び４２５、又は配列番号４２４及び４２５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４２３、ＣＤＲＨ２について配列番号４２４及びＣＤＲＨ３について配列番号４２５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１１９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４３３、４３４及び４３５、例えば、配列番号４３３及び４３４、配列番号４３３及び４３５、又は配列番号４３４及び４３５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４３３、ＣＤＲＨ２について配列番号４３４及びＣＤＲＨ３について配列番号４３５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４４３、４４４及び４４５、例えば、配列番号４４３及び４４４、配列番号４４３及び４４５、又は配列番号４４４及び４

４５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４４３、ＣＤＲＨ２について配列番号４４４及びＣＤＲＨ３について配列番号４４５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４５３、４５４及び４５５、例えば、配列番号４５３及び４５４、配列番号４５３及び４５５、又は配列番号４５４及び４５５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４５３、ＣＤＲＨ２について配列番号４５４及びＣＤＲＨ３について配列番号４５５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４６３、４６４及び４６５、例えば、配列番号４６３及び４６４、配列番号４６３及び４６５、又は配列番号４６４及び４６５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４６３、ＣＤＲＨ２について配列番号４６４及びＣＤＲＨ３について配列番号４６５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４７３、４７４及び４７５、例えば、配列番号４７３及び４７４、配列番号４７３及び４７５、又は配列番号４７４及び４７５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４７３、ＣＤＲＨ２について配列番号４７４及びＣＤＲＨ３について配列番号４７５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４８３、４８４及び４８５、例えば、配列番号４８３及び４８４、配列番号４８３及び４８５、又は配列番号４８４及び４８５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４８３、ＣＤＲＨ２について配列番号４８４及びＣＤＲＨ３について配列番号４８５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４９３、４９４及び４９５、例えば、配列番号４９３及び４９４、配列番号４９３及び４９５、又は配列番号４９４及び４９５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号４９３、ＣＤＲＨ２について配列番号４９４及びＣＤＲＨ３について配列番号４９５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５０３、５０４及び５０５、例えば、配列番号５０３及び５０４、配列番号５０３及び５０５、又は配列番号５０４及び５０５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５０３、ＣＤＲＨ２について配列番号５０４及びＣＤＲＨ３について配列番号５０５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５１３、５１４及び５１５、例えば、配列番号５１３及び５１４、配列番号５１３及び５１５、又は配列番号５１４及び５１５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５１３、ＣＤＲＨ２について配列番号５１４及びＣＤＲＨ３について配列番号５１５を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２３、５２４及び５２５、例えば、配列番号５２３及び５２４、配列番号５２３及び５２５、又は配列番号５２４及び５２５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５２３、ＣＤＲＨ２について配列番号５２４及びＣＤＲＨ３について配列番号５２５を含む重

鎖可変領域を含む。
【０１２９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５３３、５３４及び５３５、例えば、配列番号５３３及び５３４、配列番号５３３及び５３５、又は配列番号５３４及び５３５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５３３、ＣＤＲＨ２について配列番号５３４及びＣＤＲＨ３について配列番号５３５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１３０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５４３、５４４及び５４５、例えば、配列番号５４３及び５４４、配列番号５４３及び５４５、又は配列番号５４４及び５４５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５４３、ＣＤＲＨ２について配列番号５４４及びＣＤＲＨ３について配列番号５４５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１３１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５５３、５５４及び５５５、例えば、配列番号５５３及び５５４、配列番号５５３及び５５５、又は配列番号５５４及び５５５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５５３、ＣＤＲＨ２について配列番号５５４及びＣＤＲＨ３について配列番号５５５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１３２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５６３、５６４及び５６５、例えば、配列番号５６３及び５６４、配列番号５６３及び５６５、又は配列番号５６４及び５６５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５６３、ＣＤＲＨ２について配列番号５６４及びＣＤＲＨ３について配列番号５６５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１３３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５７３、５７４及び５７５、例えば、配列番号５７３及び５７４、配列番号５７３及び５７５、又は配列番号５７４及び５７５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５７３、ＣＤＲＨ２について配列番号５７４及びＣＤＲＨ３について配列番号５７５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１３４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５８３、５８４及び５８５、例えば、配列番号５８３及び５８４、配列番号５８３及び５８５、又は配列番号５８４及び５８５から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＨ１について配列番号５８３、ＣＤＲＨ２について配列番号５８４及びＣＤＲＨ３について配列番号５８５を含む重鎖可変領域を含む。
【０１３５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号８、９及び１０、例えば、配列番号８及び９、配列番号８及び１０、又は配列番号９及び１０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号８、ＣＤＲＬ２について配列番号９及びＣＤＲＬ３について配列番号１０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１３６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１８、１９及び２０、例えば、配列番号１８及び１９、配列番号１８及び２０、又は配列番号１９及び２０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１８、ＣＤＲＬ２について配列番号１９及びＣＤＲＬ３について配列番号２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１３７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２８、２９及び３０、例えば、配列番号２８及び２９、配列番号２８及び３０、又は配列番号２９及び３０から選択される

少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２８、ＣＤＲＬ２について配列番号２９及びＣＤＲＬ３について配列番号３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１３８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３８、３９及び４０、例えば、配列番号３８及び３９、配列番号３８及び４０、又は配列番号３９及び４０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３８、ＣＤＲＬ２について配列番号３９及びＣＤＲＬ３について配列番号４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１３９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４８、４９及び５０、例えば、配列番号４８及び４９、配列番号４８及び５０、又は配列番号４９及び５０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４８、ＣＤＲＬ２について配列番号４９及びＣＤＲＬ３について配列番号５０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５８、５９及び６０、例えば、配列番号５８及び５９、配列番号５８及び６０、又は配列番号５９及び６０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５８、ＣＤＲＬ２について配列番号５９及びＣＤＲＬ３について配列番号６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６８、６９及び７０、例えば、配列番号６８及び６９、配列番号６８及び７０、又は配列番号６９及び７０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号６８、ＣＤＲＬ２について配列番号６９及びＣＤＲＬ３について配列番号７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号７８、７９及び８０、例えば、配列番号７８及び７９、配列番号７８及び８０、又は配列番号７９及び８０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号７８、ＣＤＲＬ２について配列番号７９及びＣＤＲＬ３について配列番号８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号８８、８９及び９０、例えば、配列番号８８及び８９、配列番号８８及び９０、又は配列番号８９及び９０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号８８、ＣＤＲＬ２について配列番号８９及びＣＤＲＬ３について配列番号９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号９８、９９及び１００、例えば、配列番号９８及び９９、配列番号９８及び１００、又は配列番号９９及び１００から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号９８、ＣＤＲＬ２について配列番号９９及びＣＤＲＬ３について配列番号１００を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１０８、１０９及び１１０、例えば、配列番号１０８及び１０９、配列番号１０８及び１１０、又は配列番号１０９及び１１０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１０８、ＣＤＲＬ２について配列番号１０９及びＣＤＲＬ３について配列番号１１０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１１８、１１９及び１２０、例えば、配列番号１１８及び１１９、配列番号１１８及び１２０、又は配列番号１１９及び１２０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１１８、ＣＤＲＬ２について配列番号１１９及びＣＤＲＬ３について配列番号１２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１４７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２８、１２９及び１３０、例えば、配列番号１２８及び１２９、配列番号１２８及び１３０、又は配列番号１２９及び１３０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１２８、ＣＤＲＬ２について配列番号１２９及びＣＤＲＬ３について配列番号１３０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１４８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１３８、１３９及び１４０、例えば、配列番号１３８及び１３９、配列番号１３８及び１４０、又は配列番号１３９及び１４０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１３８、ＣＤＲＬ２について配列番号１３９及びＣＤＲＬ３について配列番号１４０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１４９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１４８、１４９及び１５０、例えば、配列番号１４８及び１４９、配列番号１４８及び１５０、又は配列番号１４９及び１５０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１４８、ＣＤＲＬ２について配列番号１４９及びＣＤＲＬ３について配列番号１２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１５０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１５８、１５９及び１６０、例えば、配列番号１５８及び１５９、配列番号１５８及び１６０、又は配列番号１５９及び１６０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１５８、ＣＤＲＬ２について配列番号１５９及びＣＤＲＬ３について配列番号１６０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１５１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１６８、１６９及び１７０、例えば、配列番号１６８及び１６９、配列番号１６８及び１７０、又は配列番号１６９及び１７０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１６８、ＣＤＲＬ２について配列番号１６９及びＣＤＲＬ３について配列番号１７０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１５２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１７８、１７９及び１８０、例えば、配列番号１７８及び１７９、配列番号１７８及び１８０、又は配列番号１７９及び１８０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１７８、ＣＤＲＬ２について配列番号１７９及びＣＤＲＬ３について配列番号１８０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１５３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１８８、１８９及び１９０、例えば、配列番号１８８及び１８９、配列番号１８８及び１９０、又は配列番号１８９及び１９０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１８８、ＣＤＲＬ２について配列番号１８９及びＣＤＲＬ３について配列番号１９０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１５４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１９８、１９９及び２００、例えば、配列番号１９８及び１９９、配列番号１９８及び２００、又は配列番号１９９及び２００から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号１９８、ＣＤＲＬ２について配列番号１９９及びＣＤＲＬ３について配列番号２００を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１５５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２０８、２０９及び２１０、例え

ば、配列番号２０８及び２０９、配列番号２０８及び２１０、又は配列番号２０９及び２１０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２０８、ＣＤＲＬ２について配列番号２０９及びＣＤＲＬ３について配列番号２１０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１５６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２１８、２１９及び２２０、例えば、配列番号２１８及び２１９、配列番号２１８及び２２０、又は配列番号２１９及び２２０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２１８、ＣＤＲＬ２について配列番号２１９及びＣＤＲＬ３について配列番号２２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１５７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２８、２２９及び２３０、例えば、配列番号２２８及び２２９、配列番号２２８及び２３０、又は配列番号２２９及び２３０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２２８、ＣＤＲＬ２について配列番号２２９及びＣＤＲＬ３について配列番号２３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１５８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２３８、２３９及び２４０、例えば、配列番号２３８及び２３９、配列番号２３８及び２４０、又は配列番号２３９及び２４０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２３８、ＣＤＲＬ２について配列番号２３９及びＣＤＲＬ３について配列番号２４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１５９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２４８、２４９及び２５０、例えば、配列番号２４８及び２４９、配列番号２４８及び２５０、又は配列番号２４９及び２５０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２４８、ＣＤＲＬ２について配列番号２４９及びＣＤＲＬ３について配列番号２２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２５８、２５９及び２６０、例えば、配列番号２５８及び２５９、配列番号２５８及び２６０、又は配列番号２５９及び２６０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２５８、ＣＤＲＬ２について配列番号２５９及びＣＤＲＬ３について配列番号２６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２６８、２６９及び２７０、例えば、配列番号２６８及び２６９、配列番号２６８及び２７０、又は配列番号２６９及び２７０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２６８、ＣＤＲＬ２について配列番号２６９及びＣＤＲＬ３について配列番号２７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２７８、２７９及び２８０、例えば、配列番号２７８及び２７９、配列番号２７８及び２８０、又は配列番号２７９及び２８０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２７８、ＣＤＲＬ２について配列番号２７９及びＣＤＲＬ３について配列番号２８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２８８、２８９及び２９０、例えば、配列番号２８８及び２８９、配列番号２８８及び２９０、又は配列番号２８９及び２９０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２８

８、ＣＤＲＬ２について配列番号２８９及びＣＤＲＬ３について配列番号２９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２９８、２９９及び３００、例えば、配列番号２９８及び２９９、配列番号２９８及び３００、又は配列番号２９９及び３００から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号２９８、ＣＤＲＬ２について配列番号２９９及びＣＤＲＬ３について配列番号３００を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３０８、３０９及び３１０、例えば、配列番号３０８及び３０９、配列番号３０８及び３１０、又は配列番号３０９及び３１０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３０８、ＣＤＲＬ２について配列番号３０９及びＣＤＲＬ３について配列番号３１０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３１８、３１９及び３２０、例えば、配列番号３１８及び３１９、配列番号３１８及び３２０、又は配列番号３１９及び３２０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３１８、ＣＤＲＬ２について配列番号３１９及びＣＤＲＬ３について配列番号３２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２８、３２９及び３３０、例えば、配列番号３２８及び３２９、配列番号３２８及び３３０、又は配列番号３２９及び３３０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３２８、ＣＤＲＬ２について配列番号３２９及びＣＤＲＬ３について配列番号３３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３３８、３３９及び３４０、例えば、配列番号３３８及び３３９、配列番号３３８及び３４０、又は配列番号３３９及び３４０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３３８、ＣＤＲＬ２について配列番号３３９及びＣＤＲＬ３について配列番号３４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１６９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３４８、３４９及び３５０、例えば、配列番号３４８及び３４９、配列番号３４８及び３５０、又は配列番号３４９及び３５０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３４８、ＣＤＲＬ２について配列番号３４９及びＣＤＲＬ３について配列番号３２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１７０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３５８、３５９及び３６０、例えば、配列番号３５８及び３５９、配列番号３５８及び３６０、又は配列番号３５９及び３６０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３５８、ＣＤＲＬ２について配列番号３５９及びＣＤＲＬ３について配列番号３６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１７１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３６８、３６９及び３７０、例えば、配列番号３６８及び３６９、配列番号３６８及び３７０、又は配列番号３６９及び３７０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３６８、ＣＤＲＬ２について配列番号３６９及びＣＤＲＬ３について配列番号３７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１７２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３７８、３７９及び３８０、例えば、配列番号３７８及び３７９、配列番号３７８及び３８０、又は配列番号３７９及び３８０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３７８、ＣＤＲＬ２について配列番号３７９及びＣＤＲＬ３について配列番号３８０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３８８、３８９及び３９０、例えば、配列番号３８８及び３８９、配列番号３８８及び３９０、又は配列番号３８９及び３９０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３８８、ＣＤＲＬ２について配列番号３８９及びＣＤＲＬ３について配列番号３９０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３９８、３９９及び４００、例えば、配列番号３９８及び３９９、配列番号３９８及び４００、又は配列番号３９９及び４００から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号３９８、ＣＤＲＬ２について配列番号３９９及びＣＤＲＬ３について配列番号４００を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４０８、４０９及び４１０、例えば、配列番号４０８及び４０９、配列番号４０８及び４１０、又は配列番号４０９及び４１０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４０８、ＣＤＲＬ２について配列番号４０９及びＣＤＲＬ３について配列番号４１０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４１８、４１９及び４２０、例えば、配列番号４１８及び４１９、配列番号４１８及び４２０、又は配列番号４１９及び４２０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４１８、ＣＤＲＬ２について配列番号４１９及びＣＤＲＬ３について配列番号４２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４２８、４２９及び４３０、例えば、配列番号４２８及び４２９、配列番号４２８及び４３０、又は配列番号４２９及び４３０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４２８、ＣＤＲＬ２について配列番号４２９及びＣＤＲＬ３について配列番号４３０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４３８、４３９及び４４０、例えば、配列番号４３８及び４３９、配列番号４３８及び４４０、又は配列番号４３９及び４４０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４３８、ＣＤＲＬ２について配列番号４３９及びＣＤＲＬ３について配列番号４４０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１７９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４４８、４４９及び４５０、例えば、配列番号４４８及び４４９、配列番号４４８及び４５０、又は配列番号４４９及び４５０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４４８、ＣＤＲＬ２について配列番号４４９及びＣＤＲＬ３について配列番号４２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１８０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４５８、４５９及び４６０、例え

ば、配列番号４５８及び４５９、配列番号４５８及び４６０、又は配列番号４５９及び４６０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４５８、ＣＤＲＬ２について配列番号４５９及びＣＤＲＬ３について配列番号４６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４６８、４６９及び４７０、例えば、配列番号４６８及び４６９、配列番号４６８及び４７０、又は配列番号４６９及び４７０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４６８、ＣＤＲＬ２について配列番号４６９及びＣＤＲＬ３について配列番号４７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４７８、４７９及び４８０、例えば、配列番号４７８及び４７９、配列番号４７８及び４８０、又は配列番号４７９及び４８０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４７８、ＣＤＲＬ２について配列番号４７９及びＣＤＲＬ３について配列番号４８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４８８、４８９及び４９０、例えば、配列番号４８８及び４８９、配列番号４８８及び４９０、又は配列番号４８９及び４９０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４８８、ＣＤＲＬ２について配列番号４８９及びＣＤＲＬ３について配列番号４９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４９８、４９９及び５００、例えば、配列番号４９８及び４９９、配列番号４９８及び５００、又は配列番号４９９及び５００から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号４９８、ＣＤＲＬ２について配列番号４９９及びＣＤＲＬ３について配列番号５００を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５０８、５０９及び５１０、例えば、配列番号５０８及び５０９、配列番号５０８及び５１０、又は配列番号５０９及び５１０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５０８、ＣＤＲＬ２について配列番号５０９及びＣＤＲＬ３について配列番号５１０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５１８、５１９及び５２０、例えば、配列番号５１８及び５１９、配列番号５１８及び５２０、又は配列番号５１９及び５２０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５１８、ＣＤＲＬ２について配列番号５１９及びＣＤＲＬ３について配列番号５２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２８、５２９及び５３０、例えば、配列番号５２８及び５２９、配列番号５２８及び５３０、又は配列番号５２９及び５３０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５２８、ＣＤＲＬ２について配列番号５２９及びＣＤＲＬ３について配列番号５３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５３８、５３９及び５４０、例えば、配列番号５３８及び５３９、配列番号５３８及び５４０、又は配列番号５３９及び５４０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５３

８、ＣＤＲＬ２について配列番号５３９及びＣＤＲＬ３について配列番号５４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５４８、５４９及び５５０、例えば、配列番号５４８及び５４９、配列番号５４８及び５５０、又は配列番号５４９及び５５０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５４８、ＣＤＲＬ２について配列番号５４９及びＣＤＲＬ３について配列番号５２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５５８、５５９及び５６０、例えば、配列番号５５８及び５５９、配列番号５５８及び５６０、又は配列番号５５９及び５６０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５５８、ＣＤＲＬ２について配列番号５５９及びＣＤＲＬ３について配列番号５６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５６８、５６９及び５７０、例えば、配列番号５６８及び５６９、配列番号５６８及び５７０、又は配列番号５６９及び５７０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５６８、ＣＤＲＬ２について配列番号５６９及びＣＤＲＬ３について配列番号５７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５７８、５７９及び５８０、例えば、配列番号５７８及び５７９、配列番号５７８及び５８０、又は配列番号５７９及び５８０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５７８、ＣＤＲＬ２について配列番号５７９及びＣＤＲＬ３について配列番号５８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５８８、５８９及び５９０、例えば、配列番号５８８及び５８９、配列番号５８８及び５９０、又は配列番号５８９及び５９０から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、例えば、ＣＤＲＬ１について配列番号５８８、ＣＤＲＬ２について配列番号５８９及びＣＤＲＬ３について配列番号５９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１０３、ＣＤＲＨ２について配列番号１０４及びＣＤＲＨ３について配列番号１０５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１０８、１０９及び１２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１０８、ＣＤＲＬ２について配列番号１０９及びＣＤＲＬ３について配列番号１２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１１３、ＣＤＲＨ２について配列番号１１４及びＣＤＲＨ３について配列番号１１５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１１８、１１９及び１２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１１８、ＣＤＲＬ２について配列番号１１９及びＣＤＲＬ３について配列番号１２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１２３、ＣＤＲＨ２について配列番号１２４及びＣＤＲＨ３について配列番号１２５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１２８、１２９及び１３０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１２８、ＣＤＲＬ２について配列番号１２９及びＣＤＲＬ３について配列番号１３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１９７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１３３、ＣＤＲＨ２について配列番号１３４及びＣＤＲＨ３について配列番号１３５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１３８、１３９及び１４０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１３８、ＣＤＲＬ２について配列番号１３９及びＣＤＲＬ３について配列番号１４０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１９８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１４３、ＣＤＲＨ２について配列番号１４４及びＣＤＲＨ３について配列番号１４５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１４８、１４９及び１５０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１４８、ＣＤＲＬ２について配列番号１４９及びＣＤＲＬ３について配列番号１５０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０１９９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１５３、ＣＤＲＨ２について配列番号１５４及びＣＤＲＨ３について配列番号１５５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１５８、１５９及び１６０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１５８、ＣＤＲＬ２について配列番号１５９及びＣＤＲＬ３について配列番号１６０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２００】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１６３、ＣＤＲＨ２について配列番号１６４及びＣＤＲＨ３について配列番号１６５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１６８、１６９及び１７０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１６８、ＣＤＲＬ２について配列番号１６９及びＣＤＲＬ３について配列番号１７０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２０１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１７３、ＣＤＲＨ２について配列番号１７４及びＣＤＲＨ３について配列番号１７５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１７８、１７９及び１８０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１７８、ＣＤＲＬ２について配列番号１７９及びＣＤＲＬ３について配列番号１８０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２０２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１８３、ＣＤＲＨ２について配列番号１８４及びＣＤＲＨ３について配列番号１８５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１８８、１８９及び１９０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１８８、ＣＤＲＬ２について配列番号１８９及びＣＤＲＬ３について配列番号１９０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２０３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号１９３、ＣＤＲＨ２について配列番号１９４及びＣＤＲＨ３について配列番号１９５を含む重鎖可変領域並びに配列番号１９８、１９９及び２００から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号１９８、ＣＤＲＬ２について配列番号１９９及びＣＤＲＬ３について配列番号２００を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２０４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２０３、ＣＤＲＨ２について配列番号２０４及びＣＤＲＨ３について配列番号２０５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２０８、２０９及び２２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２０８、ＣＤＲＬ２について配列番号２０９及びＣＤＲＬ３について配列番号２２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２０５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２１３、ＣＤ

ＲＨ２について配列番号２１４及びＣＤＲＨ３について配列番号２１５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２１８、２１９及び２２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２１８、ＣＤＲＬ２について配列番号２１９及びＣＤＲＬ３について配列番号２２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２０６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２２３、ＣＤＲＨ２について配列番号２２４及びＣＤＲＨ３について配列番号２２５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２２８、２２９及び２３０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２２８、ＣＤＲＬ２について配列番号２２９及びＣＤＲＬ３について配列番号２３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２０７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２３３、ＣＤＲＨ２について配列番号２３４及びＣＤＲＨ３について配列番号２３５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２３８、２３９及び２４０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２３８、ＣＤＲＬ２について配列番号２３９及びＣＤＲＬ３について配列番号２４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２０８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２４３、ＣＤＲＨ２について配列番号２４４及びＣＤＲＨ３について配列番号２４５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２４８、２４９及び２５０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２４８、ＣＤＲＬ２について配列番号２４９及びＣＤＲＬ３について配列番号２５０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２０９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２５３、ＣＤＲＨ２について配列番号２５４及びＣＤＲＨ３について配列番号２５５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２５８、２５９及び２６０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２５８、ＣＤＲＬ２について配列番号２５９及びＣＤＲＬ３について配列番号２６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２６３、ＣＤＲＨ２について配列番号２６４及びＣＤＲＨ３について配列番号２６５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２６８、２６９及び２７０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２６８、ＣＤＲＬ２について配列番号２６９及びＣＤＲＬ３について配列番号２７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２７３、ＣＤＲＨ２について配列番号２７４及びＣＤＲＨ３について配列番号２７５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２７８、２７９及び２８０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２７８、ＣＤＲＬ２について配列番号２７９及びＣＤＲＬ３について配列番号２８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２８３、ＣＤＲＨ２について配列番号２８４及びＣＤＲＨ３について配列番号２８５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２８８、２８９及び２９０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２８８、ＣＤＲＬ２について配列番号２８９及びＣＤＲＬ３について配列番号２９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号２９３、ＣＤＲＨ２について配列番号２９４及びＣＤＲＨ３について配列番号２９５を含む重鎖可変領域並びに配列番号２９８、２９９及び３００から独立して選択される軽鎖可変領域の少な

くとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号２９８、ＣＤＲＬ２について配列番号２９９及びＣＤＲＬ３について配列番号３００を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３０３、ＣＤＲＨ２について配列番号３０４及びＣＤＲＨ３について配列番号３０５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３０８、３０９及び３２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３０８、ＣＤＲＬ２について配列番号３０９及びＣＤＲＬ３について配列番号３２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３１３、ＣＤＲＨ２について配列番号３１４及びＣＤＲＨ３について配列番号３１５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３１８、３１９及び３２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３１８、ＣＤＲＬ２について配列番号３１９及びＣＤＲＬ３について配列番号３２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３２３、ＣＤＲＨ２について配列番号３２４及びＣＤＲＨ３について配列番号３２５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３２８、３２９及び３３０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３２８、ＣＤＲＬ２について配列番号３２９及びＣＤＲＬ３について配列番号３３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３３３、ＣＤＲＨ２について配列番号３３４及びＣＤＲＨ３について配列番号３３５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３３８、３３９及び３４０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３３８、ＣＤＲＬ２について配列番号３３９及びＣＤＲＬ３について配列番号３４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３４３、ＣＤＲＨ２について配列番号３４４及びＣＤＲＨ３について配列番号３４５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３４８、３４９及び３５０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３４８、ＣＤＲＬ２について配列番号３４９及びＣＤＲＬ３について配列番号３５０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２１９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３５３、ＣＤＲＨ２について配列番号３５４及びＣＤＲＨ３について配列番号３５５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３５８、３５９及び３６０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３５８、ＣＤＲＬ２について配列番号３５９及びＣＤＲＬ３について配列番号３６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２２０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３６３、ＣＤＲＨ２について配列番号３６４及びＣＤＲＨ３について配列番号３６５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３６８、３６９及び３７０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３６８、ＣＤＲＬ２について配列番号３６９及びＣＤＲＬ３について配列番号３７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２２１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３７３、ＣＤＲＨ２について配列番号３７４及びＣＤＲＨ３について配列番号３７５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３７８、３７９及び３８０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３７８、ＣＤＲＬ２について配列番号３７９及びＣＤＲＬ３について配列番号３８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２２２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３８３、ＣＤＲＨ２について配列番号３８４及びＣＤＲＨ３について配列番号３８５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３８８、３８９及び３９０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３８８、ＣＤＲＬ２について配列番号３８９及びＣＤＲＬ３について配列番号３９０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号３９３、ＣＤＲＨ２について配列番号３９４及びＣＤＲＨ３について配列番号３９５を含む重鎖可変領域並びに配列番号３９８、３９９及び４００から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号３９８、ＣＤＲＬ２について配列番号３９９及びＣＤＲＬ３について配列番号４００を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４０３、ＣＤＲＨ２について配列番号４０４及びＣＤＲＨ３について配列番号４０５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４０８、４０９及び４２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４０８、ＣＤＲＬ２について配列番号４０９及びＣＤＲＬ３について配列番号４２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４１３、ＣＤＲＨ２について配列番号４１４及びＣＤＲＨ３について配列番号４１５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４１８、４１９及び４２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４１８、ＣＤＲＬ２について配列番号４１９及びＣＤＲＬ３について配列番号４２０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４２３、ＣＤＲＨ２について配列番号４２４及びＣＤＲＨ３について配列番号４２５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４２８、４２９及び４３０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４２８、ＣＤＲＬ２について配列番号４２９及びＣＤＲＬ３について配列番号４３０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４３３、ＣＤＲＨ２について配列番号４３４及びＣＤＲＨ３について配列番号４３５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４３８、４３９及び４４０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４３８、ＣＤＲＬ２について配列番号４３９及びＣＤＲＬ３について配列番号４４０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４４３、ＣＤＲＨ２について配列番号４４４及びＣＤＲＨ３について配列番号４４５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４４８、４４９及び４５０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４４８、ＣＤＲＬ２について配列番号４４９及びＣＤＲＬ３について配列番号４５０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２２９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４５３、ＣＤＲＨ２について配列番号４５４及びＣＤＲＨ３について配列番号４５５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４５８、４５９及び４６０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４５８、ＣＤＲＬ２について配列番号４５９及びＣＤＲＬ３について配列番号４６０を含む軽鎖可変領域を含む。
【０２３０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４６３、ＣＤ

ＲＨ２について配列番号４６４及びＣＤＲＨ３について配列番号４６５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４６８、４６９及び４７０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４６８、ＣＤＲＬ２について配列番号４６９及びＣＤＲＬ３について配列番号４７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４７３、ＣＤＲＨ２について配列番号４７４及びＣＤＲＨ３について配列番号４７５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４７８、４７９及び４８０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４７８、ＣＤＲＬ２について配列番号４７９及びＣＤＲＬ３について配列番号４８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４８３、ＣＤＲＨ２について配列番号４８４及びＣＤＲＨ３について配列番号４８５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４８８、４８９及び４９０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４８８、ＣＤＲＬ２について配列番号４８９及びＣＤＲＬ３について配列番号４９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号４９３、ＣＤＲＨ２について配列番号４９４及びＣＤＲＨ３について配列番号４９５を含む重鎖可変領域並びに配列番号４９８、４９９及び５００から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号４９８、ＣＤＲＬ２について配列番号４９９及びＣＤＲＬ３について配列番号５００を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５０３、ＣＤＲＨ２について配列番号５０４及びＣＤＲＨ３について配列番号５０５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５０８、５０９及び５２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５０８、ＣＤＲＬ２について配列番号５０９及びＣＤＲＬ３について配列番号５２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５１３、ＣＤＲＨ２について配列番号５１４及びＣＤＲＨ３について配列番号５１５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５１８、５１９及び５２０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５１８、ＣＤＲＬ２について配列番号５１９及びＣＤＲＬ３について配列番号５２０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５２３、ＣＤＲＨ２について配列番号５２４及びＣＤＲＨ３について配列番号５２５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５２８、５２９及び５３０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５２８、ＣＤＲＬ２について配列番号５２９及びＣＤＲＬ３について配列番号５３０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５３３、ＣＤＲＨ２について配列番号５３４及びＣＤＲＨ３について配列番号５３５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５３８、５３９及び５４０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５３８、ＣＤＲＬ２について配列番号５３９及びＣＤＲＬ３について配列番号５４０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５４３、ＣＤＲＨ２について配列番号５４４及びＣＤＲＨ３について配列番号５４５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５４８、５４９及び５５０から独立して選択される軽鎖可変領域の少な

くとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５４８、ＣＤＲＬ２について配列番号５４９及びＣＤＲＬ３について配列番号５５０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２３９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５５３、ＣＤＲＨ２について配列番号５５４及びＣＤＲＨ３について配列番号５５５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５５８、５５９及び５６０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５５８、ＣＤＲＬ２について配列番号５５９及びＣＤＲＬ３について配列番号５６０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２４０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５６３、ＣＤＲＨ２について配列番号５６４及びＣＤＲＨ３について配列番号５６５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５６８、５６９及び５７０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５６８、ＣＤＲＬ２について配列番号５６９及びＣＤＲＬ３について配列番号５７０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２４１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５７３、ＣＤＲＨ２について配列番号５７４及びＣＤＲＨ３について配列番号５７５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５７８、５７９及び５８０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５７８、ＣＤＲＬ２について配列番号５７９及びＣＤＲＬ３について配列番号５８０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２４２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、ＣＤＲＨ１について配列番号５８３、ＣＤＲＨ２について配列番号５８４及びＣＤＲＨ３について配列番号５８５を含む重鎖可変領域並びに配列番号５８８、５８９及び５９０から独立して選択される軽鎖可変領域の少なくとも１つのＣＤＲ、特に、ＣＤＲＬ１について配列番号５８８、ＣＤＲＬ２について配列番号５８９及びＣＤＲＬ３について配列番号５９０を含む軽鎖可変領域を含む。

【０２４３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２４４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２４５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２の可変重鎖領域及び配列番号７の可変軽鎖領域を含む。

【０２４６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２４７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２４８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２の可変重鎖領域及び配列番号１７の可変軽鎖領域を含む。

【０２４９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２５０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２５１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２の可変重鎖領域及び配列番号２７の可変軽鎖領域を含む。
【０２５２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２５３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２５４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２の可変重鎖領域及び配列番号３７の可変軽鎖領域を含む。
【０２５５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２５６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２５７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２の可変重鎖領域及び配列番号５７の可変軽鎖領域を含む。
【０２５８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２５９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２６０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２の可変重鎖領域及び配列番号６７の可変軽鎖領域を含む。
【０２６１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号７２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２６２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号７７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２６３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号７２の可変重鎖領域及び配列番号７７の可変軽鎖領域を含む。
【０２６４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号８２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２６５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号８７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２６６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号８２の可変重鎖領域及び配列番号８７の可変軽鎖領域を含む。
【０２６７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号９２の可変領域を例えば重鎖の可

変領域として含む。
【０２６８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号９７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２６９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号９２の可変重鎖領域及び配列番号９７の可変軽鎖領域を含む。
【０２７０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１０２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２７１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１０７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２７２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１０２の可変重鎖領域及び配列番号１０７の可変軽鎖領域を含む。
【０２７３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１１２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２７４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１１７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２７５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１１２の可変重鎖領域及び配列番号１１７の可変軽鎖領域を含む。
【０２７６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２７７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２７８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１２２の可変重鎖領域及び配列番号１２７の可変軽鎖領域を含む。
【０２７９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１３２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２８０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１３７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２８１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１３２の可変重鎖領域及び配列番号１３７の可変軽鎖領域を含む。
【０２８２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１５２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０２８３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１５７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０２８４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１５２の可変重鎖領域及び配列番号１５７の可変軽鎖領域を含む。

【０２８５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１６２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２８６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１６７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２８７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１６２の可変重鎖領域及び配列番号１６７の可変軽鎖領域を含む。

【０２８８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１７２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２８９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１７７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２９０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１７２の可変重鎖領域及び配列番号１７７の可変軽鎖領域を含む。

【０２９１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１８２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２９２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１８７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２９３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１８２の可変重鎖領域及び配列番号１８７の可変軽鎖領域を含む。

【０２９４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１９２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２９５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１９７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２９６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号１９２の可変重鎖領域及び配列番号１９７の可変軽鎖領域を含む。

【０２９７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２０２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０２９８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２０７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０２９９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２０２の可変重鎖領域及び配列番号２０７の可変軽鎖領域を含む。

【０３００】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２１２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０３０１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２１７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３０２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２１２の可変重鎖領域及び配列番号２１７の可変軽鎖領域を含む。
【０３０３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３０４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３０５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２２２の可変重鎖領域及び配列番号２２７の可変軽鎖領域を含む。
【０３０６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２３２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３０７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２３７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３０８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２３２の可変重鎖領域及び配列番号２３７の可変軽鎖領域を含む。
【０３０９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２４２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３１０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２４７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３１１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２４２の可変重鎖領域及び配列番号２４７の可変軽鎖領域を含む。
【０３１２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２５２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３１３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２５７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３１４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２５２の可変重鎖領域及び配列番号２５７の可変軽鎖領域を含む。
【０３１５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２６２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３１６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２６７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３１７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２６２の可変重鎖領域及び配列番

号２６７の可変軽鎖領域を含む。
【０３１８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２７２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３１９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２７７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３２０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２７２の可変重鎖領域及び配列番号２７７の可変軽鎖領域を含む。
【０３２１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２８２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３２２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２８７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３２３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２８２の可変重鎖領域及び配列番号２８７の可変軽鎖領域を含む。
【０３２４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２９２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３２５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２９７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３２６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号２９２の可変重鎖領域及び配列番号２９７の可変軽鎖領域を含む。
【０３２７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３０２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３２８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３０７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３２９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３０２の可変重鎖領域及び配列番号３０７の可変軽鎖領域を含む。
【０３３０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３１２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３３１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３１７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３３２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３１２の可変重鎖領域及び配列番号３１７の可変軽鎖領域を含む。
【０３３３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３３４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０３３５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３２２の可変重鎖領域及び配列番号３２７の可変軽鎖領域を含む。

【０３３６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３３２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０３３７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３３７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０３３８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３３２の可変重鎖領域及び配列番号３３７の可変軽鎖領域を含む。

【０３３９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３５２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０３４０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３５７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０３４１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３５２の可変重鎖領域及び配列番号３５７の可変軽鎖領域を含む。

【０３４２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３６２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０３４３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３６７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０３４４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３６２の可変重鎖領域及び配列番号３６７の可変軽鎖領域を含む。

【０３４５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３７２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０３４６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３７７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０３４７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３７２の可変重鎖領域及び配列番号３７７の可変軽鎖領域を含む。

【０３４８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３８２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０３４９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３８７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０３５０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３８２の可変重鎖領域及び配列番号３８７の可変軽鎖領域を含む。

【０３５１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３９２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３５２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３９７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３５３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号３９２の可変重鎖領域及び配列番号３９７の可変軽鎖領域を含む。
【０３５４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４０２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３５５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４０７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３５６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４０２の可変重鎖領域及び配列番号４０７の可変軽鎖領域を含む。
【０３５７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４１２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３５８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４１７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３５９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４１２の可変重鎖領域及び配列番号４１７の可変軽鎖領域を含む。
【０３６０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４２２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３６１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４２７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３６２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４２２の可変重鎖領域及び配列番号４２７の可変軽鎖領域を含む。
【０３６３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４３２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３６４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４３７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３６５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４３２の可変重鎖領域及び配列番号４３７の可変軽鎖領域を含む。
【０３６６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４５２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３６７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４５７の可変領域を例えば軽鎖の

可変領域として含む。
【０３６８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４５２の可変重鎖領域及び配列番号４５７の可変軽鎖領域を含む。
【０３６９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４６２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３７０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４６７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３７１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４６２の可変重鎖領域及び配列番号４６７の可変軽鎖領域を含む。
【０３７２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４７２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３７３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４７７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３７４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４７２の可変重鎖領域及び配列番号４７７の可変軽鎖領域を含む。
【０３７５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４８２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３７６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４８７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３７７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４８２の可変重鎖領域及び配列番号４８７の可変軽鎖領域を含む。
【０３７８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４９２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３７９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４９７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号４９２の可変重鎖領域及び配列番号４９７の可変軽鎖領域を含む。
【０３８０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５０２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３８１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５０７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３８２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５０２の可変重鎖領域及び配列番号５０７の可変軽鎖領域を含む。
【０３８３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５１２の可変領域を例えば重鎖の

可変領域として含む。
【０３８４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５１７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３８５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５１２の可変重鎖領域及び配列番号５１７の可変軽鎖領域を含む。
【０３８６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３８７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３８８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５２２の可変重鎖領域及び配列番号５２７の可変軽鎖領域を含む。
【０３８９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５３２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３９０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５３７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３９１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５３２の可変重鎖領域及び配列番号５３７の可変軽鎖領域を含む。
【０３９２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５５２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３９３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５５７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３９４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５５２の可変重鎖領域及び配列番号５５７の可変軽鎖領域を含む。
【０３９５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５６２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３９６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５６７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０３９７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５６２の可変重鎖領域及び配列番号５６７の可変軽鎖領域を含む。
【０３９８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５７２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０３９９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５７７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０４００】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５７２の可変重鎖領域及び配列番号５７７の可変軽鎖領域を含む。

【０４０１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５８２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０４０２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５８７の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０４０３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５８２の可変重鎖領域及び配列番号５８７の可変軽鎖領域を含む。

【０４０４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５９２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０４０５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５９４の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０４０６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５９２の可変重鎖領域及び配列番号５９の可変軽鎖領域を含む。

【０４０７】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５９６の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０４０８】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５９８の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０４０９】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号５９６の可変重鎖領域及び配列番号５９８の可変軽鎖領域を含む。

【０４１０】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６００の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０４１１】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６０２の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０４１２】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６００の可変重鎖領域及び配列番号６０２の可変軽鎖領域を含む。

【０４１３】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６０４の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０４１４】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６０６の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。

【０４１５】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６０４の可変重鎖領域及び配列番号６０６の可変軽鎖領域を含む。

【０４１６】

一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６０８の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。

【０４１７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１０の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０４１８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６０８の可変重鎖領域及び配列番号６１０の可変軽鎖領域を含む。
【０４１９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１２の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０４２０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１４の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０４２１】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１２の可変重鎖領域及び配列番号６１４の可変軽鎖領域を含む。
【０４２２】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１６の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０４２３】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１８の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０４２４】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６１６の可変重鎖領域及び配列番号６１８の可変軽鎖領域を含む。
【０４２５】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２０の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０４２６】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２２の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０４２７】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２０の可変重鎖領域及び配列番号６２２の可変軽鎖領域を含む。
【０４２８】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２４の可変領域を例えば重鎖の可変領域として含む。
【０４２９】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２６の可変領域を例えば軽鎖の可変領域として含む。
【０４３０】
一実施形態において、本開示の結合分子は、配列番号６２４の可変重鎖領域及び配列番号６２６の可変軽鎖領域を含む。
【０４３１】
別の実施形態において、本開示は、ＶＨ及びＶＬを含む、ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片に関し、ここでＶＨは、上記に開示されるとおりのＶＨ、例えば配列番号１８２又は配列番号６１６と少なくとも９０％、例えば、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００％同一のアミノ酸配列を有する。
【０４３２】
別の実施形態において、本開示は、ＶＨ及びＶＬを含む、ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片に関し、ここで上記に開示されるとおりのＶＨ、例えば

配列番号１８２又は配列番号６１６は、フレームワークの１、２、３又は４アミノ酸が独立して異なるアミノ酸に置換されているか又は欠失している配列を有する。

【０４３３】

別の実施形態において、本開示は、ＶＨ及びＶＬを含む、ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片に関し、ここでＶＬは、上記に開示されるとおりのＶＬ、例えば配列番号１８７又は配列番号６１８と少なくとも９０％、例えば、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００％同一のアミノ酸配列を有する。

【０４３４】

別の実施形態において、本開示は、ＶＨ及びＶＬを含む、ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片に関し、ここで上記に開示される、例えば配列番号１８７又は配列番号６１８にあるＶＬは、フレームワークの１、２、３又は４アミノ酸が独立して異なるアミノ酸に置換されているか又は欠失している配列を有する。

【０４３５】

別の実施形態において、本開示は、ＶＨ及びＶＬを含む、ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片に関し、ここでＶＨは、上記に開示されるとおりのＶＨ、例えば配列番号１８２又は配列番号６１６と少なくとも９０％、例えば、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００％同一のアミノ酸配列を有し、及びＶＬは、上記に開示されるとおりのＶＬ、例えば配列番号１８７又は配列番号６１８と少なくとも９０％、例えば、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９又は１００％同一のアミノ酸配列を有する。

【０４３６】

別の実施形態において、本開示は、ＶＨ及びＶＬを含む、ＩＬ－３３に特異的に結合する単離抗体又はその抗原結合断片に関し、ここで上記に開示されるとおりのＶＨ、例えば配列番号１８２又は配列番号６１６は、フレームワークの１、２、３又は４アミノ酸が独立して異なるアミノ酸に置換されているか又は欠失している配列を有し、上記に開示される、例えば配列番号１８７又は配列番号６１８にあるＶＬは、フレームワークの１、２、３又は４アミノ酸が独立して異なるアミノ酸に置換されているか又は欠失している配列を有する。

【０４３７】

一実施形態において、本開示に係る結合分子（ｂｉｎｄｎｇ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）、例えば抗体又は結合断片を交差遮断する抗体又は結合断片が提供され、詳細には前記抗体又は結合断片は本明細書に開示される分子と同じエピトープを結合する。

【０４３８】

一部の実施形態において、本結合分子又は抗体又はその抗原結合断片は、ヒト抗体、キメラ抗体、又はヒト化抗体である。一部の実施形態において、本結合分子又は抗体又はその抗原結合断片は、天然に存在する抗体、ｓｃＦｖ断片、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、又は一本鎖抗体である。一部の実施形態において、本結合分子又は抗体又はその抗原結合断片はモノクローナル抗体である。

【０４３９】

別の実施形態において、本開示は、特に本明細書に記載されるとおりの、本開示の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドに関する。特定の実施形態において、本ポリヌクレオチドは本開示の抗体又はその抗原結合断片のＶＨをコードする。特定の実施形態において、本ポリヌクレオチドは本開示の抗体又はその抗原結合断片のＶＬをコードする。

【０４４０】

一部の実施形態において、本開示は、本開示のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

【０４４１】

一部の実施形態において、本開示は、本開示のポリヌクレオチド又はベクターを含む組

成物に関する。
【０４４２】
別の実施形態において、本開示のポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞が提供される。
【０４４３】
別の実施形態において、本明細書の開示は、抗ＩＬ－３３抗体又はその抗原結合断片の作製方法であって、本開示の宿主細胞を培養する工程と、前記抗体又はその抗原結合断片を回収する工程とを含む方法に関する。一部の実施形態において、本開示は、本開示の方法によって作製された抗ＩＬ－３３抗体又はその抗原結合断片に関する。
【０４４４】
別の実施形態において、本開示は、本開示の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片と担体とを含む医薬組成物に関する。
【０４４５】
別の実施形態において、本開示は、炎症病態を有する対象の治療方法であって、ＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する本開示に係る抗体又は抗原結合断片の有効量を前記対象に投与する工程を含む方法に関する。
【０４４６】
別の実施形態において、炎症病態を有する対象の治療方法であって、本開示の結合分子又はそれを含む組成物を投与する工程を含む方法が提供される。
【０４４７】
一態様において、特に本明細書に記載されるとおりの、例えば炎症病態の治療において使用される本開示の結合分子又はそれを含む組成物が提供される。
【０４４８】
一実施形態において、炎症病態の治療又は予防用医薬の製造における本開示の結合分子又はそれを含む組成物の使用が提供される。
【０４４９】
一実施形態において、炎症病態は、喘息、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、慢性鼻副鼻腔炎、線維増殖性疾患（例えば肺線維症）、肺好酸球増多症、胸膜悪性病変、関節リウマチ、膠原血管病、アテローム硬化性血管疾患、蕁麻疹（ｕｔｉｃａｒｉａ）、炎症性腸疾患（例えばクローン病又はセリアック病）、全身性エリテマトーデス、進行性全身性硬化症、ウェゲナー肉芽腫症、敗血症性ショック及びベーチェット病（Ｂｅｃｈｅｔ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ）から選択される。
【０４５０】
一部の実施形態において、炎症病態はアレルギー性障害、例えば、喘息、慢性鼻副鼻腔炎、食物アレルギー、湿疹（ｅｃｚｍａ）又は皮膚炎、特に難治性喘息（重症喘息とも称される）などの喘息である。
【０４５１】
一部の実施形態において、炎症反応又は炎症病態は前記対象の気道におけるものである。
【０４５２】
一実施形態において、炎症反応又は炎症病態は平滑筋におけるものである。
【０４５３】
別の実施形態において、本開示は、対象の炎症反応の予防方法であって、ＩＬ－３３と結合し且つＩＬ－３３がＳＴ２に結合するのを遮断しない抗体又はその抗原結合断片の有効量を前記対象に投与する工程を含む方法に関し、ここでＳＴ２シグナル伝達は低下する。
【０４５４】
別の実施形態において、本開示は、対象の炎症反応の予防方法であって、ＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する本開示に係る抗体又は抗原結合断片の有効量を前記対象に投与する工程を含む方法に関する。

【０４５５】
別の実施形態において、本開示は、対象の炎症反応の予防方法であって、本開示の結合分子又は抗体又はその抗原結合断片の有効量を前記対象に投与する工程を含む方法に関する。
【０４５６】
別の実施形態において、本開示は、治療用抗体又はその抗原結合断片を同定する方法であって、ＩＬ－３３に結合する抗体又はその抗原結合断片を選択する工程を含む方法に関し、ここで前記抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３がＳＴ２に結合するのを遮断せず且つＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。
【０４５７】
一実施形態において、ジスルフィド結合形成能が低下した、詳細にはＣｙｓ－２０８、Ｃｙｓ－２２７、Ｃｙｓ－２３２及びＣｙｓ－２５９から独立して選択される１つ以上の位置におけるジスルフィド結合形成能が低下した、例えば還元型に安定化したｒｅｄＩＬ－３３、又はその突然変異体で宿主を免疫することが提供される。一実施形態において、本方法は、宿主から抗体を例えば機能アッセイを用いてスクリーニングする工程と、前記抗体のうちの少なくとも１つに由来する少なくとも可変領域を単離し及び／又は複製する工程とを更に含む。
【０４５８】
実施形態において、ＳＴ２シグナル伝達の阻害薬、詳細にはｒｅｄＩＬ－３３に特異的な抗体又はその結合断片を同定するための、ジスルフィド結合形成能が低下した、詳細にはＣｙｓ－２０８、Ｃｙｓ－２２７、Ｃｙｓ－２３２及びＣｙｓ－２５９から独立して選択される１つ以上の位置におけるジスルフィド結合形成能が低下した、例えば還元型に安定化したｒｅｄＩＬ－３３、又はその突然変異体の使用が提供される。一実施形態において、この使用は、前記タンパク質又はその活性断片を用いてライブラリ、例えばファージディスプレイ抗体ライブラリを検索する工程を用いる。
【０４５９】
一部の実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合断片はＮＦκＢシグナル伝達を阻害しない。
【０４６０】
一実施形態において、本開示のｒｅｄＩＬ－３３又は突然変異体（本明細書では、まとめて本開示のタンパク質と称される）を用いて本開示の結合分子を同定又は作成する方法が提供される。一実施形態において、本方法は、本開示のタンパク質でライブラリを検索して結合分子を同定する工程を含む。一実施形態において、本方法は、本開示のタンパク質で宿主を免疫する工程を含む。
【０４６１】
一実施形態において、本明細書に開示されるとおりの結合分子、例えば抗体又はその結合断片が結合するＩＬ－３３由来のエピトープ、詳細には触媒エピトープ、即ちその結合がＩＬ－３３還元型から酸化型への変換速度を増大させるエピトープが提供される。
【０４６２】
別の実施形態において、本開示は、試料中のｒｅｄＩＬ－３３発現の検出方法に関する。
【０４６３】
発明の詳細な説明
Ｉ．定義
「単離された」とは、本明細書で用いられるとき、特に自然から隔離された非天然環境にあるタンパク質を指し、例えばこの用語は生体内のタンパク質を含まず、またヒト又は動物の体から採取された試料中のタンパク質も含まない。概して、タンパク質は液体若しくは媒体などの担体中にあり、又は製剤化、冷凍若しくは凍結乾燥されていてもよく、適切な場合にはこれらの形態の全てが「単離された」に包含され得る。一実施形態において、単離されたとは、ゲル、例えばウエスタンブロット分析などに用いられるゲル中のタン

パク質は指さない。

【０４６４】

ＩＬ－３３タンパク質とは、本明細書で用いられるとき、インターロイキン３３、詳細には哺乳類インターロイキン３３タンパク質、例えばＵｎｉＰｒｏｔ番号Ｏ９５７６０で寄託されているヒトタンパク質を指す。しかしながら、本発明者らの知見を所与とすれば、この実体が単一の種ではなく、むしろ還元型及び酸化型として存在することは明らかである。還元型がインビボで（例えば５分～４０分の時間で）及びインビトロで急速に酸化することを所与とすれば、概して先行技術によるＩＬ－３３への言及は、実際には酸化型に言及したものである。更に、市販のアッセイはこの酸化型を定量化するものと思われる。

【０４６５】

酸化ＩＬ－３３、ＩＬ－３３－ＤＳＢ（ジスルフィド結合した）及びＤＳＢ　ＩＬ－３３は、本明細書では同義的に用いられる。

【０４６６】

酸化ＩＬ－３３とは、本明細書で用いられるとき、例えば非還元条件下でのウエスタンブロット分析によって特徴的なバンドとして現れる、特に対応する還元型（ｒｅｄｕｃｅｄ　ｆｒｏｍ）よりも４Ｄａ少ない質量を有するタンパク質を指す。詳細には、これは、システイン２０８、２２７、２３２及び２５９から独立して選択されるシステイン間に１つ又は２つのジスルフィド結合を有するタンパク質を指す。一実施形態において、酸化ＩＬ－３３はＳＴ２への結合を示さない。

【０４６７】

還元ＩＬ－３３及びｒｅｄＩＬ－３３は、本明細書では同義的に用いられる。

【０４６８】

還元ＩＬ－３３とは、本明細書で用いられるとき、ＳＴ２に結合してＳＴ２依存シグナル伝達を惹起する型のＩＬ－３３を指す。詳細には、還元型のシステイン２０８、２２７、２３２及び２５９はジスルフィド結合していない。ｒｅｄＩＬ－３３の活性断片とは、本明細書で用いられるとき、ｒｅｄＩＬ－３３に匹敵する活性、例えば同程度のＳＴ２依存シグナル伝達を有する断片を指す。一実施形態において、活性断片は、完全長ｒｅｄＩＬ－３３の活性の２０、３０　４０、５０、６０、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８又は９９％である。

【０４６９】

ＳＴ－２依存シグナル伝達とは、本明細書で用いられるとき、ＳＴ２によるＩＬ－３３認識が細胞表面上のＩＬ１－ＲＡｃＰとの二量化並びに細胞内での受容体複合体成分ＭｙＤ８８、ＴＲＡＦ６及びＩＲＡＫ１－４のＴＩＲドメインへの動員を促進するＩＬ－３３／ＳＴ２系を指す。従ってＳＴ－２依存シグナル伝達は、ＩＬ－３３とＳＴ２の相互作用を乱すことによるか、或いはＩＬ－１ＲＡｃＰとの相互作用を妨げることにより妨害し得る。

【０４７０】

「還元型に安定化した」とは、本明細書で用いられるとき、タンパク質が還元型（ｒｅｄｕｃｅｄ　ｆｒｏｍ）をとる若しくは還元型のまま留まることを促進し、又は酸化ＩＬ－３３の形成を妨げる修飾を指す。

【０４７１】

一実施形態において、安定化は、化学的実体とのコンジュゲーション、例えばビオチン化による。ｒｅｄＩＬ－３３は、中性ｐＨで－ＳＨ反応性試薬ビオチン－ＢＭＣＣ（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから入手可能）に曝露されるとモノビオチン化される傾向がある。本発明者らが実施した分析によれば、このビオチン化はＣｙｓ２０８で起こることが示唆される。この位置でのビオチン化は、タンパク質の酸化を阻止し及び／又は低減するように思われる。理論によって拘束されることを望むものではないが、本発明者らが実施したインシリコ解析によれば、Ｃｙｓ２０８は、タンパク質のコンホメーション変化及び酸化に必要な活性の潜在的な開始剤（ｉｎｔｉａｔｏｒ）であることが示唆される

。
【０４７２】
一実施形態において、安定化はＣｙｓ２０８のビオチン化である。
【０４７３】
一実施形態では、Ｃｙｓ２０８がセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２２７がセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２３２がセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２５９がセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８及び２２７が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８及び２３２が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８及び２５９が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８、２２７及び２３２が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８、２２７及び２５９が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８、２３２及び２５９が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２２７、２３２及び２５９が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。一実施形態では、Ｃｙｓ２０８、２２７、２３２及び２５９が独立してセリンなどのアミノ酸によって置換される。
【０４７４】
突然変異とは、本明細書で用いられるとき、ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸が異なるか又は他の何らかの明らかな、例えば機能的な違いが実現するようなアミノ酸配列の変化又はポリヌクレオチド配列の変化を指す。詳細には、この変化には、アミノ残基の欠失又は置換（ｓｕｂｓｉｔｉｔｕｔｉｏｎ）が含まれ得る。遺伝子コードのコドン最適化又は冗長性は、本願の文脈上、突然変異ではない。
【０４７５】
本明細書においては、天然又は野生型タンパク質にアミノ酸又はポリヌクレオチド配列変化がある場合に概して突然変異（ｍｕｔａｔｉｏｎ）を用いるものとし、一方、新規配列に対する変化を考察するときには変異体（ｖａｒｉａｎｔ）を用いるものとする。
【０４７６】
天然とは、本明細書で用いられるとき、野生型配列に見られるか、又はその他の形で天然に存在するアミノ酸などの実体を指す。
【０４７７】
コンジュゲートされたとは、本明細書で用いられるとき、２つの実体又は断片をつなぎ合わせる接続、例えば共有結合（ｃｏｎ－ｖａｌｅｎｔ　ｂｏｎｄ）などの結合を指す。
【０４７８】
実体とは、本明細書で用いられるとき、「エレメント」、分子、断片、原子、成分などを指す。
【０４７９】
化学的実体とは、合成化学的プロセスによって調製されるタイプの分子又は断片である。
【０４８０】
一実施形態において、安定化は、ＩＬ－３３タンパク質の突然変異、例えば点突然変異、詳細には１つ以上のシステインアミノ酸を代替のアミノ酸、例えばセリンに置換することによる。これに関連して用いられるとおりの代替のアミノ酸とは、非システインアミノ酸を指す。一実施形態において、アミノ酸は天然に存在しないアミノ酸である。一実施形態において、アミノ酸は天然に存在するアミノ酸である。一実施形態において、アミノ酸はタンパク質性である。一実施形態において、アミノ酸はセリンであり、これは保存的置換であり、この置換後も概してタンパク質の活性が保持されるため、有利である。
【０４８１】
ｒｅｄＩＬ－３３の安定化は、それによってＩＬ－３３型が活性なコンホメーションに固定され、次にはそれを、タンパク質活性を減弱させる結合分子を発見するためのツール

として使用することができるため重要である。一実施形態において、安定化したタンパク質は、抗体のファージライブラリ又は抗体の合成ライブラリなど、分子のライブラリの検索に用いられる。一実施形態において、安定化したタンパク質は宿主の免疫に用いられ、これによって初めて、還元型に特異的な抗体を作成する機会がもたらされる。

【０４８２】

「～の活性を減弱させる」とは、本明細書で用いられるとき、関連する活性を低下させること又は関連する活性を停止させることを指す。概して減弱と阻害とは、文脈上特に指示がない限り、本明細書では同義的に用いられる。

【０４８３】

一実施形態において、減弱は、ｒｅｄＩＬ－３３への結合による。一実施形態において、本結合分子、例えば抗体又はその結合断片はｒｅｄＩＬ－３３に特異的であり、即ちｒｅｄＩＬ－３３に対する親和性が酸化型に対するよりも高く、例えば１、２、３、４、５高い親和性又はそれ以上である。これは、本明細書ではｒｅｄＩＬ－３３特異抗体と称される。

【０４８４】

一実施形態において、ｒｅｄＩＬ－３３特異抗体は、それが受容体ＳＴ２への結合を立体的に遮断するように結合する。

【０４８５】

一実施形態において、ｒｅｄＩＬ－３３特異抗体は、それが受容体ＩＬ－１ＲＡｃＰへの結合を立体的に遮断するように結合する。

【０４８６】

一実施形態において、ｒｅｄＩＬ－３３特異抗体は、それが受容体ＳＴ２への結合をアロステリックに遮断するように結合する。

【０４８７】

一実施形態において、ｒｅｄＩＬ－３３特異抗体は、それが受容体ＩＬ－１ＲＡｃＰへの結合をアロステリックに遮断するように結合する。

【０４８８】

一実施形態において、ｒｅｄＩＬ－３３特異抗体は、それが受容体ＳＴ２を介したシグナル伝達をアロステリックに遮断するが、ＳＴ２及び／又はＩＬ－１ＲＡｃＰとは結合し得るように結合する。

【０４８９】

一実施形態において、本抗体は酸化型のＩＬ－３３に結合し、還元型から酸化型への変換を触媒する。理論によって拘束されることを望むものではないが、これは、酸化型への結合によってこのプロセスの平衡が酸化型への変換に有利に変化するというものであり得る。

【０４９０】

用語「ａ」又は「ａｎ」　ｅｎｔｉｔｙ（実体）とは、当該の実体の１つ以上を指すことに留意すべきである；例えば、「ａｎ　ａｎｔｉ－ＩＬ－３３　ａｎｔｉｂｏｄｙ（抗ＩＬ－３３抗体）」は、１つ以上の抗ＩＬ－３３抗体を表すものと理解される。従って、用語「ａ」（又は「ａｎ」）、「１つ以上」、及び「少なくとも１つ」は、本明細書では同義的に用いられ得る。

【０４９１】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」は、単数形の「ポリペプチド」並びに複数形の「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状に連結されている単量体（アミノ酸）で構成された分子を指す。用語「ポリペプチド」は、２つ以上のアミノ酸の任意の１つ又は複数の鎖を指し、特定の長さの生成物を指すものではない。従って、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「アミノ酸鎖」、又は２つ以上のアミノ酸の１つ又は複数の鎖を指すために用いられる任意の他の用語が、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりに、又はそれと同義として用いられ得

る。用語「ポリペプチド」はまた、限定なしに、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、又は天然に存在しないアミノ酸による修飾を含めた、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことも意図される。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来してもよく、又は組換え技術によって産生されてもよいが、しかし必ずしも指定の核酸配列から翻訳されるとは限らない。ポリペプチドは、化学合成によることを含め、任意の方法で生成されてよい。

【０４９２】

定義付けられた三次元構造を有するポリペプチドは、折り畳まれていると称され、定義付けられた三次元構造を持たず、むしろ多数の異なるコンホメーションをとるポリペプチドは、折り畳まれていないと称される。本明細書で使用されるとき、用語の糖タンパク質は、少なくとも１つの炭水化物部分にカップリングしたタンパク質を指し、この炭水化物部分は、アミノ酸残基、例えばセリン残基又はアスパラギン残基の酸素含有側鎖又は窒素含有側鎖を介してタンパク質に付加される。

【０４９３】

「単離」ポリペプチド又はその断片、変異体、若しくは誘導体は、その自然環境にないポリペプチドを指すことが意図される。特別な精製レベルは要求されない。例えば、単離ポリペプチドは、その天然又は自然環境から取り出すことができる。宿主細胞で発現させた組換え産生のポリペプチド及びタンパク質は、本開示の目的上、任意の好適な技術によって分離、分画、又は部分的若しくは実質的に精製されている天然又は組換えポリペプチドと同様に、単離されていると見なされる。

【０４９４】

タンパク質とは、本明細書で用いられるとき、二次及び三次構造を有するポリペプチドを指す。

【０４９５】

また、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、又は変異体、及びそれらの任意の組み合わせも、本開示のポリペプチドとして含まれる。

【０４９６】

本開示の抗ＩＬ－３３抗体又は抗体ポリペプチドなど、本開示のタンパク質又はポリペプチドを参照するとき、用語「断片」、「変異体」、「誘導体」、及び「類似体」には、本開示の対応する抗体又は抗体ポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持している任意のポリペプチドが含まれる。本開示のポリペプチドの断片には、本明細書の他の部分で考察される特異的抗体断片に加えて、タンパク質分解断片、並びに欠失断片が含まれる。本開示の抗ＩＬ－３３抗体及び抗体ポリペプチドの変異体には、上記に記載したとおりの断片が含まれ、また、アミノ酸置換、欠失、又は挿入による改変アミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。変異体は天然に存在するものであっても、又は天然に存在しないものであってもよい。天然に存在しない変異体は、当該技術分野において公知の突然変異誘発技法を用いて作製されてもよい。

【０４９７】

変異ポリペプチドは、保存的又は非保存的アミノ酸置換、欠失、又は付加を含み得る。変異ポリペプチドはまた、本明細書においては「ポリペプチド類似体」とも称され得る。本明細書で使用されるとき、例えば抗ＩＬ－３３抗体又は抗体ポリペプチドの「誘導体」とは、官能性側基の反応によって化学的に誘導体化された１つ以上の残基を有する対象ポリペプチドを指す。また、「誘導体」としては、２０種標準アミノ酸の天然に存在するアミノ酸誘導体を１つ以上含有するペプチドも含まれる。例えば、４－ヒドロキシプロリンがプロリンの代わりに置換されてもよく；５－ヒドロキシリジンがリジンの代わりに置換されてもよく；３－メチルヒスチジンがヒスチジンの代わりに置換されてもよく；ホモセリンがセリンの代わりに置換されてもよく；及びオルニチンがリジンの代わりに置換されてもよい。本開示の抗ＩＬ－３３抗体及び抗体ポリペプチドの誘導体には、本開示の参照抗体又は抗体ポリペプチドには見られない追加の特徴を呈するように改変されているポリペプチドが含まれ得る。

【０４９８】
用語「ポリヌクレオチド」は、単数の核酸並びに複数の核酸を包含することが意図され、単離核酸分子又はコンストラクト、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）又はプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）を指す。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合又は非従来の結合（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）に見られるようなアミド結合）を含み得る。用語「核酸」は、ポリヌクレオチドに存在する任意の１つ以上の核酸セグメント、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ断片を指す。「単離」核酸又はポリヌクレオチドは、その自然環境から取り出されている核酸分子、ＤＮＡ又はＲＮＡが意図される。例えば、ベクターに含まれている、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片をコードする組換えポリヌクレオチドは、本開示の目的上、単離されていると見なされる。単離ポリヌクレオチドの更なる例には、異種宿主細胞中に維持されている組換えポリヌクレオチド又は溶液中にある（部分的又は実質的に）精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離ＲＮＡ分子には、本開示のポリヌクレオチドのインビボ又はインビトロＲＮＡ転写物が含まれる。本開示に係る単離ポリヌクレオチド又は核酸には、合成的に作製されたかかる分子が更に含まれる。加えて、ポリヌクレオチド又は核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、又は転写ターミネーターなどの調節エレメントであってもよく、又をそれらを含んでもよい。

【０４９９】
本明細書で使用されるとき、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸中の一部分である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ、又はＴＡＡ）はアミノ酸に翻訳されないものの、コード領域の一部と見なされることもあり、しかし任意のフランキング配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどは、コード領域の一部ではない。本開示の２つ以上のコード領域が単一のポリヌクレオチドコンストラクト中、例えば単一のベクター上に存在してもよく、又は別個のポリヌクレオチドコンストラクト中、例えば別個の（異なる）ベクター上に存在してもよい。更には、任意のベクターが単一のコード領域を含有してもよく、又は２つ以上のコード領域を含んでもよく、例えば、単一のベクターが免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖可変領域とを別々にコードしてもよい。加えて、本開示のベクター、ポリヌクレオチド、又は核酸は、抗ＩＬ－３３抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体をコードする核酸に融合されていることも、又は融合されていないこともある異種コード領域をコードし得る。異種コード領域には、限定なしに、分泌シグナルペプチド又は異種機能ドメインなどの特殊なエレメント又はモチーフが含まれる。

【０５００】
特定の実施形態において、ポリヌクレオチド又は核酸はＤＮＡである。ＤＮＡの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、１つ以上のコード領域に作動可能に結び付いたプロモーター及び／又は他の転写若しくは翻訳制御エレメントを含み得る。作動可能な結び付きとは、遺伝子産物の発現が１つ又は複数の調節配列の影響下又は制御下に置かれるような形で遺伝子産物、例えばポリペプチドのコード領域が１つ以上の調節配列と結び付いているときである。２つのＤＮＡ断片（ポリペプチドコード領域及びそれに結び付いたプロモーターなど）は、所望の遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの転写がプロモーター機能の誘導によって生じる場合、且つそれらの２つのＤＮＡ断片間の連結の性質が遺伝子産物の発現を指図する発現調節配列の能力を妨げないか、又はＤＮＡ鋳型が転写される能力を妨げない場合に、「作動可能に結び付いている」。従って、プロモーター領域は、そのプロモーターが当該の核酸の転写を生じさせる能力を有したならば、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に結び付いているとし得る。プロモーターは、所定の細胞においてのみ実質的なＤＮＡ転写を指図する細胞特異的プロモーターであってもよい。プロモーターに加え、他の転写制御エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルが、細胞特異的転写を指図するためポリヌクレオチドに作動可能に結び付き得る。好適なプロモーター及び他の転写制御領域は本明細書に開示される。

【０５０１】
種々の転写制御領域が当業者に公知である。それらとしては、限定なしに、脊椎動物細胞で機能する転写制御領域、例えば、限定はされないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーター及びエンハンサーセグメント（イントロンＡと併せた前初期プロモーター）、シミアンウイルス４０（初期プロモータ）、及びレトロウイルス（ラウス肉腫ウイルスなど）が挙げられる。他の転写制御領域としては、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギβ－グロビン、並びに真核細胞における遺伝子発現を制御する能力を有する他の配列など、脊椎動物遺伝子に由来するものが挙げられる。更なる好適な転写制御領域としては、組織特異的プロモーター及びエンハンサー並びにリンホカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロン類又はインターロイキン類によって誘導可能なプロモーター）が挙げられる。

【０５０２】
同様に、種々の翻訳制御エレメントが当業者に公知である。それらとしては、限定はされないが、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終結コドン、及びピコルナウイルスに由来するエレメント（特に配列内リボソーム進入部位、即ちＩＲＥＳ、別名ＣＩＴＥ配列）が挙げられる。

【０５０３】
他の実施形態において、本開示のポリヌクレオチドは、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態のＲＮＡである。

【０５０４】
本開示のポリヌクレオチド及び核酸コード領域には、本開示のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指図するものである分泌ペプチド又はシグナルペプチドをコードする更なるコード領域が結び付き得る。シグナル仮説によれば、哺乳類細胞によって分泌されるタンパク質はシグナルペプチド配列又は分泌リーダー配列を有し、この配列は、粗面小胞体を通じた成長タンパク質鎖の運び出しが始まると、成熟タンパク質から切断される。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドが概してポリペプチドのＮ末端に融合したシグナルペプチドを有し、シグナルペプチドが完全な又は「完全長」ポリペプチドから切断されると分泌型又は「成熟」型のポリペプチドが産生されることを認識している。特定の実施形態では、天然シグナルペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖又は軽鎖シグナルペプチド、又は作動可能に結び付いたポリペプチドの分泌を指図する能力を保持している当該配列の機能性誘導体が用いられる。或いは、異種哺乳類シグナルペプチド、又はその機能性誘導体が用いられてもよい。例えば、野生型リーダー配列がヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）又はマウスβ－グルクロニダーゼのリーダー配列に置換されてもよい。

【０５０５】
本開示の「結合分子」又は「抗原結合分子」は、その最も広義の意味において、抗原決定基と特異的に結合する分子を指す。一実施形態において、本結合分子はＩＬ－３３、詳細にはｒｅｄＩＬ－３３又はＩＬ－３３－ＤＳＢに特異的に結合する。別の実施形態において、本開示の結合分子は抗体又はその抗原結合断片である。

【０５０６】
別の実施形態において、本開示の結合分子は、参照抗体分子の重鎖又は軽鎖ＣＤＲを少なくとも１つ含む。別の実施形態において、本開示の結合分子は、１つ以上の参照抗体分子由来のＣＤＲを少なくとも６つ含む。

【０５０７】
本開示は、特定の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体に関する。

【０５０８】
抗体とは、本明細書で用いられるとき、以下で更に詳細に考察するとおりの免疫グロブリン分子、詳細には完全長抗体又は完全長抗体を含む分子、例えばＤＶＤ－Ｉｇ分子（ｍｏｌｅ）などを指す。

【０５０９】
結合断片は、例えば結合を含む、特に重鎖可変領域の３つのＣＤＲ及び軽鎖可変領域の３つのＣＤＲなど、６つのＣＤＲを含む、抗体断片のエピトープ／抗原結合断片である。
【０５１０】
天然に存在する抗体など、フルサイズの抗体を具体的に参照するのでない限り、用語「抗ＩＬ－３３抗体」は、フルサイズの抗体並びにかかる抗体の抗原結合断片、変異体、類似体、又は誘導体、例えば、天然に存在する抗体若しくは免疫グロブリン分子又は改変抗体分子又は抗体分子と同様の方法で抗原と結合する断片を包含する。
【０５１１】
本明細書で使用されるとき、「ヒト」又は「完全ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれるとともに、ヒト免疫グロブリンライブラリから単離された抗体、又は１つ以上のヒト免疫グロブリンに関してトランスジェニックの、内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体が含まれる。ヒト患者の治療処置には、完全ヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、Ｖａｕｇｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４：３０９－３１４（１９９６）、Ｓｈｅｅｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９５：６１５７－６１６２（１９９８）、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１（１９９２）、及びＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１（１９９１））に記載されるとおりのヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリ（ａｎｔｉｂｏｄｙ ｌｉｂａｒｉｅｓ）を使用したファージディスプレイ法を含め、当該技術分野において公知の種々の方法によって作製することができる。抗体ファージライブラリの作成及び使用技術については、例えば、米国特許第５，９６９，１０８号明細書、同第６，１７２，１９７号明細書、同第５，８８５，７９３号明細書、同第６，５２１，４０４号明細書；同第６，５４４，７３１号明細書；同第６，５５５，３１３号明細書；同第６，５８２，９１５号明細書；同第６，５９３，０８１号明細書；同第６，３００，０６４号明細書；同第６，６５３，０６８号明細書；同第６，７０６，４８４号明細書；及び同第７，２６４，９６３号明細書；及びＲｏｔｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３７６：１３８２（２００８）（これらの各々は全体として参照により援用される）にもまた記載されている。加えて、当該技術分野において公知のとおり、ヒト抗体は、機能性内因性免疫グロブリンの発現能を有しない、しかしヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することはできるトランスジェニックマウスを使用して作製することができる。この技術の概要については、Ｌｏｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｈｕｓｚａｒ，Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３（１９９５）を参照されたい。「ヒト」又は「完全ヒト」抗体にはまた、少なくとも重鎖の可変ドメインを含むか、又は少なくとも重鎖と軽鎖の可変ドメインを含む抗体も含まれ、ここで１つ又は複数の可変ドメインは、１つ又は複数のヒト免疫グロブリン可変ドメインのアミノ酸配列を有する。
【０５１２】
「ヒト」又は「完全ヒト」抗体にはまた、本明細書に記載される抗体分子（例えばＶＨ領域及び／又はＶＬ領域）の変異体（誘導体を含む）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる上記に記載したとおりの「ヒト」又は「完全ヒト」抗体も含まれ、これらの抗体又はその断片は、本開示に係るＩＬ－３３ポリペプチド又はその断片若しくは変異体に免疫特異的に結合する。
【０５１３】
ヒト抗ＩＬ－３３抗体をコードするヌクレオチド配列への突然変異の導入には、限定はされないが、アミノ酸置換をもたらす部位特異的突然変異誘発及びＰＣＲ媒介突然変異誘発を含め、当業者に公知の標準技法を用いることができる。一実施形態において、変異体（誘導体を含む）は、参照ＶＨ領域、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＶＬ領域、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、又はＣＤＲＬ３と比べて５０個未満のアミノ酸置換、４０個未満のアミノ酸置換（ｓｕｂｓｉｔｕｔｉｏｎｓ）、３０個未満のアミノ酸置換、２５個未満のアミノ酸置換、２０個未満のアミノ酸置換、１５個未満のアミノ酸置換、１０個未満

のアミノ酸置換、５個未満のアミノ酸置換、４個未満のアミノ酸置換、３個未満のアミノ酸置換、又は２個未満のアミノ酸置換をコードする。

【０５１４】

特定の実施形態において、アミノ酸置換は、以下で更に考察する保存的アミノ酸置換である。或いは、突然変異は、飽和突然変異誘発によるなどして、コード配列の全て又は一部に沿ってランダムに導入してもよく、得られた突然変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることにより、活性（例えば、ＩＬ－３３ポリペプチド、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせと結合する能力）を保持している突然変異体を同定し得る。「ヒト」又は「完全ヒト」抗体のかかる変異体（又はその誘導体）はまた、「最適化された」又は「抗原結合に関して最適化された」ヒト又は完全ヒト抗体と称することもでき、限定はされないが、抗原に対する親和性が向上した抗体、抗原特異性が改変された抗体、又は潜在的な構造的脆弱性（ｌｉａｂｉｌｉｔｉｔｅｓ）が低下した抗体が含まれる。

【０５１５】

脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は、比較的十分に解明されている。例えば、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ ｅｄ．；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）を参照のこと。

【０５１６】

以下で更に詳細に考察するとおり、用語「免疫グロブリン」には、生化学的に区別され得る種々の幅広いクラスのポリペプチドが含まれる。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロン（γ、μ、α、δ、ε）に分類され、それらの間で幾つかのサブクラスを有する（例えば、γ１～γ４）ことを理解しているであろう。抗体の「クラス」をそれぞれＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ、又はＩｇＥに決めるのは、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１等は十分に特徴付けられており、機能の特殊化をもたらすことが知られている。これらのクラス及びアイソタイプの各々の修飾バージョンは、当業者には本開示に鑑みて容易に識別可能であり、従って本開示の範囲内にある。以下の考察は概してＩｇＧクラスの免疫グロブリン分子に関するが、あらゆる免疫グロブリンクラスが明らかに本開示の範囲内にある。ＩｇＧに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量約２３，０００ダルトンの２つの同一の軽鎖ポリペプチドと、分子量５３，０００～７０，０００の２つの同一の重鎖ポリペプチドとを含む。これらの４本の鎖は、典型的にはジスルフィド結合によって「Ｙ字型」の配置でつなぎ合わされており、ここでは「Ｙ字型」の下流から始まり可変領域にわたって続く重鎖を軽鎖が囲っている。

【０５１７】

軽鎖は、カッパ又はラムダ（κ、λ）のいずれかに分類される。各重鎖クラスにはカッパ軽鎖又はラムダ軽鎖のいずれかが結合している。一般に、免疫グロブリンがハイブリドーマ、Ｂ細胞又は遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって生成されるとき、軽鎖と重鎖とは互いに共有結合し、２本の重鎖の「テール」部分は共有結合性のジスルフィド結合又は非共有結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列がＹ字型配置の分岐した端部のＮ末端から各鎖の最下部のＣ末端まで延びる。

【０５１８】

抗体「Ｙ字型」の基部はＦｃ（断片、結晶化可能）領域と呼ばれ、抗体のクラスに応じて２つ又は３つの定常ドメインに寄与する２本の重鎖で構成されている。従って、Ｆｃ領域は特定のクラスのＦｃ受容体、及び補体タンパク質などの他の免疫分子に結合する。軽鎖及び重鎖は両方ともに、構造的及び機能的相同性領域に分けられる。機能上は、用語「定常」及び「可変」が用いられる。これに関連して、軽鎖部分（Ｖλ又はＶκ）及び重鎖部分（ＶＨ）の可変ドメインによって抗原認識及び特異性が決まることが理解されるであろう。逆に、軽鎖（ＣＬ）及び重鎖（ＣＨ１、ＣＨ２又はＣＨ３）の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動度、Ｆｃ受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣

例上、定常領域ドメインの番号は抗体の抗原結合部位又はアミノ末端から遠位になるほど大きくなる。Ｎ末端部分は可変領域であり、Ｃ末端部分に定常領域がある；実際にはＣＨ３及びＣＬドメインが、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【０５１９】

上記に指摘したとおり、抗体は可変領域によって抗原上のエピトープを選択的に認識し、それと特異的に結合することが可能となる。即ち、抗体のＶＬドメイン及びＶＨドメイン、又はこれらの可変ドメイン内にある相補性決定領域（ＣＤＲ）の一部が組み合わさることにより、三次元抗原結合部位を画定する可変領域を形成する。この四次抗体構造が、Ｙ字型の各腕の端部に存在する抗原結合部位を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、ＶＨ鎖及びＶＬ鎖の各々にある３つのＣＤＲによって画定される。場合によって、例えば、ラクダ科動物種に由来するか又はラクダ科動物免疫グロブリンをベースとして操作された特定の免疫グロブリン分子では、完全な免疫グロブリン分子が重鎖のみからなり、軽鎖はないこともある。例えば、Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３６３：４４６－４４８（１９９３）を参照のこと。

【０５２０】

天然に存在する抗体では、各抗原結合ドメインに存在する６つの「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」は、抗体が水性環境中でその三次元配置をとることに伴い抗原結合ドメインを形成するように特異的に位置するアミノ酸の短い不連続な配列である。「フレームワーク」領域と称される、抗原結合ドメイン中の残りのアミノ酸は、分子間のばらつきをそれ程示さない。フレームワーク領域は概してβシートコンホメーションをとり、ＣＤＲが、βシート構造を接続し且つ場合によってはその一部を成すループを形成する。従って、フレームワーク領域は、鎖間非共有結合性相互作用によってＣＤＲの正しい向きでの配置をもたらす足場を形成する働きをする。これらの配置されたＣＤＲによって形成される抗原結合ドメインが、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を画定する。この相補的な表面は、抗体とそのコグネイトエピトープとの非共有結合性の結合を促進する。それぞれＣＤＲ及びフレームワーク領域を含むアミノ酸は正確に定義されているため（下記参照）、いかなる所与の重鎖又は軽鎖可変ドメインについても、当業者はそれらを容易に同定することができる。

【０５２１】

ある用語について当該技術分野で用いられている及び／又は認められている定義が２つ以上ある場合、本明細書で用いられるとおりのその用語の定義は、それに反する旨が明記されない限り、かかる意味の全てを含むことが意図される。具体的な例は、重鎖及び軽鎖の両方のポリペプチドの可変領域内に見られる不連続な抗原結合部位を記述するための用語「相補性決定領域」（「ＣＤＲ」）の使用である。この特定の領域については、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ”及びＣｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）（これらは参照により本明細書に援用される）によって記載されており、これらの定義は、互いに比較したとき重複する又はサブセットとなるアミノ酸残基を含む。それにも関わらず、抗体又はその変異体のＣＤＲを指すためのいずれの定義の適用も、本明細書において定義及び使用されるとおりのこの用語の範囲内にあることが意図される。比較として、上記に引用した参考文献の各々が定義するとおりのＣＤＲを包含する適切なアミノ酸残基を以下の表１に記載する。特定のＣＤＲを包含する正確な残基番号は、ＣＤＲの配列及びサイズによって異なり得る。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を所与としてどの残基が特定のＣＤＲを含むかをルーチン的に決定することができる。

【０５２２】

【表１】

表1. CDR定義[1]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1]表１中の全てのCDR定義の付番は、
Kabat et al.により規定される付番規則に従う(下記参照)。

【０５２３】
Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．はまた、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列の付番方式も定義した。当業者は、配列それ自体を超えるいかなる実験データにも頼ることなく、この「Ｋａｂａｔ付番」方式を任意の可変ドメイン配列に明確に割り当てることができる。本明細書で使用されるとき、「Ｋａｂａｔ付番」は、Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８３）Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ．”によって規定される付番方式を指す。特記されない限り、本開示の抗ＩＬ－３３抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体における特定のアミノ酸残基位置の付番への言及は、Ｋａｂａｔ付番方式に従う。

【０５２４】
本開示の抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体には、限定はされないが、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、マウス、ヒト、ヒト化、霊長類化、又はキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’及びＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、ＶＬ又はＶＨドメインのいずれかを含む断片、Ｆａｂ発現ライブラリによって産生された断片、及び抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（例えば、本明細書に開示される抗ＩＬ－３３抗体に対する抗Ｉｄ抗体を含む）が含まれる。ｓｃＦｖ分子は当該技術分野において公知であり、例えば米国特許第５，８９２，０１９号明細書に記載されている。本開示の免疫グロブリン分子又は抗体分子は、いかなるタイプ（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等）、又はサブクラスの免疫グロブリン分子であってもよい。

【０５２５】
本明細書で使用されるとき、用語「重鎖部分」には、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。重鎖部分を含むポリペプチドは、ＣＨ１ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中央、及び／又は下部ヒンジ領域）ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、又はその変異体若しくは断片のうちの少なくとも１つを含む。例えば、本開示に使用される結合ポリペプチドは、ＣＨ１ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、及びＣＨ２ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン及びＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖；ＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、及びＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖、又はＣＨ１ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部分、ＣＨ２ドメイン、及びＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖を含み得る。別の実施形態において、本開示のポリペプチドは、ＣＨ３ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。更に、本開示に使用される結合ポリペプチドは、ＣＨ２ドメインの少なくとも一部分（例えば、ＣＨ２ドメインの全て又は一部）を欠いていてもよい。

上記のとおり、天然に存在する免疫グロブリン分子とアミノ酸配列が異なるようにこれらのドメイン（例えば重鎖部分）を修飾し得ることは、当業者によって理解されるであろう。

【０５２６】

本明細書に開示される特定の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体において、多量体の１つのポリペプチド鎖の重鎖部分は、その多量体の第２のポリペプチド鎖上の重鎖部分と同一である。或いは、重鎖部分を含有する本開示の単量体は同一ではない。例えば、各単量体が異なる標的結合部位を含んでもよく、例えば二重特異性抗体を形成し得る。

【０５２７】

本明細書に開示される診断及び治療方法において使用される結合分子の重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、ＩｇＧ１分子に由来するC_{H1}ドメインとＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域とを含み得る。別の例において、重鎖部分は、一部がＩｇＧ１分子に由来し、且つ一部がＩｇＧ３分子に由来するヒンジ領域を含むことができる。別の例において、重鎖部分は、一部がＩｇＧ１分子に由来し、且つ一部がＩｇＧ４分子に由来するキメラヒンジを含むことができる。

【０５２８】

本明細書で使用されるとき、用語「軽鎖部分」には、免疫グロブリン軽鎖、例えばカッパ又はラムダ軽鎖に由来するアミノ酸配列が含まれる。好ましくは、軽鎖部分は、ＶＬ又はＣＬドメインのうちの少なくとも一方を含む。

【０５２９】

本明細書に開示される抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、それらが認識し又は特異的に結合する抗原、例えば本明細書に開示される標的ポリペプチド（例えば、完全長又は成熟ＩＬ－３３）の１つ又は複数のエピトープ又は１つ又は複数の部分の観点で記載又は特定することができる。標的ポリペプチドのうち、抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する部分が、「エピトープ」、又は「抗原決定基」である。標的ポリペプチドは単一のエピトープを含み得るが、典型的には少なくとも２つのエピトープを含み、抗原のサイズ、コンホメーション、及びタイプに応じて任意の数のエピトープを含むことができる。更には、標的ポリペプチド上の「エピトープ」は非ポリペプチドエレメントであってもよく、又はそれを含んでもよく、例えば、エピトープが炭水化物側鎖を含み得ることに留意しなければならない。

【０５３０】

抗体に対するペプチド又はポリペプチドエピトープの最小限のサイズは、約４～５アミノ酸であると考えられている。ペプチド又はポリペプチドエピトープは、好ましくは、少なくとも７、より好ましくは少なくとも９、及び最も好ましくは少なくとも約１５～約３０アミノ酸を含有する。ＣＤＲはその三次形態の抗原ペプチド又はポリペプチドを認識し得るため、エピトープを含むアミノ酸は連続していなくてもよく、場合によっては同じペプチド鎖上にないことさえあり得る。本開示の抗ＩＬ－３３抗体が認識するペプチド又はポリペプチドエピトープは、ＩＬ－３３の少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、より好ましくは少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、又は約１５～約３０個の連続又は非連続アミノ酸の配列を含有し得る。

【０５３１】

「特異的に結合する」とは、概して、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、及びその結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間の何らかの相補性を伴うものであることを意味する。この定義によれば、抗体は、それがランダムな無関係のエピトープに結合するであろうよりも容易にその抗原結合ドメインを介してあるエピトープに結合するとき、当該のエピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書では、特定の抗体が特定のエピトープに結合する際の相対的親和性を評価するために用いられる。例えば、抗体「Ａ」は、抗体「Ｂ」よりも所与のエピトープに

対してより高い特異性を有すると見なされることもあり、又は抗体「Ａ」は、それが関連エピトープ「Ｄ」に対して有するよりも高い特異性でエピトープ「Ｃ」に結合すると言われることもある。

【０５３２】

一実施形態において、抗体又はその結合断片はＩＬ－３３を優先的に結合する。「優先的に結合する」とは、抗体があるエピトープに対し、それが関連する、同様の、同種の、又は類似したエピトープに結合するであろうよりも容易に特異的に結合することを意味する。従って、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体であれば、かかる抗体が関連するエピトープと交差反応し得るとしても、その関連するエピトープと比べて当該のエピトープに結合する可能性が高くなる。

【０５３３】

非限定的な例として、抗体は、第２のエピトープに対するその抗体の解離定数（K_D）未満のK_Dで第１のエピトープと結合する場合に、前記第１のエピトープと優先的に結合すると見なされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第２のエピトープに対するその抗体のK_Dよりも少なくとも１桁小さい親和性で第１のエピトープと結合する場合に、第１の抗原と優先的に結合すると見なされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第２のエピトープに対する抗体のK_Dよりも少なくとも２桁小さい親和性で第１のエピトープと結合する場合に、第１のエピトープと優先的に結合すると見なされ得る。

【０５３４】

別の非限定的な例では、抗体は、第２のエピトープに対するその抗体のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））未満のｋ（ｏｆｆ）で第１のエピトープと結合する場合に、第１のエピトープと優先的に結合すると見なされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第２のエピトープに対するその抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも少なくとも１桁小さい親和性で第１のエピトープと結合する場合に、第１のエピトープに優先的に結合すると見なされ得る。別の非限定的な例では、抗体は、第２のエピトープに対するその抗体のｋ（ｏｆｆ）よりも少なくとも２桁小さい親和性で第１のエピトープと結合する場合に、第１のエピトープと優先的に結合すると見なされ得る。

【０５３５】

一実施形態において、本開示に係る抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、$5\times10^{-1}sec^{-1}$、$10^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{-2}sec^{-1}$、$10^{-2}sec^{-1}$、$5\times10^{-3}sec^{-1}$又は$10^{-3}sec^{-1}$以下のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））で本明細書に開示される標的ポリペプチド（例えば、ＩＬ－３３、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせ）又はその断片若しくは変異体を結合すると言うことができる。例えば、本開示の抗体は、$5\times10^{-4}sec^{-1}$、$10^{-4}sec^{-1}$、$5\times10^{-5}sec^{-1}$、又は$10^{-5}sec^{-1}$、$5\times10^{-6}sec^{-1}$、$10^{-6}sec^{-1}$、$5\times10^{-7}sec^{-1}$又は$10^{-7}sec^{-1}$以下のオフ速度（ｋ（ｏｆｆ））で本明細書に開示される標的ポリペプチド（例えば、ＩＬ－３３、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせ）又はその断片若しくは変異体を結合すると言うことができる。

【０５３６】

一実施形態において、本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、$10^{3}M^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{3}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{4}M^{-1}sec^{-1}$又は$5\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$以上のオン速度（ｋ（ｏｎ））で本明細書に開示される標的ポリペプチド（例えば、ＩＬ－３３、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせ）又はその断片若しくは変異体を結合すると言うことができる。例えば、本開示の抗体は、$10^{5}M^{-1}sec^{-1}$、$5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$、$10^{6}M^{-1}sec^{-1}$、又は$5\times10^{6}M^{-1}sec^{-1}$又は$10^{7}M^{-1}sec^{-1}$以上のオン速度（ｋ（ｏｎ））で本明細書に開示される標的ポリペプチド（例えば、ＩＬ－３３、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３

、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせ）又はその断片若しくは変異体を結合すると言うことができる。

【０５３７】

交差反応性とは、本明細書で用いられるとき、結合分子、例えば抗体又はその結合断片が同じエピトープ又は重複するエピトープと結合する場合を指すことが意図される。結合の競合的（ｃｏｍｐｅｔｉｖｅｌｙ）阻害は、本明細書で用いられるとき、交差反応性の一形態である。

【０５３８】

抗体は、それが所与のエピトープに対する参照抗体の結合を何らかの程度遮断する限りにおいてそのエピトープに優先的に結合する場合に、当該のエピトープに対する参照抗体の結合を競合的に阻害すると言われる。競合的阻害は、当該技術分野において公知の任意の方法、例えば、競合ＥＬＩＳＡアッセイなどの固相アッセイ、解離促進ランタニド蛍光イムノアッセイ（ＤＥＬＦＩＡ（登録商標）、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）、及び放射性リガンド結合アッセイによって決定し得る。抗体は、所与のエピトープに対する参照抗体の結合を少なくとも９０％、少なくとも８０％、少なくとも７０％、少なくとも６０％、又は少なくとも５０％だけ競合的に阻害すると言うことができる。

【０５３９】

本明細書で使用されるとき、用語「親和性」は、免疫グロブリン分子のＣＤＲとの個々のエピトープの結合強度の尺度を指す。例えば、Ｈａｒｌｏｗ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ　ｅｄ．）ｐａｇｅｓ　２７－２８を参照のこと。本明細書で使用されるとき、用語「アビディティ」は、免疫グロブリン集団と抗原との間の複合体の全体的な安定性、即ち、抗原との免疫グロブリン混合物の機能上の組み合わせ強度を指す。例えば、Ｈａｒｌｏｗ、ｐａｇｅｓ　２９－３４を参照のこと。アビディティは、特定のエピトープに対する集団中の個々の免疫グロブリン分子の親和性に関係するとともに、免疫グロブリン及び抗原の結合価にもまた関係する。例えば、二価モノクローナル抗体と高度に繰り返しのあるエピトープ構造を含む抗原、例えばポリマーとの間の相互作用は、高アビディティの一つであり得る。

【０５４０】

本開示の抗ＩＬ－３３抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体はまた、それらの交差反応性の観点で記載又は特定することもできる。本明細書で使用されるとき、用語「交差反応性」は、ある抗原に対して特異的な抗体が第２の抗原と反応する能力；２つの異なる抗原性物質間の関連性の尺度を指す。従って、抗体は、その形成を誘導したもの以外のエピトープに結合する場合には交差反応性である。交差反応性エピトープは、概して誘導エピトープと同じ相補的構造特徴の多くを含有し、場合によっては実に元のエピトープよりも良好に適合し得る。

【０５４１】

例えば、特定の抗体は、それが関連はあるが同一でないエピトープ、例えば、参照エピトープと少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％、及び少なくとも５０％の同一性（当該技術分野において公知の、及び本明細書に記載される方法を用いて計算したとき）を有するエピトープと結合する点で、ある程度の交差反応性を有する。抗体は、参照エピトープと９５％未満、９０％未満、８５％未満、８０％未満、７５％未満、７０％未満、６５％未満、６０％未満、５５％未満、及び５０％未満の同一性（当該技術分野において公知の、及び本明細書に記載される方法を用いて計算したとき）を有するエピトープと結合しない場合に、交差反応性がほとんど又は全くないと言うことができる。抗体は、特定のエピトープのいかなる他の類似体、オルソログ、又はホモログとも結合しない場合に、当該エピトープに対して「高度に特異的」と見なされ得る。

【０５４２】

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体若しくは誘導体はまた、本開示のポリペプチド、例えば、ＩＬ－３３、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせに対するそれらの結合親和性の観点で記載又は特定することもできる。好ましい結合親和性としては、5×10^{-2}Ｍ、10^{-2}Ｍ、5×10^{-3}Ｍ、10^{-3}Ｍ、5×10^{-4}Ｍ、10^{-4}Ｍ、5×10^{-5}Ｍ、10^{-5}Ｍ、5×10^{-6}Ｍ、10^{-6}Ｍ、5×10^{-7}Ｍ、10^{-7}Ｍ、5×10^{-8}Ｍ、10^{-8}Ｍ、5×10^{-9}Ｍ、10^{-9}Ｍ、5×10^{-10}Ｍ、10^{-10}Ｍ、5×10^{-11}Ｍ、5×10^{-12}Ｍ、10^{-12}Ｍ、5×10^{-13}Ｍ、10^{-13}Ｍ、5×10^{-14}Ｍ、10^{-14}Ｍ、5×10^{-15}Ｍ、又は10^{-15}Ｍ未満の解離定数又はＫｄを有するものが挙げられる。

【０５４３】

本開示の抗ＩＬ－３３抗体又はその抗原結合断片、変異体若しくは誘導体は、「多重特異性」、例えば、二重特異性、三重特異性、又はそれ以上の多重特異性であってもよく、これはつまり、それが１つ以上の異なる抗原（例えばタンパク質）上に存在する２つ以上の異なるエピトープを同時に認識して結合することを意味する。従って、抗ＩＬ－３３抗体が「単一特異性」であるか、それとも「多重特異性」、例えば「二重特異性」であるかは、結合ポリペプチドが反応する異なるエピトープの数を指す。多重特異性抗体は、本明細書に記載される標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であってもよく、又は標的ポリペプチド並びに異種エピトープ、例えば異種ポリペプチド若しくは固体支持体材料に特異的であってもよい。

【０５４４】

本明細書で使用されるとき、用語「結合価」は、結合ポリペプチド又はＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片に存在する潜在的な結合ドメイン、例えば抗原結合ドメインの数を指す。各結合ドメインが１つのエピトープと特異的に結合する。結合ポリペプチド又はＩＬ－３３結合分子が２つ以上の結合ドメインを含む場合、各結合ドメインは、２つの結合ドメインを有する抗体について同じエピトープに特異的に結合することもあり（「二価単一特異性」と呼ばれる）、又は２つの結合ドメインを有する抗体について異なるエピトープに結合することもある（「二価二重特異性」と呼ばれる）。抗体又はその抗原結合断片はまた、二重特異性で、且つ各特異性につき二価であってもよい（「二重特異性四価抗体」と呼ばれる）。別の実施形態では、四価ミニボディ又はドメイン欠失抗体を作製することができる。

【０５４５】

二重特異性二価抗体、及びその作製方法は、例えば、米国特許第５，７３１，１６８号明細書；同第５，８０７，７０６号明細書；同第５，８２１，３３３号明細書；及び米国特許出願公開第２００３／０２０７３４号明細書及び同第２００２／０１５５５３７号明細書（これらの全ての開示が参照によって本明細書に援用される）に記載されている。二重特異性四価抗体、及びその作製方法は、例えば、国際公開第０２／０９６９４８号パンフレット及び国際公開第００／４４７８８号パンフレット（これらの両方の開示が参照によって本明細書に援用される）に記載されている。概して、国際公開第９３／１７７１５号パンフレット；国際公開第９２／０８８０２号パンフレット；国際公開第９１／００３６０号パンフレット；国際公開第９２／０５７９３号パンフレット；Ｔｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０－６９（１９９１）；米国特許第４，４７４，８９３号明細書；同第４，７１４，６８１号明細書；同第４，９２５，６４８号明細書；同第５，５７３，９２０号明細書；同第５，６０１，８１９号明細書；Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照のこと。

【０５４６】

既に指摘したとおり、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び三次元構成は周知である。本明細書で使用されるとき、用語「ＶＨドメイン」は免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、用語「ＣＨ１ドメイン」は、免疫グロブリ

ン重鎖の第１の（最もアミノ末端側の）定常領域ドメインを含む。ＣＨ１ドメインはＶＨドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域よりアミノ末端側にある。

【０５４７】

本明細書で使用されるとき、用語「ＣＨ２ドメイン」は、重鎖分子のうち、従来の付番スキームを使用して例えば抗体のおよそ残基２４４～残基３６０に延在する部分を含む（残基２４４～３６０、Ｋａｂａｔ付番方式；及び残基２３１～３４０、ＥＵ付番方式；Ｋａｂａｔ　ＥＡ　ｅｔ　ａｌ．を参照）。ＣＨ２ドメインは、もう一方のドメインと緊密な対をなさない点でユニークである。むしろ、インタクトな天然ＩｇＧ分子の２つのＣＨ２ドメイン間には２つのＮ結合型分枝炭水化物鎖が介在する。また、ＣＨ３ドメインがＣＨ２ドメインからＩｇＧ分子のＣ末端まで延在し、且つ約１０８残基を含むことも十分に裏付けられている。

【０５４８】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒンジ領域」は、重鎖分子のうちＣＨ１ドメインをＣＨ２ドメインにつなぎ合わせている部分を含む。このヒンジ領域は約２５残基を含み、可動性であり、従って２つのＮ末端抗原結合領域が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域は３つの特徴的なドメイン、即ち、上部、中央、及び下部ヒンジドメインに細分することができる（Ｒｏｕｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６１：４０８３（１９９８））。

【０５４９】

本明細書で使用されるとき、用語「ジスルフィド結合」には、２つの硫黄原子間に形成される共有結合が含まれる。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成し又は第２のチオール基と架橋することのできるチオール基を含む。多くの天然に存在するＩｇＧ分子では、ＣＨ１領域とＣＬ領域とがジスルフィド結合によって連結され、且つ２つの重鎖が、Ｋａｂａｔ付番方式を用いると２３９及び２４２に対応する位置（位置２２６又は２２９、ＥＵ付番方式）で２つのジスルフィド結合によって連結されている。

【０５５０】

本明細書で使用されるとき、用語「キメラ抗体」は、免疫反応性領域又は部位が第１の種から得られるか又はそれに由来し、且つ定常領域（これは本開示においてインタクトであっても、部分的であっても、又は修飾されていてもよい）が第２の種から得られる任意の抗体を意味すると見なされるものとする。特定の実施形態では、標的結合領域又は部位が非ヒト供給源（例えばマウス又は霊長類）由来であり、且つ定常領域がヒトである。

【０５５１】

本明細書で使用されるとき、用語「操作された抗体」は、重鎖又は軽鎖のいずれか一方又は両方の可変ドメインが少なくとも１つのアミノ酸置換によって改変されているヒト抗体を指し得る。一実施形態では、フレームワーク残基のアミノ酸置換が、フレームワーク残基の生殖細胞系列への変化によって潜在的な免疫原性を低下させ得る。別の実施形態では、フレームワーク残基又はＣＤＲ残基のいずれかのアミノ酸置換が、産物の不安定性、凝集又は不均一性をもたらし得る潜在的な構造脆弱性を取り除き得る。望ましくない脆弱性の例としては、不対のシステイン（これは、ジスルフィド結合のスクランブリング、又は変動的なスルフヒドリル付加物形成につながり得る）、Ｎ結合型グリコシル化部位（構造及び活性の不均一性をもたらす）、並びにアミド分解（例えばＮＧ、ＮＳ）、異性化（ＤＧ）、酸化（露出したメチオニン）、及び加水分解（ＤＰ）部位が挙げられる。別の実施形態では、標的化した又はランダムな突然変異誘発手法のいずれかによるＣＤＲ及びフレームワーク残基のアミノ酸置換により、結合、効力又は特異性特性が向上した抗体が生じ得る。別の実施形態において、「操作された抗体」は、重鎖又は軽鎖のいずれか一方又は両方の可変ドメインが、既知の特異性の抗体由来の１つ以上のＣＤＲの少なくとも部分的な置換、並びに必要であれば部分的なフレームワーク領域置換及び配列変更によって改変されている抗体を指す。ＣＤＲは、フレームワーク領域の由来である抗体と同じクラス又は更にはサブクラスの抗体に由来してもよいが、ＣＤＲは異なるクラスの抗体及び好ましくは異なる種の抗体に由来するであろうことが想定される。

【０５５２】
本明細書で使用されるとき、用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種由来の１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）とヒト免疫グロブリン分子（本明細書ではアクセプター抗体とも称される）由来のフレームワーク領域とを有する、所望の抗原を結合する非ヒト種抗体（本明細書ではドナー抗体とも称される）由来の抗体分子を指し得る。一方の可変ドメインの抗原結合能を他方に移すために全てのＣＤＲをドナー可変ドメイン由来の完全なＣＤＲに置換する必要はない場合もある。むしろ、標的結合部位の活性の維持に必要な残基を移すだけで十分であり得る。
【０５５３】
更に、ヒト化抗体の重鎖又は軽鎖又は両方の可変ドメイン内のフレームワーク領域が専らヒト起源の残基のみを含み得ることが認識され、この場合、ヒト化抗体のこれらのフレームワーク領域は、「完全ヒトフレームワーク領域」と称される。或いは、必要であれば、ヒト化抗体の重鎖又は軽鎖又は両方における可変ドメインの１つ又は複数のヒトフレームワーク領域の対応する位置の範囲内でドナー可変ドメインの１つ又は複数のフレームワーク領域の１つ以上の残基を操作して、ＩＬ－３３抗原への適切な結合を維持し又はそれへの結合を亢進させることができる。このようにして操作されたヒトフレームワーク領域は、ひいてはヒト及びドナーフレームワーク残基の混合物を含むことになり、これは本明細書では「部分的ヒトフレームワーク領域」と称される。
【０５５４】
例えば抗ＩＬ－３３抗体のヒト化は、本質的に、当該技術分野において公知の方法（例えば、Ｗｉｎｔｅｒ及び共同研究者ら（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４－１５３６（１９８８）の方法）により、げっ歯類又は突然変異げっ歯類ＣＤＲ又はＣＤＲ配列でヒト抗ＩＬ－３３抗体の対応する配列を置換することにより実施し得る。米国特許第５，２２５，５３９号明細書；同第５，５８５，０８９号明細書；同第５，６９３，７６１号明細書；同第５，６９３，７６２号明細書；同第５，８５９，２０５号明細書（本明細書において参照により援用される）も参照のこと。得られるヒト化抗ＩＬ－３３抗体は、ヒト化抗体の重鎖及び／又は軽鎖の可変ドメインの完全ヒトフレームワーク領域内に少なくとも１つのげっ歯類又は突然変異げっ歯類ＣＤＲを含むことになり得る。場合によっては、ヒト化抗ＩＬ－３３抗体の１つ以上の可変ドメインのフレームワーク領域内の残基が、対応する非ヒト（例えばげっ歯類）残基に置換され（例えば、米国特許第５，５８５，０８９号明細書；同第５，６９３，７６１号明細書；同第５，６９３，７６２号明細書；及び同第６，１８０，３７０号明細書を参照）、この場合、得られるヒト化抗ＩＬ－３３抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の可変ドメイン内に部分的ヒトフレームワーク領域を含むことになり得る。
【０５５５】
更には、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に改良する（例えば、所望の親和性を達成する）ために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、ここではＣＤＲの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、且つフレームワーク領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含み得る。更なる詳細については、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９（１９８８）；及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）（本明細書において参照により援用される）を参照されたい。従って、かかる「ヒト化」抗体には、実質的にインタクトに満たないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている抗体が含まれ得る。実際には、ヒト化抗

体は典型的には、一部のＣＤＲ残基及び場合により一部のフレームワーク残基がげっ歯類抗体の類似した部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。例えば、米国特許第５，２２５，５３９号明細書；同第５，５８５，０８９号明細書；同第５，６９３，７６１号明細書；同第５，６９３，７６２号明細書；同第５，８５９，２０５号明細書を参照のこと。また、米国特許第６，１８０，３７０号明細書、及び国際公開第０１／２７１６０号パンフレットも参照されたく、ここでは所定の抗原に対する親和性が向上したヒト化抗体及びヒト化抗体の作製技法が開示されている。

【０５５６】

本明細書で使用されるとき、用語「連結した」、「融合した」、又は「融合」は同義的に使用される。これらの用語は、化学的コンジュゲーション又は組換え手段を含め、いかなる手段を用いるにしろ、更に２つのエレメント又は構成成分を一体につなぎ合わせることを指す。「インフレーム融合」は、２つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を元のＯＲＦの正しい翻訳リーディングフレームが維持される形でつなぎ合わせて、連続したより長いＯＲＦを形成することを指す。従って、組換え融合タンパク質は、元のＯＲＦによってコードされるポリペプチドに対応する２つ以上のセグメントを含有する単一のタンパク質である（これらのセグメントは、天然では通常そのようにつなぎ合わされることはない）。従ってリーディングフレームは融合したセグメント全体にわたって連続したものになるが、これらのセグメントは物理的又は空間的に例えばインフレームのリンカー配列によって分離されていてもよい。例えば、免疫グロブリン可変領域のＣＤＲをコードするポリヌクレオチドがインフレームで融合され、しかしそれらは、「融合した」ＣＤＲが連続ポリペプチドの一部として同時翻訳される限りにおいて、少なくとも１つの免疫グロブリンフレームワーク領域又は追加のＣＤＲ領域をコードするポリヌクレオチドによって分離されていてもよい。

【０５５７】

ポリペプチドの文脈において、「線状配列」又は「配列」は、配列中の互いに隣接する残基がポリペプチドの一次構造上で連続しているアミノ末端からカルボキシル末端方向のポリペプチド中の一系列のアミノ酸である。

【０５５８】

用語「発現」は、本明細書で使用されるとき、遺伝子が生化学的物質、例えばポリペプチドを産生する過程を指す。この過程には、限定なしに、遺伝子ノックダウン並びに一過性発現及び安定発現の両方を含め、細胞内で遺伝子の機能的存在が任意に現れることが含まれる。これには、限定なしに、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）への遺伝子の転写、及び１つ又は複数のポリペプチドへのかかるｍＲＮＡの翻訳が含まれる。最終的な所望の産物が生化学的物質である場合、発現には、当該の生化学的物質及び任意の前駆物質の生成が含まれる。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を生じる。本明細書で使用されるとき、遺伝子産物は、遺伝子の転写によって産生される核酸、例えばメッセンジャーＲＮＡ、又は転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物には、転写後修飾、例えばポリアデニル化を伴う核酸、又は翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解切断などを伴うポリペプチドが更に含まれる。

【０５５９】

本明細書で使用されるとき、用語「治療する」又は「治療」は、治療的処置及び予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）又は予防的（ｐｒｅｖｅｎｔａｔｉｖｅ）手段の両方を指し、ここで目的は、炎症病態の進行など、望ましくない生理的変化又は障害を予防し又は減速させる（和らげる）ことである。有益な又は所望の臨床結果としては、限定はされないが、検出可能か検出不能かに関わらず、症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の安定化した（即ち悪化しない）状態、疾患の進行の遅延又は減速、病状の改善又は緩和、及び寛解（部分的か全面的かに関わらず）が挙げられる。「治療」はまた、治療を受けない場合に予想される生存と比較して生存を延長させることも意味し得る。治療を必要としている者には、既に病態又は障害を有する者並びに病態又は障害に罹り易い者或いは病態又は障

害を予防すべき者が含まれる。

【０５６０】

「対象」又は「個体」又は「動物」又は「患者」又は「哺乳類」とは、診断、予後判定、又は治療が望ましい任意の対象、特に哺乳類対象を意味する。哺乳類対象には、ヒト；家畜；農業動物；及び動物園、競技、若しくは愛玩動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、雌ウシなどが含まれる。

【０５６１】

本明細書で使用されるとき、「抗ＩＬ－３３抗体の投与から利益を受けるであろう対象」及び「治療を必要としている動物」などの語句には、例えば、抗ＩＬ－３３ポリペプチドの検出（例えば診断的方法）に用いられる抗ＩＬ－３３抗体の投与からの利益、及び／又は抗ＩＬ－３３抗体による疾患の治療、即ち緩和又は予防からの利益を受けるであろう哺乳類対象などの対象が含まれる。

【０５６２】

ＩＩ．標的ポリペプチドの説明

本明細書で使用されるとき、用語「ＩＬ－３３」と「ＩＬ－３３ポリペプチド」とは同義的に用いられる。特定の実施形態において、ＩＬ－３３は完全長である。別の実施形態において、ＩＬ－３３は成熟トランケート型ＩＬ－３３（アミノ酸１１２～２７０）である。最近の研究によれば、完全長ＩＬ－３３は活性であることが示唆される（Ｃａｙｒｏｌ ａｎｄ Ｇｉｒａｒｄ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０６（２２）：９０２１－６（２００９）；Ｈａｙａｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３８７（１）：２１８－２２（２００９）；Ｔａｌａｂｏｔ－Ａｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２８４（２９）：１９４２０－６（２００９））。しかしながら、限定はされないが、ａａ ７２～２７０、７９～２７０、９５～２７０、９９～２７０、１０７～２７０、１０９～２７０、１１１～２７０、１１２～２７０を含め、Ｎ末端プロセシングを受けた又はトランケートされたＩＬ－３３は、亢進した活性を有し得る（Ｌｅｆｒａｎｃａｉｓ ２０１２，２０１４）。別の実施形態において、ＩＬ－３３には、完全長ＩＬ－３３、その断片、又はＩＬ－３３突然変異体若しくは変異体ポリペプチドが含まれることもあり、ここでＩＬ－３３の断片又はＩＬ－３３変異体ポリペプチドは、活性ＩＬ－３３の一部又は全ての機能特性を保持している。

【０５６３】

ヒトＩＬ－３３は、２７０アミノ酸のタンパク質（受託番号Ｏ９５７６０）であり、２つのドメイン：ホメオドメインとサイトカイン（ＩＬ－１様）ドメインとからなる。ホメオドメインには核移行シグナル（ＮＬＳ）が含まれる。ＩＬ－３３は当初、くも膜下出血後の血管攣縮性大脳動脈で上方制御される「ＤＶＳ２７」遺伝子として（Ｏｎｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｒｅｂ．Ｂｌｏｏｄ Ｆｌｏｗ Ｍｅｔａｂ．１９：１２７９－８８（１９９９））、及び内皮細胞核に発現する「高内皮細静脈由来の核内因子（ＮＦ－ＨＥＶ）」として（Ｂａｅｋｋｅｖｏｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ １６３：６９－７９（２００３））同定された。現在、ＩＬ－３３（ＩＬ－１Ｆ１１とも称される）は、ＩＬ－α、ＩＬ１β、及びＩＬ－１８もまた含まれるＩＬ－１サイトカインファミリーの１１番目のメンバーと見なされている。Ｏｂｏｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ａｌｌｅｒｇｏｌｏｇｙ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ５９：１４３－１６０（２０１０）を参照のこと。

【０５６４】

Ｓｃｈｍｉｔｚ ｅｔ ａｌ．が、初めてＩＬ－３３をオーファン受容体ＳＴ２（ＩＬ－１Ｒ４とも称される）のリガンドとして同定した（Ｓｃｈｍｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ ２３（５）：４７９－９０（２００５））。ＳＴ２受容体の唯一知られているリガンドがＩＬ－３３である（Ｓｃｈｍｉｔｚ ｅｔ ａｌ．（２００５））。ＩＬ－３３受容体は、ＳＴ２とＩＬ－１Ｒアクセサリータンパク質（ＩＬ－１ＲＡｃＰ）とからなるヘテロ二量体分子で形成される。ＩＬ－１ＲＡｃＰは、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β

、ＩＬ－１Ｆ６、ＩＬ１Ｆ８、及びＩＬ１Ｆ９に対する受容体に共通する構成要素である。ＩＬ－３３は、ＳＴ２とＩＬ－１ＲＡｃＰとの二量体であるＩＬ－３３受容体に結合する。ＩＬ－１ＲＡｃＰは結合には必要ないが、シグナル伝達に決定的に重要である。ＩＬ－３３受容体のＴＩＲ－ドメインがＭｙＤ８８及びＴＲＡＦ６を動員し、この受容体シグナルがＮＦκＢ及びＭＡＰキナーゼ経路の活性化をもたらす（Ｏｂｏｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０））。ＩＬ－３３受容体は他の受容体に関連している可能性もあり、ヒト及びマウスマスト細胞の受容体チロシンキナーゼｃ－Ｋｉｔを交差活性化させることが報告されている（Ｄｒｕｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１１５：３８９９－９０６（２０１０））。この交差活性化の構造基盤は、ｃ－Ｋｉｔ、ＳＴ２、及びＩＬ－１ＲＡｃＰの間の複合体形成である。ｃ－ＫｉｔとＩＬ－１ＲＡｃＰとが構成的に相互作用し、リガンド結合時にＳＴ２がこの複合体に加わる。

【０５６５】

最近になって、ＩＬ－３３は第２のＩＬ－３３受容体ヘテロ二量体複合体に結合することが示されている。ＳＴ２は、別のＩＬ１Ｒファミリー分子、「シングルＩｇ　ＩＬ－１Ｒ関連分子」（ＳＩＧＩＲＲ）（Ｔｏｌｌ　ＩＬ－１Ｒ８（ＴＩＲ８）とも称される）と複合体を形成する。ＳＩＧＩＲＲ／ＴＩＲ８は、ＩＬ－１Ｒ及びＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）媒介免疫応答の負の調節因子として働くと考えられている（Ｇａｒｌａｎｄａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：４３９－４６（２００９））。ＳＴ２：ＩＬ－１ＲＡｃＰとは対照的に、ＳＴ２：ＳＩＧＩＲＲはＩＬ－３３の負の調節因子として働くように見える。

【０５６６】

ＳＴ２はベースライン時のＴｈ２細胞及びマスト細胞に発現し、両細胞型ともアレルギー性喘息の重要なメディエーターであることが知られている。ＩＬ－３３はこれら（及び様々な他の細胞）を刺激して、サイトカイン及びケモカインを含めた多岐にわたる機能的応答を生じさせることができる。

【０５６７】

抗ＩＬ－３３抗体

特定の実施形態において、本開示の結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体、例えば、抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０、及び３３＿６４００７６－４Ｂ、３３＿６４００８１－ＡＢ；３３＿６４００８２－６Ｂ、３３＿６４００８２－７Ｂ、３３＿６４００８４－２Ｂ、３３＿６４００８６－６Ｂ、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４０２０１－２Ｂ、及び３３＿６４０２３７－２Ｂは、ＩＬ－３３に結合し、マスト細胞、内皮細胞からのＩＬ－３３駆動サイトカイン放出及びＴＦ－１細胞の増殖を阻害する。

【０５６８】

特定の実施形態において、本開示の抗体は、ＩＬ－３３に結合する抗ＩＬ－３３抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体、例えば、抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０及び３３＿６４００７６－４Ｂ、３３＿６４００８１－ＡＢ；３３＿６４００８２－６Ｂ、３３＿６４００８２－７Ｂ、３３＿６４００８４－２Ｂ、３３＿６４００８６－６Ｂ、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４０２０１－２Ｂ、及び３３＿６４０２３７－２Ｂを含む。特定の実施形態において、抗ＩＬ－３３抗体は、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせと結合する。特定の実施形態において、抗ＩＬ－３３抗体はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５６９】

一実施形態において、本開示は、抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、又はＩＬ３３０１８０及び３３＿６４００７６－４Ｂ、３３＿６４００８１－ＡＢ；３３＿６４００８２－６Ｂ、３３＿６４００８２－７Ｂ、３３＿６４００８４－２Ｂ、３３＿６４００８６－６Ｂ、３３＿６４００８

７－７Ｂ、３３＿６４０２０１－２Ｂ、及び３３＿６４０２３７－２Ｂと同じＩＬ－３３エピトープに特異的に結合する単離結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片を提供する。別の実施形態において、本開示は、ＩＬ－３３に特異的に結合し、且つ抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、又はＩＬ３３０１８０及び３３＿６４００７６－４Ｂ、３３＿６４００８１－ＡＢ；３３＿６４００８２－６Ｂ、３３＿６４００８２－７Ｂ、３３＿６４００８４－２Ｂ、３３＿６４００８６－６Ｂ、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４０２０１－２Ｂ、及び３３＿６４０２３７－２ＢがＩＬ－３３、例えば、ヒト、霊長類、マウスＩＬ－３３、又はヒト、霊長類、及びマウスＩＬ－３３の任意の組み合わせに特異的に結合するのを競合的に阻害する単離結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【０５７０】

特定の実施形態において、本開示の結合分子は、参照抗ＩＬ－３３抗体分子のアミノ酸配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、又は９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。更なる実施形態において、本結合分子は、参照抗体と少なくとも９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を共有する。特定の実施形態において、参照抗体は、ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、又はＩＬ３３０１８０及び３３＿６４００７６－４Ｂ、３３＿６４００８１－ＡＢ；３３＿６４００８２－６Ｂ、３３＿６４００８２－７Ｂ、３３＿６４００８４－２Ｂ、３３＿６４００８６－６Ｂ、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４０２０１－２Ｂ、及び３３＿６４０２３７－２Ｂである。

【０５７１】

別の実施形態において、本開示は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでＶＨドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、上記に開示されるＶＨ　ＣＤＲ由来のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は同一のアミノ酸配列を有し、このコードされたＶＨドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７２】

別の実施形態において、本開示は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでＶＨドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、上記に開示されるＶＨ　ＣＤＲと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は同一のアミノ酸配列を有し、このコードされたＶＨドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体は免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）を更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７３】

別の実施形態において、本開示は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでＶＨドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、１、２、３、４、又は５つの保存的アミノ酸置換を除いて上記に開示されるＶＨ　ＣＤＲと同一のアミノ酸配列を有し、このコードされたＶＨドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体はＶＬドメインを更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７４】

別の実施形態において、本開示は、配列番号２、１２、２２、３２、４２、又は５２のＶＨアミノ酸配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、このコードされたＶＨドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体はＶＬドメインを更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７５】

別の実施形態において、本開示は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでＶＬドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、上記に開示されるＶＨアミノ酸配列ＳＥＱ由来のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は同一のアミノ酸配列を有し、このコードされたＶＬドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体はＶＨドメインを更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７６】

別の実施形態において、本開示は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでＶＬドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、上記に開示されるＶＬ　ＣＤＲと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は同一のアミノ酸配列を有し、このコードされたＶＬドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体はＶＨドメインを更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７７】

別の実施形態において、本開示は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでＶＬドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、１、２、３、４、又は５つの保存的アミノ酸置換を除いて上記に開示されるＶＬ　ＣＤＲと同一のアミノ酸配列を有し、このコードされたＶＬドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体はＶＨドメインを更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７８】

更なる実施形態において、本開示は、上記に開示されるＶＬアミノ酸配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を有するＶＬドメインを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離抗体又はその抗原結合断片を含み、このコードされたＶＬドメインを含む抗体又はその抗原結合断片は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本単離抗体はＶＨドメインを更に含む。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０５７９】

本開示の方法においては、本開示の抗ＩＬ－３３抗体の好適な生物学的活性変異体を使用することができる。かかる変異体は親抗ＩＬ－３３抗体の所望の結合特性を保持していることになる。抗体変異体の作製方法は、当該技術分野において概して利用可能である。

【０５８０】

突然変異誘発及びヌクレオチド配列改変方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Ｗａｌｋｅｒ ａｎｄ Ｇａａｓｔｒａ，ｅｄｓ．（１９８３）Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（ＭａｃＭｉｌｌａｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）；Ｋｕｎｋｅｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：４８８－４９２（１９８５）；Ｋｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５４：３６７－３８２（１９８７）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．）；米国特許第４，８７３，１９２号明細書；及びこれらの中で引用されている文献（本明細書において参照により援用される）を参照のこと。目的のポリペプチドの生物学的活性に影響を与えない適切なアミノ酸置換に関する手引きについては、Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｎａｔｌ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｆｏｕｎｄ．，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．），ｐｐ．３４５－３５２（本明細書において全体として参照により援用される）のＤａｙｈｏｆｆ ｅｔ ａｌ．（１９７８）のモデルを参照し得る。Ｄａｙｈｏｆｆ ｅｔ ａｌ．のモデルは、点許容突然変異（Ｐｏｉｎｔ Ａｃｃｅｐｔｅｄ Ｍｕｔａｔｉｏｎ：ＰＡＭ）アミノ酸類似性行列（ＰＡＭ ２５０行列）を使用して好適な保存的アミノ酸置換を決定する。あるアミノ酸を、類似した特性を有する別のアミノ酸に換えるなど、保存的置換が好ましい。Ｄａｙｈｏｆｆ ｅｔ ａｌ．モデルのＰＡＭ ２５０行列によって教示されるとおりの保存的アミノ酸置換の例としては、限定はされないが、Ｇｌｙ⇔Ａｌａ、Ｖａｌ⇔Ｉｌｅ⇔Ｌｅｕ、Ａｓｐ⇔Ｇｌｕ、Ｌｙｓ⇔Ａｒｇ、Ａｓｎ⇔Ｇｌｎ、及びＰｈｅ⇔Ｔｒｐ⇔Ｔｙｒが挙げられる。

【０５８１】

抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、目的のポリペプチドの変異体の構築においては、例えば、ＩＬ－３３への特異的結合能を有すること、及び特定の実施形態ではＩＬ－３３がＳＴ２に結合するのを遮断しないことなど、所望の特性を変異体が保持したままであるように修飾が作製される。当然ながら、変異ポリペプチドをコードするＤＮＡに作製されるいかなる突然変異によっても、配列がリーディングフレーム外に置かれてはならず、好ましくは、二次ｍＲＮＡ構造を生じ得る相補領域が作り出されることはない。

【０５８２】

抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片の結合特異性の測定方法としては、限定はされないが、標準的な競合結合アッセイ、ＥＬＩＳＡアッセイ、ＢＩＡＣＯＲＥアッセイ、増殖又は因子放出などの機能アッセイ等が挙げられる。例えば、国際公開第９３／１４１２５号パンフレット；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １３：６３３－６４２（２０００）；Ｋｕｍａｎｏｇｏｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６９：１３７５－１３８１（２００２）；Ｗａｔａｎａｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６７：４３２１－４３２８（２００１）；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ９７：３４９８－３５０４（２００１）；及びＧｉｒａｕｄｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １７２（２）：１２４６－１２５５（２００４）（これらは全て、本明細書において参照により援用される）に開示されるかかるアッセイを参照のこと。

【０５８３】

本明細書で考察するとおり、定常領域、ＣＤＲ、ＶＨドメイン、又はＶＬドメインを含む、本明細書に開示される任意の特定のポリペプチドが、別のポリペプチドと少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は更には１００％同一である場合、％同一性は、限定はされないが、ＢＥＳＴＦＩＴプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ８ ｆｏｒ Ｕｎｉｘ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａ

ｒｃｈ Ｐａｒｋ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．５３７１３）などの、当該技術分野において公知の方法及びコンピュータプログラム／ソフトウェアを用いて決定することができる。ＢＥＳＴＦＩＴは、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（１９８１）Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２－４８９の局所的相同性アルゴリズムを用いて２つの配列間における最良の相同性セグメントを見付け出す。特定の配列が、本開示に係る参照配列と例えば９５％同一であるかどうかをＢＥＳＴＦＩＴ又は任意の他の配列アラインメントプログラムを用いて決定するとき、パラメータは、当然ながら、参照ポリペプチド配列の完全長にわたって同一性パーセンテージが計算され、且つ参照配列中のアミノ酸総数の最大５％までの相同性ギャップが許容されるように設定される。

【０５８４】

本開示の目的上、パーセント配列同一性は、アフィンギャップ検索を用いるスミス－ウォーターマンの相同性検索アルゴリズムを用いて、ギャップ開始ペナルティを１２及びギャップ伸長ペナルティを２、ＢＬＯＳＵＭ行列を６２として決定されてもよい。スミス－ウォーターマン相同性検索アルゴリズムについては、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（１９８１）Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２－４８９に教示される。変異体は、例えば、参照抗ＩＬ－３３抗体（例えば、ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、又はＩＬ３３０１８０）と僅か１～３０アミノ酸残基、僅か１～１５アミノ酸残基、僅か１～１０アミノ酸残基、例えば６～１０、僅か５、僅か４、３、２、又は更には１アミノ酸残基だけ異なり得る。

【０５８５】

ＩＬ－３３との特異的結合能を有し且つ所望の活性を保持しているポリペプチドの正確な化学構造は、幾つもの要因に依存する。分子中にはイオン化可能なアミノ基及びカルボキシル基が存在するため、特定のポリペプチドは、酸性塩又は塩基性塩として、又は中性形態で得られ得る。好適な環境条件に置かれたときにその生物学的活性を保持しているかかる調製物は全て、本明細書で用いられるとおりの抗ＩＬ－３３抗体の定義に含まれる。更に、ポリペプチドの一次アミノ酸配列は、糖部分を使用した（グリコシル化）又は脂質、リン酸塩、アセチル基などの他の補助的分子による誘導体化によって増強することができる。また、糖類とのコンジュゲーションによって増強することもできる。このような増強の特定の側面は、産生宿主の翻訳後プロセシングシステムによって達成される；他のかかる修飾はインビトロで導入され得る。いずれにしろ、かかる修飾は、抗ＩＬ－３３抗体の所望の特性が破壊されない限り、本明細書で用いられる抗ＩＬ－３３抗体の定義に含まれる。かかる修飾は、ポリペプチドの活性を亢進させるか又は弱めるかのいずれかにより、様々なアッセイにおける活性に定量的又は定性的に影響を与え得ることが予想される。更に、鎖中の個々のアミノ酸残基が、酸化、還元、又は他の誘導体化によって修飾されてもよく、ポリペプチドの切断により、活性を保持している断片が得られてもよい。所望の特性（例えば、ＩＬ－３３に対する結合特異性、結合親和性、及び会合活性、例えば、マスト細胞、内皮細胞からのＩＬ－３３駆動サイトカイン放出及びＴＦ－１細胞の増殖を阻害する能力）を破壊しないかかる改変が、本明細書で使用されるとおりの目的の抗ＩＬ－３３抗体の定義からそのポリペプチド配列を除外することはない。

【０５８６】

当該技術分野においては、ポリペプチド変異体の調製及び使用に関する実質的な指針が提供されている。抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体の調製において、当業者は、天然タンパク質のヌクレオチド又はアミノ酸配列に対するどの修飾が、本開示の方法において用いられる医薬組成物の治療活性成分としての使用に好適な変異体をもたらし得るかを容易に決定することができる。

【０５８７】

Ｆｃ領域の変異（例えば、アミノ酸置換及び／又は付加及び／又は欠失）は、抗体のエフェクター機能を亢進させ又は弱め得るとともに、抗体の薬物動態特性（例えば半減期）を改変し得ることが知られている。例えば、Ｆｃ受容体への抗体結合を最適化するＦｃ突

然変異を開示している米国特許第６，７３７，０５６Ｂ１号明細書及び米国特許出願公開第２００４／０１３２１０１Ａ１号明細書を参照のこと。

【０５８８】

特定の抗ＩＬ－３３抗体においては、当該技術分野において公知の技法を用いてＦｃ部分をエフェクター機能が低下するように突然変異させてもよい。例えば、定常領域ドメインを例えば点突然変異又はアミノ酸置換によって改変すると、循環修飾抗体のＦｃ受容体結合が減少し、それによりエフェクター細胞若しくは補体媒介性クリアランス又は標的を発現若しくは提示する細胞の損傷を最小限に抑え得る。例えば、ある特定の一組の置換、三重突然変異Ｌ２３４Ｆ／Ｌ２３５Ｅ／Ｐ３３１Ｓ（「ＴＭ」）は、ヒトＣ１ｑ、ＣＤ６４、ＣＤ３２Ａ及びＣＤ１６に対するヒトＩｇＧ１分子の結合活性を大幅に低下させる。例えば、Ｏｇａｎｅｓｙａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ．６４：７００－７０４（２００８）を参照のこと。

【０５８９】

他の場合には、それは、本開示と整合する定常領域修飾が血清中半減期を増加させるものであり得る。Ｆｃ領域を含むタンパク質の血清中半減期は、ＦｃＲｎに対するＦｃ領域の結合親和性を増加させることにより増加させ得る。用語「抗体半減期」は、本明細書で使用されるとき、抗体分子のその投与後の平均生存時間の尺度である抗体の薬物動態特性を意味する。抗体半減期は、例えば血清中（即ち循環半減期）、又は他の組織中で計測したときに、患者の体内（又は他の哺乳動物）又はその特定のコンパートメントから既知量の免疫グロブリンの５０パーセントを排出するために必要な時間として表すことができる。半減期は免疫グロブリン間又は免疫グロブリンクラス間で異なり得る。一般に、抗体半減期の増加は、投与された抗体の循環中における平均滞留時間の増加をもたらす。

【０５９０】

半減期の増加により、患者に与える薬物の量を減らすこと並びに投与頻度を減らすことが可能になる。抗体の血清中半減期を増加させるためには、当該技術分野において公知のとおり、抗体（特に抗体断片）にサルベージ受容体結合エピトープを組み込み得る。本明細書で使用されるとき、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、ＩｇＧ分子の生体内血清中半減期の増加に関与するＩｇＧ分子（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４）のＦｃ領域のエピトープを指す。半減期が増加した抗体はまた、ＦｃとＦｃＲｎ受容体との間の相互作用に関与すると同定されたアミノ酸残基を修飾することによっても作成し得る。例えば、ヒト免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）分子のＣＨ２ドメインに三重突然変異Ｍ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６Ｅ（「ＹＴＥ」）を導入すると、ヒト新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に対するその結合の増加が生じる。米国特許第７．０８３，７８４号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）を参照のこと。

【０５９１】

加えて、一部の実施形態において、Ｆｃ領域は、Ｋａｂａｔに規定されるとおりのＥＵインデックスにより付番したとき２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４３、２４４、２４５、２４７、２５１、２５２、２５４、２５５、２５６、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７９、２８０、２８４、２９２、２９６、２９７、２９８、２９９、３０５、３１３、３１６、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３９、３４１、３４３、３７０、３７３、３７８、３９２、４１６、４１９、４２１、４４０及び４４３からなる群から選択される１つ以上の位置に修飾（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む。任意選択で、Ｆｃ領域は、当該技術分野において公知の追加的及び／又は代替的な位置に天然に存在しないアミノ酸残基を含み得る。

【０５９２】

他の実施形態において、Ｆｃ領域は、Ｋａｂａｔに規定されるとおりのＥＵインデックスにより付番したとき２３４Ｄ、２３４Ｅ、２３４Ｎ、２３４Ｑ、２３４Ｔ、２３４Ｈ、２３４Ｙ、２３４Ｉ、２３４Ｖ、２３４Ｆ、２３５Ａ、２３５Ｄ、２３５Ｒ、２３５Ｗ、

２３５Ｐ、２３５Ｓ、２３５Ｎ、２３５Ｑ、２３５Ｔ、２３５Ｈ、２３５Ｙ、２３５Ｉ、２３５Ｖ、２３５Ｆ、２３６Ｅ、２３９Ｄ、２３９Ｅ、２３９Ｎ、２３９Ｑ、２３９Ｆ、２３９Ｔ、２３９Ｈ、２３９Ｙ、２４０Ｉ、２４０Ａ、２４０Ｔ、２４０Ｍ、２４１Ｗ、２４１Ｌ、２４１Ｙ、２４１Ｅ、２４１Ｒ、２４３Ｗ、２４３Ｌ　２４３Ｙ、２４３Ｒ、２４３Ｑ、２４４Ｈ、２４５Ａ、２４７Ｌ、２４７Ｖ、２４７Ｇ、２５１Ｆ、２５２Ｙ、２５４Ｔ、２５５Ｌ、２５６Ｅ、２５６Ｍ、２６２Ｉ、２６２Ａ、２６２Ｔ、２６２Ｅ、２６３Ｉ、２６３Ａ、２６３Ｔ、２６３Ｍ、２６４Ｌ、２６４Ｉ、２６４Ｗ、２６４Ｔ、２６４Ｒ、２６４Ｆ、２６４Ｍ、２６４Ｙ、２６４Ｅ、２６５Ｇ、２６５Ｎ、２６５Ｑ、２６５Ｙ、２６５Ｆ、２６５Ｖ、２６５Ｉ、２６５Ｌ、２６５Ｈ、２６５Ｔ、２６６Ｉ、２６６Ａ、２６６Ｔ、２６６Ｍ、２６７Ｑ、２６７Ｌ、２６８Ｅ、２６９Ｈ、２６９Ｙ、２６９Ｆ、２６９Ｒ、２７０Ｅ、２８０Ａ、２８４Ｍ、２９２Ｐ、２９２Ｌ、２９６Ｅ、２９６Ｑ、２９６Ｄ、２９６Ｎ、２９６Ｓ、２９６Ｔ、２９６Ｌ、２９６Ｉ、２９６Ｈ、２６９Ｇ、２９７Ｓ、２９７Ｄ、２９７Ｅ、２９８Ｈ、２９８Ｉ、２９８Ｔ、２９８Ｆ、２９９Ｉ、２９９Ｌ、２９９Ａ、２９９Ｓ、２９９Ｖ、２９９Ｈ、２９９Ｆ、２９９Ｅ、３０５Ｉ、３１３Ｆ、３１６Ｄ、３２５Ｑ、３２５Ｌ、３２５Ｉ、３２５Ｄ、３２５Ｅ、３２５Ａ、３２５Ｔ、３２５Ｖ、３２５Ｈ、３２７Ｇ、３２７Ｗ、３２７Ｎ、３２７Ｌ、３２８Ｓ、３２８Ｍ、３２８Ｄ、３２８Ｅ、３２８Ｎ、３２８Ｑ、３２８Ｆ、３２８Ｉ、３２８Ｖ、３２８Ｔ、３２８Ｈ、３２８Ａ、３２９Ｆ、３２９Ｈ、３２９Ｑ、３３０Ｋ、３３０Ｇ、３３０Ｔ、３３０Ｃ、３３０Ｌ、３３０Ｙ、３３０Ｖ、３３０Ｉ、３３０Ｆ、３３０Ｒ、３３０Ｈ、３３１Ｇ、３３１Ａ、３３１Ｌ、３３１Ｍ、３３１Ｆ、３３１Ｗ、３３１Ｋ、３３１Ｑ、３３１Ｅ、３３１Ｓ、３３１Ｖ、３３１Ｉ、３３１Ｃ、３３１Ｙ、３３１Ｈ、３３１Ｒ、３３１Ｎ、３３１Ｄ、３３１Ｔ、３３２Ｄ、３３２Ｓ、３３２Ｗ、３３２Ｆ、３３２Ｅ、３３２Ｎ、３３２Ｑ、３３２Ｔ、３３２Ｈ、３３２Ｙ、３３２Ａ、３３９Ｔ、３７０Ｅ、３７０Ｎ、３７８Ｄ、３９２Ｔ、３９６Ｌ、４１６Ｇ、４１９Ｈ、４２１Ｋ、４４０Ｙ及び４３４Ｗからなる群から選択される少なくとも１つの置換を含む。任意選択で、Ｆｃ領域は、当該技術分野において公知の追加的及び／又は代替的な天然に存在しないアミノ酸残基を含み得る。

【０５９３】

更なる実施形態において、Ｆｃ領域は、２３４、２３５及び３３１からなる群から選択される１つ以上の位置に少なくとも１つの修飾（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む。一部の実施形態において、天然に存在しないアミノ酸は、２３４Ｆ、２３５Ｆ、２３５Ｙ、及び３３１Ｓからなる群から選択される。本明細書にはＦｃ変異体が提供され、このＦｃ領域は、２３９、３３０及び３３２からなる群から選択される１つ以上の位置に少なくとも１つの天然に存在しないアミノ酸を含む。一部の実施形態において、天然に存在しないアミノ酸は、２３９Ｄ、３３０Ｌ及び３３２Ｅからなる群から選択される。

【０５９４】

他の実施形態において、Ｆｃ領域は、２５２、２５４、及び２５６からなる群から選択される１つ以上の位置に少なくとも１つの天然に存在しないアミノ酸を含む。特定の実施形態において、天然に存在しないアミノ酸は、米国特許第７．０８３，７８４号明細書（この内容は本明細書において全体として参照により援用される）に記載される、２５２Ｙ、２５４Ｔ及び２５６Ｅからなる群から選択される。

【０５９５】

定常領域の更に他の修飾を使用して、抗原特異性又は抗体可動性の増加に起因した局在化の亢進を可能にするジスルフィド結合又はオリゴ糖部分を修飾してもよい。得られる生理学的プロファイル、バイオアベイラビリティ、並びに体内分布及び血清中半減期など、これらの修飾の他の生化学的効果は、過度の実験を行うことなく周知の免疫学的技法を用いて容易に計測及び定量化し得る。

【０５９６】

本開示の抗ＩＬ－３３抗体にはまた、例えば、共有結合が抗体のそのコグネイトエピト

ープへの特異的結合を妨げないように抗体に任意のタイプの分子を共有結合させることによって修飾された誘導体も含まれる。例えば、限定としてではないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンド又は他のタンパク質の連結等によって修飾されている抗体が含まれる。多数の化学修飾のいずれも、限定はされないが、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化等を含めた公知の技法によって実施し得る。加えて、誘導体は１つ以上の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【０５９７】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられるものである。同様の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。或いは、飽和突然変異誘発によるなどしてコード配列の全て又は一部に沿って突然変異をランダムに導入することができ、得られる突然変異体を生物学的活性に関してスクリーニングして、活性（例えば、抗ＩＬ－３３ポリペプチドに結合する能力）を保持している突然変異体を同定することができる。

【０５９８】

例えば、抗体分子のフレームワーク領域のみ又はＣＤＲ領域のみに突然変異を導入することが可能である。導入された突然変異はサイレント突然変異又は中立ミスセンス突然変異であってもよく、即ち、抗体の抗原結合能に全く、又はほとんど効果を及ぼさないものであってもよい。これらのタイプの突然変異は、コドン使用頻度の最適化、又はハイブリドーマの抗体産生の改善に有用であり得る。或いは、非中立ミスセンス突然変異が抗体の抗原結合能を改変してもよい。多くのサイレント突然変異及び中立ミスセンス突然変異の位置はフレームワーク領域にある可能性が高く、一方、多くの非中立ミスセンス突然変異の位置はＣＤＲにある可能性が高いが、これは絶対的な要件ではない。当業者であれば、抗原結合活性の改変がない、又は結合活性の改変（例えば、抗原結合活性の向上又は抗体特異性の変化又は最終的な分子の安定性／均一性の亢進）を有するなど、所望の特性を有する突然変異体分子を設計及び試験することが可能であろう。突然変異誘発後、コードされたタンパク質は常法で発現させてもよく、本明細書に記載される技法を用いて、又は当該技術分野において公知の技法を常法で改良することにより、コードされたタンパク質の機能的及び／又は生物学的活性（例えば、ＩＬ－３３ポリペプチド上の少なくとも１つのエピトープに免疫特異的に結合する能力）を決定することができる。

【０５９９】

特定の実施形態において、本開示の抗体は、バーニア（ｖｅｒｎｉｅｒ）領域／ゾーンに位置するフレームワーク残基又はＣＤＲ領域の構造を支持することが提案されている残基を修飾することによって最適化し得る（例えば、Ｆｏｏｔｅ，Ｊ．ａｎｄ Ｇ．Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２４．２：４８７－９９（１９９２）；Ｐａｄｌａｎ，Ｅ．Ａ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ３１．３：１６９－２１７（１９９４）を参照のこと）。一部の実施形態において、これらの修飾は、標準的な分子生物学的方法を用いたＰＣＲ媒介性部位特異的突然変異誘発を用いることによって構築し得る。修飾された抗体は、本明細書に開示されるとおり結合親和性に関して試験することができる。別の実施形態において、ＣＤＲ領域にアミノ酸置換を導入することによるか、又は部位特異的突然変異誘発による更なる最適化、例えば復帰突然変異又は親和性成熟もまた実施することができる。

【０６００】

特定の実施形態において、本開示の抗ＩＬ－３３抗体は、少なくとも１つの最適化された相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。「最適化されたＣＤＲ」とは、ＣＤＲが、その最適化されたＣＤＲを含む抗ＩＬ－３３抗体に付与される持続的な又は向上した結合親和性及び／又は抗ＩＬ－３３活性に基づき選択された修飾及び最適化された配列であることが意図される。「抗ＩＬ－３３活性」には、例えば、ＩＬ－３３に関連する以下の活性の１つ以上、例えば、マスト細胞、内皮細胞からのＩＬ－３３駆動サイトカイン放出、及びＴＦ－１細胞の増殖；好塩基球、好酸球、Ｔｈ２細胞、ＮＫ、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、又は樹状細胞からのメディエーター（例えば、サイトカイン又はケモカイン）放出；細胞表面受容体の調節；抗原提示の調節；又はＩＬ－３３に関連する任意の他の活性を調節する活性が含まれ得る。抗ＩＬ－３３活性はまた、限定はされないが、特定の種類の炎症病態、例えば、喘息などのアレルギー性障害又は対象の気道における他の炎症反応を含めた、ＩＬ－３３発現及び／又は放出に関連する疾患の発生率又は重症度の低下にも帰することができる。修飾には、抗ＩＬ－３３抗体がＩＬ－３３抗原に対する特異性を保持し、且つ結合親和性の向上及び／又は抗ＩＬ－３３活性の向上を有するようなＣＤＲ内のアミノ酸残基の置換が関与し得る。

【０６０１】

ＩＶ．抗ＩＬ－３３抗体をコードするポリヌクレオチド

本開示はまた、本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードする核酸分子も提供する。

【０６０２】

一実施形態において、本開示は、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨドメイン）をコードする核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供し、ここでＶＨドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、配列番号１、１１、２１、３１、４１、５１、６１、７１、８１、９１、１０１、１１１、１２１、１３１、１４１、１５１、１６１、１７１、１８１、１９１、２０１、２１１、２２１、２３１、２４１、２５１、２６１、２７１、２８１、２９１、３０１、３１１、３２１、３３１、３４１、３５１、３６１、３７１、３８１、３９１、４０１、４１１、４２１、４３１、４４１、４５１、４６１、４７１、４８１、４９１、５０１、５１１、５４２１、５３１、５４１、５５１、５６１、５７１、及び５８１からなる群から選択されるＶＨコード配列のＣＤＲＨ　１、２、又は３ポリヌクレオチド配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は同一の核酸配列によってコードされる。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０６０３】

他の実施形態において、本開示は、免疫グロブリンＶＨドメインをコードする核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供し、ここでＶＨドメインのＣＤＲの少なくとも１つの配列は、（ａ）配列番号３、１３、２３、３３、４３、５３、６３、７３、８３、９３、１０３、１１３、１２３、１３３、１４３、１５３、１６３、１７３、１８３、１９３、２０３、２１３、２２３、２３３、２４３、２５３、２６３、２７３、２８３、２９３、３０３、３１３、３２３、３３３、３４３、３５３、３６３、３７３、３８３、３９３、４０３、４１３、４２３、４３３、４４３、４５３、４６３、４７３、４８３、４９３、５０３、５１３、５４２３、５３３、５４３、５５３、５６３、５７３及び５８３に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲＨ１配列；（ｂ）配列番号４、１４、２４、３４、４４、５４、６４、７４、８４、９４、１０４、１１４、１２４、１３４、１４４、１５４、１６４、１７４、１８４、１９４、２０４、２１４、２２４、２３４、２４４、２５４、２６４、２７４、２８４、２９４、３０４、３１４、３２４、３３４、３４４、３５４、３６４、３７４、３８４、３９４、４０４、４１４、４２４、４３４、４４４、４５４、４６４、４７４、４８４、４９４、５０４、５１４、５４２４、５３４、５４４、５５４、５６４、５７４；及び５８４に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲＨ２配列、及び（ｃ）配列番号５、１５、２５、３５、４５、５５

、６５、７５、８５、９５、１０５、１１５、１２５、１３５、１４５、１５５、１６５、１７５、１８５、１９５、２０５、２１５、２２５、２３５、２４５、２５５、２６５、２７５、２８５、２９５、３０５、３１５、３２５、３３５、３４５、３５５、３６５、３７５、３８５、３９５、４０５、４１５、４２５、４３５、４４５、４５５、４６５、４７５、４８５、４９５、５０５、５１５、５４２５、５３５、５４５、５５５、５６５、５７５及び５８５に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲＨ３配列からなる群から選択される。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０６０４】

更なる実施形態において、本開示は、配列番号２、１２、２２、３２、４２、５２、６２、７２、８２、９２、１０２、１１２、１２２、１３２、１４２、１５２、１６２、１７２、１８２、１９２、２０２、２１２、２２２、２３２、２４２、２５２、２６２、２７２、２８２、２９２、３０２、３１２、３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２、３８２、３９２、４０２、４１２、４２２、４３２、４４２、４５２、４６２、４７２、４８２、４９２、５０２、５１２、５４２２、５３２、５４２、５５２、５６２、５７２、及び５８２を含む参照ＶＨドメインポリペプチド配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を有するＶＨドメインをコードする核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離ポリヌクレオチドを含み、このコードされたＶＨドメインを含む抗ＩＬ－３３抗体は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０６０５】

一実施形態において、本開示は、免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬドメイン）をコードする核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供し、ここでＶＬドメインのＣＤＲの少なくとも１つは、配列番号６、１６、２６、３６、４６、５６、６６、７６、８６、９６、１０６、１１６、１２６、１３６、１４６、１５６、１６６、１７６、１８６、１９６、２０６、２１６、２２６、２３６、２４６、２５６、２６６、２７６、２８６、２９６、３０６、３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６、３８６、３９６、４０６、４１６、４２６、４３６、４４６、４５６、４６６、４７６、４８６、４９６、５０６、５１６、５４２６、５３６、５４６、５５６、５６６、５７６、及び５８６からなる群から選択されるＶＬコード配列のＣＤＲＬ　１、２、又は３ポリヌクレオチド配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は同一の核酸配列によってコードされる。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０６０６】

他の実施形態において、本開示は、免疫グロブリンＶＬドメインをコードする核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離ポリヌクレオチドを提供し、ここでＶＬドメインのＣＤＲの少なくとも１つの配列は、（ａ）配列番号８、１８、２８、３８、４８、５８、６８、７８、８８、９８、１０８、１１８、１２８、１３８、１４８、１５８、１６８、１７８、１８８、１９８、２０８、２１８、２２８、２３８、２４８、２５８、２６８、２７８、２８８、２９８、３０８、３１８、３２８、３３８、３４８、３５８、３６８、３７８、３８８、３９８、４０８、４１８、４２８、４３８、４４８、４５８、４６８、４７８、４８８、４９８、５０８、５１８、５４２８、５３８、５４８、５５８、５６８、５７８、及び５８８に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲＬ１配列、（ｂ）配列番号９、１９、２９、３９、４９、５９、６９、７９、８９、９９、１０９、１１９、１２９、１３９、１４９、１５９、１６９、１７９、１８９、１９９、２０９、２１９、２２９、２３９、２４９、２５９、２６９、２７９、２８９、２９９、３０９、３１９、３２９、３３９、３４９、３５９、３６９、３７９、３８９、３９９、４０９、

４１９、４２９、４３９、４４９、４５９、４６９、４７９、４８９、４９９、５０９、５１９、５４２９、５３９、５４９、５５９、５６９、５７９、及び５８９に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲＬ２配列、及び（ｃ）配列番号１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５４２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０及び５９０に示されるアミノ酸配列を含むＣＤＲＬ３配列からなる群から選択される。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０６０７】

更なる実施形態において、本開示は、配列番号７、１７、２７、３７、４７、５７、６７、７７、８７、９７、１０７、１１７、１２７、１３７、１４７、１５７、１６７、１７７、１８７、１９７、２０７、２１７、２２７、２３７、２４７、２５７、２６７、２７７、２８７、２９７、３０７、３１７、３２７、３３７、３４７、３５７、３６７、３７７、３８７、３９７、４０７、４１７、４２７、４３７、４４７、４５７、４６７、４７７、４８７、４９７、５０７、５１７、５４２７、５３７、５４７、５５７、５６７、５７７、及び５８７を含む参照ＶＬドメインポリペプチド配列と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を有するＶＬドメインをコードする核酸を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる単離ポリヌクレオチドを含み、このコードされたＶＬドメインを含む抗ＩＬ－３３抗体は、ＩＬ－３３に特異的又は優先的に結合する。特定の実施形態において、本抗体又はその抗原結合断片はＩＬ－３３駆動サイトカイン産生を阻害する。

【０６０８】

上記に記載したポリヌクレオチドのいずれも、例えばコードされたポリペプチドの分泌を誘導するシグナルペプチド、本明細書に記載されるとおりの抗体定常領域、又は本明細書に記載されるとおりの他の異種ポリペプチドをコードする追加の核酸を更に含み得る。また、本明細書の他の部分に更に詳細に記載されるとおり、本開示は、上記に記載したポリヌクレオチドの１つ以上を含む組成物を含む。

【０６０９】

一実施形態において、本開示は、第１のポリヌクレオチドと第２のポリヌクレオチドとを含む組成物を含み、ここで前記第１のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるとおりのＶＨドメインをコードし、且つ前記第２のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるとおりのＶＬドメインをコードする。具体的には、配列番号１、１１、２１、３１、４１、５１、６１、７１、８１、９１、１０１、１１１、１２１、１３１、１４１、１５１、１６１、１７１、１８１、１９１、２０１、２１１、２２１、２３１、２４１、２５１、２６１、２７１、２８１、２９１、３０１、３１１、３２１、３３１、３４１、３５１、３６１、３７１、３８１、３９１、４０１、４１１、４２１、４３１、４４１、４５１、４６１、４７１、４８１、４９１、５０１、５１１、５４２１、５３１、５４１、５５１、５６１、５７１、又は５８１に示されるとおりの、ＶＨドメインコードポリヌクレオチド、及びＶＬドメインコードポリヌクレオチド、例えば、配列番号６６、１６、２６、３６、４６、５６、６６、７６、８６、９６、１０６、１１６、１２６、１３６、１４６、１５６、１６６、１７６、１８６、１９６、２０６、２１６、２２６、２３６、２４６、２５６、２６６、２７６、２８６、２９６、３０６、３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６、３８６、３９６、４０６、４１６、４２６、４３６、４４６、４５６、４６６、４７６、４８６、４９６、５０６、５１６、５４２６、５３６、５４６、５５６、５６６、５７６、又は５８６に示されるとおりのＶＬドメインをコードするポリヌクレオチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる組成物。

【０６１０】
本開示はまた、他の部分に記載されるとおり、本開示のポリヌクレオチドの断片も含む。加えて、本明細書に記載されるとおりの融合ポリペプチド（ｆｕｓｉｏｎ ｐｏｌｙｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ）、Ｆａｂ断片、及び他の誘導体をコードするポリヌクレオチドもまた、本開示によって企図される。
【０６１１】
ポリヌクレオチドは、当該技術分野において公知の任意の方法によって作製又は製造され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が分かっている場合、その抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブルしてもよく（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １７：２４２（１９９４）に記載されるとおり）、これは、簡潔に言えば、抗体をコードする配列の一部を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、及び次にライゲートしたオリゴヌクレオチドのＰＣＲによる増幅が関わるものである。
【０６１２】
或いは、本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、好適な供給源由来の核酸から作成してもよい。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンが利用可能でなく、しかし抗体分子の配列が分かっている場合、その抗体をコードする核酸は、化学的に合成するか、又は好適な供給源（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリ、又は抗体の発現用に選択されたハイブリドーマ細胞など、その抗体又は他の抗ＩＬ－３３抗体を発現する任意の組織又は細胞から作成されたｃＤＮＡライブラリ、又はそれから単離された核酸、好ましくはポリＡ＋ＲＮＡ）から、その配列の３’及び５’末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用したＰＣＲ増幅によるか、又は特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用したクローニングによって、例えばｃＤＮＡライブラリからその抗体又は他の抗ＩＬ－３３抗体をコードするＤＮＡクローンを同定して得ることができる。ＰＣＲによって作成された増幅核酸は、次に当該技術分野において周知の任意の方法を用いて複製可能なクローニングベクターにクローニングし得る。
【０６１３】
抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体のヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列が確定すると、当該技術分野において周知のヌクレオチド配列の操作方法、例えば、組換えＤＮＡ技術、部位特異的突然変異誘発、ＰＣＲ等を用いてそのヌクレオチド配列を操作し（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ ｅｄ．；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．）及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．（１９９８）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ）（両方ともに全体として参照により本明細書に援用される）に記載される技法を参照のこと）、それにより異なるアミノ酸配列を有する抗体を作成して、例えばアミノ酸置換、欠失、及び／又は挿入を作り出すことができる。
【０６１４】
抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、非修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡであっても又は修飾ＲＮＡ又はＤＮＡであってもよい任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドで構成され得る。例えば、抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、一本鎖及び二本鎖ＤＮＡ、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖ＲＮＡ、及び一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるＲＮＡ、一本鎖であってもよく、又はより典型的には二本鎖又は一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であってもよいＤＮＡ及びＲＮＡを含むハイブリッド分子

で構成され得る。加えて、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、ＲＮＡ又はＤＮＡ又はＲＮＡとＤＮＡとの両方を含む三重鎖領域で構成され得る。抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドはまた、安定性のため又は他の理由で修飾された１つ以上の修飾塩基又はＤＮＡ若しくはＲＮＡ骨格も含有し得る。「修飾」塩基には、例えばトリチル化塩基及びイノシンなどの異常塩基が含まれる。種々の修飾はＤＮＡ及びＲＮＡに対して行うことができる；従って、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、又は代謝的に修飾された形態を包含する。

【０６１５】

コードされたタンパク質に１つ以上のアミノ酸置換、付加又は欠失が導入されるように免疫グロブリンのヌクレオチド配列に１つ以上のヌクレオチド置換、付加又は欠失を導入することにより、免疫グロブリンに由来するポリペプチド（例えば、免疫グロブリン重鎖部分又は軽鎖部分）の非天然変異体をコードする単離ポリヌクレオチドを作成し得る。突然変異は、部位特異的突然変異誘発及びＰＣＲ媒介突然変異誘発などの標準的な技法によって導入し得る。好ましくは、１つ以上の非必須アミノ酸残基に保存的アミノ酸置換が作製される。

【０６１６】

Ｖ．融合タンパク質及び抗体コンジュゲート

本明細書の他の部分で更に詳細に考察するとおり、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、更に、Ｎ末端若しくはＣ末端で異種ポリペプチドと組換え融合するか、又はポリペプチド若しくは他の組成物と化学的にコンジュゲート（共有結合性及び非共有結合性コンジュゲーションを含む）することができる。例えば、抗ＩＬ－３３抗体は、検出アッセイにおいて標識として有用な分子及びエフェクター分子、例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、又は毒素と組換え融合又はコンジュゲートすることができる。例えば、国際公開第９２／０８４９５号パンフレット；国際公開第９１／１４４３８号パンフレット；国際公開第８９／１２６２４号パンフレット；米国特許第５，３１４，９９５号明細書；及び欧州特許第３９６，３８７号明細書を参照のこと。

【０６１７】

本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体には、修飾されている、即ち抗体への任意のタイプの分子の共有結合によって、共有結合が抗体のＩＬ－３３への結合を妨げないように修飾されている誘導体が含まれ得る。例えば、限定としてではないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンド又は他のタンパク質との連結等によって修飾されている抗体が含まれる。数多くの化学修飾のいずれも、限定はされないが、特異的化学切断、アセチル化、ホルミル化等を含めた公知の技法によって実施し得る。加えて、誘導体は１つ以上の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【０６１８】

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、ペプチド結合又は修飾ペプチド結合、即ちペプチドアイソスターによって互いにつなぎ合わされたアミノ酸で構成されてもよく、２０種遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含有し得る。例えば、抗ＩＬ－３３抗体は、翻訳後プロセシングなどの自然の過程によって修飾されても、又は当該技術分野において周知の化学修飾技法によって修飾されてもよい。かかる修飾は、基礎テキスト及び更に詳説されるモノグラフ、並びに多数の研究文献に十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びアミノ又はカルボキシル末端、又は炭水化物などの部分を含め、抗ＩＬ－３３結合分子のどこにでも行うことができる。所与の抗ＩＬ－３３結合分子における幾つかの部位に同じタイプの修飾が同じ又は様々な程度で存在し得ることが理解されるであろう。また、所与の抗ＩＬ－３３結合分子が多くのタイプの修飾を含有し得る。抗ＩＬ－３３結合分子は、例えばユ

ビキチン化の結果として分枝状であってもよく、及び分枝を伴う又は伴わない環状であってもよい。環状、分枝状、及び分枝環状抗ＩＬ－３３結合分子は、自然の翻訳後過程によって生じることもあり、又は合成方法によって作製されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ＡＤＰ－リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール（ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ）の共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性の架橋形成、システイン形成、ピログルタミン酸形成、ホルミル化、γ－カルボキシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのタンパク質に対する転移ＲＮＡ媒介性アミノ酸付加、及びユビキチン化が含まれる（例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ－Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，ＮＹ；２ｎｄ ｅｄ．（１９９３）；Ｊｏｈｎｓｏｎ，ｅｄ．（１９８３）Ｐｏｓｔｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｖａｌｅｎｔ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ），ｐｇｓ．１－１２；Ｓｅｉｆｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：６２６－６４６（１９９０）；Ｒａｔｔａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６３：４８－６２（１９９２）を参照のこと）。

【０６１９】

本開示はまた、抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体と、異種ポリペプチドとを含む融合タンパク質も提供する。抗体が融合する異種ポリペプチドは、機能上有用であり得るか、又は抗ＩＬ－３３ポリペプチド発現細胞を標的化するのに有用である。

【０６２０】

一実施形態において、本開示の融合タンパク質は、本開示の抗体のＶＨドメインの任意の１つ以上のアミノ酸配列又は本開示の抗体のＶＬドメインの任意の１つ以上のアミノ酸配列又はその断片若しくは変異体と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０６２１】

別の実施形態において、本明細書に開示される診断及び治療方法に使用される融合タンパク質は、抗ＩＬ－３３抗体のＶＨドメインのＣＤＲのうちの任意の１、２、３つのアミノ酸配列、又はその断片、変異体、若しくは誘導体、又は抗ＩＬ－３３抗体のＶＬドメインのＣＤＲのうちの任意の１、２、３つのアミノ酸配列、又はその断片、変異体、若しくは誘導体と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

【０６２２】

一実施形態において、融合タンパク質は、本開示の抗ＩＬ－３３抗体の少なくとも１つのＶＨドメインのアミノ酸配列及び本開示の抗ＩＬ－３３抗体の少なくとも１つのＶＬドメインのアミノ酸配列又はその断片、誘導体若しくは変異体と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含む。好ましくは、この融合タンパク質のＶＨ及びＶＬドメインは、ＩＬ－３３の少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する単一供給源抗体（又はｓｃＦｖ又はＦａｂ断片）に対応する。

【０６２３】

更に別の実施形態において、本明細書に開示される診断及び治療方法に使用される融合タンパク質は、抗ＩＬ－３３抗体のＶＨドメインのＣＤＲのうちの任意の１、２、３つ又はそれ以上のアミノ酸配列及び抗ＩＬ－３３抗体のＶＬドメインのＣＤＲのうちの任意の１、２、３つ又はそれ以上のアミノ酸配列、又はその断片若しくは変異体と、異種ポリペプチド配列とを有するポリペプチドを含む。好ましくは、ＶＨドメイン又はＶＬドメインのＣＤＲのうちの２、３、４、５、６つ、又はそれ以上が、本開示の単一供給源抗体（又

はｓｃＦｖ又はＦａｂ断片）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子もまた、本開示に包含される。

【０６２４】

文献に報告される例示的融合タンパク質には、Ｔ細胞受容体（Ｇａｓｃｏｉｇｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：２９３６－２９４０（１９８７））；ＣＤ４（Ｃａｐｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３７：５２５－５３１（１９８９）；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３９：６８－７０（１９８９）；Ｚｅｔｔｍｅｉｓｓｌ ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．ＵＳＡ ９：３４７－３５３（１９９０）；及びＢｙｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４４：６６７－６７０（１９９０））；Ｌ－セレクチン（ホーミング受容体）（Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１３０：２２２１－２２２９（１９９０）；及びＷａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４９：１６４－１６７（１９９１））；ＣＤ４４（Ａｒｕｆｆｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６１：１３０３－１３１３（１９９０））；ＣＤ２８及びＢ７（Ｌｉｎｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：７２１－７３０（１９９１））；ＣＴＬＡ－４（Ｌｉｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４：５６１－５６９（１９９１））；ＣＤ２２（Ｓｔａｍｅｎｋｏｖｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ６６：１３３３－１３４４（１９９１））；ＴＮＦ受容体（Ａｓｈｋｅｎａｚｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１０５３５－１０５３９（１９９１）；Ｌｅｓｓｌａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７：２８８３－２８８６（１９９１）；及びＰｅｐｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４：１４８３－１４８９（１９９１））；及びＩｇＥ受容体α（Ｒｉｄｇｗａｙ ａｎｄ Ｇｏｒｍａｎ，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．Ｖｏｌ．１３５，Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．１４４８（１９９１））の融合物が含まれる。

【０６２５】

本明細書の他の部分で考察されるとおり、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、ポリペプチドのインビボ半減期を増加させるため、又は当該技術分野において公知の方法を用いたイムノアッセイにおける使用のため、異種ポリペプチドと融合させ得る。例えば、一実施形態では、ＰＥＧを本開示の抗ＩＬ－３３抗体にコンジュゲートして、そのインビボ半減期を増加させることができる。Ｌｅｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ １６：１０６（２００１）；Ａｄｖ．ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５４：５３１（２００２）；又はＷｅｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓａｃｔｉｏｎｓ ３０：５１２（２００２）を参照のこと。

【０６２６】

更に、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、その精製又は検出を促進するためペプチドなどのマーカー配列に融合させることができる。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、特にｐＱＥベクター（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，９２５９ Ｅｔｏｎ Ａｖｅｎｕｅ，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，Ｃａｌｉｆ．，９１３１３）に提供されるタグなど、ヘキサヒスチジンペプチドであり、その多くは市販されている。例えば、Ｇｅｎｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されるとおり、ヘキサヒスチジンによって融合タンパク質の精製が簡便となる。精製に有用な他のペプチドタグとしては、限定はされないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する「ＨＡ」タグ（Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ３７：７６７（１９８４））及び「ｆｌａｇ」タグが挙げられる。

【０６２７】

融合タンパク質は、当該技術分野において周知の方法を用いて調製することができる（例えば、米国特許第５，１３６，９６４号明細書及び同第５，２２５，５３８号明細書を参照のこと）。融合を作製する正確な部位は、融合タンパク質の分泌又は結合特性が最適

となるように実験的に選択し得る。次に、融合タンパク質をコードするＤＮＡを発現用の宿主細胞にトランスフェクトする。

【０６２８】

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、非コンジュゲート形態で用いられてもよく、又は例えば分子の治療特性の改善、標的検出の促進、又は患者のイメージング若しくは治療のため、種々の分子の少なくとも１つにコンジュゲートされてもよい。本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、精製前又は精製後のいずれにも、又は精製の実施時に、標識又はコンジュゲートすることができる。

【０６２９】

詳細には、本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的反応修飾物質、医薬品、又はＰＥＧにコンジュゲートし得る。

【０６３０】

当業者は、コンジュゲートがまた、コンジュゲートしようとする選択の薬剤に応じて種々の技法を用いてアセンブルされ得ることを理解するであろう。例えば、ビオチンを有するコンジュゲートは、例えば、結合ポリペプチドをビオチンＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのビオチンの活性化エステルと反応させることにより調製される。同様に、蛍光マーカーを有するコンジュゲートは、カップリング剤、例えば本明細書に列挙するものの存在下で、又はイソチオシアネート、好ましくはフルオレセイン－イソチオシアネートとの反応によって調製されてもよい。本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体のコンジュゲートは、類似した方法で調製される。

【０６３１】

本開示は、診断剤又は治療剤にコンジュゲートした本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を更に包含する。本抗ＩＬ－３３抗体は、その抗原結合断片、変異体、及び誘導体を含め、例えば、臨床検査手順の一環として疾患の発症又は進行をモニタして、例えばそれにより所与の治療及び／又は予防レジメンの有効性を決定するために、診断的に使用することができる。例えば、抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を検出可能物質とカップリングすることにより、検出を促進し得る。検出可能物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、様々な陽電子放射断層撮影法を用いた陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。例えば、本開示に係る診断用薬として用いられる抗体にコンジュゲートし得る金属イオンについて、米国特許第４，７４１，９００号明細書を参照のこと。好適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、β－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；好適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；好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、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、塩化ダンシル又はフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；及び好適な放射性物質の例としては、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、又は^{99}Ｔｃが挙げられる。

【０６３２】

抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体はまた、それを化学発光化合物とカップリングすることにより、検出可能に標識することもできる。次に、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することにより、化学発光タグが付加された抗ＩＬ－３３結合分子の存在が決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティックアクリジニウムエステル（ｔｈｅｒｏｍａｔｉｃ　ａｃｒｉｄｉｎｉｕｍ　ｅｓｔｅｒ）、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルである。

【０６３３】
抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を検出可能に標識し得る方法の一つは、それを酵素に連結し、その連結された生成物を酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）で使用することによるものである（Ｖｏｌｌｅｒ，Ａ．，“Ｔｈｅ Ｅｎｚｙｍｅ Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）”Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｑｕａｒｔｅｒｌｙ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，Ｍｄ．；Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｈｏｒｉｚｏｎｓ ２：１－７（１９７８）；Ｖｏｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．３１：５０７－５２０（１９７８）；Ｂｕｔｌｅｒ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．７３：４８２－５２３（１９８１）；Ｍａｇｇｉｏ，ｅｄ．（１９８０）Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ．；Ｉｓｈｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．（１９８１）Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ（Ｋｇａｋｕ Ｓｈｏｉｎ，Ｔｏｋｙｏ）。抗ＩＬ－３３抗体に結合させる酵素は、例えば分光光度定量手段、蛍光定量手段によるか、又は目測手段によって検出し得る化学的部分を生じるような形で適切な物質、好ましくは発色基質と反応することになる。抗体を検出可能に標識するために使用し得る酵素としては、限定はされないが、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、Δ－５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、α－グリセロリン酸塩、デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。加えて、検出は、酵素に対する発色基質を用いる比色法によって達成することができる。加えて、検出は蛍光法によって達成することができ、ここでは１５２Ｅｕなどの蛍光放出金属、又はランタニド系列の他の金属が抗ＩＬ－３３抗体に直接又は間接的に結合される。検出はまた、同様に調製した標準と比べた基質の酵素反応の程度を目視比較することによって達成してもよい。

【０６３４】
検出はまた、種々の他のイムノアッセイのいずれかを用いて達成してもよい。例えば、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を放射性標識することにより、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）を用いて結合分子を検出することが可能である（例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ（Ｍａｒｃｈ，１９８６）Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ）（参照により本明細書に援用される）を参照のこと）。放射性同位元素は、限定はされないが、ガンマカウンター、シンチレーションカウンター、又はオートラジオグラフィーを含めた手段によって検出することができる。

【０６３５】
抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体はまた、１５２Ｅｕなどの蛍光放出金属、又はランタニド系列の他の金属を用いて検出可能に標識することもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）又はエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）のような金属キレート基を用いて結合分子に付加することができる。

【０６３６】
様々な部分を抗体（例えば、抗ＩＬ－３３抗体）、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体にコンジュゲートする技法は周知であり、例えば、Ａｍｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５）“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ Ｄｒｕｇｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｅｄ．Ｒｅｉｓｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．），ｐｐ

．２４３－５６；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９８７）“Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，”ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｅｄ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２ｎｄ ｅｄ．；Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．），ｐｐ．６２３－５３）；Ｔｈｏｒｐｅ（１９８５）“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｅｄ．Ｐｉｎｃｈｅｒａ ｅｔ ａｌ．，ｐｐ．４７５－５０６；“Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，”ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｅｄ．Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．３０３－１６（１９８５）；及びＴｈｏｒｐｅ ｅｔ ａｌ．（１９８２）“Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．６２：１３９－５８を参照のこと。

【０６３７】

ＶＩ．抗体ポリペプチドの発現

抗体の軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡ配列は、周知の方法に従い逆転写酵素及びＤＮＡポリメラーゼを使用して、同時にも、又は別個にも作製し得る。ＰＣＲは、コンセンサス定常領域プライマーによるか、又は既発表の重鎖及び軽鎖ＤＮＡ及びアミノ酸配列をベースとするより特異的なプライマーによって開始させることができる。上記で考察したとおり、ＰＣＲはまた、抗体軽鎖及び重鎖をコードするＤＮＡクローンの単離にも用いられ得る。この場合、ライブラリがコンセンサスプライマー又はより大型の相同プローブ、例えばマウス定常領域プローブによってスクリーニングされ得る。

【０６３８】

ＤＮＡ、典型的にはプラスミドＤＮＡは、当該技術分野において公知の技法を用いて細胞から単離し、例えば組換えＤＮＡ技術に関する前述の参考文献に詳細に記載される周知の標準技法に従い制限酵素地図を作成して塩基配列決定し得る。当然ながら、ＤＮＡは、単離過程又は続く分析の任意の時点で本開示によれば合成であり得る。

【０６３９】

単離した遺伝物質を本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体がもたらされるように操作した後、抗ＩＬ－３３抗体をコードするポリヌクレオチドは、典型的には、宿主細胞に導入する発現ベクターに挿入され、この宿主細胞は所望の分量の抗ＩＬ－３３抗体の産生に用い得るものである。

【０６４０】

抗体、又はその断片、誘導体若しくは類似体、例えば、本明細書に記載される標的分子、例えばＩＬ－３３に結合する抗体の重鎖又は軽鎖を組換え発現させるには、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを構築する必要がある。本開示の抗体分子又は抗体の重鎖若しくは軽鎖、又はその一部分（好ましくは重鎖又は軽鎖可変ドメインを含有する）をコードするポリヌクレオチドが得られると、当該技術分野において周知の技法を用いる組換えＤＮＡ技術によって抗体分子の産生用ベクターを作製し得る。従って、抗体コードヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによるタンパク質の調製方法が本明細書に記載される。当業者に周知の方法を用いて抗体コード配列と適切な転写及び翻訳調節シグナルとを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技法、合成技法、及びインビボ遺伝子組換えが挙げられる。従って本開示は、プロモーターに作動可能に連結された、本開示の抗体分子、又はその重鎖若しくは軽鎖、又は重鎖若しくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。かかるベクターは、抗体

分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでもよく（例えば、国際公開第８６／０５８０７号パンフレット；国際公開第８９／０１０３６号パンフレット；及び米国特許第５，１２２，４６４号明細書を参照のこと）、完全な重鎖又は軽鎖を発現させるため抗体の可変ドメインをかかるベクターにクローニングし得る。

【０６４１】

用語「ベクター」又は「発現ベクター」は、本明細書では、宿主細胞に所望の遺伝子を導入し及びそれを発現させるための媒体として本開示において使用されるベクターを意味して用いられる。当業者に公知のとおり、かかるベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス及びレトロウイルスからなる群から容易に選択し得る。一般に、本開示に適合するベクターは、選択マーカー、所望の遺伝子のクローニングを促進するのに適切な制限部位及び真核又は原核細胞への侵入能力及び／又はそこでの複製能力を含み得る。

【０６４２】

本開示の目的上、数多くの発現ベクター系が用いられ得る。例えば、あるクラスのベクターは、動物ウイルス、例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ＲＳＶ、ＭＭＴＶ又はＭＯＭＬＶ）又はＳＶ４０ウイルスに由来するＤＮＡエレメントを利用する。他のものは、内部リボソーム結合部位を含むポリシストロニック系の使用を伴う。加えて、トランスフェクト宿主細胞の選択を可能にする１つ以上のマーカーを導入することにより、ＤＮＡがその染色体に組み込まれた細胞を選択し得る。マーカーは、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生物剤（例えば抗生物質）耐性又は銅などの重金属に対する耐性を付与し得る。選択可能なマーカー遺伝子は発現させるＤＮＡ配列に直接連結してもよく、或いは同時形質転換によって同じ細胞に導入してもよい。ｍＲＮＡの最適な合成のため、追加のエレメントもまた必要となり得る。これらのエレメントとしては、シグナル配列、スプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終結シグナルを挙げることができる。

【０６４３】

特に好ましい実施形態では、クローニングした可変領域遺伝子が、上記で考察したとおり合成した重鎖及び軽鎖定常領域遺伝子（好ましくはヒト）と共に発現ベクターに挿入される。当然ながら、本開示では、真核細胞における発現を誘発する能力を有する任意の発現ベクターを使用し得る。好適なベクターの例としては、限定はされないが、プラスミドｐｃＤＮＡ３、ｐＨＣＭＶ／Ｚｅｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＥＦ　１／Ｈｉｓ、ｐＩＮＤ／ＧＳ、ｐＲｃ／ＨＣＭＶ２、ｐＳＶ４０／Ｚｅｏ２、ｐＴＲＡＣＥＲ－ＨＣＭＶ、ｐＵＢ６／Ｖ５－Ｈｉｓ、ｐＶＡＸ１、及びｐＺｅｏＳＶ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．から入手可能）、及びプラスミドｐＣＩ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．から入手可能）が挙げられる。一般に、好適に高レベルの免疫グロブリン重鎖及び軽鎖を発現するものに関して多数の形質転換細胞をスクリーニングすることは、例えばロボットシステムによって実行し得るルーチンの実験である。

【０６４４】

より一般的には、抗ＩＬ－３３抗体の単量体サブユニットをコードするベクター又はＤＮＡ配列の調製後、発現ベクターを適切な宿主細胞に導入し得る。宿主細胞へのプラスミドの導入は、当業者に周知の様々な技法によって達成することができる。それらとしては、限定はされないが、トランスフェクション（電気泳動及び電気穿孔を含む）、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープを有するＤＮＡとの細胞融合、マイクロインジェクション、及びインタクトなウイルスによる感染が挙げられる。Ｒｉｄｇｗａｙ（１９８８）“Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｖｅｃｔｏｒｓ”ｉｎ　Ｖｅｃｔｏｒｓ，ｅｄ．Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ　ａｎｄ　Ｄｅｎｈａｒｄｔ（Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，Ｍａｓｓ．），Ｃｈａｐｔｅｒ　２４．２，ｐｐ．４７０－４７２を参照のこと。典型的には、宿主へのプラスミド導入は電気穿孔による。発現コンストラクトを有する宿主細胞を軽鎖及び重鎖の作製に適切な条件下で成長させて、重鎖及び／又は軽鎖タンパク質合成に関してアッセイする。例示的アッセイ技法としては、酵

素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、又は蛍光活性化セルソーター分析（ＦＡＣＳ）、免疫組織化学などが挙げられる。

【０６４５】

発現ベクターを従来技術によって宿主細胞に移入し、次にトランスフェクト細胞を従来技術によって培養することにより、本明細書に記載される方法において使用される抗体が作製される。従って、本開示は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本開示の抗体、又はその重鎖若しくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現に関する好ましい実施形態では、以下に詳述するとおり、完全な免疫グロブリン分子を発現させるため重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターを宿主細胞において共発現させてもよい。

【０６４６】

本明細書で使用されるとき、「宿主細胞」は、組換えＤＮＡ技法を用いて構築された、且つ少なくとも１つの異種遺伝子をコードするベクターを有する細胞を指す。組換え宿主からの抗体の単離方法についての記載の中で、用語「細胞」と「細胞培養物」とは、特に明記されない限り、抗体の供給源を指して同義的に使用される。換言すれば、「細胞」からのポリペプチドの回収とは、スピンダウンした全細胞からの回収、又は培地及び懸濁細胞の両方を含有する細胞培養物からの回収のいずれも意味し得る。

【０６４７】

本明細書に記載される方法において使用される抗体分子の発現には、種々の宿主－発現ベクター系を利用し得る。かかる宿主－発現系は、目的のコード配列の産生及び続く精製に用い得る媒体に相当するが、また、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換又はトランスフェクトしたときに本開示の抗体分子をインサイチューで発現し得る細胞にも相当する。それらとしては、限定はされないが、微生物、例えば、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ又はコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ））；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母（例えば、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ））；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）に感染させた、又は組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）で形質転換した植物細胞系；又は哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）を含有する組換え発現コンストラクトを有する哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＬＫ、２９３、３Ｔ３細胞）が挙げられる。好ましくは、組換え抗体分子の発現には、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）などの細菌細胞、より好ましくは、特に全組換え抗体分子の発現用に真核細胞が用いられる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）などの哺乳類細胞を、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間体初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと併せると、抗体に有効な発現系となる（Ｆｏｅｃｋｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ４５：１０１（１９８６）；Ｃｏｃｋｅｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：２（１９９０））。

【０６４８】

タンパク質発現に用いられる宿主細胞株は、多くの場合に哺乳類起源である；当業者は、そこで発現させる所望の遺伝子産物に最も適した特定の宿主細胞株を優先的に決定する能力があると考えられる。例示的宿主細胞株としては、限定はされないが、ＣＨＯ（チャイニーズハムスター卵巣）、ＤＧ４４及びＤＵＸＢ１３（チャイニーズハムスター卵巣株、ＤＨＦＲマイナス）、ＨＥＬＡ（ヒト子宮頸癌）、ＣＶＩ（サル腎臓株）、ＣＯＳ（ＳＶ４０ Ｔ抗原によるＣＶＩの誘導体）、ＶＥＲＹ、ＢＨＫ（ベビーハムスター腎臓）、ＭＤＣＫ、２９３、ＷＩ３８、Ｒ１６１０（チャイニーズハムスター線維芽細胞）ＢＡＬ

ＢＣ／３Ｔ３（マウス線維芽細胞）、ＨＡＫ（ハムスター腎臓株）、ＳＰ２／Ｏ（マウス骨髄腫）、Ｐ３×６３－Ａｇ３．６５３（マウス骨髄腫）、ＢＦＡ－１ｃ１ＢＰＴ（ウシ内皮細胞）、ＲＡＪＩ（ヒトリンパ球）及び２９３（ヒト腎臓）が挙げられる。宿主細胞株は、典型的には商業サービス、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ又は既発表の文献から利用可能である。

【０６４９】

加えて、挿入された配列の発現を調節するか、又は所望される特定の方法で遺伝子産物を修飾及びプロセシングする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のかかる修飾（例えばグリコシル化）及びプロセシング（例えば切断）は、タンパク質の機能に重要であり得る。種々の宿主細胞が、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセシング及び修飾に関して特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株又は宿主系を選択することにより、発現させる外来タンパク質の正しい修飾及びプロセシングを確実にすることができる。このため、一次転写物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化、及びリン酸化のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が用いられ得る。

【０６５０】

組換えタンパク質を長時間高収率で産生させるには、安定発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞株を操作し得る。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用するよりむしろ、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）によって制御されるＤＮＡ、及び選択可能なマーカーで形質転換し得る。外来ＤＮＡの導入後、操作した細胞を強化培地で１～２日間成長させてもよく、次に選択培地に切り換える。組換えプラスミド中の選択可能なマーカーによって選択抵抗性が付与され、細胞がその染色体にプラスミドを安定に組み込み、且つ成長してフォーカスを形成することが可能となり、次にはそれをクローニングして細胞株に拡大し得る。この方法は、有利には、抗体分子を安定に発現する細胞株を操作するために用いられ得る。

【０６５１】

幾つもの選択系を使用することができ、例えば、限定はされないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １３：２２３（１９７７））、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ ａｎｄ Ｓｚｙｂａｌｓｋｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ４８：２０２（１９９２））、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ２２：８１７（１９８０））遺伝子を、それぞれｔｋ細胞、ｈｇｐｒｔ細胞又はａｐｒｔ細胞で用いることができる。また、以下の遺伝子について、代謝拮抗薬耐性を選択基準として用いることができる：ｄｈｆｒ、メトトレキサート耐性を付与する（Ｗｉｇｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：３５７（１９８０）；Ｏ’Ｈａｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：１５２７（１９８１））；ｇｐｔ、ミコフェノール酸耐性を付与する（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ａｎｄ Ｂｅｒｇ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７８：２０７２（１９８１））；ｎｅｏ、アミノグリコシドＧ－４１８耐性を付与する Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｙ １２：４８８－５０５；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７－９５（１９９１）；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６（１９９３）；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６－９３２（１９９３）；及びＭｏｒｇａｎ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７（１９９３）；ＴＩＢ ＴＥＣＨ １３（５）：１５５－２１５（Ｍａｙ，１９９３）；及びｈｙｇｒｏ、ハイグロマイシン耐性を付与する（Ｓａｎｔｅｒｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ３０：１４７（１９８４）。組換えＤＮＡ技術の技術分野で一般に公知の使用し得る方法については、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ）；Ｋｒｉｅｇｌｅｒ（１９９０）“Ｇｅｎｅ Ｔ

ransfer and Expression”in A Laboratory Manual（Stockton Press，NY）；Dracopoli et al.（eds）（1994）Current Protocols in Human Genetics（John Wiley & Sons，NY）Chapters 12 and 13；Colberre−Garapin et al.（1981）J.Mol.Biol.150：1（全体として参照によって本明細書に援用される）に記載されている。

【0652】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加させることができる（レビューについては、Bebbington and Hentschel（1987）“The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning”（Academic Press，NY）Vol.3を参照のこと。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害薬レベルの増加により、マーカー遺伝子のコピー数が増加し得る。増幅領域は抗体遺伝子と関連付けられているため、抗体の産生もまた増加し得る（Crouse et al.，Mol.Cell.Biol.3：257（1983））。

【0653】

インビトロ産生では、スケールアップして大量の所望のポリペプチドをもたらすことが可能である。組織培養条件下における哺乳類細胞培養技法は当該技術分野において公知であり、例えばエアリフト反応器若しくは連続撹拌反応器における均一浮遊培養、又は例えば中空糸、マイクロカプセル、アガロースマイクロビーズ若しくはセラミックカートリッジに固定化若しくは捕捉した細胞の培養が含まれる。必要であれば及び／又は望ましい場合、通常のクロマトグラフィー方法、例えばゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ＤＥＡＥ−セルロースでのクロマトグラフィー又は（イムノ）アフィニティークロマトグラフィーによって、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドの優先的生合成後に、又は本明細書に記載されるＨＩＣクロマトグラフィー工程の前若しくはそれに続いてポリペプチドの溶液を精製することができる。

【0654】

本開示の抗ＩＬ−３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をコードする遺伝子はまた、昆虫、細菌又は酵母などの非哺乳類細胞又は植物細胞で発現させることもできる。核酸を容易に取り込む細菌としては、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）のメンバー、例えば、大腸菌（Escherichia coli）又はサルモネラ属（Salmonella）；バチルス科（Bacillaceae）、例えば枯草菌（Bacillus subtilis）；肺炎球菌（Pneumococcus）；ストレプトコッカス属（Streptococcus）、及びインフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）の株が挙げられる。更に、細菌で発現すると、異種ポリペプチドは典型的には封入体の一部になることが理解されるであろう。この異種ポリペプチドは、単離し、精製し、次に機能分子にアセンブルしなければならない。四価形態の抗体が所望される場合、次にはサブユニットを自己集合させて四価抗体とし得る（国際公開第０２／０９６９４８Ａ２号パンフレット）。

【0655】

細菌系では、有利には、発現させる抗体分子の意図される用途に応じて幾つもの発現ベクターを選択し得る。例えば、抗体分子の医薬組成物を生成するためかかるタンパク質を多量に作製しようとするとき、容易に精製される融合タンパク質産物の高度な発現を誘導するベクターが望ましいものとなり得る。かかるベクターとしては、限定されないが、大腸菌（E.coli）発現ベクターpUR278（Ruther et al.，EMBO J.2：1791（1983））（抗体コード配列が個々にベクターにlacZコード領域とインフレームでライゲートされ、それにより融合タンパク質が産生される）；p

ＩＮベクター（Ｉｎｏｕｙｅ ａｎｄ Ｉｎｏｕｙｅ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１３：３１０１－３１０９（１９８５）；Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ ａｎｄ Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２４：５５０３－５５０９（１９８９））などが挙げられる。ｐＧＥＸベクターもまた、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質として外来性ポリペプチドを発現させるために使用し得る。一般に、かかる融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオン－アガロースビーズへの吸着及び結合と、続く遊離グルタチオンの存在下における溶出によって溶解細胞から容易に精製することができる。ｐＧＥＸベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物がＧＳＴ部分から放出され得るようにするため、トロンビン又はＸａ因子プロテアーゼ切断部位を含んで設計される。

【０６５６】

原核生物に加えて、真核微生物もまた使用し得る。サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、即ち一般的なパン酵母が、真核微生物の中で最も一般的に使用されるが、幾つもの他の株、例えばピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）が、一般的に利用可能である。

【０６５７】

サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）における発現は、例えばプラスミドＹＲｐ７（Ｓｔｉｎｃｈｃｏｍｂ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２８２：３９（１９７９）；Ｋｉｎｇｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ７：１４１（１９７９）；Ｔｓｃｈｅｍｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １０：１５７（１９８０））が一般的に使用される。このプラスミドはＴＲＰ１遺伝子を既に含有し、ＴＲＰ１遺伝子は、トリプトファンでの成長能力を欠いている酵母の突然変異株、例えば受託番号４４０７６又はＰＥＰ４－１の選択マーカーを提供する（Ｊｏｎｅｓ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ８５：１２（１９７７））。酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてのｔｒｐ１病変の存在が、ひいてはトリプトファンの非存在下での成長による形質転換の検出に有効な環境をもたらす。

【０６５８】

昆虫系では、オートグラファカリフォルニカ核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）が、典型的には外来性遺伝子を発現させるベクターとして使用される。このウイルスはスポドプテラ・フルギペルダ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞で成長する。抗体コード配列をこのウイルスの非必須領域（例えばポリヘドリン遺伝子）に個々にクローニングし、ＡｃＮＰＶプロモーター（例えばポリヘドリンプロモーター）の制御下に置くことができる。

【０６５９】

本開示の結合分子は、組換え発現させた後、当該技術分野において公知の任意の免疫グロブリン分子精製方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインＡ後の特異的抗原に対する親和性によるもの、及びサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心、溶解度差によるか、又は任意の他の標準的なタンパク質精製技法によって精製し得る。或いは、本開示の抗体の親和性を増加させる好ましい方法が、米国特許出願公開第２００２ ０１２３０５７ Ａ１号明細書に開示されている。

【０６６０】

ＶＩＩ．治療用抗ＩＬ－３３抗体を使用した治療方法

本開示の方法は、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体を（その抗原結合断片、変異体、及び誘導体を含め）使用した、ＩＬ－３３発現又はＩＬ－３３発現細胞に関連する疾患を有する患者の治療に関する。「ＩＬ－３３発現細胞」とは、ＩＬ－３３抗原を発現する細胞が意図される。細胞におけるＩＬ－３３発現を検出する方法は当該技術分野において周知であり、限定はされないが、ＰＣＲ技法、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡなどが挙げられる。

【０６６１】

以下の考察は、本開示の抗ＩＬ－３３抗体による様々な疾患及び障害の診断方法及び治療に関するが、本明細書に記載される方法はまた、本開示の抗ＩＬ－３３抗体の所望の特

性、例えばＩＬ－３３との特異的結合能及びＩＬ－３３病原性活性の中和能を保持しているこれらの抗ＩＬ－３３抗体の抗原結合断片、変異体、及び誘導体にも適用可能である。

【０６６２】

一実施形態において、治療には、対象又は患者に対する本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片の適用又は投与、又は対象又は患者から単離した組織又は細胞株に対する抗ＩＬ－３３結合分子の適用又は投与が含まれ、ここで対象又は患者は、疾患、疾患の症状、又は疾患に罹り易い素因を有する。別の実施形態において、治療はまた、疾患、疾患の症状、又は疾患に罹り易い素因を有する対象又は患者に対する本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物の適用又は投与、又はそうした対象又は患者から単離した組織又は細胞株に対する抗ＩＬ－３３結合分子を含む医薬組成物の適用又は投与を含むことも意図される。

【０６６３】

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、様々な炎症病態の治療に有用である。「抗炎症活性」とは、治療中に生じるＩＬ－３３発現細胞における炎症反応速度の低下、ひいては組織における炎症の減退が意図される。例えば、少なくとも１つの抗ＩＬ－３３抗体による治療は、ヒトにおけるＩＬ－３３発現細胞に関連する病状の治療の点で有益な生理学的反応、例えば炎症反応の低下を生じさせる。

【０６６４】

一実施形態において、本開示は、医薬として使用するための、詳細には炎症反応の治療又は予防において使用するため又は炎症病態、例えば喘息又はＣＯＰＤの治療において使用するための、本開示に係る抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその結合断片に関する。特定の実施形態において、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、アレルギー性障害の治療に使用される。特定の実施形態において、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、対象又は患者の気道における炎症反応の治療に使用される。

【０６６５】

本開示の方法においては、本明細書の他の部分で定義するとおりの少なくとも１つの抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片を使用して、炎症反応の点で好ましい治療反応が促進される。炎症治療の点で「好ましい治療反応」とは、これらの結合分子、例えば抗体又はその断片の抗炎症活性に関連した疾患の改善、及び／又は疾患に関連する症状の改善が意図される。即ち、抗炎症効果、更なる炎症の予防及び／又は既存の炎症の低下、及び／又は疾患に関連する１つ以上の症状の減少を観察することができる。従って、例えば疾患の改善は完全寛解として特徴付けられ得る。「完全寛解」とは、任意の過去の検査結果を標準化して臨床的に検出可能な疾患が存在しないことが意図される。かかる反応は、本開示の方法に係る治療後少なくとも１ヵ月間持続しなければならない。或いは、疾患の改善は部分的寛解として分類されてもよい。

【０６６６】

本明細書に記載される抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片はまた、ＩＬ－３３発現細胞に関連する炎症性疾患及び免疫系の欠損又は障害の治療にも用途が見出され得る。炎症性疾患は、炎症及び組織の破壊、又はこれらの組み合わせによって特徴付けられる。「抗炎症活性」とは、炎症の低下又は予防が意図される。「炎症性疾患」には、免疫応答の惹起イベント又は標的に、例えば、同種抗原、異種抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、未知の抗原、又はアレルゲンを含めた非自己抗原が関わる任意の炎症性免疫介在過程が含まれる。一実施形態において、炎症性疾患は気道の炎症障害、例えば喘息又はＣＯＰＤである。

【０６６７】

喘息は、例えば、可変的及び反復的症状、可逆性気流閉塞、及び気管支攣縮によって特徴付けられる気道の一般的な炎症性疾患と考えられる。喘息症状には、喘鳴音、咳嗽、胸部絞扼感、及び息切れが含まれ得る。症状はアレルゲン又は刺激物への曝露によって惹起され得る。喘息は、症状がアレルゲンによって誘発されるか（アトピー性）否か（非アト

ピー性）に基づきアトピー性（外因性）又は非アトピー性（内因性）に分類することができる。急性喘息増悪は一般に「喘息発作」と称される。喘息発作の間に起こり得る更なる徴候としては、呼吸補助筋（胸鎖乳突筋及び首の斜角筋）の使用が挙げられ、奇脈（吸息中に弱く且つ呼息中に強い脈拍）、及び胸部の過膨張があり得る。酸素の欠乏により、青色の皮膚及び爪が現れ得る。

【０６６８】

本開示の方法においては、本明細書の他の部分で定義するとおりの少なくとも１つの抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片を使用して、炎症性疾患の治療又は予防の点で好ましい治療反応が促進される。炎症性疾患の点で「好ましい治療反応」とは、これらの抗体の抗炎症活性などに関連した疾患の改善、及び／又は疾患に関連する症状の改善が意図される。即ち、限定はされないが、炎症性サイトカイン、接着分子、プロテアーゼ、免疫グロブリン、これらの組み合わせなどの分泌の低下、抗炎症性タンパク質の産生の増加、自己反応性細胞数の減少、免疫寛容の増加、自己反応性細胞生存の阻害、アポトーシスの低下、内皮細胞遊走の低下、自然単球遊走の増加、ＩＬ－３３発現細胞の刺激によって媒介される１つ以上の症状の低下及び／又は減少を含めた炎症反応の低下が観察され得る。かかる好ましい治療反応は、投与経路に限定されない。

【０６６９】

臨床反応は、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）スキャン、Ｘ線画像法、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）スキャン、フローサイトメトリー又は蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）分析、組織学、肉眼的病理学、及び限定はされないが、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、クロマトグラフィーなどによって検出可能な変化を含めた血液化学などのスクリーニング技法を用いて評価することができる。これらの好ましい治療反応に加えて、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片による治療を受ける対象は、疾患に関連する症状の改善の有益な効果を経験し得る。

【０６７０】

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその結合断片は、炎症性疾患、例えば喘息又はＣＯＰＤの治療に有用であることが公知の、又はそれに使用されていたことがあるか若しくは現在使用されている任意の薬剤又は薬剤の組み合わせを含めた、任意の公知の炎症性疾患療法と併用して使用することができる。喘息の治療に使用される薬剤は、２つの一般的クラス：急性症状の治療に使用される即効性薬物；及び更なる増悪を防ぐために使用される長期管理薬物に分類される。速効治療には、例えば、短時間作用性β－２アドレナリン受容体作動薬（ＳＡＢＡ）（例えば、サルブタモール）；抗コリン薬（ａｎｔｉｃｈｏｌｉｎｅｒｇｉｎｉｃ　ｍｅｄｉｃａｔｉｏｎｓ）（例えば、臭化イプラトロピウム）、アドレナリン作動薬（例えば、エピネフリン）が含まれる。長期管理治療には、例えば、グルココルチコイド系（例えば、プロピオン酸フルチカゾン）；長時間作用型β－２アドレナリン受容体作動薬（ＬＡＢＡ）；ロイコトリエン拮抗薬（例えば、ザフィルルカスト）；及びマスト細胞安定剤（例えば、クロモリンナトリウム）が含まれる。速効治療及び長期管理治療は、多くの場合に吸入投与される。

【０６７１】

従って、併用療法が、別の治療剤の投与と併用した抗ＩＬ－３３結合分子の投与を含む場合、本開示の方法は、別個の製剤又は単一の医薬製剤を使用した共投与、及びいずれの順序にしろ連続的な投与を包含する。本開示の一部の実施形態において、本明細書に記載される抗ＩＬ－３３抗体は抗炎症薬と併用して投与され、ここで抗体又はその抗原結合断片及び１つ又は複数の治療剤は、いずれの順序にしろ逐次的に投与されてもよく、又は同時に（即ち、並行して又は同じ時間フレームの範囲内で）投与されてもよい。

【０６７２】

本開示の更なる実施形態は、臨床検査手順の一環として組織中のタンパク質レベルを診断的にモニタして、例えばそれにより所与の治療レジメンの有効性を決定するための、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片の使用である。例えば、検出は、抗体を検出可能物質とカップリングすることにより、検出を促進し得る。検出可能物質の

例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質が挙げられる。好適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、β－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；好適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；好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、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、塩化ダンシル又はフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；及び好適な放射性物質の例としては、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、又は^{3}Ｈが挙げられる。

【０６７３】

ＶＩＩＩ．医薬組成物及び投与方法

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を調製し、それを必要としている対象に投与する方法は周知であり、又は当業者によって容易に決定される。抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入によるもの又は局所であり得る。用語の非経口とは、本明細書で使用されるとき、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸、又は膣内投与を含む。これらの投与形態は全て、本開示の範囲内にあるものとして明示的に企図されるが、投与形態の別の例を挙げるとすれば、注射、詳細には静脈内若しくは動脈内注射又は点滴用の溶液であり得る。通常、本開示の好適な医薬組成物は、緩衝液（例えば酢酸塩、リン酸塩又はクエン酸塩緩衝液）、界面活性剤（例えばポリソルベート）、任意選択で安定剤（例えばヒトアルブミン）等を含み得る。しかしながら、本明細書の教示と適合する他の方法では、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、有害な細胞集団の部位に直接送達して、それにより治療剤への罹患組織の曝露を増加させることができる。一実施形態において、投与は、例えば吸入又は鼻腔内投与による、気道への直接の投与である。

【０６７４】

本明細書で考察するとおり、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、ある種の炎症性疾患など、ＩＬ－３３発現細胞媒介疾患のインビボ治療に薬学的に有効な量で投与され得る。これに関して、本開示の開示される結合分子が、活性薬剤の投与を容易にし、且つ安定性を促進するように製剤化され得ることは理解されるであろう。好ましくは、本開示における医薬組成物は、薬学的に許容可能な非毒性滅菌担体、例えば生理食塩水、非毒性緩衝液、保存剤などを含む。本願の目的上、コンジュゲート型又は非コンジュゲート型の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の薬学的に有効な量は、標的との有効な結合を実現し、及び利益を実現する、例えば、疾患若しくは病態の症状を改善し又は物質若しくは細胞を検出するのに十分な量を意味すると見なされるものとする。

【０６７５】

本開示で使用される医薬組成物は、例えば、水、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩又は電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドケイ酸、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート類、ワックス、ポリエチレン－ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂を含めた、薬学的に許容可能な担体を含み得る。

【０６７６】

投与用製剤は、滅菌水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルションを含む。非水性溶

媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、例えば、水、アルコール溶液／水溶液、エマルション又は懸濁液、例えば生理食塩水及び緩衝媒体が挙げられる。本開示において、薬学的に許容可能な担体としては、限定はされないが、０．０１～０．１Ｍ、好ましくは０．０５Ｍリン酸緩衝液又は０．８％生理食塩水が挙げられる。他の一般的な非経口媒体としては、リン酸ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー、又は固定油が挙げられる。静脈内用媒体としては、体液及び栄養素補充液、電解質補充液、例えばリンガーのデキストロースをベースとするものなどが挙げられる。保存剤及び他の添加剤、例えば、抗菌薬、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなどもまた存在し得る。

【０６７７】

より詳細には、注射用途に好適な医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）若しくは分散液と滅菌注射用溶液若しくは分散液の即時調合用の滅菌粉末とを含む。そのような場合、本組成物は無菌でなくてはならず、易注射針通過性が存在する程度に流動性があるべきである。本組成物は製造及び保管条件下で安定していなくてはならず、好ましくは細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護されているものであり得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びこれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であってもよい。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、分散液の場合には必要な粒度の維持、及び界面活性剤の使用により維持することができる。本明細書に開示される治療方法での使用に好適な製剤については、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．）１６ｔｈ ｅｄ．（１９８０）に記載されている。

【０６７８】

微生物作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、マンニトール、ソルビトール、又は塩化ナトリウムなど、糖類、多価アルコール類を組成物に含めることが好ましいであろう。吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に含めると、注射用組成物の持続的吸収をもたらすことができる。

【０６７９】

いずれの場合にも、滅菌注射用溶液は、本明細書に列挙される成分の１つ又は組み合わせを有する適切な溶媒中に必要量の活性化合物（例えば、単独の、又は他の活性薬剤と併用した、抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体）を適宜配合し、続いてろ過滅菌することにより調製し得る。一般に、分散液は活性化合物を滅菌媒体に配合することにより調製され、これには基本となる分散媒と上記に列挙したものからの必要な他の成分とが含まれる。滅菌注射用溶液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥され、それにより予め滅菌ろ過したその溶液から活性成分＋任意の追加的な所望の成分の粉末が生じる。注射用製剤は、当該技術分野において公知の方法に従い処理され、アンプル、バッグ、ボトル、シリンジ又はバイアルなどの容器に充填され、無菌条件下で密封される。更に、製剤はキットの形態で包装及び販売され得る。かかる製品は、好ましくは、関連する組成物が疾患又は障害に罹患しているか、又はそれに罹り易い対象の治療に有用であることを指示するラベル又は添付文書を有し得る。

【０６８０】

非経口製剤は、単回ボーラス用量、輸液、又は負荷ボーラス用量とそれに続く維持用量であり得る。これらの組成物は、特定の固定的又は可変的間隔で、例えば、１日１回、又は「必要に応じて」投与され得る。

【０６８１】

本開示で使用される特定の医薬組成物は、例えば、カプセル、錠剤、水性懸濁液又は溶液を含めた許容可能な剤形で経口投与され得る。特定の医薬組成物はまた、鼻エアロゾル

又は吸入によって投与されてもよい。かかる組成物は、ベンジルアルコール又は他の好適な保存剤、バイオアベイラビリティを亢進させる吸収促進剤、及び／又は他の従来の可溶化剤又は分散剤を用いて、生理食塩水中の溶液として調製されてもよい。

【０６８２】

単一の剤形を作製するため担体材料と組み合わせ得る抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその断片、変異体、若しくは誘導体の量は、治療される対象及び詳細な投与様式に応じて異なり得る。本組成物は、単回用量、複数回用量として、又は輸液で確立された期間にわたって投与され得る。投薬量レジメンはまた、最適な所望の反応（例えば、治療的又は予防的反応）をもたらすように調整され得る。

【０６８３】

本開示の範囲に即して、本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、前述の治療方法に従い治療効果を生じさせるのに十分な量でヒト又は他の動物に投与され得る。本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体若しくは誘導体は、公知の技法に従い本開示の抗体又はその抗原結合断片を従来の薬学的に許容可能な担体又は希釈剤と組み合わせることにより調製された従来の剤形でかかるヒト又は他の動物に投与することができる。当業者によれば、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤の形態及び性質が、それと共に組み合わせる活性成分の量、投与経路及び他の周知の変動要因に左右されることが認識されるであろう。当業者は更に、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の１つ以上の種を含むカクテルが特に有効であると判明し得ることを理解するであろう。

【０６８４】

「治療有効用量又は治療有効量」又は「有効量」は、治療すべき疾患又は病態を有する患者の治療に関して投与時に好ましい治療反応をもたらす抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片の量が意図される。

【０６８５】

本開示はまた、例えば喘息又はＣＯＰＤを含めた炎症性疾患の治療用医薬の製造における、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の使用も提供する。

【０６８６】

本開示はまた、炎症性疾患を治療するための対象の治療用医薬の製造における、本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の使用も提供し、この医薬は、少なくとも１つの他の療法による前治療を受けたことがある対象において使用される。「前治療を受けた」又は「前治療」とは、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を含む医薬の投与を受ける前に１つ以上の他の療法の投与を受けたことがある（例えば、少なくとも１つの他の抗炎症療法で治療されたことがある）対象が意図される。「前治療を受けた」又は「前治療」には、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を含む医薬による治療の開始前２年以内、１８ヵ月以内、１年以内、６ヵ月以内、２ヵ月以内、６週間以内、１ヵ月以内、４週間以内、３週間以内、２週間以内、１週間以内、６日以内、５日以内、４日以内、３日以内、２日以内、又は更には１日以内に少なくとも１つの他の療法で治療されたことがある対象が含まれる。対象がその１つ又は複数の先行療法による前治療に対するレスポンダーであった必要はない。従って、抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を含む医薬の投与を受ける対象は、先行療法による前治療に対して、又は前治療が複数の療法を含んだ場合は先行療法のうちの１つ以上に対して、反応した可能性もあり、又は反応しなかった可能性もある。

【０６８７】

ＩＸ．診断法

本開示は、例えば喘息を含めた、ある種の炎症性疾患などのＩＬ－３３発現細胞媒介疾患の診断時に有用な診断方法を更に提供し、この方法は、個体由来の組織若しくは他の細

胞又は体液中のＩＬ－３３タンパク質又は転写物の発現レベルを計測すること、及び計測された発現レベルを正常組織又は体液中の標準ＩＬ－３３発現レベルと比較することを伴い、ここでは標準と比較した発現レベルの増加が障害の指標となる。

【０６８８】

本開示の抗ＩＬ－３３抗体及びその抗原結合断片、変異体、及び誘導体を使用することにより、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて生体試料中のＩＬ－３３タンパク質レベルをアッセイすることができる（例えば、Ｊａｌｋａｎｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７）を参照のこと）。ＩＬ－３３タンパク質発現の検出に有用な他の抗体ベースの方法としては、イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、免疫沈降、又はウエスタンブロッティングが挙げられる。好適なアッセイについては、本明細書の他の部分に更に詳細に記載される。

【０６８９】

「ＩＬ－３３ポリペプチドの発現レベルをアッセイする」とは、第１の生体試料中のＩＬ－３３ポリペプチドレベルを直接か（例えば、絶対タンパク質レベルを決定又は推定することによる）、或いは比較によるか（例えば、第２の生体試料中の疾患関連ポリペプチドレベルと比較することによる）のいずれかによって定性的又は定量的に計測又は推定することが意図される。好ましくは、第１の生体試料中のＩＬ－３３ポリペプチド発現レベルが計測又は推定されて標準ＩＬ－３３ポリペプチドレベルと比較され、標準は、障害を有しない個体から得られた第２の生体試料から取られたか、又は障害を有しない個体の集団からレベルを平均することによって決定されたものである。当該技術分野では理解されるであろうとおり、一旦「標準」ＩＬ－３３ポリペプチドレベルが既知になると、それを比較用の標準として繰り返し使用することができる。

【０６９０】

「生体試料」とは、潜在的にＩＬ－３３を発現する個体、細胞株、組織培養物、又は他の細胞供給源から得られる任意の生体試料が意図される。哺乳動物から組織生検及び体液を得る方法は、当該技術分野において周知である。

【０６９１】

Ｘ．イムノアッセイ

本開示の抗ＩＬ－３３結合分子、例えば抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、当該技術分野において公知の任意の方法により、免疫特異的結合に関してアッセイし得る。結合アッセイは、直接結合アッセイとして、又は競合結合アッセイとして実施し得る。用いることのできるイムノアッセイとしては、いくつか例を挙げれば、限定はされないが、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）、ウエスタンブロッティング、免疫細胞化学、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィー（ａｆｆｉｎｉｔｙ ｃｈｒｏｍｏｔｏｇｒａｐｈｙ）、バイオレイヤー干渉法、Ｏｃｔｅｔ、ＦｏｒｔｅＢｉｏ）及び生化学アッセイ、例えば、解離促進ランタニド蛍光イムノアッセイ（ＤＥＬＦＩＡ（登録商標）、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）、フェルスター共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）アッセイ（例えば均一時間分解蛍光（ＨＴＲＦ（登録商標）、Ｃｉｓ Ｂｉｏｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）、及び放射性リガンド結合アッセイがある。結合はまた細胞アッセイにおいても、例えばフローサイトメトリー及び蛍光微量容積アッセイ技術（ＦＭＡＴ（登録商標）、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によって検出することができる。直接結合アッセイでは、ＩＬ－３３抗原への結合に関して候補抗体が試験される。他方で、競合結合アッセイは、候補抗体が既知の抗ＩＬ－３３抗体若しくは断片又はＩＬ－３３に結合するＳＴ２などの他の化合物と競合する能力を評価する。かかるアッセイは常法であり、当該技術分野において周知である（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ，（１９９４）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ）Ｖｏｌ．１（これは参照により全体として本明細書に援用される）を参照のこと）。例示的イムノアッセ

イについて、以下に簡単に説明する（しかし限定するよう意図するものではない）。

【０６９２】

免疫沈降プロトコルには、概して、タンパク質ホスファターゼ及び／又はプロテアーゼ阻害薬（例えば、ＥＤＴＡ、ＰＭＳＦ、アプロチニン、バナジン酸ナトリウム）を補足したＲＩＰＡ緩衝液（１％ＮＰ－４０又はＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１％デオキシコール酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ７．２、１％Ｔｒａｓｙｌｏｌ）などの溶解緩衝液中に細胞集団を溶解させて、この細胞ライセートに目的の抗体を加え、４℃である期間（例えば、１～４時間）インキュベートし、この細胞ライセートにプロテインＡ及び／又はプロテインＧセファロースビーズを加え、４℃で約１時間以上インキュベートし、溶解緩衝液でビーズを洗浄し、及びそのビーズをＳＤＳ／試料緩衝液に再懸濁することが含まれる。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えばウエスタンブロット分析によって評価することができる。当業者であれば、抗体と抗原の結合が増加し且つバックグラウンドが減少するように修正し得るパラメータ（例えば、細胞ライセートをセファロースビーズでプレクリアリングする）に関して精通しているであろう。免疫沈降プロトコルに関する更なる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ，（１９９４）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ）Ｖｏｌ．１　ａｔ　１０．１６．１を参照のこと。

【０６９３】

ウエスタンブロット分析には、概して、タンパク質試料を調製し、タンパク質試料をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し（例えば、抗原の分子量に応じて８％～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）、タンパク質試料をポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、ＰＶＤＦ又はナイロンなどの膜に転写し、ブロッキング溶液（例えば、３％ＢＳＡ又は脱脂乳を含有するＰＢＳ）で膜をブロックし、洗浄緩衝液（例えば、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ　２０）で膜を洗浄し、ブロッキング緩衝液に希釈した一次抗体（目的の抗体）で膜をブロックし、洗浄緩衝液で膜を洗浄し、ブロッキング緩衝液に希釈した、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）又は放射性分子（例えば、^{32}Ｐ又は^{125}Ｉ）にコンジュゲートした二次抗体（これは一次抗体、例えば抗ヒト抗体を認識する）で膜をブロックし、洗浄緩衝液で膜を洗浄し、及び抗原の存在を検出することが含まれる。当業者であれば、検出されるシグナルが増加し且つバックグラウンドノイズが減少するように修正し得るパラメータに関して精通しているであろう。ウエスタンブロットプロトコルに関する更なる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ，（１９９４）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ）Ｖｏｌ．１　ａｔ　１０．８．１を参照のこと。

【０６９４】

ＥＬＩＳＡには、抗原を調製し、９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングし、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）などの検出可能な化合物にコンジュゲートした目的の抗体をウェルに加えてある期間インキュベートし、及び抗原の存在を検出することが含まれる。ＥＬＩＳＡでは、目的の抗体を検出可能な化合物にコンジュゲートする必要はない；代わりに、検出可能な化合物にコンジュゲートした二次抗体（これは目的の抗体を認識する）をウェルに加えてもよい。更に、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体をウェルにコーティングしてもよい。この場合、コーティングされたウェルに目的の抗原を加えた後に、検出可能な化合物にコンジュゲートした第２の抗体が加えられ得る。当業者であれば、検出されるシグナル並びに当該技術分野において公知のＥＬＩＳＡの他の変数が増加するように修正し得るパラメータに関して精通しているであろう。ＥＬＩＳＡに関する更なる考察については、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ，（１９９４）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ）Ｖｏｌ．１　ａｔ　１３．２．１を参照のこと。

【０６９５】
加えて、本開示の抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、ＩＬ－３３タンパク質又はその保存されている変異体若しくはペプチド断片のインサイチュー検出のため、免疫蛍光法、免疫電子顕微鏡法又は非免疫学的アッセイの場合のように組織学的に用いることができる。インサイチュー検出は、患者から組織学標本を採取し、標識された抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体をそれに適用することにより（好ましくは標識された抗体（又は断片）を生体試料上に重ね合わせることにより適用される）達成し得る。かかる手順を用いることにより、ＩＬ－３３タンパク質、又は保存されている変異体若しくはペプチド断片の存在のみならず、検査下の組織におけるその分布もまた決定することが可能である。当業者は、本開示を用いて、かかるインサイチュー検出を実現するため任意の多種多様な組織学的方法（染色手順など）を修正し得ることを容易に理解するであろう。
【０６９６】
ＩＬ－３３遺伝子産物又はその保存されている変異体若しくはペプチド断片のイムノアッセイ及び非イムノアッセイには、典型的には、生体液、組織抽出物、新鮮採取細胞、又は細胞培養でインキュベートした細胞のライセートなどの試料を、ＩＬ－３３又はその保存されている変異体若しくはペプチド断片への結合能を有する検出可能に標識した抗体の存在下でインキュベートし、及び結合した抗体を、幾つもの当該技術分野において周知の技法のうちのいずれかによって検出することが含まれるであろう。
【０６９７】
生体試料は、ニトロセルロースなどの固相支持体又は担体、又は細胞、細胞粒子若しくは可溶性タンパク質を固定化することが可能な他の固体支持体と接触させて固定化することができる。次に支持体を好適な緩衝液で洗浄し、続いて検出可能に標識した抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体で処理し得る。次に固相支持体を２回目に緩衝液で洗浄して未結合の抗体を取り除き得る。任意選択で、続いて抗体を標識する。次に、固体支持体に結合した標識の量を従来の手段によって検出し得る。
【０６９８】
「固相支持体又は担体」とは、抗原又は抗体を結合することが可能な任意の支持体が意図される。周知の支持体又は担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ類、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド類、斑糲岩、及び磁鉄鉱が含まれる。本開示の目的上、担体の性質は、ある程度可溶性であっても、又は不溶性であってもよい。支持体材料は、カップリングした分子が抗原又は抗体への結合能を有する限り、事実上、いかなる可能な構造的形態を有してもよい。従って、支持体の形態は、ビーズの場合のように球状であってもよく、又は試験管の内面、又はロッドの外面の場合のように円筒状であってもよい。或いは、表面は、シート、試験紙等のように平面状であってもよい。好ましい支持体としては、ポリスチレンビーズが挙げられる。当業者は、抗体又は抗原の結合に好適な他の多くの担体について分かっているか、又はルーチンの実験を用いることによりそれを確認することができるであろう。
【０６９９】
溶相結合アッセイもまた、当該技術分野において公知の好適な方法、例として、限定はされないが、フェルスター共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）アッセイ（例えば均一時間分解蛍光（ＨＴＲＦ（登録商標）、Ｃｉｓ　Ｂｉｏｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を用いて実施し得る。ＨＴＲＦ（登録商標）アッセイは、近接しているドナーフルオロフォアとアクセプターフルオロフォアとの間の蛍光共鳴エネルギー転移を利用する均一系アッセイ技術である（Ｍａｔｈｉｓ，Ｇ．，Ｃｌｉｎ　Ｃｈｅｍ　４１（９）：１３９１－７（１９９５））。このアッセイを用いて、目的の分子の一方をドナーフルオロフォア、例えばユウロピウム（Ｅｕ３＋）クリプテートに直接又は間接的にカップリングし、且つ他方の目的の分子をアクセプターフルオロフォア、例えばＸＬ６６５（安定架橋アロフィコシアニン）にカップリングすることにより、巨大分子の相互作用を計測することができる。ドナ

ー分子の励起によって蛍光発光が生じる。この発光からのエネルギーが、ドナーフルオロフォアに近接しているときアクセプターフルオロフォアに移行し、特定の長寿命蛍光の発光が生じ得る。

【０７００】

所与のロットの抗ＩＬ－３３抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の結合活性は、周知の方法に従い決定し得る。当業者は、ルーチンの実験を用いることにより各決定毎に有効且つ最適なアッセイ条件を決定することが可能であろう。

【０７０１】

抗体抗原相互作用の親和性の計測に利用可能な方法は種々あるが、速度定数の決定については比較的少ない。これらの方法のほとんどは、抗体又は抗原をいずれか標識することに頼るものであり、これは必然的にルーチンの計測を複雑にし、計測量に不確実性が持ち込まれる。

【０７０２】

抗体の抗原への結合親和性及び抗体抗原相互作用のオフ速度は、競合結合アッセイによって決定することができる。競合結合アッセイの一例はラジオイムノアッセイであり、これには、標識された抗原（例えば、^{3}Ｈ又は^{125}Ｉ）を漸増量の非標識抗原の存在下で目的の抗体と共にインキュベートし、標識抗原に結合した抗体を検出することが含まれる。特定の抗原に対する目的の抗体の親和性及び結合オフ速度は、スキャッチャードプロット分析によってデータから決定することができる。二次抗体との競合もまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定することができる。この場合は抗原が、漸増量の非標識二次抗体の存在下で、標識化合物（例えば、^{3}Ｈ又は^{125}Ｉ）にコンジュゲートした目的の抗体と共にインキュベートされる。

【０７０３】

ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）で実施されるとおりの表面プラズモン共鳴（ｓｕｒｆａｃｅ　ｐｌａｓｍｏｎ　ｒｅａｓｏｎａｎｃｅ）（ＳＰＲ）は、抗体抗原相互作用の親和性を計測する従来方法と比べて幾つもの利点を提供する：（ｉ）抗体又は抗原のいずれかを標識する必要がない；（ｉｉ）抗体を予め精製する必要がなく、細胞培養上清を直接使用することができる；（ｉｉｉ）種々のモノクローナル抗体相互作用の高速の半定量的比較を可能にするリアルタイム計測が可能となり、且つ多くの評価目的に十分である；（ｉｖ）生物学的特異表面を再生させることができ、そのため一連の異なるモノクローナル抗体を同一条件下で容易に比較することができる；（ｖ）分析手順が完全に自動化され、使用者の介入なしに広範な一連の計測を実施することができる。ＢＩＡａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ、バージョンＡＢ（再版１９９８）、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）コード番号ＢＲ－１００１－８６；ＢＩＡｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ、バージョンＡＢ（再版１９９８），ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）コード番号ＢＲ－１００１－８４。ＳＰＲベースの結合試験には、結合対の一方のメンバーをセンサ表面に固定化することが必要である。固定化される結合パートナーはリガンドと称される。溶液中の結合パートナーはアナライトと称される。場合によっては、リガンドは、固定化された別の分子（これは捕捉分子と称される）への結合を介して表面に間接的に取り付けられる。ＳＰＲ反応は、アナライトの結合又は解離に伴う検出面での質量濃度の変化を反映する。

【０７０４】

リアルタイムＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）計測は、ＳＰＲに基づき、相互作用の発生に伴いそれを直接モニタする。この技法は速度論的パラメータの決定に良く適している。比較親和性の順位付けは実施が簡単であり、センサーグラムデータから速度定数及び親和性定数の両方を求めることができる。

【０７０５】

アナライトをリガンド表面全体に離散パルスで注入したとき、得られるセンサーグラムは３つの本質的な相に分けることができる：（ｉ）試料注入中のアナライトとリガンドの会合；（ｉｉ）試料注入中の平衡又は定常状態、ここではアナライトの結合速度が複合体からの解離と釣り合っている；（ｉｉｉ）緩衝液流動中の表面からのアナライトの解離。

【０７０６】
会合相及び解離相は、アナライト－リガンド相互作用の反応速度（k_a及びk_d、複合体形成速度及び解離速度、$k_d/k_a=K_D$）に関する情報を提供する。平衡相が、アナライト－リガンド相互作用の親和性（K_D）に関する情報を提供する。
【０７０７】
ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアは、数値積分法及び大域的フィッティングアルゴリズムの両方を用いるカーブフィッティングの総合的機能を提供する。データの好適な分析によって、単純なＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）研究から相互作用の速度定数及び親和性定数を個別に得ることができる。この技術によって計測可能な親和性の範囲は、ｍＭからｐＭまで極めて幅広い。
【０７０８】
かかる方法の別の例には、例えばＫｉｎＥｘａ機器（Ｓａｐｉｄｙｎｅ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）を使用して実施し得る結合平衡除外アッセイを用いた平衡解離定数「K_D」の計測が含まれる。簡潔に言えば、様々な濃度の抗体をＩＬ－３３と平衡に達するまで予め混合することにより、抗ＩＬ３３抗体の溶相平衡解離定数K_Dを決定し得る。次にＫｉｎＥｘａを用いて、ＩＬ－３３被覆ビーズを使用して遊離抗体を捕捉し、非結合物質を洗浄して取り除き、及び蛍光標識された種特異抗体を使用して結合した抗体を検出することにより、遊離抗体の量を計測する。各ＩＬ－３３濃度で検出された遊離抗体の量をＩＬ－３３の濃度に対してプロットし、ＫｉｎＥｘａソフトウェアを使用して平衡解離定数（K_D）を計算する。
【０７０９】
提供される単離抗体又はその抗原結合断片、又はその改変／突然変異誘導体（以下で考察する）の結合特性の決定に好適な方法及び試薬は、当該技術分野において公知であり、及び／又は市販されている。かかる反応速度解析のための機器及びソフトウェア設計は市販されている（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ、ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ；ＫｉｎＥｘａソフトウェア、Ｓａｐｉｄｙｎｅ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）。
【０７１０】
エピトープ特異性は、モノクローナル抗体の重要な特徴である。ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）によるエピトープマッピングは、ラジオイムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ又は他の表面吸着方法を用いた従来技術とは対照的に、標識又は精製抗体が不要であり、幾つかのモノクローナル抗体の配列を使用した多重部位特異性試験を可能にする。加えて、多数の分析を自動で処理することができる。
【０７１１】
ペアワイズ結合実験は、２つのＭＡｂが同じ抗原に同時に結合する能力を試験する。別個のエピトープに対するＭＡｂは独立して結合し得る一方、同一又は近縁のエピトープに対するＭＡｂは互いの結合を妨げ得る。ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）によるこれらの結合実験は、実施が容易である。
【０７１２】
例えば、捕捉分子を使用して第１のＭａｂを結合させ、続いて抗原及び第２のＭＡｂを逐次的に加えることができる。センサーグラムからは、（１）どれだけの抗原が第１のＭａｂに結合するか、（２）第２のＭＡｂがどの程度表面付加抗原に結合するか、（３）第２のＭＡｂが結合しない場合、ペアワイズ試験の順序を逆にすると結果が変わるかどうかが明らかになり得る。
【０７１３】
ペプチド阻害は、エピトープマッピングに用いられる別の技法である。この方法は相補ペアワイズ抗体結合試験であってもよく、抗原の一次配列が既知のとき、機能性エピトープを構造的特徴と関係付けることができる。ペプチド又は抗原断片が、固定化された抗原への異なるＭＡｂの結合の阻害に関して試験される。所与のＭＡｂの結合を妨げるペプチドは、当該のＭＡｂによって定義されるエピトープと構造的に関係していると見なされる

。
【０７１４】
本開示の実施は、特に指示されない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えＤＮＡ、及び免疫学の従来技術を用いるものであり、これらは当該分野の技能の範囲内にある。かかる技術については、文献に十全に説明されている。
【０７１５】
本明細書に引用される参考文献は全て、全体として参照により本明細書に援用される。
【０７１６】
以下の例は、限定としてではなく、例示として提供される。
【図面の簡単な説明】
【０７１７】
【図１】未精製ｓｃＦｖペリプラズム調製物の存在下におけるヒトＩＬ３３－ＳＴ２結合のＨＴＲＦアッセイを示す。抗体ＩＬ３３００００４が入ったウェルを強調表示する。
【図２】ＩＬ３３－ＳＴ２　ＨＴＲＦアッセイにおける精製ｓｃＦｖ調製物によるヒト及びカニクイザルＩＬ３３の中和を示す。
【図３】ＩＬ３３－ＳＴ２　ＨＴＲＦアッセイにおける精製ＩｇＧ調製物によるヒト及びカニクイザルＩＬ３３の中和を示す。
【図４】ＮＦｋＢシグナル伝達アッセイにおける精製ＩｇＧ調製物によるヒトＩＬ３３の中和を示す。
【図５】ＣＡＴ－００２陰性対照（左側のパネル）と比較したＩＬ－３３抗体ＩＬ３３００４（右側のパネル）による免疫蛍光染色による気管支平滑筋細胞の内因性ＩＬ－３３の検出を示す。
【図６】ヒトＩＬ－３３、カニクイザルＩＬ－３３及びインスリンに対してスクリーニングした単一プレートからの結合データを示す。１つの特異的ヒト／カニクイザル交差反応性ＩＬ－３３結合剤がウェルＣ４に示され、ウェルＡ１２及びＢ１２には対照ＩＬ－３３結合クローンが含まれる。
【図７Ａ】ＴＦ－１増殖アッセイにおける抗体の中和活性を示す。
【図７Ｂ】ＨＵＶＥＣ　ＩＬ－６産生アッセイにおける抗体の中和活性を示す。
【図８】マスト細胞サイトカイン産生アッセイにおける抗体の中和活性を示す。
【図９】ウエスタンブロットによるＩＬ－３３抗体（ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、及びＩＬ３３０１４９）の完全長ヒトＩＬ－３３への結合を示す。
【図１０】完全長ＩＬ－３３細胞ライセートによって刺激したマスト細胞ＩＬ－６及びＩＬ－１３産生に対する抗ＩＬ－３３抗体ＩＬ３３００６５及びＩＬ３３０１０１の中和活性を示す。
【図１１Ａ】抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０の存在下におけるＨＴＲＦ（登録商標）受容体－リガンド競合アッセイを示す。
【図１１Ｂ】抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、及びＩＬ３３０１４９の存在下におけるＨｕｖｅｃ　ＮＦｋＢ（ｐ６５／ＲｅｌＡ）転座アッセイを示す。
【図１２Ａ】ビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するｍＡｂ　ＩＬ３３０１０１との精製ｓｃＦｖ調製物の競合結合を示す。
【図１２Ｂ】ビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するｍＡｂ　ＩＬ３３０１８０との精製ｓｃＦｖ調製物の競合結合を示す。
【図１３】ビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するｍＡｂ　ＩＬ３３０１０１との競合結合ＩＬ３３０２５９　ｓｃＦｖを示す。
【図１４Ａ】ビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するｍＡｂ　ＩＬ３３０１０１との競合結合ＩＬ３３０２５９　ＩｇＧを示す。

【図１４Ｂ】ビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するｍＡｂ　Ｈ３３８Ｌ２９３との競合結合抗体を示す。
【図１５】ＨＵＶＥＣ又はマスト細胞ＩＬ－６産生アッセイにおける抗体の中和活性を示す。
【図１６】マスト細胞ＩＬ－６産生アッセイにおけるＩＬ３３０３８８及びＨ３３８Ｌ２９３のシルド解析を示す。
【図１７】ＨＵＶＥＣシグナル伝達アッセイ（３０分）及びＩＬ－６産生アッセイ（１８～２４時間）で計測した、ヒトＩＬ－３３、システイン－ビオチン化ＩＬ－３３又は細胞培養培地で前処理したＩＬ－３３の活性を示す。
【図１８】イスコブ変法ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）による処理前又は処理後の、還元又は非還元条件下でのヒト、ビオチン化ヒト又はマウスＩＬ－３３のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。
【図１９】ＳＥＣによる細胞培養培地処理したヒトＩＬ－３３の精製を示す。
【図２０】ＬＣ－ＭＳによって決定されるＰＢＳ処理と比べた培地処理ＩＬ－３３のインタクトな質量を示す。ＩＭＤＭ処理したＩＬ－３３は、ＰＢＳ処理と比較して、２つのジスルフィド結合の形成に対応する４Ｄａの損失を示した。
【図２１】培地処理したヒトＩＬ－３３のジスルフィドマッピングを示す。データは２つのジスルフィド架橋の形成と一致した。
【図２２Ａ】ＮＭＲ分析用の高濃度ｒｅｄＩＬ－３３及びＤＳＢ　ＩＬ－３３のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。
【図２２Ｂ】ｒｅｄＩＬ－３３及びＤＳＢ　ＩＬ－３３に関する^{15}Ｎ標識ヒトＩＬ－３３の^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　ＨＭＱＣスペクトルのオーバーレイでＮＭＲ異核多重量子コヒーレンス（ＨＭＱＣ）分析を示す。
【図２２Ｃ】近紫外円偏光二色性（ＣＤ）スペクトル
【図２２Ｄ】解かれたＩＬ－３３構造の範囲内に指示されるＩＬ－３３の主要な特徴（Ｔｒｐ１９３、システイン、及びＳＴ２結合部位）を示す。
【図２２Ｅ】遠紫外円偏光二色性（ＣＤ）スペクトルを示す。
【図２３】ｒｅｄＩＬ－３３及びＤＳＢ　ＩＬ－３３の水素重水素交換分析を示す。重水素取り込みの差を既発表のＩＬ－３３構造上にマッピングする。
【図２４】ＳＴ２に対するｒｅｄＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３結合を示す。
【図２５】ｒｅｄＩＬ－３３型及びＤＳＢ　ＩＬ－３３型を検出するための３つの市販のＩＬ－３３　ＥＬＩＳＡアッセイの分析を示す。
【図２６】ｒｅｄＩＬ－３３の検出に特異的なＥＬＩＳＡアッセイを示す。
【図２７】細胞培養培地（ＩＭＤＭ）又はヒト血清中でインキュベートしたヒトＩＬ－３３の時間経過を示す。ｒｅｄＩＬ－３３型又はＤＳＢ　ＩＬ－３３型はＥＬＩＳＡ又はウエスタンブロットによって計測される。
【図２８】複数のＥＬＩＳＡアッセイの組み合わせを用いた、アルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）鼻腔内攻撃後の種々の時点で採取したヒト化ＩＬ－３３マウスからのＢＡＬＦの分析を示す。（Ａ）Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、（Ｂ）Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ及び（Ｃ）ＩＬ３３０４２５／ｓＳＴ２－ビオチンアッセイを用いてｓＳＴ２の存在下又は非存在下におけるＩＬ－３３を計測した（左側のグラフ）。ｓＳＴ２の存在下におけるシグナル（還元ＩＬ－３３部分が除かれたシグナル）をジスルフィド結合ＩＬ－３３標準と比較してジスルフィド結合ＩＬ－３３のレベルを定量化した。還元ＩＬ－３３シグナルは、還元ＩＬ－３３標準に対して定量化した、ＳＴ２の存在下と非存在下とにおけるＩＬ－３３計測間のシグナルの差として計算した。右側のグラフに還元ＩＬ－３３の推定を示す。
【図２９】アルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）鼻腔内攻撃後の種々の時点で採取した野生型ＢＡＬＢ／ｃマウスからのＢＡＬＦの分析を示す。マウスＩＬ－３３　ＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、ｓＳＴ２の存在下又は非存在下におけるＩＬ－３３を計測した（培地処理したマウスＩＬ－３３を標準曲線として使用した）。ｓＳＴ２の存在下におけるシグナル（還元ＩＬ－３３部分が除かれたシグナル）を培地処理し

たマウスＩＬ－３３標準と比較して、酸化ＩＬ－３３のレベルを定量化した。還元ＩＬ－３３シグナルは、還元マウスＩＬ－３３標準に対して定量化した、ＳＴ２の存在下と非存在下とにおけるＩＬ－３３計測間のシグナルの差として計算した。

【図３０Ａ】８×ＳＹＰＲＯオレンジ染料の存在下２５℃で５ｕＭ抗体を２０ｕＭ　ＩＬ３３と共にインキュベートした後１００分の時点における相対蛍光単位を示す。ＩＬ－３３　Ｈ３３８Ｌ２９３の存在下では、蛍光シグナルの増加がタンパク質のアンフォールディングを示しているが、ＩＬ３３０００４又は対照ｍＡｂの存在下ではそれがない。

【図３０Ｂ】８×ＳＹＰＲＯオレンジ染料の存在下２５℃で種々の濃度のＨ３３８Ｌ２９３を２０ｕＭ　ＩＬ３３と共にインキュベートした後の経時的な相対蛍光単位を示す。抗体濃度の増加に伴い蛍光シグナルが増加した。

【図３０Ｃ】ＩＬ－３３のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。ＩＬ－３３をＨ３３８Ｌ２９３とプレインキュベートすると、非還元条件下でより急速に移動するジスルフィド結合型のＩＬ－３３の存在が増加したが、対照ｍＡｂ又はｍＡｂ無しでは増加しなかった。

【図３１】ｍＡｂ　Ｈ３３８Ｌ２９３によるＨＵＶＥＣのＩＬ－３３刺激ＮＦｋＢシグナル伝達の中和の時間経過を示す。

【図３２】ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、直接競合条件下又はＩＬ－３３とのプレインキュベーション後の漸増濃度のＨ３３８Ｌ２９３による阻害を示す。

【図３３】Ｈ３３８Ｌ２９３のエピトープマッピングを示す。上側のパネルは、トリプシンによる消化前及び消化後のＨ３３８Ｌ２９３とのＩＬ３３：ＩｇＧ複合体のＳＥＣ分析を示す。下側のパネルは、Ｌｉｎｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ　２００９によって記載されるＩＬ－３３構造内で黒色に色付けした、Ｈ３３８Ｌ２９３に強く結合すると決定されたトランケートペプチドを示す。

【図３４】ＩＭＤＭ細胞培養培地で１８時間処理する前及び処理した後の野生型ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１）及びＩＬ－３３のシステインからセリンへの突然変異体のＮＦｋＢシグナル伝達活性を示す。

【図３５】ＩＬ３３－１１はインビトロ及びインビボでＩＬ３３－０１（ＷＴ）と比べて効力がより高いことを示す。

【図３６】それぞれ黒色及び赤色でプロットした０．１ｍＭ ^{15}Ｎ標識ＩＬ３３－０１及びＩＬ３３－１１についての^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　ＨＭＱＣスペクトルのオーバーレイを示す。関連性のある残基の割り当てを示す。データは予想どおりＣ２０８及びＣ２５９前後にピークシフトを示す。しかしながら、Ｔ１８５～Ａ１９６から予想されるよりも多くのピークシフトがあり、これはコンホメーション変化を示している可能性がある。

【図３７】ＩＬ３３－ＳＴ２　ＨＴＲＦ結合アッセイにおける３３ｖ２００６４　ｓｃＦｖのＩＬ－３３中和活性の時間経過を示す。

【図３８】ＩＬ３３－ＳＴ２　ＨＴＲＦ結合アッセイにおける３３ｖ２００６４　ＩｇＧのＩＬ－３３中和活性の時間経過を示す。

【図３９】野生型又は突然変異体ＩＬ－３３によって刺激したＨＵＶＥＣのＩＬ－６産生の抗体中和を示す。

【図４０】ビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の試験タンパク質による阻害を示す。このシグナルの阻害は、試験タンパク質に対する３３ｖ２００６４の相対結合親和性に対応する。

【図４１】親３３ｖ２００６４　ｓｃＦｖと比較した生殖細胞系列変異体３３＿６４０００１のＩＬ３３－ＳＴ２　ＨＴＲＦ結合アッセイにおけるＩＬ－３３中和活性の時間経過を示す。

【図４２】トランケートＩＬ－３３（１１２～２７０）又は完全長ＩＬ－３３（１～２７０）によって刺激したＨＵＶＥＣのＩＬ－８産生の抗体中和を示す。

【図４３】ＩＬ－３３結合タンパク質がｒｅｄＩＬ－３３からＤＳＢ　ＩＬ－３３への変換に及ぼす効果を示す。

【図４４】ビオチン化ヒト又はカニクイザルＩＬ－３３が３３＿６４０１１７　ｍＡｂに結合することによって生成される種々の時点におけるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の試験タンパク質による阻害を示す。このシグナルの阻害は、試験タンパク質に対する３３ｖ２００６４の相対結合親和性に対応する。
【図４５】トランケートＩＬ－３３（１１２～２７０）又は完全長ＩＬ－３３（１～２７０）によって刺激したＨＵＶＥＣのＩＬ－８産生の抗体中和を示す。
【図４６】Ｈ３３８Ｌ２９３が、野生型ＢＡＬＢ／ｃマウスにおけるアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）（ＡＬＴ）誘発性ＢＡＬ　ＩＬ－５及び好酸球増加を用量依存的に阻害することを示す。２５ｕｇのＡＬＴによる攻撃前－２時間の時点で試験物質を鼻腔内投与した（括弧内に示すとおり１０、３０又は１００ｍｇ／ｋｇ）。ＡＬＴ攻撃後２４時間でＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５（図４６Ａ）及び好酸球（図４６Ｂ）の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、～～ｐ＜０．０１　対照ｍＡｂとの比較（ｎ＝４～８）。マウスＩＬ－３３　Ｔｒａｐを陽性対照として使用した。
【図４７】Ｈ３３８Ｌ２９３（３０ｍｇ／ｋｇ）及びマウスＩＬ－３３　Ｔｒａｐ（１０ｍｇ／ｋｇ）はヒト化ＩＬ－３３マウスのＡＬＴ誘発性ＢＡＬ　ＩＬ－５を阻害するが、ＩＬ３３００００４（３０ｍｇ／ｋｇ）は阻害しないことを示す。２５ｕｇのＡＬＴによる攻撃前－２時間の時点で試験物質を鼻腔内投与した。ＡＬＴ攻撃後２４時間でＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊ｐ＜０．０１（ｎ＝４）。
【図４８】３３＿６４００５０がヒト化ＩＬ－３３マウスのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）誘発性ＢＡＬ　ＩＬ－５を用量依存的に阻害することを示す。２５ｕｇのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）による攻撃前－２４時間の時点で試験物質を腹腔内投与した（括弧内に示すとおり０．３、３又は３０ｍｇ／ｋｇ）。ＡＬＴ攻撃後２４時間でＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊ｐ＜０．０１（ｎ＝４～５）。
【図４９Ａ】ＩＬ３３－ＳＴ２　ＦＲＥＴ結合アッセイにおける抗体の効果を示す。
【図４９Ｂ】ＨｕｖｅｃからのＩＬ－３３刺激によるＩＬ－８放出に対する抗体の効果を示す。
【図５０】（Ａ）ＩＬ３３／３３＿６４００８７－７Ｂ又は（Ｂ）３３＿６４０２３７－２Ｂをベースとするアッセイを用いた様々な種又は他のＩＬ－１ファミリーメンバー由来のＩＬ－３３に対するｍＡｂ特異性を示す。
【図５１】ヒト肺ライセートによって刺激したＨｕｖｅｃからのＩＬ－８放出に対する抗体の効果を示す。
【図５２】３３＿６４００８７－７Ｂがヒト化ＩＬ－３３マウスのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）誘発性ＢＡＬ　ＩＬ－５を用量依存的に阻害することを示す。
【図５３Ａ】ＳＴ２と独立した活性ＩＬ－３３の潜在的能力を調べるパイロットインビボ研究の実験計画。
【図５３Ｂ】ＢＡＬＢ／ｃマウスにヒトＩＬ－３３を反復投与した後のＢＡＬ液中におけるヒトＩＬ－３３曝露の分析。
【図５３Ｃ】ヒトＩＬ－３３（１０ｕｇ）の単回腹腔内投与後の血漿中におけるＩＬ－３３曝露の分析。
【図５３Ｄ】ＢＡＬＢ／ｃマウスにヒトＩＬ－３３を反復投与した後の血漿中におけるＩＬ－３３曝露の分析。
【図５４】（Ａ）ＰＢＳ又は（Ｂ）ＩＬ－３３を６週間にわたって鼻腔内投与したマウス由来の肺組織の代表的なＨ＆Ｅ染色パラフィン切片を示す。
【図５５】還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３に応答したＨｕｖｅｃにおける（Ａ）ｐ－ｐ３８ＭＡＰＫ又は（Ｂ）ｐ－ＳＴＡＴ５核転座活性を示す。

【図５５Ｃ】還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３で１５分間刺激したＨｕｖｅｃにおけるｐ－ｐ３８ＭＡＰＫ、ｐ－ＪＡＫ２及びｐ－ＳＴＡＴ５のウエスタンブロット分析。
【図５６Ａ】ＥＬＩＳＡによる還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３に対するＲＡＧＥ－Ｆｃの結合を示す。
【図５６Ｂ】ＤＳＢ　ＩＬ－３３に対するＨｕｖｅｃ　ｐＳＴＡＴ５応答のＲＡＧＥ－Ｆｃ又は抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂによる阻害を示す。
【図５６Ｃ】ＤＳＢ　ＩＬ－３３に対するＨｕｖｅｃ　ｐＳＴＡＴ５応答の抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂによる阻害を示す。
【図５７】ＨｕｖｅｃにおけるｐＳＴＡＴ５応答に対する抗ＩＬ－３３と抗ＳＴ２の効果を示す。
【図５８】抗ＩＬ－３３、抗ＳＴ２又は抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂが（Ａ）還元ＩＬ－３３（Ｂ）ＤＳＢ　ＩＬ－３３に対してＡ５４９細胞遊走のＩＬ－３３誘発阻害に及ぼす効果について示す。
【発明を実施するための形態】
【０７１８】

【表２】

配列の概要

配列番号	参照番号/抗体名	説明
1	IL330002	VH DNA
2	IL330002	VH PRT
3	IL330002	VH CDR1 PRT
4	IL330002	VH CDR2 PRT
5	IL330002	VH CDR3 PRT
6	IL330002	VL DNA
7	IL330002	VL PRT
8	IL330002	VL CDR1 PRT
9	IL330002	VL CDR2 PRT
10	IL330002	VL CDR3 PRT
11	IL330004	VH DNA
12	IL330004	VH PRT
13	IL330004	VH CDR1 PRT
14	IL330004	VH CDR2 PRT
15	IL330004	VH CDR3 PRT
16	IL330004	VL DNA
17	IL330004	VL PRT
18	IL330004	VL CDR1 PRT
19	IL330004	VL CDR2 PRT
20	IL330004	VL CDR3 PRT
21	IL330020	VH DNA
22	IL330020	VH PRT
23	IL330020	VH CDR1 PRT
24	IL330020	VH CDR2 PRT
25	IL330020	VH CDR3 PRT
26	IL330020	VL DNA
27	IL330020	VL PRT
28	IL330020	VL CDR1 PRT
29	IL330020	VL CDR2 PRT
30	IL330020	VL CDR3 PRT
31	IL330071	VH DNA
32	IL330071	VH PRT
33	IL330071	VH CDR1 PRT
34	IL330071	VH CDR2 PRT
35	IL330071	VH CDR3 PRT
36	IL330071	VL DNA
37	IL330071	VL PRT
38	IL330071	VL CDR1 PRT
39	IL330071	VL CDR2 PRT
40	IL330071	VL CDR3 PRT
41	IL330125	VH DNA

【０７１９】

【表３】

42	IL330125	VH PRT
43	IL330125	VH CDR1 PRT
44	IL330125	VH CDR2 PRT
45	IL330125	VH CDR3 PRT
46	IL330125	VL DNA
47	IL330125	VL PRT
48	IL330125	VL CDR1 PRT
49	IL330125	VL CDR2 PRT
50	IL330125	VL CDR3 PRT
51	IL330126	VH DNA
52	IL330126	VH PRT
53	IL330126	VH CDR1 PRT
54	IL330126	VH CDR2 PRT
55	IL330126	VH CDR3 PRT
56	IL330126	VL DNA
57	IL330126	VL PRT
58	IL330126	VL CDR1 PRT
59	IL330126	VL CDR2 PRT
60	IL330126	VL CDR3 PRT
61	IL330425	VH DNA
62	IL330425	VH PRT
63	IL330425	VH CDR1 PRT
64	IL330425	VH CDR2 PRT
65	IL330425	VH CDR3 PRT
66	IL330425	VL DNA
67	IL330425	VL PRT
68	IL330425	VL CDR1 PRT
69	IL330425	VL CDR2 PRT
70	IL330425	VL CDR3 PRT
71	IL330428	VH DNA
72	IL330428	VH PRT
73	IL330428	VH CDR1 PRT
74	IL330428	VH CDR2 PRT
75	IL330428	VH CDR3 PRT
76	IL330428	VL DNA
77	IL330428	VL PRT
78	IL330428	VL CDR1 PRT
79	IL330428	VL CDR2 PRT
80	IL330428	VL CDR3 PRT
81	IL330065	VH DNA
82	IL330065	VH PRT
83	IL330065	VH CDR1 PRT
84	IL330065	VH CDR2 PRT

【０７２０】

【表４】

85	IL330065	VH CDR3 PRT
86	IL330065	VL DNA
87	IL330065	VL PRT
88	IL330065	VL CDR1 PRT
89	IL330065	VL CDR2 PRT
90	IL330065	VL CDR3 PRT
91	IL330099	VH DNA
92	IL330099	VH PRT
93	IL330099	VH CDR1 PRT
94	IL330099	VH CDR2 PRT
95	IL330099	VH CDR3 PRT
96	IL330099	VL DNA
97	IL330099	VL PRT
98	IL330099	VL CDR1 PRT
99	IL330099	VL CDR2 PRT
100	IL330099	VL CDR3 PRT
101	IL330101	VH DNA
102	IL330101	VH PRT
103	IL330101	VH CDR1 PRT
104	IL330101	VH CDR2 PRT
105	IL330101	VH CDR3 PRT
106	IL330101	VL DNA
107	IL330101	VL PRT
108	IL330101	VL CDR1 PRT
109	IL330101	VL CDR2 PRT
110	IL330101	VL CDR3 PRT
111	IL330101_fgl	VH DNA
112	IL330101_fgl	VH PRT
113	IL330101_fgl	VH CDR1 PRT
114	IL330101_fgl	VH CDR2 PRT
115	IL330101_fgl	VH CDR3 PRT
116	IL330101_fgl	VL DNA
117	IL330101_fgl	VL PRT
118	IL330101_fgl	VL CDR1 PRT
119	IL330101_fgl	VL CDR2 PRT
120	IL330101_fgl	VL CDR3 PRT
121	IL330107	VH DNA
122	IL330107	VH PRT
123	IL330107	VH CDR1 PRT
124	IL330107	VH CDR2 PRT
125	IL330107	VH CDR3 PRT
126	IL330107	VL DNA
127	IL330107	VL PRT

【０７２１】

【表５】

128	IL330107	VL CDR1 PRT
129	IL330107	VL CDR2 PRT
130	IL330107	VL CDR3 PRT
131	IL330149	VH DNA
132	IL330149	VH PRT
133	IL330149	VH CDR1 PRT
134	IL330149	VH CDR2 PRT
135	IL330149	VH CDR3 PRT
136	IL330149	VL DNA
137	IL330149	VL PRT
138	IL330149	VL CDR1 PRT
139	IL330149	VL CDR2 PRT
140	IL330149	VL CDR3 PRT
141	IL330180	VH DNA
142	IL330180	VH PRT
143	IL330180	VH CDR1 PRT
144	IL330180	VH CDR2 PRT
145	IL330180	VH CDR3 PRT
146	IL330180	VL DNA
147	IL330180	VL PRT
148	IL330180	VL CDR1 PRT
149	IL330180	VL CDR2 PRT
150	IL330180	VL CDR3 PRT
151	IL330259	VH DNA
152	IL330259	VH PRT
153	IL330259	VH CDR1 PRT
154	IL330259	VH CDR2 PRT
155	IL330259	VH CDR3 PRT
156	IL330259	VL DNA
157	IL330259	VL PRT
158	IL330259	VL CDR1 PRT
159	IL330259	VL CDR2 PRT
160	IL330259	VL CDR3 PRT
161	IL330259_fgl	VH DNA
162	IL330259_fgl	VH PRT
163	IL330259_fgl	VH CDR1 PRT
164	IL330259_fgl	VH CDR2 PRT
165	IL330259_fgl	VH CDR3 PRT
166	IL330259_fgl	VL DNA
167	IL330259_fgl	VL PRT
168	IL330259_fgl	VL CDR1 PRT
169	IL330259_fgl	VL CDR2 PRT
170	IL330259_fgl	VL CDR3 PRT

【０７２２】

【表６】

171	H338L293	VH DNA
172	H338L293	VH PRT
173	H338L293	VH CDR1 PRT
174	H338L293	VH CDR2 PRT
175	H338L293	VH CDR3 PRT
176	H338L293	VL DNA
177	H338L293	VL PRT
178	H338L293	VL CDR1 PRT
179	H338L293	VL CDR2 PRT
180	H338L293	VL CDR3 PRT
181	H338L293_fgl	VH DNA
182	H338L293_fgl	VH PRT
183	H338L293_fgl	VH CDR1 PRT
184	H338L293_fgl	VH CDR2 PRT
185	H338L293_fgl	VH CDR3 PRT
186	H338L293_fgl	VL DNA
187	H338L293_fgl	VL PRT
188	H338L293_fgl	VL CDR1 PRT
189	H338L293_fgl	VL CDR2 PRT
190	H338L293_fgl	VL CDR3 PRT
191	IL330377	VH DNA
192	IL330377	VH PRT
193	IL330377	VH CDR1 PRT
194	IL330377	VH CDR2 PRT
195	IL330377	VH CDR3 PRT
196	IL330377	VL DNA
197	IL330377	VL PRT
198	IL330377	VL CDR1 PRT
199	IL330377	VL CDR2 PRT
200	IL330377	VL CDR3 PRT
201	IL330377_fgl	VH DNA
202	IL330377_fgl	VH PRT
203	IL330377_fgl	VH CDR1 PRT
204	IL330377_fgl	VH CDR2 PRT
205	IL330377_fgl	VH CDR3 PRT
206	IL330377_fgl	VL DNA
207	IL330377_fgl	VL PRT
208	IL330377_fgl	VL CDR1 PRT
209	IL330377_fgl	VL CDR2 PRT
210	IL330377_fgl	VL CDR3 PRT
211	IL330388	VH DNA
212	IL330388	VH PRT
213	IL330388	VH CDR1 PRT

【０７２３】

【表７】

214	IL330388	VH CDR2 PRT
215	IL330388	VH CDR3 PRT
216	IL330388	VL DNA
217	IL330388	VL PRT
218	IL330388	VL CDR1 PRT
219	IL330388	VL CDR2 PRT
220	IL330388	VL CDR3 PRT
221	IL330388_fgl	VH DNA
222	IL330388_fgl	VH PRT
223	IL330388_fgl	VH CDR1 PRT
224	IL330388_fgl	VH CDR2 PRT
225	IL330388_fgl	VH CDR3 PRT
226	IL330388_fgl	VL DNA
227	IL330388_fgl	VL PRT
228	IL330388_fgl	VL CDR1 PRT
229	IL330388_fgl	VL CDR2 PRT
230	IL330388_fgl	VL CDR3 PRT
231	IL330396	VH DNA
232	IL330396	VH PRT
233	IL330396	VH CDR1 PRT
234	IL330396	VH CDR2 PRT
235	IL330396	VH CDR3 PRT
236	IL330396	VL DNA
237	IL330396	VL PRT
238	IL330396	VL CDR1 PRT
239	IL330396	VL CDR2 PRT
240	IL330396	VL CDR3 PRT
241	IL330396_fgl	VH DNA
242	IL330396_fgl	VH PRT
243	IL330396_fgl	VH CDR1 PRT
244	IL330396_fgl	VH CDR2 PRT
245	IL330396_fgl	VH CDR3 PRT
246	IL330396_fgl	VL DNA
247	IL330396_fgl	VL PRT
248	IL330396_fgl	VL CDR1 PRT
249	IL330396_fgl	VL CDR2 PRT
250	IL330396_fgl	VL CDR3 PRT
251	IL330398	VH DNA
252	IL330398	VH PRT
253	IL330398	VH CDR1 PRT
254	IL330398	VH CDR2 PRT
255	IL330398	VH CDR3 PRT
256	IL330398	VL DNA

【０７２４】

【表８】

257	IL330398	VL PRT
258	IL330398	VL CDR1 PRT
259	IL330398	VL CDR2 PRT
260	IL330398	VL CDR3 PRT
261	IL330398_fgl	VH DNA
262	IL330398_fgl	VH PRT
263	IL330398_fgl	VH CDR1 PRT
264	IL330398_fgl	VH CDR2 PRT
265	IL330398_fgl	VH CDR3 PRT
266	IL330398_fgl	VL DNA
267	IL330398_fgl	VL PRT
268	IL330398_fgl	VL CDR1 PRT
269	IL330398_fgl	VL CDR2 PRT
270	IL330398_fgl	VL CDR3 PRT
271	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH DNA
272	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH PRT
273	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH CDR1 PRT
274	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH CDR2 PRT
275	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VH CDR3 PRT
276	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL DNA
277	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL PRT
278	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL CDR1 PRT
279	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL CDR2 PRT
280	ZZ1EBX-E05 (33v20064)	VL CDR3 PRT
281	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH DNA
282	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH PRT
283	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH CDR1 PRT
284	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH CDR2 PRT
285	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VH CDR3 PRT
286	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL DNA
287	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL PRT
288	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL CDR1 PRT
289	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL CDR2 PRT
290	ZZ1I6V-H02 (33_640001)	VL CDR3 PRT
291	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH DNA
292	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH PRT
293	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH CDR1 PRT
294	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH CDR2 PRT
295	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VH CDR3 PRT
296	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL DNA
297	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL PRT
298	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL CDR1 PRT
299	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL CDR2 PRT

【０７２５】

【表９】

300	ZZ1JRB-A03 (33_640027)	VL CDR3 PRT
301	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH DNA
302	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH PRT
303	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH CDR1 PRT
304	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH CDR2 PRT
305	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VH CDR3 PRT
306	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL DNA
307	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL PRT
308	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL CDR1 PRT
309	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL CDR2 PRT
310	ZZ1F7Q-D10 (33_640050)	VL CDR3 PRT
311	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH DNA
312	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH PRT
313	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH CDR1 PRT
314	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH CDR2 PRT
315	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VH CDR3 PRT
316	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL DNA
317	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL PRT
318	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL CDR1 PRT
319	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL CDR2 PRT
320	ZZ1F7P-E01 (33_640047)	VL CDR3 PRT
321	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH DNA
322	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH PRT
323	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH CDR1 PRT
324	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH CDR2 PRT
325	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VH CDR3 PRT
326	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL DNA
327	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL PRT
328	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL CDR1 PRT
329	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL CDR2 PRT
330	ZZ1IV4-H06 (33_640166)	VL CDR3 PRT
331	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH DNA
332	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH PRT
333	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH CDR1 PRT
334	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH CDR2 PRT
335	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VH CDR3 PRT
336	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL DNA
337	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL PRT
338	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL CDR1 PRT
339	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL CDR2 PRT
340	ZZ1IV4-G09 (33_640169)	VL CDR3 PRT
341	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH DNA
342	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH PRT

【０７２６】

【表１０】

343	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH CDR1 PRT
344	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH CDR2 PRT
345	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VH CDR3 PRT
346	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL DNA
347	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL PRT
348	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL CDR1 PRT
349	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL CDR2 PRT
350	ZZ1K7Q-B11 (33_640170)	VL CDR3 PRT
351	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH DNA
352	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH PRT
353	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH CDR1 PRT
354	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH CDR2 PRT
355	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VH CDR3 PRT
356	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL DNA
357	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL PRT
358	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL CDR1 PRT
359	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL CDR2 PRT
360	ZZ1KAD-C04 (33_640036)	VL CDR3 PRT
361	33_640117	VH DNA
362	33_640117	VH PRT
363	33_640117	VH CDR1 PRT
364	33_640117	VH CDR2 PRT
365	33_640117	VH CDR3 PRT
366	33_640117	VL DNA
367	33_640117	VL PRT
368	33_640117	VL CDR1 PRT
369	33_640117	VL CDR2 PRT
370	33_640117	VL CDR3 PRT
371	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH DNA
372	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH PRT
373	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH CDR1 PRT
374	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH CDR2 PRT
375	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VH CDR3 PRT
376	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL DNA
377	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL PRT
378	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL CDR1 PRT
379	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL CDR2 PRT
380	ZZ1JLT-F06 (33_640076)	VL CDR3 PRT
381	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH DNA
382	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH PRT
383	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH CDR1 PRT
384	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH CDR2 PRT
385	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VH CDR3 PRT

【０７２７】

【表１１】

386	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL DNA
387	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL PRT
388	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL CDR1 PRT
389	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL CDR2 PRT
390	ZZ1JMB-H05 (33_640081)	VL CDR3 PRT
391	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH DNA
392	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH PRT
393	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH CDR1 PRT
394	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH CDR2 PRT
395	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VH CDR3 PRT
396	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL DNA
397	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL PRT
398	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL CDR1 PRT
399	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL CDR2 PRT
400	ZZ1JMA-B04 (33_640082)	VL CDR3 PRT
401	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH DNA
402	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH PRT
403	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH CDR1 PRT
404	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH CDR2 PRT
405	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VH CDR3 PRT
406	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL DNA
407	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL PRT
408	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL CDR1 PRT
409	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL CDR2 PRT
410	ZZ1JLR-D06 (33_640084)	VL CDR3 PRT
411	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH DNA
412	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH PRT
413	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH CDR1 PRT
414	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH CDR2 PRT
415	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VH CDR3 PRT
416	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL DNA
417	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL PRT
418	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL CDR1 PRT
419	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL CDR2 PRT
420	ZZ1JMC-H09 (33_640086)	VL CDR3 PRT
421	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH DNA
422	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH PRT
423	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH CDR1 PRT
424	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH CDR2 PRT
425	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VH CDR3 PRT
426	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL DNA
427	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL PRT
428	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL CDR1 PRT

【０７２８】

【表１２】

429	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL CDR2 PRT
430	ZZ1JMF-G02 (33_640087)	VL CDR3 PRT
431	33_640076_1	VH DNA
432	33_640076_1	VH PRT
433	33_640076_1	VH CDR1 PRT
434	33_640076_1	VH CDR2 PRT
435	33_640076_1	VH CDR3 PRT
436	33_640076_1	VL DNA
437	33_640076_1	VL PRT
438	33_640076_1	VL CDR1 PRT
439	33_640076_1	VL CDR2 PRT
440	33_640076_1	VL CDR3 PRT
441	33_640081_A	VH DNA
442	33_640081_A	VH PRT
443	33_640081_A	VH CDR1 PRT
444	33_640081_A	VH CDR2 PRT
445	33_640081_A	VH CDR3 PRT
446	33_640081_A	VL DNA
447	33_640081_A	VL PRT
448	33_640081_A	VL CDR1 PRT
449	33_640081_A	VL CDR2 PRT
450	33_640081_A	VL CDR3 PRT
451	33_640082_2	VH DNA
452	33_640082_2	VH PRT
453	33_640082_2	VH CDR1 PRT
454	33_640082_2	VH CDR2 PRT
455	33_640082_2	VH CDR3 PRT
456	33_640082_2	VL DNA
457	33_640082_2	VL PRT
458	33_640082_2	VL CDR1 PRT
459	33_640082_2	VL CDR2 PRT
460	33_640082_2	VL CDR3 PRT
461	33_640084_2	VH DNA
462	33_640084_2	VH PRT
463	33_640084_2	VH CDR1 PRT
464	33_640084_2	VH CDR2 PRT
465	33_640084_2	VH CDR3 PRT
466	33_640084_2	VL DNA
467	33_640084_2	VL PRT
468	33_640084_2	VL CDR1 PRT
469	33_640084_2	VL CDR2 PRT
470	33_640084_2	VL CDR3 PRT
471	33_640086_2	VH DNA

【０７２９】

【表１３】

472	33_640086_2	VH PRT
473	33_640086_2	VH CDR1 PRT
474	33_640086_2	VH CDR2 PRT
475	33_640086_2	VH CDR3 PRT
476	33_640086_2	VL DNA
477	33_640086_2	VL PRT
478	33_640086_2	VL CDR1 PRT
479	33_640086_2	VL CDR2 PRT
480	33_640086_2	VL CDR3 PRT
481	33_640087_2	VH DNA
482	33_640087_2	VH PRT
483	33_640087_2	VH CDR1 PRT
484	33_640087_2	VH CDR2 PRT
485	33_640087_2	VH CDR3 PRT
486	33_640087_2	VL DNA
487	33_640087_2	VL PRT
488	33_640087_2	VL CDR1 PRT
489	33_640087_2	VL CDR2 PRT
490	33_640087_2	VL CDR3 PRT
491	33_640076_4	VH DNA
492	33_640076_4	VH PRT
493	33_640076_4	VH CDR1 PRT
494	33_640076_4	VH CDR2 PRT
495	33_640076_4	VH CDR3 PRT
496	33_640076_4	VL DNA
497	33_640076_4	VL PRT
498	33_640076_4	VL CDR1 PRT
499	33_640076_4	VL CDR2 PRT
500	33_640076_4	VL CDR3 PRT
501	33_640082_4	VH DNA
502	33_640082_4	VH PRT
503	33_640082_4	VH CDR1 PRT
504	33_640082_4	VH CDR2 PRT
505	33_640082_4	VH CDR3 PRT
506	33_640082_4	VL DNA
507	33_640082_4	VL PRT
508	33_640082_4	VL CDR1 PRT
509	33_640082_4	VL CDR2 PRT
510	33_640082_4	VL CDR3 PRT
511	33_640082_6	VH DNA
512	33_640082_6	VH PRT
513	33_640082_6	VH CDR1 PRT
514	33_640082_6	VH CDR2 PRT

【０７３０】

【表１４】

515	33_640082_6	VH CDR3 PRT
516	33_640082_6	VL DNA
517	33_640082_6	VL PRT
518	33_640082_6	VL CDR1 PRT
519	33_640082_6	VL CDR2 PRT
520	33_640082_6	VL CDR3 PRT
521	33_640082_7	VH DNA
522	33_640082_7	VH PRT
523	33_640082_7	VH CDR1 PRT
524	33_640082_7	VH CDR2 PRT
525	33_640082_7	VH CDR3 PRT
526	33_640082_7	VL DNA
527	33_640082_7	VL PRT
528	33_640082_7	VL CDR1 PRT
529	33_640082_7	VL CDR2 PRT
530	33_640082_7	VL CDR3 PRT
531	33_640086_6	VH DNA
532	33_640086_6	VH PRT
533	33_640086_6	VH CDR1 PRT
534	33_640086_6	VH CDR2 PRT
535	33_640086_6	VH CDR3 PRT
536	33_640086_6	VL DNA
537	33_640086_6	VL PRT
538	33_640086_6	VL CDR1 PRT
539	33_640086_6	VL CDR2 PRT
540	33_640086_6	VL CDR3 PRT
541	33_640087_7	VH DNA
542	33_640087_7	VH PRT
543	33_640087_7	VH CDR1 PRT
544	33_640087_7	VH CDR2 PRT
545	33_640087_7	VH CDR3 PRT
546	33_640087_7	VL DNA
547	33_640087_7	VL PRT
548	33_640087_7	VL CDR1 PRT
549	33_640087_7	VL CDR2 PRT
550	33_640087_7	VL CDR3 PRT
551	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH DNA
552	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH PRT
553	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH CDR1 PRT
554	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH CDR2 PRT
555	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VH CDR3 PRT
556	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL DNA
557	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL PRT

【０７３１】

【表１５】

558	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL CDR1 PRT
559	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL CDR2 PRT
560	ZZ1JMY-H09 (33_640201)	VL CDR3 PRT
561	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH DNA
562	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH PRT
563	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH CDR1 PRT
564	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH CDR2 PRT
565	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VH CDR3 PRT
566	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL DNA
567	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL PRT
568	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL CDR1 PRT
569	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL CDR2 PRT
570	ZZ1M37-E06 (33_640237)	VL CDR3 PRT
571	33_640201_2	VH DNA
572	33_640201_2	VH PRT
573	33_640201_2	VH CDR1 PRT
574	33_640201_2	VH CDR2 PRT
575	33_640201_2	VH CDR3 PRT
576	33_640201_2	VL DNA
577	33_640201_2	VL PRT
578	33_640201_2	VL CDR1 PRT
579	33_640201_2	VL CDR2 PRT
580	33_640201_2	VL CDR3 PRT
581	33_640237_2	VH DNA
582	33_640237_2	VH PRT
583	33_640237_2	VH CDR1 PRT
584	33_640237_2	VH CDR2 PRT
585	33_640237_2	VH CDR3 PRT
586	33_640237_2	VL DNA
587	33_640237_2	VL PRT
588	33_640237_2	VL CDR1 PRT
589	33_640237_2	VL CDR2 PRT
590	33_640237_2	VL CDR3 PRT
591	33_640076_4B	VH DNA
592	33_640076_4B	VH PRT
593	33_640076_4B	VL DNA
594	33_640076_4B	VL PRT
595	33_640081_AB	VH DNA
596	33_640081_AB	VH PRT
597	33_640081_AB	VL DNA
598	33_640081_AB	VL PRT
599	33_640082_6B	VH DNA
600	33_640082_6B	VH PRT

【０７３２】

【表１６】

601	33_640082_6B	VL DNA
602	33_640082_6B	VL PRT
603	33_640082_7B	VH DNA
604	33_640082_7B	VH PRT
605	33_640082_7B	VL DNA
606	33_640082_7B	VL PRT
607	33_640084_2B	VH DNA
608	33_640084_2B	VH PRT
609	33_640084_2B	VL DNA
610	33_640084_2B	VL PRT
611	33_640086_6B	VH DNA
612	33_640086_6B	VH PRT
613	33_640086_6B	VL DNA
614	33_640086_6B	VL PRT
615	33_640087_7B	VH DNA
616	33_640087_7B	VH PRT
617	33_640087_7B	VL DNA
618	33_640087_7B	VL PRT
619	33_640201_2B	VH DNA
620	33_640201_2B	VH PRT
621	33_640201_2B	VL DNA
622	33_640201_2B	VL PRT
623	33_640237_2B	VH DNA
624	33_640237_2B	VH PRT
625	33_640237_2B	VL DNA
626	33_640237_2B	VL PRT
627	成熟ヒトIL-33_FH	a.a. 112-270 PRT
628	成熟マウスIL-33_FH	a.a. 109-266 PRT
629	成熟カニクイザルIL-33	a.a. 112-270 PRT
630	ヒトST2 ECD-Fc/his6	a.a. 1-328 PRT
631	マウスST2 ECD-Fc/His6	a.a. 1-332 PRT
632	IL33-01	a.a. 112-270 PRT
633	ヒト6His TEV成熟IL-33 WT	a.a. 112-270 PRT
634	IL33-02	a.a. 112-270 PRT
635	IL33-03	a.a. 112-270 PRT
636	IL33-04	a.a. 112-270 PRT
637	IL33-05	a.a. 112-270 PRT
638	IL33-06	a.a. 112-270 PRT
639	IL33-07	a.a. 112-270 PRT
640	IL33-08	a.a. 112-270 PRT
641	IL33-09	a.a. 112-270 PRT
642	IL33-10	a.a. 112-270 PRT

【０７３３】

【表１７】

643	IL33-11	a.a. 112-270 PRT
644	IL33-12	a.a. 112-270 PRT
645	IL33-13	a.a. 112-270 PRT
646	IL33-14	a.a. 112-270 PRT
647	IL33-15	a.a. 112-270 PRT
648	IL33-16	a.a. 112-270 PRT
649	**カニクイザル**10His Avitag IL-33	a.a. 112-270 PRT
650	**ヒト**ST2 ECD-Flag-his10	a.a. 1-328 PRT

【実施例】

【０７３４】

実施例１　ＩＬ－３３に対する抗体の単離

ヒト、マウス及びカニクイザル由来の成熟ＩＬ－３３のクローニング、発現及び精製

ＩＬ－１ＲＡｃＰ及びＳＴ２のタンパク質配列をＳｗｉｓｓ　Ｐｒｏｔから入手した。抗ＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体の単離及び同定　ＩＬ－３３の成熟成分をコードするｃＤＮＡ分子をプライマー伸長ＰＣＲによって合成し、ｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４０４（ＤＮＡ２．０）にクローニングした。ヒト及びマウスＩＬ－３３のデータベース配列情報に対応する受託番号を表２に示す。カニクイザル（Ｃｙｎｏｍｏｌｏｇｕｓ　ｍｏｎｋｅｙ）配列は利用可能でなかったため、カニクイザルとアカゲザルとの間の高度な相同性に基づき、アカゲザルの配列（受託番号ＥＮＳＭＭＵＴ００００００３００４３）を使用してカニクイザルにおけるＩＬ－３３遺伝子のコード配列の増幅能を有するプライマーを設計した。アカゲザル遺伝子配列をヒトＩＬ－３３　ｃＤＮＡ配列（受託番号ＮＭ＿０３３４３９）とアラインメントし、これにより、アカゲザル配列が誤ってアセンブルされ、エクソン１を欠いていることが示された。ヒトエクソン１を使用してアカゲザルゲノム配列に対するＢＬＡＳＴ検索を実施し、エクソン１にマッチするアカゲザル配列を同定した。エクソン１を増幅するため追加のプライマーを設計した。

【０７３５】

成熟ＩＬ－３３コード配列は、タンパク質のＣ末端にＦＬＡＧ（登録商標）１０ｘｈｉｓエピトープタグ（ＤＹＫＤＤＤＤＫＡＡＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨ；配列番号６２７）を含むように修飾した。成熟Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ヒト、カニクイザル及びマウスＩＬ－３３に対応する配列番号を表２に示す。

【０７３６】

【表１８】

表 2. ヒト、マウス及びカニクイザル成熟 IL-33 配列

種	**アミノ酸**	**受託番号(Swiss-Prot)**	**Flag®His タグ付加 IL-33 配列**
ヒト	112-270	O95760	**配列番号 627**
マウス	109-266	Q8BVZ5	**配列番号 628**
カニクイザル	112-270	**利用不可**	**配列番号 629**

【０７３７】

ベクターをＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテント細胞（Ｍｅｒｃｋ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、６９４５０）に形質転換し、１ｍＭ　ＩＰＴＧで発現を誘導した。回収した細胞をＢｕｇｂｕｓｔｅｒ（Ｍｅｒｃｋ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、７０５８４）で溶解させて、発現したタンパク質をＮｉ－ＮＴＡアフィニティークロマトグラフィー（Ｈｉｓｔｒａｐ　ＨＰカラム：ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、１７－５２４８－０２）、続いてサイズ排

除クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５カラム：ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、１７－１０６８－０１）を使用して精製した。

【０７３８】

タンパク質修飾

ＥＺ　ｌｉｎｋ　スルホ－ＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｔｈｅｒｍｏ／Ｐｉｅｒｃｅ、２１３３５）を使用して、本明細書で使用されるＩｇＧ及び修飾受容体タンパク質を遊離アミンを介してビオチン化した。このビオチン試薬を無水ジメチルホルムアミドに溶解し、ＰＢＳベースのタンパク質溶液をＤ－ＰＢＳ（ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水）中１Ｍ$NaHCO_3$でｐＨ約８に調整した。本明細書で使用されるＩＬ－３３タンパク質は、ＥＺ　ｌｉｎｋ　ビオチン－ＢＭＣＣ（Ｐｅｒｂｉｏ／Ｐｉｅｒｃｅ、製品番号２１９００）を使用して遊離システインを介してビオチン化した。ビオチン試薬を無水ジメチルホルムアミドに溶解し、ＰＢＳタンパク質溶液に混合した。いずれの場合にも、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法によって標識の取り込みを評価し、未反応の試薬は、ＰＢＳで平衡化した使い捨てＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５カラムを使用した緩衝液交換によって取り除いた。ビオチン化について、最終的なタンパク質濃度は、アミノ酸配列から計算した吸光係数を用いて２８０ｎｍ吸光度によって決定した。

【０７３９】

選択

成人未感作ドナー由来のヒトＢ細胞から単離され、且つ繊維状ファージＭ１３をベースとするファージミドベクターにクローニングされた可変（Ｖ）遺伝子に基づく大規模単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）ヒト抗体ライブラリを選択に使用した（Ｈｕｔｃｈｉｎｇｓ，Ｃ．，“Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｎａｉｖｅ　Ｈｕｍａｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ”ｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｕｂｅｌ．Ｂｅｒｌｉｎ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌｓ：ｐ．９３（２００１）；Ｌｌｏｙｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２２（３）：１５９－６８（２００９））。ＩＬ－３３特異的ｓｃＦｖ抗体は、本質的にＶａｕｇｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１４（３）：３０９－１４（１９９６））に記載されるとおり、組換えヒト及び／又はマウスＩＬ－３３に対する一連の反復選択サイクルでファージディスプレイライブラリから単離した。本明細書で使用されるＩＬ－３３試薬のリストを表３に示す。

【０７４０】

【表１９】

表 3: ELISA 結合アッセイ試薬

試薬	供給業者	カタログ番号/記号	ELISA アッセイ
ヒト IL-33	Axxora / Adipogen	AG-40B-0038	ファージ / IgG
ヒト IL-33	Axxora / Alexis	ALX-522-098	ファージ
ヒト IL-33 Flag®His	インハウス	PS-295	ファージ / IgG
ヒト IL-33	Peprotech	200-33	ファージ
マウス IL-33	Peprotech	210-33	ファージ
マウス IL-33	Axxora / Alexis	ALX-522-101	ファージ
マウス IL-33 Flag®His	インハウス	PS-296	ファージ / IgG
カニクイザル IL-33 Flag®His	インハウス	PS-368	ファージ / IgG
IL-4Rα Flag®His	インハウス	020629080	ファージ / IgG
ウシインスリン - ビオチン	Sigma	I2258	ファージ / IgG

【０７４１】

端的には、ｓｃＦｖ－ファージ粒子を溶液中のビオチン化組換えＩＬ－３３（ＥＺ　ｌｉｎｋ　ビオチン－ＢＭＣＣ（Ｐｅｒｂｉｏ／Ｐｉｅｒｃｅ、製品番号２１９００）を使用して、遊離システインを介してビオチン化した）と共にインキュベートした。粒子を１００ｎＭビオチン化組換えＩＬ－３３と共に2時間インキュベートした。次に抗原に結合したｓｃＦｖを製造者の推奨に従いストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）、Ｍ－２８０）に捕捉した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎを使用した一連の洗浄サイクルで未結合のファージを洗い流した。抗原上に保持されたファージ粒子を溶出し、細菌に感染させて、次の選択ラウンド用にレスキューした。典型的には2回又は3回の選択ラウンドをこのように実施した。

【０７４２】

ファージＥＬＩＳＡによるＩＬ－３３特異的結合剤の同定

上記に記載した2回又は3回の選択ラウンド後の選択アウトプットからの代表的な複数の個別クローンを９６ウェルプレートで成長させた。単鎖Ｆｖ断片をファージ粒子上に提示させて結合アッセイで試験することにより、組換えヒト、マウス及びカニクイザルＩＬ－３３抗原のパネルに対する交差反応性及び特異性を決定した。ファージ提示ｓｃＦｖ上清試料を９６ウェルディープウェルプレートに以下のとおり作成した。９６ウェルマスタープレートの各ウェルからの５μｌの培養物を、５００μｌの２ＴＹＡＧ（２ＴＹ＋１００μｇ／ｍｌアンピシリン＋２％グルコース）培地が入ったＧｒｅｉｎｅｒディープウェル培養プレートに移し、３７℃、２８０ｒｐｍで5時間インキュベートした。次にＫ０７Ｍ１３ヘルパーファージ（２ＴＹＡＧ中１．５×１０^{11}ｐｆｕ／ｍｌに希釈）を１００μｌ／ウェルで加え、プレートを３７℃、１５０ｒｐｍでインキュベートして感染させた。プレートを３２００ｒｐｍで１０分間スピンダウンして上清を取り除いた。細菌ペレットを５００μｌ／ウェルの２ＴＹＡＫ（２ＴＹ＋１００μｇ／ｍｌアンピシリン＋５０μｇ／ｍｌカナマイシン）に再懸濁し、プレートを２５℃、２８０ｒｐｍで一晩インキュベートした。午前中に各ウェルに５００μｌの２×ＰＢＳ中６％（ｗ／ｖ）脱脂粉乳を加え、プレートを室温で1時間インキュベートした。次にプレートを３２００ｒｐｍで１０分間遠心し、このブロックしたファージ提示ｓｃＦｖ上清をＥＬＩＳＡ実験に直接使用した。

【０７４３】

ＥＣ５０を決定するため、典型的には精製ＩｇＧをＰＢＳ（ＰＢＳ－Ｍ）中３％（ｗ／ｖ）粉乳に3倍希釈して１１濃度ポイントとした。希釈物調製には９６ウェルＧｒｅｉｎｅｒポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）を使用した。概して、各希釈物をデュプリケートで調製した。ＩｇＧ希釈物は、ＰＢＳ－Ｍ中に室温で1時間ブロックさせておいた後、ＥＬＩＳＡ実験に直接使用した。

【０７４４】

ＩＬ－３３結合アッセイは、本質的に以下のとおり実施したプレートベースのＥＬＩＳＡであった。上記の表3は、これらの実験に使用した抗原を示す。あらゆる実験について全ての抗原を使用したわけではないが、いずれの場合にも、ヒト、マウス、及びカニクイザルＩＬ－３３抗原を試験した。関連する対照抗原（適切な場合には、ウシインスリン＋ＩＬ－４Ｒα　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ）もまた使用して、非特異的結合に関して試験した。ウシインスリンを除く全ての抗原をビオチン化し（上記のサブセクション１．１を参照）、全て細菌発現を用いて作成した。対照抗原として用いたＩＬ－４Ｒα　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓの作成方法は、国際公開第２０１０／０７０３４６号パンフレットに記載されている。

【０７４５】

ストレプトアビジンプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＡＢ－１２２６）をＰＢＳ中０．５μｇ／ｍｌのビオチン化抗原でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。プレートをＰＢＳで3回洗浄し、３００μｌ／ウェルのブロッキング緩衝液（ＰＢＳ－Ｍ）で1時間ブロックした。プレートをＰＢＳで1回洗浄し、ブロックした試料を５０μｌ／ウェルで室温で1時間加えた。プレートをＰＢＳ－Ｔ（ＰＢＳ＋１％（ｖ

／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０）で３回洗浄し、１：５０００希釈の検出試薬［抗ヒトＩｇＧＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ、Ａ０１７０）又は抗Ｍ１３－ＨＲＰ抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ、２７－９４２１－０１）、それぞれＩｇＧ又はファージ提示ｓｃＦｖの検出用］をＰＢＳ－Ｍ中５０μｌ／ウェルで室温で１時間加えた。プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄し、ＴＭＢ、５０μｌ／ウェル（Ｓｉｇｍａ、Ｔ０４４０）で発色させた。反応を５０μｌ／ウェルの０．１Ｍ H_2SO_4でクエンチした後、ＥｎＶｉｓｉｏｎ（商標）プレートリーダー、又は同様の機器において４５０ｎｍで読み取った。

【０７４６】

ＩｇＧ力価決定のため、Ｐｒｉｓｍ（Ｇｒａｐｈｐａｄ）カーブフィッティングソフトウェアを使用して用量反応曲線をプロットした。ファージ提示ｓｃＦｖは、吸光度４５０ｎｍが＞０．５、及び対照（インスリン及びＩＬ－４Ｒα　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓ）上の同じ試料について＜０．２であった場合に、ＩＬ－３３抗原に結合すると見なした。

【０７４７】

ヒト及びマウス由来のＳＴ２　ＥＣＤのクローニング、発現及び精製

ヒト及びマウス由来のＳＴ２の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）をコードするｃＤＮＡ分子をプライマー伸長ＰＣＲクローニングによって合成し、ｐＤＯＮＲ２２１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２５３６－０１７）にクローニングした。ヒト及びマウスＳＴ２のデータベース配列を使用した（表４を参照）。製造者の指示に従いＬＲ　Ｇａｔｅｗａｙ　Ｃｌｏｎａｓｅ　ＩＩ酵素を使用して、ｐＤＯＮＲ２２１中のＳＴ２　ＥＣＤ　ｃＤＮＡクローンを哺乳類発現ベクターｐＤＥＳＴ１２．２に移した。ｐＤＥＳＴ１２．２ベクターは、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃコード領域、ポリヒスチジン（Ｈｉｓ６）タグを目的の挿入遺伝子とインフレームで含むように修飾され、また、ｐＣＥＰ４ベクター由来のｏｒｉＰ複製起点の挿入によっても修飾されていたため、ＥＢＮＡ－１遺伝子産物を発現する細胞株（ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞など）へのトランスフェクト時にエピソームプラスミド複製が可能であった。

【０７４８】

【表２０】

表 4. ヒト及びマウス ST2 細胞外ドメインのアミノ酸及び受託番号

種	アミノ酸	受託番号 (Swiss-Prot)	EDC-Fc-His6 配列
ヒト	1-328	Q01638	配列番号 630
マウス	1-332	P14719	配列番号 631

【０７４９】

ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ上清中の発現したタンパク質ＳＴ２．Ｆｃを、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（ＨｉＴｒａｐプロテインＡカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、１７－０４０２－０１））と、続いてサイズ排除クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、１７－１０６９－０１））を使用して精製した。

【０７５０】

未精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

上記に記載した２回又は３回の選択ラウンド後の選択アウトプットからの代表的な複数の個別クローンを９６ウェルプレートで成長させた。ｓｃＦｖを細菌ペリプラズムで発現させて（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２００（１－２）：６９－７７（１９９７））、均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）ベースのＩＬ－３３：ＳＴ２結合アッセイでそれらの阻害活性に関してスクリーニング

した。このアッセイでは、ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３への結合に関して試料がヒト又はマウスＳＴ２．Ｆｃと競合した。

【０７５１】

ＨＴＲＦ（登録商標）アッセイは、近接しているドナーフルオロフォアとアクセプターフルオロフォアとの間の蛍光共鳴エネルギー転移を利用する均一系アッセイ技術である（Ｍａｔｈｉｓ，ｅｔ　ａｌ．．Ｃｌｉｎ　Ｃｈｅｍ　４１（９）：１３９１－７（１９９５））。このアッセイを用いて、目的の分子の一方をドナーフルオロフォアのユウロピウム（Ｅｕ３＋）クリプテートに直接又は間接的にカップリングし、且つ他方の目的の分子をアクセプターフルオロフォアＸＬ６６５（安定架橋アロフィコシアニン）にカップリングすることにより、巨大分子相互作用を計測した。クリプテート分子の励起（３３７ｎｍ）により、６２０ｎｍの蛍光発光が生じた。この発光からのエネルギーがクリプテートに近接したＸＬ６６５に移動して、ＸＬ６６５からの特定の長寿命蛍光の発光（６６５ｎｍ）が生じた。ドナー（６２０ｎｍ）及びアクセプター（６６５ｎｍ）の両方の特異的シグナルを計測することにより、アッセイ中の有色化合物の存在を補償する６６５／６２０ｎｍ比を計算することが可能であった。

【０７５２】

抗体試験試料の各希釈物１０マイクロリットルを３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７６）に加えることにより、ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＩＬ－３３のＳＴ２－Ｆｃ結合の阻害に関して未精製抗ＩＬ－３３　ｓｃＦｖ試料を試験した。次に、２ｎＭヒト又はマウスＳＴ２－Ｆｃ及び３ｎＭ抗ヒトＦｃクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＨＦＣＫＬＢ）を含有する溶液を調製し、この混合物の５マイクロリットルをアッセイプレートに加えた。これに続いて、２０ｎＭ抗ＦＬＡＧ（登録商標）ＸＬ６６５検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＦＧ２ＸＬＢ）と組み合わせた１．２ｎＭ　ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３を含有する５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＢＤＨ　１０３４４４Ｔ）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ　Ａ９５７６）を含有するアッセイ緩衝液中で実施した。アッセイプレートを室温で１時間、続いて４℃で１６時間インキュベートした後、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。

【０７５３】

各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することによりデータを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した：

【数１】

$$665/620\ \text{nm比} = \left(\frac{665\ nmシグナル}{620\ nmシグナル}\right) \text{X } 10{,}000$$

次に、各試料の％デルタＦを式２を用いて計算した：

【数２】

$$デルタF(\%) = \left(\frac{試料665/620\ nm比 - 陰性対照665/620\ nm比}{陰性対照665/620\ nm比}\right) X \quad 100$$

【０７５４】

陰性対照（非特異的結合）は、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ　Ａ９５７６）を含有するダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）を含む希釈緩衝液中に調製した１５０ｎＭ非タグ付加ヒト又はマウスＩＬ－３３（Ａｘｘｏ

ｒａ、ヒトＡＬＸ５２２－０９８、マウスＡＬＸ－５２２－１０１）によって試験試料を置き換えることにより定義した。

【０７５５】

続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した：

【数３】

$$\%\text{特異的結合} = \left(\frac{(\text{試料デルタF\%} - \text{NSBデルタF\%})}{(\text{全結合デルタF\%} - \text{NSBデルタF\%})} \right) \times 100$$

【０７５６】

ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して、４パラメータロジスティック方程式（式４）を用いたカーブフィッティングによりＩＣ$_{50}$値を決定した。

式４：

Ｙ＝ボトム＋（トップ－ボトム）／（１＋１０＾（（ＬｏｇＥＣ５０－Ｘ）＊ＨｉｌｌＳｌｏｐｅ））

Ｘは濃度の対数である。

Ｙは特異的結合である。

Ｙはシグモイド形でボトムから始まりトップに至る。

【０７５７】

図１は、ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、シングルポイントスクリーニングにおける未精製ｓｃＦｖペリプラズム抽出物による阻害を示す。ペリプラズム抽出物の最終濃度は５０％ｖ／ｖであった。ウェルＢ０４（未精製ＩＬ３３０００４　ｓｃＦｖ）が例示的な「ヒット」を示し、列１２は、指示されるとおりの対照ウェルを含む。

【０７５８】

精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

未精製ペリプラズム抽出物としてＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用に阻害効果を示したか、又は上記のファージ結合実験によって望ましい種交差反応性及び特異性プロファイルを実証した単鎖ＦｖクローンをＤＮＡシーケンシングにかけた（Ｏｓｂｏｕｒｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２（３）：１８１－９６（１９９６）；Ｖａｕｇｈａｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４（３）：３０９－１４（１９９６））。ユニークなｓｃＦｖを再び細菌で発現させて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した（国際公開第０１／６６７５４号パンフレットに記載されるとおり）。上記に記載したとおりＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３への結合に関して精製調製物の希釈系列をヒト又はマウスＳＴ２．Ｆｃと競合させることにより、これらの試料の効力を決定した。陰性対照よりも高度なＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用阻害能を有した精製ｓｃＦｖ調製物をＩｇＧフォーマットへの変換に選択した（例えば、ｓｃＦｖ抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０及びＩＬ３３００７１。

【０７５９】

図２Ａ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０及びＩＬ３３００７１による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０７６０】

図２Ｂ：カニクイザルＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０及びＩＬ３３００７１による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０７６１】

ＩＬ３３０００４のパートナー抗体の同定

ファージＥＬＩＳＡによってヒトＩＬ－３３結合陽性を示したクローンのｓｃＦｖペリプラズム抽出物をＯｃｔｅｔアッセイ（Ｏｃｔｅｔ　ＲＥＤ　３８４システム）によってスクリーニングして、ＩＬ３３０００４と同時にＩＬ－３３に結合した抗体を同定した。ニートなペリプレップ試料をニッケルＮＴＡバイオセンサーに捕捉し、ＩＬ－３３（２００ｎＭ）、続いてＩＬ３３０００４（２００ｎＭ）の逐次的結合を実施した。使用を最小限に抑えるためバイオセンサーを再生させた。センサーはグリシン（１０ｍＭ、ｐＨ１．７）で再生させ、緩衝液（ＰＢＳ＋１ｍｇ／ｍｌ（０．１％）ＢＳＡ＋０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０）で中和し、ＮｉＳ０４（１０ｍＭ）を再負荷してバイオセンサー表面上にニッケルを補充する。ＩＬ３３０４２５及びＩＬ３３０４２８が同定され、これらを全免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）抗体フォーマットに変換した。

【０７６２】

ｓｃＦｖからＩｇＧ１への再フォーマット化

ＩＬ－３３：ＳＴ２結合アッセイからの望ましい特性を有する単鎖Ｆｖクローンと、加えて結合実験による望ましい特異性を有するファージ提示ｓｃＦｖのパネルを、本質的にＰｅｒｓｉｃ　ｅｔ　ａｌ．（Ｇｅｎｅ　１８７（１）：９－１８（１９９７））によって記載されるとおり、但し以下の修正を加えて、全免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）抗体フォーマットに変換した。ＣＨＯ一過性細胞での使用を容易にし、且つエピソーム複製を可能にするため、発現ベクターにＯｒｉＰ断片を含めた。ヒト重鎖定常ドメイン及び調節エレメントを含有するベクター（ｐＥＵ１．３）に可変重鎖（ＶＨ）ドメインをクローニングして、哺乳類細胞で全ＩｇＧ１重鎖を発現させた。同様に、ヒト軽鎖（ラムダ）定常ドメイン及び調節エレメントの発現用ベクター（ｐＥＵ４．４）に可変軽鎖（ＶＬ）ドメインをクローニングして、哺乳類細胞で全ＩｇＧ軽鎖を発現させた。ＩｇＧを得るため、これらの重鎖及び軽鎖ＩｇＧ発現ベクターをＣＨＯ一過性哺乳類細胞にトランスフェクトした（Ｄａｒａｍｏｌａ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｐｒｏｇ　３０（１）：１３２－４１（２０１４））。ＩｇＧを発現させて、培地中に分泌させた。回収物をろ過した後精製し、次にプロテインＡクロマトグラフィーを用いてＩｇＧを精製した。培養上清を適切なサイズのＣｅｒａｍｉｃ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ（ＢｉｏＳｅｐｒａ）のカラムにロードし、５０ｍＭトリス－ＨＣｌ　ｐＨ８．０、２５０ｍＭ　ＮａＣｌで洗浄した。０．１Ｍクエン酸ナトリウム（ｐＨ３．０）を使用して結合したＩｇＧをカラムから溶出させて、トリス－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）を加えることにより中和した。溶出した材料をＮａｐ１０カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ、＃１７－０８５４－０２）を使用してＰＢＳに緩衝液交換し、ＩｇＧのアミノ酸配列に基づく吸光係数を用いてＩｇＧ濃度を分光光度的に決定した（Ｍａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００（１）：７４－８０（１９９２））。精製ＩｇＧの凝集及び分解純度に関して、ＳＥＣ－ＨＰＬＣを用いて、及びＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析した。抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０、ＩＬ３３００７１、ＩＬ３３０１２５、及びＩＬ３３０１２６の種々の領域に対応する配列番号を表５に示す。

【０７６３】

【表２１】

表 5. 抗 IL-33 抗体配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
IL330002	配列番号 2	配列番号 7	配列番号 3 配列番号 4 配列番号 5	配列番号 8 配列番号 9 配列番号 10
IL330004	配列番号 12	配列番号 17	配列番号 13 配列番号 14 配列番号 15	配列番号 18 配列番号 19 配列番号 20
IL330020	配列番号 22	配列番号 27	配列番号 23 配列番号 24 配列番号 25	配列番号 28 配列番号 29 配列番号 30
IL330071	配列番号 32	配列番号 37	配列番号 33 配列番号 34 配列番号 35	配列番号 38 配列番号 39 配列番号 40
IL330125	配列番号 42	配列番号 47	配列番号 43 配列番号 44 配列番号 45	配列番号 48 配列番号 49 配列番号 50
IL330126	配列番号 52	配列番号 57	配列番号 53 配列番号 54 配列番号 55	配列番号 58 配列番号 59 配列番号 60
IL330425	配列番号 62	配列番号 67	配列番号 63 配列番号 64 配列番号 65	配列番号 68 配列番号 69 配列番号 70
IL330428	配列番号 72	配列番号 77	配列番号 73 配列番号 74 配列番号 75	配列番号 78 配列番号 79 配列番号 80

【０７６４】

精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

抗ＩＬ－３３抗体がＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＩＬ－３３のＳＴ２受容体への結合を阻害する能力を、上記に原理を記載した生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。

【０７６５】

ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３への結合に関して精製ＩｇＧの希釈系列をビオチン化ヒト又はマウスＳＴ２．Ｆｃと競合させることにより、精製ＩｇＧ調製物の活性を決定した。

【０７６６】

抗体試験試料の各希釈物１０マイクロリットルを３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ　３６７６）に加えることにより、ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＩＬ－３３結合ＳＴ２－Ｆｃの阻害に関して精製又は未精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。次に、４ｎＭビオチン化ヒト又はマウスＳＴ２－Ｆｃ及び２０ｎＭストレプトアビジンＸＬ６６５検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１１ＳＡＸＬＢ）を含有する溶液を調製し、この混合物の５マイクロリットルをアッセイプレートに加えた。これに続いて、１．７２ｎＭ抗ＦＬＡＧ（登録商標）クリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＦＧ２ＫＬＢ）と組み合わせた１．２ｎＭ　ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３を含有する５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、０．８Ｍフッ化カリウム（ＢＤＨ　１０３４４４Ｔ）及び０．１％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ　Ａ９５７６）を含有するダルベッコＰ

ＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）を含むアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で２時間、続いて４℃で１６時間インキュベートした後、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。

【０７６７】

上記に記載したとおり式１～３を用いてデータを分析した。

【０７６８】

陰性対照（非特異的結合）は、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ　Ａ９５７６）を含有するダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）で構成される希釈緩衝液中に調製した１００ｎＭ非ビオチン化ＳＴ２によって試験試料を置き換えることにより定義した。

【０７６９】

精製ＩｇＧ抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０、ＩＬ３３００７１、ＩＬ３３０１２５、及びＩＬ３３０１２６の代表的な効力（IC_{50}）を表６に示す。

【０７７０】

【表２２】

表 6: IL-33 FLAG®-His/ST2-Fc 競合アッセイにおける IC_{50} 結果

IgG	ヒト IL-33 FLAG® + ヒト ST2-Fc	カニクイザル IL-33 FLAG® + ヒト ST2-Fc
IL330002	27nM	42nM
IL330004	9nM	170nM
IL330020	40nM	阻害なし
IL330071	59nM	375nM
IL330125	210nM	阻害なし
IL330126	226nM	阻害なし

【０７７１】

全ての精製ＩｇＧ調製物（即ち、ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０、ＩＬ３３００７１、ＩＬ３３０１２５、及びＩＬ３３０１２６）がヒトＩＬ－３３：ヒトＳＴ２相互作用を阻害することが示された。図３Ａ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ＩｇＧ１抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０、ＩＬ３３００７１、ＩＬ３３０１２５及びＩＬ３３０１２６による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０７７２】

ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、及びＩＬ３３００７１　ＩｇＧ調製物もまた、カニクイザルＩＬ－３３：ヒトＳＴ２相互作用を阻害することが示された。図３Ｂ：カニクイザルＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ＩｇＧ１抗体ＩＬ３３０００２、ＩＬ３３０００４、ＩＬ３３００２０及びＩＬ３３００７１、ＩＬ３３０１２５及びＩＬ３３０１２６による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓ＋マウスＳＴ２－Ｆｃ競合アッセイでは、上記の試験した抗体のいずれによっても阻害は検出されなかった。

【０７７３】

ＩｇＧによるＨｅｌａ－ＳＴ２レポーター細胞のＮＦκＢシグナル伝達の阻害

レポーターアッセイを用いることにより、ＳＴ２及びＮＦκＢ反応性ルシフェラーゼレポーターコンストラクトをコトランスフェクトしたＨｅｌａ細胞を使用して、抗ＩＬ－３３抗体ＩＬ３３００００２、ＩＬ３３００００４、ＩＬ３３００００２０、ＩＬ３３００００７１、ＩＬ３３０１２５、及びＩＬ３３０１２６によるＩＬ－３３誘導性ＮＦκＢシグナル伝達の阻害を評価した。試験抗体の存在下又は非存在下で細胞をＩＬ－３３に曝露し、続いて生じたルシフェラーゼの活性を計測することにより、ＮＦκＢシグナル伝達を検出した。ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを含有するＨｅｌａ細胞はＰａｎｏｍｉｃｓから供給された。ヒトＳＴ２配列をＳｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓのレンチウイルスベクターにクローニングした。Ａｄ２９３細胞（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）でレンチウイルス粒子を作成し、Ｈｅｌａ－ルシフェラーゼレポーター細胞の形質導入に使用した。

【０７７４】

レポーターアッセイでは、ＳＴ２受容体をＩＬ－３３で刺激するとＮＦκＢシグナル伝達経路が活性化し、ＮＦκＢプロモーターを介して酵素ルシフェラーゼの発現が惹起された。細胞の溶解後、ルシフェラーゼ基質を加えると、これがルシフェラーゼの存在下で化学反応を起こして発光産物を生じた。細胞ライセートから検出される光量をＥｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して定量化し、ＩＬ－３３媒介ＮＦκＢシグナル伝達の直接的な尺度として使用した。

【０７７５】

Ｈｅｌａトランスフェクト細胞はハイグロマイシンＢを含有する培地に維持して安定な受容体発現を維持した。試験抗体の存在下又は非存在下で細胞をＩＬ－３３に曝露し、続いて生じたルシフェラーゼの活性を計測することによりＮＦκＢシグナル伝達を検出した。

【０７７６】

３８４ウェル黒色壁ポリ－Ｄ－リジンコートプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、７８１９４６）中の１０％ｖ／ｖウシ胎仔血清（熱失活）及び１００マイクログラム／ｍＬハイグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１０６８７－０１０）を含有するＤＭＥＭ培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、４１９６６）にトランスフェクトＨｅｌａ細胞を1×10^{4}細胞／ウェル（ウェル当たり５０マイクロリットル）で播種した。プレートを３７℃、５％CO_2で１８～２４時間インキュベートし、次にウェルから細胞培地を穏やかに吸引した後、試験試料を加えた。

【０７７７】

１０％ｖ／ｖ　ＦＢＳ（熱失活）及び１００マイクログラム／ｍＬハイグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０６８７－０１０）を含有するＤＭＥＭ培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　４１９６６）中に希釈することにより、試料の段階希釈物を調製した。１５マイクロリットルの試験試料をデュプリケートで細胞に加えた。１０％ｖ／ｖ　ＦＢＳ（熱失活）及び１００マイクログラム／ｍＬハイグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１０６８７－０１０）を含有するＤＭＥＭ培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、４１９６６）中にＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓを０．６ｎＭに希釈し、１５マイクロリットルを細胞及び試験試料に加えた。この濃度は、ＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓに対するレポーター細胞応答のEC_{50}値に相当した（幾何平均０．３２ｎＭ、９５％信頼区間０．２５～０．４０ｎＭ、ｎ＝５）。バックグラウンド応答は、１０％ｖ／ｖ　ＦＢＳ（熱失活）及び１００マイクログラム／ｍＬハイグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０６８７－０１０）を含有するＤＭＥＭ培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、４１９６６）３０マイクロリットルを加えることによって定義した。プレートを３７℃、５％CO_2で４時間及び室温で１時間インキュベートした。

【０７７８】

ＮＦκＢシグナル伝達に応答したルシフェラーゼの生成を計測するため、ルシフェラーゼ基質（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｅ２６２０）と組み合わせた３０マイクロリットルのＢｒｉｇｈｔ　Ｇｌｏ（登録商標）溶解緩衝液をプレートに加え、室温で５分間インキュベートした。ルシフェラーゼによって基質が酸化した結果として生じた発光はＥｎＶｉｓｉｏｎプ

レートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して読み取る。

【０７７９】

続いて、相対発光単位（ＲＬＵ）値を使用して、式５に記載されるとおり％特異的応答を計算した：

【数４】

$$\%\text{特異的応答} = \left(\frac{(\text{試料RLU} - \text{バックグラウンドRLU})}{(\text{総RLU} - \text{バックグラウンドRLU})} \right) \times 100$$

【０７８０】

ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して、４パラメータロジスティック方程式（式４）を用いたカーブフィッティングによりＩＣ$_{50}$値を決定した。

【０７８１】

抗体ＩＬ３３００００２、ＩＬ３３００００４、ＩＬ３３００１２０、ＩＬ３３００１７１、ＩＬ３３０１２５、及びＩＬ３３０１２６の精製ＩｇＧ調製物は、ＮＦκＢ駆動ルシフェラーゼ活性を阻害することが示された（代表的な効力（ＩＣ５０）を表７に示す）。

【０７８２】

【表２３】

表 7: ヒト ST2 トランスフェクト HeLa NFkB レポーターアッセイの IC_{50} 結果

IgG	ヒト IL-33 FLAG®-His
IL330002	226nM
IL330004	23nM
IL330020	147nM
IL330125	332nM
IL330126	245nM
IL330071	226nM

【０７８３】

図４Ａは、ルシフェラーゼＮＦκＢレポーターアッセイにおける陰性対照ＩｇＧと比較したＩＬ－３３抗体ＩＬ３３００００２、ＩＬ３３００００４、ＩＬ３３００１２０、ＩＬ３３００１７１、ＩＬ３３０１２５、及びＩＬ３３０１２６によるＮＦκＢ活性の阻害を示す。

【０７８４】

ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＮＦκＢシグナル伝達の阻害

ＩＬ－３３に応答したヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｈｕｖｅｃ）におけるＮＦκＢシグナル伝達を、免疫蛍光染色によって検出されるｐ６５／ＲｅｌＡ　ＮＦｋＢサブユニットの核転座によって評価した。イメージング及び核染色強度の定量化はＡｒｒａｙＳｃａｎ　ＶＴｉ　ＨＣＳリーダー（Ｃｅｌｌｏｍｉｃｓ）で実施した。

【０７８５】

ＨｕｖｅｃをＣａｍｂｒｅｘから入手し、推奨プロトコルに従い完全ＥＢＭ－２培地（Ｌｏｎｚａ）に維持した。Ｈｕｖｅｃをアキュターゼ（ＰＡＡ、＃Ｌ１１－００７）でフラスコから回収し、９６ウェル黒色壁透明平底コラーゲンＩコートプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に培養培地［ＥＧＭ－２　ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ　Ｋｉｔ　Ｓｕｐｐｌ．＆　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒｓ（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－４１７６）含有ＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－３１５６）］中１×１０^{4}／１００μｌ／ウェルで播種し、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で１８～２４時間インキュベートした。その後、培地を吸引し、細胞単層はインタクトなまま、以下で調製するとおりのアッセイ試験試料に交換した。

【０７８６】
精製ＩｇＧの試験試料（デュプリケート）を９６ウェルＵ字底ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）中の完全培養培地に所望の濃度に希釈した。ＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ）を、１２０μｌ／ウェルの総容積中１ｎｇ／ｍＬの最終ＩＬ－３３濃度となるように適切な試験抗体と混合した完全培養培地中に調製した。全ての試料を３７℃で３０分間インキュベートした後、１００μｌのＩＬ－３３／抗体混合物をアッセイプレートに移した。３７℃で３０分間インキュベートした後、培地を吸引し、細胞単層はインタクトなまま、３７℃に予め加温した３．７％ホルムアルデヒド溶液で細胞を１５分間固定した。固定液を吸引し、細胞を１００μＬ／ウェルのＰＢＳで２回洗浄した。

【０７８７】
Ｃｅｌｌｏｍｉｃｓ ＮＦκＢアッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、＃８４００４９２）を製造者の指示に従い使用して、細胞をＮＦκＢに関して染色した。簡潔に言えば、細胞を室温で１５分間透過処理し、１５分間ブロックし、５０μＬの容積の一次抗体溶液で１時間染色した。プレートをブロッキング緩衝液で２回洗浄し、Ｈｏｅｃｈｓｔ核染色剤並びに二次抗体を含む二次抗体溶液によって室温で１時間染色した。プレートをＰＢＳで２回洗浄した。細胞を１５０μＬ／ウェルＰＢＳの最終容積で保存し、黒色遮光性シール（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、＃６００５１８９）で被覆した後、ＡｒｒａｙＳｃａｎ ＶＴｉ ＨＣＳリーダーで読み取った。好適なアルゴリズムを用いて核染色強度を計算した。データはＧｒａｐｈｐａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して分析した。４パラメータロジスティック方程式（式４）を用いたカーブフィッティングによりＩＣ$_{50}$値を決定した。

【０７８８】
図４Ｂは、Ｈｕｖｅｃ ＮＦκＢ転座アッセイにおける抗ＮＩＰ ＩｇＧ１陰性対照抗体ＮＩＰ２２８と比較したＩＬ－３３抗体ＩＬ３３０００４によるＮＦκＢ活性の阻害を示す。ｐ６５／ＲｅｌＡ ＮＦκＢの核転座は抗体ＩＬ３３０００４によって阻害された。精製ＩｇＧとして試験したとき、抗体ＩＬ３３０００４のＩＣ５０は１２ｎＭと計算された。

【０７８９】
ＢＩＡｃｏｒｅを用いたＩＬ－３３抗体の結合親和性計算
ヒト及びカニクイザルＩＬ－３３に対する例示的結合メンバーの精製ＩｇＧ試料の結合親和性を、本質的にＫａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １４５（１－２）：２２９－４０（１９９１）により記載されるとおりＢＩＡｃｏｒｅ ２０００バイオセンサー（ＢＩＡｃｏｒｅ ＡＢ）を使用した表面プラズモン共鳴によって決定した。端的には、プロテインＧ’（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｐ４６８９）を製造者の指示に従い（ＢＩＡｃｏｒｅ）標準的なアミンカップリング試薬を使用してＣＭ５センサーチップの表面に共有結合的にカップリングした。このプロテインＧ’表面を用いてＦｃドメインで精製抗ＩＬ－３３抗体を捕捉することにより、サイクル当たり約２９０ＲＵの面密度を得た。ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液（ＢＩＡｃｏｒｅ ＡＢ）中に調製した６００ｎＭ～１８．７５ｎＭの間の様々な濃度のヒト又はカニクイザルＩＬ－３３をセンサーチップ表面に流した。各抗体注入の間にｐＨ１．７及びｐＨ１．５の２回の１０ｍＭグリシン洗浄を用いて表面を再生させた。得られたセンサーグラムをＢＩＡ ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ３．１ソフトウェアを用いて評価し、１：１ラングミュア結合モデルにフィッティングして相対結合データを得た。ヒト又はカニクイザルＩＬ－３３に対する抗体ＩＬ３３０００２及びＩＬ３３０００４の結合の結合結果（ＫＤ、Ｋａ、及びＫｄ）を表８に示す。

【０７９０】

【表２４】

表 8: 例示的結合メンバーの BIAcore 結合親和性

抗体	抗原	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
IL330002	ヒト IL-33 FLAG®-His	35	6.16E+04	2.18E-03
IL330002	カニクイザル IL-33 FLAG®-His	189	2.34E+04	4.42E-03
IL330004	ヒト IL-33 FLAG®-His	6	1.96E+05	1.10E-03
IL330004	カニクイザル IL-33 FLAG®-His	365	1.25E+04	4.58E-03

【０７９１】

ＩＬ－３３抗体の細胞内ＩＬ－３３への結合

上記に記載した選択及び活性試験は、成熟ＩＬ－３３（アミノ酸１１２～２７０）の組換え又は市販の供給源を使用した。研究によれば、完全長ＩＬ－３３もまた活性であり得ることが示唆される（Ｃａｙｒｏｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０６（２２）：９０２１－６（２００９）；Ｈａｙａｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３８７（１）：２１８－２２（２００９）；Ｔａｌａｂｏｔ－Ａｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２８４（２９）：１９４２０－６（２００９））。完全長（「天然」）ＩＬ－３３との抗体の結合を初代気管支平滑筋細胞（ＢＳＭＣ）の免疫蛍光染色によって決定した。

【０７９２】

ＣａｍｂｒｅｘからＢＳＭＣを入手し、製造者の指示に従い完全平滑筋成長培地（ＳｍＢＭ（登録商標）、Ｌｏｎｚａ）に維持した。細胞をフラスコからアキュターゼ（ＰＡＡ ＃Ｌ１１－００７）で回収し、９６ウェル黒色壁透明平底コラーゲンＩコートプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ）中の培養培地［ＳＭＧＭ ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ Ｋｉｔ Ｓｕｐｐｌ．＆ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ（Ｌｏｎｚａ ＃ＣＣ－４１４９）含有ＳＭＢＭ（Ｌｏｎｚａ ＃ ＣＣ－３１８１）］に2×10^4／１００μｌ／ウェルで播種し、３７℃、５％CO_2で１８～２４時間インキュベートした。その後、培地を吸引し、細胞単層はインタクトなまま、３７℃に予め加温した３．７％ホルムアルデヒド溶液で細胞を１５分間固定した。固定液を吸引し、細胞を１００μＬ／ウェルのＰＢＳで２回洗浄した。透過処理緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、＃８４００４９２）を使用して細胞を室温で１５分間透過処理し、ＰＢＳで２回洗浄し、１００μＬ／ウェルのＰＢＳ／１％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ、＃Ａ９５７６）によって室温で３０～６０分間ブロックした。ブロッキング緩衝液を振り落とし、ブロッキング緩衝液に希釈した抗ＩＬ－３３又は好適なアイソタイプ対照抗体のタイトレーションに室温で１時間交換した。

【０７９３】

プレートをＰＢＳで２回洗浄し、１：１００００希釈したＨｏｅｃｈｓｔ染料（１０ｍｇ／ｍＬ；Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）並びに１：１０００希釈した二次抗体（抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８コンジュゲート２ｍｇ／ｍＬ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃Ａ１１０１３）を含む二次抗体溶液によって室温で１時間染色した。プレートをＰＢＳで３回洗浄した。細胞を１５０μＬ／ウェルＰＢＳの最終容積で保存し、黒色遮光性シール（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、＃６００５１８９）で被覆した後、ＡｒｒａｙＳｃａｎ ＶＴｉ ＨＣＳリーダーで画像化した。

【０７９４】

市販のポリクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、＃ＡＦ３６２５）で培養ＢＳＭＣによるＩＬ－３３発現を確認し、抗ヤギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８コンジュゲート２ｍｇ／ｍＬ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃Ａ１１０５５）で検出した。図５は、ＣＡＴ－００２陰性対照（左側のパネル）と比較したＩＬ－３３抗体ＩＬ３３０００４（右側のパネル）による免疫蛍光染色による気管支平滑筋細胞の内因性ＩＬ－３３の検出を示す。抗体ＩＬ３３０００４は、市販のｐＡｂで検出された、完

全長ＩＬ－３３の予想された局在に対応するＢＳＭＣの明るい核染色を示した。

【０７９５】

実施例２　抗ＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体の単離及び同定

ファージＥＬＩＳＡによるＩＬ－３３特異的結合剤の同定

試薬及び選択は実施例１に記載するとおりであった。単鎖Ｆｖ断片をファージ粒子上に提示させて、シングルポイントＥＬＩＳＡスクリーニングで未精製調製物として試験した。ファージ提示ｓｃＦｖは、吸光度４５０ｎｍが＞０．５であり、且つ対照（インスリン及びＩＬ－４Ｒα　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓ）に関して同じ試料について＜０．１～０．２であった場合に、ＩＬ－３３抗原に結合すると見なすものとする。

【０７９６】

図６は、ヒトＩＬ－３３、カニクイザルＩＬ－３３及びインスリンに対してスクリーニングした単一のプレートからのデータを示す。１つの特異的ヒト／カニクイザル交差反応性ＩＬ－３３結合剤がウェルＣ４に示され、ウェルＡ１２及びＢ１２には対照ＩＬ－３３結合クローンが含まれる。

【０７９７】

Ａｘｘｏｒａ　ＩＬ３３３０５Ｂ競合によるＩＬ－３３結合剤の同定

Ａｘｘｏｒａ　ＩＬ３３３０５Ｂ競合アッセイは、蛍光微量容積アッセイ技術（ＦＭＡＴ）を利用する均一系アッセイである。このアッセイでは、３８４ウェルフォーマットで粗ｓｃＦｖ上清試料又は精製ｓｃＦｖ及びＩｇＧの存在下における組換えビオチン化ヒトＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓに対するＡｘｘｏｒａ　ＩＬ３３３０５Ｂ　ｍＡｂ（Ａｘｘｏｒａ／Ａｄｉｐｏｇｅｎ、＃ＡＧ－２０Ａ－００４１－Ｃ０５０）の結合の阻害を評価した。

【０７９８】

ｓｃＦｖを細菌ペリプラズムで発現させて、既知の生物学的に活性なＩＬ３３３０５Ｂ　ｍＡｂに対するＦＭＡＴエピトープ競合アッセイでそれらの阻害活性に関してスクリーニングした。ストレプトアビジンコートビーズ（Ｓｐｈｅｒｏｔｅｃ、＃ＳＶＰ－６０－５）上にビオチン化ＩＬ－３３を固定化し、ヤギ抗マウスＡｌｅｘａｆｌｕｏｒ（登録商標）－６４７標識抗体（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　Ａ２１２３６）を使用してＡｘｘｏｒａ　ＩＬ３３３０５Ｂ　Ａｂとの相互作用を検出した。ＦＭＡＴシステムは、ビーズに関連する赤色蛍光を計測するマクロ共焦点画像装置である。

【０７９９】

Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎシステム８２００リーダーでプレートを読み取った。ヘリウムネオン励起レーザーは、ウェルの底の１００μｍ深度以内に焦点を結んで面積１ｍｍ^{2}をスキャンする。ビーズがウェルの底に沈殿し、６３３ｎｍでレーザー励起すると、フルオロフォアが結合したビーズ（ここでは未結合のフルオロフォアと比較してフルオロフォアの局所濃度が比較的高い）が６５０～６８５ｎｍでシグナルを発し、ＰＭＴ１を用いてそれを計測する。溶液中の未結合のフルオロフォアは励起深度外であるか、又は比較的低い局所濃度であり、従って有意なシグナルを発しない。従って、ＩＬ３３３０５ＢがＩＬ－３３に結合するのを有効に遮断するｓｃＦｖ又はＩｇＧ試料は、ウェルの底にあるビーズ：ＩＬ－３３：ＩＬ３３３０５Ｂ：抗マウスＡｌｅｘａｆｌｕｏｒ（登録商標）－６４７標識抗体複合体の量の減少を生じさせることになり、これが計測される蛍光の減少をもたらす。

【０８００】

アッセイセットアップのため、以下を調製した：

（１）ＩＬ３３３０５Ｂ及び抗マウスＡＦ６４７混合物、ＩＬ３３３０５Ｂをアッセイ緩衝液［０．１％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ、＃Ａ９５７６）及び０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０（Ｓｉｇｍａ、Ｐ２２８７）を含有するＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、１４１９０－０９４）］中２．２５ｎＭに希釈し、アッセイ緩衝液中２μｇ／ｍｌ（最終４００ｎｇ／ｍｌ）に希釈した抗マウスＡＦ６４７と混合した。

（２）ＩＬ－３３及びビーズ混合物、２．５ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（

登録商標）Ｈｉｓをアッセイ緩衝液中の０．００９５％ｗ／ｖストレプトアビジンビーズに加え、回転させながら室温で１時間インキュベートした－使用前にこれらの粒子は２０００ｒｐｍで１５分間スピンダウンし、元の容積のアッセイ緩衝液に再懸濁した。
（３）試料調製物、粗ｓｃＦｖ上清試料を９６ディープウェルプレートに作成した。９６ウェルマスタープレートの各ウェルからの５μｌ培養物を、９００μｌの２ＴＹ＋１００μｇ／ｍｌアンピシリン＋０．１％グルコース培地が入ったＧｒｅｉｎｅｒディープウェル培養プレートに移し、３７℃、２８０ｒｐｍで５時間インキュベートした。次にＴＹ中の１０ｍＭ　ＩＰＴＧを１００ｕｌ／ウェルで加え、プレートを３０℃、２８０ｒｐｍで一晩インキュベートした。翌朝、プレートを３２００ｒｐｍで１５分間スピンダウンした。ハイスループットスクリーニングのため、ディープウェルプレートからのｓｃＦｖ上清を２０％の最終濃度に達するようにアッセイプレートに直接移した。

【０８０１】
ＩＣ５０測定のため、典型的には精製ｓｃＦｖ又はＩｇＧをデュプリケートでアッセイ緩衝液中に3倍希釈して１１濃度ポイントとした。希釈調製には９６ウェルＧｒｅｉｎｅｒポリプロピレン（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）プレートを使用する。

【０８０２】
３８４ウェル透明底非結合表面黒色プレート（Ｃｏｓｔａｒ、＃３６５５）の列１～２２に以下を加えた：１０μｌ試料、２０μｌ　ＩＬ３３３０５Ｂ／抗マウスＡＦ６４７混合物、及び２０μｌ　ＩＬ－３３／ビーズ混合物。いずれの場合にも、総ウェル容積は４０μｌであった。これらの実験に典型的に使用した対照には、以下が含まれた：ＩＬ－３３／ビーズ混合物＋抗マウスＡＦ６４７を加えた（非特異的結合）；ＩＬ３３０３０５Ｂ／抗マウスＡＦ６４７混合物＋ＩＬ－３３／ビーズ混合物（全結合）。プレートを密閉し、室温暗所で４時間インキュベートし、次にＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎシステム８２００リーダーで読み取った。データはＶｅｌｏｃｉｔｙアルゴリズムで、ゲーティングをカラー比＜０．４、サイズ＜１５及び分カウント２０に設定して分析した。粗ｓｃＦｖ上清試料からのヒットは、全結合対照ウェルと比較してシグナルの５０％以上の阻害を示すものとして定義した。精製ｓｃＦｖ及びＩｇＧ力価決定のため、Ｐｒｉｓｍ（Ｇｒａｐｈｐａｄ）カーブフィッティングソフトウェアを使用して用量反応曲線をプロットした。

【０８０３】
ｓｃＦｖからＩｇＧ１への再フォーマット化
ファージ提示ｓｃＦｖ結合実験によって決定するとき望ましい種交差反応性及び特異性プロファイルを呈したｓｃＦｖ又はＡｘｘｏｒａ　Ｉｌ３３３０５Ｂとのエピトープ競合アッセイ（上記に記載したとおり）で阻害効果を示したｓｃＦｖを、ＤＮＡシーケンシングにかけた（Ｏｓｂｏｕｒｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２（３）：１８１－９６（１９９６）；Ｖａｕｇｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１４（３）：３０９－１４（１９９６））。初めに、望ましい特性を有するｓｃＦｖを全免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）抗体フォーマット、又はエフェクターヌルアイソタイプＩｇＧ１　ＴＭ抗体フォーマット（突然変異Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ及びＰ３３１Ｓを組み込むＩｇＧ１　Ｆｃ配列）に、実施例１に記載したとおり変換した。抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０の様々な領域に対応する配列番号を表９に示す。

【０８０４】

【表２５】

表 9. 抗 IL-33 抗体配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
IL330065	配列番号 82	配列番号 87	配列番号 83 配列番号 84 配列番号 85	配列番号 88 配列番号 89 配列番号 90
IL330099	配列番号 92	配列番号 97	配列番号 93 配列番号 94 配列番号 95	配列番号 98 配列番号 99 配列番号 100
IL330101	配列番号 102	配列番号 107	配列番号 103 配列番号 104 配列番号 105	配列番号 108 配列番号 109 配列番号 110
IL330107	配列番号 122	配列番号 127	配列番号 123 配列番号 124 配列番号 125	配列番号 128 配列番号 129 配列番号 130
IL330149	配列番号 132	配列番号 137	配列番号 133 配列番号 134 配列番号 135	配列番号 138 配列番号 139 配列番号 140
IL330180	配列番号 142	配列番号 147	配列番号 143 配列番号 144 配列番号 145	配列番号 148 配列番号 149 配列番号 150

【０８０５】

ＩｇＧの結合アッセイ

プレートベースのＥＬＩＳＡを用いて抗ＩＬ－３３抗体の種交差反応性を決定した。ストレプトアビジンプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＡＢ－１２２６）をＰＢＳ中０．５μｇ／ｍｌのビオチン化抗原でコーティングした。抗ヒトＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ、Ａ０１７０）で精製ＩｇＧ調製物の結合を検出した。結合曲線のＥＣ５０データを表１０に示す。

【０８０６】

【表２６】

表 10: Flag®His タグ付加ヒト、カニクイザル又はマウス IL-33 に対する IL-33 抗体の結合

抗体	EC50 (nM)		
	ヒト IL-33 Flag®His	カニクイザル IL-33 Flag®His	マウス IL-33 Flag®His
IL330065	0.65	0.66	結合無し
IL330099	0.40	0.35	0.38
IL330101	1.19	1.20	0.85
IL330107	0.86	1.09	0.83
IL330149	0.23	0.35	0.17
IL330180	未決定*	未決定*	未決定*

IL330180 は、ファージ提示 scFv フォーマットではヒト IL-33 に結合するが、カニクイザル又はマウス IL-33 には結合しないと決定された。

【０８０７】

抗ＩＬ－３３抗体によるＩＬ－３３機能的応答の阻害

ＩｇＧによるＴＦ－１細胞増殖の阻害

細胞生存アッセイを用いて、抗ＩＬ－３３抗体によるＴＦ－１細胞からのＩＬ－３３誘導性増殖／生存の阻害を評価した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）発光細胞生存アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）は、代謝活性を有する細胞の存在を知らせるＡＴＰの存在の定量化に基づき培養下の生細胞の数を決定する均一法である。試験抗体の存在下又は非存在下で細胞をＩＬ－３３に曝露した。ＩＬ－３３による刺激後７２時間にＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏによって細胞生存度を計測した。

【０８０８】

詳細には、増殖アッセイを用いて、抗ＩＬ－３３抗体によるＴＦ－１細胞からのＩＬ－３３誘導性増殖の阻害を評価した。ＴＦ－１細胞はＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓからの供与であり、製造者の指示に従い維持した。アッセイ培地には、５％ウシ胎仔血清（熱失活、ガンマ線照射）、１％ピルビン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ、Ｓ８６３６）、１～２％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１５１４０－１２２）を含有するＧＬＵＴＡＭＡＸ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、６１８７０）を含むＲＰＭＩ－１６４０が含まれた。各アッセイの前に、ＴＦ－１細胞を３００×ｇで５分間遠心することによりペレット化し、吸引によって培地を取り除き、次に細胞をアッセイ培地に再懸濁した。このプロセスを、細胞を２×１０^{5}細胞／ｍｌの最終濃度でアッセイ培地に再懸濁して２回繰り返した。ＩｇＧの試験溶液（デュプリケート）を所望の濃度範囲となるように９６ウェルＵ字底ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）中のアッセイ培地にタイトレーションし、５０μＬを９６ウェル平底組織培養処理プレート（Ｃｏｓｔａｒ、＃３５９８）に移した。組換えヒトＩＬ－３３（Ａｌｅｘｉｓ、ＡＬＸ－５２２－０９８－３０１０）を適切な試験抗体タイトレーションに加えて１００μｌ／ウェルの総容積とした。次に１００μｌの細胞懸濁液を１００μｌのＩＬ－３３又はＩＬ－３３と抗体との混合物に加えることにより、総アッセイ容積２００μｌ／ウェル及び総細胞数２０，００

０／ウェルとした。アッセイでは１００ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－３３の最終アッセイ濃度を使用し、これは、最大増殖応答の約８０％を与える用量として選択されたものであった。プレートを３７℃及び５％CO_2で７２時間インキュベートした。１００μＬの上清をアッセイプレートから慎重に取り出した。製造者の指示に従い再構成したＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｇ７５７１）を各ウェルにつき１００μＬ加えた。プレートをプレート振盪機で５００ｒｐｍで５分間振盪し、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で発光を読み取った。データはＧｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して分析した。３又は４パラメータロジスティック方程式を用いたカーブフィッティングによりＩＣ５０値を決定した。

【０８０９】

完全な阻害曲線を達成した抗体について、ＩＣ５０値を計算した（以下の表１１に要約する）。精製ＩｇＧ調製物は、ＩＬ－３３に応答したＴＦ－１増殖の阻害能を有した。図７Ａは、ＴＦ－１増殖アッセイに関するＩＬ３３００６５及びＩＬ３３０１０１についてのパーセント阻害（対照ｍＡｂ及びｈＳＴ２／Ｆｃとの比較）を示す（ここでｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答のパーセンテージである）。

【０８１０】

ＩＬ－３３抗体によるＨｕｖｅｃ　ＩＬ－６放出の阻害

サイトカイン放出アッセイを用いて、抗ＩＬ－３３抗体によるヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｈｕｖｅｃ）からのＩＬ－３３誘導性ＩＬ－６産生の阻害を評価した。試験抗体の存在下又は非存在下で細胞をＩＬ－３３に曝露した。

【０８１１】

ＨｕｖｅｃをＣａｍｂｒｅｘから入手し、製造者のプロトコルに従い完全ＥＢＭ－２培地（Ｌｏｎｚａ）に維持した。細胞をアキュターゼ（ＰＡＡ、＃Ｌ１１－００７）でフラスコから回収し、９６ウェル平底組織培養処理プレート（Ｃｏｓｔａｒ、＃３５９８）中の培養培地（ＥＧＭ－２　ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ　Ｋｉｔ　Ｓｕｐｐｌ．＆　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒｓ（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－４１７６）含有ＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－３１５６））に1×10^4／１００μｌ／ウェルで播種し、３７℃、５％CO_2で１８～２４時間インキュベートした。その後、培地を吸引し、細胞単層はインタクトなまま、以下で考察するとおりのアッセイ試験試料を補充した。

【０８１２】

精製ＩｇＧの試験溶液（デュプリケート）を９６ウェルU字底ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）の完全培養培地中に所望の濃度に希釈した。ＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ）を、３０ｎｇ／ｍＬの最終ＩＬ－３３濃度となるように適切な試験抗体と混合した完全培養培地中に調製した。全ての試料を室温で３０分間インキュベートした後、１２０μｌのＩＬ－３３／抗体混合物をアッセイプレートに移した。１８～２４時間インキュベートした後、ユウロピウムの読み取りに適しているＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＤＹ２０６）によって細胞上清中のＩＬ－６を計測した。黒色Ｆｌｕｒｏ－Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐプレート（ＶＷＲ、＃４３７１１１）を５０μＬ捕捉抗体でコーティングし、自動プレート洗浄器（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用してＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．０１％）で3回洗浄し、２５０μＬ／ウェルのＰＢＳ／１％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ、＃Ａ９５７６）によって室温で１～２時間ブロックした。プレートを上記のとおり洗浄し、５０ｕＬマスト細胞アッセイ上清と共に室温で１～２時間インキュベートした。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで3回洗浄した後、製造者の指示に従いプレートを検出抗体（５０ｕＬ／ウェル）と共にインキュベートした。ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで3回洗浄し、ストレプトアビジン－ユウロピウム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、１２４４－３６０）をＤＥＬＦＩＡ（登録商標）アッセイ緩衝液（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、４００２－００１０）に１：１０００希釈し、５０μｌ／ウェルで室温で４５～６０分間加えた。次にプレートをＤＥＬＦＩＡ洗浄緩衝液で７回洗浄した後、５０μｌ／ウェルのエンリッチメント溶液（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、４００１－００１０）を加え、時間分解蛍光測定法（励起３４０ｎＭ、発光６１５ｎＭ）を用いて分析した。データはＧｒａｐｈｐａｄ

Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して分析した。３又は４パラメータロジスティック方程式を用いたカーブフィッティングによりＩＣ５０値を決定した。完全な阻害曲線を達成した抗体について、ＩＣ５０値を計算した（以下の表１１に要約する）。抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３０１４９、及びＩＬ３３０１８０の精製ＩｇＧ調製物（ＩｇＧ１又はＩｇＧ１－ＴＭ）は、対照抗体と比較してＩＬ－６産生を阻害した。例示的結合メンバーの効力は、本質的にＩｇＧ１－ＴＭＦｃ配列突然変異（Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ及びＰ３３１Ｓ）の存在に影響されなかった。図示するデータは両方のフォーマットの情報を結合している。図７Ｂは、ＩＬ３３００６５及びＩＬ３３０１０１についてのパーセント最大ＩＬ－６放出（ヒトＳＴ２－Ｆｃ、抗ＩＬ３３　ｐＡｂ　ＡＦ３６２５（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、及び対照ｍＡｂとの比較）を示す（ここでｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答のパーセンテージである）。

【０８１３】

ヒトマスト細胞サイトカイン放出の阻害

サイトカイン放出アッセイを用いて、ヒトマスト細胞からの抗ＩＬ－３３抗体によるＩＬ－３３誘導性ＩＬ－６産生の阻害を評価した。ＩＬ－６に加え、細胞上清中の他のサイトカイン（ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦα）について、代替的なｄｕｏｓｅｔ　ＥＬＩＳＡ又はＭｅｓｏｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ多重分析を用いて計測した。

【０８１４】

本質的にＡｎｄｅｒｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　３３６：１６６－１７４（２００８））に記載されるとおり、臍帯血ＣＤ１３３＋前駆細胞（Ｌｏｎｚａ、＃２Ｃ－１０８）のインビトロ分化によってヒトマスト細胞を作製した。製造者の指示に従い前駆細胞を解凍し、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１５１４０－１２２）及び成長因子：１００ｎｇ／ｍＬ幹細胞因子（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、＃ＡＦ－３００－０７）及び５０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－６（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、＃ＡＦ－２００－６）を補足した無血清増殖培地（ＳｔｅｍＳｐａｎ、＃０９６５０）において８週間インビトロ培養した。加えて、最初の３週間は培養培地に１ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－３（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、＃２０３－ＩＬ）を含めた。細胞は全体を通じて＜5×10^{5}／ｍＬに維持した。

【０８１５】

アッセイ培地（ＳｔｅｍＳｐａｎ、＃０９６５０；１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１５１４０－１２２）及び１００ｎｇ／ｍＬ幹細胞因子（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、＃ＡＦ－３００－０７））においてマスト細胞を一晩培養した後、試験抗体の存在下又は非存在下でＩＬ－３３に曝露した。

【０８１６】

サイトカイン放出アッセイのため、細胞を取り出し、ペレット化し（１５０ｇ、１０分間）、アッセイ培地（ＳｔｅｍＳｐａｎ、＃０９６５０、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１５１４０－１２２）及び１００ｎｇ／ｍＬ幹細胞因子（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、＃ＡＦ－３００－０７））に再懸濁した。細胞をフラスコに戻し、１８～２４時間培養した後、アッセイをセットアップした。試料評価のため、ＩｇＧの試験溶液（デュプリケート）を所望の濃度範囲となるように９６ウェルＵ字底ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）中のアッセイ培地にタイトレーションし、５０μＬの試験溶液を９６ウェル平底組織培養処理プレート（Ｃｏｓｔａｒ、＃３５９８）に移した。アッセイ培地中に９０ｎｇ／ｍＬに希釈した５０μＬの組換えヒトＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ、＃５２２－０９８－３０１０）を適切な試験抗体タイトレーションに加えて１００μｌ／ウェルの総容積とした。次に５０μｌの細胞懸濁液（1.5×10^{5}）を１００μｌのＩＬ－３３又はＩＬ－３３と抗体との混合物に加えることにより、総アッセイ容積１５０μｌ／ウェル及び総細胞数5×10^{4}／ウェルとした。このアッセイでは、最大サイトカイン応答の約５０～８０％を与える用量として選択された３０ｎ

ｇ／ｍＬ　ＩＬ－３３の最終アッセイ濃度を使用した。プレートを３７℃及び５％CO_2で１８～２４時間インキュベートした。

【０８１７】

ユウロピウムの読み取りに適しているＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＤＹ２０６）によって細胞上清中のＩＬ－６を計測した。黒色Ｆｌｕｒｏ－Ｎｕｎｃ　Ｍａｘｉｓｏｒｐプレート（ＶＷＲ、＃４３７１１１）を５０μＬ捕捉抗体でコーティングし、自動プレート洗浄器（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用してＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．０１％）で3回洗浄し、２５０μＬ／ウェルのＰＢＳ／１％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ、＃Ａ９５７６）によって室温で１～２時間ブロックした。プレートを上記のとおり洗浄し、５０μＬマスト細胞アッセイ上清と共に室温で１～２時間インキュベートした。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで3回洗浄した後、製造者の指示に従いプレートを検出抗体（５０μＬ／ウェル）と共にインキュベートした。ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで3回洗浄し、ストレプトアビジン－ユウロピウム（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、１２４４－３６０）をＤＥＬＦＩＡアッセイ緩衝液（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、４００２－００１０）に１：１０００希釈し、５０μｌ／ウェルで室温で４５～６０分間加えた。次にプレートをＤＥＬＦＩＡ洗浄緩衝液で7回洗浄した後、５０μｌ／ウェルのエンリッチメント溶液（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、４００１－００１０）を加え、時間分解蛍光測定法（励起３４０ｎＭ、発光６１５ｎＭ）を用いて分析した。データはＧｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して分析した。３又は４パラメータロジスティック方程式を用いたカーブフィッティングによりＩＣ５０値を決定した。

【０８１８】

図８Ａは、漸増濃度の抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０によるＩＬ－６産生の減少を示す（ここでｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は％最大応答である）。試験抗体の精製ＩｇＧ調製物は、対照抗体と比較してＩＬ－６活性の阻害能を有した。例示的結合メンバーの効力は、本質的にＩｇＧ１－ＴＭ　Ｆｃ配列突然変異（Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５Ｅ及びＰ３３１Ｓ）の存在に影響されなかった。データは両方のフォーマットの情報を結合している。ＴＦ－１増殖アッセイのＩＣ５０の結果、ＨＵＶＥＣ　ＩＬ－６産生、及びマスト細胞ＩＬ－６産生を表１１に示す。

【０８１９】

【表２７】

表 11. ナイーブヒト scFv ファージディスプレイライブラリから同定されたクローンの例示的効力

抗体	IgG1 幾何平均 (95% CI) IC50 (nM)		
	TF-1 増殖	Huvec IL-6 産生	マスト細胞 IL-6 産生
IL330065	81 (19-345)	87 (60-129)	12 (4-40)
IL330099	不完全な曲線	不完全な曲線	1221 (n=1)
IL330101	149 (n=1)	497 (167-1474)	49 (31-75)
IL330107	94 (n=1)	不完全な曲線	283 (154-522)
IL330149	不完全な曲線	不完全な曲線	298 (n=2)
IL330180	未決定	未決定	22 (n=1)

【０８２０】

製造者の指示に従いＭｅｓｏ－Ｓｃａｌｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｄｅｍｏｎｓｔｒａｔｉｏｎ　１０－ｐｌｅｘヒトサイトカインアッセイ（＃Ｋ１５００２Ｂ－１）を使用して細胞上清中の更なるサイトカイン（ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、及びＧＭ－ＣＳＦ）を検出した。上記に記載したＩＬ－６　ＥＬＩＳＡと同様のプロトコルを用いるユウロピウムの読み取りに適しているＥＬＩＳＡによって細胞上

清中のサイトカインを計測した。

【０８２１】

マスト細胞は、ＩＬ－３３による刺激後、様々なサイトカインを産生することが示された（Ｍｅｓｏ－Ｓｃａｌｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ Ｄｅｍｏｎｓｔｒａｔｉｏｎ １０－ｐｌｅｘヒトサイトカインアッセイ ＃Ｋ１５００２Ｂ－１；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、＃ＤＹ２１３）。図８Ｂ～図８Ｆは、それぞれ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ１０、ＩＬ－８、ＩＬ－１３及びＩＬ－５のＩＬ－３３駆動産生の阻害を示す。これらの結果は、抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、及びＩＬ３３０１４９が、計測した全てのサイトカインのＩＬ－３３駆動産生を阻害する能力を有することを示している。

【０８２２】

天然完全長ＩＬ－３３の結合及び中和

上記に記載した選択及び活性試験では、成熟ＩＬ－３３（アミノ酸１１２～２７０）の組換えインハウス又は市販の供給源を使用した。完全長ＩＬ－３３もまた活性であり得る（Ｃａｙｒｏｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０６（２２）：９０２１－６（２００９）；Ｈａｙａｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３８７（１）：２１８－２２（２００９）；Ｔａｌａｂｏｔ－Ａｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２８４（２９）：１９４２０－６（２００９））。完全長ＩＬ－３３に対する抗体の結合を評価するため、完全長ＩＬ－３３をクローニングし、ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞で発現させた。以下に記載するとおり、選択された抗体は、ウエスタンブロットによって決定するとき完全長ＩＬ－３３に結合することが示された。

【０８２３】

完全長ヒトＩＬ－３３のクローニング及び発現

ヒト由来の完全長（ＦＬ）ＩＬ－３３（Ｓｗｉｓｓ Ｐｒｏｔ受託番号Ｏ９５７６０アミノ酸１～２７０）をコードするｃＤＮＡ分子をプライマー伸長ＰＣＲクローニングによって合成し、ｐＤＯＮＲ２２１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２５３６－０１７）にクローニングし、製造者の指示に従いＬＲ Ｇａｔｅｗａｙ Ｃｌｏｎａｓｅ ＩＩ酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２５３８－１２０）を使用して哺乳類発現ベクターｐＤＥＳＴ１２．２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に移した。ｐＤＥＳＴ１２．２ベクターはｐＣＥＰ４ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）由来のｏｒｉＰ複製起点を含むように修飾されており、ＥＢＮＡ－１遺伝子産物を発現する細胞株（ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞など）へのトランスフェクション時にエピソームプラスミド複製が可能なものであった。ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１６６８－０１９）でトランスフェクトした。ＦＬ ＨｕＩＬ－３３を発現する細胞（及びモックトランスフェクト対照）を、プロテアーゼ阻害薬（Ｒｏｃｈｅ、０５８９２７９１００１）の存在下における音波処理を用いて溶解させた。

【０８２４】

完全長ヒトＩＬ－３３を発現する細胞ライセートのウエスタンブロット分析

細胞ライセートのタンパク質を変性させてＳＤＳ試料緩衝液及びＤＴＴで還元した後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動（ｅｌｅｃｔｏｐｈｏｒｅｓｉｓ）によって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。膜をＰＢＳ－Ｔ中５％脱脂粉乳で１時間ブロックし、一次抗体（０．５μｇ／ｍｌ）と共に１時間インキュベートし、ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄し、次にＨＲＰコンジュゲート二次抗体（１対１０，０００希釈のヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ、Ａ０１７０））と共に１時間インキュベートし、ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。ＨＲＰをＡｍｅｒｓｈａｍ ＥＣＬ ｐｌｕｓ検出試薬（ＧＥ ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＲＰＮ２１３２）で検出した。サイズは、Ｍａｇｉｃ Ｍａｒｋ ＸＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＬＣ５６０２）の移動と比較することにより推定した。図９は、ウエスタンブロットによるＩＬ－３３抗体（ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、及びＩＬ３３０１４９）の完全長ヒトＩＬ－３３への結合を示す。

【０８２５】
完全長ＩＬ－３３細胞ライセートに対するマスト細胞サイトカイン応答の中和
トランスフェクション後２４時間に、完全長（ＦＬ）ＨｕＩＬ－３３を発現するＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞（及びモックトランスフェクト対照）をアキュターゼ（ＰＡＡ、＃Ｌ１１－００７）で回収した。細胞をＰＢＳで５×１０^{7}／ｍＬに希釈し、組織ホモジナイザーを使用して３０秒間ホモジナイズした。遠心によって細胞残屑を除去した。マスト細胞を種々の濃度の細胞ライセートで刺激した。サイトカイン産生の刺激は完全長ＩＬ－３３トランスフェクト細胞ライセートのみで観察され、モックトランスフェクト細胞ライセートでは観察されなかった。準最大サイトカイン放出を刺激したライセートの濃度（近似ＥＣ５０）を抗体中和試験に選択した。

【０８２６】
サイトカイン放出アッセイのため、アッセイ培地（ＳｔｅｍＳｐａｎ、＃０９６５０；１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１５１４０－１２２）及び１００ｎｇ／ｍＬ幹細胞因子（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、＃ＡＦ－３００－０７））においてマスト細胞を一晩培養した後、試験抗体の存在下又は非存在下でＦＬ　ＨｕＩＬ－３３に曝露した。１８～２４時間後にアッセイ上清のＥＬＩＳＡによってＩＬ－６及びＩＬ－１３産生が検出された。プロトコルの詳細な説明は上記に記載した（実施例２－０００７）。

【０８２７】
図１０は、完全長ＩＬ－３３－トランスフェクト細胞の細胞ライセートによって刺激されたマスト細胞ＩＬ－６及びＩＬ－１３産生に対して抗ＩＬ－３３抗体ＩＬ３３００６５及びＩＬ３３０１０１が及ぼす効果を示す。精製ＩｇＧ調製物は、完全長ＩＬ－３３細胞ライセートによって誘導されたＩＬ－６（図１０Ａ）及びＩＬ－１３（図１０Ｂ）産生の阻害能を有した。

【０８２８】
ＩＬ－３３抗体の非競合的作用様式
精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害
抗ＩＬ－３３抗体がＦｌａｇ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＩＬ－３３のＳＴ２受容体への結合を阻害する能力を生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイ（この完全な方法については実施例１に記載する）で評価した。

【０８２９】
図１１Ａは、漸増濃度の抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０によるＨＴＲＦ（登録商標）受容体－リガンド競合アッセイの特異的結合結果を示す。これらの結果は、抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３３１４９、及びＩＬ３３０１８０がＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用の競合阻害薬ではないことを示している。

【０８３０】
ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＮＦｋＢシグナル伝達の阻害
実施例１に記載されるとおり免疫蛍光染色によって検出されるｐ６５／ＲｅｌＡ　ＮＦｋＢサブユニットの核転座により、ＩＬ－３３に応答したＨｕｖｅｃのＮＦｋＢシグナル伝達を評価した。

【０８３１】
図１１Ｂは、漸増濃度の抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、及びＩＬ３３０１４９によるＨｕｖｅｃ　ＮＦｋＢ転座を示す。これらの結果は、ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、及びＩＬ３３０１４９が、ＩＬ－３３刺激を受けたＨｕｖｅｃの刺激３０分後のｐ６５／ＲｅｌＡ　ＮＦｋＢの核転座を阻害しなかったことを示している。この結果は、抗体ＩＬ３３００６５、ＩＬ３３００９９、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７、ＩＬ３

３１４９、及びＩＬ３３０１８０がＩＬ－３３のＳＴ２への結合を阻害できないことと一致している。

【０８３２】

ＨＴＲＦ（登録商標）エピトープ競合アッセイにおけるＩＬ－３３抗体のエピトープビニング

抗体がビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関してｍＡｂ　ＩＬ３３０１０１又はｍＡｂ　ＩＬ３３０１８０と競合する能力を生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）エピトープ競合アッセイで評価した。

【０８３３】

以下に記載するＨＴＲＦ（登録商標）エピトープ競合アッセイを用いてビオチン化ＩＬ－３３に対するＩｇＧフォーマットのリード抗体の結合を計測した。リード抗体と同様のエピトープを認識する試験ｓｃＦｖ試料は、ＩＬ－３３との結合に関してリード抗体と競合することになり、アッセイシグナルの減少につながる。

【０８３４】

抗体試験試料の各希釈物５マイクロリットルを３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより、リード抗体に結合するビオチン化ヒトＩＬ－３３の阻害に関して精製抗ＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体試料を試験した。次に、８ｎＭ　ＩＬ３３０１８０　ＩｇＧ１又は１２ｎＭ　ＩＬ３３０１０１　ＩｇＧ１及び４０ｎＭ抗ヒトＦｃ検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＨＦＸＬＢ）を含有する溶液を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレートに加えた。これに続いて、４ｎＭ（ＩＬ３３０１８０エピトープ競合アッセイについて）又は１８ｎＭ（ＩＬ３３０１０１エピトープ競合アッセイについて）のビオチン化ヒトＩＬ－３３（Ａｘｘｏｒａ、ＡＧ－４０Ｂ－００３８；ビオチン化）及び４．６５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）を含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、０．８Ｍフッ化カリウム（ＢＤＨ、１０３４４４Ｔ）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ　Ａ９５７６）を含有するダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）で構成されるアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で２時間、続いて４℃で１６時間インキュベートした後、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。データは先述のとおり式１～３を用いて分析した。陰性対照（非特異的結合）は、ビオチン化ＩＬ－３３／ストレプトアビジンクリプテートの組み合わせをストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義される。

【０８３５】

ＩＬ３３０１０１及びＩＬ３３０１８０エピトープ競合アッセイの結果をそれぞれ図８Ａ及び図８Ｂに示す。図１２Ａは、ビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するＩＬ３３０１０１　ｓｃＦｖ、ＩＬ３３０１０７　ｓｃＦｖ、ＩＬ３３０１４９　ｓｃＦｖ、ＩＬ３３００６５　ｓｃＦｖ、無関係のｓｃＦｖ、及びＩＬ３３０１８０　ｓｃＦｖとｍＡｂ　ＩＬ３３０１０１との競合結合を示す。これらの結果は、ＩＬ３３０１０１　ｓｃＦｖ、ＩＬ３３０１０７　ｓｃＦｖ、ＩＬ３３０１４９　ｓｃＦｖがＩＬ３３０１０１のビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合を競合的に阻害したことを示している。

【０８３６】

図１２Ｂは、生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）で評価したビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合に関するＩＬ３３０１８０、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１４９、ＩＬ３３００６５、及び無関係のｓｃＦｖとｍＡｂ　ＩＬ３３０１８０との競合結合を示す。これらの結果は、ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１４９、及びＩＬ３３００６５がＩＬ３３０１８０のビオチン化ヒトＩＬ－３３への結合を競合的に阻害しないことを示している。

【０８３７】

この方法を用いたエピトープビニングは、表１２に詳述するとおり、パネル１にＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０１０７及びＩＬ３３０１４９、パネル２にＩＬ３３００６５及び

パネル３にＩＬ３３０１８０を含む３つの抗体パネルを示す。

【０８３８】

【表２８】

表 12. エピトープビニングパネル

	IL330101 エピトープ競合アッセイにおける阻害	IL330180 エピトープ競合アッセイにおける阻害
IL330101	√	X
IL330107	√	X
IL330149	√	X
IL330065	X	X
IL330180	X	√

【０８３９】

実施例３　抗ＩＬ－３３　Ａｂ　ＩＬ３３０１０１の最適化

親和性成熟

標的突然変異誘発手法及び親和性ベースのファージディスプレイ選択を用いてＩＬ３３０１０１を最適化した。記載されるとおりの標準的な分子生物学的技術を用いた可変重鎖（ＶＨ）相補性決定領域２及び３（ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）及び軽鎖（ＶＬ）ＣＤＲ３のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって、リードクローンに由来する大規模ｓｃＦｖ－ファージライブラリを作成した（Ｃｌａｃｋｓｏｎ，Ｔ．ａｎｄ　Ｌｏｗｍａｎ，Ｈ．Ｂ．Ｐｈａｇｅ　Ｄｉｓｐｌａｙ－Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，２００４．Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ）。ヒト及びマウスＩＬ－３３に対してより高い親和性を有する変異体を選択するため、これらのライブラリを親和性ベースのファージディスプレイ選択に供した。選択は、実施例１及び２に記載されるとおりの試薬を使用して、本質的に以前記載されているとおり実施した（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｊ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ，１９９６．２５６：ｐ．７７－８８）。端的には、ｓｃＦｖ－ファージ粒子を溶液中の組換えビオチン化ヒトＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ；実施例１の「タンパク質修飾」に記載されるとおりビオチン化した）と共にインキュベートした。次に抗原に結合したｓｃＦｖ－ファージを製造者の推奨に従いストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）Ｍ－２８０）に捕捉した。次に選択されたｓｃＦｖ－ファージ粒子を以前記載されているとおりレスキューし（Ｏｓｂｏｕｒｎ，Ｊ．Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９６．２（３）：ｐ．１８１－９６）、この選択プロセスを交互漸減濃度のヒト又はマウスビオチン化ＩＬ－３３の存在下で（典型的には４ラウンドの選択にわたって５００ｎＭ～５００ｐＭ）繰り返した。

【０８４０】

未精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のｍＡｂへの結合の阻害

選択アウトプットからの代表的な複数の個別クローンを９６ウェルプレートで成長させた。ｓｃＦｖを細菌ペリプラズムで発現させて（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２００（１－２）：６９－７７（１９９７））、均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）ベースのＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイでそれらの阻害活性に関してスクリーニングした。このアッセイでは、ビオチン化ヒトＩＬ－３３又はマウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓへの結合に関して試料がＩＬ３３０１０１　ＩｇＧと競合した。かかるエピトープ競合アッセイは、抗ＩＬ－３３　ＩｇＧと同様のエピトープを認識する試験抗体試料がビオチン化ＩＬ－３３への結合に関してＩｇＧと競合し、アッセイシグナルの減少が生じることになるという原理に基づく。

【０８４１】

ビオチン化ヒト又はマウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）ＨｉｓのＩＬ３３０１０

１への結合の阻害に関して、５マイクロリットルの試料を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより未精製抗ＩＬ－３３　ｓｃＦｖ試料を試験した。次に、４０ｎＭ抗ヒトＦｃ　ＸＬ６６５検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＨＦＣＸＬＢ）と組み合わせた１２ｎＭ　ＩＬ３３０１０１を含有する溶液をヒトＩＬ－３３アッセイ用に調製し、及び４０ｎＭ抗ヒトＦｃ　ＸＬ６６５検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＨＦＣＸＬＢ）と組み合わせた２ｎＭ　ＩＬ３３０１０１をマウスアッセイ用に調製した。２．５マイクロリットルをアッセイプレートに加えた。これに続いて、ヒトアッセイ用の４．６ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた１８ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ、ＡＧ－４０Ｂ－００３８）を含有する２．５マイクロリットルの溶液又はカニクイザルアッセイ用の４．６ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた２ｎＭビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓを含有する溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で４時間、続いて４℃で１６時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。

【０８４２】

エピトープ競合アッセイがその感度限界に達したため、未精製ｓｃＦｖ試料の試験には、中間最適化ｍＡｂ　ＩＬ３３０２５９を使用したアッセイを用いた。ビオチン化ヒトＩＬ－３３又はビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）ＨｉｓのＤｙＬｉｇｈｔ標識ＩＬ３３０２５９結合の阻害に関して、５マイクロリットルの各試料を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより未精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。次に、２０ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識ＩＬ３３０２５９を含有する溶液をヒトＩＬ－３３アッセイ用に調製し、及び４ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識ＩＬ３３０２５９を含有する溶液をマウスアッセイ用に調製して、２．５マイクロリットルをアッセイプレート（製造者の指示に従いキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、５３０５１）を使用してＩｇＧ標識した）に加えた。これに続いて、６ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた２０ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ、ＡＧ－４０Ｂ－００３８）又は１．６ｎＭビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓを含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で４時間、続いて４℃で１６時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて

、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。

【０８４３】

精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＭＡｂへの結合の阻害

ＩＬ３３０１０１と比較して未精製ペリプラズム抽出物としてＩＬ－３３：ｍＡｂ相互作用に対するより大きい阻害効果を示した単鎖ＦｖクローンをＤＮＡシーケンシングにかけた（Ｏｓｂｏｕｒｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２（３）：１８１－９６（１９９６）；Ｖａｕｇｈａｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４（３）：３０９－１４（１９９６））。ユニークなｓｃＦｖを再び細菌で発現させて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した（国際公開第０１／６６７５４号パンフレットに記載されるとおり）。これらの試料の効力について、上記に記載したとおり、但しビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓアッセイを追加して（ビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓは１２ｎＭ濃度で加えた）、ビオチン化ヒトＩＬ－３３、ビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ又はビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓへの結合に関して精製調製物の希釈系列をＩＬ３３０１０１　ＩｇＧと競合させることにより決定した。

【０８４４】

図１３：ビオチン化ヒトＩＬ－３３がＩＬ３３０１０１に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０２５９による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０８４５】

ＩＬ－３３：ｍＡｂ相互作用の阻害能がＩＬ３３０１０１よりも高度であった精製ｓｃＦｖ調製物を、ＩｇＧフォーマットへの変換に選択した。ＩｇＧ発現及び精製方法は実施例１に記載される。

【０８４６】

エピトープ競合アッセイがその感度限界に達したため、精製ｓｃＦｖ試料の試験には、中間最適化ｍＡｂ（ＩＬ３３０２５９）を使用したアッセイを用いた。精製抗ＩＬ－３３抗体試料について、上記に記載したとおり、但しビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓアッセイを追加して（ビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓは１２ｎＭ濃度で加えた）、ビオチン化ヒトＩＬ－３３、ビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ又はビオチン化カニクイザルＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ　ＩＬ－３３のＩＬ３３０２５９への結合の阻害に関して試験した。

【０８４７】

配列及びエピトープ競合データに基づき、選択されたＶＨ及びＶＬアウトプットを標準的な分子生物学的技術によって組み換えることにより、クローンがランダムな対のＶＨ及びＶＬ配列を含むライブラリ（例えば、ＶＨ　ＣＤＲ２／ＶＬ　ＣＤＲ３及びＶＨ　ＣＤＲ３／ＶＬ　ＣＤＲ３ライブラリ）を形成した。或いは、ＶＨ　ＣＤＲ３及びＶＬ　ＣＤＲ３配列をランダムに対にして、改良された変異体のプールから選択された特定のＶＨ　ＣＤＲ２配列と組み換えることにより、３つ全てのＣＤＲが非親であるライブラリを作成した。典型的には１０ｎＭ～１０ｐＭの漸減交互濃度のヒト及びマウスビオチン化ＩＬ－３３を用いた５ラウンドのアフィニティ選択を全ての組換えライブラリに対して実施して、反応速度が向上したｓｃＦｖ配列を同定した。或いは、４ラウンドの選択の間に漸増する時間（例えば３０分、１時間、２時間又は４時間）にわたって１０００×非ビオチン化ＩＬ－３３の存在下で一定濃度のビオチン化ＩＬ－３３（例えば、１ｎＭ、１００ｐＭ又は３００ｐＭ）を使用して組換えライブラリを選択することにより－当該技術分野において「オフ速度」又は「競合」選択として知られるプロセス－、反応速度が向上したｓｃＦｖを同定した。

【０８４８】

先述のとおりＨＴＲＦ（登録商標）エピトープ競合アッセイにおいてＩＬ３３０１０１親抗体又はＶＨ　ＣＤＲ２最適化抗体ＩＬ３３０２５９に対する標識ｈｕＩＬ－３３の結合を阻害する能力に関して試料を再度スクリーニングした。ＩＬ３３０１０１と比較したとき有意に向上した阻害効果を示したｓｃＦｖをＤＮＡシーケンシングにかけ、更なる特徴付けのためユニークな変異体を精製ｓｃＦｖとして作製した。阻害性ｓｃＦｖを実施例１に記載されるとおり全免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）抗体フォーマットに変換した。

【０８４９】

或いは、個々のユニークなＶＨ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ３及びＶＬ　ＣＤＲ３配列を特異的且つ合理的に組み換えて、ＩｇＧとして直接作製した。この例では、いかなる追加的なアフィニティ選択もなしに、ＩｇＧを反応速度の向上に関して試験した。

【０８５０】

あらゆる戦略から反応速度が向上した抗体が同定された。これらはＩＬ３３０２５９、ＩＬ３３０３７７、ＩＬ３３０３８８、ＩＬ３３０３９６、ＩＬ３３０３９８及びＨ３３８Ｌ２９３によって例示される。

【０８５１】

ＩＬ３３０１０１親及び最適化抗ＩＬ－３３抗体のV_H及びV_Lドメインのアミノ酸配列をＩＭＧＴデータベースの既知のヒト生殖系列配列とアラインメントし（Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．Ｐ．ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００９．３７（Ｄａｔａｂａｓｅ　ｉｓｓｕｅ）：Ｄ１００６－Ｄ１０１２）、配列類似性によって最も近縁の生殖細胞系列を同定した。ＩＬ３３０１０１抗体系統のV_Hドメインについて、これはＩＧＨＶ３－２１／ＩＧＨＪ２であった。V_Lドメインについて、それはＩＧＬＶ３－２５／ＩＧＬＪ３であった。変化しないままであったＶｅｒｎｉｅｒ残基（Ｆｏｏｔｅ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ，１９９２．２２４：ｐ．４８７）を考慮しない場合、V_Hドメインのフレームワークに変化は必要なく、V_Lフレームワークに４つの変化が必要であった（Ｖ３Ｅ、Ｔ５Ｍ、Ａ４５Ｖ及びＶ１０４Ｌ；Ｋａｂａｔ付番）。これらの位置を、適切な突然変異誘発プライマーによる標準的な部位特異的突然変異誘発技法を用いて指示どおり変更した。このようにして生殖細胞系列化した抗体は、配列表に接尾辞「ｆｇｌ」を付して掲載する。抗体ＩＬ３３０２５９、Ｈ３３８Ｌ２９３、ＩＬ３３０３７７、ＩＬ３３０３８８、ＩＬ３３０３９６、及びＩＬ３３０３９８の様々な領域に対応する配列番号を表１３に示す。

【０８５２】

【表２９】

表 13. 抗 IL-33 抗体配列

IgG1	VH 配列番号	VL 配列番号	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
IL330101_fgl	112	117	配列番号 113 配列番号 114 配列番号 115	配列番号 118 配列番号 119 配列番号 120
IL330259	152	157	配列番号 153 配列番号 154 配列番号 155	配列番号 158 配列番号 159 配列番号 160
IL330259_fgl	162	167	配列番号 163 配列番号 164 配列番号 165	配列番号 168 配列番号 169 配列番号 170
H338L293	172	177	配列番号 173 配列番号 174 配列番号 175	配列番号 178 配列番号 179 配列番号 180
H338L293_fgl	182	187	配列番号 183 配列番号 184 配列番号 185	配列番号 188 配列番号 189 配列番号 190
IL330377	192	197	配列番号 193 配列番号 194 配列番号 195	配列番号 198 配列番号 199 配列番号 200
IL330377_fgl	202	207	配列番号 203 配列番号 204 配列番号 205	配列番号 208 配列番号 209 配列番号 210
IL330388	212	217	配列番号 213 配列番号 214 配列番号 215	配列番号 218 配列番号 219 配列番号 220
IL330388_fgl	222	227	配列番号 223 配列番号 224 配列番号 225	配列番号 228 配列番号 229 配列番号 230
IL330396	232	237	配列番号 233 配列番号 234 配列番号 235	配列番号 238 配列番号 239 配列番号 240
IL330396_fgl	242	247	配列番号 243 配列番号 244 配列番号 245	配列番号 248 配列番号 249 配列番号 250
IL330398	252	257	配列番号 253 配列番号 254 配列番号 255	配列番号 258 配列番号 259 配列番号 260
IL330398_fgl	262	267	配列番号 263 配列番号 264 配列番号 265	配列番号 268 配列番号 269 配列番号 270

【０８５３】

精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＭＡｂへの結合の阻害

抗ＩＬ－３３抗体がＤｙＬｉｇｈｔ標識ＩＬ３３０１０１　ＩｇＧに対するビオチン化ヒトＩＬ－３３、ビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ又はカニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓの結合を阻害する能力を生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。

【０８５４】

ビオチン化ヒトＩＬ－３３、ビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉ

ｓ又はビオチン化カニクイザルＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ　ＩＬ－３３のＤｙＬｉｇｈｔ標識ＩＬ３３０１０１結合の阻害に関して、５マイクロリットルの各濃度の試料を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。次に、４０ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識ＩＬ３３０１０１を含有する溶液を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレート（製造者の指示に従いキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、５３０５１）を使用して標識した）に加えた。これに続いて、４．６ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた４０ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ、ＡＧ－４０Ｂ－００３８）、２．５ｎＭビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ又は１２ｎＭビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓを含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で４時間、続いて４℃で１６時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。

【０８５５】

図１４Ａ：ビオチン化ヒトＩＬ－３３がＩＬ３３０１０１に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ＩｇＧ１抗体ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０２５９による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０８５６】

エピトープ競合アッセイがその感度限界に達したため、精製ＩｇＧ試料の試験には、中間最適化ｍＡｂ　ＩＬ３３０２５９を使用したアッセイを用いた。これは、精製ｓｃＦｖの試験について記載するとおりである。

【０８５７】

ＩＬ３３０２５９エピトープ競合アッセイがその感度限界に達したため、精製ＩｇＧ試料の試験には、最適化ｍＡｂ（Ｈ３３８Ｌ２９３）を使用した第３のアッセイを用いた。ビオチン化ヒトＩＬ－３３、ビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ又はビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）ＨｉｓのＤｙＬｉｇｈｔ標識Ｈ３３８Ｌ２９３結合の阻害に関して、５マイクロリットルの各試料を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。次に、２０ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識Ｈ３３８Ｌ２９３を含有する溶液を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレート（製造者の指示に従いキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、５３０５１）を使用して標識した）に加えた。これに続いて、４．６ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた４ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ、ＡＧ－４０Ｂ－００３８）、０．８ｎＭビオチン化マウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ又は１．６ｎＭビオチン化カニクイザルＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓを含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを

室温で４時間、続いて４℃で１６時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。

【０８５８】

図１４Ｂ：ビオチン化ヒトＩＬ－３３がＨ３３８Ｌ２９３に結合することによって生じるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩｇＧ１抗体Ｈ３３８Ｌ２９３、ＩＬ３３０３９６及びＩＬ３３０３８８による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０８５９】

ＩＬ－３３抗体によるＨｕｖｅｃ　ＩＬ－６産生の阻害

ＨｕｖｅｃからのＩＬ－３３刺激ＩＬ－６産生を阻害する能力に関して、実施例２に記載されるとおり抗体を評価した。

【０８６０】

図１５Ａは、漸増濃度の抗体（ＩＬ３３０１０１、ＩＬ３３０３７７、Ｈ３３８Ｌ２９３、ＩＬ３３０３８８、ＩＬ３３０３９６、ＩＬ３３０３９８）によるＩＬ－６産生の低下を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は％最大応答である）。抗体の精製ＩｇＧ調製物はＩＬ－６活性を１００％阻害した市販のポリクローナル抗体と比較して最大約７０％阻害した。

【０８６１】

ＩＬ－３３抗体によるマスト細胞ＩＬ－６産生の阻害

ヒト臍帯血由来マスト細胞からのＩＬ－３３刺激ＩＬ－６産生を阻害する能力に関して、実施例２に記載されるとおり抗体を評価した。

【０８６２】

図１５Ｂは、漸増濃度の抗体（ＩＬ３３０１０１、Ｈ３３８Ｌ２９３、ＩＬ３３０３８８、ＩＬ３３０３９６）によるＩＬ－６産生の低下を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は％最大応答である）。抗体の精製ＩｇＧ調製物は、陰性対照抗体と比較してＩＬ－６活性を１００％阻害した。

【０８６３】

ＨＵＶＥＣ　ＩＬ－６産生及びマスト細胞ＩＬ－６産生のＩＣ５０結果を表１４に示す。

【０８６４】

【表３０】

表 14. 最適化抗体の例示的効力

クローン	IgG1 幾何平均 (95% CI) IC50 (nM)	
	Huvec IL-6 産生	マスト細胞 IL-6 産生
IL330101	193	93
IL330377_FGL	6.6	1.3
H338L293	1.9	1.7
IL330388_FGL	2.1	1.2
IL330396_FGL	2.8	1.5
IL330398_FGL	1.5	0.9

【０８６５】

抗体薬理学

実施例２に記載する方法を用いて、臍帯血由来マスト細胞からのＩＬ－６産生を漸増濃度のＩＬ－３３（Ａｄｉｐｏｇｅｎ）によって誘導した。この用量反応を漸増濃度のＨ３３８Ｌ２９３又はＩＬ３３０３８８の存在下で行い、ＩＬ－３３用量反応曲線の右方シフトを生じさせた。ＧｒａｐｈＰａｄ　ＰＲＩＳＭソフトウェア（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して抗体の存在下又は非存在下におけるＩＬ－３３のＥＣ$_{50}$値を計算し、用量比（ＤＲ）を計算した。データはｌｏｇ［抗体］Ｍ（ｘ軸）対ｌｏｇ［ＤＲ－１］（ｙ軸）としてプロットした。これは明らかに、アロステリックな調節因子に特徴的な非競合的プロファイル（カーブしたプロット）を示す。これを調べるため、各実験のデータを正規化して単一のデータセットに結合した。Ｐｒｉｓｍ　Ｇｒａｐｈｐａｄソフトウェア並びに決定されたＫ$_b$及びαの値を使用してアロステリックモデルをフィッティングした。αの値は調査した両方のリードについて同様で、約０．０２のα値（即ち抗体が結合したときのＩＬ－３３親和性／効力の最大の低下が約５０倍である）が示された。機能的親和性（Ｋ$_b$）をＨ３３８Ｌ２９３（約４．２ｎＭ）及びＩＬ３３０３８８（約１．７ｎＭ）について推定することができる。

【０８６６】

図１６は、マスト細胞ＩＬ－６産生アッセイにおけるＩＬ３３０３８８及びＨ３３８Ｌ２９３のシルド解析を示す。両方の抗体とも、アロステリックな調節因子のプロファイルを呈する。

【０８６７】

ＢＩＡｃｏｒｅを用いたＩＬ－３３抗体の結合親和性計算

ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３に対する例示的結合メンバーの精製ＩｇＧ試料の結合親和性を、ＢＩＡｃｏｒｅ　２０００（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用した溶液親和性によって決定した。ビオチン化ＩＬ３３表面をストレプトアビジン（ｓｔｒｅｐｔａｖｉｎ）コートセンサーチップ（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　カタログ番号ＢＲ－１０００－３２）に固定化した。抗ＩＬ３３抗体を様々な濃度の非標識ＩＬ３３と共にインキュベートし、２５℃で４８時間平衡化させた。試料をＩＬ３３チップ上に流して、抗体の標準曲線と比較した応答を計測することにより、遊離抗体の量を決定した。ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアの溶液親和性フィットを用いて親和性を決定した。ヒト、カニクイザル又はマウスＩＬ－３３に対する抗体ＩＬ３３０１０１、Ｈ３３８Ｌ２９３、ＩＬ３３０３８８、ＩＬ３３０３９６の結合の親和性を表１５に示す。

【０８６８】

【表３１】

表 15: 例示的結合メンバーの BIAcore 溶液親和性

抗体	抗原	KD (nM)
IL3300101	ヒト IL-33 FLAG®-His	3.20E-06
H338L293	ヒト IL-33 FLAG®-His	5.90E-10
H338L293	カニクイザル IL-33 FLAG®-His	5.45E-10
H338L293	マウス IL-33 FLAG®-His	4.52E-10
IL3300388	ヒト IL-33 FLAG®-His	3.00E-10
IL3300388	カニクイザル IL-33 FLAG®-His	2.92E-10
IL3300388	マウス IL-33 FLAG®-His	8.82E-11
IL3300396	ヒト IL-33 FLAG®-His	5.93E-10

【０８６９】

実施例４　ＩＬ－３３の酸化還元調節

試薬

ヒトＩＬ－３３の成熟成分（アミノ酸１１２～２７０）；受託番号（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ）Ｏ９５７６０をコードするｃＤＮＡをプライマー伸長ＰＣＲによって合成し、ｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４０４（ＤＮＡ２．０）にクローニングした。コード配列を、タンパク質のＮ末端に１０ｘｈｉｓ、Ａｖｉｔａｇ、及び第Ｘａ因子プロテアーゼ切断部位（ＭＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＡＡＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥＡＡＩＥＧＲ）を含有するように修飾した。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞を形質転換することにより、Ｎ末端タグ付加Ｈｉｓ１０／Ａｖｉｔａｇ　ＩＬ３３－０１（ＷＴ、配列番号６３２）を作成した。形質転換細胞を自己誘導培地（Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）Ａｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　１、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７１３００－４）中３７℃で１８時間培養した後、細胞を遠心によって回収し、－２０℃で保存した。完全プロテアーゼ阻害薬カクテル錠（Ｒｏｃｈｅ、１１６９７４９８００１）、２．５ｕ／ｍｌ　Ｂｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ（ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０７４６－３）及び１ｍｇ／ｍｌ組換えリゾチームを含有するＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０９２１－５）中に細胞を再懸濁した。細胞ライセートを７５，０００×ｇで４℃で２時間遠心することにより清澄化した。上清から、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール中におけるニッケルアフィニティークロマトグラフィーによってＩＬ－３３タンパク質を精製し、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾールに溶出させた。リン酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．４中Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００　ＧＬカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、ＩＬ－３３を更に精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。純粋ＩＬ－３３を含有する画分をプールし、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定によって濃度を計測した。最終試料をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。

【０８７０】

脱タグ化ＩＬ－３３（ＢＫ３４９）を作成するため、Ｎ末端タグ付加Ｈｉｓ１０／Ａｖｉｔａｇ　ＩＬ３３－０１を２×ＤＰＢＳ緩衝液中タンパク質１ｍｇ当たり１０単位の第Ｘａ因子（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　２７－０８４９－０１）と共に室温で１時間インキュベートした。ＳＥＣクロマトグラフィーを用いて、２×ＤＰＢＳ中Ｓ７５カラム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　２８－９８９３－３３）で流量を１ｍｌ／分として脱タグ化ＩＬ３３を精製した。

【０８７１】

表１６に概要を示す他の試薬は実施例１に記載されるとおり作成した。

【０８７２】
【表３２】

表 16. IL-33 試薬

試薬	供給業者	カタログ番号/記号	配列番号
ヒト IL-33 Flag®His	インハウス		配列番号 627
マウス IL-33 Flag®His	インハウス		配列番号 628
ヒト His10/Avitag IL33-01	インハウス		配列番号 632
ヒト IL33-01 脱タグ化	インハウス	BK349	
ヒト IL-33	Axxora / Alexis	ALX-522-098	
マウス IL-33	Peprotech	210-33	
マウス IL-33	R&D systems	3626/ML	

【０８７３】
タンパク質修飾
本明細書で使用されるＩｇＧ及び修飾受容体タンパク質は、実施例１に記載されるとおりＥＺ　ｌｉｎｋ　スルホ－ＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｔｈｅｒｍｏ／Ｐｉｅｒｃｅ、２１３３５）を使用して遊離アミンを介してビオチン化した。本明細書で使用されるＩＬ－３３タンパク質は、ＥＺ　ｌｉｎｋ　ビオチン－ＢＭＣＣ（Ｐｅｒｂｉｏ／Ｐｉｅｒｃｅ、製品番号２１９００）を使用して遊離システインを介してビオチン化した。
【０８７４】
ＩＬ－３３はインビトロで急速に活性を失う
ＨＵＶＥＣシグナル伝達アッセイ（３０分）及びＩＬ－６産生アッセイ（１８～２４時間）でＩＬ－３３活性を計測した（これらの方法については、それぞれ実施例１及び２に記載される）。
【０８７５】
図１７は、ＨＵＶＥＣシグナル伝達アッセイ（３０分）及びＩＬ－６産生アッセイ（１８～２４時間）で計測したヒトＩＬ－３３、システイン－ビオチン化ＩＬ－３３又は細胞培養培地で前処理したＩＬ－３３の活性を示す。図１７Ａは、ＮＦｋＢ又はＩＬ－６アッセイによって計測したときのヒトＩＬ－３３活性（Ａｄｉｐｏｇｅｎ）の比較を示す（ｘ軸はモル濃度単位のヒトＩＬ－３３濃度であり、ｙ軸はパーセント最大応答である）。ＩＬ－３３は、短時間（３０分）アッセイと比較して一晩では効力が有意に低かった。システイン残基によるヒトＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓビオチン化によっては、短時間アッセイ（３０分）とより長時間のアッセイ（一晩）との間で活性は失われなかった（図１７Ｂ）。この現象を調べるため、ＩＬ－３３（ＢＫ３４９）を細胞培養培地（ＥＧＭ－２　ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ　Ｋｉｔ　Ｓｕｐｐｌ．＆　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒｓ（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－４１７６）含有ＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－３１５６））で１８時間前処理し、次にＮＦｋＢシグナル伝達を誘導する能力に関して未処理ＩＬ－３３と比較した。培養培地で前処理したＩＬ－３３は、有意な活性喪失を呈した（図１７Ｃ）。
【０８７６】
ＩＬ－３３のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析
ＩＬ－３３タンパク質の潜在的変化を調べるため、ＰＢＳ／０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）又はイスコブ変法ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）処理したヒトＩＬ－３３（ＢＫ３４９又はヒトＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓ）及びマウスＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓを還元又は非還元条件下でのＳＤＳ　ＰＡＧＥ電気泳動法によって分析した。試料を１×ＮｕＰＡＧＥゲルローディング緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に構成し、９０℃で３分間変性させた。還元試料は２％β－メルカプトエタノールを含有した。製造者の指示に従いＭＯＰＳ泳動緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含有する

ＮｕＰＡＧＥ　Ｎｏｖｅｘ１２％ビストリスｍｉｎｉゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で試料を泳動させた。還元試料と非還元試料とは別個のゲルで泳動させた。各レーンにつき５００ｎｇのＩＬ－３３をロードした。ゲルを振盪プラットフォーム上ｄｄＨ２０で３×５分間洗浄し、次にＥｚＢｌｕｅ（クマシーブリリアントブルーＧ－２５０ベースのゲル染色試薬、Ｓｉｇｍａ　Ｇ１０４１）を使用して１時間染色した。ゲルをｄＨ２Ｏで脱染し、Ｅｐｓｏｍスキャナを使用してスキャンした。

【０８７７】

図１８は、イスコブ変法ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）による処理前又は処理後の還元又は非還元条件下におけるヒト又はマウスＩＬ－３３のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。非還元条件下においてのみ、ＩＭＤＭによる処理後にＩＬ－３３の見かけの分子量の差が観察されたことから、ヒト及びマウスＩＬ－３３の両方について酸化還元関連修飾の存在が示唆される。図１８Ａは、非還元条件下においてのみ観察された、ＩＭＤＭによる処理後のヒトＩＬ－３３（ＢＫ３４９）の見かけの分子量の差を示す。図１８Ｂは、非還元条件下における非ビオチン化対ビオチン化ヒトＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓを示す。ＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）ＨｉｓについてはＩＭＤＭ処理後に見かけの分子量の差が観察されたが、システインビオチン化（ｂｉｏｔｎｙｌａｔｅｄ）ＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓでは観察されなかった。図１８Ｃは、非還元条件下においてのみ観察された、ＩＭＤＭによる処理後のマウスＩＬ－３３　Ｆｌａｇ（登録商標）Ｈｉｓの見かけの分子量の差を示す。

【０８７８】

質量分光分析及びジスルフィドマッピング

培地処理型のヒトＩＬ－３３を更なる分析のため精製した。ヒトＩＬ－３３（ＢＫ３４９）を６０％ＩＭＤＭ培地と共に又はＰＢＳ中で３００ｕｇ／ｍｌの最終タンパク質濃度において３７℃で１８時間インキュベートした。１８時間後、ＡＫＴＡｘｐｒｅｓｓ　ＦＰＬＣシステム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用した２×ＤＰＢＳ中Ｓ７５　１６：６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘカラム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　２８－９８９３－３３）でのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を用いて培地処理ＩＬ３３を培地成分から精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析し、凝集していない純粋画分をプールして、ＬＣ－ＭＳによって分析した。

【０８７９】

図１９は、ＳＥＣによるＩＭＤＭ処理ヒトＩＬ－３３の精製を示す。単量体画分を更なる分析のため収集した。

【０８８０】

ＬＣ－ＭＳ

Ｓｙｎａｐｔ　Ｇ１四重極飛行時間型（ＱＴｏＦ）質量分析計（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＵＳ）に結合したＡｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣを用いて逆相（ＲＰ）ＬＣ－ＭＳ分析を実施した。１０ｍＭトリスＨＣｌ　ｐＨ８に１ｍｇ／ｍｌで希釈した１μｇの精製タンパク質を、６５℃に保った５０ｍｍ×２．１ｍｍ、１．７μｍ粒径ＢＥＨ３００　Ｃ４分析カラム（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＵＳ）に注入した。５分間のバイナリーグラジエントを用いて０．１５ｍＬ／分の一定流量でタンパク質を溶出させた；溶媒Ｂは最初に５％から９５％まで１分かけて増加し、２分かけて２０％まで低下し、更に２分かけて５％に戻った。カラムを洗浄した後、続いて高い（９５％）溶媒Ｂと低い（５％）溶媒Ｂとの間を５分間揺動させることにより注入した。溶媒Ａ（水）及びＢ（アセトニトリル）に０．０１％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸及び０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸を補足した。５００～４５００ｍ／ｚの間でスペクトルを取得した。主要な装置パラメータには、＋ｖｅイオン化モード、ソース電圧：３．４ｋＶ、試料コーン電圧：５０Ｖ、ソース温度：１４０℃、脱溶媒和温度：４００℃が含まれた。ＢｉｏＰｈａｒｍａＬｙｎｘ（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＵＳ）を使用して荷電状態エンベロープをデコンボリューションした。

【０８８１】

図２０は、ＬＣ－ＭＳによって決定したＰＢＳ処理対ＩＭＤＭ処理ＩＬ－３３のインタクトな質量を示す。ＩＭＤＭ処理ＩＬ－３３はＰＢＳ処理ＩＬ－３３と比較して４Ｄａの損失を呈し、これは２つのジスルフィド結合の形成と整合した。

【０８８２】

ジスルフィド結合マッピング

各試料につき５０μｇのタンパク質を、１００ｍＭリン酸ナトリウム、１ｍＭ　Ｎ－エチルマレイミド、ｐＨ７．０緩衝液中３ｍｇ／ｍｌで調製し、室温で２０分間インキュベートした。乾燥試料を７ＭグアニジンＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭリン酸ナトリウム中に再懸濁し、３７℃で３０分間インキュベートした。変性タンパク質を０．３ｍｇ／ｍｌに希釈し、３７℃で２Ｍグアニジン（Ｇｕａｎａｄｉｎｅ）、１００ｍＭリン酸ナトリウム、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．０中１：５０のＥ：Ｓ比でＧｌｕ－Ｃによって消化した。２時間後、Ｌｙｓ－Ｃの第２の等量のアリコートを加えた。更に２時間後、消化物を分けた；還元分析用に、消化物を５０ｍＭジチオスレイトールと共に室温で１５分間インキュベートした。Ｓｙｎａｐｔ　Ｇ２　ＱＴｏＦ質量分析計（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＵＳ）に結合したＡｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣを使用して還元及び非還元試料をＲＰ　ＬＣ－ＭＳによって分析した。各試料につき５ｕｇのＬｙｓ－Ｃ消化物を、５５℃に保った１５０ｍｍ×２．１ｍｍ、１．７μｍ粒径ＢＥＨ３００　Ｃ１８分析カラム（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＵＳ）に注入した。７５分間のバイナリーグラジエントを用いて０．２ｍＬ／分の一定流量でペプチドを溶出させた；溶媒Ｂは０％から３５％まで増加した。カラムを洗浄した後、続いて高い（９５％）溶媒Ｂと低い（５％）溶媒Ｂとの間を５分間揺動させることにより注入した。溶媒Ａ（水）及びＢ（アセトニトリル）には０．０２％（ｖ／ｖ）トリフルオロ酢酸を補足した。データ独立取得モードを使用して、５０～２０００ｍ／ｚの間でスペクトルを取得した。ＢｉｏＰｈａｒｍａＬｙｎｘ（Ｗａｔｅｒｓ、Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＵＳ）を使用して低エネルギー及び高エネルギースペクトルを処理した。

【０８８３】

図２１は、ＩＭＤＭ処理ヒトＩＬ－３３のジスルフィドマッピングを示す。図２１Ａは、ＤＳＢ　ＩＬ－３３の非還元及び還元Ｌｙｓ－Ｃペプチドマッピング分析からの結合したデコンボリューション質量スペクトルを示す。図２１Ｂは、システイン含有ペプチドの隔離したスペクトルを示す。還元及び非還元試料にユニークなペプチドは、それぞれ緑色及び青色で強調表示する。データは、２つのジスルフィド架橋の形成と一致した。同定された１つの種は、それぞれシステインＣ２０８～Ｃ２４９及びＣ２２７～Ｃ２３２の間に架橋を有した。しかしながら、優勢なピークは解かれておらず、他の種が存在し得る。図２１Ｃは、ジスルフィド結合したＩＬ－３３の非還元及び還元Ｌｙｓ－Ｃペプチドマッピング分析によって同定されたジスルフィド結合ペプチドの配列を示す。ジスルフィド連結は２つのハイフン（－－）によって表す。Ｌｙｓ－Ｃの誤切断は角括弧によって表す。

【０８８４】

ジスルフィド結合ＩＬ－３３のＮＭＲ分析

ＩＬ－３３の既報告の構造に基づけば（Ｌｉｎｇｅｌ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　１７，１３９８－１４１０（２００９）；Ｌｉｕ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１０，１４９１８－１４９２３（２０１３））、システイン残基は大幅なコンホメーション変化なしにジスルフィド結合を起こすほど十分には近接していない。これを調べるため、ＮＭＲ異核多重量子コヒーレンス（ＨＭＱＣ）分析を実施した。

【０８８５】

^{15}Ｎ－ＩＬ－３３タンパク質の作製

Ｎ末端６Ｈｉｓタグ及びＴＥＶプロテアーゼ切断部位を有する野生型ＩＬ－３３（配列番号６３３）をコードするＤＮＡを使用して、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１　Ｇｏｌｄ細胞を形質転換した。５ｇ／Ｌの^{15}Ｎ－ＩｓｏＧｒｏ（商標）粉末を補足したＭ９最少培地中において形質転換細胞を３７℃で培養し、０．６～０．８のＯＤ６００ｎｍに達

したところで１００ｍＭ　ＩＰＴＧを添加することによりタンパク質発現を誘導した。培養を１８℃で更に２０時間継続した後、細胞を遠心によって回収し、－８０℃で保存した。完全プロテアーゼ阻害薬錠（Ｒｏｃｈｅ、１１６９７４９８００１）、２．５Ｕ／ｍｌ　Ｂｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ（ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０７４６－３）及び１ｍｇ／ｍｌ組換えリゾチームを含有する５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に細胞を再懸濁した。Ｃｏｎｓｔａｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍｓ細胞破壊器を２５ｋｐｓｉで使用して再懸濁細胞を溶解し、４℃、７５，０００×ｇで２時間遠心することによって清澄化した。上清から、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中におけるニッケルアフィニティークロマトグラフィーによってＩＬ－３３を精製し、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に溶出させた。溶出したタンパク質をＴＥＶプロテアーゼと共にインキュベートし、４℃で５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に透析した。５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中におけるニッケルアフィニティークロマトグラフィーによって脱タグ化タンパク質を非切断ＩＬ－３３と分離した。ＡＫＴＡｘｐｒｅｓｓ　ＦＰＬＣシステム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、２０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ６．５、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中におけるＨｉＬｏａｄ　１６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５カラム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによってＩＬ－３３を更に精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。

【０８８６】

純粋ＩＬ－３３を含有する画分をプールし、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定によって濃度を計測した。Ａｍｉｃｏｎ　１０，０００分子量カットオフスピンコンセントレータを使用して、タンパク質をＮＭＲ分析用に９．５ｍｇ／ｍｌの最終濃度となるように濃縮した。

【０８８７】

ＰＢＳ　ｐＨ７．４中の精製^{15}Ｎ標識タンパク質を６０％ＩＭＤＭ培地と共に０．２８ｍｇ／ｍｌの最終タンパク質濃度において３７℃で１８時間インキュベートした。１８時間後、Ａｍｉｃｏｎ　１０，０００分子量カットオフスピンコンセントレータを使用して、タンパク質を０．８ｍｇ／ｍｌの濃度となるように濃縮した。次に、ＰＢＳ　ｐＨ７．４中ＨｉＬｏａｄ　１６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５を使用して、タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析し、凝集していない純粋画分をプールした。最後にＡｍｉｃｏｎ　１０，０００分子量カットオフスピンコンセントレータを使用して、タンパク質をＮＭＲ分析用に１．８ｍｇ／ｍｌの濃度（１００μＭ）となるように濃縮した。

【０８８８】

ＮＭＲ分析

ＮＭＲスペクトルは、Ｚ軸グラジエントの５ｍｍ　ＴＣＩ　Ｃｒｙｏｐｒｏｂｅを備えたＴｏｐｓｐｉｎ　２．３を実行するＢｒｕｋｅｒ　Ａｖａｎｃｅ　６００ＭＨｚ分光計において２９８Ｋで記録した。５％重水を添加することにより試料のロックを可能にした上で、記載のとおり^{15}Ｎ標識ＩＬ３３　ＷＴ試料を調製した。ｓｏｆａｓｔ　ＨＭＱＣパルスシーケンスを用いて（Ｓｃｈａｎｄａ，Ｐ；Ｂｒｕｔｓｃｈｅｒ，Ｂ；Ｖｅｒｙ　ｆａｓｔ　ｔｗｏ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　ＮＭＲ　ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ　ｆｏｒ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｄｙｎａｍｉｃ　ｅｖｅｎｔｓ　ｉｎ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｎ　ｔｈｅ　ｔｉｍｅ　ｓｃａｌｅ　ｏｆ　ｓｅｃｏｎｄｓ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２００５）１２７，８０１４－５）、（Ｆ２×Ｆ１）１０２４×６４複合ポイント（ｓｔａｔｅｓ－ＴＰＰＩモード）、９６１５×１

４６０Ｈｚ掃引幅、５３．４ｍｓ×４３．８ｍｓ取得時間として例示的な^{1}Ｈ－^{15}Ｎ相関スペクトルを取得した。

【０８８９】

図２２Ａは、ＩＭＤＭ処理ＷＴ　ＩＬ３３のＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析を示す。ＮＭＲのための濃縮前及び濃縮後の還元及び非還元ＩＭＤＭ処理ＷＴ　ＩＬ３３を示すＳＤＳ　ＰＡＧＥ。

【０８９０】

図２２Ｂは、ＷＴ　ＩＬ３３のＮＭＲ分析を示す。ＩＭＤＭ培地処理前及び処理後の０．１ｍＭ　^{15}Ｎ標識ＩＬ３３　ＷＴの^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　ＨＭＱＣスペクトルのオーバーレイを、それぞれ黒色及び赤色でプロットしている。２つのスペクトルの比較は、ＩＭＤＭ処理後の、全く異なる、秩序の低い構造を示している。

【０８９１】

円偏光二色性（ＣＤ）分光法

コンホメーション変化を確認して更に調べるため、円偏光二色性（ＣＤ）分光分析を実施した。Ｊａｓｃｏ－８１５機器（Ｅａｓｔｏｎ、Ｍａｒｙｌａｎｄ）で遠紫外及び近紫外ＣＤ分析を実施した。遠紫外ＣＤについては、緩衝溶液１０ｍＭリン酸塩ｐＨ＝６．９中２０℃で、ｒｅｄＩＬ－３３及びＤＳＢ　ＩＬ－３３についてそれぞれ０．１４ｍｇ／ｍＬ及び０．１２ｍｇ／ｍＬの試料濃度で１ｍｍパスレングスキュベットにおいて波長範囲１８０～２６０ｎｍにわたりスペクトルを記録した。近紫外ＣＤについては、緩衝溶液ＤＰＢＳ中２０℃で、ｒｅｄＩＬ－３３及びＤＳＢ　ＩＬ－３３についてそれぞれ１．３８ｍｇ／ｍＬ及び０．８９ｍｇ／ｍＬの試料濃度で１０ｍｍパスレングスキュベットにおいて波長範囲２６０～３５０ｎｍにわたりスペクトルを記録した。緩衝溶液のＣＤスペクトルを記録し、全試料スペクトルから差し引いて装置、キュベット及びベースライン効果を補正した。ＣＤ　Ｐｒｏソフトウェアを用いてスペクトルを二次構造要素にデコンボリューションした。

【０８９２】

図２２Ｃ：近紫外円偏光二色性（ＣＤ）分光法。波長範囲２６０～３５０ｎｍにわたりスペクトルを記録した。最終的なスペクトルは４つのスキャンの平均とした。芳香族アミノ酸及びジスルフィド吸収バンドは、Ｋｅｌｌｙ（Ｋｅｌｌｙ　Ｓ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｈｏｗ　ｔｏ　ｓｔｕｄｙ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｂｙ　Ｃｉｒｃｕｌａｒ　Ｄｉｃｈｒｏｉｓｍ．Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ，１７５１，１１９－１３９（２００５））を出典とした。Ｔｒｐ吸収前後の楕円率に観察される差は、単独トリプトファン（Ｗ１９３）の環境の変化と一致し、還元ＩＬ－３３とＤＳＢ　ＩＬ－３３との間のこの領域における三次構造の変化を実証する。２６０ｎｍ前後の強度の差は、ジスルフィド結合形成からの追加的な発色団の導入と一致する。

図２２Ｄ：ＩＬ－３３の主要な特徴。解かれたＩＬ－３３構造（Ｌｉｎｇｅｌ　２００９）内にＴｒｐ１９３、システイン、及びＳＴ２結合部位（Ｌｉｕ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　ｉｎｓｉｇｈｔｓ　ｉｎｔｏ　ｔｈｅ　ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ＩＬ－３３　ｗｉｔｈ　ｉｔｓ　ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１１０，１４９１８－１４９２３（２０１３））を示す。

【０８９３】

図２２Ｅ：遠紫外円偏光二色性（ＣＤ）分光法。波長範囲１９０～２６０ｎｍにわたってスペクトルを記録した。最終的なスペクトルは８つのスキャンの平均とした。遠紫外スペクトルは、これまでにこのタンパク質ファミリーで見られているとおり、主にβ－シート二次構造と一致する（Ｃｈａｎｇ　Ｂ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ，Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｎ　ａｃｔｉｖｅ　ｄｉｍｅｒ　ｄｕｒｉｎｇ　ｓｔｏｒａｇｅ　ｏｆ　ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ－１　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ａｎｔａｇｏｎｉｓｔ　ｉｎ　ａｑｕｅｏｕｓ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ．７１，３３９９－３４０６（１９９６）；Ｃｒａｉｇ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｓｔａｂｉｌｉｔｙ　ａｎｄ　ｆｏｌｄｉｎｇ　ｏｆ　Ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ１β．Ｂｉｏｃｈｅｍ

istry. 26, 3570－3576（1987）；Hailey K. L. et al. Pro－interleukin（IL）－1β shares a core region of stability as compared with mature IL－1β while maintaining a distinctly different configurational landscape. J. Biol. Chem. 284. 26137－26148（2009）；Hazudat D. et al. Purification and characterisation of Human Recombinant Precursor Interleukin 1β. J. Biol. Chem. 264, 1689－1693（1989）；Meyers C. A. et al, Purification and characterization of Human recombinant interleukin－1β. J. Biol. Chem. 262, 11176－11181（1987））。スペクトルが有意に異なることから、還元ＩＬ－３３と比べたＤＳＢ　ＩＬ－３３の二次構造の変化が示される。

【０８９４】

ＣＤスペクトルから、ＩＬ－３３型間での有意なコンフォメーション変化（ｃｏｎｆｏｒｍａｔｏｎａｌ　ｃｈａｎｇｅ）が示された。ｒｅｄＩＬ－３３スペクトルは既発表のデータと一致した。ＤＳＢ－ＩＬ－３３スペクトルは、還元型と異なる構造化タンパク質と一致した。還元ＩＬ－３３とＤＳＢ－ＩＬ－３３との間で最も変わり得る範囲をマッピングするため、本発明者らは水素／重水素交換質量分析法を実施した。

【０８９５】

水素／重水素交換質量分析法（ＨＤＸ－ＭＳ）

タンパク質をリン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ７．４に３．５ｕＭに希釈した。このストックを用いて、重水素化（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＤ６．６）水性溶媒で１０倍希釈することにより標識実験を開始した。質量スペクトルからの種をＩＬ３３由来の消化性ペプチド配列に割り当てるため、最初のマッピング実験を行った。これは、概して記載されるとおり行った[21]。簡潔に言えば、プロトン化希釈タンパク質をクエンチ溶液（１００ｍＭリン酸カリウム、ｐＨ２．５５、０．１Ｍ　ＴＣＥＰ、１℃）と１：１混合し、最終的な混合物のｐＨを２．５５とした。クエンチしたタンパク質を、固定化ペプシンカラム（２．０×３０ｍｍ；Ｐｏｒｏｓｚｙｍｅ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、Ｃ１８捕捉カラム（ＶａｎＧｕａｒｄ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＢＥＨ　２．１×５ｍｍ；Ｗａｔｅｒｓ）及び分析用Ｃ１８カラム（１．０×１００ｍｍ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＢＥＨ；Ｗａｔｅｒｓ）を有するＷａｔｅｒｓ　ＨＤＸ　Ｍａｎａｇｅｒに注入した。移動相はＨ２Ｏ中０．１％ギ酸（Ａ）及びＡＣＮ中０．１％ギ酸（Ｂ）であり、これらのｐＨが２．５５となるようにした。タンパク質を１００μＬ／分緩衝液Ａでペプシン及び捕捉カラムに適用し、３～４０％Ｂの線形グラジエントにおいて４０μＬ／分で分析カラムから溶出させた。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌｙｎｘ　Ｇｌｏｂａｌ　Ｓｅｒｖｅｒ（Ｗａｔｅｒｓ）３．０．２及びＤｙｎａｍＸ　３．０（Ｗａｔｅｒｓ）でＭＳＥ断片データからペプチド配列を割り当てた。シーケンシングの際と同様に標識データを取得し、但し質量分析計はＭＳスキャンのみに設定した。ＤｙｎａｍＸ及びＭａｔＬａｂ（Ｍａｔｈｗｏｒｋｓ）でペプチドレベルデータを分析した。

図２３は、還元ＩＬ－３３及びＤＳＢ　ＩＬ－３３の水素交換質量分光（ＨＸ－ＭＳ）分析を示す。図２３Ａ　還元ＩＬ－３３（左側のパネル）及びＤＳＢ　ＩＬ－３３（右側のパネル）における機能的水素交換（重水素との）の比較。いずれの場合にも比較目的のため、既発表のＩＬ－３３構造（ｌｉｎｇｅｌ　２００９）にデータをマッピングする。データＨＸ－ＭＳデータを得ることができなかった配列カバレージのギャップを灰青色で強調表示する。システイン残基の側鎖をスティックとして表示する。図２３Ｂは、ＳＴ２結合部位（赤色及びマゼンタ）と重ね合わせた差次的ＨＸ－ＭＳデータの構造モデルを示す（Ｌｉｕ　２０１３）。濃青色は、還元ＩＬ－３３と比較してＤＳＢ　ＩＬ－３３で水素交換が増加した領域を示す。ＳＴ２結合部位１は、Ｈ／Ｄ交換の差が最も大きい範囲内

にあり、構造が変わっている可能性が高い。

【０８９６】

ＳＴ２に対する還元ＩＬ－３３対ＤＳＢ　ＩＬ－３３の結合（ＢＩＡｃｏｒｅ）

ジスルフィド結合したＩＬ－３３は、恐らくＳＴ２が結合する還元ＩＬ－３３型と極めて異なる構造であるものと思われ（図２２、図２３）、ジスルフィド結合型への変換は機能活性の喪失と関連付けられた（図１７Ｃ）。これを調べるため、ＳＴ２に結合する能力に関して、ジスルフィド結合型のＩＬ－３３をＢＩＡｃｏｒｅ分析によって試験した。ＳＴ２の細胞外ドメインに対するＩＬ－３３の直接の結合を、ＢＩＡｃｏｒｅ　２０００（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用した表面プラズモン共鳴によって決定した。抗ヒトＦｃ捕捉（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＢＲ－１００３－３９）を用いてＳＴ２をＦｃタグを介してＣＭ５センサーチップ（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＢＲ－１００３－９９）上に固定化することにより、約１５０ＲＵの安定表面を得た。ＩＬ－３３を表面に３０ｕｌ／分で３分間流して会合速度を決定した。解離は、緩衝液を３０ｕｌ／分で１５分間流すことにより計測した。センサーグラムはＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェアを用いて解釈し、反応速度は、１：１（ラングミュア）結合モデルを使用するダブルリファレンス差し引きセンサーグラムを用いて決定した。

【０８９７】

図２４Ａは、ｒｅｄＩＬ－３３のＳＴ２への結合を示す。０．２ｎＭのＫＤを与える７．８ｎＭ～０．２４ｎＭのセンサーグラムを示す。

【０８９８】

図２４Ｂは、ジスルフィド結合ＩＬ－３３（ＩＬ３３－ＤＳＢ）のＳＴ２への結合を示す。５００ｎＭ～０．２４ｎＭのセンサーグラムを示し、ここで明らかな結合は認められない。

【０８９９】

ＳＴ２結合及び活性の喪失から、本発明者らは、酸化が、ＩＬ－３３活性を終結させてインビボでのＳＴ２依存性免疫応答の持続期間を制限する機構であり得ると仮定するに至った。

【０９００】

ＩＬ－３３型の検出

ジスルフィド結合型のＩＬ－３３が実に生体内に存在することを確かめるため、本発明者らは３つの異なる市販のＩＬ－３３検出アッセイ（２つのヒトＩＬ－３３及び１つのマウスＩＬ－３３）を用いた。ヒト及びマウスＩＬ－３３　Ｄｕｏｓｅｔ　ＥＬＩＳＡ（ＲｎＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）をＭＳＤフォーマット（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）に変換した。捕捉抗体のコーティング濃度は以下のとおりであった：抗マウスＩＬ－３３　ｐＡｂ　３７．５ｕｇ／ｍｌ；抗ヒトＩＬ－３３　ｐＡｂ　１８ｕｇ／ｍＬ。捕捉抗体を０．０３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００含有ＰＢＳ中に希釈し、５μｌを標準的な結合プレート（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）の各ウェルの中心にスポットコーティングし、室温で一晩放置して乾燥させた。プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで３回洗浄し、プレートを密封して振盪しながら（４５０ｒｐｍ）室温で３０分間インキュベートすることにより、２５μｌアッセイ希釈剤でブロックした。アッセイ希釈剤に希釈した２５μｌの試料又は校正物質をブロックしたアッセイプレートに移し、これを振盪しながら（４５０ｒｐｍ）室温で２時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ及び２５μｌの検出試薬（両方ともに抗体希釈剤中１μｇ／ｍｌに希釈した検出抗体＋ストレプトアビジンＳｕｌｆｏＴａｇ）で３回洗浄した。プレートを密封して振盪しながら室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで３回洗浄した。蒸留水中に２倍希釈した１５０μｌのＲｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｔを加えた。１５分以内にプレートを読み取った（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）。

【０９０１】

ＭｉｌｌｉｐｏｒｅヒトＩＬ－３３アッセイ（カタログ番号ＨＴＨ１７ＭＡＧ－１４Ｋ

ロット２１５９１１７）を製造者の指示に従い実施した。簡潔に言えば、ＩＬ－３３標準及び試料をアッセイ緩衝液に希釈し、ビーズと共に遮光下で振盪しながら（５００ｒｐｍ）室温で１時間インキュベートした。ウェルの内容物を取り出し、２００ｕＬの洗浄緩衝液で２回洗浄した。ウェル当たり２５ｕＬの検出抗体を加え、プレートを室温で１時間インキュベートした。２５ｕＬストレプトアビジン－ＰＥを加え（洗浄無し）、プレートを振盪しながら（８５０ｒｐｍ）且つ遮光下で更に３０分間インキュベートした。ウェルの内容物を取り出し、２００ｕＬの洗浄緩衝液で２回洗浄した。試料を１２５ｕＬアッセイ緩衝液に再懸濁し、被覆し、８５０ｒｐｍで３０秒間振盪した。試料をＢｉｏ－Ｐｌｅｘ　２００（ＢｉｏＲａｄ）で分析した。プレートは、低ＲＰ１で、５０ビーズ／領域（領域４４）をカウントして、ダブレット検出ゲートを５０００（低）及び２５０００（高）に設定して読み取った。

【０９０２】

図２５は、還元ＩＬ－３３型及びジスルフィド結合ＩＬ－３３型を検出するための３つの市販のＩＬ－３３　ＥＬＩＳＡアッセイの分析を示す。還元型及びジスルフィド結合型の両方についてＳＴ２がアッセイシグナルへの干渉に及ぼす効果もまた示される。図２５Ａ及び図２５Ｂは、２つの市販のヒトＩＬ－３３アッセイが主にジスルフィド結合型のＩＬ－３３（ＩＬ３３－ＤＳＢ）を検出することを示しており、これが、これまでに他の研究者らによってヒトエキソビボ試料で計測されてきた主要な種であることが示唆される。「還元」ＩＬ－３３アッセイシグナルはｓＳＴ２を加えることにより消失し得るが、酸化／ジスルフィド結合ＩＬ－３３アッセイシグナルは消失しない。図２５Ｃは、還元型及び酸化型の両方のマウスＩＬ－３３を検出するマウスＩＬ－３３アッセイを示す。「還元」ＩＬ－３３アッセイシグナルはｓＳＴ２を加えることにより消失し得るが、酸化ＩＬ－３３アッセイシグナルは消失しない。

【０９０３】

本発明者らは、還元ＳＴ２活性型のヒトＩＬ－３３に特異的な市販のアッセイを特定することができなかったため、独自の新規アッセイを開発した。ＩＬ３３０４２５　ｍＡｂ（配列番号６２及び６７）又はＩＬ３３０００４　ｍＡｂ（配列番号１２及び１７）を捕捉抗体として使用した。捕捉されたＩＬ－３３は、それぞれビオチン化ｓＳＴ２．Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）又はビオチン化ＩＬ３３０４２５（配列番号６２及び６７）で検出した。捕捉抗体を０．０３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００含有ＰＢＳ中１５０ｕｇ／ｍＬに希釈し、５μｌを標準的な結合プレート（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）の各ウェルの中心にスポットコーティングし、室温で一晩放置して乾燥させた。プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで３回洗浄し、プレートを密封して振盪しながら（４５０ｒｐｍ）室温で３０分間インキュベートすることにより、２５μｌアッセイ希釈剤でブロックした。ブロックしたアッセイプレートに、アッセイ希釈剤に希釈した２５μｌの試料又は校正物質を移し、これを振盪しながら（４５０ｒｐｍ）室温で２時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ及び２５μｌの検出試薬（両方ともに抗体希釈剤中１μｇ／ｍｌに希釈した検出抗体＋ストレプトアビジンＳｕｌｆｏＴａｇ）で３回洗浄した。プレートを密封して振盪しながら室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで３回洗浄した。蒸留水中に２倍希釈した１５０μｌのＲｅａｄ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｔを加えた。１５分以内にプレートを読み取った（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）。

【０９０４】

図２６Ａ、図２６Ｂは、還元ＩＬ－３３の検出に特異的なＥＬＩＳＡアッセイを示す。ジスルフィド結合型の検出は観察されない。

【０９０５】

ジスルフィド結合型のＩＬ－３３への変換の時間経過

上記に記載したとおりの異なるＩＬ－３３型を検出するアッセイを用いて、ｒｅｄＩＬ－３３からそのジスルフィド結合型への変換の時間経過をモニタした。１０ｕｇ／ｍＬの脱タグ化ｒｅｄＩＬ－３３を、１００％ヒト血清、ＰＢＳ／１％ＢＳＡ又はＩＭＤＭ／１

％ＢＳＡ中３７℃でインキュベートした。時点ｔ＝０、１５分、３０分、１時間、２時間、４時間、６時間、８時間及び２４時間で１０ｕｌアリコートを取り出して９０ｕｌ　ＰＢＳ／１％ＢＳＡ（１対１０希釈で１ｕｇ／ｍｌとした）に加え、これを３×３０ｕｌアリコートに分割し、ドライアイスでスナップ凍結した後、－８０℃で保存した。ｔ＝０で、凍結／融解サイクルの対照としての試料もまた、ＥＬＩＳＡ分析の直前に新鮮調製した。ヒトＭＳＤ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）及び上記に記載したＩＬ３３００４／ＩＬ３３０４２５－ビオチンアッセイを用いて試料を分析して、それぞれジスルフィド結合ＩＬ－３３及び還元ＩＬ－３３を計測した。まとめると、これらのアッセイにより、ＩＬ－３３の還元型からジスルフィド結合型への変換をモニタすることが可能であった。

【０９０６】

ＥＬＩＳＡの結果を確認するため、時間経過試料中のＩＬ－３３をウエスタンブロットによって分析した。試料を還元又は非還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した。試料を１×ＮｕＰＡＧＥゲルローディング緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に構成し、９０℃で３分間変性させた。還元試料は２％β－メルカプトエタノールを含有した。製造者の指示に従いＭＯＰＳ泳動緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含むＮｕＰＡＧＥ　Ｎｏｖｅｘ　１２％ビス－トリスｍｉｎｉゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で試料を泳動させた。還元試料と非還元試料とは別個のゲルで泳動させた。各レーンにつき１００ｐｇのＩＬ－３３をロードした。タンパク質をニトロセルロース膜（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　カタログ番号ＩＢ３０１０－０２）に転写し、抗ＩＬ－３３　ｐＡｂ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）によるウエスタンブロッティングによって検出した。

【０９０７】

図２７は、ＩＭＤＭ又はヒト血清中でインキュベートしたヒトＩＬ－３３の時間経過を示す。図２７Ａ：ＩＬ－３３　ＥＬＩＳＡ（ＩＬ３３００４／ＩＬ３３０４２５－ビオチン及びヒト　Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ　ＭＳＤアッセイ）を用いてそれぞれ還元ＩＬ－３３及びジスルフィド結合ＩＬ－３３を検出した。図２７Ｂ：ウエスタンブロット分析を用いて還元ＩＬ－３３型及びジスルフィド結合ＩＬ－３３型を検出した。ジスルフィド結合型のＩＬ－３３への変換は急速に起こり、１～２時間で５０％の変換であった。ＥＬＩＳＡ及びウエスタンブロット分析の両方で、還元ＩＬ－３３の消失は酸化ＩＬ－３３の出現と良好に相関した。

【０９０８】

ヒト化ＩＬ－３３トランスジェニックマウスの作成

内因性ＩＬ－３３の挙動及びライフサイクルを研究するため、本発明者らは、マウスＩＬ－３３の遺伝子をヒトＩＬ－３３遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウスを使用した。ヒト化ＩＬ－３３トランスジェニックマウスは以下に記載するとおり作成した。簡潔に言えば、マウスゲノム断片（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ　ＲＰＣＩＢ－７３１　ＢＡＣライブラリから入手した）、ヒトゲノム断片（ヒトＲＰＣＩＢ－７５３　ＢＡＣライブラリから入手した）及び選択された特徴（組換え部位及び選択マーカーなど）を組み合わせてターゲティング用ベクターを作製した（データは示さず）。

【０９０９】

ターゲティング用ベクターをＢｓｔＢＩで線状化し、ＴａｃｏｎｉｃＡｒｔｅｍｉｓ　Ｂａｌｂ／ｃＪ　ＥＳ細胞株（Ｂａｌｂ／ｃ．２）に電気穿孔処理し、ピューロマイシン（ポジティブ選択）及びガンシクロビル（ネガティブ選択）でＥＳ細胞クローンを選択した。次に、得られたピューロマイシン耐性ＥＳ細胞クローンをＰＣＲとサザン解析との組み合わせによってスクリーニングし、正しく標的化されるＥＳクローンを同定した。これらを拡大して液体窒素中に凍結した。

【０９１０】

ホルモンの投与後、過排卵処理したＣ５７ＢＬ／６雌をＣ５７ＢＬ／６雄と交配させた。ｄｐｃ３．５で子宮から胚盤胞を摘出した。マイクロインジェクションのため、鉱油下の少量の１５％ＦＣＳ含有ＤＭＥＭ中に胚盤胞を置いた。内径１２～１５マイクロメートルのフラットチップ圧電駆動マイクロインジェクションピペットを使用して、１０～１５

個の標的ＢＡＬＢ／ｃ　ＥＳ細胞を各胚盤胞に注入した。回復後、注入した８個の胚盤胞を交尾後２．５日の偽妊娠ＮＭＲＩ雌の各子宮角に移植した。キメラ（Ｇ０）において、Ｃ５７ＢＬ／６宿主に対するＥＳ細胞の毛色の寄与（白色／黒色）によってキメラ現象を計測した。高度なキメラのマウスを繁殖させて、Ｆｌｐリコンビナーゼ遺伝子の存在に関する系統ＢＡＬＢ／ｃＪＢｏｍＴａｃ雌突然変異体（Ｆｌｐ－Ｄｅｌｅｔｅｒ系統）とした。毛色による生殖系列伝達は、白色の存在、系統ＢＡＬＢ／ｃ、子孫（Ｇ１）によって同定した。実際の生殖系列伝達は、標的対立遺伝子に特異的なプライマーを用いたＰＣＲ遺伝子タイピングによって確認した（データは示さず）。

【０９１１】

生体内における酸化還元型のＩＬ－３３の存在

マウスにおけるアルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ　ａｌｔｅｒｎａｔａ）誘発性気道炎症モデルについては、以前記載されている（Ｋｏｕｚａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１１，１８６：４３７５－４３８７；Ｂａｒｔｅｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０１２，１８８：１５０３－１５１３）。雄又は雌野生型又はヒト化ＩＬ－３３マウス（６～１０週齢）をイソフルラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）で短時間麻酔し、２５μｇのアルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ　ａｌｔｅｒｎａｔａ）（ＡＬＴ）抽出物（Ｇｒｅｅｒ、Ｌｅｎｏｉｒ，ＮＣ）又は媒体のいずれかを５０μｌの総容積（ｔｏｔａｌ　ｖｏｌｕｅ）で鼻腔内投与した。ＡＬＴ攻撃後複数の時点で、マウスをペントバルビタールナトリウムによって麻酔死させた後、気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を行った。気管カニューレによる洗浄（０．３ｍｌ、０．３ｍｌ及び０．４ｍｌ）によって気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を回収した。ＢＡＬＦを遠心し、酸化還元型のＩＬ－３３の存在に関して上記に記載したアッセイを用いて上清を分析した。全ての作業は、適切なプロジェクトライセンス権限下で英国内務省（ＵＫ　Ｈｏｍｅ　Ｏｆｆｉｃｅ）倫理及び飼育管理基準に則り行った。

【０９１２】

図２８は、複数のＥＬＩＳＡアッセイの組み合わせを用いた、ＡＬＴ鼻腔内攻撃後種々の時点で採取したヒト化ＩＬ－３３マウスからのＢＡＬＦの分析を示す。（Ａ）Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、（Ｂ）Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ及び（Ｃ）ＩＬ３３０４２５／ｓＳＴ２－ビオチンアッセイを用いてｓＳＴ２の存在下又は非存在下におけるＩＬ－３３を計測した（左側のグラフ）。ｓＳＴ２の存在下におけるシグナル（還元ＩＬ－３３部分が除かれたシグナル）をジスルフィド結合ＩＬ－３３標準と比較して、ジスルフィド結合ＩＬ－３３のレベルを定量化した。還元ＩＬ－３３シグナルは、還元ＩＬ－３３標準に対して定量化した、ＳＴ２の存在下と非存在下とにおけるＩＬ－３３計測間のシグナルの差として計算した。右側のグラフに還元ＩＬ－３３の推定を示す。全てのアッセイが、放出されたＩＬ－３３が主にその還元型であり、５～３０分の間に最大値をとり、続いて急速に低下して１２０分までに検出不能となったことを示している。逆に、ＩＬ－３３－ＤＳＢは時間０から徐々に増加し、３０～１２０分でピークとなり、２４時間までに消失した。これらのデータは、ＩＬ－３３が還元型で放出され、次に生体内で急速に酸化されてＩＬ３３－ＤＳＢになるモデルと一致する。

【０９１３】

図２９は、ＡＬＴ鼻腔内攻撃後種々の時点で採取した野生型ＢＡＬＢ／ｃマウスからのＢＡＬＦの分析を示す。図２９Ａ　マウスＩＬ－３３　ＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、ｓＳＴ２の存在下又は非存在下におけるＩＬ－３３を計測した（培地処理したマウスＩＬ－３３を標準曲線として使用した）。図２９Ｂ　ｓＳＴ２の存在下におけるシグナル（還元ＩＬ－３３部分が除かれたシグナル）を培地処理したマウスＩＬ－３３標準と比較して酸化ＩＬ－３３のレベルを定量化した。還元ＩＬ－３３シグナルは、還元マウスＩＬ－３３標準に対して定量化した、ＳＴ２の存在下と非存在下とにおけるＩＬ－３３計測間のシグナルの差として計算した。データは、放出されたＩＬ－３３が主にその還元型であり、１５分でピークとなり、続いて急速に低下して１２０分までに検出不能となったことを示している。逆に、ＩＬ－３３－ＤＳＢは時間０から徐々に増加し、４

５～６０分でピークとなり、２４時間までに消失した。これらのデータは、ＩＬ－３３が還元型で放出され、次に生体内で急速に酸化されてＩＬ３３－ＤＳＢになるモデルと一致する。

【０９１４】

実施例５　抗ＩＬ－３３抗体の特徴付け

Ｈ３３８Ｌ２９３はコンホメーション変化を引き起こす

モノクローナル抗体Ｈ３３８Ｌ２９３（配列番号１８２及び１８７）（その作成については実施例２及び３に記載される）は、ＩＬ－３３のアロステリックな調節因子である。ＩＬ－３３はコンホメーションがジスルフィド結合型に有意に変化し得る（実施例４に記載されるとおり）。以下の実験は、Ｈ３３８Ｌ２９３　ｍＡｂがＩＬ－３３分子を不安定化させて、そのアンフォールディングを促進し且つジスルフィド結合型への変換を加速させるように思われることを実証している。本明細書で使用される試薬及びタンパク質修飾は、前出の例に記載されるとおりであった。

【０９１５】

Ｓｙｐｒｏオレンジアッセイ

Ｓｙｐｒｏオレンジは疎水性表面に非特異的に結合し、水がＳｙｐｒｏオレンジの蛍光を強力にクエンチする。タンパク質がアンフォールドされると、露出した疎水性表面が染料に結合し、蛍光の増加がもたらされる。５ｕＭの抗体を、１×ＤＰＢＳ中の５０００倍のストック（Ｌｉｆｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｓ－６６５０）から希釈した８×ＳＹＰＲＯオレンジ染料の存在下、２０ｕＭ　ｒｅｄＩＬ－３３と共に２５℃でインキュベートした。Ｃｈｒｏｍｏ４リアルタイム検出器（Ｂｉｏ－ｒａｄ）を使用して蛍光（励起４９０ｎｍ及び発光５７５ｎｍ）を毎分計測した。本発明者らは、ｒｅｄＩＬ－３３をＨ３３８Ｌ２９３抗体と共にインキュベートすると、タンパク質アンフォールディングの指標である蛍光シグナルの増加があったが、ｒｅｄＩＬ－３３又は抗体単独ではこの増加はなかったことを観察した。

【０９１６】

図３０Ａは、８×ＳＹＰＲＯオレンジ染料の存在下２５℃で５ｕＭ抗体を２０ｕＭ　ｒｅｄＩＬ３３と共にインキュベートして１００分後の時点における相対蛍光単位を示す。ｒｅｄＩＬ－３３の存在下、Ｈ３３８Ｌ２９３によってはタンパク質アンフォールディングの指標である蛍光シグナルが増加したが、ＩＬ３３０００４又は対照ｍＡｂでは増加しなかった。

【０９１７】

図３０Ｂは、８×ＳＹＰＲＯオレンジ染料の存在下２５℃で種々の濃度のＨ３３８Ｌ２９３を２０ｕＭ　ｒｅｄＩＬ３３と共にインキュベートした後の経時的な相対蛍光単位を示す。抗体濃度の増加に伴い蛍光シグナルが増加した。

【０９１８】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動法

Ｈ３３８Ｌ２９３がＩＬ－３３のジスルフィド結合に影響を及ぼし得るかどうかを決定するため、Ｈ３３８Ｌ２９３の存在下で還元及び非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を比較することによりＩＬ－３３をモニタした。１．５ｍｇ／ｍｌ　Ｈ３３８Ｌ２９３　ｍＡｂを含有するか、ＮＩＰ２２８　ｍＡｂを含有するか、又はｍＡｂを添加しないかのいずれかであるＰＢＳ／０．１％ＢＳＡ中で１００ｕｇ／ｍｌ組換えヒトＩＬ－３３$^{112\sim270}$（ＢＫ３４９）をインキュベートした。試料を標準的な組織培養インキュベーターにおいて３７℃で２０時間インキュベートした。１ｕｇのＩＬ－３３を含有する試料を、還元及び非還元条件下でＮｏｖｅｘ１２％ビス－トリスｍｉｎｉ　ＮｕＰＡＧＥゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）におけるＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルをｄｄＨ２０で３×５分間洗浄した後、ＥｚＢｌｕｅ（Ｓｉｇｍａ　Ｇ１０４１、クマシーブリリアントブルーＧ－２５０ベースのタンパク質染料）で１時間インキュベートし、ゲルのバックグラウンドがなくなるまでｄｄＨ２０で脱染した。全てのゲル染色工程は、揺動プラットフォーム上室温で実施した。Ｅｐｓｏｍデジタルスキャナを使用してゲルを可視

化した。
【０９１９】
図３０Ｃは、ＩＬ－３３のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。ＩＬ－３３をＨ３３８Ｌ２９３とプレインキュベートすると、非還元条件下でより速く移動するジスルフィド結合型のＩＬ－３３の存在が増加したが、対照ｍＡｂ又はｍＡｂ無しでは増加しなかった。
【０９２０】
ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＮＦｋＢシグナル伝達の阻害
実施例１に記載されるとおり免疫蛍光染色によって検出されるｐ６５／ＲｅｌＡ　ＮＦｋＢサブユニットの核転座により、ＩＬ－３３に応答したヒト臍帯静脈内皮細胞のＮＦｋＢシグナル伝達を評価した。複数の濃度の試験抗体Ｈ３３８Ｌ２９３の存在下、種々のＩＬ－３３濃度で３０分又は６時間のいずれかにわたって細胞を刺激した。
【０９２１】
図３１は、Ｈ３３８Ｌ２９３がＨＵＶＥＣのＩＬ－３３刺激ＮＦｋＢ転座に及ぼす効果を示す。これらの結果は、これまでに見られたとおり、Ｈ３３８Ｌ２９３が、ＩＬ－３３刺激を受けたＨｕｖｅｃの刺激３０分後のｐ６５／ＲｅｌＡ　ＮＦｋＢの核転座を阻害しなかったことを示している。しかしながら、６時間後に阻害が見られる。この結果は、Ｈ３３８Ｌ２９３がＩＬ－３３のＳＴ２への結合を直接は阻害できないが、しかし数時間以内にＩＬ－３３を非ＳＴ２結合型に変換させる能力を有することと一致している。
【０９２２】
精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害
Ｈ３３８Ｌ２９３がＳＴ２受容体に対するＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ＩＬ－３３の結合を阻害する能力を、実施例１に記載されるとおり生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。２つの条件を試験した。第一に、正確に実施例１にあるとおり、抗体とＩＬ－３３とをアッセイに同時に加えた。以前と同じく、精製ＩｇＧ調製物は試験濃度でＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用を阻害できなかった。第二に、Ｈ３３８Ｌ２９３をＩＬ－３３ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓと１８時間プレインキュベートした後にアッセイに加えた。この場合、ＩＬ－３３：ＳＴ２結合の濃度依存的阻害が観察された。まとめると、これらのデータは、Ｈ３３８Ｌ２９３が時間の経過に伴いＩＬ－３３を非ＳＴ２結合型に変換することと一致する。
【０９２３】
図３２は、ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＨ３３８Ｌ２９３による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。これらの結果は、Ｈ３３８Ｌ２９３がリガンドと長時間プレインキュベートした後にのみＩＬ－３３のＳＴ２への結合を阻害することを示している。
【０９２４】
エピトープマッピング
ＩＬ－３３のＨ３３８Ｌ２９３　ＩｇＧとの結合様式を明らかにするため、このＩｇＧのエピトープマッピングを試みた。サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）実験を実施することにより、ＩＬ－３３：ＩｇＧ複合体の形成を観察した。ＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＳ－Ｓ　２０００カラム（３００×７．４ｍｍ、ｓ／ｎ　５５０３３１－４）をＡｇｉｌｅｎｔ　ＨＰ１１００　ＨＰＬＣにおいて０．５ｍＬ　ｍｉｎ$^{-1}$でダルベッコＰＢＳによって平衡化した。ピークはダイオードアレイ検出器（ＤＡＤ）からの２８０ｎｍシグナルを用いて検出した。これらの研究により、抗体－抗原複合体の形成がかなり遅く、少なくとも数時間かかったことが確認された。完全な複合体形成に十分な時間を与えた後、予め形成されたＩＬ－３３：ＩｇＧ複合体にトリプシンを加え、続いてＳＥＣ分析を行った。３６分間のトリプシン消化により、主ピークの保持時間が１４．１分（未処理複合体のピーク溶出時間（１３．６分）とインタクトなＨ３３８Ｌ２９２　ＩｇＧ溶出（１４．４分）との中間）に増加した。次に質量分光分析法を用いて最小Ｈ３３８Ｌ２９３　ＩｇＧエピ

トープを同定した。Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳによって観察された、捕捉された１４．１分ピークからの質量は、３，２０９及び４，４８５．３Ｄａであった。ＡＢＩ４８００　ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ　ＭＳによって観察された質量は、高強度で３，２０８．９Ｄａピークであり、４，４８６．４Ｄａの副ピークもまた存在した。観察された３２０６～３２０８Ｄａの前駆イオン質量及び３，２０６Ｄａ前駆イオンのＡＢＩ４８００　ＭＳ／ＭＳフラグメンテーション解析は、予想されたトリプシンＩＬ－３３断片ＭＬＭＶＴＬＳＰＴＫＤＦＷＬＨＡＮＮＫＥＨＳＶＥＬＨＫに合致した。これは、以下に示すとおりのｒヒトＩＬ－３３－Ｆｌａｇ　Ｈｉｓ１０（配列番号６２７）の全一次配列の範囲内にある：－

【化７】

MSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNE
SGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVS
FECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENILFKLSETNPAFLYKVVGAADYKDDDD
KAAHHHHHHHHHH

【０９２５】

次に同定されたペプチドを、トランケート変異体（ＬＳＰＴＫＤＦＷＬＨＡＮＮＫＥＨＳＶＥＬＨＫ）及び両方のスクランブル変異体と共に化学的に合成し、確証的Ｔ１００　Ｂｉａｃｏｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）結合研究に使用した。製造者の指示に従い標準的なアミンカップリング試薬を使用してプロテインＧ’（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｐ４６８９）をＣＭ５センサーチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）の表面に共有結合的にカップリングした。このプロテインＧ’表面を用いてＦｃドメインでＨ３３８Ｌ２９３又はＳＴ２－Ｆｃを捕捉することにより、サイクル当たり約２９０ＲＵの面密度を得た。ＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液中に調製した様々な濃度のＩＬ３３ペプチドをセンサーチップ表面に流した。各抗体注入の間にｐＨ１．７及びｐＨ１．５の２回の１０ｍＭグリシン洗浄を用いて表面を再生させた。得られたセンサーグラムをＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００評価ソフトウェア２．０．３（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて評価し、１：１ラングミュア結合モデルにフィッティングして相対結合データを得た。

【０９２６】

完全長合成エピトープペプチドはＨ３３８Ｌ２９３　ＩｇＧに強く結合したが、ＩＬ－３３受容体（ＳＴ２－Ｆｃ）には結合しなかった。完全長及びトランケート合成ペプチドは両方ともにＨ３３８Ｌ２９３に強く結合したが、完全長及びトランケートのスクランブル変種は結合しなかった。これは、ペプチドの切り出しによって同定されたＩＬ－３３断片がアーチファクトでなく、Ｈ３３８Ｌ２９３エピトープのコアに相当することの強力なエビデンスである。０．６２５～２０ｎＭのトランケートペプチドをＨ３３８Ｌ２９３　ＩｇＧに流して親和性を推定した。高品質１：１フィットが得られ、K_D値は２．３６ｎＭと求まった。

【０９２７】

図３３は、Ｈ３３８Ｌ２９３のエピトープマッピングを示す。上側のパネルは、トリプシンによる消化前及び消化後のＨ３３８Ｌ２９３とのＩＬ３３：ＩｇＧ複合体のＳＥＣ分析を示す。下側のパネルは、Ｌｉｎｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ　２００９によって記載されるＩＬ－３３構造内で黒色に色付けしたＨ３３８Ｌ２９３に強く結合すると決定されたトランケートペプチドを示す。

【０９２８】

実施例６　Ｃｙｓ→Ｓｅｒ　ＩＬ－３３突然変異体

ジスルフィド結合型への変換におけるヒトＩＬ－３３の４つの遊離システインの役割を理解するため、本発明者らは、可能な全てのＣｙｓからＳｅｒへの突然変異体の完全なパネルを作成した。これらの突然変異体ＩＬ－３３分子のほとんどが、野生型ＩＬ－３３と

比較して同程度のＳＴ２を介した初期活性を示した。培地中でインキュベートした後、突然変異体は、２つのジスルフィド結合の形成能を欠いていることと一致して、より速いゲル移動を呈しなかった。しかしながら、培地処理後の効力の喪失は突然変異体間で様々であった。

【０９２９】

ＩＬ－３３システインからセリンへの突然変異体パネルの作成

ヒトＩＬ－３３（１１２～２７０）；受託番号（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ）Ｏ９５７６０の成熟成分、及びあらゆる組み合わせ（合計１５）で１、２、３又は４つのシステイン残基をセリンに突然変異させた一連の変異体をコードするｃＤＮＡ分子をプライマー伸長ＰＣＲによって合成し、ｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４０４（ＤＮＡ２．０）にクローニングした。野生型（ＷＴ）及び突然変異体ＩＬ－３３コード配列は、タンパク質のＮ末端に１０ｘｈｉｓ、Ａｖｉｔａｇ、及び第Ｘａ因子プロテアーゼ切断部位（ＭＨＨＨＨＨＨＨＨＨＨＡＡＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥＡＡＩＥＧＲ）を含有するように修飾した。

【０９３０】

ＩＬ－３３突然変異体をコードするＤＮＡを使用して大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１Ｇｏｌｄ細胞を形質転換した。形質転換細胞を０．３～０．５のＯＤ６００ｎｍに達するまで３７℃で培養した。次に培養物を１８℃で成長させて、０．６～０．８のＯＤ６００ｎｍに達したところで１００ｍＭ　ＩＰＴＧを添加することによりタンパク質発現を誘導した。培養を１８℃で更に２０時間継続した後、細胞を遠心によって回収し、－８０℃で保存した。

【０９３１】

完全プロテアーゼ阻害薬錠（Ｒｏｃｈｅ、１１６９７４９８００１）、２．５ｕ／ｍｌＢｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ（ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０７４６－３）及び１ｍｇ／ｍｌ組換えリゾチームを含有する５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に細胞を再懸濁した。Ｃｏｎｓｔａｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍｓ細胞破壊器を２５ｋｐｓｉで使用して再懸濁細胞を溶解し、４℃、７５，０００×ｇで２時間遠心することによって清澄化した。上清から、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中におけるニッケルアフィニティークロマトグラフィーによってＩＬ３３を精製し、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に溶出させた。リン酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．４中Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００　ＧＬカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによってＩＬ３３を更に精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。純粋ＩＬ３３を含有する画分をプールし、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定によって濃度を計測した。最終試料をＳＤＳ　ＰＡＧＥ及びインタクトな質量分析法によって分析した。タンパク質は液体窒素中にスナップ凍結した。

【０９３２】

【表３３】

表 17. IL-33 突然変異配列

突然変異体	位置 208	位置 227	位置 232	位置 259	アミノ酸 112~270
IL33-01	C	C	C	C	配列番号 632
IL33-02	S	C	C	C	配列番号 634
IL33-03	C	S	C	C	配列番号 635
IL33-04	C	C	S	C	配列番号 636
IL33-05	C	C	C	S	配列番号 637
IL33-06	S	S	C	C	配列番号 638
IL33-07	C	C	S	S	配列番号 639
IL33-08	S	C	S	C	配列番号 640
IL33-09	C	S	C	S	配列番号 641
IL33-10	C	S	S	C	配列番号 642
IL33-11	S	C	C	S	配列番号 643
IL33-12	S	S	S	C	配列番号 644
IL33-13	S	S	C	S	配列番号 645
IL33-14	S	C	S	S	配列番号 646
IL33-15	C	S	S	S	配列番号 647
IL33-16	S	S	S	S	配列番号 648

【０９３３】

ＩＬ－３３　Ｃｙｓ→Ｓｅｒ突然変異体の活性

タンパク質の完全性を確認するため、ＳＴ２依存シグナル伝達アッセイで未処理野生型ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１）及びＩＬ－３３突然変異体の活性を計測した。ＩＬ－３３に応答したヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｈｕｖｅｃｓ）のＮＦκＢシグナル伝達を、実施例１に記載されるとおり免疫蛍光染色によって検出されるｐ６５／ＲｅｌＡ　ＮＦｋＢサブユニットの核転座によって評価した。細胞培養培地処理後の活性の喪失を調べるため、ＩＬ－３３タンパク質０１～１６をイスコブ変法ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）で一晩インキュベートし、未処理タンパク質との比較で評価した。

【０９３４】

【表３４】

表 18. HUVEC NFkB 転座アッセイにおける IL-33 突然変異体の活性

名称	配列	IC50 (nM) 未処理	IMDM 処理後の活性の喪失	配列
IL33-01 (WT)	CCCC	0.13	+++	配列番号 632
IL33-02	SCCC	0.19	++	配列番号 634
IL33-03	CSCC	0.16	++	配列番号 635
IL33-04	CCSC	0.17	+	配列番号 636
IL33-05	CCCS	0.10	++	配列番号 637
IL33-06	SSCC	0.28	+	配列番号 638
IL33-07	CCSS	0.22	+	配列番号 639
IL33-08	SCSC	0.21	-	配列番号 640
IL33-09	CSCS	0.20	++	配列番号 641
IL33-10	CSSC	0.61	+	配列番号 642
IL33-11	SCCS	0.49	+	配列番号 643
IL33-12	SSSC	0.39	-	配列番号 644
IL33-13	SSCS	0.08	+	配列番号 645
IL33-14	SCSS	0.14	-	配列番号 646
IL33-15	CSSS	0.12	-	配列番号 647
IL33-16	SSSS	0.17	-	配列番号 648

【０９３５】

図３４は、ＩＭＤＭで１８時間処理する前及び処理した後のＩＬ－３３突然変異体の活性を示す。培養培地で前処理した野生型ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１）は検出可能な活性を完全に失った。全ての突然変異体がＷＴよりも少ない効力喪失を呈した。一部の突然変異体は効力喪失から完全に保護された。

【０９３６】

ヒトマスト細胞サイトカイン放出

インビトロで突然変異体の効力が下流応答を長時間刺激すると高くなるかどうかを見るため、一晩マスト細胞ＩＬ－６産生アッセイを用いてヒトＩＬ－３３野生型及び選択された突然変異体の活性を計測した。アッセイ方法は実施例２に記載される。データはＩＬ３３－１１によって例示する。

【０９３７】
図３５Ａは、ＩＬ３３－１１がヒトマスト細胞ＩＬ－６産生の刺激時にＩＬ－３３　ＷＴよりも高い効力を有することを示している。ＩＬ３３－０１（ＷＴ）及び前処理しないＩＬ３３－１１を用いて様々な濃度でヒト臍帯血由来マスト細胞からのＩＬ－６産生を刺激した（ｘ軸はモル濃度単位のＩＬ－３３濃度であり、ｙ軸は１８時間後の上清中に検出されたＩＬ－６のレベルである）。
【０９３８】
突然変異体ＩＬ－３３のインビボ効力
雌ＢＡＬＢ／ｃマウス（６～８週齢）をイソフルラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）で短時間麻酔し、０．１～１０ｕｇの野生型ヒトＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）、ＩＬ３３－１１（配列番号６４３）又は媒体のいずれかを５０μｌの総容積で鼻腔内投与した。攻撃の２４時間後、マウスをペントバルビタールナトリウムによって麻酔死させた後、気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を行った。ＢＡＬＦを回収し、実施例４に記載されるとおり分析した。
【０９３９】
図３５Ｂは、ＩＬ３３－１１二重突然変異体の鼻腔内投与では、天然ＩＬ－３３と比較して等価なＳＴ２依存性ＩＬ－５応答に必要なタンパク質が僅か１０分の１であったことを示している。これは、マウス肺環境における野生型ＩＬ－３３のより急速な不活性化と対照的な突然変異体の長時間の活性と一致する。
【０９４０】
ＩＬ３３－１１のＮＭＲ分析
ＩＬ３３－１１と野生型ヒトＩＬ－３３タンパク質（ＩＬ３３－０１）との間のコンホメーションの違いを調べるため、ＮＭＲ分析を実施した。
【０９４１】
^{15}Ｎ－ＩＬ－３３タンパク質の作製
Ｎ末端６Ｈｉｓタグ及びＴＥＶプロテアーゼ切断部位を有する野生型ＩＬ－３３（配列番号６３３）をコードするＤＮＡを使用して大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１　Ｇｏｌｄ細胞を形質転換した。５ｇ／Ｌの^{15}Ｎ－ＩｓｏＧｒｏ（商標）粉末を補足したＭ９最少培地中３７℃で形質転換細胞を培養し、０．６～０．８のＯＤ６００ｎｍに達したところで１００ｍＭ　ＩＰＴＧを添加することによりタンパク質発現を誘導した。培養を１８℃で更に２０時間継続した後、細胞を遠心によって回収し、－８０℃で保存した。完全プロテアーゼ阻害薬錠（Ｒｏｃｈｅ、１１６９７４９８００１）、２．５Ｕ／ｍｌ　Ｂｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ（ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０７４６－３）及び１ｍｇ／ｍｌ組換えリゾチームを含有する５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に細胞を再懸濁した。Ｃｏｎｓｔａｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍｓ細胞破壊器を２５ｋｐｓｉで使用して再懸濁細胞を溶解し、４℃、７５，０００×ｇで２時間遠心することによって清澄化した。上清から、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中のニッケルアフィニティークロマトグラフィーによってＩＬ－３３を精製し、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に溶出させた。溶出したタンパク質をＴＥＶプロテアーゼと共にインキュベートし、４℃で５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中に透析した。５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中のニッケルアフィニティークロマトグラフィーによって脱タグ化タンパク質を非切断ＩＬ－３３と分離した。ＡＫＴＡｘｐｒｅｓｓ　ＦＰＬＣシステム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、２０ｍＭリン酸ナトリウム　ｐＨ６．５、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　βメルカプトエタノール中ＨｉＬｏａｄ　１６／６０　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５カラム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、ＩＬ－３３を更

に精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。純粋ＩＬ－３３を含有する画分をプールし、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定によって濃度を計測した。Ａｍｉｃｏｎ　１０，０００分子量カットオフスピンコンセントレータを使用して、タンパク質をＮＭＲ分析用に１．８ｍｇ／ｍｌ（１００μＭ）の最終濃度となるように濃縮した。

【０９４２】

ＮＭＲ分析

ＮＭＲスペクトルは、Ｚ軸グラジエントの５ｍｍ　ＴＣＩ　Ｃｒｙｏｐｒｏｂｅを備えたＴｏｐｓｐｉｎ　２．３を実行するＢｒｕｋｅｒ　Ａｖａｎｃｅ　６００ＭＨｚ分光計において２９８Ｋで記録した。５％重水を添加することにより試料のロックを可能にした上で、記載のとおり^{15}Ｎ標識ＩＬ３３　ＷＴ試料を調製した。ｓｏｆａｓｔ　ＨＭＱＣパルスシーケンスを用いて（Ｓｃｈａｎｄａ，Ｐ；Ｂｒｕｔｓｃｈｅｒ，Ｂ；Ｖｅｒｙ　ｆａｓｔ　ｔｗｏ－ｄｉｍｅｎｓｉｏｎａｌ　ＮＭＲ　ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ　ｆｏｒ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｄｙｎａｍｉｃ　ｅｖｅｎｔｓ　ｉｎ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｎ　ｔｈｅ　ｔｉｍｅ　ｓｃａｌｅ　ｏｆ　ｓｅｃｏｎｄｓ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２００５）１２７，８０１４－５）、（Ｆ２×Ｆ１）１０２４×６４複合ポイント（ｓｔａｔｅｓ－ＴＰＰＩモード）、９６１５×１４６０Ｈｚ掃引幅、５３．４ｍｓ×４３．８ｍｓ取得時間として例示的な^{1}Ｈ－^{15}Ｎ相関スペクトルを取得した。

【０９４３】

図３６は、それぞれ黒色及び赤色でプロットした０．１ｍＭ　^{15}Ｎ標識ＩＬ３３－０１及びＩＬ３３－１１についての^{1}Ｈ－^{15}Ｎ　ＨＭＱＣスペクトルのオーバーレイを示す。関連性のある残基の割り当てを示す。データは予想どおりＣ２０８及びＣ２５９前後でピークシフトを示す。しかしながら、Ｔ１８５～Ａ１９６から予想されるよりも多くのピークシフトがあり、これはコンホメーション変化を示している可能性がある。

【０９４４】

実施例７　ＩＬ３３－１１を用いた抗ＩＬ－３３抗体の単離及び同定

Ｃｙｓ→Ｓｅｒ突然変異体ＩＬ－３３タンパク質はＩＬ－３３をその還元型に安定させ、野生型と異なるコンホメーションを有する（実施例６に記載されるとおり）。突然変異体タンパク質は、異なる抗体エピトープの利用可能性又はエピトープのより長い寿命／より高い安定性をもたらすことができ、従って、詳細には還元型ＩＬ－３３に対する、中和ＩＬ－３３抗体の単離に有用であり得る。この例では酸化抵抗性突然変異体ＩＬ３３－１１タンパク質を使用して、ファージディスプレイによりＩＬ－３３抗体を単離する。

【０９４５】

組換えタンパク質

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＢＬ２１（ＤＥ３）細胞を形質転換することにより、Ｎ末端タグ付加Ｈｉｓ１０／Ａｖｉｔａｇ　ＩＬ３３－０１（ＷＴ、配列番号６３２）、Ｎ末端タグ付加Ｈｉｓ１０／Ａｖｉｔａｇ　ＩＬ３３－１１（Ｃ２０８Ｓ、Ｃ２５９Ｓ、配列番号６４３）及びＮ末端タグ付加Ｈｉｓ１０／Ａｖｉｔａｇカニクイザル　ＩＬ－３３（配列番号６４９）を作成した。形質転換細胞を自己誘導培地（Ｏｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ（商標）Ａｕｔｏｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　１、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７１３００－４）中３７℃で１８時間培養した後、細胞を遠心によって回収し、－２０℃で保存した。完全プロテアーゼ阻害薬カクテル錠（Ｒｏｃｈｅ、１１６９７４９８００１）、２．５ｕ／ｍｌ　Ｂｅｎｚｏｎａｓｅヌクレアーゼ（ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０７４６－３）及び１ｍｇ／ｍｌ組換えリゾチームを含有するＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、７０９２１－５）中に細胞を再懸濁した。細胞ライセートを、４℃、７５，０００×ｇで２時間遠心することにより清澄化した。上清から、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール中のニッケルアフィニティークロマトグラフィーによってＩＬ－３３タンパク質を精製し、５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭイミダゾール中に溶出させた。リン酸緩衝生理食塩水ｐＨ７．４中のＳｕｐｅｒｄｅｘ

７５　１０／３００　ＧＬカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、ＩＬ－３３を更に精製した。ピーク画分をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。純粋ＩＬ－３３を含有する画分をプールし、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０測定によって濃度を計測した。最終試料をＳＤＳ　ＰＡＧＥによって分析した。

【０９４６】

実施例１に記載されるヒトＳＴ２ベクターを、Ｃ末端Ｆｌａｇ－Ｈｉｓタグを有するヒトＳＴ２　ＥＣＤを含有するように修飾した（配列番号６５０）。

【０９４７】

【表３５】

表 19. 試薬

試薬	供給業者	カタログ番号/記号	配列
His10/Aviヒト IL33-01	インハウス	PS-937	配列番号 632
His10/Aviヒト IL33-11	インハウス	PS-938	配列番号 643
His10/Aviカニクイザル IL-33	インハウス	CCH 3rd April 2014	配列番号 649
IL-4Rα Flag®His	インハウス	020629080	
ウシインスリン - ビオチン	Sigma	I2258	
ヒト ST2 Flag His	インハウス	BK282	配列番号 650
ヒト ST2.Fc	R&D Systems		

【０９４８】

タンパク質修飾

ビオチンリガーゼ（ＢｉｒＡ）酵素（Ａｖｉｄｔｙ、Ｂｕｌｋ　ＢｉｒＡ）を製造者のプロトコルに従い使用して、Ａｖｉｔａｇ配列モチーフ（ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ）を含有するタンパク質をビオチン化した。本明細書で使用されるＡｖｉｔａｇを有しない全てのＩｇＧ及び修飾タンパク質は、実施例１に記載されるとおりＥＺ　ｌｉｎｋスルホ－ＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｔｈｅｒｍｏ／Ｐｉｅｒｃｅ、２１３３５）を使用して遊離アミンを介してビオチン化した。

【０９４９】

選択

本質的に実施例１に記載されるとおり、但しＩＬ３３－１１　Ｃ２０８Ｓ、Ｃ２５９Ｓ突然変異体タンパク質を使用して選択を実施した。端的には、ｓｃＦｖ－ファージ粒子を溶液中でビオチン化組換えＩＬ－３３－１１と共にインキュベートした（Ａｖｉタグによるビオチン化）。粒子を１００ｎＭビオチン化組換えＩＬ３３－１１と共に２時間インキュベートした。次に抗原に結合したｓｃＦｖを製造者の推奨に従いストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）、Ｍ－２８０）に捕捉した。ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎを使用した一連の洗浄サイクルで未結合のファージを洗い流した。抗原上に保持されたファージ粒子を溶出し、細菌に感染させて、次の選択ラウンド用にレスキューした。漸減濃度のビオチン化ＩＬ３３－１１（５０ｎＭ及び２５ｎＭ）の存在下で更に２回の選択ラウンドを行った。

【０９５０】

未精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

上記に記載した２回又は３回の選択ラウンド後の選択アウトプットからの代表的な複数の個別クローンを９６ウェルプレートで成長させた。ｓｃＦｖを細菌ペリプラズムで発現させて（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２００（１－２）：６９－７７（１９９７））、それらの阻害活性に関して均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）ベースのＩＬ－３３：ＳＴ２結合アッセイでスクリーニング

した。本質的に方法は実施例１の記載と同様であった。このアッセイでは、ビオチン化ヒトＩＬ３３－０１（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）（野生型）又はビオチン化ヒトＩＬ３３－１１（ＩＬ３３－１１、配列番号６４３）への結合に関して試料がＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ヒトＳＴ２と競合した。

【０９５１】

ビオチン化ＩＬ－３３によるＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２の結合の阻害に関して、抗体試験試料の各希釈物５マイクロリットルを３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより未精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。次に、４ｎＭヒトＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２及び５ｎＭ抗ＦＬＡＧ（登録商標）ＸＬ６６５検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１ＦＧ２ＸＬＢ）を含有する溶液を調製し、２．５マイクロリットルの混合物をアッセイプレートに加えた。これに続いて、１．５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた２．４ｎＭビオチン化ヒトＩＬ３３－０１又はＩＬ３３－１１を含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で１時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。プレートを４℃で更に１６時間（一晩）インキュベートし、再び時間分解蛍光を読み取った。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ヒトＩＬ３３－０１又はＩＬ３３－１１をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。データは実施例１に記載されるとおり分析した。

【０９５２】

精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

両方の時点で未精製ペリプラズム抽出物としてＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用に対する阻害効果を示した単鎖ＦｖクローンをＤＮＡシーケンシングにかけた（Ｏｓｂｏｕｒｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２（３）：１８１－９６（１９９６）；Ｖａｕｇｈａｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４（３）：３０９－１４（１９９６））。ユニークなｓｃＦｖを再び細菌で発現させて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した（国際公開第０１／６６７５４号パンフレットに記載されるとおり）。上記に記載したとおりビオチン化ＩＬ３３－０１又はビオチン化ＩＬ３３－１１への結合に関して精製調製物の希釈系列をＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓタグ付加ヒトＳＴ２と競合させることにより、これらの試料の効力を決定した。アッセイプレートを室温で１時間インキュベートし（１時間インキュベーション）、又はアッセイプレートを室温で１時間、続いて４℃で１６時間インキュベートした（一晩インキュベーション）。両方の時点でＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用の阻害能を有した精製ｓｃＦｖ調製物をＩｇＧフォーマットへの変換に選択した。

【０９５３】

図３７Ａ：ヒトＩＬ－３３－０１がヒトＳＴ２に結合することによって生成される１時間インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体３３ｖ２００６４による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０９５４】

図３７Ｂ：ＩＬ３３－１１がヒトＳＴ２に結合することによって生成される１時間インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体３３ｖ２００６４による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０９５５】

図３７Ｃ：ヒトＩＬ－３３－０１がヒトＳＴ２に結合することによって生成される一晩インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体３３ｖ２００６４による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０９５６】

図３７Ｄ：ＩＬ３３－１１がヒトＳＴ２に結合することによって生成される一晩インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のＩＬ－３３　ｓｃＦｖ抗体３３ｖ２００６４による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０９５７】

ｓｃＦｖからＩｇＧ１への再フォーマット化

ＩＬ－３３：ＳＴ２相互作用の阻害能を有した精製ｓｃＦｖ調製物を実施例１に記載されるとおり全免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）抗体フォーマットに変換した。ＩＬ３３００４（実施例１、配列番号１２及び１７）と同様か又はそれよりも高度に阻害した抗体を更なる分析に進めた。かかる抗体は３３ｖ２００６４によって例示される。抗体３３ｖ２００６４の様々な領域に対応する配列番号を表２０に示す。

【０９５８】

【表３６】

表 20. 抗 IL-33 抗体配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33v20064	配列番号 272	配列番号 277	配列番号 273 配列番号 274 配列番号 275	配列番号 278 配列番号 279 配列番号 280

【０９５９】

精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

抗ＩＬ－３３抗体がビオチン化ＩＬ－３３－０１のＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２受容体への結合を阻害する能力を、上記に原理を記載した生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。精製ＩｇＧの希釈系列をヒトビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１（配列番号６３２）への結合に関してヒトＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２と競合させることにより、精製ＩｇＧ調製物の活性を決定した。

【０９６０】

図３８Ａ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成される１時間インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の３３ｖ２００６４　ＩｇＧ１抗体による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０９６１】

図３８Ｂ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成される一晩インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の３３ｖ２００６４　ＩｇＧ１抗体による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【０９６２】

ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＩＬ－６産生の阻害

３３ｖ２００６４について、ＨＵＶＥＣのＩＬ－３３刺激ＩＬ－６産生の阻害を評価し

た。この方法は実施例２に記載される。Ｈｉｓ－ＡｖｉヒトＩＬ－３３野生型（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）（３０ｎｇ／ｍＬ）又はＨｉｓ－Ａｖｉ突然変異体ＩＬ－３３（ＩＬ３３－１１、配列番号６４３）（３０ｎｇ／ｍＬ）を使用して、様々な濃度の試験抗体の存在下でＨＵＶＥＣを刺激した。

【０９６３】

図３９Ａ：ＩＬ３３０００４及び抗ＮＩＰ　ＩｇＧ１陰性対照抗体ＮＩＰ２２８と比較した抗体３３ｖ２００６４によるＩＬ３３－０１（ＷＴ）刺激ＨＵＶＥＣからのＩＬ－６産生の阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント最大応答である）。３３ｖ２００６４は、高抗体濃度でＷＴ　ＩＬ－３３に対する応答の部分的阻害を示し、一方、ＩＬ３３０００４は効果を示さなかった。

【０９６４】

図３９Ｂ：ＩＬ３３０００４及び抗ＮＩＰ　ＩｇＧ１陰性対照抗体ＮＩＰ２２８と比較した抗体３３ｖ２００６４によるＩＬ３３－１１刺激ＨＵＶＥＣからのＩＬ－６産生の阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント最大応答である）。３３ｖ２００６４は、ＩＬ３３０００４と比較して、ＩＬ３３－１１突然変異体によって刺激されるＩＬ－６産生のより完全な阻害を示した。

【０９６５】

抗ＩＬ－３３抗体の交差反応性

均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）に基づくＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイを用いて抗ＩＬ－３３抗体３３ｖ２００６４の交差反応性を決定した。このアッセイでは、ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４　ＩｇＧに対する結合に関して試料がビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１（配列番号６３２）と競合した。

【０９６６】

【表３７】

表 21: FRET アッセイ試薬

試薬	供給業者	カタログ番号/記号	配列
ヒト IL-33 Flag®His	インハウス	PS-582	配列番号 627
マウス IL-33 Flag®His	インハウス	BK-265	配列番号 628
カニクイザル IL-33 Flag®His	インハウス	PS-368	配列番号 629
B7H3 Avi-His	インハウス	DBPur125	
ヒト IL-1α	R&D Systems	201-LB/CF	
ヒト IL-1β	R&D Systems	200-LA/CF	

【０９６７】

ヒト、カニクイザル及びマウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ（実施例１に記載される）について、ＩＬ－３３試料の５マイクロリットルの各希釈物を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより、ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４に対するヒトＩＬ－３３の結合の阻害に関して試験した。次に、２０ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４を含有する溶液を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレート（製造者の指示に従いキット（Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、３２６－００１０）を使用して標識した）に加えた。これに続いて、１．５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた１．２ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１を含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有す

るアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で１時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ヒトＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して、４パラメータロジスティック方程式（式４）を用いたカーブフィッティングによりIC_{50}値を決定した。これらの結果から、３３ｖ２００６４はカニクイザルＩＬ－３３と交差反応することが実証された。しかし３３ｖ２００６４はマウスＩＬ－３３との競合を示さなかった。

【０９６８】

図４０Ａ：ビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４に結合することにより生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の試験タンパク質による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の試験試料の濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。ヒト及びカニクイザルＩＬ－３３ではＦＲＥＴシグナルの阻害が観察されたが、マウスＩＬ－３３では観察されなかった。

【０９６９】

抗ＩＬ－３３抗体の選択性

均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）に基づくＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイを用いて抗ＩＬ－３３抗体３３ｖ２００６４の選択性を決定した。このアッセイでは、野生型ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４　ＩｇＧに対する結合に関して試料がビオチン化Ｈｉｓ－ＡｖｉヒトＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）と競合した。ヒトＩＬ－１α及びヒトＩＬ－１βを、上記に記載したとおり、ビオチン化ＩＬ－３３－０１のＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４結合の阻害に関して試験した。これらの結果から、３３ｖ２００６４はヒトＩＬ－１α又はＩＬ－１βでは競合を示さなかったことが実証された。

【０９７０】

図４０Ｂ：ビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の試験タンパク質による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の試験試料の濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。ヒトＩＬ－１α又はＩＬ－１βではＦＲＥＴシグナルの阻害は観察されなかった。

【０９７１】

実施例８　抗ＩＬ－３３　Ａｂ　３３ｖ２００６４の最適化

３３ｖ２００６４のフレームワーク領域の生殖細胞系列化

親抗体３３ｖ２００６４のV_H及びV_Lドメインのアミノ酸配列をＩＭＧＴデータベースの既知のヒト生殖系列配列とアラインメントし（Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．Ｐ．ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００９．３７（Ｄａｔａｂａｓｅ　ｉｓｓｕｅ）：Ｄ１００６－Ｄ１０１２）、配列類似性によって最も近縁の生殖細胞系列を同定した。３３ｖ２００６４抗体系統のV_Hドメインについては、これはＩＧＨＶ３－２３＊０１であった。V_Lドメインについては、それはＩＧＬＶ３－１であった。３３ｖ２００６４に対し、親和性成熟プロセスの前に生殖細胞系列化を行った。Ｖｅｒｎｉｅｒ残基（Ｆｏｏｔｅ　１９９２）を考慮しない場合（これはそのままとした）、３３ｖ２００６４のV_Lドメインのフレームワークには生殖細胞系列と異なる残基が６つあり、そのうち５つを、クンケル突然変異誘発法（Ｃｌａｃｋｓｏｎ，Ｔ．ａｎｄ　Ｌｏｗｍａｎ，Ｈ．Ｂ．Ｐｈａｇｅ　Ｄｉｓｐｌａｙ－Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ，２００４．Ｏｘｆ

ｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ）を用いて適切な突然変異誘発性プライマーで最も近縁の生殖系列配列に復帰させた。この生殖細胞系列化の産物が３３＿６４０００１であった。配列番号を表２２に記載する。

【０９７２】

【表３８】

表 22. 抗体 33v20064 生殖系列配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640001	配列番号 282	配列番号 287	配列番号 283 配列番号 284 配列番号 285	配列番号 288 配列番号 289 配列番号 290

【０９７３】

精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害

３３＿６４０００１の活性を、その生殖細胞系列化していない親３３ｖ２００６４と比較した。ｓｃＦｖ抗体がＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２受容体に対するビオチン化Ｈｉｓ ＡｖｉヒトＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）の結合を阻害する能力を、実施例７に記載されるとおり生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。

【０９７４】

図４１Ａ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生じる１時間インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のｓｃＦｖ抗体による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。３３＿６４０００１は、その生殖細胞系列化していない親と同等の活性を有した。

【０９７５】

図４１Ｂ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生じる一晩インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度のｓｃＦｖ抗体による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。３３＿６４０００１は、その生殖細胞系列化していない親と同等の活性を有した。

【０９７６】

親和性成熟

標的突然変異誘発手法及び親和性ベースのファージディスプレイ選択を用いて３３ｖ２００６４を最適化した。記載されるとおりの（Ｃｌａｃｋｓｏｎ ２００４）標準的な分子生物学的技術を用いた可変重鎖（V_H）相補性決定領域３（ＣＤＲ３）及び軽鎖（V_L）ＣＤＲ３のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって、生殖細胞系列化した親（３３＿６４０００１）に由来する大規模ｓｃＦｖ－ファージライブラリを作成した。V_H ＣＤＲ３については、Ｋａｂａｔの定義によるＣＤＲに先行する２つのＶｅｒｎｉｅｒ位置（即ちV_H位置９３及び９４）もまた、標的突然変異誘発手法における潜在的な最適化に含めた。ヒトＩＬ－３３に対してより高い親和性を有する変異体を選択するため、これらのライブラリを親和性ベースのファージディスプレイ選択に供した。これらの選択は、ビオチン化Ｈｉｓ－ＡｖｉヒトＩＬ－３３野生型抗原（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）とビオチン化Ｈｉｓ Ａｖｉ突然変異体ＩＬ－３３抗原（ＩＬ３３－１１、配列番号６４３）とによって順次のラウンドで交互に、或いは全てのラウンドにおいてビオチン化ＩＬ３３－１１抗原のみで行った。選択は、本質的に以前記載されているとおり実施した（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ １９９６）。端的には、ｓｃＦｖ－ファージ粒子を溶液中で組換え

ビオチン化抗原と共にインキュベートした。次に抗原に結合したｓｃＦｖ－ファージを製造者の推奨に従いストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）Ｍ－２８０）に捕捉した。次に選択されたｓｃＦｖ－ファージ粒子を以前記載されているとおりレスキューし（Ｏｓｂｏｕｒｎ，Ｊ．Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９６．２（３）：ｐ．１８１－９６）、この選択手順を漸減濃度のビオチン化抗原（典型的には５回の選択ラウンドで５０ｎＭ～１０ｐＭ）の存在下で繰り返した。

【０９７７】

本質的にＨａｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ｈａｎｅｓ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，２０００．３２８：ｐ．４０４－３０）によって記載されるとおり、３３ｖ２００６４もまたリボソームディスプレイ技術を用いて最適化した。親ｓｃＦｖクローン３３ｖ２００６４を、ライブラリ構築及び続く選択のためのリボソームディスプレイフォーマットへの変換の鋳型として使用した。ＤＮＡレベルでは、ｍＲＮＡへの効率的な転写のため、５’末端にＴ７プロモーターを付加した。ｍＲＮＡレベルでは、コンストラクトは原核細胞リボソーム結合部位（シャイン－ダルガノ配列）を含んだ。単鎖の３’末端で終止コドンを取り除き、新生ｓｃＦｖポリペプチドとリボソームとの間のスペーサーとして働くようにＭ１３バクテリオファージｇＩＩＩの一部（遺伝子ＩＩＩ）を付加した（Ｈａｎｅｓ　２０００）。

【０９７８】

Ｄｉｖｅｒｓｉｆｙ（商標）ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）ランダム突然変異誘発キット（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を製造者の推奨に従い使用したランダム突然変異誘発により、親（３３ｖ２００６４）ｓｃＦｖコンストラクトに由来するリボソームディスプレイライブラリを作成した。このエラープローンＰＣＲ（ＥＰ）の条件は、（製造者によれば）１０００塩基対当たり平均８．１個のヌクレオチド変化が導入されるように選択した。次に、得られたＥＰライブラリを親和性ベースのリボソームディスプレイ選択において使用した（Ｈａｎｅｓ　２０００）。ＲｉｂｏＭＡＸ（商標）大規模ＲＮＡ産生システム（Ｔ７）（Ｐｒｏｍｅｇａ）を製造者のプロトコルに従い使用し、且つ大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ベースの原核生物無細胞翻訳系を使用して、ｓｃＦｖをインビトロで発現させた。産生されたｓｃＦｖ抗体－リボソーム－ｍＲＮＡ（ＡＲＭ）複合体を溶液中でビオチン化ヒトＩＬ－３３抗原と共に、ビオチン化ＩＬ３３－０１抗原とビオチン化ＩＬ３３－１１抗原とによって順次のラウンドで交互に、或いは全てのラウンドにおいてビオチン化ＩＬ－３３－１１抗原のみでインキュベートした。特異的に結合した三価複合体（ＩＬ－３３：ＡＲＭ）を製造者の推奨に従い（Ｄｙｎａｌ）ストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）Ｍ－２８０）に捕捉し、一方、未結合のＡＲＭは洗い流した。次に、結合したｓｃＦｖをコードするｍＲＮＡを逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって回収した。ＩＬ－３３に対してより高い親和性を有するクローンをエンリッチし、ひいては選択するため、得られた集団に対し、漸減濃度のビオチン化ヒトＩＬ－３３（５ラウンドにわたり１００ｎＭ～１００ｐＭ）による更なる選択ラウンドについてこの選択手順を繰り返した。選択ラウンド３、４及び５のアウトプットをｐＣａｎｔａｂ６にサブクローニングし（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．Ａｐｐｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，１９９４．４７（２－３）：ｐ．１５７．）、以下に記載するとおり改良されたクローンを同定した。

【０９７９】

未精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のｍＡｂへの結合の阻害

選択アウトプットからの代表的な複数の個別クローンを９６ウェルプレートで成長させた。ｓｃＦｖを細菌ペリプラズムで発現させて（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２００（１－２）：６９－７７（１９９７））、それらの阻害活性に関して均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）に基づくＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイでスクリーニングした。このアッセイでは、ビオチン化Ｈｉｓ　Ａ

ｖｉ　ＩＬ－３３－０１（配列番号６３２）又はビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉカニクイザル　ＩＬ－３３（配列番号６４９）への結合に関して試料がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４　ＩｇＧと競合した。かかるエピトープ競合アッセイは、標識抗ＩＬ－３３　ＩｇＧと同様のエピトープを認識する試験抗体試料が、ビオチン化ＩＬ－３３への結合に関して標識ＩｇＧと競合してアッセイシグナルの減少が生じるという原理に基づく。

【０９８０】

ビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ３３－０１（ヒト）又はビオチン化Ｈｉｓ　ＡｖｉカニクイザルＩＬ－３３のＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４結合の阻害に関して、５マイクロリットルの試料を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより未精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。次に、２．４ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４を含有する溶液をヒトＩＬ－３３アッセイ用に調製し、６ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４をカニクイザルアッセイ用に調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレート（製造者の指示に従いキット（Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、３２６－００１０）を使用して標識した）に加えた。これに続いて、ヒトアッセイ用の０．７５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた０．８ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１を含有する２．５マイクロリットルの溶液又はカニクイザルアッセイ用の１．５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた４ｎＭビオチン化カニクイザルＩＬ－３３を含有する溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で１時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。

【０９８１】

エピトープ競合アッセイがその感度限界に達したため、未精製ｓｃＦｖ試料の試験には、中間最適化ｍＡｂ　３３＿６４００２７を使用したアッセイを用いた。このアッセイは、本質的に３３ｖ２００６４競合アッセイに関して記載されるとおりであったが、但し以下の修正を加えた：２０ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４００２７を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレートに加えた。これに続いて、ヒトアッセイ用の０．７５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた０．３２ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１を含有する２．５マイクロリットルの溶液又はカニクイザルアッセイ用の１．５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた０．８ｎＭビオチン化カニクイザルＩＬ－３３を含有する溶液を加えた。

【０９８２】

精製ｓｃＦｖによるＩＬ－３３のＭＡｂへの結合の阻害

未精製ペリプラズム抽出物としてＩＬ－３３：ｍＡｂ相互作用に対して阻害効果を示した単鎖ＦｖクローンをＤＮＡシーケンシングにかけた（Ｏｓｂｏｕｒｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２（３）：１８１－９６（１９９６）；Ｖａｕｇｈａｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１４（３）：３０９－１４（１９９６））。ユニークなｓｃＦｖを再び細菌で発現させて、アフィニティークロマトグラフィー

によって精製した（国際公開第０１／６６７５４号パンフレットに記載されるとおり）。阻害効力について、精製調製物の希釈系列をビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ３３－０１、ビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ３３－１１又はビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉカニクイザル　ＩＬ－３３への結合に関してＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４　ＩｇＧ又はＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４００２７　ＩｇＧと競合させることにより、精製抗ＩＬ－３３抗体試料を試験した。方法は前節に記載したとおりである。

【０９８３】

【表３９】

表 23. エピトープ競合アッセイにおける scFv 抗体の活性

アッセイ		効力 IC50 (nM)			
		33v20064	33_640027	33_640047	33_640050
33v20064	IL33-01	12	0.4	0.4	0.2
	IL33-11	26	0.6	0.5	0.4
	カニクイザル IL-33	103	8.2	2.7	1.4
33_640027	IL33-01	1498	3.8	2.3	2.5
	IL33-11	1467	2.9	未決定	2.4
	カニクイザル IL-33	3433	38	8.8	4.1

【０９８４】

ｓｃＦｖからＩｇＧ１への再フォーマット化

ＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイからの望ましい特性を有する単鎖Ｆｖクローンを、実施例１に記載されるとおり全免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）抗体フォーマットに変換した。これらには、抗体３３＿６４００２７（ＥＰライブラリ選択から得られたもの）、及び３３＿６４００４７、３３＿６４００５０（V_H　ＣＤＲ３ブロック突然変異誘発ライブラリ選択から得られたもの）が含まれる。これらの抗体の様々な領域に対応する配列番号を表２４に示す。

【０９８５】

【表４０】

表 24. IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640027	配列番号 292	配列番号 297	配列番号 293 配列番号 294 配列番号 295	配列番号 298 配列番号 299 配列番号 300
33_640047	配列番号 312	配列番号 317	配列番号 313 配列番号 314 配列番号 315	配列番号 318 配列番号 319 配列番号 320
33_640050	配列番号 302	配列番号 307	配列番号 303 配列番号 304 配列番号 305	配列番号 308 配列番号 309 配列番号 310

【０９８６】

精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＭＡｂへの結合の阻害

ビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ３３－０１、ビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ３３－１１又はビオチン化Ｈｉｓ　Ａｖｉカニクイザル ＩＬ－３３がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４　ＩｇＧ又はＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４００２７　ＩｇＧに結合するのを阻害する抗ＩＬ－３３抗体の能力を、記載のとおり生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。ＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイからの望ましい特性を有するＩｇＧを更なる分析用に選択した。

【０９８７】

ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＩＬ－８産生の阻害

サイトカイン放出アッセイを用いて、抗ＩＬ－３３抗体によるヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｈｕｖｅｃ）からのＩＬ－３３誘導性ＩＬ－８産生の阻害を評価した。本質的に実施例２に記載されるとおり、但し少し修正を加えて、試験抗体又はＳＴ２．Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）の存在下又は非存在下で細胞をＩＬ－３３に曝露した。精製ＩｇＧの試験溶液（デュプリケート）を完全培養培地中に所望の濃度に希釈した。Ｎ末端Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）を、２ｎｇ／ｍＬの最終ＩＬ－３３濃度となるように適切な試験抗体と混合した完全培養培地中に調製した。全ての試料を室温で３０分間インキュベートした後、ＩＬ－３３／抗体混合物をアッセイプレートに移した。１８～２４時間インキュベートした後、実施例２に記載されるとおりユウロピウムの読み取りに適しているＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＤＹ２０８）によって細胞上清中のＩＬ－８を計測した。データはＧｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して分析した。４パラメータロジスティック方程式を用いたカーブフィッティングによりＩＣ$_{50}$値を決定した。ＩＣ$_{50}$値が計算された。以下の表２５に要約する。

【０９８８】

図４２Ａは、３３ｖ２００６４、３３＿６４００５０、ヒトＳＴ２－Ｆｃ又は対照ｍＡ

ｂの存在下でＩＬ３３－０１によって刺激したＨＵＶＥＣを示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答（ＩＬ－８産生）のパーセンテージである）。

【０９８９】

哺乳類完全長ＩＬ－３３の中和

完全長ＩＬ－３３もまた活性である（Ｃａｙｒｏｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ １０６（２２）：９０２１－６（２００９）；Ｈａｙａｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３８７（１）：２１８－２２（２００９）；Ｔａｌａｂｏｔ－Ａｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２８４（２９）：１９４２０－６（２００９））。抗体が完全長ＩＬ－３３を中和する能力を評価するため、トランスフェクション後２４時間に、完全長（ＦＬ）ＨｕＩＬ－３３を発現するＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞（及びモックトランスフェクト対照）をアキュターゼ（ＰＡＡ、＃Ｌ１１－００７）で回収した。細胞をＰＢＳで１×１０^{8}／ｍＬに希釈し、組織ホモジナイザーを使用して３０秒間ホモジナイズした。遠心によって細胞残屑を除去した。ＨＵＶＥＣを様々な濃度の細胞ライセートで刺激した。サイトカイン産生の刺激は完全長ＩＬ－３３トランスフェクト細胞ライセートでのみ観察され、モックトランスフェクト細胞ライセートでは観察されなかった。準最大サイトカイン放出（近似ＥＣ$_{50}$）を刺激した１：１０００濃度のライセートを抗体中和試験に選択した。実験は上記に記載したとおり実施した。ＩＣ$_{50}$値を計算した。以下の表２５に要約する。

【０９９０】

図４２Ｂは、３３ｖ２００６４、３３＿６４００５０、ヒトＳＴ２－Ｆｃ又は対照ｍＡｂの存在下で完全長ＩＬ－３３細胞ライセートによって刺激したＨＵＶＥＣを示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答（ＩＬ－８産生）のパーセンテージである）。

【０９９１】

【表４１】

表 25. Huvec IL-8 アッセイにおける IC50 値

抗体	幾何平均 IC50 (95% CI) (nM)	
	対 His Avi IL-33	対完全長 IL-33 細胞ライセート
33v20064	部分的阻害	185
33_640050	0.7 (0.3-1.5)	0.32
ST2.Fc	0.3 (0.1-0.9)	0.67

【０９９２】

ＩｇＧによるジスルフィド結合型のＩＬ－３３の阻止

ＩＬ－３３－０１（０．１４ｎＭ又は３ｎｇ／ｍＬ）を、両方ともに１％ＢＳＡを含有するＩＭＤＭ又はＰＢＳ中、抗体（２５ｕｇ／ｍＬ）又はヒトＳＴ２－Ｆｃ（１０５ｕｇ／ｍＬ）の存在下又は非存在下、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で０～２４時間インキュベートした。様々な時点でアリコートを取り出し、ＰＢＳ又はｓＳＴ２（最終濃度１０．５ｕｇ／ｍＬ）が入った予め冷却したプレートに加えた。回収時に対照ｍＡｂ及び未処理試料中にｓＳＴ２をスパイクしてＩＬ－３３酸化反応が続くのを阻止した。試料をアリコートに分けて予め凍結した９６ウェルプレートに入れ、－８０℃で保存した。ヒトＩＬ－３３　ＥＬ

ＩＳＡを製造者の指示に従い（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＤＹ３６２５、ロット番号１３６２７９７）、但しストレプトアビジン－ＨＲＰの代わりにＤＥＬＦＩＡ検出システム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を代用して以降実施した。簡潔に言えば、黒色９６ウェルＭａｘｉｓｏｒｐプレートを５０ｕＬ／ウェルの捕捉抗体によって室温で一晩コーティングした。プレートをＰＢＳ中３００ｕＬ　０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で3回洗浄し、ＰＢＳ中１５０ｕＬ　１％ＢＳＡによって室温で1時間ブロックした。プレートを3回洗浄し、プレートに５０ｕＬ／ウェルの試料又は標準を振盪しながら（４００ｒｐｍ）室温で2時間加えた。プレートを3回洗浄し、プレートに５０ｕＬ／ウェルの検出抗体を振盪しながら（４００ｒｐｍ）室温で2時間加えた。前述のとおりプレートを洗浄し、ＤＥＬＦＩＡアッセイ緩衝液中に1対１０００希釈した５０ｕＬ／ウェルのストレプトアビジン－ユウロピウムをプレートに遮光下振盪しながら（４００ｒｐｍ）室温で４０分間加えた。プレートを３００ｕＬ／ウェルのＤＥＬＦＩＡ洗浄緩衝液で7回洗浄した。５０ｕＬ／ウェルのＤＥＬＦＩＡエンリッチメント溶液（予め室温に加温した）をプレートに加えた。遮光下室温で１０分間インキュベートした後、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して蛍光を計測した。Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌで標準及びデータ補間を実施し、続いてＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアで分析を実施した。

【０９９３】

実施例４、図２４Ａで考察するとおり、このＥＬＩＳＡは主に、この実験で計測されるＩＬ－３３濃度範囲内のジスルフィド結合ＩＬ－３３（ＩＬ３３－ＤＳＢ）を検出する。ここでこのＥＬＩＳＡを用いて、試験抗体の存在下におけるＩＬ－３３のそのジスルフィド結合型への変換をモニタする。

【０９９４】

図４３は、試験抗体の存在下又は非存在下でＩＭＤＭ（図４３Ａ）又はＰＢＳ（図４３Ｂ）中でインキュベートする間のＩＬ３３－０１のそのジスルフィド結合型（ＩＬ３３－ＤＳＢ）への変換を示す（ｘ軸は時間単位の時間であり、ｙ軸はＩＬ－３３－ＤＳＢ濃度である）。ＩＬ３３０００４及び３３ｖ２００６４はＩＬ３３－ＤＳＢへのＩＬ－３３変換速度を減速させる。３３＿６４００５０及びＳＴ２．Ｆｃは試験した時間経過にわたってＩＬ－３３－ＤＳＢへの変換を防ぐ。

【０９９５】

有益な突然変異の組換え及び更なる最適化

更なる親和性の向上を目的として、前出の選択及びスクリーニングカスケードから同定された有益な突然変異を幾つもの異なる方法で、単純な付加的手法によるか、或いは更なる選択を伴う組換えライブラリ手法を用いるかのいずれかによって組み換えた。

【０９９６】

配列解析から、リード抗体配列の多くに高頻度に見られる2つのシングル点突然変異「ホットスポット」、即ち、V_H　ＣＤＲ３のＩ９８Ｍ及びV_L　ＣＤＲ２のＱ５０Ｒ（Ｋａｂａｔ付番）があることが示唆された。これらの2つの突然変異を標準的な分子生物学的技術を用いて３３＿６４０００１コンストラクトにグラフトし、新規抗体３３＿６４００３６を作成した。更なる組換えにおいて、３３＿６４００４７のV_Hを３３＿６４００３６のV_Lと対にすることにより、抗体３３＿６４０１１７を作成した。これらは付加的手法を用いた配列組換えの例である。配列番号を表２６に示す。

【０９９７】

【表４２】

表 26. IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640036	配列番号 352	配列番号 357	配列番号 353 配列番号 354 配列番号 355	配列番号 358 配列番号 359 配列番号 360
33_640117	配列番号 362	配列番号 367	配列番号 363 配列番号 364 配列番号 365	配列番号 368 配列番号 369 配列番号 370

【０９９８】

加えて、V_H ＣＤＲ３及びV_L ＣＤＲ３領域を網羅するブロック突然変異誘発ライブラリからの選択アウトプットが親和性の向上及び良好な配列多様性を示していたため、集団クローニング手法を用いて組み換えた。ラウンド３の選択アウトプットを組み換えることにより、ランダムに対となった、個別にランダム化されたV_H ＣＤＲ３及びV_L ＣＤＲ３配列を含むクローンのライブラリを形成した。次にこれらの組換えV_H ＣＤＲ３／V_L ＣＤＲ３ライブラリを、ビオチン化Ｈｉｓ ＡｖｉヒトＩＬ－３３野生型抗原（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）とビオチン化Ｈｉｓ Ａｖｉ突然変異体ＩＬ－３３抗原（ＩＬ３３－１１、配列番号６４３）とを順次のラウンドで交互に用いるか、或いは全てのラウンドにおいてビオチン化Ｈｉｓ Ａｖｉ ＩＬ３３－１１抗原のみを用いるリボソームディスプレイ選択において使用した。選択は、漸減濃度のビオチン化抗原（５回の選択ラウンドで５０ｎＭ～３０ｐＭ）の存在下で、本質的に個別のＣＤＲ３ライブラリに関して記載されるとおり実施した。

【０９９９】

組換えV_H ＣＤＲ３／V_L ＣＤＲ３ライブラリの選択アウトプットからの代表的な複数の個別ｓｃＦｖの粗ｓｃＦｖ含有ペリプラズム抽出物を調製した。ビオチン化Ｈｉｓ Ａｖｉ ＩＬ３３－０１又はビオチン化Ｈｉｓ ＡｖｉカニクイザルＩＬ－３３がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３ｖ２００６４ ＩｇＧ又はＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４００２７ ＩｇＧに結合するのを阻害する抗ＩＬ－３３抗体の能力を、記載のとおり生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。親ｓｃＦｖ及び予備的な組換えで作成されたリードと比較したとき有意に向上した阻害効果を示したｓｃＦｖ変異体をＤＮＡシーケンシングにかけ、精製ｓｃＦｖとしてユニークな組換え変異体を作製し、前節に記載したとおり試験した。

【１０００】

これらの組換えライブラリから得られた最適化抗体は、３３＿６４００７６、３３＿６４００８１、３３＿６４００８２、３３＿６４００８４、３３＿６４００８６及び３３＿６４００８７によって例示される。これらの抗体の配列番号を表２７に示す。

【１００１】

【表４３】

表 27. IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640076	配列番号 372	配列番号 377	配列番号 373 配列番号 374 配列番号 375	配列番号 378 配列番号 379 配列番号 380
33_640081	配列番号 382	配列番号 387	配列番号 383 配列番号 384 配列番号 385	配列番号 388 配列番号 389 配列番号 390
33_640082	配列番号 392	配列番号 397	配列番号 393 配列番号 394 配列番号 395	配列番号 398 配列番号 399 配列番号 400
33_640084	配列番号 402	配列番号 407	配列番号 403 配列番号 404 配列番号 405	配列番号 408 配列番号 409 配列番号 410
33_640086	配列番号 412	配列番号 417	配列番号 413 配列番号 414 配列番号 415	配列番号 418 配列番号 419 配列番号 420
33_640087	配列番号 422	配列番号 427	配列番号 423 配列番号 424 配列番号 425	配列番号 428 配列番号 429 配列番号 430

【１００２】

リボソームディスプレイ選択手順の間、反復的なＰＣＲ増幅ラウンドの結果としてｓｃＦｖフォーマットのこれらの抗体の可変領域に更なる自然突然変異が導入された。これらのイベントによりアウトプットの配列多様性が増すが、それらがフレームワーク領域に起こると望ましくない場合が多い。従って３３＿６４００７６、３３＿６４００８１、３３＿６４００８２、３３＿６４００８４、３３＿６４００８６及び３３＿６４００８７のフレームワーク領域に起こった自然突然変異を実施例３に記載されるとおり標準的な分子生物学的技術を用いてＩｇＧコンストラクト上で生殖細胞系列に復帰させた。ＣＤＲ又はＣＤＲに隣接するＶｅｒｎｉｅｒ残基（例えばＫａｂａｔ付番によるV_H位置２７、２８、

２９、３０、９３及び９４）のいずれかに起こったかかる自然突然変異は、変えないままとした。親和性を増加させるための更なる戦略として、先に同定された「ホットスポット」（V_L　ＣＤＲ２のＱ５０Ｒ突然変異）もまた同時にコンストラクトにグラフトした。これらの生殖細胞系列化及びホットスポットグラフト修飾から得られた抗体は、それぞれ３３＿６４００７６、３３＿６４００８１、３３＿６４００８２、３３＿６４００８４、３３＿６４００８６及び３３＿６４００８７のそれらの親抗体に対応して３３＿６４００７６－１、３３＿６４００８１－Ａ、３３＿６４００８２－２、３３＿６４００８４－２、３３＿６４００８６－２及び３３＿６４００８７－２と命名した。これらの抗体の配列番号を表２８に示す。

【１００３】

【表４４】

表 28. IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640076-1	配列番号 432	配列番号 437	配列番号 433 配列番号 434 配列番号 435	配列番号 438 配列番号 439 配列番号 440
33_640081-A	配列番号 442	配列番号 447	配列番号 443 配列番号 444 配列番号 445	配列番号 448 配列番号 449 配列番号 450
33_640082-2	配列番号 452	配列番号 457	配列番号 453 配列番号 454 配列番号 455	配列番号 458 配列番号 459 配列番号 460
33_640084-2	配列番号 462	配列番号 467	配列番号 463 配列番号 464 配列番号 465	配列番号 468 配列番号 469 配列番号 470
33_640086-2	配列番号 472	配列番号 477	配列番号 473 配列番号 474 配列番号 475	配列番号 478 配列番号 479 配列番号 480
33_640087-2	配列番号 482	配列番号 487	配列番号 483 配列番号 484 配列番号 485	配列番号 488 配列番号 489 配列番号 490

【１００４】

更なるＣＤＲの最適化

親和性を増加させるための別の戦略として、更なるＣＤＲを最適化した。記載されるとおりの標準的な分子生物学的技術（Ｃｌａｃｋｓｏｎ　２００４）を用いた可変重鎖（V_H）ＣＤＲ１及びＣＤＲ２並びに軽鎖（V_L）ＣＤＲ１及びＣＤＲ２のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発により、生殖細胞系列化した親（３３＿６４０００１）に由来する大規模ｓｃＦｖ－ファージライブラリを作成した。選択及びスクリーニングは、$V_H V_L$ ＣＤＲ３ライブラリに関して記載したとおり実施した。最も改良された抗体変異体はV_H ＣＤＲ２ライブラリから得られた。これらは、３３＿６４０１６６、３３＿６４０１６

９、３３＿６４０１７０によって例示される。これらの抗体の配列番号を表２９に示す。

【１００５】

【表４５】

表 29. IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640166	配列番号 322	配列番号 327	配列番号 323 配列番号 324 配列番号 325	配列番号 328 配列番号 329 配列番号 330
33_640169	配列番号 332	配列番号 337	配列番号 333 配列番号 334 配列番号 335	配列番号 338 配列番号 339 配列番号 340
33_640170	配列番号 342	配列番号 347	配列番号 343 配列番号 344 配列番号 345	配列番号 348 配列番号 349 配列番号 350

【１００６】

親和性の更なる向上を実現するための付加的戦略として、標準的な分子生物学的方法を用いて３３＿６４００７６－１、３３＿６４００８２－２、３３＿６４００８６－２及び３３＿６４００８７－２のＩｇＧコンストラクトに３３＿６４０１６６、３３＿６４０１６９及び３３＿６４０１７０のV_H ＣＤＲ２配列をグラフトした。これらの組換えによって得られた抗体は、３３＿６４００７６－４、３３＿６４００８２－４、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８２－７、３３＿６４００８６－６及び３３＿６４００８７－７によって例示された。配列の起源及び配列番号を表３０に示す。

【１００７】

【表４６】

表 30. IL33 抗体の配列起源及び配列番号

IgG1	起源	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640076-4	33_640076-1 への 33_640170 の V_H CDR2 配列の グラフト	配列番号 492	配列番号 497	配列番号 493 配列番号 494 配列番号 495	配列番号 498 配列番号 499 配列番号 500
33_640082-4	33_640082-2 への 33_640166 の V_H CDR2 配列の グラフト	配列番号 502	配列番号 507	配列番号 503 配列番号 504 配列番号 505	配列番号 508 配列番号 509 配列番号 510
33_640082-6	33_640082-2 への 33_640169 の V_H CDR2 配列の グラフト	配列番号 512	配列番号 517	配列番号 513 配列番号 514 配列番号 515	配列番号 518 配列番号 519 配列番号 520
33_640082-7	33_640082-2 への 33_640170 の V_H CDR2 配列の グラフト	配列番号 522	配列番号 527	配列番号 523 配列番号 524 配列番号 525	配列番号 528 配列番号 529 配列番号 530
33_640086-6	33_640086-2 への 33_640169 の V_H CDR2 配列の グラフト	配列番号 532	配列番号 537	配列番号 533 配列番号 534 配列番号 535	配列番号 538 配列番号 539 配列番号 540
33_640087-7	33_640087-2 への 33_640170 の V_H CDR2 配列の グラフト	配列番号 542	配列番号 547	配列番号 543 配列番号 544 配列番号 545	配列番号 548 配列番号 549 配列番号 550

【１００８】

集団クローニング及び選択手法を用いて、有益なV_H ＣＤＲ３／V_L ＣＤＲ３及びV_H ＣＤＲ２配列の組換えもまた行った。V_H ＣＤＲ２領域を網羅するブロック突然変異誘発ライブラリからのラウンド３の選択アウトプットを、標準的な分子生物学的技術を用いた集団クローニング手法で組換えV_H ＣＤＲ３／V_L ＣＤＲ３ライブラリのラウンド３の選択アウトプットと組み換えた。多数のｓｃＦｖ変異体を含む選択アウトプットを組み換えることにより、V_H ＣＤＲ３／V_L ＣＤＲ３及びV_H ＣＤＲ２選択から得られたランダムに対となった配列を含むクローンのライブラリを形成した。選択は、

漸減濃度のビオチン化抗原（典型的には５回の選択ラウンドで３ｎＭ～３ｐＭ）の存在下で$V_H V_L$ＣＤＲ３ライブラリに関する記載のとおり実施した。選択アウトプットからの代表的な複数の個別ｓｃＦｖからの粗ｓｃＦｖ含有ペリプラズム抽出物を、$V_H V_L$ＣＤＲ３ライブラリに関して記載されるとおり生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）アッセイでスクリーニングした。親ｓｃＦｖ及び予備的な組換えで作成されたリードと比較したとき有意に向上した阻害効果を示したｓｃＦｖ変異体をＤＮＡシーケンシングにかけた。

【１００９】

３３＿６４００２７を利用したエピトープ競合アッセイがその感度の限界に達したため、精製ｓｃＦｖ試料の試験には、３３＿６４０１１７を使用したアッセイを用いた。このアッセイは、本質的に３３ｖ２００６４競合アッセイに関して記載されるとおりであったが、但し以下の修正を加えた：２．５ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４０１１７を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレートに加えた。これに続いて、ヒトアッセイ用の０．７５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた０．１２ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１の２．５マイクロリットルを含有する溶液又はカニクイザルアッセイ用の１．５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた０．２４ｎＭビオチン化カニクイザルＩＬ－３３を含有する溶液を加えた。１時間及び一晩のインキュベーション後に蛍光を読み取った。両方の時点で最も効力の高い試料をＩｇＧへの再フォーマット化に進めた。

【１０１０】

精製ｓｃＦｖとしてのユニークな組換え変異体を評価し、次に最も活性の高いｓｃＦｖを選択して、実施例１に記載されるとおりＩｇＧ１フォーマットに変換した。これらの組換えライブラリから得られた抗体は、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７によって例示される。リボソームディスプレイ選択の間に３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７のフレームワーク領域に導入された自然突然変異は、本節で先に記載したとおり生殖系列配列に復帰させ、それらの生殖細胞系列化した対応物を、それぞれ３３＿６４０２０１－２及び３３＿６４０２３７－２と命名した。これらの抗体の配列番号を表３１に示す。

【１０１１】

【表４７】

表 31. IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列	VH CDR 1,2,3	VL CDR 1,2,3
33_640201	配列番号 552	配列番号 557	配列番号 553 配列番号 554 配列番号 555	配列番号 558 配列番号 559 配列番号 560
33_640237	配列番号 562	配列番号 567	配列番号 563 配列番号 564 配列番号 565	配列番号 568 配列番号 569 配列番号 570
33_640201-2	配列番号 572	配列番号 577	配列番号 573 配列番号 574 配列番号 575	配列番号 578 配列番号 579 配列番号 580
33_640237-2	配列番号 582	配列番号 587	配列番号 583 配列番号 584 配列番号 585	配列番号 588 配列番号 589 配列番号 590

【１０１２】

合理的な組換え又は集団手法によってV_H ＣＤＲ３／V_L ＣＤＲ３及びV_H ＣＤＲ２に関して最適化した抗体のデータは、図４４及び図４５の３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７によって例示される。

【１０１３】

精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＭＡｂへの結合の阻害

ビオチン化Ｈｉｓ ＡｖｉヒトＩＬ－３３又はカニクイザルＨｉｓ Ａｖｉ ＩＬ－３３がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４０１１７ ＩｇＧに結合するのを阻害する抗ＩＬ－３３抗体の能力を、上記に記載したとおり生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。

【１０１４】

図４４Ａは、ビオチン化ヒトＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１）がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４０１１７ ＩｇＧに結合することによって生成される１時間インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の抗体３３ｖ２００６４、３３＿６４００５０、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【１０１５】

図４４Ｂは、ビオチン化ヒトＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１）がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３

＿６４０１１７　ＩｇＧに結合することによって生じる一晩インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の抗体３３ｖ２００６４、３３＿６４００５０、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【１０１６】

図４４Ｃは、ビオチン化カニクイザルＨｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ－３３がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４０１１７　ＩｇＧに結合することによって生成される１時間インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の抗体３３ｖ２００６４、３３＿６４００５０、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。

【１０１７】

【表４８】

表 32. 117 エピトープ競合アッセイにおける IgG1 抗体の IC50 値

抗体	IC50 (nM)		
	117-WT 1 時間	117-WT 一晩	117-カニクイザル 1 時間
33v20064 IgG	150	689	788
33_640050 IgG	0.3	1.5	4.1
33_640076-4 IgG	0.1	0.1	0.6
33-640081 IgG	0.3	0.6	10
33_640082-6 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640082-7 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640084-2 IgG	0.3	0.3	0.8
33_640086-6 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640087-7 IgG	0.1	0.1	0.2
33_640201 IgG	0.2	0.2	0.3
33_640237 IgG	0.1	0.1	1.8

【１０１８】

ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＩＬ－８産生の阻害

Ｈｕｖｅｃ　ＩＬ－８産生アッセイでＩｇＧを試験した。先述のとおり試験抗体の存在下又は非存在下で細胞をＮ末端Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）又は哺乳類完全長ＩＬ－３３細胞ライセート（ＦＬ－ＩＬ３３ライセート）に曝露した。$ＩＣ_{５０}$値を計算した。以下の表３３に要約する。

【１０１９】

図４５Ａは、試験抗体３３＿６４００５０、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７の存在下でＩＬ３３－０１によって刺激したＨＵＶＥＣを示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答（ＩＬ－８産生）のパーセンテージである）。

【１０２０】
図４５Ｂは、試験抗体３３＿６４００５０、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１及び３３＿６４０２３７の存在下で完全長ＩＬ－３３細胞ライセートによって刺激したＨＵＶＥＣを示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答（ＩＬ－８産生）のパーセンテージである）。
【１０２１】
【表４９】

表 33. Huvec IL-8 アッセイにおける IC50 値

抗体	IC50 (nM)	
	対 His Avi IL-33	対完全長 IL-33 細胞ライセート
33_640076 -4	0.032	0.095
33_640082-6	0.030	0.097
33_640082-7	0.031	0.095
33_640084-2	0.036	0.132
33_640086-6	0.026	0.081
33_640087-7	0.025	0.073
33_640201	0.046	0.101
33_640237	0.056	0.091

【１０２２】
ＩＧＬＪ配列の生殖細胞系列化
抗体３３＿６４００７６－４、３３＿６４００８１－Ａ、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８２－７、３３＿６４００８４－２、３３＿６４００８６－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１－２及び３３＿６４０２３７－２のＶ$_L$フレームワーク領域のアミノ酸配列を、ＩＭＧＴデータベースの既知のヒトＩＧＬＪ生殖系列配列とアラインメントし（Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．Ｐ．ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００９．３７（Ｄａｔａｂａｓｅ ｉｓｓｕｅ）：Ｄ１００６－Ｄ１０１２）、配列類似性によって最も近縁の生殖細胞系列を同定した。これらの抗体の全てについて、これはＩＧＬＪ２であった（これは、これらの抗体と比べてＶ$_L$領域の位置１０４（Ｋａｂａｔ付番）に単一のアミノ酸の違いを有する）。この残基を実施例３に記載されるとおり標準的な分子生物学的方法を用いて生殖細胞系列に復帰させた。得られた抗体は、それぞれ３３＿６４００７６－４、３３＿６４００８１－Ａ、３３＿６４００８２－６、３３＿６４００８２－７、３３＿６４００８４－２、３３＿６４００８６－６、３３＿６４００８７－７、３３＿６４０２０１－２及び３３＿６４０２３７－２のそれらの親系統に対応して、３３＿６４００７６－４Ｂ、３３＿６４００８１－ＡＢ、３３＿６４００８２－６Ｂ、３３＿６４００８２－７Ｂ、３３＿６４００８４－２Ｂ、３３＿６４００８６－６Ｂ、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４０２０１－２Ｂ及び３３＿６４０２３７－２Ｂと命名した。これらの抗体のＶ$_H$及びＶ$_L$領域の配列番号を表３４に示す。
【１０２３】

【表５０】

表 34. 生殖細胞系列化 IL33 抗体の配列

IgG1	VH 配列	VL 配列
33_640076-4B	配列番号 592	配列番号 594
33_640081-AB	配列番号 596	配列番号 598
33_640082-6B	配列番号 600	配列番号 602
33_640082-7B	配列番号 604	配列番号 606
33_640084-2B	配列番号 608	配列番号 610
33_640086-6B	配列番号 612	配列番号 614
33_640087-7B	配列番号 616	配列番号 618
33_640201-2B	配列番号 620	配列番号 622
33_640237-2B	配列番号 624	配列番号 626

【１０２４】

実施例９　インビボ気道炎症モデル

ＩＬ－３３サイトカイントラップのクローニング、発現及び精製

マウスＩＬ－１ＲＡｃＰ及びマウスＳＴ２のタンパク質配列をＳｗｉｓｓ　Ｐｒｏｔから入手した（それぞれ受託番号Ｑ６１７３０及びＰ１４７１９）。Ｅｃｏｎｏｍｉｄｅｓ　ｅｔ　ａｌ　２００３に基づきマウスＩＬ－３３サイトカイントラップを設計し、これは、ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分に融合したアミノ酸１～３５９　Ｑ６１７３０及びアミノ酸２７～３３２　Ｐ１４７１９からなった。タンパク質配列をコドン最適化し（Ｇｅｎｅａｒｔ）、ｐＤＥＳＴ１２．２　ＯｒｉＰにクローニングし、ＩＬ－１ＲＡｃＰ由来の天然シグナルペプチドを利用して細胞から培地中にタンパク質を分泌させた。ＣＨＯ細胞における発現のため、ゲートウェイリンカーをオーバーラッププライマーＰＣＲによって取り除いた。トラップ発現ベクターをＣＨＯ一過性哺乳類細胞にトランスフェクトした。マウスＩＬ－３３トラップを発現させて、培地中に分泌させた。回収物をプールし、ろ過した後、プロテインＡクロマトグラフィーを用いて精製した。培養上清を５ｍｌ　Ｈｉｔｒａｐプロテイン Ａカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードし、１×ＤＰＢＳで洗浄し、結合したトラップを０．１Ｍクエン酸ナトリウム（ｐＨ３．０）を使用してカラムから溶出させて、トリス－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）を加えることにより中和した。溶出した材料をＳ２００　１６：６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘカラム（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して１×ＤＰＢＳ中のＳＥＣによって更に精製し、濃度を分光光度法でアミノ酸配列に基づく吸光係数を用いて決定した（Ｍａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００（１）：７４－８０（１９９２））。

【１０２５】

ヒト化ＩＬ－３３マウス

ヒト化ＩＬ－３３マウスの作成方法については、既に実施例４に記載した。気道及び／又はアレルギー性炎症のモデルにおいてこのヒト化マウスを使用して、抗ヒトＩＬ－３３抗体の効果を評価する。

【１０２６】
インビボ気道炎症モデル
マウスにおけるアルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ）（ＡＬＴ）誘発性気道炎症のモデルについては、以前記載されている（Ｋｏｕｚａｋｉ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１１，１８６：４３７５－４３８７；Ｂａｒｔｅｍｅｓ ｅｔ ａｌ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２０１２，１８８：１５０３－１５１３）。内因性ＩＬ－３３はＡＬＴ曝露後に急速に放出され、ＩＬ－３３依存性ＩＬ－５産生及び肺における好酸球増加（ｅｏｓｉｎｐｈｉｌｉａ）を駆動する。雄又は雌野生型又はヒト化ＩＬ－３３マウス（６～１０週齢）をイソフルラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）で短時間麻酔し、２５μｇのＡＬＴ抽出物（Ｇｒｅｅｒ、Ｌｅｎｏｉｒ，ＮＣ）又は媒体のいずれかを５０μｌの総容積で鼻腔内投与した。ＡＬＴによる鼻腔内攻撃の２４時間前（腹腔内処理）又は2時間前（鼻腔内処理）に、試験物質：ＩＬ３３０００４ ＩｇＧ（配列番号１２及び１７）、Ｈ３３８Ｌ２９３ ＩｇＧ（配列番号１８２及び１８７）、マウスＩＬ－３３ Ｔｒａｐ、３３＿６４００５０（配列番号３０２及び３０７）、アイソタイプ対照ＩｇＧ（ＮＩＰ２２８）又は媒体（ＰＢＳ、１０ｍｌ／ｋｇ）によってマウスを腹腔内処理又は鼻腔内処理した。攻撃の２４時間後、マウスをペントバルビタールナトリウムによって麻酔死させた後、瀉血及び気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を行った。気管カニューレによる洗浄（０．３ｍｌ、０．３ｍｌ及び０．４ｍｌ）によって気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を回収した。ＢＡＬＦを遠心し、細胞をカウントし（ＦＡＣＳ（ＦａｃｓＣＡＬＩＢＥＲ、ＢＤ）による総細胞）、上清をサイトカインに関してＥＬＩＳＡ（Ｍｅｓｏ Ｓｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）によって分析した。Ｄｉｆｆ－Ｑｕｉｋ（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＵＫ）で染色したサイトスピン調製物に関して細胞分画カウント（２００細胞／スライド）を実施した。全ての作業は、適切なプロジェクトライセンス権限下で英国内務省（ＵＫ Ｈｏｍｅ Ｏｆｆｉｃｅ）倫理及び飼育管理基準に則り行った。
【１０２７】
図４６は、Ｈ３３８Ｌ２９３が野生型ＢＡＬＢ／ｃマウスのＡＬＴ誘発性ＢＡＬ ＩＬ－５及び好酸球増加を用量依存的に阻害することを示している。２５ｕｇのＡＬＴによる攻撃前－２時間の時点で試験物質を鼻腔内投与した（括弧内に示すとおり１０、３０又は１００ｍｇ／ｋｇ）。ＡＬＴ攻撃の２４時間後にＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５（図４６Ａ）及び好酸球（図４６Ｂ）の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、～～ｐ＜０．０１ 対照ｍＡｂとの比較（ｎ＝４～８）。マウスＩＬ－３３ Ｔｒａｐを陽性対照として使用した。
【１０２８】
図４７は、Ｈ３３８Ｌ２９３（３０ｍｇ／ｋｇ）及びマウスＩＬ－３３ Ｔｒａｐ（１０ｍｇ／ｋｇ）がヒト化ＩＬ－３３マウスのＡＬＴ誘発性ＢＡＬ ＩＬ－５を阻害するが、ＩＬ３３０００４（３０ｍｇ／ｋｇ）は阻害しないことを示している。２５ｕｇのＡＬＴによる攻撃前－２時間の時点で試験物質を鼻腔内投与した。ＡＬＴ攻撃の２４時間後にＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊ｐ＜０．０１（ｎ＝４）。
【１０２９】
図４８は、３３＿６４００５０がヒト化ＩＬ－３３マウスのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）誘発性ＢＡＬ ＩＬ－５を用量依存的に阻害することを示している。２５ｕｇのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）による攻撃前－２４時間の時点で試験物質を腹腔内投与した（括弧内に示すとおり０．３、３又は３０ｍｇ／ｋｇ）。ＡＬＴ攻撃の２４時間後にＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊ｐ＜０．０１（ｎ＝４～５）。

【１０３０】
実施例１０　抗ＩＬ－３３抗体の特徴付け
精製ＩｇＧによるＩＬ－３３のＳＴ２への結合の阻害
抗ＩＬ－３３抗体がビオチン化ＩＬ３３－０１のＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２受容体への結合を阻害する能力を、上記に原理を記載した生化学的ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）競合アッセイで評価した。精製ＩｇＧの希釈系列をヒトビオチン化ヒトＩＬ３３－０１（配列番号６３２）への結合に関してヒトＦＬＡＧ（登録商標）－Ｈｉｓタグ付加ＳＴ２と競合させることにより、精製ＩｇＧ調製物の活性を決定した。
【１０３１】
図４９Ａ：ヒトＩＬ－３３がヒトＳＴ２に結合することによって生成される一晩インキュベートした後のＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の抗体３３ｖ２００６４、３３＿６４００８７－７、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４００５０及び３３＿６４０２３７－２Ｂによる阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。
【１０３２】
ＩｇＧによるＨｕｖｅｃのＩＬ－８産生の阻害
Ｈｕｖｅｃ　ＩＬ－８産生アッセイでＩｇＧを試験した。先述のとおり試験抗体の存在下又は非存在下で細胞をＮ末端Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）に曝露した。IC_{50}値を計算した。以下の表３５に要約する。データは、ＩＧＬＪ配列の生殖細胞系列化が抗体効力にいかなる効果も及ぼさなかったことを示している。
【１０３３】
図４９Ｂは、試験抗体３３＿６４００８７－７、３３＿６４００８７－７Ｂ、３３＿６４０２３７－２及び３３＿６４０２３７－２Ｂの存在下でＩＬ３３－０１によって刺激したＨＵＶＥＣを示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答（ＩＬ－８産生）のパーセンテージである）。
【１０３４】
【表５１】

表 35. Huvec IL-8 アッセイにおける IC50 値

抗体	対 His Avi IL-33 の IC50 (nM)
33_640087-7	0.041
33_640087-7B	0.046
33_640237-2	0.105
33_640237-2B	0.067

【１０３５】
抗ＩＬ－３３抗体の選択性及び交差反応性
生殖細胞系列化抗ＩＬ－３３抗体の選択性及び交差反応性を、均一ＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）ＨＴＲＦ（登録商標）（均一時間分解蛍光、Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）に基づくＩＬ－３３：ｍＡｂ結合アッセイを用いて決定した。このアッセイでは、ＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４００８７－７Ｂ　ＩｇＧ（配列番号６１８及び６１８）又は３３＿６４０２３７－２Ｂ　ＩｇＧ（配列番号６２４及び６２６）への結合に関して試料がビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１（配列番号６３２）と競合した。

【１０３６】
ヒト、カニクイザル及びマウスＩＬ－３３　ＦＬＡＧ（登録商標）Ｈｉｓ（実施例１及び表２１に記載される）、ヒトＩＬ－１α及びＩＬ－１β（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）（表２１）又はラットＩＬ－３３（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）について、試料の５マイクロリットルの各希釈物を３８４ウェル低容量アッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ、３６７３）に加えることにより、ＤｙＬｉｇｈｔ６５０標識３３＿６４００８７－７Ｂ又はＤｙＬｉｇｈｔ６５０標識３３＿６４０２３７－２Ｂに対するヒトＩＬ－３３の結合の阻害に関して試験した。次に、１．２ｎＭ　ＤｙＬｉｇｈｔ６５０標識３３＿６４００８７－７Ｂ又は３３＿６４０２３７－２Ｂを含有する溶液を調製し、２．５マイクロリットルをアッセイプレート（製造者の指示に従いキット（Ｉｎｎｏｖａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、３２６－００１０）を使用して標識した）に加えた。これに続いて、０．７５ｎＭストレプトアビジンクリプテート検出（Ｃｉｓｂｉｏ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、６１０ＳＡＫＬＢ）と組み合わせた０．１２ｎＭビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１を含有する２．５マイクロリットルの溶液を加えた。希釈は全て、ダルベッコＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１４１９０１８５）中０．８Ｍフッ化カリウム（ＶＷＲ、２６８２０．２３６）及び０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、ＰＡＡ、Ｋ０５－０１３）を含有するアッセイ緩衝液で実施した。アッセイプレートを室温で４時間、続いて４℃で１８時間インキュベートし、ＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して６２０ｎｍ及び６６５ｎｍ発光波長で時間分解蛍光を読み取った。各試料の６６５／６２０ｎｍ比、続いて％デルタＦ値を計算することにより、データを分析した。６６５／６２０ｎｍ比を使用することにより、式１を用いて試料干渉を補正した。次に、式２を用いて各試料の％デルタＦを計算した。陰性対照（非特異的結合）は、ストレプトアビジンクリプテート検出と組み合わせたビオチン化ヒトＩＬ－３３をストレプトアビジンクリプテート検出のみに置き換えることによって定義した。続いて％デルタＦ値を用いて、式３に記載されるとおり％特異的結合を計算した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して、４パラメータロジスティック方程式（式４）を用いたカーブフィッティングによりIC_{50}値を決定した。これらの結果から、３３＿６４００８７－７Ｂ及び３３＿６４０２３７－２Ｂはカニクイザル ＩＬ－３３と交差反応するが、マウスＩＬ－３３、ラットＩＬ－３３、ヒトＩＬ－１α又はヒトＩＬ－１βとは交差反応しないことが実証された。

【１０３７】
図５０Ａ：ビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４００８７－７Ｂ（配列番号６１８及び６１８）に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の試験タンパク質による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の試験試料濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。ヒト及びカニクイザルＩＬ－３３ではＦＲＥＴシグナルの阻害が観察されたが、マウス又はラットＩＬ－３３、ヒトＩＬ－１α又はヒトＩＬ－１βでは観察されなかった。

【１０３８】
図５０Ｂ：ビオチン化ヒトＩＬ－３３－０１がＤｙＬｉｇｈｔ標識３３＿６４０２３７－２Ｂ（配列番号６２４及び６２６）に結合することによって生成されるＦＲＥＴシグナルの、漸増濃度の試験タンパク質による阻害を示す（ｘ軸はモル濃度単位の試験試料の濃度であり、ｙ軸はパーセント特異的結合である）。ヒト及びカニクイザルＩＬ－３３ではＦＲＥＴシグナルの阻害が観察されたが、マウス又はラットＩＬ－３３、ヒトＩＬ－１α又はヒトＩＬ－１βでは観察されなかった。

【１０３９】
ＨＵＶＥＣ　ＩＬ－８アッセイにおける内因性ＩＬ－３３の中和
抗体が内因性ＩＬ－３３の中和能を有するかどうかを決定するため、ヒト肺組織を使用して内因性ＩＬ－３３タンパク質の供給源を提供した。この研究はＮＲＥＳ　Ｅａｓｔ　ｏｆ　Ｅｎｇｌａｎｄ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｅａｓｔ）研究倫理委員会（参照番号０８／Ｈ０３０４／５６ｐ５）によって承認されたものであり、組織は患者のインフォームドコンセントを得た上で供与を受けた。Ｐａｐｗｏｒｔｈ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ　ＮＨＳ　Ｔ

ｒｕｓｔ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｉｓｓｕｅ Ｂａｎｋにより、氷上でＡｑｉｘ ＲＳ－Ｉ媒体（Ａｑｉｘ Ｌｔｄ）中にある肺癌患者及び肺移植手術からの非癌性隣接組織が提供された。組織はＰＢＳ中４００ｍｇ／ｍＬで希釈し、組織ホモジナイザーを使用して３０秒間ホモジナイズした。遠心によって細胞残屑を除去した。ＨＵＶＥＣを様々な濃度の肺ライセートで刺激した。ＩＬ－８放出を刺激したライセートのＥＣ$_{50}$濃度を抗体中和試験に選択した。細胞を先述のとおり試験抗体の存在下又は非存在下で肺ライセートに曝露した。ｓＳＴ２はＩＬ－８応答を最大約７０％阻害したことから、全てではないが、ほとんどのＩＬ－８産生が肺ライセート内の内因性ＩＬ－３３によって駆動されたことが示唆される。３３＿６４００５０及び３３＿６４００８７－７Ｂ ＩｇＧはｓＳＴ２と同程度にＩＬ－８応答を阻害し、内因性ＩＬ－３３を結合して中和するそれらの能力を実証した。３３＿６４００５０ ＩｇＧは肺ライセートを０．０３２ｎＭのＩＣ５０で中和した。３３＿６４００８７－７Ｂは肺ライセートを０．０１３ｎＭのＩＣ$_{50}$で中和した。ｓＳＴ２は肺ライセートを０．０１９ｎＭのＩＣ５０で中和した。

【１０４０】

図５１は、ｓＳＴ２と比較した、試験抗体３３＿６４００５０及び３３＿６４００８７－７Ｂの存在下でヒト肺ライセートによって刺激したＨＵＶＥＣを示す（ｘ軸はモル濃度単位の抗体濃度であり、ｙ軸は最大応答（ＩＬ－８産生）のパーセンテージである）。ｓＳＴ２はＩＬ－８応答を最大約７０％阻害したことから、全てではないが、ほとんどのＩＬ－８産生が肺ライセート内の内因性ＩＬ－３３によって駆動されたことが示唆される。両方の抗体ともｓＳＴ２と同程度にＩＬ－８応答を阻害し、内因性ＩＬ－３３を結合して中和するそれらの能力を実証した。

【１０４１】

インビボ気道炎症モデル

ヒト化ＩＬ－３３マウスの作成方法については、既に実施例４に記載した。実施例９に記載されるとおりアルテルナリア・アルテルナータ（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ）（ＡＬＴ）誘発性気道炎症のモデルにヒト化マウスを使用して、３３＿６４００８７－７Ｂの効果を評価した。雄又は雌野生型又はヒト化ＩＬ－３３マウス（６～１０週齢）をイソフルラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）で短時間麻酔し、２５μｇのＡＬＴ抽出物（Ｇｒｅｅｒ、Ｌｅｎｏｉｒ，ＮＣ）又は媒体のいずれかを５０μｌの総容積で鼻腔内投与した。ＡＬＴによる鼻腔内攻撃の２４時間前にマウスを試験物質：３３＿６４００８７－７Ｂ ＩｇＧ（配列番号６１８及び６１８）、アイソタイプ対照ＩｇＧ（ＮＩＰ２２８）又は媒体（ＰＢＳ、１０ｍｌ／ｋｇ）で腹腔内処理した。攻撃の２４時間後、マウスをペントバルビタールナトリウムによって麻酔死させた後、瀉血及び気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を行った。気管カニューレによる洗浄（０．３ｍｌ、０．３ｍｌ及び０．４ｍｌ）によって気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬＦ）を回収した。ＢＡＬＦを遠心し、上清をサイトカインに関してＥＬＩＳＡ（Ｍｅｓｏ Ｓｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）により分析した。全ての作業は、適切なプロジェクトライセンス権限下で英国内務省（ＵＫ Ｈｏｍｅ Ｏｆｆｉｃｅ）倫理及び飼育管理基準に則り行った。

【１０４２】

図５２は、３３＿６４００８７－７Ｂがヒト化ＩＬ－３３マウスのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）誘発性ＢＡＬ ＩＬ－５を用量依存的に阻害することを示している。２５ｕｇのアルテルナリア属（Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ）による攻撃前－２４時間の時点で試験物質を腹腔内投与した（括弧内に示すとおり０．１、１、３又は１０ｍｇ／ｋｇ）。ＡＬＴ攻撃の２４時間後にＢＡＬＦを採取し、ＩＬ－５の存在に関して分析した。一元配置ＡＮＯＶＡをボンフェローニの多重比較検定と共に用いて、試験物質の有意な効果を決定した。＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊ｐ＜０．０１（ｎ＝５～６）。

【１０４３】

実施例１１ 抗ＩＬ－３３抗体の親和性

組換えヒトＩＬ３３に対する抗ＩＬ－３３抗体断片（Ｆａｂ）の親和性を、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）によるリアルタイム相互作用モニタリングを用いて、及び３３＿６４００８

７－７Ｂについては平衡状態でＫｉｎＥｘＡ（商標）を用いて決定した。両方の方法論ともヒトＩＬ３３タンパク質をＳＥＣ－ＨＰＬＣによって精製することにより、ｂｉａｃｏｒｅ分析に対する抗原の品質及びまたＦａｂの品質も確保した。

【１０４４】

Ｂｉａｃｏｒｅ親和性分析

パパイン切断によって完全長ＩｇＧ１からＦａｂ断片を作成し、ＳＥＣによって精製した。Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００を用いて２５℃で抗体断片（Ｆａｂ）の親和性を計測した。標準的なアミンカップリング技法を用いてストレプトアビジンをＣ１チップ表面に１０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ４．５中４μｇ／ｍｌの濃度で共有結合的に固定化した。１１５～１７０ＲＵの範囲の典型的な最終ストレプトアビジン表面密度を達成した。組換え酵素ビオチン化ヒトＩＬ－３３（インハウスで作製）を飽和状態で約３０ＲＵのＦａｂ結合（Ｒｍａｘ）が可能となるようにＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液中４μｇ／ｍｌでストレプトアビジンチップ表面上にタイトレーションした。この低レベルのアナライト結合により、物質移動効果が確実に最小限となるようにした。

【１０４５】

ＩＬ－３３　ＦａｂをＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液中５ｎＭ～７８ｐＭに段階希釈して５０μｌ／分でチップ上に流し、３分の会合及び最長３０分までの解離とした。同じ条件下で複数の緩衝液単独注入を行い、ＢｉａＥｖａｌソフトウェア（バージョン２．０．１）を用いて分析した最終的なセンサーグラムセットのダブルリファレンスの差し引きを可能にした。チップ表面は３Ｍ　$MgCl_2$ のパルスで完全に再生した。

【１０４６】

ＨＥＫ－ＥＢＮＡ細胞で発現させたＳＴ２－Ｆｌａｇ－Ｈｉｓ１０（配列番号６５０）のヒトＩＬ－３３に対する親和性を、上記と同じ方法を用いてＢＩＡＣＯＲＥ（商標）により決定した。

【１０４７】

【表５２】

表 36. 抗 IL-33 Fab の Biacore 親和性結果

アナライト	Fit 設定	k_a (M^{-1} s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	R_{max}	Chi^2
33_640001 Fab	Rmax global	9.76 E+6	3.26 E-2	3340	27.0	0.022
33_640050 Fab	Rmax local	3.08 E+7	1.05 E-4	3.4	48.9	0.022
33_640087-7B Fab	Rmax local	2.20 E+7	9.42 E-6	0.43	30.7-32.8	0.010
ST2-FH 単量体	Rmax local	1.52 E+7	4.35 E-5	2.9	23.4	0.022

【１０４８】

ＫｉｎＥｘＡ親和性分析

ＳＰＲアッセイで見られた高親和性を確認するため、本発明者らは結合平衡除外アッセイ（ＫｉｎＥｘＡ）に取り掛かった。ＫｉｎＥｘＡは、より高い親和性のタンパク質間相互作用、特に表面ベースのバイオセンサー技法がその実用上の限界に達するｐＭ～ｐＭ未満の範囲のものを解くのに徐々に支持されつつある（Ｒａｔｈａｎａｓｗａｍｉ　Ｐ，Ｒｏａｌｓｔａｄ　Ｓ，Ｒｏｓｋｏｓ　Ｌ，Ｑｉａｏｊｕａｎ　ＪＳ，Ｌａｃｋｉｅ　Ｓ，Ｂａｂｃｏｏｋ　Ｊ．Ｄｅｍｏｎｓｔｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｎ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｇｅ

ｎｅｒａｔｅｄ ｓｕｂ－ｐｉｃｏｍｏｌａｒ ａｆｆｉｎｉｔｙ ｆｕｌｌｙ ｈｕｍａｎ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｏ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ－８．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ．２００５；３３４：１００４－１０１３）。

【１０４９】

抗体３３＿６４００８７－７Ｂの親和性を、ＫｉｎＥｘＡ ３２００で実施する結合平衡除外アッセイによって計測した。２００ｍｇの乾燥ＵｌｔｒａＬｉｎｋ Ｂｉｏｓｕｐｐｏｒｔアズラクトンビーズを２．５ｍｌの５０ｍＭ炭酸水素ナトリウムｐＨ８．４中１０μｇのＩＬ－３３（既述のとおり）と一定の撹拌を行いながら室温で２時間混合することにより、サンプリングビーズを調製した。ビーズをリンスし、１Ｍトリスｐ Ｈ８．７中１０ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡでブロックした。使用前に、ビーズをＤ－ＰＢＳ、０．０２％ナトリウムアジド中に再懸濁した。ＤＰＢＳ（ダルベッコＰＢＳ）中１ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ、０．０２％ナトリウムアジドで構成される試料緩衝液中に３３＿６４００８７－７Ｂ／ＩＬ－３３平衡混合物を調製した。２つの異なるＩｇＧ濃度を様々なＩＬ－３３濃度と共に使用し、即ち、５ｐＭの３３＿６４００８７－７Ｂを１２５ｐＭ～６１ｆＭに段階希釈したＩＬ－３３と共に、及び５００ｆＭ ３３＿６４００８７－７Ｂを６２．５ｐＭ～１５ｆＭに段階希釈したＩＬ－３３と共に（両方ともゼロＩＬ－３３対照を含んで行った）使用した。蛍光二次検出試薬は、ＤＰＢＳ中１ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ、０．０２％ナトリウムアジド、０．１％Ｔｗｅｅｎ ２０に希釈したＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ヤギ抗ヒト－Ｆｃであった。試料をＫｉｎＥｘＡにかけた一方で、２５℃に設定した温度制御キャビネットに収容した。データはＫｉｎＥｘＡ Ｐｒｏソフトウェア バージョン４．１．１１を使用して分析した。

【１０５０】

ＫｉｎＥｘＡアッセイは、３３＿６４００８７－７ＢがヒトＩＬ－３３に対して＜１４２ｆＭ（フェムトモル濃度）のK_Dを有することを示している（表３７）。

【１０５１】

【表５３】

表 37. 33_640087-7B IgG の KinExA 親和性結果

アナライト	推定 K_D (pM)	95%信頼区間 上限 K_D (pM)	95%信頼区間 下限 K_D (pM)
33_640087-7B	0.03	0.142	未決定

【１０５２】

実施例１２ 酸化ＩＬ－３３の活性

酸化ＩＬ－３３の活性を調査するインビボパイロットスタディ

実施例４において（Ｃｏｈｅｎ，Ｅ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｏｘｉｄａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ａｌａｒｍｉｎ ＩＬ－３３ ｒｅｇｕｌａｔｅｓ ＳＴ２－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ．Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．６：８３２７ ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ９３２７（２０１５）もまた参照のこと）、本発明者らは酸化したジスルフィド結合型のＩＬ－３３（ＤＳＢ ＩＬ－３３）の発見について記載し、この型がＳＴ２に結合しないことを示した。酸化ＩＬ－３３がＳＴ２とは独立して代替的な活性を有したかどうかを調べるため、ＳＴ２欠損マウスを反復用量のヒトＩＬ－３３で２、４又は６週間にわたり腹腔内処理又は鼻腔内処理した。複数の組織に対して組織学的分析を実施した。

【１０５３】

ＳＴ２欠損マウスを以前記載されているとおり作成した（Ｔｏｗｎｓｅｎｄ，Ｍ．Ｊ．

, Fallon, P. G., Matthews, D. J., Jolin, H. E., and McKenzie, A. N. J. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. J. Exp. Med. 191, 1069-1076)。雌ST2欠損マウス（12週齢）をイソフルラン（isofluorane）で短時間麻酔し、10μgのN末端His Avi IL-33（IL33-01、配列番号632；ロット番号CCH168、エンドトキシンレベル0.03EU/mg）、又は媒体（PBS）のいずれかを50μlの総容積で鼻腔内投与した。或いは、IL-33又は媒体はi.p.注射で投与した。このプロセスを毎週3回繰り返し、合計18回の処理を行った。IL-33による処理を2週間又は4週間のみ受けたマウスには、IL-33の投与前、最初の4週間又は2週間の投与週間にPBSを投与した。

【1054】

最終処理の24時間後、マウスをペントバルビタールナトリウムによって麻酔死させた後、瀉血及び気管支肺胞洗浄（BAL）を行った。EDTAでフラッシュしたシリンジを使用した心臓採血によって血液を収集した。血液学はSysmex XTVet血液分析器を使用して行った。残りの血液は遠心し、血漿を抽出した。気管カニューレによる洗浄（0.3ml、0.3ml及び0.4ml）によって気管支肺胞洗浄液（BALF）を回収した。BAL細胞をフローサイトメーター（MACSquant、Miltenye Biotec）によってカウントし（BAL総細胞数、BALFを遠心して上清を分離し、それをサイトカインに関してELISA（Meso Scale Discovery、Rockville, MD）によって分析した。Diff-Quik（Fisher Scientific、UK）で染色したサイトスピン調製物に対して細胞分画カウント（200細胞/スライド）を実施した。PBS洗浄後の肺に気管注入によって10%中性緩衝ホルマリン（NBF）を充満させて肺構造を維持し、NBF中に24～48時間浸漬固定した。次に、固定した肺試料を4つの等しい断面となるように横切断した後、一連のアルコール、キシレン及びパラフィンワックスで処理した。最後に、次に肺の横断切片をパラフィンワックスブロックに包埋した。分析及び炎症スコアリング評価のため4μm組織切片を切り出し、ヘマトキシリン-エオシン（H&E）染色した。全ての作業は、適切なプロジェクトライセンス権限下で英国内務省（UK Home Office）倫理及び飼育管理基準に則り行った。

【1055】

腹腔内又は鼻腔内経路によるIL-33曝露を調べるため、実施例4に記載されるとおりMilliporeヒトIL-33アッセイ（カタログ番号HTH17MAG-14K ロット2159117）を用いてBALF及び血漿中のヒトIL-33を計測した。sST2-Fcがアッセイシグナルを低下させる能力を用いて、ST2結合（還元）IL-33対非ST2結合（酸化）IL-33の存在を決定した。鼻腔内投与後、2、4及び6週のエンドポイント時点でIL-33はBALF及び血漿中に一貫して検出された。検出されたIL-33の大部分は酸化していた。単回腹腔内投与後、IL-33は投与後5時間に血漿中に一過性に検出されたが、24時間までには検出不能となった。反復IL-33投与後、2、4又は6週のエンドポイント時点でヒトIL-33がBALF又は血漿中に一貫して検出されることはなかった。これらのデータから、酸化IL-33の最も良好な全身曝露が鼻腔内投与によって達成されることが示された。

【1056】

図53A. インビボパイロットスタディの実験計画。6週間にわたるヒトIL-33又は媒体（PBS）の反復投与によってST2欠損マウスを腹腔内処理又は鼻腔内処理した（n=3～4匹/群）。最終IL-33投与後24時間で組織、BALF及び血清を採取した。

【1057】

図53B. BALB/cマウスにヒトIL-33を反復投与した後のBAL液中におけ

るヒトＩＬ－３３曝露の分析。図５３Ａに記載するとおり処理したマウスからのＢＡＬＦ中のヒトＩＬ－３３を計測した（ｘ軸は処理群を示し、ｙ軸は任意単位のヒトＩＬ－３３アッセイシグナルを示す）。ＩＬ－３３は鼻腔内投与後のＢＡＬＦにのみ検出された。検出されたＩＬ－３３はほとんどが酸化している（非ＳＴ２結合性である）ことが分かった。

【１０５８】

図５３Ｃ　ヒトＩＬ－３３（１０ｕｇ）の単回腹腔内投与後の血漿中におけるＩＬ－３３曝露の分析。投与後２、５、２４及び４８時間の時点で血漿中のヒトＩＬ－３３を計測した（ｘ軸は分析時点を示し、ｙ軸は任意単位のヒトＩＬ－３３アッセイシグナルを示す）。ＩＬ－３３は投与後５時間に血漿中に一過性に検出されたが、２４～４８時間までに検出不能となった。

【１０５９】

図５３Ｄ　ＢＡＬＢ／ｃマウスにヒトＩＬ－３３を反復投与した後の血漿中におけるＩＬ－３３曝露の分析。図５３Ａに記載するとおり処理したマウスからの血漿中のヒトＩＬ－３３を計測した（ｘ軸は処理群を示し、ｙ軸は任意単位のヒトＩＬ－３３アッセイシグナルを示す）。ＩＬ－３３は鼻腔内投与後の血漿にのみ検出された。検出されたＩＬ－３３はほとんどが酸化している（非ＳＴ２結合性である）ことが分かった。

【１０６０】

複数の組織に対して組織学的分析を実施した。肝臓、脳、脾臓、皮膚、胃、リンパ節又は心臓について、ヒトＩＬ－３３処理マウスに対照と比較して関連性のある異常なし。肺では、鼻腔内群にのみ、及び処理後６週間にのみ、対照と比較してＩＬ－３３処理マウスにリンパ球性血管周囲炎の増加が存在した。これは、酸化ＩＬ－３３への最も高い曝露と一致する（図５３）。結論として、ＳＴ２　ＫＯマウスをＩＬ－３３で処理すると、対照と比較してＩＬ－３３処理マウスの肺における血管周囲リンパ球浸潤の存在が増加する。この病理は酸化ＩＬ－３３によって媒介され得る。

【１０６１】

図５４Ａは、ＰＢＳを６週間にわたって鼻腔内投与したマウス（ｎ＝３）由来の肺組織の代表的なＨ＆Ｅ染色パラフィン切片を示す。

【１０６２】

図５４Ｂは、ＩＬ－３３を６週間にわたって鼻腔内投与したマウス（ｎ＝４）由来の肺組織の代表的なＨ＆Ｅ染色パラフィン切片を示す。

【１０６３】

ＩＬ－３３抗原処理マウス肺のパスウェイ解析

観察された炎症反応につながるマウス肺内の酸化ＩＬ－３３によって調節される経路に関して洞察を得るため、６週間ＰＢＳ処理動物対６週間ＩＬ－３３処理動物からの肺組織に対してマイクロアレイ解析を実施した。

【１０６４】

７匹のＳＴ２ＫＯマウス（上記に記載したとおりＰＢＳを３匹に投与し、ＩＬ３３－０１を４匹に投与した）から肺組織を採取し、３５０ｕＬのＲＬＴ緩衝液（Ｑｉａｇｅｎ　＃７９２１６）中に直接置いた。次にＱｉａｇｅｎ　ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ　＃８５３００）を製造者のプロトコルに従い使用して組織を破壊し、ＲＮｅａｓｙ線維組織キット（Ｑｉａｇｅｎ　＃７４７０４）を用いてＲＮＡを精製した。次にこのキットからの精製ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙマイクロカラム（Ｑｉａｇｅｎ　＃７４００４）を製造者のプロトコルに従い使用して濃縮した。次にＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社のＧｅｎｅＣｈｉｐ　ＷＴ　Ｐｌｕｓ試薬キット（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　＃９０２５１３）を使用してＲＮＡを一本鎖ＤＮＡに増幅し、マウストランスクリプトーム１．０（ＭＴＡ１．０）ジーンチップ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　＃９００７２０）にハイブリダイズし、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｆｌｕｉｄｉｃｓ　Ｓｔａｔｉｏｎで洗浄し、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｇｅｎｅｃｈｉｐ　Ｓｃａｎｎｅｒ　３０００　７Ｇでスキャンした。次にデータをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎコンソールで処理した。データをＭｉｃｒｏｓ

ｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌで分析し、４匹のＩＬ３３処理マウス中少なくとも２匹が対照群平均値から±１．２倍を超えるシグナルの変化を有した遺伝子を選別した。選別した遺伝子リストを生物学データベースネットワーク（ＢｉｏＤＢｎｅｔ　ｖ２．１）を使用してＫＥＧＧ　ＩＤに変換し、ＫＥＧＧパスウェイ解析（ｗｗｗ．ｋｅｇｇ．ｊｐ；ＫＥＧＧ　Ｍａｐｐｅｒ　ｖ２．５）で解析した。ＫＥＧＧパスウェイで解析した同じ遺伝子を、Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙパスウェイ解析（ＩＰＡ）（Ｑｉａｇｅｎ）もまた用いて分析した。ＩＰＡ解析は、細胞周期に関係する経路が調節されると見られることを示唆した。例示的な遺伝子を表３８に掲載する。

【１０６５】

【表５４】

表 38. ST2 欠損マウスにおいて鼻腔内 IL-33 治療により調節された遺伝子

	遺伝子記号
上方制御された細胞周期関連遺伝子 (>1.2 平均倍数変化)	HSPA1A, CEBP, CDKN1A, JUNB, AHCY, SOX2, MYC, ID2, HRAS, EGR1, WT1, JUND, COX4I1
下方制御された細胞周期関連遺伝子 (>-1.2 平均倍数変化)	IL1A, HGF, ERG, ZEB1, P10, DMTF1, ARHGAP18, PLA2R1, NSMCE2, CAV1

【１０６６】

ＨｕｖｅｃにおけるＤＳＢ　ＩＬ－３３のシグナル伝達

ヒト細胞で酸化（ＤＳＢ）ヒトＩＬ－３３に対する応答が観察され得るかどうかを確かめるため、インビトロでのヒト細胞の刺激を調査した。マウスマイクロアレイ解析では細胞周期に関係する経路の活性化が示されたため、ｐ３８　ＭＡＰキナーゼ及びＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル伝達を調べた。ヒト臍帯静脈内皮細胞（Ｈｕｖｅｃ）を製造者の指示に従い培養し、還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３で刺激した。ｐ－ｐ３８　ＭＡＰＫ又はｐ－ＳＴＡＴ５の核転座を免疫蛍光染色によって検出した。核染色強度のイメージング及び定量化はＡｒｒａｙＳｃａｎ　ＶＴｉ　ＨＣＳリーダー（Ｃｅｌｌｏｍｉｃｓ）で実施した。このアッセイは、ＮＦｋＢ　ｐ６５／ＲｅｌＡ核転座に関する記載と本質的に同じであったが、但し以下の修正を加えた。

【１０６７】

ｐ－ｐ３８　ＭＡＰＫアッセイについては、９６ウェル黒色壁透明平底コラーゲンＩコートプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　＃　６５５９５６）中の培養培地［ＥＧＭ－２　ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ　Ｋｉｔ　Ｓｕｐｐｌ．＆　Ｇｒｏｗｔｈ　Ｆａｃｔｏｒｓ（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－４１７６）含有ＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－３１５６）］にＨｕｖｅｃを１×１０^{4}／７５μｌ／ウェルで播種し、３７℃、５％CO_2で１８～２４時間インキュベートした。還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３の試験試料（デュプリケート）を９６ウェルＵ字底ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）内の完全培養培地中に所望の濃度に希釈し、Ｈｕｖｅｃプレートに７５ｕＬを加えて刺激を惹起した。１５分間又は３０分間の３７℃でのアッセイインキュベーション後、細胞を３．７％ホルムアルデヒド溶液に（３７℃に予め加温した５０ｕＬの１６％溶液を加えることにより）１５分間固定した。固定液を吸引し、１００μＬ／ウェルのＰＢＳで細胞を２回洗浄した。ｐ－ｐ３８に関して１：２５０希釈のホスホ－ｐ３８抗体（Ｃｅｌｌ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　＃９２１１Ｓ）で細胞を染色した。簡潔に言えば、細胞を室温で１５分間透過処理し、１５分間ブロックし、５０μＬの容積の一次抗体溶液で１時間染色した。プレートをブロッキング緩衝液で２回洗浄し、二次抗体溶液（１：４００希釈のＤｙＬｉｇｈｔ　４８８標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ

＃３５５５２）及びＨｏｅｃｈｓｔ核染色（１：１００００希釈のＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＃６２２４９）によって室温で１時間染色した。プレートをＰＢＳで２回洗浄した。細胞を１５０μＬ／ウェルＰＢＳの最終容積で保存し、黒色遮光性シール（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、＃６００５１８９）で覆い、後にＡｒｒａｙＳｃａｎ ＶＴｉ ＨＣＳリーダーで読み取った。好適なアルゴリズムを用いて核染色強度を計算した。データはＧｒａｐｈｐａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して分析した。

【１０６８】

ｐＳＴＡＴ５アッセイについては、９６ウェル黒色壁透明平底コラーゲンＩコートプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、＃６５５９５６）中の培養培地［ＥＧＭ－２ ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔ Ｋｉｔ Ｓｕｐｐｌ．＆ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－４１７６）含有ＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－３１５６）］にＨｕｖｅｃを１×10^4／７５μｌ／ウェルで播種し、３７℃、５％CO_2で１８～２４時間インキュベートした。この完全培地を吸引した後、細胞を１００ｕＬ ＰＢＳ／ウェルで２回洗浄し、このＰＢＳを吸引して、各ウェルに７５ｕＬの飢餓培地［ペニシリン／ストレプトマイシン含有ＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ、＃ＣＣ－３１５６）］を加えた。次に細胞を３７℃、５％CO_2で１８時間インキュベートした。還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ ＩＬ－３３の試験試料（デュプリケート）を９６ウェルＵ字底ポリプロピレンプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ、６５０２０１）内の飢餓培地中に所望の濃度に希釈し、Ｈｕｖｅｃプレートに７５ｕＬを加えて刺激を惹起した。１５分間又は３０分間の３７℃でのアッセイインキュベーション後、細胞を３．７％ホルムアルデヒド溶液に（３７℃に予め加温した５０ｕＬの１６％溶液を加えることにより）１５分間固定した。固定液を吸引し、１００μＬ／ウェルのＰＢＳで細胞を２回洗浄した。ｐ－ＳＴＡＴ５に関して、１：２５０希釈のホスホ－ＳＴＡＴ５ウサギ抗体Ｃ７１Ｅ５（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ ＃９３１４Ｓ）で細胞を染色し、これを上記に記載したとおり検出した。

【１０６９】

還元ＩＬ－３３によってｐ－ｐ３８ ＭＡＰＫシグナル伝達が惹起され、これは酸化によってＤＳＢ型になると失われ（図５５Ａ）、ＮＦｋＢシグナル伝達に関して先述したもの（実施例４～６）と同様であった。しかしながらＤＳＢ ＩＬ－３３はｐ－ＳＴＡＴ５シグナル伝達を惹起したが、還元ＩＬ－３３は惹起しなかった（図５５Ｂ）。従って還元型からＤＳＢ型へのヒトＩＬ－３３の変換時にシグナル伝達経路活性化における明らかな切り換えが観察され、ＤＳＢ ＩＬ－３３が既知のＩＬ－３３経路と異なる活性を有し得ることが示唆された。

【１０７０】

核転座アッセイの結果を確認するため、ＩＬ－３３シグナル伝達をウエスタンブロット分析によって決定した。Ｈｕｖｅｃを上記のとおり還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ ＩＬ－３３（３ｎｇ／ｍＬ）で１５分間刺激した。次に細胞を氷冷ＰＢＳで２回洗浄し、ＨＡＬＴプロテアーゼ阻害薬（Ｐｉｅｒｃｅ ＃７８４３０）を含有する２５０ｕＬ ＲＩＰＡ緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ ＃８９９０１）で溶解させた。試料を還元条件下でＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した。試料を４×ＮｕＰＡＧＥゲルローディング緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と３：１で混合し、９０℃で３分間変性させた。還元試料は２％β－メルカプトエタノールを含有した。試料を製造者の指示に従いＭＯＰＳ泳動緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を加えたＮｕＰＡＧＥ Ｎｏｖｅｘ ４～１２％ビス－トリスｍｉｎｉゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）上で泳動させた。タンパク質をニトロセルロース膜（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ カタログ番号ＩＢ３０１０－０２）に転写し、ウサギホスホ－ｐ３８ＭＡＰＫ抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ ＃９２１１Ｓ）、ウサギホスホ－ＳＴＡＴ５抗体Ｃ７１Ｅ５（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ ＃９３１４Ｓ）又はウサギｐ－ＪＡＫ２抗体（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ ＃３７７１Ｓ）によるウエスタンブロッティングによって検出した。一次抗体は抗ウサギ－ＨＲＰ（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ ＃７０７４）で検出し、ＥＣＬ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＃３４０９６）を使用して可視化した。

【１０７１】
図５５Ａは、還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３（ＩＭＤＭ培地で前処理したＩＬ３３－０１）に応答したＨｕｖｅｃにおけるｐ－ｐ３８ＭＡＰＫ核転座活性を示す（ｘ軸はＩＬ－３３濃度を示し、ｙ軸は任意単位の核転座シグナルを示す）。還元ＩＬ－３３については濃度依存性シグナルが観察されたが、酸化ＩＬ－３３については観察されなかった。
【１０７２】
図５５Ｂは、還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３（ＩＭＤＭ培地で前処理したＩＬ３３－０１）に応答したＨｕｖｅｃにおけるｐ－ＳＴＡＴ５核転座を示す（ｘ軸はＩＬ－３３濃度を示し、ｙ軸は任意単位の核転座シグナルを示す）。ＤＳＢ　ＩＬ－３３については濃度依存性シグナルが観察されたが、還元ＩＬ－３３については観察されなかった。
【１０７３】
図５５Ｃ。還元ＩＬ－３３又はＤＳＢ　ＩＬ－３３（ＩＭＤＭ培地で前処理したＩＬ３３－０１）で１５分間刺激したＨｕｖｅｃのｐ－ｐ３８ＭＡＰＫ、ｐ－ＪＡＫ２及びｐ－ＳＴＡＴ５のウエスタンブロット分析。還元ＩＬ－３３による刺激後はｐ－ｐ３８ＭＡＰＫの活性化が検出されたが、ＤＳＢ　ＩＬ－３３による刺激後は検出されなかった。ＤＳＢ　ＩＬ－３３による刺激後はｐ－ＪＡＫ２及びｐ－ＳＴＡＴ５の活性化が検出されたが、還元ＩＬ－３３による刺激後は検出されなかった。
【１０７４】
ＤＳＢ　ＩＬ－３３のシグナル伝達は終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）によって媒介される
ＨｕｖｅｃにおいてＤＳＢ　ＩＬ－３３により調節される経路に関する洞察を得るため、Ｈｕｖｅｃを先述のとおり培養し、６ウェル組織培養処理プレート（Ｎｕｎｃ　１４０６７５）に1×10^{6}細胞／ウェルでプレーティングした。一晩インキュベートした後、細胞をＤＳＢ　ＩＬ－３３で２又は６時間刺激した。３５０ｕＬのＲＬＴ緩衝液（Ｑｉａｇｅｎ　＃７９２１６）に細胞を収集した。ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ　＃７４００４）を製造者のプロトコルに従い用いてＲＮＡを精製した。次にＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社のＧｅｎｅＣｈｉｐ　ＷＴ　Ｐｌｕｓ試薬キット（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　＃９０２５１３）を使用してＲＮＡを一本鎖ＤＮＡに増幅し、ヒトゲノムＵ１３３Ａ　２．０（Ｕ１３３Ａ　２．０）ジーンチップ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　＃９００４６９）にハイブリダイズさせて、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｆｌｕｉｄｉｃｓ　Ｓｔａｔｉｏｎで洗浄し、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｇｅｎｅｃｈｉｐ　Ｓｃａｎｎｅｒ　３０００　７Ｇでスキャンした。次にデータをＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎコンソールで処理し、未処理対照と比べて±１．８倍を超えるシグナルの変化を有する遺伝子を選別した。遺伝子発現変化はほとんど観察されなかった（表３９）。それにも関わらず、限られた遺伝子パネルをＩｎｇｅｎｕｉｔｙパスウェイ解析（ＩＰＡ）（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて分析すると、２時間の時点におけるＥＩＦ２シグナル伝達経路及び６時間の時点におけるＡＧＥＲシグナル伝達が示唆された。潜在的にこれらは、スカベンジング／終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）経路の活性化を示唆した。
【１０７５】

【表５５】

表 39. DSB-IL-33 刺激 Huvec において調節された遺伝子

時点	遺伝子記号 >±1.8 倍変化の調節された遺伝子
2 時間	EIF3F, RPL14, RPL38, RPL27A, RPL37A, RPS10, RPS27L
6 時間	IFIT1, S100A8

【１０７６】
終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するマルチリガンド受容体であり、高移動度群ボックス１（ＨＭＧＢ－１）、Ｓ１００タンパク質ファミリー、終末糖化産物（ＡＧＥ）及びβシート線維材料を含めた種々のリガンドを認識する。これは酸化的ストレスに関与すると考えられており、数多くの疾患の病因と関連付けられている。

【１０７７】
ＤＳＢがＲＡＧＥと直接相互作用するかどうかを評価するため、ＥＬＩＳＡフォーマットを用いてＲＡＧＥの還元ＩＬ－３３対ＤＳＢ　ＩＬ－３３への結合を調査した（図５６Ａ）。還元又はＤＳＢ　Ｎ末端Ｈｉｓ　Ａｖｉ　ＩＬ－３３（ＩＬ３３－０１、配列番号６３２）を実施例７に記載するとおりビオチン化した。ストレプトアビジンプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＡＢ－１２２６）をＰＢＳ中５０μｇ／ｍｌのビオチン化抗原でコーティングし、室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔ（ＰＢＳ＋１％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０）で３回洗浄し、３００μｌ／ウェルのブロッキング緩衝液（１％ＢＳＡ含有ＰＢＳ（Ｓｉｇｍａ、Ａ９５７６））で１時間ブロックした。プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。ＲＡＧＥ－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　＃１１４５－ＲＧ）をブロッキング緩衝液に希釈し、ＩＬ－３３コートしたウェル又は対照（ＩＬ－３３無し）ウェルに加え、室温で１時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液中１：５０００希釈した抗ヒトＩｇＧ　ＨＲＰ（Ｓｉｇｍａ、Ａ０１７０）、５０μｌ／ウェルでＲＡＧＥ－Ｆｃを室温で１時間検出した。プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄し、ＴＭＢ、５０μｌ／ウェル（Ｓｉｇｍａ、Ｔ０４４０）で発色させた。反応を５０μｌ／ウェルの０．１Ｍ　H_2SO_4でクエンチした後、ＥｎＶｉｓｉｏｎ（商標）プレートリーダー、又は同様の機器において４５０ｎｍで読み取った。

【１０７８】
ＤＳＢ　ＩＬ－３３とＲＡＧＥの相互作用を更に確認するため、ＲＡＧＥ－Ｆｃ又は抗ＲＡＧＥ抗体がＨｕｖｅｃのＳＴ２非依存性ｐＳＴＡＴ５シグナル伝達を阻害する能力を評価した。このため、上記に記載したプロトコルに従い、ＲＡＧＥ－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　＃１１４５－ＲＧ）、ＳＴ２－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　＃５２３－ＳＴ）、抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂ（国際公開第２００８１３７５５２号パンフレットのもの）又は対照試薬の存在下又は非存在下で様々な濃度のＤＳＢ　ＩＬ－３３（ＩＭＤＭ処理ＩＬ３３－０１）を使用してＨｕｖｅｃを刺激した。ＲＡＧＥ－ＦｃによるＤＳＢ　ＩＬ－３３の中和（図５６Ｂ）、又は抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂによる受容体の中和（図５６Ｃ）は、ｐＳＴＡＴ５シグナルを完全に阻害することができた。

【１０７９】
図５６Ａ。ＥＬＩＳＡによる還元ＩＬ－３３又はＤＳＢプレート表面へのＲＡＧＥ－Ｆｃの結合（ｘ軸はＲＡＧＥ－Ｆｃ濃度を示し、ｙ軸は４５０ｎＭでの吸光度を示す）。データは、ＲＡＧＥの還元ＩＬ－３３への結合と比較してＤＳＢ　ＩＬ－３３への結合が増加したことを示した。

【１０８０】

図５６Ｂは、ＲＡＧＥ－Ｆｃ（５０ｕｇ／ｍＬ）、ＳＴ２－Ｆｃ（５０ｕｇ／ｍＬ）又は抗ＮＩＰ　ＩｇＧ１陰性対照抗体、ＮＩＰ２２８（５０ｕｇ／ｍＬ）の存在下でのＨｕｖｅｃにおけるＤＳＢ　ＩＬ－３３に対するｐＳＴＡＴ５応答を示す。ｐＳＴＡＴ５シグナル伝達はＲＡＧＥ－Ｆｃによって完全に阻害されたが、ＳＴ２－Ｆｃ又はＮＩＰ２２８によっては阻害されなかった。

【１０８１】

図５６Ｃは、抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂ、ｍ４Ｆ４（１０ｕｇ／ｍＬ）、又はマウスＩｇＧ１陰性対照抗体（１０ｕｇ／ｍＬ）の存在下でのＨｕｖｅｃにおけるＤＳＢ　ＩＬ－３３に対するｐＳＴＡＴ５応答を示す。ｐＳＴＡＴ５シグナル伝達はｍ４Ｆ４によって完全に阻害されたが、対照ｍＡｂによっては阻害されなかった。

【１０８２】

抗ＩＬ－３３抗体によるＤＳＢ　ＩＬ－３３活性の阻止

実施例８に記載するとおり、ＩＬ－３３に結合する抗体はＩＬ－３３のＤＳＢ型への酸化を阻止し得る（図４３Ａ）。ＩＬ－３３抗体がＨｕｖｅｃのｐＳＴＡＴ５シグナル伝達を阻止する能力を評価した。

【１０８３】

一定濃度の３３＿６４００８７－７Ｂ（配列番号６１６及び６１８）、抗ＳＴ２（国際公開第２０１３／１７３７６１　Ａｂ２号パンフレットのもの；配列番号８５及び配列番号１９）及びアイソタイプ対照ｍＡｂをＩＭＤＭ中に調製し、次に９６ウェルＵ字底プレートにおいてＷＴ　ＩＬ－３３（これもまたＩＭＤＭ中に調製した）のタイトレーションと（１００ｕＬを１００ｕＬと）組み合わせた。プレートを３７℃及び５％ＣＯ２で一晩インキュベートした。これらの「プレインキュベーション処理」プレートの各ウェルからの７５ｕＬを、上記にｐＳＴＡＴ５アッセイに関して記載したとおり調製した「飢餓」細胞に加え、３７℃で１５分間インキュベートした。次に細胞を氷冷ＰＢＳで２回洗浄し、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅホスホ－ＳＴＡＴ５Ａ／Ｂ　Ｉｎｓｔａｎｔ　Ｏｎｅ　ＥＬＩＳＡ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　＃８５－８６１１２－１１）からの１００ｕＬ溶解緩衝液を各ウェルに加えた。次に製造者の指示に従い細胞ライセートのｐＳＴＡＴ５活性を計測した。

【１０８４】

図５７は、３３＿６４００８７－７Ｂ（１０ｕｇ／ｍＬ）又は抗ＳＴ２　ｍＡｂ、Ａｂ２（１０ｕｇ／ｍＬ）の存在下におけるＩＭＤＭで処理したＩＬ－３３に対するＨｕｖｅｃのｐＳＴＡＴ５応答を示す（ｘ軸はＩＬ－３３濃度であり、ｙ軸はｐＳＴＡＴ５シグナルである）。ｐＳＴＡＴ５シグナル伝達は３３＿６４００８７－７Ｂによって完全に阻害されたが、抗ＳＴ２によっては阻害されなかったことから、この応答がＳＴ２非依存性であることが確認された。

【１０８５】

抗ＩＬ－３３抗体は上皮細胞のＲＡＧＥ依存応答を阻害する

ＲＡＧＥは肺上皮細胞で高度に発現する。ＤＳＢ　ＩＬ－３３依存応答に関して肺上皮細胞株を評価した。このため、１％ペニシリン／ストレプトマイシン及び１０％ＦＢＳを補足したＦ１２Ｋ培地（Ｇｉｂｃｏ　＃２１１２７０２２）でＡ５４９細胞を培養した。０．５％トリプシン－ＥＤＴＡ（Ｇｉｂｃｏ、＃１５４００－０５４）で細胞を回収し、洗浄して、９６ウェルプレートに培養培地中1×10^{5}／細胞／ウェルでプレーティングした。次に細胞を３７℃、５％CO_2で２４時間インキュベートした。翌日、完全培地を取り除き、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、「飢餓」培地（１％ペニシリン／ストレプトマイシン含有Ｆ１２Ｋ培地）に培地を交換し、プレートを３７℃及び５％CO_2で２４時間インキュベートした。

【１０８６】

一定濃度の３３＿６４００８７－７Ｂ（配列番号６１６及び６１８）、抗ＳＴ２（国際公開第２０１３／１７３７６１　Ａｂ２号パンフレット（配列番号８５及び配列番号１９））、抗ＲＡＧＥ　ｍ４Ｆ４（国際公開第２００８１３７５５２号パンフレットのもの）

及びアイソタイプ対照ｍＡｂをＩＭＤＭ中に調製し、次に９６ウェルＵ字底プレートにおいてＷＴ　ＩＬ－３３（これもまたＩＭＤＭ中に調製した）と（１００ｕＬを１００ｕＬと）組み合わせた。細胞及び処理プレートの両方を３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。これらの「プレインキュベーション処理」プレートの各ウェルからの７５ｕＬを、上記に記載したとおり調製した「飢餓」細胞に加え、プレートを３７℃及び５％CO_2で２４時間インキュベートした。次に、９６ウェルトランスウェルプレートを低結合９６ウェルレシーバプレートに加えることにより９６ウェルトランスウェルシステム（Ｃｏｒｎｉｎｇ　＃ＣＬＳ３４２２－４８ＥＡ）をセットアップする。２３５ｕＬの完全培地（１０％ＦＢＳ及び１％ペニシリン／ストレプトマイシンを補足したＦ１２Ｋ培地）をトランスウェルシステムのボトムチャンバに加えた。次に処理した９６ウェルの各ウェルにつきＡ５４９細胞をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理して剥離させ、１０００ｒｐｍで５分間遠心し、７５ｕＬの「飢餓」培地に再懸濁し、トランスウェルシステムのトップチャンバに加えた。次にトランスウェルプレートを３７℃、５％CO_2で１６時間インキュベートした。次にトップチャンバ及びボトムチャンバの両方から培地を取り除き、２３５ｕＬトリプシンを使用してボトムチャンバから細胞を取り出した。次に１００ｕＬのトリプシン／細胞懸濁液を１００ｕＬのＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ　＃Ｇ７５７１）に加えた。新鮮Ａ５４９細胞のタイトレーションをトリプシンに調製し、５０：５０でＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏに加えることにより、細胞数の標準曲線を作成した。次にプレートをインキュベートし、製造者の指示に従い読み取った。

【１０８７】

図５８Ａは、３３＿６４００８７－７Ｂ（１０ｕｇ／ｍＬ）、抗ＳＴ２　ｍＡｂ、Ａｂ２（１０ｕｇ／ｍＬ）、又は抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂ　４Ｆ４の存在下でＩＬ３３－０１で処理した後のＡ５４９細胞の遊走を示す（ｘ軸は細胞前処理条件を示し、ｙ軸は遊走した細胞の数である）。データは、Ａ５４９細胞をＤＳＢ　ＩＬ－３３で前処理すると、続く細胞遊走が低下することを実証している。この遊走の阻害は抗ＲＡＧＥ　ｍＡｂ及び３３＿６４００８７－７Ｂによって逆転したが、抗ＳＴ２によっては逆転しなかった。

【１０８８】

図５８Ｂは、３３＿６４００８７－７Ｂ（１０ｕｇ／ｍＬ）又は抗ＳＴ２　ｍＡｂ、Ａｂ２（１０ｕｇ／ｍＬ）の存在下でインキュベートしたＤＳＢ　ＩＬ３３－０１で処理した後のＡ５４９細胞の遊走を示す（ｘ軸は細胞前処理条件を示し、ｙ軸は遊走した細胞の数である）。データは、Ａ５４９細胞をＤＳＢ　ＩＬ－３３で前処理すると、続く細胞遊走が低下することを実証している。この遊走の阻害は、３３＿６４００８７－７Ｂ又は抗ＳＴ２によっては逆転しなかった。

【１０８９】

まとめると、これらのデータから、３３＿６４００８７－７ＢがＤＳＢ　ＩＬ－３３を直接中和するよりむしろ、還元ＩＬ－３３からＤＳＢ　ＩＬ－３３への変換を阻止することによってＤＳＢ－ＩＬ＿３３活性を阻害することが確認され、これは還元されたＳＴ２活性型のＩＬ－３３のみに結合するその能力と一致している。

【図１】

図1

%特異的結合

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	108	108	98	98	102	100	101	104	101	107	96	98	全結合
B	109	102	96	81	91	100	97	98	104	101	102	102	
C	100	105	96	99	106	106	97	97	107	107	102	100	
D	105	107	109	107	104	106	100	105	102	98	100	0	非特異的結合
E	107	101	108	91	110	108	112	105	104	107	99	0	
F	108	105	104	96	100	106	101	107	98	105	99	0	
G	98	106	105	102	105	105	100	104	96	97	105	132	
H	102	104	114	108	104	110	102	100	107	100	107	132	

ウェルB04 = IL330004

【図２】

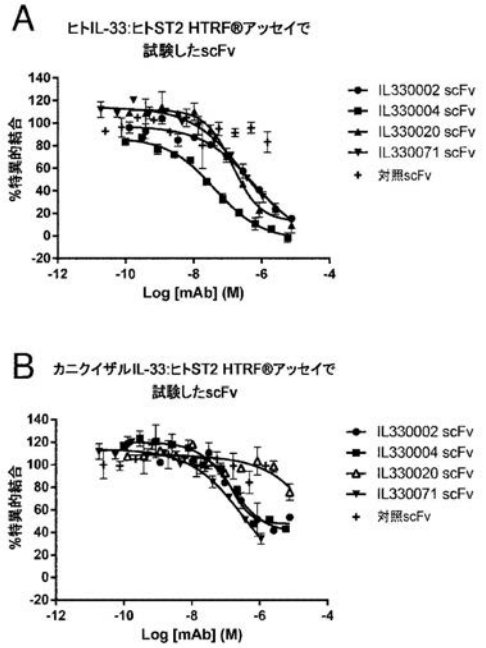


図2

【図３】

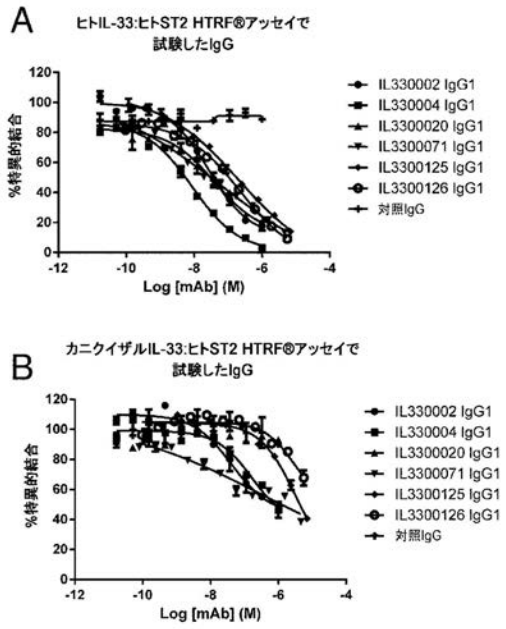


図3

【図４】

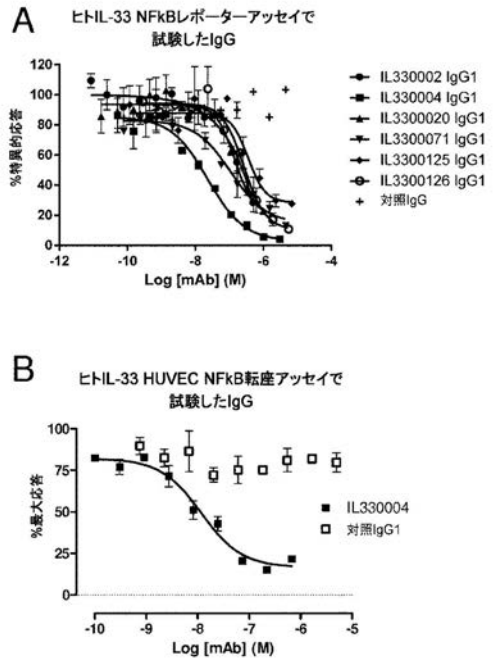


図4

【図５】

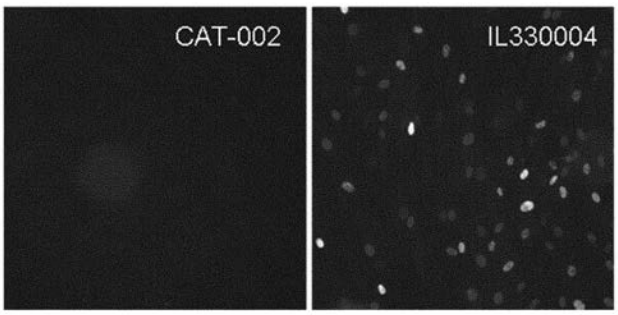


図5

【図６】

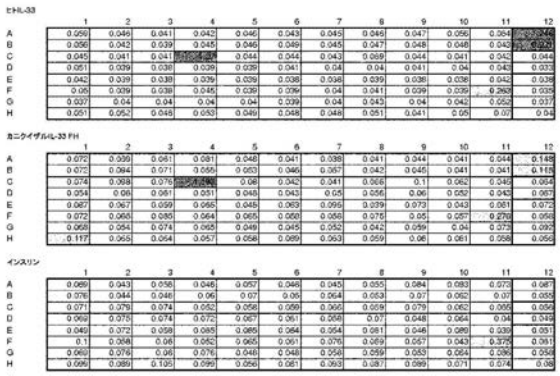


図6

【図７】

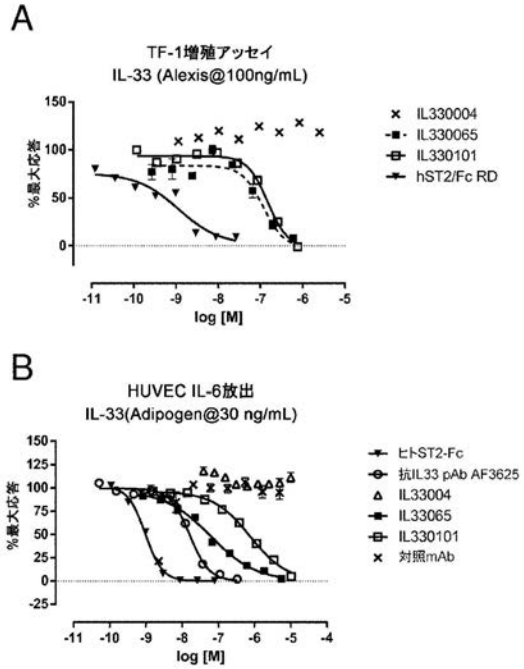


図7

【図８】

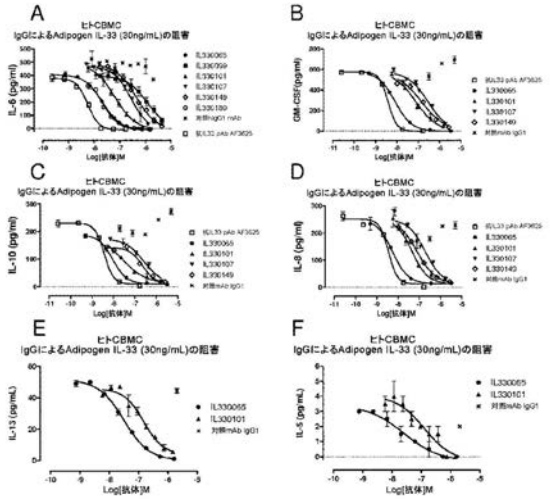
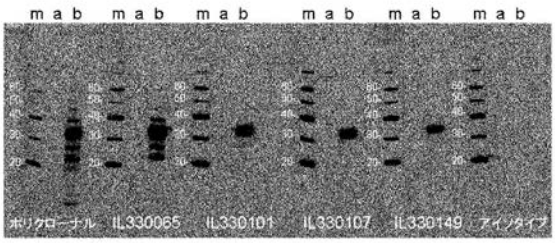


図8

【図９】



m = magic mark XP
a = モックトランスフェクトHEK-EBNA
b = FL HuIL33トランスフェクトHEK-EBNA

FL HuIL33予測MW=30kDa
カスパーゼ3切断IL33予測10kDa及び20kDa断片

図9

【図１０】

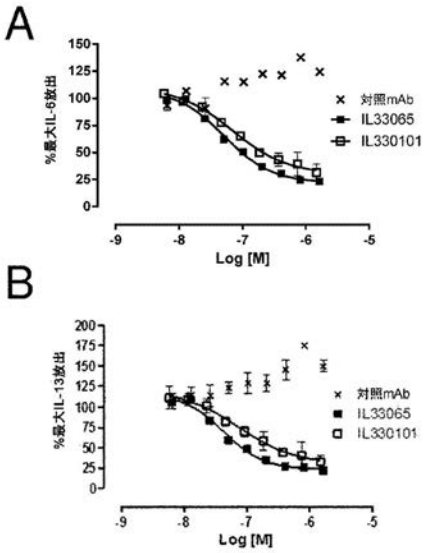


図10

【図１１】

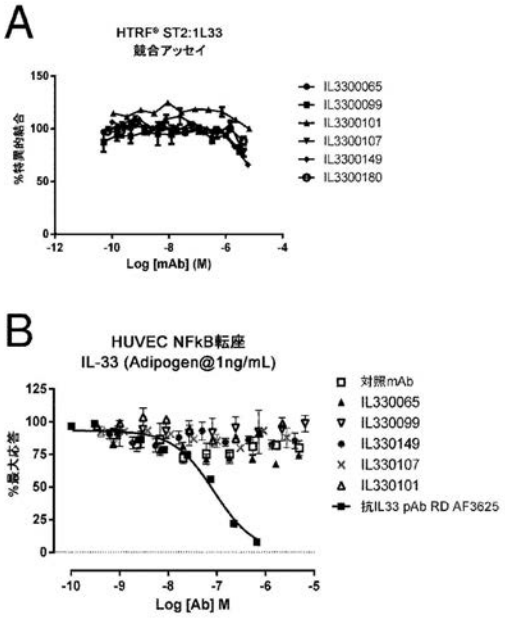


図11

【図１２】

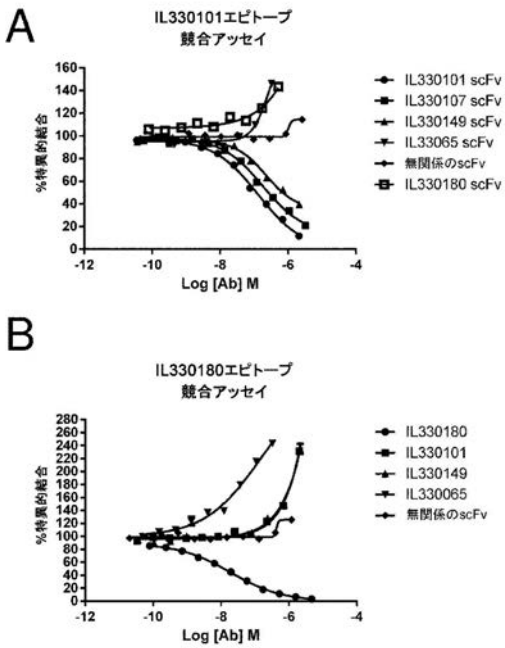


図12

【図１３】

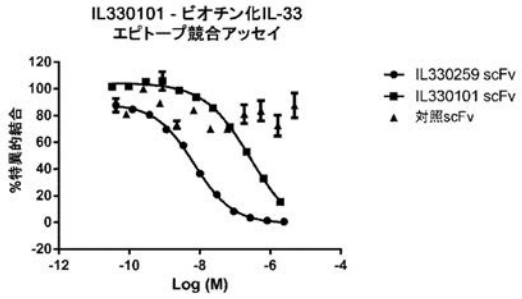


図13

【図１４】

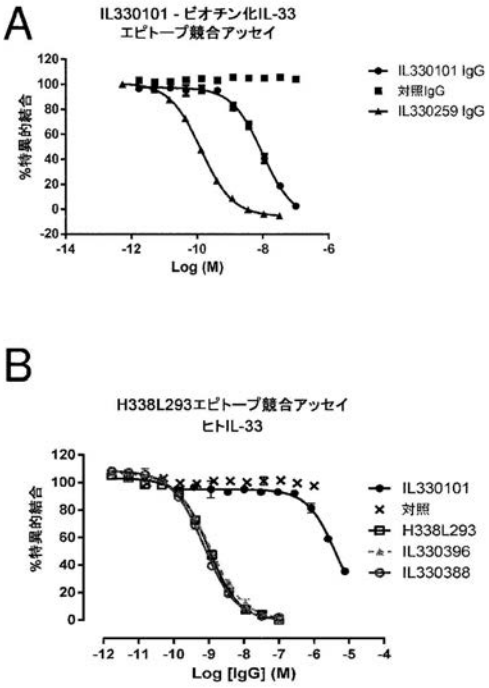


図14

【図１５】

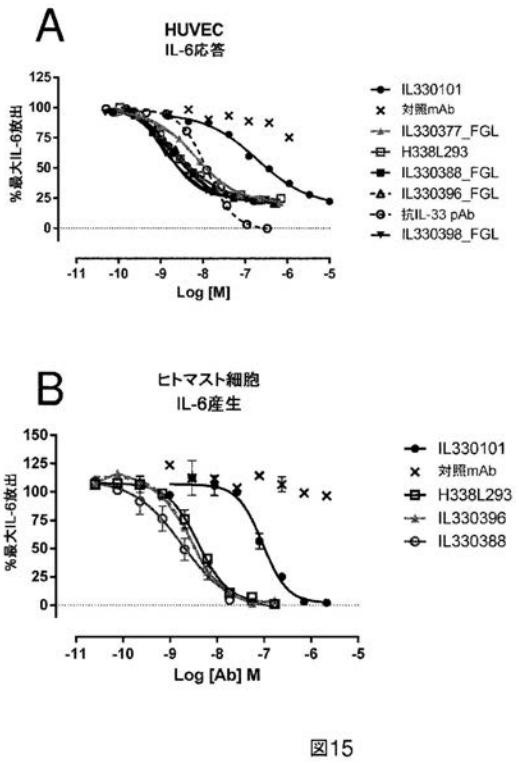


図15

【図１６】

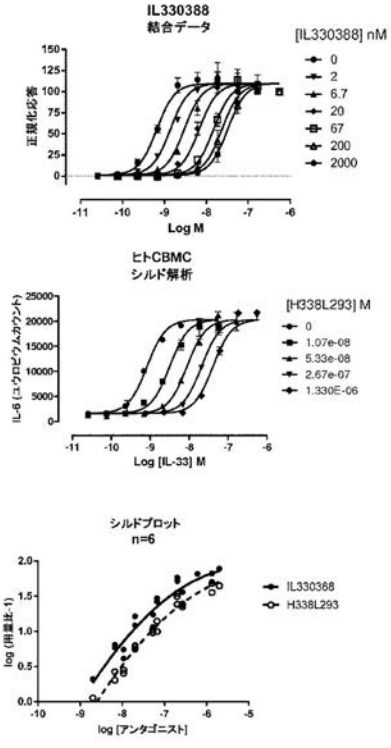


図16

【図１７】

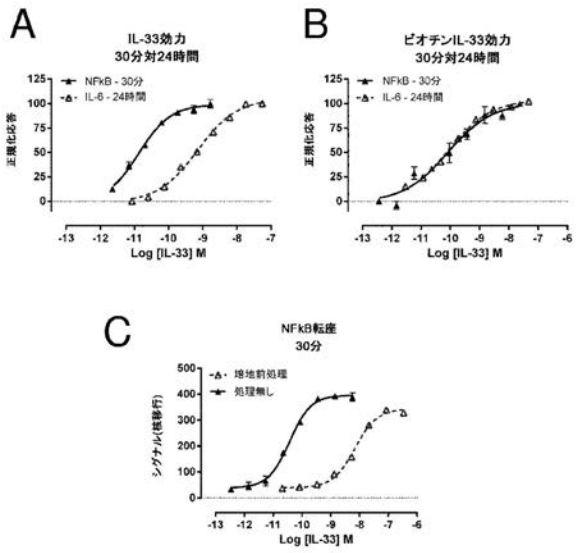


図17

【図１８】

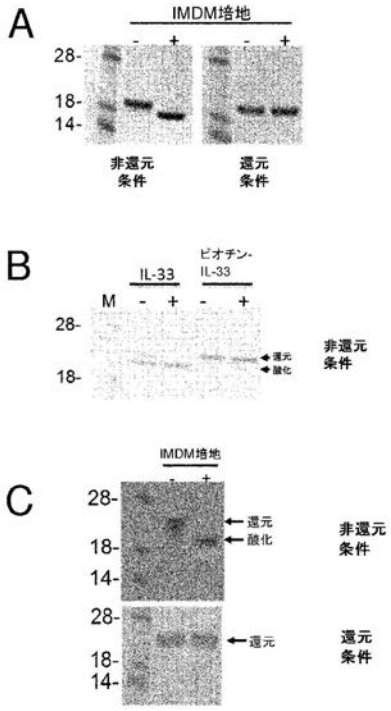


図18

【図１９】

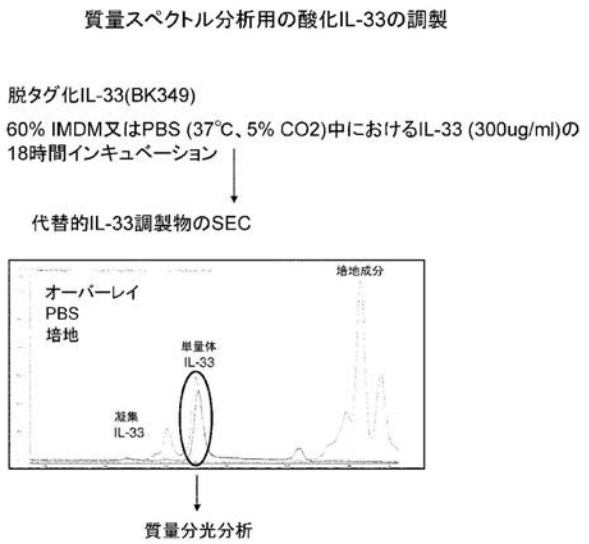


図19

【図２０】

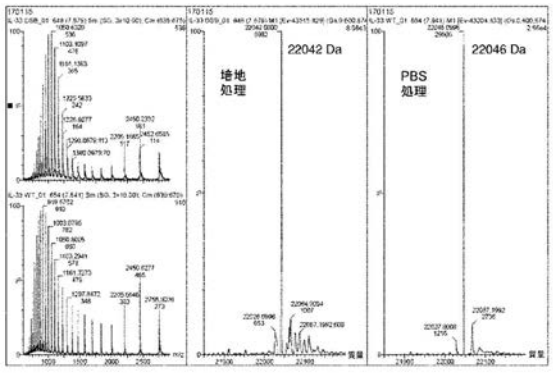


図20

【図２１】

図21A

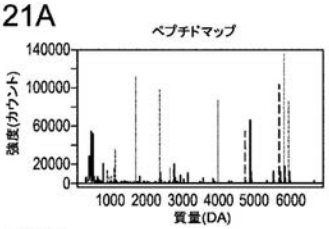


図21B

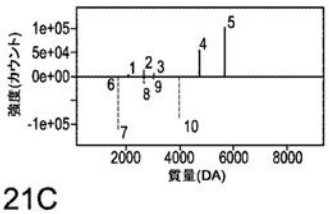


図21C

	ペプチド 配列	Cys酸化状態
	非還元Lys-Cペプチドマップ	
1	C^{208}EK–VDSSENIC^{259}TENILFK	SS
2	PLPDQAFFVLHNMHSNC^{227}VSFEC^{232}K	SS
3	[EHSVELHK][C^{208}EK]–VDSSENIC^{259}TENILFK	SS
4	[C^{208}EK][PLPDQAFFVLHNMHSNC^{227}VSFEC^{232}K]–VDSSENIC^{259}TENILFK	SS
5	[EHSVELHK][C^{208}EK][PLPDQAFFVLHNMHSNC^{227}VSFEC^{232}K]–VDSSENIC^{259}TENILFK	SS
	還元Lys-Cペプチドマップ	
6	[EHSVELHK][C^{208}EK]	SH
7	VDSSENIC^{259}TENILFK	SH
8	PLPDQAFFVLHNMHSNC^{227}VSFEC^{232}K	SH
9	[C^{208}EK][PLPDQAFFVLHNMHSNC^{227}VSFEC^{232}K]	SH
10	[EHSVELHK][C^{208}EK][PLPDQAFFVLHNMHSNC^{227}VSFEC^{232}K]	SH

【図２２】

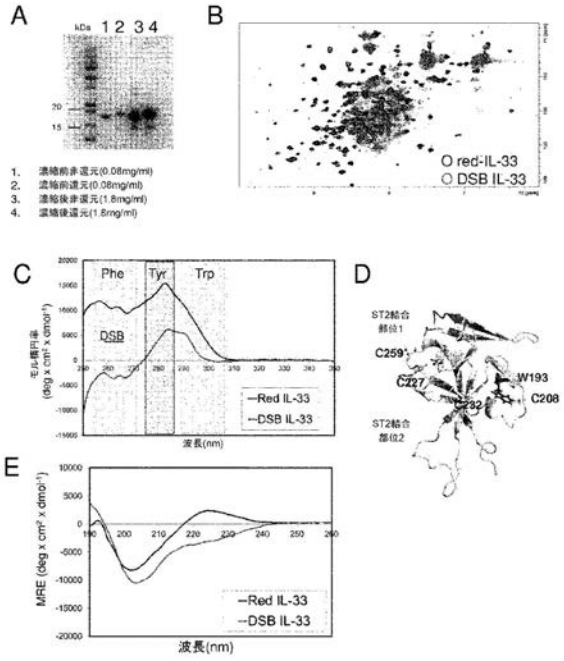


図22

【図２３】

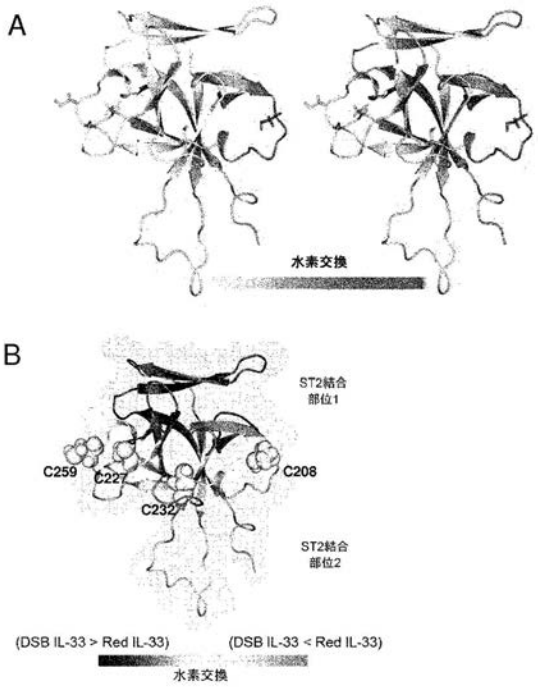


図23

【図２４】

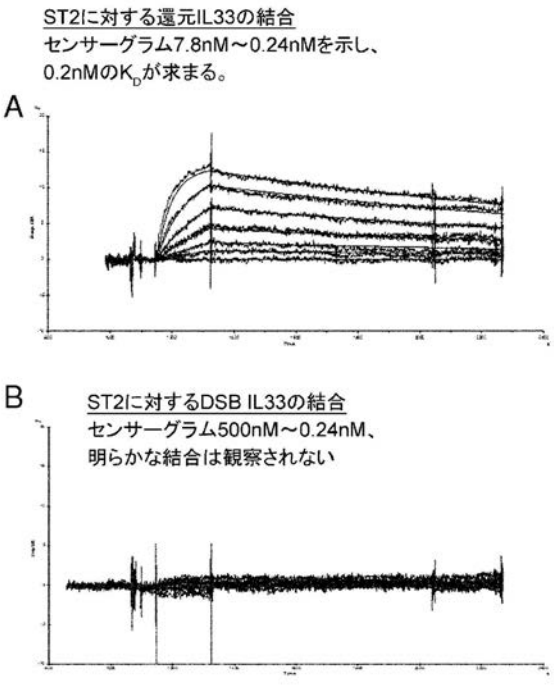


図24

【図２５】

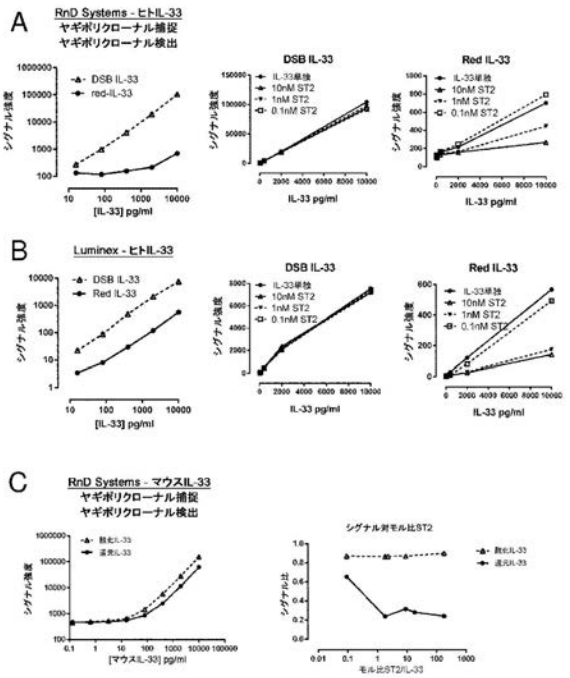


図25

【図２６】

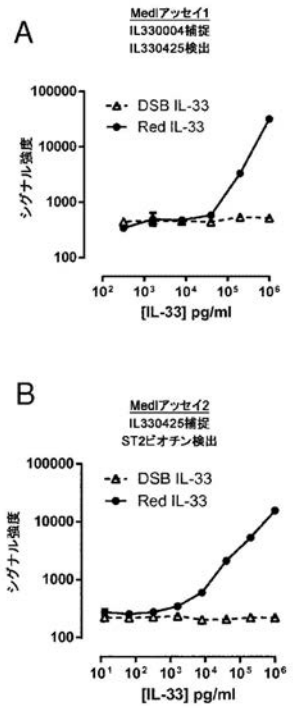


図26

【図２７】

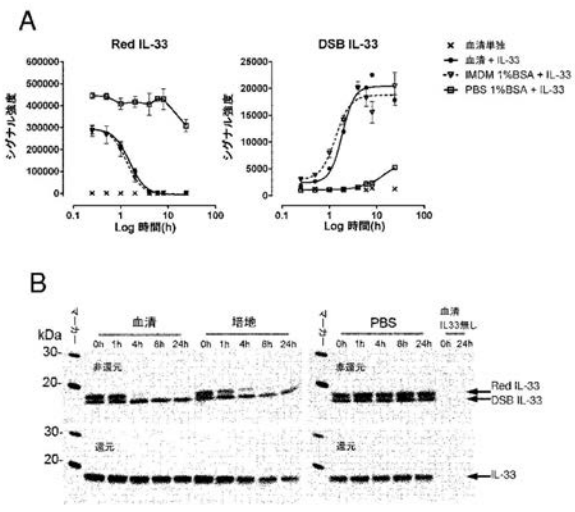


図27

【図２８】

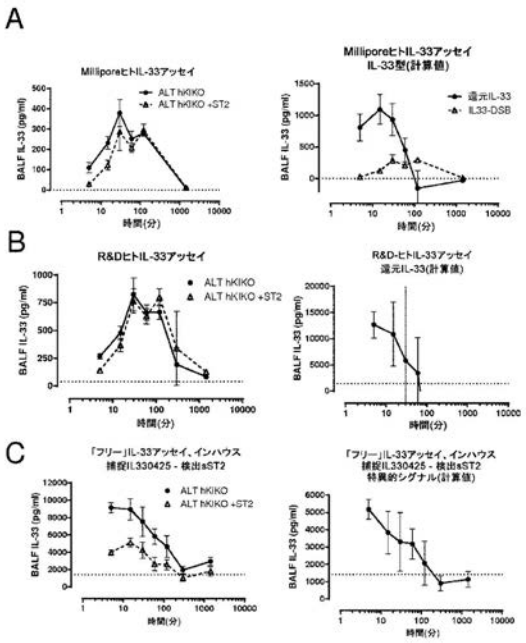


図28

【図２９】

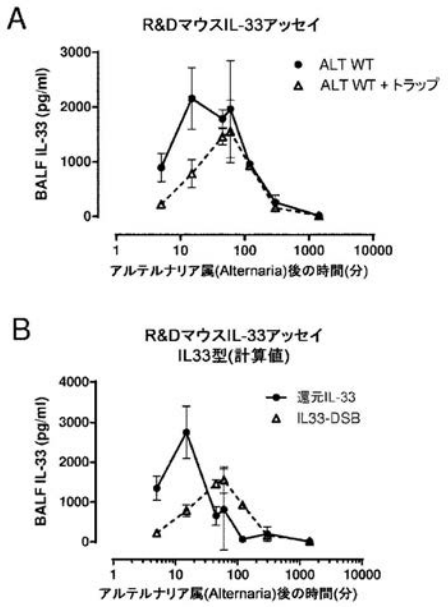


図29

【図３０】

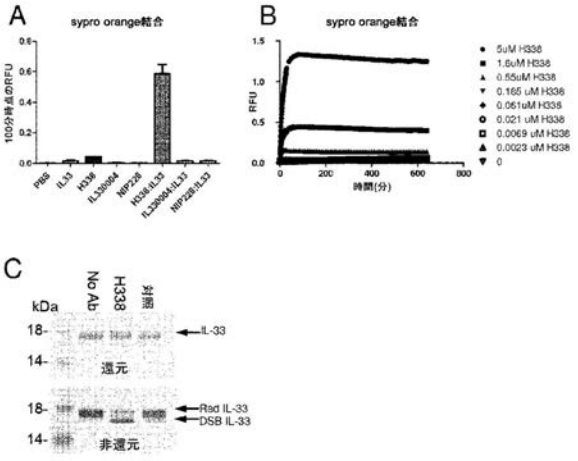


図30

【図３１】

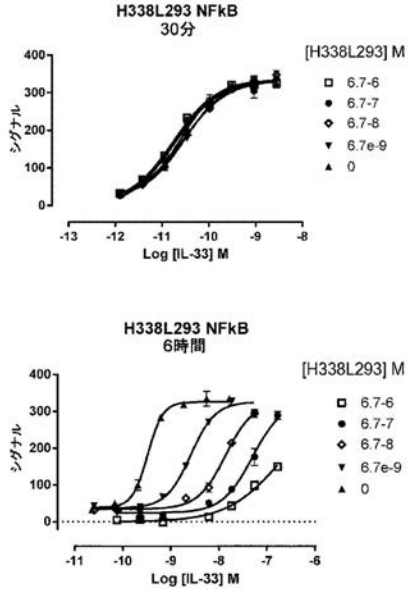


図31

【図３２】

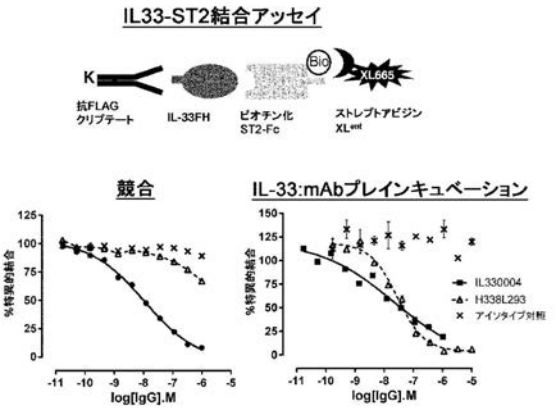


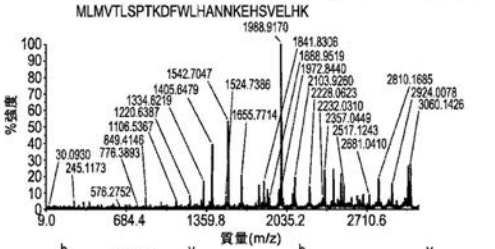
図32

【図３３】

図33A

3,206Da前駆イオンのMALDI-TOF MS-MSフラグメンテーション解析

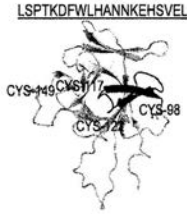
MLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHK



b				v	b			v
	1	M	27					
245.1318	2	L	26	3074.5880	1800.9175	15	H	13	1542.7772
376.1723	3	M	25	2961.5040	1871.9547	16	A	12	1405.7183
475.2407	4	V	24	2830.4635	1985.9976	17	N	11	1334.6811
576.2884	5	T	23	2731.3951	2100.0405	18	N	10	1220.6382
689.3725	6	L	22	2630.3474	2228.1355	19	K	9	1106.5953
776.4045	7	S	21	2517.2633	2357.1781	20	E	8	978.5003
873.4573	8	P	20	2430.2313	2494.2370	21	H	7	849.4577
974.5049	9	T	19	2333.1785	2581.2690	22	S	6	712.3988
1102.5999	10	K	18	2232.1309	2680.3374	23	V	5	625.3668
1217.6268	11	D	17	2104.0359	2809.3800	24	E	4	526.2984
1364.6953	12	F	16	1989.0090	2922.4641	25	L	3	397.2558
1550.7746	13	W	15	1841.9405	3059.5230	26	H	2	284.1717
1663.8586	14	L	14	1655.8612	---	27	K	1	147.1128

図33B

LSPTKDFWLHANNKEHSVELHK



【図３４】

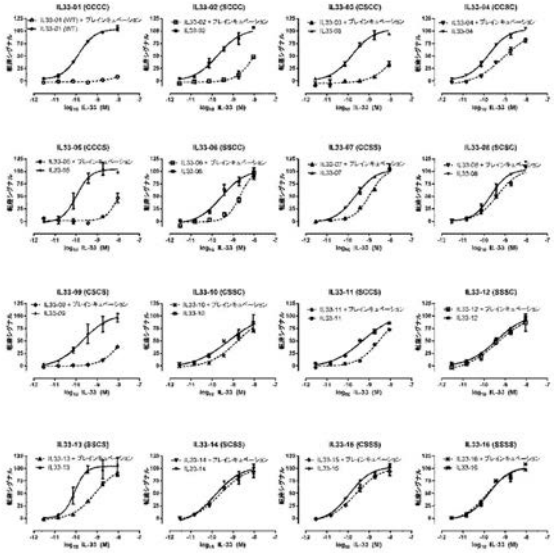


図34

【図３５】

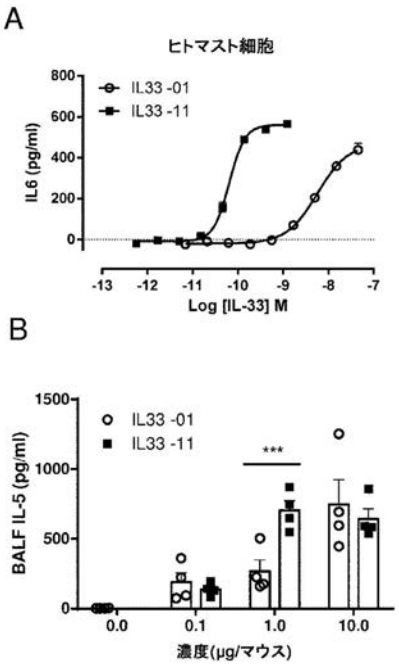


図35

【図３６】

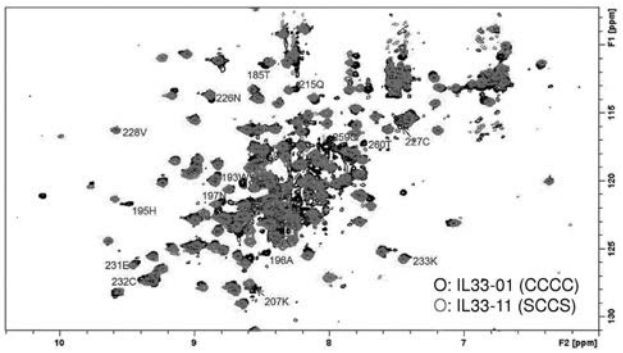


図36

【図３７】

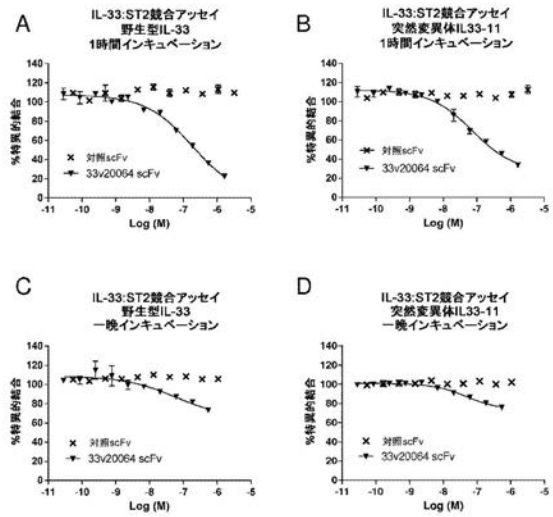


図37

【図３８】

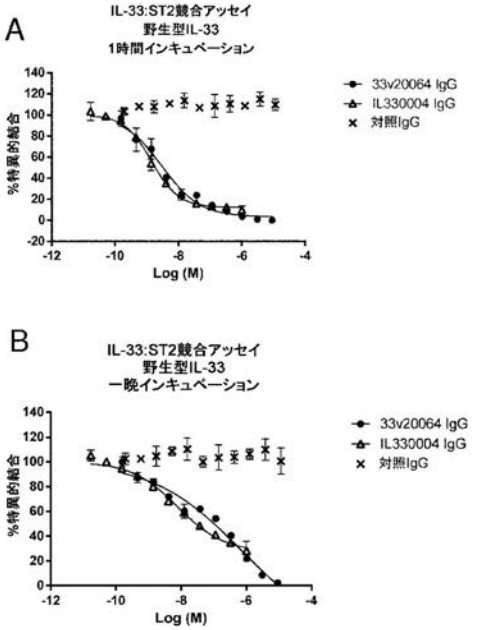


図38

【図３９】

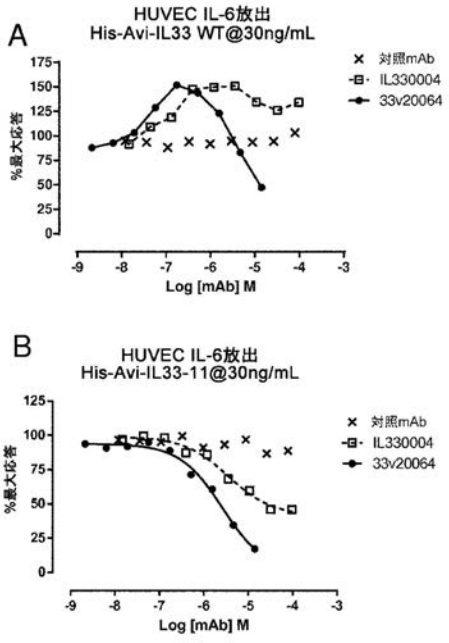


図39

【図４０】

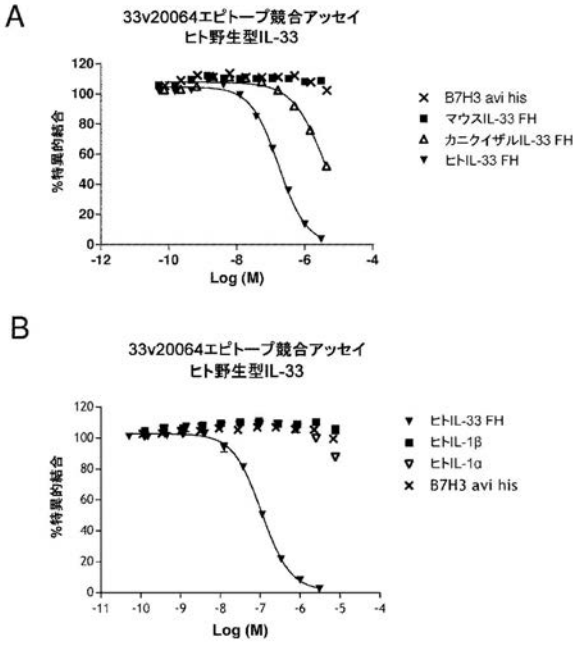


図40

【図４１】

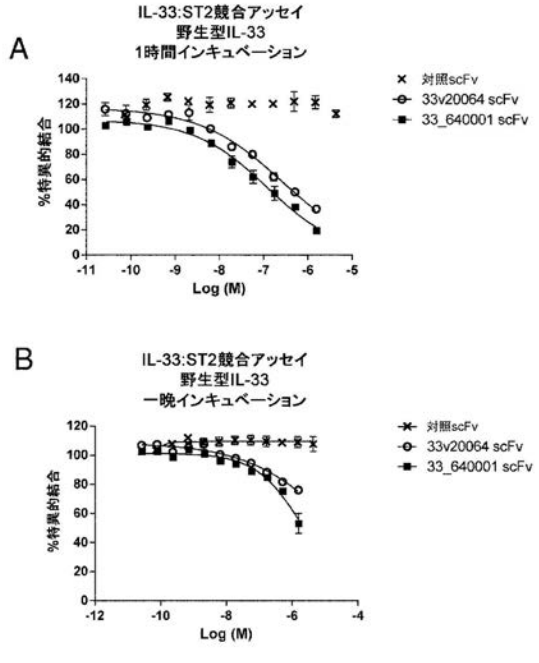


図41

【図４２】

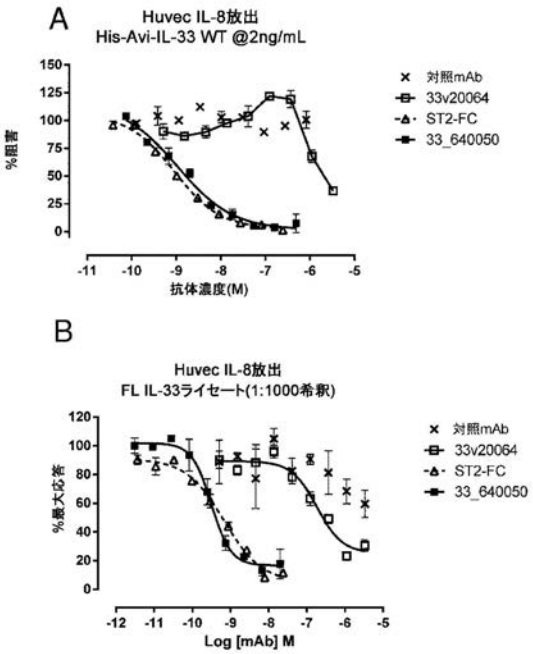


図42

【図４３】

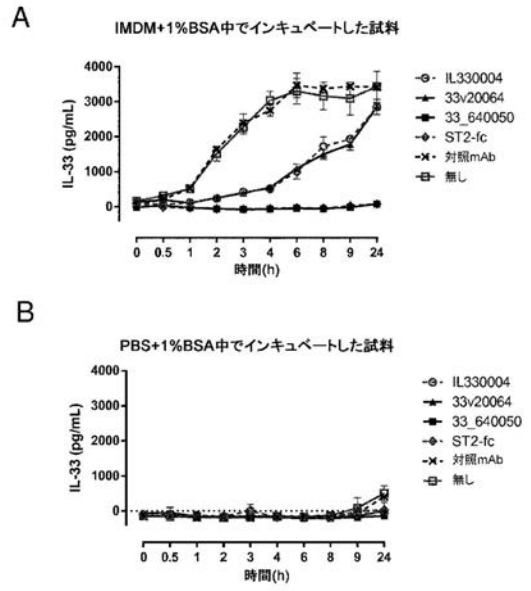


図43

【図４４】

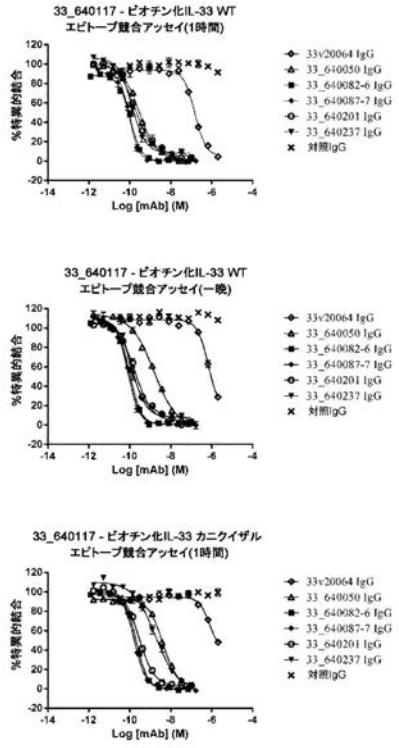


図44

【図４５】

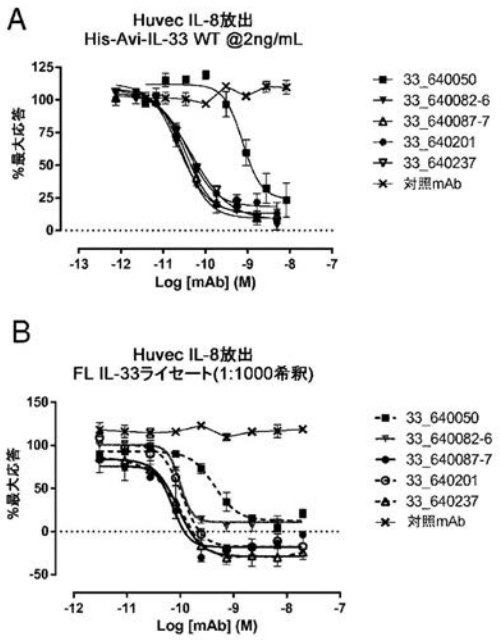


図45

【図４６】

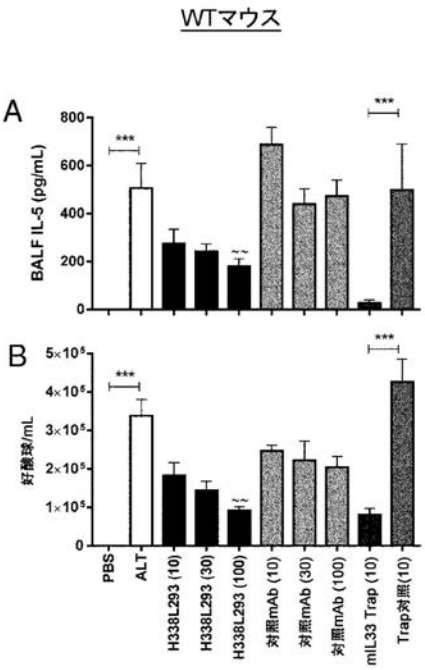


図46

【図４７】

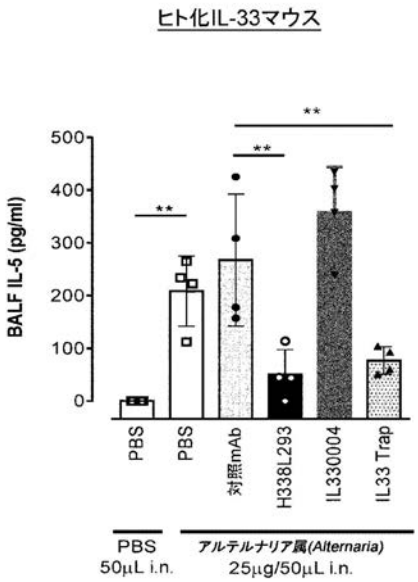


図47

【図４８】

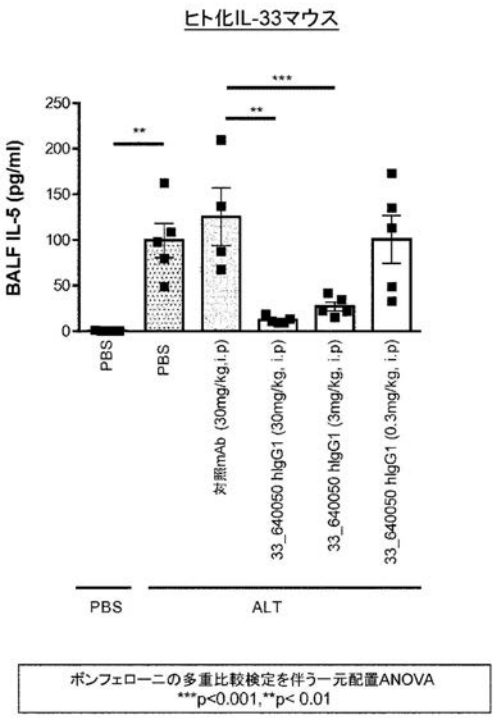


図48

【図４９】

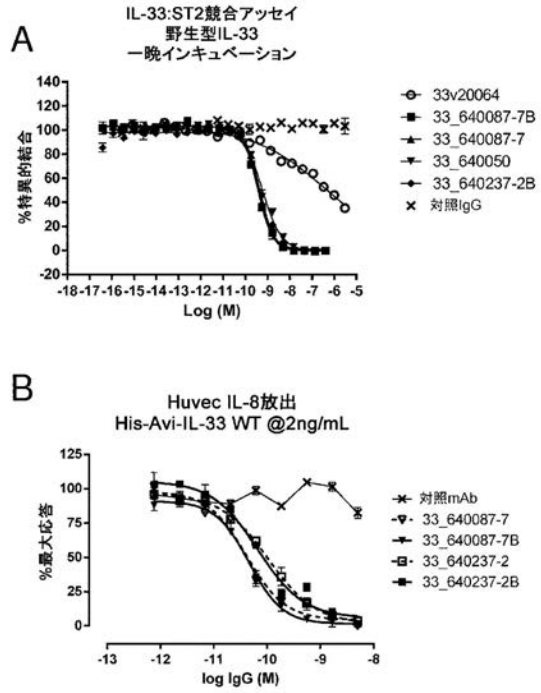


図49

【図５０】

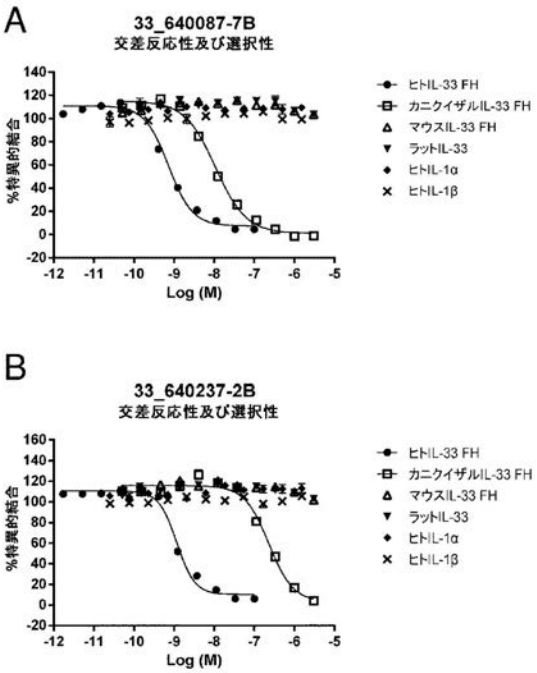


図50

【図５１】

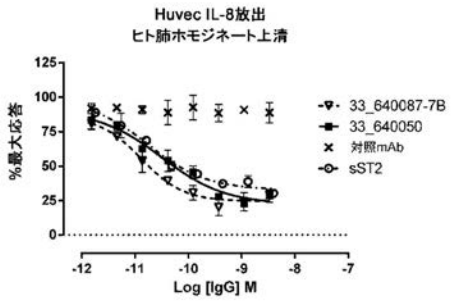
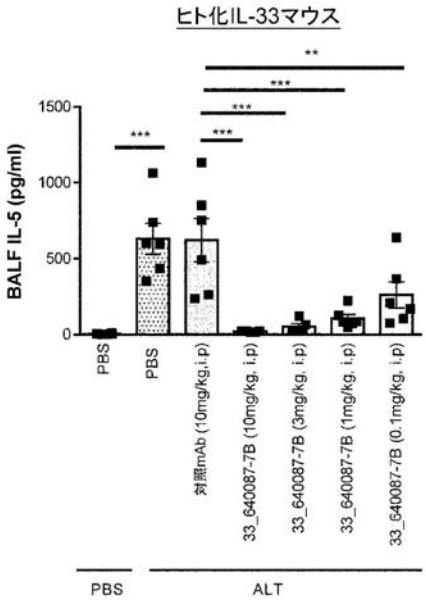


図51

【図５２】



ボンフェローニの多重比較検定を伴う一元配置ANOVA
***p<0.001,**p< 0.01

図52

【図５３】

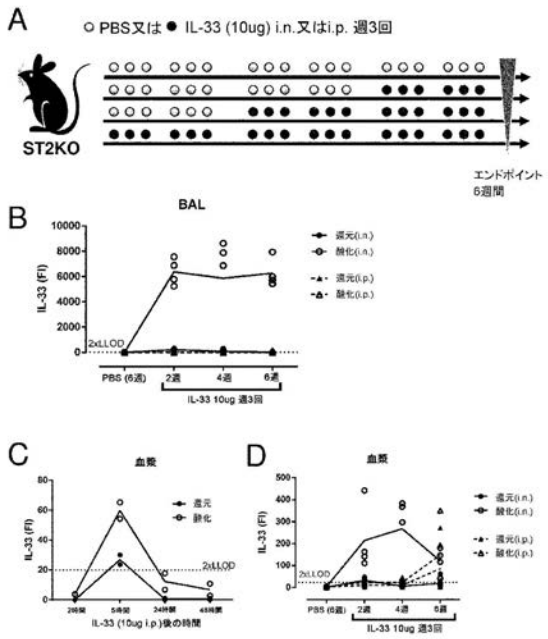
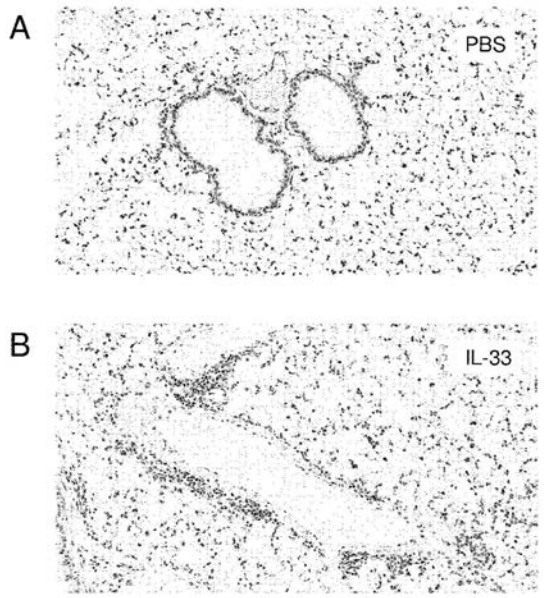


図53

【図５４】



ST2欠損マウスにIL-33を6週間鼻腔内投与すると
血管周囲炎が引き起こされる

図54

【図５５】

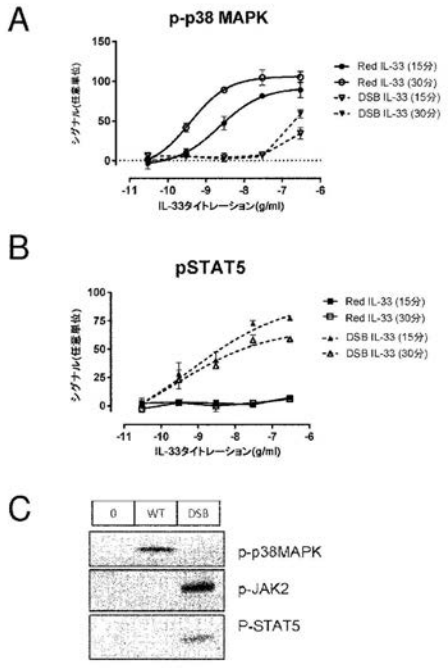


図55

【図５６】

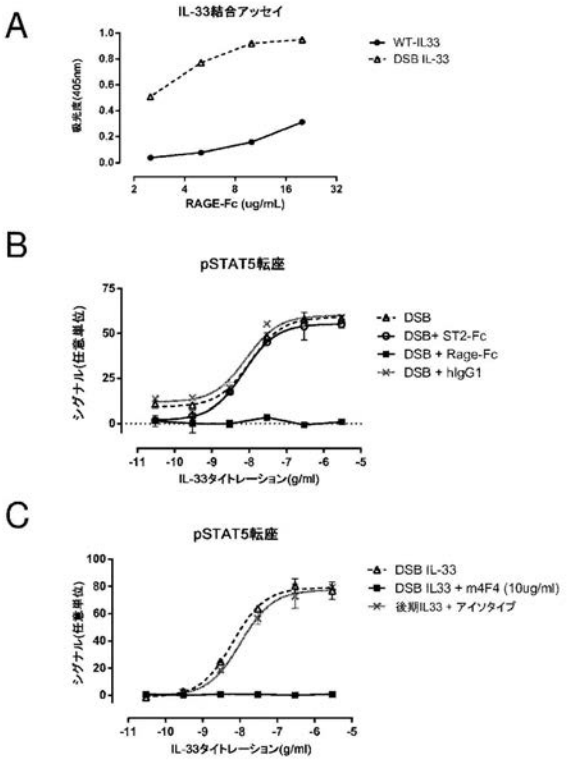


図56

【図５７】

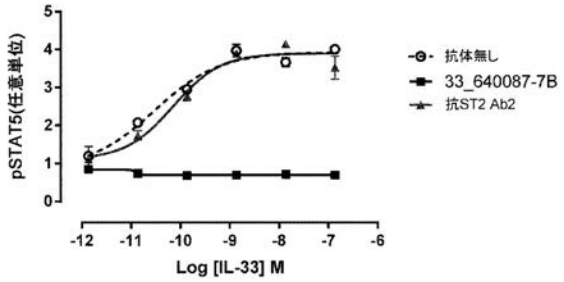


図57

【図５８】

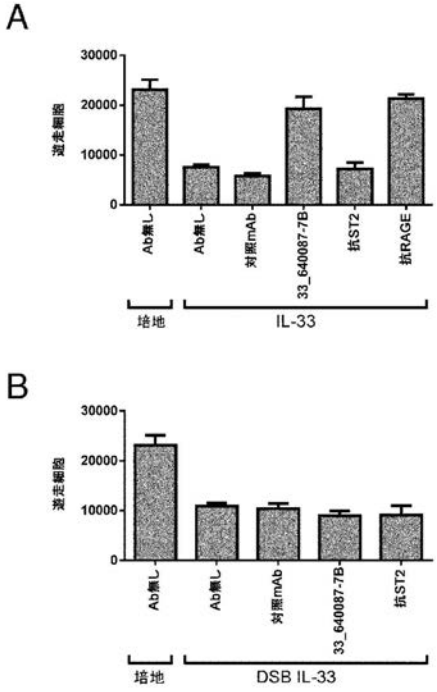


図58

【配列表】
2018516853000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/056973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24 A61K39/395 A61K39/00 A01K67/027 C07K14/54
C07K14/715
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A01K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	E. SUZANNE COHEN ET AL: "Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 6, 14 September 2015 (2015-09-14), page 8327, XP055282748, United Kingdom ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/ncomms9327 abstract page 3 - page 4, right-hand column, paragraph 1; figure 1 -----	1-58
X	WO 2014/164959 A2 (REGENERON PHARMA [US]) 9 October 2014 (2014-10-09) example 1; table 1 -----	14,24

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 July 2016	15/07/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Turri, Matteo

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/056973

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014164959 A2	09-10-2014	AU 2014248839 A1	20-08-2015
		CA 2902172 A1	09-10-2014
		CN 105051063 A	11-11-2015
		EP 2970460 A2	20-01-2016
		JP 2016513644 A	16-05-2016
		KR 20150126598 A	12-11-2015
		PH 12015501656 A1	19-10-2015
		SG 11201505745W A	28-08-2015
		TW 201522370 A	16-06-2015
		US 2014271658 A1	18-09-2014
		UY 35417 A	31-10-2014
		WO 2014164959 A2	09-10-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		4H045
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12Q	*1/02*	*(2006.01)*	C12Q	1/02		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	U	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61P	*29/00*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*37/06*	*(2006.01)*	A61P	37/06		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	111	
A61P	*37/08*	*(2006.01)*	A61P	37/08		
A61P	*11/00*	*(2006.01)*	A61P	11/00		
A61P	*11/06*	*(2006.01)*	A61P	11/06		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	P	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08		

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

(72)発明者 エマ・エス・コーエン
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 デイビッド・シー・ロウ
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 ロビン・バトラー
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 イアン・シー・スコット
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 キャサリン・エイ・バウスデン
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 マーティン・ディ・ストレイン
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 サラ・カーメン
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 エリザベス・エイチ・イングランド
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メデ

ィミューン・リミテッド
(72)発明者 ベンジャミン・ピー・ケンプ
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 デイビッド・ジー・リース
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 キャサリン・エル・オーバードーセイヤー
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 トーマス・エム・マステリン
アメリカ合衆国２０８７８メリーランド州ゲイザースバーグ、ワン・メディミューン・ウェイ、メディミューン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(72)発明者 マシュー・スリーマン
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド
(72)発明者 カースティ・ハウスレイ
英国シービー２１・６ジーエイチ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グランタ・パーク、メディミューン・リミテッド

Ｆターム(参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS36 QX01
4B064 AG27 CA19 CC24 CE07 CE12 CE14 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44
CA46
4C084 AA19 NA05
4C085 AA14 AA16 BB41 BB43 CC23 DD62 EE01 EE03
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA02 DA76 EA20
EA50 FA74 GA01 GA22 GA26 GA31

专利名称(译)	新型IL33型，突变型IL33，抗体，测定及其使用方法		
公开(公告)号	JP2018516853A	公开(公告)日	2018-06-28
申请号	JP2017551294	申请日	2016-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	Medoiμ有限公司排放		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司有限公司		
[标]发明人	エマエスコーエン デイビッドシーロウ ロビンバトラー イアンシースコット キャサリンエイバウスデン マーティンディストレイン サラカーメン エリザベスエイチイングランド ベンジャミンピーケンプ デイビッドジーリース キャサリンエルオーバードセイヤー トーマスエムマステリン マシュースリーマン カースティハウスレイ		
发明人	エマ·エス·コーエン デイビッド·シー·ロウ ロビン·バトラー イアン·シー·スコット キャサリン·エイ·バウスデン マーティン·ディ·ストレイン サラ·カーメン エリザベス·エイチ·イングランド ベンジャミン·ピー·ケンプ デイビッド·ジー·リース キャサリン·エル·オーバード-セイヤー トーマス·エム·マステリン マシュー·スリーマン カースティ·ハウスレイ		
IPC分类号	C07K14/54 C12N15/09 C07K16/24 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 A61K39/395 A61K45/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 A61P37/08 A61P11/00 A61P11/06 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K14/54 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6869 G01N2333/54 A01K67/0278 A01K2217/072 A01K2227/105 A01K2267/03 A61P11/06 C07K2319/30 A61K39/3955		
FI分类号	C07K14/54.ZNA C12N15/00.A C07K16/24 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 A61K39/395.U A61K45/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61P37/08 A61P11/00 A61P11/06 G01N33/53.P C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE07 4B064/CE12 4B064/CE14 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084		

	/NA05 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA22 4H045/GA26 4H045/GA31
代理人(译)	樱井洋子
优先权	62/140913 2015-03-31 US
其他公开文献	JP2018516853A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了分离的IL-33蛋白，其活性片段和针对该IL-33蛋白的抗体及其抗原结合片段。 还提供了调节细胞因子活性的方法，例如用于治疗免疫和炎性疾病。

FIG. 1