

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-140056

(P2017-140056A)

(43) 公開日 平成29年8月17日(2017.8.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-105838 (P2017-105838)	(71) 出願人	517020643
(22) 出願日	平成29年5月29日 (2017. 5. 29)		キニクサ ファーマシューティカルズ、
(62) 分割の表示	特願2016-517062 (P2016-517062)		リミテッド
原出願日	平成26年5月30日 (2014. 5. 30)		イギリス領 バミューダ ハミルトン エ
(31) 優先権主張番号	61/829, 082		イチエム 1 1, チャーチ ストリート
(32) 優先日	平成25年5月30日 (2013. 5. 30)		2, クラレンドン ハウス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オンコスタチンM受容体抗原結合タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 オンコスタチンM受容体抗原結合タンパク質を提供すること。

【解決手段】 本発明は、例えば、抗体および機能的フラグメント、誘導体、突然変異タンパク質、およびそれらの変異体などの、抗オンコスタチンM受容体β (OSMR) 抗原結合タンパク質を提供する。OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRへのOSM及び/またはIL-31の結合を妨げる。いくつかの実施形態では、抗OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRに関連した疾患および障害を研究する上で有用なツールであり、特に、OSMRに関連した疾患および障害の治療方法及びOSMRへのOSM及び/またはIL-31の結合方法において特に有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本明細書中に記載の発明。

【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、2013年5月30日に出願されたUS Provisional Appl. No. 61/829,082への優先権の利益を主張するものであり、その内容は、本明細書において全体が参照により組込まれる。

【背景技術】

【0002】

オンコスタチンM (OSM) とインターロイキン31 (IL-31) は、IL-6スーパーファミリーのメンバーであり、受容体サブユニットのオンコスタチンM受容体-β (OSMR) を共有する (Dillon et al., Nat. Immunol. 5 (7) : 752-60, 2004)。IL-31を除き、このファミリーのメンバーのすべてが、その多量体受容体複合体に糖タンパク質130 (gp130) の共通の鎖を共有している。OSMは、OSMRとgp130を含むヘテロ二量体受容体複合体を介して信号を送達するとともに、IL-31は、OSMRとの組み合わせで、gp130様受容体、IL-31R、を利用する (Dillon et al., supra; Drenth et al., J. Biol. Chem. 279 (34) : 36112-20, 2004)。一般に、OSMRとgp130は、組織および細胞タイプにわたってかなり普遍的に発現され、様々な刺激条件下で誘発され得る。IL-31Rの発現は比較的より制限され、しっかりと調節されているようである。ヒトおよびマウスでは同様に、IL-31R mRNA発現は、気管、骨格筋、胸腺および骨髄などの組織において低レベルで検出可能である (Dillon et al., supra)。発現のレベルは全く異なるが、IL-31R及びOSMRの両方は、皮膚や腸上皮細胞を含む多数の組織上に共発現するが、これはこれらの組織がIL-31に応答する必要があることを示唆している (Dillon et al., supra; Dambacher et al., Gut 56 (9) : 1257-65, 2007)。OSMRは上皮細胞上の肺において構成的に発現されている一方、IL-31Rの発現は肺組織において無視できる程から低レベルのものであるが、気道チャレンジの様々な方法の際にアップレギュレートされる (Dillon et al., supra; Jawa et al., J. Interferon Cytokine Res. 28 (4) : 207-19, 2008)。

【0003】

主にTリンパ球、マクロファージ、および好中球によって分泌され、OSMとIL-31は炎症を伴う様々な疾患状態において両方アップレギュレートされる。OSMは、骨形成、軟骨分解、コレステロールの取り込み、疼痛及び炎症を含む多様な生物学的役割に関与してきた (Cawston et al., Arthritis Rheum. 41 (10) : 1760-71, 1998; Hasegawa et al., Rheumatology (Oxford) 38 (7) : 612-7, 1999; Levy et al., J. Hepatol. 32 (2) : 218-26, 2000; Manicourt et al., Arthritis Rheum. 43 (2) : 281-8, 2000; de Hooge et al., Am J. Pathol. 160 (5) : 1733-43, 2002; Luzina et al., Arthritis Rheum 48 (8) : 2262-74, 2003; Morikawa et al., J. Neurosci 24 (8) : 1941-7, 2004; Kong et al., J. Lipid Res. 46 (6) : 1163-71, 2005)。OSMは、様々な状況での細胞外マトリックス (ECM) の強力な調節因子であることが示されており、OSMが、線維症 (過剰のECM) 及び軟骨分解 (ECMの分解) などの、一見反対の病理学的結果を

10

20

30

40

50

媒介することができることを示唆している。OSMが過剰発現したか、マウスの肺または関節にそれぞれ、外因的に投与された場合、組織のタイプと周囲の環境に応じて、これらの効果の両方が観察されてきた (Richards et al., Biochem. Soc. Trans. 30 (2) : 107-11, 2002; Hui et al., Arthritis Rheum, 48 (12) : 3404-18, 2003; Rowan et al., Am. J. Pathol. 162 (6) : 1975-84, 2003)。さらに、OSMは、これらのタイプの結果が存在するヒト病理においてアップレギュレートされることが以前示された (Cawston et al., supra; Hasegawa et al., supra; Levy et al., supra; Manicourt et al., supra; Luzina et al., supra) 10。主に、局所的に作用するサイトカイン、OSMは、関節リウマチ患者の関節 (RA) からの滑液中 (Cawston et al., supra; Manicourt et al., supra)、強皮症関連間質性肺疾患、特発性肺線維症 (IPF) を有する患者の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中 (Luzina et al., supra)、及び、肝硬変を有する患者の肝臓中 (Levy et al., supra)、アップレギュレートされる。OSMによるECMへの提案されている影響は、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) とMMPの組織阻害剤 (TIMP) との間のバランスをシフトさせるOSMの能力に一部帰せられ得る。TIMPは、MMPのタンパク質分解活性の損失をもたらす高い親和性により、1:1の比でMMPと結合する。TIMP-1とTIMP-3は、OSMによって差動的にレギュレートされ、TIMP-1の増加とTIMP-3の減少をもたらすことが以前示された (Gatsios et al., Eur. J. Biochem. 241 (1) : 56-63, 1996)。細胞外マトリックスコンポーネントの消化をレギュレートすることに加えて、MMPは、TGF- β 、強力な前線維性サイトカインなどの多くのタンパク質の切断とそれに続く活性化にも関与している (Leask et al., FASEB J. 18 (7) : 816-27, 2004)。OSMは、インビトロでタイプIコラーゲンの転写を直接的に誘発することができることも報告されている (Hasegawa et al., J. Rheumatol 25 (2) : 308-13, 1998)。

【0004】

OSM及びIL-31の両方の発現は、乾癬及びアトピー性皮膚炎患者の皮膚に見出されており、OSMR及びIL-31Rの突然変異は、全身皮膚アミロイド症に関連している。IL-31のシステム全体のトランスジェニック過剰発現は、マウスの皮膚における掻痒炎症反応を誘発した。OSM及びIL-31の両方は、侵害受容性および掻痒性の応答を促進することが示唆されているニューロンのOSMRを通じて信号を送達する。 30

まとめると、少なくとも炎症、細胞外マトリックスリモデリング、痛み、および掻痒症を含む多様な配列の病理学を促進するためのヒト疾患へのこれらのリンク及びOSM及びIL-31の能力は、OSMRの遮断がOSMRに関連した多くの疾患及び障害における治療的介入の有用なターゲットであることを示唆している。

【先行技術文献】

【非特許文献】 40

【0005】

【非特許文献1】Dillon et al., Nat. Immunol. 5 (7) : 752-60, 2004

【非特許文献2】Drenth et al., J. Biol. Chem. 279 (34) : 36112-20, 2004

【非特許文献3】Dambacher et al., Gut 56 (9) : 1257-65, 2007

【非特許文献4】Jawa et al., J. Interferon Cytokine Res. 28 (4) : 207-19, 2008

【非特許文献5】Cawston et al., Arthritis Rheum. 4 50

1 (10) : 1760-71, 1998

【非特許文献6】Hasegawa et al., Rheumatology (Oxford) 38 (7) : 612-7, 1999

【非特許文献7】Levy et al., J. Hepatol, 32 (2) : 218-26, 2000

【非特許文献8】Manicourt et al., Arthritis Rheum. 43 (2) : 281-8, 2000

【非特許文献9】de Hooge et al., Am J. Pathol. 160 (5) : 1733-43, 2002

【非特許文献10】Luzina et al., Arthritis Rheum 48 (8) : 2262-74, 2003 10

【非特許文献11】Morikawa et al., J. Neurosci 24 (8) : 1941-7, 2004

【非特許文献12】Kong et al., J. Lipid Res. 46 (6) : 1163-71, 2005

【非特許文献13】Richards et al., Biochem. Soc. Trans. 30 (2) : 107-11, 2002

【非特許文献14】Hui et al., Arthritis Rheum, 48 (12) : 3404-18, 2003

【非特許文献15】Rowan et al., Am. J. Pathol. 162 (6) : 1975-84, 2003 20

【非特許文献16】Gatsios et al., Eur. J. Biochem. 241 (1) : 56-63, 1996

【非特許文献17】Leask et al., FASEB J. 18 (7) : 816-27, 2004

【非特許文献18】Hasegawa et al., J. Rheumatol 25 (2) : 308-13, 1998

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

30

本発明は、商業生産およびヒトにおける治療的使用に適した特性を有する抗OSMR抗原結合タンパク質、例えば抗体およびその機能的フラグメントを提供する。抗OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRに関連した疾患及び障害、特にOSMRへのOSMまたはIL-31の結合に関連した疾患及び障害の治療方法において有用である。本明細書では、高い親和性でOSMRに結合してOSM及び／またはIL-31のOSMRへの結合を効果的にブロックし、それによって細胞内のOSMR媒介シグナル伝達を減少させるようなOSMR結合抗体が提供される。

【0007】

第1の態様においては、OSMR抗原結合タンパク質は、a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, またはSEQ ID NO: 29で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、b) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, またはSEQ ID NO: 11で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメイン、または、c) a) の前記軽鎖可変ドメイン及びb) の前記重鎖可変ドメインを含む。 40

【0008】

第1の態様の好ましい抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 27で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 9で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖 50

可変ドメインを含むもの；SEQ ID NO：28で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO：10で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメインを含むもの；及び、SEQ ID NO：29で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO：11で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメインを含むもの、を含む。

SEQ ID NO：9に対して上記の配列関係を有する重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO：9の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインはSEQ ID NO：53で示されるアミノ酸配列を選択的に含む。

SEQ ID NO：10に対して上記の配列関係を有する重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO：10の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインはSEQ ID NO：54で示されるアミノ酸配列を選択的に含む。

【0009】

第2の態様においては、OSMR抗原結合タンパク質は、a) SEQ ID NO：27, SEQ ID NO：28, またはSEQ ID NO：29で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン；SEQ ID NO：9, SEQ ID NO：10, またはb) SEQ ID NO：11で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン；または、c) a)の軽鎖可変ドメイン及びb)の重鎖可変ドメイン、を含む。

【0010】

第2の態様の好ましい抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO：27で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO：9で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；SEQ ID NO：28で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO：10で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；及び、SEQ ID NO：29で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO：11で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメインを含むもの、を含む。

SEQ ID NO：9に対して上記の配列関係を有する重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO：9の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインはSEQ ID NO：53で示されるアミノ酸配列をオプションで含む。

SEQ ID NO：10に対して上記の配列関係を有する重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、オプションで、SEQ ID NO：10の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインはSEQ ID NO：54で示されるアミノ酸配列を選択的に含む。

【0011】

10

20

30

40

50

第3の態様では、OSMR抗原結合タンパク質は、a) SEQ ID NO: 30で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1、SEQ ID NO: 33で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2、及びSEQ ID NO: 36で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3；b) SEQ ID NO: 31で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1、SEQ ID NO: 34で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2、及びSEQ ID NO: 37で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3；またはc) SEQ ID NO: 32で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1、SEQ ID NO: 35で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2、及びSEQ ID NO: 38で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3；を含む軽鎖可変ドメイン；d) SEQ ID NO: 12で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1、SEQ ID NO: 15で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2、及びSEQ ID NO: 18で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3；e) SEQ ID NO: 13で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1、SEQ ID NO: 16で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2、及びSEQ ID NO: 19で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3；またはf) SEQ ID NO: 14で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1、SEQ ID NO: 17で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2、及びSEQ ID NO: 20で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3；を含む重鎖可変ドメイン、を含む。

【0012】

第3の態様の好ましいOSMR抗原結合タンパク質は、a)の軽鎖可変ドメインとd)の重鎖可変ドメインを含むもの；b)の軽鎖可変ドメインとe)の重鎖可変ドメインを含むもの；及び、c)の軽鎖可変ドメインとf)の重鎖可変ドメインを含むものを含む。

a)の軽鎖可変ドメインとd)の重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 9の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含む重鎖可変ドメインを、選択的に含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインは、選択的に、SEQ ID NO: 53で示されるアミノ酸配列を含む。

b)の軽鎖可変ドメインとe)の重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 10の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含む重鎖可変ドメインを、オプションで含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインは、オプションで、SEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列を含む。

【0013】

本発明の第4の態様では、第1、第2、第3、又は第4の態様のOSMR抗原結合タンパク質は、 1×10^{-10} M以下の親和性でヒトOSMRに結合する。

【0014】

本発明の第5の態様では、第1、第2、又は第3の態様のOSMR抗原結合タンパク質は、ヒトOSMのヒトOSMRへの、及び／またはヒトIL-31のヒトOSMRへの結合を阻害する。

【0015】

本発明の第6の態様では、第1、第2、第3、第4又は第5の態様のOSMR抗原結合

タンパク質は、ヒト O S M R 発現細胞における、ヒト O S M 媒介、及び／またはヒト I L - 3 1 媒介 O S M R シグナル伝達を減少させる。

【0016】

本発明の第7の態様では、第1、第2、第3、第4、第5又は第6の O S M R 抗原結合タンパク質は、カニクイザル O S M R 発現細胞における、ヒト O S M 媒介、及び／またはヒト I L - 3 1 媒介 O S M R シグナル伝達を減少させる。

【0017】

本発明の第8の態様では、第1、第2、第3、第4、第5、第6又は第7の O S M R 抗原結合タンパク質は、ヒト抗体などの抗体である。好ましい抗体は、S E Q I D N O : 24で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖及びS E Q I D N O : 6で示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；S E Q I D : 25で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖及びS E Q I D N O : 7で示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；及び、S E Q I D N O : 26で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖及びS E Q I D N O : 8で示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、を含む。

さらなる抗体は、S E Q I D N O : 24で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖及びS E Q I D N O : 50で示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；S E Q I D : 25で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖及びS E Q I D N O : 51で示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；及び、S E Q I D : 26で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖及びS E Q I D N O : 52で示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、を含む。

【0018】

第9の態様では、本発明は、O S M R 抗原結合タンパク質の1つまたは複数のポリペプチドコンポーネント、例えば抗体軽鎖または抗体重鎖、をコードする核酸または単離核酸を提供する。好ましい実施形態では、核酸は以下を含むポリペプチドをコードする：

【0019】

a) S E Q I D N O : 27、S E Q I D N O : 28、またはS E Q I D N O : 29で示されるアミノ酸配列に少なくとも95%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；

【0020】

b) S E Q I D N O : 9、S E Q I D N O : 10、またはS E Q I D N O : 11で示されるアミノ酸配列に少なくとも95%の同一性を有する重鎖可変ドメイン；

【0021】

c) S E Q I D N O : 27、S E Q I D N O : 28、またはS E Q I D N O : 29で示されるアミノ酸配列から、5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン；

【0022】

d) S E Q I D N O : 9、S E Q I D N O : 10、またはS E Q I D N O : 11

で示されるアミノ酸配列から、5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン；

【0023】

e) 以下を含む軽鎖可変ドメイン：

【0024】

i) S E Q I D N O : 30で示されるL C D R 1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するL C D R 1；S E Q I D N O : 33で示されるL C D R 2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するL C D R 2；及びS E Q I D N O : 36で示されるL C D R 3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するL C D R 3；

【0025】

i i) S E Q I D N O : 31で示されるL C D R 1配列から3以下のアミノ酸の付

10

20

30

40

50

加、欠失または置換を有するLCDR1；SEQ ID NO：34で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2；及びSEQ ID NO：37で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3；または、

【0026】

iii) SEQ ID NO：32で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1；SEQ ID NO：35で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2；及びSEQ ID NO：38で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3；または、

【0027】

f) 以下を含む重鎖可変ドメイン：

【0028】

i) SEQ ID NO：12で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1；SEQ ID NO：15で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2；及びSEQ ID NO：18で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3；

【0029】

ii) SEQ ID NO：13で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1；SEQ ID NO：16で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2；及びSEQ ID NO：19で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3；または、

【0030】

iii) SEQ ID NO：14で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1；SEQ ID NO：17で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2；及びSEQ ID NO：20で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3。

特定の実施形態では、核酸または単離核酸は、SEQ ID NO：53，またはSEQ ID NO：54で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

特定の実施形態では、核酸または単離核酸は、SEQ ID NO：50，SEQ ID NO：51，またはSEQ ID NO：52で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

【0031】

第9の態様の特定の実施形態では、核酸または単離核酸は抗体軽鎖をコードし、SEQ ID NO：21，SEQ ID NO：22，またはSEQ ID NO：23で示されるヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の同一性を有する。第9の態様の他の実施形態では、核酸または単離核酸は抗体重鎖をコードし、SEQ ID NO：3，SEQ ID NO：4，またはSEQ ID NO：5で示されるヌクレオチド配列に対して、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%の同一性を有する。

特定の実施形態では、重鎖は、SEQ ID NO：47，SEQ ID NO：48，またはSEQ ID NO：49で示されるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる。

【0032】

第10の態様では、本発明は、第9の態様の核酸または単離核酸を1つまたは複数含む発現ベクターを提供する。特定の実施形態では、発現ベクターは、抗体軽鎖、抗体重鎖、または抗体軽鎖と抗体重鎖の両方をコードする。

10

20

30

40

50

【0033】

第11の態様では、本発明は、本発明の第10の態様の発現ベクターを1つまたは複数含む組み換え宿主細胞を含有する、プロモータに機能的にリンクした第9の態様の核酸または単離核酸を1つまたは複数含む組み換え宿主細胞を提供する。好ましい実施形態では、組換え宿主細胞は、OSMRに結合する抗体を分泌する。好ましい宿主細胞は、CHO細胞株などの哺乳動物宿主細胞である。

【0034】

第12の態様では、本発明は、自己免疫疾患、炎症性疾患、または細胞外マトリックスの沈着やリモデリングに関連する障害の治療方法を提供し、この方法は、必要とする患者に、第1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, または8の態様のうちの任意の1つのOSMR抗原結合タンパク質の有効量を投与することを含む。好ましい実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 27で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 9で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab1）、SEQ ID NO: 28で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 10で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab2）、またはSEQ ID NO: 29で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 11で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab3）である。いくつかの実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 27で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 53で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体、またはSEQ ID NO: 28で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 54で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体である。好ましい実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRへのOSMの結合、またはOSMRへのIL-31の結合を阻害する。特に好ましい実施形態では、自己免疫疾患、炎症性疾患、または細胞外マトリックスの沈着やリモデリングに関連する障害は、線維症、軟骨分解、関節炎、慢性関節リウマチ、強皮症、強皮症関連の間質性肺疾患、特発性肺線維症、肝硬変、乾癬、アトピー性皮膚炎、全身性皮膚アミロイド症、原発性皮膚アミロイド症、炎症、掻痒性炎症、結節性痒疹及び痛みである。

SEQ ID NO: 27で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 53で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体、またはSEQ ID NO: 28で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 54で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体である。好ましい実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRへのOSMの結合、またはOSMRへのIL-31の結合を阻害する。特に好ましい実施形態では、自己免疫疾患、炎症性疾患、または細胞外マトリックスの沈着やリモデリングに関連する障害は、線維症、軟骨分解、関節炎、慢性関節リウマチ、強皮症、強皮症関連の間質性肺疾患、特発性肺線維症、肝硬変、乾癬、アトピー性皮膚炎、全身性皮膚アミロイド症、原発性皮膚アミロイド症、炎症、掻痒性炎症、結節性痒疹及び痛みである。

【0035】

第13の態様では、本発明は、第11の態様の組換え宿主細胞を培養して、その培養物からOSMR抗原結合タンパク質を単離することによる、第1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, または8の態様のうちの任意の1つのOSMR抗原結合タンパク質の製造方法を提供する。

【0036】

第14の態様では、本発明は、以下の群から選択される抗体と交差競合する第1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, または8の態様のうちの任意の1つのOSMR抗原結合タンパク質を提供する：

【0037】

a) SEQ ID NO: 24で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖及びSEQ ID NO: 6で示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0038】

b) SEQ ID NO: 25で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖及びSEQ ID NO: 7で示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0039】

c) SEQ ID NO: 26で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖及びSEQ ID NO: 8で示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, またはSEQ ID NO: 29で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ド

メイン；

b) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する重鎖可変ドメイン；または

c) a) の前記軽鎖可変ドメイン及び b) の前記重鎖可変ドメイン；

を含むオンコスタチン M 受容体 (OSMR) 抗原結合タンパク質。

(項目 2)

前記軽鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, または SEQ ID NO: 29 で示される前記アミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する項目 1 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 3)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示される前記アミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する項目 1 または 2 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 4)

a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, または SEQ ID NO: 29 で示されるアミノ酸配列から、10 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン；

b) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示されるアミノ酸配列から、10 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン；または

c) a) の前記軽鎖可変ドメイン及び b) の前記重鎖可変ドメイン；

を含むオンコスタチン M 受容体 (OSMR) 抗原結合タンパク質。

(項目 5)

前記軽鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, または SEQ ID NO: 29 で示されるアミノ酸配列から、5 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する項目 4 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 6)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示されるアミノ酸配列から、5 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する項目 4 または 5 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 7)

前記軽鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, または SEQ ID NO: 29 で示されるアミノ酸配列を含む項目 1 ~ 6 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 8)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示されるアミノ酸配列を含む項目 1 ~ 7 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 9)

a) SEQ ID NO: 30 で示される L C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 1 ; SEQ ID NO: 33 で示される L C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 2 ; 及び SEQ ID NO: 36 で示される L C D R 3 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 3 ;

b) SEQ ID NO: 31 で示される L C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 1 ; SEQ ID NO: 34 で示される L C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 2 ; 及び SEQ ID NO: 37 で示される L C D R 3 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 3 ; または

10

20

30

40

50

c) SEQ ID NO: 32で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1; SEQ ID NO: 35で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2; 及びSEQ ID NO: 38で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3:

を含む軽鎖可変ドメインと、

d) SEQ ID NO: 12で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1; SEQ ID NO: 15で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2; 及びSEQ ID NO: 18で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3;

10

e) SEQ ID NO: 13で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1; SEQ ID NO: 16で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2; 及びSEQ ID NO: 19で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3; または

f) SEQ ID NO: 14で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1; SEQ ID NO: 17で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2; 及びSEQ ID NO: 20で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3:

20

を含む重鎖可変ドメインと;

を含むオンコスタチンM受容体(OSMR)抗原結合タンパク質。

(項目10)

a)の前記軽鎖可変ドメイン及びd)の前記重鎖可変ドメインを含む項目9に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目11)

前記軽鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 30で示されるLCDR1; SEQ ID NO: 33で示されるLCDR2配列; 及びSEQ ID NO: 36で示されるLCDR3配列を含み; 前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 12で示されるHCDR1; SEQ ID NO: 15で示されるHCDR2配列; 及びSEQ ID NO: 18で示されるHCDR3配列を含む項目10に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

30

(項目12)

b)の前記軽鎖可変ドメイン及びe)の前記重鎖可変ドメインを含む項目9に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目13)

前記軽鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 31で示されるLCDR1; SEQ ID NO: 34で示されるLCDR2配列; 及びSEQ ID NO: 37で示されるLCDR3配列を含み; 前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 13で示されるHCDR1; SEQ ID NO: 16で示されるHCDR2配列; 及びSEQ ID NO: 19で示されるHCDR3配列を含む項目12に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

40

(項目14)

c)の前記軽鎖可変ドメイン及びf)の前記重鎖可変ドメインを含む項目9に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目15)

前記軽鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 32で示されるLCDR1; SEQ ID NO: 35で示されるLCDR2配列; 及びSEQ ID NO: 38で示されるLCDR3配列を含み; 前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 14で示される

50

HCDR1; SEQ ID NO: 17で示されるHCDR2配列; 及びSEQ ID NO: 20で示されるHCDR3配列を含む項目14に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目16)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 9の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸を含む項目1～7または9～11のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目17)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 9の73位に対応する位置にアスパラギン酸を含む項目16に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

10

(項目18)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 53で示されるアミノ酸配列を含む項目1～7または9～11のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目19)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 10の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸を含む項目1～7, 9, 12または13のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目20)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 10の73位に対応する位置にアスパラギン酸を含む項目19に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

20

(項目21)

前記重鎖可変ドメインは、SEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列を含む項目1～7, 9, 12または13のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目22)

前記抗原結合タンパク質は、 1×10^{-10} M以下の親和性でヒトOSMRに特異的に結合する項目1～21のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目23)

前記抗原結合タンパク質は、ヒトOSMRへのヒトOSMまたはヒトIL-31の結合を阻害する項目1～22のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目24)

前記抗原結合タンパク質は、ヒトOSMR発現細胞におけるヒトOSM媒介またはヒトIL-31媒介OSMRシグナル伝達を減少させる項目1～23のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

30

(項目25)

前記抗原結合タンパク質は抗体である項目1～24のいずれか1項に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目26)

前記抗原結合タンパク質はヒト抗体である項目25に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目27)

前記軽鎖はSEQ ID: 24で示されるアミノ酸配列を含み、前記重鎖はSEQ ID NO: 6で示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖及び重鎖を含む項目26に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

40

(項目28)

前記軽鎖はSEQ ID: 25で示されるアミノ酸配列を含み、前記重鎖はSEQ ID NO: 7で示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖及び重鎖を含む項目26に記載のOSMR抗原結合タンパク質。

(項目29)

前記軽鎖はSEQ ID: 26で示されるアミノ酸配列を含み、前記重鎖はSEQ ID NO: 8で示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖及び重鎖を含む項目26に記載のOSMR

50

抗原結合タンパク質。

(項目 30)

前記軽鎖は SEQ ID: 24 で示されるアミノ酸配列を含み、前記重鎖は SEQ ID NO: 50 で示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖及び重鎖を含む項目 25 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 31)

前記軽鎖は SEQ ID: 25 で示されるアミノ酸配列を含み、前記重鎖は SEQ ID NO: 51 で示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖及び重鎖を含む項目 25 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 32)

前記軽鎖は SEQ ID: 26 で示されるアミノ酸配列を含み、前記重鎖は SEQ ID NO: 52 で示されるアミノ酸配列を含む、軽鎖及び重鎖を含む項目 25 に記載の OSMR 抗原結合タンパク質。

(項目 33)

a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, または SEQ ID NO: 29 で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する軽鎖可変ドメイン;

b) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する重鎖可変ドメイン;

c) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, または SEQ ID NO: 29 で示されるアミノ酸配列から、5 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン;

d) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11 で示されるアミノ酸配列から、5 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン;

e) i) SEQ ID NO: 30 で示される L C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 1、SEQ ID NO: 33 で示される L C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 2、及び SEQ ID NO: 36 で示される L C D R 3 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 3;

ii) SEQ ID NO: 31 で示される L C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 1、SEQ ID NO: 34 で示される L C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 2、及び SEQ ID NO: 37 で示される L C D R 3 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 3; または

iii) SEQ ID NO: 32 で示される L C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 1、SEQ ID NO: 35 で示される L C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 2、及び SEQ ID NO: 38 で示される L C D R 3 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する L C D R 3;

を含む軽鎖可変ドメイン; または

f) i) SEQ ID NO: 12 で示される H C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する H C D R 1、SEQ ID NO: 15 で示される H C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する H C D R 2、及び SEQ ID NO: 18 で示される H C D R 3 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する H C D R 3;

ii) SEQ ID NO: 13 で示される H C D R 1 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する H C D R 1、SEQ ID NO: 16 で示される H C D R 2 配列から 3 以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する H C D R 2、及び SEQ

10

20

30

40

50

I D N O : 19で示されるH C D R 3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するH C D R 3 ; または

i i i) S E Q I D N O : 14で示されるH C D R 1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するH C D R 1、S E Q I D N O : 17で示されるH C D R 2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するH C D R 2、及びS E Q

I D N O : 20で示されるH C D R 3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するH C D R 3 ;

を含む重鎖可変ドメイン :

を含むポリペプチドをコードする単離核酸。

(項目34)

10

前記ポリペプチドは抗体軽鎖を含む項目33に記載の単離核酸。

(項目35)

前記軽鎖は、S E Q I D N O : 21, S E Q I D N O : 22, またはS E Q I D N O : 23で示される前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目34に記載の単離核酸。

(項目36)

前記軽鎖は、S E Q I D N O : 21, S E Q I D N O : 22, またはS E Q I D N O : 23で示される前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目35に記載の単離核酸。

(項目37)

20

前記軽鎖は、S E Q I D N O : 21, S E Q I D N O : 22, またはS E Q I D N O : 23で示される前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目36に記載の単離核酸。

(項目38)

前記軽鎖は、S E Q I D N O : 21, S E Q I D N O : 22, またはS E Q I D N O : 23で示される前記ヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目37に記載の単離核酸。

(項目39)

前記ポリペプチドは抗体重鎖を含む項目33に記載の単離核酸。

(項目40)

30

前記ポリペプチドは、S E Q I D N O : 53, またはS E Q I D N O : 54で示される前記アミノ酸配列を含む項目39に記載の単離核酸。

(項目41)

前記ポリペプチドは、S E Q I D N O : 50, S E Q I D N O : 51, またはS E Q I D N O : 52で示される前記アミノ酸配列を含む項目39に記載の単離核酸。

(項目42)

前記重鎖は、S E Q I D N O : 7, S E Q I D N O : 8, S E Q I D N O : 9, S E Q I D N O : 10, S E Q I D N O : 11, S E Q I D N O : 12, S E Q I D N O : 13, S E Q I D N O : 14, S E Q I D N O : 15, S E Q I D N O : 16, またはS E Q I D N O : 17で示される前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目39に記載の単離核酸。

40

(項目43)

前記重鎖は、S E Q I D N O : 3, S E Q I D N O : 4, またはS E Q I D N O : 5で示される前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目42に記載の単離核酸。

(項目44)

前記重鎖は、S E Q I D N O : 3, S E Q I D N O : 4, またはS E Q I D N O : 5で示される前記ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレ

50

オチド配列を含む核酸によってコードされる項目 4 3 に記載の単離核酸。

(項目 4 5)

前記重鎖は、SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, または SEQ ID NO: 5 で示されるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目 4 4 に記載の単離核酸。

(項目 4 6)

前記重鎖は、SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, または SEQ ID NO: 49 で示されるヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる項目 4 4 に記載の単離核酸。

(項目 4 7)

項目 3 3 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の単離核酸を含む発現ベクター。

(項目 4 8)

前記単離核酸は、抗体軽鎖をコードする項目 4 7 に記載の発現ベクター。

(項目 4 9)

前記単離核酸は、抗体重鎖をコードする項目 4 7 に記載の発現ベクター。

(項目 5 0)

抗体重鎖をコードする単離核酸をさらに含む項目 4 8 に記載の発現ベクター。

(項目 5 1)

プロモータに機能的にリンクした項目 3 3 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の単離核酸を含む組換え宿主細胞。

(項目 5 2)

項目 4 7 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

(項目 5 3)

前記宿主細胞は、項目 4 8 及び 4 9 に記載の発現ベクターを含む項目 5 2 に記載の組換え宿主細胞。

(項目 5 4)

前記宿主細胞は、OSMR に結合する抗体を分泌する項目 5 3 に記載の組換え宿主細胞。

(項目 5 5)

前記細胞は、哺乳類由来のものである項目 5 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換え宿主細胞。

(項目 5 6)

前記細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株である項目 5 5 に記載の組換え宿主細胞。

(項目 5 7)

必要とする患者に、治療的有効量の項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の OSMR 抗原結合タンパク質を投与することを含む疾患または障害の治療方法。

(項目 5 8)

前記 OSMR 抗原結合タンパク質は抗体である項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記抗体は、SEQ ID NO: 27 で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び SEQ ID NO: 9 で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記抗体は、SEQ ID NO: 24 で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び SEQ ID NO: 6 で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記抗体は、SEQ ID NO: 27 で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及び SEQ ID NO: 53 で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目 5 8 に記

10

20

30

40

50

載の方法。

(項目62)

前記抗体は、SEQ ID NO: 24で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 50で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目61に記載の方法。

(項目63)

前記抗体は、SEQ ID NO: 28で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 10で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目58に記載の方法。

(項目64)

前記抗体は、SEQ ID NO: 25で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 7で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目63に記載の方法。

(項目65)

前記抗体は、SEQ ID NO: 28で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 54で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目58に記載の方法。

(項目66)

前記抗体は、SEQ ID NO: 25で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 51で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目65に記載の方法。

(項目67)

前記抗体は、SEQ ID NO: 29で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 11で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目58に記載の方法。

(項目68)

前記抗体は、SEQ ID NO: 26で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 8で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目67に記載の方法。

(項目69)

前記抗体は、SEQ ID NO: 26で示される軽鎖可変ドメインアミノ酸配列及びSEQ ID NO: 52で示される重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む項目67に記載の方法。

(項目70)

前記抗原結合タンパク質は、OSMRへのOSM及び／またはIL-31の結合を阻害する項目57～69のいずれか1項に記載の方法。

(項目71)

前記疾患または障害は、自己免疫疾患、炎症性疾患、または細胞外マトリックス沈着またはリモデリングに関連する障害である項目70に記載の方法。

(項目72)

前記自己免疫疾患、前記炎症性疾患、または細胞外マトリックス沈着またはリモデリングに関連する前記障害は、線維症、軟骨分解、関節炎、慢性関節リウマチ、強皮症、強皮症関連の間質性肺疾患、特発性肺線維症、肝硬変、乾癬、アトピー性皮膚炎、全身性皮膚アミロイド症、原発性皮膚アミロイド症、炎症、掻痒性炎症、結節性痒疹及び痛みである、項目71に記載の方法。

(項目73)

a) 項目51～56のいずれか1項に記載の組換え宿主細胞を培養すること；と

b) 前記培養物から前記OSMR抗原結合タンパク質を単離すること；

を含むオンコスタチンM受容体(OSMR)抗原結合タンパク質の製造方法。

(項目74)

10

20

30

40

50

前記 O S M R 抗原結合タンパク質は、

a) S E Q I D : 2 4 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖及び S E Q I D N O :

6

で示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

b) S E Q I D : 2 5 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖及び S E Q I D N O :

7

で示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；と

c) S E Q I D : 2 6 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖及び S E Q I D N O :

8

で示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

10

からなる群から選択される抗体と交差競合する、項目 1 ～ 3 2 のいずれか 1 項に記載の
オンコスタチン M 受容体 (O S M R) 抗原結合タンパク質。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためのものであり、記載
される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書の本体内で引用され
る全ての参考文献は、その全体が参照により明示的に組込まれる。

【0041】

組換え DNA、オリゴヌクレオチド合成、組織培養及び形質転換、タンパク質精製など
のために、標準的な技術を使用することができる。酵素の反応および精製技術は、製造業
者の仕様書に従って、または当該分野で一般に遂行されているように、または本明細書に
記載のように、実施することができる。以下の手順および技術は、一般に、当該技術分野
で周知である従来の方法に従って、そして本明細書を通して引用され検討されている様々
な一般的かつより具体的な参考文献に記載されているように、行うことができる。例えば
、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning :
A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harb
or, N. Y., 参照。これは、本明細書で任意の目的で、参照され組込まれている。具
体的な定義が提供されていなければ、本明細書に記載の分析化学、有機化学、並びに医薬
品及び薬剤化学に関連して使用される命名法、及びそれらの実験の手順と技術は、当該
技術分野で周知であり、一般に使用されているものである。化学合成、化学分析、薬学的
調製、調剤、並びに送達及び患者の治療のために、標準的な技術を使用することができる
。

20

30

O S M R

【0042】

本明細書に記載される抗原結合タンパク質は、O S M R に結合する。O S M と I L - 3
1 は、O S M R を通じて信号を送達する。O S M R は、タイプ I のサイトカイン受容体フ
ァミリーのメンバーである。O S M R は、糖タンパク質 130 (g p 130、インターロ
イキン 6 シグナルトランスデューサー (I L 6 S T)、I L 6 - β 、または C D 130 と
しても知られる) とヘテロ二量体化してタイプ I I O S M R を形成する。O S M R は、I
L - 3 1 受容体 A (I L 3 1 R A) ともヘテロ二量体化して I L - 3 1 受容体を形成し、
従って、O S M 及び I L - 3 1 誘発性のシグナル伝達事象を伝達する。例示的な実施形態
では、O S M R 抗原結合タンパク質は O S M R に結合し、O S M R を発現する細胞におけ
る O S M 及び／または I L - 3 1 媒介のシグナル伝達を防ぐ。

40

【0043】

ヒト O S M R 配列は当技術分野で知られている。様々な態様において、ヒト O S M R タ
ンパク質配列は、GenBank Accession No. AA I 25210, AA
I 25211, NP_003990, 及び EAW55976 に提供されている。例示的な
ヒト O S M R アミノ酸配列 (S E Q I D N O : 1) が表 1 に記載されている。タンパ
ク質は、いくつかのドメインから構成される：アミノ酸 1 - 27 は、哺乳動物細胞におけ

50

るタンパク質のプロセッシング中に切断されるシグナル配列に対応する；アミノ酸 28－740 は、細胞外ドメインに対応する；及び、アミノ酸 741－761 は、膜貫通ドメインに対応する。好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗原結合タンパク質は、OSMR の細胞外ドメインに結合し、OSM 及び／または IL－31 の OSMR と相互作用を防ぐ。

【0044】

ヒト OSM 配列は当該技術分野で知られている。様々な態様において、ヒト OSM タンパク質配列は、GenBank Accession No. CAG30420, CAG46504, NP_065391, P13725, AAC05173, EAW59864, 及び AAH11589 に提供されている。例示的なヒト OSM アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 39) が表 1 に記載されている。アミノ酸 1－25 は、シグナル配列に対応する；アミノ酸 26－220 は、成熟タンパク質に対応する；および、アミノ酸 221－252 は、プロペプチド配列に対応する。

10

【0045】

ヒト IL－31 の配列は、当該技術分野で知られている。様々な態様において、ヒト IL－31 タンパク質配列は GenBank Accession No. NP_001014358, AAS86448, AAI32999, AAI33001, Q6EBC2, 及び EAW98310 に提供されている。例示的なヒト IL－31 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 41) が、表 1 に提供されている。アミノ酸 1－23 は、推定シグナル配列に対応する。

20

【0046】

ヒト IL31RA の配列は、当該技術分野で知られている。様々な態様において、ヒト IL31RA タンパク質配列は GenBank Accession No. AAS86447, NP_001229567, 及び CBL94051 に提供されている。例示的なヒト IL31RA (v4, isoform3) アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 43) が、表 1 に提供されている。アミノ酸 1－32 は、シグナル配列に対応する；及び、アミノ酸 533－553 は、膜貫通配列に対応する。

【0047】

ヒト gp130 の配列は、当該技術分野で知られている。様々な態様において、ヒト gp130 タンパク質配列は GenBank Accession. No. AAI17403, AAI17405, EAW54936, NP_002175, ABK41905, 及び AAA59155 に提供されている。例示的なヒト gp130 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 45) が、表 1 に提供されている。タンパク質はいくつかのドメインから構成される：アミノ酸 1－22 は、シグナル配列に対応する；アミノ酸 23－619 は、細胞外ドメインに対応する；アミノ酸 620－641 は、膜貫通ドメインに対応する；および、アミノ酸 642－918 は、細胞質ドメインに対応する。

30

表 1

【表 1 - 1】

ヒト OSMR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1)
MALFAVFQTTFFLTLLSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSTRQSLHLQWTVHNL PYHQELKMFVFIQISRIETSNVIWVGNYSTTVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRIKSL VDDAKFPEPNFWSNWSSWEEVSVQDSTGQDILFVFPKDKLVEEGTNVTICYVSRNIQN NVSCYLEGKQIHGEQLDPHVTAFLNLSVPFIRNKGTNIYCEASQGNVSEGMKGIVLFVS KVLEPKDFSCETEDFKTLHCTWDPGTDALGWSKQPSQSYTLFESFSGEKKLCTHKN WCNWQITQDSQETYNFTLIAENYLKRKSVNLFNLTHRVYLMNPFVNFENVNATNAI MTWKVHSIRNNFTYLCQIELHGEGKMMQYNVSIKVNGEYFLSELEPATEYMARVRCA DASHFWKWSEWSGQNFTTLEAAPSEAPDVWRIVSLEPGNHTVTLFWKPLSKLHANGK ILFYNVVVENLDKPSSSELHSIPAPANSTKLILDRCSYQICVIANNSVGASPASVIVISADP ENKEVEEERIAGTEGGFSLSWKPQPGDVIGYVVDWCDHTQDVLGDFQWKNVGPNTTS TVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLLEKKTGYSQELAPSDNPHVLVDTLTSHSFTL SWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFEKAVLSDGSECCYKIDNPEEKALIV DNLKPESFYEFFITPFTSAGEGPSATFTKVTTTPDEHSSMLIHILLPMVFCVLLIMVMCYL KSQWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKNPHLIIMNVSDCIPDAIEVVSKPEGTKIQFLGT RKSLTETELTKPNYLYLLPTEKNHSGPGPCICFENLTYNQAASDSGSCGHVPVSPKAPS MLGLMTSPENVLKALEKNYMNSLGEIPAGETSLNYVSQLASPMFGDKDSLPTNPVEAP HCSEYKMQMAVSLRLALPPPTENSSLSSITLLDPGEIHYC

10

20

【表 1 - 2】

ヒト OSMR アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 39)
MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDP YIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRL PKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRGASQP PTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHVSGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGV RRTRPSRK GKRLMTRGQLPR
ヒト IL-31 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 41)
MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKDVEEE KGVLSQNYTLPCLSFDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIEHLDKLIFQDAP ETNISVPTDTHECKRFILTISQQFSECMDLALKSLTSGAQQATT

30

【表 1 - 3】

ヒト I L 3 1 R A アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 43) MKLSPQPSVCN LGMMWTWALWMLPSLCKFSLAALPAKPENISCVYYYRKNLTCTWS PGKETSYTQYTVKRTYAFGEKHDNCTTNSSTSEN RASC SF FLPRITIPDNYTIEVEAENG DGVIKSHMTYWRL ENIAKTEPPKIFRVKPV LGIKRMIQIEWIKPE LAPVSSDLKYTLRFR TVNSTSWMEVNF AKNR KDKNQTYNLTGLQPFTEYVIALRC AVKESKFWSDWSQEK M GMT EEEAPCGLELWRV LKPAEADGRRPVRL LWKKARGAPVLEKTLGYNIWYY PESNT NLTETMNTTNQQLHLGGESFWVSMISYNSLGKSPVATLRIPAIQEK SFQCIEVMQAC VAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIEWFPD V DSEPTTLSWESVSQATNWTIQQDKL KPF WCYNISVYPMLHDKVGEPYSIQAYAKEGVPSEGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERK GIICNYTIFYQAE G GKGFSKTVNSSILQYGL ES LKRKTSYIVQVMAS TSAGGTNGTSINF KTL SFSVFEIHLITSLIGG L L I L I L T V A Y G L K K P N K L T H L C W P T V P N P A E S S I A T W H G D D FKDKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKL V V N F G N V L Q E I F T D E A R T G Q E N N LGGEKNGTRILSSCPTSI	ヒト g p 1 3 0 アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 45) MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDP CGYISPE SPVVQLHSNFTAVCVLKEK CMDYFH VNANYIVWKT NHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNLTFGQLEQNVYGITH SGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDT PTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTS DHINFDPVYKVKPNPPHNL SVINSEELS SILKLTWTPNSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFR I RCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDPSHTQGYRTVQLVWKTLP P FEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAV LTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDW QQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRTK KVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNV DSSHTEYTLSSLTSDTL YMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTTLGLVLCFNKRD LIK KHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDSNFTDVS VVEIVANDKKPF PEDLKS L D L F K K E K I N T E G H S S G I G G S S C M S S S R P S I S S S D E N E S S Q N T S S T V Q Y S T V V H S GYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNC SQHE SSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQM KMFQEVSAADAFGP GTE GQVERFETVGMEAATDEGM PKSYLPQTVRQGGYMPQ
--	---

【0048】

本発明の特定の実施形態では、本明細書に記載した抗原結合タンパク質は、カニクイザルの O S M R に対してカニクイザルの O S M 及び／または I L - 3 1 を高い親和性で結合するものとその相互作用をブロックするものを含め、ヒトとカニクイザルの O S M R の両方を高い親和性で結合する。これらの特性は、非ヒト霊長類において有益な毒性試験を可能にする。

【0049】

アカゲザル (*Macaca mulatta*) の O S M R タンパク質配列は当該技術分野で知られており、GenBank Accession No. XP_001083745 に提供されている。例示的なカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の O S M R アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 2) が表 2 に提供されている。タンパク質はいくつかのドメインから構成される：アミノ酸 1 - 27 は、哺乳動物細胞におけるタンパク質のプロセッシング中に切断されるであろうシグナル配列に対応する；アミノ酸 28 - 737 は、細胞外ドメインに対応する；および、アミノ酸 738 - 757 は、膜貫通ドメインに対応する。好ましい実施形態では、本明細書中に記載の抗原結合タンパク質は、O S M R の細胞外ドメインに結合し、O S M 及び／または I L - 3 1 の O S M R との

相互作用を防止する。

【0050】

アカゲザル (*Macaca mulatta*) の OSM タンパク質配列は当該技術分野で知られており、GenBank Accession No. NP_001181403 に提供されている。例示的なカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の OSM アミノ酸配列 (SEQ IDNO: 40) が表 2 に提供されている。アミノ酸 1-196 は、成熟したカニクイザルの OSM に対応する。

【0051】

アカゲザル (*Macaca mulatta*) の IL-31 タンパク質配列は当該技術分野で知られており、GenBank Accession No. XP_001096743 に提供されている。例示的なカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の IL-31 アミノ酸配列 (SEQ IDNO: 42) が表 2 に提供されている。この配列は、成熟したカニクイザルの IL-31 を表す。

10

【0052】

例示的なカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の IL31RA アミノ酸配列 (SEQ IDNO: 44) が表 2 に提供されている。アミノ酸 1-19 は、シグナル配列に対応する；そして、アミノ酸 520-540 は、膜貫通ドメインに対応する。

【0053】

アカゲザル (*Macaca mulatta*) の gp130 タンパク質配列は当該技術分野で知られており、GenBank Accession No. NP_001252920 に提供されている。例示的なカニクイザル (*Macaca fascicularis*) の gp130 アミノ酸配列 (SEQ IDNO: 46) が表 2 に提供されている。タンパク質はいくつかのドメインから構成される：アミノ酸 1-22 は、シグナル配列に対応する；アミノ酸 23-619 は、細胞外ドメインに対応する；アミノ酸 620-641 は、膜貫通ドメインに対応する；そして、アミノ酸 642-918 は、細胞質ドメインに対応する。

20

表 2

【表 2 - 1】

カニクイザル○SMRアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) MALFVVFQTTFFLILLSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSIHQSLHLQWTVHNL PYHQELKMFVFIQISRIETSNVWVGNYSTPVKWNQVLHWSWESELP ECATHFVRIKSVIDDASFPEPNFWSNWSSWEEVSVQDYLGRGTLFVFPKDKLVEEGSVNTIC YVSRNIQNNVSCYLEGKQIHGEQLDPHVTAFLNLSVPFIRNRGTNIYCEASQGNVSKGIEGIVLFVSK VLEPKDFSCESQDFKTLHCTWDPGTDALGWSKQPSQSYTLFESFSGEKKLC THKNWCNWQITQDSQEMYNFTLIAENYLKRKRSVNILFNLTHRVYLMNPF SVNFENVNATNAIMTWKVHSMRNNFTYLCQIELHGEGKMMQYDV SINVNGEYFLSELEPATEYMARVRCADASHFWKWTEWSGQNF TTLEAAPSEAPDVWRSVNSEPGNHTVTLFWKPLSKLHANG KILFYNVVVENLDKPSRSELRSIPAPANSTKLILDRCSYQICV TANNSSVGASPAHIVISADPENKEVEEER IAGTEGGFSLSWKPQPGDVIGYVVDWCDHPQDVLQWKNVGPNTTST VISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLEKKTGYSQELAPSDNPHV LVDMLTSHSFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFQKAVLSDGSECCRYKIDNPEEKALIVD NLKPESFYEFFVTPFTSAGEGPNATFTKVTTPEHSSMLIRILLPMVFCVLLIMIVCYLKS QWIKETCYPDIPDPYKSSILSLIKFKNPHLTIMNVSDCIPDAIEVVSKPEGTKIQLLGR KSLTETELTKPNYLYLLPTEKNHSGPGPCICFENFTYNQAASDAGSCGHVPVPPKAPPS MLGLMTSPENVLKALEKNYMNSLGEVPAGETSLNYVSQLASPMMSGDKDSLPTNPVEP PHCSEYKMQMAVPLRLALPPPTENSSSLSSITLLDPGEHYR	10
カニクイザル○SMRアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 40) AAMGSCSKEYRMLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDIPKLREHCRESPGAFPSE ETLRGLGRRGFLQTLNATLGRILHRLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPN VLGLRNNVYCAQLLDNSDMTEPTKAGRGTPQPPTPTPTSDVFQRKLEGCSFLRGYH RFMHSVGRVFSKWGESPNRSRR	20
カニクイザル I L - 3 1 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 42) TLPVHFLQPSDIQKIVEELQSLSKMLLKDVKEDKGVLVSQNYTLPCLT PDAQPPIIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIIEHLDKLIFQDAPETNISVPTD THECKRFILTISQQFSECM DLALKSLTSGAQQATT	30
カニクイザル I L 3 1 R A アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 44) MMWTWALWMFPLLCKFGLAALPAKPENISCVYYRKNLTCTWSPGKETS YTOYTAKRTYAFGKKHDNCTTSSSTSENRASCSFFLPRITIPDNYTIEVEAENG DGVKSDMTWCWRL EDIAKTEPPEIFSVKPVLGKRMIRIEWIKPELAPVSSDLKYAL RFRTVNSTSWMEVNFAKNRKDTNQTYNLMGLQAFTEYVVALRCAVKESKFWSDWSQEK MGMTEEEAPCGLELWRVLKPTEVDGRRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYFPENNT NLTETVNTTNQQL ELHLGGESYWVSMISYNSLGKSPVTTLRIPAIQEKSFRCIEVMQAC LAEDQLVVKWQSSALDVNTWMIEWFPDMDSEHPTLSWESVSQATNWTIQQDKLKPFWC YNISVYPMLHDKVGEPIYQAYAKEGIPSKGPETKVENIGVKTVTITWKEIPKSERKGI CNYTIFYQAEGGTGFSKTVNSSILQYGLESLKRKTSYTVRVMASTSAGGINGTSINFKT LSFVSFEIILITSLI GGGLLILHILTVAYGLKKPNKLTHLCWPSVPNPAESSIATWRGDD FDKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKSVNFGNVLQEMFTDEARTGQENNLGGEK NENRILSSCPTSI	40

【表 2 - 2】

カニクイザル g p 1 3 0 アミノ酸配列 (SEQ ID NO : 46)

MLTLQTWVVQALFIFLTTESIGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTA VCVLKEKCMDYFH
VNANYIVWKT NHFTIPKEQYTIHRTASSVTFTDISSLNIQLTCNILTFGQLEQNVYGITII
SGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWNRGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDT
PTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELS
SILKLTWNTNPSIKSVIRLKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFR
ICCMKEDGKGYWSDWSEEANGITYEDRPSKAPSFYKIDPSHAQGYRTVQLMWKTL P
PFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNDTKLTVNLTDNDRYVATLTARNLVGKSDAA
VLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCIAD
WQQEDGTVHRTHLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRT
KKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSTHEYTLSSLTSDT
LYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGVLF CFNKR
DLIKKHIWPNVPDPSPKSHIAQWSPHTPPRHNFSKQDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKP
FPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTV VH
SGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPDLQLVDHVDGSDDILPRQQYFKQNC SQHE
SSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGEMKMFQEVSAADPFGPGTE
GQVERFETIGMEAAIDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ

10

20

OSMR 抗原結合タンパク質

【0054】

本発明は、OSMR に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質の実施形態は、OSMR に特異的に結合するペプチド及び／またはポリペプチドを含む。このようなペプチドまたはポリペプチドは、1 つまたは複数の翻訳後修飾を選択的に含んでもよい。抗原結合タンパク質の実施形態は、本明細書で種々定義されるように、特異的にOSMR に結合する抗体およびそのフラグメントを含む。これらは、OSMR を結合する及び／または活性化することからOSM 及び／またはIL-31 を阻害するものを含む、ヒトOSMR に特異的に結合する抗体を含む。

【0055】

本発明の抗原結合タンパク質は、OSMR に特異的に結合する。本明細書で使用される「特異的に結合する」は、他のタンパク質に対して、OSMR を優先的に結合することを意味する。いくつかの実施形態では、「特異的に結合する」は、抗原結合タンパク質が、他のタンパク質に対するより、OSMR に対して高い親和性を有することを意味する。OSMR に特異的に結合するOSMR 抗原結合タンパク質は、 1×10^{-7} M 以下の、 2×10^{-7} M 以下の、 3×10^{-7} M 以下の、 4×10^{-7} M 以下の、 5×10^{-7} M 以下の、 6×10^{-7} M 以下の、 7×10^{-7} M 以下の、 8×10^{-7} M 以下の、 9×10^{-7} M 以下の、 1×10^{-8} M 以下の、 2×10^{-8} M 以下の、 3×10^{-8} M 以下の、 4×10^{-8} M 以下の、 5×10^{-8} M 以下の、 6×10^{-8} M 以下の、 7×10^{-8} M 以下の、 8×10^{-8} M 以下の、 9×10^{-8} M 以下の、 1×10^{-9} M 以下の、 2×10^{-9} M 以下の、 3×10^{-9} M 以下の、 4×10^{-9} M 以下の、 5×10^{-9} M 以下の、 6×10^{-9} M 以下の、 7×10^{-9} M 以下の、 8×10^{-9} M 以下の、 9×10^{-9} M 以下の、 1×10^{-10} M 以下の、 2×10^{-10} M 以下の、 3×10^{-10} M 以下の、 4×10^{-10} M 以下の、 5×10^{-10} M 以下の、 6×10^{-10} M 以下の、 7×10^{-10} M 以下の、 8×10^{-10} M 以下の、 9×10^{-10} M 以下の、 1×10^{-11} M 以下の、 2×10^{-11} M 以下の、 3×10^{-11} M 以下の、 4×10^{-11} M 以下の、 5×10^{-11} M 以下の、 6×10^{-11} M 以下の、 7×10^{-11} M 以下の、 8×10^{-11} M 以下の、 9×10^{-11} M 以下の、 1×10^{-12} M 以下の、 2×10^{-12} M 以下の、 3×10^{-12} M 以下の、 4×10^{-12} M 以下の、 5×10^{-12} M 以下の、 6×10^{-12} M 以下の、 7×10^{-12} M 以下の、 8×10^{-12} M 以下の、または、

30

40

50

9×10^{-12} M以下の、ヒトOSMRに対する結合親和性を有することができる。

【0056】

抗原結合タンパク質の結合親和性を測定する方法は、当技術分野で知られている。親和性決定のために一般的に使用される方法は、表面プラズモン共鳴 (SPR) (Morton and Myszka “Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors” *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294)、バイオレイヤー干渉法 (Abdiche et al “Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet” *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217)、キネティック排除アッセイ (KinExA) (Darling and Brault “Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions” *Assay and Drug Dev Tech* (2004) 2, 647-657)、等温熱量測定 (Pierce et al “Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions” *Methods* (1999) 19, 213-221)、及び、分析超遠心 (Lebowitz et al “Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review” *Protein Science* (2002), 11: 2067-2079)を含む。実施例5は、親和性決定の例示的方法を提供する。

【0057】

本明細書において、OSMR結合抗体の様々な実施形態に参照がなされる場合、それはそのOSMR結合フラグメントも包含することが理解される。OSMR結合フラグメントは、OSMRに特異的に結合する能力を保持する本明細書に記載の抗体のフラグメントまたはドメインの任意のものを含む。OSMR結合フラグメントは、本明細書に記載の足場の任意のものの中にあってもよい。

【0058】

特定の治療的实施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRへのOSM及び／またはIL-31の結合を阻害し、及び／または、例えば、OSM及び／またはIL-31媒介シグナル伝達のような、OSMRへのOSM及び／又はIL-31の結合に関連する生物学的活性の1つまたは複数を阻害する。このような抗原結合タンパク質は、「中和」していると言われる。特定の实施形態では、中和OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRに特異的に結合し、少なくとも、約20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%以上だけでなく、10%と100%の間の任意の%から、OSMRへのOSM及び／またはIL-31の結合を阻害する。例えば、OSMR抗原結合タンパク質は、OSMRへのOSM及び／またはIL-31の結合をブロックするOSMR抗原結合タンパク質の能力を決定することによって、中和能力を試験することができる。例えば、実施例2と3の、ヒトOSMRとカニクイザルOSMRそれぞれのブロッキングアッセイを参照。あるいは、OSMR抗原結合タンパク質は、OSM及び／またはIL-31媒介の生物学的機能を測定するアッセイにおいて、OSMR抗原結合タンパク質の存在の効果を測定するアッセイで、中和能力を試験することができる。例えば、

培養ウシ大動脈内皮細胞におけるプラスミノーゲンアクチベーター活性のシミュレーション、ヒト内皮細胞のIL-6発現のレギュレーション、並びに、LDL取り込みの刺激及びHepG2細胞における細胞表面のLDL受容体のアップレギュレーションなどの、生物学的応答を誘発するOSMの能力。あるいは、皮膚の炎症を誘発するIL-31の能力。

【0059】

抗原結合タンパク質の実施形態は、本明細書で種々定義されるように、1つまた複数の相補性決定領域(CDR)を有する足場構造を含む。実施形態はさらに、重鎖または軽鎖の、1つまたは複数の抗体可変ドメインを有する足場構造を含む抗原結合タンパク質を含む。実施形態は、Ab1軽鎖可変ドメイン(LCv)、Ab2 LCv、及びAb3 LCv(それぞれ、SEQ ID NO: 27-29)から成る群から選択される軽鎖可変ドメイン、及び/または、Ab1重鎖可変ドメイン(HCv)、Ab2 HCv、及びAb3 HCv(それぞれ、SEQ ID NO: 9-11)から成る群から選択される重鎖可変ドメイン、及び、フラグメント、誘導体、突然変異タンパク質、及びその変異体、を含む抗体を含む。

SEQ ID NO: 9の例示的な重鎖可変ドメイン変異体は、SEQ ID NO: 9の73位に相当する位置に、アスパラギン以外のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)を含有する。SEQ ID NO: 53で示されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 9の重鎖可変ドメイン変異体の一例である。

SEQ ID NO: 10の例示的な重鎖可変ドメイン変異体は、SEQ ID NO: 10の73位に相当する位置に、アスパラギン以外のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)を含有する。SEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 10の重鎖可変ドメイン変異体の一例である。

【0060】

Ab1 LCvを含む例示的軽鎖は、SEQ ID NO: 24で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖である。

【0061】

Ab2 LCvを含む例示的軽鎖は、SEQ ID NO: 25で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖である。

【0062】

Ab3 LCvを含む例示的軽鎖は、SEQ ID NO: 26で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖である。

【0063】

Ab1 HCvを含む例示的重鎖は、SEQ ID NO: 6で示されるアミノ酸配列を含む重鎖である。Ab1 HCvの変異体を含む例示的重鎖は、SEQ ID NO: 50で示されるアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0064】

Ab2 HCvを含む例示的重鎖は、SEQ ID NO: 7で示されるアミノ酸配列を含む重鎖である。Ab2 HCvの変異体を含む例示的重鎖は、SEQ ID NO: 51で示されるアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0065】

Ab3 HCvを含む例示的重鎖は、SEQ ID NO: 8で示されるアミノ酸配列を含む重鎖である。Ab3 HCvの変異体を含む例示的重鎖は、SEQ ID NO: 52で示されるアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0066】

想定される足場のさらなる例は、以下を含むが、これらに限定されない: フィブロネクチン、ネオカルチノスタチンCBM4-2、リポカリン、T細胞受容体、タンパク質Aドメイン(プロテインZ)、Im9、TPRタンパク質、ジンクフィンガードメイン、pVIIII、トリ胨臓ポリペプチド、GCN4、WWドメインSrcホモロジドメイン3、PDZドメイン、TEM-1 β -ラクタマーゼ、チオレドキシン、ブドウ球菌ヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼ、PHDフィンガードメイン、CL-2、BPTI、APPI、HPSTI、エコチン、LACI-DI、LDTI、MTL-II、サソリ毒素、昆虫デフェンシンAペプチド、EETI-II、Min-23、CBD、PBP、チトクロームb-562、Ldlの受容体ドメイン、γクリスタリン、ユビキチン、トランスフェリン、及び／またはC型レクチンライクドメイン。非抗体足場および治療薬としてのそれらの使用は、Gebauer and Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol., 13:245-255 (2009) 及び Binz et al., Nat. Biotech., 23(10):1257-68 (2005) においてレビューされており、これは本明細書に参照によりその全体が組込まれている。

【0067】

本発明の態様は、可変ドメインを含む抗体：Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:29/SEQ ID NO:11)、及びそれらの組合せ、並びにそのフラグメント、誘導体、突然変異タンパク質及びその変異体を含む。

可変ドメインを含む抗体：SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:53; 及びSEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54も含まれる。

【0068】

本発明の例示的な抗体は、Ab1 (SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:6), Ab2 (SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:7), 及びAb3 (SEQ ID NO:26/SEQ ID NO:8)を含む。

さらなる例示的な抗体は、SEQ ID NO:24/SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:51; 及びSEQ ID NO:26/SEQ ID NO:52を含む。

【0069】

典型的には、抗体軽鎖又は重鎖の各可変ドメインは、3つのCDRを含む。重鎖可変ドメインは、重鎖CDR1 (HCDR1)、重鎖CDR2 (HCDR2)、及び重鎖CDR3 (HCDR3)を含む。軽鎖可変ドメインは、軽鎖CDR1 (LCDR1)、軽鎖CDR2 (LCDR2)、及び軽鎖CDR3 (LCDR3)を含む。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、本明細書に記載される好ましい可変ドメイン内に含有される1つまたは複数のCDRを含む。

【0070】

このようなCDRの例は以下を含むが、これらに限定されない：

【0071】

Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:30), LCDR2 (SEQ ID NO:33), 及びLCDR3 (SEQ ID NO:36)のCDR;

【0072】

Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:31), LCDR2 (SEQ ID NO:34), 及びLCDR3 (SEQ ID NO:37)のCDR;

【0073】

Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:32), LCDR2 (SEQ ID NO:35), 及びLCDR3 (SEQ ID NO:38)のCDR;

【0074】

Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:12), HCDR2 (SEQ ID NO:15), 及びHCDR3 (SEQ ID NO:18)のCDR;

【0075】

Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:16), 及びHCDR3 (SEQ ID NO:19)のCDR; 及び、

【0076】

Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:14), HCDR2 (SEQ ID NO:17)のCDR;

D NO:17), 及びHCDR3 (SEQ ID NO:20) のCDR。

【0077】

いくつかの実施形態では、以下の抗原結合タンパク質を含む：A) 例えば、SEQ ID NO:30, 31, 及び32からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR1; SEQ ID NO:33, 34, 及び35からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR2; 及び/またはSEQ ID NO:36, 37, 及び38からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR3、を含む軽鎖であるポリペプチド; 及び/または、B) 例えば、SEQ ID NO:12, 13, 及び14からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1; SEQ ID NO:15, 16, 及び17からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR2; 及び/またはSEQ ID NO:18, 19, 及び20からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR3、を含む重鎖であるポリペプチド。

10

【0078】

さらなる実施形態では、抗原結合タンパク質は、A) 任意のAb1 LCv, Ab2 LCv, 及びAb3 LCvのLCDR1, LCDR2, 及びLCDR3を含む軽鎖アミノ酸配列、及び、B) 任意のAb1 HCv, Ab2 HCv, 及びAb3 HCvのHCDR1, HCDR2, 及びHCDR3を含む重鎖アミノ酸配列、を含む。

【0079】

特定の実施形態では、CDRは、本明細書に示される例示的CDRからの、1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、または6つ以下の、アミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。

20

【0080】

本発明の態様は、SEQ ID NO:27, 28, 及び29からなる群から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗体を含む。本発明の態様は、SEQ ID NO:9, 10, 及び11からなる群から選択される重鎖可変ドメインを含む抗体を含む。本発明のさらなる態様は、A) SEQ ID NO:27, 28, 及び29からなる群から選択される軽鎖可変ドメイン、及びB) SEQ ID NO:9, 10, 及び11からなる群から選択される重鎖可変ドメイン、を含む抗体を含む。

【0081】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の定常領域を含むことができる。軽鎖定常領域は、例えばヒトのカッパーまたはラムダ型軽鎖定常領域などの、カッパーまたはラムダ型軽鎖定常領域を、例えば、含み得る。重鎖定常領域は、例えばヒトのアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミュー型重鎖定常領域などの、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、またはミュー型重鎖定常領域を、例えば、含み得る。一実施形態では、軽鎖または重鎖定常領域は、天然に存在する定常領域のフラグメント、誘導体、変異体、または突然変異タンパク質である。

30

【0082】

本発明の態様は、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、6つ以下、7つ以下、8つ以下、9つ以下、または10以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するSEQ ID NO:27, 28, 及び29からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む抗体を含む。本発明の態様は、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、6つ以下、7つ以下、8つ以下、9つ以下、または10以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するSEQ ID NO:9, 10, 及び11からなる群から選択される重鎖可変領域を含む抗体を含む。本発明のさらなる態様は、A) 1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、6つ以下、7つ以下、8つ以下、9つ以下、または10以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するSEQ ID NO:27, 28, 及び29からなる群から選択される軽鎖可変領域、及びB) 1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、6つ以下、7つ以下、8つ以下、9つ以下、または10以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有するSEQ ID NO:9, 10, 及び11からなる群から選択される重鎖可変領域、を含む抗体を含む。

40

50

【0083】

一変形では、抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 27, 28, 及び29からなる群から選択される軽鎖可変領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。他の変形では、抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 9, 10, 及び11からなる群から選択される軽鎖可変領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。さらに別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、A) SEQ ID NO: 27, 28, 及び29からなる群から選択される軽鎖可変領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列、及び、B) SEQ ID NO: 9, 10, 及び11からなる群から選択される軽鎖可変領域アミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列、を含む。

SEQ ID NO: 9に対して上で定義した配列関係を有する重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO: 9の73位に相当する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含有することができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインは、オプションで、SEQ ID NO: 53で示されるアミノ酸配列を含む。

SEQ ID NO: 10に対して上で定義した配列関係を有する重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO: 10の73位に相当する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含有することができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインは、選択的に、SEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列を含む。

【0084】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、軽鎖及び／または重鎖CDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 36, 37, 38, 18, 19, 及び20で示される配列の群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、そのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 36, 37, 38, 18, 19, 及び20で示される例示的配列からの、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。従って、本発明の実施形態は、SEQ ID NO: 36, 37, 38, 18, 19, 及び20で示される配列の群から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも

99%同一であるアミノ酸配列、を含む抗原結合タンパク質を含む。

【0085】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、軽鎖及び／または重鎖CDR2を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 33, 34, 35, 15, 16, 及び17で示される配列の群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、そのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 33, 34, 35, 15, 16, 及び17で示される例示的配列からの、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。従って、本発明の実施形態は、SEQ ID NO: 33, 34, 35, 15, 16, 及び17で示される配列の群から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列、を含む抗原結合タンパク質を含む。

10

【0086】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、軽鎖及び／または重鎖CDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、SEQ ID NO: 30, 31, 32, 12, 13, 及び14で示される配列の群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、そのアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 30, 31, 32, 12, 13, 及び14で示される例示的配列からの、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、5つ以下、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。従って、本発明の実施形態は、SEQ ID NO: 30, 31, 32, 12, 13, 及び14で示される配列の群から選択されるアミノ酸配列に、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列、を含む抗原結合タンパク質を含む。

20

【0087】

本発明の抗原結合タンパク質は、ヒトおよびモノクローナル抗体、二重特異性抗体、ダイアボディ、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書では、「抗体模倣物」と呼ばれることもある）、キメラ抗体、抗体融合体（「抗体コンジュゲート」と呼ばれることもある）、及び、それぞれ、各フラグメント、などの伝統的な抗体の足場を含む。CDRの様々な組合せを含む上記のCDRは、任意の以下の足場に移植することができる。

30

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、本明細書に種々記載されるように、抗原に特異的に結合する1つまたは複数のポリペプチド鎖を含む単量体または多量体タンパク質の様々な形態を指す。特定の実施形態では、抗体は、組換えDNA技術によって産生される。さらなる実施形態では、抗体は、天然に存在する抗体の酵素的または化学的切断によって産生される。他の態様では、抗体は以下からなる群から選択される：a) ヒト抗体；b) ヒト化抗体；c) キメラ抗体；d) モノクローナル抗体；e) ポリクローナル抗体；f) 組換え抗体；g) 抗原結合性フラグメント；h) 単鎖抗体；i) ダイアボディ；j) トリアボディ，k) テトラボディ，l) Fabフラグメント；m) F(ab')₂フラグメント，n) IgA抗体，o) IgD抗体，p) IgE抗体，q) IgG1抗体，r) IgG2抗体，s) IgG3抗体，t) IgG4抗体，及びu) IgM抗体。

40

【0089】

可変領域またはドメインは、フレームワーク領域（指定されたフレームワーク領域FR1, FR2, FR3, 及びFR4）内に埋め込まれた少なくとも3つの重鎖または軽鎖のCDRを含む。Kabat et al., 1991, Sequences of Pr

50

oteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I. H., Bethesda, MD。伝統的な抗体構造単位は、典型的には、四量体を含む。各四量体は、典型的には、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、各対はある1つの「軽」鎖と1つの「重」鎖を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識を担う約100～110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。ヒトの軽鎖は、カッパーまたはラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンとして分類され、それぞれ、IgM, IgD, IgG, IgA, 及びIgEなどの抗体のアイソタイプを規定する。IgGは、IgG1, IgG2, IgG3, 及びIgG4などのいくつかのサブクラスを有するがこれらに限定されない。IgMは、IgM1及びIgM2などのサブクラスを有するがこれらに限定されない。本発明の実施形態は、本明細書に記載のように、抗原結合タンパク質の可変ドメインまたはCDRを組み込むようなすべてのこのようなクラス及びサブクラスの抗体を含む。

【0090】

ラクダおよびラマに見られるようないくつかの天然に存在する抗体は、2つの重鎖からなる二量体であり、軽鎖を含まない。本発明は、OSMRに結合することができる2つの重鎖またはそのフラグメントの二量体抗体を包含する。

【0091】

重鎖及び軽鎖の可変領域は、典型的には、3つの超可変領域、すなわち、相補性決定領域またはCDRにより連結された比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ一般構造を示す。CDRは、抗原の認識結合を主に担う。各対の2つの鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列しており、特異的エピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端まで、軽鎖および重鎖の両方は、ドメインFR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabataの定義に従う。

【0092】

CDRは、抗原結合のための主要な表面接触点を構成する。CDR3または軽鎖及び、特に、重鎖のCDR3は、軽鎖及び重鎖の可変領域中の抗原結合において最も重要な決定基を構成することができる。いくつかの抗体では、重鎖CDR3は、抗原と抗体の間の接触の主要なエリアを構成しているようである。CDR3だけが変化するインビトロ選択スキームが、抗体の結合特性を変化させるか、またはどの残基が光源の結合に寄与するかを決定するのに使用することができる。

【0093】

天然に存在する抗体は、典型的には、タンパク質分泌のための細胞経路に抗体を指示し、典型的には成熟抗体には存在していない、シグナル配列を含む。本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドは、以下に記載のように、天然に存在するシグナル配列または異種のシグナル配列をコードすることができる。

【0094】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、本明細書に記載の1から6の例示的CDRを含む抗体である。本発明の抗体は、IgM, IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4を含む）、IgD, IgA, またはIgE抗体を含む任意の型のものであってよい。具体的な実施形態では、抗原結合タンパク質は、IgG型抗体、例えばIgG1抗体である。

【0095】

いくつかの実施形態では、例えば、抗原結合タンパク質が完全な重鎖及び軽鎖を有する抗体である場合、CDRは、すべて同じ種、例えばヒト、からのものである。あるいは、例えば、抗原結合タンパク質が、上記に概説した配列からの6つ未満のCDRを含有する実施形態では、追加のCDRは、他の種からのもの、または、例示的な配列に示されたものとは異なるヒトのCDRのいずれかであってもよい。例えば、本明細書で同定される適

切な配列からのHCDR3及びLCDR3領域は、HCDR1，HCDR2，LCDR1，及びLCDR2とともに使用することができ、これらは別の種または異なるヒト抗体の配列、またはそれらの組み合わせから所望により選択される。例えば、本発明のCDRは、商業的に関連するキメラまたはヒト化抗体のCDR領域を置換することができる。

【0096】

具体的な実施形態は、ヒトコンポーネントである抗原結合タンパク質の足場コンポーネントを利用している。しかし、いくつかの実施形態では、足場コンポーネントは、異なる種からの混合物であり得る。従って、抗原結合タンパク質が抗体である場合、このような抗体は、キメラ抗体及び／またはヒト化抗体であってもよい。一般に、「キメラ抗体」及び「ヒト化抗体」の両方は、2つ以上の種に由来する領域を組合せる抗体を指す。例えば、

10

【0097】

「ヒト化抗体」は、一般に、ヒト抗体に見出される配列と交換した可変ドメインフレームワーク領域を有する非ヒト抗体を指す。一般に、ヒト化抗体では、全抗体は、1つ以上のCDRを除いて、ヒト由来のポリヌクレオチドによってコードされるか、または1つ以上のCDR内を除いてそのような抗体と同一である。非ヒト生物に由来する核酸によってコードされている一部またはすべてのCDRは、抗体を作成するために、ヒト抗体可変領域のβシートフレームワークに移植されるが、その特異性は、移植したCDRによって決定される。このような抗体の作成は、例えば、WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536に記載されている。ヒト化抗体は、遺伝子操作された免疫系を有するマウスを用いても生成することができる(Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654)。

。本明細書に記載の例示的な実施形態では、識別されたCDRはヒトあり、従ってこの文脈において、ヒト化抗体およびキメラ抗体の両方はいくつかの非ヒトCDRを含む：例えば、ヒト化抗体は、異なる種由来である1つまたは複数の他のCDR領域とともに、HCDR3及びLCDR3領域を含んで生成されてもよい。

20

【0098】

一実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、多重特異性抗体であり、特に「ダイアボディ」とも呼ばれることがある、二重特異性抗体である。これらは、単一の抗原上の2つ以上の異なる抗原または異なるエピトープに結合する抗体である。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトエフェクター細胞（例えば、T細胞）上のOSMRと抗原を結合する。このような抗体は、OSMR発現腫瘍細胞などのOSMR発現細胞に対するエフェクター細胞応答を標的とするのに有用である。好ましい実施形態では、ヒトエフェクター細胞抗原はCD3である。U.S. Pat. No. 7, 235, 641。二重特異性抗体を作製する方法は当該分野で知られている。そのような方法の1つは、細胞内で共発現する場合に、重鎖のヘテロ二量体形成を促進する「節」と「穴」を作成することなどのFc部分を操作することを含む。U.S. 7, 695, 963。他の方法も、Fc部分を操作することを含むが、静電ステアリングを使用して、細胞内で共発現する場合に、ヘテロ二量体形成を促進するが、ホモ二量体形成を妨げる。WO 09/089, 004は、その全体が参照により本明細書に組込まれている。

30

40

【0099】

一実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質はミニボディである。ミニボディは、CH3ドメインに結合したscFvを含む最小化された抗体様タンパク質である(Huet al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061)。

【0100】

一実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質ドメインは抗体である；例えば、U.S. Patent No. 6, 248, 516参照。ドメイン抗体(dAb)は、ヒト抗体の重鎖(VH)または軽鎖(VL)のいずれかの可変領域に対応する、抗体の機能的結合ド

50

メインである。d A Bは、フル抗体サイズの10分の1未満の、約13 k D aの分子量を持つ。d A Bは、細菌、酵母、及び哺乳動物細胞系などの様々な宿主においてよく発現する。また、d A bは非常に安定であり、凍結乾燥又は熱変性等の過酷な条件にさらされた後でも活性を保持する。例えば、US Patent 6, 291, 158; 6, 582, 915; 6, 593, 081; 6, 172, 197; US Serial No. 2 004/0110941; European Patent 0368684; US Patent 6, 696, 245, WO 04/058821, WO 04/003019及びWO 03/002609参照。

【0101】

一実施形態では、O S M R抗原結合タンパク質は抗体フラグメントであり、すなわち、O S M Rに対して結合特異性を保持する、本明細書で概説される抗体のフラグメントである。様々な実施形態では、抗体結合タンパク質は、F (a b), F (a b'), F (a b')₂, F v, または単鎖F vフラグメントを含むが、これらに限定されない。最低限、本明細書で意図されるように、抗体は、1つ以上のC D Rなどの軽鎖又は重鎖可変領域のすべて又は部分を含むO S M Rに特異的に結合し得るポリペプチドを含む。

【0102】

O S M R結合抗体フラグメントのさらなる例は、以下を含むが、これらに限定されない。(i) V L, V H, C L及びC H 1ドメインからなるF a bフラグメント、(i i) V H及びC H 1ドメインからなるF dフラグメント、(i i i)単一の抗体のV L及びV HドメインからなるF vフラグメント; (i v)単一の変数からなるd A bフラグメント (W a r d e t a l., 1989, Nature 341: 544-546)、(v)単離C D R領域、(v i)2つの連結されたF a bフラグメントを含む2価フラグメントであるF (a b')₂フラグメント (v i i) V HドメインおよびV Lドメインが、その2つのドメインが抗原結合部位を形成するように関連付けることができるペプチドリンカーによって連結されている、単鎖F v分子 (s c F v) (B i r d e t a l., 1988, Science 242: 423-426, H u s t o n e t a l., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 5879-5883)、(v i i i)二重特異性単鎖F vダイマー (P C T/US92/09965)及び(i x)遺伝子融合によって構築される「ダイアボディ」または「トリアボディ」の多価又は多重特異的フラグメント (T o m l i n s o n e t a l., 2000, Methods Enzymol. 326: 461-479; WO 94/13804; H o l l i g e r e t a l., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6444-6448)。抗体フラグメントは修飾することができる。例えば、分子は、V H及びV Lドメインを連結するジスルフィド架橋の組込みによって安定化され得る (R e i t e r e t a l., 1996, Nature Biotech. 14: 1239-1245)。本発明の態様は、これらのフラグメントの非C D Rコンポーネントがヒト配列である、実施形態を含む。

【0103】

一実施形態では、O S M R抗原結合タンパク質は完全にヒト抗体である。この実施形態では、上記で概説したように、具体的構造は、C D R領域を含んで表される完全な重鎖及び軽鎖を含む。さらなる実施形態は、他のヒト抗体に由来する、他のC D R、フレームワーク領域、J及びD領域、定常領域、等とともに、本発明の1つ以上のC D Rを利用する。例えば、本発明のC D Rは、任意の数のヒト抗体、特に商業的に関連した抗体のC D Rに取って代ることができる。

【0104】

単鎖抗体は、単一のポリペプチド鎖を生じる、アミノ酸架橋(短いペプチドリンカー)を介して、重鎖及び軽鎖可変ドメイン(F v領域)フラグメントを連結することによって形成することができる。このような単鎖F v (s c F v)は、2つの可変ドメインポリペプチド(V_L及びV_H)をコードするD N Aの間にペプチドリンカーをコードするD N Aを融合することによって調製されている。得られたポリペプチドは、抗原結合性単量体を

形成するために、自分自身の上に折り返すことができる、または、これらは、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて、多量体（例えば、2量体、3量体、または4量体）を形成することができる（Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108）。異なるV_L及びV_H含有ポリペプチドを結合することによって、異なるエピトープに結合する多量体scFvを形成することができる（Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40）。単鎖抗体の産生のために開発された技術は、U.S. Patent No. 4,946,778; Bird, 88, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87に記載されているものを含む。単鎖抗体は、本明細書で提供される抗体Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:9), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10), 及びAb3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:29/SEQ ID NO:11)の可変ドメインの組合せを含むscFvを含むが、これに限定されない。例示的な単鎖抗体は、以下の可変ドメインの組合せを含む: SEQ ID NO:27/SEQ ID NO:53; 及びSEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54。

【0105】

一実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、抗体融合タンパク質（本明細書では「抗体コンジュゲート」と呼ばれることもある）である。コンジュゲートパートナーはタンパク質性または非タンパク質性とすることができる。後者は、一般的に抗原結合タンパク質上とコンジュゲートパートナー上に官能基を使用して生成される。特定の実施形態では、抗体は、非タンパク質性化学物質（薬物）に複合されて、抗体薬物コンジュゲートを形成する。

【0106】

一実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、「合成抗体」と呼ばれることもある、抗体類似体である。例えば、様々な研究が、移植されたCDRを有する代替タンパク質足場または人工の足場のいずれかを利用している。このような足場は、例えば生体適合性ポリマーからなる完全合成足場と同様に、結合タンパク質の3次元構造を安定化するために導入される突然変異を含むが、これらに限定されない。例えば、Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654参照。さらに、足場としてフィブロネクチンコンポーネントを利用する抗体模倣体に基いた研究と同様に、ペプチド抗体模倣体（「PAM」）を使用することができる。

【0107】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」は、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびペプチドを含む、少なくとも2つの共有結合したアミノ酸を意味する。いくつかの実施形態では、2つ以上の共有結合したアミノ酸は、ペプチド結合によって結合されている。以下に概説するように、例えばタンパク質が、発現系および宿主細胞を用いて組換え的に産生される場合、タンパク質は、天然に存在するアミノ酸及びペプチド結合から構成されてもよい。あるいは、タンパク質は、合成アミノ酸（例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、オルニチン、およびノルロイシン）、またはペプチド模倣構造、すなわち、ペプトイド（本明細書に、参照により組込まれているSimon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:9367参照）などの「ペプチドまたはタンパク質類似体」含むことができ、これらはプロテアーゼまたは他の生理学的及び/または貯蔵条件に耐えることができる。このような合成アミノ

酸は、抗原結合タンパク質が当技術分野で周知の従来の方法によってインビトロで合成される場合に特に、組込まれ得る。また、ペプチド模倣の、合成の及び天然に存在する残基／構造の任意の組合せを使用することができる。「アミノ酸」は、プロリンおよびヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基も含む。アミノ酸「R基」または「側鎖」は、(L)または(S)配置のいずれかであることができる。特定の実施形態では、アミノ酸は(L)または(S)配置である。

【0108】

特定の態様では、本発明は、OSMRと結合し、いくつかの実施形態では、組換えヒトOSMRまたはその一部と結合する、組換え抗原結合タンパク質を提供する。この文脈では、「組換えタンパク質」は、当該分野で公知の任意の技術及び方法を使用した組み換え技術を用いて、すなわち、本明細書に記載されるような組換え核酸の発現によって、産生した、タンパク質である。組換えタンパク質の産生のための方法および技術は、当該分野で周知である。本発明の実施形態は、野生型OSMR及びその変異体と結合する組換え抗原結合タンパク質を含む。

【0109】

「実質的にからなる」は、本明細書に記載されるように、列挙されたSEQ ID NO: 配列に対して、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, または15%だけ変化することができ、かつ、まだ生物学的活性を保持することを意味する。

【0110】

いくつかの実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、単離されたタンパク質または実質的に純粋なタンパク質である。「単離された」タンパク質は、それが通常はその天然状態で付随している物質の少なくとも一部だけ伴わず、例えば、所与のサンプルにおいて、全タンパク質のうち重量で少なくとも約5%、または少なくとも約50%を構成する。単離されたタンパク質は、状況に応じて、総タンパク質含量うち重量で5~99.9%を構成することができることが理解される。例えば、タンパク質は、タンパク質が高い濃度レベルで産生されるように、誘発性プロモータまたは高発現プロモータの使用により、有意により高い濃度で産生され得る。この定義は、当該分野で知られている多様な生物及び／または宿主細胞における抗原結合タンパク質の生産を含む。

【0111】

アミノ酸配列については、配列同一性及び／または類似性は、Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482のローカル配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443の配列同一性アライメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 85: 2444の類似性の方法の研究、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. におけるGAP, BESTFIT, FASTA, 及びTFASTA)、好ましくはデフォルト設定を使用して、または検査による、Devereux et al., 1984, Nucl. Acid. Res. 12: 387-395によって記載されたベストフィットシーケンスプログラムなどの、当該分野で公知の標準技術によって決定されるが、これらに限定されない。好ましくは、パーセント同一性は、以下のパラメータに基いて、FastDBによって計算される: 1のミスマッチペナルティ; 1のギャップペナルティ; 0.33のギャップサイズペナルティ; 30の結合ペナルティ、“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,” Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.。

【0112】

有用なアルゴリズムの例はP I L E U Pである。P I L E U Pは、プログレッシブ、ペアワイズアラインメントを用いて関連配列の群から複数の配列アラインメントを作製する。それはまた、アラインメントを作成するために使用されるクラスタリング関係を示すツリーをプロットすることができる。P I L E U PはFeng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360のプログレッシブアラインメント法の簡略化を使用する；この方法は、Higgins and Sharp, 1989；CABIOS 5:151-153によって記載されたものと同様である。有用なP I L E U Pパラメータは、3.00のデフォルトギャップウエイト、0.10のデフォルトギャップレングスウエイト、及び加重エンドギャップを含む。

【0113】

有用なアルゴリズムの他の例はB L A S Tアルゴリズムであり、以下に記載されている：Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410；Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402；及びKarlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:5873-5787。特に有用なB L A S Tプログラムは、Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480から入手したWU-B L A S T-2プログラムである。WU-B L A S T-2は、その大部分がデフォルト値に設定されているいくつかの検索パラメータを使用する。調節可能なパラメータは以下の値に設定される：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11。H S P SおよびH S P S2パラメータは動的な値であり、特定の配列の組成および目的の配列が検索される特定のデータベースの組成に依存してプログラム自体によって確立される；しかし、値は感度を上げるように調整することができる。

【0114】

さらに有用なアルゴリズムは、Altschul et al., 1993, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402によって報告されたギャップ付きB L A S Tである。ギャップ付きB L A S Tは、B L O S U M-62置換スコアを使用する；閾値Tパラメータは9に設定する；ギャップなしの拡張をトリガーするための2-ヒット方法は、 $10+k$ のk aコストのギャップ長をチャージする； X_u は16に設定し、 X_g は、データベース検索段階は40にとアルゴリズムの出力段階では67に設定する。ギャップ付きアラインメントは、約22ビットに対応するスコアによってトリガーされる。

【0115】

一般に、個々の変異体のC D R間のアミノ酸の相同性、類似性、または同一性は、本明細書に示される配列に対して、少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも85%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，及び、ほぼ100%の好ましくは増加する相同性または同一性を有する。同様に、本明細書中で同定された結合タンパク質の核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、抗原結合タンパク質のコード配列中のヌクレオチド残基と同一である候補配列におけるヌクレオチド残基の%として定義される。具体的な方法は、それぞれ1及び0.125に設定したオーバーラップスパン及びオーバーラップフラクションでデフォルトパラメータを設定したWU-B L A S T-2のB L A S T Nモジュールを利用する。

【0116】

一般に、個々の変異体C D Rをコードするヌクレオチド配列と本明細書中に示されるヌクレオチド配列の間の核酸配列相同性、類似性、または同一性は、少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，及びほぼ100%の好ましくは増加する相同性または同一性を有する。

【0117】

従って、「変異体C D R」は、本発明の親C D Rに対して特異的な相同性、類似性、ま

10

20

30

40

50

たは同一性を有するものであり、親CDRの特異性及び／または活性の少なくとも、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%を含むがこれらに限定されない生物学的機能を共有する。

【0118】

アミノ酸配列変異を導入するための部位または領域は予め決定されるが、突然変異自体は予め決める必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の性能を最適化するために、ランダム突然変異誘発は、標的コドン又は領域、及び所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングされた発現した抗原結合タンパク質CDR変異体で実施され得る。既知の配列を有するDNAにおける所定の部位で置換変異を作製するための技術は、例えば、M13プライマー突然変異誘発及びPCR突然変異誘発など、よく知られている。変異体のスクリーニングは、OSMR結合など、抗原結合タンパク質活動のアッセイを使用して行われる。

10

【0119】

アミノ酸置換は、典型的には単一残基である；挿入は、通常、約1から20のアミノ酸残基のオーダーであろうが、著しく大きな挿入が許容され得る。欠失は、約1から20のアミノ酸残基の範囲であるが、欠失がもっと大きくなる場合もあり得る。

【0120】

置換、欠失、挿入またはそれらの任意の組合せは、最終の誘導体または変異体に到達するために使用することができる。一般に、これらの変化は、分子の変化、特に免疫原性および抗原結合タンパク質の特異性を最小限にするために、数個のアミノ酸で行われる。しかし、特定の状況では、より大きな変化が許容され得る。保存的置換は、一般に、表3として示されている以下のチャートに従って作られる。

20

表3

【表3】

オリジナル残基	例示的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

30

40

【0121】

機能または免疫学的同一性の実質的な変化は、表3に示すものより保存性の少ない置換を選択することによってなされる。例えば、以下により大きく影響する置換がなされ得る

50

：例えば、 α ヘリックスまたは β シート構造などの改変領域のポリペプチド骨格の構造；標的部位での分子の荷電または疎水；または側鎖のバルク。一般に、ポリペプチドの性質に最大の変化を生じることが予想される置換は、(a)例えば、セリルまたはスレオニルなどの親水性残基が、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルなどの疎水性残基のために（またはによって）、置換される；(b)システインまたはプロリンが任意の他の残基のために（またはによって）置換される；(c)例えば、リシル、アルギニル、またはヒスチジルなどの電氣的に陽性の側鎖を有する残基が、例えば、グルタミルまたはアスパルチルなどの電氣的に陰性の残基のために（またはによって）置換される；(d)例えば、フェニルアラニンなどのバルキーな側鎖を有する残基が、例えば、グリシンなどの側鎖を持たない残基のために（またはによって）置換される、ものである。

10

【0122】

変異体は、必要に応じて抗原結合タンパク質の特性を改変するためにも選択されるが、変異体は、典型的には、天然に存在する類似体と同じ定性的生物学的活性を示し、同じ免疫応答を誘発する。あるいは、変異体は、抗原結合タンパク質の生物学的活性が変更されるように設計することができる。例えば、グリコシル化部位は、本明細書に説明されるように、変更されるか、または除去され得る。

【0123】

本発明の範囲内で、OSMR抗体の他の誘導体は、OSMR抗体ポリペプチドのN末端またはC末端に融合した異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現によるなどの他のタンパク質またはポリペプチドとともに、OSMR抗体の共有結合または凝集コンジュゲート、またはそのフラグメントを含む。例えば、コンジュゲートしたペプチドは、例えば、酵母 α 因子リーダーなどの異種シグナル（すなわちリーダー）ポリペプチド、またはエピトープタグなどのペプチドであってもよい。OSMR抗体含有融合タンパク質は、OSMR抗体の精製または同定を容易にするために追加されたペプチドを含むことができる（例えば、poly-His）。OSMR抗体ポリペプチドは、Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988, 及びU. S. Patent 5,011,912に記載されているように、FLAGペプチドにリンクすることもできる。FLAGペプチドは非常に抗原性であり、迅速なアッセイおよび発現された組換えタンパク質の容易な精製を可能にする、特異的なモノクローナル抗体(mAbで)により可逆的に結合されるエピトープを提供する。FLAGペプチドが所定のポリペプチドに融合された融合タンパク質を調製するのに有用な試薬は、市販されている(Sigma, St. Louis, MO)。

20

30

【0124】

一実施形態では、オリゴマーは、免疫グロブリン由来のポリペプチドを用いて、調製される。(Fcドメインを含む)抗体由来ポリペプチドの種々の部分に融合した特定の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の調製が、例えば、Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; 及びHollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11によって記載されている。

40

【0125】

本発明の一実施形態は、抗体のFc領域にOSMR抗体のOSMR結合フラグメントを融合させることによって作製される2つの融合タンパク質を含む二量体を対象とする。二量体は、組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞中で遺伝子融合体を発現する適切な発現ベクターに、融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を挿入し、発現された分裂タンパク質が、二量体を得るために鉄部分間に鎖間ジスルフィド結合が形成されるような分子を抗体様にアセンブルすることを可能にすることによって作製することができる。

50

【0126】

本明細書で用いられる用語「鉄ポリペプチド」は、抗体のFc領域由来のポリペプチドの天然および突然変異タンパク質型を含む。二量体化を促進するヒンジ領域を含有するそのようなポリペプチドの切断型も含まれる。Fc部分を含む融合タンパク質（及びそれから形成されるオリゴマー）は、プロテインAまたはプロテインGカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製の利点を提供する。

【0127】

PCT出願WO 93/10151（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている1つの適切なFcポリペプチドは、ヒトのIgG抗体のFc領域のN末端ヒンジ領域から天然のC末端に延在する単鎖ポリペプチドである。他の有用なFcポリペプチドは、U.S. Patent 5,457,035及びBaum et al., 1994, EMBO J, 13:3992-4001に記載されている鉄突然変異タンパク質である。この突然変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaに変更され、アミノ酸20がLeuからGluに変更され、アミノ酸22がGlyからAlaに変更されされていることを除いて、WO 93/10151に示されている天然Fc配列のものと同一である。この突然変異タンパク質はFc受容体に対して、減少した親和性を示す。

10

【0128】

他の実施形態では、OSMR抗体の重鎖及び／又は軽鎖の可変部分は、抗体の重鎖および／または軽鎖の可変部分に対して置換されてもよい。

20

【0129】

オリゴマーOSMR抗体誘導体を調製するための他の方法は、ロイシンジッパーの使用を含む。ロイシンジッパードメインは、それらが見出されるタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、当初いくつかのDNA結合タンパク質で同定され（Landschulz et al., Science 240:1759-64, 1988）、それ以来、様々な異なるタンパク質が発見されている。既知のロイシンジッパーの中には、二量体化または三量体化する天然に存在するペプチドおよびその誘導体がある。可溶性オリゴマー性タンパク質を産生するのに適したロイシンジッパードメインの例は、PCT出願WO 94/10308に記載されており、肺サーファクタントタンパク質D（SPD）由来のロイシンジッパーは、Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191に記載されていて、本明細書に参照により組込まれている。融合される異種タンパク質の安定な三量体化を可能にする修正されたロイシンジッパーの使用は、Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78に記載されている。1つのアプローチにおいて、ロイシンジッパーペプチドに融合したOSMR抗体フラグメントまたは誘導体を含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞中で発現され、形成する可溶性オリゴマーOSMR抗体フラグメントまたは誘導体は、培養上清から回収される。

30

【0130】

抗原結合タンパク質の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれ、常にではないが、一般的に、翻訳後に行われる。例えば、抗原結合タンパク質の共有結合修飾のいくつかのタイプは、抗原結合タンパク質の特定のアミノ酸残基を、選択された側鎖またはN-またはC-末端残基と反応できる有機誘導体化剤と反応させることによって、分子に導入される。

40

【0131】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセタミドなどのα-ハロアセテート（及び対応するアミン）と反応させ、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイニル残基は、プロモトリフルオロアセトン、αブromoβ-（5-イミドゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリベンゾエート、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロ

50

ロー7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾールとの反応によっても誘導体化される。

【0132】

ヒスチジル残基は、pH 5.5～7.0でジエチルピロカーボネートとの反応によって誘導体化されるが、この薬剤はヒスチジル側鎖に対して比較的特異的であるからである。パラブロモフェナシルブロミドも有用である；この反応は、好ましくはpH 6.0の0.1Mカコジル酸ナトリウム中で行われる。

【0133】

リシニルおよびアミノ末端残基はコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。アルファアミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬は、メチルピョリンなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；クロロボロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2, 4-ペンタンジオン；及び、トランスアミナーゼ触媒によるグリオキシル酸との反応、を含む。

【0134】

アルギニル残基は、フェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサンジオン、及びニンヒドリンなどの従来の試薬の1つまたはいくつかとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、反応が、グアニジン官能基の高い pK_a のためアルカリ性条件下で行われることを必要とする。さらに、これらの試薬はリシンの基及びアルギニンイプシロン-アミノ基と反応することができる。

【0135】

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基へのスペクトル標識の導入に特に興味をもって、製造され得る。最も一般的には、N-アセチルイミダゾールとテトラニトロメタンが、O-アセチルチロシル種と3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成するために使用される。チロシル残基は、クロラミンT法が上述のように適切である、ラジオイムノアッセイでの使用のための標識タンパク質を調製するために、 ^{125}I または ^{131}I を用いてヨウ素化される。

【0136】

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）は、選択的に、カルボジイミド（ $R'-N=C=N-R'$ ）との反応によって修飾され、ここで、R及びR'は、所望により異なる、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-4-エチル）カルボジイミドまたは1-エチル-3-（4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル）カルボジイミド、などのアルキル基である。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。

【0137】

二官能性試薬による誘導体化は、様々な方法で使用するために、水不溶性支持体マトリックスまたは表面に抗原結合タンパク質を架橋する場合に有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、例えば、3, 3'-ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）などのジスクシンイミジルエステルを含む4-アジドサリチル酸、ホモ二官能性イミドエステルとのエステルなどのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル、及びビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンなどの二官能性マレイミド、などのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを含む。メチル-3-〔（p-アジドフェニル）ジチオ〕プロピオイミデートなどの誘導化剤は、光の存在下で架橋を形成することができる光活性化中間体産生する。あるいは、U.S. Pat. No. 3, 969, 287；3, 691, 016；4, 195, 128；4, 247, 642；4, 229, 537；及び4, 330, 440に記載の臭化シアン活性化炭水化物及びその反応基質などの反応性の水不溶性マトリックスが、タンパク質固定化のために使用される。

【0138】

グルタミニルおよびアスパラギニル残基は、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパ

10

20

30

40

50

ルチル残基にしばしば脱アミド化される。あるいは、これらの残基は穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に入る。

【0139】

他の修飾は、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86)、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化、を含む。

【0140】

本発明の範囲内に含まれる、抗原結合タンパク質の他のタイプの共有結合的修飾は、タンパク質のグリコシル化パターンの変更を含む。当該技術分野で公知のように、グリコシル化パターンは、タンパク質が産生される、タンパク質（例えば、下で説明される、特定のグリコシル化アミノ酸残基の存在または非存在）の両方の配列、または宿主細胞、または生物に依存し得る。特定の発現システムは、下で説明される。

【0141】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合型またはO結合型のどちらかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンは、ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸である、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在が、潜在的なグリコシル化部位を作製する。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロース、のうちの1つの付着を意味するが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも使用することができる。

【0142】

抗原結合タンパク質へのグリコシル化部位の付加は、(N結合グリコシル化部位について) 1つまたは複数の上述したトリペプチド配列を含むように、アミノ酸配列を改変することによって、好都合に達成される。この改変は、(O結合グリコシル化部位について) 出発配列への1つ以上のセリンまたはスレオニン残基の付加によって作られてもよいし、それによる置換によって作られてもよい。容易にするために、抗原結合タンパク質アミノ酸配列は、好ましくは、DNAレベルの変化により、特に、所望のアミノ酸に翻訳するコドンが生成されるように、予め選択された基で標的ポリペプチドをコードするDNAを変異させることにより、改変される。

【0143】

抗原結合タンパク質の炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、タンパク質へのグリコシドの化学的又は酵素的結合によるものである。これらの手順は、N結合型及びO結合型のグリコシル化のグリコシル化能力を有する宿主細胞でのタンパク質の産生を必要としないという点で、有利である。使用される結合モードに応じて、糖(類)は、(a) アルギニン及びヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) システインなどの遊離スルフィドリル基、(d) セリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンなどの遊離のヒドロキシル基、(e) フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのような芳香族残基、または(f) グルタミンのアミド基、に結合していてもよい。これらの方法は、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330、及びApplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306に記載されている。

【0144】

出発抗原結合タンパク質上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物へのタンパク質の曝露を必要とする。この治療は、連結糖(N-アセチ

10

20

30

40

50

ルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン)を除くほとんどまたは全ての糖の切断をもたらすが、ポリペプチドはそのまま残す。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 及び Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131 によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350 によって記載されているように、様々なエンドー及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。潜在的なグリコシル化部位でのグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105 によって記載されているように、化合物ツニカマイシンの使用によって防止することができる。ツニカマイシンは、タンパク質-N-グリコシド結合の形成をブロックする。

10

【0145】

抗原結合タンパク質の他のタイプの共有結合的修飾は、U. S. Pat. Nos. 4, 640, 835; 4, 496, 689; 4, 301, 144; 4, 670, 417; 4, 791, 192 または 4, 179, 337 に記載された方法で、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンなどの様々なポリオールを含むがこれらに限定されない非タンパク性ポリマーに、抗原結合タンパク質を結合することを含む。また、当該技術分野で公知のように、アミノ酸置換は、PEG のようなポリマーの付加を容易にするために、抗原結合タンパク質内の様々な位置でなされ得る。

【0146】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質の共有結合修飾は、1 つまたは複数の標識の付加を含む。

20

【0147】

用語「標識基」は、任意の検出可能な標識を意味する。適切な標識基の例は、以下を含むが、これらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I ）、蛍光基（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、二次レポーターによって認識される化学発光基、ビオチニル基、または所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エ

30

【0148】

一般に、標識は、それらが検出されるべきアッセイに応じて、様々なクラスに分類される：a) 放射性同位体または重同位体でもよい同位体標識； b) 磁気標識（例えば、磁性粒子）； c) レドックス活性部分； d) 光学色素；酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）； e) ビオチン化基；及び f) 2 次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列の、2 次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エ

40

【0149】

特異的な標識は、光学色素を含み、この光学色素は、発色団、蛍光体及びフルオロフォア、このうち後者は多くの場合に特異的である、を含むが、これらに限定されない。フルオロフォアは、「小分子」蛍光物質、またはタンパク質性蛍光物質のいずれかであり得る。

50

【0150】

「蛍光標識」は、その固有の蛍光特性により検出され得る任意の分子を意味する。適切な蛍光標識は、限定されないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルークマリン、ピレン、Malacite green、スチルベン、Lucifer Yellow、Cascade Blue J、Texas Red、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、Oregon green、Alexa-Fluor dyes (Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade Blue、Cascade Yellow、及びR-phycocerythrin (P. E) (Molecular Probes, Eugene, OR)、FITC、Rhodamine、並びにTexas Red (Pierce, Rockford, IL)、Cy5、Cy5.5、Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA)を含むが、これらに限定されない。フルオロフォアを含む適切な光学色素は、Molecular Probes Handbook by Richard P. Hauglandに記載されており、これは参照により本明細書に明確に組込まれる。

10

【0151】

20

適切なタンパク質性蛍光標識は、ウミシイタケ、Ptiliosarcus、またはオワンクラゲ種のGFP (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805)を含む緑色蛍光タンパク質、EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762)、青色蛍光タンパク質 (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24: 462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6: 178-182)、増強黄色蛍光タンパク質 (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.)、ルシフェラーゼ (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150: 5408-5417)、βガラクトシダーゼ (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 2603-2607)、及びウミシイタケ (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, U. S. Patent Nos. 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558)を含むが、これらに限定されない。上記引用文献のすべては参照により本明細書に明確に組込まれる。

30

【0152】

本明細書中に記載の例示的抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質によって結合されたOSMR上の異なるエピトープに基く特性を有する。用語「エピトープ」は、例えば、抗原結合タンパク質が標的分子に結合している場合、抗体などの抗原結合タンパク質によって接触されている標的分子のアミノ酸を意味する。エピトープは、連続または非連続的であることができる。(例えば、(i)単鎖ポリペプチドにおいて、ポリペプチド配列内では連続していないが、ターゲット分子の関連内にあるアミノ酸残基は、抗原結合タンパク質によって結合されている、または(ii)例えば、OSMRとgp130またはOSMRとIL-31受容体Aなどの、2つ以上の個々のコンポーネントを含む多量体受容体において、アミノ酸残基は、個々の構成コンポーネントの1つ以上に存在しているが、抗原結合タンパク質によりまだ結合されている。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面基を含むことができ、特

40

50

異的な3次元構造特性、及び／または特異的荷電特性を有することができる。一般に、特定の標的分子に特異的な抗原結合タンパク質は、タンパク質及び／または高分子の複合混合物中の標的分子上のエピトープを優先的に認識するであろう。

【0153】

抗原結合タンパク質によって結合されたエピトープを特徴付ける方法は当該技術分野で周知であり、以下のものを含むがこれらに限定されない。ビニング（交差競合）（Miller et al “Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay” J Immunol Methods (2011) 365, 118–25）、ペプチドマッピング（例えば、PEPSHOT（商標））（Albert et al “The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis” 2008 Thromb. Haemost 99, 634–7）、キメラなどの突然変異誘導法（Song et al “Epitope Mapping of lbalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients” J. Virol. (2010) 84, 6935–6942）、アラニンスキャニング（Cunningham and Wells “High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis” Science (1989) 244, 1081–1085）、アルギニンスキャニング（Lim et al “a diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor” Biochemistry (2010) 49, 3797–3804）、HD交換法（Coates et al “Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry” Rapid Commun, mass Spectrom. (2009) 23 639–647）、NMRクロス飽和法（Morgan et al “Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation” Biochemistry (2005) 44, 518–23）、及び結晶学（Gerhardt et al “Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody” J. Mol. Biol (2009) 394, 905–21）。これらの方法は、エピトープを含むアミノ酸に関して、それらが提供する詳細のレベルが異なる。実施例4は、エピトープビニングの例示的な方法を提供する。

【0154】

本発明の抗原結合タンパク質は、例えば、Ab1, Ab2, またはAb3などの、本明細書に記載の例示的典型的抗原結合タンパク質と重複するエピトープを有するものを含む。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、例示的抗原結合タンパク質に関して同一のエピトープを持つ。他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、例示的抗原結合タンパク質と同じアミノ酸のサブセットだけを結合する。

【0155】

特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、Ab1, Ab2, またはAb3と同一であるかまたは重複するエピトープを持ち、かつ、a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, またはSEQ ID NO: 29で示されるアミノ酸配列

に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン；b) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, または SEQ ID NO: 11で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメイン；または、c) a) の軽鎖可変ドメイン及びb) の重鎖可変ドメイン、を含む。

【0156】

特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、Ab1, Ab2, またはAb3と同一であるかまたは重複するエピトープを持ち、かつ、SEQ ID NO: 27で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 9で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメイン；SEQ ID NO: 28で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 10で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメイン；及び、SEQ ID NO: 29で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 11で示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または同一性を有する重鎖可変ドメイン、を含む。

【0157】

特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、Ab1, Ab2, またはAb3と同一であるかまたは重複するエピトープを持ち、かつ、a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, またはSEQ ID NO: 29で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン；b) SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, またはSEQ ID NO: 11で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン；または、c) a) の軽鎖可変ドメイン及びb) の重鎖可変ドメイン、を含む。

【0158】

特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、Ab1, Ab2, またはAb3と同一であるかまたは重複するエピトープを持ち、かつ、SEQ ID NO: 27で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 9で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン；SEQ ID NO: 28で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 10で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン；及び、SEQ ID NO: 29で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する軽鎖可変ドメイン、及びSEQ ID NO: 11で示されるアミノ酸配列から、10以下または5以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有する重鎖可変ドメイン、を含む。

SEQ ID NO: 9の例示的重鎖可変ドメイン変異体は、SEQ ID NO: 9の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含む。SEQ ID NO: 53で示されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 9の重鎖可変ドメイン変異体の例である。

SEQ ID NO: 10の例示的重鎖可変ドメイン変異体は、SEQ ID NO: 10の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸（例えば、アスパラギン酸）を含む。SEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 10の重鎖可変ドメイン変異体の例である。

【0159】

特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質は、Ab1, Ab2, またはAb3と同一であるかまたは重複するエピトープを持ち、かつ、a) SEQ ID NO: 30で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1; SEQ ID NO: 33で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2; 及びSEQ ID NO: 36で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3; b) SEQ ID NO: 31で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1; SEQ ID NO: 34で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2; 及びSEQ ID NO: 37で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3; または、c) SEQ ID NO: 32で示されるLCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR1; SEQ ID NO: 35で示されるLCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR2; 及びSEQ ID NO: 38で示されるLCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するLCDR3: を含む軽鎖可変ドメイン、及び、d) SEQ ID NO: 12で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1; SEQ ID NO: 15で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2; 及びSEQ ID NO: 18で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3; e) SEQ ID NO: 13で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1; SEQ ID NO: 16で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2; 及びSEQ ID NO: 19で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3; または、f) SEQ ID NO: 14で示されるHCDR1配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR1; SEQ ID NO: 17で示されるHCDR2配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR2; 及びSEQ ID NO: 20で示されるHCDR3配列から3以下のアミノ酸の付加、欠失または置換を有するHCDR3、を含む重鎖可変ドメイン、を含む。

【0160】

上記のOSMR抗原結合タンパク質は、好ましくは、a) の軽鎖可変ドメイン及びd) の重鎖可変ドメインを含むもの; b) の軽鎖可変ドメイン及びe) の重鎖可変ドメインを含むもの; 及び、c) の軽鎖可変ドメイン及びf) の重鎖可変ドメインを含むもの、を含む。

a) の軽鎖可変ドメイン及びd) の重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO: 9の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)を含む重鎖可変ドメインを含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインは、選択的に、SEQ ID NO: 53で示されるアミノ酸配列を含む。

b) の軽鎖可変ドメイン及びe) の重鎖可変ドメインを含むOSMR抗原結合タンパク質は、選択的に、SEQ ID NO: 10の73位に対応する位置にアスパラギン以外のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)を含む重鎖可変ドメインを含むことができる。このような実施形態では、重鎖可変ドメインは、選択的に、SEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列を含む。

【0161】

同一のエピトープまたは重複するエピトープを持つ抗原結合性タンパク質は、抗原結合するために交差競合することが多い。従って、特定の実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、Ab1, Ab2, またはAb3と交差競合する。「交差競合する」または「交差競争」は、標的上の同じエピトープまたは結合部位について競合することを意味する。このような競合は、参照抗原結合タンパク質(例えば、抗体またはその抗原結合部分)が、テスト抗原結合タンパク質の特異的結合を防止または阻害する、及び、その逆、のアク

セイによって決定され得る。多数のタイプの競合結合アッセイが、テスト分子が結合のために参照分子と競合するかどうかを決定するのに使用することができる。用いることができるアッセイの例は、固相直接または間接のラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接または間接の酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahl et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9: 242-253 参照）、固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137: 3614-9 参照）、固相直接標識サンドイッチアッセイ、ルミネックス（Jia et al. “a novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binding FOR the characterization of monoclonal antibodies” *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91-98）、及び表面プラズモン共鳴（Song et al. “Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients” *J. Virol.* (2010) 84, 6935-42）を含む。交差競合を決定する例示的な方法は、実施例5に記載されている。通常、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、それは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、または75%だけ参照抗原結合性タンパク質の共通抗原への結合を阻害する。いくつかの場合、結合は少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上阻害される。

OSMR抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド

【0162】

本明細書に定義されるように、抗体を含む、OSMR抗原結合タンパク質をコードする核酸または単離された核酸は、本発明に包含される。好ましい核酸は、本明細書に記載の例示的な軽鎖および重鎖をコードするものを含む。

【0163】

Ab1 LCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 21で示される配列を含む核酸である。

【0164】

Ab2 LCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 22で示される配列を含む核酸である。

【0165】

Ab3 LCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 23で示される配列を含む核酸である。

【0166】

Ab1 HCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 3で示される配列を含む核酸である。

【0167】

Ab2 HCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 4で示される配列を含む核酸である。

【0168】

Ab3 HCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 5で示される配列を含む核酸である。

Ab1 HCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 47で示される配列を含む核酸である。

Ab2 HCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 48で示される配列を含む核酸である。

Ab3 HCをコードする例示的な核酸は、SEQ ID NO: 49で示される配列を含む核酸である。

【0169】

本発明の態様は、本明細書に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド変異体（例えば、縮重による）を含む。

【0170】

本発明の態様は、以下の例示的实施形態を含む様々な実施形態を含むが、これらに限定されない。

【0171】

以下の群から選択されるアミノ酸配列を含む1つ以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

【0172】

A. 1. SEQ ID NOS: 27-29で示される軽鎖可変ドメイン配列に少なくとも90%同一である軽鎖可変ドメイン配列；

【0173】

2. SEQ ID NOS: 9-11で示される重鎖可変ドメイン配列に少なくとも90%同一である重鎖可変ドメイン配列；

【0174】

3. (1)の軽鎖可変ドメイン及び(2)の重鎖可変ドメイン；及び、

【0175】

B. 以下の配列と同じであるか、または各CDRにおいて3つ以下のアミノ酸の付加、置換、及び/または欠失だけ異なる、CDR1, CDR2, CDR3を含む軽鎖可変ドメイン及び/またはCDR1, CDR2, CDR3を含む重鎖可変ドメイン；

【0176】

1. Ab1の、軽鎖CDR1 (SEQ ID NO: 30), CDR2 (SEQ ID NO: 33), CDR3 (SEQ ID NO: 36)または重鎖CDR 1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 15), CDR3 (SEQ ID NO: 18)；

【0177】

2. Ab2の、軽鎖CDR1 (SEQ ID NO: 31), CDR2 (SEQ ID NO: 34), CDR3 (SEQ ID NO: 37)または重鎖CDR 1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 16), CDR3 (SEQ ID NO: 19)；及び、

【0178】

3. Ab3の、軽鎖CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 35), CDR3 (SEQ ID NO: 38)または重鎖CDR 1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 17), CDR3 (SEQ ID NO: 20)。

いくつかの実施形態では、核酸は、SEQ ID NO: 53またはSEQ ID NO: 54で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

いくつかの実施形態では、核酸は、SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51またはSEQ ID NO: 52で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

【0179】

好ましい実施形態では、核酸または単離核酸によってコードされるポリペプチドは、は、OSMRを結合する抗原結合タンパク質のコンポーネントである。

【0180】

核酸の単離のためのプローブまたはプライマーとして、または、クエリ配列のデータベース検索用として使用される、本明細書に記載のアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列は、アミノ酸配列からの「逆翻訳」によって、または、DNA配列コードが同定されているポリペプチドとの、アミノ酸の同一性の領域を同定することによって、得ることができる。周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の手順が、OSMR抗原結合タンパク質の

10

20

30

40

50

、またはOSMR抗原結合タンパク質のポリペプチドフラグメントの所望の組み合わせをコードするDNA配列を単離して増幅するのに用いることができる。DNAフラグメントの組合せの所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドは、5'及び3'プライマーとして用いられる。オリゴヌクレオチドはさらに、DNAフラグメントの増幅された組み合わせの発現ベクターへの挿入を容易にするために、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むことができる。PCR技術は、Saiki et al., Science 239: 487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; 及びPCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990)に記載されている。

10

【0181】

本発明の核酸分子は、1本鎖と2本鎖形態の両方のDNA及びRNA、並びに対応する相補的な配列を含む。DNAは、例えば、cDNA、ゲノムDNA、化学的に合成されたDNA、PCRによって増幅されたDNA、及びそれらの組合せを含む。本発明の核酸分子は、全長遺伝子またはcDNA分子、並びにそのフラグメントの組合せを含む。本発明の核酸は、好ましくは、ヒト供給源に由来するが、本発明は同様に、非ヒト種に由来するものを含む。

【0182】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸は、単離された核酸である。「単離された核酸」は、天然に存在する供給源から単離された核酸の場合、核酸が単離された生物のゲノム中に存在する隣接した遺伝子配列から分離された核酸である。例えば、PCR生成物、cDNA分子、またはオリゴヌクレオチドのような化学的にまたはテンプレートから酵素的に合成された核酸の場合には、このようなプロセスから得られた核酸は、単離された核酸であることが理解される。単離された核酸分子は、別々のフラグメントの形で、またはより大きな核酸構築物のコンポーネントとしての核酸分子を指す。一好適実施形態では、核酸は、実質的に汚染内因性物質を含まない。核酸分子は、好ましくは、実質的に純粋な形態で、及び、標準的な生化学的方法により、そのコンポーネントのヌクレオチド配列の同定、操作、及び回収を可能にする量または濃度で、少なくとも一度単離されたDNAまたはRNAに由来する(Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)に概説されたものなど)。このような配列は、好ましくは、典型的には真核生物の遺伝子に存在する内部非翻訳配列、またはイントロンによって中断されないオープンリーディングフレームの形で提供され、及び／または構築される。非翻訳DNAの配列は、コード領域の操作または発現に干渉しないオープンリーディングフレームからの5'または3'に存在することができる。

20

30

【0183】

本発明は、本明細書に記載されるように、OSMR抗原結合タンパク質をコードする複数の核酸に、中程度にストリンジェントな条件、及びより好ましくは高度にストリンジェントな条件の下で、ハイブリダイズする核酸または単離された核酸も含む。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメータ及び適切な条件を立案するためのガイドは、Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., chapters 9 and 11; 及びCurrent Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10及び6.3-6.4)に記載されており

40

50

、そして、例えば、DNAの長さ及び／または基の組成に基いて、当業者によって容易に決定され得る。中程度にストリンジェントな条件を達成する一つの方法は、5 x SSC、0.5% SDS、1.0 mMのEDTA (pH 8.0) を含有する前洗浄溶液、約50%のホルムアミド、6 x SSC、約55℃のハイブリダイゼーション温度のハイブリダイゼーション緩衝液（または、例えば、約42℃のハイブリダイゼーション温度で、約50%のホルムアミドを含むものなど、他の同様のハイブリダイゼーション溶液）の使用、及び、0.5 x SSC、0.1% SDS中約60℃の洗浄条件、を含む。一般的に、高度にストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件として定義されるが、洗浄は約68℃、0.2 x SSC、0.1% SDSで行う。SSPE (1 x SSPEは、0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄、及び1.25 mM EDTA, pH 7.4である) は、SSCハイブリダイゼーションと洗浄緩衝液において (1 x SSCは、0.15 M NaCl及び15 mMクエン酸ナトリウムである) と置換することができる；洗浄はハイブリダイゼーションが完了した後15分間行われる。当業者に公知であり、以下にさらに記載されるように (例えば、Sambrook et al., 1989 参照)、洗浄温度と洗浄塩濃度は、ハイブリダイゼーション反応及び2本鎖の安定性を支配する基本原理を適用することによって、ストリンジェンシーの所望の程度を達成するために、必要に応じて調整することができることが、理解されるべきである。未知の配列の標的核酸へ核酸をハイブリダイズする場合、ハイブリッド長は、ハイブリダイズする核酸の長さであると仮定される。既知の配列の核酸がハイブリダイズされる場合、ハイブリッド長は核酸の配列を整列させ、領域または最適な配列相補性の領域を同定することによって決定することができる。長さが50基対未満であると予想されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 (T_m) より5~10℃低くなるべきであり、ここでT_mは以下の式に従って決定される。長さが18基対未満のハイブリッドについては、 $T_m (^\circ\text{C}) = 2 (\# \text{ of } A + T \text{ 塩基}) + 4 (\# \text{ of } \# G + C \text{ 塩基})$ 。長さが18基対以上のハイブリッドについては、 $T_m (^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% G + C) - (600/N)$ 、ここでNはハイブリッド中の基の数であり、[Na⁺]はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度 (1 x SSCに対して [Na⁺] = 0.165 M) である。好ましくは、それぞれのこのようなハイブリダイズする核酸は、ハイブリダイズする本発明の核酸の長さの、少なくとも15ヌクレオチド (またはより好ましくは少なくとも18ヌクレオチド、または少なくとも20ヌクレオチド、または少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも30ヌクレオチド、または少なくとも40ヌクレオチド、または最も好ましくは、少なくとも50ヌクレオチド)、または少なくとも25% (より好ましくは少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、そして、最も好ましくは、少なくとも80%) の長さを有し、かつ、ハイブリダイズする本発明の核酸と、少なくとも60%の配列同一性 (より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%) を有し、ここで、配列同一性は、上記でより詳細に記載されているように、配列ギャップを最少にしつつ重複と同一性を最大にするように整列した時に、ハイブリダイズする核酸の配列を比較することによって決定される。

【0184】

本発明に係る変異体は、本明細書に概説するように、変異体をコードするDNAを生成し、その後、細胞培養での組換えDNAを発現するために、通常、カセットまたはPCR変異誘導または当技術分野で周知の他の技術を用いて、抗原結合タンパク質をコードするDNA中のヌクレオチドの部位特異的変異誘導によって調製される。しかし、100~150までの残基を有する変異体CDRを含む抗原結合タンパク質フラグメントは、確立さ

れた技術を用いてインビトロ合成によって調製することができる。変異体は、典型的には、例えば、OSMRへの結合など、天然に存在する類似体と同じ定性的生物活性を示すが、以下にさらに詳細に概説されるように、修飾された特性を有する変異体も選択することができる。

【0185】

当業者によって理解されるであろうように、遺伝子コードの縮重により、非常に多数の核酸を製造することができ、これらの全ては、本発明のCDR（及び抗原結合タンパク質の重鎖及び軽鎖または他のコンポーネント）をコードする。従って、特定のアミノ酸配列を同定すると、当業者は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変更しない方法で、単に一つ以上のコドンの配列を修飾することによって、任意の数の異なる核酸を製造することができるであろう。

10

【0186】

本発明は、上記のように少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、プラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態の発現システムや構築物も提供する。また、本発明は、このような発現システムまたは構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0187】

典型的には、任意の宿主細胞で使用される発現ベクターは、プラスミド維持のためと、外因性ヌクレオチド配列のクローニングと発現のための配列を含むであろう。特定の実施形態で、「フランキング配列」と総称して呼ばれるこのような配列は、典型的には、以下のヌクレオチド配列の1つまたは複数を含むであろう：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製の起源、転写終結配列、ドナーとアクセプターのスプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をエンコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、及び、選択可能なマーカー要素。これらの配列のそれぞれは、以下に説明する。

20

【0188】

選択的に、ベクターは、「タグ」をコードする配列、すなわち、OSMR抗原結合タンパク質をコードする配列の5'または3'端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含んでもよい；オリゴヌクレオチド配列は、（ヘキサHisなどの）ポリHis、または、市販の抗体が存在するFLAG、HA（インフルエンザウイルス血球凝集素）、またはmycなどの他の「タグ」をコードする。このタグは、典型的には、ポリペプチドの発現際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からのOSMR抗原結合タンパク質のアフィニティー精製または検出の手段として作用させることができる。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリックスとしてタグに対する抗体を用いたカラムクロマトグラフィーにより、実施することができる。選択的に、タグはその後、切断のために特定のペプチダーゼを使用するなど、様々な手段によって生成OSMR抗原結合タンパク質から除去される。

30

【0189】

フランキング配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種及び／または株から）、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種から）、ハイブリッド（すなわち、複数の供給源からのフランキング配列の組合せ）、合成、または天然であってよい。従って、フランキング配列の供給源は、フランキング配列が宿主細胞組織において機能的であり、かつそれによって活性化され得るならば、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎動物もしくはは無脊椎動物生物、または任意の植物であってよい。

40

【0190】

本発明のベクターにおいて有用なフランキング配列は、当技術分野で周知のいくつかの方法の任意のものによって得ることができる。典型的には、本明細書で有用なフランキング配列は、以前にマッピングによって、及び／または制限エンドヌクレアーゼ消化により同定されているので、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な組織源から単離することができる。いくつかのケースでは、フランキング配列の完全なヌクレオチド配列を知

50

ることができる。ここで、フランキング配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書に記載した方法を用いて合成することができる。

【0191】

フランキング配列のすべてまたはほんの一部でも公知であれば、フランキング配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、及び／または、同じまたは他の種からのオリゴヌクレオチド及び／またはフランキング配列フラグメントなどの適切なプローブでゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、得ることができる。フランキング配列が公知でない場合には、フランキング配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列またはさらに別の遺伝子を含むことができるDNAのもっと大きなフラグメントから単離することができる。単離は、アガロースゲル精製、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatworth, CA）、または当業者に公知の他の方法を用いて単離に続いて適切なDNAフラグメントを生成するための、制限エンドヌクレアーゼ消化によって達成することができる。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者には容易に明らかであろう。

【0192】

複製の起点は、通常、市販の原核生物発現ベクターであり、その起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、既知の化学的配列に基づいて合成し、ベクターに連結することができる。例えば、プラスミドpBR322（New England Biolabs, Beverly, MA）からの複製の起点はほとんどのグラム陰性細菌に適しており、かつ、様々なウイルス起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、またはHPVもしくはBPVなどのパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点コンポーネントは、哺乳類発現ベクターには必要ではない（例えば、SV40起点は、ウイルス初期プロモーターも含むという理由だけで使用されることが多い）。

【0193】

典型的には、転写終結配列はポリペプチドコード領域の末端の3'に位置し、転写を終結させる作用をする。通常、原核生物細胞における転写終結は、配列ポリT配列が続くG-Cリッチなフラグメントである。その配列は容易にライブラリーからクローニングされ、さらにはベクターの一部として市販されているが、それは、本明細書に記載の方法などの核酸合成法を用いて容易に合成することもできる。

【0194】

選択マーカー遺伝子は、選択培地中で増殖させた宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、（a）原核生物の宿主細胞のために、例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシンなどの抗生物質または他の毒素に対する耐性を付与する；（b）細胞の栄養要求性欠損を補完するか；または、（c）複雑なまたは規定された培地から利用できない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。特異的な選択可能なマーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利なことに、ネオマイシン耐性遺伝子も、原核生物と真核生物の両方の宿主細胞において、選択のために使用することができる。

【0195】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用することができる。増幅は、増殖または細胞の生存に重要なタンパク質の産生に必要な遺伝子が、連続的世代の組織換え細胞の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの例は、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）及びプロモーターチミジンキナーゼ遺伝子を含む。哺乳動物細胞形質転換体は、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択可能な遺伝子によって生存するように一意的に適応させられる選択圧力下に置かれる。選択圧力は、培地中の選択剤の濃度が連続的に増加し、それによって、選択可能な遺伝子とOSMRポリペプチドに結合する抗原結合タンパク質抗体などの遺伝子をコード

するDNAの両方の増幅をもたらすような条件下で形質転換細胞を培養することによって、課される。その結果、OSMR抗原結合タンパク質のようなポリペプチドの増大した量が、増幅されたDNAから合成される。

【0196】

リボソーム結合部位はmRNAの翻訳開始のために通常必要であり、シャイン・ダルガーノ配列（原核生物）またはコザック配列（真核生物）によって特徴付けられる。エレメントは、典型的には、発現されるポリペプチドの、プロモーターに対しては3'に、コード配列に対しては5'に位置する。特定の実施形態では、1つ以上のコード領域が作動可能に内部リボソーム結合部位（IRES）に連結することができ、単一のRNA転写物から2つのオープンリーディングフレームの翻訳を可能にする。

10

【0197】

真核生物宿主細胞発現システムにおいてグリコシル化が望まれる場合などのいくつかのケースでは、グリコシル化または収量を改善するために、様々なプレまたはプロ配列を操作することができる。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更するか、またはプロ配列を追加することができるが、これはグリコシル化にも影響を及ぼし得る。最終タンパク質生成物は、-1位（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）に、完全には除去されていないであろう発現に付随するする1つ以上の付加的なアミノ酸を有し得る。例えば、最終タンパク質生成物は、アミノ末端に結合した、ペプチダーゼ切断部位に見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、成熟ポリペプチド内のこのような領域で酵素が切れる場合、所望のポリペプチドのわずかに切取られた形態をもたらし得る。

20

【0198】

本発明の発現及びクローニングベクターは、典型的には、宿主生物によって認識され、OSMR抗原結合タンパク質をコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、配列は、構築遺伝子の転写を制御する構築遺伝子の開始コドン（一般的には、約100～1000bp内）の上流（すなわち、5'）に位置する非転写配列である。プロモーターは、従来、誘導性プロモーターと構成的プロモーターの2つのクラスのいずれかに分類されている。誘導性プロモーターは、栄養物の有無または温度変化などの培養条件の何らかの変化に応答してそれらの制御下でDNAからの増加したレベルの転写を開始する。構成的プロモーターは、一方、作動可能に連結された遺伝子を一様に転写する、すなわち、遺伝子発現に対する制御は、ほとんどまたは全くない。様々な潜在的な宿主細胞によって認識される多数のプロモーターは、周知である。適切なプロモーターは、制限酵素消化及びベクターへの所望のプロモーター配列の挿入によってソースDNAからプロモーターを除去することにより、本発明のOSMR抗原結合タンパク質を含むDNAをコードする重鎖または軽鎖に、作動可能にリンクされる。

30

【0199】

酵母宿主と共に用いる好適なプロモーターも、当該技術分野で周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターとともに有利に使用される。哺乳動物の宿主細胞とともに使用するのに適したプロモーターは周知であり、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2など）、ウシバビローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、及び最も好ましくはシミアンウイルス40（SV40）などのゲノムウイルスから得られるものを含むが、これらに限定されない。他の適切な哺乳動物プロモーターは、異種哺乳動物プロモーター、例えば、ヒートショックプロモーター及びアクチンプロモーターを含む。

40

【0200】

対象となり得るさらなるプロモーターは、以下を含むが、これらに限定されない：SV40 初期プロモーター（Benoit et al., 1981, Nature 290:304-310）；CMVプロモーター（Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U. S. A. 81:659-663）；ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto et al.,

50

, 1980, *Cell* 22:787-797) ; ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:1444-1445) ; メタロチオネイン遺伝子由来のプロモーター及び制御配列 Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42) ; 及び、ベータラクタマーゼプロモーターなどの原核生物プロモーター (Villal-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:3727-3731) ; または、tacプロモーター (De Boer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:21-25) 。組織特異性を示し、トランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域も対象である：膵臓の腺房細胞において活性であるエラスターゼ I 遺伝子制御領域 (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646 ; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 ; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515) ; 膵臓β細胞において活性であるインスリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122) ; リンパ系細胞において活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658 ; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538 ; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444) ; 精巣、乳房、リンパ系細胞及び肥満細胞において活性であるマウス乳癌ウイルス制御領域 (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495) ; 肝臓で活性であるアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276) ; 肝臓で活性であるアルファエトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 ; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58) ; 肝臓において活性であるα1-アンチトリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171) ; 骨髄細胞で活性であるβ-グロビン遺伝子制御領域 (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340 ; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94) ; 脳内のオリゴデンドロサイト細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712) ; 骨格筋で活性であるミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域 (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286) ; 及び、視床下部で活性である性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378) 。

【0201】

エンハンサーは、より高等の真核生物によって、本発明の OSMR 抗原結合タンパク質を含む軽鎖又は重鎖をコードする DNA の転写を増加させるように、ベクターに挿入することができる。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約 10~300 bp の長さの、DNA のシス作用性エレメントである。エンハンサーは、配向及び位置に比較的非依存性であり、転写ユニットの 5' と 3' の両方の位置で発見されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサーが知られている (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン及びインスリン) 。しかしながら、典型的には、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。当該技術分野で公知である SV40 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、ベクター中でコード配列の 5' または 3' のいずれかに配置することができるが、それは、典型的にはプロモーターから 5' 位に位置している。適切な天然または異種のシグナル配列 (リーダー配列ま

たはシグナルペプチド)をコードする配列が、列抗体の細胞外分泌を促進するために、発現ベクターに組み込むことができる。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、抗体が生成されるべき宿主細胞の種類に依存し、異種シグナル配列は、天然のシグナル配列を置き換えることができる。哺乳動物の宿主細胞において機能的であるシグナルペプチドの例は、以下のものを含む：U S Patent No. 4, 965, 195に記載のインターロイキン7 (IL-7)のシグナル配列；Cosman et al., 1984, Nature 312:768に記載のインターロイキン-2受容体のシグナル配列；EP Patent No. 0367 566に記載のインターロイキン-4受容体シグナルペプチド；U. S. Patent No. 4, 968, 607に記載のタイプIインターロイキン-1受容体シグナルペプチド；EP Patent No. 0 460 846に記載のタイプIIインターロイキン-1受容体シグナルペプチド。

【0202】

ベクターは、ベクターが宿主細胞ゲノムに組込まれたとき、発現を容易にする1つ以上のエレメントを含んでよい。例としては、EASEエレメント(Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38)及びマトリックス結合領域(MAR)を含む。MARは、クロマチンの構造組織を仲介して、統合バクターを「ポジション」効果から遮断することができる。従って、MARは、ベクターが安定なトランスフェクタントを生成するために使用される場合に特に有用である。多数の天然及び合成のMAR含有核酸が、例えば、U. S. Pat. Nos. 6, 239, 328; 7, 326, 567; 6, 177, 612; 6, 388, 066; 6, 245, 974; 7, 259, 010; 6, 037, 525; 7, 422, 874; 7, 129, 062などで、当該技術分野で公知である。

【0203】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターなどの出発ベクターから構築することができる。このようなベクターは、所望のフランキンク配列のすべてを含んでも含まなくてもよい。本明細書に記載のフランキンク配列の1つ以上がベクター内に既に存在していない場合、それらは個々に取得してベクターに連結してもよい。それぞれのフランキンク配列を取得するのに用いられる方法当業者には周知である。

【0204】

ベクターが構築され、OSMR抗原結合配列を含む軽鎖、重鎖、または軽鎖及び重鎖をコードする核酸分子が、ベクターの適切な部位に挿入された後、完成したベクターは、増幅及び／またはポリペプチド発現に適した宿主細胞に挿入することができる。OSMR抗原結合タンパク質の発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、または他の既知の技術を含む周知の方法によって実施することができる。選択される方法は、部分的には、使用される宿主細胞のタイプの関数である。これらの方法及び他の適切な方法は当業者に周知であり、例えば、Sambrook et al., 2001, supraに記載されている。

【0205】

宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、(宿主細胞が培地中にそれを分泌する場合)培養培地から、(それが分泌されない場合)それを産生する宿主細胞から直接、続いて、回収することができるOSMR抗原結合タンパク質を合成する。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、(グリコシル化またはリン酸化などの)活性のために望ましいか、または必要とされる、ポリペプチドの修飾、及び生物学的に活性な分子への折り込みの容易さなどの様々な要因に依存するであろう。宿主細胞は、真核生物または原核生物であってよい。

【0206】

発現するための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該技術分野で周知であり、American Type Culture Collection (ATCC)から

入手可能な不死化細胞株を含むが、これに限定されない。そして、当該技術分野で公知である発現システムで使用される任意の細胞株は、本発明の組換えポリペプチドを作製するのに使用することができる。一般に、宿主細胞は、所望の抗OSMR抗体ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え発現ベクターで形質転換される。使用することができる宿主細胞の中には、原核生物、酵母または高等真核細胞がある。原核生物は、例えば、大腸菌または桿菌などのグラム陰性またはグラム陽性生物を含む。高等真核細胞は、昆虫細胞及び哺乳動物起源の樹立細胞株を含む。適切な哺乳動物宿主細胞株の例は、サル腎臓細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L細胞, 293細胞, C127細胞, 3T3細胞(ATCC CCL 163), チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞, または、無血清培地中で成長するベジCHO及び関連細胞株などのそれらの誘導体(Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31), HeLa細胞, BHK(ATCC CRL 10)細胞株, 及び、McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821によって記載されているようなアフリカミドリザル腎細胞株CV1(ATCC CCL 70)に由来するCV1/EBNA細胞株, 293などのヒト胎児腎臓細胞, 293 EBNAまたはMSR 293, ヒト上皮A431細胞, ヒトColo205細胞, 他の形質転換された霊長類細胞株, 正常二倍体細胞, 初代組織のインビトロ培養から得られる細胞株, 一次外植片, HL-60, U937, HaKまたはジャックカット細胞を含む。様々なシグナル伝達またはレポーターアッセイにおいてポリペプチドを使用することが望ましい場合、選択的に、例えば、HepG2細胞/3B、KB、NIH 3T3またはS49などの哺乳動物細胞株が、ポリペプチドの発現のために使用され得る。あるいは、酵母などの下等真核生物において、または細菌などの原核生物において、ポリペプチドを産生することが可能である。適切な酵母は、サッカロミセス セレビシエ、分裂酵母、クルイベロミセス株、カンジダ、または異種ポリペプチドを発現することが可能な任意の酵母株を含む。適切な細菌株は、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌、または異種ポリペプチドを発現することができる任意の細菌株を含む。ポリペプチドが酵母または細菌で作製されている場合、機能性ポリペプチドを得るために、適切な部位のリン酸化またはグリコシル化によって、例えば、その中に産生されたポリペプチドを修飾することが望ましいであろう。このような共有結合は、既知の化学的又は酵素的方法を用いて達成することができる。ポリペプチドは、1つ以上の昆虫発現ベクターにおいて、及び昆虫発現システムを用いて、適切な制御配列に、本発明の核酸又は単離核酸を作動可能に連結することによっても、産生することができる。バキュロウイルス/昆虫細胞発現システムのための材料及び方法は、例えば、Invitrogen, San Diego, CA, U. S. A. (the MaxBac (登録商標) kit)からキット形態で市販されており、このような方法は、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), 及びLuckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)に記載されているように、当該技術分野で周知である。無細胞翻訳系も、本明細書に開示される核酸構築物由来のRNAを用いてポリペプチドを産生するために使用することができる。細菌、真菌、酵母及び哺乳動物細胞宿主と使用するための適切なクローニング及び発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: a Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)によって記載されている。好ましくは、作動可能に少なくとも1つの発現制御配列に結合された、本発明の核酸または単離核酸を含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」である。

【0207】

特定の実施形態では、細胞株は、どの細胞株が高発現レベルを有し、OSMR結合特性を有する抗原結合タンパク質を構成的に産生するかを決定することによって、選択することができる。他の実施形態では、自分自身の抗体を作らないが、異種の抗体を作って分泌する能力を持つB細胞系列由来の細胞株が選択され得る。

10

20

30

40

50

細胞枯渇 O S M R 抗原結合タンパク質

【0208】

好ましい実施形態では、O S M R 抗原結合タンパク質は、O S M R を結合し、かつ O S M 及び／または I L - 3 1 結合を阻害して、それによって、O S M R - を発現する細胞における、O S M - 及び／または I L - 3 1 - 媒介のシグナル伝達を減少させる。しかしながら、特定の実施形態では、O S M R 抗原結合タンパク質は O S M R を結合し、枯渇のために O S M R - を発現する細胞を標的とする。様々な態様では、O S M R 抗原結合タンパク質は、O S M 及び／または I L - 3 1 結合を阻害し、枯渇のために O S M R 細胞を標的とする。

【0209】

細胞枯渇 O S M R 抗原結合タンパク質は、例えば、自己免疫性疾患、炎症性疾患、細胞外マトリックス沈着またはリモデリングに関連した疾患または障害、または O S M R - を発現する腫瘍などの、O S M R の過剰発現に関連した疾患または障害を治療するのに、特に有用である。例えば、抗体などの、抗原結合タンパク質を有する細胞を標的にする方法は、当該技術分野において周知である。例示的な実施形態は、以下に説明する。

抗体薬剤コンジュゲート

【0210】

本発明の実施形態は、抗体薬剤コンジュゲート (A D C) を含む。一般に、A D C は、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、毒素、または放射性物質などの化学療法剤に、コンジュゲートした抗体を含む。リンカー分子は、抗体に薬剤をコンジュゲートするため使用することができる。A D C 技術において有用な多様なリンカー及び薬剤が当該技術分野で公知であり、本発明の実施形態で使用するすることができる。(U S 2 0 0 9 0 0 2 8 8 5 6 ; U S 2 0 0 9 / 0 2 7 4 7 1 3 ; U S 2 0 0 7 / 0 0 3 1 4 0 2 ; W O 2 0 0 5 / 0 8 4 3 9 0 ; W O 2 0 0 9 / 0 9 9 7 2 8 ; U S 5 2 0 8 0 2 0 ; U S 5 4 1 6 0 6 4 ; U S 5 4 7 5 0 9 2 ; 5 5 8 5 4 9 9 ; 6 4 3 6 9 3 1 ; 6 3 7 2 7 3 8 ; 及び 6 3 4 0 7 0 1 参照、すべて参照により本明細書に組込まれる)。

リンカー

【0211】

特定の実施形態では、A D C は、1 つ以上のリンカーコンポーネントで構成されたリンカーを含む。例示的なリンカーコンポーネントは、6 - マレイミドカプロイル、マレイミドプロパノイル、バリニンシトルリン、アラニン - フェニルアラニン、p - アミノベンジルオキシカルボニル、及び、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルチオ) ペンタノエート (「S P P」)、N - スクシンイミジル 4 - (n - マレイミドメチル) シクロヘキサ - 1 - カルボキシレート (「S M C C」、本明細書では、「M C C」とも呼ばれる)、及び N - スクシンイミジル (4 - ヨードアセチル) アミノベンゾエート (「S I A B」) を含むが、これらに限定されない、リンカー試薬とのコンジュゲートに起因するもの、を含む。

【0212】

リンカーは、「切断可能な」リンカーまたは「非切断可能な」リンカーであり得る (D u c r y and S t u m p , B i o c o n j u g a t e C h e m . 2 0 1 0 , 2 1 , 5 - 1 3 ; 参照により本明細書にその全体が組込まれる)。切断可能なリンカーは、例えば標的細胞に内在化される場合など、特定の環境要因を受けた場合に薬物を放出するように設計されている。切断可能なリンカーは、酸不安定性リンカー、プロテアーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカーを含む。非切断可能なリンカーは、標的細胞による内在化及び標的細胞内での分解の際の抗体及び薬剤の少なくとも 1 つのアミノ酸と共有結合したままである傾向がある。例示的な非切断可能なリンカーは、M C C である。

薬剤

【0213】

特定の実施形態では、抗体は、化学療法剤にコンジュゲートされる。化学療法剤の例は

10

20

30

40

50

、チオテパ及びシクロホスファミド (CYTOXAN (商標)) などのアルキル化剤; プスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル類; ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、及びウレドーパ (uredopa) などのアジリシン類; アルトレートアミン (altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド (triethylenethiophosphoramidate) 及びトリメチローロメラミン (trimethylolomelamine) を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類; アセトゲニン類 (特にブラタシン及びブラタシノン); カンプトセシン (合成類似体トポテカンを含む); プリオスタチン; カリスタチン (callistatin); CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成類似体を含む); クリプトフィシン類 (特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8); ドラスタチン; ズオカルマイシン (合成類似体、KW-2189及びCB1-TM1を含む); エレウテロピン; パンクラチスタチン; サルコジクチン (sarcodictyin); スポンジスタチン; クロランブシル、クロロナファジン (chlomaphazine)、コロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン (prednimustine)、トロフォスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード; カルムスチン、クロロゾトシン (chlorozotocin)、フォテムスチン (fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチンなどのニトロスレアス (nitrosureas); (例えば、カリケアマイシン (calicheamicin)、特にカリケアマイシン γ 1及びカリケアマイシン θ I、例えば Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994) 参照; ダイネマイシン (dynemicin) Aを含むダイネマイシン; エスペラマイシン; 及びネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素蛋白エネジイン抗生物質発色団などの) エネジイン抗生物質などの抗生物質、アクラシノマイシン類 (aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン (cactinomycin)、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン (モルホリノ-ドキシソルビシン、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン及びデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸 (mycophenolic acid)、ノガラマイシン (nogalamycin)、オリボマイシン (olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン (zinostatin)、ゾルビシン (zorubicin); メトトレキセート及び5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗剤; デノプテリン (denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトトレキセート (trimetrexate) などの葉酸類似体; フルダラビン (fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体; アンシタビン、アザシチジン (azacitidine)、6-アザウリシン (azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリシン、ドキシフルリシン、エノシタビン (enocitabine)、フロキシウリシン (floxuridine)、5-FUなどのピリミジン類似体; カルステロン (calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン (testol

actone) などのアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸 (frolinic acid) などの葉酸リプレニッシャー (replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン (amsacrine)；ベストラブシル (bestrabucil)；ビスアントレン (bisantrene)；エダトラキセート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルシン (demecolcine)；ジアジコン (diaziquone)；エルフォルニチン (elfomithine)；酢酸エリプチニウム (elliptinium)；エポチロン (epothilone)；エトグルシド (etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン (lonidamine)；メイタンシン (maytansine) 及びアンサミトシン (ansamitocine) などのメイタンシノイド (maytansinoid) 類；ミトグアゾン (mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダンモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット (phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントロン (losoxantrone)；ポドフィリン酸 (podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (登録商標)；ラゾキサン (razoxane)；リゾキシシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム (spirogermanium)；テニウアゾン酸 (tenuazonic acid)；トリアジコン (triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類 (特に T-2 毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン (roridine) A 及びアングイジン (anguidine))；ウレタン；ビンデシン；ダカーバジン；マンノムスチン (mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール (mitolactol)；ピポブロマン (pipobroman)；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；パクリタキセル (TAXOL (商標), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 及びドキセタキセル (TAXOTERE (登録商標), Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France) などのタキソイド類；クロランブシル；ゲムシタビン (gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン；白金；エトポシド (VP-16)；イホスファミド；マイトミシン C；マイトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ノバントロン (novantrone)；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ (xeloda)；イバンドロナート (ibandronate)；CPT-11；トポイソメラーゼインヒビター RFS 2000；ジフルオロメチロールニチン (DMFO)；レチノイン酸；カペシタビン (capecitabine)；及び上記の任意のものの薬学的に許容可能な塩類、酸又は誘導体を含む。この定義には、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン (raloxifene)、アロマターゼ阻害 4 (5)-イミダゾール、ドロロキシフェン (droloxifene)、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene)、ケオキシフェン (keoxifene)、LY117018、オナプリストン (onapristone)、及びトレミフェン (Fareston) などを含む抗エストロゲン；及び、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン；siRNA 及び上記の任意のものの薬学的に許容可能な塩類、酸又は誘導体、などの、腫瘍に対するホルモン作用を調節または抑制するように作用する抗ホルモン剤、も含まれる。本発明で使用する他の化学療法剤は、US Publication No. 20080171040 または US Publication No. 20080305044 に開示されており、それぞれが、その全体が参照により本明細書に組込まれる。

【0214】

抗体は、2つ以上の異なる化学療法剤にコンジュゲートされ得るか、または、医薬組成物は、抗体コンポーネントが異なる化学療法剤にコンジュゲートされている場合を除いて

同一である抗体の混合物を含み得ることを特徴とすること、が企図されている。このような実施形態は、標的細胞で複数の生物学的経路を標的とするのに有用であり得る。

【0215】

好ましい実施形態では、ADCは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である、1つ以上のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされた抗体を含む。様々な修飾を含むメイタンシノイドは、US Pat. Nos. 3896111; 4151042; 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; 4371533; 及びWO 2009/099728に記載されている。メイタンシノイド薬物部分は、天然源から単離されるか、組換え技術を用いて産生されるか、または合成的に調製され得る。例示的なメイタンシノイドは、C-19-デクロロ (US Pat No. 4256746)、C-20-ヒドロキシ (またはC-20デメチル) +/−C-19-デクロロ (US Pat. Nos. 4307016及び4361650)、C-20-デメトキシ (またはC-20-アシルオキシ (−OCOR) +/−デクロロ (US Pat. No. 4294757)、C-9-SH (US Pat. No. 4,424,219)、C-14-アルコキシメチル (デメトキシ/CH₂OR) (U. S. Pat. No. 4,331,598)、C-14ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル (CH₂OHまたはCH₂OAc) (U. S. Pat. No. 4,450,254)、C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ (U. S. Pat. No. 4,364,866)、C-15-メトキシ (U. S. Pat. Nos. 4,313,946及び4,315,929)、C-18-Nデメチル (U. S. Pat. Nos. 4,362,663及び4,322,348)、及び4,5-デオキシ (U. S. Pat. No. 4,371,533)、を含む。

【0216】

メイタンシノイド化合物上の様々な位置が、所望の結合のタイプに応じて、結合位置として使用することができる。例えば、エステル結合を形成するためには、ヒドロキシル基を有するC-3位、hydrozylで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位のすべてが適切である (US Pat. Nos. 5208020, RE39151, 及び6913748; US Patent Appl. Pub. Nos. 20060167245及び20070037972, 及びWO 2009099728)。

【0217】

好ましいメイタンシノイドは、DM1, DM3, 及びDM4として当該技術分野で公知のものである (US Pat. Appl. Pub. Nos. 2009030924及び20050276812、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0218】

メイタンシノイドを含むADC、このようなADCを作製する方法、及びその治療的使用は、US Patent Nos. 5208020及び5416064, US Pat. Appl. Pub. No. 20050276812, 及びWO 2009099728に開示されている (すべて参照により本明細書に組込まれる)。メイタンシノイドのADCを製造するのに有用なリンカーは、当該技術分野で公知である (US Pat. No. 5208020及びUS Pat. Appl. Pub. Nos. 2005016993及び20090274713; すべて参照により本明細書に組込まれる)。SMCCリンカーを含むメイタンシノイドのADCは、US Pat. Publ. No. 2005/0276812に開示されているように調製することができる。

エフェクター機能が強化された抗体

【0219】

抗体のFc部分の機能の1つは、抗体がその標的に結合する場合に免疫システムと通信することである。これは、「エフェクター機能」と考えられる。通信は、抗体依存性細胞

傷害（A D C C）、抗体依存性細胞食作用（A D C P）、及び／または補体依存性細胞傷害（C D C）をもたらす。A D C C及びA D C Pは、免疫系の細胞の表面上のF c受容体へのF cの結合を介して媒介される。C D Cは、例えば、C 1 qなどの補体系タンパク質とのF cの結合を介して媒介される。

【0220】

I g Gのサブクラスは、エフェクター機能を媒介するそれらの能力において、変動する。例えば、I g G 1は、A D C C及びC D Cの媒介において、I g G 2及びI g G 4よりずっと優れている。従って、O S M Rを発現する細胞が破壊の標的とされる実施形態では、抗O S M R I g G 1抗体が好ましいであろう。

【0221】

抗体のエフェクター機能は、F cに1以上の突然変異を導入することによって、増加させるか、または、減少させることができる。本発明の実施形態は、エフェクター機能を増加させるように設計されたF cを有する、例えば、抗体などの抗原結合タンパク質を含む（U. S. 7, 317, 091及びStrohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009; 両方とも、その全体が参照により本明細書に組込まれる）。例示的なエフェクター機能を増加させるように設計されたI g G 1 F c分子は（Kabat番号付けスキームに基いて）以下の置換を含む：

【0222】

S 2 3 9 D / I 3 3 2 E

【0223】

S 2 3 9 D / A 3 3 0 S / I 3 3 2 E

【0224】

S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E

【0225】

S 2 9 8 A / D 3 3 3 A / K 3 3 4 A

【0226】

P 2 4 7 I / A 3 3 9 D

【0227】

P 2 4 7 I / A 3 3 9 Q

【0228】

D 2 8 0 H / K 2 9 0 S

【0229】

D 2 8 0 H / K 2 9 0 S / S 2 9 8 D

【0230】

D 2 8 0 H / K 2 9 0 S / S 2 9 8 V

【0231】

F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L

【0232】

F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / P 3 9 6 L

【0233】

F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / V 3 0 5 I / P 3 9 6 L

【0234】

G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / I 3 3 2 E

【0235】

K 3 2 6 A / E 3 3 3 A

【0236】

K 3 2 6 W / E 3 3 3 S

【0237】

K 2 9 0 E / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A

【0238】

10

20

30

40

50

K 2 9 0 N / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A

【0 2 3 9】

K 2 9 0 E / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A / K 3 2 6 E

【0 2 4 0】

K 2 9 0 N / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A / K 3 2 6 E

【0 2 4 1】

本発明のさらなる実施形態は、例えば、抗体が、エフェクター機能を低下させるように設計されたFcを有する抗原結合タンパク質を含む。低下したエフェクター機能を有する例示的なFc分子は、(K a b a t 番号付けスキームに基いて)以下の置換を含む：

【0 2 4 2】

N 2 9 7 A (I g G 1)

【0 2 4 3】

L 2 3 4 A / L 2 3 5 A (I g G 1)

【0 2 4 4】

V 2 3 4 A / G 2 3 7 A (I g G 2)

【0 2 4 5】

L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / E 3 1 8 A (I g G 4)

【0 2 4 6】

H 2 6 8 Q / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / A 3 3 1 S (I g G 2)

【0 2 4 7】

C 2 2 0 S / C 2 2 6 S / C 2 2 9 S / P 2 3 8 S (I g G 1)

【0 2 4 8】

C 2 2 6 S / C 2 2 9 S / E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A (I g G 1)

【0 2 4 9】

L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S (I g G 1)

【0 2 5 0】

S 2 6 7 E / L 3 2 8 F (I g G 1)

【0 2 5 1】

I g G Fc含有タンパク質のエフェクター機能を増加させる他の方法は、Fcのフコシル化を減少させることによる。Fcに付着した2分岐複合型オリゴ糖からのコアフコースの除去は、抗原結合またはCDCエフェクター機能を変更することなく、ADCCエフェクター機能を大きく増加した。例えば、抗体などの、Fc含有分子のフコシル化を減少または撤廃するいくつかの方法が知られている。これらは、FUT8ノックアウト細胞株、変異体CHO株Lecl3、ラットハイブリドーマ細胞株YB2/0、FUT8遺伝子に対して特異的に低分子干渉RNAを含む細胞株、及び、β-1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII及びゴルジα-マンノシダーゼIIを共発現する細胞株、を含む特定の哺乳動物の細胞株における組換え発現を含む。あるいは、Fc含有分子は、例えば、大腸菌のような、植物細胞、酵母、または原核細胞などの非哺乳動物細胞において発現され得る。本発明の特定の実施形態では、組成物は、例えば、フコシル化が減少したまたは完全にフコシル化を欠くAb1, Ab2, またはAb3などの抗体を含む。

医薬組成物

【0 2 5 2】

いくつかの実施形態では、本発明は、医薬的に有効な希釈剤、キャリア、可溶化剤、乳化剤、保存剤、及び/またはアジュバントとともに、本発明の抗原結合タンパク質の1つまたは複数を治療有効量含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は抗体である。本発明の医薬組成物は、液体、凍結したもの、凍結乾燥組成物を含むが、これらに限定されない。

【0 2 5 3】

好ましくは、製剤材料は、用いられる用量及び濃度で受容者に対して非毒性である。特

10

20

30

40

50

定の実施形態では、例えば、OSMR-結合抗体などの、治療有効量のOSMR抗原結合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。

【0254】

特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、組成物の溶解または放出、吸着または浸透の速度を、修飾、維持または保存するための製剤材料を、含有してもよい。このような実施形態では、適切な製剤材料は、（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、プロリン、またはリシンなどの）アミノ酸；抗菌剤；（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは水素ナトリウム、亜硫酸などの）抗酸化剤；（ホウ酸塩、重炭酸塩、トリス-HCl、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸などの）緩衝剤；（マンニトールまたはグリシンなどの）増量剤；（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などの）キレート剤；（カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンなどの）錯化剤；充填剤；単糖類；二糖類；及び、（グルコース、マンノースまたはデキストリンなどの）他の炭水化物；（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどの）タンパク質；着色剤、香味剤及び希釈剤；乳化剤；（ポリビニルピロリドンなどの）親水性ポリマー；低分子量ポリペプチド；（ナトリウムなどの）塩形成対イオン；（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素などの）保存剤；（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどの）溶媒；（マンニトールまたはソルビトールなどの）糖アルコール；懸濁化剤；（プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート20などのポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポールなどの）界面活性剤または湿潤剤；（スクロースまたはソルビトールなどの）安定性増強剤；（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくはナトリウム又は塩化カリウム、マンニトールソルビトールなどの）張度増強剤；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤及び／または薬学的アジュバント、を含むが、これらに限定されない。REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Genrmo, ed.) , 1990, Mack Publishing Company 参照。

【0255】

特定の実施形態では、最適な医薬組成物は例えば、企図する投与経路、送達形式及び所望の用量に依存して、当業者によって決定される。例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra 参照。特定の実施形態では、このような組成物は、本発明の抗原結合タンパク質の物理的状态、安定性、インビボ放出速度及びインビボクリアランス速度に影響を与え得る。特定の実施形態では、医薬組成物における主要なビヒクルまたは担体は、性質が水性または非水性のいずれであってもよい。例えば、適切なビヒクルまたは担体は、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の物質で補充された、注射用水、生理食塩水または人工脳脊髄液であり得る。血清アルブミンと混合した中性緩衝食塩水または生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。具体的な実施形態では、医薬組成物は、pH約7.0～8.5のトリス緩衝剤、またはpH約4.0～5.5の酢酸緩衝液を含み、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。本発明の特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質組成物は、貯蔵のために、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形で、所望の純度を有する選択された組成物を任意の処方薬（REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra）と混合することによって調製することができる。さらに、特定の実施形態では、OSMR抗原結合タンパク質生成物は、スクロースなどの適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化することができる。

【0256】

本発明の医薬組成物は、非経口投与のために選択することができる。あるいは、組成物は、経口的になど、吸入または消化管を介する投与のために選択され得る。このような薬学的に許容可能な組成物の調製は、当業者の範囲内にある。製剤成分は、好ましくは、投

与部位に許容可能な濃度内にある。特定の実施形態では、緩衝剤は、生理学的 pH で、または典型的には約 5 ～ 約 8 の pH 範囲内のわずかに低い pH で、組成物を維持するために使用される。

【0257】

非経口投与が企図される場合、本発明で使用する治療用組成物は、薬学的に許容可能なビヒクル中に所望の O S M R 抗原結合タンパク質を含有する、発熱物質を含まない、非経口的に許容可能な水溶液の形態で提供することができる。非経口注射のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、その中で、O S M R 抗原結合タンパク質は、滅菌、等張液として製剤化され、適切に保存される。特定の実施形態では、その調整は、蓄積注射を介して送達することができる生成物の制御放出または徐放性放出を提供し得る、注射可能なミクロスフェア、バイオ分解性粒子、(ポリ乳酸やポリグリコール酸などの) 高分子化合物、ビーズまたはリボソームなどの物質を有する所望の分子の製剤を含むことができる。特定の実施形態では、循環中の持続期間を助長する効果を有するヒアルロン酸も、使用することができる。特定の実施形態では、埋め込み型薬物送達デバイスを、所望の抗原結合タンパク質を導入するために使用することができる。

【0258】

本発明の医薬組成物は、吸入用に製剤化することができる。これらの実施形態では、O S M R 抗原結合タンパク質は、乾燥した吸入可能な粉末として有利に製剤化される。具体的実施形態では、O S M R 抗原結合タンパク質吸入溶液は、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に製剤化することができる。特定の実施形態では、溶液は、噴霧され得る。従って、肺投与及び製剤化の方法は、さらに、国際特許出願 No. P C T / U S 9 4 / 0 0 1 8 7 5 に記載されており、これは参照により組込まれていて、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達を記載している。

【0259】

製剤は経口的に投与され得ることも企図されている。この方法で投与される O S M R 抗原結合タンパク質は、錠剤及びカプセルなどの固体剤形の配合に通常用いられる担体とともに、または、なしで製剤化され得る。特定の実施形態では、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、前全身分解が最小化されるときに、胃腸管中の点で製剤の活性部分を放出するように設計され得る。O S M R 抗原結合タンパク質の吸収を促進するために、さらなる薬剤が含まれ得る。希釈剤、香味料、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、及び結合剤も用いることができる。

【0260】

持続または制御送達製剤に O S M R 抗原結合タンパク質を含む製剤を含むさらなる薬学的組成物は、当業者には明らかであろう。リボソーム担体、生体侵食性微粒子または多孔性ビーズ、及び蓄積注射などの、様々な他の持続または制御送達手段を製剤化する技術も、当業者に周知である。例えば、参照により組込まれており、医薬組成物の送達のための多孔性ポリマー微粒子の制御放出を記載している、国際特許出願 No. P C T / U S 9 3 / 0 0 8 2 9 を参照。持続放出製剤は、例えばフィルム、またはマイクロカプセルなどの、造形品の形態の半透過性ポリマーマトリックスを含むことができる。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリリラクチド (U. S. Pat. No. 3, 773, 919 及び European Patent Application Publication No. EP 0 584 81 に開示されており、それぞれ参照により組込まれる)、L-グルタミン酸と γ エチル-L-グルタメートのコポリマー (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2: 547-556)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 及び Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105)、エチレンビニルアセテート (Langer et al., 1981, supra) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EUROPEAN Patent Application Publication No. EP 1 33, 988)、を含むことができる。持続放出組成物は、当該技術分野

で公知のいくつかの方法の任意のものによって調製され得るリボソームも含み得る。例えば、参照により組込まれている、Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:3688-3692; European Patent Application Publication Nos. EP 036,676; EP 088,046及びEP 143,949、参照。

【0261】

インビボ投与に用いられる医薬組成物は、典型的には、滅菌調製物として提供される。滅菌は、滅菌濾過膜を通した濾過によって達成することができる。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を用いた滅菌は、凍結乾燥及びリモデリングの前または後のいずれかで行うことができる。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態でまたは溶液中に保存することができる。非経口組成物は一般に、例えば、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルなどの、滅菌アクセスポートを有する容器内に配置されている。

10

【0262】

本発明の態様は、本明細書に参照によりその全体が組込まれる、国際特許出願WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599)に記載されているように、自己緩衝OSMR抗原結合タンパク質製剤を含む。

【0263】

上述のように、特定の実施形態は、OSMR抗原結合タンパク質のタンパク質組成物、特に、OSMR抗原結合タンパク質に加えて、本明細書のこのセクション及び他の場所に例示的に記載されているような賦形剤を1つ以上含む、医薬OSMR抗原結合タンパク質を提供する。賦形剤は、この点で本発明において、製剤の物理的、化学的、または生物学的特性の調整など、粘度の調整などの多様な目的のために、及びまたは、効率を改善し、及びまたは、例えば、製造、輸送、貯蔵、使用前の準備、管理中、及びその後発生する応力による劣化及び損傷に対して、このような製剤及びプロセスを安定化するための本発明のプロセスのために、使用することができる。

20

【0264】

タンパク質の安定化及び製剤材料及びこの点において有用な方法に関して、Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3):285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," in: RATIONAL DESIGN of STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), 及びRandolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13:159-75 (2002)などの多様な開示が利用できる。これらのそれぞれは、特に、獣医学及び／又はヒトの医学的使用のためのタンパク質医薬品及びプロセスに関して、本発明に従った自己緩衝タンパク質製剤のための同じ賦形剤及びプロセスに関連する部分において、その全体が参照により本明細書に組込まれる。

30

40

【0265】

例えば、製剤のイオン強度及び／または等張性を調整するために、及び／または、本発明に従う組成物のタンパク質または他の成分の溶解性及び／または物理的安定性を改善するために、本発明の特定の実施形態に従って、塩を使用することができる。

【0266】

周知のように、イオンは、タンパク質の表面上の帯電した残基に結合することによって、及び、タンパク質中の荷電及び極性基を遮蔽して静電相互作用、引力相互作用及び反発相互作用の強度を減少させることによって、タンパク質の天然状態を安定化することがで

50

きる。イオンは、特に、タンパク質の変性ペプチド結合（—CONH）に結合することによって、タンパク質の変性状態を安定化することもできる。さらに、タンパク質中の荷電及び極性基とのイオン相互作用は、分子間の静電相互作用を減少させ、それによって、タンパク質の凝集及び不溶性を防止または低減することもできる。

【0267】

イオン種は、タンパク質への影響において大きく異なる。本発明に従う医薬組成物を製剤化するのに使用し得る、イオンの多くのカテゴリーランキングとそれらのタンパク質への効果が開発されてきた。一例は、溶液中のタンパク質の立体配座の安定性に及ぼす影響により、イオン性及び極性非イオン性溶質をランク付けするホフマイスターシリーズである。安定化溶質は、「コスモトロピック」と呼ばれる。不安定化溶質は、「カオトロピック」と呼ばれる。コスモトロップは、一般に、溶液からタンパク質を沈殿させるために（「塩析」）、高濃度（例えば、>1モル硫酸アンモニウム）で使用される。カオトロップは、一般に義歯に使用され、及び／または、タンパク質を可溶化するために（「塩溶」）使用される。「塩析」と「塩溶」へのイオンの相対的有効性が、ホフマイスターシリーズ内の位置を定義する。

【0268】

遊離アミノ酸は、本発明の様々な実施形態によるOSMR抗原結合タンパク質製剤において、増量剤、安定化剤、及び酸化防止剤、並びに他の標準的な用途として使用することができる。リシン、プロリン、セリン及びアラニンが、製剤中のタンパク質を安定化するために使用することができる。グリシンは、正しいケーキの構造と特性を確保するための凍結乾燥に有用である。アルギニンは、液体と凍結乾燥された製剤の両方において、タンパク質凝集を阻害するのに有用であり得る。メチオニンは、酸化防止剤として有用である。

【0269】

ポリオールは、例えば、マンニトール、スクロース、及びソルビトール、並びに、例えば、グリセロール及びプロピレングリコールなどの多価アルコール、並びに、本明細書中で説明する目的では、ポリエチレングリコール（PEG）及び関連物質、などの糖類を含む。ポリオールは、コスモトロピックである。それらは物理的及び化学的分解プロセスからタンパク質を保護するための液体及び凍結乾燥製剤の両方において、有用な安定化剤である。ポリオールは、製剤の張度を調節するのにも有用である。

【0270】

本発明の選択された実施形態において有用なポリオールの中には、凍結乾燥製剤においてケーキの構造的安定性を確保するために一般的に使用される、マンニトールがある。マンニトールはケーキに構造的安定性を確保する。マンニトールは、一般的には、例えば、スクロースなどの凍結乾燥保護剤と一緒に使用される。ソルビトール及びスクロースは、張度を調整するため、及び製造プロセス中にバルクの輸送または調製中に凍結融解ストレスに対して保護するための安定剤として、好適な薬剤に入る。例えば、グルコース及びラクトースなどの（遊離アルデヒドまたはケトン基を含有する）糖類を還元すると、表面リシン及びアルギニン残基を糖化することができる。従って、それらは、一般的に、本発明に従って使用するのに好適なポリオールの中にはない。また、酸性条件下で、フルクトース及びグルコースに加水分解され、その結果、糖化を生じさせるスクロースなどのこのような反応種を形成する糖類は、この点において、本発明の好ましいポリオールの中にはない。PEGは、タンパク質を安定化するのに、及び凍結保護剤として、有用であり、またこの点で、本発明で使用するすることができる。

【0271】

OSMR抗原結合タンパク質製剤の実施形態は、はさらに界面活性剤を含む。タンパク質分子は、表面上の吸着、及び、空気—液体、固体—液体及び液体—液体界面における変性及びその結果としての凝集に敏感であるであろう。これらの効果は、一般的に、タンパク質濃度に反比例して拡大する。これらの有害な相互作用は、一般に、タンパク質濃度に反比例して拡大し、典型的には、出荷と取扱いの間に生成されるような、物理的攪拌によ

って悪化する。

【0272】

界面活性剤は、表面吸着を防止、最小化、または減少させるために通常使用される。この点で、本発明における有用な界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ソルビタンポリエトキシレートの他の脂肪酸エステル、及びポロキサマー188を含む。

【0273】

界面活性剤はまた、一般的に、タンパク質の立体配座の安定性を制御するためにも使用される。この点で界面活性剤の使用は、以降のタンパク質に特異的であり、任意の所与の界面活性剤は、典型的には、いくつかのタンパク質を安定化し、他のタンパク質を不安定にする。

10

【0274】

ポリソルベートは酸化的分解の影響を受けやすく、供給されるとき、タンパク質残基の側鎖、特にメチオニンの酸化を引き起こすのに十分な量の過酸化物を含むことが多い。このため、ポリソルベートは注意深く使用するべきであり、使用する場合には、その最小有効濃度で用いるべきである。この点において、ポリソルベートは、賦形剤はその最小有効濃度で使用するべきであるという原則を例示する。

【0275】

OSMRタンパク質製剤の実施形態は、さらに1つ以上の抗酸化剤を含む。有害な酸化は、医薬製剤中で適正レベルの周辺酸素及び温度を維持し、光への曝露を避けることによってある程度防ぐことができる。タンパク質の酸化的分解を防ぐため、抗酸化賦形剤も使用することができる。この点における有用な抗酸化剤には、還元剤、酸素／フリーラジカル捕捉剤、及びキレート剤がある。本発明に係る治療用タンパク質製剤のための抗酸化剤は、好ましくは水溶性であり、製品の有効期間を通じてタンパク質の活性を維持する。EDTAは、この点において本発明に係る好ましい抗酸化剤である。

20

【0276】

酸化防止剤は、タンパク質を損傷し得る。例えば、特にグルタチオンなどの還元剤は、分子内ジスルフィド結合を破壊することができる。従って、本発明で使用する抗酸化剤は、とりわけ、製剤中のタンパク質に損傷を与えるそれ自体の可能性を除去または十分に低減するように選択される。

30

【0277】

本発明による製剤は、特定のインスリン懸濁液を形成するのに必要な亜鉛などの、タンパク質補因子であり、タンパク質の配位錯体を形成するために必要とされている金属イオンを含んでもよい。金属イオンは、タンパク質を分解するいくつかのプロセスを阻害することもできる。しかし、金属イオンは、タンパク質を分解する物理的及び化学的プロセスを触媒もする。

【0278】

マグネシウムイオン(10~120mM)は、イソアスパラギン酸へのアスパラギン酸の異性化を阻害するために使用することができる。 Ca^{+2} イオン(100mMまで)は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼの安定性を高めることができる。しかし Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 、及び Zn^{+2} は、rhDNaseを不安定化し得る。同様に、 Ca^{+2} 及び Sr^{+2} は、第VILI因子を安定化させることができ、それは Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 及び Zn^{+2} 、 Cu^{+2} 及び Fe^{+2} によって不安定化されることができ、及びその凝集は、 Al^{+3} イオンによって増大させられることができる。

40

【0279】

OSMR抗原結合タンパク質製剤の実施形態は、1つ以上の保存剤をさらに含む。同じ容器からの複数の抽出を含む複数用量の非経口製剤を開発する際に、保存剤が必要である。それらの主な機能は、微生物の増殖を阻害し、貯蔵寿命または製剤の使用期間を通じて製品無菌性を確保することである。一般的に使用される保存剤は、ベンジルアルコール、フェノール及びm-クレゾールを含む。保存剤は、小分子の非経口での使用の長い歴史を

50

持っているが、保存剤を含むタンパク質製剤の開発は難度が高い。保存剤は、ほとんどの場合、タンパク質に不安定化作用（凝集）を有し、これは複数回用量タンパク質製剤におけるそれらの使用を制限する主な要因となってきた。現在まで、ほとんどのタンパク質製剤は、単回使用のみのために製剤化されてきた。しかし、複数回投与製剤が可能である場合、それらは、患者の利便性を可能にする追加の利点を有し、市場性を増加させた。良い例は保存製剤の開発が、より便利な、多用途注射ペンの発表の商品化に導いたヒト成長ホルモン（hGH）のものである。hGHの保存製剤を含む少なくとも4つのこのようなペンデバイスは、現在市販されている。Norditropin（液体、Novo Nordisk）、Nutropin AQ（液体、Genentech）& ジェノトロピン（凍結乾燥-デュアルチャンバーカートリッジ、Pharmacia & Upjohn）はフェノールを含むが、Somatropo（Eli Lilly）は、m-クレゾールを用いて製剤化されている。

10

【0280】

保存製剤の製剤化及び開発の間の幾つかの態様を考慮する必要がある。医薬品中の有効保存剤濃度は最適化されなければならない。このことは、タンパク質の安定性を損なうことなく抗菌効果を与える濃度範囲を有する剤形で、所与の保存剤を試験することを必要とする。

【0281】

予想されるように、保存剤を含有する液体製剤の開発は、凍結乾燥製剤より困難である。凍結乾燥製品は、保存剤を用いずに凍結乾燥し、使用時に保存剤含有希釈剤を用いてリモデリングすることができる。これは、保存剤がタンパク質と接触する時間を短縮し、接触に伴う安定性のリスクを著しく最少化する。液体製剤に関しては、保存剤の有効性と安定性は、全製品有効期間（約18～24ヶ月）にわたって維持されなければならない。留意すべき重要な点は、保存剤の有効性は、活性薬剤と全ての賦形剤コンポーネントを含む最終製剤中で示されるべきであるということである。

20

【0282】

OSMR抗原結合タンパク質製剤は、一般に、投与の具体的な経路及び方法、具体的な投与量及び投与頻度、具体的な疾患の具体的な治療に対して、特に生体利用性と持続性の範囲で設計されるであろう。従って、製剤は、経口、経耳、経眼、経直腸、及び経膈を含むがこれらに限定されない任意の好適な経路による送達、並びに、静脈注射及び動脈注射、筋肉内注射、及び皮下注射を含む非経口経路による送達のために、本発明に従って設計することができる。

30

【0283】

医薬組成物が製剤化されたら、それは、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、結晶として、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として、滅菌バイアル中に保存することができる。このような製剤は、すぐに使用できる形態または投与前にリモデリングされる形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで保存することができる。本発明は、単回用量投与単位を生成するためのキットも提供する。本発明のキットは、それぞれ、乾燥タンパク質を有する第1の容器と、水性製剤を有する第2の容器の両方をを含むことができる。本発明の特定の実施形態では、単室型及び多室型プレフィルドシリンジ（例えば、液体シリンジ及び凍結乾燥シリンジ）を含むキットが提供される。

40

【0284】

用いられる治療有効量のOSMR抗原結合タンパク質含有医薬組成物は、例えば、治療の状況や目的に依存する。当業者は、治療のための適切な投与量レベルは、部分的に、送達される分子、OSMR抗原結合タンパク質が使用されていることの表示、投与経路、及び、患者のサイズ（体重、体表面または器官のサイズ）及び／または状態（年齢及び一般的な健康状態）に依存して変化することを理解するであろう。特定の実施形態では、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を滴定し、投与経路を変更することができる。典型的な用量は、上記の要因に応じて、約0.1 µg/kg～約30 mg/kg以上の範囲とすることができる。具体的な実施形態では、用量は、1.0 µg/kg～約20 m

50

g / k g、選択的に 1 0 μ g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、または 1 0 0 μ g / k g ~ 約 5 m g / k g の範囲とすることができる。

【0285】

治療有効量の O S M R 抗原結合タンパク質は、好ましくは、疾患症状の重症度の低下、疾患症状のない期間の頻度や持続時間の増加、または、傷害または疾患の苦痛に起因する障害の防止をもたらす。

【0286】

医薬組成物は、医療デバイスを用いて投与することができる。医薬組成物を投与するための医療デバイスの例は、U. S. Patent Nos. 4, 475, 196; 4, 439, 196; 4, 447, 224; 4, 447, 233; 4, 486, 194; 4, 487, 603; 4, 596, 556; 4, 790, 824; 4, 941, 880; 5, 064, 413; 5, 312, 335; 5, 312, 335; 5, 383, 851; 及び 5, 399, 163, に記載されており、すべて参照により本明細書に組込まれる。

O S M R に連する疾患または障害の診断または治療の方法

【0287】

本発明の O S M R 抗原結合タンパク質は、生物学的サンプル中の O S M R を検出するのに特に有用である。特定の実施形態では、患者から得られた生物学的サンプルは、O S M R 抗原結合タンパク質と接触させられる。次に、O S M R 抗原結合タンパク質への O S M R の結合が、サンプル中の O S M R の存在量または相対量を決定するために検出される。このような方法は、O S M R 抗原結合タンパク質による治療に適している患者を診断または決定するのに有用であり得る。

【0288】

特定の実施形態では、本発明の O S M R 抗原結合タンパク質は、自己免疫障害、炎症性障害、または細胞外マトリックス沈着や再形成に関連する障害を、診断、検出、または治療するのに使用される。

【0289】

これらの障害の治療において、O S M R 抗原結合タンパク質は、破壊のために、免疫系の O S M R - 発現細胞を標的にすることができ、及び／または、O S M R の O S M 及び／または I L - 3 1 との相互作用をブロックすることができる。

【0290】

O S M R - 媒介シグナル伝達に関連する疾患または障害は、本明細書に開示される 1 つ以上の O S M R 抗原結合タンパク質による治療に特に適している。このような障害は、炎症、疼痛、掻痒症、結節性痒疹、皮膚炎、喘息、自己免疫疾患、腫瘍随伴自己免疫疾患、軟骨炎症、線維症（肺線維症及び皮膚線維症を含むが、これらに限定されない）、線維、線維性疾患、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、間質性肺炎、異常なコラーゲン沈着、全身皮膚アミロイドーシス、原発性皮膚アミロイドーシス、ベーチェット疾患、鼻ポリープ症、肝硬変、軟骨分解、骨分解、関節炎、リウマチ性関節炎、若年性関節炎、若年性関節リウマチ、少間接型若年性関節リウマチ、多関節型若年性関節リウマチ、全身型若年性関節リウマチ、若年性強直性脊椎炎、若年腸疾患性リウマチ、若年反応性関節炎、若年性ライター症候群、S E A 症候群（血清陰性、腱付着部症、関節症症候群）、若年皮膚筋炎、若年性乾癬性関節炎、若年性強皮症、若年性全身性エリテマトーデス、若年性血管炎、少関節型関節リウマチ、多関節型リウマチ、全身発症関節リウマチ、強直性脊椎炎、腸疾患性関節炎、反応性関節炎、ライター症候群、S E A 症候群（血清陰性、腱付着部症、関節症症候群）、皮膚筋炎、乾癬性関節炎、強皮症、強皮症性肺疾患、血管炎、脊髄炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、サルコイドーシス、強皮症、硬化症、原発性胆汁硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、逆乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、アテローム性動脈硬化症、狼瘡、ステイル病、全身性エリテマトーデス（S L E）、重症筋無力症、炎症性腸疾患（I B D）、クローン病の疾患、潰瘍性大腸炎、セリアック疾患、多発性硬化症（M S）、喘息、C O P D、鼻副鼻腔炎、ポリープを

伴う副鼻腔炎、好酸球性食道炎、好酸球性気管支炎、気管支炎、ギランバレー疾患、1型糖尿病、甲状腺炎（例えば、グレーブス疾患）、アジソン疾患、レイノー現象、自己免疫性肝炎、GVHD、移植片拒絶反応、腎障害、心血管疾患、感染症、敗血症、HIV感染、外傷、腎臓移植腎症、IgA腎症、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、黄斑変性症、胆道閉鎖症、うっ血性心不全、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、放射線誘導線維症、化学療法誘導性線維症、火傷、外科的外傷、糸球体硬化症、など、を含むが、これらに限定されない。

【0291】

好ましい実施形態では、自己免疫障害、炎症性障害、または障害細胞外マトリックス沈着やリモデリングに関連した障害は、線維症、軟骨分解、関節炎、関節リウマチ、強皮症、強皮症関連間質性肺疾病、特発性肺線維症、肝硬変、乾癬、アトピー性皮膚炎、全身皮膚アミロイドーシス、原発性皮膚アミロイドーシス、炎症、掻痒、炎症、結節性痒疹、及び痛みである。

【0292】

特定の実施形態では、本発明のOSMR抗原結合タンパク質は、癌または腫瘍形成性障害を診断、検出、または治療するために使用される。癌または腫瘍形成性障害の治療において、OSMR抗原結合タンパク質は、破壊のために、免疫系のOSMR-発現細胞を標的にすることができ、及び／または、OSMRのOSM及び／またはIL-31との相互作用をブロックすることができて、それによってOSMR媒介シグナル伝達を低減する。OSM及び／またはIL-31に媒介されるシグナル伝達をブロックするOSMR抗原結合タンパク質は、癌患者における生存率の改善を促進するのに有用であろうと期待されている。OSMR抗原結合タンパク質で診断、検出、または治療され得る癌または腫瘍形成性障害は、一般的固形腫瘍、肺癌、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、子宮内膜癌、腎臓癌、食道癌、膵臓癌、扁平上皮癌、ブドウ膜黒色腫、子宮頸癌、結腸直腸癌、膀胱、脳、膵臓、頭部、頸部、肝臓、白血病、リンパ腫及びホジキン疾患、多発性骨髄腫、黒色腫、胃癌、星状細胞癌、胃、及び肺腺癌を含むが、これらに限定されない。

【0293】

抗原結合タンパク質は、腫瘍の増殖、進行及び／または転移を阻害するために使用することができる。このような阻害は、様々な方法を用いてモニターすることができる。例えば、阻害は、腫瘍サイズの減少及び／または腫瘍内の代謝活性の減少をもたらすことができる。これらのパラメータの両方は、例えば、MRIまたはPETスキャンによって測定することができる。阻害は、壊死、腫瘍細胞死のレベル、及び腫瘍内血管のレベルを確認するために、生検によってもモニターすることができる。転移の程度は、公知の方法を用いてモニターすることができる。

【0294】

本明細書に提供される、任意の及び全ての例、または例示的な言葉（例えば、「など」）の使用は、単に本発明の実施形態さらに明らかにするように意図されており、別途主張されなければ、本発明の範囲を限定するものではない。明細書の用語は、本発明の実施に不可欠なものとして、任意の非請求の要素を示すものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0295】

実際と予測の両方の、以下の実施例は、本発明の具体的な実施形態及び特徴を例示する目的で提供されるものであり、その範囲を限定することを意図したものではない。

実施例1：XENOMOUSE（登録商標）プラットフォームを用いた抗OSMR抗体の産生

【0296】

ヒトOSMRに対して指向する完全ヒト抗体が、XENOMOUSE（登録商標）技術（United States Patent Nos. 6, 114, 598; 6, 162, 963; 6, 833, 268; 7, 049, 426; 7, 064, 244, これは、その全体が参照により本明細書に組込まれる; 及び Green et al., Nat

10

20

30

40

50

ure Genetics 7:13-21, 1994; Mendez et al., Nature Genetics 15:146-56; 1997; Green et al., J. Ex. Med. 188:483-95, 1998; 及び Kellerman et al., Current Opinion in Biotechnology, 13:593-7, 2002) を使用して生成された。

【0297】

OSMRに抗体を生成するために、XENOMOUSE（登録商標）動物の2つの株、すなわち、XMG2-KLとXMG4-KLマウス、が、ヒトOSMR-Fc可溶性タンパク質（Amgen, Seattle, Waによって調製された）で免疫化された。適量の免疫源（すなわち、 $10\mu\text{g}$ /マウスの可溶性ヒトOSMR-Fcタンパク質）が、XENOMOUSE（登録商標）動物の初期免疫化のために、1996年12月3日に出願されたU. S. Patent Application Serial No. 08/759, 620、及び、国際特許出願の、1998年6月11日に公開されたWO 98/24893、及び2000年12月21日に公開されたWO 00/76310に開示された方法に従って、使用された。これらの開示は、参照により本明細書に組込まれる。初回免疫後、免疫原のその後の追加免疫（ $5\mu\text{g}$ /マウスの可溶性ヒトOSMR-Fcタンパク質）が、スケジュールにより、マウスに抗OSMR抗体の適切な力価を誘導するのに必要な期間にわたって投与された。

【0298】

血清を最初の注射後約4週間で回収し、具体的な力価をELISAにより決定した。XENOMOUSE（登録商標）動物を滴定するために使用されたプロトコルは以下の通りであった：コスター3368培地結合プレート（ $8\mu\text{g}/\text{mL}$ （ $50\mu\text{L}$ /ウェル）のニュートラビジンでコーティングし、 $1\times\text{PBS}/0.05\%$ のアジ化物中で 4°C で一晩インキュベートした。プレートは、RO水でタイターテック3サイクル洗浄を用いて洗浄した。プレートは、 $1\times\text{PBS}/1\%$ ミルクの $250\mu\text{L}$ を用いてブロックし、室温で少なくとも30分間インキュベートした。ブロックは、タイターテック3サイクル洗浄を用い、RO水で洗い流した。次いで、 $1\times\text{PBS}/1\%$ ミルク/ 10mM Ca $^{2+}$ （アッセイ希釈液） $50\mu\text{L}$ /ウェル中で、ビオチン化したhuOSMR-FNFH（Amgen, Seattle, WAで調製された）を $2\mu\text{g}/\text{mL}$ で捕捉し、室温で1時間インキュベートした。次いで、タイターテック3サイクル洗浄を用い、RO水で洗浄した。1次抗体に関しては、1:100から2つ組みで、血清を1:3滴定した。アッセイ希釈液 $50\mu\text{L}$ /ウェル中でこれを行い、室温で1時間インキュベートした。次いで、RO水で、タイターテック3サイクル洗浄を使用して洗浄した。2次抗体は、 $50\mu\text{L}$ /ウェルのアッセイ希釈液中の $400\text{ng}/\text{mL}$ のヤギ抗ヒトIgG FcHRPであった。室温で1時間、これをインキュベートした。次いで、RO水で、タイターテック3サイクル洗浄を使用してこれを洗浄し、ペーパータオル上で叩いて乾燥させた。基材に関しては、一工程のTMB溶液（Neogen, Lexington, Kentucky）を使用し（ $50\mu\text{L}$ /ウェル）、室温で30分間展開させた。

【0299】

適切な力価を示す動物が同定された。5XMG2KL動物が、OSMRに特異的なIgG免疫応答で同定された。脾臓及び流入領域リンパ節が、これらの動物から採取され、ハイブリドーマ作製のために一緒にプールされた。特異的な免疫応答を有する5XMG4KL動物が同様に回収され、別々の融合スクリーニングキャンペーンとして進められた。標準的な技術（Kohler et al., Nature 256, 495-7, 1975）を用いてハイブリドーマを生成するために、免疫動物からの濃縮されたB細胞を、非分泌骨髓腫P3x63AG8.653細胞に融合した（（American Type Culture Collection CRL-1580; Kearney et al, J. Immunol. 123:1548-50, 1979））。

【0300】

次いで、ハイブリドーマを96ウェル組織培養プレート上に高密度（ウェルあたり複数

の異なるハイブリドーマクローン)で播種し、4週間増殖させた。ハイブリドーマ株の上清を、蛍光マイクロボリュームアッセイ技術(FMAT)(Applied Biosystems, Foster City, CA)により、一過性にトランスフェクトした293T細胞上に発現した完全長ヒト及びカニクイザルのOSMRに結合するためにスクリーニングした。簡潔には、384ウェルFMATプレート中で、3,000 OSMR 293Tトランスフェクション細胞と15,000親293T細胞の40 μ lの混合物が15 μ Lのハイブリドーマ上清と混合され、10 μ Lの抗ヒト軽鎖(h kappa/h lambda) Alexa647 (Invitrogen, Carlsbad, CA)が二次抗体(1.0 μ g/mLの最終濃度)を標識化した。次いで、プレートを室温で3時間インキュベートし、蛍光を、FMATリーダーを用いて読み取った。これらのスクリーニングは、ヒト及びカニクイザルOSMRに結合する885ハイブリドーマ株を同定した。

10

実施例2:ヒトOSMRブロッキングアッセイ

【0301】

ヒトOSMRを介したシグナル伝達をブロックするOSMR抗体の能力は、リガンドとしてヒトオノコスタチンM(OSM)またはヒトインターロイキン31(IL-31)のいずれかを有する2つのアッセイを用いて決定した。組合せで、そのアッセイは、抗体が、OSM及び/またはIL-31の結合を介してトリガーされたOSMRのシグナル伝達を阻害できるかどうかを決定するのに用いられた。

【0302】

最初のスクリーニングにおいて、抗体は、OSMRを通じてOSMのシグナル伝達をブロックする能力について評価された。OSMによる一次正常ヒト肺線維芽細胞の刺激は、STAT3のリン酸化とその後の核への移行を誘導する。細胞を、Costar 384ウェルプレートにウェルあたり3000細胞で播種し、一晚接着させた。細胞を、20分間抗体上清を用いて前処理し、次いで30分間、80 pMのヒトOSMで刺激した。次いで、細胞をPBSで3回洗浄し、3.5%のホルムアルデヒド溶液で固定し、(PBSTで3回)洗浄し、0.5%トリトンX-100溶液で透過処理した。次いで、細胞を、抗ホスホSTAT3抗体で1時間染色し、洗浄し、AlexaFluorコンジュゲート抗体(すべてCellomicsからのHit Kitに含まれる)で染色した。プレートを覆い、核強度値と細胞質強度値を生成するためのCellomics独自のアルゴリズムを使用して、ArrayScan装置で読み取った。結果は、これら2つの値の間の差として報告され、最大限に刺激した細胞及び培地処理細胞(POC)を含むデータを制御するために、さらに正規化された。

20

30

【0303】

第2のアッセイでは、抗体は、ヒトのIL-31RA4及びOSMRを過剰発現した安定な細胞株において、OSMRを通じてIL-31の増殖シグナルを阻害する能力について評価された。BaF3細胞を2つのプラスミド:p cDNA3.1+huOSMRb(NeoR)とp cDNA3.1+huIL31RA4(ZeoR)で安定的にトランスフェクトした。マウスIl-3の非存在下で、この細胞株は、ヒトIL-31に応答して増殖することができ、従って、特に抗OSMR抗体のブロッキング能力を評価するために使用することができた。BaF3細胞を、ウェルあたり20,000細胞の密度で96ウェルプレートに播種した。抗体及びリガンド(huIL-31、Peprtech)を100 μ Lの最終容量にウェルに加え、プレートを5%CO₂、37℃の加湿チャンバー内で72時間インキュベートした。インキュベーション後、20 μ LのAlamar Blueを各ウェルに加え、プレートをインキュベーターに戻した。プレートは、Alamar Blueの添加後、様々な時点で、Molecular Devices Vmax Plateリーダー(570-600nm)で読み取った。

40

【0304】

2つのアッセイの結果は以下の表4に示されている。3000を超えるハイブリドーマ上清が、これら2つのアッセイにおけるブロッキング能力についてスクリーニングされた

50

；上位 200 のブロッカーが、さらに 4 点滴定で試験され、14 が、組換えタンパク質の産生及びさらなる試験のために選択された。3 つの例示的抗体（抗体 1 ～ 3）の IC50 が、両方のアッセイについて示されている。いくつかの抗体は、それらが IL-31 誘導増殖を阻害するより完全に OSM 誘導 STAT3 移行を阻害し、その逆も同様である。しかし、3 つの抗体はすべて、OSM 及び IL-31 媒介シグナル伝達の強力な阻害剤であった。

【表 4】

表 4

IC50	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	157 pM	252 pM	1.35 nM
IL-31	35.2 pM	27.6 pM	780 pM

10

実施例 3：カニクイザル OSMR ブロッキングアッセイ

【0305】

カニクイザル OSMR を通じてシグナル伝達をブロックする OSMR 抗体の能力を、リガンドとしてヒト OSM またはヒト IL-31 のいずれかを有する 2 つのアッセイを使用して調査した。

【0306】

最初のスクリーニングにおいて、抗体は、一次腎臓上皮細胞株を用いて、カニクイザル OSMR を通じて OSM のシグナル伝達をブロックする能力について評価された。カニクイザル (cyano) OSM によるこれらの細胞の刺激は、STAT3 のリン酸化とその後の核への移行を誘導する。細胞を、Costar 384 ウェルプレートにウェルあたり 3000 細胞で播種し、一晚接着させた。細胞を、20 分間抗体上清を用いて前処理し、次いで 30 分間、80 pM のカニクイザル OSM で刺激した。次いで、細胞を PBS で 3 回洗浄し、3.5 % のホルムアルデヒド溶液で固定し、(PBST で 3 回) 洗浄し、0.5 % トリトン X-100 溶液で透過処理した。次いで、細胞を、抗ホスホ STAT3 抗体で 1 時間染色し、洗浄し、Alexa Fluor コンジュゲート抗体（すべて Cellomics からの Hit Kit に含まれる）で染色した。プレートを覆い、核強度値と細胞質強度値を生成するための Cellomics 独自のアルゴリズムを使用して、Array Scan 装置で読み取った。結果は、これら 2 つの値の間の差として報告され、最大限に刺激した細胞及び培地処理細胞 (POC) を含むデータを制御するために、さらに正規化された。

20

30

【0307】

第 2 のアッセイでは、抗体は、カニクイザルの IL-31 RA 及び OSMR を過剰発現した安定な細胞株において、カニクイザル OSMR を通じて IL-31 の増殖シグナルを阻害する能力について評価された。実施例 2 と同様に、BaF3 細胞を、ウェルあたり 20,000 細胞の密度で 96 ウェルプレートに播種した。抗体及びリガンド（カニクイザル IL-31、社内、すなわち、Amgen, Seattle, WA）を 100 µL の最終容量にウェルに加え、プレートを 5 % CO₂、37 °C の加湿チャンバー内で 72 時間インキュベートした。インキュベーション後、20 µL の Alamar Blue を各ウェルに加え、プレートをインキュベーターに戻した。プレートは、Alamar Blue の添加後、様々な時点で、Molecular Devices Vmax Plateリーダー (570-600 nm) で読み取った。

40

【0308】

2 つのアッセイの結果は、両方のアッセイについて示された各抗体についての IC50 とともに以下の表 5 に示されている。結果は、抗体 1, 2, 及び 3 のそれぞれが OSM- 及び IL-31 媒介シグナル伝達の強力な阻害剤であることを確認する。

50

【表 5】

表 5

IC50	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	1.26 nM	518 pM	1.24 nM
IL-31	225 pM	29.3 pM	6.87 nM

実施例 4：抗 O S M R 抗体のエピトープビニング

【0309】

10

抗体競合試験が、抗 O S M R ゼノマウス抗体のエピトープを特徴づけるために実施された。互いに競合する抗体は、標的上の同じ部位を結合すると考えることができる。これらの実験では、O S M R または関連のない抗体は、捕獲抗体に予め結合された、ストレプトアビジンでコーティングされた Lumine x ビーズ（ビオチン化一価マウス抗ヒト I g G F c 抗体）上に捕獲された。O S M R 抗原または緩衝液（抗原なし）をウェルに加え、プローブ抗体を各ウェルに添加して、P E 標識化した一価マウス抗ヒト I g G F c 抗体を用いて検出した。各ウェルの平均蛍光強度を測定した。完全な参考文献については、J i a e t a l. , J. I m m u n o l . M e t h o d s 288:91-8, 2004 参照。所与のウェルにおける蛍光の検出は、他の O S M R 抗体の存在下でさえ、プローブ抗体は、別々のエピトープに結合していることを実証して、O S M R に結合できること、を示唆した。以下の表 6 に示すように、3 つのビンの最小値が見出された。

20

【表 6】

表 6

ビン 1	Ab4
ビン 2	Ab1, Ab2, Ab3, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12, Ab13
ビン 3	Ab14

30

実施例 5：抗 O S M R 抗体の親和性の決定

【0310】

抗 O S M R 抗体の親和性を決定した。反応速度定数の決定は、人間 O S M R に対する抗体 1 ~ 3 (A b s 1 ~ 3) の相互作用を調査するために実施された。

【0311】

バイオセンサー分析は、C M 5 センサーチップを装備した B i a c o r e 3000 光学バイオセンサーを使用して、(H B S - E P + (1 X) 緩衝系 (10 mM の H E P E S p H 7.4, 150 mM の N a C l , 3.0 mM の E D T A , 0.05 % 界面活性剤 P 20) 中で、25℃で行った。すべての試薬は、注入前に 8℃に保った。ヤギ抗ヒト I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , # 109-005-098) をフローセル 1 及び 2 への標準的アミンカップリングを介してセンサーチップに固定化し (~ 3000 R U) 、その後、エタノールアミンでブロックした。h O S M R . F H を 150 nM のランニングバッファー中で調製し、0.617 nM に 3 倍に希釈した。抗体 1 ~ 3 を、ランニングバッファー中で希釈した (0.25 ~ 0.5 μ g / m L) 。抗体を 10 μ L / 分の流速でフローセル 2 に注入した (15 μ L) 。約 50 R U の抗体が捕獲された。表面を安定化させ (90 秒) 、次いで、各濃度 (150、50.0、16.7、5.56、1.85 及び 0.617) の h O S M R を、会合 (5 分) と解離 (5 分) を観察するために、50 μ L / 分の流速でフローセル 1 及び 2 を通過させた。サンプルを 2 連で及びランダムな順序で実行した。

40

【0312】

50

バッファ検体ブランク（0 nMのhOSMR）を、サンプル注入の前、際中、及び注後に注入した。抗体を、10 μ L／分の流速でフローセル2に注入した（15 μ L）。約50 RUの抗体が捕獲された。表面を安定化させ（90秒）、次いで、各濃度（150 nM）のhOSMRを、会合（5分）と解離（1～2時間）を観察するために、50 μ L／分の流速でフローセル1及び2を通過させた。サンプルは3連で実行した。

【0313】

バッファ検体ブランク（0 nMのhOSMR）を、サンプル注入の前及び注後に注入した。表面を、50 μ L／分の流量で10 mMグリシン（pH 1.5、50 μ L）の2回の注入で再生した。続いて、バッファブランク注入（15秒）を行った

【0314】

データは、Scrubber 2.0ソフトウェアを用いて、以下のように分析した。フローセル2からのデータを、フローセル1からのデータ（ブランク参照）から差し引いた。次いで、参照を差し引いたデータ（2－1）を、最も近い0 nMの濃度データからを差し引いた（二重参照）。解離速度定数（ k_d ）を決定するために、二重参照された長解離データを、1：1結合モデルに適合させた。この解離速度定数は、会合速度定数（ k_a ）と平衡解離定数（ K_d ）を決定するために、二重参照された短解離データを1：1結合モデルに適合させるための固定パラメータとして使用された。

【0315】

試薬はかなり良く挙動し、データ（以下の表7参照）は1：1結合モデルにかなりよく適合する。

【表7】

表7

抗体	抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_d (pM)
Ab1	huOSMR	4.47×10^5	9.95×10^{-5}	221
Ab2	huOSMR	5.50×10^5	1.81×10^{-5}	32.7
Ab3	huOSMR	9.47×10^4	1.02×10^{-4}	1080

実施例6：抗OSMR抗体

【0316】

ヒトOSMRに対して指向する完全ヒト抗体が、上記の実施例1に記載したXENOMOUSE（登録商標）技術を使用して生成された。抗体1、2、及び3のそれぞれがOSM－及びIL－31－媒介シグナル伝達の強力な阻害剤であることが示された。抗体1、2、及び3（すなわち、Ab1、Ab2、及びAb3）の配列を決定し、以下の表8に示す。

10

20

30

【表 8 - 1】

表 8

明細	SEQ ID NO	配列
A b 1 - 重鎖ヌクレオチ ド	3	caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctc agtgaaggtctcctgcaaggtctctggatacaccttcaccagttatgata tcaactgggtgcgacaggccactggacaggggttgagtggatgggatgg atgaaccctaatagttggttaacacagactatgcacagaagttccagggcag agtcaccatgaccaggaacatttcataagcacggcctacattgagctga gcagcctgagatctgaggacacggcgtttattactgtgcgagagatatg gtggctgcaatacggattactacttctactacggtatggacgtctgggg ccaagggaaccaggtcacgctctcctcagctagcaccaaggggcccatcgg tcttccccctggcgccctgtctcaggagcacctccgagagcacagcgcc ctgggtgacctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctg gaactcaggcgctctgaccagcggtgacaccttcccagctgtcctac agtcctcaggactctactcctcagcagcgtgggtgacggtgacctccagc aacttcgggaacccagacctacacctgcaacgtagatcacaaagcccagcaa caccaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttggtgctgagtgccac cgtgcccagcaccacctgtggcaggacgctcagtcttctcttcccccca aaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctg ggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacg tggaaggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagcag ttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttggtgaccagga ctggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcc cagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaa ccacaggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaagaacca ggtcagcctgacctgacctgggtcaaaaggtcttaccacagcgacatcgccg tggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacct cccatgctggactcgaacggtctcttctctctctacagcaagctcacgt ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctctatgctccgtgatgc atgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccg ggtaaa
A b 2 - 重鎖ヌクレオチ ド	4	caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctc agtgaaggtctcctgcaaggtctctggatacaccttcaccagttatgaaa tcaactgggtgcgacaggccactggacaaggggttgagtggatgggatgg atgaaccctaacagtggttacacaggctatgcacagaagttccagggcag agtcaccatgaccaggaacacctccataagcacagcctacatggaaatga gcagcctgagatctgaggacacggcgtgtattactgtgcgagagatata

10

20

30

40

【表 8 - 2】

		gtggctgcgaatacggattactacttctattatggtatggacgtctgggg ccaagggaaccacggtcaccgtctectcagctagcaccaagggccatcg tcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgcc ctgggtgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtctgtg gaactcaggcgctctgaccagcggtgacacacttcccagctgtectac agtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagc aacttcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaa caccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcacac cgtgcccagcaccacctgtgagcaggaccgtcagttctctcttccccca aaacccaaggacacctcatgatctccccggaccctgaggtcagtgctgt ggtggtggacgtgagccacgaagaccccgagggtccagttcaactggtacg tggacggcggtgaggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagcag ttcaacagcaagttccgtgtggtcagcgtctcaccgttgtgcaccagga ctggctgaacggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaaggcctcc cagcccccatcgagaaaaccatctccaaaacaaagggcagccccgagaa ccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaacca ggtcagcctgacctgctggtcacaaggtcttctaccccagcgacatcgccg tggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacacct cccatgctggactccgacggtctcttcttctctctacagcaagctcaccgt ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctctatgctccgtgatgc atgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg ggtaaa	10
A b 3 - 重鎖ヌクレオチ ド	5	cagggttcatctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcctc agtgaagggtctctctgcaaggcttcttggttacacctttaccagctatggt tcagctgggtgacagcagggccctggacaagggttgagtggatgggatgg ctcagcacttacagtggttaacacaaactatgcacagaagctccagggcag agtcacatgaccacagacacatccacgagcagcagctacatggagctga ggagcctgagatctgacgacacggcctgtattactgtgcgagagggaac ttctactactacggtatggacgtctggggccaggggaccacggtcaccgt ctctcagctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgct ccaggagcacctccgagagcagcagcgccctgggtgctctggtcaggac tacttccccgaaccggtgacggtgtctggaactcaggcgctctgaccag cgcggtgcacaccttcccagctgtctacagtcctcaggactctactccc tcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcaacttcggcaccagacctac acctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagt tgagcgcaaatgttgtgtcgagtgcacaccgtgcccagcaccacctgtgg caggaccgtcagttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatg atctccccggacccctgaggtcagtgctggtggtggacgtgagccacga agaccccgagggtccagttcaactggtacgtggacggcggtgaggtgcata atgccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcagcttccgtgtg gtcagcgctctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagta caagtgcagggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaacca	30
			40

【表 8 - 3】

		tctccaaaaccaaagggcagcccgagaaaccacaggtgtacaccctgccc ccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggettctaccccgagcagacatgcctggagtgggagagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggc tccttcttctctacageaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctcctgatgatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctcctgtctcctgggtaaa
A b 1 - 重鎖タンパク質	6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISISTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDM VAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
A b 2 - 重鎖タンパク質	7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGYTGAAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEMSSLRSEDVAVYYCARDI VAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
A b 3 - 重鎖タンパク質	8	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW LSTYSGNTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGN FYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKD YFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV VSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
A b 1 - 重鎖可変領域	9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISISTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDM VAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSS
A b 2 - 重鎖可変領域	10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEWMGW MNPNSGYTGAAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEMSSLRSEDVAVYYCARDI VAANTDYYFYYGMDVWGQGTITVTVSS

10

20

30

40

【表 8 - 4】

A b 3 - 重鎖可変領域	11	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGW LSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGN FYYGMDVWGQGTITVTVSS
A b 1 - 重鎖可変 C D R 1	12	SYDIN
A b 2 - 重鎖可変 C D R 1	13	SYEIN
A b 3 - 重鎖可変 C D R 1	14	SYGIS
A b 1 - 重鎖可変 C D R 2	15	WMNPNSGNTDYAQKFQG
A b 2 - 重鎖可変 C D R 2	16	WMGWMNPNSGYTGYAQKFQG
A b 3 - 重鎖可変 C D R 2	17	WLSTYSGNTNYAQKLQG
A b 1 - 重鎖可変 C D R 3	18	DMVAANTDYYFYYGMDV
A b 2 - 重鎖可変 C D R 3	19	DIVAANTDYYFYYGMDV
A b 3 - 重鎖可変 C D R 3	20	GNFYYGMDV
A b 1 - 軽鎖ヌクレオチ ド	21	cagtctgtgtgactcagccaccctcagcctctgggacccccgggcagag ggtcaccatctcttgttcttggaagcagctccaacgtcggaagtaatactg taagctggtaaccaacagctcccaggaacggccccaaaactcctcatctat actaataatcgggcgccctcgggggtccctgaccgattctcttggtccaa gtctggcaccctcagcctccctggccatcagtgggtccagctctgaggatg aggtctgattatttctgtgcagcgtagatgacagctctgaatggtgtggta ttcggcgaggaggacaaactgaccgtcctaggccaaccgaaagcggcgcc ctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaagg ccacactgggtgtgtctcataagtgaacttctaccggggagccgtgacagtg gcctggaaggcagatagcagcccgctcaaggcgggagtgagaccaccac accctccaaacaaagcaacaacaagtaacggcgccagcagctatctgagcc tgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccaggtcacg catgaaggggagcaccgtggagaagacagtggccctacagaatgttca
A b 2 - 軽鎖ヌクレオチ ド	22	cagtctgtgtgactcagccaccctcagcctctgggacccccgggcagag ggtcaccatctcttgttcttggaagcaactccaacatcggaagtaatactg tcaactggtaaccaccagctcccaggaacggccccaaaactcctcatctat aatattaataagcgccctcagggggtccctgaccgattctcttggtccaa gtctggctcctcagcctccctggccatcagtgggtccagctctgaggatg aggtctgattattactgttcaacatgggatgacagcctggatggtgtggta ttcggcgaggaggacaaagctgaccgtcctaggccaaccgaaagcggcgcc ctcggtcactctgttcccgccctcctctgaggagcttcaagccaacaagg

10

20

30

40

【表 8 - 5】

		ccacactgggtgtgtctcataagtgacttctacccgggagccgtgacagtg gcctggaagcagatagcagcccgctcaaggcgggagtgagaccaccac accctccaaacaaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctgagcc tgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccagggtcacg catgaaggaggacaccggtggagaagacagtgggccctacagaatgttca
A b 3 - 軽鎖ヌクレオチ ド	23	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccagggga aagagccaccctctctctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctact tagcctggtagcagcagaaacctggccagggtcccaggtctctcatcttt ggtgcttccagcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtg gtctgggacagacttcaactctcaccatcagcagactggagcctgaagatt ttgcagtgtattactgtcagcagtatggtagctcgccctccgateaccttc ggccaagggacacgactggagattaaacgtacgggtggctgcaccatctgt cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctg ttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgg aaggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgtcacaga gcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgtga gcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccat cagggcctgagctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgt
A b 1 - 軽鎖タンパク質	24	QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNVGSNTVSWYQQLPGTAPKLLIY TNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAALDDSLNGVV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
A b 2 - 軽鎖タンパク質	25	QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSNSNIGSNTVNWYHQLPGTAPKLLIY NINKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYCSTWDDSLDGVV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
A b 3 - 軽鎖タンパク質	26	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIF GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF GQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
A b 1 - 軽鎖可変	27	QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNVGSNTVSWYQQLPGTAPKLLIY TNNRRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAALDDSLNGVV FGGGTKLTVLG
A b 2 - 軽鎖可変	28	QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSNSNIGSNTVNWYHQLPGTAPKLLIY NINKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYCSTWDDSLDGVV FGGGTKLTVLG
A b 3 - 軽鎖可変	29	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIF GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF GQGRLEIKR

10

20

30

40

【表 8 - 6】

A b 1 - 軽鎖 CDR 1	30	SGSSSNVGSNTVS
A b 2 - 軽鎖 CDR 1	31	SGSNSNIGSNTVN
A b 3 - 軽鎖 CDR 1	32	RASQSVSSSYLA
A b 1 - 軽鎖 CDR 2	33	TNNRRPS
A b 2 - 軽鎖 CDR 2	34	NINKRPS
A b 3 - 軽鎖 CDR 2	35	GASSRAT
A b 1 - 軽鎖 CDR 3	36	AALDDSLNGVV
A b 2 - 軽鎖 CDR 3	37	STWDDSLDGVV
A b 3 - 軽鎖 CDR 3	38	QQYGSSPPIT

10

実施例 7 : 修飾された抗 O S M R 抗体

【0 3 1 7】

A b 1 , A b 2 , 及び A b 3 の修飾バージョンが生成された。抗体のすべての 3 つの修飾された形態では、重鎖の C 末端のリシンを除去した。A b 1 及び A b 2 については、7 3 位のグリコシル化部位を、7 3 位のアスパラギンをアスパラギン酸で置換することによって除去した。これらの変異体は、A b 1 - N 7 3 D 及び A b 2 - N 7 3 D と呼ばれる。修正抗体の配列は、以下の表 9 に記載されている（修飾されたヌクレオチドとアミノ酸は下線が引かれている）。

20

【表 9 - 1】

表 9

明細	SEQ ID NO	配列
A b 1 バージョン 2 - 重鎖 ヌクレオチド (N 7 3 D / C 末端リシン除去)	47	caggtgcagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcct cagtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccagttatga tatcaactgggtgctgacaggccactggacaggggcttgagtggatggga tggtatgaacctaatagtggtaacacagactatgcacagaagttecagg gcagagtcaccatgaccagggaacatttcataagcaacggcctacattga gctgagcagcctgagatctgaggacacggcgctttattactgtgcgaga gatattggtggctgcgaatacggattactacttctactacggtatggacg tctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagctagcaccaaggg cccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagc acagcgccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaacgggtga cggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggtgcacaccttccc agctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtggtagc gtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatc acaageccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgttg tgtegagtgeccaccgtgeccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc tctcttctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccc ctgaggtcacgtgcgtgggtggtagcgtgagccacgaagaccccgaggt ccagttcaactggtagctggacggcggtggaggtgcataatgccaaagaca aagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgctcc tcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcacaa

30

40

【表 9 - 2】

		ggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa accaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccc gggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaagg cttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacacctcccattgctggactccgacggctcct ttttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggg gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac acgcagaagagcctctccctgtctccgggt	10
A b 2 バージョン 2 - 重鎖 ヌクレオチド (N73D/ C 末端リシン除去)	48	caggtgcagctggtgcagctctggggtgaggtgaagaagcctggggcct cagtgaaggctctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccagttatga aatcaactgggtgcgacagggcactggacaagggttgagtggatggga tggatgaaccttaacagtggttacacaggtatgcacagaagttccagg gcagagtcaccatgaccagggaacacctccataagcacagcctacatgga aatgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgcgaga gatatagtggctgcgaatacggattactacttctattatggtatggacg tctggggccaagggaacacggtaaccgtctcctcagctagcaccaaggg cccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagc acagcgccctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaaccggtga cgggtgtcgtggaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctccc agctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc gtgcccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatc acaagcccagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgcgaatgttg tgtcagagtgcceaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgggaccc ctgaggtcacgtgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccccgaggt ccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagaca aagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtgggtcagcgtcc tcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgc aa ggtctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa accaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccc gggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaagg cttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg gagaacaactacaagaccacacctcccattgctggactccgacggctcct ttttctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggg gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac acgcagaagagcctctccctgtctccgggt	20 30 40
A b 3 - 重鎖ヌクレオチド (C 末端リシン除去)	49	caggttcatctggtgcagctctggagctgaggtgaagaagcctggggcct cagtgaaggctctcctgcaaggcttctgggttacacctttaccagctatgg tateagctgggtgcgacagggcctggacaagggttgagtggatggga tggctcagcacttacagtggtaacacaaactatgcacagaagctccagg gcagagtcaccatgaccacagacacatccagagcacagcctacatgga gctgaggagcctgagatctgacgacacggcctgtattactgtgcgaga	

【表 9 - 3】

		gggaacttctactactacggtatggacgtctggggccaggggaccacgg teaccgtctcctcagctagcaccagggeccateggtcttccccctggc gccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgccctgggctgctg gtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtctgtggaactcaggcg ctctgaccagcggtgcacacettcccagctgtcctacagtcctcagg acttactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcaacttcggc acccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagg tggacaagacagttgagcgcaaatgttggtgtcgagtgtccaccgtgccc agcaccacctgtggcaggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccc aaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtgg tggacgtgagccacgaagaccccaggtccagttcaactggtacgtgga cggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttc aacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgttggtgcaccaggact ggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctccc agcccccatcgagaaaaccatctccaaaacaaagggcagccccgagaa ccacaggtgtacacctgcccccatccgggaggagatgaccaagaacc aggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggtttetaccccagcgacatcgc cgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccaca cctcccatgctggactccgaeggtctcttcttctctacagcaagctca ccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctg tctccgggt	10
A b 1 バージョン 2 - 重鎖 タンパク質 (N 7 3 D / C 末端リシン除去)	50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMG WMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRD <u>I</u> SISTAYIELSSLRSED ¹ TAVYYCAR DMVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ² VERKCCVECPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVS ³ VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ⁴ FSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPG	30
A b 2 バージョン 2 - 重鎖 タンパク質 (N 7 3 D / C 末端リシン除去)	51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEWMG WMNPNSGYTG ¹ Y ² AQKFQGRVTMTRD <u>T</u> SISTAYMEMSSLRSED ³ TAVYYCAR DIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ⁴ VERKCCVECPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVS ⁵ VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ⁶ FSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPG	40

【表 9 - 4】

A b 3 パージョン 2 - 重鎖 タンパク質 (C 末端リシン 除去)	52	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG WLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR GNFYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFNG TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
A b 1 パージョン 2 - 重鎖 可変領域 (N 7 3 D / C 末 端リシン除去)	53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDINWVRQATGQGLEWMG WMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTTRDISISTAYIELSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR DMVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
A b 2 パージョン 2 - 重鎖 可変領域 (N 7 3 D / C 末 端リシン除去)	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYEINWVRQATGQGLEWMG WMNPNSGYTGIAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMEMSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR DIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS

10

20

【 0 3 1 8 】

E L I S A 実験を、異なる F c 領域を有する A b 1 または A b 2 の可変領域（または、A b 1 または A b 2 の N 7 3 D 変異体）を含む抗体を使用して、様々なフォーマット（結合力なしのフォーマットのための C a p t u r e E L I S A ; 溶液相のフォーマットのための S a n d w i c h E L I S A ; 固体結合のフォーマットのための D i r e c t E L I S A）で行った。

【 0 3 1 9 】

A b 1 と A b 2 のそれぞれは、ヒト I g G 2 由来の C H 1 , C H 2 , C H 3 ドメインを含む。本明細書で使用する場合、用語「A b 1」と「A b 1 I g G 2 W T」は同じ抗体を指す。同様に、用語「A b 2」と「A b 2 I g G 2 W T」は同じ抗体を指す。

30

【 0 3 2 0 】

「I g G 4 P a g l y / I g G 1」として同定された抗体は、シャッフルを減らすための S e r から P r o への（228 位での）変異を有する、ヒト I g G 4 からの C H 1 ドメイン、ヒト I g G 4 からのヒンジ、N-結合グリコシル化部位を除去するための A s n から G l n への（297 位での）変異を有する、ヒト I g G 4 からの C H 2 ドメイン、及び、ヒト I g G 1 からの C H 3 ドメイン、に融合した A b 1 または A b 2 の可変領域（またはの A b 1 または A b 2 の N 7 3 D 変異体）を含む。「I g G 4 P a g l y / I g G 1」のフレームワークは、米国公開特許出願番号 U S 2 0 1 2 / 0 1 0 0 1 4 0 に記載されている。

【 0 3 2 1 】

E L I S A の結果は、N 7 3 D 置換を介したグリコシル化部位の除去は、O S M R への修飾抗体の結合に影響を及ぼさないことを示した。表 1 0 参照。

40

【表 10】

表 10

抗体	Capture (EC50) nM	Sandwich (EC50) nM	Direct (EC50) nM
Ab1 IgG2 WT	10.2	0.581	0.184
Ab1 N73D IgG2	4.85	0.359	0.0728
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	2.86	0.05	0.0626
Ab2 IgG2 WT	3.63	0.366	0.182
Ab2 N73D IgG2	5.49	0.343	0.179
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	1.61	0.064	0.0558

10

【0322】

B I A コア法を用いて結合研究を行った。異なる F c 領域を有する A b 1 または A b 2 の可変領域（または、A b 1 または A b 2 の N 7 3 D 変異体）を含む抗体を、製造者のプロトコルに従って C M 4 チップ（G E l i f e s c i e n c e s）上に固定化した。検体として、可溶性 O S M R を使用した。N 7 3 D 置換経路の A b 1 及び A b 2 の上のグリコシル化部位の除去は、結合親和性を改善した。A b 1 については、置換は K o n 速度を改善し、一方、A b 2 については、置換は K o f f 速度を改善した。表 11 参照。

20

【表 11】

表 11

抗体	Kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff (1/s)	KD (M)
Ab1 IgG2 WT	1.64E+05	1.50E-04	0.913E-9
Ab1 N73D IgG2	2.49E+05	1.68E-04	0.675E-9
Ab2 IgG2 WT	1.88E+05	1.89E-04	1.01E-09
Ab2 N73D IgG2	1.73E+05	4.99E-05	0.289E-9

30

【0323】

F a b フラグメントの安定性を、抗体のアンフォールディング温度を評価することによって決定した。F a b フラグメントの高い融解温度が増加した安定性に直接相関する。N 7 3 D 置換経路の A b 2 上のグリコシル化部位の除去は、示差走査蛍光定量実験によって評価されるように、F a b フラグメントの熱安定性に影響を与えず、A b 1 への小さな効果を示した。表 12 参照。

40

【表 1 2】

表 1 2

抗体	Fab Tm (セ氏)	標準誤差(セ氏)
Ab1 IgG2 WT	73.24	0.0097
Ab1 N73D IgG2	71.21	0.005
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	74.23	0.014
Ab2 IgG2 WT	76.71	0.0096
Ab2 N73D IgG2	76.54	0.14
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	76.69	0.018

10

【0 3 2 4】

ヒト O S M R を介してシグナル伝達をブロックする修飾された抗 O S M R 抗体の能力を評価した。修正された抗体は、I L 3 1, O S M, 又は I L 3 1 及び O S M の存在下で、B a F _ h u - I L 3 1 R / O S M R / g p 1 3 0 の細胞株の増殖を阻害する能力について評価された。結果は、示された各抗体に対する I C 5 0 とともに、下記の表 1 3 及び 1 4 に示す。結果は、A b 1 及び A b 2 の修飾バージョンは、O S M - 及び I L - 3 1 - 媒介のシグナル伝達の強力な阻害剤であることを確認する。

20

【表 1 3】

表 1 3

抗体	IL31 (IC50)	OSM (IC50)	IL31/OSM (IC50)
Ab2	0.3828	0.3528	~1.9
Ab1 IgG2 WT	0.6691	0.5298	4.004
Ab1 N73D IgG2	0.7565	0.5226	3.702
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	0.4672	0.5657	3.080

30

【表 1 4】

表 1 4

抗体	IL31 (IC50)	OSM (IC50)	IL31/OSM (IC50)
Ab2	0.4426	0.4019	1.8
Ab2 IgG2 WT	0.3671	0.4758	2.049
Ab2 N73D IgG2	0.2191	0.1859	1.474
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	0.2838	0.2401	1.276

10

【0 3 2 5】

本開示は、本開示の実施のための具体的な様式を含むように発見されたまたは提案された特定の実施形態の形で記載されている。記載された発明の様々な修正及び変更が、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明は、具体的な実施形態に関連して説明されているが、特許請求の範囲に記載の発明は、そのような具体的な実施形態に不当に限定されるべきではないことが理解すべきである。実際、関連分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための記載された様式の様々な修正は、以下の特許請求の範囲内にいることが意図されている。

20

【配列表】

2017140056000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ヘザー エー. アーネット

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 9 9, シアトル, 2 5 ティーエイチ アベニュー ダブリュー. 3 0 2 9

(72)発明者 サビーネ エス. エスコバー

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 7 5, サマミッシュ, エスイー, イー. ビーバーレイク ドライブ 1 7 0 7

(72)発明者 チャドウィック ティー. キング

カナダ国 ブイ7エル 3 ティー5 プリティッシュ コロンビア, ノース バンクーバー, ムーディー アベニュー 1 3 2 5

(72)発明者 アイ チン リム

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 4 0, マーサー アイランド, エスイー, 8 2 エスデュー アベニュー 7 1 0 5

(72)発明者 サラバナクマール ナラヤナン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックライン, センター ストリート 7 0, ナンバー1シー

(72)発明者 ポール ヘンリー ワインレブ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 3, ウェストン, ポストン ポスト ロード 1 3 3

(72)発明者 ネルス エリック ペダーソン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 0 4 8, マンズフィールド, パティーズ ロード 7 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01

4B065 AA92X AB01 CA25 CA44

4C085 AA14 BB41 BB43 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017140056000001.pdf