

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6022563号

(P6022563)

(45) 発行日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(24) 登録日 平成28年10月14日(2016.10.14)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C O 7 K	16/24	(2006.01)	C O 7 K	16/24	
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K	16/46	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	

請求項の数 25 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-520753 (P2014-520753)	(73) 特許権者	515230154
(86) (22) 出願日	平成24年7月5日(2012.7.5)		ゾエティス・サービシズ・エルエルシー
(65) 公表番号	特表2014-529295 (P2014-529295A)		アメリカ合衆国ニュージャージー州079
(43) 公表日	平成26年11月6日(2014.11.6)		32, フローラム・パーク, キャンパス・
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/053450		ドライブ 100
(87) 国際公開番号	W02013/011407	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成25年1月24日(2013.1.24)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成26年3月20日(2014.3.20)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	61/510, 268		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成23年7月21日(2011.7.21)	(74) 代理人	100101373
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 竹内 茂雄
前置審査		(74) 代理人	100118902
			弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100135415
			弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-31モノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イヌIL-31またはネコIL-31の少なくとも1種に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部位であって、以下の相補性決定領域(CDR)配列の組み合わせのうち少なくとも1つを含む、前記抗体またはその抗原結合部位:

1) 11E12: 配列番号1の変重(VH)-CDR1、配列番号4のVH-CDR2、配列番号7のVH-CDR3、配列番号10の変軽(VL)-CDR1、配列番号13のVL-CDR2、および配列番号16のVL-CDR3;

2) 19D07: 配列番号2のVH-CDR1、配列番号5のVH-CDR2、配列番号8のVH-CDR3、配列番号11のVL-CDR1、配列番号14のVL-CDR2、および配列番号17のVL-CDR3; または

3) 34D03: 配列番号3のVH-CDR1、配列番号6のVH-CDR2、配列番号9のVH-CDR3、配列番号12のVL-CDR1、配列番号15のVL-CDR2、および配列番号18のVL-CDR3。

【請求項2】

前記抗体が、キメラである、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項3】

前記抗体が、イヌ化またはネコ化されている、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項4】

10

20

前記抗体が、イヌまたはネコにおけるIL-31活性を減少させる、阻害する、または中和する、請求項1~3のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項5】

前記抗体が、アトピー性皮膚炎の臨床症状を減少させる、請求項4に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項6】

前記アトピー性皮膚炎の臨床症状が、痒み、皮膚病変、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項5に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項7】

前記抗体がイヌまたはネコにおける掻痒状態またはアレルギー状態を減少させる、阻害する、または中和する、請求項1~6のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位。

10

【請求項8】

a) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEDDDVATYYCQQSNKDPLTFGAGTKLELK (配列番号19; MU-11E12-VL)、

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (配列番号20; CAN-11E12-VL-cUn-FW2)、

20

DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESVDNYGISFMHWFQQKPGQSPQLLIYRASNL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK (配列番号21; CAN-11E12-VL-cUn-13)、

DIVMSQSPSSLVSAGDKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLA WYQQKPWQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK (配列番号22; MU-19D07-VL)、

EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLA WYQQKPGQAPKLLIYGASTRESGVP SRFSGSGSGTD FSFTITSSLEPEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK (配列番号23; CAN-19D07-VL-998-1)、

30

DILLTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFA GTGLMHWYQQKPGQQPKLLIYRASNL EAGVPTRFSGSGSRTDFTLNIHPVEEEDAATYFCQQSREYPWTFGGGTKLEIK (配列番号24; MU-34D03-VL)、

EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCKASQSVSFA GTGLMHWYQQKPGQAPKLLIYRASNL EAGVPSRFSGSGSGTD FSFTISSLEPEDVAVYYCQQSREYPWTFGQGTKLEIK (配列番号25; CAN-34D03-VL-998-1)、または

40

EIQMTQSPSSLASPGDRVTITCKASQSVSFA GTGLMHWYQQKPGKVPKLLIYRASNL EAGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDAATYYCQQSREYPWTFGQGTKLEIK (配列番号71; FEL-34D03-VL-021-1)

を含む可変軽鎖; および

b) QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFKYYDINWV RQRPEQGLEWIGWIFPGDGGTKYNETFKGKATLT TDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARGGTSVIR DAMDYWGQGTSTVTVSS (配列番号26; MU-11E12-VH)、

50

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFKYYDINWVRQA
 PGAGLDWMGWIFPGDGGTKYNETFKGRVTLTADTSTSTAY
 MELSSLRAGDIAVYYCARGGTSVIRDAMDYWGQGTLVTVSS (配列番号 27; CAN - 11E12 - VH - 415 - 1)、

EVKLVEESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQI
 PEKRLIEWVATITSGGGYTYSAHSVKGRTISRDNARNTLY
 LQMSSLRSEDTAVYYCARQNWVVGLAYWGQGTLVTVSA (配列番号 28; MU - 19D07 - VH)、

EVQLVEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSYDMSWVRQA
 PGKGLQWVATITSGGGYTYSAHSVKGRTISRDNARNTLY
 LQMNSLRSEDTAVYYCARQNWVVGLAYWGQGTLVTVSS (配列番号 29; CAN - 19D07 - VH - 400 - 1)、

EVQLVEESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFSFSNYGMSWVRQT
 PDKRLIEWVATISYGGSYTYYPDNIKGRFTISRDNAKNTLY
 LQMSSSLKSEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (配列番号 30; MU - 34D03 - VH)、

EVQLVEESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYGMSWVRQA
 PGKGLQWVATISYGGSYTYYPDNIKGRFTISRDNAKNTLY
 LQMNSLRAEDTAMYYCVRGYGYDTMDYWGQGTTLVTVSS (配列番号 31; CAN - 34D03 - VH - 568 - 1)、または

DVQLVEESGGDLVKPGGSLRLTCAASGFTYSNYGMSWVRQA
 PGKGLQWVATISYGGSYTYYPDNIKGRFTISRDNAKNTLY
 LQMNSLKTEDTATYYCVRGYGYDTMDYWGQGTTLVTVSS (配列番号 73; FEL - 34D03 - VH - 035 - 1)

を含む可変重鎖

からなる群のうち少なくとも 1 つを含む、請求項 7 に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 9】

治療有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体；および医薬的に許容されるキャリアーを含む、イヌまたはネコにおける掻痒状態またはアレルギー状態を治療するための獣医用組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を生産する宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体の生産用の、以下の相補性決定領域 (CDR) 配列の組み合わせのうち少なくとも 1 つをコードする核酸配列を含む単離された核酸：

1) 11E12：配列番号 1 の可変重 (VH) - CDR 1、配列番号 4 の VH - CDR 2、配列番号 7 の VH - CDR 3、配列番号 10 の可変軽 (VL) - CDR 1、配列番号 13 の VL - CDR 2、および配列番号 16 の VL - CDR 3；

2) 19D07：配列番号 2 の VH - CDR 1、配列番号 5 の VH - CDR 2、配列番号 8 の VH - CDR 3、配列番号 11 の VL - CDR 1、配列番号 14 の VL - CDR 2、および配列番号 17 の VL - CDR 3；または

3) 34D03：配列番号 3 の VH - CDR 1、配列番号 6 の VH - CDR 2、配列番号 9 の VH - CDR 3、配列番号 12 の VL - CDR 1、配列番号 15 の VL - CDR 2、および配列番号 18 の VL - CDR 3。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 13】

抗体の製造方法であって、請求項 10 に記載の宿主細胞を該抗体の生産が起こる条件下で培養すること、および該抗体を、宿主細胞または宿主細胞の培地から単離することを含

10

20

30

40

50

む、上記製造方法。

【請求項 1 4】

イヌまたはネコにおける掻痒状態またはアレルギー状態から選択される症状または障害の治療方法であって、治療有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体をイヌまたはネコに投与することを含む、上記治療方法。

【請求項 1 5】

前記掻痒状態が、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、強皮症、および心因性掻痒からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記掻痒状態が、アトピー性皮膚炎である、請求項 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

前記方法が、アトピー性皮膚炎の臨床症状を減少させることを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

アトピー性皮膚炎の臨床症状が、痒み、皮膚病変、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記アレルギー状態が、アレルギー性皮膚炎、夏癬、蕁麻疹、細胞性肺気腫、炎症性気道疾患、再発性の気道閉塞、気道過敏症、慢性閉塞性肺疾患、および自己免疫による炎症過程からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を投与することによる、イヌまたはネコにおける I L - 3 1 活性を阻害する方法。

【請求項 2 1】

サンプル中の I L - 3 1 を検出または定量する方法であって、該方法は：

(a) I L - 3 1 を含む臨床サンプルまたは生体サンプルを、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体の存在下でインキュベートすること；および

(b) サンプル中の I L - 3 1 に結合している抗体を検出すること

を含む、上記方法。

【請求項 2 2】

30

前記抗体が、検出可能に標識されている、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗体が、標識されておらず、検出可能に標識された二次抗体と組み合わせて用いられる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

配列番号 3 2 に記載のイヌ I L - 3 1 のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の 9 5 ~ 1 2 5 の間の領域またはそれに相当するネコ I L - 3 1 における領域に特異的に結合する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 5】

前記抗体が、配列番号 3 2 で示されるイヌ I L - 3 1 配列におけるアミノ酸残基の 1 0 2 ~ 1 2 2 の間の領域、またはそれに相当するネコ I L - 3 1 における領域に特異的に結合する、請求項 2 4 に記載の抗体。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、組換えモノクローナル抗体、ならびに診断手法などの臨床的および科学的な手法におけるそれらの使用の分野に関する。本発明はまた、イヌまたはネコにおける掻痒状態またはアレルギー状態を治療するのに有用な獣医用組成物の形態の単離された抗 I L 3 1 抗体も提供する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

アトピー性皮膚炎は、米国獣医皮膚科専門医協会 (American College of Veterinary Dermatology) の特別委員会により、「特徴的な臨床的兆候を有する遺伝学的に罹りやすい炎症性および掻痒性のアレルギー性皮膚疾患」と定義されてきた (Olivry等、Veterinary Immunology and Immunopathology 2001 ; 81 : 143 ~ 146)。この特別委員会はさらに、イヌにおいてこのような疾患は、アレルギー特異的 I g E に関連することも認識している (Olivry等、2001、上記 ; Marsella & Olivry Clinics in Dermatology 2003 ; 21 : 122 ~ 133)。重度の掻痒は、二次的な脱毛症および紅斑に加えて、ペットの飼い主にとって最も深刻で厄介な症状である。

【 0 0 0 3 】

アトピー性皮膚炎の罹患率は、不十分で矛盾のある疫学的データのために正確にはわかっていないが、イヌの総個体数の 10% であると推定される (MarsellaおよびOlivry 2003、上記 ; Scott等、Canadian Veterinary Journal 2002 ; 43 : 601 ~ 603 ; Hillier Veterinary Immunology and Immunopathology 2001 ; 81 : 147 ~ 151)。世界的には、約 450万頭のイヌがこの慢性的で一生涯の状態に罹患している。発生率は増加し続けているようである。品種および性別による偏りが疑われてきたが、地理的領域に応じて大きく異なっている可能性がある (Hillier、2001 上記 ; Picco等、Vet Dermatol. 2008 ; 19 : 150 ~ 155)。

【 0 0 0 4 】

アレルギー性皮膚炎に關与する可能性のある要因は多数あるが、十分に理解されていない。食物中の成分がアトピー性皮膚炎を惹起させる可能性があり (Picco、2008、上記)、さらにノミ、チリダニ、ブタクサ、植物抽出物などの環境アレルギーも同様である。さらに遺伝因子も重要な役割を果たす。品種による偏りは確認されていないが、いくつかの遺伝様式がアトピー性皮膚炎の素因を高めると考えられる (Sousa & Marsella Veterinary Immunology and Immunopathology 2001 ; 81 : 153 ~ 157 ; Schwartzman等、Clin. Exp. Immunol. 1971 ; 9 : 549 ~ 569)。

【 0 0 0 5 】

インターロイキン - 31 (I L - 31) は、2004年にクローニングされたサイトカインである。インターロイキン - 31は、主として活性化されたヘルパー T (T h) 2細胞によって生産されるが (Dillon等、Nat Immunol 2004 ; 5 : 752 ~ 60)、肥満細胞およびマクロファージでも生産される。I L - 31は、I L - 31受容体 A (I L - 31 R A) およびオンコスタチン M 受容体 (O S M R) で構成される補助受容体と結合する (Dillon等、2004、上記、およびBilsborough等、J Allergy Clin Immunol. 2006 117 (2) : 418 ~ 25)。受容体の活性化により、J A K 受容体 (複数可) を介して S T A T のリン酸化が起こる。補助受容体の発現は、マクロファージ、ケラチノサイト、および後根神経節で示されてきた。近年、I L - 31は、皮膚炎、掻痒性の皮膚病変、アレルギー、および気道過敏症に關与することが発見された。図 1 を参照されたい。

【 0 0 0 6 】

抗 C D 3 および抗 C D 2 8 抗体で T 細胞を刺激すると即座に I L - 31 の m R N A 発現がアップレギュレートされる (Dillon等、2004、上記)。マイクロアレイ解析から、I L - 31は、C X C L 1、C L L 1 7 (胸腺および活性化により調節されるケモカイン [T A R C])、C C L 1 9 (マクロファージ炎症性タンパク質 [M I P] 3)、C C L 2 2 (単球由来のケモカイン [M D C])、C C L 2 3 (M I P 3)、および C C L 4 (M I P) (Dillon等、2004、上記) などの所定の走化性遺伝子を誘導することが示されている。

【 0 0 0 7 】

I L - 31 を過剰発現するトランスジェニックマウスは、皮膚炎、心因性掻痒、重度の皮膚炎、および脱毛症を示す (Dillon等、2004、上記)。マウスに I L - 31 を皮下注射すると、炎症性細胞、好中球、好酸球、リンパ球、およびマクロファージによる浸潤が起こり、表皮肥厚および皮膚の棘細胞症が生じる。自然の原因によるアトピー性皮膚炎 (A

10

20

30

40

50

D) を有する NC / N g a マウスにおいて、IL - 31 は皮膚病変で過剰発現され、掻痒と相関がある (Takaoka等、Eur J. Pharmacol. 2005 ; 516、180 ~ 181 ; Takaoka等、Exp. Dermatol. 2006 ; 15、161 ~ 167)。またマウスモデルにおいても、IL - 31 は、急激な掻痒の発生を誘導することが示されている (Raap等、J Allergy Clin Immunol. 2008 ; 122 (2) : 421 ~ 3)。

【 0 0 0 8 】

さらなる研究では、IL - 31 は、ヒトにおいてアトピー性皮膚炎によって誘導された皮膚炎および掻痒と相関があることが示されている。ヒト AD 患者では、IL - 31 の mRNA の発現は、病変部位ではない皮膚よりも皮膚病変で顕著に高く、さらに病変部位ではない皮膚における発現は、健康な患者の正常な皮膚における発現よりも大きい (Sonkoly等、J Allergy Clin Immunol 2006 ; 117 : 411 ~ 7)。その他の研究では、AD 患者の皮膚における CD 45 RO + (メモリー) 皮膚リンパ球抗原 (CLA) 陽性 T 細胞は、IL - 31 の mRNA およびタンパク質を発現することが報告されている (Bilsborough等、2006、上記)。また、患者の皮膚における IL - 31 の mRNA の過剰発現またはアレルギー性接触皮膚炎は、IL - 4 および IL - 13 の mRNA 発現と相関するが、インターフェロン (IFN) - の mRNA 発現とは相関しないことも報告されている (Neis等、J. Allergy Clin. Immunol. 2006 ; 118、930 ~ 937)。さらに IL - 31 の血清レベルは、慢性特発性蕁麻疹を有するヒトの患者において高く、AD 患者ではよりいっそう高いことが示されている (Raap等、Exp Dermatol. 2010 ; 19 (5) : 464 ~ 6)。また、AD の重症度と IL - 31 の血清レベルとの相関もヒトで観察されている (Rapp等、2008、上記)。また IL - 31 の分泌は、アトピー性の個体では、IgE 架橋後に肥満細胞で、さらにブドウ球菌スーパー抗原への応答として強化されることも示されている。加えて IL - 31 は、ヒト結腸の筋線維芽細胞において、IL - 6、IL - 8、CXCL 1、CC 17 などの数種の炎症促進性メディエータ、および複数種のメタロプロテイナーゼの生産を刺激することが示されている (Yagi等、International Journal of Molecular Medicine 2007 ; 19 (6) : 941 ~ 946)。

【 0 0 0 9 】

環境アレルゲンに対する I 型過敏症は、イヌの AD の主要なメカニズムとみなされており、AD を有するイヌの皮膚病変において、IL - 4 などの Th 2 を介したサイトカインのレベルは高い (Nuttall等、Vet. Immunol. Immunopathol. 2002 ; 87、379 ~ 384)。さらに、炎症性細胞、リンパ球、および好中球による浸潤は、皮膚病変の悪化の基礎となる重要なメカニズムである ; CC 17 / TARC、CCR 4、および CC 28 / 粘膜関連上皮ケモカイン (MEC) などの走化性遺伝子の過剰発現は、AD を有するイヌにおける皮膚病変の悪化に寄与する (Maeda等、Vet. Immunol. Immunopathol. 2005 ; 103、83 ~ 92 ; Maeda等、Vet. Immunol. Immunopathol. 2002b ; 90、145 ~ 154 ; および Maeda等、J. Vet. Med. Sci. 2008 ; 70、51 ~ 55 を参照)。

【 0 0 1 0 】

近年の証拠から、IL - 31 が、アレルギー性喘息に特徴的なアレルギー性炎症および気道上皮の応答を促進することに関与する可能性があることが示唆されている (Chattopadhyay等、J Biol Chem 2007 ; 282 : 3014 ~ 26 ; および Wai等、Immunology、2007 ; 122、532 ~ 541)。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 非特許文献 1 】 Olivry等、Veterinary Immunology and Immunopathology 2001 ; 81 : 143 ~ 146

【 非特許文献 2 】 Marsella & Olivry Clinics in Dermatology 2003 ; 21 : 122 ~ 133

【 非特許文献 3 】 Scott等、Canadian Veterinary Journal 2002 ; 43 : 601 ~ 603

【 非特許文献 4 】 Hillier Veterinary Immunology and Immunopathology 2001 ; 81 : 147 ~ 151

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 5】 Picco等、Vet Dermatol. 2008 ; 19 : 150 ~ 155
- 【非特許文献 6】 Sousa & Marsella Veterinary Immunology and Immunopathology 2001 ; 81 : 153 ~ 157
- 【非特許文献 7】 Schwartzman等、Clin. Exp. Immunol. 1971 ; 9 : 549 ~ 569
- 【非特許文献 8】 Dillon等、Nat Immunol 2004 ; 5 : 752 ~ 60
- 【非特許文献 9】 Billsborough等、J Allergy Clin Immunol. 2006 117 (2) : 418 ~ 25
- 【非特許文献 1 0】 Takaoka等、Eur J. Pharmacol. 2005 ; 516、180 ~ 181
- 【非特許文献 1 1】 Takaoka等、Exp. Dermatol. 2006 ; 15、161 ~ 167
- 【非特許文献 1 2】 Raap等、J Allergy Clin Immunol. 2008 ; 122 (2) : 421 ~ 3)
- 【非特許文献 1 3】 Sonkoly等、J Allergy Clin Immunol 2006 ; 117 : 411 ~ 7 10
- 【非特許文献 1 4】 Neis等、J. Allergy Clin. Immunol.2006 ; 118、930 ~ 937
- 【非特許文献 1 5】 Raap等、Exp Dermatol.2010 ; 19 (5) : 464 ~ 6
- 【非特許文献 1 6】 Yagi等、International Journal of Molecular Medicine 2007 ; 19 (6) : 941 ~ 946)
- 【非特許文献 1 7】 Nuttall等、Vet. Immunol. Immunopathol. 2002 ; 87、379 ~ 384
- 【非特許文献 1 8】 Maeda等、Vet. Immunol. Immunopathol. 2005 ; 103、83 ~ 92
- 【非特許文献 1 9】 Maeda等、Vet. Immunol. Immunopathol.2002b ; 90、145 ~ 154
- 【非特許文献 2 0】 Maeda等、J. Vet. Med. Sci. 2008 ; 70、51 ~ 55
- 【非特許文献 2 1】 Chattopadhyay等、J Biol Chem 2007 ; 282 : 3014 ~ 26
- 【非特許文献 2 2】 Wai等、Immunology、2007 ; 122、532 ~ 541 20
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【 0 0 1 2 】
- これらの観察は、I L - 3 1 は、掻痒状態とアレルギー状態との両方において重要な役割を果たすという仮説を裏付けるものである。イヌまたはネコにおける掻痒状態および / またはアレルギー状態を治療するのに有用な I L - 3 1 に対する治療用抗体を提供することが望ましいと予想される。
- 【課題を解決するための手段】
- 【 0 0 1 3 】
- 発明の概要 30
- 一実施態様において、本発明は、イヌ I L - 3 1 またはネコ I L - 3 1 の少なくとも 1 種に特異的に結合する単離された抗体を提供する。いくつかの実施態様において、本抗体は、モノクローナル抗体である。一実施態様において、本モノクローナル抗体は、キメラである。その他の実施態様において、本抗体は、イヌ化またはネコ化されている。
- 【 0 0 1 4 】
- いくつかの実施態様において、本抗体は、イヌまたはネコにおける I L - 3 1 活性を減少させる、阻害する、または中和する。好ましい実施態様において、本抗体は、掻痒状態またはアレルギー状態を減少させる、阻害する、または中和する。掻痒状態としては、例えば、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、強皮症、および掻痒が挙げられる。アレルギー状態としては、例えば、アレルギー性皮膚炎、蕁麻疹、麻疹、細胞性肺気腫、炎症性気道疾患、再発性の気道閉塞、気道過敏症、慢性閉塞性肺疾患、および過敏性腸症候群 (I B S) などの自己免疫による炎症過程が挙げられる。 40
- 【 0 0 1 5 】
- 一実施態様において、本発明は、以下のうち少なくとも 1 つを含む単離された抗体またはそれらの抗原結合部位を提供する：
- アミノ酸配列 Y Y D I N (配列番号 1 ; 1 1 E 1 2 - V H - C D R 1)、S Y D M S (配列番号 2 ; 1 9 D 0 7 - V H - C D R 1)、または N Y G M S (配列番号 3 ; 3 4 D 0 3 - V H - C D R 1) を有する可変重 (V_H) 鎖の相補性決定領域 (C D R) 1 ;
- アミノ酸配列 W I F P G D G G T K Y N E T F K G (配列番号 4 ; 1 1 E 1 2 - V H - C D R 2)、T I T S G G G Y T Y S A D S V K G (配列番号 5 ; 1 9 D 0 7 - V H - C 50

DR2)、またはTISYGGSYTYYPDNIKG(配列番号6;34D03-VH-CDR2)を有する可変重鎖CDR2;

アミノ酸配列ARGGTSVIRDAMDY(配列番号7;11E12-VH-CDR3)、ARQNWVVGLAY(配列番号8;19D07-VH-CDR3)、またはVRGYGYDTMDY(配列番号9;34D03-VH-CDR3)を有する可変重鎖CDR3;および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0016】

他の実施態様において、本発明は、以下の群のうち少なくとも1つを含む単離された抗体またはそれらの抗原結合部位を提供する:

アミノ酸配列RASESVDNYGISFMH(配列番号10;11E12-VL-CDR1)、KSSQSLLNSGNQKNYLA(配列番号11;19D07-VL-CDR1)、またはKASQSVSFAGTGLMH(配列番号12;34D03-VL-CDR1)を有する相補性決定領域(CDR)1を含む可変軽(V_L)鎖;

アミノ酸配列RASNLES(配列番号13;11E12-VL-CDR2)、GASTRES(配列番号14;19D07-VL-CDR2)、またはRASNLEA(配列番号15;34D03-VL-CDR2)を有する可変軽鎖CDR2;

アミノ酸配列QQSNKDPLT(配列番号16;11E12-VL-CDR3)、QNDYSYPYT(配列番号17;19D07-VL-CDR3)、またはQQSREYPWT(配列番号18;34D03-VL-CDR3)を有する可変軽鎖CDR3;および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0017】

さらにその他の実施態様において、上述の可変軽鎖CDRの少なくとも1つを有する抗体はさらに、以下の可変重鎖CDRの少なくとも1つを含んでもよい:

アミノ酸配列YYDIN(配列番号1;11E12-VH-CDR1)、SYDMS(配列番号2;19D07-VH-CDR1)、またはNYGMS(配列番号3;34D03-VH-CDR1)を有する可変重鎖の相補性決定領域(CDR)1;

アミノ酸配列WIFPGDGGTKYNETFKG(配列番号4;11E12-VH-CDR2)、TITSGGGYTYSAHSVKG(配列番号5;19D07-VH-CDR2)、またはTISYGGSYTYYPDNIKG(配列番号6;34D03-VH-CDR2)を有する可変重鎖CDR2;

アミノ酸配列ARGGTSVIRDAMDY(配列番号7;11E12-VH-CDR3)、ARQNWVVGLAY(配列番号8;19D07-VH-CDR3)、またはVRGYGYDTMDY(配列番号9;34D03-VH-CDR3)を有する可変重鎖CDR3;および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0018】

いくつかの実施態様において、本抗体は、以下のうち少なくとも1つを含んでもよい:

a) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEITDDVATYYCQQSNKDPLTFGAGTKLELK(配列番号19;MU-11E12-VL)、DIVMTQTPLSLSVSPGEPASISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDAGVYYCQQSNKDPLTFGAGTKLEIK(配列番号20;CAN-11E12-VL-cUn-FW2)、

10

20

30

40

50

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S E S V D N Y G I S F M H W F
 Q Q K P G Q S P Q L L I Y R A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S
 R V E A D D A G V Y Y C Q Q S N K D P L T F G A G T K L E I K (配列番号 2 1 ; C
 A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - 1 3) 、

D I V M S Q S P S S L S V S A G D K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A
 W Y Q Q K P W Q P P K L L I Y G A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T
 I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N D Y S Y P Y T F G G G T K L E I K (配列番号 2 2
 ; M U - 1 9 D 0 7 - V L) 、

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

D I L L T Q S P A S L A V S L G Q R A I I S C K A S Q S V S F A G T G L M H W Y
 Q Q K P G Q Q P K L L I Y R A S N L E A G V P T R F S G S G S R T D F T L N I H
 P V E E E D A A T Y F C Q Q S R E Y P W T F G G G T K L E I K (配列番号 2 4 ; M
 U - 3 4 D 0 3 - V L) 、 または

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

を含む可変軽鎖；

b) Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F K Y Y D I N W V
 R Q R P E Q G L E W I G W I F P G D G G T K Y N E T F K G K A T L T T D K S S S
 T A Y M Q L S R L T S E D S A V Y F C A R G G T S V I R D A M D Y W G Q G T S V
 T V S S (配列番号 2 6 ; M U - 1 1 E 1 2 - V H) 、

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K T S G Y T F K Y Y D I N W V R Q A
 P G A G L D W M G W I F P G D G G T K Y N E T F K G R V T L T A D T S T S T A Y
 M E L S S L R A G D I A V Y Y C A R G G T S V I R D A M D Y W G Q G T L V T V S
 S (配列番号 2 7 ; C A N - 1 1 E 1 2 - V H - 4 1 5 - 1) 、

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q I
 P E K R L E W V A T I T S G G G Y T Y S A D S V K G R F T I S R D N A R N T L Y
 L Q M S S L R S E D T A V Y Y C A R Q N W V V G L A Y W G Q G T L V T V S A (配
 列番号 2 8 ; M U - 1 9 D 0 7 - V H) 、

E V Q L V E S G G D L V K P G G S L R L S C V A S G F T F S S Y D M S W V R Q A
 P G K G L Q W V A T I T S G G G Y T Y S A D S V K G R F T I S R D N A R N T L Y
 L Q M N S L R S E D T A V Y Y C A R Q N W V V G L A Y W G Q G T L V T V S S (配
 列番号 2 9 ; C A N - 1 9 D 0 7 - V H - 4 0 0 - 1) 、

E V Q L V E S G G D L V K P G G S L K L S C A A S G F S F S N Y G M S W V R Q T
 P D K R L E W V A T I S Y G G S Y T Y Y P D N I K G R F T I S R D N A K N T L Y
 L Q M S S L K S E D T A M Y Y C V R G Y G Y D T M D Y W G Q G T S V T V S S (配
 列番号 3 0 ; M U - 3 4 D 0 3 - V H) 、 または

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

を含む可変重鎖；および

c) 1 つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【 0 0 1 9 】

一実施態様において、本発明は、配列番号 3 2 に記載のイヌIL - 3 1 のアミノ酸配列
 におけるアミノ酸残基の約 9 5 ~ 1 2 5 の領域またはそれに相当するネコIL - 3 1 にお

10

20

30

40

50

ける領域に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。いくつかの実施態様において、本抗体は、配列番号32に記載のイヌIL-31のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の約102～122の領域またはそれに相当するネコIL-31における領域に特異的に結合する。

【0020】

本発明はまた、治療有効量の上述した抗体の少なくとも1種を含む獣医用組成物も提供する。

【0021】

その他の実施態様において、本発明は、上述の抗体を生産する宿主細胞を提供する。

【0022】

よりさらなる実施態様において、本発明は、以下のうち少なくとも1つをコードする核酸配列を含む単離された核酸を提供する：

アミノ酸配列YYDIN(配列番号1；11E12-VH-CDR1)、SYDMS(配列番号2；19D07-VH-CDR1)、またはNYGMS(配列番号3；34D03-VH-CDR1)を有する可変重(V_H)鎖の相補性決定領域(CDR)1；

アミノ酸配列WIFPGDGGTKYNETFKG(配列番号4；11E12-VH-CDR2)、TITSGGGYTYSAHSVKG(配列番号5；19D07-VH-CDR2)、またはTISYGGSYTYYPDNIKG(配列番号6；34D03-VH-CDR2)を有する可変重鎖CDR2；

アミノ酸配列ARGGTSVIRDAMDY(配列番号7；11E12-VH-CDR3)、ARQNWVVGLEY(配列番号8；19D07-VH-CDR3)、またはVRGYGYDTMDY(配列番号9；34D03-VH-CDR3)を有する可変重鎖CDR3；および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保守的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0023】

さらなる実施態様において、上述の単離された核酸はさらに、以下のうち少なくとも1つをコードする核酸配列を含んでいてもよい：

アミノ酸配列RASESVDNYGISFMH(配列番号10；11E12-VL-CDR1)、KSSQSLLNSGNQKNYLA(配列番号11；19D07-VL-CDR1)、またはKASQSVSFAGTGLMH(配列番号12；34D03-VL-CDR1)を有する相補性決定(CDR)1を含む可変軽(V_L)鎖；

アミノ酸配列RASNLES(配列番号13；11E12-VL-CDR2)、GASTRES(配列番号14；19D07-VL-CDR2)、またはRASNLEA(配列番号15；34D03-VL-CDR2)を有する可変軽鎖CDR2；

アミノ酸配列QQSNKDPLT(配列番号16；11E12-VL-CDR3)、QNDYSYPYT(配列番号17；19D07-VL-CDR3)、またはQQSREYPWT(配列番号18；34D03-VL-CDR3)を有する可変軽鎖CDR3；および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保守的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0024】

本発明はさらに、少なくとも1つの上述の核酸を含むベクターを提供する。

【0025】

その他の実施態様において、本発明は、上述の宿主細胞を本抗体の生産が起こる条件下で培養すること、および本抗体を、宿主細胞または宿主細胞の培地から単離することを含む、抗体の製造方法を提供する。

【0026】

また、治療有効量の上述した抗体を投与することを含む、掻痒状態またはアレルギー状態から選択される症状または障害の治療方法も提供される。いくつかの実施態様において

10

20

30

40

50

、搔痒状態は、アトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、強皮症、および搔痒から選択される。その他の実施態様において、治療しようとするアレルギー状態は、アレルギー性皮膚炎、夏癬、蕁麻疹、細胞性肺気腫、炎症性気道疾患、再発性の気道閉塞、気道過敏症、慢性閉塞性肺疾患、および過敏性腸症候群（IBS）などの自己免疫による炎症過程から選択される。

【0027】

さらに、上述の抗体を投与することによる、イヌまたはネコにおけるIL-31活性を阻害する方法も提供される。

【0028】

また、サンプル中のIL-31を検出または定量する方法も提供され、本方法は、IL-31を含む臨床サンプルまたは生体サンプルを、上述の抗体の存在下でインキュベートすること；およびサンプル中のIL-31に結合している抗体を検出することを含む。一実施態様において、本抗体は、検出可能に標識される。その他の実施態様において、本抗体は、標識されておらず、標識された二次抗体と組み合わせて用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、IL-31経路の概略図である。

【図2】図2は、抗原結合部位を強調表示したマウス免疫グロブリンG（IgG）分子の一般構造の概略図である。

【図3】図3は、マウス：イヌのキメラIgGの一般構造の概略図である。

【図4】図4は、マウスIgGの種分化または「イヌ化（caninization）」を示す図解であり、マウスCDRが、配列データベースから同定されたイヌフレームワークにグラフト化されている。

【図5】図5は、キメラ軽鎖と完全にイヌ化した重鎖とが対形成した「ヘテロキメラ」モノクローナル抗体の図解である。

【図6】図6は、前採血およびポジティブコントロールマウスと比較したIL-31で免疫化されたマウス（CF-1 MU#1~4）のELISAの力価である。

【図7】図7は、定常領域に対するプライマーおよびマウス可変領域に向けられた縮重プライマーを示す抗体可変鎖の図解である。

【図8】図8は、プラセボと比較した単回投与の皮下投与試験（76A60）におけるキメラ11E12の試験的な有効性を示すグラフである。

【図9】図9は、試験76A60に登録されたイヌの個々の搔痒スコアを示す表である。

【図10】図10は、11E12のキメラ（プロット番号1）、イヌ化（プロット番号2）、およびヘテロキメラ（プロット番号3および4）バージョンのイヌIL-31への結合を示すウェスタンプロットである。プロット番号3のヘテロキメラは、キメラ重鎖と対を形成するイヌ化軽鎖を有する。プロット番号4のヘテロキメラは、イヌ化重鎖と対を形成するキメラ軽鎖を有する。各ニトロセルロースプロットは、左のレーンに予備染色したタンパク質標準（シーブルー・プラス2（Seebblue plus 2）、インビトロジェン社（Invitrogen Corp.）、カリフォルニア州カールスバッド）、および右のレーンに800 ngのイヌIL-31を含む。

【図11】図11は、イヌ化11E12軽鎖のフレームワーク置換作業の概略図である。

【図12】図12は、1つの逆変異を有する11E12のイヌ化バージョンにおけるマウスフレームワークの2つの軽鎖残基への結合を示すウェスタンプロットである。各ニトロセルロースプロットは、左のレーンに予備染色したタンパク質標準（シーブルー・プラス2、インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド）、および右のレーンに800 ngのイヌIL-31を含む。

【図13】図13は、全長およびトランケートされたイヌIL-31タンパク質のウェスタンプロットである。個々のニトロセルロースプロットは、A)抗His、B)34D03、およびC)11E12抗体で探索された。プロットのレーン1~9は、以下に示す通りである：レーン1 - 予備染色したタンパク質標準（シーブルー・プラス2、インビトロ

10

20

30

40

50

ジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)；レーン2 - 全長イヌIL - 31；レーン3 - N末端トランケーション - 20N；レーン4 - N末端トランケーション - 40N；レーン5 - N末端トランケーション - 60N；レーン6 - C末端トランケーション - 20C；レーン7 - C末端トランケーション - 40C；レーン8 - C末端トランケーション - 60C；およびレーン9 - ベータ - ガラクトシダーゼ (lacZ)。注釈：C末端がトランケートされた全長IL - 31およびタンパク質 (- 20、- 40C、および - 60C) は、これらの条件下ではその発現を検出することができなかった。

【図14】図14は、トランケートされたイヌIL - 31タンパク質のウェスタンブロットである。個々のニトロセルロースブロットは、A) 抗His、B) 11E12、およびC) 34D03抗体で探索された。ブロットのレーン1~5は、以下に示す通りである：レーン1 - 予備染色したタンパク質標準 (シーブルー・プラス2、インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)；レーン2 - 20~122位でのC末端トランケーション；レーン3 - 20~100位でのC末端トランケーション；レーン4 - 20~80位でのC末端トランケーション；およびレーン5 - ベータ - ガラクトシダーゼ (lacZ)。

10

【図15】図15は、各アミノ酸位置 (76~122) においてアラニンで置換されたイヌIL - 31を発現する大腸菌 (E. coli) 株の溶解産物を用いたウェスタンブロットの断片である。個々のニトロセルロースブロットは、図で示されるように抗His、11E12、および34D03抗体で探索された。

【図16】図16は、イヌIL - 31において二重および三重の突然変異を用いたウェスタンブロットの断片である。ポジティブコントロールとして - 20Nタンパク質の溶解産物を泳動した。

20

【図17】図17は、イヌ化34D03抗体 (1.0mg/kg) を皮下注射したイヌの搔痒スコアを示すグラフである。1.5μg/kgのイヌIL - 31で攻撃する前 (基準応答) および攻撃した後 (2時間目の応答) のそれぞれの試験日に搔痒スコアを測定した。

【図18】図18は、精製したイヌおよびネコIL - 31タンパク質を用いた4~12%のピストリス (Bis Tris) SDS PAGEである。パネルAは、還元条件下で泳動されたタンパク質のクーマシー染色を示す。パネルBは、非還元条件下で泳動されたタンパク質のクーマシー染色を示す。パネルCおよびDは、抗His抗体で探索された、それぞれAおよびBと同一なゲルのウェスタンブロットである。レーン1 - イヌIL - 31；レーン2 - ネコIL - 31；レーン3 - 予備染色したタンパク質標準 (シーブルー・プラス2、インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)；レーン4 - イヌIL - 31；およびレーン5 - ネコIL - 31。

30

【図19】図19は、大腸菌で生産されたイヌおよびネコIL - 31により誘導されたイヌDH - 82単球におけるpSTATシグナル伝達のグラフである。イヌIL - 31 (CHO) は、全ての以前の細胞ベースの分析において、イヌ搔痒モデルで用いられる、さらには初期の抗体同定のための免疫原として用いられる参照タンパク質である。

【図20】図20は、11E12と34D03抗体との結合に關与するタンパク質の領域におけるネコIL - 31とイヌIL - 31との間の配列保存を示すアライメントである (プラスの記号で示した)。

40

【図21】図21は、IL - 31タンパク質のウェスタンブロットである。個々のニトロセルロースブロットは、A) 抗His、B) 11E12、およびC) 34D03抗体で探索された。注釈：イヌIL - 31 (CHO) は、6-Hisタグを含まない。

【図22】図22は、イヌDH82単球におけるイヌIL - 31によって誘導されたpSTATシグナル伝達の阻害についてのネコ化抗体34D03とイヌ化抗体34D03との比較を示すグラフである。

【図23】図23は、ネコ化抗体34D03で探索した、還元条件下でのネコおよびイヌIL - 31のウェスタンブロットである。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 3 0 】

配列の簡単な説明

配列番号 1 は、本明細書では 1 1 E 1 2 - V H - C D R 1 と称される可変重鎖 C D R 1 であり；

配列番号 2 は、本明細書では 1 9 D 0 7 - V H - C D R 1 と称される可変重鎖 C D R 1 であり；

配列番号 3 は、本明細書では 3 4 D 0 3 - V H - C D R 1 と称される可変重鎖 C D R 1 であり；

配列番号 4 は、本明細書では 1 1 E 1 2 - V H - C D R 2 と称される可変重鎖 C D R 2 であり；

10

配列番号 5 は、本明細書では 1 9 D 0 7 - V H - C D R 2 と称される可変重鎖 C D R 2 であり；

配列番号 6 は、本明細書では 3 4 D 0 3 - V H - C D R 2 と称される可変重鎖 C D R 2 であり；

配列番号 7 は、本明細書では 1 1 E 1 2 - V H - C D R 3 と称される可変重鎖 C D R 3 であり；

配列番号 8 は、本明細書では 1 9 D 0 7 - V H - C D R 3 と称される可変重鎖 C D R 3 であり；

配列番号 9 は、本明細書では 3 4 D 0 3 - V H - C D R 3 と称される可変重鎖 C D R 3 であり；

20

配列番号 1 0 は、本明細書では 1 1 E 1 2 - V L - C D R 1 と称される可変軽鎖 C D R 1 であり；

配列番号 1 1 は、本明細書では 1 9 D 0 7 - V L - C D R 1 と称される可変軽鎖 C D R 1 であり；

配列番号 1 2 は、本明細書では 3 4 D 0 3 - V L - C D R 1 と称される可変軽鎖 C D R 1 であり；

配列番号 1 3 は、本明細書では 1 1 E 1 2 - V L - C D R 2 と称される可変軽鎖 C D R 2 であり；

配列番号 1 4 は、本明細書では 1 9 D 0 7 - V L - C D R 2 と称される可変軽鎖 C D R 2 であり；

30

配列番号 1 5 は、本明細書では 3 4 D 0 3 - V L - C D R 2 と称される可変軽鎖 C D R 2 であり；

配列番号 1 6 は、本明細書では 1 1 E 1 2 - V L - C D R 3 と称される可変軽鎖 C D R 3 であり；

配列番号 1 7 は、本明細書では 1 9 D 0 7 - V L - C D R 3 と称される可変軽鎖 C D R 3 であり；

配列番号 1 8 は、本明細書では 3 4 D 0 3 - V L - C D R 3 と称される可変軽鎖 C D R 3 であり；

配列番号 1 9 は、本明細書では M U - 1 1 E 1 2 - V L と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 2 0 は、本明細書では C A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - F W 2 と称される可変軽鎖配列であり；

40

配列番号 2 1 は、本明細書では C A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - 1 3 と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 2 2 は、本明細書では M U - 1 9 D 0 7 - V L と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 2 3 は、本明細書では C A N - 1 9 D 0 7 - V L - 9 9 8 - 1 と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 2 4 は、本明細書では M U - 3 4 D 0 3 - V L と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 2 5 は、本明細書では C A N - 3 4 D 0 3 - V L - 9 9 8 - 1 と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 2 6 は、本明細書では M U - 1 1 E 1 2 - V H と称される可変重鎖配列であり；

50

配列番号 27 は、本明細書では C A N - 1 1 E 1 2 - V H - 4 1 5 - 1 と称される可変重鎖配列であり；

配列番号 28 は、本明細書では M U - 1 9 D 0 7 - V H と称される可変重鎖配列であり；

配列番号 29 は、本明細書では C A N - 1 9 D 0 7 - V H - 4 0 0 - 1 と称される可変重鎖配列であり；

配列番号 30 は、本明細書では M U - 3 4 D 0 3 - V H と称される可変重鎖配列であり；

配列番号 31 は、本明細書では C A N - 3 4 D 0 3 - V H - 5 6 8 - 1 と称される可変重鎖配列であり；

配列番号 32 は、GenBank 登録番号 C 7 G 0 W 1 に相当するアミノ酸配列であり、
イヌIL - 3 1 全長タンパク質に相当する；

10

配列番号 33 は、GenBank 登録番号 C 7 G 0 W 1 に相当するヌクレオチド配列であり、
イヌIL - 3 1 全長タンパク質をコードするヌクレオチド配列に相当する；

配列番号 34 は、本明細書では M U - 1 1 E 1 2 - V L と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 35 は、本明細書では M U - 1 1 E 1 2 - V H と称される可変重鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 36 は、本明細書では M U - 1 9 D 0 7 - V L と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 37 は、本明細書では M U - 1 9 D 0 7 - V H と称される可変重鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

20

配列番号 38 は、本明細書では M U - 3 4 D 0 3 - V L と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 39 は、本明細書では M U - 3 4 D 0 3 - V H と称される可変重鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 40 は、本明細書では H C - 6 4 と称されるイヌ重鎖定常領域に関するアミノ酸
配列であり (GenBank 登録番号 A F 3 5 4 2 6 4) ；

配列番号 41 は、本明細書では H C - 6 4 と称されるイヌ重鎖定常領域をコードするヌクレオチド
配列であり (GenBank 登録番号 A F 3 5 4 2 6 4) ；

配列番号 42 は、本明細書では H C - 6 5 と称されるイヌ重鎖定常領域に関するアミノ酸
配列であり (GenBank 登録番号 A F 3 5 4 2 6 5) ；

30

配列番号 43 は、本明細書では H C - 6 5 と称されるイヌ重鎖定常領域をコードするヌクレオチド
配列であり (GenBank 登録番号 A F 3 5 4 2 6 5) ；

配列番号 44 は、本明細書では カッパ (kappa) と称されるイヌ軽鎖定常領域に関するアミノ酸
配列であり (GenBank 登録番号 X P _ 5 3 2 9 6 2) ；

配列番号 45 は、カッパと称されるイヌ軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列であり
(GenBank 登録番号 X P _ 5 3 2 9 6 2) ；

配列番号 46 は、本明細書では C A N - 1 9 D 0 7 - V L - 9 9 8 - 1 と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 47 は、本明細書では C A N - 1 9 D 0 7 - V H - 9 9 8 - 1 と称される可変重鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

40

配列番号 48 は、本明細書では C A N - 3 4 D 0 3 - V L - 9 9 8 - 1 と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 49 は、本明細書では C A N - 3 4 D 0 3 - V H - 5 6 8 - 1 と称される可変重鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 50 は、本明細書では C A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - F W 2 と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 51 は、本明細書では C A N - 1 1 E 1 2 - V H - 4 1 5 - 1 と称される可変重鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

配列番号 52 は、本明細書では C A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - 1 3 と称される可変軽鎖配列をコードする
ヌクレオチド配列であり；

50

配列番号 53 は、本明細書では CAN - 11E12 __VL__cUn__1 と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 54 は、本明細書では CAN - 11E12 - VL - cUn - 1 と称される可変軽鎖配列をコードするヌクレオチド配列であり；

配列番号 55 は、本明細書では大腸菌で発現させるために用いられるイヌIL - 31 全長コンストラクトのアミノ酸配列に相当する；

配列番号 56 は、本明細書では大腸菌で発現させるために用いられるイヌIL - 31 全長コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 57 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 - 20N コンストラクトのアミノ酸配列であり；

10

配列番号 58 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 - 20N コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 59 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 - 40N コンストラクトのアミノ酸配列であり；

配列番号 60 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 - 40N コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 61 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 - 60N コンストラクトのアミノ酸配列であり；

配列番号 62 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 - 60N コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

20

配列番号 63 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 の 20 ~ 122 コンストラクトのアミノ酸配列であり；

配列番号 64 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 の 20 ~ 122 コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 65 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 の 20 ~ 100 コンストラクトのアミノ酸配列であり；

配列番号 66 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 の 20 ~ 100 コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 67 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 の 20 ~ 80 コンストラクトのアミノ酸配列であり；

30

配列番号 68 は、大腸菌で発現させるためのイヌIL - 31 の 20 ~ 80 コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 69 は、大腸菌で発現させるためのネコIL - 31 全長コンストラクトに相当するヌクレオチド配列であり；

配列番号 70 は、大腸菌で発現させるためのネコIL - 31 全長コンストラクトに相当するアミノ酸配列であり；

配列番号 71 は、本明細書では FEL - 34D03 - VL - 021 - 1 と称される可変軽鎖配列であり；

配列番号 72 は、本明細書では FEL - 34D03 - VL - 021 - 1 と称される可変軽鎖配列をコードするヌクレオチド配列であり；

40

配列番号 73 は、本明細書では FEL - 34D03 - VH - 035 - 1 と称される可変重鎖配列であり；

配列番号 74 は、本明細書では FEL - 34D03 - VH - 035 - 1 と称される可変重鎖配列をコードするヌクレオチド配列であり；

配列番号 75 は、本明細書では HC - Aネコと称されるネコ重鎖定常領域に関するアミノ酸配列であり (GenBank 登録番号 AB016710.1) ；

配列番号 76 は、本明細書では HC - Aネコと称されるネコ重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列であり (GenBank 登録番号 AB016710.1) ；

配列番号 77 は、本明細書では LC - カッパ・ネコと称されるネコ軽鎖定常領域に関するアミノ酸配列であり (GenBank 登録番号 AF198257.1) ；

50

配列番号 78 は、本明細書では LC - カッパ・ネコと称されるネコ軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列である (GenBank 登録番号 AF198257.1)。

【0031】

定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明に関して用いられるいくつかの用語を定義する。これらの用語に加えて、その他の用語も必要に応じて明細書中のどこかで定義する。本明細書において特に他の定義がなされない限り、本明細書で用いられる専門用語は、当分野で認識される意味を有するものとする。

【0032】

本明細書および特許請求の範囲で用いられるように、単数形「a」、「an」および「the」は、文章中に明らかな他の指示がない限り、複数の対象を含む。例えば「an antibody」と述べられる場合、これは、複数の抗体も含む。

【0033】

本明細書で用いられる用語「含む (comprising)」は、組成物および方法が列挙された要素を含んでいるが、それ以外のものが含まれていてもよいことを意味するものとする。

【0034】

エピトープは、本明細書で用いられる場合、本抗体の CDR によって認識される抗原決定基を指す。言い換えれば、エピトープは、抗体によって認識されてそれと結合できるあらゆる分子の部分部分を指す。特に他の指定がない限り、用語「エピトープ」は、本明細書で用いられる場合、抗 IL-31 物質との反応性を有する IL-31 の領域を指す。

【0035】

「抗原」は、抗体と結合することができ、加えて抗体によって認識されてそれと結合できる分子または分子の部分である (それに相当する抗体結合領域は、パラトープと称することもある)。一般的に、エピトープは、アミノ酸または糖側鎖などの化学的に活性な表面の分子団からなり、特異的な三次元構造の特徴、加えて特異的な電荷の特徴を有する。

【0036】

用語「特異的に」は、抗体結合に関して、抗体が、特異的な抗原、すなわちポリペプチドまたはエピトープに高い結合活性および/または高親和性で結合することを指す。多くの実施態様において、特異的な抗原は、抗体産生細胞が単離される動物宿主を免疫化するのに用いられる抗原 (もしくはフラグメント、または抗原の亜分画) である。抗体の抗原への特異的結合は、同抗体の他の抗原への結合よりも強い。ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、その他のポリペプチドと弱い検出可能なレベルで (例えば、対象のポリペプチドに対して示される結合の 10% またはそれ未満) 結合が可能な場合もある。このような弱い結合またはバックグラウンド結合は、対象のポリペプチドへの特異的な抗体結合と容易に区別でき、例えば適切なコントロールの使用によって区別できる。特異的な抗体は、一般的には 10^{-7} M またはそれ未満の KD の結合親和性で、例えば 10^{-8} M またはそれ未満 (例えば、 10^{-9} M もしくはそれ未満、 10^{-10} もしくはそれ未満、 10^{-11} もしくはそれ未満、 10^{-12} もしくはそれ未満、または 10^{-13} もしくはそれ未満など) の KD の結合親和性で抗原に結合する。

【0037】

用語「抗体」は、本明細書で用いられる場合、2つの軽鎖および2つの重鎖を有する無傷の免疫グロブリンを指す。従って、単一の単離された抗体またはフラグメントは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヘテロキメラ抗体、イヌ化抗体またはネコ化抗体であってもよい。用語「抗体」は、好ましくは、IL-31 タンパク質およびそれらのフラグメントに結合できる、モノクローナル抗体およびそれらのフラグメント、ならびに免疫学的に結合するそれらの等価体を指す。抗体という用語は、均一な分子、または複数の異なる分子成分で構成されている血清製品などの混合物の両方を指すのに用いられる。

【0038】

「天然抗体」および「天然免疫グロブリン」は、通常、2つの同一な軽 (L) 鎖および

10

20

30

40

50

2つの同一な重(H)鎖で構成された、約150,000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有結合のジスルフィド結合で重鎖と繋がっているが、様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖のなかでもジスルフィド結合の数は異なっている。また各重鎖および軽鎖は、一定間隔で離れている鎖内のジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の端部に可変ドメイン(V_H)と、それに続いて多数の定常ドメインとを有する。各軽鎖は、一方の端部に可変ドメイン(V_L)を有し、他方の端部に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一の定常ドメインと一致して配置され、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと一致して配置される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖の可変ドメインと重鎖の可変ドメインとの間の境界面を形成すると考えられる。図2は、抗原結合部位を強調表示した天然型マウス免疫グロブリンG(IgG)の一般構造の例である。

10

【0039】

用語「抗体フラグメント」は、無傷(intact)の抗体構造とはいえないものを指し、例えば、これらに限定されないが、単離された単一抗体鎖、Fvコンストラクト、Fabコンストラクト、Fcコンストラクト、軽鎖可変または相補性決定領域(CDR)配列などが挙げられる。

【0040】

用語「可変」領域は、フレームワークおよびCDR(あるいは超可変部としても知られている)を含んでおり、抗体のなかでも可変ドメインの所定部分の配列が広範囲にわたり異なっており、このような所定部分が、特定の抗体それぞれのその特定の抗原への結合および特異性に使用されることを意味する。しかしながら、可変域は、抗体の可変ドメイン全体に均一に分布しているわけではない。可変域は、軽鎖および重鎖の可変ドメインの両方において、高度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、複数のFRを含み、その大部分は3つの高度可変領域で連結されたシート型の立体配置をとっており、それらがシート構造と連結する、場合によってはシート構造の一部を構成するループを形成する。各鎖の高度可変領域は、FRと近接した位置で、他の鎖の高度可変領域と共に保持されており、抗体の抗原-結合部位の形成に寄与している(Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service, National Institutes of Health、メリーランド州ベ

20

30

【0041】

用語「高度可変領域」は、本明細書で用いられる場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。高度可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(上記のKabat等(1991))、および/または「高度可変ループ」からのアミノ酸残基(ChothiaおよびLesk J. Mol. Biol. 196:901~917(1987))を含む。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義されるような高度可変領域の残基以外の可変ドメイン残基である。

【0042】

抗体のパパイン消化により、「Fab」フラグメントと呼ばれるそれぞれ単一の抗原-結合部位を有する2つの同一な抗原結合フラグメントが生産され、残りは「Fc」フラグメントであり、この名前は、容易に結晶化する能力を反映している。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、それでもなお抗原を架橋させることができるF(ab')₂フラグメントが得られる。

40

【0043】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、強い非共有結合で連結された1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。この立体配置で、各可変ドメインの3つの高度可変領域が相互作用して、 $V_H - V_L$ 二量体の表面上に抗原-結合部位の範囲を定めている。まとめる

50

と、6つの高度可変領域により、本抗体に抗原結合の特異性が付与される。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原特異的な高度可変領域を3つしか含まない、Fvの半分）でも、親和性は結合部位全体よりも低い、抗原を認識してそれと結合する能力を有する。

【0044】

またFabフラグメントは、軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の第一の定常ドメイン（CH1）も含む。Fab'フラグメントは、抗体のヒンジ領域由来の1またはそれより多くのシステイン（複数可）を含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端で数個の残基が付加されている点でFabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、本明細書では、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離のチオール基を生じるFab'を示す表記である。F(ab')₂抗体フラグメントはもともと、間にヒンジシステインを有するFab'フラグメント対として生産されたものである。その他の抗体フラグメントの化学的カップリングも知られている。

10

【0045】

あらゆる脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2種の明らかに別個のタイプのうち一方に割り振ることができる。

【0046】

免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに割り振ることができる。目下、5種の主要な免疫グロブリンクラス、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのうち数種はさらに、サブクラス（アイソタイプ）、例えば（マウスおよびヒトという表記で定義されるような）IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2に分類される場合もある。様々な免疫グロブリンクラスに一致する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。様々な免疫グロブリンクラスのサブユニット構造および三次元配置は、複数の種でよく知られている。個々のアイソタイプの存在率、およびこれらの定常ドメインに関連する機能的な活性は種特異的であり、実験的に定義しなければならない。

20

【0047】

「モノクローナル抗体」は、本明細書において定義されるように、細胞の単一のクローン（具体的には、ハイブリドーマ細胞の単一のクローン）によって生産された抗体であるため、単一の純粋な均一なタイプの抗体である。同じクローンから生産されたモノクローナル抗体は全て同一であり、同じ抗原特異性を有する。用語「モノクローナル」は、細胞の単一のクローン、単一の細胞、およびその細胞の後代に関する。

30

【0048】

モノクローナル抗体は、本明細書において具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種から誘導された抗体のそれに相当する配列と同一または相同であると同時に、その鎖の残部（複数可）がその他の種から誘導された抗体のそれに相当する配列と同一または相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、加えて、望ましい生物活性を示す場合に限りこのような抗体のフラグメントを含む。典型的には、キメラ抗体とは、軽鎖および重鎖の遺伝子が、典型的には異なる種に属する抗体の可変および定常ドメイン領域の遺伝子から遺伝子工学により構築された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変性セグメントを、イヌ定常セグメントに連結させてもよい。図3は、マウス：イヌIgGの一実施態様の一般構造を示す概略図である。この実施態様において、抗原結合部位はマウスから誘導され、一方でFc部分はイヌ由来である。

40

【0049】

非イヌ（例えばマウス）抗体の「イヌ化した」形態とは、非イヌ免疫グロブリンから誘導された最小の配列を含む遺伝操作された抗体である。イヌ化抗体とは、レシピエントの高度可変領域の残基が、望ましい特異性、親和性、および能力を有するマウスなどの非イヌ種（ドナー抗体）からの高度可変領域の残基で置き換えられたイヌ免疫グロブリン配列

50

(レシピエント抗体)である。場合によっては、イヌ免疫グロブリン配列のフレームワーク領域(FR)残基が、それに相当する非イヌ由来残基で置き換えられる。さらにイヌ化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に存在しない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練させるためになされる。一般的に、イヌ化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含むと予想され、ここで全部または実質的に全部の高度可変領域が、非イヌ免疫グロブリン配列の高度可変領域に相当し、さらに全部または実質的に全部のFRが、イヌ免疫グロブリン配列のFRである。イヌ化抗体はまた、任意選択で、完全な、または少なくとも一部の免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはイヌ免疫グロブリン配列の免疫グロブリン定常領域(Fc)も含むと予想される。図4は、マウスIgGの種分化またはイヌ化を示す一実施態様の図解である。この実施態様において、マウスCDRは、イヌ由来フレームワーク上にグラフト化されている。

10

【0050】

非ネコ(例えばマウス)抗体の「ネコ化した」形態とは、非ネコ免疫グロブリンから誘導された最小の配列を含む遺伝操作された抗体である。ネコ化抗体とは、レシピエントの高度可変領域の残基が、望ましい特異性、親和性、および能力を有するマウスなどの非ネコ種(ドナー抗体)からの高度可変領域の残基で置き換えられたネコ免疫グロブリン配列(レシピエント抗体)である。場合によっては、ネコ免疫グロブリン配列のフレームワーク領域(FR)残基は、それに相当する非ネコ由来残基で置き換えられる。さらにネコ化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に存在しない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練させるためになされる。一般的に、ネコ化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含むと予想され、ここで全部または実質的に全部の高度可変領域が、非ネコ免疫グロブリン配列の高度可変領域に相当し、さらに全部または実質的に全部のFRが、ネコ免疫グロブリン配列のFRである。ネコ化抗体はまた、任意選択で、完全な、または少なくとも一部の免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはネコ免疫グロブリン配列の免疫グロブリン定常領域(Fc)も含むと予想される。

20

【0051】

用語「ヘテロキメラ」は、本明細書において定義されるように、抗体の鎖(重鎖または軽鎖)の一方がイヌ化されており、同時に他方がキメラである抗体を指す。図5に、ヘテロキメラ分子の一実施態様を示す。この実施態様において、イヌ化可変重鎖(ここで全部のCDRがマウス由来であり、全部のFRがイヌ由来である)が、キメラ可変軽鎖(ここで全部のCDRがマウス由来であり、全部のFRがマウス由来である)と対を形成する。この実施態様において、可変重鎖および可変軽鎖の両方が、イヌ定常領域に融合している。

30

【0052】

「変異」抗IL-31抗体は、本明細書において、アミノ酸配列が、親の抗体配列中の1またはそれより多くのアミノ酸残基(複数可)の付加、欠失、および/または置換により「親の」抗IL-31抗体のアミノ酸配列と異なっているが、親の抗IL-31-抗体の望ましい活性のうち少なくとも1つを保持する分子を指す。望ましい活性としては、抗原に特異的に結合する能力、動物におけるIL-31活性を低減、阻害または中和する能力、および細胞ベースの分析においてIL-31介在pSTATシグナル伝達を阻害する能力が挙げられる。一実施態様において、このような変異体は、親の抗体の1またはそれより多くの高度可変および/またはフレームワーク領域(複数可)に1またはそれより多くのアミノ酸置換(複数可)を含む。例えば、このような変異体は、親の抗体の1またはそれより多くの高度可変および/またはフレームワーク領域において、少なくとも1つの、例えば約1~約10個の、好ましくは約2~約5個の置換を含んでもよい。通常は、このような変異体は、親の抗体の重鎖または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも50%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは

40

50

少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むと予想される。この配列に関する同一性または相同性は、本明細書では、最大パーセントの配列同一性が達成されるように配列を並べて、必要に応じてギャップを導入した後の、親の抗体の残基と同一な候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。N末端、C末端、または内部の伸長、欠失もしくは抗体配列への挿入は、配列同一性または相同性に影響を及ぼすものと解釈されないものとする。このような変異体はIL-31と結合する能力を保持しており、好ましくは親の抗体よりも優れた望ましい活性を有する。例えば、このような変異体は、より強い結合親和性、動物においてIL-31活性を低減、阻害または中和する強化された能力、および/または細胞ベースの分析においてIL-31介在pSTATシグナル伝達を阻害する強化された能力を有していてもよい。

10

【0053】

「変異」核酸は、本明細書において、配列が「親の」核酸と異なっている分子を指す。ポリヌクレオチド配列の分岐は、1またはそれより多くのヌクレオチドの欠失、置換または付加などの突然変異による変化に起因する可能性がある。これらの変化はそれぞれ、所定の配列中、1ヶ所またはそれより多くの所で、単独で起こる場合もあるし、または組み合わせて起こる場合もある。

【0054】

「親の」抗体は、本明細書では、変異体の作製に用いられるアミノ酸配列によってコードされている抗体である。好ましくは、親の抗体は、イヌフレームワーク領域を有し、存在するとすればイヌ抗体の定常領域(複数可)を有する。例えば、親の抗体は、イヌ化抗体であってもよいし、またはイヌ抗体であってもよい。その他の例として、親の抗体は、ネコ化抗体であってもよいし、またはネコ抗体であってもよい。さらにその他の例として、親の抗体は、マウスモノクローナル抗体である。

20

【0055】

用語「単離された」は、物質(例えば抗体または核酸)が、その天然の環境にある成分から分離および/または回収されることを意味する。天然の環境の汚染成分とは、その物質を診断または治療的に使用する際に干渉すると予想される物質であって、例えば、酵素、ホルモン、およびその他のタンパク質様または非タンパク質性の溶質が挙げられる。核酸に関して、単離される核酸としては、染色体中では通常結合している5'から3'の配列から分離した核酸が挙げられる。好ましい実施態様において、このような物質は、物質が95質量%よりも高純度に、最も好ましくは99質量%よりも高純度に精製される。単離された物質は、物質の自然な環境に存在する成分の少なくとも1種が存在しないため、組換え細胞内のそのままの場所に存在する物質であってもよい。しかしながら通常は、単離された物質は、少なくとも1回の精製工程で調製される。

30

【0056】

「標識」という言葉は、本明細書で用いられる場合、抗体または核酸に直接的または間接的に結合した検出可能な化合物または組成物を指す。標識そのものが、それ自身によって検出できるものであってもよいし(例えば放射線同位体標識または蛍光標識)、あるいは酵素標識のケースにおいて、検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒するものであってもよい。

40

【0057】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」などは、本明細書では同義的に用いられる場合があり、これらは、DNAおよびRNA中の一連のヌクレオチド塩基(またはいわゆる「ヌクレオチド」)を指す。核酸は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および/またはそれらの類似体を含んでいてもよい。用語「核酸」は、例えば一本鎖および二本鎖分子を含む。核酸は、例えば遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、DNA分子(例えばcDNA)、RNA分子(例えばmRNA)、組換え核酸、プラスミド、ならびにその他のベクター、プライマー、およびプローブであってもよい。5'から3'(センス)および3'から5'(アンチセンス)のポリヌクレオチドのどちらも含まれる。

50

【 0 0 5 8 】

「被検体」または「患者」は、本発明の分子で影響を与えることができる治療が必要な動物を指す。本発明に従って治療することが可能な動物としては、脊椎動物が挙げられ、特に好ましい例は、哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、およびウマのような動物である。

【 0 0 5 9 】

「治療有効量」（または「有効量」）は、被検体または患者に投与した際に、有益な、または望ましい結果を達成するのに十分な、活性成分、例えば本発明に係る物質の量を指す。有効量は、1回またはそれより多くの回数の投与、適用または用量による投与が可能である。本発明に係る組成物の治療有効量は、当業者によって容易に決定できる。本発明に関して、「治療有効量」は、例えば臨床的な症状の改善などの搔痒状態またはアレルギー状態の治療に関連する1またはそれより多くのパラメーターにおいて、客観的に測定された変化がもたらされるような量である。当然ながら、治療有効量は、治療しようとする具体的な被検体および状態、被検体の体重および年齢、疾患の状態の重症度、選択された具体的な化合物、従うべき投与計画、投与のタイミング、投与方式等に応じて様々であると予想され、これらはいずれも当業者によって容易に決定できる。

10

【 0 0 6 0 】

用語「治療」は、本明細書で用いられる場合、疾患または障害に関するあらゆる治療を包含する。本発明の「治療」物質は、予防的または防止的な方式で作用するものであってもよく、例えばリスクがあると確認できる動物を標的とするように設計された手法を包含する方式で作用するものであってもよいし（遺伝薬理学）；または自然に改善または治癒するような方式で作用するものであってもよいし；あるいは治療しようとする疾患または障害の少なくとも1つの症状の進行の速度または程度を遅延させるように作用するものであってもよい。

20

【 0 0 6 1 】

「治療」、「治療すること」等は、治療的処置および予防的または防止的措置の両方を指す。治療が必要な動物は、すでに障害を有する動物に加えて、障害を防ごうとする動物も含む。疾患または障害の「治療」または疾患または障害を「治療すること」という用語は、疾患または障害を防ぐこと、または疾患または障害から保護すること（すなわち臨床症状を発生させないようにすること）；疾患または障害を阻害すること（すなわち臨床症状の発生を止めること、または抑制すること）；および/または疾患または障害を軽減すること（すなわち臨床症状の退縮を引き起こすこと）を含む。当然のことながら、決定的な誘導性の現象または現象（複数）がわかっていないかあるいは潜在性であるため、疾患または障害を「防ぐこと」と「抑制すること」とを常に区別できるとは限らない。従って、用語「予防」は、「防止」と「抑制」との両方を包含する「治療」のタイプを指すと理解されるものとする。従って用語「治療」は「予防」を含む。

30

【 0 0 6 2 】

用語「アレルギー状態」は、本明細書では、免疫系と体にとって外来の物質との相互作用によって引き起こされる障害または疾患と定義される。この外来物質は、「アレルゲン」と称される。一般的なアレルゲンとしては、空気アレルゲン、例えば花粉、ほこり、かび、チリダニのタンパク質、虫刺されで注入された唾液などが挙げられる。アレルギー状態の例としては、これらに限定されないが、以下のもの、すなわちアレルギー性皮膚炎、夏癬、蕁麻疹、細胞性肺気腫、炎症性気道疾患、再発性の気道閉塞、気道過敏症、慢性閉塞性肺疾患、および過敏性腸症候群（IBS）などの自己免疫による炎症過程が挙げられる。

40

【 0 0 6 3 】

用語「搔痒状態」は、本明細書では、皮膚を擦ったりまたは引っ掻いたりしてそのような状態を和らげたいという衝動をもたらす強烈な痒みの感覚を特徴とする疾患または障害と定義される。搔痒状態の例としては、これらに限定されないが、以下のもの、すなわちアトピー性皮膚炎、湿疹、乾癬、強皮症、および搔痒が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

50

本明細書で用いられるように、用語「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」は、同義的に用いられる場合がある。またこれらの用語はいずれもそれらの後代を含み、この後代とは、それに続くあらゆる世代のことである。当然のことながら、いずれの後代も、意図的な、または意図的ではない突然変異のために同一ではない可能性がある。異種核酸配列の発現に関して、「宿主細胞」は、原核または真核細胞（例えば細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、および昆虫細胞）を意味し、これらはインビトロで存在していてもよいし、あるいはインビボで存在していてもよい。例えば宿主細胞は、トランスジェニック動物中に存在していてもよい。宿主細胞は、ベクターのためのレシピエントとして用いてもよいし、このような宿主細胞としては、例えば、ベクターを複製したり、および/またはベクターによってコードされた異種核酸を発現したりできるあらゆる形質転換可能な生物が挙げられる。

10

【0065】

「組成物」は、活性物質と、その他の化合物または組成物との組み合わせを意味するものとし、ここで上記その他の化合物または組成物は、不活性であってもよいし（例えば標識）、あるいは活性であってもよい（例えばアジュバント）。

【0066】

本明細書において定義されるように、本発明で使用するのに適した医薬的に許容されるキャリアーは、当業者によく知られている。このようなキャリアーとしては、これらに限定されないが、水、塩類溶液、緩衝食塩水、リン酸塩緩衝液、アルコール性溶液/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられる。その他の慣習的に用いられる希釈剤、アジュバント、および賦形剤が従来の技術に従って添加されてもよい。このようなキャリアーとしては、エタノール、ポリオール、および適切なそれらの混合物、植物油、ならびに注射可能な有機エステルが挙げられる。また緩衝剤およびpH調節剤も用いることができる。緩衝剤としては、これらに限定されないが、有機酸または塩基から製造された塩が挙げられる。代表的な緩衝剤としては、これらに限定されないが、有機酸塩、例えばクエン酸の塩（例えばクエン酸塩）、アスコルビン酸の塩、グルコン酸の塩、ヒスチジン-HClの塩、炭酸の塩、酒石酸の塩、コハク酸の塩、酢酸の塩、もしくはフタル酸の塩、トリス、トリメタンアミン塩酸塩、またはリン酸塩の緩衝剤が挙げられる。非経口用キャリアーとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、トレハロース、スクロース、および塩化ナトリウム、乳酸加リンゲルまたは不揮発性油が挙げられる。静脈内キャリアーとしては、流体および栄養素の補充液、電解質補充液、例えばリンゲルデキストロースに基づく電解質補充液などが挙げられる。また保存剤およびその他の添加剤、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤（例えばEDTA）、不活性ガスなども、製剤用キャリアーに含まれていてもよい。本発明は、キャリアーの選択によって限定されない。適切なpH等張性、安定性およびその他の従来の特徴を有する、上述の成分からのこれらの医薬的に許容される組成物の調製は、当業界の技術の範囲内である。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Lippincott Williams & Wilkins出版、2000年；およびThe Handbook of Pharmaceutical Excipients、第4版、R. C. Rowe等編、APhA Publications、2003などの教本を参照されたい。

20

30

【0067】

用語「保存的アミノ酸置換」は、所定のアミノ酸残基でのあらゆるアミノ酸置換を示し、ここで置換残基は、ポリペプチドの機能（例えば酵素活性）を実質的に低減させることのない、所定の残基に化学的に類似したものである。保存的アミノ酸置換は当業界で一般的に知られており、それらの例は、例えば米国特許第6,790,639号、6,774,107号、6,194,167号、または5,350,576号で説明されている。好ましい実施態様において、保存的アミノ酸置換は、以下の6つのグループのうちいずれか1つの範囲内で起こるいずれかの置換と予想される。

40

【0068】

・1. 小さい脂肪族の実質的に非極性の残基: Ala、Gly、Pro、Ser、およびThr；

50

- ・ 2 . 大きい脂肪族の非極性残基 : I l e、L e u、および V a l ; M e t ;
- ・ 3 . 負電荷を有する極性残基およびそれらのアミド : A s p、および G l u ;
- ・ 4 . 負電荷を有する極性残基のアミド : A s n、および G l n ; H i s ;
- ・ 5 . 正電荷を有する極性残基 : A r g、および L y s ; H i s ; ならびに
- ・ 6 . 大きい芳香族残基 : T r p、および T y r ; P h e。

【 0 0 6 9 】

好ましい実施態様において、保存的アミノ酸置換は、以下に示す天然の残基の対（保存的置換）として列挙されたもののうちいずれか1つであると予想される : A l a (S e r) ; A r g (L y s) ; A s n (G l n ; H i s) ; A s p (G l u) ; G l n (A s n) ; G l u (A s p) ; G l y (P r o) ; H i s (A s n ; G l n) ; I l e (L e u ; V a l) ; L e u (I l e ; V a l) ; L y s (A r g ; G l n ; G l u) ; M e t (L e u ; I l e) ; P h e (M e t ; L e u ; T y r) ; S e r (T h r) ; T h r (S e r) ; T r p (T y r) ; T y r (T r p ; P h e) ; および V a l (I l e ; L e u)。

10

【 0 0 7 0 】

ポリペプチドが保存的アミノ酸置換（複数可）を含んでいてもよいのと同様に、それらのポリヌクレオチドも、保存的コドン置換（複数可）を含んでいてもよい。コドンの置換は、発現された際に上述のような保存的アミノ酸置換を生産するのであれば、保存的となされる。縮重コドン置換は、それによりアミノ酸置換は起こらないが、これも本発明に係るポリヌクレオチドにおいて有用である。従って、例えば本発明の実施態様において有用な選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、形質転換しようとする発現宿主細胞によって示されるコドンの使用頻度を概算するために、あるいは別の方法でそれらの発現を改善するために縮重コドン置換で突然変異されていてもよい。

20

【 0 0 7 1 】

発明の詳細な説明

当然のことながら、本発明は、本明細書で説明される特定の方法論、プロトコール、および試薬などに限定されず、そのようなものとして様々であってよい。本明細書で用いられる用語は、単に特定の実施態様を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定することは目的とせず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ定義される。

【 0 0 7 2 】

特に他の定義がない限り、本明細書で説明される抗体と関連して用いられる科学用語および専門用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに文脈中で別の要求がなされない限り、単数形用語は複数形用語を含むものとし、複数形用語は単数形用語を含むものとする。一般的に、本明細書で説明される細胞および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチド化学およびハイブリダイゼーションと関連して用いられる学術名およびそれらの技術はよく知られており、当業界において一般的に使用されている。

30

【 0 0 7 3 】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養、ならびにトランスフェクション（例えばエレクトロポレーション、リポフェクション）については標準的な技術が用いられる。酵素反応および精製技術は、製造元の明細書に従って、または当業界で一般的になされるようにして、または本明細書において説明されているようにして行われる。前述の技術および手法は、一般的には、従来当業界公知の方法に従って、様々な一般的でより具体的な、本明細書中で引用され考察されている参考文献で説明されているようにして行われ、例えば、Sambrook等、MOLECULAR CLONING : LAB. MANUAL（第3版、Cold Spring Harbor Lab. Press、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、2001）およびAusubel等、Current Protocols in Molecular Biology（New York : Greene Publishing Association/Wiley Interscience）、1993を参照されたい。本明細書で説明される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬および製薬化学と関連して用いられる学術名、ならびにそれらの実験手順および技術はよく知られているものであり、当業界において一般的に使用さ

40

50

れている。化学合成、化学分析、医薬製剤、調合物、および送達、ならびに患者の治療については標準的な技術が用いられる。

【0074】

実施例以外で、またはその他のところで指定された場合、本明細書で用いられる成分の量または反応条件を表す全ての数値は、全ての例示において用語「約」で修飾されていると理解されるものとする。

【0075】

明示された全ての特許およびその他の公報は、例えばこのような出版物で説明されている本発明と関連して使用されるかもしれない方法論を説明および開示する目的で参照により本明細書に組み入れられる。これらの公報は、本願の出願日前に開示されたために示されたにすぎない。

【0076】

本発明は、組換えモノクローナル抗体およびペプチド、ならびに診断手法などの臨床的および科学的な手法におけるそれらの使用を提供する。

【0077】

分子生物学および組換え技術の方法の出現で、組換え手段により抗体および抗体様の分子を生産することにより、本抗体のポリペプチド構造に見出される特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を生成することが可能になる。このような抗体は、前記抗体のポリペプチド鎖をコードする遺伝子配列をクローニングすることによって生産してもよいし、あるいは前記ポリペプチド鎖を直接合成し、合成された鎖を組み立てて特異的なエプーおよび抗原決定基に親和性を有する活性な四量体 (H_2L_2) 構造を形成することによって生産してもよい。このようにすれば、異なる種および源から中和抗体に特徴的な配列を有する抗体を容易に生産することが可能になる。

【0078】

抗体の源、あるいはどのようにしてそれらを組換えにより構築するか、あるいはどのようにしてそれらをインビトロまたはインビボで合成するか、トランスジェニック動物、実験レベルまたは商業的なサイズの大きい細胞培養を用いるか、トランスジェニック植物を用いるか、あるいは過程のあらゆる段階で生物を用いずに直接化学合成するかに関わらず、いずれの抗体も、類似した全体の三次元構造を有する。この構造はしばしば H_2L_2 と示され、これは、抗体は一般的に2つのアミノ酸軽 (L) 鎖および2つのアミノ酸重 (H) 鎖を含むことを意味する。いずれの鎖も、構造的に相補的な抗原性標的と相互作用することができる領域を有する。標的と相互作用する領域は「可変」または「V」領域と称され、これは、異なる抗原特異性を有する抗体とアミノ酸配列が異なっていることを特徴とする。H鎖またはL鎖のいずれかの可変領域は、抗原性の標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含む。

【0079】

用語「抗原結合領域」は、本明細書で用いられる場合、抗原と相互作用して、抗体にその抗原への特異性および親和性を付与するアミノ酸残基を含む抗体分子の部分を目指す。抗体結合領域は、抗原結合残基の適切なコンフォメーションを維持するのに必要な「フレームワーク」アミノ酸残基を含む。

【0080】

抗原結合領域を提供するH鎖またはL鎖の可変領域は、異なる特異性を有する抗体間でそれらの変異性が極端であることから、比較的短い配列が重複した「高度可変部」である。このような高度可変領域はまた、「相補性決定領域」または「CDR」領域とも称される。これらのCDR領域が、抗体において特定の抗原決定基構造に関する基本的な特異性をもたらす主要因である。

【0081】

CDRは、可変領域内のアミノ酸の非連続のストレッチを示すが、種に関係なく、可変重鎖および軽鎖領域内のこれらの重要なアミノ酸配列の位置は、可変鎖のアミノ酸配列内で類似の位置を有することが見出されている。全ての抗体の可変重鎖および軽鎖はそれぞれ

10

20

30

40

50

れ3つのCDR領域を有しており、それぞれ互いに連続していない。

【0082】

全ての哺乳動物種において、抗体ペプチドは、定常（すなわち高度に保存された）領域と可変領域とを含み、さらに後者の可変領域中に、CDRと、重鎖または軽鎖の可変領域内（ただしCDRの外側）のアミノ酸配列で構成されているいわゆる「フレームワーク領域」とが存在する。

【0083】

本抗体のCDR領域によって認識される抗原決定基に関して、これはさらに、「エピトープ」とも称される。言い換えれば、エピトープは、抗体によって認識されてそれと結合できるあらゆる分子の部分を目指す（それに相当する抗体結合領域は、パラトープと称することもある）。

【0084】

「抗原」は、抗体と結合できる分子または分子の部分であって、さらにその抗原のエピトープに結合できる抗体を生産するように動物を誘導することができる。抗原は、1種または1種より多くのエピトープを有する可能性がある。上述した特異的な反応は、抗原が、それに相当する抗体と高度に選択的な方式で反応し、その他の抗原によって誘発されたと予想されるその他の多数の抗体とは反応しないことを意味するものとする。

【0085】

用語「抗体」は、無傷の免疫グロブリン分子、加えてそれらの部分、フラグメント、ペプチド、および誘導体、例えばFab、Fab'、(Fab')₂、Fv、Fse、CDR領域、パラトープ、あるいは抗原またはエピトープと結合できる本抗体のあらゆる部分もしくはペプチド配列などを含むものとする。抗体が分子と特異的に反応して分子がその抗体に結合できる場合、抗体はその分子と「結合できる」と述べられる。

【0086】

抗体はさらに、これらに限定されないが、酵素的な切断、ペプチド合成または組換え技術などのあらゆる公知技術によって提供される、キメラ抗体、ヘテロキメラ抗体、イヌ化抗体またはネコ化抗体、加えてそれらのフラグメント、部分、領域、ペプチドまたは誘導体も含む。このような本発明の抗体は、イヌIL-31またはネコIL-31の少なくとも1種に特異的に結合できる。抗体フラグメントまたはその部分は、無傷の抗体のFcフラグメントを欠失しており、循環系からより迅速に排出される可能性があり、さらに無傷の抗体よりも非特異的な組織結合が少ない可能性がある。抗体フラグメントの例としては、当業界公知の方法を用いて、例えばパピイン（Fabフラグメントを生産するため）またはペプシン（(Fab')₂フラグメントを生産するため）などの酵素を用いたタンパク質分解的切断によって無傷の抗体から生産したものが挙げられる。例えばWahl等、24 J. Nucl. Med. 316~25（1983）を参照されたい。抗体の部分は、上記の方法のいずれかによって製造されたものでもよいし、あるいは組換え分子の部分を発現することによって製造されたものでもよい。例えば組換え抗体のCDR領域（複数可）を単離して、適切な発現ベクターにサブクローニングしてもよい。例えば米国特許第6,680,053号を参照されたい。

【0087】

クローン11E12、34D03、および19D07のヌクレオチドおよびアミノ酸配列

いくつかの実施態様において、本発明は、イヌIL-31またはネコIL-31の少なくとも1種に特異的に結合する新規のモノクローナル抗体を提供する。一実施態様において、本発明のモノクローナル抗体は、イヌIL-31またはネコIL-31に結合して、それらがIL-31受容体A（IL-31Ra）、およびオンコスタチンM特異的受容体（OsmRまたはIL-31Rb）を含むその補助受容体複合体に結合してそれらを活性化しないようにする。本発明のモノクローナル抗体は、本明細書では「11E12」、「34D03」および「19D07」と識別され、この番号は、そのハイブリドーマクローンに割り当てられた番号を意味する。本明細書において、「11E12」、「34D03」

10

20

30

40

50

、または「19D07」はまた、それぞれ11E12、34D03、または19D07抗体と結合する能力のために、11E12、34D03、または19D07と識別されたIL-31エピトープと特異的に結合するモノクローナル抗体の部分、パラトープまたはCDRも指す。本明細書で説明される11E12、34D03、および19D07の数種の組換え、キメラ、ヘテロキメラ、イヌ化および/またはネコ化した形態は、同じ名称で示されることもある。

【0088】

一実施態様において、本発明は、以下のうち少なくとも1つを含む単離された抗体またはそれらの抗原結合部位を提供する：

アミノ酸配列YYDIN(配列番号1；11E12-VH-CDR1)、SYDMS(配列番号2；19D07-VH-CDR1)、またはNYGMS(配列番号3；34D03-VH-CDR1)を有する可変重(V_H)鎖の相補性決定領域(CDR)1；

アミノ酸配列WIFPGDGGTKYNETFKG(配列番号4；11E12-VH-CDR2)、TITSGGGYTYSAHSVKG(配列番号5；19D07-VH-CDR2)、またはTISYGGSYTYYPDNIKG(配列番号6；34D03-VH-CDR2)を有する可変重鎖CDR2；

アミノ酸配列ARGGTSVIRDAMDY(配列番号7；11E12-VH-CDR3)、ARQNWVVGLAY(配列番号8；19D07-VH-CDR3)、またはVRGYGYDTMDY(配列番号9；34D03-VH-CDR3)を有する可変重鎖CDR3；および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0089】

他の実施態様において、本発明は、以下の群のうち少なくとも1つを含む単離された抗体またはそれらの抗原結合部位を提供する：

アミノ酸配列RASEVDNYGISFMH(配列番号10；11E12-VL-CDR1)、KSSQSLLNSGNQKNYLA(配列番号11；19D07-VL-CDR1)、またはKASQSVSFAGTGLMH(配列番号12；34D03-VL-CDR1)を有する相補性決定領域(CDR)1を含む可変軽(V_L)鎖；

アミノ酸配列RASNLES(配列番号13；11E12-VL-CDR2)、GASTRES(配列番号14；19D07-VL-CDR2)、またはRASNLEA(配列番号15；34D03-VL-CDR2)を有する可変軽鎖CDR2；

アミノ酸配列QQSNKDPLT(配列番号16；11E12-VL-CDR3)、QNDYSYPYT(配列番号17；19D07-VL-CDR3)、またはQQSREYPWT(配列番号18；34D03-VL-CDR3)を有する可変軽鎖CDR3；および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0090】

さらにその他の実施態様において、上述の可変軽鎖CDRの少なくとも1つを有する抗体はさらに、以下の可変重鎖CDRの少なくとも1つを含んでもよい：

アミノ酸配列YYDIN(配列番号1；11E12-VH-CDR1)、SYDMS(配列番号2；19D07-VH-CDR1)、またはNYGMS(配列番号3；34D03-VH-CDR1)を有する可変重鎖の相補性決定領域(CDR)1；

アミノ酸配列WIFPGDGGTKYNETFKG(配列番号4；11E12-VH-CDR2)、TITSGGGYTYSAHSVKG(配列番号5；19D07-VH-CDR2)、またはTISYGGSYTYYPDNIKG(配列番号6；34D03-VH-CDR2)を有する可変重鎖CDR2；

アミノ酸配列ARGGTSVIRDAMDY(配列番号7；11E12-VH-CDR3)、ARQNWVVGLAY(配列番号8；19D07-VH-CDR3)、またはV

10

20

30

40

50

R G Y G Y D T M D Y (配列番号 9 ; 3 4 D 0 3 - V H - C D R 3) を有する可変重鎖 C D R 3 ; および

C D R 1、C D R 2 または C D R 3 の少なくとも 1 つにおいて 1 つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施態様において、本抗体は、以下のうち少なくとも 1 つを含んでいてもよい：

a) D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D N Y G I S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G I P A R F S G S G S R T D F T L T I N P V E T D D V A T Y Y C Q Q S N K D P L T F G A G T K L E I K (配列番号 1 9 ; M U - 1 1 E 1 2 - V L)、D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S E S V D N Y G I S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y R A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E A D D A G V Y Y C Q Q S N K D P L T F G A G T K L E I K (配列番号 2 0 ; C A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - F W 2)、

D I V M T Q T P L S L S V S P G E P A S I S C R A S E S V D N Y G I S F M H W F Q Q K P G Q S P Q L L I Y R A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E A D D A G V Y Y C Q Q S N K D P L T F G A G T K L E I K (配列番号 2 1 ; C A N - 1 1 E 1 2 - V L - c U n - 1 3)、

D I V M S Q S P S S L S V S A G D K V T M S C K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A W Y Q Q K P W Q P P K L L I Y G A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q N D Y S Y P Y T F G G G T K L E I K (配列番号 2 2 ; M U - 1 9 D 0 7 - V L)、

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

D I L L T Q S P A S L A V S L G Q R A I I S C K A S Q S V S F A G T G L M H W Y Q Q K P G Q Q P K L L I Y R A S N L E A G V P T R F S G S G S R T D F T L N I H P V E E E D A A T Y F C Q Q S R E Y P W T F G G G T K L E I K (配列番号 2 4 ; M U - 3 4 D 0 3 - V L)、または

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

を含む可変軽鎖；

b) Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F K Y Y D I N W V R Q R P E Q G L E W I G W I F P G D G G T K Y N E T F K G K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S R L T S E D S A V Y F C A R G G T S V I R D A M D Y W G Q G T S V T V S S (配列番号 2 6 ; M U - 1 1 E 1 2 - V H)、

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K T S G Y T F K Y Y D I N W V R Q A P G A G L D W M G W I F P G D G G T K Y N E T F K G R V T L T A D T S T S T A Y M E L S S L R A G D I A V Y Y C A R G G T S V I R D A M D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 2 7 ; C A N - 1 1 E 1 2 - V H - 4 1 5 - 1)、

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q I P E K R L E W V A T I T S G G G Y T Y S A D S V K G R F T I S R D N A R N T L Y L Q M S S L R S E D T A V Y Y C A R Q N W V V G L A Y W G Q G T L V T V S A (配列番号 2 8 ; M U - 1 9 D 0 7 - V H)、

E V Q L V E S G G D L V K P G G S L R L S C V A S G F T F S S Y D M S W V R Q A P G K G L Q W V A T I T S G G G Y T Y S A D S V K G R F T I S R D N A R N T L Y L Q M N S L R S E D T A V Y Y C A R Q N W V V G L A Y W G Q G T L V T V S S (配

10

20

30

40

50

列番号 29 ; CAN - 19D07 - VH - 400 - 1)、
 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFSFSNYGMSWVRQT
 PDKRLEWVATISYGGSYTYYPDNIKGRFTISRDNKNTLY
 LQMSLSEDTAMYVCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (配
 列番号 30 ; MU - 34D03 - VH)、または
 EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYGMSWVRQA
 PGKGLQWVATISYGGSYTYYPDNIKGRFTISRDNKNTLY
 LQMNSLRAEDTAMYVCVRGYGYDTMDYWGQGTSTVTVSS (配
 列番号 31 ; CAN - 34D03 - VH - 568 - 1)

を含む可変重鎖 ; および

10

c) 1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0092】

その他の実施態様において、本発明は、上述の抗体を生産する宿主細胞を提供する。

【0093】

本発明はさらに、本発明の抗 IL - 31 抗体の軽鎖および重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列も範囲内に含む。さらに、11E12、34D03もしくは19D07またはそれらのペプチドのアミノ酸配列をコードするあらゆるヌクレオチド配列も本発明の範囲内に含まれる。

【0094】

いくつかの実施態様において、本発明は、以下のうち少なくとも1つをコードする核酸配列を含む単離された核酸を提供する：

20

アミノ酸配列 YYDIN (配列番号 1 ; 11E12 - VH - CDR1)、SYDMS (配列番号 2 ; 19D07 - VH - CDR1)、または NYGMS (配列番号 3 ; 34D03 - VH - CDR1) を有する可変重 (V_H) 鎖の相補性決定領域 (CDR) 1 ;

アミノ酸配列 WIFPGDGGTKYNETFKG (配列番号 4 ; 11E12 - VH - CDR2)、TITSGGGYTYSAHSVKG (配列番号 5 ; 19D07 - VH - CDR2)、または TISYGGSYTYYPDNIKG (配列番号 6 ; 34D03 - VH - CDR2) を有する可変重鎖 CDR2 ;

アミノ酸配列 ARGGTSVIRDAMDY (配列番号 7 ; 11E12 - VH - CDR3)、ARQNWVVGLEY (配列番号 8 ; 19D07 - VH - CDR3)、または V
 RGYGYDTMDY (配列番号 9 ; 34D03 - VH - CDR3) を有する可変重鎖 CDR3 ; および

30

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

【0095】

さらなる実施態様において、上述の単離された核酸はさらに、以下のうち少なくとも1つをコードする核酸配列を含んでいてもよい：

アミノ酸配列 RASESVDNYGISFMH (配列番号 10 ; 11E12 - VL - CDR1)、KSSQSLLNSGNQKNYLA (配列番号 11 ; 19D07 - VL - CDR1)、または KASQSVSFA GTGLMH (配列番号 12 ; 34D03 - VL - CDR1) を有する相補性決定 (CDR) 1 を含む可変軽 (V_L) 鎖 ;

40

アミノ酸配列 RASNLES (配列番号 13 ; 11E12 - VL - CDR2)、GASTRES (配列番号 14 ; 19D07 - VL - CDR2)、または RASNLEA (配列番号 15 ; 34D03 - VL - CDR2) を有する可変軽鎖 CDR2 ;

アミノ酸配列 QQSNKDPLT (配列番号 16 ; 11E12 - VL - CDR3)、QNDYSYPYT (配列番号 17 ; 19D07 - VL - CDR3)、または QQSREYPWT (配列番号 18 ; 34D03 - VL - CDR3) を有する可変軽鎖 CDR3 ; および

CDR1、CDR2またはCDR3の少なくとも1つにおいて1つまたはそれより多くの保存的アミノ酸置換を有するそれらの変異体。

50

【0096】

本発明はさらに、少なくとも1つの上述の核酸を含むベクターを提供する。

【0097】

遺伝子コードは縮重するため、特定のアミノ酸をコードするのに1つより多くのコドンが用いられる可能性がある。遺伝子コードを用いて、それぞれそのアミノ酸をコードすることが可能と予想される1つまたはそれより多くの異なるヌクレオチド配列を同定することができる。特定のオリゴヌクレオチドが、事実上XXXをコードする配列を実際に構成すると予想される確率は、通常ではない塩基対関係と、抗IL-31抗体またはその部分を発現する真核または原核細胞中で特定のコドンが実際に用いられている頻度(特定のアミノ酸をコードするために)とを考察することにより推定することができる。このような「コドン使用ルール」は、Lathe等、183 J. Molec. Biol. 1~12 (1985)で開示されている。Latheの「コドン使用ルール」を用いれば、抗IL-31配列をコードすることができる理論上「最も可能性のある」ヌクレオチド配列を含む単一のヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列群を同定することができる。

10

【0098】

本発明で使用するのに適した抗体のコード領域はさらに、本明細書で説明される抗体およびペプチドの変異体(アゴニスト)を生産する標準的な分子生物学的な技術を用いて、既存の抗体遺伝子を改変することによっても提供できるものとする。このような変異としては、これらに限定されないが、抗IL-31抗体またはペプチドのアミノ酸配列における欠失、付加、および置換が挙げられる。

20

【0099】

例えば、置換の1つのクラスは、保存的アミノ酸置換である。このような置換は、抗IL-31抗体ペプチドの所定のアミノ酸を似たような特徴を有するその他のアミノ酸で置換することである。保存的置換として、典型的には、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIleでの相互交換;ヒドロキシル残基SerとThrとの入れ替え、酸性残基AspとGluとの交換、アミド残基AsnとGlnとの置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、芳香族残基Phe、Tyr間の置き換えなどが観察される。どのアミノ酸の変更が表現型においてサイレントになる可能性が高いのかに関する指針は、Bowie等、247 Science 1306~10 (1990)で見出される。

【0100】

変異またはアゴニスト抗IL-31抗体もしくはペプチドは、完全な機能を有していてもよいし、あるいは1またはそれより多くの活性における機能がなくてもよい。完全に機能的な変異体は、典型的には、保存的な変更のみを含むか、あるいは重要ではない残基または重要ではない領域における変更を含む。機能的な変異体はまた、機能の変化を起こさないか、あるいは有意ではない変化しか起こらない類似のアミノ酸置換を含んでいてもよい。あるいはこのような置換は、ある程度、機能に正または負の影響を与える場合がある。非機能的な変異体は、典型的には、1またはそれより多くの非保存的なアミノ酸置換、欠失、挿入、転位、またはトランケーションを含むか、あるいは重要な残基または重要な領域における置換、挿入、転位、または欠失を含む。

30

【0101】

機能に必須のアミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発などの当業界公知の方法で同定することができる。Cunningham等、244 Science 1081~85 (1989)。後者の手法は、分子中の残基毎に1つのアラニン突然変異を導入するものである。続いて得られた突然変異体分子を、エピトープ結合またはインビトロでのADCC活性などの生物活性について試験する。またリガンド-受容体結合にとって重要な部位も、結晶学、核磁気共鳴、または光親和性標識などの構造解析によって決定することができる。Smith等、224 J. Mol. Biol. 899~904 (1992); de Vos等、255 Science 306~12 (1992)。

40

【0102】

さらにポリペプチドは、20種の「天然に存在する」アミノ酸以外のアミノ酸を含む場

50

合がある。さらに末端アミノ酸を含む多くのアミノ酸は、プロセシングおよびその他の翻訳後修飾などの自然の過程によって、または当業界公知の化学修飾技術によって改変されていてもよい。公知の改変としては、これらに限定されないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル、共有結合による架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解によるプロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、トランスファーRNAが介在するタンパク質へのアミノ酸付加、例えばアルギニル化、およびユビキチン化が挙げられる。

10

【0103】

このような改変は当業者によく知られており、科学文献で詳細に説明されている。いくつかの具体的な一般的な改変、例えばグリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、水酸化、およびADP-リボシル化は、Proteins--Structure and Molecular Properties (第2版、T. E. Creighton、W.H. Freeman & Co.、ニューヨーク州、1993)などのほとんどの基礎的な教本で説明されている。この主題に関して、例えばWold, Posttranslational Covalent Modification of proteins、1~12 (Johns on編、Academic Press、ニューヨーク州、1983) ; Seifter等、182 Meth. Enzymol. 626~46 (1990) ; およびRattan等、663 Ann. NY Acad. Sci. 48~62 (1992) などから多

20

【0104】

従って、本発明の抗体およびペプチドはさらに、置換されたアミノ酸残基が遺伝子コードによってコードされたアミノ酸残基ではない誘導体または類似体も包含する。

【0105】

同様に、上述したアミノ酸配列における付加および置換、加えてバリエーションおよび改変は、IL-31抗原および/もしくはエピトープまたはそれらのペプチドのアミノ酸配列にも等しく適用することができるため、本発明に包含される。上述したように、本発明に係るモノクローナル抗体をコードする遺伝子は、IL-31の認識に特に有効である。

30

【0106】

抗体誘導体

抗体誘導体も本発明の範囲内である。抗体の「誘導体」は、通常はタンパク質の一部ではない追加の化学成分を含む。共有結合によるタンパク質改変も本発明の範囲内である。このような改変は、抗体の標的のアミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応させることができる有機性の誘導体化剤と反応させることによって分子導入することができる。例えば、抗体またはフラグメントを水不溶性支持マトリックスまたはその他の高分子キャリアーに架橋するためには、当業界公知の二官能性物質での誘導体化が有用である。

【0107】

誘導体はさらに、標識された、放射性標識されたモノクローナル抗体も含む。例えば、放射性ヨウ素 (^{125}I 、 ^{131}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、インジウム (^{111}In)、トリチウム (^3H) または同種のもの；モノクローナル抗体とビオチンまたはアビジンとの結合体、加えてモノクローナル抗体と酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボン酸脱水酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼまたはグルコース6-リン酸塩デヒドロゲナーゼとの結合体；加えて、モノクローナル抗体と、生物発光物質 (例えばルシフェラーゼ)、化学発光物質 (例えばアクリジンエステル) または蛍光物質 (例えばフィコビリタンパク質) との結合体が用いられる。

40

【0108】

50

その他の本発明の二官能性抗体の誘導体は、2種の異なる抗原性基を認識する2種の別個の抗体の部分を組み合わせることによって生成した二重特異性抗体である。これは、架橋形成または組換え技術によって達成することができる。加えて、インビボでの半減期を（例えば血流から排除されるまでの時間を長くすることにより）長くするために本抗体またはそれらの部分に成分を付加してもよい。このような技術としては、例えばPEG成分の付加（ペグ化ともいう）が挙げられ、当業界公知である。米国特許出願公開第20030031671号を参照されたい。

【0109】

抗体の組換え発現

いくつかの実施態様において、対象のモノクローナル抗体をコードする核酸を宿主細胞に直接導入し、コードされた抗体の発現を誘導するのに十分な条件下で細胞をインキュベートする。対象の核酸が細胞に導入されたら、典型的には、抗体が発現されるように、通常37℃で、場合によっては選択条件下で、約1～24時間、細胞をインキュベートする。一実施態様において、本抗体は、細胞を増殖させた培地の上清に分泌される。

【0110】

従来、モノクローナル抗体は、マウスのハイブリドーマ系で天然分子として生産されてきた。この技術に加えて、本発明は、モノクローナル抗体の組換えDNA発現を提供する。これは、選択された宿主種での、イヌ化およびネコ化抗体、加えて様々な抗体誘導体および融合タンパク質の生産を可能にする。

【0111】

本発明の抗IL-31抗体、その部分またはポリペプチドのうち少なくとも1つをコードする核酸配列は、従来の技術に従ってベクターDNAで組み換えられていてもよく、このような技術は、ライゲーションのための平滑末端または食い違い末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて付着末端の埋め込み、適切なりガーゼとの望ましくない結合およびライゲーションを回避するためのアルカリホスファターゼ処理などを含む。このような操作のための技術は、例えばManiatis等、MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL, (Cold Spring Harbor Lab. Press, ニューヨーク州、1982および1989)で開示されており、上記のAusubel等、1993も、モノクローナル抗体分子またはそれらの抗原結合領域をコードする核酸配列を構築するのに用いられる可能性がある。

【0112】

DNAなどの核酸分子が、転写および翻訳調節情報を含むヌクレオチド配列を含み、このような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「機能するように連結」している場合、このような核酸分子は、そのポリペプチドを「発現することができる」と述べられる。機能できるような連結とは、抗IL-31ペプチドまたは抗体部分として回収可能な量で遺伝子が発現されるようにして、調節DNA配列と発現させようとするDNA配列とが繋がっている連結である。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、同様の分野でよく知られているように生物によって様々であってよい。例えば上記のSambrook等、2001；上記のAusubel等、1993を参照されたい。

【0113】

従って本発明は、原核細胞または真核細胞のいずれかにおける抗IL-31抗体またはペプチドの発現を包含する。適切な宿主としては、インビボまたはインサイチュのいずれかでの細菌、酵母、昆虫、菌類、鳥類、および哺乳動物細胞などの細菌もしくは真核性の宿主、または哺乳動物、昆虫、鳥類もしくは酵母由来の宿主細胞が挙げられる。哺乳動物細胞または組織は、ヒト、霊長類、ハムスター、ウサギ、げっ歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌまたはネコ由来であってもよく、さらにその他のあらゆる哺乳動物細胞も使用できる。

【0114】

一実施態様において、導入されたヌクレオチド配列は、受容宿主中で自律増殖できるプラスミドまたはウイルスベクターに取り込まれると予想される。この目的のために多種多様のベクターを用いることができる。例えば上記のAusubel等、1993を参照されたい。特

10

20

30

40

50

定のプラスミドまたはウイルスベクターを選択する際の重要な要素としては、ベクターを含むレシピエント細胞を認識して、ベクターを含まないレシピエント細胞から容易に選択されること；特定の宿主で望ましいベクターのコピー数；および異なる種の宿主細胞間でベクターが「行き来」できることが望ましいかが挙げられる。

【 0 1 1 5 】

当業界でよく知られている原核性ベクターの例としては、大腸菌で複製が可能なプラスミド（例えば p B R 3 2 2、C o l E 1、p S C 1 0 1、p A C Y C 1 8 4、. p i . V X）などのプラスミドが挙げられる。このようなプラスミドは、例えば Maniatis 等、1989、上記；Ausubel 等、1993、上記で開示されている。パチルスプラスミドとしては、p C 1 9 4、p C 2 2 1、p T 1 2 7 などが挙げられる。このようなプラスミドは、Gryczan により、THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307~329（Academic Press、ニューヨーク州、1982）で開示されている。適切なストレプトマイセスプラスミドとしては、p I J 1 0 1（Kendall 等、169 J. Bacteriol. 4177~83（1987））、およびストレプトマイセスバクテリオファージ、例えば . p h i . C 3 1（Chater 等、SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45~54（Akademiai Kaido、ブダペスト、ハンガリー、1986））が挙げられる。シュードモナスプラスミドは、John 等、8 Rev. Infect. Dis. 693~704（1986）；Izaki、33 Jpn. J. Bacteriol. 729~42（1978）；および Ausubel 等、1993、上記に総論されている。

10

【 0 1 1 6 】

あるいは、抗 I L - 3 1 抗体またはペプチドをコードする c D N A の発現に有用な遺伝子発現の要素としては、これらに限定されないが、（ a ）ウイルス転写プロモーターおよびそれらのエンハンサー要素、例えば S V 4 0 初期プロモーター（Okayama 等、3 Mol. Cell Biol. 280（1983））、ラウス肉腫ウイルス L T R（Gorman 等、79 Proc. Natl. Acad. Sci.、USA 6777（1982））、ならびにモロニーマウス白血病ウイルス L T R（Grosschedl 等、41 Cell 885（1985））；（ b ）スプライス領域およびポリアデニル化部位、例えば S V 4 0 後期領域から誘導されたスプライス領域およびポリアデニル化部位（Okayama 等、1983）、ならびに（ c ）ポリアデニル化部位、例えば S V 4 0 におけるポリアデニル化部位（Okayama 等、1983）が挙げられる。

20

【 0 1 1 7 】

免疫グロブリン c D N A 遺伝子は、Weidle 等、51 Gene 21（1987）によって説明されているようにして、発現要素として S V 4 0 初期プロモーターおよびそのエンハンサー、マウス免疫グロブリン H 鎖プロモーターのエンハンサー、S V 4 0 後期領域の m R N A スプライシング、ウサギ S - グロビン介在配列、免疫グロブリン、およびウサギ S - グロビンポリアデニル化部位、および S V 4 0 ポリアデニル化要素を用いて発現することができる。

30

【 0 1 1 8 】

部分的な c D N A、部分的なゲノム D N A で構成される免疫グロブリン遺伝子の場合（Whittle 等、1 Protein Engin. 499（1987））、転写プロモーターは、ヒトサイトメガロウイルスであってもよく、プロモーターエンハンサーは、サイトメガロウイルスおよびマウス/ヒト免疫グロブリンであってもよく、m R N A スプライシングおよびポリアデニル化領域は、天然の染色体の免疫グロブリン配列であってもよい。

40

【 0 1 1 9 】

一実施態様において、げっ歯類細胞における c D N A 遺伝子の発現の場合、転写プロモーターは、ウイルス L T R 配列であり、転写プロモーターのエンハンサーは、マウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーおよびウイルス L T R エンハンサーのいずれかまたはその両方であり、スプライス領域は、31 bp よりも大きいイントロンを含み、ポリアデニル化および転写終結領域は、合成される免疫グロブリン鎖に相当する天然の染色体の配列から誘導される。その他の実施態様において、その他のタンパク質をコードする c D N A 配列は、哺乳動物細胞でタンパク質発現を達成するために、上記で列挙された発現要素と組み合わせられる。

50

【 0 1 2 0 】

融合した遺伝子をそれぞれ発現ベクター中で組み立ててもよいし、あるいは発現ベクターに挿入してもよい。次にキメラ免疫グロブリン鎖の遺伝子産物を発現することができるレシピエント細胞は、抗 I L - 3 1 ペプチドまたはキメラ H またはキメラ L 鎖をコードする遺伝子単独でトランスフェクションされるか、あるいはキメラ H とキメラ L 鎖遺伝子とでコトランスフェクションされる。トランスフェクションされたレシピエント細胞を、組み込まれた遺伝子が発現されるような条件下で培養し、培養物から発現された免疫グロブリン鎖または無傷の抗体もしくはフラグメントを回収する。

【 0 1 2 1 】

一実施態様において、抗 I L - 3 1 ペプチドもしくはキメラ H 鎖および L 鎖またはそれらの部分をコードする融合遺伝子は、後でレシピエント細胞にコトランスフェクションするのに用いられる別個の発現ベクター中で組み立てられる。あるいはキメラ H 鎖および L 鎖をコードする融合遺伝子は、同じ発現ベクター中で組み立てられる。

10

【 0 1 2 2 】

発現ベクターのトランスフェクションおよびキメラ抗体の生産のために、レシピエント細胞系は骨髄腫細胞であってもよい。骨髄腫細胞は、トランスフェクションされた免疫グロブリン遺伝子によってコードされた免疫グロブリンを合成し、組み立てて、分泌することができ、免疫グロブリンをグリコシル化するメカニズムを有する。骨髄腫細胞は、培養液中で、またはマウスの腹膜内で増殖させることができ、腹膜内で分泌された免疫グロブリンは、腹水から得ることができる。その他の適切なレシピエント細胞としては、リンパ

20

【 0 1 2 3 】

本発明のキメラ、イヌ化もしくはネコ化抗体コンストラクト、または抗 I L - 3 1 ポリペプチドを有する発現ベクターは、様々な適切な手段のいずれかによって適切な宿主細胞に導入することができ、このような手段としては、形質転換、トランスフェクション、共役、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム - 沈殿、およびジエチルアミノエチル (D E A E) デキストランなどのポリカチオンの適用などの生化学的な手段、およびエレクトロポレーション、直接的なマイクロインジェクション、および微粒子銃などの機械的な手段が挙げられる。Johnston等、240 Science 1538 (1988)。

30

【 0 1 2 4 】

酵母は、免疫グロブリン H 鎖および L 鎖の生産に関して、細菌に優るかなりの利点を提供することができる。酵母は、グリコシル化などの翻訳後ペプチド修飾を行う。現在、酵母での望ましいタンパク質の生産に使用することができる強いプロモーター配列および高コピー数プラスミドを利用する多数の組換え D N A 法がある。酵母は、クローニングした哺乳動物の遺伝子産物のリーダー配列を認識し、リーダー配列を有するペプチド (すなわちプレペプチド) を分泌する。Hitzman等、11th Int ' l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (モンペリエ、フランス、1982)。

【 0 1 2 5 】

酵母の遺伝子発現系は、抗 I L - 3 1 ペプチド、抗体、ならびに組み立てられたマウス、およびキメラ、ヘテロキメラ、イヌ化またはネコ化抗体、それらのフラグメントおよび領域の生産、分泌、ならびに安定性のレベルについて機械的作業で評価することができる。酵母をグルコース豊富な培地で増殖させると大量に生産される糖分解酵素をコードする、活発に発現される遺伝子からのプロモーターおよび終結要素を取り入れた一連の酵母遺伝子発現系のいずれかを利用することができる。さらに公知の解糖系遺伝子も、極めて効率的な転写コントロールシグナルを供給することができる。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ (P G K) 遺伝子のプロモーターおよびターミネーターシグナルを利用することができる。酵母中でクローニングした免疫グロブリンの c D N A を発現させるのに最適な発現プラスミドを評価するために、多数のアプローチを採用することができる。Vol. 11 DNA Cloning、45 ~ 66、(Glover 編) IRL Press、オックスフォード、英国、1985) を参

40

50

照されたい。

【0126】

本発明で説明されている抗体分子またはペプチドを生産するための宿主として菌株も利用することができる。これらの細菌の宿主と共に、宿主細胞に適合する種から誘導されるレプリコンおよび制御配列を含むプラスミドベクターが用いられる。このようなベクターは、複製部位、加えて形質転換細胞において表現型の選択を可能にする特定の遺伝子を有する。細菌中で、クローニングした免疫グロブリンのcDNAによってコードされた、マウス、キメラ、ヘテロキメラ、イヌ化またはネコ化抗体、フラグメント、および領域または抗体鎖を生産するための発現プラスミドを評価するのに、多数のアプローチを採用することができる (Glover、1985、上記; Ausubel、1993、上記; Sambrook、2001、上記; Colligan等編、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク (1994~2001); Colligan等編、Current Protocols in Protein Science、John Wiley & Sons、ニューヨーク州ニューヨーク (1997~2001) を参照)。

10

【0127】

宿主の哺乳動物細胞は、インビトロまたはインビボで増殖させてもよい。哺乳動物細胞では、免疫グロブリンのタンパク質分子に、リーダーペプチドの除去、H鎖およびL鎖のフォールディングおよび組立、抗体分子のグリコシル化、および機能的な抗体タンパク質の分泌などの翻訳後修飾が行われる。

【0128】

抗体タンパク質を生産するための宿主として有用な可能性がある哺乳動物細胞としては、上述のリンパ球由来細胞に加えて、線維芽細胞由来細胞、例えばVerob (ATCC CRL 81) またはCHO-K1 (ATCC CRL 61) 細胞が挙げられる。

20

【0129】

哺乳動物細胞におけるクローニングした抗IL-31ペプチドのH鎖およびL鎖遺伝子の発現に多くのベクター系を利用することができる (上記のGlover、1985を参照)。様々なアプローチによって完全なH₂L₂抗体を得ることができる。細胞内で完全な四量体H₂L₂抗体および/または抗IL-31ペプチドにH鎖およびL鎖が結合および連結できるように、同じ細胞中でH鎖およびL鎖を共に発現することが可能である。このような共発現は、同じ宿主で同一または異なるプラスミドのいずれかを用いることによって起こる可能性がある。H鎖およびL鎖の両方および/または抗IL-31ペプチドに関する遺伝子を同じプラスミドに配置して、細胞にトランスフェクションすることにより、両方の鎖を発現する細胞を直接的に選択することもできる。あるいは、細胞をまず一方の鎖、例えばL鎖をコードするプラスミドでトランスフェクションし、続いて得られた細胞系を第二の選択マーカーを含むH鎖プラスミドでトランスフェクションしてもよい。いずれかの経路を介して抗IL-31ペプチドおよび/またはH₂L₂分子を生産する細胞系は、強化された特性 (例えば組み立てられたH₂L₂抗体分子のより高い生産) を有する、またはトランスフェクションされた細胞系において強化された安定性を有する細胞系を生成するために、追加の選択マーカーと共にペプチド、H鎖、L鎖、またはH鎖およびL鎖の追加のコピーをコードするプラスミドでトランスフェクションすることもできる。

30

【0130】

長期にわたる組換え抗体の高収量の生産のために、安定な発現が用いられる可能性がある。例えば抗体分子を安定して発現する細胞系を加工してもよい。ウイルスの複製起源を含む発現ベクターを用いるのではなく、宿主細胞は、免疫グロブリン発現カセットおよび選択マーカーで形質転換してもよい。外来DNAを導入した後、加工された細胞を強化培地中で1~2日増殖させ、その後、選択培地で交換した。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、さらに細胞が安定してプラスミドを染色体に統合させて、増殖により増殖巣が形成されるようにすることができ、その後クローニングして細胞系に発展させることが可能である。このような加工された細胞系は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する化合物/要素のスクリーニングおよび評価において特に有用な場合がある。

40

50

【0131】

本発明の抗体が生産されたら、本発明の抗体は、当業界公知のあらゆる免疫グロブリン分子の精製方法によって、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、具体的には、プロテイン A およびサイズ除去カラムクロマトグラフィー後の特異的な抗原への親和性）、遠心分離、溶解度差 (differential solubility)、またはその他のあらゆる標準的なタンパク質精製技術によって精製することができる。多くの実施態様において、抗体は、細胞から培地に分泌され、培地から回収される。

【0132】

医薬用途

本発明の抗 IL - 31 抗体またはペプチドは、例えばイヌおよびネコなどのコンパニオンアニマルにおける掻痒性および/またはアレルギー状態の治療に使用することができる。より具体的には、本発明はさらに、医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤、および活性成分として本発明に係る抗体またはペプチドを含む医薬組成物を提供する。本抗体は、本発明に係るキメラ、ヘテロキメラ、イヌ化またはネコ化抗体であってもよい。無傷の免疫グロブリンまたはそれらの結合フラグメント、例えば Fab も想定される。本発明の抗体およびそれらの医薬組成物は、非経口投与、例えば皮下、筋肉内または静脈内投与するのに有用である。

10

【0133】

本発明の抗 IL - 31 抗体および/またはペプチドは、個別の治療剤として用途してもよいし、あるいは他の治療剤と組み合わせて投与してもよい。これらは単独で投与することができるが、一般的には選択された投与経路および標準的な製薬上の実施に基づき選択された製剤用キャリアーと共に投与される。

20

【0134】

本明細書において開示された抗体の投与は、あらゆる適切な手段によって、例えば非経口的な注射（例えば腹腔内、皮下または筋肉内注射）、経口的に、または気道表面への本抗体（典型的には医薬製剤中に包含される）の局所投与によって行うことができる。気道表面への局所投与は、鼻腔内投与（例えばドロPPER、綿棒、または吸入器の使用による）によって行うことができる。本抗体の気道表面への局所投与はまた、吸入による投与によって行うこともでき、例えば、吸入に適した本抗体を含む医薬製剤粒子（固体粒子および液体粒子の両方がある）をエアロゾル懸濁液として形成し、この吸入に適した粒子を被検体に吸入させることによって行うこともできる。吸入に適した医薬製剤粒子を投与するための方法および器具はよく知られており、あらゆる従来の技術を用いることができる。経口投与は、例えば摂取しやすい液体または固形製剤の形態でなされてもよい。

30

【0135】

いくつかの望ましい実施態様において、本抗体は、非経口的な注射によって投与される。非経口投与の場合、抗 IL - 31 抗体またはペプチドは、医薬的に許容される非経口用の基剤と共に、溶液、懸濁液、エマルジョンまたは凍結乾燥粉末として製剤化することができる。このような基剤は、例えば、水性キャリアーなどの許容できるキャリアー中に溶解した本抗体またはそれらのカクテルの溶液であってもよく、このような基剤としては、水、塩類溶液、リンゲル液、デキストロース溶液、トレハロースもしくはスクロース溶液、または 5% 血清アルブミン、0.4% 塩類溶液、0.3% グリシンなどが挙げられる。またリポソームおよび不揮発性油などの非水性基剤も用いることができる。これらの溶液は滅菌されており、一般的には微粒子状の物質を含まない。これらの組成物は、従来のよく知られている滅菌技術によって滅菌してもよい。本組成物は、生理学的条件を所定値に近づけるのに必要な医薬的に許容される補助剤を含んでいてもよく、このような補助剤は、pH 調節剤および緩衝剤、毒性を調整する物質などであり、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどがある。これらの調合物中の抗体の濃度は、広範囲に様々であってもよく、例えば約 0.5 質量% 未満、通常は約 1 質量%、または少なくとも約 1 質量% から最大 15 質量% または 20 質量% であり、このような濃度は、主として流体の体積、粘度などに基づき、選択された具体的な投与様

40

50

式に従って選択されると予想される。基剤または凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（例えば塩化ナトリウム、マンニトール）、ならびに化学的安定性を維持する添加剤（例えば緩衝剤、および保存剤）を含んでいてもよい。調合物は、一般的に使用される技術によって滅菌される。

【0136】

非経投与可能な組成物を製造する実際の方法は、公知であるか、あるいは当業者にとっては明白であると予想されるが、例えばREMINGTON'S PHARMA. SCI.（第15版、Mack Pub. Co.、ペンシルバニア州イーストン、1980）でより詳細に説明されている。

【0137】

本発明の抗体は、貯蔵のために凍結乾燥して、使用前に適切なキャリアーで再溶解することができる。この技術は、従来の免疫グロブリンで有効であることが示されている。あらゆる適切な凍結乾燥および再溶解技術を用いることができる。当業者であれば理解しているものと思われるが、凍結乾燥および再溶解は程度の差はあるが抗体活性を損失させる可能性があるため、それを補うために使用レベルを調節する必要がある。

10

【0138】

本発明の抗体またはそれらのカクテルを含む組成物は、すでに罹患した疾患の再発予防および/または治療的処置のために投与することができる。適切な製剤用キャリアーは、この分野の標準的な参考書であるREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCESの最新版で説明されている。

【0139】

治療用途において、組成物は、すでに疾患に罹患した被検体に、疾患およびその合併症を治癒させる、または少なくとも部分的に停止または緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療上有効な用量」または「治療有効量」と定義される。このような使用に有効な量は、疾患の重症度、および被検体自身の免疫系の全身状態によって決まると予想されるが、一般的には抗体約0.1 mg/kg体重～抗体約10 mg/kg体重の範囲であり、好ましくは抗体約0.3 mg/kg体重～抗体約5 mg/kg体重の範囲である。異質な物質を最小化して、本発明のイヌ様およびネコ様抗体によって生じる「外来物質」による拒絶反応が起こる確率を低くすることを考慮して、これらの抗体を実質的に過量で投与することも可能である。

20

【0140】

当然ながら、投与量は、特定の物質の薬力学的な特徴、ならびにその投与様式および経路；レシピエントの年齢、健康状態、および体重；症状の性質および程度、併用療法の種類、治療の頻度、ならびに所望の効果などの公知の要因に応じて様々であると予想される。

30

【0141】

非限定的な例として、イヌまたはネコにおけるIL-31関連の病理の治療は、本発明の抗IL-31抗体を上述の用量範囲で2週間に1回または月1回の投与により行うことができる。

【0142】

イヌまたはネコの治療用途のための抗体の例は、有力なインビボでの抗IL-31活性を有する、高親和性を有する（高い結合活性も有する）本発明に係る抗体、ならびにそれらのフラグメント、領域、および誘導体である。

40

【0143】

本組成物の1回または複数回の投与は、治療を行う獣医師によって選択される用量レベルおよびパターンを用いて行うことができる。いずれの場合においても、医薬製剤は、被検体を効果的に治療するのに十分な量の本発明の抗体（複数可）を供給するものと予想される。

【0144】

診断用途

本発明はまた、掻痒性および/またはアレルギー状態を有することがわかっている、また

50

はその疑いのあるコンパニオンアニマルにおいてIL-31を検出する診断方法に使用するための上記の抗IL-31抗体およびペプチドも提供する。

【0145】

本発明の抗IL-31抗体および/またはペプチドは、サンプル中のIL-31または抗IL-31抗体を検出または定量するイムノアッセイに有用である。IL-31のためのイムノアッセイは、典型的には、IL-31に選択的に結合できる検出可能に標識された高親和性（または高結合活性）を有する本発明の抗IL-31抗体またはポリペプチドの存在下で、臨床サンプルまたは生体サンプルをインキュベートすること、およびサンプル中で結合した標識されたペプチドまたは抗体を検出することを含む。様々な臨床的な分析手法が当業界公知である。例えば、IMMUNOASSAYS FOR THE 80'S (Voller等編、Univ. Park、1981)を参照されたい。このようなサンプルとしては、組織生検、血液、血清、および糞サンプル、または被検動物から回収され、以下で説明されているようにしてELISA解析で処理された液体が挙げられる。

10

【0146】

いくつかの実施態様において、抗原の抗体への結合は、固体支持体を使用しないで検出される。例えば、抗原の抗体への結合は、液状で検出が可能である。

【0147】

その他の実施態様において、抗IL-31抗体またはポリペプチドは、例えば細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定できるニトロセルロースまたはその他の固体支持体に固定できる。次に支持体を適切な緩衝液で洗浄し、続いて検出可能に標識されたIL-31特異的ペプチドまたは抗体で処理する。次に固相支持体を緩衝液で2回洗浄して、未結合のペプチドまたは抗体を除去することができる。次に固体支持体に結合した標識の量を公知の方法の工程により検出することができる。

20

【0148】

「固相支持体」または「キャリアー」は、ペプチド、抗原または抗体と結合できるあらゆる支持体を指す。よく知られた支持体またはキャリアーとしては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびに磁鉄鉱が挙げられる。キャリアーの性質は、本発明の目的に応じてある程度の可溶性を有していてもよいし、または不溶性でもよい。支持体の材料は、カップリングされる分子がIL-31または抗IL-31抗体に結合できるのであれば、実質的にどのような可能性のある構造的な形状を有していてもよい。従って、支持体の形状は、ビーズのような球状であってもよいし、または試験管の内部表面もしくはロッドの外表面のような円柱形であってもよい。あるいは、表面は、シート、培養皿、試験ストリップ等のように平坦であってもよい。例えば、支持体としては、ポリスチレンビーズが挙げられる。当業者であれば、抗体、ペプチドまたは抗原と結合させるためのその他多くの適切なキャリアーについて認識しているか、あるいは慣例的な実験によってそれらを確認することもできる。

30

【0149】

よく知られている方法工程により、所定の多くの抗IL-31ペプチドおよび/または抗体の結合活性を決定することができる。当業者であれば、慣例的な実験によって、効果的で最適な分析条件を決定することができる。

40

【0150】

IL-31特異的ペプチドおよび/または抗体の検出可能な標識付けは、酵素免疫検査法(EIA)または酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)に使用するための酵素を連結させることによって達成することができる。連結された酵素が露出した基質と反応して、例えば分光光度、蛍光または可視的な手段によって検出可能な化学成分を生成する。本発明のIL-31特異的抗体を検出可能に標識するのに用いることができる酵素としては、これらに限定されないが、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファ-グリセロリン

50

酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。

【0151】

IL-31 特異的抗体を放射性によって標識付けすることにより、ラジオイムノアッセイ (RIA) を使用して IL-31 を検出することが可能である。Work等、LAB. TECHNIQUES & BIOCHEM. 1N MOLEC. Bio. (No. Holland Pub. Co., ニューヨーク州、1978) を参照されたい。放射性同位体は、ガンマカウンター、またはシンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィーの使用などの手段によって検出できる。本発明の目的に特に有用な同位体としては、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、および ^{125}I が挙げられる。

10

【0152】

また IL-31 特異的抗体を蛍光化合物で標識することも可能である。蛍光標識された抗体が適切な波長の光に晒されると、蛍光によってその存在を検出することができる。最も一般的に使用される蛍光標識化合物のなかでも特に、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレサミンが挙げられる。

【0153】

また IL-31 特異的抗体は、 ^{125}Eu またはランタニド系列の金属などの蛍光を放出する金属を用いても検出可能に標識することができる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属キレート基を用いて IL-31 特異的抗体に取り付けることができる。

20

【0154】

また IL-31 特異的抗体は、化学発光化合物にカップリングすることによっても検出可能に標識することができる。続いて化学発光によって標識された抗体の存在は、化学反応中に発生した発光の存在を検出することによって決定される。有用な化学発光によって標識付けする化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマトリック (theromatic) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルである。

30

【0155】

同様に、生物発光化合物も、本発明の IL-31 特異的抗体、部分、フラグメント、ポリペプチド、または誘導体を標識するのに用いることができる。生物発光とは、触媒タンパク質によって化学発光反応の効率が高められる生物系において見出される化学発光の一種である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識付けの目的で重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

【0156】

IL-31 特異的抗体、部分、フラグメント、ポリペプチド、または誘導体の検出は、例えば検出可能な標識が放射性ガンマ放出体である場合はシンチレーションカウンターで、または例えば標識が蛍光物質である場合は蛍光測定器で達成することができる。酵素標識のケースにおいて、検出は、その酵素の基質を用いる比色法によって達成することができる。また検出は、同様に調製された標準と比べた基質の酵素反応の程度の視覚的な比較によっても達成することができる。

40

【0157】

本発明の目的について、上記の分析で検出される IL-31 は、生体サンプル中に存在していてもよい。IL-31 を含むあらゆるサンプルを用いることができる。例えばサンプルは、例えば例えば血液、血清、リンパ液、尿、便、炎症性滲出液、髄液、羊水、組織抽出物またはホモジネートなどの生体液である。本発明は、これらのサンプルを用いた分

50

析のみに限定されず、本発明の観点から、当業者であればその他のサンプルを使用できるような適切な条件を決定することも可能である。

【0158】

インサイチュでの検出は、被検動物から組織標本を採取して、このような標本に本発明の標識された抗体の組み合わせを供給することによって達成することができる。標識された抗体（または部分）を生体サンプルに塗布するか、または生体サンプル上に載せることによって、本抗体（またはそれらの部分）を供給してもよい。このような手順を用いて、試験された組織中のIL-31の存在だけでなくIL-31の分布も決定することが可能である。当業者であれば容易に理解できるものと思われるが、本発明を用いる際、このようなインサイチュでの検出を達成するために多種多様の組織学的方法（例えば染色手順）はいずれも改変することができる。

10

【0159】

本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体は、「二部位（two-site）」または「サンドイッチ」分析としても知られているイムノメトリック分析での使用に適用することができる。典型的なイムノメトリック分析では、所定量の非標識抗体（または抗体フラグメント）を、試験される流体中で不溶性の固体支持体に結合させ、所定量の検出可能に標識された可溶性の抗体を添加することにより、固相抗体、抗原、および標識された抗体で形成された三元複合系の検出および/または定量化が可能になる。

【0160】

本抗体を用いて、サンプル中のIL-31を定量的または定性的に検出したり、あるいはIL-31を発現する細胞の存在を検出したりすることができる。これは、蛍光標識された抗体（以下参照）を用いる免疫蛍光法の技術と、蛍光顕微鏡検査法、フローサイトメトリーまたは蛍光による検出とを併用することによって達成することができる。診断目的では、本抗体は、標識されていてもよいし、または標識されていなくてもよい。非標識抗体は、イヌまたはネコ免疫グロブリンの定常領域に特異的な抗体などの本抗体と反応性を有するその他の標識抗体（二次抗体）と組み合わせて用いることができる。あるいは、本抗体は、直接標識されていてもよい。多種多様の標識を用いることができ、このような標識としては、例えば、放射性核種、蛍光物質、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）などが挙げられる。多数のタイプのイムノアッセイ、例えば以前に考察されたイムノアッセイなどが利用可能であり、当業者によく知られている。

20

30

【0161】

一実施態様において、IL-31を検出するための診断方法は、ラテラルフローイムノアッセイ試験である。またこれは、免疫クロマトグラフィー分析、ラピッドイムノミグレーション（Rapid ImmunoMigration）（RIMTM）またはストリップ試験としても知られている。ラテラルフローイムノアッセイは、実質的に、試験ストリップの様式に合わせて単一の軸に沿って稼働するように適合させたイムノアッセイである。この技術の多数のバリエーションが市販品に開発されてきたが、これらはいずれも同じ基本原理に従って稼働する。典型的な試験ストリップは、以下の構成要素からなる：（1）サンプルパッド - 試験サンプルを載せる吸収パッド；（2）結合体または試薬パッド - これは、着色された粒子（通常はコロイド金粒子またはラテックスマイクロスフェア）に結合した標的分析物に特異的な抗体を含む；（3）反応膜 - 典型的には、疎水性ニトロセルロースまたは酢酸セルロース膜であって、その上に捕獲ゾーンまたは試験ラインとして抗標的分析物である抗体が膜全体に列になって固定される（また結合抗体に特異的な抗体を含むコントロールゾーンが存在していてもよい）；および（4）ガーゼ芯（wick）または廃棄物の貯蔵容器 - 毛管現象によって反応膜全体からサンプルを吸い出してそれを回収するように設計されたさらなる吸収パッド。ストリップの構成要素は、通常は不活性な裏張り材に固定されており、簡単なディップスティックの様式で存在していてもよいし、あるいは捕獲を表示するサンプルポートおよび反応ウィンドウ、ならびにコントロールゾーンと共にプラスチックの包装材料内に存在していてもよい。

40

【0162】

50

微生物学的試験に用いられるラテラルフロー免疫アッセイには、2つの主要なタイプ、すなわち二重抗体サンドイッチ分析と競合分析とがある。二重抗体サンドイッチ様式では、サンプルは、サンプルパッドから結合体パッドを通して移動し、そこで存在するあらゆる標的分析物が、結合体に結合すると予想される。次にサンプルは膜を通して移動し続け、捕獲ゾーンに到達し、そこで標的/結合体複合体が固定された抗体に結合して膜上に目に見えるラインを形成すると予想される。次にサンプルはストリップに沿ってコントロールゾーンに到達するまでさらに移動し、コントロールゾーンでは、過量の結合体が結合して膜上に第二の目に見えるラインを形成すると予想される。このコントロールラインは、サンプルが目的通りに膜を通して移動したことを示す。膜上の2本の明確なラインは、結果が陽性であることを示す。コントロールゾーン中の1本のみラインは、結果が陰性であることを示す。競合分析は、結合体パッドが、予め標的分析物またはその類似体に結合している抗体を含むという点で二重抗体サンドイッチ様式とは異なる。サンプル中に標的分析物が存在する場合、標的分析物は結合体とは結合せず、従って、標的分析物は標識されないままになると予想される。サンプルが膜に沿って移動して、捕獲ゾーンに到達すると、過量の非標識分析物が固定された抗体と結合して、結合体の捕獲をブロックし、目に見えるラインが形成されないようになると予想される。次に未結合の結合体がコントロールゾーンで本抗体に結合して、目に見えるコントロールラインを形成すると予想される。膜上の1本のみコントロールラインは、結果が陽性であることを示す。捕獲およびコントロールゾーン中の2本の目に見えるラインは、結果が陰性であることを示す。しかしながら、過量の非標識標的分析物が存在しない場合、捕獲ゾーンで薄いラインが形成される可能性があり、これは、結果が決定的ではないことを示す。ラテラルフロー技術には多数のバリエーションがある。膜上の捕獲ゾーンは、抗体の代わりに(標的分析物に応じて)固定化した抗原または酵素を含んでいてもよい。また複数の捕獲ゾーンを用いてマルチプレックス試験を作成することも可能である。例えば、EHEC志賀毒素ST1およびST2の両方を同じサンプル中で別々に検出できる市販の試験ストリップが開発されている。

【0163】

重要なことに、本発明の抗体は、イヌまたはネコにおける掻痒および/またはアレルギーを診断することにおいて有用である可能性がある。より具体的には、本発明の抗体は、コンパニオンアニマルにおけるIL-31の過剰発現を確認することが可能である。従って、本発明の抗体は、重要な免疫組織化学ツールを提供する可能性がある。

【0164】

本発明の抗体は、遺伝子発現プロファイルを測定するのに極めて適切な抗体アレイに用いることができる。

【0165】

キット

本発明の方法を実施するためのキットも本発明の範囲内である。本キットは、少なくとも1種またはそれより多くの本発明の抗体、それをコードする核酸、またはそれを含む細胞を含む。一実施態様において、本発明の抗体は、通常は凍結乾燥した形態で容器中に供給されていてもよい。本抗体は、標識または毒素に結合していてもよいし、あるいは結合していなくてもよく、本抗体は、典型的には、トリス、リン酸塩、炭酸塩などの緩衝剤、安定剤、殺生剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミンまたは同種のものと共に本キット中に含まれる。一般的に、これらの材料は、活性な抗体の量に基づき5質量%未満で存在すると予想され、通常は、この場合は抗体濃度に基づき、少なくとも約0.001質量%の総量で存在する。活性成分を希釈するために不活性な増量剤または賦形剤を含むことが望ましいことが多く、このような場合、賦形剤は、組成物総量の約1質量%~99質量%で存在していてもよい。分析に一次抗体に結合できる二次抗体が用いられる場合、このような二次抗体は、通常は別個のバイアル中に存在すると予想される。二次抗体は典型的には標識と結合しており、上述の抗体の製剤化と類似した方法で製剤化される。本キットはさらに、一般的には、一連の使用説明書も含むと予想される。

【0166】

一実施態様において、本発明に係るキットは、サンプル中のイヌまたはネコIL-31タンパク質を検出するのに有用な試験ストリップキット（ラテラルフロー免疫アッセイキット）である。このような試験ストリップは、典型的には、試験サンプルを載せるサンプルパッド；イヌまたはネコIL-31特異的抗体を含む結合体または試薬パッド（ここで抗体が着色された粒子（通常はコロイド金粒子）に結合する）；捕獲ゾーンまたは試験ラインとして抗IL-31抗体が膜全体に列になって固定される反応膜（また結合抗体に特異的な抗体を含むコントロールゾーンが存在していてもよい）；および毛管現象によって反応膜全体からサンプルを吸い出してそれを回収するように設計されたさらなる吸収パッドを含むと予想される。試験ストリップキットはさらに、一般的に、使用のための指示書も含むと予想される。

10

【0167】

以下、非限定的な実施例により本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0168】

実施例1 イヌインターロイキン31（IL-31）を認識するマウスモノクローナル抗体の同定

クロモス・エース（CHROMOS ACE）（人工染色体発現（Artificial Chromosome Expression）システム（クロモス・モレキュラー・システムズ社（Chromos Molecular Systems, Inc.）、ブリティッシュコロンビア州バーナビー）を用いて、CHO細胞で組換えイヌIL-31を作製し、配列番号32で示される配列を有する分泌されたイヌIL-31タンパク質を生成した。このタンパク質は、配列番号33で示されるヌクレオチド配列によってコードされる。400mlの細胞培養（CHO細胞系）からの調整培地を得て、10倍量のQA緩衝液（20mMのpH8.0のトリス、20mMのNaCl）に対して4.5時間透析した。透析した培地を0.2μmでろ過し、QA緩衝液で前もって平衡化したSOURCE（商標）Qカラム（GEヘルスケア（GE Healthcare）、ウプサラ、スウェーデン）に1ml/分でローディングした。多段階の直線的濃度勾配を用いてタンパク質を溶出させた。IL-31の大半が素通り（FT）分画中に残り、濃度勾配の初期で少量のIL-31が溶出した。タンパク質の同一性を、トリプシン消化物のウェスタン免疫ブロッティングおよび質量スペクトル（MS）解析によって前もって確認した。FT分画中のタンパク質を4~5倍に濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して4で一晩透析した。PBSに透析した後、タンパク質の安定性をチェックした。4で数日経った後、沈殿は観察されず、タンパク質分解も観察されなかった。N-グリコシダーゼFを用いた脱グリコシル化実験により、タンパク質が濃縮されてSDS-PAGEで約15kDaの単一のバンドを得た。標準としてウシ血清アルブミン（BSA）を用いたピシンコニン酸分析（BCA分析）（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社（ThermoFisher Scientific, Inc.）、イリノイ州ロックフォード）を用いてタンパク質濃度を決定した。タンパク質溶液をアリコートに分け、急速冷凍し（液体N₂）、-80で保存した。

20

30

【0169】

CHO細胞で生産された組換えイヌIL-31による雌CF-1マウスの標準的な免疫化を用いて、マウスモノクローナル抗体を同定した。酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）を用いて免疫化されたマウスからの力価を決定した。イヌIL-31（50ng/ウェル）をポリスチレンマイクロプレートに固定し、捕獲抗原として用いた。0.05%トウイン（tween）-20を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBST）で免疫化されたマウスからの血清を希釈した。マウス抗イヌIL-31抗体の存在を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）結合ヤギ抗マウス二次抗体（キルケガー&ペリー・ラボラトリーズ社（Kirkegard & Perry Laboratories, Inc.）（KPL, Inc.）、メリーランド州ゲイザースバーグ）で検出した。発色性基質（シュアブルー・リザーブTMB1-コンポーネント・マイクロウェル・ペルオキシダーゼ基質（SureBlue Reserve TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate）、KPL社、メリーランド州ゲイザースバーグ）を添加

40

50

し、室温 (RT) で 10 分インキュベートした後、100 μ L の 0.1 N の HCl を添加して反応を止めた。各ウェルの吸光度を 450 nm の光学密度 (OD) で決定した。図 6 に、イヌ IL-31 で免疫化された個々のマウスの抗体反応を要約する。マウス 3 および 4 からのドナー脾細胞のプールを融合に使用した。融合し、ダイレクト ELISA で抗 IL-31 結合に関してスクリーニングした後、増殖および抗 IL-31 活性の二次スクリーニングのために 100 ウェルを選択した。二次スクリーニングにより、81 種の融合体が抗 IL-31 抗体を生産する能力を保持していたことが確認された。これらの 81 種の候補からの凍結細胞ストックおよび上清をさらなる評価のために保存した。

【0170】

阻害活性を有する候補を同定するために、81 種の上清全てを、細胞ベースの分析において IL-31 介在 pSTAT シグナル伝達に影響を与えるそれらの能力について評価した。この細胞ベースの分析では、10 ng/mL のイヌガンマインターフェロン (R&D システムズ (R&D Systems)、ミネソタ州ミネアポリス) で 24 時間前処理し、IL-31 受容体発現を高めるために IL-31 処理前に 2 時間血清欠乏状態にした イヌ DH-82 単球細胞で、pSTAT シグナル伝達を測定した。この前処理の後、組換えイヌ IL-31 を 1 μ g/mL で 5 分間添加し、アルファ・スクリーン (Alpha Screen) 技術 (パーキン・エルマー (Perkin Elmer)、マサチューセッツ州ウォルサム) を用いて STAT リン酸化を評価した。ハイブリドーマ上清中の抗体濃度および純度はわからないため、1:2 または 1:20 の上清希釈率を用いて 1 μ g/mL の IL-31 と共に 1 時間インキュベートした後、これらの上清を、STAT リン酸化を阻害する能力に関して定性的に測定した。この実験により、未処理のウェルと比較して STAT リン酸化の 50% より多くが阻害された 31 種の上清を同定し、続いて精製してさらに特徴付けした。

【0171】

各モノクローナル抗体 (mAb) を精製して定量した後、31 種の抗体全ての IC₅₀ 値を DH-82 細胞分析で評価した。エピトープビン (epitope bin) に基づく抗体クラスを定義するための得られた IC₅₀ 値および競合 ELISA に基づき、表 1 に記載された 3 種の抗体、11E12、19D07、および 34D03 をさらなる特徴付けのために選んで研究を進めた。

【0172】

【表 1】

表 1

抗体	HC アイソタイプ	LC アイソタイプ
11E12	G1/2b	カッパ
19D07	2b	カッパ
34D03	G1	カッパ

【0173】

実施例 2 11E12、19D07、および 34D03 抗体をコードする DNA 配列リボ核酸 (RNA) を、Rn イージー (Rneasy) - ミニキット (キアゲン社 (Qiagen, Inc.))、メリーランド州ジャーマンタウン) を製造元が説明しているようにして用いて、ハイブリドーマ細胞 11E12、19D07、および 34D03 から単離した。各ハイブリドーマからの 1000,000 個の凍結細胞を遠心分離で回収し、RNA を、プロトコールで説明されている方法に従って Rn イージー・スピンカラムを用いて細胞溶解産物から精製した。RNA を各カラムから溶出させ、即座に定量および cDNA 調製に使用した。ジーンクワント・プロ (GeneQuant pro) 分光光度計 (GE ヘルスケア (GE Healthcare)、ウプサラ、スウェーデン) を用いて RNA の吸光度を 260 nm および 280 nm で測定することによって、RNA の収量および純度を解析した。単離後、残存した RNA をさらなる使用のために -80 で保存した。

【0174】

マウス免疫グロブリン (Ig) 可変ドメインを増幅するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを製造元の説明書 (EMD ケミカルズ社 (EMDCHEMICALS, Inc.))、ニュ

10

20

30

40

50

ージャー州ギブスタウン)に従って使用した。サーモスクリプトRTキット(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)を用いた逆転写(RT)によって、製造元の説明書に従って全ハイブリドーマRNAからcDNAを調製した。3'のIg定常領域プライマーを含む個々の反応チューブに、各ハイブリドーマからの200~400ngのRNAを添加した。3'の定常Igプライマーは可変Ig領域の近位に位置しており、マウス抗体の可変領域を含む第一の鎖のcDNAを転写すると予想される。各ハイブリドーマRNAについて、それぞれ3'定常重鎖および3'定常カッパ軽鎖プライマーを用いてRT反応を行った。

【0175】

各ハイブリドーマからのcDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でテンプレートとして使用して、配列決定のために可変IgG重鎖およびカッパ軽鎖cDNAを増幅した。マウスIg可変ドメインのシグナル配列コード領域にアニールするように設計された縮重5'プライマーまたはプライマープールを用いて各PCRで複数回の反応を行った。マウス可変重鎖および可変軽鎖領域を増幅するための縮重プライマーまたはプライマープールを用いて別のPCR反応を行った(図7)。エキスパンドハイフィディリティ(Expand High Fidelity)DNAポリメラーゼキット(ロシュ・ダイアグノスティクス社(Roche Diagnostics Corp.)、インディアナ州インディアナポリス)を製造元のプロトコールに従って用いて1μlのcDNA反応液でPCRを行った。PCRの熱サイクルパラメーターは以下の通りとした; 94 で2分、35サイクル(94 で15秒、55 で30秒、72 で1分)、72 で7分。PCRで増幅したフラグメントを1%アガロースゲルでのゲル電気泳動により分離し、キアゲンのゲル抽出キット(キアゲン社、メリーランド州ジャーマンタウン)を用いて精製した。pUC19プラスミドへのクローニングを容易にするために、重鎖および軽鎖可変領域のためのフォワードプライマーに、EcoRIまたはSalI(ニューイングランドバイオラボ(NEB)社(New England Biolabs (NEB), Inc.)、マサチューセッツ州イプスウィッチ)部位を入れ、逆の重鎖および軽鎖可変に、HindIII(NEB社、マサチューセッツ州イプスウィッチ)を入れた。精製したPCRフラグメントおよびpUC19プラスミドを上記の制限エンドヌクレアーゼで37 で1~2時間消化した。消化後、PCRフラグメントを、キアクイック(Qiagquick)PCRクリーンアップキット(キアゲン社、メリーランド州ジャーマンタウン)を用いて精製した。消化したプラスミドを1%アガロースゲルでのゲル電気泳動により分離し、キアゲンのゲル抽出キットを用いて精製した。可変IgG重鎖およびカッパ軽鎖DNAを含む精製したPCRフラグメントを、T4DNAリガーゼおよびライゲーション緩衝液(NEB社、マサチューセッツ州イプスウィッチ)を用いて4 で一晩、pUC19プラスミドにライゲーションした。3μlの各ライゲーション反応液を使用して、大腸菌TOP10細胞(インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド)を形質転換した。

【0176】

プラスミドを、キアゲンのミニプレップキット(キアゲン27106)を製造元のプロトコールに従って用いて各ハイブリドーマの可変領域を含む陽性クローンから単離した。M13フォワードおよびリバースプライマーを使用して、クローニングされたインサートそれぞれについて、DNA配列をビッグダイ(BigDye)シーケンス反応(ライフ・テクノロジーズ社(Life Technologies Corp.)に属するアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)、カリフォルニア州カールスバッド)を製造元のプロトコールに従って用いて増幅した。シーケンス反応物を、96ウェルの精製キット(ザイモ・リサーチ(Zymo Research)、カリフォルニア州アーバイン)を製造元のプロトコールに従って用いて精製した。サンプルをABI-3730キャピラリーシーケンサーにローディングし、得られた配列のトレースを、シーケンチャー(Sequencher)(ジーンコード(GeneCodes)バージョン4.2)を用いて完全なオープンリーディングフレームの存在について解析した。各抗体で決定されたマウス抗イヌIL-31可変配列は以下の通りである: 11E12可変軽鎖(配列番号19で示されるMU-11E12-VL、それに対応する配列番号

10

20

30

40

50

34で示されるヌクレオチド配列)、11E12可変重鎖(配列番号26で示されるMU-11E12-VH、それに対応する配列番号35で示されるヌクレオチド配列)、19D07可変軽鎖(配列番号22で示されるMU-19D07-VL、それに対応する配列番号36で示されるヌクレオチド配列)、19D07可変重鎖(配列番号28で示されるMU-19D07-VH、それに対応する配列番号37で示されるヌクレオチド配列)、34D03可変軽鎖(配列番号24で示されるMU-34D03-VL、それに対応する配列番号38で示されるヌクレオチド配列)、および34D03可変重鎖(配列番号30で示されるMU-34D03-VH、それに対応する配列番号39で示されるヌクレオチド配列)。

【0177】

10

各抗体の可変重鎖および軽鎖から誘導されたcDNA配列の有効性を確認するために、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)のモデル494の気相プロテインシーケンサーでエドマン分解を用いて、精製したmAbタンパク質のN末端の配列解析を行った。以下の表2に、抗体11E12および34D03の可変軽鎖配列、ならびに34D03の可変重鎖配列についての証明を記載する。cDNA配列の翻訳により誘導された抗体11E12の可変重鎖のN末端アミノ酸は、グルタミンと決定された。グルタミンは、タンパク質のアミノ末端残基として、自発的に環化してエドマン分解による配列決定を阻害するピログルタミン酸になる可能性がある(Chelius等、Anal Chem. 2006 78(7): 2370~6)。

【0178】

20

【表2】

表2*		
可変軽鎖		
抗体	翻訳されたcDNA配列	N末端配列
11E12	DIVLT	DIVLT
19D07	DIVMS	試験されず
34D03	DILLT	DILLT
可変重鎖		
抗体	翻訳されたcDNA配列	N末端配列
11E12	QVQLQ	ブロック
19D07	EVKLV	試験されず
34D03	EVQLV	EVQLV

30

*表2において、「DIVLT」は、配列番号19の残基1~5に相当し、「DIVMS」は、配列番号22の残基1~5に相当し、「DILLT」は、配列番号24の残基1~5に相当し、「QVQLQ」は、配列番号26の残基1~5に相当し、「EVKLV」は、配列番号28の残基1~5に相当し、「EVQLV」は、配列番号30の残基1~5に相当する。

【0179】

実施例3 11E12、19D07、および34D03キメラ抗体の構築

上述したように、抗体は、2つのヘテロ二量体タンパク質が対になったホモ二量体で構成される。ヘテロ二量体の各タンパク質鎖(1つの重鎖および1つの軽鎖)は、可変ドメインおよび定常ドメインからなる。各可変ドメインは、抗原結合に寄与する3つの相補性決定領域(CDR)を含む。CDRは、可変ドメイン中でフレームワーク領域により分けられており、本抗体への結合部位の適切な空間的な場を提供する足場を提供する。まとめると、CDRおよびフレームワーク領域は、抗体と同種の抗原に結合する抗体の能力に寄与する(図2)。

40

【0180】

さらに上述したように、キメラ抗体は、イヌIgG分子の重鎖および軽鎖定常領域それぞれにグラフト化された、(上記の配列解析から決定されたような)マウス抗体からの可変配列(CDRおよびフレームワークの両方)からなる(図3)。可変ドメインは抗原結合に関与するため、完全マウス可変ドメインのイヌ定常領域へのグラフトは、IL-31免疫原と結合する本抗体の能力にわずかしが作用しないか、あるいはまったく作用しないと予想される。

50

【 0 1 8 1 】

重鎖および軽鎖可変領域の正しい配列が同定されたことを確認して、同時に同質の組換え物質を生産するために、哺乳動物発現系でキメラ抗体を生産する発現ベクターを作製した。フォワードおよびリバースプライマーを設計して、ハイブリドーマ11E12、19D07、および34D03から誘導された抗体配列のマウス重鎖および軽鎖可変領域を増幅した。哺乳動物細胞系からの組換え抗体の発現および分泌を容易にするために、各フォワードプライマーに特有の制限エンドヌクレアーゼ部位、コザックコンセンサス配列、および分泌リーダー配列を入れた。各リバースプライマーを設計して、それぞれの可変重鎖および軽鎖を増幅し、クローニングを容易にするために特有の制限部位を入れた。各反応のテンプレートとしてクローニングしたハイブリドーマ可変鎖抗体のDNAを用いて、PCRを行って各重鎖および軽鎖を増幅した。各PCR産物を、それぞれGenBank受託番号AF354264またはAF354265、およびXP_532962からの配列に基づき、イヌIgG重鎖（本明細書ではHC-64またはHC-65と称される）または軽鎖（本明細書ではカッパと称される）定常領域のいずれかを含む哺乳動物発現プラスミドにクローニングした。HC-64のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号40および41で示される。HC-65のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号42および43で示される。カッパのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号44および45で示される。CMVプロモーターの制御下に各重鎖および軽鎖をコードするプラスミドを、標準的なリポフェクトアミン法を用いてHEK293細胞にコトランスフェクションした。6日間発現させた後、キメラmAbを、標準的なタンパク質精製方法に従ってMabSelect SuRe（MabSelect SuRe）プロテインA樹脂（GEヘルスケア（GE Healthcare）、ウプサラ、スウェーデン）を用いて30mlの一時的にトランスフェクションしたHEK293FS細胞の上清から精製した。溶出した分画をプールし、公称で10,000MWカットオフのナノセップ・オメガ（Nanosep Omega）遠心装置（ポール社（Pall Corp.）、ニューヨーク州ポートワシントン）を用いて約500μlに濃縮し、pH7.2の1xPBS中で4で一晩透析し、さらなる使用のために4で保存した。

【 0 1 8 2 】

キメライヌIgGの発現を、天然条件および変性条件下でSDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS PAGE）を用いて評価した。各トランスフェクションからのモノクローナル抗体（mAb）を、SDS MES泳動緩衝液を製造元（インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド）のプロトコールに従って用いて4~12%のピストリスゲルで分離した。電気泳動後、タンパク質をシンブリーブルー（Simply Blue）クーマシー染色（インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド）で可視化して、適切な対形成が起こったことを確認し、粗生成物のタンパク質の均一性に関する評価を得た。組換えmAbがイヌIL-31と結合する能力を保持しているかどうかを評価するために、ウェスタンブロットによって、イヌIL-31と結合するmAbの能力を評価した。タンパク質標準および組換えイヌIL-31（800ng）を、インビトロジェンのiブロット（iBlot）装置（インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド）を用いてニトロセルロースメンブレンに移したSDS PAGEで解析した。移した後、メンブレンを蒸留した脱イオン水で洗浄し、0.05%トゥイーン-20（PBST）を含むリン酸緩衝生理食塩水中の5%脱脂粉乳（NFDM）で室温（RT）で1時間ブロックした。ブロックした後、メンブレンをPBST中で洗浄し、一過性の発現から得られた上清を希釈したしたもの、または精製したキメラ抗体のいずれかと共にインキュベートした。キメラ抗体の結合を、ヤギ抗イヌIgG抗体ペルオキシダーゼ結合体（ベチル・ラボラトリーズ社（Bethyl Laboratories Inc.）、テキサス州モンゴメリ、またはロックランド・イムノケミカルズ社（Rockland, Immunochemicals, Inc.）、ペンシルベニア州ギルバーツビル）を、PBST中で1:5000の希釈率で室温で1時間用いて評価した。ブロットにTMB基質を添加した後、IL-31結合の確認を、イヌIL-31のグリコシル化された形態に相当する比色バンド（見かけの分子量は15kDa）の存在によって決定した（K

10

20

30

40

50

PL社、メリーランド州ゲイザースバーグ)。

【0183】

ウェスタンブロットによってHEK293細胞からの発現と組換えイヌIL-31免疫原への結合を示すキメラmAbを親和性および官能性についてさらに解析した。候補mAbがIL-31と結合する親和性を特徴付けるために、表面プラズモン共鳴(SPR)を、ピアコア(Biacore)のシステム(ピアコア・ライフサイエンス(Biacore Life Sciences)(GEヘルスケア)、ウプサラ、スウェーデン)を用いて評価した。抗体を表面に固定する際に起こる可能性がある差異のある表面処理に関連する親和性の差を回避するために、IL-31を直接表面に結合させる方法を用いた。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)/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)の化学的方法を用いて5μg/mLのIL-31にアミンをカップリングすることによって固定を達成した。チップをエタノールアミンでクエンチし、全ての候補mAbが固定されたIL-31に結合する親和性を評価した。全ての曲線を1:1モデルにフィッティングした。E-11未満の親和性は、機器の検出の定量限界の下限よりも下である。

10

【0184】

また2種の独立した様式での細胞ベースの分析において、全ての候補mAbは、IL-31シグナル伝達を阻害するそれらの能力についても評価された。コインキュベーションの様式で、mAb:IL-31の複合体を1時間プレインキュベートして、細胞添加の前に確実に複合体を形成した。mAb同士をよりよく識別できるように、コインキュベートせずにmAbを細胞に5分で直接添加し、続いてIL-31を添加するという第二のセットの実験を行った。いずれのケースでもIL-31の刺激は5分で行われた。以下の表3で概説されるように、マウスモノクローナル11E12、19D07、および34D03のイヌキメラ形態への変換は、それらのIL-31と結合する能力または細胞介在シグナル伝達を阻害する能力にまったく影響を与えなかった。この結果から、各マウスハイブリドーマから正しい可変重鎖および可変軽鎖配列が誘導されたことも実証される。

20

【0185】

【表3】

表3

抗体	DH82のpSTAT分析		ピアコア親和性 K _D (M)
	コインキュベーション	前処理	
	IC ₅₀ μg/ml	IC ₅₀ μg/ml	
マウス11E12	1.61	2.28	8.93E-13
キメラ11E12	1.48	1.57	2.68E-13
マウス19D07	1.76	3.46	7.24E-12
*キメラ19D07	1.92	1.33	5.15E-13
マウス34D03	1.73	2.28	1.01E-12
*キメラ34D03	1.28	1.08	4.65E-12

30

*キメラ11E12-重鎖について、MU-11E12-VHはHC-64と対になっており、軽鎖について、MU-11E12-VLはカップと対になっていた。

*キメラ19D07-重鎖について、MU-19D07-VHはHC-64と対になっており、軽鎖について、MU-19D07-VLはカップと対になっていた。

*キメラ34D03-重鎖について、MU-34D03-VHはHC-64と対になっており、軽鎖について、MU-34D03-VLはカップと対になっていた。

40

【0186】

実施例4 キメラmAbのインビボでの評価

DH-82分析で観察されたIL-31介在細胞シグナル伝達の阻害が、イヌにおけるIL-31介在の掻痒の阻害と互いに関係があることを確認するために、IL-31イヌ掻痒モデルで、表3で上述したキメラ11E12モノクローナル抗体(キメラ11E12-64)を評価した。このモデルにおいて、イヌIL-31は、1~1.5μg/kgの用量で静脈内(IV)投与されると、一貫した掻痒性応答の迅速な開始をもたらし、この応答は2時間の観察期間にわたり定量できる。掻痒性応答を評価するために、イヌを1つの畜舎に入れ、ビデオ監視を用いて掻痒性活性の測定を行った。1時間以上の順応時間の後、リアルタイムのビデオ監視を用いて基準の掻痒スコアを、分類的なスコアリングシステ

50

ムを用いてイヌごとに決定した。具体的に言えば、連続1分のインターバル中に、各イヌで搔痒行動が提示されたかどうかに関して「はい/いいえ」の決定をなすことであった。指示されたタイムインターバル中に「はい」の応答が引き出されるのは、脚、わき腹、および/または肛門領域をなめる/噛む、脇腹、頸部を引っ掻く、および/または床に擦り付ける (flooring)、頭を振る、ならびにケージの床で臀部を擦り付ける動作などの搔痒行動が十分に示された場合であった。この期間の終了時に「はい」の決定の数を足して、累積的な搔痒スコアインデックス (P S I) とした。搔痒スコアを動物ごとに2回決定し、そのうち1回目の測定は、被験物質の処理期間の開始直前の30分に測定され、これを基準スコアとした。計画された観察期間それぞれが終わった後、イヌを通常の居住場所に戻した。

10

【0187】

キメラ11E12-64の皮下 (S C) 投与はIL-31介在の搔痒を阻害できるかどうかを評価するために、処理グループとプラセボグループ (N = 4 / グループ) との両方を用いた予備試験 (76A03) を行った。この試験では、8匹のイヌ全てにおいて基準の応答が達成され、イヌをランダムにグループ分けし、それらのP S Iに基づき飼育した。各グループは、2匹の高い応答を示すもの (P S I > 55)、および2匹の中程度の応答を示すもの (P S I = 30 ~ 55) からなることが重要である。続いて7日目に、これらのイヌにキメラ11E12-64を投与し、8、14、および22日目にIL-31で攻撃した。図8にこの試験の結果を示す。これらの結果から、キメラ11E12-64で処理した動物の場合、キメラ11E12-64の投与により、8および14日目の平均P S Iが1日目と比べて75%よりも大きく減少したことが実証される。これは、未処理の動物の場合ではP S Iスコアが37~51%増加したと対照的である。P S Iは、m A b処理後2週間で基準値に戻り、これは、0.3 mg / k gの用量を投与した場合の有効性の持続時間は1~2週間であることを示唆している。

20

【0188】

P S Iを評価する際、イヌの搔痒行動が日によってばらばらであることが特に難題である。このばらつきを制御を助けるために、IL-31での攻撃前に毎日、イヌごとに30分の基準P S Iを決定した。図9に、この試験 (76A60) に登録されたそれぞれのイヌの搔痒スコアを示す。図9のデータは、キメラ11E12-64で処理したグループにおいて、8日目および14日目の基準P S Iは、IL-31攻撃後のおよそ25%であったことを説明する。基準の観察期間 (0.5時間) がIL-31後の観察期間 (2時間) の25%であることから、この観察は、IL-31に関連する搔痒を完全に阻害したことに等しい。総合すると、これらのインビボのデータから、1) キメラ11E12モノクローナルは、イヌにおいて搔痒を誘発するIL-31の能力を中和する可能性があること、2) 細胞ベースの分析におけるIL-31介在シグナル伝達の阻害は、インビボでの有効性と互いに関係があること、および3) このようなm A b評価のためのIL-31モデルを利用するのに必要なパラメーターは、他の候補抗体の評価のために確立されることといった極めて強い証拠が得られる。

30

【0189】

実施例5 イヌ化の方法

抗薬物抗体 (A D A) の発生は、モノクローナル抗体を含むあらゆる生物学的治療用タンパク質にとって有効性の損失に関連している。文献での総合的な評価では、免疫原性の完全ヒトm A bおよび非免疫原性キメラm A bの例を見出すことができるが、モノクローナル抗体の種分化はm A bの免疫原性になる傾向を低減させる可能性があることが示されている。本明細書で示されたマウス抗IL-31モノクローナル抗体においてA D A形成に関連するリスクの軽減を補助するために、イヌ化の方法が用いられた。このイヌ化の方法は、C D Rグラフィティングにとって最適なイヌの生殖細胞系の抗体の配列を同定することに基づく (図4)。あらゆる利用可能なイヌの生殖細胞系の配列を重鎖および軽鎖の両方について広範囲にわたり解析した後、それらのマウスm A bに対する相同性に基づいて生殖細胞系の候補を選択し、前駆マウスm A bからのC D Rを使用して天然のイヌC D Rを

40

50

置換した。その目的は、インピボにおける免疫原性の発生可能性を最小化するために、完全なイヌフレームワークを用いて高親和性および細胞ベースの活性を保持することであった。イヌ化mAbを発現させ、ウェスタンブロットティングによってIL-31と結合するそれらの能力について特徴付けた。実施例8でこれらの結果について説明する。イヌ化後にIL-31と結合する能力を保持していたmAbだけをさらなる特徴付けのために採用した。IL-31と結合する能力を失ったmAbを系統的に分析して、1)機能の喪失に關与する鎖、2)機能の喪失に關与するフレームワーク、および3)失われた機能に關与するアミノ酸(複数可)を確認した。

【0190】

実施例6 11E12、19D07、および34D03抗体のイヌ化

mAbの11E12、19D07、および34D03のイヌ化可変重鎖および軽鎖を含む合成ヌクレオチドコンストラクトを作製した。イヌ重鎖またはカッパ定常領域それぞれを含むプラスミドに各可変鎖をサブクローニングした後、プラスミドを、HEK293細胞で抗体を発現させるために共にトランスフェクションした。まとめると、mAbの19D07および34D03はいずれも、イヌ化してもIL-31結合を保持していた。各抗体で決定されたイヌ化抗イヌIL-31可変配列は、以下に示す通り、すなわち19D07の可変軽鎖(配列番号23で示されるCAN-19D07-VL-998-1、それに対応する配列番号46で示されるヌクレオチド配列)、19D07可変重鎖(配列番号29で示されるCAN-19D07-VH-400-1、それに対応する配列番号47で示されるヌクレオチド配列)、34D03の可変軽鎖(配列番号25で示されるCAN-34D03-VL-998-1、それに対応する配列番号48で示されるヌクレオチド配列)、および34D03可変重鎖(配列番号31で示されるCAN-34D03-VH-568-1、それに対応する配列番号49で示されるヌクレオチド配列)である。

【0191】

それに対して、11E12のイヌ化の試みに用いられた生殖細胞系の配列は、ある種の機能しないmAbを生じた。図10を参照すると、mAbの11E12のキメラ、ヘテロキメラ、およびイヌ化バージョンを発現させ、ウェスタンブロットティングによりイヌIL-31と結合するそれらの能力に關して特徴付けた。これらの結果から、イヌ化11E12抗体はイヌIL-31と結合しなかった(プロット番号2)ことが実証された。また、ヘテロキメラに關しても、イヌ化軽鎖と対のキメラ重鎖は、IL-31と結合しなかったが(プロット番号3)、キメラ軽鎖と対のイヌ化重鎖は、IL-31との結合活性を保持した(プロット番号4)。ヘテロキメラから得られた結果によれば、イヌ化軽鎖は活性の損失に關与すると推測された。

【0192】

11E12のイヌ化バージョンのイヌIL-31への結合を回復させる目的で、フレームワーク配列を交換することによりイヌ化軽鎖を改変した。図11に、11E12軽鎖フレームワークの置換作業の概説を示す。この作業により、イヌフレームワークII(FWII)をマウスフレームワークIIで交換し、イヌIL-31への結合を回復させた抗体(11E12可変軽鎖(配列番号20で示されるCAN-11E12-VL-cUn-FW2、それに対応する配列番号50で示されるヌクレオチド配列)、11E12可変重鎖(配列番号27で示されるCAN-11E12-VH-415-1、それに対応する配列番号51で示されるヌクレオチド配列))を確認した。

【0193】

これらの逆突然変異をさらに改良して、フレームワークIIにおいて1つのアルギニンをロイシンに逆突然変異(R50L)させた抗体を同定し、これは、ウェスタンブロット解析によりIL-31結合を回復させることができた(11E12可変軽鎖(配列番号21で示されるCAN-11E12-VL-cUn-13、それに対応する配列番号52で示されるヌクレオチド配列)、11E12可変重鎖(配列番号27で示されるCAN-11E12-VH-415-1))(図12)。可能性のある候補それぞれの「イヌ化」バージョンが確認されたら、さらなる評価のためにmAbを精製し、PBSに対して透析し

10

20

30

40

50

た。

【 0 1 9 4 】

表 4 に、親和性測定および細胞ベースの阻害データの両方の結果を要約する。これらのデータから、1 1 E 1 2 および 3 4 D 3 両方のイヌ化誘導体はいずれも、細胞ベースの分析において優れた阻害活性を保持し、さらにピアコアで測定されたように I L - 3 1 に対する親和性を保持していることが実証される。さらに注目すべきことに、元のイヌ化 1 9 D 7 分子はピアコアで測定されたような優れた効力を保持するが、細胞ベースの I L - 3 1 シグナル伝達を阻害する能力は、そのマウス前駆体と比べて機能が低下するようであるということが観察された。m A b をそれらのマウスアイソタイプからイヌ誘導体に変換すると、親和性の損失はわずかであるかまったくない。

10

【 0 1 9 5 】

【表 4】

表 4

抗体	DH82 pSTAT 分析		ピアコア親和性 KD (M)
	コインキュベーション	前処理	
	IC ₅₀ μg/ml	IC ₅₀ μg/ml	
マウス 11E12	1.61	2.28	8.93E-13
イヌ化 HE12	活性なし	活性なし	5.06E-07
11E12 ヘテロキメラ	2.67	3.35	4.97E-12
イヌ化 11E12FW2	2.7	5.31	1.47E-10
イヌ化 11E12 13	5.49	5.18	5.16E-12
マウス 19D07	1.76	3.46	7.24E-12
イヌ化 19D07	曲線の範囲内	曲線の範囲内	9.23E-10
マウス 34D03	1.73	2.28	1.01E-12
イヌ化 34D03	2.42	2.25	2.91E-11

20

抗体	可変鎖	
	重鎖	軽鎖
イヌ化 11E12	CAN-11E12-VH-415-1	CAN-11E12-VL-cUn-1
11E12 ヘテロキメラ	CAN-11E12-VH-415-1	キメラ 11E12
イヌ化 11E12FW2	CAN-11E12-VH-415-1	CAN-11E12-VL-cUn-FW2
イヌ化 11E12 13	CAN-11E12-VH-415-1	CAN-11E12-VL-cUn-13
イヌ化 19D07	CAN-19D07-VH-400-1	CAN-19D07-VL-998-1
イヌ化 34D03	CAN-34D03-VH-568-1	CAN-34D03-VL-998-1

重鎖:11E12 のイヌ化およびヘテロキメラの形態は全て、CAN-11E12-VH-415-1 の V_H 配列 (配列番号 27) および HC-64 と名付けられた定常領域 (配列番号 40) で構成され; イヌ化 19D07 は、CAN-19D07-VH-400-1 の V_H 配列 (配列番号 29) および HC-64 で構成され; イヌ化 34D03 は、CAN-34D03-VH-568-1 の V_H 配列 (配列番号 31) および HC-64 で構成された。

軽鎖:イヌ化 11E12 は、CAN-11E12-VL-cUn-1 の V_L 配列 (配列番号 53) およびカッパと名付けられた定常領域 (配列番号 44) で構成され;ヘテロキメラ 11E12 は、MU-11E12-VL の V_L 配列 (配列番号 19) およびカッパで構成され;イヌ化 11E12FW2 は、CAN-11E12-VL-cUn-FW2 の V_L 配列 (配列番号 20) およびカッパで構成され;イヌ化 11E1213 は、CAN-11E12-VL-cUn-13 の V_L 配列 (配列番号 21) およびカッパで構成され;イヌ化 19D07 は、CAN-19D07-VL-998-1 の V_L 配列 (配列番号 23) およびカッパで構成され;イヌ化 34D03 は、CAN-34D03-VL-998-1 の V_L 配列 (配列番号 25) およびカッパで構成された。

30

【 0 1 9 6 】

実施例 7 抗体 1 1 E 1 2 および 3 4 D 0 3 に結合するイヌ I L - 3 1 の特徴付け

イヌ I L - 3 1 の抗体 1 1 E 1 2 および 3 4 D 0 3 への結合に關与するアミノ酸残基を決定するために、1) I L - 3 1 タンパク質の N および C 末端の両方をトランケートすること、および 2) m A b 結合への影響を決定するために個々のアミノ酸をアラニンで置換すること (アラニンスキャニング) を含む突然変異による方法を使用した。P C R プライマーを設計して、大腸菌宿主で発現させるためにコドンが最適化されたイヌ I L - 3 1 遺伝子を増幅した。この大腸菌で発現させるためにコドンが最適化されたイヌ I L - 3 1 全長コンストラクトの配列は、配列番号 5 5 で示され、それに対応するヌクレオチド配列は配列番号 5 6 で示される。プライマーを設計して全長遺伝子を増幅し、タンパク質の N および C 末端から内側に向かって 2 0 個のアミノ酸をトランケートした。これらの N 末端トラ

40

50

ンケーションの目的のために、コドン最適化コンストラクト中のN末端の6 - H i s タグ直後のグリシン残基を第1位とした。P C R 増幅産物を p E T 1 0 1 D (インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド) に製造元のプロトコールに従ってクローニングした。p E T 1 0 1 D プラスミドは、組換えタンパク質を、発現を確認するためのN末端の6 - H i s エピトープタグに融合することができる。配列が確認されたプラスミドを使用して、B L 2 1 S t a r T O P 1 0 大腸菌細胞 (インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド) を形質転換し、標準的な培養条件下で1 m M イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (I P T G) を用いて組換えタンパク質の発現を誘導した。誘導後、細胞をペレット化し、細菌タンパク質の抽出試薬 (B a c t e r i a l P r o t e i n E x t r a c t i o n R e a g e n t s) (略称は B - P E R、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、イリノイ州ロックフォード) を用いて溶解させた。粗生成物の溶解産物を S D S - P A G E で処理し、上述したようにウェスタンブロットティングを行った。必要な精製抗体および試薬が入手できるため、突然変異解析のために全てのウェスタンブロットティングを 1 1 E 1 2 および 3 4 D 0 3 のマウスバージョンを用いて行った。全長およびトランケートされた I L - 3 1 を示す粗タンパク質溶解産物のプロットと結合する能力に関して各抗体を試験した。また各タンパク質の発現を確認するために、コントロールプロットも抗 H i s m A b で探索した。N末端がトランケートされた (- 2 0 N、 - 4 0 N、および - 6 0 N) タンパク質はいずれも、大腸菌において強健な発現を示し、1 1 E 1 2 および 3 4 D 0 3 に結合することができた (図 1 3)。 - 2 0 N コンストラクトに相当するアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 5 7 および 5 8 である。 - 4 0 N コンストラクトに相当するアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 5 9 および 6 0 である。 - 6 0 N コンストラクトに相当するアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 6 1 および 6 2 である。しかしながら、C末端がトランケートされた全長 I L - 3 1 およびタンパク質 (- 2 0 C、 - 4 0 C、および - 6 0 C) は、これらの条件下で発現されなかった。

【 0 1 9 7 】

全長 I L - 3 1 タンパク質の発現は極めて不十分であったことが観察された。しかしながら、N末端から最初の20個のアミノ酸が除去された (- 2 0 N) コンストラクトは、強健な発現を示した。抗体 1 1 E 1 2 および 3 4 D 0 3 はいずれも - 2 0 N タンパク質に結合した。それゆえに、この - 2 0 N コンストラクトを用いてさらなる試験を行った。2 0 ~ 1 2 2 位でC末端がトランケートされたコンストラクト (分子量 1 5 . 3、h i s タグを含む)、2 0 ~ 1 0 0 位でC末端がトランケートされたコンストラクト (分子量 1 2 . 9、h i s タグを含む)、および 2 0 ~ 8 0 位でC末端がトランケートされたコンストラクト (分子量 1 0 . 4、h i s タグを含む) を作製して、I L - 3 1 タンパク質におけるこれらの領域に結合する m A b を評価した。2 0 ~ 1 2 2 コンストラクトに相当するアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 6 3 および 6 4 である。2 0 ~ 1 0 0 コンストラクトに相当するアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 6 5 および 6 6 である。2 0 ~ 8 0 コンストラクトに相当するアミノ酸およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 6 7 および 6 8 である。図 1 4 に、m A b の 1 1 E 1 2 (プロット B) および 3 4 D 0 3 (プロット C) で探索されたこれらのトランケートされたタンパク質の粗タンパク質溶解産物のウェスタンプロットを示す。この図で示されるように、m A b の 1 1 E 1 2 および 3 4 D 0 3 は I L - 3 1 のトランケートされたタンパク質 2 0 ~ 1 2 2 および 2 0 ~ 1 0 0 に結合したが、2 0 ~ 8 0 に結合できなかった。これらの結果から、配列番号 5 5 で示されるイヌ I L - 3 1 全長コンストラクトの 8 0 位 ~ 1 0 0 位のアミノ酸 (N末端として「S S H M A」を使用) がこれらの抗体の結合に関与することが示された。この領域は、配列番号 3 2 で示されるイヌ I L - 3 1 全長タンパク質配列のアミノ酸残基 1 0 2 ~ 1 2 2 のアミノ酸番号に相当する。抗 H i s m A b (プロット A) を用いたコントロールプロットは、全てのトランケートされたタンパク質が発現されたことを示した。加えて、m A b の宿主タンパク質への非特異的な結合がないことを確認するために、コントロールとして p E T 1 0 1 D - l a c Z タンパク質を使用した。

10

20

30

40

50

【0198】

mAbの11E12および34D03への結合に関与するイヌIL-31のアミノ酸をさらに同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を、公知の方法に従って行った。イヌIL-31のアミノ酸76~122において各位置にアラニンを置換することにより(-20Nプラスミドで)個々のコンストラクトを作製した。配列確認後、タンパク質発現を行い、粗タンパク質溶解産物をウェスタンブロット解析で処理した。図15に、アラニンに突然変異させた場合、mAbの11E12および34D03による結合に影響を与えるイヌIL-31における位置を示す結果を要約する。この図で示されるように、全長IL-31コンストラクトの77、78、81、および85位全てが、11E12または34D03抗体の結合に影響を与える。これらは、配列番号32で示されるイヌIL-31全長タンパク質配列のそれぞれアミノ酸残基99、100、103、および107に相当する。

10

【0199】

11E12および34D03抗体への結合に重要なIL-31の領域における複数の突然変異の影響を試験するために、二重(D82A、I85A)および三重(I81A、D82A、I85A)のアラニン置換を用いて発現プラスミドを構築した。-20Nコントロールに加えて、これらの二重および三重の突然変異を有するイヌIL-31を発現する大腸菌溶解産物を11E12および34D03抗体と共にブロットした(図16)。イヌIL-31におけるこれら3種のアミノ酸は、これらの部位をアラニンに変更した場合に、完全な結合の阻害が観察されたことから、11E12および34D03の認識に関与することは明らかである。これらの3種のアミノ酸は、配列番号32で示されるイヌIL-31全長タンパク質配列のアミノ酸残基103、104、および107に相当する。

20

【0200】

まとめると、イヌIL-31のトランケーション解析から、アミノ酸残基(図15で注釈がつけられた80~122位)は、11E12および34D03抗体の結合に関与することが解明された。さらに、アラニンスキャニングを用いた詳細な突然変異の解析から、全長IL-31コンストラクトのASP77、LYS78、ILE81、ASP82、およびILE85はいずれも11E12または34D03の結合に影響を与えることが明らかになり、これは、この領域が、これらの抗体による認識に関与するエピトープを定義する可能性が最も高いことを示す。興味深いことに、ヒトIL-31タンパク質のこの領域は、その補助受容体のGPLサブユニットへの結合に関与することが示されている(Le Saux S等、Biol Chem.2010 Jan 29;285(5):3470~7. 2009年11月17日に電子出版)。これらの観察は、単球においてIL-31介在のpSTAT活性を中和するmAbの11E12および34D03の能力と共に、これらのmAbが、イヌIL-31においてこのサイトカインがその受容体に結合するのに必須の残基に結合することにより、シグナル伝達を誘導するその能力を阻害するという仮説を裏付けるものである。

30

【0201】

実施例8 グルタミン合成酵素(GS)プラスミドからのイヌ化34D03抗体の生産
mAbのイヌ化34D03(重鎖および軽鎖、上記の表4)をコードする遺伝子をGSプラスミドpEE6.4およびpEE12.4それぞれにクローニングした(ロンザ(Lonza)、バーゼル、スイス)。得られたプラスミドを製造元のプロトコールに従って消化し、ライゲーションして一体化し単一の哺乳動物発現プラスミドを形成した。各プラスミドを使用して、HEK293細胞をトランスフェクションし、20Lの培養培地中で発現させた。標準的なタンパク質精製方法に従ってプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いてタンパク質を馴化HEK培地から単離した。培地をクロマトグラフィーの樹脂にローディングし、pHのシフトにより溶出させた。溶出したタンパク質のpHを調節し、透析し、使用前に滅菌ろ過した。分析的なサイズ排除クロマトグラフィーにより、得られた抗体の99パーセントより多くがモノマーであり、高分子量の集合体は観察されなかった。その後この抗体を、インビボでの有効性を評価するためのイヌ搔痒モデルでの評価に用いた。

40

50

【 0 2 0 2 】

実施例 9 イヌ搔痒モデルにおけるイヌ化 3 4 D 0 3 抗体の評価

イヌ化 3 4 D 0 3 の抗搔痒性活性 (配列番号 4 2 (H C - 6 5) および配列番号 4 4 (L C - カップ)) において配列番号 2 5 (V L) と対を形成する配列番号 3 1 で示される C A N 3 4 D 0 3 - 6 5 (V H) を、 I L - 3 1 によって誘導された搔痒のイヌモデルを用いて評価した。このモデルを用いて、ビーグル犬に一過性の搔痒行動を誘発させることが知られている組換えイヌ I L - 3 1 による攻撃として $1.5 \mu\text{g} / \text{kg}$ の静脈内投与 (I L - 3 1 攻撃、搔痒の持続時間は 2 4 時間未満) を、 $1.0 \text{mg} / \text{kg}$ の C A N 3 4 D 0 3 - 6 5 を 1 回皮下投与する前から投与後 6 3 日まで繰り返し動物に与えた。それぞれの I L - 3 1 攻撃の期間に、リアルタイムのビデオ監視を使用して、サイトカイン送達の 0 . 5 時間前 (I L - 3 1 前の基準期間) に搔痒行動の尺度を得て、続いてサイトカイン注射後 2 0 分から始まる同様の 2 時間の尺度を得た (2 時間後の I L - 3 1 攻撃期間) 。連続 1 分のタイムインターバルで搔痒行動が提示されたかどうかについて「はい / いいえ」の決定をなすことにより評価しながら各期間における搔痒スコアを作製した (最大の搔痒スコアは、それぞれの基準期間で 3 0 であり、 I L - 3 1 攻撃後の期間では 1 2 0 であった) 。図 1 7 に、試験の 0 日目に行われた C A N 3 4 D 0 3 - 6 5 処理の前後に得られた搔痒スコアを要約する。 m A b 処理の 7 日前、 I L - 3 1 攻撃後のイヌの平均搔痒スコアは、 68 ± 13 (標準誤差、 $n = 4$) であった。比較すると、 7、 1 4、 2 1 日目の試験日に、 I L - 3 1 攻撃後の平均搔痒スコアは、それぞれ 5 ± 2 、 8 ± 4 、 および 9 ± 5 に低められた。このような 7 日目と 7 日目から 2 1 日目の間との搔痒スコアの変化は、全体の I L - 3 1 に対する搔痒性反応における 8 5 % 以上の減少に相当する。

【 0 2 0 3 】

0 日目から 2 1 日目の間、 0 . 5 時間の I L - 3 1 前の基準スコアが平均で 1.6 ± 0.6 である (これは、 2 時間にわたり 6 ~ 7 の搔痒スコアと推測されるレベルである) と判断される場合、 I L - 3 1 によって誘導された搔痒の阻害の程度は、実際にはこの時間枠中で 1 0 0 % に近い可能性がある。処理されたイヌの外因性 I L - 3 1 に対する搔痒性の反応性は、時間が経つにつれて次第に回復した。 C A N D 0 3 - 6 5 で処理してから 6 3 日目までに、 2 時間の I L - 3 1 攻撃後の搔痒スコアの平均は、 57 ± 8 に増加するか、または 7 日目に観察された m A b の I L - 3 1 攻撃前の応答のおよそ 8 4 % であった。従って、 I L - 3 1 によって誘導された搔痒のモデルでは、処理したイヌに C A N 3 4 D 0 3 - 6 5 を 1 回で皮下注射することにより数週間にわたり搔痒が予防された。

【 0 2 0 4 】

実施例 1 0 ネコ I L - 3 1 の特徴付け

ネコ I L - 3 1 の配列を、 N C B I のゲノムソース (www.ncbi.nlm.nih.gov) を用いてネコのゲノムとイヌ I L - 3 1 との類似性検索により同定した。大腸菌で最適な発現がなされるようにネコ I L - 3 1 を示す遺伝子を合成した。検出および精製のために N 末端の 6 - H i s タグを含む全長イヌおよびネコ I L - 3 1 遺伝子を有する発現コンストラクトを作製した。大腸菌での発現に用いられるネコの全長コンストラクトは、配列番号 6 9 で示されるヌクレオチド配列および配列番号 7 0 で示されるタンパク質配列で示される。配列確認したプラスミドを使用して大腸菌 B L 2 1 S t a r (商標) (インビトロジェン社、カリフォルニア州カールスバッド) を形質転換し、 3 0 ° C で 5 時間、発現を行った。細胞ペレットを溶解させた後、免疫反応性の反応性タンパク質が、不溶性溶解産物中で高濃度化されていることを見出した。これらの細胞ペレットを 6 M 尿素中で可溶化し、ニッケルコバルト樹脂 (サーマフィッシャー・サイエンティフィック社、イリノイ州ロックフォード) を用いた変性条件下で組換えタンパク質の精製を行った。 H i s タグの存在について陽性を示す溶出分画のプールを 0 . 8 M 尿素 P B S、続いて P B S に対して段階的に透析し、 S D S P A G E で解析した (図 1 8) 。これまで観察されているように、大腸菌での誘導による組換えイヌ I L - 3 1 の収量は低かった。しかしながら、精製後に S D S - P A G E によって期待される分子量に従って移動したタンパク質を回収した。

【 0 2 0 5 】

10

20

30

40

50

大腸菌から生産されたイヌおよびネコIL-31の生物活性を試験するために、DH82細胞分析において、各タンパク質を、pSTATシグナル伝達を誘導するその能力に関して解析した。哺乳動物細胞（イヌIL-31（CHO））由来の組換えIL-31は高度にグリコシル化されているため、グリコシル化されていない形態が生物活性を保持するかどうかは不明であった。図19に、ネコIL-31はCHO細胞で生産された参照IL-31に匹敵する生物活性を有することを示す。

【0206】

イヌIL-31のアラニンスキャニング変異誘発により、11E12および34D03抗体への結合に必要なタンパク質内の領域が定義された。この領域における配列保存により（図20）、これらのmAbはネコIL-31と交差反応するという仮説を立てた。

10

【0207】

図21に、mAbの11E12および34D03がイヌIL-31（大腸菌）に結合することができ、さらにネコIL-31タンパク質とも交差反応できることを示す。これらのデータに基づいて、34D03抗体のネコへの種分化（ネコ化（felinization））を追跡した。

【0208】

実施例11 抗体34D03におけるネコ化

説明したイヌ化の方法と同様に、mAbの34D03からCDRグラフトニングに関するあらゆる利用可能なネコ配列から適切な生殖細胞系の抗体の配列を同定した。可変軽鎖（配列番号71で示されるFEL-34D03-VL-021-1、それに対応する配列番号72で示されるヌクレオチド配列）、および可変重鎖（配列番号73で示されるFEL-34D03-VH-035-1、それに対応する配列番号74で示されるヌクレオチド配列）を、イヌ化34D03におけるそれらのイヌフレームワークそれぞれとの最大の相同性に基づいて選択した。それらの定常重鎖IgG1（配列番号75で示されるネコHC-A、それに対応する配列番号76で示されるヌクレオチド配列、GenBank登録番号AB016710.1）、およびカッパ定常軽鎖（配列番号77で示されるネコLC-カッパ、それに対応する配列番号78で示されるヌクレオチド配列、GenBank登録番号AF198257.1）鎖配列それぞれに連結された選択された可変領域を用いて、組換えネコ化34D03を生産した。これまでに述べられたようにして抗体をHEK細胞から生産し、精製した。図22に、pSTATシグナル伝達を中和するネコ34D03の能力が、イヌバージョンのIC₅₀に匹敵するIC₅₀を有することを示す。

20

30

【0209】

ネコ化34D03を、ネコおよびイヌIL-31の両方と結合するその能力に関して評価した。図23に、哺乳動物および大腸菌源の両方から精製したタンパク質を用いたネコ化34D03でのウェスタンブロットを示す。イヌおよびネコタンパク質の両方への決定的な結合が観察され、これは、34D03のネコ化した形態の十分な交差反応性、およびネコタンパク質への結合の立証を示す。総合すると、これらの結果は、ネコIL-31において保存されたエピトープは、ネコにおいてこのサイトカインを阻害するのに適切な標的である可能性があることを示唆している。

【0210】

40

実施例12 自然発生したアトピー性皮膚炎を有するイヌにおけるIL-31サイトカインの検出

本発明の実施例において、アトピー性皮膚炎を有するイヌを含むイヌ群から回収された血清中のIL-31タンパク質のレベルを定量的イムノアッセイ技術を用いて評価した。

【0211】

血清を以下のイヌ群から回収し、IL-31血清測定の前に凍結した。

【0212】

1) アレルゲンとしてイエダニ（コナヒョウヒダニ（*Dermatophagoides farina*）、グリーアー・ラボ（Greer Labs））に感作させる前後の24匹の研究用に繁殖させたビーグル（マーシャル・バイオリソース（Marshall BioResources）、ニューヨーク州ノース

50

ローサ)を用いた。全ての動物は、およそ9ヶ月齢であった。雄と雌の数はほぼ同じであった。

【0213】

2)ノミの侵入前、または成体のネコノミ(*Ctenocephalides felis*)侵入のおよそ1週間後の30匹のノミアレルギーのイヌ(ヤングス・ベタリナリー・リサーチ・サービス(Youngs Veterinary Research Services)、カリフォルニア州ターロック)を用いた。このコロニーにおけるイヌの大半が雑種であった。平均年齢はおよそ10.5歳であった。雄と雌の数はほぼ同じであった。

【0214】

3)87匹のクライアント所有の、無症状の歯周疾患を有するがその他の点では優れた健康状態と決定されたイヌを用いた。18ヶ所の米国の獣医診療所でサンプルを回収した。動物は、性別および品種に関して米国のイヌ群の代表的なものであり、年齢は2~5歳であった。

10

【0215】

4)224匹のクライアント所有の、少なくとも1年持続する季節と関係のない慢性アトピー性皮膚炎を有すると診断された(改変されたWillemseの基準およびPrelaud(*Willemsse T. J small Anim Pract 1986; 27: 771~778*、およびPrelaud等、*Revue de Medecine Veterinaire 1998; 149: 1057~1064*)に基づき)動物であって、これらの動物は、所有者により最小の「中程度の痒み」を有すると評価され、さらに獣医師によりCADESI-02において最小の皮膚病変スコア25を有すると評価された。サンプルを、14ヶ所の米国の獣医診療所から家畜の皮膚病学における専門家により回収した。およそ75%のイヌが純血種であり、全体の約25%がレトリバーであった(ラブラドル(17.3%)およびゴールデン(8.2%))。イヌは中程度の年齢のものが多かった(約6歳)。雄と雌の数はほぼ同じであった。

20

【0216】

サンドイッチイムノアッセイを使用して、イヌ血清中のcIL-31レベルを定量した。血清サンプルをRexxip緩衝液(ジャイロラボ(Gyrolab)、ニュージャージー州ウォーレン)で1:2に希釈し、バイオアフィ(Bioaffy)の1000nLのCD(ジャイロラボ)でジャイロラボxPワークステーションを用いて泳動した。cIL-31を、ビオチン標識した本発明に係る抗IL-31モノクローナル抗体で捕獲し、アレクサフルオロ(Alexaflour)647で標識した本発明に係る抗IL-31モノクローナル抗体で検出した。cIL-31のサンプル濃度を、8ポイントの標準曲線から0.013~250ng/mLのダイナミックレンジを用いて、ジャイロラボのエバリュエーター(Evaluator)ソフトウェアで5パラメーターのフィッティングモデルを用いて外挿した。

30

【0217】

自然発生したアトピー性皮膚炎を有するイヌの57%の血清サンプルにおいて、cIL-31のレベルを検出することができたが(13pg/mL)、研究用に繁殖させたビーグル+/HDMへの感作、雑種のイヌ+/ノミ侵入、または歯周疾患を有するがその他の点では優れた健康状態とみなされたクライアント所有のイヌからの血清では、品種に関係なく検出できなかった(<13pg/mL)。自然発生したアトピー性皮膚炎を有するイヌにおいて、解析されたサンプルの53%が、13~1000pg/mLのIL-31血清レベルを示し、4%が1000pg/mLを超えるレベルを示した(表5)。

40

【0218】

【表 5】

表 5:様々なイヌ群における IL-31 の血清レベル

イヌ群	評価した動物の数	血清中に検出可能な IL-31 を含む動物の数 ^a	血清中に検出可能な IL-31 を含む動物のパーセント
研究用に繁殖させたビーグル	24	0	0%
HDM 感作した研究用に繁殖させたビーグル	24	0	0%
雑種のイヌノミなし	30	0	0%
雑種のイヌノミ侵入	30	0	0%
健康なクライアント 所有の動物-複数の品種	87	0	0%
クライアント所有の動物で 自然発生したアトピー性 皮膚炎-複数の品種	224	128	57%

^a13pg/mL 未満は、定量限界より下である。

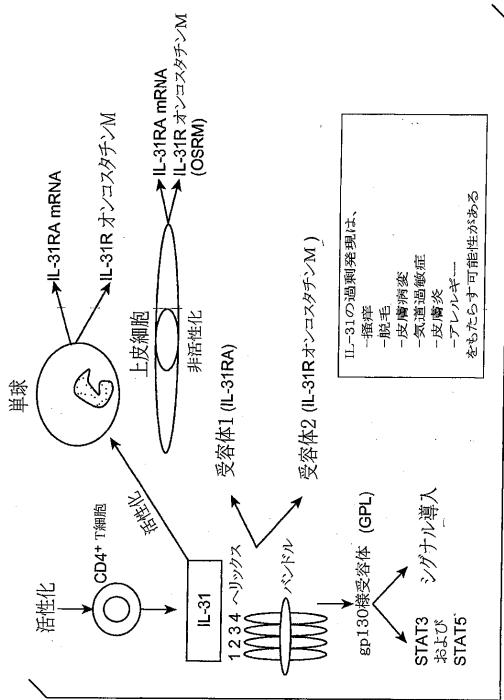
10

【 0 2 1 9 】

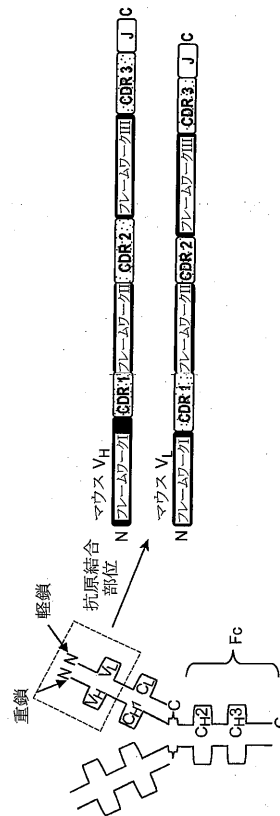
本発明の実施例の結果から、有意な数のイヌのアトピー性皮膚炎を有するイヌにおいて、IL-31タンパク質が上昇したことが実証される。いずれか1つの理論に縛られることは望まないが、IL-31経路は、これらに限定されないがイヌアトピー性皮膚炎などの掻痒性のアレルギー性の皮膚状態の病理生物学において役割を果たすものと考えられ、さらに、これらに限定されないがイヌIL-31に特異的に結合するオクラシチニブ (olacitnib) および/または抗IL-31抗体などのIL-31アンタゴニストを用いた治療的介入のための新規の経路の1つである。

20

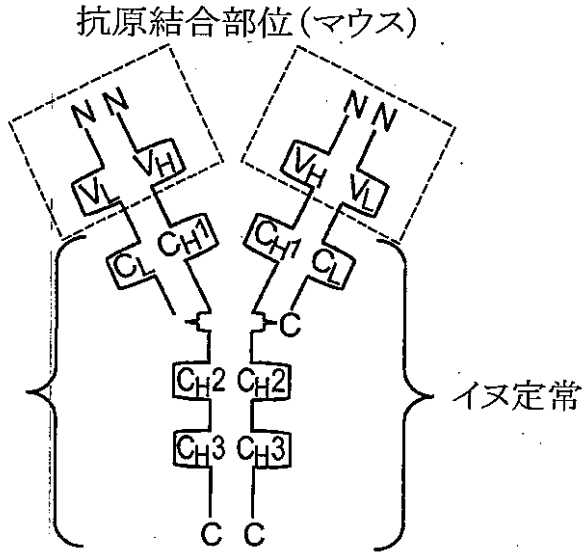
【 図 1 】



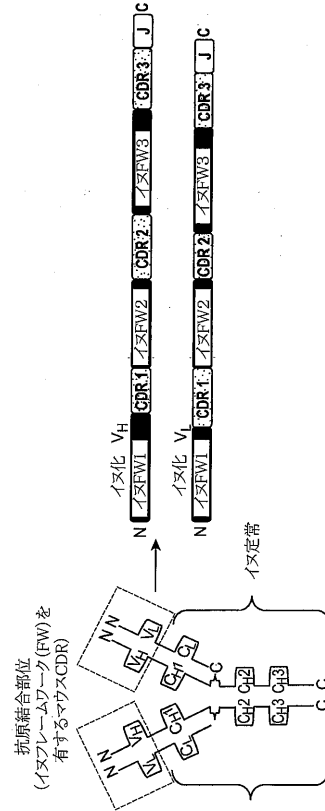
【 図 2 】



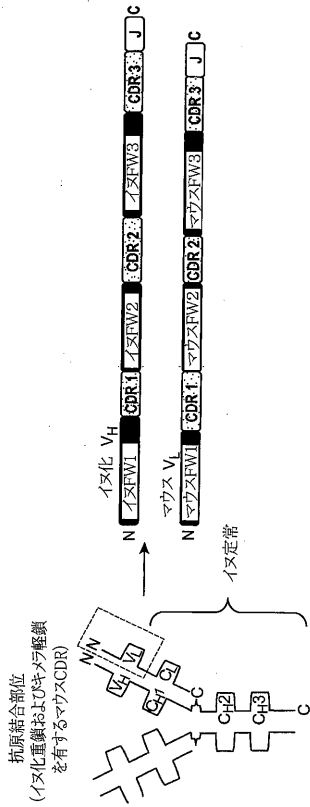
【図3】



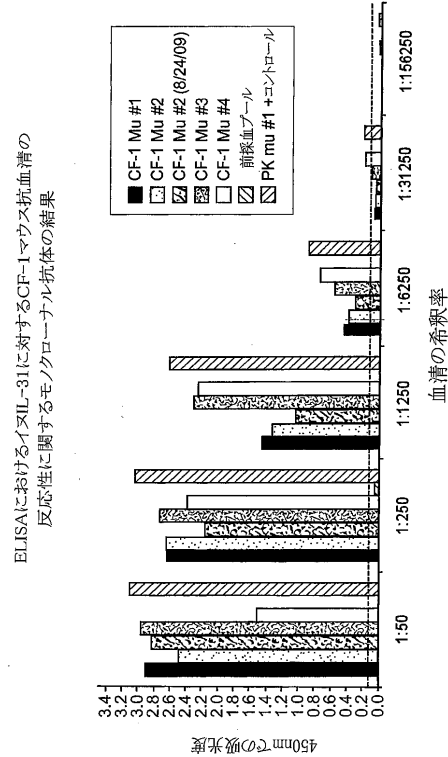
【図4】



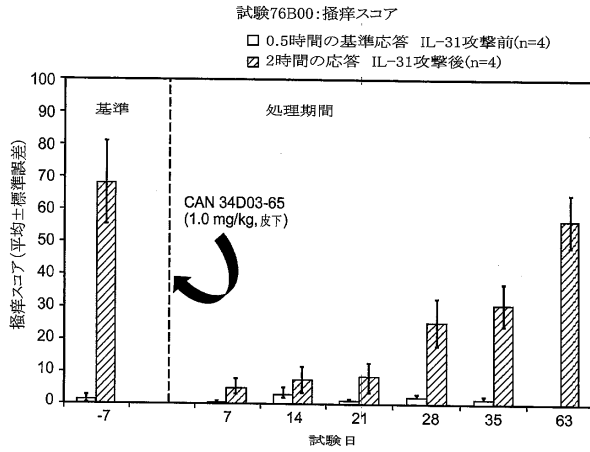
【図5】



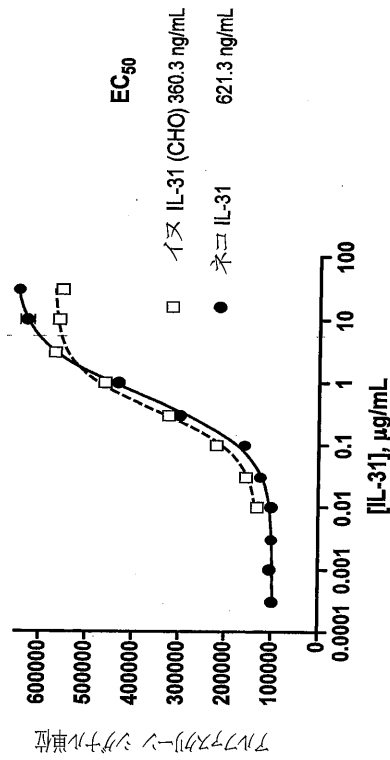
【図6】



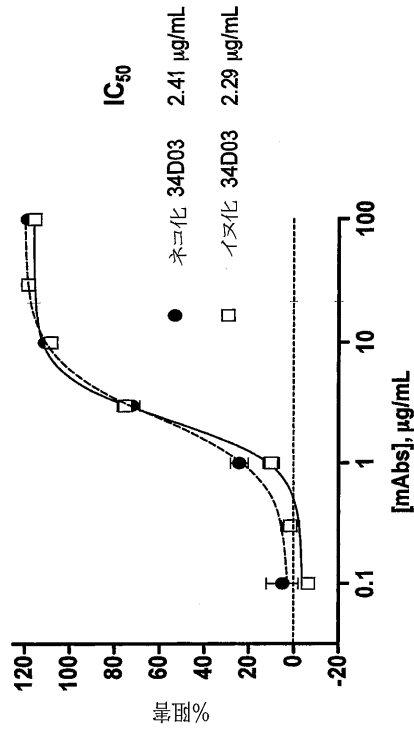
【図17】



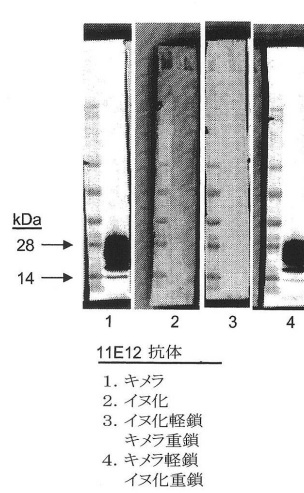
【図19】



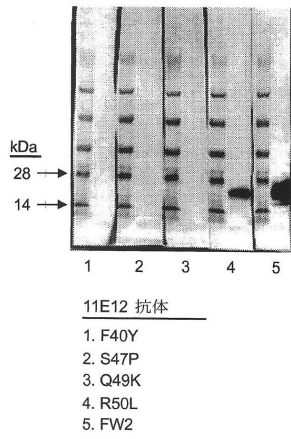
【図22】



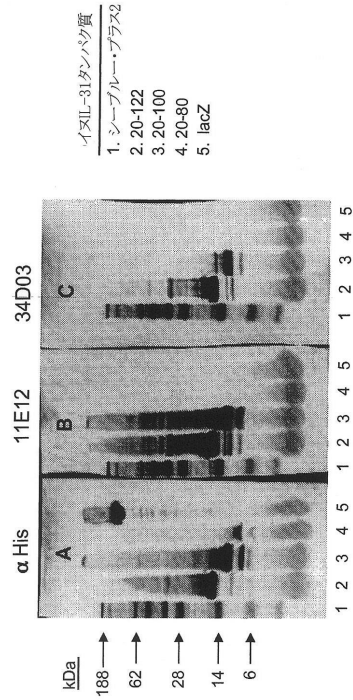
【図10】



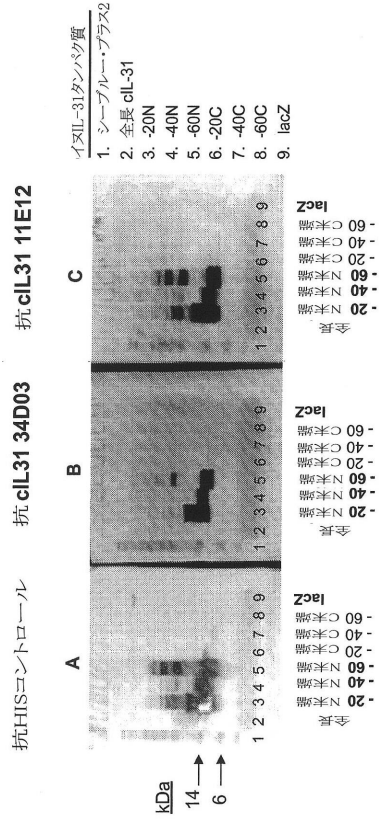
【 図 1 2 】



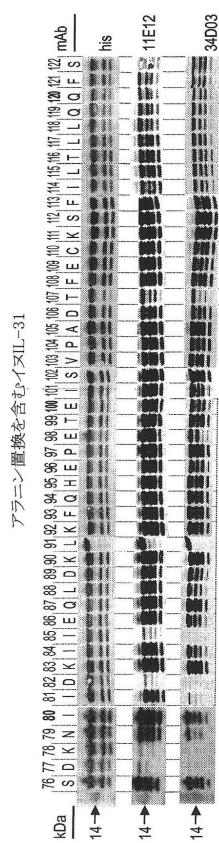
【 図 1 4 】



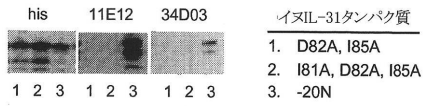
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



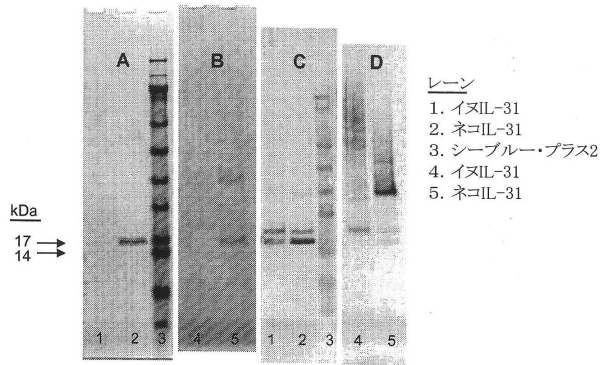
【図16】



イヌIL-31タンパク質

1. D82A, I85A
2. I81A, D82A, I85A
3. -20N

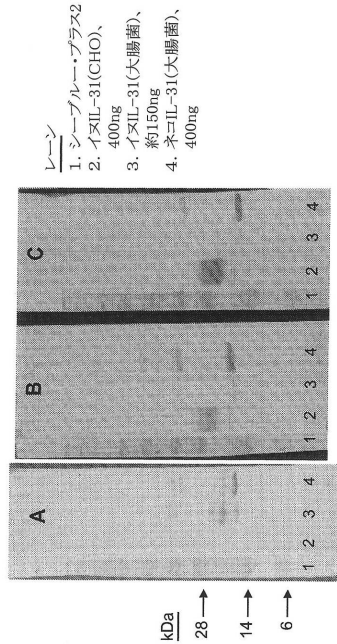
【図18】



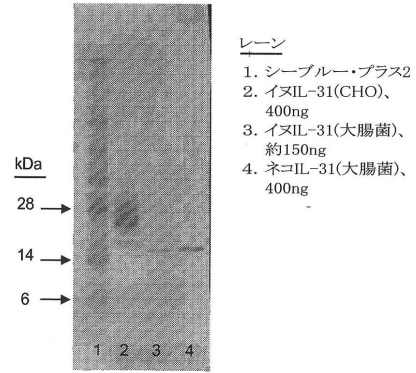
【図20】



【図21】



【図23】



【配列表】

0006022563000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/04
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00 1 7 1
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	17/08 (2006.01)	A 6 1 P	17/08
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 7 1
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
		G 0 1 N	33/53 P

(72)発明者 バンメルト, ゲーリー・エフ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州07932, フローラム・パーク, キャンパス・ドライブ 1
 00, ケア・オブ・ゾエティス・エルエルシー

(72)発明者 ダナム, スティーブン・エイ
 アメリカ合衆国ニュージャージー州07932, フローラム・パーク, キャンパス・ドライブ 1
 00, ケア・オブ・ゾエティス・エルエルシー

審査官 原 大樹

(56)参考文献 特表2008-541704(JP, A)
 特表2010-502652(JP, A)
 特表2011-506302(JP, A)
 特表2008-535823(JP, A)
 特表2010-500380(JP, A)
 特表2002-516104(JP, A)
 Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009年, Vol.131, p.140-143
 Experimental Dermatology, 2008年, Vol.18, p.35-43

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 15/00 - 15/90
 C 0 7 K 1/00 - 19/00
 MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/WPIX/CAPLUS/REG
 ISTRY(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	白细胞介素-31单克隆抗体		
公开(公告)号	JP6022563B2	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	JP2014520753	申请日	2012-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	硕腾服务有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Zoetis LLC		
当前申请(专利权)人(译)	Zoetis-Sabishizu LLC		
[标]发明人	バンメルトゲリーエフ ダナムスティーブンエイ		
发明人	バンメルト,ゲリーエフ ダナム,スティーブンエイ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61P17/04 A61P37/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/08 A61P11/00 A61P37/06 A61P43/00 A61K39 /395 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/54 A61K2039/552 C07K16/244 C07K2317/56 C07K2317/565 A61K2039/505 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/08 A61P29/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6869 G01N2333/54		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C07K16/24 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61P17/04 A61P37/08 A61P17/00.171 A61P17/06 A61P17/08 A61P11/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61P43/00.171 A61K39/395.N G01N33/53.P		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中濱 明子		
审查员(译)	原 大树		
优先权	61/510268 2011-07-21 US		
其他公开文献	JP2014529295A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明提供了一种分离的抗体，其特异性结合犬白细胞介素-31 (IL-31) 或猫IL-31中的至少一种。此类抗体可以是诊断和/或兽医组合物形式，可用于治疗狗或猫的瘙痒和/或过敏性病症。 点域1

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6022563号 (P6022563)
(45) 発行日 平成28年11月9日(2016.11.9)	(24) 登録日 平成28年10月14日(2016.10.14)	
(51) Int. Cl.	F I	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	Z N A A
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00	C
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	
請求項の数 25 (全 62 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-520753 (P2014-520753)	(73) 特許権者 515230154	
(86) (22) 出願日 平成24年7月5日(2012.7.5)	ゾエティス・サービシズ・エルエルシー	
(65) 公表番号 特表2014-529295 (P2014-529295A)	アメリカ合衆国ニュージャージー州079	
(43) 公表日 平成26年11月6日(2014.11.6)	32, フローラム・パーク, キャンパス・	
(86) 国際出願番号 PCT/182012/053450	ドライブ 100	
(87) 国際公開番号 W02013/011407	(74) 代理人 100140109	
(87) 国際公開日 平成25年1月24日(2013.1.24)	弁理士 小野 新次郎	
審査請求日 平成26年3月20日(2014.3.20)	(74) 代理人 100075270	
(31) 優先権主張番号 61/510,268	弁理士 小林 泰	
(32) 優先日 平成23年7月21日(2011.7.21)	(74) 代理人 100101373	
(33) 優先権主張国 米国(US)	弁理士 竹内 茂雄	
前置審査	(74) 代理人 100118902	
	弁理士 山本 修	
	(74) 代理人 100135415	
	弁理士 中濱 明子	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 インターロイキン-31モノクローナル抗体		

