

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-512985
(P2008-512985A)

(43) 公表日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B065
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-516776 (P2007-516776)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月17日 (2005.6.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年2月16日 (2007.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/021454
 (87) 国際公開番号 W02006/085938
 (87) 国際公開日 平成18年8月17日 (2006.8.17)
 (31) 優先権主張番号 60/581,078
 (32) 優先日 平成16年6月17日 (2004.6.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/149,025
 (32) 優先日 平成17年6月9日 (2005.6.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

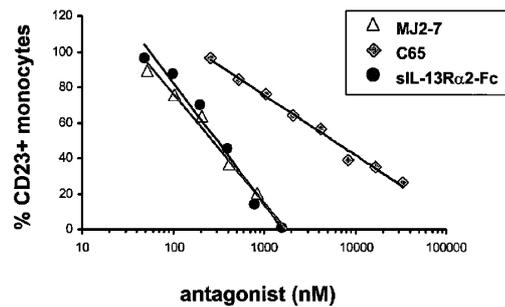
(71) 出願人 591011502
 ワイス
 W y e t h
 アメリカ合衆国07940-0874ニュー
 ジャージー州 マディソン、ファイブ・
 ジラルダ・ファームズ
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-13結合剤

(57) 【要約】

IL-13に特異的に結合し、IL-13がIL-13受容体およびシグナル伝達中間体と相互に作用する能力を調節する薬剤(例えば抗体およびその断片)を開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

K_D が 10^{-7} M 未満である IL - 13 に結合する抗原結合部位を形成する重鎖免疫グロブリン可変領域配列および軽鎖免疫グロブリン可変領域配列を含む抗体分子であって、抗体または抗原結合断片が、下記の 1 つまたは複数の性質：

(a) 重鎖免疫グロブリン可変領域配列が、m A b M J 2 - 7 の重鎖 C D R 3 とは 3 未満のアミノ酸置換が異なる重鎖 C D R 3 を含む；

(b) 軽鎖免疫グロブリン可変領域配列が、対応する m A b M J 2 - 7 の軽鎖 C D R とは 3 未満のアミノ酸置換が異なる軽鎖 C D R を含む；

(c) 重鎖免疫グロブリン可変領域配列が、V 2 . 1、V 2 . 3、V 2 . 4、V 2 . 5、V 2 . 6、V 2 . 7、または V 2 . 1 1 の重鎖可変領域をコードする核酸の相補体と高ストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされた配列を含む；

(d) 軽鎖免疫グロブリン可変領域配列が、V 2 . 1 1 の軽鎖可変領域をコードする核酸の相補体と高ストリンジентな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされた配列を含む；

(e) 重鎖免疫グロブリン可変領域配列が、V 2 . 1、V 2 . 3、V 2 . 4、V 2 . 5、V 2 . 6、V 2 . 7、または V 2 . 1 1 の重鎖可変領域と少なくとも 9 0 % 同一である；

(f) 軽鎖免疫グロブリン可変領域配列が、V 2 . 1 1 の軽鎖可変領域と少なくとも 9 0 % 同一である；

(g) 抗体分子が、ヒト IL - 13 との結合のために m A b M J 2 - 7 と競合する；

(h) 抗体分子が、配列番号 2 4 または配列番号 1 7 8 の残基 1 1 6、1 1 7、1 1 8、1 2 2、1 2 3、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、および 1 2 8 からなる群から選択された IL - 13 からの 1 つまたは複数のアミノ酸残基と接触する；

(i) 重鎖可変領域配列が、超可変ループ 1、2、および / または 3 において m A b M J 2 - 7 と同じカノニカル構造を有する；

(j) 軽鎖可変領域配列が、超可変ループ 1、2、および / または 3 において m A b M J 2 - 7 と同じカノニカル構造を有する；および

(k) 重鎖可変領域配列および / または軽鎖可変領域配列が、それぞれ生殖細胞系遺伝子 D P - 5 4 および D P K - 9 によってコードされた V H 領域からの F R 1、F R 2、および F R 3 フレームワーク領域、または生殖細胞系遺伝子 D P - 5 4 および D P K - 9 によってコードされた V H 領域と少なくとも 9 5 % 同一の配列を有するを有する抗体分子。

【請求項 2】

精製されている、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 3】

F c 領域を含む組換え I g G である、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 4】

F a b または s c F v である、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 5】

ヒト生殖細胞系フレームワーク領域と少なくとも 9 0 % 同一であるフレームワーク領域を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 6】

ヒトフレームワーク領域、ヒト F c 領域、または両方を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 7】

重鎖可変領域配列の超可変ループが、m A b M J 2 - 7 の超可変ループと同じカノニカル構造を有し、重鎖可変領域が、少なくとも 4 つの m A b M J 2 - 7 の IL - 13 接触アミノ酸残基を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

重鎖可変領域配列のフレームワークが、

(i) 49 に対応する位置に G l y ;

(i i) 72 に対応する位置に A l a ;

(i i i) 48 に対応する位置に I l e、かつ 49 に対応する位置に G l y ;

(i v) 48 に対応する位置に I l e、49 に対応する位置に G l y、かつ 72 に対応する位置に A l a ;

(v) 67 に対応する位置に L y s、68 に対応する位置に A l a、かつ 72 に対応する位置に A l a ; および / または

(v i) 48 に対応する位置に I l e、49 に対応する位置に G l y、72 に対応する位置に A l a、79 に対応する位置に A l a

を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 9】

I L - 13 の I L - 13 R 1 に結合する能力を低下させる、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 10】

配列番号 24 の位置 130 に存在する多型とは無関係に I L - 13 に結合する、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 11】

配列番号 1 からなるペプチドおよび配列番号 2 からなるペプチドの一方または両方と結合する、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 12】

重鎖可変領域配列が、

(i) C D R 1 にて G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H (配列番号 48)、

(i i) C D R 2 にて (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G (配列番号 49)、および

(i i i) C D R 3 にて S E E N W Y D F F D Y (配列番号 17)

を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 13】

重鎖可変領域配列が、

C D R 1 にて G F N I K D T Y I H (配列番号 15)、

C D R 2 にて R I D P A N D N I K Y D P K F Q G (配列番号 16)、および

C D R 3 にて S E E N W Y D F F D Y (配列番号 17)

を含む、請求項 12 に記載の抗体分子。

【請求項 14】

軽鎖可変領域配列が、

(i) C D R 1 にて (R K) - S - S - Q - S - (L I) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) (配列番号 25)、

(i i) C D R 2 にて K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S (配列番号 27)、および

(i i i) C D R 3 にて Q - (G S A) - (S T) - (H E Q) - I - P (配列番号 28)

を含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 15】

軽鎖可変領域配列が、

C D R 1 にて R S S Q S I V H S N G N T Y L E (配列番号 18)、

C D R 2 にて K V S N R F S (配列番号 19)、および

C D R 3 にて F Q G S H I P Y T (配列番号 20)

を含む、請求項 14 に記載の抗体分子。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

2つのポリペプチド鎖：V2.11の軽鎖可変領域を含む軽鎖と、V2.1、V2.3、V2.4、V2.5、V2.6、V2.7、またはV2.11の重鎖可変領域を含む重鎖とを含む、単離された組換えIgG抗体。

【請求項17】

重鎖がさらにFc領域を含む、請求項16に記載の単離された組換えIgG抗体。

【請求項18】

請求項1に記載の抗体分子と、医薬上許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項19】

皮下、吸入、または局所投与に適合される、請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項20】

(i)(a) 対応するmAb MJ2-7のCDR3とは3未満のアミノ酸置換が異なる重鎖CDR3を含むか、または

(b) V2.1、V2.3、V2.4、V2.5、V2.6、V2.7、またはV2.11の重鎖可変領域と少なくとも90%同一である

重鎖免疫グロブリン可変領域配列を含むポリペプチドをコードし、あるいは

(ii) V2.1、V2.3、V2.4、V2.5、V2.6、V2.7、またはV2.11の重鎖可変領域をコードする核酸の相補体と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

配列を含む核酸。

【請求項21】

(i)(a) 対応するmAb MJ2-7のCDRとは3未満のアミノ酸置換が異なる軽鎖CDRを含むか、または

(b) V2.11の軽鎖可変領域と少なくとも90%同一である

軽鎖免疫グロブリン可変領域配列を含むポリペプチドをコードするか、あるいは

(ii) V2.11の軽鎖可変領域をコードする核酸の相補体と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

配列を含む核酸。

【請求項22】

請求項1に記載の抗体分子をコードする1つまたは複数の核酸配列を含む宿主細胞。

【請求項23】

宿主細胞に、請求項1に記載の抗体分子をコードする核酸配列を提供する工程と、

抗体分子が発現される条件下に細胞を維持する工程と

を含む、組換え抗体を提供する方法。

【請求項24】

宿主細胞、または宿主細胞が維持される培地から、タンパク質を単離する工程をさらに含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

医薬組成物として、単離されたタンパク質を処方する工程をさらに含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

IL-13関連障害があり、またはIL-13関連障害の危険性のある対象に、有効量の請求項1に記載の抗体分子を投与する工程を含む、IL-13関連障害を治療する方法。

【請求項27】

IL-13関連障害が、喘息性障害、アトピー性障害、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、気道炎症、好酸球増加症、線維症、および過剰粘液生成に関わる状態、炎症状態、自己免疫状態、腫瘍または癌、ウイルス感染、および防御1型免疫応答の発現の抑制からなる群から選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

障害が喘息性障害またはアレルギー性鼻炎である、請求項26に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

障害が炎症性腸疾患である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

障害が慢性閉塞性肺疾患 (COPD) である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

障害がアトピー性障害である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

タンパク質を、皮下から、吸入によって、または局所的に投与する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 33】

(i) サンプルを、請求項 1 に記載の抗 IL-13 抗体分子と接触させる工程と、
(ii) 抗 IL-13 抗体分子を使用してサンプル中の IL-13 を検出する工程とを含む、サンプル中の IL-13 の存在を検出する方法。

10

【請求項 34】

サンプルが対象からのものである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

喘鳴、息切れ、気管支収縮、気道応答亢進、肺容量の低下、線維症、気道炎症、および粘液生成からなる群から選択された喘息の症状を示す対象を治療する方法であって、請求項 1 に記載の抗体を患者に投与する工程を含み、抗体を IL-13 に結合させ、機能性 IL-13 シグナル伝達複合体の形成を妨げる方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、米国特許法第 119 条 (35 U.S.C. § 119) に基づいて 2004 年 6 月 17 日に出願された米国特許出願第 60/581078 号の優先権を主張するものであり、また、「ANTI-IL-13-ANTIBODIES AND COMPLEXES」という名称の、代理人整理番号 16163-029001 が付された 2005 年 6 月 9 日出願の米国特許出願第 11/—の優先権を主張するものである。上記出願の内容を、出典明示により本明細書の一部とする。

30

【0002】

(配列表)

本願は、後日に提出される配列表もその一部とする。

【背景技術】

【0003】

インターロイキン-13 (IL-13) は、Tリンパ球および肥満細胞によって分泌されるサイトカインである (McKenzie 他, (1993) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:3735-39; Bost 他, (1996) Immunology 87: 663-41)。IL-13 は、いくつかの生物活性を IL-4 と共有する。例えば、IL-4 または IL-13 は、B 細胞で IgE アイソタイプスイッチングを引き起こす可能性がある (Tomkinson 他, (2001) J.Immunol. 166: 5792-5800)。さらに、喘息患者の場合に高レベルの細胞表面 CD23 および血清 CD23 (sCD23) が報告されている (Sanchez-Guererro 他, (1994) Allergy 49:587-92; DiLorenzo 他, (1999) Allergy Asthma Proc. 20:119-25)。さらに、IL-4 または IL-13 は、B 細胞および単球上での MHC クラス II および低親和性 IgE 受容体 (CD23) の発現をアップレギュレートする可能性があり、その結果、抗原の提示が増大し、マクロファージの機能が制御される (Tomkinson 他, 前掲)。重要なのは、IL-4 または IL-13 が、内皮細胞上で VCAM-1 の発現を増加させる可能性があり、気道組織への好酸球 (および T 細胞) の優先的漸増が促進される点である (Tomkinson 他, 前掲)。IL-4 または IL-13 は、気道粘液の分泌も増加させる可能性があり、気道の応答性が悪化する可能性がある (Tomkinson 他, 前掲)。これらの観察内容は、IL-13 が必ずしも

40

50

Th 2 の発生を引き起こすのに必要ではなく、またはそのような発生を引き起こすことが可能であるとしても、IL - 13 は、気道好酸球増加症示および AHR の発症で重要な役割を果たすことを示唆している (Tomkinson 他, 前掲; Wills-Karp 他, (1998) Science 282:2258-61)。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者等は、とりわけ IL - 13 結合剤、特に抗 IL - 13 抗体分子が、高い親和性および特異性でヒト IL - 13 および / またはカニクイザル IL - 13 と結合することを発見した。一実施形態では、抗体分子は、少なくとも 1 種の IL - 13 関連活性、例えば炎症状態の調節を低下させる。例えば抗 IL - 13 抗体分子は、IL - 13 に結合し、IL - 13 と IL - 13 受容体、例えば IL - 13 受容体 1 (「IL - 13 R 1」)、IL - 13 受容体 2 (「IL - 13 R 2」)、および / またはインターロイキン - 4 受容体鎖 (「IL - 4 R」) との相互作用 (例えば結合) を調節すること、例えば阻害することができ、それによってシグナル伝達が低下しまたは妨げられる。

【0005】

抗 - IL - 13 抗体分子などの IL - 13 結合剤は、少なくとも 1 種の生体内 IL - 13 関連活性を調節 (例えば阻害) するのに使用することができる。IL - 13 結合剤は、IL - 13 関連障害を治療しまたは予防するのに、あるいはその少なくとも 1 種の症状を寛解させるのに使用することができる。例示的な IL - 13 関連障害には、炎症性障害 (例えば肺の炎症)、呼吸器障害 (例えば、アレルギー性および非アレルギー性喘息を含めた喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD))、ならびに気道炎症、好酸球増加症、線維性障害 (例えば嚢胞性線維症、肝臓線維症、および肺線維症)、強皮症、過剰な粘液生成; アトピー性障害 (例えばアトピー性皮膚炎、蕁麻疹、湿疹、アレルギー性鼻炎、およびアレルギー性胃腸炎)、IL - 13 関連癌 (例えば白血病、グリア芽細胞腫、またはリンパ腫、例えばホジキンリンパ腫)、胃腸障害 (例えば炎症性腸疾患)、肝臓障害 (例えば肝硬変)、およびウイルス性感染が含まれる。

【0006】

IL - 13 結合剤は、IL - 13、特に哺乳類の IL - 13、例えばヒトまたはヒト以外の霊長類の IL - 13 と相互作用する、例えばそれに結合しかつ / またはそれを阻害するタンパク質、例えば抗体分子、ペプチド、または骨格ドメインとすることができる。抗体分子は、単独の抗体分子とすることができる。一実施形態では、結合剤は拮抗薬であり、例えば、とりわけ CD 23 発現の誘導; ヒト B 細胞による IgE 産生; 転写因子、例えば STAT タンパク質 (例えば STAT 6 タンパク質) のリン酸化; 生体内抗原誘発性好酸球増加症; 生体内抗原誘発性気管支収縮; または生体内薬物誘発性気道反応亢進を含むがこれらに限定することのない 1 種または複数の IL - 13 関連活性を中和し、低下させ、かつ / または阻害する結合剤である。例えば結合剤は、本明細書で述べる 1 種または複数のアッセイで、統計的に有意な効果を発揮する。抗 - IL - 13 抗体分子の他に、使用することができるその他の IL - 13 結合剤には、IL - 13 受容体 Fc 融合体、その他の可溶形態の IL - 13 受容体、可溶形態の IL - 4 R、IL - 13 R に結合する抗体、および IL - 13 とその受容体との相互作用を阻害するその他の分子が含まれる。

【0007】

一態様では、本発明は、例えば 5×10^{-7} M 未満、 1×10^{-7} M、 5×10^{-8} 、 1×10^{-8} 、 5×10^{-9} 、 1×10^{-9} M、より典型的には 5×10^{-10} 未満、 1×10^{-10} 、 5×10^{-11} M、 1×10^{-11} M 未満、またはそれよりも良好な K_D に対応する親和性で IL - 13 と結合する IL - 13 結合剤を特徴とする。IL - 13 結合剤は、例えば、少なくとも IL - 13 と結合する抗原結合部位を形成するのに十分な部分の免疫グロブリン可変領域を含む第 1 および第 2 の免疫グロブリン可変領域配列を含んだ抗体分子とすることができる。典型的な場合、第 1 および第 2 の免疫グロブリン可変領域配列は、重鎖および軽鎖、例えば対になりまたは別の方法で適合性を有する重鎖および

10

20

30

40

50

軽鎖の免疫グロブリン可変領域配列に対応する。

【0008】

一実施形態では、IL-13結合剤は、例えば単独のペプチドとして下記のペプチド、すなわち

FVKDLLVHLKKLFR^{EG}Q₁₃₀FN (配列番号1)、
 FVKDLLVHLKKLFR^{EG}R₁₃₀FN (配列番号2)、
 FVKDLLLHLKKLFR^{EG}Q₁₃₀FN (配列番号3)、
 FVKDLLLHLKKLFR^{EG}R₁₃₀FN (配列番号4)、
 FVKDLLVHLKKLFR^{EG} (配列番号5)、および
 FVKDLLLHLKKLFR^{EG} (配列番号6)

10

の1種または複数と結合し、またはペプチドが成熟IL-13タンパク質の構造に折り畳まれる場合には、そのようなペプチド内のアミノ酸と結合する。

【0009】

例えばIL-13結合剤は、RまたはQが位置130に存在するか否かに関わらず、類似の親和性(例えば、8倍、5倍、4倍、または2倍未満異なる親和性)でペプチドにまたはIL-13に結合することができる。特に、IL-13結合剤は、RまたはQが位置130に存在しているか否かに関わらず、同等の親和性でペプチドまたはIL-13に結合してよい。

20

【0010】

IL-13結合剤は、例えば単独のペプチドとして下記のペプチド、すなわち

KDLLVHLKKLFR^{EG}QFN (配列番号7)、
 KDLLVHLKKLFR^{EG}RFN (配列番号8)、
 KDLLLHLKKLFR^{EG}QFN (配列番号9)、
 KDLLLHLKKLFR^{EG}RFN (配列番号10)、
 KDLLVHLKKLFR^E (配列番号11)、
 KDLLLHLKKLFR^E (配列番号12)、および
 HLKKLFR^E (配列番号13)

30

の1種または複数と結合することができ、またはペプチドが成熟IL-13タンパク質の構造に折り畳まれる場合は、そのようなペプチド内のアミノ酸と結合することができる。IL-13結合剤は、本明細書に列挙するペプチド配列(例えば図1B)からの、あるいはアミノ酸残基が少なくとも1種であるが1、2、または3種以下の異なる対応するペプチド、例えばヒトIL-13から得た対応するペプチドからの少なくとも1種(例えば1種、2種、3種、または4種)のアミノ酸残基を含む、IL-13上のエピトープと結合することができる。

【0011】

一実施形態では、IL-13結合剤は、完全長IL-13(配列番号24または配列番号178)のヘリックスD(アミノ酸残基114~130)中のアミノ酸残基、例えば下記のアミノ酸残基、すなわち配列番号24または配列番号178の残基116、117、118、122、123、124、125、126、127、または128の1つまたは複数と接触する(例えばファンデルワールス接触をもたらす)。一実施形態では、IL-13結合剤は、ヘリックスD上のエピトープに結合し、またはヘリックスD上の少なくとも1種のアミノ酸残基(例えば少なくとも1、2、3、または4種)を含むエピトープに結合し、かつ/またはIL-13と、IL-13R₁および/またはIL-13R₂の一方または両方との相互作用を阻害することができる。ヘリックスDは、成熟し処理されたIL-13(配列番号14または配列番号124)のアミノ酸残基95~111に対応する。

40

【0012】

50

一実施形態では、IL-13結合剤は、IL-13、例えば哺乳類の、例えばヒトのIL-13のエピトープ、例えば線状または立体配座エピトープに特異的に結合する。例えばIL-13結合剤は、IL-13に、例えばヒトIL-13に結合するために、MJ2-7および/またはC65と競合する。IL-13結合剤は、MJ2-7および/またはC65とIL-13との結合を競合的に阻害することができる。IL-13結合剤は、ヒトIL-13とのMJ2-7の結合によって定義されたエピトープ、またはIL-13とのC65の結合により定義されたエピトープの、少なくとも1種のアミノ酸と特異的に結合することができる。一実施形態では、IL-13結合剤は、MJ2-7またはC65のエピトープと重なるエピトープ、例えば共通して少なくとも1、2、3、または4種のアミノ酸を含むエピトープ、あるいは結合したときにMJ2-7またはC65との相互作用を立体的に妨げるエピトープに結合することができる。

10

【0013】

さらに別の実施形態では、IL-13結合剤は、ヒトIL-13に結合するIL-13R1によって定義されたエピトープ内、またはヒトIL-13に結合するIL-13R2によって定義されたエピトープ内、またはそのようなエピトープに重なるエピトープ内の、少なくとも1種のアミノ酸と特異的に結合する。IL-13結合剤は、IL-13と、例えばヒトIL-13と結合するために、IL-13R1および/またはIL-13R2と競合することができる。IL-13結合剤は、IL-13R1および/またはIL-13R2とIL-13との結合を競合的に阻害することができる。IL-13結合剤は、結合したときにIL-13R1および/またはIL-13R2との相互作用を立体的に妨げるIL-13上のエピトープと、相互に作用することができる。

20

【0014】

一実施形態では、IL-13結合剤は、IL-13R2に匹敵する機能的活性を有し、例えばIL-13結合剤は、IL-13のIL-13R1との相互作用を低下させ、または阻害する。IL-13結合剤は、IL-13とIL-13R1との複合体の形成を妨げることができ、あるいは、IL-13とIL-13R1との複合体を崩壊しまたは不安定化させることができる。一実施形態では、IL-13結合剤は、三重複合体の形成、例えばIL-13、IL-13R1、およびIL-4-Rとの間の複合体の形成を阻害する。

30

【0015】

一実施形態では、IL-13結合剤は、1種または複数のIL-13関連活性を阻害することができる。IC₅₀は約50nMから5pMであり、典型的には約100から250pM以下であり、例えばそれよりも良好に阻害する。IL-13の少なくとも1種の活性を阻害する物質は、IL-13拮抗薬と見なされる。一実施形態では、IL-13結合剤は、10³から10⁸M⁻¹s⁻¹の範囲内の動態で、典型的には10⁴から10⁷M⁻¹s⁻¹の範囲内の動態で、IL-13に結合することができる。さらに別の実施形態では、IL-13結合剤は、10⁻²から10⁻⁶s⁻¹、典型的には10⁻²から10⁻⁵s⁻¹の範囲内の解離動態を有する。一実施形態では、IL-13結合剤は、IL-13、例えばヒトIL-13に対し、モノクローナル抗体MJ2-7またはC65あるいはその修飾形態、例えばそのキメラ形態またはヒト化形態と同様の（例えば20、10、または5倍以内）、親和性および/または反応速度で結合しする。IL-13結合剤の親和性および結合動態は、例えばバイオセンサー技術（BIACORE（商標））を使用して試験することができる。

40

【0016】

IL-13結合剤は、抗体分子、例えば抗体の抗原結合断片（Fab、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fv断片など）、またはFcドメインを含む抗体とすることができる。典型的な場合、抗-IL-13抗体分子は、モノクローナルまたは単一特異的である。

【0017】

IL-13結合剤、特に抗-IL-13抗体分子は、事実上のヒト、ヒト化、CDR-グラフト化、キメラ、変異、親和性成熟、脱免疫化、合成、またはその他の方法で

50

生体外で発生させたタンパク質とすることができる。一実施形態では、IL-13結合剤はヒト化抗体である。一実施形態では、IL-13結合剤は、ヒトにおいては抗原性ではなく、またはHAMMA応答を引き起こさない。

【0018】

一実施形態では、IL-13抗体分子は、重鎖および軽鎖を含む。抗-IL-13抗体分子の重鎖および軽鎖は、実質的に完全長とすることができ（例えば抗体分子は、少なくとも1つ、好ましくは2つの重鎖と、少なくとも1つ、好ましくは2つの軽鎖とを含むことができる）、または抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、または単鎖Fv断片）を含むことができる。さらにその他の実施形態では、抗体分子は、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEの重鎖定常領域から選択され、特に例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択され、より特別には重鎖定常領域IgG1（例えばヒトIgG1）である、重鎖定常領域を有する。典型的な場合、重鎖定常領域は、ヒトまたは修飾形態のヒト定常領域である（例えば、実施例5で述べるように）。別の実施形態では、抗体分子が、例えば または の軽鎖定常領域から選択され、好ましくは（例えばヒト）である軽鎖定常領域を有する。一実施形態では、定常領域が変化し、例えば変異して、抗体分子の性質を修飾する（例えばFc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞の機能、または相補的機能の1つまたは複数を増大させ、または低下させる）。例えば、ヒトIgG1定常領域は、1つまたは複数の残基、例えば実施例5で述べるように、残基234および237の1つまたは複数で変異することができる。

10

20

【0019】

一実施形態では、IL-13結合剤（例えば抗-IL-13結合分子）が、例えばMJ2-7など、本明細書に開示される抗体の軽鎖または重鎖可変領域からの、少なくとも1つ、2つ、好ましくは3つのCDRを含む。例えばタンパク質は、CDR領域内に下記の配列の1つまたは複数、すなわち
GFNIKDTYIH（配列番号15）、
RIDPANDNIKYDPKFQGG（配列番号16）、
SEENWYDFFDY（配列番号17）、
RSSQSIVHSNGNTYLE（配列番号18）、
KVSNRFS（配列番号19）、および
FQGSHIPT（配列番号20）の1つまたは複数を含み、あるいは、上記列挙した配列に対して10のアミノ酸ごとに4、3、2、5、2、1、5、1、または0.5以下の変性部分（例えば置換、挿入、または欠失）があり（例えば、異なる部分の数はCDRの長さに比例している）、例えばCDR1つ当たり少なくとも1つの変性部分があるが2、3、または4以下である、異なるアミノ酸配列を有するCDRを含む。

30

【0020】

例えばIL-13結合剤は、軽鎖可変領域配列内で、CDR領域内に下記の配列、すなわち
RSSQSIVHSNGNTYLE（配列番号18）、
KVSNRFS（配列番号19）、および
FQGSHIPT（配列番号20）の少なくとも1つ、2つ、または3つを含むことができ、あるいは、上記列挙した配列に対して10のアミノ酸ごとに、4、3、2、5、2、1、5、1、または0.5以下の置換、挿入、または欠失分だけ異なるアミノ酸配列を含むことができる。

40

【0021】

IL-13結合剤は、重鎖可変領域配列内で、CDR領域内に下記の配列、すなわち
GFNIKDTYIH（配列番号15）、
RIDPANDNIKYDPKFQGG（配列番号16）、および
SEENWYDFFDY（配列番号17）の少なくとも1つ、2つ、または3つを含むことができ、あるいは、上記列挙した配列に対して10のアミノ酸ごとに、4、3、2、

50

5、2、1.5、1、または0.5以下の置換、挿入、または欠失分だけ異なるアミノ酸配列を含むことができる。重鎖CDR3領域は、その長さが13未満または12未満のアミノ酸とすることができ、例えばその長さは11アミノ酸である(C h o t i aまたはK a b a t定義のどちらかを使用して)。

【0022】

別の実施形態では、IL-13結合剤は、軽鎖可変領域配列で、CDR領域内に下記の配列、すなわち

(i) (RK) - S - S - Q - S - (LI) - (KV) - H - S - (ND) - G - N - (TN) - Y - L - (EDNQYAS) (配列番号25) or (RK) - S - S - Q - S - (LI) - (KV) - H - S - (ND) - G - N - (TN) - Y - L - E (配列番号26)、または(RK) - S - S - Q - S - (LI) - (KV) - H - S - N - G - N - T - Y - L - (EDNQYAS) (配列番号21)、

(ii) K - (LVI) - S - (NY) - (RW) - (FD) - S (配列番号27)、or K - (LV) - S - (NY) - R - F - S (配列番号22)、および

(iii) Q - (GSA) - (ST) - (HEQ) - I - P (配列番号28)、F - Q - (GSA) - (SIT) - (HEQ) - (IL) - P (配列番号23)、またはQ - (GSA) - (ST) - (HEQ) - I - P - Y - T (配列番号193)、またはF - Q - (GSA) - (SIT) - (HEQ) - (IL) - P - Y - T (配列番号29)

の少なくとも1つ、2つ、または3つを含むことができる(カッコ内のアミノ酸は、特定位置に対する代替例を表す)。

【0023】

好ましい一実施形態では、IL-13結合剤は、MJ2-7からの6つの全てのCDR、または密接に関連したCDRを含み、例えば、全て同一でありまたは少なくとも1つのアミノ酸変性部分を有するが2つ、3つ、または4つ以下の変性部分(例えば、置換、欠失、または挿入)を有するCDRを含む。IL-13結合剤は、MJ2-7の、少なくとも1、2、3、4、5、6、または7個のIL-13接触アミノ酸残基を含むことができる。

【0024】

さらに別の実施例では、IL-13結合剤は、同じカノニカル(canonical)構造を有する少なくとも1つ、2つ、または3つのCDR領域と、対応するMJ2-7のCDR領域、例えばMJ2-7の重鎖および/または軽鎖可変領域の少なくともCDR1およびCDR2とを含む。

【0025】

IL-13結合剤は、下記の配列、すなわち

DIVMTQTPLSLPVTPEGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVS N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
SRVEAEDVGVYYC FQGS HIPYT (配列番号30)

DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW
FQQRPGQSPRRLIYKVS N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
SRVEAEDVGVYYC FQGS HIPYT (配列番号31)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVS N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
SRVEAEDVGVYYC FQGS HIPYT (配列番号32)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW
YLQKPGQPPQLLIYKVS N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
SRVEAEDVGVYYC FQGS HIPYT (配列番号33)

DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVS N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
SRVEAEDVGVYYC FQGS HIPYT (配列番号34)

DIVMTQTPLSSPVT LGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW

L Q Q R P G Q P P R L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G A G T D F T L K I
 S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H I P Y T (配列番号 3 5)
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W
 Y Q Q K P G K A P K L L I Y K V S N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I
 S S L Q P E D F A T Y Y C F Q G S H I P Y T (配列番号 3 6)
 D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L V Y S D G N T Y L N W
 F Q Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H I P Y T (配列番号 3 7)
 D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W
 Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H I P Y T (配列番号 3 8)

10

の1つを含むことができ、あるいは8、7、6、5、4、3、または2つよりも少ない変性部分(例えば置換、挿入、または欠失、例えば同類置換、またはM J 2 - 7内の対応位置でのアミノ酸残基との置換)を有する配列を含むことができる。例示的な置換は、以下のK a b a t位置、すなわち2、4、6、35、36、38、44、47、49、62、64~69、85、87、98、99、101、および102の1つでなされる。置換は、例えばM J 2 - 7からの対応する位置のアミノ酸をヒトフレームワーク領域へと置き換えることができる。

【 0 0 2 6 】

I L - 13 結合剤は、下記の配列、すなわち

20

D I V M T Q T P L S L P V T P G E P A S I S C - (R K) - S - S - Q - S - (L I)
) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) W Y
 L Q K P G Q S P Q L L I Y K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S G
 V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F - Q - (G S A)
) - (S I T) - (H E Q) - (I L) - P (配列番号 3 9)

D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C - (R K) - S - S - Q - S - (L I)
) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) W F
 Q Q R P G Q S P R R L I Y K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S G
 V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F - Q - (G S A)
) - (S I T) - (H E Q) - (I L) - P (配列番号 4 0)

30

D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C - (R K) - S - S - Q - S - (L I)
) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) W Y
 L Q K P G Q S P Q L L I Y K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S G
 V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F - Q - (G S A)
) - (S I T) - (H E Q) - (I L) - P (配列番号 4 1)

D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C (R K) - S - S - Q - S - (L I)
) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) W Y L
 Q K P G Q P P Q L L I Y K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S G V
 P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F - Q - (G S A) -
) - (S I T) - (H E Q) - (I L) - P (配列番号 4 2)

40

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C (R K) - S - S - Q - S - (L I)
) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) W Y L
 Q K P G Q S P Q L L I Y K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S G V
 P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F - Q - (G S A) -
) - (S I T) - (H E Q) - (I L) - P (配列番号 4 3)

D I V M T Q T P L S S P V T L G Q P A S I S C (R K) - S - S - Q - S - (L I)
) - (K V) - H - S - (N D) - G - N - (T N) - Y - L - (E D N Q Y A S) W L Q
 Q R P G Q P P R L L I Y K - (L V I) - S - (N Y) - (R W) - (F D) - S G V
 P D R F S G S G A G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F - Q - (G S A) -
) - (S I T) - (H E Q) - (I L) - P (配列番号 4 4)

50

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC(RK) - S - S - Q - S - (LI)
 - (KV) - H - S - (ND) - G - N - (TN) - Y - L - (EDNQYAS)WYQ
 QKPGKAPKLLIYK - (LVI) - S - (NY) - (RW) - (FD) - SGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCF - Q - (GSA) -
 (SIT) - (HEQ) - (IL) - P (配列番号45)

DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISC(RK) - S - S - Q - S - (LI)
 - (KV) - H - S - (ND) - G - N - (TN) - Y - L - (EDNQYAS)WYL
 QKPGQSPKLLIYK - (LVI) - S - (NY) - (RW) - (FD) - SGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF - Q - (GSA) -
 (SIT) - (HEQ) - (IL) - P (配列番号46)

10

の1つを含んでもよく、あるいは、8、7、6、5、4、3、または2つよりも少ない変性部分(例えば置換、挿入、または欠失、例えば同類置換、またはMJ2-7内の対応位置でのアミノ酸残基との置換)を有する配列を、フレームワーク領域内に含んでもよい。例示的な置換は、以下のKabab位置、すなわち2、4、6、35、36、38、44、47、49、62、64~69、85、87、98、99、101、および102の1つまたは複数でなされる。置換は、例えばMJ2-7からの対応する位置のアミノ酸をヒトフレームワーク領域へと置き換えることができる。配列の後には、ジペプチドTyr-Thrが続いてもよい。FR4領域は、例えば配列FGGGTKVEIKR(配列番号47)を含むことができる。

20

【0027】

別の実施例では、IL-13結合剤は、重鎖可変領域配列内で、下記の配列、すなわち(i)G-(YF)-(NT)-I-K-D-T-Y-(MI)-H(配列番号48)、(ii)(WR)-I-D-P-(GA)-N-D-N-I-K-Y-(SD)-(PQ)-K-F-Q-G(配列番号49)、および(iii)SEENWYDFFDY(配列番号17)の少なくとも1つ、2つまたは3つをCDR領域内に含むことができる(カッコ内のアミノ酸は、特定位置に対する代替例を表す)。

【0028】

IL-13結合剤は、下記の配列、すなわち
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 PGQGLEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTMTRDTSISTAY
 MELSLRLRSDDTAVYYCARSEENWYDFFDY(配列番号50)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 PGQRLLEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTITRDTASASTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARSEENWYDFFDY(配列番号51)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 TGQGLEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTMTRNTSISTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARSEENWYDFFDY(配列番号52)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 PGQGLEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTMTTDTSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCARSEENWYDFFDY(配列番号53)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTMTEDTSTDTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCATSEENWYDFFDY(配列番号54)
 QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 PGQALEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTITRDRSMSTAY
 MELSSLRSEDTAMYYCARSEENWYDFFDY(配列番号55)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNICKDTYIHWVRQA
 PGQGLEWMGRIDPANDNIKYDPKFKQGRVTMTRDTSSTSTVY
 MELSSLRSEDTAVYYCARSEENWYDFFDY(配列番号56)

30

40

50

QMQLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGFNIKDTYIHWVRQA
 RGQRLIEWIGRIDPANDNIKYDPKFQGRVTITRDMSTSTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCAASEENWYDFFDY (配列番号57)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号58)
 EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRAEDTALYYCAK DSEENWYDFFDY (配列番号59)
 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWIRQA 10
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号60)
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVGRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDDS KNTLY
 LQMNSLKTEDTAVYYCTTSEENWYDFFDY (配列番号61)
 EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRAEDTALYHCARSEENWYDFFDY (配列番号62)
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY 20
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号63)
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKSEENWYDFFDY (配列番号64)
 QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCAKSEENWYDFFDY (配列番号65)
 QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号66) 30
 EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRTEDTALYYCAK DSEENWYDFFDY (配列番号67)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRDEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号68)
 EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCTASGFNIKDTYIHWFRQA
 PGKGLEWVGRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISR DGSKS IAY
 LQMNSLKTEDTAVYYCTRSEENWYDFFDY (配列番号69)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA 40
 PGKGLE YVSRIIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNTLY
 LQMNSLRAEDMAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号70)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWIGRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISRDNACKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号71)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVARIDPANDNIKYDPKFQ GKATI SRDNACKNSLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDY (配列番号72)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWVARIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNACKNSLY 50

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 3)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W V G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S R D N A K N S L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 4)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W V A R I D P A N D N I K Y D P K F Q G K A T I S A D N A K N S L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 5)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W I G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S A D N A K N S L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 6)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W V G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S A D N A K N S L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 7)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W V A R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S R D N A K N S A Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 8)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W V G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S A D N A K N S A Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 7 9)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W I G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S A D N A K N S A Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 0)
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T G S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W I G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S A D N A K N S L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 1)
 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T G S G F N I K D T Y I H W V K Q R
 P E Q G L E W I G R I D P A N D N I K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
 L Q L N S L T S E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 2)

10

20

30

40

の1つを含むことができ、あるいは、8、7、6、5、4、3、または2つよりも少ない変性部分（例えば置換、挿入、または欠失、例えば同類置換、またはM J 2 - 7内の対応位置でのアミノ酸残基との置換）を有する配列を含むことができる。例示的な置換は、以下のK a b a t位置、すなわち2、4、6、25、36、37、39、47、48、93、94、103、104、106、および107の1つまたは複数でなされる。例示的な置換は、下記の位置（順次番号付けによる）、すなわち48、49、67、68、72、および79の1つまたは複数で行うこともできる。置換は、例えばM J 2 - 7からの対応する位置のアミノ酸をヒトフレームワーク領域へと置き換えることができる。一実施形態では、配列は、下記のもの、すなわち48のI l e、49のG l y、67のL y s、68のA l a、72のA l a、および79のA l a、好ましくは48のI l e、49のG l y、72のA l a、および79のA l aの、1つまたは複数を含む（順次番号付けによる）。

【 0 0 2 9 】

さらに、重鎖可変領域配列のフレームワークは、(i) 4 9 に対応する位置にG l y、(i i) 7 2 に対応する位置にA l a、(i i i) 4 8 に対応する位置にI l e、および4 9 に対してG l y、(i v) 4 8 に対応する位置にI l e、4 9 に対してG l y、および7 2 に対してA l a、(v) 6 7 に対応する位置にL y s、6 8 に対してA l a、および7 2 に対してA l a、および/または(v i) 4 8 に対応する位置にI l e、4 9 に対してG l y、7 2 に対してA l a、7 9 に対してA l aを含むことができる。

【 0 0 3 0 】

I L - 1 3 結合剤は、下記の配列、すなわち
 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K

50

- D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G Q G L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T M T R D T S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 3)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G Q R L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T I T R D T S A S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 4)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A T G Q G L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T M T R N T S I S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 5)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G Q G L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T M T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 6)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T M T E D T S T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A T S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 7)

Q M Q L V Q S G A E V K K T G S S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G Q A L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T I T R D R S M S T A Y M E L S S L R S E D T A M Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 8)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G Q G L E W M G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T M T R D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 8 9)

Q M Q L V Q S G P E V K K P G T S V K V S C K A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A R G Q R L E W I G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R V T I T R D M S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A A S E E N W Y D F F D Y (配列番号 9 0)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 9 1)

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K D S E E N W Y D F F D Y (配列番号 9 2)

Q V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K

10

20

30

40

50

- D - T - Y - (M I) - H , W I R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 3)

E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 D S K N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T T S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 4)

E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y H C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 5)

E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 6)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 7)

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 8)

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 9 9)

E V Q L V E S G G V V V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N S K N S L Y L Q M N S L R T E D T A L Y Y C A K D S E E N W Y D F F D Y (配
 列番号 1 0 0)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 1)

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C T A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W F R Q A P G K G L E W V G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 G S K S I A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 2)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K

10

20

30

40

50

- D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E Y V S (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N S K N T L Y L Q M G S L R A E D M A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 3)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W I G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 4)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G K A T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 5)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S A D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 6)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 7)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G K A T I S A D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 8)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W I G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S A D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 0 9)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S A D
 N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 1 0)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V A (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S R D
 N A K N S A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 1 1)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K
 - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W V G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S A D
 N A K N S A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列
 番号 1 1 2)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G - (Y F) - (N T) - I - K

10

20

30

40

50

- D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W I G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S A D N A K N S A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 1 1 3)

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T G S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V R Q A P G K G L E W I G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G R F T I S A D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 1 1 4)

E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T G S G - (Y F) - (N T) - I - K - D - T - Y - (M I) - H , W V K Q R P E Q G L E W I G (W R) - I - D - P - (G A) - N - D - N - I - K - Y - (S D) - (P Q) - K - F - Q - G K A T I T A D T S S N T A Y L Q L N S L T S E D T A V Y Y C A R S E E N W Y D F F D Y (配列番号 1 1 5)

の1つを含んでもよく、あるいは、8、7、6、5、4、3、または2つよりも少ない変性部分(例えば置換、挿入、または欠失、例えば同類置換、またはM J 2 - 7内の対応位置でのアミノ酸残基との置換)を有する配列を、フレームワーク領域内に含んでもよい。例示的な置換は、以下のK a b a t位置、すなわち2、4、6、25、36、37、39、47、48、93、94、103、104、106、および107の1つまたは複数でなされる。置換は、例えばM J 2 - 7からの対応する位置のアミノ酸をヒトフレームワーク領域へと置き換えることができる。FR 4領域は、例えば、配列W G Q G T T L T V S S (配列番号116)またはW G Q G T L V T V S S (配列番号117)を含むことができる。

【0031】

一実施形態では、重鎖可変領域配列は、V 2 . 1、V 2 . 2、V 2 . 3、V 2 . 4、V 2 . 5、V 2 . 6、V 2 . 7、V . 2 . 11の重鎖可変領域または本明細書で述べるその他の重鎖可変領域に対して、少なくとも90、92、93、94、95、96、97、98、99%同一であり、または同一である。一実施形態では、重鎖可変領域配列は、V 2 . 1、V 2 . 2、V 2 . 3、V 2 . 4、V 2 . 5、V 2 . 6、V 2 . 7、V . 2 . 11の重鎖可変領域または本明細書で述べるその他の重鎖可変領域をコードする核酸の相補体と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる配列を含んだ可変領域配列を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域配列は、V 2 . 11の軽鎖可変領域または本明細書で述べるその他の軽鎖可変領域に対し、少なくとも90、92、93、94、95、96、97、98、99%同一であり、または同一である。一実施形態では、軽鎖可変領域配列は、V 2 . 11の軽鎖可変領域または本明細書で述べるその他の軽鎖可変領域をコードする核酸の相補体と、高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされた配列を含む。

【0032】

一実施形態では、重鎖フレームワーク(例えばFR 1、FR 2、FR 3のそれぞれ、またはFR 1、FR 2、およびFR 3を包含した配列であるが、CDRは除外する)は、以下の生殖細胞系Vセグメント配列、すなわちDP - 25、DP - 1、DP - 12、DP - 9、DP - 7、DP - 31、DP - 32、DP - 33、DP - 58、またはDP - 54の1つ、あるいはカノニカル構造クラス1~3に適合する別のV遺伝子の、重鎖フレームワークに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む(例えば、Chothia他、(1992) J.Mol.Biol. 227:799-817; Tomlinson他、(1992) J.Mol. Biol. 227:776-798参照)。カノニカル構造クラス1~3に適合するその他のフレームワークは、K a b a t番号付けによる下記の残基、すなわち位置26のA l a、G l y、T h r、またはV a l;位置26のG l y;位置27のT y r、P h e、またはG l y;位置29のP h e、V a l、I l e、またはL e u;位置34のM e t、I l e、L e u、V a l、T h r、T r p、またはI l e;位

10

20

30

40

50

置 94 の A r g、T h r、A l a、L y s；位置 54 の G l y、S e r、A s n、または A s p；および位置 71 の A r g の 1 つまたは複数を有するフレームワークを含む。

【0033】

一実施形態では、軽鎖フレームワーク（例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、または F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する）は、V I I サブグループ生殖細胞系配列、あるいは以下の生殖細胞系 V セグメント配列、すなわち A 17、A 1、A 18、A 2、A 19 / A 3、または A 23 の 1 つ、あるいはカノニカル構造クラス 4 ~ 1 に適合する別の V 遺伝子の、軽鎖フレームワークに対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む（例えば、Tomlinson 他、(1995) EMBO J. 14:4628 参照）。カノニカル構造クラス 4 ~ 1 に適合するその他のフレームワークは、K a b a t 番号付けによる下記の残基、すなわち位置 2 の V a l または L e u または I l e；位置 25 の S e r または P r o；位置 29 の I l e または L e u；位置 31 d の G l y；位置 33 の P h e または L e u；および位置 71 P h e の 1 つまたは複数を有するフレームワークを含む。

10

【0034】

別の実施形態では、軽鎖フレームワーク（例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、または F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する）は、V I サブグループ生殖細胞系配列、例えば D P K 9 配列の軽鎖フレームワークに対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む。

20

【0035】

別の実施形態では、重鎖フレームワーク（例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、または F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する）は、V H I サブグループ生殖細胞系配列、例えば D P - 25 配列、または V H I I I サブグループ生殖細胞系配列、例えば D P - 54 配列の軽鎖フレームワークに対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む。

【0036】

一実施形態では、I L - 13 結合剤は、本明細書で述べる抗体、例えば C 65 の、軽鎖または重鎖可変領域からの少なくとも 1 つ、2 つ、好ましくは 3 つの C D R を含む。例えば、I L - 13 結合剤は、下記の配列、すなわち

30

Q A S Q G T S I N L N（配列番号 118）、

G A S N L E D（配列番号 119）、および

L Q H S Y L P W T（配列番号 120）

G F S L T G Y G V N（配列番号 121）、

I I W G D G S T D Y N S A L（配列番号 122）、および

D K T F Y Y D G F Y R G R M D Y（配列番号 123）の 1 つまたは複数を C D R 領域内に含み、あるいは、上記列挙した配列に対して、10 のアミノ酸ごとに 4、3、2、5、

2、1.5、1、または 0.5 以下の置換、挿入、または欠失分だけ異なる（例えば、相違部分の数は、C D R の長さに比例する）アミノ酸配列を有する C D R を含み、例えば、C D R 当たり少なくとも 1 つの変性部分であるが 2、3、または 4 以下である。例えばタンパク質は、軽鎖可変領域配列で、C D R 領域内に下記の配列、すなわち

40

Q A S Q G T S I N L N（配列番号 118）、

G A S N L E D（配列番号 119）、および

L Q H S Y L P W T（配列番号 120）の 1 つ、2 つ、または 3 つを含むことができ、あ

るいは、上記列挙した配列に対して、10 のアミノ酸ごとに 4、3、2、5、2、1.5、1、または 0.5 以下の置換、挿入、または欠失分だけ異なる 4 アミノ酸配列を含むことができる。

【0037】

I L - 13 結合剤は、重鎖可変領域配列で、C D R 領域内に下記の配列、すなわち

50

G F S L T G Y G V N (配列番号 1 2 1)、
 I I W G D G S T D Y N S A L (配列番号 1 2 2)、および
 D K T F Y Y D G F Y R G R M D Y (配列番号 1 2 3) の少なくとも 1 つ、2 つ、または
 3 つを含むことができ、あるいは、上記列挙した配列に対して、10 のアミノ酸ごとに 4
 、3、2、5、2、1、5、1、または 0.5 以下の置換、挿入、または欠失分だけ異なる
 4 アミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 3 8 】

好ましい一実施形態では、I L - 1 3 結合剤は、C 6 5 からの 6 つの C D R の全て、ま
 たは密接に関係する C D R を含み、これら C D R は同一であり、または少なくとも 1 つの
 変性部分を有するが 2、3、または 4 以下の変性部分 (例えば、置換、欠失、または挿入
) を有するものである。

10

【 0 0 3 9 】

さらに別の実施形態では、I L - 1 3 結合剤は、同じカノニカル構造を有する少なくと
 も 1 つ、2 つ、または 3 つの C D R 領域と、C 6 5 の対応する C D R 領域、例えば C 6 5
 の重鎖および / または軽鎖可変領域の少なくとも C D R 1 および C D R 2 とを含む。

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、重鎖フレームワーク (例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、ま
 たは F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する) は、下
 記の生殖細胞系 V セグメント配列、すなわち D P - 7 1 または D P - 6 7 の 1 つ、あるい
 はカノニカル構造クラスの C 6 5 に適合する別の V 遺伝子の、重鎖フレームワークに対し
 て、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ
 以上が同一のアミノ酸配列を含む (例えば、Chothia 他、(1992) J.Mol.Biol. 227:799-81
 7; Tomlinson 他、(1992) J.Mol. Biol. 227:776-798 参照) 。

20

【 0 0 4 1 】

一実施形態では、軽鎖フレームワーク (例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、ま
 たは F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する) は、D
 P K - 1 または D P K - 9 生殖細胞系配列あるいはカノニカル構造クラスの C 6 5 に適合
 する別の V 遺伝子の、軽鎖フレームワークに対して、少なくとも 80%、85%、90%
 、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む (例
 えば、Tomlinson 他、(1995) EMBO J. 14:4628 参照) 。

30

【 0 0 4 2 】

別の実施形態では、軽鎖フレームワーク (例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、
 または F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する) は、
 V I サブグループ生殖細胞系配列、例えば D P K - 9 または D P K - 1 配列の軽鎖フ
 レームワークに対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%、
 99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 3 】

別の実施形態では、重鎖フレームワーク (例えば F R 1、F R 2、F R 3 のそれぞれ、
 または F R 1、F R 2、および F R 3 を包含した配列であるが、C D R は除外する) は、
 V H I V サブグループ生殖細胞系配列、例えば D P - 7 1 または D P - 6 7 配列の軽鎖
 フレームワークに対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98%
 、99%、またはそれ以上が同一のアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、軽鎖または重鎖可変フレームワーク (例えば、少なくとも F R 1、F
 R 2、F R 3、および所望により F R 4 を包含する領域) は、(a) 例えばヒト成熟抗体
 、ヒト生殖細胞系配列、ヒトコンセンサス配列、または本明細書で述べるヒト抗体からの
 軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基など、ヒト軽鎖または重鎖可変フレームワークか
 らのアミノ酸残基の少なくとも 80%、85%、90%、95%、または 100% を含む
 軽鎖または重鎖可変フレームワーク ; (b) 例えばヒト成熟抗体、ヒト生殖細胞系配列、
 ヒトコンセンサス配列からの軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基など、ヒト軽鎖また

50

は重鎖可変フレームワークからのアミノ酸残基の20%から80%、40%から60%、60%から90%、または70%から95%を含む軽鎖または重鎖可変フレームワーク；(c)非ヒトフレームワーク(例えば、げっ歯類フレームワーク)；または(d)例えば抗原性または細胞毒性決定基を除去するように修飾され、脱免疫化され、または部分的にヒト化された、非ヒトフレームワークから選択することができる。一実施形態では、重鎖可変領域配列は、ヒト残基またはヒトコンセンサス配列残基を下記の位置の1つまたは複数に、すなわち(軽鎖の可変領域のFRでは)4L、35L、36L、38L、43L、44L、58L、46L、62L、63L、64L、65L、66L、67L、68L、69L、70L、71L、73L、85L、87L、98L、および/または(重鎖の可変領域のFRでは)2H、4H、24H、36H、37H、39H、43H、45H、49H、58H、60H、67H、68H、69H、70H、73H、74H、75H、78H、91H、92H、93H、および/または103H(Kabat番号付けによる)の1つまたは複数に(少なくとも5、10、12、または全てであることが好ましい)含む。

【0045】

一実施形態では、IL-13結合剤は、少なくとも1つの非ヒトCDR、例えばマウスCDR、例えばMJ2-7またはC65からのCDR、またはそのj変異体と、MJ2-7またはC65のフレームワークとは少なくとも1つのアミノ酸、例えば少なくとも5、8、10、12、15、または18のアミノ酸だけ異なる少なくとも1つのフレームワークとを含む。例えばタンパク質は、1、2、3、4、5、または6個のそのような非ヒトCDRを含み、HC FR1、HC FR2、HC FR3、LC FR1、LC FR2、およびLC FR3の少なくとも3つで少なくとも1アミノ酸だけ異なる部分を含む。

【0046】

一実施形態では、抗-IL-13抗体分子の重鎖または軽鎖可変領域配列は、本明細書で述べる抗体、例えばMJ2-7またはC65の可変領域配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一であるアミノ酸配列、あるいは、本明細書で述べる抗体、例えばMJ2-7またはC65の可変領域配列に対して少なくとも1または5個の残基であるが40、30、20、または10個未満の残基が異なっているアミノ酸配列を含む。一実施形態では、タンパク質の重鎖または軽鎖可変領域配列は、例えば低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件下、本明細書で述べる核酸配列によって、あるいは本明細書で述べる核酸配列またはその相補体とハイブリダイズする核酸によってコードされたアミノ酸配列を含む。

【0047】

一実施形態では、可変領域配列の一方または両方は、非ヒト抗体(例えば、mAb13.2などのマウス抗体)とヒト抗体または生殖細胞系配列との両方から様々に得られるフレームワーク領域に、アミノ酸位置を含む。例えば可変領域配列は、いくつかの位置、すなわち非ヒト抗体とヒト抗体(またはヒト生殖細胞系配列)の両方がその位置で同一であるために、アミノ酸残基がこれらの抗体の両方と同一になるいくつかの位置を含むことができる。非ヒトおよびヒト抗体が異なる残りのフレームワーク位置では、可変領域の位置の少なくとも50、60、70、80、または90%が、非ヒトではなくてヒト抗体(またはヒト生殖細胞系配列)と同一であることが好ましい。例えば、そのような残りのフレームワーク位置には、ヒトではなく非ヒト抗体と同一でよい場所が、全くないかあるいは少なくとも1、2、3、または4カ所ある。例えばHC FR1では、1つまたは2つのそのような位置を、非ヒトとすることができ；HC FR2では、1つまたは2つのそのような位置を、非ヒトとすることができ；FR3では、1、2、3、または4つのそのような位置を、非ヒトとすることができ；LC FR1では、1、2、3、または4つのそのような位置を、非ヒトとすることができ；LC FR2では、1つまたは2つのそのような位置を、非ヒトとすることができ；LC FR3では、1つまたは2つのそのよう

10

20

30

40

50

な位置を、非ヒトとすることができる。フレームワークは、追加の非ヒト位置を含むことができる。

【0048】

IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子は、別の機能性分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質（例えば Fab 断片）に誘導体化または結合することができる。例えば結合剤は、とりわけ別の抗体分子（例えば二重特異性または多重特異性抗体分子を形成するため）や毒素、放射性同位元素、細胞毒性または細胞増殖抑制性物質のような1つまたは複数のその他の分子本体に、機能的に結合することができる（例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合、またはその他の方法によって）。

【0049】

別の実施形態では、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子は、IL-13 と受容体 IL-13R₁ との相互作用を妨げる。一実施形態では、IL-13 結合剤は、IL-13（配列番号124、図13A）の Phe107 と、残基 Leu319、Cys257、Arg256、および Cys320 の側鎖によって形成された IL-13R₁（配列番号125、図13B）の疎水性ポケットとの相互作用を、例えばこれら残基との直接結合によってまたは立体障害によって妨げることができる。別の実施形態では、IL-13 結合剤は、IL-13R₁（配列番号125）のアミノ酸残基 Ile254、Ser255、Arg256、Lys318、Cys320、および Tyr321 と、IL-13（配列番号124）のアミノ酸残基 Arg11、Glu12、Leu13、Ile14、Glu15、Lys104、Lys105、Leu106、Phe107、および Arg108 との間のファンデルワールス相互作用を、例えばこれら残基のとの直接結合によってまたは立体障害によって妨げることができる。

【0050】

一実施形態では、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子は、"the suggested list of human tissues to be used for immunohistochemical investigations of cross-reactivity", Annex II, the DC CPMP Guideline III/5271/94 Draft 5, "Production and quality control of monoclonal antibodies" の少なくとも半分、3分の2、4分の3、90%、または全ての組織に対して、また1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use" の表2で推奨される組織の少なくとも半分、3分の2、4分の3、90%、または全てに対してスクリーニングしたときに、有意な交差反応性を持たない。

【0051】

一実施形態では、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体は、IL-13、例えば哺乳類 IL-13、例えばヒトまたはヒト以外の霊長類 IL-13 に特異的に結合する。例えば結合剤は、IL-13 以外の非特異的抗原（例えば BSA、カゼイン）に結合するための親和性よりも、少なくとも2倍、10倍、50倍、100倍、またはそれよりも良好な（より小さい K_d ）親和性で、あるいは IL-13 以外の別のヒトインターロイキンに結合するための親和性よりも、少なくとも2倍、10倍、50倍、100倍、またはそれよりも良好な（より小さい K_d ）親和性で、IL-13 に結合する。いくつかの実施形態では、IL-13 結合剤は、実施例1で記述されるヒト IL-13 の粗製サンプルに対してプロットしたときに、単一の目立つバンドを検出するだけである（「4元スクリーン」）。いくつかの実施形態では、IL-13 結合剤を固定化したビーズを使用して粗製サンプルからタンパク質を引き出すことにより形成された沈殿物は、IL-13 が少なくとも5%、10%、50%、または80%の純度である組成物である。

【0052】

別の態様では、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子、またはその医薬組成物を、IL-13 関連障害を治療または予防するために投与する。治療は、対象の状態を改善または維持する（またはそのように試みる）ことを指す。典型的な場合、治療は、医師が認め得る程度まで対象の状態を改善し、または状態の悪化を予防する。IL-13 関連障害の例には、呼吸器障害、例えば喘息（例えばアレルギー性および非アレルギー

10

20

30

40

50

一性の喘息（例えば、幼児における呼吸器合胞体ウイルス（RSV）などによる感染が原因の喘息など）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、および気道炎症、好酸球増加症、線維症、過剰粘液生成に関わるその他の状態、例えば嚢胞性線維症および肺線維症；例えばIL-13に対する感受性の増大から生ずるアトピー性障害（例えば、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、湿疹、アレルギー性鼻炎、およびアレルギー性胃腸炎）；炎症性および/または自己免疫状態であって、皮膚に関するもの（例えばアトピー性皮膚炎）、胃腸障害（例えば、潰瘍性大腸炎および/またはクローン病などの炎症性腸疾患（IBD））、肝臓に関するもの（例えば肝硬変、肝細胞癌）、および強皮症；白血病やグリア芽細胞腫、リンパ腫、例えばホジキンリンパ腫などの腫瘍または癌（例えば軟組織または充実性腫瘍）；ウイルス感染（例えばHTLV-1から）；その他の器官の線維症、例えば肝臓の線維症（例えば、B型および/またはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる線維症）；および保護1型免疫応答の発現抑制（例えばワクチン接種中）であって、例えば本明細書に記述されるものの1つまたは複数から選択された障害が含まれるが、これらに限定するものではない。

10

20

30

40

50

【0053】

IL-13結合剤（例えば、本明細書で記述されるものなどの、抗-IL-13抗体分子）は、障害を治療しまたは予防するのに有効な量で投与することができる。予防的使用の場合（例えば、発症を予防しまたは発症を遅らせるため）、対象は、障害の1種または複数の症状を示しても示さなくてもよい。量は、障害の少なくとも1種の症状が寛解するのに効果的であるよう選択することもできる。好ましくは対象が哺乳類であり、例えば、本明細書で述べるIL-13関連障害に罹っているヒトである。呼吸器障害、例えば喘息では、IL-13結合剤を吸入によってデリバリーすることができる。

【0054】

一実施形態では、方法が、IL-13に結合する抗体分子を複数用量投与する工程を含む。例えば抗体分子は、IL-13を阻害しまたは中和する。一実施形態では、各用量を、例えば約0.5~10mg/kg（例えば0.7~3.3mg/kg）の量で、週当たり1回以下、例えば隔週でまたは月に1回または2回の頻度で皮下から投与する。一実施形態では、抗体は、本明細書に記述される抗体である。例えば抗体は、IL-13R1の結合を阻害する抗体である。抗体は、例えば注射後少なくとも6週間、ヒツジモデルにおける回虫（Ascaris）抗原への曝露に対して注射後保護効果をもたらすことができる。

【0055】

一実施形態では、IL-13結合剤を別の治療薬と組み合わせて投与する。併用療法は、本明細書に記述される1種または複数の追加の治療薬、例えば1種または複数のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫要請剤、抗炎症剤（例えば全身性抗炎症薬）、代謝阻害剤、酵素阻害剤、および/または細胞毒性または細胞増殖抑制剤と同時に配合されかつ/または同時に投与されたIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を含むことができる。IL-13結合剤およびその他の治療薬は、別々に投与することもできる。

【0056】

IL-13結合剤と同時投与しかつ/または同時配合することができる、好ましい追加の治療薬の例には、吸入ステロイド； β_2 -作動薬、例えば短時間作用性または長時間作用性の β_2 -作動薬；ロイコトリエンまたはロイコトリエン受容体の拮抗薬；ADV AIR（登録商標）などの複合薬；IgE阻害剤、例えば抗-IgE抗体（例えばXOLAIR（登録商標））；ホスホジエステラーゼ阻害剤（例えばPDE4阻害剤）；キサンチン；抗コリン作動薬；クロモリンなどの肥満細胞安定剤；IL-4阻害剤；IL-5阻害剤；エオタキシン/CCR3阻害剤；および抗ヒスタミンが含まれる。そのような組合せは、喘息およびその他の呼吸器障害を治療するのに使用することができる。IL-13結合剤と同時投与しかつ/または同時配合することができる治療薬の追加の例には、とりわけTNF拮抗薬（例えば、p55やp75ヒトTNF受容体またはその誘導体、例えば75kd TNFR-IgG（例えば75kd TNF受容体-IgG融合タンパク質、ENBR

EL (商標)) などの、TNF受容体の可溶性断片) ; TNF酵素拮抗薬、例えばTNF変換酵素 (TACE) 阻害剤 ; ムスカリン受容体拮抗薬 ; TGF- β 拮抗薬 ; インターフェロン ; パーフェニドン ; 化学療法薬、例えばメトトレキサート、レフルノミド、またはシロリムス (ラパマイシン) 、またはこれらの類似体、例えばCCI-779 ; COX2およびcPLA2阻害剤 ; NSAID ; 免疫調節剤 ; p38阻害剤、TPL-2、Mk-2、およびNF- κ B阻害剤の1種または複数が含まれる。

【0057】

別の態様では、本願は、組成物、例えば医薬上許容される担体と少なくとも1種のIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子とを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、組成物、例えば医薬組成物は、2種以上のIL-13結合剤、例えば2種以上の抗-IL-13抗体分子の組合せを含む。IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子と、薬物、例えば治療薬 (例えば本明細書に記載される、1種または複数のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤 (例えば全身性抗炎症剤) 、代謝抑制剤、酵素抑制剤、および/または細胞毒性または細胞増殖抑制剤) との組合せも、使用することができる。

10

【0058】

本願は、本明細書に記載されるIL-13結合剤またはその成分をコードするヌクレオチド配列、例えば抗-IL-13抗体分子、例えば本明細書に記載される抗体分子の重鎖および/または軽鎖可変領域配列を含む核酸も特徴とする。例えば本願は、本明細書に記載されるような、例えばMJ2-7またはC65の1種または複数から選択された抗-IL-13抗体の、重鎖および軽鎖可変領域配列をそれぞれコードする第1および第2の核酸を特徴とする。別の態様では、本願は、宿主細胞と、本明細書に記載される核酸を含有するベクターとを特徴とする。

20

【0059】

本発明は、例えばMJ2-7またはC65の1種または複数によって認識されるIL-13、例えばヒトIL-13のエピトープも特徴とする。例えば、エピトープを含むタンパク質およびペプチドは、エピトープ、例えば抗体や小分子などのタンパク質と相互に作用するその他の結合化合物を生成しまたはスクリーニングするのに使用することができる。例えば、エピトープを含むペプチドは、免疫原として、または発現ライブラリーをスクリーニングするための標的として使用することができる。化合物がペプチドと相互に作用できるかどうかを評価すること、あるいはマッピングまたは構造決定によって、化合物が、例えば成熟IL-13との関連においてエピトープと相互に作用できるかどうかを評価することも可能である。

30

【0060】

別の態様では、本願は、IL-13および同族のIL-13結合タンパク質、例えばIL-13受容体複合体、例えばIL-13R α 1およびIL-4R α を含む複合体、またはそのサブユニットとの相互作用、例えば結合を調節し、例えば妨げる (例えば阻害し、阻止し、またはその他の方法で低下させる) 方法の特徴とする。調節は、生体内または生体外で行うことができる。その他の実施形態では、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、IL-13に結合し、IL-13と、IL-13受容体複合体のサブユニット、例えばIL-13R α 1またはIL-4R α のそれぞれとの相互作用、例えば結合を妨げる (例えば、阻害し、阻止し、またはその他の方法で低下させる) 。さらに別の実施形態では、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、IL-13に結合し、IL-13とIL-13R α 1との相互作用、例えば結合を妨げる (例えば阻害し、阻止し、またはその他の方法で低下させる) 。別の実施形態では、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、IL-13に結合し、IL-13とIL-13R α 1との相互作用、例えば結合を妨げる (例えば阻害し、阻止し、またはその他の方法で低下させる) 。典型的な場合、抗-IL-13抗体分子は、IL-13とIL-13R α 1との相互作用、例えば結合を、妨げる (例えば阻害し、阻止し、またはその他の方法で低下させる) 。

40

50

【0061】

別の実施形態では、本願は、IL-13とIL-13受容体タンパク質、例えばIL-13R₁またはIL-13R₂との相互作用を調節する方法を特徴とする。例えば、IL-13結合剤、例えば本明細書に記述される薬剤は、IL-13とIL-13R₁またはIL-13R₂との結合を低下させまたは阻害するのに使用することができ、あるいはIL-13R₁およびIL-4Rを含む複合体（例えば本明細書に記述される複合体）の形成を低下させるのに使用することができる。この方法は、IL-13またはIL-13を含有する複合体を、IL-13結合剤、例えば本明細書に記述されるタンパク質と接触させる工程を含む。

【0062】

主題となる方法は、細胞に生体外（例えば細胞を含まない系）で、培養物中で、例えば試験管内または生体外で使用することができる。例えば、IL-13受容体-発現細胞は、培地中、生体外で培養することができ、接触工程は、IL-13結合剤を培地に添加することによって行うことができる。あるいはこの方法は、例えば生体外（例えば治療的または予防的）プロトコルの一部として、対象に存在する細胞に実施することができる。例えばIL-13結合剤は、局所にまたは全身にデリバリーすることができる。

10

【0063】

方法は、IL-13とIL-13受容体複合体またはそのサブユニットとの相互作用を引き起こすことが可能な条件下で、IL-13をIL-13受容体複合体にまたはそのサブユニットに接触させ、それによってIL-13/IL-13受容体混合物を形成する工程を含む。一般にIL-13結合剤は、例えばIL-13/IL-13受容体混合物の接触が、IL-13と受容体タンパク質との相互作用、またはIL-13の少なくとも1つの機能、例えばIL-13により媒介されるシグナル伝達を調節し、例えば妨げる（例えば阻害し、阻止し、またはその他の方法で低下させる）ような有効量で提供される。

20

【0064】

別の態様では、本願は、生体外でのサンプル（例えば血清や血漿、組織、生検などの生体サンプル）中のIL-13の存在を検出するための方法を提供する。主題となる方法は、障害、例えば免疫細胞関連障害を診断するのに使用することができる。この方法は、(i) サンプルまたは対照サンプルをIL-13結合剤に、例えば抗-IL-13抗体分子に、例えば本明細書に記述されるようなものに接触させる工程と、(ii) IL-13結合剤とサンプルまたは対照サンプルとの複合体の形成を検出する工程とを含み、対照サンプルに比べてサンプル中の複合体形成の統計上有意な変化は、サンプル中にIL-13が存在することを示している。

30

【0065】

さらに別の態様では、本願は、生体内でのIL-13の存在を検出するための方法を提供する（例えば、対象の生体内イメージング）。主題となる方法は、障害、例えばIL-13関連障害を診断するのに使用することができる。この方法は、(i) 結合剤とIL-13との結合が可能になる条件下で、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子、例えば本明細書に記述されるようなものを、対象または対照者に投与する工程と、(ii) 結合剤とIL-13との複合体の形成を検出する工程とを含み、対照者に比べて対象における複合体形成の統計上有意な変化は、IL-13が存在することを示している。

40

【0066】

例えば抗体分子は、結合または非結合抗体の検出を促進させるため、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子団、蛍光物質、ルミネセンス物質、および放射性物質が含まれる。

【0067】

薬剤、例えば治療薬または予防薬を、生体内IL-13発現細胞にデリバリーしまたは狙いを定めるための方法も、開示される。

【0068】

一態様では、本発明は、下記の配列、すなわち

50

SPVPPSTALKELEELVNI TQNQKAPLCNGSMVWS INLTA
 GUYCAALES LINVSGCSAIEKTQRMLNGFCPHKVSAGQFS
 SLRVRDTKIEVAQFVKDLLVHLKKL FREGQFN (配列番号14)

またはその機能的断片を含むポリペプチドを特徴とする。

【0069】

ポリペプチドはさらに、

MALLLTMVIALTCLGGFASP (配列番号127)

10

を、例えばN末端シグナル配列として含むことができる。例えばポリペプチドは、カニクイザルからのIL-13タンパク質(ここでは、「NHP-IL-13」)である。このNHP-IL-13は、成熟IL-13タンパク質または未処理の完全長IL-13タンパク質とすることができる。上記配列のペプチド、例えばヒトIL-13の対応するペプチドとは異なるペプチドを、例えば免疫原または標的化合物として使用することができる。

【0070】

上記太字の位置の少なくとも1つまたは複数でヒトIL-13とは異なるが、上記太字以外の位置ではヒトIL-13と同一である関連するポリペプチドも特徴とする。例えば、太字位置の1つまたは複数アラニンとすることができ、あるいは、カニクイザル配列(上記)中の対応する残基またはヒト配列中の対応する残基の同類置換とすることができる。本発明は、例えば、上記配列からの少なくとも5または6アミノ酸のペプチドも特徴とする。ペプチドは、異種タンパク質(例えば、IL-13以外のタンパク質)、キメラタンパク質(例えばヒトIL-13)に含めることができ、または単独のペプチド、例えばその他の配列を含まないものとしてすることができる。ペプチドは、その他の化合物、例えば担体と融合しまたは結合することもできる。一実施形態では、ペプチドは、ヒトIL-13とは異なる少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。例示的なペプチドについては、以下に述べる。

20

【0071】

カニクイザルIL-13配列およびその変種をコードする核酸も特徴とする。ポリペプチドは、カニクイザルIL-13および所望により別の種からのIL-13タンパク質、例えばヒトIL-13にも結合するIL-13結合剤を提供するのに使用することができる。

30

【0072】

一態様では、本発明は、ヒト標的タンパク質に特異的に結合する標的結合分子を提供する方法を特徴とする。例えば、標的結合分子は抗体分子である。この方法は、ヒト標的タンパク質の対応する部分と同種である(少なくとも70、75、80、85、87、90、92、94、95、96、97、または98%同一である)が少なくとも1つのアミノ酸(例えば少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、または9アミノ酸)が異なる非ヒトタンパク質の、少なくとも一部を含む標的タンパク質を提供する工程と; 抗原に特異的に結合する結合剤を得る工程と; 結合剤がヒト標的タンパク質に特異的に結合するか否かを評価し、またはヒト標的タンパク質の活性を調節する際の結合剤の効力を評価する工程とを含む。この方法はさらに、結合剤(例えば抗体分子)または誘導体(例えばヒト抗体分子)をヒト被験体に投与する工程を含むことができる。一実施形態では、ヒト標的タンパク質はサイトカインであり、例えばインターロイキン、例えばIL-13またはIL-4である。非ヒトタンパク質は、ヒト以外の霊長類、例えばアカゲザル、カニクイザル、またはブタオザルから得ることができる。

40

【0073】

一実施形態では、得る工程が、タンパク質発現ライブラリー、例えばファージまたはリ

50

ボソームディスプレイライブラリーを使用することを含む。例えばライブラリーは、F a b ' や s c F v などの抗体分子を表示する。一実施形態では、得る工程が、抗原を免疫原として使用して動物を免疫化することを含む。例えば動物は、げっ歯類、例えばマウスまたはラットとすることができる。動物は、少なくとも1種のヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物とすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0074】

本明細書で記述される全ての資料、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、その全体を、参照により本明細書に組み込む。

【0075】

(定義)

【0076】

本明細書で使用する「IL-13結合剤」という用語は、IL-13タンパク質、例えば哺乳類IL-13、特にヒトまたは非ヒト霊長類IL-13に結合する界面を含む、タンパク質(例えば多重鎖ポリペプチドやポリペプチド)やペプチドなどの任意の化合物を指す。結合剤は、一般に、 5×10^{-7} M未満のKdで結合する。例示的なIL-13結合剤は、抗原結合部位を含むタンパク質、例えば抗体分子である。

【0077】

本明細書で使用する「抗体分子」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変領域配列を含むタンパク質を指す。抗体分子という用語は、例えば完全長の成熟抗体、および抗体の抗原結合断片を含む。例えば抗体分子は、重(H)鎖可変領域配列(本明細書ではVHと省略する)および軽(L)鎖可変領域配列(本明細書ではVLと省略する)を含むことができる。別の例では、抗体分子は、2つの重(H)鎖可変領域配列および2つの軽(L)鎖可変領域配列を含み、それによって2つの抗原結合部位が形成される。抗原結合断片の例には、(i) Fab断片、VL、VH、CL、およびCH1領域からなる1価の断片；(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された2つのFab断片を含む2価の断片；(iii) VHおよびCH1領域からなるFd断片；(iv) 抗体のシングルアームのVLおよびVH領域からなるFv断片；(v) VH領域からなるdAb断片；(vi) ラクダ科動物またはラクダ化した可変領域；および(vii) 単鎖Fv(scFv)が含まれる。

【0078】

VHおよびVL領域は、より保存的な「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれる領域共に散在している「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に、さらに細分することができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、いくつかの方法によって厳密に定義されている(Kabat,E.A.他,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242; Chothia,C.他,(1987) J.Mol.Biol. 196:901-917; およびAbM definition used by Oxford Molecular's AbM antibody modeling software参照)。一般に、例えばProtein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. Antibody Engineering Lab Manual(Duebel,S.およびKontermann,R.編, Springer-Verlag, Heiderberg)を参照されたい。一般に、他に特に指示しない限り、以下の定義、すなわち重鎖可変領域のCDR1に関してはAbMの定義、およびその他のCDRに関してはKabatの定義を使用する。さらに、KabatまたはAbMのCDRに関して記述される本発明の実施形態は、Chothia超可変ループを使用して実施してもよい。VHおよびVLのそれぞれは、典型的には3つのCDRおよび4つのFRを以下の順序で、すなわちFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並べたものを含む。

【0079】

本明細書で使用する「免疫グロブリン可変領域配列」は、免疫グロブリン可変領域の構造を形成することができるアミノ酸配列を指す。例えば配列は、天然に生ずる可変領域の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列の全てまたは一部を含むことができる。例えば配列は、1、2、またはそれ以上のNまたはC末端アミノ酸を含んでも含まなくてもよく、あるいは、タンパク質構造の形成に適合するその他の変性部分を含むことができる。

【0080】

「抗原結合部位」という用語は、IL-13、例えば哺乳類IL-13、例えばヒトまたは非ヒト霊長類IL-13、またはそのエピトープに結合する界面を形成する決定基を含む、IL-13結合剤の部分に指す。タンパク質（またはタンパク質擬似体）に関し、抗原結合部位は、典型的にはIL-13に結合する界面を形成する1つまたは複数のループ（少なくとも4つのアミノ酸またはアミノ酸模倣体）を含む。典型的な場合、抗体分子の抗原結合部位は、少なくとも1つまたは2つのCDRを含み、あるいはより典型的には少なくとも3、4、5、または6つのCDRを含む。

10

【0081】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一分子組成物の抗体分子の製剤を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対し、単一の結合特異性および親和性を示す。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術によって、またはハイブリドーマ技術を使用しない方法（例えば組換え法）によって作製することができる。

【0082】

「事実上のヒト」タンパク質は、中和抗体応答、例えばヒト抗マウス抗体（HAMMA）応答を惹起しないタンパク質である。HAMMAは、例えば慢性または再発性の疾患状態を治療する際に、例えば抗体分子を繰り返し投与する場合、いくつかの環境で問題がある可能性がある。HAMMA応答は、血清からの高度な抗体クリアランスが理由で（例えば、Saleh他、Cancer Immunol. Immunother., 32: 180-190(1990)参照）、また潜在的なアレルギー反応が理由で（例えば、LoBuglio他、Hybridoma, 5:5117-5123(1986)参照）、繰り返される抗体投与を潜在的に無効にすることができる。

20

【0083】

「単独（の）」という用語は、その自然環境が実質的にない分子を指す。例えば単独のタンパク質は、細胞物質、あるいはその他のタンパク質が得られる細胞または組織源からのその他のタンパク質を、実質的に含まない。この用語は、単独のタンパク質が、治療用組成物として投与するのに十分純粋であり、または少なくとも70%から80%（w/w）の純度であり、より好ましくは少なくとも80%～90%（w/w）の純度であり、さらにより好ましくは90～95%の純度であり、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%（w/w）の純度の製剤を指す。「分離（した）」化合物は、化合物が得られるサンプルの少なくとも1つの成分の少なくとも90%から除去された化合物を指す。本明細書に記述される任意の化合物は、単独のまたは分離した化合物として提供することができる。

30

【0084】

「エピトープ」は、結合剤によって、例えば抗体分子によって結合される標的化合物上の部位を指す。エピトープは、線状または立体配座のエピトーム、あるいはその組合せとすることができる。例えば、標的化合物がタンパク質の場合、エピトープは、結合剤によって結合されたアミノ酸を指すことができる。重複エピトープは、少なくとも1つの共通のアミノ酸残基を含む。

40

【0085】

本明細書で使用する「低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件下ハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する条件を指す。ハイブリダイゼーション反応を実施するための指針は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出すことができる。水性および非水性方法がこの参考文献に記述されており、どちらも使用することができる。本明細書で示される特定のハイブリダイゼーション条件は、下記の通りである：1) 低ストリンジェンシーハイブリダ

50

イゼーション条件 約 45 で 6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) の後、少なくとも 50 で、0.2 × SSC、0.1% SDS で 2 回洗浄 (洗浄温度は、低ストリンジェンシー条件の間、55 まで上昇させることができる) ; 2) 中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件 約 45 で 6 × SSC の後、60 で、0.2 × SSC、0.1% SDS で 1 回または複数回洗浄 ; 3) 高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件 約 45 で 6 × SSC の後、65 で、0.2 × SSC、0.1% SDS で 1 回または複数回洗浄 ; および好ましくは 4) 非常に高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、65 で 0.5 M リン酸ナトリウム、7% SDS、その後 65 で、0.2 × SSC、0.1% SDS で 1 回または複数回洗浄。非常に高いストリンジェンシー条件 (4) が好ましい条件であり、他に特に指示しない限り使用される条件である。

10

【0086】

「IL-13 関連障害」は、IL-13 が、障害の病態または症状に寄与する障害である。したがって、IL-13 結合剤、例えば 1 種または複数の IL-13 関連活性の拮抗薬である IL-13 結合剤を、障害の治療または予防に使用することができる。

【0087】

「IL-13」という用語は、IL-13 (種の起源とは無関係に、哺乳類、例えばヒトおよび非ヒト霊長類 IL-13 を含む) として当技術分野で知られている完全長の未処理形態のサイトカイン、ならびにその成熟した処理済み形態、ならびに任意の断片 (少なくとも 5 アミノ酸の) またはそのようなサイトカインの変種を含む。IL-13 配列内の位置は、完全長の未処理のヒト IL-13 配列に関する番号付けに従って名付けることができる。例示的な完全長サル IL-13 については、配列番号 24 を参照されたい ; 成熟した処理済みのサル IL-13 については、配列番号 14 を参照されたい ; 完全長ヒト IL-13 については、配列番号 178 を参照されたい ; また成熟した処理済みのヒト IL-13 については、配列番号 124 を参照されたい。例示的な配列を、下記の通り列挙する。

20

M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P G P V P P S T A L R E L I E E L V N I T
Q N Q K A P L C N G S M V W S I N L T A G M Y C A A L E S L I N V S G C S A I E
K T Q R M L S G F C P H K V S A G Q F S S L H V R D T K I E V A Q F V K D L L L
H L K K L F R E G R F N (配列番号 178)

30

【0088】

例えば位置 130 は、共通の多型の部位である。

【0089】

IL-13 受容体タンパク質 (例えば IL-13R₁ および IL-13R₂) の例示的な配列は、例えば Donaldson 他, (1998) J Immunol. 161: 2317-24; 米国特許第 6214559 号 ; 米国特許第 6248714 号 ; および米国特許第 6268480 号に記載されている。

【0090】

(図面の簡単な記載)

図 1A は、それぞれ配列番号 178 および配列番号 14 の、完全長ヒトおよびカニクイザル IL-13 の配列である。

40

【0091】

図 1B は、カニクイザル IL-13 からの例示的なペプチドのリストである (それぞれ配列番号 179 ~ 188)。

【0092】

図 2 は、CD23⁺ 単球のパーセンテージ (y 軸) により測定したときの、様々な IL-13 結合剤による NHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。MJ2-7 ()、C65 ()、および sIL-13R₂-Fc () の濃度を x 軸上に示す。

【0093】

図 3 は、MJ2-7 (マウス ;) またはヒト化 MJ2-7v2.11 () による、

50

NHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL-13 活性は、抗体濃度 (x 軸) に対する STAT6 のリン酸化 (y 軸) によって測定した。

【0094】

図4は、MJ2-7v2.11 () または sIL-13R2-Fc () による、NHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL-13 活性は、拮抗薬濃度 (x 軸) に対する STAT6 のリン酸化 (y 軸) によって測定した。

【0095】

図5は、MJ2-7 ()、C65 ()、または sIL-13R2-Fc () による、NHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL-13 活性は、拮抗薬濃度 (x 軸) に対する STAT6 のリン酸化 (y 軸) によって測定した。

10

【0096】

図6Aは、天然ヒトIL-13 (x 軸) によるテネイシン産生の誘導 (y 軸) を示すグラフである。

【0097】

図6Bは、抗体濃度 (x 軸) に対するテネイシン産生誘導の阻害 (y 軸) によって測定したときの、MJ2-7によるNHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。

【0098】

図7は、MJ2-7または対照抗体と、SPRチップに連結されたsIL-13R2-Fcに結合されたNHP-IL-13との結合を示すグラフである。

【0099】

図8は、様々な濃度 (0.09 ~ 600 nM) のNHP IL-13と、捕獲されたhMJ2-7V2-11抗体との結合を示すグラフである。

20

【0100】

図9は、マウスMJ2-7 ()、あるいはヒト化変種1 ()、変種2 ()、または変種3 () 抗体によるNHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL-13 活性は、抗体濃度 (x 軸) に対する STAT6 のリン酸化 (y 軸) によって測定した。

【0101】

図10は、マウスMJ2-7VHおよびVL ()、マウスVHおよびヒト化変種2VL ()、または変種2VHおよびVL () を含む抗体によるNHP IL-13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL-13 活性は、抗体濃度 (x 軸) に対する STAT6 のリン酸化 (y 軸) によって測定した。

30

【0102】

図11Aおよび11Bは、ELISAにより測定したときの、MJ2-7抗体による、IL-13と固定化されたIL-13受容体との結合の阻害を示すグラフである。結合は、450 nmでの吸光度 (y 軸) として示す。MJ2-7抗体の濃度はx軸に示す。図11Aは、IL-13R1との結合を示す。図11Bは、IL-13R2との結合を示す。

【0103】

図12は、DPK18生殖細胞系アミノ酸配列 (配列番号193) とヒト化MJ2-7変種3VL (配列番号190) とのアライメントである。

40

【0104】

図13Aは、成熟した処理済みのヒトIL-13のアミノ酸配列 (配列番号124) である。

【0105】

図13Bは、ヒトIL-13R1のアミノ酸配列 (配列番号125) である。

【0106】

IL-13に特異的に結合し、かつIL-13がIL-13受容体およびシグナル伝達媒介物と相互に作用する能力を調節する結合剤 (例えば抗IL13抗体分子) について、開示する。結合剤は、1種または複数のIL-13関連活性を調節する (例えば阻害する

50

) のに使用することができる。例えば本明細書に記述されるような I L - 1 3 結合剤は、例えば I L - 1 3 で媒介された障害 (例えば喘息、気道炎症、アトピー性障害、アレルギー応答、好酸球増加症、線維症、および I L - 1 3 関連癌) を治療または予防するために、例えば生体内での 1 種または複数の I L - 1 3 関連活性を調節するのに使用することができる。

【 0 1 0 7 】

(抗 I L - 1 3 抗体分子)

【 0 1 0 8 】

抗体分子を得るための数多くの方法が、利用可能である。1 つの例示的な方法は、タンパク質発現ライブラリー、例えばファージまたはリボソームディスプレイライブラリーをスクリーニングする工程を含む。ファージディスプレイは、例えば L a n d e r 他、米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号 ; Smith (1985) Science 228:1315-1317 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 1 / 1 7 2 7 1 ; W O 9 2 / 2 0 7 9 1 ; W O 9 2 / 1 5 6 7 9 ; W O 9 3 / 0 1 2 8 8 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 0 9 6 9 0 ; および W O 9 0 / 0 2 8 0 9 に記載されている。ディスプレイライブラリーの使用の他に、その他の方法を使用して抗 I L - 1 3 抗体分子を得ることができる。例えば、I L - 1 3 タンパク質またはそのペプチドを、非ヒト動物、例えばげっ歯類、例えばマウス、ハムスター、ラットなどでの抗原として使用することができる。

10

【 0 1 0 9 】

一実施形態では、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、ヒト I g 遺伝子座の大断片で、マウス抗体産生が失われているマウス株を設計製作することが可能である。ハイブリドーマ技術を使用することにより、所望の特異性を有する遺伝子から得られた抗原特異的モノクローナル抗体を生成し、選択することができる。例えば、X E N O M O U S E (商標)、Green 他、(1994) Nature Genetics 7:13-21、U S 2 0 0 3 - 0 0 7 0 1 8 5、1 9 9 6 年 1 0 月 3 1 日公開の W O 9 6 / 3 4 0 9 6、および 1 9 9 6 年 4 月 2 9 日出願の P C T 出願番号 P C T / U S 9 6 / 0 5 9 2 8 を参照されたい。

20

【 0 1 1 0 】

別の実施形態では、モノクローナル抗体を非ヒト動物から得て、修飾し、例えばヒト化または脱免疫化する。W i n t e r は、本明細書に記述されるヒト化抗体の調製に使用することができる、例示的な C D R 移植法について述べている (米国特許第 5 2 2 5 5 3 9 号)。特定のヒト抗体の C D R 全てを、非ヒト C D R の少なくとも 1 部に代えることができ、または C D R の一部を、非ヒト C D R に代えることができる。ヒト化抗体と所定の抗原との結合に必要な C D R の数を、代える必要があるだけである。

30

【 0 1 1 1 】

ヒト化抗体は、抗原結合に直接関与していない F v 可変領域の配列を、ヒト F v 可変領域からの同等の配列に代えることによって生成することができる。ヒト化抗体分子を生成するための例示的な方法は、Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi 他、(1986) Bi oTechniques 4:214; および米国特許第 5 5 8 5 0 8 9 号 ; 米国特許第 5 6 9 3 7 6 1 号 ; 米国特許第 5 6 9 3 7 6 2 号 ; 米国特許第 5 8 5 9 2 0 5 号 ; および米国特許第 6 4 0 7 2 1 3 号により示されている。これらの方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも 1 つからの免疫グロブリン F v 可変領域の全てまたは一部をコードする核酸配列を、単離し、操作し、発現させる工程を含む。そのような核酸は、上述のような所定の標的に対する抗体を生成するハイブリドーマから、ならびにその他の供給源から得ることができる。次いでヒト化抗体分子をコードする組換え D N A を、適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

40

【 0 1 1 2 】

I L - 1 3 結合抗体分子は、ヒト T 細胞エプープの特異的欠失によって、または W O 9 8 / 5 2 9 7 6 および W O 0 0 / 3 4 3 1 7 に開示されている方法による「脱免疫化」によって修飾してもよい。手短に言うと、抗体の重鎖および軽鎖可変領域を、M H C クラ

50

スIIに結合するペプチドに関して分析することができ；これらのペプチドは、潜在的なT細胞エプトープを提示する（WO98/52976およびWO00/34317に開示されるように）。潜在的なT細胞エプトープを検出するために、「ペプチドスレッディング」と呼ばれるコンピュータモデリングアプローチを利用することができ、さらに、WO98/52976およびWO00/34317に記載されるように、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを、V_HおよびV_L配列中に存在するモチーフに関して探索することができる。これらのモチーフは、18の主なMHCクラスII DRアロタイプのいずれかと結合し、したがって潜在的なT細胞エプトープを構成する。検出された潜在的なT細胞エプトープは、可変領域内の少数のアミノ酸残基を置換することによって、好ましくは単一アミノ酸置換によって排除することができる。典型的な場合、保存的置換が行われる。しばしば、ヒト生殖細胞系抗体配列の、ある位置に共通するアミノ酸を使用することができるが、これに限るものではない。ヒト生殖細胞系配列は、例えば、Tomlinson他、(1992) J.Mol. Biol. 227:776-798; Cook,G.P.他、(1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; Chothia,D.他、(1992) J.Mol. Biol. 227: 799-817; およびTomlinson他、(1995) EMBO J. 14:4628-4638に開示されている。V B A S Eディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的ディレクトリ（Tomlinson,I.A.他、MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UKによりコンパイルされた）を提供する。これらの配列は、例えばフレームワーク領域およびCDRのために、ヒト配列の供給源として使用することができる。コンセンサスヒトフレームワーク領域も、米国特許第6300064号に記載されるように使用することができる。

10

20

【0113】

さらに、キメラ、ヒト化、および単鎖抗体分子（例えば、ヒトおよび非ヒト部分を含むタンパク質）を、標準的な組換えDNA技法を使用して生成することができる。ヒト化抗体は、例えば、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現するが内因性マウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができない、トランスジェニックマウスを使用して生成してもよい。

【0114】

さらに、本明細書に記述される抗体分子は、IL-13に結合し、機能的IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨げ、かつ重鎖の定常領域内に変異を有するものも含む。ときどき、定常領域のある断片を変異させ不活性化することが望ましい。例えば重鎖定常領域内の変異は、Fc受容体（FcR）および/または補体との結合が低下した抗体が生成されるように行うことができるが、そのような変異は当技術分野で周知のものである。IgGの重鎖の定常領域のアミノ配列へのそのような変異の例は、配列番号128で示される。CLおよびCHサブユニット（例えばCH1）のある活性断片は、互いに共役結合している。他の態様は、機能的IL-13シグナル伝達複合体の形成に寄与するIL-13の表面に特異的な、抗原結合部位を得るための方法を提供する。

30

【0115】

例示的な抗体分子は、配列番号30～46で示されるV_L鎖、および/または配列番号50～115で示されるV_H鎖の配列を含むことができるが、IL-13結合能力を維持するこれら配列の変種も含むことができる。そのような変種は、当技術分野で周知の技法を使用して、提供された配列から得ることができる。アミノ酸の置換、欠失、または付加は、FRまたはCDR中で行うことができる。フレームワーク領域内の変化は、通常は抗体分子の安定性が改善しかつ免疫原性が低下するよう設計されるのに対し、CDR内の変化は、通常は抗体分子のその標的に対する親和性が増大するように設計される。そのような親和性増大の変化は、典型的にはCDR領域を変性させかつ抗体分子を試験することによって、経験的に決定される。そのような変性は、Antibody Engineering, 第2版(1995), Borrebaek編, Oxford University Pressに記載される方法に従って行うことができる。

40

【0116】

本明細書に記述される重鎖可変領域配列の変種である重鎖可変領域配列を得るための例示的な方法は、本明細書に記述される重鎖可変領域配列に1つまたは複数のアミノ酸を付

50

加し、欠失させ、置換し、または挿入する工程と、所望により重鎖可変領域配列と1つまたは複数の軽鎖可変領域配列とを組み合わせる工程と、IL-13との特異的結合に関し、修飾された重鎖可変領域配列を含むタンパク質を試験する工程と、(好ましくは)そのような抗原結合領域が1つまたは複数のIL-13関連活性を調節できるか否かを試験する工程とを含む。本明細書に記述される軽鎖可変領域配列の1つまたは複数の配列変種を使用した、類似の方法を用いることができる。

【0117】

抗体分子の変種は、1種または複数の様々なCDRを有するライブラリーを作成し、このライブラリーをスクリーニングして、例えば改善された親和性でIL-13に結合する要素を見出すことにより、調製することができる。例えばMarks他、(Bio/Technology (1992) 10:779-83)は、抗体可変領域のレパートリーを生成する方法について述べており、すなわち可変領域の5'末端に向けられまたは隣接するコンセンサプライマーを、ヒトVH遺伝子の第3のフレームワーク領域に対するコンセンサプライマーと併せて使用して、CDR3が欠けているVH可変領域のレパートリーが提供されるようにしている。レパートリーは、特定の抗体のCDR3と組み合わせることができる。さらに、CDR3由来の配列を、CDR3に欠けているVHまたはVL領域のレパートリーと混合し、この混合した完全VHまたはVL領域を、同族のVLまたはVH領域と組み合わせ、特異的抗原結合断片を提供することができる。次いでレパートリーを、WO92/01047のファージディスプレイ系などの適切な宿主系に表示することができ、したがって適切な抗原結合断片を選択することができる。類似の混合または組合せ技法も、Stemmer (Nature (1994) 370:389-91)により開示されている。他の代替例は、全可変領域内に変異が生成されるように、1つまたは複数の選択されたVHおよび/またはVL遺伝子のランダムな変異誘発を使用して、変性VHまたはVL領域を生成することである。例えば、Gram他、Proc.Nat.Acad.Sci. USA (1992) 89:3576-80を参照されたい。

【0118】

使用することができる別の方法は、変異誘発をVHまたはVL遺伝子のCDR領域に向けることである。そのような技法は、例えば、Barbas他 (Proc.Nat.Acad.Sci. USA (1994) 91:3809-13)およびSchier他 (J.Mol.Biol. (1996) 263:551-67)によって開示されている。同様に、3つのCDRの1つまたは複数または全てを、VHまたはVL領域のレパートリーに、あるいはさらに他の足場(フィブロネクチン領域など)に移植することができる。得られるタンパク質が、IL-13に結合できるかどうかについて評価する。

【0119】

一実施形態では、標的に結合する結合剤を、例えば変異誘発によって修飾し、それによって、修飾された結合剤のプールが得られるようにする。次いで修飾された結合剤に関し、変性した機能的性質(例えば、改善された結合、改善された安定性、生体内での長時間にわたる安定性)を有する1つまたは複数の変性した結合剤を特定するために評価する。一実施例では、ディスプレイライブラリー技術を使用して、修飾された結合剤のプールを選択しまたはスクリーニングする。次いでより高い親和性結合剤を、例えばより高いストリンジエンシーまたはより競合的な結合および洗浄条件を使用することによって、第2のライブラリーから特定する。その他のスクリーニング技法を使用することもできる。

【0120】

いくつかの実施形態では、変異誘発は、結合界面にあることが知られておりまたは結合界面にある可能性の高い領域を標的としている。例えば、特定された結合剤が抗体分子である場合、変異誘発は、本明細書に記述される重鎖または軽鎖のCDR領域に向けることができる。さらに、変異誘発は、CDR付近またはCDRに隣接するフレームワーク領域、例えば、特にCDR接合の10、5、または3アミノ酸以内のフレームワーク領域に向けることができる。抗体の場合、変異誘発は、段階的な改善を行うために、CDRの1つまたは2~3に限定することもできる。

【0121】

一実施形態では、抗体が1つまたは複数の生殖細胞系配列により類似するように、変異

10

20

30

40

50

誘発を使用する。1つの例示的な生殖細胞系形成方法は、単独の抗体の配列に類似している（例えば、特定のデータベースでは大部分が類似している）1種または複数の生殖細胞系配列を特定する工程を含む。次いで変異（アミノ酸レベルで）を、漸進的にまたは組み合わせてまたはその両方により、単独の抗体で行うことができる。例えば、一部または全ての可能な生殖細胞系変異をコードする配列を含む核酸ライブラリーを、作成する。次いで変異した抗体に関し、例えば単独抗体に比べて1つまたは複数の追加の生殖細胞系残基を有する抗体あるいは依然として有用な抗体が特定されるように、評価する。一実施形態では、できる限り多くの生殖細胞系残基を、単独抗体に導入する。

【0122】

一実施形態では、1つまたは複数の生殖細胞系残基を置換しまたはCDR領域に挿入するために、変異誘発を使用する。例えば生殖細胞系CDR残基は、修飾された可変領域に類似する（例えば大部分が類似する）生殖細胞系配列からのものでよい。変異誘発後、抗体の活性（例えば結合、またはその他の機能的活性）を、1つまたは複数の生物細胞系残基が耐えられるか否かを決定するために評価することができる。同様の変異誘発は、フレームワーク領域で行うことができる。

10

【0123】

生殖細胞系配列の選択は、種々の方法で行うことができる。例えば生殖細胞系配列は、選択性または類似性に関する所定の基準を満たす場合、例えば少なくともある特定の同一性パーセンテージで、例えば少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または99.5%の同一性で選択することができる。この選択は、少なくとも2、3、5、または10個の生殖細胞系配列を使用して行うことができる。CDR1およびCDR2の場合、類似する生殖細胞系配列の特定は、そのような1つの配列の選択を含むことができる。CDR3の場合、類似する生殖細胞系配列の特定は、そのような1つの配列の選択を含むことができるが、アミノ末端部分およびカルボキシ末端部分に別々に寄与する2つの生殖細胞系配列の使用を含むことができる。その他の実施例では、例えばコンセンサス配列を形成するために、複数のまたは2つの生殖細胞系配列を使用する。

20

【0124】

その他の実施形態では、変性グリコシル化パターンを有するように抗体を修飾することができる（すなわち、当初のまたは天然のグリコシル化パターンを変性させる）。この文脈で使用されるように、「変性」は、1つまたは複数の炭水化物部分が欠失し、かつ/または当初の抗体に付加された1つまたは複数のグリコシル化部位を有することを意味する。現在開示されている抗体へのグリコシル化部位の付加は、グリコシル化部位コンセンサス配列を含有するようにアミノ酸配列を変性させることによって、実現することができる；そのような技法は、当技術分野で周知である。抗体上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、グリコシドと抗体のアミノ酸残基との化学結合または酵素結合による。これらの方法は、例えばW087/05330、AplinおよびWriston (1981) CRC Crit.Rev.Biochem. 22:259-306に開示されている。抗体上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、当技術分野で記述されるように、化学的にまたは酵素作用によって実現することができる（Hakimuddin他, (1987) Arch.Biochem.Biophys. 259:52; Edge他, (1981) Anal.Biochem. 118:131; およびThotakura他, (1987) Meth.Enzymol. 138:350）。例えば、サルベージ受容体結合エピトープを提供することによって生体内半減期を延ばす修飾に関しては、米国特許第5869046号を参照されたい。

30

40

【0125】

一実施形態では、抗体分子は、MJ2-7またはC65の場合とごく僅かしか異ならないCDR配列を有する。僅かな相違には、典型的にはCDR、例えばChothiaまたはKabatt CDRの配列における5~7アミノ酸のいずれかのうち1または2個の置換など、少量のアミノ酸の変化が含まれる。典型的な場合、アミノ酸は、類似の電荷、疎水性、または立体化学的特徴を有する関連あるアミノ酸によって置換される。そのような置換は、当業者の技量の範囲内である。CDRの場合とは異なって、構造フレームワーク

50

領域 (F R) のより多くの変更を、抗体の結合特性に悪影響を及ぼすことなく行うことができる。 F R に対する変化には、非ヒト由来のフレームワークのヒト化、あるいは抗原接触にまたは結合部位の安定化に重要なあるフレームワーク残基の設計製作が含まれ、例えば、定常領域のクラスまたはサブクラスの変化、 F c 受容体結合などのエフェクター機能を変性させる可能性のある特定アミノ酸残基の変化 (Lund他, (1991) J. Immunol. 147:26 57-62; Morgan他, (1995) Immunology 86:319-24)、あるいは定常領域を得ることができる種の変化などが含まれるが、これらに限定するものではない。抗体は、エフェクター機能、例えば F c 受容体結合および補体活性化を低下させまたは変化させる変異を、重鎖の C F 1 2 領域内に有することができる。例えば抗体は、米国特許第 5 6 2 4 8 2 1 号および第 5 6 4 8 2 6 0 号に記載されるような変異を有することができる。例えば I g G 1 または I g G 2 重鎖では、そのような変異を、配列番号 1 7 で示されるアミノ酸配列に類似させることができる。抗体は、当技術分野で開示されるような、 I g G 4 のヒンジ領域内の変異など、免疫グロブリンの 2 つの重鎖間のジスルフィド結合を安定化させる変異を有してもよい (例えば、Angal他, (1993) Mol. Immunol. 30: 105-08)。

10

【 0 1 2 6 】

I L - 1 3 結合剤は、無傷の抗体、抗体の抗原結合断片、例えば F a b、 F (a b ')₂、 F d、 d A b、および s c F v 断片、その定常領域および / または可変領域で変異した無傷の抗体および断片 (例えば、キメラ、一部ヒト化、または完全ヒト化抗体を生成し、ならびに所望の形質、例えば強化された I L - 1 3 結合および / または低下した F c R 結合を有する抗体を生成する変異) の形をとることができる。

20

【 0 1 2 7 】

抗体の生成。一部の抗体分子、例えば F a b は、細菌細胞、例えば大腸菌 (E . c o l i) 細胞中で生成することができる。例えば F a b が、ディスプレイ部分とバクテリオファージタンパク質 (またはその断片) との間の抑制性終止コドンを含むファージディスプレイベクターの配列によってコードされる場合、ベクター核酸は、終止コドンを抑制することができない細菌細胞に移動することができる。この場合、 F a b は遺伝子 I I I タンパク質と融合せず、周縁細胞質および / または媒質中に分泌される。

【 0 1 2 8 】

抗体分子は、真核細胞中で生成することもできる。一実施形態では、抗体 (例えば s c F v) を、ピチア (P i c h i a) (例えば、Powers他, (2001) J Immunol Methods. 25 1:123-35)、ハンゼヌラ (H a n s e u l a)、またはサッカロミセス (S a c c h a r o m y c e s) などの酵母菌中で発現させる。

30

【 0 1 2 9 】

一実施形態では、抗体分子を哺乳類細胞中で生成する。クローン抗体またはその抗原結合断片を発現させるのに好ましい哺乳類宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O 細胞) (例えばKaufmanおよびSharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621に記載されるように D H F R 選択性マーカーと共に使用され、UrlaubおよびChasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されている、 d h f r⁻ C H O 細胞を含む)、リンパ球細胞系、例えば N S 0 骨髄腫細胞および S P 2 細胞、 C O S 細胞、およびトランスジェニック動物、例えばトランスジェニック哺乳類からの細胞が含まれる。例えば細胞は、哺乳類上皮細胞である。

40

【 0 1 3 0 】

抗体分子をコードする核酸配列の他に、組換え発現ベクターは、宿主細胞中のベクター (例えば複製開始点) および選択性マーカー遺伝子の複製を調節する配列などの追加の配列を有することができる。選択性マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進させる (例えば、米国特許第 4 3 9 9 2 1 6 号、第 4 6 3 4 6 6 5 号、および第 5 1 7 9 0 1 7 号参照)。例えば、典型的には選択性マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞上の、 G 4 1 8 やヒグロマイシン、またはメトトレキセートなどの薬物に抵抗力を与える。

【 0 1 3 1 】

50

抗体分枝の組換え発現に関する例示的な系では、抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウム媒介型トランスフェクションによって d h f r⁺ CHO 細胞に導入する。組換え発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖遺伝子のそれぞれは、高レベルの遺伝子転写が推進されるように、エンハンサー/プロモーター調節要素（例えば、CMVエンハンサー/A d M L Pプロモーター調節要素、またはSV40エンハンサー/A d M L Pプロモーター調節要素など、SV40、CMV、アデノウイルスなどから得られる）に動作可能に結合する。組換え発現ベクターは、D H F Rも担い、そのためメトトレキサートの選択/増幅を使用してベクターによりトランスフェクトされている CHO 細胞の選択が可能になる。選択された形質転換宿主細胞は、抗体重鎖および軽鎖の発現が可能になるように培養することができ、無傷の抗体を、培地から回収する。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換物を選択し、宿主細胞を培養し、抗体分子を培地から回収するために、標準的な分子生物学的技法を使用することができる。例えば一部の抗体分子は、プロテイン A またはプロテイン G 結合マトリックスによるアフィニティクロマトグラフィによって単離することができる。

10

【0132】

F c 領域を含む抗体分子の場合、抗体生成系は、F c 領域がグリコシル化される抗体を合成することが好ましい。例えば I g G 分子の F c 領域は、C F 2 領域内のアスパラギン 297 でグリコシル化される。このアスパラギンは、二分岐型オリゴ糖による修飾のための部位である。このグリコシル化は、F c 受容体および補体 C 1 q によって媒介されるエフェクター機能に必要であることが実証されている (Burton および Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis 他, (1998) Immunol.Rev. 163:59-76)。一実施形態では、F c 領域は、アスパラギン 297 に対応する残基を適切にグリコシル化する哺乳類発現系内で生成される。F c 領域は、その他の真核翻訳後修飾を含むこともできる。

20

【0133】

抗体分子は、トランスジェニック動物によって生成することもできる。例えば米国特許第 5849992 号は、トランスジェニック動物の乳腺で抗体を発現させる方法について述べている。乳特異的プロモーター、および抗体分子をコードする核酸、および分泌用シグナル配列を含む導入遺伝子が構成される。そのようなトランスジェニック哺乳類のメスによって生成された乳は、その中に分泌された、問題の抗体を含む。抗体分子は、乳から精製することができ、またはいくつかの適用例では直接使用することができる。

30

【0134】

(特徴付け)

【0135】

結合剤の結合特性は、任意の方法によって、例えば下記の方法、すなわち B I A C O R E (商標)分析、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、x 線結晶解析、配列分析、および走査変異誘発によって測定することができる。タンパク質が、1つまたは複数の I L - 13 関連活性を中和しかつ/または阻害する能力は、下記の方法によって、すなわち I L - 13 依存細胞系、例えば T F I の増殖を測定するためのアッセイ; I L - 13 媒介型ポリペプチドの発現を測定するためのアッセイ、例えば C D 23 の発現の流動細胞計測分析; 下流シグナル伝達分子、例えば S T A T 6 の活性を評価するアッセイ; テネイシン生成を評価するアッセイ; 関連する動物モデル、例えばカニクイザルでの喘息を予防するための、本明細書に記述される抗体の効率を試験するアッセイ、およびその他のアッセイによって測定することができる。I L - 13 結合剤、特に I L - 13 抗体分子は、これらアッセイの1つまたは複数において、統計上有意な効果を発揮することができる。結合特性に関する例示的なアッセイには、下記のものが含まれる。

40

【0136】

I L - 13 結合剤と標的 (例えば I L - 13) との結合相互作用は、表面プラズモン共鳴 (S P R) を使用して分析することができる。S P R または生体分子相互作用解析 (B I A) は、相互作用のいずれも標識することなく、生物特異的相互作用を実時間で検出する。B I A チップの結合表面での質量変化 (結合事象を表す) は、表面付近の光の屈折率

50

の変化をもたらす。屈折率の変化によって、検出可能なシグナルが発生し、これを生体分子間の実時間反応の表れとして測定する。SPRを使用する方法は、例えば米国特許第5641640号; Raether (1998) Surface Plasmon Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal.Chem. 63: 2338-2345; Szabo他, (1995) Curr.Opin.Struct.Biol. 5:699-705、およびBIAcore International AB (Uppsala、スウェーデン)により提供されるオンライン資料に記載されている。

【0137】

SPRからの情報は、分子を標的に結合するための、平衡解離定数 (K_d) と K_{on} および K_{off} を含めた動学的パラメーターとの正確で定量的な測定値を提供するのに使用することができる。そのようなデータは、種々の分子を比較するのに使用することができる。SPRからの情報は、構造活性関係 (SAR) を開発するのに使用することもできる。例えば、種々の抗体分子の動学的および平衡結合パラメーターを評価することができる。特定の結合パラメーター、例えば高親和性および低 K_{off} に相関する、所与の位置での変種アミノ酸を特定することができる。この情報は、構造モデリングと組み合わせることができる (例えば、相同性モデリング、エネルギー最小化、あるいはX線結晶解析またはNMRによる構造決定を使用して)。その結果、タンパク質とその標的との物理的相互作用に関する理解が形成され、その他の設計プロセスを手引きするのに使用される。

【0138】

(呼吸器障害)

【0139】

IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、喘息 (例えばアレルギー性および非アレルギー性喘息 (例えば幼い子供での、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) などによる感染に起因する)); 気管支炎 (例えば慢性気管支炎); 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) (例えば肺気腫 (例えばタバコにより誘発された肺気腫)); 気道炎症、好酸球増加症、線維症、および過剰な粘液生成などに関する状態、例えば嚢胞性線維症およびアレルギー性鼻炎を含むがこれらに限定されない呼吸器障害を、治療または予防するのに使用することができる。例えば、IL-13結合剤 (例えば抗-IL-13抗体分子) は、障害を治療または予防するのに、あるいは障害の少なくとも1つの症状を寛解するのに有効な量で投与することができる。

【0140】

喘息は、無数の状態によって、例えばアレルゲンの吸入によって、あるいは上気道または耳の感染の存在などによって引き起こされる可能性がある (Opperwall (2003) Nurs.Clin.North Am. 38:697-711)。アレルギー性喘息は、様々な特異的および非特異的な刺激に対する気道反応亢進 (AHR)、高血清免疫グロブリンE (IgE)、過剰気道粘液生成、浮腫、および気管支上皮損傷 (Wills-Karp, 前掲) を特徴とする。アレルギー性喘息は、アレルゲンが早期気道応答を引き起こしたときに始まり、しばしば数時間後に遅延晩期気道応答 (LAR) が続く (Henderson他, (2000) J.Immunol. 164:1086-95)。LAR中、好酸球、リンパ球、およびマクロファージの気道壁および気管支液全体にわたる流入がある (Henderson他、前掲)。肺好酸球増加症は、アレルギー喘息の特徴であり、呼吸器上皮の損傷の多くの原因である。(Li他, (1999) J.Immunol. 162: 2477-87)。

【0141】

CD4⁺Tヘルパー (Th) 細胞は、喘息に関連する慢性炎症に重要である (Henderson他, 前掲)。いくつかの研究は、2型Tヘルパー (Th2) 細胞へのCD4⁺細胞の関与と、その後の2型サイトカイン (例えばIL-4、IL-5、IL-10、およびIL-13) の生成が、AHRに至るアレルギー性炎症応答に重要であることを示している (Tomkinson他, (2000) J.Immunol. 166: 5792-5800、およびそこに引用される参考文献)。第1に、CD4⁺T細胞は、マウスモデルでのアレルギー誘発型喘息に必要なことが示されている。第2に、2型サイトカインを生成するCD4⁺T細胞は、これら動物モデルにおいてだけでなくアレルギー性喘息の患者においても増殖する。第3に、2型サイトカインのレベルは、動物モデルおよび喘息患者の気道組織で増加する。第4にTh2

10

20

30

40

50

サイトカインは、アレルギー性喘息のマウスモデルにおいて、好酸球漸増に中心的役割を演ずるとして意味付けられており、養子性の転移によるTh2細胞は、肺の高レベルのエオタキシン（強力な好酸球化学誘引物質）ならびに肺好酸球増加症（Wills-Karp他，前掲；Li他，前掲）に相関している。

【0142】

本明細書に記述される喘息を治療または予防するための方法には、外因性喘息（アレルギー性喘息またはアトピー性喘息としても知られる）、内因性喘息（非アレルギー性専属または非アトピー性喘息としても知られる）、または混合型喘息と呼ばれている両方の組合せに対する方法が含まれる。外因性またはアレルギー性喘息は、例えば花粉や孢子、草、雑草、ペット、フケ、埃、ダニなどのアレルゲンによって引き起こされ、またはこの

10

【0143】

本明細書に記述される薬剤によって治療または寛解することができる障害には、ウイルスなどの感染性物質（例えば風邪およびインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、パラミクスウイルス、ライノウイルス、およびインフルエンザウイルス）によって引き起こされる呼吸器障害および喘息が含まれる。RSV、ライノウイルス、およびインフルエンザウイルス感染は、子供に一般的であり、乳児および幼児の気道疾患の1つの主な原因である。ウイルス性細気管支炎に罹っている子供は、慢性喘鳴および喘息を

20

【0144】

本明細書に記述される方法は、気管支収縮を刺激する可能性のある胃食道逆流（GERD）に関連した喘息の治療および寛解にも有用である。GERDは、残留分泌液、抑制された咳、および心室内のアレルゲンおよび刺激物への曝露と共に、喘息状態に寄与する可能性があり、これらをまとめて夜間喘息または夜行性喘息と呼ぶ。GERDに関連する喘息の治療、阻害、または寛解の方法では、医薬上有効な量のIL-13結合剤を、本明細書に記述されるように、GERDを治療するための医薬上有効な量の薬剤と組み合わせて使用することができる。これらの薬剤には、PROTONIX（登録商標）ブランドの徐放性パントプラゾールナトリウム錠剤や、PRILOSEC（登録商標）ブランドのオメプラゾール徐放性カプセル、ACIPHEX（登録商標）ブランドのレベプラゾールナトリウム徐放性錠剤、またはPREVACID（登録商標）ブランドの徐放性ランソプラゾールカプセルなどのプロトンポンプ阻害剤が含まれるが、これらに限定するものではない。

30

40

【0145】

（アトピー性障害およびその症状）

【0146】

アトピー患者からの細胞は、IL-13に対する感受性が高まっていることが観察されている。したがって、IL-13結合剤（例えば、本明細書に記述される抗体分子などのIL-13結合剤）は、アトピー性障害を治療または予防するのに有効な量で投与することができる。「アトピー性」は、しばしばアレルギー反応を発症するという遺伝的傾向のある疾患グループを指す。

50

【0147】

アトピー性障害の例には、アレルギー、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、喘息、および枯草熱が含まれる。喘息は、例えば気管支反応亢進や可逆的気流閉塞などの、断続的な呼吸器症状に関連した表現型的に不均一な障害である。喘息の免疫組織病理学的特徴には、例えば、気道上皮剥離、基底膜下でのコラーゲン堆積、浮腫、肥満細胞活性化、および炎症性細胞浸潤（例えば好中球、好酸球、およびリンパ球による）が含まれる。気道炎症はさらに、気道反応亢進、気流制限、急性気管支収縮、粘液栓形成、気道壁リモデリング、およびその他の呼吸器症状に寄与する可能性がある。IL-13結合剤（例えば、本明細書に記述される抗体分子などのIL-13結合剤）は、これら症状の1つまたは複数

10

【0148】

アレルギー性鼻炎（枯草熱）の症状には、痒み、鼻水、くしゃみ、または鼻詰まり、および目の痒みが含まれる。IL-13結合剤は、これら症状の1つまたは複数

を寛解させるために投与することができる。アトピー性皮膚炎は、皮膚に影響を及ぼす慢性（長く続く）疾患である。アトピー性皮膚炎に関する情報は、例えばNIH冊子No. 03-4272から入手可能である。アトピー性皮膚炎では、皮膚が極めて痒くなり、その結果、発赤、腫脹、ひび、透明な液の流れ、最後に痂皮の形成および剥がれに至る可能性がある。多くの場合、疾患が悪化（憎悪または発赤拡大と呼ぶ）する時期があり、その後、皮膚が改善しまたは完全にきれいになる期間（寛解と呼ぶ）が続く。アトピー性皮膚炎は、しばしば「湿疹」と呼ばれるが、これはいくつかのタイプの皮膚の炎症に一般的な用語である。

アトピー性皮膚炎の例には、アレルギー性接触湿疹（皮膚炎：発赤、痒み、および湿潤性反応であり、そこではウルシツタや、クリームおよびローション中のある保存剤など、異物であることが免疫系によって認識される物質に、皮膚が接触している）；接触性湿疹（発赤、痒み、および灼熱痛を含む局所反応であり、そこでは皮膚が、アレルゲン（アレルギー誘発物質）あるいは酸や清浄剤またはその他の化学物質などの刺激物に接触している）；汗疱状湿疹（痒くて焼け付くような、透明で深い水疱を特徴とする掌および足の裏の皮膚の刺激）；神経皮膚炎（引っ掻かれたときに激しい刺激を受けるようになる、局所的な痒み（昆虫に噛まれるなど）によって引き起こされる、頭、下肢、手首、または前腕の皮膚の鱗状斑点）；貨幣状湿疹（痂皮で覆われ、剥がれ、かつ極めて痒くなる可能性のある、最も一般的には腕、背中、臀部、および下肢で刺激を受けた皮膚のコイン形斑点）；脂漏性湿疹（頭皮、顔、および時には身体のその他の部分の皮膚の、黄色く油状で鱗状の斑点）が含まれる。追加の特定の症状には、うっ血性皮膚炎、アトピー性プリーツ（Dennie-Morganの皺）、口唇炎、掌の過剰な線（hyperlinear palms）、色素沈着した眼瞼（炎症または枯草熱から色がより濃くなった眼瞼）、魚鱗癬、毛孔性角化症、苔癬化、丘疹、および蕁麻疹が含まれる。IL-13結合剤は、これら症状の1つまたは複数

20

30

【0149】

アレルギー性鼻炎またはその他のアレルギー性障害を治療するための例示的な方法は、アレルゲンに曝す前に、例えば季節ごとにアレルゲンに曝す前に、例えばアレルゲンが

発生する前に、IL-13結合剤による療法を開始する工程を含むことができる。そのような療法は、1回または複数回の用量、例えば規則的な間隔での複数回の用量を含むことができる。

40

【0150】

（癌）

【0151】

IL-13およびその受容体は、少なくともいくつかのタイプの癌、例えば造血細胞から生ずる癌、あるいは脳または神経細胞から生ずる癌（例えばグリア芽細胞腫）の発症に

関与する可能性がある。例えば可溶性IL-13受容体またはSTAT6-/-欠失マウスの使用を介した、例えばIL-13シグナル伝達経路の遮断は、それぞれホジキンリンパ腫細胞系または転移性乳癌の遅い腫瘍の発症および/または成長をもたらす（Trieu他、

50

(2004) Cancer Res. 64: 3271-75; Ostrand-Rosenberg他, (2000) J.Immunol. 165: 6015-6019)。IL-13R2 (HusainおよびPuri (2003) J.Neurooncol. 65:37-48; Mintz他 (2003) J.Neurooncol. 64:117-23) を発現する癌は、本明細書に記述される抗-IL-13抗体によって特異的に狙うことができる。IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、癌細胞増殖またはその他の癌細胞活性を阻害するのに役立つことができる。癌は、正常な成長制御に対する応答性が失われ、かつ典型的には対応する正常細胞と比べて調節性が低下した状態で増殖する、1つまたは複数の細胞を指す。

【0152】

治療のためにIL-13結合剤(例えば、本明細書に記述される抗体や抗原結合断片などのIL-13結合剤)を使用することができる癌の例には、白血病、例えばB細胞慢性リンパ球白血病、急性骨髄性白血病、およびヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)形質転換T細胞;リンパ腫、例えばT細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫;グリア芽細胞腫;膵臓癌;腎細胞癌;卵巣癌;およびAIDS-カポジ肉腫が含まれる。例えばIL-13結合剤(例えば抗-IL-13抗体分子)は、障害を治療または予防するのに、例えば細胞増殖を低下させるのに、または障害の少なくとも1つの症状を寛解させるのに有効な量で投与することができる。

【0153】

(線維症)

【0154】

IL-13結合剤は、炎症および線維症、例えば肝臓の線維症を治療するのに役立つこともできる。IL-13生成は、肝硬変、おそらくは肝細胞癌に向かう肝臓炎症(例えばウイルス性肝炎)の進行と関連している(de Lalla他, (2004) J.Immunol. 173:1417-1425)。線維症は、例えば正常な組織が癒痕組織に置き換わり、その後しばしば炎症が続いたときに生じる。B型肝炎およびC型肝炎ウイルスは共に、肝臓内で繊維性反応を引き起こし、それが肝硬変に進行する可能性がある。肝硬変は、肝機能不全や肝細胞癌などの重症な合併症を引き起こす可能性がある。IL-13結合剤、例えば本明細書に記載される抗-IL-13抗体を使用したIL-13活性の阻止は、炎症および線維症、例えば肝臓疾患、特にB型肝炎やC型肝炎に関連した炎症、線維症、および肝硬変を低減させることができる。例えばIL-13結合剤(例えば抗-IL-13抗体分子)は、障害を治療または予防するために、あるいは炎症および/または繊維性障害の少なくとも1つの症状を寛解させるために、有効な量で投与することができる。

【0155】

(炎症性腸疾患)

【0156】

炎症性腸疾患(IBD)は、腸の炎症を引き起こす疾患の一般的名称である。炎症性腸疾患の2つの例は、クローン病および潰瘍性大腸炎である。IL-13/STAT6シグナル伝達は、マウス平滑筋の炎症誘発型収縮亢進、炎症性腸疾患のモデルに關与することがわかっている(Akiho他, (2002) Am.J.Physiol. Gastrointest.Liver Physiol. 282: G226-232)。例えばIL-13結合剤(例えば抗-IL-13抗体分子)は、障害を治療または予防するために、あるいは炎症性腸疾患の少なくとも1つの症状を寛解させるために、有効な量で投与することができる。

【0157】

(追加のIL-13結合剤)

【0158】

IL-13に結合する、抗体およびその断片である結合剤以外の結合剤、特に、MJ2-7またはC65およびIL-13に結合するための本明細書に記述されるその他の抗体と競合する結合剤も提供される。例えば結合剤は、IL-13上のMJ2-7またはV65と同じエピトープまたは重複エピトープに結合することができる。結合剤は、IL-13活性を阻害または中和することが好ましい。例えば結合剤は、IL-13とIL-13R1との結合を阻害し、例えばIL-13とIL-4Rとの結合を妨げない。その

10

20

30

40

50

ような結合剤は、本明細書に記述される方法で、例えば障害を治療し予防する方法で使用することができる。本明細書に記述される全ての実施形態は、I L - 1 3 結合剤と共に使用するために適応させることができる。

【 0 1 5 9 】

結合剤は、本明細書に記述される可変領域の修飾、あるいは本明細書に記述される可変領域の1つまたは複数のC D Rの別の足場領域への移植も含めた、いくつかの手段によって特定することができる。結合剤は、多様なライブラリーから、例えばスクリーニングによって特定することもできる。タンパク質ライブラリーをスクリーニングするための1つの方法は、ファージディスプレイを使用する。タンパク質の特定領域は様々であり、I L - 1 3 と相互に作用するタンパク質は、例えば固体支持体上での保持によって、またはその他の物理的結合によって特定される。I L - 1 3 上のM J 2 - 7 またはC 6 5 と同じエピトープまたは重複エピトープと結合する特定の結合剤を特定するために、結合剤を、M J 2 - 7 またはC 6 5 (または関連する抗体)を添加することによって溶離することができる、あるいは結合剤を、M J 2 - 7 またはC 6 5 (または関連する抗体)との競合実験で評価することができる。その他のエピトープと結合する薬剤のライブラリーは、I L - 1 3 およびM J 2 - 7 またはC 6 5 (または関連する抗体)を含有する複合体とライブラリーとを接触させることによって使い尽くすことも可能である。次いで使い尽くされたライブラリーをI L - 1 3 と接触させて、I L - 1 3 に結合するがM J 2 - 7 またはC 6 5 により結合される場合にはI L - 1 3 に結合しない結合剤を得ることができる。また、標的としてM J 2 - 7 またはC 6 5 エピトープを含有するI L - 1 3 からのペプチドを使用することも可能である。

10

20

【 0 1 6 0 】

ファージディスプレイについては、例えば、米国特許第5 2 2 3 4 0 9号; Smith(1985) Science 228: 1315-1317; W O 9 2 / 1 8 6 1 9; W O 9 1 / 1 7 2 7 1; W O 9 2 / 2 0 7 9 1; W O 9 2 / 1 5 6 7 9; W O 9 3 / 0 1 2 8 8; W O 9 2 / 0 1 0 4 7; W O 9 2 / 0 9 6 9 0; W O 9 0 / 0 2 8 0 9; W O 9 4 / 0 5 7 8 1; Fucsh他, (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay他, (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse他, (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths他, (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins他, (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson他, (1991) Nature 352: 624-628; Gram他, (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrard他, (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Rebar他, (1996) Methods Enzymol. 267: 129-49; およびBarbas他, (1991) PNAS 88: 7978-7982に記載されている。酵母表面ディスプレイは、例えばBoderおよびWittrup (1997) Nat.Biotechnol. 15: 553-557に記載されている。別の形のディスプレイは、リボソームディスプレイである。例えば、Mattheakis他, (1994) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 91:9022およびHanes他, (2000) Nat Biochnol. 18: 1287-92; Hanes他, (2000) Methods Enzymol. 328: 404-30およびSchaffitzel他, (1999) J Immunol Methods. 231 (1-2): 119-35を参照されたい。

30

【 0 1 6 1 】

I L - 1 3 に結合する結合剤は、ある骨格タンパク質、例えば折り畳み領域の構造的特徴を有することができる。例示的な骨格領域は、抗体に基づいて「ミニボディ」であり、骨格は、モノクローナル抗体の重鎖可変領域から3本の鎖をなくすことによって設計されている (Tramontano他, 1994, J.Mol.Recognit. 7:9; およびMartin他, 1994, EMBO J. 13:5303-5309)。この領域は6 1個の残基を含み、2つの超可変ループ、例えば本明細書に記述される可変領域の1つまたは複数の超可変ループ、あるいは本明細書に記述される変種を提示するのに使用することができる。別の手法では、結合剤は、V状領域である骨格領域を含む (Coia他, W O 9 9 / 4 5 1 1 0)。V状領域は、抗体の可変重鎖 (V H) または可変軽鎖 (V L) 領域に類似した構造的特徴を有する領域を指す。別の骨格領域は、テンダミスタチン、すなわち2つのジスルフィド結合によって一緒に保持された7 4残基の6本鎖シートサンドイッチから得られる (McConnellおよびHoess, 1995, J.Mol. Biol. 250:460)。この親タンパク質は、3つのループを含む。ループは、例えばI L -

40

50

13と結合する領域が選択されるように、修飾し（例えば本明細書に記述されるCDRまたは超可変ループを使用して）または変化させることができる。WO00/60070は、骨格領域として使用することができる、CTLA-4の天然に生ずる細胞外領域から得られる - サンドイッチ構造について述べている。

【0162】

IL-13結合剤に関するさらに別の骨格は、フィブロネクチンIII型領域または関係するフィブロネクチン様タンパク質を基にした領域である。フィブロネクチンIII型(Fn3)領域の全体的な折り畳みは、最小機能性抗体断片、抗体重鎖の可変領域の場合と密接に関係している。Fn3は、Fn3が9本ではなく7本の鎖を有すること以外、抗体VH領域の場合に類似した - サンドイッチである。Fn3の端部には3つのループがあり、BC、DE、およびFGループの位置は、抗体のVH領域のCDR1、2、および3の場合にほぼ対応している。Fn3は、ジスルフィド結合を持たないので有利である。したがってFn3は、抗体およびその断片とは異なって、還元条件下で安定である(WO98/56915; WO01/64942; WO00/34784参照)。Fn3領域は、例えばIL-13に結合する領域が選択されるように、修飾し（例えば本明細書に記述されるCDRまたは超可変ループを使用して）または変化させることができる。

10

【0163】

さらにその他の例示的な骨格領域には、T細胞受容体; MHCタンパク質; 細胞外領域（例えばフィブロネクチンIII型リピート、EGFリピート）; プロテアーゼ阻害剤（例えばKunitz領域、エコチン、BPTIなど）; TPRリピート; トリフォイル構造; 亜鉛フィンガー領域; DNA結合タンパク質; 特にモノマー性のDNA結合タンパク質; RNA結合タンパク質; 酵素、例えばプロテアーゼ（特に不活性化プロテアーゼ）、RNase; シャペロン、例えばチオレドキシン、および熱ショックタンパク質; および細胞内シグナル伝達領域（SH2およびSH3領域など）が含まれる。US2004009530は、いくつかの代替の骨格の例について述べている。

20

【0164】

小骨格領域の例には、Kunitz領域（58アミノ酸、3つのジスルフィド結合）、Cucurbitidinmaximatリプシン阻害剤領域（31アミノ酸、3つのジスルフィド結合）、グアニリンに関係する領域（14アミノ酸、2つのジスルフィド結合）、グラム陰性菌からの熱安定性エンテロトキシンIAに関係する領域（18アミノ酸、3つのジスルフィド結合）、EGF領域（50アミノ酸、3つのジスルフィド結合）、クリンゲル領域（60アミノ酸、3つのジスルフィド結合）、真菌性糖鎖結合領域（35アミノ酸、2つのジスルフィド結合）、エンドセリン領域（18アミノ酸、2つのジスルフィド結合）、および連鎖球菌G IgG結合領域（35アミノ酸、ジスルフィド結合はない）が含まれる。小細胞内骨格領域の例には、SH2、SH3、およびEVH領域が含まれる。一般に、任意のモジュラー領域、細胞内または細胞外のものを、使用することができる。

30

【0165】

骨格領域を評価するための例示的な基準には、(1)アミノ酸配列、(2)いくつかの同種領域の配列、(3)3次元構造、および/または(4)ある範囲のpH、温度、塩分、有機溶媒、酸化剤濃度全体にわたる安定性のデータを含めることができる。一実施形態では、骨格領域は、小さく安定なタンパク質領域であり、例えば100、70、50、40、または30未満のアミノ酸のタンパク質である。領域は、1つまたは複数のジスルフィド結合を含むことができ、金属、例えば亜鉛をキレート化することができる。

40

【0166】

さらに別の結合剤は、ペプチドをベースにしており、例えばアミノ酸が30、25、24、20、18、15、または12未満であるアミノ酸を有するタンパク質である。ペプチドは、より大きいタンパク質に組み込むことができるが、典型的にはIL-13に、例えば本明細書に記述されるエピトープに独立に結合する領域に組み込むことができる。ペプチドは、ファージディスプレイによって特定することができる。例えばUS20040

50

071705を参照されたい。

【0167】

IL-13結合剤は、非ペプチド結合およびその他の化学修飾を含むことができる。例えば、結合剤の一部または全ては、ペプチド模倣体、例えばペプトイドとして合成することができる（例えば、Simon他、(1992) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89:9367-71およびHorwell (1995) Trends Biotechnol. 13: 132-4参照）。結合剤は、1つまたは複数（例えば全て）の非加水分解型結合を含むことができる。多くの非加水分解型ペプチド結合は、そのような結合を含有するペプチドを合成するための手順と一緒に、当技術分野で知られている。例示的な非加水分解型結合には、- - [CH₂NH] - -還元アミドペプチド結合、- - [COCH₂] - -ケトメチレンペプチド結合、- - [CH(CN)NH] - -（シアノメチレン）アミノペプチド結合、- - [CH₂CH(OH)] - -ヒドロキシエチレンペプチド結合、- - [CH₂O] - -ペプチド結合、および- - [CH₂S]チオメチレンペプチド結合が含まれる（例えば、米国特許第6172043号参照）。

10

【0168】

（医薬組成物）

【0169】

IL-13結合剤、例えばIL-13に結合する抗体分子（本明細書に記述されるものなど）は、試験管内で、生体外で、または生体内で使用することができる。これらは、例えばIL-13結合剤と医薬上許容される担体とを組み合わせることによって、医薬組成物中に組み込むことができる。そのような組成物は、IL-13結合剤および担体の他に、様々な希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、および当技術分野で周知のその他の材料を含有することができる。医薬上許容される材料は、一般に、IL-13結合剤の生物活性の有効性を妨げない無毒性の材料である。担体の特徴は、投与経路に依存することができる。

20

【0170】

本明細書に記述される医薬組成物は、以下により詳細に述べるような、その他の抗サイトカイン抗体分子やその他の抗炎症剤などであるがこれらに限定することのないその他の要素を含有してもよい。そのような追加の要素および/または薬剤は、IL-13結合剤、例えば本明細書に記述される抗-IL-13抗体分子によって相乗効果をもたらされるように、医薬組成物中に含めることができる。例えばアレルギー性喘息の治療では、本明細書に記述される医薬組成物は、抗-IL-4抗体分子、またはアレルギー応答を低下させることが知られている薬物を含むことができる。

30

【0171】

本明細書に記述される医薬組成物は、IL-13結合剤、例えば本明細書に記述されるものなどの抗-IL-13抗体分子が、その他の医薬上許容される担体に加えて水溶液中でミセルとして凝集した形で存在する脂質、不溶性単層、液晶、または層状層などの両親媒性剤と組み合わせられている、リポソームの形をとることができる。リポソームの配合に適切な脂質には、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが含まれるが、これらに限定するものではない。そのようなリポソーム配合物を調製するための例示的な方法には、米国特許第4235871号、第4501728号、第4837028号、および第4737323号に記載されている方法が含まれる。

40

【0172】

本明細書で使用される「治療上有効な量」という用語は、医薬組成物の各活性成分の総量、あるいは意味のある患者の利益、例えばそのような状態の症状の寛解、治癒、または治癒速度の増大を示すのに十分な方法を意味する。個々の活性成分を施用した場合、すなわち単独で投与した場合、この用語は、その成分だけを指す。組み合わせて施用した場合、この用語は、組み合わせて投与したか、または逐次投与したか、または同時に投与したか否かに関わらず、治療効果をもたらす活性成分を合わせた量を指す。

【0173】

50

治療または使用の方法を実施する際、治療上有効な量のIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子、例えばIL-13に結合しかつ機能性IL-13シグナル伝達複合体の形成を妨げる（また例えば、1つまたは複数のIL-13関連活性を中和または阻害する）抗体分子を、被験体、例えば哺乳類（例えばヒト）に投与する。IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、本明細書に記述される方法に従って単独で、ならびにサイトカイン、リンホカイン、またはその他の造血因子を用いる治療や、癌療法、または抗炎症薬などの、その他の療法と組み合わせて投与することができる。1種または複数の薬剤と同時投与する場合、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、第2の薬剤と同時に、または逐次投与することができる。逐次投与する場合、医師は、IL-13結合剤をその他の薬剤と組み合わせて投与するのに適した配列を選択することができる。

10

【0174】

医薬組成物で使用されるIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子の投与は、経口摂取や吸入、あるいは経皮、皮下、または静脈内注射など、様々な従来方法で実施することができる。治療上有効な量のIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、静脈内、経皮、または皮下注射によって投与され、結合剤は、発熱性物質を含まない非経口的に許容される水溶液として調製することができる。そのような非経口的に許容されるタンパク質溶液の組成物は、pHや等張性、安定性などの要素を考慮して、生理的状态や結合剤安定性などに合わせて組成物が最適化するように適合させることができる。静脈内、経皮、または皮下注射のための医薬組成物は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロス注射液、デキストロスおよび塩化ナトリウムの注射液、乳酸加リンゲル注射液、または当技術分野で知られているその他のビヒクルなどの、等張性ビヒクルを含有することができる。医薬組成物は、安定剤、保存剤、緩衝液、酸化防止剤、またはその他の添加剤を含有してもよい。

20

【0175】

医薬組成物中のIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子の量は、治療する状態の性質および重症度と、患者が受けた以前の治療の性質とに応じて、様々に変えることができる。医薬組成物は、通常の患者または症状を示さない患者、例えば予防形態の患者に投与することができる。主治医は、個々の患者それぞれを治療するIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子の量を決定することができる。例えば主治医は、低用量の拮抗薬を投与し、患者の応答を観察することができる。より多くの用量の拮抗薬を、最適な治療効果が患者に得られるまで投与ことができ、その時点で、一般に投薬量をそれ以上増やさない。例えば医薬品は、体重1kg当たり約0.1mgから50mgの間の抗体、例えば、体重1kg当たり約0.1mgから5mgの間、または約8mgから50mgの間の抗体を含有することができる。抗体を、月に2回以下の頻度で、例えば隔週または毎月の頻度で皮下からデリバリーする一実施形態では、組成物が、約0.7~3.3、例えば1.0~3.0mg/kg、例えば約0.8~1.2、1.2~2.8、または2.8から3.3mg/kgの量を含む。

30

【0176】

医薬組成物を使用する治療期間は、治療する疾患の重症度と、個々の患者それぞれの状態および潜在的特異体質応答とに応じて様々に変えることができる。一実施形態では、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、皮下経路を介して、例えば週に1度、24、48、96時間ごとに1度の範囲で、またはそのような間隔よりも少ない頻度で投与することもできる。例示的な投薬量は、0.1~20mg/kg、より好ましくは1~10mg/kgの範囲内とすることができる。薬剤は、例えば静脈内注入によって、約1から50mg/m²または約5から20mg/m²の用量に達するように、20、10、5、または1mg/分未満の速度で投与することができる。

40

【0177】

一実施形態では、IL-13結合剤の患者への投与は、例えば副作用を低下させまたは最小限に抑えるために、タンパク質の投薬量を変化させる工程を含む。例えば被験体に、

50

第1の投薬量、例えば治療上有効な量よりも少ない投薬量を投与することができる。この後に続く休止期間、例えば少なくとも6、12、24、または48時間後に、患者に第2の投薬量、例えば第1の投薬量よりも少なくとも25、50、75、または100%多い投薬量を投与することができる。例えば第2および/または同等の第3、第4、および第5の投薬量は、治療上有効な量の少なくとも約70、80、90、または100%とすることができる。

【0178】

(吸入)

【0179】

IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を含む組成物は、吸入またはその他の肺デリバリー形態に合わせて処方することができる。したがってIL-13結合剤は、吸入によって肺組織に投与することができる。本明細書で使用する「肺組織」という用語は、他に特に指示しない限り、気道の任意の組織を指しかつ上気道および下気道を含む。IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、肺疾患を治療するために、既存のモダリティーの1つまたは複数を組み合わせて投与することができる。

10

【0180】

一実施例では、IL-13結合剤を、ネブライザー用に処方する。一実施形態では、IL-13結合剤を、凍結乾燥形態で貯蔵することができる(例えば室温で)、吸入前に溶液に溶かして元に戻すことができる。医療機器、例えば吸入器を使用した吸入に合わせて、IL-13結合剤を処方することも可能である。例えば、米国特許第6102035号(粉末吸入器)および第6012454号(乾燥粉末吸入器)を参照されたい。吸入器は、貯蔵に適したpHのIL-13結合剤用の別個の区画と、中和緩衝液用の別の区画と、噴霧化直前にIL-13結合剤および中和緩衝液と一緒にするメカニズムとを含むことができる。一実施形態では、吸入器が定量吸入器である。

20

【0181】

肺空気の通路に薬物を局所的にデリバリーするのに使用される、3つの一般的なシステムには、乾燥粉末吸入器(DPI)、定量吸入器(MDI)、およびネブライザーが含まれる。MDIは、吸入投与の最も一般的な方法であり、薬品を可溶化形態または分散液としてデリバリーするのに使用することができる。典型的な場合、MDIは、機器の起動によって、噴霧化された薬品を気道に押しやるフレオンまたはその他の比較的高い蒸気圧の噴射剤を含む。MDIとは異なり、DPIは一般に、薬品を乾燥粉末形態で肺に導入するのに、患者の吸気努力に完全に頼るものである。ネブライザーは、液体溶液にエネルギーを与えることによって、吸入すべき医薬品のエアロゾルを形成する。フルオロケミカル媒体を使用した、液体流通または肺洗浄中の薬物の直接的な肺へのデリバリーについても、調査されている。これらおよびその他の方法は、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子をデリバリーするのに使用することができる。一実施形態では、IL-13結合剤は、ポリマーに、例えば化合物を安定化しまたはその半減期を延ばすポリマーに結合している。

30

【0182】

例えば吸入による投与の場合、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、適切な噴射剤またはネブライザーが入っている加圧容器またはディスペンサーから、エアロゾルスプレイの形でデリバリーされる。IL-13結合剤は、乾燥粒子または液体の形をとることができる。IL-13結合剤を含む粒子は、例えば噴霧乾燥によって、あるいはIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子の水溶液を、電荷中和剤と共に乾燥し、次いでこの乾燥粉末から粒子を生成することによって、あるいは有機改質剤中で水溶液を乾燥し、次いでこの乾燥粉末から粒子を生成することによって、調製することができる。

40

【0183】

IL-13結合剤は、適切な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、またはその他の適切な気体

50

を用いて、加圧パックまたはネブライザーから、エアロゾルスプレイの呈をなす形で都合良くデリバリーすることができる。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、計量した量をデリバリーする弁を設けることによって決定することができる。吸入器または注入器で使用するためのカプセルおよびカートリッジは、粒子が配合粒子である場合、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子とラクトースやデンプンなどの適切な粉末ベースとの粉末ミックスを入れたものを処方することができる。配合されまたは配合されていない化合物の他に、100% DPPC やその他の表面活性物質などのその他の材料を、IL-13 結合剤と混合して、配合されまたは配合されていない化合物のデリバリーおよび分散を促進させることができる。乾燥粒子を調製する方法は、例えばW002/32406に記載されている。

10

【0184】

IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子は、これを投与したときに素早く吸収することができるように、かつ迅速な局所的または全身的治療結果をもたらすことができるように、エアロゾルデリバリー用に、例えば乾燥エアロゾル粒子として処方することができる。投与は、投与から2分、5分、1時間、または3時間以内に検出可能な活性が提供されるように、調整して行うことができる。いくつかの実施形態では、ピーク活性は、さらにより素早く、例えば半時間以内に、または10分以内にも実現することができる。IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子は、例えばIL-13 結合剤が肺から循環系に入り、他の器官にまたは特定の標的器官に分布されるように、他の投与形態の代替例として使用するためにより長い生物半減期を目的として処方することができる（例えば、PEGなどのポリマーとの結合によって）。

20

【0185】

一実施形態では、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子は、ポリペプチドの質量の少なくとも5%が下気道または深部肺にデリバリーされるような量でデリバリーされる。深部肺は、極めて密度の高い毛細血管の網状構造を有する。毛細血管の管腔と肺胞気室とを隔てる呼吸器膜は、非常に薄く（6 μm）、極めて浸透性が高い。さらに、肺胞表面に裏打ちされる液層は、肺表面活性物質に富んでいる。その他の実施形態では、IL-13 結合剤、例えば抗-IL-13 抗体分子の組成物の少なくとも2%、3%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、または80%を、下気道にまたは深部肺にデリバリーする。これら組織のいずれかまたは両方へのデリバリーの結果、IL-13 結合剤の効率的な吸収と高い生物学的利用能がもたらされる。一実施形態では、IL-13 結合剤は、例えば吸入気またはネブライザーを使用して計量された用量で提供される。例えばIL-13 結合剤は、少なくとも約0.02、0.1、0.5、1、1.5、2、5、10、20、40、または50 mg / パフまたはそれ以上の単位剤形でデリバリーされる。生物学的利用能%は、下記の通り計算することができる：生物学的利用能% = (AUC_{非侵襲性} / AUC_{静脈内または皮下}) × (用量_{静脈内または皮下} / 用量_{非侵襲性}) × 100。

30

【0186】

必ずしも必要ではないが、表面活性物質などのデリバリー増強剤を使用して、肺デリバリーをさらに強化することができる。本明細書で使用する「表面活性物質」は、2つの不混和相の界面との相互作用によって薬物の吸収を促進させる親水性および親油性の部分を持つIL-13 結合剤を指す。表面活性物質は、例えば粒子凝集の低減やマクロファージ食作用の低減など、いくつかの理由で乾燥粒子に有用である。肺表面活性物質と結合した場合、DPPCなどの表面活性物質は化合物の拡散を大幅に促進させるので、IL-13 結合剤のより効率的な吸収を実現することができる。表面活性物質は当技術分野で周知であり、ホスホグリセリド、例えばホスファチジルコリン、L-ホスファチジルコリンジパルミトイル（DDPC）、およびジホスファチジルグリセロール（DPPG）；ヘキサデカノイル；脂肪酸；ポリエチレングリコール（PEG）；ポリオキシエチレン-9；アルリルエーテル；パルミチン酸；オレイン酸；トリオレイン酸ソルビタン（Span 85）；グリココレート；サーファクチン；ポリオキシマー；ソルビタン脂肪酸エ

40

50

ステル；トリオレイン酸ソルビタン；チロキサポール；およびリン脂質が含まれるが、これらに限定するものではない。

【0187】

(安定化)

【0188】

一実施形態では、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子が、その循環内、例えば血液、血清、リンパ、気管支肺洗浄、またはその他の組織での安定化および/または維持を、少なくとも1.5、2、5、10、または50倍改善する部分と結合する。

【0189】

例えばIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、ポリマー、例えばポリアルキレンオキシドやポリエチレンオキシドなどの実質的に非抗原性のポリマーと結合することができる。適切なポリマーは、その重量がかなり変化することになる。約200から約35000（または約1000から約15000、および2000から約12500）に及ぶ数平均分子量を有するポリマーを使用することができる。

10

【0190】

例えば、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、水溶性ポリマー、例えば親水性ポリビニルポリマー、例えばポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンと結合することができる。そのようなポリマーの非限定的なリストには、ポリアルキレンオキシドホモポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)やポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン化ポリオール、そのコポリマー、およびそのブロックコポリマーなどであるがブロックコポリマーの水溶性が維持されることを前提としたものが含まれる。追加の有用なポリマーには、ポリオキシエチレンやポリオキシプロピレン、ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンとのブロックコポリマー(Pluronic)などのポリオキシアルキレン；ポリメタクリレート；カルボマー；ラクトースやアミロペクチン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、アミロース、硫酸デキストラン、デキストラン、デキストリン、グリコーゲン、または酸性ムコポリ多糖の多糖サブユニット、例えばヒアルロン酸などの、ホモ多糖およびヘテロ多糖を含む、糖モノマー D-マンノース、D-およびL-ガラクトース、フコース、フルクトース、D-キシロース、L-アラビノース、D-グルクロン酸、シアル酸、D-ガラクトン酸、D-マンヌロン酸（例えばポリマンヌロン酸、またはアルギン酸）、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、D-グルコース、およびノイラミン酸を含む、分枝状または非分枝状の多糖；ヘパリンまたはヘパランが含まれる。

20

30

【0191】

IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子とポリマーとの結合体は、例えばゲルする過またはイオン交換クロマトグラフィ、例えばHPLCによって、未反応の出発物質から分離することができる。異種同士の間結合体は、同じ手法で相互に精製することができる。異なる種（例えば1つまたは複数のPEG残基を含有する）の分解も、未反応のアミノ酸のイオン特性の相違が原因で可能である。例えば、WO96/34015を参照されたい。

【0192】

(1種または複数の生体内IL-13関連活性を調節するためのIL-13結合剤の使用)

40

【0193】

さらに別の態様では、本発明は、生体内での1種または複数のIL-13関連活性を、その活性を阻害するのに十分な量の本明細書に記述されるIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を投与することによって調節する（例えば低下させ、中和し、かつ/または阻害する）ための方法の特徴とする。IL-13結合剤は、IL-13媒介型炎症応答の阻害を必要とする被験体に、投与することもできる。これらの状態には、例えば、気道炎症、喘息、線維症、好酸球増加症、および粘膜生成の増加が含まれる。

【0194】

50

本明細書に記述される I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体分子の効力は、例えばブタ回虫 (A s c a r i s s u u m) アレルゲンに曝されたカニクイザルの気道炎症を拮抗薬が調節する能力を評価することによって、評価することができる。I L - 1 3 結合剤、特に少なくとも 1 種の I L - 1 3 活性を阻害する結合剤は、例えば喘息および / またはこれに関連した症状を含めた I L - 1 3 関連病態を治療または予防するために、1 種または複数の I L - 1 3 関連活性を中和または阻害するのに使用することができる、例えば生体内での I L - 1 3 媒介型炎症を低減させるのに使用することができる。

【 0 1 9 5 】

一実施形態では、I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体分子、例えばその医薬組成物を、療法と組み合わせ、すなわちその他の薬剤、例えばアレルギーや炎症性障害などの病的状態または障害を治療するのに有用な治療薬と組み合わせ投与する。この文脈における「組み合わせ」という用語は、薬剤を実質的に同時期に、あるいは同時にまたは逐次与えることを意味する。逐次与える場合、第 2 の化合物の投与時点では、これら 2 種の化合物の最初のもので、治療部位において依然として有効な濃度で検出可能であることが好ましい。

10

【 0 1 9 6 】

例えば併用療法は、以下により詳細に述べるように、例えば 1 種または複数の追加の治療薬、例えば 1 種または複数のサイトカインおよび成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、および / または細胞毒性または細胞増殖抑制性の薬剤と共に同時処方されかつ / または同時投与される、例えば I L - 1 3 に結合しかつ機能的 I L - 1 3 シグナル伝達複合体の形成を妨げる 1 種または複数の I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体と、その断片を含むことができる。さらに、1 種または複数の I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体分子は、本明細書に記述される治療薬の 1 種または複数と組み合わせることができる。そのような併用療法は、投与される治療薬をより低い用量で有利に利用でき、したがって様々な単独療法に関連した可能性ある毒性または合併症が回避される。さらに、本明細書に開示される治療薬は、I L - 1 3 / I L - 1 3 受容体経路とは異なる経路上で作用し、したがって I L - 1 3 結合剤の効果を高めかつ / または相乗効果をもたらすことが予想される。

20

【 0 1 9 7 】

喘息または気道炎症の種々の誘因を妨げる治療薬、例えばアレルギー、上気道炎、または耳感染の治療で使用される治療薬は、I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体分子と組み合わせ使用することができる。一実施形態では、1 種または複数の I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体およびその断片を、その他のサイトカインまたは成長因子拮抗薬 (例えば可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子、付着因子)、その他の標的に結合する抗体分子 (例えばその他のサイトカインまたは成長因子と結合する抗体、その受容体、またはその他の細胞表面分子)、および抗炎症サイトカインまたはその作動薬と共に、同時処方しかつ / または同時投与することができる。I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体、およびその断片と組み合わせ使用することができる薬剤の非限定的な例には、吸入ステロイド ; 作動薬、例えば短時間作用性または長時間作用性の作動薬 ; ロイコトリエンまたはロイコトリエン受容体の拮抗薬 ; A D V A I R (登録商標) などの複合薬 ; I g E 阻害剤、例えば抗 - I g E 抗体 (例えば X O L A I R (登録商標)) ; ホスホジエステラーゼ阻害剤 (例えば P D E 4 阻害剤) ; キサンチン ; 抗コリン作動薬 ; クロモリンなどの肥満細胞安定剤 ; I L - 4 阻害剤 ; I L - 5 阻害剤 ; エオタキシン / C C R 3 阻害剤 ; および抗ヒスタミン含まれるが、これらに限定するものではない。

30

40

【 0 1 9 8 】

その他の実施形態では、1 種または複数の I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体分子を、1 種または複数の抗炎症薬、免疫抑制剤、あるいは代謝または酵素阻害剤と共に同時処方しかつ / または同時投与することができる。I L - 1 3 結合剤、例えば抗 - I L - 1 3 抗体、およびその断片と組み合わせ使用することができる薬物または阻害剤の例には、とりわけ T N F 拮抗薬 (例えば T N F 受容体、例えば p 5 5 または p 7 5 ヒト T

50

NF受容体またはその誘導体の可溶性断片、例えば75kd TNFR-IgG(75kD TNF受容体-IgG融合タンパク質、ENBREX(商標))；TNF酵素拮抗薬、例えばTNF変換酵素(TACE)阻害剤；ムスカリン様受容体拮抗薬；TGF-拮抗薬；インターフェロン；ペルフェニドン；化学療法薬、例えばメトトレキサート、レフルノミド、またはシロリムス(ラパマイシン)、またはその類似体、例えばCCI-779；COX2およびcPLA2阻害剤；NSAID；免疫調節剤；p38阻害剤、TPL-2、Mk-2、およびNF-B阻害剤の1種または複数を含む、1種または複数の抗-IL-13抗体またはその断片と共に同時投与しかつ/または同時処方することができる治療薬の追加の例の1種または複数が含まれるが、これらに限定するものではない。

10

【0199】

(ワクチン製剤)

【0200】

別の態様では、本発明は、免疫化に関連した免疫応答を修飾する方法を特徴とする。IL-13結合剤(例えば抗-IL-13抗体分子)は、IL-13活性を阻害することによって免疫化の効力を増大させるのに使用することができる。IL-13結合剤は、免疫原のデリバリー、例えばワクチンの投与の前、間、または後に投与することができる。一実施形態では、ワクチン接種によって高められた免疫は細胞性免疫であり、例えば癌細胞またはウイルス感染細胞、例えばレトロウイルス感染細胞、例えばHIV感染細胞に対する免疫である。一実施形態では、ワクチン製剤は、1種または複数のIL-13結合剤および抗原、例えば免疫原を含有する。別の実施形態では、IL-13結合剤および免疫原は、互いに別々に、例えば1時間、3時間、1日、または2日以内に投与される。IL-13結合剤は、1種または複数のIL-13活性を中和または阻害するものでよい。

20

【0201】

IL-13の阻害は、例えば細胞性ワクチン、例えば癌やウイルス感染、例えばレトロウイルス感染、例えばHIV感染などの疾患に対するワクチンの効力を改善することができる。ワクチンによるCD8⁺細胞毒性Tリンパ球(CTL)の誘発は、おそらくサイトカインIL-13を通して、CD4⁺T細胞によってダウンレギュレートされる。IL-13の阻害は、CTL応答のワクチン誘導を高めることが示されている(Ahlers他、(2002) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 99:13020-10325)。IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子、本明細書に記述される抗体は、ワクチンの効力を高めるために、ワクチンと併せて使用することができる。癌およびウイルス感染(レトロウイルス(例えばHIV)感染)は、細胞性ワクチン応答が有効であり得る例示的な障害である。ワクチンの効力は、ワクチン接種時に、IL-13シグナル伝達を阻止することによって高められる(Ahlers他、(2002) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 99:13020-25)。ワクチン製剤は、医薬または治療組成物の形で被験体に投与することができる。

30

【0202】

(障害を診断し、予後診断し、モニタするための方法)

【0203】

IL-13結合剤は、診断薬として、生体外および生体内で使用することができる。1つの例示的な方法は、(i)IL-13結合剤(例えばIL-13抗体分子)を被験体に投与する工程と、(ii)被験体内のIL-13結合剤を検出する工程とを含む。検出は、被験体内のIL-13結合剤の位置を決定する工程を含むことができる。別の例示的な方法は、IL-13結合剤とサンプル、例えば被験体からのサンプルとを接触させる工程を含む。サンプル中にIL-13が存在するかないか、またはIL-13のレベル(定性的または定量的)を、決定することができる。

40

【0204】

別の態様では、本発明は、生体外(例えば、組織や生検などの生体サンプル)または生体内(例えば、被験体内での生体内イメージング)でIL-13の存在を検出するための診断方法を提供する。

50

【0205】

この方法は、(i) サンプルを I L - 1 3 結合剤と接触させる工程と、(ii) I L - 1 3 結合剤とサンプルとの複合体形成を検出する工程とを含む。この方法は、参照サンプル(例えば対照サンプル)を結合剤と接触させる工程と、複合体の形成の程度を決定する工程とを含むこともできる。対照サンプルまたは対照者と比べたときの、複合体形成の変化、例えば統計上有意な変化は、サンプル中の I L - 1 3 の存在を表すことができる。

【0206】

別の方法は、(i) 対象に I L - 1 3 結合剤を投与する工程と、(ii) I L - 1 3 結合剤と被験体との間での複合体の形成を検出する工程とを含む。検出は、複合体の形成の位置または時間を決定する工程を含むことができる。

10

【0207】

I L - 1 3 結合剤は、結合しまたは結合していないタンパク質の検出を促進させるために、検出可能な物質で直接または間接的に標識することができる。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子団、蛍光物質、ルミネセンス物質、および放射性物質が含まれる。

【0208】

I L - 1 3 結合剤と I L - 1 3 との間での複合体形成は、I L - 1 3 に結合した結合剤または結合していない結合剤を測定しまたは視覚化することによって、検出することができる。従来の検出アッセイは、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)、放射免疫アッセイ(R I A)、または組織免疫化学を使用することができる。I L - 1 3 結合剤の標識の他に、I L - 1 3 の存在は、検出可能な物質で標識された標準物質および非標識 I L - 1 3 結合剤を利用する競合免疫アッセイによって、サンプル中でアッセイすることができる。このアッセイの一実施形態では、生体サンプル、標識された標準物質、および I L - 1 3 結合剤を一緒にし、標識された標準物質および非標識結合剤の量を決定する。サンプル中の I L - 1 3 の量は、I L - 1 3 結合剤に結合した標識済み標準物質の量に逆比例する。

20

【0209】

(喘息を診断し、予後診断し、かつ/またはモニタするための方法)

【0210】

本明細書に記述される結合剤は、例えば生体サンプル中の I L - 1 3 のレベルを測定することによって喘息を診断し、予後診断し、モニタするための方法で使用することができる。さらにこの発見によって、喘息の治療にも有用な、I L - 1 3 シグナル伝達の新たな阻害剤の特定も可能になる。

30

【0211】

アレルギーおよび非アレルギー性喘息を診断するためのそのような方法は、生体サンプル、例えば血清、血漿、気管支肺胞洗浄液、痰などでの I L - 1 3 の変化(例えば減少または増加)を検出する工程を含むことができる。「診断」または「診断する」は、病原状態が存在するか否かを特定することを意味する。診断方法では、被験体(ヒトまたはヒト以外の哺乳類)からの生体サンプル中、例えば気管支肺胞洗浄液中の試験量の I L - 1 3 ポリペプチドを検出し、その試験量を、I L - 1 3 ポリペプチドに関する通常量または範囲(すなわち喘息に罹っていないことがわかっている個体からの量または範囲)と比較することによって、I L - 1 3 の存在を検出する。特定の診断方法は、喘息の最終的な診断を下すことができないが、この方法が診断を助ける肯定的な徴候をもたらすなら、それで十分である。

40

【0212】

喘息および/またはアトピー性障害を診断するための方法は、m R N A またはタンパク質のレベルで I L - 1 3 のアップレギュレーションを検出する工程を含むことができる。「予後診断」または「予後診断する」は、可能性ある病的状態の発症および/または重症度を予測することを意味する。予後診断方法では、被験体からの生体サンプル中の I L - 1 3 の試験量を決定し、その試験量を、I L - 1 3 の予後診断量または範囲(すなわち喘

50

息の重症度が様々な個体からの量または範囲)と比較する。試験サンプル中のIL-13の様々な量は、ある特定の喘息の予後と一致する。特定の予後レベルでの、IL-13の量の検出は、被験体の予後診断を提供する。

【0213】

本願は、IL-13のアプレギュレーションを検出することによって喘息の過程をモニタするための方法も提供する。モニタ方法では、被験体から得られた生体サンプル中のIL-13の試験量を、第1および第2の時間で決定し、これらの量を比較する。第1と第2の時間の間でのIL-13の量の変化は、喘息および/またはアトピー性障害の過程の変化を示すことができ、その量が減少した場合は喘息の鎮静を表し、その量が増加した場合は喘息および/またはアトピー性障害の進行を表す。そのようなモニタアッセイは、IL-13関連障害の治療をしている患者での、特定の治療介入の効力(例えば疾患の寛解および/またはぶり返し)を評価するのにも有用である。

10

【0214】

蛍光団および発色団で標識した結合剤を調製することができる。蛍光部分は、310nmよりも長い波長で、好ましくは400nmよりも長い波長でかなりの吸収があるように選択することができる。様々な適切な蛍光体および発色団は、Stryer (1968) Science, 162:526およびBrand, L. 他, (1972) Annual Review of Biochemistry, 41: 843-868に記載されている。結合剤は、米国特許第3940475号、第4289747号、および第4376110号に開示されているものなどの従来の手順により、蛍光発色団の群で標識することができる。上述のいくつかの所望の性質を有する蛍光体の1つの群は、フルオレセインおよびローダミンを含むキサンテン染料である。蛍光化合物の別の群は、ナフチルアミンである。蛍光団または発色団で標識したら、例えば蛍光顕微鏡法(共焦点またはデコンボリューション顕微鏡法)を使用してサンプル中のIL-13の存在または局在化を検出するために、この結合剤を使用することができる。

20

【0215】

組織分析。免疫組織化学を、本明細書に記述される結合剤を使用して実施することができる。例えば抗体の場合、抗体を標識(精製またはエピトープタグなど)と共に合成することができる。あるいは、例えば標識または標識結合基を結合することによって検出可能に標識することができる。例えばキレート剤を、抗体に結合することができる。次いで抗体を、組織製剤、例えば顕微鏡スライド上にある組織の固定部分に接触させる。結合のためインキュベートした後、この製剤を洗浄して、結合していない抗体を除去する。次いで製剤に抗体が結合しているか否か明らかにするために、例えば顕微鏡法を使用して製剤を分析する。抗体(あるいはその他のポリペプチドまたはペプチド)は、結合の時点では標識されていなくてよい。結合および洗浄の後、抗体を検出可能にするために標識する。

30

【0216】

タンパク質アレイ。IL-13結合剤(例えば、IL-13結合剤であるタンパク質)は、タンパク質アレイ上に固定化することもできる。タンパク質アレイは、例えば医療サンプル(単離した細胞や血液、血清、生検など)をスクリーニングするための、診断ツールとして使用することができる。タンパク質アレイは、その他の結合剤、例えばIL-13またはその他の標的分子に結合するものを含むこともできる。

40

【0217】

タンパク質アレイを生成する方法は、例えば、De Wildt他, (2000) Nat. Biotechnol. 18: 989-994; Lueking他, (1999) Anal. Biochem. 270: 103-111; Ge(2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeathおよびSchreiber (2000) Science 289: 1760-1763; WO 01/40803、およびWO 99/51773 A 1に記載されている。アレイ用のポリペプチドは、例えばGenetic MicrosystemsまたはBioRoboticsから市販されているロボット装置を使用して、高速でしみを付けることができる。アレイ基板は、例えばニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば表面改質ガラスとすることができる。アレイは、多孔質マトリックス、例えばアクリルアミド、アガロース、または別のポリマーを含むこともできる。例えばアレイは、De Wildt(前掲)などに記

50

載されるように、抗体のアレイとすることができる。タンパク質を生成する細胞は、アレイ型フォーマットのフィルタ上に成長させることができる。タンパク質の生成を誘発し、発現したタンパク質を、細胞の位置でフィルタに固定化する。

【0218】

タンパク質アレイは、サンプル中のIL-13の程度を決定するために、サンプルに接触させることができる。サンプルが標識されていない場合、IL-13の結合を検出するために、例えば標識プローブを使用するサンドイッチ法を使用することができる。アレイの各アドレスでの結合の程度に関する情報は、例えばコンピュータデータベースにプロファイルとして保存することができる。タンパク質アレイを複製物として生成し、例えば種々のサンプルの結合プロファイルを比較するのに使用することができる。

10

【0219】

フローサイトメトリー。IL-13結合剤は、細胞、例えばサンプル（例えば患者のサンプル）中の細胞を標識するのに使用することができる。結合剤は、蛍光化合物に結合することができる（または結合可能である）。次いで細胞を、フローサイトメトリーによって分析し、かつ/または選別された蛍光活性化細胞を使用して（例えばBecton Dickinson Immunocytometry Systems、San Jose CAから入手可能な選別機を使用して；米国特許第5627037号、第5030002号、および第5137809号も参照）選別することができる。細胞が選別機内を通過するとき、レーザ光線が蛍光化合物を励起し、それと同時に検出器が通過する細胞をカウントし、蛍光を検出することによって蛍光化合物が細胞に結合したか否かを決定する。各細胞に結合された標識の量を定量し、サンプルの特徴付けを行うよう分析することができる。選別機は、細胞の方向を逸らせて、結合剤により結合された細胞を、結合剤により結合されていない細胞から分離することもできる。分離した細胞を培養し、かつ/または特徴付けることができる。

20

【0220】

生体内イメージング。さらに別の実施形態では、本発明は、生体内で被験体内のIL-13の存在を検出するための方法を提供する。この方法は、(i)被験体（例えばIL-13関連障害を有する患者）に、検出可能なマーカーに結合した抗-IL-13抗体を投与する工程と、(ii)この被験体を、検出可能なマーカーを検出するための手段に曝露する工程とを含む。例えば被験体を、例えばNMRまたはその他のX線断層撮影手段によってイメージングする。

30

【0221】

診断イメージングに有用な標識の例には、 ^{131}I や ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、および ^{188}Rh などの放射能標識、フルオレセインやローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子放出断層撮影（「PET」）走査機により検出可能な陽電子放出同位体、ルシフェリンなどの化学発光体、ペルオキシダーゼやホスファターゼなどの酵素マーカーが含まれる。短域検出器プローブによって検出可能な同位体などの、短域放射線エミッタを使用することもできる。結合剤は、既知の技法を使用して、そのような試薬で標識することができる。例えば、抗体の放射能標識に関連した技法に関するWenselおよびMeares (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New Yorkと、Colcher他, (1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816を参照されたい。放射能標識された結合剤は、生体外診断試験に使用することもできる。同位体標識された結合剤の特異的活性は、半減期、放射能標識の同位体の純度、および標識を抗体にどのように組み込むかに応じて様々に異なる。放射性同位体（ ^{14}C や ^3H 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、および ^{131}I など）でポリペプチドを標識するための手順は、一般に知られている。例えば、米国特許第4302438号；Golding, J.W. (Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 第2版 London; Orlando: Academic Press, 1986. pp124-126)およびそこに引用されている参考文献；およびA.R. Bradwell他, "Developments in Antibody Imaging", Mo

40

50

noclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W.Baldwin他(編), pp65-85 (Academic Press 1985)を参照されたい。

【0222】

本明細書に記述されるIL-13結合剤は、磁気共鳴イメージング(MRI)造影剤に結合することができる。いくつかのMRI技法は、EP-A-0502814に概説されている。一般に、種々の環境における水の陽子の緩和時間定数T1およびT2の相違を使用して、画像を生成する。しかしこれらの相違は、鮮明な高解像度画像を提供するのに不十分である可能性がある。これらの緩和時間定数の相違は、造影剤によって増強することができる。そのような造影剤の例には、いくつかの磁性剤、常磁性剤(おもにT1を変化させる)、および強磁性または超常磁性剤(おもにT2応答を変化させる)が含まれる。キレート(例えばEDTA、DTPA、およびNTAキレート)を、一部の常磁性物質(例えばFe³⁺、Mn²⁺、Gd³⁺)の結合(および毒性の低減)に使用することができる。その他の薬剤は、粒子の形、例えば直径10μm未満から約10nmであり、強磁性、反強磁性、または超常磁性を有する粒子の形をとることができる。IL-13結合剤は、IL-13の分布を位置付けかつ画像形成するために、Pykett(1982) Scientific American, 246:78-88により記述されるように、NMR活性¹⁹F原子を含有する指示基で標識することもできる。

10

【0223】

本明細書の範囲内には、IL-13結合剤と、診断使用のための取扱説明書、例えば生体外で、例えばサンプル中で、例えばIL-13関連障害を有する患者からの生検または細胞中で、または例えば対象をイメージングすることによって生体内でIL-13を検出するための、IL-13結合剤(例えば抗体分子、あるいはその他のポリペプチドまたはペプチド)の使用のための取扱説明書を含むキットも含まれる。キットは、標識や追加の診断薬など、少なくとも1種の追加の試薬をさらに含むことができる。生体内での使用では、結合剤を、医薬組成物として処方することができる。

20

【0224】

(キット)

【0225】

IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子は、例えばキットの構成要素としてキット内に提供することができる。例えばキットは、(a)IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子と、所望により(b)情報資料とを含む。情報資料は、記述的、指示的、市場的、または方法、例えば本明細書に記述される方法に関するものとしてすることができる。キットの情報資料は、その形に限定されない。一実施形態では、情報資料は、化合物の生成、化合物の分子量、濃度、有効期日、バッチ処理または生産現場の情報などに関する情報を含むことができる。一実施形態では、情報資料は、本明細書に記述される障害を治療し、予防し、診断し、予後診断し、またはモニタするために、IL-13結合剤を使用することに関する。

30

【0226】

一実施形態では、情報資料は、例えば適切な用量、剤形、または投与形態(例えば本明細書に記述される用量、剤形、または投与形態)で、本明細書に記述される方法を実施するのに適切な手法により、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を投与するための取扱説明書を含むことができる。別の実施形態では、情報資料は、適切な被験体に、例えばヒトに、例えばアレルギー性喘息、非アレルギー喘息、またはIL-13媒介型障害、例えばアレルギーおよび/または炎症性障害、あるいはHTLV-1感染に罹っておりまたはそのリスクのあるヒトに、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を投与するための取扱説明書を含むことができる。IL-13の生成は、HTLV-1感染に関連していた(Chung他,(2003) Blood 102: 4130-36)。

40

【0227】

例えば資料は、患者、すなわちアレルギー性喘息、非アレルギー喘息、またはIL-13媒介型障害、例えばアレルギーおよび/または炎症性障害、あるいはHTLV-1感染

50

に罹っておりまたはそのリスクのある患者に、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を投与するための取扱説明書を含むことができる。

【0228】

キットは、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子を含有する組成物用の、1つまたは複数の容器を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、組成物および情報資料のための別個の容器、仕切り、または区画を含む。例えば組成物は、瓶、バイアル、または注射器に入れることができ、情報資料は、プラスチックのスリーブまたはパケットに入れることができる。その他の実施形態では、キットの個別の要素を、単一の分割されていない容器内に入れる。例えば組成物を、ラベルの形をした情報資料がそこに付着されている瓶、バイアル、または注射器に入れる。いくつかの実施形態では、キットは、IL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子1の種または複数の単位剤形（例えば本明細書に記述されている剤形）がそれぞれ入っている複数の（例えばパック）の個々の容器を含む。例えばキットは、1つの単位用量のIL-13結合剤、例えば抗-IL-13抗体分子、または複数の単位用量がそれぞれ入っている、複数の注射器、アンプル、ホイルパケット、アトマイザ、または吸入器を含む。

10

【0229】

キットは所望により、組成物の投与に適した機器、例えば注射器、吸入器、ピペット、鉗子、計量スプーン、滴瓶（例えば目薬用スポイト）、綿棒（例えば綿製の棒または木製の棒）、または任意のそのようなデリバリー機器を含む。好ましい実施形態では、機器は、計量済み用量の結合剤を吐出する埋込み可能な機器である。

20

【0230】

以下に示す実施例は、本発明の理解を助けるために記述するものであるが、その範囲をいかようにも限定することを意図するものではなく、かつその範囲をいかようにも限定するように解釈すべきではない。

【実施例】

【0231】

（実施例1）

【0232】

（a）NHP-IL-13のクローニングおよびヒトIL-13に対する相同性

【0233】

カニクイザルIL-13（NHP IL-13）を、ハイブリダイゼーションプローブを使用してクローニングした。カニクイザルIL-13アミノ酸配列と、ヒトIL-13のアミノ酸配列との比較を、図1Aに示す。2つの配列の間には、8つのアミノ酸に相違があるため、94%のアミノ酸に同一性がある。これらの相違の1つ、R130Qは、喘息患者で優先的に発現する一般的なヒト多型性を表している（Heinzmann他、(2000) Hum. Mol. Genet. 9: 549-559）。

30

【0234】

（b）NHP-IL-13とヒトIL-13 R2との結合

【0235】

ヒトIL-13は、高い親和性で、2型のIL-13受容体（IL-13 R2）に結合する。この受容体の可溶形態が、ヒトIgG1 Fc末端と共に発現した。IL-13に結合し、細胞表面IL-13 R1-IL4Rシグナル伝達複合体からサイトカインを隔離することによって、sIL-13 R2-Fcは、ヒトIL-13生物活性の強力な阻害剤として働くことができる。sIL-13 R2-Fcは、CHO細胞または大腸菌により生成されたNHP-IL-13と結合することが示された。

40

【0236】

（c）ヒト単球上でのNHP-IL-13の生物活性

【0237】

（i）ヒト単球上でのCD23発現

カニクイザルIL-13をコードするcDNAを大腸菌に発現させ、再びリフォールデ

50

ィングして、生物活性を維持した。カニクイザル I L - 1 3 に対するヒト細胞の反応性について、健康なドナーからの正常な抹消血単核細胞を 3 7 で一晚 I L - 1 3 で処理するバイオアッセイを使用して実証した。これは、単球表面での C D 2 3 発現のアップレギュレーションを誘発した。結果は、カニクイザル I L - 1 3 が、主要なヒト単球に対して生物活性を有することを示していた。

【 0 2 3 8 】

(i i) H T - 2 9 細胞上での S T A T 6 リン酸化

ヒト H T - 2 9 上皮細胞系は、I L - 1 3 受容体を通じたシグナル伝達の結果、S T A T 6 リン酸化を受けることによって、I L - 1 3 に応答する。組換え N H P - I L - 1 3 が S T A T 6 リン酸化を引き起こす能力のアッセイを行うため、H T - 2 9 細胞に N H P - I L - 1 3 を 3 7 で 3 0 分間免疫化し、次いで固定し、浸透させ、ホスホ - S T A T 6 に対する蛍光抗体で染色した。結果は、カニクイザル I L - 1 3 が、このヒト細胞系内で S T A T 6 リン酸化を効率的に誘発することを示していた。

10

【 0 2 3 9 】

(d) N H P - I L - 1 3 に結合する抗体の生成

【 0 2 4 0 】

マウスまたはその他の適切な動物を、例えば下記の方法の 1 つまたは複数を使用して、カニクイザル I L - 1 3 で免疫化しかつ追加免疫を行うことができる。免疫化するための 1 つの方法は、追加免疫を行うために同じかまたは異なる方法と組み合わせることができる。

20

【 0 2 4 1 】

(i) 大腸菌で発現させ、封入体から精製し、生物活性を保存するためにリフォールディングされた、カニクイザル I L - 1 3 タンパク質による免疫化。免疫化のため、タンパク質を完全フロイントアジュバント (C F A) で乳化し、マウスを標準的なプロトコルに従って免疫化する。追加免疫では、同じタンパク質を不完全フロイントアジュバント (I F A) で乳化する。

【 0 2 4 2 】

(i i) 成熟カニクイザル I L - 1 3 の全配列に及ぶペプチドによる免疫化。各ペプチドは、カニクイザル I L - 1 3 に特有でありかつヒトタンパク質には存在しない、少なくとも 1 つのアミノ酸を含有する。図 1 B を参照されたい。ペプチドが、システイン以外の C 末端残基を有する場合、担体タンパク質との結合のためにシステインを添加する。ペプチドを、K L H などの免疫原担体タンパク質に結合し、これを使用して、標準的なプロトコルに従ってマウスを免疫化する。免疫化では、タンパク質を完全フロイントアジュバント (C F A) で乳化し、マウスを標準的なプロトコルに従って免疫化する。追加免疫では、同じタンパク質を、不完全フロイントアジュバント (I F A) で乳化する。

30

【 0 2 4 3 】

(i i i) 発現した N H P - I L - 1 3 コード化 c D N A による免疫化。リーダー配列を含んだ N H P - I L - 1 3 をコード化する c D N A を、適切なベクターにクローニングする。この D N A を金ビーズ表面に被覆し、これを遺伝子銃で皮内注射する。

【 0 2 4 4 】

(i v) タンパク質またはペプチドは、タンパク質ライブラリー、例えばファージまたはリボソームディスプレイライブラリーをスクリーニングするための標的として使用することができる。例えばライブラリーは、様々な免疫グロブリン分子、例えば F a b、s c F v、または F d を表示することができる。

40

【 0 2 4 5 】

(e) N H P および所望によりヒト I L - 1 3、例えば未変性ヒト I L - 1 3 に対して交差反応性を示す、抗体クローンの選択。

【 0 2 4 6 】

(1 次スクリーン)

【 0 2 4 7 】

50

抗体用の1次スクリーンは、ELISAによる組換えNHP-IL-13との結合のための選択であった。このELISAでは、ウェルを組換えNHP-IL-13で被覆する。免疫血清を連続希釈により添加し、室温で1時間インキュベートした。ウェルを、0.05%TWEEN(登録商標)-20を含有するPBS(PBS-Tween)で洗浄した。結合した抗体を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)で標識された抗マウスIgGおよびテトラメチルベンジデン(TMB)基質を使用して検出した。吸光度を450nmで読んだ。典型的な場合、全ての免疫化マウスは、NHP-IL-13に対する高い力価の抗体を生成した。

【0248】

(2次スクリーン)

10

【0249】

2次スクリーンは、ELISAによる組換えNHP-IL-13とsIL-13R1-Fcとの結合阻害のための選択であった。ウェルを、FLAGタグ付きNHP-IL-13を結合することができる可溶性IL-13R1-Fcで被覆した。この結合を、HRPに結合された抗FLAG抗体で検出した。TMB基質の加水分解を、450nmでの吸光度として読んだ。このアッセイでは、FLAGタグ付きNHP-IL-13を、高濃度の免疫血清と共に添加した。免疫血清が、NHP-IL-13に結合した抗体を含有し、ウェルを被覆するsIL-13R1-Fcとのその結合を妨げた場合、ELISAシグナルは減少した。全ての免疫化マウスは、NHP-IL-13に結合するsIL-13R1-Fcと競合した抗体を生成したが、力価はマウスごとに異なっていた。血清が、最高希釈でNHP-IL-13とのsIL-13R1-Fc結合を阻害することを示す、その動物からの融合を目的として、脾臓を選択した。

20

【0250】

(3次スクリーン)

【0251】

3次スクリーンは、NHP-IL-13生物活性の阻害について試験をした。TF-1増殖アッセイ、単球CD23発現アッセイ、およびHT-29細胞STAT6リン酸化アッセイを含めたいくつかのバイオアッセイを使用することができる。免疫血清を、NHP-IL-13媒介型STAT6リン酸化の阻害に関して試験した。HT-29ヒト上皮細胞系を、指示された濃度のマウス免疫血清の存在下および存在しない状態で、37で30分間、組換えNHP-IL-13で免疫化した。次いで細胞を固定化し、浸透させ、ホスホ-STAT6(Pharmingen)に対するALEXA(商標)Fluor488結合mAbで染色した。STAT6リン酸化を受けることによってIL-13に応答する細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより決定した。高血清希釈でNHP-IL-13生物活性を最大阻害するとして決定された、最も強力な中和活性を有するマウスの脾臓を、ハイブリドーマの生成を目的として選択した。

30

【0252】

(4次スクリーン)

【0253】

ヒトIL-13を含有する粗製製剤を、ヒト臍帯血単核細胞(BioWhittaker/Cambrex)から生成した。細胞を、5%CO₂の37のインキュベーター内で、10%熱不活性化FCS、50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、および2mM L-グルタミンを含有するRPMI培地中で培養した。細胞を、マイトジェンPHA-P(Sigma)で3日間刺激し、組換えヒトIL-4(R&D Systems)および抗ヒトIL-12でTh2へとねじれ処理した。Th2細胞をIL-2で1週間増殖し、次いで3日間、ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)およびイオノマイシンで処理することによって、サイトカインが生成されるように活性化した。上澄みを収集し、透析して、PMAおよびイオノマイシンを除去した。IL-13のバイオアッセイを妨げる可能性のあるGM-CSFおよびIL-4をなくすため、上澄みを、GM-CSFおよびIL-4(R&D Systems, Inc)に対す

40

50

るビオチニル化抗体で処理し、次いでストレプトアビジンで被覆した磁気ビーズ (Dyna1) と共にインキュベートした。IL-13 の最終濃度を ELISA (Biosource) により決定し、総タンパク質に関しては Bradford アッセイ (Bio-Rad) を行った。典型的な製剤は、 < 0.0005 重量% の IL-13 を含有する。

【0254】

(ハイブリドーマクローンの選択)

【0255】

確立された方法を使用して、上述のように選択されたマウスの脾臓からハイブリドーマを生成し、P3X63__AG8.653 骨髄腫細胞系 (ATCC) に融合した。細胞を、限界希釈で塗布し、クローンを、上述のスクリーニング基準に従って選択した。データは、ELISA によって sIL13R 1-Fc に結合する NHP-IL-13 と競合する能力に基づいて、クローンの選択を目的に収集した。クローンを、NHP-IL-13 の生物活性を中和する能力に関してさらに試験した。ハイブリドーマの上澄みを、HT-29 ヒト上皮細胞系内で NHP-IL-13 によって誘発される STAT-6 リン酸化の競合に関して試験した。

10

【0256】

(実施例2)

MJ2-7 抗体

【0257】

トータル RNA を、QIAGEN RNEASY (商標) ミニキット (Qiagen) を使用して MJ2-7 ハイブリドーマ細胞から調製した。RNA を、SMART (商標) PCR 合成キット (BD Biosciences Clontech) を使用して cDNA に逆転写した。SMART (商標) オリゴヌクレオチドを順方向プライマーとして使用し、マウス IgG1 定常領域の CH1 領域の N 末端部分をコードする DNA にアニールする mIgG1 プライマーを、逆方向プライマーとして使用して、PCR によって MJ2-7 重鎖の可変領域を外挿した。MJ2-7 軽鎖可変領域をコードする DNA 断片を、SMART (商標) およびマウス 特異的プライマーを使用して生成した。PCR 反応を、DEEP VENT (商標) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs) および 25 nM の dNTP を使用して、24 サイクル (94 で 1 分間、60 で 1 分間、72 で 1 分間) にわたり実施した。PCR 産物を pED6 ベクターにサブクローニングし、挿入物の配列を、DNA 配列決定によって特定した。精製したマウス MJ2-7 抗体の N 末端タンパク質配列決定を使用して、翻訳された配列が観察されたタンパク質配列に対応することを確認した。

20

30

【0258】

NHP IL-13 と相互に作用し、かつヒト IL-13 と相互に作用する可能性があることを示唆する特徴を有するマウスモノクローナル抗体 MJ2-7 の、例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、下記の通りである。

【0259】

重鎖可変領域をコードする例示的なヌクレオチド配列は、

```
GAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT GTG
AAGCCAG
GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGCACAGGTT CTGGCTT
CAA CATTAAAGAC
ACCTATATAC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGG
GCC TGGAGTGGAT
TGGAAAGGATT GATCCTGCGA ATGATAATAT TAAATAT
GAC CCGAAGTTCC
AGGGCAAGGC CACTATAACA GCAGACACAT CCTCCA
CAC AGCCTACCTA
CAGCTCAACA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCT
```

40

50

ATT ACTGTGCTAG
 ATCTGAGGAA AATTGGTACG ACTTTTTTTGA CTA CTGG
 GGC CAAGGCACCA
 CTCTCACAGT CTCCTCA (配列番号129)
 を含む。

【0260】

重鎖可変領域の例示的なアミノ酸配列は、

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKDTYIHWVKQR
 PEQGLEWIGRIDPANDNIKYDPKFQGKATITADTSSNTAY
 LQLNSLTSEDTAVYYCARSEENWYDFFDYWGQGTTTLTVSS
 (配列番号130)

10

を含む。

【0261】

CDRには下線を付している。可変領域の前には、所望によりリーダー配列が、例えばMKCSWVIFFLMAVVTGVNS (配列番号131)が存在する。軽鎖可変領域をコードする例示的なヌクレオチド配列は、

GAT GTTTTGATGA CCCAAACTCC ACTCTCCCTG CCT
 GTCAGTCT
 TTGGAGATCA AGCCTCCATC TCTTGCAGGT CTAGTCA
 GAG CATTGTACAT
 AGTAATGGAA ACACCTATTT AGAATGGTAC CTGCAGA
 AAC CAGGCCAGTCT
 TCCAAAGCTC CTGATCTACA AAGTTTCCAA CCGATTT
 TCT GGGGTCCAG
 ACAGGTTTCAG TGGCAGTGGA TCAGGGACAG ATTTCAC
 ACT CAAGATTAGC
 AGAGTGGAGG CTGAGGATCT GGGAGTTTAT TACTGCT
 TTC AAGGTTTCACA
 TATTCCGTAC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAA
 ATA AAA (配列番号132)

20

30

を含む。

【0262】

掲載可変領域に関する例示的なアミノ酸配列は、

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW
 YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
 SRVEAEDLGVYYCFQGSHIPYTFGGGTKLEIK (配列番号133)

40

を含む。

【0263】

CDRには下線を付す。アミノ酸配列の前には、所望によりリーダー配列が、例えばMKLPVRLLVLMFWIPASSS (配列番号134)が存在する。「MJ2-7」という用語は、本明細書では「mAb7.1.1」という用語と同義に使用する。

【0264】

(実施例3)

C65抗体

【0265】

50

NHP IL-13 と相互に作用し、かつヒト IL-13 と相互に作用することができることを示唆する特徴を有する、マウスモノクローナル抗体 C65 の例示的なヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、下記の通りである。

【0266】

重鎖可変領域に関する例示的核酸配列は、

```

      1   ATGGCTGTCC   TGGCATTACT   CTTCTGCC
TG   GTAACATTCC   CAAGCTGTAT
      51   CCTTTCCCAG   GTGCAGCTGA   AGGAGTCA
GG   ACCTGGCCTG   GTGGCGCCCT
     101   CACAGAGCCT   GTCCATCACA   TGCACCGT
CT   CAGGGTTCTC   ATTAACCGGC
     151   TATGGTGTA   ACTGGGTTCG   CCAGCCTC
CA   GGAAGGGTTC   TGGAGTGGCT
     201   GGGATAAATT   TGGGGTGATG   GAAGCACA
GA   CTATAATTCA   GCTCTCAAA
     251   CCAGACTGAT   CATCAACAAG   GACAACCTC
CA   AGAGCCAAGT   TTTCTTAAAA
     301   ATGAACAGTC   TGCAAACTGA   TGACACAG
CC   AGGTACTTCT   GTGCCAGAGA
     351   TAAGACTTTT   TACTACGATG   GTTTCTAC
AG   GGGCAGGATG   GACTACTGGG
     401   GTC AAGGAAC   CTCAGTCACC   GTCTCCTC
A (配列番号135)

```

を含む。

【0267】

重鎖可変領域に関する例示的なアミノ酸配列は、

```

QVQLKESG PGL VAPSQSL SIT CTVSGFSLTG YGVNWV
RQPP GKGLEWLG II WGDGSTDYNS ALKSRLI INK DN
SKSQVFLK MNSLQTDDTA RYFCARDDKTF YYDGFYRGR
M DYWGQGTSVT VSS (配列番号136)

```

30

を含む。CDRには下線を付けている。アミノ酸配列の前には、所望によりリーダー配列が、例えば MAVLA L L FCL VTFPSCILS (配列番号137) が存在する。

【0268】

軽鎖可変領域をコードする例示的なヌクレオチド配列は、

```

      1   ATGAACACGA   GGGCCCCCTGC   TGAGTTCC
TT   GGGTTCCTGT   TGCTCTGGTT
      51   TTTAGGTGCC   AGATGTGATG   TCCAGATG
AT   TCAGTCTCCA   TCCTCCCTGT
     101   CTGCATCTTT   GGGAGACATT   GTCACCAT
GA   CTTGCCAGGC   AAGTCAGGGC
     151   ACTAGCATTA   ATTTAAACTG   GTTTCAGC
AA   AAACCAGGGA   AAGCTCCTAA
     201   GCTCCTGATC   TTTGGTGCAA   GCAACTTG
GA   AGATGGGGTC   CCATCAAGGT
     251   TCAGTGGCAG   TAGATATGGG   ACAAATTT
CA   CTCTCACCAT   CAGCAGCCTG
     301   GAGGATGAAG   ATATGGCAAC   TTATTTCT
GT   CTACAGCATA   GTTATCTCCC

```

50

3 5 1 G T G G A C G T T C G G T G G C G G C A C C A A A C T G
G A A A T C A A A (配列番号 1 3 8)

を含む。

【 0 2 6 9 】

軽鎖可変領域に関する例示的なアミノ酸配列は、

DVQMIQSP SLSASLGLDI VTMTCQASQG TSINLNWFQ
Q KPGKAPKLLI FGASNLEDGV PSRFSGSRYG TNFTL
TISSL EDEDMATYFC LQHSYLPWTF GGGTKLEIK (配列
番号139)

10

を含む。CDRには下線を付す。アミノ酸配列の前には、所望によりリーダー配列が、例えばMNTRAPAEFLGFLLWFLGAR C (配列番号140)が存在する。

【 0 2 7 0 】

(実施例 4)

カニクイザルモデル

【 0 2 7 1 】

生体内の1種または複数のIL-13関連活性を中和する抗体の効力は、回虫に対して生来アレルギーを有するカニクイザルの抗原誘発性気道炎症モデルを使用して、試験をすることができる。このモデルでは、アレルギーのサルに回虫抗原を投与し、その結果、炎症性細胞、特に好酸球が気道に流入する。抗体がこの細胞流入を妨げることができるかどうかを試験するために、抗体を、回虫抗原投与の24時間前に投与することができる。抗原投与の日、基底気管支肺胞洗浄(BAL)サンプルを左肺から採取することができる。次いで抗原を、気管内から右肺に1滴ずつ投与することができる。24時間後、右肺を洗浄し、CHO細胞から発現した10mg/kgの組換え抗体で静脈内から処理をした動物からのBAL流体と、未処理の動物からのBAL流体とを比較する。抗体が気道炎症を低下させる場合、未処理の群ではBAL好酸球%の増加が観察される可能性があるが、抗体で処理した群では観察されない。これらのアッセイを使用して、抗体が、アレルギーの攻撃を受けたアレルギーを有する動物の気道好酸球増加症を効果的に妨げることを確認することができる。

20

30

【 0 2 7 2 】

(実施例 5)

Fc配列

【 0 2 7 3 】

配列番号128の位置#1のSerは、第1の例示的な完全長抗体番号付けスキームにおけるアミノ酸残基#119を表し、Serの前には、重鎖可変領域の残基#118が存在する。第1の例示的な完全長抗体番号付けスキームでは、変異したアミノ酸が、番号234および237にあり、これは、配列番号128の位置116および119に対応している。したがって下記の配列は、第1の例示的な完全長抗体番号付けスキームに従って、2つの変異、すなわちL234AおよびG237Aを有するFc領域を表す。

40

STKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP V T V S W
NSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVV T V P S S S L G T Q T Y
ICNVNHKPSNTKVDK K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A L G A P
SVFLFPKPKD T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
VDGVEVHNAKT K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
YKCKVSNKALPAPIEK T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
TKNQVSLTCLVKGFYPSDI A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q
KSLSLSPGK (配列番号 1 2 8)

【 0 2 7 4 】

50

下記は、別の例示的なヒトFc領域配列である。

STKGP S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
 I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
 S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
 V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
 Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M
 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
 D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
 K S L S L S P G K (配列番号141)

10

【0275】

エフェクター機能を低下させるのに使用することができる、その他の例示的な変更例には、L234A; L235A)、(L235A; G237A)、およびN297Aが含まれる。

【0276】

(実施例6)

マウスにおけるIL-13およびIgE

【0277】

IL-13はIgEの生成に関与し、アトピー性疾患の重要な媒介物である。IL-13に欠けているマウスは、血清IgEおよび肥満細胞IgEの応答に一部低下があるのに対し、未変性IL-13結合剤、IL-13R₂-/-に欠けているマウスは、高レベルのIgEおよびIgEエフェクター機能を有していた。

20

【0278】

BALB/cメスマウスを、Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から得た。IL-13R₂-/-マウスは、例えばWood他, (2003) J.Exp.Med. 197:703-9に記載されている。IL-13に欠けているマウスは、例えばMcKenzie他, (1998) Immunity 9:423-32に記載されている。全ての変異株は、BALB/cバックグラウンド上に存在していた。

【0279】

血清IgEレベルを、ELISAによって測定した。ELISAプレート(MaxiSorp; Nunc, Rochester, NY)を、ラット抗マウスIgE(BD Biosciences, San Diego, CA)で、4で一晩被覆した。プレートを、PBSに溶かした0.5%のゼラチンで、室温で1時間遮断し、0.05%TWEEN(登録商標)-20(PBS-Tween)を含有するPBSで洗浄し、標準物質としての精製済みマウスIgE(BD Biosciences)と共に、または血清希釈液と共に、室温で6時間インキュベートした。結合を、マウスIgG(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を遮断薬として使用して、ビオチニル化抗マウスIgE(BD Biosciences)で検出した。結合を、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)およびSURE BLUE(商標)基質(KPL Inc., Gaithersburg, MD)で検出した。

30

40

【0280】

未変性マウスの静止IgEレベルを支持するIL-13に関する要件を調査するために、血清を、野生型マウスとIL-13およびIL-13R₂に遺伝的に欠けているマウスからの特異的免疫化が存在しない状態で、試験をした。IL-13に欠けているマウスは、視覚的に検出できないレベルの血清IgEを有していた。これに対し、阻害的受容体IL-13R₂に欠けているマウスは、高レベルの血清IgEを表示していた。これらの結果は、IL-13を遮断することが、アトピー性障害の治療または予防に役立つことができることを実証している。

【0281】

50

(実施例 7)

IL - 13 およびアトピー性障害

【0282】

MJ2 - 7 が、未変性ヒト IL - 13 の生物活性 (1 ng / ml) を阻害する能力について、STAT6 リン酸化に関するアッセイで評価した。MJ2 - 7 は、このアッセイにおいて、約 0.293 nM の IC50 で未変性 IL - 13 の活性を阻害した。MJ2 - 7 のマウス重鎖抗体を有する抗体およびヒト化軽鎖は、このアッセイにおいて、未変性 IL - 13 の活性を、約 0.554 nM の IC50 で阻害した。

【0283】

MJ2 - 7 が、非ヒト霊長類 IL - 13 を阻害する能力 (1 ng / ml) を、CD23 発現に関するアッセイで評価した。MJ2 - 7 は、このアッセイにおいて、非ヒト霊長類 IL - 13 の活性を約 0.242 nM の IC50 で阻害した。MJ2 - 7 のマウス重鎖を有する抗体とヒト化軽鎖は、このアッセイにおいて、約 0.308 nM の IC50 で非ヒト化霊長類 IL - 13 の活性を阻害した。

【0284】

(実施例 8)

マウス MJ2 - 7 抗体のヌクレオチドおよびアミノ酸配列

【0285】

重鎖可変領域 (所望によるリーダーを有する) をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

```

      1   A T G A A A T G C A   G C T G G G T T A T   C T T C T T C C
T G   A T G G C A G T G G   T T A C A G G G G T
      5 1   C A A T T C A G A G   G T T C A G C T G C   A G C A G T C T
G G   G G C A G A G C T T   G T G A A G C C A G
      1 0 1   G G G C C T C A G T   C A A G T T G T C C   T G C A C A G G
T T   C T G G C T T C A A   C A T T A A A G A C
      1 5 1   A C C T A T A T A C   A C T G G G T G A A   G C A G A G G C
C T   G A A C A G G G C C   T G G A G T G G A T
      2 0 1   T G G A A G G A T T   G A T C C T G C G A   A T G A T A A T
A T   T A A A T A T G A C   C C G A A G T T C C
      2 5 1   A G G G C A A G G C   C A C T A T A A C A   G C A G A C A C
A T   C C T C C A A C A C   A G C C T A C C T A
      3 0 1   C A G C T C A A C A   G C C T G A C A T C   T G A G G A C A
C T   G C C G T C T A T T   A C T G T G C T A G
      3 5 1   A T C T G A G G A A   A A T T G G T A C G   A C T T T T T T
G A   C T A C T G G G G C   C A A G G C A C C A
      4 0 1   C T C T C A C A G T   C T C C T C A   (配列番号 142)

```

【0286】

所望によるリーダー (下線を付す) を有する重鎖可変領域のアミノ酸配列は、下記の通りである。

```

      1   M K C S W V I F F L   M A V V T G V N S E   V Q L Q Q S G A
E L   V K P G A S V K L S   C T G S G F N I K D
      5 1   T Y I H W V K Q R P   E Q G L E W I G R I   D P A N D N I K
Y D   P K F Q G K A T I T   A D T S S N T A Y L
      1 0 1   Q L N S L T S E D T   A V Y Y C A R S E E   N W Y D F F D Y
W G   Q G T T L T V S S
      (配列番号 143)

```

【0287】

軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

```

      1   A T G A A G T T G C   C T G T T A G G C T   G T T G G T G C

```

T G A T G T T C T G G A T T C C T G C T T C
5 1 C A G C A G T G A T G T T T T G A T G A C C C A A A C T
C C A C T C T C C C T G C C T G T C A G T C
1 0 1 T T G G A G A T C A A G C C T C C A T C T C T T G C A G
G T C T A G T C A G A G C A T T G T A C A T
1 5 1 A G T A A T G G A A A C A C C T A T T T A G A A T G G T
A C C T G C A G A A A C C A G G C C A G T C
2 0 1 T C C A A A G C T C C T G A T C T A C A A A G T T T C C
A A C C G A T T T T C T G G G G T C C C A G
2 5 1 A C A G G T T C A G T G G C A G T G G A T C A G G G A C 10
A G A T T T C A C A C T C A A G A T T A G C
3 0 1 A G A G T G G A G G C T G A G G A T C T G G G A G T T T
A T T A C T G C T T T C A A G G T T C A C A
3 5 1 T A T T C C G T A C A C G T T C G G A G G G G G A C C
A A G C T G G A A A T A A A A (配列番号 1 4 4)

【 0 2 8 8 】

所望によるリーダー（下線を付す）を有する軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D V L M T Q T P L S L P
V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H 20
5 1 S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G
V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
1 0 1 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H I P Y T F G G G T K L E I K
(配列番号 1 4 5)

【 0 2 8 9 】

(実施例 9)

M J 2 - 7 抗体の、例示的な第 1 のヒト化変種のヌクレオチドおよびアミノ酸配列

【 0 2 9 0 】

ヒト化抗体変種 1 (V 1) は、最も近いヒト生殖細胞系クローンをベースにしている。h M J 2 - 7 V 1 重鎖可変領域 (h M J 2 - 7 V H V 1) のヌクレオチド配列 (所望によるリーダー配列をコードする配列を有する) は、下記の通りである。 30

1 A T G G A T T G G A C C T G G C G C A T C C T G T T C C
T G G T G G C C G C T G C C A C C G G C G C
5 1 T C A C T C T C A G G T G C A G C T G G T G C A G T C T
G G C G C C G A G G T G A A G A A G C C T G
1 0 1 G C G C T T C C G T G A A G G T G T C C T G T A A G G C
C T C C G G C T T C A A C A T C A A G G A C
1 5 1 A C C T A C A T C C A C T G G G T G C G G C A G G C T C
C C G G C C A G C G G C T G G A G T G G A T
2 0 1 G G G C C G G A T C G A T C C T G C C A A C G A C A A C 40
A T C A A G T A C G A C C C C A A G T T T C
2 5 1 A G G G C C G C G T G A C C A T C A C C C G C G A T A C
C T C C G C T T C T A C C G C C T A C A T G
3 0 1 G A G C T G T C T A G C C T G C G G A G C G A G G A T A
C C G C C G T G T A C T A C T G C G C C C G
3 5 1 C T C C G A G G A G A A C T G G T A C G A C T T C T T C
G A C T A C T G G G G C C A G G G C A C C C
4 0 1 T G G T G A C C G T G T C C T C T (配列番号 1 4 6)

【 0 2 9 1 】

重鎖可変領域 (h M J 2 - 7 V 1) のアミノ酸配列は、D P - 2 5、V H - I、1 - 0 50

3 に移植された CDR をベースにしている。所望によるリーダー（最初の下線が付された領域； A b M の定義に基づく CDR は、後続の下線が付された領域に示される）を有するアミノ酸配列は、下記の通りである。

```

1   MDWTWRILFL VAAATGAHS-Q   VQLVQSGAEV
KKPGASVKVS  CKASGFNIKD
51  TYIHWVRQAP GQRLEWMGRI DPANDNIKYD P
KFQGRVTIT RDTSASTAYM
101  ELSSLRSEDT AVYYCARSEE NWYDFFDYWG Q
GTLVTVSSG  ESCR (配列番号147)

```

10

【0292】

hMJ2-7V1 軽鎖可変領域 (hMJ2-7VLV1) (所望によるリーダー配列をコードする配列を有する) のヌクレオチド配列は、下記の通りである。

```

1   ATGCGGCTGC CCGCTCAGCT GCTGGGCC
TG  CTGATGCTGT GGGTGCCCGG
51  CTCTTCCGGC GACGTGGTGA TGACCCAG
TC  CCTCTGTCT CTGCCCGTGA
101  CCTGGGGCCA GCCCGCTTCT ATCTCTTG
CC  GGTCCCTCCA GTCCATCGTG
151  CACTCCAACG GCAACACCTA CCTGGAGT
GG  TTTCAGCAGA GACCCGGCCA
201  GTCTCCTCGG CGGCTGATCT ACAAGGTG
TC  CAACCGCTTT TCCGGCGTGC
251  CCGATCGGTT CTC CGGCAGC GGCTCCGG
CA  CCGATTTTAC CCTGAAGATC
301  AGCCGCGTGG AGGCCGAGGA TGTGGGCG
TG  TACTACTGCT TCCAGGGCTC
351  CCACATCCCT TACACCTTTG GCGGCGGA
AC  CAAGGTGGAG ATCAAAG
(配列番号148)

```

20

30

【0293】

この変種は、DPK18、V I I への CDR 移植片をベースにしている。hMJ2-7V1 軽鎖可変領域 (hMJ2-7VLV1) (最初の下線が付された領域として、所望によるリーダーを有する； A b M の定義に基づく CDR は、後続の下線を付した領域に示される) のアミノ酸配列は、下記の通りである。

```

1   MRLPAQLLGL LMLWVPGSSG-DVVMTQSPLS L
PVTLGQPAS  ISCRSSQSIV
51  HSNGNTYLEW FQQRPGQSPR RLIYKVSNRF S
GVPDRFSGS  GSGTDFTLKI
101  SRVEAEDVGV YYCFQGSHIP YTFGGGTKVE I
K (配列番号149)

```

40

【0294】

(実施例10)

MJ2-7 抗体の、例示的な第2のヒト化変種のヌクレオチドおよびアミノ酸配列

【0295】

下記为重鎖可変領域は、DP-54、VH-3、3-07 に対する CDR 移植片をベースにしている。hMJ2-7 変種2 (V2) 重鎖可変領域 (hMJ2-7VHV2) (所

50

望によるリーダー配列をコードする配列を有する)のヌクレオチド配列は、下記の通りである。

```

      1   ATGGAGCTGG  GCCTGTCTTG  GGTGTTCC
TG  GTGGCTATCC  TGGAGGGCGT
      51   GCAGTGCAG  GTGCAGCTGG  TGGAGTCT
GG  CGGCGGACTG  GTGCAGCCTG
     101   GCGGCTCTCT  GCGGCTGTCT  TGCGCCGC
TT  CCGGCTTCAA  CATCAAAGGAC
     151   ACCTACATCC  ACTGGGTGCG  GCAGGCTC
CC  GGCAAGGGCC  TGGAGTGGGT
     201   GGCCCGGATC  GATCCTGCCA  ACGACAAC
AT  CAAGTACGAC  CCCAAGTTCC
     251   AGGGCCGGTT  CACCATCTCT  CGCGACAA
CG  CCAAGAACTC  CCTGTACTCT
     301   CAGATGAACT  CTCTGCGCGC  CGAGGATA
CC  GCCGTGTACT  ACTGCGCCCG
     351   GAGCGAGGAG  AACTGGTACG  ACTTCTTC
GA  CTA CTGGGGC  CAGGGCACCC
     401   TGGTGACCGT  GTCCTCT    (配列番号150)

```

10

20

【0296】

所望によるリーダー(最初に下線が付された領域; AbMの定義を基にしたCDRは、後続の下線が付された領域に示される)を有する、hMJ2-7V2重鎖可変領域(hMJ2-7VHV2)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

```

      1   MELGLSWVFL VAILEGVQC-E  VQLVESGGGL
VQPGGSLRLS  CAASGFNIKD
     51   TYIHWVRQAP  GKGLEWVARI  DPANDNIKYD  P
KFQGRFTIS  RDNAKNSLYL
    101   QMNSLRAEDT  AVYYCARSEE  NWYDFFDYWG  Q
GTLVTVSS    (配列番号151)

```

30

【0297】

hMJ2-7V2軽鎖可変領域は、DPK9、V I、02に対するCDR移植片をベースにした。hMJ2-7V2軽鎖可変領域(hMJ2-7VLV2)(所望によるリーダー配列をコードする配列を有する)のヌクレオチド配列は、下記の通りである。

```

      1   ATGGATATGC  GCGTGC CCGC  TCAGCTGC
TG  GGCCTGCTGC  TGCTGTGGCT
     51   GCGCGGAGCC  CGCTGCGATA  TCCAGATG
AC  CCAGTCCCT  TCTTCTCTGT
     101  CCGCCTCTGT  GGGCGATCGC  GTGACCAT
CA  CCTGTCGGTC  CTCCAGTCC
     151  ATCGTGC ACT  CCAACGGCAA  CACCTACC
TG  GAGTGGTATC  AGCAGAAAGCC
     201  CGGCAAGGCC  CCTAAGCTGC  TGATCTAC
AA  GGTGTCCAAC  CGCTTTTCCG
     251  GCGTGCCTTC  TCGGTTCTCC  GGCTCCGG
CT  CCGGCACCGA  TTTCACCCTG
     301  ACCATCTCCT  CCCTCCAGCC  CGAGGATT
TC  GCCACCTACT  ACTGCTTCCA
     351  GGGCTCCAC  ATCCCTTACA  CCTTTGGC

```

40

50

GG CGGAACCAAG GTGGAGATCA
401 AGCGT (配列番号152)

【0298】

hMJ2-7V2軽鎖可変領域(hMJ2-7VL V2)の軽鎖可変領域(所望によるリーダーペプチドには下線が付されており、AbMの定義に基づくCDRは、後続の下線が付された領域に示される)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RC-DIQMTQSP
SSL SASV GDR VTITCRSSQS
51 IVHSNGNTYL EWYQQKPGKA PKLLIYKVSN R
FSGVPSRFS GSGSGTDFTL
101 TISSLQPEDF ATYYCFQGSH IPYTFGGGTK V
EIKR (配列番号153)

10

【0299】

MJ2-7V2重鎖可変領域の、追加のヒト化変種を作製した。これらの変種は、選択されたフレームワーク位置にマウスアミノ酸を有する復帰突然変異を含んでいた。

【0300】

復帰突然変異V48I、A29Gを有する重鎖可変領域「Version 2.1」またはV2.1をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCG
GA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGC
TT CAACATCAAG GACACCTACA
101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAA
GG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGT
AC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
201 GTTCACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAG
AA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGT
GT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
301 GAGA ACTGGT ACGACTTCTT CGACTACT
GG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
351 CGTGTCCTCT (配列番号154)

20

30

【0301】

V2.1の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWIGR
51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SRDNAKNSLY L
QMNSLRAED TAVYYCARSE
101 ENWYDFFDYW GGGTLVTVSS (配列番号155)

40

【0302】

復帰突然変異(R67K; F68A)を有する重鎖可変領域V2.2をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCG
GA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC

50

```

      5 1   T C T G C G G C T G   T C T T G C G C C G   C T T C C G G C
T T   C A A C A T C A A G   G A C A C C T A C A
      1 0 1   T C C A C T G G G T   G C G G C A G G C T   C C C G G C A A
G G   G C C T G G A G T G   G G T G G C C C G G
      1 5 1   A T C G A T C C T G   C C A A C G A C A A   C A T C A A G T
A C   G A C C C C A A G T   T C C A G G G C A A
      2 0 1   G G C C A C C A T C   T C T C G C G A C A   A C G C C A A G
A A   C T C C C T G T A C   C T C C A G A T G A
      2 5 1   A C T C T C T G C G   C G C C G A G G A T   A C C G C C G T
G T   A C T A C T G C G C   C C G G A G C G A G
      3 0 1   G A G A A C T G G T   A C G A C T T C T T   C G A C T A C T
G G   G G C C A G G G C A   C C C T G G T G A C
      3 5 1   C G T G T C C T C T   (配列番号156)

```

10

【0303】

V2.2重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

```

      1   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWVAR
      5 1   IDPANDNIKY DPKFQGKATI SRDNAKNSLY L
QMNSLRAED TAVYYCARSE
      1 0 1   ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (配列番号157)

```

20

【0304】

復帰突然変異(R72A)を有する重鎖可変領域V2.3をコードするヌクレオチド配列:

```

      1   G A G G T G C A G C   T G G T G G A G T C   T G G C G G C G
G A   C T G G T G C A G C   C T G G C G G C T C
      5 1   T C T G C G G C T G   T C T T G C G C C G   C T T C C G G C
T T   C A A C A T C A A G   G A C A C C T A C A
      1 0 1   T C C A C T G G G T   G C G G C A G G C T   C C C G G C A A
G G   G C C T G G A G T G   G G T G G C C C G G
      1 5 1   A T C G A T C C T G   C C A A C G A C A A   C A T C A A G T
A C   G A C C C C A A G T   T C C A G G G C C G
      2 0 1   G T T C A C C A T C   T C T G C C G A C A   A C G C C A A G
A A   C T C C C T G T A C   C T C C A G A T G A
      2 5 1   A C T C T C T G C G   C G C C G A G G A T   A C C G C C G T
G T   A C T A C T G C G C   C C G G A G C G A G
      3 0 1   G A G A A C T G G T   A C G A C T T C T T   C G A C T A C T
G G   G G C C A G G G C A   C C C T G G T G A C
      3 5 1   C G T G T C C T C T   (配列番号158)

```

30

40

【0305】

V2.3の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASSGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWVAR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSLY L
 QMNSLRAED TAVYYCARSE
 101 ENWYDFFDYW GGGTLVTVSS (配列番号159)

【0306】

復帰突然変異(A49G)を有する重鎖可変領域V2.4をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCG
 GA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGC
 TT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAA
 GG GCCTGGAGTG GGTGGGCCGG
 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGT
 AC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTTCACCATC TCTCGCGACA ACGCCAAG
 AA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGT
 GT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGAACTGGT ACGACTTCTT CGACTACT
 GG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCCTCT (配列番号160)

【0307】

V2.4の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASSGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWVGR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SRDNAKNSLY L
 QMNSLRAED TAVYYCARSE
 101 ENWYDFFDYW GGGTLVTVSS (配列番号161)

【0308】

復帰突然変異(R67K; F68A; R72A)を有する重鎖可変領域V2.5をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCG
 GA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGCGCCG CTTCCGGC
 TT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAA
 GG GCCTGGAGTG GGTGGGCCGG
 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGT
 AC GACCCCAAGT TCCAGGGCAA
 201 GGCCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAG
 AA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGT
 GT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG

3 0 1 G A G A A C T G G T A C G A C T T C T T C G A C T A C T
 G G G G C C A G G G C A C C C T G G T G A C
 3 5 1 C G T G T C C T C T (配列番号162)

【0309】

V2.5の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWVAR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGKATI SADNAKNSLY L
 QMNSLRAED TAVYYCARSE
 101 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (配列番号163)

10

【0310】

復帰突然変異(V48I; A49G; R72A)を有する重鎖可変領域V2.6をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G C G G C G
 G A C T G G T G C A G C C T G G C G G C T C
 51 T C T G C G G C T G T C T T G C G C C G C T T C C G G C
 T T C A A C A T C A A G G A C A C C T A C A
 101 T C C A C T G G G T G C G G C A G G C T C C C G G C A A
 G G G C C T G G A G T G G A T C G G C C G G
 151 A T C G A T C C T G C C A A C G A C A A C A T C A A G T
 A C G A C C C C A A G T T C C A G G G C C G
 201 G T T C A C C A T C T C T G C C G A C A A C G C C A A G
 A A C T C C C T G T A C C T C C A G A T G A
 251 A C T C T C T G C G C G C C G A G G A T A C C G C C G T
 G T A C T A C T G C G C C C G G A G C G A G
 301 G A G A A C T G G T A C G A C T T C T T C G A C T A C T
 G G G G C C A G G G C A C C C T G G T G A C
 351 C G T G T C C T C T (配列番号164)

20

30

【0311】

V2.6の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWIGR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSLY L
 QMNSLRAED TAVYYCARSE
 101 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (配列番号165)

40

【0312】

復帰突然変異(A49G; R72A)を有する重鎖可変領域V2.7をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G C G G C G
 G A C T G G T G C A G C C T G G C G G C T C
 51 T C T G C G G C T G T C T T G C G C C G C T T C C G G C
 T T C A A C A T C A A G G A C A C C T A C A
 101 T C C A C T G G G T G C G G C A G G C T C C C G G C A A
 G G G C C T G G A G T G G G T G G G C C G G

50

```

      1 5 1   A T C G A T C C T G   C C A A C G A C A A   C A T C A A G T
A C   G A C C C C A A G T   T C C A G G G C C G
      2 0 1   G T T C A C C A T C   T C T G C C G A C A   A C G C C A A G
A A   C T C C C T G T A C   C T C C A G A T G A
      2 5 1   A C T C T C T G C G   C G C C G A G G A T   A C C G C C G T
G T   A C T A C T G C G C   C C G G A G C G A G
      3 0 1   G A G A A C T G G T   A C G A C T T C T T   C G A C T A C T
G G   G G C C A G G G C A   C C C T G G T G A C
      3 5 1   C G T G T C C T C T   (配列番号166)

```

【0313】

10

V2.7の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

```

      1   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWVGR
      5 1   IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSLY L
QMNSLRAED TAVYYCARSE
     10 1   ENWYDFFDYW GQGT L V T V S S   (配列番号167)

```

【0314】

20

復帰突然変異(L79A)を有する重鎖可変領域V2.8をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

```

      1   G A G G T G C A G C   T G G T G G A G T C   T G G C G G C G
G A   C T G G T G C A G C   C T G G C G G C T C
      5 1   T C T G C G G C T G   T C T T G C G C C G   C T T C C G G C
T T   C A A C A T C A A G   G A C A C C T A C A
      1 0 1   T C C A C T G G G T   G C G G C A G G C T   C C C G G C A A
G G   G C C T G G A G T G   G G T G G C C C G G
      1 5 1   A T C G A T C C T G   C C A A C G A C A A   C A T C A A G T
A C   G A C C C C A A G T   T C C A G G G C C G
      2 0 1   G T T C A C C A T C   T C T C G C G A C A   A C G C C A A G
A A   C T C C G C C T A C   C T C C A G A T G A
      2 5 1   A C T C T C T G C G   C G C C G A G G A T   A C C G C C G T
G T   A C T A C T G C G C   C C G G A G C G A G
      3 0 1   G A G A A C T G G T   A C G A C T T C T T   C G A C T A C T
G G   G G C C A G G G C A   C C C T G G T G A C
      3 5 1   C G T G T C C T C T   (配列番号168)

```

30

【0315】

V2.8の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

40

```

      1   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWVAR
      5 1   IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SRDNAKNSAY L
QMNSLRAED TAVYYCARSE
     10 1   ENWYDFFDYW GQGT L V T V S S   (配列番号169)

```

【0316】

復帰突然変異(A49G; R72A; L79A)を有する重鎖可変領域V2.10をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

50

1 G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G C G G C G
 G A C T G G T G C A G C C T G G C G G C T C
 5 1 T C T G C G G C T G T C T T G C G C C G C T T C C G G C
 T T C A A C A T C A A G G A C A C C T A C A
 1 0 1 T C C A C T G G G T G C G G C A G G C T C C C G G C A A
 G G G C C T G G A G T G G G T G G G C C G G
 1 5 1 A T C G A T C C T G C C A A C G A C A A C A T C A A G T
 A C G A C C C C A A G T T C C A G G G C C G
 2 0 1 G T T C A C C A T C T C T G C C G A C A A C G C C A A G
 A A C T C C G C C T A C C T C C A G A T G A
 2 5 1 A C T C T C T G C G C G C C G A G G A T A C C G C C G T
 G T A C T A C T G C G C C C G G A G C G A G
 3 0 1 G A G A A C T G G T A C G A C T T C T T C G A C T A C T
 G G G G C C A G G G C A C C C T G G T G A C
 3 5 1 C G T G T C C T C T (配列番号170)

10

【0317】

V2.10の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T
Y I H W V R Q A P G K G L E W V G R
 5 1 I D P A N D N I K Y D P K F Q G R F T I S A D N A K N S A Y L
 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S E
 1 0 1 E N W Y D F F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号171)

20

【0318】

復帰突然変異(V48I; A49G; R72A; L79A)を有する重鎖可変領域V2.11をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G C G G C G
 G A C T G G T G C A G C C T G G C G G C T C
 5 1 T C T G C G G C T G T C T T G C G C C G C T T C C G G C
 T T C A A C A T C A A G G A C A C C T A C A
 1 0 1 T C C A C T G G G T G C G G C A G G C T C C C G G C A A
 G G G C C T G G A G T G G A T C G G C C G G
 1 5 1 A T C G A T C C T G C C A A C G A C A A C A T C A A G T
 A C G A C C C C A A G T T C C A G G G C C G
 2 0 1 G T T C A C C A T C T C T G C C G A C A A C G C C A A G
 A A C T C C G C C T A C C T C C A G A T G A
 2 5 1 A C T C T C T G C G C G C C G A G G A T A C C G C C G T
 G T A C T A C T G C G C C C G G A G C G A G
 3 0 1 G A G A A C T G G T A C G A C T T C T T C G A C T A C T
 G G G G C C A G G G C A C C C T G G T G A C
 3 5 1 C G T G T C C T C T (配列番号172)

30

40

【0319】

V2.11の重鎖可変領域(AbMの定義に基づくCDRを、後続の下線を付した領域に示す)のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWIGR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSAY L
 QMNSLRAED TAVYYCARSE
 101 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (配列番号173)

【0320】

復帰突然変異 (V48I ; A49G ; R72A) を有する重鎖可変領域 V2.16 をコードするヌクレオチド配列は、下記の通りである。

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGCGGCG
 GA CTGGTGCAGC CTGGCGGCTC
 51 TCTGCGGCTG TCTTGCAACCG GCTCCGGC
 TT CAACATCAAG GACACCTACA
 101 TCCACTGGGT GCGGCAGGCT CCCGGCAA
 GG GCCTGGAGTG GATCGGCCGG
 151 ATCGATCCTG CCAACGACAA CATCAAGT
 AC GACCCCAAGT TCCAGGGCCG
 201 GTTCACCATC TCTGCCGACA ACGCCAAG
 AA CTCCCTGTAC CTCCAGATGA
 251 ACTCTCTGCG CGCCGAGGAT ACCGCCGT
 GT ACTACTGCGC CCGGAGCGAG
 301 GAGA ACTGGT ACGACTTCTT CGACTACT
 GG GGCCAGGGCA CCCTGGTGAC
 351 CGTGTCCTCT (配列番号174)

10

20

【0321】

V2.16 の重鎖可変領域 (AbM の定義に基づく CDR を、後続の下線を付した領域に示す) のアミノ酸配列は、下記の通りである。

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCTGSGFNIK D
TYIHWVRQA PGKGLEWIGR
 51 IDPANDNIKY DPKFQGRFTI SADNAKNSLY L
 QMNSLRAED TAVYYCARSE
 101 ENWYDFFDYW GQGTLVTVSS (配列番号175)

30

【0322】

下記の配列は、変異した CH2 領域を有するヒト化 MH2-7V2.11 IgG1 のアミノ酸配列である。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISKDTYIHWVRQA
 PGKGLEWIGRIDPANDNIKYDPKFQGRFTISADNAKNSAY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARSEENWYDFFDYWGQGTLLVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEALGA
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK (配列番号176)

10

【0323】

可変領域は、アミノ酸1~120にあり；CH1は121~218に；ヒンジは219~233に；CH2は234~343に；CH3は344~450にある。軽鎖は、1~133に可変領域を有する下記の配列を含む。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIVHSNGNTYLEW
 YQQKPKGAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
 SSLQPEDFATYYCFQGSHPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
 SGNSEQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号177)

20

【0324】

(実施例11)

MJ2-7の例示的な変種の機能的アッセイ

【0325】

本発明者等は、MJ2-7抗体およびヒト化変種が、IL-13活性のアッセイにおいてヒトIL-13を阻害できるか否か評価した。

30

【0326】

(STAT6リン酸化アッセイ)

【0327】

HT-29ヒト結腸上皮細胞(ATCC)を、10%FBS、Pen-Strep、グルタミン、および重炭酸ナトリウムを含有するMcCoy 5A培地中に、付着単層として成長させた。アッセイのため、トリプシンを使用して細胞をフラスコから取り出し、新鮮な培地中に洗浄し、12x75mmのポリスチレン試験管内に流した。組換えヒトIL-13(R&D Systems, Inc.)を、100~0.01ng/mlに及ぶ濃度で添加した。抗体がIL-13応答を阻害できるか否かを試験するアッセイのため、1ng/mlの組換えヒトIL-13を、500~0.4ng/mlに及ぶ抗体の希釈液と共に添加した。細胞を、37℃の水浴中で30~60分間インキュベートし、次いで1%BSAを含有する氷冷PBS中に洗浄した。細胞を、PBSに溶かした1%パラホルムアルデヒド中で、37℃で15分間インキュベートすることによって固定し、次いで1%BSAを含有するPBS中に洗浄した。核を浸透させるため、細胞を無水メタノール中で、-20℃で一晩インキュベートした。これらを、1%のBSAを含有するPBS中に洗浄し、次いで、STAT6(BD Biosciences)に対するALEXA(商標)Fluor 488標識抗体で染色した。蛍光を、FACSCAN(商標)およびCELLQUEST(商標)ソフトウェア(BD Biosciences)で分析した。

40

【0328】

50

(ヒト単球上でのCD23誘導)

【0329】

単核細胞を、HISTOPAQUE (登録商標) (Sigma) 上に層形成することによってヒト抹消血から単離した。細胞を、10%熱不活性化FCS、50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを含有するRPMI中に洗浄し、48ウェル組織培養皿(Costar/Corning)に蒔いた。組換えヒトIL-13 (R&D Systems, Inc.) を、100~0.01ng/mlに及ぶ希釈率で添加した。抗体がIL-13応答を阻害できるか否かを試験するアッセイのため、1ng/ml組換えヒトIL-13を、500~0.4ng/mlに及ぶ希釈液と共に添加した。細胞を、5%CO₂インキュベーター中で、37℃で一晩インキュベートした。翌日、非酵素性細胞解離溶液Cell Dissociation Solution (Sigma) を使用してウェルから細胞を収集し、次いで1%BSAを含有する氷冷PBS中に洗浄した。細胞を、ヒトCD23 (BD Biosciences, San Diego, CA) に対するフィコエリトリン (PE) 標識抗体およびヒト11b (BD Biosciences) に対するCy-Chrome標識抗体と共にインキュベートした。単球を、高い前方および側方散乱光とCD11b発現に基づいて、ゲーティングした。単球上のCD23発現は、FACSCAN (商標) (BD Biosciences) を使用するフローサイトメトリーによって決定し、CD23⁺細胞のパーセンテージは、CELLQUESTソフトウェア (BD Biosciences) により分析した。

10

20

【0330】

(TF-1細胞増殖)

【0331】

TF-1細胞は、その長時間にわたる成長のため、インターロイキン3 (IL-3) または顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を必要とする因子依存性ヒト造血細胞系である。TF-1細胞は、インターロイキン13 (IL-13) を含めた様々なその他のサイトカインにも応答する。TF-1細胞 (ATCC) を、10%熱不活性化FCS、50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、および5ng/ml組換えヒトGM-CSF (R&D Systems) を含有するRPMI培地中で維持した。アッセイの前に、細胞を一晩、GM-CSF欠如の状態にした。アッセイのため、TF-1細胞を、96ウェル平底マイクロタイタープレート (Costar/Cloning) に5000細胞/ウェルで蒔いて、これと同一のものを重複して作製し、100~0.01ng/mlに及ぶヒトIL-13 (R&D Systems) を免疫投与した。5%CO₂と共に37℃のインキュベーター内で72時間経過した後、細胞に、1μCi/ウェル³H-チミジン (Perkin Elmer/New England Nuclear) でパルス標識した。これらをさらに4.5時間インキュベートし、次いで細胞を、TOMTEK (商標) 収集器を使用してフィルターマット上に収集した。³H-チミジンの組込みは、液体シンチレーションカウンターにより評価した。

30

【0332】

(テネイシン生成アッセイ)

【0333】

BEAS-2Bヒト気管支上皮細胞 (ATCC) を、補給物質 (Clonetics) が補われたBEGM培地で維持した。細胞を一晩、96ウェル平底培養皿に、ウェル当たり20000で蒔いた。指示される抗体の存在下または存在しない状態で、IL-13を含有する新鮮な培地を添加する。一晩インキュベートした後、上澄みを収集し、ELISAによって、細胞外マトリックス成分、テネイシンCの存在に関してアッセイを行う。ELISAプレートは、PBS中のヒトテネイシン (IgG1, k; Chemicon International) に対する1ug/mlのマウスモノクローナル抗体で、一晩被覆する。プレートを、0.05%TWEEN (登録商標) -20を含有するPBS (P

40

50

BS-Tween)で洗浄し、1%BSAを含有するPBSで遮断する。新鮮な遮断溶液を6分ごとに添加し、合計で3回入れ替わるようにした。プレートを、PBS-Tweenで3回洗浄した。細胞の上澄みまたはヒトテネイシン標準物質(Chemicon International)を添加し、37で60分間インキュベートした。プレートを、PBS-Tweenで3回洗浄した。テネイシンを、テネイシンに対するマウスモノクローナル抗体(IgG2a,k;Biohit)で検出した。結合を、マウスIgG2aに対するHRP標識抗体で検出した後、TMB基質により行った。反応を、0.01N硫酸で停止させた。吸光度を450nmで読み取った。

【0334】

HT29ヒト上皮細胞系を使用して、STAT6リン酸化のアッセイを行うことができる。HT29細胞を、高濃度の試験抗体の存在下、1ng/mlの未変性ヒトIL-13粗製製剤と共に、37で30分間インキュベートする。リン酸化STAT6に対する抗体を用いた細胞溶解物のウェスタンブロット分析を使用して、STAT6の用量依存性IL-13媒介型リン酸化を検出することができる。同様に、フローサイトメトリー分析では、飽和濃度のIL-13で30分間37で処理し、固定し、浸透させ、ホスホ-STAT6に対するALEXA(商標)Fluor 488標識mAbで染色した、HT29細胞中のリン酸化STAT6を検出することができる。例示的な一組の結果を、表1に示す。V2.11の阻害活性は、sIL-13Ra2-Fcの阻害活性と同等であった。

【0335】

表1

【表1】

構造		復帰突然変異	発現	未変性hIL-13
VH	VL	VH	$\mu\text{g/ml}$ / COS; 48h	STAT6アッセイ IC 50, nM
V2.0	V2 CDR移植	なし、CDR移植	8-10	>100
V 2.1	V2	V48I; A49G	9-14	2.8
V 2.2	V2	R67K; F68A	5-6	>100
V 2.3	V2	R72A	8-9	1.67 - 2.6
V 2.4	V2	A49G	10	17.5
V 2.5	V2	R67K; F68A; R72A	4-5	1.75
V 2.6	V2	V48I; A49G; R72A	11-12	1.074 - 3.37
V 2.7	V2	A49G; R72A	10-11	1.7
V 2.11	V2	V48I; A49G; R72A:L79A	24	0.25 - 0.55

【0336】

(実施例12)

IL-13とIL-13R 1との間の結合相互作用部位

【0337】

IL-13、IL-13R 1の細胞外領域(配列番号125の残基27~342)、およびヒトIL-13に結合する抗体の複合体を、x線結晶学によって調査した。例えば、Ap.16163-029001を参照されたい。実質的な相互作用の2点が、IL-13とIL-13R 1の間に見出された。IL-13R 1のIg領域とIL-13との相互作用の結果、2つの分子にまたがる広いシートが形成される。IL-13(配列番号124、成熟配列[完全長配列(配列番号178)])の残基Thr88[Thr

107]、Lys 89 [Lys 108]、Ile 90 [Ile 109]、および Glu 91 [Glu 110] は、受容体 (配列番号 125) の残基 Lys 76、Lys 77、Ile 78、および Ala 79 と相互に作用する鎖を形成する。さらに、IL-13 (配列番号 124 [配列番号 178]) の Met 33 [Met 52] の側鎖は、これら隣接する鎖の側鎖によって生成される疎水性ポケットにまで届く。

【0338】

Ig 領域との相互作用の主な特徴は、受容体 IL-13R₁ の Ig 領域 3 内の疎水性ポケットへの、IL-13 (配列番号 124 [配列番号 178]) の疎水性残基 (Phe 107 [Phe 126]) の挿入である。IL-13R₁ の疎水性ポケットは、残基 Leu 319、Cys 257、Arg 256、および Cys 320 (配列番号 125) の側鎖によって形成される。IL-13 (配列番号 124 [配列番号 178]) の Phe 107 [Phe 126] との相互作用の結果、広範な一組のファンデルワールス相互作用が、IL-13R₁ (配列番号 125) のアミノ酸残基 Ile 254、Ser 255、Arg 256、Lys 318、Cys 320、および Tyr 321 と、IL-13 (配列番号 124 [配列番号 178]) のアミノ酸残基 Arg 11 [Arg 30]、Glu 12 [Glu 31]、Leu 13 [Leu 32]、Ile 14 [Ile 33]、Glu 15 [Ile 34]、Lys 104 [Lys 123]、Lys 105 [Lys 124]、Leu 106 [Leu 125]、Phe 107 [Phe 126]、および Arg 108 [Arg 127] との間に生ずる。これらの結果は、IL-13R₁ との相互作用に関与する IL-13 領域に結合する IL-13 結合剤を使用して、IL-13 シグナル伝達を阻害できることを実証している。

10

20

【0339】

(実施例 13)

COS 細胞でのヒト化 MJ2-7 抗体の発現

【0340】

哺乳類組換え系におけるキメラ抗 NHP IL13 抗体の生成を評価するため、マウス MJ2-7 抗体の可変領域を、ヒト および IgG1 mut 定常領域を含有する pED6 発現ベクターにサブクローニングした。サル腎臓 COS-1 細胞を、10% 熱不活性化ウシ胎児血清、1mM グルタミン、および 0.1mg/ml ペニシリン/ストレプトマイシンを含有する DME 培地 (Gibco) で成長させた。COS 細胞のトランスフェクションは、試薬供給元によって提示されたプロトコルに従って、TRANSITIT (商標) - LT1 トランスフェクション試薬 (Mirus) を使用して実施した。トランスフェクトした COS 細胞を、10% CO₂ の存在下、37°C で 24 時間インキュベートし、滅菌 PBS で洗浄し、次いで血清を含まない培地 R1CD1 (Gibco) で 48 時間成長させて、ならし培地での抗体の分泌および蓄積を可能にした。chMJ2-7 抗体の発現を、標準物質として精製された IgG1 / 抗体を使用して、全ヒト IgG ELISA により定量した。

30

【0341】

COS 細胞でのキメラ MJ2-7 抗体の生成は、対照キメラ抗体よりも著しく少なかった (表 2)。したがって、Ab 発現の最適化は、MJ2-7 ヒト化プロセスに含まれていた。ヒト化 MJ2-7 V1 は、典型的なヒト抗体応答で十分に発現し提示される、最も相異なるヒト生殖細胞系クローン DP25 への、マウス MJ2-7 重鎖 CDR の CDR 移植によって構成した。軽鎖の CDR を、huMJ2-7 V1 VL を生成するために、ヒト生殖細胞系クローン DPK18 にサブクローニングした。ヒト化 MJ2-7 V2 は、DP54 ヒト生殖細胞系遺伝子フレームワークへの MJ2-7 重鎖可変領域 CDR、および DPK9 ヒト生殖細胞系遺伝子フレームワークへの MJ2-7 軽鎖可変領域 CDR の CDR 移植によって作製した。DP54 クローンは、ヒト VH III 生殖細胞系サブグループに属し、DPK9 は、ヒト生殖細胞系遺伝子の V I サブグループからのものである。VH III および V I フレームワークを含む抗体分子は、大腸菌系内で高い発現レベルを有し、水溶液中で高い安定性および溶解性を有する (例えば、Stefan Ewert 他, J.Mol.Biol

40

50

. (2003), 325; 531-553, Adrian Auf他, Methods (2004) 34: 215-224参照)。本発明者等は、いくつかの組換え抗体の生成で、D P 5 4 / D P K 9 ヒトフレームワークの組合せを使用し、一過性C O S トランスフェクション実験では、抗体の高い発現 (> 20 μ g/ml) を実現した。

【0342】

【表2】

表2

mAb	発現 (g/ml)
3D6	10.166
Ch MJ 2-7 pED6 (1)	2.44
Ch MJ 2-7pED6 (2)	2.035
h12A11 V2	1.639

10

【0343】

C D R 移植 M J 2 - 7 V 1 および V 2 V H および V L 遺伝子を、2つの哺乳類発現ベクター系 (p E D 6 / p E D 6 I g G 1 m u t および p S M E N 2 / p S M E D 2 I g G 1 m u t) にサブクローニングし、ヒト化 M J 2 - 7 抗体の生成を、上述の一過性C O S トランスフェクション実験で評価した。第1の組の実験では、h u M J 2 - 7 V L および V H の様々な組合せが抗体発現に及ぼす影響について、評価した (表3)。M J 2 - 7 V L フレームワーク領域から D K P 9 への変化は、抗体生成を8~10倍増加させるのに対し、V L V 1 (C D R が D P K 1 8 に移植された) は、抗体生成の緩やかな増加しか示さなかった。この効果は、ヒト化 V L をキメラ M J 2 - 7 V H およびヒト化 M J 2 - 7 V 1 および V 2 と組み合わせたときに観察された。C D R 移植 M J 2 - 7 V 2 は、C D R 移植 M J 2 - 7 V 1 よりも、同じアッセイ条件下で3倍高い発現レベルを有していた。

20

【0344】

【表3】

表3

mAb	発現 μ g/ml
ChMJ 2-7	1.83
hVH V1/ mVL	3.04
hVH V1/ hVL V1	6.34
hVH V1/ hVL V2	15.4
hVH-V2 / mVL	0.2
mVH / hVL-V2	18.41
hVH-V2 / hVL-V1	5.13
hVH-V2 / hVL-V2	10.79

30

【0345】

同様の実験を、重鎖可変領域に復帰突然変異を含む h u M J 2 - 7 V 2 で実施した (表4)。最高の発現レベルが、マウス M J 2 - 7 抗体の抗原結合および中和特性を保持する h u M J 2 - 7 V 2 . 1 1 に関して検出された。位置 4 8 および 4 9 (V 4 8 I および A 4 9 G) での復帰突然変異の導入により、C O S 細胞での h u M J 2 - 7 V 2 抗体の生成が増加し、それに対して位置 2 3、2 4、6 7、および 6 8 (A 2 3 T ; A 2 4 G ; R 6 7 K および F 6 8 A) でのアミノ酸の復帰突然変異は、抗体発現に負の影響を及ぼしていた。

40

【0346】

【表4】

表4

mAb	発現 $\mu\text{g/ml}$
V2	8.27
V2.1	12.1
V2.2	5.29
V2.3	9.60
V2.4	8.20
V2.5	6.05
V2.6	11.3
V2.10	9.84
V2.11	14.85
V2.16	1.765

10

【0347】

(実施例14)

NHP IL-13 FLAG ELISAによるヒト化MJ2-7抗体の抗原結合特性の評価

【0348】

完全ヒト化MJ2-7mAb (V1、V2 v2)が、NHP IL-13-FLAGとの結合のためにビオチニル化マウスMJ2-7Abと競合できるか否かを、ELISAによって評価した。マイクロタイタープレート (Costar) を、 $1\mu\text{g/ml}$ の抗FLAGモノクローナル抗体M2 (Sigma) で被覆した。 10ng/ml の濃度のFLAG NHP IL-13タンパク質を、 10ng/ml のビオチン標識マウスMJ2-7抗体と、様々な濃度の標識していないマウスおよびヒト化MJ2-7抗体と混合した。この混合物を、室温で2時間インキュベートし、次いで抗FLAG抗体被覆プレートに添加した。FLAG NHP-IL-13/bioMJ2-7Ab複合体の結合を、ストレプトアビジン-HRPおよび3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) で検出した。ヒト化MJ2-7V2は、活性を著しく失ったのに対し、huMJ2-7V2.11は、抗原結合活性を完全に回復し、FLAG-NHP IL-13との結合のためにビオチニル化MJ2-7mAbと競合することが可能であった。BIACORE (商標) 分析では、NHP IL-13が、固定化したhuMJ2-7v2.11と急速に結合し、またゆっくりと解離したことも確認した。

20

30

【0349】

(実施例15)

ヒト化MJ2-7V2VHの分子モデリング

【0350】

ヒト化MJ2-7重鎖変種2 (MJ2-7V2VH) をモデリングするための構造鑄型を、Protein Data Bank (PDB) に対するBLAST相同性探索に基づいて選択した。BLAST探索出力から選択された2つの構造の他に、追加の鑄型をタンパク質構造の社内データベースから選択した。MJ2-7V2VHのモデルを、鑄型として3つの鑄型構造 1JPS (ヒト化Fab D3h44と複合体を形成するヒト組織因子の共結晶構造)、1N8Z (Herceptin Fabと複合体を形成するヒトHer2の共結晶構造)、およびF13.2 (マウス抗体Fab断片と複合体を形成するIL-13) を使用し、かつInsight IIの相同性モジュール (Accelrys, San Diego) を使用して構築した。1JPS、1N8Z、およびF13.2 (Ap.16163-029001から入手可能) の構造的に保存される領域 (SCR) を、各分子ごとにC 距離マトリックスに基づいて決定し、鑄型構造を、SCRでの対応する原子の最小RMS偏差に基づいて重ね合わせた。標的タンパク質MJ2-7V2VHの配

40

50

列を、重ね合わせた鋳型タンパク質の配列と位置合わせし、SCRの座標を、標的タンパク質の対応する残基に割り当てた。SCRのそれぞれにおける標的と鋳型との配列類似性の程度に基づいて、種々の鋳型からの座標を種々のSCRに使用した。SCRに含まれないループおよび可変領域に関する座標は、相同性モジュールで実施されるように、Search LoopまたはGenerate Loop法によって作成した。簡単に言うと、Search Loop法は、フランキングSCR残基のCa距離マトリックスと、同じ数のフランキング残基および所与の長さの介在ペプチド領域を有するタンパク質構造から得られた事前に計算されたマトリックスとを比較することにより、2つのSCR間で正しく適合するタンパク質構造を走査する。新たに原子座標を生成するGenerate Loop法は、Search Loopが所望の結果をもたらさない場合に使用した。アミノ酸側鎖の立体構造は、アミノ酸残基が鋳型および標的と同一である場合、鋳型と同様に維持した。しかし、回転異性体の立体構造探索を行い、鋳型および標的で同一ではない残基に関してエネルギー的に最も好ましい立体構造を維持した。この後、分子機構シミュレーションを設定するSplice Repairを行って、2つのSCR間またはSCRと可変領域との間の接合部での、適正な結合の長さおよび結合角を得た。最後にこのモデルを、5 kcal / (モル) または500サイクルの最大デリバティブまでSteepest Descentアルゴリズムを使用し、また5 kcal / (モル) または2000サイクルの最大デリバティブまでConjugate Gradientsアルゴリズムを使用して、エネルギー最小化に付した。モデルの品質を、ProStat / Struct_Checkコマンドを使用して評価した。

【0351】

マウスMJ2-7VHの分子モデルは、使用した鋳型を1QBLおよび1QBM、ウマ抗シトクロムc抗体FabE8としたこと以外、結晶構造ヒト化MJ2-7V2VHに関して述べた手順に従って構築した。

【0352】

モデルによって予測される、CDRフレームワークH結合の潜在的な相違

hMJ2-7 V2VH : G26 - hMJ2-7 V2VH : A24

hMJ2-7 V2VH : Y109 - hMJ2-7 V2VH : S25

mMJ2-7 VH : D61 - mMJ2-7 VH : I48

mMJ2-7 VH : K63 - mMJ2-7 VH : E46

mMJ2-7 VH : Y109 - mMJ2-7 VH : R98

これらの相違は、以下の所望による復帰突然変異 : A23T、A24G、およびV48Iを示唆していた。

【0353】

個々のアミノ酸の有意なRMS偏差、およびこれらに隣接するアミノ酸残基の相違に基づいて示唆されるその他の所望による復帰突然変異は、G9A、L115T、およびR87Tである。

【0354】

(実施例16)

MJ2-7およびC65のIL-13中和活性

【0355】

MJ2-7およびC65のIL-13中和能力を、一連のバイオアッセイで試験した。まず、これらの抗体がNHP IL-3の生物活性を中和できるか否か、単球CD23発現アッセイで試験した。新たに単離されたヒトPBMCを、高濃度のMJ2-7、C65、またはsIL-13R2-Fcの存在下で、3 ng / mlのNHP IL-13と共に一晩インキュベートした。細胞を収集し、単球特異的マーカー、CD11bに対するCYCHROME (商標) 標識抗体で、またCD23に対するPE標識抗体で染色した。IL-13処理に应答して、CD23の発現は、CD11bの発現に基づいてゲーティングされた単球表面でアップレギュレートされた。MJ2-7、C65、およびsIL13R2-Fcの全ては、このアッセイにおいてNHP IL-13の活性を中和することが

できた。MJ2-7およびsIL13R 2-Fcの効力は、同等であった。C65は、約20分の1の活性であった(図2)。

【0356】

第2のバイオアッセイでは、未変性ヒトIL-13に対するMJ2-7およびC65の中和能力について、STAT6リン酸化アッセイで試験をした。HT-29上皮細胞系を、高濃度のMJ2-7、C65、またはsIL-13R 2-Fcの存在下、0.3 ng/mlの未変性ヒトIL-13と共に37℃で30分間インキュベートした。細胞を固定し、浸透させ、リン酸化STAT6に対するALEXA(商標)Fluor 488標識抗体で染色した。IL-13処理は、STAT6のリン酸化を刺激した。MJ2-7、C65、およびsIL13Ra2-Fcは、このアッセイにおいて、未変性ヒトIL-13の活性を中和することができた(図3)。マウスMJ-27抗体およびヒト化形態(V2-11)に関するIC50は、それぞれ0.48 nMおよび0.52 nMであった。MJ2-7およびsIL-13R 2-Fcの効力は、ほぼ同等であった。sIL-13Ra2-FcのIC50は、0.33 nMであった(図4)。C65は、約20分の1の活性であった(図5)。

10

【0357】

第3のバイオアッセイでは、MJ2-7が未変性ヒトIL-13を中和することができるか否か、テネニン生成アッセイで試験をした。ヒトBEAS-2B肺上皮細胞系を、高濃度のMJ2-7の存在下、3 ng/mlの未変性ヒトIL-13と共に一晩インキュベートした。上澄みを収集し、ELISAによって、細胞外マトリックスタンパク質、テネニンCの生成に関して試験をした(図6A)。MJ2-7は、IC50が約0.1 nMのときにこの応答を阻害した(図6B)。

20

【0358】

これらの結果は、MJ2-7が、NHP IL-13と未変性ヒトIL-13の両方に効果的な中和剤であることを実証している。MJ2-7のIL-13中和能力は、sIL-13R 2-Fcの場合と同等である。NJ1-65もIL-13中和活性を有するが、MJ2-7よりも約20分の1の効力である。

【0359】

(実施例17)

SPRによるMJ2-7抗体のエピトープマッピング

30

【0360】

sIL-13R 2-Fcを、標準的なアミンカップリングによってCM5チップ上に直接被覆した。100 nM濃度のNHP-IL-13を注入し、固定化したIL-13R 2-Fcとのその結合を、BIACORE(商標)によって検出した。追加の注入分である100 nMの抗IL-13抗体をさらに添加し、結合の変化をモニタした。MJ2-7抗体は、huIL-13R 2と複合体を形成したときにNHP-IL-13と結合しなかったのに対し、正の対照である抗IL-13抗体は結合した(図7)。これらの結果は、huIL-13R 2およびMJ2-7が、NHP IL-13の同じかまたは重複エピトープに結合することを示している。

40

【0361】

(実施例18)

NHP-IL-13とヒト化MJ2-7 V2-11抗体との相互作用に関する動力学的速度定数の測定

【0362】

バイオセンサー面を調製するため、アミンカップリングを使用して、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的抗体を、研究グレードのカルボキシメチルデキストランチップ(CM5)に固定化した。この面を、0.1 Mの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)および0.05 MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の混合物で活性化した。捕捉した抗体を、酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)中に10 µg/mlの濃度で注入した。残りの活性化基は、1.0 Mのエタノールアミン(pH 8.0)

50

0)で遮断した。対照として、第1の流動細胞を、バルク屈折率、マトリックス効果、および非特異的結合を補正するための参照面として使用し、第2、第3、および第4の流動細胞を、捕捉分子で被覆した。

【0363】

動力学的分析では、 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を $40\ \mu\text{l}$ 注入することによって、モノクローナル抗体hMJ2-7V2-11を抗IgG抗体表面で捕捉した。ベースラインと、注入終了後約30秒の時点との間での正味の差は、結合した標的の量を表すものと解釈した。600、200、66.6、22.2、7.4、2.5、0.8、0.27、0.09、および0nMの濃度のNHP-IL-13溶液を、2分間にわたり毎分 $100\ \mu\text{l}$ の流量で注入し、これと同じものを3重に形成し、結合した材料の量を時間の関数として記録した(図8)。解離相を、HBS/EP緩衝液(10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、および0.005%(v/v)界面活性剤P20を含有する)中で5分間、同じ流量でモニタし、その後、 $5\ \mu\text{l}$ のグリシン、pH1.5を2回注入して、完全に活性な捕捉面を再生した。全ての動力学実験は、HBS/EP緩衝液中で、22.5で行った。ブランクおよび緩衝液の作用は、二重参照を使用して各センサーグラム(sensorgram)ごとに差し引いた。

10

【0364】

動力学的データを、1:1モデルに適用されたBIAEVALUATION(商標)ソフトウェア3.0.2を使用して分析した。見掛けの解離(k_d)および会合(k_a)速度定数を、全体分析を使用してセンサーグラムの適切な領域から計算した。抗体とNHP-IL-13との相互作用の親和性定数は、以下の式、すなわち $K_d = k_d / k_a$ によって、動力学的速度定数から計算した。これらの結果は、hMJ2-7V2-11が、それぞれ $2.05 \times 10^7\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ および $8.89 \times 10^{-4}\ \text{l/s}$ のオンおよびオフ速度を有し、その結果、NHP-IL-13に対して43pMの親和性を有する抗体が得られることを示している。

20

【0365】

(実施例19)

バイオアッセイにおけるMJ2-7ヒト化中間体の阻害活性

【0366】

ヒト化プロセスにおける様々な中間体の阻害活性を、STAT6リン酸化およびテネイシン生成バイオアッセイにより試験した。最大より下のレベルのNHP-IL-13または未変性ヒトIL-13粗製製剤を使用して生体応答を引き出し、最大値の半分の応答阻害に必要なMJ2-7のヒト化変種の濃度を決定した。ヒトIgG1および定常領域により発現したhMJ2-7V1、hMJ2-7V2、およびhMJ2-7V3の分析は、変種2が、未変性ヒトIL-13に対する中和活性を保持することを示した。未変性ヒトIL-13生物活性の最大値の半分を阻害するのに必要な、変種2ヒト化抗体のこの濃度は、マウスMJ2-7の場合よりも約110倍高かった(図9)。V1またはV2VLをマウスMJ2-7VHと組み合わせた半ヒト化形態の分析では、未変性ヒトIL-13中和活性の低下がヒト化VLに起因するのではなく、VH配列に起因することを実証した(図10)。VL-V1を有する半ヒト化MJ2-7抗体は、中和活性をごく一部で保持するだけであるが、ヒト化VL-V2を有する変種は、親マウス抗体と同様に活性であった。したがって、一連の復帰突然変異をV1-VH配列に導入して、マウスMJ2-7の未変性ヒトIL-13中和活性を改善した。

30

40

【0367】

(実施例20)

MJ2-7はIL-13R₁およびIL-13R₂とのIL-13相互作用を遮断する

【0368】

MJ2-7は、未熟タンパク質(配列番号24)のアミノ酸残基114~132および成熟タンパク質(配列番号14)の残基95~113に対応する、NHP-IL-13の

50

C末端19merに特異的である。ヒトIL-13では、タンパク質のDヘリックスの部分形成するこの領域が、IL-13R₁およびIL-13R₂の両方に結合するのに重要な残基を含有することが報告されている。ヒトIL-13変異体の分析では、A、C、およびDヘリックスを、IL-13R₁/IL-4R₁シグナル伝達複合体に対して重要な接触部位を含むものであることが明らかにされた(ThompsonおよびDebinski (1999) J.Biol.Chem. 274:29944-50)。Dヘリックスのアラニン走査変異誘発では、残基K123、K124、およびR127(配列番号24)が、IL-13R₂との相互作用の一因をなし、残基E110、E128、およびL122は、IL-13R₁に対して重要な接触部位であることが明らかにされた(Madhankumar他, (2002) J.Biol.Chem. 277:43194-205)。NMRによって決定されたヒトIL-13の高分解溶液構造は、既知の構造の関連するリガンド-受容体対との類似性に基づいた、IL-13結合相互作用を予測していた。これらのNMRの研究は、IL-13R₁との重要な接触を作る際の、IL-13 AおよびDヘリックスの重要な役割を裏付けていた(Eisenmesser他, (2001) J.Mol.Biol. 310: 231-241; Moy他, (2001) J.Mol.Biol. 310:219-230)。MJ2-7と、IL-13のC末端Dヘリックスに位置付けられたこのエピトープとの結合は、IL-13とIL-13R₁およびIL-13R₂との相互作用を破壊すると予測した。

【0369】

MJ2-7が、NHP IL-13とIL-13R₁およびIL-13R₂との結合を阻害できるか否かについて、ELISAにより試験をした。組換え可溶性形態のヒトIL-13R₁-FcおよびIL-13R₂-Fcを、ELISAプレート上に被覆した。FLAGタグ付きNHP IL-13を、高濃度のMJ2-7の存在下で添加した。結果は、MJ2-7が、NHP IL-13との結合のために両方の可溶性受容体形態と競合することを示していた(図11Aおよび11B)。これは、MJ2-7によるIL-13生物活性の中和の基本を示している。

【0370】

(実施例21)

MJ2-7軽鎖CDRは抗原結合に寄与する

【0371】

3つの軽鎖CDR領域全てがMJ2-7抗体とNHP IL-13との結合に必要なかを評価するために、MJ2-7VLの2種の追加のヒト化変種をCDR移植によって構成した。VL変種3は、ヒト生殖細胞系クローンDPK18に基づいて設計し、ヒト生殖細胞系クローンのCDR1およびCDR2とマウスMJ2-7抗体からのCDR3とを含んでいた(図12)。第2の構成(hMJ2-7V4)では、MJ2-7抗体のCDR1およびCDR2だけをDPK18フレームワークに移植し、CDR3は、無関係のマウスモノクローナル抗体から得た。

【0372】

ヒト化MJ2-7V3およびV4を、hMJ2-7VHV1とhMJ2-7VLV3およびV4とを組み合わせることによって、COS細胞内で生成した。抗体の抗原結合特性を、直接NHP IL-13結合ELISAによって検査した。MJ2-7軽鎖CDR3が存在しないhMJ2-7は、NHP IL-13に結合する能力を保持するのに対し、軽鎖内にヒト生殖細胞系CDR1およびCDR2を含有するV3は、固定化されたNHP IL-13に結合しなかった。これらの結果は、MJ2-7抗体軽鎖のCDR1およびCDR2が、この抗体の抗原結合特性に最も寄与している可能性あることを実証している。

【0373】

hMJ2-7 VL V3のヌクレオチド配列

```

          1   A T G C G G C T G C   C C G C T C A G C T   G C T G G G C C
T G   C T G A T G C T G T   G G G T G C C C G G
          5 1   C T C T T C C G G C   G A C G T G G T G A   T G A C C C A G
T C   C C C T C T G T C T   C T G C C C G T G A

```

10

20

30

40

50

1 0 1 C C C T G G G C C A G C C C G C T T C T A T C T C T T G
 C C G G T C C T C C C A G T C C C T G G T G
 1 5 1 T A C T C C G A C G G C A A C A C C T A C C T G A A C T
 G G T T C C A G C A G A G A C C C G G C C A
 2 0 1 G T C T C C T C G G C G G C T G A T C T A C A A G G T G
 T C C A A C C G C T T T T C C G G C G T G C
 2 5 1 C C G A T C G G T T C T C C G G C T C C G G C A G C G G
 C A C C G A T T T C A C C C T G A A G A T C
 3 0 1 A G C C G C G T G G A G G C C G A G G A T G T G G G C G
 T G T A C T A C T G C T T C C A G G G C T C
 3 5 1 C C A C A T C C C T T A C A C C T T T G G C G G C G G A
 A C C A A G G T G G A G A T C A A G

(配列番号189)

【0374】

hMJ2-7 VL V3のアミノ酸配列

MRLPAQLLGLLMLWVPGSSG-DVVMTQSPLSLPVTLGQ
 PASISCRSSQSLVYSDGNTYLNW
 FQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL
 KISRVEAEDVGVYYCFQGSHP
 YTFGGGTKVEIK (配列番号190)

10

20

【0375】

hMJ2-7 VL V4のヌクレオチド配列

GATGTTGTGATGACCCAATCTCCA CTCTCCCTGCCTGT
 CACTCCTGGAGAGCCAGCCTCC
 ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTGCATAGTAA
 TGGAAACACCTACCTGGAATGG
 TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGAT
 CTACAAAGTTTCCAACCGATTT
 TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGG
 GACAGATTTCACACTCAAGATC
 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTG
 CTTTCAAAGTTCACATGTTCTCCT
 CTCACCTTCGGTCAAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (配

30

列番号191)

【0376】

hMJ2-7 VL V4のアミノ酸配列

DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSI V HSNNTY
 LEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRFSGVPDRFSGS GSG
 TDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQSSHVP LTFGQGTKLE
 IK (配列番号192)

40

【0377】

当業者なら、日常的な実験法しか使用せずに、本明細書に記述される特定の実施形態の多くの均等物を理解し、または確かめることができるであろう。その他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0378】

50

【図 1 A】それぞれ配列番号 178 および配列番号 14 の、完全長ヒトおよびカニクイザル IL - 13 の配列を示す図である。

【図 1 B】カニクイザル IL - 13 からの例示的なペプチドのリストを示す図である（それぞれ配列番号 179 ~ 188）。

【図 2】CD23⁺ 単球のパーセンテージ（y 軸）により測定したときの、様々な IL - 13 結合剤による NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。MJ2 - 7（ ）、C65（ ）、および sIL - 13R₂ - Fc（ ）の濃度を x 軸上に示す。

【図 3】MJ2 - 7（マウス； ）またはヒト化 MJ2 - 7v2.11（ ）による、NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL - 13 活性は、抗体濃度（x 軸）に対する STAT6 のリン酸化（y 軸）によって測定した。

【図 4】MJ2 - 7v2.11（ ）または sIL - 13R₂ - Fc（ ）による、NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL - 13 活性は、拮抗薬濃度（x 軸）に対する STAT6 のリン酸化（y 軸）によって測定した。

【図 5】MJ2 - 7（ ）、C65（ ）、または sIL - 13R₂ - Fc（ ）による、NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL - 13 活性は、拮抗薬濃度（x 軸）に対する STAT6 のリン酸化（y 軸）によって測定した。

【図 6 A】天然ヒト IL - 13（x 軸）によるテネイシン産生の誘導（y 軸）を示すグラフである。

【図 6 B】抗体濃度（x 軸）に対するテネイシン産生誘導の阻害（y 軸）によって測定したときの、MJ2 - 7 による NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。

【図 7】MJ2 - 7 または対照抗体と、SPRチップに連結された sIL - 13R₂ - Fc に結合された NHP - IL - 13 との結合を示すグラフである。

【図 8】様々な濃度（0.09 ~ 600 nM）の NHP IL - 13 と、捕獲された hMJ2 - 7V2 - 11 抗体との結合を示すグラフである。

【図 9】マウス MJ2 - 7（ ）、あるいはヒト化変種 1（ ）、変種 2（ ）、または変種 3（ ）抗体による NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL - 13 活性は、抗体濃度（x 軸）に対する STAT6 のリン酸化（y 軸）によって測定した。

【図 10】マウス MJ2 - 7VH および VL（ ）、マウス VH およびヒト化変種 2VL（ ）、または変種 2VH および VL（ ）を含む抗体による NHP IL - 13 活性の中和を示すグラフである。NHP IL - 13 活性は、抗体濃度（x 軸）に対する STAT6 のリン酸化（y 軸）によって測定した。

【図 11 A - 11 B】ELISA により測定したときの、MJ2 - 7 抗体による、IL - 13 と固定化された IL - 13 受容体との結合の阻害を示すグラフである。結合は、450 nm での吸光度（y 軸）として示す。MJ2 - 7 抗体の濃度は x 軸に示す。図 11 A は、IL - 13R₁ との結合を示す。図 11 B は、IL - 13R₂ との結合を示す。

【図 12】DPK18 生殖細胞系アミノ酸配列（配列番号 193）とヒト化 MJ2 - 7 変種 3VL（配列番号 190）とのアライメントを示す図である。

【図 13 A】成熟した処理済みのヒト IL - 13 のアミノ酸配列（配列番号 124）を示す図である。

【図 13 B】ヒト IL - 13R₁ のアミノ酸配列（配列番号 125）を示す図である。

10

20

30

40

【 図 1 A 】

FIG. 1A

human	MAILLT <small>↓</small> VIALTC <small>↓</small> LGGFAS <small>↓</small> SPVPPSTALRELELVNITQNKKA	45	配列番号:178
cyno	MAILLT <small>↓</small> VIALTC <small>↓</small> LGGFAS <small>↓</small> SPVPPSTALRELELVNITQNKKA		配列番号:124
human	PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRM <small>↓</small> LSGF	89	
cyno	PLCNGSMVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKTQRM <small>↓</small> LSGF		
human	C <small>↓</small> PHKVSAGQFSSLI <small>↓</small> VRDTKIEVAQFVKDLLLHLKLFREGQFN	132	
cyno	C <small>↓</small> PHKVSAGQFSSLI <small>↓</small> VRDTKIEVAQFVKDLLLHLKLFREGQFN		

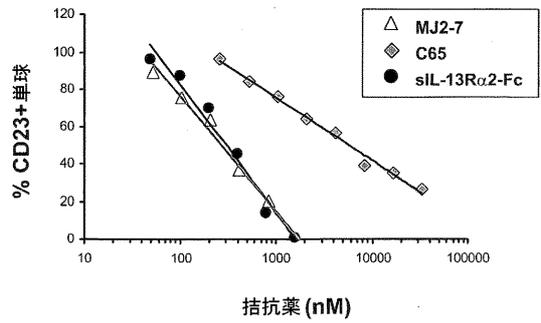
【 図 1 B 】

FIG. 1B

peptide 1	MAILLT <small>↓</small> VIALTC	配列番号:179
peptide 2	LGGFAS <small>↓</small> SPVPP	配列番号:180
peptide 3	SPVPPSTALRELELVNITQNKKA	配列番号:181
peptide 4	TALRELELVNITQNKKA	配列番号:182
peptide 5	NQKAPLCNGSMVWSINLTAGMY	配列番号:183
peptide 6	INLTAGMYCAALESLINVSGC	配列番号:184
peptide 7	SLINVSGCSAIEKTQRM <small>↓</small> LSGF	配列番号:185
peptide 8	GFCPHKVSAGQFSSLI <small>↓</small> VR	配列番号:186
peptide 9	VRDTKIEVAQFVKDLLLHLK	配列番号:187
peptide 10	FVKDLLLHLKLFREGQFN	配列番号:188

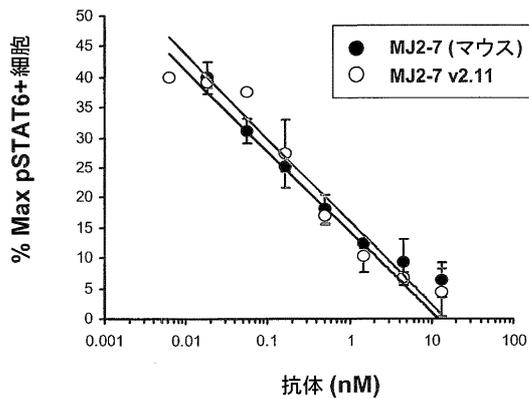
【 図 2 】

FIG. 2



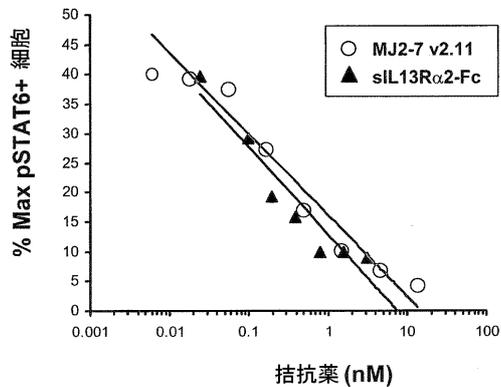
【 図 3 】

FIG. 3



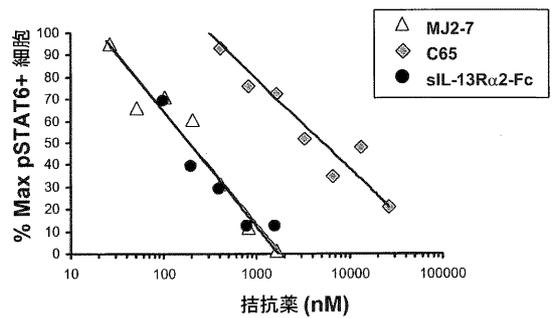
【 図 4 】

FIG. 4



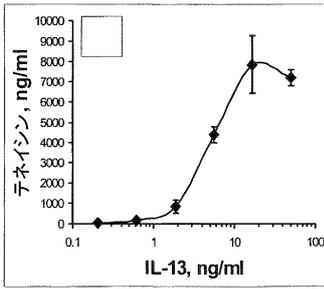
【 図 5 】

FIG. 5



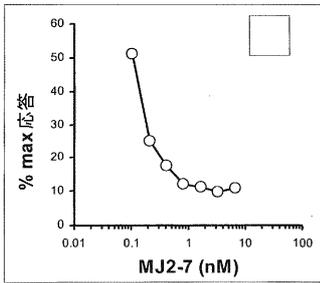
【 図 6 A 】

FIG. 6A



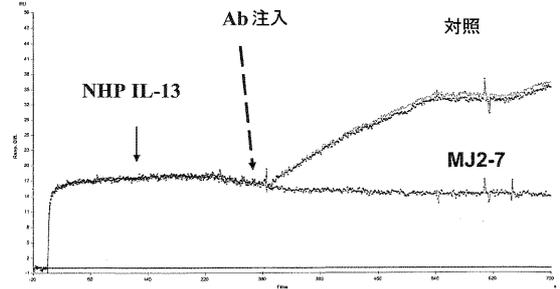
【 図 6 B 】

FIG. 6B



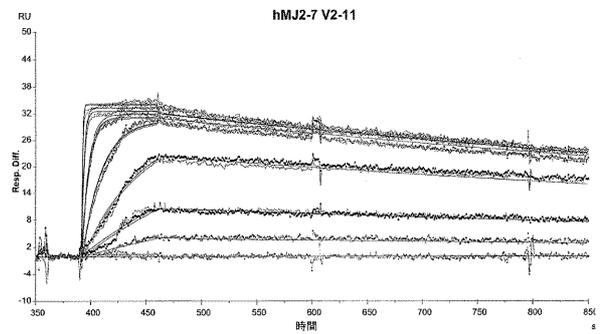
【 図 7 】

FIG. 7



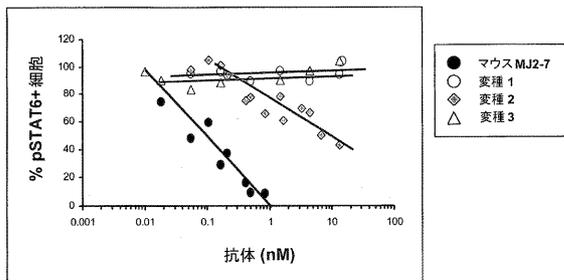
【 図 8 】

FIG. 8



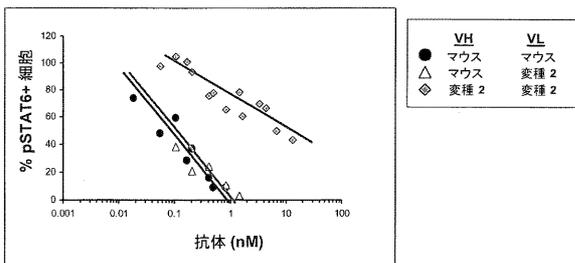
【 図 9 】

FIG. 9

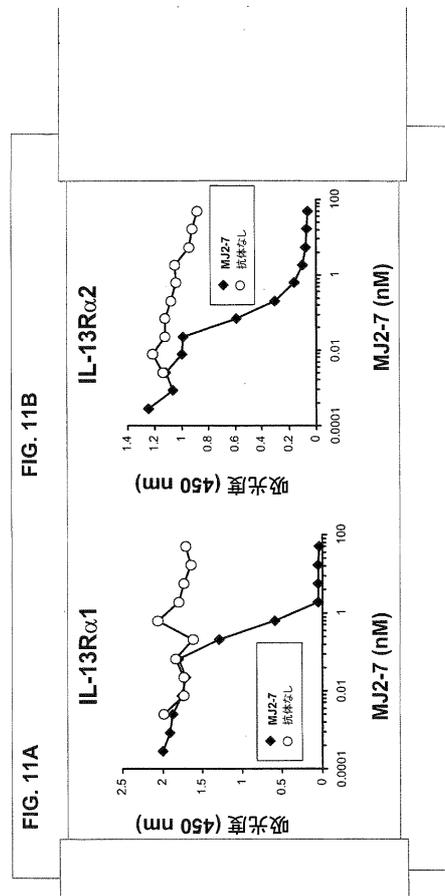


【 図 1 0 】

FIG. 10



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

FIG. 12

```

DPK 18   DVVMTQSPLEFVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPR 50 (配列番号:193)
          |||
hMJ2-7VLV3 DVVMTQSPLEFVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPR 50 (配列番号:190)

DPK 18   RLIYKVSNRDSGVEDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTP 100
          |||
hMJ2-7VLV3 RLIYKVSNRDSGVEDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLVGYCYFGGSHIP 100

DPK 18   P..... 101
hMJ2-7VLV3 YTFGGGTRKVEIK 112

```

【 図 1 3 A 】

FIG. 13A

```

PGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGM
YCAALESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVR
DTKIEVAQFVKDLLLHLKLFREGRFN (配列番号:124)

```

【 図 1 3 B 】

FIG. 13B

```

MEWPARLCGLWALLLCAGGGGGGGAAPTETQPPVTNLSVSVENLCTVIWTVNPPPE
GASSNCSLWYFHSFGDKQDKKIAPETRRSIEVPLNERICLQVGSQCSTNESEKPSI
LVEKICISPPGEDPESAVTELQCIWHNLSYMKCSWLPGRNTSPDTNYTYWHRSLLE
KIHQENIFREGQYFGCSFDLTKVKDSSFEQHSVQIMVKDNAGKIKPSFNIVPLTS
RVKPDPPHIKNLSFHNDLIVQWENPQNFISRCLFYEVVNNSTETHNVFVYQEA
KCENPEFERNVENTSCFMVPGVLPDTLNTVRIRVKTNKLCYEDDKLWSNWSQEMSI
GKKRNSTLYITMLLIVPVI VAGAIIVLLLYLKRKIIIFPPIPDPGKIFKEMFGDQ
NDDTLHWKKYDIYEKQTKKEETDSVVLIENLKKASQ (配列番号:125)

```

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成19年2月28日 (2007.2.28)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2008512985000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
	G 0 1 N 33/53	P

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, L T, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN , TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 リュードミラ・チスティアコワ
アメリカ合衆国 0 1 8 1 0 マサチューセッツ州アンドーバー、アボット・ブリッジ・ドライブ 1 9 番
- (72)発明者 マリオン・ティ・カサイアン
アメリカ合衆国 0 2 1 2 9 マサチューセッツ州チャールズタウン、ナンバー 1、コンコード・ストリート 1 8 番
- (72)発明者 デブラ・ディ・ドナルドソン
アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州メドフォード、ブレイクリー・ロード 1 0 8 番
- (72)発明者 シャン・ヤン・タン
アメリカ合衆国 0 1 8 6 7 マサチューセッツ州レディング、ガゼボ・サークル 8 1 1 番
- (72)発明者 ダビンダー・ギル
アメリカ合衆国 0 1 8 0 3 マサチューセッツ州バーリントン、フォックス・ヒル・ロード 2 0 8 番
- (72)発明者 ブルース・ジェイコブソン
アメリカ合衆国 0 1 7 0 2 マサチューセッツ州フラミンガム、メイプル・ストリート 6 4 番
- (72)発明者 メイシー・エックス・ジン
アメリカ合衆国 0 1 8 6 7 マサチューセッツ州レディング、ユニット 7、レイクビュー・アベニュー 1 5 番
- (72)発明者 サミュエル・ジェイ・ゴールドマン
アメリカ合衆国 0 1 7 2 0 マサチューセッツ州アクトン、モーホーク・ドライブ 9 番
- (72)発明者 ジョン・ノーフ

アメリカ合衆国 0 1 7 4 1 マサチューセッツ州カーライル、ロビンズ・ドライブ 1 4 7 番

(72)発明者 アンジェラ・エム・ウィダム

アメリカ合衆国 0 1 7 2 0 マサチューセッツ州アクトン、チェロキー・ロード 1 9 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA44 CA02 CA07 DA02 EA04
4B064 AG27 CA10 CA19 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA44 CA53 DC50 NA14 ZC021 ZC022
4C085 AA13 AA14 CC21 CC23 GG04
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 FA74

专利名称(译)	IL-13結合剤		
公开(公告)号	JP2008512985A	公开(公告)日	2008-05-01
申请号	JP2007516776	申请日	2005-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	リュードミラチステシアコワ マリオンティカサイアン デブラディドナルドソン シャンヤンタン ダビンダーギル ブルースジェイコブソン メイシーエックスジン サミュエルジェイゴールドマン ジョンノーフ アンジェラエムウィダム		
发明人	リュードミラチステシアコワ マリオンティカサイアン デブラディドナルドソン シャンヤンタン ダビンダーギル ブルースジェイコブソン メイシーエックスジン サミュエルジェイゴールドマン ジョンノーフ アンジェラエムウィダム		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K38/00 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P35/00 A61P31 /12 A61P37/06 A61P43/00 A61P11/02 A61P1/04 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P29 /00 C07K16/244 C07K2317/24 C07K2317/52 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317 /92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K37/02 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P35/00 A61P31/12 A61P37/06 A61P43/00.111 A61P11/02 A61P1/04 G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024 /EA04 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084 /AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZC021 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/GG04 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
優先権	60/581078 2004-06-17 US 11/149025 2005-06-09 US		

摘要(译)

公开了特异性结合IL-13并调节IL-13与IL-13受体和信号传导中间体相互作用的能力的试剂（例如抗体及其片段）。

