

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5571567号
(P5571567)

(45) 発行日 平成26年8月13日 (2014. 8. 13)

(24) 登録日 平成26年7月4日 (2014. 7. 4)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	16/28	(2006. 01)	C O 7 K	16/28	
C 1 2 P	21/08	(2006. 01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19	

請求項の数 14 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-538920 (P2010-538920)
 (86) (22) 出願日 平成20年12月19日 (2008. 12. 19)
 (65) 公表番号 特表2011-508592 (P2011-508592A)
 (43) 公表日 平成23年3月17日 (2011. 3. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/051212
 (87) 国際公開番号 W02009/081201
 (87) 国際公開日 平成21年7月2日 (2009. 7. 2)
 審査請求日 平成23年12月15日 (2011. 12. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/015, 869
 (32) 優先日 平成19年12月21日 (2007. 12. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506042265
 メディミューン リミテッド
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ
 ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ
 ランタ パーク, ミルステイン ビルディ
 ング
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-4受容体 α (IL-4R α) - 173に対する結合メンバー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトインターロイキン-4受容体 (hIL-4R)に対する単離された抗体又はそのフラグメント、ここで該抗体又はそのフラグメントはカニクイザルインターロイキン-4受容体 (cyIL-4R)に結合することもでき、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、

HCDR1が配列番号193のアミノ酸配列を有し、
 HCDR2が配列番号194のアミノ酸配列を有し、
 HCDR3が配列番号195のアミノ酸配列を有し、
 LCDR1が配列番号198のアミノ酸配列を有し、
 LCDR2が配列番号199のアミノ酸配列を有し、かつ
 LCDR3が配列番号200のアミノ酸配列を有するもの、

または

HCDR1が配列番号363のアミノ酸配列を有し、
 HCDR2が配列番号364のアミノ酸配列を有し、
 HCDR3が配列番号365のアミノ酸配列を有し、
 LCDR1が配列番号368のアミノ酸配列を有し、
 LCDR2が配列番号369のアミノ酸配列を有し、かつ
 LCDR3が配列番号370のアミノ酸配列を有するもの、

または

HCDR1が配列番号233のアミノ酸配列を有し、
HCDR2が配列番号234のアミノ酸配列を有し、
HCDR3が配列番号235のアミノ酸配列を有し、
LCDR1が配列番号238のアミノ酸配列を有し、
LCDR2が配列番号239のアミノ酸配列を有し、かつ
LCDR3が配列番号240のアミノ酸配列を有するもの、
である。

【請求項 2】

抗体がIgG1、IgG2およびIgG4分子から選択される抗体分子である、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 3】

抗体がVHドメインを有する単離されたヒト抗体であり、該VHドメインがヒト生殖細胞系列フレームワークVh1_DP-7_ (1-46)を含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 4】

VLドメインを含み、該VLドメインがヒト生殖細胞系列フレームワークV 1_DPL5を含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 5】

配列番号192のVHドメイン及び／又は配列番号197のVLドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 6】

配列番号232のVHドメイン及び／又は配列番号237のVLドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 7】

配列番号422のVHドメイン及び／又は配列番号427のVLドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 8】

配列番号432のVHドメイン及び／又は配列番号436のVLドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 9】

配列番号362のVHドメイン及び／又は配列番号367のVLドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 10】

配列番号442のVHドメイン及び／又は配列番号447のVLドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体又はそのフラグメント。

【請求項 11】

請求項1～10のいずれか1項記載の単離された抗体もしくはそのフラグメントおよび製薬上許容される添加剤を含む組成物。

【請求項 12】

IL-4R に関連する疾患の治療に使用するための、請求項 11 記載の組成物、ここで該疾患はアレルギー、喘息、気管支炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、炎症性腸疾患、線維性疾患、アレルギー、移植片拒絶反応、遅延型過敏症もしくは接触過敏症反応の1以上である前記組成物。

【請求項 13】

請求項 1～10のいずれか1項記載の抗体若しくはそのフラグメントまたは該抗体もしくはそのフラグメントの単離されたVHもしくはVLドメインをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 14】

請求項 13 記載の核酸により形質転換されたin vitroの宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターロイキン-4受容体（IL-4R、またCD124とも称される）に対する結合メンバー、特に抗体分子、ならびに、それらの治療への使用、たとえば、IL-4R、IL-4および/またはIL-13と関係のある疾患の治療もしくは予防への使用に関するが、そうした疾患の例としては喘息およびCOPDがある。

【背景技術】

【0002】

ヒトIL-4Rサブユニット（Swiss Protアクセッション番号P24394）は、ヒトIL-4と高い親和性で結合する140kDaの1型膜タンパク質である（Andrews et al J. Biol. Chem (2002) 277:46073-46078）。IL-4/IL-4R複合体は、IL-4上のドメインを介して、共通鎖（ α 、CD132）またはIL-13R α 1サブユニットのいずれかと二量体を形成し、2つの異なるシグナル伝達複合体を生成することができ、これらはそれぞれI型およびII型受容体と呼ばれる。また、IL-13はIL-13R α 1と結合して、IL-13/IL-13R α 1複合体を形成することができるが、これはIL-4RサブユニットをリクルートしてII型受容体複合体を形成する。したがって、IL-4RはIL-4およびIL-13のいずれの生物活性にも介在する（Gessnerら、Immunobiology, 201:285, 2000で概説されている）。in vitroでの研究から、IL-4およびIL-13は、数多くの細胞型、たとえば、T細胞、B細胞、好酸球、マスト細胞、好塩基球、気道平滑筋細胞、呼吸上皮細胞、肺線維芽細胞、および内皮細胞においてエフェクター機能を活性化することが明らかとなっている（Steinkeら、Resp Res, 2:66, 2001、およびWillis-Karp, Immunol Rev, 202:175, 2004で概説されている）。

【0003】

IL-4は、たとえば、末梢血T細胞、単球、気道上皮細胞、B細胞および肺線維芽細胞などのさまざまな細胞型で、少数（100-5000分子/細胞）が発現される。I型受容体は造血細胞で優位を占めるが、II型受容体は、造血細胞および非造血細胞のいずれでも発現される。

【0004】

ヒト個体群においてIL-4Rの多型が報告されており（Gessnerら、Immunobiology, 201:285, 2000で概説されている）、IgEレベルもしくは臨床的アトピーとの関連性が、一部の個体群で報告されている。たとえば、V75R576 IL-4Rは、アレルギー性喘息、ならびにIL-4R機能の強化に関与する（Rismaら、J. Immunol. 169(3):1604-1610, 2002）。

【0005】

いくつかの証拠が、喘息の病理においてIL-4/IL-13経路の果たす重要な役割を裏付けている（Chatila, Trends in Molecular Med, 10:493, 2004で概説される）が、本明細書の他所に記載のさまざまな他の疾患においてもその重要な役割が立証されている。IL-4およびIL-13の分泌の増加は、疾病の経過を開始させ、かつ維持すると考えられている。IL-13は、気道過敏症（AHR）、粘液過分泌、および気道リモデリングの誘発において支配的なパートナーであると考えられる一方、IL-4はTh2極性化およびIgE産生の主要な誘導因子であることが示唆されている（Wynn, Annu Rev Immunol, 21: 425, 2003）。

【0006】

喘息におけるIL-4Rの役割は、疾病の動物モデルから得られる証拠によってさらに裏付けられる。オボアルブミン（OVA、モデルアレルゲン）によるアレルゲンチャレンジ中に、機能的なマウスIL-4R拮抗薬（IL-4変異体；C118欠失）を投与すると、あらかじめOVAで感作されたマウスにおいて、アレルギー性気道好酸球増多、およびAHRの進行が抑制された（Tomkinsonら、J. Immunol. 166(9):5792-5800, 2001）。その上、多くのin vivo研究によって、喘息の動物モデルにおいて、IL-13もしくはIL-4のいずれかをブロックすることのプラス効果を実証されている。たとえば、OVAで誘発された持続性気道炎症の慢性モデルにおいて抗IL-13 mAbを治療投与すると、AHRが抑制され、上皮下の線維症および炎症の進行が止まり、粘液過形成は基底レベルにまで回復する（Yangら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 313(1):8-15, 2005）。マウスOVAモデルにおいて、抗IL-4抗体によるIL-4の阻害は、免疫化中に投与されたとき、好酸球浸潤の著しい減少を示した（Coyleら、Am J Re

sp Cell Mol Biol, 13:54, 1995)。同様のモデルにおいて、IL-4欠損マウスは、OVAチャレンジ後に、気管支肺胞内の好酸球の数がかなり少なく、気管支周囲の炎症は非常に小さかった (Brusselleら、Clin Exp Allergy, 24:73, 1994)。

【 0 0 0 7 】

ヒトでは、フェーズIIa研究から、IL-4R 拮抗薬 (いわゆるIL-4変異タンパク質) がアレルゲン誘発の遅発性喘息反応を低下させ、喘息患者の肺の安静時炎症状態を軽減することが明らかになった (Wenzelら、Lancet, 370:1422, 2007)。こうしたヒトのデータは、IL-4R 拮抗薬が喘息に関して臨床の有用性を提供しようという考えをさらに補強する。

【 0 0 0 8 】

IL-4R は、それが喘息に果たす役割に加えて、いくつかの他の病理、たとえば下記、
にも関連している：

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、さまざまな程度の慢性気管支炎、末梢気道疾患および気腫を有する患者集団を包含しており、喘息を基準とする現在の治療にほとんど反応しない、進行性不可逆の肺機能低下を特徴とする。COPDの根本的な原因は、いまだにほとんどわかっていない。「オランダ仮説」は、COPDと喘息に共通する易罹患性があり、したがって、類似の機序が双方の疾患の病因に関与する可能性があることを提示する (Sluiterら、Eur Respir J, 4(4): p. 479-89, 1991)。Zhengら (J Clin Invest, 106(9):1081-93, 2000) は、マウスの肺でIL-13の過剰発現が、気腫、粘液生成の上昇、および炎症を引き起こすことを実証したが、これはヒトCOPDの特徴を示している。さらに、アレルギー性炎症のマウスモデルにおいて、IL-13依存性の反応であるAHRは、喫煙者の肺機能低下の前兆となることが明らかになっている (Tashkinら、Am J Respir Crit Care Med, 153(6 Pt 1):1802-11, 1996)。IL-13プロモーター多型とCOPDの発症しやすさとの間にも関連性が立証されている (Van Der Pouw Kraanら、Genes Immun, 3(7): 436-9, 2002)。したがって、こうした証拠からIL-4/IL-13経路、特にIL-13がCOPDの病因に重要な役割を果たしているということとなる。

【 0 0 0 9 】

IL-13は、炎症性腸疾患の病因に関与している可能性がある。Hellerら (Heller et al., Immunity, 17(5):629-38, 2002) は、可溶性IL-13R 2の投与によるIL-13の中和が、ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルにおいて、大腸炎症を改善することを報告している。これに対して、IL-13の発現は、対照と比較して、潰瘍性大腸炎患者から得られた直腸生検標本のほうが高い (Inoueら、Am J Gastroenterol, 94(9):2441-6, 1999)。

【 0 0 1 0 】

喘息の他に、IL-4/IL-13経路は、全身性硬化症 (Hasegawaら、J Rheumatol, 24(2):328-32, 1997)、肺線維症 (Hancockら、Am J Respir Cell Mol Biol, 18(1): 60-5, 1998)、寄生虫による肝線維症 (Fallonら、J Immunol, 164(5): 2585-91, 2000; Chiaramonteら、J Clin Invest, 104(6): 777-85, 1999; Chiaramonte Hepatology 34(2):273-82, 2001)、および嚢胞性線維症 (Hauberら、J. Cyst Fibr, 2:189, 2003) のような、他の線維性疾患とつながりがあるとされてきた。

【 0 0 1 1 】

IL-4は、そしてIL-13もある程度までは、B細胞仲介性活性、たとえばB細胞増殖、免疫グロブリン分泌およびFc Rの発現にきわめて重要である。IL-4R 阻害薬の臨床応用用途としては、たとえば、IgE合成を抑制するアレルギー治療への使用 (たとえばアトピー性皮膚炎および食物アレルギーを含む)、移植片拒絶反応を予防するための移植治療への使用、ならびに遅延型過敏もしくは接触過敏反応の抑制が挙げられる。

【 0 0 1 2 】

IL-4R拮抗薬は、アレルギー免疫治療のアジュバントとして、またワクチンアジュバントとしての使用も考えられる。

【 0 0 1 3 】

IL-4R に対する抗体は報告されている。中和マウス抗IL-4R モノクローナル抗体MAB230 (クローン25463) およびI6146 (クローン25463.11) の二つの例があり、これらはそれ

10

20

30

40

50

ぞれR&D Systems (Minneapolis, MN)およびSigma (St Louis, MO)から供給される。これらの抗体は、IgG2aサブタイプに属し、精製組換えヒトIL-4R (バキュロウイルス由来)で免疫されたマウスから作製されたマウスハイブリドーマから産生された。他に2つの中和マウス抗IL-4R 抗体M57およびX2/45-12がそれぞれ、BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) および eBioscience (San Diego, CA)から供給される。これらはIgG1抗体であって、やはり組換え可溶性IL-4R で免疫化されたマウスから作製されたマウスハイブリドーマによって産生される。

【 0 0 1 4 】

完全にヒト型の抗体は、マウス抗体もしくはキメラ抗体よりすぐれた臨床的有用性を有する可能性が高い。これは、多くの場合マウス免疫グロブリンのFc部分に対するヒト抗マウス抗体 (HAMA) が産生されて、結果的に迅速除去を招き、しかもアナフィラキシー反応が起こりうるためである (Brochierら、Int. J. Immunopharm., 17:41-48, 1995)。キメラ抗体 (マウス可変領域およびヒト定常領域) は、マウスmAbよりも免疫原性が低い、ヒト抗キメラ抗体 (HACA) 応答は報告されている (BellおよびKamm, Aliment. Pharmacol. Ther., 14:501-514, 2000)。

【 0 0 1 5 】

WO 01/92340 (Immunex)は、可溶性IL-4Rペプチドによるトランスジェニックマウスの免疫化、ならびにIL-4Rに対する抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株の作製を含む手順によって作製された、IL-4受容体に対するヒトモノクローナル抗体を記載しているが、主な抗体12B5は、IgG1抗体であって、完全にヒト型であると開示されている。WO 05/047331 (Immunex)は、VH領域のオリゴヌクレオチド変異によって12B5 (H1L1と改称) から生じる他の抗体を開示する。変異したVH鎖はそれぞれ、6つの別個のVL鎖の1つと対をなし、抗体分子の小レパートリーを作っていた。

【 0 0 1 6 】

WO 07/082068 (Aerovance)は、R121DおよびY124Dの置換を有する変異型ヒトIL-4タンパク質を投与することを含んでなる、喘息を治療する方法を開示する。その明細書は、医薬組成物において投与されるこのようなIL-4変異タンパク質が野生型huIL-4および野生型huIL-13と受容体との結合に拮抗しうることを示している。

【 0 0 1 7 】

WO 08/054606 (Regeneron)は、ヒト抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウスで産生された、ヒトIL-4Rに対する特定の抗体を開示する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 8 】

【 特許文献 1 】 国際公開第01/92340号パンフレット

【 特許文献 2 】 国際公開第05/047331号パンフレット

【 特許文献 3 】 国際公開第07/082068号パンフレット

【 特許文献 4 】 国際公開第08/054606号パンフレット

【 非特許文献 】

【 0 0 1 9 】

【 非特許文献 1 】 Andrews et al J. Biol. Chem (2002) 277:46073-46078

【 非特許文献 2 】 Gessner ら、Immunobiology, 201:285, 2000

【 非特許文献 3 】 Steinkeら、Resp Res, 2:66, 2001

【 非特許文献 4 】 Willis-Karp, Immunol Rev, 202:175, 2004

【 非特許文献 5 】 Gessnerら、Immunobiology, 201:285, 2000

【 非特許文献 6 】 Rismaら、J. Immunol. 169(3):1604-1610, 2002

【 非特許文献 7 】 Chatila, Trends in Molecular Med, 10:493, 2004

【 非特許文献 8 】 Wynn, Annu Rev Immunol, 21: 425, 2003

【 非特許文献 9 】 Tomkinsonら、J. Immunol. 166(9):5792-5800, 2001

【 非特許文献 1 0 】 Yangら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 313(1):8-15, 2005

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 1】Coyleら、Am J Resp Cell Mol Biol, 13:54, 1995
【非特許文献 1 2】Brusselleら、Clin Exp Allergy, 24:73, 1994
【非特許文献 1 3】Wenzelら、Lancet, 370:1422, 2007
【非特許文献 1 4】Sluiterら、Eur Respir J, 4(4): p. 479-89, 1991
【非特許文献 1 5】Zhengら、J Clin Invest, 106(9):1081-93, 2000
【非特許文献 1 6】Tashkinら、Am J Respir Crit Care Med, 153(6 Pt 1):1802-11, 199

6

- 【非特許文献 1 7】Van Der Pouw Kraanら、Genes Immun, 3(7): 436-9, 2002
【非特許文献 1 8】Heller et al., Immunity, 17(5):629-38, 2002
【非特許文献 1 9】Inoueら、Am J Gastroenterol, 94(9):2441-6, 1999
【非特許文献 2 0】Hasegawaら、J Rheumatol, 24(2):328-32, 1997
【非特許文献 2 1】Hancockら、Am J Respir Cell Mol Biol, 18(1): 60-5, 1998
【非特許文献 2 2】Fallonら、J Immunol, 164(5): 2585-91, 2000
【非特許文献 2 3】Chiaramonteら、J Clin Invest, 104(6): 777-85, 1999
【非特許文献 2 4】Chiaramonte, Hepatology 34(2):273-82, 2001
【非特許文献 2 5】Hauberら、J. Cyst Fibr, 2:189, 2003
【非特許文献 2 6】Brochierら、Int. J. Immunopharm., 17:41-48, 1995
【非特許文献 2 7】BellおよびKamm, Aliment. Pharmacol. Ther., 14:501-514, 2000
【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

20

【0020】

他種たとえばカニクイザル起源のオルソロガスタンパク質に対しても交差反応性を示す、ヒトIL-4R に対する抗体の発見および開発には利点および恩恵がある。このような抗体は、in vivoでの薬理および安全性に関して、その抗体の特性解析を容易にすることができる。他種に対する能力もしくは親和性は、ヒト活性とは、たとえば10倍未満ほど異なるが、そのような評価には適しているといえる。しかしながら、ヒトIL-4R タンパク質は、チンパンジー以外の他種由来オルソロガスIL-4R タンパク質に対しては、比較的わずかな類似性しか示さない。したがって、安全性および毒性評価に好適であると広く認められた種に対して交差反応性を有する、臨床用途に適した親和性および能力の高い抗体を発見することは、非常に取り組みがいのあることである。

30

【課題を解決するための手段】

【0021】

適切にデザインされた選抜法およびアッセイを通じて、本発明者らは、ヒトおよびカニクイザルIL-4R の生物活性を阻害する、IL-4R に対する結合メンバーを開発した。

【0022】

実施例に詳述するように、最初のリード化合物の同定プログラムから、本発明者らは、カニクイザルIL-4R に対しても、弱いがある程度の結合および機能的中和を示す、ヒトIL-4R に対する1つの抗体分子を選択した。この親抗体分子から、標的変異誘発およびランダム変異誘発の計画的かつ明確なプロセスを行い、変異体をさらに選択した後、特性が大きく改善された、大規模な抗体分子パネルが開発された。親抗体（抗体1）および最適化抗体の相補性決定領域（CDR）を含めたVHおよびVL領域を、図1、2、3および4に示す。これらの抗体分子、VH、VL、CDR、およびそのCDRのうち1つもしくは複数を含んでなる結合メンバーが、本発明の態様をなしている。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】抗体1に対する抗体2-42のVHドメインのアラインメントを示す（シートaおよびbに分かれている）。

【図1B】抗体1に対する抗体2-42のVHドメインのアラインメントを示す（シートaおよびbに分かれている）。

【図2A】抗体1に対する抗体2-42のVLドメインのアラインメントを示す（シートaおよび

50

bに分かれている)。

【図2B】抗体1に対する抗体2-42のVLドメインのアラインメントを示す(シートaおよびbに分かれている)。

【図3A】抗体20に対する抗体1-19および21-42のVHドメインのアラインメントを示す(シートaおよびbに分かれている)。

【図3B】抗体20に対する抗体1-19および21-42のVHドメインのアラインメントを示す(シートaおよびbに分かれている)。

【図4A】抗体20に対する抗体1-19および21-42のVLドメインのアラインメントを示す(シートaおよびbに分かれている)。

【図4B】抗体20に対する抗体1-19および21-42のVLドメインのアラインメントを示す(シートaおよびbに分かれている)。

10

【図5A】6xCDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図5B】6xCDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図5C】6xCDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図6A】3xVH CDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図6B】3xVH CDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図6C】3xVH CDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図7A】3xVL CDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図7B】3xVL CDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

【図7C】3xVL CDRに関する配列同一性の表である(a、bおよびcに分かれている)。

20

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の結合メンバーは、野生型IL-4R のほかに、一般的なヒトバリエーションである175 V IL-4R と結合することが明らかになった。

【0025】

IL-4R の生物学的効果を強力に中和し、IL-4R と高い親和性で結合し、IL-4およびIL-13によって誘導されるシグナル伝達を阻害する結合メンバーが本明細書記載されている。注目すべきことには、結合メンバーは、高親和性複合体、たとえばIL-4:IL-4R : c、IL-4:IL-4R : IL-13R 1、IL-13:IL-13R 1:IL-4R からのシグナル伝達を阻害する。こうした作用は、IL-4およびIL-13のシグナル伝達をいずれも妨げる。加えて、データは、結合メンバーがIL-4R 1型および2型複合体の相互作用およびシグナル伝達を阻害することを示している。結合メンバーの上記およびその他の特性および効果は、以下に、より詳細に記載する。

30

【0026】

結合メンバーは、IL-4R 、IL-4またはIL-13が発現される疾患、たとえば、喘息もしくはCOPDなどの、本明細書の他の箇所而言及される1つまたは複数のIL-4R 、IL-4またはIL-13関連疾患を治療するのに有用である。

【0027】

本明細書の他の箇所に記載のように、IL-4R に対する結合メンバーの結合は、表面プラズモン共鳴、たとえばBIAcoreを用いて測定することができる。

40

【0028】

表面プラズモン共鳴データを、1:1 ラングミュア(Langmuir)結合モデルに当てはめることができ(同時Ka Kd)、親和性定数KDは速度定数比kd1/ka1から計算することができる。本発明の結合メンバーは、20nM未満の、ヒトIL-4R と結合するための1価の親和性を有する。他の実施形態において、ヒトIL-4R と結合するための1価の親和性は、10nM未満、たとえば、8nM未満、5nM未満である。他の実施形態において、結合メンバーはカニクイザルIL-4R と結合する。ある実施形態において、本発明の結合メンバーは、0.05から12nMの範囲の、ヒトIL-4R と結合するための1価の親和性を有する。ある実施形態において、本発明の結合メンバーは、0.1から5nMの範囲の、ヒトIL-4R と結合するための1価の親和性を有する。ある実施形態において、本発明の結合メンバーは、0.1から2nMの範囲

50

の、ヒトIL-4R と結合するための1価の親和性を有する。

【0029】

ある実施形態において、本発明の結合メンバーは、ヒトIL-4R と免疫特異的に結合することができ、その親和性(KD)は、本明細書に記載の、または当業者に周知の方法(たとえば、BIAcoreアッセイ、ELISA)(Biacore International AB, Uppsala, Sweden)によって評価されるように、5000 pM未満、4000 pM未満、3000 pM未満、2500 pM未満、2000 pM未満、1500 pM未満、1000 pM未満、750 pM未満、500 pM未満、250 pM未満、200 pM未満、150 pM未満、100 pM未満、75 pM未満でありうる。

【0030】

特定の実施形態において、本発明の結合メンバーは、ヒトIL-4R と免疫特異的に結合することができ、その親和性(KD)は、本明細書に記載の方法、または当業者に知られている方法(たとえば、BIAcoreアッセイ、ELISA)を用いて評価されるように、25から5000 pMまで、25から4000 pMまで、25から3500 pMまで、25から3000 pMまで、25から2500 pMまで、25から2000 pMまで、25から1500 pMまで、25から1000 pMまで、25から750 pMまで、25から500 pMまで、25から250 pMまで、25から100 pMまで、25から75 pMまで、25から50 pMまででありうる。別の実施形態において、本発明の抗IL-4R 結合メンバー(抗体を含む)は、ヒトIL-4R と免疫特異的に結合することができ、その親和性(KD)は、本明細書に記載の方法、または当業者に知られている方法(たとえば、BIAcoreアッセイ、ELISA)を用いて評価されるように、500 pM、100 pM、75 pMまたは50 pMでありうる。

【0031】

実施例においてより詳細に説明するように、本発明の結合メンバーは、高い能力でIL-4R を中和する。中和とは、IL-4R を介した生物活性の阻害を意味する。本発明の結合メンバーは、IL-4R を介した1つまたは複数の活性を中和することができる。生物活性の阻害は、おそらく、IL-4R が 鎖(もしくはIL-13R)および関連する可溶性リガンド、たとえばIL-4もしくはIL-13のいずれか1つとともに、シグナル伝達複合体を形成するのを妨げることによってもたらされる。

【0032】

IL-4R 含有受容体複合体による、IL-4もしくはIL-13のシグナル伝達の中和は、IL-4もしくはIL-13刺激TF-1細胞増殖の阻害によって測定することができる。

【0033】

本発明の抗体が結合するヒトIL-4R のエピトープの位置は、変異誘発とドメインスワッピングを組み合わせて決定された。全ドメインスワップキメラから、エピトープの位置がヒトIL-4R のドメイン1(D1)(残基M1-E119)に限定された。ヒトIL-4R は5つのループ領域を含有するが、その領域は結晶構造においてIL-4にきわめて接近している(Hagerら、Cell 97:271-281, 1999)。ループスワップキメラによって、本発明の抗体が結合するヒトIL-4R エピトープの位置を、ループ3の主要コンポーネント(残基L89-N98)およびループ2の非主要コンポーネント(残基V65-H72)にさらに限定することができた。ヒトループ3を欠くキメラは、ヒトIL-4R の抗体との結合を阻害することができず、ループ2を欠くキメラは、ヒトIL-4R より100倍高いIC₅₀を与えた(表5)。ループ2およびループ3はドメイン1(D1)に位置しており(Hagerら、Cell 97:271-281, 1999)、これはドメインスワップのデータと一致する。

【0034】

抗体エピトープは、ヒトIL-4R の2つのループ領域にある18アミノ酸の不連続エピトープ; V65-H72およびL89-N98に位置づけられた。このエピトープは、ループ2のアミノ酸残基L67およびL68、ならびにループ3のD92およびV93にさらに限定することができる(残基67、68、92および93の位置については配列番号454または460を参照されたい)。D92残基は最も重要であり、V93が続くが、それは、テストした抗体が、ループ2のL67および/またはL68を欠いたキメラIL-4R と、依然として結合することができたためである。もちろん、本発明の抗体は、L67、L68、D92およびV93に加えて、ヒトIL-4R タンパク質の残基とも結合する可能性が高い。

【 0 0 3 5 】

本発明のある態様によれば、配列番号460の位置づけにしたがって、67、68、92および93位のアミノ酸から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基で、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）と結合することができる、単離された結合メンバーが与えられる。本発明のある態様によれば、ネイティブのヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）の、配列番号460の位置づけにしたがって、67、68、92および93位のアミノ酸残基のうち少なくとも1つと結合することができる、単離された結合メンバーが与えられる。特定の実施形態において、単離された結合メンバーは、配列番号460の位置づけにしたがって、hIL-4Rの92位にあるアミノ酸と結合することができる。別の実施形態において、単離された結合メンバーは、D92、ならびにL67、L68およびV93から選択される少なくとも1つの他の残基と、結合することができる。別の実施形態において、単離された結合メンバーは、D92およびV93と結合することができる。もう1つの実施形態において、単離された結合メンバーは、D92、V93、およびL67もしくはL68のいずれか一方と結合することができる。もう1つの実施形態において、抗体は、L67、L68、D92およびV93のそれぞれと結合することができる。これらの実施形態はいずれも、hIL-4Rにおけるアミノ酸位置を参照しているが、その位置は配列番号460に記載のhIL-4Rアミノ酸配列（1 - 229位）にしたがって同定することができる。ある実施形態において、結合メンバーは、全長hIL-4Rの、列挙されたエピトープ残基（すなわち、67、68、92および93位のうち少なくとも1つ）と結合することができる。ある実施形態において、結合メンバーは、細胞表面上に発現されたネイティブhIL-4Rの、列挙されたエピトープ残基（すなわち、67、68、92および93位のうち少なくとも1つ）と結合することができる。ある実施形態において、結合メンバーは、組換え発現全長（229アミノ酸）hIL-4Rの、列挙されたエピトープ残基（すなわち、67、68、92および93位のうち少なくとも1つ）と結合することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明の他の態様によれば、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）と結合することができる、単離された結合メンバーが与えられる。特定の実施形態において、結合メンバーはヒト抗体である。他の実施形態において、結合メンバーは、カニクイザルインターロイキン-4受容体（cyIL-4R）にも結合することができる。

【 0 0 3 7 】

本発明のもう1つの態様によれば、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する、単離された結合メンバーが与えられるが、この結合メンバーは、18 pM可溶性ヒトIL-4タンパク質を用いたTF-1増殖アッセイにおいて、ヒトIL-4（hIL-4）誘発細胞増殖の阻害に関する IC_{50} 幾何平均が50 pM未満であり、かつこの結合メンバーは、cyIL-4Rと結合することもできる。

【 0 0 3 8 】

本発明のこの態様の具体的な実施形態において、結合メンバーは、18 pM可溶性ヒトIL-4タンパク質を用いたTF-1増殖アッセイにおいて、ヒトIL-4（hIL-4）誘発細胞増殖の阻害に関する IC_{50} 幾何平均が、50 pM未満、35 pM未満、25 pM未満、または20 pM未満である。特定の実施形態において、本発明の結合メンバーは、本明細書に記載の（例えば、実施例3.2.1の）、または当業者に公知の方法において、18 pM可溶性ヒトIL-4タンパク質を用いた、ヒトIL-4（hIL-4）誘発細胞増殖の阻害に関する IC_{50} 幾何平均が、1から50 pMまで、1から35 pMまで、2から30 pMまで、2から25 pMまで、2から12 pMまでの間である。

【 0 0 3 9 】

cyIL-4Rとの結合は、任意の適当な方法によって測定することができる。

【 0 0 4 0 】

同様に、本発明の範囲に含まれる結合メンバーは、400 pM可溶性ヒトIL-13（hIL13）を用いた、ヒトIL-13（hIL-13）誘発TF-1細胞増殖の阻害（hIL-4Rの中和による）に関する IC_{50} 幾何平均が、200pM未満である。特定の実施形態において、400 pM可溶性ヒトIL-13（hIL13）を用いた、ヒトIL-13（hIL-13）誘発TF-1細胞増殖の阻害（hIL-4Rの中和による）に関する IC_{50} 幾何平均は、5から75pMまで、または5から45pMまでの間である。

【0041】

特定の実施形態において、本発明の結合メンバーは、マウスIL-4R とは実質的に結合することができない。これは、本発明の結合メンバーが、マウスIL-4R よりもヒトインターロイキン-4受容体 の方に、少なくとも500倍（たとえば、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも1500倍、少なくとも2000倍、少なくとも3000倍、少なくとも4000倍）強く結合することができることを意味している。これはたとえば実施例5.1.2に記載のHTRF競合アッセイによって測定することができる。

【0042】

本明細書で使用される幾何平均は、対数の底が10となるよう変換された、一連のデータの対数値の平均を意味する。これには、少なくとも2つの測定値、たとえば、少なくとも2、好ましくは少なくとも5、より好ましくは少なくとも10回の反復があることが必要である。当業者には当然のことであるが、反復回数が多いほど、幾何平均値は確実となる。反復回数の選択は、当業者の裁量に任せることができる。

【0043】

生物活性の阻害は、部分的または全体的でありうる。具体的な実施形態において、IL-4R 生物活性を阻害する結合メンバーであって、結合メンバー非存在下での活性の少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%阻害する前記結合メンバーが与えられる。結合メンバーがIL-4R

を中和する度合いを、その中和能力という。中和能力は、当業者に公知の、および/または本明細書に記載もしくは引用された、1つもしくは複数のアッセイを用いて、決定または測定することができる。たとえば、中和能力は、下記においてアッセイすることができる：

- 蛍光（たとえば、HTRFまたはDELFI A）または放射能フォーマットでの受容体リガンド結合アッセイ
- 蛍光（たとえば、HTRFまたはDELFI A）エピトープ競合アッセイ
- ヒトもしくはカニクイザルPBMCのSTAT6リン酸化、TF-1細胞の増殖、ヒトもしくはカニクイザル線維芽細胞株からのエオタキシン放出、ヒト血管内皮細胞でのVCAM-1アップレギュレーション、またはヒトT細胞の増殖などの、細胞に基づく機能アッセイ。

【0044】

上記アッセイ法の一部は、実施例でも説明している。

【0045】

2つの種のIL-4R に対する結合メンバーの交差反応性の程度を評価するために、第1の種（たとえばヒト）由来のIL-4R を用いたアッセイにおいて算定される結合メンバーの中和能力を、第2の種（たとえばカニクイザル）由来のIL-4R を用いた同じアッセイでの該結合メンバーの中和能力と比較することができる。ヒト標的と、他種由来のオーソロガス標的の両方に結合する結合メンバー、たとえば抗体もしくは抗体フラグメントがあると非常に好都合である。結合メンバーが治療用製品として進捗中で、安全性研究（たとえば毒性）を別の種で実施する必要がある場合、重要な利点となる。別の種に対する能力および親和性が、たとえばヒトの活性とは、10倍未満ほど異なると、そのような評価には適しているといえる。

【0046】

ヒトおよび「他種」（たとえばカニクイザル）のIL-4R に対する本発明の結合メンバーの結合比を測定するさまざまな方法がある。その1つは、実施例4.3で用いられるような、受容体リガンド結合アッセイである。

【0047】

本発明の結合メンバーに関する特定の実施形態によれば、結合メンバーの結合比は、hIL-4R に対するscFv、およびcyIL-4R に対するscFvとして、受容体リガンド結合アッセイを用いて測定すると、すくなくとも6:1である。ここで使用される「少なくとも」6:1とは、2:1、1:1ではなくて、8:1、10:1などを含む。

【0048】

本発明の結合メンバーは、ヒトIL-4R およびカニクイザルIL-4R と結合するが、ヒトおよびカニクイザルIL-4R を中和する能力には、実施例4.3のようにscFvフォーマットにおいて結合メンバーを用いて、受容体リガンド結合アッセイで測定し、250倍未満、たとえば、少なくとも150、100、75、50、25、20、15、10倍未満の相違を有しうる。

【0049】

たとえば、本明細書のデータから、番号2、4-8、12、16、19、20、22、23、24、26、28、32、33、34、37および37GLの抗体は、本明細書に記載の受容体リガンド結合アッセイにおいてscFvフォーマットとした場合、それぞれ、ヒトおよびカニクイザルIL-4R を中和する能力に、25倍以下の相違があることが示される。データは実施例4.3および表1に示す。このように、一部の実施形態では、受容体リガンド結合アッセイを用いて測定された、ヒトおよびカニクイザルIL-4R に対する本発明の結合メンバーの中和能力は（scFvフォーマットとした場合）、25倍以内である。ヒトおよびカニクイザルIL-4R に対して10倍以内の中和能力を示す、本明細書に記載の抗体の具体例には、番号2、4、5、20および22の抗体がある。ある実施形態において、ヒトおよびカニクイザルIL-4R に対する本発明の結合メンバーの中和能力は、210倍以内である；すなわち、ヒトIL-4R に対する結合は、カニクイザルIL-4R に対する結合の210倍程度である。別の実施形態では、前記中和能力は、5:1から210:1の間、たとえば、5:1から100:1の間である。

【0050】

細胞に基づく機能アッセイに関して、能力は、特に明記しない限り、通常 IC_{50} としてnM単位で表される。機能アッセイにおいて、 IC_{50} は、生物学的（または生化学的）反応をその最大値の50%に減少させる、結合メンバーのモル濃度である。 IC_{50} は、生物学的反応の最大値の%を、結合メンバー濃度の対数の関数としてプロットすること、ならびに IC_{50} 値をもたらすデータにシグモイド関数をフィットさせるためにPrism (GraphPad)またはOrigin (Origin Labs)といったソフトウェアプログラムを使用することによって算出される。

【0051】

受容体リガンド結合アッセイに関して、能力は通常、 K_i （阻害定数）、すなわち標識リガンドが存在しない場合に受容体の50%を占有する結合メンバーの濃度、として表される。 IC_{50} がリガンド濃度に応じて実験ごとに変動する可能性があるのに対して、 K_i はチェン-プルソフ（Cheng Prusoff）式から算出される絶対値である。

【0052】

本発明の結合メンバーは、本明細書に記載のヒトIL-4R HTRF（登録商標）アッセイにおいて、5 nM以下の中和能力すなわち K_i を示しうる。このアッセイを用いて、scFvフォーマットにおける結合メンバーの K_i を測定することができる。 K_i は、たとえば、5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05または0.02nM以下とすることができる。 K_i データの例は、実施例4.3に示される（表1を参照されたい）が、この場合、最終濃度0.125 nMのヒトIL-4R および2 nM IL-4が、HTRF（登録商標）受容体リガンド結合アッセイに使用され、詳細な方法が与えられる。

【0053】

さらに、IL-4R に対する、IL-4R 結合メンバーの結合反応速度および親和性（平衡解離定数、 K_D として表される）を、たとえば、BIAcore（登録商標）のような表面プラズモン共鳴を用いて決定し、あるいは K_D を pA_2 解析から算定することができる。

【0054】

表面プラズモン共鳴は、標的に対する結合メンバーの親和性を測定するための、十分に確立された技法である。それは、流体相中のアナライトを、担体に付着させたリガンドに通し、アナライトとリガンドの間の結合を測定するものである。たとえば、組換えIL-4R を流体相中にて、担体に付着させた結合メンバー上を通過させるような、表面プラズモン共鳴法を行うことができる。表面プラズモン共鳴データを二価アナライトのデータモデル、または一価アナライトデータモデルにフィットさせることができる。本明細書の実施例に示すように、一価アナライトデータモデルは、IL-4R に対する結合メンバーの親和性を測定するために、特にふさわしいことが判明した。親和性定数 K_D は、1:1ラングミュ

ア (Langmuir) 結合モデルを用いた表面プラズモン共鳴によって測定される速度定数比 k_d/k_a から計算することができる。

【0055】

表面プラズモン共鳴を用いて計算された IL-4R との結合に関する推定 KD 値の例を、実施例 4.7 に示す (表 4 を参照されたい)。これらのデータは、抗体 37GL の、組換え作製ヒトおよびカニクイザル IL-4R に対する優れた結合特性を実証する。HEK-EBNA 細胞由来の IL-4R との結合は、その抗体がネイティブのグリコシル化されたヒト IL-4R と結合することを示している。本明細書に記載のすべての抗体 (たとえば抗体 1~42) が、単一の親抗体 (抗体 1) から得られたこと、ならびにそれゆえに IL-4R の同一の、またはきわめて類似したエピトープにすべて結合すると考えられることに鑑みれば、抗体 37GL がネイティブなグリコシル化ヒト IL-4R と結合するということから、当業者であれば、これらの抗体のすべてがネイティブなグリコシル化ヒト IL-4R と結合できると予測することができる。

10

【0056】

したがって、特定の実施形態によれば、本発明の結合メンバーは、グリコシル化 hIL-4R と結合することができる。

【0057】

実施例 4.7 および表 4 に示すように、ヒトおよびカニクイザル IL-4R との結合における良好な交差反応性が、抗体 1 に由来する代表的な抗体パネルについての表面プラズモン共鳴によって測定された。

20

【0058】

本発明の結合メンバーは、他の構造的関連分子 (たとえば他のインターロイキン受容体) よりも IL-4R に特異的である可能性があり、したがって IL-4R と選択的に結合しうる。たとえば、本発明の結合メンバーは、IL-13R 1 もしくは IL-13R 2 および共通鎖 (c) のいずれにも交差反応しないと考えられる。これは、たとえば、実施例 4.6 に例示された DELFIA (登録商標) エピトープ競合アッセイで測定、もしくは実証することができる。

【0059】

本発明の結合メンバーは、抗体分子、たとえばヒト抗体分子を含んでいてもよい。結合メンバーの VH ドメインも本発明の一部として提供される。結合メンバーは、抗体 VH および/または VL ドメインを含んでなる。VH および VL ドメインのそれぞれには、相補性決定領域 (CDR) およびフレームワーク領域 (FR) が含まれる。VH ドメインは、一連の HCDR を含み、VL ドメインは一連の LCDR を含む。抗体分子は、VH CDR1、CDR2 および CDR3、ならびにフレームワークを含んでなる抗体 VH ドメインを含んでいてもよい。抗体分子は、その代わりに、またはそれに加えて、VL CDR1、CDR2 および CDR3、ならびにフレームワークを含んでなる抗体 VL ドメインを含んでいてもよい。VH または VL ドメインフレームワークは、4 つのフレームワーク領域、FR1、FR2、FR3 および FR4 を含んでなり、下記の構造で CDR が散在して組み入れられている: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4。

30

【0060】

本発明の抗体 VH および VL ドメイン、FR および CDR の例は、本明細書の開示の一部を成す添付の配列表に記載のとおりである。本明細書に開示される VH および VL 配列、CDR 配列、CDR のセット、ならびに HCDR のセットおよび LCDR のセットはすべて、本発明の態様および実施形態を示している。本明細書に記載のように、「CDR のセット」は CDR1、CDR2 および CDR3 を含む。したがって、HCDR のセットは HCDR1、HCDR2 および HCDR3 を表し、LCDR のセットは LCDR1、LCDR2 および LCDR3 を表す。特に明記しない限り、「CDR のフルセット」は HCDR および LCDR を含める。典型的には、本発明の結合メンバーは、モノクローナル抗体である。

40

【0061】

本発明の他の態様は、添付の配列表に示す抗体 1 から 42 までのいずれかの VH ドメインと、アミノ酸配列が少なくとも 75、80、85、90、95、98、または 99% 同一の VH ドメインを含んでなり、かつ/または添付の配列表に示す抗体 1 から 42 までのいずれかの VL ドメインと、アミノ酸配列が少なくとも 75、80、85、90、95、98、または 99% 同一の VL ドメインを含

50

んでなる、抗体分子である。AccelrysのMacVector（登録商標）プログラムを用いて、2つのアミノ酸配列の%同一性を計算することができる。

【0062】

本発明の結合メンバーは、抗原結合部位を非抗体分子内に有していてもよく、下記でさらに検討されるように、非抗体タンパク質スキャフォールド内で、通常1つもしくは複数のCDR、たとえば、HCDR3および/もしくはLCDR3、またはCDRのセットによって与えられる。

【0063】

実施例の項でより詳細に記載するように、本発明者らは、図1（VHドメイン）および図2（VLドメイン）に示すCDRセットの配列を有する親抗体分子（抗体1）を単離した。最適化のプロセスを通じて、親CDR3配列に由来するが図1（VHドメイン）および図2（VLドメイン）に示す位置に置換を有する、CDR3配列を持つ番号2から20までの抗体クローンが含まれる、抗体クローンパネルを作製した。したがって、たとえば、図1（aおよびb）から、抗体2は親HCDR1、HCDR2、LCDR1およびLCDR2を有しており、かつ、Kabat残基95がQで置換され、Kabat残基95A、95Bおよび96がそれぞれPで置換され、Kabat残基97がLで置換された親LCDR3配列、ならびにKabat残基101がYで置換され、Kabat残基102がNで置換された親HCDR3配列も有していることがわかる。

【0064】

本明細書に記載の親抗体分子および抗体分子2から20は、それぞれ、親抗体分子のCDRを有する抗体分子、および抗体分子2から20のCDRを有する抗体分子を表す。さらなる最適化プロセスによって、本発明者らは、VHおよびVLドメインの全体にわたって追加の置換を有する番号21から42までの抗体クローンのパネルを作製した。したがって、たとえば、抗体21は、抗体20と同じLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1およびHCDR3を有する；抗体21は、抗体20の親HCDR2配列を有するが、Kabat残基57はAで置換されている；ならびに、Kabat残基85および87（LFW3にある）がそれぞれVおよびFで置換されている。

【0065】

図3（VH）および4（VL）に示す抗体20のCDRセットを含有する、基準となる結合メンバーが本明細書に記載されるが、このHCDR1は配列番号193（Kabat残基31-35）であり、HCDR2は配列番号194（Kabat残基50-65）、HCDR3は配列番号195（Kabat残基95-105）、LCDR1は配列番号198（Kabat残基24-34）、LCDR2は配列番号199（Kabat残基50-56）、ならびにLCDR3は配列番号200（Kabat残基89-97）である。他の結合メンバーは、この基準結合メンバーの配列を参照して記載することができる。

【0066】

本発明の結合メンバーは、本明細書に記載の1つもしくは複数のCDR（すなわち、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、および少なくとも6個）を含有することができるが、たとえば、CDR3、ならびに、状況に応じてCDR1およびCDR2も含有しCDRのセットを形成することができる。CDRまたはCDRのセットは、親CDRまたは親CDRのセットとすることができるが、抗体2から42までの任意のCDRまたはCDRのセットのセットであってもよく、あるいは本明細書に記載のそれらのバリエーションであってもよい。

【0067】

たとえば、本発明の結合メンバーまたはVLドメインは、Kabat残基92-97のうち1つもしくは複数が別のアミノ酸で置換された基準LCDR3を含有することができる。置換の例としては次のものがある：

Kabat残基92がPhe（F）、Val（V）またはAla（A）で置換；

Kabat残基93がGly（G）またはSer（S）で置換；

Kabat残基94がThr（T）で置換；

Kabat残基95がLeu（L）、Gln（Q）、Pro（P）またはSer（S）で置換；

Kabat残基95aがSer（S）、Pro（P）、Ala（A）、Thr（T）、His（H）またはGly（G）で置換；

Kabat残基95bがAla（A）、Pro（P）、Ser（S）、Tyr（Y）、Met（M）、Leu（L）、Thr（T）、Arg（R）またはAsp（D）で置換；

Kabat残基95cがAsn (N)、Gln (Q)、His (H)、Tyr (Y)、Thr (T)、Ile (I)、Lys (K)、Arg (R)またはMet (M)で置換；

Kabat残基96がTyr (Y)またはPro (P)で置換；

Kabat残基97がVal (V)、Leu (L)またはIle (I)で置換。

【0068】

結合メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基97-102のうち1つもしくは複数が別のアミノ酸で置換されている基準HCDR3を含有することができる。置換の例としては次のものがある：

Kabat残基97がTrp (W)またはLeu (L)で置換；

Kabat残基98がLeu (L)で置換；

Kabat残基99がLeu (L)、Lys (K)、Phe (F)またはTrp (W)で置換；

Kabat残基101がAsp (D)、Asn (N)またはGln (Q)で置換；

Kabat残基102がTyr (Y)、Asn (N)、Pro (P)またはHis (H)で置換。

【0069】

本発明の結合メンバーは、抗体1から42までのいずれかのHCDR1、HCDR2および/もしくはHCDR3、ならびに/または抗体1から42までのいずれかのLCDR1、LCDR2および/もしくはLCDR3を含有することができるが、その例は、図1また図2に示す抗体1から42までのいずれかのCDRのセットである。結合メンバーは、上記抗体のうち1つのVH CDRのセットを含有することができる。上記抗体のうち1つのVL CDRのセットを含有することもできるが、VL CDRはVH CDRと同一または異なる抗体に由来するものとすることができる。抗体1から42までのいずれかのHCDRのセットを含有するVHドメイン、および/または抗体1から42までのいずれかのLCDRのセットを含有するVLドメインもまた、本発明の個別の実施形態である。

【0070】

以下でさらに検討するようにVHまたはVLドメインを単独で使用して、抗原と結合することはできるが、典型的には、VHドメインはVLドメインと対になって抗体の抗原結合部位を与える。ある実施形態において、抗体1 VHドメインは抗体1 VLドメインと対をなし、その結果、抗体1 VHおよびVLドメインの両方からなる、抗体の抗原結合部位が形成される。類似の実施形態が、本明細書に記載の他のVHおよびVLドメインについても与えられる。他の実施形態において、抗体1 VHは、抗体1 VL以外のVLドメインと対をなす。軽鎖の無差別な対形成は、当技術分野で十分確立されている。また、本明細書に記載の他のVHおよびVLドメインについても、類似の実施形態が本発明によって与えられる。したがって、親(抗体1)または抗体2から42までのいずれかのVHは、親または抗体2から42までのいずれかのVLと対をなすことができる。

【0071】

本発明のある態様は、VHおよびVLドメインを含有する抗体であって、そのVHドメインは図1または3に記載の配列を含む。

【0072】

本発明の別の態様は、VHおよびVLドメインを含有する抗体であって、そのVLドメインは図2または4に記載の配列を含む。

【0073】

本発明の別の態様は、配列番号362、442、232、422または432に示すVHドメインアミノ酸配列を有するVHドメイン、および配列番号367、237、447、437または427に示すVLドメインアミノ酸配列を有するVLドメインを含有する、単離された抗体分子である。

【0074】

結合メンバーは、親抗体、または抗体2から42までのいずれかの、Hおよび/またはL CDRのセットであって、その開示されたHおよび/またはL CDRのセットの中に、12または10または9個以下の、たとえば、1、2、3、4もしくは5個の置換を有する前記セットを含有することができる。たとえば、本発明の結合メンバーは、12個以下の置換、たとえば、7個以下の置換、たとえば、0、1、2、3、4、5または6個の置換を有する、抗体16または抗体20のHおよび/またはL CDRセットを含有することができる。置換は、CDRのセットの中の任意

の残基で行われる可能性があるが、CDR1、CDR2および/またはCDR3内とすることができる。

【 0 0 7 5 】

したがって、本発明のある態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、このCDRのセットは、基準となるCDRセットから12個以下のアミノ酸が変化しており：

HCDR1は配列番号153のアミノ酸配列を有する；
HCDR2は配列番号154のアミノ酸配列を有する；
HCDR3は配列番号155のアミノ酸配列を有する；
LCDR1は配列番号158のアミノ酸配列を有する；
LCDR2は配列番号159のアミノ酸配列を有する；ならびに
LCDR3は配列番号160のアミノ酸配列を有する。

10

【 0 0 7 6 】

この例における基準抗体は、抗体16である。

【 0 0 7 7 】

単離された結合メンバーは、10個以下、8個以下、7個以下、たとえば、6、5、4、3、2、1または0個のアミノ酸が基準のCDRセットから変化している可能性がある。具体的な変化はアミノ酸の置換である。

【 0 0 7 8 】

20

本発明の別の態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、このCDRのセットは、基準となるCDRセットから12個以下のアミノ酸が変化しており：

HCDR1は配列番号193のアミノ酸配列を有する；
HCDR2は配列番号194のアミノ酸配列を有する；
HCDR3は配列番号195のアミノ酸配列を有する；
LCDR1は配列番号198のアミノ酸配列を有する；
LCDR2は配列番号199のアミノ酸配列を有する；ならびに
LCDR3は配列番号200のアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 7 9 】

この例における基準抗体は、抗体20である。

【 0 0 8 0 】

単離された結合メンバーは、10個以下、8個以下、7個以下、たとえば、6、5、4、3、2、1または0個のアミノ酸が基準のCDRセットから変化している可能性がある。具体的な変化はアミノ酸の置換である。特定の実施形態において、単離された結合メンバーは、上記で特定された基準のCDRセットから4個以下のアミノ酸が置換されている。

【 0 0 8 1 】

本発明の別の態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、このCDRのセットは、基準となるCDRセットから6個以下のアミノ酸が変化しており：

40

HCDR1は配列番号363のアミノ酸配列を有する；
HCDR2は配列番号364のアミノ酸配列を有する；
HCDR3は配列番号365のアミノ酸配列を有する；
LCDR1は配列番号368のアミノ酸配列を有する；
LCDR2は配列番号369のアミノ酸配列を有する；ならびに
LCDR3は配列番号370のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 8 2 】

この例における基準抗体は、抗体37である。

50

【 0 0 8 3 】

置換は、CDR3内、たとえば、図 1 または 3 (VHドメイン) および図2または4 (VLドメイン) に示されるように、抗体2から42までのいずれかにおいて置換された位置に、存在する可能性がある。したがって、1つもしくは複数の置換は、下記の残基の位置での1つもしくは複数の置換を含むことができる：

HCDR3におけるKabat残基97、98、99、101もしくは102；または

LCDR3におけるKabat残基92、93、94、95、95A、95B、95C、96もしくは97。

【 0 0 8 4 】

したがって、CDRは、たとえば、Kabat残基92、93、94、95、95A、95B、95C、96または97の位置に1つもしくは複数の置換を有する基準LCDR3とすることができる。

10

【 0 0 8 5 】

親/基準CDRにおける置換の例は本明細書の他の箇所に記載される。記載のように、置換は図1から4に示す1つもしくは複数の置換を包含することができる。

【 0 0 8 6 】

本発明の結合メンバーは、基準抗体20のHCDR1、HCDR2および/またはHCDR3を含んでなるとすることができ、下記の置換のうち1つもしくは複数の置換を有していてもよい：

Kabat残基53がArg (R)であるHCDR2；

Kabat残基57がAla (A)であるHCDR2；

Kabat残基97がTrp (W)もしくはLeu (L)；Kabat残基98がLeu；Kabat残基99がLeu (L)、Lys (K)もしくはTrp (W)；Kabat残基101がAsn (N)もしくはGln (Q)；および/またはKabat残基102がTyr (Y)、Asn (N)、Pro (P)もしくはHis (H)であるHCDR3。

20

【 0 0 8 7 】

本発明の結合メンバーは、基準抗体20のLCDR1、LCDR2および/またはLCDR3を含んでなるとすることができ、下記の置換のうち1つもしくは複数の置換を有していてもよい：

Kabat残基27がGly (G)であり；

Kabat残基27AがThr (T)であり；

Kabat残基27BがSer (S)であり；

Kabat残基31がAsn (N)であるLCDR1；

Kabat残基56がPro (P)であるLCDR2；

Kabat残基92がPhe (F)、Val (V)もしくはAla (A)であり；

30

Kabat残基93がGly (G)もしくはSer (S)であり；

Kabat残基94がThr (T)であり；

Kabat残基が Leu (L)、Gln (Q)、Pro (P)もしくはSer (S)であり；

Kabat残基95AがSer (S)、Pro (P)、Ala (A)、Thr (T)、His (H)もしくはGly (G)であり；

Kabat残基95BがAla (A)、Pro (P)、Ser (S)、Tyr (Y)、Met (M)、Leu (L)、Thr (T)、Asp (D)もしくはArg (R)であり；

Kabat残基95CがAsn (N)、Gln (Q)、His (H)、Tyr (Y)、Ile (I)、Lys (K)、Arg (R)、Thr (T)もしくはMet (M)であり；

Kabat残基96がTyr (Y)もしくはPro (P)であり；および/または

Kabat残基97がVal (V)、Leu (L)もしくはIle (I)であるLCDR3。

40

【 0 0 8 8 】

特定の実施形態において、抗体20の配列を基準として、HCDR2のKabat残基53はArg (R)で置き換える；および/またはHCDR2のKabat残基57はAla (A)で置き換える；および/またはLCDR1のKabat残基27はGly (G)で置き換える；および/またはLCDR1のKabat残基27BはSer (S)で置き換える；および/またはLCDR3のKabat残基95はPro (P)で置き換える。

【 0 0 8 9 】

本発明の特定の態様によれば、ヒトインターロイキン-4受容体 (hIL-4R) に対する単離された結合メンバーが与えられるが、この結合メンバーにおいて、

50

HCDR1は配列番号363のアミノ酸配列を有する；
HCDR2は配列番号364のアミノ酸配列を有する；
HCDR3は配列番号365のアミノ酸配列を有する；
LCDR1は配列番号368のアミノ酸配列を有する；
LCDR2は配列番号369のアミノ酸配列を有する；ならびに
LCDR3は配列番号370のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 0 】

本発明のもう一つの特定の態様によれば、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、この結合メンバーにおいて、

HCDR1は配列番号233のアミノ酸配列を有する；
HCDR2は配列番号234のアミノ酸配列を有する；
HCDR3は配列番号235のアミノ酸配列を有する；
LCDR1は配列番号238のアミノ酸配列を有する；
LCDR2は配列番号239のアミノ酸配列を有する；ならびに
LCDR3は配列番号240のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 1 】

本発明の結合メンバーにおいて：

HCDR1は、Kabat残基31-35からなる5アミノ酸長とすることができる；
HCDR2は、Kabat残基50-65からなる17アミノ酸長とすることができる；
HCDR3は、Kabat残基95-102からなる9アミノ酸長とすることができる；
LCDR1は、Kabat残基24-34からなる13アミノ酸長とすることができる；
LCDR2は、Kabat残基50-56からなる7アミノ酸長とすることができる；および/または
LCDR3は、Kabat残基89-97からなる9アミノ酸長とすることができる。

【 0 0 9 2 】

HCDRおよびLCDRのセットのKabatナンバリングであって、HCDR1はKabat残基31-35であり、HCDR2はKabat残基50-65であり、HCDR3はKabat残基95-102である前記ナンバリングを図1および3に示す；LCDR1はKabat残基24-34であり、LCDR2はKabat残基50-56であり、そしてLCDR3はKabat残基89-97である前記ナンバリングを、図2および4に示す。

【 0 0 9 3 】

本発明のもう一つの態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、このCDRのセットは、2008年12月9日にNCIMBに寄託された、アクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれている基準CDRセットから6個以下のアミノ酸の変化を有するものである。

【 0 0 9 4 】

本発明の別の態様によれば、2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVH配列を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられる。

【 0 0 9 5 】

本発明の別の態様によれば、2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVL配列を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられる。

【 0 0 9 6 】

本発明の別の態様によれば、2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVHおよびVL配列を含んでなる、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられる。

【 0 0 9 7 】

本発明の別の態様によれば、単離された抗体または抗体のフラグメントが与えられるが、この抗体またはそのフラグメントは、ヒトインターロイキン-4受容体に免疫特異的に結合し、下記を含んでなる；

10

20

30

40

50

- (a) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVH CDR1と同一のアミノ酸配列、またはそのVH CDR1と比較して1、2もしくは3個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVH CDR1；
- (b) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVH CDR2と同一のアミノ酸配列、またはそのVH CDR2と比較して1、2もしくは3個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVH CDR2；
- (c) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVH CDR3と同一のアミノ酸配列、またはそのVH CDR3と比較して1、2もしくは3個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVH CDR3；
- (d) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVL CDR1と同一のアミノ酸配列、またはそのVL CDR1と比較して1、2もしくは3個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVL CDR1；
- (e) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVL CDR2と同一のアミノ酸配列、またはそのVL CDR2と比較して1、2もしくは3個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVL CDR2；ならびに
- (f) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVL CDR3と同一のアミノ酸配列、またはそのVL CDR3と比較して1、2もしくは3個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVL CDR3。

【 0 0 9 8 】

本発明の別の態様によれば、単離された抗体または抗体のフラグメントが与えられるが、この抗体またはそのフラグメントは、ヒトインターロイキン-4受容体 に免疫特異的に結合し、下記を含んでなる；

- (a) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVH配列と同一のアミノ酸配列、またはそのVH配列と比較して1、2、3、4、5もしくは6個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVH配列；
- (b) 2008年12月9日にNCIMBに寄託されたアクセッション番号：NCIMB 41600を有するクローンに含まれているVL配列と同一のアミノ酸配列、またはそのVL配列と比較して1、2、3、4、5もしくは6個のアミノ酸残基の置換を含むアミノ酸配列を有するVL配列。

【 0 0 9 9 】

結合メンバーは、抗体フレームワーク内に1つもしくは複数のCDR、たとえば、CDRのセットを有する抗体分子を含んでなることができる。たとえば、1つもしくは複数のCDR、または抗体のCDRのセットを、フレームワーク（たとえばヒトフレームワーク）内に連結して抗体分子を作製することができる。フレームワーク領域は、ヒト生殖系列遺伝子セグメント配列を含有することができる。したがって、フレームワーク領域を生殖系列化することが可能であり、それによって、該フレームワーク内の1つもしくは複数の残基を、最もよく似たヒト生殖系列フレームワーク内の対応する位置にある残基と一致するように変更することができる。当業者は、生殖系列化する前の抗体のフレームワーク配列に最も近い生殖系列セグメントを選択し、その抗体の親和性または活性をテストして、本明細書に記載のアッセイにおいて生殖系列化が抗原結合もしくは能力を有意に減少させないことを確認することができる。ヒト生殖系列遺伝子セグメント配列は当業者に知られており、たとえば、VBase集積データから判断することができる（Tomlinson, Journal of Molecular Biology, 224, 487-499, 1997）。

【 0 1 0 0 】

ある実施形態において、本発明の結合メンバーは、ヒト生殖系列フレームワーク、たとえば、Vh1_DP-7_(1-46)、の中にHCDRのセットを含んでなるVHドメインを有する、単離されたヒト抗体分子である。したがって、そのVHドメインフレームワーク領域FR1、FR2および/またはFR3は、ヒト生殖系列遺伝子セグメントVh1_DP-7_(1-46)のフレームワーク領域を含むことができる。FR4は、ヒト生殖系列jセグメントJH1、JH4またはJH5（これらのjセグメントは同一のアミノ酸配列を有する）からなるフレームワーク領域を含み、あるいはヒト生殖系列jセグメントJH3のフレームワーク領域を含んでいてもよい。VH FR1のアミノ酸配

列は、配列番号442（残基1-30）とすることができる。VH FR2のアミノ酸配列は、配列番号442（残基36-49）とすることができる。VH FR3のアミノ酸配列は、配列番号442（残基66-94）とすることができる。VH FR4のアミノ酸配列は、配列番号442（残基103-113）とすることができる。通常、結合メンバーは、たとえば、ヒト生殖系列フレームワーク、たとえばV₁_DPL5の中にLCDRのセットを含んでなるVLドメインも有している。したがって、VLドメインフレームワーク領域FR1、FR2および/またはFR3は、ヒト生殖系列遺伝子セグメントV₁_DPL5のフレームワーク領域を含むことができる。FR4はヒト生殖系列jセグメントJL2またはJL3（これらのjセグメントは同一のアミノ酸配列を有する）のフレームワーク領域を含むことができる。VL FR1のアミノ酸配列は、配列番号447（残基1-23）とすることができる。VL FR2のアミノ酸配列は、配列番号447（残基35-49）とすることができる。VL FR3のアミノ酸配列は、配列番号447（残基57-88）とすることができる。VL FR4のアミノ酸配列は、配列番号447（残基98-107）とすることができる。生殖系列化されたVHもしくはVLドメインは、1つもしくは複数のVernier残基の位置で生殖系列化されていても、されていなくてもよいが、通常、生殖系列化されていない。

10

【0101】

本発明の抗体分子もしくはVHドメインは、下記の重鎖フレームワーク領域のセットを含むことができる：

FR1配列番号442（残基1-30）；

FR2配列番号442（残基36-49）；

FR3配列番号442（残基66-94）；

20

FR4配列番号442（残基103-113）；あるいは、1、2、3、4、5もしくは6個のアミノ酸の変化、たとえば置換を有する前記重鎖フレームワーク領域のセットを含有していてもよい。

【0102】

本発明の抗体分子もしくはVLドメインは、下記の重鎖フレームワーク領域のセットを含むことができる：

FR1配列番号447（残基1-23）；

FR2配列番号447（残基35-49）；

FR3配列番号447（残基57-88）；

FR4配列番号447（残基98-107）；あるいは、1、2、3、4、5もしくは6個のアミノ酸の変化、たとえば置換を有する前記軽鎖フレームワーク領域のセットを含有していてもよい。

30

【0103】

アミノ酸の変化は、置換、挿入（付加）または欠失とすることができる。

【0104】

もっとも多く見られる変化は、置換である可能性が高い。

【0105】

たとえば、本発明の抗体分子は、重鎖および軽鎖フレームワーク領域のセットを含んでいてもよく、その場合

重鎖FR1は、配列番号192(残基1-30) である；

重鎖FR2は、配列番号192(残基36-49) である；

重鎖FR3は、配列番号192(残基66-94) である；

40

重鎖FR4は、配列番号192(残基103-113) である；

軽鎖FR1は、配列番号197(残基1-23) である；

軽鎖FR2は、配列番号197(残基35-49) である；

軽鎖FR3は、配列番号197(残基57-88) である；

軽鎖FR4は、配列番号197(残基98-107) である；または7個以下、たとえば6個以下のアミノ酸の変化、たとえば置換を有する、前記の重鎖および軽鎖フレームワーク領域のセットを含んでいてもよい。たとえば、1または2個のアミノ酸置換が前記の重鎖および軽鎖フレームワーク領域のセットの中に存在してもよい。

【0106】

実施例4.2に示すように、抗体21-42は、抗体20を基本とするが、CDRおよびフレームワ

50

ーク領域内にいくつかの追加的变化を有する。抗体20と同様に、抗体21-42はhIL-4R およびcyIL-4R に結合する。したがって、こうしたCDRおよび/またはフレームワーク置換は、より強く結合する可能性のある結合メンバーを生じさせる、選択的もしくは追加的な置換として考慮しうる。

【0107】

このように、結合メンバーは、VHおよびVLドメインの6個のCDRのいずれかの中にある置換に加えて、フレームワーク領域内の下記の残基（Kabatの標準ナンバリングによる）にも、1つもしくは複数のアミノ酸置換を含むことができる：

HFW1の11、12；

HFW2の37、48；

HFW3の68、84、85；

HFW4の105、108、113；

LFW1の1、2、3、9；

LFW2の38、42；または

LFW3の58、65、66、70、74、85、87。

【0108】

適切なフレームワークの置換を図1～4に示す。そして、本発明の結合メンバーは、図1～4に示す具体的な置換のうち1つもしくは複数の有することができる。

【0109】

本発明の抗体分子またはVHドメインは、Kabat残基11がValもしくはGluであり、かつ/またはKabat残基12がLysもしくはArgであるVH FR1を含有することができる；本発明の抗体分子またはVHドメインは、Kabat残基37がAlaもしくはValであり、かつ/またはKabat残基48がMetもしくはValであるVH FR2を含有することができる；本発明の抗体分子またはVHドメインは、Kabat残基68がSer、AlaもしくはThrであり、かつ/またはKabat残基84がSerもしくはProであり、かつ/またはKabat残基85がGluもしくはGlyであるVH FR3を含有することができる；本発明の抗体分子またはVHドメインは、Kabat残基105がLysもしくはAsnであり、かつ/またはKabat残基108がGln、ArgもしくはLeuであり、かつ/またはKabat残基113がSerもしくはGlyであるVH FR4を含有することができる。

【0110】

本発明の抗体分子またはVLドメインは、Kabat残基1がGlnもしくはLeuであり、かつ/またはKabat残基2がSerもしくはProもしくはAlaであり、かつ/またはKabat残基3がValもしくはAlaであり、かつ/またはKabat残基9がSerもしくはLeuであるVL FR1を含有することができる；本発明の抗体分子またはVLドメインは、Kabat残基38がGlnもしくはArgであり、かつ/またはKabat残基42がThrもしくはAlaであるVL FR2を含有することができる；本発明の抗体分子またはVLドメインは、Kabat残基58がIleもしくはValであり、かつ/またはKabat残基65がSerもしくはPheであり、かつ/またはKabat残基66がLysもしくはArgであり、かつ/またはKabat残基70がSerもしくはThrであり、かつ/またはKabat残基74がAlaもしくはGlyであり、かつ/またはKabat残基85がAspもしくはValであり、かつ/またはKabat残基87がTyrもしくはPheであるVL FR3を含有することができる。

【0111】

生殖系列化されていない抗体は、生殖系列化された抗体と比べて、CDRは同一であるがフレームワークは異なる。本明細書に示す抗体配列のうち、抗体24PGLおよび37GLのVHおよびVLドメインが生殖系列化されている。

【0112】

図5、6および7は、抗体1-42のそれぞれが互いに他に対して示す、複合配列同一性を示す。複合配列は、主要CDR領域の人為的なアラインメントである。したがって、図5については、6個のCDRドメイン（LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2、HCDR3；6xCDR）は、LCDR1の最後のコドンがLCDR2の最初のコドンに隣接し、LCDR2の最後のコドンがLCDR3の最初のコドンに隣接するといったように整列させた。このようにして、介在するフレームワーク領域を欠いた配列が作成される。複合配列は、図5に関するように、すべてのCDR

10

20

30

40

50

領域からなる複合配列とすることができるが、重鎖もしくは軽鎖CDR配列のみであることもある（それぞれ図6および7がそうであるように）。次に、各抗体の複合配列の、それぞれ他の抗体複合配列に対する配列アラインメントを作成し、図5、6および7のチャートにおいて同一性スコアを示すことができる。図5からわかるように、6個すべてのCDR領域に関しては、抗体1-42のいずれかが他に対して示す配列同一性のうち最低は73%である（これは、抗体3の抗体23、25、37、37GLおよび41に対する同一性である）；抗体3を除くと、配列同一性の程度は78%となる。3個の重鎖CDR（3xHCDR）領域のみを比較する配列同一性の最低は75%であるが、抗体3を除外すると79%となる。3個の軽鎖CDR（3xLCDR）領域のみを比較する配列同一性の最低は65%であるが、抗体3を除外すると75%となる。

【0113】

特定の実施形態において、単離された結合メンバーは、抗体1-42のいずれかの6xCDR複合配列について少なくとも73%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0114】

本発明の他の態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含有する、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、この結合メンバーは、抗体1-42のいずれかの、介在するフレームワーク配列のまったくないHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3の整列した配列からなる複合配列に関して、少なくとも73%のアミノ酸配列同一性を有する。特定の実施形態において、単離された結合メンバーは、抗体1-42のいずれかの複合スコアに関して、少なくとも78%のアミノ酸配列を有する。

【0115】

本発明の他の態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含有する、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、この結合メンバーは、抗体1-42のいずれかのHCDR1、HCDR2およびHCDR3からなる複合配列に関して、少なくとも75%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0116】

本発明の他の態様によれば、CDRのセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含有する、ヒトインターロイキン-4受容体（hIL-4R）に対する単離された結合メンバーが与えられるが、この結合メンバーは、抗体1-42のいずれかのLCDR1、LCDR2およびLCDR3からなる複合配列に関して、少なくとも65%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0117】

本発明の結合メンバーは、IL-4R との結合に関して、任意の結合メンバーと競合するものとしてすることができるが、これらの結合メンバーはいずれもIL-4R と結合し、しかも、本明細書に記載の結合メンバー、VHおよび/またはVLドメイン、CDRたとえばHCDR3、およびCDRのセットを含んでなるものである。結合メンバー間の競合は、たとえば、ELISAによって、および/または1つもしくは複数の他のタグなし結合メンバーの存在下で検出される結合分子に特異的レポーター分子をタグ付けすることによって、in vitroで容易にアッセイすることができ、同一のエピトープもしくは重なり合ったエピトープに結合する結合メンバーの同定が可能となる。競合は、たとえばELISAによって測定することができるが、この場合、IL-4R をプレートに固定化し、第1のタグ付き結合メンバーを、他の1つもしくは複数のタグなし結合メンバーとともにそのプレートに加える。タグ付き結合メンバーと競合するタグなし結合メンバーの存在は、タグ付き結合メンバーの発するシグナルの減少によって観察される。こうした方法は当業者には容易に分かるが、本明細書でより詳細に記載する。ある実施形態において、競合的結合は、本明細書に記載のようにエピトープ競合アッセイで評価する。本発明の結合メンバーは、IL-4R に対する結合について、抗体分子、たとえば、特に、親抗体もしくは抗体2-42のいずれかのVHおよび/またはVLドメイン、CDRたとえばHCDR3、またはCDRのセットを含有する抗体分子と競合する、抗体抗原結合部位を含有することができる。本発明の態様は、IL-4R との結合について、本明細書に記載の任意の結合メンバーと競合する結合メンバーを与えるが、この結合メンバーは、たとえば、親抗体または抗体2-42のいずれかと、たとえばscFvもしくはIgG1もしくは

10

20

30

40

50

はIgG2フォーマットで競合する結合メンバーである。IL-4R に対する結合について、本明細書に記載の任意の結合メンバーと競合する結合メンバーは、本発明の結合メンバーに関する本明細書に記載の構造的および/または機能的特性のうち任意の1つもしくは複数を有していてもよい。

【0118】

他の態様において、本発明は、結合メンバー（たとえば、本発明のVHドメインおよび/またはVLドメイン）をコードする配列を含んでなる、単離された核酸を与え、加えて、結合メンバー（たとえば、本発明のVHドメインおよび/またはVLドメイン）を調製する方法を与えるが、その方法は、VHドメインおよび/またはVLドメインおよび/または抗体などの前記結合メンバーの生成をもたらす条件下で前記核酸を発現させること、およびそれを回収することを含んでなる。

10

【0119】

本発明の別の態様は、本明細書に記載のVH CDRまたはVL CDR配列をコードする核酸であって、一般に単離された前記核酸を与える。

【0120】

本発明のさらなる態様は、本発明の核酸を含有する、もしくは本発明の核酸で形質転換された宿主細胞を与える。

【0121】

本発明のさらに別の態様は、本発明の結合メンバーを含有する組成物、ならびにIL-4Rを阻害および/または中和する方法におけるその使用を与えるが、これにはヒトもしくは動物を治療によって処置する方法が含まれる。

20

【0122】

本発明の結合メンバーは、ヒトもしくは動物を治療もしくは診断する方法、たとえば、ヒト患者の疾患もしくは障害を治療する方法（予防的治療を含めることができる）であって、有効量の本発明の結合メンバーを前記患者に投与することを含んでなる前記方法に使用することができる。本発明にしたがって治療することができる疾患には、本明細書において他所で詳細に検討されるように、IL-4R、IL-4および/またはIL-13が関与するあらゆる疾患が含まれる。

【0123】

本発明の上記の、および他の態様は、以下にさらに詳細に説明される。

30

【0124】

用語

本明細書で使用される「および/または」は、2つの指定された特徴または構成要素のそれぞれが他方を付加包含する、または付加包含しないことの具体的開示として解釈されるべきであるところで指摘する。たとえば、「Aおよび/またはB」は、まさに本明細書中にそれぞれが個別に記載されているように、(i)A、(ii)B、ならびに(iii)AおよびB、のそれぞれの具体的開示であると解釈されるべきである。

【0125】

IL-4R

IL-4R はインターロイキン-4受容体 である。IL-4R への言及は、特に指示しない限り、通常、ヒトIL-4R のことを言う。野生型成熟ヒトIL-4R の配列は、アクセッション番号P24394 (Swiss-Prot)として寄託されているが、これはシグナルペプチドを含めた全長IL-4R を示す。

40

【0126】

カニクイザルIL-4R は社内で配列決定したが、カニクイザルIL-4R のcDNA配列は配列番号455として示す。

【0127】

本明細書の他所に記載するように、IL-4R は組換え体であってもよく、かつ/または、グリコシル化もしくは非グリコシル化のいずれでもよい。IL-4R は、天然では、in vivoにおいてN-結合グリコシル化型として発現される。グリコシル化IL-4R は、たとえば

50

、HEK-EBNA細胞などの組換え系において発現されることもある。IL-4R は、大腸菌 (*E. coli*) 細胞において非グリコシル化型で発現されることもある。

【0128】

結合メンバー

この用語は、互いに結合する分子ペアの一方のメンバーを表す。結合ペアのメンバーは、天然由来であってもよいが、全体的または部分的合成によって作製されてもよい。分子ペアの一方のメンバーは、分子ペアの他方のメンバーの特定の空間および極性をもつ構造に結合し、したがって分子ペアの他方のメンバーに相補的である、一定の領域またはキャビティーをその表面上に有している。結合ペアのタイプの例は、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、受容体-リガンド、酵素-基質である。本発明は、抗原-抗体型の反応に関係している。

10

【0129】

結合メンバーは通常、抗原結合部位を有する分子を含む。たとえば、結合メンバーは、抗原結合部位を含む抗体分子または非抗体タンパク質とすることができる。

【0130】

抗原結合部位は、フィブロネクチンもしくはチトクロームBなどといった非抗体タンパク質スキャフォールド上にCDRを配置することによって与えられるが (Haan & Maggos, *BioCentury*, 12(5):A1-A6, 2004; Koide, *Journal of Molecular Biology*, 284:1141-1151, 1998; Nygrenら, *Current Opinion in Structural Biology*, 7:463-469, 1997)、あるいは、望ましい標的に対する結合特異性を付与するように、タンパク質スキャフォールド内のループのアミノ酸残基をランダム化する、もしくは変異させることによって与えられることもある。タンパク質中に新規結合部位を操作するためのスキャフォールドは、Nygrenら (上記) により詳細に概説されている。抗体擬似体のためのタンパク質スキャフォールドはWO/0034784に開示されており、これは参照によりその全体を本明細書に組み入れるが、その発明者らは、少なくとも1つのランダム化されたループを有するフィブロネクチンIII型ドメインなどのタンパク質 (抗体擬似体) を記載している。1つもしくは複数のCDR、たとえば、複数のHCDRのセット、または単一のHCDRおよび/またはLCDR3をその中にグラフトするのに適したスキャフォールドは、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの任意のドメインメンバーが提供することができる。スキャフォールドは、ヒトもしくは非ヒトタンパク質とすることができる。非抗体タンパク質スキャフォールドの利点は、少なくとも一部の抗体分子より小さく、かつ/または操作しやすいスキャフォールド分子内に、抗原結合部位を提供できることである。結合メンバーのサイズが小さいことは、有用な生理学的特性、たとえば、細胞に入り、組織に深く浸透し、あるいは他の構造体の中にある標的に到達する能力、または標的抗原のタンパク質キャビティー内で結合する能力をもたらすことができる。非抗体タンパク質スキャフォールドの抗原結合部位を使用することは、Wess, 2004において概説されている。典型的なのは、安定した骨格および1つもしくは複数の可変ループを有するタンパク質であって、この1つもしくは複数のループのアミノ酸配列が、特異的もしくはラン

20

30

ダムに変異して、標的抗原に結合する抗原結合部位をもたらす。こうしたタンパク質には、*S. aureus*由来プロテインAのIgG結合ドメイン、トランスフェリン、テトラネクチン、フィブロネクチン (たとえば、第10フィブロネクチンIII型ドメイン)、およびリポカリンがある。他の方法としては、合成「ミクロボディ」 (Selecore GmbH社) があるが、これは、分子内ジスルフィド結合を有する小タンパク質-サイクロチドに基づいている。

40

【0131】

抗体配列および/または抗原結合部位に加えて、本発明の結合メンバーは、たとえば、折りたたまれたドメインなどのペプチドもしくはポリペプチドを形成している他のアミノ酸、または抗原に結合する能力に加えて別の機能的特徴を分子に付与する他のアミノ酸を含有することができる。本発明の結合メンバーは、検出可能な標識を保有することができるが、毒素またはターゲティング部分または酵素に (たとえば、ペプチド結合もしくはリンカーを介して) コンジュゲートしていてもよい。たとえば、結合メンバーは、抗原結合

50

部位のみならず（たとえば酵素ドメインの）触媒部位も含有することができるが、この抗原結合部位は、抗原と結合することによって触媒部位を抗原に向けてターゲティングする。触媒部位は、抗原の生物学的機能を、たとえば切断によって阻害することができる。

【 0 1 3 2 】

上記のように、非抗体スキヤフォールドはCDRを保有することができるが、CDR、たとえばCDR3または本発明のCDRのセットを保有するための構造は、一般に、抗体重鎖もしくは軽鎖配列、またはそれらの重要部分であり、その中で、CDRまたはCDRのセットは、再構成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる天然のVHおよびVL抗体可変ドメインのCDRまたはCDRのセットに対応する位置にある。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest、第4版、US Department of Health and Human Services (米保健社会福祉省)、1987)、およびそのアップデート、たとえば第5版 (Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、US Department of Health and Human Services (米保健社会福祉省)、Public Service, NIH, Washington, 1991)を参照して決定することができる。

10

【 0 1 3 3 】

特に指示しない限り、本明細書で言及される特定の残基、ならびにCDRおよびフレームワーク領域の位置は、Kabatのナンバリングシステムを使用する。

【 0 1 3 4 】

CDR領域またはCDRは、Kabatら（上記）で定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖超可変領域を示すものである。抗体は、典型的には、3つの重鎖CDRおよび3つの軽鎖CDRを含有する。「CDRまたは複数のCDR」という用語は、場合によって、上記領域のうち1つ、またはいくつか、またはその全体までも示すために本明細書では使用され、この領域は、抗体が認識する抗原またはエピトープに対する、当該抗体の親和性に基づく結合に関与する、アミノ酸残基の大部分を含有している。

20

【 0 1 3 5 】

6つの短いCDR配列のうち、重鎖の第3のCDR (HCDR3) は、サイズ可変性が高い（それを引き起こす遺伝子の配置メカニズムによって本質的に多様性が大きい）。既知の最長サイズは26アミノ酸であるが、2アミノ酸のように短いこともある。HCDR3は、機能としては、抗体の特異性の決定に一部関与する (Segalら、PNAS, 71:4298-4302, 1974; Amitら、Science, 233:747-753, 1986; Chothiaら、J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987; Chothiaら、Nature, 342:877-883, 1989; Catonら、J. Immunol., 144:1965-1968, 1990; Sharonら、PNAS, 87:4814-4817, 1990(a); Sharonら、J. Immunol., 144:4863-4869, 1990; Kabatら、J. Immunol., 147:1709-1719, 1991b)。

30

【 0 1 3 6 】

HCDR1は、Kabat残基31-35からなる5アミノ酸長とすることができる。

【 0 1 3 7 】

HCDR2は、Kabat残基50-65からなる17アミノ酸長とすることができる。

【 0 1 3 8 】

HCDR3は、Kabat残基95-102からなる7アミノ酸長とすることができる。

【 0 1 3 9 】

LCDR1は、Kabat残基24-34からなる13アミノ酸長とすることができる。

40

【 0 1 4 0 】

LCDR2は、Kabat残基50-56からなる7アミノ酸長とすることができる。

【 0 1 4 1 】

LCDR3は、Kabat残基89-97からなる12アミノ酸長とすることができる。

【 0 1 4 2 】

抗体分子

この用語は、天然であるか、部分的または完全に合成であるかにかかわらず免疫グロブリンを表す。また、この用語は、抗体の抗原結合部位を含有するポリペプチドもしくはタンパク質を含む。ここで当然のことながら、本発明は自然状態の抗体に関するものではな

50

く、すなわち、抗体は天然の環境に存在するのではなくて、天然起源からの精製によって単離もしくは入手する、あるいは遺伝子組換えまたは化学合成によって入手することができたが、そのとき、後述のように非天然アミノ酸を含有することができる。抗体の抗原結合部位を含有する抗体フラグメントには、Fab、Fab'、Fab'-SH、scFv、Fv、dAb、Fd；およびダイアボディ(diabody)などの分子が含まれるが、それらに限定されない。

【0143】

本発明の抗体分子は、IgG、たとえばIgG1、IgG4、IgG2または非グリコシルIgG2とすることができる。

【0144】

モノクローナルおよびその他の抗体を用い、さらに組換えDNA技術を使用して、標的抗原に結合する他の抗体またはキメラ分子を作製することができる。こうした技術は、抗体の免疫グロブリン可変領域またはCDRをコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域、または定常領域+フレームワーク領域に導入することを伴いうる。たとえば、EP-A-184187、GB 2188638AまたはEP-A-239400、およびその後の多数の文献を参照されたい。ハイブリドーマ、または抗体を産生する他の細胞は、遺伝子変異または他の変化を受けることができるが、この変異や変化は、産生される抗体の結合特異性を変化させることも変化させないこともある。

【0145】

抗体はさまざまな方法で改変することができるので、「抗体分子」という用語は、必要とされる特異性を有する抗体の抗原結合部位を有し、かつ/または、抗原に結合する、任意の結合メンバーまたは物質を包含すると解釈されるべきである。したがって、この用語は、天然であるか、全体的もしくは部分的に合成であるかにかかわらず、抗体の抗原結合部位を含有する任意のポリペプチドを含めて、抗体フラグメントおよび誘導体を包含する。したがって別のポリペプチド(たとえば、別種に由来する、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属するもの)と融合した、抗体の抗原結合部位もしくは同等物を含有するキメラ分子は、この用語に含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、EP-A-0120694およびEP-A-0125023、ならびにその後の多数の文献に記載されている。

【0146】

抗体工学の分野で利用できるその他の技術によって、ヒト抗体およびヒト化抗体の単離が可能になった。たとえばヒトハイブリドーマは、Kontermann & Dubel (Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545)に記載のように作製することができる。結合メンバーを作り出すためのもう一つの既存技術であるファージディスプレイは、多くの刊行物、たとえば、WO92/01047 (以下でさらに検討される)および米国特許US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160、US6521404およびKontermann & Dubel (上記)に、詳細に記載されている。マウス抗体遺伝子が不活化されて、機能的にはヒト抗体遺伝子に置き換えられているが、マウス免疫系の他の構成要素はインタクトなままである、トランスジェニックマウスを用いて、ヒト抗体を単離することができる(Mendezら、Nature Genet, 15(2):146-156, 1997)。

【0147】

たとえば、Knappikら(J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000)またはKrebsら(Journal of Immunological Methods, 254:67-84, 2001)によって記載されるように、オリゴヌクレオチドを合成し、適当な発現ベクター内にアセンブルすることによって、合成抗体分子を作製することができる。

【0148】

全抗体のフラグメントは、抗体と結合する機能を果たせることが示されている。結合フラグメントの例は、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなるFabフラグメント；(ii) VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iii) 単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(iv) VHまたはVLドメインからなるdAbフラグメント(Wardら、Nature 341:544-546, 1989; McCaffertyら、Nature, 348:552-554, 1990; Holtら、Trends

10

20

30

40

50

in Biotechnology 21, 484-490, 2003); (v) 単離されたCDR領域; (vi) F(ab')₂フラグメント (2つの連結されたFabフラグメントを含む2価フラグメント); (vii) 一本鎖Fv分子(scFv) (VHドメインおよびVLドメインがペプチドリinkerによって連結されており、これによって、前記2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することが可能となっている) (Birdら、Science, 242, 423-426, 1988; Huston PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) 二重特異性一本鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)および(ix) 遺伝子融合によって構築された多価または多重特異性フラグメント「ダイアボディ」(W094/13804; Holligerら、PNAS USA 90:6444-6448, 1993a)である。Fv、scFvまたはダイアボディ分子は、VHおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋を組み込むことによって安定化することができる(Reiterら、Nature Biotech, 14:1239-1245, 1996)。CH3ドメインに連結されたscFvを含有するミニボディを作製してもよい(Huら、Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996)。結合フラグメントの他の例はFab'およびFab'-SHである。Fab'は、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に少数の残基(抗体ヒンジ領域由来の1つもしくは複数のシステインも含まれる)が付加されていることによってFabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインの1つもしくは複数のシステイン残基が遊離のチオール基を保持するFab'フラグメントである。

【0149】

本発明の抗体フラグメントは、本明細書に記載の任意の抗体分子、たとえば、抗体1~42のいずれかのVHおよび/またはVLドメインまたはCDRを含有する抗体分子から出発して、ペプシンまたはパインといった酵素による消化などの方法によって、および/または化学的還元によるジスルフィド架橋の切断によって得られうる。別の方法では、本発明に含まれる抗体フラグメントは、同様に当業者によく知られている遺伝子組換え技術によって、あるいは他に、たとえばApplied Biosystems社などによって供給されるような自動ペプチドシンセサイザーを用いたペプチド合成、または核酸合成および発現によって得ることができる。

【0150】

本発明の機能的抗体フラグメントには、化学修飾、特にPEG化によって、またはリボソーム内への取り込みによって、半減期が長くなった任意の機能的フラグメントが含まれる。

【0151】

dAb(ドメイン抗体)は、抗体の、抗原に結合する単量体小フラグメント、すなわち抗体重鎖または軽鎖の可変領域である(Holtら、Trends in Biotechnology 21, 484-490, 2003)。VH dAbは、ラクダ科の動物(たとえばラクダ、ラマ)において天然に存在しており、ラクダ科動物を標的抗原で免疫し、抗原特異的B細胞を単離して、個々のB細胞からdAb遺伝子を直接クローニングすることによって作製することができる。dAbは細胞培養で生成させることもできる。dAbは、サイズが小さく、溶解性に優れ、温度安定性であるので、生理学的に有用で、選択および親和性成熟に好適となる。本発明の結合メンバーは、実質的に本明細書に記載されたVHもしくはVLドメイン、または実質的に本明細書に記載されたCDRのセットを含有するVHもしくはVLドメインを含んでなるdAbとすることができる。

【0152】

本明細書で使用される「実質的に記載された」という表現は、本明細書に記載の結合メンバーのVHまたはVLドメインの、関連CDRの特徴(1つもしくは複数)が、本明細書に配列が記載されている指定領域と同一であるかまたはきわめて類似していることを表す。本明細書で使用される、1つもしくは複数の可変領域の指定領域(1つもしくは複数)に関する「きわめて類似している」という表現は、VHおよび/またはVLドメインのCDRにおいて、1から約12個まで、たとえば1~8、たとえば1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1もしくは2個のアミノ酸置換を行ってもよいことを想定している。

【0153】

本発明の抗体には二重特異性抗体が含まれる。二重特異性または二機能性抗体はモノクローナル抗体の第二世代となるが、これらにおいて、2つの異なる可変領域が同一分子に

組み込まれている (Holliger, P. & Winter, G. 1999 Cancer and metastasis rev. 18:4 11-419, 1999)。それらが新規エフェクター機能を補充する能力、またはいくつかの分子を腫瘍細胞表面にターゲティングする能力から、その有用性は、診断分野でも治療分野においても実証されている。二重特異性抗体を使用する場合、これらは従来の二重特異性抗体であってもよいが、上記の二重特異性抗体フラグメントのいずれかであってもよく、前者は、さまざまな方法で製造することができるが (Holligerら、PNAS USA 90:6444-6448, 1993)、たとえば、化学的に、またはハイブリッドハイブリドーマから、調製することができる。これらの抗体は、化学的方法 (Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp et al., J. Hemat. 377-382, 1995)、または体細胞による方法 (Staerz U. D. and Bevan M. J. PNAS 83, 1986; et al., Method Enzymol. 121:210-228, 1986) によって得られるが、同様に遺伝子工学技術によっても得ることが可能であって、この技術は、強制的にヘテロ二量体化させることを可能にし、それによって目的の抗体の精製プロセスを容易にするものである (Merchand et al. Nature Biotech, 16:677-681, 1998)。二重特異性抗体の例としては、BiTE (商標) 技術の二重特異性抗体があるが、この抗体では、異なる特異性を有する2つの抗体の結合ドメインが使用され、短いフレキシブルなペプチドを介して直接連結されている。これが短いポリペプチド一本鎖の上で2つの抗体を結びつけている。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインのみを用いて、Fc領域なしで構築することができるので、抗イディオタイプ反応の影響を低下させることができる。

【0154】

二重特異性抗体は、完全なIgGとして、二重特異性Fab'2として、Fab'PEGとして、ダイアボディとして、あるいは二重特異性scFvとして構築することができる。さらに、2つの二重特異性抗体を当業者に公知の通常の方法によって連結し、四価抗体を形成することができる。

【0155】

二重特異性ダイアボディは、二重特異性全抗体とは対照的に、大腸菌において容易に構築し発現させることができるという理由で、特に有用であることもある。適当な結合特異性を持つダイアボディ (および抗体フラグメントなどの他の多くのポリペプチド) は、ライブラリーからファージディスプレイ (WO94/13804) によって容易に選択することができる。ダイアボディの一方のアームが、たとえばIL-4R に対する特異性を有していて、一定に保持されるべきであるならば、もう一方のアームを変化させたライブラリーを作製して、適当な特異性を持つ抗体を選択することができる。二重特異性全抗体は、Ridgewayら、(Protein Eng., 9:616-621, 1996) に記載されるような別法によって作製してもよい。

【0156】

IL-4R に対する抗体を得るために、当技術分野においてさまざまな方法が利用できる。抗体は、特にヒト、マウス、キメラまたはヒト化起源の、モノクローナル抗体とすることができるが、これは当業者に周知の標準的方法によって得られる。

【0157】

一般に、モノクローナル抗体またはその機能的フラグメント (特にマウス起源) を調製するために、特にマニュアル「Antibodies」 (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988) に記載の技術、またはKohlerおよびMilstein (Nature, 256:495-497, 1975) に記載のハイブリドーマからの調製法を参照することができる。

【0158】

モノクローナル抗体は、たとえば、IL-4R 、または、前記モノクローナル抗体によって認識されるエピトープを含有するその断片の1つ、に対して免疫した動物細胞から得られる。IL-4R またはその断片の1つは、特に、IL-4R またはその断片をコードするcDNA配列中に含まれる核酸配列から出発する遺伝子組換えによる通常の作業方法、IL-4R および/またはその断片のペプチド配列中に含まれるアミノ酸配列から出発するペプチド合成による通常の作業方法にしたがって、作製することができる。モノクローナル抗体は、たとえば、IL-4R 、または前記モノクローナル抗体によって認識されるエピトープを含

有するその断片の1つが、あらかじめ固定化されたアフィニティカラムで、精製することができる。より詳細には、モノクローナル抗体は、プロテインAおよび/またはGでのクロマトグラフィーによって精製することができるが、次に、残存する夾雑タンパク質ならびにDNAおよびLPSの除去を目的とするイオン交換クロマトグラフィーを、それ自体行っても行わなくてもよく、続いて、二量体または他の多量体の存在による潜在的凝集物を除去する目的で、セファロースゲルによる排除クロマトグラフィーを行うことができるが行わなくてもよい。ある実施形態において、これらの全技術を同時に、または逐次的に続けて行うことができる。

【0159】

抗原結合部位

これは、標的抗原の全体または一部と結合し、かつそれに相補的な、分子の一部を表す。抗体分子では、それは抗体抗原結合部位と称され、標的抗原の全体または一部と結合し、かつそれに相補的な、抗体の一部をなす。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定の部分にしか結合することができず、その部分をエпитープという。抗体抗原結合部位は、1つもしくは複数の抗体可変ドメインによって与えられる。抗体の抗原結合部位は、抗体軽鎖可変領域（VL）および抗体重鎖可変領域（VH）を含むことができる。

【0160】

単離されている

これは、本発明の結合メンバー、またはそうした結合メンバーをコードする核酸が、総じて本発明に合致している状態を表す。したがって、VHおよび/またはVLドメインを含む本発明の結合メンバー、ならびにコードする核酸分子およびベクターは、たとえば、その天然環境から単離および/または精製されて、実質的に純粋もしくは均一な状態で、または核酸の場合には、所定の機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の起源の核酸もしくは遺伝子が実質的にない状態で、提供される。単離された結合メンバーおよび単離された核酸は、天然の環境、またはそれらが調製される（この場合その調製はin vitroまたはin vivoで実施される組換えDNA技術による）環境（たとえば、細胞培養）中に存在する他のポリペプチドまたは核酸などの、天然では付随する物質を含まないまたは実質的に含まない。メンバーおよび核酸は、賦形剤またはアジュバントとともに製剤することができるが、それでもなお事実上、実用目的については単離されているとすることができる。たとえば、メンバーは通常、免疫アッセイ用にマイクロタイタープレートにコーティングするために使用する場合、ゼラチンと混合することになり、あるいは、診断または治療に使用する場合は製薬上許容される担体または賦形剤と混合することになる。結合メンバーは、天然で、または異種真核細胞（たとえば、CHO、またはNS0（ECACC 85110503）細胞）の系によって、グリコシル化されていてもよいが、グリコシル化されていなくてもよい（たとえば、原核細胞での発現によって作製される場合）。

【0161】

抗IL-4R 抗体分子を含有する不均一標品も本発明の一部をなしている。たとえば、こうした標品は、さまざまな程度にグリコシル化され、かつ/または、N末端グルタミン酸が環化してピログルタミン酸残基を形成するといった、誘導体化されたアミノ酸を有する、全長重鎖、およびC末端リジンを欠いた重鎖を有する、抗体の混合物とすることができる。

【0162】

上記のように、本発明の結合メンバーは、IL-4R の生物活性を調節しており、これを中和することができる。本明細書に記載のように、本発明のIL-4R 結合メンバーは、中和能力について最適化することができる。一般に、中和能力の最適化には、選択された結合メンバーの配列（通常、抗体の可変ドメイン配列）を変異させて、結合メンバーのライブラリーを作製する必要がある。その後、能力をアッセイして、より強力な結合メンバーが選択される。このようにして選択された「能力最適化」結合メンバーは、ライブラリーを作製する元になった結合メンバーより高い能力を有する傾向がある。それにもかかわらず、高い能力を持つ結合メンバーは、最適化せずに得ることも可能であって、たとえば、

能力の高い結合メンバーは、生化学的中和アッセイなどの最初のスクリーニングから、直接得ることができる。「能力最適化」結合メンバーは、最適化された結合能力、またはIL-4R の特定の活性、または下流機能を中和する最適化された能力をもつ結合メンバーを表す。アッセイおよび能力は、本明細書の別の箇所により詳細に説明される。本発明は、能力最適化結合メンバーと非最適化結合メンバーをともに与えるが、選択された結合メンバーから能力を最適化するための方法ももちろん提供する。このように、本発明によって当業者は、高い能力を有する結合メンバーを生成させることが可能になる。

【0163】

能力の最適化によって、所与の結合メンバーからより能力の高い結合メンバーを生成させることができるが、能力の最適化をしなくても能力の高い結合メンバーが得られることも指摘しておく。

10

【0164】

他の態様において、本発明は、抗原に結合することができる1つもしくは複数の結合メンバーを得る方法を与えるが、その方法は、本発明の結合メンバーのライブラリーと当該抗原とを接触させること、ならびに当該抗原に結合可能なライブラリーの1つもしくは複数の結合メンバーを選択することを包含する。

【0165】

ライブラリーは、粒子または分子複合体、たとえば、酵母、細菌もしくはバクテリオファージ（たとえばT7）粒子、ウイルス、細胞などの複製可能な遺伝的パッケージ上に、または共有結合によるディスプレイ系、リボゾームディスプレイ系もしくはその他の *in vitro* ディスプレイ系に、ディスプレイすることができるが、それぞれの粒子または分子複合体は、抗体VH可変ドメインをその上にディスプレイして含有しており、さらに、もしあればディスプレイされたVLドメインを含有してもよい。ファージディスプレイは、WO92/01047、ならびに米国特許US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160およびUS6521404に記載されており、これはそれぞれ、参照によりその全体を本明細書に含めるものとする。

20

【0166】

抗原に結合可能で、かつバクテリオファージまたは他のライブラリー粒子もしくは分子複合体上にディスプレイされている結合分子を選択した後、選択された前記結合メンバーをディスプレイしているバクテリオファージまたは他の粒子もしくは分子複合体から、核酸を取得することができる。こうした核酸はその後、選択された前記結合メンバーをディスプレイするバクテリオファージまたは他の粒子もしくは分子複合体から採取された核酸配列を有する、核酸からの発現によって、結合メンバーまたは抗体VHもしくはVL可変ドメインを作製する際に、使用することができる。

30

【0167】

前記の選択された結合メンバーの抗体VHドメインのアミノ酸配列を有する、抗体VHドメインは、単離された状態でも、このようなVHドメインを含有する結合メンバーとしても与えられうる。

【0168】

IL-4R と結合する能力、および/または、IL-4R との結合について、たとえば親抗体分子（たとえば抗体1）もしくは最適化抗体分子、抗体2~42（たとえば、scFv型および/またはIgG型で、たとえばIgG1、IgG2またはIgG4で）と競合する能力をさらに調べることができる。IL-4R を中和する能力は、本明細書の他所で検討されるように、テストすることができる。

40

【0169】

本発明の結合分子は、たとえば、scFvまたはIgG1またはIgG2またはIgG4型の、抗体1~42のうち1つのもつ親和性で、またはそれより強い親和性で、IL-4R と結合することができる。

【0170】

50

本発明の結合分子は、たとえば、scFvまたはIgG1またはIgG2またはIgG4型の、抗体1～42のうち1つのもつ能力で、またはそれに優る能力で、IL-4R の生物活性を中和することができる。

【0171】

異なる結合メンバーの結合親和性および中和能力を、適切な条件下で比較することができる。

【0172】

本明細書に記載の抗体分子の変異体を作製し、本発明に使用することができる。多変数データ解析技術を構造/特性-活性相関に適用する計算化学の先導にしたがって (Woldら、

Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6))、周知の数学的手法、たとえば、統計的回帰、パターン認識および分類を用いて、抗体の定量的活性-特性相関を導くことができる (Normanら、Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 第3版 (April 1998) ISBN: 0471170828; Kandel, Abraham & Backer, Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847; Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089; Witten & Frank Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java(登録商標) Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525; Denison DGT. (Editor), Holmes, CC. ら、Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369; Ghose, AK. & Viswanadhan, VN. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8)。抗体の特性は、抗体配列、機能および三次元構造の経験的および理論的モデル(たとえば、接触しそうな残基、または計算された物理化学的特性)から導かれ、これらの特性は、1つ1つ個別に、および組み合わせて考慮することができる。

【0173】

VHドメインおよびVLドメインからなる抗体の抗原結合部位は、典型的には、6つのペプチドループ：軽鎖可変ドメイン(VL)由来の3つ、および重鎖可変ドメイン(VH)由来の3つ、で形作られている。既知の原子構造をもつ抗体の解析は、抗体複合部位の配列と三次元構造との間の相関を解明した(Chothia et al. Journal Molecular Biology 1992227, 799-817, 1992; Al-Lazikani et al. Journal Molecular Biology 273(4):927-948, 1997)。こうした相関性は、VHドメインの第3領域(ループ)を除いて、結合部位のループが、少数の主鎖立体構造：カノニカル構造の1つを有することを意味する。特定のループ内で形成されるカノニカル構造は、そのサイズ、ならびにループとフレームワーク領域の双方の重要部位における特定の残基の存在によって決定されることが明らかとなっている(Chothia et al, Journal Molecular Biology 1992227, 799-817, 1992; Al-Lazikani 上記)。

【0174】

配列-構造相関に関するこの研究は、既知の配列をもつが三次元構造は不明である抗体中の残基であって、その抗体のCDRループの三次元構造の維持に重要であり、ゆえに結合特異性を維持している前記残基を予想するために利用することができる。こうした予想は、その予想と先行する最適化実験から得られたアウトプットとを比較することによって、裏付けることができる。構造的アプローチでは、任意の、自由に利用できる、または市販されているパッケージ、たとえばWAMを用いて(Whitelegg & Rees, Prot. Eng., 12:815-824, 2000)、抗体分子のモデルを作成することができる(Chothia et al. Science, 223:755-758, 1986)。そこで、タンパク質可視化および解析ソフトウェアパッケージ、たとえば、Insight II (Accelrys, Inc.) またはDeep View (Geux & Peitsch, Electrophor

esis(1997) 18, 2714-2723) を用いて、CDR内のそれぞれの位置で起こりうる置換を評価することができる。次に、この情報を用いて、活性に対して最小の、または有益な影響を及ぼす可能性の高い置換を行うことができる。

【0175】

CDR、抗体VHまたはVLドメインおよび結合メンバーのアミノ酸配列の中で置換を行うのに必要な技術は、一般に当技術分野で利用可能である。活性に対して最小の、または有益な影響を及ぼすと予想されるまたは予想されない置換を有する変異体配列を作製することができ、IL-4R と結合する能力および/もしくはIL-4R を中和する能力について、ならびに/または他の任意の所望の特性について、テストすることができる。

【0176】

本明細書中にその配列を具体的に開示しているVHおよびVLドメインのいずれかの、可変ドメインアミノ酸配列変異体を、先に述べたように、本発明にしたがって用いることができる。特定の変異体は、1つもしくは複数のアミノ酸配列の変化(アミノ酸残基の付加、欠失、置換および/または挿入)を含んでいてもよく、約20個未満の変化、約15個未満の変化、約12個未満の変化、約10個未満の変化、または約6個未満の変化を含んでいてもよく、例えば5、4、3、2または1個の変化を含むことができる。変更は、1つもしくは複数のフレームワーク領域、および/または1つもしくは複数のCDR内で、加えることができる。変化は通常、結果として機能の喪失をもたらさないで、このように変化したアミノ酸配列を含有する結合メンバーは、IL-4R と結合し、および/またはこれを中和する能力を保持することができる。たとえば、結合メンバーは、たとえば、本明細書に記載のアッセイで測定して、変化させていない結合メンバーと量的に同じ結合および/または中和能力を保有することができる。このように変化したアミノ酸配列を含有する結合メンバーは、向上したIL-4R に対する結合および/または中和能力を有することもある。実際、抗体20のランダム変異から生じた抗体21~42は、抗体20と比較して、大半がさまざまなフレームワーク領域内に変異を示すが、これらはそれぞれ依然としてIL-4R と結合し、および/またはこれを中和するのであって、たしかに一部は、向上したIL-4R に対する結合および/または中和能力を示す。

【0177】

変化には、非天然または非標準アミノ酸で1つもしくは複数のアミノ酸残基を置き換えること、1つもしくは複数のアミノ酸残基を、非天然または非標準の形に修飾すること、または、1つもしくは複数の非天然または非標準アミノ酸を配列内に挿入することを含めることができる。例番号および本発明の配列中の位置は本明細書の他の箇所に記載する。天然アミノ酸には、標準一文字コードでG、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、Eと表示される20個の「標準的な」L-アミノ酸がある。非標準アミノ酸には、ペプチド骨格に組み込むことができる、または既存のアミノ酸残基の修飾の結果として得られる、任意の他の残基が含まれる。非標準アミノ酸は、天然であることも、非天然であることもある。いくつかの天然の非標準アミノ酸が当技術分野で知られており、たとえば、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリジン、3-メチルヒスチジン、N-アセチルセリン、などである(Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995)。N-位で誘導体化されたアミノ酸残基は、アミノ酸配列のN末端にのみ位置づけられることになる。本発明では通常、アミノ酸はL-アミノ酸であるが、一部の実施形態では、D-アミノ酸とすることができる。したがって、変化とは、L-アミノ酸を、D-アミノ酸に改変する、またはD-アミノ酸で置き換えることを含む。アミノ酸のメチル化、アセチル化および/またはリン酸化型も知られており、本発明のアミノ酸は、そうした修飾を受けることができる。

【0178】

本発明の抗体ドメインおよび結合メンバーのアミノ酸配列は、上記の非天然または非標準アミノ酸を含有することができる。一部の実施形態では、非標準アミノ酸(たとえば、D-アミノ酸)をアミノ酸配列内に、合成中に組み込むことができるが、他の実施形態では、アミノ酸配列の合成後に、「元の」標準アミノ酸の修飾または置換によって、非標準ア

10

20

30

40

50

ミノ酸を導入してもよい。

【0179】

非標準および/または非天然アミノ酸の使用は、構造的および機能的多様性を高めるので、本発明の結合メンバーにおいて、望ましいIL-4R 結合および中和特性を達成するための能力を高めることができる。加えて、D-アミノ酸およびアナログは、動物、たとえばヒトへの投与後にL-アミノ酸を有するポリペプチドのin vivo分解がおこるので、標準L-アミノ酸より優れた薬物動態プロファイルを有することが明らかになっている。

【0180】

本発明のCDR由来配列を保有する新規VHまたはVL領域は、可変ドメイン全体において変異を生じさせる、1つもしくは複数の選択されたVHおよび/またはVL遺伝子のランダム変異誘発によって生成させることができる。こうした技術は、Gramら (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580, 1992) により記載されているが、そこではエラープロードPCRが用いられた。一部の実施形態では、可変ドメイン全体またはCDRのセットの中で、1つもしくは複数のアミノ酸置換が起こっている。利用可能なもう1つの方法は、変異誘発を、VHまたはVL遺伝子のCDR領域に向けることである。こうした技術は、Barbasら (Proc. Natl. Acad. Sci., 91:3809-3813, 1994) およびSchierら (J. Mol. Biol. 263:551-567, 1996) により開示されている。

【0181】

上記の技術はすべて、そのまま当技術分野で公知であって、当業者は当技術分野の通常の方法論によって本発明の結合メンバーを作製するために、そうした技術を利用することができる。

【0182】

本発明の他の態様は、IL-4R に対する抗体の抗原結合部位を得るための方法を与えるが、その方法は、本明細書に提示されたVHドメインのアミノ酸配列内で1つもしくは複数のアミノ酸を付加、欠失、置換または挿入することによって、VHドメインのアミノ酸配列変異体であるVHドメインを提供すること、こうして与えられたVHドメインを1つもしくは複数のVLドメインと必要に応じて組み合わせること、ならびにそのVHドメインまたは1つもしくは複数のVH/VLの組み合わせをテストして、IL-4R に対する結合メンバーまたは抗体の抗原結合部位であって、必要に応じて、1つもしくは複数の機能的特性、たとえばIL-4R 活性を中和する能力、を有するものを同定することを含む。前記VLドメインは、実質的に本明細書に提示されたとおりのアミノ酸配列を有していてもよい。本明細書に記載のVLドメインの1つもしくは複数の配列変異体を、1つもしくは複数のVHドメインと組み合わせる、同様の方法を用いることもできる。

【0183】

上記のように、実質的に本明細書に提示されるCDR配列は、ヒト抗体可変ドメインまたはその実質的な一部分の中にCDRとして保持されることが考えられる。実質的に本明細書に提示されるHCDR3配列は、本発明の実施形態を表しており、たとえばこれらはそれぞれ、HCDR3として、ヒト重鎖可変ドメインもしくは実質的なその一部分の中に保持されることがある。

【0184】

本発明で使用される可変ドメインは、任意の生殖系列または再構成ヒト可変ドメインから得る、もしくは導き出すことができるが、既知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列または実際の配列に基づいた合成可変ドメインであってもよい。可変ドメインは非ヒト抗体を起源として得ることができる。本発明のCDR配列 (たとえば、CDR3) は、組換えDNA技術を用いて、CDR (たとえば、CDR3) を欠いた可変ドメインのレパートリーに導入することができる。たとえば、Marksら (Bio/Technology, 10:779-783, 1992) は、抗体可変ドメインのレパートリーを作製する方法を記載しているが、その方法では、可変ドメイン領域の5' 末端に対する、またはそれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトVH遺伝子の第3フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーとともに使用して、CDR3を欠いたVH可変ドメインのレパートリーを提供する。Marksらはさらに、このレパートリーを

特定の抗体のCDR3と組み合わせる方法も記載している。同様の技術を用いて、本発明のCDR3由来配列を、CDR3を欠いたVHまたはVLドメインのレパートリーとシャッフルし、シャッフルされた完全なVHまたはVLドメインを同属のVLまたはVHドメインと組み合わせ、本発明の結合メンバーを与えることができる。その後、適当な結合メンバーを選択することができるように、レパートリーを適当な宿主系、たとえば、WO92/01047（これはその全体を参照により本明細書に含めるものとする）、またはKay, Winter & McCafferty (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press, 1996) などのその後の多数の文献のいずれかの、ファージディスプレイ系にディスプレイすることができる。レパートリーは 10^4 個から上の数のメンバー、たとえば、少なくとも 10^5 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^7 、少なくとも 10^8 、少なくとも 10^9 、または少なくとも 10^{10} 個のメンバーから構成されることができる。他の適当な宿主系には、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、T7ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、細胞ディスプレイ、リボゾームディスプレイおよび共有結合ディスプレイがあるがそれに限定されない。

【0185】

同様のシャッフリングまたはコンビナトリアル技術は、Stemmer (Nature, 370:389-391, 1994) によっても開示されており、ここではラクタマーゼ遺伝子に関する技術が記載されているが、そのアプローチを抗体の作製に利用できることが観察されている。

【0186】

IL-4R 抗原に対する結合メンバーを調製する方法が与えられるが、その方法は下記を含んでなる：

- (a) 置き換えられるべきCDR3を含有する、またはCDR3をコードする領域を欠失した、VHドメインをコードする核酸の出発レパートリーを提供すること；
- (b) VHドメインをコードする核酸の生成物レパートリーを与えるために、前記レパートリーを、本明細書で後に提示する、VH CDR3のアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせ、前記ドナー核酸がレパートリーのCDR3領域に挿入されるようにすること；
- (c) 前記生成物レパートリーの核酸を発現させること；
- (d) IL-4R に対する結合メンバーを選択すること；ならびに
- (e) 前記結合メンバーまたはそれをコードする核酸を回収すること。

【0187】

また、置き換えられるべきCDR3を含有する、またはCDR3をコードする領域を欠失した、VLドメインをコードする核酸のレパートリーと、本発明のVL CDR3を組み合わせる、同様の方法を用いることができる。

【0188】

同じように、本明細書に記載の、他のVHおよびVLドメイン、CDRのセットおよびHCDRのセットおよび/またはLCDRのセットを用いることができる。

【0189】

同様に、1つもしくは2つ、または3つすべてのCDRを、VHまたはVLドメインのレパートリーにグラフトすることができ、これらは次にIL-4R に対する1つまたは複数の結合メンバーのためにスクリーニングされる。

【0190】

あるいはまた、本発明の結合メンバー、たとえば抗体1~42のいずれかのVHおよび/またはVLドメインをコードする核酸を、変異誘発（たとえば、標的化またはランダム）に供し、1つもしくは複数の変異した核酸を生成させることができる。その後、こうした配列によってコードされる結合メンバーを生成することができる。

【0191】

ある実施形態において、抗体1~42のHCDR1、HCDR2およびHCDR3のうち1つもしくは複数、または抗体1~42のHCDRのセットを用いることができ、かつ/または、抗体1~42のLCDR1、LCDR2およびLCDR3のうち1つもしくは複数、または抗体1~42のLCDRのセットを用いることができる。

【0192】

本発明のある態様によれば、IL-4R と結合する結合メンバーを作製するための方法が与えられるが、その方法は下記を含んでなる：

VHドメインもしくはVLドメインをコードする出発核酸、または、置き換えられるべきCDR1、CDR2およびCDR3を含有する、またはCDR1、CDR2および/もしくはCDR3をコードする領域を欠失した、VHまたはVLドメインをそれぞれコードする核酸の出発レパートリーを提供すること；

VHまたはVLドメインをコードする核酸の生成物レパートリーを与えるために、前記出発核酸または出発レパートリーを、抗体1～42のいずれかのCDR1、CDR2、および/またはCDR3のアミノ酸配列をコードする、またはそのアミノ酸配列の変異によって作製された、1つもしくは複数のドナー核酸と組み合わせて、1つもしくは複数の前記ドナー核酸が出発核酸もしくは出発レパートリーのCDR1、CDR2および/またはCDR3領域に挿入されるようにすること；

前記生成物レパートリーの核酸を発現させて、生成物VHもしくはVLドメインを作製すること；

必要に応じて、前記生成物VHまたはVLドメインを1つもしくは複数のコンパニオンVLもしくはVHドメインと組み合わせること；

生成物VHもしくはVLドメイン、および必要に応じてコンパニオンVLもしくはVHドメインを含有する、IL-4R に対する結合メンバーを選択すること；ならびに

前記結合メンバーまたはそれをコードする核酸を回収すること。

【0193】

具体的な実施形態において、ドナー核酸は、VHもしくはVLドメイン、またはその任意のCDR領域の、標的化変異誘発もしくはランダム変異誘発によって作製される。

【0194】

別の実施形態において、生成物VHもしくはVLドメインは、抗体定常領域に連結される。

【0195】

もう1つの実施形態において、生成物VHもしくはVLドメインおよびコンパニオンVLもしくはVHドメインはそれぞれ、IgG、scFvまたはFab抗体分子に含まれる。

【0196】

別の実施形態において、回収された結合メンバーまたは抗体分子は、IL-4R を中和する能力についてテストされる。

【0197】

別の実施形態において、抗体分子は、少なくとも1つの追加成分を含有する組成物へと調剤される。こうした成分は、たとえば、不活性な製薬用賦形剤または担体でありうる。

【0198】

一部の実施形態では、免疫グロブリン可変ドメインの大部分は、少なくとも3個のCDR領域を、介在するフレームワーク領域とともに含む。その部分は、第1および第4フレームワーク領域のいずれか一方または両方のうち少なくとも約50%をやはり含むことができるが、その50%は、第1のフレームワーク領域のC末端50%、および第4のフレームワーク領域のN末端50%である。可変ドメインの大部分のN末端およびC末端での付加残基は、天然の可変ドメイン領域には通常付いていないものとすることができる。たとえば、組換えDNA技術によって作製される、本発明の結合メンバーの構築は、結果的に、クローニングまたは他の操作段階を容易にするために導入されたリンカーによってコードされるNまたはC末端残基の導入をもたらすことがある。他の操作段階としては、本明細書の他所でより詳細に検討されるように、本発明の可変ドメインを、他のタンパク質配列、たとえば、抗体定常領域、他の可変ドメイン（たとえば、ダイアボディの作製時）、または検出可能な/機能的な標識に連結するためのリンカーの導入が挙げられる。

【0199】

本発明の一部の態様において、結合メンバーはVHおよびVLドメインのペアを含有するが、VHまたはVLドメインのいずれか一方の配列に基づく単一の結合ドメインは、本発明の別の態様をなす。単一の免疫グロブリンドメイン、特にVHドメインが標的抗原と特異的な様

10

20

30

40

50

式で結合する能力を有することがわかっている。たとえば、上記Absに関する考察を参照されたい。

【0200】

単一の結合ドメインの一方についていえば、これらのドメインを用いて、IL-4R と結合できる2ドメイン結合メンバーを形成することが可能な、相補的ドメインをスクリーニングすることができる。これは、W092/01047（参照によりその全体を本明細書に組み入れる）に記載の、いわゆる階層的二元コンビナトリアルアプローチを用いたファージディスプレイスクリーニング法によって達成することができるが、この方法では、HまたはL鎖クローンのいずれか一方を含有する個々のコロニーを用いて、もう一方の鎖（LまたはH）をコードするクローンの完全なライブラリーに感染させ、その結果として得られる2鎖結合メンバーを、その参考文献に記載されるようなファージディスプレイ技術にしたがって選択する。この技術は、Marksら（Bio/Technology, 10:779-783, 1992）によっても開示されている。

10

【0201】

本発明の結合メンバーは、抗体定常領域またはその一部、たとえば、ヒト抗体定常領域またはその一部をさらに含有することができる。たとえば、VLドメインはそのC末端で、ヒトC またはC 鎖などの抗体軽鎖定常ドメイン、たとえばC 鎖に結合していてもよい。同様に、VHドメインを基本とする結合メンバーは、そのC末端で、任意の抗体アイソタイプ、たとえば、IgG、IgA、IgY、IgEおよびIgM、ならびにアイソタイプサブクラスのいずれか（たとえばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2；特にIgG1およびIgG4）に由来する免疫グロブリン重鎖の全て、または一部（たとえばCH1ドメイン）に結合していてもよい。IgG1は、そのエフェクター機能および製造の容易さから利用しやすい。上記の特性を有し可変領域を安定化する、合成の、またはその他の、任意の定常領域バリエーションも、本発明の実施形態において有用である。

20

【0202】

「アイソタイプ」という用語は、抗体の重鎖もしくは軽鎖定常領域の分類を表す。抗体の定常ドメインは抗原との結合には関与しないが、さまざまなエフェクター機能を示す。重鎖定常領域のアミノ酸配列に応じて、所与のヒト抗体もしくは免疫グロブリンを、免疫グロブリンの5つの主要クラス：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの1つに帰属させることができる。前記クラスのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）、たとえばIgG1（1）、IgG2（2）、IgG3（3）およびIgG4（4）、ならびにIgA1およびIgA2に分割することができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 、 、 およびμと呼ばれる。クラスの異なる免疫グロブリンの構造および三次元配置はよく知られている。さまざまなヒト免疫グロブリンクラスの中で、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMだけが補体を活性化することが知られている。ヒトIgG1およびIgG3は、ヒトにおいてADCCを仲介することが知られている。ヒト軽鎖定常領域は、2つの主要クラス、 および に分類される。

30

【0203】

抗体フォーマット

本発明にはまた、改変されたIgG定常ドメインを有する、本発明の結合メンバー、特に本発明の抗体が含まれる。ヒトIgGクラスの抗体は、血清中で半減期が長く、様々なエフェクター機能を仲介することができるという機能的特徴を有しており、本発明の一定の実施形態に使用される（Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)）。ヒトIgGクラス抗体は、次の4つのサブクラスにさらに分類される：IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4。IgGクラス抗体のエフェクター機能としてのADCCおよびCDCについて、これまで数多くの研究が行われてきたが、ヒトIgGクラスの抗体のうち、IgG1サブクラスがヒトにおいてもっとも高いADCC活性およびCDC活性を有することが報告されている（Chemical Immunology, 65, 88 (1997)）。

40

【0204】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」および「ADCC」は、非特異的細胞傷害性細胞（たと

50

例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が、標的細胞に結合した抗体を認識した後、その標的細胞の溶解を引き起こす、細胞介在性の反応を表す。ある実施形態において、上記細胞はヒト細胞である。いかなる特定の作用メカニズムにも限定されるものではないが、ADCCを仲介する上記の細胞傷害性細胞は、一般に、Fc受容体（FcR）を発現する。ADCCを仲介する第1の細胞であるNK細胞はFc RIIIを発現するが、単球はFc RI、Fc RII、Fc RIIIおよび/またはFc RIVを発現する。造血細胞上のFcR発現は、RavetchおよびKinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991)に概要がまとめられている。分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または5,821,337号に記載のようなin vitro ADCCアッセイを実施することができる。こうしたアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞がある。その代わりに、またはそれに加えて、当該分子のADCC活性は、in vivoで、たとえばClynesら、*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 95: 652-656 (1998)に記載されるような、動物モデルで評価してもよい。

【0205】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、ある分子が補体活性化を開始し、補体の存在下で標的を溶解させる能力を表す。補体活性化経路は、補体系（C1q）の第1成分が、コグネイト抗原と複合体を形成している分子（たとえば抗体）に結合することによって開始される。補体活性化を評価するために、たとえば（Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996)）に記載のCDCアッセイを行うことができる。

【0206】

ヒトIgG1サブクラス抗体のADCC活性およびCDC活性の発現は、一般に、抗体のFc領域が、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、または活性化マクロファージなどのエフェクター細胞表面に存在する、抗体に対する受容体（以後「Fc R」と称する）に結合することを必要とする。さまざまな補体成分が結合可能である。その結合に関しては、ヒンジ領域のいくつかのアミノ酸残基、および抗体のC領域の第2ドメイン（以後「C 2ドメイン」と称する）が重要であること（*Eur. J. Immunol.*, 23, 1098 (1993), *Immunology*, 86, 319 (1995), *Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)）ならびにC 2ドメインの糖鎖（*Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)）も重要であることが示唆されている。

【0207】

「エフェクター細胞」は、1つもしくは複数のFcRを発現してエフェクター機能を果たす白血球である。この細胞は、すくなくともFc RI、Fc RII、Fc RIIIおよび/またはFc RIVを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを仲介するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球がある。

【0208】

「Fc受容体」または「FcR」という用語は、抗体のFc領域と結合する受容体を表すために使用される。ある実施形態において、FcRは、天然配列のヒトFcRである。さらに、ある実施形態では、FcRはIgG抗体と結合するもの（受容体）であって、これには、Fc RI、Fc RII、Fc RIIIおよびFc RIVサブクラスの受容体（これらの受容体の対立遺伝子多型および選択的スプライシング型を含む）が含まれる。Fc RII受容体にはFc RIIA（「活性化受容体」）およびFc RIIB（「抑制受容体」）があるが、これらは、主としてその細胞質ドメインに相違がある類似したアミノ酸配列を有する。活性化受容体Fc RIIAは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン依存性活性化モチーフ（ITAM）を含有する。抑制受容体Fc RIIBは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフ（ITIM）を含有する（Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)を参照されたい）。FcRは、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); および de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995)に概説されている。将来同定されるものを含めて、他のFcRは、本明細書の「FcR」という用語に含まれる。この用語には、新生児受容体、FcRnも含まれるが、これは母体IgGの胎児への移行に関与する（Guyer et al., *Immunol.*, 117:587 (1976)およびKim

10

20

30

40

50

et al., J. Immunol., 24:249 (1994))。

【 0 2 0 9 】

抗IL-4R 抗体は、エフェクター機能について、たとえば、抗体のADCCおよび/または補体依存性細胞傷害 (CDC) を強めるために、改変することができる。これは、1つもしくは複数のアミノ酸置換を抗体のFc領域内に導入することによって達成することができる。1つもしくは複数のシステイン残基もFc領域内に導入することができるが、これによってこの領域に鎖間ジスルフィド結合を形成することが可能になる。このようにして、改善された内在化能力、および増強された補体依存性細胞傷害およびADCCを有する可能性のある、ホモ二量体型抗体を生成させることができる (Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) および Shopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992))。ヘテロ二官能性架橋剤を用いて、抗腫瘍活性の強まったホモ二量体型抗体を作製することもできる (Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993))。抗体は、2つ以上のFc領域を有し、その結果として補体溶解およびADCC能力が強まるように操作することもできる (Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, (3): 219-230 (1989))。

【 0 2 1 0 】

エフェクター機能を変化させるために抗体のFc領域を操作する他の方法が、当技術分野で知られている (たとえば、いずれも Koenigらの米国特許公開第20040185045号およびPCT公報WO2004/016750は、Fc RIIAに対する結合親和性と比べてFc RIIBに対する結合親和性を強めるようにFc領域を変化させることを記載する; Armour らのPCT公報WO 99/58572、Idusogie らのWO 99/51642、およびDeoらの U.S. 6,395,272も参照されたい; これらの開示はその全体を本明細書に含めるものとする)。Fc RIIBに対する結合親和性を低下させるためにFc領域を改変する方法も、当技術分野で知られている (たとえば、いずれも Ravetchらの米国特許公開第20010036459号およびPCT公報WO01/79299、これらの開示はその全体を本明細書に含めるものとする)。野生型Fc領域と比べてFc RIIIAおよび/またはFc RIIAに対する結合親和性が強くなった変異型Fc領域を有する改変抗体も記載されている (たとえば、StavenshagenらのPCT公報WO2004/063351; この開示はその全体を本明細書に含めるものとする)。

【 0 2 1 1 】

少なくとも4つの異なる型のFc Rが発見されており、これらはそれぞれ、Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、Fc RIII (CD16) およびFc RIVと呼ばれる。ヒトでは、Fc RII およびFc RIIIはそれぞれ、Fc RIIaおよびFc RIIB、ならびにFc RIIIaおよびFc RIIBにさらに分類される。Fc Rは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜タンパク質であり、構成成分として、Fc RII、Fc RIII、およびFc RIVは、2つの免疫グロブリン様ドメインを含有する細胞外領域のある鎖を有し、Fc RIは3つの免疫グロブリン様ドメインを含有する細胞外領域のある鎖を有するが、その鎖は、IgG結合活性に関与する。それに加えて、Fc RIおよびFc RIIIは、構成成分として、鎖と関連したシグナル伝達機能を有する鎖または鎖を有する (Annu. Rev. Immunol., 18, 709 (2000), Annu. Rev. Immunol., 19, 275 (2001))。Fc RIVは、Bruhnsら、(Clin. Invest. Med., (Canada) 27:3D (2004)) によって記載されている。

【 0 2 1 2 】

目的の抗IL-4R 抗体のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されるようなin vitro ADCCアッセイを用いることができる。このアッセイは、市販のキット、たとえばCytoTox 96 (登録商標) (Promega)を用いて行ってもよい。こうしたアッセイに有用な細胞には、末梢血単核細胞 (PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、およびNK細胞株があるがそれらに限定されない。トランスジェニックFc受容体 (たとえばCD16) および関連シグナルペプチド (たとえば、Fc RI-) を発現するNK細胞株がエフェクター細胞としての役割を果たすこともできる (たとえば、CampbellのWO 2006/023148 A2を参照されたい)。たとえば、特定の抗体が補体活性化および/またはADCCによる標的細胞の溶解を仲介する能力をアッセイすることができる。対象の細胞を増殖させて、in vitroで標識する; 抗体を、抗原抗体複合体によって活性化される可能性のある免

疫細胞、たとえば、ADCC反応に関わるエフェクター細胞と組み合わせて、細胞培養に加える。抗体は、補体活性化についてもテストすることができる。いずれも場合も、標的細胞の細胞溶解は、溶解した細胞からの標識の放出によって検出される。標的細胞の溶解の程度も、上清中への細胞質タンパク質（たとえばLDH）の放出を検出することによって測定することができる。実際、抗体は、補体および/または免疫細胞の供給源として患者自身の血清を使用して、スクリーニングすることができる。その後、*in vitro*テストでヒトADCCを仲介する能力を有する抗体をまさにその患者の治療に使用することができる。関心のある分子のADCC活性を*in vivo*で、たとえばClynesら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998)に記載のような動物モデルで評価してもよい。さらに、抗体のADCCのレベルを調整し、必要ならばCDC活性を調整する（すなわち増加させる、または減少させる）ための技術は、当技術分野でよく知られている。たとえば米国特許No. 6,194,551を参照されたい。本発明の抗体は、ADCCおよび/またはCDCを誘導する能力を有する可能性があり、そうした能力を有するように改変されているかもしれない。ADCC機能を測定するアッセイは、ヒトADCC機能を評価することができるヒトエフェクター細胞を用いて実施することができる。こうしたアッセイには、壊死および/またはアポトーシス機序によって細胞死を誘導、仲介、増進、阻止する抗体をスクリーニングすることを目的とするアッセイも含めることができる。生存可能な色素（viable dye）を利用するアッセイ、カスパーゼを検出して分析する方法、およびDNA破壊を測定する方法などの方法を用いて、目的の抗IL-4R 抗体とともに*in vitro*で培養した細胞のアポトーシス活性を評価することができる。

【0213】

たとえば、Deckerら、Blood (USA) 103:2718-2725 (2004)に記載のようにアネキシンVまたはタネル染色（TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)）アッセイを行って、アポトーシス活性を検出することができる。タネルアッセイは、DNA鎖の切れ目に取り込ませるための蛍光標識したdUTPとともに、目的の細胞を培養することを含む。その後細胞は、フローサイトメトリーでの分析用に処理される。アネキシンVアッセイは、露出したホスファチジルセリン（PS）分子を特異的に認識するフルオレセイン結合アネキシンVを用いて、アポトーシス細胞の細胞膜の外側に出現したPSを検出する。同時に、ヨウ化プロピジウムのような生存可能な色素を用いて、後期アポトーシス細胞を除外することができる。細胞は標識されたアネキシンVで染色し、フローサイトメトリーで分析する。

【0214】

したがって、本発明の他の態様にしたがって、結合メンバーの生物学的エフェクター機能を変化させる、すなわち増大させる、減少させる、または除去するように改変された結合メンバー、特に抗体、たとえば改変されたFc領域を有する抗体が与えられる。一部の実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーまたは抗体を改変し、それが補体を固定し補体依存性細胞傷害（CDC）に関与する能力を強めることができる。他の実施形態において、結合メンバーまたは抗体を改変して、それがエフェクター細胞を活性化して抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与する能力を強めることができる。さらに他の実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーまたは抗体を改変して、それがエフェクター細胞を活性化して抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与する能力を強め、かつ、それが補体を固定し補体依存性細胞傷害（CDC）に関与する能力を強めることができる。

【0215】

ある実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーまたは抗体を改変し、それが補体を固定して補体依存性細胞傷害（CDC）に関与する能力を低下させることができる。他の実施形態において、結合メンバーまたは抗体を改変して、それがエフェクター細胞を活性化して抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与する能力を低下させることができる。さらに他の実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーまたは抗体を改変し、それがエフェクター細胞を活性化して抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与する能力を低下させ、かつ、それが補体を固定して補体依存性細胞傷害（CDC）に関与する能力を低下させることができる。

【0216】

ある実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等の分子と比べて増強されたADCC活性を有する。具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等の分子より、少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍大きいADCC活性を有する。別の具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べて、Fc受容体Fc R111Aとの結合が増強され、増加したADCC活性を有する。他の実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べて、増強されたADCC活性および増加した血清半減期をともに有している。

【0217】

ある実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等の分子と比べて低下したADCC活性を有する。具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等の分子より、少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍低いADCC活性を有する。別の具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べて、Fc受容体Fc R111Aとの結合が減少し、低下したADCC活性を有する。他の実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べて、低下したADCC活性および増加した血清半減期をともに有している。

【0218】

ある実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等の分子と比べて増強されたCDC活性を有する。具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等の分子より、少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍大きいCDC活性を有する。他の実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べて、増強されたCDC活性および増加した血清半減期をともに有している。

【0219】

ある実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比較して、1つもしくは複数のFcリガンドに対する結合が減少している。別の実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子の親和性と比較して、少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍低い、Fcリガンドに対する親和性を有する。具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体に対する結合が減少している。別の実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体Fc R111Aとの結合が減少している。他の具体的な実施形態において、本明細書に記載のFc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子の親和性と比べて、少なくとも約5倍低い、Fc受容体Fc R111Aに対する親和性を有するが、前記Fc変異体は、Fc受容体Fc R11Bに対する親和性は同等分子の約2倍以内である。さらに別の具体的な実施形態では、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体FcRnに対する結合が低下している。また別の具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べてC1qに対する結合が低下している。

【0220】

ある実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べて1つもしくは複数のFcリガンドに対する結合が増強されている。別の実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子より、少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍大きい、Fcリガンドに対する親和性を有する。具体的な実施形態では、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体に対す

る結合が増強されている。別の具体的な実施形態では、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体Fc RIIIAとの結合が増強されている。他の具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体Fc RIIIBとの結合が増強されている。さらに別の具体的な実施形態では、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、Fc受容体FcRnに対する結合が増強されている。また別の具体的な実施形態において、Fc変異型領域を有する結合メンバーは、同等分子と比べてC1qに対する結合が増強されている。

【0221】

ある実施形態において、本発明の抗IL-4R 抗体は変異型Fcドメインを含有するが、この変異型Fcドメインは、対応する変異型でないFcドメインと比べて、Fc 受容体IIBに対する結合親和性が増強されている。他の実施形態では、本発明の抗IL-4R 抗体は変異型Fcドメインを含有するが、この変異型Fcドメインは、対応する変異型でないFcドメインと比べて、少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍大きい、Fc 受容体IIBに対する親和性を有する。

【0222】

ある実施形態において、本発明は、Fc変異型領域を有する結合メンバー、またはこれらを含む製剤を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付け付けとして、228, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440および443からなる一群から選択される1箇所または複数箇所にネイティブではないアミノ酸残基を含有する。必要に応じて、Fc領域は、当業者に公知の、追加の位置および/または代替りの位置にネイティブではないアミノ酸残基を含有してもよい(たとえば、米国特許5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT特許公報WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925およびWO 06/020114を参照されたい)。

【0223】

「ネイティブではないアミノ酸残基」は、天然のタンパク質の列挙された位置に存在しないアミノ酸残基を意味する。典型的には、これは、天然の/自然のままのアミノ酸残基が1つもしくは複数の他の残基に置き換えられていることを意味するが、こうした残基は、もとの残基以外の20個の天然の(一般的な)アミノ酸、または非古典的アミノ酸、もしくは化学的なアミノ酸アナログを含むことができる。非古典的アミノ酸には、一般的なアミノ酸のD異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 β -Abu、 β -Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 γ -アラニン、フルオロアミノ酸、意図的に作られたアミノ酸、たとえば、 α -メチルアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸、およびアミノ酸アナログ全般が挙げられるが、それらに限定されない。

【0224】

具体的な実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を有する結合メンバー、またはそうした変異型Fc領域を有する結合メンバーを含む製剤を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付け付けとして、234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I

, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Yおよび434Wからなる一群から選択される、少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸残基を含有する。必要に応じて、Fc領域は、当業者に公知の、追加の、および/または代替りのネイティブではないアミノ酸残基を含有してもよい(たとえば、米国特許5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; PCT公報WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752およびWO 05/040217を参照されたい)。

【0225】

当然のことながら、本明細書で使用されるFc領域には、第1の定常領域免疫グロブリンドメインを除いた抗体の定常領域を含有するポリペプチドが含まれる。したがって、Fcは、IgA、IgD、およびIgGの残る2つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにIgEおよびIgMの残る3つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにこれらのドメインに向かう可動性ヒンジのN-末端を表す。IgAおよびIgMについては、FcにJ鎖を含めることができる。IgGについては、Fcは、免疫グロブリンドメインCガンマ2およびCガンマ3(C 2およびC 3)、ならびにCガンマ1(C 1)とCガンマ2(C 2)の間のヒンジを含有する。Fc領域の境界は変動する可能性があるが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、C226もしくはP230の残基からそのカルボキシ末端までを含むと定義され、そのナンバリングは、Kabatら(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA)に記載のEUインデックスによる。「Kabatに記載のEUインデックス」は、Kabatら、上記、に記載のヒトIgG1 EU抗体の残基ナンバリングを表す。Fcは、単離された状態のこの領域、または抗体、抗体フラグメント、またはFc融合タンパク質との関連におけるこの領域を表す。変異型Fcタンパク質は、抗体、Fc融合物、またはFc領域を含有する任意のタンパク質もしくはタンパク質ドメインであってよく、これには、Fcの天然に存在しない変異体である、変異型Fc領域を含有するタンパク質が含まれるが、それに限定されない。

【0226】

本発明は、変異型Fc領域を有する結合メンバーに関するが、この結合メンバーは、同等の分子(たとえば、野生型Fc領域を有する以外は同一のアミノ酸配列を有するタンパク質)と比べて変化した、Fcリガンド(たとえば、Fc受容体、C1q)に対する結合特性を有する。結合特性の例としては、結合特異性、平衡解離定数(K_D)、解離速度および会合速度(それぞれ、 k_{off} および k_{on})、結合親和性および/またはアビディティがあるがこれらに限定されない。 K_D の低い結合分子(たとえば、抗体などの変異型Fcタンパク質)のほうが、 K_D の高い結合分子より好ましいであろうことは一般に認識されている。しかしながら、場合によっては、 k_{on} または k_{off} 値のほうが K_D 値より関連性があることもある。当業者は、どの速度論パラメーターが、与えられた抗体の適用にもっとも重要であるかを判断することができる。

【0227】

Fcドメインの、そのリガンドに対する親和性および結合特性は、Fc-Fc R相互作用、すなわち、Fc領域のFc Rに対する特異的結合を測定するための、当技術分野で公知のさまざまなin vitroアッセイ法(生化学または免疫学に基づくアッセイ)によって測定することができ、その方法には、平衡法(たとえば、酵素免疫測定法(ELISA)、もしくはラジオイムノアッセイ(RIA))、または反応速度論(たとえば、BIAcore(登録商標)解析)、お

10

20

30

40

50

よび他の方法、たとえば、間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET)、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー (たとえば、ゲル濾過) が含まれるが、それらに限定されない。上記およびその他の方法は、調べられるべき1つもしくは複数の成分に付いている標識を利用すること、および/またはさまざまな検出方法を用いることができるのであって、それには発色標識、蛍光標識、発光標識、または同位体標識が含まれるが、これに限定されない。結合親和性および反応速度論についてのより詳細な説明が、Paul, W.E編、Fundamental Immunology、第4版、Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)にあるが、これは抗体-免疫原相互作用に焦点を当てている。Fc領域を含有するタンパク質の血清中の半減期は、Fc領域のFcRnに対する結合親和性を増大させることによって、長くすることができる。ある実施形態において、Fc変異体タンパク質は、同等分子と比べて、増強された血清半減期を有する。

10

【0228】

本明細書で使用される「抗体半減期」という用語は、抗体分子の投与後の平均残存時間の指標となる、抗体の薬物速度論的特性を意味する。抗体半減期は、血清もしくは血漿中で測定される (すなわち血中半減期)、または他の組織で測定される、患者の身体またはその特定部分から既知量の免疫グロブリンのうち50%が消失するのに要する時間として表すことができる。半減期は、免疫グロブリンごとに、または免疫グロブリンクラスによって異なる可能性がある。概して、抗体半減期の延長は、投与された抗体の血中での平均滞留時間 (MRT) の延長をもたらす。

【0229】

20

ある実施形態において、本発明の組成物および方法の抗IL-4R 抗体の半減期は、少なくとも約4日~7日である。ある実施形態において、本発明の組成物および方法の抗IL-4R 抗体の平均半減期は、少なくとも約2~5日、3~6日、4~7日、5~8日、6~9日、7~10日、8~11日、8~12、9~13、10~14、11~15、12~16、13~17、14~18、15~19、16~20日である。他の実施形態において、本発明の組成物および方法の抗IL-4R 抗体の平均半減期は、少なくとも約17~21日、18~22日、19~23日、20~24日、21~25日、22~26日、23~27日、24~28日、25~29日、26~30日である。さらに他の実施形態では、本発明の組成物および方法の抗IL-4R 抗体の半減期は、最大で約50日とすることができる。ある実施形態において、本発明の組成物および方法の抗体の半減期は、当技術分野で公知の方法によって延長することができる。このような延長は、その結果として、抗体組成物の投与量および/または投与回数を減らすことができる。in vivo半減期が改善された抗体、およびそれを調製する方法は、米国特許6,277,375、米国特許7,083,784 ; ならびに国際公開番号WO 98/23289およびWO 97/3461に記載されている。

30

【0230】

抗IL-4R 抗体のin vivo血清循環はまた、高分子量ポリエチレングリコール (PEG) などの不活性ポリマー分子を、多官能性リンカーを用いてもしくは用いずに、抗体のN-またはC-末端へのPEGの部位特異的結合によって、もしくはリジン残基に存在する アミノ基を介して、抗体に結合させることによって延ばすことができる。生物活性の最小限の損失をもたらす直鎖もしくは分岐鎖ポリマー誘導体化が利用されることになる。結合の程度は、SDS-PAGEおよび質量分析法によって厳密にモニターすることができ、抗体に対するPEGの適切な結合を確認することができる。未反応PEGは、サイズ排除もしくはイオン交換クロマトグラフィーによって抗体-PEG複合体から分離することができる。PEG誘導体化抗体は、たとえば本明細書に記載のイムノアッセイによって、当業者に公知の方法を用いて、結合活性ならびにin vitro有効性をテストすることができる。

40

【0231】

さらに、本発明の組成物および方法の抗体は、in vivoで抗体をより安定化させるため、またはin vivoでの半減期を長くするために、アルブミンと結合させることができる。その技術は当技術分野で知られており、たとえば、国際公開番号WO 93/15199、WO 93/15200、およびWO 01/77137 ; ならびに欧州特許 EP 413, 622を参照されたいが、これらはすべて、その全体を本明細書に含めるものとする。

50

【 0 2 3 2 】

ある実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーもしくは抗体であって、本発明の組成物の中の前記結合メンバーもしくは抗体の半減期は、少なくとも約4日～7日である。ある実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーもしくは抗体であって、本発明の組成物の中の前記結合メンバーもしくは抗体の平均半減期は、少なくとも約2～5日、3～6日、4～7日、5～8日、6～9日、7～10日、8～11日、8～12、9～13、10～14、11～15、12～16、13～17、14～18、15～19、16～20日である。他の実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーもしくは抗体であって、本発明の組成物の中の前記結合メンバーもしくは抗体の平均半減期は、少なくとも約17～21日、18～22日、19～23日、20～24日、21～25日、22～26日、23～27日、24～28日、25～29日、26～30日である。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の結合メンバーもしくは抗体であって、本発明の組成物の中の前記結合メンバーもしくは抗体の半減期は、最大約50日とすることができる。ある実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーもしくは抗体であって、本発明の組成物の中の前記結合メンバーもしくは抗体の半減期は、当技術分野で公知の方法によって延長することができる。このような延長は、その結果として、抗体組成物の投与量および/または投与回数を減らすことができる。in vivo半減期が改善された抗体、およびそれを調製する方法は、米国特許6,277,375、米国特許7,083,784；ならびに国際公開番号WO 98/23289およびWO 97/3461に記載されている。

10

【 0 2 3 3 】

別の実施形態において、本発明は、結合メンバー、特に変異型Fc領域を有する抗体、またはこれらを含む製剤を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして239、330および332からなる一群から選択される1つもしくは複数の位置に少なくとも1つの非天然改変を含んでいる。具体的な実施形態において、本発明は、Fc変異体を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして239D、330Lおよび332Eからなる一群から選択される少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸を含んでいる。このFc領域は、必要に応じて、さらに追加のネイティブではないアミノ酸を、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして252、254および256からなる一群から選択される1つもしくは複数の位置に有していてもよい。具体的な実施形態において、本発明は、Fc変異体を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして239D、330Lおよび332Eからなる一群から選択される少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸を、ならびに、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして252Y、254Tおよび256Eからなる一群から選択される1つもしくは複数の位置に少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸を含んでいる。

20

30

【 0 2 3 4 】

別の実施形態において、本発明は、結合メンバー、特に変異型Fc領域を有する抗体、またはこれらを含む製剤を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして234、235および331からなる一群から選択される1つもしくは複数の位置に少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸を含んでいる。具体的な実施形態において、本発明は、Fc変異体を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして234F、235F、235Y、および331Sからなる一群から選択される少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸を含んでいる。他の具体的な実施形態において、本発明のFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして234F、235Fおよび331Sアミノ酸残基を含んでいる。別の実施形態において、本発明のFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして234F、235Yおよび331Sアミノ酸残基を含んでいる。このFc領域は、必要に応じて、さらに追加のネイティブではないアミノ酸を、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして252、254および256からなる一群から選択される1つもしくは複数の位置に有していてもよい。具体的な実施形態において、本発明は、Fc変異体を与えるが、このFc領域は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして234F、235F、235Y、および331Sからなる一群から選択される少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸；ならびに、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付け

40

50

として252Y、254Tおよび256Eからなる一群から選択される1つもしくは複数の位置に少なくとも1つのネイティブではないアミノ酸を含んでいる。

【0235】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を有する本発明の結合メンバーを与えるが、この変異体は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして252位にチロシン（Y）残基、254位にトレオニン（T）残基、および256位にグルタミン酸（E）残基を有する。

【0236】

Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして、M252Y、S254TおよびT256Eの変異は、以後YTE変異と称するが、特定のIgG1抗体分子の血清半減期を延長することが報告されている（Dall'Acquaら、J. Biol. Chem. 281(33):23514-23524, 2006）。

10

【0237】

他の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を有する本発明の結合メンバーを与えるが、この変異体は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして252位にチロシン（Y）残基、254位にトレオニン（T）残基、256位にグルタミン酸（E）残基、および241位にプロリン（P）残基を有する。

【0238】

Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして、セリン228プロリン変異（S228P）は、以後P変異と称するが、特定のIgG4分子の安定性を高めることが報告されている（Lu et al., J Pharmaceutical Sciences 97(2):960-969, 2008）。注：Lu et al.において、それは241位と呼ばれているが、これは、彼らがKabatに記載の「EUインデックス」ではなく、Kabatナンバリング系を使用しているためである。

20

【0239】

このP変異は、ADCCをさらにノックアウトするために、L235Eと組み合わせてもよい。この変異の組み合わせを、以後、二重変異（DM）と称する。

【0240】

特定の実施形態において、本発明は、変異型Fc領域を有する本発明の結合メンバーを与えるが、この変異体は、Kabatに記載のEUインデックスによる番号付けとして234位にフェニルアラニン（F）残基、235位にフェニルアラニン（F）残基またはグルタミン酸（E）残基、および331位にセリン（S）残基を有する。このような変異の組み合わせを、以後、三重変異（TM）と称する。

30

【0241】

他の実施形態によれば、本発明は、Fc領域内にYTE変異を有する、IgG1フォーマットの本発明の抗体を与える。

【0242】

他の実施形態によれば、本発明は、Fc領域内にTM変異を有する、IgG1フォーマットの本発明の抗体を与える。

【0243】

他の実施形態によれば、本発明は、Fc領域内にYTE変異およびTM変異を有する、IgG1フォーマットの本発明の抗体を与える。

40

【0244】

他の実施形態によれば、本発明は、Fc領域内にYTEおよびP変異を有する、IgG4フォーマットの本発明の抗体を与える。

【0245】

他の実施形態によれば、本発明は、Fc領域内にYTEおよびDM変異を有する、IgG4フォーマットの本発明の抗体を与える。

【0246】

本発明の特定の実施形態によれば、IgG1 YTE、IgG1 TM、IgG1 TM+YTE、IgG4 P、IgG4 DM、IgG4 YTE、IgG4 P+YTEおよびIgG4 DM+YTEから選択されるフォーマットの、本発明の抗体が与えられる。

50

【0247】

使用される命名法については、当然のことながら、DM + YTEは、定常ドメインFc領域が、二重変異（S228PおよびL235E）およびYTE変異をともに有していることを意味する。

【0248】

非天然Fc領域を作製する方法は、当技術分野で知られている。たとえば、変異誘発法によってアミノ酸置換および/または欠失を生じさせることができ、その変異誘発法には、部位特異的変異誘発（Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, 1985）、PCR変異誘発（Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183, 1990）、およびカセット変異誘発（Wells et al., Gene 34:315-323, 1985）が含まれるが、それらに限定されない。好ましくは、部位特異的変異誘発は、オーバーラップ-エクステンションPCR法によって行われる（Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70, 1989）。オーバーラップ-エクステンションPCR（Higuchi、前記）の技術を用いて、標的配列（出発DNA）に、なんらかの望ましい変異（1つもしくは複数）を導入することもできる。たとえば、オーバーラップ-エクステンション法のPCRの第1ラウンドは、外側のプライマー（プライマー1）および内部の変異誘発プライマー（プライマー3）を用いて、ならびにそれとは別に第2の外側のプライマー（プライマー4）および内部プライマー（プライマー2）を用いて、標的配列を増幅し、2つのPCRセグメント（セグメントAおよびB）を生成させることを含む。内部の変異誘発プライマー（プライマー3）は、（1つもしくは複数の）所望の変異を指定する、標的配列に対するミスマッチを含有するように設計されている。PCRの第2ラウンドでは、PCRの第1ラウンドの生成物（セグメントAおよびB）を、2つの外側のプライマー（プライマー1および4）を用いてPCRにより増幅する。その結果得られた全長PCRセグメント（セグメントC）は、制限酵素で消化され、得られた制限断片を適当なベクターにクローニングする。変異誘発の第1段階として、出発DNA（たとえば、Fc融合タンパク質、抗体、または単にFc領域をコードする）は、変異誘発ベクターに、機能しうるようにクローニングされる。プライマーは、所望のアミノ酸置換を反映するように設計される。変異型Fc領域の作製に有用な他の方法が、当技術分野で知られている（たとえば、米国特許5,624,821；5,885,573；5,677,425；6,165,745；6,277,375；5,869,046；6,121,022；5,624,821；5,648,260；6,528,624；6,194,551；6,737,056；6,821,505；6,277,375；米国特許公開2004/0002587およびPCT公報WO 94/29351；WO 99/58572；WO 00/42072；WO 02/060919；WO 04/029207；WO 04/099249；WO 04/063351；WO 06/23403を参照されたい）。

【0249】

本発明の一部の実施形態では、本明細書で与えられる結合メンバーのグリコシル化パターンは、ADCCおよびCDCエフェクター機能を強めるように改変されている（Shields RL et al., JBC. 277:26733-26740, 2002；Shinkawa T et al., JBC. 278:3466-3473, 2003；およびOkazaki A et al., J. Mol. Biol., 336:1239, 2004を参照されたい）。一部の実施形態において、Fc変異型タンパク質は、1つもしくは複数の改変された糖型、すなわち、Fc領域を含有する分子に共有結合した炭水化物組成を有する。改変された糖型は、エフェクター機能を増強または低下させることを含めて、さまざまな目的に有用となる可能性があるが、目的はこれに限定されない。改変された糖型は、当業者に公知の任意の方法によって作製することができるが、その方法はたとえば、操作された、もしくは変異型の発現株を使用すること、1つもしくは複数の酵素、たとえばDN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTIII）と同時発現させること、さまざまな生物もしくはさまざまな生物由来の細胞株においてFc領域を含有する分子を発現させること、またはFc領域を含有する分子が発現された後に糖鎖を修飾することによるものである。改変された糖型を作製するための方法は当技術分野で知られており、Umana et al, Nat. Biotechnol 17:176-180, 1999；Davies et al., Biotechnol Bioeng 74:288-294, 2007；Shields et al, J Biol Chem 277:26733-26740, 2002；Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003；米国特許第6,602,684号；米国特許出願第10/277,370号；米国特許出願第10/113,929

号 ; PCT WO 00/61739A1 ; PCT WO 01/292246A1 ; PCT WO 02/311140A1 ; PCT WO 02/30954A1 ; Potillegent(商標)technology (Biowa, Inc. Princeton, N.J.) ; GlycoMAb(商標)glycosylation engineering technology (Glycart Biotechnology AG, Zurich, Switzerland) に記載の方法などがあるがこれらに限定されない。たとえば、WO 00/061739 ; EA01229125 ; US 20030115614 ; Okazaki et al., JMB. 336:1239-49, 2004を参照されたい。

【 0 2 5 0 】

本発明の結合メンバーは、検出可能な、または機能的な標識で標識することができる。標識は、シグナルを生じる、またはシグナルを生じるように誘導することができる、任意の分子とすることができる。これには、蛍光、放射性標識、酵素、化学発光または光増感物質があるが、これらに限定されない。したがって、結合は、蛍光もしくは発光、放射能、酵素活性または吸光度を検出することによって、検出および/または測定することができる。

10

【 0 2 5 1 】

適当な標識としては、説明のためであって限定するつもりはないが、酵素、たとえば、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(「G6PDH」)および西洋ワサビペルオキシダーゼ ; 色素 ; 蛍光物質、たとえばフルオレセイン、ローダミン化合物、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド、フルオレスカミン、フルオロフォア、たとえばランタニドクリプテートおよびキレート (Perkin Elmer and Cis Biointernational) ; 化学発光物質、たとえばイソルミノール ; 増感物質 ; 補酵素 ; 酵素基質 ; 放射標識、たとえば¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³²P、¹⁴C、³H、⁵⁷Co、⁹⁹Tcおよび⁷⁵Se、ならびに本明細書に記載の他の放射標識があるがそれに限定されない ; 粒子、たとえばラテックスまたは炭素粒子 ; 金属ゾル ; 微結晶 ; リポソーム ; 細胞などが挙げられ、これらはさらに色素、触媒、または他の検出可能な原子団で標識されていてもよい。適当な酵素および補酵素は米国特許第4,275,149号および米国特許第4,318,980号に開示されており、このいずれも参照によりその全内容を本明細書に組み入れるものとする。適当な蛍光発光物質および化学発光物質も米国特許第4,275,149号に開示されており、参照によりその全内容を本明細書に組み入れる。標識としてはさらに、ビオチンのような、特定のコグネイトな検出可能部分 (例えばアビジンもしくはストレプトアビジン) への結合を介して検出される化学基が挙げられる。検出可能な基は当技術分野で既知の慣用的な化学を用いて、本発明の抗体に連結させることができる。

20

30

【 0 2 5 2 】

標識が、外部手段、たとえば、視覚による検査、電磁放射線、熱、および化学試薬により検出可能なシグナルを、発生させることができるような、数多くの方法がある。標識はまた、本発明の抗体に結合する別の結合メンバー、または担体に結合させることもできる。

【 0 2 5 3 】

標識は直接シグナルを発生させることができるので、シグナルを生じるために追加の成分は必要ない。多数の有機分子、たとえば、蛍光物質は、紫外線および可視光線を吸収するが、この光線吸収は、エネルギーをこれらの分子に転移し、その分子を励起されたエネルギー状態に引き上げる。この吸収されたエネルギーは、次に、第2の波長での光の放出によって消失する。この第2波長での発光はまた、エネルギーを標識されたアクセプター分子に転移することができ、その結果得られたエネルギーは、発光、たとえば蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) によってアクセプター分子から消えることになる。シグナルを直接発生させる他の標識には、放射性同位体および色素がある。

40

【 0 2 5 4 】

あるいはまた、標識は、シグナルを発生させるために、他の成分を必要とすることもあり、その場合、シグナル発生系には、シグナルを発生させるために必要とされるすべての成分が含まれることになるが、その成分には、基質、補酵素、エンハンサー、追加の酵素、酵素生成物と反応する物質、触媒、活性化剤、コファクター、阻害薬、スカベンジャー、金属イオン、およびシグナル発生物質の結合に必要な特異的結合物質を含めることがで

50

きる。適当なシグナル発生系の詳細な検討は、米国特許第5,185,243号に見いだされるが、これはその全体を参照により本明細書に含めるものとする。

【0255】

結合メンバー、抗体、またはその機能的フラグメントの1つは、検出可能な、および/または定量可能なシグナルを得られるように、イムノコンジュゲートの形で存在することができる。イムノコンジュゲートは、たとえば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水素酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸脱水素酵素もしくはグルコース 6-リン酸脱水素酵素などの酵素とともに、またはビオチン、ジゴキシゲニン、または5-プロモデオキシウリジンなどの分子によってコンジュゲート化することができる。蛍光標識も同様に、本発明のイムノコンジュゲートまたはそれらの機能的フラグメントに結合することができるが、この蛍光標識には、特にフルオレセインおよびその誘導体、蛍光色素、ローダミンおよびその誘導体、GFP (「緑色蛍光タンパク質」に対するGFP)、ダンシル、ウンベリフェロン、ランタニドキレートまたはクリプテートユーロピウムなどが挙げられる。

【0256】

イムノコンジュゲートまたはその機能的フラグメントは、当業者に公知の方法によって調製することができる。前記コンジュゲートまたはフラグメントは、酵素もしくは蛍光標識と直接結合することができるが、スパーサー基もしくは連結基、たとえば、グルタルアルデヒドのようなポリアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DPTA)を介して結合してもよく、又は治療用コンジュゲートについて上記で述べたようなカップリング剤の存在下で結合してもよい。フルオレセインタイプの標識を含有するコンジュゲートは、イソチオシアン酸との反応によって調製することができる。他のイムノコンジュゲートは同様に、化学発光標識、たとえばルミノールおよびジオキセタン、生物発光標識、たとえばルシフェラーゼおよびルシフェリン、また他には、放射能標識、たとえばヨウ素123、ヨウ素125、ヨウ素126、ヨウ素131、ヨウ素133、臭素77、テクネチウム99m、インジウム111、インジウム113m、ガリウム67、ガリウム68、硫黄35、リン32、炭素14、トリチウム(水素3)、コバルト57、セレン75、ルテニウム95、ルテニウム97、ルテニウム103、ルテニウム105、水銀107、水銀203、レニウム99m、レニウム101、レニウム105、スカンジウム47、テルル121 m、テルル122m、テルル125m、ツリウム165、ツリウム167、ツリウム168、フッ素8、イットリウム199を含有することができる。治療用放射性同位元素を抗体に、直接、または上記のEDTA、DTPAなどのキレート剤を介して結合するために行われている当業者に公知の方法を、診断に使用できる放射性元素のために用いることができる。同様に、クロラミンT法(Hunter and Greenwood, Nature, 194:495, 1962)によるNa[¹²⁵I]を用いた標識化、またはCrockfordら(米国特許 No. 4,424,200、その全体を参照により本明細書に含める)の技法によるテクネチウム99mを用いた標識化、またはHnatowich(米国特許No. 4,479,930、その全体を参照により本明細書に含める)によって記載された、DTPAを介して結合した標識化について述べることもできる。他のイムノコンジュゲート

は、毒素部分、たとえば、緑膿菌外毒素(PEまたはその細胞毒性断片または変異体)、ジフテリア毒素もしくはその細胞毒性断片もしくは変異体、ボツリヌス毒素AからF、リシンもしくはその細胞毒性断片、アブリンもしくはその細胞毒性断片、サボリンもしくはその細胞毒性断片、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルス性毒素もしくはその細胞毒性断片、およびブリオジン(bryodin)1もしくはその細胞毒性断片からなる一群から選択される毒素部分を含有することができる。

【0257】

本発明は、本明細書で与えられる結合メンバーのIL-4R との結合を引き起こす、または可能にする方法を与える。上記のように、そうした結合はin vivoで、たとえば、結合メンバーの投与後に、または結合メンバーをコードする核酸の投与後に起こりうるが、たとえば、ELISA、ウェスタンブロッティング、免疫細胞化学、免疫沈降法、アフィニティ

10

20

30

40

50

クロマトグラフィー、および本明細書に記載の生化学的もしくは細胞に基づくアッセイにおいて、*in vitro*で起こることもある。本発明はまた、本発明の結合メンバーをたとえばバイオセンサー系において使用することによって、抗原レベルの直接測定を提供する。

【0258】

たとえば、本発明は、IL-4R に対する結合を検出および/または測定する方法を含むが、その方法は、(i) 前記結合メンバーをIL-4R に暴露すること、および(ii) 前記結合メンバーのIL-4R に対する結合を検出することからなり、その結合は本明細書に記載の任意の方法または検出可能な標識を用いて検出される。前記方法および本明細書に記載の任意の他の結合検出方法は、その方法を実施する個人が直接、たとえば、検出可能な標識を視覚的に観察することによって、読み取ることができる。あるいはまた、この方法、もしくは本明細書に記載の任意の他の結合検出法は、オートラジオグラフ、写真、コンピュータープリントアウト、フローサイトメトリーレポート、グラフ、チャート、結果の入った試験管もしくは容器もしくはウェル、またはその方法の結果に関する任意の他の視覚的もしくは物理的表現の形をとる報告を与えることができる。

【0259】

結合メンバーのIL-4R に対する結合の量を測定することができる。定量は、テストサンプル中の抗原の量と関係づけることができ、それは診断上関心をもたれるものとなりうる。IL-4R の結合および/またはその定量に関するスクリーニングは、たとえば、本明細書の他所で言及されるようなIL-4R に関連する疾患もしくは障害についての患者のスクリーニングに役立つ可能性がある。ある実施形態において、特に、本発明の診断法は、(i) 被験体から組織もしくは体液サンプルを採取すること、(ii) 前記組織もしくは体液サンプルを本発明の1つもしくは複数の結合メンバーに暴露すること、ならびに(iii) 結合したIL-4R を対照サンプルと比較して検出することを含んでなるが、対照と比較したIL-4R 結合量の増加は、IL-4R の発現もしくは活性の異常なレベルを示している可能性がある。調べられる組織もしくは体液サンプルには、血液、血清、尿、生検材料、腫瘍、または異常なレベルのIL-4R を含有することが疑われる任意の組織がある。異常なIL-4R レベルまたは活性の検査で陽性と出た被験体は、本明細書において後に記載される治療方法から恩恵を受けることもできる。

【0260】

当業者は、本明細書に記載の方法に照らして、その優先傾向および一般知識にしたがって、抗原に対する結合メンバーの結合を測定する適当な方法を選択することができる。

【0261】

サンプル中の結合メンバーの反応性は、任意の適当な手段によって測定することができる。ラジオイムノアッセイは一つの可能性である。放射能標識抗原を、標識されていない抗原(テストサンプル)と混合し、結合メンバーと結合させる。結合した抗原を、未結合抗原から物理的に分離して、結合メンバーと結合した放射性抗原の量を測定する。テストサンプル中の抗原が多いほど、結合メンバーと結合する放射性抗原は少なくなる。競合的結合アッセイは、レポーター分子に結合した抗原もしくはアナログを使用することによって、非放射性抗原でも用いることができる。レポーター分子は、スペクトル的に分離された吸収もしくは発光特性を有する、蛍光色素、蛍光物質または色素レーザーとすることができる。適当な蛍光色素には、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、テキサスレッド、およびランタニドキレートまたはクリプテートがある。適当な発色色素にはジアミノベンジジンがある。

【0262】

他のレポーターとしては、高分子コロイド粒子または粒子性物質、たとえば有色、磁性もしくは常磁性であるラテックスビーズ、ならびに目視により観察できる、または電子的に検出できる、または別の方法で記録することができる検出可能なシグナルを直接もしくは間接的に発生させることができる、生物学的もしくは化学的に活性な物質がある。これらの分子は酵素であってもよいが、酵素は、発色反応、または色の变化する反応、または電気的特性の変化を引き起こす反応を触媒する。酵素は、分子的に励起させることができ

るので、エネルギー状態間の電子遷移は、特徴的なスペクトル吸収または放射をもたらす。それには、バイオセンサーと併せて使用される化学物質を含めることができる。ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系を使用することができる。

【0263】

個々の結合メンバー-レポーターコンジュゲートにより生じるシグナルを用いて、サンプル（正常およびテスト）中の関連結合メンバーの結合に関する定量可能な絶対データまたは相対データを引き出すことができる。

【0264】

本発明の任意の態様もしくは実施形態の結合メンバーを含んで構成されるキットも、本発明の態様として与えられる。キットにおいて結合メンバーは、サンプルにおけるその反応性を測定することができるように、たとえばさらに下記に記載のように標識化することができる。さらに、結合メンバーは固体担体に結合していても、結合していなくてもよい。キットの構成成分は、一般に無菌で、密封されたバイアルもしくは他の容器に入っている。キットは、結合メンバーが役立つ診断解析もしくは他の方法に用いることができる。キットは、方法、たとえば本発明の方法において、その成分を使用するための取扱説明書を含んでいてもよい。そうした方法を実施するのを助け、またはそれを可能にする補助材料を本発明のキットの中に含めることができる。補助材料には、第2の、異なる結合メンバーがあるが、これは第1の結合メンバーに結合し、しかも検出可能な標識（たとえば、蛍光標識、放射性同位元素または酵素）とコンジュゲート化している。抗体を基本とするキットはまた、免疫沈降法を行うためのビーズを含んでいてもよい。キットの各成分は、一般に、それぞれ適切な容器に入っている。したがって、これらのキットは総じて、それぞれの結合メンバーに適した別々の容器を含んでいる。さらに、キットは、アッセイを実施するための説明書、ならびにアッセイを実施した結果得られたデータを解釈し解析するための方法を含むことができる。

【0265】

本発明はまた、競合アッセイにおいて抗原レベルを測定するための上記結合メンバーの使用、すなわち、競合アッセイにおいて本発明で与えられる結合メンバーを使用することによってサンプル中の抗原レベルを測定する方法を与える。これは、未結合抗原から結合した抗原を物理的に分離する必要なく行いうる。物理的もしくは光学的变化が起こるようにレポーター分子を結合メンバーに連結することは、一つの可能性である。レポーター分子は、直接または間接的に、検出可能なシグナルを発生させることができ、このシグナルは定量可能である。レポーター分子の結合は、直接的もしくは間接的であってよく、たとえばペプチド結合を介した、共有結合であってもよいが非共有結合であってもよい。ペプチド結合を介した結合は、抗体およびレポーター分子をコードした遺伝子融合物の組換え発現の結果でありうる。

【0266】

たとえば、本発明は、IL-4R 結合化合物を同定する方法を含んでおり、その方法は（i）IL-4R を担体に固定化すること、（ii）前記の固定化されたIL-4R と、少なくとも1つの本発明の、タグの付いた、または標識化された結合メンバー、および1つもしくは複数のタグなしの、または標識化されていないテスト結合化合物とを、同時に、または段階的に接触させること、ならびに（iii）タグ付き結合メンバーからの結合したタグの量の減少を観察することによって、新規IL-4R 結合化合物を同定することからなる。

【0267】

IL-4R 結合化合物を同定する別法は、（i）結合メンバーを担体に固定化すること、（ii）前記の固定化された結合メンバーと、タグ付きのIL-4R および1つもしくは複数のタグのない、または標識化されていない結合メンバーもしくは結合化合物とを、同時に、または段階的に接触させること、（iii）タグ付きのIL-4R からの結合したタグの量の減少を観察することによって、新規IL-4R 結合化合物を同定することを含んでいてもよい。

【0268】

こうした方法は、マルチウェルまたはアレイフォーマットを用いて、ハイスループットなやり方で実施することができる。このようなアッセイはまた、たとえば、実施例4.3に記載のHTRF（登録商標）アッセイとして、溶液中で行ってもよい。たとえば、U.S. 5,814,468を参照されたい。これは参照によりその全体を本明細書に含めるものとする。上記のように、結合の検出は、その方法を実施した人によって、たとえば、検出可能な標識、またはその存在の減少を、目視で観察することによって、直接読み取ることができる。あるいはまた、本発明の結合方法は、オートラジオグラフ、写真、コンピュータープリントアウト、フローサイトメトリレポート、グラフ、チャート、結果の入った試験管もしくは容器もしくはウェル、またはその方法の結果に関する任意の他の視覚的もしくは物理的表現の形をとる報告を与えることができる。

10

【0269】

競合アッセイは、エピトープマッピングにも使用することができる。ある場合において、エピトープマッピングを用いて、IL-4R 結合メンバーが結合するエピトープを同定することができるが、その結合メンバーは、必要に応じて最適化された中和および/または調節特性を有する。このようなエピトープは、直鎖または立体構造的とすることができる。立体構造的なエピトープは、IL-4R の少なくとも2つの異なる断片を含むことができるが、IL-4R がその三次構造もしくは四次構造の状態に折り畳まれて、IL-4R 結合メンバーのようなIL-4R の阻害剤によって認識される立体構造的なエピトープを形成している場合、前記断片は互いに近接して位置付けられる。競合をテストする際に、抗原のペプチド断片を使用することができるが、特に、目的のエピトープを含む、または実質的に目的のエピトープからなる、ペプチドを使用することができる。エピトープ配列に加えて1つもしくは複数のアミノ酸をいずれかの端に有するペプチドを使用することができる。本発明の結合メンバーは、抗原に対するそれらの結合が、所定の配列を有する、または所定の配列を含むペプチドによって阻害されるものでありうる。

20

【0270】

本発明はさらに、本発明の結合メンバーをコードする、単離された核酸を与える。核酸は、DNAおよび/またはRNAを含みうる。ある態様において、本発明は、上記で定義された本発明のCDRまたはCDRのセット、またはVHドメイン、またはVLドメイン、または抗体の抗原結合部位、または抗体分子、たとえば、scFvまたはIgG、たとえばIgG1、IgG2もしくはIgG4をコードする核酸を提供する。

30

【0271】

本発明はまた、少なくとも1つの上記のポリヌクレオチドを含有するプラスミド、ベクター、転写もしくは発現カセットの形をとる構築物を与える。

【0272】

本発明はまた、1つもしくは複数の上記構築物を含有する組換え宿主細胞を与える。与えられた任意のCDRまたはCDRのセット、またはVHドメイン、またはVLドメイン、または抗体の抗原結合部位、または抗体分子、たとえば、scFvまたはIgG1、IgG2もしくはIgG4をコードする核酸は、コードされた生成物を作製する方法がそうであるように、それ自体、本発明の態様をなしており、その方法は、コードしている核酸からの発現を含む。発現は、適当な条件下で、当該核酸を含有する組換え宿主細胞を培養することによって、都合よく達成することができる。発現による生産の後、VHもしくはVLドメイン、または結合メンバーを、任意の適当な技術を用いて単離および/または精製することができ、その後必要に応じて使用することができる。

40

【0273】

本発明の核酸は、DNAおよびRNAを含むことができ、全体もしくは部分的に合成であってもよい。本明細書に記載のヌクレオチド配列への言及には、指定の配列を有するDNA分子が含まれているが、さらに、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、UがTで置き換えられた指定の配列を有するRNA配列も含まれる。さらに別の態様は、抗体VH可変ドメインを製造する方法を与えるが、その方法はコードする核酸からの発現を引き起こすことを含んでいる。そのような方法は、前記抗体VH可変ドメインを産生する条件下で、宿主細胞を培養

50

することを含むことができる。

【0274】

VL可変ドメイン、ならびにVHおよび/またはVLドメインを含有する結合メンバーを製造するための同様の方法が、本発明のさらに他の態様として与えられる。

【0275】

製造方法は、生成物の単離および/または精製のステップを含むことができる。製造方法は、生成物を製剤して、製薬上許容される添加剤のような少なくとも1つの追加成分を含有する組成物にすることを含むことができる。

【0276】

さまざまな宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングおよび発現系はよく知られている。適当な宿主には、細菌、哺乳類細胞、植物細胞、糸状菌、酵母およびバキュロウイルス系、ならびにトランスジェニック植物および動物がある。抗体および抗体フラグメントの原核細胞における発現は、当技術分野で十分確立されている。総説として、たとえば、Pluckthun 1991を参照されたい。一般的な細菌宿主は大腸菌 (*E. coli*) である。

【0277】

培養真核細胞における発現も、結合メンバーを製造するための選択肢として、当業者が利用できる。たとえば、Chadd & Chamow (*Current Opinion in Biotechnology* 12:188-194, 2001), Andersen & Krummen (*Current Opinion in Biotechnology* 13:117, 2002) および Larrick & Thomas (*Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418, 2001)。異種ポリペプチドの発現のために当技術分野で利用可能な哺乳類細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NS0 マウスメラノーマ細胞、YB2/O ラットミエローマ細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞、ヒト胎児由来網膜細胞およびその他多くの細胞がある。

【0278】

プロモーター配列、転写終結配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および必要に応じて他の配列などの、適切な制御配列を含有する適当なベクターを、選択もしくは構築することができる。ベクターは、プラスミド、たとえばファージミド、またはウイルス、たとえば必要に応じてファージとすることができる。詳細については、たとえば、Sambrook & Russell (*Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition*, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press)を参照されたい。たとえば核酸構築物の調製における核酸の操作、変異誘発、配列決定、DNAの細胞への導入および遺伝子発現、ならびにタンパク質の分析のための、多くの既知の技術およびプロトコルが、Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4th edition 1999 に詳細に記載されている。

【0279】

本発明の他の態様は、本明細書に記載の核酸を含有する宿主細胞を与える。こうした宿主細胞は、*in vitro*であり、培養下であってよい。このような宿主細胞は*in vivo*であってもよい。宿主細胞が*in vivo*で存在することによって、本発明の結合メンバーの、「イントラボディ」すなわち細胞内抗体としての細胞内発現が可能になりうる。イントラボディは、遺伝子治療に使用することができる。

【0280】

さらに他の態様は、本発明の核酸を宿主細胞に導入することを含む方法を与える。導入は任意の利用可能な技術を用いることができる。真核細胞については、適当な技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、レトロウイルスもしくは他のウイルス、たとえばワクシニア、または昆虫用にはバキュロウイルスを用いたリポソーム介在性トランスフェクションおよびトランスダクションが挙げられる。核酸の宿主細胞への導入、特に真核細胞への導入は、ウイルスもしくはプラスミドに基づく系を使用することができる。プラスミド系は、エピソームとして維持され、または宿主細胞に、もしくは人工染色体に取り込むことができる。取り込みは、1

10

20

30

40

50

つもしくは複数のコピーを、単一もしくは複数の遺伝子座で、ランダムに、もしくは標的化して組み込むことによる。細菌細胞については、適当な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージによるトランスフェクションを含めることができる。

【0281】

たとえば、遺伝子を発現する条件下で宿主細胞を培養することによって、導入に続いて核酸からの発現を引き起こす、または可能にすることができる。発現産物の精製は、当業者に公知の方法によって達成することができる。

【0282】

ある実施形態において、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（たとえば、染色体）に組み込まれる。組み込みは、標準的な方法にしたがって、ゲノムとの組換えを促進する配列を組み入れることにより、促進することができる。

【0283】

本発明はまた、上記の結合メンバーもしくはポリペプチドを発現させるために、発現系において上記の構築物を使用することを含む方法を提供する。

【0284】

本発明の結合メンバーは、ヒトもしくは動物被験体、たとえばヒトにおいて、診断法または治療法に使用することができる。たとえば、結合メンバーはIL-4R 関連疾患または障害の診断法または治療法に使用することができるが、こうした疾患または障害の例は、本明細書の他の箇所述べる。

【0285】

本発明の結合メンバーをその治療もしくは診断に用いることができる、具体的な疾患としては：喘息、COPD（慢性気管支炎、末梢気道疾患および肺気腫を含む）、炎症性腸疾患、線維性疾患（全身性硬化症、肺線維症、寄生虫による肝線維症および嚢胞性線維症を含む）、アレルギー（たとえばアトピー性皮膚炎および食物アレルギー）、移植片拒絶反応を予防する移植治療、ならびに遅延型過敏症もしくは接触過敏症反応の抑制（アレルギー免疫療法のアジュバントとして、およびワクチンアジュバントとして）が挙げられる。

【0286】

したがって、本発明の結合メンバーは、IL-4、IL-13、またはIL-4R の発現および/または活性に関わる疾患の治療において治療薬として有用である。特に、ある実施形態は、有効量の本発明の結合メンバーを、それを必要とする患者に投与することを含んでなる治療法であって、それでIL-4R 活性化の機能的な結果は減少させられる。数ある中で、もう一つの実施形態は、(i) たとえば上記の診断法を用いることによって、IL-4、IL-13もしくはIL-4R の発現または活性を示す患者を同定すること、ならびに(ii) その患者に、本発明の結合メンバーを有効量投与することを含んでなる治療法であるが、それでIL-4R 活性化の機能的な結果は弱められる。本発明の有効量とは、治療すべき特定の疾患もしくは障害を、必ずしも治癒させるのではなくとも、その疾患もしくは障害の少なくとも1つの症状の重症度を調節する（たとえば、低下させる、または軽減する）ために、IL-4R

活性化の機能的結果を調節する（たとえば減少させる）量である。したがって、本発明のある実施形態は、本明細書で言及されるいずれかの障害の少なくとも1つの症状の重症度を治療もしくは軽減する方法であって、その方法は、それを必要とする患者に、いずれかの障害の少なくとも1つの症状の重症度を下げような、有効量の1つもしくは複数の本発明の結合メンバーを、単独で、または併用療法として、当技術分野で公知の、もしくは本明細書に記載の別の適当な薬剤とともに投与することを含むものである。本発明のもう一つの実施形態は、特に、IL-4R の少なくとも1つの効果に拮抗する方法であって、その方法は、前記IL-4R の少なくとも1つの効果、たとえばIL-4R がIL-4とともに複合体（アクティブなシグナル伝達の前駆体）を形成する能力、と拮抗しような、有効量の1つもしくは複数の本発明の結合メンバーと接触させる、またはそれを投与することを含むものである。

【0287】

したがって、本発明の他の態様は、記載の結合メンバー、もしくはその結合メンバーを含有する医薬組成物の投与を含んでなる治療方法、および/または投与のための医薬の製造（たとえば製薬上許容される添加剤とともに結合メンバーを製剤化することを含む、医薬もしくは医薬組成物を作製する方法）におけるそうした結合メンバーの使用を与える。製薬上許容される添加剤は、二次反応を引き起こすことなく、たとえば、活性化合物の投与を容易にすること、体内でのその寿命および/または有効性を増大させること、溶液状態でのその溶解性を高めること、またはその保存を改善することを可能にする、医薬組成物の中に入っている化合物、または化合物の組み合わせとすることができる。これらの製薬上許容されるビヒクルはよく知られており、当業者はそれらを、選択された活性化合物の性質、およびその投与方法に応じて、適合させることができる。

10

【0288】

本発明の結合メンバーは通常、医薬組成物の形で投与されるが、これは結合メンバーに加えて少なくとも1つの成分を含有することができる。したがって、本発明による、本発明にしたがって使用するための医薬組成物は、活性成分に加えて、製薬上許容される添加剤、キャリア、緩衝剤、安定化剤、または当業者に周知の他の物質を含有してもよい。こうした物質は無毒でなければならず、しかも活性成分の有効性を妨げるものであってはならない。キャリアもしくはその他の物質の具体的な性質は、投与経路によって決まってくるが、それは経口、吸入もしくは注射、たとえば静脈からとすることができる。ある実施形態において、組成物は無菌である。

【0289】

20

たとえばナノボディ（nanobody）などの経口投与用の医薬組成物も、本発明において想定される。そうした経口製剤は、錠剤、カプセル、粉末、液体または半固体の形をとることができる。錠剤はゼラチンなどの固体キャリアまたは補助剤を含有することができる。液体医薬組成物は一般に、液体キャリア、たとえば水、石油、動物もしくは植物油、鉱油または合成油を含有する。生理的食塩水、ブドウ糖液もしくは他の単糖類溶液、またはグリコール類、たとえばエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールを含めることができる。

【0290】

静脈注射、または苦痛部位への注射のために、活性成分は、非経口的に許容される水溶液の形をとることになるが、それは発熱物質を含まず、適切なpH、等張性および安定性を有する。当業者は、たとえば、塩化ナトリウム注射液、リンガー液、乳酸加リンガー液などの等張性ビヒクルを用いて適切な溶液をうまく調製することができる。防腐剤、安定化剤、緩衝剤、酸化防止剤、および/または他の添加物を必要に応じて使用することができるが、それには、緩衝剤、たとえばリン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジンおよび他の有機酸；酸化防止剤、たとえばアスコルビン酸およびメチオニン；防腐剤（たとえば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、たとえばメチルパラベンもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3'-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド；タンパク質、たとえば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、たとえばポリビニルピロリドン；アミノ酸、たとえばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン；単糖類、二糖類および他の炭水化物、たとえばグルコース、マンノース、またはデキストリン；キレート剤、たとえばEDTA；糖類、たとえばショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール；塩を形成する対イオン、たとえばナトリウム；金属錯体（亜鉛-タンパク質錯体）；および/または非イオン性界面活性剤、たとえばTWEEN(商標)、PLURONICS(商標)またはポリエチレングリコール(PEG)が含まれる。

30

40

【0291】

本発明の結合メンバーは、その分子の物理化学的性質および送達経路に応じて、液体、半固体、または固体の形で製剤することができる。製剤は、添加剤、もしくは添加剤の組

50

み合わせ、たとえば糖類、アミノ酸、および界面活性剤を含むことができる。液体製剤は、広範囲の抗体濃度およびpHを取り入れることができる。固体製剤は、凍結乾燥、噴霧乾燥、または超臨界流体技術による乾燥などによって製造することができる。抗IL-4Rの製剤は、目的とする送達経路によって決まってくる：たとえば、肺送達のための製剤は、吸入時に肺の深部への浸透を保证する物理的性質を有する粒子から構成することができる；局所製剤は、粘度調整剤を含有することができるが、これは薬物が作用部位にとどまる時間を長くするものである。特定の実施形態において、結合メンバーは、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系などの放出制御製剤のように、急速な放出から結合メンバーを保護するキャリアとともに調製することができる。生分解性、生体適合性ポリマー、たとえば、酢酸ビニルエチレン、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用することができる。こうした製剤を調製するための多くの方法が当業者に知られている。たとえば、Robinson, 1978を参照されたい。

10

【0292】

本発明の結合メンバーによる抗IL-4R治療は、経口で（たとえばナノボディ）、注射で（たとえば皮下、関節内、静脈内、腹腔内、動脈内、もしくは筋肉内に）、吸入で、膀胱内経路で（膀胱内への点滴注入）、または局所的に（たとえば眼球内、鼻内、直腸、外傷の中、皮膚の上に）行うことができる。治療は、パルス注入によって、特に結合メンバーの投与量を減らしながら投与することができる。投与経路は、治療の物理化学的性質、疾病に対する特別な考慮、または効果を最大限に、もしくは副作用を最小限にするための必要によって、決定することができる。一つ具体的な投与経路は、静脈内である。本発明の医薬組成物を投与するもう一つの経路は、皮下である。

20

【0293】

抗IL-4R治療は、病院もしくは医院での使用に限定されず、むしろ家庭および職場を含めることができる。したがって無針デバイスを用いた皮下注射は好都合である。

【0294】

組成物は、治療すべき疾患に応じて、単独で、または他の治療と組み合わせて、別の1つもしくは複数の治療薬と同時に、または順次、または前記治療薬との混合製品として、投与することができる。

【0295】

IL-4Rに対する結合メンバーを、追加の医薬成分と併用して、併用療法の一部として使用してもよい。併用療法を用いて、著しい相乗効果をもたらすことができるが、特に抗IL-4R結合メンバーと、1つもしくは複数の他の薬物との併用がそうである。IL-4Rに対する結合メンバーは、本明細書に挙げた疾患のうち1つもしくは複数の治療のために、別の1つもしくは複数の治療薬と同時に、または順を追って、または前記治療薬との混合製品として、投与することができる。

30

【0296】

本発明の結合メンバーは、次の作用物質のうち1つもしくは複数と併用して、またはそれに追加して提供される：

- サイトカイン、またはサイトカイン機能の作動薬もしくは拮抗薬（たとえば、サイトカインシグナル伝達経路に作用する物質、SOCS系のモジュレーターなど）、たとえば、インターフェロン、および/または；インスリン様成長因子I（IGF-I）、その受容体および関連結合タンパク質；インターロイキン（IL）、たとえばIL-1から-33までのうち1つもしくは複数、および/またはインターロイキン拮抗薬もしくは阻害薬、たとえばアナキンラ；インターロイキンファミリーメンバー受容体の阻害薬またはその受容体の特定のサブユニットの阻害薬、腫瘍壊死因子（TNF-）阻害薬、たとえば抗TNFモノクローナル抗体（たとえばインフリキシマブ、アダリムマブおよび/またはCDP-870）および/またはTNF受容体拮抗薬、たとえば免疫グロブリン分子（たとえばエタネルセプト）、および/または低分子量作用物質、たとえばペントキシフィリン；
- B細胞のモジュレーター、たとえばBリンパ球に対するモノクローナル抗体（たとえばC

40

50

D20 (リツキシマブ)もしくはMRA-aIL16R)またはTリンパ球に対するモノクローナル抗体 (たとえばCTLA4-Igもしくはアバタセプト) ;

- 破骨細胞活性を阻害するモジュレーター、たとえばRANKLに対する抗体 ;
- ケモカインまたはケモカイン受容体機能のモジュレーター、たとえばCCR1、CCR2、CCR 2A、CCR2B、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10もしくはCCR11 (C-Cファミリ- について) ; CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6もしくはCXCL13 (C-X-Cファミリ- について) 、またはCX₃CR1 (C-X₃-Cファミリ- について) の拮抗薬 ;
- マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) 、すなわちストロメライシン、コラゲナーゼおよびゼラチナーゼのうち1つもしくは複数、ならびにアグリカナーゼ、特にコラゲナーゼ- 1 (MMP-1) 、コラゲナーゼ-2 (MMP-8) 、コラゲナーゼ-3 (MMP-13) 、ストロメライシン-1 (MMP-3) 、ストロメライシン-2 (MMP-10) および/またはストロメライシン-3 (MMP-11) および/またはMMP-9および/またはMMP-12の阻害薬、たとえばドキシサイクリン ;
- ロイコトリエン合成阻害薬、5-リポキシゲナーゼ (5-LO) 阻害薬または5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質 (FLAP) 拮抗薬、たとえばジレウトン ; ABT-761 ; フェンレウトン (fenleuton) ; テボキサリン ; Abbott-79175 ; Abbott-85761 ; N-(5-置換)-チオフェン-2-アルキルスルホンアミド ; 2,6-ジ-tert-ブチルフェノールヒドラゾン ; メトキシテトラヒドロピラン、たとえばZeneca ZD-2138 ; 化合物SB-210661 ; ビリジニル置換2-シアノナフタレン化合物、たとえばL-739,010 ; 2-シアノキノリン化合物、たとえばL-746,530 ; インドールおよび/またはキノリン化合物、たとえばMK-591、MK-886および/またはBAY x 1005 ;
- ロイコトリエン (LT) B₄、LTC₄、LTD₄、およびLTE₄に対する受容体拮抗薬、これは、フェノチアジン-3-1s、たとえばL-651,392 ; アミジノ化合物、たとえばCGS-25019c ; ベンゾオキサゾールアミン、たとえばオンタゾラスト ; ベンゼンカルボキシミドアミド、たとえばBIIL 284/260 ; ならびにザフィルルカスト、アブルカスト、モンテルカスト、ブランルカスト、ベルルカスト (MK-679) 、RG-12525、Ro-245913、イラルカスト (CGP 45715A) およびBAY x 7195などの化合物、からなる一群から選択される ;
- ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬、例としては、メチルキサンチン、たとえばテオフィリンおよび/またはアミノフィリン ; および/または選択的PDEアイソザイム阻害薬、たとえばPDE4阻害薬および/またはアイソフォームPDE4Dの阻害薬および/またはPDE5の阻害薬 ;
- ヒスタミン1型受容体拮抗薬、たとえばセチリジン、ロラタジン、デスロラタジン、フェキソフェナジン、アクリバステイン、テルフェナジン、アステミゾール、アゼラスチン、レボカバステイン、クロルフェニラミン、プロメタジン、シクリジン、および/またはミゾラスチン (一般に、経口、局所または非経口で適用される) ;
- プロトンポンプ阻害薬 (オメプラゾールなど) または胃保護ヒスタミン2型受容体拮抗薬 ;
- ヒスタミン4型受容体の拮抗薬 ;
- 1/ 2アドレノセプター作動薬血管収縮交感神経様作用薬、たとえばプロピルヘキセドリン、フェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、エフェドリン、プソイドエフェドリン、ナファゾリン塩酸塩、オキシメタゾリン塩酸塩、テトラヒドロゾリン塩酸塩、キシロメタゾリン塩酸塩、トラマゾリン塩酸塩、およびエチルノルエピネフリン塩酸塩 ;
- 抗コリン剤、たとえばムスカリン受容体 (たとえばM1、M2、M3、M4またはM5) 拮抗薬、たとえばアトロピン、ヒヨスチン、グリコピロレート、臭化イبراتロピウム、臭化チオトロピウム、臭化オキシトロピウム、ピレンゼピンおよびテレンゼピン ;
- アドレノセプター作動薬 (受容体サブタイプ1-4) 、たとえば、イソプレナリン、サルブタモール、フォルモテロール、サルメテロール、テルブタリン、オルシプレナリン、メシル酸ピトルテロールおよび/またはピルブテロール、たとえばそのキラルエナンチオマー ;
- クロモン、たとえばクロモグリク酸ナトリウムおよび/またはネドクロミルナトリウム ;

10

20

30

40

50

- グルココルチコイド、たとえば、フルニソリド、トリアムシノロンアセトニド、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ブデソニド、プロピオン酸フルチカゾン、シクレソニド、および/またはフロ酸モメタゾン；
- 核ホルモン受容体を調節する物質、たとえばPPAR；
- 免疫グロブリン（Ig）もしくはIg製剤、またはIg機能を調節する拮抗薬もしくは抗体、たとえば抗IgE（たとえばオマリズマブ）；
- 他の全身もしくは局所に適用する抗炎症薬、たとえばサリドマイドもしくはその誘導体、レチノイド、ジトラノールおよび/またはカルシポトリオール；
- アミノサリチル酸およびスルファピリジンの組み合わせ、たとえばスルファサラジン、メサラジン、バルサラジド、およびオルサラジン；ならびに免疫調節薬、たとえばチオプリン；ならびにコルチコステロイド、たとえばブデソニド；
- 抗菌薬、たとえばペニシリン誘導体、テトラサイクリン、マクロライド、ラクタム、フルオロキノロン、メトロニダゾール、および/または吸入アミノグリコシド；および/または抗ウイルス薬、たとえばアシクロビル、ファムシクロビル、バラシクロビル、ガンシクロビル、シドフォビル；アマンタジン、リマンタジン；リバビリン；ザナミビルおよび/またはオセルタミビル；プロテアーゼ阻害薬、たとえばインジナビル、ネルフィナビル、リトナビルおよび/またはサキナビル；ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬、たとえばジダノシン、ラミブジン、スタブジン、ザルシタピン、ジドブジン；非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬、たとえばネビラピン、エファビレンツ；
- 心血管作動薬、たとえばカルシウムチャンネル遮断薬、アドレノセプター遮断薬、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬、アンジオテンシン-2受容体拮抗薬；脂質降下薬、たとえばスタチンおよび/またはフィブラート；血球形態のモジュレーター、たとえばペントキシフィリン；血栓溶解薬および/または抗凝固薬、たとえば血小板凝集阻害薬；
- 中枢神経系（CNS）薬、たとえば抗鬱薬（セルトラリン）、抗パーキンソン病薬（たとえばデプレニル、L-ドーパ、ロピニロール、プラミベキソール；MAOB阻害薬、たとえばセレジンおよびラサギリン；comP阻害薬、たとえばタスマー（tasmar）；A-2阻害薬、ドーパミン再取り込み阻害薬、NMDA拮抗薬、ニコチン作動薬、ドーパミン作動薬および/または神経型一酸化窒素合成酵素の阻害薬）および抗アルツハイマー病薬、たとえばドネペジル、リバスチグミン、タクリン、COX-2阻害薬、プロペントフィリンもしくはメトリフォネート；
- 急性および慢性疼痛の治療薬、たとえば中枢もしくは末梢作用鎮痛薬、たとえばオピオイド類似体もしくは誘導体、カルバマゼピン、フェニトイン、バルプロ酸ナトリウム、アミトリプチリンもしくは他の抗鬱薬、パラセタモール、または非ステロイド性抗炎症薬；
- 非経口または局所適用（吸入を含む）局所麻酔薬、たとえばリグノカインまたはその類似体；
- 抗骨粗鬆症薬、たとえば、ラロキシフェンなどのホルモン剤、またはアレンドロネートなどのビスホスホネート；
- (i)トリプターゼ阻害薬；(ii)血小板活性化因子(PAF)拮抗薬；(iii)インターロイキン変換酵素(ICE)阻害薬；(iv) IMPDH阻害薬；(v)接着分子阻害薬、たとえばVLA-4拮抗薬；(vi)カテプシン；(vii)キナーゼ阻害薬、たとえばチロシンキナーゼ（たとえば、Btk、Itk、Jak3 MAP、阻害薬の例にはゲフィチニブ、メシル酸イマチニブが挙げられる）の阻害薬、セリン/トレオニンキナーゼの阻害薬（たとえば、p38、JNKなどのMAPキナーゼ、プロテインA、BおよびC、ならびにIKKの阻害薬）、または細胞周期制御にかかわるキナーゼ（たとえばサイクリン依存性キナーゼ）の阻害薬；(viii) グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ阻害薬；(ix)キニンB1および/またはB2受容体拮抗薬；(x)抗痛風薬、たとえば、コルヒチン；(xi)キサンチンオキシダーゼ阻害薬、たとえばアロプリノール；(xii)尿酸排泄薬、たとえばプロベネシド、スルフィンピラゾン、および/またはベンズブロマロン；(xiii)成長ホルモン分泌促進物質；(xiv)トランスフォーミング増殖因子（TGF）；(xv)血小

板由来成長因子(PDGF) ; (xvi)線維芽細胞増殖因子、たとえば塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF) ; (xvii)顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) ; (xviii)カプサイシンクリーム ; (xix) タキキニンNK-1および/またはNK-3受容体拮抗薬、たとえばNKP-608C、SB-233412(タルネタント)および/またはD-4418 ; (xx)エラスターゼ阻害薬、たとえばUT-77および/またはZD-0892 ; (xxi) TNF- 変換酵素阻害薬(TACE) ; (xxii)誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)阻害薬または(xxiii)TH2細胞上に発現される走化性因子受容体-相同分子(たとえばCRTH2拮抗薬) ; (xxiv) P38の阻害薬 ; (xxv)トール様受容体(TLR)の機能を調節する物質ならびに(xxvi)プリン作動性受容体の活性を調節する物質、たとえばP2X7 ; (xxvii)転写因子活性化の阻害薬、たとえばNFkB、API、および/またはSTATS。

【0297】

10

阻害薬は特異的であってもよいが、混合された阻害薬、たとえば上記の2つ以上の分子(たとえば受容体)または分子クラスを標的とする阻害薬であってもよい。

【0298】

結合メンバーは、化学療法薬もしくは別のチロシンキナーゼ阻害薬と併せて、同時投与で、またはイムノコンジュゲートの形で、使用することもできる。前記抗体のフラグメントを二重特異性抗体に使用することもできるが、この二重特異性抗体は、組換え機構または生化学的カプリングによって得られ、それで、上記抗体の特異性と、IL-4R が関与する活性に必要な他の分子を認識することができる他の抗体の特異性とを結び付けるものである。

【0299】

20

炎症性疾患、たとえば関節リウマチ、変形性関節炎、喘息、アレルギー性鼻炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、または乾癬を治療するために、本発明の結合メンバーを、1つもしくは複数の薬剤、たとえば非ステロイド性抗炎症薬(以後NSAID)(これには、局所または全身に適用される非選択的シクロオキシゲナーゼ(COX)-1/COX-2阻害薬、たとえば、ピロキシカム、ジクロフェナク、プロピオン酸系(ナプロキセン、フルピプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェンおよびイブプロフェンなど)、フェナム酸(メフェナム酸など)、インドメタシン、スリダク、アザプロパゾン、ピラゾロン(フェニルブタゾンなど)、サリチル酸系(アスピリンなど) ; 選択的COX-2阻害薬、たとえばメロキシカム、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、ルマロコキシブ(lumaprocoxib)、パレコキシブおよびエトリコキシブ ; シクロオキシゲナーゼを阻害する一酸化窒素供与体(CINOD)が含まれる) ; グルココルチコステロイド(局所、経口、筋肉内、静脈内または関節内経路により投与) ; メトトレキサート、レフルノミド ; ヒドロキシクロロキン、d-ペニシラミン、オーラノフィンまたは他の非経口もしくは経口金製剤 ; 鎮痛薬 ; ジアセレイン ; 関節内治療、たとえばヒアルロン酸誘導体 ; ならびに栄養補助食品、たとえばグルコサミンと併用することができる。

30

【0300】

本発明の結合メンバーは、癌治療のための既存の治療薬と併用することもできる。併用に適した薬剤には下記のものがある :

(i) 内科的腫瘍学で使用される抗増殖/抗腫瘍薬およびそれらの組み合わせ、たとえばグリベック(メシル酸イマチニブ)、アルキル化剤(たとえば、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファンおよびニトロソ尿素) ; 代謝拮抗物質(たとえば、葉酸拮抗薬、たとえば、5-フルオロウラシルおよびテガフルなどのフルオロピリミジン、ラルチトレキセド、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、ヒドロキシ尿素、ならびにパクリタキセル) ; 抗腫瘍抗生物質(たとえば、アントラサイクリン系のアドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキソルビシンダウノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシン-C、ダクチノマイシンおよびミトラマイシン) ; 抗有糸分裂薬(たとえば、ピンカアルカロイド(ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシンおよびビノレルビンなど)ならびにタキソイド(タキソールおよびタキソテルなど) ; ならびにトポイソメラーゼ阻害薬(たとえば、エピボドフィロトキシン(エトポシドおよびテニポシドなど)、アムサクリン、

40

50

トボテカン、およびカンプトテシン)；

(ii) 細胞増殖抑制薬、たとえば抗エストロゲン薬（たとえば、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、およびヨードキシフェン）、エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（たとえば、フルベストラント）、抗アンドロゲン薬（たとえば、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミドおよび酢酸シプロテロン）、LHRH拮抗薬またはLHRH作動薬（たとえば、ゴセレリン、ロイプロレリンおよびブセレリン）、プロゲステロゲン（たとえば、酢酸メゲストロール）、アロマターゼ阻害薬（たとえば、アナストロゾール、レトロゾール、ボラゾール（vorazole）およびエキセメスタン）、ならびに5-レダクターゼの阻害薬、たとえばフィナスチリド；

(iii) 癌細胞浸潤を阻害する薬剤（たとえば、メタロプロテイナーゼ阻害薬（マリマスタットなど）およびウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体機能の阻害薬）；

(iv) 増殖因子機能の阻害薬、たとえば、こうした阻害薬には、増殖因子抗体、増殖因子受容体抗体（たとえば、抗ErbB2抗体トラスツズマブおよび抗ErbB1抗体セツキシマブ[C225]）、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬およびセリン/トレオニンキナーゼ阻害薬、たとえば、上皮成長因子ファミリーの阻害薬（たとえば、EGFRファミリーチロシンキナーゼ阻害薬、たとえばN-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロボキシ)キナゾリン-4-アミン(ゲフィチニブ、AZD1839)、N-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン(エルロチニブ、OSI-774)および6-アクリルアミド-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-(3-モルホリノプロボキシ)キナゾリン-4-アミン(CI 1033))、たとえば、血小板由来増殖因子ファミリーの阻害薬、ならびに、たとえば、肝細胞増殖因子ファミリーの阻害薬がある；

(v) 血管新生阻害薬、たとえば血管内皮増殖因子の作用を阻害する物質（たとえば、抗血管内皮細胞増殖因子抗体ベパシズマブ、国際特許出願WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856およびWO 98/13354（これらはそれぞれ、その全体を本明細書に含めるものとする）に記載の化合物、ならびに他の機序で作用する化合物（たとえば、リノミド、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 機能の阻害薬、およびアンギオスタチン）；

(vi) 血管損傷薬、たとえばコンプレスタチンA4、および国際特許出願WO 99/02166、WO 00/40529、WO 00/41669、WO 01/92224、WO 02/04434およびWO 02/08213（これらはそれぞれ、その全体を本明細書に含めるものとする）に記載の化合物；

(vii) アンチセンス療法、たとえば上記の標的に対するものであって、ISIS 2503、アンチ-rasアンチセンスなど；

(viii) 遺伝子治療アプローチ、たとえば、異常なp53または異常なBRCA1もしくはBRCA2などの異常遺伝子を置き換えるアプローチ、GDEPT（遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法）アプローチ、たとえば、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ、もしくは細菌のニトロ還元酵素を用いたアプローチ、ならびに化学療法もしくは放射線療法に対する患者の許容度を高めるアプローチ、たとえば、多剤耐性遺伝子治療；ならびに

(ix) 免疫療法アプローチ、たとえば、患者の腫瘍細胞の免疫原性を高めるためのex vivoおよびin vivoアプローチ、たとえば、インターロイキン2、インターロイキン4もしくは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子などのサイトカインを用いたトランスフェクション、T細胞アネルギーを減少させるアプローチ、トランスフェクトされた免疫細胞を用いたアプローチ、たとえばサイトカインでトランスフェクトされた樹状細胞、サイトカインでトランスフェクトされた腫瘍細胞株を用いたアプローチ、および抗イディオタイプ抗体を用いたアプローチ。

【0301】

本発明の結合メンバーおよび1つもしくは複数の追加の医薬成分を医薬の製造に用いることができる。医薬は、個体への個別投与用であっても併用投与用であってもよいので、結合メンバーおよび追加の成分を、1つの複合製剤として含有しても、複数の別々の製剤として含有していてもよい。別々の製剤を用いて、別々で順を追った投与をしても、同時投与を進めてもよく、しかも、異なる経路、たとえば経口および非経口投与による各成分の投与を可能にすることができる。

10

20

30

40

50

【0302】

本発明にしたがって、与えられた成分を哺乳類に投与することができる。投与は、「治療上有効な量」で行われるが、これは患者にとって利益を示すのに十分なものである。こうした利益は、少なくとも1つの症状の、少なくとも1つの改善でありうる。実際の投与量、ならびに投与率および投与の時間的経過は、治療を受けているものの特性および重症度、治療を受ける具体的な哺乳類、具体的な患者の臨床状態、疾患の原因、組成物の送達部位、結合メンバーのタイプ、投与方法、投与スケジュール、および医師に周知の他の要因に応じて決まる。治療の処方、たとえば投与量の決定などは、一般開業医および他の医師の責任の範囲内であるが、治療される疾患の症状および/または経過の重症度に応じて決定されうる。抗体の適切な投与量は当技術分野でよく知られている (Ledermann et al. *Int. J. Cancer* 47:659-664, 1991; Bagshawe et al. *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4:915-922, 1991)。投与される医薬のタイプに適しているとして本明細書に、またはPhysician's Desk Reference (2003)に示された具体的な投与量を用いることができる。本発明の結合メンバーの治療上有効な量または適切な用量は、動物モデルにおけるそのin vitroおよびin vivo活性を比較することによって決定することができる。マウスおよび他の実験動物での有効な投与量からヒトの有効量を推定する方法はよく知られている。正確な用量は、その抗体が診断用か予防用か、あるいは治療用かどうか、治療すべき場所の大きさおよび位置、抗体の厳密な特性（たとえば、全抗体、フラグメントまたはダイアボディ）、ならびに抗体に結合した検出可能な標識もしくは他の分子の特性、などのいくつかの要因によって決まる。典型的な抗体の用量は、全身適用には100 μ gから1gまでの範囲であり、局所適用には1 μ gから1mgである。最初に高い負荷用量で、その後1回もしくは複数回、低い用量で投与することができる。典型的には、抗体は全抗体、たとえばIgG1アイソタイプである。これは成人患者の1回治療のための用量であるが、それを比例的に小児および乳幼児用に調整することができ、分子量に比例して他の抗体型に調整することもできる。治療は、医師の裁量で、毎日、週2回、1週間もしくは1月間隔で、繰り返してもよい。治療は、皮下投与については2~4週間に1回とし、静脈内投与については4~8週間に1回とすることができる。本発明の一部の実施形態において、治療は定期的であって、投与と投与の間は約2週間以上、たとえば約3週間以上、約4週間以上、またはおよそ月1回である。本発明の他の実施形態では、外科手術の前、および/または後に治療を行ってもよく、外科治療の解剖学的部位に直接投与もしくは適用することができる。

【0303】

本発明は、以下の限定的でない実施例および図によってさらに説明される。

【0304】

(実施例)

【実施例1】

【0305】

1.1 ヒトIL-4R 細胞外ドメインのクローニング

ヒトIL-4R 細胞外ドメイン (アミノ酸残基1-229 Swiss-Protアクセッション番号P24394) の配列をコードしたcDNAを、HUVEC cDNAライブラリーから、ヒトIL-4R cDNA配列 (RefSeq NM_000418) に基づくプライマーを用いてPCRによって増幅した。得られたcDNAを、メーカーの説明書にしたがってpDONR201 (Invitrogen) にサブクローニングした。

【0306】

IL-4R 細胞外ドメインをコードしたcDNA断片を次に、LR Gateway (登録商標) (Invitrogen) 反応を用いて、哺乳類発現ベクターpDEST12.2 (Invitrogen) にトランスファーした。このpDEST12.2ベクターは、ヒトIgG1 Fcコード領域、ポリヒスチジン (His6) タグを目的の挿入遺伝子とインフレームで含有するように改変されており、また、さらにEBNA-1遺伝子産物を発現する細胞株 (たとえばHEK293-EBNA細胞) にトランスフェクトしたときにエピソーム性のプラスミドの複製を可能にする、pCEP4ベクター (Invitrogen) 由来の複製開始点oriPの挿入により改変済みのものであった。

【 0 3 0 7 】

ヒトIL-4R mRNAのパブリックデータベースのアクセッション番号はNM-000418である；このデータベース配列に関する重要領域は243-929である。その結果得られるヒトIL-4R/Fcの予想されるアミノ酸配列を、配列番号454に示す。

【 0 3 0 8 】

1.1.1. 発現および精製

HEK-EBNA細胞を、PEIを用いてトランスフェクトした。タンパク質は、馴化培地からプロテインGクロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【 0 3 0 9 】

1.2 組換えカニクイザルIL-4R およびヒトIL-4R I75V変異体のクローニング

カニクイザルIL-4R サブユニットを、カニクイザル胸腺およびリンパ節 (BioCat GmbH) からポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、下記のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて増幅した：

5' ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcctt cttaacttt aagaaggaga tataaccatg ggggtggcttt gctctgggct cctgttgcct gtgagc-3' (配列番号 4 5 1)

5'- ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctgctcgaag ggctccctgt aggagttgta cca-3' (配列番号 4 5 2)

得られたcDNAを、メーカーの説明書にしたがってpDONR201 (Invitrogen) にサブクローニングした。カニクイザルIL-4R 細胞外ドメインの配列を配列番号455に示す。

【 0 3 1 0 】

1.3 ヒトIL-4R I75Vバリエーションのクローニング

ヒトIL-4R の多型、I75Vを、ヒトIL-4R に対するコード配列 (アミノ酸残基1-229 NP_000409) を含有するpDONR201ベクターを用いて作製した。アミノ酸75位のイソロイシンを、QuikChange Multi部位特異的変異誘発キット (Stratagene) を用いて、下記のオリゴヌクレオチドを変異プライマーとして使用して、バリンに変異させた：

5'-gaagcccacacgtgtgccctgagaacaacgga-3' (配列番号 4 5 3)

1.4 カニクイザルおよびI75VバリエーションIL-4R /Fcのための組換えバキュロウイルスの作製

カニクイザルIL-4R およびヒトIL-4R I75Vバリエーションを、次に、ヒトIgG1 Fcコード領域を含有する、Gatewayに適合したpFastBacベクター (自社製) 内に挿入した。カニクイザルIL-4R /Fcのヌクレオチドおよびタンパク質配列を、配列番号456および配列番号457にそれぞれ示す。I75V IL-4R /Fcのヌクレオチドおよびタンパク質配列は、配列番号458および配列番号459にそれぞれ示す。大腸菌DH10Bac (E.coli) (Invitrogen) の形質転換によって、組換えバクミドの作製を行い、選択培地を有するLB寒天培地に蒔いた。Sf9細胞を組換えバクミドでトランスフェクトし、高力価の組換えバキュロウイルスを作製した。

【 0 3 1 1 】

1.5 ヒトI75VおよびカニクイザルFcタグ付きIL-4R タンパク質バリエーションの発現および精製

SF-900 II SFM培地 (Invitrogen) 中で、 3×10^6 細胞 /mlの細胞密度でウイルスMOI 1に感染したSf21細胞 (400ml) において、タンパク質を発現させた。分泌されたIL-4R -Fc融合タンパク質を含有する培地を、それぞれ72および96時間後に回収した。Sf21細胞 (400ml) 由来の増殖培地をpH 8.0に調整した。タンパク質Gクロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによってタンパク質を精製した。

【 実施例 2 】

【 0 3 1 2 】

リードの単離

2.1 選択

繊維状ファージM13を基本とするファージミドベクターにクローニングされたナイーブなヒト一本鎖Fv (scFv)ファージディスプレイライブラリーを選択のために使用した (Vaughan et al. Nature Biotechnology 14(3):309-314, 1996; Hutchings, C. Generation of Naive Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93)。抗IL-4R 特異的scFv抗体を、基本的にVaughan et al (Vaughan, T.J. et al. Nature Biotechnology 14(3):309-14, 1996)およびHawkins et al. Journal of Molecular Biology 226:889-896, 1992)によってすでに記載された組換えヒトIL-4R Fc (R & D Systems) 上で一連の選択サイクルによってファージディスプレイライブラリーから単離した。手短に述べると、パニング選択のために、PBS (Dulbecco's PBS, pH7.4) 中のヒトIL-4R Fcを4 にて一晚、Immobilizer(商標)マイクロタイタープレート(Nunc)のウェル上に吸着させた。ウェルをPBSで洗浄した後、PBS-Marvel (3% w/v)で1時間ブロックした。10倍過剰量の無関係のFcタグ付きタンパク質を含有する、PBS-Marvel (3% w/v)中の精製ファージをウェルに加えて、コーティングされた抗原と1時間結合させた。未結合ファージを、PBS-Tween (0.1% v/v)およびPBSを用いた一連の洗浄サイクルで除去した。結合したファージ粒子を溶出し、E. coli TG1菌に感染させて、次の選択のためにレスキューした (Vaughan et al. Nature Biotechnology 14(3):309-314, 1996)。

【0313】

2.2 未精製scFvによる、IL-4受容体に対するIL-4結合の阻害

ヒトおよびカニクイザルIL-4R の両者に対する阻害活性を測定するために並行して実施される、2つのホモジニアス時間分解蛍光 (HTRF (登録商標)) 受容体-リガンド結合アッセイで、ペリプラズム標品から未精製scFvをスクリーニングした。ヒトアッセイでは、未精製scFvサンプルは、ヒトIL-4R -Fc受容体 (R and D Systems, 604-4R) に対する結合について、ヒトビオチン化IL-4 (Peprotec、社内でビオチン化) と競合した。カニクイザルアッセイでは、未精製scFvサンプルは、カニクイザルIL-4R -Fc-HIS6 (社内でHEK発現) に対する結合について、カニクイザルビオチン化IL-4 (社内でE.coli発現、社内でビオチン化) と競合した。詳細なアッセイ法は、「材料および方法」のセクション(2.4)で与えられる。

【0314】

ヒトおよびカニクイザルの両方の受容体-リガンドアッセイにおいて、未精製ペリプラズム抽出物として、IL-4のIL-4R に対する結合に対して阻害作用を示すscFvを、DNA配列決定に供した (Osbourn et al. Immunotechnology. 2:181-196, 1996を参照されたい)。独特の配列を有するscFvを、(Bannister et al. Biotechnology and bioengineering, 94. 931-937, 2006によって記載されるように) 細菌において発現させ、アフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

【0315】

2.3 精製scFvによるIL-4のIL-4受容体に対する結合の阻害

IL-4R との結合について、scFv精製標品の希釈系列をIL-4に対して競合させることによって、scFvサンプルの効力を測定した。ヒトおよびカニクイザル受容体-リガンドアッセイの両方を方法および材料セクション2.4に記載のように、並行して実施した。抗体1のscFv精製標品は、ヒトIL-4のIL-4R に対する結合を阻害し、Ki値は12 nMであった (95% CI 8.7, 16.6)。抗体1による、カニクイザルIL-4のIL-4R に対する結合の阻害は不完全で、観察されたアッセイシグナルの10%阻害であった。したがって、観察された結果から、正確なKi値のデータを計算することはできなかった。

【0316】

2.4 方法および材料

IL-4のIL-4R に対する結合の阻害に関する受容体-リガンドHTRF (登録商標) アッセイ
ハイスループットスクリーニング

ヒトおよびカニクイザルIL-4R の両者に対する阻害活性を測定するために並行して実施される、2つのホモジニアス時間分解蛍光（HTRF（登録商標））受容体-リガンド結合アッセイで、選択アウトプットをスクリーニングした。

【0317】

2つのアッセイについて、選択アウトプットをスクリーニングしたが、scFvを含有する未精製の無希釈または希釈細菌ペリプラスム抽出物は、50mM MOPSバッファー pH7.4、0.5 mM EDTAおよび0.5 M ショ糖中で調製した。希釈はすべて、0.4Mフッ化カリウムおよび0.1% BSAを含有するリン酸緩衝食塩水（PBS）（アッセイバッファー）で行った。

【0318】

ユーロピウムクリプテート標識ヤギ抗ヒトFc抗体、3.2 nM（（CIS Bio International 61HFCKLB）を、ヒトIL-4R /Fc（R and D Systems 604-4R）0.5 nMとあらかじめ混合した（プレミックスA）。XL665結合ストレプトアビジン10 nM（CIS Bio International 611SAXLB）を、ヒトビオチン化IL-4（Peprotec、社内でビオチン化）4 nMとあらかじめ混合した（プレミックスB）。

【0319】

並行して、カニクイザルについてのアッセイのために、ユーロピウムクリプテート標識ヤギ抗ヒトFc抗体、3.2 nM（（CIS Bio International 61HFCKLB）を、カニクイザルIL-4R Fc（単離/Sf21発現）またはカニクイザルIL-4R /Fc HIS6（最適化/HEK発現）0.5 nMとあらかじめ混合した（プレミックスA）。XL665結合ストレプトアビジン10 nM（CIS Bio International 611SAXLB）を、カニクイザルビオチン化IL-4（社内でE.coli発現、社内でビオチン化）3 nMとあらかじめ混合した（プレミックスB）。

【0320】

それぞれのアッセイごとに、プレミックスA、5 μlを384ウェル低容量アッセイプレート（Costar 3676）に加えた。次に未精製scFvサンプル5 μlを加えた。その後、プレミックスB、10 μlを添加した。

【0321】

モノクローナルマウスIgG2aクローン25463（R and D Systems）、最終10 nM、またはカニクイザルIL-4、最終50 nM（社内でE.coli発現）を、ヒトおよびカニクイザルIL-4R 受容体-リガンド結合アッセイにそれぞれ使用して、非特異的結合を明らかにした。

【0322】

アッセイプレートを室温で4時間インキュベートしたのち、時間分解蛍光を620 nmおよび665 nmの発光波長で、EnVisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて読み取った。

【0323】

データは、各サンプルについて% デルタFの値を計算することによって解析した。デルタFは、式1にしたがって決定した。

【0324】

式1:

$$\% \text{ デルタF} = \left(\frac{\text{サンプル665nm/620nm比}}{\text{（非特異的対照665nm/620nm比）}} - \left(\frac{\text{（非特異的対照665nm/620nm比）}}{\text{（非特異的対照665nm/620nm比）}} \right) \right) \times 100$$

% デルタの値は、次に、式2に記載の% 特異的結合を計算するために使用した。

【0325】

式2:

$$\% \text{ 特異的結合} = \frac{\text{サンプルの\% デルタF}}{\text{全結合対照の\% デルタF}} \times 100$$

【0326】

Kiの決定

精製scFv濃度の希釈系列を調製し、ヒトおよびカニクイザルアッセイにおいて、scFvの能力としてKi値を測定した。プレミックスA、5 μlを384ウェル低容量アッセイプレート（Costar 3676）に加えた。次にscFv希釈サンプル5 μlを加えた。その後、プレミックスB、

10 μ lを添加した。

【0327】

モノクローナルマウスIgG2aクローン25463 (R and D Systems)、最終10 nM、またはカニクイザルIL-4、最終50 nM (社内でE.coli発現)を、ヒトおよびカニクイザルIL-4R 受容体-リガンド結合アッセイにそれぞれ使用して、非特異的結合を明らかにした。

【0328】

アッセイプレート室温で4時間インキュベートしたのち、時間分解蛍光を620 nmおよび665 nmの発光波長で、EnVisionプレートリーダー (Perkin Elmer) を用いて読み取った。

【0329】

データは、各サンプルについて% デルタFの値を計算することによって解析した。デルタFは、式1にしたがって決定した。

【0330】

式1:

$$\% \text{ デルタF} = \left(\frac{\text{サンプル665nm/620nm比}}{\text{(非特異的対照665nm/620nm比)}} - \left(\frac{\text{非特異的対照665nm/620nm比}}{\text{(非特異的対照665nm/620nm比)}} \right) \right) \times 100$$

% デルタの値は、次に、式2に記載の% 特異的結合を計算するために使用した。

【0331】

式2:

$$\% \text{ 特異的結合} = \frac{\text{サンプルの\% デルタF}}{\text{全結合対照の\% デルタF}} \times 100$$

IC₅₀値は、4-パラメーターロジスティック方程式 (式3) を用いた曲線の当てはめにより、GraphPad Prismソフトウェアを用いて決定した。

【0332】

式3:

$$Y = \text{下限} + (\text{上限} - \text{下限}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Hill傾斜}))}$$

Xは濃度の対数である。Yは特異的結合である。

【0333】

Yは下限からスタートしてシグモイド型で上限に至る。

【0334】

IC₅₀値は、式4に記載のCheng-Prusoff式を用いてKiに変換した。

【0335】

式4:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$$

【実施例3】

【0336】

scFvのIgG2への再構成

3.1

クローンは、V_HおよびV_Lドメインを、それぞれ全抗体重鎖および軽鎖を発現するベクターにサブクロニングすることによって、scFvからIgGフォーマットに変換した。V_Hドメインは、ヒト重鎖定常ドメイン、および哺乳類細胞で完全なIgG重鎖を発現させる調節エレメントを含有するベクター (pEU9.2) にクロニングした。同様に、V_Lドメインは、哺乳類細胞で完全なIgG軽鎖を発現させる調節エレメントを有する、ヒトラムダ軽鎖定常ドメイン発現のためのベクター (pEU4.4) にクロニングした。重鎖および軽鎖発現用のベクターは、最初にPeric et al., (Gene 187:9-18, 1997) に記載された。これらのベクターは単純にOriPエレメントを導入することによって作製された。IgGを得るために、重鎖および軽鎖IgG発現ベクターを、EBNA-HEK293哺乳類細胞 (Invitrogen R620-07-) にトランスフェクトした。IgGが発現され、培地中に分泌された。回収物をプールして、精製前に濾過した。IgGは、プロテインAクロマトグラフィーを用いて精製した。培養上清を適当なサイズのCeramic Protein A (BioSeptra) カラムに添加し、50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250

10

20

30

40

50

mM NaClで洗浄した。結合したIgGは、0.1 Mクエン酸ナトリウム(pH 3.0)を用いてカラムから溶出し、Tris-HCl (pH 9.0)を加えて中和した。溶出された材料は、Nap10カラム (Amersham, #17-0854-02)を用いてPBSにバッファー交換し、IgG濃度を、IgGのアミノ酸配列に基づく吸光係数によって分光光度法で測定した (Mach et al., Anal Biochem. 200 (1):20-26, 1992)。精製IgGは、SEC-HPLCを用いて、さらにSDS-PAGEによって、凝集または分解について分析した。

【0337】

3.2 IL-13およびIL-4誘導TF-1細胞増殖のIgGによる阻害

精製IgG標品のヒトIL-13およびIL-4生物活性に対する中和能力を、TF-1細胞増殖アッセイを用いて評価した。TF-1は、赤白血病患者から樹立されたヒト骨髓系前駆細胞株である (Kitamura et al. J. Cell Physiol. 140(2):323-34, 1989)。TF-1細胞株は、生存および増殖のためにファクターに依存する。TF-1細胞は、ヒトIL-13とIL-4 (Peprotech, E.coli由来)の両者に反応することが示された。IL-4およびIL-13依存性増殖の阻害は、分裂細胞の新合成DNAへのトリチウム化チミジン取り込みの減少を測定することにより決定された。プロトコールの詳細な説明は、材料および方法のセクション3.2.1で与えられる。

【0338】

抗体1の再構成されたIgG標品は、IL-13およびIL-4が誘導するTF-1細胞の増殖を、濃度依存性の様式で阻害した。抗体1のIL-13およびIL-4に対するIC₅₀幾何平均はそれぞれ18 nMおよび38 nMであると算出された。

【0339】

3.2.1 材料および方法 - IL-13およびIL-4誘導TF-1細胞増殖の精製IgGによる阻害

TF-1細胞 (R&D Systems) は、供給元のプロトコールにしたがって維持された。アッセイ培地は、5% ウシ胎仔血清 (JRH), 1% ピルビン酸ナトリウム (Sigma)、ペニシリン/ストレプトマイシン (1-2%) を含有する、GLUTAMAX 1含有RPMI-1640培地 (Invitrogen) とした。各アッセイに先立って、TF-1細胞を300xgにて5分間遠心してペレット化し、培地を吸引によって除去し、細胞をアッセイ培地中に再懸濁した。このプロセスを2回繰り返し、細胞を最終濃度 2×10^5 細胞/mlでアッセイ培地中に再懸濁した。細胞は96ウェルアッセイプレートに100 μ l/ウェルとして蒔いた。IgGの試験溶液 (二回反復) は、アッセイ培地中で望ましい濃度範囲に用量設定した。IL-4R に対するのではない無関係の抗体をネガティブコントロールとして用いた。アッセイは競合形式で行われ、細菌由来の組換えヒトIL-4またはIL-13 (Peprotech)、および適当な用量設定の試験抗体をそれぞれ50 μ lずつ、順次100 μ lの細胞に加えた。最終アッセイ容量200 μ l/ウェル、および18pM (IL-4)または40pM (IL-13)の濃度をアッセイで用いた。IL-4およびIL-13の濃度は、最大の増殖反応の約50%を与える用量として選択された。プレートは、37 °Cで5% CO₂にて72時間インキュベートした。トリチウム化チミジン (5 μ Ci/ml) 20 μ lを各アッセイポイントに加え、プレートをインキュベーターにさらに4-5時間戻した。細胞ハーベスターを用いてグラスファイバーフィルタープレート (Perkin Elmer) 上に細胞を回収した。Packard TopCountマイクロプレート液体シンチレーションカウンターを用いて、チミジンの取り込みを測定した。その後データをGraphpad Prismソフトウェアによって解析した。

【実施例4】

【0340】

抗体最適化

4.1 標的変異導入による親クローンの最適化

ヒトIL-4R に対する抗体であって、他種、たとえばカニクイザル由来のオルソロガスタンパク質に対しても交差反応性を示す前記抗体を発見および開発することには、利点および利益がある。こうした抗体は、in vivoでの薬理および安全性に関する、そういった抗体の特性解析を容易にするであろう。他種に対する能力および親和性とは、たとえばヒト活性と10倍未満の相違であり、こうした評価には適しているといえる。

【0341】

求められる種間交差反応性を達成するために、ヒトおよびカニクイザルIL-4R の両者

に対して改善された親和性を目的として、親抗体（抗体1）を最適化した。これは、親和性に基づくファージディスプレイ選択による標的化変異導入アプローチによって達成された。標的変異導入アプローチのために、抗体1に由来する大規模なscFv-ファージライブラリーを、Clackson and Lowman (2004) A Practical Approach, 2004. Oxford University Pressに記載の標準的な分子生物学の技術を用いて、可変重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）相補性決定領域3（CDR3）のオリゴヌクレオチド指定変異導入によって作製した。

【0342】

ヒト型およびカニクイザル型IL-4R に対してより高い親和性を有するバリエーションを選択するために、ライブラリーに、親和性に基づくファージディスプレイ選択を施した。選択は基本的に既述のように実施した（Thompson, Journal of Molecular Biology, 256:77-88, 1996）。簡単に述べると、scFvファージ粒子を、組換えピオチン化ヒトもしくはカニクイザルIL-4R のいずれかとともに溶液状態でインキュベートした（bio-huIL-4R FLAG HISまたはbio-cyno-IL-4R Fc HIS、いずれも社内でHEK-EBNAから作製）。抗原の種類は、一連の選択ラウンドごとに変更した。抗原に結合したscFv-ファージをその後、メーカーの推奨指示に従って、ストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Dynabeads（登録商標）M280）上に捕捉した。選択されたscFv-ファージ粒子を次に、既述のようにレスキューして（Osborn, JK. et al. Immunotechnology, 2(3):181-96, 1996）、その選択プロセスを、bio-huIL-4R またはbio-cyno-IL-4R の濃度を下げて繰り返し、選択ラウンドの間で種を変更した（6ラウンドにわたって500 nMから250 nMまで）。

【0343】

6ラウンドの選択が完了したら、VHおよびVLランダム化ライブラリーを組み換えて、クローンが、ランダムに対をなす、個別にランダム化されたVHおよびVL配列を含有するような、単一のライブラリーを作製した。その後、先に述べたようにbio-huIL-4R またはbio-cyno-IL-4R の濃度を下げて選択を続け（さらに5ラウンドにわたって2.5 nMから0.5 nMまで）、適宜、抗原の種類を変えた。

【0344】

4.2 ランダム変異導入による抗体の最適化

ランダム変異導入アプローチを用いて、抗体のうち1つ（抗体20）をさらに最適化し、ヒトおよびカニクイザルIL-4R との結合を向上させることができる抗体配列内の重要配列を同定した。抗体20 scFv配列の可変領域の全域にわたってランダム変異を導入することによって、大規模なscFv-ファージライブラリーを作製した。これは、Diversify(商標) PCR ランダム変異導入キット(BD biosciences)を用いて、メーカーの説明書にしたがって2ラウンドの変異導入により達成され、1ラウンドの変異導入につき、核酸配列中に平均してキロベースあたり8.1個の変異が組み入れられた。その方策のためのプロトコルは、国際特許出願公開番号WO2006/072801 (Cambridge Antibody Technology)によった。ヒト型およびカニクイザル型IL-4R に対してより高い親和性を有するバリエーションを選択するために、ライブラリーに、親和性に基づくファージディスプレイ選択を施した。

【0345】

選択は、基本的に既述のように実施した（Thompson, Journal of Molecular Biology, 256:77-88, 1996）。簡単に述べると、scFvファージ粒子を組換えピオチン化ヒトもしくはカニクイザルIL-4R とともに溶液状態でインキュベートした（bio-huIL-4R FLAG HISまたはbio-cyno-IL-4R Fc HIS、いずれも社内でHEK-EBNAから作製）。抗原の種類は、特定の種のIL-4R に対する親和性を向上させるためにそれに応じてヒトとカニクイザルの間で変更された。抗原に結合したscFv-ファージをその後、メーカーの推奨指示に従って、ストレプトアビジンコート常磁性ビーズ（Dynabeads（登録商標）M280）上に捕捉した。選択されたscFv-ファージ粒子を次に、既述のように回収し（Osborn, JK. et al. Immunotechnology, 2(3):181-96, 1996）、その選択プロセスを、bio-huIL-4R またはbio-cyno-IL-4R の濃度を下げて繰り返した（4ラウンドにわたって20 nMから1 pMまで）。

【0346】

4.3 受容体-リガンド結合アッセイを用いたランダム変異導入からの改良クローンの同定

標的変異およびランダム変異導入選択から得られたscFvを、細菌ペリプラズムに発現させ、ヒトおよびカニクイザルIL-4R の両者に対する阻害活性を測定するために並行して実施される、2つのホモジニアス時間分解蛍光（HTRF（登録商標））受容体-リガンド結合アッセイでスクリーニングした。詳細なアッセイ法は、材料および方法セクション2.4で与えられる。両方のアッセイで有意な阻害効果を示したscFvを、DNA配列決定に供し、ユニークな配列を有するscFvを精製標品として調製した。

【0347】

IL-4R との結合について、精製scFv標品の希釈系列をIL-4に対して競合させることによって、精製scFv抗体の能力を測定した。ヒトおよびカニクイザル受容体-リガンド結合アッセイは、材料および方法セクション2.4に記載のとおり並行して実施した。

10

【0348】

各サンプルのscFvに関する能力データの例を表1に示す。

【表 1】

Ki (nM)幾何平均、括弧内は 95%信頼限界					
scFv	ヒト IL4R	カニクイザル IL4R	scFv	ヒト IL4R	カニクイザル IL4R
抗体 1	12.0 (8.7, 16.6)	不完全	抗体 24	49pM (25, 94)	0.8 (0.5, 1.0)
抗体 2	0.6 (0.5, 0.7)	4.3 (2.1, 8.9)	抗体 24PGL	65pM	0.7
抗体 3	0.5	48.0	抗体 25	39pM (20, 79)	1.3 (0.7, 2.7)
抗体 4	0.8 (0.4, 1.8)	6.8 (3.4, 13.6)	抗体 26	0.1	1.2
抗体 5	0.6 (0.1, 2.8)	3.8 (1.8, 8.2)	抗体 27	63pM	2.8
抗体 6	0.3	3.5	抗体 28	94pM	1.8
抗体 7	1.1	16.5	抗体 29	61pM	2.4

抗体 8	0.4	9.4	抗体 30	69pM	3.6
抗体 9	0.1 (0.1, 0.3)	12.9 (9.0, 19)	抗体 31	44pM (26, 76)	2.2 (1.4, 3.4)
抗体 10	0.5	19.6	抗体 32	75pM	1.3
抗体 11	0.7	26.1	抗体 33	92pM	1.4
抗体 12	0.3	7.2	抗体 34	56pM	1.2
抗体 13	0.3	22.2	抗体 35	71pM	2.6
抗体 14	0.6 (0.4, 0.9)	27.7	抗体 36	0.1	5.3
抗体 15	1.0 (0.8, 1.2)	32.3	抗体 37	40pM (30, 51)	0.8 (0.7, 1.0)
抗体 16	0.4 (0.2, 1.0)	8.7	抗体 37 GL	61pM (40, 92)	0.7 (0.5, 1.1)
抗体 17	0.9	43.5	抗体 38	66pM	2.7
抗体 18	0.7	56.5	抗体 39	27pM	1.6
抗体 19	0.8 (0.4, 1.6)	18.5	抗体 40	31pM	6.5
抗体 20	0.7 (0.6, 0.8)	4.2 (3.4, 5.3)	抗体 41	53pM	2.7
抗体 21	31pM (13, 76)	1.0 (0.5, 1.9)	抗体 42	27pM (16, 49)	2.5 (1.4, 4.5)
抗体 22	0.3	2.6			
抗体 23	0.2	4.8			

【 0 3 4 9 】

4.4 最適化クローンによるTF-1細胞のIL-13およびIL-4誘導増殖の阻害

10

20

30

40

50

精製scFv抗体の能力は、TF-1増殖アッセイにおいても測定した。TF-1増殖アッセイでもっとも強力なクローンを前記のようにIgGに変換し、TF-1増殖アッセイで再テストした。各サンプルのIgGに関する能力データの例を表2に示す。

【表 2】

表 2：TF-1 細胞増殖アッセイで調べた改良クローンの能力の例

クローン(非生殖系列化)	IC ₅₀ (pM)	
	IL-4	IL-13
抗体 2	41.7 (33.2, 52.3)	171 (68.0, 429)
抗体 4	20.9 (13.5, 32.3)	58.1
抗体 7	12.3	42.7
抗体 8	7.9	22.4
抗体 9	8.88 (5.94, 13.3)	20.4 (13.9, 29.9)
抗体 10	10.1	25.4
抗体 11	18.8	32.7
抗体 12	18.2	40.7
抗体 14	3.8	27.2
抗体 15	2.8	17.8
抗体 16	6.2	19.5
抗体 19	7.6	22.4
抗体 20	31.1 (19.9, 48.6)	66.1 (34.2, 128)
抗体 13	15.7 (7.47, 33.1)	24.6
抗体 21	19.7	34.7
抗体 24	12.6 (9.5, 16.7)	30.2 (14.5, 62.8)
抗体 25	9.8	23.2
抗体 31	20.2	44.2
抗体 37	10.4 (7.5, 14.5)	22.1 (11.7, 41.8)
抗体 42	20.2	42.7
12B5 *	42.7 (25.9, 70.4)	79.1 (34.7, 180)

* 12B5 = ベンチマーク抗体は W0 01/92340 の指示にしたがって作製した。

【 0 3 5 0 】

4.5 生殖系列化

最適化抗 IL-4R 抗体のV_HおよびV_Lドメインのアミノ酸配列を、VBASEデータベース (MR C Centre For Protein Engineering) において既知のヒト生殖系列配列にアラインし、配列相同性によってもっとも近い生殖系列を同定した。最適化抗体系のV_HドメインについてはこれはVh1_DP-7_(1-46)であった。V_Lドメインについては、V 1_DPL5であった。

【 0 3 5 1 】

バーニア (Vernier) 残基 (Foote & Winter, J Mol Biol. Mar 20:224(2):487-99, 1992) を考慮せず、それは変更されずそのままであったが、抗体37のV_Hドメインのフレームワークには3つ、V_Lドメインには2つの変化があり、それらはすべて、完全にヒト抗体にマッチするように、もっとも近い生殖系列配列に戻された。抗体24はV_Hドメインに1つ、V_Lドメインには2つの、もっとも近いヒト生殖系列マッチから遠ざかる変化があった。V_Hド

メインのKabat番号37、およびV_LドメインのKabat番号73の変化は、もっとも近いヒト生殖系列マッチに戻した。V_Lドメインの87位のアミノ酸変化は、変更しないまま残し、能力を維持した（抗体24PGL）。これらのアミノ酸残基の生殖系列化は、適当な変異プライマーを用いた標準的な部位特異的変異導入法によって実施された。

【0352】

抗体37GL scFv配列を、クローニングベクターにクローニングして、大腸菌（E. coli）Top10細胞（F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lac 74 recA1 araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG）に形質転換し、2008年12月9日にブダペスト条約に基づいてNCIMB (Aberdeen, Scotland)に寄託した。本出願人のクローンの表示は「抗体37 GL」であり、NCIMBアクセッション番号はNCIMB 41600である。

10

【0353】

生殖系列化されたIgGを、次に、IL-4およびIL-13誘導TF-1細胞増殖アッセイで再評価し、能力の低下が無かったことを確認した。生殖系列化（GL）された抗体の能力の例を表3に示す。

【表3】

表3: IL-4およびIL-13誘導TF-1細胞増殖アッセイにて評価したときの生殖系列化された最適化クローンの能力データの例

クローン(生殖系列化)	IC ₅₀ (pM)	
	IL-4	IL-13
抗体 24 (PGL)	15.3 (6.63, 35.1)	55.0 (29.3, 103.1)
抗体 37 (PGL)	14.9 (7.8, 28.6)	41.7 (18.6, 93.4)
抗体 37 (FGL)	11.4 (9.8, 13.3)	21.1 (12.4, 35.9)

20

データは幾何平均および95%信頼区間として表される。

【0354】

4.6 DELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイにおける最適化抗体の選択性および種間交差反応性

IL-4R_αならびに構造的関連分子；IL13R_{α1} Fc、IL13R_{α2} Fcおよび共通鎖（IL-2R_β）に対する抗体の種間交差反応性および選択性を、DELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイによって実証した。このアッセイは、それぞれ固定化された抗IL-4R_α抗体に結合するビオチン化IL-4R_α HIS FLAG（社内でHEK-EBNAより作製）の阻害を測定することによって、相対的な交差反応性を決定する。

30

【0355】

用量設定した精製IL13R_{α1} Fc、IL13R_{α2} Fcおよび共通鎖（IL-2R_β）（すべてR & D Systems）を、それぞれのアッセイでテストし、そのアッセイでのIC₅₀値を尺度として構造的関連タンパク質の特異性プロファイルを確立した。

【0356】

カニクイザルIL-4R_α HIS Fc（社内でHEK-EBNAから作製）、ヒトIL-4R_α 175V Fc（AstraZeneca）、ヒトIL-4R_α FcおよびマウスIL-4R_α（いずれもR & D Systems）などの、用量設定したIL-4R_α分子種をそれぞれのアッセイでテストし、抗体の種間交差反応性を実証した。ポジティブコントロールとして非ビオチン化ヒトIL-4R_α HIS FLAGを使用した。ヒトおよびカニクイザルIL-4R_α HIS Fcは、ヒトIL-4R_α 175V Fcと同様に、重なり合った阻害曲線をもたらし、IC₅₀値ははっきりしなかった。マウスIL-4R_α またはテストした関連ヒトタンパク質のいずれについても阻害は認められなかった。結果は、抗体37GLが、カニクイザルIL-4R_α およびヒトIL-4R_α 175V に対して交差反応性であるが、マウスIL-4R_α、またはヒトIL-4R_α にもっとも関係のあるヒトタンパク質のいずれにも結合しないことを示している。プロトコルの詳細は、材料および方法のセクション4.6.1に示す。

40

【0357】

50

4.6.1 材料および方法 - DELFIA (登録商標) エピトープ競合アッセイ

精製IgGをPBS中で96ウェルMaxisorpマイクロタイタープレート(Nunc)上に吸着させたが、その濃度は、ビオチン化ヒトIL-4R HIS FLAGをまさにそのIgGに対するおおよその推定KDで添加したときに有意なシグナルを与える濃度とした。過剰なIgGをPBS-Tween (0.1% v/v) で洗浄除去し、ウェルをPBS-Marvel (3% w/v) で1時間ブロックした。下記の競合物質のそれぞれの希釈系列をPBS中で調製したが、その希釈系列は、ビオチン化ヒトIL-4R とそれぞれのIgG; ヒトIL-4R Fc (R & D Systems, 604-4R-050)、ヒトIL-4R 175V Fc(AstraZeneca)、カニクイザルIL-4R HIS Fc (当社)、マウスIL4R Fc(R & D Systems 530-MR-100)、ヒト共通 鎖(sIL-2R) (R & D Systems 384-RG-050-CF)、ヒトIL-13R 1 Fc(R & D Systems, 146-1R-100)、ヒトIL-13R 2 Fc(R & D Systems, 614-1R-100)との間の相互作用のKD値の、約400倍の濃度から始めた。非ビオチン化ヒトIL-4R HIS FLAGをポジティブコントロールとして使用した。この系列に、同量のビオチン化組み換えヒトIL-4R をKD値の約2倍の濃度で添加した(結果として、競合抗原: ビオチン化ヒトIL-Rの比が約200:1から始まる希釈系列となった)。次に、これらの混合物を、ブロックされたIgG上に移し、1.5時間平衡化させた。未結合抗原をPBS-Tween (0.1% v/v) による洗浄によって除去する一方、残存するビオチン化ヒトIL-4R をストレプトアビジン-ユーロピウム3+コンジュゲートによって検出した(DELFI A (登録商標) 検出、PerkinElmer)。時間分解蛍光をEnVisionプレートリーダー(PerkinElmer)上で620 nmで測定した。蛍光データを%特異的結合に変換した(ビオチン化ヒトIL-4R を含有するが競合物質は含まない対照ウェルから100%を決定し、0%は、ビオチン化ヒトIL-4R および1000倍過剰量の非ビオチン化ヒトIL-4R を含有するウェルから決定した)。その結果得られたデータを、 IC_{50} 値を決定するために、Prism曲線当てはめソフトウェア(Graphpad)によって解析した。

【 0 3 5 8 】

4.7 最適化クローンに関する親和性データのBIAcoreによる計算

代表的な抗体パネルの精製IgGサンプルの、ヒトおよびカニクイザルIL-4R に対する結合親和性を、基本的にKarlssonら、(J. Immunol. Methods, 145(1-2):229-240, 1991)に記載のように、BIAcore 2000バイオセンサー(BIAcore AB)を用いて表面プラズモン共鳴によって測定した。手短に述べると、メーカーの使用説明書(BIAcore)にしたがって標準的なアミンカップリング試薬を用いて、CM5センサーチップの表面にプロテインG'(Sigma Aldrich, P4689)を共有結合により結合させた。このプロテインG'表面を用いて、一定量の精製抗IL-4R 抗体またはアイソタイプ対照が、Fcドメインを介して捕捉された。HBS-EPバッファ(BIAcore AB)中で調製された100nMから0.2nMまでの濃度範囲のヒトまたはカニクイザルIL-4R HIS FLAGを、センサーチップ表面上に流した。各回の抗体注入の間に、その表面を10 mMグリシン、pH 1.75を用いて再生した。その結果得られたセンサーグラムを、BIA evaluation 4.1ソフトウェアを用いて評価し、1:1 Langmuir 結合モデルに当てはめて、相対的な結合データを作成した。実験は少なくとも3日間にわたって実施され、平均の一価親和性を計算した。得られたデータフィットから、ヒトおよびカニクイザルIL-4R に対する抗体37GLの親和性は、表4に示すように約504pMおよび4.4nMであると決定された。

【表 4】

表 4: ヒトおよびカニクイザル IL-4R α との結合に関する代表的抗体パネルの速度論的解析例

	ヒト IL4R α HIS FLAG			カニクイザル IL4R α HIS FLAG		
	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)	Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
抗体 2	6.51x10 ⁵	2.94x10 ⁻³	4.51	9.67x10 ⁴	4.59x10 ⁻³	47.5
抗体 9	5.43x10 ⁵	2.29x10 ⁻⁴	0.422	1.31x10 ⁵	1.63x10 ⁻²	124
抗体 20	6.98x10 ⁵	8.73x10 ⁻⁴	1.25	1.63x10 ⁵	4.52x10 ⁻³	27.7
抗体 37	6.40x10 ⁵	1.62x10 ⁻⁴	0.255 (0.313, 0.250, 0.203)	2.43x10 ⁵	6.88x10 ⁻⁴	2.97 (2.59, 2.36, 3.96)
抗体 37GL	6.88x10 ⁵	3.46x10 ⁻⁴	0.504 (0.533, 0.531, 0.459)	2.44x10 ⁵	1.08x10 ⁻³	4.41 (4.67, 4.34, 4.41)

【実施例 5】

【0359】

キメラヒト/マウス IL-4R 細胞外ドメインを用いた IL-4R : 抗体相互作用のエピトープマッピング:

5.1 全ドメインスワップキメラ IL-4R 分子の作製

本発明の結合メンバーは、ヒト IL-4R とは強く結合するが、マウス IL-4R との結合はきわめて弱く、ほとんど識別不可能である。この性質を用いて、エピトープマッピングのためにキメラ IL-4R を作製した。全ドメインスワップキメラは、ヒト IL-4R 細胞外ドメインのドメイン1 (D1) (M1-E119) またはドメイン2 (D2) (H120-F229) を、対応するマウス IL-4R の配列と置き換えることによって作製した。ループスワップキメラは、IL-4 と反応することが知られているヒト IL-4R のループ領域を、マウス IL-4R の対応する領域と置き換えることによって作製された。HTRF (ホモジニアス時間分解蛍光法) 競合アッセイを用いて、抗体に対するキメラの結合を測定した。アッセイでは、Eu³⁺ クリプテートで標識された抗体がビオチン標識ヒト IL-4R と相互作用した。その相互作用を Eu³⁺ クリプテートと XL665 標識ストレプトアビジンとの間の FRET (蛍光共鳴エネルギー転移) シグナルによって検出した (Mathis et al., Clin Chem 41: 1391-1397, 1995)。

【0360】

5.1.1 方法および材料 - キメラのクローニング、発現および精製

ヒト IL-4R 細胞外ドメイン (アミノ酸残基 1-229 NP_000409) およびマウス IL-4R 細胞外ドメイン (アミノ酸残基 1-230 NP_001008700) のキメラをコードする cDNA 分子を、プライマー伸長 PCR クローニングによって合成し、pDONR221 (Invitrogen Cat. No. 12536-01

7)にクローニングした。キメラのIL-4R 細胞外ドメインをコードするcDNA断片を次に、メーカーの使用説明書にしたがってLR Gateway Clonase II酵素を用いて(Invitrogen Cat. No.12538-120)、哺乳類発現ベクターpDEST12.2 (Invitrogen)にトランスファーした。pDEST12.2ベクターは、FLAG 10xhisタグ(DYKDDDDKAAHHHHHHHHH;たとえば、配列番号460、第252-261位を参照されたい)を目的の挿入遺伝子とインフレームで含有するように改変されており、また、EBNA-1遺伝子産物を発現する細胞株(HEK293-EBNA細胞など)へのトランスフェクションでエピソームプラスミドの複製を可能にする、pCEP4ベクター(Invitrogen cat. no. V044-50)由来oriP複製開始点の挿入によっても改変済みであった。HEK293-EBNA上清中の発現タンパク質を、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィー(Histrap HPカラム(GE Healthcare Cat. No. 17-5248-02))、続いてサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200カラム(GE Healthcare Cat. No.17-1069-01))を用いて精製した。

10

【0361】

ヒトIL-4R 細胞外ドメイン(1-229位;NP_000409でも同じ)、ベクターにコードされた配列(230-241位)、FLAGタグ(242-249位)および10xhisタグ(252-261位)を、配列番号460に示す。マウスIL-4R 細胞外ドメイン(1-230位;NP_001008700でも同じ)、ベクターにコードされた配列(233-242位)、FLAGタグ(243-250位)および10xhisタグ(253-262位)を、配列番号461に示す。

【0362】

5.1.2 抗体のIL-4R キメラとの結合

20

抗体は、メーカーの使用説明書にしたがってEu³⁺ クリプテート標識キットで(CisBio International Cat No. 62EUSPEA)クリプテート標識し、IL-4R /Fc(R&D systems Cat. No. 604-4R-050)は、メーカーの使用説明書にしたがってEZ Link NHS-Biotinで(Perbio Cat No. 20217)ビオチン標識した。アッセイ条件は、384ウェルマイクロタイタープレート(Greiner)において、総容量20μl中0.4nMクリプテート標識抗体、0.25nM ビオチン標識IL-4R /Fc、2.5nM ストレプトアビジンXL665(CisBio International Cat. No. 611SAXLB)1xDPBS溶液、0.1% BSA、0.4Mフッ化カリウムとした。このアッセイ液に、テストタンパク質の希釈系列(1000nMから0.017nM)を添加し、それを4に overnight インキュベートした。PerkinElmer EnVisionプレートリーダーを使用し、320nm励起フィルターならびに620nmおよび665nm発光フィルターを用いて、FRETシグナルを検出した。665/620比から特異的結合のパーセンテージとして結果を計算した(競合抗原なしのシグナル)。結果は、シグモイド型用量反応モデルを用いてPrism(GraphPad Software)で解析した。

30

【0363】

5.2 結果

キメラ分子の抗体結合は、HTRF(ホモジニアス時間分解蛍光法)競合アッセイでテストした。ヒトIL-4R と同じパラトープに抗体を結合した分子は、結合相互作用を阻害し、シグナルの低下をもたらす。阻害曲線から、ヒトIL-4R、マウスIL-4R およびキメラ分子のIC₅₀値を計算した(表5)。分子が結合を完全には阻害しないならば、最高濃度で認められた阻害パーセントを計算した。ネイティブヒトIL-4R と同様のIC₅₀値を与えるキメラは依然としてエピトープを含有していた。IL-4R の抗体との結合を完全には阻害せず、またはIC₅₀値の増加を示すキメラは、完全なエピトープは含有していなかった。これらのデータは、抗体エピトープの位置の特定を可能にした。

40

【表 5】

キメラ	NP_000409 由来の配列	NP_001008700 由来の配列	競合アッセイにおける IC ₅₀ (nM)
HuIL-4R α	M1-F229		0.673
MoIL-4R α		M1-L230	45% 阻害*
HuD1MoD2IL-4R α	M1-E119	N121-L230	3.4
MoD1HuD2IL-4R α	H120-F229	M1-G120	34% 阻害*
MoLoop1HuIL-4R α	M1-Y38; S42-F229	I39-T41	1.9
MoLoop2HuIL-4R α	M1-L64; T73-F229	M65-L73	23
MoLoop3HuIL-4R α	M1-L88; Y99-F229	E90-R99	58% 阻害*
MoLoop4HuIL-4R α	M1-W143; N151-F229	N145-N151	0.663
MoLoop5HuIL-4R α	M1-W204; T211-F229	S206-G211	1.4
AllMoLoopsHuIL-4R α	M1-Y38; S42-L88; Y99-W143; N151-W204; T211-F229	I39-T41; M65-L73; E90-R99; N145-N151; S206-G211	41% 阻害*

【0364】

表5; ヒトIL-4R の抗体との結合に対して競合するキメラIL-4R 分子のIC₅₀ (nM単位) 。ヒト (NP_000409) およびマウス (NP_001008700) IL-4R 由来のアミノ酸配列からなるキメラの、抗体との結合に対してヒトIL-4R と競合する能力を調べた。IC₅₀ 値は、完全な競合曲線が得られる場合に計算された。* キメラが、抗体に対するヒトIL-4R の結合を完全には阻害できなかった場合には、キメラの最高濃度(1000nM)で見られた阻害パーセントを示す。

【0365】

ヒト/マウスIL-4R キメラの結合は、抗体が結合するヒトIL-4R エピトープの位置の特定を可能にした。ヒトD1-マウスD2キメラはヒトIL-4R と競合することができるのに対して、マウスD1-ヒトD2キメラはヒトIL-4R の結合を完全には阻害できないので、全ドメインスワップキメラは、エピトープの位置をヒトIL-4R のD1 (残基M1-E119) に特定した。そのエピトープは、AllMoLoopsキメラおよびMoIL-4R が非常によく似た阻害パーセントを示すので、ほぼ完全にループ領域から構成されている (表5)。

【0366】

ヒトIL-4R は、5つのループ領域を含有し、これらは結晶構造においてIL-4にきわめて近接している (Hage et al., Cell 97:271-281, 1999)。ループスワップキメラによって、ヒトIL-4R エピトープの位置を、ループ3の主要コンポーネント (残基L89-N98) およびループ2の非主要コンポーネント (残基V65-H72) に特定することができた。ヒトループ3を欠くキメラは、ヒトIL-4R の抗体との結合を阻害することができず、ループ2を欠くキメラは、ヒトIL-4R より100倍高いIC₅₀を与えた (表5)。ドメインスワップのデータと一致して、ループ2およびループ3はいずれもD1に位置している (Hageら、Cell 97:271-281, 1999)。

【0367】

これらのデータから、抗体エピトープは、ヒトIL-4R の2つのループ領域にある18アミノ酸の不連続エピトープ; V65-H72およびL89-N98に位置づけられた。

【0368】

5.3 MoLoop2Hu IL-4R およびMoLoop3HuIL-4R の変異体を用いた抗体のIL-4R エピトープのより詳細な位置の特定

10

20

30

40

50

ヒトIL-4R の抗体エピトープの重要な残基の位置を特定するために、MoLoop2Hu IL-4R およびMoLoop3HuIL-4R の変異体を作製し、HTRF競合アッセイで活性を調べた。

【 0 3 6 9 】

MoLoop2Hu IL-4R (表5)を変異させ、マウス残基を変換してヒトに戻した。エピトープ重要残基が変異した場合、その IC_{50} 値はMoLoop2Hu IL-4R より低くなった(表6)。3つの変異体(構築物EM18、EM22およびEM23)がMoLoop2Hu IL-4R に類似した IC_{50} 値を与えた(表6)。さらに、マウス残基N72およびL73がヒトIL-4R に置き換えられている場合、得られたキメラ分子は、ヒトIL-4R /抗体相互作用を強く阻害することができる(表6)。これらのデータは、ヒトIL-4R 残基V65、A71およびH72は抗体エピトープの重要部分ではないことを示唆する。

10

【 0 3 7 0 】

ループ2の残りの3つのマウス残基(F67, E68, F69)は、2つのヒト残基(L67, L68)に対応する。2つのマウスのフェニルアラニン残基が1つのヒトのリジン残基に置き換えられたMoLoop2HuIL-4R では、 IC_{50} は減少した(表6)。マウスE68がMoLoop2HuIL-4R から除去された場合、 IC_{50} はやはり減少するが、そのことは、マウスループ2の酸性のグルタミン酸残基が抗体エピトープのブロッキング部分であることを示唆している。さらに、3つのマウス残基(F67, E68, F69)がすべてヒトIL-4R に置き換えられた場合、キメラはヒトIL-4R /抗体相互作用の弱い阻害しかない(表6)。これらのデータは、ヒト残基L67およびL68がヒトIL-4R の抗体結合エピトープ部分であることを示す。

【 表 6 】

20

構築物名	ループ2配列	競合アッセイでの IC_{50} (nM)
ヒト IL-4R α	<i>VfL-LseAH</i>	0.673
MoLoop2HuIL-4R α	MfFEFseNL	25
EM18	<i>VfFEFseNL</i>	20
EM19	MfLEFseNL	4.5
EM20	MfF-FseNL	3.8
EM21	MfFE <i>L</i> seNL	5.7
EM22	MfFEFse <i>AL</i>	19
EM23	MfFEFse <i>NH</i>	56
EM24	<i>VfFEFseAH</i>	13
EM25	<i>VfL-LseNL</i>	0.448

30

【 0 3 7 1 】

表6：ヒトIL-4R の抗体との結合に対して競合するキメラIL-4R 分子の IC_{50} (nM単位)。ヒトIL-4R (NP_000409)由来のアミノ酸M1-L64およびT73-F229からなり、異なるループ2領域を有するキメラを、抗体との結合でヒトIL-4R と競合する能力についてテストした。ヒトとマウス間で保存された残基を小文字で、マウス残基と異なるヒト残基を大文字の太字の斜体で示し、ヒト残基と異なるマウス残基は大文字プレーンテキストで示す。 IC_{50} 値は、完全な競合曲線が得られる場合に算出された。

40

【 0 3 7 2 】

ループ3に関して、個々の残基がマウス残基に変更されたヒトIL-4R の変異体を構築した(表7)。エピトープの重要残基が変異している場合、ヒトIL-4R より低い IC_{50} が認められる。

【 0 3 7 3 】

2つの変異体は、ヒトIL-4R /抗体相互作用をブロックする能力が大幅に低下していたが、そのことはそれらがエピトープの一部であることを示している。ヒトIL-4R D92がR

50

に変異している場合（変異体EM03の場合）、変異タンパク質は1000nMでヒトIL-4R / 抗体相互作用をブロックすることができない。ヒトIL-4R V93がPに変異している場合（変異体EM04の場合）、 IC_{50} 値はヒトIL-4R より20倍高い（表7）。それに対して、ヒトIL-4R

変異体L89E、D91N、S95Q、A96VおよびN98R（キメラ EM01、EM02、EM05、EM06およびEM07）はいずれも、ヒトIL-4R と同様の IC_{50} 値を示した（表3）。これらのデータは、抗体エピトープがヒトIL-4R D92およびV93を含んでいること、ならびにD92がヒトIL-4R / 抗体相互作用において最も重要な残基であることを示唆する。

【表7】

構築物名	Loop3 配列	競合アッセイでの IC_{50} (nM)
ヒト IL-4R α	<i>LmDDVvSAdN</i>	0.673
MoLoop3HuIL-4R α	EmNRPvQSdR	45% 阻害*
EM01	EmDDVvSAdN	0.71
EM02	<i>LmNDVvSAdN</i>	2.25
EM03	<i>LmDRVvSAdN</i>	29% 阻害*
EM04	<i>LmDDPvSAdN</i>	15
EM05	<i>LmDDVvQAdN</i>	1.65
EM06	<i>LmDDVvSSdN</i>	3.25
EM07	<i>LmDDVvSAdR</i>	1.41

【0374】

表7：ヒトIL-4R の抗体との結合に対して競合するキメラIL-4R 分子の IC_{50} （nM単位）。ヒトIL-4R（NP_000409）由来のアミノ酸M1-L88およびY99-F229からなり、異なるループ3領域を有するキメラを、抗体との結合でヒトIL-4R と競合する能力についてテストした。ヒトとマウス間で保存された残基を小文字で、マウス残基と異なるヒト残基を大文字の太字の斜体で示し、ヒト残基と異なるマウス残基は大文字プレーンテキストで示す。 IC_{50} 値は、完全な競合曲線が得られる場合に算出された。* キメラが、抗体に対するヒトIL-4R の結合を完全には阻害できなかった場合には、キメラの最高濃度（1000nM）で見られた阻害パーセントを示す。

【0375】

ドメインスワッピングおよび変異導入によって、抗体エピトープの位置はヒトIL-4R のループ2（残基65-72）および3（残基89-98）に特定された。エピトープの位置は、ループ2のL67およびL68、ならびにループ3のD92およびV93に、さらに特定することができる（残基67、68、92および93の位置については配列番号454を参照されたい）。

【0376】

本発明の抗体は、カニクイザルIL-4R とも交差反応性である。エピトープ残基D92およびV93がカニクイザルIL-4R にも存在していることは興味深い。

【0377】

配列

本発明の結合メンバーの配列を添付の[配列表]に示すが、その配列番号は下記のように対応する：

【表 8】

配列	説明
1	抗体 1 VH DNA
2	抗体 1 VH PRT
3	抗体 1 CDR1 PRT
4	抗体 1 CDR2 PRT
5	抗体 1 CDR3 PRT
6	抗体 1 VL DNA
7	抗体 1 VL PRT
8	抗体 1 CDR1 PRT
9	抗体 1 CDR2 PRT
10	抗体 1 CDR3 PRT
11	抗体 2 VH DNA
12	抗体 2 VH PRT
13	抗体 2 CDR1 PRT
14	抗体 2 CDR2 PRT
15	抗体 2 CDR3 PRT
16	抗体 2 VL DNA
17	抗体 2 VL PRT
18	抗体 2 CDR1 PRT
19	抗体 2 CDR2 PRT
20	抗体 2 CDR3 PRT
21	抗体 3 VH DNA
22	抗体 3 VH PRT
23	抗体 3 CDR1 PRT
24	抗体 3 CDR2 PRT
25	抗体 3 CDR3 PRT
26	抗体 3 VL DNA
27	抗体 3 VL PRT
28	抗体 3 CDR1 PRT
29	抗体 3 DR2 PRT
30	抗体 3 CDR3 PRT
31	抗体 4 VH DNA
32	抗体 4 VH PRT
33	抗体 4 CDR1 PRT
34	抗体 4 CDR2 PRT
35	抗体 4 CDR3 PRT
36	抗体 4 VL DNA
37	抗体 4 VL PRT
38	抗体 4 CDR1 PRT
39	抗体 4 CDR2 PRT
40	抗体 4 CDR3 PRT

配列	説明
41	抗体 5 VH DNA
42	抗体 5 VH PRT
43	抗体 5 CDR1 PRT
44	抗体 5 CDR2 PRT
45	抗体 5 CDR3 PRT
46	抗体 5 VL DNA
47	抗体 5 VL PRT
48	抗体 5 CDR1 PRT
49	抗体 5 CDR2 PRT
50	抗体 5 CDR3 PRT
51	抗体 6 VH DNA
52	抗体 6 VH PRT
53	抗体 6 CDR1 PRT
54	抗体 6 CDR2 PRT
55	抗体 6 CDR3 PRT
56	抗体 6 VL DNA
57	抗体 6 VL PRT
58	抗体 6 CDR1 PRT
59	抗体 6 CDR2 PRT
60	抗体 6 CDR3 PRT
61	抗体 7 VH DNA
62	抗体 7 VH PRT
63	抗体 7 CDR1 PRT
64	抗体 7 CDR2 PRT
65	抗体 7 CDR3 PRT
66	抗体 7 VL DNA
67	抗体 7 VL PRT
68	抗体 7 CDR1 PRT
69	抗体 7 CDR2 PRT
70	抗体 7 CDR3 PRT
71	抗体 8 VH DNA
72	抗体 8 VH PRT
73	抗体 8 CDR1 PRT
74	抗体 8 CDR2 PRT
75	抗体 8 CDR3 PRT
76	抗体 8 VL DNA
77	抗体 8 VL PRT
78	抗体 8 CDR1 PRT
79	抗体 8 CDR2 PRT
80	抗体 8 CDR3 PRT

10

20

30

40

配列	説明
81	抗体 9 VH DNA
82	抗体 9 VH PRT
83	抗体 9 CDR1 PRT
84	抗体 9 CDR2 PRT
85	抗体 9 CDR3 PRT
86	抗体 9 VL DNA
87	抗体 9 VL PRT
88	抗体 9 CDR1 PRT
89	抗体 9 CDR2 PRT
90	抗体 9 CDR3 PRT
91	抗体 10 VH DNA
92	抗体 10 VH PRT
93	抗体 10 CDR1 PRT
94	抗体 10 CDR2 PRT
95	抗体 10 CDR3 PRT
96	抗体 10 VL DNA
97	抗体 10 VL PRT
98	抗体 10 CDR1 PRT
99	抗体 10 CDR2 PRT
100	抗体 10 CDR3 PRT
101	抗体 11 VH DNA
102	抗体 11 VH PRT
103	抗体 11 CDR1 PRT
104	抗体 11 CDR2 PRT
105	抗体 11 CDR3 PRT
106	抗体 11 VL DNA
107	抗体 11 VL PRT
108	抗体 11 CDR1 PRT
109	抗体 11 CDR2 PRT
110	抗体 11 CDR3 PRT
111	抗体 12 VH DNA
112	抗体 12 VH PRT
113	抗体 12 CDR1 PRT
114	抗体 12 CDR2 PRT
115	抗体 12 CDR3 PRT
116	抗体 12 VL DNA
117	抗体 12 VL PRT
118	抗体 12 CDR1 PRT
119	抗体 12 CDR2 PRT
120	抗体 12 CDR3 PRT

配列	説明
121	抗体 13 VH DNA
122	抗体 13 VH PRT
123	抗体 13 CDR1 PRT
124	抗体 13 CDR2 PRT
125	抗体 13 CDR3 PRT
126	抗体 13 VL DNA
127	抗体 13 VL PRT
128	抗体 13 CDR1 PRT
129	抗体 13 CDR2 PRT
130	抗体 13 CDR3 PRT
131	抗体 14 VH DNA
132	抗体 14 VH PRT
133	抗体 14 CDR1 PRT
134	抗体 14 CDR2 PRT
135	抗体 14 CDR3 PRT
136	抗体 14 VL DNA
137	抗体 14 VL PRT
138	抗体 14 CDR1 PRT
139	抗体 14 CDR2 PRT
140	抗体 14 CDR3 PRT
141	抗体 15 VH DNA
142	抗体 15 VH PRT
143	抗体 15 CDR1 PRT
144	抗体 15 CDR2 PRT
145	抗体 15 CDR3 PRT
146	抗体 15 VL DNA
147	抗体 15 VL PRT
148	抗体 15 CDR1 PRT
149	抗体 15 CDR2 PRT
150	抗体 15 CDR3 PRT
151	抗体 16 VH DNA
152	抗体 16 VH PRT
153	抗体 16 CDR1 PRT
154	抗体 16 CDR2 PRT
155	抗体 16 CDR3 PRT
156	抗体 16 VL DNA
157	抗体 16 VL PRT
158	抗体 16 CDR1 PRT
159	抗体 16 CDR2 PRT
160	抗体 16 CDR3 PRT

10

20

30

40

配列	説明
161	抗体 17 VH DNA
162	抗体 17 VH PRT
163	抗体 17 CDR1 PRT
164	抗体 17 CDR2 PRT
165	抗体 17 CDR3 PRT
166	抗体 17 VL DNA
167	抗体 17 VL PRT
168	抗体 17 CDR1 PRT
169	抗体 17 CDR2 PRT
170	抗体 17 CDR3 PRT
171	抗体 18 VH DNA
172	抗体 18 VH PRT
173	抗体 18 CDR1 PRT
174	抗体 18 CDR2 PRT
175	抗体 18 CDR3 PRT
176	抗体 18 VL DNA
177	抗体 18 VL PRT
178	抗体 18 CDR1 PRT
179	抗体 18 CDR2 PRT
180	抗体 18 CDR3 PRT
181	抗体 19 VH DNA
182	抗体 19 VH PRT
183	抗体 19 CDR1 PRT
184	抗体 19 CDR2 PRT
185	抗体 19 CDR3 PRT
186	抗体 19 VL DNA
187	抗体 19 VL PRT
188	抗体 19 CDR1 PRT
189	抗体 19 CDR2 PRT
190	抗体 19 CDR3 PRT
191	抗体 20 VH DNA
192	抗体 20 VH PRT
193	抗体 20 CDR1 PRT
194	抗体 20 CDR2 PRT
195	抗体 20 CDR3 PRT
196	抗体 20 VL DNA
197	抗体 20 VL PRT
198	抗体 20 CDR1 PRT
199	抗体 20 CDR2 PRT
200	抗体 20 CDR3 PRT

配列	説明
201	抗体 21 VH DNA
202	抗体 21 VH PRT
203	抗体 21 CDR1 PRT
204	抗体 21 CDR2 PRT
205	抗体 21 CDR3 PRT
206	抗体 21 VL DNA
207	抗体 21 VL PRT
208	抗体 21 CDR1 PRT
209	抗体 21 CDR2 PRT
210	抗体 21 CDR3 PRT
211	抗体 22 VH DNA
212	抗体 22 VH PRT
213	抗体 22 CDR1 PRT
214	抗体 22 CDR2 PRT
215	抗体 22 CDR3 PRT
216	抗体 22 VL DNA
217	抗体 22 VL PRT
218	抗体 22 CDR1 PRT
219	抗体 22 CDR2 PRT
220	抗体 22 CDR3 PRT
221	抗体 23 VH DNA
222	抗体 23 VH PRT
223	抗体 23 CDR1 PRT
224	抗体 23 CDR2 PRT
225	抗体 23 CDR3 PRT
226	抗体 23 VL DNA
227	抗体 23 VL PRT
228	抗体 23 CDR1 PRT
229	抗体 23 CDR2 PRT
230	抗体 23 CDR3 PRT
231	抗体 24 VH DNA
232	抗体 24 VH PRT
233	抗体 24 CDR1 PRT
234	抗体 24 CDR2 PRT
235	抗体 24 CDR3 PRT
236	抗体 24 VL DNA
237	抗体 24 VL PRT
238	抗体 24 CDR1 PRT
239	抗体 24 CDR2 PRT
240	抗体 24 CDR3 PRT

10

20

30

40

配列	説明
241	抗体 25 VH DNA
242	抗体 25 VH PRT
243	抗体 25 CDR1 PRT
244	抗体 25 CDR2 PRT
245	抗体 25 CDR3 PRT
246	抗体 25 VL DNA
247	抗体 25 VL PRT
248	抗体 25 CDR1 PRT
249	抗体 25 CDR2 PRT
250	抗体 25 CDR3 PRT
251	抗体 26 VH DNA
252	抗体 26 VH PRT
253	抗体 26 CDR1 PRT
254	抗体 26 CDR2 PRT
255	抗体 26 CDR3 PRT
256	抗体 26 VL DNA
257	抗体 26 VL PRT
258	抗体 26 CDR1 PRT
259	抗体 26 CDR2 PRT
260	抗体 26 CDR3 PRT
261	抗体 27 VH DNA
262	抗体 27 VH PRT
263	抗体 27 CDR1 PRT
264	抗体 27 CDR2 PRT
265	抗体 27 CDR3 PRT
266	抗体 27 VL DNA
267	抗体 27 VL PRT
268	抗体 27 CDR1 PRT
269	抗体 27 CDR2 PRT
270	抗体 27 CDR3 PRT
271	抗体 28 VH DNA
272	抗体 28 VH PRT
273	抗体 28 CDR1 PRT
274	抗体 28 CDR2 PRT
275	抗体 28 CDR3 PRT
276	抗体 28 VL DNA
277	抗体 28 VL PRT
278	抗体 28 CDR1 PRT
279	抗体 28 CDR2 PRT
280	抗体 28 CDR3 PRT

配列	説明
281	抗体 29 VH DNA
282	抗体 29 VH PRT
283	抗体 29 CDR1 PRT
284	抗体 29 CDR2 PRT
285	抗体 29 CDR3 PRT
286	抗体 29 VL DNA
287	抗体 29 VL PRT
288	抗体 29 CDR1 PRT
289	抗体 29 CDR2 PRT
290	抗体 29 CDR3 PRT
291	抗体 30 VH DNA
292	抗体 30 VH PRT
293	抗体 30 CDR1 PRT
294	抗体 30 CDR2 PRT
295	抗体 30 CDR3 PRT
296	抗体 30 VL DNA
297	抗体 30 VL PRT
298	抗体 30 CDR1 PRT
299	抗体 30 CDR2 PRT
300	抗体 30 CDR3 PRT
301	抗体 31 VH DNA
302	抗体 31 VH PRT
303	抗体 31 CDR1 PRT
304	抗体 31 CDR2 PRT
305	抗体 31 CDR3 PRT
306	抗体 31 VL DNA
307	抗体 31 VL PRT
308	抗体 31 CDR1 PRT
309	抗体 31 CDR2 PRT
310	抗体 31 CDR3 PRT
311	抗体 32 VH DNA
312	抗体 32 VH PRT
313	抗体 32 CDR1 PRT
314	抗体 32 CDR2 PRT
315	抗体 32 CDR3 PRT
316	抗体 32 VL DNA
317	抗体 32 VL PRT
318	抗体 32 CDR1 PRT
319	抗体 32 CDR2 PRT
320	抗体 32 CDR3 PRT

10

20

30

40

配列	説明
321	抗体 33 VH DNA
322	抗体 33 VH PRT
323	抗体 33 CDR1 PRT
324	抗体 33 CDR2 PRT
325	抗体 33 CDR3 PRT
326	抗体 33 VL DNA
327	抗体 33 VL PRT
328	抗体 33 CDR1 PRT
329	抗体 33 CDR2 PRT
330	抗体 33 CDR3 PRT
331	抗体 34 VH DNA
332	抗体 34 VH PRT
333	抗体 34 CDR1 PRT
334	抗体 34 CDR2 PRT
335	抗体 34 CDR3 PRT
336	抗体 34 VL DNA
337	抗体 34 VL PRT
338	抗体 34 CDR1 PRT
339	抗体 34 CDR2 PRT
340	抗体 34 CDR3 PRT
341	抗体 35 VH DNA
342	抗体 35 VH PRT
343	抗体 35 CDR1 PRT
344	抗体 35 CDR2 PRT
345	抗体 35 CDR3 PRT
346	抗体 35 VL DNA
347	抗体 35 VL PRT
348	抗体 35 CDR1 PRT
349	抗体 35 CDR2 PRT
350	抗体 35 CDR3 PRT
351	抗体 36 VH DNA
352	抗体 36 VH PRT
353	抗体 36 CDR1 PRT
354	抗体 36 CDR2 PRT
355	抗体 36 CDR3 PRT
356	抗体 36 VL DNA
357	抗体 36 VL PRT
358	抗体 36 CDR1 PRT
359	抗体 36 CDR2 PRT
360	抗体 36 CDR3 PRT

配列	説明
361	抗体 37 VH DNA
362	抗体 37 VH PRT
363	抗体 37 CDR1 PRT
364	抗体 37 CDR2 PRT
365	抗体 37 CDR3 PRT
366	抗体 37 VL DNA
367	抗体 37 VL PRT
368	抗体 37 CDR1 PRT
369	抗体 37 CDR2 PRT
370	抗体 37 CDR3 PRT
371	抗体 38 VH DNA
372	抗体 38 VH PRT
373	抗体 38 CDR1 PRT
374	抗体 38 CDR2 PRT
375	抗体 38 CDR3 PRT
376	抗体 38 VL DNA
377	抗体 38 VL PRT
378	抗体 38 CDR1 PRT
379	抗体 38 CDR2 PRT
380	抗体 38 CDR3 PRT
381	抗体 39 VH DNA
382	抗体 39 VH PRT
383	抗体 39 CDR1 PRT
384	抗体 39 CDR2 PRT
385	抗体 39 CDR3 PRT
386	抗体 39 VL DNA
387	抗体 39 VL PRT
388	抗体 39 CDR1 PRT
389	抗体 39 CDR2 PRT
390	抗体 39 CDR3 PRT
391	抗体 40 VH DNA
392	抗体 40 VH PRT
393	抗体 40 CDR1 PRT
394	抗体 40 CDR2 PRT
395	抗体 40 CDR3 PRT
396	抗体 40 VL DNA
397	抗体 40 VL PRT
398	抗体 40 CDR1 PRT
399	抗体 40 CDR2 PRT
400	抗体 40 CDR3 PRT

10

20

30

40

配列	説明
401	抗体 41 VH DNA
402	抗体 41 VH PRT
403	抗体 41 CDR1 PRT
404	抗体 41 CDR2 PRT
405	抗体 41 CDR3 PRT
406	抗体 41 VL DNA
407	抗体 41 VL PRT
408	抗体 41 CDR1 PRT
409	抗体 41 CDR2 PRT
410	抗体 41 CDR3 PRT
411	抗体 42 VH DNA
412	抗体 42 VH PRT
413	抗体 42 CDR1 PRT
414	抗体 42 CDR2 PRT
415	抗体 42 CDR3 PRT
416	抗体 42VL DNA
417	抗体 42 VL PRT
418	抗体 42 CDR1 PRT
419	抗体 42 CDR2 PRT
420	抗体 42 CDR3 PRT
421	抗体 24 PGLVH DNA
422	抗体 24 PGLVH PRT
423	抗体 24 PGLCDR1 PRT
424	抗体 24 PGLCDR2 PRT
425	抗体 24 PGLCDR3 PRT
426	抗体 24 PGLVL DNA
427	抗体 24 PGLVL PRT
428	抗体 24 PGLCDR1 PRT
429	抗体 24 PGLCDR2 PRT
430	抗体 24 PGLCDR3 PRT
431	抗体 24 GLVH DNA
432	抗体 24 GLVH PRT
433	抗体 24 GLCDR1 PRT
434	抗体 24 GLCDR2 PRT
435	抗体 24 GLCDR3 PRT
436	抗体 24 GLVL DNA
437	抗体 24 GLVL PRT
438	抗体 24 GLCDR1 PRT
439	抗体 24 GLCDR2 PRT
440	抗体 24 GLCDR3 PRT

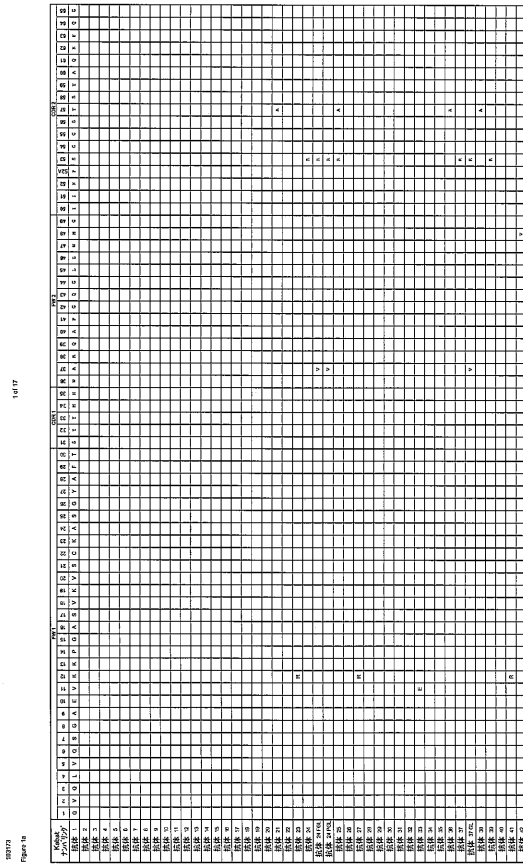
配列	説明
441	抗体 37 GLVH DNA
442	抗体 37 GLVH PRT
443	抗体 37 GLCDR1 PRT
444	抗体 37 GLCDR2 PRT
445	抗体 37 GLCDR3 PRT
446	抗体 37 GLVL DNA
447	抗体 37 GLVL PRT
448	抗体 37 GLCDR1 PRT
449	抗体 37 GLCDR2 PRT
450	抗体 37 GLCDR3 PRT
451	カニクイザルIL4Rプライマー1
452	カニクイザルIL4Rプライマー2
453	I75Vオリゴヌクレオチド変異 プライマー
454	ヒト IL-4R α /Fcタンパク質
455	カニクイザルIL-4R α cDNA ヌクレオチド
456	カニクイザルIL-4R α /Fc cDNA ヌクレオチド
457	カニクイザルIL-4R α /Fc cDNA タンパク質
458	ヒトI75V IL-4R α /Fc cDNA ヌクレオチド配列
459	ヒトI75V IL-4R α /Fc タンパク質
460	ヒトIL-4R α /FLAG/HISタグ アミノ酸配列
461	マウスIL-4R α /FLAG/HISタグ アミノ酸配列

10

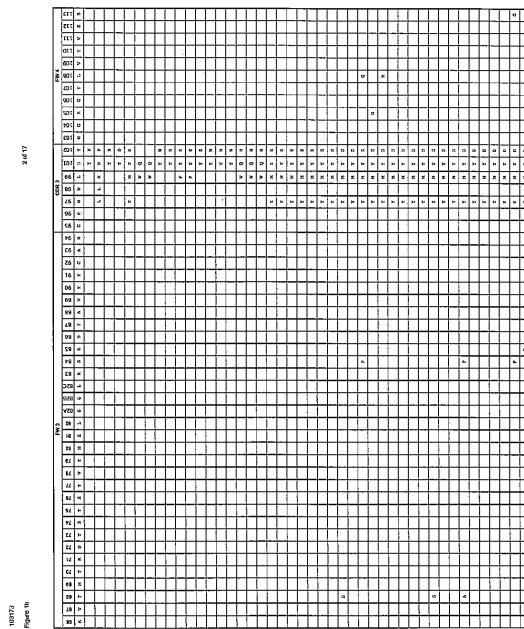
20

30

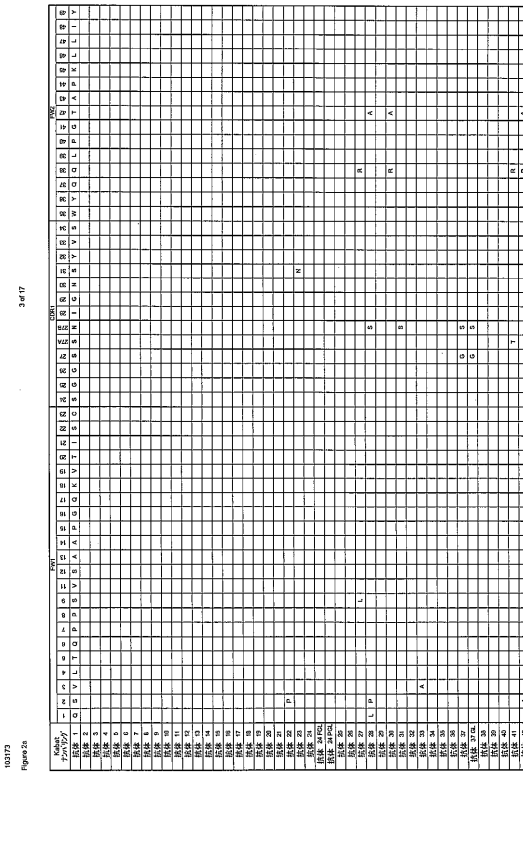
【図 1 A】



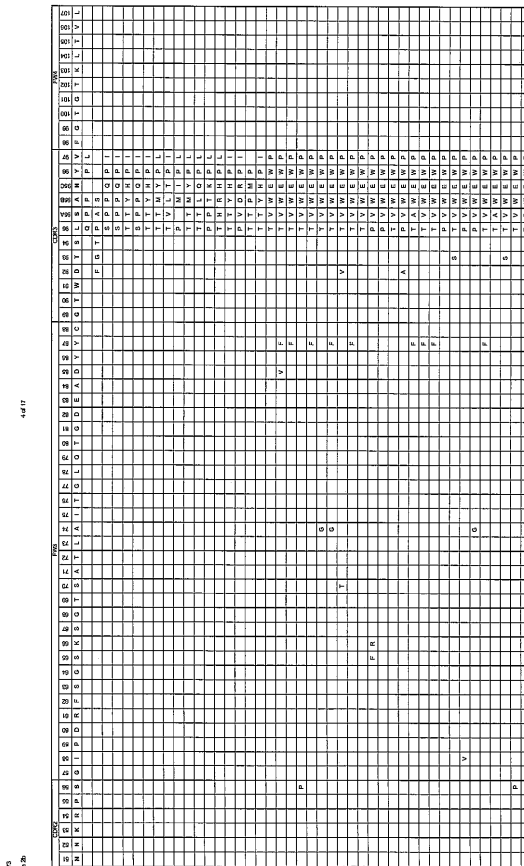
【図 1 B】



【図 2 A】

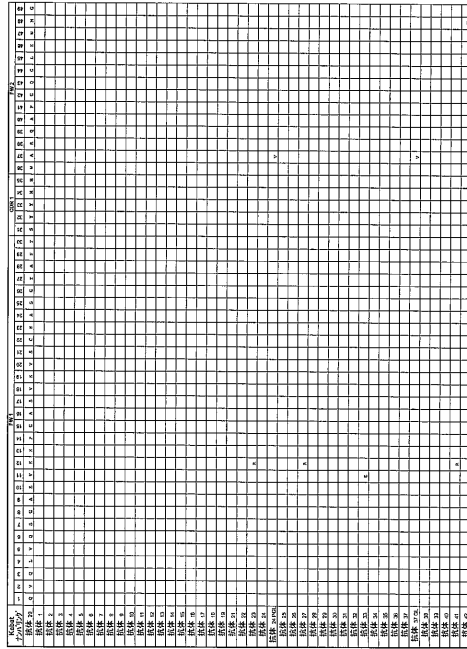


【図 2 B】



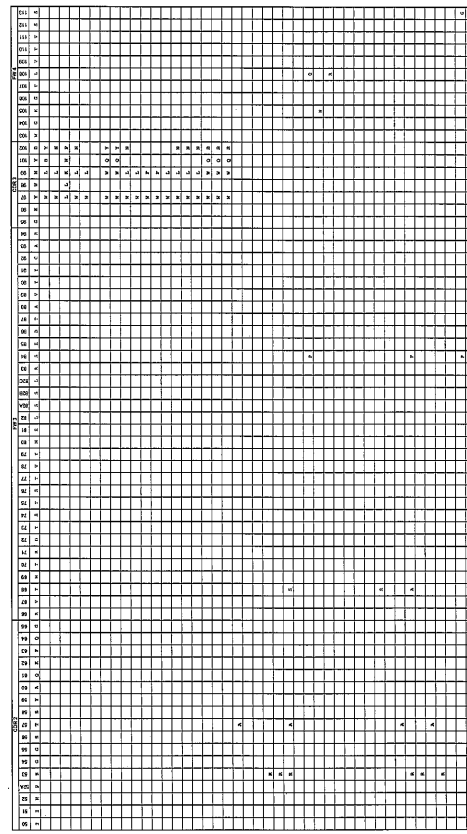
【図 3 A】

10072
Figure 3a
5477



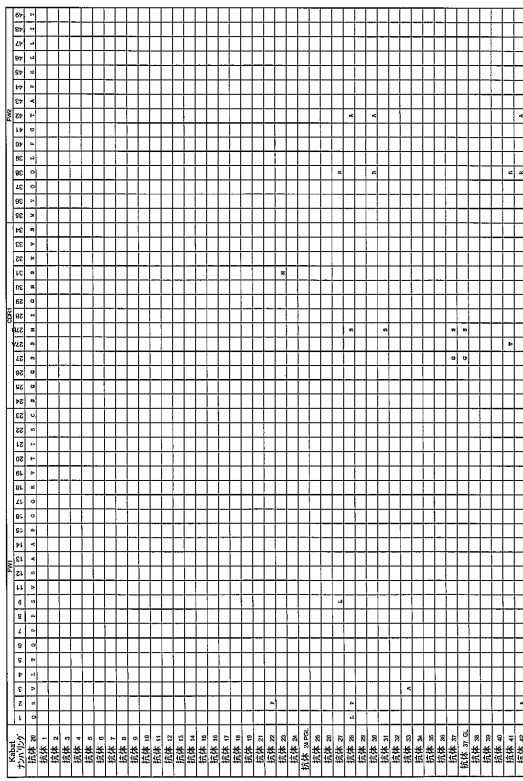
【図 3 B】

10073
Figure 3b
5477



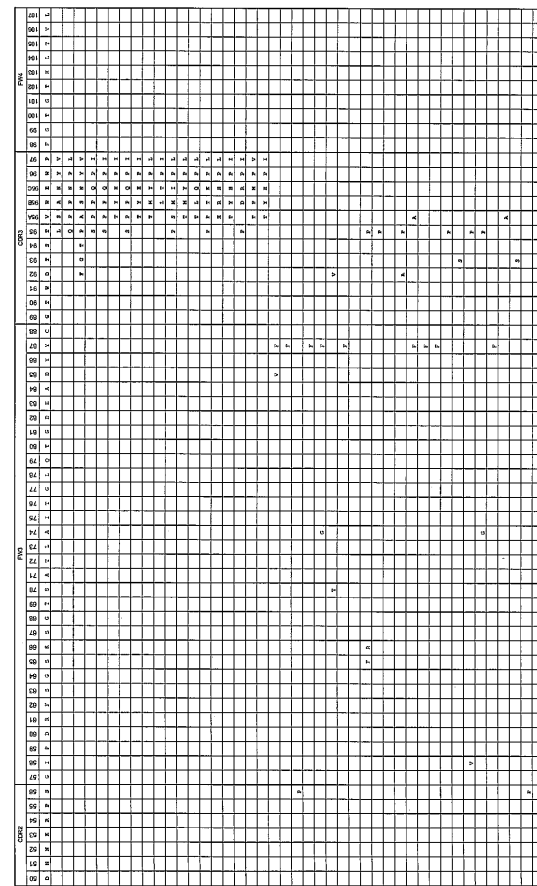
【図 4 A】

10074
Figure 4a
7477



【図 4 B】

10075
Figure 4b
5477



【 図 6 C 】

科目 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 16	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 17	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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	100
科目 18	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	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</																																										

【圖 7 B】

[illegible]

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 P 11/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/08
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/06
A 6 1 P 11/08 (2006.01)		A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 11/08
A 6 1 P 19/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 19/04
C 0 7 K 14/715 (2006.01)		A 6 1 P 37/06
		C 0 7 K 14/715

- (72)発明者 コヘン, スザンヌ
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 ドブソン, クレア, ルイーズ
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 エリクソン, パー - オロフ, フレデリック
スウェーデン国 エス - 2 2 1 8 7 ランド, アストラゼネカ アール アンド ディー ランド
- (72)発明者 レイン, デボラ, ルイーズ
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 フォン ヴァッヘンフェルト, カリン
スウェーデン国 エス - 2 2 1 8 7 ランド, アストラゼネカ アール アンド ディー ランド

審査官 一宮 里枝

- (56)参考文献 特開平 1 1 - 3 3 2 5 6 7 (J P , A)
特開平 0 7 - 1 4 9 6 6 2 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 0 2 1 3 2 (U S , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 K 4 9 / 0 0 - 4 9 / 0 4
A 6 1 P 3 7 / 0 0 - 3 7 / 0 8
A 6 1 P 1 1 / 0 0 - 1 1 / 1 6
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
S c i e n c e D i r e c t
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)