

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5102616号  
(P5102616)

(45) 発行日 平成24年12月19日(2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日(2012.10.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/24	(2006.01)	C07K 16/24	Z N A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00	1 O 2
C07K 16/46	(2006.01)	C07K 16/46	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08	

請求項の数 49 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-518695 (P2007-518695)  
 (86) (22) 出願日 平成17年6月30日 (2005.6.30)  
 (65) 公表番号 特表2008-511542 (P2008-511542A)  
 (43) 公表日 平成20年4月17日 (2008.4.17)  
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2005/002581  
 (87) 國際公開番号 WO2006/003407  
 (87) 國際公開日 平成18年1月12日 (2006.1.12)  
 審査請求日 平成20年4月22日 (2008.4.22)  
 (31) 優先権主張番号 0414799.7  
 (32) 優先日 平成16年7月1日 (2004.7.1)  
 (33) 優先権主張国 英国(GB)  
 (31) 優先権主張番号 0423675.8  
 (32) 優先日 平成16年10月25日 (2004.10.25)  
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者 397009934  
 グラクソ グループ リミテッド  
 G L A X O G R O U P L I M I T E D  
 イギリス ミドルセックス ユービー6  
 Oエヌエヌ グリーンフォード バークレー アベニュー グラクソ ウエルカム  
 ハウス (番地なし)  
 G l a x o W e l l c o m e H o u s e , B e r k e l e y A v e n u e G r e e n f o r d , M i d d l e s e x U B 6 O N N , G r e a t B r i t a i n  
 (74) 代理人 100062144  
 弁理士 青山 葵

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫グロブリン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

h I L - 1 3 と特異的に結合し、h I L - 1 3 とh I L - 1 3 R の間の相互作用を阻害し、次のC D R :

C D R H 1 : 配列番号 1

C D R H 2 : 配列番号 2

C D R H 3 : 配列番号 3

C D R L 1 : 配列番号 4

C D R L 2 : 配列番号 5

C D R L 3 : 配列番号 6

を含む、治療用抗体またはその抗原結合断片。

10

## 【請求項 2】

抗体が無傷の抗体であるところの、請求項 1 記載の治療用抗体または抗原結合断片。

## 【請求項 3】

抗体がラット、マウス、靈長類またはヒト由来であるところの、請求項 1 または 2 記載の治療用抗体または抗原結合断片。

## 【請求項 4】

配列番号 7 のV H ドメインおよび配列番号 8 のV L ドメインを含む、請求項 3 記載のネズミ抗体。

## 【請求項 5】

20

抗体がヒト化またはキメラ抗体であるところの、請求項 3 記載の治療用抗体。

【請求項 6】

配列番号 1 1 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 7】

配列番号 1 2 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 8】

配列番号 1 3 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。 10

【請求項 9】

配列番号 1 4 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 10】

配列番号 1 1 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 11】

配列番号 1 2 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。 20

【請求項 12】

配列番号 1 3 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 13】

配列番号 1 4 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 14】

抗体がヒト定常領域を含むところの、請求項 5 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

抗体が I g G アイソタイプの定常領域を含むところの、請求項 1 4 記載の抗体。 30

【請求項 16】

抗体が I g G 1 または I g G 4 であるところの、請求項 1 5 記載の抗体。

【請求項 17】

配列番号 1 8 の重鎖および配列番号 2 2 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 18】

配列番号 1 9 の重鎖および配列番号 2 2 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 19】

配列番号 2 0 の重鎖および配列番号 2 2 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 2 0】

配列番号 2 1 の重鎖および配列番号 2 2 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。 40

【請求項 2 1】

配列番号 1 8 の重鎖および配列番号 2 3 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 2 2】

配列番号 1 9 の重鎖および配列番号 2 3 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 2 3】

配列番号 2 0 の重鎖および配列番号 2 3 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 2 4】

配列番号 2 1 の重鎖および配列番号 2 3 の軽鎖を含む、請求項 5 記載のヒト化抗体。

【請求項 2 5】

h I L - 1 3 と特異的に結合する請求項 1 に記載のヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片であって、ヒトアクセプター重鎖フレームワーク領域の 1 9、 3 8、 7 3 および 8 50

1からなる群から選択された残基およびヒトアクセプター軽鎖フレームワークの位置85の残基が、CDRH3が誘導されるドナー抗体フレームワーク中に見つかる対応する残基で置換されている、抗体またはその断片。

**【請求項26】**

hIL-13と特異的に結合する請求項25に記載のヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片であって、ヒト重鎖フレームワークが以下の残基（またはその同類置換基）の1つもしくは複数を含み：

位置 残基

38 I

19 R

73 T

81 R

ヒト軽鎖が：

位置 残基

85 V

を含む、抗体またはその断片。

**【請求項27】**

断片がFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ジアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニ抗体、ミニボディ、単離されたVH、単離されたVLであるところの、請求項1～3、25または26のいずれかに記載の抗原結合断片。

**【請求項28】**

抗体がADCcおよび/または補体活性化を減少させるように変異Fc領域を含む、請求項5～26のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項29】**

第1および第2のベクターを含む形質転換またはトランスフェクトされた組換え宿主細胞であって、第1のベクターが請求項1～28のいずれか一項に記載の抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチドを含み、該第2のベクターが請求項1～28のいずれか一項に記載の抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞。

**【請求項30】**

第1のベクターが配列番号7のポリヌクレオチドを含み、第2のベクターが配列番号8のポリヌクレオチドを含む、請求項29記載の宿主細胞。

**【請求項31】**

第1のベクターが配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含み、第2のベクターが配列番号15、配列番号16、配列番号36、配列番号37からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、請求項30記載の宿主細胞。

**【請求項32】**

細胞が真核生物由来である、請求項29～31のいずれか一項に記載の宿主細胞。

**【請求項33】**

細胞が哺乳動物由来である、請求項32記載の宿主細胞。

**【請求項34】**

細胞がCHOまたはNS0である、請求項32記載の宿主細胞。

**【請求項35】**

請求項1～28のいずれか一項に記載の治療用抗体の製法であって、請求項29～34のいずれか一項に記載の宿主細胞を無血清培地にて培養する工程を含む、方法。

**【請求項36】**

抗体が宿主細胞により培地に分泌される、請求項35記載の方法。

**【請求項37】**

抗体がさらに、該抗体を含有する培地に対して、少なくとも95%またはそれ以上まで精製されている、請求項36記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 8】**

請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の治療用抗体またはその抗原結合断片と、医薬上許容される担体とを含む、医薬組成物。

**【請求項 3 9】**

アレルギー喘息、重篤な喘息、難治性喘息、ブリットル喘息、夜間喘息、月経前喘息、ステロイド耐性喘息、ステロイド依存性喘息、アスピリン誘導性喘息、成人発症喘息、小児喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー鼻炎、クローン病、COPD、突発性肺線維症、全身性進行性硬化症、肝線維症、肝肉芽腫、住血吸虫症、リーシュマニア症、ホジキン病およびB細胞慢性リンパ性白血病からなる群より選択される疾患または障害の治療にて用いるための、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の治療用抗体またはその抗原結合断片。

10

**【請求項 4 0】**

アレルギー喘息、重篤な喘息、難治性喘息、ブリットル喘息、夜間喘息、月経前喘息、ステロイド耐性喘息、ステロイド依存性喘息、アスピリン誘導性喘息、成人発症喘息、小児喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー鼻炎、クローン病、COPD、突発性肺線維症、全身性進行性硬化症、肝線維症、肝肉芽腫、住血吸虫症、リーシュマニア症、ホジキン病およびB細胞慢性リンパ性白血病からなる群より選択される疾患または障害を治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の治療用抗体またはその抗原結合断片の使用。

**【請求項 4 1】**

20

hIL-13に特異的に結合し、 $1.4 \times 10^{-4}$ ないし $8.22 \times 10^{-5}$ 秒 $^{-1}$ の範囲の解離定数  $K_{off}$  を有する、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の治療用抗体。

**【請求項 4 2】**

アレルギー喘息、重篤な喘息、難治性喘息、ブリットル喘息、夜間喘息、月経前喘息、ステロイド耐性喘息、ステロイド依存性喘息、アスピリン誘導性喘息、成人発症喘息、小児喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー鼻炎、クローン病、COPD、突発性肺線維症、全身性進行性硬化症、肝線維症、肝肉芽腫、住血吸虫症、リーシュマニア症、ホジキン病およびB細胞慢性リンパ性白血病からなる群より選択される疾患または障害の治療にて用いるための請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の抗体、および抗 - IL - 4 モノクローナル抗体の組合せ。

30

**【請求項 4 3】**

抗 - IL - 4 モノクローナル抗体がパスコリズマブである、請求項 4 2 記載の組合せ。

**【請求項 4 4】**

抗 - IL - 4 モノクローナル抗体が、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の抗体と、同時に、連続的に、あるいは別々に投与される、請求項 4 2 または 4 3 記載の組合せ。

**【請求項 4 5】**

アレルギー喘息、重篤な喘息、難治性喘息、ブリットル喘息、夜間喘息、月経前喘息、ステロイド耐性喘息、ステロイド依存性喘息、アスピリン誘導性喘息、成人発症喘息、小児喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー鼻炎、クローン病、COPD、突発性肺線維症、全身性進行性硬化症、肝線維症、肝肉芽腫、住血吸虫症、リーシュマニア症、ホジキン病およびB細胞慢性リンパ性白血病からなる群より選択される疾患または障害を治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の抗体ならびに抗 - IL - 4 モノクローナル抗体の使用。

40

**【請求項 4 6】**

抗 - IL - 4 モノクローナル抗体がパスコリズマブである、請求項 4 5 記載の使用。

**【請求項 4 7】**

抗 - IL - 4 モノクローナル抗体が、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の抗体と、同時に、連続的に、あるいは別々に投与される、請求項 4 5 または 4 6 記載の使用。

**【請求項 4 8】**

請求項 1 ないし 2 8 のいずれか一項に記載の第 1 の抗体と、抗 - IL - 4 抗体である第

50

2の抗体と、医薬上許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 4 9】

抗 - I L - 4 モノクローナル抗体がパスコリズマブである、請求項 4 8 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、インターロイキン 13 ( I L - 13 ) および具体的にはヒト I L - 13 ( h I L - 13 ) に特異的に結合する免疫グロブリンに関する。本発明の一実施形態は、 h I L - 13 に特異的に結合する抗体に関する。本発明はまた、前記免疫グロブリンを用いた疾患または障害の治療方法、前記免疫グロブリンを含む医薬組成物および製造方法にも関する。本発明の他の態様は以下の説明から明らかとなろう。  
10

【背景技術】

【0 0 0 2】

インターロイキン - 13 ( I L - 13 )

I L - 13 とは、炎症性サイトカインの産生を阻害する T 細胞由来サイトカインとして最初に記載された、 12 kDa の分泌サイトカインである。構造的研究により、これは 2 つのジスルフィド結合によって保持された 4 - ヘリックス束配置を有することが示されている。 I L - 13 は 4 つの潜在的なグリコシル化部位を有するが、ラット肺由来のネイティブ I L - 13 の解析により、グリコシル化されていない分子として産生されることが示されている。 NSO および COS - 7 細胞からのヒト I L - 13 の発現によりこの観察が確認されている ( Eisenmesser ら、 J . Mol . Biol ., 2001, 310 ( 1 ) : 231 ~ 241 ; Moy ら、 J . Mol . Biol ., 2001, 310 ( 1 ) : 219 ~ 230 ; Cannon - Carlson ら、 Protein Expression and Purification, 1998, 12 ( 2 ) : 239 ~ 248 ) 。  
20

【0 0 0 3】

I L - 13 とは、活性 Th 2 細胞、肥満細胞、好塩基球、樹状細胞、ケラチノサイトおよび NKT 細胞を含めた様々な細胞種によって産生される多面発現性サイトカインである。また、 Th 0 、 Th 1 、 CD 8 および未処置の CD 45 RA + T 細胞によっても産生され得る。 I L - 13 は I L 4 と部分的に重複する免疫調節性活性を有しており、この重複性は I L 4 および I L - 13 の受容体中の共有の構成成分によって説明し得る。 I L - 13 は、 I L 4 R および I L - 13 R 1 の鎖からなるヘテロ二量体である II 型 I L 4 受容体を介してシグナル伝達を行う。 I L - 13 R 1 は I L - 13 と低い親和性 ( Kd = 2 ~ 10 nM ) で結合するが、 I L 4 R と対になった場合に高い親和性 ( Kd = 400 pM ) で結合して、シグナル伝達を行う機能的な I L - 13 受容体を形成し ( ヒト受容体は本明細書中で「 h I L - 13 R 」と呼ぶ ) 、その結果、 JAK / STAT および IRS - 1 / IRS - 2 経路の活性化がもたらされる。さらなる I L - 13 受容体鎖 ( I L - 13 R 2 ) も特徴づけられており、これは高い親和性 ( Kd = 250 pM ) で I L - 13 と結合するがシグナル伝達を行わず、むしろ囲受容体として役割を果たすと考えられている。 I L - 13 に対する機能的な受容体は、気道上皮、平滑筋、肥満細胞、好酸球、好塩基球、 B 細胞、線維芽細胞、単球およびマクロファージを含めた幅広い細胞上で発現される。 T 細胞は I L - 13 に対する機能的な受容体を有さない ( Hilton ら、 PNAS, 1996, 93 ( 1 ) : 497 ~ 501 ; Caput ら、 J . Biol . Chem ., 1996, 271 ( 28 ) : 16921 ~ 16926 ; Hershey GK, J . Allergy Clin . Immunol ., 2003, 111 ( 4 ) : 677 ~ 690 ) 。  
30  
40

【0 0 0 4】

I L - 13 および I L - 4 どちらも、アレルギー関連の炎症を促進し、細菌、ウイルスおよび細胞内病原体に起因する炎症を抑制することによって、免疫ならびに炎症反応を変  
50

更する役割を果たす。IL-13の主な生物学的效果には、B細胞増殖の誘発およびIgEへのアイソタイプスイッチの調節；B細胞および単球上におけるMHC-IIおよびCD23の発現の誘発；内皮細胞上のVCAM-1のアップレギュレーション；ケモカイン産生の調節；肥満細胞、好酸球および好中球の機能の活性化、ならびに単球およびマクロファージ集団における炎症誘発性遺伝子の発現の阻害が含まれる。IL-13はT細胞に対して増殖性効果をまったく有さない。したがって、IL-4とは異なり、IL-13はCD4 T細胞からTh2型細胞への最初の分化に重要であるとは見受けられず、むしろアレルギー性炎症のエフェクター相に重要であると見受けられる(McKenzieら、PNAS、1993、90(8)：3735～3739；Wynn TA、Annu. Rev. Immunol.、2003、21：425～456)。

10

#### 【0005】

##### IL-13と喘息

喘息とは、下気道の炎症によって引き起こされ、再発性の呼吸障害によって特徴づけられている、慢性肺疾患である。患者の気道は敏感であり、かつ症状がない場合にも常にある程度の腫大または炎症を起こしている。炎症は気道の狭小化をもたらし、肺からの空気の流入および流出を減少させて呼吸を困難にし、喘鳴、胸苦しさおよび咳嗽をもたらす。喘息は、アレルゲン（たとえば埃ダニ、花粉、カビ）、刺激因子（たとえば煙、有害ガス、悪臭）、呼吸器感染症、運動および乾燥した天候に対する過敏が引き金となる。この引き金が気道を刺激し、気道の内側が腫大してさらに炎症を起こし、その後、粘液が気道を詰まらせ、呼吸が困難かつストレスとなって喘息の症状が現れるまで気道の周りの筋肉が締め付けられる。

20

#### 【0006】

動物モデルおよび患者から、喘息の炎症および他の病状が空中アレルゲンおよび他の刺激に対するTh2応答の調節不全によって駆動されているという有力な証拠がある(Busseら、Am. J. Resp. Crit. Care Med.、1995、152(1)：388～393)。具体的には、IL-13は、気道過敏症、好酸球増加症、杯細胞異形成および粘液過剰分泌を含めた肺における様々な細胞応答を駆動する主要なエフェクターサイトカインであると考えられている。

#### 【0007】

##### 喘息におけるIL-13の役割の臨床上の証拠

30

IL-13をコードしている遺伝子は染色体5q31上に位置する。この領域はIL-3、IL-4、IL-5、IL-9およびGM-CSFをコードしている遺伝子も含んでおり、喘息と関連づけられている。喘息およびアトピーに関連づけられているIL-13の遺伝的変異がプロモーターおよびコード領域の両方で見つかっている(Verceil D、Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.、2002、2(5)：389～393)。コード変異であるQ130IL-13（本明細書内で「Q130IL-13」と呼ぶ）の機能的な研究のデータが利用可能である。第4エクソン中に見つかる+2044のGからAへの一塩基多型(SNP)は、位置130におけるアルギニンからグルタミンへの置換をもたらす(Q130IL-13)。また、配列番号9ではこれは位置110に相当し、ここでは成熟ヒトIL-13アミノ酸配列の先頭にある最初の「G」アミノ酸残基が位置1であることに留意されたい。この変異は、日本人およびヨーロッパ人の集団において喘息、IgEレベルの上昇ならびにアトピー性皮膚炎に関連していることが判明している。Q130IL-13は、野生型IL-13と比較して安定性が増強されていると考えられている。また、これはIL-13R<sub>2</sub>受容体に対する親和性が僅かに低く、これらの観察と一貫して、Q130IL-13変異においてホモ接合性の患者では非ホモ接合性患者と比較して血清IL-13レベル中央値が高かった。これらの結果は、Q130IL-13がIL-13の局所濃度および全身濃度に影響を与える可能性があることを示している(Kazuhikoら、J. Allergy Clin. Immunol.、2002、109(6)：980～987)。

40

#### 【0008】

50

アトピー性喘息および非アトピー性喘息のどちらにおいても IL-13 レベルの上昇が測定されている。一研究では、正常な対照患者の平均血清 IL-13 レベル 8 pg/ml に対して、喘息患者では 50 pg/ml が測定された (Lee ら、J. Asthma, 2001, 38(8) : 665~671)。また、IL-13 レベルの増加は、血漿、細気管支肺胞洗浄液、肺生検試料および痰においても測定されている (Berry ら、J. Allergy Clin. Immunol., 2004, 114(5) : 1106~1109; Kroegel ら、Eur. Respir. J., 1996, 9(5) : 899~904; Huang ら、J. Immunol., 1995, 155(5) : 2688~2694; Humbert ら、J. Allergy Clin. Immunol., 1997, 99(5) : 657~665)。

10

#### 【0009】

##### 喘息における IL-13 の関与の in vivo での証拠

いくつかの研究が、アレルギー性喘息の急性および慢性のマウスモデルのどちらについても、病状を駆動する重要なエフェクターとしての IL-13 の役割を定義している。これらのモデルでは、マウス IL-13 の生物活性を中和するために高親和性の IL-13 受容体 (IL-13R<sub>2</sub>) または抗 IL-13 ポリクローナル抗体を用いた。アレルゲン投与時における IL-13 の遮断により、OVA 誘発性の気道過敏症、好酸球増加症および杯細胞異形成が完全に阻害された。対照的に、感作後およびアレルゲン投与期中の IL-4 に対する抗体の投与は、喘息の表現型を部分的にのみ軽減させた。したがって、外来性の IL-4 および IL-13 はどちらも喘息様の表現型を誘発する能力を有するが、IL-13 のエフェクター活性が IL-4 よりも優れているように見受けられる。これらのデータは免疫誘発における IL-4 の主な役割を示唆しており（特に Th2 細胞の発生および気道への動員ならびに IgE の産生について）、一方で IL-13 は気道過敏症、粘液の過剰産生および細胞炎症を含めた様々なエフェクター結果に主に従事していると考えられる (Willis-Karp ら、Science, 1998, 282 : 2258~2261; Grunig ら、Science, 1998, 282 : 2261~2263; Taube ら、J. Immunol., 2002, 169 : 6482~6489; Blaise at al、J. Immunol., 2001, 166(8) : 5219~5224)。

20

#### 【0010】

補足実験では、トランスジェニックマウスにおける過剰発現によって、または IL-13 タンパク質を野生型マウスの気管に滴下することによって、肺の IL-13 レベルを上昇させた。どちらの設定においても、喘息様の特徴、すなわちコリン作動性の刺激に対する非特異的な気道過敏症、肺好酸球増加症、上皮細胞肥大症、粘液細胞化生、上皮下線維症、気道閉塞およびシャルコー - ライデン様結晶が誘発された。さらに、IL-13 は肺においてマトリックスメタロプロテイナーゼおよびカテーテンプロテアーゼの強力な刺激因子であり、その結果として気腫性の変化ならびに粘液異形成がもたらされることが判明した。したがって、IL-13 は喘息および COPD 疾患の表現型のどちらにおいても重要なエフェクター分子である可能性がある (Zhu ら、J. Clin. Invest., 1999, 103(6) : 779~788; Zheng ら、J. Clin. Invest., 2000, 106(9) : 1081~1093)。

30

#### 【0011】

これらのデータは、IL-13 活性が、妥当性がよく確認された動物モデルにおいてアレルギー性喘息の主要な臨床特徴および病理特徴のうちのいくつかを生じさせるのに必要かつ十分であることを示している。

#### 【0012】

##### 慢性閉塞性肺疾患 (COPD)

COPD とは、気腫および慢性気管支炎を含めたいいくつかの臨床症候群を包含する一般的な用語である。症状は喘息に類似しており、同じ薬物を用いて COPD を治療することができる。COPD は、慢性の進行性かつ主として不可逆的な空気流閉塞によって特徴づ

40

50

けられている。疾患過程における個人の貢献は未知であるが、喫煙が症例の90%を引き起こすと考えられている。症状には咳嗽、慢性気管支炎、息切れおよび呼吸器感染症が含まれる。この疾患は最終的には重篤な身体障害および死をもたらす。慢性気管支炎は、2年間にわたって少なくとも3ヶ月間ほぼ毎日、他に説明のつかない咳または痰が出る病歴をもつ患者に診断される。肺気腫は、気腔の異常な永久肥大および肺胞壁の破壊によって特徴づけられている。

#### 【0013】

IL-13はCOPDの発生に役割を果たし得る。COPDを発生するヒト喫煙者は肺実質中に多くの炎症細胞型（好中球、マクロファージ、好酸球）を有する。したがって、IL-13は、気腫の進行のモデリングを行うための炎症誘発性のTh2サイトカインである。Zhangらは、IL-13の過剰発現をIL-13トランスジェニックマウスの気道上皮の標的とした。これらの動物は気道および肺実質の炎症ならびに気腫を発生した。また、動物は慢性気管支炎を暗示する粘液異形成も発生した（J. Clin. Invest., 2000, 106(9): 1081~1093）。

10

#### 【0014】

アレルギー性喘息に関連するIL-13プロモーターの多型性（-1055のCからT）も、健康な対照と比較してCOPD患者で頻度が高いことが報告されている。これは、COPDを発生する危険性の増強におけるIL-13プロモーターの多型性の機能的な役割を示唆している（Kraanら、Genes and Immunity, 2002, 3: 436~439）。さらに、無症候の喫煙者と比較して慢性気管支炎に罹患した喫煙者でIL-13およびIL-4陽性細胞数の増加が観察された（Miotttoら、Eur. Resp. J., 2003, 22: 602~608）。しかし、重篤な気腫患者の肺中のIL-13発現レベルを評価するための最近の研究では、IL-13レベルと疾患との間に関連性が見つからなかった（Bouttenら、Thorax, 2004, 59: 850~854）。

20

#### 【0015】

アトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎を含めたアレルギー性疾患

IL-13は、アトピー性鼻炎およびアトピー性皮膚炎などのアトピー性障害にも関与するとみなされている。アレルギー性鼻炎は米国において最も一般的なアトピー性疾患であり、成人の25%までおよび40%を超える子供が冒されていると推定されている。アレルギー性鼻炎と喘息との間には密接な関係が存在する。どちらの状態も共通の免疫病理学および病態生理学を共有しており、これらは鼻ならびに気管支組織中の好酸球およびTh2リンパ球が役割を果たす類似した免疫プロセスを有する。Th2サイトカイン、特にIL-4およびIL-5の過剰産生は、アレルギー性疾患の病因の基礎であると考えられている。IL-13はいくつかの特徴およびエフェクター機能をIL-4と共有しており、これが、IL-4およびIL-13受容体の使用の機能重複、細胞内シグナル伝達構成成分、ならびに遺伝子構成とあいまって、ヒトの即時型過敏症をin vivoで促進または維持することにおけるIL-13の役割の抗しがたい（間接的ではあるが）証拠を提供する。これは、季節性アレルギー性鼻炎を有するアトピーの対象が、Ag依存性であるがポリクローナルではない活性化に応答して有意に強力なIL-13応答を示したことを見証した、Liらによって確証されている（Liら、J Immunol, 1998; 161: 7007）。

30

#### 【0016】

アトピー性皮膚炎とは、一般的な、慢性的、再発性の、高度に搔痒性の炎症性皮膚疾患である。アトピー性皮膚炎患者の病変皮膚は、炎症性のT細胞浸潤によって組織学的に特徴づけられており、これは、急性期にはIL-4、IL-5およびIL-13の発現の優勢と関連している（Simonら、J Allergy Clin Immunol, 2004; 114: 887; Hamidら、J Allergy Clin Immunol, 1996; 98: 225）。さらに、Tazawaらは、IL-13 mRNAがアトピー性皮膚炎患者の亜急性および慢性的皮膚病変において有意にアップレギュレーション

40

50

されていることを実証した (IL-4 はされない) (Tazawaら、Arch Derm Res、2004；296：459)。循環 CD4+ および CD8+ T 細胞を発現する IL-13 の頻度も、このような患者において有意に上昇している (Alekszala、British J Dermatol、2002；147；1135)。この増大した IL-13 活性は、血清 IgE レベルの上昇をもたらし、したがってアトピー性皮膚炎の病因に貢献すると考えられている。さらに、新生児 CD4+ T 細胞による IL-13 の産生の増加は、のちにアレルギー性疾患、特にアトピー性皮膚炎を発生する危険性の高い新生児を同定するための有用なマーカーである (Ohshimaら、Pediatr Res、2002；51：195)。アトピー性皮膚炎の病因学における IL-13 の重要性のさらなる証拠は Simon らによって提供されている (Simon ら、J Allergy Clin Immunol、2004；114：887)；タクロリムス軟膏（サイトカイン産生の細胞内シグナル伝達経路を阻害する免疫抑制薬）を用いた局所的治療の結果、アトピー性皮膚病変の有意な臨床的かつ組織学的な改善、およびそれに付随して IL-13 を含めた Th2 サイトカインの局所的発現の有意な減少がもたらされた。さらに、IL-13R<sub>1</sub> (IL-4R<sub>1</sub> と共に IL-13 に対する機能的な受容体を形成する細胞表面タンパク質) は、アトピー性皮膚炎患者の皮膚の基底上ケラチノサイト上で過剰発現されることが示されており、IL-13 は IL-13R<sub>1</sub> の mRNA を *in vitro* でアップリギュレーションすることができた (Wongpiyabovorn ら、J Dermatol Science、2003；33：31)。

## 【0017】

これらのデータは集合的に、IL-13 モノクローナル抗体を含めた IL-13 を標的としたインターベンションがヒトアレルギー性疾患の治療に有効な手法を提供し得ることを示している。

## 【0018】

## 食道好酸球増加症

食道における好酸球の蓄積は、胃食道逆流症、好酸球性食道炎、好酸球性胃腸炎、および寄生虫感染を含めた多様な疾患に罹患している患者における一般的な医学的問題である。食道的好酸球増加症はアレルギー性応答に関連しており、マウスに空中アレルゲンを繰り返して投与することによりアレルギー性気道炎症と食道好酸球増加症との間に関連性が確立された。Th2 細胞は、炎症経路およびエフェクター経路を直接ならびに間接的に活性化させる、IL-4 および IL-13 を含めたサイトカインのアレイを分泌することによって好酸球関連炎症を誘発させると考えられている。IL-13 は、Th2 細胞によって大量に産生され、アレルギー性疾患の複数の特徴（たとえば IgE の産生、粘液の過剰産生、好酸球の動員および生存、ならびに気道過敏症を調節するので、特に重要であると考えられる。好酸球は、好酸球性炎症反応において *in vitro*、*ex vivo*、および *in vivo* 条件下で GM-CSF ならびに / または IL-5 に曝したのちに機能的に活性のある IL-13 を産生することができる。（Schmid-Grendelmeier、J Immunology、2002、169：1021～1027）。気管内投与によって野生型、STAT-6、エオタキシン-1 または IL-5 欠損のマウスの肺にデリバリーを行った IL-13 により、IL-13 によって始動された肺炎症が食道好酸球増加症の発生に関連していることが確立された (Mishra ら、Gastroenterol、2003；125：1419)。総合すると、これらのデータは食道好酸球増加症における IL-13 の役割の証拠を提供する。

## 【0019】

## 腫瘍学の指標

別の重要な関心領域は、特定の種類の腫瘍の増殖を阻害するように IL-13 または IL-13 受容体を標的化することである。1型 T 細胞媒介性の宿主防御は最適な腫瘍拒絶を *in vivo* で媒介すると考えられており、Th2 型応答へのそれが腫瘍拒絶の遮断および / または腫瘍再発の促進に貢献し得る (Kobayashi M ら、J. Immunol.、1998；160：5869)。移植可能な腫瘍細胞系を用いたいくつかの動

10

20

30

40

50

物研究は、Stat6、IL-4、およびIL-13（部分的にNKT細胞によって産生される）が腫瘍拒絶を阻害する能力を有することを実証することによってこの概念を支持している（Terabeら、Nat. Immunol.、2000；1：515；Kacchala、J. Immunol.、2000；165：6024～28；Ostrand-Rosenbergら、J. Immunol.、2000；165：6015）。Stat-6の非存在下における強力な抗腫瘍活性は、腫瘍特異的なIFNg産生およびCTL活性の増強によるものと考えられていた。さらに、NKT細胞の損失は、腫瘍再発の増加を伴ってIL-13産生を減少させることが示されており、これは、部分的にNKT細胞によって産生されたIL-13が免疫監視に重要であることを示している（Terabeら、Nat. Immunol.、2000；1：515）。したがって、これらの発見は、IL-13阻害剤またはIL-13mAbを含めた新規IL-13拮抗剤が、腫瘍細胞に対する免疫応答のダウンレギュレーションにおいてIL-13が果たす負の調節を妨げることによって癌の免疫治療剤として有効であり得ることを唆している。10

#### 【0020】

Th1型関連抗腫瘍の防御をブーストすることに加えて、IL-13阻害剤はまた、腫瘍細胞の増殖をより直接的に遮断し得る。たとえば、B細胞慢性リンパ性白血病（B-CLL）およびホジキン病では、IL-13はアポトーシスを遮断するか、または腫瘍細胞増殖を促進する（Chaouchiら、Blood、1996；87：1022；Kappら、J. Exp. Med.、1999；189：1939）。B-CLLとは、Bリンパ球に由来する臨床的に不均一な疾患であり、白血病細胞におけるアポトーシス欠陥に関与する。IL-13は直接的な成長因子として作用するとは考えられていないが、腫瘍細胞をin vitroの自発性アポトーシスから保護し（Chaouchiら、Blood、1996；87：1022；Laiら、J. Immunol.、1999；162：78）、新生細胞の死を予防することによってB-CLLに貢献し得る。20

#### 【0021】

ホジキン病とは、主に若年成人が冒され、米国において年間約7,500件が計上されているリンパ腫の一種である。この癌は大きな多核ホジキン／リード-シュテルンベルク細胞（HRS）の存在によって特徴づけられている。大多数の場合、悪性細胞集団はB細胞から生じる。いくつかのホジキン病由来細胞系およびホジキンリンパ腫患者から採取したリンパ節組織は、IL-13および/またはIL-13受容体を過剰発現する。（Kappら、J. Exp. Med.、1999；189：1939、Billiardら、EUR Cytokine Netw.、1997；8：19；Skinniderら、Blood、2001；97：250；Oshimaら、Cell Immunol.、2001；211：37）。抗IL-13mAbまたはIL-13拮抗剤の中和は、用量依存性の様式でHRS細胞の増殖を阻害することが示されている（Kappら、J. Exp. Med.、1999；189：1939；Oshimaら、Cell Immunol.、2001；211：37）。同様に、ホジキン病由来細胞系を移植したNOD/SCIDマウスへの可溶性IL-13Ra2囲受容体のデリバリーにより腫瘍の発症および増殖が遅延し、生存が増強され、これは、IL-13の中和によりホジキンリンパ腫の増殖をin vitroおよびin vivoで抑制できることを実証している（Trieuら、Cancer Research、2004；64：3271）。集合的に、これらの研究はIL-13が自己分泌様式でHRS細胞の増殖を刺激することを示している（Kappら、J. Exp. Med.、1999；189：1939；Ohshimaら、Histopathology、2001；38：368）。3040

#### 【0022】

したがって、IL-13の中和は、腫瘍細胞の増殖を阻害すると同時に抗腫瘍防御を増強させることによって、ホジキン病および他のB細胞関連癌の魅力的かつ有効な治療を表す可能性がある。

#### 【0023】

炎症性腸疾患50

炎症性腸疾患（IBD）の病因においてIL-13が役割を果たしている可能性がある。炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎、クローン病および不定大腸炎として臨床上分類されたいいくつかの疾患を含む。その主な徴候は、腸管粘膜中のTh1およびTh2リンパ球の活性化の不均衡を伴った、誇大な免疫応答による慢性腸炎である。これは、クローン病（Bamiasら、Gastroenterol、2005；128：657）および潰瘍性大腸炎（Hellerら、Immunity、2002；17：629）の動物モデルで実証されている。IL-13R<sub>2-Fc</sub>の投与によるIL-13の中和は、ヒト潰瘍性大腸炎のネズミTh2モデルにおいて大腸炎を予防した（Hellerら、Immunity、2002；17：629）。さらに、このモデルではIL-13の産生はIL-4のそれに迅速に取って代わり、IL-13の産生はNKT細胞の刺激によって誘発することができ、これは、組織損傷が上皮細胞に対するIL-13の毒性活性の結果であり得ることを示唆している。これらの発見を支持するヒトでのデータがある程度存在する：潰瘍性大腸炎に罹患している患者由来のIL-13陽性直腸生検標本の頻度は炎症性および非炎症性の対照対象よりも有意に高く、非急性潰瘍性大腸炎よりもより高率のIL-4およびIL-13の発現が急性潰瘍性大腸炎で観察された（Inoueら、Am J Gastroenterol、1999；94：2441）。さらに、Akidoらは、クローン病患者の腸部分由来の外筋層の免疫活性の特徴づけを行い、IL-4およびIL-13がSTAT-6経路によって腸平滑筋細胞の高収縮性を媒介することを見出した。著者らは、この経路がクローン病において腸の筋肉の高収縮性に貢献している可能性があると結論づけた（Akihiraら、Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol、2005；288：619）。

#### 【0024】

したがって、IL-13mAbは、場合によっては他のサイトカインに向けられた分子と組み合わせて、IBDの進行を停止または遅延させる手法を提供し得る。

#### 【0025】

##### 乾癬および乾癬関節炎

乾癬とは、ケラチノサイトの過剰増殖、および表皮ケラチノサイトの表現型に影響を与えることができる様々なサイトカインを産生する、活性T細胞を含めた免疫細胞性浸潤物によって特徴づけられた慢性皮膚疾患である。CDw60とは、乾癬皮膚の乾癬性基底および基底上ケラチノサイトの表面上でアップレギュレーションされる炭水化物保有分子である。乾癬病変由来のT細胞から分泌されたIL-4およびIL-13は、ケラチノサイト上におけるCDw60の発現の強力なアップレギュレーションを行うことが示されており（Skovら、Am J Pathol、1997；15：675）、一方で、インターフェロン- $\gamma$ は培養ケラチノサイト上におけるIL-4/IL-13媒介のCDw60の誘発を遮断した（Huangら、J Invest Dermatol、2001；116：305）。したがって、乾癬表皮ケラチノサイト上におけるCDw60の発現は、病変内の活性T細胞によって分泌されたIL-13によって少なくとも部分的に誘発されると考えられている。さらに、一緒になってIL-13の受容体複合体を形成する細胞表面タンパク質であるIL-13R<sub>1</sub>およびIL-4R $\gamma$ は、乾癬を有する患者および有さない患者由来の皮膚生検では異なって発現され（Cancino-Diazら、J Invest Dermatol、2002；119：1114；Wongpiyabovornら、J Dermatol Science、2003；33：31）、IL-13はin vitro実験により、IL-13R<sub>1</sub>の発現のアップレギュレーションを行うことができる事が実証された（IL-4はできない）（Wongpiyabovornら、J Dermatol Science、2003；33：31）。IL-13は様々な細胞種に対して効果を有するので、これらの研究はIL-13受容体が乾癬の初期炎症プロセスにおいて役割を果たしている可能性を示唆している。

#### 【0026】

乾癬関節炎は、炎症誘発性および抗炎症性のサイトカインのどちらによっても媒介される滑膜炎によって特徴づけられている。関節炎の様々な形態におけるIL-13の役割は

10

20

30

40

50

、関心が高まっている。Spadaroらは、乾癬関節炎および関節リウマチに罹患している患者の潤滑液中のIL-13レベルが骨関節炎に罹患している患者よりも有意に高いことを観察した。さらに、IL-13の潤滑液レベルは乾癬関節炎に罹患している患者の血清中のレベルよりも有意に高く、IL-13の潤滑液／血清比は関節リウマチ群よりも乾癬関節炎群で顕著に高く、これは、乾癬関節炎に罹患している患者の滑膜組織中で局所的に產生されたIL-13の潜在的な役割を示唆している(Spadaroら、Ann Rheum Dis、2002；61：174)。

#### 【0027】

他の病態におけるIL-13の潜在的な役割

急性移植片対宿主疾患とは、幹細胞移植後の病的状態および死亡の深刻な原因であり、ドナーとレシピエントとのヒト白血球抗原(HLA)不適合性の度合いに直接関連している。Jordanらは、IL-13を血縁関係のない非適合MLR(混合リンパ球反応；最初のHLAタイピング後にドナー選択の微調整を行うためのin vitroアッセイ)間に豊富に產生される典型的なTh2サイトカインとして最初に同定した(Jordanら、J Immunol Methods、2002；260：1)。同じグループがのちに、ドナーT細胞によるIL-13产生が、血縁関係のないドナー幹細胞移植後の急性移植片対宿主疾患(aGVHD)に予測的であることを示した(Jordanら、Blood、2004；103：717)。幹細胞移植後に重篤なIII級aGVHDに罹患したすべての患者は、非常に高い移植前IL-13応答を生じたドナーを持っており、これによりIL-13レベルとaGVHDとの間に有意な関連性が実証され、aGVHDに関連する病状の一部に対してIL-13が直接の原因であり得る可能性が高まっている。したがって、IL-13の特異的遮断に基づいた治療が幹細胞移植後のaGVHDの治療に有用であり得る。

#### 【0028】

糖尿病性腎症は、西欧諸国において末期腎臓病の主な原因の1つである。1型糖尿病による腎症の発生率は減少しつつあるが、2型の真性糖尿病が現在、米国、日本および欧洲において最も一般的なただ1つの腎不全の原因である。さらに、この患者群は、心血管イベントによって引き起こされる非常に高い死亡率により、維持透析に関して予後が非常に悪い。現在、血行動態、代謝および構造の変化は絡み合っていることがますます明らかとなり、様々な酵素、転写因子および成長因子がこの疾患の病因に役割を果たすことが同定されている。特に、TGF- $\beta$ は腎肥大の発生および細胞外基質構成成分の蓄積に重要であり、腎臓中でのコラーゲン形成の媒介に中心的なサイトカインであるとみなされている(Cooper. Diabetologia、2001；44：1957；Wolff. Eur J Clin Invest、2004；34(12)：785)。実験系およびヒト糖尿病性腎症では、TGF-1の生物活性が増加し、糖尿病マウスへのTGF-1抗体の投与により腎機能の改善がもたらされ、細胞外基質の蓄積が減少した。最近、肺線維症のトランスジェニックマウスマルクモデルにおいて、TGF-1およびコラーゲン沈着の产生および活性化を調節することによってIL-13がその効果を少なくとも部分的に媒介することが示されており(Leesら、J. Exp. Med.、2001；194：809；Zhuら、J. Clin. Invest.、1999；103：779)、これによりIL-13とTGF- $\beta$ との間に直接的な機能的関連が確立されている。したがって、糖尿病の腎臓においてTGF- $\beta$ 活性を調節するIL-13の同様な役割を想像することができ、IL-13を標的としたインターベンションが糖尿病性腎症の管理において役割を有する潜在性が存在する。

#### 【0029】

線維状態

肺線維症とは、肺の不適切かつ有害な瘢痕状態であり、身体障害およびしばしば死をもたらす。この用語には、明確に異なる病因、病状および治療に対する応答を有する様々な異なる病状が含まれる。一部の例では、線維症の原因は同定されている。原因には、(1)アスベストもしくはケイ素などのプロフィブロティック材料または超硬合金粉の吸入

10

20

30

40

50

(2) 線維症をもたらす、患者が特異体質の免疫学的応答を有する有機物質の吸入（たとえば農夫肺）(3) ニトロフラントイントイン、アミオダロンおよびメトトレキサートなどの薬物(4) 全身性硬化症または関節リウマチなどの全身性炎症性疾患との関連が含まれる。

#### 【0030】

しかし、多くの場合、原因または根底にある病態は同定されていない。このような患者の多くは特発性肺線維症（IPF）と診断されている。これは比較的稀な病態である（有病率20/100000）。診断は、同定されている原因が存在しないことと、特定の放射線学的および病理学的特徴、特にCTまたは肺生検の蜂巣化との組合せに基づいている。この疾患は通常、年齢の患者(>50)で見られ、多くの場合、死をもたらす容赦ない進行性肺機能障害の経路をたどり、その生存期間中央値は2~5年と見積もられている。さらに、患者は長い年月にわたって進行する非常に不快な息切れの経験をする。このことは、最初は身体活動を制限するが、数ヶ月間に及び得る末期には、患者は安静時にも息切れをし、さらに酸素依存性である。

#### 【0031】

現在、この疾患の満足できる治療は存在しない。現在の治療は、一般に副腎皮質ステロイドおよびアザチオプリンなどの免疫抑制剤の形態をとる。しかし、副腎皮質ステロイドは患者の多くで無効であり得、その副作用により状況が悪化し得る。最近の大きな研究で生存の向上傾向が示されたインターフェロン およびペルフェニドン（perfendone）を含めた数多くの潜在的な治療が調査中である。

#### 【0032】

IL-13およびTh2の表現型に関連するサイトカインが組織修復における線維症の過程に関与しているという証拠が存在する（Wynn TA、Nat. Rev. Immunol.、2004、4:583~594；Jakubzickら、Am. J. Pathol.、2004、164(6):1989~2001；Jakubzickら、Immunol. Res.、2004、30(3):339~349；Jakubzickら、J. Clin. Pathol.、2004、57:477~486）。IL-13およびIL-4は様々な線維状態に関連づけられている。住血吸虫によって誘発される肝線維症はIL-13依存性であると考えられており、IL-13が強皮症の病因に関与しているという制限された証拠が存在する（Hasegawaら、J. Rheumatol.、1997、24:328~332；Ricciardiら、Clin. Rheumatol.、2003、22:102~106）。

#### 【0033】

肺線維症に関して、in vitro研究により、IL-13が纖維形成性の表現型を促進することが示されている。動物研究により、線維症の人工誘発モデルにおいてIL-13発現レベルが上昇すること、およびIL-13を排除することによって線維症を軽減できることが示されている。

#### 【0034】

IL-13はプロフィブロティック表現型を促進する。細胞レベルでは、IL-13が線維症を促進し得るいくつかの機構が存在する。シグナル経路およびこれら様々な機構の重要性は明確でない。

#### 【0035】

IL-13は線維芽細胞に作用してコラーゲンの産生およびその分解の阻害をどちらも促進し、それにより纖維性の表現型を有利にするという証拠が存在する。皮膚線維芽細胞はIL-13受容体を保有しており、培養皮膚線維芽細胞をIL-13に曝すことによってコラーゲン産生のアップレギュレーションがもたらされる（Orienteら、J. Pharmacol. Exp. Ther.、2000、292:988~994）。また、IL-4も、類似しているがより一過性の効果を有する。ヒト肺線維芽細胞系（ICIG7）はII型IL-4受容体を発現する（Jinninら、J. Biol. Chem.、2004、279:41783~41791）。これらの細胞をIL-13に曝すことにより、様々な炎症性かつプロフィブロティックなメディエーター、すなわちGM-CSF、

10

20

30

40

50

G-CSF、VCAM-1インテグリンの分泌が促進される(Douce et al., Int. Immunol., 1998, 10(10): 1421~1433)。

【0036】

IL-13は、皮膚線維芽細胞によるIL-1a誘発性のマトリックスメタロプロテイナーゼ1および3タンパク質の産生を阻害し、これはEC基質の分解を軽減させる傾向がある(Oriente et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000, 292: 988~994)。IL-13は、喘息気道の生検によって得たヒト線維芽細胞に対してTGF- $\beta$ と相乗的に作用して、メタロプロテイナーゼ1の組織阻害剤(TIMP-1)の発現を促進する。細胞外基質の分解はマトリックスメタロプロテイナーゼによって行われ、これはTIMP-1によって阻害される。したがって、IL-13のこの作用は、基質の分解を軽減させる傾向にある(Zhou et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2005, 288:C435~C442)。

【0037】

トランスジェニックマウスにおけるIL-13の過剰発現は、上皮下線維症、上皮細胞肥大、杯細胞肥大症、結晶沈着(酸性哺乳動物キチナーゼ)、気道過敏症、間質性線維症、2型細胞肥大および界面活性物質蓄積をもたらす(Zhu et al., J. Clin. Invest., 1999, 103(6): 779~788)。

【0038】

マウスの様々な株はブレオマイシン誘発性肺線維症に対して異なる感受性を有する。感受性のあるC57B1/6Jマウスは、ブレオマイシンに応答してIL-13、IL-13RおよびIL-4(ならびにTGF- $\beta$ 、TNFRおよびIL1R)の迅速なアップリギュレーションを示す。感受性のないBALB/cマウスはIL-13のアップリギュレーションを示さない。

【0039】

Belpedio et al.(Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2002, 27: 419~427)は、マウスブレオマイシン線維症モデルにおいてIL-13、IL-4およびCCケモカインC10の発現ならびに役割を研究した。IL-13およびIL-4のどちらにおける肺組織レベルも、ブレオマイシンに応答して増加した。ポリクローナル抗IL-13抗体を用いたIL-13の事前中和により、肺のヒドロキシプロリンレベルによって評価した、ブレオマイシンに応答した肺線維症が有意に軽減された。同モデルにおけるIL-4の発現の増加にもかかわらず、IL-4の中和は肺線維症に影響を与えたかった。

【0040】

BALB/cマウスにおいてFITCによって誘発させた急性肺線維症別のモデルでは、IL-13が存在しないこと(ノックアウト中)は肺線維症に対する保護を示したが、IL-4はそうではなかった。IL-13ノックアウトでは、IL-4のノックアウトでは追加の保護が存在しなかった(Kolodsiick et al., J. Immunol., 2004, 172: 4068~4076)。IL-13が存在しないことの保護効果は、肺への細胞動員の差異によるものではない:すべてのノックアウトおよびBALB/cにおいて、動員された全細胞数が類似しており、最初の炎症性構成成分は影響を受けていないと考えられる。好酸球の動員はBALB/cと比較してIL-4およびIL-13ノックアウトにおいて低いが、IL-4-/-が線維症に対して保護されていなかったので、このことで線維症の差異を説明することはできない。恐らく驚くべきことに、IL10、MCP-1、インターフェロン、TGF- $\beta$ を含めたIL-13+/-と-/-とでサイトカインのレベルに差異はなかった。さらに、同数の線維芽細胞がFITC後の様々な動物の肺から単離されたが、IL-13-/-マウスでは、コラーゲンIの産生が減少している。これは、IL-13の損失は単に炎症反応を予防するだけでなく、むしろより具体的な抗線維性の役割を有することを示している。IL-13がTGF- $\beta$ を介してその線維性の効果を発揮する可能性があることが示唆されている(Lee et al., J. Exp. Med., 2001, 194: 809~821)。しかし、このFITCモデルでは、TGF-

10

20

30

40

50

i の発現は IL - 13 ノックアウトマウスで軽減されていなかった。

#### 【0041】

インターロイキン4は、どちらも同じ受容体を介して作用するので IL - 13 と同様の効果を発揮することが予測される。IL - 4 は、ブレオマイシン誘発性肺線維症に罹患しているマウスの肺において有意にアップレギュレーションされている (Gharaee-Kermaniら、Cytokine、2001、15：138～147)。しかし、IL - 4 を過剰発現する C57BL6/J マウス、IL - 4 ノックアウトおよび野生型においてブレオマイシン誘発性肺線維症の比較を行うことによっては、Izbickiら (Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.、2002、283(5)：L1110～L1116) は IL - 4 が肺線維症に関与しているという証拠を見出さなかった。線維症は IL - 4 ノックアウトで軽減されておらず、IL - 4 を過剰発現するマウスでは線維症のレベルが増加していた。10

#### 【0042】

IL - 13 の BAL サイトカインレベルは、肺線維症の様々な形態に罹患している患者において有意に上昇しているが、相当なばらつきがある。IL - 13 の発現は、肺線維症に罹患している患者から得た肺胞マクロファージ中で有意にアップレギュレーションされている。

#### 【0043】

最も強力な臨床上の証拠は、ミシガン大学 (University of Michigan) の研究によってもたらされる。Jakubzick およびその同僚は、肺線維症に罹患している患者由来の外科肺生検において IL - 13 および IL - 4 ならびにその受容体の遺伝子発現について研究を行っている。IL - 13 の遺伝子発現は、IPF に冒された肺由来の標本で、正常な肺または他の肺線維状態由来の標本においてよりも顕著に高かった。IPF / UIP に罹患している患者から培養した線維芽細胞は、正常な肺または肺線維症の他の形態に罹患している患者由来の生検から得た組織および線維芽細胞と比較して、より高い IL - 13 および IL - 4 受容体の発現を示す。具体的には、おそらくは疾患活動の中心点である線維芽細胞の病巣が、これらの受容体に対して特に強力に染色される (Jakubzickら、J. Immunol.、2003、171：2684～2693；Jakubzickら、Am. J. Pathol.、2003、162：1475～1486；Jakubzickら、Am. J. Pathol.、2004、164(6)：1989～2001；Jakubzickら、Immunol. Res.、2004、30(3)：339～349；Jakubzickら、J. Clin. Pathol.、2004、57：477～486)。2030

#### 【0044】

一般的には Th2 サイトカイン、具体的には IL - 13 がプロフィプロティック表現型を促進するという良好な *in vitro* の証拠が存在する。少なくとも 2 つの動物モデルにおいて、IL - 13 を排除することによって化学的に誘発させた線維症を軽減させることができることが示されている（遺伝子ノックアウトにおいて、または抗 IL - 13 抗体によって）。一部の証拠は、肺線維症の促進において IL - 13 が IL - 4 よりも重要であることを示している。肺線維症における IL - 13 の役割の臨床上の証拠は、IL - 13 およびその受容体は IPF に罹患している患者の肺において無調節であることを示唆している。40

#### 【0045】

住血吸虫症誘発性の肝線維症を含めた様々な線維状態の治療ならびに肺線維症の様々な形態（たとえば IPF [他の箇所で記述]、強皮症）における IL - 13 に基づいた治療の重要な役割を示唆するデータが増加している。

#### 【0046】

IL - 4 および IL - 13 を阻害した実験により、IL - 13 がいくつかのモデルにおいて線維症の優性エフェクターサイトカインであることが独立に同定された (Chiaramonteら、J. Clin. Invest.、1999；104：777～785；50

B l e a s e ら、J . I mm u n o l . 、2 0 0 1 ; 1 6 6 : 5 2 1 9 ; K u m a r ら、C l i n . E x p . A l l e r g y 、2 0 0 2 ; 3 2 : 1 1 0 4 )。住血吸虫症では、卵誘発性の炎症反応は I L - 1 3 の遮断によって影響を受けなかつたが、I L - 4 の継続的かつ減少していない產生にもかかわらず、慢性的に感染した動物においてコラーゲン沈着が 8 5 % を超えて減少した ( C h i a r a m o n t e ら、J . C l i n . I n v e s t . 、1 9 9 9 ; 1 0 4 : 7 7 7 ; C h i a r a m o n t e ら、H e p a t o l o g y 、2 0 0 1 ; 3 4 : 2 7 3 )。

#### 【 0 0 4 7 】

h I L - 1 3 のアミノ酸配列を配列番号 9 として記載する。(これは成熟タンパク質配列である、すなわち、シグナル配列は存在しない)。

10

#### 【 0 0 4 8 】

h I L - 1 3 をコードしている c D N A を配列番号 1 0 に記載する。(これは成熟タンパク質配列の D N A 配列である、すなわち、シグナル配列は存在しない)。

#### 【 0 0 4 9 】

本明細書中で開示するすべての特許および参考文献(本出願が優先権を主張するすべての特許出願を含む)は、明白にかつその全体で本明細書中に参考として組み込まれている。

#### 【 0 0 5 0 】

最近、喘息を治療するために I L - 1 3 に対する免疫応答を生じさせるワクチンが記載されている(国際公開公報 W O 0 2 / 0 7 0 7 1 1 号)。環境アレルゲンに対する皮膚の感作における I L - 1 3 の役割も、最近記載されている( H e r r i c k ら、 T h e J o u r n a l o f I mm u n o l o g y 、2 0 0 3 、1 7 0 : 2 4 8 8 ~ 2 4 9 5 )。

20

#### 【 発明の開示 】

##### 【 発明が解決しようとする課題 】

#### 【 0 0 5 1 】

本発明は、とりわけ、6 A 1 と呼ばれる抗体を提供する。以下に示すように、h I L - 1 3 と結合する 6 A 1 は、配列番号 9 の位置 1 0 7 におけるアルギニンの存在に依存していると考えられる。配列番号 9 の位置 1 0 7 のアルギニンは、h I L - 1 3 / h I L - 1 3 R の相互作用に関する重要な残基であると報告されている。 T h o m p s o n J . P および D e b i n s k i W ( 1 9 9 9 ) J . B i o l . C h e m 、第 2 4 卷、第 4 2 号、ページ 2 9 9 4 4 ~ 2 9 9 5 0 は、「h I L 1 3 - ヘリックス A 中の位置 1 3 および 1 6 のグルタミン酸、ならびにヘリックス C 中の位置 6 6 および 6 9 のアルギニンおよびセリン、ならびにヘリックス D 中の位置 1 0 9 のアルギニンは、その特異的突然変異により機能現象の損失および/または獲得がもたらされたので、生物学的シグナル伝達の誘発に重要であることが判明した。」と記述している(要約および開示全体参照)。本発明者らがこの論文の著者らとは異なる番号づけ手法を採用したために、この論文の位置 1 0 9 のアルギニンは本明細書の配列番号 9 の 1 0 7 に相当する。したがって、h I L - 1 3 と結合する 6 A 1 は、h I L - 1 3 / h I L - 1 3 R の相互作用、したがって I L - 1 3 経路の生物学的シグナル伝達に重要であると既に同定された h I L - 1 3 上の残基の 1 つを含む。

30

#### 【 課題を解決するための手段 】

#### 【 0 0 5 2 】

したがって、本発明は、h I L - 1 3 に特異的に結合し、かつ h I L - 1 3 の活性を中和する治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。たとえば以下の表 A を参照されたい。

40

#### 【 0 0 5 3 】

本発明の抗体およびその抗原結合断片に関して本明細書にわたって用いる用語「特異的に結合する」とは、抗体が h I L - 1 3 と結合し、他のヒトタンパク質、具体的にはヒト I L - 4 とは結合しないまたは結合が有意でないことを意味する。しかし、この用語は、

50

本発明の抗体がカニクイザルIL-13とも交差反応性を有し得るという事実を排除しない。

**【0054】**

本発明の別の態様では、hIL-13に特異的に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調し(たとえば阻害または遮断する)、治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。このような阻害には、それだけには限定されないが、競合的阻害が含まれる。特定の実施形態では、本発明の抗体は、少なくともhIL-13とhIL-13Rとの相互作用を阻害するが、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用も遮断してhIL-13/hIL-13Rのシグナル伝達経路のデカップリングを行い得る。

**【0055】**

別の態様では、hIL-13に特異的に結合し、配列番号3に記載の配列を有するCDRH3を含む治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

**【0056】**

本発明の別の態様では、hIL-13に特異的に結合し、配列番号3に記載の配列の変異体であるCDRH3を含む治療用抗体またはその抗原結合断片であって、前記変異体の前記CDRH3内の1つもしくは2つの残基が配列番号3中の対応する位置の残基と異なる治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

**【0057】**

本発明の別の態様では、hIL-13に特異的に結合し、以下のCDRを含む治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する：

CDRH1：配列番号1

CDRH2：配列番号2

CDRH3：配列番号3

CDRL1：配列番号4

CDRL2：配列番号5

CDRL3：配列番号6

**【0058】**

本明細書にわたって、抗体配列中にアミノ酸残基はKabatのスキームに従って番号付けを行っている。同様に、用語「CDR」、「CDRL1」、「CDRL2」、「CDRL3」、「CDRH1」、「CDRH2」、「CDRH3」はKabatら；免疫学的に興味深いタンパク質の配列(Sequences of proteins of immunological interest)NIH、1987に記載のKabatの番号付け方式に従う。「CDRH1」とは、CDRH1のKabatの定義(残基31～35B)およびKabat26～32を含むChothia(Chothiaら(1989))；免疫グロブリン超可変領域のコンホメーション(Conformations of immunoglobulins hypervariable regions)；Nature、342、ページ877～883)によるCDRH1の定義がどちらも含まれる配列ストレッチと理解される。したがって、以下により本発明によるCDRを定義する：

CDR：残基

CDRH1：26～35B

CDRH2：50～65

CDRH3：95～102

CDRL1：24～34

CDRL2：50～56

CDRL3：89～97

**【0059】**

本発明の別の態様では、配列番号7に記載の配列を有するVHドメインおよび配列番号8に記載の配列を有するVLドメインを含む治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

20

30

40

50

**【 0 0 6 0 】**

本発明の別の態様では、配列番号7あるいは11、12、13、14を含む（またはそれから本質的になる、もしくはそれからなる）抗体の単離したVHドメインを提供する。

**【 0 0 6 1 】**

本発明の別の態様では、配列番号7もしくは11、12、13、14からなる群から選択されたVHドメインを含む治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

**【 0 0 6 2 】**

本発明の別の態様では、配列番号3のCDRH3を含む治療用抗体とhIL-13との結合を競合的に阻害する、治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

**【 0 0 6 3 】**

本発明の別の態様では、配列番号1、2、3、4、5および6のCDRを含む治療用抗体とhIL-13との結合を競合的に阻害する、治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

**【 0 0 6 4 】**

本発明の別の態様では、配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖を含む治療用抗体とhIL-13との結合を競合的に阻害する、治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

**【 0 0 6 5 】**

本発明によれば、ヒト化治療用抗体であって、配列番号11、12、13、14からなる群から選択されたVHドメインおよび配列番号15、16からなる群から選択されたVLドメインを含む抗体を提供する。

20

**【 0 0 6 6 】**

本発明の別の態様では、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用の変調に応答性のある疾患または障害（喘息、COPD、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎など）に冒されたヒト患者の治療方法であって、前記患者に本明細書中に記載の治療用抗体またはその抗原結合断片を治療上有効な量で投与する工程を含む方法を提供する。

**【 0 0 6 7 】**

hIL-13とhIL-13Rとの相互作用の変調に応答性のある疾患または障害を治療するための医薬品の製造における本発明の抗体の使用も提供する。

**【 0 0 6 8 】**

30

本発明の別の態様では、ヒトIL-13に特異的に結合する治療用抗体であって、配列番号9の残基97～108でヒトIL-13に特異的に結合する抗体を提供する。以下に開示する結果に基づいて当業者には明らかなように、「配列番号9の残基97～108」とは位置97および108を含む。

**【 0 0 6 9 】**

本発明の別の態様では、配列番号3のCDRH3を有する治療用抗体とヒトIL-13との結合を競合的に阻害する治療用抗体を提供し（配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖を含む治療用抗体など）、競合抗体は配列番号9の残基97～108でヒトIL-13に特異的に結合する。

**【 0 0 7 0 】**

40

本発明の別の態様では、配列番号9の残基103～107（両端を含めて）でヒトIL-13に特異的に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）治療用抗体を提供する。

**【 0 0 7 1 】**

本発明の一実施形態では、配列番号9の残基103～107でhIL-13に特異的に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）複数のモノクローナル治療用抗体（典型的にはヒトまたはヒト化抗体である）、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

**【 0 0 7 2 】**

本発明の別の実施形態では、配列番号9の残基103～107でhIL-13に特異的

50

に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）治療用抗体の產生方法であって、無血清培養培地中で、第1および第2のベクターを含む組換え宿主細胞を培養する工程（前記第1のベクターは前記抗体の重鎖をコードしているポリヌクレオチドを含み、前記第2のベクターは前記抗体の軽鎖をコードしているポリヌクレオチドを含む）を含む方法を提供する。以下の結果に基づいて当業者には明らかのように、「配列番号9の103～107」とは、位置103および107を含む。

#### 【0073】

本発明の別の実施形態では、配列番号9の残基97～108でhIL-13に特異的に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）治療用抗体の產生方法であって、無血清培養培地中で、第1および第2のベクターを含む組換え宿主細胞を培養する工程（前記第1のベクターは前記抗体の重鎖をコードしているポリヌクレオチドを含み、前記第2のベクターは前記抗体の軽鎖をコードしているポリヌクレオチドを含む）を含む方法を提供する。10

#### 【0074】

本発明の別の実施形態では、hIL-13に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）無傷の治療用抗体であって、配列番号9の残基107と相互作用する抗体を提供する。

#### 【0075】

本発明の別の実施形態では、hIL-13に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）無傷の治療用抗体であって、前記治療用抗体とhIL-13との結合が配列番号9の位置107におけるアルギニン残基の存在に依存する（または正に相關する）抗体を提供する。20

#### 【0076】

別の実施形態では、hIL-13に特異的に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調し（たとえば阻害または遮断する）、 $1.4 \times 10^{-4} \sim 8.22 \times 10^{-5}$ 秒<sup>-1</sup>の範囲の解離定数k<sub>off</sub>（たとえばBiacore（商標）によって測定）を有する治療用抗体を提供する。このような抗体は配列番号3のCDRH3またはその変異体を含んでいてもよく、また、配列番号3またはその変異体に加えて配列番号1、2、4、5および6も含んでいてよい。30

#### 【0077】

別の実施形態では、hIL-13に特異的に結合し、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）抗体であって、配列番号3のCDRH3ならびに所望により配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2、配列番号4のCDRL1、配列番号5のCDRL2および配列番号6のCDRL3のそれぞれをさらに含み、前記抗体はカニクイザルIL-13（cIL-13）との交差反応性も有する抗体を提供する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0078】

1. 抗体の構造  
1.1 無傷の抗体

無傷の抗体には、少なくとも2つの重鎖および2つの軽鎖を含むヘテロ多量体の糖タンパク質が含まれる。IgMを除いては、無傷の抗体は通常約150Kdaのヘテロ四量体の糖タンパク質であり、2つの同一の軽鎖（L）および2つの同一の重鎖（H）からなる。典型的には、それぞれの軽鎖が1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間でジスルフィド結合の数は変化する。それぞれの重鎖および軽鎖は鎖内ジスルフィド橋も有する。それぞれの重鎖は一方の末端に可変ドメイン（VH）を有し、いくつかの定常領域がそれに続く。それぞれの軽鎖はその他方の末端に可変ドメイン（VL）および定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の第1の定常領域とアラインメントされており、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメイ4050

ンとアラインメントされている。ほとんどの脊椎動物種由来の抗体の軽鎖は、定常領域のアミノ酸配列に基づいて および と呼ばれる 2 種類のうちの 1 種に割り当てる事ができる。その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、ヒト抗体を 5 つの異なるクラス、すなわち Ig A、Ig D、Ig E、Ig G および Ig M に割り当てる事ができる。Ig G および Ig A は、サブクラス、すなわち Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3 および Ig G 4；ならびに Ig A 1 および Ig A 2 へとさらに再分割する事ができる。マウスおよびラットで種変異体が存在し、少なくとも Ig G 2 a、Ig G 2 b を有する。抗体の可変ドメインにより抗体に結合特異性が与えられ、特定の領域が相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる特定の可変性を表示する。可変領域のより保存された部分はフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。無傷の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ 3 つの CDR によって結合した 4 つの FR を含む。それぞれの鎖内の CDR は FR 領域によって近接して結合されており、他の鎖からの CDR と一緒にになって抗体の抗原結合部位の形成に貢献する。定常領域は抗体の抗原への結合に直接関与していないが、抗体依存性細胞媒介細胞傷害 (ADCC)、Fc 受容体への結合を介した貪食、新生児 Fc 受容体 (FcRn) を介した半減期 / クリアランス速度および補体カスケードの C1q 構成成分を介した補体依存性細胞傷害などへの参加の様々なエフェクター機能を示す。  
10

#### 【0079】

したがって、一実施形態では、本発明者らは、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）無傷の治療用抗体を提供する。無傷の治療用抗体は上述の任意のアイソタイプまたはそのサブクラスの定常領域を含んでいてよい。一実施形態では、抗体は IgG アイソタイプ、特に IgG 1 のものである。抗体は、ラット、マウス、ウサギ、靈長類またはヒトであり得る。典型的な一実施形態では、抗体は靈長類（カニクイザル、旧世界ザルもしくは大型猿人類など、たとえば国際公開公報 WO 99/55369 号、国際公開公報 WO 93/02108 号を 参照）またはヒトである。  
20

#### 【0080】

別の実施形態では、配列番号 3 の CDRH3 を含む単離した無傷の治療用抗体を提供する。別の実施形態では、配列番号 1、2、3、4、5 および 6 の CDR を有する可変領域を含む無傷の治療用抗体を提供する。

#### 【0081】

別の実施形態では、配列番号 7 の配列を有する VH ドメインおよび配列番号 8 の配列の VL ドメインを含む、単離したネズミの無傷の治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。  
30

#### 【0082】

##### 1.1.2 ヒト抗体

ヒト抗体は、当業者に知られているいくつかの方法によって产生し得る。ヒト抗体は、ヒト骨髄腫またはマウス - ヒトヘテロ骨髄腫細胞系を用いたハイブリドーマ方法によって作製することができる。Kozbor、J. Immunol. 133、3001、(1984) および Brodeur、モノクローナル抗体の产生技術および応用 (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)、ページ 51 ~ 63 (Marcel Dekker Inc、1987) を参照されたい。別法として、ファージライブラリまたはトランスジェニックマウスの使用が含まれ、これらはどちらもヒト V 領域レパートリーを利用する (Wintter G、(1994)、Annu. Rev. Immunol. 12、433 ~ 455、Green LL (1999)、J. Immunol. Methods 231、11 ~ 23 参照)。  
40

#### 【0083】

トランスジェニックマウスのいくつかの株が現在利用可能であり、そのマウス免疫グロブリン座位がヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントによって置き換えられている (Tomizuka K、(2000) PNAS 97、722 ~ 727; Fishwild D  
50

. M ( 1996 ) *Nature Biotechnol.*、14、845~851、Mendez MJ、1997、*Nature Genetics*、15、146~156 参照)。抗原チャレンジの際に、このようなマウスは、そこから目的の抗体を選択することができるヒト抗体のレパートリーを作製する能力を有する。特に注目すべきは、ヒトリンパ球を照射したマウス内に移植する *Trimeria* (商標) システム (Eren Rら、(1998) *Immunology*、93 : 154~161 参照)、ヒト(または他の種)のリンパ球を大量にプールした *in vitro* 抗体产生手順に有効に通し、次いでデコンピュレートを行い、限界希釈および選択の手順を行う選択リンパ球抗体システム (SLAM、Babcockら、PNAS、(1996) 93 : 7843~7848 参照)、ならびに *Xenomouse II* (商標) (Abgenix Inc) である。代替手法は Morphotec Inc から Morphodoma (商標) 技術を用いて利用可能である。  
10

#### 【0084】

ファージディスプレイ技術を用いてヒト抗体(およびその断片)を產生することができる。McCafferty; *Nature*、348、552~553 (1990) および Griffiths ADら (1994) EMBO、13 : 3245~3260 参照。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、M13 または fdなどの糸状バクテリオファージの主または副のタンパク質遺伝子外被のいずれか内にインフレームでクローニングし、(通常はヘルパー・ファージの援助を受けて) ファージ粒子の表面上の機能的な抗体断片として表示させる。抗体の機能特性に基づいた選択の結果、それらの特性を示す抗体をコードしている遺伝子の選択がもたらされる。ファージディスプレイ技術を用いて、上述の疾患もしくは障害に冒された個体または免疫化していないヒトドナーから採取したヒトB細胞より作製したライプラリから抗原特異的抗体を選択することができる (Marks; J. Mol. Bio.、222、581~597、1991 参照)。Fcドメインを含む無傷のヒト抗体を所望する場合は、ファージディスプレイに由来する断片を所望の定常領域を含む哺乳動物発現ベクター内に再クローニングし、安定した発現細胞系を確立する必要がある。  
20

#### 【0085】

親和性成熟の技術 (Marks; Bio/technol. 10、779~783 (1992)) を用いて結合親和性を改善させてもよく、H および L鎖 V 領域を天然に存在する変異体で逐次的に置き換え、改善された結合親和性に基づいて選択を行うことによって、一次ヒト抗体の親和性を改善させる。「エピトープインプリンティング」などのこの技術の変形も、現在利用可能である。国際公開公報 WO 93 / 06213 号参照。また、Waterhouse; Nucleic Acids Res. 21、2265~2266 (1993) も参照。  
30

#### 【0086】

したがって、別の実施形態では、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13Rとの相互作用を変調し(たとえば阻害もしくは遮断する)、単離したヒトの無傷の治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。  
40

#### 【0087】

別の態様では、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13Rとの相互作用を変調し(たとえば阻害もしくは遮断する)、配列番号 3 の CDRH3 を含む単離したヒトの無傷の治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。別の態様では、上記で定義した配列番号 1、2、3、4、5 および 6 の CDR を有する可変領域を含む、単離したヒトの無傷の治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

#### 【0088】

##### 1.2 キメラ抗体およびヒト化抗体

ヒトの疾患または障害の治療における無傷の非ヒト抗体の使用には、現在はよく確立されている免疫原性の問題、すなわち、患者の免疫系が非ヒトの無傷の抗体を非自己と認識して中和応答を開始し得るという潜在性が付随する。これは、非ヒト抗体をヒト患者に複  
50

数回投与した際に特に明らかである。これらの問題を克服するために様々な技術が長年にわたって開発されており、一般に、免疫化した動物、たとえばマウス、ラットまたはウサギから非ヒト抗体を得る相対的な容易さを保つ一方で、無傷の抗体中の非ヒトアミノ酸配列の組成を減少させることを含む。概して、これを達成するために2つの手法が用いられている。第1の手法はキメラ抗体であり、これは一般に、ヒト定常領域と融合した非ヒト（たとえばマウスなどのげっ歯類）可変ドメインを含む。抗体の抗原結合部位は可変領域内に局在しているので、キメラ抗体は抗原に対するその結合親和性を保つがヒト定常領域のエフェクター機能を獲得し、したがって、上述のものなどのエフェクター機能を行うことができる。キメラ抗体は、典型的には組換えDNA方法を用いて产生する。抗体をコードしているDNA（たとえばcDNA）を単離し、従来の手順を用いて配列決定を行う（たとえば、本発明の抗体のHおよびL鎖をコードしている遺伝子、たとえば上述の配列番号1、2、3、4、5および6をコードしているDNAに特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによる）。ハイブリドーマ細胞がこのようなDNAの典型的な源の役割を果たす。単離したのち、DNAを発現ベクターに入れ、その後、これをそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を產生しない大腸菌、COS細胞、CHO細胞または骨髄腫細胞などの宿主細胞内に形質移入させて抗体の合成を得る。DNAは、ヒトL鎖およびH鎖のコード配列を対応する非ヒト（たとえばネズミ）HおよびL定常領域で置換することによって修飾し得るたとえばMorrison; PNAS, 81、6851(1984)参照。

## 【0089】

10

第2の手法は、可変領域をヒト化することによって抗体の非ヒト含有量を減らす、ヒト化抗体の產生を含む。ヒト化の2つの技術が人気を得ている。第1の技術はCDR移植によるヒト化である。CDRは抗体のN末端近くにループを構築し、ここで、フレームワーク領域によって提供される骨格中に載せられた表面が形成される。抗体の抗原結合特異性は、主にそのCDR表面のトポグラフィーおよび化学的特徴によって定義づけられる。立ち代って、これらの特徴は個々のCDRのコンホメーション、CDRの相対的位置、ならびにCDRを構成する残基の側鎖の性質および配置によって決定される。免疫原性の大幅な減少は、非ヒト（たとえばネズミ）抗体（「ドナー」抗体）のCDRのみをヒトフレームワーク（「アクセプターフレームワーク」）および定常領域上に移植することによって達成することができる（Jonesら(1986)Nature, 321, 522~525およびVerhoeven Mら(1988)Science, 239, 1534~1536参照）。しかし、CDR移植は本質的には抗原結合特性の完全な保持をもたらさない可能性があり、しばしば、有意な抗原-結合親和性を回復させる場合は、ヒト化分子中でドナー抗体の一部のフレームワーク残基（時折「逆突然変異」と呼ばれる）を保存する必要があることが判明している（Queen Cら(1989)PNAS, 86, 10, 029~10, 033、Co, Mら(1991)Nature, 351, 501~502参照）。この場合、ヒトフレームワーク(FR)を提供するために、非ヒトドナー抗体に対して最も高い配列相同性を示すヒトV領域をデータベースから選択する。ヒトFRの選択はヒトコンセンサスまたは個別のヒト抗体のどちらからも行うことができる。必要な場合は、ドナー抗体の主要残基をヒトアクセプターフレームワーク内に置換して入れ、CDRのコンホメーションを保存する。抗体のコンピュータモデリングを用いてこのような構造的に重要な残基の同定を補助し得る。国際公開公報WO 99/48523号参照。

## 【0090】

30

別法として、ヒト化は「ベニアリング」工程によって達成され得る。独特なヒトおよびネズミ免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変領域の統計的解析により、曝された残基の正確なパターンがヒト抗体とネズミ抗体とでは異なり、ほとんどの個別の表面位置が少数の異なる残基に対して強い優先傾向を有することが明らかとなった（Padlan E.A.ら; (1991) Mol. Immunol., 28, 489~498およびPeder sen J.T.ら(1994) J. Mol. Biol., 235; 959~973参照）。したがって、そのフレームワーク領域中の、ヒト抗体中に通常見つかるものとは異な

40

50

る曝された残基を置き換えることによって、非ヒト Fv の免疫原性を軽減させることが可能である。タンパク質の抗原性は表面接近性と相関している可能性があるので、マウス可変領域をヒト免疫系に「不可視」にさせるには表面残基を置き換えることで十分であり得る (Mark G. E. ら (1994)、実験薬理学の手引き (Handbook of Experimental Pharmacology)、第 113 号 : モノクローナル抗体の薬理学 (The pharmacology of monoclonal antibodies)、Springer-Verlag、ページ 105 ~ 134 も参照)。このヒト化手順は、抗体の表面のみを変更し、支持残基はそのままであるので「ベニアリング」と呼ばれる。

## 【0091】

10

したがって、本発明の別の実施形態は、ヒト定常領域 (IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のものであり得る) と融合した非ヒト (たとえばげっ歯類) 可変ドメインを含むキメラ治療用抗体であって、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13R との相互作用を変調する (たとえば阻害または遮断する) 抗体を提供する。

## 【0092】

別の実施形態では、非ヒト (たとえばげっ歯類) 可変領域およびヒト定常領域 (IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のものであり得る) を含むキメラ治療用抗体であって、hIL-13 に特異的に結合し、配列番号 3 の CDRH3 をさらに含む抗体を提供する。このような抗体は、IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のヒト定常領域をさらに含み得る。

20

## 【0093】

別の実施形態では、非ヒト (たとえばげっ歯類) 可変領域およびヒト定常領域 (IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のものであり得る) を含むキメラ治療用抗体であって、hIL-13 に特異的に結合し、配列番号 1、2、3、4、5 および 6 の CDR を有する抗体がある。

## 【0094】

別の実施形態では、配列番号 7 の VH ドメインおよび配列番号 8 の VL ドメインならびに IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のヒト定常領域を含むキメラ治療用抗体であって、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13R との相互作用を変調する (たとえば阻害または遮断する) 抗体を提供する。

30

## 【0095】

別の実施形態では、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13R との相互作用を変調する (たとえば阻害または遮断する)、ヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。

## 【0096】

別の実施形態では、hIL-13 に特異的に結合し、配列番号 3 の CDRH3 を含む、ヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。このような抗体は、IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のヒト定常領域を含み得る。

## 【0097】

40

別の実施形態では、hIL-13 に特異的に結合し、配列番号 1、2、3、4、5 および 6 の CDR を含む、ヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片を提供する。このような抗体は、IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のヒト定常領域を含み得る。

## 【0098】

本発明によれば、配列番号 11、12、13、14 の群から選択される VH ドメインおよび配列番号 15、16 の群から選択される VL ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。このような抗体は、IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のヒト定常領域を含み得る。

## 【0099】

別の実施形態では、配列番号 11 の VH ドメインおよび配列番号 15 の VL ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

50

**【 0 1 0 0 】**

別の実施形態では、配列番号 1 2 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

**【 0 1 0 1 】**

別の実施形態では、配列番号 1 3 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

**【 0 1 0 2 】**

別の実施形態では、配列番号 1 4 の V H ドメインおよび配列番号 1 5 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

**【 0 1 0 3 】**

別の実施形態では、配列番号 1 1 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

10

**【 0 1 0 4 】**

別の実施形態では、配列番号 1 2 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

**【 0 1 0 5 】**

別の実施形態では、配列番号 1 3 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

**【 0 1 0 6 】**

別の実施形態では、配列番号 1 4 の V H ドメインおよび配列番号 1 6 の V L ドメインを含むヒト化治療用抗体を提供する。

20

**【 0 1 0 7 】**

本発明の別の実施形態では、h I L - 1 3 に特異的に結合するヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片であって、C D R H 3 ( 配列番号 3 ) を含み、所望により配列番号 1 、 2 、 4 、 5 および 6 の C D R をさらに含み、ヒトアクセプター重鎖フレームワーク領域の 1 9 、 3 8 、 7 3 および 8 1 からなる群から選択された残基およびヒトアクセプター軽鎖フレームワークの位置 8 5 の残基が、C D R H 3 が由来するドナー抗体フレームワーク中に見つかる対応する残基で置換されている抗体またはその断片を提供する。

**【 0 1 0 8 】**

当業者には、用語「由来する」とは、材料の物理的起源である意味の源を定義するだけでなく、材料と(一次アミノ酸配列に関して)構造的に同一であるが、参照源から派生しない材料も定義することを意図することが明らかであろう。したがって、「C D R H 3 が由来するドナー抗体中に見つかる残基」とは、必ずしもドナー抗体から精製したものである必要はない。

30

**【 0 1 0 9 】**

別の実施形態では、h I L - 1 3 に特異的に結合するヒト化治療用抗体またはその抗原結合断片であって、配列番号 3 の C D R H 3 を含み、所望により配列番号 1 、 2 、 4 、 5 および 6 の C D R をさらに含み、ヒト重鎖フレームワークが以下の残基(もしくはその同類置換基)の 1 つもしくは複数(たとえばすべて)を含み:

位置 残基

40

3 8 I

1 9 R

7 3 T

8 1 R

ヒト軽鎖が:

位置 残基

8 5 V

を含む、抗体またはその断片を提供する。

**【 0 1 1 0 】**

特定のアミノ酸置換が「保存的」であるとみなされることは、当分野で周知である。ア

50

ミノ酸は共通側鎖の特性に基づいてグループに分けられており、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片の結合親和性をすべてまたは実質的にすべて保つ、グループ内の置換は保存的置換とみなされる。以下の表を参照されたい：

**【0111】**

**【表1】**

側鎖	メンバー
疎水性	メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン
中性 親水性	システィン、セリン、スレオニン
酸性	アスパラギン酸、グルタミン酸
塩基性	アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン
鎖配向に影響を及ぼす残基	グリシン、プロリン
芳香族	トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン

10

**【0112】**

本発明によれば、配列番号18、19、20、21からなる群から選択された重鎖および配列番号22、23からなる群から選択された軽鎖を含む、ヒト化治療用抗体を提供する。

**【0113】**

本発明の一実施形態では、配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

20

**【0114】**

本発明の一実施形態では、配列番号19の重鎖および配列番号22の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

**【0115】**

本発明の一実施形態では、配列番号20の重鎖および配列番号22の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

**【0116】**

本発明の一実施形態では、配列番号21の重鎖および配列番号22の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

30

**【0117】**

本発明の一実施形態では、配列番号18の重鎖および配列番号23の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

**【0118】**

本発明の一実施形態では、配列番号19の重鎖および配列番号23の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

**【0119】**

本発明の一実施形態では、配列番号20の重鎖および配列番号23の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

**【0120】**

本発明の一実施形態では、配列番号21の重鎖および配列番号23の軽鎖を含むhIL-13に特異的に結合するヒト化治療用抗体を提供する。

40

**【0121】**

**1.3 二重特異性抗体**

二重特異性抗体とは、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。このような抗体を作製する方法は当分野で知られている。従来より、二重特異性抗体の組換え產生は2つの免疫グロブリンH鎖-L鎖対の同時発現に基づいており、2つのH鎖は異なる結合特異性を有するM ill steinら、Nature、305、537～539(1983)、国際公開公報WO93/08829号およびTrauneckerら、EMBO、10、1991、3655～3659参照。HおよびL鎖のラン

50

ダムな取り揃えにより、10種の異なる抗体構造の潜在的な混合物が生じ、そのうち1種のみが所望の結合特異性を有する。代替手法は、少なくともヒンジ領域、C H 2 およびC H 3 領域の一部を含む重鎖定常領域に対して所望の結合特異性を有する可変ドメインを融合させることを含む。軽鎖結合に必要な部位を含むC H 1 領域を融合体の少なくとも1つの中に存在させることができ。このような融合体をコードしているD N A 、および所望する場合はL鎖を、個別の発現ベクター内に挿入し、その後、適切な宿主生物内に同時形質移入する。しかし、2つまたは3つの鎖すべてのコード配列を1つの発現ベクター内に挿入することも可能である。1つの好ましい手法では、二重特異性抗体は、一方のアームに第1の結合特異性を有するH鎖、および他方のアームに第2の結合特異性をもたらすH-L鎖対からなる。国際公開公報W O 9 4 / 0 4 6 9 0号参照。また、S u r e s hら、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 、1 2 1 、2 1 0 、1 9 8 6 も参照。

#### 【0122】

本発明の一実施形態では、二重特異性治療用抗体であって、前記抗体の少なくとも1つの結合特異性がh I L - 1 3 に対するものであり、h I L - 1 3 とI L - 1 3 Rとの相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）抗体を提供する。このような抗体は、I g G アイソタイプ、たとえばI g G 1 のヒト定常領域をさらに含み得る。一部の実施形態では、二重特異性治療用抗体は、h I L - 1 3 に対する第1の結合特異性を有し、h I L - 1 3 とh I L - 1 3 Rとの相互作用を変調し（たとえば阻害または遮断する）、また、h I L - 4 に対する第2の結合特異性を有し、h I L - 4 とh I L - 4 の受容体との相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）。

#### 【0123】

本発明の一実施形態では、二重特異性治療用抗体であって、前記抗体の少なくとも1つの結合特異性はh I L - 1 3 に対するものであり、配列番号3のC D R H 3 を含む抗体を提供する。このような抗体は、I g G アイソタイプ、たとえばI g G 1 のヒト定常領域をさらに含み得る。

#### 【0124】

本発明の一実施形態では、二重特異性治療用抗体であって、前記抗体の少なくとも1つの結合特異性はh I L - 1 3 に対するものであり、少なくとも配列番号1、2、3、4、5 および6 のC D R を含む抗体を提供する。このような抗体は、I g G アイソタイプ、たとえばI g G 1 のヒト定常領域をさらに含み得る。

#### 【0125】

##### 1.4 抗体断片

本発明の特定の実施形態では、h I L - 1 3 とh I L - 1 3 Rとの相互作用を変調する治療用抗体断片を提供する。このような断片は、上述の抗体のF a b 、F a b ' 、F ( a b ' )<sub>2</sub> 、F v 、S c F v 断片などの、無傷の抗体および/またはヒト化抗体および/またはキメラ抗体の機能的な抗体結合断片であり得る。従来、このような断片はたとえばペパイン消化による無傷の抗体のタンパク質分解性消化は產生されているが（たとえば、国際公開公報W O 9 4 / 2 9 3 4 8号参照）、組換えによって形質転換させた宿主細胞から直接产生し得る。S c F v の产生には、B i r d ら；(1988) S c i e n c e 、2 4 2 、4 2 3 ~ 4 2 6 を参照されたい。さらに、下に記述する様々な操作技術を用いて抗体断片を产生し得る。

#### 【0126】

F v 断片は、その2つの鎖の相互作用エネルギーがF a b 断片よりも低いと考えられる。V H およびV L ドメインの会合を安定化するために、これらはペプチド(B i r d ら、(1988) S c i e n c e 、2 4 2 、4 2 3 ~ 4 2 6 、H u s t o n ら、P N A S 、8 5 、5 8 7 9 ~ 5 8 8 3 )、ジスルフィド橋(G l o c k s h u b e r ら、(1990) B i o c h e m i s t r y 、2 9 、1 3 6 2 ~ 1 3 6 7 )および「ノブインホール(k n o b i n h o l e )」突然変異(Z h u ら(1997)、P r o t e i n S c i . 、6 、7 8 1 ~ 7 8 8 )で連結されている。S c F v 断片は当業者に周知の方法によって产生することができる。W h i t l o w ら(1991) M e t h o d s c o m p a n i

10

20

30

40

50

gon Methods Enzymol. 2, 97~105 および Hustonら (1993) Int. Rev. Immunol. 10, 195~217 参照。ScFv は大腸菌などの細菌細胞中で产生し得るが、真核細胞中で产生することがより好ましい。ScFv の 1 つの不利点は、産物が一価性であり多価結合による结合力の増強が妨げられること、およびその短い半減期である。これらの問題を克服する試みには、追加の C 末端システインを含む ScFV から化学的カップリングによって产生した (Adamsら (1993) Can. Res. 53, 4026~4034 および McCartneyら (1995) Protein Eng., 8, 301~314)、または非対合 C 末端システイン残基を含む ScFv の自発性の部位特異的な二量体化によって产生した (Kipriyanov ら (1995) Cell. Biophys. 26, 187~204 参照) 二価 (ScFv')<sub>2</sub> が含まれる。あるいは、ScFv は、ペプチドリンカーを 3~12 残基に短縮して「二重特異性抗体」を形成させることによって、多量体を形成させることができる。Holliger ら、PNAS、(1993)、90, 6444~6448 参照。リンカーをさらに縮小することにより ScFV 三量体 (「三重特異性抗体」、Kortt ら (1997) Protein Eng. 10, 423~433 参照) および四量体 (「四重特異性抗体」、Le Gall ら (1999) FEBS Lett. 453, 164~168 参照) をもたらすことができる。また、二価 ScFV 分子の構築は、タンパク質二量体化モチーフと遺伝子融合させて「ミニ抗体」 (Pacak ら (1992) Biochemistry 31, 1579~1584 参照) および「ミニボディー」 (Hu ら (1996) Cancer Res. 56, 3055~3061 参照) を形成させることによっても達成することができる。ScFv - Sc - Fv タンデム ((ScFV)<sub>2</sub>) は、第 3 のペプチドリンカーによって 2 つの ScFv 単位を連結させることによっても产生し得る。Kurucz ら (1995) J. Immol. 154, 4576~4582 参照。二重特異性の二重特異性抗体は、1 つの抗体の VH ドメインが短いリンカーによって別の抗体の VL ドメインに結合されたことからなる、2 つの单鎖融合産物の非共有結合によって产生することができる。Kipriyanov ら (1998)、Int. J. Can. 77, 763~772 参照。このような二重特異性の二重特異性抗体の安定性は、上述のようにジスルフィド橋もしくは「ノブインホール」突然変異を導入することによって、または二重ハイブリッド ScFv 断片がペプチドリンカーによって結合されている单鎖二重特異性抗体 (ScDb) を形成させることによって、増強することができる。Kontermann ら (1999) J. Immunol. Methods 226, 179~188 参照。四価の二重特異性分子は、たとえばヒンジ領域を介して ScFv 断片を IgG 分子の CH3 ドメインまたは Fab 断片に融合させることによって利用可能である。Colomar ら (1997) Nature Biotechnol. 15, 159~163 参照。あるいは、四価の二重特異性分子が二重特異性の单鎖二重特異性抗体の融合によって作製されている (Alt ら、(1999) FEBS Lett. 454, 90~94 参照)。また、より小さな四価の二重特異性分子は、ヘリックス - ループ - ヘリックスモチーフを含むリンカーを用いた ScFv - ScFv タンデムの二量体化 (Di Biミニ抗体、Muller ら (1998) FEBS Lett. 432, 45~49 参照) または 4 つの抗体可変ドメイン (VH および VL) を含む单鎖分子の分子内対合を妨げる配向の二量体化 (タンデム二重特異性抗体、Kipriyanov ら、(1999) J. Mol. Biol. 293, 41~56 参照) によって形成することができる。二重特異性の Fab' (ab')<sub>2</sub> 断片は、Fab' 断片の化学的カップリングまたはロイシンジッパーを介したヘテロ二量体化によって作製することができる (Shalaby ら、(1992) J. Exp. Med. 175, 217~225 および Kostelny ら (1992) J. Immunol. 148, 1547~1553 参照)。また、単離された VH および VL ドメイン (Domantis plc) も利用可能である。US 6,248,516; US 6,291,158; US 6,172,197 参照。

## 【0127】

—実施形態では、hIL-13 に特異的に結合し、hIL-13 と hIL-13R との

10

20

30

40

50

相互作用を変調する（たとえば阻害または遮断する）、治療用抗体断片（たとえばS c F v、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>）または上述のように操作した抗体断片を提供する。治療用抗体断片は、典型的には、配列番号3の配列を有するCDRH3を、所望により配列番号1、2、4、5および6に記載の配列を有するCDRと共に含む。

#### 【0128】

##### 1.5 ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体も本発明の一実施形態を形成する。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便利な架橋結合方法を用いて形成された2つの共有結合された抗体からなる。たとえばU S 4，6 7 6，9 8 0 参照。

#### 【0129】

##### 1.6 他の修飾

抗体のFc領域と様々なFc受容体(FcR)との相互作用は、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)、補体の固定、貪食および抗体の半減期/クリアランスを含めた、抗体のエフェクター機能を媒介すると考えられている。本発明の抗体のFc領域に対する様々な修飾は、所望する特性に応じて実施し得る。たとえば、そうでなければ溶解性の抗体を非溶解性にするためのFc領域中の特異的突然変異は、E P 0 6 2 9 2 4 0 B 1 およびE P 0 3 0 7 4 3 4 B 2 に詳述されており、また、血清半減期を増加させるために救助(salvage)受容体結合エピトープを抗体内に取り込ませてもよい。U S 5,7 3 9, 2 7 7 参照。現在認識されているヒトFc受容体は5つ存在し、それらはFcR(I)、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIaおよび新生児FcRnである。Shieldsら、(2001)J.Biol.Chem. 276, 6591~6604は、IgG1残基の共通の組がすべてのFcRの結合に関与しているが、FcRIIおよびFcRIIIはこの共通の組以外に異なる部位を利用することを実証した。IgG1残基の1つのグループは、アラニンに変更した場合にすべてのFcRに対する結合が軽減された。これらはPro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297およびPro-239である。これらはすべてIgGのCH2ドメイン中にあり、CH1およびCH2を連結するヒンジ付近に密集している。FcRIは結合にIgG1残基の共通の組のみを利用するが、FcRIIおよびFcRIIIは共通の組に加えて、異なる残基とも相互作用する。一部の残基の変更では、FcRII(たとえばArg-292)またはFcRIII(たとえばGlu-293)への結合のみが軽減された。一部の変異体ではFcRIIまたはFcRIIIに対して結合の改善が示されたが、他の受容体に対する結合は影響を受けなかった(たとえばSer-267AlaによりFcRIIに対する結合が改善されたが、FcRIIIに対する結合は影響を受けなかった)。他の変異体ではFcRIまたはFcRIIIに対する結合の改善が示されたが、他の受容体に対する結合が軽減された(たとえばSer-298AlaによりFcRIIIに対する結合が改善され、FcRIIに対する結合は影響を受けなかった)。FcRIIIaでは、最良の結合のIgG1変異体はSer-298、Glu-333およびLys-334におけるアラニン置換の組合せを有していた。新生児FcRn受容体は、抗体クリアランスおよび組織にわたる経細胞輸送のどちらにも関与していると考えられている(Jung hans R.P.(1997) Immunol.Rev. 1629~57およびGhetieら(2000)Annals Rev. Immunol. 18, 739~766 参照)。ヒトFcRnと直接相互作用すると決定されたヒトIgG1残基には、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434およびHis435が含まれる。本セクション中に記載のこれらのうちの任意の位置における転換は、血清半減期の増加および/または本発明の抗体のエフェクター特性の変更を可能にし得る。

#### 【0130】

他の修飾には、本発明の抗体のグリコシル化変異体が含まれる。その定常領域内の保存された位置における抗体のグリコシル化は、抗体の機能、特に上述のものなどのエフェクター機能に大きな影響を与えることが知られている。たとえば、Boydら(1996)

10

20

30

40

50

、 Mol. Immunol. 、 32 、 1311 ~ 1318 を参照されたい。 1 つもしくは複数の炭水化物部分が付加、置換、欠失または修飾されている、本発明の治療用抗体またはその抗原結合断片のグリコシル化変異体が意図されている。アスパラギン - X - セリンまたはアスパラギン - X - スレオニンモチーフの導入は炭素水和物部分の酵素的付着の潜在的な部位をもたらすので、抗体のグリコシル化の操作に用い得る。 Rajuら (2001) Biochemistry 、 40 、 8868 ~ 8876 では、 TNFR - IgG イムノアドヘシンの末端シアリル化は、 -1,4 - ガラクトシルトランスフェラーゼおよび / または ,2,3 シアリルトランスフェラーゼを用いた再ガラクトシル化および / または再シアリル化の工程によって増加させた。末端シアリル化の増加により免疫グロブリンの半減期が増加すると考えられている。ほとんどの糖タンパク質と共に、抗体は典型的には糖型の混合物として産生される。この混合は、抗体を真核細胞、特に哺乳動物細胞中で産生させた場合に特に明らかである。定義された糖型を作製するために様々な方法が開発されている。 Zhangら、 Science 、 (2004) 、 303 、 371 、 Searsら、 Science 、 (2001) 291 、 2344 、 Wackerら (2002) Science 、 298 、 1790 、 Davisら (2002) Chem. Rev. 、 102 、 579 、 Hangら (2001) Acc. Chem. Res. 、 34 、 727 参照。したがって、本発明は、定義された数 ( たとえば 7 以下、たとえば 2 つもしくは単一などの 5 以下 ) の糖型の前記抗体またはその抗原結合断片を含む、本明細書中に記載の複数の治療用 ( モノクローナル ) 抗体 ( これは IgG アイソタイプ、たとえば IgG1 のものであり得る ) を意図する。

10

20

#### 【 0131 】

本発明のさらなる実施形態には、ポリエチレングリコール (PEG) 、ポリプロピレングリコールもしくはポリオキシアルキレンなどの非タンパク質ポリマーとカップリングした本発明の治療用抗体またはその抗原結合断片が含まれる。タンパク質と PEG とのコンジュゲーションは、タンパク質の半減期を増加させるため、ならびにタンパク質の抗原性および免疫原性を軽減させるための確立された技術である。様々な分子量および形 ( 直鎖状または分枝鎖状 ) を用いた PEG 化の使用が無傷の抗体および Fab' 断片について調査されている。 Koumenis I. L. ら (2000) Int. J. Pharmacaceut. 、 198 : 83 ~ 95 参照。

30

#### 【 0132 】

##### 2. 競合抗体

本発明はまた、 hIL-13 に特異的に結合して、配列番号 3 の CD RH3 を含む本発明の治療用抗体もしくはその抗原結合断片の hIL-13 への結合、および / または配列番号 1 、 2 、 3 、 4 、 5 および 6 の CDR を含む治療用抗体もしくはその抗原結合断片の hIL-13 への結合を競合的に阻害する、抗体ならびに抗体の抗原結合断片も意図する。一部の実施形態では、治療用抗体は配列番号 7 の VH ドメインおよび配列番号 8 の VL ドメインを含むネズミ抗体である。このような競合抗体は、配列番号 1 、 2 、 3 、 4 、 5 および 6 の CDR を含む治療用抗体によって結合されるものと同じ、それに重複する、または空間的に隣接する hIL-13 のエピトープに結合する。競合抗体または抗体断片は、等モル濃度において、少なくとも 25% の阻害、典型的には 35% 以上、より典型的には少なくとも 50% の阻害を示す。

40

#### 【 0133 】

したがって、本発明の一実施形態では、候補抗体または抗体断片が本明細書中に記載した競合抗体であるかどうかを決定するための、候補抗体または抗体断片のスクリーニング方法であって、

#### 【 0134 】

( a ) 候補抗体または抗体断片を、配列番号 3 の CD RH3 を含み、所望により配列番号 1 、 2 、 4 、 5 および 6 の CDR をさらに含む治療用抗体 ( 配列番号 7 の VH ドメインおよび配列番号 8 の VL ドメインを有するネズミ治療用抗体、もしくは配列番号 18 の重鎖および配列番号 22 の軽鎖を有するヒト化治療用抗体、もしくは配列番号 19 の重鎖お

50

および配列番号23の軽鎖を有するヒト化治療用抗体など)またはその抗原結合断片と共にインキュベーションする工程と;

【0135】

(b) 工程(a)の候補抗体またはその抗体断片が、治療用抗体またはその抗原結合断片のhIL-13への結合を競合的に阻害するかどうかを決定する工程との工程を含む方法を提供する。

【0136】

また、配列番号1、2、3、4、5および6に記載の配列を有するCDRを含む治療用抗体もしくはその抗原結合断片の結合を競合的に阻害する、競合抗体またはその抗原結合断片も提供する。

10

【0137】

別の実施形態では、配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖を含む本発明の、治療用抗体のhIL-13への結合を競合的に阻害する、競合抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0138】

競合抗体またはその抗原結合断片は、上記抗体構造のうちの任意のもので得る。たとえば、競合抗体は、靈長類もしくはヒトの無傷の抗体、またはヒト化抗体、好ましくはIgGアイソタイプ、たとえばIgG1もしくはIgG4のもので得る。競合抗体断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、ScFvなどであり得る。競合抗体は、本明細書中に開示した方法に従って产生し得る。

20

【0139】

### 3. 产生方法

本発明の抗体はポリクローナル集団として产生し得るが、モノクローナル集団として(すなわち、特異的な抗原結合部位に向けられた同一抗体の実質的に均一な集団として)产生することがより好ましい。当業者には、もちろん、集団とは複数の抗体実体を意味することが明らかであろう。本発明の抗体は、ヤギ(Pollockら(1999)、J.Immunol.Methods, 231:147~157参照)、ニワトリ(Morrows KJJ(2000)Genet.Eng.News, 20:1~55参照、マウス(Pollockら参照)または植物(Doran PM, (2000)Curr.Opinion Biotechnol., 11, 199~204, Ma JK-C(1998)、Nat.Med., 4; 601~606, Baez Jら、BioPharm, (2000)13:50~54、Stoger Eら; (2000)Plant Mol.Biol., 42:583~590参照)などのトランスジェニック生物中で产生させ得る。また、化学合成によって抗体を合成してもよい。しかし、本発明の抗体は、典型的には当業者に周知の組換え細胞培養技術を用いて产生する。抗体をコードしているポリヌクレオチドを単離し、プラスミドなどの複製可能なベクター内に導入してさらにクローニング(増幅)または発現させる。特に宿主細胞がCHOまたはNS0である場合(以下参照)、1つの有用な発現系はグルタミン酸合成酵素系(Lonza Biologicsから販売されているものなど)である。抗体をコードしているポリヌクレオチドは、従来の手順(たとえばオリゴヌクレオチドプローブ)を用いて容易に単離され、配列決定を行う。使用し得るベクターには、プラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾン、プラスミドが典型的な具体化であるミニ染色体が含まれる。一般に、このようなベクターにはさらに、発現を促進するために軽鎖および/または重鎖ポリヌクレオチドに動作可能に連結されたシグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーターならびに転写停止配列が含まれる。軽鎖および重鎖をコードしているポリヌクレオチドは、個別のベクター内に挿入して同一宿主細胞内に形質移入させてもよく、または、所望する場合は重鎖および軽鎖をどちらも同一ベクター内に挿入して宿主細胞内に形質移入させることができる。したがって、本発明の一態様によれば、本発明の治療用抗体もしくはその抗原結合断片の軽鎖および/または重鎖をコードしているベクターの構築工程であって、ベクター内に、本発明の治療用抗体の軽鎖および/または重鎖のどちらかを

30

40

50

コードしているポリヌクレオチドを挿入することを含む方法を提供する。

【0140】

本発明の他の態様では、配列番号24として記載した配列を有するネズミVHドメインをコードしているポリヌクレオチドを提供する。

【0141】

本発明の別の態様では、配列番号25として記載した配列を有するネズミVLドメインをコードしているポリヌクレオチドを提供する。

【0142】

別の実施形態では、配列番号26、27、28、29からなる群から選択された配列を有するVHドメインコードしているポリヌクレオチドを提供する。

10

【0143】

別の実施形態では、配列番号30、31からなる群から選択された配列を有するVLドメインをコードしているポリヌクレオチドを提供する。

【0144】

本発明によれば、本発明の重鎖をコードしている、配列番号32、33、34、35からなる群から選択されたポリヌクレオチドを提供する。

【0145】

本発明によれば、本発明の軽鎖をコードしている、配列番号36、37からなる群から選択されたポリヌクレオチドを提供する。

【0146】

20

当業者には、遺伝暗号の重複性により、本明細書中に開示したものの代替となるポリヌクレオチドも、本発明のポリペプチドをコードしており利用可能であることが直ちに明らかであろう。

【0147】

### 3.1 シグナル配列

本発明の抗体は、成熟タンパク質のN末端に特異的切断部位を有する異種シグナル配列を有する融合タンパク質として产生し得る。シグナル配列は宿主細胞によって認識およびプロセッシングされるべきである。原核宿主細胞には、シグナル配列はアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定性エンテロトキシンIリーダーであり得る。酵母分泌には、シグナル配列は酵母インベルターゼリーダー、因子リーダーまたは酸ホスファターゼリーダーであり得る。たとえば国際公開公報WO90/13646号参照。哺乳動物細胞系では、単純ヘルペスgDシグナルなどのウイルス分泌リーダーおよびネイティブ免疫グロブリンシグナル配列が利用可能である。典型的には、シグナル配列は、本発明の抗体をコードしているDNAに、読み替中でライゲーションさせる。

30

【0148】

### 3.2 複製起点

複製起点は当分野で周知であり、pBR322がほとんどのグラム陰性細菌に適しており、 $2\mu$ プラスミドがほとんどの酵母に適しており、SV40などの様々なウイルス、ポリオーマ、アデノウイルス、HSVまたはBPVがほとんどの哺乳動物細胞に適している。一般に、哺乳動物発現ベクターには複製起点の構成成分は必要ないが、初期プロモーターを含むのでSV40を用いてもよい。

40

【0149】

### 3.3 選択マーカー

典型的な選択遺伝子は、(a)抗生物質または他の毒素、たとえばアンピシリン、ネオマイシン、メトレキサートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を与える、あるいは(b)栄養要求性欠乏を補完するまたは複合培地内で利用可能でない栄養素を供給する、タンパク質をコードしている。選択スキームは、宿主細胞の増殖を停止させることを含み得る。本発明の治療用抗体をコードしている遺伝子を用いて形質転換が成功している細胞は、選択マーカーによって与えられた、たとえば薬物耐性によって生存する。別の例はいわゆるDHFR選択マーカーであり、メトレキサートの存在下で形質転換体を培養する

50

。典型的な実施形態では、目的の外来遺伝子のコピー数を増幅させるために、徐々に増加する量のメトトレキサートの存在下で細胞を培養する。CHO細胞がDHF R選択に特に有用な細胞系である。さらなる例はグルタミン酸合成酵素発現系 (Lonza Biologics) である。酵母で用いるための適切な選択遺伝子は trp1 遺伝子である。S tinch comb ら、Nature、282、38、1979 参照。

#### 【0150】

##### 3.4 プロモーター

本発明の抗体の発現に適したプロモーターを、抗体をコードしているDNA / ポリヌクレオチドに動作可能に連結させる。原核宿主用のプロモーターには、phoA プロモーター、 - ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファンならびにTacなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。酵母細胞中の発現に適したプロモーターには、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素、たとえばエノラーゼ、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸脱炭酸酵素、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース6リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼおよびグルコキナーゼが含まれる。誘導性酵母プロモーターには、アルコール脱水素酵素2、イソチトクロームC、酸ホスファターゼ、メタロチオネインおよび窒素代謝またはマルトース / ガラクトース利用を担っている酵素が含まれる。

#### 【0151】

哺乳動物細胞系中での発現用のプロモーターには、ポリオーマ、鶏痘およびアデノウイルス(たとえばアデノウイルス2)などのウイルスプロモーター、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス(具体的には前初期遺伝子プロモーター)、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、アクチン、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターならびに初期および後期シミアンウイルス40が含まれる。もちろん、プロモーターの選択は発現に用いる宿主細胞との適切な適合性に基づいている。したがって、一実施形態では、RSVおよび/またはSV40および/またはCMVプロモーター、本発明の軽鎖V領域(VL)をコードしているDNA、C領域をネオマイシンおよびアンピシリン耐性の選択マーカーと共に含む第1のプラスミド、ならびにRSVまたはSV40プロモーター、本発明の重鎖V領域(VH)をコードしているDNA、1定常領域をコードしているDNA、DHF Rおよびアンピシリン耐性マーカーを含む第2のプラスミドを提供する。

#### 【0152】

##### 3.5 エンハンサー要素

適切な場合、たとえば高等真核生物中の発現には、ベクター内でプロモーター要素に動作可能に連結したエンハンサー要素を用い得る。適切な哺乳動物エンハンサー配列には、グロビン、エラスターーゼ、アルブミン、フェトプロテインおよびインスリン由来のエンハンサー要素が含まれる。あるいは、SV40エンハンサー(bp100~270)、サイトメガロウイルス初期プロモーター-エンハンサー、ポリーマエンハンサー、バキュロウイルスエンハンサーまたはネズミIgG2a座位などの、真核細胞ウイルス由来のエンハンサー要素を用い得る(国際公開公報WO04/009823号参照)。エンハンサーは、ベクターのプロモーターよりも上流の部位に位置することが好ましい。

#### 【0153】

##### 3.6 宿主細胞

本発明の抗体をコードしているベクターをクローニングまたは発現させるための適切な宿主細胞は、原核細胞、酵母または高等真核細胞である。適切な原核細胞には、真正細菌、たとえば、大腸菌属(Escherichia)、たとえば大腸菌(たとえばATCC31,446;31,537;27,325)などの腸内細菌科、エンテロバクター属(Enterobacter)、エルウィニア属(Erwiniella)、クレブシエラプロテウス(Klebsiella Proteus)、サルモネラ属(Salmonella)、たとえばネズミチフス菌、セラチア属(Serratia)、たとえばセラチアマル

10

20

30

40

50

セスキャンス (*Serratia marcescans*) および赤痢菌属 (*Shigella*)、ならびに枯草菌 (*Bacillus subtilis*) およびリケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) などの桿菌 (*Bacilli*) (DD 266 710 参照)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) などのシュードモナス属 (*Pseudomonas*)、ならびにストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) が含まれる。酵母宿主細胞のうち、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイヴェロマイセス属 (*Kluyveromyces*) (たとえば ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500)、ヤロウイア (*Yarrowia*) (EP 402,226)、ピキアバストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183,070、また Pengら、J. Biotechnol. 108 (2004) 185~192も参照)、カンジダ属、トリコデルマリーシア (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)、ペニシリン属、トリポクラジウム属 (*Tolypocladium*) ならびに偽巣性コウジ菌 (*A. nidulans*) およびクロカビ (*A. niger*) などのアスペルギルス属の宿主も意図される。  
10

#### 【0154】

原核および酵母宿主細胞は本発明に具体的に意図されるが、本発明宿主細胞は高等真核細胞であることが好ましい。適切な高等真核宿主細胞には、COS-1 (ATCC 番号 CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651)、ヒト胚性腎臓系 293、仔ハムスター腎細胞 (BHK) (ATCC CRL 1632)、BHK 570 (ATCC 番号 CRL 10314)、293 (ATCC 番号 CRL 1573)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO (たとえば CHO-K1、ATCC 番号 CCL 61、DG 44 などの DHFR-CHO 細胞系 (Ur laubら、(1986) Somatic Cell Mol. Genet. 12, 555~556 参照))、特に懸濁培養に適応させた CHO 細胞系、マウスセルトリ細胞、サル腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞 (ATCC CRL-1587)、HELA 細胞、イヌ科動物腎細胞 (ATCC CCL 34)、ヒト肺細胞 (ATCC CCL 75)、Hep G2 および骨髄腫またはリンパ腫細胞、たとえば NS0 (USS 5, 807, 715 参照)、Sp 2/0、Y0 などの哺乳動物細胞が含まれる。  
20

#### 【0155】

したがって、本発明の一実施形態では、本明細書中に記載した治療用抗体またはその抗原結合断片の重鎖および/もしくは軽鎖をコードしているベクターを含む、安定に形質転換した宿主細胞を提供する。好ましくは、このような宿主細胞は、軽鎖をコードしている第1のベクターおよび前記重鎖をコードしている第2のベクターを含む。  
30

#### 【0156】

##### 細菌発酵

細菌系は、抗体断片の発現に特に適している。このような断片は、細胞内またはペリプラズマ内に局在している。当業者に知られている方法に従って不溶性のペリプラズムタンパク質を抽出し、再折畳みを行って活性タンパク質を形成することができる。Sanchez ら (1999) J. Biotechnol. 72, 13~20 および Cupit PM ら (1999) Lett Appl Microbiol. 29, 273~277 参照。  
40

#### 【0157】

##### 3.7 細胞培養方法

本発明の治療用抗体またはその抗原結合断片をコードしているベクターで形質転換した宿主細胞を、当業者に知られている任意の方法によって培養し得る。宿主細胞はスピナーフラスコ、ローラーボトルまたは中空纖維系で培養し得るが、大規模生産には、懸濁培養用に特に攪拌タンクの反応器を用いることが好ましい。好ましくは、攪拌タンクはたとえばスパージャー、バッフルまたは低剪断の羽根を用いた通気に適応している。気泡塔およびエアリフト反応器には、空気または酸素の気泡を用いた直接通気を用い得る。宿主細胞  
50

を無血清培養培地中で培養する場合は、通気過程の結果としての細胞損傷を防ぐために培地にプルロニック F - 68などの細胞保護剤を添加することが好ましい。宿主細胞の特徴に応じて、足場依存性の細胞系の増殖基質としてマイクロキャリアを用いてもよく、または細胞を懸濁培養に適応させてもよい(これは典型的である)。宿主細胞、特に無脊椎動物宿主細胞の培養では、流加培養、反復バッチ処理(Drapéauら(1994)Cytotechnology、15:103~109参照)、延長バッチ処理または灌流培養などの様々な動作モードを利用し得る。組換えによって形質転換させた哺乳動物宿主細胞は、ウシ胎児血清(FCS)などの血清を含有する培地中で培養し得るが、宿主細胞は、Keenら(1995)Cytotechnology、17:153~163に開示されているもの、または必要な場合はグルコースなどのエネルギー源および組換えインスリンなどの合成成長因子を添加したProCHO-CDMもしくはUltraCHO(商標)(Camrex、米国ニュージャージー)などの市販の培地などの、血清を含まない合成培地中で培養することが好ましい。宿主細胞の無血清培養は、これらの細胞が無血清条件下で増殖することに適応していることを要する可能性がある。1つの適応手法は、このような宿主細胞を血清含有培地中で培養し、宿主細胞が無血清条件に適応することを学ぶように、培地の80%を無血清培地用の培地で繰り返して交換することである(たとえば、Scharfenberg Kら(1995)、動物細胞技術:21世紀に向けた開発(Animal Cell technology: Developments towards the 21st century)(Beuvery E.C.ら編)、ページ619~623、Kluwer Academic publishers参照)。

#### 【0158】

培地中に分泌された本発明の抗体を回収し、様々な技術を用いて精製して、意図する使用に適した精製の度合を提供し得る。たとえば、ヒト患者を治療するための本発明の治療用抗体の使用は、典型的には(粗培地と比較して)少なくとも95%の純度、より典型的には98%もしくは99%またはそれ以上の純度が義務づけられている。最初の例では、培養培地からの細胞細片を典型的には遠心分離を用いて除去し、次いで、たとえば微量濾過、限外濾過および/またはデブスマイルターを用いて上清の清澄化工程を行う。透析およびゲル電気泳動ならびにヒドロキシアパタイト(HA)、アフィニティクロマトグラフィー(所望によりポリヒスチジンなどの親和性タグづけシステムを含む)および/または疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC、USS, 429, 746参照)などのクロマトグラフィー技術等の様々な他の技術が利用可能である。一実施形態では、本発明の抗体は、様々な清澄化工程のうち、タンパク質AまたはGアフィニティクロマトグラフィーを用いて捕捉し、次いでイオン交換および/またはHAクロマトグラフィー、陰イオンもしくは陽イオン交換、サイズ排除クロマトグラフィーならびに硫酸アンモニウム沈殿などのさらなるクロマトグラフィー工程を行う。典型的には、様々なウイルス除去工程も用いる(たとえば、たとえばDV-20フィルターを用いたナノ濾過)。これらの様々な工程のうち、少なくとも75mg/ml以上、たとえば100mg/ml以上の本発明の抗体またはその抗原結合断片を含む精製した(好ましくはモノクローナル)調製物が提供され、したがって本発明の一実施形態が形成される。適切なことに、このような調製物は本発明の形態の凝集した形態を実質的に含まない。

#### 【0159】

##### 4. 医薬組成物

上述の本発明の抗体の精製した調製物(特にモノクローナル調製物)は、アトピー性疾患、たとえば喘息、アレルギー性鼻炎、COPDなどのヒトの疾患および障害の治療に用いるために、医薬組成物中に取り込まれ得る。典型的には、このような組成物は、許容される医薬の実施において知られており指示されている、医薬上許容される担体を含む。たとえば、レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第16版、(1980)、Mack Publishing Co.参照。このような担体の例には、適切な緩衝液で5~8の範囲のpHに緩衝した、生

理食塩水、リンガー溶液またはデキストロース溶液などの滅菌した担体が含まれる。注射（たとえば静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内もしくは門脈内）または持続注入用の医薬組成物は、適切に、目に見える粒子状物質を含まず、0.1ng～100mgの抗体、好ましくは5mg～25mgの抗体を含み得る。このような医薬組成物の調製方法は当業者に周知である。一実施形態では、医薬組成物は、0.1ng～100mgの本発明の治療用抗体を単位剤形中に、所望により使用説明書と共に含む。本発明の医薬組成物は、当業者に周知または明らかな方法に従って投与前に再構成するために、凍結乾燥（凍結乾燥）し得る。本発明の実施形態が IgG1 アイソタイプを有する本発明の抗体を含む場合は、クエン酸塩（たとえばクエン酸ナトリウム）もしくは EDTA などの銅のキレート剤またはヒスチジンを医薬組成物に加えて、このアイソタイプの抗体の銅媒介性の分解の度合を軽減させ得る。EP0612251 参照。抗 hIL-13 治療は、経口、吸入、局所的（たとえば、眼内、鼻腔内、直腸、皮膚上の創傷内）に与え得る。

## 【0160】

本発明の抗体を投与するための有効な用量および治療レジームは、一般に経験的に決定され、患者の年齢、重量および健康状態ならびに治療する疾患または障害などの因子に依存する。このような因子は担当医の権限内にある。適切な用量を選択するための指針は、たとえば Smithら (1977) ヒトの診断および治療における抗体 (Antibodies in human diagnosis and therapy), Raven Press、ニューヨーク中に見つけ得る、一般には 1mg～1000mg である。

## 【0161】

治療する疾患または障害に応じて（特に喘息）、本発明の抗体を治療上有効な量で含む医薬組成物は、有効量の、抗炎症剤（たとえば副腎皮質ステロイドまたは NSAID）、抗コリン剤（特に M1 / M2 / <3 受容体拮抗剤）、<sub>2</sub> アドレナリン受容体作用剤、抗感染剤（たとえば抗生物質、抗ウイルス剤）、抗ヒスタミン、PDE4 阻害剤などの別の医薬品と共に、同時に、個別に、または逐次的に用い得る。<sub>2</sub> アドレナリン受容体作用剤の例には、サルメテロール、サルブタモール、フォルモテロール、サルメファモール、フェノテロール、テルブタリンが含まれる。好ましい長時間作用性 <sub>2</sub> アドレナリン受容体作用剤には、国際公開公報 WO02/66422 号 A、国際公開公報 WO02/270490 号、国際公開公報 WO02/076933 号、国際公開公報 WO03/024439 号および国際公開公報 WO03/072539 号に記載のものが含まれる。適切な副腎皮質ステロイドには、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プロピオン酸フルチカゾン、6, 9 -ジフルオロ-17 - [(2 - フラニルカルボニル) オキシ] - 11 - ヒドロキシ - 16 - メチル - 3 - オキソ - アンドロスター - 1, 4 - ジエン - 17 - カルボチオ酸 S - フルオロメチルエステル、6, 9 -ジフルオロ - 11 - ヒドロキシ - 16 - メチル - 3 - オキソ - 17 - プロピオニルオキシ - アンドロスター - 1, 4 - ジエン - 17 - カルボチオ酸 S - (2 - オキソ - テトラヒドロ - フラン - 3S - イル) エステル、ベクロメタゾンエステル（たとえば 17 - プロピオン酸エステルまたは 17, 21 - ジプロピオン酸エステル）、ブデソニド、フルニソリド、モメタゾンエステル（たとえばフロ酸エステル）、トリアムシノロンアセトニド、ロフレポン（rofleponide）、シクレソニド (16, 17 - [(R) - シクロヘキシルメチレン] ビス(オキシ)] - 11, 21 - ジヒドロキシ - プレグナ - 1, 4 - ジエン - 3, 20 - ジオン）、プロピオン酸ブチキソコート (butixocort propionate)、RPR - 106541、および ST - 126 が含まれる。好ましい副腎皮質ステロイドには、プロピオン酸フルチカゾン、6, 9 -ジフルオロ - 11 - ヒドロキシ - 16 - メチル - 17 - [(4 - メチル - 1, 3 - チアゾール - 5 - カルボニル) オキシ] - 3 - オキソ - アンドロスター - 1, 4 - ジエン - 17 - カルボチオ酸 S - フルオロメチルエステルおよび 6, 9 -ジフルオロ - 17 - [(2 - フラニルカルボニル) オキシ] - 11 - ヒドロキシ - 16 - メチル - 3 - オキソ - アンドロスター - 1, 4 - ジエン - 17 - カルボチオ酸 S - フルオロメチルエステル、より好ましくは 6, 9 -ジフルオロ - 17 - [(2 - フラニルカルボニル) オキシ] - 11

10

20

30

40

50

- ヒドロキシ - 16 - メチル - 3 - オキソ - アンドロスタ - 1 , 4 - ジエン - 17 - カルボチオ酸 S - フルオロメチルエステルが含まれる。

#### 【 0 1 6 2 】

転写活性化よりも転写抑制に対して選択性を有し得、組合せ療法において有用であり得る糖質コルチコイド作用性を有する非ステロイド化合物には、以下の特許に包含されるものが含まれる：国際公開公報 WO 03 / 082827 号、国際公開公報 WO 01 / 10143 号、国際公開公報 WO 98 / 54159 号、国際公開公報 WO 04 / 005229 号、国際公開公報 WO 04 / 009016 号、国際公開公報 WO 04 / 009017 号、国際公開公報 WO 04 / 018429 号、国際公開公報 WO 03 / 104195 号、国際公開公報 WO 03 / 082787 号、国際公開公報 WO 03 / 082280 号、国際公開公報 WO 03 / 059899 号、国際公開公報 WO 03 / 101932 号、国際公開公報 WO 02 / 02565 号、国際公開公報 WO 01 / 16128 号、国際公開公報 WO 00 / 66590 号、国際公開公報 WO 03 / 086294 号、国際公開公報 WO 04 / 026248 号、国際公開公報 WO 03 / 061651 号、国際公開公報 WO 03 / 08277 号。  
10

#### 【 0 1 6 3 】

適切な抗炎症剤には、非ステロイド抗炎症性薬（NSAID）が含まれる。

#### 【 0 1 6 4 】

適切な NSAID には、クロモグリク酸ナトリウム、ネドクロミルナトリウム、ホスホジエステラーゼ（PDE）阻害剤（たとえばテオフィリン、PDE4 阻害剤または PDE3 / PDE4 阻害剤混合物）、ロイコトリエン拮抗剤、ロイコトリエン合成の阻害剤（たとえばモンテルカスト）、iNOS 阻害剤、トリプターゼおよびエラスターーゼ阻害剤、-2 インテグリン拮抗剤およびアデノシン受容体作用剤もしくは拮抗剤（たとえばアデノシン 2a 作用剤）、サイトカイン拮抗剤（たとえばCCR3 拮抗剤などのケモカイン拮抗剤）もしくはサイトカイン合成の阻害剤、または 5 - リポキシゲナーゼ阻害剤が含まれる。適切な他の<sub>2</sub> - アドレナリン受容体作用剤には、サルメテロール（たとえばキシナホ酸塩として）、サルブタモール（たとえば硫酸塩または遊離塩基として）、フォルモテロール（たとえばフマル酸塩として）、フェノテロールまたはテルブタリンおよびその塩が含まれる。iNOS（誘導型一酸化窒素合成酵素阻害剤）は経口投与用であることが好ましい。適切な iNOS 阻害剤には、国際公開公報 WO 93 / 13055 号、国際公開公報 WO 98 / 30537 号、国際公開公報 WO 02 / 50021 号、国際公開公報 WO 95 / 34534 号および国際公開公報 WO 99 / 62875 号に開示されているものが含まれる。適切な CCR3 阻害剤には、国際公開公報 WO 02 / 26722 号に開示されているものが含まれる。  
20  
30

#### 【 0 1 6 5 】

特に興味深いのは、ホスホジエステラーゼ 4 (PDE4) 阻害剤と組み合わせた本発明の抗体の使用である。本発明のこの態様に有用な PDE4 に特異的な阻害剤は、PDE4 酵素を阻害することが知られている、または PDE4 阻害剤として作用することが判明している任意の化合物であって、PDE4 のみの阻害剤であり、PDE4 と共に PDE3 および PDE5 などの PDE ファミリーの他のメンバーを阻害する化合物ではない化合物であり得る。  
40

#### 【 0 1 6 6 】

目的化合物には、シス - 4 - シアノ - 4 - (3 - シクロペンチルオキシ - 4 - メトキシフェニル) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸、2 - カルボメトキシ - 4 - シアノ - 4 - (3 - シクロプロピルメトキシ - 4 - ジフルオロメトキシフェニル) シクロヘキサン - 1 - オンおよびシス - [4 - シアノ - 4 - (3 - シクロプロピルメトキシ - 4 - ジフルオロメトキシフェニル) シクロヘキサン - 1 - オール] が含まれる。また、1996 年 9 月 03 日発行の米国特許第 5,552,438 号に記載のシス - 4 - シアノ - 4 - [3 - (シクロペンチルオキシ) - 4 - メトキシフェニル] シクロヘキサン - 1 - カルボン酸（シロミラストとしても知られる）およびその塩、エステル、プロドラッグまたは物理的形態；こ  
50

の特許および開示される化合物は、全体で参考として本明細書中に組み込まれる。

**【0167】**

ElbionのAWD-12-281(Hofgen, N.ら、15th EFMC Int Symp Med Chem(9月6~10日、エジンバラ)1998、要旨集ページ98; CAS参照番号247584020-9); NCS-613と命名された9-ベンジルアデニン誘導体(INSERM); ChiroscienceおよびScheiring-PlooughのD-4418; CI-1018として同定された、Pfizerに帰属するベンゾジアゼピンPDE4阻害剤(PD-168787); 国際公開公報WO99/16766号にKyowa Hakkoによって開示されているベンゾジオキソール誘導体; Kyowa HakkoのK-34; NappのV-11294A(Landells, L.J.ら、Eur Resp J、[Ann Cong Eur Resp Soc(9月19~23日、ジュネーブ)1998] 1998, 12(補遺28):要旨集ページ2393); Byk-Guldenのロフルミラスト(CAS参照番号162401-32-3)およびフタルアジノン(その開示が本明細書中に参考として組み込まれている国際公開公報WO99/47505号); Byk-Gulden、現在はAltanaによって調製および公開されているPDE3/PDE4阻害剤混合物である、プマフェントリン(Pumafentrine)、(-)-p-[((4aR<sup>\*</sup>, 10bS<sup>\*</sup>)-9-エトキシ-1, 2, 3, 4, 4a, 10b-ヘキサヒドロ-8-メトキシ-2-メチルベンゾ[c][1, 6]ナフチリジン-6-イル]-N, N-ジイソプロピルベンズアミド; Almirall-Prodesfarmaにより開発中のアロフィリン(carofylline); VernalisのVM554/UM565; またはT-440(Tanabe Seiyaku; Fuji, K.ら、J Pharmacol Exp Ther、1998、284(1): 162)、ならびにT2585。

**【0168】**

さらなる目的化合物は、公開国際特許出願の国際公開公報WO04/024728号(Glaxo Group Ltd)、PCT/EP2003/014867号(Glaxo Group Ltd)およびPCT/EP2004/005494号(Glaxo Group Ltd)に開示されている。

**【0169】**

適切な抗コリン剤は、ムスカリ受容体の位置で拮抗剤として作用する化合物、具体的にはM<sub>1</sub>またはM<sub>3</sub>受容体の拮抗剤である化合物、M<sub>1</sub>/M<sub>3</sub>またはM<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>の二重拮抗剤、M<sub>1</sub>/M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>受容体の受容体または汎用拮抗剤である。吸入によって投与する例示的な化合物には、イプラトロピウム(たとえば臭化物として、CAS22254-24-6、商品名Atroventの下で販売)、オキシトロピウム(たとえば臭化物として、CAS30286-75-0)およびチオトロピウム(たとえば臭化物として、CAS136310-93-5、商品名Spirivaの下で販売)が含まれる。また、レバトロパン酸(たとえば臭化水素酸塩として、CAS262586-79-8)および国際公開公報WO01/04118号に開示されているLAS-34273も興味が持たれている。経口投与用の例示的な化合物には、ビレンゼピン(CAS28797-61-7)、ダリフェナシン(CAS133099-04-4、または臭化水素酸塩ではCAS133099-07-7、商品名Enablexの下で販売)、オキシブチニン(CAS5633-20-5、商品名Ditropanの下で販売)、テロジリン(CAS15793-40-5)、トルテロジン(CAS124937-51-5、または酒石酸塩ではCAS124937-52-6、商品名Detroolの下で販売)、オチロニウム(たとえば臭化物として、CAS26095-59-0、商品名Spasmomenの下で販売)、塩化トロスピウム(CAS10405-02-4)およびソリフェナシン(CAS242478-37-1、またはコハク酸塩ではCAS242478-38-2、YM-905としても知られ、商品名Vesicareの下で販売)が含まれる。

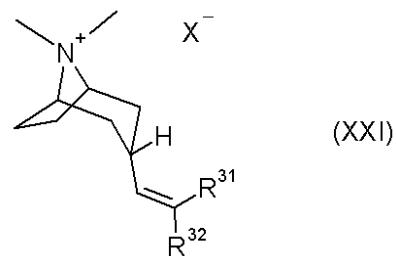
**【0170】**

他の適切な抗コリン剤には、米国特許出願第60/487981号に開示されている式

(XXI) の化合物が含まれる：

【0171】

【化1】



10

【0172】

[式中、トロパン環に付着したアルキル鎖の好ましい配向は内向きであり；

$\text{R}^{31}$  および  $\text{R}^{32}$  は、独立して、好ましくは 1 ~ 6 個の炭素原子を有する直鎖状または分枝鎖状低級アルキル基、5 ~ 6 個の炭素原子を有するシクロアルキル基、6 ~ 10 個の炭素原子を有するシクロアルキル - アルキル、4 個の炭素原子を超えないアルキル基で置換された 2 - チエニル、2 - ピリジル、フェニル、4 個の炭素原子を超えないアルキル基で置換されたフェニル、および 4 個の炭素原子を超えないアルコキシ基で置換されたフェニルからなる群から選択され；

$\text{X}^-$  は、 $\text{N}$  原子の陽性電荷に関連する陰イオンを表す。

20

$\text{X}^-$  は、それだけには限定されないが、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硫酸、ベンゼンスルホン酸、およびトルエンスルホン酸であってよく、

たとえば以下のものが含まれる：

(3 - endo) - 3 - (2, 2 - ジ - 2 - チエニルエテニル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロミド；

(3 - endo) - 3 - (2, 2 - ジフェニルエテニル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロマイド；

(3 - endo) - 3 - (2, 2 - ジフェニルエテニル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタン 4 - メチルベンゼンスルホネート；

(3 - endo) - 8 , 8 - ジメチル - 3 - [2 - フェニル - 2 - (2 - チエニル) エテニル] - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロマイド；および / または

(3 - endo) - 8 , 8 - ジメチル - 3 - [2 - フェニル - 2 - (2 - ピリジニル) エテニル] - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロマイド。]。

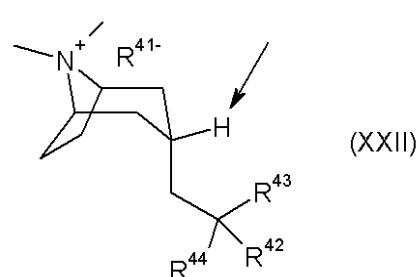
30

【0173】

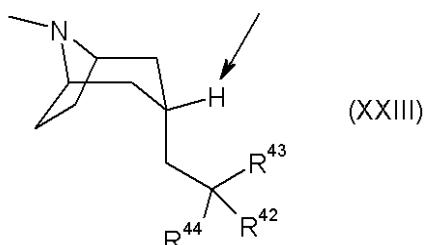
さらなる適切な抗コリン剤には、米国特許出願第 60 / 511009 号に開示されている式 (XXII) または (XXIII) の化合物が含まれる：

【0174】

【化2】



40



【0175】

[式中、

示した H 原子は外部位置にあり；

$\text{R}^{41}$  -  $\text{N}$  原子の陽性電荷に関連する陰イオンを表す。

50

R<sub>1</sub><sup>-</sup>は、それだけには限定されないが塩化物、臭化物、ヨウ化物、硫酸、ベンゼンスルホン酸およびトルエンスルホン酸であってよく；

R<sub>4</sub><sup>2</sup>およびR<sub>4</sub><sup>3</sup>は、独立して、直鎖状または分枝鎖状低級アルキル基（好ましくは1～6個の炭素原子を有する）、シクロアルキル基（5～6個の炭素原子を有する）、シクロアルキル-アルキル（6～10個の炭素原子を有する）、ヘテロシクロアルキル（5～6個の炭素原子を有する）および異種原子としてNまたはO、ヘテロシクロアルキル-アルキル（6～10個の炭素原子を有する）および異種原子としてNまたはO、アリール、所望により置換されたアリール、ヘテロアリール、ならびに所望により置換されたヘテロアリールからなる群から選択され；

R<sub>4</sub><sup>4</sup>は、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-アリール、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-ヘテロアリール、-O R<sub>4</sub><sup>5</sup>、-CH<sub>2</sub>OR<sub>4</sub><sup>5</sup>、-CH<sub>2</sub>OH、-CN、-CF<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>O(CO)R<sub>4</sub><sup>6</sup>、-CO<sub>2</sub>R<sub>4</sub><sup>7</sup>、-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>N(R<sub>4</sub><sup>7</sup>)SO<sub>2</sub>R<sub>4</sub><sup>5</sup>、-SO<sub>2</sub>N(R<sub>4</sub><sup>7</sup>)(R<sub>4</sub><sup>8</sup>)、-CON(R<sub>4</sub><sup>7</sup>)(R<sub>4</sub><sup>8</sup>)、-CH<sub>2</sub>N(R<sub>4</sub><sup>8</sup>)CO(R<sub>4</sub><sup>6</sup>)、-CH<sub>2</sub>N(R<sub>4</sub><sup>8</sup>)SO<sub>2</sub>(R<sub>4</sub><sup>6</sup>)、-CH<sub>2</sub>N(R<sub>4</sub><sup>8</sup>)CO<sub>2</sub>(R<sub>4</sub><sup>5</sup>)、-CH<sub>2</sub>N(R<sub>4</sub><sup>8</sup>)CONH(R<sub>4</sub><sup>7</sup>)からなる群から選択され；

R<sub>4</sub><sup>5</sup>は、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-アリール、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-ヘテロアリールからなる群から選択され；

R<sub>4</sub><sup>6</sup>は、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-アリール、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-ヘテロアリールからなる群から選択され；

R<sub>4</sub><sup>7</sup>およびR<sub>4</sub><sup>8</sup>は、独立して、H、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>)シクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル(C<sub>3</sub>～C<sub>7</sub>)ヘテロシクロアルキル、(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-アリール、および(C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>)アルキル-ヘテロアリールからなる群から選択され、たとえば以下のものが含まれる：

(Endo)-3-(2-メトキシ-2,2-ジ-チオフェン-2-イル-エチル)-8,8-ジメチル-8-アゾニアビシクロ[3.2.1]オクタンヨージド；

3-((Endo)-8-メチル-8-アザビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,2-ジフェニル-プロピオニトリル；

(Endo)-8-メチル-3-(2,2,2-トリフェニル-エチル)-8-アザビシクロ[3.2.1]オクタン；

3-((Endo)-8-メチル-8-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,2-ジフェニル-プロピオンアミド；

3-((Endo)-8-メチル-8-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,2-ジフェニル-プロピオン酸；

(Endo)-3-(2-シアノ-2,2-ジフェニル-エチル)-8,8-ジメチル-8-アゾニアビシクロ[3.2.1]オクタンヨージド；

(Endo)-3-(2-シアノ-2,2-ジフェニル-エチル)-8,8-ジメチル-8-アゾニアビシクロ[3.2.1]オクタンプロマイド；

3-((Endo)-8-メチル-8-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,2-ジフェニル-プロパン-1-オール；

N-ベンジル-3-((Endo)-8-メチル-8-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクト-3-イル)-2,2-ジフェニル-プロピオンアミド；

10

20

30

40

50

(Endo) - 3 - (2 - カルバモイル - 2 , 2 - ジフェニル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンヨージド ;  
 1 - ベンジル - 3 - [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - 尿素 ;  
 1 - エチル - 3 - [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - 尿素 ;  
 N - [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - アセトアミド ;  
 N - [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - ベンズアミド ;  
 3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジ - チオフェン - 2 - イル - プロピオニトリル ;  
 (Endo) - 3 - (2 - シアノ - 2 , 2 - ジ - チオフェン - 2 - イル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンヨージド ;  
 N - [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - ベンゼンスルホンアミド ;  
 [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - 尿素 ;  
 N - [3 - ((Endo) - 8 - メチル - 8 - アザ - ビシクロ [3 . 2 . 1] オクト - 3 - イル) - 2 , 2 - ジフェニル - プロピル] - メタンスルホンアミド ; および / または  
 (Endo) - 3 - {2 , 2 - ジフェニル - 3 - [(1 - フェニル - メタノイル) - アミノ] - プロピル} - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロマイド。 ]。  
 【0176】

本発明に有用なより好ましい化合物には、

(Endo) - 3 - (2 - メトキシ - 2 , 2 - ジ - チオフェン - 2 - イル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンヨージド ;  
 (Endo) - 3 - (2 - シアノ - 2 , 2 - ジフェニル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンヨージド ;  
 (Endo) - 3 - (2 - シアノ - 2 , 2 - ジフェニル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロマイド ;  
 (Endo) - 3 - (2 - カルバモイル - 2 , 2 - ジフェニル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンヨージド ;  
 (Endo) - 3 - (2 - シアノ - 2 , 2 - ジ - チオフェン - 2 - イル - エチル) - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンヨージド ; および / または  
 (Endo) - 3 - {2 , 2 - ジフェニル - 3 - [(1 - フェニル - メタノイル) - アミノ] - プロピル} - 8 , 8 - ジメチル - 8 - アゾニアビシクロ [3 . 2 . 1] オクタンプロマイド  
 が含まれる。

【0177】  
 適切な抗ヒスタミン (H1 - 受容体拮抗剤とも呼ばれる) には、H1 - 受容体を阻害し、ヒトでの使用が安全である、数々の既知の拮抗剤の任意の1つまたは複数が含まれる。第一世代拮抗剤には、エタノールアミン、エチレンジアミン、およびアルキルアミンの誘導体、たとえばジフェニルヒドラミン、ピリラミン、クレマスチン、クロロフェニラミンが含まれる。非鎮痛性である第二世代拮抗剤には、ロラチジン、デスロラチジン (desloratidine)、テルフェナジン、アステミゾール、アクリバスチン、アゼラスチン、レボセチリジン、フェキソフェナジンおよびセチリジンが含まれる。

【0178】  
 好ましい抗ヒスタミンの例には、ロラチジン、デスロラチジン、フェキソフェナジンお

およびセチリジンが含まれる。

【0179】

意図される他の組合せには、抗IL-4剤（たとえばパソコリズマブ（p a s c o l i z u m a b）などの抗IL-4抗体）および／または抗IL-5剤（たとえばメポリズマブなどの抗IL-5抗体）および／または抗IgE剤（オマリズマブ（X o l a i r（商標））もしくはタリズマブなどのたとえば抗IgE抗体）と組み合わせた本発明の抗体の使用が含まれる。

【0180】

便利なことに、本発明の抗体またはその抗原結合断片の一部分のキットを、このような別の医薬品、および所望により使用説明書と共に含む医薬組成物も、本発明によって意図される。

10

【0181】

本発明はさらに、hIL-13とhIL-13Rとの相互作用の変調に対して応答性を有する疾患の治療で用いるための本明細書中に記載したモノクローナル治療用抗体またはその抗原結合断片を治療上有効な量で含む医薬組成物を意図する。

【0182】

本発明によれば、配列番号11、12、13、14からなる群から選択されたVHドメインおよび配列番号15、16からなる群から選択されたVLドメインを含むモノクローナルヒト化治療用抗体を治療上有効な量で含む医薬組成物を提供する。

20

【0183】

本発明によれば、配列番号18、19、20、21からなる群から選択された重鎖および配列番号22、23からなる群から選択された軽鎖を含むモノクローナル治療用抗体を含む医薬組成物を提供する。

【0184】

本発明によれば、配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖ならびに医薬上許容される担体を含むモノクローナル治療用抗体を含む医薬組成物を提供する。

【0185】

本発明によれば、配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖ならびに医薬上許容される担体を含む（またはそれから本質的になる）モノクローナル抗体を含む医薬組成物を提供する。

30

【0186】

本発明によれば、医薬上許容される担体ならびに配列番号18の重鎖および配列番号22の軽鎖を含む治療用抗体のモノクローナル集団を治療上有効な量で含む医薬組成物を提供する。

【0187】

## 5. 臨床的使用

本発明の抗体は、アトピー性疾患／障害および慢性炎症性疾患／障害の治療に使用し得る。特に興味深いのは、アレルギー性喘息、特に重篤な喘息（すなわち副腎皮質ステロイドの全身投与を含めた現在の治療に無応答の喘息；B u s s e W Wら、J A l l e r g y C l i n . I mm u n o l 、2 0 0 0 、1 0 6 : 1 0 3 3 ~ 1 0 4 2 参照）、「難治性」喘息（処方された吸入ステロイドの最大推奨用量にもかかわらず制御の達成に至らないことによって特徴づけられる喘息の表現型として定義される、B a r n e s P J (1998)、E u r R e s p i r J 、1 2 : 1 2 0 8 ~ 1 2 1 8 )、「ブリットル」喘息（高用量の吸入ステロイドにもかかわらず広い最大呼気流量（P E F）の変動を維持している、重篤かつ不安定喘息に罹患している患者のサブグループを定義する、A y r e s J G ら (1998) T h o r a x 、5 8 : 3 1 5 ~ 3 2 1 参照）、夜間喘息、月経前喘息、ステロイド耐性喘息（W o o d c o c k A J (1993) E u r R e s p i r J 、6 : 7 4 3 ~ 7 4 7 参照）、ステロイド依存性喘息（高用量の経口ステロイドでのみ制御することができる喘息と定義される）、アスピリン誘導性喘息、成人発症喘息、小児喘息などの喘息の治療におけるその使用である。本発明の抗体は、急性の喘息の発症（

40

50

喘息状態)を予防する、その頻度を減らす、またはその影響を緩和させるために用い得る。また、本発明の抗体は、喘息の治療に用いられる他の医薬品の必要な投薬を減らすため(投与量または投薬頻度のいずれに関しても)にも用い得る。たとえば、本発明の抗体は、副腎皮質ステロイド治療などの喘息のステロイド治療に必要な投薬を減らすために用い得る(「ステロイド節約」)。本発明の抗体を用いて治療し得る他の疾患または障害には、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、クローン病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、好酸球性食道炎、特発性肺線維症などの線維性疾患または障害、進行性全身性硬化症(強皮症)、肝線維症、肝肉芽腫、住血吸虫症、リーシュマニア症、および細胞周期調節疾患、たとえばホジキン病、B細胞慢性リンパ性白血病が含まれる。本発明の抗体を用いて治療し得るさらなる疾患または障害は、上記の背景技術セクションに詳述されている。

10

#### 【0188】

本発明の一実施形態では、副腎皮質ステロイドを用いた治療に不応性である喘息状態に冒されたヒト患者の治疗方法であって、前記患者に治療上有効な量の本発明の抗体を投与する工程を含む方法を提供する。

#### 【0189】

別の実施形態では、患者に治療上有効な量の本発明の抗体を投与する工程を含む、ヒト患者において急性の喘息発作を予防する方法を提供する。

#### 【0190】

別の実施形態では、患者に治療上有効な量の本発明の抗体を投与する工程を含む、ヒト患者において急性の喘息発作の頻度を軽減させるおよび/またはその影響を緩和させる方法を提供する。

20

#### 【0191】

本発明の別の実施形態では、患者に治療上有効な量の本発明の抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、ヒト患者において炎症性および/またはアレルギー性傷害のあとにTヘルパー細胞の応答をTh1型の応答に偏らせる方法を提供する。

#### 【0192】

本発明の別の実施形態では、Q130hIL-13変異体を有する、重篤な喘息などの喘息に冒されているヒト患者を治療する方法であって、前記患者に治療上有効な量の本発明の抗体またはその抗原結合断片を投与する工程を含む方法を提供する。

#### 【0193】

30

本発明を主にヒトの疾患または障害の治療に関して記述したが、本発明は非ヒト哺乳動物の類似した疾患または障害の治療においても用途を有し得る。

#### 【0194】

以降、本発明を例のみとして記載する。

#### 【実施例】

#### 【0195】

1. モノクローナル抗体の產生およびマウスモノクローナル抗体6A1の特徴づけ  
モノクローナル抗体(mAb)は、一般にE HarlowおよびD Lane、抗体実験室の手引き(Antibodies a Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory、1988に記載の方法に従って、ハイブリドーマ細胞によって產生される。マウス骨髄腫細胞と標的抗原で免疫化したマウス由来のBリンパ球との融合の結果。ハイブリドーマ細胞は骨髄腫融合パートナーによって不死化される一方で、抗体を產生する能力がBリンパ球によって提供される。

40

#### 【0196】

それぞれ2μgの大腸菌由来の組換えヒトIL-13(Cambridge Bioscience、カタログ番号CH-013)に腹腔内注射を行うことによって、5匹のSJLマウスの免疫化を行った。マウスにおいて高力価の抗ヒトIL-13抗体免疫応答を発生させるために免疫化計画を用いた。64日間にわたる5回の免疫化ののち、マウスを選び抜き、脾臓細胞を収穫した。3匹のマウスの脾臓細胞を取り出し、PEG1500(

50

*Boehringer*)を用いてBリンパ球をP3X細胞由来のマウス骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを作製した。限界希釈によって個々のハイブリドーマ細胞系のクローニングを行った(E HarlowおよびD Lane、上記)。単一のコロニーを含むウェルを顕微鏡で同定し、上清を活性について試験した。最も活性のあるクローンからの細胞を、冷凍保存、抗体産生などのために拡張した。

#### 【0197】

最初に、ハイブリドーマの上清を、大腸菌で発現させた、組換えdet-1でタグ付けしたヒトIL-13タンパク質(所内で作製)に対する結合活性について、サンドイッチアッセイ様式でスクリーニングを行った。これらの陽性物の二次スクリーニングは、det-1でタグ付けしたヒトIL-13タンパク質に対する結合を検出するためのBIAcore(商標)方法を用いて完了した。その後、これらのハイブリドーマからの試料を、大腸菌で発現させた組換えヒトIL-13(Cambridge Bioscience、カタログ番号CH-013)の生物活性を中和する能力について、TF-1細胞バイオアッセイで試験した。

#### 【0198】

ヒトIL-13中和バイオアッセイから同定された6つの陽性を限界希釈によってローニングして、安定したモノクローナル細胞系を作製した。無血清条件下で細胞工場において増殖させたこれらのハイブリドーマからの免疫グロブリンを、固定タンパク質Aカラムを用いて精製した。その後、以下のアッセイ系でこれらの精製したmAbの再スクリーニングを行った;

10

#### 【0199】

- 大腸菌で発現させた組換えヒトIL-13への結合(サンドイッチELISA様式で)
- 大腸菌で発現させた、組換えdet-1でタグ付けしたヒトIL-13の、両方のIL-13受容体鎖への結合の阻害(サンドイッチELISA様式で)
- 大腸菌で発現させたヒトまたはカニクイザルの組換えIL-13の中和(TF-1細胞バイオアッセイで)

20

- 哺乳動物で発現させたヒトIL-13の中和(TF-1細胞バイオアッセイで)
- 大腸菌で発現させた組換えQ130ヒトIL-13変異体の中和(TF-1細胞バイオアッセイで)
- 抗IL-4ELISAにおけるヒトIL-4に対するmAb交差反応性の評価、およびIL5中和バイオアッセイにおけるヒトIL5に対するmAb交差反応性の評価による、ヒトIL-13への結合の特異性
- ヒトIL-13に対する結合親和性測定値のBIAcore(商標)解析

30

#### 【0200】

モノクローナル抗体6A1は、ヒトおよびカニクイザルIL-13の生物活性をどちらも中和する抗体として同定された。以下の解析は、これらのアッセイにおけるモノクローナル抗体6A1のプロフィールを記載している。

#### 【0201】

1.1 大腸菌で発現させた組換えヒトIL-13への結合

6A1はサンドイッチELISAにおいて大腸菌で発現させた組換えヒトIL-13を結合し、方法は実質的にセクション7に記載したとおりである。図1参照。

40

#### 【0202】

1.2 ELISA様式での、大腸菌で発現させた、組換えdet-1でタグ付けしたヒトIL-13の、IL-13R-1およびIL-13R-2に対する結合の阻害

6A1は、大腸菌で発現させた、組換えdet-1でタグ付けしたヒトIL-13の、両方のヒトIL-13受容体鎖への結合を阻害した。さらに、これは市販の抗ヒトIL-13ポリクローナルおよび抗ヒトIL-13モノクローナル抗体試薬(R&D Systemsから供給)よりも有効に結合を阻害した。モノクローナル抗体6A1による、ヒトIL-13R-1に対するヒトIL-13の結合の阻害について、 $0.165\mu\text{g}/\text{ml}$ のIC<sub>50</sub>値が計算された。モノクローナル抗体6A1による、ヒトIL-13R-2に

50

対するヒトIL-13の結合の阻害について、0.056 μg/mlのIC<sub>50</sub>値が計算された。図2Aおよび2B参照。無関係の特異性の対照IgGは、検出可能な活性を有さなかった。

#### 【0203】

1.3 TF-1細胞増殖バイオアッセイにおける、大腸菌で発現させた組換えヒトおよびカニクイザルIL-13の中和

TF-1細胞は、ヒトIL-13およびカニクイザルIL-13に応答して増殖することができる。ヒトおよびカニクイザルIL-13誘発性のTF-1細胞増殖に対する抗IL-13mAbの中和能を評価するためにバイオアッセイを開発した。6A1は、TF-1細胞バイオアッセイにおいて組換えヒトおよびカニクイザルIL-13のどちらの生物活性も中和した。さらに、これは市販の抗ヒトIL-13ポリクローナルおよび抗ヒトIL-13モノクローナル抗体試薬(R&D Systemsから供給)よりも強力に、ヒトおよびカニクイザルIL-13をどちらも中和した。図3参照。

10

#### 【0204】

モノクローナル抗体6A1によるTF-1細胞バイオアッセイにおいて、5ng/mlの大腸菌で発現させた組換えヒトIL-13の生物活性の中和について0.0783 μg/mlの平均ND<sub>50</sub>値が計算された。モノクローナル抗体6A1によるTF-1細胞バイオアッセイにおいて、5ng/mlの大腸菌で発現させた組換えカニクイザルIL-13の生物活性の中和について0.04 μg/mlのND<sub>50</sub>値が計算された。[ND<sub>50</sub>(中和用量)値とは、一定濃度のIL-13に応答してTF-1細胞増殖を50%減少させるために必要なモノクローナル抗体の濃度である]。

20

#### 【0205】

1.4 TF-1細胞増殖バイオアッセイにおける哺乳動物で発現させた(CHO細胞)ヒトIL-13の中和

CHO細胞から発現させたヒトIL-13に対するモノクローナル抗体6A1の中和能をTF-1細胞増殖アッセイで評価した。ND<sub>50</sub>値によって測定すると、6A1は、哺乳動物で発現させたヒトIL-13を、市販の抗ヒトIL-13ポリクローナル試薬よりも強力に中和した。モノクローナル抗体6A1によるTF-1細胞バイオアッセイにおいて、~50ng/mlの哺乳動物で発現させたヒトIL-13の中和について0.037 μg/mlのND<sub>50</sub>値が計算された。図4参照。

30

#### 【0206】

1.5 TF-1細胞増殖バイオアッセイにおける組換えQ130ヒトIL-13変異体の中和

大腸菌で発現させた組換えQ130ヒトIL-13(Protech、カタログ番号200-13A)に対するモノクローナル抗体6A1の中和能をTF-1細胞増殖アッセイで評価した。6A1は、Q130ヒトIL-13を、市販の抗ヒトIL-13ポリクローナル試薬よりも強力に中和した。モノクローナル抗体6A1によるTF-1細胞バイオアッセイにおいて、60ng/mlのQ130ヒトIL-13の生物活性について0.11 μg/mlのND<sub>50</sub>値が計算された。図5参照。

40

#### 【0207】

1.6 ヒトIL-13への結合に対する特異性

ヒトIL-4は構造的にも機能的にもヒトIL-13と最も同一性を共有しているので、ヒトIL-13に対するモノクローナル抗体6A1の特異性をヒトIL-4結合ELISAで評価した。6A1は大腸菌で発現させた組換えヒトIL-4と検出可能に結合せず、これは、ヒトIL-13に対するこのモノクローナル抗体の高レベルの特異性を示している。さらに、6A1は、TF-1細胞バイオアッセイにおいて大腸菌で発現させた組換えヒトIL5の生物活性を検出可能に交差中和しなかった。図6および7参照。

#### 【0208】

1.7 BIACore(商標)解析

組換えヒトおよびカニクイザルIL-13に対する6A1の親和性をBIACore(

50

商標) 解析によって評価した。表 1 参照。

### 【0209】

#### 【表 2】

I L 1 3 試料	オン速度 K <sub>a</sub> (1/M s)	オフ速度 K <sub>d</sub> (1/s)	親和定数 (K D)
d e t - 1 タグ化ヒト I L 1 3	2. 2 5 x 1 0 <sup>6</sup>	7. 2 x 1 0 <sup>-5</sup>	3 2 p M
ヒト I L 1 3 (CA)	6. 8 2 x 1 0 <sup>5</sup>	1. 8 4 x 1 0 <sup>-4</sup>	2 7 0 p M
カニクイザル I L 1 3 (C)	9. 1 4 x 1 0 <sup>5</sup>	5. 6 x 1 0 <sup>-5</sup>	6 1. 2 p M
A)			10

### 【0210】

これらのデータは、6 A 1 がヒトおよびカニクイザル I L - 1 3 のどちらに対しても親和性を有することを示している。[2つの異なるヒト I L - 1 3 試料(どちらも大腸菌で产生)をこの解析に用いた。I L - 1 3 は大腸菌内で产生させた場合に実質的に不溶性であるが、溶解させ、その後 in vitro で再折畳みを行うことができる。2つの再折畳みを行った I L - 1 3 試料の品質の差により、これらのヒト I L - 1 3 試料のそれぞれの結合親和性の差が説明され得る]。

### 【0211】

#### 2. クローン 6 A 1 の可変領域のクローニング

20

全 R N A をクローン 6 A 1 ハイブリドーマ細胞から抽出し、ネズミリーダー配列および事前に決定したアイソタイプ (I g G 1 / ) に従った抗体定常領域に特異的なプライマーを使用した逆転写によって、重ならびに軽可変ドメインの c D N A を作製した。その後、配列決定のために可変重および軽ドメインの c D N A をベクター p C R 2 . 1 内にクローニングした。

### 【0212】

#### 2. 1 R N A 抽出

P r o m e g a の S V 全 R N A 単離システムを用いて、製造者の指示に従って、ハイブリドーマクローン 6 A 1 の約 1 0<sup>6</sup> 個の細胞のペレットから、全 R N A を抽出した。

30

### 【0213】

#### 2. 2 逆転写

ネズミリーダー配列およびネズミ I g G 1 / 定常領域に特異的なプライマーを使用して、R N A を逆転写して可変重および軽ドメインの c D N A を作製した。用いたプライマー混合物は、J o n e s S T およびB e n d i g MM、B i o / t e c h n o l o g y、9 : 8 8 ~ 8 9 (1 9 9 1) に記載されている。

### 【0214】

ネズミ V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> リーダー配列順方向プライマーのプールを 5 0 μ M で調製した。ネズミ I g G 1 および 定常領域逆方向プライマーの溶液も 5 0 μ M で調製した。

### 【0215】

#### 2. 3 逆転写 P C R (R T - P C R)

40

可変重および軽領域をコードしている R N A の逆転写は、P r o m e g a の A c c e s s R T - P C R システムを用いて、製造者の指示に従って、2 つ組で実施した。V H および V L 順方向および逆方向プライマーは上述のとおりである。

### 【0216】

#### 2. 4 R T - P C R 産物のゲル精製

R T - P C R (2 × V<sub>H</sub> および 2 × V<sub>L</sub>) の産物を、ゲルローディング溶液中で 0 . 0 1 % 臭化エチジウムを含む調製用 1 % アガロースゲルに載せ、T A E 緩衝液中で 1 0 0 V 、1 時間流し、V 領域のバンドを切除した。V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> バンドの同定を可能にするために、1 0 0 b p D N A ラダーもゲル上に流した。

### 【0217】

50

QiagenのQIAquick（商標）ゲル抽出キットを用いて、製造者の指示に従って、DNA断片をゲルから抽出および精製した。

【0218】

2.5 ライゲーション

In vitroのTAクローニングキットを用いて、製造者の指示に従って、精製したRT-PCR断片（ $2 \times V_H$  および  $2 \times V_L$ ）をpCR2.1ベクター内にクローニングした。

【0219】

2.6 形質転換

ライゲーションしたプラスミドをTAクローニングキットの指示書に従ってTOP10 F'細胞内に形質転換させた。50 μl および 200 μl の形質転換細胞を 100 μg / ml のアンピシリンを含む L-寒天プレートに広げ、8 μl の 500 mM の IPTG 溶液および DMF 中の 16 μl の 50 mg / ml x-Gal 溶液でコーティングした。プレートを終夜 37 度でインキュベーションを行った。

【0220】

2.7 配列決定

コロニーを選択し、100 μg / ml のアンピシリンを添加した 5 ml の LB 培地中で、終夜 37 度で培養した。

【0221】

Qiagen QIAprep Spin Miniprep キットを用いて、製造者の指示に従って、6A1のV<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを含む pCR2.1 プラスミドを抽出および精製した。プライマー T7、M13 順方向および M13 逆方向を用いて V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインの配列決定を行った。

【0222】

6A1のV<sub>H</sub> の領域のアミノ酸配列（2回の RT-PCR 反応からの 10 個のクローンの一一致）：

配列番号 7

【0223】

6A1のV<sub>L</sub> の領域のアミノ酸配列（2回の RT-PCR 反応からの 10 個のクローンの一一致）：

配列番号 8

【0224】

3. キメラ抗体

親ネズミ V 領域からなるキメラ抗体（セクション 2.7 に記載）をヒト IgG1 / k 野生型 C 領域上に移植した。これは、正しいネズミ V 領域のクローニングを確認するため、およびヒト化構築体を試験する際の参照として用いるように設計した。キメラ抗体を CHO 細胞中で発現させ、精製し、ELISA によってヒト IL-13 への結合を試験した。

【0225】

3.1 PCR 増幅

クローニングしたネズミ V 領域を PCR によって増幅して、哺乳動物発現ベクター内へのクローニングに必要な制限部位、すなわち R1d および R1n を導入した。HindIII および SpeI 部位は、V<sub>H</sub> ドメインの枠となり、ヒト 1 野生型 C 領域を含む修飾した R1d ベクター内へのクローニングを可能にするように設計した。HindIII および BsiWI 部位は、V<sub>L</sub> ドメインの枠となり、ヒト C 領域を含む修飾した R1n ベクター内へのクローニングを可能にするように設計した。

【0226】

V<sub>H</sub> 順方向プライマー：

【化3】

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA ATG CAG CTG GGT CAT C-3' (配列番号 86)

10

20

30

40

50

H i n d I I I 制限部位に下線を引き、コザック配列を太字で示した。

【0227】

V<sub>H</sub> 逆方向プライマー：

5'-GAT GGA CTA GTG TTC CTT GAC CCC AGT A -3' (配列番号 8 7 )

S p e I 制限部位に下線を引いた。

【0228】

V<sub>L</sub> 順方向プライマー：

【化4】

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GAA GTT GCC TGT TAG GCT G-3' (配列番号 8 8 )

10

H i n d I I I 制限部位に下線を引き、コザック配列を太字で示した。

【0229】

V<sub>L</sub> 逆方向プライマー：

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA GCT TGG TGC C-3' (配列番号 8 9 )

B s i W I 制限部位に下線を引いた

【0230】

【表3】

P C R反応	水	6 6 $\mu$ l	
	1 0 x P C R 緩衝液	1 0 $\mu$ l	
	d N T P (2 mM)	1 0 $\mu$ l	
	プライマー1 (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ l	
	プライマー2 (5 $\mu$ M)	4 $\mu$ l	
	A m p l i T a q ポリメラーゼ	2 $\mu$ l	
	精製プラスミド	4 $\mu$ l	
	全容量	1 0 0 $\mu$ l	

20

【0231】

プライマー1：V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> 順方向プライマー

プライマー2：V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> 逆方向プライマー

30

【0232】

精製したプラスミド：Q i a g e n M i n i p r e p s (2 0 0 ×に希釈) によって精

製したp C R 2 . 1 V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> プラスミド

【0233】

【表4】

P C Rサイクル：1 ~ 9 5 °Cで4分間	
2 ~ 9 5 °Cで1分間	
3 ~ 5 5 °Cで1分間	
4 ~ 7 2 °Cで1分間	
5 ~ 7 2 °Cで7分間	

40

工程2 ~ 4：3 0回繰り返した

【0234】

3 . 2 哺乳動物発現ベクター内へのクローニング

Q i a g e n のM i n i E l u t e P C R 精製キットを用いて、製造者の指示に従って  
、P C R 産物を精製した。

【0235】

V<sub>H</sub> P C R 産物およびR l d h C 1 w t 哺乳動物発現ベクターをH i n d I I I -  
S p e I で消化した：

50

## 【表5】

10×緩衝液 (NE緩衝液2)	5 μl
B S A 1 0 0 × (N E B)	0. 5 μl
D N A	5 μl
H i n d I I I (P r o m e g a)	2 μl
S p e I (N E B)	2 μl
水	3 5. 5 μl
全容量	5 0 μl

## 【0236】

10

D N A : 精製したV<sub>H</sub> P C R 産物またはR l d h C 1 w t ベクター (0. 2 5 m g / m l )

2時間37でインキュベーションを行った。

## 【0237】

V<sub>L</sub> P C R 産物およびR l n h C 哺乳動物発現ベクターをH i n d I I I - B s i W I で消化した :

## 【表6】

10×緩衝液 (NE緩衝液2)	5 μl
D N A	5 μl
H i n d I I I (P r o m e g a)	2 μl
水	3 8 μl
全容量	5 0 μl

20

## 【0238】

D N A : 精製したV<sub>L</sub> P C R 産物またはR l n h C ベクター (0. 2 5 m g / m l )

2時間37でインキュベーションを行った。2 μl のB s i W I (N E B) を加え、2時間55でインキュベーションを行った。

## 【0239】

30

制限消化の産物をゲルローディング溶液中で0. 0 1 %臭化工チジウムを含む調製用1%アガロースゲル上に載せ、T A E 緩衝液中で1 0 0 V、1時間流し、R l d およびR l n ベクターならびにV<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> P C R 断片のバンドを切除した。V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> およびベクターのバンドの同定を可能にするために、1 0 0 b p D N A ラダーもゲルに流した。Q i a g e n のQ I A q u i c k ゲル抽出キットを用いて、製造者の指示に従って、D N Aをゲルから抽出および精製した。

## 【0240】

H i n d I I I - S p e I で消化したV<sub>H</sub> P C R 断片を、H i n d I I I - S p e I で消化したR l d h C 1 w t ベクター内にライゲーションした。H i n d I I I - B s i W I で消化したV<sub>L</sub> P C R 断片を、H i n d I I I - B s i W I で消化したR l n h C ベクター内にライゲーションした。ライゲーションは、P r o m e g a のL i g a F a s t 迅速D N A ライゲーションシステムを用いて、製造者の指示に従って実施し、以下を得た :

40

## 【0241】

V<sub>H</sub> : ベクター : R l d h C 1 w t 、H i n d I I I - S p e I で消化  
挿入物 : V<sub>H</sub> P C R 断片、H i n d I I I - S p e I で消化

## 【0242】

V<sub>L</sub> : ベクター : R l n h C 、H i n d I I I - B s i W I で消化  
挿入物 : V<sub>L</sub> P C R 断片、H i n d I I I - B s i W I で消化

## 【0243】

50

ライゲーションさせた産物を D H 5 コンピテント細胞内に形質転換させた。200 μ l の D H 5 のバイアルを氷上で解凍した。50 μ l のアリコートを形質転換チューブ中で調製した。2 μ l のライゲーション混合物を加え、ピペットチップを用いて穩やかに混合し、次いで表情で30分間インキュベーションを行った。混合物を45秒間42で、振盪せずにインキュベーションを行った。その後、これを氷上に2分間移した。450 μ l のS O C 培地を加え、チューブを1時間37で、振盪インキュベーター上でインキュベーションを行った。100 μ l の培養物を100 μ g / m l のアンピシリンを添加したL - 塞天プレート上に広げ、終夜37でインキュベーションを行った。

## 【0244】

## 3.3 配列決定

V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> クローンを100 μ g / m l のアンピシリンを添加した5 m l のL B 培地中で終夜、37で培養した。QiagenのQIAprep Spin Miniprep Kitを用いて、製造者の指示に従って、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインをそれぞれ含むR1d および R1n プラスミドを抽出ならびに精製した。R1d ベクター中の順方向プライマーならびにヒトC 1領域中のシグナル配列および逆方向プライマーを用いて、V<sub>H</sub> 領域の配列決定を行った。

## 【0245】

R1n ベクター中の順方向プライマーならびにヒトC 領域中のシグナル配列および逆方向プライマーを用いて、V<sub>L</sub> 領域の配列決定を行った。正しいV<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 配列を有するクローンを同定し、CHO細胞中での発現のためにプラスミドを調製した。

## 【0246】

## 3.4 CHO細胞中でのキメラ抗体の発現

6A1のV<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインをそれぞれ含むR1d および R1n プラスミドをCHO細胞内に一過的に同時形質移入させ、発現させた。產生されたキメラ抗体を、タンパク質Aセファロースのアフィニティクロマトグラフィーによって細胞培養物の上清から精製した。

## 【0247】

## 3.4.1 プラスミドの精製

R1d - 6A1V<sub>H</sub> および R1n - 6A1V<sub>L</sub> プラスミドを含むD H 5 細胞を、100 μ g / m l のアンピシリンを添加した5 m l のL B 培地中、8時間37で、振盪インキュベーター内で培養した。100 μ g / m l のアンピシリンを添加した200 m l のL B 培地中に1 m l の1日培養物を接種し、振盪インキュベーター内で終夜、37でインキュベーションを行った。QiagenのQIAfilter Plasmid Maxi Kitを用いて、製造者の指示に従って、プラスミドを抽出および精製した。エタノールペレットを200 μ l のTE緩衝液に再懸濁させ、ストック溶液の100倍希釈を行ったとの260 nmにおける吸光度によってプラスミドの濃度を測定した。

## 【0248】

## 3.4.2 形質移入

Ultra Lowウシ胎児血清および1%ペニシリン - ストレプトマイシンを添加したG1utamax - 1 添加ダルベッコMEM (DMEM) 培地中、4 × 175 cm<sup>2</sup> のBDファルコン組織培養物フラスコ内で、37でCHO細胞をコンフルエントになるまで培養した。

## 【0249】

各フラスコについて、50 m l のファルコンチューブ内で以下を加えて混合した：

8 m l のG1utamax - 1 を含むOptimem 1

20 μ g のR1d - 6A1V<sub>H</sub> 精製プラスミド

20 μ g のR1n - 6A1V<sub>L</sub> 精製プラスミド

240 μ l のボルテックス下のTransFast 形質移入試薬

## 【0250】

混合物を10 ~ 15分間、RTでインキュベーションを行った。DMEM培地をフラス

10

20

30

40

50

コから除去し、その後、混合物のボルテックスを行い、フラスコに加えた。混合物を37℃、1時間でインキュベーションを行った。32mlのOptimemをフラスコに加え、37℃で48～72時間インキュベーションを行った。

#### 【0251】

##### 3.4.3 キメラ抗体の精製

すべての175cm<sup>2</sup> フラスコからの培地をプールし、MSE Mistral 2000で1500rpm、3分間遠心分離し、上清を500mLフィルターシステム0.22μmCAに通した。Unicornソフトウェアを用いて、Amersham Biosciences Akt a Explorerで清澄にした上清から抗体を精製した。用いたカラムは、1mlのHiTrap rタンパク質AセファロースFFであった。流速は1ml/分であった。  
10

#### 【0252】

カラムを10CVのダルベッコPBSで平衡化し、その後、ポンプAによって清澄にした上清を載せた。カラムを20CVのダルベッコPBSで洗浄し、ポンプAを洗浄して液を廃棄し、上清の完全な排除を確実にするために、さらに10CVのダルベッコPBSをカラムに通した。

#### 【0253】

抗体を10CVのImmunoPure IgG溶出緩衝液(Pierce)で溶出させ、100μlの1M Trizma-HCl、pH 8.0の中和緩衝液を含む1ml画分で採取した。カラムを5CVのダルベッコPBSで再度平衡化した。  
20

#### 【0254】

溶出液画分中の抗体は、280nmにおける吸光度を10倍容量のImmunoPure IgG溶出緩衝液+1倍容量の1M Trizma-HCl、pH 8.0を含むブランク溶液に対して読み取ることによって定量し、十分な量の純粋な抗体を有する画分をプールし、100μlのアリコートで、-20℃で保存した。

#### 【0255】

##### 3.4.4 キメラ抗体の解析

上清および精製した6A1キメラ抗体(6A1c)を、ヒトおよびカニクイザルIL-13の結合ELISAで解析した。

#### 【0256】

キメラ6A1モノクローナル抗体で一過的に形質移入したCHO細胞からの上清は、サンドイッチELISAにおいて、大腸菌で発現させた組換えヒトおよびカニクイザルIL-13をどちらも結合した。精製した抗体も、サンドイッチELISAにおいて、大腸菌で発現させた組換えヒトおよびカニクイザルIL-13をどちらも結合した(データ示さず)。図8参照。  
30

#### 【0257】

カニクイザルIL-13のアミノ酸配列およびcDNA配列(シグナル配列を含む)は、それぞれ配列番号90および91として記載する。

#### 【0258】

これらの結果により、正しい6A1可変領域のクローニングが成功し、ヒトおよびカニクイザルIL-13をどちらも結合する能力を有する抗原結合キメラ抗体が產生されたことが確認された。  
40

#### 【0259】

##### 4.クローン6A1のヒト化

##### 4.1 ヒト化戦略

##### 4.1.1 マウスデータベースの検索

ペプチドデータベース(Genbank)を検索することによって、6A1のV<sub>H</sub>アミノ酸配列に対して最も高い相同性を有する12個のマウス配列およびV<sub>L</sub>アミノ酸配列に対して最も高い相同性を有する11個のマウス配列を同定した。

#### 【0260】

6 A 1 の V<sub>H</sub> アミノ酸配列を、データベース検索からの 12 個のマウス配列すべてと比較し、以下のフレームワーク残基が有意であると同定された：

## 【表 7】

位置	6 A 1 V <sub>H</sub>	マウス	出現
1 9	R	K	1 2 / 1 2
3 8	I	K	1 2 / 1 2
8 1	R	Q	1 2 / 1 2

## 【0261】

10

位置は、K a b a t 他の番号付け方式に従う。

## 【0262】

6 A 1 の V<sub>L</sub> アミノ酸配列を、データベース検索からの 11 個のマウス配列すべてと比較し、どのフレームワーク残基も有意であると同定されなかった。

## 【0263】

## 4 . 1 . 2 . ヒトデータベースの検索

ペプチドデータベースで E a s y B l a s t を用いて、6 A 1 の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> フレームワークに対して最も高い相同意を有するヒトフレームワーク配列を同定した。

## 【0264】

6 A 1 の V<sub>H</sub> について 1 組のヒト配列が同定され、その中で以下のフレームワークがヒト化のために選択された：

20

配列番号 9 2

## 【0265】

以下のフレームワーク残基が親和性を回復するために潜在的に重要であると同定され、逆突然変異を行う必要があり得る：

## 【表 8】

位置 (K a b a t 番号)	ヒト V <sub>H</sub>	6 A 1 V <sub>H</sub>
1 9	K	R
3 8	R	I
7 3	E	T
8 1	E	R

30

## 【0266】

異なる逆突然変異を有する 4 つのヒト化 V<sub>H</sub> 構築体を設計し、1 つは上述の C D R の定義に従った直鎖状の移植であり (A 1)、他は様々な逆突然変異を有する (A 2、A 3、A 4)。

## 【0267】

したがって

A 2 は A 1 + R 3 8 I であり、

40

A 3 は A 2 + E 7 3 T であり、

A 4 は A 3 + K 1 9 R + E 8 1 R である。

## 【0268】

6 A 1 の V<sub>L</sub> について 1 組のヒト配列が同定され、その中で以下のフレームワークがヒト化のために選択された：

配列番号 9 3

## 【0269】

以下の残基が親和性を回復するために潜在的に重要であると同定され、逆突然変異を行う必要があり得る：

位置 (K a b a t #) マウス 6 A 1 の V<sub>L</sub> ヒト V<sub>L</sub>

50

85

V

I

## 【0270】

2つの構築体を設計し、一方は直鎖状の移植であり（L1）、他方は逆突然変異を有する（L2）（すなわちL1+I85V）。

## 【0271】

ヒト化V<sub>H</sub>構築体A1：

配列番号11

ヒト化V<sub>H</sub>構築体A2：

配列番号12

ヒト化V<sub>H</sub>構築体A3：

10

配列番号13

ヒト化V<sub>H</sub>構築体A4：

配列番号14

ヒト化V<sub>L</sub>構築体L1：

配列番号15

ヒト化V<sub>L</sub>構築体L2：

配列番号16

## 【0272】

4.2.6 A1のヒト化

R1dおよびR1n哺乳動物発現ベクター内にクローニングするための制限部位ならびにヒトシグナル配列を含めた重複するオリゴヌクレオチドの積み重ねによって、ヒト化V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>構築体を新規に調製した。ヒト1野生型定常領域を含むR1d内へのクローニングのために、ヒトシグナル配列を含むV<sub>H</sub>ドメインの枠となるように HindIII およびSpeI制限部位を導入した。ヒト定常領域を含むR1n内へのクローニングのために、ヒトシグナル配列を含むV<sub>L</sub>ドメインの枠となるように HindIII およびBswI制限部位を導入した。

20

## 【0273】

ヒトシグナル配列：配列番号17

## 【0274】

4つのヒト化V<sub>H</sub>構築体および2つのヒト化V<sub>L</sub>構築体を設計した。この結果、8つの異なる重鎖-軽鎖の組合せが生じる。

30

## 【0275】

約18塩基の重複を有する約60塩基長の約10個のオリゴヌクレオチドを、積み重ね用に設計した。

## 【0276】

4.2.1 オリゴヌクレオチドの積み重ね

オリゴヌクレオチドのプール溶液を、5μlの各オリゴストック溶液から100μMで調製した。重複オリゴヌクレオチドの積み重ねによるヒト化V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>遺伝子の合成を、一般的に Stemmer- WPら(1995)Gene、164(1):49~53に従って、Ertl PFLら(2003)Methods、31:199~206に記載のソフトウェアを用いて、実施した。

40

## 【0277】

## 【表 9】

4. 2. 1. 1 代表的なアセンブリ PCR 反応：

水	4 1. 5 $\mu$ l
10 × Proof Start PCR 緩衝液	5 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1. 5 $\mu$ l
オリゴプール	1 $\mu$ l
Proof Start DNA ポリメラーゼ	1 $\mu$ l
全容量	50 $\mu$ l

## 【0278】

10

## 【表 10】

アセンブリ PCR サイクル： 1 ~ 94°C で 2 分間

2 ~ 94°C で 30 秒間

3 ~ 40°C で 2 分間

4 ~ 72°C で 10 秒間

5 ~ 94°C で 15 秒間

6 ~ 40°C で 30 秒間

7 ~ 72°C で 20 秒間 + 3 秒間 / サイクル

工程 4 ~ 7 を 25 回繰り返した

20

## 【0279】

4. 2. 1. 2 代表的な回復 PCR

プライマー 1 および 2 が、アセンブリ PCR で用いた最初の上部および下部のオリゴヌクレオチドであった。回復 PCR は、完全な V 遺伝子の增幅を可能にする。

## 【0280】

## 【表 11】

回復 PCR 反応：

水	4 2 $\mu$ l
10 × Proof Start PCR 緩衝液	4 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1. 5 $\mu$ l
プライマー 1 (100 $\mu$ M)	0. 5 $\mu$ l
プライマー 2 (100 $\mu$ M)	0. 5 $\mu$ l
アセンブリ PCR 反応	1 $\mu$ l
Proof Start DNA ポリメラーゼ	0. 5 $\mu$ l
全容量	50 $\mu$ l

30

## 【0281】

## 【表 12】

回復 PCR サイクル： 1 ~ 94°C で 2 分間

40

2 ~ 94°C で 45 秒間

3 ~ 60°C で 30 秒間

4 ~ 72°C で 2 分間

5 ~ 72°C で 4 分間

工程 2 ~ 4 を 25 回繰り返した

## 【0282】

Qiagen の MiniElute PCR 精製キットを用いて、製造者の指示に従って、回復 PCR の産物を精製した。

50

## 【0283】

## 4.2.2 制限消化

セクション3で同様に記載したように、ヒト化6A1のV<sub>H</sub>構築体A1、A2、A3、A4をHindIII-SpeIで消化し、ヒト化6A1のV<sub>L</sub>構築体L1、L2をHind-IIIA-BsiWIで消化した。

## 【0284】

## 4.2.3 ゲル精製

セクション3と同様に制限消化の産物を精製した。

## 【0285】

## 4.2.4 ライゲーション

HindIIIA-SpeIで消化した6A1ヒト化V<sub>H</sub>断片を、HindIIIA-SpeIで消化したR1d-hC-1wtベクター内にライゲーションした。

10

## 【0286】

HindIIIA-BsiWIで消化した6A1ヒト化V<sub>L</sub>断片を、HindIIIA-BsiWIで消化したR1n-hCベクター内にライゲーションした。

## 【0287】

ライゲーションは、PromegaのLigast迅速DNAライゲーションシステムを用いて、製造者の指示に従って実施した。

## 【0288】

## 4.2.5 形質転換

20

セクション3で既に記載した方法と同様。

## 【0289】

## 4.2.6 代表的な配列決定方法

各反応プレートからのコロニーを、100μg/mlのアンピシリンを添加した5mlのLB培地中、終夜37℃で培養した。QiagenのQIAprep Spin Miniprepキットを用いて、製造者の指示に従ってプラスミドを抽出および精製し、セクション3で既に記載したプライマーを用いて配列決定を行った。正しいヒト化V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列を有するクローニングを同定し、CHO細胞中での発現のためにプラスミドを調製した。

## 【0290】

30

## 5.ヒト化抗体の発現および特徴づけ

4つのヒト化V<sub>H</sub>構築体(A1、A2、A3、A4)ならびに2つのヒト化V<sub>L</sub>構築体(L1およびL2)をR1d-hC-1wtおよびR1n-hC哺乳動物発現ベクターにおいて調製した。8つのプラスミド重鎖-軽鎖の組合せ(A1L1、A1L2、A2L1、A2L2、A3L1、A3L2、A4L1、A4L2)をCHO細胞内に一過的に同時形質移入させ、小規模で発現させて8つの異なるヒト化抗体を得た。CHO細胞の上清中で產生された抗体をヒトIL-13結合ELISAで解析した。

## 【0291】

## 5.1 代表的なプラスミド精製方法

上述のプラスミドの1つを含むDH5<sup>+</sup>細胞を、100μg/mlのアンピシリンを添加した5mlのLB培地中、8時間37℃で、振盪インキュベーター内で培養した。100μg/mlのアンピシリンを添加した200mlのLB培地に1mlの1日培養物を接種し、振盪インキュベーター内で終夜、37℃でインキュベーションを行った。QiagenのQIAfilter Plasmid Maxiキットを用いて、製造者の指示に従って、プラスミドを抽出および精製した。エタノールペレットを200μlのTE緩衝液に再懸濁させ、ストック溶液の100倍希釈を行ったとの260nmにおける吸光度によってプラスミドの濃度を測定した。

40

## 【0292】

## 5.2 代表的な形質移入方法

Corning Costar 3506 6 - ウェルプレートの9個のウェルに10<sup>6</sup>

50

個のC H O 細胞を播種し、U l t r a L o w ウシ胎児血清および1 %ペニシリン - ストレプトマイシンを添加したG l u t a m a x - 1 添加ダルベッコM E M ( D M E M ) 培地中、37で終夜培養した。

#### 【0293】

各ウェルについて、それぞれの形質移入が異なる軽鎖と重鎖の組合せを含むように以下を5 mlのB i j o u 中で加えた：

1 mlのG l u t a m a x - 1 を含むO p t i m e m 1

5  $\mu$  gのヒト化V<sub>H</sub>保有プラスミド

5  $\mu$  gのヒト化V<sub>L</sub>保有プラスミド

30  $\mu$  gのボルテックス下のT r a n s F a s t 形質移入試薬

10

#### 【0294】

インキュベーションは10～15分間室温で行った。D M E M 培地をウェルから除去し、その後、ボルテックス混合し、適切なウェルに加えた。インキュベーションは37で1時間行った。各ウェルに2 mlのO p t i m e m を加え、37で48～72時間インキュベーションを行った。

#### 【0295】

##### 5.3 ヒト化抗体の解析

各ウェルからの培地を回収し、13000 rpmで1分間、E p p e n d o r f 5415 R ベンチ遠心分離機で遠心分離を行い、上清を0.2  $\mu$ mのP a l l A c r o d i s c 25 mmシリングフィルターに通した。E L I S Aにおいて、細胞の上清をヒトI L - 13への結合について評価した。8つのヒト化抗体すべてが、ヒトI L - 13結合E L I S Aにおいて6 A 1キメラ抗体と同様のプロフィールでヒトI L - 13と結合した。図9参照。

20

#### 【0296】

ヒト化抗体L 1 + A 1 およびL 2 + A 1 を発現のスケールアップ、精製、およびさらなる解析のために選択した。

#### 【0297】

##### 6. ヒト化抗ヒトI L - 13 抗体L 1 + A 1 およびL 2 + A 1 の評価

##### 6.1 ヒトおよびカニクイザルI L - 13 結合E L I S Aにおける活性

L 1 + A 1 およびL 2 + A 1 はスケールアップからの作製が成功し、E L I S Aによって、大腸菌で発現させたヒトおよびカニクイザルI L - 13に対する結合を評価した。図10 a および10 b ならびに表B 参照。

30

#### 【0298】

##### 【表13】

表B

	m A b	E C <sub>50</sub> ( $\mu$ g/m l)
ヒトI L - 13 結合	6 A 1 親m A b	0. 0 4 9
	キメラ6 A 1	0. 0 1 5
	L 1 + A 1	0. 0 1 8
	L 2 + A 1	0. 0 2 4
カニクイザルI L - 13 結合	6 A 1 親m A b	0. 0 3 9
	キメラ6 A 1	0. 0 1 8
	L 1 + A 1	0. 0 2 1
	L 2 + A 1	0. 0 2 8

40

#### 【0299】

L 1 + A 1 およびL 2 + A 1 はどちらも、大腸菌で発現させたヒトおよびカニクイザルI L - 13 に同様のプロフィールで結合した。E C<sub>50</sub> 値(エクセルの「R o b o s a g e」曲線当てはめ機能を用いて作成)により、結合活性がキメラ6 A 1 m A b 標準に非常に類似していることが示された。

50

## 【0300】

6.2 ネイティブ( P B M C 由来)ヒト I L - 1 3 への結合における L 1 + A 1 および L 2 + A 1 の評価

抗 C D 3 および抗 C D 2 8 で刺激した C D 4 + T h 2 細胞からの上清(ヒト P B M C 培養物から生じる)を用いて、キメラ 6 A 1 m A b、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 の、ネイティブ( P B M C 由来)ヒト I L - 1 3 への結合を評価した。E L I S A では、3つの抗体すべてが、T h 2 細胞上清において、親 6 A 1 m A b と非常に類似した性能でネイティブヒト I L - 1 3 と結合した。図 1 1 参照。

## 【0301】

さらに、T h 2 細胞の上清中に存在するネイティブヒト I L - 1 3 のレベルを決定するために、市販の試薬を用いて検量線を作成した。3つの抗体すべておよび市販の抗ヒト I L - 1 3 m A b で、T h 2 上清試料において等量の I L - 1 3 が検出された。以下の表 2 参照。

## 【0302】

## 【表 1 4】

表 2

m A b	ネイティブ I L - 1 3 (n g / m l)	
6 A 1 親 m A b	22.5	
キメラ 6 A 1	19.6	
L 1 + A 1	25.1	20
L 2 + A 1	22.7	
+ 対照の m A b	28.0	

## 【0303】

6.3 I L - 1 3 受容体結合 E L I S A における、ヒト I L - 1 3 に対する L 1 + A 1 および L 2 + A 1 の阻害活性

6 A 1 親マウス m A b、キメラ 6 A 1、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 を、競合 E L I S A において、ヒト I L - 1 3 の I L - 1 3 R 1 および I L - 1 3 R 2 の鎖に対する結合を阻害する能力について評価した。図 1 2 a および 1 2 b ならびに以下の表 3 参照。

## 【0304】

## 【表 1 5】

表 3

エライザ	m A b	I C <sub>50</sub> (μ g / m l)	
ヒト I L - 1 3 R α 1 競合	6 A 1 親 m A b	0. 0 3 9	
	キメラ 6 A 1	0. 0 3 4	
	L 1 + A 1	0. 0 4 4	
	L 2 + A 1	0. 0 5 6	
ヒト I L - 1 3 R α 2 競合	6 A 1 親 m A b	0. 0 2 0	
	キメラ 6 A 1	0. 0 4 0	
	L 1 + A 1	0. 1 1 3	40
	L 2 + A 1	0. 1 1 7	

## 【0305】

すべての抗体が、大腸菌で発現させた d e t - 1 でタグ付けしたヒト I L - 1 3 のヒト I L - 1 3 R 1 に対する結合を同様のプロフィールで阻害した。同様に、すべての抗体が、大腸菌で発現させた d e t - 1 でタグ付けしたヒト I L - 1 3 のヒト I L - 1 3 R 2 に対する結合を阻害したが、このアッセイでは L 1 + A 1 および L 2 + A 1 の効力が一部低下していた(I C<sub>50</sub> 値はエクセルの「R o b o s a g e」曲線当てはめ機能を用いて作成した)。

## 【0306】

10

20

30

40

50

## 6.4 L1+A1およびL2+A1のヒトIL-13への結合の親和性評価

ヒトIL-13に対するL1+A1およびL2+A1の結合動力学を、BIAcore（商標）システムを用いて評価した。用いた方法には以下のセクション7を参照されたい。

## 【0307】

解析1：

ヒトおよびカニクイザルIL-13（大腸菌で発現させたタンパク質）のどちらについても完了した。引用したKD値は、5つの異なるIL-13濃度曲線（3つ組で行った）の平均である。この解析では質量移動問題が明らかであり、変更した実験プロトコル（この問題を訂正するため）を解析4（質量移動問題が存在しない）で完了したことによれば、表4参照。

## 【0308】

## 【表16】

表4

IL-13試料	mAb	オン速度 ka (Ms <sup>-1</sup> )	オフ速度 kd (s <sup>-1</sup> )	親和定数 KD (pM)
ヒトIL-13	6A1親mAb	1.96×10 <sup>6</sup>	6.78×10 <sup>-5</sup>	35
	キメラ6A1	4.64×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>-5</sup>	43
	L1+A1	5.07×10 <sup>5</sup>	1.55×10 <sup>-4</sup>	300
	L2+A1	5.07×10 <sup>5</sup>	1.56×10 <sup>-4</sup>	310
カニクイザルIL-13	6A1親mAb	9.14×10 <sup>5</sup>	5.6×10 <sup>-5</sup>	61
	キメラ6A1	5.92×10 <sup>5</sup>	3.27×10 <sup>-5</sup>	55
	L1+A1	4.46×10 <sup>5</sup>	1.55×10 <sup>-5</sup>	35
	L2+A1	5.77×10 <sup>5</sup>	5.58×10 <sup>-5</sup>	97

## 【0309】

解析2：

ヒトIL-13（大腸菌で発現させたタンパク質）のL1+A1に対する結合について完了した。表5参照。

## 【0310】

## 【表17】

表5

IL-13試料	mAb	オン速度 ka(Ms-1)	オフ速度 kd(s-1)	親和定数 KD(pM)
ヒトIL-13	L1+A1	4.66×10 <sup>5</sup>	6.95×10 <sup>-5</sup>	149

## 【0311】

解析3：

16量体のビオチン標識したヒトIL-13、ペプチド数24について完了した（親mAb 6A1の直鎖状結合エピトープとして同定、セクション6.7参照）。ペプチドリガンドへの結合について得られた絶対KD値が全タンパク質標的への結合において見られるものと全く異なることに注目されたい。しかし、キメラ6A1とL1+A1との間に約3倍の親和性の低下を示す点で、このデータは全タンパク質のデータおよびIL-13中和データ（TF-1バイオアッセイ）と矛盾がないと考えられている。表6参照。

## 【0312】

## 【表18】

表6

I L - 1 3 試料	m A b	オン速度 k a (M s <sup>-1</sup> )	オフ速度 k d (s <sup>-1</sup> )	親和定数 KD (nM)
ペプチド 2 4	6 A 1 親 m A b	2. 95 x 1 0 <sup>5</sup>	9. 15 x 1 0 <sup>-4</sup>	3. 11
	キメラ 6 A 1	2. 57 x 1 0 <sup>5</sup>	9. 19 x 1 0 <sup>-4</sup>	3. 58
	L 1 + A 1	1. 95 x 1 0 <sup>5</sup>	1. 7 x 1 0 <sup>-3</sup>	9. 03
	L 2 + A 1	1. 79 x 1 0 <sup>5</sup>	1. 67 x 1 0 <sup>-3</sup>	9. 35

10

## 【0313】

解析4:

ヒトおよびカニクイザル I L - 1 3 (大腸菌で発現させたタンパク質) のどちらについても完了。引用した KD 値は、5つの異なる I L - 1 3 濃度曲線 (3つ組で行った) の平均である。このデータ組では質量移動問題が見られないことに注目されたい。表7 参照。

## 【0314】

## 【表19】

表7

I L - 1 3 試料	m A b	オン速度 k a (M s <sup>-1</sup> )	オフ速度 k d (s <sup>-1</sup> )	親和定数 KD (pM)
ヒト I L - 1 3	キメラ 6 A 1	1. 05 x 1 0 <sup>6</sup>	4 x 1 0 <sup>-5</sup>	38
	L 1 + A 1	8. 24 x 1 0 <sup>5</sup>	1. 4 x 1 0 <sup>-4</sup>	170
	L 2 + A 1	9. 07 x 1 0 <sup>5</sup>	1. 39 x 1 0 <sup>-4</sup>	153
カニクイザル I L - 1 3	キメラ 6 A 1	8. 85 x 1 0 <sup>5</sup>	2. 65 x 1 0 <sup>-5</sup>	30
	L 1 + A 1	7. 3 x 1 0 <sup>5</sup>	5. 86 x 1 0 <sup>-5</sup>	80
	L 2 + A 1	7. 72 x 1 0 <sup>5</sup>	4. 25 x 1 0 <sup>-5</sup>	55

20

## 【0315】

結果は、ヒト化構築体 L 1 + A 1 と L 2 + A 1 とで有意な差が存在しないことを示している。

30

## 【0316】

L 1 + A 1 は、約 168 pM のヒト I L - 1 3 に対する親和性を示している。動力学は、例外的に遅いオフ速度によって支配されており、これは抗体の有意な中和活性から予測されるものである。会合定数  $k_{on}$  のデータは一貫して  $6 \times 1 0^5 M^{-1} s^{-1}$  付近である。解離定数  $k_{off}$  の推定値にはよりばらつきがあり、 $1.4 \times 1 0^{-4} \sim 8.22 \times 1 0^{-5} s^{-1}$  の範囲にわたり、遅いオフ速度の正確な定量を得ることの技術的な挑戦を反映している。

## 【0317】

6.5 I L - 1 3 中和バイオアッセイにおける L 1 + A 1 および L 2 + A 1 の活性  
in vitro T F - 1 細胞バイオアッセイにおいて、6 A 1 親マウス m A b、キメラ 6 A 1、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 を I L - 1 3 中和活性について評価した (このバイオアッセイが、I L - 1 3 の生物活性を評価するため、および市販の抗 I L - 1 3 抗体の中和能を評価するための業界標準である)。大腸菌で発現させたヒト I L - 1 3、大腸菌で発現させたカニクイザル I L - 1 3、大腸菌で発現させた Q 130 ヒト I L - 1 3 (喘息関連変異体)、および哺乳動物 C H O 細胞で発現させたヒト I L - 1 3 を含めたいつかの I L - 1 3 変異体をこのアッセイで評価した (注記: T h 2 細胞上清は T F - 1 細胞を増殖させることができる他のサイトカインも含むので、この試料中のネイティブヒト I L - 1 3 はこのバイオアッセイで用いることができない)。図 13 a、13 b、13 c および 13 d 参照。

40

50

## 【0318】

試験したすべての抗体が、このバイオアッセイ系のすべてのIL-13変異体の生物活性を中和した；各IL-13変異体に対する各抗体の中和能を決定し、ND<sub>50</sub>値として表した。表8参照

## 【0319】

## 【表20】

表8

IL-13変異体

mA b

2アッセイの平均ND<sub>50</sub>  
(μg/m1)

イー・コリ発現のヒトIL-13	キメラ6A1	0. 119	10
	L1+A1	0. 428	
	L2+A1	0. 608	
	6A1親mA b	0. 193	
イー・コリ発現のカニクイザルIL-13	キメラ6A1	0. 059	20
	L1+A1	0. 078	
	L2+A1	0. 120	
	6A1親mA b	0. 078	
イー・コリ発現のQ130ヒトIL-13	キメラ6A1	0. 128	20
	L1+A1	0. 438	
	L2+A1	0. 705	
	6A1親mA b	0. 213	
CHO発現のヒトIL-13	キメラ6A1	0. 285	
	L1+A1	0. 975	
	L2+A1	1. 200	
	6A1親mA b	0. 440	

## 【0320】

注記：このアッセイにおいてTF-1細胞を同程度増殖させるために異なる量の各IL-13変異体が必要であるため、1つの特定の抗体によって生じたND<sub>50</sub>値を用いた各IL-13変異体にわたって比較することが望ましい可能性がある。しかし、各抗体によって生じたND<sub>50</sub>値を単一のIL-13変異体について比較することは妥当である。

30

## 【0321】

一般に、親6A1 mA bおよびキメラ6A1によって達成された中和レベルは同様であり、親mA bとキメラとの間に検出可能な効力の損失は示されなかった。しかし、L1+A1およびL2+A1の効力は、親6A1 mA bおよびキメラ6A1のどちらにおいても、試験したそれぞれ個別のIL-13変異体で平均して約3～4倍、測定可能に低下していた。これらのデータはBIAcore（商標）評価から得られたものと一致している。

## 【0322】

6.6 ヒトIL-13への結合に対するL1+A1およびL2+A1の特異性

40

ヒトIL-13に対するL1+A1およびL2+A1の特異性は、結合ELISAにおけるヒトIL-4およびヒトGM-CSFに対する交差反応性の潜在性の解析によって評価した。図14aおよび14b参照。

## 【0323】

これらのmA bはIL-13に対する結合に特異的であることが判明しており、30 μg/m1までのmA b濃度でヒトIL-4またはヒトGM-CSFに対する交差反応性が存在しない。さらに、これらのmA bはIL5バイオアッセイにおいてヒトIL5の生物活性を交差中和しなかった。図14c参照。

## 【0324】

6.7 ピオチン標識したペプチドを用いた6A1のエピトープマッピング

50

ヒトIL-13およびカニクイザルIL-13タンパク質を変性SDS-PAGEゲルに流した。マウスマAb 6A1を用いたウエスタンプロットティングにより、ヒト(大腸菌で発現させた、所内)およびカニクイザル(大腸菌で発現させた、所内)IL-13タンパク質のどちらにおいても予想された大きさのバンドが検出された。恐らくは技術的故障により、6A1ではhIL-13(大腸菌で発現させた、Cambridge Bioscience)が検出されなかった。この解析は、mAb 6A1がヒトおよびカニクイザルIL-13配列内の直鎖状ペプチドエピトープを認識したことを示唆している(データ示さず)。

【0325】

ビオチン標識した16量体ペプチドのオフセット4は、ヒトおよびカニクイザルIL-13のどちらもの上のmAb 6A1によって認識されたB細胞エピトープの位置をマッピングするために合成した。ELISA方法を用いて固定したビオチン標識したペプチドと親mAb 6A1との結合を検出した。

10

【0326】

16量体のカスタム設計したペプチドの詳細：88×16量体、オフセット4(Mimotopes、オーストラリアにより供給)。

【0327】

様式：ペプチド25&44=ビオチン-SGSG-ペプチド-酸  
ペプチド2~24&27~43=ビオチン-SGSG-ペプチド-アミド

【0328】

20

【表21】

番号	疎水性	分子量	N-末端	配列	C-末端
2	0.42	2311.66	ビオチン-	配列番号38-NH2	
3	0.27	2453.82	ビオチン-	配列番号39-NH2	
4	0.38	2326.70	ビオチン-	配列番号40-NH2	
5	0.31	2231.58	ビオチン-	配列番号41-NH2	
6	0.43	2289.66	ビオチン-	配列番号42-NH2	
7	0.59	2190.57	ビオチン-	配列番号43-NH2	
8	0.57	2260.64	ビオチン-	配列番号44-NH2	
9	0.62*	2255.64	ビオチン-	配列番号45-NH2	10
10	0.51	2197.56	ビオチン-	配列番号46-NH2	
11	0.56	2144.52	ビオチン-	配列番号47-NH2	
12	0.46	2090.38	ビオチン-	配列番号48-NH2	
13	0.29	2219.54	ビオチン-	配列番号49-NH2	
14	0.29	2180.53	ビオチン-	配列番号50-NH2	
15	0.36	2318.70	ビオチン-	配列番号51-NH2	
16	0.32	2303.73	ビオチン-	配列番号52-NH2	
17	0.47	2209.57	ビオチン-	配列番号53-NH2	
18	0.48	2257.60	ビオチン-	配列番号54-NH2	20
19	0.17	2273.57	ビオチン-	配列番号55-NH2	
20	0.27	2300.60	ビオチン-	配列番号56-NH2	
21	0.29	2383.77	ビオチン-	配列番号57-NH2	
22	0.35	2401.83	ビオチン-	配列番号58-NH2	
23	0.45	2407.92	ビオチン-	配列番号59-NH2	
24	0.42	2541.08	ビオチン-	配列番号60-NH2	
25	0.33	2513.97	ビオチン-	配列番号61-OH	
27	0.42	2283.64	ビオチン-	配列番号62-NH2	
28	0.27	2425.81	ビオチン-	配列番号63-NH2	
29	0.57	2228.57	ビオチン-	配列番号64-NH2	30
30	0.62*	2223.57	ビオチン-	配列番号65-NH2	
31	0.51	2165.49	ビオチン-	配列番号66-NH2	
32	0.56	2112.45	ビオチン-	配列番号67-NH2	
33	0.27	2207.56	ビオチン-	配列番号68-NH2	
34	0.33	2345.73	ビオチン-	配列番号69-NH2	
35	0.29	2330.76	ビオチン-	配列番号70-NH2	
36	0.45	2236.60	ビオチン-	配列番号71-NH2	
37	0.43	2276.64	ビオチン-	配列番号72-NH2	
38	0.12	2292.62	ビオチン-	配列番号73-NH2	
39	0.22	2319.64	ビオチン-	配列番号74-NH2	40
40	0.24	2402.82	ビオチン-	配列番号75-NH2	
41	0.33	2387.80	ビオチン-	配列番号76-NH2	
42	0.43	2393.90	ビオチン-	配列番号77-NH2	
43	0.39	2527.05	ビオチン-	配列番号78-NH2	
44	0.35	2471.88	ビオチン-	配列番号79-OH	

## 【0329】

実施例：このアッセイのために設定された典型的な96ウェルプレート

【表22】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
B	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
D	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
E	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
F	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
G	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44
H	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	+VE (4)	+VE (16)	+VE (32)	-VE (4)	-VE (16)	-VE (32)	-VE (4)	-V (16)	-VE (32)

10

20

## 【0330】

N B : 数字は各ウェル中のペプチドを示す

括弧内の数字は対照抗体の希釈係数を示す

## 【0331】

96ウェルの490nmでの吸光度

【表23】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.057	0.067	0.079	0.063	0.072	0.061	0.084	0.061	0.075	0.064	0.075	0.066
B	0.068	0.070	0.105	0.065	0.075	0.072	0.071	0.070	0.064	0.061	0.062	0.063
C	0.119	0.081	0.099	0.064	0.073	0.077	0.060	0.061	0.090	0.144	2.109	2.200
D	0.115	0.129	0.141	0.060	0.090	0.063	0.104	0.078	0.076	0.135	2.148	2.210
E	0.060	0.074	0.098	0.062	0.064	0.071	0.088	0.082	0.089	0.073	0.068	0.067
F	0.082	0.078	0.071	0.062	0.056	0.057	0.084	0.067	0.090	0.074	0.063	0.056
G	0.057	0.055	0.060	0.060	0.058	0.058	0.104	0.108	2.236	2.237	2.229	2.229
H	1.499	1.197	0.739	1.548	1.209	0.976	0.077	0.080	0.072	0.072	0.082	0.103

30

## 【0332】

この結果（数回の試みの1つ）は、以下に示すようにペプチド24、25、43および44（ならびに陽性対照ペプチド）の陽性結果に相關している。図15参照。すべての試みは、ペプチド24、25、43および44が陽性であったことを実証している。

40

## 【0333】

## 【化5】

ペプチド24 : QFVKDLLLHLKKLFRE (配列番号80)

ペプチド25 : DLLLHLKKLFREGRFN (配列番号81)

ペプチド43 : QFVKDLLVHLKKLFRE (配列番号82)

ペプチド44 : DLLVHLKKLFREGQFN (配列番号83)

## 【0334】

ペプチド24および25はhIL-13に由来する。ペプチド43および44はcyn

50

○ I L - 1 3 に由来する。

【 0 3 3 5 】

さらに、キメラ 6 A 1、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 m A b は、ヒトおよびカニクイザル I L - 1 3 の両方において、すべて C 末端領域で同じ直鎖状エピトープに結合している（キメラ 6 A 1、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 m A b のデータは示さず）。

【 0 3 3 6 】

要約すると、E L I S A の結果は、親マウス m A b 6 A 1、キメラ 6 A 1、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 m A b がすべてヒト I L - 1 3 タンパク質由来の以下の配列内で結合したことを示している：

DLLLHLKKLFRE (配列番号 8 4 )

10

【 0 3 3 7 】

さらにカニクイザル I L - 1 3 タンパク質由来の以下の配列内：

【 化 6 】

DLLVHLKKLFRE (配列番号 8 5 )

【 0 3 3 8 】

N B : 太字はヒト I L - 1 3 とカニクイザル I L - 1 3 相同分子種との残基の差異を示す。

【 0 3 3 9 】

したがって、親マウス m A b 6 A 1、キメラ 6 A 1、L 1 + A 1 および L 2 + A 1 m A b は、配列番号 9 の残基 9 7 ~ 1 0 8 でヒト I L - 1 3 に免疫特異的に結合すると定められた。

20

【 0 3 4 0 】

6 . 8 ビオチン標識したペプチドを用いた 6 A 1 のエピトープ精細マッピング m A b 6 A 1 の結合エピトープは、ヒト I L - 1 3 への結合には K D L L L H L K K L F R E G、カニクイザル I L - 1 3 への結合には K D L L V H L K K L F R E G に基づいたペプチド組を用いて決定した。m A b 6 A 1 の正確な直鎖状結合エピトープを定義するために、これら親ペプチド配列（すなわち K D L L L H L K K L F R E G または K D L L V H L K K L F R E G ）の N または C 末端のどちらかから 1 個のアミノ酸が逐次的に取り除かれるようにペプチドをオーダーした。

30

【 0 3 4 1 】

固定したビオチン標識したペプチドの、親 m A b 6 A 1 への結合を検出するために E L I S A 方法を用いた。

【 0 3 4 2 】

ペプチドの識別番号（4 1 3 ~ 4 4 7 ）および対応する配列を以下に示す。

【 0 3 4 3 】

ペプチド配列：

【表24】

ペプチド番号	N-末端	配列番号	C-末端	
4 1 3	ビオチン-	配列番号 9 4	-NH 2	
4 1 4	ビオチン-	配列番号 9 5	-NH 2	
4 1 5	ビオチン-	配列番号 9 6	-NH 2	
4 1 6	ビオチン-	配列番号 9 7	-NH 2	
4 1 7	ビオチン-	配列番号 9 8	-NH 2	
4 1 8	ビオチン-	配列番号 9 9	-NH 2	
4 1 9	ビオチン-	配列番号 1 0 0	-NH 2	
4 2 0	ビオチン-	配列番号 1 0 1	-NH 2	10
4 2 1	ビオチン-	配列番号 1 0 2	-NH 2	
4 2 2	ビオチン-	配列番号 1 0 3	-NH 2	
4 2 3	ビオチン-	配列番号 1 0 4	-NH 2	
4 2 4	ビオチン-	配列番号 1 - 5	-NH 2	
4 2 5	ビオチン-	配列番号 1 0 6	-NH 2	
4 2 6	ビオチン-	配列番号 1 0 7	-NH 2	
4 2 7	ビオチン-	配列番号 1 0 8	-NH 2	
4 2 8	ビオチン-	配列番号 1 0 9	-NH 2	
4 2 9	ビオチン-	配列番号 1 1 0	-NH 2	20
4 3 0	ビオチン-	配列番号 1 1 1	-NH 2	
4 3 1	ビオチン-	配列番号 1 1 2	-NH 2	
4 3 2	ビオチン-	配列番号 1 1 3	-NH 2	
4 3 3	ビオチン-	配列番号 1 1 4	-NH 2	
4 3 4	ビオチン-	配列番号 1 1 5	-NH 2	
4 3 5	ビオチン-	配列番号 1 1 6	-NH 2	
4 3 6	ビオチン-	配列番号 1 1 7	-NH 2	
4 3 7	ビオチン-	配列番号 1 1 8	-NH 2	
4 3 8	ビオチン-	配列番号 1 1 9	-NH 2	
4 3 9	ビオチン-	配列番号 1 2 0	-NH 2	30
4 4 0	ビオチン-	配列番号 1 2 1	-NH 2	
4 4 1	ビオチン-	配列番号 1 2 2	-NH 2	
4 4 2	ビオチン-	配列番号 1 2 3	-NH 2	
4 4 3	ビオチン-	配列番号 1 2 4	-NH 2	
4 4 4	ビオチン-	配列番号 1 2 5	-NH 2	
4 4 5	ビオチン-	配列番号 1 2 6	-NH 2	
4 4 6	ビオチン-	配列番号 1 2 7	-NH 2	
4 4 7	ビオチン-	配列番号 1 2 8	-NH 2	
4 4 (対照)	ビオチン-	配列番号 7 9	-OH	

40

## 【0344】

実施例：このアッセイために設定した96ウェルプレート

【表25】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
B	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
C	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
D	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436
E	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	44
F	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	44
G	ブランク											
H	ブランク											

10

N B : 数字は各ウェル中のペプチドを示す

【0345】

96ウェルの490nmでの吸光度

【表26】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.456	2.501	2.434	2.419	2.746	2.661	2.224	2.407	0.059	0.052	0.052	2.527
B	2.480	2.452	2.444	2.624	2.639	3.106	2.188	2.473	0.059	0.055	0.052	2.568
C	2.472	0.099	0.065	0.059	0.070	0.058	0.053	0.054	0.162	2.479	2.389	2.883
D	2.399	0.100	0.067	0.053	0.049	0.051	0.052	0.047	0.485	2.838	2.783	2.640
E	2.582	2.359	2.585	2.512	0.096	0.052	0.054	0.048	0.049	0.183	0.051	2.424
F	2.431	2.872	2.522	2.243	0.097	0.059	0.052	0.049	0.057	0.047	0.050	2.342
G	0.056	0.051	0.058	0.065	0.056	0.067	0.049	0.047	0.053	0.057	0.052	0.056
H	0.047	0.052	0.050	0.070	0.054	0.047	0.056	0.053	0.049	0.050	0.052	0.049

20

【0346】

図16aおよび16b参照。結果は、親mAb 6A1がヒトIL-13およびカニクイザルIL-13相同分子種の両方のC末端領域中の直鎖状アミノ酸エピトープKKLFRに結合することを示している。

【0347】

さらに、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1 mAbは、ヒトIL-13において、すべてC末端領域で同じ直鎖状エピトープ（すなわちKKLFR）に結合している（キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1 mAbのデータは示さず）。次いで、親mAb 6A1がカニクイザルIL-13中で同じエピトープに結合したことが示された。

30

【0348】

要約すると、ELISAの結果は、親マウスマAb 6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1 mAbがすべてヒトIL-13タンパク質由来の以下の配列内で結合したことを示した：KKLFR

【0349】

6.9 ビオチン標識したペプチドを用いた6A1結合エピトープのアラニン走査

40

IL-13とmAb 6A1との相互作用に関与している特定の主要残基を同定するために、KKLFR結合エピトープ（すなわちQFVKDLLLHLKKLFRREGRFN）を含む親ペプチド配列を用いたアラニン走査手法を採用した。この解析には、KKLFRエピトープ中のそれぞれのアミノ酸（およびこのエピトープを直接縁取るアミノ酸のそれぞれ）の位置で1個のアミノ酸がアラニン残基で逐次的に置換されているように、ペプチドを作製した（Anaspec Incから供給）。

【0350】

固定したビオチン標識したペプチドの、親mAb 6A1およびL1+A1への結合を検出するためにELISA方法を用いた。

【0351】

50

この解析用に作製したペプチドおよび対応するペプチドの識別番号を以下に示す：

【表27】

ペプチド番号	N-末端	配列番号
1	ビオチン	配列番号 1 2 9
6 2	ビオチン	配列番号 1 3 0
6 3	ビオチン	配列番号 1 3 1
6 4	ビオチン	配列番号 1 3 2
6 5	ビオチン	配列番号 1 3 3
6 6	ビオチン	配列番号 1 3 4
6 7	ビオチン	配列番号 1 3 5
6 8	ビオチン	配列番号 1 3 6

10

【0352】

結果：490 nmでの吸光度

平均試験結果（n = 2）。

【0353】

親（ネズミ）6A1 mAb：

【表28】

ペプチド番号	1	62	63	64	65	66	67	68
平均 A <sub>490</sub>	3.543	3.489	3.2795	1.468	3.8495	3.5995	0.595	3.581

20

【0354】

L1+A1：

【表29】

ペプチド番号	1	62	63	64	65	66	67	68
平均 A <sub>490</sub>	2.8535	2.832	2.6535	1.8175	3.0165	2.84	0.816	2.8085

30

【0355】

図17aおよび17b参照。

【0356】

これらのデータは、mAb 6A1 または L1+A1 とヒトIL-13との相互作用に関与している主要なアミノ酸残基は位置107のアルギニン（R）および位置103のリシン（K）であることを示唆している。

【0357】

mAbの希釈範囲にわたってこの効果を確認するために、6A1およびL1+A1 mAbを用いて一定の濃度範囲でこの解析を繰り返した。

40

【0358】

親マウスマAb 6A1（図17c）およびヒト化候補L1+A1（図17d）を、様々な濃度におけるアラニン走査ペプチド（配列番号129、131～135）への結合についてアッセイを行った。ペプチドを2つの96ウェルプレートに分割しなければならなかったので、アラニン置換を含まない親配列ペプチド（配列番号129）のアッセイを両プレートで行い、したがって1つのグラフに2つの結果が示される。これは、プレート間の大きなばらつきが存在するかどうかを決定するためであり、どちらの事例でも明白なばらつきは存在しなかった。

【0359】

50

置換 K 1 0 3 A、L 1 0 5 A および F 1 0 6 A を含むペプチド（それぞれ配列番号 1 3 1、1 3 3 および 1 3 4、残基番号は配列番号 9 に記載のとおり）は、親ペプチド（配列番号 1 2 9）と非常に類似した m A b への結合を示したので、これらの残基は 6 A 1 / L 1 + A 1 と I L - 1 3 との結合に重要でない。しかし、置換 K 1 0 4 A および R 1 0 7 A を含むペプチド（それぞれ配列番号 1 3 2 および 1 3 5、残基番号は配列番号 9 に記載のとおり）は、親ペプチド（配列番号 1 2 9）と比較して特により低い濃度で低減した 6 A 1 / L 1 + A 1 の結合を示し、これは、これらの残基が 6 A 1 / L 1 + A 1 と I L - 1 3 との最適な結合に重要であることを示している。

## 【0360】

図 1 7 c および 1 7 d を参照されたい。

10

## 【0361】

これらのデータは、親（すなわちネズミ）6 A 1 または L 1 + A 1 とヒト I L - 1 3 との相互作用に関与している主要なアミノ酸残基は配列番号 9 の位置 1 0 7 のアルギニン（R）および位置 1 0 3 のリシン（K）であることを示している。

## 【0362】

セクション 7 . - 材料および方法

以下のセクションでは、必要に応じて以下の材料および方法を用いた。これらは代表的な材料および方法である。繰り返し実験中では材料および方法の軽微な変化が生じている可能性がある。

## 【0363】

20

## 材料

S V 全 RNA 単離システム：P r o m e g a Z 3 1 0 0

A c c e s s R T - P C R システム：P r o m e g a A 1 2 5 0

Q I A q u i c k ゲル抽出キット：Q i a g e n 2 8 7 0 4

ゲルローディング溶液：S i g m a G 7 6 5 4

アガロース：I n v i t r o g e n 1 5 5 1 0 - 0 1 9

臭化工チジウム：S i g m a E 1 5 1 0

T A E 緩衝液：所内

1 0 0 b p D N A ラダー：N e w E n g l a n d B i o L a b s N 3 2 3 1 S

T A クローニングキット：I n v i t r o g e n 4 5 - 0 0 4 6

30

T O P 1 0 F ' 細胞：I n v i t r o g e n 4 4 - 0 3 0 0

L - 寒天 + 1 0 0 μ g / m l のアンピシリン：所内

X - G a l 、D M F 中に 5 0 m g / m l : P r o m e g a V 3 9 4 A

A m p l i T a q D N A ポリメラーゼ：A p p l i e d B i o s y s t e m s

1 0 × P C R 緩衝液：A p p l i e d B i o s y s t e m s

E - G e l 1 . 2 % アガロース：I n v i t r o g e n G 5 0 1 8 0 1

L B 培地 + 1 0 0 μ g / m l のアンピシリン：所内

Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p キット：Q i a g e n 2 7 1 0 6

M i n E l u t e P C R 精製キット：Q i a g e n 2 8 0 0 4

N E 緩衝液 2 1 0 × 濃度：N e w E n g l a n d B i o l a b s B 7 0 0 2 S

40

精製した B S A 1 0 0 × 濃度：N e w E n g l a n d B i o l a b s B 9 0 0 1

S

B s i W I : N e w E n g l a n d B i o l a b s R 0 5 5 3 L

H i n d I I I : P r o m e g a R 6 0 4 A

S p e I : N e w E n g l a n d B i o l a b s R 0 1 3 3 S

L i g a F a s t 迅速 D N A ライゲーションシステム：P r o m e g a M 8 2 2 5

M A X 効率 D H 5 化学的にコンピテントな細胞：I n v i t r o g e n 1 8 2 5 8 - 0 1 2

S O C 培地：所内

Q I A f i l t e r プラスミド M a x i キット：Q i a g e n 1 2 2 6 3

50

G l u t a m a x - 1 添加ダルベッコMEM : I n v i t r o g e n 3 1 9 6 6 - 0 2

1

G l u t a m a x - 1 を含むOptimem 1 : I n v i t r o g e n 5 1 9 8 5 - 0 2 6

T r a n s F a s t 形質移入試薬 : P r o m e g a E 2 4 3 1

1 ml の H i T r a p r タンパク質 A セファロース FF : A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 1 7 - 5 0 7 9 - 0 1

ダルベッコ PBS : S i g m a D 8 5 3 7

I mmunoP u r e I g G 溶出緩衝液 : P i e r c e 2 1 0 0 9

1 M T r i z m a - H C l 、 pH 8 . 0 : S i g m a T 2 6 9 4

10

P r o o f S t a r t D N A ポリメラーゼ : Q i a g e n 1 0 1 6 8 1 6

P r o o f S t a r t P C R 緩衝液 : Q i a g e n 1 0 1 6 9 6 1

#### 【 0 3 6 4 】

7 . 1 . ヒトまたはカニクイザル I L - 1 3 結合 E L I S A

このアッセイは、抗体とヒトまたはカニクイザル I L - 1 3 との結合を検出する E L I S A について記載する。これはサンドイッチ E L I S A 様式である。

#### 【 0 3 6 5 】

7 . 1 . 1 材料

1 . N u n c I mmunopla t e 1 F 9 6 M a x i s o r p ( L i f e T e c h n o l o g i e s 、 4 - 3 9 4 5 4 A )

20

2 . ヒト I L - 1 3 ( C a m b r i d g e B i o s c i e n c e s 、 カタログ番号 C H 1 - 0 1 3 )

3 . カニクイザル I L - 1 3 ( G l a x o S m i t h k l i n e 製 )

4 . ヤギ抗ヒト I L - 1 3 ポリクローナル抗体 ( R + D S y s t e m s 、 カタログ番号 A F - 2 1 3 - N A )

5 . 抗ヒト I g G - H R P ( S i g m a 、 カタログ番号 A - 6 0 2 9 )

6 . 抗マウス I g G - H R P ( S i g m a 、 カタログ番号 A - 9 3 0 9 )

7 . 炭酸 / 炭酸水素緩衝液 ( S i g m a ; カタログ番号 C - 3 0 4 1 )

8 . T B S T [ トリス緩衝生理食塩水 ( 6 . 0 6 g のトリス + 8 . 0 6 g の N a C l + 0

. 2 g の K C l + H 2 O 1 L まで ) + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ]

30

9 . B S A ( S i g m a A - 7 0 3 0 )

1 0 . O P D ( S i g m a 、 カタログ番号 P - 9 1 8 7 )

1 1 . 硫酸

#### 【 0 3 6 6 】

7 . 1 . 2 方法

1 . ブロッキング溶液は 3 % B S A + T B S T である

2 . 洗浄溶液は T B S T である

3 . 「 N u n c M a x i s o r p 」 E L I S A プレートを、 5 0 u l の炭酸 / 炭酸水素緩衝液 ( S i g m a ; カタログ番号 C - 3 0 4 1 、 製造者の指示に従って作製した ) 中の 5 u g / m l のヤギ抗ヒト I L - 1 3 ポリクローナル抗体 ( R + D S y s t e m s 、 カタログ番号 A F - 2 1 3 - N A ) 。 製造者の指示に従って 5 0 0 u g / m l のストック濃度で作製し、 アリコートで - 2 0 C で保存した ) でコーティングし、 プレートシーラーで覆い、 終夜 4 でインキュベーションを行う。

40

4 . 1 0 0 u l の 3 % B S A / T B S T でブロッキングし、 r t p で 1 時間インキュベーションを行う。

5 . T B S T で 3 回洗浄する ( 1 回の洗浄あたり少なくとも 2 0 0 u l の洗浄溶液 / ウェル ) 。

6 . 2 0 n g / ウェル ( 5 0 u l の容量で ) ヒト I L - 1 3 ( C a m b r i d g e B i o s c i e n c e 、 カタログ番号 C H 1 - 0 1 3 ) 。 製造者の指示に従って 1 0 0 n g / u l のストック濃度で作製、 アリコートで - 2 0 C で保存した ) または 2 0 n g / ウェルの

50

カニクイザル IL - 13 をブロッキング溶液中で加え、室温で 1 時間インキュベーションを行う。

7 . T B S T で 3 回洗浄する。

8 . 50 u l の抗体試料（必要な場合は終点力価データを得るために滴定する）をブロッキング溶液中で加え、 r t p で 1 時間インキュベーションを行う。

9 . T B S T で 3 回洗浄する。

10 . 6 A 1 キメラ抗体またはヒト化抗体には、 50 u l / ウェルの抗ヒト IgG - HRP (Sigma、カタログ番号 A - 6029) を 1 / 2000 希釀でブロッキング溶液中、 1 時間 r t p で用いて、結合を検出する。6 A 1 マウスモノクローナル抗体には、 50 u l / ウェルの抗マウス IgG - HRP (Sigma、カタログ番号 A - 9309) を 1 / 1000 希釀でブロッキング溶液中、 1 時間 r t p で用いて、結合を検出する。  
10

11 . T B S T で 3 回洗浄する。

12 . 100 u l の OPD (Sigma、カタログ番号 P - 9187。製造者の指示に従って作製した) で展開させ、 50 u l の 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で停止させ、 490 nm の吸光度で読み取る。展開時間は ~ 12 分間である。

### 【0367】

7 . 2 . ヒト IL - 13 のヒト IL - 13 R 1 鎖への結合の E L I S A

この E L I S A では、抗体がヒト IL - 13 のヒト IL - 13 R 1 鎖への結合を阻害できるかどうかを決定する。

### 【0368】

7 . 2 . 1 材料

1 . Nunc Immunoplate 1 F 96 Maxisorp (Life Technologies、4 - 39454A)

2 . ヒト IL - 13 R 1 - Fc (R & D Systems、カタログ番号 146 - IR )

3 . Det - 1 でタグ付けしたヒト IL - 13 (所内で作製)

4 . ビオチン標識した抗ヒト IL - 13 (R & D Systems、カタログ番号 BAF 213 )

5 . ストレプトアビシン - HRP

6 . 炭酸 / 炭酸水素緩衝液 (Sigma ; カタログ番号 C - 3041)   
30

7 . T B S T [トリス緩衝生理食塩水 (6 . 06 g のトリス + 8 . 06 g の NaCl + 0 . 2 g の KCl + H<sub>2</sub>O 1 Lまで) + 0 . 05 % Tween 20 ]

8 . BSA (Sigma A - 7030)

9 . OPD (Sigma、カタログ番号 P - 9187 )

10 . 硫酸

### 【0369】

7 . 2 . 2 方法

1 . ブロッキング溶液は 3 % BSA + T B S T である

2 . 洗浄溶液は T B S T である

3 . 「Nunc Maxisorp」 E L I S A プレートを、炭酸 / 炭酸水素緩衝液中の 50 u l の 5 ng / u l のヒト IL - 13 R 1 - Fc でコーティングする。プレートシーラーで覆い、終夜 4 でインキュベーションを行う。  
40

4 . 100 u l の 3 % BSA / T B S T でブロッキングし、 r t p で 1 時間インキュベーションを行う。

5 . T B S T で 3 回洗浄する (1 回の洗浄あたり少なくとも 200 u l の洗浄溶液 / ウェル)。

6 . 全容量 50 u l で、 0 . 04 ng / u l の det - 1 でタグ付けしたヒト IL - 13 をブロッキング溶液中の抗体試料（滴定済）とともに、 30 分間プレインキュベーションを行う。プレインキュベーションを行った試料を受容体でコーティングした E L I S A プレートに加え、室温で 1 時間インキュベーションを行う。  
50

7 . T B S T で 3 回洗浄する

8 . 1 u g / m l に希釈した 5 0 u l / ウエルのビオチン標識した抗ヒト I L - 1 3 を用いて、結合したすべてのヒト I L - 1 3 を検出する。1 時間室温でインキュベーションを行う

9 . T B S T で 3 回洗浄する

1 0 . 5 0 u l / ウエルのストレプトアビジン - H R P コンジュゲートを 1 / 1 0 0 0 希釈で加える。1 時間室温でインキュベーションを行う。

1 1 . T B S T で 3 回洗浄する

1 2 . 1 0 0 u l / ウエルの O P D ( S i g m a 、カタログ番号 P - 9 1 8 7 。製造者の指示に従って作製した) で展開させ、5 0 u l / ウエルの 3 M H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> で停止させ、4 9 0 n m の吸光度で読み取る。展開時間は ~ 2 分間。

### 【 0 3 7 0 】

7 . 3 . ヒト I L - 1 3 のヒト I L - 1 3 R 2 鎮への結合の E L I S A

この E L I S A では、抗体がヒト I L - 1 3 のヒト I L - 1 3 R 2 鎮への結合を阻害できるかどうかを決定する。

### 【 0 3 7 1 】

7 . 3 . 1 材料

1 . N u n c Immunoplate 1 F 9 6 Maxisorp ( L i f e T e c h n o l o g i e s 、 4 - 3 9 4 5 4 A )

2 . 抗ヒト I g G ( S i g m a 、カタログ番号 I - 3 3 8 2 )

3 . ヒト I L - 1 3 R 2 - F c ( R & D S y s t e m s 、カタログ番号 6 1 4 - I R )

4 . D e t - 1 でタグ付けしたヒト I L - 1 3 ( 所内で作製 )

5 . ビオチン標識した抗ヒト I L - 1 3 ( R & D S y s t e m s 、カタログ番号 B A F 2 1 3 )

6 . ストレプトアビジン - H R P

7 . 炭酸 / 炭酸水素緩衝液 ( S i g m a ; カタログ番号 C - 3 0 4 1 )

8 . T B S T [ トリス緩衝生理食塩水 ( 6 . 0 6 g のトリス + 8 . 0 6 g の N a C l + 0 . 2 g の K C l + H 2 O 1 L まで ) + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ]

9 . B S A ( S i g m a A - 7 0 3 0 )

1 0 . O P D ( S i g m a 、カタログ番号 P - 9 1 8 7 )

1 1 . 硫酸

### 【 0 3 7 2 】

7 . 3 . 2 方法

1 . ブロッキング溶液は 3 % B S A + T B S T である

2 . 洗浄溶液は T B S T である

3 . 「 N u n c Maxisorp 」 E L I S A プレートを、1 / 1 0 0 0 に希釈した炭酸 / 炭酸水素緩衝液中の 5 0 u l の抗ヒト I g G でコーティングする。プレートシーラーで覆い、終夜 4 でインキュベーションを行う。

4 . 1 0 0 u l の 3 % B S A / T B S T でブロッキングし、 r t p で 1 時間インキュベーションを行う。

5 . T B S T で 3 回洗浄する ( 1 回の洗浄あたり少なくとも 2 0 0 u l の洗浄溶液 / ウエル ) 。

6 . 5 0 u l / ウエルの 1 u g / m l のヒト I L - 1 3 R 2 - F c をブロッキング溶液中に加える。プレートシーラーで覆い、室温で 1 時間インキュベーションを行う。

7 . T B S T で 3 回洗浄する

8 . 全容量 5 0 u l で、0 . 0 0 4 n g / u l の d e t - 1 でタグ付けしたヒト I L - 1 3 をブロッキング溶液中の抗体試料 ( 滴定済 ) とともに、3 0 分間プレインキュベーションを行う。プレインキュベーションを行った試料を受容体でコーティングした E L I S A プレートに加え、室温で 1 時間インキュベーションを行う。

10

20

30

40

50

9 . T B S T で 3 回洗浄する

10 . 1 u g / m l に希釈した 5 0 u l / ウェルのビオチン標識した抗ヒト I L - 1 3 を用いて、結合したすべてのヒト I L - 1 3 を検出する。1 時間室温でインキュベーションを行う。

11 . T B S T で 3 回洗浄する

12 . 5 0 u l / ウェルのストレプトアビジン - H R P コンジュゲートを 1 / 1 0 0 0 希釈で加える。1 時間室温でインキュベーションを行う。

13 . T B S T で 3 回洗浄する

14 . 1 0 0 u l / ウェルの O P D ( S i g m a 、カタログ番号 P - 9 1 8 7 。製造者の指示に従って作製した) で展開させ、5 0 u l / ウェルの 3 M H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> で停止させ、4 9 0 n m の吸光度で読み取る。展開時間は ~ 2 分間である。

### 【 0 3 7 3 】

7 . 4 . I L - 1 3 中和バイオアッセイ ( T F - 1 細胞増殖アッセイ )

これは、抗 I L - 1 3 抗体の中和能の決定に用いることができる I L - 1 3 バイオアッセイである。以下に記載する方法では、組換えヒトまたはカニクイザル I L - 1 3 を用いる。哺乳動物で発現させたヒト I L - 1 3 または Q 1 3 0 ヒト I L - 1 3 変異体もこのアッセイで用いることができる。( T F - 1 細胞もヒト I L 5 に応答して増殖する。このアッセイを用いてヒト I L 5 生物活性に対する 6 A 1 の中和能も評価した)。

### 【 0 3 7 4 】

7 . 4 . 1 材料

1 . T F - 1 細胞系 ( 所内で得た )

2 . 9 6 ウェル組織培養プレート ( I n v i t r o g e n )

3 . ヒト I L - 1 3 ( C a m b r i d g e B i o s c i e n c e 、カタログ番号 C H 1 - 0 1 3 )

4 . C e l l T i t e r 9 6 非放射性細胞増殖アッセイ ( P r o m e g a 、カタログ番号 G 4 0 0 0 )

### 【 0 3 7 5 】

7 . 4 . 2 方法

1 . T F - 1 細胞バイオアッセイにおいて組換えヒトまたはカニクイザル I L - 1 3 の生物活性を中和する抗ヒト I L - 1 3 m A b の能力を測定する方法 ( 所内で得た T F - 1 細胞系、 A T C C 版ではない )。

2 . このアッセイは無菌的な 9 6 ウェル組織培養プレート ( I n v i t r o g e n ) 中、無菌条件下で行う。すべての試験は 3 つ組で行う。

3 . 1 0 n g / m l のヒト I L - 1 3 ( C a m b r i d g e B i o s c i e n c e 、カタログ番号 C H 1 - 0 1 3 )。製造者の指示に従って、無菌技術を用いて、クラス 2 組織培養フード内でストック濃度 1 0 0 n g / u l で構成し、小アリコートで - 2 0 C で保存する) または 1 0 n g / m l の c y n o I L - 1 3 ( C A から所内で得た ) を、様々な希釈率の抗ヒト I L - 1 3 m A b と共に ( 6 u g / m l から 3 倍希釈で 0 . 0 2 5 u g / m l まで希釈 ) 、全容量 5 0 u l で 1 時間、 3 7 C でプレインキュベーションを行う。また、 I L - 1 3 が存在するが抗ヒト I L - 1 3 m A b を有さない陽性対照ウェルも含める。さらに、陰性対照ウェルは I L - 1 3 を有さず、抗ヒト I L - 1 3 m A b も存在しない。このプレインキュベーションには、無菌的な低タンパク質結合性の丸底 9 6 ウェルプレートを用いる。( I L - 1 3 および抗ヒト I L - 1 3 m A b の濃度は細胞を加える後の段階で半分になることに注目されたい)。

4 . 5 0 u l の T F - 1 細胞を 2 × 1 0<sup>5</sup> / m l で、無菌的な 9 6 ウェル組織培養プレート中にプレートアウトする。1 時間のプレインキュベーションののち、 I L - 1 3 および抗ヒト I L - 1 3 m A b 試料を細胞に加える。様々な抗ヒト I L - 1 3 m A b 希釈、組換え I L - 1 3 および T F - 1 細胞を含む最終的な 1 0 0 u l のアッセイ容量を、 3 7 で ~ 7 0 時間、加湿 C O<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションを行った。

5 . ~ 6 6 時間後に、無菌的であり、細菌汚染が起こっていないことを確認するためにウ

10

20

30

40

50

エルの走査を行う。

6. 15 u l のフィルター滅菌した MTT 基質 / ウェル (カタログ番号 G 4 0 0 0 、 Promega。製造者の指示に従って作製した) を加え、最終的な 4 時間のインキュベーションを行う。

7. 100 u l の停止溶液 (MTT キットに提供される) を用いて反応を停止させて、代謝された青色ホルマザン産物を溶解させる。少なくとも 2 時間静置し、その後、ピペットで吸ったり吐いたりして結晶の溶解を手助けする。あるいは、プレートシーラーで覆い、4 C で終夜静置し、その後、翌日ピペットで吸ったり吐いたりする (ピペット操作に関してはこちらの方が容易である)

8. 各ウェルの溶液の吸光度を、96 ウェルプレートリーダーで 570 nm の波長で読み取る。 10

9. 抗ヒト IL - 13 mAb がヒトまたはカニクイザル IL - 13 の生物活性を中和する能力は、定義した量のヒトまたはカニクイザル IL - 13 (5 ng / ml) の生物活性を 50 % 中和するために必要な、抗ヒト IL - 13 mAb の濃度として表される (= ND<sub>50</sub>)。必要な濃度は低ければ低いほど、中和能は強力である。

#### 【 0 3 7 6 】

実施例：このアッセイのために設定した 96 ウェルプレート

【表 30】

試料 1												ポジティブ抗体		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	3 ug/ml 抗-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1	mAb 試料 2		mAb 試料 3			3 ug/ml 抗-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1							20
B	1 ug/ml 抗-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1						1 ug/ml 抗-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1							
C	0.33 ug/ml 抗-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1						0.33 ug/ml 抗-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1							
D	0.11 ug/ml 抗-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1						0.11 ug/ml 抗-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1						30	
E	0.037 ug/ml 抗-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1						0.037 ug/ml 抗-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1							
F	0.0123 ug/ml 抗-hIL-13 mAb + IL-13 + TF-1						0.0123 ug/ml 抗-hIL-13 poly + IL-13 + TF-1							
G	TF-1 細胞増殖のためのポジティブ対照 = TF-1 細胞 + IL-13 (mAb 不含、12 ウェル)												40	
H	バックグランド用の対照 = TF-1 細胞だけが存在する (IL-13 不含、mAb 試料不含、12 ウェル)													

#### 【 0 3 7 7 】

#### 7. 5. ヒト IL - 4 結合 E L I S A

このアッセイでは、抗体とヒト IL - 4 との結合を検出する E L I S A について記載する。これはサンドイッチ E L I S A 様式である。

#### 【 0 3 7 8 】

#### 7. 5. 1 材料

1. Nunc Immunoplate 1 F 96 Maxisorp (Life Technologies、4-39454A)  
 2. ヒトIL-4 (R+D Systems、カタログ番号)  
 3. ヤギ抗ヒトIL-4ポリクローナル抗体 (R+D Systems、カタログ番号AF-204-NA)  
 4. ビオチン標識したラット抗ヒトIL-4モノクローナル抗体 (BD/Pharmingen、カタログ番号)  
 5. 抗マウスIgG-HRP (Dako、カタログ番号P0260)  
 6. 抗マウスIgG-HRP (Sigma、カタログ番号A-9309)  
 7. 炭酸/炭酸水素緩衝液 (Sigma; カタログ番号C-3041) 10  
 8. PBST (PBS+0.05%Tween20)  
 9. BSA (Sigma A-7030)  
 10. OPD (Sigma、カタログ番号P-9187)  
 11. 硫酸  
**【0379】**  
 7.5.2 方法  
 1. ブロッキング溶液はPBST中3%のBSAである  
 2. 洗浄溶液はPBSTである  
 3. 「Nunc Maxisorp」ELISAプレートを、炭酸/炭酸水素緩衝液中500u1の5ug/mlのヤギ抗ヒトIL-4ポリクローナル抗体 (R+D Systems、カタログ番号AF-204-NA。製造者の指示に従って500ug/mlのストック濃度で作製し、アリコートで-20°Cで保存した)でコーティングし (Sigma; カタログ番号C-3041、製造者の指示に従って作製した)、プレートシーラーで覆い、終夜4でインキュベーションを行う。 20  
 4. 100u1の3%BSA/PBSTでブロッキングし、室温圧力(rt p)で1時間インキュベーションを行う。  
 5. PBSTで3回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも200u1の洗浄溶液/ウェル)。  
 6. 1ng/ml (50u1の容量で)ヒトIL-4をブロッキング溶液中で加え、室温で1時間インキュベーションを行う。 30  
 7. PBSTで3回洗浄する。  
 8. 50u1の抗体試料 (必要な場合は終点力価データを得るために滴定する)をブロッキング溶液中で加え、rt pで1時間インキュベーションを行う。ヒトIL-4との結合の陽性対照として、ビオチン標識した抗ヒトIL-4モノクローナル抗体 (滴定済)を用いる。  
 9. PBSTで3回洗浄する。  
 10. 6A1マウスマノクローナル抗体には、50u1/ウェルの抗マウスIgG-HRP (Sigma、カタログ番号A-9309)を1/1000希釈でブロッキング溶液中、1時間rt pで用いて、結合を検出する。6A1キメラ抗体またはヒト化抗体には、50u1/ウェルの抗ヒトIgG-HRP (Sigma、カタログ番号A-6029)を1/2000希釈でブロッキング溶液中、1時間rt pで用いて、結合を検出する。陽性対照には、ビオチン標識したラット抗ヒトIL-4モノクローナル抗体を用い、ストレプトアビシン-HRPコンジュゲート抗体を用いて検出する。(あるいは、抗マウスHRP抗体、P0260によって、6A1およびビオチン標識したラット抗ヒトIL-4モノクローナル抗体がどちらも検出される)。 40  
 11. PBSTで3回洗浄する。  
 12. 100u1のOPD (Sigma、カタログ番号P-9187。製造者の指示に従って作製した)で展開させ、50u1の3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、490nmの吸光度で読み取る。  
**【0380】** 50

## 7.6.エピトープマッピングELISA

このアッセイでは、マウスマAb 6A1とヒトまたはカニクイザルIL-13ペプチドとの結合を検出するELISAについて記載する。

### 【0381】

#### 7.6.1 材料

- 1. Nunc Immunoplate 1 F 96 Maxisorp (Life Tech nologies、4-39454A)
- 2. ImmunoPure (著作権) ストレプトアビジン (Pierce、カタログ番号 21125)
- 3. PBS-T (リン酸緩衝生理食塩水 + 0.05% Tween 20) 10
- 4. BSA (Sigma A-7030)
- 5. ヒトおよびカニクイザルIL-13の16量体ペプチド、オフセット=4 (Mimotopesカスタム注文)
- 6. 陽性および陰性対照の20量体ペプチド (Mimotopesのカスタム注文から供給)

#### 7.6.1 MAb

- 8. 対照Ab (Mimotopesのカスタム注文から供給)
- 9. ウサギ抗マウスIg HRPコンジュゲート (DAKO、コード番号 P0260)
- 10. OPD (Sigma、カタログ番号 P-9187) 20

#### 11. 3Mの硫酸

### 【0382】

#### 7.6.2 方法

1. ブロッキング溶液は3%BSA+PBS-Tである。

2. 洗浄溶液はPBS-Tである。

3. PBS-Tを希釈剤として用いて、「Nunc Maxisorp」ELISAプレートを、100μlの5μg/mlのImmunoPure (著作権) ストレプトアビジン (Pierce、カタログ番号 21125、製造者の指示に従って1mg/mlのストック濃度で作製し、アリコートで+4で保存した) でコーティングする。溶液を乾燥させるために終夜37でインキュベーションを行う。

4. 200μlの3%BSA/PBS-Tでブロッキングする。プレートシーラーを加え、rtpで1時間インキュベーションを行う。 30

5. PBS-Tで3回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも200μlの洗浄溶液/ウェル)。

6. 2つ組でかつPBS-Tを希釈剤として用いて、100μl/ウェル (対照ウェル以外) の1,000倍希釈の各ペプチド (製造者の指示に従って200μlの40%アセトニトリル60%水に溶解し、その後、同じ溶媒で10倍希釈にアリコート分割し、-20で保存した) を加えた。

7. 対照ウェルに、2つ組でかつPBS-Tを希釈剤として用いて、100μl/ウェルの10倍希釈の対照ペプチド (製造者の指示に従って1mlの40%アセトニトリル60%水に溶解し、-20で保存した) を加えた。プレートシーラーを加え、rtpで1時間、振盪台上でインキュベーションを行う。 40

8. PBS-Tで3回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも200μlの洗浄溶液/ウェル)。

9. 100μl/ウェル (対照ウェル以外) の1.506μg/mlのマウスマAbをPBS-T中で加える。

10. 対照ウェルのみに、100μl/ウェルの4、16および32倍希釈の対照抗体 (製造者によって供給されたとおりに使用し、-20で保存した) を、PBS-Tを希釈剤として用いて加える。プレートシーラーを加え、rtp (室温および室内圧力) で1時間、振盪台上でインキュベーションを行う。

11. PBS-Tで3回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも200μlの洗浄溶液/ウ 50

エル)。

12. 100 μl / ウェルの 2,000 倍希釈のウサギ抗マウス IgG HRP - コンジュゲート (DAKO、コード番号 P0260、供給されたとおりに使用し、+4℃で保存した) を、PBSTを希釈剤として用いて加える。プレートシーラーを加え、rtpで1時間、振盪台上でインキュベーションを行う。

13. PBSTで3回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも 200 μl の洗浄溶液 / ウェル)。

14. 100 μl のOPD (Sigma、カタログ番号 P-9187。製造者の指示に従って作製した) で展開させ、50 μl の3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、490 nmの吸光度で読み取る。展開時間は~10分間である。

10

#### 【0383】

##### 7.7.エピトープ精細マッピングELISA

このアッセイでは、mAb 6A1とヒトまたはカニクイザルIL-13ペプチドとの結合を検出するELISAについて記載する。

#### 【0384】

##### 7.7.1 材料

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies、4-39454A)

2. ImmunoPure (著作権) ストレプトアビシン (Pierce、カタログ番号 21125)

20

3. PBST (リン酸緩衝生理食塩水 + 0.05% Tween 20)

4. BSA (Sigma A-7030)

5. ヒトおよびカニクイザルIL-13パーシャルウィンドウネットペプチド (一度にN末端およびC末端の両方から1個のアミノ酸によって切断された14量体; Mimotopes カスタム注文)

6. 陽性対照の16量体ペプチド (以前のMimotopes カスタム注文により供給)

7. 6A1 mAb (所内で作製)

8. ヤギ抗マウス IgG (Fc 特異的) HRP コンジュゲート抗体 (Sigma A-9309)

9. OPD (Sigma、カタログ番号 P-9187)

30

10. 3M 硫酸

#### 【0385】

##### 7.7.2 方法

1. プロッキング溶液は 3% BSA + PBST である。

2. 洗浄溶液は PBST である。

3. 「Nunc Maxisorp」ELISA プレートを、超純水 (Pierce、カタログ番号 21125、製造者の指示に従ってストック濃度 1 mg / ml で構成し、+4℃で保存した) 中の 100 μl の 5 μg / ml の ImmunoPure (著作権) ストレプトアビシンでコーティングする。終夜 +37℃ でインキュベーションを行う。

4. 200 μl の PBST 中 3% の BSA でプロッキングする。プレートシーラーを加え、終夜 +4℃ でインキュベーションを行う。

40

5. PBST で 3 回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも 200 μl の洗浄溶液 / ウェル)。

6. 2つ組でかつ PBST 中 3% の BSA を希釈剤として用いて、100 μl / ウェルの 1,000 倍希釈の各ペプチド (製造者の指示に従って 200 μl の 40% アセトニトリル 60% 水に溶解し、-20℃ で保存した) を加える。プレートシーラーを加え、振盪台上で、室温で 1 時間インキュベーションを行う。

7. PBST で 3 回洗浄する (1回の洗浄あたり少なくとも 200 μl の洗浄溶液 / ウェル)。

8. PBST 中 3% の BSA で希釈した 100 μl / ウェルの 3 μg / ml の 6A1 を加

50

える。プレートシーラーを加え、振盪台上で、室温で1時間インキュベーションを行う。  
9. P B S Tで3回洗浄する(1回の洗浄あたり少なくとも200μlの洗浄溶液/ウェル)。

10. 100μl/ウェルの1,000倍希釈のヤギ抗マウスIgG HRP-コンジュゲート抗体(Sigma A-9309、供給されたとおりに使用し、+4で保存した)を、P B S T中3%のBSAを希釈剤として用いて加える。プレートシーラーを加え、振盪台上で、室温で1時間インキュベーションを行う。

11. P B S Tで3回洗浄する(1回の洗浄あたり少なくとも200μlの洗浄溶液/ウェル)。

12. 100μlのOPD(Sigma、カタログ番号P-9187。製造者の指示に従って作製した)で展開させ、50μlの3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させ、490nmの吸光度で読み取る。展開時間は~10分間である。 10

#### 【0386】

7.8 IL13抗体対完全長IL13におけるBiacore(商標)方法のヒト化構築体

動力学解析は、抗体捕捉方法を用いて、Biacore3000機器で行った。手短に述べると、キメラ6A1およびヒト化抗体の構築体にはタンパク質A捕捉を行い、親ネズミ6A1抗体では、Biacoreから供給された抗マウスFc抗体によって捕捉を行った。

#### 【0387】

手短に述べると、方法は以下のとおりである。Biacoreの標準プロトコルに従い、Biacoreの第一級アミンカップリングキットに供給される試薬を用いて、第一級アミンカップリングによって捕捉リガンドをCM5バイオセンサーチップに固定した。この方法は、50mMのN-ヒドロキシ-スクシンイミド(NHS)および200mMのN-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボナイト(EDC)の溶液を表面に通過させることによってCM5センサー表面の活性化を含む。その後、捕捉リガンド(酢酸緩衝液pH5またはpH4.5に溶解)を活性センサー表面にカップリングさせ、その後、依然として活性のあるすべてのエステルを1Mの塩酸エタノールアミン、pH8.5を注入することによってブロッキングした。 20

#### 【0388】

その後、ヒトまたはマウス由来であったに応じて候補抗体をタンパク質Aまたは抗マウスFc抗体表面上に通過させ、捕捉した。安定した結合シグナルが見られたのち、様々な定義した濃度でIL13を捕捉した抗体表面上に通過させた。その結果生じた結合曲線をBiacore解析ソフトウェアBIAeval v4.1で解析して動力学を決定した。実験は、Biacore HBS-EP緩衝液を用いて実施した。 30

#### 【0389】

7.8.1 IL-13抗体対ペプチドのBiacore(商標)方法

抗体と固定したIL-13ペプチドとの直接結合を用いて、Biacore3000機器で動力学の解析を行った。手短に述べると、Biacore SA(ストレプアビジン)バイオセンサーチップを用いてIL-13ビオチン標識したペプチドを捕捉した。その後、様々な濃度で抗体をセンサー表面上に通過させた。その結果生じた結合曲線をBiacore解析ソフトウェアBIAeval 4.1で解析して動力学を決定した。実験は、Biacore HBS-EP緩衝液を用いて実施した。 40

#### 【0390】

8. カニクイザル喘息モデルにおけるL1+A1ヒト化抗IL-13mAbの有効性。

このセクションは仮説的である。

#### 【0391】

カニクイザル(Macaca fascicularis)におけるブタ回虫(Ascaris suum)誘発性の(A.suum)肺気管支収縮のモデルは、ヒトの喘息の非臨床モデルとして、またはそれに関連すると認識されている(Patterson R 50

ら、Trans. Assoc. Am. Physicians、1980、93：317～325；Patterson Rら、J. Lab. Clin. Med.、1983、101：864～872）。

#### 【0392】

このモデルでは、喘息応答を誘発させるために、A. suumに対して生まれつきの肺感受性を有する動物を噴霧化したA. suumに曝す。この喘息応答は、気道応答性亢進(AHR)、気管支肺胞洗浄(BAL)液中で測定された細胞浸潤および血清IgEレベルを測定することによって特徴づけることができる。実験方法は、Mauser Pら、Am. J. Resp. Crit. Care Med.、1995、204：467～472およびEvanooff Hら、Immunologic Investigation、1992、21：39によって以前に記述されているものと類似している。  
10

#### 【0393】

この研究では、A. suum抗原の特定の用量に対して陽性の気管支収縮剤応答性を有すると実証された、侵入用に事前に選択した30匹の動物を用いる。

#### 【0394】

A. suumを、各動物の最適な応答用量(ORD)で投与する。これは、エアロゾル吸入(噴霧器を用いて15回の呼吸にわたって与える単一用量)によって少なくとも40%のR<sub>L</sub>(肺抵抗)の増加および少なくとも35%のC<sub>DY</sub>N(ダイナミックコンプライアンス)の減少をもたらす、事前に決定したA. suumの用量である。  
20

#### 【0395】

この研究は2段階で行う。第1段階では、A. suum抗原の投与(9日目および10日目、A. suumを各動物に最適な事前に決定した用量でエアロゾル吸入によって投与する)の前(1日目のベースライン肺機能評価)および後(11日目)に、静脈内(i/v)ヒスタミンチャレンジ(すなわち、ベースラインを少なくとも30%超えるR<sub>L</sub>の増加を誘導するために十分なヒスタミンの用量(PC<sub>30</sub>))に応答してAHRを評価する。  
。

#### 【0396】

第2段階は、動物に抗体を用いた治療を与える以外は第1段階と同一であり(以下参照)、各抗体は、i/vインフュージョンによって3回の約30mg/kgの用量として1日目、5日目および9日に投与する。  
30

#### 【0397】

グループ1(n=12)：L1+A1(ヒト化抗IL-13mAb、配列番号18および配列番号22)

グループ2(n=12)：L1+A1(ヒト化抗IL-13mAb、30mg/kg)およびパソコリズマブ(ヒト化抗IL4 mAb、30mg/kg)

グループ3(n=6)：ビヒクル単独の陰性対照治療

#### 【0398】

第1段階および第2段階からのAHRの読取値は、Buycott肺力学系を用いて、ヒスタミンに応答した圧力および空気流の読取値、すなわち肺抵抗(R<sub>L</sub>)およびダイナミックコンプライアンス(C<sub>DY</sub>N)を探ることによって計算する。A. suum抗原チャレンジ後[肺抵抗(R<sub>L</sub>)およびダイナミックコンプライアンス(C<sub>DY</sub>N)]と比較したベースラインからの最大変化率を第1段階および第2段階、すなわち抗体治療を行ったまたは行わない場合について比較し、これらのデータを用いてAHR表現型を評価する。  
40

#### 【0399】

さらに、第1段階および第2段階の1日目および11日目にBAL試料を採取して、細胞浸潤、具体的には好酸球増加症を測定する。IgEレベルを監視するために血清試料も採取する。

#### 【0400】

## 【表 3 1】

表A

蛋白またはポリヌクレオチド (PN) の記載	配列の識別子 (配列番号)	
6 A 1、CDRH1	1	
6 A 1、CDRH2	2	
6 A 1、CDRH3	3	
6 A 1、CDRL1	4	
6 A 1、CDRL2	5	
6 A 1、CDRL3	6	
6 A 1、VH (ネズミ)	7	10
6 A 1、VL (ネズミ)	8	
h IL-13	9	
h IL-13 (PN)	10	
6 A 1、VH、ヒト化構築物 A 1	11	
6 A 1、VH、ヒト化構築物 A 2	12	
6 A 1、VH、ヒト化構築物 A 3	13	
6 A 1、VH、ヒト化構築物 A 4	14	
6 A 1、VL、ヒト化構築物 L 1	15	
6 A 1、VL、ヒト化構築物 L 2	16	20
6 A 1、重鎖、ヒト化構築物 A 1	18	
6 A 1、重鎖、ヒト化構築物 A 2	19	
6 A 1、重鎖、ヒト化構築物 A 3	20	
6 A 1、重鎖、ヒト化構築物 A 4	21	
6 A 1、軽鎖、ヒト化構築物 L 1	22	
6 A 1、軽鎖、ヒト化構築物 L 2	23	
6 A 1、配列番号 7 をコードする PN	24	
6 A 1、配列番号 8 をコードする PN	25	
6 A 1、配列番号 11 をコードする PN	26	
6 A 1、配列番号 12 をコードする PN	27	30
6 A 1、配列番号 13 をコードする PN	28	
6 A 1、配列番号 14 をコードする PN	29	
6 A 1、配列番号 15 をコードする PN	30	
6 A 1、配列番号 16 をコードする PN	31	
6 A 1、配列番号 18 をコードする PN	32	
6 A 1、配列番号 19 をコードする PN	33	
6 A 1、配列番号 20 をコードする PN	34	
6 A 1、配列番号 21 をコードする PN	35	
6 A 1、配列番号 22 をコードする PN	36	40
6 A 1、配列番号 23 をコードする PN	37	

## 【図面の簡単な説明】

## 【0 4 0 1】

【図 1】高い濃度での (at increasing concentration) モノクローナル抗体 6 A 1 と、組換えイー・コリ発現のヒト IL - 13 との結合を説明するサンドウィッヂエライザを示す。

【図 2 a】組換えイー・コリ発現のヒト IL - 13 のヒト IL - 13 受容体 1 鎖との結合を阻害する、高い濃度でのモノクローナル抗体 6 A 1 の能力を説明するエライザを示す。

【図2b】組換えイー・コリ発現のヒトIL-13のヒトIL-13受容体2鎖との結合を阻害する、高い濃度でのモノクローナル抗体6A1の能力を説明するエライザを示す。

【図3】TF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のヒトおよびカニクイザルの生物活性を阻害する、高い濃度での6A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図4】TF-1細胞増殖アッセイにて哺乳動物発現の(CHO細胞)ヒトIL-13の生物活性を阻害する、高い濃度での6A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図5】TF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のQ130ヒトIL-13の生物活性を阻害する、高い濃度での6A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図6】6A1が組換えイー・コリ発現のヒトIL-4と結合しないことを説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図7】6A1がTF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のヒトIL-5の生物活性を阻害しないことを説明するIL-5中和アッセイを示す。

【図8】高い濃度での、キメラ6A1mAbと、組換えイー・コリ発現のヒトIL-13およびカニクイザルIL-13との結合を説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図9】高い濃度での、8種のヒト化抗-HitIL-13mAbと、組換えイー・コリ発現のヒトIL-13との結合を説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図10a】高い濃度での、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1と、組換えイー・コリ発現のヒトIL-13との結合を説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図10b】高い濃度での、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1と、組換えイー・コリ発現のカニクイザルIL-13との結合を説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図11】高い濃度での、キメラ6A1mAb、L1+A1およびL2+A1と、ネイティブヒトIL-13との結合を説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図12a】組換えイー・コリ発現のヒトIL-13のヒトIL-13受容体1鎖との結合を阻害する、高い濃度でのモノクローナル抗体6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1の能力を説明するエライザを示す。

【図12b】組換えイー・コリ発現のヒトIL-13のヒトIL-13受容体2鎖との結合を阻害する、高い濃度でのモノクローナル抗体6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1の能力を説明するエライザを示す。

【図13a】TF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のヒトIL-13の生物活性を阻害する、高い濃度での6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図13b】TF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のカニクイザルIL-13の生物活性を阻害する、高い濃度での6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図13c】TF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のQ130ヒトIL-13の生物活性を阻害する、高い濃度での6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図13d】TF-1細胞増殖アッセイにて哺乳動物発現の(CHO細胞)ヒトIL-13の生物活性を阻害する、高い濃度での6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1の能力を説明する中和アッセイを示す。

【図14a】6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1が組換えイー・コリ発現のヒトIL-4と結合しないことを説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図14b】6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1が組換えイー・コリ発現のヒトGM-CSFと結合しないことを説明するサンドウイッヂエライザを示す。

【図14c】6A1、キメラ6A1、L1+A1およびL2+A1がTF-1細胞増殖アッセイにて組換えイー・コリ発現のヒトIL-5の生物活性を阻害しないことを説明するIL-5中和アッセイを示す。

【図15】ヒトおよびカニクイザルIL-13にある6A1についての結合エピトープを

10

20

30

40

50

決定するためのエピトープ地図作製を示す。

【図16a】ヒトIL-13にある6A1の精密な(fine)結合特異性を同定するためのエピトープ地図作製エライザを示す。

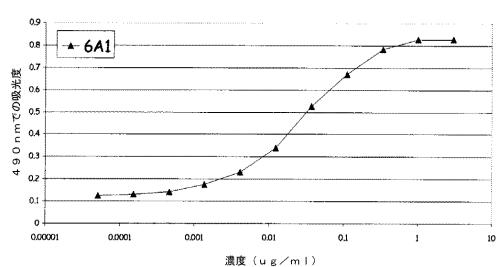
【図16b】カニクイザルIL-13にある6A1の精密な(fine)結合特異性を同定するためのエピトープ地図作製エライザを示す。

【図17a】6A1がヒトIL-13に結合するのに必要とされる鍵となるアミノ酸残基を測定するためのエピトープ地図作製エライザを示す。

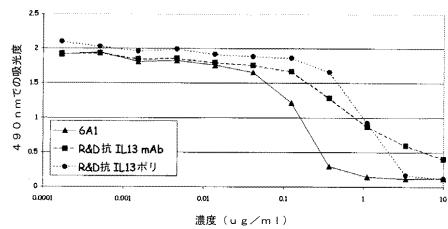
【図17b】L1+A1がヒトIL-13に結合するのに必要とされる鍵となるアミノ酸残基を測定するためのエピトープ地図作製エライザを示す。

【図17c】親(ネズミ)6A1(図17c)およびヒト化L1-A1抗体についてアラニンのスキャン分析を説明するグラフを示す。 10

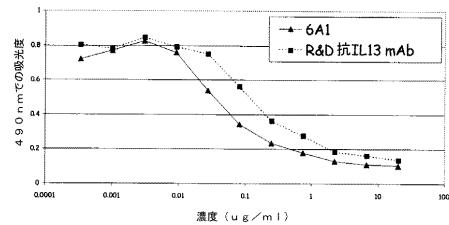
【図1】



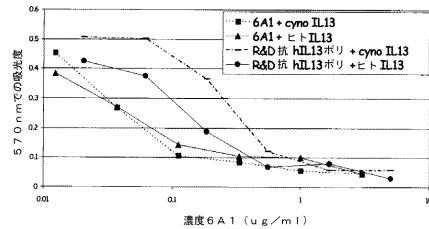
【図2a】



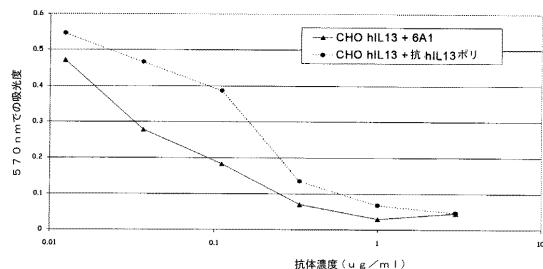
【図2b】



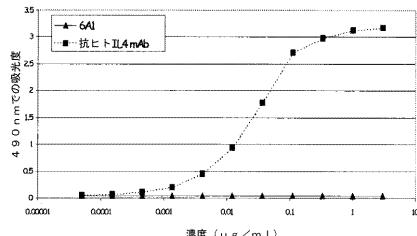
【図3】



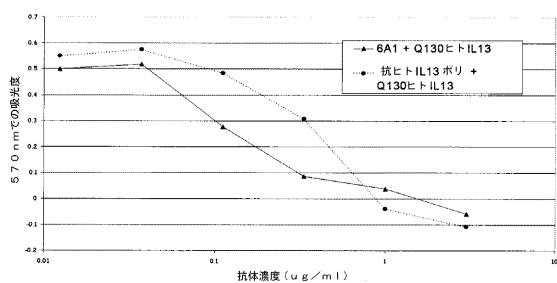
【図4】



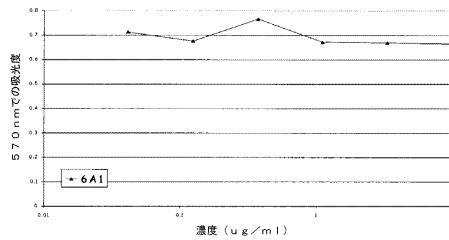
【図6】



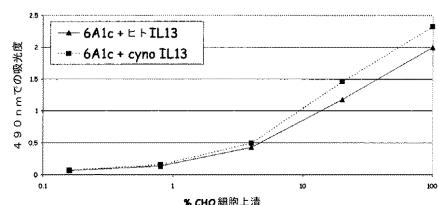
【図5】



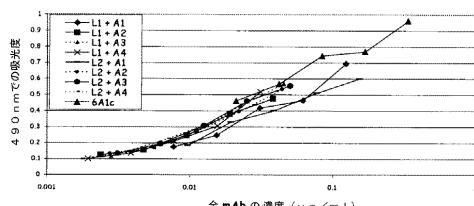
【図7】



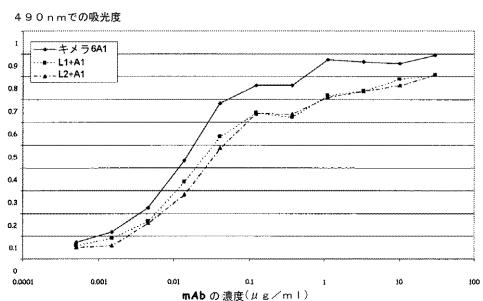
【図8】



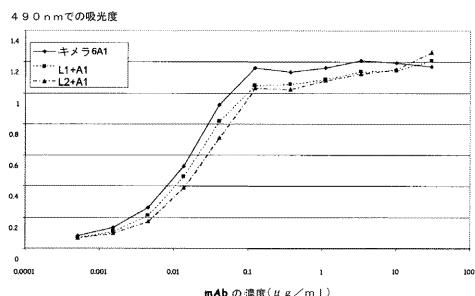
【図9】



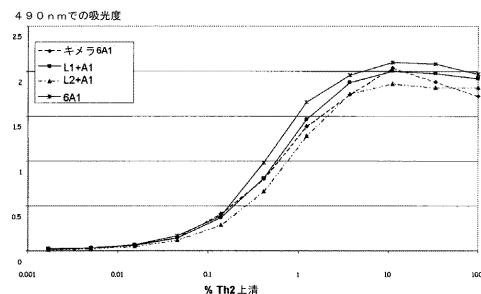
【図10 a】



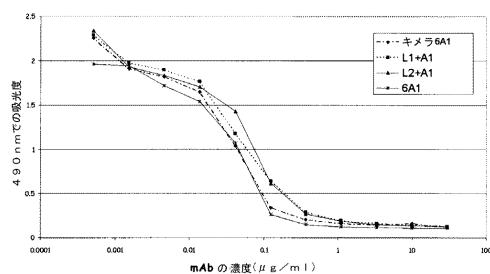
【図10 b】



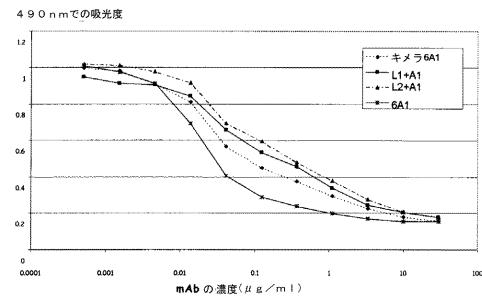
【図11】



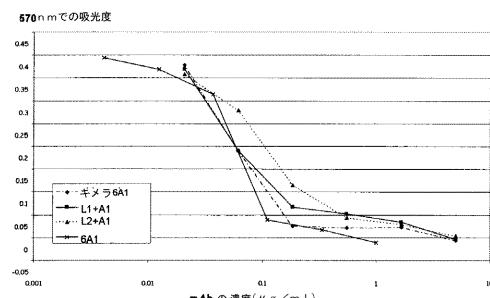
【図12 a】



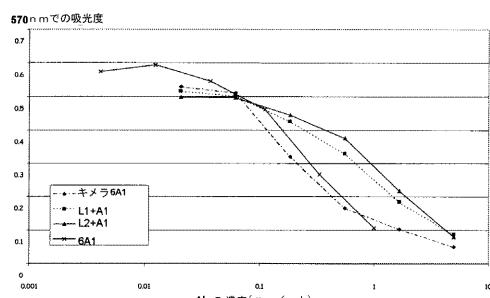
【図12 b】



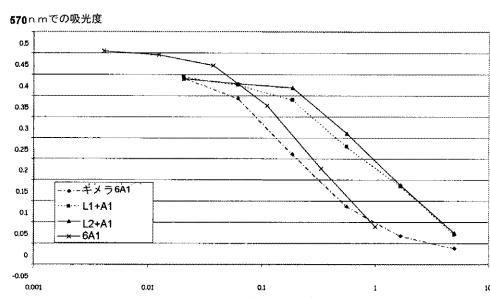
【図13 b】



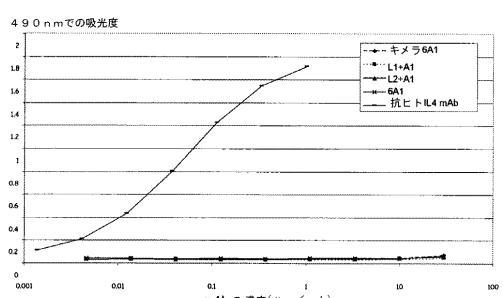
【図13 d】



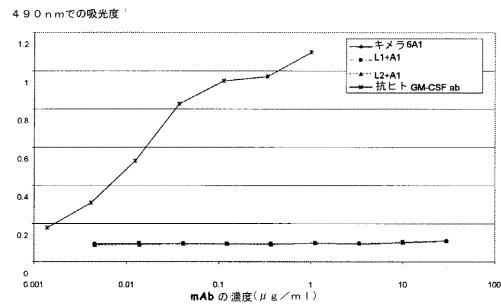
【図13 c】



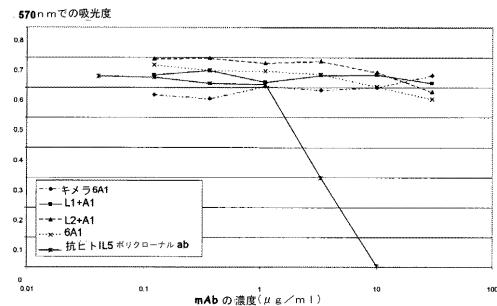
【図14 a】



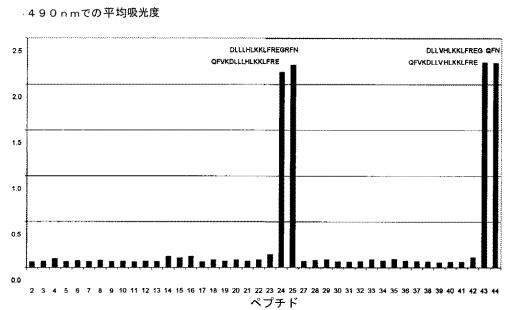
【図14b】



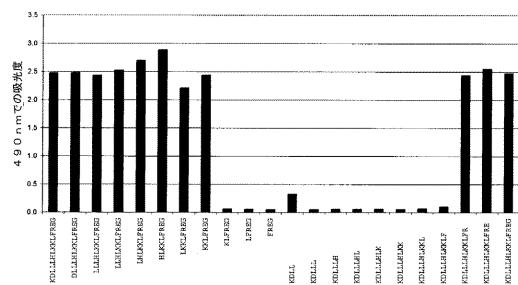
【図14c】



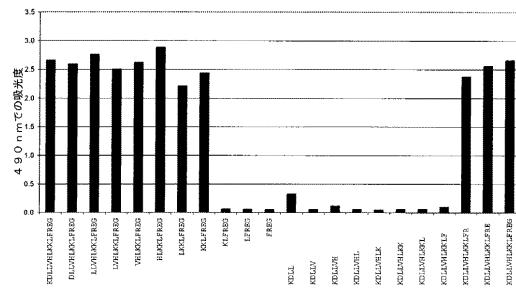
【図15】



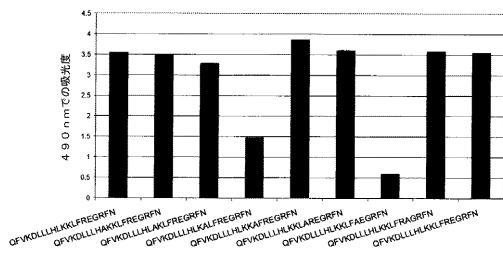
【図16a】



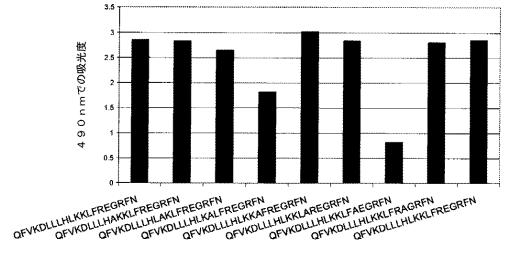
【図16b】



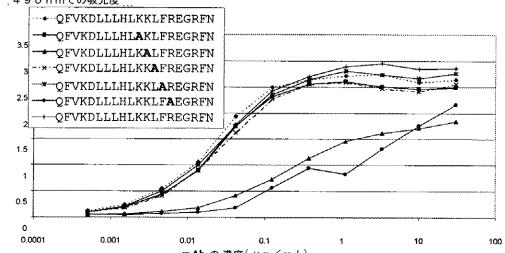
【図17a】



【図17b】

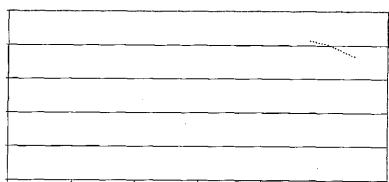


【図17c】



## 【図 1 7 d】

Figure 17d



## 【配列表】

0005102616000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 33/12 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/12	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	
	A 6 1 P 35/02	

(74)代理人 100101454

弁理士 山田 卓二

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100156100

弁理士 西野 満

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 クレア・アシュマン

英国エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソsmithkline

(72)発明者 マーティン・ジョン・キャシディー

英国エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソsmithkline

(72)発明者 ジョナサン・ヘンリー・エリス

英国エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソsmithkline

(72)発明者 トレバー・アンソニー・ケネス・ワッタム

英国エスジー1・2エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガネルズ・ウッド・ロード、グラクソsmithkline

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 米国特許第06468528(US, B1)

国際公開第2003/034381(WO, A1)

米国特許出願公開第2003/0235555(US, A1)

J.Allergy.Clin.Immunol.,1997,100(6 Pt1),p.792-801

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/24  
C12N 15/00-15/90  
PubMed