(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-545182
(P2023-545182A)
(43)公表日　令和5年10月26日(2023.10.26)

(51)国際特許分類			ＦＩ				テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28			４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		ＺＮＡ	４Ｃ０８５
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ		４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*1/15*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15			
Ｃ１２Ｎ	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19			

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全59頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-522848(P2023-522848)
(86)(22)出願日　令和3年10月14日(2021.10.14)
(85)翻訳文提出日　令和5年5月24日(2023.5.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/078385
(87)国際公開番号　WO2022/079138
(87)国際公開日　令和4年4月21日(2022.4.21)
(31)優先権主張番号　63/092,294
(32)優先日　令和2年10月15日(2020.10.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/092,296
(32)優先日　令和2年10月15日(2020.10.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/127,184
最終頁に続く

(71)出願人　510000976
インターベット インターナショナル ベー．フェー．
オランダ国、５８３１・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・３５
(74)代理人　100114188
弁理士　小野 誠
(74)代理人　100119253
弁理士　金山 賢教
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉 道明
(74)代理人　100129713
弁理士　重森 一輝
(74)代理人　100137213
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　イヌインターロイキン－３１受容体アルファに対するイヌ化ラット抗体

(57)【要約】
本発明は、イヌＩＬ－３１受容体アルファに対する高い結合親和性を有し、イヌＩＬ－３１受容体アルファへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断することができる、イヌＩＬ－３１受容体アルファに対するイヌ化ラット抗体を提供する。本発明は、イヌのアトピー性皮膚炎の治療のための抗体の使用をさらに提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）：ＣＤＲ ｈｅａｖｙ １（ＨＣＤＲ１）、ＣＤＲ ｈｅａｖｙ ２（ＨＣＤＲ２）およびＣＤＲ ｈｅａｖｙ ３（ＨＣＤＲ３）のセットを含む、イヌインターロイキン－３１受容体アルファ（イヌＩＬ－３１ＲＡ）に結合する単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片であって、
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２および配列番号４１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３３、配列番号３９および配列番号４３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２】
前記抗体が、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合した場合、配列番号１０４、配列番号１０５、ならびに配列番号１０４および配列番号１０５の両方からなる群から選択されるアミノ酸配列によって構成されるエピトープに結合する、請求項１に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項３】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３３のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項４】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３９のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項５】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号４３のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項６】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号４１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３９のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項７】
３つの軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）：ＣＤＲ ｌｉｇｈｔ １（ＬＣＤＲ１）、ＣＤＲ ｌｉｇｈｔ ２（ＬＣＤＲ２）およびＣＤＲ ｌｉｇｈｔ ３（ＬＣＤＲ３）のセットをさらに含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片であって、
（ｉｖ）前記ＬＣＤＲ１が、配列番号３４、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２および配列番号４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖ）前記ＬＣＤＲ２が、配列番号３５および配列番号３７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖｉ）前記ＬＣＤＲ３が、配列番号３６および配列番号４５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項８】
（ｉｖ）前記ＬＣＤＲ１が、配列番号３４、配列番号３８および配列番号４４からなる

群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖ）前記ＬＣＤＲ２が、配列番号３５および３７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖｉ）前記ＬＣＤＲ３が、配列番号３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項９】
前記抗体およびその抗原結合断片が、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合し、イヌインターロイキン－３１へのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合を遮断する、請求項１～８のいずれか一項に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１０】
イヌ化抗体またはそのイヌ化抗原結合断片である、請求項９に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１１】
配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１および配列番号８２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む、請求項１０に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１２】
配列番号７８のアミノ酸配列を含む改変イヌＩｇＧ－Ｂ（ＩｇＧ－Ｂｍ）を含む重鎖を含む、請求項１０に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１３】
前記イヌ化ＩＬ－３１ＲＡ抗体が、配列番号８３、配列番号８６および配列番号８７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８４および配列番号８５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む、請求項１０に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１４】
前記イヌ化ＩＬ－３１ＲＡ抗体が、
配列番号８３のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８３のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８６のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８６のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、請求項１３に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１５】
請求項１～１４のいずれか一項に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片の前記重鎖をコードする単離された核酸。
【請求項１６】
請求項１～１４のいずれか一項に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片の前記軽鎖をコードする単離された核酸。
【請求項１７】
請求項１６に記載の単離された核酸を含む発現ベクター。
【請求項１８】
請求項１５に記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

【請求項１９】
請求項１７、請求項１８、または請求項１７および１８の両方に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項２０】
請求項１０～１４のいずれか一項に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物。
【請求項２１】
アトピー性皮膚炎に関連する掻痒症の遮断を補助する方法であって、それを必要とする被験体に、請求項２０に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、米国特許法第１１９条（ｅ）の下で、２０２０年１０月１５日に出願された米国仮特許出願第６３／０９２，２９４号、２０２０年１０月１５日に出願された米国仮特許出願第６３／０９２，２９６号、２０２０年１２月１８日に出願された米国仮特許出願第６３／１２７，１８４号、２０２１年８月２０日に出願された米国仮特許出願第６３／２３５，２５８号、２０２１年８月２０日に出願された米国仮特許出願第６３／２３５，２５７号の優先権を主張し、その内容全体を参照により本明細書に組み入れる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０２１年１０月１日に作成された上記ＡＳＣＩＩコピーは、２５０７０－ＷＯ－ＰＣＴ＿ＳＬ．ｔｘｔという名称であり、サイズが１０４，１５９バイトである。
【０００３】
本発明は、イヌＩＬ－３１受容体アルファに対する高い結合親和性を有し、イヌＩＬ－３１受容体アルファへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断することができる、イヌＩＬ－３１受容体アルファに対する抗体に関する。本発明はまた、イヌのアトピー性皮膚炎の治療に対する本発明の抗体の使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
免疫系は、宿主を感染性疾患および癌から保護するために協働して機能する、常在性細胞および再循環する特殊な細胞のネットワークを含む。免疫系がこの機能を果たす能力は、白血球によって分泌され、インターロイキンとまとめて呼ばれるタンパク質群の生物学的活性に大きく依存する。よく研究されているインターロイキンの中には、インターロイキン－３１（ＩＬ－３１）、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、インターロイキン－１３（ＩＬ－１３）およびインターロイキン－２２（ＩＬ－２２）として同定された４つの重要な分子がある。ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＩＬ－２２およびＩＬ－３１は、細胞外病原体（例えば、組織または管腔内に存在する寄生生物）に対する保護に必要な免疫応答の発生のための重要なサイトカインであるが、これらのサイトカインはまた、アトピー性皮膚炎を含む、ヒトおよび動物のアレルギー性疾患の病因に関与している。
【０００５】
アトピー性皮膚炎（ＡＤ）は、再発性の掻痒性および慢性炎症性皮膚疾患であり、ヒトでは、免疫系調節不全および表皮バリア異常を特徴とする。アトピー性皮膚炎の病理学的属性および免疫学的属性は、広範囲な調査の対象となっている［Ｒａｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ＆Ａｌｌｅｒｇｙ－ｄｒｕｇ ｔａｒｇｅｔ １０：４８６－４９６（２０１１）およびＨａｒｓｋａｍｐ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍｉｎａｒ ｉｎ Ｃｕｔａｎｅｏｕｓ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｓｕｒｇｅｒｙ ３２：１３２－１３９（２０１３）に概説されている］。アトピー性皮膚炎はまた、伴侶動物、特にイヌでは

一般的な病態であり、その有病率は、イヌ集団の約１０～１５％であると推定されている。イヌおよびネコのアトピー性皮膚炎の病因［Ｎｕｔｔａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｒｅｃｏｒｄｓ １７２（８）：２０１－２０７（２０１３）に概説されている］は、ヒトのアトピー性皮膚炎の病因との顕著な類似性を示しており、これには、様々な免疫細胞による皮膚浸潤、ならびにＩＬ－３１、ＩＬ－４およびＩＬ－１３が優勢であることを含むＣＤ４$^{+}$Ｔｈ２極性化サイトカイン環境が含まれる。さらに、ＩＬ－２２は、アトピー性皮膚炎に特徴的な表皮過形成をもたらす過剰な上皮増殖に関与している。

【０００６】

例えば、イヌＩＬ－３１に対する抗体は、イヌのアトピー性皮膚炎に関連する掻痒症に対する効果を有することが示されている［米国特許第８，７９０，６５１号；米国特許第１０，０９３，７３１号］。加えて、ヒトＩＬ－３１受容体アルファ（ＩＬ－３１ＲＡ）に対する抗体が試験され、ヒトではアトピー性皮膚炎に関連する掻痒症に対する効果を有することが見出されている［Ｒｕｚｉｃｋａ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，３７６（９），８２６－８３５（２０１７）］。

【０００７】

ＩＬ－４およびＩＬ－１３は、ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ２細胞、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ）、マクロファージ、肥満細胞および好塩基球を含む多くの細胞型によって分泌され得る密接に関連したタンパク質である。ＩＬ－４およびＩＬ－１３は、多くの重複する機能を示し、Ｔ細胞依存性液性免疫応答の発生に重要である。ＩＬ－４は、２つの受容体、すなわち、Ｉ型およびＩＩ型のＩＬ－４受容体に高い親和性で結合することが知られている。ヒトＩＬ－４受容体アルファ（ＩＬ－４ Ｒα）に対して生じるモノクローナル抗体が開発されており、これらの抗体の一部は、ヒトでは、アトピー性皮膚炎を治療するためのそれらの治療効果について広範囲に試験されている［例えば、米国特許第２０１５／００１７１７６号を参照］。さらに近年では、イヌＩＬ－４ Ｒαに対するイヌＩＬ－４の結合を遮断する、イヌＩＬ－４ Ｒαに対するイヌ化抗体も開示されている［参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第２０１８／０３４６５８０号］。ＩＩ型ＩＬ－４受容体はＩＬ－４受容体α鎖およびＩＬ－１３受容体α１鎖からなるため、イヌＩＬ－４およびイヌＩＬ－１３の両方がＩＩ型イヌＩＬ－４受容体に結合するのを遮断することができ、それによって、アトピー性皮膚炎に関連する炎症を遮断するのに役立つ、イヌＩＬ－４ Ｒαに対する抗体が得られている［米国特許第２０１８／０３４６５８０号］。

【０００８】

ＩＬ－１０関連Ｔ細胞由来誘導因子（ＩＬ－ＴＩＦ）としても知られるインターロイキン－２２（ＩＬ－２２）は、ＩＬ－１０サイトカインファミリーに属する。ＩＬ－２２は、ヒトでは、抗ＣＤ３刺激時に正常Ｔ細胞によって産生される。また、リポ多糖注射時に様々な器官内でマウスＩＬ－２２発現が誘導され、ＩＬ－２２が炎症応答に関与し得ることが示唆されている。ＩＬ－２２は、ＩＬ－１０Ｒ２（ＩＬ－１０Ｒベータとしても知られている）とインターロイキン－２２受容体（ＩＬ－２２Ｒ）とのヘテロ二量体複合体からなる受容体複合体に特異的に結合し、それを介してシグナル伝達する［Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ＆Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ，Ｐａｇｅｓ １－１３（２０１８：ｅ００４３４）を参照］。インターロイキン－２２受容体は、インターロイキン－２２Ｒ、アルファ１；ＩＬ－２２ＲＡ１；ＩＬ－２２Ｒ１；ｚｃｙｔｏｒ１１；およびＣＲＦ２－９としても知られている［Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９８（１７）９５１１－９５１６（２００１）；Ｇｅｌｅｂａｒｔ ａｎｄ Ｌａｉ，Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔｉｃｓ １４（１２）：１１０６－１１１０（２０１０）］。ＩＬ－２２は、創傷治癒中に上皮細胞増殖を誘導し、その欠乏は、腫瘍発生の増強を可能にし得る［Ｈｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４９１：２５９－２６３（２０１２］。ＩＬ－２２は、いくつかの肝細胞癌細胞株ではＳＴＡＴ－１およびＳＴＡＴ－３を活性化し、急

性期タンパク質の産生をアップレギュレートすることが示されている。インターロイキン－２２およびＩＬ－２２Ｒに対する抗体は、ＩＬ－２２とＩＬ－２２Ｒとの相互作用を遮断し、それによって、上皮増殖をもたらす関連シグナル伝達経路を遮断することによって、抗増殖剤として作用する。

【０００９】

アトピー性皮膚炎の治療を補助することが証明されている、および／またはそうすることが有望であることが示されている医薬品には、ヤヌスキナーゼ（ＪＡＫ）阻害剤［例えば、米国特許第８，１３３，８９９号、米国特許第８，９８７，２８３号、国際公開第２０１８／１０８９６９号を参照］、脾臓チロシンキナーゼ（ＳＹＫ）阻害剤［例えば、米国特許第８，７５９，３６６号を参照］、およびＴＨ２細胞上に発現される化学誘引物質受容体相同分子に対するアンタゴニスト［例えば、米国特許第７，６９６，２２２号、米国特許第８，５４６，４２２号、米国特許第８，６３７，５４１号および米国特許第８，５４６，４２２号を参照］が含まれる。

【００１０】

しかし、アトピー性皮膚炎の治療に対するいくらかの近年の成功にもかかわらず、イヌのアトピー性皮膚炎の症状のうちの１つ以上に対処することができる代替療法および／またはさらに良好な療法を設計する必要性が依然として存在する。

【００１１】

本明細書におけるいかなる参考文献の引用も、そのような参考文献が本出願に対する「先行技術」として利用可能であることの承認として解釈されないものとする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１２】

【特許文献１】米国特許第８，７９０，６５１号
【特許文献２】米国特許第１０，０９３，７３１号
【特許文献３】米国特許第２０１５／００１７１７６号
【特許文献４】米国特許第２０１８／０３４６５８０号
【特許文献５】米国特許第８，１３３，８９９号
【特許文献６】米国特許第８，９８７，２８３号
【特許文献７】国際公開第２０１８／１０８９６９号
【特許文献８】米国特許第８，７５９，３６６号
【特許文献９】米国特許第７，６９６，２２２号
【特許文献１０】米国特許第８，５４６，４２２号
【特許文献１１】米国特許第８，６３７，５４１号

【非特許文献】

【００１３】

【非特許文献１】Ｒａｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ＆Ａｌｌｅｒｇｙ－ｄｒｕｇ ｔａｒｇｅｔ １０：４８６－４９６（２０１１）
【非特許文献２】Ｈａｒｓｋａｍｐ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍｉｎａｒ ｉｎ Ｃｕｔａｎｅｏｕｓ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｓｕｒｇｅｒｙ ３２：１３２－１３９（２０１３）
【非特許文献３】Ｎｕｔｔａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｒｅｃｏｒｄｓ １７２（８）：２０１－２０７（２０１３）
【非特許文献４】Ｒｕｚｉｃｋａ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，３７６（９），８２６－８３５（２０１７）
【非特許文献５】Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ＆Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅｓ，Ｐａｇｅｓ １－１３（２０１８：ｅ００４３４）
【非特許文献６】Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９８（１７）９５１１－９５１６（２００１）
【非特許文献７】Ｇｅｌｅｂａｒｔ ａｎｄ Ｌａｉ，Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔｉｃｓ １４（１２）：１１０６－１１１０（２０１０）

【非特許文献８】Ｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４９１：２５９－２６３（２０１２）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１４】

本発明は、イヌ由来のＩＬ－３１受容体アルファ（ＩＬ－３１ＲＡ）に対する、イヌ化抗体を含む新しい哺乳動物抗体を提供する。ある特定の実施形態では、イヌＩＬ－３１受容体アルファ（ｃＩＬ－３１ＲＡ）に対する哺乳動物抗体は、単離された抗体である。好ましい実施形態では、哺乳動物抗体またはその抗原結合断片は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合する。さらに特定の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、イヌインターロイキン－３１へのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合も遮断する。特定の実施形態では、抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡに対するラット抗体である。さらに特定の実施形態では、哺乳動物抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡに対するイヌ化ラット抗体である。

【００１５】

したがって、本発明は、イヌインターロイキン－３１受容体アルファに結合し、３つの重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）、ＣＤＲ　ｈｅａｖｙ　１（ＨＣＤＲ１）、ＣＤＲ　ｈｅａｖｙ　２（ＨＣＤＲ２）およびＣＤＲ　ｈｅａｖｙ　３（ＨＣＤＲ３）のセットを含む重鎖を含む哺乳動物抗体またはその抗原結合断片であって、ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、ＨＣＤＲ２が、配列番号３２または配列番号４１のアミノ酸配列を含み、ＨＣＤＲ３が、配列番号３３、配列番号３９または配列番号４３のアミノ酸配列を含む哺乳動物抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１６】

この種の特定の実施形態では、哺乳動物抗体またはその抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含む。関連する実施形態では、哺乳動物抗体またはその抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含む。さらに他の実施形態では、哺乳動物抗体またはその抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含む。なお他の実施形態では、哺乳動物抗体またはその抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号４１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含む。

【００１７】

本発明の哺乳動物抗体のいずれかは、３つの軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）：ＣＤＲ　ｌｉｇｈｔ　１（ＬＣＤＲ１）、ＣＤＲ　ｌｉｇｈｔ　２（ＬＣＤＲ２）およびＣＤＲ　ｌｉｇｈｔ　３（ＬＣＤＲ３）のセットをさらに含むことができ、ＬＣＤＲ１は、配列番号３４、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２または配列番号４４のアミノ酸配列を含み、ＬＣＤＲ２は、配列番号３５または配列番号３７のアミノ酸配列を含み、ＬＣＤＲ３は、配列番号３６または配列番号４５のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３４、配列番号３８または配列番号４４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５または３７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。

【００１８】

ある特定の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含み、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。関連する実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配

列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含み、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。他の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含み、配列番号３８のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。

【００１９】

他の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含み、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。さらに他の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号４１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含み、配列番号４２のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。なお他の実施形態では、哺乳動物抗体または抗原結合断片は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とを含み、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号４５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをさらに含む。具体的な実施形態では、抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合した場合、配列番号１０４もしくは配列番号１０５のアミノ酸によって構成されるエピトープに、または配列番号１０４および配列番号１０５の両方に結合する。関連する実施形態では、抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合した場合、配列番号１０４もしくは配列番号１０５、または配列番号１０４および配列番号１０５の両方のアミノ酸配列内の少なくとも１つのアミノ酸残基、好ましくは１～３つのアミノ酸残基、さらに好ましくは２～５つのアミノ酸残基、および／またはさらに好ましくは３～８つのアミノ酸残基もしくはそれ以上に結合する。

【００２０】

具体的な実施形態では、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する哺乳動物抗体はラット抗体である。特定の実施形態では、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する哺乳動物抗体は、イヌ化ラット抗体である。ある特定の実施形態では、イヌ化抗体は、ＩｇＧ－Ｄ　ｃＦｃを含む重鎖を含むが、天然に存在するＩｇＧ－Ｄヒンジ領域は、配列番号７９のアミノ酸配列を含むヒンジ領域によって置換されている。他の実施形態では、イヌ化抗体は、ＩｇＧ－Ｄ　ｃＦｃを含む重鎖を含むが、天然に存在するＩｇＧ－Ｄヒンジ領域は、配列番号８０のアミノ酸配列を含むヒンジ領域によって置換されている。さらに他の実施形態では、イヌ化抗体は、ＩｇＧ－Ｄ　ｃＦｃを含む重鎖を含むが、天然に存在するＩｇＧ－Ｄヒンジ領域は、配列番号８１のアミノ酸配列を含むヒンジ領域によって置換されている。なお他の実施形態では、イヌ化抗体は、ＩｇＧ－Ｄ　ｃＦｃを含む重鎖を含むが、天然に存在するＩｇＧ－Ｄヒンジ領域は、配列番号８２のアミノ酸配列を含むヒンジ領域によって置換されている。

【００２１】

ある特定の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号７８のアミノ酸配列を含む改変イヌＩｇＧ－Ｂ（ＩｇＧ－Ｂｍ）を含む重鎖を含む。代替的な実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号７７のアミノ酸配列を含む非改変イヌＩｇＧ－Ｂを含む重鎖を含む。

【００２２】

本発明はまた、ＣＤＲ、イヌ化抗体もしくはその抗原結合断片の重鎖、および／またはイヌ化抗体もしくはその抗原結合断片の軽鎖をコードする、単離された核酸を含む核酸を提供する。

【００２３】

したがって、本発明は、本発明の哺乳動物抗体またはその抗原結合断片の３つの重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）、ＣＤＲ ｈｅａｖｙ １（ＨＣＤＲ１）、ＣＤＲ ｈｅａｖｙ ２（ＨＣＤＲ２）およびＣＤＲ ｈｅａｖｙ ３（ＨＣＤＲ３）のセットをコードする核酸をさらに提供する。この種のさらに具体的な実施形態では、核酸は、配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号３２または配列番号４１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号３３、配列番号３９または配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３とをコードする。

【００２４】

組成物のある特定の実施形態では、イヌＩＬ－３１ＲＡに対するイヌ化抗体は、配列番号８４または配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号８３、配列番号８６または配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。本発明は、これらのイヌ化抗体の抗原結合断片をさらに提供する。

【００２５】

特定の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号８３のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。他の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号８３のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。なお他の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号８６のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。さらに他の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号８６のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。なお他の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。さらに他の実施形態では、イヌ化抗体は、配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。具体的な実施形態では、抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合した場合、配列番号１０４もしくは配列番号１０５のアミノ酸によって構成されるエピトープに、または配列番号１０４および配列番号１０５の両方に結合する。関連する実施形態では、抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合した場合、配列番号１０４もしくは配列番号１０５、または配列番号１０４および配列番号１０５の両方のアミノ酸配列内の少なくとも１つのアミノ酸残基、好ましくは１～３つのアミノ酸残基、さらに好ましくは２～５つのアミノ酸残基、および／またはさらに好ましくは３～８つのアミノ酸残基もしくはそれ以上に結合する。本発明は、これらのイヌ化抗体の抗原結合断片をさらに提供する。

【００２６】

本発明は、本発明の哺乳動物抗体またはその抗原結合断片の３つの軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）、ＣＤＲ ｌｉｇｈｔ １（ＬＣＤＲ１）、ＣＤＲ ｌｉｇｈｔ ２（ＬＣＤＲ２）およびＣＤＲ ｌｉｇｈｔ ３（ＬＣＤＲ３）のセットをコードする核酸をさらに提供する。この種のさらに具体的な実施形態では、核酸は、配列番号３４、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４２または配列番号４４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号３５または配列番号３７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号３６または配列番号４５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３とをコードする。

【００２７】

本発明はまた、本発明の哺乳動物抗体またはその抗原結合断片の重鎖をコードする核酸を提供する。本発明はまた、本発明の哺乳動物抗体またはその抗原結合断片の軽鎖をコードする核酸を提供する。さらに、本発明は、本発明の核酸のうちの１つ以上を含む発現ベクター、およびそのような発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【００２８】

本発明は、薬学的に許容される担体および／または希釈剤とともに、本発明のイヌ化抗体およびその抗原結合断片を含む医薬組成物をさらに提供する。本発明はまた、アトピー性皮膚炎を治療する方法であって、アトピー性皮膚炎を有するイヌに前述の組成物の１つを投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では、本発明は、アトピー性皮膚炎に関連する掻痒症の遮断を補助する方法であって、それを必要とするイヌに、本発明の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。

【００２９】
本発明のこれらおよび他の態様は、以下の図面の簡単な説明および詳細な説明を参照することによってさらによく理解されるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００３０】
【図１】イヌＩＬ－３１に結合する能力について、イヌＩＬ－３１ＲＡの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を試験した。結果は、イヌＩＬ－３１ＲＡ　ＥＣＤが、ビオチン化イヌＩＬ－３１に用量依存的に結合することを示している。
【図２Ａ】イヌＩＬ－３１ＲＡに対する反応性について、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する選択したラットｍＡｂを試験した。図２Ａ：４Ｇ７（●）、２０Ｂ８（■）、２２Ｂ４（▲）、２７Ａ１０（▼）およびラットＩｇＧ２ａ／カッパ（◆）対照。
【図２Ｂ】イヌＩＬ－３１ＲＡに対する反応性について、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する選択したラットｍＡｂを試験した。図２Ｂ：３８Ｂ６（●）、４８Ｂ１（■）、４９Ｄ３（▲）およびラットＩｇＧ２ａ／カッパ（◆）対照。
【図２Ｃ】イヌＩＬ－３１ＲＡに対する反応性について、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する選択したラットｍＡｂを試験した。図２Ｃ：１０Ａ１２（■）、４４Ｅ２（▼）およびラットＩｇＧ２ａ／カッパ（◆）対照。
【図２Ｄ】イヌＩＬ－３１ＲＡに対する反応性について、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する選択したラットｍＡｂを試験した。図２Ｄ：４７Ｆ３（●）、５１Ｇ４（■）およびラットＩｇＧ２ａ／カッパ（▼）対照。
【図２Ｅ】イヌＩＬ－３１ＲＡに対する反応性について、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する選択したラットｍＡｂを試験した。結果は、選択したラットｍＡｂが、イヌＩＬ－３１ＲＡに用量依存的に結合することを示している。試験した１４のラットモノクローナル抗体はいずれも、イヌＩＬ－３１ＲＡに対する強い結合反応性を有する。図２Ｅ：７Ｄ７（●）、２８Ｆ１２（■）、５３Ｂ３（▲）ならびにラットＩｇＧ２ａ／カッパ（Ｘ）対照およびラットＩｇＧ２ｂ／カッパ（◆）対照。
【図３Ａ】ＥＬＩＳＡによって、イヌＩＬ－３１ＲＡへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断する能力について、選択したラットｍＡｂを試験した。図３Ａ：２０Ｂ８（●）、２２Ｂ４（■）、２７Ａ１０（▲）ならびにラットＩｇＧ２ａ／カッパ（△）対照およびラットＩｇＧ２ｂ／カッパ（∇）対照。
【図３Ｂ】ＥＬＩＳＡによって、イヌＩＬ－３１ＲＡへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断する能力について、選択したラットｍＡｂを試験した。図３Ｂ：３８Ａ６（●）、４９Ｄ３（▲）、１０Ａ１２（■）ならびにラットＩｇＧ２ａ／カッパ（△）対照およびラットＩｇＧ２ｂ／カッパ（∇）対照。
【図３Ｃ】ＥＬＩＳＡによって、イヌＩＬ－３１ＲＡへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断する能力について、選択したラットｍＡｂを試験した。図３Ｃ：５３Ｂ３（■）、７Ｄ７（●）ならびにラットＩｇＧ２ａ／カッパ（△）対照およびラットＩｇＧ２ｂ／カッパ（∇）対照。
【図３Ｄ】ＥＬＩＳＡによって、イヌＩＬ－３１ＲＡへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断する能力について、選択したラットｍＡｂを試験した。結果は、選択したｍＡｂのいくつかが、イヌＩＬ－３１ＲＡへのイヌＩＬ－３１の結合を用量依存的に遮断することができるが、他のものは遮断することができなかったことを示した。図３Ｄ：５１Ｇ４（■）、４７Ｆ３（●）およびラットＩｇＧ２ｂ／カッパ（▼）対照。
【図４】ＩＬ－３１誘導性ＳＴＡＴ－３リン酸化について、ＩＬ－３１受容体複合体を発現するＢａ／ｆ３－ＯＩ細胞を試験した。結果は、ＳＴＡＴ－３リン酸化がＢａｆ３－ＯＩ細胞（■）内でＩＬ－３１によって用量依存的に誘導されたことを示しており、（ｉ）イヌＩＬ－３１受容体複合体が細胞表面上で首尾よく発現されること、（ｉｉ）ＩＬ－３１受容体へのイヌＩＬ－３１の結合が内因性ＳＴＡＴ３リン酸化を刺激し得ること、および（ｉｉｉ）次いで、その下流のシグナル伝達経路を開始させることを暗示している。対照としてＢａ／ｆ３細胞（●）を使用した。

【図５】Ｂａ／ｆ３－ＯＩ細胞内のＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害。結果は、抗体１０Ａ１２（▼）および４７Ｆ３（■）によるＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示す。ｃＩＬ－３１を含む培地（Ｘ）または含まない培地（＋）を対照として使用した。

【図６Ａ】ＥＬＩＳＡによって評価した場合のラムダ（Ｌ）軽鎖またはカッパ（ｋ）軽鎖のいずれかを含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体の結合を示す。図６Ａは、ＥＬＩＳＡによって評価した場合のラムダ（Ｌ）軽鎖を含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体（ｃＡ１２）の結合を示す。キメララット／イヌ化：キメラ１０Ａ１２［●］、イヌ化１０Ａ１２ＶＨ１ＶＬ５［∇］、イヌ化１０Ａ１２ＶＨ１ＶＬ６［■］、イヌ化１０Ａ１２ＶＨ２ＶＬ５［▲］およびイヌ化１０Ａ１２ＶＨ２ＶＬ６［▼］。

【図６Ｂ】ＥＬＩＳＡによって評価した場合のラムダ（Ｌ）軽鎖またはカッパ（ｋ）軽鎖のいずれかを含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体の結合を示す。図６Ｂは、ＥＬＩＳＡによって評価した場合のカッパ（ｋ）軽鎖を含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体（２８Ｆ１２）の結合を示す。キメララット／イヌ化：キメラ２８Ｆ１２［●］、イヌ化２８Ｆ１２ＶＨ１ＶＫ３［■］、イヌ化２８Ｆ１２ＶＨ１ＶＫ４［▲］、イヌ化２８Ｆ１２ＶＨ２ＶＫ２［▼］、イヌ化２８Ｆ１２ＶＨ２ＶＫ３［∇］およびイヌ化２８Ｆ１２ＶＨ２ＶＫ４［△］。

【図６Ｃ】ＥＬＩＳＡによって評価した場合のラムダ（Ｌ）軽鎖またはカッパ（ｋ）軽鎖のいずれかを含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体の結合を示す。図６Ｃは、ＥＬＩＳＡによって評価した場合のカッパ（ｋ）軽鎖を含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体（４４Ｅ２）の結合を示す。キメララット／イヌ化：キメラ４４Ｅ２［●］、イヌ化４４Ｅ２ＶＨ２ＶＫ１［■］、イヌ化４４Ｅ２ＶＨ２ＶＫ２［▲］、イヌ化４４Ｅ２ＶＨ５ＶＫ１［▼］、イヌ化４４Ｅ２ＶＨ５ＶＫ２［∇］およびイヌ化４４Ｅ２ＶＨ４ＶＫ１［△］。結果は、イヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体がイヌＩＬ－３１ＲＡに結合することを示す。

【図７Ａ】ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示すグラフである。図７Ａは、ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体（ｃ１０Ａ１２）によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示す。キメララット／イヌ化：キメラ１０Ａ１２［●］およびイヌ化１０Ａ１２ＶＨ２ＶＬ６［■］。

【図７Ｂ】ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示すグラフである。図７Ｂは、ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体（ｃ２８Ｆ１２）によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示す。キメララット／イヌ化：キメラ２８Ｆ１２［●］、イヌ化２８Ｆ１２ＶＨ２Ｋ２［■］およびイヌ化２８Ｆ１２ＶＨ２ＶＫ３［▲］。

【図７Ｃ】ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示すグラフである。ＳＴＡＴ－３リン酸化を阻害する能力について、イヌ化１０Ａ１２、イヌ化ｃ２８Ｆ１２およびイヌ化４４Ｅ２と呼ばれる３つの異なるイヌ化モノクローナル抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体を評価した。図７Ｃは、ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体（ｃ４４Ｅ２）によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示す。キメララット／イヌ化：キメラｃ４４Ｅ２［●］、イヌ化４４Ｅ２ＶＨ２ＶＫ１［■］、イヌ化４４Ｅ２ＶＨ２ＶＫ２［▲］およびイヌ化４４Ｅ２ＶＨ５ＶＫ２［▼］。データは、３つの抗体がいずれも、ＩＬ－３１の存在下でＳＴＡＴ－３リン酸化の用量依存的阻害をもたらすことを示す。

【図８Ａ】それぞれ抗体１０Ａ１２、２８Ｆ１２および４４Ｅ２についてイヌＩＬ－３１ＲＡ上のエピトープを示す。図８Ａは、それぞれ配列番号１０４および配列番号１０５のアミノ酸配列を示す。

【図８Ｂ】それぞれ抗体１０Ａ１２、２８Ｆ１２および４４Ｅ２についてイヌＩＬ－３１ＲＡ上のエピトープを示す。図８Ｂは、配列番号１０１のアミノ酸配列を示す。

【図８Ｃ】それぞれ抗体１０Ａ１２、２８Ｆ１２および４４Ｅ２についてイヌＩＬ－３１ＲＡ上のエピトープを示す。図８Ｃは、それぞれ配列番号１０２および配列番号１０３の

アミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【００３１】

アトピー性皮膚炎のためのさらに良好な治療法の必要性に応えて、本発明は、アトピー性皮膚炎に関連する皮膚炎症に対して顕著な効果を達成することができる製剤および方法を提供する。

【００３２】

略語

本発明の詳細な説明および実施例を通して、以下の略語が使用される：

ＡＤＣＣ　抗体依存性細胞傷害

ＣＤＣ　補体依存性細胞傷害

ＣＤＲ　Ｋａｂａｔナンバリングシステムを使用して定義される、免疫グロブリン可変領域内の相補性決定領域

ＥＣ５０　５０％の効果または結合をもたらす濃度

ＥＬＩＳＡ　酵素結合免疫吸着測定法

ＦＲ　抗体フレームワーク領域：ＣＤＲ領域を除く免疫グロブリン可変領域

ＩＣ５０　５０％の阻害をもたらす濃度

ＩｇＧ　免疫グロブリンＧ

Ｋａｂａｔ　Ｅｌｖｉｎ　Ａ．Ｋａｂａｔ［Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）］によって開発された免疫グロブリンのアライメントおよびナンバリングシステム

ｍＡｂ　モノクローナル抗体（同じくＭａｂまたはＭＡｂ）

Ｖ領域　異なる抗体間で配列が可変である、ＩｇＧ鎖のセグメント。

ＶＨ　免疫グロブリン重鎖可変領域

ＶＬ　免疫グロブリンラムダ軽鎖可変領域

ＶＫ　免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域

【００３３】

定義

本発明がさらに容易に理解され得るように、特定の技術用語および科学用語を以下に具体的に定義する。本明細書の他の箇所で具体的に定義されていない限り、本明細書で使用される他のすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。

【００３４】

添付の特許請求の範囲を含む本明細書で使用される場合、単語の単数形、例えば、「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに別段の指示をしない限り、それらの対応する複数の言及を含む。

【００３５】

「投与」および「治療」は、動物、例えば、イヌ被験体、細胞、組織、器官または生体体液に適用される場合、外因性の医薬品、治療剤、診断剤または組成物と動物、例えば、イヌ被験体、細胞、組織、器官または生体体液との接触を指す。細胞の処理は、試薬と細胞との接触、および流体が細胞と接触している場合、試薬と流体との接触を包含する。

【００３６】

「投与」および「処理」はまた、例えば、試薬、診断化合物、結合化合物または別の細胞による細胞のインビトロおよびエクスビボ処理を意味する。用語「被験体」は、任意の生物、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物（例えば、イヌ、ネコまたはヒト）、最も好ましくはイヌを含む。

【００３７】

「治療（ｔｒｅａｔ）」または「治療すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」は、治療剤、例

えば、本発明の抗体のいずれかを含有する組成物を、例えば、１つ以上の症状を有するか、またはその薬剤が治療活性を有する病態を有することが疑われるイヌ被験体または患者に内部的または外部的に投与することを意味する。典型的には、薬剤は、任意の臨床的に測定可能な程度だけそのような（１または複数の）症状の退縮を誘導するか、またはそのような（１または複数の）症状の進行を阻害することによってであろうとなかろうと、治療された被験体または集団の１つ以上の疾患／病態症状を緩和および／または改善するのに有効な量で投与される。任意の特定の疾患／病態症状を緩和するのに有効な治療剤の量（「治療有効量」とも呼ばれる）は、疾患／病態、患者（例えば、イヌ）の年齢および体重、ならびに被験体において所望の応答を誘発する医薬組成物の能力などの因子によって変動し得る。疾患／病態症状が緩和または改善されたかどうかは、その症状の重症度または進行状態を評価するために獣医または他の熟練した医療提供者によって典型的に使用される任意の臨床測定によって評価することができる。本発明の実施形態（例えば、治療方法または製造品）は、あらゆる被験体の（１または複数の）標的疾患／病態症状を緩和するのに有効ではない可能性があるが、当技術分野で公知の任意の統計学的検定、例えば、スチューデントのｔ検定、カイ二乗検定、マン・ホイットニーによるＵ検定、クラスカル・ワリス検定（Ｈ検定）、ヨンクヒール・ターペストラ検定およびウィルコクソン検定によって決定されるように、統計学的に有意な数の被験体の（１または複数の）標的疾患／病態症状を緩和するはずである。

【００３８】

ヒト、獣医学的（例えば、イヌ）被験体または研究被験体に適用される「治療」は、治療的処置、ならびに研究および診断の用途を指す。ヒト、獣医学的（例えば、イヌ）被験体もしくは研究被験体、または細胞、組織もしくは器官に適用される「治療」は、本発明の抗体と、例えば、イヌもしくは他の動物被験体、細胞、組織、生理学的区画または生理学的流体との接触を包含する。

【００３９】

本明細書で使用される場合、用語「イヌ」は、別段の指定がない限り、あらゆる家畜イヌ、カニス・ルプス・ファミリアリス（Ｃａｎｉｓ　ｌｕｐｕｓ　ｆａｍｉｌｉａｒｉｓ）またはカニス・ファミリアリス（Ｃａｎｉｓ　ｆａｍｉｌｉａｒｉｓ）を含む。

【００４０】

本明細書で使用される場合、用語「ネコ」は、ネコ科の任意のメンバーを指す。この科のメンバーには、野生、動物園および家畜のメンバー、例えば、飼いネコ、純血種および／または雑種の伴侶ネコ、キャットショー用ネコ、実験室用ネコ、クローン化ネコならびにヤマネコまたは野ネコが含まれる。

【００４１】

本明細書で使用される場合、用語「イヌフレーム」は、本明細書でＣＤＲ残基として定義される超可変領域残基以外の、イヌ抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を指す。イヌ化抗体に関して、大部分の実施形態では、天然のイヌＣＤＲのアミノ酸配列は、両鎖において対応する外来ＣＤＲ（例えば、マウス抗体またはラット抗体由来のもの）によって置換される。イヌ抗体の重鎖および／または軽鎖は、例えば、下記に例示されるように、および／または参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第１０，１０６，６０７号に開示されるように、イヌ抗体内の外来ＣＤＲの立体配座を保存するために、および／またはＦｃ機能を改変するために、いくつかの外来非ＣＤＲ残基を含有していてもよい。

【００４２】

「Ｆｃ」と略記される「断片結晶化可能領域」は、Ｆｃ受容体と呼ばれる細胞表面受容体と相互作用する、抗体のＣＨ３－ＣＨ２部分に対応する。４つのイヌＩｇＧの各々のイヌ断片結晶化可能領域（ｃＦｃ）は、Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．によって最初に記載された［Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．８０：２５９－２７０（２００１）；また、Ｂｅｒｇｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．１５７：３１－４１（２０１４）および米国特許第１０，１０６，６０７

号を参照］。

【００４３】

本明細書で使用される場合、イヌＦｃ（ｃＦｃ）「ＩｇＧ－Ｂｍ」は、ＩｇＧ－Ｂの配列番号７８のアミノ酸配列（下記参照）のように、かつｃ末端リジン（「Ｋ」）を有しない、２つのアミノ酸残基置換Ｄ３１ＡおよびＮ６３Ａを含むイヌＩｇＧ－Ｂ　Ｆｃである。配列番号７７の３１位のアスパラギン酸残基（Ｄ）および配列番号７７の６３位のアスパラギン残基（Ｎ）はいずれも、ＩｇＧ－Ｂｍではアラニン残基（Ａ）によって置換されている。これらの２つのアミノ酸残基置換は、天然に存在するイヌＩｇＧ－Ｂの抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を顕著に減少させるのに役立つ［参照によりその内容全体が本明細書に組み込まれる米国特許第１０，１０６，６０７号を参照］。ＩｇＧ－Ｂｍに対するさらなるアミノ酸置換も想定され、これはＩｇＧ－Ｂ内で行われ得るものと並行し、二重特異性抗体におけるヘテロ二量体形成を促進するためのアミノ酸置換を含み得る。ＩｇＧ－Ｂのアミノ酸配列、配列番号７７は、以下の通りである：

【化１】

```
1                                                  50
LGGPSVFIFP PKPKDTLLIA RTPEVTCVVV DLDPEDPEVQ ISWFVDGKQM
└→ CH2

51                                                100
QTAKTQPREE QFNGTYRVVS VLPIGHQDWL KGKQFTCKVN NKALPSPIER

101                                               150
TISKARGQAH QPSVYVLPPS REELSKNTVS LTCLIKDFFP PDIDVEWQSN
      └→ CH3

151                                               200
GQQEPESKYR TTPPQLDEDG SYFLYSKLSV DKSRWQRGDT FICAVMHEAL

201         215
HNHYTQKSLS HSPGK
```

ＩｇＧ－Ｂｍのアミノ酸配列、配列番号７８を以下に示す。

【化２】

```
LGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAG
TYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNT
VSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI
CAVMHEALHNHYTQESLSHSPG
```

【００４４】

本明細書で使用される場合、抗体のアミノ酸配列内の別のアミノ酸残基による「アミノ酸残基の置換（ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｎ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ　ｒｅｓｉｄｕｅ）」は、例えば、別のアミノ酸残基によって「アミノ酸残基を置換すること（ｒｅｐｌａｃｉｎｇ　ａｎ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ　ｒｅｓｉｄｕｅ）」と等価であり、ア

ミノ酸配列内の特定の位置にある特定のアミノ酸残基が、異なるアミノ酸残基に置換されている（ｒｅｐｌａｃｅｄ）（または置換されている（ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｅｄ））ことを示す。そのような置換は、具体的に設計され得、すなわち、例えば、組換えＤＮＡ技術によって、アミノ酸配列内の特定の位置でアラニンをセリンによって意図的に置換することができる。あるいは、抗体の特定のアミノ酸残基または一連のアミノ酸残基は、例えば、細胞によって産生された抗体がその抗原上の所与の領域、例えば、エピトープもしくはその一部を含有するものに結合する能力に基づいて、および／または抗体が、置換されているＣＤＲと同じカノニカル構造を保持する特定のＣＤＲを含むために、さらに自然な選択プロセスを介して１つ以上のアミノ酸残基によって置換され得る。そのような置換（ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）／置換（ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ）は、「変異体」ＣＤＲおよび／または変異体抗体をもたらし得る。

【００４５】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、所望の生物学的活性を示す抗体の任意の形態を指す。抗体は、単量体、二量体またはさらに大きな多量体であり得る。したがって、用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、限定するものではないが、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、イヌ化抗体、完全イヌ抗体、キメラ抗体およびラクダ化単一ドメイン抗体を具体的に包含する。「親抗体」は、意図する用途のための抗体の改変、例えば、イヌ治療用抗体として使用するための抗体のイヌ化の前に、免疫系を抗原に曝露することによって得られる抗体である。

【００４６】

本明細書で使用される場合、例えば、その結合パートナー（リガンド）へのイヌ受容体を「遮断する」または「遮断している」またはその「結合を遮断している」、本発明の抗体は、標準的な結合アッセイ（例えば、ＢＩＡＣｏｒｅ（登録商標）、ＥＬＩＳＡまたはフローサイトメトリー）で決定される場合、そのイヌリガンドへのイヌ受容体の結合を（部分的または完全に）遮断する抗体であり、逆もまた同様である。

【００４７】

典型的には、本発明の抗体または抗原結合断片は、その活性がモルベースで表される場合、（親抗体と比較すると）そのイヌ抗原結合活性の少なくとも１０％を保持する。好ましくは、本発明の抗体または抗原結合断片は、親抗体としてのイヌ抗原結合親和性の少なくとも２０％、５０％、７０％、８０％、９０％、９５％もしくは１００％またはそれ以上を保持する。本発明の抗体または抗原結合断片が、その生物学的活性を実質的に変化させない保存的または非保存的アミノ酸置換を含み得る（抗体の「保存的変異体」または「機能保存変異体」と呼ばれる）ことも意図される。

【００４８】

「単離された抗体」は、精製状態を指し、そのような文脈では、分子が、他の生物学的分子、例えば、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、または他の材料、例えば、細胞残屑および増殖培地を実質的に含まないことを意味する。一般に、用語「単離された」は、本明細書に記載の結合化合物の実験的または治療的使用を実質的に妨げる量で存在しない限り、そのような材料が完全に存在しないこと、または水、緩衝液もしくは塩が存在しないことを指すことを意図しない。

【００４９】

本明細書で使用される場合、抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡのアミノ酸配列の一部を含むポリペプチドに結合するが、イヌＩＬ－３１ＲＡの配列のその部分を欠く他のイヌタンパク質には結合しない場合、所与の抗原配列（この場合、イヌＩＬ－３１ＲＡのアミノ酸配列の一部）を含むポリペプチドに特異的に結合すると言われる。例えば、イヌＩＬ－３１ＲＡを含むポリペプチドに特異的に結合する抗体は、イヌＩＬ－３１ＲＡのＦＬＡＧ（登録商標）タグ付き形態に結合し得るが、他のＦＬＡＧ（登録商標）タグ付きイヌタンパク質には結合しない。抗体、または抗体の抗原結合部位に由来する結合化合物は、そのイヌ抗原、またはその変異体もしくはムテインに対して、試験された任意の他のイヌ抗原に対

する親和性の少なくとも１０倍、さらに好ましくは少なくとも２０倍、さらになお好ましくは少なくとも１００倍の親和性を有する場合、そのイヌ抗原、またはその変異体もしくはムテインに「特異性を以って」結合する。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗体」は、第１の抗体由来の可変ドメインと、第２の抗体由来の定常ドメインとを有する抗体であり、第１の抗体と第２の抗体とは異なる種に由来する。［米国特許第４，８１６，５６７号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１－６８５５（１９８４）］。典型的には、可変ドメインは、齧歯類などの実験動物由来の抗体（「親抗体」）から得られ、定常ドメイン配列は、動物被験体抗体、例えば、ヒトまたはイヌから得られ、その結果、得られたキメラ抗体は、親（例えば、齧歯類）抗体よりも、ヒトまたはイヌ被験体においてそれぞれ有害な免疫応答を誘発する可能性が低くなる。

【００５１】

本明細書で使用される場合、用語「イヌ化抗体」は、イヌ抗体および非イヌ（例えば、ラット）抗体の両方由来の配列を含有する抗体の形態を指す。一般に、イヌ化抗体は、少なくとも１つ以上、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全部を含み、ここで、超可変ループの全部または実質的に全部は、非イヌ免疫グロブリン（例えば、以下に例示されるような６つのＣＤＲを含む）のものに対応し、フレームワーク（ＦＲ）領域の全部または実質的に全部（および典型的には残りのフレームの全部または実質的に全部）は、イヌ免疫グロブリン配列のものである。本明細書で例示されるように、イヌ化抗体は、イヌフレームまたは改変イヌフレームとともに、ラット抗イヌ抗原抗体由来の３つの重鎖ＣＤＲおよび３つの軽鎖ＣＤＲの両方を含む。改変イヌフレームは、例えば、イヌ抗原へのその結合、および／またはイヌ抗原の天然結合パートナーへのそのイヌ抗原の結合を遮断する能力を増加させるために、イヌ化抗体の有効性をさらに最適化する、本明細書に例示される１つ以上のアミノ酸変化を含む。

【００５２】

各軽鎖／重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。したがって、一般に、インタクトな抗体は２つの結合部位を有する。二機能性抗体または二重特異性抗体を除いて、２つの結合部位は一般に同じである。典型的には、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）内に位置する、相補性決定領域（ＣＤＲ）とも呼ばれる３つの超可変領域を含む。ＣＤＲは、通常、フレームワーク領域によってアライメントされ、特定のエピトープへの結合を可能にする。一般に、Ｎ末端からＣ末端に向かって、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの両方が、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４を含む。各ドメインへのアミノ酸の割当ては、一般に、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｋａｂａｔ，ｅｔ ａｌ．；Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．；５ｔｈ ｅｄ．；ＮＩＨ Ｐｕｂｌ．Ｎｏ．９１－３２４２（１９９１）；Ｋａｂａｔ，Ａｄｖ．Ｐｒｏｔ．Ｃｈｅｍ．３２：１－７５（１９７８）；Ｋａｂａｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５２：６６０９－６６１６（１９７７）；Ｃｈｏｔｈｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）またはＣｈｏｔｈｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７８－８８３（１９８９）］の定義に従う。

【００５３】

本明細書で使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に関与する、抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」（すなわち、軽鎖可変ドメイン内のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３ならびに重鎖可変ドメイン内のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３）由来のアミノ酸残基を含む。［抗体のＣＤＲ領域を配列によって定義するＫａｂａｔ ｅｔ ａｌ．Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ

ｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）を参照されたい。また、抗体のＣＤＲ領域を構造によって定義するＣｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）を参照されたい］。本明細書で使用される場合、用語「フレームワーク」残基または「ＦＲ」残基は、本明細書でＣＤＲ残基として定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を指す。

【００５４】

イヌＩｇＧの４つの公知のＩｇＧ重鎖サブタイプが存在し、それらは、ＩｇＧ－Ａ、ＩｇＧ－Ｂ、ＩｇＧ－ＣおよびＩｇＧ－Ｄと呼ばれる。２つの公知の軽鎖サブタイプは、ラムダおよびカッパと呼ばれる。本発明の具体的な実施形態では、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合することに加えて、本発明のその抗原に対するイヌ抗体またはイヌ化抗体は、最適には以下の２つの属性を有する：

１．抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）などのエフェクター機能の欠如、ならびに

２．プロテインＡクロマトグラフィーに基づくものなどの業界標準技術を使用して、大規模で容易に精製されること。

【００５５】

天然に存在するイヌＩｇＧアイソタイプはいずれも、両基準を満たさない。例えば、ＩｇＧ－Ｂは、プロテインＡを使用して精製することができるが、高レベルのＡＤＣＣ活性を有する。一方、ＩｇＧ－Ａは、プロテインＡに弱く結合するが、ＡＤＣＣ活性も示す。さらに、ＩｇＧ－ＤはＡＤＣＣ活性を示さないが、ＩｇＧ－ＣもＩｇＧ－ＤもプロテインＡカラムを用いて精製することはできない。（ＩｇＧ－Ｃは、かなりのＡＤＣＣ活性を有する）。本発明がこれらの問題に対処する１つの方法は、ＡＤＣＣなどのエフェクター機能を欠き、業界標準のプロテインＡクロマトグラフィーを使用して容易に精製され得る、本発明の抗原に特異的な本発明の改変イヌＩｇＧ－Ｂ抗体を提供することによる。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「鎮痒剤」は、かゆみを阻害、軽減および／または予防する傾向がある化合物、高分子および／または製剤である。鎮痒剤は、かゆみ止め薬と口語的に呼ばれる。

【００５７】

本明細書で使用される場合、「鎮痒抗体」は、特にアトピー性皮膚炎に関して、ヒト、イヌおよび／またはネコなどの哺乳動物を含む動物では、鎮痒剤として作用することができる抗体である。特定の実施形態では、鎮痒抗体は、ＩＬ－３１またはその受容体ＩＬ－３１ＲＡなどのＩＬ－３１シグナル伝達経路の特定のタンパク質に結合する。その対応する抗原（例えば、ＩＬ－３１またはＩＬ－３１ＲＡ）への鎮痒抗体の結合は、例えば、ＩＬ－３１とＩＬ－３１ＲＡとの結合を阻害し、この経路の良好なシグナル伝達を妨害および／または防止し、それによって、ＩＬ－３１シグナル伝達経路によって普通なら引き起こされるかゆみを阻害、軽減および／または予防する。

【００５８】

本明細書で使用される「相同性」は、２つのポリヌクレオチド配列間または２つのポリペプチド配列が最適にアライメントされた際のそれらの間の配列類似性を指す。２つの比較される配列の両方における位置が同じ塩基またはアミノ酸残基によって占められている場合、例えば、２つのＤＮＡ分子の各々における位置がアデニンによって占められている場合、該分子はその位置で相同である。相同性のパーセントは、比較した位置の総数×１００で割った、２つの配列が共有する相同位置の数である。例えば、配列が最適にアライメントされた際に、２つの配列内の位置１０個のうちの６個が一致するかまたは相同である場合、２つの配列は６０％相同である。一般に、比較は、２つの配列が最大パーセントの相同性をもたらすようにアライメントされた際に行われる。配列同一性とは、２つの配列が最適にアライメントされた際に、２つのポリペプチドのアミノ酸が同等の位置で同じである程度を指す。本明細書で使用される場合、両配列のアミノ酸残基が同一である場合、１つのアミノ酸配列は、第２のアミノ酸配列に対して１００％「同一」である。したが

って、２つのアミノ酸配列のアミノ酸残基の５０％が同一である場合、アミノ酸配列は、第２のアミノ酸配列と５０％「同一」である。配列比較は、所与のタンパク質、例えば、比較されるタンパク質、またはポリペプチドの一部に含まれるアミノ酸残基の連続したブロックに対して行われる。特定の実施形態では、普通なら２つのアミノ酸配列間の対応を変更する可能性がある選択された欠失または挿入が考慮に入れられる。配列類似性には、同一の残基、および同一でない生化学的に関連するアミノ酸が含まれる。同様の特性を共有し、交換可能であり得る生化学的に関連するアミノ酸。

【００５９】

「保存的に改変された変異体」または「保存的置換」は、タンパク質の生物学的活性を変化させることなく変化を頻繁に加えることができるような、類似の特徴（例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性／親水性、主鎖立体配座および剛性など）を有する他のアミノ酸によるタンパク質内のアミノ酸の置換を指す。当業者であれば、一般に、ポリペプチドの非必須領域内の単一アミノ酸置換が生物学的活性を実質的に変化させないことを認識している［例えば、Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｇｅｎｅ，Ｔｈｅ Ｂｅｎｊａｍｉｎ／Ｃｕｍｍｉｎｇｓ Ｐｕｂ．Ｃｏ．，ｐ．２２４（４ｔｈ Ｅｄ．；１９８７）を参照］。さらに、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物学的活性を破壊する可能性が低い。例示的な保存的置換を直下の表Ａに示す。

【００６０】

【表１】

表 A

例示的な保存的アミノ酸置換

元の残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala; Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

【００６１】

本発明の抗体の機能保存的変異体も本発明によって企図される。本明細書で使用される「機能保存的変異体」は、所望の特性、例えば、抗原親和性および／または特異性を変化

させることなく１つ以上のアミノ酸残基が変化された抗体または断片を指す。そのような変異体には、限定するものではないが、上記の表Ａの保存的アミノ酸置換など、同様の特性を有するものによるアミノ酸の置換が含まれる。

【００６２】

「単離された核酸分子」は、単離されたポリヌクレオチドが自然界で見出されるか、または自然界では連結されていないポリヌクレオチドに連結されている、ポリヌクレオチドの全部または一部に関連しない、ゲノム、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡもしくは合成起源またはそれらの何らかの組合せのＤＮＡまたはＲＮＡを意味する。本開示の目的のために、特定のヌクレオチド配列「を含む核酸分子」は、インタクトな染色体を包含しないことを理解されたい。指定された核酸配列「を含む」単離された核酸分子は、指定された配列に加えて、最大１０もしくはさらには最大２０もしくはそれ以上の他のタンパク質もしくはその一部もしくは断片のコード配列を含み得るか、または列挙された核酸配列のコード領域の発現を制御する作動可能に連結された調節配列を含み得るか、および／またはベクター配列を含み得る。

【００６３】

本発明は、本発明の単離されたイヌ化抗体、病態の治療、例えば、イヌのアトピー性皮膚炎の治療における抗体の使用方法を提供する。イヌでは、Ａ、Ｂ、ＣおよびＤと呼ばれる４つのＩｇＧ重鎖が存在する。これらの重鎖は、ＩｇＧ－Ａ（またはＩｇＧＡ）、ＩｇＧ－Ｂ（またはＩｇＧＢ）、ＩｇＧ－Ｃ（またはＩｇＧＣ）およびＩｇＧ－Ｄ（またはＩｇＧＤ）と呼ばれる、イヌＩｇＧの４つの異なるサブクラスを表す。２つの重鎖の各々は、１つの可変ドメイン（ＶＨ）と、ＣＨ－１、ＣＨ－２およびＣＨ－３と呼ばれる３つの定常ドメインとからなる。ＣＨ－１ドメインは、「ヒンジ」あるいは「ヒンジ領域」と呼ばれるアミノ酸配列を介してＣＨ－２ドメインに接続される。

【００６４】

これらの４つの重鎖の核酸配列およびアミノ酸配列は、Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．によって最初に同定された［Ｖｅｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．８０：２５９－２７０（２００１）］。これらの重鎖のアミノ酸配列および核酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋデータベースからも入手可能である。例えば、ＩｇＧＡ重鎖のアミノ酸配列はアクセッション番号ＡＡＬ３５３０１．１を有し、ＩｇＧＢはアクセッション番号ＡＡＬ３５３０２．１を有し、ＩｇＧＣはアクセッション番号ＡＡＬ３５３０３．１を有し、ＩｇＧＤはアクセッション番号（ＡＡＬ３５３０４．１）を有する。イヌ抗体はまた、２種類の軽鎖、カッパおよびラムダを含有する。これらの軽鎖のＤＮＡおよびアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋデータベースから入手することができる。例えば、カッパ軽鎖アミノ酸配列はアクセッション番号ＡＢＹ　５７２８９．１を有し、ラムダ軽鎖はアクセッション番号ＡＢＹ　５５５６９．１を有する。

【００６５】

本発明では、４つのイヌＩｇＧ　Ｆｃ断片の各々のアミノ酸配列は、Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ（前出）によって決定されたＣＨ１ドメインおよびＣＨ２ドメインの同定された境界に基づく。イヌＩＬ－３１ＲＡに結合するイヌ化ラット抗イヌ抗体には、限定するものではないが、イヌＩｇＧ－Ａ重鎖、イヌＩｇＧ－Ｂ重鎖、イヌＩｇＧ－Ｃ重鎖およびイヌＩｇＧ－Ｄ重鎖および／またはイヌカッパ軽鎖もしくはイヌラムダ軽鎖をラット抗イヌＩＬ－３１ＲＡ　ＣＤＲとともに含む本発明の抗体が含まれる。したがって、本発明は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合し、好ましくはまた、イヌＩＬ－３１に対するそのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合を遮断する単離されたイヌ化ラット抗イヌ抗体を含む、本発明のイヌ化ラット抗イヌ抗体を提供する。

【００６６】

したがって、本発明は、イヌ化ラット抗体、および病態の治療、例えば、イヌのアトピー性皮膚炎の治療における本発明の抗体の使用方法をさらに提供する。

【００６７】

本発明は、イヌ化抗体を作製するために対応する軽鎖と適合させることができる完全長

イヌ重鎖をさらに提供する。したがって、本発明は、本発明のイヌ化ラット抗イヌ抗原抗体（単離されたイヌ化ラット抗イヌ抗体を含む）、および病態の治療、例えば、イヌのアトピー性皮膚炎の治療における本発明の抗体の使用方法をさらに提供する。

【００６８】

本発明はまた、１つ以上のエフェクター機能を増大させるために、低下させるために、または排除するためにｃＦｃが遺伝子改変されているイヌ断片結晶化可能領域（ｃＦｃ領域）を含む本発明の抗体を提供する。本発明の一態様では、遺伝子改変ｃＦｃは、１つ以上のエフェクター機能を低下させるかまたは排除する。本発明の別の態様では、遺伝子改変ｃＦｃは、１つ以上のエフェクター機能を増大させる。ある特定の実施形態では、遺伝子改変ｃＦｃ領域は、遺伝子改変イヌＩｇＧＢ　Ｆｃ領域である。別のそのような実施形態では、遺伝子改変ｃＦｃ領域は、遺伝子改変イヌＩｇＧＣ　Ｆｃ領域である。特定の実施形態では、エフェクター機能は、増大されるか、低下されるか、または排除される抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）である。別の実施形態では、エフェクター機能は、増大されるか、低下されるか、または排除される補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）である。さらに別の実施形態では、ｃＦｃ領域は、ＡＤＣＣおよびＣＤＣの両方を増大させるか、低下させるか、または排除するように遺伝子改変されている。

【００６９】

エフェクター機能を欠く、イヌＩｇＧの変異体を生成するために、多数の変異イヌＩｇＧＢ重鎖が生成された。これらの変異体は、重鎖アミノ酸配列のＦｃ部分に、以下の単一または組合せの置換、すなわち、Ｐ４Ａ、Ｄ３１Ａ、Ｎ６３Ａ、Ｇ６４Ｐ、Ｔ６５Ａ、Ａ９３ＧおよびＰ９５Ａのうちの１つ以上を含み得る。変異体重鎖（すなわち、そのようなアミノ酸置換を含有する）は、発現プラスミドにクローニングされ、軽鎖をコードする遺伝子を含有するプラスミドとともにＨＥＫ　２９３細胞にトランスフェクトされる。インタクトな抗体が、ＨＥＫ　２９３細胞から発現および精製され、次いで、免疫エフェクター機能の媒介に関するそれらの可能性について評価するために、ＦｃγＲＩおよびＣ１ｑへの結合について評価され得る。［参照によりその内容全体が本明細書に組み込まれる米国特許第１０，１０６，６０７号を参照。］

【００７０】

本発明はまた、その天然のＩｇＧ－Ｄヒンジ領域の代わりに、以下からのヒンジ領域を含む改変イヌＩｇＧ－Ｄを提供する：

【化３】

IgG-A:	FNECRCTDTPPCPVPEP	配列番号: 79
IgG-B:	PKRENGRVPRPPDCPKCPAPEM	配列番号: 80;または
IgG-C:	AKECECKCNCNNCPCPGCGL	配列番号: 81.

【００７１】

あるいは、ＩｇＧ－Ｄヒンジ領域は、セリン残基をプロリン残基によって置換することによって、すなわち、

【化４】

PKESTCKCI**P**PCPVPES,　配列番号: 82

によって遺伝子改変され得る（下線を引かれ、太字のプロリン残基（Ｐ）により、天然に存在するセリン残基を置換する）。そのような改変は、ｆａｂアーム交換を欠くイヌＩｇＧ－Ｄをもたらすことができる。改変イヌＩｇＧ－Ｄは、組換えＤＮＡ技術の標準的な方法を使用して構築され得る［例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（１９８２）］。これらの変異体を構築するために、イヌＩｇＧ－Ｄのアミノ酸配列をコードする核酸は、改変ＩｇＧ－Ｄをコードするように改変され得る。次いで、改変された核酸配列は、タンパク

質発現のために発現プラスミドにクローニングされる。

【００７２】

本明細書に記載のイヌ化ラット抗イヌ抗体の６つの相補性決定領域（ＣＤＲ）は、ラット軽鎖ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３を含むイヌ抗体カッパ（ｋ）軽鎖またはイヌ抗体ラムダ（ｌ）軽鎖と、ラット重鎖ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３を含むイヌ抗体重鎖ＩｇＧとを含むことができる。

【００７３】

核酸

本発明は、本発明の抗体をコードする核酸をさらに含む（例えば、以下の実施例を参照）。

【００７４】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって比較が行われる場合、本明細書で提供される変化しないＣＤＲを除いて、イヌ化抗体のアミノ酸配列と少なくとも約７０％同一、好ましくは少なくとも約８０％同一、さらに好ましくは少なくとも約９０％同一、最も好ましくは少なくとも約９５％同一（例えば、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％）であるアミノ酸配列を含む免疫グロブリンポリペプチドをコードする核酸も本発明に含まれ、ここで、アルゴリズムのパラメーターは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列間の最大一致を与えるように選択される。本発明は、ＢＬＡＳＴアルゴリズムを用いて比較が行われる場合、参照アミノ酸配列のいずれかと少なくとも約７０％類似する、好ましくは少なくとも約８０％類似する、さらに好ましくは少なくとも約９０％類似する、最も好ましくは少なくとも約９５％類似する（例えば、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％）アミノ酸配列を含む免疫グロブリンポリペプチドをコードする核酸をさらに提供し、ここで、アルゴリズムのパラメーターは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列間の最大一致を与えるように選択される。

【００７５】

本明細書で使用される場合、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列のパーセント同一性は、アライメントのデフォルトパラメーター、および同一性のためのデフォルトパラメーターとともに、Ｃ，ＭａｃＶｅｃｔｏｒ（ＭａｃＶｅｃｔｏｒ，Ｉｎｃ．Ｃａｒｙ，ＮＣ ２７５１９）、Ｖｅｃｔｏｒ ＮＴＩ（Ｉｎｆｏｒｍａｘ，Ｉｎｃ．ＭＤ）、Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｇｒｏｕｐ ＰＬＣ（１９９６）およびＣｌｕｓｔａｌ Ｗアルゴリズムを使用して決定することができる。これらの市販のプログラムは、同じまたは類似のデフォルトパラメーターを使用して配列類似性を決定するために使用することもできる。あるいは、例えば、デフォルトパラメーターを使用するＧＣＧ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｐｒｏｇｒａｍ Ｍａｎｕａｌ ｆｏｒ ｔｈｅ ＧＣＧ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ７，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）のパイルアッププログラムを使用して、デフォルトのフィルター条件下でＡｄｖａｎｃｅｄ Ｂｌａｓｔ検索を使用することができる。

【００７６】

以下の参考文献は、配列分析に使用されることが多いＢＬＡＳＴアルゴリズムに関する：ＢＬＡＳＴ ＡＬＧＯＲＩＴＨＭＳ：Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）；Ｇｉｓｈ，Ｗ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．３：２６６－２７２（１９９３）；Ｍａｄｄｅｎ，Ｔ．Ｌ．，ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：１３１－１４１（１９９６）；Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７）；Ｚｈａｎｇ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．７：６４９－６５６（１９９７）；Ｗｏｏｔｔｏｎ，Ｊ．Ｃ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｕｔ．Ｃｈｅｍ．１７：１４９－１６３（１９９３）；Ｈａｎｃｏｃｋ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．１０：６７－７０（１９９４）；ＡＬＩＧＮＭＥＮＴ ＳＣＯＲＩＮＧ ＳＹＳＴＥＭＳ：Ｄａｙｈｏｆｆ，Ｍ．Ｏ．，ｅｔ ａｌ．，“Ａ ｍｏｄｅｌ ｏｆ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｃｈａｎｇ

e in proteins.”in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol.5, suppl.3. M.O.Dayhoff (ed.), pp.345−352, (1978);Natl.Biomed.Res.Found., Washington, DC;Schwartz, R.M., et al.,“Matrices for detecting distant relationships.”in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol.5, suppl.3.“(1978), M.O.Dayhoff (ed.), pp.353−358 (1978), Natl.Biomed.Res.Found., Washington, DC;Altschul, S.F., J.Mol.Biol.219:555−565 (1991);States, D.J., et al., Methods 3:66−70 (1991);Henikoff, S., et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915−10919 (1992);Altschul, S.F., et al., J.Mol.Evol.36:290−300 (1993);ALIGNMENT STATISTICS:Karlin, S., et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264−2268 (1990);Karlin, S., et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873−5877 (1993);Dembo, A., et al., Ann.Prob.22:2022−2039 (1994);およびAltschul, S.F.“Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments.”in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S.Suhai, ed.), pp.1−14, Plenum, New York (1997).

【0077】

抗体タンパク質工学

限定ではなく例として、イヌ重鎖定常領域は、ＩｇＧＡ、ＩｇＧ−Ｂ、ＩｇＧＣ、ＩｇＤ、または改変ｃＦｃ、例えば、本明細書で使用されるＩｇＧ−Ｂｍ［参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第１０，１０６，６０７号を参照］に由来し得、イヌ軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダに由来し得る。

【0078】

抗体は、例えば、抗体の特性を改善するために、親（すなわち、ラット）モノクローナル抗体の可変ドメイン内のイヌフレームワークおよび／またはイヌフレーム残基に対する改変を含むように操作され得る。

【0079】

イヌ化抗イヌＩＬ−３１受容体アルファモノクローナル抗体の構築は、イヌＩｇＧの重鎖および軽鎖をコードするＤＮＡ配列を決定することによって行われ得る。イヌ重鎖およびイヌ軽鎖のＤＮＡおよびタンパク質配列は、当技術分野で公知であり、ＮＣＢＩ遺伝子およびタンパク質データベースを検索することによって得ることができる。上記のように、イヌ抗体については、４つの公知のＩｇＧサブタイプ、すなわち、ＩｇＧ−Ａ、ＩｇＧ−Ｂ、ＩｇＧ−ＣおよびＩｇＧ−Ｄ、ならびに２つのタイプの軽鎖、すなわち、カッパおよびラムダが存在する。

【0080】

イヌ化ラット抗イヌＩＬ−３１抗体は、当該分野で公知の方法によって組換え産生され得る。本明細書に開示される抗体または断片の発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当技術分野で周知であり、American Type Culture Collection（ＡＴＣＣ）から入手可能な多くの不死化細胞株を含む。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＮＳＯ、ＳＰ２細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Ｈｅｐ Ｇ２）、Ａ５４９細胞、３Ｔ３細胞、ＨＥＫ−２９３細胞およ

びいくつかの他の細胞株が含まれる。哺乳動物宿主細胞には、ヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、イヌ細胞、サル細胞、ブタ細胞、ヤギ細胞、ウシ細胞、ウマ細胞およびハムスター細胞が含まれる。どの細胞株が高い発現レベルを有するかを決定することによって、特に好ましい細胞株が選択される。使用され得る他の細胞株には、昆虫細胞株、例えば、Ｓｆ９細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞がある。重鎖またはその抗原結合部分もしくは断片、軽鎖および／またはその抗原結合断片をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、抗体は、宿主細胞内の抗体の発現、またはさらに好ましくは、宿主細胞が増殖している培養培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって産生される。

【００８１】

抗体は、標準的なタンパク質精製方法を使用して、培養培地から回収され得る。さらに、産生細胞株からの本発明の抗体（またはそれ由来の他の部分）の発現は、いくつかの公知の技術を使用して増強され得る。例えば、グルタミンシンテターゼ遺伝子発現系（ＧＳ系）は、特定の条件下で発現を増強するための一般的な手法である。ＧＳ系は、欧州特許第０２１６８４６号、欧州特許第０２５６０５５号および欧州特許第０３２３９９７号、ならびに欧州特許出願第８９３０３９６４．４号に関連して全体的または部分的に説明されている。

【００８２】

ある特定の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、重鎖定常領域、例えば、イヌ定常領域、例えば、ＩｇＧ－Ａ、ＩｇＧ－Ｂ、ＩｇＧ－ＣおよびＩｇＧ－Ｄイヌ重鎖定常領域またはその変異体を含む。ある特定の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、軽鎖定常領域、例えば、イヌ軽鎖定常領域、例えば、ラムダもしくはカッパイヌ軽鎖領域またはその変異体を含む。限定ではなく例として、イヌ重鎖定常領域はＩｇＧ－Ｂ由来であり得、イヌ軽鎖定常領域はカッパ由来であり得る。

【００８３】

エピトープマッピング

抗体とその同族タンパク質抗原との相互作用は、抗体の特異的アミノ酸（パラトープ）と標的抗原の特異的アミノ酸（エピトープ）との結合を介して媒介される。エピトープは、免疫グロブリンによる特異的反応を引き起こす抗原決定基である。エピトープは、抗原の表面上のアミノ酸の群からなる。目的のタンパク質は、異なる抗体によって認識されるいくつかのエピトープを含有し得る。抗体によって認識されるエピトープは、線状エピトープまたは立体配座エピトープとして分類される。線状エピトープは、タンパク質内のアミノ酸の連続配列のストレッチによって形成されるが、立体配座エピトープは、一次アミノ酸配列では不連続である（例えば、遠く離れている）が、三次元タンパク質フォールディング時に一緒にされるアミノ酸から構成される。

【００８４】

エピトープマッピングとは、それらの標的抗原上の抗体によって認識されるアミノ酸配列（すなわち、エピトープ）を同定するプロセスを指す。標的抗原上のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）によって認識されるエピトープの同定は、重要な用途を有する。例えば、それは、新しい治療薬、診断薬およびワクチンの開発を補助することができる。エピトープマッピングはまた、最適化された治療用ｍＡｂの選択を補助し、それらの作用機序の解明を助けることができる。ＩＬ－３１受容体アルファ上のエピトープ情報により、固有のエピトープを解明し、ワクチンの保護効果または病原性効果を定義することもできる。エピトープ同定はまた、同定されたペプチドエピトープと担体タンパク質または他の免疫刺激剤との化学的または遺伝的カップリングに基づくサブユニットワクチンの開発をもたらし得る。

【００８５】

エピトープマッピングは、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して行われ得、エピトープの疑われる性質（すなわち、線状対立体配座）に応じて、いくつかの方法がエピトープ同定に使用される。線状エピトープのマッピングの方が単純であり、比

較的容易に行われる。この目的のために、線状エピトープマッピングのための商業サービスは、多くの場合、ペプチドスキャンを使用する。この場合、標的タンパク質の重複する一連の短いペプチド配列が化学合成され、目的の抗体に結合するそれらの能力について試験される。この戦略は、迅速であり、ハイスループットであり、行うのに比較的安価である。一方、不連続エピトープのマッピングは、比較的技術的に困難であり、モノクローナル抗体とその標的タンパク質とのＸ線共結晶構造解析、水素－重水素（Ｈ／Ｄ）交換、酵素消化と組み合わせた質量分析、および当業者に公知の他のいくつかの方法などのさらに特殊な技術を必要とする。

【００８６】

エピトープ結合および交差遮断抗体

本発明の抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体またはその抗原結合断片には、イヌＩＬ－３１ＲＡでは、本明細書に開示される抗体の１つ、例えば、イヌ化抗体を含む、配列番号１０１のアミノ酸配列を含むエピトープに結合する２８Ｆ１２抗体、および本明細書でイヌＩＬ－３１ＲＡ結合について説明される抗体もしくは断片を（部分的または完全に）交差遮断するか、または本明細書でイヌＩＬ－３１ＲＡ結合について説明される抗体もしくは断片によって（部分的または完全に）交差遮断される任意の抗体または抗原結合断片、ならびにその任意の変異体と同じエピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片が含まれる。

【００８７】

交差遮断抗体および抗原結合断片は、標準的な結合アッセイ（例えば、以下に例示されるようなＢＩＡＣｏｒｅ（登録商標）、ＥＬＩＳＡ、またはフローサイトメトリー）では、例えば、２８Ｆ１２抗体と交差競合するそれらの能力に基づいて同定され得る。例えば、組換えイヌＩＬ－３１ＲＡタンパク質をプレートに固定化し、抗体の１つを蛍光標識し、非標識抗体が標識抗体の結合と競合する能力を評価する標準的なＥＬＩＳＡアッセイを使用することができる。追加的または代替的に、ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）分析を使用して、抗体が交差競合する能力を評価することができる。イヌＩＬ－３１ＲＡに対する２８Ｆ１２抗体の結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体が、イヌＩＬ－３１ＲＡへの結合について２８Ｆ１２抗体と競合することができ、したがって、場合によっては、イヌＩＬ－３１ＲＡ上で、２８Ｆ１２抗体が結合するのと同じエピトープに結合し得ることを実証する。

【００８８】

本発明の抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体または断片のいずれかと同じエピトープに結合する抗体およびその断片も、本発明の一部を形成する。

【００８９】

医薬組成物および投与

本発明の抗体を含む医薬組成物または無菌組成物を調製するために、これらの抗体を薬学的に許容される担体または賦形剤と混合することができる。［例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｕ．Ｓ．Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ：Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ（１９８４）を参照］。

【００９０】

治療剤および診断剤の製剤は、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液または懸濁液の形態の許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することによって調製され得る［例えば、Ｈａｒｄｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ；Ｇｅｎｎａｒｏ（２０００）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ，ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ；Ａｖｉｓ，ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）（１９９３）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｍｅｄｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ；Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，ｅｔ ａｌ．

（ｅｄｓ．）（１９９０）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｔａｂｌｅｔｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ；Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）（１９９０）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｄｉｓｐｅｒｓｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ；Ｗｅｉｎｅｒ ａｎｄ Ｋｏｔｋｏｓｋｉｅ（２０００）Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｎｄ Ｓａｆｅｔｙ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹを参照］。一実施形態では、本発明の抗体は、酢酸ナトリウム溶液ｐＨ５～６中で適切な濃度に希釈され、ＮａＣｌまたはスクロースが張性のために加えられる。安定性を高めるために、ポリソルベート２０またはポリソルベート８０などの追加の薬剤を加えてもよい。

【００９１】

単独で、または別の薬剤と組み合わせて投与される抗体組成物の毒性および治療有効性は、例えば、ＬＤ$_{50}$（集団の５０％に対して致死的な用量）およびＥＤ$_{50}$（集団の５０％において治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物に対する標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性作用と治療効果との間の用量比は、治療指数（ＬＤ$_{50}$／ＥＤ$_{50}$）である。特定の態様では、高い治療指数を示す抗体が望ましい。これらの細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、イヌに使用するための投与量の範囲を考案するのに使用することができる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、毒性がほとんどまたは全くない、ＥＤ$_{50}$を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、使用される剤形と投与経路とに応じて、この範囲内で変動し得る。

【００９２】

投与様式は変動し得る。好適な投与経路には、経口、直腸、経粘膜、腸、非経口；筋肉内、皮下、皮内、髄内、髄腔内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、眼内、吸入、吹送、局所、皮膚、経皮または動脈内が含まれる。特定の実施形態では、本発明の抗体は、注射などの侵襲的経路によって投与され得る。本発明のさらなる実施形態では、本発明の抗体またはその医薬組成物は、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内投与されるか、または吸入、エアロゾル送達によって投与される。非侵襲的経路（例えば、経口；例えば、丸剤、カプセルまたは錠剤）による投与も本発明の範囲内である。

【００９３】

組成物は、当技術分野で公知の医療機器を用いて投与され得る。例えば、本発明の医薬組成物は、例えば、プレフィルドシリンジまたは自動注入装置を含む皮下注射針を用いた注射によって投与され得る。本明細書に開示される医薬組成物はまた、無針皮下注射装置、例えば、米国特許第６，６２０，１３５号、米国特許第６，０９６，００２号、米国特許第５，３９９，１６３号、米国特許第５，３８３，８５１号、米国特許第５，３１２，３３５号、米国特許第５，０６４，４１３号、米国特許第４，９４１，８８０号、米国特許第４，７９０，８２４号または米国特許第４，５９６，５５６号に開示されている装置を用いて投与されてもよい。

【００９４】

本明細書に開示される医薬組成物はまた、注入によって投与され得る。医薬組成物を投与する周知のインプラントおよびモジュール形態の例には、制御された速度で薬剤を分配するための植込み型微量注入ポンプを開示している米国特許第４，４８７，６０３号、正確な注入速度で薬剤を送達するための薬剤注入ポンプを開示している米国特許第４，４４７，２３３号、連続薬物送達のための可変流量植込み型注入装置を開示している米国特許第４，４４７，２２４号、マルチチャンバー区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示している米国特許第４，４３９，１９６号が挙げられる。他の多くのそのようなインプラント、送達システムおよびモジュールは、当業者に周知である。

【００９５】

あるいは、本発明の抗体を全身的様式ではなく局所的様式で、多くの場合、デポー製剤または持続放出製剤で投与してもよい。

【００９６】

投与レジメンは、治療用抗体の血清または組織の代謝回転速度、症状のレベル、治療用抗体の免疫原性、および生物学的マトリックス中の標的細胞の接近可能性を含むいくつかの要因に依存する。好ましくは、投与レジメンは、標的疾患／病態の改善をもたらすのに十分な治療用抗体を送達しながら、同時に望ましくない副作用を最小限に抑える。したがって、送達される生物製剤の量は、部分的に、特定の治療用抗体、および治療される病態の重症度に依存する。適切な用量の治療用抗体を選択する際の指針が利用可能である［例えば、Ｗａｗｒｚｙｎｃｚａｋ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂｉｏｓ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂ．Ｌｔｄ，Ｏｘｆｏｒｄｓｈｉｒｅ，ＵＫ（１９９６）；Ｋｒｅｓｉｎａ（ｅｄ．）Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ ａｎｄ Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ（１９９１）；Ｂａｃｈ（ｅｄ．）Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ（１９９３）；Ｂａｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４８：６０１－６０８（２００３）；Ｍｉｌｇｒｏｍ ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４１：１９６６－１９７３（１９９９）；Ｓｌａｍｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４４：７８３－７９２（２００１）；Ｂｅｎｉａｍｉｎｏｖｉｔｚ ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４２：６１３－６１９（２０００）；Ｇｈｏｓｈ ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４８：２４－３２（２００３）；Ｌｉｐｓｋｙ ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４３：１５９４－１６０２（２０００）を参照］。

【００９７】

適切な用量の決定は、例えば、治療に影響を及ぼすことが当技術分野で知られているまたは疑われるパラメーターまたは因子を使用して、獣医によって行われる。一般に、用量は、最適用量よりも幾分少ない量で始まり、その後、任意の負の副作用に対して所望のまたは最適な効果が達成されるまで、少しずつ増加される。重要な診断尺度には、症状の診断尺度が含まれる。

【００９８】

本明細書で提供される抗体は、連続注入によって、または例えば、連日、週に１～７回、毎週、隔週、毎月、隔月、四半期ごと、半年ごと、毎年などに投与される用量によって提供され得る。用量は、例えば、静脈内、皮下、局所、経口、経鼻、直腸、筋肉内、脳内、脊髄内提供され得るか、または吸入によって提供され得る。総毎週用量は、一般に少なくとも０．０５μｇ／ｋｇ体重、さらに一般に少なくとも０．２μｇ／ｋｇ、０．５μｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ、１００μｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｋｇ、２５ｍｇ／ｋｇ、５０ｍｇ／ｋｇまたはそれ以上である［例えば、Ｙａｎｇ，ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４９：４２７－４３４（２００３）；Ｈｅｒｏｌｄ，ｅｔ ａｌ．Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４６：１６９２－１６９８（２００２）；Ｌｉｕ，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｌ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．Ｐｓｙｃｈ．６７：４５１－４５６（１９９９）；Ｐｏｒｔｉｅｌｊｉ，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５２：１３３－１４４（２００３）を参照］。イヌの血清中の本発明の抗体の所定の標的濃度、例えば、０．１、０．３、１、３、１０、３０、１００、３００μｇ／ｍｌまたはそれ以上を達成するための用量も提供され得る。他の実施形態では、本発明の抗体は、１０、２０、５０、８０、１００、２００、５００、１０００または２５００ｍｇ／被験体で、毎週、隔週、「４週間ごと」、毎月、隔月または四半期ごとに皮下または静脈内投与される。

【００９９】

本明細書で使用される場合、「阻害する（ｉｎｈｉｂｉｔ）」または「治療する（ｔｒｅａｔ）」または「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」は、障害に関連する症状の発症の延期、および／またはそのような障害の症状の重症度の低下を含む。該用語は、既存の制御されないまたは望ましくない症状を改善すること、追加の症状を予防すること、およびその

ような症状の根本的な原因を改善または予防することをさらに含む。したがって、該用語は、障害、病態および／もしくは症状を有するか、またはそのような障害、疾患もしくは症状を発症する可能性を有する脊椎動物被験体（例えば、イヌ）に有益な結果が与えられたことを意味する。

【０１００】

本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」、「治療有効用量」および「有効量」は、単独で、または追加の治療剤と組み合わせて細胞、組織または被験体、例えば、イヌに投与した場合に、疾患もしくは病態の１つ以上の症状、またはそのような疾患もしくは病態の進行の測定可能な改善を引き起こすのに有効な、本発明の抗体の量を指す。治療有効用量は、症状の少なくとも部分的な改善、例えば、関連する医学的病態の治療、治癒、予防もしくは改善、またはそのような病態の治療、治癒、予防もしくは改善の速度の増加をもたらすのに十分な抗体の量をさらに指す。治療有効用量は、組合せに適用される場合、組み合わせて投与されるか、連続的に投与されるか、または同時に投与されるかにかかわらず、治療効果をもたらす有効成分の組合せ量を指す。有効量の治療薬は、診断手段またはパラメーターの少なくとも１０％、通常少なくとも２０％、好ましくは少なくとも約３０％、さらに好ましくは少なくとも４０％、最も好ましくは少なくとも５０％の改善をもたらす。有効量はまた、主観的尺度が病態の重症度を評価するために使用される場合に、主観的尺度の改善をもたらすことができる。

【０１０１】

［実施例］

［実施例１］

ＩＬ－３１受容体アルファ

ヌクレオチド配列

配列番号１のヌクレオチド配列は、ＨＩＳタグに融合したイヌＩＬ－３１受容体アルファ（ｃＩＬ－３１ＲＡ）の細胞外ドメインをコードする。イヌＩＬ－３１ＲＡ　ＥＣＤ　ＨＩＳタグ付きタンパク質は、配列番号２のアミノ酸配列を含む。ヌクレオチド配列を化学合成によって調製し、次いで、ＨＥＫ－２９３細胞またはＣＨＯ細胞のいずれかの真核細胞内の対応するタンパク質の産生に適した発現プラスミドにクローニングした。

【０１０２】

【化５】

イヌ IL-31RA ECD-10His: [配列番号 : 1]

```
gtgctgcccgccaagcccgagaacatcagctgcatcttctactacgaggagaacttcacctgcacctgga
gccccgagaaggaggccagctacacctggtacaaggtgaagagaacctacagctacggctacaagagcga
catctgcagcaccgacaacagcaccagaggcaaccacgccagctgcagcttcctgccccccaccatcacc
aaccccgacaactacaccatccaggtggaggcccagaacgccgacggcatcatgaagagcgacatcacct
actggaacctggacgccatcatgaagatcgagcccccccgagatcttcagcgtgaagagcgtgctgggcat
caagagaatgctgcagatcaagtggatcagacccgtgctggcccccccacagcagcaccctgaagtacacc
ctgagattcagaaccatcaacagcgcctactggatggaggtgaacttcaccaaggaggacatcgacagag
acgagacctacaacctgaccgagctgcaggccttcaccgagtacgtgatgaccctgagatgcgcccccgc

cgagagcatgttctggagcggctggagccaggagaaggtgggcaccaccgaggaggaggcccccctacggc
ctggacctgtggagagtgctgaagcccgccatggtggacggcagaagacccgtgcagctgatgtggaaga
aggccaccggcgcccccgtgctggagaaggccctgggctacaacatctggtacttccccgagaacaacac
caacctgaccgagaccgtgaacaccaccaaccagacccacgagctgtacctgggcggcaagacctactgg
gtgtacgtggtgagctacaacagcctgggcgagagccccgtggccaccctgagaatccccgccctgaacg
agaagaccttccagtgcatcgaggccatgcaggcctgcctgacccaggaccagctggtggtggagtggca
gagcagcgcccccgaggtggacacctggatggtggagtggttccccgacgtggacagcgagcccagcagc
ttcagctgggagagcgtgagccaggccagaaactggaccatccagaaggacgagctgaagcccctgtggt
gctacaacatcagcgtgtaccccgtgctgagagacagagtgggccagccctacagcacccaggcctacgt
gcaggagggcatccccagcgccggccccgtgacccaggccgacagcatcggcgtgaagaccgtgaccatc
acctggaaggagatccccaagagcaagagaaacggcttcatcaagaactacaccatcttctaccaggccg
aggacggcaaggagttcagcaagaccgtgaacagcaacatcctgcagtacagactggagagcctgaccag
aagaaccagctacagcctgcaggtgatggccagcaccaacgccggcggcaccaacggcaccaagatcaac
ttcaagaccctgagcatcagccaccaccaccaccaccaccaccaccaccac
```

【０１０３】
［実施例２］
ＩＬ－３１受容体アルファＥＣＤの発現および精製
製造業者の推奨に従ってＭａｘＣｙｔｅ機器を介したエレクトロポレーションを使用して、配列番号１のヌクレオチド配列を含むプラスミドをＨＥＫ－２９３細胞またはＣＨＯ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの数日後、トランスフェクト細胞および非トランスフェクト対照の上清を回収し、遠心して細胞残屑を除去した。製造業者の推奨に従って、トランスフェクト細胞から清澄化された回収された流体をニッケルカラムに通すことによって、ＨＩＳタグを有するＩＬ－３１ＲＡを細胞培養液から精製した。２８０ｎｍの紫外光の吸光度を測定することによって、精製したタンパク質を定量した。
【化６】

イヌ IL-31RA ECD-10His: [配列番号: 2]
VLPAKPENISCIFYYEENFTCTWSPEKEASYTWYKVKRTYSYGYKSDICSTDNSTRGNHASCSF
LPPTITNPDNYTIQVEAQNADGIMKSDITYWNLDAIMKIEPPEIFSVKSVLGIKRMLQIKWIRP
VLAPHSSTLKYTLRFRTINSAYWMEVNFTKEDIDRDETYNLTELQAFTEYVMTLRCAPAESMFW
SGWSQEKVGTTEEEAPYGLDLWRVLKPAMVDGRRPVQLMWKKATGAPVLEKALGYNIWYFPENN
TNLTETVNTTNQTHELYLGGKTYWVYVVSYNSLGESPVATLRIPALNEKTFQCIEAMQACLTQD
QLVVEWQSSAPEVDTWMVEWFPDVDSEPSSFSWESVSQARNWTIQKDELKPLWCYNISVYPVLR
DRVGQPYSTQAYVQEGIPSAGPVTQADSIGVKTVTITWKEIPKSKRNGFIKNYTIFYQAEDGKE
FSKTVNSNILQYRLESLTRRTSYSLQVMASTNAGGTNGTKINFKTLSISHHHHHHHHHH

【０１０４】
［実施例３］
ビオチン化イヌＩＬ－３１へのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合：
プロトコル
１．リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で１μｇ／ｍＬに希釈することによって、ＩＬ－３１ＲＡタンパク質によって（１または複数の）免疫プレートをコーティングする。１００μＬ／ウェルを加える。（１または複数の）プレートを２～７°で一晩インキュベートする。
２．２７５μＬ／ウェルのリン酸緩衝生理食塩水＋ＴＷＥＥＮ（登録商標）　２０（ＰＢＳＴ）を用いてプレートを３回洗浄する。
３．穏やかに振盪しながら（１２０±２０ＲＰＭ）、３６±２℃で３０～４５分間かけて、２００μＬ／ウェルのブロッキング緩衝液［ＰＢＳＴ中１％脱脂粉乳（ＮＦＤＭ）］を用いてプレートをブロッキングする。
４．２７５μＬ／ウェルのＰＢＳＴを用いてプレートを３回洗浄する。
５．希釈プレート上でビオチン化ＩＬ－３１（１０μｇ／ｍＬ）をＰＢＳＴ中１％ＮＦＤＭで３倍希釈し、１００μＬ／ウェルを（１または複数の）免疫プレートに移す。穏やかに振盪しながら（１２０±２０ＲＰＭ）、３６±２℃で３０～４５分間インキュベートする。
６．２７５μＬ／ウェルのＰＢＳＴを用いてプレートを３回洗浄する。
７．西洋ワサビペルオキシダーゼ－ストレプトアビジン（ＨＲＰ－ストレプトアビジン）をＰＢＳＴ中１％ＮＦＤＭで１：１０００の最終希釈に希釈する。
８．１００μＬ／ウェルのＨＲＰ－ストレプトアビジンを（１または複数の）免疫プレートに加え、穏やかに振盪しながら（１２０±２０ＲＰＭ）３６±２℃で３０～４５分間インキュベートする。
９．２７５μＬ／ウェルのＰＢＳＴを用いてプレートを３回洗浄する。
１０．使用直前に、等量の予熱されたＴＭＰ　２成分基質を組み合わせる。
１１．１００μＬ／ウェルの調製した３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＰ）基質を（１または複数の）免疫プレートに加え、穏やかに振盪しながら（１２０±２０ＲＰＭ）３６±２℃で１０～１５分間暗所でインキュベートする。

１２．１００μＬ／ウェルの１Ｍ　Ｈ３ＰＯ４を加えることによって、反応を停止させる。

１３．マイクロプレートリーダーを使用して、波長４５０ｎｍ、参照波長５４０ｎｍでプレートを読み取る。

【０１０５】

［実施例４］

イヌＩＬ－３１受容体アルファに対するモノクローナル抗体

３～４週間にわたってイヌＩＬ－３１ＲＡ　ＥＣＤを用いてＬｅｗｉｓラット２匹を複数回免疫することによって（毎回１０μｇまたは２５μｇの抗原／ラットを使用）、イヌＩＬ－３１ＲＡに対するモノクローナル抗体（ｍＡｂ）を産生させた。免疫後、血清を各ラットから回収し、ＥＬＩＳＡによってイヌＩＬ－３１ＲＡに対して試験した。最も高いＩＬ－３１ＲＡ　ＥＣＤ反応性を有する、ラットのリンパ節細胞を骨髄腫ＳＰ２／０細胞株と融合させて、ハイブリドーマを作製した。融合の約１０日後、以下に記載されるプロトコルを使用して、ＩＬ－３１ＲＡ　ＥＣＤタンパク質をコーティングしたプレート上で、ＥＬＩＳＡによって、増殖中のハイブリドーマから得られた上清をスクリーニングした。以下の図２Ａ～図２Ｅに例示されるように、このＥＬＩＳＡでは、ＩＬ－３１ＲＡへの潜在的な結合を示す約２６０個のクローンを選択し、ラットＩｇＧ２ａ／カッパを陰性対照として使用した。クローンの大部分はＯＤ４５０＞１を有した。

【０１０６】

ＥＬＩＳＡの手順：

１．ＩＬ－３１ＲＡ（ＰＢＳ緩衝液中１μｇ／ｍＬ）、２５μＬ／ウェルによって、９６ウェルハーフエリアプレートをコーティングする。

２．プレートを４℃で一晩インキュベートする。

３．ＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）を用いてプレートを３回洗浄する

４．ブロッキング緩衝液（５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含むＰＢＳ）］、２５ｕｌ／ウェルを用いて、プレートを室温で３０分間ブロッキングする。

５．２５ｕｌ／ウェルのハイブリドーマ上清を９６ウェルプレートに移し、室温で６０分間インキュベートする。

６．ＰＢＳＴを用いてプレートを３回洗浄する。

７．２５ｕｌ／ウェルの抗ラットＨＲＰ、ブロッキング緩衝液中１：４０００希釈液をプレートに加え、室温で６０分間インキュベートする。

８．ＰＢＳＴによってプレートを５回洗浄する。

９．２～３分間の比色反応のために、ＴＭＢ系試薬をプレートに加える。

１０．０．１６Ｍ硫酸を用いて反応を停止させる。

１１．プレートリーダーによってプレートを読み取る。

【０１０７】

ＩＬ－３１に結合するイヌＩＬ－３１ＲＡに対して惹起された１４個のラット抗体を選択した。ラット抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を以下に示す。以下の実施例５では、イヌＩＬ－３１へのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合を遮断する能力について、これらの抗体をさらに試験した。

【０１０８】

【化 7 】

49D3VH [配列番号: 49]
EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYCARHGTLYFDYWGQGVMVTVSS

49D3VL [配列番号 : 50]
QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGDSYVSWYQQHLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFS
GSIDSSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDSNIDGPVFGGGTKLTVL

10A12VH [配列番号: 51]
EVQLVESGGGLVKPGRSMKLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKRTLYLQMDSLRSEDTATYYCGRHGTLYFDYWGQGVMVTVSS

10A12VL [配列番号: 52]
QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGDSYVSWYQQHLGRPPINVIYVDDQRPSEVSDRFS
GSIDSSSNSASLTITDLQMDDEADYFCQSYDSNIDGPVFGGGTKLTVL

47F3VH [配列番号 : 53]
EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCVASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYCARHGTLYFDYWGQGVMVTVS

47F3VL [配列番号 : 54]
QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGNTYVSWYQQHLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFS
GSIDSSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDSNIDGPVFGGGTKLTVL

51G4VH [配列番号 : 55]
EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAALGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLRSEDTATYYCARHGTIAAMDYWGQGVMVTVSS

51G4VL [配列番号 : 56]
QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERNNGDIGDSYVSWYQQHLGRPPIIVIYADDQRPSEVSDRFS
GSIDSSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDSNIDGPVFGGGTKLTVL

53B3VH [配列番号 : 57]
EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCAAFGFTFNNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTFYRDSV
KGRFTISRDNVKSILSLQMDSLRSEDTATYYCARHGTIAAMDYWGQGVMVTVSS

53B3VL [配列番号 : 58]
QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERTSGDIGDNYVSWYQQHLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFS
GSIDSSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDSNIDGPVFGGGTKLTVL

27A10VH [配列番号 : 59]
EVQLVESGGGLVQPGRSMKLSCTASGFTFSNYYMAWVRQAPTKGLEWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRAEDTATYYCARHTMGYFDYWGQGVMVTVSS

27A10VL [配列番号 : 60]
QFTLTQPKSVSGSLRSTITIPCERSSGDIGDNYVSWYQQHLGRPPINVIYADDQRPSEVSDRFS
GSIDSSSNSASLTITNLQMDDEADYFCQSYDGKIEIPVFGGGTKLTVL

44E2VH [配列番号 : 61]
QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTSNGVSWVRQPPGKGLEWIAAISSGGSTYYNSVLK
SRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCTRRLSGYNYVPFAYWGQGTLVTVSS

44E2VK [配列番号 : 62]
DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLNCKASQNIYKHLAWCQQKLGEPPNLLISNANSLQTGIPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSGDTFGAGTKLELK

4G7VH [配列番号 : 63]
EVQLQQYGAELGKPGTSVKLSCKVSGYNIRSTFMHWVNQRPGKGLEWIGRIDPVNGNTIYSEKF
KSKATLTADTSSNTAYMQLSQLKSDDTAIYFCAMFNYAGHSGDYWGQGVMVTVSS

4G7VK [配列番号 : 64]
DIQMTQSPSSMSVSLGDTVTITCRASQDVGIYVNWFQQKPGKSPRRMIYRATNLADGVPSRFSG
SRSGSDYSLTISSLESEDVADYHCLQYDEYPYTFGAGTKLELK

28F12VH [配列番号: 65]
EVQLVESDGGLAQPGRSLKLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPTKGLEWVATISYDGSSTYYRDSV
RGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYCARGPLTDWAPNWFAYWGQGTLVTVSS

28F12VK [配列番号: 66]
DIQMTQSPASLSASLGETVTIQCQTSEDIYSGLAWYQQKPGKSPQFLIYGASRLEDGVPSRFSG
SGSGTQYSLKISSMQTEDEGVYFCQQGLKYPNTFGAGTKLELK

38A6VH [配列番号: 67]
EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCVASGFTFNNYWMTWIRQAPGKGLEWVASITNTGGTTYYPDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRSEDTATYYCTRGPTTVVGGWFAYWGQGTLVTVSS

38A6VK [配列番号: 68]
DIVMTQSPTSMSISVGDRVTMNCKASQNVGSNVDWYQQKTGQSPKVLIYRASSRSTGVPDRFTG
SGSGTDFTFTISNMQAEDLAVYYCMQSNSYPPTFGGGTKLELK

20B8VH [配列番号: 69]
EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCVASGFTFNNYWMTWIRQAPGKGLEWVASITNTGGSTYYPDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRSEDTATYYCTRGPTTVVGGWFAYWGQGTLVTVSS

20B8VK [配列番号: 70]
DIVMTQSPTSMSISVGDRVTMNCKASQNVGSNVDWYQQKTGQSPKLLIYRPSNRYTGVPDRFTG
SGSGTDFTFTISNMQAEDLAVYYCMQSNSYPPTFGGGTKLELK

7D7VH [配列番号: 71]
EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCVASGFTFNNYWMTWIRQAPGKGLEWVASITNTGGSTFYPDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRSEDTATYYCTRGPDYGGHLNWFAYWGQGTLVTVSS

7D7VK [配列番号: 72]
DIVMTQSPTSMSISAGDRVTMNCKASQNVGSNVDWYQQKTGQSPKLLIYKASNRYTGVPDRCTG
SGSGTDFTFTISNMQAEDLAVYYCMQSNSYPPTFGGGTKLELK

22B4VH [配列番号: 73]
EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCVASGFTFNKYWMTWIRQAPGKGLEWVASITNTGGSSYYSDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRSEETATYYCTRGPDYGGHLNWFAYWGQGTLVTVSS

22B4VK [配列番号: 74]
DIVMTQSPTSMSISVGDRVTMNCKASQNVGSNVDWYQEKTGQSPKLVIYKASNRYTGVPDRFTG
SGSGTDFTFTISNMQAEDLAVYYCMQSNSYPPTFGGGTKLELK

48B1VH [配列番号: 75]
EVQLVESGGGLVQPGRTLKLFCVASGFTFNNYWMTWIRQAPGKGLEWVASITNTGGSTYYPDSV
KGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLRSEDTATYYCTRGPDYGGHLNWFVYWGQGTLVTVSS

48B1VK [配列番号: 76]
DIVMTQSPTSMSISVGDRVTMNCKASQNVGSNVDWYQQKTGQSPKLLIYKASNRYTGVPDRFTG
SGSGTDFTFTISNMQAEDLAVYYCMQSNSYPPTFGGGTKLELK

【０１０９】
［実施例５］
抗ＩＬ－３１受容体アルファ抗体の遮断活性
下記のブロッキングＥＬＩＳＡでは、抗イヌＩＬ－３１ＲＡハイブリドーマ上清がＩＬ－３１ＲＡへのＩＬ－３１の結合を遮断する能力を評価した。
【０１１０】
プロトコル
１．ＩＬ－３１ＲＡ（ＰＢＳ緩衝液中１μｇ／ｍＬ）、２５μＬ／ウェルによって、９６ウェルハーフエリアプレートをコーティングする。

２．プレートを４℃で一晩インキュベートする。
３．ＰＢＳＴ（ＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０）によってプレートを３回洗浄する
４．ブロッキング緩衝液（５％ＦＢＳを含むＰＢＳ）、２５ｕｌ／ウェルを用いて、プレートを室温で３０分間ブロッキングする。
５．２５ｕｌ／ウェルのハイブリドーマ上清を９６ウェルプレートに移し、室温で６０分間インキュベートする。
６．ＰＢＳＴを用いてプレートを３回洗浄する。
７．２５μＬ／ウェルのビオチン化ＩＬ３１（ブロッキング緩衝液中０．５μｇ／ｍＬ）を移し、室温で６０分間インキュベートする。
８．ＰＢＳＴを用いてプレートを３回洗浄する。
９．２５μｌ／ウェルのストレプトアビジン－ＨＲＰ、ブロッキング緩衝液中１：５０００希釈液をプレートに加え、室温で６０分間インキュベートする。
１０．ＰＢＳＴを用いてプレートを５回洗浄する。
１１．２～３分間の比色反応のために、ＴＭＢ系試薬をプレートに加える。
１２．０．１６Ｍ硫酸を用いて反応を停止させる。
１３．プレートリーダーによってプレートを読み取る。

【０１１１】

結果：

ＩＬ－３１ＲＡへの結合を示した約２６０個のクローンのうち、２０個～２５個のクローンのみが、ＩＬ－３１ＲＡへのＩＬ－３１結合の潜在的な遮断も示した。これらのうち、ＩＬ－３１ＲＡに結合し、かつＩＬ－３１ＲＡへのＩＬ－３１の結合を遮断する６つのラット抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体の特定の群が、顕著なアミノ酸配列類似性を有するＣＤＲのセットを含むものとして同定された（ラット免疫血清を陽性対照として使用し、ラットＩｇＧ２ａを陰性対照として使用した、以下の図３Ａ～図３Ｄを参照）。これらのアミノ酸配列も以下の表３に示す。

【化８】

重鎖

AB	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号
49D3	NYYMA	NO:31	SISTGGGNTYYRDSVKG	NO:32
10A12	NYYMA	NO:31	SISTGGGNTYYRDSVKG	NO:32
47F3	NYYMA	NO:31	SISTGGGNTYYRDSVKG	NO:32
27A10	NYYMA	NO:31	SISTGGGNTYYRDSVKG	NO:32
51G4	NYYMA	NO:31	SISTGGGNTYYRDSVKG	NO:32
53B3	NYYMA	NO:31	SISTGGGNT**F**YRDSVKG	NO:41

AB	HCDR3	配列番号
49D3	HGTLYFDY	NO:33
10A12	HGTLYFDY	NO:33
47F3	HGTLYFDY	NO:33
27A10	H**TMG**YFDY	NO:43
51G4	HGT**IAAM**DY	NO:39
53B3	HGT**IAAM**DY	NO:39

【０１１２】
実際に、６つの抗体のこの群のＨＣＤＲ１はいずれも、同一のアミノ酸配列（配列番号３１）を有する。さらに、６つのＨＣＤＲ２のうちの５つは、同一のアミノ酸配列（配列番号３２）を有するのに対して、６番目の５３Ｂ３のＨＣＤＲ２は、１つの芳香族アミノ酸チロシンをその密接に関連する芳香族アミノ酸フェニルアラニンによって置換するという単一のアミノ酸置換のみを有する（配列番号４１）。また、６つのＨＣＤＲ３のアミノ酸配列は、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ１の対応するアミノ酸配列よりも異なるが、それらのＨＣＤＲ３の半分は、同一のアミノ酸配列を有する（配列番号３３）。さらに、抗体４９Ｄ３、１０Ａ１２および４７Ｆ３の３つ全部のＨＣＤＲのアミノ酸配列は同一である。
【０１１３】
加えて、残りの３つのＨＣＤＲ３のうちの２つ、すなわち、５１Ｇ４および５３Ｂ３のアミノ酸配列は、互いに同一である（配列番号３９）。５１Ｇ４および５３Ｂ３のＨＣＤＲ３のアミノ酸配列と４９Ｄ３、１０Ａ１２および４７Ｆ３のＨＣＤＲ３のアミノ酸配列とを比較すると、配列番号３３の中央「ＬＹＦ」が、配列番号３９の「ＩＡＡＭ」（配列番号１０６）によって置換されていることが分かる。同様に、６番目のＨＣＤＲ３のアミノ酸配列、すなわち、２７Ａ１０のアミノ酸配列と４９Ｄ３、１０Ａ１２および４７Ｆ３のアミノ酸配列とを比較すると、配列番号３３の「ＧＴＬ」残基は、２７Ａ１０の配列番号４３の「ＴＭＧ」に対してスクランブルされているように見え、メチオニン残基によるロイシン残基の置換を含む。

【化９】

軽鎖：

AB	LCDR1	配列番号	LCDR2	配列番号
49D3	ERSSGDIGDSYVS	NO:34	ADDQRPS	NO:35
10A12	ERSSGDIGDSYVS	NO:34	**V**DDQRPS	NO:37
47F3	ERSSGDIG**NT**YVS	NO:38	ADDQRPS	NO:35
27A10	ERSSGDIGD**N**YVS	NO:44	ADDQRPS	NO:35
51G4	ER**NN**GDIGDSYVS	NO:40	ADDQRPS	NO:35
53B3	ER**T**SGDIGD**N**YVS	NO:42	ADDQRPS	NO:35

AB	LCDR3	配列番号
49D3	QSYDSNIDGPV	NO:36
10A12	QSYDSNIDGPV	NO:36
47F3	QSYDSNIDGPV	NO:36
27A10	QSYD**GK**I**EI**PV	NO:45
51G4	QSYDSNIDGPV	NO:36
53B3	QSYDSNIDGPV	NO:36

【０１１４】

これら６つの抗体に関する重鎖ＣＤＲのセットのアミノ酸配列として、軽鎖のセットの対応するアミノ酸配列も極めて類似している。興味深いことに、重鎖ＣＤＲセットとは対照的に、軽鎖ＣＤＲセットの最大の多様性を有するのはＬＣＤＲ１のアミノ酸配列である。その結果、４９Ｄ３および１０Ａ１２のＬＣＤＲ１のアミノ酸配列は互いに同一である（配列番号３４）が、他の４つのＬＣＤＲ１はわずかに異なる。したがって、２７Ａ１０のＬＣＤＲ１のアミノ酸配列（配列番号４４）は、４９Ｄ３および１０Ａ１２のアミノ酸残基置換と比較して１つのアミノ酸残基置換を有するが、残りの３つの抗体５１Ｇ４、４７Ｆ３および５３Ｂ３のＬＣＤＲ１はいずれも、４９Ｄ３および１０Ａ１２と比較して２つのアミノ酸残基置換、または合計７つのそのような置換を有する。配列番号３４のアミノ酸配列に関して置換された７つのアミノ酸残基のうちの６つはセリンであり、７番目はアスパラギン酸残基である（配列番号３４を配列番号３８と比較する）。特に、配列番号３４と比較した置換アミノ酸残基はいずれも、アスパラギン残基またはトレオニン残基のいずれかである。

【０１１５】

６つのＬＣＤＲ２のうちの５つは、同一のアミノ酸配列（配列番号３５）を有するが、６番目の１０Ａ１２のＬＣＤＲ２（配列番号３７）は、単一のアミノ酸置換のみを有し、バリン残基がＮ末端アラニン残基を置換している。同様に、ＬＣＤＲ３の６つのアミノ酸のうちの５つは同一であるが（配列番号３６）、６番目の２７Ａ１０は、配列番号４５のアミノ酸配列を有し、２対の２つのアミノ酸置換が不変異体イソロイシンによって連結されており、すなわち、配列番号３６の「ＧＫＩＥＩ」（配列番号１０７）が「ＳＮＩＤＧ」（配列番号１０８）を置換している。重要なことに、重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲでは、これらの比較的微妙なアミノ酸の差は、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合する６つの個々の抗体の能力に影響を及ぼすことも、そのリガンドであるイヌＩＬ－３１へのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合を遮断する能力を妨害することもないように思われる。

【０１１６】
イヌＩＬ－３１ＲＡに結合し、かつイヌＩＬ－３１ＲＡへのイヌＩＬ－３１の結合を遮断する３つのラット抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体（４４Ｅ２、４Ｇ７および２８Ｆ１２）の特定の群もまた同定された。これらの抗体のＣＤＲのアミノ酸配列を以下に示す。これらのアミノ酸配列も以下の表３に示す。
【化１０】

重鎖 CDR：

AB	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号
44E2	SNGVS	NO:13	AISSGGSTYYNSVLKS	NO:14
4G7	STFMH	NO:19	RIDPVNGNTIYSEKFKS	NO:20
28F12	DYYMA	NO:25	TISYDGSSTYYRDSVRG	NO:26

AB	HCDR3	配列番号
44E2	RLSGYNYVPFAY	NO:15
4G7	FNYAGHSGDY	NO:21
28F12	GPLTDWAPNWFAY	NO:27

軽鎖 CDR：

AB	LCDR1	配列番号	LCDR2	配列番号
44E2	KASQNIYKHLA	NO:16	NANSLQT	NO:17
4G7	RASQDVGIYVN	NO:22	RATNLAD	NO:23
28F12	QTSEDIYSGLA	NO:28	GASRLED	NO:29

AB	LCDR3	配列番号
44E2	QQYYSGDT	NO:18
4G7	LQYDEYPYT	NO:24
28F12	QQGLKYPNT	NO:30

【０１１７】
［実施例６］
イヌ化抗体
イヌ化抗イヌＩＬ－３１受容体アルファｍＡｂを産生するために様々な組合せで混合され得るイヌ化重鎖およびイヌ化軽鎖を産生する全体的なプロセスは、以下のスキームを伴う：
ｉ）所望の抗ＩＬ－３１受容体アルファｍＡｂのＣＤＲを含むＶＨドメインおよびＶＬドメインのＤＮＡ配列を同定する
ｉｉ）所望の抗ＩＬ－３１ＲＡ　ｍＡｂのＨ鎖ＣＤＲおよびＬ鎖ＣＤＲを同定する
ｉｉｉ）イヌＩｇＧのＨ鎖およびＬ鎖に適した配列を同定する
ｉｖ）上記の配列のイヌＩｇＧのＨ鎖およびＬ鎖の内因性ＣＤＲをコードするＤＮＡ配列を同定する。
ｖ）内因性イヌＨ鎖ＣＤＲおよび内因性イヌＬ鎖ＣＤＲをコードするＤＮＡ配列を、所

望の抗ＩＬ－３１ＲＡ　ＣＤＲをコードするＤＮＡ配列によって置換する。さらに、いくつかのイヌフレームワーク残基を所望の抗ＩＬ－３１受容体アルファｍＡｂフレームワーク領域から選択された残基によって置換していてもよい。

ｖｉ）工程（ｖ）からのＤＮＡを合成し、それを好適な発現プラスミドにクローニングし、所望のイヌ化Ｈ鎖およびイヌ化Ｌ鎖を含有するプラスミドをＨＥＫ　２９３細胞にトランスフェクトする。

ｖｉｉ）発現したイヌ化抗体をＨＥＫ　２９３上清から精製する。

ｖｉｉｉ）イヌＩＬ－３１受容体アルファ鎖への結合について精製イヌ化抗体を試験する。

【０１１８】

上記で概説した工程の適用により、以下に示すイヌ化Ｈ鎖配列およびイヌ化Ｌ鎖配列のセットがもたらされ得る。対応する配列番号を以下の表５に列挙する。

【０１１９】

図６Ａ～図６Ｃは、ＥＬＩＳＡによって評価した場合のラムダ（Ｌ）軽鎖またはカッパ（Ｋ）軽鎖のいずれかを含有するイヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体の結合を示す。結果は、イヌ化抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体がイヌＩＬ－３１ＲＡに結合することを示す。

【０１２０】

図７Ａ～図７Ｃは、以下の実施例６に記載されるアッセイを使用する、ｃＩＬ－３１ＲＡ抗体によるｃＩＬ－３１媒介性ＳＴＡＴ－３リン酸化の阻害を示すプロットである。ＳＴＡＴ－３リン酸化を阻害する能力について、ｃ１０Ａ１２、ｃ２８Ｆ１２およびｃ４４Ｅ２と呼ばれる３つの異なるイヌ化モノクローナル抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体を評価した。データは、３つの抗体がいずれも、ＩＬ－３１の存在下でＳＴＡＴ－３リン酸化の用量依存的阻害をもたらすことを示す。

【０１２１】

イヌＩＬ－３１受容体アルファ（ｃＩＬ－３１ＲＡ）に対するイヌ化抗体

【化１１】

C10A12VL5-cCL [配列番号 : 83]
QPVLTQPPSLSASLGTTARLTCERSSGDIGDSYVSWYQQKPGSPPRDLLYVDDQRPSGVSKSFS
GSKDTSANAGLLLISGLQPEDEADYYCQSYDSNIDGPVFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLFPPSS
EELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKADGSPVTQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPDKWK
SHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS

C10A12VH1-cIgGBm [配列番号 : 84]
EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYYMAWVRQAPGKGLQWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAKHGTLYFDYWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPL
APSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSR
WPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLI
ARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGK
QFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEW
QSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSH
SPGK

c10A12VH2-cIgGBm [配列番号 : 85]
EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKGLQWVASISTGGGNTYYRDSV
KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHGTLYFDYWGQGTLVTVSSASTTAPSVFPL
APSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSR
WPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLI
ARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWLKGK
QFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEW
QSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSH
SPGK

c10A12VL4-cCL [配列番号 : 86]
QSVLTQPASVSGSLGQRVTISCERSSGDIGDSYVSWYQQLPGKAPSLLIYVDDQRPSGVPERFS
GSKSGSSNSATLTITGLQAEDEADYYCQSYDSNIDGPVFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLFPPSS
EELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKADGSPVTQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPDKWK
SHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS

c10A12VL6-cCL [配列番号 : 87]
QPVLTQPPSLSASLGTTARLTCERSSGDIGDSYVSWYQQKPGSPPRDVIYVDDQRPSEVSKSFS
GSKDTSANAGLLLISGLQPEDEADYFCQSYDSNIDGPVFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLFPPSS
EELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKADGSPVTQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPDKWK
SHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS

c28F12VH1-cIgGBm [配列番号 : 88]
EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLQWVATISYDGSSTYYRDSV
RGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAKGPLTDWAPNWFAYWGQGTLVTVSSASTTAP
SVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVT
VPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPK
DTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQD
WLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPD
IDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQ
ESLSHSPGK

c28F12VH2-cIgGBm [配列番号 : 89]
EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLQWVATISYDGSSTYYRDSV
RGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGPLTDWAPNWFAYWGQGTLVTVSSASTTAP
SVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVT
VPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPK
DTLLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQD
WLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPD
IDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQ
ESLSHSPGK

c28F12VL1-cCK [配列番号 : 90]
DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCQTSEDIYSGLAWFRQKPGQSPQRLIYGASRLEDGVPDRFSG
SGSGTDFTLRISTVEADDTGVYYCQQGLKYPNTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTG
SASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYS
CEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c28F12VL2-cCK [配列番号 : 91]
EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCQTSEDIYSGLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLEDGVPSRFSG
SGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYCQQGLKYPNTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTG
SASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYS
CEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c28F12VL3-cCK [配列番号 : 92]
DIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCQTSEDIYSGLAWYQQKPGQAPKLLIYGASRLEDGVPSRFSG
SGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYFCQQGLKYPNTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTG
SASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYS
CEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c28F12VL4-cCK [配列番号 : 93]
DIVMTQTPLSLSVSPGETASISCQTSEDIYSGLAWFRQKPGQSPQLLIYGASRLEDGVPDRFSG
SGSGTDFTLRISTVEADDTGVYFCQQGLKYPNTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTG
SASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYS
CEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c44E2VH1-cIgGBm [配列番号 : 94]
EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVSGFTFSSNGVSWVRQAPGKGLQWVAAISSGGSTYYNSVLK
SRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCAKRLSGYNYVPFAYWGQGTLVTVSSASTTAPSV
FPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVP
SSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDT
LLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWL
KGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDID

VEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQES
LSHSPGK

c44E2VH4-cIgGBm [配列番号 : 95]
ELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCVVSGGSVTSNGVSWIRQRPGRGLEWMGAISSGGSTYYNSVLK
SRISITADTAKNQFSLQLSSMTTEDTAVYYCARRLSGYNYVPFAYWGQGTLVTVSSASTTAPSV
FPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVP
SSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDT
LLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWL
KGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDID
VEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQES
LSHSPGK

c44E2VH5-cIgGBm [配列番号 : 96]
ELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLTSNGVSWIRQRPGRGLEWMGAISSGGSTYYNSVLK
SRISITADTAKNQFSLQLSSMTTEDTAVYYCARRLSGYNYVPFAYWGQGTLVTVSSASTTAPSV
FPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVP
SSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDT
LLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWL
KGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDID
VEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQES
LSHSPGK

c44E2VL1-cCK [配列番号 : 97]
EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKASQNIYKHLAWYQQKPGQAPKLLIYNANSLQTGVPSRFSG
SGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYYCQQYYSGDTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGS
ASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSC
EITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c44E2VL2-CcK [配列番号 : 98]
EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKASQNIYKHLAWYQQKPGQAPKLLIYNANSLQTGIPSRFSG
SGSGTDFSFTISSLEPEDVAVYFCQQYYSGDTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGS
ASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSC
EITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c44E2VL4-cCK [配列番号 : 99]
EIVMTQSPGSLAGSAGESVSINCKASQNIYKHLAWYQQKPGERPKLLIYNANSLQTGVPARFSS
SGSGTDFTLTINNLQAEDVGDYYCQQYYSGDTFGAGTKVELKRNDAQPAVYLFQPSPDQLHTGS
ASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTEQDKDSTYSLSSTLTMSSTEYLSHELYSC
EITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD

c44E2VH2-cIgGBm [配列番号 : 100]
EVQLVESGGDLVKPEGSLRLSCVVSGFSLTSNGVSWVRQAPGKGLQWIAAISSGGSTYYNSVLK
SRLTISRDNAKNTLYLQMNSLRTEDTAVYYCARRLSGYNYVPFAYWGQGTLVTVSSASTTAPSV
FPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVP
SSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDT
LLIARTPEVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGTYRVVSVLPIGHQDWL
KGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDID
VEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQES
LSHSPGK

【０１２２】
［実施例７］
ＳＴＡＴ－３アッセイ
Ｓｔａｔ－３は、ＩＬ－３１に対するヘテロ二量体受容体を含む細胞内で、ＩＬ－３１によって活性化されることが知られている。イヌＩＬ－３１によるＳＴＡＴ－３の活性化を評価するアッセイを開発するために、ＩＬ－３１ＲＡおよびＯＳＭＲをそれぞれコードするヌクレオチド配列を化学合成によって調製し、次いで、発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１にクローニングした。ＩＬ－３１ＲＡおよびＯＳＭＲのヌクレオチド配列をそれぞれ含有するベクターをＢａ／ｆ３細胞に同時トランスフェクトし、「Ｂａ／ｆ３－ＯＩ」とし

て示されるトランスフェクト細胞を抗生物質選択下でプールとして増殖させた。イヌＩＬ－３１がＳＴＡＴ－３活性化を誘導する能力を以下のように試験した。

【０１２３】

材料：

細胞株：Ｂａ／ｆ３－ＯＩ安定プール細胞

マウスＩＬ－３またはイヌＩＬ－３１（ｃＩＬ－３１）を含む増殖培地：

ＲＰＭＩ １６４０ ４３５ｍｌ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、１２６３３－０２０）ＦＢＳ ５０ｍＬ（ＳＡＦＣカタログ番号１２００３ｃ－５００ｍＬ）

２－メルカプトエタノール（５０ｍＭ）０．５ｍＬ（Ｇｉｂｃｏ ３１３５０－０１０）

１００Ｘ Ｐｅｎ Ｓｔｒｅｐ ５ｍＬ（Ｇｉｂｃｏ １５１４０－１２２ Ｌｏｔ１７３４０４０）

２００ｍＭ Ｌ－Ｇｌｕ １０ｍｌ（Ｇｉｂｃｏ ２５０３０－０８１ Ｌｏｔ１６７７１８５）

５００ｎｇ／ｍＬ Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ Ｇ４１８（ＧｉｂｃｏまたはＳｉｇｍａ製）５ｎｇ／ｍＬ ｍＩＬ－３または１００ｎｇ／ｍＬ ｃＩＬ－３１

飢餓培地：ｍＩＬ－３およびｃＩＬ－３１を含まない増殖培地

ｐ－ＳＴＡＴ３（Ｔｙｒ７０５）Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ：ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、ＡＬＳＵ－ＰＳＴ３－Ａ－ＨＶ

【０１２４】

手順

細胞培養

１．Ｂａ／ｆ３－ＯＩ細胞のバイアルを解凍し、１２５ｒｐｍの３７℃ ＣＯ２シェーカー内で、ｍＩＬ－３を含む増殖培地中で細胞を増殖させる。

２．細胞ベースのアッセイを設定する前に、細胞を２～３継代して≧９０％の生存率を有する細胞を得る。

３．アッセイを設定するために、細胞を回収し、１×１０^{7}生存細胞／ｍＬまで飢餓培地に再懸濁する。

４．細胞を９６ウェルプレート、５０μＬ／ウェル（約５×１０^{5}細胞／ウェル）に分注する。

５．希釈プレート内の飢餓培地でｃＩＬ－３１を３倍希釈し、次いで、連続希釈したｃＩＬ－３１アリコートの各々の５０μＬを細胞プレートに移す。

６．細胞プレートを１２５ｒｐｍで１～２時間にわたり、３７℃ ＣＯ$_{2}$シェーカー内で１５～３０分間インキュベートする。

製造業者の指示によるＡｌｐｈａＬＩＳＡアッセイ：

７．細胞を遠心し、上清を吸引し、５０～１００μＬ／ウェルの１×溶解緩衝液を加える。１０００ｒｐｍで振盪しながら、室温で１０分間インキュベートする。

８．３０μＬの細胞溶解物を１／２面積プレートに取り出すか、またはその後の試験のために－８０℃で凍結保存する。

９．ＳｕｒｅＦｉｒｅ Ａｓｓａｙ：１５μＬ／ウェルのアクセプターミックスを細胞溶解物に加える。プレートを密封し、１０００ｒｐｍで２分間撹拌し、次いで、室温で１～２時間インキュベートする。

１０．１５μＬ／ウェルのドナーミックスを細胞溶解物に加える。密封し、１０００ｒｐｍで２分間撹拌し、次いで、室温で１～２時間インキュベートする（プレートを４℃で一晩保存することができる。室温で１時間インキュベートした後、翌日プレートを読み取る）

１１．プレートを５２０～６２０ｎｍでＡｌｐｈａプレートリーダーを用いて読み取る。

【０１２５】

結果：

図４に示すように、イヌＩＬ－３１は、用量依存的様式でＢａ／ｆ３－ＯＩ細胞内でＳ

ＴＡＴ－３の活性化を刺激する。

【０１２６】

［実施例８］

抗イヌＩＬ－３１ＲＡ抗体の生物学的活性

抗イヌＩＬ－３１ＲＡ　ｍＡｂがＢａ／ｆ３－ＯＩ細胞内でＳＴＡＴ－３の活性化を阻害する能力を以下のように評価する：

１．Ｂａ／ｆ３－ＯＩ細胞のバイアルを解凍し、１２５ｒｐｍの３７℃　ＣＯ２シェーカー内で、ｍＩＬ－３を含む増殖培地中でＢａ／ｆ３－ＯＩ細胞を増殖させる。

２．細胞ベースのアッセイを設定する前に、細胞を２～３継代して≧９０％の生存率を有する細胞を得る。

３．アッセイを設定するために、細胞を回収し、１×１０^{7}生存細胞／ｍＬまで飢餓培地に再懸濁する。

４．細胞を９６ウェルプレート、５０μＬ／ウェル（約５×１０^{5}細胞／ウェル）に分注する。

５．９６ウェルプレート上の一列の飢餓培地中で、２００μｇ／ｍＬの濃度から始めて抗体を３倍希釈する。次いで、各ウェルに５～１０μＬのｃＩＬ－３１を加えて、１００ｎｇ／ｍＬの最終濃度にする。

６．５０μＬの希釈抗体およびｃＩＬ－３１混合物を細胞プレートの各ウェルに移し、穏やかに混合する。

７．細胞プレートを１２５ｒｐｍで１～２時間にわたり、３７℃　ＣＯ$_{2}$シェーカー内でインキュベートする。

製造業者の指示によるＡｌｐｈａＬＩＳＡアッセイ：（実施例７を参照）

【０１２７】

結果：

図５に例示されるように、抗体４７Ｆ３および１０Ａ１２はともに、イヌＩＬ－３１がＢａ／ｆ３－ＯＩ細胞内でＳＴＡＴ－３の活性化を刺激する能力を阻害する。

【０１２８】

［実施例９］

質量分析を使用するイヌＩＬ－３１受容体アルファエピトープのマッピング

化学的架橋および質量分析検出に基づく方法を使用して、抗イヌＩＬ－３１受容体アルファｍＡｂによって認識されるエピトープを同定した［９９９　Ｂｒｏａｄｗａｙ，Ｓｕｉｔｅ　３０５，Ｓａｕｇｕｓ，ＭＡ　０１９０６－４５１０にあるＣｏｖａｌＸ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ］。イヌＩＬ－３１受容体アルファ鎖のエピトープマッピングへのこの技術の適用により、表６に列挙したｍＡｂによって認識されるエピトープが同定された。本明細書に開示される３つの抗体によるイヌＩＬ－３１受容体アルファのエピトープマッピングから得られた結果は、ｍＡｂが、イヌＩＬ－３１受容体アルファの細胞外ドメイン内に存在する特異的ペプチドエピトープを認識することを示している（以下の表６を参照）。

【０１２９】

注目すべきことに、試験した３つのモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の各々について同定されたエピトープは、著しく異なっていた。以下の表６に示すように、データは、２８Ｆ１２抗体が配列番号１０１のアミノ酸配列を含む単一エピトープに結合し、該抗体がアミノ酸配列配列番号２の２１５および２２５位でアルギニン（Ｒ）残基と、ならびに２３３位でリジン（Ｋ）残基と結合することを示す。データは、４４Ｅ２抗体が、２つの異なるエピトープ、すなわち、配列番号１０２のアミノ酸配列を含む第１のもの（ここで、該抗体は、アミノ酸配列配列番号２の４０８位でトレオニン（Ｔ）残基と結合する）、ならびに配列番号１０３のアミノ酸配列を含む第２のエピトープであって、２つの別個の部分を有し、そのうちの１つでは、該抗体が、アミノ酸配列配列番号２の４６４および４７２位でセリン（Ｓ）残基と、および４７１位でチロシン（Ｙ）残基と結合し、他方の部分では、該抗体が、アミノ酸配列配列番号２の４８７位でトレオニン（Ｔ）残基と結合する第２

のエピトープに結合することをさらに示す。データは、１０Ａ１２抗体が、２つの異なるエピトープ、すなわち、配列番号１０４のアミノ酸配列を含む第１のもの（ここで、該抗体は、アミノ酸配列配列番号２の３１、３４および４２位でチロシン（Ｙ）残基と、ならびに３９位でトレオニン（Ｔ）残基と結合する）、および配列番号１０５のアミノ酸配列を含む第２のエピトープ（ここで、該抗体は、アミノ酸配列配列番号２の８９位でリジン（Ｋ）残基と、９０位でセリン（Ｓ）残基と、９３位でトレオニン（Ｔ）残基と、および９４位でチロシン（Ｙ）残基と結合する）に結合することをさらに示す。

【０１３０】

配列表

【０１３１】

【表２】

表 1

イヌ IL-31RA 細胞外ドメイン-HIS タグ

	配列番号	核酸	アミノ酸
イヌ IL-31RA ECD-10His	1	X	
イヌ IL-31RA ECD-10His	2		X

【０１３２】

【表３】

表 2

非ブロッキング抗体の CDR

アミノ酸配列		配列番号	アミノ酸配列	配列番号
	20B8		38A6	
HCDR1	NYWMT	3	NYWMT	3
HCDR2	SITNTGGSTYYPDSVKG	4	SITNTGGSTYYPDSVKG	4
HCDR3	GPTTVVGGWFAY	5	GPTTVVGGWFAY	5
LCDR1	KASQNVGSNVD	6	KASQNVGSNVD	6
LCDR2	RPSNRYT	7	RASSRST	9
LCDR3	MQSNSYPPT	8	MQSNSYPPT	8
	7D7		48B1	
HCDR1	NYWMT	3	NYWMT	3
HCDR2	SITNTGGSTFYPDSVKG	10	SITNTGGSTYYPDSVKG	4
HCDR3	GPDYGGHLNWFAY	11	GPDYGGHLNWFVY	46
LCDR1	KASQNVGSNVD	6	KASQNVGSNVD	6
LCDR2	KASNRYT	12	KASNRYT	12
LCDR3	MQSNSYPPT	8	MQSNSYPPT	8
	22B4			
HCDR1	KYWMT	47		
HCDR2	SITNTGGSSYYSDSVKG	48		
HCDR3	GPDYGGHLNWFAY	11		
LCDR1	KASQNVGSNVD	6		
LCDR2	KASNRYT	12		
LCDR3	MQSNSYPPT	8		

【０１３３】
【表４】
表 3

ブロッキング抗体の CDR

アミノ酸配列		配列番号	アミノ酸配列	配列番号
	44E2		4G7	
HCDR1	SNGVS	13	STFMH	19
HCDR2	AISSGGSTYYNSVLKS	14	RIDPVNGNTIYSEKFKS	20
HCDR3	RLSGYNYVPFAY	15	FNYAGHSGDY	21
LCDR1	KASQNIYKHLA	16	RASQDVGIYVN	22
LCDR2	NANSLQT	17	RATNLAD	23
LCDR3	QQYYSGDT	18	LQYDEYPYT	24
	28F12			
HCDR1	DYYMA	25		
HCDR2	TISYDGSSTYYRDSVRG	26		
HCDR3	GPLTDWAPNWFAY	27		
LCDR1	QTSEDIYSGLA	28		
LCDR2	GASRLED	29		
LCDR3	QQGLKYPNT	30		
	49D3		10A12	
HCDR1	NYYMA	31	NYYMA	31
HCDR2	SISTGGGNTYYRDSVKG	32	SISTGGGNTYYRDSVKG	32
HCDR3	HGTLYFDY	33	HGTLYFDY	33
LCDR1	ERSSGDIGDSYVS	34	ERSSGDIGDSYVS	34
LCDR2	ADDQRPS	35	VDDQRPS	37
LCDR3	QSYDSNIDGPV	36	QSYDSNIDGPV	36
	47F3		51G4	
HCDR1	NYYMA	31	NYYMA	31
HCDR2	SISTGGGNTYYRDSVKG	32	SISTGGGNTYYRDSVKG	32
HCDR3	HGTLYFDY	33	HGTIAAMDY	39
LCDR1	ERSSGDIGNTYVS	38	ERNNGDIGDSYVS	40
LCDR2	ADDQRPS	35	ADDQRPS	35
LCDR3	QSYDSNIDGPV	36	QSYDSNIDGPV	36
	53B3		27A10	
HCDR1	NYYMA	31	NYYMA	31
HCDR2	SISTGGGNTFYRDSVKG	41	SISTGGGNTYYRDSVKG	32
HCDR3	HGTIAAMDY	39	HTMGYFDY	43
LCDR1	ERTSGDIGDNYVS	42	ERSSGDIGDNYVS	44
LCDR2	ADDQRPS	35	ADDQRPS	35
LCDR3	QSYDSNIDGPV	36	QSYDGKIEIPV	45

【０１３４】

【表５】

表 4

ラット抗イヌ IL-31RA 可変領域

配列番号	重鎖	配列番号	軽鎖
49	49D3VH	50	49D3VL
51	10A12VH	52	10A12VL
53	47F3VH	54	47F3VL
55	51G4VH	56	51G4Vl
57	53B3VH	58	53B3VL
59	27A10VH	60	27A10VL
61	44E2VH	62	44E2VK
63	4G7VH	64	4G7VK
65	28F12VH	66	28F12VK
67	38A6VH	68	38A6VK
69	20B8VH	70	20B8VK
71	7D7VH	72	7D7VK
73	22B4VH	74	22B4VK
75	48B1VH	76	48B1VK

【０１３５】
【表６】

表 5

イヌ IL-31RA に対するイヌ化抗体のアミノ酸配列

配列番号	IL-31 受容体アルファ	重鎖	軽鎖
83	c10A12VL5-cCL		√
84	c10A12VH1-cIgGBm	√	
85	c10A12VH2-cIgGBm	√	
86	c10A12VL4-cCL		√
87	c10A12VL6-cCL		√
88	c28F12VH1-cIgGBm	√	
89	c28F12VH2-cIgGBm	√	
90	c28F12VK1-cCK		√
91	c28F12VK2-cCK		√
92	c28F12VK3-cCK		√
93	c28F12VK4-cCK		√
94	c44E2VH1-cIgGBm	√	
95	c44E2VH4-cIgGBm	√	
96	c44E2VH5-cIgGBm	√	
97	c44E2VK1-cCK		√
98	c44E2VK2-cCK		√
99	c44E2VK4-CcK		√
100	c44E2VH2-cIgGBm	√	

【０１３６】
【表７】

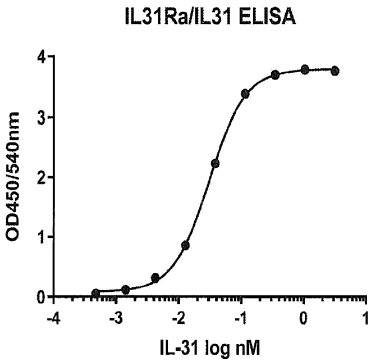
表 6

エピトープ配列

抗体	配列番号	cIL-31RA のエピトープのアミノ酸配列
28F12	101	GLDLWRVLKPAMVDGRRPVQLMWKKATGAPV
44E2	102	GIPSAGPVTQADSIGVKTVTITWKEI
44E2	103	SKTVNSNILQYRLESLTRRTSYSLQVMASTNAGGTNGTKINFKTLSIS
10A12	104	SYTWYKVKRTYSYGYKSDICS
10A12	105	EAQNADGIMKSDITYWNLDAIMKIEPPEIFSVKSVLGIKRMLQIKWIRPVL

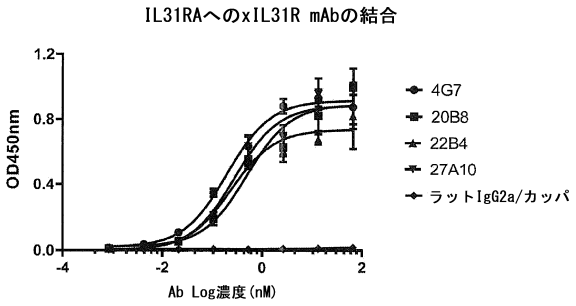
【図面】
【図１】

Figure 1



【図２Ａ】

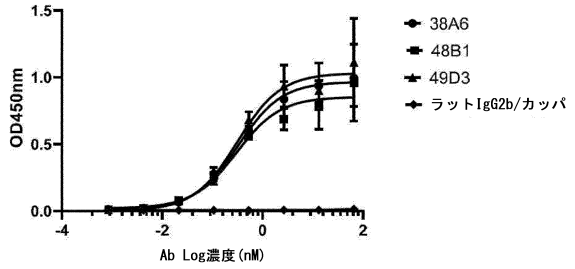
Figure 2A



【図２Ｂ】

Figure 2B

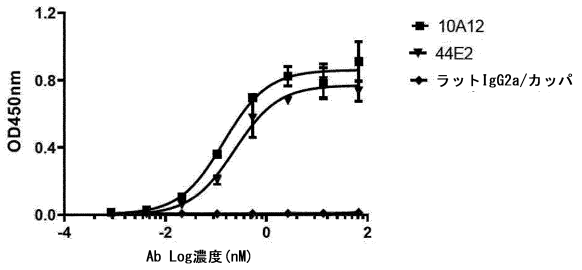
IL31RAへのxIL31R mAbの結合



【図２Ｃ】

Figure 2C

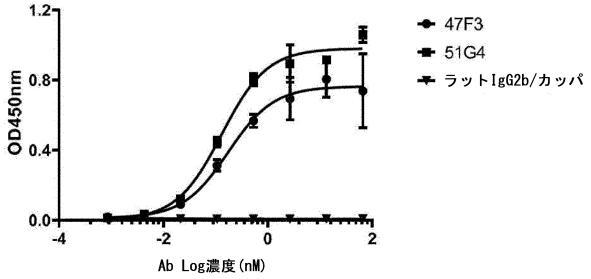
IL31RAへのxIL31R mAbの結合



【図２Ｄ】

Figure 2D

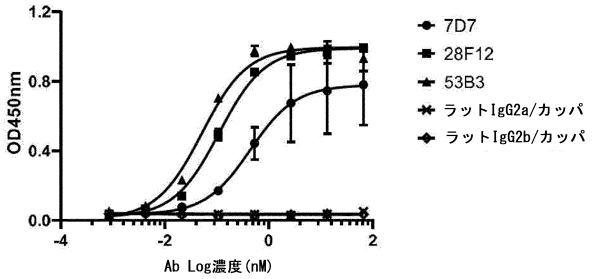
IL31RAへのxIL31R mAbの結合



【図２Ｅ】

Figure 2E

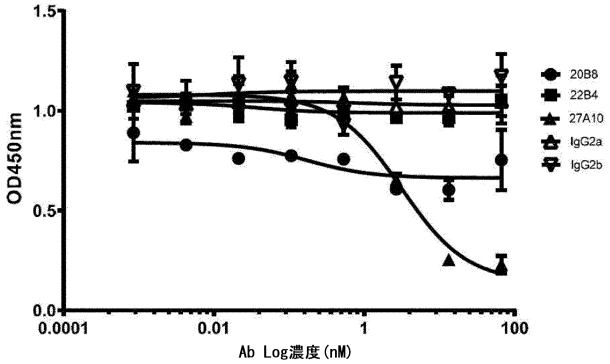
IL31RAへのxIL31R mAbの結合



【図３Ａ】

Figure 3A

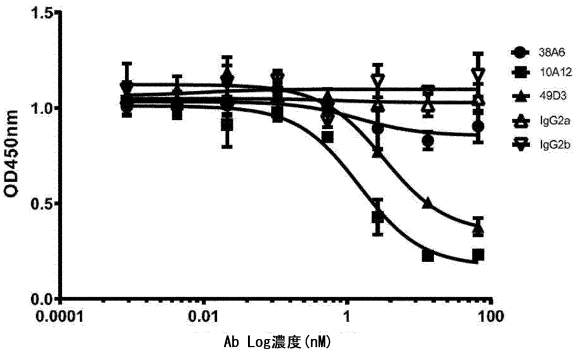
抗IL-31RA抗体によるIL-31結合の遮断



【図３Ｂ】

Figure 3B

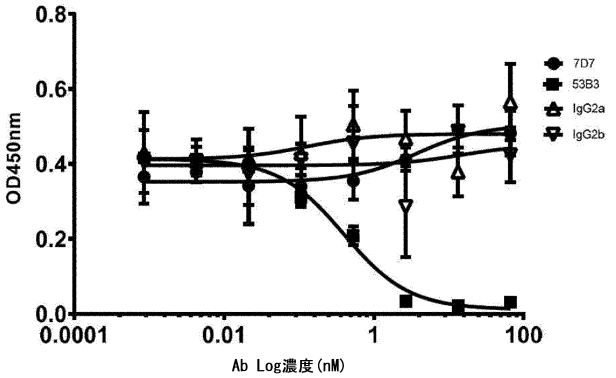
抗IL-31RA抗体によるIL-31結合の遮断



【図３Ｃ】

Figure 3C

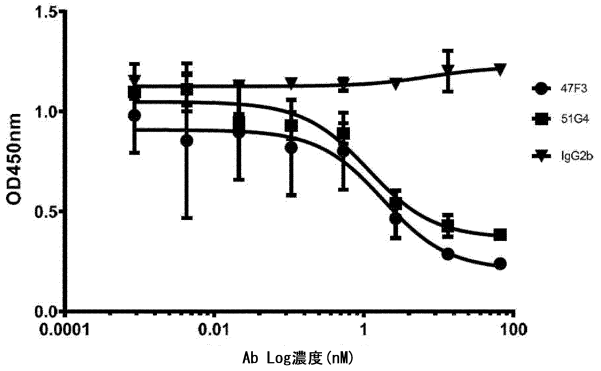
xIL-31RA抗体によるIL-31結合の遮断



【図３Ｄ】

Figure 3D

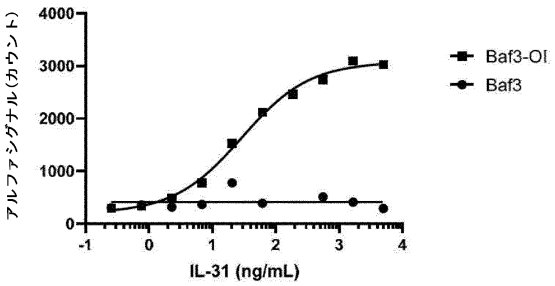
抗IL-31RA抗体によるIL-31結合の遮断



【図４】

Figure 4

IL-31によるSTAT-3リン酸化の誘導

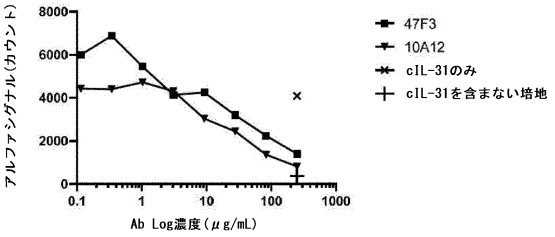


	Baf3	Baf3-OI
EC50	~ 0.000	29.16

【図５】

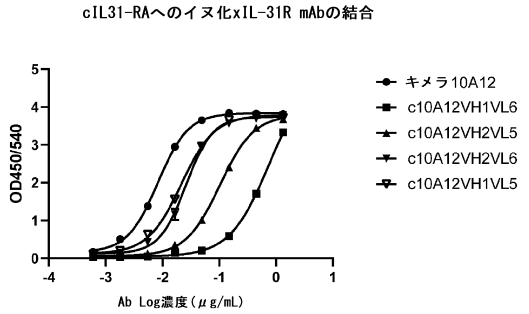
Figure 5

選択したxIL-31R1a抗体によるBa/F3-OI細胞内の
cIL-31媒介性STAT-3リン酸化の阻害



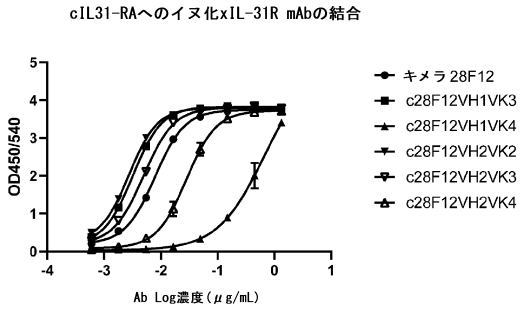
【図６Ａ】

Figure 6A



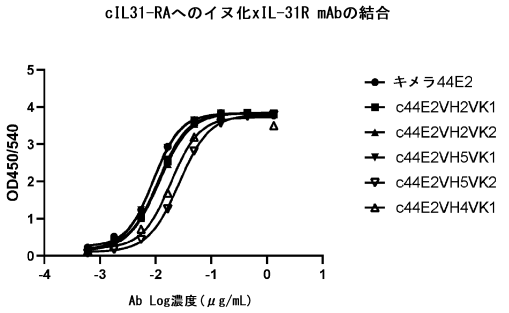
【図６Ｂ】

Figure 6B



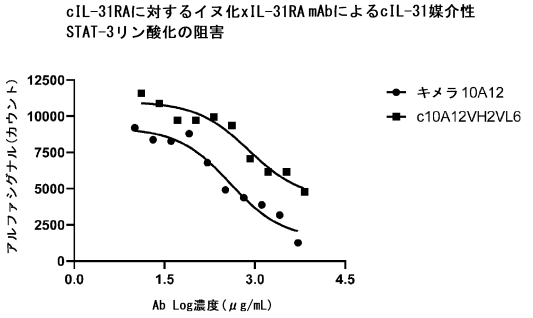
【図６Ｃ】

Figure 6C



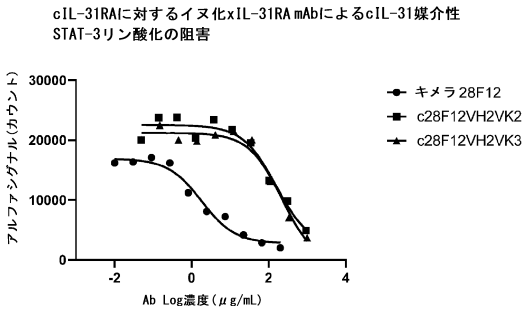
【図７Ａ】

Figure 7A



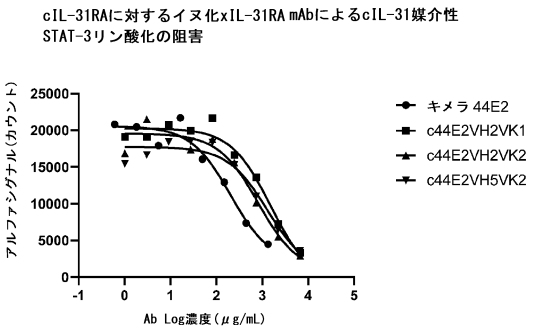
【図７Ｂ】

Figure 7B



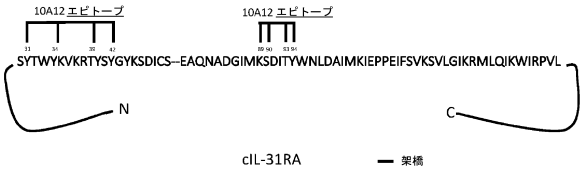
【図７Ｃ】

Figure 7C



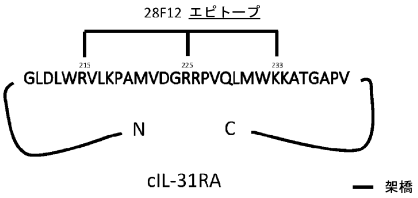
【図８Ａ】

Fig. 8A



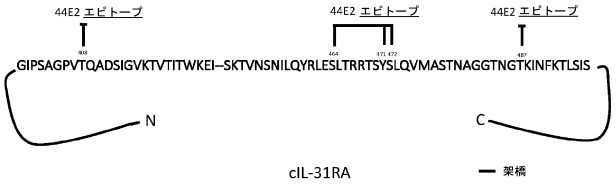
【図８Ｂ】

Fig. 8B



【図８Ｃ】

Fig. 8C



【配列表】

202354518200000 1.app

【手続補正書】
【提出日】令和5年8月24日(2023.8.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）：ＣＤＲ ｈｅａｖｙ １（ＨＣＤＲ１）、ＣＤＲ ｈｅａｖｙ ２（ＨＣＤＲ２）およびＣＤＲ ｈｅａｖｙ ３（ＨＣＤＲ３）のセットを含む、イヌインターロイキン－３１受容体アルファ（イヌＩＬ－３１ＲＡ）に結合する単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片であって、
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２および配列番号４１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３３、配列番号３９および配列番号４３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項２】
前記抗体が、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合した場合、配列番号１０４、配列番号１０５、ならびに配列番号１０４および配列番号１０５の両方からなる群から選択されるアミノ酸配列によって構成されるエピトープに結合する、請求項１に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項３】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３３のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項４】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３９のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項５】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号４３のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項６】
（ｉ）前記ＨＣＤＲ１が、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉ）前記ＨＣＤＲ２が、配列番号４１のアミノ酸配列を含み、
（ｉｉｉ）前記ＨＣＤＲ３が、配列番号３９のアミノ酸配列を含む、請求項１または２に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項７】
３つの軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）：ＣＤＲ ｌｉｇｈｔ １（ＬＣＤＲ１）、ＣＤＲ ｌｉｇｈｔ ２（ＬＣＤＲ２）およびＣＤＲ ｌｉｇｈｔ ３（ＬＣＤＲ３）のセットをさらに含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片であって、
（ｉｖ）前記ＬＣＤＲ１が、配列番号３４、配列番号３８、配列番号４０、配列番号４

２および配列番号４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖ）前記ＬＣＤＲ２が、配列番号３５および配列番号３７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖｉ）前記ＬＣＤＲ３が、配列番号３６および配列番号４５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項８】
（ｉｖ）前記ＬＣＤＲ１が、配列番号３４、配列番号３８および配列番号４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖ）前記ＬＣＤＲ２が、配列番号３５および３７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
（ｖｉ）前記ＬＣＤＲ３が、配列番号３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項９】
前記抗体およびその抗原結合断片が、イヌＩＬ－３１ＲＡに結合し、イヌインターロイキン－３１へのイヌＩＬ－３１ＲＡの結合を遮断する、請求項１～８のいずれか一項に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１０】
イヌ化抗体またはそのイヌ化抗原結合断片である、請求項９に記載の単離された哺乳動物抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１１】
配列番号７９、配列番号８０、配列番号８１および配列番号８２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むヒンジ領域を含む、請求項１０に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１２】
配列番号７８のアミノ酸配列を含む改変イヌＩｇＧ－Ｂ（ＩｇＧ－Ｂｍ）を含む重鎖を含む、請求項１０に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１３】
前記イヌ化ＩＬ－３１ＲＡ抗体が、配列番号８３、配列番号８６および配列番号８７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号８４および配列番号８５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む、請求項１０に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１４】
前記イヌ化ＩＬ－３１ＲＡ抗体が、
配列番号８３のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８３のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８６のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８６のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８４のアミノ酸配列を含む重鎖、または
配列番号８７のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号８５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、請求項１３に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１５】
請求項１０～１４のいずれか一項に記載のイヌ化抗体の鎖をコードする単離された核酸であって、

前記イヌ化抗体の鎖が、イヌ化抗体またはその抗原結合断片の重鎖、イヌ化抗体またはその抗原結合断片の軽鎖、または、イヌ化抗体またはその抗原結合断片の重鎖およびイヌ化抗体またはその抗原結合断片の軽鎖の両方からなる群より選択される、核酸。

【請求項１６】

請求項１５に記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

【請求項１７】

請求項１６に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項１８】

請求項１０～１４のいずれか一項に記載のイヌ化抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む医薬組成物。

【請求項１９】

アトピー性皮膚炎に関連する掻痒症の遮断を補助する方法であって、それを必要とする被験体に、請求項１８に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含み、前記被験体が非ヒト動物である方法。

【国際調査報告】

International application No.
PCT/EP2021/078385

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/078385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/022616 A1 (BAMMERT GARY F [US] ET AL) 24 January 2013 (2013-01-24) claims 1,6 -----	1-21
Y	US 2020/239563 A1 (PIKETTY CHRISTOPHE [FR]) 30 July 2020 (2020-07-30) the whole document -----	1-21

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 January 2022	31/01/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Scheffzyk, Irmgard

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/078385

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KABASHIMA KENJI ET AL: "Trial of Nemolizumab and Topical Agents for Atopic Dermatitis with Pruritus", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 383, no. 2, 9 July 2020 (2020-07-09), pages 141-150, XP055881702, US ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa1917006 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1917006?articleTools=true> the whole document -----	1-21
Y	THOMAS RUZICKA ET AL: "Supplementary Appendix of: Anti?Interleukin-31 Receptor A Antibody for Atopic Dermatitis", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 376, no. 9, 2 March 2017 (2017-03-02) , pages 826-835, XP055588908, US ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa1606490 cited in the application the whole document -----	1-21

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/078385

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013022616 A1	24-01-2013	AR 087281 A1	12-03-2014
		AU 2012285432 A1	30-01-2014
		AU 2016203590 A1	16-06-2016
		BR 112014001407 A2	01-03-2017
		CA 2842475 A1	24-01-2013
		CA 2926379 A1	24-01-2013
		CN 103890009 A	25-06-2014
		CN 105504059 A	20-04-2016
		CY 1119475 T1	07-03-2018
		DK 2734549 T3	11-09-2017
		EP 2734549 A1	28-05-2014
		EP 3219729 A1	20-09-2017
		EP 3653645 A1	20-05-2020
		EP 3842456 A1	30-06-2021
		ES 2638340 T3	19-10-2017
		ES 2827231 T3	20-05-2021
		HR P20171198 T1	20-10-2017
		HR P20201634 T1	25-12-2020
		HU E034282 T2	28-02-2018
		HU E051068 T2	28-01-2021
		JP 6022563 B2	09-11-2016
		JP 2014529295 A	06-11-2014
		KR 20140041858 A	04-04-2014
		KR 20160028488 A	11-03-2016
		LT 2734549 T	11-09-2017
		LT 3219729 T	25-11-2020
		ME 02837 B	20-01-2018
		MX 349053 B	06-07-2017
		NZ 620031 A	31-03-2016
		PL 2734549 T3	30-11-2017
		PL 3219729 T3	25-01-2021
		PT 2734549 T	29-08-2017
		PT 3219729 T	23-10-2020
		RU 2014101250 A	27-08-2015
		SI 2734549 T1	30-10-2017
		SI 3219729 T1	30-11-2020
		US 2013022616 A1	24-01-2013
		US 2014286958 A1	25-09-2014
		US 2014315251 A1	23-10-2014
		US 2019092854 A1	28-03-2019
		US 2019359702 A1	28-11-2019
		US 2019389944 A1	26-12-2019
		UY 34206 A	28-02-2013
		WO 2013011407 A1	24-01-2013
		ZA 201400768 B	23-12-2015
US 2020239563 A1	30-07-2020	AU 2020213978 A1	23-09-2021
		CA 3127983 A1	06-08-2020
		CN 113660981 A	16-11-2021
		EP 3917617 A1	08-12-2021
		JP 2021509103 A	18-03-2021
		KR 20210122286 A	08-10-2021
		SG 11202108220Y A	30-08-2021
		TW 202043282 A	01-12-2020
		US 2020239563 A1	30-07-2020
		WO 2020157636 A1	06-08-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/21 (2006.01)		C12N 1/21		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N 5/10		
A61K 39/395 (2006.01)		A61K 39/395	N	
A61P 17/04 (2006.01)		A61P 17/04		
A61P 37/08 (2006.01)		A61P 37/08		

(32)優先日 令和2年12月18日(2020.12.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/235,257
(32)優先日 令和3年8月20日(2021.8.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 63/235,258
(32)優先日 令和3年8月20日(2021.8.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 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,IT,JO,JP,KE,KG,KH,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 安藤 健司
(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
(74)代理人 100196483
弁理士 川嵜 洋祐
(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
(74)代理人 100172683
弁理士 綾 聡平
(74)代理人 100219265
弁理士 鈴木 崇大
(74)代理人 100203208
弁理士 小笠原 洋平
(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
(72)発明者 モージー，モハマド
アメリカ合衆国、ネブラスカ・６８０２２、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・２１４０１

(72)発明者　チャン，ユアンチョン
アメリカ合衆国、ニュージャージー・０７０３３、ケニルワース、ギャロッピング・ヒル・ロード・２０００
(72)発明者　サハ，アナスヤ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０８０、サウス・サンフランシスコ、ゲートウェイ・ブールバード・６３０／６５０

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA43
4C085　AA14 BB11 BB31 DD62 EE01
4H045　AA11 AA20 AA30 BA09 BA10 DA76 EA20 FA74