

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5086098号
(P5086098)

(45) 発行日 平成24年11月28日(2012.11.28)

(24) 登録日 平成24年9月14日(2012.9.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 18 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-548835 (P2007-548835)
 (86) (22) 出願日 平成18年1月2日(2006.1.2)
 (65) 公表番号 特表2008-526187 (P2008-526187A)
 (43) 公表日 平成20年7月24日(2008.7.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/000005
 (87) 国際公開番号 W02006/072564
 (87) 国際公開日 平成18年7月13日(2006.7.13)
 審査請求日 平成19年8月31日(2007.8.31)
 (31) 優先権主張番号 05000003.3
 (32) 優先日 平成17年1月3日(2005.1.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 05002229.2
 (32) 優先日 平成17年2月3日(2005.2.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100113653
 弁理士 東田 幸四郎
 (74) 代理人 100116919
 弁理士 齋藤 房幸

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2711

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-13受容体α1に対する抗体とその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

IL-13Rα1に結合し、IL-13の生物活性を阻害する抗体であって、重鎖可変領域のCDR1として配列番号5のアミノ酸31～35、CDR2としてアミノ酸50～66およびCDR3としてアミノ酸99～107を含み、そして軽鎖可変領域のCDR1として配列番号6のアミノ酸24～34、CDR2としてアミノ酸50～56およびCDR3としてアミノ酸89～97を含むことを特徴とする抗体。

【請求項2】

請求項1記載の抗体であって、重鎖可変領域として配列番号5および軽鎖可変領域として配列番号6を含むことを特徴とする抗体。

【請求項3】

a) Gly₂₃₆が欠失したアミノ酸配列Pro₂₃₃Val₂₃₄Ala₂₃₅、および/またはアミノ酸配列Gly₃₂₇Leu₃₂₈Pro₃₂₉Ser₃₃₀Ser₃₃₁、

b) アミノ酸配列Ala₂₃₄Ala₂₃₅、もしくは

c) アミノ酸Ala₂₆₅およびAla₂₉₇

を含むヒトγ1重鎖を含むことを特徴とする、請求項1または2記載の抗体。

【請求項4】

ヒト抗体であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項記載の抗体。

【請求項5】

IL-13R α 1に結合する親和度が 10^{-9} M (K_D) 以下であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項6】

ハイブリドーマ細胞系 DSM ACC 2711 から取得した請求項1または2記載の抗体。

【請求項7】

κ 軽鎖定常領域として配列番号11、および γ 1 重鎖定常領域として配列番号12を含むことを特徴とする請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項8】

突然変異 L234A と L235A もしくは D265A と N297A を有することを特徴とする請求項7記載の抗体。

10

【請求項9】

医薬組成物の製造のための、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項10】

医薬的に有効な量の請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を含む医薬組成物。

【請求項11】

請求項1～8のいずれか一項記載の組換え抗体を産生可能な組換え宿主細胞。

【請求項12】

医薬的に有効な量の請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を含む医薬組成物の製造方法。

20

【請求項13】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体をコードする核酸。

【請求項14】

原核宿主細胞内もしくは真核宿主細胞内で該核酸を発現することができる、請求項13記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項15】

請求項14記載のベクターを含む原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞。

【請求項16】

IL-13R α 1に結合し、IL-13がIL-13R α 1に結合するのを阻害するポリペプチドの生産方法であって、請求項13記載の重鎖をコードする核酸および軽鎖をコードする核酸を原核宿主細胞内もしくは真核宿主細胞内で発現させ、該細胞から該ポリペプチドを回収することを特徴とする方法。

30

【請求項17】

請求項1～8のいずれか一項記載の抗体を組換え発現によって産生し、該抗体を回収し、かつ該抗体を医薬的に受容可能な緩衝剤および/またはアジュバントと組み合わせることを特徴とする医薬組成物の製造方法。

【請求項18】

ハイブリドーマ細胞系 DSM ACC 2711。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、IL-13受容体 α 1 (IL-13R α (アルファ) 1) に対するヒト抗体、それらの産生方法および使用に関する。

【0002】

発明の背景

IL-13は、主としてTh2細胞によって産生されるが、肥満細胞やNK細胞によっても産生される分泌単量体ペプチドである。IL-13の生体機能には、例えばIGE産生の調節とTh2発達の調節がある。IL-13は、IL-13受容体アルファ1 (IL-13R α 1) 鎖およびIL-4受容体アルファ (IL-4R α) 鎖からなる受容体複合体に結合する。IL-13が結合すると、主としてSTAT6を介する信号伝達事象が誘

50

発される。IL - 13 は、単独では IL - 13 R α 1 に結合する親和性が低く、また IL - 4 R α 1 には結合しない。これに反して、IL - 4 は、IL - 4 R α に単独で結合し、IL - 13 R α 1 には単独で結合しない。IL - 13 には別の受容体すなわち IL - 13 R α 2 が報告されている。IL - 13 は、この受容体には高い親和性で結合するので、この受容体はおとり受容体として作用する可能性がある。

【0003】

形質転換マウスにおいて IL - 13 の過剰発現が誘導されると、その結果生ずる表現型は喘息患者と多くの特徴を共有する。それらの特徴により、粘液化生、マクロファージ、リンパ球および好酸球の増殖性炎症、プロテアーゼ様 MMP - 9、- 12、- 13、- 2 および - 14 の亢進、カテプシン B、H、K および S が現れるほか、上皮下線維症も顕わる。IL - 13 のノックアウトマウスでは、Th 2 の発達が阻害されて、Th 2 サイトカインの産生が大幅に低下する。これらのマウスでは、好酸球性炎症が存在しているにもかかわらず気道過敏症 (AHR) は発現しない。IL - 13 の投与により AHR が回復するので、このことから、マウスにおける AHR の誘導には IL - 13 が必要かつ十分であることが示唆される。喘息に関連する IL - 13 の他の重要な生体機能には、例えば杯形細胞の化生と粘液の産生の誘導が挙げられる。IL - 13 は、気道上皮細胞、線維芽および気道平滑筋細胞上に直接作用し、この細胞種のそれぞれにおける各種転写プログラムを誘導する。面白いことに、IL - 13 は、平滑筋細胞におけるアルファ - アドレナリン反応を低下させ、気道狭窄の原因となる。IL - 13 プロモーターの多型は、アレルギー性喘息発生リスクの増大と関連している。IL - 13 遺伝子における多型は、血清 IgE レベルが高いことと関連している。IL - 4 と IL - 13 の両遺伝子間における遺伝子間配列において単一のヌクレオチド多型が存在することは、アトピー性喘息と関連する。

【0004】

IL - 13 アンタゴニストは、動物モデルで利用されてきた。たとえば、可溶性のマウス IL - 13 R α 2 - IgG Fc 融合タンパクを使用することによって、オボアルブミン誘導 AHR と粘液含有細胞の数を完全に逆転させる効果が示された。この逆転は、表現型が完全に発現してから治療した場合であっても達成された。さらに、IL - 13 融合サイトトキシン分子でマウスを治療すると、慢性真菌誘発型アレルギー性炎症における気道疾患のあらゆる特徴が減少した。結論として、IL - 13 はアレルギー応答を呈する奏功部位の重要な伝達物質である。

【0005】

IL - 13 R α 1 は、多数のヘマポイチン受容体スーパーファミリー (1 型サイトカイン受容体ファミリー) に属し、Obiri N. I. et al., J. Biol. Chem., 270 (1995) 8797-8804) および W096/29417 によって特定および報告されている。これは、シグナル配列を含む 427 個のアミノ酸からなるタンパクである。この DNA 配列およびタンパク配列が、W097/15663 および SwissProt No. P78552 に開示されている。IL - 13 R α 1 はグルコシル化タンパクであって、IL - 13 への結合親和性は低いが、IL - 4 R α に連結してヘテロ二量体になると、IL - 13 への結合親和性は高くなる。この複合体も IL - 4 の受容体である。

【0006】

IL - 13 R α 1 に対する抗体は、W096/29417、W097/15663、W003/080675、Graber P., ら, Eur. J. Immunol., 28 (1998) 4286-4298; Poudrier J., et al, J. Immunol., 163 (1999) 1153-1161; Poudrier J., ら, Eur. J. Immunol., 30 (2000) 3157-3164; Aikawa M., ら, Cytokine, 13 (2001) 75-84 から公知である。IL - 13 R α 1 に対する抗体は、R&D Systems Inc. (USA) から購入することができる。

【0007】

発明の概要

本発明は、IL - 13 R α 1 に結合することによって IL - 13 の生物活性を阻害する抗体であって、該抗体の可変重鎖アミノ酸配列 CDR 3 が配列番号 1、3、5、7 もしくは 9 の重鎖 CDR 3 配列からなる群から選択されることを特徴とする抗体を含む。

【 0 0 0 8 】

抗体は、ヒト抗体であることが好ましい。

【 0 0 0 9 】

抗体は、好ましくは、 $IL-13R\alpha 1$ に結合する親和度が $10^{-9} M (K_D)$ 以下、好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-13} M$ であることを特徴とする。

【 0 0 1 0 】

抗体は、好ましくは、その重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列が、配列番号 1、3、5、7 もしくは 9 の重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列からなる群から選択されることを特徴とする。

【 0 0 1 1 】

抗体は、好ましくは、該抗体の可変軽鎖アミノ酸配列 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、配列番号 2、4、6、8 もしくは 10 の軽鎖 C D R 配列からなる群から選択されることを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

抗体は、好ましくは、該抗体の可変重鎖アミノ酸配列 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、配列番号 1、3、5、7 もしくは 9 の重鎖 C D R 配列からなる群から選択され、該抗体の可変軽鎖アミノ酸配列 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 が、配列番号 2、4、6、8 もしくは 10 の軽鎖 C D R 配列からなる群から選択されることを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

C D R 配列は、好ましくは、相互に他から独立に選択され、F R (フレームワーク) 領域によって分離される。

【 0 0 1 4 】

抗体は、好ましくは、重鎖 C D R として配列番号 1 の C D R および軽鎖 C D R として配列番号 2 の C D R ; 重鎖 C D R として配列番号 3 の C D R および軽鎖 C D R として配列番号 4 の C D R ; 重鎖 C D R として配列番号 5 の C D R および軽鎖 C D R として配列番号 6 の C D R ; 重鎖 C D R として配列番号 7 の C D R および軽鎖 C D R として配列番号 8 の C D R ; あるいは、重鎖 C D R として配列番号 9 の C D R および軽鎖 C D R として配列番号 10 の C D R を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 5 】

C D R 配列は、Kabat ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) の標準の定義に従って決定することができる。これを基準として、配列番号 1 ~ 8 の相補性決定領域 (C D R) は、以下の配列を有する。

【 0 0 1 6 】

重鎖 C D R : 配列番号 1、3、5、7、9 の C D R 1 (a a 3 1 - 3 5)、配列番号 1、3、5、7、9 の C D R 2 (a a 5 0 - 6 6)、配列番号 1、3、9 の C D R 3 (a a 9 9 - 1 0 8)、配列番号 5 の C D R 3 (a a 9 9 - 1 0 7)、配列番号 7 の C D R 3 (a a 9 9 - 1 1 2)、

軽鎖 C D R : 配列番号 2、4、6、10 の C D R 1 (a a 2 4 - 3 4)、配列番号 8 の C D R 1 (a a 2 4 - 3 5)、配列番号 2、4、6、10 の C D R 2 (a a 5 0 - 5 6)、配列番号 8 の C D R 2 (a a 5 1 - 5 7) および配列番号 2、4、6、10 の C D R 3 (a a 8 9 - 9 7)、配列番号 8 の C D R 3 (a a 9 0 - 9 7)。

【 0 0 1 7 】

本発明は、好ましくは、相補性決定領域 (C D R) として下記の配列を有する抗体を提供する。

- a) 配列番号 1、3、5、7 もしくは 9 の重鎖 C D R を含む抗体重鎖
 - b) 配列番号 2、4、6、8 もしくは 10 の軽鎖 C D R を含む抗体軽鎖
- ここで C D R は相互に他から独立に選択される。

【 0 0 1 8 】

抗体は、好ましくは、重鎖可変領域として配列番号 1 および軽鎖可変領域として配列番

10

20

30

40

50

号 2、重鎖可変領域として配列番号 3 および軽鎖可変領域として配列番号 4、重鎖可変領域として配列番号 5 および軽鎖可変領域として配列番号 6、重鎖可変領域として配列番号 7 および軽鎖可変領域として配列番号 8、または重鎖可変領域として配列番号 9 および軽鎖可変領域として配列番号 10 を含むことを特徴とする。

【0019】

抗体は、好ましくは、下記を含むことを特徴とする。

- a) 重鎖可変領域として配列番号 1 および軽鎖可変領域として配列番号 2、 κ 軽鎖定常領域として配列番号 11 および γ 1 重鎖定常領域として配列番号 12、ただし場合によって突然変異 L234A と L235A もしくは D265A と N297A を有する、
- b) 重鎖可変領域として配列番号 3 および軽鎖可変領域として配列番号 4、 κ 軽鎖定常領域として配列番号 11 および γ 1 重鎖定常領域として配列番号 12、ただし場合によって突然変異 L234A と L235A もしくは D265A と N297A を有する、
- c) 重鎖可変領域として配列番号 5 および軽鎖可変領域として配列番号 6、 κ 軽鎖定常領域として配列番号 11 および γ 1 重鎖定常領域として配列番号 12、ただし場合によって突然変異 L234A と L235A もしくは D265A と N297A を有する、
- d) 重鎖可変領域として配列番号 7 および軽鎖可変領域として配列番号 8、 κ 軽鎖定常領域として配列番号 11 および γ 1 重鎖定常領域として配列番号 12、ただし場合によって突然変異 L234A と L235A もしくは D265A と N297A を有する、または、
- e) 重鎖可変領域として配列番号 9 および軽鎖可変領域として配列番号 10、 κ 軽鎖定常領域として配列番号 11 および γ 1 重鎖定常領域として配列番号 12、ただし場合によって突然変異 L234A と L235A もしくは D265A と N297A を有する。

【0020】

抗体は、好ましくは、抗体 LC5002-002、LC5002-003、LC5002-005、LC5002-007 および / または LC5002-018 と競合して IL-13R α 1 に結合することを特徴とする。抗体は、好ましくは、可変領域として LC5002-002、LC5002-003、LC5002-005、LC5002-007 もしくは LC5002-018 の可変領域を含むことを特徴とする。これら抗体の可変領域は、配列番号 1 ~ 10 に示されている。有用な定常領域は、本技術分野で公知である。配列番号 11 ~ 12 にその例が示されている。

【0021】

抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体もしくは組み換えにより産生された抗体である。

【0022】

本発明の一つの実施態様では、抗体は、クラス改変ヒト抗体である。

【0023】

本発明の好ましい実施例では、抗体は、

- a) Gly₂₃₆ が欠失したアミノ酸配列 Pro₂₃₃ Val₂₃₄ Ala₂₃₅ および / またはアミノ酸配列 Gly₃₂₇ Leu₃₂₈ Pro₃₂₉ Ser₃₃₀ Ser₃₃₁、
- b) アミノ酸配列 Ala₂₃₄ Ala₂₃₅、もしくは
- c) アミノ酸 Ala₂₆₅ および Ala₂₉₇ を含むヒト γ 1 重鎖を含む。

【0024】

本発明抗体は、好ましくは、IL-13 により誘発される Stat-6 リン酸化を阻害し、その IC₅₀ 値は 6 nM 以下であり、IL-13 より誘発されるエオタキシン産生を阻害し、その IC₅₀ 値は 20 nM 以下であり、さらに / または IL-13 もしくは IL-4 により誘発される細胞増殖、好ましくは TF-1 細胞 (ATCC CRL 2003) の細胞増殖を阻害し、その IC₅₀ 値は (IL-13 では) 10 nM 以下および (IL-4 では) 60 nM 以下である。IL-13 により誘発される Stat-6 リン酸化、エオタキシン産生および細胞増殖の誘発は、実施例 6 ~ 8 によって決定される。

【 0 0 2 5 】

本発明抗体は、好ましくは、変性 I L - 1 3 R α 1 には結合しない（結合親和度 K_D は 10^{-6} 以上）。抗体は、好ましくは、I L - 1 3 R α 2 および I L - 4 R α との交差反応性を実質的に呈さないことを特徴とする（結合親和度 K_D は 10^{-6} 以上）。

【 0 0 2 6 】

本発明は、さらに、I L - 1 3 R α 1 に対する拮抗性モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。

【 0 0 2 7 】

本発明による好ましいハイブリドーマ細胞系 (hu-MAB<h-IL-13 R α 1>LC.5002-002 (DSM ACC2709)、hu-MAB<h-IL-13 R α 2>LC.5002-003 (DSM ACC2710)、hu-MAB<h-IL-13 R α 1>LC.5002-005 (DSM ACC2711)、hu-MAB<h-IL-13 R α 2>LC.5002-007 (DSM ACC2712)) は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germany に 2 0 0 5 年 1 月 1 3 日に寄託された。

【 0 0 2 8 】

該細胞系から取得可能な抗体は、本発明の実施態様である。

【 0 0 2 9 】

本発明は、本発明抗体を構成するポリペプチドをコード化する該核酸、核酸を含む発現ベクターおよび、このような抗体の組み換え産生用の宿主細胞をさらに提供する。本発明はさらに、このような抗体の組み換え産生方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明の核酸によってコード化されるポリペプチドは、

- a) 配列番号 1、3、5、7 もしくは 9 の重鎖 C D R を有する抗体重鎖と
- b) 配列番号 2、4、6、8 もしくは 10 の軽鎖 C D R を有する抗体軽鎖である。

【 0 0 3 1 】

これらのポリペプチドは、それぞれ他方の抗体鎖と集合化して抗体を生成することが可能である。

【 0 0 3 2 】

本発明抗体により、コルチコステロイド療法を必要とする患者への利益が出現する。本発明抗体群には、喘息もしくはアレルギー性疾患の患者に利益を招来する新しい独創的な特性がある。

【 0 0 3 3 】

本発明はさらに、喘息およびアレルギー性疾患の治療方法を提供する。

【 0 0 3 4 】

本発明には、本発明抗体の使用であって喘息の治療ならびに本発明医薬組成物の製造のための使用が含まれる。さらに、本発明には、本発明医薬組成物の製造方法が含まれる。

【 0 0 3 5 】

本発明には、さらに、医薬的に有効な量の本発明抗体を含有し、場合によっては、抗体を医薬目的に製剤化するのに有用な緩衝剤および / またはアジュバントとともに含有する医薬組成物が含まれる。

【 0 0 3 6 】

本発明は、さらに、医薬的に受容可能な担体にこのような抗体を含有する医薬組成物を提供する。一つの実施態様では、その医薬組成物は、製造品もしくはキット製品に含まれていてもよい。

【 0 0 3 7 】

本発明には、さらに、本発明核酸を含むベクターであって、該核酸を原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞内で発現することができるベクターが含まれる。

【 0 0 3 8 】

本発明には、さらに、本発明ベクターを含む原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞が含まれる。

【 0 0 3 9 】

本発明には、さらに、本発明組み換えヒト抗体の産生方法であって、原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞内で本発明核酸を発現し、該細胞から該抗体を回収することを特徴とする方法が含まれる。本発明には、さらに、このような組み換え方法によって取得可能な抗体が含まれる。

【0040】

本発明には、さらに、医薬組成物の製造方法であって、該抗体を使用しないこのようなアッセイと比較して、複数の抗IL-13R α 1抗体から一つの抗IL-13R α 1抗体を選択し、組み換え発現によって該抗体を産生し、該抗体を回収し、医薬的に受容可能な緩衝剤および/もしくはアジュバントと該抗体を組み合わせることを特徴とする方法が含まれる。抗体は、上記追加特性の一以上を有することが好ましい。

10

【0041】

発明の詳細な説明

「IL-13R α 1、ネズミIL-13R α 1、IL-13、IL-13R α 2およびIL-4R α 」という用語およびそれらのドメインは、当技術分野では公知であり、たとえば、SwissProt P78552、O09030、P35225、Q14627およびP24394によって定義されている。したがって、特に記載しない限り、「IL-13R α 1、IL-13、IL-13R α 2およびIL-4R α 」という用語は、ヒトポリペプチドIL-13R α 1、IL-13、IL-13R α 2およびIL-4R α を表す。

【0042】

本明細書で使用している「ヒト抗体」という用語には、所定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に帰属することができる可変領域および定常領域(ドメイン)を有する抗体が挙げられる。その理由は、その抗体の配列はヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列と類似性もしくは同一性が高いからである。ヒト抗体は、当技術分野では公知である(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。ヒト抗体は、免疫時に内因性免疫グロブリンを産生せずにヒト抗体の全領域もしくは選択領域を産生可能である形質転換動物(たとえばマウス)でも産生することができる。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列をこのような生殖細胞系突然変異マウスに移植すると、抗原の投与時にヒト抗体が産生する(たとえば、Jakobovits, A.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., ら, Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., ら, Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照)。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーでも産生可能である(Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., ら, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597)。ColeらおよびBoernerらによる技法もまたヒトモノクローナル抗体の調製に利用できる(Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985); and Boerner, P., ら, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)。ヒト抗体には各種形態の抗体、好ましくはモノクローナル抗体が包含され、例えば抗体全体、抗体フラグメント、クラス改変抗体ならびに遺伝子操作による抗体(変異抗体もしくは突然変異抗体)が挙げられるが、本発明の特徴的特性が維持される限りこれらに限定されない。組み換えヒト抗体が特に好ましい。本明細書で使用されている「モノクローナル抗体」という用語は、全てが実質的に同じアミノ酸配列を有する抗体分子の調製物を言う。

20

30

40

【0043】

本明細書で使用されている「組み換えヒト抗体」という用語は、組み換え手段によって調製、発現、生成もしくは単離したすべてのヒト抗体を包含することを意図としており、例えば、NSO細胞またはCHO細胞由来の宿主細胞またはヒト免疫グロブリンを形質導入した動物(例えばマウスなど)から単離した抗体、あるいはそれら宿主細胞に形質導入した組み換え発現ベクターを用いて発現させた抗体が挙げられる。このような組み換えヒト抗体で可変領域および定常領域は再配列した形態にある。本発明組み換えヒト抗体は、生体内で体細胞レベルの超変異(somatic hypermutation)を受けている。したがって、組み換え抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、定義されたヒト生殖細胞系VHおよびVL配列に帰属可能であるが、生体内のヒト抗体生殖細胞系の配列領域内に天然に

50

は存在しないかもしれない。

【 0 0 4 4 】

「クラス改変抗体」という用語は、モノクローナル抗体、好ましくはヒト抗体であって、ただしそれに含まれる可変領域すなわち結合領域は或る種の細胞源もしくは生殖細胞系に由来し、他方定常領域の少なくとも一部は他の種の細胞源もしくは生殖細胞系由来の通常は組み換えDNA技法により調製された抗体の定常領域に一致する抗体を言う。このようなクラス改変抗体は、天然には生起しないので、異種移植したマウスから直接入手することはできない。本発明に包含される「クラス改変抗体」の形態においては、定常領域の配列は野生型定常領域の配列とは差異があり、その結果、この抗体の特性は本発明の特性と相違しており、特にC1q結合および/またはFc受容体(FcR)結合に関してはFCが変化もしくは突然変異しているので相違する。クラス改変抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメントおよび免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む免疫グロブリン遺伝子の発現の生成物である。クラス改変抗体の産生方法には従来の組み換えDNAが含まれており、遺伝子の形質転換技術は当技術分野では公知である(たとえば、Morrison, S.L., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US Patent Nos. 5,202,238と5,204,244を参照)。

10

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用されている「可変領域」(軽鎖の可変領域(VL)、重鎖の可変領域(VH))は、対になっている軽鎖と重鎖のそれぞれにおいて抗原と抗体の結合に直接係わる部分を言う。ヒトの可変軽鎖と重鎖のドメインの一般構造は同じであり、各ドメインには4つのフレームワーク(FR)領域が含まれており、それらは、配列が広範囲に保存され、3つの「超可変領域」(もしくは相補的決定領域(CDR))によって連結している。フレームワーク領域は、 β (ベータ)-シート構造をとっており、そのCDRがループを形成してベータシート構造に連結することがある。各鎖のCDRは、フレームワーク領域によって三次元構造に保持され、他方の鎖のCDRと一体になって抗原接合部位を形成する。抗体重鎖および軽鎖のCDR3領域、好ましくは重鎖のCDR3は、本発明抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たし、本発明のさらなる目的を提供する。

20

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用する、「超可変領域」もしくは「抗体の抗原結合部分」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を表す。超可変領域には、「相補的決定領域」すなわち「CDR」のアミノ酸残基が含まれる。「フレームワーク」すなわち「FR」領域は、本明細書で定義する超可変領域残基を除く可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖および重鎖には、そのN末端からC末端に向けてドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4が含まれる。CDRおよびFR領域は、Kabat., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)らの標準の定義に従って決定される。

30

【 0 0 4 7 】

「定常領域」は、抗原に対する抗体の結合には直接関与しないが、各種エフェクター機能を発揮する。重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、抗体もしくは免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMのクラスに分けられ、これらのいくつかは更にサブクラス(イソタイプ)、たとえばIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、IgA1およびIgA2に分類することができる。免疫グロブリンのクラスが異なるに応じて、重鎖定常領域はそれぞれ γ 、 δ 、 μ 、 α および ϵ と呼ばれる。本発明抗体はIgG1型であることが好ましい。

40

【 0 0 4 8 】

抗体のFc部は、補体活性化、C1q結合、C3活性化およびFc受容体結合に直接関与する。C1qに対する結合は、Fc部の所定の結合部位によって生じる。このような結合部位は、当技術分野では公知であり、たとえば、Lukas, T.J., ら, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917

50

; Burton, D.R., ら, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., ら, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., ら, J. Immunol. 164 (2000) 4128-4184; Hezar eh, M., ら, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., ら, Immunology 86 (1995) 319-324; および EP 0 307 434 に記述されている。このような結合部位の例として、L 2 3 4、L 2 3 5、D 2 7 0、N 2 9 7、E 3 1 8、K 3 2 0、K 3 2 2、P 3 3 1 および P 3 2 9 (Kabat の E U インデックスにしたがって符番、以下を参照) が挙げられる。サブクラス I g G 1、I g G 2 および I g G 3 の抗体は、通常、補体活性化、C 1 q 結合 および C 3 活性化を呈するが、I g G 4 抗体は、補体系を活性化させず、C 1 q 結合を行わず C 3 活性化も行わない。本明細書で使用している「ヒト起源由来の F c 部」という用語は、サブクラス I g G 1 のヒト抗体の F c 部のアミノ酸配列を有するのが好ましい F c 部を言うが、ただし修飾が加えられ、その結果 C 1 q 結合、C 3 活性化および / または F c R 結合が検出されないか、もしくは結合がヒト I g G 1 抗体に比べ少なくとも 50%、好ましくは 70% 低減されたもの言う。「抗体の F c 部」は、熟練技術者にとっては公知の用語であり、パラインによる抗体の開裂の基本概念に基づいて定義されている。本発明抗体には、ヒト起源由来の F c 部のアミノ酸配列を持つ F c 部、好ましくはヒト定常領域の他のすべての部分を含んでいることが好ましい。その F c 部はヒト I g G 1 サブクラス由来の突然変異ヒト F c 部であるのが好ましい。もっとも好ましい F c 部は L 2 3 4 A と L 2 3 5 A もしくは D 2 6 5 A と N 2 9 7 A の突然変異を有する γ 1 - 重鎖定常領域 (配列番号 11 に例がある) を含む (WO99/51642)。

【0049】

ヒト定常領域鎖、例えば γ 1 - 重鎖については、Kabat ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) および Bruggemann, M., ら, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., ら, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527 に詳細な記述がある。本発明における好ましい定常ドメインによって補体結合は得られない。本明細書で使用されている「可変領域」(軽鎖の可変領域 (V L)、重鎖の可変領域 (V H)) は、抗原に対する抗体の結合に直接関与する一対の軽鎖と重鎖のそれぞれを言う。

【0050】

本明細書で使用されている核酸および核酸分子という用語は、DNA 分子と RNA 分子とを含むことを意図している。核酸分子は、1 本鎖もしくは 2 本鎖であってもよいが、2 本鎖 DNA であることが好ましい。

【0051】

核酸は、他の核酸配列との機能的な関係に置かれると、「操作可能なように連結」される。例えば、前駆体配列もしくは分泌のリーダーとなる DNA は、それがポリペプチドの分泌に参加する前駆体タンパクとして発現する場合には、ポリペプチドの DNA に操作可能なように連結される。プロモーターもしくはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合には、コーディング配列に操作可能なように連結される。あるいはリボソームへの結合部位は、それが翻訳を促進する位置に置かれる場合には、コーディング配列に操作可能なように連結される。包括的に「操作可能なように連結される」という用語は、連結される DNA 配列が cis であり、分泌リーダーとなる場合には連続的であり、読取り枠内にあることを意味する。ただし、エンハンサーは連続している必要はない。連結は、便利な制限部位のライゲーション反応によって達成される。このような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを従来の慣行に従って使用する。

【0052】

本明細書で使用されている「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」という表現は、相互に交換して使用することができ、このような名称にはすべて子孫が含まれる。したがって、「形質転換体」および「形質転換細胞」という用語には、一次対象細胞とその対象細胞に由来する培養物が包含され、転換の回数には関係がない。また、子孫のすべてが DNA において正確に一致しているとは限らないと理解される。理由は意図的な変異あるいは

偶然の変異があるからである。変異子孫であっても、最初に形質転換した細胞をスクリーニングするのに使用した機能や生物活性が同じであれば、包含される。別の名称を意図する場合には、文脈から明らかとなる。

【 0 0 5 3 】

本明細書で用いられている「IL - 13R α 1に結合」という用語は、インビトロの測定において抗体がIL - 13R α 1に結合することを意味し、ただしその結合測定においては抗体を表面に結合させ、IL - 13R α 1の結合を表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定するのが好ましい。結合とは、結合の親和度(K_D)が 10^{-8} M以下、好ましくは $10^{-13} \sim 10^{-9}$ Mであることを意味する。「結合しない」とは、 K_D が 10^{-6} M以上であることを意味する。本発明抗体は、ヒトIL - 13R α 1の細胞外ドメインに結合するが、マウスIL - 13R α 1にも結合するのが好ましい。

10

【 0 0 5 4 】

IL - 13R α 1への結合は、BIAcore測定によって検討可能である(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)。結合の親和度は、 k_a (抗体/抗原複合体からの抗体の会合の速度定数)、 k_d (解離速度)、および K_D (k_d/k_a)の項目によって定義される。

【 0 0 5 5 】

IL - 13のIL - 13R α 1への結合は、本発明抗体によって阻害される。この阻害は、IL - 13のIL - 13R α 1/IL - 4R α 異種二量体への結合に対するELISAによる IC_{50} として測定される。この測定を実施するには、IL - 13R α 1を固定化してIL - 13およびIL - 4R α を添加する。IL - 13のIL - 13R α 1への結合に対する本発明抗体の IC_{50} 値はせいぜい6 nMである。 IC_{50} 値は、少なくとも3回の独立した測定の平均値もしくは中央値として測定される。1個の IC_{50} 値が範囲外となってもよい。

20

【 0 0 5 6 】

本発明抗体は、抗体LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007もしくはLC5002 - 018からなる群から選択される抗体が結合するのと同じIL - 13R α 1のエピトープに結合するのが好ましく、あるいはこれら抗体が結合して生ずる立体障害によってIL - 13R α 1に対する結合を阻害される。結合の阻害はSPR測定で検出することができ、その測定では抗体LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007もしくはLC5002 - 018からなる群から選択された固定化抗体および20 ~ 50 nMの濃度のIL - 13R α 1、ならびに100 nMの濃度で検出される抗体を用いる。信号が50%以上減衰すれば、該抗体が、抗体LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007もしくはLC5002 - 018からなる群から選択された抗体と競合していることが判る。「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合可能なタンパク質上の決定因子を意味する。エピトープは通常は分子の化学的に活性な表面の基、例えばアミノ酸あるいは糖側鎖から構成され、通常は特異的な3次元構造の特性および特異的な電荷特性を有する。立体構造エピトープと非立体構造エピトープとの識別は、変性溶剤の存在下で抗体は前者には結合性を喪失し、後者には喪失しないことにある。また本発明には、IL - 13R α 1に結合することによってIL - 13の生体活性を阻害するヒト抗体が含まれ、その特徴であるIL - 13R α 1への結合親和度は 10^{-9} M(K_D)以下、好ましくは $10^{-9} \sim 10^{-13}$ Mであり、またマウスIL - 13R α 1への結合親和度は 10^{-7} M(K_D)以下、好ましくは $10^{-8} \sim 10^{-9}$ Mである。

30

40

【 0 0 5 7 】

本発明の好ましい実施態様では、本発明抗体は、さらに、抗体LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007もしくはLC5002 - 018からなる群から選択される抗体が結合するのと同じエピトープに結合し、その結合パラメータ K_a 、 K_d および K_D から選択された一以上の特性を特徴とする。

50

【 0 0 5 8 】

本発明による抗体は、組み換え法によって産生されることが好ましい。この方法は、当技術分野では広く公知であり、原核細胞と真核細胞でタンパク質発現後、抗体ポリペプチドの単離が続き、通常は医薬的に受容可能な純度まで精製する。タンパク質を発現するには、軽鎖と重鎖もしくはそのフラグメントをコードする核酸を標準の方法によって発現ベクターに挿入する。発現は、CHO細胞、NSO細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母もしくはE. coli細胞のような適切な原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞で行い、抗体を細胞（上清もしくは溶解細胞）から回収する。

【 0 0 5 9 】

抗体の組み換え産生は、当技術分野では公知であり、例えば、Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., ら, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880のレビュー記事に記述」されている。

10

【 0 0 6 0 】

抗体は、細胞体中に、細胞溶解液中に、あるいは部分的に精製されたまたは実質的に純粋な形態で存在しうる。他の細胞成分や他の混入物、例えば他の細胞核酸もしくはタンパク質を除去するために、標準的な技術、例えばアルカリ/SDS処置、CsCl結合、カラムクロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で公知の他の技術によって精製を行う。Ausube, F., ら, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

20

【 0 0 6 1 】

NSO細胞における発現は、Barnes, L.M., ら, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; およびBarnes, L.M., ら, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270による記述がある。一過的発現については、Durocher, Y., ら, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9による記述がある。可変ドメインのクローニングについては、Orlandi, R., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; およびNorderhaug, L., ら, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87による記述がある。好ましい一過的発現系（HEK 293）については、Schlaeger, E.-J., および Christensen, K., in Cytotechnology 30 (1999) 71-83および Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199による記述がある。

30

【 0 0 6 2 】

例えば、原核細胞に好適な制御配列には、例えばプロモーター、場合によってはオペレーター配列およびリボソーム結合部位が含まれる。

【 0 0 6 3 】

真核細胞は、プロモーター、エンハンサーおよびポリアデニール化信号を利用することで知られている。

【 0 0 6 4 】

モノクローナル抗体を培地から好適に分離するには、従来の免疫グロブリン精製操作、例えばタンパクA - セファローズ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析法もしくはアフィニティ - クロマトグラフィーによる。このモノクローナル抗体をコードするDNAおよびRNAは容易に単離され、通常の操作により配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAおよびRNAの提供源として機能することができる。このDNAを一旦単離すれば発現ベクターに挿入し、次にそのベクターを宿主細胞、例えばCHO細胞、HEK293細胞または形質導入しなければ免疫グロブリンタンパクを産生しないミエローマ細胞に形質導入し、宿主細胞での組み換えモノクローナル抗体の合成を達成する。

40

【 0 0 6 5 】

本発明抗体には、さらに、「保存的な配列修飾」、すなわち本発明抗体の上記特性に効果または改変を及ぼさないヌクレオチドおよびアミノ酸配列の修飾、を有する抗体が含まれる。修飾の導入は、特定部位突然変異誘発ならびにCPR介在突然変異誘発などの、当

50

技術分野で公知の標準の技術によって可能である。保存的なアミノ酸置換には、例えばあるアミノ酸残基を側鎖が類似した他のアミノ酸残基で置き換える置換が含まれる。側鎖が類似したアミノ酸残基ファミリーは、当技術分野ですでに定義されている。これらのファミリーには、例えば塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジンなど）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸など）、非電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラリン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファンなど）、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、メチオニンなど）、ベータ分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシンなど）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンなど）を有するアミノ酸が含まれる。したがって、ヒト抗IL-13R α 1抗体中の予測される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリー由来の他のアミノ酸残基と置換可能であることが望ましい。

10

【0066】

アミノ酸置換は、Riechmann, L., ら, Nature 332 (1988) 323-327およびQueen, C., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033によって記述されているように、分子モデリングに基づく突然変異誘発によって実施することができる。

【0067】

ヒトIL-13R α 1抗体のアミノ酸配列変異体を作成するには、抗体DNAに適切なヌクレオチド変化を導入するか、またはペプチド合成による。ただし、このような修飾は、例えば上記のようなごく限られた範囲内でのみ行うことができる。例えば、修飾によって、前述の抗体の特性、例えばIgGイソタイプおよびエピトープ結合には変更がなく、組み換え体の産生収率やタンパク質の安定性が向上し精製が容易になるのがよい。

20

【0068】

抗IL-13R α 1抗体が適切な立体構造を維持するのに関与しないシステイン残基は全て一般的にセリンと置換してもよく、それによって分子の酸化安定性が向上し、異常な架橋は防止される。逆に、システイン結合（複数の場合もあり）を抗体に追加してもよく、それによって安定性が向上する（特に抗体がFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合）。

【0069】

抗体の別の型のアミノ酸変異体では、抗体の本来のグルコシル化パターンが変化する。この変化とは、抗体に存在する1以上の炭水化物構成成分が除去され、さらに/または抗体に存在しない1以上のグリコシル化部位が付加されることを意味する。抗体のグリコシル化は、一般にN-連結である。N-連結とは、アスパラギン残基の側鎖に炭水化物構成成分が結合することを言う。アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（ここでXは、プロリンを除くアミノ酸である）のトリペプチド配列は、炭水化物構成成分がアスパラギン側鎖に酵素的に結合するための認識配列である。したがって、これらトリペプチド配列のどちらかがポリペプチドに存在すれば、グリコシル化の潜在的部位が形成される。抗体へのグリコシル化部位の付加が好都合に達成されるためには、アミノ酸配列を変化し抗体中に（N-連結グリコシル化部位のための）上記トリペプチド配列の1つ以上を含有させる。

30

40

【0070】

抗IL-13R α 1抗体のアミノ酸配列変異体をコード化する核酸分子は、当技術分野で公知のさまざまな方法によって調製される。これらの方法には、例えば天然源からの単離（自然起源のアミノ酸配列変異体の場合）、あるいはオリゴヌクレオチド介在（もしくは部位特異的）突然変異誘発による調製、PCR突然変異誘発、および初期段階で調製された変異体または抗IL-13R α 1抗体の非変異体のカセット式突然変異誘発が挙げられるが、これらに限定されない。

【0071】

共有結合による別の型の修飾には、化学的もしくは酵素的に抗体にグリコシドを結合させることが必要である。これらの操作は、N-連結グリコシル化もしくはO-連結グリコ

50

シル化を呈するためのグリコシル化能を備えた宿主細胞で抗体を産生させる必要がないという利点がある。そのような結合モードを利用するかに応じて、糖（複数もあり）を結合させる相手は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボシキル基、（c）システイン等の遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、トレオニンもしくはヒドロキシルプロリン等の遊離ヒドロキシル基、（e）フェニルアラニン、チロシンもしくはトリプトファン等の芳香族残基もしくは（f）グルタミンのアミノ基であってよい。これらの方法については、W087/05330およびAplin, J.D., およびWriston, J.C.Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 259-306に記述がある。

【0072】

抗体に存在している炭水化物構成成分は、化学的にもしくは酵素により除去することができる。化学的脱グリコシル化は、抗体を、トリフルオロメタンスルホン酸もしくは同等の化合物に曝露させることによって実現できる。この処置の結果、連結糖（N - アセチルグルコサミンもしくはN - アセチルガラクトサミン）を除く糖類の大部分もしくは全てが開裂し、無修飾の抗体が遊離される。化学的脱グリコシル化については、Sojahn, H.T., and Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57およびEdge, A.S., ら, Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137によって記述されている。抗体上の炭水化物構成成分の酵素による開裂を達成するには、Thotakura, N.R., and Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359によって記述されているように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用する。

【0073】

共有結合による別の型の抗体修飾には、非タンパク性の多様なポリマーの1つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレンに、米国特許第 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 号もしくは4,179,337号に記述されている方法で抗体を連結させることが含まれる。

【0074】

さらに別の態様では、本発明は、本発明ヒト抗IL - 13R α 1抗体を発現する形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスから単離したB細胞を提供する。単離B細胞は、IL - 13R α 1抗原の精製物または濃縮物および/またはIL - 13R α 1を発現する細胞で免疫した形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスから取得するのが好ましい。形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスのゲノムには、本発明抗体の全部もしくは一部をコード化するヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランス遺伝子が含まれることが好ましい。次に単離したB細胞を不死化することにより、ヒト抗IL - 13R α 1抗体の供給源（例えば、ハイブリドーマ）が提供される。したがって、本発明はまた本発明ヒトモノクローナル抗体を産生可能なハイブリドーマを提供する。1つの実施態様では、ハイブリドーマ、例えばB細胞を形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスから取得し、不死化細胞に融合させる。このマウスのゲノムには本発明抗体の全部もしくは一部をコード化するヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランス遺伝子が含まれる。

【0075】

特定の実施態様では、形質転換非ヒト動物が形質転換マウスであり、このマウスのゲノムには本発明抗体の全部もしくは一部をコード化するヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランス遺伝子が含まれる。形質転換非ヒト動物は、IL - 13R α 1抗原の精製物または濃縮物および/もしくはIL - 13R α 1を発現する細胞で免疫することができる。形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスは、IL - 13R α 1に対するヒトモノクローナル抗体のIgG1イソタイプを産生することができる。

【0076】

本発明ヒトモノクローナル抗体の産生を可能にするには、本発明抗体の全部もしくは一部をコード化するヒト重鎖トランス遺伝子およびヒト軽鎖トランス遺伝子をゲノムに含む形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスをIL - 13R α 1抗原の精製物または濃縮物および/もしくはIL - 13R α 1を発現する細胞で免疫する。次に、その動物のB細胞（例えば、脾臓B細胞など）を骨髓腫細胞と融合させて、IL - 13R α 1に対するヒ

トモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成する。

【 0 0 7 7 】

好ましい実施態様では、 $IL-13R\alpha 1$ に対するヒトモノクローナル抗体の生成を可能にするために、マウスの免疫系ではなくヒトの免疫系部分を担持する形質転換マウスを使用する。本明細書で「HuMa b」マウスと呼ばれるこれらの形質転換マウスは、内在する μ および κ 鎖の遺伝子座を不活性化する標的突然変異とともに、重鎖(μ および γ)および κ 軽鎖(定常領域遺伝子)を含む再構成されていないヒト免疫グロブリン遺伝子をコード化するヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座を含む(Lonberg, N., ら, Nature 368 (1994) 856-859)。したがって、これらマウスでは、マウスIg MもしくはKの発現が低減し、免疫に応答して導入されたヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子がクラス変更と体細胞突然変異を受けて高親和性のヒトIg Gモノクローナル抗体を生成する(Lonberg, N., ら, Nature 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101にレビュー; Lonberg, N., and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; および Harding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546)。HuMa bマウスの調製については、Taylor, L., ら Nucleic Acids Research 20 (1992) 6287-6295; Chen, J., ら, International Immunology 5 (1993) 647-656; Tuailon, N., ら, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K., ら, Nature Genetics 4 (1993) 117-123; Chen, J., ら, EMBO j. 12 (1993) 821-830; Tuailon, N., ら, Immunol. 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N., ら, Nature 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Taylor, L., ら, Int. Immunol. 6 (1994) 579-591; Lonberg, N., and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; Harding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851に記述がある。これらすべての内容は、全体を本明細書に引用により編入される。(さらに、米国特許番号第 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,545,807; 5,770,429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; およびWO 92/03918参照)。

【 0 0 7 8 】

$IL-13R\alpha 1$ に対するヒトモノクローナル抗体を十分に生成するために、HuMa bマウスをLonberg, N., ら, Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851およびWO98/24884に記述されている一般的方法に従って、 $IL-13R\alpha 1$ 抗原の精製物または濃縮物および/または $IL-13R\alpha 1$ を発現する細胞で免疫することができる。マウスは、第1回の免疫時には週齢6~16であることが好ましい。例えば、可溶性 $IL-13R\alpha 1$ 抗原の精製物または濃縮物(例えば、 $IL-13R\alpha 1$ 発現細胞から精製)を使用してHuMa bマウスを腹腔内に免疫することができる。 $IL-13R\alpha 1$ 抗原の精製物または濃縮物を用いて免疫しても結果的に抗体が生成されない場合には、 $IL-13R\alpha 1$ を発現する細胞、例えば腫瘍細胞系でマウスを免疫すれば免疫応答を促進することができる。各種抗原での蓄積された経験によれば、最初にフロイントの完全アジュバントと抗原を腹腔内(i.p.)に免疫付与し、次いで二週間毎にフロイントの不完全アジュバンドと抗原をi.p.またはs.cに交互に免疫(例えば、全6回まで)すれば、HuMa b形質転換マウスの応答が最良になる。免疫プロトコルの全過程にわたって免疫応答を監視するには、眼窩後部を出血させて取得した血漿試料を使用する。血漿はELISAによってスクリーニングすることができ、十分な力価の抗 $IL-13R\alpha 1$ ヒト免疫グロブリンを有するマウスを、対応するB細胞の不死化のために使用することができる。抗体力価を高めるためにマウスに抗原を静脈注射し、3~4日後に屠殺して脾臓とリンパ節を摘出する。抗原ごとに2~3の融合を実施する必要があると想定される。抗原ごとに数匹のマウスに免疫する。例えば、合計5~12匹のHC o 7およびHC o 1 2系HuMa bマウスに免疫することができる。

【 0 0 7 9 】

HC o 7マウスでは、それらの内因性軽鎖(カッパ)遺伝子(Chen, J., ら, EMBO J.

12(1993) 821-830の記述のとおり)にJ K Dの欠落があり、それらの内因性重鎖遺伝子(WO01/14424の実施例1に記載のとおり)にC M Dの欠落があり、K C o 5 ヒトカップ軽鎖遺伝子導入(Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851記載のとおり)およびH C o 7 ヒト重鎖遺伝子導入(US Patent No. 5,770,429に記載のとおり)がある。

【0080】

H C o 1 2 マウスでは、それらの内因性軽鎖(カップ)遺伝子(Chen, J., ら, EMBO J. 12(1993) 821-830の記述のとおり)にJ K Dの欠落があり、それらの内因性重鎖遺伝子(WO 01/14424の実施例1に記載のとおり)にC M Dの欠落があり、K C o 5 ヒトカップ軽鎖遺伝子導入(Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851記載のとおり)およびH C o 1 2 ヒト重鎖遺伝子導入(WO01/14424の実施例2に記載のとおり)がある。

10

【0081】

マウスのリンパ球を単離し、標準のプロトコルに基づいてP E Gを使用してマウスの骨髓腫細胞系と融合してハイブリドーマを作成する。次に、作成したハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生を求めてスクリーニングする。例えば、免疫マウスの脾臓およびリンパ節由来のリンパ球の単細胞懸濁液を、50% P E Gを使用してS P 2 / 0 非分泌マウスミエローマ細胞(A T C C , C R L 1 5 8 1)の6分の1個数と融合させる。細胞を平底マイクロタイタープレートに約 2×10^5 で移植し、続いて選択培地で約2週間インキュベートする。

20

【0082】

次に、個々のウェルをELISAによってスクリーニングし、ヒト抗I L - 1 3 R α 1モノクローナルI g MおよびI g G抗体を求める。ハイブリドーマが広範に成長したなら、通常10~14日後に培地を分析する。抗体を分泌しているハイブリドーマを再度プレートし、再度スクリーニングして、依然としてヒトI g G、抗I L - 1 3 R α 1抗体陽性である場合には、少なくとも2回、限界希釈法によってサブクロニングすることができる。次に、安定なサブクローンをインビトロで培養することにより、特徴付けのために組織培養で抗体を産生する。

【0083】

C D R配列は抗原抗体相互作用の原因であるから、本発明組み換え抗体の発現を可能にするためには、別のヒト抗体由来のフレームワーク配列上に本発明C D R配列を含む発現ベクターを構築する(例えば、Riechmann, L., ら, Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P., ら, Nature 321 (1986) 522-525; およびQueen, C., ら, Proc. Natl. Acad. U.S.A 86 (1989) 10029-10033を参照)。このようなフレームワーク配列は、生殖細胞系ヒト抗体遺伝子配列を格納している公開D N Aデータベースから取得することができる。これらのヒト生殖細胞配列は成熟抗体遺伝子配列とは異なる。理由はヒト生殖細胞配列は完全に組立てられた可変遺伝子を含むことはなく、可変遺伝子はB細胞の成熟中にV(D)J接合によって形成されるからである。またヒト生殖細胞系遺伝子配列は、可変領域で個々に均等にある高親和性の二次範囲抗体の配列とも異なる。

30

【0084】

本発明には、I L - 1 3がI L - 1 3 R α 1に結合するのを阻害するポリペプチドであって、

- a) 配列番号1、3、5、7もしくは9の重鎖C D Rを有する抗体重鎖
 - b) 配列番号2、4、6、8もしくは10の軽鎖C D Rを有する抗体軽鎖
- からなる群から選択されるI L - 1 3 R α 1に結合するポリペプチドをコード化する核酸フラグメントが含まれる。

40

【0085】

再構築した重鎖および軽鎖の可変領域を、プロモーター、翻訳開始、定常領域、3'非翻訳、ポリアデニール化および転写停止の各配列と組み合わせ、発現ベクター構築体を形成する。重鎖および軽鎖を発現する構築体を組み合わせ、一つのベクターにまとめ、宿

50

主細胞中に共形質転換、連続形質転換、または個別形質転換した後、融合させて両方の鎖を発現する一つの宿主細胞を形成する。

【 0 0 8 6 】

したがって、本発明は、本発明組み換えヒト抗体の産生方法であって、

- a) 配列番号 1、3、5、7 もしくは 9 の重鎖 C D R を有する抗体重鎖
 - b) 配列番号 2、4、6、8 もしくは 10 の軽鎖 C D R を有する抗体軽鎖
- をコード化する核酸の発現を含む方法を提供する。

【 0 0 8 7 】

本発明はさらに、インビトロで I L - 1 3 R α 1 を検出するための、好ましくは試料中の I L - 1 3 R α 1 と本発明抗体との間の結合を測定する免疫学的測定法によって検出するための、本発明抗体の使用を含む。

10

【 0 0 8 8 】

もう一つの態様では、本発明は、本発明ヒトモノクローナル抗体の 1 つもしくはそれらの組み合わせまたはその抗原結合部を、医薬的に受容可能な担体と共に配合させた組成物、例えば医薬的組成物を提供する。

【 0 0 8 9 】

本明細書で使用する「医薬的に受容可能な担体」には、例えば溶剤、分散媒体、被膜、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等、生理学的に適合性のあるものが挙げられる。担体は、静脈、筋肉、皮下、腹部、脊髄もしくは皮膚投与に好適であることが望ましい（例えば、注射液や輸液など）。

20

【 0 0 9 0 】

「医薬的に受容可能な塩」は、抗体の所望の生物学的活性を維持し、望ましくない毒性効果を全く呈さない塩を言う（例えば、Berge, S.M., ら, J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19 参照）。このような塩は本発明に包含される。塩の例には、例えば酸付加塩類および塩基付加塩類が挙げられる。酸付加塩類は非毒性の無機酸から誘導され、例えば塩化水素塩である。

【 0 0 9 1 】

本発明組成物は、当技術分野で公知の多種多様な方法によって投与することができる。熟練技術者によって理解されるように、投与の経路および / もしくは方式は、どのような結果を所望するかに応じて変更される。

30

【 0 0 9 2 】

特定の投与経路によって本発明化合物を投与するには、その化合物の不活性化を防止するための材料で化合物をコーティングするかもしくは、その材料と一緒に化合物を同時に投与する必要があるかもしれない。例えば、リボソームなどの適切な担体や希釈液で対象者に化合物を投与することができる。医薬的に受容可能な希釈液には、生理食塩水および緩衝水溶液があげられる。

【 0 0 9 3 】

医薬的に受容可能な担体としては、殺菌水溶液もしくは分散液および、注射可能な滅菌溶液もしくは分散液の即時調製用の粉末滅菌剤が挙げられる。医薬的に活性のある物質のためにこのような媒体や薬剤を使用することは当技術分野では公知である。

40

【 0 0 9 4 】

本明細書で使用されている「非経口投与」および「非経口投与される」という語句は、通常は注射による、経腸および局所投与以外の投与方式を意味し、例えば静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、経胸腔、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内の各種注射と注入が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 5 】

組成物には、保存料、湿潤剤、乳化剤および分散剤などの補助剤も含まれる。微生物の存在を確実に防止するには、殺菌処置し、さらには各種抗菌剤や抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸を含有させる。組成物に、等張剤、例

50

えば糖類、塩化ナトリウムを含有させることも望ましいであろう。さらに、注入可能な吸収延長型製剤形を作成するには、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含有させてもよい。

【0096】

どのような投与経路を選択するかとは関係なく、本発明化合物は好適な水和形態で使用してもよく、および/または本発明組成物は、当業者に公知の従来方法によって医薬的に受容可能な投与形態に製剤される。

【0097】

所望の治療応答を達成する上で特定の患者、組成および投与方式にとって効果的な活性成分量を獲得し、かつ患者に対し毒性がないように、本発明医薬組成物中の活性成分の実際の用量レベルを変更することができる。多種多様な薬物動態学的因子、例えば採用した本発明の特定組成物、またはエステル、塩またはアミドの活性、投与経路、投与時間、特定の採用化合物の排泄速度、治療期間、採用する特定の組成物と組み合わせて使用する他の薬剤、化合物および/または材料、治療する患者の年齢、性別、体重、容態、全般的健康状態ならびにそれまでの病歴等の医療分野で公知の各種要因に応じて投与量レベルを選択する。

【0098】

組成物は、無菌であり、かつ注射器で移送可能な程度にまで流状でなくてはならない。担体は、水のほかに、等張緩衝化食塩水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびその好適な混合物のいずれであってもよい。

【0099】

適切な流状性の維持を可能にするためには、例えば、被膜剤、例えばレシチンを使用し、分散の場合には必要な粒子サイズを維持し、および表面活性剤を使用する。多くの場合、組成物には等張剤、例えば糖類、ポリアルコール類、例えばマニトールやソルビトールおよび塩化ナトリウムを含有させるのが好ましい。長期的吸収型の注射可能な組成物の作成を可能にするには、吸収を遅延する薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムもしくはゼラチンを組成物中に含有させる。

【0100】

以下の実施例、参考資料、配列リストおよび図は、本発明の理解を助けるために提供されており、本発明の真の対象範囲は付随する請求項に規定されている。修飾改変例は、規定の手順により本発明の要旨から逸脱することなく作成可能であるのが理解される。

【0101】

配列リストの記述

配列番号 1	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 2	の重鎖可変ドメイン
配列番号 2	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 2	の軽鎖可変ドメイン
配列番号 3	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 3	の重鎖可変ドメイン
配列番号 4	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 3	の軽鎖可変ドメイン
配列番号 5	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 5	の重鎖可変ドメイン
配列番号 6	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 5	の軽鎖可変ドメイン
配列番号 7	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 7	の重鎖可変ドメイン
配列番号 8	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 7	の軽鎖可変ドメイン
配列番号 9	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 1 8	の重鎖可変ドメイン
配列番号 10	H u M a b	L C 5 0 0 2 - 0 0 1 8	の軽鎖可変ドメイン
配列番号 11	κ 軽鎖定常領域		
配列番号 12	y 1 重鎖定常領域		

【0102】

実施例

実施例 1

ハイブリドーマの作成

本発明ヒトモノクローナル抗体の産生を可能にするには、本発明抗体の全部もしくは一部をコード化するヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子をゲノムに含む形質転換非ヒト動物、例えば形質転換マウスをヒトIL-13R α 1を発現する細胞で免疫する。次に、その動物のB細胞（例えば、脾臓B細胞など）を得て骨髓腫細胞と融合させて、IL-13R α 1に対するヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成する。IL-13R α 1に対するヒトモノクローナル抗体は、マウスの免疫系ではなくヒトの免疫系部分を担持する形質転換マウスを使用して生成することができる。本明細書で「HuMa b」マウスと呼ばれるこれらの形質転換マウスは、内在する μ および κ 鎖の遺伝子座を不活性化する標的突然変異とともに、重鎖（ μ および γ ）および κ 軽鎖（定常領域遺伝子）を含む再構成されていないヒト免疫グロブリン遺伝子をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ遺伝子座（minilocus）を含む（Lonberg, N., ら, Nature 368 (1994) 856-859）。したがって、これらマウスでは、マウスIg MもしくはKの発現が低減し、免疫に応答して導入されたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子がクラス変更と体細胞突然変異を受けて高親和性のヒトIg Gモノクローナル抗体を生成する。IL-13R α 1に対するヒトモノクローナル抗体を十分に生成するために、HuMa bマウスをLonberg, N., ら, Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851およびWO98/24884に記述されている一般的方法に従って、ヒトIL-13R α 1を発現する細胞で免疫することができる。マウスは、第1回の免疫時には週齢6～16であることが好ましい。例えば、IL-13R α 1の形質転換細胞を使用してHuMa bマウスを腹腔内に免疫することができる。免疫付与プロトコルの全過程にわたって免疫応答を監視するには、眼窩後部を出血させて取得した血漿試料を使用する。血漿はELISA及び/又はFACSによってスクリーニングすることができ、十分な力価の抗IL-13R α 1ヒト免疫グロブリンを有するマウスを、対応するB細胞の不死化のために使用することができる。マウスに抗原を静脈注射し、3～4日後に屠殺して脾臓とリンパ節を摘出する。例えば、HC o 7およびHC o 12系HuMa bマウスに免疫することができる。HC o 7マウスでは、それらの内因性軽鎖（カッパ）遺伝子（Chen, J., ら, EMBO J. 12(1993) 821-830の記述のとおり）にJKDの欠落があり、それらの内因性重鎖遺伝子（WO/14424の実施例1に記載のとおり）にCMDの欠落があり、KC o 5ヒトカッパ軽鎖導入遺伝子（Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851記載のとおり）およびHC o 7ヒト重鎖導入遺伝子（US Patent No. 5,770,429に記載のとおり）を有する。HC o 12マウスでは、それらの内因性軽鎖（カッパ）遺伝子（Chen, J., ら, EMBO J. 12(1993) 821-830の記述のとおり）にJKDの欠落があり、それらの内因性重鎖遺伝子（WO 01/14424の実施例1に記載のとおり）にCMDの欠落があり、KC o 5ヒトカッパ軽鎖導入遺伝子（Fishwild, D.M., ら, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851記載のとおり）およびHC o 12ヒト重鎖導入遺伝子（WO01/14424の実施例2に記載のとおり）を有する。

マウスのリンパ球を単離し、標準のプロトコルに基づいてPEGを使用してマウスの骨髓腫細胞系と融合してハイブリドーマを作成する。次に、作成したハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングする。例えば、免疫マウスの脾臓およびリンパ節由来のリンパ球の単細胞懸濁液を、50%PEGを使用してSP2/0非分泌マウス骨髓腫細胞（ATCC, CRL 1581）と融合させる。細胞を平底マイクロタイタープレートに約0.75×10⁷でプレートし、続いて選択培地で約2週間インキュベートする。次に、個々のウェルをELISAおよび/またはFACSによってヒト抗IL-13R α 1モノクローナルIg MおよびIg G抗体についてスクリーニングする。ハイブリドーマが広範に成長したなら、抗体を分泌しているハイブリドーマを再度プレートし、再度スクリーニングして、依然としてヒトIg G、抗IL-13R α 1抗体陽性である場合には、少なくとも2回、限界希釈法によってサブクロニングすることができる。次に、安定なサブクローンをインビトロで培養することにより、特徴付けのために組織培養培地で抗体を産生する。

形質転換マウスの免疫手順

3匹のHCo7マウス(オス3匹)、GG2201系(Medares, San Jose, CA, USA)および2匹のHCo12(オス1匹メス1匹)、GG2198系(Medares, San Jose, CA, USA)をIL-13R α 1の発現ベクターで形質転換した 1×10^6 HEK293細胞により免疫した。腹腔内(i.p.)および尾の基底の皮下(s.c.)に交互に合計8回の免疫を実施した。第1回の免疫では、 $100 \mu\text{l}$ の 1×10^6 HEK293:IL-13R α 1細胞を $100 \mu\text{l}$ の完全フロイントアジュバンド(CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA)と混合した。その他の免疫では、PBS内で $100 \mu\text{l}$ の細胞を $100 \mu\text{l}$ の不完全フロイントアジュバンド(ICFA; Difco)と混合した。

【0104】

10

マウスのブースト

抗IL-13R α 1の血清力価が十分であることが判明した段階で、マウスを融合の4および3日前に静注(i.v.)により $200 \mu\text{l}$ PBS中の 1×10^6 HEK293:IL-13R α 1細胞を用いてさらに2回注射した。

【0105】

実施例2

ELISAによる固定化IL-13R α 1に対するHuMabの結合に関する試験

本発明の抗体が、組み換えIL-13R α 1に結合する能力を判定するために、IL-13R α 1(R&D Systems, UK)の細胞外ドメインをPBS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)に溶解させ、4で終夜インキュベートし、マイクロタイタープレートに吸着させた。洗浄用緩衝液(WB=0.9% NaCl; 0.1% Tween(登録商標) 20)で平板を洗浄した後で、 $100 \mu\text{l}$ のインキュベーション緩衝液(IB=PBS with 1% crotein C および 0.1% Tween(登録商標) 20)を添加し、室温(RT)で30分間インキュベートして、非特異的結合部位を遮断した。次に、連続的に希釈したHuMabおよびコントロール抗体($100 \mu\text{l}$ /ウェル; IBで希釈)を添加し、RTで1時間培養した。再度プレートを洗浄し、そしてIBで1:500に最終希釈したペルオキシターゼコンジュゲートウサギ抗ヒトカップ(DAKO, Denmark)と共にインキュベートすることで、結合ヒト抗体を検出した。ポリクローナルヤギ抗hIL-13R α 1抗体を、ペルオキシターゼコンジュゲートポリクローナルロバ抗ヤギIgG(Sant Cruz; IBで1:1000希釈)で検出した。RTで1時間インキュベーションしてから洗浄した後で、プレートを暗所においてRTで既製のABTS(登録商標)溶液(Roch Diagnostics GmbH)で展開させた。もっとも高い濃度の吸収値が十分なODに到達した後で、 405 nm での吸収値を測定した。

20

30

【0106】

試験したIL-13R α 1に対するすべての抗体が、ヒトIL-13R α 1の固定化細胞外ドメインに結合することができた。測定したEC50値は、試験した各種LC抗体で0.5~2 nMの範囲内であった。陰性のコントロールHuMabの抗KLHは、IL-13R α 1の固定化細胞外ドメインに結合しなかった。陽性コントロールとして含めたポリクローナルヤギ抗ヒトIL-13R α 1抗体は、IL-13R α 1の固定化細胞外ドメインに十分に結合した(図1)。

【0107】

40

実施例3

IL-13R α 1/IL-4R α 異種二量体に対するIL-13結合の阻害(ELISA)

マイクロタイタープレートを、PBS中に $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ のhIL-13R α 1:hFcキメラタンパク(R&D Systems, UK) $100 \mu\text{l}$ にて振とう機上に終夜4で被覆した。WBでプレートを洗浄した後に、連続希釈したHuMabとコントロール抗体($100 \mu\text{l}$ /ウェル; IBで希釈)を添加し、RTで30分間インキュベートした。プレートを再度洗浄してから、IL-13の混合物(R&D Systems, UK; $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$; IBで希釈)およびIL-4R α (R&D Systems, UK; $0.75 \mu\text{g}/\text{ml}$; IBで希釈)を添加し、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄した後に、濃度 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化抗IL-13抗体(BAF213; R&D Systems, UK) $100 \mu\text{l}$ を添加し、RTで1時間インキュベートした。プ

50

レートを洗浄した後に、結合 IL - 13 を、IB で 1 : 5 0 0 0 の希釈率にしたペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Roche Diagnostics GmbH, DE)によって検出した(RT で培養 1 時間)。最後にプレートを洗浄し、暗所で室温(RT)で既製の ABTS (登録商標) 溶液(Roche Diagnostics GmbH, DE)で展開した。45 ~ 60 分後に 405 nm で吸収値を測定した。

【0108】

抗体 LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007 および LC5002 - 018 は、ヘテロ二量体受容体に対する IL - 13 の結合を阻害することができ、その最大阻害値は約 50 % ~ 80 - 85 % の範囲であった。陽性のコントロールは、AF152 (ポリクローナルラビット抗体)であった。予想どおり、陰性のコントロール抗 K L H は、ヘテロ二量体受容体に対する IL - 13 の結合を阻害しなかった。得られた IC₅₀ 値は、抗体 LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007 および LC5002 - 018 に関しては 1.5 nM と 10.1 nM との間であった(図 2)。

【0109】

実施例 4

ラジオリガンド結合測定

¹²⁵I - IL - 13 結合測定を、結合緩衝液(25 mM HEPES、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂ および 0.5 % のウシ血清アルブミン、pH7.2 に調整した)内でヒト IL - 13 R α 1 とヒト IL - 4 R α を発現する CHO 細胞を用いて実施した。1 × 10⁵ 細胞/ウェルを、抗体と混合させ、15 分から 1 時間かけて前インキュベートした。0.1 nM ¹²⁵I - IL - 13 を添加し、この混合物を 4 時間 4 でインキュベートした。測定で使用した ¹²⁵I - IL - 13 の濃度を、飽和結合分析、競合分析および細胞系との平衡結合に到達するまで投入した、¹²⁵I - IL - 13 の定量から測定した。試料を、1 % PEI / 0.5 % BSA で前処理した GF / C フィルタープレート上で回収し、Packard TopCount シンチレーションカウンターでカウントした。非線形回帰曲線適合法を用いて PRISM でデータ分析を実施した(GraphPad Software, San Diego, CA)。

【0110】

試験した IL - 13 R α 1 に対する抗体すべてが IL - 13 R α 1 / IL - 4 R α 複合体に対する標識 IL - 13 の結合を阻止した。抗体 LC5002 - 002、LC5002 - 003、LC5002 - 005、LC5002 - 007 および LC5002 - 018 の計算した IC₅₀ 値は、0.09 nM と 0.32 nM との間で、AF152 の場合は 84.8 nM であった(図 3)。

【0111】

実施例 5

ヒト B 細胞と単核細胞上で IL - 13 により誘発される CD23 の亢進を HuMab が阻害

末梢血単核細胞(PBMC)をFicoll Hypaque密度勾配によって単離した。RPMIで細胞を洗浄した後、RPMI / 10 % FCS 中で再度懸濁し、96 ウェルの平底マイクロタイタープレート(Corning Incorporated Costar)内に 3 × 10⁵ PBMC / ウェル(容積 50 μ l)で分配した。次に、RPMI / 10 % FCS 中で最終濃度 0.5 μ g / ml の抗ヒト CD40 抗体(Immunotech) 25 μ l および、RPMI / 10 % FCS 中で最終濃度 10 μ g / ml の抗ヒト IgA + IgG + IgM 抗体(Immunoresearch) 25 μ l を添加した。次に、連続的に希釈した HuMab とコントロール抗体(50 μ l / ウェル; RPMI / 10 % の FCS 希釈)を添加し、細胞を培養器中で 30 分間インキュベートした(37 ; 5 % CO₂)。次に、0.67 ng / ml の最終濃度の組み換えヒト IL - 13 (R&D Systems)を添加し(50 μ l / ウェル)、さらに細胞を 37 / 5 % CO₂ の条件下で 72 時間インキュベートした。このインキュベート後に、プレートを遠心分離にかけ、培地を吸引した。付着した細胞を分離させるために、200 μ l の Accutase (P

10

20

30

40

50

AA)を添加し、細胞を 3.7×10^5 ; 5% CO_2 の条件下で約5分間インキュベートした。細胞を、繰り返しフラッシングすることによって分離させ、丸底プレートに移した。上清の遠心分離および吸引後に、細胞を抗CD23-PE、抗CD20-FITCおよび抗CD14-APC(すべてBD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA提供)の混合物200 μl を用いてインキュベートした。細胞を4分間で30分間インキュベートし、遠心分離にかけ上清を吸引した。この洗浄工程を1回繰り返し、最終的に細胞を200 μl のPBS/0.1%のヒト血清アルブミンに再度懸濁し、FACS Caliburフローサイトメーター(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)内で、CellQuestソフトウェアを用いて分析した。ほとんどの場合に10,000のイベントが取得され、光分散ゲート上に通して、生存リンパ球と単核球のみを取り込んだ。細胞を、Bリンパ球の場合CD19陽性クラスターで、もしくは単核球の場合CD14陽性クラスターで前通過させ、CD23発現についてさらに分析を行った。

10

【0112】

Bリンパ球上でCD23の亢進を阻害する観察された IC_{50} 値は、抗体LC5002-002、LC5002-003、LC5002-005、LC5002-007及びLC5002-018の場合、0.5 nMと>70 nMとの間で、AF152の場合13.6 nMであった。ヒト単核球上でIL-13により誘発されるCD23の亢進を阻害するについても同様のプロファイルが観察された。単核球に関しては、 IC_{50} の値は、抗体LC5002-002、LC5002-003、LC5002-005、LC5002-007及びLC5002-018の場合には、0.1 nMと62.8 nMとの間であり、AF152の場合は62.9 nMであった。

20

【0113】

実施例6

刺激因子としてのIL-13もしくはIL-4に応答するTF-1の増殖測定

TF-1細胞(ATCC # CRL 2003)を、ATCC修飾RPMI、10% FBS、1Xペニシリン/ストレプトマイシン、2 ng/ml GM-CSFを含有する培地で成長させた。測定を実施する1日前に細胞を無GM-CSF培地で保持した。 5×10^3 細胞/ウェルを1時間、 3.7×10^5 で適切な濃度の抗IL-13 $\text{R}\alpha 1$ 抗体を使用してインキュベートした。次に、細胞を2 ng/mlのヒトIL-13(R&D Systems, Minneapolis, MN)もしくは0.1 ng/mlのヒトIL-4(R&D Systems, Minneapolis, MN)で刺激し、48時間、 3.7×10^5 でインキュベートした。細胞に、0.5 μCi ^3H -チミジンをパルスし、16~18時間 3.7×10^5 でインキュベートした。Parkin Elmar Filtermate 96ハーベスターを用いて、1%のPEI/0.25% BSAで前処理したGFCプレート上に試料を回収した。GFCプレートを、Parkin Elmar TOPカウントシンチレーションカウンター上でカウントした。非線形回帰曲線適合法を用いて(GraphPad Software, San Diego, CA)PRISMでデータ分析を行った。

30

【0114】

抗KLH抗体は、本測定では阻害能を示さなかった。LC5002-007でも同様であった。他の抗体はすべて、たとえLC5002-007が他の抗体よりも高い IC 値で反応を阻害した場合であっても、このような反応を阻害した。観察された各種抗体に関する IC_{50} 値は、AF152の場合13.50 nM、LC5002-002の場合9.21 nM、LC5002-003の場合3.07 nMおよびLC5002-005の場合0.39 nMであった。IL-4-誘発性TF-1細胞増殖に関しても同様のプロファイルが認められたが、抗体の効力はIL-13-誘発性反応に比べ低下していた。IL-4-誘発性増殖に関する IC_{50} 値は、抗IL4R抗体の場合0.02 nM、AF152の場合74.37 nMおよび抗体LC5002-002、LC5002-003、LC5002-005、LC5002-007およびLC5002-018の場合には4.68 nMと60 nMとの間であった。

40

【0115】

実施例7

50

IL-13 に応答したヒト肺繊維芽細胞のエオタキシン産生を阻害

HFL-1 細胞(Human Lung Fibroblast, ATCC # CCL-153)を使用して測定を実施した。細胞を、12 ウェルのプレート内の各プレートに100,000細胞の密度でプレートし、集密に達するまで72時間、37℃でインキュベートした。次に、細胞を24時間、無血清培地で飢餓状態に置き、1時間37℃で抗IL-13 R α 1 抗体で処置をした。この処置の後に、細胞を48時間37℃で10 ng/mlのIL-13 (R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて刺激した。上清を回収し、R&D Systems (Cat. No. DTX00)提供の市販のELISAを用いてエオタキシンの定量を行った。吸収値をSpectromaxマイクロプレートリーダーを用いて読み取り、PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA)を用いてデータを分析した。

10

【0116】

試験した抗体は、エオタキシン放出を阻害するさまざまな能力を示した。LC5002-007を除き、試験の対象となった他のすべての抗体が、何らかの阻害を示した。3~4種類の実験で得られた平均算出IC₅₀値は、AF152の場合11.5 nMで、抗体LC5002-002、LC5002-003、LC5002-005、LC5002-007およびLC5002-0018の場合には、2.45 nMと19.8 nMとの間であった。

【0117】

実施例 8

ヒト気管支平滑筋細胞におけるIL-13誘発性Stat-6リン酸化の阻害

20

ヒト気管支平滑筋細胞(BSMC; Clonetics, Cat. No CC-2576)を製造元の指示に従って成長させた。集密するまで、細胞を12ウェルの組織培養プレートで成長させた。無血清培地で24時間、細胞を飢餓状態に置き、各種量の抗体を添加した。プレートを1時間培養した後に、2.5 ng/mlのIL-13 (R&D Systems)で刺激した。15分間インキュベートした後に、上澄みを取り除き、細胞をリン酸緩衝液で洗浄し、100 μ lの溶解緩衝液を添加した。氷上で短期間超音波にかけた後、さらに遠心分離にかけた。溶解液を用いてリン酸化Stat-6をウエスタンブロット検出した。等量のタンパクをSDSゲル上に付加し、流し込んで膜に移動させた。抗Stat-6抗体をSanta Cruz Biotechnology (Cat. No. SC-11762R)から入手し、ペルオキシターゼに結合した二次抗体を用いた。検出は、Amersham (Cat No RPN 2132)提供のECL Plus Systemを用いて行った。定量は、Typhoon 9400 Imagerで実施した。

30

【0118】

本測定で試験した両方のHuMab (LC50002-003とLC5002-005)はいずれもIL-13誘発性Stat-6リン酸化を阻害した。本測定で認められた効力は、他の機能測定で認められた効力と同等であった。計算されたIC₅₀値は、AF152の場合18.64 nM、LC5002-003の場合5.98 nMおよびLC5002-005の場合1.18 nMであった。

【0119】

実施例 9

抗hIL-13 R α 1 HuMab可変ドメイン(κ -軽鎖および γ 1-重鎖)のクローニングと配列分析

40

抗hIL-13 R α 1 HuMabの軽鎖可変領域V_Lと重鎖可変領域V_Hをコードするヌクレオチド配列を標準のcDNA合成/PCR手順を用いて単離した。全RNAを、GeneRacer (商標)キット(Invitrogen)を用いて1 $\times$ 10⁶ - 1 $\times$ 10⁷ ハイブリドーマ細胞から調製した。ハイブリドーマ由来のRNAを、第一鎖cDNA合成およびGeneRacer (商標) Oligo-dT Primerの連結反応のためのテンプレートとして用いた。第二鎖cDNA合成およびcDNAフラグメントをコード化するV_LおよびV_HのさらなるPCR増幅を、それぞれ κ -軽鎖および γ 1-重鎖定常領域ならびに、5' - 特異的GeneRacer (商標)プライマーのヌクレオチド配列に相補的な逆軽鎖および重鎖プライマーで実施した。クローニングベクターとして、Invitrogen (商標) Life Technologies提供のTA クロー

50

ニングキットおよび pCR4-TOPO (商標) TOPO (商標) を用いてクローニングした。E c o L I を用いて適切なプラスミドの制限マッピングによってクローン化された P C R 生成物を特定し、それぞれ V_L および V_H に関する約 740 bp および 790 bp の DNA フラグメントサイズを予測 / 計算した。クローン化した P C R フラグメントの DNA 配列を、二本鎖配列決定法によって判定した。GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) ソフトウェアパッケージバージョン 10.2 と Vector-NTI 8 (InforMax, Inc) を汎用データ処理に用いた。DNA およびタンパク配列を G C G モジュール CLUSTALW を用いて整列させた。配列の整列は、GENEDOC (バージョン 2.1) プログラムを用いて行った。

【0120】

実施例 10

10

抗 h I L - 13 R α 1 I g G 1 H u M a b の発現プラスミドの構築

抗 h I L - 13 R α 1 I g G 1 H u M a b の軽鎖および重鎖をコード化する遺伝子を哺乳動物の細胞発現ベクターに別々に集合化した (assemble)。これによって、抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b 軽鎖可変領域 (V_L) とヒト κ 軽鎖定常領域 (C_L , SEQ ID NO:11) をコード化する遺伝子セグメントが抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b 重鎖可変領域 (V_H) およびヒト γ 1 重鎖定常領域の遺伝子セグメントと同様に連結された (C_{H1} -Hinge- C_{H2} - C_{H3} , SEQ ID NO:12)。使用されているコドンのヒト軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般情報は、Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., および Feller, C., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH publication No.91-3242 に記述されている。抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b κ 軽鎖の転写ユニットは下記要素で構成されている。

20

- ・ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ・コザック配列を含む合成 5' - U T、
- ・信号配列イントロンを含むマウス免疫グロブリン重鎖信号配列、
- ・5' 末端に特異な B s m I 制限部位および 3' 末端にスプライドナー部位と特異な N o t I 制限部位を配列したクローン化抗 h I L - 13 R α H u M a b 可変軽鎖 c D N A
- ・イントロン 2 マウス I g - κ エンハンサー [Picard, D., and Schaffner, W., Nature 307 (1984) 80-82] を含むゲノムヒト κ 遺伝子定常領域、および
- ・ヒト免疫グロブリン κ ポリアデニル化 (「ポリ A」) 信号配列。

30

【0121】

抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b γ 1 重鎖の転写ユニットは下記要素から構成されている。

- ・ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) 由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、
- ・コザック配列を含む合成 5' - U T、
- ・信号配列イントロンを含む修飾マウス免疫グロブリン重鎖信号配列、
- ・5' 末端に特異な B s m I 制限部位および 3' 末端にスライドナー部位および特異な N o t I 制限部位配列したクローン化抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b 可変重鎖 c D N A
- ・マウス I g μ エンハンサー (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378) を含む、ゲノムヒト γ 1 重鎖遺伝子定常領域、
- ・ヒト γ 1 免疫グロブリンポリアデニル化 (「ポリ A」) 信号配列。

40

【0122】

抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b κ 軽鎖および γ 1 重鎖発現プラスミドの機能的要素：

抗 h I L - 13 R α 1 H u M a b κ 軽鎖および γ 1 重鎖発現カセットのほかに、これらのプラスミドには以下が含まれている。

- ・ハイグロマイシン耐性遺伝子、

50

- ・Epstein-Barrウイルス(EBV)のオリジン、oriP、
- ・E.coliにおけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターpUC18からのオリジン、
- ・E.coliにおけるアンピシリン耐性を付与するβラクタマーゼ遺伝子。

【0123】

実施例11

突然変異体(変異体)抗hIL-13Rα1IgG1の発現プラスミドの構築

突然変異抗hIL-13Rα1γ1重鎖をコード化する発現プラスミドは、Quick Change(商標)Site-Directed mutagenesisキット(Stratagene)を用いて野生型発現プラスミドの特定部位突然変異誘発によって生成することができ、表1に記載されているとおりである。アミノ酸には、EU符番法にしたがって符番されている[Edelman, G.M., ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K. S., およびFoeller, C., (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No. 91-3242]。

【0124】

【表1】

表1

突然変異	説明
E233P; L234V; L235A; デルタ G236; によって特定される PVA-236; GLPSS331	ヒトγ1重鎖のアミノ酸配列 Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ が、 ヒトγ2重鎖のアミノ酸配列 Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ によって 置き換えられている。
A327G; A330S; P331S	ヒトγ1重鎖のアミノ酸配列 Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ が、 ヒトγ4重鎖のアミノ酸配列 Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ によって置き換えられている。
L234A; L235A	ヒトγ1重鎖のアミノ酸配列 Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ が、アミノ酸配列 Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅ によって置き換えられている。

【0125】

実施例12

組み換え抗hIL-13Rα1 HuMabの産生

組み換え抗hIL-13Rα1 HuMabは、10%の超低IgGのFCS(Gibco)、2mMのグルタミン(Gibco)、1%v/vの非必須アミノ酸(Gibco)、および250μg/mlのG418(Roche Diagnostics GmbH, DE)を補充したDMEM(Gibco)でインキュベートした付着性HEK293-EBNA細胞(ATTC CRL-10852)の一過的形質転換によって作成した。形質転換では、Fugene(商標)6(Roche Diagnostics GmbH, DE)形質転換試薬を3:1~6:1の範囲のDNA(μg)に対する試薬(μl)の割合で使用した。免疫グロブリン軽鎖および重鎖は、1:2~2:1のプラスミドをコード化する重鎖に対する軽鎖のモル比を用いて2種類のプラスミドから発現させた。HuMabを含有する細胞培養上清を形質転換後4~11日目に収穫した。

【0126】

例えば H E K 2 9 3 におけるヒト抗体の組み換え発現の一般情報は、Meissner, P., ら, Biotechnol Bioeng 75 (2001) 197-203に記述されている。

【 0 1 2 7 】

実施例 1 3

a) キメラ h I L - 1 3 R α 1 : h F c を用いた、H u M a b L C 5 0 0 2 - 0 0 3、- 0 0 5、および - 0 0 7 の親和性分析

相互作用を分析するために、B i a c o r e 3 0 0 0 計器を用いた。操作と反应用緩衝液として H B S - P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005 % ポリ界面活性剤 P, pH 7.4) を 2 5 で用いた。捕捉分子 (ヤギ抗ヒト I g G、F c γ 特異的) を、2 0 分間、5 μ l / 分の流速で、2 0 μ g / m l の濃度でアミン結合した。H u M a b を、1 μ g / m l の濃度で 1 0 μ l / 分の流速で 1 分間注入した。遊離ヤギ抗ヒト I g G の F c γ を遮断するために、ヒト γ グロブリン 5 0 0 nM を 3 0 μ l / 分で 3 分間注入した。被験体 (h I L - 1 3 R α 1 : h F c キメラタンパク) を、5 . 6 3 nM ~ 9 0 nM 間の 5 種類の濃度で 2 分間注入し、5 分間 H B S - P で洗浄した。1 0 0 nM の H C l を 2 回それぞれ 1 分間ずつ注入することによって表面の再生を達成した。注入のチップ、測定フォーマットおよび順序ならびに反応速度データは、表 2 の記述に対応する。系固有のベースラインドリフトを補正しノイズ信号を減少するために、試料曲線から陰性コントロールデータ (例えば、緩衝液曲線) を差し引いた。センサーグラムの分析と親和性データの計算のため、BiaEvaluation バージョン 4 . 0 1 を用いた。反応速度データは、1 : 1 ラングミュアー結合モデルに反応速度データを適合させることによって計算した (表 2)。

【 0 1 2 8 】

【表 2】

表 2

h I L - 1 3 R α 1 : h F c を用いた H u M a b s の親和性分析。

1:1 ラングミュアー結合モデルに基づいたデータ分析

チップ	捕捉	リガンド	被験体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
CM5	抗 hFcγ	LC5002-003	hIL-13 Rα1:hFc	2.1×10^5	1.4×10^{-6}	$< 6.5 \times 10^{-12}$
CM5	抗 hFcγ	LC5002-005	hIL-13 Rα1:hFc	1.73×10^5	3.12×10^{-6}	1.8×10^{-11}
CM5	抗 hFcγ	LC5002-007	hIL-13 Rα1:hFc	1.19×10^5	1×10^{-6}	$< 8.4 \times 10^{-12}$

【 0 1 2 9 】

b) h I L - 1 3 R α 1 : h F c キメラタンパク質から開裂した h I L - 1 3 R α 1 の細胞外ドメインを用いた、H u M a b L C 5 0 0 2 - 0 0 3、- 0 0 5、および - 0 0 7 の親和性分析

親和性分析のため B i a c o r e 3 0 0 0 計器を用いた。操作と反应用緩衝は 2 5 の H B S - P であった (1 0 m M H E P E S , 1 5 0 m M N a C l , 0 . 0 0 5 % ポリ界面活性剤 P , p H 7 . 4)。捕捉抗体分子 (抗 h F c γ) を、2 0 分間、5 μ l / 分の流速で、1 0 0 μ g / m l の濃度でアミン結合させた。H u M a b を、3 0 秒間 1 0 μ l / 分の流速で 1 0 μ g / m l の濃度で注入した。開裂した h I L - 1 3 R α 1 分子 (M_w 4 0 k D a) を 1 . 5 6 n M ~ 1 0 0 n M 間の 7 種類の濃度で 2 0 0 秒間注入し、5 分間 H B S - P で洗浄した。表面の再生は、1 0 μ g / m l の流速で 1 0 0 m M H C l の注入を 2 回それぞれ 1 分間繰り返すことによって実現した。注入のチップ、測定

フォーマットおよび順序ならびに反応速度データは下記の表 3 の記述に対応する。反応速度データは、ラングミュアー結合モデルに反応速度データを、適合させることによって計算した。

【 0 1 3 0 】

【表 3】

表3

チップ	捕捉	リガンド	被験体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
C1	抗 hFcγ	LC5002-002	hIL-13Rα1	1.1×10^6	6.5×10^{-4}	6.2×10^{-10}
C1	抗 hFcγ	LC5002-003	hIL-13Rα1	1.3×10^6	5.1×10^{-4}	3.9×10^{-10}
C1	抗 hFcγ	LC5002-005	hIL-13Rα1	1.4×10^6	3.0×10^{-4}	2.2×10^{-10}
C1	抗 hFcγ	LC5002-007	hIL-13Rα1	1.9×10^5	8.3×10^{-4}	4.4×10^{-9}
C1	抗 hFcγ	LC5002-005, 突然変異 L234A; L235A	hIL-13Rα1	1.4×10^6	2.9×10^{-4}	2.1×10^{-10}

【 0 1 3 1 】

c) hIL-13Rα1 : hFcキメラタンパクから開裂したhIL-13Rα1細胞外ドメインを用いたLC5002-005の組み換え変異体の比較親和性分析

これらの実験では、ハイブリドーマ由来の初代IgG1の親和性を組み換え変異体IgG1-Ala-Alaの親和性と比較した。相互作用の分析のためBiacore 3000計器を用いた。操作と反应用緩衝液は、25のHBS-Pであった(10mMのHEPES, 150mMのNaCl, 0.005%のポリ界面活性剤P, pH7.4)。捕捉抗体分子(抗hFcγ)を、20分間、5μl/分の流速で、20μg/mlの濃度でアミン結合させた。HuMabを、1分間10μl/分の流速で10μg/mlの濃度で注入した。開裂したhIL-13Rα1分子(被験体)を1.56nM~200nM間の8種類の濃度で5分間注入し、5分間HBS-Pで洗浄した。表面の再生は、100mM HClの注入を2回それぞれ1分間繰り返すことによって実現した。注入のチップ、測定フォーマットおよび順序ならびに、反応速度データは、表4の記述に対応する。反応速度データは、二価被験体結合モデルに反応速度データを適合させることによって計算した。

【 0 1 3 2 】

【表 4】

表 4

チップ	捕捉	リガンド	被験体	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/RUs)	k_{d2} (1/s)	K_D (M)
CM5	抗hFcγ	LC5002-005	hIL-13 Rα1	1.33×10^5	3.6×10^{-4}	5.8×10^{-3}	0.06	2.7×10^{-9}
CM5	抗hFcγ	IgG1 ala-ala LC5002-005	hIL-13 Rα1	1.53×10^5	4.2×10^{-4}	4.1×10^{-3}	0.04	2.8×10^{-9}

【 0 1 3 3 】

実施例 1 4

h I L - 1 3 R α 2 および h I L - 4 R α との H u M a b の交差反応の E L I S A による試験

キメラタンパク h I L - 1 3 R α 2 : h F c と h I L - 4 R α : h F c (R&D Systems, UK) を P B S (1 μ g / m l) に溶解し、4 で終夜インキュベートしてマイクロタイタープレート (NUNC Maxisorb) に吸着させた。洗浄緩衝液 (W B = 0 . 9 % NaCl ; 0 . 1 % Tween (登録商標) 2 0) でプレートを洗浄後、非特異的部位を遮断するために、1 0 0 μ l の培養緩衝液 (I B = 1 % Crotein C 含有 PBS および 0 . 1 % Tween (登録商標) 2 0) を加え、室温で 3 0 分間インキュベートした。次に、連続希釈した H u M a b およびコントロール抗体 (1 0 0 μ l / ウェル ; I B 中に希釈) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを再度洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲートウサギ抗ヒトカップ (DAKO、デンマーク) の I B 中最終希釈 1 : 5 0 0 にてインキュベートして結合抗体を検出した。室温で 1 時間インキュベートし、次に洗浄し、プレートを暗所室温にて既成の ABTS (登録商標) 溶液 (Roche Diagnostics GmbH、DE) で展開した。最高濃度の吸収値が十分な OD 値に到達してから 4 0 5 n m で吸収値を測定した。

【 0 1 3 4 】

I L - 1 3 R アルファ 1 に対する試験抗体の全てが、ヒト I L - 1 3 R α 1 の固定化細胞外ドメインに結合することができたが、h I L - 1 3 R α 2 にも h I L - 4 R α には結合できなかった (図 4) 。

【 0 1 3 5 】

実施例 1 5

マウス I L - 1 3 R α 1 との H u M a b の交差反応性

キメラタンパクマウス I L - 1 3 R α 1 : h F c (R&D Systems, UK) を P B S (1 μ g / m l) に溶解し、4 で終夜培養することによってマイクロタイタープレート (NUNC Maxisorb) に吸着させた。洗浄用緩衝液 (W B = 0 . 9 % の N a C l ; 0 . 1 % の Tween (登録商標) 2 0) でプレートを洗浄した後に、非特異的結合部位を遮断するために、1 0 0 μ l の培養緩衝液 (I B = 1 % Crotein C および 0 . 1 % Tween (登録商標) 2 0 を含む P B S) を添加し室温 (R T) で 3 0 分間インキュベートした。次に、連続希釈した H u M a b とコントロール抗体 (H u M a b 抗 K L H およびポリクロナールヤギ抗 h I L - 1 3 R α 1 (R&D Systems)) をウェル (1 0 0 μ l / ウェル ; I B で希釈) に分配し、R T で 1 時間インキュベートした。再度プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲートウサギ抗ヒトカップ (DAKO, Denmark) の I B 中 1 : 5 0 0 の最終希釈にてインキュベートして結合ヒト抗体を検出した。プレートに結合したヤギ抗 h I L - 1 3 R α 1 抗体を、ペルオキシダーゼコンジュゲートロバ抗ヤギ I g G (Santa Cruz ; I B 中に 1 : 1 0 0 0) に

よって検出した。室温で1時間インキュベートし、続いて洗浄した後に、プレートを暗所RTで既製のABTS（登録商標）溶液(Roche Diagnostics GmbH, DE)で展開した。最高濃度の吸収値が十分なODに到達した後に、405nmで吸収値を測定した（図5）。

【0136】

実施例16

カニクイザルIL-13R α 1とのHuMabの交差反応性

IL-13R α 1をコードする遺伝子を、カニクイザルの組織からRT-PCRによって単離し、マウス細胞系Ba/F3に形質転換した。HuMabがカニクイザルIL-13R α 1と交差反応するか否かを試験するため、安定した形質転換Ba/F3細胞と親Ba/F3細胞を、10 μ g/mlのHuMabとコントロール抗体とでインキュベートした。陽性コントロールとして、ポリクローナルヤギ抗hIL-13R α 1(R&D Systems)を用いた。含めた陰性コントロールは、ヒトIgG1骨髄腫タンパク(Nordic)および正常なヤギの血清であった。結合抗体をFACS分析によって検出するために、ヒトIgGに対するFITCコンジュゲート抗体を用いてHuMabを検出し、またヤギIgGに対するFITCコンジュゲート抗体を使用してヤギ抗体を検出した。親細胞系に対して形質転換Ba/F3で試験した個々の抗体について平均蛍光強度(MFI)を比較した。

【0137】

本発明HuMabの全てが、形質転換Ba/F3細胞内に発現しているカニクイザルIL-13R α 1に結合可能であった。ヒトとカニクイザルのIL-13R α 1の間の緊密な類似性から期待されるように、ポリクローナルAF152抗体もカニクイザルIL-13R α 1に結合した。陰性のコントロール抗体では、形質転換Ba/F3細胞系で試験した場合にMFIがごくわずかに増加しただけであった（表5）。

【0138】

【表5】

表5

	抗体	MFI Ba/F3	MFI Ba/F3_Cyno_IL- 13R α 1	Cyno_IL-13R α 1の 存在下における MFI の増加
HuMabs	LC5002-002	3.9	83.7	79.8
	LC5002-003	3.4	82.4	79.0
	LC5002-005	14.8	101.5	86.7
	LC5002-007	4.1	19	14.9
コントロール	AF152	3.2	21.2	18.0
	正常ヤギ IgG	3.3	5.7	2.4
	正常ヒト IgG1 (Nordic)	3.5	10.2	6.7
	抗ヒト IgG- FITC のみ	3.3	5.5	2.2

【0139】

実施例17

IL-13R α 1 HuMabのFc γ 受容体に対する結合(NK細胞上のFc γ RIIaに対する結合)

本発明抗体がナチュラルキラー(NK)細胞上のFc γ RIIa(CD16)に結合できるか否かを判定するため、抹消血単核細胞(PBMC)を単離し、20 μ g/mlのHuMab抗体およびコントロール抗体と共に、Fc γ RIIa(抗CD16、クローン3G8、RDI、Flanders、NJ)に対する遮断用マウス抗体20 μ g/mlの存在下または不存在下でインキュベートし、Fc γ RIIaを介する結合を検証した。Fc γ RIIaに結合しないヒトIgG2およびIgG4(The Binding Site)を陰性コントロールとして使用した。ヒトIgG1およびIgG3(The Binding Site)を、Fc γ RIIa結合のための陽性コントロールとして含めた。NK細胞上の結合抗体をFACS分析によって検出するために、PE標識マウス抗ヒトCD56(NK細胞表面マーカー)抗体(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)をFITC標識ヤギF(ab)₂抗ヒトIgG(Fc)抗体(Protos immunoresearch, Burlingame, CA)と組み合わせて使用した。試験したHuMabは20 μ g/ml(Bmax: MFI $\pm$ 標準偏差)において最大に結合することが判定された。

10

【0140】

LC5002-005は、580.6 $\pm$ 245.8のBmax(MFI)値によって示されるとおり、Fc γ RIIaに効果的に結合することができた(コントロールIgG1抗体に比較する)。Fc γ RIIaに対する遮断用抗体を添加すると、LC5002-005のNK細胞への結合を劇的に低下させ(260.42 $\pm$ 95.90のBmax(MFI)値)、このことはFc γ RIIaに特異的に結合することを示唆する。

20

【0141】

【表 6】

参考文献

- Aikawa, M., et al., *Cytokine* 13 (2001) 75-84
- Aplin, J.D., and Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* (1981) 259-306
- Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)
- Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123 10
- Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270
- Berge, S.M., et al., *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1-19
- Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95
- Brueggemann M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361
- Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40
- Brunhouse, R., and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917
- Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344
- Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289 20
- Chen, J., et al., *International Immunology* 5 (1993) 647-656
- Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830
- Choi, T.K., et al., *Nature Genetics* 4 (1993) 117-123
- Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss (1985) p. 77
- Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9
- Edelman, G.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85
- Edge, A.S., et al., *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137
- EP 0 307 434 30
- Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851
- Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282
- Graber, P., et al., *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 4286-4298
- Harding, F., and Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546
- Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168
- Hoogenboom, H.R., and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388
- Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184
- Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555 40
- Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258
- Jones, P., et al., *Nature* 321 (1986) 522-525
- Kabat, E.A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), NIH Publication No. 91-3242

- Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161
- Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859
- Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101
- Lonberg, N., and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93
- Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527
- Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560
- Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202
- Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597 10
- Meissner, P., et al., *Biotechnol Bioeng* 75 (2001) 197-203
- Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324
- Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855
- Neuberger, M.S., *EMBO J.* 2 (1983) 1373-1378
- Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87
- Obiri, N.I., et al., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 8797-8804
- Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837
- Picard, D., and Schaffner, W., *Nature* 307 (1984) 80-82 20
- Poudrier, J., et al., *J. Immunol.* 30 (2000) 3157-3164
- Poudrier J., et al., *J. Immunol.*, 163 (1999) 1153-1161
- Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033
- Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327
- Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83
- Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199
- Sojahn, H.T., and Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57
- SwissProt No. O09030 30
- SwissProt No. P24394
- SwissProt No. P35225
- SwissProt No. P78552
- SwissProt No. Q14627
- Taylor, L., et al., *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 6287-6295
- Taylor, L., et al., *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591
- Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004
- Thotakura, N.R., and Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359
- Tuailon, N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90 (1993) 3720-3724 40
- Tuailon, N., et al., *Immunol.* 152 (1994) 2912-2920
- US Patent No. 4,640,835
- US Patent No. 4,496,689

US Patent No. 4,301,144

US Patent No. 4,670,417

US Patent No. 4,791,192

US Patent No. 4,179,337

US Patent No. 5,202,238

US Patent No. 5,204,244

US Patent No. 5,545,806

US Patent No. 5,545,807

10

US Patent No. 5,569,825

US Patent No. 5,625,126

US Patent No. 5,633,425

US Patent No. 5,661,016

US Patent No. 5,770,429

US Patent No. 5,789,650

US Patent No. 5,814,318

US Patent No. 5,874,299

20

US Patent No. 5,877,397

van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol 5 (2001) 368-374

Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880

WO 87/05330

WO 92/22645

WO 92/03918

WO 93/1227

WO 94/25585

30

WO 96/29417

WO 97/15663

WO 98/24884

WO 01/14424

WO 03/080675

【図面の簡単な説明】

【 0 1 4 2 】

【図 1】 固定化組み換えヒト IL - 13 R α 1 ポリペプチドに対する抗 IL - 13 R α 1 抗体の結合を示している。ポリクローナルウサギ抗ヒト IL - 13 R α 1 抗体 AF 152 (R&D Systems) および抗 - K L H を、陰性のコントロール H u M a b として含む。

40

【図 2】 IL - 13 の固定化 IL - 13 R α 1 / IL - 4 R α 受容体に対する結合を抗 IL - 13 R α 1 抗体が阻害するのを示す。

【図 3】 IL - 13 の CHO 細胞 (IL - 13 R α 1 および IL - 4 R α 2 を発現) に対する結合を抗 IL - 13 R α 1 抗体が遮断するのを示す。陽性のコントロールとして、市販のポリクローナル抗 IL - 13 R α 1 抗体 (AF152、R&D Systems, Minneapolis, MN) を含めた。

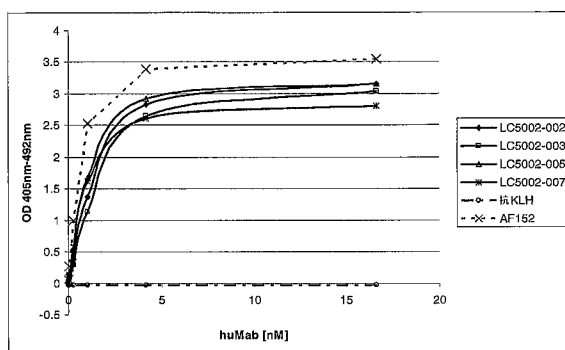
【図 4】 抗 IL - 13 R α 1 抗体の h IL - 13 R α 1 に対する結合および機能的に関係のある受容体 h IL - 13 R α 2 および h IL - 4 R α に対する結合特性を示す。

【図 5】 固定化組み換えマウス IL - 13 R α 1 ポリペプチドに対する抗 IL - 13 R α

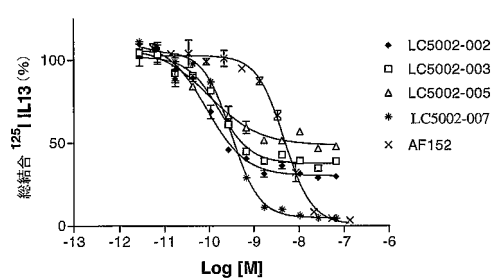
50

1 抗体の結合能力を示す。ポリクローナルヤギ抗ヒト IL - 13 R α 1 抗体 AF 152 (R&D Systems) および抗 K L H を、陰性のコントロール H u M a b として含む。

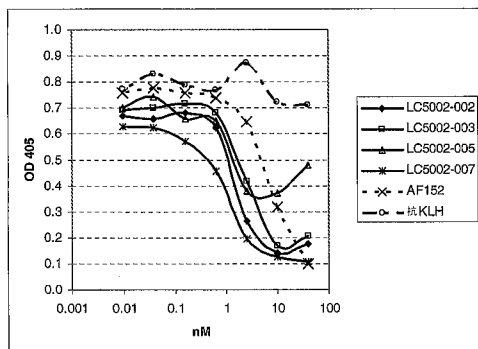
【図 1】



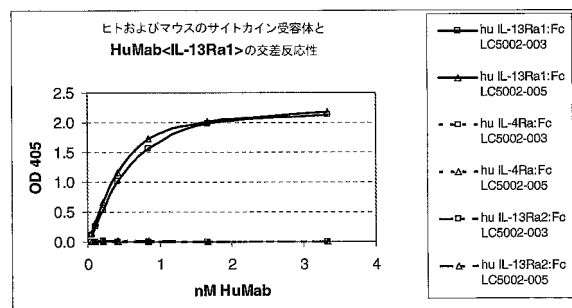
【図 3】



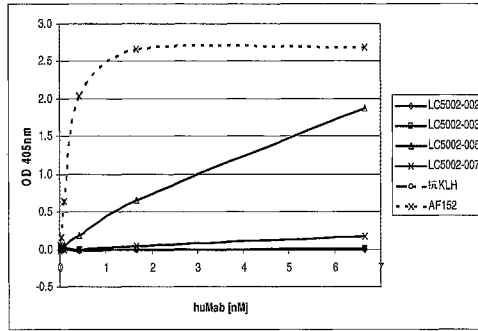
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0005086098000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

- (72)発明者 エンドル, ヨーゼフ
ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、ウルメンシュトラッセ 1 2
- (72)発明者 フェンテス, マリア
アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 4 0 8 7、サニーベイル、ピターン・ドライブ 1 4 9 0
- (72)発明者 グラウス, イヴォ
オランダ国、エンエル - 3 9 8 4 ピーエル・オデイク、ヴェルドルベルヴァールト 3
- (72)発明者 グロースマン, アデルベルト
ドイツ国、8 2 4 3 6 エーゲルフィンク、ハイムガルテンシュトラッセ 1
- (72)発明者 ノイマン, セバスティアン
ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、アイスフォーゲルシュトラッセ 2 5
- (72)発明者 パーレン, パウル
オランダ国、エンエル - 3 9 8 4 ピーエル・オデイク、ヴェルドルパーヴァールト 1 7
- (72)発明者 レベルス, フランク
オランダ国、エンエル - 3 5 5 4 セーテ・ユトレヒト、アドリアーン・メニククアルティール 3 4
- (72)発明者 レグラ, イェルク
ドイツ国、8 0 6 3 9 ミュンヘン、リールシュトラッセ 1 5
- (72)発明者 シューマッハー, ラルフ
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ホーホフェルトシュトラッセ 7 8
- (72)発明者 ゼーバー, シュテファン
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ブロイネッツリーダー・ヴェーク 2 2
- (72)発明者 シュトラッカー, ヤン
ドイツ国、8 1 3 7 3 ミュンヘン、ブルネッケルシュトラッセ 7
- (72)発明者 シュトゥーベンラウホ, カイ - グンナー
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、アン・デア・フライハイト 1 0 5
- (72)発明者 ファン・デ・ヴィンケル, ヤン
オランダ国、エンエル - 3 7 0 7 セーカー・ザイスト、ヴェルレンジ・スロトラーン 8 0
- (72)発明者 ファン・フースト, マルティーン
オランダ国、エンエル - 3 9 9 4 カーエル・ホーテン、フルウィールモス 6
- (72)発明者 フレーケン - フルプルーヘン, サンドラ
オランダ国、エンエル - 3 4 3 1 セーデー・ニューゲイン、ヘッセラーン 1 9

審査官 引地 進

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 3 / 0 4 6 0 0 9 (WO, A 1)
国際公開第2 0 0 3 / 0 8 0 6 7 5 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C07K 16/00-16/46

PubMed

UniProt/GeneSeq