

(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2019-500859

(P2019-500859A)

(43) 公表日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 146 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-526904 (P2018-526904)
 (86) (22) 出願日 平成28年11月25日 (2016.11.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月23日 (2018.7.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2016/051158
 (87) 国際公開番号 W02017/088028
 (87) 国際公開日 平成29年6月1日 (2017.6.1)
 (31) 優先権主張番号 2015904924
 (32) 優先日 平成27年11月27日 (2015.11.27)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 516179960
 シーエスエル リミティド
 オーストラリア国, ビクトリア 3052
 , パークビル, ポップラー ロード 45
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝
 (74) 代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD131結合タンパク質とその利用

(57) 【要約】

本開示は、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131-結合タンパク質、及びそれらの使用を提供する。ここで、当該抗原結合ドメインは、CD131に結合又は特異的に結合し、そしてインターロイキン4、IL-5、及びガムロサイトマクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) によるシグナリングを中和する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にすることで、このCD131結合タンパク質が、GM-CSFによって誘導されるTF-1赤白血病細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} は少なくとも700 nMである、CD131結合タンパク質。

【請求項2】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131の部位2内のエピトープに結合するか特異的に結合し、インターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にする、CD131結合タンパク質。

10

【請求項3】

前記抗原結合ドメインが、2つのCD131ポリペプチドが二量体化するときに形成されるエピトープに結合する、請求項2のCD131結合タンパク質。

【請求項4】

前記抗原結合ドメインが、ある1つのCD131ポリペプチドのドメイン1内の残基と、別の1つのCD131ポリペプチドのドメイン4内の残基に結合する、請求項3のCD131結合タンパク質。

【請求項5】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、以下の変異ポリペプチド：

20

- (i) 配列番号119に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号123に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号124に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iv) 配列番号135に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (v) 配列番号131に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vi) 配列番号136に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vii) 配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (viii) 配列番号139に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ix) 配列番号145に示した配列を含む変異ポリペプチド

30

の1つ以上(またはすべて)に、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへのこのCD131結合タンパク質の結合レベルと比べて低下したレベルで結合する、CD131結合タンパク質。

【請求項6】

前記変異ポリペプチドへの結合が検出可能でない、請求項5のCD131結合タンパク質。

【請求項7】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にすることで、このCD131結合タンパク質が(配列番号5に示した配列を含む軽鎖可変領域(V_L)と、配列番号20に示した配列を含む重鎖可変領域(V_H)を含む)抗体9A2の結合を競合的に抑制する、CD131結合タンパク質。

40

【請求項8】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、

50

(i) 配列番号20のアミノ酸26～35に示した配列と少なくとも約40%一致する配列を含む相補性決定領域(CDR)1と、配列番号20のアミノ酸50～66に示した配列と少なくとも約65%一致する配列を含むCDR2と、配列番号20のアミノ酸99～106に示した配列と少なくとも約44%一致する配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域(V_H) ;

(ii) 配列番号20、25、37、59、63、64、65、68、69、72、101のいずれか1つに示した配列と少なくとも約89%、または90%、または91%、または92%、または93%、または94%、または95%、または96%、または97%、または98%、または99%一致する配列を含む V_H ;

(iii) 配列番号5のアミノ酸24～34に示した配列と少なくとも約45%一致する配列を含むCDR1と、配列番号5のアミノ酸44～51に示した配列を含むCDR2と、配列番号5のアミノ酸89～97に示した配列と少なくとも約44%一致する配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L) ;

(iv) 配列番号5に示した配列と少なくとも約94%、または95%、または96%、または97%、または98%、または99%一致する配列を含む V_L ;

(v) 配列番号180のアミノ酸26～35に示した配列を含むCDR1と、配列番号180のアミノ酸50～66に示した配列を含むCDR2と、配列番号180のアミノ酸99～106に示した配列を含むCDR3を含む V_H ;

(vi) 配列番号180に示した配列を含む V_H ;

(vii) 配列番号177のアミノ酸24～34に示した配列を含むCDR1と、配列番号177のアミノ酸44～51に示した配列を含むCDR2と、配列番号177のアミノ酸89～97に示した配列を含むCDR3を含む V_L ;

(viii) 配列番号177に示した配列を含む V_L ;

(ix) 配列番号5に示したアミノ酸配列を含む V_L ;

(x) (i) に示した V_H と(iii) に示した V_L ;

(xi) (i) に示した V_H と(iv) に示した V_L ;

(xii) (i) に示した V_H と(ix) に示した V_L ;

(xiii) (ii) に示した V_H と(iii) に示した V_L ;

(xiv) (ii) に示した V_H と(iv) に示した V_L ;

(xv) (ii) に示した V_H と(ix) に示した V_L ;

(xvi) (v) に示した V_H と(vii) に示した V_L ;

(xvii) (v) に示した V_H と(viii) に示した V_L ;

(xviii) (v) に示した V_H と(ix) に示した V_L ;

(xix) (vi) に示した V_H と(vii) に示した V_L ;

(xx) (vi) に示した V_H と(viii) に示した V_L ;

(xxi) (vi) に示した V_H と(ix) に示した V_L ;

の少なくとも1つを含む、CD131結合タンパク質。

【請求項9】

前記抗原結合ドメインが、配列番号193に示した配列を含む重鎖可変領域(V_H)と、配列番号5に示した配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む、請求項8のCD131結合タンパク質。

【請求項10】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、

(lxxxix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(lxxxix) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(lxxxix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号6に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(cclxxxiv) 配列番号108に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(cclxxxv) 配列番号109に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(cclxxxvi) 配列番号109に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(cclxxxvii) 配列番号110に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(cclxxxviii) 配列番号110に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(cclxxxix) 配列番号111に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ccxc) 配列番号111に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(ccxci) 配列番号112に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ccxcii) 配列番号112に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(ccxciii) 配列番号113に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ccxciv) 配列番号113に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(ccxcv) 配列番号114に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ccxcvi) 配列番号114に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(ccxcvii) 配列番号115に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ccxcviii) 配列番号115に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(ccxcix) 配列番号116に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ccc) 配列番号116に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L のいずれかを含む、CD131結合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質であって、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号59に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(ii) 配列番号59に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(iii) 配列番号63に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(iv) 配列番号63に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(v) 配列番号64に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(vi) 配列番号64に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(vii) 配列番号65に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(viii) 配列番号65に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(ix) 配列番号68に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(x) 配列番号68に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(xi) 配列番号69に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;
(xii) 配列番号69に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
(xiii) 配列番号72に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配

列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(xiv) 配列番号72に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(xv) 配列番号100に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(xvi) 配列番号100に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L のいずれかを含む、CD131結合タンパク質。

【請求項12】

配列番号194に示した配列を含むポリペプチドが固体表面に固定化されているとき、そのポリペプチドに対する K_D が約100 nM以下であり、その K_D は表面プラズモン共鳴によって求められる、請求項1～11のいずれか1項のCD131結合タンパク質。

10

【請求項13】

以下の活性：

(i) GM-CSFによって誘導される好中球細胞のサイズ増加の低下または抑制によって判断される、GM-CSFによる単離されたヒト好中球の活性化を低下させる活性または抑制する活性；

(ii) IL-3によって誘導されるヒト好塩基球によるIL-8の分泌を低下させる活性または抑制する活性；

(iii) IL-3を媒介とした形質細胞様樹状細胞(pDC)の生存率を低下させる活性または阻止する活性；

(iv) フローサイトメトリーによって評価される前方散乱の変化を評価することによって判断される、IL-5によるヒト末梢血好酸球の活性化を低下させる活性または阻止する活性；

20

(v) IL-5および/またはGM-CSFおよび/またはIL-3の存在下でヒト末梢血好酸球の生存を低下させる活性または阻止する活性；

(vi) IL-3によって誘導されるヒトマスト細胞からの腫瘍壊死因子(TNF)の放出を低下させる活性または阻止する活性；

(vii) IL-3によって誘導されるヒトマスト細胞からのIL-13の放出を低下させる活性または阻止する活性；

(viii) IL-5および/またはGM-CSFおよび/またはIL-3によるIgEを媒介としたヒトマスト細胞からのIL-8の放出強化を低下させる活性または阻止する活性；

30

(ix) 幹細胞因子(SCF)とGM-CSFとIL-3とIL-5の存在下で培養したCD34⁺ヒト骨髓細胞によるコロニー形成単位-顆粒球マクロファージ(CFU-GM)の形成を低下させる活性または阻止する活性

の1つ以上を有する、請求項1～12のいずれか1項のCD131結合タンパク質。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか1項のCD131結合タンパク質であって、 V_H と V_L が単一のポリペプチド鎖である場合には、このタンパク質が、

(i) 一本鎖Fvフラグメント(scFv)；

(ii) 二量体scFv(di-scFv)；

(iii) 抗体の定常領域、Fc、重鎖定常ドメイン(C_H)2および/または C_H3 のいずれかに連結した、(i)と(ii)のいずれか一方；

40

(iv) 免疫エフェクタ細胞に結合するタンパク質に連結した、(i)と(ii)のいずれか一方

のいずれかであり、

V_H と V_L が別々のポリペプチド鎖である場合には、このタンパク質が、

(i) 二重特異性抗体；

(ii) 三重特異性抗体(triobody)；

(iii) 四重特異性抗体(tetrabody)；

(iv) Fab；

(v) F(ab')₂；

50

- (vi) Fv ;
 - (vii) 抗体の定常領域、Fc、重鎖定常ドメイン(C_H)₂および/またはC_H₃のいずれかに連結した、(i) ~ (vi) の1つ ;
 - (viii) 免疫エフェクタ細胞に結合するタンパク質に連結した、(i) ~ (vi) の1つ ;
 - (ix) 抗体
- のいずれかである、CD131結合タンパク質。

【請求項15】

CD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にするCD131結合抗体であって、その抗原結合ドメインが、

(ccxxi) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxii) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;

(ccxxiii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号6に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxiv) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号6に示した配列を含むV_L ;

(ccxxv) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号7に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxvi) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号7に示した配列を含むV_L ;

(ccxxvii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号8に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxviii) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号8に示した配列を含むV_L ;

(ccxxix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号9に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxx) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号9に示した配列を含むV_L ;

(ccxxxi) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号10に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxxii) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号10に示した配列を含むV_L ;

(ccxxxiii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号11に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxxiv) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号11に示した配列を含むV_L ;

(ccxxxv) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号12に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxxvi) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号12に示した配列を含むV_L ;

(ccxxxvii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号13に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxxxviii) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号13に示した配列を含むV_L ;

(ccxxxix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号14に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxli) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号14に示した配列を含むV_L ;

(ccxlii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号15に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxliv) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号15に示した配列を含むV_L ;

(ccxliii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号16に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxliv) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号16に示した配列を含むV_L ;

(ccxlv) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号17に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L ;

(ccxlvi) 配列番号20に示した配列を含むV_Hと、配列番号17に示した配列を含むV_L ;

(ccxlvii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号18に示し

10

20

30

40

50

- (cdxiv) 配列番号103に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxv) 配列番号104に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxvi) 配列番号104に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxvii) 配列番号105に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxviii) 配列番号105に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxix) 配列番号106に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxx) 配列番号106に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxi) 配列番号107に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxii) 配列番号107に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxiii) 配列番号108に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxiv) 配列番号108に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxv) 配列番号109に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxvi) 配列番号109に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxvii) 配列番号110に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxviii) 配列番号110に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxix) 配列番号111に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxx) 配列番号111に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxx i) 配列番号112に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxx ii) 配列番号112に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxx iii) 配列番号113に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxx iv) 配列番号113に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxx v) 配列番号114に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxx vi) 配列番号114に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxx vii) 配列番号115に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxxx viii) 配列番号115に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (cdxxx ix) 配列番号116に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (cdxl) 配列番号116に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- のいずれかを含む、CD131結合タンパク質。

【請求項 16】

CD131に結合するか特異的に結合してインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にするCD131結合抗体であって、その抗原結合ドメインが、

- (xvii) 配列番号59に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xviii) 配列番号59に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (xix) 配列番号63に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

10

20

30

40

50

- (xx) 配列番号63に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；
- (xxi) 配列番号64に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；
- (xxii) 配列番号64に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；
- (xxiii) 配列番号65に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；
- (xxiv) 配列番号65に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；
- (xxv) 配列番号68に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；
- (xxvi) 配列番号68に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；
- (xxvii) 配列番号69に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；
- (xxviii) 配列番号69に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；
- (xxix) 配列番号72に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；
- (xxx) 配列番号72に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；
- (xxxi) 配列番号100に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；
- (xxxii) 配列番号100に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_Lのいずれかを含む、CD131結合タンパク質。

10

20

【請求項 17】

別の化合物に共役する、請求項1～14のいずれか1項のCD131結合タンパク質、または請求項15または16の抗体。

【請求項 18】

請求項1～14のいずれか1項のCD131結合タンパク質をコードするか、請求項15または16の抗体をコードするか、そのポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 19】

請求項18の核酸を含む発現コンストラクト。

【請求項 20】

請求項1～14のいずれか1項のCD131結合タンパク質を発現するか、請求項15または16の抗体を発現する、単離された細胞または組み換え細胞。

30

【請求項 21】

請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体と、医薬として許容可能な基剤を含む組成物。

【請求項 22】

対象におけるCD131を媒介とする疾患を治療または予防する方法であって、請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体、または請求項21の組成物を投与することを含む方法。

【請求項 23】

薬における、請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体、または請求項21の組成物の利用。

40

【請求項 24】

CD131を媒介とする疾患を治療するための薬の製造における、請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体の利用。

【請求項 25】

CD131を媒介とする疾患の治療で利用するための、請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体、または請求項21の組成物。

【請求項 26】

50

CD131を発現する細胞に関連するCD131を媒介とする疾患の特定および/または検出および/または診断および/または予後予測をする方法であって、請求項17のCD131結合タンパク質、またはCD131を発現する細胞に結合した請求項17の抗体を、存在する場合に生体内で検出することを含み、そのCD131結合タンパク質またはその抗体が検出可能なタグに共役している方法。

【請求項27】

対象に前記CD131結合タンパク質または抗体を投与することをさらに含む、請求項26の方法。

【請求項28】

サンプル中のCD131、またはCD131を発現する細胞を検出する方法であって、そのサンプルを請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体と接触させて複合体を形成させ、その複合体を検出することを含んでいて、その複合体の検出が、サンプル中にCD131、またはCD131を発現する細胞が存在することを示している方法。

10

【請求項29】

CD131を媒介とする疾患の診断または予後予測をする方法であって、請求項28の方法を実施して対象からのサンプル中でCD131、またはCD131を発現する細胞を検出することを含んでいて、CD131、またはCD131を発現する細胞の検出が、その疾患の診断または予後予測である方法。

【請求項30】

CD131を媒介とする前記疾患が、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー疾患、がんのいずれかである、請求項22、26、29いずれか1項の方法、または請求項24の利用、または請求項25の利用のためのCD131結合タンパク質または抗体または組成物。

20

【請求項31】

対象で好酸球を激減または低減させる方法であって、対象でインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にすることを含む方法。

【請求項32】

対象における好酸球増多症を治療する方法であって、その対象でインターロイキン(IL)-3、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)によるシグナル伝達を無効にすることを含む方法。

30

【請求項33】

IL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFの1種類以上の阻害剤を投与することを含む、請求項31または32の方法。

【請求項34】

請求項1～14のいずれか1項または請求項17のCD131結合タンパク質、または請求項15～17のいずれか1項の抗体、または請求項21の組成物を投与することを含む、請求項31～33のいずれか1項の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本出願は、2015年11月27日に出願された「CD131結合タンパク質とその利用」という名称のオーストラリア国特許出願第2015904924号からの優先権を主張する。その全内容は、参照によって本明細書に組み込まれている。

【0002】

本出願は、電子形式の配列リストとともに提出される。その配列リストの全内容は、参照によって本明細書に組み込まれている。

【0003】

本開示は、CD131結合タンパク質と、その化合物およびその利用に関する。

【背景技術】

50

【0004】

多面的サイトカインであるインターロイキン（IL）-3（IL-3）、IL-5、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）は、骨髄細胞の分化と機能において極めて重要かつ重複した役割を果たしている。これらサイトカインは宿主防御と自然免疫の重要なメディエータだが、炎症性の病状（喘息、鼻ポリーブのある慢性副鼻腔炎（CRSwNP）、鼻ポリーブのない慢性副鼻腔炎（CRSsNP）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、喘息-COPDオーバーラップ症候群（ACOS）などの炎症性気道疾患が含まれる）の進展と進行にも大きく寄与している可能性がある。GM-CSFは関節リウマチなどの自己免疫疾患にも関与しており、IL-3は白血病などの疾患に関与している。喘息とCOPDでは、GM-CSF発現の上昇が、痰、気管支肺泡洗浄液（BALF）、気管支生検において見られる。IL-3は造血の初期段階で作用し、他の増殖因子と相乗作用して造血を進展させる。IL-3はさまざまなタイプの成熟細胞（単球、樹状細胞、巨核細胞、マスト細胞）の活性を変化させるとともに、好酸球を活性化させて好塩基球にヒスタミン放出の準備をさせることもできる。好塩基球の増殖因子、すなわちBALF中のIL-3のレベル上昇が、アレルゲンチャレンジの後に典型的に存在している。IL-5は細胞のタイプに対する特異性がより強く、骨髄が成熟した好酸球を産生して循環系へと放出することを制御している。IL-5のレベル上昇が、喘息を持つ患者の血清と気道液で見いだされている。喘息患者では、IL-5の吸入によってAHRが増加するとともに活性化された好酸球が気道にリクルートされた。

10

【0005】

IL-3、IL-5、GM-CSFのそれぞれはどれも、共通する鎖（鎖またはCD131）とサイトカイン特異的鎖からなる多量体受容体を通じてシグナル伝達する。

20

【0006】

骨髄細胞系の細胞とIL-3、IL-5、GM-CSFが炎症性気道疾患の進展と進行においてカギとなる役割を持つことを支持する証拠があることの帰結として、個々のサイトカインまたは受容体鎖を標的とする多数の治療用抗体が臨床で開発されている。これら薬剤は選ばれた一部の患者には有用であることが証明される可能性がある一方で、より広い応用は、それらが標的とする分子の機能が重複していることと、喘息の基礎となる可能性のある炎症性細胞浸潤物の性質がさまざまであることの両方のため、制限される可能性が大きい。例えば抗IL-5抗体であるメポリズマブの研究から、IL-5だけを標的のすると、喘息を持つ患者で気道閉塞や気道過剰反応に対して効果がないことがわかっている。

30

【0007】

上記のことに基づくと、IL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFを媒介とした疾患を治療できる化合物（例えば抗体、抗体由来のタンパク質）が本分野で必要とされていることが、当業者には明らかであろう。

【発明の概要】

【0008】

本発明をなすにあたり、発明者は、CD131に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にする試薬（例えば抗体や、抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質）を作製しようとした。発明者は、そのような活性を有する一連の抗体を作製し、そのうちのいくつかは、特に多数のアッセイにおいてIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を強力に無効にする（例えばこれらサイトカインのそれぞれに反応してTF-1細胞の増殖を阻止する）。発明者は、エピトープのマッピングも実施し、その抗体が「部位2」と名づけた領域内でCD131に結合することを見いだすと同時に、IL-3、IL-5、GM-CSFの結合にとって重要な部位2内のいくつかの残基がその抗体の結合にとっても重要であることも見いだした。

40

【0009】

発明者はそれに加え、自ら作製した抗体が、気道疾患（例えば喘息および/または鼻ポリーブ）に苦しむヒト対象からの炎症性細胞の生存を減らせることを示した。炎症性細胞の生存のこの抑制は、喘息などの炎症性気道疾患（例えば喘息）のための現在の標準的治療薬（すなわちプレドニゾロン）を用いて観察されているよりも大きかった。発明者は、

50

鼻ポリープの異種移植片モデルを利用することで、自ら作製した抗体が、ポリープのサイズおよび重量と、ポリープに浸潤するB細胞の数を対照抗体と比べて低下させることを示した。

【0010】

発明者は、IL-3、IL-5、GM-CSFのシグナル伝達を無効にすることが、例えば好酸球増多症を治療するため好酸球の生存を減らすのに有効なやり方であることも示した。これは、CD131に結合する本開示の抗体を用いて、またはIL-3R、IL-5R、GM-CSF-Rのそれぞれに対する抗体の組み合わせを用いて示された。抗体の組み合わせは好酸球の生存を減らすのに有効だったが、本開示の抗体はそれ以上に有効であった。

【0011】

上記のことに基づくと、発明者が、抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFのシグナル伝達を無効にすることのできるタンパク質を作製したことは、当業者には明らかであろう。発明者は、例えば本開示のタンパク質を用いてIL-3、IL-5、GM-CSFのシグナル伝達を無効にすることによってさまざまな疾患を治療する方法、および/または好酸球の生存を減らす方法も生み出した。

【0012】

一例では、本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、そのCD131結合タンパク質が、GM-CSFによって誘導されるTF-1赤白血球細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} は少なくとも700 nMであるCD131結合タンパク質が提供される。

【0013】

一例では、CD131結合タンパク質は、GM-CSFによって誘導されるTF-1細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} は少なくとも600 nMまたは500 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約460 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約300 nMまたは200 nMまたは100 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約460 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約10 nMまたは5 nMまたは1 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約1 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約0.9 nMまたは0.8 nMまたは0.6 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約0.5 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約0.4 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約0.3 nMである。

【0014】

一例では、CD131結合タンパク質は、IL-3によって誘導されるTF-1細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} は少なくとも600 nMまたは500 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約460 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約300 nMまたは200 nMまたは100 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約10 nMまたは5 nMまたは1 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約1 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約0.9 nMまたは0.8 nMまたは0.6 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約0.5 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約0.2 nM、または少なくとも約0.1 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約0.15 nMである。

【0015】

一例では、CD131結合タンパク質は、IL-5によって誘導されるTF-1細胞の増殖を抑制し、 IC_{50} は少なくとも600 nMまたは500 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約460 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約300 nMまたは200 nMまたは100 nMである。例えば IC_{50} は、少なくとも約10 nMまたは5 nMまたは1 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約5 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約4 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約4.5 nM、または少なくとも約4.6 nM、または少なくとも約4.7 nMである。一例では、 IC_{50} は、少なくとも約4.6 nMである。

【0016】

IC_{50} を求める方法は、CD131結合タンパク質の存在下でTF-1細胞（例えば約 1×10^4 個のTF-1細胞）を（例えば少なくとも約3分間～1時間（例えば約30分間））培養した後、関係

10

20

30

40

50

する増殖因子（GM-CSFおよび/またはIL-3および/またはIL-5）を添加し、それら細胞をさらに（例えば少なくとも約48時間、または少なくとも約72時間、または少なくとも約96時間（例えば約72時間））培養した後、細胞の増殖を調べることを含んでいる。細胞の増殖は、細胞を³[H]-チミジンの存在下で約6時間増殖させ、³[H]-チミジンの取り込みを例えば液体シンチレーションをカウントすることによって調べることができる。さまざまな濃度のCD131結合タンパク質で増殖を調べることにより、IC₅₀を求めることができる。

【0017】

一例では、本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を（Sun他、Blood、第94巻：1943～1951ページ、1999年に開示されている）抗体BION-1よりも大きな程度で無効にするCD131結合タンパク質が提供される。

10

【0018】

本開示によりさらに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131の部位2内のエピトープに結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするCD131結合タンパク質が提供される。この点に関し、当業者は、CD131の部位2が、二量体を形成する2つのCD131ポリペプチドからの残基（例えば部位2は、一方のCD131ポリペプチドのドメイン1のループA-B内およびループE-F内の残基と、他方のCD131ポリペプチドのループB-C内およびループF-G内の残基を含んでいる）でできていることを知っているであろう。

【0019】

一例では、抗原結合ドメインは、2つのCD131ポリペプチドが二量体になるときに形成されるエピトープに結合する。例えば抗原結合ドメインは、一方のCD131ポリペプチドのドメイン1内の残基と、他方のCD131ポリペプチドのドメイン4内の残基に結合する。

20

【0020】

一例では、抗原結合ドメインは、配列番号1の残基39および/または103に対応する1個以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

【0021】

別の一例では、抗原結合ドメインは、配列番号1の残基338、365、367、368に対応する1個以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

【0022】

さらに別の一例では、抗原結合ドメインは、2つのCD131ポリペプチドが二量体になるときに形成されるエピトープに結合し、そのエピトープは、一方のCD131ポリペプチドの残基39、103と、他方のCD131ポリペプチドの残基338、365、367、368に対応する1個以上（またはすべて）のアミノ酸を含んでいる。

30

【0023】

別の一例では、本開示により、本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131の部位2内のエピトープに結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、CD131へのIL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFの結合に関与するアミノ酸を含むエピトープに結合するCD131結合タンパク質が提供される。例えばアミノ酸は、配列番号1の残基39、103、338、365、367、368に対応する。例えばアミノ酸は、配列番号1の残基39に対応する。例えば残基は、一方のCD131ポリペプチドの残基39、103と、他方のCD131ポリペプチドの残基338、365、367、368に対応する。例えば残基は、一方のCD131ポリペプチドの残基39と、他方のCD131ポリペプチドの残基365および/または367に対応する。

40

【0024】

本開示により、それに加え、CD131の部位2内のエピトープに結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にする化合物が提供される。例えばこの化合物は、2つのCD131ポリペプチドが二量体になるときに形成されるエピトープに結合する。例えばこの化合物は、一方のCD131ポリペプチドのドメイン1内の残基と、他方のCD13

50

1ポリペプチドのドメイン4内の残基に結合する。

【0025】

一例では、化合物は、配列番号1の残基39および/または103に対応する1個以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

【0026】

別の一例では、化合物は、配列番号1の残基365と367に対応する1個以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

【0027】

別の一例では、化合物は、配列番号1の残基338、365、367、368に対応する1個以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

10

【0028】

さらに別の一例では、化合物は、2つのCD131ポリペプチドが二量体になるときに形成されるエピトープに結合し、そのエピトープは、一方のCD131の残基39、103と、他方のCD131の残基338、365、367、368に対応する1個以上（またはすべて）のアミノ酸を含んでいる。

【0029】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、以下の変異ポリペプチド：

- (i) 配列番号119に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号123に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号124に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iv) 配列番号135に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (v) 配列番号131に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vi) 配列番号136に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vii) 配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (viii) 配列番号139に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ix) 配列番号145に示した配列を含む変異ポリペプチド

20

の1つ以上（またはすべて）に、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへのCD131結合タンパク質の結合レベルと比べて低下したレベルで結合するCD131結合タンパク質も提供される。

30

【0030】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチドに、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへのCD131結合タンパク質の結合レベルと比べて低下したレベルで結合するCD131結合タンパク質も提供される。

【0031】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、配列番号139に示した配列を含む変異ポリペプチドに、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへのCD131結合タンパク質の結合レベルと比べて低下したレベルで結合するCD131結合タンパク質も提供される。

40

【0032】

一例では、（例えば K_D によって判断される）変異ポリペプチドに対するCD131結合タンパク質の結合レベルは、少なくとも約 $1/3$ または $1/4$ または $1/5$ または $1/10$ に低下する。例えば変異ポリペプチドに対する結合レベルは、少なくとも約 $1/20$ または $1/50$ または $1/100$ に低下する。

【0033】

一例では、変異ポリペプチドに対するCD131結合タンパク質の親和性（ K_D ）は、約 4×10

50

10^{-6} 以上、例えば 4.5×10^{-6} または 1×10^{-5} である。

【0034】

一例では、本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、以下の変異ポリペプチド：

- (i) 配列番号119に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号124に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号131に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iv) 配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (v) 配列番号139に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vi) 配列番号140に示した配列を含む変異ポリペプチド

10

の1つ以上（またはすべて）よりも配列番号192に示した配列を含むポリペプチドのほうに結合するCD131結合タンパク質が提供される。

【0035】

一例では、CD131結合タンパク質は、変異ポリペプチドへの結合が検出可能でないか、有意でない。例えばCD131結合タンパク質は、以下の変異ポリペプチド：

- (i) 配列番号119に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号124に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号131に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iv) 配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチド

20

の1つ以上への結合が検出可能でないか、有意でない。

【0036】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号117、118、120～123、125～130、132～136、138、140～148のいずれか1つに示した配列を含むポリペプチドに結合するか、そのポリペプチドと交差反応する。

【0037】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号127に示した配列を含むポリペプチドに、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドに結合するよりも大きな親和性で結合する。

【0038】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、以下の変異ポリペプチド：

- (i) 配列番号135に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号136に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号138に示した配列を含む変異ポリペプチド

30

の1つ以上に結合するか、その変異ポリペプチドと交差反応する。

【0039】

本開示により、CD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にする化合物として、その化合物が、以下の変異ポリペプチド：

- (i) 配列番号119に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号124に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号131に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iv) 配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (v) 配列番号139に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vi) 配列番号140に示した配列を含む変異ポリペプチド

40

の1つ以上（またはすべて）に、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの結合レベルと比べて低下したレベルで結合する化合物も提供される。

【0040】

あるポリペプチドへのCD131結合タンパク質の結合を調べる方法は、当業者には明らかであろう。例えばそのポリペプチドを固体表面または半固体表面に固定化し、CD131結合タンパク質をその固定化したポリペプチドに接触させる。その後、結合を例えば表面ブラ

50

ズモン共鳴によって調べる。

【0041】

本開示によりさらに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、CD131への、および/または配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの（配列番号5に示した配列を含む V_L と、配列番号20に示した配列を含む V_H を含む）抗体9A2の結合を競合的に抑制するCD131結合タンパク質が提供される。

【0042】

一例では、本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、CD131への、および/または配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの（配列番号5に示した配列とヒト軽鎖定常領域を含む V_L と、配列番号20に示した配列とヒトIgG4定常領域を含む V_H を含む）抗体9A2の結合を競合的に抑制するCD131結合タンパク質が提供される。

10

【0043】

本開示により、それに加え、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、このCD131結合タンパク質が、CD131への、および/または配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの（配列番号5に示した配列を含む軽鎖と、配列番号20に示した配列を含む重鎖を含む）抗体9A2の結合を競合的に抑制するCD131結合タンパク質が提供される。

20

【0044】

本開示により、それに加え、抗体の抗原結合ドメインを含む化合物として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にし、CD131への、および/または配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの以下の抗体：

- (i) 配列番号5に示した配列を含む V_L と、配列番号20に示した配列を含む V_H を含む抗体；
- (ii) 配列番号5に示した配列とヒト軽鎖定常領域を含む V_L と、配列番号20に示した配列とヒトIgG4定常領域を含む V_H を含む抗体；
- (iii) 配列番号5に示した配列を含む軽鎖と、配列番号20に示した配列を含む重鎖を含む抗体

30

の1つ以上の結合を競合的に抑制する化合物が提供される。

【0045】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、

- (i) 配列番号20のアミノ酸26～35に示した配列と少なくとも約40%一致する配列を含む相補性決定領域(CDR)1と、配列番号20のアミノ酸50～66に示した配列と少なくとも約65%一致する配列を含むCDR2と、配列番号20のアミノ酸99～106に示した配列と少なくとも約44%一致する配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域(V_H)；

40

- (ii) 配列番号20、25、37、59、63、64、65、68、69、72、101のいずれか1つに示した配列と少なくとも約89%、または90%、または91%、または92%、または93%、または94%、または95%、または96%、または97%、または98%、または99%一致する配列を含む V_H ；

- (iii) 配列番号5のアミノ酸24～34に示した配列と少なくとも約45%一致する配列を含むCDR1と、配列番号5のアミノ酸44～51に示した配列を含むCDR2と、配列番号5のアミノ酸89～97に示した配列と少なくとも約44%一致する配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)；

- (iv) 配列番号5に示した配列と少なくとも約94%、または95%、または96%、または97

50

%、または98%、または99%一致する配列を含むV_L；

(v) 配列番号180のアミノ酸26～35に示した配列を含むCDR1と、配列番号180のアミノ酸50～66に示した配列を含むCDR2と、配列番号180のアミノ酸99～106に示した配列を含むCDR3を含むV_H；

(vi) 配列番号180に示した配列を含むV_H；

(vii) 配列番号177のアミノ酸24～34に示した配列を含むCDR1と、配列番号177のアミノ酸44～51に示した配列を含むCDR2と、配列番号177のアミノ酸89～97に示した配列を含むCDR3を含むV_L；

(viii) 配列番号177に示した配列を含むV_L；

(ix) 配列番号5に示したアミノ酸配列を含むV_L；

10

(x) (i) に示したV_Hと (iii) に示したV_L；

(xi) (i) に示したV_Hと (iv) に示したV_L；

(xii) (i) に示したV_Hと (ix) に示したV_L；

(xiii) (ii) に示したV_Hと (iii) に示したV_L；

(xiv) (ii) に示したV_Hと (iv) に示したV_L；

(xv) (ii) に示したV_Hと (ix) に示したV_L；

(xvi) (v) に示したV_Hと (vii) に示したV_L；

(xvii) (v) に示したV_Hと (viii) に示したV_L；

(xviii) (v) に示したV_Hと (ix) に示したV_L；

20

(xix) (vi) に示したV_Hと (vii) に示したV_L；

(xx) (vi) に示したV_Hと (viii) に示したV_L；

(xxi) (vi) に示したV_Hと (ix) に示したV_L；

の少なくとも1つを含むCD131結合タンパク質が提供される。

【0046】

一例では、定義した配列（すなわち配列番号）内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・V_Hに関しては、CDR1はアミノ酸26～35の間であり；CDR2はアミノ酸50～66の間であり；CDR3はアミノ酸99～106の間であり；

・V_Lに関しては、CDR1はアミノ酸24～34の間であり；CDR2はアミノ酸44～51の間であり；CDR3はアミノ酸89～97の間である

30

として理解する。

【0047】

一例では、抗原結合ドメインは、配列番号193に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_Lを含んでいる。

【0048】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号5に示した配列を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質が提供される。

40

【0049】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号5に示した配列を含む（か、配列番号5に示した配列を含むV_LのCDRを含む）V_Lを含み、その抗原結合ドメインが、配列番号49、52、53、56、57、59、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、80、81、83、88、91、92、93、94、95、99、100、101、102、103、114、115、116、182、186、195のいずれか1つに示したCDR2を含むV_Hを含むCD131結合タンパク質が提供される。一例では、抗原結合ドメインは、59、63、64、65、68、69、72、100のいずれか1つに示したCDR2を含むV_Hを含んでいる。

50

【 0 0 5 0 】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号5に示した配列を含む（か、配列番号5に示した配列を含む V_L のCDRを含む） V_L を含み、その抗原結合ドメインが、配列番号49、52、53、56、57、59、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、80、81、83、88、91、92、93、94、95、99、100、101、102、103、114、115、116、182、186、195のいずれか1つに示したCDR2とCDR3を含む V_H を含むCD131結合タンパク質が提供される。一例では、抗原結合ドメインは、配列番号59、63、64、65、68、69、72、100のいずれか1つに示したCDR2とCDR3を含む V_H を含んでいる。

10

【 0 0 5 1 】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号5に示した配列を含む（か、配列番号5に示した配列を含む V_L のCDRを含む） V_L を含み、その抗原結合ドメインが、配列番号49、52、53、56、57、59、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、80、81、83、88、91、92、93、94、95、99、100、101、102、103、114、115、116、182、186、195のいずれか1つに示したCDR1とCDR3を含む V_H を含むCD131結合タンパク質が提供される。一例では、抗原結合ドメインは、配列番号59、63、64、65、68、69、72、100のいずれか1つに示したCDR1とCDR3を含む V_H を含んでいる。一例では、抗原結合ドメインは、配列番号25に示したCDR1とCDR3を含む V_H を含んでいる。

20

【 0 0 5 2 】

一例では、定義した配列（すなわち配列番号）内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・ V_H に関しては、CDR1はアミノ酸26～35の間であり；CDR2はアミノ酸50～66の間であり；CDR3はアミノ酸99～106の間であり；

・ V_L に関しては、CDR1はアミノ酸24～34の間であり；CDR2はアミノ酸44～51の間であり；CDR3はアミノ酸89～97の間である

30

として理解する。

【 0 0 5 3 】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(ii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(iii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号6に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

40

(iv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号6に示した配列を含む V_L ；

(v) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号7に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(vi) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号7に示した配列を含む V_L ；

(vii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号8に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(viii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号8に示した配列を含む V_L ；

(ix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号9に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(x) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号9に示した配列を含む V_L ；

50

(ccxi) 配列番号112に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(ccxii) 配列番号112に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(ccxiii) 配列番号113に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(ccxiv) 配列番号113に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(ccxv) 配列番号114に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(ccxvi) 配列番号114に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(ccxvii) 配列番号115に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(ccxviii) 配列番号115に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(ccxix) 配列番号116に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(ccxx) 配列番号116に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_Lのいずれかを含むCD131結合タンパク質が提供される。

【 0 0 5 4 】

一例では、定義した配列（すなわち配列番号）内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・V_Hに関しては、CDR1はアミノ酸26～35の間であり；CDR2はアミノ酸50～66の間であり；CDR3はアミノ酸99～106の間であり；

・V_Lに関しては、CDR1はアミノ酸24～34の間であり；CDR2はアミノ酸44～51の間であり；CDR3はアミノ酸89～97の間である

として理解する。

【 0 0 5 5 】

本開示により、それに加え、またはその代わりに、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号49に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(ii) 配列番号49に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(iii) 配列番号52に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(iv) 配列番号52に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(v) 配列番号53に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(vi) 配列番号53に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(vii) 配列番号56に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(viii) 配列番号56に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(ix) 配列番号57に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(x) 配列番号57に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(xi) 配列番号59に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(xii) 配列番号59に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(xiii) 配列番号61に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_L；

(xiv) 配列番号61に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L；

(xv) 配列番号62に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列

10

20

30

40

50

(xlix) 配列番号81に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(l) 配列番号81に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(li) 配列番号83に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lii) 配列番号83に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(liii) 配列番号88に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(liv) 配列番号88に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lv) 配列番号91に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lvi) 配列番号91に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lvii) 配列番号92に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lviii) 配列番号92に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lix) 配列番号93に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lx) 配列番号93に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxi) 配列番号94に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxii) 配列番号94に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxiii) 配列番号95に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxiv) 配列番号95に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxv) 配列番号99に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxvi) 配列番号99に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxvii) 配列番号100に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxviii) 配列番号100に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxix) 配列番号101に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxx) 配列番号101に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxxi) 配列番号102に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxxii) 配列番号102に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxxiii) 配列番号103に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxxiv) 配列番号103に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxxv) 配列番号114に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxxvi) 配列番号114に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxxvii) 配列番号115に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxxviii) 配列番号115に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(lxxix) 配列番号116に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(lxxx) 配列番号116に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L のいずれかを含むCD131結合タンパク質が提供される。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

一例では、定義した配列（すなわち配列番号）内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・ V_H に関しては、CDR1はアミノ酸26～35の間であり；CDR2はアミノ酸50～66の間であり；CDR3はアミノ酸99～106の間であり；

・ V_L に関しては、CDR1はアミノ酸24～34の間であり；CDR2はアミノ酸44～51の間であり；CDR3はアミノ酸89～97の間である

として理解する。

【0057】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号59に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

10

【0058】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号59に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0059】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号63に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

20

【0060】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号63に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0061】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号64に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

30

【0062】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号64に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

40

【0063】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号65に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L を含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0064】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号65に示した配列を含む V_H

50

と、配列番号5に示した配列を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0065】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号68に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0066】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号68に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

10

【0067】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号69に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0068】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号69に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

20

【0069】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号72に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

【0070】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号72に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

30

【0071】

本開示により、抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質として、その抗原結合ドメインがCD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、その抗原結合ドメインが、配列番号100に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Hと、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含むV_Lを含むCD131結合タンパク質も提供される。

40

【0072】

一例では、定義した配列（すなわち配列番号）内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・V_Hに関しては、CDR1はアミノ酸26～35の間であり；CDR2はアミノ酸50～66の間であり；CDR3はアミノ酸99～106の間であり；

・V_Lに関しては、CDR1はアミノ酸24～34の間であり；CDR2はアミノ酸44～51の間であり；CDR3はアミノ酸89～97の間である

として理解する。

【0073】

一例では、本明細書に記載したCD131結合タンパク質は、少なくともV_HとV_Lを含んでい

50

て、その V_H と V_L は、結合して、抗原結合ドメインを含むFvを形成する。当業者は、その抗原結合ドメインが抗体の結合部位を含むことを理解するであろう。

【0074】

一例では、 V_H と V_L は、単一のポリペプチド鎖である。例えばそのタンパク質は、
 (i) 一本鎖Fvフラグメント(scFv)；
 (ii) 二量体scFv(di-scFv)；
 (iii) 抗体の定常領域、Fc、重鎖定常ドメイン(C_H)₂および/または C_H ₃のいずれかに連結した、(i)と(ii)のいずれか一方；
 (iv) 免疫エフェクタ細胞に結合するタンパク質に連結した、(i)と(ii)のいずれか一方
 のいずれかである。

10

【0075】

一例では、 V_H と V_L は別々のポリペプチド鎖である。

【0076】

例えばそのタンパク質は、
 (i) 二重特異性抗体；
 (ii) 三重特異性抗体(triobody)；
 (iii) 四重特異性抗体(tetrabody)；
 (iv) Fab；
 (v) F(ab')₂；
 (vi) Fv；
 (vii) 抗体の定常領域、Fc、重鎖定常ドメイン(C_H)₂および/または C_H ₃のいずれかに連結した、(i)～(vi)の1つ；
 (viii) 免疫エフェクタ細胞に結合するタンパク質に連結した、(i)～(vi)の1つ
 のいずれかである。

20

【0077】

(以前の2つのリストに記載した)上記タンパク質も、抗体の抗原結合ドメインと呼ぶことができる。

【0078】

一例では、タンパク質は、抗体(例えばモノクローナル抗体)である。一例では、抗体は裸の抗体である。

30

【0079】

一例では、タンパク質(または抗体)は、キメラ抗体、脱免疫化抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、霊長類化抗体のいずれかである。

【0080】

一例では、タンパク質または抗体は、ヒトのタンパク質または抗体である。例えば本開示により、CD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするとともに、本明細書の任意の例に記載した抗原結合ドメイン、または V_H および/または V_L を含んでいる抗体が提供される。

40

【0081】

一例では、本開示の抗体は、配列番号5～19のいずれか1つ(例えば配列番号5)に示した配列を含む V_L を含んでいる。

【0082】

一例では、本開示の抗体は、配列番号179に示した配列を含む V_L を含んでいる。

【0083】

一例では、本開示の抗体は、配列番号20～116のいずれか1つに示した配列を含む V_H を含んでいる。

【0084】

一例では、本開示の抗体は、配列番号182、186、90のいずれか1つに示した配列を含む V_H を含んでいる。

50

【 0 0 8 5 】

一例では、本開示により、CD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするCD131結合抗体として、抗原結合ドメインが、

- (i) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (ii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;
- (iii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号6に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (iv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号6に示した配列を含む V_L ;
- (v) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号7に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (vi) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号7に示した配列を含む V_L ;
- (vii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号8に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (viii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号8に示した配列を含む V_L ;
- (ix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号9に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (x) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号9に示した配列を含む V_L ;
- (xi) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号10に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号10に示した配列を含む V_L ;
- (xiii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号11に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xiv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号11に示した配列を含む V_L ;
- (xv) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号12に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xvi) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号12に示した配列を含む V_L ;
- (xvii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号13に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xviii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号13に示した配列を含む V_L ;
- (xix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号14に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xx) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号14に示した配列を含む V_L ;
- (xxi) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号15に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xxii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号15に示した配列を含む V_L ;
- (xxiii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号16に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xxiv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号16に示した配列を含む V_L ;
- (xxv) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号17に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xxvi) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号17に示した配列を含む V_L ;
- (xxvii) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号18に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xxviii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号18に示した配列を含む V_L ;
- (xxix) 配列番号20に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号19に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;
- (xxx) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号19に示した配列を含む V_L ;
- (xxxi) 配列番号21に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

10

20

30

40

50

(cxcix) 配列番号106に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(cc) 配列番号106に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(cci) 配列番号107に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccii) 配列番号107に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(cciii) 配列番号108に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(cciv) 配列番号108に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccv) 配列番号109に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccvi) 配列番号109に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccvii) 配列番号110に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccviii) 配列番号110に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccix) 配列番号111に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccx) 配列番号111に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccxi) 配列番号112に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccxii) 配列番号112に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccxiii) 配列番号113に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccxiv) 配列番号113に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccxv) 配列番号114に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccxvi) 配列番号114に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccxvii) 配列番号115に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccxviii) 配列番号115に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(ccxix) 配列番号116に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ccxx) 配列番号116に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L のいずれか

を含むCD131結合抗体が提供される。

【 0 0 8 6 】

一例では、定義した配列(すなわち配列番号)内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・ V_H に関しては、CDR1はアミノ酸26~35の間であり；CDR2はアミノ酸50~66の間であり；CDR3はアミノ酸99~106の間であり；

・ V_L に関しては、CDR1はアミノ酸24~34の間であり；CDR2はアミノ酸44~51の間であり；CDR3はアミノ酸89~97の間である

として理解する。

【 0 0 8 7 】

本開示により、CD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするCD131結合抗体として、抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号59に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ;

(ii) 配列番号59に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ;

(iii) 配列番号63に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列

10

20

30

40

50

のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(iv) 配列番号63に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(v) 配列番号64に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(vi) 配列番号64に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(vii) 配列番号65に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(viii) 配列番号65に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(ix) 配列番号68に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(x) 配列番号68に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(xi) 配列番号69に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(xii) 配列番号69に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(xiii) 配列番号72に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(xiv) 配列番号72に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；

(xv) 配列番号100に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、配列番号5に示した配列のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L ；

(xvi) 配列番号100に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L のいずれかを含むCD131結合抗体も提供される。

【0088】

一例では、定義した配列（すなわち配列番号）内のCDRに上記段落で言及しているときには、以下のように、すなわち

・ V_H に関しては、CDR1はアミノ酸26～35の間であり；CDR2はアミノ酸50～66の間であり；CDR3はアミノ酸99～106の間であり；

・ V_L に関しては、CDR1はアミノ酸24～34の間であり；CDR2はアミノ酸44～51の間であり；CDR3はアミノ酸89～97の間である

として理解する。

【0089】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR2とCDR3を含む V_H と、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L を含んでいる。

【0090】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR1とCDR3を含む V_H と、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_L を含んでいる。

【0091】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR1とCDR3を含む V_L を含んでいる。

【0092】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR1、CDR2、CDR3を含む V_H と、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体のCDR2とCDR3を含む V_L を含んでいる。

【0093】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、例えばそのポリペプチドを固体表面に固定化して K_D を表面プラズモン共鳴によって求めるとき、配列番号194に示した配列を含むポリペプチドに約100 nM以下の K_D で結合する。一例では、 K_D は、10 nM以下、例えば5 nM以下、または4 nM以下、または3 nM以下、または2 nM以下である。一例では、

10

20

30

40

50

K_D は1 nM以下である。一例では、 K_D は、0.9 nM以下、または0.7 nM以下、または0.8 nM以下、または0.7 nM以下、または0.6 nM以下である。一例では、 K_D は0.5 nM以下である。一例では、 K_D は0.4 nM以下である。一例では、 K_D は0.3 nM以下である。

【0094】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、例えば、標識した、または標識していないタンパク質または抗体を用いた競合アッセイを利用すると、CD131を発現する細胞（例えば好中球、または好酸球、またはTF-1細胞）に約10 nM以下の K_D で結合する。一例では、 K_D は、5 nM以下、または4 nM以下、または3 nM以下、または2 nM以下である。一例では、 K_D は1 nM以下である。一例では、 K_D は、0.9 nM以下、または0.7 nM以下、または0.8 nM以下、または0.7 nM以下、または0.6 nM以下である。

10

【0095】

一例では、 K_D は、好中球に関して約300 nM以下である。

【0096】

一例では、 K_D は、好酸球に関して約700 nM以下である。

【0097】

一例では、 K_D は、TF-1細胞に関して約400 nM以下である。

【0098】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、IL-3および/またはGM-CSFによって誘導されるSTAT-5のシグナル伝達を低減させるか阻止する。

【0099】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、IL-3によって誘導されるSTAT-5のシグナル伝達を低減させるか阻止し、 IC_{50} は約20 nM以下である。一例では、pStat-5 IC_{50} IL-3は、約10 nM以下、または約9 nM以下、または約8 nM以下である。一例では、pStat-5 IC_{50} IL-3は、約7.5 nM以下、例えば7.3 nMである。

20

【0100】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、GM-CSFによって誘導されるSTAT-5のシグナル伝達を低減させるか阻止し、 IC_{50} は約60 nM以下である。一例では、pStat-5 IC_{50} GM-CSFは、約50 nM以下、または約45 nM以下、または約40 nM以下である。一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、GM-CSFによって誘導されるSTAT-5のシグナル伝達を低減させるか阻止し、 IC_{50} は約40 nM以下である。

30

【0101】

例えばそのタンパク質または抗体を、IL-3および/またはGM-CSFの存在下にて、インターフェロン調節因子1 (*irf1*) 応答エレメントの制御下にある -ラクタマーゼレポータ遺伝子を含む細胞（例えばTF-1細胞）に接触させる。細胞は適切な基質（例えば負に帯電した蛍光性 -ラクタマーゼ基質（例えばCCF2やCCF4））にも接触させ、信号（例えば蛍光）の変化を求める。陽性対照（すなわち、タンパク質または抗体の不在下でIL-3および/またはGM-CSFと接触させた細胞）において信号が低下する変化は、タンパク質または抗体が、IL-3および/またはGM-CSFによって誘導されるSTAT-5のシグナル伝達を低減させるか阻止していることを示している。

【0102】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、CD131を発現する細胞（例えばTF-1細胞）への結合に関してIL-3および/またはGM-CSFおよび/またはIL-5と競合する。

40

【0103】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、CD131を発現する細胞（例えばTF-1細胞）への結合に関してIL-3と競合し、 IC_{50} は約10 nM以下である。一例では、 IC_{50} は、約9 nM以下、または約8 nM以下、または約7 nM以下である。一例では、 IC_{50} は約6 nM以下、例えば約5.96 nM以下である。

【0104】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、CD131を発現する細胞（例えばTF-1細胞）への結合に関してGM-CSFと競合し、 IC_{50} は約600 nM以下である。一例では、 IC

50

IC_{50} は、約550 nM以下、または約500 nM以下である。一例では、 IC_{50} は約480 nM以下、または約460 nM以下、例えば約456 nM以下である。

【0105】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、CD131を発現する細胞（例えばTF-1細胞）への結合に関してIL-5と競合し、 IC_{50} は約1600 nM以下である。一例では、 IC_{50} は、約1550 nM以下、または約1500 nM以下である。一例では、 IC_{50} は、約1480 nM以下、または約1460 nM以下、または約1450 nM以下、例えば約1448 nM以下である。

【0106】

一例では、IL-3および/またはGM-CSFおよび/またはIL-5は、CD131を発現する細胞（例えばTF-1細胞）への結合に関して本開示のCD131結合タンパク質または抗体と競合する。

10

【0107】

例えば細胞（例えば約 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個のTF-1細胞）を本開示のCD131結合タンパク質または抗体と約45分間接触させる。次に、標識したIL-3および/またはGM-CSFおよび/またはIL-5を細胞に（例えば1~2時間）接触させ、洗浄した後、細胞に結合した標識のレベルを評価する。結合した標識のレベルが陽性対照（すなわちそのタンパク質または抗体の不在下で、標識したサイトカインと接触させた細胞）と比べて低下していることは、そのタンパク質または抗体が、細胞への結合に関してIL-3および/またはGM-CSFおよび/またはIL-5と競合することを示している。相互アッセイを利用して、細胞への結合に関してIL-3および/またはGM-CSFおよび/またはIL-5がそのタンパク質または抗体と競合する能力を求め

20

【0108】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、以下の活性：

(i) GM-CSFによって誘導される好中球細胞のサイズ増加の低下または抑制によって判断される、GM-CSFによる単離されたヒト好中球の活性化を低下させる活性または抑制する活性；

(ii) IL-3によって誘導されるヒト好塩基球によるIL-8の分泌を低下させる活性または抑制する活性；

(iii) IL-3を媒介とした形質細胞様樹状細胞（pDC）の生存を低下させる活性または阻止する活性；

30

(iv) フローサイトメトリーによって評価される前方散乱の変化を評価することによって判断される、IL-5によるヒト末梢血好酸球の活性化を低下させる活性または阻止する活性；

(v) IL-5および/またはGM-CSFおよび/またはIL-3の存在下でヒト末梢血好酸球の生存を低下させる活性または阻止する活性；

(vi) IL-3によって誘導されるヒトマスト細胞からの腫瘍壊死因子（TNF）の放出を低下させる活性または阻止する活性；

(vii) IL-3によって誘導されるヒトマスト細胞からのIL-13の放出を低下させる活性または阻止する活性；

(viii) IL-5および/またはGM-CSFおよび/またはIL-3によるIgEを媒介としたヒトマスト細胞からのIL-8の放出強化を低下させる活性または阻止する活性；

40

(ix) 幹細胞因子（SCF）とGM-CSFとIL-3とIL-5の存在下で培養したCD34⁺ヒト骨髓細胞によるコロニー形成単位-顆粒球マクロファージ（CFU-GM）の形成を低下させる活性または阻止する活性；

(x) ヒト鼻ポリープのマウス異種移植片モデルにおけるポリープのサイズまたは重量を減らす活性；

(xi) ヒト鼻ポリープのマウス異種移植片モデルにおけるポリープ中のB細胞の数を減らす活性

のうちの1つ以上を有する。

【0109】

50

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、エリスロポエチン、IL-6、IL-4、幹細胞因子の1つ以上に反応してTF-1細胞の増殖を実質的にまたは有意に抑制することはない。CD131結合タンパク質がサイトカインまたは増殖因子に反応してTF-1細胞の増殖を抑制する能力を調べる方法は本明細書に記載してあり、その方法を本開示のこの例に容易に適合させることができる。

【0110】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、炎症性気道疾患または鼻ポリープを患っている対象に由来する痰または鼻ポリープ組織からの免疫細胞（例えば好酸球）の生存を減らすか、その免疫細胞の死を誘導する。例えばその免疫細胞をIL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFとそのタンパク質または抗体の存在下で培養する。その後、細胞死を、例えばアネキシン-Vの発現を例えば蛍光活性化セルソーティングを利用して検出することによって評価する。そのタンパク質または抗体の存在下でアネキシン-Vを発現する（すなわちアポトーシスする）細胞の数が増加するというのは、そのタンパク質または抗体が免疫細胞（例えば好酸球）の生存を減らすか、免疫細胞の死を誘導することを示している。

10

【0111】

本明細書でのCD131「に結合する」タンパク質または抗体への言及は、CD131「に特異的に結合する」タンパク質または抗体の文字通りの土台を提供する。

【0112】

本開示により、上記抗体の抗原結合ドメインまたは抗原結合フラグメントも提供される。

20

【0113】

一例では、本明細書に記載したタンパク質または抗体は、ヒト定常領域、例えばIgG定常領域（例えばIgG1定常領域、IgG2定常領域、IgG3定常領域、IgG4定常領域や、これらの混合物）を含んでいる。V_LとV_Hを含む抗体またはタンパク質の場合には、V_Hを重鎖定常領域に連結させ、V_Lを軽鎖定常領域に連結させることができる。

【0114】

本開示の抗体全体（または、定常領域またはC_H3を含むCD131結合タンパク質）の重鎖定常領域のC末端リシンは、例えば抗体またはタンパク質を作製または精製する間に、抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え操作して除去することができる。したがって抗体全体（またはCD131結合タンパク質）は、C末端リシン残基がすべて除去された集団、および/またはC末端リシン残基が除去されていない集団、および/またはC末端リシン残基を持つタンパク質とC末端リシン残基を持たないタンパク質の混合物を有する集団を含むことができる。いくつかの例では、集団はさらに、重鎖定常領域の1つでC末端リシン残基が除去されているタンパク質を含むことができる。同様に、抗体全体の組成物は、C末端リシン残基を持つ抗体集団またはC末端リシン残基を持たない抗体集団の同じ混合物または同様の混合物を含むことができる。

30

【0115】

一例では、本明細書に記載したタンパク質または抗体は、IgG4抗体の定常領域、またはIgG4抗体の安定化させた定常領域を含んでいる。一例では、そのタンパク質または抗体は、位置241にプロリンを持つIgG4定常領域を含んでいる（Kabat（Kabat他、「免疫学的に興味深いタンパク質の配列」、ワシントンDC、アメリカ合衆国保険福祉省、1987年および/または1991年）のナンバリングシステムによる）。

40

【0116】

一例では、重鎖定常領域は、配列番号197に示した配列を含んでいる。一例では、本明細書に記載したタンパク質または抗体、または本明細書に記載したタンパク質または抗体の組成物は、全部または一部がC末端リシン残基を持つ、または持たない配列の混合物を含む重鎖定常領域（その中には安定化させた重鎖定常領域が含まれる）を含んでいる。

【0117】

一例では、本開示の抗体は、（例えば上述のような）IgG4定常領域または安定化させた

50

IgG4定常領域に連結または融合された本明細書に開示の V_H と、軽鎖定常領域に連結または融合された V_L を含んでいる。

【0118】

本開示のCD131結合タンパク質の機能上の特徴は、必要に応じて変更を加えて本開示の抗体に適用されることになる。

【0119】

一例では、本明細書に記載したCD131結合タンパク質または抗体は、単離されている、および/または組み換えである。

【0120】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、別の化合物（例えば検出可能な標識や、タンパク質または抗体の半減期を延長する化合物（ポリエチレングリコールやアルブミン結合タンパク質など））に共役される。他の適切な化合物は本明細書に記載されている。

10

【0121】

本開示により、本開示のCD131結合タンパク質または抗体をコードする核酸、またはそのポリペプチドも提供される。

【0122】

一例では、そのような核酸は発現コンストラクトに含まれていて、その発現コンストラクトの中では核酸がプロモータに機能可能に連結されている。このような発現コンストラクトはベクター（例えばプラスミド）の中に入れることができる。

20

【0123】

本開示で単一のポリペプチド鎖からなるCD131結合タンパク質に関する例では、発現コンストラクトは、そのポリペプチド鎖をコードする核酸に連結したプロモータを含むことができる。

【0124】

CD131結合タンパク質を形成する多数のポリペプチド鎖に関する例では、発現コンストラクトは、例えばプロモータに機能可能に連結された V_H を含むポリペプチドをコードする核酸と、例えばプロモータに機能可能に連結された V_L を含むポリペプチドをコードする核酸を含んでいる。

【0125】

別の一例では、発現コンストラクトは、5'から3'に向かって順番に例えば以下の機能可能に連結された要素：

30

(i) プロモータ；

(ii) 第1のポリペプチドをコードする核酸；

(iii) 内部リボソーム挿入部位；

(iv) 第2のポリペプチドをコードする核酸

を含むバイシストロニック発現コンストラクトである。ただし第1のポリペプチドが V_H を含み、第2のポリペプチドが V_L を含むか、その逆である。

【0126】

本開示では、1つの発現コンストラクトが V_H を含む第1のポリペプチドをコードし、別の発現コンストラクトが V_L を含む第1のポリペプチドをコードするといった別々の発現コンストラクトも考慮する。例えば本開示により、

40

(i) プロモータに機能可能に連結された V_H を含むポリペプチドをコードする核酸を含む第1の発現コンストラクト；と

(ii) プロモータに機能可能に連結された V_L を含むポリペプチドをコードする核酸を含む第2の発現コンストラクト

を含む組成物も提供される。

【0127】

本開示により、本開示のCD131結合タンパク質を発現する単離された細胞または組み換え細胞も提供される。

50

【0128】

一例では、細胞は、本開示の発現コンストラクト、すなわち

(i) プロモータに機能可能に連結された V_H を含むポリペプチドをコードする核酸を含む第1の発現コンストラクト；と

(ii) プロモータに機能可能に連結された V_L を含むポリペプチドをコードする核酸を含む第2の発現コンストラクト

を含んでいて、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドが合わさって本開示のCD131結合タンパク質を形成する。

【0129】

本開示の細胞の例には、細菌の細胞、酵母の細胞、昆虫の細胞、哺乳動物の細胞が含まれる。

10

【0130】

本開示によりさらに、本開示のCD131結合タンパク質または抗体を製造する方法が提供される。例えばそのような方法は、本開示の発現コンストラクトを、CD131結合タンパク質または抗体を作製するのに十分な条件に維持することを含んでいる。

【0131】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体を製造する方法は、本開示の細胞を、CD131結合タンパク質または抗体を作製するのに十分な条件下で培養し、場合によってはそのCD131結合タンパク質または抗体を分泌させることを含んでいる。

【0132】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体を製造する方法はさらに、そのタンパク質または抗体を単離し、場合によってはそのCD131結合タンパク質または抗体を医薬組成物にすることを含んでいる。

20

【0133】

本開示によりさらに、本開示のCD131結合タンパク質または抗体と、医薬として許容可能な基剤を含む組成物が提供される。

【0134】

いくつかの例では、組成物は、

(i) 重鎖からのC末端リシン残基を含む本開示の抗体；および/または

(ii) 重鎖からのC末端リシン残基が欠けた本開示の抗体；および/または

(iii) 1つの重鎖にはC末端リシン残基を含み、別の(他方の)重鎖にはC末端リシン残基が欠けた本開示の抗体

30

と、場合によっては、医薬として許容可能な基剤を含んでいる。

【0135】

本開示により、対象におけるCD131を媒介とする疾患を治療または予防する方法も提供され、この方法は、本開示のCD131結合タンパク質または抗体、または本開示の組成物を投与することを含んでいる。

【0136】

本開示により、対象においてCD131を抑制する方法または無効にする方法も提供され、この方法は、本開示のCD131結合タンパク質または抗体、または本開示の組成物を投与することを含んでいる。一例では、対象は、CD131を媒介とする疾患を患っている。

40

【0137】

一例では、本明細書に記載した方法は、約0.05 mg/kg ~ 30 mg/kgのCD131結合タンパク質または抗体を投与することを含んでいる。例えばこの方法は、CD131結合タンパク質または抗体を0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg、または0.2 mg/kg ~ 5 mg/kg投与することを含んでいる。一例では、この方法は、CD131結合タンパク質または抗体を約0.5 ~ 2.0 mg/kg投与することを含んでいる。

【0138】

本開示により、医学における本開示のCD131結合タンパク質または抗体、または本開示の組成物の利用も提供される。

50

【 0 1 3 9 】

本開示によりさらに、CD131を媒介とする疾患を治療するための薬の製造における本開示のCD131結合タンパク質または抗体の利用が提供される。

【 0 1 4 0 】

本開示により、CD131を媒介とする疾患の治療に用いるための本開示のCD131結合タンパク質または抗体、または本開示の組成物も提供される。

【 0 1 4 1 】

本開示によりさらに、CD131を発現する細胞に関連するCD131を媒介とする疾患を特定および/または検出および/または診断および/または予後予測する方法が提供される。この方法は、CD131を発現する細胞に結合した本開示のCD131結合タンパク質または抗体を、存在する場合に生体内で検出することを含んでいて、CD131結合タンパク質または抗体は検出可能なタグに共役されている。一例では、この方法はさらに、対象にCD131結合タンパク質または抗体を投与することを含んでいる。

10

【 0 1 4 2 】

本開示によりさらに、サンプル中のCD131、またはCD131を発現する細胞を検出する方法が提供される。この方法は、サンプルを本開示のCD131結合タンパク質または抗体と接触させて複合体を形成し、その複合体を検出することを含んでいて、複合体の検出が、サンプル中にCD131、またはCD131を発現する細胞が存在することを示している。一例では、この方法は、生体外またはインビトロで実施される。このような方法は、疾患の診断または予後予測に適しており、CD131、またはCD131を発現する細胞の検出が、その疾患の診断または予後予測である。

20

【 0 1 4 3 】

一例では、CD131を媒介とする疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー疾患、がんのいずれかである。例えば疾患は、喘息、鼻ポリープ、鼻ポリープのある慢性副鼻腔炎(CRSwNP)、鼻ポリープのない慢性副鼻腔炎(CRSsNP)、膀胱がんのいずれかである。一例では、疾患はコルチコステロイド耐性喘息である。別の一例では、疾患は、鼻ポリープのある慢性副鼻腔炎(CRSwNP)である。さらに別の一例では、疾患は、鼻ポリープのない慢性副鼻腔炎(CRSsNP)である。さらに別の一例では、疾患は膀胱がんである。一例では、疾患は急性骨髄性白血病である。さらに別の一例では、疾患は慢性骨髄性白血病である。

30

【 0 1 4 4 】

別の一例では、本開示の方法は、IL-3とIL-5とGM-CSFの阻害剤(例えば三重特異性抗体、またはCD131結合タンパク質または抗体(例えば本開示のCD131結合タンパク質または抗体))を投与することを含んでいる。

【 0 1 4 5 】

本開示により、本明細書に記載した任意の例によるCD131結合タンパク質または抗体を含むキット(例えばパッケージまたは製品)も提供され、そのキットは、場合によっては本明細書に記載した方法で使用するための指示とともに包装される。

【 0 1 4 6 】

本開示によりさらに、CD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にする化合物(例えば、抗体、または抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質)を選択する方法が提供される。この方法は、CD131への、および/または配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの以下の抗体：

40

(i) 配列番号5に示した配列を含むV_Lと、配列番号20に示した配列を含むV_Hを含む抗体；および/または

(ii) 配列番号5に示した配列とヒト軽鎖定常領域を含むV_Lと、配列番号20に示した配列とヒトIgG4定常領域を含むV_Hを含む抗体；および/または

(iii) 配列番号5に示した配列を含む軽鎖と、配列番号20に示した配列を含む重鎖を含む抗体

の1つ以上の結合を競合的に抑制する化合物を選択することを含んでいる。

50

【 0 1 4 7 】

本開示により、CD131に結合するか特異的に結合してIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にする化合物も提供される。この化合物は、以下の変異ポリペプチド：

- (i) 配列番号119に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (ii) 配列番号124に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iii) 配列番号131に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (iv) 配列番号137に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (v) 配列番号139に示した配列を含む変異ポリペプチド；
- (vi) 配列番号140に示した配列を含む変異ポリペプチド

の1つ以上（またはすべて）に、配列番号192に示した配列を含むポリペプチドへの結合レベルと比べて低下したレベルで結合する。

10

【 0 1 4 8 】

カギとなる配列リスト

配列番号1：ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号2：ホモサピエンスIL-3受容体 のアミノ酸配列

配列番号3：ホモサピエンスGCS-F受容体のアミノ酸配列

配列番号4：ホモサピエンスIL-5受容体のアミノ酸配列

配列番号5：抗体 9A2のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号6：抗体 9A2-VR1のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号7：抗体 9A2-VR2のV_L鎖のアミノ酸配列

20

配列番号8：抗体 9A2-VR3のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号9：抗体 9A2-VR4のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号10：抗体 9A2-VR5のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号11：抗体 9A2-VR6のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号12：抗体 9A2-VR8のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号13：抗体 9A2-VR9のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号14：抗体 9A2-VR11のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号15：抗体 9A2-VR12のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号16：抗体 9A2-VR13のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号17：抗体 9A2-VR14のV_L鎖のアミノ酸配列

30

配列番号18：抗体 9A2-VR16のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号19：抗体 9A2-VR19のV_L鎖のアミノ酸配列

配列番号20：抗体 9A2のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号21：抗体 9A2-VR20のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号22：抗体 9A2-VR21のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号23：抗体 9A2-VR22のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号24：抗体 9A2-VR23のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号25：抗体 9A2-VR24のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号26：抗体 9A2-VR26のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号27：抗体 9A2-VR27のV_H鎖のアミノ酸配列

40

配列番号28：抗体 9A2-VR28のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号29：抗体 9A2-VR31のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号30：抗体 9A2-VR32のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号31：抗体 9A2-VR33のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号32：抗体 9A2-VR34のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号33：抗体 9A2-VR35のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号34：抗体 9A2-VR36のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号35：抗体 9A2-VR37のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号36：抗体 9A2-VR38のV_H鎖のアミノ酸配列

配列番号37：抗体 9A2-VR39のV_H鎖のアミノ酸配列

50

配列番号38：抗体	9A2-VR40のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号39：抗体	9A2-VR41のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号40：抗体	9A2-VR42のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号41：抗体	9A2-VR43のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号42：抗体	9A2-VR44のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号43：抗体	9A2-VR45のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号44：抗体	9A2-VR46のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号45：抗体	9A2-VR47のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号46：抗体	9A2-VR48のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号47：抗体	9A2-VR49のV _H 鎖のアミノ酸配列	10
配列番号48：抗体	9A2-VR50のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号49：抗体	9A2-VR24.04のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号50：抗体	9A2-VR24.07のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号51：抗体	9A2-VR24.10のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号52：抗体	9A2-VR24.12のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号53：抗体	9A2-VR24.19のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号54：抗体	9A2-VR24.24のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号55：抗体	9A2-VR24.76のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号56：抗体	9A2-VR24.78のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号57：抗体	9A2-VR24.81のV _H 鎖のアミノ酸配列	20
配列番号58：抗体	9A2-VR24.82のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号59：抗体	9A2-VR24.84のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号60：抗体	9A2-VR24.87のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号61：抗体	9A2-VR24.91のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号62：抗体	9A2-VR24.93のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号63：抗体	9A2-VR24.27のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号64：抗体	9A2-VR24.29のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号65：抗体	9A2-VR24.30のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号66：抗体	9A2-VR24.33のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号67：抗体	9A2-VR24.44のV _H 鎖のアミノ酸配列	30
配列番号68：抗体	9A2-VR24.97のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号69：抗体	9A2-VR24.98のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号70：抗体	9A2-VR24.102のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号71：抗体	9A2-VR24.107のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号72：抗体	9A2-VR24.110のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号73：抗体	9A2-VR24.111のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号74：抗体	9A2-VR24.55のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号75：抗体	9A2-VR24.56のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号76：抗体	9A2-VR24.57のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号77：抗体	9A2-VR24.122のV _H 鎖のアミノ酸配列	40
配列番号78：抗体	9A2-VR24.124のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号79：抗体	9A2-VR24.131のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号80：抗体	9A2-VR39.01のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号81：抗体	9A2-VR39.02のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号82：抗体	9A2-VR39.04のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号83：抗体	9A2-VR39.05のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号84：抗体	9A2-VR39.06のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号85：抗体	9A2-VR39.11のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号86：抗体	9A2-VR39.12のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号87：抗体	9A2-VR39.16のV _H 鎖のアミノ酸配列	50

配列番号88：抗体 9A2-VR39.17のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号89：抗体 9A2-VR39.18のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号90：抗体 9A2-VR39.19のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号91：抗体 9A2-VR39.21のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号92：抗体 9A2-VR39.22のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号93：抗体 9A2-VR39.23のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号94：抗体 9A2-VR39.24のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号95：抗体 9A2-VR39.97のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号96：抗体 9A2-VR39.98のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号97：抗体 9A2-VR39.102のV _H 鎖のアミノ酸配列	10
配列番号98：抗体 9A2-VR39.103のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号99：抗体 9A2-VR39.105のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号100：抗体 9A2-VR39.109のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号101：抗体 9A2-VR39.110のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号102：抗体 9A2-VR39.111のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号103：抗体 9A2-VR39.112のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号104：抗体 9A2-VR39.116のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号105：抗体 9A2-VR39.27のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号106：抗体 9A2-VR39.28のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号107：抗体 9A2-VR39.46のV _H 鎖のアミノ酸配列	20
配列番号108：抗体 9A2-VR39.122のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号109：抗体 9A2-VR39.139のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号110：抗体 9A2-VR39.140のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号111：抗体 9A2-VR39.148のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号112：抗体 9A2-VR39.162のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号113：抗体 9A2-VR39.77のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号114：抗体 9A2-VR39.93のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号115：抗体 9A2-VR39.174のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号116：抗体 9A2-VR39.177のV _H 鎖のアミノ酸配列	
配列番号117：C末端6×Hisタグと置換N37Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	30
配列番号118：C末端6×Hisタグと置換D38Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号119：C末端6×Hisタグと置換Y39Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号120：C末端6×Hisタグと置換T40Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号121：C末端6×Hisタグと置換S41Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号122：C末端6×Hisタグと置換H42Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	40
配列番号123：C末端6×Hisタグと置換S102Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号124：C末端6×Hisタグと置換F103Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号125：C末端6×Hisタグと置換V104Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号126：C末端6×Hisタグと置換V105Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	
配列番号127：C末端6×Hisタグと置換T106Aを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列	50

配列

配列番号128 : C末端6 x Hisタグと置換D107Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号129 : C末端6 x Hisタグと置換V108Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号130 : C末端6 x Hisタグと置換N337Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号131 : C末端6 x Hisタグと置換I338Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号132 : C末端6 x Hisタグと置換Q339Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号133 : C末端6 x Hisタグと置換M340Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号134 : C末端6 x Hisタグと置換K362Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号135 : C末端6 x Hisタグと置換M363Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号136 : C末端6 x Hisタグと置換R364Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号137 : C末端6 x Hisタグと置換Y365Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号138 : C末端6 x Hisタグと置換E366Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号139 : C末端6 x Hisタグと置換H367Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号140 : C末端6 x Hisタグと置換I368Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号141 : C末端6 x Hisタグと置換D369Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号142 : C末端6 x Hisタグと置換R418Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号143 : C末端6 x Hisタグと置換T419Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号144 : C末端6 x Hisタグと置換G420Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号145 : C末端6 x Hisタグと置換Y421Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号146 : C末端6 x Hisタグと置換N422Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号147 : C末端6 x Hisタグと置換G423Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号148 : C末端6 x Hisタグと置換I424Aを含む可溶性ホモサピエンスCD131のアミノ酸配列

配列番号149 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 L1.1をコードする核酸配列

配列番号150 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 L3.1をコードする核酸配列

配列番号151 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 L3.2をコードする核酸配列

配列番号152 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 H1.1をコードする核酸配列

配列番号153 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 H2.1をコードする核酸配列

配列番号154 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 H3.1をコードする核酸配列

配列番号155 : 三量体オリゴヌクレオチド9A2 H3.2をコードする核酸配列

10

20

30

40

50

- 配列番号156：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR24-H2.1をコードする核酸配列
 配列番号157：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR24-H2.2をコードする核酸配列
 配列番号158：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR24-H2.3をコードする核酸配列
 配列番号159：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR39-H1.1をコードする核酸配列
 配列番号160：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR39-H1.2をコードする核酸配列
 配列番号161：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR39-H2.2をコードする核酸配列
 配列番号162：三量体オリゴヌクレオチド9A2-VR39-H2.3をコードする核酸配列
 配列番号163：9A2 H1.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号164：9A2 H2.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号165：9A2 H3.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列 10
 配列番号166：9A2 H3.2の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号167：9A2 L1.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号168：9A2 L3.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号169：9A2 L3.2の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号170：9A2 VR24-H2.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号171：9A2 VR24-H2.2の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号172：9A2 VR24-H2.3の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号173：9A2 VR39-H1.1の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号174：9A2 VR39-H1.2の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号175：9A2 VR39-H2.2の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列 20
 配列番号176：9A2 VR39-H2.3の終止鋳型のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号177：9A2と誘導体のV_L鎖のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号178：9A2と誘導体のV_L鎖のCDR1のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号179：9A2と誘導体のV_L鎖のCDR3のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号180：9A2と誘導体のV_H鎖のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号181：9A2と誘導体のV_H鎖のCDR1のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号182：9A2と誘導体のV_H鎖のCDR2のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号183：9A2と誘導体のV_H鎖のCDR3のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号184：9A2-VR24と誘導体のV_H鎖のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号185：9A2-VR24と誘導体のV_H鎖のCDR1のコンセンサスのアミノ酸配列 30
 配列番号186：9A2-VR24と誘導体のV_H鎖のCDR2のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号187：9A2-VR24と誘導体のV_H鎖のCDR3のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号188：9A2-VR39と誘導体のV_H鎖のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号189：9A2-VR39と誘導体のV_H鎖のCDR1のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号190：9A2-VR39と誘導体のV_H鎖のCDR2のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号191：9A2-VR39と誘導体のV_H鎖のCDR3のコンセンサスのアミノ酸配列
 配列番号192：C末端6×Hisタグを含む可溶性ホモサピエンズCD131のアミノ酸配列
 配列番号193：9A2-VR24 HCDR2変異体のV_H鎖のアミノ酸配列
 配列番号194：抗体9A2重鎖のアミノ酸配列
 配列番号195：抗体9A2軽鎖のアミノ酸配列 40
 配列番号196：安定化させたIgG4重鎖定常領域のアミノ酸配列
 配列番号197：軽鎖定常領域のアミノ酸配列

【図面の簡単な説明】

【0149】

【図1】図1は、抗体9A2と誘導体のV_Lの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図2A】図2Aと図2Bは、抗体9A2と誘導体のV_Hの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図 2 B】図2Aと図2Bは、抗体9A2と誘導体のVHの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図 3 A】図3Aと図3Bは、抗体9A-VR24と誘導体のVHの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図 3 B】図3Aと図3Bは、抗体9A-VR24と誘導体のVHの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図 4 A】図4Aと図4Bは、抗体9A-VR39と誘導体のVHの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図 4 B】図4Aと図4Bは、抗体9A-VR39と誘導体のVHの可変領域の配列を示す一覧表示である。四角で囲んだ領域には、Kabatナンバリングシステムによって規定される（表記の）CDRが含まれている。

【図 5】図5は、親和性成熟に用いる抗体9A2の可変領域のアミノ酸配列を示す一覧表示である。パネル（A）は9A2の軽鎖可変領域の配列を示し、パネル（B）は重鎖可変領域の配列を示しており、CDRには下線が引かれ、ランダム化のために選択された領域は四角で囲んでKabatナンバリングシステムに従って番号が付けられている。

【図 6】図6A～図6Fは、抗体9A2と選択された誘導体がIL-3、GM-CSF、IL-5のシグナル伝達に及ぼす効果を示すグラフ表示である。TF-1細胞を試験抗体（BION-1（□）、9A2（○）、9A2-VR24（◇）、9A2-VR24.29（△））で30分間処理した後、サイトカインを添加した：（A）IL-3、（B）GM-CSF、（C）IL-5。その後、増殖を³[H]-チミジンの取り込みによって評価し、DにBION-1（○）と9A2（□）に関するIC₅₀値をプロットしてある。ヒストグラムは、技術的デュープリケートの平均値と標準誤差を示している。実験は少なくとも3回繰り返した。代表的な実験を示してある。パネル（E）は、（図5に示した）9A2の親和性成熟ライブラリのGM-CSFのシグナル伝達に対する力価を示している。個々のIC₅₀値をプロットしてある。パネル（F）は、9A2の誘導体である9A2-VR24と9A2-VR39の親和性成熟ライブラリのGM-CSFのシグナル伝達に対する力価を示している。個々のIC₅₀値をプロットしてある。変異体9A2-VR24（◇）、9A2-VR39（△）、9A2-VR24.29（△）が目立つ。

【図 7】図7Aと図7Bは、抗体9A2の存在下でTF-1-blaを用いてIL-3（A）またはGM-CSF（B）のシグナル伝達を評価したアッセイの結果を示すグラフ表示である。ヒストグラムは、技術的デュープリケートの平均値と標準誤差を示している。代表的な実験を示してある。

【図 8】図8A～図8Dは、IL-6（A）、IL-4（B）、SCF（C）、エリスロポエチン（D）に刺激されたTF-1赤白血球細胞の増殖を無効にしないことを示すグラフ表示である。増殖を³[H]-チミジンの取り込みによって評価した。ヒストグラムは、技術的デュープリケートの平均値と標準誤差を示している。すべての実験を少なくとも4回繰り返したが、エリスロポエチンによるTF-1の刺激は別であり、これは2回繰り返した。

【図 9】図9は、フローサイトメトリーによって調べると、抗体9A2は、ヒトCD131を一過性にトランスフェクトした細胞には結合するが、ヒトGM-CSFR 鎖、IL-3R 鎖、IL-5R 鎖だけを発現する細胞には結合しないことを示す一連のグラフ表示である。ヒトGM-CSFR 鎖、IL-3R 鎖、IL-5R 鎖のいずれかに対する対照抗体から、トランスフェクトされた細胞におけるこれらタンパク質の発現が確認された。

【図 10】図10A～図10Cは、shCD131への9A2（A）、9A2-VR24（B）、9A2-VR24.29（C）の組み換えFabの結合を、表面プラズモン共鳴を利用して調べた動的結合分析を示す一連のグラフ表示である。

【図 11】図11Aと図11Bは、親和性成熟に用いる抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す一覧表示である。（A）9A2-VR24の重鎖可変領域と（B）9A2-VR39の重鎖可変領域の配列を示してあり、CDRには下線が引かれ、ランダム化のために選択された領域は四角で囲んでKabatナンバリングシステムに従って番号が付けられている。

10

20

30

40

50

【図12】図12A～図12Dは、9A2-VR24.29が大きな親和性でヒトCD131を発現する細胞に結合することを示すグラフ表示である。放射性ヨウ素化9A2-VR24.29 IgGまたは放射性ヨウ素化9A2-VR24.29 Fab (AとC)とともにインキュベートした (AとB) 好中球または (CとD) 好酸球で飽和結合研究を実施した。全体 (○、実線)、特異的に結合する9A2-VR24.29 IgG (□、実線)、非特異的に結合する9A2-VR24.29 IgG (△、点線)に関する結合曲線を示してある。9A2-VR24.29 IgG (□、実線)と9A2-VR24.29 Fab (△、点線)の結合データのスカッチャード変換を示してあり、線は、放射性ヨウ素化抗体それぞれの結合に関する最良フィットを示している (BとD)。各点は、細胞に結合した放射性ヨウ素化抗体のデュープリケートで求めた平均値から非特異的結合を差し引いた後の値である。単一の好中球結合実験と代表的な好酸球結合実験 (n=2)からのデータを示してある。

10

【図13】図13は、好中球、好酸球、TF-1細胞に対する9A2-VR24.29 IgGまたは9A2-VR24.29 Fabの親和性を示す表形式の表示である。

【図14A-C】図14A～図14Jは、ヒト炎症性気道疾患組織から単離した細胞の生存を9A2-VR24.29が抑制することを示すグラフ表示である。パネル (A) は、軽症アトピー性喘息を持つ対象からの痰サンプルの分析を示しており、痰サンプルをベースライン (黒い記号)の時点とアレルゲン吸入チャレンジの24時間後 (白い記号)に回収し、サイトスピンを細胞百分率が調べられる設定にし、存在しているタイプの細胞の割合を求めたものである。パネル (B) は、9A2-VR24.29 (100 μg/ml) またはアイソタイプ対照 (100 μg/ml) とともに37 °Cで24時間インキュベートした痰サンプルの分析を示しており、細胞の生存をフローサイトメトリーによって分析した。データは、各ドナーについて、アイソタイプ対照と

20

【図14D-G】図14A～図14Jは、ヒト炎症性気道疾患組織から単離した細胞の生存を9A2-VR24.29が抑制することを示すグラフ表示である。アレルギー性喘息である対象からベースラインの時点とアレルゲン吸入チャレンジの24時間後に回収した (D～E) 骨髄サンプルと (F～G) 血液サンプルからの非付着性単核細胞 (NAMC) を、希釈液 (陰性対照) の存在下、またはそれぞれ1 ng/mlのIL-3、GM-CSF、IL-5の存在下、または (すべて) 組み合わせたサイトカインの存在下で9A2-VR24.29 (100 μg/ml、黒い四角) またはアイソタイプ

30

【図14H-J】図14A～図14Jは、ヒト炎症性気道疾患組織から単離した細胞の生存を9A2-VR24.29が抑制することを示すグラフ表示である。パネル (H) は、生体外で培養した刺激なしの鼻ポリープ細胞において好酸球が優勢な細胞のタイプであったことを示している。パネル (I) は、9A2-VR24.29が、72時間培養した後に鼻ポリープ組織から単離された刺激なしの好酸球の生存を抑制したことを示している。パネル (J) は、培養した細胞滲出液の生存に対する9A2-VR24.29の効果、プレドニゾロンおよび個々の抗IL-5抗体と比較して示している。データは、中央値 ± 範囲と95%信頼区間で表示した。ns、非有意 p > 0.05; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.005。

40

【図15】図15は、12人の異なるドナーに由来する鼻ポリープ組織細胞滲出液の上清を5日間培養したものをLuminex分析した結果を示すグラフ表示である。単一の細胞懸濁液でさまざまなサイトカインとサイトカイン濃度をLuminexヒト42-プレックスビーズアッセイによって調べた。個々のドナーについて各分析物の濃度を示してある。n = 12人のドナー。

【図16A-F】図16A～図16Fは、9A2-VR24.29が、CD131ファミリーのサイトカインで刺激した後の一次骨髄細胞の活性化を抑制することを示すグラフ表示である。(A) 一次ヒト好中球を9A2-VR24.29であらかじめ処理し、GM-CSFで18時間刺激し、その活性化をフローサイトメトリーで前方散乱の変化によって調べた。(B) 一次ヒト好塩基球を9A2-VR24.29であらかじめ処理し、IL-3で18時間刺激し、IL-8の放出をELISA

50

によって調べた。(C) pDCを9A2-VR24.29であらかじめ処理し、IL-3で24時間刺激し、細胞の生存をViaLight (登録商標) Plus 細胞増殖と細胞毒性バイオアッセイによって調べた。(D~E) 一次ヒト好酸球を正常で健康なドナーから単離した後、(D) 9A2-VR24.29であらかじめ処理してからIL-5で刺激し、フローサイトメトリーによって側方散乱の変化を調べるか、(E) 9A2-VR24.29 ()、抗IL-5R ()、抗IL-3R ()、抗GM-CSFR ()のいずれか、または抗IL-5R と抗IL-3R と抗GM-CSFR の組み合わせ () であらかじめ処理した後にIL-3、IL-5、GM-CSFのカクテルで72時間処理し、細胞の生存を調べた。代表的な実験からのデータを示してある、n=5。好酸球をEC₈₀濃度の(F) IL-3、(G) GM-CSF、(H) IL-5で処理し、細胞の生存を調べた。点線は、刺激不在下での細胞の数を示す。好酸球を試験抗体である(I) 抗IL-3R ()、(J) 抗GMR ()、(K) 抗IL-5R () であらかじめ処理した後、(F) IL-3、(G) GM-CSF、(H) IL-5で72時間処理し、細胞の生存を調べた。(L~N) HCMCを9A2-VR24.29で1時間あらかじめ処理した後、IL-3 (1 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml) のいずれかを添加し、さらに48時間インキュベートした。ヒト骨髄腫IgE (0.5 µg/ml) を添加してから20時間後に抗IgEで刺激した。培養後に培地を新しくし、次いでHCMCを、(L) TNFの放出 (18時間) と (M) IL-13の放出 (8時間) に関してはIL-3 (1 ng/ml) の存在下で抗IgE (1 µg/ml) を用いて刺激し、IL-8の放出 (8時間) に関しては (N) IL-3 (1 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml) いずれかの存在下で抗IgE (1 µg/ml) を用いて刺激した。抗IgE ()、抗IgE + IL-3 ()、抗IgE + GM-CSF ()、抗IgE + IL-5 ()、抗IgE + IL-3 + 9A2-VR24.29 ()、抗IgE + GM-CSF + 9A2-VR24.29 ()、抗IgE + IL-5 + 9A2-VR24.29 (○)。上清に含まれるサイトカインのレベルをELISAによって測定した。9A2-VR24.29の不在下と存在下でのサイトカインの放出の有意差を、ダネット事後検定を伴う一元配置分散分析によって分析した。* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001。すべての値を4回の独立な実験に関して平均値 ± SEMとして表示した。(O) CD34⁺ BM細胞を9A2-VR24.29 ()、抗IL-5R ()、抗IL-3R ()、抗GM-CSFR ()、抗IL-5R () のいずれか、または抗IL-5Rと抗IL-3Rと抗GM-CSFRの組み合わせ () であらかじめ処理し、SCF (50 ng/ml)、IL-3 (10 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (10 ng/ml) を含む半固体培地の中で増殖させた。細胞を37 °Cで14~16日間インキュベートし、コロニーをカウントした。すべての値を平均値 ± SEMとして表示した。すべての実験を少なくとも4回繰り返し、代表的な実験を示してある。

【図16G-O】図16A~図16Oは、9A2-VR24.29が、CD131ファミリーのサイトカインで刺激した後の一次骨髄細胞の活性化を抑制することを示すグラフ表示である。(A) 一次ヒト好中球を9A2-VR24.29であらかじめ処理し、GM-CSFで18時間刺激し、その活性化をフローサイトメトリーで前方散乱の変化によって調べた。(B) 一次ヒト好塩基球を9A2-VR24.29であらかじめ処理し、IL-3で18時間刺激し、IL-8の放出をELISAによって調べた。(C) pDCを9A2-VR24.29であらかじめ処理し、IL-3で24時間刺激し、細胞の生存をViaLight (登録商標) Plus 細胞増殖と細胞毒性バイオアッセイによって調べた。(D~E) 一次ヒト好酸球を正常で健康なドナーから単離した後、(D) 9A2-VR24.29であらかじめ処理してからIL-5で刺激し、フローサイトメトリーによって側方散乱の変化を調べるか、(E) 9A2-VR24.29 ()、抗IL-5R ()、抗IL-3R ()、抗GM-CSFR ()のいずれか、または抗IL-5R と抗IL-3R と抗GM-CSFR の組み合わせ () であらかじめ処理した後にIL-3、IL-5、GM-CSFのカクテルで72時間処理し、細胞の生存を調べた。代表的な実験からのデータを示してある、n=5。好酸球をEC₈₀濃度の(F) IL-3、(G) GM-CSF、(H) IL-5で処理し、細胞の生存を調べた。点線は、刺激不在下での細胞の数を示す。好酸球を試験抗体である(I) 抗IL-3R ()、(J) 抗GMR ()、(K) 抗IL-5R () であらかじめ処理した後、(F) IL-3、(G) GM-CSF、(H) IL-5で72時間処理し、細胞の生存を調べた。(L~N) HCMCを9A2-VR24.29で1時間あらかじめ処理した後、IL-3 (1 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml) のいずれかを添加し、さらに48時間インキュベートした。ヒト骨髄腫IgE (0.5 µg/ml) を添加してから20時間後に抗IgEで刺激した。培養後に培地を新しくし、次いでHCMCを、(L) TNFの放出 (18時間) と (M) IL-13の放出 (8時間

) に関してはIL-3 (1 ng/ml) の存在下で抗IgE (1 µg/ml) を用いて刺激し、IL-8の放出 (8時間) に関しては (N) IL-3 (1 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml) いずれかの存在下で抗IgE (1 µg/ml) を用いて刺激した。抗IgE ()、抗IgE + IL-3 ()、抗IgE + GM-CSF ()、抗IgE + IL-5 ()、抗IgE + IL-3 + 9A2-VR24.29 ()、抗IgE + GM-CSF + 9A2-VR24.29 ()、抗IgE + IL-5 + 9A2-VR24.29 (○)。上清に含まれるサイトカインのレベルをELISAによって測定した。9A2-VR24.29の不在下と存在下でのサイトカインの放出の有意差を、ダネット事後検定を伴う一元配置分散分析によって分析した。* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001。すべての値を4回の独立な実験に関して平均値 ± SEMとして表示した。(○) CD34⁺ BM細胞を9A2-VR24.29 ()、抗IL-5R ()、抗IL-3R ()、抗GM-CSFR ()、抗IL-5R () のいずれか、または抗IL-5Rと抗IL-3Rと抗GM-CSFRの組み合わせ () であらかじめ処理し、SCF (50 ng/ml)、IL-3 (10 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (10 ng/ml) を含む半固体培地の中で増殖させた。細胞を37 °Cで14~16日間インキュベートし、コロニーをカウントした。すべての値を平均値 ± SEMとして表示した。すべての実験を少なくとも4回繰り返し、代表的な実験を示してある。

10

【図17A-C】図17A~図17Dは、ヒト異種移植片モデルにおいて9A2-VR24.29が鼻ポリープに及ぼす効果を示すグラフ表示である。(A)は、9A2-VR24.29 () またはアイソタイプ対照抗体 (○) で処理した後に異種移植片モデルから単離したポリープの外径を示している。矢印で示した時点でマウスを抗体で処理した。データは平均値 ± SEMで示した。ポリープに浸潤する好酸球 (B) と好中球 (C) の数も評価した。p > 0.05; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.005。

20

【図18】図18A~図18Gは、9A2-VR24.29が生体内でヒト鼻ポリープ異種移植片炎症性細胞の生存を抑制することを示す一連のグラフ表示である。アイソタイプ対照mAbまたは9A2-VR24.29 (5 mg/kg/注射) を合計で4回皮下ポリープ内注射することにより鼻ポリープ異種移植片を弱く処理し、そのポリープを移植してから5週間後に切除した。(A) トルイジンブルー染色したマスト細胞 / mm² (1つの処理につきn = 11匹のマウス; 9つの異なる患者サンプル); (B~G) 鼻ポリープ異種移植片から回収したヒト細胞の数であり、(B) 好酸球 (CD16⁻ CD15⁺ CD49d⁺ Siglec8⁺); (C) 好中球 (CD14⁻ CD49d⁻ CD15⁺ CD16⁺); (D) マクロファージ (CD16⁻ CD49d⁻ CD14⁺ CD15⁺); (E) B細胞 (CD45⁺ CD19⁺ CD20⁺); (F) 形質B細胞 (CD45⁺ CD19⁺ CD138⁺); (G) T細胞 (CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD4⁺CD8⁺) のフローサイトメトリー分析によって求めた。データ: 中央値 ± 範囲; (B~D) 1つの処理につきn = 14匹のマウス、6人の異なる患者からの鼻ポリープサンプル; (E~G) アイソタイプ対照mAbと9A2-VR24.29のそれぞれに関してn = 6匹または7匹のマウス、3人の異なる鼻ポリープ患者; 示してある比較に関し、(A、D~G) * p < 0.05 マン-ホイットニーのU検定、または(B) * p < 0.05 ウィルコクソンの符号順位検定; ns = 非有意。

30

【図19】図19A~図19Dは、9A2-VR24.29が一次骨髄細胞とヒトTF-1細胞への結合に関してIL-3、GM-CSF、IL-5と競合することを示すグラフ表示である。精製したヒト好酸球を9A2-VR24.29 () またはヒトIgG4対照抗体 (○) とともにあらかじめインキュベートした。(A) 次に、細胞を340 pMの放射性ヨウ素化IL-3、(B) 40 pMの放射性ヨウ素化GM-CSF、(C) 200 pMの放射性ヨウ素化IL-5で平衡させた。各点は、放射性ヨウ素化サイトカインが結合した細胞のデュープリケートで求めた平均値であり、誤差棒は標準偏差を表わす。代表的な実験からのデータを示してある、n = 2。(D) TF-1細胞をIL-3 ()、GM-CSF ()、IL-5 () のいずれかとともにあらかじめインキュベートした後、細胞を85 pMの放射性ヨウ素化9A2-VR24.29で平衡させた。各点は、放射性ヨウ素化9A2-VR24.29が結合した細胞のデュープリケートで求めた平均値であり、誤差棒は標準偏差を表わす。代表的な実験からのデータを示してある、n = 3。

40

【図20A-B】図20A~図20Dは、9A2-VR24.29とCD131の間の部位2相互作用インターフェイスの図像表示である。(A) GM-CSF受容体三次構造の上にCD131 / 9A2-VR24.29 Fab複合体を重ね合わせてあり、9A2-VR24.29 Fab (重鎖をオレンジ色で、軽鎖を黄色で示してある) とGM-CSF (灰色) の間の相互作用インターフェイスが重複していることが示されている。GM-CSF三次構造からのCD131二量体を緑色と紫色に着色してある。(B) CD131二量

50

体上において9A2-VR24.29と相互作用する重要な残基の面表示を示してある。9A2-VR24.29結合親和性に対する特定のアラニン置換変異の効果を示すため、個々の残基に着色してある。すなわち、結合しない変異、または結合が無視できる変異は赤色で、結合を $10^{-5} \sim 10^{-7}$ Mの範囲へと小さくする変異は黄色で、結合を改善する変異は青色で示してある。CDR H1~H3およびCDR L1とL3を含む詳細な相互作用は、添付の拡大パネルに示してある。極性相互作用を黒の破線で示し、重要なファンデルワールス相互作用を黄色で示してある。どの図もPyMOLを用いて作成した。

【図20C-D】図20A~図20Dは、9A2-VR24.29とCD131の間の部位2相互作用インターフェイスの図像表示である。(C) CDR H3からのD101およびY100と相互作用ネットワークを形成する際に関与する重要なCD131残基(Y365とH367)を示してある。水素結合を黒の破線で示し、ファンデルワールス接触を黄色の破線で示してある。(D) CD131上においてCDR H3からのD101と水素結合するY39の側鎖を安定化させるのにF103とI338が関与することを示してある。水素結合を黒の破線で示し、ファンデルワールス接触を黄色の破線で示してある。

【図21A-E】図21A~図21Jは、ヒト異種移植片モデルにおいて9A2-VR24.29とプレドニゾロンが鼻ポリープに及ぼす効果を示すグラフ表示である。Aは、9A2-VR24.29、プレドニゾロン、生理食塩水ビヒクル、アイソタイプ対照抗体のいずれかで処理した後に異種移植片モデルから単離したポリープの外径を示している。矢印で示した時点でマウスを抗体で処理した。データは平均値 \pm SEMで示した。# $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。(B)は、9A2-VR24.29、プレドニゾロン、生理食塩水ビヒクル、アイソタイプ対照抗体のいずれかで処理した後に異種移植片モデルから単離したポリープの重量を示している。(C~J)鼻ポリープ異種移植片から回収したヒト細胞の数であり、(C)好酸球(CD16⁻ CD15⁺ CD49d⁺ Siglec 8⁺) ; (D)好中球(CD14⁻ CD49d⁻ CD15⁺ CD16⁺) ; (E)マクロファージ(CD16⁻ CD49d⁻ CD14⁺ CD15⁺) ; (F~H)T細胞(それぞれCD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺) ; (I)B細胞(CD45⁺ CD19⁺ CD20⁺ ; CD45⁺ CD19⁺ CD138⁺) ; (J)形質細胞のフローサイトメトリ分析によって求めた。データ：中央値 \pm 範囲 ; (A) # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置分散分析 ; または(B~J)クラスカル-ウォリス検定 * $p < 0.05$ 。

【図21F-J】図21A~図21Jは、ヒト異種移植片モデルにおいて9A2-VR24.29とプレドニゾロンが鼻ポリープに及ぼす効果を示すグラフ表示である。Aは、9A2-VR24.29、プレドニゾロン、生理食塩水ビヒクル、アイソタイプ対照抗体のいずれかで処理した後に異種移植片モデルから単離したポリープの外径を示している。矢印で示した時点でマウスを抗体で処理した。データは平均値 \pm SEMで示した。# $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。(B)は、9A2-VR24.29、プレドニゾロン、生理食塩水ビヒクル、アイソタイプ対照抗体のいずれかで処理した後に異種移植片モデルから単離したポリープの重量を示している。(C~J)鼻ポリープ異種移植片から回収したヒト細胞の数であり、(C)好酸球(CD16⁻ CD15⁺ CD49d⁺ Siglec 8⁺) ; (D)好中球(CD14⁻ CD49d⁻ CD15⁺ CD16⁺) ; (E)マクロファージ(CD16⁻ CD49d⁻ CD14⁺ CD15⁺) ; (F~H)T細胞(それぞれCD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺) ; (I)B細胞(CD45⁺ CD19⁺ CD20⁺ ; CD45⁺ CD19⁺ CD138⁺) ; (J)形質細胞のフローサイトメトリ分析によって求めた。データ：中央値 \pm 範囲 ; (A) # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ ボンフェローニ事後検定を伴う二元配置分散分析 ; または(B~J)クラスカル-ウォリス検定 * $p < 0.05$ 。

【図22】図22Aと図22Bは、ヒト異種移植片モデルにおいて9A2-VR24.29とプレドニゾロンが鼻ポリープのマスト細胞の数と粘液産生に及ぼす効果を示すグラフ表示である。(A)は、トルイジンブルーで染色したマスト細胞の数/mm²を示しており ; (B)は、9A2-VR24.29、プレドニゾロン、生理食塩水ビヒクル、アイソタイプ対照抗体のいずれかで処理した後に異種移植片モデルから単離したポリープからの粘液の面積(mm²)を示している。データ：中央値 \pm 範囲 ; クラスカル-ウォリス検定 * $p < 0.05$ 。

【図23】図23Aと図23Bは、ヒト異種移植片モデルにおいてポリープ内と全身に投与された9A2-VR24.29が鼻ポリープに及ぼす効果を示すグラフ表示である。9A2-VR24.29またはア

10

20

30

40

50

イソタイプ対照抗体をポリープ内または全身に投与して処理した後に異種移植片モデルから単離されたポリープについて、(A)は、そのポリープの外径を示しており、(B)は、そのポリープの重量を示している。

【発明を実施するための形態】

【0150】

一般的事項

本明細書を通じ、特に断わらない限り、または文脈から異なることがわかる場合を除き、単一の工程、物質の組成物、工程群、物質の組成物群への言及は、1つまたは複数（すなわち1つ以上）の工程、物質の組成物、工程群、物質の組成物群を包含する。

【0151】

当業者は、本開示に対して具体的に記載した以外のバリエーションや改変が可能であることがわかるであろう。本開示はそのようなバリエーションや改変をすべて含むことを理解されたい。本開示は、本明細書で言及した、または本明細書に示した工程、特徴、組成物、化合物のすべてを個別に、または集合的に含むとともに、その工程または特徴のあらゆる組み合わせ、または任意の2つ以上の組み合わせも含む。

【0152】

本明細書に記載した具体的な例は例示のみを目的としているため、本開示は、そのような具体的な例による範囲に限定されない。機能的に同等な産物、組成物、方法は、明らかに本開示の範囲内である。

【0153】

本開示のどの例も、特に断わらない限り、必要に応じて変更を加えた上で本開示の他のあらゆる例に適用される。

【0154】

本開示でCD131結合タンパク質に関するどの例も、必要に応じて変更を加えた上でCD131結合抗体に適用される。

【0155】

本開示でCD131結合タンパク質に関するどの例も、必要に応じて変更を加えた上でCD131結合化合物に適用される。

【0156】

特に断わらない限り、本明細書で用いるあらゆる科学技術用語は、（例えば細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、生化学において）当業者が一般に理解しているのと同じ意味を持つ。

【0157】

特に断わらない限り、本開示で利用する組み換えタンパク質、細胞培養、免疫学の技術は、当業者に周知の標準的な手続きである。そのような技術は出典となる文献に記載されて説明されており、例えば文献として、J. Perbal、『A Practical Guide to Molecular Cloning』、John Wiley and Sons社（1984年）、J. Sambrook他、『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989年）、T.A. Brown（編者）、『Essential Molecular Biology: A Practical Approach』、第1巻と第2巻、IRL Press社（1991年）、D.M. GloverとB.D. Hames（編者）、『DNA Cloning: A Practical Approach』、第1巻～第4巻、IRL Press社（1995年と1996年）、F.M. Ausubel他（編者）、『Current Protocols in Molecular Biology』、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience社（1988年、現在までのあらゆる更新を含む）、Ed HarlowとDavid Lane（編者）、『Antibodies: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1988年）、J.E. Coligan他（編者）、『Current Protocols in Immunology』、John Wiley & Sons社（現在までのあらゆる更新を含む）がある。

【0158】

本明細書における可変領域とその部分、免疫グロブリン、抗体とそのフラグメントの説明と定義は、Kabat、「免疫学的に興味深いタンパク質の配列」、国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州、1987年と1991年、および/またはBork他、J Mol. Biol. 第24巻

10

20

30

40

50

、309～320ページ、1994年、および/またはChothiaと Lesk J. Mol Biol. 第196巻：901～917ページ、1987年、および/またはChothia他、Nature第342巻、877～883ページ、1989年、および/またはAl-Lazikani他、J Mol Biol第273巻、927～948ページ、1997年の中の議論によってさらに明確にすることができよう。

【0159】

「および/または」という用語、例えば「Xおよび/またはY」は、「XとY」または「XまたはY」を意味すると理解され、両方の意味またはいずれかの意味を明白に示している。

【0160】

本明細書を通じ、「含む」という用語、またはそのバリエーションである「含んでいる」は、記載されている要素、整数、工程、要素群、整数群、工程群を包含することを意味するが、他の何らかの要素、整数、工程、要素群、整数群、工程群が除外されることはない。

10

【0161】

本明細書では、「に由来する」という用語は、特定のものが特定の供給源から得られることを示していると理解されるが、必ずしもその供給源から直接得られる必要はない。

【0162】

本明細書における例えば残基の範囲への言及は、端の値を含むと理解される。例えば「アミノ酸56～65を含む領域」は、端の値を含むと理解される。すなわちその領域は、指定された配列中の56、57、58、59、60、61、62、63、64、65という番号のアミノ酸配列を含んでいる。

20

【0163】

定義の抜粋

呼称を限定するためではなく呼称を決めることだけが目的で、ヒトCD131（プレCD131）の配列の一例が、NCBI参照配列：NP_000386.1とNCBI Genbank登録番号P32927（と、配列番号1）に示されている。成熟したヒトCD131の配列は配列番号1のアミノ酸1～16を欠いている。アミノ酸の位置は、本明細書ではプレCD131を参照して示すことがしばしばある。成熟CD131における位置は、シグナル配列（配列番号1の場合にはアミノ酸1～16）を考慮することによって容易に求まる。他の種に由来するCD131の配列は、本明細書および/または公開データベースに示されている配列を用いて求めること、または標準的な技術（例えばAusbel他（編者）、『Current Protocols in Molecular Biology』、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience社（1988年、現在までのあらゆる更新を含む）、またはSambrook他、『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989年））を用いて求めることができる。ヒトCD131に言及するとき、hCD131と略記することができる。可溶性CD131に言及するとき、CD131の細胞外領域（例えば配列番号1のアミノ酸17～438）を含むポリペプチドを意味する。

30

【0164】

CD131に言及するとき、CD131の元の形と、その変異体形態であってCD131（例えばhCD131）に結合してシグナル伝達を誘導する能力を保持しているものが含まれる。

【0165】

「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」という用語は、出所または供給元が理由で、元の状態で付随している天然の要素を伴っていないタンパク質またはポリペプチドであり、同じ供給元からの他のタンパク質を実質的に含まない。タンパク質は、自然に付随している要素を実質的になくすこと、または本分野で知られている精製技術を利用した単離によって実質的に精製することができる。「実質的に精製された」は、タンパク質が汚染物質を実質的に含まないこと、例えば汚染物質が少なくとも約70%、または75%、または80%、または85%、または90%、または95%、または96%、または97%、または98%、または99%除去されていることを意味する。

40

【0166】

「組み換え」という用語は、人工的遺伝子組み換えの産物を意味すると理解される。し

50

たがって抗体抗原結合ドメインを含む組み換えタンパク質の文脈では、この用語は、B細胞が成熟する間に起こる天然の組み換え産物である、対象の体内で自然に発生する抗体を包含しない。しかしそのような抗体が単離されると、それは、抗体抗原結合ドメインを含む単離されたタンパク質と見なすべきである。同様に、そのタンパク質をコードする核酸を単離して組み換え手段を用いて発現させる場合、得られるタンパク質は、抗体抗原結合ドメインを含む組み換えタンパク質である。組み換えタンパク質には、人工的な組み換え手段によって発現させるタンパク質も包含される（ただし、そのタンパク質を発現させる細胞、組織、対象いずれかの中にその人工的な組み換え手段が存在しているとき）。

【0167】

「タンパク質」という用語は、単一のポリペプチド鎖、すなわちペプチド結合によって連結された連続した一連のアミノ酸、または互いに共有結合または非共有結合した一連のポリペプチド鎖（すなわちポリペプチド複合体）を含むと理解される。例えば一連のポリペプチド鎖は、適切な化学的結合またはジスルフィド結合を利用して共有結合させることができる。非共有結合の例には、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用が含まれる。

【0168】

「ポリペプチド」または「ポリペプチド鎖」という用語は、上記の段落から、ペプチド結合によって連結された一連の連続したアミノ酸を意味すると理解されよう。

【0169】

本明細書では、「抗原結合ドメイン」という用語は、抗体で抗原に特異的に結合することのできる領域、すなわち V_H 、または V_L 、または V_H と V_L の両方を含むFvを意味すると理解される。抗原結合ドメインは、抗体全体の文脈である必要はなく、例えば、単離形態または別の形態（例えば本明細書に記載したようにscFvなど）であることが可能である。

【0170】

本開示の目的では、「抗体」という用語は、抗原結合ドメインがFvに含まれることが理由で、1個または数個の密接に関係した抗原（例えばCD131）に特異的に結合することのできるタンパク質を含んでいる。この用語は、4本鎖抗体（例えば2本の軽鎖と2本の重鎖）、組み換え抗体または改変された抗体（例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、CDR移植抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体、類似ヒト化（synhumanized）抗体、半抗体、二重特異性抗体）を含んでいる。抗体は一般に複数の定常ドメインを含んでいて、それら定常ドメインが配置されて、1つの定常領域、または定常フラグメント、または結晶化可能なフラグメント（Fc）になることができる。抗体の形態例には、基本単位として4本鎖構造が含まれる。完全長抗体は、共有結合した2本の重鎖（約50~70 kD）と、2本の軽鎖（それぞれ約23 kD）を含んでいる。軽鎖は一般に1つの可変領域（存在する場合）と1つの定常ドメインを含んでいて、哺乳動物では、鎖または鎖のいずれかである。重鎖は一般に、1つの可変領域と、ヒンジ領域によって追加の定常ドメインに連結された1つまたは2つの定常ドメインを含んでいる。哺乳動物の重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、 ϵ というタイプのいずれか1つからなる。それぞれの軽鎖も重鎖の1つに共有結合している。例えば2本の重鎖と1本の重鎖と1本の軽鎖が鎖間ジスルフィド結合と非共有相互作用によって互いに合体する。鎖間ジスルフィド結合の数は、抗体のタイプが異なると異なる可能性がある。それぞれの鎖は、1つのN末端可変領域（ V_H または V_L であり、それぞれは長さがアミノ酸約110個である）と、C末端の1つ以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメイン（長さがアミノ酸約110個の C_L ）は、重鎖の第1の定常ドメイン（長さがアミノ酸330~440個の C_H1 ）と揃っていて、その第1の定常領域にジスルフィド結合している。軽鎖可変領域は重鎖の可変領域と揃っている。抗体重鎖は、2つ以上の追加の C_H ドメイン（例えば C_H2 、 C_H3 など）を含むことができ、 C_H1 定常ドメインと C_H2 定常ドメインの間にヒンジ領域を含むことができる。抗体は、任意のタイプ（例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY）、またはクラス（例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂）、またはサブクラスのものが可能である。一例では、抗体は齧歯類（マウスまたはラット）抗体、または霊長類（ヒトなど）抗体である。一例では、抗体重鎖は、C末端リシン残基を欠いている。一例では、抗体は

10

20

30

40

50

、ヒト化抗体、類似ヒト化抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、脱免疫化抗体のいずれかである。

【0171】

「完全長抗体」、「完全な抗体」、「全抗体」という用語は同じ意味で用いることができ、抗体の抗原結合フラグメントとは違って実質的に完全な形態の抗体を意味する。具体的には、全抗体には、Fc領域を含む重鎖と軽鎖を有する抗体が含まれる。定常ドメインとして、野生型配列の定常ドメイン（例えばヒト野生型配列定常ドメイン）、またはそのアミノ酸配列変異体が可能である。

【0172】

本明細書では、「可変領域」は、本明細書で定義した抗体の軽鎖および/または重鎖のうちで抗原に特異的に結合することのできる部分を意味し、その中には、相補性決定領域（CDR）、すなわちCDR1、CDR2、CDR3と、フレームワーク領域（FR）のアミノ酸配列が含まれる。例えば可変領域は、3つまたは4つのFR（例えばFR1、FR2、FR3と、場合によってはFR4）を3つのCDRとともに含んでいる。 V_H は重鎖の可変領域を意味する。 V_L は軽鎖の可変領域を意味する。

10

【0173】

本明細書では、「相補性決定領域」（同義語CDR；すなわちCDR1、CDR2、CDR3）という用語は、抗体可変領域のアミノ酸残基を意味し、その存在が、抗原の特異的な結合に主に寄与する。各可変領域ドメイン（ V_H または V_L ）は、典型的には、CDR1、CDR2、CDR3という3つのCDRを有する。一例では、CDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置は、Kabat「免疫学的に興味深いタンパク質の配列」、国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州、1987年と1991年（本明細書では「Kabatナンバリングシステム」とも呼ぶ）に従って規定される。別の一例では、CDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置は、Enhanced Chothia Numbering Scheme (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)に従って規定される。Kabatのナンバリングシステムによれば、 V_H のFRとCDRは以下のように位置する：残基1～30（FR1）、31～35（CDR1）、36～49（FR2）、50～65（CDR2）、66～94（FR3）、95～102（CDR3）、103～113（FR4）。Kabatのナンバリングシステムによれば、 V_L のFRとCDRは以下のように位置する：残基1～23（FR1）、24～34（CDR1）、35～49（FR2）、50～56（CDR2）、57～88（FR3）、89～97（CDR3）、98～107（FR4）。本開示は、Kabatナンバリングシステムによって規定されるFRとCDRに限定されることはなく、あらゆるナンバリングシステムを含んでおり、その中に含まれるのは、正規ナンバリングシステム、すなわちChothiaとLesk J. Mol. Biol. 196巻：901～917ページ、1987年；および/またはChothia他、Nature第342巻：877～883ページ、1989年；および/またはAl-Lazikani他、J. Mol. Biol. 第273巻：927～948ページ、1997年のナンバリングシステム；またはHonnegherとPlukthun J. Mol. Biol. 第309巻：657～670ページ、2001年のナンバリングシステム；またはGiudicelli他、Nucleic Acids Res. 第25巻：206～211ページ、1997年で論じられているIMGTシステムである。一例では、CDRはKabatナンバリングシステムに従って規定される。場合によっては、Kabatナンバリングシステムによる重鎖CDR2は、本明細書に記載した5個のC末端アミノ酸を含んでいないか、それらアミノ酸のうちの任意の1つ以上が別の天然のアミノ酸で置換されている。この点に関し、Padlan他、FASEB J.、第9巻：133～139ページ、1995年が、重鎖CDR2の5個のC末端アミノ酸は一般に抗原結合に関与しないことを確立した。

20

30

40

【0174】

「フレームワーク領域」（FR）は、可変領域でCDR残基を除いた残基である。

本明細書では、「Fv」という用語は、多数のポリペプチドからなるか、単一のポリペプチドからなるかに関係なく、 V_L と V_H が合わさって、抗原結合ドメインを有する複合体、すなわち抗原に特異的に結合できる複合体を形成する任意のタンパク質を意味すると理解される。抗原結合ドメインを形成する V_L と V_H は、単一のポリペプチド鎖、または異なる複数のポリペプチド鎖で構成することができる。さらに、本開示のFv（と本開示の任意のタンパク質）は、多数の抗原結合ドメインを持つことができるが、それら抗原結合ドメインは、同じ抗原に結合しても結合しなくてもよい。この用語は、抗体に直接由来するフラグメ

50

ントと、組み換え手段を利用して作製したそのようなフラグメントに対応するタンパク質を包含すると理解される。いくつかの例では、 V_H は重鎖定常ドメイン(C_H1)に連結されていない、および/または V_L は軽鎖定常ドメイン(C_L)に連結されていない。 F_v を含むポリペプチドまたはタンパク質の例に、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、より高次の複合体や、定常領域またはそのドメイン(C_H2 ドメインまたは C_H3 ドメイン)に連結された上記の任意のもの(例えばミニボディ)が含まれる。「Fabフラグメント」は、免疫グロブリンの1価の抗原結合フラグメントからなり、全抗体を酵素パパイニンで消化させることで完全な軽鎖と重鎖の一部からなるフラグメントを生成させて作製することや、組み換え手段を利用して作製することができる。抗体の「Fab'フラグメント」は、全抗体をペプシンで処理した後、還元することで、完全な軽鎖と、 V_H と単一の定常ドメインを含む重鎖の部分からなる分子を生成させることによって取得できる。このようにして処理した抗体1つにつき2つのFab'フラグメントが得られる。Fab'フラグメントは、組み換え手段によって作製することもできる。抗体の「 $F(ab')_2$ フラグメント」は、2つのジスルフィド結合によって接続された2つのFab'フラグメントの二量体からなり、全抗体分子を酵素ペプシンで処理し、その後還元することなしに得られる。「 Fab_2 」フラグメントは、例えばロイシンジッパーまたは C_H3 ドメインを用いて連結した2つのFabフラグメントを含む組み換えフラグメントである。「一本鎖 F_v 」または「scFv」は、抗体の可変領域フラグメント(F_v)を含む組み換え分子であり、その分子では、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域が適切な可撓性ポリペプチドリンカーによって共有結合している。

10

20

【0175】

本明細書では、CD131結合タンパク質またはその抗原結合ドメインと抗原の相互作用に関する「結合する」という用語は、その相互作用が抗原上の特別な構造(例えば抗原決定基またはエピトープ)の存在に依存することを意味する。例えば抗体は、タンパク質一般ではなくて特定のタンパク質構造を認識してそれに結合する。抗体がエピトープ「A」に結合するのであれば、標識された「A」とタンパク質を含む反応物の中にエピトープ「A」(すなわち遊離した標識されていない「A」)を含む分子が存在していると、抗体に結合する標識された「A」の量が減るであろう。

【0176】

本明細書では、「特異的に結合する」は、本開示のCD131結合タンパク質が特定の抗原またはその抗原を発現する細胞と、代替りの抗原または細胞と比べてより頻繁に、および/またはより迅速に、および/またはより長時間、および/またはより大きな親和性で、反応または会合することを意味する。例えばCD131結合タンパク質は、CD131(例えばhCD131、またはその1つの領域を含むポリペプチド(例えば配列番号191に示した配列を含むポリペプチド))に、他のインターロイキン受容体に対するよりも、または多反応性の天然の抗体(すなわちヒトで自然に見られる多彩な抗原に結合することが知られている天然の抗体)によって一般に認識される抗原に対するよりもかなり大きな親和性(例えば1.5倍、または2倍、または5倍、または10倍、または20倍、または40倍、または60倍、または80倍~100倍、または150倍、または200倍)で結合する。本開示の一例では、CD131結合タンパク質は、hCD131の1形態に、またはその1つの領域(例えばhCD131の細胞外領域)を含むポリペプチドに、または配列番号191に示した配列を含むポリペプチドに、配列番号119、124、131、137のいずれかに示した配列を含む配列番号191の変異形態に対するよりも少なくとも1.5倍、または2倍、またはそれ以上(例えば5倍、または10倍、または20倍、または50倍、または100倍、または200倍)大きな親和性で「特異的に結合する」。「結合する」への言及は、「特異的に結合する」という表現を明白に示しており、逆も同様である。

30

40

【0177】

本明細書では、「結合が検出可能でない」という表現は、CD131結合タンパク質(例えば抗原)が候補抗原に、バックグラウンドよりも10%未満、または8%未満、または6%未満、または5%未満のレベルで結合することを意味すると理解される。バックグラウンドとして、そのタンパク質の不在下で、および/または陰性対照タンパク質(例え

50

ばアイソタイプ対照抗体)の存在下で検出される結合信号のレベル、および/または陰性対照抗原の存在下で検出される結合のレベルが可能である。結合のレベルはバイオセンサー分析(例えばBiacore)を利用して検出され、その分析では、抗原(例えばポリペプチド)を固定化してCD131結合タンパク質と接触させる。

【0178】

本明細書では、「特異的に結合しない」という表現は、ポリペプチドに対する本開示のCD131結合タンパク質の結合のレベルが、バックグラウンド(例えばCD131結合タンパク質の不在下で、および/または陰性対照タンパク質(例えばアイソタイプ対照抗体)の存在下で検出される結合信号のレベル)よりも、および/または陰性対照ポリペプチドの存在下で検出される結合のレベルよりも統計的に有意に大きくはないことを意味すると理解される。結合のレベルは、バイオセンサー分析(例えばBiacore)を用いて検出され、その分析では、抗原(例えばポリペプチド)を固定化してCD131結合タンパク質と接触させる。

10

【0179】

本明細書では、抗原に関する「低下した結合」または「より低いレベルでの結合」という表現は、CD131結合タンパク質(例えば抗体)が抗原(例えば本明細書に示した配列番号191の変異体(例えば配列番号119、124、131、137のいずれかに示した配列を含む変異体))に、対照エピトープまたは対照抗原(例えば配列番号191)に対するよりも少なくとも約1.5倍、または2倍、または5倍、または10倍、または20倍、または50倍、または100倍、または200倍小さな親和性で結合することを意味すると理解される。

20

【0180】

CD131結合タンパク質または抗体が、あるポリペプチドに「より多く結合する」と見なせるのは、そのCD131結合タンパク質または抗体が、そのポリペプチドに、別のポリペプチドに対するそのタンパク質または抗体の解離定数(K_D)よりも小さな K_D で結合する場合である。一例では、CD131結合タンパク質または抗体があるポリペプチドにより多く結合すると見なされるのは、そのCD131結合タンパク質または抗体が、そのポリペプチドに、別のポリペプチドに対するそのタンパク質または抗体の K_D よりも少なくとも約1.5倍、または2倍、または5倍、または10倍、または20倍、または50倍、または100倍、または200倍小さな親和性(すなわち K_D)で結合する場合である。

【0181】

明確にする目的で、そして本明細書に例示した主題に基づけば当業者には明らかなように、本明細書における「親和性」に言及するというのは、タンパク質または抗体の K_D に言及することである。

30

【0182】

明確にする目的で、そして本明細書に例示した主題に基づけば当業者には明らかなように、「少なくとも約Xの親和性」への言及は、親和性(または K_D)が記載の値と等しいかそれよりも大きい(すなわち親和性として記載されている値がより小さい)こと、すなわち2 nMという親和性は、3 nMという親和性よりも大きいことを意味すると理解される。言い換えると、この表現は、「X以下の親和性」とすることが可能であろう。ただしXはそこに記載されている値である。

40

【0183】

「少なくとも約Xの IC_{50} 」は、 IC_{50} が記載の値と等しいかそれよりも小さい(すなわち IC_{50} として記載されている値がより小さい)こと、すなわち2 $\mu\text{g/ml}$ という IC_{50} は1 $\mu\text{g/ml}$ という IC_{50} よりも大きいことを意味すると理解される。言い換えると、この表現は、「X以下の IC_{50} 」とすることが可能であろう。ただしXはそこに記載されている値である。

【0184】

本明細書では、「エピトープ」(同義語「抗原性決定基」)という用語は、CD131のうちで抗体の抗原結合ドメインを含むCD131結合タンパク質が結合する領域を意味すると理解される。この用語は、CD131結合タンパク質が接触する特定の残基または構造に必ずしも限定されない。例えばこの用語は、CD131結合タンパク質が接触する複数のアミノ酸に

50

またがる領域と、この領域外の5～10個（またはそれ以上）、または2～5個、または1～3個のアミノ酸を含んでいる。いくつかの例では、エピトープは、CD131結合タンパク質が折り畳まれて例えば別のC131ポリペプチドと会合するときに互いに近接した位置になる一連の不連続なアミノ酸、すなわち「配座（conformational）エピトープ」を含んでいる。

【0185】

「競合的に抑制する」という表現は、本開示のCD131結合タンパク質（またはその抗原結合ドメイン）が、CD131（例えばCD131）に対する記載の抗体またはCD131結合タンパク質の結合を低減させるか阻止することを意味すると理解される。これは、CD131結合タンパク質（またはその抗原結合ドメイン）と抗体が、同じエピトープまたは重複しているエピトープに結合することに起因する可能性がある。上記のことから、CD131結合タンパク質は抗体の結合を完全に抑制する必要はなく、結合が統計的に有意な量、例えば少なくとも約10%、または20%、または30%、または40%、または50%、または60%、または70%、または80%、または90%、または95%低下することだけが必要とされることが明らかであろう。例えばCD131結合タンパク質は、抗体の結合を少なくとも約30%、例えば少なくとも約50%、少なくとも約70%、例えば少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%または85%、例えば少なくとも約90%低下させる。結合の競合的抑制を調べる方法は本分野で知られている、および/または本明細書に記載されている。例えば抗体をCD131結合タンパク質の存在下または不在下でCD131に曝露する。CD131結合タンパク質の存在下でCD131結合タンパク質の不在下よりも少数の抗体が結合する場合には、そのタンパク質は抗体の結合を競合的に抑制すると見なされる。一例では、競合的抑制は立体障害に起因するわけではない。

10

20

【0186】

2つのエピトープの文脈における「重複している」は、2つのエピトープが十分な数のアミノ酸残基を共有していて、一方のエピトープに結合するCD131結合タンパク質（またはその抗原結合ドメイン）が、他方のエピトープに結合するCD131結合タンパク質（またはその抗原結合ドメイン）の結合を競合的に抑制できることを意味すると理解される。例えば「重複している」エピトープは、少なくとも1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または20個のアミノ酸を共有している。

【0187】

本明細書では、「無効にする」という用語は、タンパク質が、細胞内においてIL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFによるCD131を媒介としたシグナル伝達をブロックすること、または低減させること、または阻止することを意味する。無効化を調べる方法は、本分野で知られている、および/または本明細書に記載されている。

30

【0188】

本明細書では、「疾患」という用語は、正常な機能の中断または正常な機能への干渉を意味し、特定の疾患に限定されることはなく、病気や異常が含まれる。

【0189】

本明細書では、「CD131関連疾患」は、CD131の過剰、またはCD131を発現する細胞の過剰によって起こるあらゆる疾患か、CD131の過剰、またはCD131を発現する細胞の過剰に関連する疾患を意味する。当業者は、そのような疾患が何であるか容易にわかるであろう。疾患の例は本明細書に記載されている。

40

【0190】

本明細書では、「阻止する」または「阻止」という用語は、本開示のCD131結合タンパク質を投与することによって疾患の少なくとも1つの症状の進展を停止させること、または妨げることを含んでいる。この用語は、再発を阻止するか妨げて対象を治療し、寛解させることを包含する。

【0191】

本明細書では、「治療する」または「治療」という用語は、本明細書に記載したCD131結合タンパク質を投与することで特定の病気または疾患の少なくとも1つの症状を低減ま

50

たは消失させることを含む。

【0192】

本明細書では、「対象」という用語は、あらゆる動物を意味すると理解され、その中にはヒト、例えば哺乳動物が含まれる。対象の非限定的な例には、ヒトと非ヒト霊長類が含まれる。例えば対象はヒトである。

【0193】

抗体

一例では、本明細書の任意の例に記載したCD131結合タンパク質は抗体である。

【0194】

抗体を作製する方法は本分野で知られている、および/またはHarlowとLane(編者)『Antibodies: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press、(1988年)に記載されている。一般に、そのような方法では、CD131(例えばhCD131)またはその1つの領域(例えば配列番号191に示されている配列を含む細胞外領域)または免疫原性フラグメント、またはそのエピトープ、またはそれ(すなわち免疫原)を発現して提示する細胞を、場合によっては、適切な、または望む基剤、アジュバント、医薬として許容可能な賦形剤とともに製剤化し、非ヒト動物(例えばマウス、ニワトリ、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ)に投与する。免疫原は、鼻腔内、筋肉内、皮下、静脈内、皮内、腹腔内に投与すること、または他の知られている経路で投与することができる。

10

【0195】

ポリクローナル抗体の作製は、免疫化した動物の血液を免疫化後のさまざまな時点でサンプリングしてモニタすることができる。必要な場合には1回以上の追加の免疫化を実施して望む抗体力価を実現することができる。適切な力価に達するまで、ブーストとタイタリングのプロセスを繰り返す。望むレベルの免疫原性が得られると、免疫化した動物を出血させ、血清を単離して保管する、および/またはその動物を用いてポリクローナル抗体(mAb)を作製する。

20

【0196】

モノクローナル抗体は、本開示で考慮する抗体の形態の一例である。「モノクローナル抗体」または「mAb」という用語は、同じ抗原(例えば抗原内の同じエピトープ)に結合することのできる均一な抗体集団を意味する。この用語には、抗原の供給源や作製方法に関する制限がない。

30

【0197】

mAbを作製するため、多数ある公知の技術のうちの任意の1つ、例えばアメリカ合衆国特許第4196265号、またはHarlowとLane(1988年)、上掲文献に例示されている手続きを用いることができる。

【0198】

例えば適切な動物を、抗体産生細胞を刺激するのに十分な条件下で免疫原を用いて免疫化する。齧歯類(ウサギ、マウス、ラットなど)が動物の例である。ヒト抗体を発現するよう遺伝子操作して例えばマウス抗体は発現しないマウスも、(例えばWO2002/066630に記載されているようにして)本開示の抗体を作製するのに使用できる。

40

【0199】

免疫化後、抗体産生能力を有する体細胞、特にBリンパ球(B細胞)を選択してmAb作製プロトコルで使用する。これらの細胞は、脾臓、扁桃腺、リンパ節いずれかの生検から、または末梢血サンプルから得ることができる。次に、免疫化した動物からのB細胞を、一般に、免疫原で免疫化した動物と同じ種に由来する不死骨髄腫細胞と融合させる。

【0200】

組織培養培地の中でヌクレオチドが新たに合成されるのを阻止する薬剤を含む選択培地の中で培養することにより、ハイブリッドを増幅する。薬剤の例は、アミノプテリン、メトトレキサート、アザセリンである。

【0201】

50

増幅したハイブリドーマについて、例えばフローサイトメトリーおよび/または免疫化学および/またはイムノアッセイ（例えばラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞毒性アッセイ、ブランクアッセイ、ドットイムノアッセイなど）により、抗体の特異性および/または力価の機能的選択を実施する。

【0202】

あるいはABL-MYC技術（NeoClone社、マディソン、ウィスコンシン州 53713、アメリカ合衆国）を利用して、（例えばLargaespada他、J. Immunol. Methods. 第197巻：85～95ページ、1996年に記載されている）MAbを分泌する細胞系を作製する。

【0203】

抗体は、例えばアメリカ合衆国特許第6300064号および/または第5885793号に記載されているように、提示ライブラリ（例えばファージ提示ライブラリ）をスクリーニングすることによって作製または単離することもできる。例えば発明者は、ファージ提示ライブラリから完全なヒト抗体を単離した。

10

【0204】

本明細書に記載したように、CD131に結合する本開示のいくつかのCD131結合タンパク質は、CD131のいくつかの変異体と、または変異したCD131の領域を含むポリペプチドと交差反応する、および/または他のものとは交差反応しない。これらの特徴を利用して抗体またはCD131結合タンパク質を作製することができる。

【0205】

例えばファージ提示ライブラリを、配列番号1または191を含むポリペプチドでスクリーニングし、それに結合するタンパク質を同定する。次に、CD131結合タンパク質の結合が検出可能でないか、CD131結合タンパク質の結合レベルが低下している（例えば配列番号19、124、131、137のいずれかに示した配列を含む）ポリペプチドの変異体を用い、交差反応するタンパク質を除去する、および/または（CD131結合タンパク質が結合する例えば配列番号135、136、138、142のいずれかに示した配列を含む）ポリペプチド変異体を用い、正確に交差反応するタンパク質を単離する。非ヒト哺乳動物を免疫化するためのスクリーニング法を上記のことに基づいて考案することもできる。

20

【0206】

さらに別の一例では、CD131、またはその細胞外領域（場合によっては抗体9A2が結合する変異体）、またはCD131を発現する細胞を、9A2に接触させる。次に、ファージ提示ライブラリを、CD131に、またはその領域に、またはその細胞に接触させ、結合に関して抗体と競合することのできるタンパク質を発現するファージを選択する。

30

【0207】

本開示の抗体として、合成抗体が可能である。例えば抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、類似ヒト化抗体、霊長類化抗体、脱免疫化抗体のいずれかである。

【0208】

脱免疫化CD131結合タンパク質、キメラCD131結合タンパク質、CDR移植CD131結合タンパク質、ヒト化CD131結合タンパク質、類似ヒト化CD131結合タンパク質、霊長類化CD131結合タンパク質、ヒトCD131結合タンパク質、複合CD131結合タンパク質

本開示のCD131結合タンパク質として、CDR移植タンパク質が可能であり、このCDR移植タンパク質では、非ヒト種（例えばマウス、ラット、非ヒト霊長類）に由来する抗体からのCDRがヒト抗体からのFRに移植または挿入されているか、1つのタイプの抗体（例えば1つのタイプのヒト抗体）からのCDRが別のタイプの抗体（例えば別のタイプのヒト抗体）からのFRに移植または挿入されている。この用語は、例えばCDR移植可変領域を1つ以上と、例えばヒト可変領域、キメラ可変領域、類似ヒト化可変領域、霊長類化可変領域のいずれかを1つ以上含む複合CD131結合タンパク質も包含する。

40

【0209】

本開示のCD131結合タンパク質として、ヒト化タンパク質が可能である。

【0210】

「ヒト化タンパク質」という用語は、ヒト様可変領域を含むタンパク質を意味すると理

50

解され、そのタンパク質では、非ヒト種（例えばマウス、ラット、非ヒト霊長類）に由来する抗体からのCDRがヒト抗体からのFRに移植または挿入されている（このタイプの抗体は、「CDR移植抗体」のクラスに入る）。ヒト化CD131結合タンパク質には、ヒトタンパク質の1つ以上の残基が1つ以上のアミノ酸置換によって改変されたタンパク質、および/またはヒトタンパク質の1つ以上のFR残基が対応する非ヒト残基で置換されたタンパク質も含まれる。ヒト化タンパク質には、ヒト抗体にも非ヒト抗体にも見られない残基も含まれてよい。タンパク質の追加領域（例えばFc領域）は一般にヒトに由来する。ヒト化は、本分野で知られている方法、例えばアメリカ合衆国特許第5225539号、第6054297号、第7566771号、第5585089号のいずれかを利用して実施することができる。「ヒト化タンパク質」という用語は、例えばアメリカ合衆国特許第7732578号に記載されている超ヒト化タンパク質も包含する。この用語は、例えばヒト化可変領域を1つ以上と、例えばヒト可変領域、キメラ可変領域、類似ヒト化可変領域、霊長類化可変領域のいずれかを1つ以上含む複合タンパク質も包含する。

10

20

30

40

50

【0211】

本開示のCD131結合タンパク質として、ヒトCD131結合タンパク質が可能である。本明細書では、「ヒトタンパク質」という用語は、ヒトに見られる抗体可変領域と、場合によっては抗体定常領域を有するタンパク質を意味する。そのような領域は、例えばヒトの生殖細胞または体細胞に見られるか、そのような領域を用いて作ったライブラリに由来する。「ヒト」タンパク質は、ヒト配列によってコードされていないアミノ酸残基、例えばインビトロでのランダムな突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発によって導入された変異（特に、保存的置換を含む変異や、タンパク質の少数の残基（例えばタンパク質の1個、または2個、または3個、または4個、または5個の残基）における変異）を含むことができる。これらの「ヒトタンパク質」は、必ずしもヒトの免疫反応の結果として生成される必要はなく、組み換え手段（例えばファージ提示ライブラリのスクリーニング）を利用して、および/またはヒト抗体の定常領域および/または可変領域をコードする核酸を含むトランスジェニック動物（例えばマウス）によって、および/または（例えばアメリカ合衆国特許第5565332号に記載されているように）ガイドされた選択を利用して生成させることができる。この用語は、そのような抗体の親和性成熟形態も包含する。本開示の目的では、ヒトタンパク質には、例えばアメリカ合衆国特許第6300064号および/または第6248516号に記載されているように、ヒト抗体からのFR、またはヒトFRのコンセンサス配列からの配列を含むFRを含んでいて、CDRの1つ以上がランダムまたは半ばランダムであるタンパク質も含まれると考えられよう。

【0212】

ヒトCD131結合タンパク質の例は、可変領域のペアを含む抗体であり、以下の可変領域のペア：

- (i) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号5に示した配列を含む V_L ；
- (ii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号6に示した配列を含む V_L ；
- (iii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号7に示した配列を含む V_L ；
- (iv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号8に示した配列を含む V_L ；
- (v) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号9に示した配列を含む V_L ；
- (vi) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号10に示した配列を含む V_L ；
- (vii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号11に示した配列を含む V_L ；
- (viii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号12に示した配列を含む V_L ；
- (ix) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号13に示した配列を含む V_L ；
- (x) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号14に示した配列を含む V_L ；
- (xi) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号15に示した配列を含む V_L ；
- (xii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号16に示した配列を含む V_L ；
- (xiii) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号17に示した配列を含む V_L ；
- (xiv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号18に示した配列を含む V_L ；
- (xv) 配列番号20に示した配列を含む V_H と、配列番号19に示した配列を含む V_L ；

(l x v i) 配列番号71に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x v i i) 配列番号72に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x v i i i) 配列番号73に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x i x) 配列番号75に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x) 配列番号76に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x i) 配列番号77に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x i i) 配列番号78に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x i i i) 配列番号79に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x i v) 配列番号80に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x v) 配列番号81に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ; 10
 (l x x v i) 配列番号82に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x v i i) 配列番号83に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x v i i i i) 配列番号84に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x i x) 配列番号85に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x) 配列番号86に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x i) 配列番号87に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x i i) 配列番号88に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x i i i) 配列番号89に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x i v) 配列番号90に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x v) 配列番号91に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ; 20
 (l x x x v i) 配列番号92に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x v i i) 配列番号93に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x v i i i) 配列番号94に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (l x x x i x) 配列番号95に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c) 配列番号96に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c i) 配列番号97に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c i i) 配列番号98に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c i i i) 配列番号99に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c i v) 配列番号100に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c v) 配列番号101に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ; 30
 (x c v i) 配列番号102に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c v i i) 配列番号103に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c v i i i) 配列番号104に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (x c i x) 配列番号105に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c) 配列番号106に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c i) 配列番号107に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c i i) 配列番号108に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c i i i) 配列番号109に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c i v) 配列番号110に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c v) 配列番号111に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ; 40
 (c v i) 配列番号112に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c v i i) 配列番号113に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c v i i i) 配列番号114に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 (c i x) 配列番号115に示した配列を含むV_Hと、配列番号5に示した配列を含むV_L ;
 のいずれかを含んでいる。

【 0 2 1 3 】

場合によっては、V_Hを、重鎖定常領域（例えばIgG4重鎖定常領域、または安定化させたIgG4定常領域（例えば本明細書で論じてあるもの））、例えば配列番号197に示した配列を含む定常領域に連結させる。一例では、重鎖定常領域はC末端リシン残基を欠いている

【0214】

場合によっては、 V_L を重鎖定常領域に連結させる。

【0215】

本開示のCD131結合タンパク質として、類似ヒト化タンパク質が可能である。「類似ヒト化タンパク質」という用語は、WO2007/019620に記載されている方法によって調製したタンパク質を意味する。類似ヒト化CD131結合タンパク質は、抗体の可変領域として、新世界霊長類の抗体可変領域からのFRと、非新世界霊長類の抗体可変領域からのCDRを含む可変領域を含んでいる。例えば類似ヒト化CD131結合タンパク質は、抗体の可変領域として、その可変領域は、新世界霊長類の抗体可変領域からのFRと、マウスまたはラットの抗体からのCDRを含む可変領域を含んでいる。一例では、類似ヒト化CD131結合タンパク質は、可変領域の一方または両方が類似ヒト化されたCD131結合抗体である。この用語は、例えば類似ヒト化可変領域を1つ以上と、例えばヒト可変領域、ヒト化可変領域、キメラ可変領域のいずれかを1つ以上含む複合タンパク質も包含する。

10

【0216】

本開示のCD131結合タンパク質として、霊長類化タンパク質が可能である。「霊長類化タンパク質」は、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）を免疫化した後に生成する抗体からの可変領域を含んでいる。場合によっては、非ヒト霊長類抗体の可変領域をヒト定常に連結させて霊長類化抗体を作製する。霊長類化抗体を作製する方法の例は、アメリカ合衆国特許第6113898号に記載されている。この用語は、例えば霊長類化可変領域を1つ以上と、例えばヒト可変領域、ヒト化可変領域、キメラ可変領域のいずれかを1つ以上含む複合タンパク質も包含する。

20

【0217】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、キメラタンパク質である。「キメラタンパク質」という用語は、抗原結合ドメインが特定の種（例えばネズミであるマウスやラット）に由来するタンパク質、または抗原結合ドメインが特定の抗体クラスまたはサブクラスに属するが、タンパク質の残部が別の種（例えばヒトまたは非ヒト霊長類）に由来するタンパク質からのものであるタンパク質、または抗原結合ドメインが別の抗体クラスまたはサブクラスに属するタンパク質を意味する。一例では、キメラタンパク質は、非ヒト抗体（例えばネズミ抗体）からの V_H および/または V_L を含み、残りの領域がヒト抗体に由来するキメラ抗体である。そのようなキメラタンパク質の作製は本分野で知られており、（例えばアメリカ合衆国特許第6331415号、第5807715号、第4816567号、第4816397号に記載されている）標準的な手段によって実現できる。この用語は、例えばキメラ可変領域を1つ以上と、例えばヒト可変領域、ヒト化可変領域、キメラ可変領域のいずれかを1つ以上含む複合タンパク質も包含する。

30

【0218】

本開示では、例えばWO2000/34317とWO2004/108158に記載されている脱免疫化CD131結合タンパク質も考える。脱免疫化抗体と脱免疫化タンパク質は、1つ以上のエピトープ（例えばB細胞エピトープまたはT細胞エピトープ）が除去されている（すなわち変異している）ことで、対象がその抗体またはタンパク質に対する免疫反応を起こす可能性が減る。例えば本開示のCD131結合タンパク質を分析して1つ以上のB細胞エピトープまたはT細胞エピトープを同定し、そのエピトープ内の1つ以上のアミノ酸残基を変異させることでそのCD131結合タンパク質の免疫原性を低下させる。

40

【0219】

上記のことから、「複合」タンパク質は、1つの形態の V_H （例えばヒト）と、別の形態の V_L （例えばヒト化）を含むことが、当業者には明らかであろう。本開示は、さまざまな形態の V_H と V_L のあらゆる組み合わせを明示的に包含している。

【0220】

抗体結合ドメインを含むタンパク質

【0221】

単一ドメイン抗体

50

【0222】

いくつかの例では、本開示のCD131結合タンパク質は、単ドメイン抗体（「ドメイン抗体」または「dAb」という用語と同じ意味で用いられる）であるか、単ドメイン抗体を含んでいる。単ドメイン抗体は、1つの抗体の重鎖可変領域のすべてまたは一部を含む単一ポリペプチド鎖である。いくつかの例では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体（Domantis社、ウォルサム、マサチューセッツ州；例えばアメリカ合衆国特許第6248516号を参照のこと）である。

【0223】

二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、

【0224】

いくつかの例では、本開示のCD131結合タンパク質は、W098/044001および/またはW094/007921に記載されている二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、またはより高次のタンパク質複合体であるか、そのような二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、またはより高次のタンパク質複合体を含んでいる。

【0225】

例えば二重特異性抗体は会合した2本のポリペプチド鎖を含むタンパク質であり、それぞれのポリペプチド鎖は、構造 V_L-X-V_H または V_H-X-V_L を含んでいる。ただし V_L は抗体軽鎖可変領域であり、 V_H は抗体重鎖可変領域であり、 X は、単一ポリペプチド鎖内の V_H と V_L が会合（またはFvを形成）できるには不十分な残基を含むリンカーであるか、 X は存在しないかであり、一方のポリペプチド鎖の V_H は他方のポリペプチド鎖の V_L に結合して抗原結合ドメインを形成する（すなわち1つ以上の抗原に特異的に結合することのできるFv分子を形成する）。 V_L と V_H をそれぞれのポリペプチド鎖で同じにすること、または V_L と V_H をそれぞれのポリペプチド鎖で異なるようにして二重特異性抗体（すなわち特異性が異なる2つのFvを含む）を形成することができる。

【0226】

単鎖Fv（scFv）

【0227】

本開示のCD131結合タンパク質としてscFvが可能である。scFvは、単一ポリペプチド鎖内の V_H 領域および V_L 領域と、 V_H と V_L の間のポリペプチドリinkerを含んでいて、このリンカーにより、このscFvは抗原が結合するため（すなわち単一ポリペプチド鎖の V_H と V_L が互いに会合してFvを形成するため）の望む構造を形成できることを当業者は知っているであろう。例えばリンカーは過剰な12個のアミノ酸残基を含んでおり、 $(Gly_4Ser)_3$ が、scFvのための非常に好ましいリンカーの1つである。

【0228】

本開示では、ジスルフィドで安定化させたFv（またはdiFvまたはdsFv）も考慮する。この安定化させたFvでは1個のシステイン残基が V_H のFRと V_L のFRに導入されていて、それらシステイン残基がジスルフィド結合によって連結されて安定なFvを作り出す。

【0229】

その代わりに、またはそれに加えて、本開示は、二量体scFv（すなわち非共有結合または共有結合により、（例えばFosまたはJunに由来する）例えばロイシンジッパードメインを介して連結された2つのscFv分子を含むタンパク質）を包含する。あるいは、例えばアメリカ合衆国特許出願公開第20060263367号に記載されているように、2つのscFvを十分な長さのペプチドリinkerによって連結し、両方のscFvが二量体を形成して抗原に結合できるようにする。

【0230】

他の抗体と、その抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質

【0231】

本開示では、他の抗体と、その抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質も考慮する。その例は、以下のものである：

(i) アメリカ合衆国特許第5731168号に記載されている「カギと穴」二重特異性抗体；

10

20

30

40

50

(ii) 例えばアメリカ合衆国特許第4676980号に記載されているヘテロ共役タンパク質；
(iii) 例えばアメリカ合衆国特許第4676980号に記載されている、化学的架橋剤を用いて作製したヘテロ共役タンパク質；

(iv) (例えば欧州特許出願公開第19930302894号に記載されている) Fab₃。

【0232】

タンパク質に対する変異

【0233】

本開示により、CD131結合タンパク質またはそれをコードする核酸であって、本明細書に開示されている配列と少なくとも80%一致するものも提供される。一例では、本開示のCD131結合タンパク質または核酸は、本明細書に開示されている配列と少なくとも約85%、または90%、または95%、または97%、または98%、または99%一致する配列を含んでいて、そのタンパク質は、本明細書の任意の例に記載されているCD131に特異的に結合する。

10

【0234】

その代わりに、またはそれに加えて、CD131結合タンパク質は、本明細書の任意の例に記載されているV_HまたはV_LのCDRと少なくとも約80%、または85%、または90%、または95%、または97%、または98%、または99%一致するCDR(例えば3つのCDR)を含んでいて、そのタンパク質は、本明細書の任意の例に記載されているCD131に特異的に結合することができる。この点に関し、発明者は、CDR内にさまざまな配列を有する多数の抗体を作製した。CD131へのタンパク質の結合を調べる方法は本明細書に記載されている。

20

【0235】

例えば発明者は、少なくとも40%一致したHCDR1を共有する一群のCD131結合タンパク質を同定した。

【0236】

発明者は、Kabatナンバリングシステムによれば少なくとも65%一致したHCDR2を共有する1つのクラスのCD131結合タンパク質と、Kabatナンバリングシステムによれば少なくとも77%一致したHCDR2を共有する1つのサブクラスのCD131結合タンパク質も同定した(例えば抗体9A2-VR24の誘導体で、HCDR2に変異を含んでいて、GM-CSFシグナル伝達を抑制するIC₅₀が0.5 nM以下であるもの)。

【0237】

本明細書に記載されているように、本分野では、重鎖CDR2の5個のC末端残基を保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換(残基の31%)に変異させることが可能であることも知られている(Padlan他、FASEB J. 第9巻:133-139ページ、1995年)。したがってタンパク質は、本明細書に開示した重鎖CDR2配列と少なくとも約35%一致したCDR2を含むことができる。

30

【0238】

例えば発明者は、Kabatナンバリングシステムによれば少なくとも44%一致したHCDR3を共有する一群のCD131結合タンパク質を同定した。

【0239】

例えば発明者は、配列番号20に示した配列を含むV_Hにおいて、機能の喪失なしに置換が可能である残基、または置換の結果として機能が改善される残基をいくつか同定した。一例では、CD131結合タンパク質は、配列番号20と比べて1~12個のアミノ酸置換を含んでいる。例えばCD131結合タンパク質は、配列番号20と比べて1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個、または7個、または8個、または9個、または10個のアミノ酸置換を含んでいる。例えばCD131結合タンパク質は、配列番号20と比べて9個のアミノ酸置換を含んでいる。例えばCD131結合タンパク質は、配列番号20と比べて10個のアミノ酸置換を含んでいる。一例では、置換はCDR1および/またはCDR2の中にある。

40

【0240】

一例では、CD131結合タンパク質は、配列番号20と比べてCDR2の中に1~5個のアミノ酸置換を含んでいる。例えばCD131結合タンパク質は、配列番号20と比べてCDR2の中に1個、

50

または2個、または3個、または4個、または5個のアミノ酸置換を含んでいる。

【0241】

一例では、CD131結合タンパク質は、配列番号20と比べてCDR1の中に1～6個のアミノ酸置換を含んでいる。例えばCD131結合タンパク質は、配列番号20と比べてCDR1の中に1個、または2個、または3個、または4個、または5個、または6個のアミノ酸置換を含んでいる。

【0242】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号20に示した配列の変異体を含んでおり、その変異体の配列は、少なくとも、配列番号20の位置58にプロリンを含んでいる。

10

【0243】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号20に示した配列の変異体を含んでおり、その変異体の配列は、少なくとも、配列番号20の位置61にヒスチジンまたはアスパラギンまたはセリンを含んでいる。

【0244】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号20に示した配列の変異体を含んでおり、その変異体の配列は、少なくとも、配列番号20の位置30にプロリンを、位置31にトリプトファンを、位置33にアルギニンを、位置34にバリンを、位置35にヒスチジンを含んでいる。

【0245】

例えば発明者は、Kabatナンバリングシステムによれば少なくとも45%一致したLCDR1を共有する一群のCD131結合タンパク質を同定した。

20

【0246】

本開示では、本開示のCD131結合タンパク質の変異体で、本明細書に示した配列と比べて1個以上の保守的アミノ酸置換を含むものも考慮する。いくつかの例では、CD131結合タンパク質は、10個以下、例えば9個、または8個、または7個、または6個、または5個、または4個、または3個、または2個、または1個の保守的アミノ酸置換を含んでいる。「保守的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、側鎖および/または疎水性および/または親水性が似たアミノ酸残基で置き換えられる置換である。

【0247】

似た側鎖を持つアミノ酸残基のファミリーが本分野で規定されており、その中に含まれるのは、塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）である。疎水性指数は、例えばKyteとDoolittle *J. Mol. Biol.*、第157巻：105～132ページ、1982年に記載されており、親水性指数は、例えばアメリカ合衆国特許第4554101号に記載されている。

30

【0248】

本開示では、非保守的アミノ酸の変化も考慮する。例えば特に興味深いのは、帯電したアミノ酸が別の帯電したアミノ酸で置換される場合と、中性のアミノ酸または正に帯電したアミノ酸で置換される場合である。いくつかの例では、CD131結合タンパク質は、10個以下、例えば9個、または8個、または7個、または6個、または5個、または4個、または3個、または2個、または1個の非保守的アミノ酸置換を含んでいる。

40

【0249】

一例では、変異は、本開示のCD131結合タンパク質の抗原結合ドメインのFR内で起こる。別の一例では、変異は、本開示のCD131結合タンパク質のCDR内で起こる。

【0250】

CD131結合タンパク質の変異体を作製する方法の例に含まれるのは、

50

・DNAの突然変異誘発 (Thie他、Methods Mol. Biol. 第525巻 : 309 ~ 322ページ、2009年) またはRNAの突然変異誘発 (Kopsidas他、Immunol. Lett. 第107巻 : 163 ~ 168ページ、2006年 ; Kopsidas他、BMC Biotechnology、第7巻 : 18ページ、2007年 ; WO1999/058661) ;

・ポリペプチドをコードする核酸を変異誘起細胞 (例えばXL-1Red細菌細胞、XL-mutS細菌細胞、XL-mutS-Kanr細菌細胞 (Stratagene社)) に導入する ;

・例えばStemmer、Nature第370巻 : 389 ~ 391ページ、1994年に開示されているDNAシャッフルリング

・例えばDieffenbach (編者) とDveksler (編者) (『PCR Primer: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ニューヨーク州、1995年の中) に記載されている部位特異的突然変異誘発

10

【0251】

本開示の変異CD131結合タンパク質の生物活性を求める方法の例は、当業者には明らかであろう、および/または本明細書に記載されている (例えば抗原の結合)。例えば抗原の結合、結合の競合的抑制、親和性、会合、解離、治療効率を調べる方法が本明細書に記載されている。

【0252】

別の一例では、本開示の核酸は、本明細書の任意の例に記載されている機能を持つCD131結合タンパク質をコードしていて、本明細書に示した配列と少なくとも約80%、または85%、または90%、または95%、または97%、または98%、または99%一致する配列を含んでいる。本開示は、本開示のCD131結合タンパク質をコードする核酸で、遺伝コードが縮重している結果として本明細書に例示したのと異なる配列を持つものも包含する。

20

【0253】

核酸またはポリペプチドの一致率は、GAP (NeedlemanとWunsch、Mol. Biol. 第48巻、443 ~ 453ページ、1970年) 分析 (GCGプログラム) により、ギャップ生成ペナルティ = 5、ギャップ延長ペナルティ = 0.3の設定にして求める。質問配列は長さが少なくとも50残基であり、GAP分析で2つの配列を少なくとも50残基の領域にわたってアラインメントさせる。例えば質問配列は長さが少なくとも100残基であり、GAP分析で2つの配列を少なくとも100残基の領域にわたってアラインメントさせる。例えば2つの配列をその全長にわたってアラインメントさせる。

30

【0254】

本開示では、厳しいハイブリダイゼーション条件で本明細書に記載したCD131結合タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする核酸も考慮する。「中程度の厳しさ」は、本明細書では、2×SSC緩衝液、0.1% (w/v) SDSの中で、45 ~ 65 の範囲の温度にて、またはそれと同等の条件で、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を実施することと定義される。「高度の厳しさ」は、本明細書では、0.1×SSC緩衝液、0.1% (w/v) SDS、またはそれよりも小さい塩濃度の中で、少なくとも65 の温度にて、またはそれと同等の条件で、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を実施することと定義される。本明細書で厳しさの具体的なレベルに言及するとき、当業者に知られているSSC以外の洗浄/ハイブリダイゼーション溶液を用いた同等な条件が包含される。例えば二本鎖核酸の鎖が解離する温度 (融点または T_m としても知られる) を計算する方法は、本分野で知られている。核酸の T_m と同程度 (例えば5 以内、または10 以内) の温度または同じ温度は、高度の厳しさで見なされる。中程度の厳しさは、核酸の計算値 T_m から10 ~ 20 以内、または10 ~ 15 以内で見なされる。

40

【0255】

定常領域

本開示には、抗体の定常領域を含む本明細書に記載したCD131結合タンパク質および/または抗体が含まれる。ここには、Fcに融合した抗体の抗原結合フラグメントが含まれる。

【0256】

50

本開示のタンパク質を作製するのに有用な定常領域の配列は、多数の異なる供給源から得ることができる。いくつかの例では、タンパク質の定常領域またはその一部は、ヒト抗体に由来する。定常領域またはその一部は、任意のクラスの抗体（IgM、IgG、IgD、IgA、IgEが含まれる）と任意のアイソタイプの抗体（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれる）に由来するものが可能である。一例では、定常領域は、ヒトアイソタイプIgG4または安定化させたIgG4の定常領域である。

【0257】

一例では、定常領域のFc領域は、エフェクタ機能を誘導する能力が例えば天然または野生型のヒトIgG1またはIgG3 Fc領域と比べて低下している。本開示の文脈では、「エフェクタ機能」は、抗体のFc領域（天然配列Fc領域、またはアミノ酸配列変異体Fc領域）に結合して細胞を殺すことになる細胞またはタンパク質を媒介とした生物活性を意味する。抗体によって誘導されるエフェクタ機能の例に含まれるのは、補体依存性細胞毒性（CDC）；抗体依存性細胞媒介細胞毒性（ADCC）；補体依存性細胞ファゴサイトーシス（ADCP）；B細胞活性化である。一例では、エフェクタ機能は、ADCCおよび/またはADCPおよび/またはCDCである。Fc領域を含むタンパク質のエフェクタ機能のレベルを評価する方法は本分野で知られている、および/または本明細書に記載されている。

10

【0258】

一例では、Fc領域は、IgG4 Fc領域（すなわちIgG4定常領域に由来する）、例えばヒトIgG4 Fc領域である。適切なIgG4 Fc領域の配列は、当業者には明らかであろう、および/または公開データベースから入手できる（例えば国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）から入手できる）。

20

【0259】

一例では、定常領域は、安定化させたIgG4定常領域である。「安定化させたIgG4定常領域」という用語は、改変により、Fabアーム交換またはFabアーム交換する傾向が低下しているか、半抗体の形成または半抗体を形成する傾向が低下しているIgG4定常領域を意味すると理解される。「Fabアーム交換」は、ヒトIgG4に関するある種のタンパク質改変を意味し、この改変では、IgG4の重鎖と付随する軽鎖（半分子）が別のIgG4分子からの重-軽鎖ペアと交換される。したがってIgG4分子は、2つの異なる抗原を認識する2つの異なるFabアームを獲得することができ（、その結果として二重特異性分子になる）。Fabアーム交換は生体内で自然に起こる一方で、精製した血液細胞または還元剤（例えば還元されたグルタチオン）によってインビトロで誘導することができる。「半抗体」は、IgG4分子が解離し、それぞれが単一の重鎖と単一の軽鎖を含む2つの分子を形成するとき形成される。

30

【0260】

一例では、安定化させたIgG4定常領域は、Kabatのシステム（Kabat他、「免疫学的に興味深いタンパク質の配列」、ワシントンDC、アメリカ合衆国保険福祉省、1987年および/または1991年）に従えば、ヒンジ領域の位置241にプロリンを含んでいる。この位置は、EUNanバリングシステムに従えば、ヒンジ領域の位置228に対応する（Kabat他、「免疫学的に興味深いタンパク質の配列」、ワシントンDC、アメリカ合衆国保険福祉省、2001年とEdelman他、Proc. Natl. Acad. USA、第63巻、78～85ページ、1969年）。ヒトIgG4では、この残基は一般にセリンである。セリンをプロリンで置き換えた後、IgG4ヒンジ領域は配列CPPCを含んでいる。この点に関し、当業者は、「ヒンジ領域」が、Fc領域とFab領域を連結して抗体の2本のFabアームに移動性を与える抗体重鎖定常領域のプロリン-リッチな部分であることを知っているであろう。ヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド結合に関与するシステイン残基を含んでいる。それは一般に、KabatのナンバリングシステムによればヒトIgG1のGlu226からPro243まで延びると定義される。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド（S-S）結合を形成する最初と最後のシステイン残基を同じ位置に配置することによってIgG1配列とアラインメントさせることができる（例えばWO2010/080538参照）。

40

【0261】

50

安定化させたIgG4抗体の追加例は、(例えばWO2006/033386に記載されているように)(EUナンバリングシステムによれば)ヒトIgG4の重鎖定常領域内の位置409にあるアルギニンがリシン、トレオニン、メチオニン、ロイシンのいずれかで置き換えられた抗体である。定常領域のFc領域はそれに加え、またはその代わりに、アラニン、バリン、グリシン、イソロイシン、ロイシンからなるグループから選択された残基を(EUナンバリングシステムによる)405に対応する位置に含むことができる。場合によっては、ヒンジ領域は、(上述のように)位置241にプロリンを含んでいる(すなわちCPPC配列)。

【0262】

別の一例では、Fc領域は、改変によりエフェクタ機能が低下した領域、すなわち「非免疫刺激性Fc領域」である。例えばFc領域は、268、309、330、331からなるグループから選択された1つ以上の位置に置換を含むIgG1 Fc領域である。別の一例では、Fc領域は、変化E233P、L234V、L235Aのうち1つ以上と、G236の欠失を含むIgG1 Fc領域、および/または変化A327G、A330S、P331Sのうち1つ以上を含むIgG1 Fc領域である(Armour他、Eur J Immunol. 第29巻:2613~2624ページ、1999年; Shields他、J Biol Chem. 第276巻(9):6591~6604ページ、2001年)。非免疫刺激性Fc領域の追加例は、例えばDall'Acqua他、J Immunol. 第177巻:1129~1138ページ、2006年; および/またはHezareh J Virol; 第75巻:12161~12168ページ、2001年に記載されている。

10

【0263】

別の一例では、Fc領域は、例えばIgG4抗体からの少なくとも1つのC_H2ドメインと、IgG1抗体からの少なくとも1つのC_H3ドメインを含むキメラFc領域であり、そのFc領域は、(例えばWO2010/085682に記載されているように)240、262、264、266、297、299、307、309、323、399、409、427(Euナンバリング)からなるグループから選択された1つ以上のアミノ酸位置に置換を含んでいる。置換の例に含まれるのは、240F、262L、264T、266F、297Q、299A、299K、307P、309K、309M、309P、323F、399S、427Fである。

20

【0264】

追加の改変

本開示では、抗体に対する追加の改変、またはFc領域または定常領域を含むCD131結合タンパク質に対する追加の改変も考慮する。

【0265】

例えばその抗体は、タンパク質の半減期を長くする1つ以上のアミノ酸置換を含んでいる。例えばその抗体は、新生児Fc領域(FcRn)に対するFc領域の親和性を増大させる1つ以上のアミノ酸置換を含むFc領域を含んでいる。例えばFc領域は、より小さなpH(例えばpH約6.0)でFcRnに対する親和性が増大しているため、エンドソームの中でFc/FcRn結合が容易になる。一例では、Fc領域は、pH約6.0において、pH約7.4での親和性と比べてFcRnに対する親和性が増大している。そのため細胞リサイクリングの後にFcが血液の中に再放出されやすくなる。これらアミノ酸置換は、血液からの除去を減らすことでタンパク質の半減期を長くするのに有用である。

30

【0266】

アミノ酸置換の例に含まれるのは、EUナンバリングシステムによるT250Qおよび/またはM428LまたはT252A、T254SとT266FまたはM252Y、S254TとT256EまたはH433K、N434Fである。追加の、または代替のアミノ酸置換は、例えばアメリカ合衆国特許出願公開第20070135620号またはアメリカ合衆国特許第7083784号に記載されている。

40

【0267】

CD131結合タンパク質の例

発明者が作製した可変領域含有CD131結合タンパク質の例を表1に記載する。

【0268】

【表 1 - 1】

表1：例示するCD131結合タンパク質の配列

	抗体の名称	V _L アミノ酸配列番号	V _H アミノ酸配列番号
1	9A2	5	20
2	9A2-VR1	6	20
3	9A2-VR2	7	20
4	9A2-VR3	8	20
5	9A2-VR4	9	20
6	9A2-VR5	10	20
7	9A2-VR6	11	20
8	9A2-VR8	12	20
9	9A2-VR9	13	20
10	9A2-VR11	14	20
11	9A2-VR12	15	20
12	9A2-VR13	16	20
13	9A2-VR14	17	20
14	9A2-VR16	18	20
15	9A2-VR19	19	20
16	9A2-VR20	5	21
17	9A2-VR21	5	22
18	9A2-VR22	5	23
19	9A2-VR23	5	24
20	9A2-VR24	5	25
21	9A2-VR26	5	26
22	9A2-VR27	5	27
23	9A2-VR28	5	28
24	9A2-VR31	5	29
25	9A2-VR32	5	30
26	9A2-VR33	5	31
27	9A2-VR34	5	32
28	9A2-VR35	5	33
29	9A2-VR36	5	34
30	9A2-VR37	5	35
31	9A2-VR38	5	36
32	9A2-VR39	5	37
33	9A2-VR40	5	38
34	9A2-VR41	5	39
35	9A2-VR42	5	40
36	9A2-VR43	5	41
37	9A2-VR44	5	42
38	9A2-VR45	5	43
39	9A2-VR46	5	44
40	9A2-VR47	5	45
41	9A2-VR48	5	46
42	9A2-VR49	5	47
43	9A2-VR50	5	48
44	9A2-VR24. 04	5	49
45	9A2-VR24. 07	5	50
46	9A2-VR24. 10	5	51
47	9A2-VR24. 12	5	52
48	9A2-VR24. 19	5	53
49	9A2-VR24. 24	5	54
50	9A2-VR24. 76	5	55

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	抗体の名称	V _L アミノ酸配列番号	V _H アミノ酸配列番号
51	9A2-VR24. 78	5	56
52	9A2-VR24. 81	5	57
53	9A2-VR24. 82	5	58
54	9A2-VR24. 84	5	59
55	9A2-VR24. 87	5	60
56	9A2-VR24. 91	5	61
57	9A2-VR24. 93	5	62
58	9A2-VR24. 27	5	63
59	9A2-VR24. 29	5	64
60	9A2-VR24. 30	5	65
61	9A2-VR24. 33	5	66
62	9A2-VR24. 44	5	67
63	9A2-VR24. 97	5	68
64	9A2-VR24. 98	5	69
65	9A2-VR24. 102	5	70
66	9A2-VR24. 107	5	71
67	9A2-VR24. 110	5	72
68	9A2-VR24. 111	5	73
69	9A2-VR24. 55	5	74
70	9A2-VR24. 56	5	75
71	9A2-VR24. 57	5	76
72	9A2-VR24. 122	5	77
73	9A2-VR24. 124	5	78
74	9A2-VR24. 131	5	79
75	9A2-VR39. 01	5	80
76	9A2-VR39. 02	5	81
77	9A2-VR39. 04	5	82
78	9A2-VR39. 05	5	83
79	9A2-VR39. 06	5	84
80	9A2-VR39. 11	5	85
81	9A2-VR39. 12	5	86
82	9A2-VR39. 16	5	87
83	9A2-VR39. 17	5	88
84	9A2-VR39. 18	5	89
85	9A2-VR39. 19	5	90
86	9A2-VR39. 21	5	91
87	9A2-VR39. 22	5	92
88	9A2-VR39. 23	5	93
89	9A2-VR39. 24	5	94
90	9A2-VR39. 97	5	95
91	9A2-VR39. 98	5	96
92	9A2-VR39. 102	5	97
93	9A2-VR39. 103	5	98
94	9A2-VR39. 105	5	99
95	9A2-VR39. 109	5	100
96	9A2-VR39. 110	5	101
97	9A2-VR39. 111	5	102
98	9A2-VR39. 112	5	103

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	抗体の名称	V _L アミノ酸配列番号	V _H アミノ酸配列番号
99	9A2-VR39.116	5	104
100	9A2-VR39.27	5	105
101	9A2-VR39.28	5	106
102	9A2-VR39.46	5	107
103	9A2-VR39.122	5	108
104	9A2-VR39.139	5	109
105	9A2-VR39.140	5	110
106	9A2-VR39.148	5	111
107	9A2-VR39.162	5	112
108	9A2-VR39.77	5	113
109	9A2-VR39.93	5	114
110	9A2-VR39.174	5	115
111	9A2-VR39.177	5	116

10

【0269】

タンパク質の作製

一例では、本明細書の任意の例に記載したCD131結合タンパク質は、例えば本明細書に記載されているように、および/または本分野で知られているように、そのタンパク質を作製するのに十分な条件下でハイブリドーマを培養することによって作製される。

20

【0270】

組み換え発現

別の一例では、本明細書の任意の例に記載したCD131結合タンパク質は、組み換えタンパク質である。

【0271】

組み換えタンパク質の場合には、そのタンパク質をコードする核酸をクローニングして発現コンストラクトまたは発現ベクターに入れた後、それを宿主細胞（例えば別のやり方でそのタンパク質を産生しない大腸菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞（サルCO S細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚性腎臓（HEK）細胞、骨髄腫細胞など））にトランスフェクトすることができる。タンパク質を発現させるのに用いる細胞の例は、CHO細胞、骨髄腫細胞、HEK細胞である。これらの目的を達成するための分子クローニング技術は本分野で知られており、それが記載されているのは、例えばAusubel他、（編者）、『Current Protocols in Molecular Biology』、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience社（1988年、現在までのあらゆる更新を含む）、またはSambrook他、『Molecular Cloning: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press（1989年）である。クローニングしてインビトロで増幅する多彩な方法が、組み換え核酸を構成するのに適している。組み換え抗体を作製する方法も本分野で知られており、例えばアメリカ合衆国特許第4816567号または第5530101号を参照されたい。

30

【0272】

核酸を単離した後、プロモータに機能可能に連結させて発現コンストラクトまたは発現ベクターに挿入し、さらにクローニングする（DNAの増幅）か、無細胞系または細胞内で発現させる。

40

【0273】

本明細書では、「プロモータ」という用語は最も広い文脈で理解され、ゲノム遺伝子の転写調節配列を含む。そこに含まれるのは、正確な転写開始に必要とされるTATAボックスまたは開始エレメントであり、それらは、例えば発生刺激および/または外部刺激に反応して、または組織特異的なやり方で核酸の発現を変化させる追加の調節要素（例えば上流の活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサ、サイレンサ）を伴っている場合、または伴っていない場合がある。本明細書の文脈では、「プロモータ」という用語は、そのプロモータが機能可能に連結した核酸の発現をさせる、または活性化させる、または増大させ

50

る組み換え核酸、合成核酸、融合核酸、誘導体を記述するのにも用いられる。プロモータの例は、発現をさらに増大させるための、および/またはその核酸の空間的発現および/または時間的発現を変化させるための1つ以上の特異的調節要素の追加コピーを含むことができる。

【0274】

本明細書では、「機能可能に連結した」という表現は、核酸の発現がプロモータによって制御されるようにそのプロモータをその核酸に対して配置することを意味する。

【0275】

細胞内で発現させるための多くのベクターを利用できる。ベクターの構成要素の非限定的な例には、一般に、シグナル配列、タンパク質をコードする配列（例えば本明細書に提示した情報に由来する配列）、エンハンサ要素、プロモータ、転写終止配列のうちの1つ以上が含まれる。当業者は、タンパク質を発現させるのに適した配列を知っているであろう。シグナル配列の例には、原核生物分泌シグナル（例えばpelB、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、熱安定性エンテロトキシンII）、酵母分泌シグナル（例えばインベルターゼリーダー、因子リーダー、酸ホスファターゼリーダー）、哺乳動物分泌シグナル（例えば単純ヘルペスgDシグナル）が含まれる。

10

【0276】

哺乳動物の細胞内で活性なプロモータの例に含まれるのは、サイトメガロウイルス極初期プロモータ（CMV-IE）、ヒト伸長因子1-プロモータ（EF1）、小核RNAプロモータ（U1aとU1b）、 α -ミオシン重鎖プロモータ、サルウイルス40プロモータ（SV40）、ラウス骨肉腫ウイルスプロモータ（RSV）、アデノウイルス主要後期プロモータ、 α -アクチンプロモータ、CMVエンハンサ/ α -アクチンプロモータを含むハイブリッド調節要素、免疫グロブリンプロモータ、またはこれらの活性フラグメントである。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1系（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚性腎臓系（293細胞、または懸濁培地の中で増殖させるためにサブクロニングした293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）である。

20

【0277】

酵母細胞（例えば*Pichia pastoris*、*Saccharomyces cerevisiae*、*S. pombe*を含むグループから選択された酵母細胞）の中で発現させるのに適した典型的なプロモータの非限定的な例には、ADH1プロモータ、GAL1プロモータ、GAL4プロモータ、CUP1プロモータ、PHO5プロモータ、nmtプロモータ、RPR1プロモータ、TEF1プロモータが含まれる。

30

【0278】

単離した核酸、またはその核酸を含む発現コンストラクトを発現のための細胞に挿入する手段は当業者に知られている。所与の細胞で用いられる技術は、既知の成功した技術に依存する。組み換えDNAを細胞に導入する手段には、特に、微量注入、DEAE-デキストランを媒介としたトランスフェクション、リポソームを媒介としたトランスフェクション（例えばリポフェクタミン（Gibco社、メリーランド州、アメリカ合衆国）および/またはセルフェクチン（Gibco社、メリーランド州、アメリカ合衆国）を用いることによる）、PEGを媒介としたDNA取り込み、電気穿孔、微粒子爆撃（例えばDNAで被覆したタングステンまたは金の粒子（Agracetus Inc.社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）を用いることによる）が含まれる。

40

【0279】

タンパク質の産生に用いる宿主細胞は、使用する細胞の種類に応じてさまざまな培地の中で培養することができる。市販されている培地（例えばハムのF10（Sigma社）、最少必須培地（MEM）（Sigma社）、RPMI-1640（Sigma社）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（Sigma社））が、哺乳動物の細胞を培養するのに適している。本明細書で議論した他のタイプの細胞を培養するための培地は、本分野で知られている。

【0280】

タンパク質の単離

50

タンパク質を単離する方法は、本分野で知られている、および/または本明細書に記載されている。

【0281】

CD131結合タンパク質が培地に分泌されると、最初に、市販のタンパク質濃縮フィルタ（例えばAmiconまたはMillipore Pellicon超濾過ユニット）を用いてそのような発現系からの上清を濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めることでタンパク質分解を抑制することができ、抗生物質を含めることで偶発的な汚染の増加を阻止することができる。その代わりに、またはそれに加えて、タンパク質を発現する細胞から、例えば連続的遠心分離を利用して上清を濾過および/または分離することができる。

【0282】

例えばイオン交換、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、アフィニティクロマトグラフィ（例えばプロテインAアフィニティクロマトグラフィまたはプロテインGクロマトグラフィ）や、これらの任意の組み合わせを利用して、細胞から調製されたCD131結合タンパク質を精製することができる。これらの方法は本分野で知られており、例えばWO99/57134、またはEd HarlowとDavid Lane（編者）『Antibodies: A Laboratory Manual』、Cold Spring Harbor Laboratory Press、（1988年）に記載されている。

【0283】

当業者は、タンパク質を修飾してタグ（例えばポリ-ヒスチジンタグ（例えば6ヒスチジンタグ）、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）タグ、サルウイルス5（V5）タグ、FLAGタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）タグ）を含めることで、精製または検出をしやすいことも知っているであろう。次に、本分野で知られている方法（例えばアフィニティ精製）を利用し、得られたタンパク質を精製する。例えば6ヒスチジンタグを含むタンパク質は、そのタンパク質を含むサンプルを、固体または半固体の支持体に固定化した6ヒスチジンタグに特異的に結合するニッケル-ニトリロ三酢酸（Ni-NTA）と接触させることによって精製し、サンプルを洗浄して結合しなかったタンパク質を除去した後、結合したタンパク質を溶離させる。その代わりに、またはそれに加えて、タグに結合するリガンドまたは抗体をアフィニティ精製法で使用する。

【0284】

非抗体由来の化合物

免疫グロブリンと免疫グロブリンフラグメント

本開示の化合物の一例は、免疫グロブリンの可変領域を含むタンパク質、例えばT細胞受容体または重鎖免疫グロブリン（例えばIgNAR抗体、ラクダ抗体）である。

【0285】

重鎖免疫グロブリン

重鎖免疫グロブリンは、重鎖を含むが軽鎖は含まないという点で、構造的に免疫グロブリンの他の多くの形態（例えば抗体）と異なっている。したがってこれら免疫グロブリンは、「重鎖のみの抗体」とも呼ばれる。重鎖免疫グロブリンは、例えばラクダや軟骨魚類（IgNARとも呼ばれる）で見られる。

【0286】

天然の重鎖免疫グロブリンに存在する可変領域は、通常の4鎖抗体に存在する重鎖可変領域（「V_Hドメイン」と呼ばれる）および通常の4鎖抗体に存在する軽鎖可変領域（「V_Lドメイン」と呼ばれる）と識別するため、一般に、ラクダIgでは「V_{HH}ドメイン」、IgNARではV-NARと呼ばれる。

【0287】

重鎖免疫グロブリンは、関連する抗原に大きな親和性かつ大きな特異性で結合するための軽鎖の存在を必要としない。これは、単一ドメイン結合フラグメントとして、発現が容易で一般に安定かつ可溶性である重鎖免疫グロブリンに由来するものが可能であることを意味する。

【0288】

10

20

30

40

50

ラクダからの重鎖免疫グロブリンとその可変領域、それを作製および/または単離および/または使用方法の一般的な記述は、特に、WO94/04678、WO97/49805、WO 97/49805に見いだされる。

【0289】

軟骨魚類からの重鎖免疫グロブリンとその可変領域、それを作製および/または単離および/または使用方法の一般的な記述は、特に、WO2005/118629に見いだされる。

【0290】

V様タンパク質

本開示の化合物の一例は、T細胞受容体である。T細胞受容体は2つのVドメインを持っていて、それらが合わさって抗体のFvモジュールと似た構造になる。Novotny他、Proc Natl Acad Sci USA第88巻：8646～8650ページ、1991年には、T細胞受容体の2つのVドメイン（とと名づけられている）をどのようにして融合させて単一鎖ポリペプチドを発現させることができるかに加え、表面残基をどのようにして変化させて抗体scFvと同様に疎水性を直接低下させるかが記載されている。V-ドメインとV-ドメインの2つを含む単一鎖T細胞受容体または多量体T細胞受容体の作製を記述した他の刊行物には、WO1999/045110またはWO2011/107595が含まれる。

10

【0291】

抗原結合ドメインを含む他の非抗体タンパク質には、一般に単量体である、V様ドメインを有するタンパク質が含まれる。そのようなV様ドメインを含むタンパク質の例にはCTLA-4、CD28、ICOSが含まれる。そのようなV様ドメインを含むタンパク質のさらなる開示は、WO1999/045110に含まれている。

20

【0292】

アドネクチン

一例では、本開示の化合物はアドネクチンである。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンの第10フィブロネクチンIII型（¹⁰F_n3）ドメインに基づいていて、そのドメイン内のループ領域が抗原に結合するように変化している。例えば¹⁰F_n3ドメインの-サンドイッチの一端にある3つのループを操作してアドネクチンが抗原を特異的に認識できるようにすることが可能である。より詳しいことに関しては、アメリカ合衆国特許出願公開第20080139791号またはWO2005/056764を参照されたい。

【0293】

アンチカリン

さらに別の一例では、本開示の化合物はアンチカリンである。アンチカリンは、小さな疎水性分子（例えばステロイド、ピリン、レチノイド、脂質）を輸送する細胞外タンパク質のファミリーであるリポカリンに由来する。リポカリンは、操作して抗原に結合することができる複数のループが円錐構造の開放端にある堅固な-シート二次構造を有する。そのように操作されたリポカリンはアンチカリンとして知られている。アンチカリンのさらなる説明に関しては、アメリカ合衆国特許第7250297B1号またはアメリカ合衆国特許出願公開第20070224633号を参照されたい。

30

【0294】

Affibody

さらに別の一例では、本開示の化合物はaffibodyである。affibodyは、操作して抗原に結合することができるStaphylococcus aureusのプロテインAのZドメイン（抗原結合ドメイン）に由来する足場である。Zドメインは、アミノ酸が約58個の3螺旋バンドルからなる。表面残基のランダム化によってライブラリが作製されている。より詳しいことに関しては、欧州特許第1641818号を参照されたい。

40

【0295】

アビマー

さらに別の一例では、本開示の化合物はアビマーである。アビマーは、A-ドメイン足場ファミリーに由来する多ドメインタンパク質である。約35個のアミノ酸からなる天然のドメインは、ある決められたジスルフィド結合構造を採用している。A-ドメインのファミリ

50

ーが示す天然のバリエーションをシャッフルすることで多様性が生まれる。より詳しいことに関しては、WO2002088171を参照されたい。

【0296】

DARPin

さらに別の一例では、本開示の化合物は、設計されたアンキリン反復タンパク質 (DARPin) である。DARPinは、細胞骨格への内在性膜タンパク質の付着を媒介するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。1つのアンキリン反復単位は、2つの α -ヘリックスと1つの β -ターンからなる33残基のモチーフである。DARPinは、各反復単位の第1の α -ヘリックスと β -ターンの残基をランダム化することによって操作して異なる標的抗原が結合するようにできる。DARPinの結合インターフェイスは、モジュールの数を増やすことによって増加させることができる (親和性成熟の方法)。より詳しいことに関しては、

10

【0297】

他の非抗体ポリペプチド

【0298】

結合ドメインを含む他の非抗体タンパク質には、ヒト α -クリスタリンとヒトユビキチンに基づくタンパク質 (アフィリン)、ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメインに基づくタンパク質、Ras結合タンパク質AF-6のPDZ-ドメインに基づくタンパク質、サソリ毒 (カリブドトキシン) に基づくタンパク質、C型レクチンドメイン (テトラネクチン) に基づくタンパク質が含まれる。

20

【0299】

ペプチド

一例では、結合分子は、例えばランダムなペプチドライブラリから単離されたペプチドである。適切なペプチドを同定するため、例えばアメリカ合衆国特許第5,733,731号、第5,591,646号、第5,834,318号に記載されているようにしてランダムなペプチドライブラリを作製してスクリーニングする。一般に、そのようなライブラリは、生体内またはインビトロで発現させて提示する短いランダムなオリゴヌクレオチドから作製されるため、ライブラリのスクリーニングが容易になり、本明細書に記載した抗原に特異的に結合できるペプチドが同定される。提示の方法には、ファージ提示、レトロウイルス提示、細菌表面提示、細菌鞭毛提示、細菌孢子提示、酵母表面提示、哺乳動物表面提示が含まれ、インビトロ提示の方法には、mRNA提示、リボソーム提示、共有結合提示が含まれる。

30

【0300】

本明細書に記載した抗原に結合できるペプチドは、本分野で知られている多数の方法のうち任意の方法 (例えば標準的なアフィニティ精製法 (例えばScopes、1994年に記載されている方法)、アメリカ合衆国特許第645563号に記載されているFACSを用いた精製) によって同定される。

【0301】

小分子

別の一例では、結合分子は小分子である。そのような小分子はライブラリから単離することができる。化学的小分子ライブラリは、市販のものを入手すること、あるいは本分野で知られている方法 (例えばアメリカ合衆国特許第5,463,564号に記載されている方法) を利用して作製することができる。

40

【0302】

小さな有機化合物を合成する技術は化合物に応じて大きく異なるであろうが、そのような方法は当業者に知られているであろう。

【0303】

一例では、インフォマティクスを利用して既知の化合物から適切な化学的建築ブロックを選択し、コンビナトリアルライブラリを作製する。例えばQSAR (定量的構造活性関係) モデリングというアプローチでは、適切さを判断するのに化合物構造の線形回帰または回帰ツリーを用いる。Chemical Computing Group, Inc.社 (モントリオール、カナダ国) の

50

ソフトウェアは、活性な化合物と不活性な化合物に関するハイスループットスクリーニングの実験データを用いて確率的QSARモデルを作り出した後、そのモデルを用いてリード化合物を選択する。2項QSAR法は、特定の化合物が要求される機能（部分電荷、モル屈折率（結合相互作用）、logP（分子の親油性））を満たすか満たさないかの可能性の「記述子」を形成する化合物の3つの特徴的な特性に基づいている。各原子は分子内に表面積を持っていて、その表面積が、原子と関係するこれら3つの特性を有する。ある範囲の部分電荷を持つ化合物のすべての原子が明らかにされ、表面積（ファンデルワールス表面積記述子）が合計される。その後、2項QSARモデルを用いて活性モデルまたはADMETモデルを作り、それらのモデルを用いてコンビナトリアルライブラリを構築する。したがって初期スクリーニングで同定されたリード化合物を用いるとスクリーニングされる化合物のリストを拡張できるため、非常に活性な化合物が同定される。

10

【0304】

核酸アプタマー

別の一例では、化合物は核酸アプタマー（適合可能なオリゴマー）である。アプタマーは、特定の標的分子（例えばタンパク質や小分子（例えばCD131））に結合する能力を提供する二次構造および/または三次構造を形成することのできる一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体である。したがってアプタマーは、抗体に類似したオリゴヌクレオチドである。一般に、アプタマーは約15～約100個のヌクレオチド（約15～約40個のヌクレオチドなど）、例えば約20～約40個のヌクレオチドを含んでいる。というのもこの範囲に入る長さのオリゴヌクレオチドは、定型的な技術によって調製できるから

20

【0305】

アプタマーは、アプタマーのライブラリから単離または同定することができる。アプタマーのライブラリは、例えばランダムなオリゴヌクレオチドをクローニングしてベクター（または、RNAアプタマーの場合には発現ベクター）に入れることによって作製される。この場合にランダム配列は、PCRプライマーが結合する部位を提供する既知配列に隣接している。望む生物活性を提供する（例えばCD131のエピトープに特異的に結合する）アプタマーを選択する。例えばSELEX（指数関数的豊富化によるリガンドの系統的進化）を利用して、活性が増大したアプタマーを選択する。アプタマーのライブラリの作製および/またはスクリーニングに適した方法は、例えばElloingtonとSzostak、Nature 第346巻：818～822ページ、1990年；および/またはアメリカ合衆国特許第5270163号；および/またはアメリカ合衆国特許第5475096号に記載されている。

30

【0306】

共役体

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は化合物に共役させる。例えば化合物は、放射性同位体、検出可能な標識、治療用化合物、コロイド、毒素、核酸、ペプチド、タンパク質、対象内でCD131結合タンパク質の半減期を長くする化合物、これらの混合物からなるグループから選択される。

【0307】

他の化合物をCD131結合タンパク質に直接または間接に結合させることができる（例えば間接的結合の場合には、他の化合物はリンカーを含むことができる）。化合物の例には、放射性同位体（例えばヨウ素-131、イットリウム-90、インジウム-111）、検出可能な標識（例えば蛍光体、蛍光性ナノ結晶、量子ドット）、治療用化合物（例えば化学療法剤、抗炎症剤）、コロイド（例えば金）、毒素（例えばリシン、破傷風トキソイド）、核酸、ペプチド（例えば血清アルブミン結合ペプチド）、タンパク質（例えば抗体の抗原結合ドメインを含むタンパク質、血清アルブミン）、対象内でCD131結合タンパク質の半減期を長くする化合物（例えばポリエチレングリコール、またはこの活性を有する他の水溶性ポリマー）、これらの混合物が含まれる。本開示のCD131結合タンパク質に共役させることのできる化合物と、そのような共役のための方法の例は本分野で知られており、例えばWO2010/059821に記載されている。

40

50

【0308】

CD131結合タンパク質は、(例えばKogan他、Nanomedicine (Lond). 第2巻:287~306ページ、2007年に概説が記載されている)ナノ粒子に共役させることができる。ナノ粒子として、金属ナノ粒子が可能である。

【0309】

CD131結合タンパク質は、(例えばPCT/IB2005/000204に記載されている)抗体が標的とする細菌ミニ細胞に含めることができる。

【0310】

本開示のCD131結合タンパク質に共役させることのできるいくつかの化合物の例を表2に列挙する。

【0311】

【表2】

表2: 共役で有用な化合物

グループ	詳細
放射性同位体 (直接または間接)	・ 123I、125I、130I、133I、135I、47Sc、72As、72Sc、90Y、88Y、97Ru、100Pd、101mRh、101mRh、119Sb、128Ba、197Hg、211At、212Bi、153Sm、169Eu、212Pb、109Pd、111In、67Ga、68Ga、67Cu、75Br、76Br、77Br、99mTc、110、13N、150、18I、188Re、203Pb、64Cu、105Rh、198Au、199Ag、177Lu
半減期延長剤	・ ポリエチレングリコール ・ グリセロール ・ グルコース
蛍光プローブ	・ フィコエリトリン (PE) ・ アロフィコシアニン (APC) ・ Alexa Fluor 488 ・ Cy5.5
生物剤	・ ウミシイタケルシフェラーゼ、GFPなどの蛍光タンパク質 ・ サイトカイン (例えばインターフェロン) などの免疫調節剤または免疫タンパク質 ・ 毒素 ・ 免疫グロブリンまたは抗体または抗体可変領域 ・ アルブミンや、アルブミンに結合する抗体可変領域またはタンパク質などの半減期延長剤
化学療法剤	・ タキソール ・ 5-FU ・ ドキソルビシン ・ イダルビシン

【0312】

CD131結合タンパク質の活性の評価

CD131とその変異体への結合

本明細書の開示から、本開示のいくつかのCD131結合タンパク質が、hCD131の細胞外領域 (例えば本明細書に記載されている領域) と、hCD131の細胞外領域の特定の変異体 (例えば配列番号3または配列番号192であり、いくつかの点変異がない、またはいくつかの点変異がある) に結合することは当業者には明らかであろう。タンパク質への結合を評価する方法は本分野で知られており、例えばScopes (『Protein purification: principles and practice』、第3版、Springer Verlag社、1994年) に記載されている。そのような方法は一般に、CD131結合タンパク質を固定化した後、それを標識した抗原と接触させることを含んでいる。洗浄して非特異的結合をしたタンパク質を除去した後、標識の量と、そ

10

20

30

40

50

の帰結である結合した抗原の量を検出する。もちろん、CD131結合タンパク質を標識し、抗原を固定化することもできる。パンニング型のアッセイも利用できる。その代わりに、またはそれに加えて、表面プラズモン共鳴アッセイを利用することができる。

【0313】

上に記載したアッセイを用いてCD131または（例えば配列番号192に含まれている）その細胞外領域にタンパク質が結合するレベルを検出することもできる。

【0314】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号119に示した配列を含むポリペプチドに、配列番号192のポリペプチドへの結合と比べて少なくとも約1/1.5、または1/2、または1/5、または1/10、または1/50、または1/100、または1/150、または1/160、または1/200に低下したレベルで結合する。一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号119に示した配列を含むポリペプチドへの結合が検出可能でない。

10

【0315】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号124のポリペプチドに、配列番号192のポリペプチドへの結合と比べて少なくとも約1/1.5、または1/2、または1/5、または1/10、または1/50、または1/100、または1/150、または1/160、または1/200に低下したレベルで結合する。一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号124に示した配列を含むポリペプチドへの結合が検出可能でない。

【0316】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号131のポリペプチドに、配列番号192のポリペプチドへの結合と比べて少なくとも約1/1.5、または1/2、または1/5、または1/10、または1/50、または1/100、または1/150、または1/160、または1/200に低下したレベルで結合する。一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号131に示した配列を含むポリペプチドへの結合が検出可能でない。

20

【0317】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号137のポリペプチドに、配列番号192のポリペプチドへの結合と比べて少なくとも約1/1.5、または1/2、または1/5、または1/10、または1/50、または1/100、または1/150、または1/160、または1/200に低下したレベルで結合する。一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号137に示した配列を含むポリペプチドへの結合が検出可能でない。

30

【0318】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号139のポリペプチドに、配列番号192のポリペプチドへの結合と比べて少なくとも約1/1.5、または1/2、または1/5、または1/10、または1/50、または1/100、または1/150、または1/160、または1/200、または1/1000、または1/2000に低下したレベルで結合する。

【0319】

一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、配列番号138のポリペプチドに、配列番号192のポリペプチドへの結合と比べて少なくとも約1/1.5、または1/2、または1/5、または1/10、または1/50、または1/100に低下したレベルで結合する。

【0320】

結合のレベルは、バイオセンサーを用い、例えば表面プラズモン共鳴によって簡便に求められる。

40

【0321】

本開示では、上記の特徴のあらゆる組み合わせを考慮する。一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、直上の7つの段落に示した結合特性をすべて有する。

【0322】

エピトープのマッピング

別の一例では、本明細書に記載したタンパク質が結合するエピトープをマッピングする。エピトープをマッピングする方法は、当業者には明らかであろう。例えばCD131配列またはその配列中で興味のあるエピトープを含む1つの領域にまたがる重複した一連のペプ

50

チド（例えば10～15個のアミノ酸を含むペプチド）を作製する。次にCD131結合タンパク質を各ペプチドに接触させ、そのタンパク質に結合するペプチドを明らかにする。こうすることで、そのタンパク質が結合するエピトープを含むペプチドを明らかにすることができる。多数の不連続なペプチドにタンパク質が結合する場合には、そのタンパク質は配座エピトープに結合することができる。

【0323】

その代わりに、またはそれに加えて、例えばアラニン走査突然変異誘発によって、または進化的に保存されたアミノ酸の置換によってCD131内のアミノ酸残基を変異させ、CD131結合タンパク質の結合を低減させるか阻止する変異を明らかにする。CD131結合タンパク質の結合を低減させるか阻止するあらゆる変異は、CD131結合タンパク質が結合するエピトープの中にある可能性が大きい。

10

【0324】

エピトープを含む領域を明らかにするさらに別の方法は、固定化した本開示のCD131結合タンパク質にCD131またはその1つの領域を結合させ、得られた複合体をプロテアーゼで消化させることを含んでいる。次に、固定化したCD131結合タンパク質に結合したままのペプチドを単離し、例えば質量分析を利用して分析してその配列を求める。

【0325】

さらに別の方法は、CD131内またはその1つの領域内の水素を重水素に変換し、得られたタンパク質を、固定化した本開示のCD131結合タンパク質に結合させることを含んでいる。次に重水素を変換して水素に戻し、CD131またはその上記領域を単離し、酵素を用いて消化させ、例えば質量分析を利用して分析し、重水素を含む領域を同定する。その領域は、本明細書に記載したCD131結合タンパク質が結合することで水素への変換から保護されていたと考えられる。

20

【0326】

場合によっては、CD131またはそのエピトープに対する固定化したCD131結合タンパク質の解離定数 (K_d)、および/または会合定数 (K_a)、および/または親和性定数 (K_D) を求める。CD131結合タンパク質に関する「 K_d 」または「 K_a 」または「 K_D 」は、一例では、放射性標識または蛍光標識したCD131の結合アッセイによって測定する。「 K_d 」の場合には、このアッセイにおいて、標識していないCD131の滴定シリーズの存在下で、CD131結合タンパク質を最小濃度の標識したCD131と平衡させる。洗浄して結合しなかったCD131を除去した後、標識の量を求める。それが、タンパク質の K_d を示している。

30

【0327】

別の一例によれば、 K_d 、 K_a 、 K_D は、固定化したCD131またはその1つの領域、または固定化したCD131結合タンパク質を用いて表面プラズモン共鳴アッセイ（例えばBIAcore表面プラズモン共鳴（BIAcore Inc.社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）を利用する）によって測定する。

【0328】

いくつかの例では、CD131結合タンパク質は、抗体9A2または9A2-VR24または9A2-VR39と同様の K_D を有する（これら抗体はCD131への結合が競合する可能性が大きい）か、改善された K_D （すなわちこれら抗体よりも小さな K_D 値）を有する。

40

【0329】

競合的結合を調べる

抗体9A2、またはそのV領域を含む抗体、または本明細書に記載した別の抗体の結合を競合的に抑制するタンパク質を明らかにするアッセイは、当業者には明らかであろう。そのような1つの方法を本明細書に例示する。

【0330】

例えば抗体を検出可能な標識（例えば蛍光標識または放射性標識）に共役させる。次に、標識した抗体と試験するCD131結合タンパク質を混合し、CD131またはその1つの領域（例えば配列番号192を含むポリペプチド内に含まれる領域）、またはそれを発現する細胞と接触させる。次に、標識した抗体のレベルを求め、標識した抗体をCD131結合タンパク

50

質の不在下でCD131、または上記領域、または上記細胞と接触させたときに求めたレベルと比較する。標識した抗体のレベルが、試験するCD131結合タンパク質の存在下ではCD131結合タンパク質の不在下と比べて低下する場合には、CD131結合タンパク質が、CD131への抗体の結合を競合的に抑制すると見なされる。

【0331】

場合によっては、試験するCD131結合タンパク質を、抗体に対する別の標識に共役させる。標識のこの交代により、試験するCD131結合タンパク質がCD131またはその上記領域、または上記細胞に結合するレベルを検出することができる。

【0332】

別の一例では、CD131結合タンパク質は、CD131またはその1つの領域（例えば配列番号192を含むポリペプチド内に含まれる領域）、またはそれを発現する細胞を抗体に結合させた後、CD131または上記領域または上記細胞に接触させることができる。結合した抗体の量がCD131結合タンパク質の存在下ではCD131結合タンパク質の不在下と比べて低下するというのは、そのタンパク質が、CD131への抗体の結合を競合的に抑制することを示している。標識したCD131結合タンパク質を用い、最初に抗体をCD131に結合させる相互アッセイを実施することもできる。この場合には、CD131に結合する標識したCD131結合タンパク質の量が抗体の存在下では抗体の不在下と比べて低下するというのは、CD131結合タンパク質が、CD131への抗体の結合を競合的に抑制することを示している。

【0333】

上記のどのアッセイも、CD131および/または配列番号192の変異体、および/または抗体9A2が結合するCD131の細胞外領域（例えば本明細書に記載した細胞外領域）を用いて実施することができる。

【0334】

無効化を調べる

一例では、CD131結合タンパク質は、CD131を含む受容体（例えばIL-3Rおよび/またはIL-5Rおよび/またはGM-CSFR）へのIL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFの結合を低減させるか阻止する。これらのアッセイは、標識したIL-3/IL-5/GM-CSFおよび/または標識したCD131結合タンパク質を用いた競合結合アッセイとして実施することができる。例えば関係する受容体を発現する細胞をCD131結合タンパク質の存在下または不在下でIL-3/IL-5/GM-CSFに接触させ、結合した標識の量を検出する。結合した標識の量がCD131結合タンパク質の存在下ではCD131結合タンパク質の不在下と比べて低下するというのは、CD131結合タンパク質が、CD131を含む受容体へのIL-3/IL-5/GM-CSFの結合を低減させるか阻止することを示している。CD131結合タンパク質を多数の濃度で試験することにより、 IC_{50} 、すなわちCD131を含む受容体に結合するIL-3/IL-5/GM-CSFの量を低下させるタンパク質の濃度が求まる。あるいは EC_{50} 、すなわちCD131結合タンパク質によるCD131へのIL-3/IL-5/GM-CSFの結合を抑制する最大値の50%を達成するタンパク質の濃度を求めることができる。

【0335】

さらに別の一例では、CD131結合タンパク質は、IL-3/IL-5/GM-CSFを媒介とした白血病細胞系TF-1の増殖を低減させるか阻止する。例えばTF-1細胞を、IL-3/IL-5/GM-CSFなしで、その細胞が増殖を停止するのに十分な時間（例えば24~48時間）培養する。次に細胞をIL-3/IL-5/GM-CSFとさまざまな濃度のCD131結合タンパク質の存在下で培養する。対照細胞は、化合物（陽性対照）またはIL-3/IL-5/GM-CSF（陰性対照）と接触させない。次に標準的な技術（例えば 3H -チミジンの取り込み）を利用して細胞の増殖を評価する。IL-3の存在下で細胞増殖を陽性対照よりも低いレベルまで低減させるか阻止するCD131結合タンパク質は、IL-3シグナル伝達を無効にすると見なされる。CD131結合タンパク質を多くの濃度で試験することにより IC_{50} が求まる。

【0336】

別の一例では、CD131結合タンパク質は、STAT-5の活性化を抑制または阻止する。例えばIL-3および/またはGM-CSFの存在下で、インターフェロン調節因子1（*irf1*）応答エレ

10

20

30

40

50

メントの制御下にある -ラクタマーゼレポータ遺伝子を含む細胞（例えばTF-1細胞）。適切な細胞は、Life Technologies Corporation社から入手できる。細胞を適切な基質（例えば負に帯電した蛍光性 -ラクタマーゼ基質（例えばCCF2やCCF4））にも接触させ、信号（例えば蛍光）の変化を調べる。陽性対照（すなわちタンパク質または抗体の不在下でIL-3および/またはGM-CSFに接触させた細胞）で信号の変化が低下するというのは、そのタンパク質または抗体がIL-3および/またはGM-CSFによって誘導されるSTAT-5シグナル伝達を低減させるか阻止することを示している。

【0337】

さらに別の一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、免疫細胞に影響を与える。

【0338】

例えばCD131結合タンパク質は、単離されたヒト好中球のGM-CSFによる活性化を低下させる、または抑制する。それは、GM-CSFによって誘導される好中球細胞のサイズの増加が低下すること、または抑制されることからわかる。例えば好中球（例えば 1×10^5 個の細胞）をCD131結合タンパク質とGM-CSFの存在下で適切な時間（例えば約24時間）培養する。次に細胞を（例えばホルムアルデヒドで）固定し、フローサイトメトリーを利用して前方散乱を分析する。

【0339】

一例では、CD131結合タンパク質は、IL-3によって誘導されるヒト好塩基球からのIL-8の分泌を低減させるか抑制する。例えば好塩基球（例えば 1×10^5 個の細胞）をCD131結合タンパク質とIL-3の存在下で適切な時間（例えば約24時間）培養する。次にIL-8の分泌を例えばELISA（例えばR&D Systems社から入手できる）を利用して評価する。

【0340】

さらに別の一例では、CD131結合タンパク質は、IL-3を媒介とするpDCの生存を低減させるか阻止する。例えばpDCをCD131結合タンパク質とIL-3の存在下で適切な時間（例えば約24時間）培養する。次に細胞の生存を例えば標準的な方法（例えばLonza社からのViaLight Plus Kit）を利用して評価する。

【0341】

さらに別の一例では、CD131結合タンパク質は、IL-5によるヒト末梢血好酸球の活性化を低減させるか阻止する。それは、サイトメトリーによって評価される前方散乱の変化を評価することによりわかる。例えば好酸球（例えば 1×10^5 個の細胞）をCD131結合タンパク質とIL-5の存在下で適切な時間（例えば約24時間）培養する。次に細胞を（例えばホルムアルデヒドで）固定し、フローサイトメトリーを利用して前方散乱の変化を評価する。

【0342】

さらに別の一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、IL-5および/またはGM-CSFおよび/またはIL-3の存在下でヒト末梢血好酸球の生存を低減させるか阻止する。例えば好酸球（例えば 1×10^4 個の細胞）をCD131結合タンパク質とIL-5および/またはGM-CSFおよび/またはIL-3の存在下で適切な時間（例えば約5日間）培養し、細胞数を標準的な方法（例えばLonza社からのViaLight Plus Kit）を利用して評価する。

【0343】

さらに別の一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、IL-3によって誘導されるヒトマスト細胞からのTNF α の放出を低減させるか阻止する。例えば培養したヒトマスト細胞（例えば末梢血に由来する10週齢の細胞）をCD131結合タンパク質とIL-3の存在下で培養する。次に、TNF α の分泌レベルを例えばELISAによって評価する。

【0344】

さらに別の一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、IL-3によって誘導されるヒトマスト細胞からのIL-13の放出を低減させるか阻止する。例えば培養したヒトマスト細胞（例えば末梢血に由来する10週齢の細胞）をCD131結合タンパク質とIL-3の存在下で培養する。次に、IL-13の分泌レベルを例えばELISAによって評価する。

【0345】

さらに別の一例では、本開示のCD131結合タンパク質は、IgEを媒介としたヒトマスト細

10

20

30

40

50

胞からのIL-8の放出がIL-3および/またはGM-CSFおよび/またはIL-5によって強化されるのを低減させるか阻止する。例えば培養したヒトマスト細胞（例えば末梢血に由来する10週齢の細胞）をCD131結合タンパク質とIL-3/IL-5/GM-CSFの存在下で（例えば約48時間）培養する。次に細胞をIgE（例えばヒト骨髄腫IgE）とともに適切な時間（例えば約24時間）培養し、IL-8の分泌を例えばELISAによって評価する。

【0346】

さらに別の一例では、CD131結合タンパク質は、SCF、GM-CSF、IL-3、IL-5の存在下で培養したCD34⁺ヒト骨髄細胞（または臍帯血細胞）によるCFU-GMの形成を低減させるか阻止する。例えばCD34⁺細胞（例えば 1×10^3 個の細胞）をCD131結合タンパク質の存在下で（例えばウシ胎仔血清、ウシ血清アルブミン、SCF、GM-CSF、IL-3、IL-5を補足したメチルセルロース（例えば1%メチルセルロース）上にて）培養する。細胞を適切な時間（例えば約16日間）培養し、その直後に形成されているコロニーの数を数える。

10

【0347】

さらに別の一例では、本開示のCD131結合タンパク質または抗体は、炎症性気道疾患または鼻ポリープ症を患っている対象からの脾臓または鼻ポリープ組織に由来する免疫細胞（例えば好酸球）の生存を低減させるか、その免疫細胞の死を誘導する。例えばその免疫細胞をIL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFと、そのタンパク質または抗体の存在下で培養する。次に、細胞死を、標準的な方法（例えば蛍光活性化セルソーティング）を利用してアネキシンVの発現を検出することによって評価する。

【0348】

別の一例では、CD131結合タンパク質は、IL-3を媒介とした好塩基球からのヒスタミンの放出を低減させるか阻止する。例えば好塩基球を含む低密度白血球を、IgE、IL-3、ならびにさまざまな濃度の抗体または抗原結合フラグメントとともにインキュベートする。対照細胞は、免疫グロブリン（陽性対照）またはIL-3（陰性対照）を含んでいない。次に、放出されるヒスタミンのレベルを、標準的な技術（例えばRIA）を利用して評価する。ヒスタミンの放出レベルを陽性対照よりも低いレベルに低下させるCD131結合タンパク質は、IL-3シグナル伝達を無効にすると見なされる。一例では、低下のレベルは、タンパク質の濃度と相関している。IL-3を媒介としたヒスタミンの放出を評価する方法の一例が、例えばLopez他、J. Cell. Physiol.、第145巻：69ページ、1990年に記載されている。

20

【0349】

IL-3シグナル伝達の無効化を評価するための別のアッセイは、CD131結合タンパク質が、内皮細胞に対するIL-3を媒介とした効果を低減させるか阻止するかどうかを調べることを含んでいる。例えばヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）をIL-3（場合によってはIFN- γ も）とさまざまな濃度のCD131結合タンパク質の存在下で培養する。次に、分泌されたIL-6の量を例えば酵素固定免疫吸着アッセイ（ELISA）を利用して評価する。対照培養物は、CD131結合タンパク質（陽性対照）またはIL-3（陰性対照）を含んでいない。IL-3の存在下でIL-6の産生を低減させるか阻止して陽性対照よりも低いレベルにするCD131結合タンパク質は、IL-3シグナル伝達を無効にすると見なされる。

30

【0350】

シグナル伝達の無効化を評価するための他の方法を本開示で考慮する。

40

エフェクタ機能を調べる

本明細書で議論したように、本開示のいくつかのCD131結合タンパク質は、エフェクタ機能を低下させるか、エフェクタ機能を持たせる（またはエフェクタ機能を増大させる）。ADCC活性を評価する方法は本分野で知られている。

【0351】

一例では、ADCC活性のレベルは、 ^{51}Cr 放出アッセイ、ユーロピウム放出アッセイ、 ^{35}S 放出アッセイのいずれかを利用して評価する。これらアッセイのそれぞれにおいて、CD131を発現する細胞を本明細書に記載した1つ以上の化合物とともに、ある時間にわたり、その化合物が細胞に取り込まれるのに十分な条件下で培養する。 ^{35}S 放出アッセイの場合には、CD131を発現する細胞を、 ^{35}S で標識したメチオニンおよび/またはシステインとともに

50

に十分な時間にわたって培養し、その標識したアミノ酸を新たに合成されるタンパク質に取り込ませることができる。次に、細胞をCD131結合タンパク質の存在下または不在下と、免疫エフェクタ細胞（例えば末梢血単核細胞（PBMC）および/またはNK細胞）の存在下で培養する。次に細胞培地中の⁵¹Crおよび/またはユーロピウムおよび/または³⁵Sの量を検出する。CD131結合タンパク質の存在下ではCD131結合タンパク質の不在下と比べて変化がほとんどないかまったくないというのは、そのタンパク質がエフェクタ機能を低下させたことを示しており、CD131結合タンパク質の不在下と比べて量が増加している（またはIgG1 Fc領域を含むCD131結合タンパク質の存在下と比べて増加している）というのは、エフェクタ機能があること、またはエフェクタ機能が増大したことを示している。タンパク質によって誘導されるADCCのレベルを評価するためのアッセイが開示されている刊行物の例には、Hellstrom他、Proc. Natl Acad. Sci. USA第83巻：7059～7063ページ、1986年と、Bruggemann他、J. Exp. Med. 第166巻：1351～1361ページ、1987年が含まれる。

10

【0352】

タンパク質によって誘導されるADCC活性のレベルを評価するための他のアッセイには、フローサイトメトリーのためのACT1（商標）非放射性細胞毒性アッセイ（CellTechnology, Inc.社、カリフォルニア州、アメリカ合衆国）、またはCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega社、ウィスコンシン州、アメリカ合衆国）が含まれる。

【0353】

CD131結合タンパク質がC1qに結合できてCDCを誘導する可能性があることを確認するのにC1q結合アッセイを実施することもできる。補体の活性化を評価するため、CDCアッセイを実施することができる（例えばGazzano-Santoro他、J. Immunol. Methods 第202巻：163ページ、1996年を参照されたい）。

20

【0354】

半減期を求める

本開示に包含されるいくつかのCD131結合タンパク質は、改善された半減期を有する（例えば改変されていないCD131結合タンパク質と比べて半減期が長くなるように改変されている）。改善された半減期を有するCD131結合タンパク質を特定する方法は、当業者には明らかであろう。例えばCD131結合タンパク質が新生児Fc受容体（FcRn）に結合する能力を評価する。この点に関し、FcRnに対する結合親和性が増大すると、CD131結合タンパク質の血清半減期が長くなる（例えばKim他、Eur J Immunol.、第24巻：2429ページ、1994年を参照されたい）。

30

【0355】

本開示のCD131結合タンパク質の半減期は、例えばKim他、Eur J Immunol.、第24巻：2429ページ、1994年に記載されている方法に従う薬物動態研究によって測定することもできる。この方法によれば、放射性標識したCD131結合タンパク質をマウスに静脈内注射し、その血漿濃度を時間の関数として定期的に（例えば注射後3分～72時間の時点で）測定する。このようにして得られたクリアランス曲線は、2相性、すなわち相と相になっているはずである。このタンパク質の生体内半減期を求めるには、相におけるクリアランス速度を計算し、野生型または改変されていないタンパク質のクリアランス速度と比較する。

40

【0356】

治療効率の評価

治療効率を評価するためのアッセイは、CD131結合タンパク質による無効化を明らかにすることとの関連で上に記載してある。

【0357】

別の一例では、タンパク質が疾患を治療する効率は、生体内アッセイを利用して評価する。

【0358】

例えばCD131結合タンパク質をTh2-炎症性疾患（例えば喘息や気道過敏症）で試験することができる。アレルギー性喘息のモデルの一例は、例えばWang他、J. Immunol. 第165

50

巻：2222ページ、2000年に記載されているマウスOVAモデルである。炎症を誘導した後、CD131結合タンパク質をマウスに投与し、喘息の症状（例えば気管支肺胞洗浄液（BALF）に含まれる好酸球の数、および/または粘液分泌、および/または杯細胞過形成）を評価する。喘息の他のモデルが本分野で知られており、その中に含まれるのは、WO2002/098216に記載されている炎症性喘息のヒツジモデル、例えばイエダニによって誘導されるアレルギー性喘息のマウスモデル（Fattouh他、Am J Respir Crit Care Med第172巻：314～321ページ、2005年）、IL-5とエオタキシンが過剰発現している重症喘息のマウスモデル、エーロゾルとして供給されるときメタコリンに対して過敏でポリ-1-リシンの気管内点滴を受けるマウス（Homma他、Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol第289巻：L413～L418ページ、2005年）である。

10

【0359】

別の一例では、CD131結合タンパク質を関節炎の動物モデルで試験する。モデルの例に含まれるのは、SKG系統のマウス（Sakaguchi他、Nature、第426巻：454～460ページ、2003年）、ラットII型コラーゲン関節炎モデル、マウスII型コラーゲン関節炎モデル、いくつかの種において抗原によって誘導される関節炎モデル（Bendele J Musculoskel Neuron Interact；第1巻(4)：377～385ページ、2001年）である。これらのアッセイでは、関節炎を誘導し、CD131結合タンパク質が関節炎の1つ以上の症状（例えば関節の炎症および/または滑液に含まれる炎症マーカー）を減らす能力を評価する。関節炎の症状を減らすCD131結合タンパク質は、この疾患またはCD131を媒介とする疾患（例えばCD131を媒介とする炎症性疾患）の治療に役立つと見なされる。

20

【0360】

CD131結合タンパク質は、COPDのモデルでも調べること、または代わりにCOPDのモデルで調べることができ、その場合には例えば非ヒト哺乳動物（例えば齧歯類であるマウスなど）をタバコの煙に曝露する。曝露後、その哺乳動物にCD131結合タンパク質を投与し、肺炎の程度および/または肺内の好中球の数を標準的な技術を用いて評価または推定する。肺炎および/または好中球の数を減らすCD131結合タンパク質は、肺炎、またはCOPD、またはCD131を媒介とする疾患（例えばCD131を媒介とする炎症性疾患である、CD131を媒介とする炎症性肺疾患）の治療に役立つと見なされる。

【0361】

さらに別の一例では、CD131結合タンパク質を大腸炎のモデル（例えば大腸好酸球増多症を発症する、オキサゾロンで処理したマウス）、またはAlbert他、Am. J. Pathol.、第178巻：150～160ページ、2011年に記載されているモデルで試験する。

30

【0362】

別の一例では、CD131結合タンパク質を非ヒト動物（例えば非ヒト霊長類）に投与し、免疫細胞（例えば循環している好酸球、または組織内の好酸球、または他のサンプル（例えばBAL液）中の好酸球）の数/レベルを評価する。免疫細胞の数/レベルを投与前および/またはそのタンパク質が投与されていない対照哺乳動物と比べて低下させるCD131結合タンパク質は、その疾患または病気を治療するのに適していると思なされる。

【0363】

別の一例では、CD131結合タンパク質を受身皮膚アナフィラキシーのモデルで試験する。このモデルでは、例えば抗ジニトロフェニル（DNP）-IgEで感作させた後にDNP-ヒト血清アルブミン（HSA）で刺激した非ヒト哺乳動物（例えば齧歯類であるマウス）にCD131結合タンパク質を投与し、耳の厚みのベースライン（すなわち投与前）からの変化および/またはサイトカイン（例えばTNFまたはIL-13）のレベルを標準的な技術を利用して評価または推定する。そのタンパク質が投与されていない対照哺乳動物と比べて耳の厚みの変化を減らす、および/またはサイトカインのレベルを下げるCD131結合タンパク質は、その疾患または病気を治療するのに適していると思なされる。

40

【0364】

別の一例では、哺乳動物を循環しているサイトカイン（例えばIFN、TNF）のレベルを例えばELISAを用いて検出する。サイトカインのレベルを投与前および/またはそのタ

50

ンパク質が投与されていない対照哺乳動物と比べて低下させるCD131結合タンパク質は、その疾患または病気を治療するのに適していると思なされる。

【0365】

治療すべき疾患

本開示では、対象内でCD131を通じた（例えばIL-3および/またはIL-5および/またはGM-CSFによる）シグナル伝達によって起こるか悪化するあらゆる疾患の治療または予防を考慮する。

【0366】

一例では、疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー疾患のいずれかである。

【0367】

一例では、疾患は、自己免疫を媒介とする炎症性疾患である。例えば自己免疫を媒介とする炎症性疾患は、関節リウマチ、多発性硬化症、間質性肺炎、大腸炎、全身性エリテマトーデスのいずれかである。一例では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一例では、自己免疫疾患は間質性肺炎である。さらに別の一例では、自己免疫疾患は全身性エリテマトーデスである。

【0368】

一例では、炎症性疾患は、慢性炎症性疾患である。例えば慢性炎症性疾患は、水疱性類天疱瘡またはチャージ-ストラウス症候群である。一例では、疾患は水疱性類天疱瘡である。さらに別の一例では、疾患はチャージ-ストラウス症候群である。

【0369】

一例では、疾患はアレルギー疾患である。例えば疾患は、蕁麻疹、喘息、気道過敏症、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、セリアック病、鼻ポリープ、鼻ポリープを伴う慢性副鼻腔炎（CRSwNP）、鼻ポリープを伴わない慢性副鼻腔炎（CRSsNP）、アトピー性皮膚炎のいずれかである。一例では、疾患は、鼻ポリープを伴う慢性副鼻腔炎（CRSwNP）である。一例では、疾患は、鼻ポリープを伴わない慢性副鼻腔炎（CRSsNP）である。別の一例では、疾患はアトピー性皮膚炎である。さらに別の一例では、疾患は慢性蕁麻疹である。

【0370】

一例では、アレルギー疾患は、アレルギー性肺疾患である。例えば疾患は、喘息または気道過敏症である。例えば疾患は喘息である。

【0371】

関連する一例では、疾患は呼吸器疾患である。例えば疾患は、喘息、COPD、嚢胞性線維症、肺線維症、細気管支炎、肺胞隔炎、脈管炎、サルコイドーシスのいずれかである。一例では、疾患はCOPDである。さらに別の一例では、疾患は肺線維症である。

【0372】

本明細書では、「喘息」という用語は、呼吸困難の発作性症状または持続的症狀、胸部圧迫感、喘鳴、痰の発生、咳を特徴とし、それに加えて可変気流制限と、内在性または外在性の刺激に対する気道過敏がある疾患（Canadian Asthma Consensus Guidelines）、および/または夜間または早朝の喘鳴、息切れ、胸部圧迫感、咳の再発エピソードにつながる気道過敏に加え、自然に、または治療で回復することがしばしばある可変気流閉塞があることを特徴とする疾患（The Global Initiative for Asthma）を意味すると理解される。

【0373】

一例では、疾患は重症喘息である。本明細書では、「重症喘息」という用語は、高用量または非常に高用量のコルチコステロイドの吸入に加え、経口コルチコステロイドを使用して、または使用せずによく管理された状態の喘息症状を意味すると理解される。「非常に重症の喘息」は、非常に高用量のコルチコステロイドの吸入と摂取に加え、必要な追加の治療をしたりしなかったりしているにもかかわらず、うまく管理できたりできなかったりする喘息を意味すると理解される。これらの定義に関し、吸入するコルチコステロイドの1日の高用量または非常に高用量（大まかな等価用量）は以下の通りである。すなわち

10

20

30

40

50

高用量は、1000～2000 µgのジプロピオン酸ベクロメタゾン、500～1000 µgのフルチカゾン、800～1600 µgのブデソニドであり、非常に高用量は、1000～2000 µgのフルチカゾン、1600～3200 µgのブデソニドである。

【0374】

一例では、疾患は、難治性喘息である。本明細書では、「難治性喘息」という用語には、「致命的喘息」または「準致命的 (near fatal) 喘息」の患者と、以前は「重症喘息」、「ステロイド依存性および/または抵抗性喘息」、「管理が難しい喘息」、「管理不良の喘息」、「激変型喘息」、「不可逆型喘息」と記述された一部の喘息が含まれる。難治性喘息は、亜アメリカ胸部学会 (American Thoracic Society) のガイドラインでは、下記の主基準の一方または両方と、下記の副基準のうちの2つが満たされるときと定義することができる。主基準は、軽度-中程度のレベルの持続性喘息への管理を実現するのに、(1) 連続的またはほぼ連続的な治療、(2) 高用量のコルチコステロイドを吸入する治療が必要とされることである。副基準は、(1) コルチコステロイド (例えばLABA、テオフィリン、ロイコトリエンアンタゴニスト) 吸入に加えてコントロール薬を用いた毎日の治療の必要性、(2) 短時間作用する β_2 -アゴニストを毎日またはほぼ毎日使用する必要がある喘息症状、(3) 持続的気道閉塞 ($FEV_1 < 80\%$ を予測; 毎日のピーク呼気流量 (PEF) 変動性 $> 20\%$)、(4) 喘息に関する年に1回以上の緊急ケア訪問、(5) 年に3回以上の経口ステロイド「バースト」、(6) 経口または吸入によるコルチコステロイド用量を25%以上減らすことによる迅速な悪化、(7) 過去の準致命的喘息事象である。難治性喘息を定義しようとする、薬 (µg/日) と用量 (パフ/日) は、(a) ジプロピオン酸ベクロメタゾン $> 1,260 > 40$ パフ (1回の吸入で42 µg) > 20 パフ (1回の吸入で84 µg); (b) ブデソニド $> 1,200 > 6$ パフ; (c) フルニソリド $> 2,000 > 8$ パフ; (d) プロピオン酸フルチカゾン $> 880 > 8$ パフ (110 µg) > 4 パフ (220 µg); (e) トリアムシノロンアセトニド $> 2,000 > 20$ パフとなる。

10

20

【0375】

一例では、疾患は、急性喘息または非アレルギー性喘息である。本明細書では、「急性喘息」または「アレルギー性喘息」という用語は、アレルゲン (例えばイエダニの糞、花粉) が、呼吸器の下部気道の粘膜下に位置するマスト細胞を活性化させることによって起こる喘息を意味する。マスト細胞の活性化によって鼻上皮を刺激する顆粒球が放出されて粘液が発生し、それに引き続いて気道内の平滑筋が収縮する。平滑筋のこの収縮が気道を収縮させ、特徴的な喘息性喘鳴を引き起こす。

30

【0376】

一例では、疾患は慢性喘息である。「慢性喘息」は、アレルゲンによって起こるのではなく、急性喘息による炎症の結果である。急性喘息の全体的効果が慢性の炎症を引き起こし、それが原因で、環境反応に対して粘膜上皮が過敏になる。煙などのほんの些細な環境因子が過敏な上皮を刺激して大量の粘液と収縮を発生させる。

【0377】

一例では、疾患は鼻ポリープである。

一例では、疾患は、好酸球増加症であるか、好酸球増加症を特徴とする。疾患の例に含まれるのは、肺疾患 (例えば喘息、レフラー症候群)、脈管炎 (例えばチャージ-ストラウス症候群)、慢性好酸球性肺炎、炎症性腸疾患 (例えば大腸炎 (潰瘍性大腸炎など) やクローン病)、薬剤性好酸球増加症、腸への寄生虫感染、膠原病 (例えば関節リウマチ)、肝硬変、逆流性食道炎、皮膚疾患 (例えば剥脱性皮膚炎やアトピー性皮膚炎)、好酸球性消化管疾患 (例えば胃腸炎、食道炎、胃炎)、鼻ポリープ、好酸球増加性気管支炎、アレルギー性結膜炎である。

40

【0378】

一例では、疾患は、好酸球性消化管疾患である。一例では、疾患は食道炎である。別の一例では、疾患は胃炎である。さらに別の一例では、疾患は胃腸炎である。

【0379】

一例では、自己免疫疾患は、自己免疫性関節疾患 (例えば炎症性関節炎、関節リウマチ

50

、特発性関節炎（例えば若年性特発性関節炎））である。一例では、疾患は関節リウマチである。

【0380】

一例では、自己免疫疾患は、自己免疫性腸疾患（例えば炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎やクローン病など））である。

【0381】

一例では、自己免疫疾患は、自己免疫性皮膚疾患（乾癬など）である。

【0382】

一例では、疾患は水疱性類天疱瘡である。

【0383】

一例では、疾患は肥満細胞症である。

【0384】

一例では、疾患は、マスト細胞活性化症候群である。

【0385】

一例では、疾患は、がんである。がんの例には、膀胱がんと血液がん（例えばリンパ腫または白血病）が含まれる。一例では、がんは膀胱がんである。

【0386】

一例では、血液がんは急性骨髄白血病である。別の一例では、血液がんは慢性骨髄白血病である。

【0387】

一例では、対象は、疾患の治療に用いる別の化合物を用いた治療に抵抗性であるか、十分に反応しないか、その治療に適していない。例えば自己免疫疾患または炎症性疾患またはアレルギー性疾患を患っている対象は、コルチコステロイドおよび/または免疫抑制剤および/またはシクロホスファミドおよび/またはメトトレキサートおよび/または抗TNF抗体または可溶性TNF受容体および/または抗CD20抗体および/または抗IL-6抗体および/または抗CD22抗体を用いた治療に抵抗性であるか、十分に反応しないか、その治療に適していない。

【0388】

本開示により、生体内でIL-3/IL-5/GM-CSFに反応する細胞の増殖を抑制する方法も提供され、この方法は、対象に本開示のCD131結合タンパク質または抗体を投与することを含んでいる。

【0389】

本開示により、生体内に好酸球が蓄積されるのを抑制する方法も提供され、この方法は、対象に本開示のCD131結合タンパク質または抗体を投与することを含んでいる。

【0390】

組成物

いくつかの例では、本明細書に記載したCD131結合タンパク質は、医薬として許容可能な通常の高非毒性の基剤を含む製剤にして、または他の一般的な任意の剤形にして、経口投与すること、非経口投与すること、吸入スプレーにより投与すること、吸着させること、吸収させること、局所投与すること、直腸投与すること、鼻腔投与すること、口腔投与すること、膺投与すること、心室内投与すること、埋め込んだリザーバを経由して投与することが可能である。本明細書では、「非経口」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、髄腔内、心室内、胸骨内、ポリープ内、頭蓋内への注射技術または輸液技術が含まれる。

【0391】

CD131結合タンパク質を対象に投与するのに適した形態（例えば医薬組成物）に調製する方法は本分野で知られており、例えば『Remington's Pharmaceutical Sciences』（第18版、1990年）とアメリカ合衆国薬局方：国民医薬品集（Mack Publishing Company社、イーストン、ペンシルヴェニア州、1984年）に記載されている方法が含まれる。

【0392】

10

20

30

40

50

本開示の医薬組成物は、非経口投与（例えば静脈内投与、体腔への投与、臓器または関節の管腔への投与）するのに特に有用である。投与するための組成物は一般に、医薬として許容可能な基剤（例えば水性基剤）にCD131結合タンパク質を溶かした溶液を含んでいる。多彩な水性基剤（例えば緩衝化生理食塩水）を用いることができる。組成物は、生理的条件に似せるため、pH調節剤、緩衝剤、毒性調節剤など、医薬として許容可能な補助物質（例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど）を必要に応じて含むことができる。これら製剤中の本開示のCD131結合タンパク質の濃度は広い範囲で変えることができ、選択した具体的な投与様式と患者の必要に応じ、主に体液の体積、粘度、体重などに基づいて選択されることになる。基剤の例には、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、5%ヒト血清アルブミンが含まれる。混合油やオレイン酸エチルなどの非水性ビヒクルも用いることができる。リポソームも基剤として用いることができる。ビヒクルは、等張性と化学的安定性を増大させる添加剤、（例えば緩衝剤や保存剤）を少量含むことができる。

10

20

30

40

50

【0393】

本開示のCD131結合タンパク質は、製剤化されると、剤形に適合したやり方で、治療/予防に効果的な量を投与されることになる。製剤は多彩な剤形（例えば上述の注射可能な溶液）で容易に投与できるが、医薬として許容可能な他の形態（例えば錠剤、ビル、カプセルや、経口投与のための他の固体、座薬、ペッサリー、鼻腔溶液、鼻腔スプレー、エロゾル、吸入剤、リポソーム形など）も考えられる。「徐放性」の医薬カプセルまたは医薬組成物も使用できる。徐放製剤は、一般に、長期にわたって薬のレベルが一定になるように設計されており、本開示のCD131結合タンパク質を送達するのに使用できる。

【0394】

WO2002/080967には、例えば喘息を治療するための抗体を含むエロゾル化した組成物を投与するための組成物と方法が記載されており、この組成物と方法は、本開示のCD131結合タンパク質を投与するのにも適している。

【0395】**組み合わせ療法**

一例では、本開示のCD131結合タンパク質を、組み合わせ治療工程または追加の治療工程として、または治療用製剤の追加の要素として、本明細書に記載した疾患の治療に有用な別の化合物と組み合わせて投与する。

【0396】

例えば別の化合物は、抗炎症化合物である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、免疫抑制剤である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、コルチコステロイド（例えばプレドニゾンおよび/またはプレドニゾロン）である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、メトトレキサートである。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、シクロホスファミドである。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、ミコフェノラートモフェチルである。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、抗CD20抗体（例えばリツキシマブ、オファツムマブ）である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、抗CD22抗体（例えばエブラツズマブ）である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、抗TNF抗体（例えばインフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ）または可溶性TNF受容体（例えばエタナーセプト）である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、CTLA-4アンタゴニスト（例えばアパタセプト、CTLA4-Ig）である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、抗IL-6抗体である。その代わりに、またはそれに加えて、別の化合物は、BLysアンタゴニスト（抗BLys抗体など（例えばベリムマブ））である。

【0397】

別の一例では、別の化合物は、化学療法薬、またはがんの治療に用いる他の薬である。

【0398】

別の一例では、本明細書に記載したタンパク質を、がんを治療するための放射線療法の前または後に投与する。

【0399】

本開示により、アレルギー疾患（例えば喘息や鼻ポリープ）を患っている患者の治療に必要なコルチコステロイドの用量を減らす方法も提供され、この方法は、本開示のCD131結合タンパク質とコルチコステロイドの両方を投与することを含んでいて、コルチコステロイドは、単独で投与される場合、またはCD131結合タンパク質の不在下で投与される場合よりも少ない用量で投与される。CD131結合タンパク質とコルチコステロイドは同時に投与する必要はなく、対象に対して効果が重なる（例えば対象の体内で両方が同時に活性である）ようにすることだけが必要とされる。

【0400】

投与の用量と時期

本開示のCD131結合タンパク質の適切な用量は、具体的なCD131結合タンパク質、および/または治療すべき疾患、および/または治療を受けている対象に応じて変化するであろう。適切な用量の決定は、熟練した医師の能力範囲である。例えば最適であるよりも少ない用量から開始して段階的に増量することにより、最適な用量または有用な用量を決定する。あるいは治療/予防のための適切な用量を決定するには、細胞培養アッセイまたは動物研究からのデータを使用する。その場合に適切な用量は、活性化化合物のED₅₀を含む循環濃度の範囲内であり、毒性はほとんどないか、まったくない。用量は、使用する剤形と用いる投与経路に応じてこの範囲内で変えることができる。治療/予防に有効な用量は、最初は細胞培養アッセイから推定することができる。1回分の用量を、動物モデルにおいて細胞培養で求めたID₅₀（すなわち半数で症状抑制を実現する化合物の濃度または量）を含む循環血漿濃度が実現されるように製剤化することができる。そのような情報を利用してヒトで有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィによって測定することができる。

10

20

【0401】

いくつかの例では、本開示の方法は、本明細書に記載したタンパク質を予防または治療に有効な量で投与することを含んでいる。

【0402】

「治療に有効な量」という表現は、治療を必要とする対象に投与するとき、対象の予後および/または状態を改善する量、および/または本明細書に記載した臨床疾患の1つ以上の症状を低減または抑制することにより、その疾患の臨床的診断または臨床的性質として観察され、受け入れられているよりも低いレベルにする量である。対象に投与する量は、治療する疾患の具体的な特徴、治療する疾患のタイプとステージ、投与様式、対象の特徴（全体的な健康状態、他の疾患、年齢、性別、遺伝子型、体重など）に依存するであろう。当業者は、これらの因子と他の因子に応じて適切な用量を決定することができよう。したがってこの表現は、本開示を具体的な量（例えばタンパク質の重量と量）に制限すると解釈されることはなく、逆に、本開示は、対象において上記の結果を達成するのに十分な任意の量のCD131結合タンパク質を包含する。

30

【0403】

本明細書では、「予防に有効な量」という表現は、臨床疾患の1つ以上の検出可能な症状の開始を阻止する、または抑制する、または遅延させるのに十分な量のタンパク質を意味する。そのような量は、例えば投与される具体的なCD131結合タンパク質、および/または具体的な対象、および/または疾患の種類または重篤度またはレベル、および/または疾患への（遺伝的またはそれ以外の理由による）かかりやすさによって変わることを当業者は知っているであろう。したがってこの表現は、本開示を具体的な量（例えばCD131結合タンパク質の重量または量）に制限すると解釈されることはなく、逆に、本開示は、対象において上記の結果を達成するのに十分な任意の量のCD131結合タンパク質を包含する。

40

【0404】

本明細書に記載したCD131結合タンパク質の生体内投与に関し、通常の用量は、1日当たり、個人の体重1 kgにつき約10 ngから約100 mg以上まで変えることができる。数日以上

50

にわたる繰り返し投与に関しては、治療する疾患または異常の重篤度に応じ、望む症状抑制が達成されるまで治療を続けることができる。

【0405】

いくつかの例では、CD131結合タンパク質を、約1 mg/kg～約30 mg/kg（例えば約1 mg/kg～約10 mg/kg、または約1 mg/kg、または約2 mg/kg、または約5 mg/kg）の初期用量で投与する。その後CD131結合タンパク質をより少ない約0.01 mg/kg～約2 mg/kg、例えば約0.05 mg/kg～約1 mg/kg（例えば約0.1 mg/kg～約1 mg/kg、例えば約0.1 mg/kg、または0.5 mg/kgまたは1 mg/kg）の維持用量で投与することができる。維持用量は、7～30日ごとに、例えば10～15日ごとに（例えば10日ごとに、または11日ごとに、または12日ごとに、または13日ごとに、または14日ごとに、または15日ごとに）投与することができる。

10

【0406】

いくつかの例では、CD131結合タンパク質を約0.01 mg/kg～約50 mg/kg（例えば約0.05 mg/kg～約30 mg/kg（例えば約0.1 mg/kg～約20 mg/kg、例えば約0.1 mg/kg～約10 mg/kg、例えば約0.1 mg/kg～約2 mg/kg））の用量で投与する。例えばCD131結合タンパク質を約0.01 mg/kg～約5 mg/kg、例えば約0.1 mg/kg～約2 mg/kg（例えば0.2 mg/kg、または0.3 mg/kg、または0.5 mg/kg、または1 mg/kg、または1.5 mg/kg）の用量で（例えばより大きな負荷用量またはより小さな維持用量なしに）投与する。いくつかの例では、多数の用量を例えば7～30日ごとに（例えば10～22日ごとに、例えば10～15日ごとに、例えば10日ごとに、または11日ごとに、または12日ごとに、または13日ごとに、または14日ごとに、または15日ごとに、16日ごとに、または17日ごとに、または18日ごとに、または19日ごとに、または20日ごとに、または21日ごとに、または22日ごとに）投与する。例えばCD131結合タンパク質を7日ごとに、または14日ごとに、または21日ごとに投与する。

20

【0407】

いくつかの例では、治療を開始するとき、哺乳動物にCD131結合タンパク質を投与するのは、連続して7日間まで、または連続して6日間まで、または連続して5日間まで、または連続して4日間までである。

【0408】

治療に十分に反応する哺乳動物の場合には、一週間に多数回投与することができる。その代わりに、またはそれに加えて、用量を増やしながら投与することができる。

【0409】

別の一例では、有害な反応を経験している哺乳動物に関しては、初期（または負荷）用量を1週間のうちの多数の日に分割すること、または多数の連続した日に分割することができる。

30

【0410】

本開示の方法によるCD131結合タンパク質の投与は、例えば投与の目的が治療であれ予防であれ、レシピエントの生理的条件と、熟練した医師に知られている他の因子に応じ、連続的に、または間欠的に行なうことができる。CD131結合タンパク質の投与は、本質的に、例えば疾患の進行中または疾患が進行した後に、あらかじめ選択した期間を通じて連続的に実施すること、または間隔を空けて一連の用量で実施することができる。

40

【0411】

CD131検出アッセイ

本開示のCD131結合タンパク質（例えば本明細書で議論した検出可能な標識に共役させたCD131結合タンパク質）で以下のアッセイを実施することができる。CD131、またはCD131を発現する細胞を本明細書に記載したアッセイで検出することは、疾患の診断または予後予測にとって有用である。

【0412】

イムノアッセイは、対象の疾患を診断するための、またはサンプル中のCD131、またはCD131を発現する細胞を検出するためのアッセイ形式の一例である。本開示では、あらゆる形態のイムノアッセイを考慮する。その中には、ウエスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、蛍光結合免疫吸着アッセイ（FLISA）、競合アッセイ、ラジオ

50

イムノアッセイ、側方流イムノアッセイ、フロースルーイムノアッセイ、電気化学発光アッセイ、比濁測定に基づくアッセイ、濁度測定に基づくアッセイ、蛍光活性化セルソーティング (FACS) に基づくアッセイが含まれる。

【0413】

適切なイムノアッセイの一形態は、例えば、ELISAまたはFLISAである。

【0414】

一形態では、そのようなアッセイは、本開示のCD131結合タンパク質を固体マトリックス (例えばポリスチレンやポリカーボネートでできたマイクロウエルやディップスティック、膜、ガラス支持体 (例えばガラススライド)) に固定化することを含んでいる。次に試験サンプルをCD131結合タンパク質に直接接触させ、サンプル中のCD131、またはCD131を発現する細胞を結合させるか捕獲する。洗浄してサンプル中の結合しなかったタンパク質をすべて除去した後、明確なエピトープの位置でCD131に結合するか、細胞上の異なる抗原に結合するCD131結合タンパク質を、捕獲されたCD131または細胞と直接接触させる。この検出用タンパク質は一般に、ELISAの場合には検出可能なレポータ分子 (例えば酵素 (例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、 β -ガラクトシダーゼ)) で標識し、FLISAの場合には蛍光体で標識する。あるいは、検出用タンパク質に結合する標識した第2のタンパク質を用いることができる。結合しなかったあらゆるタンパク質を除去した後、ELISAの場合には基質 (例えば過酸化水素、TMB、トリインジン、5-プロモ-4-クロロ-3-インドール-D-ガラクトピラノシド (x-gak)) を添加することによって、検出可能なレポータ分子を検出する。もちろん固定化した (捕獲用) タンパク質と検出用タンパク質は逆に用いることができる。

10

20

【0415】

次に、既知量のマーカーを用いて作成した標準的な曲線を用いることにより、または対照サンプルと比較することにより、サンプル中の抗原のレベルを求める。

【0416】

上に記載したアッセイは、検出の基礎として化学発光またはエレクトロ化学ルミネッセンスを用いるように改変することが容易である。

【0417】

当業者には明らかなように、免疫吸着アッセイに基づく他の検出法は本開示を実施するのに有用である。例えば、検出のための放射性標識、または検出のための金標識 (例えばコロイド状の金)、または例えば検出のためのNAD⁺を封止したリボソームを用いた上記の記述に基づく免疫吸着法や、アクリジニウム結合免疫吸着アッセイがある。

30

【0418】

本開示のいくつかの例では、CD131、またはCD131を発現する細胞のレベルを、表面プラズモン共鳴検出器 (例えばBIAcore (商標)、GE Healthcare社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)、フロースルー装置 (例えばアメリカ合衆国特許第7205159号に記載されているもの)、マイクロイムノアッセイ装置またはナノイムノアッセイ装置 (例えばアメリカ合衆国特許出願公開第20030124619号に記載されているもの)、側方流装置 (例えばアメリカ合衆国特許出願公開第20040228761号または第20040265926号に記載されているもの)、蛍光偏光イムノアッセイ (FPiA; 例えばアメリカ合衆国特許第4593089号または第4751190号に記載されているもの)、免疫濁度測定アッセイ (例えばアメリカ合衆国特許第5571728号または第6248597号に記載されているもの) のいずれかを用いて求める。

40

【0419】

サンプルと対照サンプル

当業者には明らかなように、本明細書に記載した例のいくつかは、CD131、またはCD131を発現する細胞のレベルを求めるのにある程度の定量化を必要とする。そのような定量化は、本開示にアッセイに適切な対照サンプルを含めることによって実現できる。

【0420】

一例では、適切な対照サンプルは、健康な対象または正常な対象に由来するサンプルである。

50

【0421】

本文脈では、「健康な対象」という用語は、CD131に関連する疾患（例えば炎症性疾患）を患っていないことが知られている個人を意味する。

【0422】

「正常な対象」という用語は、サンプル中のCD131、またはCD131を発現する細胞のレベルが個人の集団と比べて正常である個人を意味する。

【0423】

本開示では、正常および/または健康な対象、または正常および/または健康な対象の集団から得られたデータセットとしての対照サンプルも考慮する。

【0424】

一例では、本開示の方法はさらに、対照サンプル中のCD131のレベルを例えば本明細書に記載した方法を用いて求めることを含んでいる。

【0425】

一例では、対象からのサンプルと対照サンプルをほぼ同じ時期、または実質的に同じ時期に調べる。

【0426】

一例では、対象からのサンプルと対照サンプルを、本明細書の任意の1つ以上の例に記載されている本開示の同じ方法を用いて調べ、結果を比較できるようにする。

【0427】

キット

本開示はさらに、

(i) 本開示のCD131結合タンパク質、またはそれをコードする発現コンストラクト；

(ii) 本開示の細胞；

(iii) 本開示の医薬組成物

の1つ以上を含むキットを含んでいる。

【0428】

別の一例では、本開示により、複数の化合物を含んでいて、それら化合物が合わさってIL-3、IL-5、GM-CSFによるシグナル伝達を無効にするキットが提供される。

【0429】

CD131を検出するためのキットの場合には、そのキットはさらに、例えば本開示のCD131結合タンパク質に連結された検出手段を含むことができる。

【0430】

治療/予防に利用するキットの場合には、そのキットはさらに、医薬として許容可能な基剤を含むことができる。

【0431】

場合によっては、本開示のキットを、本明細書に記載した任意の例による方法で使用するための指示とともに包装する。

【0432】

本開示は、以下の非限定的な実施例を含んでいる。

【実施例】

【0433】

非限定的な実施例

実施例1：方法

細胞培養

FreeStyle (商標) 293-F (FS293F) 細胞と哺乳動物発現ベクター-pcDNA3.1をInvitrogen社から取得した。細胞をGIBCO (登録商標) FreeStyle (商標) 293発現培地 (Life Technologies社) の中で培養した。すべての組織培養培地にペニシリン/ストレプトマイシン/フンギゾン試薬 (GIBCO (登録商標)、Life Technologies社) を補足し、細胞をインキュベータの中で8%CO₂の雰囲気にして37℃に維持した。

【0434】

10

20

30

40

50

サイトカインと抗体

放射性ヨウ素化を容易にするP6YY置換をコードする組み換えヒトGM-CSFを、以前に報告されているようにして (Hercus他、Proc Natl Acad Sci USA 第91巻：5838～5842ページ、1994年) 大腸菌から調製した。残基13～121と放射性ヨウ素化を容易にするW13Y置換を含む組み換えヒトIL-3 (Murphy他、Growth Factors第28巻：104～110ページ、2010年) を大腸菌から発現させて精製した。無担体組み換えヒトIL-5をR&D Systems社 (ミネアポリス、ミネソタ州) から購入した。細胞アッセイのためのサイトカイン (IL-3、GM-CSF) をR&D Systems社 (ミネアポリス、ミネソタ州) から購入した。抗ヒトIgE抗体 (鎖特異的) をSigma社 (セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国) から購入し、ヒト骨髄腫IgEをCalbiochem社 (ダルムシュタット、ドイツ国) から購入した。

10

【0435】

ハイブリドーマの作製

【0436】

と_{IL-3}の両方が欠けたBALB/cマウス (Scott他、Blood 第96巻：1588～1590ページ、2000年) に腹腔内注射して50 μgの6-Hisタグ付きshCD131タンパク質を入れた。マウスにはさらに、同じ部位に同じ用量を毎週2×4回注射した。ハイブリドーマは、本質的に以前に報告されているようにして (Nicola他、Blood第82巻：1724～1731ページ、1993年) 作製したが、脾臓細胞をSp2/0骨髄腫細胞と融合させた点が異なっている。個々のハイブリドーマ (C末端6-Hisタグに対する3H3と、抗h_{IL-3} mAb 7H12と3F1) を限界希釈によって再クローニングした。ローラーボトルの中に0.5～1.0%低IgG FCS (GIBCO (登録商標)、Life Technologies社) を補足したハイブリドーマSFM培地を入れ、その培地の中でハイブリドーマを37℃にて培養した。

20

【0437】

cDNA発現プラスミドの作製

CD131のヒト共通受容体cDNA (CD131; GenBank登録番号 P32927) とアミノ酸変異体について、ヒトで発現させるためのコドン最適化と合成をGeneart (登録商標) (Life Technologies社) によって実施した。そのそれぞれが、開始メチオニン (+1) のすぐ上流にコザックコンセンサス配列 (106) (GCCACC) を有する。PCRに基づく標準的な突然変異誘発技術を利用して完全長膜貫通CD131変異体と可溶性CD131 (sCD131) 変異体 (Ser438の後が切断されていて、C末端6×ヒスチジンタグがフレーム内に融合している) を作製した。各cDNAが完成すると、それをNheIとXhoIを用いて消化させ、pcDNA3.1に連結した (Invitrogen社、Life Technologies社)。

30

【0438】

ヒトインターロイキン-3受容体鎖cDNA (Hu-IL3R鎖; GenBank登録番号NP_002174)、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体鎖cDNA (GM-CSFR鎖、GenBank登録番号NP_006131)、ヒトインターロイキン-5受容体鎖アイソフォーム1 (Hu-IL5R鎖、GenBank登録番号NP_000555) をH. Ramshaw博士 (がん生物学センター、アデレード、オーストラリア国) またはGeneart (登録商標) (Life Technologies社) から取得し、上記のようにしてクローニングした。抗Hu-IL5R鎖抗体cDNA (アメリカ合衆国特許第6018032号) をIgG4pK骨格上でGeneart (登録商標) (Life Technologies社) によって合成した。

40

【0439】

上に記述したようにして、9A2の組み換えFabフラグメントと親和性が成熟した変異体を、軽鎖全体と切断された重鎖 (終止コドンがアミノ酸241の後に導入されていた) をクローニングすることによって作製し、別々にpcDNA3.1の中に入れた。

【0440】

QIAGEN Plasmid Maxiまたは Giga Kitを製造者の指示に従って用いてプラスミドDNAの大規模調製を実施した。BigDye (商標) Terminatorバージョン3.1 Ready Reaction Cycle SequencingとApplied Biosystems 3130xl Genetic Analyzerを用い、全プラスミドコンストラクトのヌクレオチド配列を、両方の鎖のシーケンシングによって確認した。

50

【0441】

組み換えタンパク質を作製するための一過性トランスフェクション

【0442】

293fectinトランスフェクション試薬（Invitrogen社、Life Technologies社）を製造者の指示に従って使用し、2/10 Wave Bioreactorシステム2/10（GE Healthcare社）上のCellbag 2L（GE Healthcare Life Sciences社）の中で、または50 mlのBioreactor管（Sartorius社）の中で、FS293F細胞を用いた発現プラスミドの一過性トランスフェクションを、8%CO₂の雰囲気にしたインキュベータの中で37℃にて6日間実施した。培養物に、トランスフェクションの4時間後にPluronic F68（Gibco社、Life Technologies社）を補足して最終濃度を0.1%v/vにし、トランスフェクションの24時間後にLucraTone Lupin（Millipore社）を補足して最終濃度を0.5%v/vにした。細胞培養物の上清を2500 rpmで遠心分離することによって回収し、0.45 μmのフィルタ（Nalgene社）を通過させた後に精製した。

10

【0443】

抗体の精製

HiTrap MabSelect SuReまたはKappaSelect（1 ml、GE Healthcare Life Sciences社）というクロマトグラフィ樹脂をそれぞれ用いてすべてのmAbと組み換えFabフラグメントをアフィニティ精製した後、AKTExpressハイスループットクロマトグラフィシステム（GE Healthcare Life Sciences社）上でHiPrep（商標）26/10 Desaltingカラム（GE Healthcare Life Sciences社）を用いて脱塩した。Fabフラグメントは、精製した抗体を、固定化したパイン-アガロース（Sigma社、セントルイス、ミズーリ州）を用いて消化させ、プロテインAとサイズ排除クロマトグラフィを利用して精製することによって作製した。1×MT PBS緩衝液と平衡させておいたカラムに濾過した細胞培地（500 ml）を1 ml/分の割合で適用し、内毒素を除去しやすくするため0.5 Mアルギニンの存在下にて、1×MTPBS pH 7.3（10 ml）、10 mMトリス、150 mM NaCl pH 7.2（80 ml）を順番に用いて洗浄した。次に、結合した抗体を8 mlの0.1 M酢酸ナトリウムpH 3.0（または0.1 MグリシンpH 2.5）を用いて溶離させ、ただちに脱塩カラムに適用した。タンパク質分画をプールし、Amicon Ultra Cel 50K遠心分離装置（Millipore社）を用いて濃縮した後、0.22 μmのフィルタを用いて殺菌濾過した。抗体の純度をSDS-PAGEによって評価し、PlusOne（商標）Coomassie（商標）Blue PhastGel（商標）R-350 Stainを製造者の指示に従って用いてタンパク質を可視化し、クロマトグラフィで対照抗体基準と比較することにより抗体の濃度を求めた。

20

30

【0444】

Hisタグ付きタンパク質の精製

AKTA（商標）発現（GE Healthcare Life Sciences社）精製システム上のタンデム式のニッケルとサイズ排除クロマトグラフィによって可溶性CD131（sCD131）とsCD131変異体を精製した。カラムクロマトグラフィを製造者の指示に従って実施した。溶離後のサンプルをPBS中で4 ml/分にてSuperdex 200 pg 26/60カラム（GE Healthcare Life Sciences社）に直接適用し、分画を回収した。追加のサイズ排除分析の後にsCD131分画を含むピーク分画をプールし、引き続き実施する試験のため殺菌濾過した。

【0445】

抗体の作製

ファージミドFABライブラリをスクリーニングすることにより、ビオチン-抗ヒトFc捕獲（Jackson ImmunoResearch Laboratories社）によってDynabeads（登録商標）M-280ストレプトアビジン（Invitrogen Life Technologies社）の表面に固定化したヒトIgG1のFc領域に融合したヒトFc受容体（CD131）の組み換え細胞外ドメイン（CD131-Fc、Apollo Cytokine Research社）に結合したファージミドを探した。以前に報告されている方法（Hoet他、Nat Biotechnol第23巻：344～348ページ、2005年）に従って選択を実施した。選択の前に、ファージ入力からストレプトアビジンまたはFcに非特異的に結合するものを激減させる操作を、ストレプトアビジンビーズそのものとの1：1混合物とともに5回連続してインキュベートすることにより実施するか、ファージ入力を、ビオチン抗ヒトFc捕獲を通じて無関係なヒトIgG抗体で被覆した。2%ミルク/PBST（MTPBS、0.1%トゥイーン20）の中

40

50

で、その激減ファージ入力を、濃度を下げていく固定化したCD131-Fc (15 µg、10 µg、5 µg) とともに室温で20分間インキュベートすることによって3回の選択を実施した後、12回洗浄した。選択されたファージクローンを対数増殖期の大腸菌TG1細胞の中で増幅させ、M13K07ヘルパーファージを超感染させることによってFab-ファージミドをレスキューした後、標準的なプロトコル (Barbas他、Proc Natl Acad Sci USA 第88巻: 7978~7982ページ、1991年) を利用して精製した。2回目と3回目の選択の後に個々のクローンを取り出し、Fabカセットと軽鎖をPCRで増幅し、本質的に報告されている (Hoet他、上掲文献) ようにしてシークエンシングした。競合ファージELISAを利用して高親和性クローンをスクリーニングした。選択されたファージ由来Fabコンストラクトからの軽鎖全体 (可変ドメインと定常ドメイン) と重鎖可変ドメインをクローニングしてpRhG4ベクター (Jostock他、Immunol Methods 第289巻: 65~80ページ、2004年) に入れることにより、選択された独自の抗体クローン群を再構成して、セリン241からプロリンへのヒンジ領域変異 (Angal他、Mol Immunol 第30巻: 105~108ページ、1993年) と軽鎖を有する完全長IgG4抗体 (IgG4pKと呼ぶ) を発現させた。

【0446】

9A2の親和性成熟

19種類のアミノ酸 (システインなし) の組み合わせを含むプライマー (配列番号149~162) を用いたCDRのランダム化により、クローン9A2を親和性成熟させた。pTac-geneIII-9A2 Fabの「終止鑄型」バージョン (各ファージミドについて、すべてのCDRで18個のコードン (6個のアミノ酸残基) をTAA終止コードンに置き換えることによって生殖系列終止鑄型 (GeneArt (登録商標)、Life Technologies社) を作製した (配列番号163~176)) を使用し、以前に報告されている方法 (Sidhu他、Methods Enzymol 第328巻: 333~363ページ、2000年) を利用して7つの異なるライブラリを構成した。CDR中のアミノ酸は、Kabat (1991年、本明細書で言及) に従って番号を付けた。それぞれの終止鑄型をKunkel突然変異誘発法 (Kunkel他、Methods Enzymol 第154巻: 367~382ページ、1997年) のための鑄型として用いた。変異したオリゴヌクレオチドを補足の表5に示してある。大腸菌SS320に電気穿孔して突然変異誘発反応を起こさせ、次いでM13-K07ヘルパーファージを添加してファージの産生を開始させた後、30℃で18時間インキュベートした。標準的なプロトコル (Barbas他、上掲文献) を利用してファージを精製した。突然変異誘発の効率は、各ライブラリからランダムに取り出した12個のクローンのシークエンシングによって評価すると、27%~100%であった。プライマー-3254 (5' GGTTCTGGCAAATATTCTG 3'、配列番号199) を用いてライブラリL1、L3.1、L3.2からクローンをシークエンシングし、プライマー-SeqCL (5' ATGCGTGCGAAGTGACCCATCAGG 3'、配列番号200) を用いてライブラリH1.1、H2.1、H3.1、H3.2からクローンをシークエンシングした。各ライブラリは、 $4 \times 10^9 \sim 1.05 \times 10^{10}$ 個の個別のクローンを含んでいた。

【0447】

固定化したCD131-Fcを含む溶液中でライブラリに対して選択を5回実施した。そのとき、全ライブラリで濃度を1回ごとに1/10に下げることによって100 nMから5回目の10 nMにしたが、H3.1は例外であり、2回目に100 nMから10 nMへと1/10に下げたが、その後のすべての選択では一定の10 nMに維持した。本質的に、抗体作製に関して上に記載したようにして、親和性成熟ファージをライブラリから単離した。各ライブラリからランダムに選択した20個のクローンのシークエンシングを、(軽鎖クローンに関しては) プライマー-3254を用い、(重鎖クローンに関しては) SeqCLを用いて実施することによって独自のファージクローンを同定し、コンセンサス配列を求めた。上に記載したようにして独自の変異体を再構成して完全長ヒトIgG4抗体にした。

【0448】

さらなる親和性成熟のために変異体9A2-VR24と9A2-VR39を選択した。ライブラリは、9A2-VR24と9A2-VR39のアミノ酸配列に基づいていた。Geneart (登録商標) (Life Technologies社) によって作製した終止鑄型は上に列挙してあり、ライブラリは、上記の突然変異誘発性オリゴヌクレオチドを用い、上に記載した方法を利用して構築した。突然変異誘発

の効率は、各ライブラリからランダムに選択した12個のクローンをシーケンシングによって評価すると、50%~90%の範囲であった。各ライブラリは、 $0.25 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^9$ 個の個別のクローンを含んでいた。本質的に上に記載した方法を利用し、固定化したCD131-Fcの濃度を下げながら溶液中でライブラリに対して選択を4回実施した。標的濃度を1回ごとに1/10に下げ、100 pMから4回目の1 pMにした。

【0449】

4回の選択の後、1 pMの出力ファージを伴うビーズと、対応するブランクサンプルを上記のようにして洗浄し、PBSの中に再懸濁させた。これを、その後50 mM (ジチオトレイトール) DTTで溶離させ、次いで中和するか、固定化したCD131-Fc (1 nM) を過剰に存在させて室温で1時間インキュベートするかして、オフレートが改善した変異体を選択した後、洗浄、溶離、中和を上記のようにして実施した。SeqCLプライマーを用いたシーケンシングによって各ライブラリからの独自の変異体を同定し、上記のようにして完全なヒトIgG4/抗体に再構成した。

【0450】

ELISA

標的へのファージミド-Fabクローンの結合をELISAによって調べた。精製したCD131-Fcタンパク質または無関係なヒトIgG抗体をMTPBS; pH 7.3の中で $2 \mu\text{g/ml}$ にして、96ウエルMaxisorp ELISAプレートを4 にて一晚被覆した。200 μl /ウエルの5%スキムミルク/PBSTを用いてプレートを37 で2時間ブロックし、PBSTで2回洗浄した後、ファージ上清 (100 μl /ウエル) とともに室温で90分間インキュベートした。プレートをPBSTで5回洗浄した後、PBSTの中に1:10,000に希釈した抗M13-HRP抗体 (GE Healthcare社) とともにインキュベートした。プレートをPBSTで6回洗浄し、信号を100 μl のTMB/E基質 (Chemicon International, Inc社) で現像した。2Mリン酸 (50 μl /ウエル) を用いて反応を停止させ、450 nmで測定した。CD131-Fcタンパク質に対するファージミドクローンの大まかな結合親和性を求めるため、競合ELISAを実施した。ファージ上清を2%スキムミルク/PBSTで希釈すると、ファージ滴定ELISAの結果の外挿から450 nmでの吸光度の値として1.5が得られた。適切に希釈したファージ上清を50 μl /ウエルで添加する前に、同体積の競合CD131-Fcタンパク質を各ウエルに2.5 μM の開始濃度で添加し、その後2%スキムミルク/PBSTの中で4倍に希釈した。

【0451】

結合親和性の測定

BIAcore (商標) A-100装置 (GE Healthcare Life Sciences社) を備えたSPRを利用して結合の動力学定数を測定した。アミンカップリング化学 (116) を利用して、抗C末端6-His抗体 (3H3) をCM-5センサーチップ (GE Healthcare Life Sciences社) の各フローセルのスポット1、2、4、5に固定化した。3H3 mAbを10 mM CH_3COONa 、pH 5.0の中で30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にして7分間注入すると、典型的な結果は、13000~15000反応単位 (RU) という免疫化レベルになった。sh_{CD131}は二量体であるため、センサー表面に捕獲されたsh_{CD131}を用いて動力学アッセイを実施し、分析物として注入したFabを精製した。全IgGではなくてFabを用いることによってアビディティ効果を回避した。

【0452】

各フローセルのスポット1と5でshCD131を0.4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で2分間捕獲した。9A2分析のため、精製したFabを各フローセルに2分間注入した後、解離をさらに5分間モニタした。いくつかの分析のため、精製したFabを各フローセルに3分間注入した後、解離をさらに10分間モニタした。各サイクルの後、25 mMグリシン、pH 2.0を40秒間注入して表面を再生させた。100~0.31 nMのいくつかの濃度のFabを用いて分析した。そのとき、各濃度をランダムな順番で2回分析した。分析は、HBS-EP緩衝液 (10 mMヘプス、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% トゥイーン20、pH 7.4) の中で37 にて流速30 $\mu\text{l}/\text{分}$ で実施した。(sh_{CD131}は捕獲されていないが、それ以外は同じように処理した) 各フローセルのスポット2と4からの反応をそれぞれスポット1と5の反応から差し引き、参照減算データを得た。緩衝液だけを含むブランク注入からの参照減算データを得られたセンサーグラムから差し引き、動

10

20

30

40

50

力学分析に適した二重参照データを得た。非線形回帰を利用し、1:1動力学を記述するモデル（質量輸送制限の項を含む）に二重参照センサーグラムをフィットさせた。捕獲されたsCD131のレベルのわずかな偏差を説明するため R_{max} 値は局所的にフィットさせる一方で、会合速度（ k_a ）、解離速度（ k_d ）、平衡解離定数（ K_D ）は全体にフィットさせた。

【0453】

エピトープのマッピング

本質的に上に記載したようにしてshCD131のさまざまなアラニン点変異体に対するFabの親和性を測定することによりshCD131エピトープのマッピングを実施したが、以下の点が異なっている。それぞれのshCD131変異体を1~5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で120秒間捕獲した。動力学分析のため、精製した組み換えFabを2分間注入した後、解離をさらに2分間モニタした。安定状態の親和性を分析するため、Fabを2分間または3分間注入した後、解離を60秒間モニタした。Fabの濃度は、2倍希釈で16 μM ~3.9 nMの範囲であった。アッセイは25℃で実施した。すべてのセンサーグラムから上記のようにして参照データを差し引いた。安定状態の親和性（ K_D のみ）を求めるため、結合相終了時の反応を利用してデータを単一部位結合モデルにフィットさせた。動力学パラメータを上記のようにして求めた。9A2とは異なるエピトープを有する2つの対照Fab（7H12と3F1）の動力学も各点変異について調べ、変異がshCD131に構造擾乱を引き起こしたどうかを明確にした。7H12と3F1は、hCD131のドメイン4内とドメイン3内のエピトープとそれぞれ結合する（データは示さず）。

10

【0454】

Fab複合体の結晶化

サイズ排除クロマトグラフィによって単量体成分の混合物からFab複合体を精製した。複合体を結晶化する試みはすべて、タンパク質の濃度6 mg/mlで市販のタンパク質結晶化スクリーンを用いて18℃で実施した。96ウエルシッティングドロップ形式のArt Robbins liquid handler（Gryphon社）を用いて結晶化の試みを実施した。40%PEG 200と100 mMトリリス pH 8.5の中でPEGs Suite（Qiagen社 130904）から長方形の板状結晶が2日目~3日目に出現した。ハンギングドロップ-蒸気拡散法によって結晶を最適化した。

20

【0455】

いくつかのプレ結晶化法とポスト結晶化法を利用して結晶の回折を最適化した。0.3%~1%のグルタルアルデヒド（Sigma-Aldrich社 111-30-8）を15分間~1時間用いて結晶を処理することにより、回折が8 Åから4 Åに改善された。いくつかの結晶をスクリーニングした後、3つの部分データセットを合体させて完全なデータセットを3.9 Åの解像度で得た。

30

【0456】

Fab複合体の構造決定

20%減衰ビームを用いてデータを回収した。結晶はC2空間群に属していて、単位胞のサイズは $a = 99.95$ 、 $b = 71.28$ 、 $c = 221.23$ であった。データをスケールリングし、XDS（Kabsch W. Xds. Acta crystallographica Section D, Biological crystallography 2010年；第66巻：125~132ページ）とAimless（Evans PR, Murshudov GN、「私のデータはどれほど優れていて、解像度はどれくらいか（How good are my data and what is the resolution?）」Acta crystallographica Section D, Biological crystallography 2013年；第69巻：1204~1214ページ）を用いて処理し、Phaser（CCP4スイート）（McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ.「Phaser crystallographic software」Journal of applied crystallography 2007年；第40巻：658~674ページ）を用いて分子置換を実施した。CD131エクトドメイン構造（PDB 2GYS）を、ドメインD4とD1だけからなる部分的CD131二量体に改変するとともに、探索モデルとして用いてCD131分子の位置を特定した。CDRループを欠失させた後、PDB 3HI5を探索モデル（重鎖に関して9A2-V R24.29との配列類似性が約84%）として用いてFab分子の位置を特定した。（単量体AからのドメインD1およびD2と、単量体BからのドメインD3およびD4を含む）部分的CD131二量体と、重鎖（H）と軽鎖（L）を有するFabの1つの分子を含む単一の解が、1回目の剛体精密化の後に得られ、 $R_{work}/R_{free} = 0.38/0.45$ であった。初期電子密度は、Fab分子と、CD131

40

50

のドメインD4およびD1について最も明瞭であったのに対し、CD131のドメインD2およびD3の密度は最も弱かった。Cootにおけるモデル構築の反復サイクルとPhenixを用いたモデル精密化によって初期Fabモデルをさらに改良した。

【0457】

CD131のドメインD4およびD1と、FabのH鎖およびL鎖の可変ドメインの電子密度マップは連続的であるにもかかわらず、CD131のD2とD3の部分と、FabのH鎖とL鎖の定常ドメインの部分には、精密化の後でさえ電子密度が観察されなかった。構造を精密化して最終的に $R_{work}/R_{free} = 0.30/0.34$ を得た。構造はMolprobitryを用いて確認した。

【0458】

細胞表面受容体結合アッセイ

Pierce Pre-Coated Iodination管 (Thermo Scientific社) を製造者の指示に従って用いてサイトカインと抗体を放射性ヨウ素化した。h_γを発現する細胞へのmAbの結合を、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞をある範囲の濃度の放射性ヨウ素化mAbとともに軽く混合しながら23で1~2時間インキュベートすることによって調べた。次に、細胞懸濁液をウシ胎仔血清 (FCS) の中で遠心分離し、細胞ペレットの放射能を、Wizard² 2470自動ガンマカウンタ (Perkin Elmer社、ロウヴィル、ヴィクトリア州、オーストラリア国) でカウントすることによって評価した。放射性ヨウ素化mAbのそれぞれについて、標識していないmAbを少なくとも500倍過剰に存在させ、非特異的結合を評価した。EBDAプログラムとLIGANDプログラム (117) (KELL Radlig社、Biosoft社、ケンブリッジ、連合王国) を用いて解離定数と受容体の数を計算した。本質的に以前に報告されている (41) ようにして競合結合アッセイを実施した。簡単に述べると、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞をある範囲の濃度のmAbまたはサイトカイン競合物とともに軽く混合しながら4で45分間インキュベートした。次に、放射性ヨウ素化したサイトカインまたはmAbを添加し、得られた混合物を軽く混合しながら23でさらに1~2時間インキュベートした。次に、細胞懸濁液をFCSの中で遠心分離し、細胞ペレットの放射能を、カウントすることによって評価した。

【0459】

TF-1増殖アッセイ

10%FCS、1×グルタミン、1×ペニシリン/ストレプトマイシン、2 ng/mlのhGM-CSF (R&D Systems社) を含むRPMI培地の中にTF-1細胞を37、5%CO₂で維持した。細胞を18時間にわたって増殖因子が欠乏した状態にし、96ウエル平底プレートに 1×10^4 細胞/ウエルで播種し、次いで試験抗体で30分間処理した後、IL-3 (R&D Systems社)、IL-5 (R&D Systems社)、GM-CSFのいずれかを添加した。細胞を37、5%CO₂で72時間インキュベートし、最後の6時間にわたって³[H]-チミジンをパルスで与えた後、ガラスフィルタに回収した。³[H]-チミジンの取り込みを、Beckman カウンタを用いて液体シンチレーションをカウントすることによって求めた。

【0460】

細胞シグナル伝達アッセイ

GeneBLAzer (登録商標) TF-1 bla pStat5アッセイ

10%FCS、0.1 mM非必須アミノ酸 (NEAA)、1 mMピルビン酸ナトリウム、ペニシリン/ストレプトマイシン、プラスチジン (Invitrogen社、Life Technologies社) (5 μg/ml)、hGM-CSF (2 ng/ml) を含むRPMIの中でTF-1 bla細胞 (Invitrogen社) を培養した。アッセイの前に、細胞を、0.1%FCSを含むPBSで3回洗浄して増殖因子を除去し、次いでアッセイ培地 (0.5%FCS、0.1 mM NEAA、1 mMピルビン酸ナトリウム、ペニシリン/ストレプトマイシンを含むOpti-MEM) の中に再懸濁させ、37、5%CO₂で18時間インキュベートした。細胞を、平坦で透明な底と黒い壁を有する96ウエルプレートの中のアッセイ培地に 1.2×10^5 細胞/ウエルで播種し、次いで試験抗体で30分間処理した後、IL-3 (R&D Systems社) またはGM-CSF (R&D Systems社) を添加した。細胞を37、5%CO₂で5時間インキュベートし、次いでFRET B/G基質 (Invitrogen社、Life Technologies社) を2.5時間添加した後、読み取った (Invision社、Perkin Elmer社)。

【0461】

細胞内pSTAT5染色

トランスフェクトされたFS293F細胞またはトランスフェクトされていないFS293F細胞を96ウェル丸底プレートに 5×10^5 細胞/ウェルで播種した後、IL-3 (R&D Systems社)、IL-5 (R&D Systems社)、GM-CSF (R&D Systems社)のいずれかで処理した。細胞を37℃、5%CO₂で20分間インキュベートした後、上清を取り出し、細胞を37℃、5%CO₂にて2%ホルムアルデヒドの中で10分間固定した。細胞を冷たいPBS、0.1%BSAで2回洗浄した後、90%氷冷メタノールを20分間用いて透過性にした。細胞を上記のようにして洗浄した後、抗ホスホ-STAT5-PE抗体 (BD Biosciences社)とともに室温で1時間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、200 μlのPBS、0.1%BSAに再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した。

10

【0462】

一次ヒト細胞活性化アッセイ

好中球、好酸球、好塩基球、pDC、マスト細胞の単離

好中球、好酸球、好塩基球を、健康なドナー (オーストラリア赤十字血液サービス (ARCBS)、メルボルン、ヴィクトリア、アデレード、南オーストラリア州) に由来する淡褐色のコートから単離した。Ficoll-Paque (商標) PLUS (GE Healthcare Life Sciences社) 密度勾配遠心分離によって末梢血単核細胞 (PBMC) を顆粒球と赤血球細胞から分離した。好中球を赤血球細胞ペレットからデキストラン沈降によって分離した。好中球を冷たいPBSで洗浄し、赤血球細胞を低張ショックによって溶解させた。顆粒球を含む赤血球ペレットを塩化アンモニウム溶液 (Stem Cell Technologies社) で溶解させ、MACS (登録商標) 好酸球単離キット (Miltenyi Biotec社) を用いて好酸球を単離した。好塩基球とpDCは、PBMC分画からMACS (登録商標) 好塩基球またはpDC単離キット (Miltenyi Biotec社) を用いて単離した。HCMCは、MACS (登録商標) CD34マイクロビーズ (Miltenyi Biotec社) を用いてPBMC分画から単離されたCD34⁺前駆細胞分画に由来していた。単離したCD34⁺細胞を6ウェルのプレートに移し (1%インスリン-トランスフェリン-セレン、 5×10^{-5} Mの2-メルカプトエタノール、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、0.1%BSA、100 ng/mlのrhSCF、50 ng/mlのrhIL-6、5 ng/mlのrhIL-3を補足したIMDMの中に 5×10^6 細胞/mlの密度)、37℃にしたCO₂インキュベータの中に入れた。サイトカインを補足した培地を合計10週間にわたって毎週交換した後、マスト細胞の純度95%超が達成された。最初の2週間の培養が終わった後に培地からrhIL-3を除き、6週目以降は10%FCSを培地に添加した。

20

30

【0463】

好塩基球アッセイ

好塩基球から放出されるIL-8を検出するため、単離した好塩基球を丸底96ウェルプレートの中に 1×10^5 細胞/ウェルで播種し、次いで試験抗体を30分間添加した後、IL-3 (R&D Systems社) を添加した。細胞を37℃、5%CO₂で18時間インキュベートし、無細胞上清を回収し、ELISA (R&D Systems社) によってIL-8を調べた。

【0464】

好酸球アッセイ

精製した好酸球を丸底96ウェルプレートの中に 1×10^5 細胞/ウェルで播種し、次いで試験抗体を30分間添加した後、IL-5 (R&D Systems社) を添加した。細胞を37℃、5%CO₂で2時間インキュベートし、2%ホルムアルデヒドで20分間固定し、フローサイトメトリーによって前方散乱の変化を分析した。

40

【0465】

精製した好酸球を丸底96ウェルプレートの中に 1×10^5 細胞/ウェルで播種し、次いで試験抗体を30分間添加した後、IL-5 (R&D Systems社)、IL-3 (R&D Systems社)、GM-CSF (R&D Systems社) を添加した。細胞を37℃、5%CO₂で5日間インキュベートし、ViaLight (登録商標) Plus Cell ProliferationとCytotoxicity BioAssay Kit (Lonza社) を用いて細胞数を求めた。

【0466】

好中球アッセイ

50

精製した好中球を丸底96ウエルプレートの中に 1×10^5 細胞/ウエルで播種し、次いで試験抗体を30分間添加した後、GM-CSF (R&D Systems社)を添加した。細胞を37℃、5%CO₂で24時間インキュベートし、2%ホルムアルデヒドで20分間固定し、フローサイトメトリーによって前方散乱の変化を分析した。

【0467】

マスト細胞アッセイ

培養した10週齢の末梢血由来HCMCを試験抗体とともにあらかじめ1時間インキュベートした後、IL-3 (1 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml)のいずれかを添加してさらに48時間インキュベートした。ヒト骨髄腫IgE (0.5 μg/ml)を添加してから24時間後、IL-3 (1 ng/ml)、IL-5 (10 ng/ml)、GM-CSF (1 ng/ml)いずれかの存在下で抗IgE (1 μg/ml)を用いて抗IgE Abを刺激し、TNFの放出に関しては18時間、IL-8とIL-13の放出に関しては8時間調べた。上清に含まれるサイトカインのレベルはELISAによって測定した。細胞培養物の上清に含まれるヒトTNF-αのレベルは、ヒトTNF-α ELISA Ready-SET-Go! Kit (eBioscience社、サンディエゴ、カリフォルニア州、アメリカ合衆国)を用いて求めた。

10

【0468】

ヒト骨髄コロニー形成アッセイ

コロニー形成単位 (CFU) アッセイに関し、CD34⁺ BM細胞 (Stem Cell Technologies社)を、35 mmの皿1つにつき 1×10^3 細胞の割合で、30%ウシ胎仔血清、1%BSA、50 ng/mlのhSCF、10 ng/mlのhGM-CSF、10 ng/mlのhIL-3 (MethoCult H4534 Classic; Stem Cell Technologies社)、10 ng/mlのhIL-5 (Peprotech社)を補足した1%メチルセルロースを含むIMDMの中に播種した。培養物を5%CO₂の湿潤雰囲気中で37℃にて14~16日間インキュベートした後、コロニーを数えた。

20

【0469】

鼻ポリープ (NP) 細胞アッセイ

新鮮なNP試料をVictoria Parade Surgical Centre (VPSC) から、Institutional Ethics Approvalを得た上で、書面によるインフォームドコンセントのもとに取得した。NPを小片に切断し、6ウエルプレートのウエル1つにつき3 mlの培地 (10%FCS、1×グルタミン、1×ペニシリン/ストレプトマイシンを含むRPMI)の中に入れた。組織を37℃、5%CO₂で18時間インキュベートした後、組織と細胞滲出液を含む培地を70 μmのナイロン製フィルタ (BD Biosciences社)を通過させることによって単一細胞懸濁液を回収した。赤血球細胞を溶解させた後、細胞を6ウエルプレートの中の3 mlの培地に 1×10^6 細胞/ウエルで播種した。細胞培養物を37℃、5%CO₂で6時間インキュベートして付着細胞を除去した後、付着しなかった細胞を試験抗体またはプレドニゾロン (50 μM、Sigma社)の存在下で96ウエル平底プレートに $1 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウエルで播種した。細胞培養物を37℃、5%CO₂で5日間インキュベートした後、上清を回収してサイトカインとケモカインを分析した。サイトカインのレベルは、ヒトサイトカイン/ケモカインLuminexキット (Millipore社)を製造者の指示に従って用いて求めた。データの取得と分析は、Luminex-100マシン (Luminex社、テキサス州、アメリカ合衆国)でMasterPlexソフトウェアを用いて実施した。生きて残存している細胞の数をViaLight (登録商標) Plus Cell ProliferationとCytotoxicity BioAssay Kit (Lonza社)を用いて求めた。

30

40

【0470】

アレルゲン吸入チャレンジアッセイ

安定した軽症アトピー性喘息があって、非喫煙者でもあり、他の肺疾患がなく、妊娠しておらず、ベースラインFEV₁ 70%が予測される患者を選択してアレルゲンチャレンジを実施した。この研究は、Health Sciences/Hamilton Health Sciences Research Ethics BoardのMcMaster Facultyによって承認されたものであり、署名したインフォームドコンセントを対象から取得した。アレルゲンチャレンジを以前に報告されているようにして実施した (O'Byrne他、Am Rev Respir Dis 第136巻:740~751ページ、1987年)。痰サンプルをPBS (DTTなし)の中で混合して細胞を分散させ、この混合物を濾過して粘液を除去し

50

た後、遠心分離した。100 U/mlのペニシリン/ストレプトマイシンと10%FCSを含むRPMIの中に細胞ペレットを 1×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁させた。サイトスピンを細胞百分率（そこには、好酸球、好中球、マクロファージ、リンパ球、気管支上皮細胞の割合が含まれる）が求められる設定にした。混合した細胞集団を最終濃度100 μ g/mlの9A2-VR24.29とともに24時間インキュベートした。結果を、最終濃度100 μ g/mlの無関係なアイソタイプ対照抗体とともにインキュベートしたものと比較した。増殖因子は添加しなかった。5%二酸化炭素にした湿潤なインキュベータの中で細胞を37 °Cで24時間インキュベートした。24時間後、細胞をウエルから取り出し、洗浄し、Binding Buffer (BD Pharmingen社、カタログ番号556454)の中に再懸濁させた。細胞を、以下の抗体とアイソタイプ対照：抗CD16 FITC抗IgG1 FITC、抗CD3 PeCy7、抗IgG1 PeCy7、抗CD68 APC、抗IgG2b APC、Siglec 8 -PE、抗IgG1 PEを用いた特異的細胞系列マーカーで共染色し、特定の集団の生存を、ベースラインの時点とアレルゲンチャレンジの24時間後に評価した。

【0471】

鼻ポリープ異種移植片アッセイ

本質的にBernstein他、Ann Otol Rhinol Laryngol第115巻：65～73ページ、2006年；Bernstein他、Ann Otol Rhinol Laryngol第118巻：866～875ページ、2009年；Bernstein他、Ann Otol Rhinol Laryngol第121巻：307～316ページ、2012年に記載されているようにして、Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+}hIL-3/GM-CSFノック-インマウスを使用し、ヒト鼻ポリープ異種移植片モデルを作製した。Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+}hIL-3/GM-CSFノック-インマウスの皮下ポケットに、（鼻ポリープの手術を受けた9人の異なる患者から取得した）破壊されていないヒト鼻ポリープの4 mm³の小片を移植するという予防アプローチを利用した。この小片は、100 μ g/mlの9A2-VR24.29またはアイソタイプ対照抗体で1時間にわたってあらかじめ処理してあった。一週間後、マウス（のポリープ内）に9A2-VR24.29（5 mg/kg）またはアイソタイプ対照抗体（5 mg/kg）を毎週注射する操作を4週間続け、ポリープのサイズを外から観察した。

【0472】

CD34⁺細胞集団からの好酸球/好塩基球CFUとGM-CFUを定量するための骨髓細胞と末梢血細胞の調製

アレルゲンチャレンジの前と24時間後に、血液サンプル（80 ml）と骨髓穿刺液（5 ml）を軽症アトピー性喘息の対象から回収した。Accuprep（商標）密度勾配（Cedarlane社、AN551）での沈降によって低密度単核細胞（MNC）を単離した。非付着性単核細胞（NAMNC）をイスコフの2+（1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含むイスコフ改変ダルベッコ培地（Gibco社、15140-122））と1%の2-メルカプトエタノール（Sigma社、M3148）に再懸濁させ、16%ウシ胎仔血清（Sigma社、13G210）の存在下、かつIL-5（10 ng/ml）（R&D Systems社、205-IL-005）、IL-3（25 ng/ml）（R&D Systems社、203-IL-010）、GM-CSF（10 ng/ml）（R&D Systems社、215-GM-010）のいずれか、またはこれら3つの増殖因子すべての組み合わせの存在下でMethocult（登録商標）培地（Stemcell Technologies社、04236）の中に入れた。5%CO₂、高湿度、37 °CにてNAMNC細胞を 0.5×10^6 細胞/mlの濃度で2週間培養した。倒立顕微鏡を40倍の倍率で用いて好酸球/好塩基球CFUの数をデュープリケートのプレートで定量し、プレートごとのコロニー形成単位の平均数を計算した。コロニーは、最小密度が細胞40個である好酸球/好塩基球のクラスターとして定義した。

【0473】

実施例2：結果

ヒトCD131受容体に対する特異性がある無効化能力を持つ完全ヒトmAbの作製

【0474】

大きな力価でIL-3、GM-CSF、IL-5の同時拮抗を可能にするFabの同定を容易にするため、CD131の組み換え細胞外領域全体を用いてナイーブヒトFabライブラリをスクリーニングした。次に、競合ファージELISAを利用して親和性が最も大きいクローンをスクリーニングし、独自のクローンを選択して全IgG4pK抗体として再構成した。

【0475】

力価評価をGM-CSF依存TH-1増殖アッセイでスクリーニングした。抗体9A2は、IL-3、GM-CSF、IL-5によって誘導されるTF-1赤白血病細胞の増殖を用量に依存して抑制できることが明らかになった（図6、A~D）。9A2の重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列の概要を図5に示してある。9A2は、TF-1細胞でのSTAT-5レポータアッセイを利用するとIL-3とGM-CSFの活性も阻止した（図7Aと図7B）。TF-1細胞は、IL-6、IL-4、エリスロポエチン、SCFにも反応して増殖した。9A2は、エリスロポエチン、IL-6、IL-4、SCFを用いて刺激したTF-1赤白血病細胞の増殖を抑制しなかった（図8）。これは、この抗体の特異性を証明している。9A2は、ヒトCD131を発現する細胞に特異的に結合したが、ヒトIL-3R 鎖、ヒトGM-CSFR 鎖、ヒトIL-5R 鎖のいずれかだけを発現する細胞には結合しなかった（図9）。

10

【 0 4 7 6 】

9A2抗体の親和性成熟により力価が1500倍向上する

9A2はGM-CSF活性とIL-5活性のアンタゴニストであり、TF-1細胞増殖アッセイにおける $I_{C_{50}}$ は456 nM（GM-CSF）である（図6B）。

【 0 4 7 7 】

この抗体の親和性成熟を実施し、CD131に対する親和性が親9A2よりも大きくて、しかもIL-3、GM-CSF、IL-5を媒介とする受容体活性化を臨床的に重要な治療用量で実質的に抑制することのできる変異体を同定した。

【 0 4 7 8 】

7つのファージライブラリ（それぞれが、6個のアミノ酸残基をカバーしていて、19種類の可能なアミノ酸すべて（システインを除く）についてランダム化されている）を作製し、CD131への抗体の結合に対する各9A2 CDR（軽鎖のCDR2は除く）の寄与を系統的に分析した。各ライブラリの位置の概要を図5Aと図5Bに示す。何回かの選択の後、各ライブラリからの独自の变異体をヒトIgG4pK分子に変換し、発現させ、精製し、TF-1増殖アッセイでスクリーニングした。全ライブラリからの代表的な变異体は、親9A2と比べて力価が同等であるか改善されていた（表3）が、親9A2の軽鎖由来でCDR3を標的とする变異体は例外であった。

20

【 0 4 7 9 】

【表 3 - 1】

表3：1回目の9A2親和性成熟からの変異体リスト

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s) (Fab)	K_D (nM)	IC_{50} GM-CSF (nM)	IC_{50} IL-3 (nM)	IC_{50} IL-5 (nM)	pStat5 IC_{50} IL-3 (nM)	pStat5 IC_{50} IL-GM-CSF (nM)
9A2	$2.0E+06 \pm 1.7E+05$	$9.6E-02 \pm 8.6E-09$	1.3 ± 1.3 (N=6)	456.0	5.96	1448	7.3	40
9A2-VR1				294.0				
9A2-VR2				443.9				
9A2-VR3				101.0				
9A2-VR4				121.9				
9A2-VR5				87.0				
9A2-VR6				249.8				
9A2-VR8				57.7				
9A2-VR9				72.7				
9A2-VR11				353.0				
9A2-VR12				198.3				
9A2-VR13				> 1000				
9A2-VR14				> 1000				
9A2-VR16				> 1000				
9A2-VR19			30.0 (N=2)	> 1000				
9A2-VR20			0.58 (N=2)	79.3				

10

20

30

40

【表 3 - 2】

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s) (Fab)	K_D (nM)	IC ₅₀ GM-CSF (nM)	IC ₅₀ IL-3 (nM)	IC ₅₀ IL-5 (nM)	pStat5 IC ₅₀ IL-3 (nM)	pStat5 IC ₅₀ IL-5 (nM)
9A2-VR21			0.39 (N=2)	99.8				
9A2-VR22				39.9				
9A2-VR23				60.0			24	
9A2-VR24	2.3E+06 ± 7.4E+04	1.1E-03 ± 1.8E-04	0.46 ± 0.03 (N=5)	2.5	0.726	23.52	8.6	
9A2-VR26	2.4E+06 ± 1.1E+05	5.5E-04 ± 1.9E-05	0.23 ± 0.005 (N=3)	4.6			23.6	
9A2-VR27	2.3E+06 ± 1.6E+05	1.1E-03 ± 2.8E-04	0.47 ± 0.07 (N=5)	4.9			8.5	
9A2-VR28				47.9				
9A2-VR31				232.9				
9A2-VR32			0.34 (N=1)	31.2				
9A2-VR33				602.1				
9A2-VR34				184.5				
9A2-VR35			0.34 (N=2)	76.0				
9A2-VR36			0.30 (N=1)	38.1				
9A2-VR37				48.1				
9A2-VR38				5.0				
9A2-VR39	3.0E+06	5.9E-04 ± 1.0E-05	0.27 ± 0.17	0.88			4.1	

10

20

30

40

【表 3 - 3】

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s) (Fab)	K_D (nM)	IC ₅₀ GM-CSF (nM)	IC ₅₀ IL-3 (nM)	IC ₅₀ IL-5 (nM)	pStat5 IC ₅₀ IL-3 (nM)	pStat5 IC ₅₀ IL-5 (nM)
	5.76E+05	05	(N=5)					
9A2-VR40	1.3E+06 ± 4.7E+04	6.6E-04 ± 1.9E-04	0.52 ± 0.055	5.7				
9A2-VR41	1.7E+06 ± 6.0E+04	7.6E-04 ± 1.7E-04	0.46 ± 0.057	7.0				
9A2-VR42		05	(N=5)					
			0.38 (N=2)	54.7				
hu9A2-G4pK								
9A2-VR43				53.7				
9A2-VR44			5 (N=1)	36.4				
9A2-VR45				88.7				
9A2-VR46				23.4				
9A2-VR47				27.2				
9A2-VR48				21.7				
9A2-VR49				23.4				
9A2-VR50				46.5				

10

20

30

40

【0480】

親和性が増大したすべての変異体で改善された解離速度が観察された(表3)。力価の改善は、クローン重鎖CDR1(H1.1)ライブラリとクローン重鎖CDR2(H2.1)ライブラリに由来するクローンで最大であった(図6E)。重鎖CDR1ライブラリ(H1.1)に由来する変異

50

体9A2-VR24は、力価が親9A2の182倍に向上した（表3）。変異体9A2-VR24は、解離速度（ k_d ）が1/87に低下したことが理由で、親9A2（ $K_D = 49$ nM）と比べて106倍大きな親和性（ $K_D = 0.46$ nM）でshCD131に結合した（表3）。shCD131に結合する9A2の組み換えFabのSPR分析（図10A）と9A2-VR24の組み換えFabのSPR分析（図10B）から、9A2の解離は2分以内に起こるが、9A2-VR24は5分後もまだ会合していることがわかった。最も強力なCDR2（H2.1）変異体（9A2-VR39）は、親9A2と比べて結合親和性が約180倍向上し（ $K_D = 0.27$ nM）、GM-CSF力価が518倍向上した（試験したすべての変異体については表3を参照されたい）。

【0481】

変異体9A2-VR24と9A2-VR39を選択して親和性をさらに最適化した。コンビナトリアルアプローチのもとで、9A2-VR24または9A2-VR39の配列（図11Aと図11B）を固定し、9A2-VR24アミノ酸配列（VR24-H2.1～2.3）でCDRH2の全残基を標的とし、9A2-VR39アミノ酸配列（VR39-H1.1、H2.1、H2.1、H2.3）でCDRH1の全残基とCDRH2の残基57～65を標的とするライブラリを作製した。追加の「オフレート」選択工程を含めた。なぜなら、これまでのあらゆる力価改善は、抗体のオフレートの改善と関連しているからである。あらゆる選択戦略からの独自の変異体をIgG4pK分子に変換し、TF-1増殖アッセイでさらに分析した。図6Fは、GM-CSFに対する力価が改善された変異体を7つのライブラリそれぞれから作製されたことを示している。VR24 CDR1配列とVR39 CDR2配列の組み合わせは、この2回目の親和性成熟からは高力価阻害剤であると同定されなかった。試験した全変異体からの親和性測定と力価（ IC_{50} GM-CSF）測定の結果を表4にまとめてある。

【0482】

10

20

【表 4 - 1】

表4：2回目の9A2親和性成熟からの変異体のリスト（表1に示した配列）。選択された変異体について組み換えFabを作製し、動力学実験を実施した。

変異体	k_a (1/Ms) (Fab)	k_d (1/s) (Fab)	K_D (M) (Fab)	IC ₅₀ GM-CSF (nM)
9A2-VR24	2.3E+06	1.1E-03	0.46 ± 0.03 (N=5)	2.5
9A2-VR24.04				0.7
9A2-VR24.07				1.17
9A2-VR24.10	1.481E+6	5.502E-4	3.716E-10 (N=1)	9.52
9A2-VR24.12				0.93
9A2-VR24.19				0.98
9A2-VR24.24				1.09
9A2-VR24.76				12.4
9A2-VR24.78				0.65
9A2-VR24.81	2.851E+6	4.921E-4	1.726E-10 (N=1)	0.48
9A2-VR24.82				3.99
9A2-VR24.84	3.949E+6	4.177E-4	1.058E-10 (N=1)	0.21
9A2-VR24.87				2.37
9A2-VR24.91	2.776E+6	4.478E-4	1.613E-10 (N=1)	0.50
9A2-VR24.93				0.92
9A2-VR24.27	3.097E+6	5.270E-4	1.702E-10 (N=1)	0.25
9A2-VR24.29	4E+6 ± 5.5E4	4.18E-4 ± 8.1E-6	1.0E-10 ± 3.1E-12 (N=4)	0.29
9A2-VR24.30	3.802E+6	4.642E-4	1.221E-10 (N=1)	0.25
9A2-VR24.33	3.156E+6	4.720E-4	1.495E-10 (N=1)	0.34
9A2-VR24.44	3.003E+6	4.882E-4	1.626E-10 (N=1)	0.40
9A2-VR24.97	3.2E+6 ± 1.0E5	5.24E-4 ± 7.0E-6	1.6E-10 ± 6.1E-12 (N=4)	0.16
9A2-VR24.98	3.211E+6	5.586E-4	1.739E-10 (N=1)	0.25
9A2-VR24.102	2.952E+6	5.559E-4	1.883E-10 (N=1)	0.32
9A2-VR24.107	2.892E+6	5.304E-4	1.834E-10 (N=1)	0.30
9A2-VR24.110	3.146E+6	4.747E-4	1.509E-10 (N=1)	0.24
9A2-VR24.111	2.700E+6	6.370E-4	2.359E-10 (N=1)	0.42
9A2-VR24.55	2.552E+6	9.425E-4	3.693E-10 (N=1)	0.60
9A2-VR24.56	2.823E+6	9.968E-4	3.531E-10 (N=1)	0.48
9A2-VR24.57	4.0E+6 ± 1.0E5	8.41E-4 ± 7.3E-6	2.11E-10 ± 5.2E-12 (N=4)	0.33
9A2-VR24.122	2.539E+6	8.973E-4	3.535E-10 (N=1)	0.66
9A2-VR24.124	2.9E+6 ± 7.8E4	7.6E-4 ± 1.5E-5	2.5E-10 ± 1.7E-12 (N=4)	0.54
9A2-VR24.131				1.06

10

20

30

40

【表 4 - 2】

変異体	k_a (1/Ms) (Fab)	k_d (1/s) (Fab)	K_D (M) (Fab)	IC ₅₀ GM-CSF (nM)
9A2-VR39	3.0E+6	5.9E-4	2.7E-10	0.88
9A2-VR39.01	3.042E+6	3.099E-4	1.019E-10 (N=1)	0.51
9A2-VR39.02	3.888E+6	3.411E-4	8.772E-11 (N=1)	0.46
9A2-VR39.04	3.548E+6	0.001167	3.289E-10 (N=1)	30.39
9A2-VR39.05				0.96
9A2-VR39.06				1.85
9A2-VR39.11				18.61
9A2-VR39.12				25.10
9A2-VR39.16				6.07
9A2-VR39.17	2.811E+6	5.661E-4	2.014E-10 (N=1)	0.67
9A2-VR39.18				> 1000
9A2-VR39.19				7.26
9A2-VR39.21				0.96
9A2-VR39.22	3.130E+6	4.411E-4	1.410E-10 (N=1)	0.50
9A2-VR39.23				0.90
9A2-VR39.24	2.965E+6	5.001E-4	1.687E-10 (N=1)	0.42
9A2-VR39.97				0.92
9A2-VR39.98				1.44
9A2-VR39.102				2.29
9A2-VR39.103				5.14
9A2-VR39.105				0.53
9A2-VR39.109	3.4E+6 ± 8.6E4	3.3E-4 ± 2.2E-6	9.8E-11 ± 2.7E-12 (N=4)	0.24
9A2-VR39.110	3.8E+6 ± 4.8E4	3.9E-4 ± 3.2E-6	1.1E-10 ± 2.2E-12 (N=4)	0.28
9A2-VR39.111				0.99
9A2-VR39.112				1.00
9A2-VR39.116				7.93
9A2-VR39.27				17.90
9A2-VR39.28				57.16
9A2-VR39.46				3.34
9A2-VR39.122				15.04
9A2-VR39.139				21.50
9A2-VR39.140				42.48
9A2-VR39.148				1.12
9A2-VR39.162				1.60
9A2-VR39.77				2.03
9A2-VR39.93	4.154E+6	7.098E-4	1.709E-10 (N=1)	0.28
9A2-VR39.174				0.64
9A2-VR39.177	3.691E+6	5.536E-4	1.500E-10 (N=1)	0.52

【0483】

変異体9A2-VR24.29を選択してさらに分析した。9A2-VR24.29がIL-3、GM-CSF、IL-5に反応してTF-1細胞の増殖を抑制する能力を、親抗体9A2および9A2-VR24と比較するとともに、BION-1 (Sun他、Blood第94巻：1943～1951ページ、1999年)とも比較した。9A2-VR24.29は、CD131ファミリーの3つのサイトカインすべてに反応してTF-1細胞の増殖を抑制する

10

20

30

40

50

ことに関して両方の親抗体およびBION-1よりも有意に強力であり、GM-CSFに対する IC_{50} は0.29 nMである(図6A~図6C)。これは9A2-VR24(2.5 nM)と比べて8.6倍であり、親抗体9A2の1572倍の改善である。親9A2と比べた9A2-VR24.29の力価の改善は、IL-3(41倍、 $IC_{50} = 0.144$ nM)とIL-5(310倍、 $IC_{50} = 4.67$ nM)に対しても観察された。9A2-VR24.29は、解離速度(k_d)がさらに2.6倍改善されているため、9A2-VR24よりも4.6倍大きな親和性でshCD131に結合した($K_D = 100$ pM)(表3)。

【0484】

放射性標識した抗体 ^{125}I -9A2-VR24.29は、好中球上のCD131レポータに $K_D = 246$ pMで結合し、9A2-VR24.29の組み換えFabフラグメントは同様の親和性 $K_D = 384$ pMで結合した(図12A、図12B、図13)。9A2-VR24.29 IgGは、ヒト好酸球に平均 $K_D = 629$ pMで結合した(図12C、図13)。

10

【0485】

9A2-VR24.29は、ヒト気道疾患組織から単離して生体外で培養した一次細胞の生存を低下させる

【0486】

ベースラインの時点と、アレルゲン吸入チャレンジの24時間後に、誘導された痰から単離した骨髄細胞とリンパ細胞の生存に対する9A2-VR24.29の効果をフローサイトメトリーによって調べた。アレルゲン吸入チャレンジの前と24時間後に、誘導された痰をドナーから回収した。混合した細胞集団の細胞百分率から、優勢な細胞のタイプは好中球とマクロファージであり、好酸球、リンパ球、気管支上皮細胞はより小さな割合であることがわかった(図14A)。痰由来の細胞を外来性増殖因子の不在下にて生体外で24時間インキュベートし、9A2-VR24.29がこれら培養物に及ぼす効果を、アイソタイプ対照抗体で処理したデュプリケートの培養物と比較した。ベースライン生存率が10%未満の細胞を分析から除外した。9A2-VR24.29は、アネキシンV染色によって検出されるように、痰の好酸球の細胞生存率を有意に低下させた(P 値 = 0.0391)(図14B)。好酸球の集団、またはリンパ球の集団、またはマクロファージの集団の生存に対して9A2-VR24.29がアイソタイプ対照抗体よりも有意な効果を持つことは観察されなかった。

20

【0487】

同様の研究において、痰細胞を単離し、以前に報告されているようにしてインキュベートしたが、それぞれ1 ng/mlのIL-3、IL-5、GM-CSFの存在下でインキュベートした点が異なっている。この状況では、アネキシンV染色(図14C)によって検出されるように、9A2-VR24.29は、ベースライン時点とアレルゲン吸入チャレンジの24時間後に回収した痰の好酸球(対象8人中の6人、 P 値 = 0.0078)と好中球(対象8人中の6人、 P 値 = 0.0391)両方の生存を、アイソタイプ対照抗体と比べて有意に低下させた。好塩基球の生存低下が有意でないことも観察された(対象8人中の5人、 P 値 = 0.3828)。

30

【0488】

末梢血サンプルと骨髄サンプルを自覚症状のないアレルギー性喘息患者からアレルゲンチャレンジの前と後に取得し、IL-3、IL-5、GM-CSFのいずれか、またはこれら3つすべてのサイトカインの組み合わせの存在下で培養した。9A2-VR24.29またはアイソタイプ対照抗体での処理が、骨髄サンプルと血液サンプルに由来するCD34+前駆細胞から生じるGM-CSFまたは好酸球/好塩基球CFUに及ぼす効果を調べた。9A2-VR24.29を用いた処理は、アイソタイプ対照と比べると、すべての条件下で培養した末梢血の数と骨髄GM-CSFを有意に低下させた(図14D~図14G)。9A2-VR24.29を用いた処理は、アイソタイプ対照と比べると、すべての条件下で培養した末梢血の数と骨髄好酸球/好塩基球CFUも有意に低下させた。

40

【0489】

NP炎症性細胞滲出液の培養物を用いて炎症性サイトカインとケモカインの発現レベルを調べた。刺激されていないNP細胞が産生する炎症性サイトカインとケモカインのレベルをLuminex分析によって評価した(図15)。好中球、単核細胞、T細胞をリクルートするケモカイン(GRO、IL-8、MCP-1、フラクタルカイン、IP-10、MCP-3、MDCのほか、これら細胞の活性化を媒介する増殖因子であるG-CSF、GM-CSF、IL-6などが含まれる)が高レベルか

50

ら非常に高レベル（100 pg/ml ~ 1000 pg/ml超）であることが観察された。それに加え、好中球、好酸球、好塩基球を活性化するケモカインMIP-1 とMIP-1 が10 ~ 100 pg/mlの範囲で存在しており、炎症促進因子（TNF、IFN、IL-1、IFN）と抗炎症因子（IL-10、IL-1RA）の両方が同様の濃度で検出された。低い検出可能なレベルで存在するサイトカインには、Th2サイトカイン（IL-5など）、Th-1/Th17サイトカインに加え、T細胞とB細胞の生存やNK細胞の生存と活性化に関する別のものが含まれていた。これらのデータから、NPが、気道疾患に寄与する免疫細胞を研究するための重要な炎症発症環境を提供することが確認される。

【0490】

9A2-VR24.29が刺激されていないヒト疾患組織由来細胞の生存を直接抑制するかどうかを調べるため、以前に選択的ポリプ切除を受けていた16人の患者から取得したヒトNP組織から細胞を新たに単離して生体外で5日間培養した後、9A2-VR24.29と接触させた。以前の研究と整合するように、大半のドナーでは好酸球が優勢なタイプの細胞であった（図14H）。さらに、フローサイトメトリーによって調べると、9A2-VR24.29は、72時間培養した後にNP組織から単離した刺激されていない好酸球の生存を抑制した（図14I）。9A2-VR24.29は、好中球、リンパ球、マクロファージの生存に対しては有意な効果を持たなかった。

10

【0491】

培養したNP炎症性全細胞滲出液の生存に対する9A2-VR24.29の効果を、現在の標準的な治療法であるプレドニゾロンの効果ならびに個別の抗鎖抗体の効果と比較した（図14J）。各ドナーについて、各試験条件を、処理なしの対照と比較した生存率として表現した。ただし、処理なしの対照が生存率最大（100%）である。プレドニゾロンを用いた処理によって全細胞生存率が低下し、平均値と中央値はそれぞれ83.9%、83.02%であった。個別の抗鎖mAbは、処理なしの対照で生存率を82.3%（抗GM-CSFR鎖）から92.3%（抗IL-5R鎖）の範囲に低下させた。3つの鎖mAbすべての組み合わせは生存率をプレドニゾロン処理で観察されたのと同様のレベルまで低下させた。これらのアッセイにおいて、9A2-VR24.29は、全細胞滲出液の生存を、プレドニゾロンを用いた処理後に観察されたのと同程度に抑制することができ、平均生存率は79.4%、中央値は74.8%であっただけでなく、より広い範囲の患者でそうになっていた。

20

【0492】

9A2-VR24.29は、IL-3、GM-CSF、IL-5で刺激した一次ヒト骨髄細胞の活性化と生存を抑制する

30

【0493】

正常なドナーからのヒト骨髄細胞（そこには、好中球、好塩基球、形質細胞様樹状細胞（pDC）、マスト細胞、ヒトCD34⁺ BM細胞が含まれる）を単離し、気道疾患に寄与する他の一次ヒト骨髄細胞における9A2-VR24.29の抑制活性を調べた。9A2-VR24.29は、GM-CSFによって誘導されるヒト好中球の活性化を抑制したことが、フローサイトメトリーによって測定した細胞のサイズが用量に依存して増加したことからわかる（図16A）。主に好中球、好塩基球、好酸球、T細胞を誘引する走化性因子であるIL-8は、IL-3を用いた刺激に反応してヒト好塩基球から分泌される。9A2-VR24.29は、IL-3によって誘導されて精製したヒト好塩基球からIL-8が分泌されるのを用量に依存して阻止することができた（図16B）。DCは喘息とアレルギーの進展に決定的に重要な役割を果たしており、そのレベルは喘息を持つ対象で上昇している。CD11c⁻ pDCは、生存をIL-3に依存している。9A2-VR24.29は、IL-3を媒介としたCD11c⁻ pDCの生存を用量に依存して抑制することが、VialightPlusアッセイによる測定からわかった（図16C）。

40

【0494】

好酸球は、喘息における優勢な免疫エフェクタ細胞であり、その活性化と脱顆粒が、気道の炎症に寄与する。喘息の発症における好酸球の重要性は、IL-5またはIL-5受容体に対する抗体を用いて治療した患者で見られる症状の低減によって確認されている。IL-5は、造血前駆細胞からの好酸球の分化と好酸球の生存に関わる重要な因子であり、成熟した好酸球の活性化に寄与する。9A2-VR24.29は、精製した末梢血のヒト好酸球がIL-5によって

50

誘導されて活性化するのを用量に依存して抑制できることが、前方散乱の増加からわかった(図16D)。ヒト好酸球は、IL-5に加え、GM-CSFとIL-3を用いた刺激にも反応する(図16F~図16H)。特に、組み換えIL-3またはGM-CSFをヒトに投与することで循環する好酸球のレベルが上昇する。したがって好酸球が1つの発症因子となっている疾患では、3つのサイトカインすべての組み合わせが、骨髄からそれらサイトカインをリクルートすることを通じ、好酸球の数の増加と、病気の部位における好酸球の生存の増加に寄与する可能性がある。好酸球生存アッセイを利用し、9A2-VR24.29が(EC_{50} 用量の)3種類のサイトカインすべてのカクテルに反応して好酸球の生存を阻止する能力を評価した。IL-3R 鎖、GM-CSFR 鎖、IL-5R 鎖に対する個々のアンタゴニストも同じアッセイで評価した。対応するサイトカインを用いた刺激に反応する個々の受容体アンタゴニストの力価を求めた。各アンタゴニストについて、約10 nMで競合的抑制が観察された(図16I~図16K)。しかし逆に、200 nMまたは30 μ g/mlという低濃度の9A2-VR24.29を用いて好酸球を処理すると、IL-5、GM-CSF、IL-3の存在下で好酸球の生存を完全に阻止することができた。細胞生存率の同様の低下は、個々の鎖アンタゴニストを(各サイトカインについて EC_{50} で)組み合わせたときにだけ実現することができた(図16E)。これらのデータは、9A2-VR24.29が、好酸球を媒介とした疾患(例えば喘息)を単一標的抗体よりも有効に制御できる可能性があることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0495】

ヒトマスト細胞は、環境との境界となる粘膜組織に豊富に存在していて、その粘膜組織において、アレルギー性炎症反応を、一部はTNF- α の放出を通じ、悪化させる可能性がある。IL-3は、マスト細胞の生成とマスト細胞の機能のいくつかをインビトロで調節することが以前からわかっており、IgE+抗IgEで刺激されたマスト細胞におけるTNF- α 放出の強力なアクチベータである。9A2-VR24.29は、ヒト培養マスト細胞(HCMC)においてIL-3のこの効果を用量に依存して抑制した(図16L)。マスト細胞はアレルギー反応の後期でも多機能サイトカイン(例えばIL-13)をIgEに依存して放出させることを通じてある役割を果たしているため、Th2細胞に関連した免疫反応の進展および/または強度および/または持続に影響を与える。(GM-CSF、IL-5ではなく)IL-3は、IgEで刺激されたマスト細胞からのIL-13の放出も強化することができた。9A2-VR24.29は、IL-3によって強化されたIL-13の放出を用量に依存して阻止することができた(図16M)。IL-3、IL-5、GM-CSFはすべて、IgEを媒介としHCMCからIL-8が放出されるのを強化することができ、これらの反応は9A2-VR24.29によって阻止することもできた(図16N)。

【0496】

9A2-VR24.29は、SCF、GM-CSF、IL-3、IL-5を含むサイトカインカクテルに反応してCD34⁺ヒト骨髄CFU-GMコロニーの形成を減らすことができた。9A2-VR24.29は、用量に依存して、CFU-GMコロニーの形成を、細胞をSCFだけの存在下で培養するときに観察されるレベルまで抑制することができた。IL-3R 鎖、GM-CSFR 鎖、IL-5R 鎖に対する個々のアンタゴニストがコロニー形成を減少させる能力も調べた。9A2-VR24.29を用いた処理によるCFU-GMコロニーの形成の減少は、CD34⁺ヒト骨髄細胞を3種類の鎖阻害剤すべての組み合わせで処理したときに観察されたのと同様であった(図16O)。これらのデータは好酸球生存アッセイで得られたデータと一致しており、9A2-VR24.29が、IL-3、IL-5、GM-CSFを組み合わせで添加するとき、これらサイトカインの作用を同時に抑制できることを証明している。

【0497】

9A2-VR24.29の予防的投与により、Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+} hIL-3/GM-CSF KIマウスにおける鼻ポリーブの異種移植片の増殖が低下する

【0498】

9A2-VR24.29は、マウスCD131/IL-3受容体に対して活性ではなく、ヒトIL-3R またはGMR に対してマウスIL-3交差活性でもマウスGM-CSF交差活性でもないため、9A2-VR24.29が生体内の設定で作用する能力を、以前に報告されているヒト鼻ポリーブ異種移植片モデル(方法の項参照)を用いて調べた。Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+} hIL-3/GM-CSF ノック-インマウス

の皮下ポケットに、(鼻ポリープの手術を受けた9人の異なる患者から取得した)破壊されていないヒト鼻ポリープの4 mm³の小片を移植するという予防アプローチを利用した。この小片は、100 µg/mlの9A2-VR24.29またはアイソタイプ対照抗体で1時間にわたってあらかじめ処理してあった。1週間後、マウス(のポリープ内)に9A2-VR24.29(5 mg/kg)またはアイソタイプ対照抗体(5 mg/kg)を毎週注射する操作を4週間続け、ポリープのサイズを外から観察した。5週間後にマウスを安楽死させ、ポリープを計量し、組織学的に分析し、フローサイトメトリーによって分析した。9A2-VR24.29で処理したポリープではサイズが統計的に有意に低下した(図17A)。9A2-VR24.29は処理期間の終わりに鼻ポリープの重量も統計的に有意に低下させたが、アイソタイプ対照で処理したポリープではそれが観察されなかった。9A2-VR24.29は粘液腺のサイズ、粘液の蓄積、ポリープへの細胞の浸潤も低下させた(図17Bと図17C)。5週間後、ポリープをヒトTリンパ球、Bリンパ球、好酸球、好中球、マクロファージに関するフローサイトメトリーによって調べた。アイソタイプ対照で処理した鼻ポリープと比べて9A2-VR24.29で処理した鼻ポリープでは、トルイジンブルーで染色したマスト細胞、好酸球(CD16⁻CD15⁺CD49d⁺Siglec8⁺)、好中球(CD14⁻CD49d⁻CD15⁺CD16⁺)、B細胞の集団(CD45⁺CD19⁺)において数の統計的に有意な低下が観察されたが、マクロファージ(CD16⁻CD49d⁻CD14⁺CD15⁺)とT細胞の集団(すなわちCD3⁺CD4⁺とCD3⁺CD8⁺)では観察されなかった(図18)。

10

【0499】

9A2-VR24.29は、CD131の部位2内の残基に結合することによってIL-3、GM-CSF、IL-5の機能を抑制する

20

【0500】

相互抑制実験を実施し、9A2-VR24.29が、IL-3、GM-CSF、IL-5の受容体を発現する細胞へのこれらサイトカインの結合と競合する能力を評価した。ヒト好酸球を無関係なアイソタイプ対照IgGではなく9A2-VR24.29とともにあらかじめインキュベートすると、¹²⁵Iで標識したIL-3の結合が消え、¹²⁵Iで標識したIL-5の結合が85%低下した(図19A、図19C)。ヒト好中球を無関係なアイソタイプ対照IgGではなく9A2-VR24.29とともにあらかじめインキュベートすると、¹²⁵Iで標識したGM-CSFの結合が完全に消えた(図19B)。

【0501】

TF-1細胞をIL-3およびGM-CSFとともにあらかじめインキュベートすると、試験した最大濃度では、¹²⁵Iで標識した9A2-VR24.29の結合が90%低下した(図19D)。IL-5とともにあらかじめインキュベートしても9A2-VR24.29の結合が低下したが、わずかに40%の低下であった(図19D)。これは、CD131鎖に対するIL-5/IL-5R複合体の親和性が比較的小さいことの結果である可能性が非常に大きい。これらの研究は、CD131の部位2(サイトカインが結合する部位)が9A2エピトープと重複しているらしいことを示している。

30

【0502】

CD131上の9A2-VR24.29結合エピトープの構造分析

部位特異的アラニン突然変異誘発により、9A2とその親和性成熟誘導体9A2-VR24.29に結合するヒトCD131のアミノ酸残基を調べた。ヒトCD131の突然変異誘発と結晶化の研究から、部位2が、1つのCD131鎖からのドメイン1のA-BループおよびE-Fループと、別のCD131鎖からのドメイン4からのB-CループおよびF-Gループからなる不連続な界面であることがわかった。GM-CSF受容体三次構造(PDB 4NKQ)をCD131/9A2-VR24.29複合体の上に重ねると、9A2-VR24.29がCD131に対する抑制機能をサイトカイン結合部位の直接的な阻止によって及ぼしていることが明らかになる(図20A)。933 Å²の表面積が複合体の中に埋め込まれており、界面の相補的表面(S_c = 0.59)は複合体の強結合親和性と整合していて、SPRによって測定したK_Dは100 pMである。構造から、9A2-VR24.29の接触の大半が重鎖CDRループ(CDR H1~H3)を通じてなされることが明らかである。これは、CDRが変化して親和性の改善が最大になることと整合している。

40

【0503】

疎水性接触と極性接触が、CD131への9A2-VR24.29の結合に寄与する。P30とW31のCDR H1主鎖カルボニルは、それぞれ、CD131上のR364のグアニジン側鎖およびQ101の主鎖カルボ

50

ニルと極性接触をする。CDR H1からのY32の側鎖は、R364の主鎖カルボニルと水素結合することができ、CD131からのY365と - 相互作用できる可能性がある。CDR H2からのS53は、CD131のD1からのS102と極性接触をする。R52の側鎖はD107と塩架橋を形成し、CD131上のV104の主鎖アミンから水素結合の距離内にもある。9A2-VR24.29のCDR H3からのY100の側鎖はCD131の残基E366およびH367と水素結合し、CD131上のY365と - 相互作用する。CDR H3からのD101の側鎖は、CD131上のY39、Y421の側鎖およびV105の主鎖アミンと極性接触する。比較により、9A2-VR24.29軽鎖は、CD131との相互作用でより限定された役割を果たしているように見える。CDR L1上のW32の側鎖はG420の主鎖カルボニルと極性接触し、Y421の側鎖とファンデルワールス接触する。CDR L2からのどの残基もCD131とは接触しない。CDR L3上のF94は、CD131のD1からの側鎖T106とファンデルワールス接触する範囲内である。これらの接触に加え、CDR H1からのY32の芳香族側鎖とCDR H3からのY100は、CD131の部位2の界面にあるクレフトに埋め込まれていて、CD131からのY365およびH367の側鎖と - 相互作用してCD131/9A2-VR24.29複合体をさらに安定化させる（図20C）。

10

【0504】

hCD131上の既知のリガンド結合部位の上または周囲にアラニン点変異があるいくつかの変異体を作製した。CD131上の既知のリガンド結合部位の上または周囲にアラニン点変異があるいくつかのshCD131変異体を作製した。SPRを利用し、これら変異体への結合に関する9A2の精製組み換えFabフラグメントの親和性を測定し、野生型shCD131と比較した（表5）。最も顕著な効果は、F103A変異体、Q339A変異体、I424A変異体において結合が無視できるほどになったことと、I388A変異体において9A2/9A2-VR24.29が結合しなくなったことであった。構造的には、F103とI338がY39の側鎖の安定化に関与していて、その側鎖が、CDR H3上のD101の側鎖と重要な水素結合を形成する（図20D）。これら残基の変異は、Y39の向きに影響を与える可能性があり、すると今度は9A2-VR24.29の結合に影響する。Q399とI424は9A2-VR24.29とまったく相互作用せず、逆に、二量体のD1-D4界面に深く埋め込まれている。したがって9A2-VR24.29が結合しないというのは、二量体に対する構造的効果が原因である可能性がある。

20

【0505】

CD131のD1からのY39A変異の結果として、9A2と9A2-VR24.29の結合が弱くなった。そのためY39が親和性の大きな結合にとって重要であることがさらに強調される。D4からの残基Tyr365、His367、I368が変異した結果として結合が弱くなった。これらのうちでY365とH367は、CDR H3上のD101およびY100との重要な水素結合にそれぞれ関与している。これら残基は、CDR H1とH3からのY32とY100を含む - 相互作用ネットワークの一部も形成する。そのためこれら残基が9A2-VR24.29の結合において役割を果たしていることがさらに強調される。I368は9A2-VR24.29と直接相互作用することはないが、部位2インターフェイスにおける疎水性の溝の一部であり、Y39、Y421、Y365、H367の周囲を取り囲む芳香族側鎖が適切な方向を維持する上で構造的に重要である可能性がある。興味深いことに、Thr106の変異は親和性を約10倍に増大させた。これらのことが合わさって、9A2エピトープがこれら残基の中心にあることを示唆している。表面残基Ser102、Val104、Arg364の変異は野生型shCD131への9A2の結合を1/3～1/7に低減させたため、これらアミノ酸も9A2エピトープの一部を形成している。9A2-VR24.29を用いてこれらの実験を繰り返すと、本質的に同じ結果が得られた（表5）。これは、原初のエピトープの特異性が、親和性成熟を2回実施した後に保持されていたことを示している。

30

40

【0506】

9A2と9A2-VR24.29が結合するこの部位も、結合にとって残基363、364、366が重要な抗体BION-1の結合部位から離れている（Sun他、上掲文献）。

【0507】

【表5】

表5：ヒトCD131の1アミノ酸置換が9A2 Fabへの結合に及ぼす効果

shCD131 変異体	位置	方法	K _d (nM) 9A2	K _d (nM) 9A2-VR24.29
野生型	N/A	動力学	49 ± 2.1 (N=3)	0.100 ± 0.003 (N=4)
N37A	ドメイン1 A-B ループ	安定状態	620 (N=1)	
D38A	ドメイン1 A-B ループ	発現なし	発現なし	
Y39A	ドメイン1 A-B ループ		結合なし (N=1)	弱い結合 (N=1)
T40A	ドメイン1 A-B ループ	安定状態	236 (N=1)	
S41A	ドメイン1 A-B ループ	動力学	56 (N=1)	
H42A	ドメイン1 A-B ループ	動力学	41 (N=1)	
S102A	ドメイン1 E-F ループ	安定状態	324 (N=1)	
F103A	ドメイン1 E-F ループ		結合なし (N=1)	無視できる結合 (N=6)
V104A	ドメイン1 E-F ループ	動力学	117 (N=1)	
V105A	ドメイン1 E-F ループ	動力学	78 (N=1)	
T106A	ドメイン1 E-F ループ	動力学	5.8 (N=1)	
D107A	ドメイン1 E-F ループ	動力学	191 (N=1)	
V108A	ドメイン1 E-F ループ	動力学	83 (N=1)	
N337A	ドメイン4 A-ループ	動力学	91 (N=1)	
I338A	ドメイン4 A-ループ		結合なし (N=1)	結合なし (N=1)
Q339A	ドメイン4 A-ループ	動力学	144 (N=1)	無視できる結合 (N=6)
M340A	ドメイン4 A-ループ	安定状態	235 (N=1)	
K362A	ドメイン4 B-C ループ	動力学	64.8 ; 65 (N=2)	
M363A	ドメイン4 B-C ループ	動力学	171 (N=1)	
R364A	ドメイン4 B-C ループ	動力学	119 (N=1)	
Y365A	ドメイン4 B-C ループ		結合なし (N=1)	弱い結合 (N=6)
E366A	ドメイン4 B-C ループ	動力学	32 (N=1)	
H367A	ドメイン4 B-C ループ	安定状態*	10300 ; 10800 (N=2)	弱い結合 (N=6)
I368A	ドメイン4 B-C ループ	安定状態*	4770 (N=1)	弱い結合 (N=6)
D369A	ドメイン4 B-C ループ	動力学	28 (N=1)	
R418A	ドメイン4 F-G ループ	動力学	70 (N=1)	
T419A	ドメイン4 F-G ループ	動力学	53 (N=1)	
G420A	ドメイン4 F-G ループ	動力学	63 (N=1)	
Y421A	ドメイン4 F-G ループ	動力学	167 (N=1)	
N422A	ドメイン4 F-G ループ	動力学	54 (N=1)	
G423A	ドメイン4 F-G ループ	安定状態	197 (N=1)	
I424A	ドメイン4 F-G ループ	動力学	126 (N=1)	無視できる結合 (N=6)

【0508】

9A2-VR24.29の治療的投与により、Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+} hIL-3/GM-CSF KIマウスにおける鼻ポリープの異種移植片の増殖が減少する

【0509】

Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+} hIL-3/GM-CSF KIマウスの皮下ポケットに、破壊されていないヒト鼻ポリープの4 mm³の小片を上記のようにして移植した。1週間後、マウス(のポリープ内)に9A2-VR24.29 (5 mg/kg)、アイソタイプ対照抗体 (5 mg/kg)、プレドニゾロン (1 mg/kg)、生理食塩水ビヒクル (0.9%) のいずれかを毎週注射する操作を4週間続け、ポリープのサイズを外から観察した。5週間後にマウスを安楽死させ、ポリープを計量し、組織

10

20

30

40

50

学的に分析し、フローサイトメトリーによって分析した。9A2-VR24.29で処理したポリープは、アイソタイプ対照で処理したポリープと比べてサイズが有意に小さくなった。9A2-VR24.29で処理した後のポリープは重量が有意に減少したが、アイソタイプ対照で処理した後は重量の有意差がなかった。プレドニゾロンで処理したポリープのサイズは、ビヒクル（0.9%生理食塩水）で処理したポリープと比べて有意に小さくなった（図21A）。プレドニゾロンで処理した後のポリープは重量が有意に減少したが、ビヒクルで処理した後は重量の有意差がなかった（図21B）。

【0510】

5週間後、ポリープを、ヒトのTリンパ球、Bリンパ球、好酸球、好中球、マクロファージに関するフローサイトメトリーによって調べた。好酸球（CD16⁻CD15⁺CD49d⁺Siglec8⁺）、好中球（CD14⁻CD49d⁻CD15⁺CD16⁺）、マクロファージ（CD16⁻CD49d⁻CD14⁺CD15⁺）、CD3⁺CD4⁺（CD3⁺CD8⁺とCD3⁺CD4⁺CD8⁺ではない）T細胞の集団数の統計的に有意な減少が、アイソタイプで処理したポリープと比較して9A2-VR24.29で処理したポリープにおいて観察された。これら集団のどれにおいても、プレドニゾロンで処理したポリープでは、ビヒクルで処理したポリープと比較して低下が観察されなかった（図21C～図21H）。9A2-VR24.29とプレドニゾロンの両方とも、形質B細胞（CD45⁺CD19⁺CD20⁺とCD45⁺CD19⁺CD138⁺）を変化させない（図21I～図21J）。

10

【0511】

9A2-VR24.29とプレドニゾロンの両方が、ヒト鼻ポリープにおいてトルイジンブルー染色したマスト細胞の数と粘液の産生を低下させたが、効果は9A2-VR24.29のほうがより顕著であった（図22Aと図22B）。

20

【0512】

鼻ポリープのサイズと重量を小さくすることに関し、9A2-VR24.29の全身投与は9A2-VR24.29のポリープ内投与と同じくらい有効である

Rag2^{+/+} Il2rg^{+/+} hIL-3/GM-CSF KIマウスの皮下ポケットに、破壊されていないヒト鼻ポリープの4 mm³の小片を上記のようにして移植した。1週間後、マウス（のポリープ内）に9A2-VR24.29（5 mg/kg）またはアイソタイプ対照抗体（5 mg/kg）を注射するか、マウスの全身（静脈内）に9A2-VR24.29（5 mg/kg）またはアイソタイプ対照抗体（5 mg/kg）を注射する操作を毎週、4週間にわたって続け、ポリープのサイズを外から観察した。

【0513】

5週間後にマウスを安楽死させ、ポリープを計量した。9A2-VR24.29のポリープ内注射と全身注射の両方が、鼻ポリープのサイズを小さくし（図23A）、重量を低下させた（図23B）。

30

【0514】

9A2-VR24.29は、霊長類の他の種からのIL-3、GM-CSF、IL-5と結合しない、またはIL-3、GM-CSF、IL-5の機能を無効にしない

【0515】

9A2-VR24.29がIL-3、GM-CSF、IL-5に結合する能力、またはIL-3、GM-CSF、IL-5の機能を無効にする能力を、アカゲザル、パブーン、リスザル、カニクイザルで調べた。9A2-VR24.29は、種間でアミノ酸配列が類似していたにもかかわらず、IL-3、GM-CSF、IL-5に結合すること、またはIL-3、GM-CSF、IL-5の機能を無効にすることができなかった。

40

【 図 3 B 】

CDR3		
9A2-VR24	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.04	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.07	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.10	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.12	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.19	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.24	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.76	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.81	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.82	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.84	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.87	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.91	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.93	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.27	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.29	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.30	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.33	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.44	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.97	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.98	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.102	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.107	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.110	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.111	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.55	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.56	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.57	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.122	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.124	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR24.131	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
コンセンサス FYDSFFDI WGQGMVTVSS		

Figure 3B

【 図 4 A 】

CDR3		
9A2-VR39	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.01	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.02	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.04	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.05	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.06	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.11	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.12	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.16	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.17	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.18	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.19	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.21	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.22	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.24	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.7	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.8	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.10	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.102	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.109	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.110	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.112	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.116	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.27	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.46	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.122	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.148	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.172	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.53	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.174	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.177	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
コンセンサス FYDSFFDI WGQGMVTVSS		

Figure 4B

【 図 4 B 】

CDR3		
9A2-VR39	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.01	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.02	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.04	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.05	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.06	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.11	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.12	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.16	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.17	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.18	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.19	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.21	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.22	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.23	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.24	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.97	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.98	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.102	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.103	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.105	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.109	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.110	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.111	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.112	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.116	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.27	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.28	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.46	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.122	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.139	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.140	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.148	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.162	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.77	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.83	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.174	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
9A2-VR39.177	FYDSFFDI	WGQGMVTVSS
コンセンサス FYDSFFDI WGQGMVTVSS		

【 図 5 A 】

DIQMTQPSVSAVSDRVTITCRASGSSILWYQQKPKAPKLLIYAASSLS
 L1.1
 GVP/SRFSGGSGGDTFLTSLQLPEDFATYQQQANSPTIFGGTRLEIKRTVA
 L3.1 L3.2

Figure 4A

【 図 1 3 】

細胞	9A2-VR24.29 IgG (K _D pM)	9A2-VR24.29 Fab (K _D pM)
好中球	246 ± 17	384 ± 29
好酸球	730 ± 83	528 ± 78
TF1 細胞	361 ± 24	656 ± 41
	303 ± 32	668 ± 25
	393 ± 32	522 ± 24
全細胞についての平均 (±SEM)	426 ± 79	569 ± 93

Figure 13

【 図 1 4 A - C 】

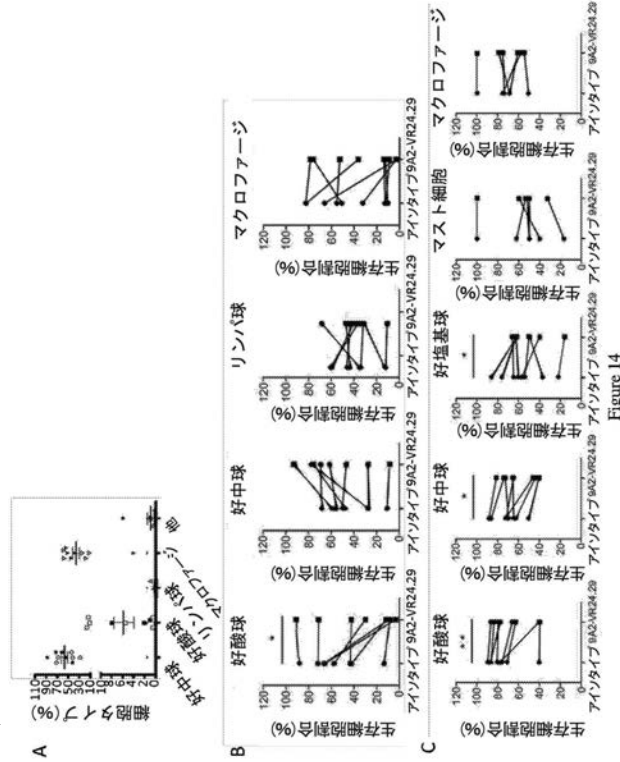


Figure 14

【 図 1 4 D - G 】

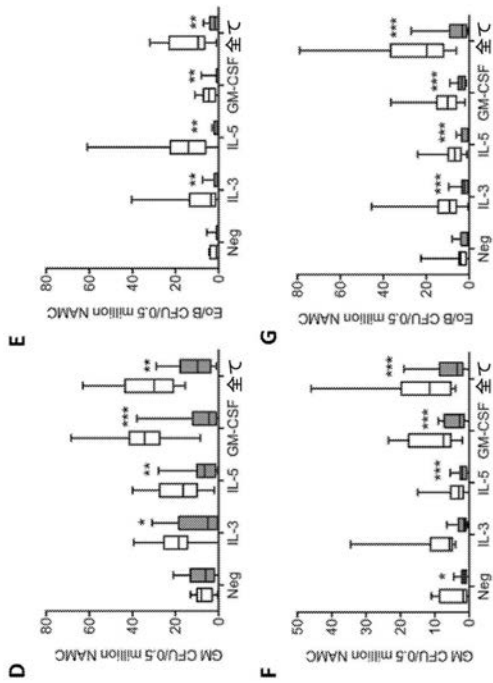


Figure 14

【 図 1 4 H - J 】

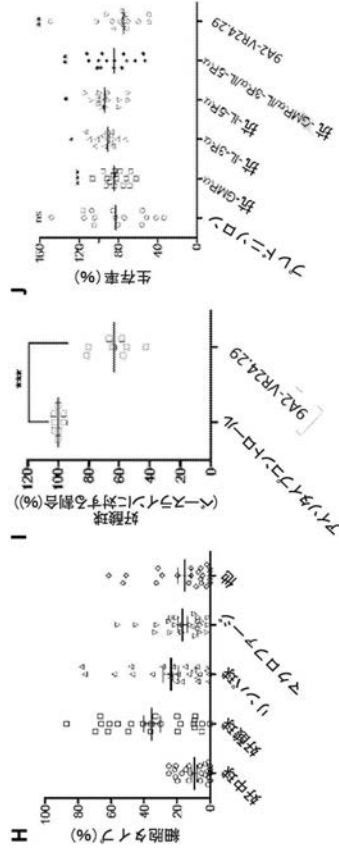


Figure 14

【図 15】

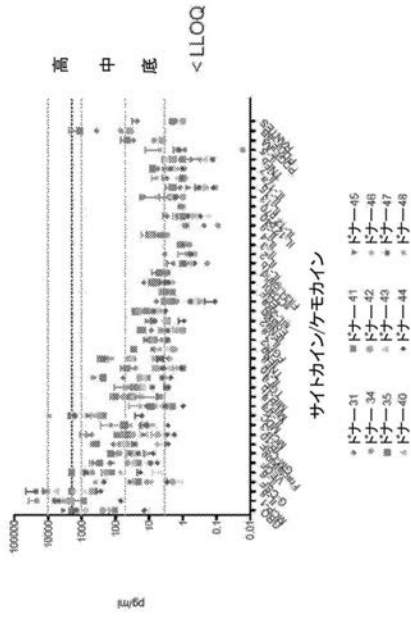


Figure 15

【図 16 A - F】

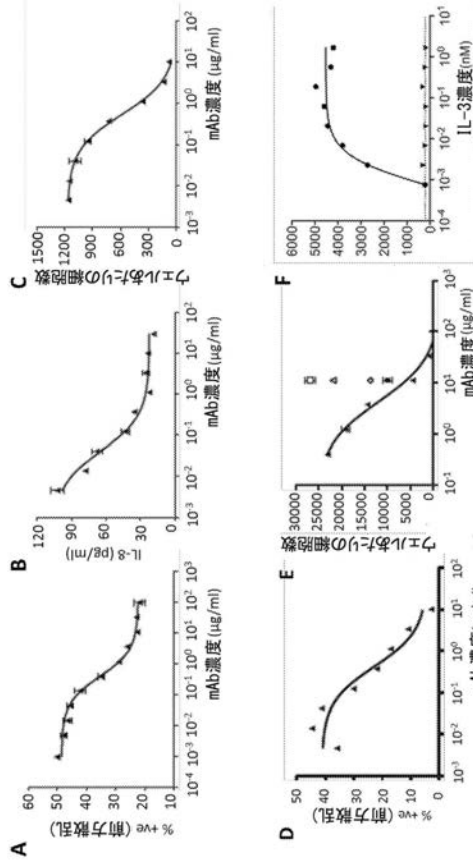


Figure 16

【図 16 G - O】

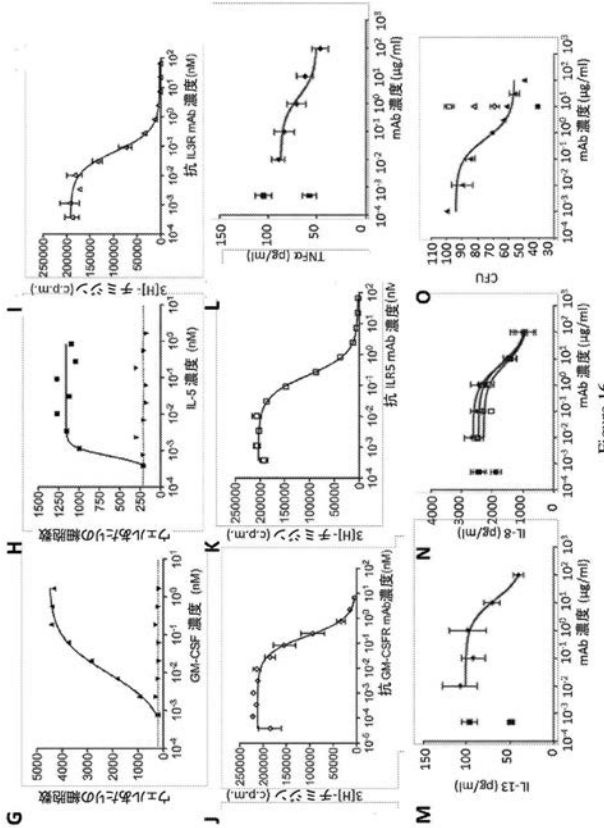


Figure 16

【図 17 A - C】

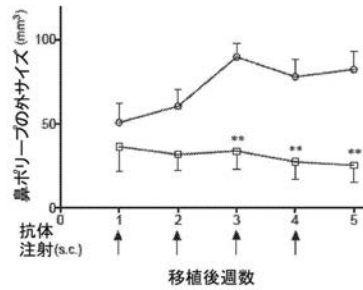


Figure 17A

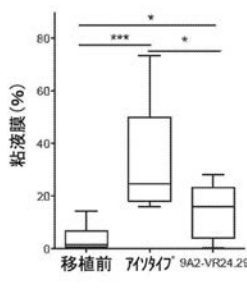


Figure 17B

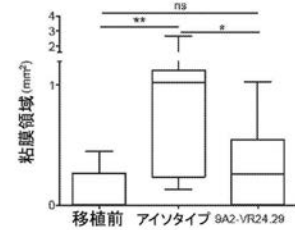
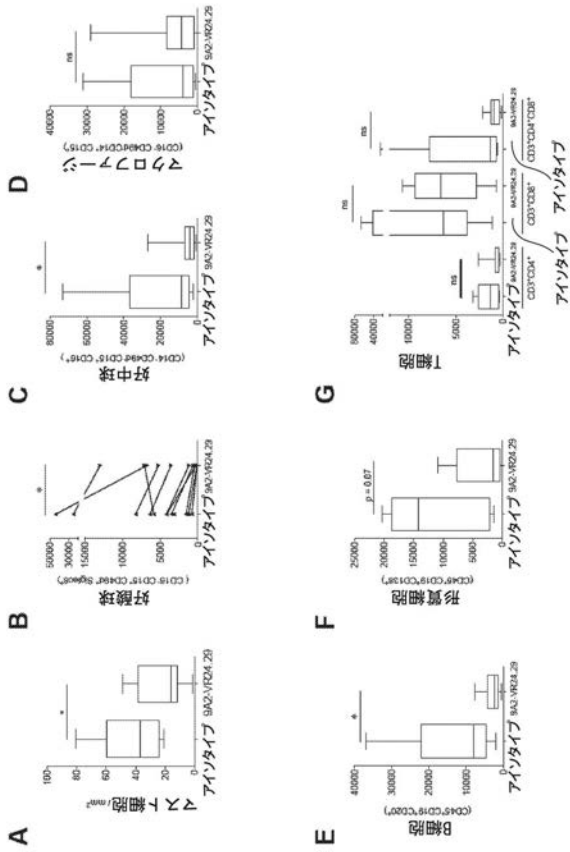
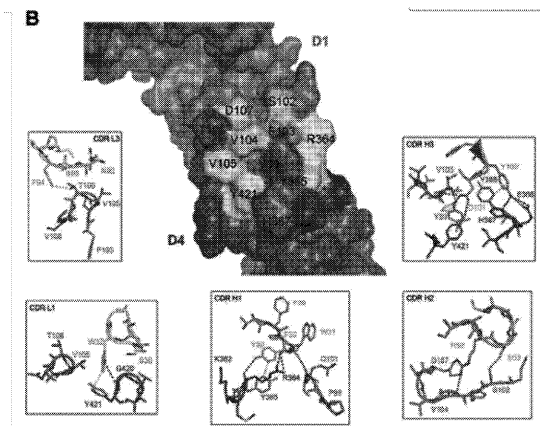


Figure 17C

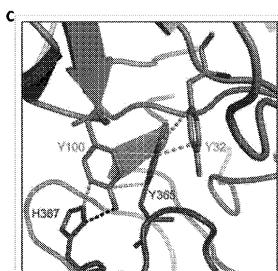
【図 18】



【図 20 B】



【図 20 C】



【図 19】

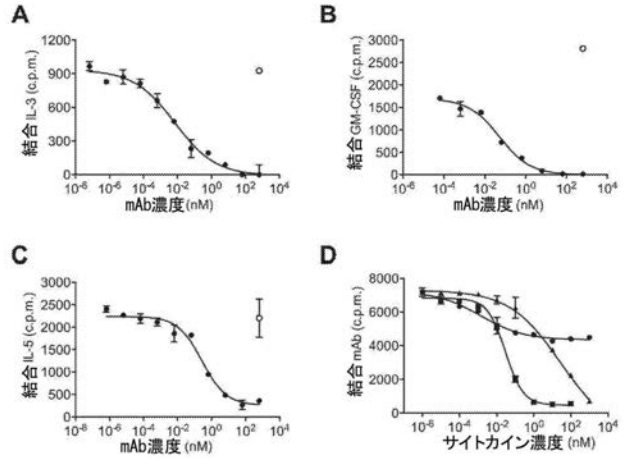
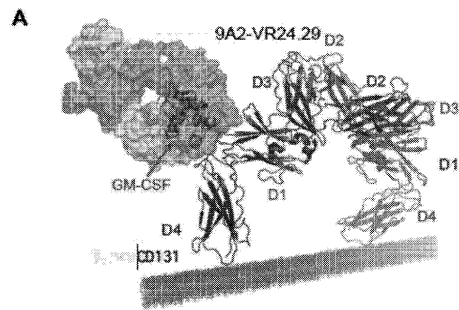


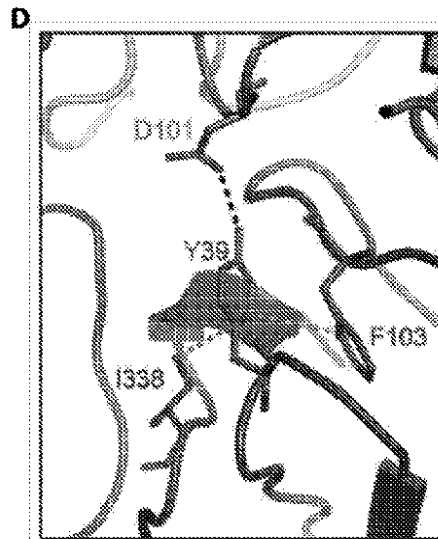
Figure 18

Figure 19

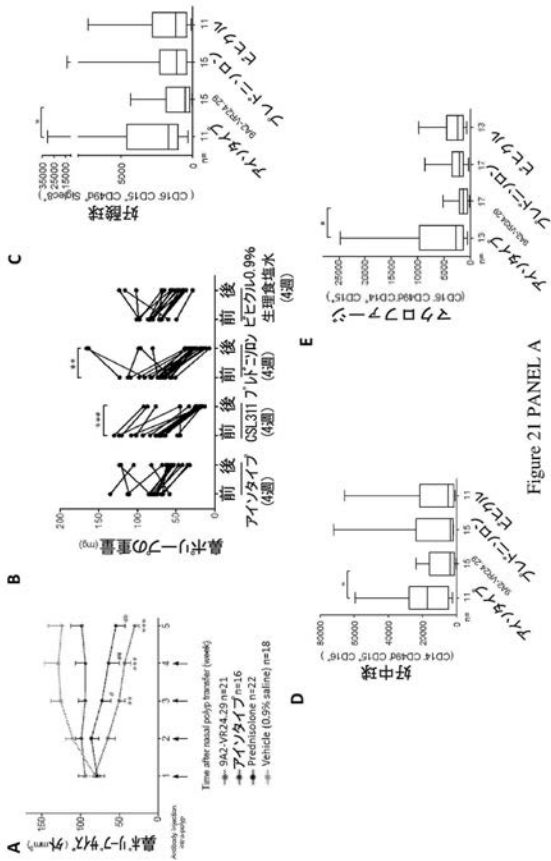
【図 20 A】



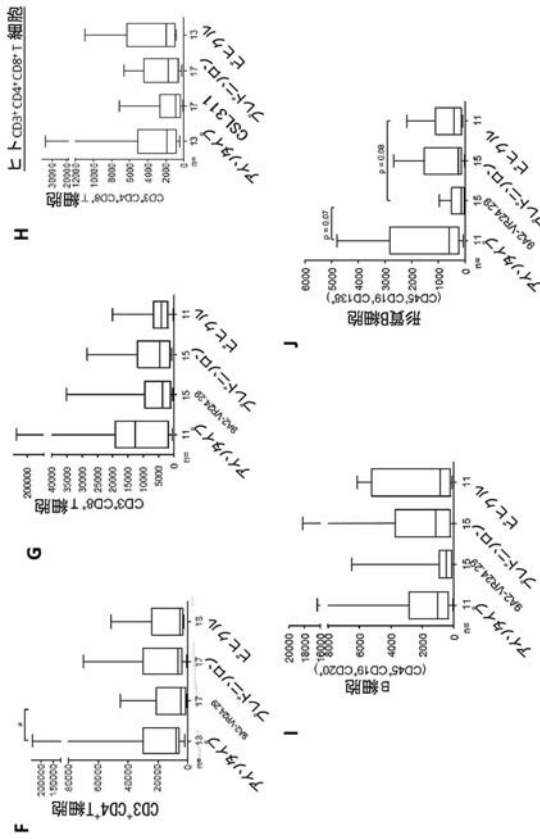
【図 20 D】



【図 21 A - E】



【図 21 F - J】



【図 22】

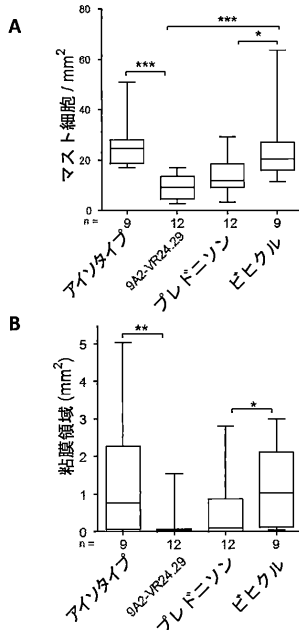


Figure 22

【図 23】

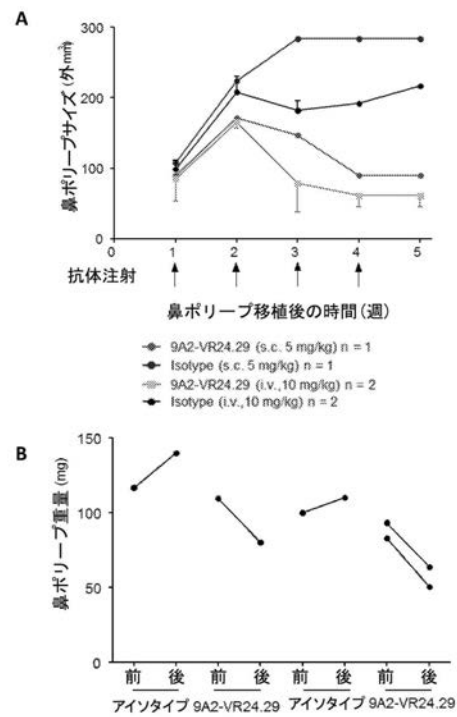


Figure 23

【配列表】

2019500859000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2016/051158
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)		
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)		
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) WPIAP, EPODOC, MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, GENOMEQUEST: CD131 binding protein/antibody, IL-3, IL-5, GM-CSF, beta/β chain/subunit, eosinophil and similar terms, as well as the recited sequences. Internal databases provided by IP Australia, PubMed, Espacenet Worldwide EN: Applicant/Inventors and keywords search.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> 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 1 February 2017	Date of mailing of the international search report 01 February 2017	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Authorised officer Lauren Howitt AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262256130	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation).		PCT/AU2016/051158
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2000/009561 A1 (MEDVET SCIENCE PTY. LTD.) 24 February 2000 Abstract, page 3, lines 10-20, page 6, lines 14-20, page 6, line 22 – page 7, line 2, page 20, lines 5-23, page 21, lines 20-32	1, 5-7, 12-14, 17-19 and 21-35
X	WO 2000/047620 A1 (MEDVET SCIENCE PTY. LTD. et al.) 17 August 2000 page 27, lines 6-20, page 18, line 22 – page 19, line 7, Example 1	1, 5-7, 12-14, 17-19 and 21-35
X	WO 2007/147019 A2 (ZYMOGENETICS, INC.) 21 December 2007 SEQ ID NOs: 745 and 1007, [175]	18 and 19
A	RAMSHAW, H.S. et al., 'New approaches in the treatment of asthma', Immunology and Cell Biology. 2001, Vol. 79, pages 154-159 Summary, 'Targeting the β c as an alternative therapy for asthma'	1, 5-7, 12-14, 17-19 and 21-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2016/051158	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2000/009561 A1	24 February 2000	WO 0009561 A1	24 Feb 2000
		AU 5497399 A	06 Mar 2000
		AU 760927 B2	22 May 2003
		EP 1105426 A1	13 Jun 2001
		EP 1105426 B1	11 May 2005
		US 6720155 B1	13 Apr 2004
		US 2004265957 A1	30 Dec 2004
		US 7427401 B2	23 Sep 2008
WO 2000/047620 A1	17 August 2000	WO 0047620 A1	17 Aug 2000
		AU 2648800 A	29 Aug 2000
		AU 773029 B2	13 May 2004
		CA 2362264 A1	17 Aug 2000
		EP 1161453 A1	12 Dec 2001
		JP 2002541061 A	03 Dec 2002
		NZ 513507 A	29 Aug 2003
		US 2003044975 A1	06 Mar 2003
		US 7220829 B2	22 May 2007
		ZA 200106536 B	08 Aug 2002
WO 2007/147019 A2	21 December 2007	WO 2007147019 A2	21 Dec 2007
		AU 2007226627 A1	20 Sep 2007
		AU 2007226627 B2	20 Sep 2012
		AU 2007260787 A1	21 Dec 2007
		CA 2646478 A1	20 Sep 2007
		CA 2655372 A1	21 Dec 2007
		CA 2683145 A1	06 Nov 2008
		EP 1996622 A2	03 Dec 2008
		EP 2044118 A2	08 Apr 2009
		EP 2150564 A2	10 Feb 2010
		EP 2377887 A1	19 Oct 2011
		EP 2392597 A2	07 Dec 2011
		EP 2392597 B1	02 Apr 2014
		IL 193444 A	29 Oct 2015
		JP 2009534297 A	24 Sep 2009
		JP 2009540018 A	19 Nov 2009
		US 2009004199 A1	01 Jan 2009

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2016/051158	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 7790163 B2	07 Sep 2010
		US 2008095775 A1	24 Apr 2008
		US 7790862 B2	07 Sep 2010
		US 2008299129 A1	04 Dec 2008
		US 7910703 B2	22 Mar 2011
		US 2011059087 A1	10 Mar 2011
		US 8227579 B2	24 Jul 2012
		US 2011159589 A1	30 Jun 2011
		US 8333968 B2	18 Dec 2012
		US 2012294862 A1	22 Nov 2012
		US 8496936 B2	30 Jul 2013
		US 2012329093 A1	27 Dec 2012
		US 8557544 B2	15 Oct 2013
		US 2010310565 A1	09 Dec 2010
		US 8609099 B2	17 Dec 2013
		US 2013288304 A1	31 Oct 2013
		US 8871467 B2	28 Oct 2014
		US 2013309235 A1	21 Nov 2013
		US 8992922 B2	31 Mar 2015
		US 2015010553 A1	08 Jan 2015
		US 9416183 B2	16 Aug 2016
		US 2015197566 A1	16 Jul 2015
		US 9464134 B2	11 Oct 2016
		US 2007218065 A1	20 Sep 2007
		US 2011097331 A1	28 Apr 2011
		US 2011318350 A1	29 Dec 2011
		US 2012177653 A1	12 Jul 2012
		US 2012295310 A1	22 Nov 2012
		US 2013209470 A1	15 Aug 2013
		US 2016053008 A1	25 Feb 2016
		US 2016311897 A1	27 Oct 2016
		US 2016376362 A1	29 Dec 2016
		WO 2007106769 A2	20 Sep 2007
		WO 2008134659 A2	06 Nov 2008

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2016/051158	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
End of Annex			
<p>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</p>			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	C 1 2 N	15/06	1 0 0
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	
	G 0 1 N	33/53	D
	C 1 2 P	21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 キャサリン オフツアレク

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2, パークビル, ポップラー ロード 4 5, シー/オー
シーエスエル リミティド

(72)発明者 コスタ パヌシス

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2, パークビル, ポップラー ロード 4 5, シー/オー
シーエスエル リミティド

(72)発明者 ニコラス ウィルソン

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2, パークビル, ポップラー ロード 4 5, シー/オー
シーエスエル リミティド

(72)発明者 マシュー ハーディ

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2, パークビル, ポップラー ロード 4 5, シー/オー
シーエスエル リミティド

(72)発明者 キルステン エドワーズ

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2, パークビル, ポップラー ロード 4 5, シー/オー
シーエスエル リミティド

(72)発明者 ベロニカ レイズマン

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2, パークビル, ポップラー ロード 4 5, シー/オー
シーエスエル リミティド

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33

QX01

4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA01 DA05

4B065 AA91X AA92Y AB05 AC14 BA05 BD14 CA25 CA44 CA46

4C084 AA19 NA05 ZA511 ZB081 ZB111 ZB131 ZB261 ZC022 ZC751

4C085 AA13 AA14 CC01 CC23 DD62 EE01 EE03 KA03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74
GA26

专利名称(译)	CD131结合蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2019500859A	公开(公告)日	2019-01-17
申请号	JP2018526904	申请日	2016-11-25
申请(专利权)人(译)	海洋エスエルリミ红茶徳		
[标]发明人	キャサリン オフツアレク コスタ パヌシス ニコラス ウィルソン マシュー ハーディ キルステン エドワーズ ベロニカ レイズマン		
发明人	キャサリン オフツアレク コスタ パヌシス ニコラス ウィルソン マシュー ハーディ キルステン エドワーズ ベロニカ レイズマン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/62 C12N15/85 C12N5/10 C12Q1/04 C12N15/06 A61P7/00 A61P43/00 A61K45/00 A61K39/395 A61K49/00 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/54 A61K2039/543 A61P37/06 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/68 G01N2333/70596		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12N15/62.Z C12N15/85.Z C12N5/10 C12Q1/04 C12N15/06.100 A61P7/00 A61P43/00.121 A61P43/00.111 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K49/00 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA05 4B065/AA91X 4B065/AA92Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA05 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZA511 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB261 4C084/ZC022 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC01 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/KA03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	2015904924 2015-11-27 AU		
其他公开文献	JP2019500859A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了包含抗体的抗原结合结构域的CD131结合蛋白及其用途。在这里，抗原结合结构域与CD131结合或特异性结合，并中和白介素4，IL-5和牙龈巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）的信号传导。

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	Z N A 4 B 0 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z 4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 146 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-526904 (P2018-526904)	(71) 出願人	516179980
(86) (22) 出願日	平成28年11月25日 (2016.11.25)		シーエスエル リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月23日 (2018.7.23)		オーストラリア国, ビクトリア 3 0 5 2
(86) 国際出願番号	PCT/AU2016/051158		, パークビル, ポップラー ロード 4 5
(87) 国際公開番号	W02017/088028	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成28年6月1日 (2017.6.1)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	2015904924	(74) 代理人	100123582
(32) 優先日	平成27年11月27日 (2015.11.27)		弁理士 三橋 真二
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		(74) 代理人	100150810
			弁理士 武原 具太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C D 1 3 1 結合タンパク質とその利用