

(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2019-507102

(P2019-507102A)

(43) 公表日 平成31年3月14日 (2019.3.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06 1 0 0	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-525399 (P2018-525399)	(71) 出願人	518164641
(86) (22) 出願日	平成28年11月10日 (2016.11.10)		ユニベルシテートシュクリナム レーゲンスブルク
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月10日 (2018.7.10)		ドイツ連邦共和国, 93053 レーゲンスブルク, フランツヨーゼフシュトラウスーアレー 1 1
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/077371	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開番号	W02017/081218		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日	平成29年5月18日 (2017.5.18)	(74) 代理人	100123582
(31) 優先権主張番号	15194062.4		弁理士 三橋 真二
(32) 優先日	平成27年11月11日 (2015.11.11)	(74) 代理人	100117019
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 渡辺 陽一
(31) 優先権主張番号	16172551.0	(74) 代理人	100141977
(32) 優先日	平成28年6月1日 (2016.6.1)		弁理士 中島 勝
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

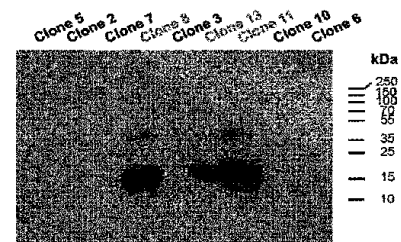
(54) 【発明の名称】 抗-ヒト IL-3 抗体、IL-3 の高められた発現又はレベルに関連する疾患又は機能障害へのそれらの使用、及びヒト IL-3 の検出方法へのそれらの使用

(57) 【要約】

本発明の抗-ヒト IL-3 抗体又はそのフラグメントは、治療剤として有用である。その抗体は、患者における h IL-3 の高められた発現又はレベルに関連する疾患、特に炎症又は自己免疫疾患、例えば関節リウマチの治療又は予防のための医薬組成物に使用され得る。その抗体はまた、ヒト細胞により発現されるヒト IL-3 を検出するためにも使用され得る。

Fig. 2

Westernblot with mAbs against IL-3



Each lane : 1 µg/ml recombinant hIL-3
Reducing (β-ME) and denaturing conditions (SDS)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコシル化 h I L - 3 に対する阻害活性を有する抗 h I L - 3 抗体であって、当該抗 h I L - 3 抗体の I C ₅₀ が 1 0 0 n g / m l 以下であり、他のサイトカイン及び非ヒト I L - 3 との交差反応性が 5 % 未満であり、治療に用いる、当該抗体、又はその変異体。

【請求項 2】

前記抗体が、ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 2 8 1 によって生産された抗体、又はハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 1 6 4 によって生産された抗体、又はハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 2 8 1 によって生産された抗体の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む抗体、又はハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 1 6 4 によって生産された抗体の 1 つ以上の相補性決定領域 (C D R) を含む抗体である、請求項 1 に記載の抗 h I L - 3 抗体。

10

【請求項 3】

前記抗体と h I L - 3 との結合と比較して、I L - 5 又は G M - C S F との結合の程度が 5 % 未満、好ましくは 2 % 未満、最も好ましくは 1 % 未満である；及び / 又はマウス又はラット I L - 3 と交差反応しない；及び / 又はポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の抗 h I L - 3 抗体。

【請求項 4】

4 0 n g / m l 以下、好ましくは 1 0 n g / m l 以下の I C ₅₀ で h I L - 3 に対して阻害活性を有し；
又は当該抗体が完全な抗体、フラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体であり；
又は当該抗体が h I L - 3 依存的疾患及び症状の治療に用いられ、又は患者の h I L - 3 の発現又はレベルの増大に関連する疾患又は機能不全の治療又は予防に使用され；又は
当該抗体が患者の h I L - 3 の発現又はレベルの増大に関連する疾患又は機能不全の治療又は予防に使用され、ここで任意で当該疾患又は機能不全が、炎症性又は自己免疫性疾患、好ましくはリウマチ性関節炎、慢性移植片対宿主疾患、多発性硬化症、又は全身性エリテマトーデスである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗 h I L - 3 抗体。

20

【請求項 5】

ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 2 8 1 によって生産された抗 h I L - 3 抗体、又はハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 1 6 4 によって生産された抗体の 1 つ以上の C D R、又はハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 2 8 1 によって生産された抗体の 1 つ以上の C D R を含む抗 h I L - 3 抗体。

30

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗 I L - 3 抗体、又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体をコードすることを特徴とする核酸。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗 h I L - 3 モノクローナル抗体を生産することを特徴とするハイブリドーマ細胞株。

【請求項 8】

医薬として有効な量の、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗 h I L - 3 抗体、又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体、及び任意で医薬として許容される助剤及び / 又は担体を含有する、医薬組成物。

40

【請求項 9】

患者の h I L - 3 の発現又はレベルの増大に関連する疾患又は機能不全の治療又は予防に使用される、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

抗 h I L - 3 抗体、又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体の h I L - 3 阻害活性を決定する方法であって、以下の工程：

a) 1 つ以上の濃度の h I L - 3 と共に、h I L - 3 抗体、又はそのフラグメント、変異

50

体、コンストラクト又は接合体をブレインキュベーションする工程；

b) 工程 a) の混合物を試料に添加する工程；

c) 工程 b) で得られた混合物を 1 つ以上の細胞マーカーと接触する工程；

d) 1 つ以上の細胞マーカーの上方制御及び / 又は下方制御を定量する工程；

を含み、h I L - 3 によって上方制御される細胞マーカーの減少及び / 又は h I L - 3 によって下方制御される細胞マーカーの増大が、阻害活性の指標である、方法。

【請求項 1 1】

以下の工程；

a) 1 つ、2 つ又はそれ以上の濃度の h I L - 3 と共に、h I L - 3 抗体、又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体を、グリコシル化抗 I L - 3 と共にブレインキュベーションする工程；

b) 工程 a) の混合物を一次ヒト血液細胞を含有する試料に添加する工程；

c) 工程 b) の混合物の血液細胞を、好塩基球、形質細胞様樹状細胞、C D 1 4 + C D 1 6 + 単球、C D 1 4 + + 単球及び / 又は好酸球のための標識された細胞マーカー又はそれらの任意の組み合わせで標識する工程；

e) 解析、任意でフローサイトメトリ解析により、好塩基球、形質細胞様樹状細胞、単球及び / 又は好酸球を同定する工程；

f) 好塩基球上の C D 2 0 3 c 又は C D 1 1 b の上方制御、又は C D 1 3 1 の下方制御を定量する工程；及び / 又は

g) 形質細胞様樹状細胞上の H L A - D R の上方制御又は C D 1 3 1 の下方制御を定量する工程；及び / 又は

h) C D 1 4 + C D 1 6 + 単球、C D 1 4 + + 単球及び / 又は好酸球上の C D 1 3 1 の下方制御を定量する工程；

を含み、h I L - 3 により上方制御される細胞マーカーの減少及び / 又は h I L - 3 によって下方制御される細胞マーカーの増大が阻害活性の指標であり、1 0 0 n g / m l 以下の $I C_{50}$ が、インビボでの h I L - 3 の効率的なブロック又は h I L - 3 / h I L - 3 受容体相互作用の指標である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記 h I L - 3 抗体又はそのフラグメント又は変異体の濃度が約 0 ~ 3 0 μ g / m l であり；及び / 又は工程 a) における h I L - 3 の濃度が約 0 . 1 n g / m l であり；及び / 又はブレインキュベーション工程 a) が約 2 0 分間室温で実施され；及び / 又は一次ヒト血液細胞が E D T A 血液試料に由来し；及び / 又は一次ヒト血液細胞が関節リウマチに罹患した患者から得られたものであり；及び / 又はインキュベーション工程 c) が 3 7 で約 1 時間実施され；及び / 又は染色工程 d) が約 2 0 分間氷上で実施され；及び / 又は好塩基球、形質細胞様樹状細胞、単球又は好酸球のための蛍光標識された細胞マーカーの組み合わせが、C D 1 1 b、C D 1 2 3、C D 2 0 3 C、C D 1 3 1、H L A - D R、C D 4、C D 1 4、C D 1 6、C D 1 1 6、C D 3 0 3、C D 3 0 4、C C R 3、C C R 2 を含む群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

抗体、そのフラグメント、コンストラクト、変異体又は接合体が、4 0 n g / m l 以下、好ましくは 1 0 n g / m l 以下の $I C_{50}$ を有する、h I L - 3 抗体、そのフラグメント、コンストラクト、変異体又は接合体である、請求項 1 1 又は 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗 h I L - 3 抗体を取得する方法であって、グリコシル化 h I L - 3 ペプチド又はその活性部分が免疫化の抗原として使用され、及び / 又はグリコシル化ヒト h I L - 3 ペプチドが、ハイブリドーマによって生産されたモノクローナル抗体のスクリーニングに使用され、及び / 又はグリコシル化 h I L - 3 が抗体の阻害能力を試験するために使用され；任意で抗 h I L - 3 ペプチドが初代ヒト細胞から発現及び翻訳される、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

ヒト細胞中又は患者試料中の h I L - 3 を検出する、好ましくは E L I S A 法によって検出するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗 h I L - 3 抗体又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 - ヒトインターロイキン (I L - 3) 抗体、そのような抗体をコードする核酸配列及び本発明の抗体を生成するハイブリドーマ細胞系に関する。本発明はさらに、ヒト患者における I L - 3 の高められたレベルに関連する疾患又は機能障害の予防又は治療のために有用である、抗 - ヒト I L - 3 抗体を含む医薬組成物、及びヒトにおける I L - 3 の活性を阻止する抗 - ヒト I L - 3 抗体の能力を決定するための方法に関する、さらに、本発明は、ヒト I L - 3 の検出方法へのそのような抗体の使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

インターロイキンは、サイトカインと呼ばれる大きなタンパク質ファミリーに属する。サイトカインは、特定の細胞に結合すると特定の細胞の機能に影響を及ぼすポリペプチドであり、サブクラス、すなわちインターフェロン、コロニー刺激因子 (C S F)、リンホカイン、成長因子及びモノカインに分けられる。サイトカインが細胞増殖及び例えば、また炎症疾患において主要役割を果たすことは良く知られている。

20

【0003】

細胞増殖は、成長因子が細胞表面上の特定の受容体に結合し、この後、エンドサイトーシスが起こり、そしてサイトカイン及び受容体の複合体が内在化され、細胞応答を引起す複雑な工程である。そのような細胞応答は、D N A 合成及び細胞複製のような特定の遺伝子転写活性を含む。比較的高い濃度で試験される場合、サイトカインの大部分は、いくつかの異なる生物学的効果を有する。それらのサイトカインの効果のために、それらのタンパク質の可能な治療用途についての調査に高い関心がある。

【0004】

インターロイキンは、大部分、白血球において低濃度で生成される免疫系のメディエーターである。それらは、免疫系の細胞の増殖、分化及び活性に影響を及ぼし、そして従って、免疫モジュレーターに属する。それらはまた、標的細胞の表面上の受容体に結合することにより効果を発揮し、そして従って、特定遺伝子の転写速度を変える。それらは、多数の細胞応答の誘発において重要な役割を果たす。

30

【0005】

インターロイキンは、例えば免疫細胞活性化カスケード及び続く炎症性変化に関与する。不規則及び / 又は異常炎症は、広範なヒト疾患の主要成分及び因子であり、それらの 1 つは免疫学的障害である関節リウマチ (R A) である。しかしまた、他の免疫学的疾患もインターロイキンにより影響される。

【0006】

マルチ C S F と呼ばれる I L - 3 は、インターロイキンファミリーの良く知られたメンバーである。それは、種々の造血前駆体細胞に対する増殖刺激及び分化効果を有し、そして肥満細胞のための増殖因子として作用する。I L - 5 及び G M - C S F と共に、I L - 3 は、4 つの短い α - ヘリックス束を有する造血サイトカインのファミリーに属する。G M - C S F 及び I L - 3 は、好中球及び抗酸性顆粒球コロニー及びマイクロファージの形成を刺激する。それはさらに、マスト、巨核球、及び純粋な及び混合された赤血球コロニーの形成を刺激する (D . Metcalf , , The hematopoietic colony - stimulating factors " , 1984 , Elsevier , Amsterdam) 。

40

【0007】

I L - 3 は、133 個のアミノ酸から成り、そしてヒト造血前駆体細胞によるコロニー

50

形成の刺激、及びヒト急性骨髄性白血病（AML）芽球によるDNA合成の刺激のために知られている。IL-3は、CD123抗原として知られている独自の受容体に結合する。この受容体は、I型サイトカイン受容体ファミリーに属し、そして共通のβ-サブユニット（βC又はCDW131）と対になるユニークα鎖を有するヘテロダイマーである。IL-3はユニークα-受容体サブユニットに結合する。しかしながら、シグナル伝達は、JAK2-STATS経路による共通のβ-受容体サブユニット（βC）により媒介される。

【0008】

ヒトIL-3は、配列番号10で定義されるようなヒトIL-3のアミノ酸配列の2つの潜在的N-グリコシル化部位、すなわちaaN15及びaaN70を有する：

A P M T Q T T S L K T S W V N C S N M I D E I I T H L K Q P P L P L L D
F N N L N G E D Q D I L M E N N L R R P N L E A F N R A V K S L Q N A S
A I E S I L K N L L P C L P L A T A A P T R H P I H I K D G D W N E F R R
K L T F Y L K T L E N A Q A Q Q T T L S L A I F（グリコシル化部位は太字である）。

【0009】

真核細胞により発現されたIL-3は、N-グリコシル化されることは十分に確立されている（Biolegend and Biomol and Protein Expr Purif. 2003 Sep; 31(1): 34-41からのデータシートを参照のこと）。IL-3のグリコシル化された及び非グリコシル化されたバージョンは、腫瘍細胞のIL-3誘発された増殖により測定された場合と類似する生物活性を有する（Peprotech, Biolegend, Biomol and Protein Expr Purif. 2003 Sep; 31(1): 34-41からのデータシート、以下同様）。ネズミIL-3に関しては、グリコシル化はIL-3の生物活性に影響を及ぼさないことも示されている（Cytokine 1993; 5: 291-297, J. Biol. Chem. 1988, 263: 14511-17）。

【0010】

これまで、グリコシル化がIL-3生物活性を阻止するモノクローナル抗体の能力に影響を及ぼすというヒントは文献には存在しなかった。モノクローナル抗体の阻害活性は、E. コリ由来のIL-3（J. Biol. Chem 1991; 266: 10624-31, J. Immunol. 1991; 146: 893-8）又は非グリコシル化IL-3（J. Biol. Chem 1991; 266: 21310-17）のいずれかにより特徴づけられた。IL-3への抗体の結合は、グリコシル化及び非グリコシル化IL-3により試験され、そしてグリコシル化に無関係であることが見出された。IL-3は主に、活性化されたCD4⁺T細胞により生成され、そして特に、CD34⁺造血前駆体細胞の増殖、分化及び生存に寄与する。IL-3は、インビトロで、好塩基球及び肥満細胞の骨髄細胞からの分化を促進することが観察されている。さらに、マウス好塩基球によるIL-6放出を誘発し、そして単球/マクロファージにおけるMHC-II発現及びIL-1分泌をアップレギュレートすることが観察されている。さらに、IL-3は、単球の樹状細胞及び破骨細胞への分化を支持する。

【0011】

ヒトゲノムライブラリーにおけるIL-3の最初の検出以来、健康なヒトにおけるその役割及び疾患の発生におけるその可能性ある役割を決定することが、調査の焦点であった。サイトカインが造血を開始するか又は調節する能力は、特に免疫系の機能不全又は疾患に関連する限り、興味あるものである。そのような障害は造血系の妨害に関連されているようであり、そしてそのような疾患は、生存可能な前駆体細胞を造血系に提供することにより治療され得ると考えられている。そのような前駆体細胞を分化させるように誘発することは、それぞれの疾患を治療する手段としてみなされた。

【0012】

数年前まで、自己免疫疾患及び特に関節リウマチ（RA）におけるIL-3の役割につ

10

20

30

40

50

いてはほとんど知られていなかった。RAは、関節の最も一般的な炎症性疾患である。最初の疾患段階はしばしば、徐々に進行するが、しかしまた、瞬間的爆発で出現することもあり得ます。主に痛みは、指又はつま先関節で発生するが、また他の関節も影響を受けます。罹患した関節は腫脹を示し、そして通常、異常高熱である。ほとんど、この疾患はエピソードで進行し、エピソードは通常、数週～週ヶ月間、持続する。エピソードの間、一般的に症状の改善がある。

【0013】

RAの病因はまだ知られていない。自己免疫の原因はウイルスによって強く疑われ、そして細菌原因もまた論じられている。遺伝的影響は、何人かの著者により報告されてきた (Hemminki K. et al., Arthritis Rheum. 2009; 60(3): 661-8, Padyukov L. et al., Arthritis Rheum. 2004; 50(10) 3085-92)。間違っ
た免疫細胞が影響された関節に侵入し、そして前症炎症性サイトカインの生成を引起すと推定される。1つの理論によれば、サイトカイン間のバランスがRAにおいて妨げられる。IL-1、IL-6及びTNF α はRAにおいて過剰に存在し、そして軟骨組織において有害な炎症工程及び破骨細胞の活性化を担当していることが報告されている。

10

【0014】

関節リウマチの治療は、有害な副作用の高いリスクを有する医薬が使用されなければならないので、患者にとって、まだ困難で且つ負担がかかると考えられている。この疾患を治療する1つの手段は、主に、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) を用いての対症療法を行うことである。それらの薬物は、抗炎症及び鎮痛剤として作用し、そしてしばしば、痛みの緩和のみを達成する。薬物はさらに、プロスタグランジンがシクロオキシゲナーゼにより生成される、炎症カスケードにおける特定段階を妨害する。しかしながら、NSAIDは、根底にある炎症工程に影響を及ぼさず、そして従って、RAの最も有害な効果である関節破壊を遅らせることができない。

20

【0015】

関節破壊及び疾患活動を予防するために、RAを治療するためのさらなる現在のアプローチは、疾患改変抗リウマチ薬 (DMARD) の使用である。それらの医薬品は実際、疾患工程を改変する。DMARDの例は、メトトレキセートであり、最も一般的に使用される抗リウマチ薬であり、その効果は、酵素ジヒドロ葉酸レダクターゼの可逆的阻害に基
いている。RAを治療するための別の一般的に使用される物質は、レフルノミドであり、これはピリミジン代謝を介することにより効果をもたらす。両医薬品は、長時間作用し、そして従って、所望の効果を示すためには、長時間 (通常12 - 16週) にわたって投与されるべきである。DMARDが患者を改善するまでの時間を埋めるためには、ほとんどの患者はステロイドが投与される。

30

【0016】

RAを治療するためのさらなるアプローチは、TNF、IL-6、IL-1のようなサイトカイン、又はB7のような共刺激性分子をブロックするか、又は白血球サブセット (例えば、B細胞) を枯渇させる「生物学的製剤」である。生物学的製剤 (例えば、TNF抗体インフリキシマブ) は、重篤な疾患段階に、及びDMARDが疾患の活動を十分に制
御できなかった後に、主に使用される。生物学的製剤は、免疫系における多くのシグナル系に影響を及ぼし、そして細菌及びウイルス感染、及び腫瘍の発生の高いリスクを含む種々の重度の副作用を有する。

40

【0017】

全ての既知治療は、重度の欠点及び副作用を有し、そして従って、効果的であり、自己免疫疾患に罹患している患者において他のサイトカインよりもより選択的に発現され、そして現在使用される治療レジームよりも低い副作用を有する、RAの治療のための新規薬物を開発することが目的であった。

【0018】

より最近では、自己免疫疾患、及び特にRAにおけるIL-3の関与が記載されて来た

50

。国際公開第2010/063488号は、IL-3インヒビターが関節リウマチの初期段階の治療に使用され得ることを記載している。上記特許出願は、IL-3 mRNAがRA患者の滑膜に検出されず、そしてIL-3の効果が培養線維芽細胞に観察されなかったことを述べているが、遺伝子分析によれば、IL-3プロモーター遺伝子中の単一のヌクレオチド多型とRAとの間に関連性が見出された。RA患者における相当に高められたレベルのIL-3の存在を示すこの発見及びまたさらなる研究に基いて、国際公開第2010/063488号は、予防的RA治療、疾患の初期段階における治療処置、又は維持処置への阻害剤、主に抗体又は抗体フラグメント、抗体変異体又は抗体マルチマーのそのような使用を提案している。

【0019】

10

しかしながら、高い親和性及びアビディティをまた示すIL-3に対して高い特異性を有する効果的な抗体の必要性がまだ存在する。患者の身体における疾患又は機能不全の治療に使用される抗体のインビボ有効性は必須であるので、インビボ状況下で有効である抗体に対する緊急の必要性もまた存在する。そのような抗IL-3抗体は好ましくは、他の種からのIL-3との交差反応性を示さないが、又は非常に低いはずである。本発明のこの目的の範囲内で、IL-3の活性をインビボで効率的且つ特異的に阻害することができる抗体を提供することが望ましく、従って、IL-3のレベルの上昇と診断された患者における疾患を治療するのに有用な薬剤となる。

【発明の概要】

【0020】

20

本発明のそれらの目的は、添付の請求項及び以下の記載に特定されるような本発明の抗IL-3抗体又はそのフラグメント、コンストラクト、変異体又は接合体により解決される。

【0021】

抗ヒトIL-3抗体を効率的に得るための方法を提供することがさらなる目的である。ヒトにおけるIL-3活性を阻止できる抗ヒトIL-3抗体を同定するための方法及び試験を提供することが本発明のさらなる目的であった。本発明のさらなる目的は、ヒト細胞により発現されるヒトIL-3の検出のための方法において効率的に使用され得る抗体を提供することである。

【図面の簡単な説明】

30

【0022】

本発明はまた、以下の図面を参照しても説明される。以下の図面は、本発明をさらに例示し、そして説明するが、しかしその範囲を限定するものではない。

【0023】

【図1】図1は、種々の種のアミノ酸配列相同性を示す。

【0024】

【図2】図2は、IL-3に結合するモノクローナル抗体の能力をウェスタンブロットで示す。

【0025】

【図3】図3は、異なる量のIL-3が、上昇する量の被覆されたヤギ抗-hIL-3抗体を介して固体表面にヤギ抗-ヒト-IL-3抗体により結合された、ELISAアッセイにおいて種々の量の抗体を用いることにより決定されたような、IL-3のための抗体クローン11の相対的親和性を示す。

40

【0026】

【図4】図4は、ELISAアッセイにおいて固相に結合された一定量のIL-3で種々の濃度の抗体を用いて決定された抗体の相対的IL-3親和性を示す。

【0027】

【図5】図5は、他のヒトサイトカインと抗-IL-3抗体との可能性ある交差反応性を検出するために実施された試験の結果を示す。試験では、IL-3、GM-CSF及びIL-5への抗体の結果が比較された。

50

【0028】

【図6】図6は、クローンP8C11C8-6が、ヒトIL-5又はヒトGM-CSFとの交差反応性を示さないことを示す。ELISAは、PBS、PBS中、ヒトGM-CSF、ヒトIL-5又はヒトIL-3(1 μ g/ml)により一晚、被覆された。洗浄し、そしてPBS/1%BSA(ウシ血清アルブミン)によりブロックした後、クローンP8C11C8-6(40 μ g/ml)又は培地を、室温で1時間、適用した。洗浄の後、二次HRP-標識ウサギ抗-マウスポリクローナル抗体(P260, DakoCytomation)を適用した。洗浄の後、色基質反応をABTSにより実施し、そして光学濃度を測定した。図6に示される結果を、昆虫細胞(Biolegendからの組換えヒトIL-3(キャリアフリー)カタログ番号57002)により発現されたヒトIL-3を用いることにより得た。従って、ヒトIL-3ペプチドをグリコシル化した。

10

【0029】

【図7】図7-9は、他の種からのIL-3と、種々の抗-IL3抗体との可能性ある交差反応性を検出するために行われた試験の結果を示す。図8は、クローンP8C11C8-6がマウス又はラットIL-3との交差反応性を示さないことを示している。ELISAウェルが、PBS、PBS中、マウスIL-3、ラットIL-3又はヒトIL-3(1 μ g/ml)により一晚、被覆された。洗浄、及びPBS/1%BSA(ウシ血清アルブミン)によるブロッキングの後、クローンP8C11C8-6(40 μ g/ml)又は培地が、室温で1時間、適用された。洗浄の後、二次HRP標識ウサギ抗-マウスポリクローナル抗体(P260, DakoCytomation)が適用された。洗浄の後、色基質反応がABTSにより行われ、そして光学濃度が測定された。図8に示される結果は、昆虫細胞(Biolegendからの組換えヒトIL-3(キャリアフリー)カタログ番号57002)により発現されたヒトIL-3を用いることにより得られた。従って、そのヒトIL-3ペプチドはグリコシル化された。図9に示される試験においては、また商業的に入手できる抗-IL-3が含まれた。

20

【図8】図7-9は、他の種からのIL-3と、種々の抗-IL3抗体との可能性ある交差反応性を検出するために行われた試験の結果を示す。図8は、クローンP8C11C8-6がマウス又はラットIL-3との交差反応性を示さないことを示している。ELISAウェルが、PBS、PBS中、マウスIL-3、ラットIL-3又はヒトIL-3(1 μ g/ml)により一晚、被覆された。洗浄、及びPBS/1%BSA(ウシ血清アルブミン)によるブロッキングの後、クローンP8C11C8-6(40 μ g/ml)又は培地が、室温で1時間、適用された。洗浄の後、二次HRP標識ウサギ抗-マウスポリクローナル抗体(P260, DakoCytomation)が適用された。洗浄の後、色基質反応がABTSにより行われ、そして光学濃度が測定された。図8に示される結果は、昆虫細胞(Biolegendからの組換えヒトIL-3(キャリアフリー)カタログ番号57002)により発現されたヒトIL-3を用いることにより得られた。従って、そのヒトIL-3ペプチドはグリコシル化された。図9に示される試験においては、また商業的に入手できる抗-IL-3が含まれた。

30

【図9】図7-9は、他の種からのIL-3と、種々の抗-IL3抗体との可能性ある交差反応性を検出するために行われた試験の結果を示す。図8は、クローンP8C11C8-6がマウス又はラットIL-3との交差反応性を示さないことを示している。ELISAウェルが、PBS、PBS中、マウスIL-3、ラットIL-3又はヒトIL-3(1 μ g/ml)により一晚、被覆された。洗浄、及びPBS/1%BSA(ウシ血清アルブミン)によるブロッキングの後、クローンP8C11C8-6(40 μ g/ml)又は培地が、室温で1時間、適用された。洗浄の後、二次HRP標識ウサギ抗-マウスポリクローナル抗体(P260, DakoCytomation)が適用された。洗浄の後、色基質反応がABTSにより行われ、そして光学濃度が測定された。図8に示される結果は、昆虫細胞(Biolegendからの組換えヒトIL-3(キャリアフリー)カタログ番号57002)により発現されたヒトIL-3を用いることにより得られた。従って、そのヒトIL-3ペプチドはグリコシル化された。図9に示される試験においては、また

40

50

商業的に入手できる抗 - I L - 3 が含まれた。

【 0 0 3 0 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、T F 1 細胞の I L - 3 依存性増殖を示し、ここで生存細胞は I L - 3 の不在下で増殖せず、そして細胞増殖は増殖培地において I L - 3 の量に依存することが示され得る。

【 0 0 3 1 】

【 図 1 1 】 図 1 1 - 1 4 は、市販の抗 - I L - 3 抗体を含む種々のモノクローナル抗体の、T F 1 細胞の I L - 3 依存性増殖を阻害する能力を示す。細胞増殖培地に依存する異なる濃度の h I L - 3 に関して、抗体クローン 1 1、クローン 1 3 及び R & D 抗 - I L - 3 抗体の細胞増殖の明確な阻害を示す抗体の効果が試験されたが、クローン 8 はわずかな効果しか有さなかった。使用されたヒト I L - 3 は、P e p r o t e c h から入手され、そして E . コリにより発現された。従って、使用されたヒト I L - 3 は、非グリコシル化 I L - 3 ペプチドであった。

10

【 図 1 2 】 図 1 1 - 1 4 は、市販の抗 - I L - 3 抗体を含む種々のモノクローナル抗体の、T F 1 細胞の I L - 3 依存性増殖を阻害する能力を示す。細胞増殖培地に依存する異なる濃度の h I L - 3 に関して、抗体クローン 1 1、クローン 1 3 及び R & D 抗 - I L - 3 抗体の細胞増殖の明確な阻害を示す抗体の効果が試験されたが、クローン 8 はわずかな効果しか有さなかった。使用されたヒト I L - 3 は、P e p r o t e c h から入手され、そして E . コリにより発現された。従って、使用されたヒト I L - 3 は、非グリコシル化 I L - 3 ペプチドであった。

20

【 図 1 3 】 図 1 1 - 1 4 は、市販の抗 - I L - 3 抗体を含む種々のモノクローナル抗体の、T F 1 細胞の I L - 3 依存性増殖を阻害する能力を示す。細胞増殖培地に依存する異なる濃度の h I L - 3 に関して、抗体クローン 1 1、クローン 1 3 及び R & D 抗 - I L - 3 抗体の細胞増殖の明確な阻害を示す抗体の効果が試験されたが、クローン 8 はわずかな効果しか有さなかった。使用されたヒト I L - 3 は、P e p r o t e c h から入手され、そして E . コリにより発現された。従って、使用されたヒト I L - 3 は、非グリコシル化 I L - 3 ペプチドであった。

【 図 1 4 】 図 1 1 - 1 4 は、市販の抗 - I L - 3 抗体を含む種々のモノクローナル抗体の、T F 1 細胞の I L - 3 依存性増殖を阻害する能力を示す。細胞増殖培地に依存する異なる濃度の h I L - 3 に関して、抗体クローン 1 1、クローン 1 3 及び R & D 抗 - I L - 3 抗体の細胞増殖の明確な阻害を示す抗体の効果が試験されたが、クローン 8 はわずかな効果しか有さなかった。使用されたヒト I L - 3 は、P e p r o t e c h から入手され、そして E . コリにより発現された。従って、使用されたヒト I L - 3 は、非グリコシル化 I L - 3 ペプチドであった。

30

【 0 0 3 2 】

【 図 1 5 】 図 1 5 は、I L - 3、G M - C S F 又はそれらの組合せの存在下で、又はそれらのサイトカインの不在下で、T F 1 細胞の増殖に対する、培地中の種々の抗体（クローン 8、クローン 1 1、クローン 1 3 及び R & D）及びそれらの異なる濃度の抗体の効果を示す。いずれの抗体も、G M - C S F の存在下で T F 1 細胞の増殖に対する顕著な阻害効果を示さなかったのに対して、クローン 1 1、及び高濃度でのクローン 1 3 及び R & D 抗体は T F 1 細胞の増殖に対する I L - 3 効果を明白に阻害した。使用されたヒト I L - 3 は、P e p r o t e c h から入手され、そして E . コリにより発現された。従って、使用されたヒト I L - 3 は、非グリコシル化 I L - 3 ペプチドであった。

40

【 0 0 3 3 】

【 図 1 6 】 図 1 6 は、抗 - I L - 3 クローン 1 1 及びクローン 1 3 の B i a c o r e - A n a l y s i s を示す。

【 0 0 3 4 】

【 図 1 7 】 図 1 7 は、好塩基球上の C D 2 0 3 c 及び C D 1 1 b の I L - 3 誘発されたアップレギュレーションを示す。

【 0 0 3 5 】

50

【図18】図18は、形質細胞様樹状細胞（pDC）に対するHLA-DRのIL-3誘発されたアップレギュレーションを示す。

【0036】

【図19】図19-21は、好塩基球上のCD203のIL-3誘発されたアップレギュレーションに対する抗体の効果を示す。

【図20】図19-21は、好塩基球上のCD203のIL-3誘発されたアップレギュレーションに対する抗体の効果を示す。

【図21】図19-21は、好塩基球上のCD203のIL-3誘発されたアップレギュレーションに対する抗体の効果を示す。

【0037】

10

IL-3（0.1 ng/ml）が、室温で20分間、抗体（10 μg/ml）と共にプレインキュベートされ、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加された。37 °Cでの1時間のインキュベーションの後、細胞は、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色され、そしてフローサイトメトリーより分析され、好塩基球が同定され、そして好塩基球上のCD203cのアップレギュレーションが定量化された。

【0038】

MOPC-21 = マウスIgG1 κアイソタイプ対照抗体。クローン11、13、36、44、47、R&D203 4306 = 抗ヒトIL-3抗体。

【0039】

20

【図22】図22は、RA患者から入手された血液サンプルに由来する一次ヒト血液細胞におけるIL-3遮断を示す。

【0040】

IL-3（0.1 ng/ml）が、室温で20分間、抗体（10 μg/mlのクローン13又は10 μg/mlのP8C11C8-6）と共にプレインキュベートされ、そして関節リウマチ（RA）を有する新鮮なヒトEDTA血液に添加された。37 °Cでの1時間のインキュベーションの後、細胞は、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色され、そしてフローサイトメトリーより分析され、好塩基球が同定され、そして好塩基球上のCD203cのアップレギュレーションが定量化された。

30

【0041】

【図23】図23は、2人のRA患者から得られたサンプルにおける好塩基球上のCD203cのIL-3誘発されたアップレギュレーションに対する抗体の効果を示す。

【0042】

IL-3（0.1 ng/ml）が、室温で20分間、抗体（10 μg/ml）と共にプレインキュベートされ、そしてRAを罹患する患者からの新鮮なヒトEDTA血液に添加された。37 °Cでの1時間のインキュベーションの後、細胞は、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色され、そしてフローサイトメトリーより分析され、好塩基球が同定され、そして好塩基球上のCD203cのアップレギュレーションが定量化された。

40

【0043】

MOPC-21 = マウスIgG1 κアイソタイプ対照抗体。クローン11、13、4806 = 抗ヒトIL-3抗体。

【0044】

【図24】図24は、クローン13による好塩基上のCD203cのIL-3誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

【0045】

IL-3（0.1 ng/ml）を、室温で20分間、種々の濃度のIL-3抗体クローン13と共にプレインキュベートし、そして新鮮なEDTA血液に添加した。37 °Cでの1時間のインキュベーションの後、細胞を、氷上で20分間、CD11b、CD203c

50

、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上のCD203のアップレギュレーションを定量化した。

【0046】

【図25】図25は、クローン13による好塩基球上のCD11bのIL-3誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

【0047】

IL-3(0.1ng/ml)を、室温で20分間、種々の濃度のIL-3抗体クローン13と共に、又は10µg/mlのMOPC-21(マウスIgG1アイソタイプ対照抗体)、クローン11又はR&D mab203(クローン4806)と共にプレインキュベートし、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加した。37での1時間のインキュベートの後、細胞を、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上のCD11bのアップレギュレーションを定量化した。

10

【0048】

【図26】図26は、クローン13によるpDCs上のHLA-DRのIL-3誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

【0049】

IL-3(0.1ng/ml)を、室温で20分間、種々の濃度のIL-3抗体クローン13と共に、又は10µg/mlのMOPC-21(マウスIgG1アイソタイプ対照抗体)、クローン11又はR&D mab203(クローン4806)と共にプレインキュベートし、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加した。37での1時間のインキュベートの後、細胞を、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして形質細胞様樹状細胞(pDC)上のHLA-DRのアップレギュレーションを定量化した。

20

【0050】

【図27】図27は、好塩基球上のCD203cのIL-3誘発されたアップレギュレーションに対する抗体の効果を示す。

30

【0051】

IL-3(0.1ng/ml)を、室温で20分間、抗体(10µg/ml)と共にプレインキュベーションし、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加した。37での1時間のインキュベーションの後、細胞を、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上のCD203cのアップレギュレーションを定量化した。

【0052】

MOPC-21 = マウスIgG1κアイソタイプ対照抗体。クローン11、13、36、4806 = 抗ヒトIL-3抗体。

40

【0053】

クローン32703 = 抗ヒトIL-3受容体抗体。AF-403 = R&D Systemsからのポリクローナルヤギ抗-ヒトIL-3。

【0054】

【図28】図28は、好塩基球上のCD203cのIL-3誘発されたアップレギュレーションに対する抗体の効果を示す。

【0055】

IL-3(0.1ng/ml)を、室温で20分間、種々の濃度の抗IL-3抗体と共にプレインキュベートし、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加した。37での1時間のインキュベーションの後、細胞を、氷上で20分間、CD11b、CD203c、CD

50

1 2 3 及び H L A - D R に対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上の C D 2 0 3 c のアップレギュレーションを定量化した。

【 0 0 5 6 】

【 図 2 9 】 図 2 9 は、好塩基球上の C D 2 0 3 c の I L - 3 誘発されたアップレギュレーションに対する R & D 抗 - I L - 3 受容体クローン 3 2 7 0 3 の阻止効果を示す。

【 0 0 5 7 】

新鮮なヒト E D T A 血液を、種々の濃度の抗 - I L - 3 受容体クローン 3 2 7 0 3 と共に室温で 2 0 分間、プレインキュベートした。洗浄しないで、I L - 3 (0 . 3 n g / m l) を添加し、そして 3 7 ° で 1 時間インキュベートした。細胞を、氷上で 2 0 分間、C D 1 1 b、C D 2 0 3 c、C D 1 2 3 及び H L A - D R に対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上の C D 2 0 3 c のアップレギュレーションを定量化した。

10

【 0 0 5 8 】

図 1 7 ~ 2 9 に示される結果は、昆虫細胞 (B i o l e g e n d から組換えヒト I L - 3 (キャリアフリー) カタログ番号 5 7 0 0 2) により発現されたヒト I L - 3 を用いることにより得られた。従って、ヒト I L - 3 ペプチドはグリコシル化された。

【 0 0 5 9 】

【 図 3 0 】 図 3 0 及び 3 1 A 及び 3 1 B は、ヒト I L - 3 由来の種々のペプチドへの P 8 C 1 1 C 8 - 6 の結合を示す。P 8 C 1 1 C 8 - 6 により認識されたエピトープは、アミノ酸 2 7 - 2 9 (L K Q) を含む。それは、アミノ酸 2 2 - 4 8 内に位置し、そして配列番号 1 0 で定義されるようなアミノ酸配列のアミノ酸 2 6 (H) - 3 6 (D) のいくつか又はすべては結合に関与するようである。

20

【 図 3 1 】 図 3 0 及び 3 1 A 及び 3 1 B は、ヒト I L - 3 由来の種々のペプチドへの P 8 C 1 1 C 8 - 6 の結合を示す。P 8 C 1 1 C 8 - 6 により認識されたエピトープは、アミノ酸 2 7 - 2 9 (L K Q) を含む。それは、アミノ酸 2 2 - 4 8 内に位置し、そして配列番号 1 0 で定義されるようなアミノ酸配列のアミノ酸 2 6 (H) - 3 6 (D) のいくつか又はすべては結合に関与するようである。

【 0 0 6 0 】

【 図 3 2 】 図 3 2 及び 3 3 は、クローン 1 3 及びクローン P 8 C 1 1 8 - 6 による、好塩基球上の C D 2 0 3 c の I L - 3 誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

30

【 図 3 3 】 図 3 2 及び 3 3 は、クローン 1 3 及びクローン P 8 C 1 1 8 - 6 による、好塩基球上の C D 2 0 3 c の I L - 3 誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

【 0 0 6 1 】

I L - 3 (0 . 1 n g / m l) を、室温で 2 0 分間、種々の濃度の抗 I L - 3 抗体と共にプレインキュベートし、そして新鮮なヒト E D T A 血液に添加した。3 7 ° での 1 時間のインキュベーションの後、細胞を、氷上で 2 0 分間、C D 1 1 b、C D 2 0 3 c、C D 1 2 3 及び H L A - D R に対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上の C D 2 0 3 c のアップレギュレーションを定量化した。

40

【 0 0 6 2 】

【 図 3 4 】 図 3 4 及び 3 5 は、クローン 1 3 及びクローン P 8 C 1 1 8 - 6 による、好塩基球上の C D 1 3 1 の I L - 3 誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

【 図 3 5 】 図 3 4 及び 3 5 は、クローン 1 3 及びクローン P 8 C 1 1 8 - 6 による、好塩基球上の C D 1 3 1 の I L - 3 誘発されたアップレギュレーションの阻止を示す。

【 0 0 6 3 】

I L - 3 (0 . 1 n g / m l) を、室温で 2 0 分間、種々の濃度の抗 I L - 3 抗体と共にプレインキュベートし、そして新鮮なヒト E D T A 血液に添加した。3 7 ° での 1 時間のインキュベーションの後、細胞を、氷上で 2 0 分間、C D 1 1 b、C D 2 0 3 c、C D 1 2 3 及び H L A - D R に対する直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサ

50

イトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球上のCD131のアップレギュレーションを定量化した。

【0064】

【図36】図36は、クローン13及びクローンP8C11C8-6がIL-3の同じエピトープに結合しないことを示す。

【0065】

【図37】図37は、P3C11C8-6がIL-3へのクローン13又はクローン11の結合を妨害しないことを示す。

【0066】

【図38】図38は、P3C11C8-6がIL-3へのクローン13(AK13)又はクローン11(AK11)の結合を妨げないことを示す。

10

【0067】

図32～38に示される結果は、昆虫細胞(Biolegendからの組換えヒトIL-3(キャリアフリー)カタログ番号57002)により発現されたヒトIL-3を用いることにより得られた。従って、ヒトIL-3ペプチドはグリコシル化された。

【0068】

【図39】図39は、ヒト好塩基球に対するE. コリ又は昆虫細胞由来のIL-3の同等の活性を示す。

【0069】

【図40】図40は、ヒト好塩基球によるバイオアッセイにおける種々の源からのIL-3の類似する活性を示す。

20

【0070】

【図41】図41は、クローン11及びR&D mab203が、好塩基球を用いたアッセイにおいて、昆虫細胞又はHEK293細胞由来のIL-3の活性を阻止するのではなく、E. コリ由来のIL-3の活性を単に阻止することを示す。

【0071】

【図42】図42は、クローン11及びR&D mab203が、好塩基球を用いたアッセイにおいて、昆虫細胞由来のIL-3の活性を阻止するのではなく、E. コリ由来のIL-3の活性を単に阻止することを示す。

【0072】

30

【図43】図43は、クローン13及びP3C11C8-6が、RA患者からの一次T細胞により放出されるIL-3の生物活性を阻止し、そしてクローン11がほとんど阻害活性を有さないことを示す。

【0073】

【図44】図44は、クローン13及びP3C11C8-6が、ヒトPBMCにより生成されたIL-3の生物活性を阻止し、そしてクローン11及びR&D mab203がほとんど阻害活性を有さないことを示す。

【0074】

【図45】図45は、クローン11及びR&D mab203が、TF-1アッセイにおいて、昆虫細胞由来のIL-3の活性を阻止するのではなく、E. コリ由来のIL-3の活性を単に阻止することを示す。

40

【0075】

【図46】図46は、クローン11及びR&D mab203が、TF-1アッセイにおいて、昆虫細胞又はHEK293細胞からのIL-3の活性を阻止するのではなく、E. コリ由来のIL-3の活性を単に阻止し；そしてアカゲザルIL-3は抗体により阻止されないことを示す。

【0076】

【図47】図47A-Cは、サンドイッチELISAによる種々の源からのIL-3の検出を示し、そしてクローン13+P8C11C8-6の対のみがHEK293細胞を検出することを示す。

50

【 0 0 7 7 】

【図 4 8】図 4 8 は、2 つの異なるサンドイッチ E L I S A による種々の源から I L - 3 の検出、及び I L - 3 の定量化のための標準曲線（図 4 8 の下の図）を示す。

【 0 0 7 8 】

【図 4 9】図 4 9 は、2 つの異なるサンドイッチ E L I S A を用いてのヒト P B M C により生成された I L - 3 の検出を示す。

【 0 0 7 9 】

【図 5 0】図 5 0 は、種々の源からの I L - 3 の検出のためのヒト好塩基球を用いてのバイオアッセイの結果、及び I L - 3 生物活性の定量化のための標準曲線（図 5 0 の下の図）を示す。

10

【 0 0 8 0 】

【図 5 1】図 5 1 は、E L I S A 及びバイオアッセイを用いてのヒト P B M C 由来の I L - 3 の定量化、及び E L I S A（P 8 C 1 1 C 8 - 6 + クローン 1 3 - H R P）を用いての I L - 3 の定量化がヒト P B M C 由来の I L - 3 の生物活性を非常に良く相関することを示す。昆虫由来の I L - 3 を標準として使用する。

【 0 0 8 1 】

【図 5 2】図 5 2 は、ヒト I L - 3 のグリコシル化の程度により引起される分子量の差異を示すウェスタンブロットを提供する。さらに、それは、h I L - 3 のグリコシル化状態に依存して、いくつかの抗 - h I L - 3 抗体の異なる結合能力を示す（1 μ g の I L - 3 がレーン当たりブロットされた；抗体が 1 μ g / m l で適用され；H E K : I L - 3 が H E K 細胞（B i o m o l）において発現され；昆虫：I L - 3 が昆虫細胞（B i o l e g e n d）において発現され；E . コリ：I L - 3 が E . コリ（P e p r o t e c h）において発現された。

20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 2 】

従来技術においては、可能性ある I L - 3 特異的な抗体の効力が、白血病細胞系又は T F 1 細胞に対して試験された。T F 1 は、ヒト赤芽球細胞系のモデルであり、重度の汎血球減少症を有する 3 5 歳の日本人男性の骨髄から、1 9 8 7 年 T . K i t a m u r a により確立された。T F 1 細胞の増殖は、I L - 3 又は G M - C S F の存在に完全に依存する。従って、T F 1 細胞の細胞増殖に基く試験が、I L - 3 活性の遮断を決定するために使用され得、これは T F 1 細胞の増殖の減少又はさらに、完全な阻害を導く。

30

【 0 0 8 3 】

ヒトの治療に抗体を使用するためには、I L - 3 活性を遮断する能力もまた、T F 1 細胞系モデルのように、インビボの状況から離れていないモデルにおいてアッセイされるべきである。従って、本発明者は、I L - 3 抗体により治療されるべき患者、又は対照としての健康な対象から得られた一次ヒト細胞について、本発明の I L - 3 抗体を試験した。一次細胞及び一次ヒト細胞により生成される I L - 3 の使用は、細胞系モデルよりも卓越している。

【 0 0 8 4 】

しかしながら、T F 1 細胞増殖を効率的に遮断した I L - 3 抗体は、I L - 3 抗体により治療されるべき患者から得られた一次ヒト細胞の増殖に対して同じ効果を必ずしも有する必要は無かったことが見出された。T F 1 細胞系モデルにおいて効率的な遮断能力を示すが、しかし一次ヒト血液細胞を用いてのアッセイにおいてはもはや存在しない抗体の例は、本明細書においては「クローン 1 1」とも呼ばれる、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 3 1 6 3 により生成される抗体である。本発明者は、T F 1 細胞系を用いてのインビトロモデルにより得られた結果は、潜在的な I L - 3 抗体が患者における I L - 3 関連患者又は機能不全の治療のために有効である場合、正しく予測するのに使用され得ないことを見出し、そして本発明者はこの理由を見出した。他方では、T F 1 細胞系増殖を非常に効率的に遮断できなかった I L - 3 抗体は、一次ヒト細胞の増殖を効率的に遮断するために使用され得たことが見出された。言い換えれば、T F 1 細胞系により得られた結果は

40

50

、信頼性がなく、そして「偽陽性」及び「偽陰性」の結果をもたらすことができ、すなわち一次ヒト細胞において不活性である抗体についての活性、又は一次ヒト細胞においては活性的である抗体については低い活性を示すことができる。このシナリオの1つの例は、本明細書においては、「クローン13」としても呼ばれる、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 3 1 6 4 により生成される抗体である。細胞系モデルにおけるその挙動により、クローン13は、効率的な治療抗体ではないと思われた。しかしながら、本発明者は、一次ヒト血液細胞に使用される場合、驚くべき高い可能性を有することを見出した。従って、T F 1 細胞系の細胞における抗体の試験は、患者における意図される使用のための信頼できる結果を必ずしも提供しない。

【0085】

10

本発明は、I L - 3 抗体の挙動の予測不能についての理由を、現在見出した。これが、何れかの I L - 3 誘発された効果を観察するのに必要な I L - 3 の濃度のためであることが、発明者により最初に想定された。T F 1 細胞に関しては、細胞増殖の半最大刺激が約 1 ng / ml の I L - 3 で見られ得る。対象的に、C D 2 0 3 c 好塩基球の半最大アップレギュレーションは、約 0.01 ng / ml の I L - 3 で既に観察され得る。別の説明は、T F 1 細胞が I L - 3 受容体 α 鎖の N 末端切断スプライス変異体を発現することであった (J B i o l C h e m . 2 0 0 9 ; 2 8 4 : 5 7 6 3 - 7 3) 。このスプライス変異体の発現は、一次ヒト細胞ではあまり顕著ではあり得ない。

【0086】

しかしながら、本発明者は、インビボで h I L - 3 遮断活性の予測が困難である別の理由を見出した。驚くべきことには、彼らは、I L - 3 のグリコシル化及びグリコシル化の程度が、抗体が I L - 3 に結合するかどうかを決定し、そしてグリコシル化された h I L - 3 に結合する抗体が I L - 3 活性を遮断することを見出した。

20

【0087】

グリコシル化状態は、ヒト I L - 3 を生成する細胞のタイプに依存する。I L - 3 が E . コリ細胞により組換え的に生成され得る場合、得られるヒト I L - 3 は、グリコシル化されないであろう。非グリコシル化されたヒト I L - 3 の分子量は約 15 k D である。I L - 3 が昆虫細胞により生成される場合、得られるヒト I L - 3 は弱くグリコシル化されるであろう。この弱くグリコシル化された I L - 3 の分子量は、約 $15 \sim 20 \text{ k D}$ であり、そして約 18 k D で最大である。I L - 3 がヒト細胞、例えば H E K 細胞により生成される場合、得られるヒト I L - 3 はより強くグリコシル化されるであろう。H E K 細胞により生成された、グリコシル化されたヒト I L - 3 の分子量は、約 $17 \sim 40 \text{ k D}$ であり、約 $25 \sim 35 \text{ k D}$ で最大であった。従って、本発明において適切なグリコシル化されたヒト I L - 3 は、少なくとも 17 k D 、好ましくは少なくとも 20 k D 又はそれ以上の分子量を有するグリコシル化されたヒト I L - 3 として定義され得る。

30

【0088】

本発明において適切な「グリコシル化されたヒト I L - 3」はまた、グリコシル化が、グリコシル鎖の構造、タイプ、及び / 又は長さに関して、H E K 細胞又は一次ヒト細胞により生成された h I L - 3 におけるグリコシル鎖の構造、タイプ、及び / 又は長さ非常に類似する、グリコシル化されたヒト I L - 3 としても定義され得る。グリコシル鎖は、グリコシル鎖の長さ及び / 又は構造が H E K 細胞又は一次ヒト細胞により生成された、グリコシル化された h I L - 3 における長さ / 構造の少なくとも 80% 、 90% 、 95% 又は 100% である場合、「非常に類似する」と見なされる。ヒト細胞は、ヒト細胞系又は一次ヒト細胞であり得る。「強くグリコシル化された」ヒト I L - 3 は、「少なくとも $20 \text{ k D} \sim 40 \text{ k D}$ の分子量を有するグリコシル化されたヒト I L - 3」として定義され得る (また、図 5 2 を参照のこと) 。

40

【0089】

遮断すると記載される抗体 (例えば、クローン 1 1、R & D c l o n e 4 8 0 6 , R & D c l o n e 4 8 1 5 , N o v u s c l o n e M M 0 4 0 2 - 1 0 B 3 5) は、非グリコシル化された I L - 3 に非常に良く結合し、そして遮断する。それらは

50

また、弱くグリコシル化された I L - 3 (昆虫細胞において発現される) に非常に良く結合するが、しかしながら、それらは I L - 3 のことタイプを遮断しない。I L - 3 のグリコシル化がより顕著である場合 (例えば、H E K 細胞における発現)、それらの抗体は I L - 3 に結合も、遮断もしない。従って、所望する活性を有する抗体は、阻害性質の試験について、グリコシル化された h I L - 3 を用いて同定され得るか、又は言い換えれば、グリコシル化された h I L - 3 に非常に良く結合し、そしてインビトロで I L - 3 活性を遮断する抗体はまた、インビボで使用される場合、h I L - 3 についての阻害性質も有するであろう。トランスフェクトされたヒト細胞により生成された h I L - 3、又はさらに良好には、一次活性化されたヒト T 細胞により生成された I L - 3 が、それらの試験に使用され得る。さらに、グリコシル化された h I L - 3 に対して特異的な抗体の生成、及びハイブリドーマにより生成されたモノクローナル抗体のスクリーニングのための抗原として、グリコシル化された h I L - 3 を用いることは効率的であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

本発明の抗 - h I L - 3 抗体は、患者に投与される場合、すなわちインビボで、グリコシル化された I L - 3 を遮断する場合、阻害効果を有する抗体を言及する。用語「抗 - h I L - 3 抗体」とは、本発明の状況下で使用される場合、h I L - 3 のグリコシル化された形、特にヒト身体において見出されるようなグリコシル化された形を有する h I L - 3 に対して特異的な抗体に使用される。さらに、用語「抗体」とは、全ての免疫学的に有効な単位又は要素、例えば、抗体の全長抗体、フラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体、又は上記で定義されたような活性抗体の少なくともひとつの C D R を含む組換え抗体を包含することを意味する。

【 0 0 9 1 】

用語「ヒト I L - 3」又は「h I L - 3」とはそれぞれ、天然に存在するような形での h I L - 3、すなわち一次ヒト細胞において生成されたか、又は一次ヒト細胞において生成された、グリコシル化された形でのヒト I L - 3、又はグリコシル化された形でのヒト I L - 3 の配列を有する、組換え的に生成された I L - 3、例えば、ヒト細胞により発現された h I L - 3、又は同じ結合性質を有するそのフラグメントを言及する。用語 I L - 3 及び h I L - 3 は、その機能に関して、交換可能的に使用される。用語 h I L - 3 が使用される場合いつでも、それはヒト又はヒト由来の I L - 3 を言及する。

【 0 0 9 2 】

用語「インビボでの h I L - 3 遮断活性」が本発明の状況下で使用される場合、それは、h I L - 3 と、細胞系の細胞のみならず、またインビボでの抗体との間の結合を遮断できる本発明の抗 - h I L - 3 抗体の活性を言及する。

【 0 0 9 3 】

本発明は、患者における I L - 3 関連の疾患又は機能不全の治療に使用され得る抗体を同定するための効果的手段、すなわち h I L - 3 抗体の試験のためへの、グリコシル化された形、特に一次ヒト細胞におけるようにグリコシル化された形での h I L - 3 の使用を提供する。さらに、特異的抗 - h I L - 3 抗体を生成するために、好ましい実施形態によれば、グリコリス化された形での h I L - 3 が抗原として使用される。驚くべきことには、グリコシル化された形での h I L - 3 の使用は、非グリコシル化された組換え的に発現された I L - 3 よりも卓越しており、そして h I L - 3 抗体による患者の治療の間、インビボ状況下で得られるであろう結果をより良く示すであろう。驚くべきことに、ヒト I L - 3 に類似するグリコシル化された形での h I L - 3 に結合する抗体は、昆虫細胞において得られるような弱くグリコシル化された h I L - 3 に結合するそれらの抗体よりも卓越している。さらに、ヒト血液に関するアッセイにおいては、本発明の抗体は、h I L - 3 濃度 0.1 ng/ml ですでに強い h I L - 3 シグナルを与える一方、T F - 1 細胞に関するアッセイは、典型的には、 $2.5 \sim 5 \text{ ng/ml}$ の I L - 3 濃度で実施される。ヒト血液に関するアッセイは、活性化されたヒト P B M C の上清液に存在する h I L - 3 の生物活性の直接的な検出を可能にする。

【 0 0 9 4 】

本発明の抗体は、当業界において知られている方法により生成され得、そして下記に詳細に概説されている。従って、マウスのような哺乳類が、下記に記載されるような少なくともエピトープを含むIL-3又はそのフラグメントである抗原により免疫化され得る。1つの実施形態によれば、グリコシル化されたhIL-3が免疫化のために使用される。ハイブリドーマ、公知のKohler-Milstein方法に基づく方法により創造され得、そして次に、そして次に、IL-3へのそれらの結合についてスクリーニングされる。次に、IL-3結合クローンが、グリコシル化されたhIL-3へのそれらの結合により試験され得る。ファージディスプレイ方法もまた、さらなる試験のために抗体を選択するのに使用され得、そしてパニングのためにグリコシル化されたhIL-3を使用することが好ましい。

10

【0095】

本発明が、グリコシル化された形でのhIL-3、例えば一次ヒトT細胞又はトランスフェクトされたヒト細胞により発現されるようなhIL-3のみによる診断及び治療のための抗-hIL-3抗体を選択するための機能的試験を実施することは重要である。これに関する機能的試験は、特にhIL-3への結合についての試験、又はhIL-3への抗体の結合の遮断、阻害、干渉における試験された抗体の性質に関する。hIL-3又はその誘導体は、天然、すなわちインビボでのグリコシル化されたhIL-3と同じ結合性質を有する限り使用され得る。一次ヒト細胞、例えば活性化されたT-細胞から得られたhIL-3の使用が最も好ましい。組換えhIL-3はまた、それが本明細書に定義されるようにグリコシル化されている限り使用され得る。例としては、一次ヒト細胞から得られたか、又はHEK細胞において発現されたhIL-3を列挙できる。例えば、E.コリから得られたような非グリコシル化された形でのhIL-3、及び昆虫細胞からの弱くグリコシル化されたhIL-3は、IL-3結合抗体のいずれかの機能的スクリーニング又は選択のために適切でないか又は適切でないようであるので、有用ではない。

20

【0096】

本発明のhIL-3抗体の効率を決定するために使用される一次細胞は、当業者に知られているような一次ヒト血液細胞であり、そして好ましくは、関節リウマチ(RA)に罹患している患者から得られる。一次ヒト血液細胞はまた、健康な対象から得られ、そして対象として使用され得る。試験のためには、血液サンプルは、当業界において知られている抗-凝固剤としてのヘパリン、クエン酸塩又はEDTAにより処理され得る。好ましくは、EDTAが、抗-凝固剤として血液サンプルに添加される。血液サンプルのこの種類はまた、「EDTA血液」と呼ばれる。

30

【0097】

一次ヒト血液細胞は、標識された抗体、例えば好塩基球発現細胞マーカー、例えばCD11b、CD123、CCR3及びCD203cに対して向けられた蛍光標識された抗体の組合せを用いてのフローサイトメトリーのような既知方法により検出され得る「好塩基球」とも呼ばれる好塩基球顆粒球を含む。例えば、hIL-3活性を遮断する能力が、好塩基球顆粒球におけるCD203cのhIL-3誘発アップレギュレーションをアッセイすることにより試験され得る(Hauswirth AW et al., Int J Immunopathol Pharmacol, 2007; 20:267-278)。IL-3はまた、好塩基球におけるCD11bのアップレギュレーション及びCD131のダウンレギュレーションも誘発する。さらに、hIL-3は、一次ヒト血液細胞を含む血液サンプルにも含まれる、形質細胞様樹状細胞(pPC)におけるHLA-DRのアップレギュレーション及びCD131のダウンレギュレーションを誘発する。pDCは、樹状細胞発現細胞マーカー、例えばHLA-DR、CD123及びCD4に対して向けられた蛍光標識された抗体の組合せを用いての当業界において知られているフローサイトメトリーにより検出され得る。さらに、CD131のIL-3誘発ダウンレギュレーションは、CD14+CD16+単球、CD14++単球及び好酸球に対して定量化され得る。従って、hIL-3活性を効果的に遮断する抗-hIL-3抗体の能力は、既知試験により、例えば好塩基球におけるCD116及びCD203c又はpDCにおけるHL

40

50

A - D R のアップレギュレーション、又は好塩基球、p D C、単球又は好酸球を含む種々の細胞型における C D 1 3 1 のダウンレギュレーションを定量化することによりアッセイされ得る。好塩基球は、ヒトサンプルにおける I L - 3 の生物活性を定量化するための好ましい細胞型である。なぜならば、好塩基球は、I L - 3 と強く反応し、そして I L - 5 及び G M - C S F のような密接に関連するサイトカインに対してほとんど反応性を示さないからである。

【 0 0 9 8 】

ヒト血液細胞の主要性質及び従ってインビボモデルとしてのそれらの適合性を維持するためには、得られた一次ヒト血液細胞の垂画分の単離又は精製を導く工程は行われてはいけないことが見出されている。例えば、好塩基球顆粒球を産生する単離及び精製工程（例えば、フィコール調製又は細胞選別）により得られた好塩基球細胞集団は、I L - 3 に対してあまり良好には応答しないことが驚くべきことには示されている。結果的に、高濃度の I L - 3 が、いずれかの I L - 3 誘発された効果を観察できるためには必要である。従って、一次ヒト血液細胞、例えば好塩基球の垂画分を含む単離された及び精製された集団は、I L - 3 抗体の中和特性を調べるためにはあまり適切ではない。

10

【 0 0 9 9 】

従って、特異的で且つ効果的に、有用な h I L - 3 抗体を同定し、そして新規抗 - h I L - 3 抗体を開発する重要な工程は同定されている。効果的手段で特異的抗体を得るためには、ハイブリドーマ細胞技法を用いて抗体、例えばモノクローナル抗体を開発しながら、スクリーニングのための正しい抗原を提供することが重要である。先行技術の知識に基づいて、グルコシル化は、h I L - 3 の生物活性に大きな影響を与えないと思われ、そして I L - 3 に対する阻害活性を特徴付けられるすべてのモノクローナル抗体は、そのグリコシル化とはほとんど無関係に I L - 3 を認識する。従って、グリコシル化が h I L - 3 生物活性を遮断するモノクローナル抗体の能力に影響を及ぼす可能性は非常に低いと思われる。

20

【 0 1 0 0 】

しかしながら、驚くべきことには、特徴的且つ効率的な抗体を調製するために、h I L - 3 特異的抗体、例えばモノクローナル抗 - I L - 3 抗体を生成するために h I L - 3 をそのグリコシル化された状態で抗原として用いて、結合について抗体を試験することは重要である。

30

【 0 1 0 1 】

ヒトにおける h I L - 3 生物活性を遮断する抗 - h I L - 3 の能力は、h I L - 3 のグリコシル化に依存し、すなわち非グリコシル化された h I L - 3 への強い親和性を有する抗 - h I L - 3 抗体はグリコシル化された h I L - 3 に対する遮断活性を必ずしも示さないことが示されている。しかしながら、インビボ h I L - 3 はグリコシル化された形で存在し、従って、それぞれ、インビボで又は治療のために使用されることが予期される任意の抗体がグリコシル化された h I L - 3 に対するその結合性質について試験されるべきである。この特異的スクリーニングを用いることにより、非常に低い I C₅₀ を有する抗体がもたらされ、そして従って、治療のために非常に価値ある抗体が得られる。

40

【 0 1 0 2 】

この効果を示す対応するデータは、実施例において詳細に概説されている。以下の 3 種の型の組換えヒト I L - 3 が比較された：E . コリ発現された非グリコシル化 I L - 3（約 15 キロダルトン（k D））、昆虫細胞発現されたグリコシル化 I L - 3（約 15 - 20 k D）及び H E K 細胞発現されたグリコシル化 I L - 3（約 17 - 40 k D）。

【 0 1 0 3 】

I L - 3 のすべてのバージョンが、一次ヒト好塩基球又は T F - 1 細胞を用いてのアッセイにおいて、非常に類似する生物活性を有することが見出された。E . コリ発現された非グリコシル化 I L - 3 は、I L - 3 抗体クローン 11 及び R & D S y s t e m s m a b 203（クローン 4806）により非常に効率的に遮断されるが、ところがグリコシル化昆虫細胞又は H E K 細胞発現の I L - 3 は、ほとんどわずかな程度しか遮断されな

50

い。対照的に、ハイブリドーマ細胞クローン 13 及びクローン P8C11C8-6 により生成された抗体は、グリコシル化 IL-3 及び非グリコシル化 IL-3 の両者の生物活性を遮断する。IL-3 を遮断する抗体の能力は、TF-1 腫瘍細胞及び一次ヒト好塩基球を用いてのアッセイにおいて類似した。

【0104】

昆虫細胞又は HEK 細胞において組換え的に発現されたヒト IL-3 は、一次ヒト細胞により発現された hIL-3 よりも異なった型のグリコシル化を有することができる。一次ヒト細胞により発現された hIL-3 に対する抗体の効果を分析するために、ヒト PBMC が、抗-CD3 抗体を用いて 3 日間、RA-患者から活性化され、そして細胞培養上清液における IL-3 の濃度が測定された。IL-3 の非常に低いレベル、中位のレベル及び非常に高いレベルで生成する PBMC の上清液が、ヒト一次好塩基球を用いて IL-3 活性について非常に高感度のバイオアッセイで試験された。上清液が、種々の IL-3 抗体と共にプレインキュベートされた。結果は、クローン 13 及び P8C11C8-6 が一次ヒト IL-3 の生物活性を遮断するか、ところがクローン 11 及び R&D203 はほとんど無効化であったことを示す。(実施例 9 を参照のこと)。

10

【0105】

従って、本発明は、ヒト IL-3 に対する遮断抗体の開発のための効果的な方法を提供し、そして特に、抗体の阻害活性の分析のためには、グリコシル化された hIL-3 (例えば、昆虫細胞からの) 又はヒト細胞により発現された hIL-3 が使用される。IL-3 に対するモノクローナル抗体の阻害活性を特徴づけるために先行技術においてしばしば使用されるような、E. コリ由来の IL-3 は、誤解を招く可能性があり、そして本発明の抗体のように特異的で且つ関係のある抗体を生成するのには適していない。

20

【0106】

さらなる試験が、実施例において詳細の記載されるようにして、本発明者により実施され、そして結果は、本発明の抗体の好ましい特性を示す。グリコシル化及び非グリコシル化 hIL-3 を認識する IL-3 抗体の種々の組合せの能力が、サンドイッチ ELISA により測定された(実施例 10 を参照のこと)。抗体クローン 11、クローン 13 及び P3C11C8-6 の種々の組合せが試験された。すべての組合せが、E. コリ由来の非グリコシル化 hIL-3 及び昆虫細胞由来のグリコシル化 hIL-3 を検出し、クローン 13 及び p8C11C8-6 の組合せのみがまた、同等の効力で HEK 細胞由来の hIL-3 を検出した。HEK 細胞由来の hIL-3 は、昆虫細胞由来の hIL-3 よりも、より強くグリコシル化される。サンドイッチ ELISA においてクローン 11 を含む任意の組合せは、HEK 細胞由来の hIL-3 で非常に低いシグナルのみを生成した。

30

【0107】

さらに、抗体は、一次抗-CD3 活性化ヒト PBMC (上記を参照のこと) により発現された IL-3 の検出において、それらの選択性及び正確さについて分析された。それらの実験においては、ELISA、及びヒト好塩基球を用いての機能的バイオアッセイにおける IL-3 の濃度が、昆虫細胞由来及び HEK 細胞由来の hIL-3 を標準として用いて測定された。抗体 P8C11C8-6 + クローン 13 - HRP を用いてのサンドイッチ ELISA により測定された活性化ヒト PBMC の上清液における IL-3 濃度は、生物活性アッセイにおいて測定された IL-3 濃度と非常に良く相関した。抗体クローン 13 + クローン 11 - HRP を用いてのサンドイッチ ELISA は、活性化されたヒト PBMC の上清液中の IL-3 濃度を約 4 倍低下させた。市販の抗体 R&D クローン 4806、R&D クローン 4815 及び Novus クローン MM0402-10B35 は、HEK 細胞由来の hIL-3 を検出することができず、そして従って、診断方法のために有用ではなく、そして治療のためにも適切でないこともまた示された。さらに、これは、本発明の抗体の優位性、及び検出されるか又は阻害されるべき hIL-3 ペプチドのグリコシル化状態の重要性を示す。

40

【0108】

本発明の hIL-3 抗体は、インビボで特異的且つ有効であり、そしてインビボ状況下

50

で使用され得る。本発明の抗体はまた、他の哺乳類起源の I L - 3 分子との交差反応性が驚くほど低いことも示している。さらに、より効果的な手段で抗体を開発し、そして使用する方法が提供される。I L - 3 のみに対する（但し、他のサイトカインに対してはそうではない）非常に高い特異性は別として、本発明の抗体は、驚くべきことには、哺乳類 I L - 3 との交差反応性をほとんど示さないが、しかしヒトタンパク質及び哺乳類タンパク質のアミノ酸同一性は 99 % までであり得、例えばマーマセツト、アカゲザル又はチンパンジータンパク質のアミノ酸同一性は、72 ~ 99 % の範囲である（図 1 を参照のこと）。

【0109】

自己免疫疾患において高められたレベルで存在し得るさらなるサイトカインの中で、I L - 5 及び G M - C S F が特に重要である。イムノアッセイにおけるそのようなサイトカインと抗 - I L - 3 抗体との高い交差反応性は、自己免疫疾患の出現及び進行において重要な影響を有する事実に関して誤った結果を導く可能性がある。しかしながら、そのような結果は、抗 - I L - 3 抗体の適用が有望な治療アプローチであると考えられ得るかどうかの決定に対して重要な影響を有する。

10

【0110】

従って、本発明の抗体がヒト I L - 5 及び G M - C S F との可能な限り低い交差反応性を示すことが好ましい。特に好ましくは、抗体により結合された h I L - 3 の量に比較して、本発明の抗体が I L - 5 又は G M - C S F に対して、5 % 以下、より好ましくは 2 % 以下、及び特に好ましくは、1 % 以下の程度まで結合することが、本発明の抗体の特徴である。そのような抗体は、本発明により提供され、そしてさらに、そのような低い交差反応性を有する抗体を、特に調製及び検出のためにグリコシル化形で h I L - 3 を用いることにより、開発するための方法が提供される。

20

【0111】

本発明は、インビボで h I L - 3 活性を効果的に遮断するので、治療のために適切である上記のような特性を有する抗 - h I L - 3 抗体を提供する。従って、1つの側面によれば、本発明は、グリコシル化形で h I L - 3 による免疫化により、及び / 又は I L - 3 依存性疾患及び状態の治療への使用のために、100 ng / ml 又はそれ以下の I C₅₀ 値を有し、そして 5 % 以下の他のサイトカイン及び非ヒト I L - 3 との交差反応性を有するグリコシル化形で h I L - 3 によるスクリーニングにより得られる抗 - h I L - 3 抗体を提供する。

30

【0112】

一次ヒト血液細胞に対する h I L - 3 活性を効果的に遮断し、そして好ましくはヒト細胞において発現されるグリコシル化 h I L - 3 の生物活性を阻害する抗体の能力は、下記のようにして決定され得る。

【0113】

I L - 3 特異的抗体が一次ヒト細胞における h I L - 3 活性を効果的に遮断できるかどうかを分析するために、当業界において知られている方法が適用され得る。以下では、この特性の分析のために有用である方法が記載されている。

【0114】

一次ヒト血液細胞における h I L - 3 活性を遮断する効果を決定するための方法の第 1 段階において、試験されるべき I L - 3 抗体は、I L - 3 と共にプレインキュベートされる。

40

【0115】

試験は、I C₅₀ 値を決定するための一定濃度のグリコシル化 h I L - 3 を用いて、少なくとも 1 つの濃度、好ましくは少なくとも 2 又は種々の濃度の抗体を用いて実施されるべきである。例えば、一定濃度の h I L - 3 は 0.1 ng / ml であり得る。任意には、負の対照は I L - 3 を完全に除外することによりアッセイに含められ得る。このようにして、I L - 3 が、添加される場合、活性を有することが確認され得る。

【0116】

50

試験されるべき抗 - h I L - 3 抗体の濃度範囲は、約 0 ~ 1 0 0 μ g / m l であり得る。好ましくは、その範囲は約 0 ~ 3 0 μ g / m l である。試験されるべき抗体が添加されない場合、h I L - 3 誘発された活性の完全な効果が決定され得る。

【 0 1 1 7 】

ブレインキュベーションは、当業者に良く知られている条件下で行われ得る。例えば、ブレインキュベーション工程は、室温で、約 1 ~ 約 6 0 分間、例えば約 2 0 分間、実施され得る。

【 0 1 1 8 】

次に、I L - 3 及び試験されるべきブレインキュベートされた抗体を含む混合物が、サンプル、例えば一次ヒト血液細胞を含む溶液に添加される。サンプルは、血液又はヒト血液細胞を含む血液誘導体、又は組織であり得る。一次ヒト血液細胞は、関節リウマチを罹患している患者から得られた血液サンプルに含まれ得る。一次ヒト血液細胞はまた、対照サンプルを提供するために健康な対象から得られた血液サンプルにも含まれ得る。血液サンプルは、抗凝固剤、例えばヘパリン、クエン酸塩又は E D T A を含むことができる。好ましくは、血液サンプルは、抗凝固剤として E D T A を含む。このタイプの血液サンプルはまた、「E D T A 血液」とも呼ばれる。

10

【 0 1 1 9 】

次に h I L - 3 、試験されるべき抗体、及び一次ヒト血液細胞を含む混合物は、当業者に良く知られている条件下でインキュベートされる。例えば、インキュベーション工程は、3 7 °C で、約 1 0 ~ 約 1 2 0 分間、例えば約 1 時間、実施され得る。

20

【 0 1 2 0 】

インキュベーションの後、一次ヒト血液細胞は、当業界において知られているようにして、例えば当業者に良く知られているようなフローサイトメトリーにより分析される。一次ヒト血液細胞は、当業界において知られているようにして、検出可能なユニットにより標識される少なくとも 1 つの細胞マーカーにより標識される。例えば、好塩基球及び形質細胞様樹状細胞に対する蛍光標識された細胞マーカーの組合せが使用され得る。好塩基球顆粒球に対して特異的な細胞マーカーの例は、C D 1 1 b 、C D 1 2 3 及び C D 2 0 3 c である。形質細胞様樹状細胞に対して特異的な細胞マーカーの例は、C D 1 2 3 、H L A - D R 及び C D 4 である。それらの及び / 又は他の既知マーカーの任意の組合せが使用され得る。

30

【 0 1 2 1 】

標識工程は、フローサイトメトリーによる分析のために細胞を調製する当業者に良く知られている条件下で実施され得る。例えば、染色工程は、低温度で、例えば氷上で行われ、そして約 1 ~ 約 6 0 分、例えば 2 0 分を要する。

【 0 1 2 2 】

次に、標識された細胞、例えば好塩基球顆粒球及び形質細胞様樹状細胞が、当業者に公知のフローサイトメトリーにより固定される。

【 0 1 2 3 】

評価のために、少なくとも 1 つの細胞マーカーのアップレギュレーション及び / 又はダウンレギュレーションが定量化される。例えば、好塩基球に対する C D 2 0 3 c 及び / 又は C D 1 1 b のアップレギュレーション、及び / 又は好塩基球及び他の細胞型、例えば p D C 、単球及び好酸球に対する C D 1 3 1 のダウンレギュレーションが定量化される。他方では又は累積的には、形質細胞様樹状細胞上の H L A - D R のアップレギュレーションが定量化され得る。好ましくは、マーカーのアップレギュレーション及びダウンレギュレーションの両者は、いくつかの異なる細胞型で定量化され得る。アップレギュレートされる好塩基球上の I L - 3 C D 2 0 3 c 及び / 又は C D 1 1 b により誘発される場合、それらのマーカーの低下は、候補抗体による I L - 3 / I L - 3 受容体相互作用に対する干渉を示す。ダウンレギュレートされる好塩基球及び他の細胞型上の I L - 3 C D 1 3 1 により誘発される場合、このマーカーの上昇は、候補抗体による I L - 3 / I L - 3 受容体相互作用に対する干渉を示す。アップレギュレートされる形質細胞様樹状細胞上の I L

40

50

- 3 H L A - D Rにより誘発される場合、このマーカーの低下は、候補抗体による I L - 3 / I L - 3 受容体相互作用に対する干渉を示す。従って、候補抗体の阻害活性が、h I L - 3 によりアップレギュレートされる細胞マーカーの低下、及び / 又は h I L - 3 によるダウンレギュレートされる細胞マーカーの上昇が阻害活性の指標である、細胞マーカーの上昇又は低下を通して試験される。阻害活性の量は、I C ₅₀、すなわち h I L - 3 の生化学的機能を阻害するのに必要な最大阻害濃度の半分により決定される。

【 0 1 2 4 】

インビボでの h I L - 3 活性を遮断する I L - 3 抗体が、h I L - 3 抗体の I C ₅₀ が 1 0 0 n g / m l 又はそれ以下であるように、グリコシル化 h I L - 3 に対する阻害活性を有することが重要であることが見出された。好ましくは、I C ₅₀ は、4 0 n g / m l 又はそれ以下、好ましくは 1 0 n g / m l 又はそれ以下である。I C ₅₀ を決定するための方法は、当業者に知られており、そして既知の何れかの方法が本試験に使用され得る。

10

【 0 1 2 5 】

本発明の抗体はそのような低い I C ₅₀ を有するので、それらは、あらゆる目的、特に診断及び治療に使用され得、そして従って、非常に価値ある。

【 0 1 2 6 】

抗体、そのフラグメント又は変異体は、「効率的に遮断する」と見なされ、すなわち前記抗体、そのフラグメント、コンストラクト、変異体又は接合体が、遮断活性を測定するための試験、例えば一次ヒト血液細胞における好塩基球上の C D 2 0 3 c の誘発されたアップレギュレーションの遮断、又は一次ヒト血液細胞における形質細胞様樹状細胞上の H L A - D R の誘発されたアップレギュレーションの遮断のフローサイトメトリー試験において測定され得る、h I L - 3 を阻害のために、約 1 0 0 n g / m l 以下、又は約 4 0 n g / m l 以下、又は約 1 0 n g / m l 以下の I C ₅₀ を示す場合、本発明の抗体であると思なされる。言い換えれば、h I L - 3 / I L - 3 受容体相互作用についての阻害活性を測定するための試験において、約 1 0 0 n g / m l 以下、又は約 4 0 n g / m l 以下、又は約 1 0 n g / m l 以下の I C ₅₀ を示し、そして従って、効果的な遮断活性を有する、抗体又はそのフラグメント、コンストラクト、変異体又は接合体は、h I L - 3 のためのインヒビターとして有用であり、そして以下に定義されるような組成物に使用され得る。

20

【 0 1 2 7 】

本発明の抗体の 1 つの条件は、本明細書においては「P 8 C 1 1 C 8 - 6」とも呼ばれる、ハイブリドーマ細胞系により生成される抗体である。この抗体のフラグメント及び変異体、並びにこの抗体の少なくとも 1 つの C D R を含む組換え抗体も使用され得る。

30

【 0 1 2 8 】

P 8 C 1 1 C 8 - 6 は、上記方法により測定される場合、約 1 0 n g / m l の I C ₅₀ を示す。

【 0 1 2 9 】

P 8 C 1 1 C 8 - 6 は、シグナルペプチド（配列番号 1 0 ）なしでヒト h I L - 3 のアミノ酸残基 2 2 - 4 8 に対応する以下のアミノ酸配列を有するペプチドに含まれる h I L - 3 における線状エピトープに結合する：E I I T H L K Q P P L P L L D F N N L N G E D Q D I L （配列番号 1 ）。実験は、P 8 C 1 1 C 8 - 6 により認識されるエピトープが配列番号 1 0 で定義されるようなアミノ酸配列 2 6 （H）～3 6 （D）内に位置し、そして少なくともアミノ酸 2 7 - 2 9 （L K Q）を含み、そしてアミノ酸 3 1 - 3 6 はまた、結合に関与している可能性があることを示唆する。

40

【 0 1 3 0 】

P 3 C 1 1 C 8 - 6 により認識されるエピトープが a a 2 2 （E）～a a 3 0 （P）を含んだことが見出された。ペプチド I L - 3 - 2 a （配列番号 9 ）はまた、いくつかのシグナルも付与し、これは、より多くの C 末端アミノ酸（例えば、a a 3 1 - 3 6 ）が結合に関与している可能性があることを示唆する。

【 0 1 3 1 】

50

本発明の抗体のさらなる例は、本明細書においては、「クローン 13」とも呼ばれる、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 3 1 6 4 により生成される抗体である。この抗体のフラグメント及び変異体、並びにこの抗体の少なくとも 1 つの C D R を含む組換え抗体もまた使用され得る。

【0132】

クローン 13 は、上記方法により決定される場合、約 40 - 100 ng / ml の I C ₅₀ を示す。

【0133】

クローン 13 は、立体配座エピトープである、h I L - 3 における異なるエピトープに結合する。

10

【0134】

クローン 13 及び P 3 C 1 1 C 8 - 6 は、お互い競争しないことが見出され、このことは、それらが、h I L - 3 受容体への h I L - 3 の結合に關与する異なるエピトープをカバーすることを示唆する。従って、クローン 13 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 の抗体は、組合して適用される場合、他の抗体の遮断活性に影響を及ぼさない。従って、1 つの実施形態によれば、本発明の少なくとも 1 つの抗体、例えば上記抗体の 1 つ、又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト又は接合体は、単独で、又は少なくとも 2 つの抗体又はそれらのフラグメント、又は変異体、又はコンストラクト、又は接合体の組合せで、治療のために、及び本発明の抗体、又はそのフラグメントの少なくとも 1 つ、又は少なくとも 2 つの抗体、及び / 又はそれらのフラグメント、及び / 又は変異体、及び / 又はコンストラクトの組合せを含む組成物を調製するために使用され得る。

20

【0135】

この明細書に含まれる実施例は、他の種の I L - 3 及び本発明の抗体のために他のヒトサイトカインとの交差反応性の特異性及び欠如に関する卓越した特性を示す。

【0136】

本発明の抗体は、異なる性質のものであり得、そして可能性ある抗体、又は抗体フラグメント、コンストラクト、変異体、又は接合体の以下のより詳細な説明は、例示的であることのみを意味する。これは、本発明の状況内で、用語抗体はその広い意味で理解されるべきであることを意味する。本発明の実施例に示される抗体の特徴を含み、そしてその抗体の特異性を保持する任意の抗体、又はその何れかの部分に由来するか、又はそれに基く抗体、例えばコンストラクト、フラグメント、変異体、又は接合体は、本発明の状況において用語抗体に包含されるものと見なされる。

30

【0137】

原則的に、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が使用され得る。モノクローナル抗体は一般的に、ポリクローナル抗体に比較して、より高い特性の利点を有し、そして従って、本発明の観点から好ましい。本発明に関して、用語「抗体」とはまた、好ましくは、I L - 3 特異的結合部位であるいくつかの抗原結合部位を有するフラグメント、二重、三重又は多重体又は二重又は三重又は多官能性抗体を含むことができる。本発明に関して、用語「抗体」とはさらに、融合タンパク質の一部として、本発明の抗体の対応する特異性を示し、そしてさらに、h I L - 3 へのそれらの結合能力を保持している、本発明の抗体、又は抗体フラグメント、又は本発明の抗体の補体決定領域 (C D R) を含む。

40

【0138】

従って、1 つの実施形態によれば、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 3 2 8 1 又は D S M A C C 3 1 6 4 により生成される抗体の補体決定領域 (C D R) を含む、抗 h I L - 3 抗体、そのフラグメント、変異体、コンストラクト、又は接合体である。

【0139】

さらに、一本鎖抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体は、任意の適切な抗体クラスに属することができるが、しかしながら、治療へのそれらの使用が可能であることは必須である。好ましくは、本発明の抗 - I L - 3 抗体又はそのフラグメントは、クラス I g G、

50

I g A、I g E 又は I g M のものである。

【0140】

本発明の抗体の記載において、用語「抗体」とは、すべての免疫学的に有効な単位又は要素、例えば全抗体、そのフラグメント、変異体、コンストラクト、又は接合体、又は上記及び請求項において定義されるような抗体の少なくとも1つのCDRを含む組換え抗体を包含することを意味する。これに関して、「免疫学的に有効」とは、hIL-3とその受容体との間の相互作用を阻害し、低め、妨害し、又は何れか他の手段で影響を与え、そしてそれにより、hIL-3の活性を低め、遮断し、又は妨害する単位又は要素を言及する。本発明の抗体フラグメントが関与している限り、そのフラグメントは、抗原結合ドメイン及びFcドメインを保持することが好ましい。あるいは、Fab又はF(ab)₂フラグメントは、それらがhIL-3の細胞表面上のその受容体への結合、又はその受容体を活性化するhIL-3の能力に介入する限り、使用され得る。本発明の接合体は、抗-hIL-3抗体又はその活性部分が機能的分子に結合され、その機能的分子が固定化、標識、等の所望する機能を提供できる単位である。

10

【0141】

用語「少なくとも1つの抗体」とは、本明細書において使用される場合、所望する活性を有する、少なくとも1つの抗体、又は少なくとも1つの抗体フラグメント、又は少なくとも1つの抗体コンストラクト、又は少なくとも1つの抗体変異体、又は少なくとも1つの抗体接合体、等が存在することを意味する。本発明の抗体の組合せは、2つの上記抗体、又はその変異体、例えばそれらの抗体のヒト化形の組合せ、又は抗体、及び/又はその抗体のフラグメント、及び/又はコンストラクト、及び/又は変異体、及び/又は接合体の組合せであり得る。

20

【0142】

要約すると、本発明のためには、用語「抗体」により包含されると考えられる分子の実際の形は、それが、hIL-3と天然の受容体との相互作用を阻害し、そして従って、それにより引起される細胞反応を妨げるのに十分な態様で、hIL-3に特異的に結合する限り、無関係である。

【0143】

本発明の抗体は、当業界において知られている何れかの方法により生成され得る。例えば、抗体は、免疫原として完全なhIL-3タンパク質を用い、そして後で、言及された配列に対して特異的である抗体及び抗体クローンを選択することにより生成され得る。あるいは、hIL-3の所望する部分又はエピトープを、その配列内に含むペプチドが、免疫化のために使用され得る。さらなる可能性は、抗体の生成を可能にする環境に組み込まれるエピトープ（立体配座的に識別するエピトープ、CDE）のみを含む人工エピトープの使用である。そのような方法は、当業者に知られており、そして国際公開第2005/051999号に記載されている。要約すると、抗体を生成するための任意の方法は、それが、必要とされる特性を有し、そして必要に応じて、IL-3又はその一部による免疫化に基いて生成される多くの抗体から本発明の抗体の選択を可能にする限り、本発明の状況内で有用である。

30

【0144】

本発明の抗体は、任意の起源、例えばヒト、マウス、ヤギ、ウサギのものであり得る。ヒト又はヒト化抗体が特に好ましい。一般的に使用される方法として、抗体の生成は、適切な哺乳類、例えばマウス、ラット、ハムスター又はウサギを免疫化することにより行われる。上記のように、本発明の抗体はまた、それらが上記で定義された特性を有する限り、組換え的に生成され得る。

40

【0145】

しかしながら、治療的使用のためには、それらは免疫系のかなり重度の副作用を引起し得るので、非ヒトタンパク質を使用することはあまり望ましくない。これは、例えば、上記の現在使用されるマウス抗体インフリキシマブの重度の副作用の1つの原因である。

【0146】

50

従って、抗体がヒト抗体であり、又は他の種において生成される抗体のヒト化が行われることが特に好ましい。抗体のヒト化のための方法は、当業者に知られており、そして例えば Jones P. T. et al., Nature 1986; 321: 522 - 525, Santos A. D. and Padlan E. A., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1998; 60: 169 - 94, Presta L. G., Curr Opin Immunol. 2008 Aug; 20(4): 460 - 70, Almagro J. C. and Fransson J., Front Biosci. 2008 Jan 1; 13: 1619 - 33 に記載されている。

【0147】

10

ヒト化抗体の用語は、ヒト起源の95%以上の抗体について一般的に使用される。例えば、70%のヒト抗体部分を有する、より少ないヒト特徴を有する抗体は、しばしば、キメラ抗体と呼ばれる。ヒト又はキメラ抗体は、組換えDNA技法を用いて生物工学的方法により生成され、それによれば、少なくとも抗原結合部分を含む、動物/哺乳類タンパク質の一部が、機能的抗体又はそのフラグメント、コンストラクト、変異体又は接合体が生成されるよう、ヒト抗体の追加の部分と組合される。

【0148】

ヒト化抗体を生成する可能性は、例えばヒト哺乳類において生成されたhIL-3特異的抗体の1つにより、ヒト抗体である、受容体抗体のCDRの少なくとも1つを置換することである。さらに、全CDR-領域、全可変領域、又はFab-又はFab'-部分がヒト抗体の対応するさらなる部分と組合されるよう、哺乳類抗体の少なくとも1つのCDRよりも多くの部分を使用することが可能である。

20

【0149】

ヒト化及びキメラ抗体に加えて、またヒト抗体は、本発明の状況内で使用され得る。ヒト抗体は、当業界において記載されるようなヒトモノクローナル抗体生成のための技法を用いて調製され得る。1つの通常使用される方法は、ヒト抗体がファージディスプレイされたライブラリーを用いて生成される、いわゆるファージディスプレイ技法である。この技法においては、ヒト抗体をコードするDNA配列が、ファージDNA中に挿入され、ファージDNAライブラリーが提供される。ライブラリー中の各ファージは、その表面上に異なる抗体を担持する。そのようなライブラリーは、所望の抗原を結合する抗体についてスクリーニングされ得る。本発明によれば、スクリーニングは、hIL-3のアミノ酸残基22-48内に含まれるエピトープに関して実施され得る。そのようなライブラリーと、抗原/エピトープ担持のタンパク質又はペプチドとの混合に基いて、抗原特異的抗体を有するファージのみが選択される。特異的抗体を担持するそのようなファージは増殖され得、そしてそれから、抗体が大量に得られる。ハイブリドーマ細胞に類似して、そのようなファージからの遺伝子情報により形質転換される哺乳類細胞が連続的に抗体を生成することができる(例えば、Beerli et al., PNAS September 23, 2008 vol. 105 no. 38 14336 - 14341を参照のこと)。

30

【0150】

40

さらなる可能性として、ヒト抗体はまた、トランスジェニック動物から得られ得る。この方法によっても、完全なヒト抗体が得られる。この技法に関しては、遺伝子操作されたトランスジェニックマウスがヒト抗体遺伝子を担持するよう調製される。マウス特異的抗体遺伝子の発現は抑制されるが、ヒト抗体遺伝子の発現はそのようなマウスにおいて促進される。免疫化に応答してヒト抗体を生成できるトランスジェニック変異体マウスを用いる技法、例えばXenomouse技法(例えば、Jakobovits A., Nature Biotechnology 25, 1134 - 1143 (2007))を参照のこと)、又はMedarexからのUltiMab(登録商標)マウス技法は、当技術分野において記載されており、そして当業者には利用可能である。

【0151】

50

本発明の抗体の h I L - 3 特異性及び交差反応性は、当業界において知られている方法、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) により容易に決定され得る。特異性及び交差反応性を決定するための 1 つの既知方法においては、組換え的に生成されたサイトカイン (例えば、それぞれ、h I L - 3、I L - 3 及び G M - C S F、又は他の種からの I L - 3) が固定され、例えば試験配列中の適切な表面上に被覆され、生成された抗 - ヒト - I L - 3 - 抗体が添加され、そしてそれらの結合が、検出試薬、例えば標識された抗 - I g G - 抗体により、被覆された表面上で検出される。そのような試験レジメンにおいては、本発明の抗体はほぼ排他的に I L - 3 に結合するが、I L - 3 及び G M - C S F への結合は非常にわずかな範囲でしか発生しない。他の種からの I L - 3 が関与する限り、本発明の抗体についても同様である (実施例 4 を参照のこと) 。

10

【 0 1 5 2 】

一次ヒト I L - 3 (一次ヒト細胞により生成されたグリコシル化 I L - 3) に結合し、そして一次ヒト I L - 3 の検出のために有用である新規抗体を同定するために、抗体クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 が使用され得る。クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 は、標準として E . コリ、昆虫細胞又はヒト細胞において組換え的に発現された I L - 3 を用いてのサンドイッチ E L I S A で両抗体に関して測定された一次ヒト I L - 3 の濃度は、一次ヒト細胞を用いての機能的アッセイ (上記のような) において、一次ヒト I L - 3 及び組換え的に発現された I L - 3 の生物活性と非常に良く相関するので、完全にグリコシル化された一次ヒト I L - 3 を結合することが示されている。新規の抗 - I L - 3 抗体 (クローン X) が一次ヒト I L - 3 の検出のために使用され得るかどうかを決定するために、クローン X が E L I S A プレートの被覆のために使用され得た。次に、一次ヒト I L - 3 及び組換え的に発現された I L - 3 (標準として) が、種々の希釈度で添加される。次に、結合された I L - 3 は、H R P - 標識 P 8 C 1 1 を用いた第 2 アッセイにおいては、H R P - 標識クローン 1 3 を用いた 1 つのアッセイにおいて検出される。クローン 1 3 及び P 8 C 1 1 は、I L - 3 の非オーバーラッピングエピトープを認識する。クローン X + クローン 1 3 - H R P 又はクローン X + P 8 C 1 1 - H R P を用いたサンドイッチ E L I S A が、標準及び既知濃度の一次ヒト I L - 3 (例えば、P 8 C 1 1 及びクローンを用いたサンドイッチ E L I S A により決定された) に比較して、一次ヒト I L - 3 についての正しい濃度を与える場合、この新規の抗体クローン X は、一次ヒト I L - 3 の検出のために適切であろう。他方では、新規クローン X は、被覆のためのクローン 1 3 又は P 8 C 1 1 と組合して、検出 (例えば、H R P - 標識されたクローン X) のために使用され得る。

20

30

【 0 1 5 3 】

本発明は、多くの点で既知抗体よりも卓越する抗体、及びそれを得るための方法を提供する。多くの実験及びまた、本明細書に包含される実施例において、本発明の抗体、例えばクローン 1 3 及び P 3 C 1 1 C 8 - 6 は、特異性、h I L - 3 誘発された活性のインビボ遮断能力、交差反応性の欠如、又は親和性及び結合活性に関して非常に卓越した特性が証明されている。従って、それらの好ましい抗体は、治療処置への使用のために特に適切であると思われる。従って、本発明の 1 つの側面は、治療への使用のためのそれらの抗体、例えばそれらのフラグメント、変異体、コンストラクト、及び接合体を言及する。

40

【 0 1 5 4 】

治療に使用される場合、本発明の抗 - I L - 3 抗体、例えばクローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 を、ヒト化バージョンで使うことが好ましい。このためには、クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 が当業界において知られている任意の態様でヒト化される。この状況下で、クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 の C D R の少なくとも 1 つが同様に維持 / 保存され、マウス抗体クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 の他の部分がヒト抗体起源の配列により、完全に又は部分的に置換され得る。この状況下で、得られたヒト化された抗体は、既知方法を用いて容易に決定され得る同じ特異性をまだ示していることが必須である。好ましくは、そのようなヒト抗体クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 はまた、ヒト以外の種の I L - 3、及び寄託されたマウスクローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 のような他のヒトサイトカインとの交差反応性もわずかに示す。

50

【0155】

本発明のさらなる主題は、抗体、抗体フラグメント、抗体変異体、抗体コンストラクト、抗体接合体、又は本発明の抗体の特異性を伝達するCDRの配列をコードする核酸である。動物／哺乳類経路の免疫化、及び／又はモノクローナル抗体の生成のためのハイブリドーマ技法を通しての抗体の生成に加えて、組換え方法により抗体を生成することはまた、現在確立されている。

【0156】

従って、細菌又は真核細胞において抗体フラグメントを生成するために、それぞれの核酸を用いることはまだ、可能であり、そして好ましい方法である。組換え抗体又は抗体のフラグメントを生成するための対応する方法は、当業者に知られている（例えば、J e o n g K J , J a n g S H , V e l m u r u g a n N , B i o t e c h n o l J . 2 0 1 1 J a n ; 6 (1) : 1 6 - 2 7 . ; L i J e t a l . , J I m m u n o l M e t h o d s . 2 0 0 7 J a n 1 0 ; 3 1 8 (1 - 2) : 1 1 3 - 2 4を参照のこと）。

10

【0157】

組換え的に得られた抗体の利点は、それらが完全に動物／哺乳類生物外で生成され得ることである。この側面によれば、例えば、抗原は生物にとって有害である物質であり、又は一定の生化学条件は、インビトロシステムにおいて正確に制御され得る所望の抗体に関連しているので、動物／哺乳類において生成され得なかった抗体を得ることもまた可能である。

20

【0158】

特に、ヒト又はヒト化抗体の生成に関して、特に治療に関して、組換え抗体技法の使用は、上記で既に言及されたように、他の生物において生成された抗体に対する患者の免疫応答は防止され得るので、好都合である。抗体の非ヒト部分に対するそのような免疫応答は、治療剤を中和できるか、又は重度の副作用を伴うことにより患者に任意の否定的な効果を危険にさらす可能性がある。

【0159】

組換え方法により、抗体及び／又はそれらのフラグメントはまた、他のタンパク質と容易にカップリングされ得、そして従って、多機能コンストラクト、多特異的又は二又は多官能性接合体、多機能及び多特異的抗体、等が生成され得（D u b e l a n d K o n t e r m a n n 2 0 0 1 , R e c o m b i n a n t A n t i b o d i e s . I n : R . K o n t e r m a n n a n d S . D u b e l (E D S) , A n t i b o d y E n g i n e e r i n g , S p r i n g e r V e r l a g , H e i d e l b e r g / N e w Y o r k , p a g e s 3 - 1 6) 。

30

【0160】

本発明によれば、本発明の抗体をコードする核酸配列は、h I L - 3 のアミノ酸残基 2 - 4 8 内の特異的エピトープに対する抗体の特異的結合を付与する抗体の少なくともそれらの部分をコードするヌクレオチドを含む。

【0161】

好ましい実施形態によれば、前記核酸は、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 3 1 6 4 (クローン 1 3) 又は D S M A C C 3 2 5 1 (P 8 C 1 1 C 8 - 6) により生成される抗体、又はそのフラグメント、変異体、コンストラクト、又は接合体をコードする。さらなる、特に好ましい核酸は、ヒト化クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 をコードし、それにより、それは、本発明の特異的 h I L - 3 エピトープへの結合を伴う、抗体クローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6 における領域をコードする少なくともそれらのヌクレオチドを含む。

40

【0162】

本発明のさらなる主題は、本発明のモノクローナル抗 - I L - 3 抗体を生成するハイブリドーマ細胞系である。ハイブリドーマ細胞系の生成及びそれからのモノクローナル抗体の取得は、当業者において良く知られている。K o h l e r a n d M i l s t e i n

50

による方法の最初の出版物から出発し、そしてそれに基づいて、この方法は広く使用され、そしてさらに改善されて来た。一般的に、モノクローナル抗体の生成のためには、B a l d / c マウスが抗原、この場合、h I L - 3、例えばグリコシル化 h I L - 3、及び好ましくは、h I L - 3 のアミノ酸 22 - 48 を含む h I L - 3 のそれらの部分により免疫化される。所望するエピトープに対する特異的抗体の生成方法は、当業界において良く知られている。免疫化されたマウスの脾細胞が骨髓腫細胞により融合され、そして得られるハイブリドーマが、例えば E L I S A アッセイを用いて、抗体の生成について試験される。特異的抗体の生成について陽性であると試験されたクローンはさらに、所望の抗体の連続的生成のために維持され、そして使用され得る安定したハイブリドーマ細胞系を形成するために増殖される。

10

【0163】

本発明の特に好ましいハイブリドーマ細胞系は、抗体クローン 13 を生成する細胞系 D S M A C C 3 1 6 4、又は抗体クローン P 8 C 1 1 C 8 - 6 を生成する細胞系 D S M A C C 3 2 8 1 である。

【0164】

治療に使用される抗体は、例えば、他の無関係なサイトカインとの交差反応性、又は既知抗体により経験された重度の免疫学的応答により引起される欠点を伴わないことが重要である。

【0165】

本発明の抗体は、治療使用のために価値がある。従って、本発明のさらなる主題及び実施形態は、治療使用のための上記で定義された少なくとも 1 つの抗体、及び任意には、治療使用のための医薬的に許容できる賦形剤又は担体を含む組成物である。本発明のそのような医薬組成物は、活性成分として本明細書に記載されるような、医薬的有効量の少なくとも 1 つの抗体又はその活性部分、例えば抗体フラグメント、抗体コンストラクト、抗体変異体又は抗体接合体の存在により特徴づけられる。医薬製剤のための通常の賦形剤及び / 又は担体物質は、必要に応じて、及び適切であると思われる場合、含まれ得る。そのような賦形剤及び担体は、当業界において良く知られており、そして当業者は、その最適物質及び用量を知っている。

20

【0166】

本発明の抗体、及び上記で定義されるような少なくとも 1 つの抗体（そのフラグメント、変異体、コンストラクト及び接合体）を含む医薬組成物は、高められたレベルの I L - 3 に関連する疾患又は機能不全の治療、又は防止及び予防のために使用され得る。本明細書の導入部分で論じたように、I L - 3 は、種々の造血前駆体細胞に対して有意な増殖刺激及び分化効果を有し、そしてまた、肥満細胞のための増殖因子である。I L - 3 により引起されるシグナルトランスダクションは、免疫系に主要影響を及ぼす。I L - 3 が発生又は進行において直接的又は間接的役割を演じる任意の疾患又は医学的状态は、本発明の抗体を投与することによる治療のための候補体である。好ましくは、I L - 3 を生成できる細胞、例えば好塩基球、好酸球、形質細胞様樹状細胞、単球、B 細胞、T 細胞、内皮細胞、及び特定タイプの癌 / 腫瘍、ニューロン及び他の細胞による高められたレベルの I L - 3、又は高められた I L - 3 の発現に関連するそのような疾患又は機能不全は、免疫系、ほとんど自己免疫疾患及び特に R A、又は急性又は慢性移植片対宿主病、及び多発性硬化症に関連している。

30

40

【0167】

本発明の抗体により治療されるべき I L - 3 を生成できる細胞による高められたレベルの I L - 3 又は高められた発現の I L - 3 に関連する疾患又は機能不全は、以下から選択された疾患又は機能不全であり得る：尋常性ざ瘡、喘息、過敏症、アレルギー；自己免疫疾患、例えば心筋炎、心筋梗塞後症候群、心外膜後症候群、亜急性細菌性心内膜炎、糸球体腎炎（各種）、糸球体症（各種）、間質性膀胱炎、ループス腎炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性血管性皮膚炎、自己免疫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、瘢痕性虫垂炎

50

、疱疹状皮膚炎、円板状紅斑性狼瘡、表皮剥離性水疱性口内炎、結節性紅斑、妊娠性類天疱瘡、甲状腺炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、線状IgA疾患、モルフェア、尋常性天疱瘡、精神病性リケノイド類及びパリオフォルミスシスアクタ、ミュシャ - ハバーマン病、乾癬、全身性強皮症、白斑、アジソン病、自己免疫性内分泌症候群、自己免疫性多発内分泌症候群2型、自己免疫性多発内分泌症候群3型、自己免疫性膵炎、1型真性糖尿病、自己免疫性甲状腺炎、オーズ甲状腺炎、グレーブス病、自己免疫性卵巣炎、自己免疫腸炎、シェーグレン症候群、自己免疫性腸疾患、セリアック病、クローン病、微視的大腸炎、潰瘍性大腸炎、抗リン脂質症候群、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、低温アグルチニン病、必須混合性クリオグロブリン血症、必須混合性クリオグロブリン血症、エバンス症候群、IgG4関連全身性疾患、発作性夜間ヘモグロビン尿症、悪性貧血、純赤血球形成不全、血小板減少症、脂肪症ドロロサ、成人発症スティル病、強直性脊椎炎、CREST症候群、薬物誘発性狼瘡、腱炎関連関節炎、好酸球性筋膜炎、フェルティー症候群、若年性関節炎、ライム病（慢性）、混合性結合組織疾患、パリンドローム性リウマチ、バリー・ロムバーグ症候群、パーソンズ・ターナー症候群、乾癬性関節炎、反応性関節炎、再発性多発軟骨症、後腹膜線維症、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、シュニッツラー症候群、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、線維筋痛、封入体筋炎、筋炎、重症筋無力症、神経線維腫、腫瘍性小脳変性症、多発性筋炎、急性播種性脳脊髄炎、急性運動性軸索ニューロパシー、抗N-メチル-D-アスパラギン酸レセプター脳炎、バロ同心硬化症、ピッカースタフ脳炎、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、ギラン・バレー症候群、橋本脳症、特発性炎症性脱髄疾患、ランパート・イトン筋萎縮症候群、多発性硬化症、オシュトラン症候群、連鎖球菌に関連する小児自己免疫神経精神障害、進行性炎症性ニューロパチー、不穏下肢症候群、硬直者症候群、シデナム舞踏病、横断性脊髄炎、自己免疫性網膜炎、自己免疫ブドウ膜炎、コガン症候群、グレーブス眼症、中間ブドウ膜炎、硝子体結膜炎、ムーレン潰瘍、視神経乳頭炎、オプソクロナスミオクローヌス症候群、視神経炎、強膜炎、スサック症候群、交感神経性眼炎、トロサ - ハント症候群、自己免疫内耳疾患、メニエール病、抗好中球細胞質抗体関連脈管炎、ベーチェット病、チャグ・ストラウス症候群、巨細胞性動脈炎、ヘノッホ・シェンライン紫斑病、川崎病、白血球梗塞性血管炎、狼瘡血管炎、リウマチ様血管炎、顕微鏡的多発血管炎、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛、蕁麻疹性血管炎；又は自己炎症性疾患、例えば家族性地中海熱；再発熱（HIDS）を伴う高免疫グロブリン血症；TNF受容体関連周期性症候群（TRAPS）；マックルウェルズ症候群（蕁麻疹難聴アミロイドーシス）；家族性冷蕁麻疹；新生児発症性多系統炎症性疾患（NOMID）；定期的な発熱、アフタ性口内炎、咽頭炎及び腺炎（PFAPA症候群）；ブラウ症候群；化膿性無菌性関節炎、膿皮膿瘍、ざ瘡（PAPA）；インターロイキン-1-受容体アンタゴニスト（DIRA）の効率）；又は移植拒絶、再灌流傷害、敗血症；又は血液悪性腫瘍、例えばリンパ腫、白血病又は他の血液腫瘍；又は非血液悪性腫瘍。

【0168】

好ましくは、本発明の医薬組成物を投与することにより治療されるさらなる状況は、アレルギー反応を患っている個人におけるヒト好塩基球の活性の抑制、及び血清又は血漿における高められたIL-3レベル、又はIL-3を生成できる細胞によるIL-3の高められた発現を有する患者の層別化への使用である。

【0169】

それぞれの疾患又は機能不全において、本発明の医薬組成物による治療に適格であるためには、健康な個人に比較して、hIL-3を生成できる細胞（例えば、T細胞）による高められたレベルのhIL-3又は高められた発現のhIL-3が、滑液、又は血液、血漿及び血清を含む任意の体液に存在すべきである。医薬組成物に含まれる本発明の抗体は、hIL-3に特異的に結合し、そしてそれにより、hIL-3の活性を阻害する。

【0170】

特に、RAの観点から、大きなグループの患者に関しては、T細胞により生成された高

10

20

30

40

50

められたレベルのh I L - 3は、患者において引起される悪化及び疾患の進行と相関することが見出されている。I L - 3は主に活性R Aにおいて検出され、ところが非活性段階のR Aを有する患者はh I L - 3の高められた発現又は高められたレベルを通常示さない。従って、本発明の医薬組成物は、自己免疫の活発なエピソード、例えばR Aを有する患者の治療に、及び疾患の活発なエピソードの発生を回避するための予防処置のために特に有用である。

【0171】

利用可能な治療は治療された患者の約50%においてのみ有効であるので、本発明の組成物の提供は、患者における自己免疫疾患の新規且つ穏やかな治療の重要な工程である。I L - 3欠損マウス(Nature 1998; 392(6671):90-3)の明白な表現型の欠如、及びI L - 3に対する抗体により処置されたマウスの明白な副作用の欠落(Arthritis Rheum. 2009; 60(5):1352-61)に基いて、I L - 3を標的とする治療は、特に感染又は新形成に関して、現在使用されている医薬品よりも低い重度の副作用を示す。ある場合、抗体及び本発明の医薬組成物と、メトトレキサート又はレフルノミドのような他の薬剤との治療を組合すことが所望される。血漿、血清又は他の体液中のI L - 3発現又はI L - 3レベルに従っての個別化された治療戦略は、現時点で、どの患者が特定の療法(生物学的製剤を含む)に応答するかを、確実に予測することは不可能であるので、入手できる生物学的製剤に比較して、利点を提供する。さらに、個別化されたアプローチは、無効果な治療の副作用のリスクを低めることにより治療の安全性を改善し、そしてR Aの治療のためのコストを低める。

10

20

【0172】

また、本発明の抗体による治療は、血液、血漿又は血清中の高められたh I L - 3発現又は高められたh I L - 3レベルが発現されるとすぐに、優先的に開始されるであろう。従って、早期治療は、R A活性が、高められたh I L - 3レベルと相関し、そして長期間の関節損傷が回避され、又は最小限に保持され得る患者に適用され得る。さらに、患者がD M A R D又は生物学的製剤によるこれまでの治療に失敗した場合、抗-I L - 3抗体による治療が優先的に開始されるであろう。さらに、本発明の抗体の使用は、疾患病理においてさらなる負の要因であり得る滑膜組織の細胞浸潤を低めることができることが期待される。

30

【0173】

本発明の医薬組成物に含まれるh I L - 3抗体の有効量は、当核分野で一般的に知られている医師により容易に決定され得る。有効量は、疾患の症状を緩和するか、又は患者の状態は、体液、好ましくは血液、血漿又は血清における炎症又は自己免疫についてh I L - 3発現又はh I L - 3レベル及び他のマーカーを決定し、そして疾患標的を決定し、又は既知診断方法を用いることによりモニターされ得る。R Aについては、疾患の進行及び患者の状態は、例えばD A S 2 8活性評点を用いて決定され得る。関節損傷を防ぐためには、D A S 2 8 2, 6が達成されるべきである。治療の有効性は、疾患活性の一定(例えば、50%又は70%)の低下を達成する患者の%として測定され得る。体液中のh I L - 3又は他の炎症マーカーの低下はまた、治療の成功の指標でもある。医薬組成物の有効量は、当業者に良く知られているような用量-応答-曲線を用いて決定され得る。本発明の診断方法を用い転決定される、患者の体液に存在するh I L - 3の量はまた、各患者のための医薬組成物における抗体の有効量及び疾患及び機能不全の重症度を決定するための基礎となり得る。

40

【0174】

本発明の医薬組成物及びその中に含まれるh I L - 3抗体の量に関して、用量はさらに、抗体の活性、結合活性及び半減期に依存する。約1~2週の半減期を有する抗体の場合、その用量は、1回の投与当たり1~1000mg及びより好ましくは、10~100mgの範囲である。医薬組成物は好ましくは、抗体の半減期に依存して、1日1回~1ヶ月に1回、適用される。本発明の医薬組成物は、固体又は液体形のような意図された目的のために有用である任意の形で存在し得る。例えば懸濁液、溶液又はエマルジョンが有用で

50

ある。組成物は、注射可能な製剤などの任意の有用な形での投与のために提供され得る。

【0175】

また、体液中の高められたhIL-3レベルと相関する患者の治療のための医薬組成物及びその使用に関して、抗体クローン13及びP8C11C8-6が特に好ましい候補体である。抗体クローン13及びP18C11C8-6は、GM-CSF及びIL-5との検出できる交差反応を示さず、そして従って、患者におけるそれらのサイトカインの活性に影響を及ぼさない（感知例4bを参照のこと）。さらに、クローン13及びP8C11C8-6は、ヒト細胞系又は一次ヒト細胞において発現されるグリコシル化hIL-3を用いて、一次ヒト血液細胞におけるhIL-3活性を遮断することにおいて非常に有効であることは示されている。

10

【0176】

クローン13及びP3C11C8-6はまた、非常に高い親和性及び結合活性を示し、そしてこの抗体の既に非常に少ない量が、一次ヒト血液細胞におけるその阻害活性のために十分である（実施例5を参照のこと）。

【0177】

本発明の抗体は、PMBcなどの一次ヒト細胞により発現されるhIL-3が確実に及び効率的に検出され得るサンドイッチELISAなどの検出方法にも使用され得る。好ましい実施形態によれば、検出方法に使用される抗体は、クローン13及びP8C11C8-6と呼ばれる抗体である。

【0178】

20

グリコシル化状態を診断の原因としての新規同定により、新規な抗-hIL-3特異的抗体を効率的にスリーニングし、そして/又は開発することは現在、可能である。抗原として、それらの場合、グリコシル化hIL-3ペプチドが使用される。「グリコシル化hIL-3ペプチド」とは、配列番号10のアミノ酸15又は70のいずれかで、又は配列番号1のアミノ酸15又は70の両方で、N-グリコシル化を含むペプチドとして、本明細書において定義される。そのようなペプチドは、昆虫細胞のような真核生物発現系、又はHEK細胞のようなヒト細胞系により、又は活性化されたPBMCのような一次ヒト細胞の発現により生成され得る。

【0179】

従って、本発明はまた、抗体の結合及び阻害活性を測定するために、グリコシル化hIL-3ペプチドが抗原として、及びサイトカインとして使用される、本発明の抗-hIL-3抗体を得るための方法を含む。この方法の好ましい実施形態によれば、グリコシル化hIL-3ペプチドは、ヒト細胞から発現され、そして翻訳される。

30

【実施例】

【0180】

本発明の好ましい実施形態は、以下の実施例に概説されるが、それらは本発明の範囲又は精神を制限するものとして解釈されるべきではない。

【0181】

実施例1 - モノクローナル抗-IL-3抗体の生成

ミウバン中、ヒト真核生物グリコシル化IL-3の少なくとも6回のi.p.注射を用いて、4週間隔でBalb/cマウスを免疫化することにより、抗-IL-3抗体を生成した。細胞融合の2日前、PBS中、IL-3を腹腔内注射した。免疫化されたマウスから得られた抗体-産生脾細胞（HAT培地上で増殖できるHGPRT陽性）を、ポリエチレングリコール（PEG）の存在下で、骨髓腫細胞系x63Ag8.6.5.3と融合され、そしてハイブリドーマの選択を、HAT選択培地において実施した。ハイブリドーマを、10%FCS（純粋に不活性された、NIA）、P/S及びグルタミン（1:100）により補充されたRPMI-1640培地において培養した。得られた細胞は、懸濁状態で増殖することができ、そして1:4の比で3日ごとに分けた。

40

【0182】

貯蔵のために、ハイブリドーマ細胞を、細胞培養ボトルから、50ml又は15mlの

50

細胞培養フラスコ (BD Falcon (登録商標)) 中に移す。室温で 1400 rpm の 5 分間の遠心分離の後、上清液を完全に除去する。細胞を、凍結培地 (90% FCS (HIA) + 10% DMSO) において再懸濁し、そして 1.5 ml のアリコートバイアルに満たす。細胞を -80 °C のフリーザーにおける凍結容器において予備凍結し、そして 1 - 2 日後、液体窒素貯蔵タンクに移す。

【0183】

得られた細胞系のクローニング及び再クローニングを、限界希釈法を用いて実施し、モノクローナル抗体の長期安定供給源を提供する。

【0184】

得られた抗体が、表 1 に示される。

10

【0185】

抗体のアイソタイプを決定するために、ELISA アッセイを、抗体が添加された IL-3 被覆プレートを用いて実施した。結合された抗体を、アイソタイプ特異的二次抗体を用いて検出した。さらなる分析のために、アイソタイプ IgG の抗体のみを使用した。

【0186】

【表 1】

表 1 - ヒト IL-3 に対する mAb の概要

オリジナルクローン	一次クローニング	二次クローニング	アイソタイプ
クローン 2	2. 28	2. 28. 11	IgM, κ
クローン 3	3. 47	3. 47. 20	IgG1, κ
クローン 5	5. 3	5. 3. 2	IgM, κ
クローン 6	6. 38	6. 38. 14	IgG1, κ
クローン 7	7. 42	7. 42. 45	IgM, κ
クローン 8	8. 36	8. 36. 38	IgG1, κ
クローン 10	10. 12	10. 12. 4	IgG1, κ
クローン 11	11. 14	11. 14. 6	IgG1, κ
クローン 13	13. 47	13. 4. 4	IgG1, κ
クローン 36	36. 26	36. 26. 10	IgG1, κ
クローン 38	38. 18	38. 18. 5	IgG1, λ
クローン 41	41. 28	41. 28. 4	IgG1, κ
クローン 42	42. 47	42. 47. 36	IgG1, κ
クローン 43	43. 14	43. 14. 28	IgG1, κ
クローン 44	44. 16	44. 16. 16	IgG1, κ
クローン 45	45. 14	45. 14. 27	IgG1, κ
クローン 46	46. 21	46. 21. 1	IgG1, κ
クローン 47	47. 28	47. 28. 15	IgG1, κ
P8C11	P8C11C8	P8C11C8-6	IgG1, κ

20

30

40

【0187】

実施例 2 - ハイブリドーマ上清液における IgG1 の量の決定

タイプ IgG1 の得られた抗体のいくつかを、ハイブリドーマクローンから単離し、そしてそれらの濃度を決定した。濃度の決定を、以下の方法に従って実施した：96 ウェルプレートを、室温で一晩、100 μ l / ウェルの濃度での抗 - マウス IgG (pBS 中、1:100) により被覆する。遮断を、PBS 中、2% BSA 100 μ l / ウェルを添加し、そして室温で 2 時間、インキュベートすることにより実施する。遮断反応の後、プレートを 2 度、洗浄する。クローン 3. 47. 20、6. 38. 14、. 36. 38、10. 12. 4、11. 14. 6 の上清液の 2 つのサンプル及びブランクをそれぞれ、希

50

釈せずに、並びに 1 : 3、 1 : 9、 1 : 27、 1 : 81、 1 : 243、 1 : 729 及び 1 : 2187 (ウェル当たり 100 μ l、PBS 中、2 % BSA での希釈) の希釈度で、室温でインキュベートする。1 mg / ml の開始濃度でのマウス IgG1 を標準として用いるが、20 ng / ml の濃度を、1 : 2、 1 : 4、 1 : 8、 1 : 16、 1 : 32、 1 : 64 及び 1 : 128 の希釈度で適用する。

【0188】

プレートを3度、洗浄し、そして次に、ウェル当たり 100 μ l で室温で1時間、ビオチン化された抗 - マウス IgG1 (PBS 中、2 % BSA で 1 : 250 に希釈された) と共にインキュベートする。プレートを、さらに3度、洗浄した後、ストレプトアビジン - HRP (PBS 中、2 % BSA 中、1 : 1000) を、室温で及び暗室で1時間、添加する。抗体の濃度を、ABTS を添加し、さらに30分間インキュベートし、そして分光光度計上で 405 及び 490 nm でシグナルを測定した後、決定する。この決定に基づいて、所望する量の試験される抗体を、さらなる試験のために適用する。

10

【0189】

実施例 3 - ウェスタン - プロットアッセイにおけるモノクローナル抗体による IL - 3 の決定

ゲルの調製及びウェスタンプロット分析の実施のために、標準方法を用いる。12 % PAA 分解ゲルを注ぎ、約 1 - 2 ml の水により被覆し、そして認識可能な「ライン」が形成されるまで、重合を 30 ~ 45 分間、行う。水を除去し、スタッキングゲルを分解ゲル上に注ぎ、そしてテフロン櫛を挿入する。重合を 30 分間、実施し、次に櫛を注意して除く。

20

【0190】

IL - 3 のサンプルを、Laemmli 緩衝液と共に組換えヒト IL - 3 (1 : 1) を混合し、そして 60 ° で 5 分間、サンプルを加熱することにより、調製する。レーン当たり 1 μ g の IL - 3 の量、及び分子サイズを決定するための通常の標準をゲル上に負荷する。次に、ゲルを、ランニング緩衝液をすでに含む SDS - PAGE ゲル電気泳動装置に装着する。次に、挿入されたゲルを、追加のランニング緩衝液により注意して重ね、そして約 1 . 5 時間、無限に調整された電圧で 20 ~ 25 mA で電気泳動を行う。ランが完結すると、ゲルを装置から回収し、そしてスタッキングゲルを除く。

30

【0191】

トランスファー緩衝液に予備浸漬された6層のワットマン紙、及び PVD F 膜を、ゲルのサイズに合わせて切断する。トランスファースタックを、通常の手段で調整し、そして 20 - 25 mA 及び無限に調整され電圧で 40 分間、セミドライプロットティングにより、トランスファーを行う。次に、膜を、遮断溶液 (PBS 中、5 % 粉末スキムミルク) と共に振盪装置上で 4 ° で一晩インキュベートし、そして膜を室温で PBS によりそれぞれ 5 分間、3度洗浄する。

【0192】

抗体クローンを、振盪装置上で攪拌下で、室温で2時間、遮断溶液中、5 μ g / ml の濃度でインキュベートする。3回の洗浄工程の後、HRP 標識された抗 - マウス免疫グロブリン (遮断溶液中、1 : 100) を添加し、そしてインキュベーションを、振盪視ながら、室温で1時間、行う。3回のさらなる洗浄工程の後、検出溶液 (NALGEN から入手された Western blotting Luminal Reagent の溶液 A 及び B の 1 : 1 混合物) を添加し、そして室温で1分間インキュベートする。次に、フィルムを、異なる時間の露光で膜上で調整し、そして暗室で現像する。

40

【0193】

図 2 は、抗体クローン 2、3、5、6、7、8、10、11 及び 13 の結合の結果を示す。所定の濃度での IL - 3 への結合を、クローン 8、11 について、及びそれにより低い程度でのクローンについて検出した。

【0194】

実施例 4 - モノクローナル抗体の IL - 3 の親和性及び特異性の分析

50

a) IL-3 に対する抗体の親和性

得られた抗体の IL-3 に対する親和性を、ELISA アッセイで測定した。ELISA プレートに、異なる濃度 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.66 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.22 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$) の抗-ヒト IL-3 抗体 (RD、ヤギ IgG 抗-ヒト IL-3 AF-203-NA)、により一晩、被覆した。各濃度について、二重反復を用いた (2×12 ウェル)。このためには、第 1 の濃度 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) を PBS により希釈し、IgG の全濃度を一定に保つために、さらなる希釈を、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の対照ヤギ IgG を含む PBS で行う。2% BSA による遮断を、室温で 2 時間、実施し、続いて PBS を用いての 5 回の洗浄工程を行う。

【0195】

次に、ウェルを、hIL-3 (PBS 中、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共に室温で 2 時間インキュベートし、対照グループについては、hIL-3 を添加しない。PBS による 5 回のさらなる洗浄工程の後、ウェルを、実施例 1 で得られた抗体クローン 8 及び 11 の連続 ($1:3$) 希釈液と共に 4 で一晩インキュベートし、この抗体は、2% BSA を含む PBS 緩衝液で使用され、そして $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の開始濃度を有する。

【0196】

5 回のさらなる洗浄工程の後、結合された抗体を、ヤギ-抗-マウス-HRP 抗体 (2% BSA を含む PBS 中、 $1:500$) を用いて検出し、そして室温で 1 時間インキュベートする。5 回のさらなる洗浄工程の後、ABTS (ROCHE、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$) を、基質として添加し、そして光学密度を 405 nm での分光計により測定する。

【0197】

結果は、クローン 11 について図 3 に示されている。抗体クローン 11 は、アッセイにおいて IL-3 に対する高い親和性を示す。図 4 は、他の抗体を含む、さらなる試験の結果を示す。試験は、記載されるのと同じ手段で行われたが、しかしながら、固相の被覆は、図に示されるように、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヤギ抗-ヒト IL-3 (上記を参照のこと) 及び異なる濃度 / 希釈度の抗体を用いて実施された。

【0198】

b) 他のサイトカインとの交差反応性

診断アッセイのための得られたモノクローナル抗体の有用性を決定するためには、患者の血液、血漿、血清又は他の体液にも存在する密接に関連するサイトカインとの交差反応を排除できないことは重要である。この目的のために、ELISA プレーートのウェルを、PBS 中、 $100 \mu\text{g}/\text{ウェル}$ のヒト IL-3 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 又は IL-5 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加することにより被覆した。負の対照として、PBS を使用した ($100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$)。試験された各抗体に関して、異なる希釈液を、hIL-3、hGM-CSF、hIL-5 及び PBS を有する共通プレート上で強制的に試験した。

【0199】

サイトカイン被覆されたプレートを、3 回洗浄し、そして遮断を、PBS 中、2% BSA を用いて、室温で 2 時間、実施した。3 回のさらなる洗浄工程の後、抗体クローン 3、47、20、8、36、38、10、12、4、11、14、6、13、4、4 及び対照としての培地 (10% FCS と含む RPMI 1640) を、 $40 \mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度で添加し、そして $1:5$ 及び $1:25$ の希釈液を $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ の容量で含み、そして室温で 1 時間インキュベートした。各プレート上に負の対照が使用される。

【0200】

3 回の洗浄工程の後、二次 HRP-標識されたウサギ抗-マウス IgG (DAKO-Cytomation P260 (PBS 中、2% BSA 中、 $1:2000$ 、 $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$)) を添加し、そしてプレートを、暗室において室温で 1 時間インキュベートした。別の 3 回の洗浄工程の後、ABTS (ROCHE、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$) を添加し、そして分光測定を、 405 及び 490 nm で実施した。

【0201】

結果は図 5 に示され、これは、クローン 8 及び 10 については弱い交差反応性を示すが

10

20

30

40

50

、しかしクローン 11 及び 13 については、有意な交差反応性は示されていない。図 6 は、クローン P18C11C8-6 により得られた結果を示す。

【0202】

c) 他の種からの IL-3 との交差反応性

モノクローナル抗体のさらなる性質として、他の種からの IL-3 とのそれらの交差反応性を決定した。それぞれのアッセイに関しては、ELISA プレートのウェルを、PBS 中、ヒト、ネズミ、ラット及びアガゲザル IL-3 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)、及びバックグラウンドとしての $100 \mu\text{l}$ / ウェルの PBS により被覆し、そして冷蔵庫で一晩インキュベートした。各抗体に関しては、異なる希釈溶液を、hIL-3、ネズミ IL-3、ラット IL-3、アカゲザル IL-3 及び負の対照としての PBS を有する共通プレート上で強制的に試験した。

10

【0203】

IL-3 被覆プレートを、3 回、洗浄し、そして遮断を、PBS 中、2% BSA により、室温で 2 時間、行った。3 回の洗浄工程の後、図 7 及び 9 に示されるような一定濃度の抗体クローン 3.47.20、8.36.38、10.12.4、11.14.6、13.4.4、及びそれらの 1:5、1:25 及び 1:125 希釈溶液を、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルの容積で添加した。R&D モノクローナル抗-IL-3 抗体クローン (R&D Systems, Inc., カタログ番号 MAB203) を、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用し ($100 \mu\text{l}$ / ウェル)、そして負の対照として、抗体を含まない培地 ($100 \mu\text{g}$ / ウェル) (10% FCS を含む RPMI 1640) を使用した。各プレート上で、負の対照を使用した。図 8 は、クローン P8C11C9-6 に得られた結果を示す。

20

【0204】

3 回の洗浄工程の後、二次 HRP-標識されたウサギ抗-マウス IgG (DAKO-Cytomation P260 (PBS 中、2% BSA 中、1:2000、 $100 \mu\text{l}$ / ウェル)) を添加し、そしてプレートを、暗室において室温で 1 時間インキュベートした。別の 3 回の洗浄工程の後、ABTS (ROCHE, $1 \text{mg}/\text{ml}$) を添加し、そして 30 分後、 405nm で分光測定を行った。

【0205】

結果は、上記のように図 7 - 9 に示され、これは、クローン 10 のわずかな交差反応性にもかかわらず、実施例 1 の抗体は検出できる交差反応性を示さなかったことを示唆する。他方では、R&D 抗体は、アカゲザル IL-3 とのいくらかは交差反応を示しました。

30

【0206】

実施例 5 - モノクローナル抗体の遮断性質の分析

実施例 1 に従って得られた抗体の IL-3 活性を遮断する能力を分析するために、いくつかの異なる実験を実施した。

【0207】

a) TF1 細胞の IL-3 依存性増殖に基いて IL-3 を遮断する抗体の能力の分析

TF1 細胞はヒト赤芽球であり、そして重度の汎血球減少症に罹患している 35 歳の日本人男性の骨髓からの細胞系が 1987 年、T.K. Kitamura により確立されている。TF1 細胞の増殖は、IL-3 又は GM-CSF の存在に完全に依存している。従って、TF1 細胞の細胞増殖に基く試験を用いて、TF1 細胞の増殖の低下又はさらに、完全な阻害を導く IL-3 活性の遮断を決定することができる。そのような試験に関しては、MTT-細胞-増殖アッセイを行い、ミトコンドリアデヒドロゲナーゼの活性に基いて細胞の生存性を決定する。溶液中で黄色を示すデヒドロゲナーゼの基質 MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド) は、酵素活性によりテトラゾリウム環で切断され、紫色の MTT ホルマゼン結晶の形成が導かれる。そのような結晶は、イソプロパノールに溶解され、紫色の溶液が分光計で測定され、そしてその結果は、生存 TF1 細胞の量と相関する。

40

【0208】

50

TF 1 細胞の培養：

TF 1 細胞を、培養培地（10% FCS（HIA）、P/S 及びグルタミン（1：100）を含み、そして5 ng/ml のIL-3 又は5 ng/ml のGM-CSF のいずれかにより補充されたRPMI-1640）において増殖し、そして3 日ごとに1：4 に分割した。

【0209】

貯蔵のために、細胞を、細胞培養ボトルから、50 ml 又は15 ml の細胞培養フラスコ（BD Falcon（登録商標））に移した。室温で1400 rpm で5 分間の遠心分離の後、上清液を完全に除去した。細胞を、培養培地（10% FCS（HIA）、P/S 及びグルタミン+5 ng/ml のIL-3 を含むRPMI-1640）において再懸濁し、そして5% DMSO 及び1.5 ml のアリコートバイアルに満たす。細胞を-80 °C のフリーザーにおける凍結容器中で予備凍結し、そして1-2 日後、液体窒素貯蔵タンクに移す。

【0210】

遮断実験：

上記プロトコルに従って3 日ごとに分割されたTF-1 細胞を、実験が行われる前日、5 ng/ml のヒトIL-3 を含む培養培地中に1：2 に分割する。

【0211】

実験のために、細胞を室温で1600 rpm で5 分間、遠心分離する。培養培地を除き、そして細胞を、RPMI 培地により2 度、洗浄し、続いて細胞を、1 ml のRPMI-1640+10% FCS（HIS）+P/S+グルタミン（1：100）に再懸濁し、計数し、そして 1×10^5 個の細胞/ml の最終濃度に緩衝液により補充する。

【0212】

96 ウェルプレートにおいて、100 μ l の培地（RPMI+10% FCS+P/S+グルタミン）中、10,000 個の細胞を各ウェルに提供する。37 °C で60 分間、実施例1 のモノクローナル抗体と共にプレインキュベートされたIL-3（100 μ l）を得た。プレインキュベーションのためには、異なる最終濃度の抗体及びIL-3 を使用する。そのような最終濃度を得るためには、抗体及びIL-3 溶液の濃度は、最終濃度の2 倍である必要がある。37 °C での5 日間のインキュベーション及び5% CO₂ の添加の後、100 μ l の培地を各ウェルから除去し、そして10 μ l のMTT 溶液（LCG 標準-ATCC）を各ウェルに添加し、そしてプレートを、37 °C 及び5% CO₂ でのインキュベーターにおいて、さらに4 時間インキュベートする。このさらなるインキュベーションの後、100 μ l のMTT 溶液を添加し、そしてウェル中の内容物を注意して混合する。一服のインキュベーションの後、光学密度を、570 及び690 nm で決定し、そして生存細胞の数をそれから計算する。

【0213】

実験を以下に対して実施した：抗体クローン8.36.38（クローン8）、11.14.6（クローン11）、13.4.4（クローン13）、市販の抗-hIL-3 抗体クローン4806（RD カタログ番号 MAB203）及びアイソタイプ対照としてのマウスIgG1 κ MOPC 21 抗体（アジドを含まない）（Sigma-Aldrich）。

【0214】

TF 1 の増殖に対するIL-3 の一般的影響を、図10 に示す。種々の濃度のmAb を含み、及び含まないIL-3 の異なる量についての結果が図11-14 に示されている。

【0215】

b) TF 1 細胞のGM-CSF 依存性増殖に対する抗-IL-3 抗体の可能性ある影響の分析

上記のように、TF 1 細胞の増殖は、IL-3 又はGM-CSF の存在に依存する。実施例5a に示されるように、抗-IL-3 抗体は、TF 1 細胞の増殖に対して負の効果を有する。IL-3 は、70 kDa の α 鎖及び約130 kDa の β 鎖から構成されるIL

10

20

30

40

50

- 3 受容体に結合する。同じ β 鎖がまた、IL - 5 及び GM - CSF の受容体上に存在する。従って、別の実験において、抗 - IL - 3 抗体がまた、GM - CSF の存在下で TF 1 細胞の増殖にも影響を及ぼすかどうかを試験した。このためには、上記実験を、抗 - IL - 3 抗体と共にプレインキュベートされた、GM - CSF、IL - 3 及びそれらの混合物の、TF 1 細胞の培養培地への添加を反復した。GM - CSF 及び IL - 3 を含まない対照も含まれていた。

【0216】

この実施例において使用される、それぞれ、GM - CSF 及び抗体の影響及び量の遮断を考慮しての試験の結果が図 15 に示されており、これは、試験したいずれの抗体も、GM - CSF に対する遮断効果及び TF 1 細胞に対するその増殖誘導を有さないことを示唆する。

10

【0217】

c) pDC 上の好塩基球及び HLA - DR に対する CD 203 c 及び CD 11 b の IL - 3 誘発されたアップレギュレーションを阻害する抗 - IL - 3 抗体の能力の分析

ヒト好塩基球顆粒球は、CD 203 c 及び CD 11 b の IL - 3 誘発されたアップレギュレーションを示す。この実験においては、抗 - IL - 3 抗体もまた、この点で IL - 3 の効果を阻害できるかどうかを決定した。

【0218】

CD 11 b、CD 203 c、CD 123 及び HLA - DR に対する抗体により染色された新鮮なヒト EDTA 血液中の好塩基球のフローサイトメトリー検出が、図 17 の左上に示されている。CD 11 b、CD 203 c、CD 123 及び HLA - DR に対する抗体により染色された新鮮なヒト EDTA 血液中の形質細胞様樹状細胞 (pDC) のフローサイトメトリー検出が、左側に示される。新鮮なヒト EDTA 血液を、図 18 の種々の濃度の IL - 3 と共に 37 で 1 時間インキュベートした。

20

【0219】

一次ヒト細胞上のヒト IL - 3 に対するモノクローナル抗体の中和能力を分析するために、好塩基球上の CD 203 c 及び CD 11 b の IL - 3 誘発されたアップレギュレーション又は CD 131 の IL - 3 誘発されたダウンレギュレーション (右側の図 17、図 34 及び 35 を参照のこと)、及びヒト pDC 上の HLA - DR の IL - 3 誘発されたアップレギュレーション (図 18 を参照のこと) を研究した。すべてのアッセイは、新鮮な EDTA 血液により実施された。

30

【0220】

新鮮なヒト EDTA 血液を、種々の濃度の IL - 3 と共に 37 で 1 時間インキュベートした。次に、細胞を、CD 11 b、CD 203 c、CD 123、CD 131 及び HLA - DR に対する抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析した (図 17 及び 18 の右側、及び図 34 及び 35 に示されている)。

【0221】

非常に驚くべきことには、TF 1 細胞に対する IL - 3 効果を中和する抗 - IL - 3 抗体の能力は、一次ヒト細胞に対する IL - 3 効果を中和する能力とまったく相関しないことが見出された。

40

【0222】

クローン 11 及び R & D クローン 4806 は、TF 1 細胞の IL - 3 依存性増殖を効率的に遮断するが (2.5 ng / ml の E. コリ発現された IL - 3 の存在下で、IC₅₀ はそれぞれ、10 ng / ml 及び 33 ng / ml である; 図 13 及び 14 を参照のこと)、しかし一次ヒト細胞に対する昆虫細胞発現された IL - 3 の IL - 3 効果を基本的に遮断することができない (図 19 - 21 を参照のこと)。対照的に、TF 1 細胞に対する IL - 3 効果を遮断する効果はるかに低い抗体クローン 13 (200 ng / ml での IC₅₀; 図 12 を参照のこと) は、一次ヒト末梢白血球により測定される場合、IL - 3 効果を完全に且つ非常に効果的に遮断する (40 ng / ml での IC₅₀; 図 19 - 22 及び 24 - 28 を参照のこと)。

50

【0223】

クローン13とは別に、一次ヒト細胞により測定される場合、IL-3活性を完全に遮断する二次モノクローナル抗体（クローンP8C11C8-6）は生成されている（図22及び32-36を参照のこと）。RA患者から得られた一次血液細胞に対する本発明の抗体の遮断能力は、図23に示される。

【0224】

実施例6 - 抗-IL-3抗体P3c11C8-6についてのエピトープマッピング

ELISAプレートを、PBS中、10 μ g/mlの濃度で、ヒトIL-3由来の種々のペプチドにより一晚、被覆した。PBS単独による被覆を、負の対照として使用した。洗浄し、PBS/1%BSA（ウシ血清アルブミン）により遮断した後、クローンP8C11C8-6（40 μ g/ml）を、室温で1時間、適用した。洗浄の後、結合されたP8C11C8-6抗体を、二次HRP-標識されたウサギ抗-マウスポリクローナル抗体及び色基質反応により検出した（図30を参照のこと）。

10

【0225】

アミノ酸残基の位置は、最初の27個のアミノ酸のシグナルペプチドを有さないヒトIL-3の位置に由来する。ヒトIL-3の配列は、受託番号NP__000579.2、バージョンGI:28416915としてGenBankに寄託される。

【0226】

IL3-1 (aa 1-27): APMTQTTP LKTSWVNC SNMIDE IITHL (配列番号2)

20

IL3-1A (aa 1-24、2つの突然変異に下線を引く): APMTQTTP LKTSW AK C SNMIDE I I (配列番号3)

IL3-1B (aa 1-24、2つの突然変異に下線を引く): APMTQTTP SL KTSWVNC SNMIDE I I (配列番号4)

IL3-2 (aa 22-48): E I I T H L K Q P P L P L L D F N N L N G E D Q D I L (配列番号1)

IL3-3 (aa 43-69): E D Q D I L M E N N L R R P N L E A F N R A V K S L Q (配列番号5)

IL3-4 (aa 64-90): A V K S L Q N A S A I E S I L K N L L P C L P L A T A (配列番号6)

30

IL3-5 (aa 85-111): L P L A T A A P T R H P I H I K D G D W N E F R R K L (配列番号7)

IL3-6 (aa 106-133): E F R R K L T F Y L K T L E N A Q A Q Q T T L S L A I F (配列番号8)

【0227】

ELISAプレートを、PBS中、5 μ g/mlの濃度で、ヒトIL-3由来の種々のペプチドにより一晚、被覆した。PBS単独による被覆を、負の対照として使用した。洗浄し、PBS/1%BSA（ウシ血清アルブミン）により遮断した後、クローンP8C11C8-6を、室温で1時間、適用した。洗浄の後、結合されたP8C11C8-6抗体を、二次HRP-標識されたウサギ抗-マウスポリクローナル抗体及び色基質反応により検出した。

40

【0228】

結果は、図30及び3Aに示される。

【0229】

実験を、以下のペプチドを用いて反復した。

IL3-2 (aa 22-48): E I I T H L K Q P P L P L L D F N N L N G E D Q D I L (配列番号1)

IL3-2a (aa 30-48): P P L P L L D F N N L N G E D Q D I L (配列番号9)

IL3-26 (aa 26-48): H L K Q P P L P L L D F N N L N G E D Q

50

D I L 配列番号 1 1)

I L 3 - 2 8 (a a 2 8 - 4 8) : K Q P P L P L L D F N N L N G E D Q D I L
(配列番号 1 2) 。

【 0 2 3 0 】

実験条件は、上記に詳細される通りであったが、但し、洗浄、及び P B S / 1 % B S A (ウシ血清アルブミン) による遮断の後、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ のクローン P 8 C 1 1 8 - 6 を室温で 1 時間、適用した。

【 0 2 3 1 】

結果は、図 3 1 B に示される。P 8 C 1 1 C 8 - 6 により認識されるエピトープは、a a 2 2 (E) ~ a a 4 8 (L) 内に含まれる。さらなる実験は、P 8 C 1 1 C 8 - 6 により認識されるエピトープが、配列番号 1 0 で定義されるアミノ酸配列のアミノ酸 2 6 (H) ~ 3 6 (D) 内に位置し、そして P 8 C 1 1 C 8 - 6 のエピトープがアミノ酸 2 7 ~ 2 9 (L K Q) を含むことを示唆した。

10

【 0 2 3 2 】

実施例 7 - クローン 1 3 とクローン P 3 C 1 1 C 8 - 6 との間の相互作用の分析

E L I S A ウェルを、P B S 中、ヒト I L - 3 ($0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$) により一晩、被覆した。洗浄、及び P B S / 1 % B S A (ウシ血清アルブミン) による遮断の後、標識されていない抗体クローン 1 3 又はクローン P 8 C 1 1 C 8 - 6 を、室温で 1 時間、種々の濃度で適用した。洗浄、又は標識されていない抗体の除去なしで、H R P - 標識された抗体クローン 1 3 ($0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$) を、室温で 1 時間、添加した。洗浄の後、色基質反応を、A B T S により行い、そして光学密度 (O D) を測定した。図 3 6 - 3 8 に示される結果からわかるように、クローン P 8 C 1 1 C 8 - 6 及びクローン 1 3 は、お互いと競争しない。クローン P 3 C 1 1 C 8 - 6 はまた、クローン 1 3 又はクローン 1 1 の I L - 3 への結合を妨げない (図 3 7 を参照のこと) 。

20

【 0 2 3 3 】

E L T S A を、抗体クローン 1 3 ($5 \mu\text{g} / \text{ml}$) により一晩、被覆した。I L - 3 ($1 \text{ ng} / \text{ml}$) を、種々の濃度のクローン 1 3 P 8 C 1 1 C 8 - 6 と共に 3 0 分間ブレインキュベートし、次に E L I S A プレートに適用し、そして室温で 1 時間インキュベートした。洗浄の後、結合された I L - 3 を、H R P - 標識された抗体クローン 1 1 (室温で 1 時間、 $0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$) により検出した。洗浄の後、色基質反応を T M B により実施し、そして光学密度 (O D) を測定した。

30

【 0 2 3 4 】

P 8 C 1 1 C 8 - 6 はまた、クローン 1 3 又はクローン 1 1 の I L - 3 への結合を妨げない (図 3 8 を参照のこと) 。

【 0 2 3 5 】

E L I S A ウェルを、P B S 中、ヒト I L - 3 ($0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$) により一晩、被覆した。洗浄、及び P B S / 1 % B S A (ウシ血清アルブミン) による遮断の後、標識されていない抗体クローン P 8 C 1 1 C 8 - 6、クローン 1 3 (A K 1 3) 又はクローン 1 1 (A K 1 1) を、室温で 1 時間、種々の濃度で適用した。洗浄、又は標識されていない抗体の除去なしで、H R P - 標識された抗体クローン 1 1 ($0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$)、H R P 標識された抗体クローン 1 3 ($0.4 \mu\text{g} / \text{ml}$) 又は H R P 標識された抗体クローン P 8 C 1 1 C 8 - 6 ($0.13 \mu\text{g} / \text{ml}$) を、室温で 1 時間、添加した。洗浄の後、色基質反応を、T M B により行い、そして光学密度 (O D) を測定した。

40

【 0 2 3 6 】

実施例 8 - ヒト好塩基球に対する E . コリ又は昆虫由来の I L - 3 の活性の評価

図 3 9 に示されるように、ヒト好塩基球に対する E . コリ又は昆虫細胞由来の I L - 3 の活性は同等である。昆虫細胞 (B i o l e g e n d) 又は E . コリ (P e p r o t e c h)、又は負の対照としての P B S において生成された種々の濃度の I L - 3 を、新鮮なヒト E D T A 血液に、3 7 で 1 時間、添加した。次に、細胞を、C D 1 1 b、C 2 0 3 c、C D 1 2 3 及び H L A - D R に対する、直接的に標識された抗体により、氷上で 2 0

50

分間、染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対するCD203cのアプレギュレーションを定量化した。

【0237】

図40に示されるように、種々の源からのIL-3の活性は、ヒト好塩基球とのバイオアッセイにおいて類似する。HER細胞(Biomol)、昆虫細胞(Biolegend)又はE・コリ(Peprotech)において生成されたヒトIL-3、及びE・コリにおいて発現されたアカゲザルIL-3を、種々の濃度で、新鮮なヒトEDTAと共に、37で1時間インキュベートした。次に、細胞を、CD203c、及びCD123に対する、直接的に標識された抗体により、氷上で20分間、染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対するCD203cのアプレギュレーションを定量化した。

10

【0238】

実施例9 - 抗 - ヒトIL-3抗体の遮断活性の評価

図41に示されるように、クローン11及びR&D mab203は単に、E・コリ由来の活性を遮断するが、しかし好塩基球によるアッセイにおける昆虫細胞由来のIL-3の活性は遮断しない。

【0239】

昆虫細胞(Biolegend)又はE・コリ(Peprotech)において生成されたIL-3(0.1ng/ml)を、種々の濃度の抗-IL-3抗体又はマウスIgG1アイソタイプ対照抗体(MOPC-21)と共に室温で45分間、ブレインキュベートし、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加した。PBSのみを、負の対照として、ヒトEDTA血液に添加した。37での1時間のインキュベーションの後、細胞を、CD11b、CD203c、CD123及びHLA-DRに対する、直接的に標識された抗体により、氷上で20分間、染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対するCD203cのアプレギュレーションを定量化した。負の対照(PBS)のCD203発現を差し引いた。

20

【0240】

図42に示されるように、クローン11及びR&D mab203は、好塩基球を用いたアッセイにおいて、E・コリ由来のIL-3の活性を単に遮断するが、しかし昆虫細胞由来のIL-3の活性は遮断しない。HEK細胞(Biomol)、昆虫細胞(Biolegend)又はE・コリ(Peprotech)において生成されたIL-3(0.1ng/ml又は0.2ng/ml)、又はE・コリ(Biomol)において発現されたアカゲザルIL-3を、種々の濃度の抗-IL-3抗体と共に室温で1時間ブレインキュベートし、そして新鮮なヒトEDTA血液に添加した。PBSのみを、負の対照としてヒトEDTA血液に添加した。37での1時間のインキュベーションの後、細胞を、CD203c及びCD123に対する、直接的に標識された抗体により、氷上で20分間、染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対するCD203cのアプレギュレーションを定量化した。

30

【0241】

図43に示されるように、クローン13及びP8C11C8-6は、RA患者からの一次T細胞により放出されるIL-3の生物活性を遮断し、そしてクローン11は、ほとんど阻害活性を有さない(RA患者からの抗-CD3活性化されたPBMCの細胞培養上清液中のIL-3:IL-3の濃度を、クローン13+クローン11-HRP及び標準としての昆虫細胞由来のIL-3を用いてのサンドイッチELISAにより測定した)。6人のRA患者からのPBMC(500,000/ウェル)を、10%FCSを含む、200µlのRPMI培地中、抗-CD3抗体(クローンOKT3、5µg/ml)により3日間、活性化した。上清液(SN)を、種々の希釈度で、新鮮なヒトEDTA血液に37で1時間、添加した。さらに、SNを、抗-IL-3抗体(10µg/ml、P8C11=P8C11C8-6、K13=クローン13、K11=クローン11)と共に室温で45分間ブレインキュベートし、そして新鮮なヒトEDTA血液に37で1時間、添加し

40

50

た。上清液中の I L - 3 濃度を、E L I S A により測定し、そして E D T A 血液中の S N 1 0 0 % の最終濃度を図に提供する。次に、細胞を、氷上で 2 0 分間、C D 1 1 b、C D 2 0 3 c、C D 1 2 3 及び H L A - D R に対する、直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対する C D 2 0 3 c のアップレギュレーションを定量化した。

【 0 2 4 2 】

図 4 4 に示されるように、クローン 1 3 及び P 8 C 1 1 C 8 - 6 は、ヒト P B M C により生成される I L - 3 の生物活性を遮断し、そしてクローン及び R & D m a b 2 0 3 はほとんど阻害活性を有さない。R A 患者からの P B M (5 0 0 , 0 0 0 / ウェル) を、1 0 % F C S を含む 2 0 0 μ l の P R M I 培地中、抗 - C D 3 抗体 (クローン O K T 3、5 μ g / m l) により 3 日間、活性化した。上清液 (P B M C - S N) を、1 7 5 p g / m l の I L - 3 を含む希釈度 (P 8 C 1 1 C 8 - 6 + クローン 1 3 - H R P を用いての E L I S A により測定された) で使用した。P B M C - S N を、種々の濃度の種々の抗 - I L - 3 抗体と共に室温で 1 時間ブレインキュベートし、そして新鮮なヒト E D T A 血液に、3 7 で 1 時間添加した。次に、細胞を、氷上で 2 0 分間、C D 2 0 3 c 及び C D 1 2 3 に対する、直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対する C D 2 0 3 c のアップレギュレーションを定量化した。

10

【 0 2 4 3 】

図 4 5 に示されるように、クローン 1 1 及び R & D m a b 2 0 3 は単に、T F - 1 アッセイにおいて、E . コリ由来の I L - 3 の活性を遮断するが、しかし昆虫細胞由来の I L - 3 の活性は遮断しない。昆虫細胞 (B i o l e g e n d) 又は (P e p r o t e c h) において生成された I L - 3 (2 . 5 n g / m l) を、種々の濃度の抗 - I L - 3 抗体又はマウス I g G アイソタイプ対照抗体 (M O P C - 2 1) と共に、室温で 6 0 分間ブレインキュベートし、そして 5 日間の培養の間、1 0 , 0 0 0 の T F - 1 細胞に添加した。生存細胞の数を、M T T アッセイ (L C G 標準 - A T C C) を用いて定量化した。I L - 3 の不在下での T F - 1 細胞増殖を差し引いて、そして結果は、陽性対照 (抗体を含まない 2 . 5 n g / m l の I L - 3) の % として示される。

20

【 0 2 4 4 】

図 4 6 に示されるように、T F - 1 細胞アッセイにおいて、クローン 1 1 及び R & D m a b 2 0 3 は単に E . コリ由来の I L - 3 の活性を遮断するが、しかし、昆虫細胞又は H E K 2 0 3 細胞からの I L - 3 の活性は遮断せず ; そしてアカゲザル I L - 3 はそれらの抗体によっては遮断されない。ヒト H E K 2 9 3 細胞 (B i o m o l)、昆虫細胞 (B i o l e g e n d) 又は E . コリ (R e p r o t e c h) において生成されたヒト I L - 3 (2 . 5 n g / m l)、又は E . コリ (B i o m o l) において生成されたアカゲザル I L - 3 を、種々の濃度の抗 - I L - 3 抗体と共に、室温で 6 0 分間ブレインキュベートし、そして 5 0 分間の培養の間、1 0 , 0 0 0 T F - 1 細胞に添加した。生存細胞を、M T T アッセイ (L C G 標準 - A T C C) により定量化し、そして O D 値が示される。

30

【 0 2 4 5 】

実施例 1 0 - サンドイッチ E L I S A による I L - 3 検出

40

図 4 7 A - C に示されるように、種々の供給源からの I L - 3 がサンドイッチ E L I S A により検出され、そしてクローン 1 3 + P 8 C 1 1 C 8 - 6 の対のみが H E K 2 9 3 細胞において発現された I L - 3 を検出する。

【 0 2 4 6 】

E L I S A ウェルを、P B S 中、異なる I L - 3 抗体 (5 μ g / m l) により一晚、被覆した。ウェルを P B S / T w e e n 2 0 により洗浄し、そして R T で 2 時間、P B S / 1 % B S A により遮断した。次に、H E K 2 9 3 細胞 (B i o m o l)、昆虫細胞 (B i o l e g e n d) 又は E . コリ (P e p r o t e c h) において生成された I L - 3 を、P B S / 1 % B S A に希釈された種々の濃度で適用した。P B S / T w e e n 2 0 により洗浄した後、異なる H R P - 標識された検出 - 抗体 (0 . 4 μ g / m l) を、P B S / B

50

S A に R T で 1 時間、添加した。

【 0 2 4 7 】

P B S / T w e e n 2 0 による洗浄の後、H R P 標識されたクローン 1 3 (0 . 4 μ g / m l) を、検出抗体として使用し、そして P B S / B S A に R T で 1 時間、添加した。その結果は、図 4 7 B に示される。

【 0 2 4 8 】

P B S / T w e e n 2 0 による洗浄の後、H R P 標識された P 8 C 1 1 C 8 - 6 (0 . 1 μ g / m l) を、検出抗体として使用し、そして P B S / B S A に R T で 1 時間、添加した。その結果は、図 4 7 C に示される。

【 0 2 4 9 】

洗浄の後、色の反応を、T M B 基質を用いて実施し、そして光学密度を測定した。バックグラウンド値 (I L - 3 の不在下で測定される O D 値) を差し引いた。

【 0 2 5 0 】

図 4 8 に示されるように、種々の供給源からの I L - 3 を、2 つの異なるサンドイッチ E L I S A により検出できる。

【 0 2 5 1 】

E L I S A ウェルを、P B S 中、異なる I L - 3 抗体 (5 μ g / m l でのクローン 1 3 又は P 8 C 1 1 C 8 - 6) により一晚、被覆した。ウェルを P B S / T w e e n 2 0 により洗浄し、そして P B S / 1 % B S A により R T で 2 時間、遮断した。次に、H E K 2 9 3 細胞 (B i o m o l) 又は昆虫細胞 (B i o l e g e n d) において生成された I L - 3 を、P B S / 1 % B S A により希釈された種々の濃度で適用した。P B S / T w e e n 2 0 による洗浄の後、異なる H R P - 標識された検出抗体 (0 . 4 μ g / m l でのクローン 1 1 - H R P 又はクローン 1 3 - H R P) を、P B S / B S A に R T で 1 時間、添加した。洗浄の後、色反応を T M B 基質を用いて実施し、そして光学密度を測定した。バックグラウンド値 (I L - 3 の不在下で測定される O D 値) を差し引いた。

【 0 2 5 2 】

図 4 9 に示されるように、ヒト P B M C により生成された I L - 3 を、2 つの異なるサンドイッチ E L I S A を用いて検出することができる。

【 0 2 5 3 】

9 人の R A 患者からの P B M C (5 0 0 , 0 0 0 / ウェル) を、1 0 % F C S を含む 2 0 0 μ l の R P M I 培地中、抗 - C D 3 抗体 (クローン O K T 3 , 5 μ g / m l) により 3 日間、活性化した。上清液 (S N) を除いた。E L I S A ウェルを、P B S 中、異なる I L - 3 抗体 (5 μ g / m l) により一晚、被覆した。ウェルを、P B S / T w e e n 2 0 により洗浄し、そして P B S / 1 % B S A により R T で 2 時間、遮断した。上清液 (S N) を、P B S / 1 % B S A に希釈された種々の濃度で適用した。P B S / T w e e n 2 0 による洗浄の後、異なる H R P - 標識された検出抗体 (0 . 4 μ g / m l でのクローン 1 1 - H R P 又はクローン 1 3 - H R P) を、P B S / B S A に R T で 1 時間、添加した。洗浄の後、色反応を T M B 基質を用いて実施し、そして光学密度を測定した。バックグラウンド値 (I L - 3 の不在下で測定される O D 値) を差し引いた。

【 0 2 5 4 】

図 5 0 は、種々の供給源からの I L - 3 の検出のためのヒト好塩基球を用いてのバイオアッセイの結果を示す。

【 0 2 5 5 】

昆虫細胞 (B i o l e g e n d) 又は H E K 細胞 (B i o m o l) において生成された種々の濃度の I L - 3 を、新鮮なヒト E D T A 血液に 3 7 で 1 時間、添加した。次に、細胞を、氷上で 2 0 分間、C D 2 0 3 c 及び C D 1 2 3 に対する、直接的に標識された抗体により染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析し、好塩基球を同定し、そして好塩基球に対する C D 2 0 3 c のアップレギュレーションを定量化した。

【 0 2 5 6 】

図 5 1 は、E L I S A 及びバイオアッセイによる、ヒト P B M C 由来の I L - 3 の定量

10

20

30

40

50

化を示し、そして E L I S A (P 3 C 1 1 C 8 - 6 + クロ ー ン 1 3 - H R P) による I L - 3 の定量化が、ヒト P B M C 由来の I L - 3 の生物活性と非常に良く相関することを示す。アッセイを、対応する図に示される標準曲線を用いて、上記のようにして行った。昆虫細胞由来の I L - 3 を、標準として使用した。

【 0 2 5 7 】

【 表 2 】

Ausdruck (Original in elektronischem Format)

(Dieses Blatt zählt nicht als Blatt der internationalen Anmeldung und ist nicht Teil derselben)

0-1	Formular PCT/RO/134 Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material		
0-1-1	Erstellt mit	PCT Online Filing Version 3.5.000.250e MT/FOP 20141031/0.20.5.20	10
0-2	Internationales Aktenzeichen		
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	UNR161101PCT	
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist		20
1-1	Seite	11	
1-2	Zeile	16	
1-3	Angaben betr. Hinterlegung		
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)	
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany	
1-3-3	Datum der Hinterlegung	14. März 2012 (14.03.2012)	
1-3-4	Eingangsnummer	DSM ACC3163	
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	Alle Bestimmungsstaaten	30
2	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist		
2-1	Seite	11	
2-2	Zeile	26	
2-3	Angaben betr. Hinterlegung		
2-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)	
2-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany	40
2-3-3	Datum der Hinterlegung	14. März 2012 (14.03.2012)	
2-3-4	Eingangsnummer	DSM ACC3164	
2-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	Alle Bestimmungsstaaten	

【表 3】

Ausdruck (Original in elektronischem Format)
(Dieses Blatt zählt nicht als Blatt der internationalen Anmeldung und ist nicht Teil derselben)

3	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
3-1	Seite	20
3-2	Zeile	17
3-3	Angaben betr. Hinterlegung	
3-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
3-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany
3-3-3	Datum der Hinterlegung	07. Oktober 2015 (07.10.2015)
3-3-4	Eingangsnummer	DSM ACC3281
3-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	Alle Bestimmungsstaaten

10

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	ja
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	Kuiper-Cristina, Nathalie

20

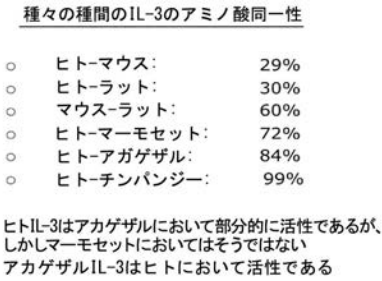
VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

30

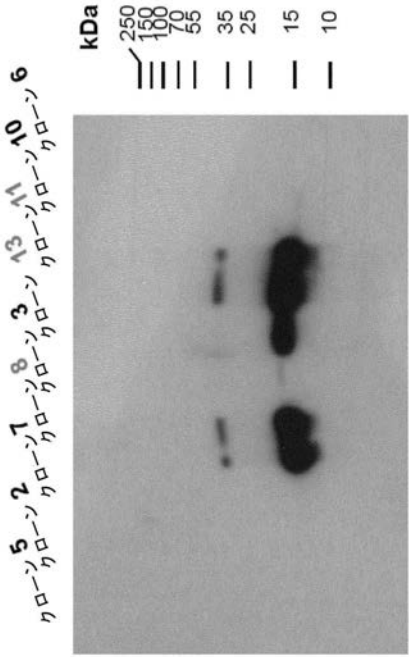
【 図 1 】

Fig. 1



【 図 2 】

il-3に対するmAbを用いてのウェスタンブロット



各レーン: 1 μ g/mlの粗換えhIL-3
還元(β -ME)及び変性条件(SDS)

Fig. 2

【 図 3 】

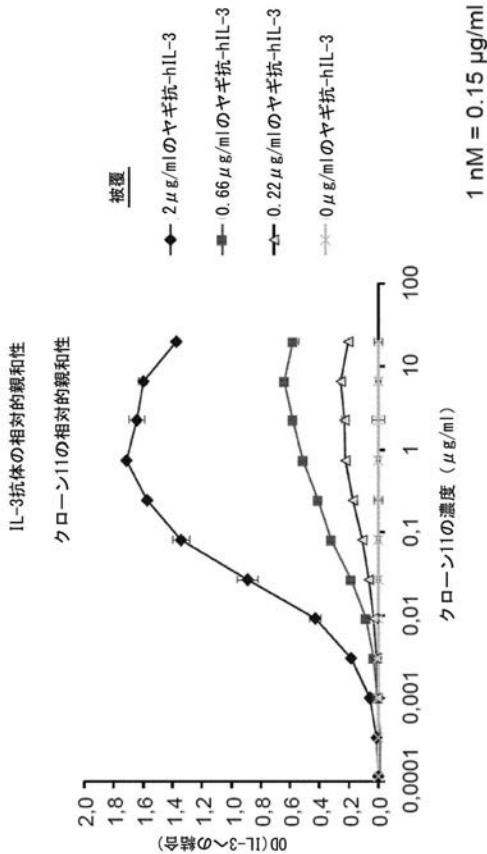


Fig. 3

【 図 4 】

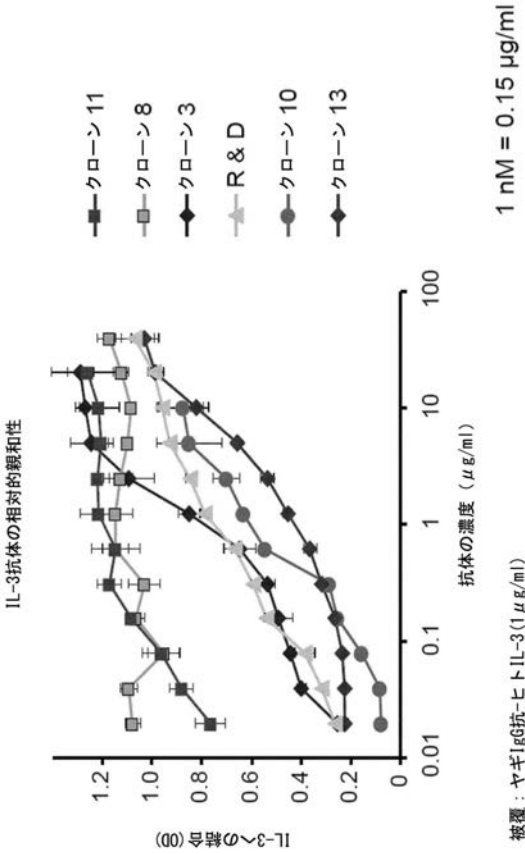
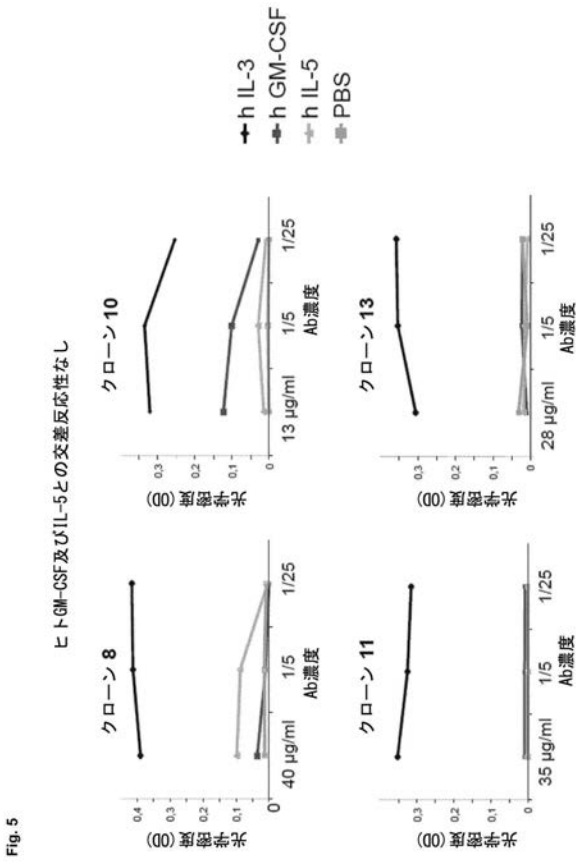
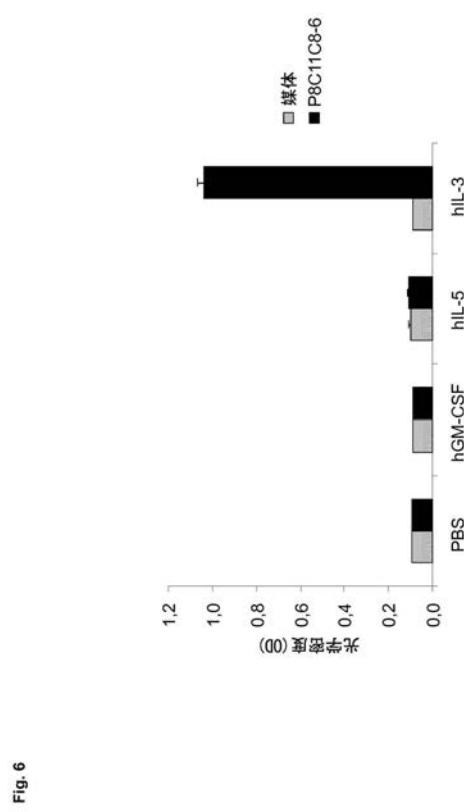


Fig. 4

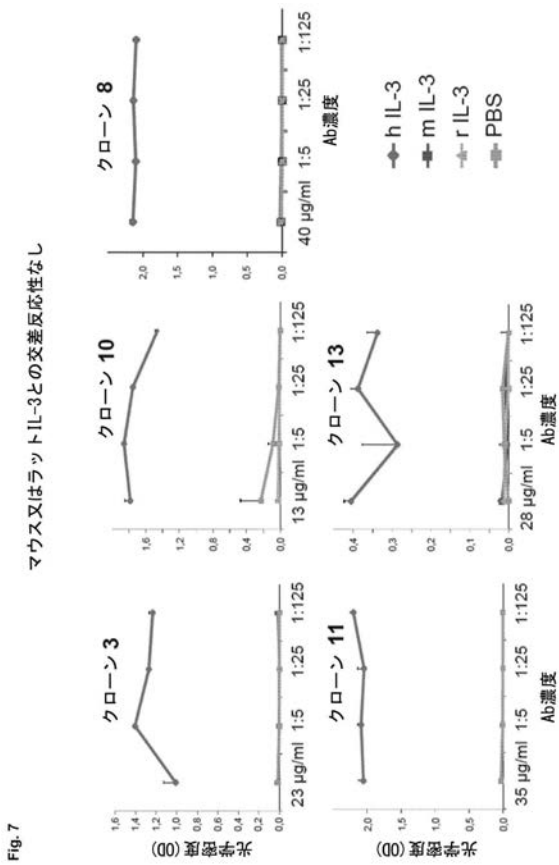
【 図 5 】



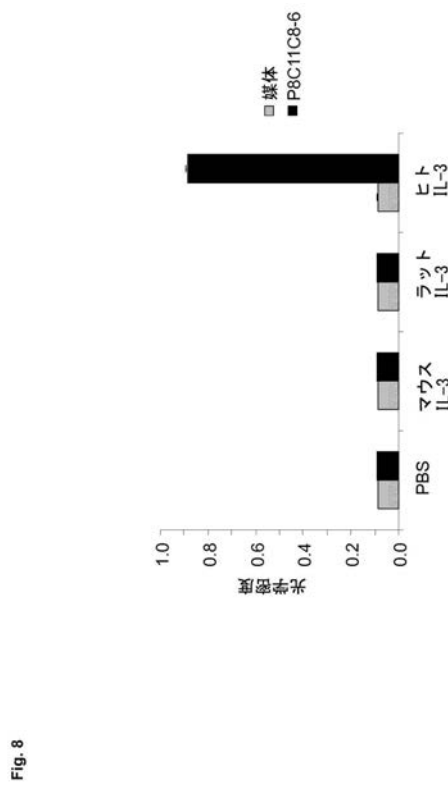
【 図 6 】



【 図 7 】

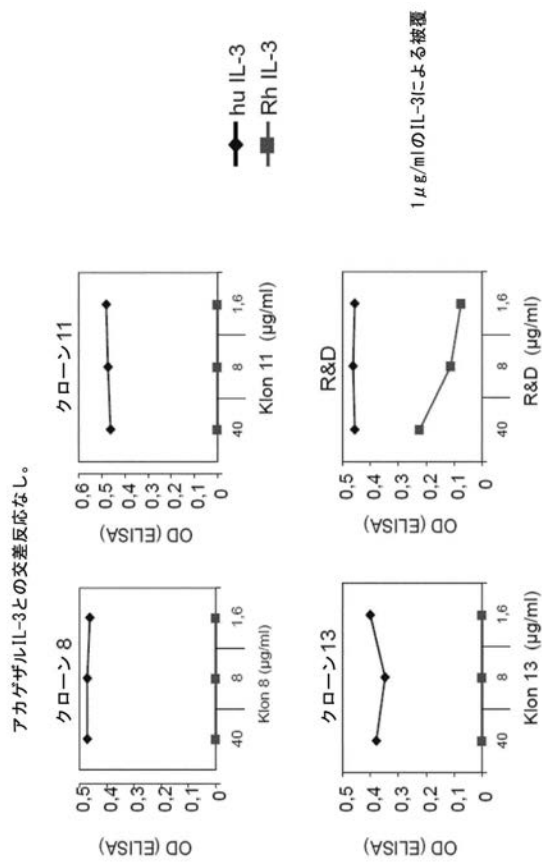


【 図 8 】



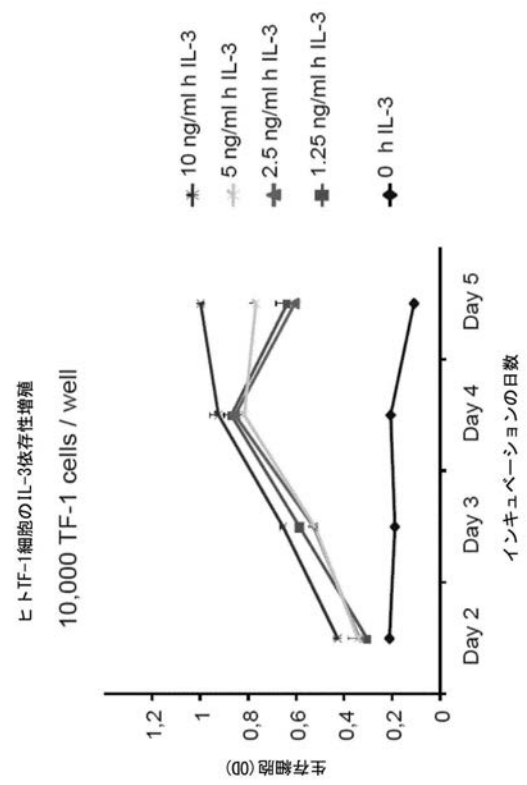
【 図 9 】

Fig. 9



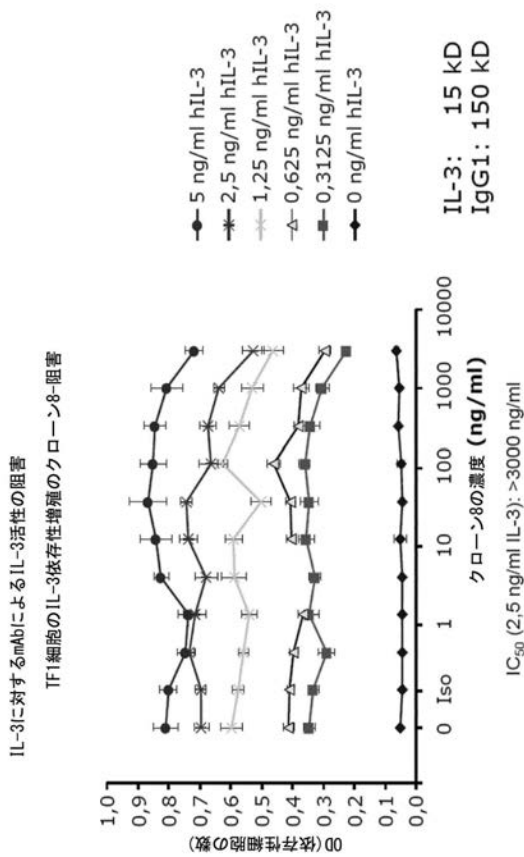
【 図 10 】

Fig. 10



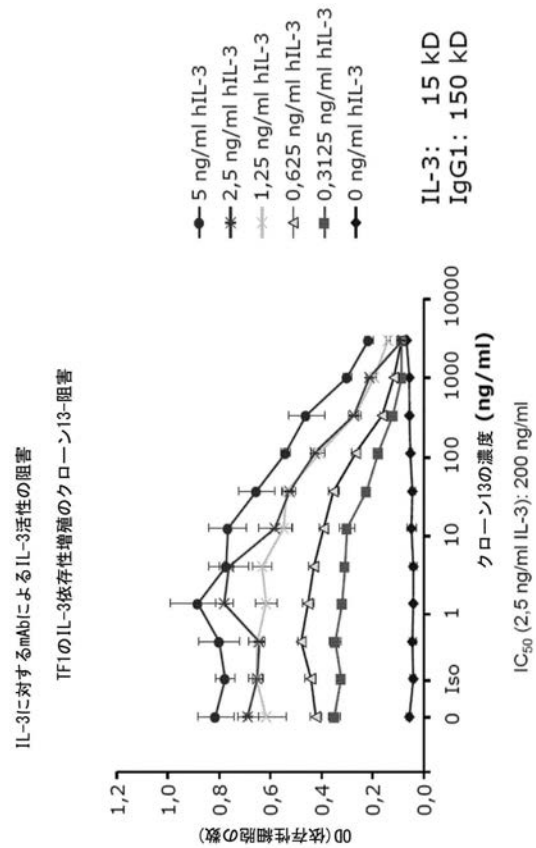
【 図 11 】

Fig. 11



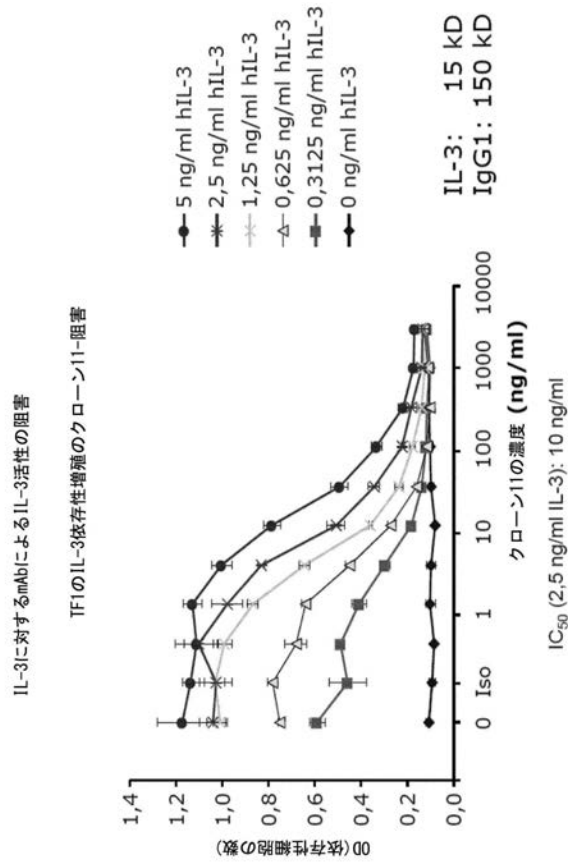
【 図 12 】

Fig. 12



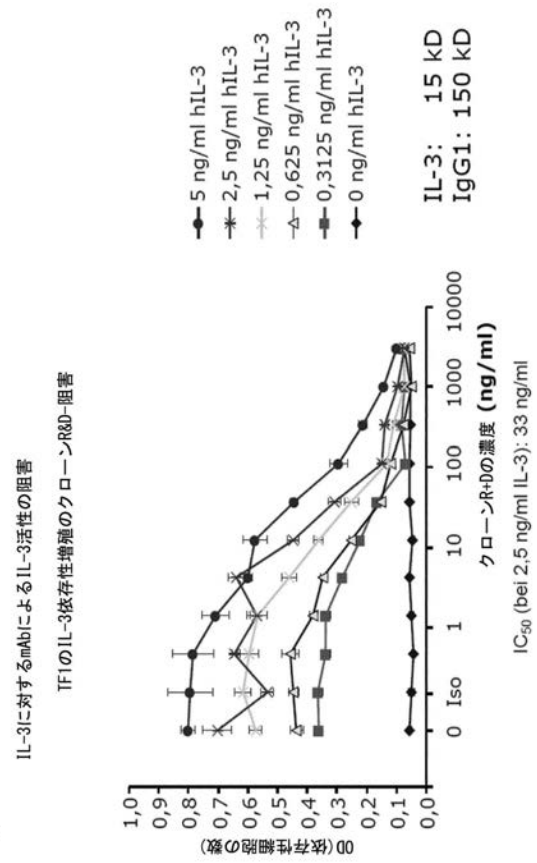
【 図 1 3 】

Fig. 13



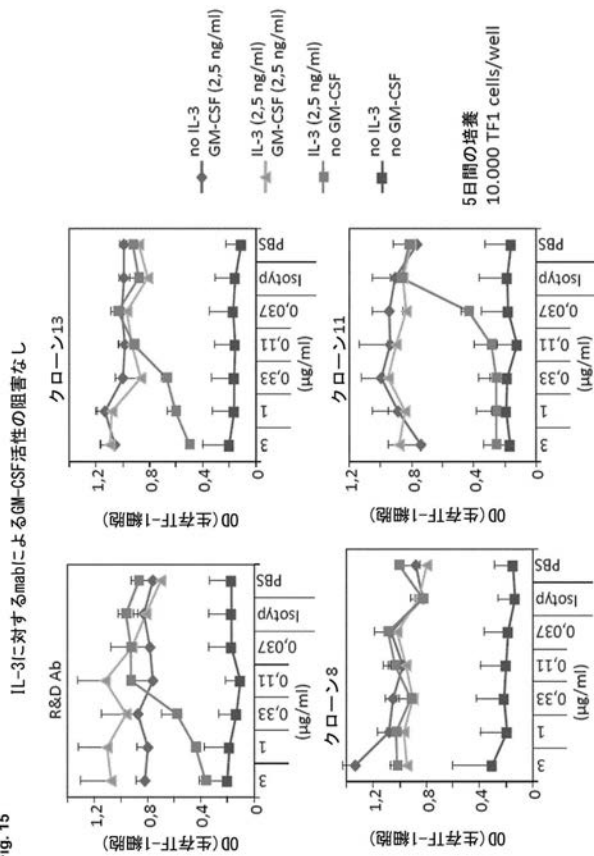
【 図 1 4 】

Fig. 14



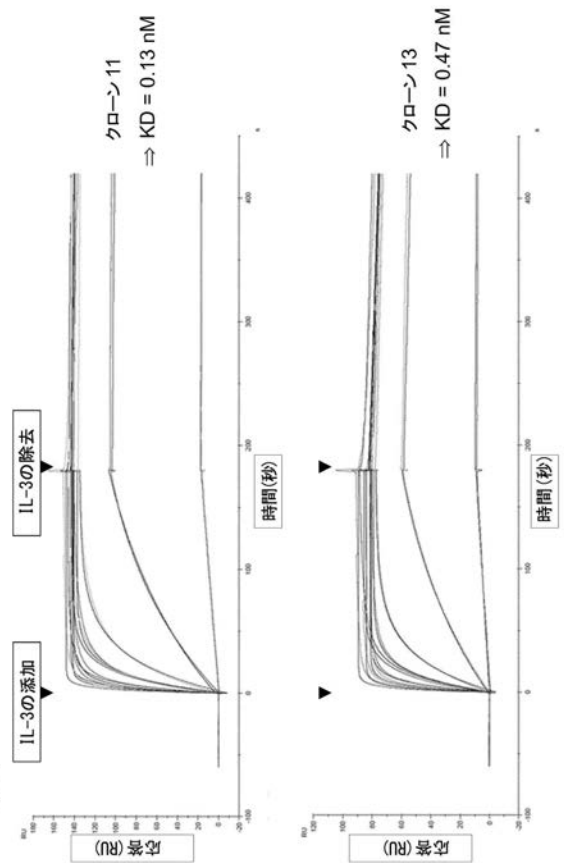
【 図 1 5 】

Fig. 15



【 図 1 6 】

Fig. 16



【 図 2 1 】

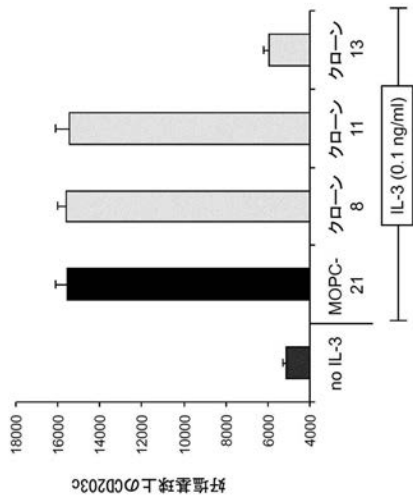


Fig. 21

【 図 2 2 】

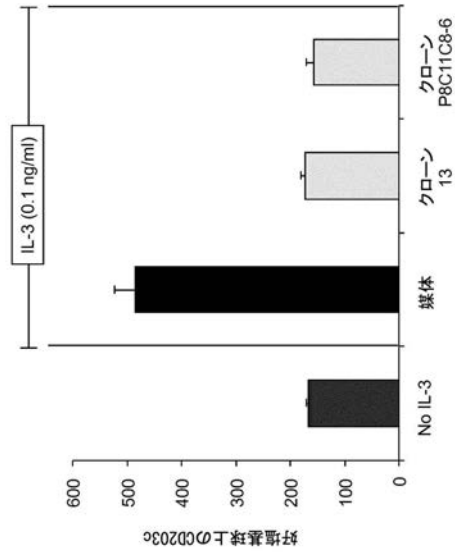


Fig. 22

【 図 2 3 】

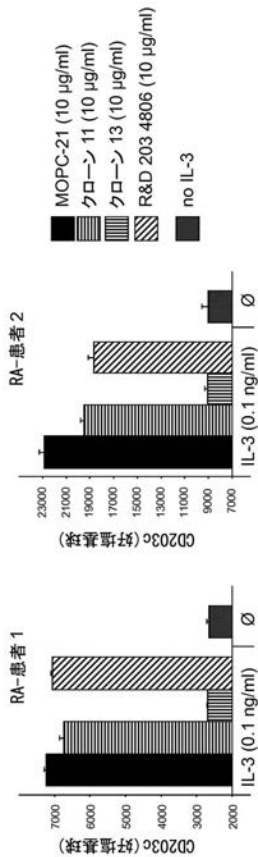


Fig. 23

【 図 2 4 】

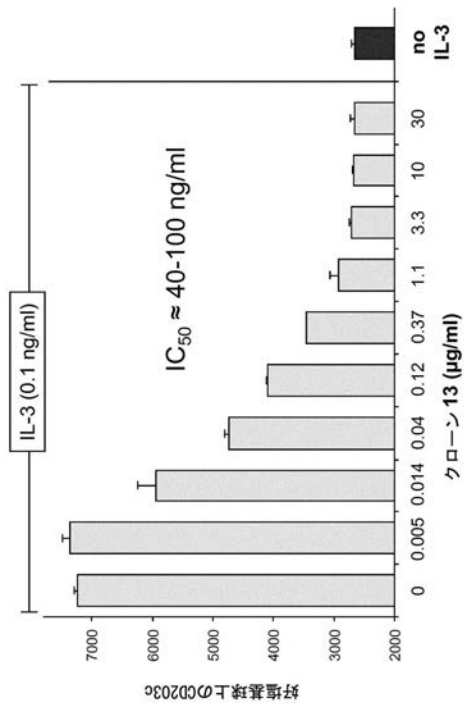
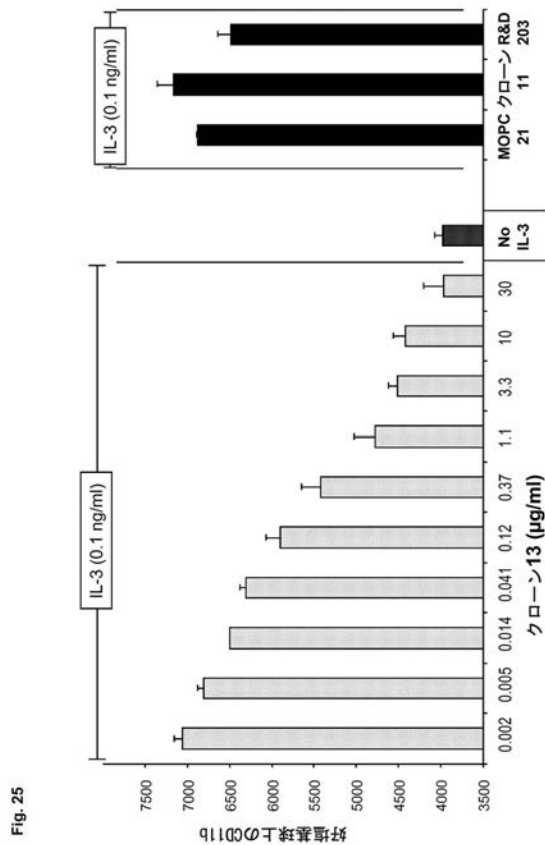
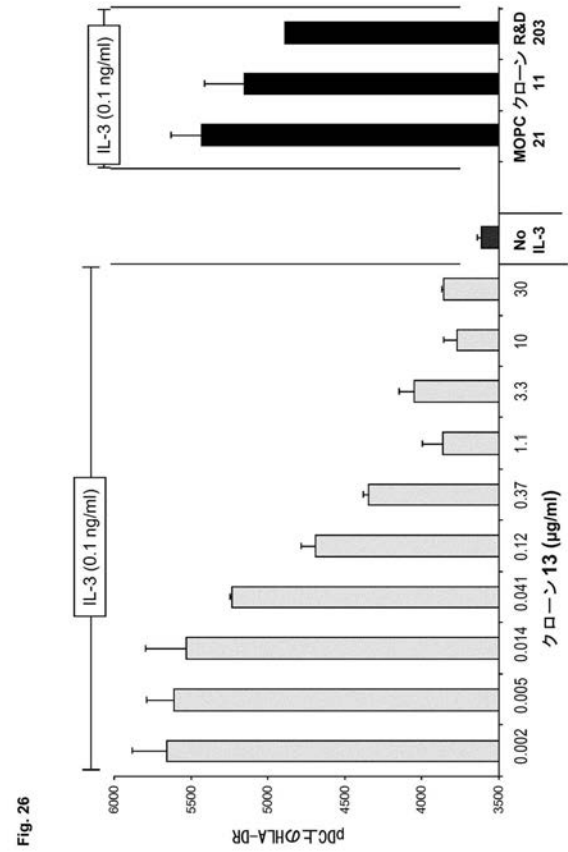


Fig. 24

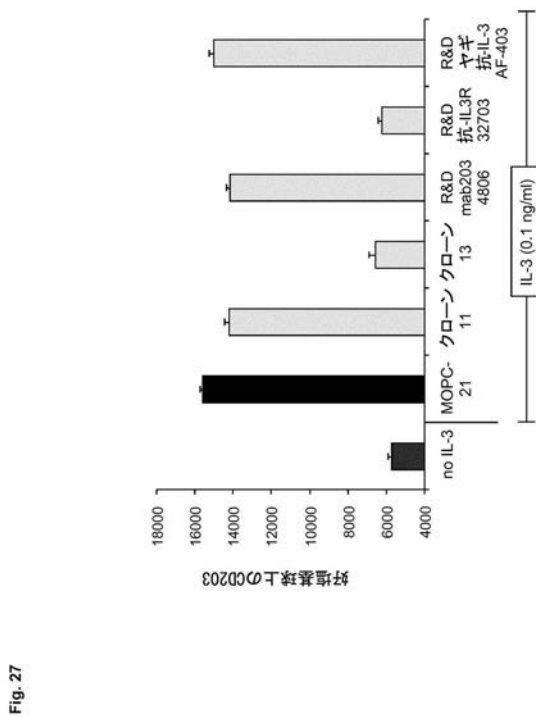
【図 25】



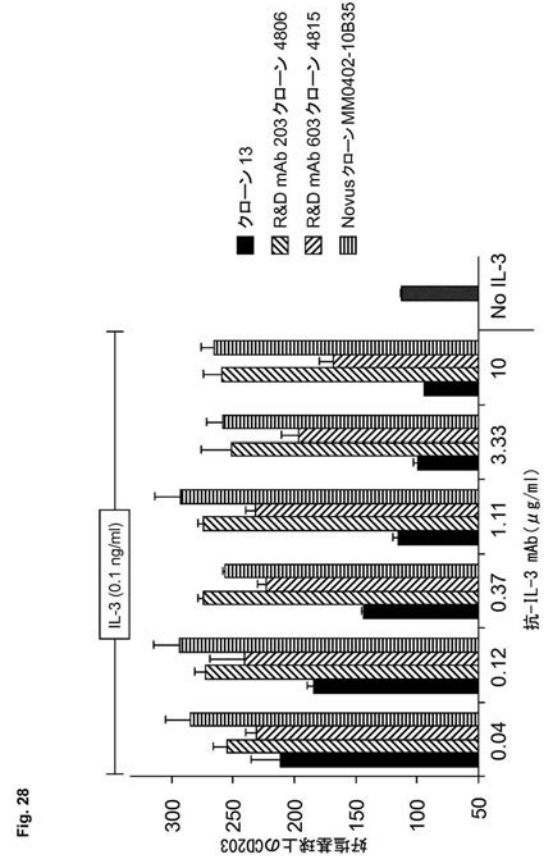
【図 26】



【図 27】



【図 28】



【図 29】

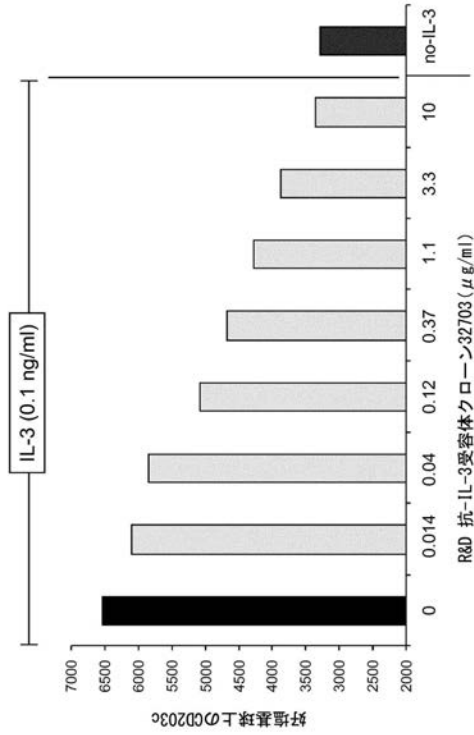


Fig. 29

【図 31】

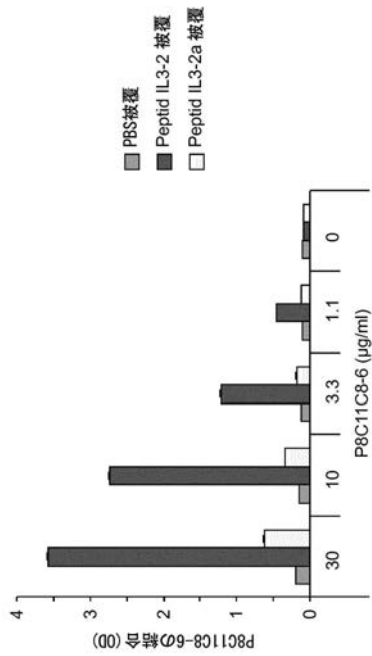


Fig. 31

【図 30】

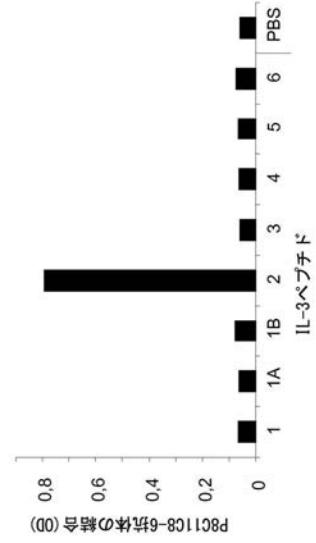


Fig. 30

【図 32】

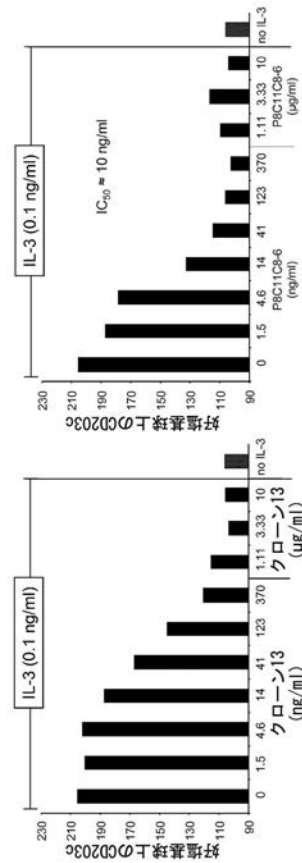


Fig. 32

【 図 3 3 】

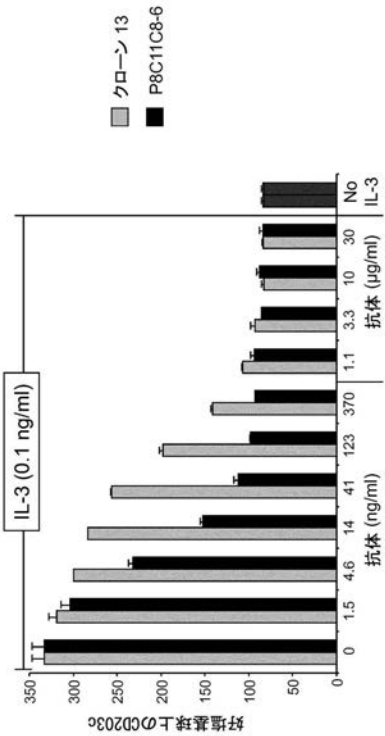


Fig. 33

【 図 3 5 】

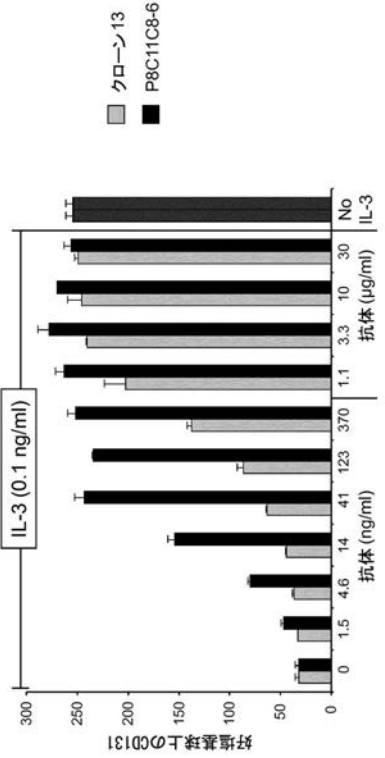


Fig. 35

【 図 3 4 】

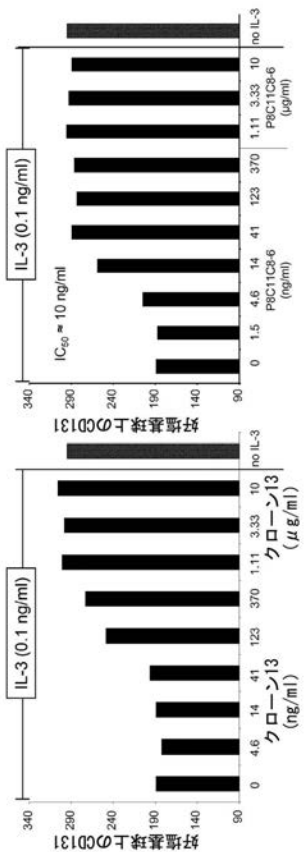


Fig. 34

【 図 3 6 】

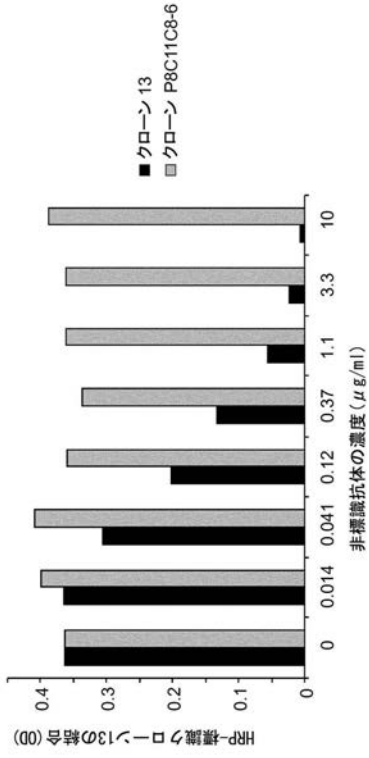


Fig. 36

【図 37】

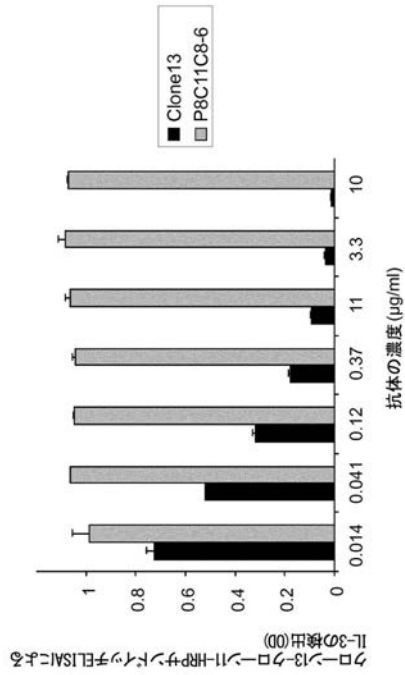


Fig. 37

【図 39】

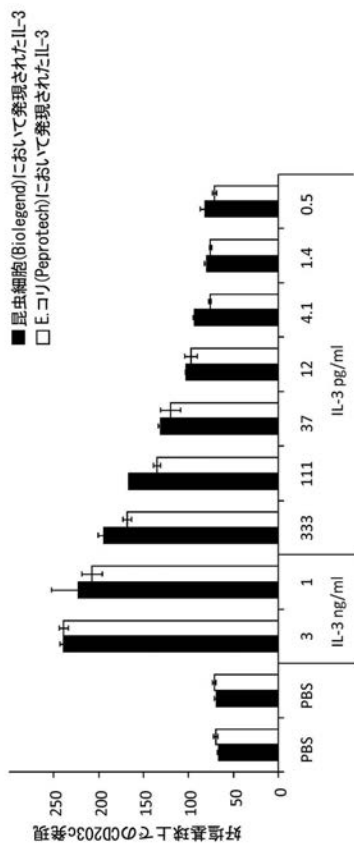


Fig. 39

【図 38】

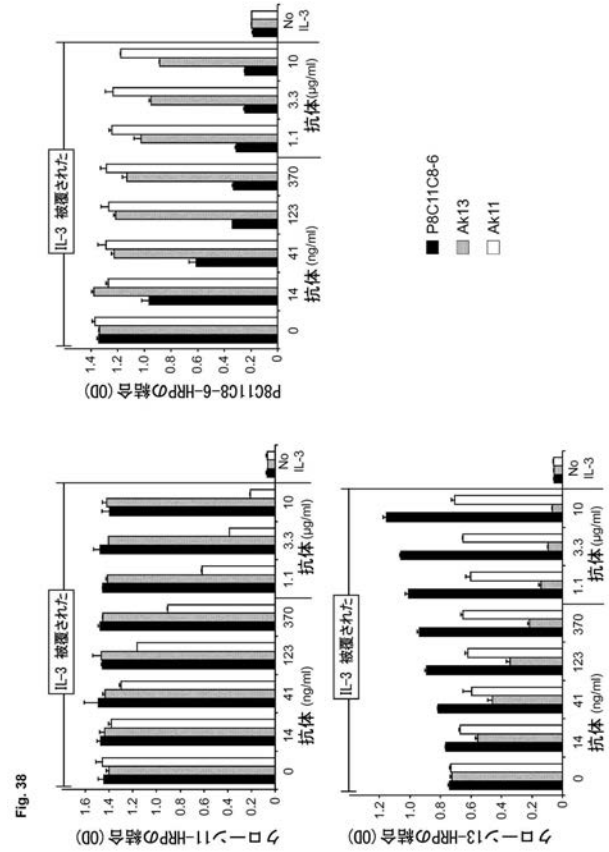


Fig. 38

【図 40】

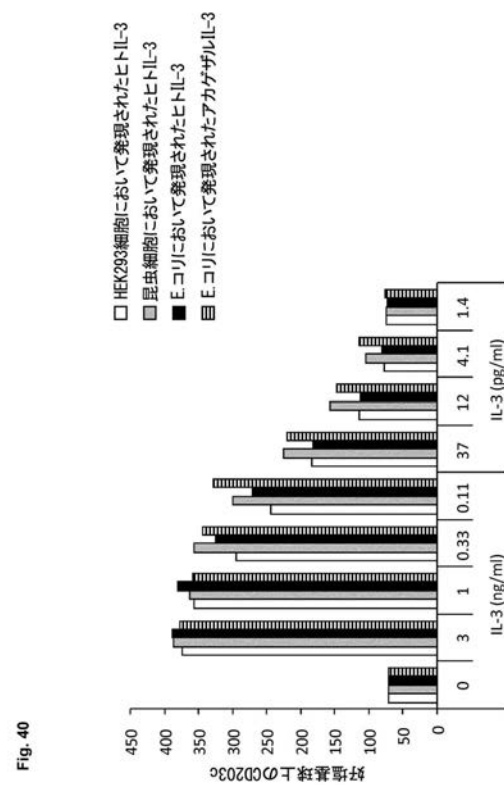
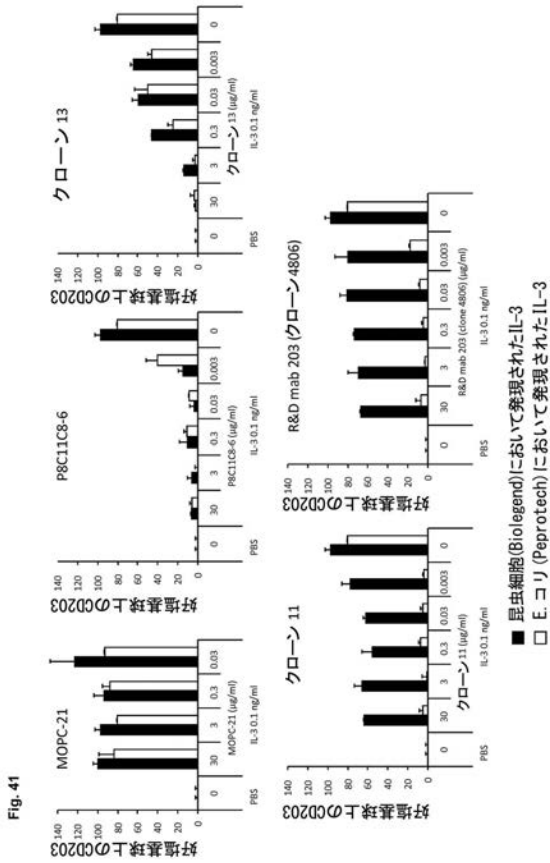
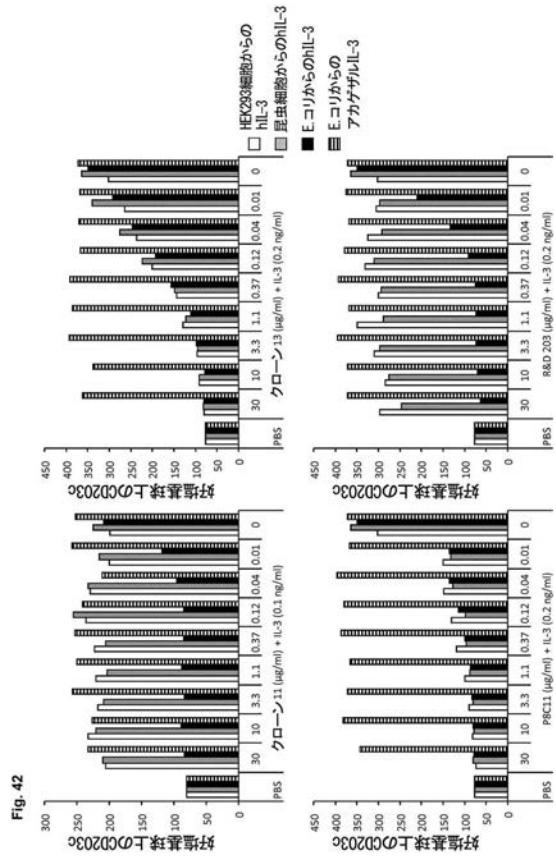


Fig. 40

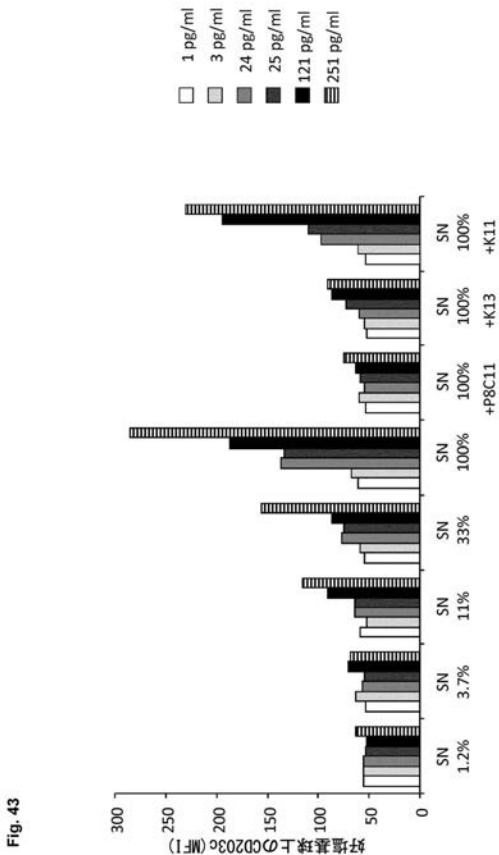
【 図 4 1 】



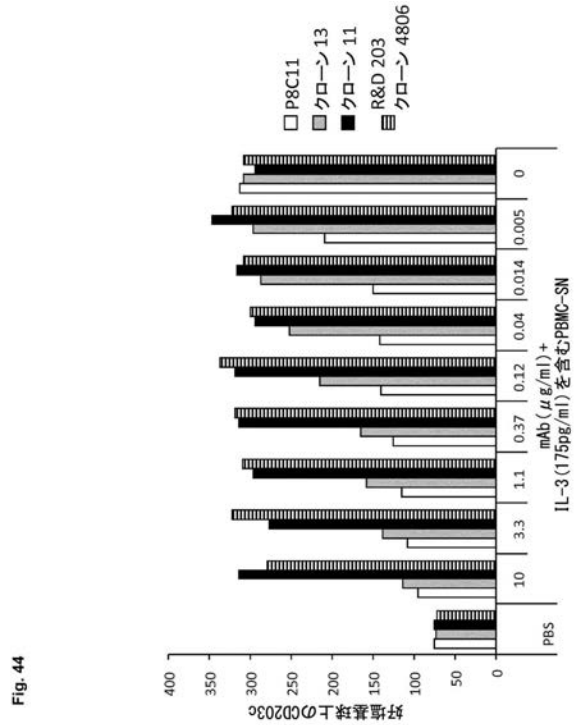
【 図 4 2 】



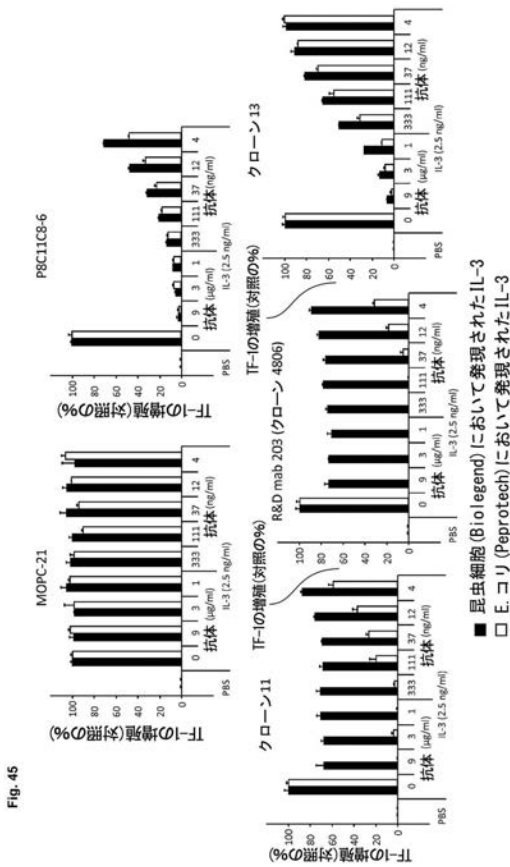
【 図 4 3 】



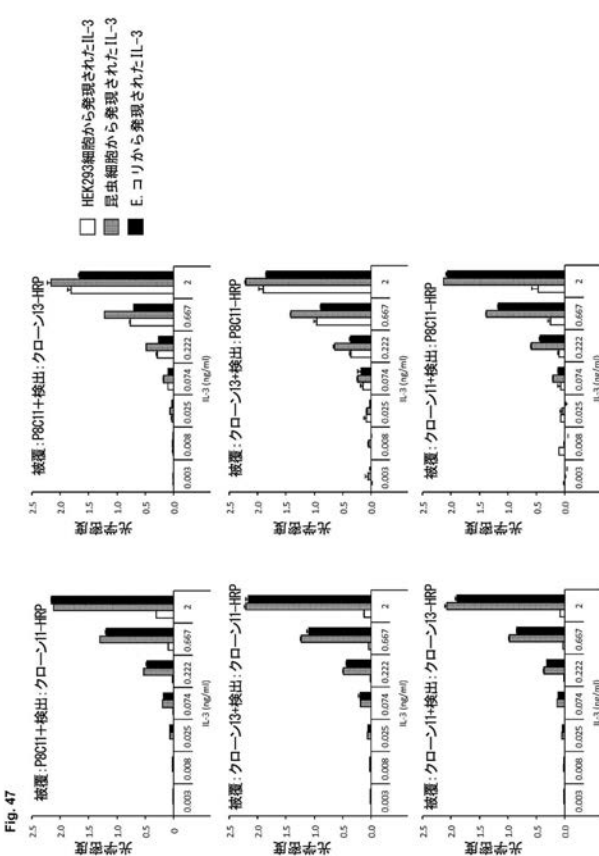
【 図 4 4 】



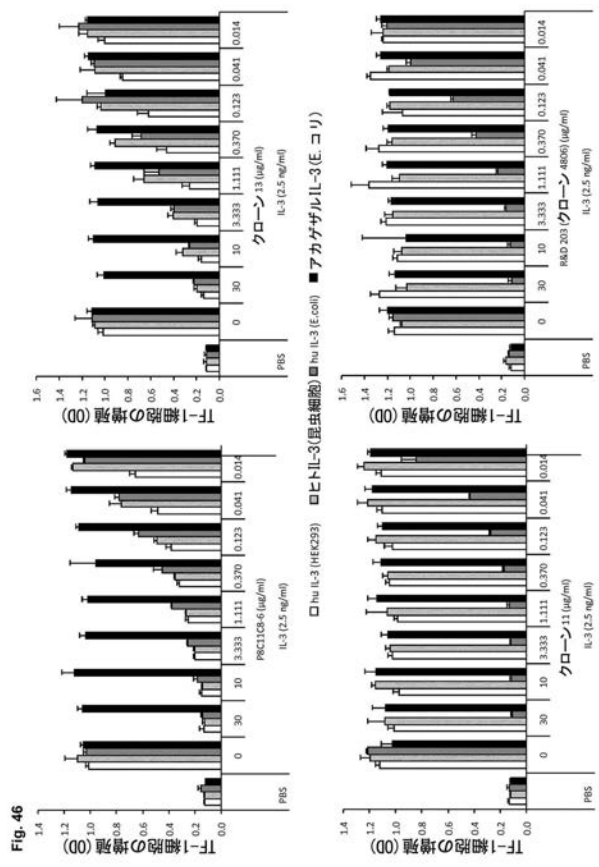
【図 45】



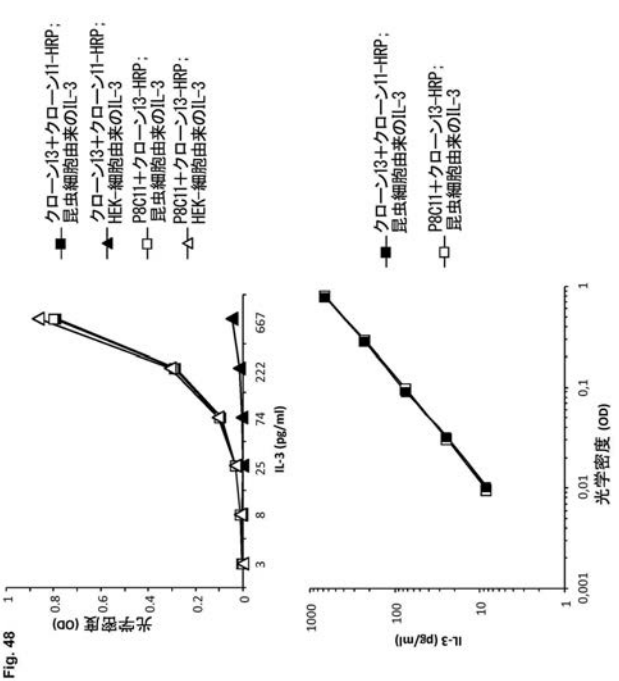
【図 47】



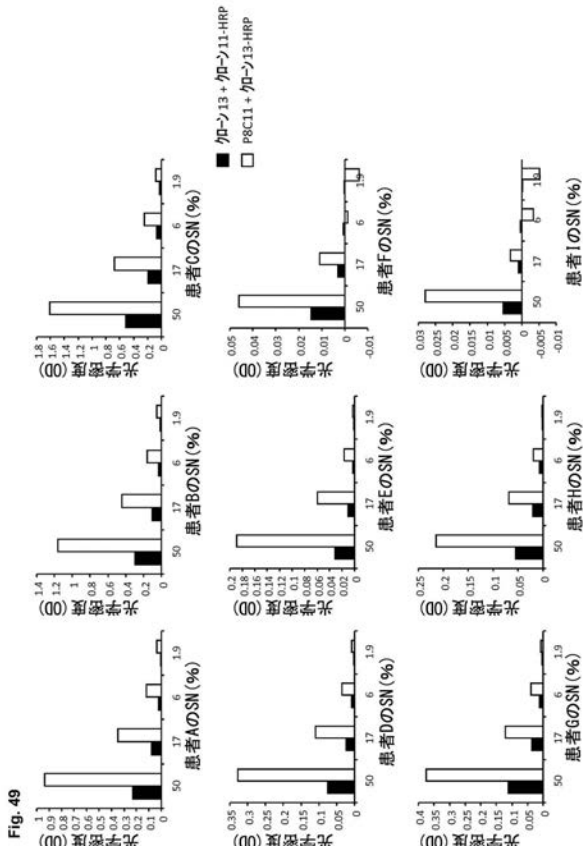
【図 46】



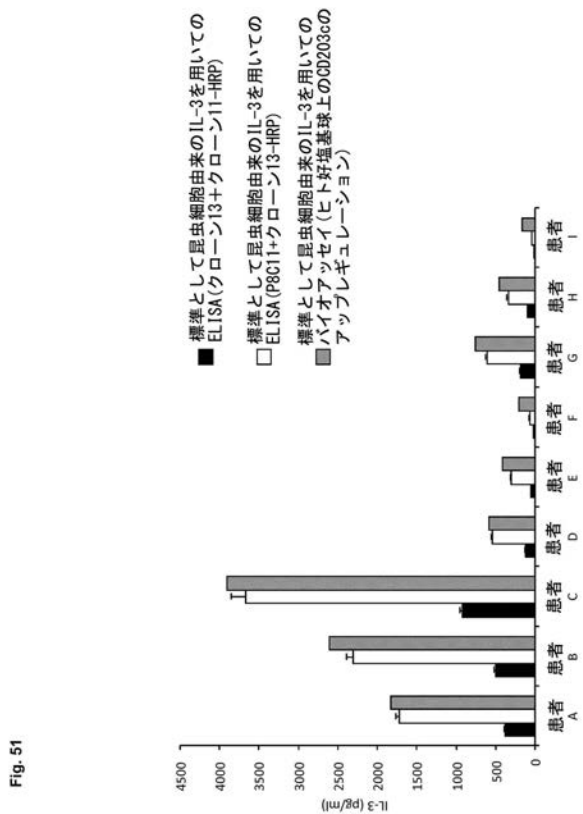
【図 48】



【 図 4 9 】

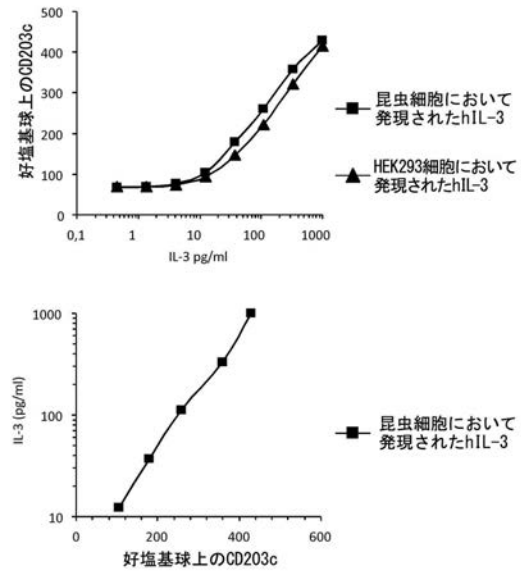


【 図 5 1 】

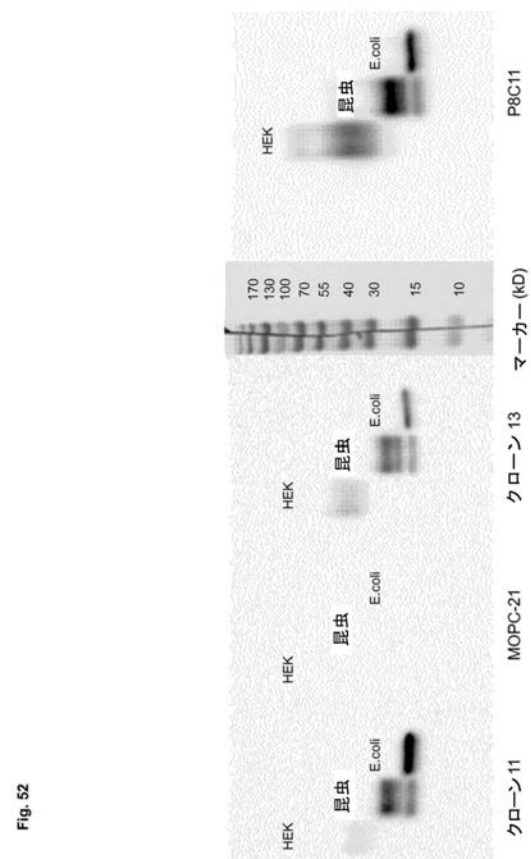


【 図 5 0 】

Fig. 50



【 ㊦ 5 2 】



【配列表】

2019507102000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/077371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/24 G01N33/68
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 G01N

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	WO 2015/063228 A1 (UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG [DE]) 7 May 2015 (2015-05-07) the whole document see in particular pages 31/32 -----	1-9, 14, 15
X	WO 2013/178707 A1 (UNIVERSITAETSKLINIKUM REGENSBURG [DE]) 5 December 2013 (2013-12-05) the whole document see in particular abstract; Ex. 1, claims 1-14 *	1-9, 14, 15
X	WO 2013/178706 A1 (UNIVERSITAETSKLINIKUM REGENSBURG [DE]) 5 December 2013 (2013-12-05) the whole document pages 18/19, Fig. 10-17; Ex. 5, 6 ----- -/--	1-15

☒ 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

15 May 2017

Date of mailing of the international search report

22/05/2017

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Sirim, Pinar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/077371

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANONYMOUS ED - ANONYMOUS: "Human IL-3 Antibody", INTERNET CITATION, 1 January 2011 (2011-01-01), page 1, XP002679305, Retrieved from the Internet: URL:http://www.rndsystems.com/pdf/mab603.pdf [retrieved on 2012-07-04] the whole document -----	1-9,14, 15
A	R&D SYSTEMS: "Human IL-3 polyclonal goat IgG AF-203-NA", INTERNET CITATION, 1 January 2011 (2011-01-01), page 1, XP002685916, Retrieved from the Internet: URL:http://www.rndsystems.com/pdf/af203na.pdf [retrieved on 2012-10-24] the whole document -----	1-9,14, 15
A	HERMANN J ZILTENER ET AL: "Multiple Glycosylated Forms of T Cell-derived Interleukin 3 (IL-3); HETEROGENEITY OF IL-3 FROM PHYSIOLOGICAL AND NONPHYSIOLOGICAL SOURCES", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 263, 5 October 1988 (1988-10-05), pages 14511-14517, XP055320596, the whole document -----	1-15
X	TOMLINSON JONES A ET AL: "ENHANCEMENT OF THE BIOLOGIC EFFECTS OF INTERLEUKIN-3 IN VIVO BY ANTI-INTERLEUKIN-3 ANTIBODIES", BLOOD, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 82, no. 4, 15 August 1993 (1993-08-15), pages 1133-1141, XP000877365, ISSN: 0006-4971 the whole document * see in particular abstract; Fig. 1 * ----- -/--	10-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/077371

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P. D. EMANUEL ET AL: "Specific inhibition of interleukin 3 bioactivity by a monoclonal antibody reactive with hematopoietic progenitor cells.", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 87, no. 12, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 4449-4452, XP055371546, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.87.12.4449 the whole document * see in particular abstract; Fig. 1-3 -----	10-13
X	Js Abrams ET AL: "Development of rat anti-mouse interleukin 3 monoclonal antibodies which neutralize bioactivity in vitro", The Journal of Immunology, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 131-137, XP055371545, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL: http://www.jimmunol.org/content/140/1/131.full-text.pdf [retrieved on 2017-05-11] the whole document * see in particular abstract; Fig. 2, 4, 5; pages 132-133; page 135, paragraph 3 * -----	10-13
A	A.W. HAUSWIRTH ET AL: "Interleukin-3 Promotes the Expression of E-NPP3/CD203C on Human Blood Basophils in Healthy Subjects and in Patients with Birch Pollen Allergy", INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY, vol. 20, no. 2, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 267-278, XP055371941, GB ISSN: 0394-6320, DOI: 10.1177/039463200702000207 the whole document -----	10-13
A	EVA M. STURM ET AL: "CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: Characteristics and differences to CD63 upregulation", CYTOMETRY PART B: CLINICAL CYTOMETRY, vol. 78B, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 308-318, XP055039265, ISSN: 1552-4949, DOI: 10.1002/cyto.b.20526 the whole document -----	10-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP2016/077371**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2016/ 077371

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-9, 14, 15

subject-matter relating to an anti-hIL-3 antibody having an inhibitory activity against glycosylated hIL-3 such that the IC50 of the anti-hIL-3 antibody is 100 ng/ml or less, having a cross-reactivity with other cytokines and non-human IL-3 of below 5%, or a fragment or variant thereof, for use in therapy

2. claims: 10-13

subject-matter relating to a method of determining hIL-3 inhibitory activity of an anti-hIL-3 antibody or a fragment, variant, construct, or conjugate thereof, wherein the method comprises the steps of: a) preincubating an hIL-3 antibody, or a fragment, a variant, a construct or a conjugate thereof with at least one concentration of hIL-3 ;b) adding a mixture of step a) to a sample;c) contacting the mixture obtained in step b) with at least one cell marker;d) quantifying upregulation and/or downregulation of the at least one cell marker, wherein a decrease of a cell marker that is upregulated by hIL-3 and/or an increase of a cell marker that is downregulated by hIL-3 is an indication for inhibitory activity.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/077371

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015063228 A1	07-05-2015	EP 2868328 A1 EP 3062817 A1 US 2016264660 A1 WO 2015063228 A1	06-05-2015 07-09-2016 15-09-2016 07-05-2015
WO 2013178707 A1	05-12-2013	EP 2669295 A1 EP 2855525 A1 US 2015338420 A1 WO 2013178707 A1	04-12-2013 08-04-2015 26-11-2015 05-12-2013
WO 2013178706 A1	05-12-2013	EP 2669294 A1 EP 2855524 A1 US 2015175693 A1 WO 2013178706 A1	04-12-2013 08-04-2015 25-06-2015 05-12-2013

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06		
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 21/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 P 21/00		
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		A 6 1 P 17/00		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 9 7	
		G 0 1 N 33/53	P	

(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, DJ, 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, KW, 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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. テフロン

2. T W E E N

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72) 発明者 マティーアス マック

ドイツ連邦共和国, 9 3 0 5 1 レーゲンスブルク, アレクサンダー - フェルディナント - シュトラーセ 1 1

(72) 発明者 ヒルケ ブリュール

ドイツ連邦共和国, 9 3 0 5 1 レーゲンスブルク, アレクサンダー - フェルディナント - シュトラーセ 1 1

(72) 発明者 ケルシュティン レンナー

ドイツ連邦共和国, 9 3 0 9 6 ケーフェリング, エックルフィンガーシュトラーセ 1 3

F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ79 QR48 QR66 QS33 QX02

4C085 AA14 AA16 CC02 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA71

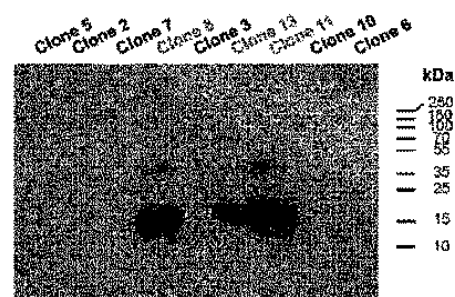
专利名称(译)	抗人IL-3抗体，其用于与IL-3表达或水平升高相关的疾病或功能障碍，以及它们用于检测人IL-3的方法		
公开(公告)号	JP2019507102A	公开(公告)日	2019-03-14
申请号	JP2018525399	申请日	2016-11-10
发明人	マティーアス マック ヒルケ ブリュール ケルシュティン レンナー		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/06 C12N15/13 C12Q1/02 A61K39/395 A61P29/00 A61P37/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P21/00 A61P17/00 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	A61P17/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/244 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/52 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6869 C07K2317/14 C07K2317/21 C07K2317/24 G01N2333/5403		
FI分类号	C07K16/24 C12N15/06.100 C12N15/13 C12Q1/02 A61K39/395.N A61P29/00 A61P37/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P25/00 A61P21/00 A61P17/00 G01N33/543.597 G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX02 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	2015194062 2015-11-11 EP 2016172551 2016-06-01 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的抗人IL-3抗体或其片段可用作治疗剂。该抗体可以用于药物组合合物中，用于治疗或预防与患者中hIL-3表达或水平升高有关的疾病，特别是炎性或自身免疫性疾病，例如类风湿性关节炎。该抗体还可用于检测人细胞表达的人IL-3。

Fig. 2

Westernblot with mAbs against IL-3



Each lane : 1 µg/ml recombinant hIL-3
Reducing (3-ME) and denaturing conditions (SDS)