

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5850860号
(P5850860)

(45) 発行日 平成28年2月3日(2016.2.3)

(24) 登録日 平成27年12月11日(2015.12.11)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 12 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-551247 (P2012-551247)	(73) 特許権者	397009934
(86) (22) 出願日	平成23年1月26日 (2011.1.26)		グラクソ グループ リミテッド
(65) 公表番号	特表2013-517799 (P2013-517799A)		GLAXO GROUP LIMITED
(43) 公表日	平成25年5月20日 (2013.5.20)		イギリス ミドルセックス ティーダブリ
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/022507		ュ8 9ジーエス プレントフォード グ
(87) 国際公開番号	W02011/094259	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成23年8月4日 (2011.8.4)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成25年12月9日 (2013.12.9)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	61/299,010		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成22年1月28日 (2010.1.28)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD127結合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号13、121、123、125、127、129又は131の重鎖可変領域と、配列番号22の軽鎖可変領域を含んでなる抗CD127抗体。

【請求項2】

配列番号13の重鎖可変領域を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

配列番号114又は配列番号118の重鎖を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号121又は配列番号123の重鎖可変領域を含んでなる、請求項1に記載の抗体。 10

【請求項5】

配列番号115の軽鎖を含んでなる、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体をコードする核酸分子。

【請求項7】

請求項6に記載の核酸分子を含んでなる発現ベクター。

【請求項8】

請求項7に記載の発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞。

【請求項9】

請求項 8 に記載の宿主細胞により発現される抗体。

【請求項 10】

培地中で請求項 8 に記載の宿主細胞を培養して抗体を産生させる工程と、前記培地から前記抗体を単離又は精製する工程とを含んでなる、抗体を製造する方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 又は 9 のいずれか 1 項に記載の抗体と、薬学上許容される担体又は賦形剤とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 又は 9 のいずれか 1 項に記載の抗体を含んでなる、自己免疫疾患又は炎症性疾患に罹患している被験体の治療に使用するための医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト IL - 7 受容体の鎖 (CD127) に特異的に結合する抗原結合タンパク質、特に免疫グロブリンに関する。また、本発明は、前記タンパク質を用いて疾患又は障害を治療する方法、前記タンパク質を含んでなる、医薬組成物、及びその製造方法に関する。本発明の他の態様は、以下の説明から明らかになるであろう。

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症 (MS) は、中枢神経系に影響を与える慢性の炎症性脱髄疾患である。MS では、浸潤性炎症性免疫細胞が乏突起膠細胞の破壊に関与すると考えられており、前記乏突起膠細胞とは、ミエリン鞘として知られている脂肪層の形成及び維持に関与する細胞である。MS は、ミエリンの薄膜化又は全損を引き起こす。ミエリンが失われると、ニューロンは、もはや電気信号を有効に伝えることができず、多くの神経機能障害が生じる。MS 患者では、神経繊維のミエリン鞘に沿った炎症性病変の形成に関与する自己反応性 T 細胞が産生される。活動性 MS 患者の脳脊髄液は、活性化 T 細胞を含有しており、これが脳組織に浸潤し、特徴的な炎症性病変を引き起こし、ミエリンを破壊する。多発性硬化症の症状及び疾病の経過は、人によって異なり得るが、前記疾患には再発寛解型 MS、二次性進行型 MS、及び一次性進行型 MS という 3 つの基本的な形態が存在する。

20

【0003】

MS の初期段階では、炎症発作が生じ、短い間隔で疾患活性が急速に高まる。これら症状発現の後に、回復及び寛解の期間が生じる。寛解期間中、神経系病変における局所的腫脹は消散し、免疫細胞は活性が低下するか又は不活化し、ミエリン産生細胞は軸索を再有髄化する。神経のシグナル伝達は改善し、炎症によって引き起こされる能力障害は重篤度が低下するか又は完全に消失する。前記疾患のこの相は、再発寛解型 MS (RRMS) と呼ばれる。しかし、病変が全て完全に治癒する訳ではない。一部は「慢性の」病変として残り、これは、通常、免疫細胞を欠く脱髄芯領域を有する。経時的に、このような病変の中心にある細胞はほとんど死ぬが、多くの場合病変の縁部で炎症が継続する。脳は、一部のニューロンの喪失にうまく適合することができるので、長年にわたる永続的な能力障害は生じ得ない。しかし、MS 患者の 50% 超は、最終的に、二次性進行型 MS (SPMS) と呼ばれる進行性劣化の病期に入る。この病期では、前記疾患は、もはや疾患を緩和する医薬品に対して十分に応答せず、患者の能力障害が確実に悪化する。MS の自然経過の初期からのニューロンの破壊は、SPMS の進行性能力障害が蓄積されたニューロン喪失の結果である可能性があり、それが最終的に脳の代償能を凌駕することを示唆する。一次性進行型 MS は、再発しないが、長期間にわたって身体機能及び認知機能が徐々に失われる種類の多発性硬化症である。

30

40

【0004】

再発寛解型多発性硬化症の患者における治療目的は、前記疾患の再発の頻度及び重篤度を低減し (それによって憎悪を防ぐ) ことに加えて、前記疾患の進行性相の開始を防いだ

50

り遅らせたりすることである。この目的を達成するために、これまで特に免疫調節薬又は免疫抑制薬が用いられてきたが、これらは有効性が限られており且つ毒性が高いので広範囲に受け入れられるものではなかった。例えば、インターフェロンベータ - 1 a、インターフェロンベータ - 1 b、及びグラチラマー酢酸塩を用いた大規模な無作為対照化試験が成功裡に行われている。

【 0 0 0 5 】

自己免疫T細胞応答の変化及び免疫系の調節ネットワークの機能不全の両方が、MS及び関節リウマチ等のヒトの自己免疫疾患において重要な役割を果たしている (K u c h r o o r a , (2 0 0 2 年) A n n u . R e v . I m m u n o l . 2 0 : 1 0 1 - 1 2 3 ; S o s p e d r a 及び M a r t i n (2 0 0 5 年) A n n u . R e v . I m m u n o l . 2 3 : 6 8 3 - 7 4 7 ; T o h 及び M i o s s e c (2 0 0 7 年) C u r r . O p i n . R h e u m a t o l . 1 9 : 2 8 4 - 2 8 8) 。

10

【 0 0 0 6 】

MSの病因及び発症機序は依然として不明であるが、一般に自己免疫病理であると考えられており、ここでは、 $T_H 1$ 及び $T_H 17$ 細胞等の病因となる可能性のある自己反応性T細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。これらエフェクターT細胞が疾患経過中にインビボで活性化され、中枢神経系 (C N S) 炎症の一因となり得るという証拠が存在する。また、前記疾患の活動期にこれらT細胞がEAE及びMSの病変におけるミエリン発現細胞の破壊を媒介するという証拠も存在する。他方、通常病原性 $T_H 1$ 及び $T_H 17$ 細胞を抑制する調節性T細胞 (T_{reg}) がMS患者では欠損しており、これによって免疫系が更に炎症促進性状態に傾く。

20

【 0 0 0 7 】

最近、3つの別々のグループが、MSに罹患しているか又は罹患していない合計17,947人のドナーにおいてゲノムワイドに一塩基変異多型 (S N P) をスキャンした結果を報告した。334,923のSNPをスキャンした後、ヒトIL-7受容体鎖 (I L - 7 R) における非同義コーディングSNPがMS感受性に非常に深く関連している (全体として $P = 2.9 \times 10^{-7}$) ことが見出された。前記SNPは、CD127 (I L - 7 R) としても知られている) のエキソン6におけるTからCへの変化に相当している。この変化は、RNAスプライシング中にエキソン6をスキッピングする機会を増やして、可溶性のCD127を生じさせる。更に、MS患者の脳脊髄液 (C S F) におけるCD127及びIL-7のRNA発現は、他の神経障害患者のCSFに比べて有意に高い。

30

【 0 0 0 8 】

IL-7及びIL-7受容体 (I L - 7 R) は、T細胞及びB細胞の発生、並びに主として胸腺環境におけるホメオスタシスに重要な役割を果たすことが知られている。実際、胸腺間質細胞、胎児胸腺及び骨髄は、IL-7の産生部位である。IL-7受容体は、2つのサブユニット：CD127とIL-2、IL-4、IL-9、IL-15及びIL-21の受容体で共有されている共通鎖 (鎖又は a c) とからなる。

【 0 0 0 9 】

CD127は、IL-7受容体アルファ (I L - 7 R) 及びp90 IL-7Rとしても知られている。ヒトCD127 (S w i s s P r o t アクセションナンバーP16871) は、合計459のアミノ酸 (20のシグナル配列) を有する。ヒトCD127は、219アミノ酸の細胞外領域、25アミノ酸の膜貫通領域、及び195アミノ酸の細胞内領域を含む。CD127内の残基の番号付けは、(例えば、抗体のエピトープについて説明するために) 本発明で用いるとき、シグナル配列の残基を含む完全長タンパク質に基づく。CD127は、4つのアイソフォームで存在する場合があります、アイソフォームH20 (S w i s s p r o t アクセションナンバーP16871-1) は、以下のアミノ酸配列 (シグナル配列を含む) を有する：

40

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

50

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

10

【0010】

また、CD127は、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の受容体においても見出されている。TSLP受容体は、CD127とサイトカイン受容体様因子2(CRLF2)とのヘテロダイマーである。

【0011】

IL-7Rに対するIL-7の結合は、JAKキナーゼ1及び3の活性化を含む、複数のシグナル伝達経路を活性化し、Stat5のリン酸化及び活性化を導く。Stat5の活性化は、抗アポトーシス性タンパク質Bcl-2の誘導及びアポトーシス促進性タンパク質Baxのミトコンドリアへの侵入を防ぐのに必要であるので、胸腺発生T細胞前駆体の生存にとって重要である。IL-7Rが媒介する別の経路は、PI3キナーゼの活性化であり、それによって、アポトーシス促進性タンパク質Badがリン酸化され細胞質に保持される。CD127は、末梢の休止T細胞及び記憶T細胞で発現する。T細胞の生存及びホメオスタシスのIL-7調節の機序並びに末梢におけるIL-7の起源は、完全には解明されていない。更に、自己免疫疾患における病原性T細胞の分化及び機能におけるその潜在的な役割についてはそれほど研究が進んでおらず、大部分は未知である。IL-7が自己免疫疾患の発病の一因である可能性があることを示唆する報告はほとんど存在しない。

20

30

【0012】

最近、Liuら(Liuら, (2010年) Nature Medicine 16: 191-197)は、T_H17の生存及び増殖におけるIL-7の役割について報告した。国際出願第PCT/US2009/053136号には、マウスの抗CD127抗体(抗CD127抗体1A11及び6A3を含む)、並びにMS及び他の自己免疫疾患の治療におけるその役割について記載されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

ヒトCD127に結合する及び/又はヒトCD127の生物学的作用を阻害する更なるモノクローナル抗体を単離及び開発することが望ましい。このような抗体は、MS並びに他の炎症性及び自己免疫性の疾患及び障害、特に、病原性T_H17細胞の関与するものの治療において治療上有用であり得る。

40

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、CD127に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。前記抗原結合タンパク質は、治療方法、特に、病原性T_H17細胞が関与する疾患の治療又は予防において使用することができる。前記抗原結合タンパク質は、CD127に結合して、CD127の生物学的機能を阻害、例えば中和することができる。

【0015】

50

第1の態様では、本発明は、以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号2に記載のCDRH1、
 - (ii) 配列番号3に記載のCDRH2、
 - (iii) 配列番号4又は配列番号132～配列番号137のいずれか記載のCDRH3、
 - (iv) 配列番号5に記載のCDRL1、
 - (v) 配列番号6に記載のCDRL2、
 - (vi) 配列番号7に記載のCDRL3
- のうちの1～6つを含んでなる、抗体又はその変異体等の抗原結合タンパク質を提供する。

10

【0016】

別の態様では、本発明は、以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号39に記載のCDRH1、
 - (ii) 配列番号40に記載のCDRH2、
 - (iii) 配列番号41に記載のCDRH3、
 - (iv) 配列番号42に記載のCDRL1、
 - (v) 配列番号43に記載のCDRL2、
 - (vi) 配列番号44に記載のCDRL3
- のうちの1～6つを含んでなる、抗体又はその変異体等の抗原結合タンパク質を提供する。

20

【0017】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、抗体、場合によりキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体である。抗体は、アクセプター抗体フレームワークにおける(ドナー抗体由来の配列番号2～7又は39～44の)1以上のCDRを含んでなり得る。アクセプター抗体フレームワークは、ヒト化抗体であり得る。

【0018】

1つの態様では、本発明は、以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号2に記載のCDRH1、
 - (ii) 配列番号3に記載のCDRH2、
 - (iii) 配列番号4又は配列番号132～配列番号137のいずれか記載のCDRH3
- のうちの1以上を含んでなる、重鎖可変領域を含んでなる、ヒト化抗体であって、(Kabattに従って番号付けされる)重鎖可変領域の位置66におけるリシン残基、位置69におけるフェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン又はバリン残基、及び位置71におけるバリン、アルギニン、アラニン又はロイシン残基のうちの少なくとも1つを更に含んでなる、ヒト化抗体を提供する。

30

【0019】

1つの実施形態では、ヒト化抗体は、位置69にロイシンを含んでなる。1つの実施形態では、ヒト化抗体は、位置71にバリンを含む。1つの実施形態では、ヒト化抗体は、位置69にロイシン及び位置71にバリンを含む。1つの実施形態では、ヒト化抗体は、位置66にリシン、位置69にロイシン、及び位置71にバリンを含む。上述の点突然変異を除いて、重鎖可変領域は、ヒト生殖細胞系可変領域のフレームワーク配列を有し得る。例えば、1つの実施形態では、重鎖可変領域は、IGHV1_2ヒトフレームワーク(配列番号116)に由来する。

40

【0020】

したがって、別の態様では、本発明は、V_Hフレームワークにおいて以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号2に記載のCDRH1、
- (ii) 配列番号3に記載のCDRH2、
- (iii) 配列番号4又は配列番号132～配列番号137のいずれか記載のCDRH

50

3

のうちの1以上を含んでなる、抗体であって、
前記V_Hフレームワークが、ヒト生殖細胞系V_Hフレームワークに由来し、且つ(Kabatに従って番号付けされる)重鎖可変領域の位置66におけるリシン残基、位置69におけるフェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン又はバリン残基、及び位置71におけるバリン、アルギニン、アラニン又はロイシン残基のうちの少なくとも1つを含んでなる、抗体を提供する。1つの実施形態では、ヒトV_Hフレームワークは、IGHV1_2ヒトフレームワーク(配列番号116)である。

【0021】

本発明の抗体は、CDRH1(配列番号2)及びCDRH3(配列番号4); CDRH2(配列番号3)及びCDRH3(配列番号4); CDRH1(配列番号2)及びCDRH2(配列番号3); 又はCDRH1(配列番号2)、CDRH2(配列番号3)及びCDRH3(配列番号4)を含んでなる、重鎖可変領域を含んでなり得る。前記抗体は、配列番号10~17のうちのいずれかの重鎖可変領域(1A11.H0 V_H~1A11.H7 V_H)を含んでなり得る。1つの実施形態では、前記ヒト化抗体は、配列番号13の重鎖可変領域(1A11.H3 V_H)を含んでなる。これら実施形態のいずれかでは、配列番号4のCDRH3を、配列番号132~137のいずれか記載のCDRH3で置換してもよい。あるいは、配列番号13の重鎖可変領域は、N98D、N98E、F100bE、F100bH、F100bI及びF100bV(Kabat)から選択される1以上の置換を含んでなり得る。別の実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号121、123、125、127、129、又は131のアミノ酸配列を有する。1つの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号16の軽鎖可変領域と対合する。

【0022】

また、本発明は、以下の相補性決定領域:

- (i) 配列番号5に記載のCDRL1、
- (ii) 配列番号6に記載のCDRL2、
- (iii) 配列番号7に記載のCDRL3

のうちの1以上を含んでなる、軽鎖可変領域を含んでなる、抗体であって、
(Kabatに従って番号付けされる)可変領域軽鎖の位置45におけるリシン残基、位置46におけるプロリン残基、位置47におけるトリプトファン残基、位置58におけるバリン残基、位置60におけるバリン残基、位置70におけるセリン残基、及び位置71におけるチロシン又はフェニルアラニン残基のうちの少なくとも1つを更に含んでなる、抗体を提供する。

【0023】

1つの実施形態では、抗体は、位置46にプロリン残基を含んでなる。1つの実施形態では、抗体は、位置71にチロシン残基を含んでなる。1つの実施形態では、抗体は、位置46にプロリン残基及び位置71にチロシン残基を含んでなる。

【0024】

抗体は、CDRL1(配列番号5)及びCDRL3(配列番号7); CDR L2(配列番号6)及びCDRL3(配列番号7); CDR L1(配列番号5)及びCDRL2(配列番号6); 又はCDRL1(配列番号5)、CDRL2(配列番号6)及びCDRL3(配列番号7)を含んでなる、軽鎖可変領域を含んでなり得る。前記抗体は、配列番号18~27のうちのいずれかの軽鎖可変領域(1A11.L0 V~1A11.L9 V)を含んでなり得る。1つの実施形態では、抗体は、配列番号22の軽鎖可変領域(1A11.L4 V)を含んでなる。

【0025】

別の態様では、本発明は、以下の相補性決定領域:

- (i) 配列番号2に記載のCDRH1、
- (ii) 配列番号3に記載のCDRH2、
- (iii) 配列番号4又は配列番号132~配列番号137のいずれか記載のCDRH

10

20

30

40

50

3

のうちの1、2又は3つを含んでなる、重鎖可変領域を含んでなり、
 (Kabatに従って番号付けされる)重鎖可変領域の位置66におけるリシン残基、位置69におけるフェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン又はバリン残基、及び位置71におけるバリン、アルギニン、アラニン又はロイシン残基のうちの少なくとも1つを更に含んでなり；

且つ以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号5に記載のCDRL1、
- (ii) 配列番号6に記載のCDRL2、
- (iii) 配列番号7に記載のCDRL3

10

のうちの1、2又は3つを含んでなる、軽鎖可変領域を含んでなり、
 (Kabatに従って番号付けされる)可変領域軽鎖の位置45におけるリシン残基、位置46におけるプロリン残基、位置47におけるトリプトファン残基、位置58におけるバリン残基、位置60におけるバリン残基、位置70におけるセリン残基、及び位置71におけるチロシン又はフェニルアラニン残基のうちの少なくとも1つを更に含んでなる、抗体を提供する。

【0026】

抗体は、1つの重鎖CDR及び1つの軽鎖CDRから前記CDRの6つ全て(すなわち、3つの重鎖及び3つの軽鎖CDRの全て)までを含んでなる、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3の任意の組合せを含んでなり得る。1つの実施形態では、抗体は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3の6つ全てを含んでなる。

20

【0027】

1つの実施形態では、抗体は、以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号2に記載のCDRH1、
- (ii) 配列番号3に記載のCDRH2、
- (iii) 配列番号4又は配列番号133～配列番号138のいずれか記載のCDRH

3

を含んでなる、重鎖可変領域と、
 以下の相補性決定領域：

- (iv) 配列番号5に記載のCDRL1、
- (v) 配列番号6に記載のCDRL2、
- (vi) 配列番号7に記載のCDRL3

30

を含んでなる、軽鎖可変領域とを含んでなり、

重鎖可変領域の位置69におけるロイシン残基、及び軽鎖可変領域の位置46におけるプロリン残基を更に含んでなる。

【0028】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号13のアミノ酸配列(1A11.H3_{V_H})又は配列番号13のアミノ酸配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、重鎖可変領域、あるいは配列番号121、123、125、127、129又は131のいずれか記載のアミノ酸配列を含んでなる、重鎖可変領域と、配列番号22のアミノ酸配列(1A11.L4_V)又は配列番号22のアミノ酸配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、軽鎖可変領域とを含んでなる。

40

【0029】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号114のアミノ酸配列、又は配列番号114若しくは配列番号118のアミノ酸配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、重鎖を含んでなる。特定の実施形態では、重鎖は、N98D、N9

50

8 E、F 1 0 0 b E、F 1 0 0 b H、F 1 0 0 b I及びF 1 0 0 b V (K a b a t) から選択される1以上の置換を含んでなる。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号115のアミノ酸配列、又は配列番号115のアミノ酸配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、軽鎖を含んでなる。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号114若しくは118のアミノ酸配列、又は配列番号114若しくは118のアミノ酸配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、重鎖と、配列番号115のアミノ酸配列又は配列番号115のアミノ酸配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、軽鎖とを含んでなる。特定の実施形態は、配列番号118の重鎖アミノ酸配列と、配列番号115の軽鎖アミノ酸配列とを有する抗原結合タンパク質を含んでなる。

10

【0030】

別の態様では、本発明は：

- (i) 配列番号2に記載のCDRH1又はその変異体CDR、
 - (ii) 配列番号3に記載のCDRH2又はその変異体CDR、
 - (iii) 配列番号4に記載のCDRH3又はその変異体CDR、あるいは配列番号132~137のいずれか記載のCDRH3、
 - (iv) 配列番号5に記載のCDRL1又はその変異体CDR、
 - (v) 配列番号6に記載のCDRL2又はその変異体CDR、
 - (vi) 配列番号7に記載のCDRL3又はその変異体CDR
- のうちの1以上を含んでなる、抗原結合タンパク質であって、以下の残基：

20

- (a) 位置2におけるVal、Ile、又はGly
- (b) 位置4におけるLeu又はVal
- (c) 位置20におけるLeu、Ile、Met、又はVal
- (d) 位置22におけるCys
- (e) 位置24におけるThr、Ala、Val、Gly又はSer
- (f) 位置26におけるGly
- (g) 位置47におけるTrp又はTyr
- (h) 位置48におけるIle、Met、Val、又はLeu
- (i) 位置69におけるIle、Leu、Phe、Met、又はVal
- (j) 位置71におけるArg、Val、Ala、又はLeu
- (k) 位置78におけるAla、Leu、Val、Tyr、又はPhe
- (l) 位置80におけるLeu又はMet
- (m) 位置90におけるTry又はPhe
- (n) 位置92におけるCys
- (o) 位置94におけるArg、Lys、Gly、Ser、His又はAsn

30

のうちの少なくとも1つを有する重鎖フレームワーク及び/又は以下の残基：

- (p) 位置2におけるIle
- (q) 位置4におけるLeu
- (r) 位置23におけるCys
- (s) 位置35におけるTrp
- (t) 位置36におけるTry
- (u) 位置71におけるTry又はPhe
- (v) 位置88におけるCys
- (w) 位置98におけるPhe

40

のうちの少なくとも1つを有する軽鎖フレームワークを更に含んでなり、CD127に結合することができる抗原結合タンパク質を提供する。

【0031】

50

抗原結合タンパク質は、1つのCDRから6つの前記CDR（配列番号2～7）までを含んでなる、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3の任意の組合せを含んでなり得る。1つの実施形態では、前記抗原結合タンパク質は、前記CDRの6つ全て（配列番号2～7）を含んでなる。

【0032】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、上記重鎖フレームワークと軽鎖フレームワーク領域とを両方とも含んでなる。

【0033】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は抗体であり、任意で、ヒト化抗体若しくはヒト化抗体、又はこれらの抗原結合断片である。

10

【0034】

本発明のこの態様の1以上の変異体CDRは、以下を含んでなり得る：

(a) 以下のCDRH1（配列番号2）の変異体：

i . 位置32におけるチロシン残基が、イソロイシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トレオニン、アスパラギン、システイン、グルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されている；

ii . 位置33におけるトレオニン残基が、チロシン、アラニン、トリプトファン、グリシン、ロイシン又はバリンに置換されている；

iii . 位置34におけるメチオニン残基が、イソロイシン、バリン又はトリプトファンに置換されている；及び/又は

20

iv . 位置35におけるアスパラギン残基が、ヒスチジン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、チロシン又はトレオニンに置換されている；

(b) 以下のCDRH2（配列番号3）の変異体：

i . 位置50におけるロイシン残基が、アルギニン、グルタミン酸、トリプトファン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、アスパラギン、リシン又はアラニンに置換されている；

ii . 位置51におけるイソロイシン残基が、ロイシン、バリン、トレオニン、セリン又はアスパラギンに置換されている；

iii . 位置52におけるアスパラギン残基が、アスパラギン、ロイシン、セリン又はチロシンに置換されている；

30

iv . 位置53におけるチロシン残基が、アラニン、グリシン、セリン、リシン、トレオニン又はアスパラギンに置換されている；

v . 位置54におけるアスパラギンが、セリン、トレオニン、リシン、アスパラギン又はグリシンに置換されている；

vi . 位置56におけるバリンが、チロシン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシン、セリン又はアラニンに置換されている；及び/又は

vii . 位置58におけるセリンが、リシン、アスパラギン、トレオニン、アルギニン、グリシン、フェニルアラニン又はチロシンに置換されている；

(c) 位置102におけるバリンが、チロシン、ヒスチジン、イソロイシン、セリン、アスパラギン酸又はグリシンに置換されているCDRH3（配列番号4）の変異体；

40

(d) 以下のCDRL1（配列番号5）の変異体：

i . 位置29におけるセリンが、バリンに置換されている；及び/又は

ii . 位置33におけるメチオニンが、ロイシンに置換されている；及び/又は

(e) 以下の置換のうちの1以上を含んでなる、CDRL3（配列番号7）の変異体：

i . 位置89におけるグルタミンが、ロイシンに置換されている；

ii . 位置90におけるグルタミン酸が、グルタミンに置換されている；

iii . 位置91におけるトリプトファンが、チロシンに置換されている；及び/又は

は

iv . 位置93におけるチロシンが、セリン又はアルギニンに置換されている。

【0035】

50

抗原結合タンパク質は、配列番号10～17のいずれかの重鎖可変領域(1A11.H0V_H～1A11.H7V_H)又は配列番号121、123、125、127、129若しくは131のいずれかの重鎖可変領域を含んでなり得る。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号13の重鎖可変領域(1A11.H3V_H)を含んでなる。前記抗原結合タンパク質は、配列番号18～27のいずれかの軽鎖可変領域(1A11.L0V～1A11.L9V)を含んでなり得る。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号22の軽鎖可変領域(1A11.L4V)を含んでなる。

【0036】

特定の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号13の重鎖可変領域(1A11.H3V_H)及び配列番号22の軽鎖可変領域(1A11.L4V)を含んでなる。別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号114又は配列番号118、特に配列番号118の重鎖と、配列番号115の軽鎖とを含んでなる。重鎖は、以下の置換のいずれかを更に含んでなり得る：N98D、N98E、F100bE、F100bH、F100bI及びF100bV(Kabat)。

10

【0037】

別の実施形態では、抗原結合タンパク質は、CDRH3内に1以上の点突然変異を含んでなり、前記抗原結合タンパク質は、前記突然変異を欠く抗原結合タンパク質よりもIL-7Rに対して高い結合親和性を有する。例えば、1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号132～137に記載のCDRH3を含んでなる。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号121、123、125、127、129又は131に記載の重鎖可変領域を含んでなる。

20

【0038】

別の態様では、本発明は、以下に記載の重鎖可変ドメイン：

- (a) 配列番号11
- (b) 配列番号12
- (c) 配列番号13
- (d) 配列番号14
- (e) 配列番号15
- (f) 配列番号16
- (g) 配列番号17
- (h) 配列番号121
- (i) 配列番号123
- (j) 配列番号125
- (k) 配列番号127
- (l) 配列番号129
- (m) 配列番号：131、

30

又は配列番号11～17のうちの1つに対して70%以上の同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる、抗原結合タンパク質であって、CD127に結合することができる抗原結合タンパク質を提供する。

40

【0039】

1つの実施形態では、重鎖可変ドメインは、配列番号11～17のうちの1つに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する。

【0040】

1つの実施形態では、前記抗原結合タンパク質は、配列番号13に記載の重鎖可変ドメイン、又は配列番号13に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる。

【0041】

50

1つの実施形態では、前記抗原結合タンパク質は、配列番号115又は配列番号118に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する重鎖を有する。

【0042】

1つの実施形態では、重鎖、又は重鎖可変ドメインは、配列番号11~17、121、123、125、127、129、131のうちの1つの変異体であり、変異の程度は、以下のうちの1以上からなる：

- i . 位置2におけるVal、Ile、又はGly
- ii . 位置4におけるLeu又はVal
- iii . 位置20におけるLeu、Ile、Met、又はVal
- iv . 位置24におけるThr、Ala、Val、Gly又はSer
- v . 位置47におけるTrp又はTyr
- vi . 位置48におけるIle、Met、Val、又はLeu
- vii . 位置69におけるIle、Leu、Phe、Met、又はVal
- viii . 位置71におけるArg、Val、Ala、又はLeu
- ix . 位置78におけるAla、Leu、Val、Tyr、又はPhe
- x . 位置80におけるLeu又はMet
- xi . 位置90におけるTry又はPhe、及び
- xii . 位置94におけるArg、Lys、Gly、Ser、His又はAsn。

10

【0043】

別の態様では、本発明は、以下に記載の軽鎖可変ドメイン：

- (a) 配列番号19
- (b) 配列番号20
- (c) 配列番号21
- (d) 配列番号22
- (e) 配列番号23
- (f) 配列番号24
- (g) 配列番号25
- (h) 配列番号26
- (i) 配列番号27

30

又は配列番号19~27のうちの1つに対して70%以上の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、抗原結合タンパク質であって、CD127に結合することができる抗原結合タンパク質を提供する。

【0044】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号22に記載の軽鎖可変ドメイン、又は配列番号22に対して70%以上の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。

【0045】

1つの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、配列番号19~27のうちの1つに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する。

40

【0046】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号115に対して70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有する軽鎖を有する。

【0047】

本発明は、記載する重鎖及び軽鎖の可変ドメインの任意の対合を意図する。したがって、1つの実施形態では、本発明は、また、以下の重鎖及び軽鎖の可変ドメインの組合せのうちの任意の1つを含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する：配列番号11の重鎖可変ドメイン（又はそれに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95

50

を有する配列)。

【0048】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号13に記載の配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、重鎖可変ドメインと、配列番号22に記載の配列に対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

【0049】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号13に記載の重鎖可変ドメインと配列番号22に記載の軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

10

【0050】

別の態様では、本発明は、以下の相補性決定領域：

(i) 配列番号2に記載のCDRH1又はその変異体CDR、
 (ii) 配列番号3に記載のCDRH2又はその変異体CDR、
 (iii) 配列番号4に記載のCDRH3又はその変異体CDR、あるいは配列番号132~137のいずれか記載のCDRH3、
 (iv) 配列番号5に記載のCDRL1又はその変異体CDR、
 (v) 配列番号6に記載のCDRL2又はその変異体CDR、
 (vi) 配列番号7に記載のCDRL3又はその変異体CDR、
 のうちの1以上を含んでなり、前記CDRのうちの少なくとも1つが変異体CDRであり、CD127に結合することができる抗原結合タンパク質を提供する。

20

【0051】

1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号6に記載のCDRL2又はその変異体を少なくとも含んでなる。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号4に記載のCDRH3又はその変異体CDRを少なくとも含んでなる。本発明のこの態様の変異体CDRは、以下を含んでなり得る：

(f) 以下のCDRH1(配列番号2)の変異体：

i. 位置32におけるチロシン残基が、イソロイシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トレオニン、アスパラギン、システイン、グルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されている；

30

ii. 位置33におけるトレオニン残基が、チロシン、アラニン、トリプトファン、グリシン、ロイシン又はバリンに置換されている；

iii. 位置34におけるメチオニン残基が、イソロイシン、バリン又はトリプトファンに置換されている；及び/又は

iv. 位置35におけるアスパラギン残基が、ヒスチジン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、チロシン又はトレオニンに置換されている；

(g) 以下のCDRH2(配列番号3)の変異体：

i. 位置50におけるロイシン残基が、アルギニン、グルタミン酸、トリプトファン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、アスパラギン、リシン又はアラニンに置換されている；

40

ii. 位置51におけるイソロイシン残基が、ロイシン、バリン、トレオニン、セリン又はアスパラギンに置換されている；

iii. 位置52におけるアスパラギン残基が、アスパラギン、ロイシン、セリン又はチロシンに置換されている；

iv. 位置53におけるチロシン残基が、アラニン、グリシン、セリン、リシン、トレオニン又はアスパラギンに置換されている；

v. 位置54におけるアスパラギンが、セリン、トレオニン、リシン、アスパラギン又はグリシンに置換されている；

vi. 位置56におけるバリンが、チロシン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラ

50

ギン酸、グリシン、セリン又はアラニンに置換されている；及び/又は

v i i . 位置 5 8 におけるセリンが、リシン、アスパラギン、トレオニン、アルギニン、グリシン、フェニルアラニン又はチロシンに置換されている；

(h) 位置 1 0 2 におけるバリンが、チロシン、ヒスチジン、イソロイシン、セリン、アスパラギン酸又はグリシンに置換されている C D R H 3 (配列番号 4) の変異体；

(i) 以下の C D R L 1 (配列番号 5) の変異体：

i . 位置 2 9 におけるセリンが、バリンに置換されている；及び/又は

i i . 位置 3 3 におけるメチオニンが、ロイシンに置換されている；及び/又は

(j) 以下の置換のうちの 1 以上を含んでなる、C D R L 3 (配列番号 7) の変異体：

i . 位置 8 9 におけるグルタミンが、ロイシンに置換されている；

i i . 位置 9 0 におけるグルタミン酸が、グルタミンに置換されている；

i i i . 位置 9 1 におけるトリプトファンが、チロシンに置換されている；及び/又は

は

i v . 位置 9 3 におけるチロシンが、セリン又はアルギニンに置換されている。

【 0 0 5 2 】

別の態様では、本発明は、
重鎖可変ドメインフレームワークに：

(i) 配列番号 2 に記載の C D R H 1 又はその変異体 C D R 、

(i i) 配列番号 3 に記載の C D R H 2 又はその変異体 C D R 、

(i i i) 配列番号 4 に記載の C D R H 3 又はその変異体 C D R 、あるいは配列番号 1 3 2 ~ 1 3 7 のいずれか記載の C D R H 3

を含んでなり、

(a) 位置 2 における V a l 、 I l e 、 又は G l y

(b) 位置 4 における L e u 又は V a l

(c) 位置 2 0 における L e u 、 I l e 、 M e t 、 又は V a l

(d) 位置 2 2 における C y s

(e) 位置 2 4 における T h r 、 A l a 、 V a l 、 G l y 又は S e r

(f) 位置 2 6 における G l y

(g) 位置 4 7 における T r p 又は T y r

(h) 位置 4 8 における I l e 、 M e t 、 V a l 、 又は L e u

(i) 位置 6 9 における I l e 、 L e u 、 P h e 、 M e t 、 又は V a l

(j) 位置 7 1 における A r g 、 V a l 、 A l a 、 又は L e u

(k) 位置 7 8 における A l a 、 L e u 、 V a l 、 T y r 、 又は P h e

(l) 位置 8 0 における L e u 又は M e t

(m) 位置 9 0 における T r y 又は P h e

(n) 位置 9 2 における C y s

(o) 位置 9 4 における A r g 、 L y s 、 G l y 、 S e r 、 H i s 又は A s n 、
のうちの少なくとも 1 つを含んでなる、重鎖可変ドメインと、

軽鎖可変ドメインフレームワークに：

(i v) 配列番号 5 に記載の C D R L 1 又はその変異体 C D R 、

(v) 配列番号 6 に記載の C D R L 2 又はその変異体 C D R 、

(v i) 配列番号 7 に記載の C D R L 3 又はその変異体 C D R

を含んでなり、

(a) 位置 2 における I l e

(b) 位置 4 における L e u

(c) 位置 2 3 における C y s

(d) 位置 3 5 における T r p

(e) 位置 3 6 における T r y

(f) 位置 7 1 における T r y 又は P h e

(g) 位置 8 8 における C y s

10

20

30

40

50

(h) 位置 98 における P h e
 のうちの少なくとも 1 つを含んでなる、軽鎖可変ドメインとを含んでなり、C D 1 2 7 に結合することができる抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 0 5 3 】

本発明のこの態様の変異体 C D R は、以下を含んでなり得る：

- (a) 以下の C D R H 1 (配列番号 2) の変異体：
- i . 位置 3 2 におけるチロシン残基が、イソロイシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トレオニン、アスパラギン、システイン、グルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されている；
 - i i . 位置 3 3 におけるトレオニン残基が、チロシン、アラニン、トリプトファン、グリシン、ロイシン又はバリンに置換されている； 10
 - i i i . 位置 3 4 におけるメチオニン残基が、イソロイシン、バリン又はトリプトファンに置換されている；及び / 又は
 - i v . 位置 3 5 におけるアスパラギン残基が、ヒスチジン、グルタミン酸、グルタミン、セリン、チロシン又はトレオニンに置換されている；
- (b) 以下の C D R H 2 (配列番号 3) の変異体：
- i . 位置 5 0 におけるロイシン残基が、アルギニン、グルタミン酸、トリプトファン、チロシン、グリシン、グルタミン、バリン、アスパラギン、リシン又はアラニンに置換されている；
 - i i . 位置 5 1 におけるイソロイシン残基が、ロイシン、バリン、トレオニン、セリン又はアスパラギンに置換されている； 20
 - i i i . 位置 5 2 におけるアスパラギン残基が、アスパラギン、ロイシン、セリン又はチロシンに置換されている；
 - i v . 位置 5 3 におけるチロシン残基が、アラニン、グリシン、セリン、リシン、トレオニン又はアスパラギンに置換されている；
 - v . 位置 5 4 におけるアスパラギンが、セリン、トレオニン、リシン、アスパラギン又はグリシンに置換されている；
 - v i . 位置 5 6 におけるバリンが、チロシン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グリシン、セリン又はアラニンに置換されている；及び / 又は
 - v i i . 位置 5 8 におけるセリンが、リシン、アスパラギン、トレオニン、アルギニン、グリシン、フェニルアラニン又はチロシンに置換されている； 30
- (c) 位置 1 0 2 におけるバリンが、チロシン、ヒスチジン、イソロイシン、セリン、アスパラギン酸又はグリシンに置換されている C D R H 3 (配列番号 4) の変異体；
- (d) 以下の C D R L 1 (配列番号 5) の変異体：
- i . 位置 2 9 におけるセリンが、バリンに置換されている；及び / 又は
 - i i . 位置 3 3 におけるメチオニンが、ロイシンに置換されている；及び / 又は
- (e) 以下の置換のうちの 1 以上を含んでなる、C D R L 3 (配列番号 7) の変異体：
- i . 位置 8 9 におけるグルタミンが、ロイシンに置換されている；
 - i i . 位置 9 0 におけるグルタミン酸が、グルタミンに置換されている；
 - i i i . 位置 9 1 におけるトリプトファンが、チロシンに置換されている；及び / 又は 40
 - i v . 位置 9 3 におけるチロシンが、セリン又はアルギニンに置換されている。

【 0 0 5 4 】

1 つの実施形態では、抗原結合タンパク質は抗体であり、任意で、ヒト化抗体若しくはヒト抗体、又はこれらの抗原結合断片である。

【 0 0 5 5 】

別の態様では、本発明は、以下の相補性決定領域：

- (i) 配列番号 3 9 に記載の C D R H 1、
- (i i) 配列番号 4 0 に記載の C D R H 2、
- (i i i) 配列番号 4 1 に記載の C D R H 3

のうちの1、2、又は3つを含んでなる、重鎖可変領域を含んでなる、抗体であって、(Kabatに従って番号付けされる)重鎖可変領域の位置24におけるバリン、位置27におけるチロシン、位置28におけるセリン、位置29におけるイソロイシン、位置30におけるトレオニン、位置48におけるメチオニン、位置49におけるグリシン、位置67におけるイソロイシン、位置68におけるセリン、位置71におけるアルギニン、位置73におけるトレオニン、及び位置78におけるフェニルアラニンのうちの少なくとも1つを更に含んでなる、抗体を提供する。

【0056】

1つの実施形態では、抗体は、位置27におけるチロシン、位置30におけるトレオニン、位置48におけるメチオニン、位置67におけるイソロイシン及び位置71におけるアルギニンのうちの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つ全てを含んでなる。

10

【0057】

抗体は、CDRH1(配列番号39)及びCDRH3(配列番号41);CDRH2(配列番号40)及びCDRH3(配列番号41);CDRH1(配列番号39)及びCDRH2(配列番号40);又はCDRH1(配列番号39)、CDRH2(配列番号40)及びCDRH3(配列番号41)を含んでなる、重鎖可変領域を含んでなり得る。抗体は、配列番号48~56(6A3IGHV4__61.H1V_H~6A3IGHV4__61.H9)又は配列番号58~68(6A3IGHV3-33.H1V_H~6A3IGHV3-33.H11)のうちのいずれかの重鎖可変領域を含んでなり得る。

【0058】

20

また、本発明は、以下の相補性決定領域:

- (iv)配列番号42に記載のCDRL1、
- (v)配列番号43に記載のCDRL2、
- (vi)配列番号44に記載のCDRL3

のうちの1つ、2つ、又は3つを含んでなる、軽鎖可変領域を含んでなる、抗体であって、(Kabatに従って番号付けされる)

(a)可変領域軽鎖の位置45におけるグルタミン残基、及び位置70におけるリシン残基の一方又は両方、あるいは

(b)位置4におけるロイシン、位置31におけるチロシン、位置70におけるメチオニン、位置85におけるトレオニン、位置94におけるチロシン、位置100におけるグリシン、及び位置104におけるバリンのうちの1以上を更に含んでなる、抗体を提供する。

30

【0059】

1つの実施形態では、抗体は、位置45におけるグルタミン残基及び位置71におけるリシン残基を両方とも含んでなる。別の実施形態では、抗体は、位置4におけるロイシン、位置31におけるチロシン、位置70におけるメチオニン、位置85におけるトレオニン、位置94におけるチロシン、位置100におけるグリシン、及び位置104におけるバリンの各々を含んでなる。

【0060】

40

抗体は、CDRL1(配列番号42)及びCDRL3(配列番号44);CDRL2(配列番号43)及びCDRL3(配列番号44);CDRL1(配列番号42)及びCDRL2(配列番号43);又はCDRL1(配列番号42)、CDRL2(配列番号43)及びCDRL3(配列番号44)を含んでなる、軽鎖可変領域を含んでなり得る。抗体は、配列番号70~72及び138のうちのいずれかの軽鎖可変領域(6A3.L1V、6A3.L2V、6A3.L3V及び6A3.L27V)を含んでなり得る。

【0061】

別の態様では、本発明は、以下の相補性決定領域:

- (iv)配列番号39に記載のCDRH1、

50

(v) 配列番号40に記載のCDRH2、
 (vi) 配列番号41に記載のCDRH3
 のうちの1、2、又は3つを含んでなる、重鎖可変領域を含んでなり、
 重鎖可変領域の位置24におけるバリン、位置27におけるチロシン、位置28における
 セリン、位置29におけるイソロイシン、位置30におけるトレオニン、位置48にお
 けるメチオニン、位置49におけるグリシン、位置67におけるイソロイシン、位置68に
 おけるセリン、位置71におけるアルギニン、位置73におけるトレオニン、及び位置7
 8におけるフェニルアラニンのうちの少なくとも1つを更に含んでなり、
 以下の相補性決定領域：

(i) 配列番号42に記載のCDRL1、
 (ii) 配列番号43に記載のCDRL2、
 (iii) 配列番号44に記載のCDRL3
 のうちの1つ、2又は3つを含んでなる、軽鎖可変領域を含んでなり、
 (Kabattに従って番号付けされる)
 (a) 可変領域軽鎖の位置45におけるグルタミン残基及び位置70におけるリシン残
 基の一方又は両方；あるいは
 (b) 位置4におけるロイシン、位置31におけるチロシン、位置70におけるメチオ
 ニン、位置85におけるトレオニン、位置94におけるチロシン、位置100におけるグ
 リシン、及び位置104におけるバリンのうちの1以上
 を更に含んでなる、抗体を提供する。

【0062】

抗体は、1つの重鎖CDR及び1つの軽鎖CDRから前記CDRの6つ全てまでを含ん
 でなる、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3
 の任意の組合せを含んでなり得る。

【0063】

1つの実施形態では、抗体は、以下の相補性決定領域：
 (i) 配列番号39に記載のCDRH1、
 (ii) 配列番号40に記載のCDRH2、
 (iii) 配列番号41に記載のCDRH3、
 (iv) 配列番号42に記載のCDRL1、
 (v) 配列番号43に記載のCDRL2、
 (vi) 配列番号44に記載のCDRL3
 を含んでなる、重鎖可変領域を含んでなり、
 前記抗体は、以下のうちの少なくとも1つを更に含んでなる：

(a) 重鎖可変領域の位置24におけるバリン、位置27におけるチロシン、位置28
 におけるセリン、位置29におけるイソロイシン、位置30におけるトレオニン、位置4
 8におけるメチオニン、位置49におけるグリシン、位置67におけるイソロイシン、位
 置68におけるセリン、位置71におけるアルギニン、位置73におけるトレオニン、及
 び位置78におけるフェニルアラニン、及び/又は

(b) (Kabattに従って番号付けされる)
 a. 可変領域軽鎖の位置45におけるグルタミン残基及び位置70におけるリシン残
 基のうちの少なくとも1つ、又は
 b. 位置4におけるロイシン、位置31におけるチロシン、位置70におけるメチオ
 ニン、位置85におけるトレオニン、位置94におけるチロシン、位置100におけるグ
 リシン、及び位置104におけるバリンのうちの1以上。

【0064】

本発明は、記載する重鎖及び軽鎖の可変ドメインの任意の対合を意図する。したがっ
 て、1つの実施形態では、本発明は、また、以下の重鎖及び軽鎖の可変ドメインの組合せの
 うちの任意の1つを含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する：配列番号47の重鎖可
 変ドメイン（又はそれに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95

%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する配列)。
。

【0065】

特定の実施形態では、配列番号53、54、55、又は56に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号138に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。

【0066】

結合タンパク質は、抗体、特に、ヒト化抗体若しくはヒト抗体、又はこれらの抗原結合断片であり得る。

【0067】

別の態様では、本発明は、配列番号28の可変重鎖ドメインと配列番号29の可変軽鎖ドメイン、又は配列番号73の可変重鎖ドメインと配列番号74の可変軽鎖ドメインを含んでなる、キメラ抗体を提供する。

【0068】

本発明の抗原結合タンパク質は、TSLPシグナル伝達を阻害することはできない。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質はTSLPシグナル伝達を阻害しない。

【0069】

また、本発明は、本発明の抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。1つの実施形態では、本発明は、配列番号30~38、配列番号75~113、配列番号119~120、並びに配列番号122、124、126、128、及び130の核酸分子を提供する。また、本発明は、本明細書に定義する核酸分子を含んでなる、発現ベクター、及び本明細書に定義する発現ベクターを含んでなる、組換え宿主細胞を提供する。発現ベクターは、配列番号30~38、配列番号75~113、及び配列番号119~120、並びに配列番号122、124、126、128、及び130のうちの任意の1以上の核酸分子を含んでなり得る。1つの実施形態では、発現ベクターは、上記抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を含んでなる。別の実施形態では、本発明は、上記発現ベクターを含んでなる、宿主細胞を提供する。更なる実施形態では、本発明は、上記宿主細胞によって発現される抗体を提供する。

【0070】

また、本発明は、本発明の抗原結合タンパク質を産生する方法であって、上に定義した宿主細胞を培養する工程と、前記抗原結合タンパク質を回収する工程とを含んでなる、方法を提供する。

【0071】

また、本発明は、本発明に係る抗体又は抗原結合タンパク質をコードする核酸配列又は配列を含んでなる、宿主細胞により発現される本発明に係る抗体又は抗原結合タンパク質を提供する。

【0072】

また、本発明は、本発明の抗原結合タンパク質と、薬学上許容される担体又は賦形剤とを含んでなる、医薬組成物を提供する。

【0073】

また、本発明は、自己免疫疾患又は炎症性疾患に罹患している被験体を治療する方法であって、本発明の抗原結合タンパク質を被験体に投与する工程を含んでなる、方法を提供する。

【0074】

また、本発明は、病原性T_H17細胞が関与する疾患に罹患している被験体を治療する方法であって、本発明の抗原結合タンパク質を被験体に投与する工程を含んでなる、方法を提供する。

【0075】

また、本発明は、アップレギュレートされたIL-17の発現に関連する疾患に罹患している被験体を治療する方法であって、本発明の抗原結合タンパク質を被験体に投与する

10

20

30

40

50

工程を含んでなる、方法を提供する。

【0076】

具体的には、自己免疫疾患又は炎症性疾患、病原性の T_H17 細胞が関与する疾患、あるいはアップレギュレートされた $IL-17$ の発現に関連する疾患は、多発性硬化症(MS)、SLE、関節リウマチ、ベーチェット病、又は喘息であり得る。1つの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、多発性硬化症を治療する方法において有用である。本発明の抗原結合タンパク質の投与によって治療することができる他の疾患を本明細書に記載する。

【0077】

また、本発明は、自己免疫疾患又は炎症性疾患；病原性の T_H17 細胞が関与する疾患；あるいはアップレギュレートされた $IL-17$ の発現に関連する疾患に罹患している被験体の治療において使用するための、本明細書に記載する抗原結合タンパク質を提供する。

10

【0078】

また、本発明は、自己免疫疾患又は炎症性疾患；病原性の T_H17 細胞が関与する疾患；あるいはアップレギュレートされた $IL-17$ の発現に関連する疾患に罹患している被験体の治療において使用するための薬剤の製造における、本明細書に記載する抗原結合タンパク質の使用を提供する。

【0079】

本発明の他の態様及び実施形態は、以下の詳細な説明から明白になるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、 $hIL-7R$ を発現するHEK293細胞に対する抗 $IL7R$ mAb 1A11 H3L4の補体依存性細胞傷害を示す。

【図2】図2は、末梢血単核細胞の存在下における、 $hIL-7R$ を発現するHEK293細胞に対するヒト化抗 $IL7R$ mAb 1A11 H3L4及びFc不能抗 $IL7R$ mAb (1A11 H3L4Fc)の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を示す。

【図3】図3A及び3Bは、2人の別々のドナーによって提供されたヒトPBMCにおける1A11 H3L4による $IL-7$ 誘導性STAT5リン酸化の阻害を示す。

【図4】図4A~4Dは、(4人の異なるドナーにおける)1A11 H3L4による分化したヒト T_H17 細胞における $IL-7$ 誘導性 $IL-17$ 産生の阻害を示す。

30

【図5】図5A~5Eは、1A11 H3L4がTARC(胸腺及び活性化制御ケモカイン)のTSLP誘導に影響を与えないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0081】

$IL-7/IL-7R$ シグナル伝達は、マウス及びヒトの両方の系において関係する T_H17 細胞の生存及び増殖にとって必須であるが、 T_H17 分化におけるその役割は、 $IL-6$ に比べて本質的ではない(Liuら, (2010年) Nature Medicine 16:191-197)。驚くべきことに、 $IL-7R$ の拮抗作用による免疫系に対するインビボにおける効果は、多発性硬化症の動物モデルであるEAEにおいて高度に選択的であり、 T_H17 細胞に影響を与え、それよりも低い程度ではあるが主に記憶表現型の T_H1 細胞に影響を与え、 T_{reg} 細胞には影響を与えない。この選択性が、EAEにおける $IL-7R$ 拮抗作用による病原性の T_H17 細胞と T_{reg} 細胞との比のリバランシングにおいて重要な役割を果たしていると考えられ、また、治効に寄与している。

40

【0082】

T_H17 細胞の生存及び増殖における $IL-7/IL-7R$ シグナル伝達の役割は、MS等のヒト自己免疫疾患における $IL-7R$ 拮抗作用の治効を補助することである。 $IL-7$ の中和又は $IL-7R$ の拮抗作用は、独自の治療上の利点を有する可能性がある。一方では、この治療は、病原性の T_H1 及び T_H17 細胞と T_{reg} 及び無関係な免疫細胞を区別する選択性を付与する。他方では、 $IL-7R$ 拮抗作用の更なる治療上の利点は、

50

T_H17の分化とは対照的に、分化したT_H17の生存及び増殖に対するその選択的効果を含んでなる。T_H17分化に対する関係するT_H17のインビボにおける維持を標的とすることが、治療の状況においてより効率的であると考えられる。したがって、IL-7受容体媒介性シグナル伝達の阻害は、自己免疫疾患又は炎症性疾患を治療するための有望な治療的介入を提供する。

【0083】

本発明で使用するIL-7R媒介性シグナル伝達という用語は、そのリガンドであるIL-7が結合したときにIL-7受容体複合体によって引き起こされる生物学的作用を意味する。したがって、IL-7R媒介性シグナル伝達は、必ずしも限定される訳ではないが、STAT-5のIL-7誘導性リン酸化、T_H17細胞のIL-7誘導性増殖、及びT_H17細胞のIL-7誘導性生存のうちの1以上又は全てを含んでなる。

10

【0084】

国際出願第PCT/US2009/053136号(国際出願第2010/017468号パンフレット)には、マウス抗体1A11及び6A3が記載されている。これら抗体は、ヒトIL-7受容体の鎖であるCD127(配列番号1)に特異的に結合する。これら抗体の可変ドメインは、配列番号8及び9(それぞれ、V_H、V_H1A11)、並びに配列番号45及び46(それぞれV_H、V_H6A3)に記載されている。

【0085】

本発明は、1A11又は6A3の相補性決定領域(CDR)のうちの1以上を含んでなる、抗原結合タンパク質、及びその変異体を提供する。抗原結合タンパク質は、IL-7Rに結合し、IL-7Rのシグナル伝達を中和することができる。1つの実施形態では、本発明は、ヒトアクセプタ抗体においてマウス抗体1A11又は6A3(ドナー抗体)由来のCDRのうちの1つ~6つを含んでなる、ヒト化抗体を提供する。

20

【0086】

本発明で使用する用語「抗原結合タンパク質」は、CD127に結合することができる抗体、抗体断片、及びドメイン等のタンパク質構造を指す。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は抗体である。

【0087】

本発明で使用する用語「抗体」は、最も広い意味で、免疫グロブリン様ドメインを有する分子を指し、例えば、モノクローナル抗体、組換え型抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、及びヘテロコンジュゲート抗体;単一可変ドメイン、ドメイン抗体、抗原結合断片、免疫学的に有効な断片、単鎖Fv、ダイアボディ、Tandabs(商標)等が挙げられる(別の「抗体」フォーマットの概要については、Holliger及びHudson, Nature Biotechnology, 2005年, 23巻, 9号, 1126-1136を参照されたい)。

30

【0088】

語句「単一可変ドメイン」とは、異なる可変領域又はドメインとは独立に、抗原又はエピトープに特異的に結合する抗原結合タンパク質の可変ドメイン(例えば、V_H、V_HH、V_L)を指す。

【0089】

「ドメイン抗体」又は「dAb」は、抗原に結合することができる「単一可変ドメイン」と同一であると考えてよい。単一可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインであってもよいが、げっ歯類(例えば、国際公開第00/29004号パンフレットに開示されている)、テンジクザメ及びラクダ科のV_HHdAb等の他の種に由来する単一抗体可変ドメインも含んでなる。ラクダ科のV_HHは、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ及びゲアナコを含む種に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドであり、天然に軽鎖が欠けている重鎖抗体を産生する。このようなV_HHドメインは、当技術分野において利用可能な標準技術に従ってヒト化することができ、このようなドメインは、「ドメイン抗体」であると考えられる。本発明で使用するV_Hとしては、ラクダ科のV_HHドメインが挙げられる。

40

50

【0090】

本発明で使用する用語「ドメイン」は、タンパク質の残りとは無関係の三次構造を有する折り畳まれたタンパク質構造である。一般的に、ドメインは、タンパク質の個別の機能特性に關与しており、多くの場合、タンパク質及び/又はドメインの残りの機能を失うことなく付加、除去、又は他のタンパク質に転移することができる。「単一可変ドメイン」は、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含んでなる、折り畳まれたポリペプチドドメインである。したがって、それは、完全な抗体可変ドメイン及び、例えば、抗体可変ドメインに特徴的ではない配列、切頭されているか又はN末端若しくはC末端に伸長を含んでなる、抗体可変ドメイン、並びに完全長ドメインの結合活性及び特異性を少なくとも保持する可変ドメインの折り畳まれた断片によって1つ以上のループが置換されている改変可変ドメインを含んでなる。ドメインは、異なる可変領域又はドメインとは無関係に抗原又はエピトープに結合することができる。

10

【0091】

抗原結合断片は、ドメイン等の非抗体タンパク質スカフォールドに1以上のCDRを配置することにより提供することができる。非抗体タンパク質スカフォールド又はドメインは、例えば、以下から選択されるスカフォールドの誘導体であるドメイン等の天然リガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学に供されたものである：CTLA-4（エヴィボディ）；リポカイン；プロテインAのZドメイン等のプロテインAに由来する分子（アフィボディ、SpA）、Aドメイン（アヴィマー/マキシボディ）；GroE1及びGroES等の熱ショックタンパク質；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリン反復タンパク質（DARPin）；ペプチドアプタマー；C-型レクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒト-クリスタリン及びヒトユビキチン（アフィリン）；PDZドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のサソリ毒素クニツツ型ドメイン（アドネクチン）；これらは、その天然リガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学に供されている。

20

【0092】

CTLA-4（細胞毒性Tリンパ球関連抗原4）は、主にCD4+T細胞で発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様Igフォールドを有する。抗体のCDRに対応するループを異種配列で置換して、異なる結合性を付与してもよい。異なる結合特異性を有するように改変されたCTLA-4分子は、エヴィボディとしても知られている。更なる詳細については、Journal of Immunological Methods 248（1-2），31-45（2001年）を参照されたい。

30

【0093】

リポカインは、ステロイド、ピリン、レチノイド及び脂質等の小さな疎水性分子を輸送する細胞外タンパク質のファミリーである。これは、異なる表現抗原に結合するように改変することができるカノニカルな構造の開放端に多くのループを有する強固なシート二次構造を有する。アンチカリンの長さは160～180アミノ酸であり、リポカリンに由来する。更なる詳細については、Biochim Biophys Acta 1482：337-350（2000年）、米国特許第7250297B1号明細書及び米国特許出願公開第20070224633号明細書を参照されたい。

40

【0094】

アフィボディは、抗原に結合するように改変することができる黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）のプロテインAに由来するスカフォールドである。ドメインは、約58アミノ酸の3つのヘリックス束からなる。表面残基のランダム化によりライブラリが作製されている。更なる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 17，455-462（2004年）及び欧州特許出願公開第1641818A1号を参照されたい。

【0095】

アヴィマーは、Aドメインスカフォールドファミリーに由来する複数ドメインタンパク

50

質である。約35アミノ酸のネイティブドメインは、規定の二硫化物結合構造を有する。Aドメインのファミリーの示す自然変動をシャッフルすることにより多様性が生じる。更なる詳細については、*Nature Biotechnology* 23(12), 1556-1561(2005年)及び*Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917(2007年7月)を参照されたい。

【0096】

トランスフェリンは、モノマー性血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、1以上のCDR等のペプチド配列を許容表面ループに挿入することにより異なる標的抗原に結合するように改変することができる。改変されたトランスフェリンスカフォールドの例としては、トランスポディが挙げられる。更なる詳細については、*J. Biol. Chem* 274, 24066-24073(1999年)を参照されたい。

10

【0097】

設計アンキリン反復タンパク質(DARPin)は、細胞骨格に対する不可欠な膜タンパク質の結合を媒介するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。単一アンキリン反復は、2つの α -ヘリックス及び β -ターンからなる33残基のモチーフである。これらは、各反復の最初の α -ヘリックス及び β -ターンにおける残基をランダム化するか、又は1以上のCDR等のペプチド配列を挿入することにより、異なる標的抗原に結合するように改変することができる。これらの結合界面は、モジュール数を増加させることにより増加し得る(親和性成熟の方法)。更なる詳細については、*J. Mol. Biol.* 332, 489-503(2003年), *PNAS* 100(4), 1700-1705(2003年)、及び*J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028(2007年)、米国特許出願公開第20040132028A1号明細書を参照されたい。

20

【0098】

フィブロネクチンは、抗原に結合するように改変することができるスカフォールドである。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型(FN3)の15の反復単位のうちの10番目のドメインの天然アミノ酸配列の骨格からなる。 α -サンドイッチの一端における3つのループは、対象となる治療標的をアドネクチンが特異的に認識できるように改変することができる。更なる詳細については、*Protein Eng. Des. Sel.* 18, 435-444(2005年)、米国特許出願公開第20080139791号明細書、国際公開2005056764号パンフレット、及び米国特許第6818418B1号明細書を参照されたい。

30

【0099】

ペプチドアプタマーは、定常スカフォールドタンパク質、典型的には、活性部位に挿入された拘束可変ペプチドループを含有するチオレドキシニン(TrxA)からなるコンビナトリアルな認識分子である。更なる詳細については、*Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 783-797(2005年)を参照されたい。

【0100】

マイクロボディーは、3~4つのシステイン架橋を含有する長さ25~50アミノ酸の天然に存在する微小タンパク質に由来し；微小タンパク質の例としては、KalataB1及びコノトキシニン及びノッティンが挙げられる。微小タンパク質は、微小タンパク質の折り畳み全体に影響を与えることなく、最高25アミノ酸を含んでなるように改変することができるループを有する。改変されたノッティンドメインの更なる詳細については、国際公開第2008098796号パンフレットを参照されたい。

40

【0101】

他の結合ドメインとしては、異なる標的抗原結合特性を改変するためにスカフォールドとして用いられているタンパク質が挙げられ、例えば、ヒト α -クリスタリン及びヒトユビキチン(アフィリン)、ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、Ras結合タンパク質AF-6のPDZドメイン、サソリ毒素(カリブドトキシニン)、C-型レクチンドメイン(テトラネクチン)が挙げられ、これらは、*Handbook of Ther*

50

apeutic Antibodiesの第7章Non - Antibody Scaffolds (2007年, Stefan Dubel編)及びProtein Science 15:14 - 27 (2006年)に概説されている。本発明の結合ドメインは、これら代替タンパク質ドメインのいずれか、及び前記ドメインにグラフトされた本発明のCDRの任意の組み合わせに由来し得る。

【0102】

抗原結合断片又は免疫学的に有効な断片は、部分的に重鎖又は軽鎖の可変配列を含んでなり得る。断片の長さは、少なくとも5、6、8、又は10アミノ酸である。あるいは、断片の長さは、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも75、又は少なくとも100アミノ酸である。

10

【0103】

抗原結合タンパク質に関連して本明細書全体で用いる用語「特異的に結合する」は、抗原結合タンパク質が、他の(例えば、無関係の)タンパク質には全く結合しないか又は殆ど結合しないがCD127には結合することを意味する。すなわち、本明細書に記載する抗原結合タンパク質及び抗体は、CD127に特異的に結合し得る。しかし、この用語は、抗原結合タンパク質が、マウスCD127、カニクイザル(Macaca fascicularis)、又はマーモセットのCD127等の他の種に由来するCD127と交差反応し得るという事実を除外するものではない。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、カニクイザル及びマーモセットの両方CD127に結合する。本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、他の種に由来するCD127に結合するよりも少なくとも2

20

【0104】

抗原結合タンパク質 - CD127相互作用の結合親和性又は平衡解離定数(K_D)は、100nM以下、10nM以下、2nM以下又は1nM以下であり得る。あるいは、 K_D は、5~10nM;又は1~2nMであってもよい。 K_D は、1pM~500pM;又は500pM~1nMであってもよい。抗原結合タンパク質の結合親和性は、会合速度定数(k_a)及び解離速度定数(k_d)によって決定される($K_D = k_d / k_a$)。結合親和性は、BIAcore(商標)により、例えば、一級アミンカップリングによってCM5チップにカップリングされたCD127による抗原捕捉及びこの表面上における抗原捕捉により測定することができる。実施例4に記載のBIAcore(商標)法を使用して、結合親和性を測定することができる。あるいは、結合親和性は、FORTEbioにより、例えば、一級アミンカップリングによってCM5針にカップリングされたCD127による抗原捕捉及びこの表面上における抗原捕捉により測定することができる。

30

【0105】

k_d は、 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下、又は $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下であり得る。 k_a は、 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$;又は $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であり得る。 k_d が遅いと、抗原結合タンパク質 - リガンド複合体の解離を遅らせ、リガンドの中和を改善することができる。

【0106】

用語「由来する」は、その意味における源が、物質の物理的起源であることを定義するだけでなく、物質と構造的に同一であるがレファレンス源を起源とする物質も定義することを意図することが、当業者には明らかであろう。したがって、「ドナー抗体で見られる残基」は必ずしもドナー抗体から精製されたものである必要はない。

40

【0107】

単離するとは、抗原結合タンパク質等の分子が、自然界で前記分子を見出すことができる環境から取り出されることを意図する。例えば、前記分子は、通常自然界において共に存在する物質から精製され得る。例えば、抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質を含有する培養培地に対して少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%以上に精製することができる。本発明の抗原結合タンパク質及び抗体は、単離された抗原結合タ

50

ンパク質及び抗体であってもよい。

【0108】

「キメラ抗体」は、アクセプター抗体由来の軽鎖及び重鎖定常領域に会合しているドナー抗体由来の天然に存在する可変領域（軽鎖及び重鎖）を含有する改変抗体の種類を指す。

【0109】

「ヒト化抗体」は、非ヒトドナー免疫グロブリン由来のCDRのうちの1以上を有し、分子の残りの免疫グロブリン由来部分が1以上のヒト免疫グロブリンに由来する改変抗体の種類を指す。更に、フレームワークサポート残基は、結合親和性を保つように変化させることができる（例えば、Queenら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032 (1989年), Hodgsonら, Bio/Technology, 9:421 (1991年)を参照されたい）。好適なヒトアクセプター抗体は、ドナー抗体のヌクレオチド及びアミノ酸の配列に対する相同性によって、従来のデータベース、例えば、KABAT（登録商標）データベース、Los Alamosデータベース、及びSwiss Proteinデータベースから選択される抗体であってもよい。（アミノ酸に基づいて）ドナー抗体のフレームワーク領域に対する相同性により特徴付けられるヒト化抗体は、ドナーCDRを挿入するために重鎖定常領域及び/又は重鎖可変フレームワーク領域を提供するのに好適であり得る。軽鎖の定常又は可変フレームワーク領域を供与することができる好適なアクセプター抗体は、同様の方法で選択することができる。アクセプター抗体の重鎖及び軽鎖は、同じアクセプター抗体を起源とする必要はないことに留意すべきである。先行技術には、このようなヒト化抗体を産生する幾つかの方法が記載されている。例えば、欧州特許出願公開第0239400号明細書及び欧州特許出願公開第054951号明細書を参照されたい。

【0110】

用語「ドナー抗体」は、その可変領域、1以上のCDR、若しくは他の機能性断片、又はこれらのアナログのアミノ酸配列を第1の免疫グロブリンパートナーに提供する抗体を指す。したがって、ドナーは、ドナー抗体に特徴的な抗原特異性及び中和活性を有する免疫グロブリンコーディング領域及びそれから生じる発現した改変抗体を提供する。

【0111】

用語「アクセプター抗体」は、ドナー抗体とは異種の抗体であって、その重鎖及び/若しくは軽鎖のフレームワーク領域並びに/又はその重鎖及び/若しくは軽鎖の定常領域をコードするアミノ酸配列の全て（又は任意の部分）を第1の免疫グロブリンパートナーに付与する抗体を指す。ヒト抗体は、アクセプター抗体であり得る。

【0112】

用語「V_H」及び「V_L」は、それぞれ、抗原結合タンパク質の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を指すために本発明で用いられる。また、Vは、可変軽鎖ドメインを指すために使用される。

【0113】

「CDR」は、抗原結合タンパク質の相補性決定領域のアミノ酸配列として定義される。これらは、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の超変異領域である。免疫グロブリンの可変部分には3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDR（すなわち、CDR領域）が存在する。したがって、本発明で使用する「CDR」は、3つの重鎖CDR全て、3つの軽鎖CDR全て、重鎖及び軽鎖のCDRの全て、又は少なくとも2つのCDRを指すために本発明で用いられる。

【0114】

本明細書全体にわたって、可変ドメイン配列及び完全長抗体配列におけるアミノ酸残基は、特に明記しない限り、Kabatsの番号付け規則に従って番号付けされる。同様に、実施例で用いられる用語「CDR」、「CDRL1」、「CDRL2」、「CDRL3」、「CDRH1」、「CDRH2」、「CDRH3」は、Kabatsの番号付け規則に従う。更なる情報については、Kabatsら, Sequences of Protein

10

20

30

40

50

s of Immunological Interest, 第4版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987年)を参照されたい。

【0115】

可変ドメイン配列及び完全長抗体配列におけるアミノ酸残基について別の番号付け規則が存在することが当業者には明らかであろう。また、例えば、Chothiaら。(1989年) Nature 342: 877-883に記載の通り、CDR配列についての別の番号付け規則も存在する。抗体の構造及びタンパク質の折り畳みは、他の残基をCDR配列の一部とみなすことを意味する場合があります、当業者にはそのように理解される。したがって、本発明で使用する用語「対応するCDR」は、例えば、表1に記載の通り、任意の番号付け規則を用いるCDR配列を指す。

10

【0116】

当業者が利用可能なCDR配列についての他の番号付け規則としては、「AbM」法(University of Bath)及び「contact」(University College London)法が挙げられる。少なくともKabat、Chothia、AbM及びcontact法のうちの少なくとも2つを用いる最小重複領域が、「最小結合単位」を提供すると定めることができる。最小結合単位は、CDRのサブ部分であってもよい。

【0117】

以下の表1は、各CDR又は結合単位について各番号付け規則を用いた1つの定義を表す。可変ドメインのアミノ酸配列を番号付けするために表1ではKabatの番号付けスキームを使用する。CDRの定義のうちの一部は、使用される個々の刊行物によって異なる場合があることに留意するべきである。

20

【表1】

表1:

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	Contact CDR	最小結合単位
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

30

40

【0118】

本発明で使用する用語「抗原結合部位」は、抗原に特異的に結合することができる抗原結合タンパク質上の部位を指す。これは単ドメイン(例えば、エピトープ結合ドメイン)であっても単鎖Fv(SCFv)ドメインであってもよく、又は標準抗体で見出すことができるように対号V_H/V_Lドメインであってもよい。

【0119】

本発明で使用する用語「エピトープ」は、抗原結合タンパク質の特定の結合ドメインと接触する抗原の部分の部分を指す。エピトープは、抗原に由来する本質的に直鎖状のアミノ酸配列を含む直鎖状であってもよい。あるいは、エピトープは、立体構造的であってもよく不連

50

続であってもよい。例えば、立体構造的エピトープは、構造制御の元素を必要とするアミノ酸残基を含む。不連続なエピトープは、他の配列によって分離されるアミノ酸残基を含む、すなわち、抗原の一次配列における配列ではない。抗原の三次構造及び四次構造では、不連続エピトープの残基は、抗原結合タンパク質が結合するのに十分な程度互いに近接している。

【0120】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列について、用語「同一」又は、「配列同一性」は、必要に応じて、最適に整列させ、適切に挿入又は欠失したものと比較したときの、2つの核酸又は2つのアミノ酸配列間の同一性の程度を示す。

【0121】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列を最適に整列させるために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮して、配列が共有している同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）。下記の通り、数学アルゴリズムを使用して、配列を比較し、2つの配列間の同一性パーセントを求めることができる。

【0122】

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージにおけるギャッププログラムを使用し、NWSgapdna.CMPマトリックス、並びにギャップ重み付け40、50、60、70、又は80、及びギャップ長重み付け1、2、3、4、5、又は6を使用して求めることができる。2つのヌクレオチド又はアミノ酸の配列間の同一性パーセントは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE. Meyers及びW. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988))のアルゴリズムを使用し、PAM120重み付け残基表、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を用いて求めることもできる。更に、GCGソフトウェア・パッケージにおけるギャッププログラムに組み込まれたNeedleman及びWunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970))のアルゴリズムを使用し、Blossum 62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、並びにギャップ重み付け16、14、12、10、8又は4、及びギャップ長重み付け1、2、3、4、5、又は6を使用して、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを求めることができる。

【0123】

1つの方法では、ポリヌクレオチド配列は、本明細書に記載するレファレンスポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号30～39、配列番号76～105を参照されたい）と同一である、すなわち、100%同一であってもよく、レファレンス配列と比べて、特定の整数以下のヌクレオチドの変化を含んでもよい、例えば、少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、98又は99%同一であってもよい。このような変化は、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、転位及び転換を含む置換、又は挿入から選択され、前記変化は、レファレンスヌクレオチド配列の5'若しくは3'末端位置、又はこれら末端位置間のいずれの位置に生じてもよく、レファレンス配列中のヌクレオチドの中に個々に点在してもよく、又はレファレンス配列内の1以上の連続する群に生じてもよい。ヌクレオチドの変化の数は、本明細書に記載するレファレンスポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号30～39、配列番号76～105を参照されたい）におけるヌクレオチドの総数に、それぞれの同一性パーセントの数値的パーセント（100で除された数）を乗じ、本明細書に記載するレファレンスポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号30～39、配列番号76～105を参照されたい）におけるヌクレオチドの総数からその積を減じることにより求められる、すなわち：

$$n_n \times n - (x_n \cdot y)$$

（式中、 n_n は、ヌクレオチド変化の数であり、 x_n は、本明細書に記載するレファレンスポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号30～39、配列番号76～105を参照されたい）におけるヌクレオチドの総数であり、 y は、50%の場合0.50、60%の場

10

20

30

40

50

合 0.60、70%の場合 0.70、75%の場合 0.75、80%の場合 0.80、85%の場合 0.85、90%の場合 0.90、95%の場合 0.95、98%の場合 0.98、99%の場合 0.99、又は 100%の場合 1.00 であり、 \cdot は、乗算演算子の記号であり、 x_n 及び y の非整数積は、 x_n からそれを減じる前に最も近い整数に切り捨てられる)。

【0124】

同様に、ポリペプチド配列は、本明細書に記載するレファレンスポリペプチド配列(例えば、配列番号 1~29、配列番号 40~75 を参照されたい)と同一である、すなわち、100%同一であってもよく、レファレンス配列と比べて、同一性%が 100%未満、例えば少なくとも 50、60、70、75、80、85、90、95、98 又は 99% 同一になるように、特定の整数以下のアミノ酸の変化を含んでもよい。このような変化は、少なくとも 1 つのアミノ酸の欠失、保存的及び非保存的置換を含む置換、又は挿入からなる群より選択され、前記変化は、レファレンスポリペプチド配列のアミノ末端又はカルボキシ末端位置、又はこれら末端位置間のいずれの位置に生じてもよく、レファレンス配列中のアミノ酸の中に個々に点在してもよく、又はレファレンス配列内の 1 以上の連続する群に生じてもよい。所与の同一性%のアミノ酸の変化の数は、本明細書に記載するポリペプチドレファレンス配列(例えば、配列番号 1~29、配列番号 40~75 を参照されたい)によりコードされるポリペプチド配列におけるアミノ酸の総数に、それぞれの同一性パーセントの数値的パーセント(100で除された数)を乗じ、次いで、本明細書に記載するポリペプチドレファレンス配列(例えば、配列番号 1~29、配列番号 40~75 を参照されたい)におけるアミノ酸の総数からその積を減じることにより求められる、すなわち：

$$n_a \cdot x_a - (x_a \cdot y)$$

(式中、 n_a は、アミノ酸の変化の数であり、 x_a は、本明細書に記載するレファレンスポリペプチド配列(例えば、配列番号 1~29、配列番号 40~75 を参照されたい)におけるアミノ酸の総数であり、 y は、50%の場合 0.50、60%の場合 0.60、70%の場合 0.70、75%の場合 0.75、80%の場合 0.80、85%の場合 0.85、90%の場合 0.90、95%の場合 0.95、98%の場合 0.98、99%の場合 0.99、又は 100%の場合 1.00 であり、 \cdot は、乗算演算子の記号であり、 x_a 及び y は、 x_a からそれを減じる前に最も近い整数に切り捨てられる)。

【0125】

同一性%は、任意の挿入又は欠失を含むか又は含まない、配列の完全長又はその任意の断片に対して求めることができる。

【0126】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、それぞれ、2 以上のアミノ酸残基を含む分子を指す。ペプチドは、モノマーであってもポリマーであってもよい。

【0127】

特定のアミノ酸置換を「保存的」とであるとみなすことは、当技術分野において十分認識されている。アミノ酸は、共通の側鎖特性に基づいてグループ分けされ、抗原結合タンパク質の結合親和性の全て又は実質的に全てを維持するグループ内の置換は、保存的置換であるとみなされる。以下の表 2 を参照されたい。

【表 2】

表 2

側鎖	メンバー
疎水性	met, ala, val, leu, ile
中性親水性	cys, ser, thr
酸性	asp, glu
塩基性	asn, gln, his, lys, arg
鎖の配向に影響を与える残基	gly, pro
芳香族	trp, tyr, phe

10

【0128】

本発明は、CD127に結合し、且つ配列番号4のCDRH3；その変異体CDRH3、又は配列番号132～137のCDRH3を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。前記抗原結合タンパク質は、CD127に特異的に結合することができ、また、IL-7R活性を中和することができる。

20

【0129】

また、本発明は、CD127に結合し、且つ配列番号3のCDRH2；又はその変異体CDRH2を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。前記抗原結合タンパク質は、CD127に特異的に結合することができ、また、IL-7R活性を中和することができる。

【0130】

前記抗原結合タンパク質は、上記CDRH3又はCDRH2の配列に加えて、以下から選択される1以上のCDR又は全てのCDRを任意の組み合わせで更に含んでもよい：CDRH1（配列番号2）、CDRH2（配列番号3）、CDRH3（配列番号4、又は配列番号132～配列番号137のいずれか）、CDRL1（配列番号5）、CDRL2（配列番号6）及びCDRL3（配列番号7）；又は前記CDRのいずれかの変異体。

30

【0131】

例えば、抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4）及びCDRH1（配列番号2）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4）及びCDRH2（配列番号3）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号2）及びCDRH2（配列番号3）及びCDRH3（配列番号4）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。

【0132】

抗原結合タンパク質は、CDRL1（配列番号5）及びCDRL2（配列番号6）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRL2（配列番号6）及びCDRL3（配列番号7）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRL1（配列番号5）、CDRL2（配列番号6）及びCDRL3（配列番号7）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。

40

【0133】

抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4）及びCDRL3（配列番号7）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。前記抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4）、CDRH2（配列番号3）及びCDRL3（配列番号7）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4）、CDRH2（配列番号3）、CDRL2（配列番号6）、及びCDRL3（配列番号7）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。

50

【0134】

抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号2）、CDRH2（配列番号3）、CDRH3（配列番号4）、CDRL1（配列番号5）、CDRL2（配列番号6）及びCDRL3（配列番号7）を含んでなり得る。あるいは、変異体CDRが存在してもよく、配列番号4のCDRH3を配列番号132～137のCDRのうちのいずれかで置換してもよい。

【0135】

本発明は、CD127に結合し、且つ配列番号41のCDRH3；又はその変異体CDRH3を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。また、前記抗原結合タンパク質は、IL-7R活性を中和することができる。

10

【0136】

また、本発明は、CD127に結合し、且つ配列番号40のCDRH2；又はその変異体CDRH2を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。また、前記抗原結合タンパク質は、IL-7R活性を中和することができる。

【0137】

抗原結合タンパク質は、上記CDRH3又はCDRH2の配列に加えて、以下から選択される1以上のCDR又は全てのCDRを任意の組み合わせで更に含んでもよい：CDRH1（配列番号39）、CDRH2（配列番号40）、CDRH3（配列番号41）、CDRL1（配列番号42）、CDRL2（配列番号43）及びCDRL3（配列番号44）、又は前記CDRのいずれかの変異体。

20

【0138】

例えば、抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号41）及びCDRH1（配列番号40）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号41）及びCDRH2（配列番号40）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。前記抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号39）及びCDRH2（配列番号40）及びCDRH3（配列番号41）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。

【0139】

抗原結合タンパク質は、CDRL1（配列番号42）及びCDRL2（配列番号43）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRL2（配列番号43）及びCDRL3（配列番号44）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRL1（配列番号42）、CDRL2（配列番号43）及びCDRL3（配列番号44）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。

30

【0140】

抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号41）及びCDRL3（配列番号44）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号41）、CDRH2（配列番号40）及びCDRL3（配列番号44）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号41）、CDRH2（配列番号40）、CDRL2（配列番号43）、及びCDRL3（配列番号44）、又はこれらの変異体を含んでなり得る。

【0141】

抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号39）、CDRH2（配列番号40）、CDRH3（配列番号41）、CDRL1（配列番号42）、CDRL2（配列番号43）及びCDRL3（配列番号44）を含んでなり得る。あるいは、変異体CDRが存在してもよい。

40

【0142】

また、本発明は、CD127に結合し、且つヒトアクセプターフレームワークに配列番号8の変動ドメイン配列の対応するCDRH3又はその変異体CDRH3を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質は、CD127活性を中和することができる。抗原結合タンパク質は、ヒト抗体であっても、キメラ抗体であっても、ヒト化抗体であってもよい。

50

【 0 1 4 3 】

抗原結合タンパク質は、配列番号 8 及び / 又は配列番号 9 の可変ドメイン配列から選択される対応する C D R のうちの 1 以上又は全て、あるいはこれらの変異体を更に含んでもよい。

【 0 1 4 4 】

また、本発明は、C D 1 2 7 に特異的に結合し、且つヒトアクセプターフレームワークに配列番号 4 5 の可変ドメイン配列の対応する C D R H 3 又はその変異体 C D R H 3 を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質は、C D 1 2 7 活性を中和することができる。抗原結合タンパク質は、ヒト抗体であっても、キメラ抗体であっても、ヒト化抗体であってもよい。

10

【 0 1 4 5 】

抗原結合タンパク質は、配列番号 4 5 及び / 又は配列番号 4 6 の可変ドメイン配列から選択される対応する C D R のうちの 1 以上又は全て、あるいはこれらの変異体を更に含んでもよい。

【 0 1 4 6 】

例えば、抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3 及び対応する C D R H 1、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3 及び対応する C D R H 2、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 1、対応する C D R H 2、及び対応する C D R H 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。

20

【 0 1 4 7 】

抗原結合タンパク質は、対応する C D R L 1 及び対応する C D R L 2、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、対応する C D R L 2 及び対応する C D R L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、対応する C D R L 1、対応する C D R L 2、及び対応する C D R L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。

【 0 1 4 8 】

抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3 及び対応する C D R L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3、対応する C D R H 2、及び対応する C D R L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3、対応する C D R H 2、対応する C D R L 2、及び対応する C D R L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。

30

【 0 1 4 9 】

抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 1、対応する C D R H 2、対応する C D R H 3、対応する C D R L 1、対応する C D R L 2、及び対応する C D R L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。

【 0 1 5 0 】

対応する C D R は、K a b a t (1 9 8 7)、C h o t h i a (1 9 8 9)、A b M、又は c o n t a c t 法を参照することにより定義することができる。前記方法の各々の 1 つの定義は、表 1 に見出すことができ、対応する C D R を決定するためにレファレンス重鎖可変ドメイン (配列番号 8 又は配列番号 4 5) 及びレファレンス軽鎖可変ドメイン (配列番号 9 及び配列番号 4 6) に適用することができる。

40

【 0 1 5 1 】

また、本発明は、C D 1 2 7 に結合し、且つ配列番号 8 の K a b a t 残基 9 5 ~ 1 0 1 を含んでなる、結合単位 H 3、又は変異体 H 3 を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質は、抗体等のヒト抗原結合タンパク質、ヒト化抗原結合タンパク質、又はキメラ抗原結合タンパク質であってよい。

【 0 1 5 2 】

抗原結合タンパク質は、以下から選択される 1 以上又は全ての結合単位を更に含んでもよい：配列番号 8 の K a b a t 残基 3 1 ~ 3 2 を含んでなる、H 1、配列番号 8 の K a b a t 残基 5 2 ~ 5 6 を含んでなる、H 2、配列番号 9 の K a b a t 残基 3 0 ~ 3 4 を含ん

50

でなる、L 1、配列番号9のK a b a t残基50～55を含んでなる、L 2、及び配列番号9のK a b a t残基89～96を含んでなる、L 3；又は変異体結合単位。

【0153】

また、本発明は、C D 1 2 7に結合し、且つ配列番号45のK a b a t残基95～101を含んでなる、結合単位H 3、又は変異体H 3を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質は、抗体等のヒト抗原結合タンパク質、ヒト化抗原結合タンパク質、又はキメラ抗原結合タンパク質であってよい。

【0154】

抗原結合タンパク質は、以下から選択される1以上又は全ての結合単位を更に含んでもよい：配列番号45のK a b a t残基31～32を含んでなる、H 1、配列番号46のK a b a t残基52～56を含んでなる、H 2、配列番号46のK a b a t残基30～34を含んでなる、L 1、配列番号46のK a b a t残基50～55を含んでなる、L 2、及び配列番号46のK a b a t残基89～96を含んでなる、L 3；又は変異体結合単位。

10

【0155】

例えば、抗原結合タンパク質は、結合単位H 3、及び結合単位H 1、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、結合単位H 3、及び結合単位H 2、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、結合単位H 1、結合単位H 2及び結合単位H 3；又はこれらの変異体を含んでもよい。

【0156】

抗原結合タンパク質は、結合単位L 1、及び結合単位L 2、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、結合単位L 2、及び結合単位L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、結合単位L 1、結合単位L 2及び結合単位L 3；又はこれらの変異体を含んでもよい。

20

【0157】

抗原結合タンパク質は、結合単位H 3、及び結合単位L 3、又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、結合単位H 3、結合単位H 2及び結合単位L 3；又はこれらの変異体を含んでもよい。抗原結合タンパク質は、結合単位H 3、結合単位H 2、結合単位L 2、及び結合単位L 3；又はこれらの変異体を含んでもよい。

【0158】

抗原結合タンパク質は、結合単位H 1、結合単位H 2、結合単位L 2、結合単位H 3、結合単位L 1、結合単位L 2、及び結合単位L 3；又はこれらの変異体を含んでもよい。

30

【0159】

C D R変異体又は変異体結合単位は、少なくとも1つのアミノ酸によって改変されたアミノ酸配列を含み、前記改変は、(例えば、10以下のアミノ酸による)アミノ酸配列の化学的又は部分的変化であり得、この改変により、変異体が未改変配列の生物学的特徴を保持することが可能になる。例えば、前記変異体は、C D 1 2 7に結合する機能的変異体である。C D Rアミノ酸配列の部分的変化は、(例えば、10以下のアミノ酸による)1つ～幾つかのアミノ酸の欠失又は置換、あるいは1つ～幾つかのアミノ酸の付加又は挿入、あるいはこれらの組合せによるものであり得る。C D R変異体又は結合単位変異体は、アミノ酸配列で、1、2、3、4、5又は6アミノ酸の置換、付加、又は欠失を任意の組合せで含有し得る。C D R変異体又は結合単位変異体は、アミノ酸配列で、1、2、又は3アミノ酸の置換、挿入、付加、又は欠失を任意の組合せで含有し得る。アミノ酸残基における置換は、例えば、ある疎水性アミノ酸を別の疎水性アミノ酸に置換する保存的置換であってよい。例えば、ロイシンは、バリン又はイソロイシンで置換することができる。

40

【0160】

C D RのL 1、L 2、L 3、H 1、H 2及びH 3は、有限数の主鎖高次構造のうちの一つ(基準構造(c a n o n i c a l s))を構造的に示す傾向がある。C D Rの特定の基準構造クラスは、C D Rの長さ、C D R及びフレームワーク領域の両方において重要な位置に存在する残基(構造決定残基又はS D R)により決定されるループパッキングとによって定義される。M a r t i n及びT h o r n t o n(1996年；J M o l B i

50

o1 263:800-815)は、「重要な残基の」基準テンプレートを自動的に定義する方法を作成した。クラスター分析を使用してCDRのセットの基準クラスを定義し、次いで、埋もれている疎水物、水素結合残基、並びに保存されているグリシン及びプロリンを分析することにより基準テンプレートを同定する。抗体のCDRの配列は、前記配列を重要な残基のテンプレートと比較し、同一性又は類似性のマトリクスを使用して各テンプレートをスコア付けすることにより基準クラスに割り当てることができる。

【0161】

1A11 H3L4抗体(配列番号13(1A11.H3 V_H)又は配列番号22(1A11.L4 V_L))の基準クラスに基づいて、機能的抗体の結合は、以下のCDR置換(Kabat番号の前のアミノ酸は、オリジナルのアミノ酸配列であり、Kabat番号の後のアミノ酸配列は、置換されたアミノ酸である)の存在下で維持されると予測することができる:

CDRH1の基準:

Y32I、Y32H、Y32F、Y32T、Y32N、Y32C、Y32E、Y32D
T33Y、T33A、T33W、T33G、T33L、T33V
M34I、M34V、M34W
N35E、N35H、N35Q、N35S、N35Y、N35T

CDRH2の基準:

L50R、L50E、L50W、L50Y、L50G、L50Q、L50V、L50N
、L50K、N50A
I51L、I51V、I51T、I51S、I51N
N52D、N52L、N52S、N52Y
Y53A、Y53G、Y53S、Y53K、Y53T、Y53N
N54S、N54T、N54K、N54D、N54G
V56Y、V56R、V56E、V56D、V56G、V56S、V56A
S58K、S58N、S58T、S58D、S58R、S58G、S58F、S58Y

CDRH3の基準:

V102Y、V102H、V102I、V102S、V102D、V102G

CDRL1の基準:

S29V
M33L

CDRL3の基準:

Q89L
E90Q
W91Y
Y93S、Y93R

【0162】

したがって、抗原結合タンパク質は、CDR位置内に上記置換のいずれかを有していてもよく、有していなくてもよい。変異体CDR1つ当たり、対応するCDR1つ当たり、結合単位1つ当たり、重鎖又は軽鎖の可変領域1つ当たり、重鎖又は軽鎖1本当たり、及び抗原結合タンパク質1つ当たり複数の置換が存在してもよく、したがって、CDRの基準構造が維持されている限り、本発明の抗原結合タンパク質中に任意の組合せの置換が存在し得る。

【0163】

疑念を取り除くために、上記置換は、抗CD127抗体の機能を保持しながら実施することができる可能なCDR置換を限定するものであると解釈すべきではない。

【0164】

記載するCDR、対応するCDR、変異体CDR、結合単位、又は変異体結合単位を含んでなる、抗原結合タンパク質は、EC50により立証される通り、1A11c(キメラ、V_H-配列番号28、V_L-配列番号29)又は6A3c(キメラ、V_H-配列番号7

10

20

30

40

50

4、V - 配列番号 75) が示す結合能の 10 倍以内又は 5 倍以内の CD127 に対する結合能を示すことができる。CD127 に対する結合能は、(例えば BIAcore による) 結合親和性、又は (例えば ELISA アッセイによる) EC50 等の様々な方法により立証することができる。

【0165】

上述の通り、CDR の特定の基準構造クラスは、CDR の長さ、CDR 及びフレームワーク領域の両方において重要な位置に存在する残基により決定されるループパッキングとによって定義される。したがって、配列番号 2 ~ 6 に列挙されている CDR、変異体 CDR、対応する CDR、結合単位、又はこれらの変異体に加えて、機能的抗体を保持しながら、基準クラスに基づいて、本発明の抗原結合タンパク質のフレームワーク残基において置換を行い得る。このような置換としては、以下が挙げられる (Kabata の番号付けを用いる) :

重鎖 : 位置 2 における V、I 又は G ; 位置 4 における L 又は V ; 位置 20 における L、I、M 又は V ; 位置 22 における C ; 位置 24 における T、A、V、G 又は S ; 位置 26 における G ; 位置 29 における I、F、L 又は S ; 位置 36 における W ; 位置 47 における W 又は Y ; 位置 48 における I、M、V 又は L ; 位置 69 における I、L、F、M 又は V ; 位置 71 における V、A、R 又は L ; 位置 78 における A、L、V、Y 又は F ; 位置 80 における L 又は M ; 位置 90 における Y 又は F ; 位置 92 における C ; 及び / 又は位置 94 における R、K、G、S、H 又は N ; 及び / 又は

軽鎖 : 位置 2 における I、L 又は V ; 位置 3 における V、Q、L 又は E ; 位置 4 における M 又は L ; 位置 23 における C ; 位置 35 における W ; 位置 36 における Y、L 又は F ; 位置 46 における S、L、R 又は V ; 位置 49 における Y、H、F 又は K ; 位置 71 における Y 又は F ; 位置 88 における C ; 及び / 又は位置 98 における F。

【0166】

上記フレームワーク位置のうちのいずれか 1 つ、任意の組合せ、又は全てが、本発明の抗原結合タンパク質中に存在し得る。重鎖又は軽鎖可変領域 1 つ当たり、重鎖又は軽鎖 1 本当たり、及び抗原結合タンパク質 1 つ当たり複数の可変フレームワーク基準位置が存在し得るので、フレームワークの基準構造が維持されている限り、本発明の抗原結合タンパク質中に任意の組合せが存在してもよい。

【0167】

例えば、重鎖可変フレームワークは、位置 2 に V、位置 4 に L、位置 20 に V、位置 22 に C、位置 24 に A、位置 26 に G、位置 29 に F、位置 36 に W、位置 47 に W、位置 48 に M、位置 69 に L、位置 71 に R、位置 78 に A、位置 80 に M、位置 90 に Y、位置 92 に C、及び位置 94 に R を含んでなり得、また、例えば、軽鎖可変フレームワークは、位置 2 に I、位置 4 に L、位置 23 に C、位置 35 に W、位置 36 に Y、位置 71 に F、位置 88 に C、位置 90 に E、及び位置 93 に Y を含んでなり得る。

【0168】

本明細書に記載する CDR、対応する CDR、変異体 CDR 又は結合単位のうちの 1 以上は、例えば、ヒト化又はキメラ可変ドメインとして、ヒトフレームワークの状況において存在してもよい。

【0169】

ヒト化重鎖可変ドメインは、配列番号 2 ~ 4 又は配列番号 39 ~ 41 に列挙されている CDR ; その変異体 CDR ; 対応する CDR ; 結合単位 ; 又はこれらの変異体を、配列番号 116 のヒトアクセプタ可変ドメイン配列に対して、フレームワーク領域において 75 % 以上、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、95 % 以上、98 % 以上、99 % 以上、又は 100 % の同一性を有するアクセプタフレームワーク内に含んでもよい。

【0170】

ヒト化軽鎖可変ドメインは、配列番号 5 ~ 7 又は配列番号 42 ~ 44 に列挙されている CDR ; その変異体 CDR ; 対応する CDR ; 結合単位 ; 又はこれらの変異体を、配列番号 117 のヒトアクセプタ可変ドメイン配列に対して、フレームワーク領域において 75

10

20

30

40

50

%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、又は100%の同一性を有するアクセプタフレームワーク内に含んでもよい。

【0171】

また、本発明は、CD127に結合し、且つ配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、121、123、125、127、129又は131のうちのいずれか1つから選択される重鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。前記抗原結合タンパク質は、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、26又は27のうちのいずれか1つから選択される軽鎖可変領域を含んでなる。前記重鎖可変領域のいずれかを前記軽鎖可変領域のいずれかと組合せてもよい。また、前記抗原結合タンパク質は、CD127を中和することができる。

10

【0172】

また本発明は、CD127に結合し、且つ配列番号48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68又は69のうちのいずれか1つから選択される重鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質を提供する。前記抗原結合タンパク質は、配列番号70、71、72、73又は138のうちのいずれか1つから選択される軽鎖可変領域を含んでもよい。前記重鎖可変領域のいずれかを前記軽鎖可変領域のいずれかと組合せてもよい。また、前記抗原結合タンパク質は、CD127を中和することができる。

【0173】

抗体重鎖可変領域は、配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、121、123、125、127、129又は131；あるいは配列番号48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68又は69のうちのいずれか1つに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、又は100%の同一性を有し得る。

20

【0174】

抗体軽鎖可変領域は、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、26又は27；あるいは配列番号70、71、72、73又は138のうちのいずれか1つに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、又は100%の同一性を有し得る。

30

【0175】

配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、121、123、125、127、129又は131の変異体の同一性パーセントは、配列の完全長全体に対して求めることができる。

【0176】

抗体重鎖可変領域は、30、25、20、15、10、9、8、7、6の、5、4、3、2又は1アミノ酸の置換、挿入又は欠失を含有する配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、121、123、125、127、129又は131のうちのいずれか1つの変異体であってよい。

【0177】

抗体軽鎖可変領域は、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1アミノ酸の置換、挿入又は欠失を含有する配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、26又は27のうちのいずれか1つの変異体であってよい。

40

【0178】

例えば、上記基準CDR及び基準フレームワーク残基の置換は、少なくとも75%同一であるか又は30アミノ酸以下の置換を含有する変異体配列として変異体の重鎖又は軽鎖可変領域中に存在してもよい。

【0179】

別の実施形態では、抗体重鎖可変領域は、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1アミノ酸の置換、挿入又は欠失を含有する配列番号48、4

50

9、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68又は69のうちのいずれか1つの変異体であってもよい。抗体軽鎖可変領域は、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1アミノ酸の置換、挿入又は欠失を含有する配列番号70、71、72又は73のうちのいずれか1つの変異体であってもよい。

【0180】

例えば、上記基準CDR及び基準フレームワーク残基の置換は、少なくとも75%同一であるか又は30アミノ酸以下の置換を含有する変異体配列として変異体の重鎖又は軽鎖可変領域中に存在してもよい。

【0181】

本発明の重鎖可変領域のいずれかを好適なヒト定常領域と組み合わせてもよい。本発明の軽鎖可変領域のいずれかを好適な定常領域と組み合わせてもよい。

【0182】

また本発明は、CD127に特異的に結合し、且つ任意の以下の重鎖及び軽鎖可変ドメインの組合せ：1A11・H3・L4（配列番号13及び配列番号22）を含んでなる、抗原結合タンパク質、又は配列番号13に対して少なくとも75%の同一性を有する重鎖可変ドメインと配列番号22に対して少なくとも75%の同一性を有する軽鎖可変ドメインとを有する抗原結合タンパク質を提供する。また、前記抗原結合タンパク質は、CD127を中和することができる。

【0183】

上記の抗原結合タンパク質、例えば、1以上のアミノ酸残基の化学的修飾及び/又は挿入、欠失、若しくは置換により配列が部分的に変化している変異体、あるいは、上記配列のうちのいずれかに対して75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有する変異体は、EC50又はBIACoreによって実証される通り、1A11又は6A3が示す結合能の10倍以内又は5倍以内のCD127に対する結合能を示すことができる。CD127に対する結合能は、EC50により立証することもでき（ELISAアッセイによって実行される）、結合能によって立証することもできる（BIACoreによって実行される）。

【0184】

本発明者らは、CDRH3内の特定の位置を置換して結合親和性を低下させる（すなわち、より強く結合させる）ことが見出された。このようなCDRH3アナログを表4に記載する。位置N98及びF100b（Kabatsの番号付け）における置換が、親和性を増加させるのに特に有効であることが分かった。具体的な置換としては、N98D、N98E、F100bE、F100bI及びF100bVが挙げられる。これら置換を表すCDRH3配列は、それぞれ、配列番号132、133、134、135、136及び137である。

【0185】

本発明は、本明細書に記載する抗体のいずれかにこのような置換を組み込むことを意図する。

【0186】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、位置100にW（Trp）残基を有する。

【0187】

抗原結合断片のこのようなエフェクター機能を改変する、例えば、ADCC又はCDC、半減期等を増強することが望ましい場合がある。

【0188】

1つの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、Fcが不能であってもよい。Fcを不能にする1つの方法は、重鎖定常領域の位置235及び237（EUインデックスの番号付け）におけるアラニン残基の置換を含んでなる。あるいは、抗原結合タンパク質は、Fcの機能を有し、位置235及び237にアラニン置換を含まなくてもよい。

【0189】

10

20

30

40

50

抗原結合タンパク質は、ヒト、又はマウス動物モデルにおいて、少なくとも6時間、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも7日又は少なくとも9日のインビボ半減期を有し得る。

【0190】

抗原結合タンパク質は、ラット、マウス、霊長類（例えば、カニクイザル、旧世界サル、又は類人猿）又はヒトに由来し得る。抗原結合タンパク質は、ヒト抗体であっても、ヒト化抗体であっても、キメラ抗体であってもよい。抗原結合タンパク質は、いずれのアイソタイプ又はサブクラスであってもよい定常領域を含み得る。定常領域は、IgGアイソタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、又はこれらの変異体の定常領域であってもよい。抗原結合タンパク質の定常領域は、IgG1であってもよい。

10

【0191】

抗体のFcエフェクター部分に対する突然変異変化を使用して、FcRnと抗体との間の相互作用の親和性を変化させて、抗体のターンオーバーを調節することができる。抗体の半減期は、インビボで延長され得る。より長時間にわたってインビボIC50を維持する結果、最大用量及び最高投与頻度を達成することができるので、これは患者集団にとって有益であり得る。CD127を発現する細胞を殺すことは望ましくない場合があるので、抗体のFcエフェクター機能の全体又は一部を除去してもよい。この除去により安全性プロフィールを高めることができる。

【0192】

定常領域を含んでなる、抗原結合タンパク質は、ADCC及び/又は補体活性化若しくはエフェクター機能を低下させることができる。定常領域は、IgG2又はIgG4アイソタイプの生来不能である定常領域、あるいは突然変異型IgG1定常ドメインを含んでもよい。好適な修飾の例は、欧州特許第0307434号明細書に記載されている。Fcを不能にする1つの方法は、重鎖定常領域の位置235及び237（EUインデックスの番号付け）におけるアラニン残基の置換を含んでなる。

20

【0193】

抗原結合タンパク質は、抗体のエフェクター機能/ADCC及び/又は補体活性化が増強されるように、突然変異型定常領域から選択される1以上の修飾を含んでもよい。好適な修飾の例は、Shieldsら、J. Biol. Chem. (2001年) 276: 6591-6604、Lazarら、PNAS (2006年) 103: 4005-4010、及び米国特許第6737056号明細書、国際公開第2004063351号パンフレット、及び国際公開第2004029207号パンフレットに記載されている。

30

【0194】

抗原結合タンパク質のエフェクター機能/ADCC及び/又は補体活性化が増強されるように、抗原結合タンパク質は、変化したグリコシル化プロファイルを有する定常領域を含んでもよい。変化したグリコシル化プロファイルを有する抗原結合タンパク質を産生するのに好適な方法の例は、国際公開第2003/011878号パンフレット、国際公開第2006/014679号パンフレット、及び欧州特許第1229125号明細書に記載されている。

【0195】

抗原結合タンパク質が結合するCD127ポリペプチドは、組換え型ポリペプチドであってもよく、Fcドメイン等の別のタンパク質に任意で融合している細胞外ドメイン（ECD）を含んでもよく、完全長CD127タンパク質を含んでもよい。CD127は、溶液中に存在してもよく、固体表面に付着していてもよい。例えば、CD127は、磁気ビーズ等のビーズに付着していてもよい。CD127は、ビオチン化されてもよい。CD127にコンジュゲートするビオチン分子を用いて、固体表面上でビオチンとストレプトアビジンとをカップリングさせることにより固体表面上にCD127を固定化することができる。

40

【0196】

また、本発明は、本明細書に記載する抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を提供

50

する。前記核酸分子は、(i)及び(ii)が同じ核酸分子上に存在するように、(i) 1以上のCDRH、重鎖可変配列又は完全長重鎖配列；及び(ii) 1以上のCDRL、軽鎖可変配列、又は完全長軽鎖配列をコードする配列を含んでもよい。あるいは、本明細書に記載する抗原結合タンパク質をコードする核酸分子は、(a)及び(b)が別々の核酸分子上に存在するように、(a) 1以上のCDRH、重鎖可変配列、若しくは完全長重鎖配列；又は(b) 1以上のCDRL、軽鎖可変配列、又は完全長軽鎖配列をコードする配列を含んでもよい。

【0197】

重鎖可変ドメインをコードする核酸分子は、配列番号30～36を含んでなり得る。軽鎖可変ドメインをコードする核酸分子は、配列番号10～113を含んでなり得る。

10

【0198】

重鎖可変ドメインをコードする核酸分子は、配列番号75～96を含んでなり得る。軽鎖可変ドメインをコードする核酸分子は、配列番号97～100を含んでなり得る。

【0199】

また、本発明は、本明細書に記載する核酸分子を含んでなる、発現ベクターを提供する。また、本明細書に記載する発現ベクターを含んでなる、組換え宿主細胞を提供する。

【0200】

本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、好適な宿主細胞において産生することができる。本明細書に記載する抗原結合タンパク質を産生するための方法は、本明細書に記載する宿主細胞を培養する工程と、抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでよい。組換え型の形質転換、トランスフェクト、又は形質導入された宿主細胞は、少なくとも1つの発現カセットを含んでよく、前記発現カセットは、本明細書に記載する抗原結合タンパク質の重鎖をコードするポリヌクレオチドを含んでなり、本明細書に記載する抗原結合タンパク質の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを更に含んでなる。あるいは、組換え型の形質転換、トランスフェクト、又は形質導入された宿主細胞は、少なくとも1つの発現カセットを含んでよく、第1の発現カセットは、本明細書に記載する抗原結合タンパク質の重鎖をコードするポリヌクレオチドを含んでなり、本明細書に記載する抗原結合タンパク質の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含んでなる、第2の発現カセットを更に含んでなる。安定的に形質転換された宿主細胞は、本明細書に記載する抗原結合タンパク質の重鎖及び/又は軽鎖をコードする1以上の発現カセットを含んでなる、ベクターを含んでなり得る。例えば、このような宿主細胞は、軽鎖をコードする第1のベクターと、重鎖をコードする第2のベクターとを含んでなり得る。

20

30

【0201】

宿主細胞は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞であってよい。このような細胞株の例としては、CHO又はNS0が挙げられる。宿主細胞は、非ヒト宿主細胞であってよい。宿主細胞は、非胚宿主細胞であってよい。宿主細胞は、培養培地、例えば、無血清培養培地中で培養することができる。抗原結合タンパク質は、宿主細胞により培養培地中に分泌され得る。抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質を含有する前記培養培地に対して、少なくとも95%以上(例えば、98%以上)に精製することができる。

【0202】

抗原結合タンパク質と薬学上許容される担体とを含んでなる、医薬組成物も本発明により提供される。使用説明書と共に医薬組成物を含んでなる、キットオブパーツが更に提供される。便宜上、キットオブパーツは、使用説明書と共に所定の量の試薬を含んでよい。

40

【0203】

抗体の構造

インタクトな抗体

大部分の脊椎動物種に由来する抗体の軽鎖は、定常領域のアミノ酸配列に基いてカッパ及びラムダと呼ばれる2種類のうちの1つに帰属し得る。その重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、ヒト抗体は、5つの異なるクラス、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMに帰属し得る。IgG及びIgAは、サブクラス、IgG1、IgG2、IgG3

50

及びIgG4、並びにIgA1及びIgA2に更に細分化することができる。種による変異体が存在し、マウス及びラットは少なくともIgG2a、IgG2bを有する。

【0204】

可変領域のより保存されている部分をフレームワーク領域(FR)と呼ぶ。インタクトな重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、3つのCDRによって連結されている4つのFRを含む。各鎖のCDRは、FR領域に極近接して保持され、他の鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。

【0205】

定常領域は、抗体の抗原に対する結合に直接関与する訳ではないが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、Fc受容体への結合を介する食作用、新生児Fc受容体(FcRn)を介する半減期/クリアランス速度、及び補体カスケードのC1q成分を介する補体依存性細胞傷害への関与等の様々なエフェクター機能を示す。

【0206】

ヒトIgG2定常領域は、古典的経路によって補体を活性化するか又は抗体依存性細胞性細胞傷害を媒介する能力を本質的に欠くことが報告されている。ヒトIgG4定常領域は、古典的経路によって補体を活性化する能力を欠き、且つ抗体依存性細胞性細胞傷害をほんのわずかししか媒介しないことが報告されている。これらエフェクター機能を本質的に欠く抗体を「非溶解性」抗体と呼ぶ場合もある。任意でエフェクター機能を本質的に有しない程度まで、本発明に係る抗体のエフェクター機能を低下させることが望ましい場合もある。1つの実施形態では、本発明に係る抗体は、非溶解性である。1つの実施形態では、本発明に係る抗体は、エフェクター機能を本質的に有しない。抗体は、別の分子、例えば、細胞傷害性部分又は放射活性部分等のエフェクター機能を改変することを意図する分子にコンジュゲートしてもよく、しなくてもよい。1つの実施形態では、抗体は、放射標識又は細胞傷害性分子等の別の分子にコンジュゲートしない。この実施形態では、抗体は、直接細胞を殺す作用によってではなく、天然の生物学的相互作用をブロックすることにより、その機能効果を発揮する。

【0207】

ヒト抗体

ヒト抗体は、当業者に公知の多数の方法によって作製することができる。ヒト抗体は、ヒト骨髄腫又はマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株を用いてハイブリドーマ法により作製することができる。Kozbor(1984年)J. Immunol 133, 3001, 及びBrodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63(Marcel Dekker Inc, 1987年)を参照されたい。別の方法としては、ファージライブラリ又はトランスジェニックマウスの使用が挙げられ、これらは両方ともヒト可変領域レポーターを利用する(Winter(1994年)Annu. Rev. Immunol 12: 433-455; Green(1999年)J. Immunol. Methods 231: 11-23)。

【0208】

マウスの免疫グロブリン遺伝子座がヒトの免疫グロブリン遺伝子セグメントに置換されている幾つかの系統のトランスジェニックマウスが現在入手可能である(Tomizuka(2000年)PNAS 97: 722-727; Fishwild(1996年)Nature Biotechnol. 14: 845-851; Mendez(1997年)Nature Genetics, 15: 146-156)。抗原チャレンジの際、このようなマウスは、ヒト抗体のレポーターを産生することができ、それから対象となる抗体を選択することができる。

【0209】

ファージディスプレイ技術を使用して、ヒト抗原結合タンパク質(及びその断片)を作製することができる。McCafferty(1990年)Nature 348: 552-553及びGriffithsら。(1994年)EMBO 13: 3245-32

10

20

30

40

50

60を参照されたい。

【0210】

親和性成熟の技術 (Marks Bio/technology (1992年) 10: 779 - 783) を用いて結合親和性を改善することもでき、一次ヒト抗体の親和性は、順次H及びL鎖の変領域を天然に存在する変異体で置換し、改善された結合能に基づいて選択することにより改善される。「エピトープインプリンティング」等のこの技術の変形例も現在利用可能である。例えば、国際公開第93/06213号パンフレット; Waterhouse (1993年) Nucl. Acids Res. 21: 2265 - 2266を参照されたい。

【0211】

キメラ及びヒト化抗体

キメラ抗体は、典型的に、組換えDNA方法を使用して作製される。抗体(例えばcDNA)をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、抗体のH及びL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの典型的な起源として機能する。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに入れられ、次いで、発現ベクターが存在しなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌、COS細胞、CHO細胞又は骨髓細胞等の宿主細胞にトランスフェクトされて、抗体を合成する。ヒトのL及びH鎖のコーディング配列を対応する非ヒト(例えば、マウス)のH及びL定常領域の代わりに用いることによりDNAを改変してもよい。例えば、Morrisson (1984年) PNAS 81: 6851を参照されたい。

【0212】

非ヒト(例えば、マウス)抗体(「ドナー」抗体)のCDRのみをヒトフレームワーク(「アクセプタフレームワーク」)及び定常領域にグラフトして、ヒト化抗体を作製することにより免疫原性を大きく低下させることができる(Jonesら。(1986年) Nature 321: 522 - 525; 及びVerhoeyenら。(1988年) Science 239: 1534 - 1536)。しかし、CDRのグラフト自体は、抗原結合特性を完全に保持させることはできないので、多くの場合、有意な抗原結合親和性を回復させたい場合、ドナー抗体のうち幾つかのフレームワーク残基をヒト化分子中に保存しておく必要がある(「復帰突然変異」とも呼ばれる)ことが見出されている(Queenら。(1989年) PNAS 86: 10,029 - 10,033; Coら。(1991年) Nature 351: 501 - 502)。この場合、ヒトフレームワーク(FR)を提供するために、非ヒトドナー抗体に対して最も高い配列相同性を示すヒト可変領域をデータベースから選択する。ヒトFRの選択は、ヒトのコンセンサス又は個々のヒト抗体のいずれかから作製することもできる。必要な場合、CDRの高次構造を保存するために、ヒトアクセプタフレームワークにドナー抗体由来の重要な残基を置換して入れることができる。抗体のコンピュータモデリングを用いて、このような構造的に重要な残基を同定するのに役立つことができる。国際公開第99/48523号パンフレットを参照されたい。

【0213】

あるいは、ヒト化は、「ベニアリング」のプロセスにより行うことができる。独自のヒト及びマウスの免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖可変領域を統計分析することにより、露出残基の正確なパターンはヒト抗体とマウス抗体とで異なり、そして、大部分の個々の表面位置は少数の異なる残基に対して強い偏好性を有することが明らかになった(Padlanら。(1991年) Mol. Immunol. 28: 489 - 498; 及びPedersenら。(1994年) J. Mol. Biol. 235: 959 - 973)。したがって、ヒト抗体で通常みられるものとは異なるフレームワーク領域の露出残基を置換することにより、非ヒトFvの免疫原性を低下させることが可能である。タンパク質の抗原性は表面の接近可能性と相関している場合があるので、表面残基の置換は、マウス可変領域をヒト免疫系に「見えない」ようにするのに十分であり得る(Markら。(1994年)

10

20

30

40

50

Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113: The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134も参照されたい)。このヒト化の手順は、抗体の表面だけを改変し、支持残基はそのまま保つので、「ベニアリング」と呼ばれる。更なる別のアプローチとしては、国際公開号04/006955号パンフレットに記載されているもの、及び細菌の発現系を使用して配列がヒト生殖細胞系に近い抗体を産生するHumaneering (商標) (Kalobios)の手順が挙げられる (Alfenito - M Advancing Protein Therapeutics 2007年1月, San Diego, California)。

【0214】

10

二重特異性抗原結合タンパク質

二重特異性抗原結合タンパク質は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗原結合タンパク質である。このような抗原結合タンパク質を作製する方法は、当技術分野において公知である。従来より、二重特異性抗原結合タンパク質の組換え体作製は、2本のH鎖が異なる結合特異性を有する2つの免疫グロブリンH鎖-L鎖対の共発現に基づいている。Millssteinら。(1983年) Nature 305: 537-539; 国際公開号93/08829号パンフレット; 及びTraunckeckerら。(1991年) EMBO 10: 3655-3659を参照されたい。H鎖及びL鎖のランダムな組合せによって、10種の異なる抗体構造の混合物が産生される可能性があり、そのうち1つのみが望ましい結合特異性を有する。別のアプローチは、ヒンジ領域、CH2及びCH3領域の少なくとも一部を含む重鎖定常領域に、望ましい結合特異性を有する可変ドメインを融合させることを含む。軽鎖との結合に必要な部位を含有するCH1領域は、融合物のうちの少なくとも1つに存在し得る。これら融合物及び望ましい場合L鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、次いで、好適な宿主生物にコトランスフェクトする。しかし、1つの発現ベクターに2つ又は3つの鎖のコーディング配列を挿入することも可能である。1つのアプローチでは、二重特異性抗体は、一方の腕に第1の結合特異性を有するH鎖とH鎖-L鎖対とから構成されるが、但し、他の腕は第2の結合特異性を有する。国際公開第94/04690号パンフレットを参照されたい。また、Sureshら。(1986年) Methods in Enzymology 121: 210を参照されたい。

20

30

【0215】

抗原結合断片

定常領域を欠く断片は、古典的経路によって補体を活性化するか又は抗体依存性細胞性細胞傷害を媒介する能力を欠く。従来より、このような断片は、例えば、パパイニン消化によりインタクトな抗体のタンパク質を分解することにより作製されるが(例えば、国際公開第94/29348号パンフレットを参照されたい)、組換え技術により形質転換された宿主細胞から直接産生してもよい。ScFvの産生については、Birdら。(1988年) Science 242: 423-426を参照されたい。更に、抗原結合断片は、下記のような様々な改変技術を使用して作製してもよい。

【0216】

40

Fv断片は、2本の鎖の相互作用エネルギーがFab断片よりも低いと考えられる。V_H及びV_Lドメインの会合を安定化させるために、これらをペプチド(Birdら。(1988年) Science 242: 423-426; Hustonら。(1988年) PNAS 85(16): 5879-5883)、ジスルフィド架橋(Glockshuberら。(1990年) Biochemistry 29: 1362-1367)及び「knob in hole」突然変異(Zhuら。(1997年) Protein Sci., 6: 781-788)で連結させてもよい。ScFv断片は、当業者に周知の方法により作製することができる。Whitlowら。(1991年) Methods Companion Methods Enzymol, 2: 97-105及びHustonら。(1993年) Int. Rev. Immunol 10: 195-217を参照さ

50

りたい。ScFvは、大腸菌等の細菌細胞又は真核細胞で産生させることもできる。ScFvの1つの問題点は、生成物が一価性であるので多価結合により結合活性を高めることができないこと及び半減期が短いことである。これら問題点を克服する試みとしては、化学的カップリング(Adamsら。(1993年)Can. Res. 53:4026-4034;及びMcCartyら。(1995年)Protein Eng. 8:301-314)により、又は不對C末端システイン残基を含有するScFvの自然発生的部位特異的二量体化により、更なるC末端システインを含有するScFvから二価の(ScFv')₂を作製することが挙げられる。あるいは、ペプチドリンカーを3~12残基まで短くすることによりScFvに多量体を形成させて「ダイアボディ」を形成することもできる。Holligerら。(1993年)PNAS 90:6444-6448を参照されたい。リンカーを更に短くすることによりScFvの三量体(「トリアボディ」、Korttら。(1997年)Protein Eng. 10:423-433を参照されたい)及び四量体(「テトラボディ」、Le Gallら。(1999年)FEBS Lett, 453:164-168を参照されたい)を生じさせることもできる。また、タンパク質を二量体化させるモチーフと遺伝的に融合させて、「ミニ抗体」(Packら。(1992年)Biochemistry 31:1579-1584を参照されたい)及び「ミニボディ」(Huら。(1996年)Cancer Res. 56:3055-3061)を形成することにより二価ScFv分子を構築することができる。また、ScFv-ScFvタンデム((ScFv)₂)は、第3のペプチドリンカーによって2つのScFv単位を連結させることにより作製することができる。Kuruczら。(1995年)J. Immunol. 154:4576-4582を参照されたい。二重特異性ダイアボディは、短いリンカーによって別の抗体のV_Lドメインに接続されている、ある抗体に由来するV_Hドメインからなる2つの単鎖融合生成物の非共有結合を通じて作製することができる。Kipriyanovら。(1998年)Int. J. Can. 77:763-772を参照されたい。上記のようなジスルフィド架橋又は「knob in hole」突然変異の導入により、又は2つのハイブリッドScFv断片がペプチドリンカーを通して接続されている単鎖ダイアボディ(ScDb)の形成により、このような二重特異性ダイアボディの安定性を高めることができる。Kontermannら。(1999年)J. Immunol. Methods 226:179-188を参照されたい。四価の二重特異性分子は、例えば、IgG分子のCH3ドメイン又はヒンジ領域を通してFab断片にScFv断片を融合させることにより入手可能である。Colomaら。(1997年)Nature Biotechnol. 15:159-163を参照されたい。あるいは、四価の二重特異性分子は、二重特異性単鎖ダイアボディの融合により作製することができる(Altら。(1999年)FEBS Lett 454:90-94を参照されたい)。また、より小さな四価の二重特異性分子は、ScFv-ScFvタンデムを、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフを含有するリンカー(DiBiミニ抗体、Mullerら。(1998年)FEBS Lett 432:45-49)又は4つの抗体可変ドメイン(V_H及びV_L)を含む単鎖分子のいずれかと、分子内の対合を防ぐ配向で二量体化させることにより形成することができる(タンデムダイアボディ、Kipriyanovら。(1999年)J. Mol. Biol. 293:41-56を参照されたい)。二重特異性F(ab')₂断片は、Fab'断片の化学的カップリングにより、又はロイシンジッパーを通じたヘテロ二量体化により作製することができる(Shalabyら。(1992年)J. Exp. Med. 175:217-225;及びKostelnyら。(1992年), J. Immunol. 148:1547-1553)。また、単離V_H及びV_Lドメインも利用可能である(Domantis plc)、米国特許第6,248,516号明細書;米国特許第6,291,158号明細書;及び米国特許第6,172,197号明細書を参照されたい。

【0217】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便利な架橋法を使用して形成される、2つの共有

10

20

30

40

50

結合した抗体で構成される。例えば、米国特許第 4,676,980 号を参照されたい。

【0218】

他の改変

本発明の抗原結合タンパク質は、そのエフェクター機能を強化するか又は変化させるために他の改変を含んでもよい。本発明で使用する用語「エフェクター機能」は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害活性 (ADCC)、補体依存性細胞傷害活性 (CDC) 媒介性反応、Fc 媒介性食作用、及び FcRn 受容体を介した抗体の再利用のうちの 1 以上を指すことを意味する。IgG 抗体については、ADCC 及び ADCP を含むエフェクター機能は、免疫細胞の表面に存在する Fc 受容体のファミリーと重鎖定常領域との相互作用によって媒介される。ヒトでは、これらは、FcRI (CD64)、FcRII (CD32) 及び FcRIII (CD16) を含む。抗原結合している抗原結合タンパク質と Fc/Fc 複合体の形成との間の相互作用により、細胞傷害、免疫細胞活性化、食作用、及び炎症性サイトカインの放出を含む一連の作用が誘導される。

10

【0219】

抗原結合タンパク質の定常領域と様々な Fc 受容体 (FcR) との間の相互作用は、抗原結合タンパク質のエフェクター機能を媒介すると考える。有意な生物学的作用は、エフェクター機能、特に、抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC)、補体の固定 (補体依存性細胞傷害又は CDC)、及び抗原結合タンパク質の半減期/クリアランスの結果であり得る。通常、エフェクター機能を媒介する能力は、抗原に対する抗原結合タンパク質の結合を必要とし、全ての抗原結合タンパク質が全てのエフェクター機能を媒介するとは限らない。

20

【0220】

例えば、ナチュラルキラー細胞に対する FcRIII の結合を介して、又は単球/マクロファージに対する FcRI の結合を介して ADCC エフェクター機能を測定する等の多数の方法でエフェクター機能を測定することができる。例えば、本発明の抗原結合タンパク質の ADCC エフェクター機能は、ナチュラルキラー細胞アッセイにおいて評価することができる。このようなアッセイの例は、Shields ら, 2001 年 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, p 6591 - 6604; Chappel ら, 1993 年 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, p 25124 - 25131; Lazar ら, 2006 年 *PNAS*, 103; 4005 - 4010 に見出すことができる。

30

【0221】

CDC の機能を測定するためのアッセイの例としては、1995 年 *J Immun Meth* 184: 29 - 38 に記載されているものが挙げられる。

【0222】

ヒト定常領域の幾つかのアイソタイプ、特に IgG4 及び IgG2 アイソタイプは、a) 古典的経路による補体の活性化; 及び b) 抗体依存性細胞性細胞傷害の機能を本質的に欠く。望ましいエフェクター特性に応じて、抗原結合タンパク質の重鎖定常領域に対する様々な改変を行ってもよい。特異的突然変異を含有する IgG1 定常領域は、Fc 受容体に対する結合を減少させ、ひいては ADCC 及び CDC を低下させることが独立に報告されている (Duncan ら. *Nature* 1988 年, 332; 563 - 564; Lund ら. *J. Immunol.* 1991 年, 147; 2657 - 2662; Chappel ら. *PNAS* 1991 年, 88; 9036 - 9040; Burton 及び Woof, *Adv. Immunol.* 1992 年, 51; 1 - 84; Morgan ら., *Immunology* 1995 年, 86; 319 - 324; Hezareh ら., *J. Virol.* 2001 年, 75 (24); 12161 - 12168)。

40

【0223】

望ましい特性に応じて、抗体の Fc 領域に対する様々な改変を行ってもよい。例えば、溶解性抗体を非溶解性にするための Fc 領域における特異的突然変異は、欧州特許第 062

50

9 240号及び欧州特許第0307 434号明細書に詳述されている。あるいは、血清半減期を延長するために抗体にサルベージ受容体結合エピトープを組み込んでよい。米国特許第5,739,277号明細書を参照されたい。ヒトFc 受容体としては、Fc R(I)、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIIa、及び新生児Fc Rnが挙げられる。Shieldsら。(2001年) J. Biol. Chem 276: 6591-6604は、IgG1残基の共通のセットは、全てのFc Rの結合に關与しているが、Fc RII及びFc RIIIIは、この共通のセットの外側の異なる部位を利用することを立証した。以下に記載するIgG1残基の1つの群は、アラニンに変更されたとき全てのFc Rに対する結合を減少させる: Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297及びPro-239。全てIgG CH2ドメインに存在し、CH1及びCH2を連結するヒンジの近傍でクラスタを形成する。Fc RIは、結合のためにIgG1残基の共通のセットのみを利用するが、Fc RII及びFc RIIIIは、前記共通のセットに加えて異なる残基とも相互作用する。幾つかの残基を変化させると、Fc RII(例えばArg-292)又はFc RIIII(例えばGlu-293)に対する結合のみが減少する。幾つの変異体では、Fc RII又はFc RIIIIに対する結合が改善されたが、他の受容体に対する結合は影響を受けなかった(例えば、Ser-267 Alaは、Fc RIIに対する結合を改善したが、Fc RIIIIに対する結合には影響を与えなかった)。他の変異体は、Fc RII又はFc RIIIIに対する結合を改善すると共に、他の受容体に対する結合を減少させた(例えば、Ser-298 Alaは、Fc RIIIIに対する結合を改善し、Fc RIIに対する結合を減少させた)。Fc RIIIIaの場合、最も優れた結合を示すIgG1変異体は、Ser-298、Glu-333及びLys-334におけるアラニン置換の組合せを有していた。新生児Fc Rn受容体は、抗体のクリアランスと組織を横断するトランスサイトシスとの両方に關与していると考えられる(Junghans(1997年) Immunol. Res 16: 29-57; 及びGhetieら。(2000年) Ann u. Rev. Immunol. 18: 739-766)。ヒトFc Rnと直接相互作用することが見出されているヒトIgG1残基としては、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434及びHis435が挙げられる。この段落に記載する位置のいずれかにおける置換は、血清半減期を延長する及び/又は抗体のエフェクター特性を変化させることができる。

【0224】

他の改変としては、抗体のグリコシル化変異体が挙げられる。これらの定常領域の保存部位における抗体のグリコシル化は、抗体機能、特に、上記のようなエフェクター機能に対する重要な作用を有することが知られている。例えば、Boydら。(1996年) Mol. Immunol. 32: 1311-1318を参照されたい。1以上の炭水化物部分が付加、置換、欠失、又は修飾されている抗体又はその抗原結合断片のグリコシル化変異体が考えられる。アスパラギン-X-セリン又はアスパラギン-X-トレオニンモチーフを導入すると酵素的に結合する可能性のある部位が炭水化物部分に作製されるので、抗体のグリコシル化を操作するために用いることができる。Rajuら。(2001年) Biochemistry 40: 8868-8876では、TNFR-IgGイムノアドヘシンの末端シアリル化が、-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ及び/又は、2,3シアリルトランスフェラーゼを用いる再ガラクトシル化及び/又は再シアリル化のプロセスを通して増加した。末端のシアリル化を増加させることは、免疫グロブリンの半減期を延長すると考えられる。ほとんどの糖タンパク質と同様に、抗体は、典型的に、グリコフォームの混合物として産生される。抗体が真核生物、特に哺乳類細胞において産生されるとき、この混合物は特に明らかである。規定のグリコフォームを製造するために様々な方法が開発されている。Zhangら。(2004年) Science 303: 371; Searsら。(2001年) Science 291: 2344; Wacke rら。(2002年) Science 298: 1790; Davisら。(2002年) Chem. Rev. 102: 579; Hangら。(2001年) Acc. Chem.

10

20

30

40

50

Res 34:727を参照されたい。本明細書に記載する抗体（例えば、IgGアイソタイプ、例えばIgG1）は、規定の数（例えば、7以下、例えば、5以下、例えば、2つ又は1つ）のグリコフォームを含んでよい。

【0225】

抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール又はポリオキシアルキルエン等の非タンパク質性ポリマーにカップリングしてもよく、しなくてもよい。PEGに対するタンパク質のコンジュゲート化は、タンパク質の抗原性及び免疫原性を低下させることに加えて、タンパク質の半減期を延長するために確立されている技術である。Fab'断片に加えてインタクトな抗体でも、様々な分子量及び形状（直鎖又は分岐鎖）のPEG化の使用について研究されている。Koumenisら。（2000年）Int. J. Pharmaceut. 198:83-95を参照されたい。

10

【0226】

産生方法

抗原結合タンパク質は、ヤギ（Pollackら。（1999年）J. Immunol. Methods 231:147-157を参照されたい）、ニワトリ（Morrow（2000年）Genet. Eng. News 20:1-55を参照されたい）、マウス（Pollackらを参照されたい）又は植物（Doran（2000年）Curr. Opin. Biotechnol. 11:199-204; Ma（1998年）Nat. Med. 4:601-606; Baezら。（2000年）BioPharm 13:50-54; Stogerら。（2000年）Plant Mol. Biol. 42:583-590）等のトランスジェニック生物で産生させることができる。

20

【0227】

また、抗原結合タンパク質は、化学合成によって作製することもできる。しかし、抗原結合タンパク質は、典型的には、当業者に周知の組換え細胞培養技術を使用して作製される。抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを単離し、更にクローニング（増幅）又は発現のために複製可能なベクターに挿入する。特に宿主細胞がCHO又はNSOである場合、1つの発現系は、グルタミン酸合成系（例えば、Lonza Biologicsにより販売されている）である。抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、従来の手順（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ）を使用して容易に単離され、配列決定される。使用することができるベクターとしては、プラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾン、ミニ染色体が挙げられ、この中でも典型的にプラスミドが使用される。一般的に、このようなベクターは、発現を促進するために抗原結合タンパク質に機能的に連結しているシグナル配列、複製開始点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列を更に含む。軽鎖及び重鎖をコードするポリヌクレオチドを別々のベクターに挿入し、同時に又は順次、（例えば形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、又は形質導入により）同じ宿主細胞に導入してもよく、必要に応じて、前記導入前に重鎖及び軽鎖の両方を同じベクターに挿入してもよい。

30

【0228】

野性型配列でトランスフェクトされたときの量と比べて、コドン最適化された遺伝子でトランスフェクトしたときに宿主細胞によって産生されるタンパク質の総量が増えることを意図して、コドンの最適化を使用してもよい。幾つかの方法が公開されている（Nakamuraら。（1996年）Nucleic Acids Research 24:214-215; 国際公開第98/34640号パンフレット; 国際公開第97/11086号パンフレット）。遺伝子コードの冗長性により、本明細書に開示するものとは別のポリヌクレオチド（特に、所与の宿主細胞で発現させるためにコドン最適化されたポリヌクレオチド）も、本明細書に記載する抗原結合タンパク質をコードすることができる。本発明の抗原結合タンパク質のコドン使用頻度を変化させて、転写物及び/又は生成物の収率を高めるように宿主細胞のコドンバイアスを適応させてもよい（例えば、Hoekemaら Mol Cell Biol 1987年 7(8):2914-24）。コド

40

50

ンの選択は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

【0229】

シグナル配列

抗原結合タンパク質は、成熟タンパク質のN末端に、特異的な切断部位を有する異種のシグナル配列を含む融合タンパク質として作製してもよい。シグナル配列は、宿主細胞により認識され、プロセッシングされなければならない。原核生物の宿主細胞の場合、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーであってよい。酵母分泌物については、シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー又は酸性ホスファターゼリーダーであってよい。例えば、国際公開第90/13646号パンフレットを参照されたい。哺乳類細胞系では、単純ヘルペスgDシグナル及びネイティブな免疫グロブリンシグナル配列等のウイルス分泌リーダーが好適であり得る。典型的に、シグナル配列は、リーディングフレームにおいて抗原結合タンパク質をコードするDNAにライゲーションされる。

10

【0230】

複製開始点

複製開始点は、ほとんどのグラム陰性菌に好適なpBR322、ほとんどの酵母に好適な2µプラスミド、ほとんどの哺乳類細胞好適なSV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV等の様々なウイルス開始点が当技術分野において周知である。一般的に、複製開始点の成分は、哺乳類の発現ベクターには必要ないが、SV40は、初期プロモータを含有しているため用いてもよい。

20

【0231】

選択マーカー

典型的な選択遺伝子は、(a)例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート又はテトラサイクリン等の抗生物質又は他の毒素に対する耐性を付与するタンパク質、又は(b)栄養要求性の欠損を補完したり複合培地では入手不可能な栄養素を供給したりするタンパク質をコードするか、又は(c)これら両方の組合せである。選択スキームは、宿主細胞の増殖を妨げることを含んでもよい。抗原結合タンパク質をコードする遺伝子による形質転換が成功した細胞は、例えば、同時に送達された選択マーカーにより付与された薬剤耐性により生存する。一例は、形質転換体がメトトレキセートの存在下で培養されるDHFR選択マーカーである。対象となる外来遺伝子のコピー数を増幅させるために増量したメトトレキセートの存在下で細胞を培養してもよい。CHO細胞は、DHFR選択に特に有用な細胞株である。更なる例は、グルタミン酸合成酵素発現系(Lonza Biologicals)である。酵母で使用される選択遺伝子の一例は、trp1遺伝子である。Stinchcombら。(1979年)Nature 282:38を参照されたい。

30

【0232】

プロモーター

抗原結合タンパク質を発現させるのに好適なプロモータは、抗原結合タンパク質をコードするDNA/ポリヌクレオチドに機能的に連結される。原核生物の宿主のプロモーターとしては、phoAプロモーター、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン、及びTac等のハイブリッドプロモーターが挙げられる。酵母細胞で発現させるのに好適なプロモーターとしては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖系酵素、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース6リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、及びグルコキナーゼが挙げられる。誘導性酵母プロモーターとしては、アルコール脱水素酵素2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、メタロチオネイン、及び窒素代謝又はマルトース/ガラクトース利用に関与する酵素が挙げられる。

40

【0233】

哺乳類細胞系で発現させるためのプロモーターとしては、ポリオーマ、鶏痘、及びアデ

50

ノウイルス（例えばアデノウイルス2）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス（特に、前初期遺伝子プロモーター）、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、アクチン、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、及び初期又は後期シミアンウイルス40等のウイルスプロモータが挙げられる。無論、プロモータの選択は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。第1のプラスミドは、RSV及び/又はSV40及び/又はCMVプロモーター、軽鎖可変領域（V_L）をコードするDNA、C領域をネオマイシン及びアンピシリン耐性選択マーカーと共に含んでよく、第2のプラスミドは、RSV又はSV40プロモーター、重鎖可変領域（V_H）をコードするDNA、1定常領域をコードするDNA、DHFR及びアンピシリン耐性マーカーを含む。

10

【0234】

エンハンサーエレメント

適切な場合、例えば、高等真核生物で発現させるために、ベクター中のプロモータエレメントに機能的に連結しているエンハンサーエレメントを使用することができる。哺乳類のエンハンサー配列としては、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、フェトプロテイン及びインスリン由来のエンハンサーエレメントが挙げられる。あるいは、SV40エンハンサー（bp100～270）、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、パキユウイルスエンハンサー又はマウスIgG2a遺伝子座等の真核細胞ウイルスに由来するエンハンサーを用いてもよい（国際公開第04/009823号パンフレットを参照されたい）。エンハンサーは、ベクターにおいてプロモータの上流の部位に位置してもよい。あるいは、エンハンサーは、例えば、非翻訳領域内、又はポリアデニル化シグナルの下流に位置してもよい。エンハンサーの選択及び配置は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

20

【0235】

ポリアデニル化/終結

真核細胞系では、ポリアデニル化シグナルは、抗原結合タンパク質をコードするDNA/ポリヌクレオチドに機能的に連結される。このようなシグナルは、典型的に、オープンリーディングフレームの3'に位置する。哺乳類系では、非限定的な例としては、成長ホルモン、伸長因子1アルファ及びウイルスの（例えば、SV40）遺伝子、又はレトロウイルスの長い末端反復配列に由来するシグナルが挙げられる。酵母系では、ポリアデニル化/終結シグナルの非限定的な例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）及びアルコール脱水素酵素1（ADH）遺伝子に由来するものが挙げられる。原核細胞系では、ポリアデニル化シグナルは、典型的には必要とされず、代わりに、より短く且つより明確なターミネーター配列が通常使用される。ポリアデニル化/終結配列の選択は、発現に使用される宿主細胞との好適な適合性に基づいてよい。

30

【0236】

収率を高めるための他の方法/エレメント

上記に加えて、収率を高めるために使用することができる他の機構としては、クロマチンリモデリングエレメント、イントロン、及び宿主細胞に特異的なコドン修飾が挙げられる。

40

【0237】

宿主細胞

抗原結合タンパク質をコードするベクターをクローニング又は発現させるのに好適な宿主細胞は、原核生物、酵母、又は高等真核生物の細胞である。好適な原核細胞としては、真性細菌が挙げられ、例えば、腸内細菌科、例えば、エシェリキア属（*Escherichia*）、例えば大腸菌（*E. coli*）（例えば、ATCC31,446；31,537；27,325）、エンテロバクター属（*Enterobacter*）、エルウィニア属（*Erwinia*）、クレブシエラ属（*Klebsiella*）、プロテウス属（*Proteus*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）等のサルモネラ属（*Salmonella*）、霊菌（*Serratia marcescans*）

50

s)等のセラシア属(*Serratia*)、及び赤痢菌属(*Shigella*)に加えて、枯草菌(*B. subtilis*)及びリケニホルミス菌(*B. licheniformis*)等のバチルス属(*Bacilli*) (旧東独国特許第266710号明細書を参照されたい)、緑膿菌(*P. aeruginosa*)等のシュードモナス属(*Pseudomonas*)、及びストレプトミセス属(*Streptomyces*)等である。酵母宿主細胞の中でも出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、クリベロマイセス属(*Kluyveromyces*) (例えば、ATCC16,045;12,424;24178;56,500)、ヤロウイア属(*yarrowia*) (欧州特許第402,226号明細書)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) (欧州特許第183070号明細書、また、Pengら。(2004年) *J. Biotechnol.* 108:185-192を参照されたい)、カンジダ属(*Candida*)、トリコデルマ・リーシア(*Trichoderma reesia*) (欧州特許第244234号明細書)、ペニシリン、トリポクラジウム属(*Tolypocladium*)、並びに偽巢性コウジ菌(*Anidulans*)及びクロコウジカビ(*A. niger*)等のアスペルギルス属(*Aspergillus*)の宿主も考えられる。

10

【0238】

高等真核宿主細胞としては、COS-1(ATCC番号CRL1650)COS-7(ATCC CRL1651)、ヒト胚腎臓系統293、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)(ATCC CRL1632)、BHK570(ATCC番号CRL10314)、293(ATCC番号CRL1573)、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO(例えば、CHO-K1、ATCC番号CCL61、DG44等のDHFR-CHO細胞株(Urlaubら。(1986年) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12:555-556を参照されたい)、特に懸濁培養に適したCHO細胞株、マウスセルトリ細胞、サル腎臓培養細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞(ATCC CRL-1587)、HELA細胞、イヌ腎臓細胞(ATCC CCL34)、ヒト肺細胞(ATCC CCL75)、Hep G2及び骨髄腫又は、リンパ腫細胞、例えばNS0(米国特許第5,807,715号を参照されたい)、Sp2/0、Y0等の哺乳類細胞が挙げられる。

20

【0239】

また、このような宿主細胞は、抗原結合タンパク質の品質、機能、及び/又は収率を改良するために更に改変又は適応させてもよい。非限定的な例としては、特異的修飾(例えば、グリコシル化)酵素及びタンパク質ホールディングシャペロンの発現が挙げられる。

30

【0240】

細胞培養方法

抗原結合タンパク質をコードするベクターで形質転換された宿主細胞は、当業者に公知の任意の方法により培養することができる。宿主細胞は、スピナーフラスコ、ローラーボトル、又は中空ファイバー系で培養することができるが、大規模に産生させる場合、特に懸濁培養には攪拌槽型反応器が使用される。攪拌槽は、例えば、スパージャー、バッフル、又は低剪断インペラ等を用いるエアレーションに適応し得る。気泡塔及びエアリフト反応器については、空気又は酸素の気泡を用いて直接エアレーションを行ってもよい。宿主細胞を無血清培地で培養する場合、pluronic F-68等の細胞保護剤を培地に添加して、エアレーションプロセスに起因する細胞の損傷を防ぐのを補助する。宿主細胞の特徴に応じて、足場依存性細胞株に対する成長基材としてマイクロキャリアを使用してもよく、細胞を懸濁培養に適応させてもよい(これが典型的である)。宿主細胞、特に無脊椎宿主細胞の培養は、フェッドバッチ、反復バッチ処理(Drapeauら。(1994年) *Cytotechnology* 15:103-109を参照されたい)、延長バッチ処理、又は灌流培養等の様々な操作方式を利用してよい。組換え技術を用いて形質転換された哺乳類宿主細胞は、ウシ胎仔血清(FCS)等の血清含有培地で培養してもよいが、例えば、このような宿主細胞は、Keen et al.(1995) *Cytote*

40

50

chnology 17:153-163に開示されているような合成無血清培地、又はProCHO-CDM若しくはUltraCHO(商標)(Cambrex NJ, USA)等の市販培地で培養され、これら培地には、必要な場合、グルコース等のエネルギー源及び組換えインスリン等の合成成長因子が添加される。宿主細胞の無血清培養は、これら細胞が無血清条件における成長に適応していることを必要とする場合がある。1つの適応アプローチは、血清含有培地中でこのような宿主細胞を培養し、宿主細胞が無血清条件に適応できるようになるように培地の80%を無血清培地に繰り返し交換することである(例えば、Scharfenbergら、(1995年)in Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century (Beuveryら編, 619-623, Kluwer Academic publishers)。

【0241】

培地に分泌される抗原結合タンパク質は、意図する用途に好適な精製度を得るために様々な技術を用いて回収及び精製することができる。例えば、ヒト患者を治療するための抗原結合タンパク質の使用には、典型的に、(粗培養培地と比較して)少なくとも純度95%、より典型的には98%若しくは99%又はそれ以上の純度が要求される。培地の細胞残屑は、典型的に、遠心分離し、次いで、例えば、精密濾過、限外濾過、及び/又は深層濾過等の清澄化工程を用いて除去する。透析及びゲル電気泳動、並びにハイドロキシアパタイト(HA)、アフィニティークロマトグラフィー(任意でポリヒスチジン等の親和性タギング系を含む)及び/又は疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC、米国特許第5,429,746号を参照されたい)等のクロマトグラフィー技術等の様々な他の技術が利用可能である。抗体は、以下の様々な清澄化工程に従って、プロテインA又はGアフィニティークロマトグラフィーを使用して、捕捉することができる。この後、イオン交換及び/又はHAクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換、サイズ排除クロマトグラフィー、及び硫酸分画等の更なるクロマトグラフィー工程を行ってもよい。様々なウイルス除去工程を使用してもよい(例えば、DV-20フィルタを用いるナノ濾過等)。これら様々な工程後、少なくとも75mg/mL以上又は100mg/mL以上の抗原結合タンパク質を含む精製された(例えば、モノクローナル)調製物が得られる。このような調製物は、抗原結合タンパク質の凝集形態を実質的に含まない。

【0242】

抗原結合断片を発現させるために細菌系を使用してもよい。このような断片は、細胞内の周辺細胞質内に局在するか、又は細胞外に分泌され得る。当業者に公知の方法に従って不溶性タンパク質を抽出及びリフォールディングして、活性タンパク質を形成することができる。Sanchezら、(1999年)J. Biotechnol. 72:13-20;及びCupitら、(1999年)Let Appl Microbiol 29:273-277を参照されたい。

【0243】

医薬組成物

疾患、障害及び病状という用語は、互換的に使用される。本明細書に記載する抗原結合タンパク質の精製調製物を、本明細書に記載するヒトの疾患の治療において使用するための医薬組成物に配合してもよい。前記医薬組成物は、IL-7が疾患の一因であるか、又はIL-7R媒介性シグナル伝達の阻害/中和が有益である疾患の治療において使用することができる。前記医薬組成物は、治療上有効な量の本明細書に記載する抗原結合タンパク質を含む。

【0244】

医薬調製物は、薬学上許容される担体と組合せて抗原結合タンパク質を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、単独で投与してもよく、医薬組成物の一部として投与してもよい。

【0245】

典型的に、このような組成物は、公知であり且つ許容し得る薬務により要求される薬学

上許容される担体を含む。例えば、Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th edition (1980) Mack Publishing Co. を参照されたい。このような担体の例としては、生理食塩水、リンゲル液、又はデキストロス溶液等の無菌担体が挙げられ、これら担体は、任意で好適なバッファにより pH 5 ~ 8 に緩衝される。

【0246】

医薬組成物は、(例えば、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内、門内に)注射又は持続注入することにより投与することができる。このような組成物は、目に見える粉粒体を含まないことが好ましい。医薬組成物は、1 mg ~ 10 g の抗原結合タンパク質、例えば、5 mg ~ 1 g の抗原結合タンパク質を含んでなり得る。あるいは、前記組成物は、5 mg ~ 500 mg、例えば、5 mg ~ 50 mg を含んでなり得る。

10

【0247】

このような医薬組成物を調製する方法は、当業者に周知である。医薬組成物は、単位剤形中に抗原結合タンパク質を 1 mg ~ 10 g 含んでなり得、任意で使用説明書を共に含む。医薬組成物は、当業者に周知であるか又は当業者に明らかである方法に従って、投与前に再構成するために凍結乾燥(フリーズドライ)してもよい。抗体が Ig G 1 アイソタイプを有する場合、このアイソタイプの抗体の銅触媒による分解の程度を低下させるために医薬組成物にクエン酸塩(例えば、クエン酸ナトリウム)又は EDTA 又はヒスチジン等の銅のキレート化剤を添加してもよい。欧州特許第 0612251 号明細書を参照されたい。また、医薬組成物は、アルギニン塩基、ポリソルベート 80 等の洗剤/抗凝集剤、及びバイアルのヘッドスペースの酸素を置換するための窒素等の不活性ガス等の可溶化剤を含んでなり得る。

20

【0248】

抗原結合タンパク質を投与するための有効量及び治療レジメンは、一般的に、経験的に決定され、患者の年齢、体重、及び健康状態、並びに治療される疾患又は障害等の要因に依存し得る。このような要因は、主治医の理解の範囲内である。適切な用量の選択における指針は、例えば、Smithら(1977年)Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New Yorkに見出すことができる。したがって、本発明の抗原結合タンパク質を治療上有効な量で投与することができる。

30

【0249】

被験体に投与される抗原結合タンパク質の投薬量は、一般的に、被験体の体重 1 kg 当たり 1 µg ~ 150 mg、0.1 mg ~ 100 mg、0.5 mg ~ 50 mg、1 ~ 25 mg、又は 1 ~ 10 mg である。例えば、用量は、10 mg / kg、30 mg / kg 又は 60 mg / kg であり得る。抗原結合タンパク質は、例えば、皮下、静脈内、又は筋肉内等、非経口的に投与してもよい。

【0250】

望ましい場合、有効な日用量の治療組成物は、任意で単位剤形にて、適切な間隔で別々に 2、3、4、5、6 又はそれ以上のサブ用量で投与してもよい。例えば、14 日又は 28 日に 1 回、各投与日に複数のサブ用量の形態で用量を皮下投与してもよい。

40

【0251】

典型的に、15 分 ~ 24 時間、例えば、2 ~ 12 時間、又は 2 ~ 6 時間の期間にわたって静脈内注入により用量を投与してよい。これは、有毒な副作用を低減することができる。

【0252】

用量の投与は、必要に応じて 1 回以上、例えば、1 日 3 回、毎日 1 回、2 日に 1 回、1 週間に 1 回、2 週間に 1 回、1 ヶ月に 1 回、3 ヶ月に 1 回、6 ヶ月に 1 回、又は 12 ヶ月に 1 回繰り返してもよい。抗原結合タンパク質は、維持療法により、例えば、6 ヶ月以上の期間にわたって 1 週間に 1 回投与してもよい。抗原結合タンパク質は、間欠療法により、例えば、1 周期において、3 ~ 6 ヶ月間抗原結合タンパク質を投与し、次いで、3 ~ 6

50

ヶ月間投与せず、次いで、3～6ヶ月間再度抗原結合タンパク質を投与してもよい。

【0253】

生体サンプル中のIL-17の量を測定することにより、投薬量を決定又は調節することができる。投薬量を決定又は調節する他の手段を用いてもよく、例えば、薬理学の生物学的マーカー（「バイオマーカー」）、筋肉量の測定、並びに/又は機能、安全性、耐容性及び治療反応が挙げられるがこれらに限定されない。抗原結合タンパク質は、被験体におけるIL-7媒介性シグナル伝達活性をダウンレギュレートするのに有効な量及び期間投与してよい。

【0254】

抗原結合タンパク質は、特定の部位に対する標的療法を行うように被験体に投与してよい。例えば、筋肉、例えば骨格筋に抗原結合タンパク質を局所的に注射してもよい。

10

【0255】

抗原結合タンパク質は、1以上の他の治療活性剤、例えば、インターフェロンベータ（IFN 1a又はIFN 1b）及び酢酸グラチラマー等の免疫調節物質、シクロホスファミド、メトトレキサート、アザチオプリン、クラドリピン、シクロスポリン及びミトキサントロン等の免疫抑制物質、静脈内免疫グロブリン（IVIg）、血漿補充及びスルファサラジン等の他の免疫療法と併用してもよい。更なる治療剤は、医師に指示される方法（投薬量、タイミング、機序）で投与し得る。1つの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質と同時に又は順次又は別々に更なる治療剤を投与してもよい。1つの実施形態では、患者に対する薬理効果が重複するように、言い換えれば、患者に対して同時に生物学的作用発揮するように、更なる治療剤と抗原結合タンパク質とを投与する。

20

【0256】

抗原結合タンパク質を他の治療活性剤と併用する場合、個々の成分を、一緒に又は別々に、順次又は同時に、別個の医薬製剤又は複合医薬製剤で、任意の適切な経路により投与してよい。別々に又は順次投与する場合、抗原結合タンパク質及び治療活性剤は、任意の順序で投与してよい。

【0257】

上記組合せは、任意で薬学上許容される担体又は賦形剤と共に、上に定義する組合せを含む単一医薬製剤の形態で使用するために提示してもよい。

【0258】

同じ製剤中で組合せる場合、成分が安定であり且つ互いに及び製剤の他の成分と適合しなくてはならず、投与用に製剤化できることが認識される。別々に製剤化する場合、例えば当技術分野の抗原結合タンパク質について公知のように、任意の便利な製剤で提供してよい。

30

【0259】

同じ疾患に対する第2の治療活性剤と組合せる場合、各成分の用量は、抗原結合タンパク質を単独で使用するときと異なってもよい。当業者は適切な用量を容易に認識する。

【0260】

抗原結合タンパク質及び治療活性剤は、相乗的に作用する場合もある。言い換えれば、抗原結合タンパク質と治療活性剤とを組合せて投与すると、本明細書に記載する疾患、障害、又は病状に対する効果が、それぞれの単独の効果の合計よりも大きい場合がある。

40

【0261】

医薬組成物は、任意で使用説明書と共に、抗原結合タンパク質と他の薬剤とのキットオブパーツを含んでよい。便宜上、キットは、使用説明書と共に所定の量の試薬を含んでよい。

【0262】

用語「個体」、「被験者」及び「患者」は、本発明において互換的に使用される。被験体は、典型的にヒトである。また、被験体は、マウス、ラット又は霊長類（例えばマーモセット又はサル）等の哺乳類であってもよい。被験体は、非ヒト動物であってもよい。また、抗原結合タンパク質は、獣医学的に使用してもよい。治療される被験体は、家畜、例

50

えば、雌ウシ又は雄ウシ、ヒツジ、ブタ、雄ウシ、ヤギ又はウマ等の家畜であってもよく、イヌ又はネコ等のペットであってもよい。動物は、任意の年齢であってもよく、成熟した成体動物であってもよい。

【0263】

治療は、治療的、予防的、又は防止的であってもよい。被験体は、それを必要としている被験体であってもよい。治療を必要としている被験体は、特定の医学的疾患に既に罹患している個体に加えて、将来その疾患を発現する可能性のある個体を含んでなり得る。

【0264】

したがって、本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、予防的又は防止的治療に用いることができる。この場合、本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、疾患の1以上の局面又は症状の発生を防止するか又は遅らせるために、個体に投与される。被験体は、無症候性であり得る。被験体は、その疾患に対する遺伝性素因を有し得る。このような個体には、予防上有効な量の抗原結合タンパク質が投与される。予防上有効な量は、本明細書に記載する疾患の1以上の局面又は症状の発生を防止するか又は遅らせる量である。

【0265】

また、本明細書に記載する抗原結合タンパク質を治療の方法で用いてもよい。用語「治療」は、疾患の少なくとも1つの局面又は症状の緩和、低減、又は防止を包含する。例えば、本明細書に記載する抗原結合タンパク質を用いて、本明細書に記載する疾患の1以上の局面又は症状を寛解又は低減することができる。

【0266】

本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、治療的、予防的、又は防止的治療に有効な量で用いられる。本明細書に記載する抗原結合タンパク質の治療上有効な量は、疾患の1以上の局面又は症状を寛解又は低減するのに有効な量である。また、本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、本明細書に記載する疾患を治療、防止、又は治癒させるために用いることができる。

【0267】

本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、一般的に、被験体の健康に対して有益な効果を有し得、例えば、被験体の予測寿命を延ばすことができる。

【0268】

本明細書に記載する抗原結合タンパク質は、生存可能な治療的治療を行うために疾患の全ての症状又は徴候を完全に治癒させる又は根絶する必要がある訳ではない。適切な分野で認識されている通り、治療剤として使用される薬物は、所与の疾患状態の重篤度を低下させることができるが、有用な治療剤であるとみなされるために疾患の全ての徴候を消失させる必要がある訳ではない。同様に、予防的に投与される治療は、生存可能な予防剤を構成するために疾患の発症を防止するのに完全に有効である必要はない。単に、(例えばその症状の数又は重篤度を減らすことにより、又は別の治療の有効性を高めることにより、又は別の有益な効果を生じさせることにより)疾患の影響を低下させるか又は(例えば疾患の発症を遅らせることにより)被験体において疾患が生じたり悪化したりする可能性を低下させることで十分である。

【0269】

本発明の抗原結合タンパク質は、多発性硬化症、及び他の自己免疫疾患又は炎症性疾患、特に病原性T_H17細胞が関与するものの治療において使用することができる。このような疾患は、高レベルのIL-17発現を伴う。MS患者の血清及びCSF(Matusevicius, D.ら.; Mult. Scler. 5, 101-104; 1999年)、並びに関節リウマチ患者から得られた滑液で高レベルのIL-17が報告されている。また、IL-17は乾癬にも関与しており(Homeyら.; J. Immunol. 164(12): 6621-32; 2000)、一方では、ベーチェット病における高レベルのIL-17もHamzaouiらにより報告されている(Scand. J. Rheumatol.; 31: 4, 205-210; 2002年)。また、高レベルのIL-17は、全身性エリテマトーデス(SLE)でも観察されている(Wongら.; Lupus

10

20

30

40

50

9(8):589-93;2000年)。

【0270】

また、IL-7受容体媒介性シグナル伝達の阻害は、喘息等のIL-17の増加が関与している炎症性(非自己免疫)疾患の治療においても有用であり得る。

【0271】

したがって、本発明の炎症性疾患及び/又は自己免疫疾患としては、乾癬及びアトピー性皮膚炎を含む炎症性皮膚疾患;全身性強皮症及び硬化症;炎症性腸疾患(IBD);クローン病;潰瘍性大腸炎;外科的組織再灌流傷害、心筋梗塞、心停止、心臓手術後の再灌流、並びに経皮経管冠動脈形成術後の狭窄、卒中及び腹部大動脈瘤等の心筋虚血状態を含む虚血再灌流障害;卒中に続発する脳浮腫;頭蓋外傷、循環血液量減少性ショック;窒息;成人型呼吸窮迫症候群;急性肺障害;ベーチェット病;皮膚筋炎;多発性筋炎;多発性硬化症(MS);皮膚炎;脳膜炎;脳炎;ブドウ膜炎;変形性関節症;狼瘡腎炎;関節リウマチ(RA)、シェーグレン症候群、脈管炎等の自己免疫性疾患;白血球漏出を含む疾患;中枢神経系(CNS)炎症性障害、敗血症又は外傷に続発する多臓器損傷症候群;アルコール性肝炎;細菌性肺炎;糸球体腎炎を含む抗原抗体複合体媒介性疾患;敗血症;サルコイドーシス;組織/臓器移植に対する免疫病理学的応答;肋膜炎、肺炎、肺胞炎、脈管炎、慢性気管支炎、気管支拡張症、びまん性汎細気管支炎、過敏性肺炎、特発性肺線維症(IPF)及び嚢胞性線維症を含む肺の炎症;乾癬性関節炎;視神経脊髄炎、ギラン-バレー症候群(GBS)、COPD、1型糖尿病等が挙げられる。

【0272】

特に、本発明のアンタゴニストは、視神経脊髄炎を含む全ての形態の多発性硬化症の治療に有用であり得る。活動性炎症性疾患の状況で投与されたとき、すなわち、臨床的に孤立した症候群又は再発型のMSの治療において使用されるとき、本発明のアンタゴニストによる治療が最も効果的であると予測される。これら疾患の病期は、臨床的に、及び/又はガドリニウム増強若しくはより高感度な技術等の画像診断基準により、及び/又は活動性疾患の未だ定義されていないバイオマーカー等の他の方法により確定することができる。特に、本発明のアンタゴニストを用いて、患者が再発しつつあるか又は再発している場合に(静脈内、皮下、経口、筋肉内への送達を介して)RRMSを治療することができる。1つの実施形態では、再発の発生時に、又は再発の発生から1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日又は10日以内に本発明のアンタゴニストを投与する。

【0273】

本発明の抗原結合タンパク質は、CD127に結合することができる。1つの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、IL-7受容体の生物学的作用に拮抗することができる。1つの実施形態では、抗原結合タンパク質は、 T_H17 受容体媒介性増殖、及びIL-7受容体媒介性生存のうちの少なくとも1つに拮抗することができる。

【0274】

阻害、拮抗、中和という用語は、本発明において同義的に用いられる。これら用語はいずれも、完全な中和の必要性を示唆することを意図するものではなく;部分的な中和(生物学的作用の低下に相当するが、完全に消失させる訳ではない)も考えられる。

【0275】

IL-7受容体媒介性の T_H17 の増殖及び/又は生存は、 T_H17 細胞数の増加若しくは維持によって、又は他のCD4+T細胞数と比較した T_H17 細胞数の比率の増加によって、又はより具体的には、 T_H17 : T_H1 細胞の比、 T_H17 : T_{reg} 細胞の比、(T_H17 + T_H1): T_{reg} 細胞の比、及び/又は T_H17 :(T_H1 + T_{reg})の比の増加によって細胞レベルで観察することができる。

【0276】

分子レベルでは、 T_H17 の増加及び/又は生存は、CD4+T細胞の集団による(又は T_H17 細胞の集団による)IL-17産生の増加によって観察することができる。したがって、1つの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、CD4+T細胞の集団

10

20

30

40

50

によるIL-17産生を減少させる。また、IL-7受容体媒介性の T_H17 の増殖及び生存は、CD4+T細胞の集団による（又は T_H17 細胞の集団による）IFN- γ の産生の増加によって観察することもできる。したがって、1つの実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、CD4+T細胞の集団によるIFN- γ 産生に拮抗する（減少させる）。分子レベルでは、本発明の抗原結合タンパク質は、IL-7受容体媒介性のSTAT-5リン酸化を阻害することができる。

【0277】

分子レベルでは、IL-7誘導性のpSTAT5又はBcl-2等のアッセイにより本発明の抗原結合タンパク質のブロッキング効果を観察及び測定することができる。細胞レベルでは、IL-17又はIFN- γ の T_H17 分泌等のアッセイによりブロッキング効果を観察及び測定することができる。例示的なアッセイは、国際出願第PCT/US2009/053136号（国際出願第2010/017468号パンフレット）に記載されている。

10

【0278】

例示的なpSTAT-5アッセイでは、試験剤の存在下及び不在下にて、IL-7でPBMCを刺激する。次いで、例えば、（例えば、Alexa Fluor（登録商標）647マウス抗Stat5（pY694, BD[#612599]）等の標識された抗pSTAT-5抗体を用いて）pSTAT-5を染色し、次いで、蛍光活性化細胞選別を行うことにより、細胞のpSTAT-5の量を定量的に評価する。また、リン酸化型STAT-5の量は、ELISAによって測定することもできる。リン酸化型STAT-5の量を減少させる剤は、自己免疫疾患に対する潜在的な治療剤の候補である可能性がある。

20

【0279】

アンタゴニストの不在下におけるSTAT-5量と比較したとき、又はネガティブコントロール、すなわち未処理細胞と比較したとき、アンタゴニストは、リン酸化型STAT-5の量を少なくとも20%、50%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%減少させることができる。アンタゴニストは、50 μ g/mL、25 μ g/mL以下、10 μ g/mL以下、5 μ g/mL以下、又は2 μ g/mL以下のIC₅₀を有し得る。1つの実施形態では、アンタゴニストは、1 μ g/mL以下、0.75 μ g/mL以下、0.5 μ g/mL以下、0.25 μ g/mL以下、又は0.1 μ g/mL以下のIC₅₀を有する。

30

【0280】

本発明のアンタゴニストは、 T_H17 細胞の増殖を阻害において特に有効である。 T_H17 細胞の増殖は、 T_H17 増殖アッセイにおいて測定することができ、これは、試験剤の存在下及び不在下でナイーブなT細胞の集団を刺激して増殖させ、次いで、前記細胞を刺激してIL-17を産生させ、試験剤の存在下及び不在下で前記細胞により産生されるIL-17の量を評価することを含む。

【0281】

例示的なアッセイでは、IL-1、IL-6及びIL-23の存在下でT細胞の受容体を活性化を用いて刺激することにより、ヒトCD4+T細胞を T_H17 に分化させる。5日間分化させた後、CCR6+細胞を分離して、 T_H17 の濃縮された集団を作製する。次いで、この集団をヒトIL-7で刺激し、上清中におけるIL-17及びIFN- γ の増加を測定する。インキュベーション期間中にIL-7とCD127との相互作用のアンタゴニストが存在すれば、 T_H17 細胞の増殖を防ぎ、IL-7及びIFN- γ 産生を減少させるはずであることから、本発明の抗原結合タンパク質等の試験剤がこの相互作用をブロックする能力を測定することができる。

40

【0282】

本発明の抗原結合タンパク質は、ネガティブコントロールに対して、このようなアッセイにおけるIL-17分泌を20%以上阻害することができる。より典型的には、抗原結合タンパク質は、対照に対してIL-17分泌を50%、75%、85%、又は90%以上阻害することができる。抗原結合断片は、幾つかの実施形態では、前記アッセイにおい

50

て50 µg/mL以下のIC₅₀を示し得る。他の実施形態では、IC₅₀は、20 µg/mL、10 µg/mL又は5 µg/mL以下であり得る。

【0283】

したがって、別の態様では、本発明は、患者においてT_H17細胞数を減少させるのに十分な量の中の本発明の抗原結合タンパク質を患者に投与することを含んでなる、自己免疫疾患又は炎症性障害を治療する方法を提供する。

【0284】

別の態様では、本発明は、IL-7受容体の媒介するSTAT-5リン酸化を減少させるのに十分な量の抗原結合タンパク質を被験体に投与することを含んでなる、ヒト被験体における自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

10

【0285】

別の態様では、本発明は、患者に本発明の抗原結合タンパク質を投与することを含んでなる、患者の多発性硬化症を治療する方法であって、前記患者が再発寛解型多発性硬化症に罹患している方法を提供する。

【0286】

別の態様では、本発明は、T_H1細胞に対するT_H17細胞の比率を低下させるのに有効な量の本発明の抗原結合タンパク質を被験体に投与することを含んでなる、ヒト被験体における自己免疫疾患又は炎症性疾患を治療する方法を提供する。

【0287】

別の態様では、本発明は、(Foxp3+)T_{reg}細胞に対するT_H細胞の比率を低下させるのに有効な量の本発明の抗原結合タンパク質を被験体に投与することを含んでなる、ヒト被験体における自己免疫疾患又は炎症性疾患を治療する方法を提供する。

20

【0288】

診断的使用方法

本明細書に記載する抗原結合タンパク質を使用して、診断目的のためにインビトロ又はインビボにおける生体サンプル中のCD127を検出することができる。例えば、抗CD127抗原結合タンパク質を使用して、培養細胞、組織又は血清中のCD127を検出することができる。前記組織は、ヒト又は動物の身体から最初に除去されてもよい(例えば生検)。ELISA、ウェスタンブロット、免疫組織化学又は免疫沈降を含む従来のイムノアッセイを使用することができる。

30

【0289】

抗原結合タンパク質は、1以上の抗原結合タンパク質、検出可能な標識、及びキットの使用説明書を含む診断キットを提供することができる。便宜上、前記キットは、使用説明書と共に所定の量の試薬を含んでよい。

【0290】

遺伝子治療

本明細書に記載する抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を、それを必要としている被験体に投与してもよい。また、核酸分子は、適切なスカフォールド又はドメインにおけるCDR、可変ドメイン又は完全長抗体を発現することができる。核酸分子は、ヒト又は動物の細胞中で発現させるためのベクターに含まれてもよい。上記の通り薬学上許容される賦形剤及び/又は1以上の治療活性剤を投与するために核酸分子又はベクターを製剤化してもよい。

40

【実施例】

【0291】

1.0 1A11のヒト化

1.1 1A11 ハイブリドーマ可変領域のクローニング

1A11ハイブリドーマの細胞ペレットから全RNAを調製し、RT-PCRを実施して、可変領域のcDNAを作製した。各ハイブリドーマの重鎖及び軽鎖の増幅された可変領域をpCR2.1クローニングベクターにクローニングした。各ハイブリドーマの重鎖及び軽鎖の可変領域の配列を得た。配列分析により、ペプチド配列は以下の通り予測され

50

た（相補性決定領域を強調する）：

A) 1A11 VH

EVQLQQSGPELLKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWWVKQSHGKNLEWIGLI
NPYNGVTSYNQKFKGKATLTVAKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARGDGN
YWYFDWWGAGTTVTVSS

B) 1A11 VL

EIVLTQSPAITAASLGQKVTITCSASSSVTYMHWYQQKSGTSPKPWIYEISKL
ASGVPVRFSGSGSGTSYSLTSSMEAEDAIIYYCQEWNPYPTFGGGTKLEIK

10

重鎖及び軽鎖の変領域をそれぞれヒト I g G 1 F c 及びカッパ定常領域に融合させることにより、組み換えキメラ型の抗体を作製した。

【0292】

1.2 1A11 重鎖ヒト化ストラテジ

ヒトV遺伝子生殖細胞系データベースのBLAST分析に従って、ヒト化に好ましいアクセプターフレームワークとして、マウス1A11可変重鎖配列と64%の同一性(CDRを含む)を有するヒト生殖細胞系IGHV1_2を選択した。生殖細胞系のV領域を、配列相同性に基いて好適なFR4、この場合、JH6ミニ遺伝子(Kabat Vol. II)とインシリコで組合せた。WGQGモチーフに先行するJH6ミニ遺伝子残基の最初の6つの残基は、ドナー抗体由来のCDRに置換されるCDR3領域内に含まれる。配列比較及び抗体機能に影響を及ぼす可能性に基づいて、8つのヒト化重鎖変異体を作製した。コンストラクトH0は、上で選択されたヒトアクセプターフレームワークに(Kabatの定義を使用する)1A11由来のマウスCDRをグラフトしたストレートグラフトであった。コンストラクトH1~H3は、H0に基づき；各々に、各コンストラクトで異なる1つの更なるフレームワーク突然変異(それぞれ、位置71、66及び69)が組み込まれている。H4~H7には、上記の復帰突然変異のうちの2、3、4又は5つが組み込まれている。

20

30

【0293】

1.3 1A11 フレームワークIGHV1-2の重鎖ヒト化の原理

	1	11	21	CDR1	39	48	
VH1A11	EVQLQQSGPE	LLKPGASMKI	SCKASGYSFT	GYTM..	NWVK	QSHGKNLEWI	
IGVH1-2	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYM..	HWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H0	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H1	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H2	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H3	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H4	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	10
1A11H5	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H6	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
1A11H7	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	NWVR	QAPGQGLEWM	
	49		CDR2	66	76	83	92
VH1A11	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	KATLTVAKSS	STAYMELLSL	TSEDSAVYYC		
IGVH1-2	GWINPN..SG	GTNYAQKFKG	RVTMTRDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H0	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	RVTMTRDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		20
1A11H1	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	RVTMTVDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H2	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	<u>K</u> VTMTRDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H3	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	RVTLTRDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H4	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	<u>K</u> VMTVDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H5	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	<u>K</u> VTLVDTSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H6	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	<u>K</u> VTLVDKSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
1A11H7	GLINPY..NG	VTSYNQKFKG	<u>K</u> VTLTVAKSI	STAYMELSRL	RSDDTAVYYC		
							30
	93	CDR3	104				
VH1A11	ARGDGNV...	...	WYFDWVG	AGTTVTVSS			
JH6	--		WG	QGTTVTVSS			
1A11H0	ARGDGNV...	...	WYFDWVG	QGTTVTVSS			

1.4 1A11 軽鎖ヒト化ストラテジ

ヒトV遺伝子生殖細胞系データベースのBLAST分析に従って、ヒト化に好ましいアクセプターフレームワークとして、マウス1A11可変軽鎖配列と53%の同一性(CDRを含む)を有するヒト生殖細胞系IGHV3_11を選択した。生殖細胞系のV領域を、配列相同性に基いて好適なFR4、この場合、J領域カップ4ミニ遺伝子(Kabat Vol. II)とインシリコで組合せた。JK-4ミニ遺伝子残基の最初の3つの残基は、ドナー抗体由来のCDRに置換されるCDR3領域内に含まれる。配列比較及び抗体機能に影響を及ぼす可能性に基づいて、10個のヒト化軽鎖変異体を作製した。コンストラクトL0は、上で選択されたヒトアクセプターフレームワークに(Kabatの定義を使用)1A11由来のマウスCDRをグラフトしたストレートグラフトであった。コンストラクトL1、L2、L4は、L0に基づき、各々に、各コンストラクトで異なる1つの更なるフレームワーク突然変異(それぞれ、位置47、71及び46)が組み込まれている。コンストラクトL3には、上記の復帰突然変異47及び71が両方とも組み込まれている。コンストラクトL5には、上記の復帰突然変異47及び71及び46のうちの3

つが組込まれている。コンストラクト L 6 ~ L 9 は、L 5 に基づき、各々に、各コンストラクトで異なる 1、2、3、及び 4 つの異なるフレームワーク突然変異（それぞれ、位置 58、45、70 及び 60）が組み込まれている；。

【 0 2 9 4 】

1 . 5 1 A 1 1 フレームワーク I G K V 3 - 1 1 の軽鎖ヒト化の原理

1	CDR1	44	
Vk1A11	EIVLTQSPAI TAASLGQKVT ITC SASS SVTYMH WYQQKSGTSP		
Vk3-11	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC RASQ SVSSYLA WYQQKPGQAP		
1A11L0	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC SASS SVTYMH WYQQKPGQAP		10
1A11L1-L9	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC SASS SVTYMH WYQQKPGQAP		

45	CDR2	<u>CDR3</u> 94	
Vk1A11	KPW ^W Y EISKL ASGVPVRFSG SGS ^G TSYSLT ISSMEAE ^D AA IY Y C QEWNY		
Vk3-11	RLLIY DASNR ATGIPARFSG SGS ^G TDFTLT ISSLEPEDFA VY Y C		
1A11L0	RLLIY EISKL ASGIPARFSG SGS ^G TDFTLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L1	RLW ^W Y EISKL ASGIPARFSG SGS ^G TDFTLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L2	RLLIY EISKL ASGIPARFSG SGS ^G TDY ^T TLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		20
1A11L3	RLW ^W Y EISKL ASGIPARFSG SGS ^G TDY ^T TLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L4	RPLIY EISKL ASGIPARFSG SGS ^G TDFTLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L5	RPW ^W Y EISKL ASGIPARFSG SGS ^G TDY ^T TLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L6	RPW ^W Y EISKL ASG ^V PARFSG SGS ^G TDY ^T TLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L7	KPW ^W Y EISKL ASG ^V PARFSG SGS ^G TDY ^T TLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L8	KPW ^W Y EISKL ASG ^V PARFSG SGS ^G TSYTLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		
1A11L9	KPW ^W Y EISKL ASG ^V VPVRFSG SGS ^G TSYTLT ISSLEPEDFA VY Y C QEWNY		

95			30
Vk Vk1A11	.PYTFGGGT KLEIK		
1A11L0	.PYTFGGGT KVEIK		
hJk1	---Q-- -V---		
hJk2	Y---Q-- ----		
hJk3	F---P-- -VD--		
hJk4	L---G-- -V---		
hJk5	I---Q-- R----		

2 . 0 6 A 3 のヒト化

2 . 1 6 A 3 重鎖ヒト化ストラテジ

ヒト V 遺伝子生殖細胞系データベースの B L A S T 分析に従って、ヒト化に好ましいアクセプターフレームワークとして、マウス 6 A 3 可変重鎖配列と 7 1 % の同一性（ C D R を含む）を有するヒト生殖細胞系 I G H V 4 _ 6 1、及び 5 1 % の同一性を有するヒト生殖細胞系 I G H V 3 _ 3 3（これは I G K V 1 _ 3 9 と共によく発現することが既に知られている）を選択した。生殖細胞系の V 領域を、配列相同性に基いて好適な F R 4、この場合、J H 6 ミニ遺伝子（ K a b a t V o l . I I ）とインシリコで組合せた。W G Q G モチーフに先行する J H 6 ミニ遺伝子残基の最初の 2 つの残基は、ドナー抗体由来の C D R に置換される C D R 3 領域内に含まれる。配列比較及び抗体機能に影響を与える可能

性に基づいて、フレームワークIGHV4_61を含む10個のヒト化重鎖変異体及びフレームワークIGHV3_33を含む12個のヒト化重鎖変異体を作製した。コンストラクトH0は、上で選択されたヒトアクセプターフレームワークに(Kabatの定義を使用する)6A3由来のマウスCDRをグラフトしたストレートグラフトであった。フレームワークIGHV4_61を有するH1~H5コンストラクトは、H0に基づき、各々に、各コンストラクトで異なる1つの異なるフレームワーク突然変異(それぞれ、位置71、27、30、67、及び48)が組み込まれている。H6~H9コンストラクトには、上記の復帰突然変異のうち2、3、4又は5つが組み込まれている。フレームワークIGHV3-33を有するH1~H11コンストラクトは、H0に基づき、各々に、各コンストラクトで異なる1つの異なるフレームワーク突然変異が組み込まれている(それぞれ、位置27、30、28、29、67、73、78、49、68、24及び48)。

10

【0295】

2.2 6A3 フレームワークIGHV4_61についての重鎖ヒト化の原理

1 11 21 **CDR1** 39 48

VH6A3 DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT **TDYAW.NWIR** QFPGNKLEWM
 IGHV4_61 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **SGGYW**SWIR QPPGKGLEWI
 6A3-H0 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H2 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVS **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H3 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVI **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H4 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H5 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWM
 6A3-H6 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVS **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H7 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVI **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H8 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVI **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWI
 6A3-H9 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVI **TDYAW.NWIR** QPPGKGLEWM

10

49 **CDR2** 66 76 83 92

VH6A3 GYIFY...SG STTYTPSLKS RISITRDISK NQFFLQLNSV TTEDTATYYC
 IGHV4_61 GYIYY...SG STNYNPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H0 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H1 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H2 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H3 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H4 GYIFY...SG STTYTPSLKS RITISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H5 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H6 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H7 GYIFY...SG STTYTPSLKS RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H8 GYIFY...SG STTYTPSLKS RITISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
 6A3-H9 GYIFY...SG STTYTPSLKS RITISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC

20

30

93 **CDR3** 104

VH6A3 ARGGYDVNYF.... DYW GQGTTTLTVSS
 IGHV4_61 AR
 6A3 H0-H9 ARGGYDVNYF.... DYW GQGTTTVTVSS

40

フレームワーク 4

93 **CDR3** 104

VH6A3 AGGLAGTL..... DYW GQGTTTLTVSS
 IGHV4_61 AR

hJH1 FQH- ----LV----
hJH2 FDL- -R--LV----
hJH3 FDV- ----MV----
hJH4 ---- ----LV----
hJH5 FDS- ----LV----
hJH6 MDV- -----V----
6A3H0-9 AGGLAGTL.....DYW GQGTTVTVSS

2 . 3 6 A 3 フレームワーク I G H V 3 _ 3 3 についての重鎖ヒト化の原理

1 11 21 **CDR1** 39 48

VH6A3 DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT **TDYAW.NWIR** QFPGNKLEWM
 IGHV3_33 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **SYGMH**.WVR QAPGKGLEWV
 6A3-H0 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGYTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H2 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFI **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H3 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSFFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H4 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTIS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV 10
 6A3-H5 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H6 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H7 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H8 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H9 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H10 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAVSGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWV
 6A3-H11 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.NWVR** QAPGKGLEWM

49 **CDR2** 66 76 83 92

VH6A3 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RSITRDISK NQEFLQLNSV TTEDTATYYC
 IGHV3_33 **AVI**WY...**DGSNKYYADSVKG** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H0 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H1 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H2 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H3 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H4 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H5 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RIISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC 30
 6A3-H6 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDISK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H7 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTEYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H8 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H9 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H10 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
 6A3-H11 **AYIFY...SG STTYTPSLKS** RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC

93 **CDR3** 104

VH6A3 ARGGYDVNYF... ..**DYW** GQGTTLTVSS
 IGHV3_33 AR
 6A3 H0-H9 **ARGGYDVNYF... ..DYW** GQGTTVTVSS

10

20

30

40

フレームワーク 4

93 **CDR3** 104VH6A3 **AGGLAGTL.....DYW** GQGTTTLTVSSIGHV3_33 AR

hJH1 FQH- ----LV----

hJH2 FDL- -R--LV----

hJH3 FDV- ----MV----

hJH4 ---- ----LV----

hJH5 FDS- ----LV----

hJH6 MDV- ----V----

6A3H0-11 **AGGLAGTL.....DYW** GQGTTVTVSS

10

2 . 4 6 A 3 軽鎖ヒト化ストラテジ

ヒトV遺伝子生殖細胞系データベースのBLAST分析に従って、ヒト化に好ましいアクセプターフレームワークとして、マウス6A3可変軽鎖配列と72%の同一性(CDRを含む)を有するヒト生殖細胞系IGKV1__39を選択した。生殖細胞系のV領域を、配列相同性に基いて好適なFR4、この場合、J領域カッパ2ミニ遺伝子(Kabat Vol. I I)とインシリコで組合せた。JK-2ミニ遺伝子残基の最初の2つの残基は、CDR3領域内に含まれ、マウス6A3軽鎖CDR3の最後の2つの残基と同一である。配列比較及び抗体機能に影響を与える可能性に基づいて、5個のヒト化軽鎖変異体を作製した。コンストラクトL0は、上で選択されたヒトアクセプターフレームワークに(Kabatの定義を使用する)6A3由来のマウスCDRをグラフトしたストレートグラフトであった。コンストラクトL1、L2は、L0に基づき、各々に、各コンストラクトで異なる1つの更なるフレームワーク突然変異が組み込まれている(それぞれ、位置45、70)。コンストラクトL3には、上記の復帰突然変異が両方とも組み込まれている。

20

【0296】

6 A 3 フレームワークIGKV1__39の軽鎖ヒト化の原理

30

1 **CDR1** 44

Vk 6A3 DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKSP
 IGKV1_39 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP
 6A3 L0 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP
 6A3 L1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP
 6A3 L2 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP
 6A3 L3 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP

10

45 CDR2 CDR3 94

Vk 6A3 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTKFSFK ISSLQAEDFV SYYCQQFFST
 IGKV1_39 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYYCQQFFST
 6A3 L0 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST
 6A3 L1 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST
 6A3 L2 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTKFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST
 6A3 L3 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTKFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST

20

95

Vk 6A3 P..WTEGGGT KLEIKR
 6A3 L0-L3 P..WTEGQGT KLEIKR

フレームワーク 4

hJk2 FGQGT KLEIKR

30

配列比較及び抗体機能に影響を与える可能性に基づいて、5個のヒト化軽鎖変異体を作製した。コンストラクトL0は、上で選択されたヒトアクセプターフレームワークに(Kabatの定義を使用する)6A3由来のマウスCDRをグラフトしたストレートグラフトであった。コンストラクトL1、L2は、L0に基づき、各々に、各コンストラクトで異なる1つの更なるフレームワーク突然変異が組み込まれている(それぞれ、位置45、70)。コンストラクトL3には、上記復帰突然変異が両方とも組み込まれている。コンストラクトL27には、T4L、A31Y、D70M、V85T、T94Y、Q100G、L104V(配列番号138)を含むより多くの突然変異が組み込まれている。

【表 3】

表 3 : 6 A 3 可変軽鎖ヒト化変異体

ヒト化 VL	テンプレート	復帰突然変異 (Kabat#)
L0	IGKV1-39 + JK-2 ミニ遺伝子に対する 6A3VLCDR のストレートグラフト	無し
L1	L0	K45Q
L2	L0	D70K
L3	L1	K45Q, D70K
L27	L0	T4L, A31Y, D70M, V85T, T94Y, Q100G, L104V

10

20

【 0 2 9 7 】

2.5 Fc 不能可変重鎖の構築

1 A 1 1 H 3 コンストラクトに対して2つのアミノ酸置換 L 2 3 7 A 及び G 2 3 9 A を行った。これら修飾により、分子は免疫エフェクター細胞又は補体をそれほど動員できなくなる。得られた V H コンストラクトは、1 A 1 1 H 3 - F c であると同定され、(配列番号 1 1 9 の配列を有するポリヌクレオチドによりコードされる)配列番号 1 1 8 に示す配列を有する。以下の実施例 4 に記載する通り、1 A 1 1 H 3 - F c 及び 1 A 1 1 . L 4 軽鎖 (1 A 1 1 H 3 L 4 F c) を含む抗体を更に分析した。

【 0 2 9 8 】

2.6 1 A 1 1 H 3 L 4 の親和性成熟

2.6.1 組換え型抗 I L 7 R 1 A 1 1 H 3 L 4 C D R H 3 変異体の構築

ヒト化抗 I L 7 R モノクローナル抗体 1 A 1 1 H 3 L 4 の多数の変異体を作製した。これらは全て、配列番号 1 1 4 に記載の重鎖アミノ酸配列 (H 3) 及び配列番号 1 1 5 に記載の軽鎖アミノ酸配列 (L 4) を有する抗体の重鎖の C D R H 3 領域においてアミノ酸置換 1 つしか異なっていなかった。

【 0 2 9 9 】

部位特異的変異誘発を使用して、p L E F D 哺乳類発現ベクター内の 1 A 1 1 H 3 L 4 のヒト化 C D R H 3 変異体を作製した。

【 0 3 0 0 】

2.6.2 H E K 2 9 3 6 E 細胞の小規模抗体発現

1 A 1 1 H 3 L 4 及び C D R H 3 変異体の軽鎖及び重鎖をそれぞれコードする p L E F N 及び p L E F D プラスミドを、2 9 3 f e c t i n (I n v i t r o g e n 、 1 2 3 4 7 0 1 9) を使用して 9 6 ウェルスケール (発現体積 5 0 0 μ L) で H E K 2 9 3 6 E の細胞へ一過的にコトランスフェクトした。1 5 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離することにより上清を収集した。次いで、0 . 4 5 μ m 濾過プレートを使用して、抗体を含有する上清を濾過した。組織培養上清から直接抗体を評価した。

【 0 3 0 1 】

2.6.3 抗 I L 7 R 1 A 1 1 H 3 L 4 C D R H 3 変異体の P r o t e o n 分析

C D R H 3 抗体変異体 (これらは H E K 2 9 3 6 E 細胞における小規模抗体発現に

30

40

50

由来し、実施例 2.6.2 に記載の通り組織培養上清から直接評価された) の結合親和性を決定するための初期スクリーニングを ProteOn XPR36 (Biorad) において実行した。方法は以下の通りであった; 一級アミンカップリングにより GLC チップ上にプロテイン A を固定化し、次いで、CDRH3 突然変異体抗体をこの表面に捕捉し、結合曲線のダブルレファレンスのために用いられる 0 nM 注入 (すなわち、バッファのみ) と共に 256、64、16、4、1 nM の IL7R を通した。50 mM の NaOH を使用して捕捉表面を再生し、結合している CDRH3 突然変異体抗体を除去して、捕捉及びアナライト注入の別のサイクルの準備を整えた。機械に固有の解析ソフトウェアを使用して、1:1 モデルにデータを適合させた。組織培養上清から直接突然変異体抗体の結合解析を行った。

10

【0302】

スクリーニングにより、親分子 (1A11 H3L4) よりも優れた動態プロファイルを有すると考えられる幾つかの抗体を同定した。この分析から得られたデータを 4.2.3 に示す。このデータは、N98 及び F100b の残基における幾つかの CDRH3 突然変異が IL7R に対する結合親和性を改善すると考えられることを示す。このデータセットから、更なる分析 (実施例 2.6.4) のために 6 つの分子を選択した。

【0303】

2.6.4 HEK 293 6E 細胞の大規模抗体発現

上記データは、N98 及び F100b 残基における幾つかの CDRH3 突然変異が IL7R に対する結合親和性を改善すると考えられることを強調した (4.2.3 にデータを示す)。したがって、これら 6 つの CDRH3 変異体について精製抗体を作製した。1A11 H3L4 CDRH3 変異体の重鎖及び軽鎖をコードするコンストラクトを、pLEFD 及び pLEFN のプラスミドから大規模 HEK 293 6E 発現に最適な pTTベクターにサブクローニングした。293fectin (Invitrogen、12347019) を使用して、50 ~ 100 mL の HEK 293 6E (プラスミドの詳細は表 7 に要約する) にプラスミドを一過的にコトランスフェクトした。24 時間後トリプトンフィードを細胞培養物に添加し、更に 72 時間後細胞を収集した。次いで、固定化されたプロテイン A カラムを用いて抗体を親和性精製し、280 nm における吸光度を読み取ることにより定量した。

20

【0304】

3.0 ヒト化ベクターの構築

ヒト化可変領域の DNA 配列は、LETO 1.0 ソフトウェア (Entelechon GmbH) を用いて最適化された配列であり、重複するオリゴヌクレオチドの構築及び PCR 増幅によりデノボ合成された。プライマーは、哺乳類発現ベクターにクローニングするための制限酵素部位及び分泌のためのヒト免疫グロブリンシグナル配列を含んでいた。Age1/Kas1 を使用して、ヒトガンマ 1 定常領域を含有する哺乳類発現ベクターにヒト化可変重鎖領域をクローニングした。並行して、HindIII 及び BsiWI を使用して、ヒトカッパ定常領域を含有する哺乳類発現ベクターにヒト化可変軽鎖領域をクローニングした。

30

【0305】

4.0 ヒト化抗体の特性評価

4.1 1A11 及び 6A3 コンストラクトの結合動態の測定: BIAcore (商標) 3000

BIAcore 3000 装置 (GE Healthcare) を使用して、ヒト CD127 ECD についての抗 CD127 抗体の結合動態を評価した。供給されたカップリングバッファを使用して、BIAcore (GE Healthcare カタログ番号 BR-1008-39) 抗ヒト IgG (Fc 特異的) モノクローナル抗体が既に固定化されている CM5 バイオセンサーチップにヒト化 6A3 又は 1A11 コンストラクトを捕捉した。様々な濃度 (512、256、128、64、32、16 nM) のヒト CD127 ECD を 30 µL / 分間の流速で 240 秒間注入した。

40

50

【0306】

- 1) 対象となるMAbを捕捉する
- 2) 捕捉されたMAbに対してアナライトを会合させる
- 3) アナライトを解離させる(バッファ)
- 4) BIAcoreに最適化されたバッファにより再生する。共有結合している抗H A bを除いて全て除去する。BIAcore動態ランサイクル: バッファ、512、256、128、64、32、16nMのIL7R ECD; ダブルレファレンスのためにバッファサイクルを用いた。

【0307】

3MのMgCl₂で抗体表面を再生した。BIAevaluationソフトウェアを使用して、1:1ラングミュアモデルにデータを全体的に適合させることにより動態を測定した。実施例4.2.1(1A11)及び4.2.2(6A3)に結果を示す。

10

【0308】

4.1.1 選択された1A11 H3L4 CDRH3変異体の結合動態の測定

BIAcore分析を用いて、精製CDRH3突然変異体抗体(実施例2.6.4に記載した通り、HEK 293 6E細胞における大規模抗体発現から得られた)の結合親和性を測定した。

【0309】

4.1.1.1 方法1: BIAcore(商標)T100

一級アミンカップリングにより、約1300共鳴単位(RU)のレベルまでCM3チップに抗ヒトIgG(GE Healthcare/BIAcore(商標)BR-1008-39)を固定化し、次いで、CDRH3突然変異体抗体をこれに捕捉し、全ての抗体を同レベル(44~56RU)で捕捉し、結合曲線のダブルレファレンスのために用いられる0nM注入(すなわち、バッファのみ)と共に256、64、16、4、1nMのIL-7Rを通し、3MのMgCl₂を使用してこの表面を再生した。BIAcore(商標)T100解析ソフトウェアに固有の1:1モデルに結合データを適合させた。ランニングバッファとしてHBS-EPを使用してランを実行し、BIAcore(商標)T100上にて25で実行した。結果を4.2.4に示す。

20

【0310】

4.1.1.2: 方法2: BIAcore(商標)3000

一級アミンカップリングにより、約5400共鳴単位(RU)のレベルまでCM5チップに抗ヒトIgG(GE Healthcare/BIAcore(商標)BR-1008-39)を固定化し、次いで、CDRH3突然変異体抗体をこの表面に捕捉し、全ての抗体を同レベル(175~205RU)で捕捉し、結合曲線のダブルレファレンスのために用いられる0nM注入(すなわち、バッファのみ)と共に、256、64、16、4、1nMのIL7Rを通し、3MのMgCl₂を使用してこの表面を再生した。BIAcore(商標)3000解析ソフトウェアに固有の1:1モデルに結合データを適合させた。ランニングバッファとしてHBS-EPを使用してランを実行し、BIAcore(商標)3000上にて25で実行した。結果を4.2.5に示す。

30

【0311】

4.1.2 カニクイザル及びマーモセットにおける1A11 H3L4の種交差反応性の決定

Biacore 3000を使用して、カニクイザル及びマーモセットのCD127 ECDについて1A11H3L4の結合動態を評価した。BIAcore(GE Healthcareカタログ番号BR-1008-39)抗ヒトIgG(Fc特異的)モノクローナル抗体が既に固定化されているCM5バイオセンサーチップに1A11 H3L4を捕捉した。3MのMgCl₂で抗体表面を再生した。BIAevaluationソフトウェアを使用して、1:1ラングミュアモデルにデータを全体的に適合させることにより動態を測定した。結果を4.3に示す。

40

【0312】

50

4.1.3 IL7受容体阻害アッセイ

BIAcore (商標) 分析を用いて、精製CDRH3突然変異体抗体(実施例2.6.4に記載した通り、HEK 293 6E細胞における大規模抗体発現から得られた)がIL7とIL7Rとの間の相互作用を阻害できることを実証した。

【0313】

一級アミンカップリングによりCM5チップ上にIL7(R&D Systems)を固定化した; 10mMのグリシン(pH3.0)で表面をコンディショニングして、中和アッセイのための安定な表面を得た。ラン1では256nM、128nM、64nM、16nM、8nM、4nM、2nM及び1nM、及びラン2では256nM、128nM、64nM、16nM、8nM、4nM、2nM、1nM、0.5nM及び0.25nMの濃度の試験抗体と共に64nMのIL7Rをインキュベートした。次いで、IL7/CM5チップに対するランの前に3時間室温でサンプルをインキュベートし、10mMのグリシン(pH3.0)を使用して、次の相互作用のための表面を再生した。Robosageを使用してIC₅₀値を計算した。それによって、0nM抗体と共に64nMのIL7Rを使用して得られた最大シグナルに基づいて結合シグナルを百分率値に変換した。結果を4.7に示す。

【0314】

4.2 結合動態結果

4.2.1 1A11

【表4】

表4：1A11コンストラクトの結合動態

サンプル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1A11 キメラ	9.26e4	2.98e-4	3.22e-9
1A11 H0L0	結合は見られなかった	-	-
1A11 H1L1	結合は見られなかった	-	-
1A11 H6L6	結合は見られなかった	-	-
1A11 H7L5	発現は見られなかった	-	-
1A11 H3L4	1.77e5	4.64e-4	2.62e-9
1A11 H3L5	2.94e4	6.07e-3	2.07e-7
1A11 H3L9	4.32e4	1.84e-3	4.25e-8
1A11 H3L6	1.82e4	2.82e-3	1.55e-7
1A11 H4L4	結合は見られなかった	-	-
1A11 H6L4	結合は見られなかった	-	-
1A11 H7L4	発現は見られなかった	-	-
ビオチン標識 1A11 H3L4	1.69e5	4.52e-4	2.67e-9
1A11 H3L4Fc	1.8e5	6.62e-4	3.68e-9

10

20

30

【0315】

40

4.2.2 6A3

【表 5】

表 5 : 6 A 3 コンストラクトの結合動態

サンプル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H4-61_6L27	1.6e4	2.99e-4	19
H4-61_7L27	3.77e4	1.04e-3	28
H4-61_8L27	2.43e4	3.7e-4	15
H4-61_9L27	6.99e4	1.22e-3	18

10

【 0 3 1 6 】

4 . 2 . 3 B I A c o r e (商 標) 分 析 に よ る 1 A 1 1 H 3 L 4 の 様 々 な 抗 I L 7 R
1 A 1 1 H 3 L 4 C D R H 3 変 異 体 の 選 択

【表 6】

表6:抗-IL-7R 1A11 H3L4 CDRH3変異体のProton分析(KD、nM)

1A11 H3L4 CDRH3内のアミノ酸の位置	CDRH3									
	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
Ala	0.30	14.60	0.18	0.23	0.21	5.75	0.20	0.17	0.76	0.13
Cys	1.16	1.97	1.34	0.24	2.74	40.90	0.32	0.06	0.94	0.15
Asp	2.48	親	0.35	0.05	0.39	僅かしか結合しない	0.26	0.08	親	0.10
Glu	2.06	0.16	2.28	0.05	0.39	僅かしか結合しない	0.88	0.04	0.44	0.10
Phe	2.18	19.20	1.51	0.48	0.15	9.61	0.48	親	1.25	0.10
Gly	親	30.40	親	0.18	0.52	11.50	0.89	0.24	1.00	0.10
His	0.63	3.05	1.66	0.24	0.41	12.20	0.23	0.06	0.85	0.18
Iso		4.73	0.21	0.37	0.93	僅かしか結合しない	0.20	0.06	0.71	0.09
Lys		25.70	2.27		4.64	7.97	2.34	0.07	1.24	0.25
Leu	2.14	2.67	1.08		2.42	3.38	0.44	0.15	0.92	0.33
Met	0.82	7.81	2.26	0.27	1.70	10.60	0.17	0.06	0.89	0.08
Asn	2.44	0.46	0.43	親	1.50	10.90	0.09	0.14	0.41	0.14
Pro	6.92	6.84	0.19	5.38	6.90	僅かしか結合しない	1.24	0.90	0.26	0.71
Gln	3.02	1.21	2.07	0.30	1.31	12.80	0.68	0.07	0.74	0.25
Arg	29.50	15.70	2.06	結合せず	3.26	僅かしか結合しない	2.55	3.49	0.95	0.31
Ser	0.79	3.76	0.53	0.10	0.25	10.40	0.46	0.10	0.60	0.08
Thr	3.29	2.32	0.28	0.10	1.11	僅かしか結合しない	0.31	0.14	0.49	0.10
Val	2.36	3.72	0.08		1.65	僅かしか結合しない	0.17	0.05	0.59	親
Trp		15.80	4.96	0.52	0.31	親	1.73	0.44	1.50	0.07
Tyr		21.90	1.31	0.71	親	8.67	親	0.26	1.18	結合せず

 IL7R1についての結合親和性が改善したCDRH3変異体
 存在せず

1A11 H3L4についての例示的なKD値=0.116nM

10
20
30
40

【表 7】

表 7：構築及び発現させた、選択された CDRH3 変異体 mAb

抗体 ID	別名	バッチ No.	分子の説明	DNA 配列 ID No.	タンパク質配列 ID No.
BPC4398	1A11 H3L4 N98D (CDRH3 変異体)	HEK1 023	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3 N98D	120	121
			L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22
BPC4399	1A11 H3L4 N98E (CDRH3 変異体)	HEK1 024	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3 N98E	122	123
			L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22
BPC4400	1A11 H3L4 F100bE (CDRH3 変異体)	HEK1 025	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3 F100bE	124	125
			L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22
BPC4401	1A11 H3L4 F100bH (CDRH3 変異体)	HEK1 026	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3 F100bH	126	127
			L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22
BPC4402	1A11 H3L4 F100bI (CDRH3 変異体)	HEK1 027	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3 F100bI	128	129
			L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22
BPC4403	1A11 H3L4 F100bV (CDRH3 変異体)	HEK1 028	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3 F100bV	130	131
			L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22
BPC1142	1A11 H3L4	HEK1 029	H鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VH3	13	32
		GRIT S379 88	L鎖：抗ヒト IL7R 1A11 VL4	108	22

【0317】

4.2.4 選択された 1A11 H3L4 CDRH3 変異体の B I A c o r e (商標) T 1 0 0 分析

表 8 は、4.1.1.1 試験から得られたデータを示す。これは、CDRH3 突然変異が全て、親分子よりも優れた親和性を有すると考えられ、最良のコンストラクトは B P C 4 3 9 8 (抗 I L 7 R 1 A 1 1 H 3 L 4 N 9 8 D) であると思われることを示す。

10

20

30

40

【表 8】

表 8 :

分子の識別子/番号	分子の説明	ka (M/s)	Kd (1/s)	KD (nM)	
BPC1142(GRITS 37988) 複製 1	抗 -IL7R 1A11 H3L4	1.08E+06	7.06E-05	0.065	
BPC1142(GRITS 37988) 複製 2	抗 -IL7R 1A11 H3L4	1.12E+06	5.86E-05	0.052	10
BPC4398	抗 -IL7R 1A11 H3L4 N98D (CDRH3 変異体)	1.71E+06	3.70E-05	0.022	
BPC4399	抗 -IL7R 1A11 H3L4 N98E (CDRH3 変異体)	1.45E+06	4.08E-05	0.028	20
BPC4400	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bE (CDRH3 変異体)	9.24E+05	2.68E-05	0.029	
BPC4401	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bH (CDRH3 変異体)	9.10E+05	3.06E-05	0.034	30
BPC4402	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bI (CDRH3 変異体)	8.26E+05	3.32E-05	0.040	
BPC4403	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bV (CDRH3 変異体)	8.47E+05	3.30E-05	0.039	
BPC1142 (HEK1029)	抗 -IL7R 1A11 H3L4	1.16E+06	6.48E-05	0.056	40
CHO で発現させた物質 (GRITS37988) 及び HEK で発現させた物質 (HEK1029) を用いた実験において親分子 (BPC1142-抗-IL7R 1A11 H3L4) を複数回試験したところ、親分子について、異なる発現系間で親和性に有意な差はみられなかった。					

【 0 3 1 8 】

4.2.5 選択された 1A11 H3L4 CDRH3 変異体の B I A c o r e (商 標) 3 0 0 0 分 析

表 9 は、4.1.1.2 試験から得られたデータを示す。これは、CDRH3 突然変異が全て、親分子よりも優れた親和性を有すると考えられ、最良のコンストラクトは B P C 4 3 9 8 (1 A 1 1 H 3 L 4 N 9 8 D) 及び B P C 4 3 9 9 (1 A 1 1 H 3 L 4 N 9 8 E) であると思われることを示す。

【表 9】

表 9 :

分子の識別子/番号	分子の説明	ka (M/s)	kd(1/s)	KD (nM)
BPC1142(GRITS37988) 複製 1	抗 -IL7R 1A11 H3L4	3.60E+05	2.70E-04	0.751
BPC1142(GRITS37988) 複製 2	抗 -IL7R 1A11 H3L4	3.62E+05	2.36E-04	0.651
BPC4398	抗 -IL7R 1A11 H3L4 N98D (CDRH3 変異体)	5.44E+05	2.09E-04	0.385
BPC4399	抗 -IL7R 1A11 H3L4 N98E (CDRH3 変異体)	5.97E+05	2.33E-04	0.39
BPC4400	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bE (CDRH3 変異体)	3.51E+05	1.91E-04	0.546
BPC4401	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bH (CDRH3 変異体)	3.37E+05	1.96E-04	0.582
BPC4402	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bI (CDRH3 変異体)	3.00E+05	2.00E-04	0.668
BPC4403	抗 -IL7R 1A11 H3L4 F100bV (CDRH3 変異体)	2.98E+05	1.89E-04	0.636
BPC1142 (HEK1029)	抗 -IL7R 1A11 H3L4	3.49E+05	2.29E-04	0.656
CHO で発現させた物質(GRITS37988)及び HEK で発現させた物質(HEK1029)を用いた実験において親分子(BPC1142-抗-IL7R 1A11 H3L4)を複数回試験したところ、親分子について、異なる発現系間で親和性に有意な差はみられなかった。				

【 0 3 1 9 】

2つの方法間で計算された全体的な親和性において差がみられた。これは、IL7Rがホモダイマーであるという事実に起因する可能性があり、したがって、結合活性及び抗体と抗原との架橋の量は、2つのアッセイで用いられる異なる捕捉表面に固定化されている

10

20

30

40

50

IL7Rの様々な密度に依存して増加又は減少する場合がある。2回のラン間で異なる親和性がみられたにもかかわらず、2つの実験におけるランキングは、BPC4398(1A11 H3L4 N98D)が親分子1A11 H3L4よりも改善された親和性を有することを示す。

【0320】

4.3 種交差反応性

1A11 H3L4(野性型)は、Biacore系によって同等のレベルで試験されたマーモセット及びカニクイザルIL-7Rと交差反応することが観察された(表10)。

【表10】

表10: ヒトIL7R、マウスIL7R、及びカニクイザルIL7Rと1A11 H3L4との比較

サンプル	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1A11 H3L4 とヒト IL7R	1.77e5	4.64e-4	2.62e-9
1A11 H3L4 とカニクイザル IL7R	2.58e4	2.34e-4	9.06e-9
1A11 H3L4 とマーモセット IL7R	4.93e4	2.99e-4	6.05e-9

【0321】

4.4 X線結晶学によるエピトープ結合

観察される機能中和に推定機構を提供するのに役立てたり、抗体成熟についての合理的な選択を行ったりするために、1A11 H3L4 Fabを使用して、インシリコモデリングとX線結晶学とを併用してmAbの結合界面を予測した。

【0322】

1A11H3L4 Fab/ヒトIL7受容体複合体の高解像度(2.08Å)構造を確立した。ヒトIL7受容体細胞外ドメイン及び1A11H3L4をCHO1ec細胞で発現させ、アフィニティークロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。パイン開裂により1A11H3L4のFab断片を作製した。Fab1A11H3L4とIL7受容体ECDとを1:1.2のモル比で混合することにより、Fab1A11H3L4/IL7R ECD複合体を作製した。懸滴蒸気拡散方法を使用して、タンパク質を濃縮し結晶化させた。Argonne National LaboratoryのAdvanced Photon SourceでX線回折データを収集した。回折データにインデックスを付け、HKL2000ソフトウェアを使用して比較した。プログラムX-PLORにおける分子置換により構造を決定した。初期分子置換溶液を、CNX中の分子動力学精製、及びプログラムWinCootによる再構築に複数ラウンド供した。

【0323】

高解像度2.08Å結晶構造に基いて、1A11H3L4がIL-7Rの細胞外のループのうち4つでIL7受容体に結合し、それによって、IL7リガンド結合をブロックすると予測される:

ループ2: 55 Gly 56 Ala 57 Leu 58 Val 59 Glu 60 Val
61 Lys

ループ3: 80 Leu 81 Leu 82 Ile 83 Gly 84 Lys 100 L

y s

ループ4 : 1 3 8 L y s 1 3 9 T y r 1 4 2 V a l

ループ5 : 1 9 2 T y r 1 9 3 P h e。

【0324】

これら所見は、1 A 1 1 と 6 A 3 との間で観察された、h I L 7 について観察された競合と一致している。

【0325】

4.5 エフェクター機能の分析

4.5.1 1 A 1 1 H 3 L 4 は補体媒介性細胞傷害を欠く

合計6つの別々の実験により、1 A 1 1 H 3 L 4 (野性型) が測定可能な補体媒介性細胞傷害を有しないことが示された。標的として用いられる h I L - 7 r B a c M a m が形質導入された H E K 2 9 3 M S R I I 細胞株でこれら実験を実施した。T 1 7 5 培養フラスコにおいて、3 7 、5 % C O ₂ で約21時間これら細胞に形質導入した (m o i 7 5) 。次いで、T r y p L E を使用して、フラスコから付着細胞を除去し、数回洗浄した後、 1×10^5 細胞 / 5 0 μ L / ウェルで96ウェルプレートにプレATINGした。3 7 、5 % C O ₂ で30分間かけて25 μ L の抗体を添加した。このインキュベート後、ウサギ補体20 μ L を添加し、次いで、プレートを2時間インキュベータに戻した。多重チャンネルのピペットを使用して穏やかに混合しながら、各ウェルに100 μ L の C e l l T i t e r - G l o を添加することにより、細胞の生存率の評価を行った。次いで、V i c t o r V プレートリーダーでプレートの蛍光シグナルを読み取った (生細胞はシグナルを増加させる) 。図1にこれら実験のうちの1例を示す。

【0326】

上記実験において使用されるポジティブコントロール抗体 (G r i t s 3 2 0 9 2) は、h I L - 7 R を発現していた標的細胞と同じ細胞において共発現していた H E R 3 についての細胞表面受容体に対して特異的であった。この制御抗体を、1 A 1 1 H 3 L 4 と同濃度で用い (1 0 μ g / m L) 、同じ2つの供給元 (C a l b i o c h e m 及び I n v i t r o g e n) のウサギ補体と組み合わせた。これら結果は、アッセイにおいて使用された標的細胞及び補体の両方が補体依存細胞傷害を誘導できることを示した。

【0327】

4.5.2 1 A 1 1 H 3 L 4 F c は抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) を低下させた。

A D C C アッセイにおけるエフェクター細胞として、7人のヒトドナー由来の精製末梢血単核細胞を解析した。標的細胞として用いられる h I L - 7 r B a c M a m が形質導入された H E K 2 9 3 M S R I I 細胞株でこれら実験を実施した。T 1 7 5 培養フラスコにおいて、3 7 、5 % C O ₂ で約21時間これら細胞を形質導入した (m o i 7 5) 。次いで、T r y p l e を使用してフラスコからこれら付着細胞を除去し、数回洗浄した後、ユーロピウムを「ロード」した。これらロードされた細胞を、3 7 、5 % C O ₂ で30分間、抗 - I L - 7 R 抗体を含有する96ウェルプレート (2×10^4 細胞 / 2 5 μ L / ウェル) に組合せた。インキュベート後、200、100、50及び25 : 1 の比率でエフェクター細胞を添加し (1 0 0 μ L / ウェル) 、3 7 、5 % C O ₂ に2時間戻した。このインキュベート後、25 μ L の上清を除去し、100 μ L / ウェルの D e l f i a 増強溶液を含有する96ウェルプレートに添加した。次いで、室温のプレートシェーカーで5分間プレートをインキュベートし、次いで、V i c t o r V プレートリーダーで読み取った。溶解細胞により周囲の上清に放出された任意のユーロピウム (細胞の細胞傷害) を蛍光単位として測定した。

【0328】

これらアッセイにより、「野生型」1 A 1 1 H 3 L 4 及び F c 不能分子 1 A 1 1 H 3 L 4 F c が F c 受容体を介してヒトエフェクター細胞に結合し、I L - 7 受容体陽性標的細胞を殺傷する能力と比較した。これら実験の結果は、全体的に、F c 不能分子 1 A 1 1 H 3 L 4 F c が、「野生型」1 A 1 1 H 3 L 4 よりも抗体依存性細胞媒介性細胞傷

10

20

30

40

50

害を開始させる能力が少なくとも2倍低いことを示した。また、これら結果は、7人ドナーのうち6人のドナーにおいて、不能抗体がADC C活性をある程度誘導できることを示した(1人のドナーは、野生型及び不能の1A11 H3L4の両方で僅かな活性しか示さなかった)を誘導することができたことを示した。結果を図2に示す。

【0329】

4.5.3 Fc受容体結合

複数のFcエフェクター受容体(FcガンマI、IIa及びIIIa)及び多数の種のFcRnに結合する能力について1A11 H3L4及び1A11 H3L4Fcを評価し、対照の野生型及びFc機能不全抗体と比較した。Protein XPR36表面プラズモン共鳴装置(BioRad)でこの実験を行った。一級アミンカップリングにより、試験される抗体をGLMバイオセンサーチップにカップリングした。ランニングバッファとしてHBS-EP(pH7.4)を使用し、アナライトとして2048nM、512nM、128nM、32nM及び8nMの様々なFc受容体を使用した。FcRn受容体の結合については、アナライトとして2048nM、512nM、128nM、32nM及び8nMのヒト、カニクイザル、マウス及びラットのFcRnを使用し、pH6.0及びpH7.4でランを実行した。0nM注入(すなわちバッファのみ)で全ての結合センサグラムをダブルレファレンスした。Protein解析ソフトウェアに固有の平衡モデルにデータを適合させた。

10

【0330】

表11は、この研究で評価した様々なFc受容体に対する抗体結合について得られた親和性を示し、1A11 H3L4及び1A11 H3L4Fcがこれらの対照抗体相当物と同様に挙動したことを示す。不能Fc抗体(1A11 H3L4Fc)は、Fc受容体に結合しないか又は結合が非常に少なかったため、正確な分析を実施することができなかった。FcRn結合についてのデータは、Fc不能及びFc野性型が、試験した全ての種に対して同様の親和性を有することを示した。表中のデータはpH6.0におけるアッセイのデータであり、pH7.4では予想通り結合しないか又は結合が非常に少なかった。

20

【表11】

表11: Fc受容体に対する1A11 H3L4 (Fc不能及びFc野性型)の結合親和性(nM)

30

コンストラクト	Fcγ2a (Arg)	Fcγ2a (His)	Fcγ3a (Phe)	Fcγ (Val)	Fcγ1	ヒト FcRn	カニクイザル FcRn	マウス FcRn	ラット FcRn
対照 Ab (Fc WT)	1290	1500	1840	442	14.9	95	156	160	112
対照 Ab (Fc 不能)	結合が非常に少ない	結合せず	結合せず	結合せず	結合が非常に少ない	154	195	171	118
1A11 H3L4	1250	1040	990	319	21.4	183	210	192	145
1A11 H3L4Fc	結合が非常に少ない	結合せず	結合せず	結合せず	結合が非常に少ない	158	248	207	163

40

【0331】

4.6 インピトロにおける効力アッセイ

50

4.6.1 IL-7に刺激されるSTAT5リン酸化の1A11及び1A11 H3L4による阻害

IL-7R に対する機能的抗体をスクリーニングするために、IL-7で刺激する前に30分間、ハイブリドーマ培養培地、ポジティブコントロール抗体又は試験する上清サンプルをPBMC細胞と共にインキュベートした。未処理細胞をバックグラウンドシグナルとして分析し、一方、IL-7処理細胞をネガティブコントロールとして設定した。対照又は試験サンプルと共に30分間インキュベートした後、37 °Cにて15分間IL-7で細胞を刺激した。次いで、37 °Cで10分間、1.6%のパラホルムアルデヒド/PBSで細胞を固定し、20~30分間100%メタノールで透過性処理した。次いで、細胞を染色バッファ(PBS中1%のBSA)で2回洗浄し、Alexa-647で標識されている抗pStat5抗体(BD Biosciences Inc #612599)で1時間染色した。BD LSR II FACS機器でサンプルを分析した。

10

【0332】

親1A11モノクローナル抗体は、0.088 µg/mLのIC50でヒトPBMCにおけるIL-7のSTAT5リン酸化誘導をブロックする(データは示さない)。2つのヒトIL-7濃度(0.1 ng/mL及び1 ng/mL)で2人のドナー由来のPBMCを使用して、同アッセイで1A11 H3L4を試験した。1A11 H3L4は、1A11と比較して非常に類似するIC50(平均=0.087 µg/mL)を示し、これは、抗体がIL-7誘導性pSTAT5を阻害する能力にヒト化プロセスが影響を与えないことを示す(図3A及び3B)。

20

【0333】

4.6.2 1A11 H3L4によるIL-7誘導性IL-17産生の阻害

Th17増殖を阻害する能力を決定するために以下のプロトコールに従って1A11 H3L4をアッセイした。マニュアル(#130-091-155、Miltenyi)に従ってCD4+細胞を単離した。100 µL中約 1×10^6 /mLのCD4+細胞を等体積の2x濃度のTh17分化培地(2 µg/mLの抗CD28+10 µg/mLの抗IFN- γ +10 µg/mLの抗IL-4+12.5 ng/mLのIL-1+20 ng/mLのIL-23+50 ng/mLのIL-6)と混合し、37 °C、5%CO₂で5日間培養した。Th17培地中の様々なサイトカイン及び成長因子による処理は、優先的にCD4+細胞をTh17細胞に分化させた。BD FACS SORP Aria IIを使用して、5日目の分化した培養細胞からCCR6+細胞を選別した。次いで、IL-17産生アッセイのためにCCR6+細胞を 2×10^6 /mLに調節した。

30

【0334】

IL-17及びIFN- γ 量を測定するために、100 µLのCCR6+細胞を37 °Cで1時間試験抗体と共にプレインキュベートし、次いで、10 ng/mLのIL-7 100 µLと混合した。5%のCO₂を添加して37 °Cで24~40時間細胞を培養した。100 µLの培養上清中のIFN- γ 及びIL-17量を、それぞれ24時間及び40時間Flow Cytomix(Bender MedSystems)により測定した。

【0335】

合計4つのヒトCD4+細胞サンプル中のTh17増殖アッセイにおいて1A11 H3L4を試験した(図4A~D)。ヒト化抗体は、2つのサンプルではIL-17産生の有意な阻害を示し、他の2つのサンプルでは阻害の傾向を示した。このアッセイにおけるドナー間変動を考慮して、1A11 H3L4がIL-7媒介性Th17細胞増殖をブロックできると結論付けた。

40

【0336】

4.6.3 TSLPシグナル伝達に対する効果

IL-7R サブユニットは、IL-7R及びTSLP受容体複合体(TSLPR)の両方で共有されている。TSLPシグナル伝達に対する1A11 H3L4の効果を、ヒト血中単球によるTARC産生のTSLP誘導に基いてインビトロアッセイで試験した。市販の抗IL-7R抗体であるR34.34を、TARCのTSLP誘導のブロック

50

グについてのポジティブコントロールとして使用した。更に、Fc不能ヒト化IgG1 (HuIgG1; GRITS39633) をネガティブコントロールとして使用した。5人のドナー由来の単球を使用し、1 ng/mLのTSLPを用い、0.001~30 µg/mLの用量の1A11 H3L4及びHuIgG1を使用し、0.4、2及び10 µg/mLのR34.34を使用した。また、細胞計数により細胞生存を評価した。

【0337】

1A11 H3L4は、図5A~Eに示す通り、TARCのTSLP誘導に影響を与えなかったが、同じ5人のドナーについて、R34.34はTARC産生を実質的に阻害した。ヒト化ネガティブコントロール抗体は、TARC産生に効果を有していなかった。このデータセットは、1A11 H3L4がヒト単球におけるTSLPシグナル伝達を中和しないことを示す。したがって、1A11 H3L4は、IL-7Rを通じたIL-7Rシグナル伝達の中和に対して特異的であり、TSLPRを通じたTSLPシグナル伝達には影響を与えないことが予測される。

10

【0338】

4.7 IL7受容体阻害試験

表12Aは、ラン1で得られたIC₅₀値を示す。この表は、全てのコンストラクトが親1A11 H3L4分子について得られた最高の値よりも優れたIC₅₀値を有し、且つ上位2分子がBPC4401 (抗IL7R 1A11 H3L4 F100bH) 及びBPC4398 (1A11 VH3 N98D L4) であったことを示す。表12Bは、ラン2で得られたIC₅₀値を示す。これも、両方のコンストラクトBPC4401 (抗IL7R 1A11 H3L4 F100bH) 及びBPC4398 (1A11 VH3 N98D L4) が親1A11 H3L4分子について得られた最高の値よりも優れたIC₅₀値を有していたことを示す。ラン1及び2は、別々のIL7R/CM5表面上で行った。

20

【表 1 2 A】

表 1 2 A : I C 5 0 受容体阻害試験 (ラン 1)

分子の識別子/番号	分子の説明	IC50 (nM)
BPC1142(GRITS37988) 複製 1	抗-IL7R 1A11 H3L4	19.42
BPC4398	抗-IL7R 1A11 H3L4 N98D (CDRH3 変異体)	14.94
BPC4399	抗-IL7R 1A11 H3L4 N98E (CDRH3 変異体)	15.8
BPC4400	抗-IL7R 1A11 H3L4 F100bE (CDRH3 変異体)	15.33
BPC4401	抗-IL7R 1A11 H3L4 F100bH (CDRH3 変異体)	14.75
BPC4402	抗-IL7R 1A11 H3L4 F100bI (CDRH3 変異体)	15.23
BPC4403	抗-IL7R 1A11 H3L4 F100bV (CDRH3 変異体)	15.54
BPC1142 (HEK1029)	抗-IL7R 1A11 H3L4	16.21
BPC1142(GRITS37988) 複製	抗-IL7R 1A11 H3L4	17.23
CHO で発現させた物質 (GRITS37988) 及び HEK で発現させた物質 (HEK1029)を用いた実験において親分子(BPC1142-抗-IL7R 1A11 H3L4)を複数回試験した。		

10

20

30

【表 1 2 B】

表 1 2 B : I C 5 0 受容体阻害試験 (ラン 2)

分子の識別子/番号	分子の説明	IC ₅₀ (nM)
BPC1142(GRITS37988) 複製 1	1A11 H3L4	16.44
BPC4398 複製 1	1A11 VH3 N98D L4	14.86
BPC4401 複製 1	1A11 VH3 F100bH L4	14.92
BPC1142(GRITS37988) 複製 2	1A11 H3L4	16.57
BPC1142(GRITS37988) 複製 3	1A11 H3L4	16.79
BPC4398 複製 2	1A11 VH3 N98D L4	14.17
BPC4401 (複製 2)	1A11 VH3 F100bH L4	15.15
BPC1142(GRITS37988) 複製 4	1A11 H3L4	17.35
CHO で発現させた物質(GRITS37988)を用いた実験、BPC4398 (1A11 VH3 N98D L4)及び BPC4401 (1A11 VH3 F100bH L4)の複製ランにおいて親分子 (BPC1142-抗-IL7R 1A11 H3L4)を複数回試験した。		

10

20

【 0 3 3 9 】

30

4 . 8 I L - 7 R 多形結合アッセイ

I L - 7 R は 2 つ の 多 形 相、 す な わ ち 変 異 体 1 : T h r 6 6 - I l e 1 2 8、 変 異 体 2 : I l e 6 6 - T h r 1 2 8 と し て 存 在 す る。 両 方 の 多 形 相 に 対 す る 1 A 1 1 H 3 L 4 の 結 合 を ア ッ セ イ し た。 一 級 ア ミ ン カ ッ プ リ ン グ に よ り、 約 9 0 0 0 共 鳴 単 位 (R U) の レ ベ ル ま で C M 5 チ ッ プ に 抗 ヒ ト I g G (G E H e a l t h c a r e / B I A c o r e (商 標) B R - 1 0 0 8 - 3 9) を 固 定 化 し、 次 い で、 1 A 1 1 H 3 L 4 を こ の 表 面 に 捕 捉 し、 結 合 曲 線 の ダ ブ ル レ フ ァ レ ン ス の た め に 用 い た 0 n M 注 入 (す な わ ち、 バ ッ フ ァ の み) と 共 に、 5 1 2 n、 2 5 6 n、 1 2 8 n、 6 4 n n M、 3 2 n M、 及 び 1 6 n M の I L 7 R を 通 し、 3 M の M g C 2 を 使 用 し て こ の 表 面 を 再 生 し た。 B I A c o r e (商 標) 3 0 0 0 解 析 ソ フ ト ウ ェ ア に 固 有 の 1 : 1 モ デ ル に 結 合 デ ー タ を 適 合 さ せ た。 ラ ン ニ ン グ バ ッ フ ァ と し て H B S - E P を 使 用 し て ラ ン を 実 行 し、 2 5 で B I A c o r e (商 標) 3 0 0 0 に お い て 実 行 し た。 表 1 3 に 得 ら れ た デ ー タ を 示 す。 こ の 表 は、 1 A 1 1 H 3 L 4 が 両 方 の 多 形 変 異 体 に 対 し て 同 一 又 は 類 似 す る 結 合 親 和 性 を 有 す る (す な わ ち、 両 方 の 多 形 に 結 合 す る) こ と を 示 し た。

40

【表 1 3】

表 1 3 : I L - 7 R 多形結合

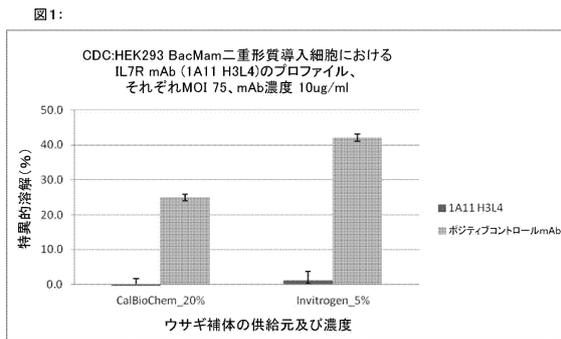
1A11H3L4 と hIL7R 変異体 1: Thr66-Ile128	Kon (Ka) 1.52e5	Koff (Kd)4.15e-4	KD 2.73e-9
1A11H3L4 と hIL7R 変異体 2: ILE66-Thr128	Kon (Ka) 1.46e5	Koff (Kd) 4.56e-4	KD 3.1e-9

10

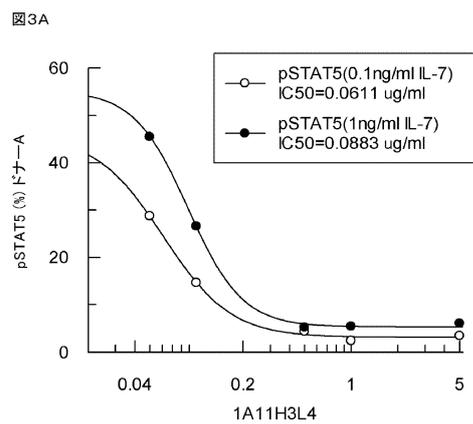
【 0 3 4 0 】

本明細書中では、本発明は、明確且つ簡潔に説明を記載することができるように、実施形態を参照して記載される。実施形態は、本発明から逸脱することなく様々に組合せたり分離させたりできることを意図しており、またそのように認識されるべきである。

【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】

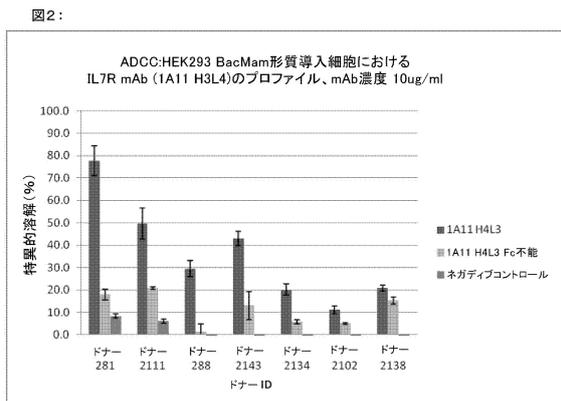
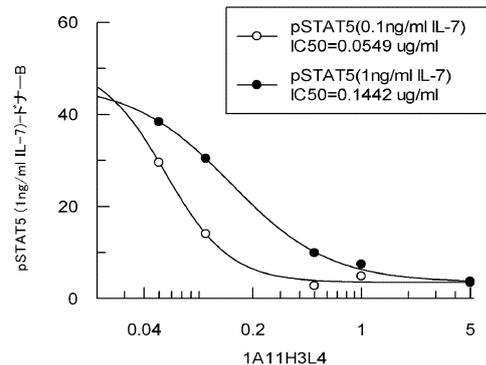
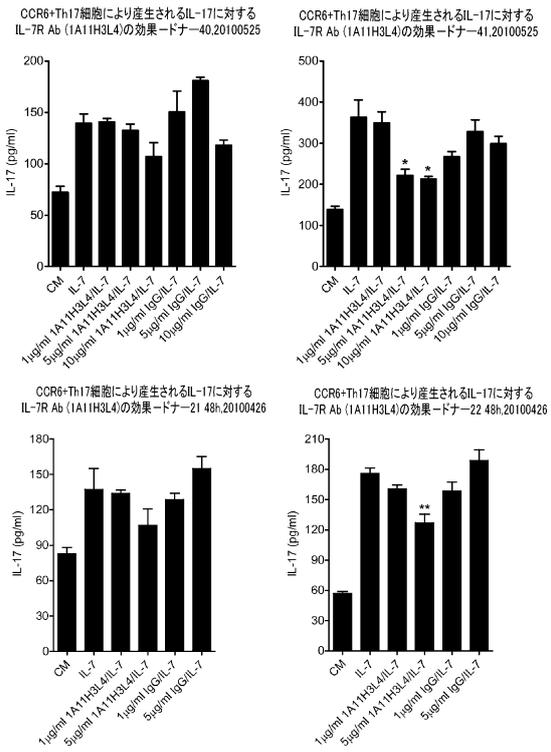


図3B



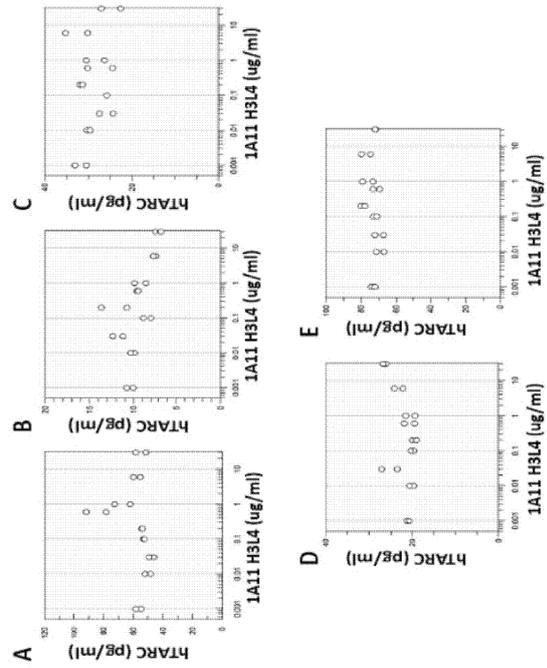
【 図 4 】

図4A-D



【 図 5 】

図5A-E



【 配列表 】

000585086000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06

- (72)発明者 カービー, イアン
イギリス国 エスジー-1 2エヌワイ ハートフォードシャー ステイーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
- (72)発明者 テイラー, アレクサンダー, エイチ.
アメリカ合衆国 1 9 4 0 6 ペンシルバニア州, キング オブ プルシア, スウィードランド
ロード 7 0 9, グラクソスミスクライン
- (72)発明者 ウェブ, トーマス, マシュー
イギリス国 エスジー-1 2エヌワイ ハートフォードシャー ステイーヴネイジ, ガンネルズ
ウッド ロード, グラクソスミスクライン
- (72)発明者 ヅエ, ユー
アメリカ合衆国 1 9 4 0 6 ペンシルバニア州, キング オブ プルシア, スウィードランド
ロード 7 0 9, グラクソスミスクライン

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 6 6 0 (W O , A 2)
特開 2 0 0 8 - 0 2 9 3 5 5 (J P , A)
Blood, 2007, Vol. 110, No. 8, pp. 2803-2810
PLoS ONE, 2009, Vol. 4, No. 8, e6534
J. Immunol., 2003, Vol. 171, No. 3, pp.1556-1563

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 0 0
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / W P I D S (S T N)