

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-180001

(P2016-180001A)

(43) 公開日 平成28年10月13日(2016.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	ZNA 4B064
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A 4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C085
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4H045
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-134763 (P2016-134763)
 (22) 出願日 平成28年7月7日(2016.7.7)
 (62) 分割の表示 特願2015-512897 (P2015-512897) の分割
 原出願日 平成25年5月17日(2013.5.17)
 (31) 優先権主張番号 61/649, 147
 (32) 優先日 平成24年5月18日(2012.5.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/792, 619
 (32) 優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500203709
 アムジェン インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
 サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ディルク イー. スミス
 アメリカ合衆国 ワシントン 98110,
 ベインブリッジ アイランド, メド
 ーミアー サークル エヌイー 11633

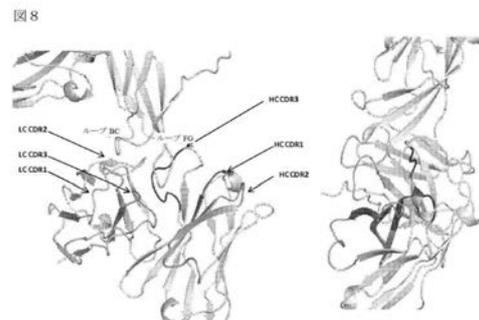
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ST2 抗原結合タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 ST2 抗原結合タンパク質の提供。
 【解決手段】 抗体を含む、ヒト ST2 に結合する抗原結合タンパク質に関連する組成物および方法を本明細書に記載する。具体的な実施形態において、本開示は、完全ヒト抗 ST2 抗体、ならびにその誘導体および多様体を提供する。さらに、そのような抗体および抗体断片、多様体、ならびに誘導体をコードする核酸も提供される。また、自己免疫性疾患および炎症性疾患を治療および予防する方法を含む、そのような抗体を作製および使用する方法も提供される。

【選択図】 図 8



【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/792,619号、および2012年5月18日に出願された米国仮特許出願第61/649,147号に対する優先権を主張するものであり、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

配列表の参照

本出願は、EFS-Webを介して電子形式で配列表とともに出願される。配列表は、2013年5月17日に作成されたA1712WOPCT_ST25.txtという標題の189,804バイトサイズのテキストファイルとして提供される。電子形式の配列表に含まれる情報は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

ST2は、IL-1およびIL-18に関連するサイトカインであり、NF-HEVまたはIL-1F11としても知られるインターロイキン-33(IL-33)の結合受容体である。ST2は、可溶性の非シグナル伝達多様体(可溶性ST2またはST2)、およびIL-33への細胞応答を媒介する完全長膜貫通型(FL-ST2、ST2、またはST2L)の両方として発現される。後者の形態は、多数の疾患状況において病的炎症に関与する幅広い細胞型において発現される。これらは、リンパ球、特に、IL-5およびIL-13を発現するTヘルパー細胞、ナチュラルキラー(NK)およびナチュラルキラーT(NKT)細胞、ならびに多くのいわゆる自然免疫細胞、例えば、マスト細胞、好塩基球、好酸球、マクロファージ、および自然ヘルパー細胞(nuocyteとしても知られるNeill, Wong et al., 2010)を含む。IL-33がこれらの細胞上でST2に結合すると、IL-1Rアクセサリタンパク質(ACP)として知られる広範囲に発現する共受容体の動員、ならびにIL-1およびIL-18に類似する炎症誘発性シグナル伝達の活性化を引き起こす。IL-33は、このように、ST2を発現する細胞を直接活性化することができるか、または、他の活性化刺激の存在下において、それらの活性化を増強することができる。IL-33によって誘導される細胞応答の例は、IL-5、IL-6、IL-13、TNF、IFN-、およびGM-CSF等の炎症性サイトカインの産生、ならびにCXCL8、CCL17、およびCCL24等のケモカインの産生を含む。また、IL-33は、IgE受容体シグナル伝達または他のマスト細胞および好塩基球活性化因子によって引き起こされるマスト細胞および好塩基球の活性化を増大させることによって、急性アレルギー反応を増強することも示されている。IL-33はまた、ST2を発現する免疫細胞の動員、生存、および接着性を増強するので、

20

30

40

【0004】

自然免疫細胞および獲得免疫細胞に対するIL-33の炎症誘発作用は、結果的に多くの病理学的プロセスを促進する。肺において、これらは、気道炎症、粘液産生、気道過敏性、および線維リモデリングの増加を含む。IL-33はまた、炎症誘発性サイトカインの産生を促進することによって、関節の局所炎症、ならびに皮膚および関節の痛覚過敏(hypernociception)にも寄与し得る(Verri, Guerrero et al., 2008; Xu, Jiang et al., 2008)。過剰なIL-33は、病的なコラーゲン沈着および線維症と関連付けられており、炎症性腸疾患の状況における上皮損傷にも寄与する。好塩基球およびIgEで感作されたマスト細胞に対するその

50

強力な作用を通じて、IL-33は、アナフィラキシーショックを引き起こす可能性もあり(Pushparaj, Tay et al. 2009)、アレルギー性疾患における原因となる役割を果たす場合がある。これらの疾患の多くは、本質的に慢性および進行性であり、治療することが困難であるため、より効果的な治療の必要性が存在する。

【0005】

確認されている生物学的作用と一致して、IL-33/ST2経路がヒト疾患に寄与するという一連の証拠がいくつか存在する。例えば、粘膜組織の炎症および関節の炎症に關与する疾患には、IL-33の異常に高い発現が認められる。これらは、喘息(Prefontaine, Lajoie-Kadoch et al. 2009; Prefontaine, Nadigel et al. 2010)、炎症性腸疾患(Beltran, Nunez et al. 2010; Pastorelli, Garg et al. 2010; Sponheim, Pollheimer et al. 2010)、および関節リウマチ(Palmer, Talabot-Ayer et al. 2009; Matsuyama, Okazaki et al. 2010)を含む。IL-33の発現は、乾癬性皮膚(Theoharides, Zhang et al. 2010)およびアトピー性皮膚炎患者の皮膚(Pushparaj, Tay et al. 2009)において上昇し、また、全身性硬化症(Yanaba, Yoshizaki et al. 2011)(Manetti, Ibba-Manneschi et al. 2009)および肝線維症(Marvie, Lisbonne et al. 2009)等の線維症の病的状態においても増加する。多数の病状においても循環する可溶性ST2の濃度が上昇しており、このサイトカイン経路とこれらの疾患との関連性がさらに示唆される。例として、喘息(Kuroiwa, Arai et al. 2001; Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001; Ali, Zhang et al. 2009)、慢性閉塞性肺疾患(Hacker, Lambers et al. 2009)、肺線維症(Tajima, Oshikawa et al. 2003)、敗血症および外傷(Brunner, Krenn et al. 2004)、HIV感染(Miyagaki, Sugaya et al. 2011)、全身性エリテマトーデス(Mok, Huang et al. 2010)、炎症性腸疾患(Beltran, Nunez et al. 2010)、ならびに関節リウマチ、硬化症、ウェゲナー肉芽腫症およびベーチェット病(Kuroiwa, Arai et al. 2001)、そして循環器疾患(Shah and Januzzi 2010)が挙げられる。IL-33は、好酸球性炎症を増強し、この経路が鼻副鼻腔炎および鼻ポリープ症(Plager, Kahl et al. 2010)、ならびに好酸球性気管支炎(Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001)等の好酸球関連疾患に關与するという証拠がある。

【0006】

IL-33/ST2経路をヒト疾患に關連付けるさらなる証拠が遺伝学的研究によって提供されており、疾患のリスク増加または疾患重症度のパラメータと著しく關連する、一般集団におけるIL-33および/またはST2の遺伝子多型性が同定されている。いくつかの大規模なゲノムワイド關連解析が、ST2(IL1RL1)またはIL-33における遺伝的多様性を喘息のリスク増加と關連付けており(Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010; Wu, Romieu et al. 2010)、他の研究は、この経路を喘息の重症度の増加(Ali, Zhang et al. 2009)および気管支過敏性(Reijmerink, Postma et al. 2008)と遺伝的に關連付けている。同様の知見が、アトピー性皮膚炎(Shimizu, Matsuda et al. 2005)、鼻副鼻腔炎(Sakashita, Yoshimoto et al. 2008; Castano R 2009)、および鼻ポリープ症(Buysschaert, Grulois et al. 2010)等のアレルギー疾患にこの経路を關係付けている。

総合すると、いくつかのヒト疾患との関連性、およびこのサイトカイン系が多くの形態

10

20

30

40

50

の有害な炎症を促進する能力は、これが治療的介入に有用な標的であることを意味している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). 「Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity.」 Nature 464 (7293): 1367 - 1370

【非特許文献2】Verri, W. A., Jr., A. T. Guerrero, et al. (2008). 「IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice.」 Proc Natl Acad Sci U S A 105 (7): 2723 - 2728

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、商業生産およびヒトにおける治療用途に適した特性を有する抗ST2抗原結合タンパク質、例えば、抗体およびその機能的断片を提供する。抗ST2抗原結合タンパク質は、IL-33/ST2系に関連する疾患および障害を治療する方法において特に有用である。高い親和性でST2に結合してIL-33の結合を効果的にブロックし、それによって細胞内でIL-33によって媒介されるシグナル伝達を低下させるST2結合抗体を、本明細書に提供する。

20

【0009】

第1の態様において、ST2抗原結合タンパク質は、a) 配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、もしくは配列番号165に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、もしくは同一である軽鎖可変ドメイン；b) 配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、もしくは配列番号147に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、もしくは同一である重鎖可変ドメイン、またはc) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む。

30

【0010】

第1の態様の好ましい抗原結合タンパク質は、配列番号95に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号29に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号96に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号30に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号97に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号31に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号98に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号32に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号99に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、

40

50

少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号33に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号100に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号34に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号101に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号35に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号102に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号36に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号103に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号37に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号104に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号38に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号105に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号39に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号163に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号145に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号164に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号146に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むもの；ならびに配列番号165に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である軽鎖可変ドメインおよび配列番号147に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、または同一である重鎖可変ドメインを含むものを含む。

【0011】

第2の態様において、ST2抗原結合タンパク質は、a)配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、もしくは配列番号165に記載のアミノ酸配列からの10個以下のもしくは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン；b)配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、もしくは配列番号147に記載のアミノ酸配列からの10個以下のもしくは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン；またはc) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む。

【0012】

第2の態様の好ましい抗原結合タンパク質は、配列番号95に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号29に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号96に

、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号154に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；a a)配列番号149に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号152に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号155に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；またはb b)配列番号150に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号153に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号156に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3を含む重鎖可変ドメインを含有する。

10

【0014】

第3の態様の好ましいST2抗原結合タンパク質は、a)の軽鎖可変ドメインおよびo)の重鎖可変ドメインを含むもの；b)の軽鎖可変ドメインおよびp)の重鎖可変ドメインを含むもの；c)の軽鎖可変ドメインおよびq)の重鎖可変ドメインを含むもの；d)の軽鎖可変ドメインおよびr)の重鎖可変ドメインを含むもの；e)の軽鎖可変ドメインおよびs)の重鎖可変ドメインを含むもの；f)の軽鎖可変ドメインおよびt)の重鎖可変ドメインを含むもの；g)の軽鎖可変ドメインおよびu)の重鎖可変ドメインを含むもの；h)の軽鎖可変ドメインおよびv)の重鎖可変ドメインを含むもの；i)の軽鎖可変ドメインおよびw)の重鎖可変ドメインを含むもの；j)の軽鎖可変ドメインおよびx)の重鎖可変ドメインを含むもの；k)の軽鎖可変ドメインおよびy)の重鎖可変ドメインを含むもの；l)の軽鎖可変ドメインおよびz)の重鎖可変ドメインを含むもの；m)の軽鎖可変ドメインおよびa a)の重鎖可変ドメインを含むもの；ならびにn)の軽鎖可変ドメインおよびb b)の重鎖可変ドメインを含むものを含む。

20

【0015】

本発明の第4の態様において、第1、第2、または第3の態様のST2抗原結合タンパク質は、 1×10^{-10} M以下の親和性でヒトST2に結合する。

【0016】

本発明の第5の態様において、第1、第2、第3、または第4の態様のST2抗原結合タンパク質は、ヒトST2のヒトIL-33への結合を阻害する。

30

【0017】

本発明の第6の態様において、第1、第2、第3、第4、または第5の態様のST2抗原結合タンパク質は、ヒトST2を発現する細胞においてヒトIL-33によって媒介されるST2シグナル伝達を低下させる。

【0018】

本発明の第7の態様において、第6の態様のST2抗原結合タンパク質は、カニクイザルST2を発現する細胞においてIL-33によって媒介されるカニクイザルST2シグナル伝達を低下させる。

【0019】

本発明の第8の態様において、第1、第2、第3、第4、第5、第6、または第7の態様のST2抗原結合タンパク質は、ヒト抗体等の抗体である。好ましい抗体は、配列番号84に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号18に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号85に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号19に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号86に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号20に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；配列番号87に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号21に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；配列番号88に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号22に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体；配列番号89に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号23に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号90に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号24に記載のアミノ酸配列を有する重

40

50

鎖を含む抗体、配列番号 9 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号 9 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号 9 4 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号 1 6 0 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 1 4 2 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、配列番号 1 6 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 1 4 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体、ならびに配列番号 1 6 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖および配列番号 1 4 4 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を含む。

10

【 0 0 2 0 】

第 9 の態様において、本発明は、S T 2 抗原結合タンパク質の 1 つ以上のポリペプチド成分、例えば、抗体軽鎖または抗体重鎖をコードする単離された核酸を提供する。好ましい実施形態において、核酸は、

【 0 0 2 1 】

a) 配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4、もしくは配列番号 1 6 5 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する軽鎖可変ドメイン、

【 0 0 2 2 】

b) 配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、もしくは配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する重鎖可変ドメイン、

20

【 0 0 2 3 】

c) 配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4、もしくは配列番号 1 6 5 に記載のアミノ酸配列からの 5 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン、

30

【 0 0 2 4 】

d) 配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、もしくは配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸配列からの 5 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン、

【 0 0 2 5 】

e) 軽鎖可変ドメインであって；

【 0 0 2 6 】

i) 配列番号 1 0 6 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1 ; 配列番号 1 1 7 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 2 ; および配列番号 1 2 8 に記載の L C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 3 ;

40

【 0 0 2 7 】

i i) 配列番号 1 0 7 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1 ; 配列番号 1 1 8 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 2 ; および配列番号 1 2 9 に記載の L C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 3 ;

【 0 0 2 8 】

50

3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号138に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

【0037】

xii) 配列番号166に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号169に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号172に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

【0038】

xiii) 配列番号167に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号170に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号173に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；または

【0039】

xiv) 配列番号168に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号171に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号174に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3を含む、軽鎖可変ドメイン、あるいは

【0040】

f) 重鎖可変ドメインであって、

【0041】

i) 配列番号40に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号51に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号62に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0042】

ii) 配列番号41に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号52に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号63に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0043】

iii) 配列番号42に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号53に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号64に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0044】

iv) 配列番号43に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号54に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号65に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0045】

v) 配列番号44に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号55に記載のHCDR2配列からの3個

10

20

30

40

50

以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号66に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0046】

v i) 配列番号45に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号56に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号67に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0047】

v i i) 配列番号46に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号57に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号68に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0048】

v i i i) 配列番号47に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号58に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号69に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0049】

i x) 配列番号48に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号59に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号70に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0050】

x) 配列番号49に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号60に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号71に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0051】

x i) 配列番号50に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号61に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号72に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0052】

x i i) 配列番号148に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号151に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号154に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

【0053】

x i i i) 配列番号149に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号152に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号155に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換

10

20

30

40

50

を有する H C D R 3 ; または

【 0 0 5 4 】

x i v) 配列番号 1 5 0 に記載の H C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する H C D R 1 ; 配列番号 1 5 3 に記載の H C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する H C D R 2 ; および配列番号 1 5 6 に記載の H C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する H C D R 3 を含む重鎖可変ドメイン、を含むポリペプチドをコードする。

【 0 0 5 5 】

第 9 の態様のある特定の実施形態において、ポリペプチドは、抗体軽鎖をコードし、配列番号 7 3、配列番号 7 4、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 1 5 7、配列番号 1 5 8、または配列番号 1 5 9 に記載のヌクレオチド配列と、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または 1 0 0 % 同一である。第 9 の態様の他の実施形態において、ポリペプチドは、抗体重鎖をコードし、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 3 9、配列番号 1 4 0、または配列番号 1 4 1 に記載のヌクレオチド配列と、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または 1 0 0 % 同一である。

【 0 0 5 6 】

第 1 0 の態様において、本発明は、第 8 の態様の 1 つ以上の単離された核酸を含む発現ベクターを提供する。特定の実施形態において、発現ベクターは、抗体軽鎖、抗体重鎖、または抗体軽鎖および抗体重鎖の両方をコードする。

【 0 0 5 7 】

第 1 1 の態様において、本発明は、本発明の第 1 0 の態様の 1 つ以上の発現ベクターを含む組換え宿主細胞を含む、プロモーターに作動可能に連結された第 9 の態様の 1 つ以上の単離された核酸を含む組換え宿主細胞を提供する。好ましい実施形態において、組換え宿主細胞は、S T 2 に結合する抗体を分泌する。好ましい宿主細胞は、C H O 細胞系を含む哺乳動物宿主細胞である。

【 0 0 5 8 】

第 1 2 の態様において、本発明は、自己免疫疾患または炎症性疾患を治療する方法を提供し、当該方法は、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、または第 8 の態様のいずれか 1 つの治療有効量の S T 2 抗原結合タンパク質を、それを必要とする患者に投与することを含む。好ましい実施形態において、S T 2 抗原結合タンパク質は、配列番号 9 5 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 2 9 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 1）、配列番号 9 6 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 0 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 2）、配列番号 9 7 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 1 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 3）、配列番号 9 8 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 2 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 4）、配列番号 9 9 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 3 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 5）、配列番号 1 0 0 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 4 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 6）、配列番号 1 0 1 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 5 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 7）、配列番号 1 0 2 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 6 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 8）、配列番号 1 0 3 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 7 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 9）、配列番号 1 0 4 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 8 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、A b 1 0）、

10

20

30

40

50

配列番号 105 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 39 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab 11）；配列番号 163 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 145 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab 30）；配列番号 164 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 146 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab 32）；または配列番号 165 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 147 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体（例えば、Ab 33）である。好ましい実施形態において、ST2 抗原結合タンパク質は、IL-33 の ST2 への結合を阻害する。特に好ましい実施形態において、自己免疫疾患または炎症性疾患は、喘息、炎症性腸疾患、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、線維症、慢性閉塞性肺疾患、全身性エリテマトーデス、硬化症、ウェゲナー肉芽腫症、ベーチェット病、副鼻腔炎、鼻ポリープ症、好酸球性気管支炎、および循環器疾患である。

10

【0059】

第 13 の態様において、本発明は、第 11 の態様の組換え宿主細胞を培養して、当該培養物から ST2 抗原結合タンパク質を単離することにより、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 6、第 7、または第 8 の態様のいずれか 1 つの ST2 抗原結合タンパク質を作製する方法を提供する。

【0060】

第 14 の態様において、本発明は、以下からなる群から選択される抗体と交差競合する、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 6、第 7、または第 8 の態様のいずれか 1 つの ST2 抗原結合タンパク質を提供する：

20

【0061】

a) 配列番号 84 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 18 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0062】

b) 配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0063】

c) 配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 20 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

30

【0064】

d) 配列番号 87 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 21 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0065】

e) 配列番号 88 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 22 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0066】

f) 配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0067】

g) 配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 24 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

40

【0068】

h) 配列番号 91 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0069】

i) 配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 26 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0070】

j) 配列番号 93 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 27 に記載のアミノ

50

酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0071】

k) 配列番号94に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号28に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0072】

l) 配列番号160に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号142に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；

【0073】

m) 配列番号161に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号143に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体；ならびに

【0074】

n) 配列番号162に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号144に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体。

【0075】

第15の態様において、本発明は、ヒトST2ドメイン1およびドメイン2を含むポリペプチド(配列番号175)に結合する単離されたST2抗原結合タンパク質、好ましくは、抗体またはその抗原結合断片を提供し、ポリペプチドのヒトST2ドメイン1またはドメイン2に単一変異が導入されると、結合は有意に阻害され、単一変異は、L14R、I15R、S33R、E43R、V47R、A62R、G65R、T79R、D92R、D97R、V104R、G138R、N152R、およびV176Rからなる群から選択される。「有意に阻害される」とは、結合において測定される差が、統計的に有意であることを意味する。好ましい実施形態において、群の全てのメンバーを含む群の2つ以上のメンバーのために結合が有意に阻害される。第15の態様のある特定の実施形態において、ポリペプチドのヒトST2ドメイン1またはドメイン2に単一変異が導入されると、結合はまた有意に活性化もされ、単一変異は、L53R、R72A、およびS73Rからなる群から選択される。「有意に活性化される」とは、結合において測定される差が、統計的に有意であることを意味する。好ましい実施形態において、群の全てのメンバーのために結合が有意に活性化される。第15の態様のある特定の実施形態において、ST2結合タンパク質は、ヒトST2への結合について配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号19に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体と交差競合する。特に好ましい実施形態において、抗原結合タンパク質は、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、または第8の態様の抗原結合タンパク質である。

【0076】

第16の態様において、本発明は、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第14、または第15の態様の抗原結合タンパク質を提供し、当該ST2結合タンパク質、好ましくは、抗体またはその抗原結合断片は、水素/重水素交換分析によって決定して、配列番号1のアミノ酸33~44および/または88~94を含むST2の一部に結合する。

【0077】

第17の態様において、本発明は、ST2に結合して界面を形成する、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第14、第15、または第16の態様の抗原結合タンパク質、好ましくは、抗体またはその抗原結合断片を提供し、当該結合によって形成される界面は、K1、F2、P19、R20、Q21、G22、K23、Y26、I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、およびY81からなる群から選択されるST2残基を含む。第17の態様の好ましい実施形態において、当該結合によって形成される界面は、ST2残基P19、R20、Q21、G22、K23、および/もしくはY26、ST2残基I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、および/もしくはY81、またはST2残基P19、R20、Q21、G22、K23、Y26、I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、およびY81を含む。界面は、

10

20

30

40

50

結合ST2と非結合ST2との間の溶媒露出の差によって決定されてもよく、界面残基は、10%を超える差を有するアミノ酸、および当該抗体と水を介した水素結合を形成するアミノ酸として定義されるか、または、抗体の5以内になくとも1つの原子を有するアミノ酸によって決定される。

【0078】

第18の態様において、本発明は、a)配列番号96に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン、b)配列番号30に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の同一性を有する重鎖可変ドメイン；c) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメイン、d)配列番号96に記載のアミノ酸配列からの10個以下もしくは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン；e)配列番号30に記載のアミノ酸配列からの10個以下もしくは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン；f) d)の軽鎖可変ドメインおよびe)の重鎖可変ドメイン、g)配列番号107に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号118に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号129に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3を含む軽鎖可変ドメイン、h)配列番号41に記載のHC DR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHC DR1；配列番号52に記載のHC DR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHC DR2；および配列番号63に記載のHC DR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHC DR3を含む重鎖可変ドメイン、またはi) g)の軽鎖可変ドメインおよびh)の重鎖可変ドメインを含む、単離されたST2抗原結合タンパク質、好ましくは、抗体もしくはその抗原結合断片を提供する。

10

20

30

40

50

【0079】

第18の態様の好ましい実施形態において、軽鎖可変領域は、D28もしくはその保存的置換、I29もしくはその保存的置換、S30もしくはその保存的置換、N31もしくはその保存的置換、Y32もしくはその保存的置換、Y49もしくはその保存的置換、D50もしくはその保存的置換、N53もしくはその保存的置換、E55もしくはその保存的置換、T56もしくはその保存的置換、D91もしくはその保存的置換、D92もしくはその保存的置換、N93もしくはその保存的置換、F94もしくはその保存的置換、またはL96もしくはその保存的置換を含む。他の好ましい実施形態において、軽鎖可変領域は、D28またはその保存的置換、N31またはその保存的置換、D50またはその保存的置換、N53またはその保存的置換、E55またはその保存的置換、D91またはその保存的置換、およびD92またはその保存的置換を含む。さらに他の好ましい実施形態において、軽鎖可変領域は、D28、N31、D50、N53、E55、D91、およびD92を含む。

【0080】

第18の態様はまた、ST2結合タンパク質、好ましくは、抗体またはその抗原結合断片を含み、重鎖可変領域は、W33もしくはその保存的置換、I50もしくはその保存的置換、D57もしくはその保存的置換、R59もしくはその保存的置換、H99もしくはその保存的置換、G100もしくはその保存的置換、T101もしくはその保存的置換、S102もしくはその保存的置換、S103もしくはその保存的置換、D104もしくはその保存的置換、Y105もしくはその保存的置換、またはY106もしくはその保存的置換を含み；重鎖可変領域は、S102またはその保存的置換、S103またはその保存的置換、D104またはその保存的置換、およびY105またはその保存的置換を含み；重鎖可変領域は、S102、S103、D104、およびY105を含む。

【0081】

第18の態様のある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、 1×10^{-10} M以下の親和性でヒトST2に特異的に結合し、ヒトST2のヒトIL-33への

結合を阻害し、ヒトST2を発現する細胞においてヒトIL-33によって媒介されるST2シグナル伝達を低下させ、カニクイザルST2のカニクイザルIL-33への結合を阻害し、カニクイザルST2を発現する細胞においてIL-33によって媒介されるカニクイザルST2シグナル伝達を低下させ、かつ/または、ヒト抗体等の抗体である。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

a) 配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、もしくは配列番号165に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；

b) 配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、もしくは配列番号147に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメイン；または

c) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む、単離されたST2抗原結合タンパク質。

(項目2)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、または配列番号165に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する、項目1に記載のST2抗原結合タンパク質。

(項目3)

前記重鎖可変ドメインは、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、または配列番号147に記載のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する、項目1または2に記載のST2抗原結合タンパク質。

(項目4)

a) 配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、もしくは配列番号165に記載のアミノ酸配列からの10個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン；

b) 配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、もしくは配列番号147に記載のアミノ酸配列からの10個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン；または

c) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む、単離されたST2抗原結合タンパク質。

(項目5)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、または配列番号165に記載のアミノ酸配列からの5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する、項目4に記載のST2抗原結合タンパク質。

(項目6)

前記重鎖可変ドメインは、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、または配列番号147に記載の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列からの5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する、項目4または5に記載のST2抗原結合タンパク質。

(項目7)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、または配列番号165に記載のアミノ酸配列を含む、項目1～6に記載のST2抗原結合タンパク質。

(項目8)

前記重鎖可変ドメインは、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、または配列番号147に記載のアミノ酸配列を含む、項目1～7に記載のST2抗原結合タンパク質。

10

(項目9)

a) 配列番号106に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号117に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号128に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

b) 配列番号107に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号118に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号129に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

20

c) 配列番号108に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号119に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号130に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

d) 配列番号109に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号120に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号131に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

30

e) 配列番号110に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号121に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号132に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

f) 配列番号111に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号122に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号133に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

40

g) 配列番号112に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号123に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号134に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

h) 配列番号113に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号124に記載のLCDR2配列からの3個

50

以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号135に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

i) 配列番号114に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号125に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号136に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

j) 配列番号115に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号126に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号137に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

k) 配列番号116に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号127に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号138に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

l) 配列番号166に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号169に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号172に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

m) 配列番号167に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号170に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号173に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；または

n) 配列番号168に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号171に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号174に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3、を含む軽鎖可変ドメイン；

ならびに

o) 配列番号40に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号51に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号62に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

p) 配列番号41に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号52に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号63に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

q) 配列番号42に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号53に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号64に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

r) 配列番号43に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、も

10

20

30

40

50

、もしくは置換を有する H C D R 1 ; 配列番号 1 5 3 に記載の H C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する H C D R 2 ; および配列番号 1 5 6 に記載の H C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する H C D R 3、を含む重鎖可変ドメイン、を含む、単離された S T 2 抗原結合タンパク質。
(項目 1 0)

前記 a) の軽鎖可変ドメインおよび前記 o) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 0 6 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 1 7 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 2 8 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 0 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 1 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 2 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 1 0 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

10

(項目 1 2)

前記 b) の軽鎖可変ドメインおよび前記 p) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 0 7 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 1 8 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 2 9 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 1 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 2 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 3 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 1 2 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

20

(項目 1 4)

前記 c) の軽鎖可変ドメインおよび前記 q) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 5)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 0 8 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 1 9 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 0 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 2 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 3 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 4 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 1 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

30

(項目 1 6)

前記 d) の軽鎖可変ドメインおよび前記 r) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 7)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 0 9 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 0 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 1 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 3 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 4 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 5 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 1 6 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

40

(項目 1 8)

前記 e) に記載の軽鎖可変ドメインおよび前記 s) に記載の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 9)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 0 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 1 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 2 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 4 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 5 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 6 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 1 8 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 0)

50

前記 f) の軽鎖可変ドメインおよび前記 t) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 1)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 1 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 2 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 3 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 5 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 6 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 7 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 2 0 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 2)

前記 g) の軽鎖可変ドメインおよび前記 u) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

10

(項目 2 3)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 2 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 3 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 4 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 6 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 7 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 8 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 2 2 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 4)

前記 h) の軽鎖可変ドメインおよび前記 v) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

20

(項目 2 5)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 3 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 4 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 5 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 7 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 8 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 6 9 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 2 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 6)

前記 i) の軽鎖可変ドメインおよび前記 w) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 7)

30

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 4 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 5 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 6 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 8 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 5 9 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 7 0 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 2 6 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 8)

前記 j) の軽鎖可変ドメインおよび前記 x) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 2 9)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 5 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 6 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 7 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 4 9 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 6 0 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 7 1 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 2 8 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

40

(項目 3 0)

前記 k) の軽鎖可変ドメインおよび前記 y) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 3 1)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 1 6 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 1 2 7 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 1 3 8 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変

50

ドメインは、配列番号 50 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 61 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 72 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 30 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 32)

前記 1) の軽鎖可変ドメインおよび前記 z) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 33)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 166 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 169 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 172 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 148 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 151 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 154 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 32 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

10

(項目 34)

前記 m) の軽鎖可変ドメインおよび前記 a a) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 35)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 167 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 170 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 173 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 149 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 152 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 155 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 34 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

20

(項目 36)

前記 n) の軽鎖可変ドメインおよび前記 b b) の重鎖可変ドメインを含む、項目 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 37)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 168 に記載の L C D R 1 ; 配列番号 171 に記載の L C D R 2 配列 ; および配列番号 174 に記載の L C D R 3 配列を含み ; 前記重鎖可変ドメインは、配列番号 150 に記載の H C D R 1 ; 配列番号 153 に記載の H C D R 2 配列 ; および配列番号 156 に記載の H C D R 3 配列を含む、項目 36 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

30

(項目 38)

前記抗原結合タンパク質は、 1×10^{-10} M 以下の親和性でヒト S T 2 に特異的に結合する、項目 1 ~ 37 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 39)

前記抗原結合タンパク質は、ヒト S T 2 のヒト I L - 33 への結合を阻害する、項目 1 ~ 38 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 40)

前記抗原結合タンパク質は、ヒト S T 2 を発現する細胞においてヒト I L - 33 によって媒介される S T 2 シグナル伝達を低下させる、項目 1 ~ 39 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

40

(項目 41)

前記抗原結合タンパク質は、カニクイザル S T 2 のカニクイザル I L - 33 への結合を阻害する、項目 39 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 42)

前記抗原結合タンパク質は、カニクイザル S T 2 を発現する細胞において I L - 33 によって媒介されるカニクイザル S T 2 シグナル伝達を低下させる、項目 41 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 43)

前記抗原結合タンパク質は、抗体である、項目 1 ~ 42 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

50

(項目 4 4)

前記抗体は、ヒト抗体である、項目 4 3 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 4 5)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 4 6)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

10

(項目 4 7)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 4 8)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 4 9)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

20

(項目 5 0)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 5 1)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

30

(項目 5 2)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 9 1 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 5 3)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 5 4)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 9 3 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

40

(項目 5 5)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 9 4 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 5 6)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 1 6 0 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 1 4 2 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

50

(項目 5 7)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 1 6 1 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 1 4 3 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 5 8)

軽鎖および重鎖を含み、前記軽鎖は、配列番号 1 6 2 に記載のアミノ酸配列を含み、前記重鎖は、配列番号 1 4 4 に記載のアミノ酸配列を含む、項目 4 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 5 9)

ポリペプチドをコードする単離された核酸であって、前記ポリペプチドは、

10

a) 配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4、もしくは配列番号 1 6 5 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；

b) 配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、もしくは配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する重鎖可変ドメイン；

c) 配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4、もしくは配列番号 1 6 5 に記載のアミノ酸配列からの 5 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン；

20

d) 配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、もしくは配列番号 1 4 7 に記載のアミノ酸配列からの 5 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン；

e) 軽鎖可変ドメインであって、

i) 配列番号 1 0 6 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1；配列番号 1 1 7 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 2；および配列番号 1 2 8 に記載の L C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 3；

30

i i) 配列番号 1 0 7 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1；配列番号 1 1 8 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 2；および配列番号 1 2 9 に記載の L C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 3；

i i i) 配列番号 1 0 8 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1；配列番号 1 1 9 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 2；および配列番号 1 3 0 に記載の L C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 3；

40

i v) 配列番号 1 0 9 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1；配列番号 1 2 0 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 2；および配列番号 1 3 1 に記載の L C D R 3 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 3；

v) 配列番号 1 1 0 に記載の L C D R 1 配列からの 3 個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する L C D R 1；配列番号 1 2 1 に記載の L C D R 2 配列からの 3 個

50

以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号132に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

v i) 配列番号111に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号122に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号133に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

v i i) 配列番号112に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号123に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号134に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

v i i i) 配列番号113に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号124に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号135に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

i x) 配列番号114に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号125に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号136に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

x) 配列番号115に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号126に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号137に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

x i) 配列番号116に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号127に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号138に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

x i i) 配列番号166に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号169に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号172に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；

x i i i) 配列番号167に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号170に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号173に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；または

x i v) 配列番号168に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号171に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号174に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3を含む、軽鎖可変ドメイン、あるいは

f) 重鎖可変ドメインであって、

i) 配列番号40に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、

10

20

30

40

50

、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号61に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号72に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

xiii) 配列番号148に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号151に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号154に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；

xiiii) 配列番号149に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号152に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号155に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；または

xv) 配列番号150に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号153に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号156に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3を含む、重鎖可変ドメイン、を含む、単離された核酸。

(項目60)

前記ポリペプチドは、抗体軽鎖を含む、項目59に記載の単離された核酸。

(項目61)

前記軽鎖は、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号157、配列番号158、または配列番号159に記載のヌクレオチド配列と少なくとも80%同一なヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目60に記載の単離された核酸。

(項目62)

前記軽鎖は、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号157、配列番号158、または配列番号159に記載のヌクレオチド配列と少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目61に記載の単離された核酸。

(項目63)

前記軽鎖は、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号157、配列番号158、または配列番号159に記載のヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目62に記載の単離された核酸。

(項目64)

前記軽鎖は、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号157、配列番号158、または配列番号159に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目63に記載の単離された核酸。

(項目65)

前記ポリペプチドは、抗体重鎖を含む、項目59に記載の単離された核酸。

(項目66)

前記重鎖は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号139、配列番号140、または配列番号141に記載のヌクレオチド配列と

10

20

30

40

50

少なくとも 80% 同一なヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目 65 に記載の単離された核酸。

(項目 67)

前記重鎖は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 139、配列番号 140、または配列番号 141 に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 90% 同一なヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目 66 に記載の単離された核酸。

(項目 68)

前記重鎖は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 139、配列番号 140、または配列番号 141 に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 95% 同一なヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目 67 に記載の単離された核酸。

10

(項目 69)

前記重鎖は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 139、配列番号 140、または配列番号 141 に記載のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる、項目 68 に記載の単離された核酸。

(項目 70)

20

項目 59 ~ 69 のいずれかに記載の単離された核酸を含む、発現ベクター。

(項目 71)

前記単離された核酸は、抗体軽鎖をコードする、項目 70 に記載の発現ベクター。

(項目 72)

前記単離された核酸は、抗体重鎖をコードする、項目 70 に記載の発現ベクター。

(項目 73)

抗体重鎖をコードする単離された核酸をさらに含む、項目 71 に記載の発現ベクター。

(項目 74)

プロモーターに作動可能に連結された項目 59 ~ 69 のいずれかに記載の単離された核酸を含む、組換え宿主細胞。

30

(項目 75)

項目 70 ~ 73 のいずれかに記載の発現ベクターを含む、組換え宿主細胞。

(項目 76)

前記宿主細胞は、項目 71 および 72 に記載の発現ベクターを含む、項目 75 に記載の組換え宿主細胞。

(項目 77)

前記宿主細胞は、ST2 に結合する抗体を分泌する、項目 76 に記載の組換え宿主細胞。

(項目 78)

前記細胞は、哺乳動物起源の細胞である、項目 74 ~ 77 のいずれかに記載の組換え宿主細胞。

40

(項目 79)

前記細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系である、項目 78 に記載の組換え宿主細胞。

(項目 80)

自己免疫疾患または炎症性疾患を治療する方法であって、治療有効量の項目 1 ~ 58 のいずれか 1 項に記載の ST2 抗原結合タンパク質を、それを必要とする患者に投与することを含む、方法。

(項目 81)

前記 ST2 抗原結合タンパク質は、抗体である、項目 80 に記載の方法。

50

(項目 8 2)

前記抗体は、配列番号 9 5 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 2 9 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記抗体は、配列番号 8 4 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 1 8 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記抗体は、配列番号 9 6 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 0 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記抗体は、配列番号 8 5 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 1 9 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記抗体は、配列番号 9 7 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 1 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記抗体は、配列番号 8 6 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 2 0 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記抗体は、配列番号 9 8 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 2 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記抗体は、配列番号 8 7 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 2 1 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記抗体は、配列番号 9 9 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 3 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記抗体は、配列番号 8 8 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 2 2 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 9 0 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記抗体は、配列番号 1 0 0 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 4 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

前記抗体は、配列番号 8 9 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 2 3 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記抗体は、配列番号 1 0 1 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 5 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記抗体は、配列番号 9 0 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 2 4 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記抗体は、配列番号 1 0 2 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号 3 6 に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記抗体は、配列番号 9 1 に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号 2 5 に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記抗体は、配列番号 1 0 3 に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号

10

20

30

40

50

37に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目99)

前記抗体は、配列番号92に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号26に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目98に記載の方法。

(項目100)

前記抗体は、配列番号104に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号38に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目101)

前記抗体は、配列番号93に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号27に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目100に記載の方法。

(項目102)

前記抗体は、配列番号105に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号39に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目103)

前記抗体は、配列番号94に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号28に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目102に記載の方法。

(項目104)

前記抗体は、配列番号163に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号145に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目105)

前記抗体は、配列番号160に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号142に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目104に記載の方法。

(項目106)

前記抗体は、配列番号164に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号146に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目107)

前記抗体は、配列番号161に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号143に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目106に記載の方法。

(項目108)

前記抗体は、配列番号165に記載の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列および配列番号147に記載の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目109)

前記抗体は、配列番号162に記載の軽鎖アミノ酸配列および配列番号144に記載の重鎖アミノ酸配列を含む、項目108に記載の方法。

(項目110)

前記抗原結合タンパク質は、IL-33のST2への結合を阻害する、項目80~109のいずれかに記載の方法。

(項目111)

前記自己免疫疾患または炎症性疾患は、喘息、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患、肺線維症、敗血症および外傷、HIV感染、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、関節リウマチ、硬化症、ウェゲナー肉芽腫症、ベーチェット病、循環器疾患、副鼻腔炎、鼻ポリープ症、または好酸球性気管支炎である、項目110に記載の方法。

(項目112)

ST2抗原結合タンパク質を作製する方法であって、

- a) 項目74~79のいずれか1項に記載の組換え宿主細胞を培養することと、
- b) 前記培養物から該ST2抗原結合タンパク質を単離することを含む、方法。

(項目113)

a) 配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号19に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、抗体、または

b) 配列番号93に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号27に記載のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む重鎖を含む、抗体と交差競合する、単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1 4)

前記 S T 2 結合タンパク質は、項目 1 ~ 5 8 のいずれかに記載の S T 2 結合タンパク質である、項目 1 1 3 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1 5)

前記 S T 2 抗原結合タンパク質は、配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体と交差競合する、項目 1 1 3 または項目 1 1 4 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1 6)

ヒト S T 2 ドメイン 1 およびドメイン 2 を含むポリペプチド (配列番号 1 7 5) に結合する単離された S T 2 抗原結合タンパク質であって、前記ポリペプチドのヒト S T 2 ドメイン 1 またはドメイン 2 に単一変異が導入されると結合が有意に阻害され、ここで、前記単一変異は、L 1 4 R、I 1 5 R、S 3 3 R、E 4 3 R、V 4 7 R、A 6 2 R、G 6 5 R、T 7 9 R、D 9 2 R、D 9 7 R、V 1 0 4 R、G 1 3 8 R、N 1 5 2 R、または V 1 7 6 R である、単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1 7)

前記単一変異のうち 2 つ以上のために結合が有意に阻害される、項目 1 1 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1 8)

前記単一変異の全てのために結合が有意に阻害される、項目 1 1 7 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 1 9)

前記ポリペプチドのヒト S T 2 ドメイン 1 またはドメイン 2 に単一変異が導入されると結合が有意に活性化され、ここで、前記単一変異は、L 5 3 R、R 7 2 A、または S 7 3 R である、項目 1 1 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 0)

前記群の全てのメンバーのために結合が有意に活性化される、項目 1 1 9 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 1)

前記 S T 2 結合タンパク質は、ヒト S T 2 への結合について配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖および配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖を含む抗体と交差競合する、項目 1 1 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 2)

前記 S T 2 結合タンパク質は、項目 1 ~ 5 8 のいずれかに記載の S T 2 結合タンパク質である、項目 1 1 6 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 3)

水素 / 重水素交換分析によって決定されるように、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 ~ 3 2 2 を含む S T 2 を配列番号 1 のアミノ酸 3 3 ~ 4 4 または 8 8 ~ 9 4 内で結合する、単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 4)

水素 / 重水素交換分析によって決定されるように、前記 S T 2 結合タンパク質は、配列番号 1 のアミノ酸 3 3 ~ 4 4 および 8 8 ~ 9 4 内で結合する、項目 1 2 3 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 5)

前記 S T 2 結合タンパク質は、項目 1 ~ 5 8 のいずれかに記載の S T 2 結合タンパク質である、項目 1 2 4 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 6)

S T 2 に結合して界面を形成する単離された S T 2 抗原結合タンパク質であって、前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 K 1、F 2、P 1 9、R 2 0、Q 2 1、G 2 2、K 2 3、Y 2 6、I 7 0、V 7 1、R 7 2、S 7 3、P 7 4、T 7 5、

10

20

30

40

50

F 7 6、N 7 7、R 7 8、T 7 9、または Y 8 1 を含む、単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 7)

前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 P 1 9、R 2 0、Q 2 1、G 2 2、K 2 3、または Y 2 6 を含む、項目 1 2 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 2 8)

前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 P 1 9、R 2 0、Q 2 1、G 2 2、K 2 3、および Y 2 6 を含む、項目 1 2 7 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

10

(項目 1 2 9)

前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 I 7 0、V 7 1、R 7 2、S 7 3、P 7 4、T 7 5、F 7 6、N 7 7、R 7 8、T 7 9、または Y 8 1 を含む、項目 1 2 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3 0)

前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 I 7 0、V 7 1、R 7 2、S 7 3、P 7 4、T 7 5、F 7 6、N 7 7、R 7 8、T 7 9、および Y 8 1 を含む、項目 1 2 9 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3 1)

前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 P 1 9、R 2 0、Q 2 1、G 2 2、K 2 3、Y 2 6、I 7 0、V 7 1、R 7 2、S 7 3、P 7 4、T 7 5、F 7 6、N 7 7、R 7 8、T 7 9、および Y 8 1 を含む、項目 1 2 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

20

(項目 1 3 2)

前記結合することによって形成される前記界面は、S T 2 残基 K 1、F 2、P 1 9、R 2 0、Q 2 1、G 2 2、K 2 3、Y 2 6、I 7 0、V 7 1、R 7 2、S 7 3、P 7 4、T 7 5、F 7 6、N 7 7、R 7 8、T 7 9、および Y 8 1 を含む、項目 1 3 1 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3 3)

前記界面は、結合 S T 2 と非結合 S T 2 との間の溶媒露出の差によって決定され、界面残基は、10% を超える差を有するアミノ酸であって、かつ前記抗体と水を介した水素結合を形成するアミノ酸として定義される、項目 1 2 6 ~ 1 3 1 のいずれかに記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

30

(項目 1 3 4)

前記界面残基は、前記抗体の 5 以内に少なくとも 1 つの原子を有するアミノ酸として定義される、項目 1 2 6 ~ 1 3 1 のいずれかに記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3 5)

a) 配列番号 9 6 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する軽鎖可変ドメイン；

40

b) 配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する重鎖可変ドメイン；または

c) a) の軽鎖可変ドメインおよび b) の重鎖可変ドメイン、を含む、単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3 6)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号 9 6 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する、項目 1 3 5 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 3 7)

前記重鎖可変ドメインは、配列番号 3 0 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する、項目 1 3 5 または 1 3 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

50

(項目138)

a) 配列番号96に記載のアミノ酸配列からの10個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン；

b) 配列番号30に記載のアミノ酸配列からの10個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン；または

c) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメイン、を含む、単離されたST2抗原結合タンパク質。

(項目139)

前記軽鎖可変ドメインは、配列番号96に記載のアミノ酸配列からの5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する、項目138に記載の単離されたST2抗原結合タンパク質。

10

(項目140)

前記重鎖可変ドメインは、配列番号30に記載のアミノ酸配列からの5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する、項目138または139に記載の単離されたST2抗原結合タンパク質。

(項目141)

a) 配列番号107に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号118に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号129に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3を含む、軽鎖可変ドメイン；

20

b) 配列番号41に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号52に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号63に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3を含む、重鎖可変ドメイン；または

c) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む、単離されたST2抗原結合タンパク質。

(項目142)

前記軽鎖可変領域は、D28もしくはその保存的置換、I29もしくはその保存的置換、S30もしくはその保存的置換、N31もしくはその保存的置換、Y32もしくはその保存的置換、Y49もしくはその保存的置換、D50もしくはその保存的置換、N53もしくはその保存的置換、E55もしくはその保存的置換、T56もしくはその保存的置換、D91もしくはその保存的置換、D92もしくはその保存的置換、N93もしくはその保存的置換、F94もしくはその保存的置換、またはL96もしくはその保存的置換を含む、項目135～141のいずれかに記載の単離されたST2抗原結合タンパク質。

30

(項目143)

前記軽鎖可変領域は、D28またはその保存的置換、N31またはその保存的置換、D50またはその保存的置換、N53またはその保存的置換、E55またはその保存的置換、D91またはその保存的置換、およびD92またはその保存的置換を含む、項目142に記載の単離されたST2抗原結合タンパク質。

40

(項目144)

前記軽鎖可変領域は、D28、N31、D50、N53、E55、D91、およびD92を含む、項目143に記載の単離されたST2抗原結合タンパク質。

(項目145)

前記重鎖可変領域は、W33もしくはその保存的置換、I50もしくはその保存的置換、D57もしくはその保存的置換、R59もしくはその保存的置換、H99もしくはその保存的置換、G100もしくはその保存的置換、T101もしくはその保存的置換、S102もしくはその保存的置換、S103もしくはその保存的置換、D104もしくはその保存的置換、Y105もしくはその保存的置換、またはY106もしくはその保存的置換

50

を含む、項目 1 3 5 ~ 1 4 4 のいずれかに記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 4 6)

前記重鎖可変領域は、S 1 0 2 またはその保存的置換、S 1 0 3 またはその保存的置換、D 1 0 4 またはその保存的置換、および Y 1 0 5 またはその保存的置換を含む、項目 1 4 5 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 4 7)

前記重鎖可変領域は、S 1 0 2、S 1 0 3、D 1 0 4、および Y 1 0 5 を含む、項目 1 4 6 に記載の単離された S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 4 8)

前記抗原結合タンパク質は、 1×10^{-10} M 以下の親和性でヒト S T 2 に特異的に結合する、項目 1 1 3 ~ 1 4 7 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

10

(項目 1 4 9)

前記抗原結合タンパク質は、ヒト S T 2 のヒト I L - 3 3 への結合を阻害する、項目 1 1 3 ~ 1 4 8 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 5 0)

前記抗原結合タンパク質は、ヒト S T 2 を発現する細胞においてヒト I L - 3 3 によって媒介される S T 2 シグナル伝達を低下させる、項目 1 1 3 ~ 1 4 9 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 5 1)

前記抗原結合タンパク質は、カニクイザル S T 2 のカニクイザル I L - 3 3 への結合を阻害する、項目 1 4 9 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

20

(項目 1 5 2)

前記抗原結合タンパク質は、カニクイザル S T 2 を発現する細胞において I L - 3 3 によって媒介されるカニクイザル S T 2 シグナル伝達を低下させる、項目 1 5 1 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 5 3)

前記抗原結合タンパク質は、抗体である、項目 1 1 3 ~ 1 5 2 のいずれかに記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

(項目 1 5 4)

前記抗体は、ヒト抗体である、項目 1 5 3 に記載の S T 2 抗原結合タンパク質。

30

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図 1】S T 2 m A b による処理は、B a l b / c および C 5 7 B l / 6 マウスの気管支肺胞洗浄液 (B A L F) 中で I L - 3 3 によって誘導される I L - 5 を有意に阻害した。

【図 2】S T 2 m A b による処理は、喘息のゴキブリアレルギー (C R A) 誘発モデルにおいて有効である。S T 2 抗体で処置したマウスは、アイソタイプ対照 I g で処置したマウスよりも有意に少ない B A L F 好酸球を有していた。

【図 3】種々のドナーからの C D 4 + T 細胞からヒト I L - 3 3 によって誘導された I L - 5 の産生の阻害における S T 2 m A b 。

40

【化 1】

(一)

線は、阻害なしで、ヒト I L - 2 と組み合わせたヒト I L - 3 3 の陽性対照値を示す。

【化 2】

(…)

は、ヒト I L - 2 の陽性対照値を示す。

【化3】
 (--)

線は、培地対照値を示す。

【図4】ヒトNK細胞アッセイにおけるヒトIL-33の用量反応。

【図5】ヒトNK細胞アッセイにおいて、市販のST2抗体と比較した、Ab2によって引き起こされるIL-33活性の減少。クローンHB12、FB9、および2A5は、MBL International Corporationから入手した。クローンB4E6は、MD Biosciencesから入手した。クローン97203は、R&D Systemsから入手した。

【図6】HDXによって特定されたAb2が結合するST2の領域の位置（実施例12を参照）。ST2の細胞外ドメインのアミノ酸15～26に相当する領域を赤色で強調し、ST2の細胞外ドメインのアミノ酸70～76に相当する領域を赤紫色で強調している。

【図7】ST2/Ab2 sc-dsFv複合体の全体的な構造。2つのAb2 sc-dsFv分子がカートゥーンで示され、軽鎖(LC)/重鎖(HC)対は、それぞれシアン/青色または淡黄色/金色で着色されている。2つのST2分子を、赤紫色および緑色のカートゥーンで示す。

【図8】結合界面。ST2は、黄色のカートゥーンで示される。Ab2の重鎖および軽鎖は、グレーおよび小麦色のカートゥーンで示される。重鎖および軽鎖のCDRループは、次の順序で着色されている：CDR1：赤色(HC)または淡赤色(LC)；CDR2：緑色(HC)または薄緑色(LC)；およびCDR3：青色(HC)または薄青色(LC)。

【図9A】ST2およびAb2 sc-dsFvの静電表面電位マップ。図9A) ST2およびAb2 sc-dsFvの電荷および表面相補性。結合界面が丸で囲まれている。図9B) 左：Ab2 (グレー/小麦色のカートゥーン)は、ST2 (表面)上の正電荷を帯びたパッチに結合する；右：ST2 (黄色のカートゥーン)は、Ab2 sc-dsFv (表面)の酸性パッチに結合する。静電表面電位マップについては、赤色の表面は負電荷を表し、青色の表面は正電荷を表す。

【図9B】ST2およびAb2 sc-dsFvの静電表面電位マップ。図9A) ST2およびAb2 sc-dsFvの電荷および表面相補性。結合界面が丸で囲まれている。図9B) 左：Ab2 (グレー/小麦色のカートゥーン)は、ST2 (表面)上の正電荷を帯びたパッチに結合する；右：ST2 (黄色のカートゥーン)は、Ab2 sc-dsFv (表面)の酸性パッチに結合する。静電表面電位マップについては、赤色の表面は負電荷を表し、青色の表面は正電荷を表す。

【図10】抗原に結合した時にST2と界面を形成するAb2可変ドメイン内の残基。CDR領域は四角で囲まれている。界面内の残基を太字で示す。ST2内のアミノ酸と水素結合または塩架橋を形成する残基は、イタリック体で示される。

【発明を実施するための形態】

【0083】

本明細書において用いられる見出しは、構成上の目的のためであるに過ぎず、記載される主題を限定すると見なされるべきではない。本明細書の本文に引用される全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0084】

標準的な技術が、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、組織培養および形質転換、タンパク質精製等に用いられてもよい。酵素反応および精製技術は、製造者の規格に従って、または当該技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように行われてもよい。以下の手順および技術は、当該技術分野で周知の従来方法に従って、また本明細書を通して引用されるおよび論じられる種々の一般的なおよびより具体的な参考文献に記載されるように、一般的に行われてもよい。例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory

10

20

30

40

50

ory Manuel, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (任意の目的のために参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。具体的な定義が提供されない限り、本明細書に記載される分析化学、有機化学、ならびに医薬品および製薬化学に関連して用いられる命名法、それらの実験手順および技術は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。標準的な技術が、化学合成、化学分析、薬剤の調製、処方、および送達、ならびに患者の治療に用いられてもよい。

【0085】

ST2

本明細書に記載される抗原結合タンパク質は、ST2に結合する。ST2は、可溶性の非シグナル伝達多様体(可溶性ST2またはsST2)および完全長膜貫通型(FL-ST2、ST2、またはST2L)の両方として発現される。本明細書では、例示的なヒトST2Lアミノ酸配列を表1に提供する。このタンパク質は、いくつかのドメインから構成される:哺乳動物細胞におけるタンパク質のプロセシング中に切断され得るリーダー配列に対応するアミノ酸1~18;細胞外ドメインに対応するアミノ酸19~331;膜貫通ドメインに対応するアミノ酸332~350;および細胞内ドメインに対応するアミノ酸351~556。好ましい実施形態において、抗原結合タンパク質は、ST2Lの細胞外ドメインに結合し、ST2のIL-33との相互作用を妨げる。例示的なヒトIL-33アミノ酸配列を表1に提供する。

10

【0086】

IL-33は、ST2LおよびAcPを含むヘテロ二量体受容体を通してシグナルを伝達する。例示的なヒトAcPアミノ酸配列を表1に提供する。このタンパク質も、いくつかのドメインから構成される:哺乳動物細胞におけるタンパク質のプロセシング中に切断され得るリーダー配列に対応するアミノ酸1~20;細胞外ドメインに対応するアミノ酸21~367;膜貫通ドメインに対応するアミノ酸368~388;および細胞内ドメインに対応するアミノ酸389~570。例示的な実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、ST2Lに結合し、ST2LおよびAcPを発現する細胞においてIL-33によって媒介されるシグナル伝達を妨げる。

20

表1

【表 1】

ヒトST2アミノ酸配列 (配列番号1)	
MGFWILAILTILMYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSY TVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLKFLPAXVADSGIYTCI VRSPTFNRTGYANVTIYKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIY CPTIDLINWTAPLEWFKNCQALQGSRYRAHKSFLVIDNVMTEDA GDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSLFPVIGAPAQN EIKEVEIGKNANLTCACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKITDFGEP RIQQEEGQNQSFSNGLACLDMVLR IADVKEEDLLLQYDCLALNL HGLRRHTVRLSRKNPIDHHSIYCI IAVCSVFLMLINVLV IILKM FWIEATLLWRDIAKPYKTRNDGKLYDAYVVYPRNYKSSTDGASR VEHFVHQILPDVLENKCGYTLCIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRK SRRHIFILTPQITHNKEFAYEQEVALHCALIQNDAKVILIEMEA LSELDMLQAEALQDSLQHLMKVQGTIKWREDHIANKRSLNSKFW KHVRYQMPVPSKIPRKASSLTPLAAQKQ X = EまたはA	10
ヒトAcPアミノ酸配列 (配列番号2)	
MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPAR IKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLP ENRISKEKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEV QKDSCFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTIT WYMGCYKIQNFNNV IPEGMNL SFLIALISNNGNYTCVVTPENG RTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGEELLI PCTVYFSLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTE DETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVKQKVP APRYTVELACGFGATVLLVVLIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTD ETILDGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIF DRDSLPGGIVTDETL SFIQKSRRLLVVLSPNYVLQGTQALLELK AGLENMASRGNINVLVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKWKG EKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSLKNV	20
ヒトIL-33アミノ酸配列 (配列番号3)	
MKPKMKYSTNKIISTAKWKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCPMYF MKLRSGLMIKKEACYFRRETTKRPSLKTGRKHKRHLVLAACQQQ STVECFAFGISGVQKYTRALHDSSITGISPITEYLASLSTYNDQ SITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGDG VDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVL HNMHSNCVVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSENLCTENIL FKLSET	30

【0087】

本発明の例示的な実施形態は、ヒトおよびカニクイザルの両方のST2に高い親和性で結合する（高い親和性で結合してカニクイザルIL-33とカニクイザルST2との相互作用をブロックするものを含む）。これらの特徴により、非ヒト霊長類における有益な毒性試験が可能となる。

40

【0088】

カニクイザルST2Lの例示的なアミノ酸配列を、表2に提供する。このタンパク質は、いくつかのドメインから構成される：哺乳動物細胞におけるタンパク質のプロセッシング中に切断され得るリーダー配列に対応するアミノ酸1~18；細胞外ドメインに対応するアミノ酸19~331；膜貫通ドメインに対応するアミノ酸332~350；および細胞内ドメインに対応するアミノ酸351~556。

【0089】

カニクイザルAcPの例示的なアミノ酸配列を、表2に提供する。このタンパク質は、いくつかのドメインから構成される：哺乳動物細胞におけるタンパク質のプロセッシング中に切断され得るリーダー配列に対応するアミノ酸1~20；細胞外ドメインに対応するア

50

ミノ酸 21 ~ 367 ; 膜貫通ドメインに対応するアミノ酸 368 ~ 388 ; および細胞内ドメインに対応するアミノ酸 389 ~ 570。

【0090】

カニクイザル IL - 33 の例示的なアミノ酸配列を、表 2 に提供する。

表 2

【表 2】

<p>カニクイザル ST2 アミノ酸配列 (配列番号 4)</p> <p>MGLWILAILTILVYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKSSY IVDWYYSQTNKSIPTQERNRVFASGQLLKFLPAEVADSGIYTCI VRSPTFNRTGYANVTIYKKQPDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIY CPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQGSRYKAHKSFLVIDNVMTDDA GDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQGFSRFPVIRAPAHN ETKEVEIGENTNLTCACFGKGAQFLATVQWQLNGNKITDFSEP RIQQEEGQNQSF SNGLACVNTVLR IADVKEEDLLLR YDCLALNL HGLRRHTIRLSRKNPIDHQSTYCI IAVCSVLLMLINILVILKLT FWIEATLLWRDIAKPYKTRNDGKLYDAYVIYPRNYTSSADGASR VEYFVHQIILPDVLENKCGYTLCIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRK SRRHIFILTPQITHSEEFAYEQEVALHSALIQNDSKVILIEMEA LSELDMLQAEALQDSLRLHMEVQGTIKWREDHVANKRSLNSKFW KHVRYQMPVPSKMPRKASSLTSLAAQKQ</p>	10
<p>カニクイザル AcP アミノ酸配列 (配列番号 5)</p> <p>MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPAR IKCPLFEHFLKFNYSTAHSAGLTLIYWTRQDRDLEEPINFRLP ENRISKEKDVLWFRPTLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEV QKDS CFNSPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSSVKPTIT WYMG CYKI QNFNNVIPEGMNL SFLIAFISNNGNYTCVV TYPENG RTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPEGEELLI PCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDIPIDVTINESISHSRTE DETRTQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAATVKQKVP APRYTVELACGFGATVLLVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTD ETILDGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIF DRDSLPGGIVTDETL SFIQKSRLLVVLSPNYVLQGTQALLELK AGLENMASQGNINVILVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKWKG EKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSSLKNV</p>	20
<p>カニクイザル IL-33 アミノ酸配列 (配列番号 6)</p> <p>MKPKMKYSTNKI STAKRKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCHVYF MKLRSGLMIKKEACYFRRETTKRPSLKTGGGKHKHGLVLAACQQQ STVECFAFGISGVPKYTRALHDSSITGISPITESLASLSTYNDQ SITFALEDESIEIYVEDLKKDKKKDKVLLSYYESQHPSSES GDG VDGKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSVELHKCEKPLPDQAFFVL HNRSFNVCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDHSEN LGSENI FKLSEI</p>	30
	40

【0091】

ST2 抗原結合タンパク質

本発明は、ST2 に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質の実施形態は、ST2 に特異的に結合するペプチドおよび / またはポリペプチドを含む。そのようなペプチドまたはポリペプチドは、任意選択的に、1 つ以上の翻訳後修飾を含む。抗原結合タンパク質の実施形態は、本明細書において様々に定義されるように、ST2 に特異的に結合する抗体およびその断片を含む。これらは、IL - 33 が ST2 に結合するおよび / または ST2 を活性化するのを阻害するものを含む、ヒト ST2 に特異的に結合する抗体を含む。

【0092】

本発明の抗原結合タンパク質は、ST2に特異的に結合する。本明細書で使用される「特異的に結合する」とは、抗原結合タンパク質が、他のタンパク質よりも優先的にST2に結合することを意味する。いくつかの実施形態において、「特異的に結合する」とは、ST2抗原結合タンパク質が、他のタンパク質に対するよりも高い親和性をST2に対して有することを意味する。ST2に特異的に結合するST2抗原結合タンパク質は、 1×10^{-7} M以下、 2×10^{-7} M以下、 3×10^{-7} M以下、 4×10^{-7} M以下、 5×10^{-7} M以下、 6×10^{-7} M以下、 7×10^{-7} M以下、 8×10^{-7} M以下、 9×10^{-7} M以下、 1×10^{-8} M以下、 2×10^{-8} M以下、 3×10^{-8} M以下、 4×10^{-8} M以下、 5×10^{-8} M以下、 6×10^{-8} M以下、 7×10^{-8} M以下、 8×10^{-8} M以下、 9×10^{-8} M以下、 1×10^{-9} M以下、 2×10^{-9} M以下、 3×10^{-9} M以下、 4×10^{-9} M以下、 5×10^{-9} M以下、 6×10^{-9} M以下、 7×10^{-9} M以下、 8×10^{-9} M以下、 9×10^{-9} M以下、 1×10^{-10} M以下、 2×10^{-10} M以下、 3×10^{-10} M以下、 4×10^{-10} M以下、 5×10^{-10} M以下、 6×10^{-10} M以下、 7×10^{-10} M以下、 8×10^{-10} M以下、 9×10^{-10} M以下、 1×10^{-11} M以下、 2×10^{-11} M以下、 3×10^{-11} M以下、 4×10^{-11} M以下、 5×10^{-11} M以下、 6×10^{-11} M以下、 7×10^{-11} M以下、 8×10^{-11} M以下、 9×10^{-11} M以下、 1×10^{-12} M以下、 2×10^{-12} M以下、 3×10^{-12} M以下、 4×10^{-12} M以下、 5×10^{-12} M以下、 6×10^{-12} M以下、 7×10^{-12} M以下、 8×10^{-12} M以下、または 9×10^{-12} M以下のヒトST2に対する結合親和性を有し得る。

【0093】

抗原結合タンパク質の結合親和性を測定する方法は、当該技術分野において周知である。親和性を決定するために一般的に用いられる方法は、表面プラズモン共鳴法(SPR)(Morton and Myszk a “Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors” Methods in Enzymology (1998) 295, 268-294)、バイオレイヤー干渉法(Abdiche et al “Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet” Analytical Biochemistry (2008) 377, 209-217)、結合平衡除外アッセイ(KinExA)(Darling and Brault “Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions” Assay and Drug Dev Tech (2004) 2, 647-657)、等温熱量測定(Pierce et al “Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions” Methods (1999) 19, 213-221)、および分析用超遠心分離法(Lebowitz et al “Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review” Protein Science (2002), 11: 2067-2079)を含む。実施例3は、例示的な方法を提供する。

【0094】

本明細書に記載されるST2結合抗体の種々の実施形態に言及がなされる場合、そのST2結合断片も包含されることを理解されたい。ST2-結合断片は、ST2に特異的に結合する能力を保持する本明細書に記載される抗体断片またはドメインのうちいずれをも含む。ST2-結合断片は、本明細書に記載される足場のうちいずれであってもよい。

【0095】

ある特定の治療的实施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、ST2のIL-33への結合を阻害し、かつ/または、例えば、IL-33によって媒介されるシグナル伝達等の、ST2のIL-33への結合に関連する1つ以上の生物学的活性を阻害する。そのような抗原結合タンパク質は「中和」と言われている。ある特定の实施形態において、中和ST2抗原結合タンパク質は、ST2に特異的に結合し、ST2のIL-33への結合を10%~100%の範囲、例えば、少なくとも約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、またはそれ以上阻害する。例えば、ST2抗原結合タンパク質は、該抗原結合タンパク質が、IL-33のST2への、またはIL-33の共受容体ST2およびAcPへの結合をブロックする能力を特定することにより、中和能について検査することができる(例えば、実施例6のIL-33ブロッキングアッセイを参照のこと)。代替として、ST2抗原結合タンパク質は、IL-33によって媒介される生物学的機能を測定するアッセイにおいてST2抗原結合タンパク質の存在の影響を測定するアッセイにおける中和能について検査することができる。例えば、IL-33が、細胞内シグナル伝達、または、好酸球、好塩基球、T細胞、マスト細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、もしくは自然ヘルパー細胞等の細胞からのサイトカインおよびケモカイン等のメディエーターのmRNA発現もしくはメディエーターの分泌の増加等の生物学的応答を誘導する能力である。代替として、IL-33が、好酸球、好塩基球、T細胞、マスト細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、または自然ヘルパー細胞等の細胞の分化、増殖、生存、走化性、形状変化、または接着性を促進する能力である。代替として、IL-33が、好酸球、好塩基球、T細胞、マスト細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、または自然ヘルパー細胞等の細胞上で、CD11b等の細胞活性化の特定のマーカーの細胞表面発現を誘導する能力である。例示的な方法を、実施例7~10に提供する。

10

20

【0096】

本明細書において様々に定義されるように、抗原結合タンパク質の実施形態は、1つ以上の相補性決定領域(CDR)とともに、足場構造を含む。実施形態は、重鎖または軽鎖のいずれかの1つ以上の抗体可変ドメインを有する足場構造を含む抗原結合タンパク質をさらに含む。実施形態は、Ab1軽鎖可変ドメイン(LCv)、Ab2 LCv、Ab3 LCv、Ab4 LCv、Ab5 LCv、Ab6 LCv、Ab7 LCv、Ab8 LCv、Ab9 LCv、Ab10 LCv、Ab11 LCv、Ab30 LCv、Ab32 LCv、およびAb33 LCv(それぞれ、配列番号95~105、163-165)からなる群から選択される軽鎖可変ドメイン、ならびに/または、Ab1重鎖可変ドメイン(HCv)、Ab2 HCv、Ab3 HCv、Ab4 HCv、Ab5 HCv、Ab6 HCv、Ab7 HCv、Ab8 HCv、Ab9 HCv、Ab10 HCv、Ab11 HCv、Ab30 HCv、Ab32 HCv、およびAb33 HCv(それぞれ、配列番号29~39、145~147)からなる群から選択される重鎖可変ドメイン、ならびにその断片、誘導體、ムテイン、および多様体を含む抗体を含む。

30

40

【0097】

Ab1 LCvを含む例示的な軽鎖は、配列番号84に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。

【0098】

Ab2 LCvを含む例示的な軽鎖は、配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。

【0099】

50

- A b 3 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0100】
- A b 4 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0101】
- A b 5 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0102】
- A b 6 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。 10
【0103】
- A b 7 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0104】
- A b 8 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 9 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0105】
- A b 9 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。 20
【0106】
- A b 10 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 9 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0107】
- A b 11 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 9 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0108】
- A b 30 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 1 6 0 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0109】 30
- A b 32 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 1 6 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0110】
- A b 33 L C v を含む例示的な軽鎖は、配列番号 1 6 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖である。
【0111】
- A b 1 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 1 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。
【0112】
- A b 2 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 1 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖 40
である。
【0113】
- A b 3 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖
である。
【0114】
- A b 4 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖
である。
【0115】
- A b 5 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖
である。 50

【0116】

A b 6 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 3 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0117】

A b 7 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0118】

A b 8 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0119】

A b 9 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

10

【0120】

A b 1 0 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0121】

A b 1 1 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 2 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0122】

A b 3 0 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 1 4 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

20

【0123】

A b 3 2 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 1 4 3 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0124】

A b 3 3 H C v を含む例示的な重鎖は、配列番号 1 4 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖である。

【0125】

想定される足場のさらなる例として、フィブロネクチン、ネオカルチノスタチン C B M 4 - 2、リポカリン、T 細胞受容体、プロテイン A ドメイン (プロテイン Z)、I m 9、T P R タンパク質、ジンクフィンガードメイン、p V I I I、トリ膵臓ポリペプチド、G C N 4、W W ドメイン、S r c 相同ドメイン 3、P D Z ドメイン、T E M - 1 ラクタマーゼ、チオレドキシン、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、P H D フィンガードメイン、C L - 2、B P T I、A P P I、H P S T I、エコチン、L A C I - D 1、L D T I、M T I - I I、サソリ毒素、昆虫デフェンシン - A ペプチド、E E T I - I I、M i n - 2 3、C B D、P B P、チトクロム b - 5 6 2、L d l 受容体ドメイン、ガンマ - クリスタリン、ユビキチン、トランスフェリン、およびまたは C 型レクチン様ドメインが挙げられる。非抗体足場およびそれらの治療薬としての使用法は、G e b a u e r a n d S k e r r a , C u r r . O p i n . C h e m . B i o l . , 1 3 : 2 4 5 - 2 5 5 (2 0 0 9) および B i n z e t a l . , N a t . B i o t e c h . , 2 3 (1 0) : 1 2 5 7 - 1 2 6 8 (2 0 0 5) (参照により、その全体が本明細書に組み込まれる) に概説されている。

30

40

【0126】

本発明の態様は、以下の可変ドメインを含む抗体を含む：A b 1 L C v / A b 1 H C v (配列番号 9 5 / 配列番号 2 9)、A b 2 L C v / A b 2 H C v (配列番号 9 6 / 配列番号 3 0)、A b 3 L C v / A b 3 H C v (配列番号 9 7 / 配列番号 3 1)、A b 4 L C v / A b 4 H C v (配列番号 9 8 / 配列番号 3 2)、A b 5 L C v / A b 5 H C v (配列番号 9 9 / 配列番号 3 3)、A b 6 L C v / A b 6 H C v (配列番号 1 0 0 / 配列番号 3 4)、A b 7 L C v / A b 7 H C v (配列番号 1 0 1 / 配列番号 3 5)、A b 8 L C v / A b 8 H C v (配列番号 1 0 2 / 配列番号 3 6)、A b

50

9 LCv / Ab9 HCv (配列番号103 / 配列番号37)、Ab10 LCv / Ab10 HCv (配列番号104 / 配列番号38)、Ab11 LCv / Ab11 HCv (配列番号105 / 配列番号39)、Ab30 LCv / Ab30 HCv (配列番号163 / 配列番号145)、Ab32 LCv / Ab32 HCv (配列番号164 / 配列番号146)、Ab33 LCv / Ab33 HCv (配列番号165 / 配列番号147)、およびこれらの組み合わせ、ならびにその断片、誘導體、ムテイン、および多様体。

【0127】

本発明の例示的な抗体は、Ab1 (配列番号84 / 配列番号18)、Ab2 (配列番号85 / 配列番号19)、Ab3 (配列番号86 / 配列番号20)、Ab4 (配列番号87 / 配列番号21)、Ab5 (配列番号88 / 配列番号22)、Ab6 (配列番号89 / 配列番号23)、Ab7 (配列番号90 / 配列番号24)、Ab8 (配列番号91 / 配列番号25)、Ab9 (配列番号92 / 配列番号26)、Ab10 (配列番号93 / 配列番号27)、Ab11 (配列番号94 / 配列番号28)、Ab30 (配列番号160 / 配列番号142)、Ab32 (配列番号161 / 配列番号143)、およびAb33 (配列番号162 / 配列番号144)を含む。

10

【0128】

典型的には、抗体の軽鎖または重鎖の各可変ドメインは、3つのCDRを含む。重鎖可変ドメインは、重鎖CDR1 (HCDR1)、重鎖CDR2 (HCDR2)、および重鎖CDR3 (HCDR3)を含む。軽鎖可変ドメインは、軽鎖CDR1 (LCDR1)、軽鎖CDR2 (LCDR2)、および軽鎖CDR3 (LCDR3)を含む。ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、本明細書に記載される好ましい可変ドメイン内に含有される1つ以上のCDRを含む。

20

【0129】

そのようなCDRの例は、以下のCDRが挙げられるが、これらに限定されない：

【0130】

Ab1 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号106)、LCDR2 (配列番号117)、およびLCDR3 (配列番号128)；

【0131】

Ab2 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号107)、LCDR2 (配列番号118)、およびLCDR3 (配列番号129)；

30

【0132】

Ab3 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号108)、LCDR2 (配列番号119)、およびLCDR3 (配列番号130)；

【0133】

Ab4 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号109)、LCDR2 (配列番号120)、およびLCDR3 (配列番号131)；

【0134】

Ab5 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号110)、LCDR2 (配列番号121)、およびLCDR3 (配列番号132)；

40

【0135】

Ab6 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号111)、LCDR2 (配列番号122)、およびLCDR3 (配列番号133)；

【0136】

Ab7 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号112)、LCDR2 (配列番号123)、およびLCDR3 (配列番号134)；

【0137】

Ab8 LCvのCDR：LCDR1 (配列番号113)、LCDR2 (配列番号124)、およびLCDR3 (配列番号135)；

【0138】

50

- Ab9 LCvのCDR：LCDR1（配列番号114）、LCDR2（配列番号125）、およびLCDR3（配列番号136）；
【0139】
- Ab10 LCvのCDR：LCDR1（配列番号115）、LCDR2（配列番号126）、およびLCDR3（配列番号137）；
【0140】
- Ab11 LCvのCDR：LCDR1（配列番号116）、LCDR2（配列番号127）、およびLCDR3（配列番号138）；
【0141】
- Ab30 LCvのCDR：LCDR1（配列番号166）、LCDR2（配列番号169）、およびLCDR3（配列番号172）；
【0142】
- Ab32 LCvのCDR：LCDR1（配列番号167）、LCDR2（配列番号170）、およびLCDR3（配列番号173）；
【0143】
- Ab33 LCvのCDR：LCDR1（配列番号168）、LCDR2（配列番号171）、およびLCDR3（配列番号174）；
【0144】
- Ab1 HCvのCDR：HCDR1（配列番号40）、HCDR2（配列番号51）、およびHCDR3（配列番号62）；
【0145】
- Ab2 HCvのCDR：HCDR1（配列番号41）、HCDR2（配列番号52）、およびHCDR3（配列番号63）；
【0146】
- Ab3 HCvのCDR：HCDR1（配列番号42）、HCDR2（配列番号53）、およびHCDR3（配列番号64）；
【0147】
- Ab4 HCvのCDR：HCDR1（配列番号43）、HCDR2（配列番号54）、およびHCDR3（配列番号65）；
【0148】
- Ab5 HCvのCDR：HCDR1（配列番号44）、HCDR2（配列番号55）、およびHCDR3（配列番号66）；
【0149】
- Ab6 HCvのCDR：HCDR1（配列番号45）、HCDR2（配列番号56）、およびHCDR3（配列番号67）；
【0150】
- Ab7 HCvのCDR：HCDR1（配列番号46）、HCDR2（配列番号57）、およびHCDR3（配列番号68）；
【0151】
- Ab8 HCvのCDR：HCDR1（配列番号47）、HCDR2（配列番号58）、およびHCDR3（配列番号69）；
【0152】
- Ab9 HCvのCDR：HCDR1（配列番号48）、HCDR2（配列番号59）、およびHCDR3（配列番号70）；
【0153】
- Ab10 HCvのCDR：HCDR1（配列番号49）、HCDR2（配列番号60）、およびHCDR3（配列番号71）；
【0154】
- Ab11 HCvのCDR：HCDR1（配列番号50）、HCDR2（配列番号61）、およびHCDR3（配列番号72）；

【0155】

Ab30 HCVのCDR：HCDR1（配列番号148）、HCDR2（配列番号151）、およびHCDR3（配列番号154）；

【0156】

Ab32 HCVのCDR：HCDR1（配列番号149）、HCDR2（配列番号152）、およびHCDR3（配列番号155）；ならびに

【0157】

Ab33 HCVのCDR：HCDR1（配列番号150）、HCDR2（配列番号153）、およびHCDR3（配列番号156）。

【0158】

いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、A)ポリペプチド、例えば、配列番号106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、166、167、および168からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR1；配列番号117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、169、170、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR2；ならびに/もしくは配列番号128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCDR3を含む軽鎖、ならびに/またはB)ポリペプチド、例えば、配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、148、149、および150からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1；配列番号51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、151、152、および153からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR2；ならびに/もしくは配列番号62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、154、155、および156からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR3を含む重鎖を含む。

【0159】

さらなる実施形態において、抗原結合タンパク質は、A)Ab1 LCV、Ab2 LCV、Ab3 LCV、Ab4 LCV、Ab5 LCV、Ab6 LCV、Ab7 LCV、Ab8 LCV、Ab9 LCV、Ab10 LCV、Ab11 LCV、Ab30 LCV、Ab32 LCV、およびAb33 LCVのうちのいずれかのLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖アミノ酸配列、ならびにB)Ab1 HCV、Ab2 HCV、Ab3 HCV、Ab4 HCV、Ab5 HCV、Ab6 HCV、Ab7 HCV、Ab8 HCV、Ab9 HCV、Ab10 HCV、Ab11 HCV、Ab30 HCV、Ab32 HCV、およびAb33 HCVのうちのいずれかのHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖アミノ酸配列を含む。

【0160】

ある特定の実施形態において、CDRは、本明細書に記載される例示的なCDRからの1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。

【0161】

本発明の態様は、配列番号95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、163、164、および165からなる群から選択される軽鎖可変ドメインを含む抗体を含む。本発明の態様は、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、145、146、および147からなる群から選択される重鎖可変ドメインを含む抗体を含む。本発明のさらなる態様は、A)配列番号95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、163、164、および165からなる群から選択される軽鎖可変ドメイン、ならびにB)配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、145、146、および147からなる群から選択される重鎖可変ドメインを含む抗体を含む。

【0162】

10

20

30

40

50

本発明の抗体は、当該技術分野で既知の任意の定常領域を含むことができる。軽鎖定常領域は、例えば、 κ 型または λ 型軽鎖定常領域、例えば、ヒト κ 型または λ 型軽鎖定常領域であり得る。重鎖定常領域は、例えば、 μ 型、 δ 型、 γ 型、 ϵ 型、または μ 型重鎖定常領域、例えば、ヒト μ 型、 δ 型、 γ 型、 ϵ 型、または μ 型重鎖定常領域であり得る。一実施形態において、軽鎖または重鎖定常領域は、天然に存在する定常領域の断片、誘導体、多様体、またはムテインである。

【0163】

本発明の態様は、1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、6つ以下の、7つ以下の、8つ以下の、9つ以下の、または10個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する配列番号95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、163、164、および165からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む抗体を含む。本発明の態様は、1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、6つ以下の、7つ以下の、8つ以下の、9つ以下の、または10個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、145、146、および147からなる群から選択される重鎖可変領域を含む抗体を含む。本発明のさらなる態様は、A) 1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、6つ以下の、7つ以下の、8つ以下の、9つ以下の、または10個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する配列番号95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、163、164、および165からなる群から選択される軽鎖可変領域、ならびにB) 1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、6つ以下の、7つ以下の、8つ以下の、9つ以下の、または10個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、145、146、および147からなる群から選択される重鎖可変領域を含む抗体を含む。

10

20

【0164】

一変形例において、抗原結合タンパク質は、配列番号95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、163、164、および165からなる群から選択される軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。別の変形例において、抗原結合タンパク質は、配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、145、146、および147からなる群から選択される重鎖可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態において、抗原結合タンパク質は、A) 配列番号95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、163、164、および165からなる群から選択される軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列、およびB) 配列番号29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、145、146、および147から

30

40

50

なる群から選択される重鎖可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0165】

ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、軽鎖および/または重鎖CDR3を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、配列番号128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、172、173、174、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、154、155、および156に記載される配列の群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、アミノ酸配列は、配列番号128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、172、173、174、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、154、155、および156に記載される例示的な配列からの1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。よって、本発明の実施形態は、配列番号128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、172、173、174、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、154、155、および156に記載される配列の群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質を含む。

10

20

【0166】

ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、軽鎖および/または重鎖CDR2を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、配列番号117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、169、170、171、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、151、152、および153に記載される配列の群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、アミノ酸配列は、配列番号117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、169、170、171、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、151、152、および153に記載される例示的な配列からの1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。よって、本発明の実施形態は、配列番号117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、169、170、171、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、151、152、および153に記載される配列の群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む抗原結合タンパク質を含む。

30

40

【0167】

ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、軽鎖および/または重鎖CDR

50

1を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、配列番号106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、166、167、168、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、148、149、および150に記載される配列の群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、アミノ酸配列は、配列番号106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、166、167、168、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、148、149、および150に記載される例示的な配列からの1つ以下の、2つ以下の、3つ以下の、4つ以下の、5つ以下の、または6つ以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を含む。よって、本発明の実施形態は、配列番号106、107、108、109、

10

【0168】

20

本発明の抗原結合タンパク質は、ヒトおよびモノクローナル抗体、二重特異性抗体、ダイアポディ、ミニポディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書において「抗体模倣体」と称されることがある）、キメラ抗体、抗体融合体（「抗体コンジュゲート」と称されることがある）を含む従来の抗体の足場、および各々の断片をそれぞれ含む。CDRの種々の組み合わせを含む上述のCDRは、それに続く足場のいずれにも移植されてもよい。

【0169】

本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、本明細書において様々に記載されるように、抗原に特異的に結合する、1つ以上のポリペプチド鎖を含む単量体または多量体タンパク質の種々の形態を指す。ある特定の実施形態において、抗体は、組換えDNA技術によって産生される。さらなる実施形態において、抗体は、天然に存在する抗体の酵素切断または化学切断によって産生される。別の態様において、抗体は、a) ヒト抗体；b) ヒト化抗体；c) キメラ抗体；d) モノクローナル抗体；e) ポリクローナル抗体；f) 組換え抗体；g) 抗原-結合断片；h) 単鎖抗体；i) ダイアポディ；j) トリアポディ、k) テトラポディ、l) Fab断片；m) F(ab')₂断片、n) IgA抗体、o) IgD抗体、p) IgE抗体、q) IgG1抗体、r) IgG2抗体、s) IgG3抗体、t) IgG4抗体、およびu) IgM抗体からなる群から選択される。

30

【0170】

可変領域またはドメインは、フレームワーク領域（FR1、FR2、FR3、およびFR4フレームワーク領域と称される）に取り囲まれた少なくとも3つの重鎖または軽鎖CDRを含む。Kabata et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. 従来の抗体の構造単位は、典型的には四量体を含む。各四量体は、典型的には、それぞれの対が1つの「軽」鎖および1つの「重」鎖を有するポリペプチド鎖の2つの同一の対からなる。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100~110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、軽鎖または軽鎖として分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、または ϵ として分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして定義する。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むがこれらに限定されないいくつかのサブクラスを有する。IgMは、IgM1

40

50

および I g M 2 を含むがこれらに限定されないサブクラスを有する。本発明の実施形態は、本明細書に記載されるように、抗原結合タンパク質の可変ドメインまたは C D R を組み込む抗体の全てのそのようなクラスおよびサブクラスを含む。

【 0 1 7 1 】

ラクダおよびラマに見出される抗体等のいくつかの天然に存在する抗体は、2つの重鎖からなり、軽鎖を含まない二量体である。本発明は、S T 2 に結合することができる2つの重鎖またはその断片の二量体抗体を包含する。

【 0 1 7 2 】

重鎖および軽鎖の可変領域は、典型的には、3つの超可変領域、すなわち、相補性決定領域または C D R によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域 (F R) の同じ全体構造を示す。C D R は、主に抗原認識および結合を担う。各対の2つの鎖からの C D R は、フレームワーク領域によって整列させられ、特異的エピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端に向けての、軽鎖および重鎖の両方が、ドメイン F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、および F R 4 を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、K a b a t の定義に従う。

10

【 0 1 7 3 】

C D R は、抗原結合のための主要な表面接触点を構成する。C D R 3 または軽鎖、および特に重鎖の C D R 3 は、軽鎖および重鎖可変領域内の抗原結合における最も重要な決定基を構成し得る。いくつかの抗体において、重鎖 C D R 3 は、抗原と抗体との間の主要な接触領域を構成すると考えられる。抗体の結合特性を変化させるために、またはどの残基が抗原の結合に寄与するかを決定するために、C D R 3 のみを変化させた *i n v i t r o* 選択スキームを用いることができる。

20

【 0 1 7 4 】

天然に存在する抗体は、典型的には、タンパク質分泌のための細胞経路内に抗体を誘導し、かつ典型的には成熟抗体には存在しない、シグナル配列を含む。本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドは、後述のように、天然に存在するシグナル配列、または異種のシグナル配列をコードしてもよい。

【 0 1 7 5 】

一実施形態において、抗原結合タンパク質は、本明細書に記載される例示的な C D R のうちの 1 ~ 6 つを含む抗体である。本発明の抗体は、I g M、I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 を含む)、I g D、I g A、または I g E 抗体を含むいずれの種類の抗体であってもよい。具体的な実施形態において、抗原結合タンパク質は、I g G 型抗体、例えば、I g G 1 抗体である。

30

【 0 1 7 6 】

いくつかの実施形態において、例えば、抗原結合タンパク質が完全な重鎖および軽鎖を有する抗体である場合、C D R は全て同じ種、例えば、ヒトに由来する。代替として、例えば、抗原結合タンパク質が、上で概説した配列からの6個未満の C D R を含有する実施形態では、さらなる C D R は、他の種に由来してもよいが、または例示的な配列に示されるものとは異なるヒト C D R であってもよい。例えば、本明細書で特定される適切な配列からの H C D R 3 および L C D R 3 領域が、代替の種、または異なるヒト抗体配列、またはそれらの組み合わせから任意選択的に選択される H C D R 1、H C D R 2、L C D R 1、および L C D R 2 とともに用いられてもよい。例えば、本発明の C D R は、商業用キメラ抗体またはヒト化抗体の C D R 領域に取って代わることができる。

40

【 0 1 7 7 】

具体的な実施形態は、ヒト成分である抗原結合タンパク質の足場成分を利用する。いくつかの実施形態において、しかしながら、足場成分は、異なる種からの混合物であってもよい。そのため、抗原結合タンパク質が抗体である場合、そのような抗体は、キメラ抗体および/またはヒト化抗体であり得る。一般的に、「キメラ抗体」および「ヒト化抗体」は両方とも、1つより多くの種に由来する領域を組み合わせた抗体を指す。例えば、「キメラ抗体」は、従来、マウス(または場合によってはラット)の可変領域(複数可)とヒト

50

の定常領域（複数可）を含む。

【0178】

「ヒト化抗体」は、通常、可変ドメインフレームワーク領域をヒト抗体に見出される配列と交換した非ヒト抗体を指す。通常、ヒト化抗体において、1つ以上のCDRを除く抗体全体がヒト起源のポリヌクレオチドによってコードされるか、または1つ以上のCDR内を除いてそのような抗体と同一である。一部または全部が非ヒト生物を起源とする核酸によってコードされるCDRは、ヒト抗体可変領域のシートフレームワークに移植され、移植したCDRによって特異性が決定される抗体を作製する。そのような抗体の作製については、例えば、国際公開第WO92/11018号、Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536に記載されている。ヒト化抗体はまた、遺伝子操作された免疫系を有するマウスを用いて作製することもできる。Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654。本明細書に記載される例示的な実施形態において、特定されたCDRはヒトであり、よって、この文脈においてヒト化抗体およびキメラ抗体の両方がいくつかの非ヒトCDRを含む：例えば、HC DR3およびLC DR3領域を含むヒト化抗体が作製されてもよく、他のCDR領域のうちの1つ以上は異なる種起源である。

10

【0179】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、多重特異性抗体、特に、二重特異性抗体であり、時には「ダイアボディ」とも称される。これらは、2つ以上の異なる抗原、または単一抗原上の異なるエピトープに結合する抗体である。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、ST2およびヒトエフェクター細胞（例えば、T細胞）上の抗原に結合する。そのような抗体は、エフェクター細胞応答に、ST2を発現する腫瘍細胞等のST2発現細胞を標的とさせる上で有用である。好ましい実施形態において、ヒトエフェクター細胞の抗原は、CD3である。米国特許第7,235,641号。二重特異性抗体を作製する方法は、当該技術分野において既知である。1つのそのような方法は、細胞内で共発現された時に重鎖のヘテロ二量体形成を促進する「ノブ」および「ホール」を形成するように重鎖のFc部分を遺伝子操作することを含む。米国特許第7,695,963号。他の方法も、重鎖のFc部分を遺伝子操作することを含むが、細胞内で共発現された時に重鎖のヘテロ二量体形成を阻止しながらヘテロ二量体形成を促進するために静電ステアリングを用いる。国際公開第WO09/089,004号（参照により、その全体が本明細書に組み込まれる）。

20

30

【0180】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、ミニボディである。ミニボディは、CH3ドメインに結合されたscFvを含む、縮小化された抗体様タンパク質である。Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061。

【0181】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、ドメイン抗体である：例えば米国特許第6,248,516号を参照のこと。ドメイン抗体（dAb）は、ヒト抗体の重鎖（VH）または軽鎖（VL）のいずれかの可変領域に対応する抗体の機能的結合ドメインである。dAbは、約13kDaの分子量を有するか、または完全抗体の10分の1未満のサイズである。dAbは、細菌、酵母、および哺乳動物細胞系を含む様々な宿主において良好に発現される。さらに、dAbは高度に安定であり、たとえ凍結乾燥または熱変性等の過酷な条件に供された後であっても活性を保持する。例えば、米国特許第6,291,158号；6,582,915号；6,593,081号；6,172,197号；米国特許出願第2004/0110941号；欧州特許第0368684号；米国特許第6,696,245号、国際公開第WO04/058821号、同第WO04/003019号および同第WO03/002609を参照のこと。

40

【0182】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、抗体断片、すなわち、ST2への

50

結合特異性を保持する本明細書に概説される抗体のうちのいずれかの断片である。種々の実施形態において、抗体結合タンパク質は、限定されないが、 $F(ab)$ 、 $F(ab')$ 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、または単鎖 Fv 断片を含む。最低でも、本明細書において意味される抗体は、軽鎖または重鎖可変領域、例えば1つ以上のCDRの全部または一部を含むST2に特異的に結合することができるポリペプチドを含む。

【0183】

ST2に結合する抗体断片のさらなる例として、限定されないが、(i)VL、VH、CL、およびCH1ドメインをからなるFab断片、(ii)VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iii)単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFv断片；(iv)単一可変部分からなるdAb断片(Ward et al., 1989, Nature 341:544-546)、(v)単離されたCDR領域、(vi)2つの連結したFab断片を含む二価断片である、 $F(ab')_2$ 断片、(vii)VHドメインとVLドメインが、2つのドメインを関連させて抗原結合部位を形成することができるペプチドリンカーによって連結された単鎖Fv分子(scFv)(Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883)、(viii)二重特異性単鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)、および(ix)遺伝子融合によって構築される多価または多重特異性断片である、「ダイアボディ」または「トリアボディ」(Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479；国際公開第WO94/13804号；Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448)が挙げられる。抗体断片は、修飾されてもよい。例えば、VHドメインとVLドメインを連結するジスルフィド架橋の組み込みによって、分子を安定させてもよい(Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245)。本発明の態様は、これらの断片の非CDR成分がヒト配列である実施形態を含む。

【0184】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、完全にヒト抗体である。この実施形態において、上で概説したように、特定の構造は、CDR領域を含む図示された完全な重鎖および軽鎖を含む。さらなる実施形態は、本発明のCDRのうちの1つ以上を利用し、他のCDR、フレームワーク領域、JおよびD領域、定常領域等は、他のヒト抗体に由来する。例えば、本発明のCDRは、任意の数のヒト抗体、特に、商業用抗体のCDRに取って代わることができる。

【0185】

単鎖抗体は、重鎖および軽鎖可変ドメイン(Fv領域)の断片を、アミノ酸架橋(短いペプチドリンカー)を介して連結させ、単一ポリペプチド鎖を生じさせることによって形成されてもよい。そのような単鎖Fv(scFv)は、2つの可変ドメインポリペプチド(V_LおよびV_H)をコードするDNA間に、ペプチドリンカーをコードするDNAを融合することによって調製されている。得られたポリペプチドは、2つの可変ドメインの間の柔軟なリンカーの長さに応じて、それ自体の上で折り畳んで、抗原に結合する単量体を形成することができるか、またはそれらは多量体(例えば、二量体、三量体、もしくは四量体)を形成することができる(Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423；Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108)。異なるV_LおよびV_Hを含むポリペプチドを組み合わせることにより、異なるエピトープに結合する多量体scFvを形成することができる(Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40)。単鎖抗体の産生のために開発された技術は、米国特許第4,946,778号；Bird, 1988, Science 242:423；Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879；Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002

, *Methods Mol Biol*, 178:379-87に記載されるものを含む。本明細書に提供される抗体(限定されないが、Ab1 LCv/Ab1 HCv(配列番号95/配列番号29)、Ab2 LCv/Ab2 HCv(配列番号96/配列番号30)、Ab3 LCv/Ab3 HCv(配列番号97/配列番号31)、Ab4 LCv/Ab4 HCv(配列番号98/配列番号32)、Ab5 LCv/Ab5 HCv(配列番号99/配列番号33)、Ab6 LCv/Ab6 HCv(配列番号100/配列番号34)、Ab7 LCv/Ab7 HCv(配列番号101/配列番号35)、Ab8 LCv/Ab8 HCv(配列番号102/配列番号36)、Ab9 LCv/Ab9 HCv(配列番号103/配列番号37)、Ab10 LCv/Ab10 HCv(配列番号104/配列番号38)、およびAb11 LCv/Ab11 HCv(配列番号105/配列番号39)、Ab30 LCv/Ab30 HCv(配列番号163/配列番号145)、Ab32 LCv/Ab32 HCv(配列番号164/配列番号146)、Ab33 LCv/Ab33 HCv(配列番号165/配列番号147)の可変ドメインの組み合わせを含むscFvを含む)およびそれらの組み合わせに由来する単鎖抗体が、本発明に包含される。

10

【0186】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、抗体融合タンパク質(本明細書において「抗体コンジュゲート」と称されることもある)である。コンジュゲートパートナーは、タンパク質性または非タンパク質性であってもよい。後者は、通常、抗原結合タンパク質上およびコンジュゲートパートナー上の官能基を用いて産生される。ある特定の実施形態において、抗体は、非タンパク質性化学物質(薬物)にコンジュゲートされ、抗体薬物コンジュゲートを形成する。

20

【0187】

一実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、抗体類似体であり、「合成抗体」と称されることもある。例えば、様々な研究が、代替のタンパク質足場またはCDRを移植した人工足場のいずれかを利用している。そのような足場は、限定されないが、結合タンパク質の3次元構造を安定させるために導入された変異、および、例えば生体適合性ポリマーからなる完全合成足場を含む。例えば、Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129、Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654を参照のこと。さらに、ペプチド抗体模倣体(「PAM」)、および足場としてフィブロネクチン成分を利用する抗体模倣体に基づく研究を用いることができる。

30

【0188】

「タンパク質」とは、本明細書で使用される場合、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチドを含む、少なくとも2つの共有結合的に結合したアミノ酸を意味する。いくつかの実施形態において、2つ以上の共有結合的に結合したアミノ酸は、ペプチド結合によって結合する。タンパク質は、天然に存在するアミノ酸およびペプチド結合から構成されてもよい(例えば、後に概説するように、発現系および宿主細胞を用いて組換えによってタンパク質が作製される場合)。代替として、タンパク質は、プロテアーゼまたは他の生理学的条件および/もしくは保存条件に耐性を示すことができる、合成アミノ酸(例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、オルニチン、およびノルロイシン)またはペプチド模倣構造、すなわち、ペプトイド等の「ペプチドまたはタンパク質類似体」を含んでもよい(Simon et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9367(参照により本明細書中に組み込まれる)を参照)。そのような合成アミノ酸は、抗原結合タンパク質が当該技術分野で周知の従来の方法によって*in vitro*で合成される場合に、特に組み込むことができる。さらに、いずれの組み合わせのペプチド模倣体、合成および天然に存在する残基/構造が用いられてもよい。「アミノ酸」はまた、プロリンおよびヒドロキシプロリン等のイミノ酸残基も含む。アミノ酸の「R基」または「側鎖」は、(L)または(S)配置のいずれかで

40

50

あり得る。具体的な実施形態において、アミノ酸は、(L)または(S)配置であってもよい。

【0189】

ある特定の態様において、本発明は、ST2に結合する組換え抗原結合タンパク質を提供し、いくつかの実施形態において、組換えヒトST2またはその部分を提供する。この文脈において、「組換えタンパク質」は、組換え技術を用いて、当該技術分野で既知の任意の技術および方法を用いて、すなわち、本明細書に記載されるような組換え核酸の発現によって、作製されるタンパク質である。組換えタンパク質の産生のための方法および技術は、当該技術分野において周知である。本発明の実施形態は、野生型ST2およびその多様体に結合する組換え抗原結合タンパク質を含む。

10

【0190】

「本質的に～からなる」とは、本明細書に記載されるように、アミノ酸配列が、列挙される配列番号の配列に対して約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15%変化し得るが、なおも生物学的活性を保持できることを意味する。

【0191】

いくつかの実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質は、単離されたタンパク質または事実上純粋なタンパク質である。「単離された」タンパク質は、その天然の状態において通常関連している物質のうち少なくともいくつかを伴わず、例えば、所与の試料中の全タンパク質の少なくとも約5重量%、または少なくとも約50重量%を構成する。単離されたタンパク質は、状況に応じて、全タンパク質含有量の5~99.9重量%を構成してもよいことを理解されたい。例えば、タンパク質が高い濃度レベルで作製されるように、タンパク質は、誘導性プロモーターまたは高発現プロモーターを使用することによって、有意により高い濃度で作製されてもよい。この定義は、当該技術分野で既知の多種多様な生物および/または宿主細胞における抗原結合タンパク質の産生を含む。

20

【0192】

アミノ酸配列に関して、配列同一性および/または配列類似性は、Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482の局所的配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443の配列同一性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施(Wisconsin Genetics Software Package内のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis)、Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12: 387-395によって記載されるBest Fit配列プログラムを含むが、これらに限定されない当該技術分野で既知の標準的な技術を用いて、好ましくはデフォルト設定を用いて、または検査によって決定される。好ましくは、同一性パーセントは、以下のパラメータに基づいてFastDBによって算出される：ミスマッチペナルティ=1；ギャップペナルティ=1；ギャップサイズペナルティ=0.33；および結合ペナルティ=30（「Current Methods in Sequence Comparison and Analysis」Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp127-149(1988)、Alan R. Liss, Inc.）

30

40

【0193】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、累進ペアワイズアラインメントを用いて、関連配列の群から多重配列アラインメントを作成する。また、これは、アラインメントを作成するために使用したクラスター化関係を示すツリーを描画することもできる。PILEUPは、Feng & Doolittle, 1987, J. M

50

ol. Evol. 35: 351 - 360の累進アラインメントを単純化したものを使用する：この方法は、Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5: 151 - 153によって記載された方法に類似する。有用なPILEUPパラメータは、デフォルトギャップ重み付け = 3.00、デフォルトギャップ長さ重み付け = 0.10、および重み付き末端ギャップを含む。

【0194】

有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403 - 410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402およびKarin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873 - 5787に記載されるBLASTアルゴリズムである。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266: 460 - 480から得たWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、いくつかの検索パラメータを使用し、そのほとんどはデフォルト値に設定される。調整可能なパラメータは、以下の値で設定される：重複スパン = 1、重複断片 = 0.125、ワード閾値 (T) = I I。HSP SおよびHSP S 2パラメータは、動的な値であり、特定の配列の組成物およびそれに対して対象配列が検索される特定のデータベースの組成物に応じてプログラム自体によって確立されるが、値は感度を高めるように調整されてもよい。

10

【0195】

さらなる有用なアルゴリズムは、Altschul et al., 1993, Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402によって報告されたGapped BLASTである。Gapped BLASTは、BLOSUM-62置換スコア；9に設定された閾値Tパラメータ；ギャップなしの伸長を開始させるための2ヒット法、ギャップ長さkにコスト10+kを負荷；16に設定された X_u 、ならびに、アルゴリズムのデータベース検索段階で40に、およびアルゴリズムの出力段階で67設定された X_g を用いる。ギャップ付アラインメントは、約22ビットに対応するスコアによって開始される。

20

【0196】

通常、本明細書に示される配列に対する個々の多様体CDR間のアミノ酸の相同性、類似性、または同一性は、少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、およびほぼ100%の増加する相同性または同一性が好ましい。同じように、本明細書で特定される結合タンパク質の核酸配列に関する「核酸配列同一性パーセント (%)」は、抗原結合タンパク質のコード配列のヌクレオチド残基と同一な候補配列のヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。特定の方法は、それぞれ、1および0.125に設定された重複スパンおよび重複断片を用いて、デフォルトパラメータに設定されたWU-BLAST-2のBLASTNモジュールを利用する。

30

【0197】

通常、個々の多様体CDRをコードするヌクレオチド配列と、本明細書に示されるヌクレオチドとの間の核酸配列の相同性、類似性、または同一性は、少なくとも80%であり、より典型的には、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%、およびほぼ100%の増加する相同性または同一性が好ましい。

40

【0198】

よって、「多様体CDR」は、本発明の親CDRに対する指定された相同性、類似性、または同一性を有し、かつ、限定されないが、親CDRの特異性および/または活性の少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

50

または 99% を含む生物学的機能を共有するものである。

【0199】

アミノ酸配列多様性を導入するための部位または領域は予め決められているが、変異自体は必ずしも予め決められてなくてもよい。例えば、所与の部位における変異の性能を最適化するために、標的コドンまたは領域でランダム変異誘発を行って、発現された抗原結合タンパク質の CDR 多様体を所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングしてもよい。既知の配列を有する DNA の所定の部位で置換変異を作成するための技術、例えば、M13 プライマー変異誘発および PCR 変異誘発等が周知である。変異体のスクリーニングは、ST2 の結合等の抗原結合タンパク質活性のアッセイを用いて行われる。

【0200】

アミノ酸置換は、典型的には単一残基の置換である：挿入は、通常、およそ約 1 ~ 約 20 アミノ酸残基の程度であるが、それよりもかなり大きな挿入が許容され得る。欠失は、約 1 ~ 約 20 アミノ酸残基の範囲であるが、場合によっては、欠質はそれよりもはるかに大きくてもよい。

【0201】

置換、欠失、挿入、またはそれらの任意の組み合わせが、最終的な誘導体または多様体に到達するために用いられ得る。通常、これらの変更は、分子の変化、特に、抗原結合タンパク質の免疫原性および特異性の変化を最小限に抑えるために数個のアミノ酸に対して行われる。しかしながら、より大きな変更が特定の状況において許容され得る。保存的置換は、表 3 に示される以下のチャートに従って一般的に行われる。

表 3

【表 3】

元の残基	例示的な置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

【0202】

機能または免疫学的同一性における実質的な変更は、表 3 に示されるものよりも保存性が低い置換を選択することによって行われる。例えば、変化の領域にあるポリペプチド骨格の構造、例えば、ヘリックスまたはシート構造；標的部位における分子の電荷もしくは疎水性；または側鎖の高さに、より著しく影響を及ぼす置換が行われてもよい。一般にポリペプチドの特性に最も大きな変化をもたらすことが予測される置換は、(a) 親水性残基、例えば、セリルもしくはスレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、パリル、もしくはアラニルに代えて（または、それによって）置換される；(b) システインもしくはプロリンが、任意の他の残基に代えて（または、それによって）置換される；(c) 電気陽性側鎖を有する残基、例えば、リジル、アルギニル、もしくはヒスチジルが、電気陰性残基、例えば、グルタミルもしくはアスパルチルに代えて（または、それによって）置換される；あるいは (d) 嵩高い側鎖を有する

10

20

30

40

50

残基、例えばフェニルアラニンが、側鎖を有しない残基、例えばグリシンに代えて（または、それによって）置換される、置換である。

【0203】

多様体は、典型的には、天然に存在する類似体と同じ質的な生物学的活性を示し、同じ免疫応答を誘発するが、多様体は、必要に応じて抗原結合タンパク質の特徴を修飾するためにも選択される。代替として、多様体は、抗原結合タンパク質の生物学的活性が変化するように設計されてもよい。例えば、グリコシル化部位は、本明細書に記載されるように変化されてもまたは除去されてもよい。

【0204】

本発明の範囲内のST2抗体の他の誘導体は、ST2抗体ポリペプチドのN末端またはC末端に融合した異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現等による、他のタンパク質またはポリペプチドとのST2抗体またはその断片の共有結合コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートを含む。例えば、コンジュゲートされるペプチドは、異種シグナル（またはリーダー）ポリペプチド、例えば酵母因子リーダー、またはエピトープタグ等のペプチドであってもよい。ST2抗体を含有する融合タンパク質は、ST2抗体の精製または特定を促進するために付加されるペプチド（例えばポリ-His）を含むことができる。また、ST2抗体ポリペプチドは、Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988、および米国特許第5,011,912号に記載されるようなFLAGペプチドに連結することもできる。FLAGペプチドは、高度に抗原性であり、特異的なモノクローナル抗体(mAb)によって可逆的に結合されるエピトープを提供し、発現される組換えタンパク質の迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。FLAGペプチドが所与のポリペプチドに融合された融合タンパク質を調製するために有用な試薬は、市販されている(Sigma, St. Louis, MO)。

【0205】

一実施形態において、オリゴマーは、免疫グロブリン由来のポリペプチドを用いて調製される。抗体に由来するポリペプチドの種々の部分(Fcドメインを含む)に融合した特定の異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の調製は、例えば、Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535; Byrn et al., 1990, *Nature* 344:677; および Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1~10.19.11に記載されている。

【0206】

本発明の一実施形態は、ST2抗体のST2結合断片を抗体のFc領域に融合することによって作製される2つの融合タンパク質を含む二量体を対象とする。二量体は、例えば、融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクターに挿入し、組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞において遺伝子融合体を発現させ、発現された融合タンパク質を抗体分子に酷似するように組み立てることによって作製することができ、そうすることで、Fc部分間に鎖間ジスルフィド結合が形成して二量体を生じる。

【0207】

本明細書で使用される「Fcポリペプチド」という用語は、抗体のFc領域由来のポリペプチドの天然型およびムテイン型を含む。二量体化を促進するヒンジ領域を含有する、そのようなポリペプチドの切断型もまた含まれる。Fc部分を含む融合タンパク質（およびそこから形成されるオリゴマー）は、プロテインAまたはプロテインGカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製という利点を提供する。

【0208】

PCT出願第WO93/10151号（参照によって本明細書に組み込まれる）に記載される1つの好適なFcポリペプチドは、ヒトIgG抗体のFc領域のN末端ヒンジ領域から天然C末端に広がる単鎖ポリペプチドである。別の有用なFcポリペプチドは、米国

10

20

30

40

50

特許第5,457,035号およびBaum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001に記載されるFcムテインである。このムテインのアミノ酸配列は、アミノ酸19がLeuからAlaに変更され、アミノ酸20がLeuからGluに変更され、アミノ酸22がGlyからAlaに変更されていることを除いて、国際公開第WO93/10151号に提示される天然Fc配列のものと同一である。ムテインは、Fc受容体に対して低い親和性を示す。

【0209】

他の実施形態において、ST2抗体の重鎖および/または軽鎖の可変部分は、抗体重鎖および/または軽鎖の可変部分に代えて置換されてもよい。

【0210】

オリゴマーST2抗体誘導体を調製するための別の方法は、ロイシンジッパーの使用を伴う。ロイシンジッパードメインは、それらが見出されるタンパク質のオリゴマー形成を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、元々は、いくつかのDNA結合タンパク質において同定され(Landschulz et al., 1988, Science 240:1759)、それ以来、様々な異なるタンパク質において発見されている。既知のロイシンジッパーの中には、二量体化または三量体化する、天然に存在するペプチドおよび誘導体がある。可溶性オリゴマータンパク質を産生するのに適したロイシンジッパードメインの例は、PCT出願第WO94/10308号に記載され、肺界面活性タンパク質D(SPD)に由来するロイシンジッパーは、Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191に記載されている(参照により本明細書に組み込まれる)。それに融合された異種タンパク質の安定な三量体化を可能にする修飾されたロイシンジッパーの使用は、Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78に記載されている。1つのアプローチにおいて、ロイシンジッパーペプチドに融合したST2抗体断片または誘導体を含む組換え融合タンパク質が、好適な宿主細胞において発現され、形成する可溶性オリゴマーST2抗体断片または誘導体が、培養上清から回収される。

【0211】

抗原結合タンパク質の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれ、必ずではないが一般的には、翻訳後に行われる。例えば、いくつかの種類の抗原結合タンパク質の共有結合修飾が、抗原結合タンパク質の特異的アミノ酸残基を、選択した側鎖またはNもしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって、分子に導入される。

【0212】

カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得るために、システイニル残基を、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセトアミド等のハロアセテート(および対応するアミン)と反応させる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -プロモ- β -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリ安息香酸、2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によっても誘導体化される。

【0213】

ヒスチジル残基は、pH 5.5~7.0でジエチルピロカーボネートとの反応によって誘導化される(この薬剤は、ヒスチジル側鎖に比較的特異的であるため)。パラ-プロモフェナシルブロミドもまた有用であり、反応は、pH 6.0の0.1Mカコジル酸ナトリウム中で行われることが好ましい。

【0214】

リジニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸無水物または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤との誘導体化は、リジニル残基の電荷を反転させる効果を有する。

アミノ含有残基を誘導体化するための他の好適な試薬は、メチルピコリンイミダート等

10

20

30

40

50

のイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロボロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4-ペンダンジオン、およびグリオキシル酸とのトランスアミナーゼ触媒反応を含む。

【0215】

アルギニル残基は、1つまたはいくつかの従来の特薬、とりわけ、フェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、およびニンヒドリンとの反応によって修飾される。グアニジン官能基の pK_a が高いため、アルギニン残基の誘導体化は、アルカリ性条件において行う必要がある。さらに、これらの特薬は、リジン基ならびにアルギニンアミノ基と反応させてもよい。

【0216】

チロシル残基の特異的修飾は、チロシル残基にスペクトル標識を導入させることに特に関心を払って、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によって行うことができる。最も一般的には、N-アセチルイミジゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、O-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成する。チロシル残基は、 ^{125}I または ^{131}I を用いてヨウ素化し、放射免疫測定法において使用するための標識タンパク質を調製し、上述のクロラミンT法が好適である、

【0217】

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミン）は、カルボジイミド（ $R'-N=C=N-R'$ ）との反応によって選択的に修飾され、式中、RおよびR'は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミド等の任意に異なるアルキル基である。さらに、アスパルチル残基およびグルタミン残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換される。

【0218】

二官能性物質を用いた誘導体化は、抗原結合タンパク質を、さまざまな方法に用いられる不水溶性支持マトリックスまたは表面に架橋するのに有用である。一般的に使用される架橋剤は、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル(3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオナート)等のジスクシンイミジルエステルを含む)、およびビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミドを含む。メチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミダート等の誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することが可能な光活性化可能な中間体をもたらす。代替として、米国特許第3,969,287号、第3,691,016号、第4,195,128号、第4,247,642号、第4,229,537号、および第4,330,440号に記載される、臭化シアン活性化炭水化物および反応基質等の反応性の不水溶性マトリックスが、タンパク質の固定に利用される。

【0219】

グルタミニル残基およびアスパラギニル残基は、それぞれ対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基に頻りに脱アミド化される。代替として、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれかの形状は、本発明の範囲内である。

【0220】

他の修飾は、プロリンおよびリジンの水酸化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のアミノ基のメチル化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86)、N末端アミンのアセチル化、ならびにいずれかのC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0221】

本発明の範囲内に含まれる抗原結合タンパク質の別の種類の共有結合修飾は、タンパク質のグリコシル化パターンを変化させることを含む。当該技術分野で既知のように、グリ

10

20

30

40

50

コシル化パターンは、タンパク質の配列（例えば、後に記載する特定のグリコシル化アミノ酸残基の有無）、またはタンパク質が産生される宿主細胞もしくは生物の両方に依存し得る。具体的な発現系は後に記載する。

【0222】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N連結またはO連結のいずれかである。N連結は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリ - ペプチド配列アスパラギン - X - セリン、およびアスパラギン - X - スレオニン（Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素結合の認識配列である。よって、ポリペプチドのこれらのトリ - ペプチド配列のいずれかの存在が、潜在的なグリコシル化部位を形成する。O連結グリコシル化は、糖類であるN - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの結合を指すが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリジンが使用されてもよい。

10

【0223】

抗原結合タンパク質へのグリコシル化部位の付加は、上述のトリ - ペプチド配列（N連結グリコシル化部位の）のうちの1つ以上を含むようにアミノ酸配列を変化させることによって、都合よく達成される。変更はまた、（O連結グリコシル化部位の）開始配列への1つ以上のセリンまたはスレオニン残基の追加または置換によって行われてもよい。容易にするために、抗原結合タンパク質のアミノ酸配列は、好ましくは、DNAレベルでの変化によって変更され、具体的には、所望のアミノ酸へと翻訳されるコドンが形成されるように、予め選択した塩基で標的ポリペプチドをコードするDNAを変異させることによって変更される。

20

【0224】

抗原結合タンパク質の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、タンパク質へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによるものである。これらの手順は、N - およびO連結グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞においてタンパク質の産生を必要としないという点において有利である。使用されるカップリング様式に応じて、糖（複数可）は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）システインのもの等の遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、スレオニン、もしくはヒドロキシプロリンのもの等の遊離ヒドロキシル基、（e）フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンのもの等の芳香族残基、または（f）グルタミンのアミド基に結合してもよい。これらの方法は、1987年9月11日に公開された国際公開第WO87/05330号、およびApplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259 - 306に記載される。

30

【0225】

出発抗原結合タンパク質上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的にまたは酵素的に達成されてもよい。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物へのタンパク質の曝露を必要とする。この処理によって、ポリペプチドが無傷な状態のまま、連結した糖（N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン）を除くほとんどのまたはすべての糖類の切断がもたらされる。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52によって、およびEdge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350によって記載されるような様々なエンド - およびエキソ - グルコシダーゼの使用によって達成することができる。潜在的なグリコシル化部位におけるグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105によって記載されるように、化合物ツニカマイシンの使用によって防止され得る。ツニカマイシンは、タンパク質 - N - グリコシド連結の形成を阻止する。

40

50

【0226】

抗原結合タンパク質の共有結合修飾の別の種類は、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号；または第4,179,337号に記載される様式で、抗原結合タンパク質を、種々のポリオール、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン等を含むがこれらに限定されない、種々の非タンパク質性ポリマーに連結させることを含む。さらに、当該技術分野で既知のように、PEG等のポリマーの付加を容易にするように、アミノ酸置換は、抗原結合タンパク質内の種々の位置で行われてもよい。

【0227】

いくつかの実施形態において、本発明の抗原結合タンパク質の共有結合修飾は、1つ以上の標識の付加を含む。

【0228】

「標識基」という用語は、任意の検出可能な標識を意味する。好適な標識基の例として、限定されないが、以下が挙げられる：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光基（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光基、ビオチニル基、または二次レポーターによって認識される予め決定されたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）。いくつかの実施形態において、標識基は、潜在的な立体障害を減少するために、種々の長さのスペーサーアームを介して抗原結合タンパク質に結合される。タンパク質を標識するための種々の方法が、当該技術分野で既知であり、本発明を実施する際に使用され得る。

【0229】

一般に、標識は、それらが検出されるアッセイに応じて様々なクラスに分類される：a)放射性同位体または重同位体であってもよい同位体標識；b)磁気標識（例えば、磁気粒子）；c)レドックス活性部分；d)光学色素；酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；e)ビオチン化基；およびf)二次レポーター（例えば、ロイシンジッパー対の配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ等）によって認識される所定のポリペプチドエピトープ。いくつかの実施形態において、標識基は、潜在的な立体障害を減少するために、種々の長さのスペーサーアームを介して抗原結合タンパク質に結合される。タンパク質を標識するための種々の方法が、当該技術分野で既知であり、本発明を実施する際に使用され得る。

【0230】

特異的標識は、発色団、蛍光体、およびフルオロフォアを含むがこれらに限定されない光学色素を含み、後者は多くの場合において特異的である。フルオロフォアは、「小分子」蛍光または、タンパク質性蛍光のいずれかであり得る。

【0231】

「蛍光標識」とは、その固有の蛍光特性によって検出され得る任意の分子を意味する。好適な蛍光標識として、限定されないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチル-クマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、カスケードブルーJ、テキサスレッド、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LCRed640、Cy5、Cy5.5、LCレッド705、オレゴングリーン、Alexa-Fluor色素（Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680）、カスケードブルー、カスケードイエロー、お

10

20

30

40

50

よび R - フィコエリトリン (P E) (M o l e c u l a r P r o b e s , E u g e n e , O R) 、 F I T C 、 ロ ー ダ ミ ン 、 お よ び テ キ サ ス レ ッ ド (P i e r c e , R o c k f o r d , I L) 、 C y 5 、 C y 5 . 5 、 C y 7 (A m e r s h a m L i f e S c i e n c e , P i t t s b u r g h , P A) が 挙 げ ら れ る 。 フ ル オ ロ フ オ ア を 含 む 好 適 な 光 学 色素は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる M o l e c u l a r P r o b e s H a n d b o o k b y R i c h a r d P . H a u g l a n d に 記 載 さ れ て い る 。

【 0 2 3 2 】

好適なタンパク質性蛍光標識は、限定されないが、GFPのウミシイタケ、ウミエラ、またはオワンクラゲ種を含む緑色蛍光タンパク質 (C h a l f i e e t a l . , 1 9 9 4 , S c i e n c e 2 6 3 : 8 0 2 - 8 0 5) 、 E G F P (C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s , I n c . , G e n b a n k A c c e s s i o n N u m b e r U 5 5 7 6 2) 、 青 色 蛍 光 タ ン パ ク 質 (B F P , Q u a n t u m B i o t e c h n o l o g i e s , I n c . 1 8 0 1 d e M a i s o n n e u v e B l v d . W e s t , 8 t h F l o o r , M o n t r e a l , Q u e b e c , C a n a d a H 3 H 1 J 9 ; S t a u b e r , 1 9 9 8 , B i o t e c h n i q u e s 2 4 : 4 6 2 - 4 7 1 ; H e i m e t a l . , 1 9 9 6 , C u r r . B i o l . 6 : 1 7 8 - 1 8 2) 、 強 化 黄 色 蛍 光 タ ン パ ク 質 (E Y F P , C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s , I n c .) 、 ル シ フ エ ラ ー ゼ (I c h i k i e t a l . , 1 9 9 3 , J . I m m u n o l . 1 5 0 : 5 4 0 8 - 5 4 1 7) 、 ガ ラ ク ト シ ダ ー ゼ (N o l a n e t a l . , 1 9 8 8 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5 : 2 6 0 3 - 2 6 0 7) お よ び ウ ミ シ イ タ ケ (国 際 公 開 第 W O 9 2 / 1 5 6 7 3 号 、 同 第 W O 9 5 / 0 7 4 6 3 号 、 同 第 W O 9 8 / 1 4 6 0 5 号 、 同 第 W O 9 8 / 2 6 2 7 7 号 、 同 第 W O 9 9 / 4 9 0 1 9 号 、 米 国 特 許 第 5 2 9 2 6 5 8 号 、 同 第 5 4 1 8 1 5 5 号 、 同 第 5 6 8 3 8 8 8 号 、 同 第 5 7 4 1 6 6 8 号 、 同 第 5 7 7 7 0 7 9 号 、 同 第 5 8 0 4 3 8 7 号 、 同 第 5 8 7 4 3 0 4 号 、 同 第 5 8 7 6 9 9 5 号 、 同 第 5 9 2 5 5 5 8 号) を 含 む 。 上 記 引 用 参 考 文 献 は 全 て 、 参 照 に よ り 、 明 示 的 に 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る 。

【 0 2 3 3 】

本明細書に記載される例示的な抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質が結合する S T 2 上 の 異 な る エ ピ ト ー プ に 基 づ く 特 性 を 有 す る 。 「 エ ピ ト ー プ 」 と い う 用 語 は 、 抗 原 結 合 タ ン パ ク 質 が 標 的 分 子 に 結 合 し た 時 に 、 抗 原 結 合 タ ン パ ク 質 、 例 え ば 、 抗 体 に よ っ て 接 触 さ れ る 、 標 的 分 子 の ア ミ ノ 酸 を 意 味 す る 。 エ ピ ト ー プ は 、 連 続 ま た は 不 連 続 で あ り 得 る (例 え ば 、 (i) 一 本 鎖 ポ リ ペ プ チ ド に お い て 、 ポ リ ペ プ チ ド 配 列 中 で は 互 い に 連 続 し て い な い が 、 標 的 分 子 と の 関 連 に お い て 抗 原 結 合 タ ン パ ク 質 に よ っ て 結 合 さ れ る ア ミ ノ 酸 残 基 、 ま た は (i i) 2 つ 以 上 の 個 々 の 成 分 、 例 え ば 、 S T 2 お よ び A c P を 含 む 多 量 体 受 容 体 に お い て 、 個 々 の 成 分 の う ち の 1 つ 以 上 に 存 在 す る が 、 抗 原 結 合 タ ン パ ク 質 に よ っ て な お も 結 合 さ れ る 、 ア ミ ノ 酸 残 基 。 エ ピ ト ー プ 決 定 基 は 、 ア ミ ノ 酸 、 糖 側 鎖 、 ホ ス ホ リ ル ま た は ス ル ホ ニ ル 基 等 の 分 子 の 化 学 的 に 活 性 な 表 面 基 を 含 ん で も よ く 、 か つ 、 特 異 的 な 3 次 元 構 造 特 性 、 お よ び / ま た は 特 異 的 な 電 荷 特 性 を 有 し 得 る 。 通 常 、 特 定 の 標 的 分 子 に 特 異 的 な 抗 原 結 合 タ ン パ ク 質 は 、 タ ン パ ク 質 お よ び / ま た は 巨 大 分 子 の 複 雑 な 混 合 物 中 で 、 標 的 分 子 上 の エ ピ ト ー プ を 選 択 的 に 認 識 す る 。

【 0 2 3 4 】

抗原結合タンパク質によって結合されるエピトープを特徴付ける方法は、当該技術分野において周知であり、限定されないが、ピニング (交 差 競 合) (M i l l e r e t a l " E p i t o p e b i n n i n g o f m u r i n e m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s b y a m u l t i p l e x e d p a i r i n g a s s a y " J I m m u n o l M e t h o d s (2 0 1 1) 3 6 5 , 1 1 8 - 2 5) 、 ペ プ チ ド マ ッ ピ ン グ (例 え ば 、 P E P S P O T (商 標)) (A l b e r t e t a l " The B - c e l l E p i t o p e o f t h e M o n o c l o n a l A n t i - F a c t o r V I I I A n t i b o d y E S H 8 C h a r a c t e r i z e d b y P e p t i d e A r r a y A n a l y s i s " 2 0 0 8 T h r o m b H a e

10

20

30

40

50

most 99, 634-7)、変異誘発法、例えば、キメラ(Song et al “Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients” J. Virol. (2010) 84, 6935-6942)、アラニンスキャニング(Cunningham and Wells “High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis” Science (1989) 244, 1081-1085)、アルギニンスキャニング(Lim et al “A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor” Biochemistry (2010) 49, 3797-3804)、HD交換法(Coates et al “Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry” Rapid Commun. Mass Spectrom. (2009) 23 639-647)、NMR交差飽和法(Morgan et al “Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation” Biochemistry (2005) 44, 518-23)、および結晶学(Gerhardt et al “Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody” J. Mol. Biol. (2009) 394, 905-21)を含む。エピトープを含むアミノ酸に関して、方法が提供する詳細なレベルが異なる。

【0235】

本発明の抗原結合タンパク質は、本明細書に記載される例示的な抗原結合タンパク質、例えば、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab30、Ab32、またはAb33と重複するエピトープを有するものを含む。ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、例示的な抗原結合タンパク質と同一のエピトープを有する。他の実施形態において、抗原結合タンパク質は、例示的な抗原結合タンパク質と同じアミノ酸のサブセットにのみ結合する。

【0236】

ある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab30、Ab32、またはAb33と同一のまたは重複するエピトープを有し、a) 配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、または配列番号165に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、もしくは同一である軽鎖可変ドメイン；b) 配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、または配列番号147に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性を有するか、もしくは同一である重鎖可変ドメイン；またはc) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む。

【0237】

ある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab30、A

【 0 2 3 8 】

ある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab30、Ab32、またはAb33と同一のもしくは重複するエpitopeを有し、a)配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号163、配列番号164、もしくは配列番号165に記載のアミノ酸配列からの10個以下もしくは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する軽鎖可変ドメイン；b)配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号145、配列番号146、もしくは配列番号147に記載のアミノ酸配列からの10個以下もしくは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有する重鎖可変ドメイン；またはc) a)の軽鎖可変ドメインおよびb)の重鎖可変ドメインを含む。

10

【 0 2 3 9 】

ある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab30、Ab32、またはAb33と同一のまたは重複するエpitopeを有し、配列番号95に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号29に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメイン；配列番号96に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号30に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号97に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号31に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号98に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号32に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号99に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号33に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号100に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号34に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号101に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号35に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号102に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号36に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号103に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号37に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号104に記載のアミノ酸配列からの10個以下または5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号38に記載のアミ

20

30

40

50

ノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号105に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号39に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号163に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号145に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；配列番号164に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号146に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むもの；ならびに配列番号165に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する軽鎖可変ドメインおよび配列番号147に記載のアミノ酸配列からの10個以下のまたは5個以下のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する重鎖可変ドメインを含むものを含む。

10

【0240】

ある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、Ab11、Ab30、Ab32、またはAb33と同一のまたは重複するエピトープを有し、a)配列番号106に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号117に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号128に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；b)配列番号107に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号118に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号129に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；c)配列番号108に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号119に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号130に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；d)配列番号109に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号120に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号131に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；e)配列番号110に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号121に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号132に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；f)配列番号111に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号122に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号133に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；g)配列番号112に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号123に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR2；および配列番号134に記載のLCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR3；h)配列番号113に記載のLCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するLCDR1；配列番号124に記載のLCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有

20

30

40

50

の3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；u)配列番号46に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号57に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号68に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；v)配列番号47に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号58に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号69に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；w)配列番号48に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号59に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号70に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；x)配列番号49に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号60に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号71に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；y)配列番号50に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号61に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号72に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；z)配列番号148に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号151に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号154に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；aa)配列番号149に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号152に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号155に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3；またはbb)配列番号150に記載のHCDR1配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR1；配列番号153に記載のHCDR2配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR2；および配列番号156に記載のHCDR3配列からの3個以下のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を有するHCDR3を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0241】

すぐ上に記載される好ましいST2抗原結合タンパク質は、a)の軽鎖可変ドメインおよびo)の重鎖可変ドメインを含むもの；b)の軽鎖可変ドメインおよびp)の重鎖可変ドメインを含むもの；c)の軽鎖可変ドメインおよびq)の重鎖可変ドメインを含むもの；d)の軽鎖可変ドメインおよびr)の重鎖可変ドメインを含むもの；e)の軽鎖可変ドメインおよびs)の重鎖可変ドメインを含むもの；f)の軽鎖可変ドメインおよびt)の重鎖可変ドメインを含むもの；g)の軽鎖可変ドメインおよびu)の重鎖可変ドメインを含むもの；h)の軽鎖可変ドメインおよびv)の重鎖可変ドメインを含むもの；i)の軽鎖可変ドメインおよびw)の重鎖可変ドメインを含むもの；j)の軽鎖可変ドメインおよびx)の重鎖可変ドメインを含むもの；k)の軽鎖可変ドメインおよびy)の重鎖可変ドメインを含むもの；l)の軽鎖可変ドメインおよびz)の重鎖可変ドメインを含むもの；m)の軽鎖可変ドメインおよびaa)の重鎖可変ドメインを含むもの；ならびにn)の軽鎖可変ドメインおよびbb)の重鎖可変ドメインを含むものを含む。

【0242】

同一のエピトープまたは重複するエピトープを有する抗原結合タンパク質は、抗原への結合について交差競合することが多い。よって、ある特定の実施形態において、本発明の抗

原結合タンパク質は、Ab 1、Ab 2、Ab 3、Ab 4、Ab 5、Ab 6、Ab 7、Ab 8、Ab 9、Ab 10、Ab 11、Ab 30、Ab 32、またはAb 33と交差競合する。「交差競合する」または「交差競合」とは、抗原結合タンパク質が標的上の同じエピトープまたは結合部位について競合することを意味する。そのような競合は、基準抗原結合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合部分）が、試験抗原結合タンパク質の特異的な結合を防止または阻害する（およびその逆の）アッセイによって決定することができる。多数の種類競合アッセイを用いて、試験分子が結合について基準分子と競合するかどうかを決定することができる。利用することができるアッセイの例として、固相直接または間接放射免疫アッセイ（RIA）、固相直接または間接酵素免疫アッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253を参照のこと）、固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619を参照のこと）、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ、Luminex (Jia et al. "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91-98)、および表面プラズモン共鳴法 (Song et al. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-6942) が挙げられる。交差競合を決定する例示的な方法を実施例5に記載する。通常、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、それは、一般的な抗原に対する基準抗原結合タンパク質の結合を、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、または75%阻害する。ある場合において、結合は、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上阻害される。

【0243】

Ab 2は、ヒトおよびカニクイザルのST 2に高い親和性で結合し、IL-33のST 2への結合をブロックし、よって、IL-33によって媒介されるST 2シグナル伝達をブロックする。Ab 2の場合と同一か、類似するか、または重複するエピトープに対する抗体は、これらの特有の特徴を共有し得る。好ましい実施形態において、ST 2抗原結合タンパク質は、ST 2への結合についてAb 2と交差競合する。Ab 2と交差競合する例示的なST 2抗原結合タンパク質は、Ab 1、Ab 3、Ab 5、Ab 7、Ab 8、およびAb 30を含む（実施例5を参照のこと）。Ab 2の場合と重複するか、類似するか、または同一であるエピトープに結合する抗体を見つけようとする場合、1つ以上の抗体をAb 2との交差競合についてスクリーニングしてもよい。さらに、Ab 2と交差反応する抗体に対する多様体を作成する場合、多様化後に交差競合が維持され、多様体のエピトープが、親分子から著しく変更されていないことが示唆されるかどうかを決定するためにそのような抗体をスクリーニングしてもよい。よって、ある特定の実施形態において、本発明は、ST 2への結合についてAb 2と交差競合する抗体多様体を提供する。

【0244】

互いに交差競合する以外にも、重複するか、類似するか、または同一であるエピトープを有する抗体は、ST 2の変異誘発によって同様に影響を受け得る。ある特定の 변異は、抗体の結合を阻害し得、他の変異は、結合を強化または活性化し得る。実施例11において、ST 2の細胞外ドメインの一部に対するアルギニン/アラニンの変異誘発のスクリーニングを行って、例示的な抗体への影響を決定した。変異誘発に対して例示的な抗体と類似する様式で影響を受けるような特徴を有するST 2結合タンパク質が、本発明の範囲内に含まれる。

【0245】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態において、ST2 抗原結合タンパク質の結合は、ST2 における単一変異によって阻害され、単一変異は、L14R、I15R、S33R、E43R、V47R、A62R、G65R、T79R、D92R、D97R、V104R、G138R、N152R、およびV176Rからなる群から選択される。好ましい実施形態において、該群の単一変異の2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10個以上のいずれか、または全てが、ST2 結合タンパク質の結合を個別に阻害する。他の実施形態において、ST2 抗原結合タンパク質の結合は、ST2 における単一変異によって活性化され、単一変異は、L53R、R72A、およびS73Rからなる群から選択される。好ましい実施形態において、該群の単一変異の全てが、ST2 結合タンパク質の結合を個別に活性化する。好ましい実施形態において、ST2 抗原結合タンパク質は、Ab2の属性を共有し、L14R、I15R、S33R、E43R、V47R、A62R、G65R、T79R、D92R、D97R、V104R、G138R、N152R、およびV176Rのいずれかによって阻害され、L53R、R72A、S73Rのいずれかによって活性化される。

10

【0246】

抗体をそのエピトープに基づいて特徴付ける別の方法は、アミド水素/重水素交換(HDX)である。HDXは、タンパク質の高次構造および動態、タンパク質-リガンド相互作用、およびタンパク質-タンパク質相互作用を研究するために広く使用されている(Zhang and Smith 1993, Engen and Smith 2001)。1つの水素を重水素に置き換えることにより、各交換ごとに1Daの質量増加がもたらされるため、質量分析による検出は、交換の程度を決定するための強力なツールを提供する。HDXの程度は、制御条件下でタンデム質量分析と液体クロマトグラフィーを組み合わせることによるタンパク質のタンパク分解の分析によって、ペプチドレベルで容易に測定することができる(Engen and Smith 2001, Baerga-Ortiz, Hughes et al. 2002, Codreanu, Ladner et al. 2002, Hamuro, Coales et al. 2006, Coales, Tuske et al. 2009, Zhang, Zhang et al. 2012)。

20

【0247】

抗体の非存在下および存在下(遊離状態対結合状態)でのST2のタンパク分解間の抗原HDXプロファイルの比較により、相互作用の部位を明らかにすることができる。具体的には、抗体がST2に結合すると、遊離ST2中の溶媒露出アミド水素が保護され得るようになり、その結果として、より緩徐な交換速度が観察される。したがって、抗体の存在下においてその不在下よりも少ない重水素を獲得した領域は、潜在的な結合性エピトープである。エピトープが決定されると、遊離状態での交換速度、抗原タンパク質構造の知識、および他のエピトープマッピングの取り組みの結果等の他の要因が考慮される。

30

【0248】

実施例12に記載されるように、Ab2のST2への結合をHDXによって分析した。分析により、Ab2が、配列番号1のアミノ酸19~322のアミノ酸33~44および88~94(それぞれ、成熟したST2のアミノ酸15~26および70~76)を含むST2構造の一部に結合して、その交換速度を変化させることが示された。Ab2の場合と重複するエピトープ、類似または同一のエピトープに対する抗体もまた、配列番号1の33~44および88~94内のアミノ酸に結合して、その交換速度を変化させる。ある特定の実施形態において、ST2結合タンパク質、例えば、抗体は、ST2に結合し、HDXによって分析した場合、配列番号1のアミノ酸33~44のいずれかを保護する。他の実施形態において、アミノ酸88~94のいずれかが保護される。両方とも、Ab2との結合性エピトープと部分的に重複することを示す。好ましい実施形態において、33~44のいずれかおよび88~94のいずれかの両方が保護される。ある特定の実施形態において、ST2結合タンパク質、例えば、抗体は、ST2に結合し、HDXによって分析した場合、配列番号1のアミノ酸33~44の全てを保護する。他の実施形態において、

40

50

アミノ酸 88 ~ 94 の全てが保護される。両方とも、類似した、Ab2 との結合性エピトープを示す。好ましい実施形態において、33 ~ 44 の全ておよび 88 ~ 94 の全ての両方が保護され、Ab2 の場合と同一であるかまたはほぼ同一のエピトープを示す。

【0249】

Ab2 の ST2 への結合を、X線結晶構造解析を用いてさらに分析した。X線結晶構造解析は、HDX 分析と一致していた。Ab と抗原との間の界面は、いくつかの方法で決定 / 定義することができる。実施例 13 では、溶媒露出の差を用いて、および距離によって界面を決定した。溶媒露出の差または 5 未満の距離によって決定される Ab2 との界面内の ST2 残基は、(成熟 ST2 (リーダー配列を欠く) の位置に対応する) K1、F2、P19、R20、Q21、G22、K23、Y26、I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、および Y81 である。ある特定の
10
実施形態において、ST2 結合タンパク質は、K1、F2、P19、R20、Q21、G22、K23、Y26、I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、または Y81 のいずれかが界面内に存在するものを含む、Ab2 の界面と重複する ST2 との界面を形成する。いくつかの実施形態において、ST2 結合タンパク質は、ST2 と界面を形成し、P19、R20、Q21、G22、K23、および / または Y26 が、界面内に存在する。他の実施形態において、I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、および / または Y81
20
が、界面内に存在する。好ましい実施形態において、K1、F2、P19、R20、Q21、G22、K23、Y26、I70、V71、R72、S73、P74、T75、F76、N77、R78、T79、および Y81 が、界面内に存在する。

【0250】

結晶構造は、特定のアミノ酸残基が、Ab2 とのアミノ酸と水素結合または塩架橋を形成したことを示した。これらの残基は、K1、R20、K23、Y26、T75、N77、R78、および T79 を含む。ある特定の実施形態において、ST2 抗原結合タンパク質は、K1、R20、K23、Y26、T75、N77、R78、および T79 のうちの
1 つ以上と水素結合または塩架橋を形成する。

【0251】

結晶構造はさらに、Ab2 のどの残基が ST2 と界面を形成するかの情報を提供する。図 10 は、ST2 と界面を形成する軽鎖可変領域および重鎖可変領域内の残基を示す。また、ST2 内のアミノ酸と水素結合または塩架橋を形成する残基も示される。この情報を用いて、90% の同一性、95% の同一性、ならびに Ab2 の軽鎖または重鎖可変ドメイン内に 10 個以下の挿入、欠失、および / または置換を有する可変ドメインを含有するものを含む、Ab2 の多様体を設計することができる。非界面残基を変更する一方で、界面内にアミノ酸を維持することを所望する場合がある。よって、Ab2 の 1 つ以上の CDR
30
内に 1 つ以上のアミノ酸の付加、置換、および / または欠失を有する、ST2 への結合を維持する Ab2 の多様体を設計および作製することができる。

【0252】

いくつかの実施形態において、ST2 結合タンパク質は、D28、I29、S30、N31、Y32、Y49、D50、N53、E55、T56、D91、D92、N93、F94、および / もしくは L96 が、変化しないままであるか、またはその保存的置換を含む、Ab2 軽鎖可変領域 (配列番号 96) の多様体、ならびに / あるいは W33、I50、D57、R59、H99、G100、T101、S102、S103、D104、Y105、および / もしくは Y106 が、変化しないままであるか、または保存的変異を含む、Ab2 重鎖可変領域 (配列番号 30) の多様体を含む。好ましい実施形態において、軽鎖可変領域の D28、N31、D50、N53、E55、D91、および D92 は、変化しないままであり、重鎖の S102、S103、D104、および Y105 は、変化しないままである。
40

【0253】

ST2 抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド

本明細書に定義されるような抗体を含むS T 2抗原結合タンパク質をコードする核酸が、本発明に包含される。好ましい核酸は、本明細書に記載される例示的な軽鎖および重鎖をコードするものを含む。

【0254】

A b 1 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号73に記載の配列を含む核酸である。

【0255】

A b 2 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号74に記載の配列を含む核酸である。

【0256】

A b 3 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号75に記載の配列を含む核酸である。

【0257】

A b 4 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号76に記載の配列を含む核酸である。

【0258】

A b 5 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号77に記載の配列を含む核酸である。

【0259】

A b 6 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号78に記載の配列を含む核酸である。

【0260】

A b 7 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号79に記載の配列を含む核酸である。

【0261】

A b 8 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号80に記載の配列を含む核酸である。

【0262】

A b 9 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号81に記載の配列を含む核酸である。

【0263】

A b 10 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号82に記載の配列を含む核酸である。

【0264】

A b 11 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号83に記載の配列を含む核酸である。

【0265】

A b 30 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号157に記載の配列を含む核酸である。

【0266】

A b 32 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号158に記載の配列を含む核酸である。

【0267】

A b 33 LCをコードする例示的な核酸は、配列番号159に記載の配列を含む核酸である。

【0268】

A b 1 HCをコードする例示的な核酸は、配列番号7に記載の配列を含む核酸である。

【0269】

A b 2 HCをコードする例示的な核酸は、配列番号8に記載の配列を含む核酸である。

10

20

30

40

50

。

【0270】

A b 3 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 9 に記載の配列を含む核酸である

。

【0271】

A b 4 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 10 に記載の配列を含む核酸である。

【0272】

A b 5 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 11 に記載の配列を含む核酸である。

10

【0273】

A b 6 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 12 に記載の配列を含む核酸である。

【0274】

A b 7 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 13 に記載の配列を含む核酸である。

【0275】

A b 8 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 14 に記載の配列を含む核酸である。

【0276】

A b 9 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 15 に記載の配列を含む核酸である。

20

【0277】

A b 10 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 16 に記載の配列を含む核酸である。

【0278】

A b 11 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 17 に記載の配列を含む核酸である。

【0279】

A b 30 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 139 に記載の配列を含む核酸である。

30

【0280】

A b 32 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 140 に記載の配列を含む核酸である。

【0281】

A b 33 H C をコードする例示的な核酸は、配列番号 141 に記載の配列を含む核酸である。

【0282】

本発明の態様は、本明細書に記載されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド多様体（例えば、縮重のため）を含む。

40

【0283】

本発明の態様は、限定されないが、以下の例示的な実施形態を含む様々な実施形態を含む。

【0284】

単離されたポリヌクレオチドであって、当該ポリヌクレオチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む 1 つ以上のポリペプチドをコードする：

【0285】

A . 1 . 配列番号 95 ~ 105、163 ~ 165 に記載の軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも 90 % 同一である軽鎖可変ドメイン配列；

【0286】

50

2. 配列番号 29 ~ 39、145 ~ 147 に記載の重鎖可変ドメイン配列と少なくとも 90% 同一である重鎖可変ドメイン配列；

【0287】

3. (1) の軽鎖可変ドメインおよび (2) の重鎖可変ドメイン；ならびに

【0288】

B. 同じか、または以下の配列からの各 CDR において全部で 3 つ以下のアミノ酸の付加、置換、および / もしくは欠失だけ異なる、CDR 1、CDR 2、CDR 3 を含む軽鎖可変ドメインおよび / または CDR 1、CDR 2、CDR 3 を含む重鎖可変ドメイン；

【0289】

1. Ab1 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 106)、CDR 2 (配列番号 117)、CDR 3 (配列番号 128)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 40)、CDR 2 (配列番号 51)、CDR 3 (配列番号 62)；

10

【0290】

2. Ab2 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 107)、CDR 2 (配列番号 118)、CDR 3 (配列番号 129)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 41)、CDR 2 (配列番号 52)、CDR 3 (配列番号 63)；

【0291】

3. Ab3 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 108)、CDR 2 (配列番号 119)、CDR 3 (配列番号 130)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 42)、CDR 2 (配列番号 53)、CDR 3 (配列番号 64)；

20

【0292】

4. Ab4 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 109)、CDR 2 (配列番号 120)、CDR 3 (配列番号 131)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 43)、CDR 2 (配列番号 54)、CDR 3 (配列番号 65)；

【0293】

5. Ab5 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 110)、CDR 2 (配列番号 121)、CDR 3 (配列番号 132)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 44)、CDR 2 (配列番号 55)、CDR 3 (配列番号 66)；

【0294】

6. Ab6 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 111)、CDR 2 (配列番号 122)、CDR 3 (配列番号 133)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 45)、CDR 2 (配列番号 56)、CDR 3 (配列番号 67)；

30

【0295】

7. Ab7 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 112)、CDR 2 (配列番号 123)、CDR 3 (配列番号 134)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 46)、CDR 2 (配列番号 57)、CDR 3 (配列番号 68)；

【0296】

8. Ab8 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 113)、CDR 2 (配列番号 124)、CDR 3 (配列番号 135)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 47)、CDR 2 (配列番号 58)、CDR 3 (配列番号 69)；

40

【0297】

9. Ab9 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 114)、CDR 2 (配列番号 125)、CDR 3 (配列番号 136)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 48)、CDR 2 (配列番号 59)、CDR 3 (配列番号 70)；

【0298】

10. Ab10 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 115)、CDR 2 (配列番号 126)、CDR 3 (配列番号 137)、または重鎖 CDR 1 (配列番号 49)、CDR 2 (配列番号 60)、CDR 3 (配列番号 71)；

【0299】

11. Ab11 の軽鎖 CDR 1 (配列番号 116)、CDR 2 (配列番号 127)、

50

C D R 3 (配列番号 1 3 8)、または重鎖 C D R 1 (配列番号 5 0)、C D R 2 (配列番号 6 1)、C D R 3 (配列番号 7 2)；

【 0 3 0 0 】

1 2 . A b 3 0 の軽鎖 C D R 1 (配列番号 1 6 6)、C D R 2 (配列番号 1 6 9)、C D R 3 (配列番号 1 7 2)、または重鎖 C D R 1 (配列番号 1 4 8)、C D R 2 (配列番号 1 5 1)、C D R 3 (配列番号 1 5 4)；

【 0 3 0 1 】

1 3 . A b 3 2 の軽鎖 C D R 1 (配列番号 1 6 7)、C D R 2 (配列番号 1 7 0)、C D R 3 (配列番号 1 7 3)、または重鎖 C D R 1 (配列番号 1 4 9)、C D R 2 (配列番号 1 5 2)、C D R 3 (配列番号 1 5 5)；および

【 0 3 0 2 】

1 4 . A b 3 3 の軽鎖 C D R 1 (配列番号 1 6 8)、C D R 2 (配列番号 1 7 1)、C D R 3 (配列番号 1 7 4)、または重鎖 C D R 1 (配列番号 1 5 0)、C D R 2 (配列番号 1 5 3)、C D R 3 (配列番号 1 5 6)。

【 0 3 0 3 】

好ましい実施形態において、単離された核酸によってコードされるポリペプチドは、S T 2 に結合する抗原結合タンパク質の構成成分である。

【 0 3 0 4 】

核酸の単離のためのプローブもしくはプライマーとして、またはデータベース検索のためのクエリ配列として使用される、本明細書に記載されるアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列は、アミノ酸配列からの「逆翻訳」によって、またはコードする DNA 配列が特定されているポリペプチドとのアミノ酸素性の領域の特定によって得ることができる。周知のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 手順を利用して、S T 2 抗原結合タンパク質をコードする DNA 配列、または所望の組み合わせの S T 2 抗原結合タンパク質ポリペプチド断片を単離および増幅することができる。DNA 断片の組み合わせの所望の末端を画定するオリゴヌクレオチドが、5' および 3' プライマーとして用いられる。オリゴヌクレオチドは、増幅した DNA 断片の組み合わせの発現ベクターへの挿入を促進するために、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を付加的に含有することができる。P C R 技術は、S a i k i e t a l . , S c i e n c e 2 3 9 : 4 8 7 (1 9 8 8) ; R e c o m b i n a n t D N A M e t h o d o l o g y , W u e t a l . , e d s . , A c a d e m i c P r e s s , I n c . , S a n D i e g o (1 9 8 9) , p p . 1 8 9 - 1 9 6 ; および P C R P r o t o c o l s : A G u i d e t o M e t h o d s a n d A p p l i c a t i o n s , I n n i s e t a l . , e d s . , A c a d e m i c P r e s s , I n c . (1 9 9 0) に記載されている。

【 0 3 0 5 】

本発明の核酸分子は、一本鎖および二本鎖の両方の形態の DNA および RNA、ならびに対応する相補性配列を含む。DNA は、例えば、c DNA、ゲノム DNA、化学合成 DNA、P C R によって増幅した DNA、およびそれらの組み合わせを含む。本発明の核酸分子は、完全長遺伝子または c DNA 分子、ならびにそれらの断片の組み合わせを含む。本発明の核酸は、ヒト源から選択的に誘導されるが、本発明は、非ヒト種に由来するものも含む。

【 0 3 0 6 】

天然に存在する源から単離された核酸の場合、「単離された核酸」は、核酸が単離された生物のゲノムに存在する隣接する遺伝子配列から分離された核酸である。例えば、P C R 産物、c DNA 分子、またはオリゴヌクレオチド等、鋳型から酵素的に合成された核酸または化学合成された核酸の場合、そのようなプロセスから得られた核酸は、単離された核酸であることを理解されたい。単離された核酸分子は、分離断片の形態の、またはより大きな核酸構築物の構成成分としての、核酸分子を指す。1つの好ましい実施形態において、核酸は、内因性汚染物質を実質的に含まない。核酸分子は、実質的に純粋な形態で、かつ、その構成成分であるヌクレオチド配列の標準的な生化学的方法 (S a m b r o o k

10

20

30

40

50

et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) に概説されるもの等) による特定、操作、および回収を可能にする量または濃度で、少なくとも1回単離されたDNAまたはRNAから誘導されていることが好ましい。そのような配列は、真核細胞の遺伝子中に典型的に存在する内部非翻訳配列またはイントロンによって中断されないオープンリーディングフレームの形態で提供されるおよび/または構築されることが望ましい。非翻訳DNAの配列は、オープンリーディングフレームの5'または3'に存在してもよく、この場合、該配列は、コード領域の操作または発現に干渉しない。

【0307】

本発明はまた、中程度にストリンジェントな条件下で、またより好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、本明細書に記載されるようなST2抗原結合タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする核酸を含む。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本パラメータ、および好適な条件を案出するための指針は、Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; および Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3 - 6.4) によって記述されており、例えば、DNAの長さおよび/または塩基組成に基づいて、当業者が容易に決定することができる。中程度にストリンジェントな条件を達成する1つの方法は、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0) を含有する前洗浄溶液、約50%ホルムアミド、6×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、および約55のハイブリダイゼーション温度(またはハイブリダイゼーション温度約42の、約50%ホルムアミドを含有するもの等の他の類似するハイブリダイゼーション溶液)、ならびに0.5×SSC、0.1% SDS中、約60の洗浄条件の使用を伴う。一般に、高度なストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件として定義されるが、約68で、0.2×SSC、0.1% SDSの洗浄を伴う。ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液中のSSPE (1×SSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、および1.25mM EDTA、pH 7.4である) は、SSC (1×SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸ナトリウムである) に代えて用いてもよく、洗浄は、ハイブリダイゼーションが終了した後15分間行われる。当業者に既知であるように、また後に詳述するように、洗浄温度および洗浄塩濃度は、ハイブリダイゼーション反応および二本鎖安定性を支配する基本原理を適用することによって、所望の程度のストリンジェンシーを達成するように必要に応じて調整できることを理解されたい(例えば、Sambrook et al., 1989を参照のこと)。ある核酸を既知の配列の標的核酸にハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズする核酸の長さであると想定される。既知の配列の核酸をハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さは、核酸の配列を整列させて、最適な配列相補性の領域(単数または複数)を特定することによって決定することができる。50塩基対未満の長さであると予測されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度(T_m)よりも5~10低くあるべきであり、T_mは、次の方程式に従って決定される。18塩基対未満のハイブリッドの場合、 $T_m() = 2(A + T \text{塩基の数}) + 4(G + C \text{塩基の数})$ 。18塩基対を超えるハイブリッドの場合、 $T_m() = 81.5 + 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/N)$ 、式中、Nは、ハイブリッド中の塩基の数であり、[Na⁺]は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である(1×SSCの[Na⁺] = 0.165M)。好ましくは、それぞれのそのようなハイブリダイズする核酸は、それがハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも15ヌクレオチド(も

10

20

30

40

50

しくは、より好ましくは少なくとも18ヌクレオチド、もしくは少なくとも20ヌクレオチド、もしくは少なくとも25ヌクレオチド、もしくは少なくとも30ヌクレオチド、もしくは少なくとも40ヌクレオチド、もしくは最も好ましくは少なくとも50ヌクレオチド)、または少なくとも25% (より好ましくは少なくとも50%、もしくは少なくとも60%、もしくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも80%) である長さを有し、かつ、それがハイブリダイズする本発明の核酸と少なくとも60% (より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、および最も好ましくは少なくとも99.5%) の配列同一性を有し、上により詳しく記載されたように、配列同一性は、配列ギャップを最小限に抑えながら重複および同一性を最大化するように整列させた時にハイブリダイズする核酸の配列を比較することによって決定される。

【0308】

本発明による多様体は、通常、カセットもしくはPCR変異誘発、または当該技術分野で周知の他の技術を用いて、抗原結合タンパク質をコードするDNA内のヌクレオチドの部位特異的変異誘発によって多様体をコードするDNAを産生させ、その後、本明細書に概説されるように、細胞培養物中で組換えDNAを発現させることによって調製される。しかしながら、最大約100~150個の残基を有する多様体CDRを含む抗原結合タンパク質断片は、確立された技術を用いて*in vitro*合成によって調製されてもよい。多様体は、典型的には、天然に存在する類似体と同じ定性的な生物学的活性、例えば、ST2への結合を示すが、後により詳細に概説するように、修飾された特徴を有する多様体を選択することもできる。

【0309】

当業者には理解されるように、遺伝子コードの縮重に起因して極めて多数の核酸が作製され得、それらは全て、本発明のCDR (ならびに重鎖および軽鎖または抗原結合タンパク質の他の構成成分) をコードする。よって、特定のアミノ酸配列を特定すると、当業者は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させない様式で単純に1つ以上のコードの配列を修飾することによって、任意の数の異なる核酸を作成することができる。

【0310】

本発明はまた、上述のような少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態の発現系および構築物も提供する。さらに、本発明は、そのような発現系または構築物を含む宿主細胞を提供する。

【0311】

典型的には、宿主細胞のうちのいずれかにおいて用いられる発現ベクターは、プラスミド維持のための配列、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含有する。ある特定の実施形態において集合的に「フランキング配列」と称されるそのような配列は、典型的には、次のヌクレオチド配列のうちの一つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライシング部位を含有する完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカー要素。これらの配列の各々については、後に記載する。

【0312】

任意選択的に、ベクターは、「タグ」コード配列、すなわち、ST2抗原結合タンパク質コード配列の5'または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含有してもよく、オリゴヌクレオチド配列は、市販の抗体が存在するポリHis (ヘキサHis等)、または別の「タグ」、例えば、FLAG、HA (インフルエンザウイルス血球凝集素)、もし

くはmycをコードする。このタグは、典型的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からのST2抗原結合タンパク質の親和性精製または検出のための手段としての役割を果たすことができる。親和性精製は、例えば、タグに対する抗体を親和性マトリックスとして用いたカラムクロマトグラフィーによって達成されてもよい。任意選択的に、切断のための特定のペプチダーゼを用いる等の種々の手段によって、精製したST2抗原結合タンパク質から次にタグを取り除いてもよい。

【0313】

フランキング配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または株に由来する）、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種に由来する）、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの源からのフランキング配列の組み合わせ）、合成、または天然であり得る。そのため、フランキング配列が宿主細胞機構において機能的であり、該機構によって活性化され得る限り、フランキング配列の源は、任意の原核もしくは真核生物、任意の脊椎もしくは無脊椎生物、または任意の植物であり得る。

10

【0314】

本発明のベクターにおいて有用なフランキング配列は、当該技術分野で周知のいくつかの方法のいずれによって得られ得る。典型的には、本明細書において有用なフランキング配列は、マッピングによって、および/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に特定されており、したがって、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて適当な組織源から単離することができる。場合によっては、フランキング配列の完全長ヌクレオチド配列が既知であるかもしれない。本明細書では、フランキング配列は、核酸の合成またはクローニングのために本明細書に記載される方法を用いて合成されてもよい。

20

【0315】

フランキング配列の全てまたは一部のみが既知であるかどうかにかかわらず、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、ならびに/または、同じ種もしくは別の種に由来するオリゴヌクレオチドおよび/もしくはフランキング配列断片等の好適なプローブでゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、フランキング配列を得ることができる。フランキング配列が未知である場合、フランキング配列を含有するDNAの断片は、例えば、コード配列またはさらには別の遺伝子（単数もしくは複数）も含有し得るDNAのより大きな一片から単離されてもよい。制限エンドヌクレアーゼ消化により適当なDNA断片を産生させ、その後、アガロースゲル精製、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth, CA）、または当業者に既知の他の方法を用いて単離することによって、単離が達成されてもよい。この目的を達成するのに好適な酵素の選択は、当業者には容易に明らかになるであろう。

30

【0316】

複製起点は、典型的には、市販品を購入した原核生物発現ベクターの一部であり、起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅に役立つ。選択したベクターが複製起点部位を含有しない場合、既知の配列に基づいて化学的に合成し、ベクター内に連結してもよい。例えば、プラスミドpBR322（New England Biolabs, Beverly, MA）由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に好適であり、種々のウイルス起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV））、またはHPVもしくはBPV等のパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。通常、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない（例えば、SV40起点が用いられることが多いが、それは、単に該起点がウイルス初期プロモーターも含有するためである）。

40

【0317】

転写終結配列は、典型的には、ポリペプチドコード領域の末端の3'側に位置し、転写を終結させる役割を果たす。通常、原核細胞の転写終結配列は、その後ポリT配列が続くG-Cリッチな断片である。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされるか、またはさらにはベクターの一部として市販品が購入されるが、本明細書に記載されるもの等の核酸合成のための方法を用いて容易に合成することもできる。

50

【0318】

選択可能マーカー遺伝子は、選択的な培養培地で成長させる宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は (a) 抗生物質または他の毒素、例えば、原核宿主細胞の場合はアンピシリン、テトラサイクリン、もしくはカナマイシンに対する耐性を付与するタンパク質；(b) 細胞の栄養要求不全を補完するタンパク質；あるいは (c) 複合培地または定義された培地から利用できない決定的に重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。特定の選択可能マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利には、ネオマイシン耐性遺伝子も、原核宿主細胞および真核宿主細胞の両方における選択に用いられ得る。

10

【0319】

他の選択可能遺伝子を用いて、発現される遺伝子を増幅してもよい。増幅は、増殖または細胞生存のために決定的に重要なタンパク質の産生に必要な遺伝子が、組換え細胞の継続的世代の染色体内でタンデムに反復するプロセスである。哺乳動物細胞に好適な選択可能マーカーの例として、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびプロモーターレスのチミジンキナーゼ遺伝子が挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、ベクター中に存在する選択可能遺伝子によって形質転換体のみが生存するように一意的に適応させた選択圧下に置かれる。培地中の選択剤の濃度が連続的に増加される条件下で形質転換細胞を培養することにより選択圧を課し、それによって、選択可能遺伝子および別の遺伝子、例えば、ST2ポリペプチドに結合する抗原結合タンパク質抗体等をコードするDNAの両方の増幅がもたらされる。その結果として、増幅されたDNAから、増加した量のポリペプチド、例えば、ST2抗原結合タンパク質等が合成される。

20

【0320】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、シャイン・ダルガノ配列 (原核生物) またはコザック配列 (真核生物) によって特徴付けられる。この要素は、典型的には、発現されるべきポリペプチドのプロモーターの3'側、およびコード配列の5'側に位置する。ある特定の実施形態において、1つ以上のコード領域が内部リボソーム結合部位 (IRES) に作動可能に連結されてもよく、単一のRNA転写物から2つのオープンリーディングフレームの翻訳が可能となる。

【0321】

場合によっては、例えば、真核宿主細胞発現系においてグリコシル化が望ましい場合、グリコシル化または収率を改善するために、種々のプレ配列またはプロ配列を操作することができる。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変化させてもよいが、または同様にグリコシル化に影響を及ぼし得るプロ配列を付加してもよい。最終タンパク質産物は、-1位 (成熟タンパク質の最初のアミノ酸と比較して) に、完全に除去されていない場合もある、発現に伴う1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得る。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合した、ペプチダーゼ切断部位に見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。代替として、いくつかの酵素切断部位の使用により、酵素が成熟ポリペプチド内のそのような領域を切断する場合、若干ランケート型の形態の所望のポリペプチドを生じ得る。

30

40

【0322】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、典型的には、宿主生物に認識され、かつST2抗原結合タンパク質をコードする分子に作動可能に連結されるプロモーターを含有する。プロモーターは、慣習的に、構造遺伝子の転写を制御する、構造遺伝子の開始コドンの上流 (すなわち、5') (通常、約100~1000bp以内) に位置する非転写配列である。プロモーターは、誘導性プロモーターおよび構成性プロモーターの2つのクラスのうちの1つに分類される。誘導性プロモーターは、培養条件における何らかの変化、例えば、栄養素の有無または温度の変化等に応じて、それらの制御下にあるDNAから増加レベルの転写を開始する。一方、構成性プロモーターは、それらが作動可能に連結した遺伝子を、均一に、すなわち、遺伝子発現をほとんどまたはまったく制御せずに

50

、転写する。様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。好適なプロモーターは、制限酵素消化によってソースDNAからプロモーターを除去し、ベクター内に所望のプロモーター配列を挿入することによって、本発明のST2抗原結合タンパク質を含む重鎖または軽鎖をコードするDNAに作動可能に連結される。

【0323】

酵母宿主とともに用いるのに好適なプロモーターもまた、当該技術分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターとともに有利に用いられる。哺乳動物宿主細胞とともに用いるのに好適なプロモーターが周知であり、それらは、限定されないが、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2等）、ウシパピローマウイルス、鳥肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、そして最も好ましくはサルウイルス40（SV40）等のウイルスのゲノムから得られるものを含む。他の好適な哺乳動物プロモーターは、異種哺乳動物プロモーター、例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターを含む。

10

【0324】

対象となり得るさらなるプロモーターは、限定されないが、SV40初期プロモーター（Benoit and Chambon, 1981, Nature 290:304-310）；CMVプロモーター（Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 81:659-663）；ラウス肉腫ウイルスの3'末端長反復配列に含有されるプロモーター（Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445）；メタロチオネイン遺伝子由来のプロモーターおよび制御配列（Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42）；およびラクタマーゼプロモーター等の原核生物プロモーター（Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731）；またはtacプロモーター（DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25）を含む。同じく対象となるのは、組織特異性を示し、トランスジェニック動物において利用されてきた以下の動物転写制御領域である：膵臓腺房細胞において活性なエラストラーゼI遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38:639-646；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；膵臓細胞において活性なインスリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature 315:115-122）；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Groschedl et al., 1984, Cell 38:647-658；Adames et al., 1985, Nature 318:533-538；Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444）；精巢細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、およびマスト細胞において活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域（Leder et al., 1986, Cell 45:485-495）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276）；肝臓において活性なフェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648；Hammer et al., 1987, Science 253:53-58）；肝臓において活性な1アンチトリプシン遺伝子制御領域（Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171）；骨髄性細胞において活性なグロビン遺伝子制御領域（Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340；Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94）；脳内のオリゴデンドロサイト細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Re

20

30

40

50

adhead et al., 1987, Cell 48:703-712); 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani, 1985, Nature 314:283-286); および視床下部において活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378)。

【0325】

より高次の真核生物による、本発明のST2抗原結合タンパク質を構成する軽鎖または重鎖をコードするDNAの転写を増加させるために、エンハンサー配列がベクターへと挿入されてもよい。エンハンサーは、通常、約10~300bpの長さの、DNAのシス作用性要素であり、プロモーターに作用して転写を増加させる。エンハンサーは、比較的、配向および位置独立性であり、転写単位の5'および3'側の両方の位置で見出されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が既知である(例えば、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、フェトプロテイン、およびインスリン)。しかしながら、典型的には、ウイルス由来のエンハンサーが用いられる。当該技術分野で既知のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーター・エンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーター活性化のための例示的な促進要素である。エンハンサーは、コード配列の5'または3'のいずれかでベクター中に配置されてもよいが、典型的には、プロモーターの5'部位に位置する。抗体の細胞外分泌を促進するために、適切な天然または異種シグナル配列(リーダー配列またはシグナルペプチド)をコードする配列を発現ベクター内に取り込むことができる。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、抗体が産生される宿主細胞の種類に依存し、異種シグナル配列が天然シグナル配列に取って代わることができる。哺乳動物宿主細胞において機能的であるシグナルペプチドの例として、以下が挙げられる: 米国特許第4,965,195号に記載されるインターロイキン7(IL-7)のシグナル配列; Cosman et al., 1984, Nature 312:768に記載されるインターロイキン2受容体のシグナル配列; 欧州特許第0367566号に記載されるインターロイキン4受容体シグナルペプチド; 米国特許第4,968,607号に記載されるI型インターロイキン1受容体シグナルペプチド; 欧州特許第0460846号に記載されるII型インターロイキン1受容体シグナルペプチド。

【0326】

ベクターは、ベクターが宿主細胞ゲノムに組み込まれた時に発現を促進する1つ以上の要素を含有してもよい。例として、EASE要素(Aldrich et al. 2003 Biotechnol Prog. 19:1433-38)およびマトリックス付着領域(MAR)が挙げられる。MARは、クロマチン構造の組織化を媒介し、統合されたベクターを「位置」効果から遮蔽し得る。よって、MARは、安定した形質転換体を作製するためにベクターが使用される場合に特に有用である。多数の天然および合成MAR含有核酸が当該技術分野において既知である(例えば、米国特許第6,239,328号、同第7,326,567号、同第6,177,612号、同第6,388,066号、同第6,245,974号、同第7,259,010号、同第6,037,525号、同第7,422,874号、同第7,129,062号)。

【0327】

本発明の発現ベクターは、市販のベクター等の開始ベクターから構築されてもよい。そのようなベクターは、所望のランキング配列の全てを含有してもまたは含有しなくてもよい。本明細書に記載されるランキング配列のうちの1つ以上がまだベクターに存在しない場合、それらを個別に得て、ベクターに結合させてもよい。ランキング配列の各々を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0328】

ベクターが構築されて、ST2抗原に結合する配列を構成する軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖をコードする核酸分子がベクターの適当な部位に挿入された後、増幅および/またはポリペプチド発現のために、完成したベクターが好適な宿主細胞に挿入されてもよ

い。ST2抗原結合タンパク質の発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、リン酸カルシウム共沈、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、または他の既知の技術を含む周知の方法によって達成することができる。選択される方法は、一部、用いられる宿主細胞の種類に依存するであろう。これらの方法および他の好適な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrook et al., 2001 (上記参照)に記載される。

【0329】

宿主細胞は、適切な条件下で培養するとST2抗原結合タンパク質を合成するが、それは、後に培地から回収することができるか(宿主細胞が該タンパク質を培地内に分泌する場合)、またはそれを産生している宿主細胞から直接回収することができる(該タンパク質が分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾(グリコシル化またはリン酸化等)、および生物学的に活性な分子への折り畳みやすさ等の種々の要因に依存する。宿主細胞は、真核生物または原核生物であり得る。

【0330】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当該技術分野において周知であり、限定されないが、American Type Culture Collection (ATCC)から入手可能な不死化細胞系、および本発明の組換えポリペプチドを作製するために用いることができる当該技術分野で既知の発現系において使用される任意の細胞系を含む。一般的に、宿主細胞は、所望の抗ST2抗体ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え発現ベクターで形質転換させる。中でも、原核細胞、酵母細胞、またはより高次の真核細胞が、利用され得る宿主細胞である。原核生物は、グラム陰性細菌またはグラム陽性細菌、例えば、大腸菌または桿菌を含む。より高次の真核細胞は、昆虫細胞および哺乳動物起源の樹立された細胞系を含む。好適な哺乳動物宿主細胞の例として、サル腎細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175)、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャニーズハムスター卵巢(CHO)細胞、またはそれらの誘導体、例えば、無血清培地で増殖するVeggie CHOおよび関連細胞系(Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31)、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞系、McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821に記載されるようなアフリカミドリザル腎細胞系CVIに由来するCVI/EBNA細胞系(ATCC CCL 70)、ヒト胎児腎細胞、例えば、293、293 EBNA、またはMSR 293、ヒト表皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換された霊長類細胞系、正常2倍体細胞、一時組織のin vitro培養に由来する細胞株、一次外移植片、HL-60、U937、HaKもしくはJurkat細胞が挙げられる。任意選択的に、様々なシグナル伝達またはレポーターアッセイにおいてポリペプチドを使用することが望ましい場合、例えば、HepG2/3B、KB、NIH 3T3、またはS49等の哺乳動物細胞系を、ポリペプチドの発現に用いることができる。代替として、酵母等の低次真核生物または細菌等の原核生物においてポリペプチドを産生することが可能である。好適な酵母は、サッカロミセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、クリベロミセス株、カンジダ、または異種ポリペプチドを発現することができるあらゆる酵母株を含む。好適な細菌株は、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌、または異種ポリペプチドを発現することができるあらゆる細菌株を含む。ポリペプチドが酵母または細菌中で作製される場合、機能的なポリペプチドを得るために、例えば、適切な部位のリン酸化またはグリコシル化によって、そこで産生されるポリペプチドを修飾することが望ましいかもしれない。そのような共有結合的な結合は、既知の化学的または酵素的方法を用いて達成することができる。また、ポリペプチドは、本発明の単離された核酸を、1つ以上の昆虫発現ベクターの好適な制御配列に作動可能に連結し、昆虫発現系を利用することによって産生させることもで

10

20

30

40

50

きる。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料および方法は、例えば、Invitrogen、San Diego, Calif., U.S.A. からキットの形態で市販されており (MaxBac (登録商標) キット)、そのような方法は、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) および Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988) によって記載されるように、当該技術分野において周知である。本明細書に開示される核酸構築物に由来するRNAを用いてポリペプチドを産生するために、無細胞翻訳系も利用することができる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主とともに使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985) に記載されている。好ましくは、少なくとも1つの発現制御配列に作動可能に連結された、本発明の単離された核酸を含む宿主細胞は、「組換え宿主細胞」である。

【0331】

ある特定の実施形態において、どの細胞系が高い発現レベルを有し、ST2結合特性を有する抗原結合タンパク質を構成的に産生するかを決定することにより、細胞系が選択され得る。別の実施形態において、それ自体の抗体は作製しないが、異種抗体を作製および分泌する能力を有するB細胞系列由来の細胞系が選択されてもよい。

【0332】

細胞を枯渇させるST2抗原結合タンパク質

好ましい実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、ST2に結合してIL-33の結合を阻害し、それによってST2を発現する細胞においてIL-33によって媒介されるシグナル伝達を低下させる。しかしながら、ある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質は、枯渇のために、ST2に結合し、ST2を発現する細胞を標的とする。当然、ST2抗原結合タンパク質は、枯渇のために、IL-33の結合を阻害し、ST2細胞を標的としてもよい。

【0333】

細胞を枯渇させるST2抗原結合タンパク質は、ST2の過剰発現と関連する疾患、例えば、炎症性疾患またはST2を発現する腫瘍を治療するのに特に有用である。抗原結合タンパク質、例えば、抗体を用いて細胞を標的とする方法は、当該技術分野において周知である。例示的な実施形態は、後に記載する。

【0334】

抗体薬物コンジュゲート

本発明の実施形態は、抗体薬物コンジュゲート(ADC)を含む。通常、ADCは、化学療法剤、例えば、細胞傷害性剤、細胞増殖抑制剤、毒素、または放射性薬剤にコンジュゲートした抗体を含む。薬物を抗体にコンジュゲートするためにリンカー分子を用いることができる。ADC技術において有用な多様なリンカーおよび薬物が、当該技術分野で既知であり、本発明の実施形態において使用され得る。(米国特許出願公開第20090028856号;同第2009/0274713号;同第2007/0031402号;国際公開第WO2005/084390号;同第WO2009/099728号;米国特許第5208020号;同第5416064号;同第5475092号;5585499号;6436931号;6372738号;および6340701号(参照により、全て本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。

【0335】

リンカー

ある特定の実施形態において、ADCは、1つ以上のリンカー成分から構成されるリンカーを含む。例示的なリンカー成分は、6-マレイミドカプロイル、マレイミドプロパノイル、パリン-シトルリン、アラニン-フェニルアラニン、p-アミノベンジルオキシカルボニル、ならびに、限定されないが、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)

ペントノエート(「SPP」、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」、本明細書において「MCC」とも称される)、およびN-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノ安息香酸(「SIAB」)を含むリンカー試薬とのコンジュゲーションから生じるものを含む。

【0336】

リンカーは、「切断可能な」リンカーまたは「切断不可能な」リンカーであり得る(Ducry and Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13: 参照により、その全体が本明細書に組み込まれる)。切断可能なリンカーは、特定の環境因子に供された時、例えば、標的細胞に内部移行された時に、薬物を放出するように設計される。切断可能なリンカーは、酸に不安定なリンカー、プロテアーゼ感受性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカーを含む。切断不可能なリンカーは、標的細胞による内部移行および標的細胞内の分解の際に、抗体の少なくとも1つのアミノ酸および薬物と共有結合的に会合した状態に留まる傾向がある。例示的な切断不可能なリンカーは、MCCである。

10

【0337】

薬物

ある特定の実施形態において、抗体は、化学療法剤とコンジュゲートする。化学療法剤の例として、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド(CYTOXAN.TM.);スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン;アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ;アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミンを含む、エチレンイミンおよびメチルアメラミン;アセトゲニン(特にプラタシンおよびプラタシノン);カンプトテシン(合成類似体トポテカンを含む);プリオスタチン;カリスタチン;CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む);クリプトフィシン(特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8);ドラスタチン;デュオカルマイシン(合成類似体、KW-2189およびCBI-TMIを含む);エリユテロピン;パンクラチスタチン;サルコディクチン;スポンジスタチン;ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、チオロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン;イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン;フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード;ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン;抗生物質、例えば、エンジイン系抗生物質(例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシン1、およびカリケアマイシンI(例えば、Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)を参照);ダイネマイシンAを含むダイネマイシン;エスペラマイシン;ならびにネオカルチノスタチンクロモフォアおよび関連するクロモプロテイン系エンジイン抗生物質クロモフォア)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン, シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを含む)、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン;代謝拮抗物質、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU);葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート;プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン;ピリミジン類似体、

20

30

40

50

例えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5 - FU；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フロリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォルニチン (elfomithine)；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；マイタンシノイド、例えば、メイトンシンおよびアンサマイトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK、RTM；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (特に、T - 2 毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン)；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド (「Ara - C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、バクリタキセル (TAXOL、TM、Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) およびドセタキセル (TAXOTERE、RTM、Rhone - Poulenc Rorer, Antony, France)；クロラムブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；エトポシド (VP - 16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT - 11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン (difluoromethylomithine) (DMFO)；レチノイン酸；カペシタピン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。また、腫瘍に対するホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲン薬 (例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4 (5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン (フェアストン) を含む)；ならびに抗アンドロゲン薬、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リュープロリド、およびゴセレリン；siRNA、および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体も、この定義に含まれる。本発明とともに用いることができる他の化学療法剤は、米国特許出願公開第20080171040号または同第20080305044号に開示され、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0338】

抗体が2つ以上の異なる化学療法剤にコンジュゲートされ得ること、または薬学的組成物が抗体の混合物を含んでもよいことが企図され、その場合、抗体成分は、異なる化学療法剤にコンジュゲートしていることを除いて同一である。そのような実施形態は、標的細胞を有する複数の生物学的経路を標的とするために有用であり得る。

【0339】

好ましい実施形態において、ADCは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である1つ以上のマイタンシノイド分子にコンジュゲートした抗体を含む。種々の変更例を含むマイタンシノイドは、米国特許第3896111号；同第4151042号；同第4137230号；同第4248870号；同第4256746号；同第4260608号；同第4265814号；同第4294757号；同第4307016号；同第4308268号；同第4309428号；同第4313946号；同第4315929号；同第4317821号；同第4322348号；同第4331598号；

同第4361650号；同第4364866号；同第4424219号；同第4450254号；同第4362663号；同第4371533号、および国際公開第WO2009/099728号に記載される。マイタンシノイド薬物部分は、天然の源から単離することができるか、組換え技術を用いて産生させることができるか、または合成的に調製することができる。例示的なマイタンシノイドは、C-19-デクロロ（米国特許第4256746号）、C-20-ヒドロキシ（またはC-20-デメチル）+/-C-19-デクロロ（米国特許第4307016号および4361650号）、C-20-デメトキシ（またはC-20-アシルオキシ（-OCOR））、+/-デクロロ（米国特許第4294757号）、C-9-SH（米国特許第4,424,219号）、C-14-アルコキシメチル（デメトキシ/CH₂OR）（米国特許第4,331,598号）、C-14-ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル（CH₂OHまたはCH₂OAc）（米国特許第4,450,254号）、C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ（米国特許第4,364,866号）、C-15-メトキシ（米国特許第4,313,946号および4,315,929号）、C-18-N-デメチル（米国特許第4,362,663号および4,322,348号）、ならびに4,5-デオキシ（米国特許第4,371,533号）を含む。

10

【0340】

所望される結合の種類に応じて、マイタンシノイド化合物上の種々の位置が結合位置として用いられ得る。例えば、エステル結合を形成する場合、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチル（hydrozyl）で修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、およびヒドロキシル基を有するC-20位が、全て好適である（米国特許第5208020号、RE39151、および6913748号；米国特許出願公開第20060167245号および同第20070037972号、ならびに国際公開第WO2009099728号）。

20

【0341】

好ましいマイタンシノイドは、当該技術分野においてDM1、DM3、およびDM4として知られるものを含む（米国特許出願公開第2009030924号および同第20050276812号、参照により組み込まれる）。

【0342】

マイタンシノイドを含有するADC、そのようなADCを作製する方法、およびそれらの治療上の用途は、米国特許第5208020号および同第5416064号、米国特許出願公開第20050276812号、ならびに国際公開第WO2009099728号（全て参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。マイタンシノイドADCを作製するために有用なリンカーは、当該技術分野で既知である（米国特許第5208020号および米国特許出願公開第2005016993号および同第20090274713号、全て参照により本明細書に組み込まれる）。SMCCリンカーを含むマイタンシノイドADCは、米国特許公開第2005/0276812号に開示されるように調製されてもよい。

30

【0343】

エフェクター機能増強抗体

抗体のFc部分の機能の1つは、抗体がその標的に結合した時に免疫系に連絡することである。これは、「エフェクター機能」と見なされる。連絡は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、および/または補体依存性細胞傷害（CDC）を引き起こす。ADCCおよびADCPは、免疫系の細胞の表面上にあるFc受容体にFcが結合することによって媒介される。CDCは、Fcと、補体系のタンパク質、例えばC1qとの結合によって媒介される。

40

【0344】

IgGサブクラスは、それらの間でエフェクター機能を媒介する能力が異なる。例えば、IgG1は、ADCCおよびCDCの媒介においてIgG2およびIgG4よりもはるかに優れている。したがって、ST2を発現する細胞が破壊の標的とされる実施形態では

50

、抗S T 2 I g G 1抗体が好ましいであろう。

【0345】

抗体のエフェクター機能は、Fcに1つ以上の変異を導入することによって増加または低下させることができる。本発明の実施形態は、エフェクター機能を増加させるように遺伝子操作されたFcを有する抗原結合タンパク質、例えば、抗体を含む(米国特許第7,317,091号およびStrohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009;両方とも、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。エフェクター機能を増加させる例示的なIgG1 Fc分子は以下の置換を有するものを含む(Kabat付番スキームに基づく): S239D/I332E

【0346】

S239D/A330S/I332E

【0347】

S239D/A330L/I332E

【0348】

S298A/D333A/K334A

【0349】

P247I/A339D

【0350】

P247I/A339Q

【0351】

D280H/K290S

【0352】

D280H/K290S/S298D

【0353】

D280H/K290S/S298V

【0354】

F243L/R292P/Y300L

【0355】

F243L/R292P/Y300L/P396L

【0356】

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L

【0357】

G236A/S239D/I332E

【0358】

K326A/E333A

【0359】

K326W/E333S

【0360】

K290E/S298G/T299A

【0361】

K290N/S298G/T299A

【0362】

K290E/S298G/T299A/K326E

【0363】

K290N/S298G/T299A/K326E

【0364】

本発明のさらなる実施形態は、エフェクター機能を低下させるように遺伝子操作されたFcを有する抗原結合タンパク質、例えば、抗体を含む。エフェクター機能を低下させる例示的なFc分子は、以下の置換を有するものを含む(Kabat付番スキームに基づく)：

10

20

30

40

50

【0365】

N297A (IgG1)

【0366】

L234A / L235A (IgG1)

【0367】

V234A / G237A (IgG2)

【0368】

L235A / G237A / E318A (IgG4)

【0369】

H268Q / V309L / A330S / A331S (IgG2)

10

【0370】

C220S / C226S / C229S / P238S (IgG1)

【0371】

C226S / C229S / E233P / L234V / L235A (IgG1)

【0372】

L234F / L235E / P331S (IgG1)

【0373】

S267E / L328F (IgG1)

【0374】

IgG Fc含有タンパク質のエフェクター機能を増加させる別の方法は、Fcのフコシル化を減少させることによるものである。Fcに結合した二分岐複合型オリゴ糖からコアフコースを除去することにより、抗原結合またはCDCのエフェクター機能を変化させることなく、ADCCのエフェクター機能を大きく増加させた。Fc含有分子、例えば抗体のフコシル化を減少させるかまたは無効にするためのいくつかの方法が知られている。これらは、FUT8ノックアウト細胞系、多様体CHO系Lecl3、ラットハイブリドーマ細胞系YB2/0、FUT8遺伝子を特異的に標的とする低分子干渉RNAを含む細胞系、および-1,4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIおよびゴルジマンノシダーゼIIを共発現する細胞系を含む、特定の哺乳動物細胞系における組換え発現を含む。代替として、Fc含有分子は、植物細胞、酵母、または原核細胞等（例えば、大腸菌）などの非哺乳動物細胞において発現させてもよい。したがって、本発明のある特定の実施形態において、組成物は、フコシル化が減少しているかまたはフコシル化が完全に欠損した抗体、例えば、Ab1、Ab2、Ab3、Ab4、Ab5、Ab6、Ab7、Ab8、Ab9、Ab10、またはAb11を含む。

20

30

【0375】

薬学的組成物

いくつかの実施形態において、本発明は、治療有効量の1つまたは複数の本発明の抗原結合タンパク質を、薬学的に有効な希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤、および/またはアジュバントと一緒に含む薬学的組成物を提供する。ある特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は抗体である。本発明の薬学的組成物は、限定されないが、液体、凍結、および凍結乾燥組成物を含む。

40

【0376】

好ましくは、製剤材料は、用いられる投与量および濃度ではレシピエントに無毒である。具体的な実施形態において、治療有効量のST2抗原結合タンパク質、例えばST2結合抗体を含む薬学的組成物が提供される。

【0377】

ある特定の実施形態において、薬学的組成物は、例えば、組成物のpH、容量オスモル濃度、粘性、透明性、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、該組成物の溶解もしくは放出、吸着もしくは浸透の速度を変更、維持、または保存するための製剤材料を含有してもよい。そのような実施形態において、好適な製剤材料は、限定されないが、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、プロリン、もしくはリジン等）；抗菌剤；

50

酸化防止剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムもしくは亜硫酸水素ナトリウム等）；パ
 ッファ（ボレート、ピカーボネート、トリス - HCl、シトレート、ホスフェート、もし
 くは他の有機酸等）；増量剤（マンニトールもしくはグリシン等）；キレート化剤（エチ
 レンジアミン四酢酸（EDTA）等）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、
 シクロデキストリンもしくはヒドロキシプロピル - シクロデキストリン等）；充填剤；
 単糖類；二糖類；および他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリン
 等）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等）；着色剤、
 香味剤、および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドン等）；低分子量
 ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウム等）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息
 香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパ
 ラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、もしくは過酸化水素等）；溶媒（グリセリン、
 プロピレングリコール、もしくはポリエチレングリコール等）；糖アルコール（マンニト
 ールもしくはソルビトール等）；懸濁化剤；界面活性剤もしくは湿潤剤（プルロニック、
 PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20、ポリソル
 ベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール等）；安
 定性促進剤（スクロースまたはソルビトール等）；張度増強剤（アルカリ金属ハロゲン化
 物、好ましくは、塩化ナトリウムもしくは塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール等
 ）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤および/または薬学的アジュバントが挙げられる。R
 E M I N G T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S , 1 8 " E d
 i t i o n , (A . R . G e n r m o , e d .) , 1 9 9 0 , M a c k P u b l i s h
 i n g C o m p a n y を参照のこと。

【0378】

ある特定の実施形態において、最適な薬学的組成物は、例えば、意図する投与経路、送達
 形態、および所望の投与量に応じて、当業者によって決定される。例えば、R E M I N G
 T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S（上記参照）を参照のこ
 と。ある特定の実施形態において、そのような組成物は、本発明の抗原結合タンパク質の
 物理的状态、安定性、in vivo放出の速度、およびin vivoクリアランスの
 速度に影響を及ぼし得る。ある特定の実施形態において、薬学的組成物中の一次ビヒクル
 または担体は、本質的に水性または非水性のいずれかであってもよい。例えば、好適な
 ビヒクルまたは担体は、非経口投与用の組成物に一般的な他の材料が場合によって補充さ
 れた、注射用水、生理食塩水、または人工脳脊髄液であってもよい。中性緩衝食塩水また
 は血清アルブミンと混合した食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。具体的な実施
 形態において、薬学的組成物は、約pH7.0~8.5のトリス緩衝液または約pH4.
 0~5.5の酢酸緩衝液を含み、さらにソルビトールまたはその好適な代替物を含み得る
 。本発明のある特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質組成物は、所望の純
 度を有する選択された組成物と、任意選択的な配合剤（R E M I N G T O N ' S P H A
 R M A C E U T I C A L S C I E N C E S、上記参照）とを混合することによって、凍
 結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で保存するために調製することができる。さらに、ある
 特定の実施形態において、ST2抗原結合タンパク質産物は、スクロース等の適切な賦形
 剤を用いて凍結乾燥物として製剤化されてもよい。

【0379】

本発明の薬学的組成物は、非経口送達のために選択することができる。代替として、組
 成物は、吸入のため、または消化管を通した送達、例えば経口送達のために選択されても
 よい。そのような薬学的に許容される組成物の調製は、当該技術分野の範囲内である。製
 剤成分は、投与の部位に許容される濃度で存在することが好ましい。ある特定の実施形態
 において、組成物を生理的pHまたはやや低いpHに、典型的には約5~約8のpH範囲
 内に維持するために、パッファが用いられる。

【0380】

非経口投与が企図される場合、本発明に使用される治療組成物は、薬学的に許容される
 ビヒクル中に所望のST2抗原結合タンパク質を含む、発熱物質を含まない非経口的に許

10

20

30

40

50

容される水溶液の形態で提供されてもよい。非経口注射に特に好適なビヒクルは滅菌蒸留水であり、その中で、S T 2 抗原結合タンパク質が、無菌の等張液として製剤化され、適切に保存される。ある特定の実施形態において、調製は、所望の分子と、ある剤との、例えば、デポ注射によって送達され得る生成物の制御放出または徐放性放出を提供し得る注射用マイクロスフェア、生体内分解性粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸もしくはポリグリコール酸等）、ビーズまたはリポソームとの製剤化を含むことができる。ある特定の実施形態において、循環中の徐放期間を促進する効果を有するヒアルロン酸も用いられ得る。ある特定の実施形態において、移植可能な薬物送達デバイスを用いて所望の抗原結合タンパク質を導入してもよい。

【0381】

本発明の薬学的組成物は、吸入用に製剤化することができる。これらの実施形態では、S T 2 抗原結合タンパク質は、乾燥した吸入可能な粉末として有利に製剤化される。具体的な実施形態において、S T 2 抗原結合タンパク質の吸入溶液も、エアロゾル送達のための噴霧剤とともに製剤化され得る。ある特定の実施形態において、溶液は噴霧されてもよい。したがって、肺投与および製剤化の方法は、参照によって組み込まれ、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達について記載する、国際特許出願番号 P C T / U S 9 4 / 0 0 1 8 7 5 号にさらに記載される。

【0382】

製剤は、経口投与され得ることも企図される。この様式で投与される S T 2 抗原結合タンパク質は、錠剤およびカプセル等の固体剤形の調合に慣習的に使用される担体を用いてまたは用いずに製剤化することができる。ある特定の実施形態において、カプセルは、消化管内において、バイオアベイラビリティが最大となり、かつ全身前分解が最低となる時点で製剤の活性部分を放出するように設計することができる。S T 2 抗原結合タンパク質の吸収を促進するために、さらなる剤が含まれてもよい。希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および結合剤も利用され得る。

【0383】

徐放または制御送達製剤中に S T 2 抗原結合タンパク質を含む製剤を含む、さらなる薬学的組成物が当業者に明白である。様々な他の徐放または制御送達手段、例えば、リポソーム担体、生体内分解性微小粒子または多孔性ビーズ、およびデポ注射剤等を製剤化するための技術も当業者に既知である。例えば、参照によって組み込まれ、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー微小粒子の制御放出について記載する、国際特許出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 0 8 2 9 を参照のこと。徐放性調製物は、成形された物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態の、半透性のポリマーマトリックスを含んでもよい。徐放性のマトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（各々が参照により組み込まれる米国特許第 3, 773, 919 号および欧州特許出願公開番号 E P 0 5 8 4 8 1 に開示されるような）、L グルタミン酸および エチル - L - グルタミン酸塩のコポリマー（Sidman et al., 1983, Biopolymers 2: 547-556）、ポリ（2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート）（Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277、および Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105）、エチレン酢酸ビニル（Langer et al., 1981、上記参照）、またはポリ - D（-）- 3 - ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開番号 E P 1 3 3, 9 8 8）を含んでもよい。徐放性組成物はまた、当該技術分野で既知の任意のいくつかの方法のうちいずれかによって調製され得るリポソームを含んでもよい。例えば、Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3688-3692；欧州特許出願公開番号 E P 0 3 6, 6 7 6；同第 E P 0 8 8, 0 4 6 および同第 E P 1 4 3, 9 4 9（参照により組み込まれる）を参照のこと。

【0384】

in vivo 投与のために使用される薬学的組成物は、典型的には滅菌調製物として提供される。滅菌は、滅菌濾過膜を通した濾過によって達成することができる。組成物が

10

20

30

40

50

凍結乾燥される場合、この方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行なわれ得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態でまたは溶液で保存することができる。非経口組成物は、通常、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針によって穿刺可能な栓を有する静脈注射用溶液用のバッグまたはバイアル中に入れられる。

【0385】

本発明の態様は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際特許出願第WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599)号に記載されるような、薬学的組成物として使用することができる自己緩衝ST2抗原結合タンパク質製剤を含む。

10

【0386】

上述のように、ある特定の実施形態は、ST2抗原結合タンパク質のタンパク質組成物、具体的には、ST2抗原結合タンパク質に加えて、本項および本明細書の他の箇所で例示的に記載されるもの等の1つ以上の賦形剤を含む薬学的なST2抗原結合タンパク質組成物を提供する。この点において、賦形剤は、製剤の物理的、化学的、もしくは生物学的特性の調節(粘性の調節等)、および/または有効性を向上させるための本発明のプロセス、ならびに/または、例えば、製造中、出荷中、保存中、使用前調製中、投与中、およびその後生じるストレスによる分解および損傷に対して、そのような製剤およびプロセスを安定させること等の、多様な目的のために本発明において使用することができる。

20

【0387】

具体的には、特に、獣医学および/またはヒト医学的用途のためのタンパク質医薬品およびプロセスに関して、賦形剤および本発明による自己緩衝タンパク質製剤のための賦形剤のプロセスに関する部分において、Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3):285-91(1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13:61-84(2002)、およびRandolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13:159-75(2002)(これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)等の、タンパク質の安定化、ならびにこの点において有用な製剤材料および方法に関する様々な解説が入手可能である。

30

【0388】

例えば、製剤のイオン強度および/もしくは等張性を調節するため、ならびに/または本発明による組成物のタンパク質もしくは他の成分の溶解性および/もしくは物理的安定性を向上させるために、本発明のある特定の実施形態に従って塩が用いられてもよい。

【0389】

周知のように、イオンは、タンパク質の表面上で荷電残基に結合することによって、ならびにタンパク質中の荷電基および極性基を遮蔽して、それらの静電相互作用、引力、および反発相互作用の強度を減少させることによって、タンパク質の天然状態を安定させることができる。イオンはまた、特に、タンパク質の変性ペプチド結合(-CONH)に結合することによって、タンパク質の変性状態を安定させることもできる。さらに、タンパク質中の荷電基および極性基とのイオン相互作用によっても、分子間静電相互作用を減少させ、それにより、タンパク質の凝集および不溶性を防止するかまたは低下させることができる。

40

【0390】

イオン種は、タンパク質に対するそれらの効果が互いに有意に異なる。本発明による薬

50

学的組成物を製剤化する際に使用することができる、タンパク質に対するイオンおよびそれらの効果のカテゴリー別の順位付け法が多数開発されている。一例として、イオン性溶質および極性非イオン溶質を、溶液中のタンパク質の立体配座安定性に対するそれらの効果別に順位付けするホフマイスターシリーズが挙げられる。安定化溶質は、「コスモトロピック」と称される。不安定化溶質は、「カオトロピック」と称される。コスモトロブは、一般的に、溶液からタンパク質を沈殿させる（「塩析する」）ために高濃度（例えば、1モル超の硫酸アンモニウム）で用いられる。カオトロブは、一般的に、タンパク質を変性させる、および/または可溶化する（「塩溶する」）ために使用される。「塩溶」および「塩析」するためのイオンの相対的有効性が、ホフマイスターシリーズにおけるそれらの位置を画定する。

10

【0391】

遊離アミノ酸は、増量剤、安定剤、および酸化防止剤、ならびに他の標準的な用途として、本発明の種々の実施形態によるST2抗原結合タンパク質製剤に使用することができる。製剤中のタンパク質を安定させるために、リジン、プロリン、セリン、およびアラニンを使用することができる。グリシンは、正確なケーキの構造および特性を確保するために、凍結乾燥において有用である。アルギニン、液体製剤および凍結乾燥製剤の両方において、タンパク質の凝集を阻害するために有用であり得る。メチオニン、酸化防止剤として有用である。

【0392】

ポリオールは、糖類、例えば、マンニトール、スクロース、ならびにソルビトール、および多価アルコール、例えば、グリセロールおよびプロピレングリコール等、そして本明細書における考察の目的のために、ポリエチレングリコール（PEG）および関連物質を含む。ポリオールは、コスモトロピックである。それらは、物理的および化学的な分解過程からタンパク質を保護するために、液体製剤および凍結乾燥製剤の両方において有用な安定化剤である。また、ポリオールは、製剤の等張性を調節するためにも有用である。

20

【0393】

本発明の選択実施形態において有用なポリオールの中には、凍結乾燥調合物におけるケーキの構造的安定性を確保するために一般的に使用されるマンニトールがある。それは、ケーキに対する構造的安定性を確実にする。それは、通常、冷凍保護剤、例えば、スクロースとともに使用される。ソルビトールおよびスクロースは、等張性を調節するための好ましい剤のうちの一つであり、輸送または製造工程中のバルクの調製中の凍結融解ストレスから保護する安定剤として存在する。グルコースおよびラクトース等の還元糖（遊離アルデヒド基またはケトン基を含有する）は、表面のリジン残基およびアルギニン残基を糖化することができる。したがって、それらは、通常、本発明による使用に好ましいポリオールの中には入らない。さらに、酸性条件下でフルクトースおよびグルコースに加水分解され、その結果として糖化を引き起こす、スクロース等のそのような反応種を形成する糖類も、この点において本発明の好ましいポリオールの中には入らない。PEGは、タンパク質を安定させるために、および抗凍結剤として有用であり、この点において本発明において使用することができる。

30

【0394】

ST2抗原結合タンパク質製剤の実施形態は、界面活性剤をさらに含む。タンパク質分子は、表面上での吸着、ならびに空気-液体、固体-液体、および液体-液体界面における変性およびその結果としての凝集の影響を受けやすい可能性がある。これらの効果は、通常、タンパク質濃度と逆比例する。これらの有害な相互作用は、通常、タンパク質濃度と逆比例し、典型的には、製品の出荷および取扱い中に生じるもの等の物理的攪拌によって悪化する。

40

【0395】

界面活性剤は、表面吸着を防止する、最小限に抑える、または低減させるために、日常的に使用される。この点において本発明において有用な界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ソルビタンポリエトキシレートの他の脂肪酸エステル、および

50

ポロキサマー 188 を含む。

【0396】

また、界面活性剤は、タンパク質の立体配座安定性を制御するためにも一般的に使用される。任意の所与の界面活性剤は、典型的には、あるタンパク質を安定させ、他のタンパク質を不安定にするため、この点において界面活性剤の使用はタンパク質に特異的である。

【0397】

ポリソルベートは、酸化分解の影響を受けやすく、しばしば、供給された時にタンパク質残基の側鎖、特に、メチオニンの酸化を引き起こすのに十分な量の過酸化物を含有する。そのため、ポリソルベートは、慎重に使用されるべきであり、使用される時は、それらの最低有効濃度で用いられるべきである。この点において、ポリソルベートは、賦形剤はそれらの最低有効濃度で使用されるべきであるという一般的な規則を例示する。

10

【0398】

ST2 抗原結合タンパク質製剤の実施形態は、1つ以上の酸化防止剤をさらに含む。適当なレベルの周囲酸素および温度を維持することによって、ならびに光への曝露を回避することによって、医薬品におけるタンパク質の有害な酸化をある程度防止することができる。タンパク質の酸化分解を防止するために、酸化防止賦形剤も使用することができる。この点において有用な酸化防止剤の中には、還元剤、酸素/フリーラジカル捕捉剤、およびキレート化剤がある。本発明による治療用タンパク質製剤において使用される酸化防止剤は、好ましくは、水溶性であり、製品の有効期間全体を通してそれらの活性を維持する。この点において、EDTA は、本発明による好ましい酸化防止剤である。

20

【0399】

酸化防止剤は、タンパク質を損傷し得る。例えば、特にグルタチオン等の還元剤は、分子内ジスルフィド結合を破壊する可能性がある。したがって、本発明で使用される酸化防止剤は、とりわけ、それら自体が製剤中のタンパク質を損傷する可能性を排除するかまたは十分に低下させるように選択される。

【0400】

本発明による製剤は、タンパク質補因子であり、かつ特定のインスリン懸濁液を形成するために必要な亜鉛等のタンパク質配位複合体を形成するために必要な、金属イオンを含んでもよい。金属イオンは、タンパク質を分解するいくつかのプロセスを阻害することもできる。しかしながら、金属イオンはまた、タンパク質を分解する物理的および化学的プロセスを触媒する。

30

【0401】

アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への異性化を阻害するために、マグネシウムイオン (10 ~ 120 mM) を用いることができる。Ca⁺2イオン (最大 100 mM) は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼの安定性を増加させることができる。しかしながら、Mg⁺2、Mn⁺2、およびZn⁺2は、rhDNAseを不安定にさせ得る。同様に、Ca⁺2およびSr⁺2は、因子VIIを安定させることができ、それは、Mg⁺2、Mn⁺2およびZn⁺2、Cu⁺2およびFe⁺2によって不安定にされ得、またその凝集は、Al⁺3イオンによって増加され得る。

40

【0402】

ST2 抗原結合タンパク質製剤の実施形態は、1つ以上の防腐剤をさらに含む。防腐剤は、同じ容器から1回よりも多く取り出すことを伴う、複数回投与用の非経口製剤を開発するときに必要なものである。それらの主要な機能は、微生物の増殖を阻害し、薬剤製品の有効期間または使用期間全体を通して製品の無菌性を確保することである。一般的に使用される防腐剤は、ベンジルアルコール、フェノール、およびm-クレゾールを含む。防腐剤は、低分子非経口剤と一緒に使用されるという長い歴史を有するが、防腐剤を含むタンパク質製剤の開発は困難であり得る。防腐剤は、ほぼ必ずタンパク質に対する不安定化効果 (凝集) を有し、これは、複数回投与用のタンパク質製剤におけるそれらの使用を制限する主な要因になっている。現在まで、ほとんどのタンパク質製剤は、単回使用のみのため

50

に製剤化されている。しかしながら、複数回投与用の製剤が可能な場合、それらは、患者の利便性および市場性の増加を可能にするという付加的な利点を有する。適例は、保存製剤の開発が、より利便性の高い複数回使用注射ペン形態の商品化につながった、ヒト成長ホルモン(hGH)の例である。hGHの保存製剤を含有する少なくとも4つのそのようなペンデバイスが、現在市場で入手可能である。Norditropin(液体、Novo Nordisk)、Nutropin AQ(液体、Genentech)、およびGenotropin(凍結乾燥、二重チャンバカートリッジ、Pharmacia & Upjohn)が、フェノールを含有する一方で、Somatropin(Eli Lilly)は、m-クレゾールを用いて製剤化される。

【0403】

保存剤形の製剤化および開発中に、いくつかの側面が考慮される必要がある。薬剤製品中の有効防腐剤濃度は最適化されなければならない。これは、タンパク質の安定性を犠牲にすることなく、抗菌有効性を付与する濃度範囲の剤形において所与の防腐剤を検査することを必要とする。

【0404】

予想され得るように、防腐剤を含有する液体製剤の開発は、凍結乾燥製剤よりも困難である。凍結乾燥製品は、防腐剤なしで凍結乾燥し、使用時に防腐剤を含有する希釈剤を用いて再構成することができる。これは、防腐剤がタンパク質と接触している時間を短縮し、付随する安定性リスクを極めて最小限に抑える。液体製剤では、防腐剤の有効性および安定性が、製品の保存期間(約18~24ヶ月)全体にわたって維持されるべきである。留意すべき重要な点は、活性薬剤および全ての賦形剤成分を含有する最終製剤において、防腐剤の有効性が証明されるべきであるということである。

【0405】

ST2抗原結合タンパク質製剤は、通常、とりわけ、バイオアベイラビリティおよび持続性の範囲をそなえた、特定の投与経路および投与方法のため、特定の投与量および投与頻度のため、特定の疾患の特定の治療のために設計される。したがって、製剤は、限定されないが、経口的、経耳的、経眼的、経直腸的、および経膈的を含む任意の好適な経路による送達、ならびに静脈内および動脈内注射、筋肉内注射、および皮下注射を含む非経口経路による送達のために、本発明に従って設計されてもよい。

【0406】

一旦、薬学的組成物が製剤化されると、それは、溶液、懸濁液、ゲル、乳剤、固体、結晶として、または脱水粉末もしくは凍結乾燥粉末として、無菌バイアル中に保存することができる。そのような製剤は、すぐに使用できる形態、または投与前に再構成される形態(例えば、凍結乾燥)のいずれかで保存され得る。本発明はまた、単回用量投与単位を生成するためのキットも提供する。本発明のキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第1の容器、および水性製剤を有する第2の容器の両方を含んでもよい。本発明のある特定の実施形態において、単一チャンバおよび複数チャンバ付きのプレフィルドシリンジ(例えば、液体シリンジおよび凍結乾燥シリンジ)を含むキットが提供される。

【0407】

用いられるST2抗原結合タンパク質含有薬学的組成物の治療有効量は、例えば、治療の状況および目的に依存する。当業者は、治療のための適切な投与量レベルは、送達される分子、ST2抗原結合タンパク質が使用される適応症、投与経路、ならびに患者のサイズ(体重、体表面、もしくは臓器サイズ)および/または状態(年齢および全般的健康)に一部依存することを理解する。ある特定の実施形態において、臨床医は、最適な治療効果を得るように、投与量を滴定してもよく、また投与経路を変更してもよい。典型的な投与量は、上述の要因に応じて、約0.1 μg/kg~最大約30 mg/kgの範囲かまたはそれ以上であってもよい。具体的な実施形態において、投与量は、1.0 μg/kg~最大約20 mg/kg、任意選択的に、10 μg/kg~最大約10 mg/kg、または100 μg/kg~最大約5 mg/kgの範囲であってもよい。

【0408】

治療有効量の S T 2 抗原結合タンパク質は、疾患症状の重症度の軽減、疾患の無症状期間の頻度もしくは期間の増加、または病気に罹患していることによる損傷または障害の防止をもたらすことが好ましい。

【0409】

薬学的組成物は、医療デバイスを使用して投与されてもよい。薬学的組成物を投与するための医療デバイスの例は、米国特許第 4, 475, 196 号、同第 4, 439, 196 号、同第 4, 447, 224 号、同第 4, 447, 233 号、同第 4, 486, 194 号、同第 4, 487, 603 号、同第 4, 596, 556 号、同第 4, 790, 824 号、同第 4, 941, 880 号、同第 5, 064, 413 号、同第 5, 312, 335 号、同第 5, 312, 335 号、同第 5, 383, 851 号、および同第 5, 399, 163 号（全て参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

10

【0410】

S T 2 関連疾患または障害の診断方法または治療方法

本発明の S T 2 抗原結合タンパク質は、生物試料中の S T 2 を検出するために特に有用である。ある特定の実施形態において、患者から得られた生物試料を、S T 2 抗原結合タンパク質と接触させる。次いで、S T 2 抗原結合タンパク質の S T 2 への結合を検出し、試料中の S T 2 の存在または相対量を決定する。そのような方法は、S T 2 抗原結合タンパク質を用いた治療に適した患者を診断または決定する際に有用であり得る。

【0411】

ある特定の実施形態において、本発明の S T 2 抗原結合タンパク質は、自己免疫疾患または炎症性疾患を診断、検出、または治療するために使用される。自己免疫疾患または炎症性疾患の治療において、S T 2 抗原結合タンパク質は、免疫系の S T 2 を発現する細胞を破壊の標的とすることができ、かつ/または S T 2 と I L - 33 との相互作用をブロックすることができる。

20

【0412】

I L - 33 によって媒介されるシグナル伝達と関連する障害は、本明細書に開示される 1 つ以上の S T 2 抗原結合タンパク質を用いた治療に特に適している。そのような障害は、限定されないが、炎症、自己免疫性疾患、腫瘍随伴性自己免疫疾患、軟骨の炎症、線維性疾患および/または骨分解、関節炎、関節リウマチ、若年性関節炎、若年性関節リウマチ、少関節型若年性関節リウマチ、多関節型若年性関節リウマチ、全身型若年性関節リウマチ、若年性強直性脊椎炎、若年性腸炎性関節炎、若年性反応性関節炎、若年性ライター症候群、S E A 症候群（血清陰性、腱附着部症、関節症候群）、若年性皮膚筋炎、若年性乾癬性関節炎、若年性強皮症、若年性全身性エリテマトーデス、若年性血管炎、少関節型関節リウマチ、多関節型関節リウマチ、全身型関節リウマチ、強直性脊椎炎、腸炎性関節炎、反応性関節炎、ライター症候群、S E A 症候群（血清陰性、腱附着部症、関節症候群）、皮膚筋炎、乾癬性関節炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、血管炎、脊髄炎（myelitis）、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、サルコイドーシス、強皮症、硬化症、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、シェーグレン症候群、乾癬、プラーク乾癬、滴状乾癬、逆性乾癬、膿疱性乾癬、乾癬性紅皮症、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、粥状動脈硬化、狼瘡、ステイル病、全身性エリテマトーデス（SLE）、重症筋無力症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、多発性硬化症（MS）、喘息、COPD、副鼻腔炎、ポリープを伴う副鼻腔炎、好酸球性食道炎、好酸球性気管支炎、ギランバレー疾患、I 型糖尿病、甲状腺炎（たとえばグレーブス病）、アジソン病、レイノー現象、自己免疫性肝炎、GVHD、移植拒絶反応、腎障害等を含む。

30

40

【0413】

好ましい実施形態において、自己免疫疾患または炎症性疾患は、喘息、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患、肺線維症、敗血症および外傷、HIV 感染、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、関節リウマチ、硬化症、ウェゲナー肉芽腫症、ベーチェット病、循環器疾患、副鼻腔炎、鼻ポリープ症、および好酸球性気管支炎である。

50

【0414】

ある特定の実施形態において、本発明のST2抗原結合タンパク質は、癌または腫瘍形成障害を診断、検出、または治療するために使用される。癌または腫瘍形成障害の治療において、ST2抗原結合タンパク質は、ST2を発現する細胞を破壊の標的とすることができ、かつ/またはST2とIL-33との相互作用をブロックすることができ、それによってIL-33によって媒介されるシグナル伝達を低下させる。例えば、可溶性の高いST2の発現は、乳癌患者の生存率の向上と関連している(Prechtel et al, Lab Invest (2001) 81:159-165)。可溶性ST2は、IL-33によって媒介されるシグナル伝達に結合してブロックするため、IL-33によって媒介されるシグナル伝達をブロックするST2抗原結合タンパク質は、乳癌患者の生存率の向上を促進するのに有用であると考えられる。ST2抗原結合タンパク質を用いて診断、検出、または治療され得る癌または腫瘍形成障害は、限定されないが、固形腫瘍全般、肺癌、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、子宮内膜癌、腎癌、食道癌、膵癌、扁平上皮癌、ぶどう膜黒色腫、子宮頸癌、結腸直腸癌、膀胱、脳、膵臓、頭、首、肝臓、白血病、リンパ腫、およびホジキン病、多発性骨髄腫、メラノーマ、胃癌、星細胞腫(astrocytic cancer)、胃、および肺腺癌を含む。

10

【0415】

抗原結合タンパク質は、腫瘍の増殖、進行、および/または転移を抑制するために使用されてもよい。そのような抑制は、種々の方法を用いて監視することができる。例えば、抑制は、腫瘍サイズの縮小および/または腫瘍内の代謝活性の低下をもたらし得る。これらのパラメータはどちらも、例えば、MRIまたはPETスキャンによって測定することができる。抑制はまた、腫瘍内の壊死レベル、腫瘍細胞死、および血管増生レベルを確認するための生検によっても監視することができる。転移の程度は、既知の方法を用いて監視することができる。

20

【実施例】

【0416】

実際的および予測的の両方である以下の実施例は、本発明の具体的な実施形態または特徴を例示する目的で提供されるのであって、その範囲を限定することを意図するものではない。

【0417】

実施例1：ST2抗体は、喘息の動物モデルにおいて有効である

この実施例は、ST2に結合し、かつIL-33によって媒介されるシグナル伝達を阻害する抗体の投与が、炎症性疾患、すなわち喘息の動物モデルにおいて有効であることを実証する。中和マウスST2 mAb(ST2代替mAb)は、in vivoで外因的に投与したIL-33の活性を阻害した。100ugの抗ST2 mAbの静脈内注射から2時間後、200ngの組換えマウスIL-33をマウスに鼻腔内投与した。翌日、気管支肺胞洗浄液(BALF)IL-5の濃度をELISAにより測定した。生理食塩水を接種する前に生理食塩水で処置したマウスのBALFからベースラインIL-5濃度を得た。IL-33を接種した、アイソタイプ対照Igで処置したマウスから最大BALF IL-5濃度を得た。ST2 mAbによる処置は、アイソタイプ対照Igによる処置と比較して、BALB/cマウス系統およびC57BL/6マウス系統の両方のBALFにおいて、IL-33によって誘導されたIL-5を有意に阻害した(図1)。

30

40

【0418】

ST2代替mAbは、喘息のゴキブリアレゲン(CRA)誘発モデルにおいて有効であり、ST2抗体で処置したマウスは、アイソタイプ対照Igで処置したマウスよりも有意に少ないBALF好酸球を有していた。1、3、6、8、10、および13日目に、100ugのCRAをBALB/cマウスに接種した。0、7、および13日目に、抗ST2 mAbまたはアイソタイプ対照Igのいずれかを250ugマウスに注射し、13日目の抗体注射は、最終的な鼻腔内CRA接種の前に行った。14日目に、マウスを安楽死させ、肺洗浄に供した。BALF細胞集団を数えたところ、抗ST2 mAbによる処置は

50

有意に少ない全BALF細胞の存在をもたらし、好酸球は有意に強い影響を受けた (impacted) 細胞集団を含んでいた (図2)。

実施例2：Xenomouse (登録商標) プラットフォームを使用した抗ST2抗体の産生

【0419】

XENOMOUSE (登録商標) 技術を用いて、ヒトST2に対して指向する完全ヒト抗体の産生を行った (米国特許第6,114,598号; 6,162,963号; 6,833,268号; 7,049,426号; 7,064,244号 (参照により、その全体が本明細書に組み込まれる); Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green and Jakobovits, 1998, J. Ex. Med. 188:483-495, Kellermann and Green, 2002, Current Opinion in Biotechnology, 13:593-597)。

10

【0420】

ヒト抗体Fcドメインに融合したヒトST2の細胞外ドメインを含むポリペプチド、またはヒトIL-33と複合体を形成したヒトST2-Fc融合タンパク質のいずれかを用いて、XMG2K、XMG4K、およびXMG4KL XENOMOUSE (登録商標) 動物の免疫を行った。1996年12月3日に出版された米国特許出願第08/759,620号、ならびに1998年6月11日に公開された国際特許出願第WO98/24893号、および2000年12月21日に公開された国際公開第WO00/76310号 (参照により、これらの開示は本明細書に組み込まれる) に開示される方法に従って、適量の免疫原 (すなわち、10 µg / マウスの可溶性ST2) をXENOMOUSE (登録商標) 動物の初期免疫に用いた。初期免疫後、それに続く追加免疫の免疫原 (5 µg / マウスの可溶性ST2またはST2/IL33複合体のいずれか) を、予定通り、マウスにおいて抗ST2抗体の好適な力価を誘導するのに必要な期間投与した。好適な方法、例えば、ELISAまたは蛍光標識細胞分取 (FAC) によって力価を決定した。

20

【0421】

好適な力価を示す動物を同定し、流入領域リンパ節からリンパ球を得、必要があれば各コホートについてプールした。組織から細胞を遊離させるための好適な培地 (例えば、Invitrogen、Carlsbad, CAから入手したダルベッコ変法イーグル培地: DMEM) 中で粉砕することによりリンパ組織からリンパ球を解離して、DMEM中に懸濁した。好適な方法を用いてB細胞を選択および/または増殖させ、当該技術分野で既知の技術を用いて好適な融合パートナー、例えば、非分泌型骨髓腫P3X63Ag8.653細胞 (American Type Culture Collection CRL 1580; Kearney et al., J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) と融合させた。

30

【0422】

ある融合方法において、リンパ球を1:4の比率で融合パートナー細胞と混合した。400 × gで4分間遠心分離することにより細胞混合物を緩やかにペレット化し、上清をデカントし、(例えば、1 mLピペットを使用することにより) 細胞混合物を緩やかに混合した。PEG/DMSO (ポリエチレングリコール/ジメチルスルホキシド: Sigma-Aldrich, St. Louis MOから入手可能、リンパ球100万個当たり1 mL) で融合を誘導した。緩やかに攪拌しながらPEG/DMSOを1分間かけて徐々に加え、続いて1分間混合した。次いで、緩やかに攪拌しながらIDMEM (グルタミンを含まないDMEM、B細胞100万個当たり2 mL) を2分間かけて加え、続いてさらにIDMEM (B細胞100万個当たり8 mL) を3分間かけて加えた。

40

【0423】

融合細胞を緩やかにペレット化し (400 × gで6分)、B細胞100万個当たり20 mLの選択培地 (必要に応じてアザセリンおよびヒポキサンチン [HA] ならびに他の補

50

助的材料を含有するDMEM)中に再懸濁した。37℃で20~30分間細胞をインキュベートし、次いで200mLの選択培地に再懸濁し、T175フラスコ内で3~4日培養した後、96ウェルにプレATINGした。

【0424】

得られるコロニーのクローン性を最大化するために、標準技術を用いて96ウェルプレートに細胞を分配した。数日間の培養後、上清を回収してスクリーニングアッセイに供した。ST2-Fc/IL33複合体で免疫したマウスから作製したハイブリドーマ上清を、ヒトIL-33と複合体を形成した0.5ug/mLのST2-Flag/hisを用いて4℃で一晩受動的にコーティングした96ウェルポリスチレンELISAプレートを10を使用して実施したELISAに基づくアッセイでスクリーニングした。ST-2特異的結合を決定するために、10ug/mLのニュートラアビジン(neutravidin)を用いて4℃で一晩受動的にコーティングした96ウェルポリスチレンプレートを使用して2回目のELISAスクリーニングを行った。次いで、プレートを洗浄し、0.5ug/mLのビオチン化ヒトIL33をロードした。このELISAスクリーニングにより、1200個を超える抗ST2特異的結合剤を同定した。

10

【0425】

可溶性ST2-Fcで免疫したマウスから作製したハイブリドーマ上清を、完全長ヒトST2で一過性にトランスフェクトした組換えHEK293T細胞に対してスクリーニングし、模擬トランスフェクトしたHEK293T細胞に対してカウンタースクリーニングすることにより、蛍光微量測定技術(FMAT)を用いてST2抗原特異的抗体についてスクリーニングした。端的に述べると、40ul/ウェルの体積の384ウェルFMATプレートに、6,000個のST2陽性細胞/ウェルおよび14,000個の模擬トランスフェクトしたST2陰性細胞/ウェルの密度で細胞を播種した。次いで、ハイブリドーマ上清を加え、室温で1時間結合させた後、洗浄し、抗ヒトFc-Cy5二次抗体を用いて二次検出を行った。このFMATスクリーニングにより、ST2の細胞外ドメインで免疫したマウスから作製したハイブリドーマから、2200個を超える抗ST2特異的結合剤を同定した。

20

【0426】

この3400個の抗ST2特異的ハイブリドーマ上清を組み合わせたパネルを、次いで、インターフェロン-γサイトカイン放出アッセイを用いて、ST2シグナル伝達を機能的に拮抗する能力についてさらに特徴付けた。端的に述べると、精製したヒト末梢血単核球(PBMNC)または精製したヒトNK細胞のいずれかを、96ウェル組織培養プレートに播種し、ヒトIL-33およびIL-12で刺激してインターフェロン-γの上清中への放出を誘導した。上清中のインターフェロン-γレベルを定量化したところ、IL-33/ST2依存性シグナル伝達(dependant signaling)と直接関連していた。このバイオアッセイを用いて、ハイブリドーマ試料を、ST2シグナル伝達経路の遮断によってインターフェロン-γの放出をブロックする能力について検査した。このスクリーニングにより、インターフェロン-γの放出を80%超阻害した、ST2-Fcによる免疫から作製した578個のハイブリドーマ上清を同定した。さらに、インターフェロン-γの放出を70%超阻害した、ST2-Fc/IL-33複合体による免疫から作製した505個のハイブリドーマ上清を同定した。

30

40

【0427】

次いで、この1083個のハイブリドーマ上清のパネルを、マウスおよびカニクイザルのST2との交差反応結合、制限抗原ELISAによる相対的親和性ランキング、ELISAによる生化学的受容体/リガンドのブロッキング、および細胞系を用いたFACSによる内因性結合についてさらに特徴付けた。これらの二次アッセイで作製されたデータを用いて、大きなパネルを2セットの40個のハイブリドーマ系に多様化し、サブクローニング、スケールアップ、および精製へと進めた。

実施例3：K_Dの決定

【0428】

50

この実施例では、ST2結合抗体の親和性を決定した。GLCセンサチップ(Bio-Rad)を搭載したProteon XPR-36光バイオセンサを使用して、表面プラズモン共鳴法による評価を行った。バイオセンサ分析は、HBS-EP+(1X)緩衝系(10mM HEPES(pH7.4)、150mM NaCl、3.0mM EDTA、0.05% Surfactant P20、GE Healthcare)において25で行った。注入前は、全ての試薬を8に維持した。

【0429】

1~6レーン(約4000RU)への標準的なアミンカップリングにより、ヤギ抗ヒトIgG(Fc断片特異的、Jackson ImmunoResearch)をセンサ表面に垂直方向に固定し、次いでエタノールアミンでブロックした。1~5レーンで垂直方向に抗体を捕捉した(約40~100RU)。垂直方向レーン6をブランクとし、参照目的に使用した。15個の抗体の群でデータを収集した(5個を3セット)。

10

【0430】

ST2試薬(ヒトまたはカニクイザル)をランニング緩衝液中で25nMの濃度に調製し、次いで、309pMに3倍段階希釈した。緩衝液を用いて、水平方向に沿った単回注入により各ST2分子の完全な濃度系列を送達し、一列の6つの試料を完成させ、反応データの二重参照のための1列に並んだ(in-line)ブランクを提供した。100uL/分の流速で会合(3分)および解離(30分)の速度を監視した。

【0431】

10mMグリシン(pH1.5、30uL)を用いて100uL/分の流速で表面を再生した。

20

【0432】

データを、ベースライン補正し、クロップし、アラインし、参照値を差し引いて(スポット間)、次いで、ProteOn Manager(バージョン2.1.2.05)を用いて1:1結合モデルに適合させた。その結果を表4に示す。

表4

【表 4】

抗体	分析物	ka	kd	KD (pM)	抗体	分析物	ka	kd	KD (pM)
Ab12	cy ST2	2.50E+06	5.60E-05	22.5	Ab12	hu ST2	2.35E+06	3.41E-05	14.5
Ab13	cy ST2	1.40E+06	1.80E-04	128.0	Ab13	hu ST2	1.30E+06	9.12E-05	70.3
Ab14	cy ST2	3.57E+06	1.59E-03	445.0	Ab14	hu ST2	4.22E+06	2.57E-05	6.1
Ab15	cy ST2	2.67E+06	6.23E-05	23.4	Ab15	hu ST2	1.83E+06	5.38E-05	29.3
Ab16	cy ST2	2.61E+06	2.18E-04	83.7	Ab16	hu ST2	1.28E+06	1.47E-04	115.0
Ab17	cy ST2	3.38E+06	1.43E-04	42.2	Ab17	hu ST2	2.86E+06	1.04E-04	36.4
Ab18	cy ST2	3.16E+06	1.44E-04	45.7	Ab18	hu ST2	2.67E+06	1.19E-04	44.5
Ab19	cy ST2	3.07E+06	1.59E-04	51.8	Ab19	hu ST2	2.81E+06	1.25E-04	44.5
Ab20	cy ST2	2.61E+06	6.64E-05	25.5	Ab20	hu ST2	2.41E+06	5.68E-05	23.5
Ab21	cy ST2	3.21E+06	4.92E-05	15.3	Ab21	hu ST2	2.83E+06	3.07E-05	10.8
Ab22	cy ST2	2.87E+06	5.33E-05	18.6	Ab22	hu ST2	2.50E+06	4.05E-05	16.2
Ab23	cy ST2	3.29E+06	3.23E-04	98.2	Ab23	hu ST2	2.70E+06	2.24E-04	83.1
Ab24	cy ST2	2.03E+06	1.54E-04	75.9	Ab24	hu ST2	2.89E+06	1.50E-04	51.7
Ab25	cy ST2	6.42E+06	5.75E-04	89.6	Ab25	hu ST2	4.00E+06	5.44E-04	136.0
Ab26	cy ST2	5.65E+06	3.08E-04	54.5	Ab26	hu ST2	5.22E+06	2.97E-04	56.9
Ab27	cy ST2	1.63E+06	3.75E-04	230.0	Ab27	hu ST2	1.35E+06	3.12E-04	230.0
Ab28	cy ST2	2.97E+06	1.35E-05	4.5	Ab28	hu ST2	2.37E+06	1.98E-05	8.4
Ab29	cy ST2	3.97E+05	9.45E-05	238.0	Ab29	hu ST2	3.76E+05	8.96E-05	238.0
Ab30	cy ST2	3.09E+06	3.17E-05	10.2	Ab30	hu ST2	2.79E+06	2.71E-05	9.7
Ab31	cy ST2	1.07E+06	2.08E-04	194.0	Ab31	hu ST2	8.78E+05	2.43E-04	277.0
Ab32	cy ST2	4.81E+06	2.69E-04	55.8	Ab32	hu ST2	4.37E+06	2.63E-04	60.2
Ab33	cy ST2	4.26E+06	3.31E-04	77.6	Ab33	hu ST2	4.04E+06	3.41E-04	84.4
Ab34	cy ST2	2.78E+06	4.60E-05	16.5	Ab34	hu ST2	2.61E+06	3.19E-05	12.3
Ab35	cy ST2	9.76E+05	1.00E-04	103.0	Ab35	hu ST2	8.17E+05	1.15E-04	141.0
Ab36	cy ST2	4140000	0.000278	67.1	Ab36	hu ST2	4.12E+06	2.80E-04	68.1

10

20

【0433】

若干変更したプラズモン共鳴プロトコルを用いて、さらなる抗体の親和性を決定した。CM5 センサチップを搭載したBiacore 3000 機器 (Biacore International AB、Uppsala, Sweden) を使用して、25 で抗体 Ab1、Ab2、Ab3、および Ab4 の表面プラズモン共鳴法による評価を行った。HBS-EP (10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20、GE Healthcare) をランニング緩衝液として用いる標準的なアミンカップリング化学を使用して、抗Fc 特異的捕捉抗体をCM4 チップ上の2つのフローセルに共有結合的に固定した。端的に述べると、各フローセルを、0.1 M NHS および 0.4 M EDC の 1:1 (v/v) 混合物を用いて活性化した。10 mM 酢酸ナトリウム中 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (pH 5.0) の AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG、Fc 断片特異的抗体 (Jackson ImmunoResearch Inc. West Grove, PA) を標的レベルの 3,000 RU で2つのフローセルに固定した。1 M エタノールアミンの注入により残りの反応表面を非活性化した。次いで、残りの全てのステップのためにランニング緩衝液を HBS-EP + 0.1 mg/ml の BSA に交換した。

30

40

【0434】

試験フローセル上に 10 $\mu\text{l}/\text{分}$ で3分間注入することにより試験フローセル表面上に捕捉された抗体の約 75 ~ 90 反応ユニットが得られるように、全ての抗体をランニング緩衝液中で3通り調製し、3倍に希釈して注入した。対照フローセルの表面上には抗体は捕捉されなかった。次いで、種々の濃度 (200 nM ~ 0.0914 nM) のヒトまたはカニクイザルの ST2 を緩衝液ブランクとともに2つのフローセル上に流した。50 $\mu\text{l}/\text{分}$ の流速を用いて、2分間の会合相の後に4分間の解離相とした。各サイクルの後、5

50

0 u L の 10 m M グリシン (p H 1 . 5) を注入して表面を再生した。次いで、試験フローセル上で新しい抗体を捕捉して、次のサイクルの準備をした。200 n M の濃度で、別の長期解離実験 (60 分) を 3 通り行った。

【 0 4 3 5 】

バルク屈折率の変化を排除するために対照の表面反応を差し引き、次いで、実験フローセルから系統的アーチファクトを排除するために平均緩衝液ブランク反応を差し引くことにより、データを二重参照した。ST2 データを処理し、B I A E v a l u a t i o n S o f t w a r e V 4 . 1 . (B i a c o r e I n t e r n a t i o n a l A B 、 U p p s a l a , S w e d e n) のローカル R m a x を用いて、1 : 1 相互作用モデルに全体的に適合させた。会合 (k_a) および解離 (k_d) 速度定数を決定し、平衡解離定数 (K_D) を算出するために用いた。Ab1、Ab2、Ab3、およびAb4の解離速度定数および平衡解離定数を表5に要約する。

10

表 5

【表 5】

抗体	ST2	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
Ab1	ヒト	1.43E+06	1.11E-04	77.7
Ab1	カニクイザル	1.69E+06	1.97E-04	117
Ab2	ヒト	3.33E+05	1.13E-05	33.9
Ab2	カニクイザル	3.60E+05	1.16E-05	32.2
Ab3	ヒト	4.00E+05	9.50E-05	238
Ab3	カニクイザル	6.74E+05	8.55E-05	127
Ab4	ヒト	2.35E+06	7.06E-04	301
Ab4	カニクイザル	2.50E+06	1.29E-03	516

20

実施例 4 : 抗体の pH 感受性結合

【 0 4 3 6 】

低 pH でそれらの標的に低い親和性で結合する治療抗体は、より低い頻度でまたはより低い用量で送達されることを可能にする強化された PK 特性を有し得る (Nat Biotechnol . 2010 28 (11) : 1203 - 7 T . I g a w a e t a l A n t i b o d y r e c y c l i n g b y e n g i n e e r e d p H - d e p e n d e n t a n t i g e n b i n d i n g i m p r o v e s t h e d u r a t i o n o f a n t i g e n n e u t r a l i z a t i o n) 。これは、低 pH のリソソーム (l y z o s o m e) における抗体による標的放出、その後の標的分解および抗体リサイクルによるものである。

30

【 0 4 3 7 】

B i a c o r e 4000 上で、抗体 Ab1、Ab2、Ab3、および Ab4 の pH 感受性結合のバイオセンサ分析を行った。設定は、これらの抗体の K_D 測定を行った実施例 3 に類似していたが、単一濃度 2 . 46 n M の - S T 2 抗体の 2 つ組の注入にデータを適合させた。30 u L / 分の流速で、pH 7 . 4 での会合 (5 分) 速度ならびに pH 5 . 5 および 7 . 4 での解離 (10 分) 速度を監視した。参照値を差し引いたデータを S c r u b b e r で 1 : 1 モデルに適合させた。表 6 に示すように、抗体のうちのいくつかは、より低い pH で劇的に迅速なオフ速度を示した。

40

表 6

【表 6】

抗体	pH	予測 k_d (1/s)*	pH7.4/pH5.5 kd の倍率変化
Ab1	7.4	0.000134	88.1
Ab1	5.5	0.0118	
Ab2	7.4	0.0000298	8.0
Ab2	5.5	0.000238	
Ab3	7.4	0.0000273	2.9
Ab3	5.5	0.0000791	
Ab4	7.4	0.000632	16.9
Ab4	5.5	0.0107	

10

実施例 5 : 抗体の交差競合

【0438】

エピトープを特徴付けるための一般的な方法は、競合実験によるものである。互いに競合する抗体は、標的上の同じ部位に結合するものと考えられ得る。本実施例は、ST2への結合のための競合を決定する方法、および本明細書に記載される多数の抗体に適用した場合の該方法の結果について記載する。

【0439】

ビニング実験は多数の方法で行うことができ、用いられる方法は、アッセイの結果に影響を及ぼし得る。これらの方法に一般的なのが、ST2は、典型的には、1つの参照抗体によって結合され、別の抗体によってプローブされるということである。参照抗体がプローブ抗体の結合を妨げる場合、その抗体は同じビンに属すると言われる。抗体が用いられる順番が重要である。抗体Aが参照抗体として用いられ、抗体Bの結合をブロックする場合、その逆は必ずしも真ではない：参照抗体として使用される抗体Bは、必ずしもAをブロックするわけではない。この場合、影響を及ぼす多くの要因が存在する：抗体の結合は、標的において第2の抗体の結合を妨げる立体構造変化を引き起こし得るか、または、重複しているが完全には互いを妨げないエピトープは、第2の抗体が、結合できるほど十分に高い親和性で標的との相互作用を有することを可能にし得る。一般に、抗体が共にビン(bin)といわれるいずれかの順序で競合が観察される場合、および両方の抗体が互いをブロックすることができる場合、そのエピトープはより完全に重複する可能性が高い。

20

30

【0440】

この実施例では、Jia, et al (J. Immunological Methods, 288 (2004) 91-98) によって記載される多重化ビニング法の変更例を使用した。可溶性ST2-FLAG Hisを用いた。ストレプトアビジンでコーティングしたLuminexビーズの各ビーズコード(Luminex、番号L100-L1XX-01(XXはビーズコードを特定する))を6pg/ビーズのビオチン化一価マウス抗ヒトIgG捕捉抗体(BD Pharmingen、番号555785)100ulで1時間、暗所にて室温でインキュベートし、次いで、PBSA、リン酸緩衝食塩水(PBS)+1%ウシ血清アルブミン(BSA)で3回洗浄した。各ビーズコードを別個に100ulの1:10希釈抗ST2抗体(コーティング抗体(Coating Antibody))で1時間インキュベートし、次いで洗浄した。ビーズをプールし、次いで96ウェルフィルタプレート(Millipore、番号MSBVN1250)に分注した。100ulの2ug/ml ST2を半分のウェルに、残りの半分のウェルには緩衝液を加えて1時間インキュベートし、次いで洗浄した。100ulの1:10希釈抗ST2抗体(検出Ab)を、ST2を含む1つのウェルおよびST2を含まない1つのウェルに加え、1時間インキュベートし、次いで洗浄した。無関係なヒトIgG(Jackson、番号009-000-003)および抗体を含まない条件(ブランク)を陰性対照として処理した。20ulのPEコンジュゲート一価マウス抗ヒトIgG(BD Pharmin

40

50

gen、番号555787)を各ウェルに加え、1時間インキュベートし、次いで洗浄した。75ulのPBSAにビーズを再懸濁し、BioPlex機器(BioRad)上で少なくとも100イベント/ビーズコードを回収した。

【0441】

ST2を含まない抗体対の蛍光強度中央値(MFI)を、ST2を含有する対応する反応のシグナルから差し引いた。同時に結合し、従って異なるピンに属すると考えられる抗体対の場合、反応の値は、以下の2つの基準を満たさなければならなかった：1)値は、それ自体、無関係な抗体、またはブランク(いずれか最も高いもの)と対を形成するコーティング抗体よりも2倍高くなければならなかった、かつ、2)値は、無関係な抗体またはブランクでコーティングしたビーズとともに存在する検出抗体のシグナルよりも高くなければならなかった。下の表7に示すように、最低3つのピンが見つかった。

10

表7

【表7】

ピン	抗体
ピン1	Ab23
	Ab17
	Ab24
	Ab25
	Ab12
	Ab36
	Ab14
	Ab18
	Ab19
	Ab20
	Ab33
	Ab34
	Ab1
	Ab7
	Ab3
	Ab15
	Ab16
	Ab27
	Ab5
	Ab2
	Ab8
	Ab13
	Ab30
	Ab35
	Ab28

ピン	抗体
ピン2	Ab9
	Ab10
	Ab11
ピン3	Ab29

20

30

40

実施例6：IL-33ブロッキングアッセイ

2つのlphaScreenを使用してST2抗体の作用機序を調査した。総合すると、このアッセイを用いて、抗体がIL-33とST2との会合を阻害することができるか、または対照的に、IL-33がST2と会合することを可能にする一方で、抗体が共受容体ST2とAcPの会合を特異的にブロックすることができるかどうかを決定した。

lphaScreenは、Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay Screenの頭字語である。

【0442】

第1のスクリーンにおいて、IL-33とST2との間の会合をブロックする能力につい

50

て抗体を評価した。このアッセイでは、抗ST2抗体が、ビオチン化ヒトIL-33（ストレプトアビジンドナービーズに結合）と6xヒスチジntag付ヒトST2（Niキレートアクセプタービーズに結合）との会合をブロックする能力を測定した。96ウェルハーフエリアプレート（Perkin Elmer）中の40ul反応物を用いてIL-33/ST2のlphaScreenを実行した。両方のlphaScreenに使用したアッセイ緩衝液は、40mM HEPES（pH=7.4）、1mM CaCl₂、0.1% BSA、0.05% Tween-20、および100mM NaClを含有していた。各アッセイウェルは、0.3nMビオチン化ヒトIL-33、0.3nMヒトST2-FH（FHは、FLAGおよび6xヒスチジntagを表す）、10ug/mlストレプトアビジンでコーティングしたドナービーズ（Perkin Elmer、Waltham, MA）、10ug/mlのNiキレートでコーティングしたアクセプタービーズ（Perkin Elmer）、および12.5ug/mlの抗ST2 Abを含有した。全てのアッセイ成分を加えた後、暗所にて室温でプレートを一晩インキュベートした。翌日、2103 Envisionマルチラベルリーダー（Perkin Elmer）でプレートを読み取った。ドナービーズの680nmにおけるレーザ励起を使用して反応性酸素を生成し、該酸素は、ビーズに結合させたタンパク質の相互作用に起因して近接したアクセプタービーズにおいて発光/蛍光カスケードを開始させることができ、その結果、570nmで検出される光の放出をもたらした。

10

【0443】

第2のアッセイでは、IL-33によって媒介されるST2と共受容体AcPとの会合を阻害する能力について抗体を評価した。このアッセイでは、抗ST2抗体が、IL-33によって媒介されるビオチン化ヒトST2-Fc（ストレプトアビジンドナービーズに結合）と6xヒスチジntag付ヒトAcP（Niキレートアクセプタービーズに結合）との会合をブロックする能力を測定した。384ウェルOptiPlate（Perkin Elmer）中の8ul反応物を用いてST2/AcPのlphaScreenを実行した。各アッセイウェルは、5nMヒトIL-33、5nMビオチン化ヒトST2-Fc、5nMヒトAcP-FH、10ug/mlストレプトアビジンでコーティングしたドナービーズ、10ug/mlのNiキレートでコーティングしたアクセプタービーズ、および12.5ug/mlの抗ST2 Abを含有した。全てのアッセイ成分を加えた後、暗所にて室温でプレートを一晩インキュベートした。翌日、第1のアッセイについて上記と同じパラメータを用いて、2103 Envisionマルチラベルリーダー（Perkin Elmer）でプレートを読み取った。

20

30

【0444】

2つのlphaScreenの結果を下を表8に提示する。各抗体の阻害は、濃度12.5ug/mlの所与の抗体を用いて、アッセイウェルに抗体が含まれない場合のアッセイにおけるシグナルと比較した、lphaScreenにおけるシグナル阻害のパーセンテージとして表される。ある抗体は、ST2およびIL-33の相互作用をそれらがST2/IL-33/AcPの相互作用を阻害したよりも完全に阻害し、またある抗体は、ST2/IL-33/AcPの相互作用をST2およびIL-33の相互作用よりも完全に阻害した。全ての抗体が、IL-33とST2との相互作用を少なくとも50%阻害した。

40

表8

【表 8】

名称	阻害% ST2-IL33 AS 12.5ug/ml	阻害% ST2-AcP AS 12.5ug/ml
Ab6	98.5	71.2
Ab4	98.4	77.8
Ab9	75.9	93.1
Ab10	51.8	73.2
Ab1	98.1	86.9
Ab7	98.9	75.7
Ab3	98.8	68.7
Ab11	75.8	93.6
Ab5	96.3	33.8
Ab2	99.2	96.4

10

実施例 7 : *in vitro* ヒト IL - 33 バイオアッセイ

【0445】

例示的な ST2 ヒト mAb を、ヒト IL - 33 およびヒト IL - 2 で刺激した種々のドナーから得た精製 CD4 + T 細胞を用いて、ヒトバイオアッセイにおいて検査した。アッセイの手順は次の通りである。96 ウェル丸底プレートに 1 ウェル当たり 250,000 細胞で体積 60 μ l の細胞を播種する。プレインキュベーション後、huIL - 2 + huIL - 33 の 4x 混合物 30 μ l を各ウェルに加える。96 ウェル丸底プレートの総体積は 120 μ l である。20 μ g/ml の抗体で開始し、1 : 3 希釈を行って 10 点曲線を作成する。30 μ l 中に 4x を作成。Ab を細胞とプレインキュベーションした後、huIL - 2 + huIL - 33 の 4x 混合物 30 μ l を各ウェルに加える。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 48 時間。上清を回収する。huIL - 5 ELISA により IL - 5 の阻害を分析する。

20

【0446】

図 3 は、種々のドナーからの CD4 + T 細胞からヒト IL - 33 によって誘導された IL - 5 の産生の阻害における ST2 mAb を示す。

30

【化 4】

(一)

線は、阻害なしで、ヒト IL - 2 と組み合わせたヒト IL - 33 の陽性対照値を示す。

【化 5】

(…)

は、ヒト IL - 2 の陽性対照値を示す。

【化 6】

(--)

40

線は、培地対照値を示す。ヒト CD4 + T 細胞を抗 ST2 mAb と 30 分間プレインキュベートし、次いで、ヒト IL - 33 (4 ng/ml) およびヒト IL - 2 (10 ng/ml) で 48 時間刺激した。図 3 は、CD4 + T 細胞からの IL - 5 の産生によって決定されるように、ST2 抗体がヒト IL - 33 によって誘導される ST2 の活性化を阻害することができることを示す。ST2 抗体は、IL - 33 によって誘導される CD4 + T 細胞からの IL - 5 の産生を約 < 100 nM の IC50 で拮抗することができた。表 9 は、代表的な IC50 値を示す。

表 9

50

【表 9】

Ab	IC50 (nM)
2	5.25
8	6.90
10	6.90
1	10.68
9	62.01
5	64.54
11	479.86

実施例 8：カニクイザル CD4 + T 細胞 IFN 放出アッセイ

10

【0447】

ISOLYMPH (Gallard - Schlesinger Industries、Plainview, NY) 勾配遠心分離により、クエン酸デキストロース (ACD) で処理した正常ドナー末梢血からカニクイザル末梢血単核球 (PBMC) を濃縮した。その後のカニクイザル CD4 + T 細胞の単離は、Miltenyi Biotec のカニクイザル CD4 + T 細胞単離キットを使用して行った。単離されたカニクイザル CD4 + T 細胞 (96 ウェルプレート中 2×10^5 細胞/ウェル) を、種々の濃度の精製モノクローナル抗体とともに 30 分間室温でインキュベートし、次いで、IL-33 (10 ng/mL)、IL-2 (10 ng/mL)、および IL-12p70 (50 ng/mL) で 84 時間刺激した。次いで、得られた細胞を含まないカニクイザル CD4 + T 細胞培養上清を

20

表 10

【表 10】

IC-50 値	pM
Ab1	15.82
Ab2	79.5
Ab3	15.15
Ab4	4.03
Ab5	12.9
Ab6	47.1
Ab7	40.01
Ab8	158.07

30

実施例 9：ヒト好酸球 IL-8 放出アッセイ

【0448】

ISOLYMPH (Gallard - Schlesinger Industries、Plainview, NY) 勾配遠心分離により、ヘパリン処理した正常ドナー末梢血からヒト赤血球および顆粒球を濃縮した。ACK 溶解緩衝液 (Gibco、Carlsbad, CA) を使用して赤血球を除去した。その後の好酸球の単離は、Miltenyi Biotec の好酸球単離キットを使用して行った。単離された好酸球 (96 ウェルプレート中 2×10^5 細胞/ウェル) を、数回希釈した非クローンおよびクローン上清、または種々の濃度の精製モノクローナル抗体とともに 30 分間室温でインキュベートし、次いで IL-33 (2 ng/mL) および IL-3 (100 ng/mL) で 3 日間刺激した。次いで、得られた細胞を含まない好酸球培養上清を IL-8 の存在について ELISA により分析した。例示データを表 11 に示す。3 匹の別々のドナーからの好酸球 IL-8 放出アッセイにおいて精製モノクローナル抗体の効力を決定した。

40

表 11

【表 1 1】

IC-50	
	pM
Ab1	51.45
Ab2	52.75
Ab3	50.38
Ab4	14.12
Ab5	73.27
Ab6	63.02
Ab7	40.68
Ab8	3120

10

実施例 10：市販の抗体と比較した抗 ST 2 抗体の効力

ヒト NK 細胞アッセイにおけるヒト IL - 33 の用量反応

【0449】

図 4 に示すように、一次 CD 5 6 陽性ヒト NK 細胞 (5×10^4 細胞) を、ヒト IL - 1 2 ($1 \text{ ng} / \text{mL}$) および量を増加させたヒト IL - 3 3 で処理した。2 2 時間後、細胞を含まない上清を回収し、市販のアッセイ (R & D Systems) を用いて IFN - 濃度を測定した。 $10 \text{ ng} / \text{mL}$ の IL - 3 3 を ST 2 抗体阻害のための刺激用量として用いた。

IL - 3 3 活性の抗体阻害

20

【0450】

ヒト NK 細胞を上記の通り刺激した。IL - 3 3 および IL - 1 2 を加える 3 0 分前に、ST 2 抗体を表 5 に示す濃度で細胞に加えた。IL - 3 3 処理から 2 2 時間後、細胞を含まない上清を回収し、市販のアッセイ (R & D Systems) を用いて IFN - 濃度を測定した。市販の抗体についてはクローンの名称が示されている。Ab 2 のみが IL - 3 3 依存性 IFN - 反応を完全に阻害し、いずれの市販の hu ST 2 抗体よりも著しく強力であった。各抗体に対応する IC 5 0 値を表 1 2 に示す。

表 1 2

【表 1 2】

抗体	IC50 (ug/ml)
2A5	約 608
HB12	7.700
B4E6	約 43.54
FB9	約 498.4
97203	0.3851
Ab2	0.04123

30

【0451】

実施例 11：ST 2 のアラニン / アルギニン スキャニング変異誘発

【0452】

40

本実施例は、ST 2 の変異誘発がそれらの標的に結合する能力に与える影響に基づいて ST 2 抗体を特徴付ける。以前の結合データにより、ST 2 ドメイン 1 および 2 は、本実施例において ST 2 スキャニング変異誘発によって分析される抗体パネルの抗体結合に主に関与することが示された。そのため、変異部位の設計において、ST 2 のドメイン 1 および 2 (D 1 D 2) のみを完全長 ST 2 に照らして構造的に考慮した。

【0453】

ST 2 および IL - 3 3 複合体モデル座標は、Lingel et al., Structure (London, England: 1993) Elsevier Ltd 17, 1398 - 410 から得た。Molecular Operating Environment (Molecular Operating Environment (

50

MOE), 2011.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2011)においてST2の残基当たりの側鎖溶媒露出度を算出した。次いで、これらの溶媒露出度の値を、最初に、少なくとも 10^{-2} の側鎖露出度を有する全てのD1D2残基、または少なくとも 10^{-2} の総露出度を有するグリシン残基を選択することによって、変異誘発のためのD1D2表面残基の選択に用いた。正の角を有するグリシン残基、およびプロリン残基は排除した(そのような位置の変異は、局所的なタンパク質構造を歪めるより高い可能性を有するため)。ジスルフィド結合を維持するために、システイン残基も選択から排除した。残基A82は、目視後に排除された。この方法により、変異誘発のための140個の残基のリストを作成した。アラニンに変異させたアルギニンおよびリジン残基以外、全ての残基をアルギニンに変異させた。

【0454】

pTT5ベクター内の親His-Aviタグ付ST2細胞外ドメイン(ECD)の全ての変異体構築物を、24ウェルプレート内の一過性にトランスフェクトした293-6E懸濁細胞(NRCC)に発現させた。pTT5ベクター内でのBiRAの共トランスフェクションによりin vivoビオチン化を達成した。上清をPBSで透析して過剰なビオチンを除去した。

【0455】

BioPlex結合アッセイを用いて、抗ST2抗体のST2の点変異への結合を測定する。ビオチン化変異体を、ストレプトアビジンでコーティングしたビーズの80個のビーズコード上に結合させた(Luminex、番号L100-L1XX-01(Xはビーズコードを特定する))。80個のビーズコードにより、70個が2セットの全部で140個の変異体の多重化が可能となった。各セットは、6つの親対照、3つの無関係タンパク質対照、および1つのブランクを含んでいた。変異体タンパク質への抗体結合を、親タンパク質への抗体結合と比較した。

【0456】

ビーズに前結合させた1:7希釈のST2変異体、親タンパク質、および対照または非タンパク質100ulをPBS+1%BSAで5回洗浄し、プールし、96ウェルフィルタプレート(Millipore)にアリコートし、次いで再び洗浄した。3倍段階希釈した100ulの抗ST2抗体を3つ組のウェルに加え、室温で1時間インキュベートして洗浄した。1:500希釈の100ulのPEコンジュゲート抗ヒトIgG Fc(Jackson、番号109-116-170)を各ウェルに加え、0.5時間インキュベートして洗浄した。ビーズを75ulに再懸濁し、少なくとも3分間振盪し、BioPlex上で読み取った。

【0457】

結合アッセイを実行する前に、「ビーズ領域」と「ビーズ領域」の間(B-B間)の変動性を評価するための確認試験を行った。確認試験では、全てのビーズを同じ野生型対照タンパク質にコンジュゲートさせた。したがって、ビーズ領域間の差は、純粹にB-B間の分散によるものであり、野生型と変異体タンパク質との間の差によって交絡されなかった。抗体の滴定は、異なるウェルにおいて12個の複製を用いて行った。

【0458】

この統計分析の目的は、結合曲線からの推定EC50のB-B間の変動性を推定することであった。次いで、推定B-B間の標準偏差(SD)を用いて、曲線比較実験の間に野生型および変異体タンパク質のEC50信頼区間を構築した。

【0459】

4パラメータロジスティックモデルを各ビーズ領域の結合データに適合させた。曲線品質管理(QC)の結果、ならびに曲線の上部(最大)、下部(最小)、Hill slope(勾配)、およびEC50の自然対数(xmid)のパラメータ推定値を含む、得られた「sumout.xls」ファイルを、分析のための原データとして用いた。SAS P

10

20

30

40

50

R O C M I X E D手順を用いて混合効果モデルを適合させることにより、各パラメータごとのB - B間の変動性を推定した。「良好な」Q C状態の曲線のみを分析に含めた。最終混合効果モデルは、残差のみ(すなわち、個々のピーズ領域)をランダム効果として含んでいた。各パラメータの最小二乗平均(L S平均)も、混合効果モデルによって推定した。B - B間の分散の平方根をとることによりB - BのS Dを算出した。集団の97.5パーセントイルのおよその上限値および下限値を表すL S平均 + 2 S DとL S平均 - 2 S Dとの間の倍率変化も算出した。

【0460】

各抗体についてW T対照と比較してあまり反応を生じなかった変異体を同定するためには、最大値(M F I)がW T対照の最大値(M F I)の30%未満である変異体を同定し、H i t m a xとしてフラグを立てる。

10

【0461】

変異体の結合曲線と野生型の結合曲線からのE C 5 0を比較した。統計的に有意な差を、さらなる検討のためにヒットとして同定した。「n o f i t」または「b a d f i t」フラグを有する曲線は、この分析から排除した。

【0462】

E C 5 0推定値の比較において、曲線フィットからの変動およびピーズ - ピーズ間の変動の2つの変動の源を検討した。野生型および変異体を異なるピーズに連結したため、それらの差は、ピーズ - ピーズ間の差によって交絡される。曲線フィットの変動は、対数E C 5 0推定値の標準誤差から推定される。ピーズ - ピーズ間の変動は、野生型対照がそれぞれ一方のピーズに連結された実験を用いて実験的に決定される。この実験の野生型結合曲線のE C 5 0推定値におけるピーズ変動は、実際のマッピング実験においてピーズ - ピーズ間の変動を推定するために用いられる。

20

【0463】

スチューデントのt検定を用いて2つのE C 5 0の比較(対数スケール)を行う。t統計量を(E C 5 0推定値間の絶対差)と の標準偏差の比として算出する。非線形回帰における変異体および野生型の曲線に関するE C 5 0の分散推定値、ならびに別の実験から推定されるピーズ - ピーズ間の分散の2倍といった、3つの成分の和によって の分散を推定する。ピーズ - ピーズ間の分散の2の倍数は、変異体および野生型ピーズの両方が同じ分散を有するという仮定によるものである。

30

【0464】

サタースウェイト(1946)の近似法を用いて の標準偏差の自由度を算出した。

【0465】

各比較ごとにスチューデントのt分布に基づいて個々のp値および信頼区間(95%および99%)を誘導した。

【0466】

複数の野生型対照の場合、変異体に最も類似した野生型対照を選択すること、すなわち、最も高いp値を有するものを選択することにより、保守的なアプローチをとった。

【0467】

多数のテストを同時に行いながら偽陽性を制御するために多重性の調整が重要である。ファミリーワイズエラー率(F W E)制御および偽発見率(F D R)制御の2つの形式の多重性調整をこのアッセイのために実行した。F W Eアプローチは、1つ以上のヒットが真ではない確率を制御し、F D Rアプローチは、選択されたヒットの間で予測される偽陽性の割合を制御する。前者のアプローチは、後者のアプローチよりも保守的であり、かつ弱い。両方のアプローチのために多くの方法が利用可能であるが、この分析のために、本発明者らはF W E分析にはH o c h b e r g (1988)の方法、そしてF D R分析にはB e n j a m i n i - H o c h b e r g (1995)のF D R方法を選択した。両方のアプローチについて調整されたp値は、各抗体ごとにまたはアッセイ全体としてのいずれかで算出する。

40

【0468】

50

変異体は、以下の基準によって効果を有すると選択した：1) *bad fit* または *no fit* の結果が、その変異体に返された、2) 変異体が、*hit max* 基準で選択された、3) ファミリーワイズエラーの *p* 値が 0.01 未満であった、または 4) *B max* 値が親の 200% を超えていた。効果が *B max* を減少させるかまたは *EC50* 値を増加させた場合、ヒットは阻害剤であると指定され、*B max* を増加させるかまたは *EC50* 値を減少させた場合、ヒットは活性化因子であると指定された。検査した抗体の 90% 以上に効果を有するために、ヒットリストから 8 つの変異が除外された：それらは、K37A、R46A、D63R、V71R、G106R、K112A、N132R、Q137R、および Y141R である。

【0469】

10

分析の結果を表 13 および 14 に提供する。

表 13

【表 13】

Ab	ピン	阻害する変異体	活性化する変異体
Ab2	1	L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, V176R	L53R, R72A, S73R
Ab3	1	S3R, E10R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, F76R, T79R, D92R, D97R, V104R, T124R, K131A, Q134R, G138R, F147R, V176R, V184R	D29R, L53R, V61R, R72A, T162R
Ab32	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, V176R	D29R, R72A
Ab33	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, T35R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, N152R, V176R	D29R, R72A
Ab30	1	S3R, L14R, Y26R, S33R, T35R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, V104R, G138R, A143R, F147R, N152R, V176R, V184R	R72A
Ab11	2	S50R, S175R	W7R, E10R, L14R, Q21R, E43R, T79R, N110R, T177R, V184R, K185A
Ab10	2	A49R, S50R, I70R, S175R, S181R	K4A, Q5R, W7R, E10R, L14R, I15R, Q21R, Y26R, E43R, T79R, M100R, K109A, N110R, T124R, K145A, T177R, V184R, K185A
Ab29	3	N11R, V47R, S50R, Y67R, N83R, V104R, L120R, G138R, S139R, S146R, F147R, A172R	

20

30

表 14

【表 1 4 - 1】

Ab	効果のない変異体	
Ab2	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R	
Ab3	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R	10
Ab32	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R	20
Ab33	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R	
Ab30	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R	30
Ab11	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, A49R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, K109A, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, S181R, T183R, D186R, E187R	40

【表 1 4 - 2】

Ab	効果のない変異体
Ab10	K1A,F2R,S3R,S6R,L9R,N11R,E12R,A13R,V16R,R17A,R20A,K23A,S25R,V28R,D29R,Y31R,Y32R,S33R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,R44A,N45R,V47R,G51R,Q52R,L53R,K55A,L57R,E60R,V61R,A62R,S64R,G65R,I66R,Y67R,T68R,I70R,R72A,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,G80R,Y81R,N83R,T85R,Y87R,K88A,K89A,Q90R,S91R,D92R,N94R,V95R,D97R,Y98R,Y101R,S102R,T103R,V104R,S107R,E108R,Y114R,T117R,D119R,L120R,Y121R,N122R,W123R,E128R,F130R,K131A,Q134R,A135R,G138R,S139R,R140A,R142A,A143R,H144R,S146R,F147R,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,A172R,N173R,Y174R,V176R,R180A,T183R,D186R,E187R
Ab29	K1A,F2R,S3R,K4A,Q5R,S6R,W7R,L9R,E10R,E12R,A13R,L14R,I15R,V16R,R17A,R20A,Q21R,K23A,S25R,Y26R,V28R,D29R,Y31R,Y32R,S33R,Q34R,T35R,N36R,S38R,T41R,Q42R,E43R,R44A,N45R,A49R,G51R,Q52R,L53R,K55A,L57R,E60R,V61R,A62R,S64R,G65R,I66R,T68R,I70R,R72A,S73R,T75R,F76R,N77R,R78A,T79R,G80R,Y81R,T85R,Y87R,K88A,K89A,Q90R,S91R,D92R,N94R,V95R,D97R,Y98R,M100R,Y101R,S102R,T103R,S107R,E108R,K109A,N110R,Y114R,T117R,D119R,Y121R,N122R,W123R,T124R,E128R,F130R,K131A,Q134R,A135R,R140A,R142A,A143R,H144R,K145A,V149R,D151R,N152R,M154R,T155R,E156R,A158R,D160R,T162R,K164A,I166R,H167R,N168R,N170R,N173R,Y174R,S175R,V176R,T177R,R180A,S181R,T183R,V184R,K185A,D186R,E187R

10

実施例 1 2 : 水素 / 重水素交換 (H D X) 分析

【 0 4 7 0 】

本実施例では、A b 2 を S T 2 に結合させ、結合が H D X に与える影響を決定した。

【 0 4 7 1 】

C 末端に F L A G タグおよび H i s タグの両方を有する可溶性 S T 2 タンパク質 (配列番号 1 のアミノ酸 1 9 ~ 3 2 2 を含有するドメイン 1 ~ 3) を哺乳動物 2 9 3 - 6 E 細胞中で一過性に発現させ、I M A C (固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー) で精製し、分取 S E C (サイズ排除クロマトグラフィー) によりさらに精製した。次いで、限外濾過を用いてタンパク質を 3 . 5 m g / m L に濃縮した。S T 2 抗体 A b 2 を遺伝子操作した C H O - C S 9 細胞に発現させ、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー、続いて分取 S E C により精製した。分析 S E C を用いて、S T 2 タンパク質が抗体に完全に結合することを確実にするためには、モル比 0 . 7 5 : 1 . 0 0 の抗体 : 抗原が最適であることが分かった。遊離 S T 2 タンパク質および抗原 - 抗体複合体の両方を、P B S 緩衝液 (p H 7 . 2) 中に保存した。

20

30

【 0 4 7 2 】

自動 H D X システム (Z h a n g , Z h a n g e t a l . 2 0 1 2) 上で H D X 実験を行った。端的に述べると、H / D 交換プロセスは、5 u L の遊離 S T 2 タンパク質溶液 (3 . 5 m g / m L) または S T 2 - 抗体複合体 (j S T 2 濃度 3 . 5 m g / m L 、抗原 : 抗体比率 1 : 0 . 7 5) のいずれかを、2 5 の D ₂ O 水に P B S 錠剤を溶解することによって調製した 1 0 0 m M P B S (p H 7 . 2) 中の D ₂ O 緩衝液 2 5 u L に希釈することにより開始する。交換反応により各 H D X 実験ごとに種々の標識期間 (3 0 秒、2、8、3 0 分、および 2、8 時間) インキュベートし (i n s u b a t e) 、2 0 μ L の標識溶液を、8 0 μ L の反応停止 / 変性 / 還元緩衝液 (7 . 2 5 M 尿素および 6 2 5 m M t r i s (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) 、0 . 4 5 M グリシン、p H 2 . 7) と 1 で混合することにより標識反応を停止した。

40

【 0 4 7 3 】

反応停止溶液の 4 0 μ L アリコートをし、1 2 0 μ L の 0 . 4 m g / m L ブタペプシン (S i g m a , S t . L o u i s , M O) 溶液に移した。1 の試料ループに消化溶液を迅速に注入し、完全に消化するために 6 分間そのままにした。さらに、C 1 8 カラム (直列した 3 本のカラム、B E H C 1 8 、2 . 1 m m x 5 m m 、W a t e r s C o r p . 、M i l f o r d , M A) により消化を分離した。5 分間で 1 ~ 4 0 % の A C N 勾配を用いて、1 で H P L C 分離を行った。データ依存性 L C - M S / M S 実験において O r b i t r a p E l i t e 質量分析計 (T h e r m o S c i e n t i f i c , S a n J o s e , C A) により L C 溶離液を分析した。

50

【0474】

LEAP Shells (LEAP Technologies, Carrboro, NC) により制御された LEAP HD-X PAL システム上で重水素標識、反応停止、タンパク質分解消化、および注入を行った。

【0475】

この実験を3回繰り返し、各実験において各時点を2回繰り返した。標準的なペプチド混合物を試料に加え、逆交換の変動性を追跡して補正した。混合物は、これらの3つのペプチドを含有する：ブラジキニン、アンジオテンシンI、およびロイシンエンケファリン。特別に設計したテトラペプチド P P P I (AnaSpec, Fremont, CA により合成) を、実験間の変動性を最小限に抑えるための第2の内部標準として用いた。H/D 交換なしの ST2 タンパク質の消化も、対照として分析した。

10

【0476】

得られたデータファイルを Mass Analyzer プログラム (Zhang, Zhang et al. 2012) を用いて処理した。このソフトウェアは、抗原消化からのペプチドを同定し、各ペプチドの交換速度を算出し、内部標準から得た逆交換情報を補正し、各残基に保護因子を与えるモデルにデータを適合させる。

【0477】

遊離 ST2 と抗体結合 ST2 タンパク質との交換プロファイルの比較により、対象となる、潜在的なエピトープとなり得る2つの領域が明らかとなった。ST2 配列の2つの領域を、多重重複ペプチドにより IVRCPRQGKPSY (成熟 ST2 のアミノ酸 15 ~ 26 に対応する配列番号 1 のアミノ酸 33 ~ 44) および IVRSPTF (成熟 ST2 のアミノ酸 70 ~ 76 に対応する配列番号 1 のアミノ酸 88 ~ 94) に精密化した。これらの領域は、ST2 が遊離状態にある時はあまり保護されておらず、ST2 および抗体が結合すると交換速度が劇的に減少する。さらに、図6に示される ST2 相同性構造モデルに基づくと、これら2つの配列ストレッチは、タンパク質の外表面上で類似する空間的位置を占める。これらの結果から、2つのペプチドが Ab2 と ST2 タンパク質との間の結合に関与しているという結論を導き出す。

20

実施例 13 : X 線結晶構造解析

【0478】

本実施例において、Ab2 および ST2 の sc-dsFv 断片の複合体の結晶構造が、相互作用界面に特異的アミノ酸残基を提供する。

30

【0479】

Ab2 sc-dsFv を BL21 (DE3) Star 細胞に発現させた。端的に述べると、Ab2 sc-dsFv は、リンカー (G_4S)₃ によって軽鎖可変ドメインに接続された重鎖可変ドメインを含有する。分子をさらに安定させるために、重鎖可変領域の44位および軽鎖可変領域の101位をシステインに変異させることにより分子内でジスルフィド結合を操作した。タンパク質を封入体として発現させた。封入体を可溶化させ、再び折り畳んだ。タンパク質をサイズ排除カラム (SEC)、およびイオン交換 Mono Q カラムでさらに精製し、次いで SEC で仕上げを実施 (polish) した。

【0480】

ST2 を 293S 細胞に発現させた。タンパク質を Ni アフィニティーカラムにより精製し、EndoH で脱グリコシル化した。SEC でタンパク質をさらに精製した。

40

【0481】

Ab2 sc-dsFv および過剰な ST2 を混合することにより、Ab2 sc-dsFv と ST2 の複合体を形成した。複合体を SEC 上で精製し、結晶化のために 12 mg/ml に濃縮した。シッティングドロップ蒸気拡散法により、16 の 32 ~ 36 % PEG 400 および 0.1 M Hepes (pH 7.5 - 8.5) 中でタンパク質複合体を結晶化した。

【0482】

Advanced Light Source, Lawrence Berkeley

50

National Lab (Berkeley, CA) で、解像度 1.9 のデータセットを収集した。データを MOSFLM (Leslie, 1992) で処理し、CCP4 プログラムスイート (Collaborative Computational Project, No 4. (1994)) 中の SCALA によりスケーリングした。公開された構造である IL-1RII (pdbコード: 3O4O) の D1D2 ドメイン、および Ab2 の Fab 構造の可変ドメインを検索モデルとして使用して、PHASER プログラムを用いた分子置換法 (McCoy et al., 2007) により構造を解析した。REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) および COOT (Emsley and Cowtan, 2004) を用いて反復性構造精密化およびモデル構築を行った。

10

【0483】

CCP4 パッケージ中の PISA、AREAMOL、および NCONTACT プログラムを用いて界面分析を行った。Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System. Schroedinger) を用いて図を調製した。

【0484】

ST2 / Ab2 sc-dsFv 複合体の結晶構造を解像度 1.9 まで解析した。非対称ユニットには 2 つの独立した ST2 / Ab2 sc-dsFv 複合体の対があった (図 7)。各複合体は、1 つの ST2 分子および 1 つの Ab2 sc-dsFv 断片からなる。ST2 分子は、2 つの IgG 様ドメイン (D1 および D2 ドメイン) でできている。Ab2 Fv ドメインは、重鎖および軽鎖の 6 つ全ての CDR ループを利用して ST2 分子と相互作用する (図 8)。ST2 の場合、2 つのループ (ループ BC および ループ FG) と ST2 の N 末端が、抗体と直接相互作用する。ST2 と Ab2 sc-dsFv との間の総埋没溶媒接触表面積は、 1803 \AA^2 である。

20

【0485】

ST2 と Ab2 との界面は、高度に荷電している。ST2 は、D1 ドメインに塩基性残基 (Lys および Arg) のクラスターを有する。この正電荷を帯びた表面パッチは、CDR 領域の酸性残基 (Asp および Glu) のクラスターによって形成される Ab2 上の負に帯電したパッチを補正する (図 9)。

【0486】

界面残基を定義するために 2 つの異なる方法を用いた。第 1 の方法では、溶媒露出の差を用いて界面残基を定義した。複合体中の ST2 (または Ab2 sc-dsFv) の各残基の溶媒接触表面積を算出し、複合体から除去した ST2 (または Ab2 sc-dsFv) 中の対応する残基の溶媒接触表面積と比較した。10% 超の差を有する全てのアミノ酸を ST2 および Ab2 に関して表 15 および表 16 にそれぞれ列挙する。ST2 の Arg72 および Tyr81 の表面露出の違いは、10% 未満であった。しかしながら、複合体構造の検査により、両方の残基が Ab2 重鎖残基と水を介した水素結合を形成することが明らかになり、したがって、それらはリストに含まれる。

30

表 15

溶媒露出の差によって定義されるエピトープ残基: ST2。

残基数は、成熟 ST2 中のアミノ酸の位置に対応する、すなわち、アミノ酸 1 は、配列番号 1 のアミノ酸 19 に対応する。

40

【表 15】

残基	残基数	複合体中の ASA	apo 中の ASA	比率	変化率(%)
LYS	1	68.5	196.9	0.348	65.2
PHE	2	48.4	106.2	0.456	54.4
PRO	19	7.9	10.8	0.731	26.9
ARG	20	0	79.6	0.000	100.0
GLN	21	81.7	98.1	0.833	16.7
GLY	22	17.8	59.3	0.300	70.0
LYS	23	51.5	130.6	0.394	60.6
TYR	26	32.4	56.6	0.572	42.8
ILE	70	16.6	30.9	0.537	46.3
VAL	71	1.7	5.3	0.321	67.9
ARG	72	52.2	56.9	0.917	8.3
SER	73	18	22.2	0.811	18.9
PRO	74	70.9	106.8	0.664	33.6
THR	75	3.8	84.6	0.045	95.5
PHE	76	0	134.3	0.000	100.0
ASN	77	2.8	47.6	0.059	94.1
ARG	78	1.1	83.6	0.013	98.7
THR	79	7	37	0.189	81.1
TYR	81	78.3	80.8	0.969	3.1
ASN77-NAG	502	148.2	249	0.595	40.5

10

20

表 16 溶媒露出の差によって定義されるパラトープ残基 : A b 2

【表 16】

HC 残基	残基数	複合体中の ASA	apo 中の ASA	比率	変化率
TRP	33	1.9	32.2	0.059	94.1
ILE	50	0	8.3	0.000	100.0
ASP	57	52.8	59.6	0.886	11.4
ARG	59	60.4	89.5	0.675	32.5
HIS	99	2	6.6	0.303	69.7
GLY	100	3.6	5.5	0.655	34.5
THR	101	27.5	35.9	0.766	23.4
SER	102	48.8	97.6	0.500	50.0
SER	103	45.3	111.8	0.405	59.5
ASP	104	23.1	93	0.248	75.2
TYR	105	1.9	75.4	0.025	97.5
TYR	106	36.8	64.6	0.570	43.0

30

LC 残基	残基数	複合体中の ASA	apo 中の ASA	比率	変化率
ASP	28	85.1	105.2	0.809	19.1
SER	30	11.9	50.9	0.234	76.6
ASN	31	12.5	47.1	0.265	73.5
TYR	32	1.1	109.9	0.010	99.0
TYR	49	8.4	58.1	0.145	85.5
ASP	50	8.1	51.5	0.157	84.3
ASN	53	20.2	59.5	0.339	66.1
GLU	55	27.5	38.4	0.716	28.4
THR	56	116.9	127.4	0.918	8.2
ASP	91	2	27.4	0.073	92.7
ASP	92	2.5	54.1	0.046	95.4
ASN	93	50.5	69.5	0.727	27.3
PHE	94	54.9	110.9	0.495	50.5
LEU	96	2.9	7.8	0.372	62.8

40

第 2 の方法では、そのパートナータンパク質までの所定の距離内に少なくとも 1 つの原子を有する界面残基を選択した。異なる距離のカットオフに基づいて 2 つのシェルを定義した。

【 0 4 8 8 】

コアシェルは、最大距離 5 . 0 の全ての残基を含む。

【 0 4 8 9 】

境界シェルは、5 . 0 よりも長いが 8 . 0 よりも短い距離の全ての残基を含む。

【 0 4 9 0 】

S T 2、A b 2 の重鎖および軽鎖の各シェル内のアミノ酸残基の完全なリストを、それぞれ、表 1 7、1 8、および 1 9 に示す。そのパートナータンパク質と水素結合または塩架橋を形成する残基について、特異的相互作用の種類を、残基の後のカッコ内に記す（水素結合は H B、塩架橋は S B）。

表 1 7 距離のカットオフによって定義されるエピトープ残基：S T 2。

残基数は、成熟 S T 2 中のアミノ酸の位置に対応する、すなわち、アミノ酸 1 は、配列番号 1 のアミノ酸 1 9 に対応する。

【表 1 7】

コア(0~5Å)	境界(5~8Å)
1(LYS) (HB/SB)	3(SER)
2(PHE)	4(LYS)
19(PRO)	18(CYS)
20(ARG) (HB/SB)	24(PRO)
21(GLN)	27(THR)
22(GLY)	28(VAL)
23(LYS) (HB/SB)	31(TYR)
26(TYR) (HB)	68(THR)
70(ILE)	69(CYS)
71(VAL)	80(GLY)
72(ARG)	81(TYR)
73(SER)	
74(PRO)	
75(THR) (HB)	
76(PHE)	
77(ASN) (HB)	
78(ARG) (HB/SB)	
79(THR) (HB)	
502(NAG)-77(ASN)	

表 1 8 距離のカットオフによって定義されるパラトープ残基：A b 2 重鎖。

【表 1 8】

コア(0~5Å)	境界(5~8Å)
33(TRP)	31(ASN)
50(ILE)	32(TYR)
57(ASP)	34(ILE)
59(ARG)	47(TRP)
99(HIS)	52(TYR)
100(GLY)	55(ASN)
101(THR)	58(THR)
102(SER) (HB)	98(ARG)
103(SER) (HB)	107(GLY)
104(ASP) (HB/SB)	108(LEU)
105(TYR) (HB)	109(ASP)
106(TYR)	

10

表 1 9 距離のカットオフによって定義されるパラトープ残基：A b 2 軽鎖。

【表 1 9】

コア(0~5Å)	境界(5~8Å)
28(ASP) (HB)	2(ILE)
29(ILE)	27(GLN)
30(SER)	33(LEU)
31(ASN) (HB)	34(ASN)
32(TYR)	46(LEU)
49(TYR)	52(SER)
50(ASP) (HB/SB)	54(LEU)
53(ASN)	67(SER)
55(GLU) (HB/SB)	68(GLY)
56(THR)	89(GLN)
91(ASP) (HB/SB)	90(GLN)
92(ASP) (HB/SB)	95(PRO)
93(ASN)	96(LEU)
94(PHE)	
96(LEU)	

20

30

【0 4 9 1】

溶媒露出の差によって定義されるエピトープ残基は、距離のカットオフによって定義されるコア相互作用基の残基と一致する。界面内の全ての水素結合および塩架橋対を表 2 0 に列挙する。

表 2 0 界面内の相互作用対

40

【表 2 0】

A b 2 軽鎖-ST 2

水素結合

##	構造 1	距離	構造 2
1	L:ASN 31 [ND2]	3.4	A:ARG 20 [O]
2	L:GLU 55 [OE1]	2.7	A:LYS 1 [NZ]
3	L:ASP 50 [OD2]	2.8	A:ARG 20 [NE]
4	L:ASP 50 [OD1]	3.0	A:ARG 20 [NH2]
5	L:ASP 28 [O]	2.9	A:LYS 23 [NZ]
6	L:ASP 92 [OD1]	2.9	A:LYS 23 [NZ]
7	L:ASP 92 [OD1]	3.3	A:TYR 26 [OH]
8	L:ASP 91 [O]	2.7	A:THR 75 [OG1]
9	L:ASP 91 [O]	3.0	A:ARG 78 [NH2]
10	L:ASP 91 [OD2]	3.0	A:ARG 78 [NH2]

塩架橋

##	構造 1	距離	構造 2
1	L:GLU 55 [OE1]	2.7	A:LYS 1 [NZ]
2	L:GLU 55 [OE2]	3.6	A:LYS 1 [NZ]
3	L:ASP 50 [OD1]	3.9	A:ARG 20 [NE]
4	L:ASP 50 [OD2]	2.8	A:ARG 20 [NE]
5	L:ASP 50 [OD1]	3.0	A:ARG 20 [NH2]
6	L:ASP 50 [OD2]	3.4	A:ARG 20 [NH2]
7	L:ASP 92 [OD2]	3.4	A:LYS 23 [NZ]
8	L:ASP 92 [OD1]	2.9	A:LYS 23 [NZ]
9	L:ASP 91 [OD2]	3.0	A:ARG 78 [NH2]

【0 4 9 2】

実施例 1 2 の H D X - M S 分析から得られた S T 2 エピトープ領域を結晶構造解析データにより確認する。H D X からの 2 つのエピトープ (1 5 ~ 2 6 および 7 0 ~ 7 6) を、より高い解像度の結晶構造解析データにおいてエピトープして同定した。具体的には、A r g 2 0、G l y 2 2、L y s 2 3、および T y r 2 6、ならびに T h r 7 5 が、3 . 4 未満の距離を有し、抗体に近いと同定された。抗体までの距離 3 . 4 ~ 5 を有すると同定されたさらなる残基 (P r o 1 9、G l n 2 1、I l e 7 0、V a l 7 1、A r g 7 2、S e r 7 3、P r o 7 4、および P h e 7 6) もまた、H D X エピトープに包含された。

【0 4 9 3】

全体として、この結果から、H D X - M S および結晶構造解析の両方から得られた S T 2 エピトープ領域が一定であることが確認された。ドメイン 1 の B C ループおよび F G ル

A b 2 重鎖-ST 2

水素結合

##	構造 1	距離	構造 2
1	H:TYR 105 [N]	3.3	A:ASN 77 [O]
2	H:SER 102 [O]	2.6	A:ASN 77 [ND2]
3	H:SER 103 [O]	2.7	A:THR 79 [OG1]
4	H:ASP 104 [OD1]	2.7	A:LYS 1 [N]
5	H:ASP 104 [OD2]	2.8	A:THR 79 [N]
6	H:ASP 104 [OD2]	2.9	A:ARG 20 [NH1]
7	H:TYR 105 [O]	2.8	A:ARG 20 [NH2]

塩架橋

##	構造 1	距離	構造 2
1	H:ASP 104 [OD1]	2.7	A:LYS 1 [N]
2	H:ASP 104 [OD2]	3.2	A:LYS 1 [N]
3	H:ASP 104 [OD2]	2.9	A:ARG 20 [NH1]

10

20

30

40

50

ープ（結晶構造解析データを参照）は、主な相互作用部位である。

参考文献

【 0 4 9 4 】

【 数 1 】

Ali, M., G. Zhang, et al. (2009). "Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children." Tissue Antigens **73**(3): 206-212.

Beltran, C. J., L. E. Nunez, et al. (2010). "Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **16**(7): 1097-1107.

【数 2】

Brunner, M., C. Krenn, et al. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma." *Intensive Care Med* **30**(7): 1468-1473.

Buyschaert, I. D., V. Grulois, et al. (2010). "Genetic evidence for a role of IL33 in nasal polyposis." *Allergy* **65**(5): 616-622.

Castano R, B. Y., Mfuno Endam L, Desrosiers M (2009). "Evidence of association of Interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with surgery unresponsive Chronic Rhinosinusitis." *American Journal of Rhinology in press*(NA): NA. 10

Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction." *Nat Genet* **41**(3): 342-347.

Hacker, S., C. Lambers, et al. (2009). "Increased soluble serum markers caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD." *J Clin Lab Anal* **23**(6): 372-379.

Kuroiwa, K., T. Arai, et al. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases." *Biochem Biophys Res Commun* **284**(5): 1104-1108.

Manetti, M., L. Iba-Manneschi, et al. (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis." *Ann Rheum Dis*. 20

Marvie, P., M. Lisbonne, et al. (2009). "Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans." *J Cell Mol Med*.

Matsuyama, Y., H. Okazaki, et al. (2010). "Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **37**(1): 18-25.

Miyagaki, T., M. Sugaya, et al. (2011). "High Levels of Soluble ST2 and Low Levels of IL-33 in Sera of Patients with HIV Infection." *J Invest Dermatol* **131**(3): 794-796. 30

Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma." *N Engl J Med* **363**(13): 1211-1221.

Mok, M. Y., F. P. Huang, et al. (2010). "Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus." *Rheumatology (Oxford)* **49**(3): 520-527.

Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Neutrophils represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* **464**(7293): 1367-1370. 40

Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(2): 277-281.

【 数 3 】

Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Acute eosinophilic pneumonia with increased soluble ST2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid." Respir Med **95**(6): 532-533.

Palmer, G., D. Talabot-Ayer, et al. (2009). "Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis." Arthritis Rheum **60**(3): 738-749.

Pastorelli, L., R. R. Garg, et al. (2010). "Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 8017-8022. 10

Plager, D. A., J. C. Kahl, et al. (2010). "Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis." PLoS ONE **5**(7): e11450.

Prefontaine, D., S. Lajoie-Kadoch, et al. (2009). "Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells." J Immunol **183**(8): 5094-5103.

Prefontaine, D., J. Nadigel, et al. (2010). "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma." J Allergy Clin Immunol **125**(3): 752-754. 20

Pushparaj, P. N., H. K. Tay, et al. (2009). "The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(24): 9773-9778.

Reijmerink, N. E., D. S. Postma, et al. (2008). "Association of IL1RL1, IL18R1, and IL18RAP gene cluster polymorphisms with asthma and atopy." J Allergy Clin Immunol **122**(3): 651-654 e658.

Sakashita, M., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis." Clin Exp Allergy **38**(12): 1875-1881. 30

Shah, R. V. and J. L. Januzzi, Jr. (2010). "ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure." Curr Heart Fail Rep **7**(1): 9-14.

Shimizu, M., A. Matsuda, et al. (2005). "Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis." Hum Mol Genet **14**(19): 2919-2927.

Sponheim, J., J. Pollheimer, et al. (2010). "Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts." Am J Pathol **177**(6): 2804-2815. 40

Tajima, S., K. Oshikawa, et al. (2003). "The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis." Chest **124**(4): 1206-1214.

【数 4】

Theoharides, T. C., B. Zhang, et al. (2010). "IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4448-4453.

Verri, W. A., Jr., A. T. Guerrero, et al. (2008). "IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2723-2728.

Wu, H., I. Romieu, et al. (2010). "Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans." J Allergy Clin Immunol **125**(2): 321-327 e313.

10

Xu, D., H. R. Jiang, et al. (2008). "IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(31): 10913-10918.

Yanaba, K., A. Yoshizaki, et al. (2011). "Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis." Clin Rheumatol.

Zhang, Z.; Zhang, A. and Xiao, G.; "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing", *Analytical Chemistry*, **2012**, **84**(11), 4942-9

20

Zhang Z, Smith DL. *Protein Sci.* 1993; 2: 522.

Engen JR, Smith DL. *Anal. Chem.* 2001; 73: 256A.

Codreanu SG, Ladner JE, Xiao G, Stourman NV, Hachey DL, Gilliland GL, Armstrong RN. *Biochemistry* 2002; 41: 15161.

Hamuro Y, Coales SJ, Morrow JA, Molnar KS, Tuske SJ, Southern MR, Griffin PR. *Protein Sci.* 2006; 15: 1.

30

Baerga-Ortiz A, Hughes CA, Mandell JG, Komives EA. *Protein Sci.* 2002; 11: 1300.

Coales, SJ. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639-647.

CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.

Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**.

40

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**, 658-674.

【数 5】

Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, L.

Baerga-Ortiz, A., C. A. Hughes, J. G. Mandell and E. A. Komives (2002). "Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein." *Protein Sci.* 11(6): 1300-1308. 10

Coales, S. J., S. J. Tuske, J. C. Tomasso and Y. Hamuro (2009). "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23(5): 639-647.

Codreanu, S. G., J. E. Ladner, G. Xiao, N. V. Stourman, D. L. Hachey, G. L. Gilliland and R. N. Armstrong (2002). "Local Protein Dynamics and Catalysis: Detection of Segmental Motion Associated with Rate-Limiting Product Release by a Glutathione Transferase." *Biochemistry* 41(51): 15161-15172. 20

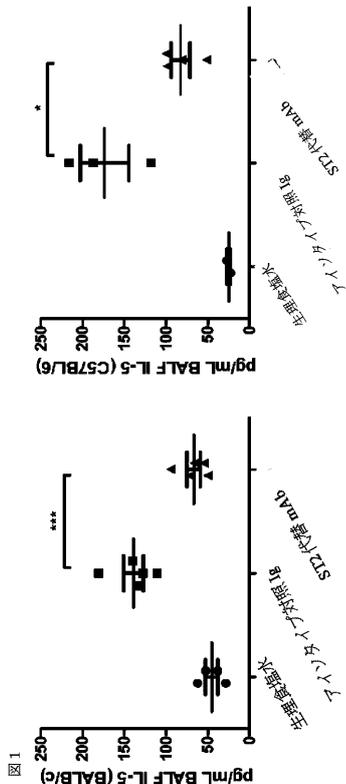
Engen, J. R. and D. L. Smith (2001). "Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS." *Anal. Chem.* 73(9): 256A-265A.

Hamuro, Y., S. J. Coales, J. A. Morrow, K. S. Molnar, S. J. Tuske, M. R. Southern and P. R. Griffin (2006). "Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR γ LBD in the presence of various modulators." *Protein Sci.* 15(8): 1883-1892.

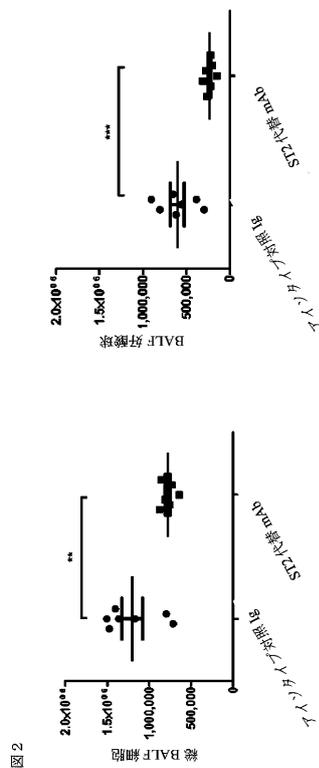
Zhang, Z. and D. L. Smith (1993). "Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation." *Protein Sci.* 2(4): 522-531. 30

Zhang, Z., A. Zhang and G. Xiao (2012). "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing." *Analytical Chemistry* 84(11): 4942-4949.

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 4 】

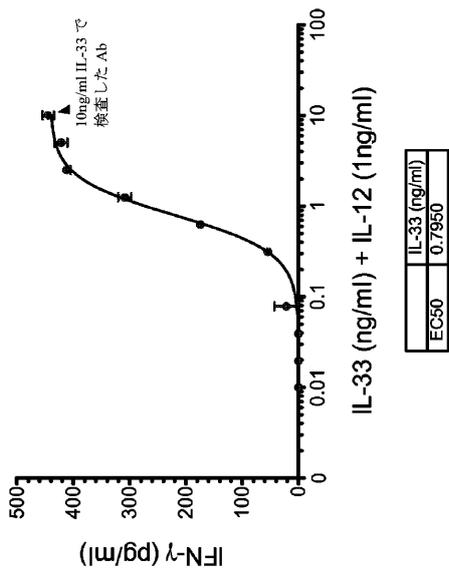


図 4

【 図 10 】

図 10

AB2 重鎖可変領域(配列番号 30)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGGYSFT NYWIGWVRQM PGKLEWMI IYEGNSITRF SPSFCQVTI SADKSIITAY
LQWSSLKASD TAMYCAHG TSSDYFLD VWCQTTVTVS S

AB2 軽鎖可変領域(配列番号 96)

DIQWTQSPSS LGSASVDRVT ITCASQDIS WYLDWYQKP GKAPLLIAD ASNLEIVPS RFGSGSGTD FTFTISSLQP
EDIATYICQQ DNFPELFGG GTKVEIKR

【 図 3 】

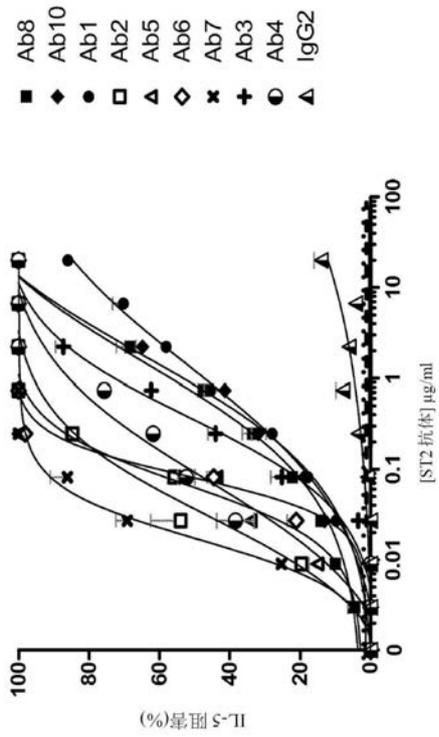


图 3

【 図 5 】

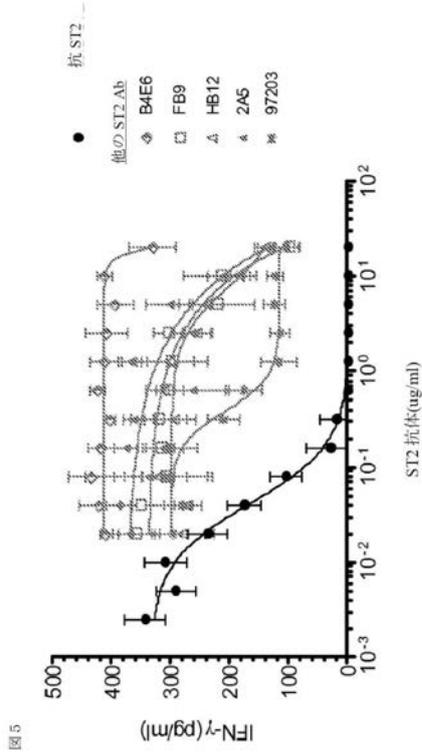


图 5

【 図 6 】

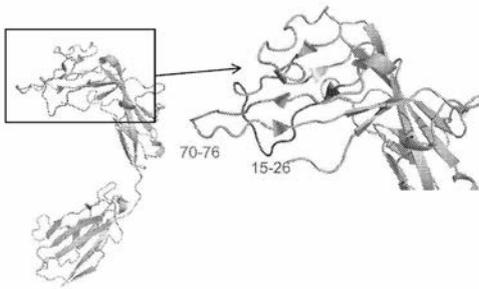


FIG. 6

【 図 7 】

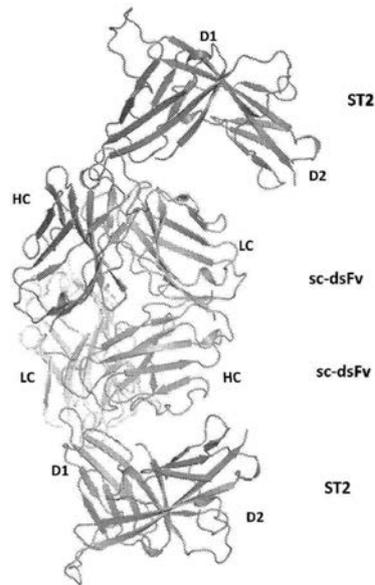
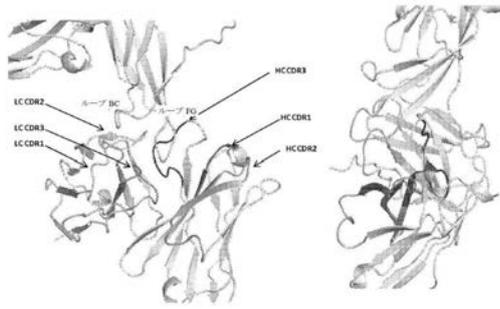


FIG. 7

【 図 8 】

図 8



【 図 9 A 】

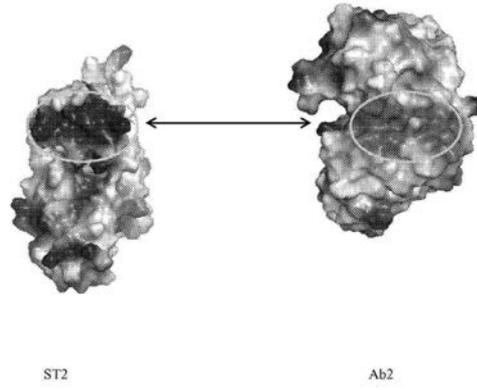


FIG. 9A

【 図 9 B 】

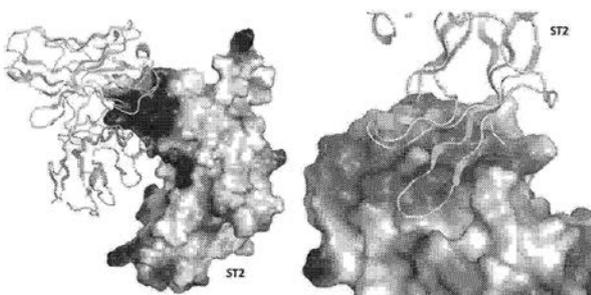


FIG. 9B

【配列表】

2016180001000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	11/02	
		A 6 1 K	39/395	D
		A 6 1 K	39/395	N

- (72)発明者 イアン フォルツ
カナダ国 ブイ5エー 4ビー9 ブリティッシュ コロンビア, バーナビー, ナイツウッド
プレイス 2108
- (72)発明者 チャドウィック ティー. キング
カナダ国 ブイ7エル 3ティー5 ブリティッシュ コロンビア, ノース バンクーバー,
ムーディー アベニュー 1325
- (72)発明者 アイ チン リム
アメリカ合衆国 ワシントン 98040, マーサー アイランド, 82エヌディー アベニ
ュー エスイー 7105
- (72)発明者 ルティーリオ クラーク
アメリカ合衆国 ワシントン 98110, ベインブリッジ アイランド, オールド ミル
ロード エヌイー 5335
- (72)発明者 マイケル アール. コモ
アメリカ合衆国 ワシントン 98110, ベインブリッジ アイランド, ハイ スクール
ロード エヌイー 1044
- (72)発明者 ランダル アール. ケッチャム
アメリカ合衆国 ワシントン 98296, スノホミッシュ, 152エヌディー ストリート
エスイー 6332
- (72)発明者 ドンファイ シー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91362, サウザンド オークス, リッキー コート
3198
- (72)発明者 シャオシャン ミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングゲーム, クラリス レーン 210
8
- (72)発明者 シュールン ワン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306, パロ アルト, グレンブルック ドライブ
660

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 BA08 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41
BB43 BB44 CC05 CC22 CC23 DD21 DD31 DD62 EE01 GG01
GG02 GG08
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】

2016180001000001.pdf