

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-537190

(P2015-537190A)

(43) 公表日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	2 G O 4 3
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z	2 G O 4 5
C O 7 K 16/24 (2006. 01)	C O 7 K 16/24	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-533163 (P2015-533163)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月18日 (2013. 9. 18)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/060480
 (87) 国際公開番号 W02014/047222
 (87) 国際公開日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)
 (31) 優先権主張番号 61/703, 170
 (32) 優先日 平成24年9月19日 (2012. 9. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509189086
 アッヴィ・バイオセラピューティクス・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94063, レッドウッド シティ, シーポート ブールバード 1500
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低減された免疫原性を有する抗体を同定するための方法

(57) 【要約】

基準抗体と比較して低減された免疫原性を有する、基準抗体の変種を同定する方法について記載する。さらに、基準抗TNF- 基準抗体と比較して低減された免疫原性を有する、基準抗TNF- 抗体の変種について記載する。

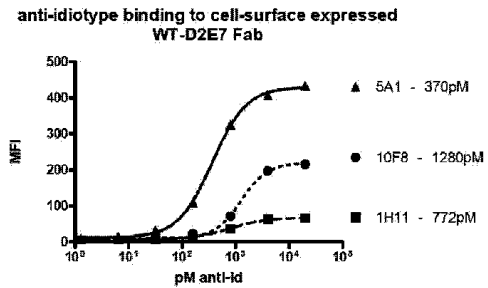
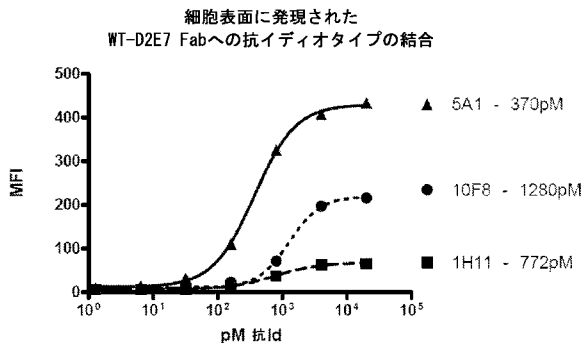


FIG. 6

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 基準抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と、宿主細胞ライブラリとを接触させる段階であって、基準抗体が、標的分子に結合するモノクローナル抗体であり、宿主細胞ライブラリが、単一のアミノ酸点突然変異によって基準抗体とは異なる抗体変種を各々が細胞表面上に発現する哺乳類宿主細胞を含む、段階；

(b) 基準抗体と比べて抗イディオタイプ抗体への低下した結合を呈する抗体変種を発現する、宿主細胞ライブラリ中の細胞の集団を同定する段階；および

(c) 該集団において濃縮された抗体変種を同定し、それによって低減された免疫原性を有する基準抗体の変種を同定する段階

を含む、低減された免疫原性を有する基準抗体の変種を同定する方法。

10

【請求項 2】

段階(b)が、宿主細胞ライブラリをフローサイトメトリーに供することおよび宿主細胞ライブラリから前記集団を選別することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

フローサイトメトリーが蛍光活性化細胞選別(FACS)である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

(d) 抗体変種が前記標的分子に結合するその能力を保持しているかどうかを判定する段階をさらに含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

段階(d)が、フローサイトメトリー、磁気ビーズ選別、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLissa、およびKinExAにより、前記標的分子への抗体変種の結合のレベルをアッセイすることを含む、請求項4に記載の方法。

20

【請求項 6】

(i) 宿主細胞ライブラリまたは前記集団の細胞と、蛍光標識された標的分子とを接触させる段階；(ii) 該細胞をフローサイトメトリーに供する段階；(iii) 結合した蛍光標識標的分子の量により該細胞を亜集団へ選別する段階；および(iv) 抗体変種が、基準抗体と実質的に同等にまたは基準抗体よりも良好に標的分子に結合する抗体変種を発現する細胞の亜集団において濃縮されたかどうかを判定し、それによって該抗体変種が該標的分子に結合する能力を保持しているかどうかを判定する段階を含む方法において、段階(d)が、フローサイトメトリーにより該標的分子への抗体変種の結合のレベルをアッセイすることを含む、請求項5に記載の方法。

30

【請求項 7】

段階(d)(i)~(d)(iii)が、段階(b)の前に、段階(b)と同時に、または段階(b)の後に行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

段階(d)(iv)が、段階(c)の前に、段階(c)と同時に、または段階(c)の後に行われる、請求項6または7に記載の方法。

【請求項 9】

(e) 基準抗体の発現レベルと比較して変種の発現レベルを決定する段階をさらに含む、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

段階(e)が、フローサイトメトリー、磁気ビーズ選別、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLissa、およびKinExAにより、抗体変種の発現のレベルをアッセイすることを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

(i) 宿主細胞ライブラリまたは前記集団の細胞と、抗体変種および基準抗体の間で保存されたエピトープに結合する蛍光標識された抗体とを接触させる段階；(ii) 該細胞をフローサイトメトリーに供する段階；(iii) 結合した蛍光標識抗体の量により該細胞を亜集団へ選別する段階；ならびに(iv) 抗体変種が、基準抗体を発現する細胞と実質的に同等

50

なレベルまたは基準抗体を発現する細胞よりも良好なレベルで蛍光標識抗体に結合する細胞の亜集団において濃縮されたかどうかを判定し、それによって該抗体変種が基準抗体と実質的に同等なレベルまたは基準抗体よりも良好なレベルで発現されているかどうかを判定する段階を含む方法において、段階(e)が、フローサイトメトリーにより抗体変種の発現のレベルをアッセイすることを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

エピトープが抗体変種および基準抗体の定常領域中にある、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

段階(e)(i)~(e)(iii)が、段階(b)の前に、段階(b)と同時に、または段階(b)の後に行われる、請求項11または12に記載の方法。

10

【請求項14】

段階(e)(iv)が、段階(c)の前に、段階(c)と同時に、または段階(c)の後に行われる、請求項11または12に記載の方法。

【請求項15】

抗イディオタイプ抗体が蛍光標識されている、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

段階(c)が、前記集団から得られた核酸を、大規模並列配列決定することを含む、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

段階(d)(iv)が、基準抗体と実質的に同等にまたは基準抗体よりも良好に前記標的分子に結合する抗体変種を発現する細胞の亜集団から得られた核酸を、大規模並列配列決定することを含む、請求項6~8のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項18】

段階(e)(iv)が、基準抗体を発現する細胞と実質的に同等なレベルまたは基準抗体を発現する細胞よりも良好なレベルで前記蛍光標識された抗体に結合する細胞の亜集団から得られた核酸を、大規模並列配列決定することを含む、請求項11~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

宿主細胞ライブラリが10,000種未満の固有のメンバーを有する、請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項20】

宿主細胞ライブラリが約50~約10,000種の固有のメンバーを有する、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

宿主細胞ライブラリが約1,000~約1,300種の固有のメンバーを有する、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

宿主細胞が293c18細胞である、請求項1~21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

抗体変種が、エプスタイン・バーウイルスの複製起点および核抗原を含むベクターから発現され、かつ抗体可変ドメインが細胞表面上に全長IgG-膜貫通アンカー融合タンパク質の一部として提示される、請求項1~22のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項24】

基準抗体が2つの抗体可変ドメインを含み、かつ抗体変種が、少なくとも1つの抗体可変ドメインが基準抗体における可変ドメインと比べて単一の点突然変異を有する抗体可変ドメインを含む、請求項1~23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記単一のアミノ酸置換が、前記2つの抗体可変ドメインの相補性決定領域(CDR)中にある、請求項24に記載の方法。

50

【請求項 26】

前記2つの抗体可変ドメインのCDR中の約50～約60種のアミノ酸位置が天然アミノ酸の各々で置換されている、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

宿主細胞ライブラリがNNK変異誘発を用いて構築される、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

基準抗体または結合断片が、SEQ ID NO:5 (CDR-H1)、SEQ ID NO:6 (CDR-H2)、SEQ ID NO:7 (CDR-H3)、SEQ ID NO:8 (CDR-L1)、SEQ ID NO:9 (CDR-L2)およびSEQ ID NO:10 (CDR-H3)に対応するアミノ酸配列を有する6つの相補性決定領域(「CDR」)を含む、基準抗TNF-

抗体または抗体の基準抗TNF- 結合断片の変種であって、変種が、CDR-L1中のG5F、CDR-L1中のG5I、CDR-L1中のG5V、CDR-L1中のG5W、CDR-L1中のG5Y、CDR-L1中のR7I、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8D、CDR-L1中のN8E、CDR-L1中のN8G、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L1中のN8T、CDR-L2中のA1I、CDR-L2中のA1T、CDR-L2中のA1V、CDR-L2中のT4D、CDR-L3中のR2G、CDR-L3中のN4F、CDR-L3中のN4M、CDR-L3中のN4W、CDR-L3中のN4Y、CDR-L3中のR5L、CDR-L3中のR5N、CDR-L3中のR5W、CDR-L3中のR5Y、CDR-L3中のT9Y、CDR-H1中のD1S、CDR-H1中のY2A、CDR-H1中のY2C、CDR-H1中のY2K、CDR-H1中のY2M、CDR-H1中のY2R、CDR-H1中のY2S、CDR-H1中のY2V、CDR-H1中のH5C、CDR-H1中のH5D、CDR-H1中のH5E、CDR-H1中のH5S、CDR-H1中のH5T、CDR-H2中のT3A、CDR-H2中のT3G、CDR-H2中のT3N、CDR-H2中のW4A、CDR-H2中のW4F、CDR-H2中のW4H、CDR-H2中のW4L、CDR-H2中のW4M、CDR-H2中のW4V、CDR-H2中のN5G、CDR-H2中のS6D、CDR-H2中のS6L、CDR-H2中のI9K、CDR-H2中のD10L、CDR-H2中のY11A、CDR-H2中のY11C、CDR-H2中のY11E、CDR-H2中のY11F、CDR-H2中のY11G、CDR-H2中のY11H、CDR-H2中のY11I、CDR-H2中のY11K、CDR-H2中のY11L、CDR-H2中のY11M、CDR-H2中のY11N、CDR-H2中のY11Q、CDR-H2中のY11R、CDR-H2中のY11S、CDR-H2中のY11V、CDR-H2中のY11W、CDR-H2中のA12Y、CDR-H2中のD13N、CDR-H2中のV15D、CDR-H2中のV15L、CDR-H2中のV15M、CDR-H2中のV15Q、CDR-H2中のV15T、CDR-H2中のE16F、CDR-H2中のE16H、CDR-H2中のE16K、CDR-H2中のE16R、CDR-H2中のE16T、CDR-H2中のE16W、CDR-H2中のG17A、CDR-H2中のG17C、CDR-H2中のG17E、CDR-H2中のG17H、CDR-H2中のG17I、CDR-H2中のG17K、CDR-H2中のG17L、CDR-H2中のG17M、CDR-H2中のG17N、CDR-H2中のG17P、CDR-H2中のG17Q、CDR-H2中のG17R、CDR-H2中のG17S、CDR-H2中のG17T、CDR-H2中のG17Y、CDR-H3中のV1G、CDR-H3中のV1R、CDR-H3中のV1W、CDR-H3中のL4T、CDR-H3中のL4V、CDR-H3中のT6V、CDR-H3中のS9K、CDR-H3中のS9W、CDR-H3中のS9Y、およびCDR-H3中のD11Vから選択される少なくとも1つの置換を含み、該6つのCDRが全体で、基準抗体または結合断片のCDR配列と比較して8つまでのアミノ酸置換を有する、基準抗TNF- 抗体または抗体の基準抗TNF- 結合断片の変種。

【請求項 29】

CDRが、CDR-L1中のG5F、CDR-L1中のG5I、CDR-L1中のG5Y、CDR-L1中のR7I、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8D、CDR-L1中のN8E、CDR-L1中のN8G、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L1中のN8T、CDR-L2中のA1V、CDR-L3中のR2G、CDR-L3中のN4F、CDR-L3中のN4M、CDR-L3中のN4W、CDR-L3中のR5L、CDR-L3中のR5N、CDR-L3中のR5W、およびCDR-L3中のR5Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 30】

CDRが、CDR-L3中のR2G、CDR-L3中のR5L、CDR-L3中のR5N、およびCDR-L3中のR5Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 31】

CDRが、CDR-L1中のG5F、CDR-L1中のG5I、CDR-L1中のG5Y、CDR-L1中のR7I、CDR-L3中のN4M、およびCDR-L3中のR5Wから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

CDRが、CDR-L1中のN8DおよびCDR-L1中のN8Eから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 3】

CDRが、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8G、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L1中のN8T、CDR-L2中のA1V、CDR-L3中のN4F、およびCDR-L3中のN4Wから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 4】

CDRが、CDR-L1中のG5F、CDR-L1中のG5I、CDR-L1中のG5V、CDR-L1中のG5W、CDR-L1中のG5Y、CDR-L1中のR7I、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8G、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L1中のN8T、CDR-L2中のA1I、CDR-L2中のA1T、CDR-L2中のA1V、CDR-L2中のT4D、CDR-L3中のN4F、CDR-L3中のN4M、CDR-L3中のN4W、およびCDR-L3中のR5Wから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 5】

CDRがCDR-L1中の置換G5Vを含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 6】

CDRが、CDR-L1中のG5W、CDR-L2中のA1I、CDR-L2中のA1T、およびCDR-L2中のT4Dから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 7】

CDRが、CDR-L1中のG5W、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8D、CDR-L1中のN8E、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L2中のA1I、CDR-L2中のA1T、CDR-L2中のA1V、CDR-L2中のT4D、CDR-L3中のN4F、CDR-L3中のN4W、CDR-L3中のN4Y、およびCDR-L3中のT9Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 8】

CDRが、CDR-L3中のN4YおよびCDR-L3中のT9Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 3 9】

CDRが、CDR-H1中のD1S、CDR-H1中のY2A、CDR-H1中のY2C、CDR-H1中のY2K、CDR-H1中のY2M、CDR-H1中のY2R、CDR-H1中のY2S、CDR-H1中のY2V、CDR-H1中のH5C、CDR-H1中のH5D、CDR-H1中のH5E、CDR-H1中のH5S、CDR-H1中のH5T、CDR-H2中のT3A、CDR-H2中のT3G、CDR-H2中のT3N、CDR-H2中のW4A、CDR-H2中のW4F、CDR-H2中のW4H、CDR-H2中のW4L、CDR-H2中のW4M、CDR-H2中のW4V、CDR-H2中のD10L、CDR-H3中のV1G、CDR-H3中のV1R、CDR-H3中のV1W、CDR-H3中のL4T、CDR-H3中のL4V、CDR-H3中のT6V、CDR-H3中のS9K、およびCDR-H3中のD11Vから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 4 0】

CDRが、CDR-H2中のN5G、CDR-H2中のS6D、CDR-H2中のS6L、CDR-H2中のI9K、CDR-H2中のY11A、CDR-H2中のY11C、CDR-H2中のY11E、CDR-H2中のY11F、CDR-H2中のY11G、CDR-H2中のY11H、CDR-H2中のY11I、CDR-H2中のY11K、CDR-H2中のY11L、CDR-H2中のY11M、CDR-H2中のY11N、CDR-H2中のY11Q、CDR-H2中のY11R、CDR-H2中のY11S、CDR-H2中のY11V、CDR-H2中のY11W、CDR-H2中のA12Y、CDR-H2中のV15D、CDR-H2中のV15L、CDR-H2中のV15M、CDR-H2中のV15Q、CDR-H2中のV15T、CDR-H2中のE16F、CDR-H2中のE16H、CDR-H2中のE16K、CDR-H2中のE16R、CDR-H2中のE16T、CDR-H2中のE16W、CDR-H2中のG17A、CDR-H2中のG17C、CDR-H2中のG17E、CDR-H2中のG17H、CDR-H2中のG17I、CDR-H2中のG17K、CDR-H2中のG17L、CDR-H2中のG17M、CDR-H2中のG17N、CDR-H2中のG17P、CDR-H2中のG17Q、CDR-H2中のG17R、CDR-H2中のG

10

20

30

40

50

17S、CDR-H2中のG17T、CDR-H2中のG17Y、CDR-H3中のS9W、およびCDR-H3中のS9Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 4 1】

CDRが、CDR-H2中のN5G、CDR-H2中のS6D、CDR-H2中のS6L、CDR-H2中のY11M、CDR-H2中のY11Q、CDR-H2中のA12Y、CDR-H2中のE16H、CDR-H2中のG17H、CDR-H3中のS9W、およびCDR-H3中のS9Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 4 2】

CDRが、CDR-H2中のI9K、CDR-H2中のY11A、CDR-H2中のY11C、CDR-H2中のY11E、CDR-H2中のY11F、CDR-H2中のY11G、CDR-H2中のY11H、CDR-H2中のY11I、CDR-H2中のY11K、CDR-H2中のY11L、CDR-H2中のY11N、CDR-H2中のY11R、CDR-H2中のY11S、CDR-H2中のY11V、CDR-H2中のY11W、CDR-H2中のV15D、CDR-H2中のV15L、CDR-H2中のV15M、CDR-H2中のV15Q、CDR-H2中のV15T、CDR-H2中のE16F、CDR-H2中のE16K、CDR-H2中のE16R、CDR-H2中のE16T、CDR-H2中のE16W、CDR-H2中のG17A、CDR-H2中のG17C、CDR-H2中のG17E、CDR-H2中のG17I、CDR-H2中のG17K、CDR-H2中のG17L、CDR-H2中のG17M、CDR-H2中のG17N、CDR-H2中のG17P、CDR-H2中のG17Q、CDR-H2中のG17R、CDR-H2中のG17S、CDR-H2中のG17T、およびCDR-H2中のG17Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

10

【請求項 4 3】

CDRが、CDR-H2中のI9K、CDR-H2中のY11A、CDR-H2中のY11C、CDR-H2中のY11E、CDR-H2中のY11F、CDR-H2中のY11G、CDR-H2中のY11H、CDR-H2中のY11I、CDR-H2中のY11K、CDR-H2中のY11L、CDR-H2中のY11N、CDR-H2中のY11R、CDR-H2中のY11S、CDR-H2中のY11V、CDR-H2中のY11W、CDR-H2中のD13N、CDR-H2中のV15D、CDR-H2中のV15L、CDR-H2中のV15M、CDR-H2中のV15Q、CDR-H2中のV15T、CDR-H2中のE16F、CDR-H2中のE16K、CDR-H2中のE16R、CDR-H2中のE16T、CDR-H2中のE16W、CDR-H2中のG17A、CDR-H2中のG17C、CDR-H2中のG17E、CDR-H2中のG17I、CDR-H2中のG17K、CDR-H2中のG17L、CDR-H2中のG17M、CDR-H2中のG17N、CDR-H2中のG17P、CDR-H2中のG17Q、CDR-H2中のG17R、CDR-H2中のG17S、CDR-H2中のG17T、およびCDR-H2中のG17Yから選択される少なくとも1つの置換を含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

20

30

【請求項 4 4】

CDRがCDR-H2中の置換D13Nを含む、請求項28に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 4 5】

基準抗TNF- 抗体または基準抗TNF- 結合断片が、SEQ ID NO:2に対応するアミノ酸配列を有する可変重鎖断片とSEQ ID NO:4に対応するアミノ酸配列を有する可変軽鎖断片とを含む、請求項28～44のいずれか一項に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片。

【請求項 4 6】

請求項28～45のいずれか一項に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片をコードする核酸分子。

40

【請求項 4 7】

請求項28～45のいずれか一項に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片をコードする核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 4 8】

請求項28～45のいずれか一項に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

【請求項 4 9】

請求項28～45のいずれか一項に記載の抗TNF- 抗体または抗TNF- 結合断片の治療的有効量をヒト患者に投与する段階を含む、免疫障害を患うヒト患者を処置する方法。

【請求項 5 0】

50

免疫障害が、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、尋常性乾癬および軸性脊椎関節炎から選択される、請求項49に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法119条(e)の下で優先権を主張し、2012年9月19日付で出願された仮出願第61/703,170号の優先権を主張するものであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

2. 配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。2013年9月17日付で作成された該ASCIIコピーは、381493-721WO(118133)_SL.txtと名付けられており、サイズが6,980バイトである。

【背景技術】

【0003】

3. 背景

B細胞エピトープは、免疫系の抗体によって認識される分子の部位である。治療用タンパク質におけるB細胞エピトープの同定は、患者への投与時に免疫応答を誘発しない変種を設計するうえで有用でありうる。

【0004】

B細胞エピトープは、典型的にはアラニン(アラニンスキニング)で、タンパク質のアミノ酸を個々に変異させ、抗体結合に及ぼす各変異の効果を決定することによって同定することができる(Onda et al., 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. 108(14):5742-7(非特許文献1))。突然変異誘発後のタンパク質-抗体結合の崩壊により、変異した残基が、抗体によって認識されるB細胞エピトープの一部であることが示唆される。B細胞エピトープ中の単一の変異でさえも、該タンパク質に向けられた抗体パネルへの結合を排除できること、およびB細胞エピトープ中の変異の導入によって、タンパク質の免疫原性を低減できることを見出されている(Nagata and Pastan, 2009, Advanced Drug Delivery Reviews 61:977-985(非特許文献2))。しかしながら、この手法はまた、多大な時間を要し、かつ大きな労働力を要する。さらに、アラニンスキニングは、免疫原性の最大の低減をもたらさずであろう変異を必ずしも同定するものではない。

【0005】

したがって、B細胞エピトープの同定および排除を可能にする、単純で、大きな労働力を要しないが、包括的な方法が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Onda et al., 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. 108(14):5742-7

【非特許文献2】Nagata and Pastan, 2009, Advanced Drug Delivery Reviews 61:977-985

【発明の概要】

【0007】

4. 概要

本開示は、基準抗体における関心対象の領域内のすべての各アミノ酸の免疫原性への寄与を解明可能にするシステムを提供する。本開示は、基準抗体の任意の位置、一部の位置または全部の位置のアミノ酸残基をその他の19種のアミノ酸の一部または全部へ変異させることができ、抗体の免疫原性に及ぼすその変異の効果を評価できることを提供する。また、抗体の発現レベルおよび/または標的分子への結合に及ぼす変異の効果を評価することもでき、これは、免疫原性領域が排除されているまたは弱められているが、有利な特性

10

20

30

40

50

(例えば、適当な発現レベル、標的分子への結合)を保持している抗体変種の同定を可能にする。したがって、本開示は、抗体の免疫原性を低減させるための方法を提供する。本方法は、抗イディオタイプ抗体への低減された結合を有する抗体変種をスクリーニングおよび同定することに基づく。抗イディオタイプ抗体への結合の低減は、インビボでの低減された免疫原性と相関している(例えば、Nagata and Pastan, 2009, Advanced Drug Delivery Reviews 61:977-985を参照のこと)。

【0008】

本開示の方法は一般に、(a) 基準抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と、宿主細胞ライブラリとを接触させる段階であって、基準抗体が、標的分子に結合するモノクローナル抗体であり、宿主細胞ライブラリが、単一のアミノ酸点突然変異によって基準抗体とは異なる抗体変種を各々が細胞表面上に発現する哺乳類宿主細胞を含む、段階；(b) 基準抗体と比べて抗イディオタイプ抗体への低下した結合を呈する抗体変種を発現する、宿主細胞ライブラリ中の細胞の集団を同定する段階；および(c) 集団において濃縮された抗体変種を同定し、それによって低減された免疫原性を有する基準抗体の変種を同定する段階を含む。ある局面において、本方法は、宿主細胞ライブラリをフローサイトメトリーに供する段階、および、例えば蛍光活性化細胞選別(FACS)を用いて、宿主細胞ライブラリから集団を選別する段階を伴う。

10

【0009】

ある局面において、本方法は、低減された免疫原性を有する抗体変種が、基準抗体と実質的に同等なレベルもしくは基準抗体よりも良好なレベルで標的分子に結合するかどうか、および/または基準抗体の発現レベルと実質的に同等なレベルもしくは基準抗体の発現レベルよりも良好なレベルで発現されるかどうかを判定する段階をさらに含む。特定の態様において、結合および発現は、フローサイトメトリー、磁気ビーズ選別、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa、またはKinExAにより判定され、低減された免疫原性を有する抗体変種の同定の前に、その同定と同時に、またはその同定の後に判定される。

20

【0010】

本明細書において記載される方法は、抗TNF- 抗体D2E7 (アダリムマブとしても知られる)に対して適用された。1種、2種、または3種の異なる抗イディオタイプ抗体への低減された結合を有するD2E7の変種が同定された。本開示は、CDR配列がD2E7のそれに関連しているが、抗Id抗体への結合を低減させる少なくとも1つの置換を有する抗TNF- 抗体を提供する。そのような変種は、本明細書において「低減された免疫原性」の変種と呼ばれることもある。

30

【0011】

本開示の抗TNF- 抗体は、SEQ ID NO:5 (CDR-H1)、SEQ ID NO:6 (CDR-H2)、SEQ ID NO:7 (CDR-H3)、SEQ ID NO:8 (CDR-L1)、SEQ ID NO:9 (CDR-L2)およびSEQ ID NO:10 (CDR-H3)に対応するアミノ酸配列を有する6つのCDRを含み、かつCDR-L1中のG5F、CDR-L1中のG5I、CDR-L1中のG5V、CDR-L1中のG5W、CDR-L1中のG5Y、CDR-L1中のR7I、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8D、CDR-L1中のN8E、CDR-L1中のN8G、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L1中のN8T、CDR-L2中のA1I、CDR-L2中のA1T、CDR-L2中のA1V、CDR-L2中のT4D、CDR-L3中のR2G、CDR-L3中のN4F、CDR-L3中のN4M、CDR-L3中のN4W、CDR-L3中のN4Y、CDR-L3中のR5L、CDR-L3中のR5N、CDR-L3中のR5W、CDR-L3中のR5Y、CDR-L3中のT9Y、CDR-H1中のD1S、CDR-H1中のY2A、CDR-H1中のY2C、CDR-H1中のY2K、CDR-H1中のY2M、CDR-H1中のY2R、CDR-H1中のY2S、CDR-H1中のY2V、CDR-H1中のH5C、CDR-H1中のH5D、CDR-H1中のH5E、CDR-H1中のH5S、CDR-H1中のH5T、CDR-H2中のT3A、CDR-H2中のT3G、CDR-H2中のT3N、CDR-H2中のW4A、CDR-H2中のW4F、CDR-H2中のW4H、CDR-H2中のW4L、CDR-H2中のW4M、CDR-H2中のW4V、CDR-H2中のN5G、CDR-H2中のS6D、CDR-H2中のS6L、CDR-H2中のI9K、CDR-H2中のD10L、CDR-H2中のY11A、CDR-H2中のY11C、CDR-H2中のY11E、CDR-H2中のY11F、CDR-H2中のY11G、CDR-H2中のY11H、CDR-H2中のY11I、CDR-H2中のY11K、CDR-H2中のY11L、CDR-H2中のY11M、CDR-H2中のY11N、CDR-H2中のY11Q、CDR-H2中のY11R、CDR-H2中のY11S、CDR-H2中のY11V、CDR-H2中のY11W、CDR-H2中のA12Y、CDR-H

40

50

2中のD13N、CDR-H2中のV15D、CDR-H2中のV15L、CDR-H2中のV15M、CDR-H2中のV15Q、CDR-H2中のV15T、CDR-H2中のE16F、CDR-H2中のE16H、CDR-H2中のE16K、CDR-H2中のE16R、CDR-H2中のE16T、CDR-H2中のE16W、CDR-H2中のG17A、CDR-H2中のG17C、CDR-H2中のG17E、CDR-H2中のG17H、CDR-H2中のG17I、CDR-H2中のG17K、CDR-H2中のG17L、CDR-H2中のG17M、CDR-H2中のG17N、CDR-H2中のG17P、CDR-H2中のG17Q、CDR-H2中のG17R、CDR-H2中のG17S、CDR-H2中のG17T、CDR-H2中のG17Y、CDR-H3中のV1G、CDR-H3中のV1R、CDR-H3中のV1W、CDR-H3中のL4T、CDR-H3中のL4V、CDR-H3中のT6V、CDR-H3中のS9K、CDR-H3中のS9W、CDR-H3中のS9Y、およびCDR-H3中のD11Vから選択される少なくとも1つの置換を有する。6つのCDRは全体で、アダリムマブのCDR配列と比較して8つまでの、7つまでの、6つまでの、5つまでの、または4つまでのアミノ酸置換を有することができる。ある局面において、各CDRは、アダリムマブのCDRと比較して4つまでの、3つまでの、または2つまでの置換を有することができる。特定の態様において、本開示の抗TNF-抗体は、重鎖置換が、もし存在するならば、(a) CDR-H1中のY2K; (b) CDR-H1中のY2M; (c) CDR-H1中のY2KおよびCDR-H3中のT6V; (d) CDR-H1中のY2K、CDR-H3中のV1GおよびCDR-H3中のT6V; (e) CDR-H3中のV1W; ならびに(f) CDR-H3中のV1GおよびCDR-H3中のT6V、のうちの少なくとも1つを含み、かつ軽鎖置換が、もし存在するならば、(a) CDR-L1中のG5SおよびCDR-L1中のA11S; (b) CDR-L1中のR7I; (c) CDR-L1中のG5S、CDR-L1中のR7TおよびCDR-L1中のA11S; ならびに(d) CDR-L1中のG5S、CDR-L1中のR7IおよびCDR-L1中のA11S、のうちの少なくとも1つを含む、アミノ酸置換の1つまたは複数の組み合わせを有する。特定の態様において、本開示の抗体は、図22に記載されたものから選択されるアミノ酸置換の組み合わせを含む。

10

20

【0012】

本開示の抗TNF-抗体は、好ましくは、アダリムマブ抗イディオタイプ抗体5A1、10F8、7A11、1H11、6A11、および10B7のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または全6つへの低減された結合を有する。

【0013】

本開示は、本開示の抗TNF-抗体をコードする核酸分子およびそれらを含む宿主細胞にさらに関する。

【0014】

本開示は、本開示の抗TNF-抗体を含む薬学的組成物、および抗TNF-抗体またはそれを含有する薬学的組成物を投与することによって免疫障害を患うヒト患者を処置する方法にさらに関する。ある局面において、処置される免疫障害は、関節リウマチ(RA) (成人における中等度から重度のRAを含む)、若年性特発性関節炎(JIA) (4歳およびそれ以上の患者における中等度から重度の多関節JIAを含む)、乾癬性関節炎(PsA) (成人におけるPsAを含む)、強直性脊椎炎(AS) (成人におけるASを含む)、クローン病(CD) (成人における中等度もしくは重度のCDを含む)、慢性尋常性乾癬(Ps) (成人における中等度から重度の慢性尋常性乾癬を含む)、または軸性脊椎関節炎(axSpA) (X線による、構造的な損傷の証拠のない成人患者における重度のaxSpAを含む)である。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

(図1A) 合成D2E7 (アダリムマブ、ヒュミラ)可変重鎖(V_H)断片および可変軽鎖(V_L)断片の翻訳されたアミノ酸配列を提供する。

40

(図1B) D2E7 V_H 断片および V_L 断片のCDRアミノ酸配列を提供する。

(図1C) D2E7 V_H 断片およびD2E7 V_L 断片のヌクレオチド配列(それぞれ、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:3)を提供する。

(図2) TNF-への中位の結合および抗Id 5A1 (a)、10F8 (b)、または7A11 (c)への低下した結合をもたらすと考えられるD2E7- V_L 中の有益な変異の一覧を提供する。アミノ酸位置は、個々のCDRとの関連およびKabat付番の両方で与えられている。図2は、SEQ ID NO:8~10を、それぞれ、登場順に開示している。

(図3A) TNF-への中位の結合および抗Id 1H11 (d)、6A11 (e)、または10B7 (f)への低下した結合をもたらすと考えられるD2E7- V_H CDR-H1およびCDR-H2中の有益な変異の

50

一覧を提供する。アミノ酸位置は、個々のCDRとの関連およびKabat付番の両方で与えられている。図3Aは、SEQ ID NO:5~6を、それぞれ、登場順に開示している。

(図3B) TNF- への中位の結合および抗Id 1H11 (d)、6A11 (e)、または10B7 (f)への低下した結合をもたらすと考えられるD2E7-V_H CDR-H3中の有益な変異の一覧を提供する。アミノ酸位置は、個々のCDRとの関連およびKabat付番の両方で与えられている。図3Bは、SEQ ID NO:7を開示している。

(図4) ベクター-pYA206およびpCW600中のD2E7の構造を提供する。

(図5) 細胞表面に発現されたWT D2E7 Fabに対するヒトTNF- の滴定プロットを提供する。

(図6) 細胞表面に発現されたWT-D2E7 Fabへの抗イデオタイプ(抗Id)の結合の滴定プロットを提供する。

(図7) 図7Aは、TNF- で染色された野生型D2E7のFACS選別プロファイルを提供する。図7Bは、TNF- で染色されたV_H点突然変異ライブラリのFACS選別プロファイルを提供する。

(図8) 1H11で染色された野生型D2E7およびV_H点突然変異ライブラリのFACS選別プロファイルを提供する。

(図9) 位置によるサイレントなコドン変異D2E7の濃縮比を提供する。アミノ酸位置は、個々のCDRとの関連で与えられている。

(図10) D2E7サブライブラリのプレートマップを提供する。アミノ酸位置は、個々のCDRとの関連およびKabat付番の両方で与えられている。図10は、SEQ ID NO:8~10および5~7を、上から下、左から右へ、それぞれ、登場順に開示している。

(図11) D2E7変異体サブライブラリおよび野生型対照のFACSプロファイルを提供する。

(図12) D2E7変異体サブライブラリおよび野生型対照のFACSプロファイルを提供する。

(図13) D2E7重鎖可変領域の空間充填モデルを提供する。パネルA、B、およびCは、それぞれ、グレーで軽鎖CDR 1、2、および3を示す。パネルDは、グレーで抗Id抗Id 1H11のエピトープを示す。以下に示すV_H配列(SEQ ID NO:2)は、CDRに下線を引いて、および抗Id 1H11への結合にとって重要な位置を太字の二重下線テキストにて示す。3つのCDRの各々が1つまたは複数のアミノ酸をエピトープに寄与させる。

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV
SAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:2)

(図14) D2E7軽鎖可変領域の空間充填モデルを提供する。パネルA、B、およびCは、それぞれ、グレーで軽鎖CDR 1、2、および3を示す。パネルDは、グレーで抗Id 5A1および10F8のエピトープを示す。以下に示すV_L配列(SEQ ID NO:4)は、CDRに下線を引いて、ならびに抗Id 5A1および10F8への結合にとって重要な位置を太字の二重下線テキストにて示す。3つのCDRの各々が1つまたは複数のアミノ酸をエピトープに寄与させる。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQKPGKAPKLLIYA
ASTLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIK (SEQ ID NO:4)

(図15) D2E7-V_H CDR1-2変異体の1点FACS分析を提供する。

(図16) D2E7の代表的な位置の分析を提供する。

(図17) 位置による平均の1H11濃縮比を提供する。

(図18) 位置による平均の5A1濃縮比を提供する。

(図19) 位置による平均の10F8濃縮比を提供する。

10

20

30

40

50

(図20A) 4人の商業的ドナー由来の血清サンプル中の抗アダリムマブ抗体への結合に及ぼす抗TNF- 抗体変異の影響を示す。アミノ酸配列は、Kabat付番で与えられている。VL-SSは、CDR-L1におけるG5S + A11Sの組み合わせに対応する、CDR-L1における置換G28SおよびA34S (Kabat付番)を有するVLを指す。

(図20B) 4人の商業的ドナー由来の血清サンプル中の抗アダリムマブ抗体への結合に及ぼす抗TNF- 抗体変異の影響を示す。アミノ酸配列は、Kabat付番で与えられている。VL-SSは、CDR-L1におけるG5S + A11Sの組み合わせに対応する、CDR-L1における置換G28SおよびA34S (Kabat付番)を有するVLを指す。

(図21) 抗アダリムマブ抗体への結合の最大の低減を有する抗TNF- 変種抗体を示す。VL-SSは、CDR-L1におけるG5S + A11Sの組み合わせに対応する、CDR-L1における置換G28SおよびA34S (Kabat付番)を有するVLを指す。

(図22) 複数のアミノ酸置換を有する変種の結合データを示す。VL-SSは、CDR-L1におけるG5S + A11Sの組み合わせに対応する、CDR-L1における置換G28SおよびA34S (Kabat付番)を有するVLを指す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

6. 詳細な説明

6.1. 低減された免疫原性を有する抗体を同定する方法

本開示は、関心対象の抗体(基準抗体)内の関心対象の領域中のすべての各アミノ酸の免疫原性への寄与を解明可能にするシステムをさらに提供する。本方法は、基準抗体を、1つまたは複数の領域(例えば、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-H1、FR-H2、FR-H3、およびFR-H4のうちの1つまたは複数)における包括的な突然変異誘発に供すること、および抗イディオタイプ抗体(「抗Id」)への結合に及ぼす変異の効果を評価することを伴う。本明細書において記載される方法は、上記の低減された免疫原性を有する変種抗TNF- 抗体の同定をもたらした。

【0017】

ライブラリの設計および構築:

抗Id抗体への結合に及ぼす変異の効果(良い、悪いまたはどちらでもない)を特定するため基準抗体の所望の領域またはドメイン中のあらゆる可能な位置にあらゆる可能な単一アミノ酸置換を含む抗体ライブラリを設計する。次に、例えば単一アミノ酸変種を生成するために「ランダム化NNKコドン」を用いて、抗体変種のライブラリを構築する;ここで「N」は任意の塩基(例えば、A、C、G、またはT)を指し、「K」はGまたはTのいずれかを指す。NNKランダム化スキームは、全20種の天然アミノ酸を網羅する32種の異なるコドンをコードしうる。抗体の各位置のアミノ酸残基を、同じ位置の野生型アミノ酸とは異なる19種のアミノ酸のうちのいずれか1種に変異させ、抗体中に単一のアミノ酸点突然変異を生じさせることができる。その最終の結果が、ライブラリ中のメンバー間で異なる1つの残基を有する複数抗体の群を包含する抗体変種ライブラリである。ライブラリの全体的な複雑度は、変異の標的となるアミノ酸の数に基づき、約50~10,000種のメンバー(例えば、50種、100種、500種、1000種、1500種、2000種、2500種、3000種、3500種、4000種、4500種、5000種、5500種、6000種、6500種、7000種、7500種、8000種、8500種、9000種、9500種、もしくは10,000種のメンバー)、約1000~5000種のメンバー、または約1000種のメンバーでありうる。ライブラリのサイズおよび複雑度に関係なく、本明細書において記載される方法は、ライブラリのメンバー全ての同時スクリーニングおよび同時配列決定を可能にする。

【0018】

非限定的な例として、基準抗体と比較して低下した免疫原性を有する特定の抗体変種を同定するためには、相補性決定領域(CDR)中のアミノ酸残基が変異の標的となる可能性がある。B細胞エピトープを排除するまたは弱めることによって、低減された免疫原性を有する抗体を産生することができる。典型的には、約50~60種のCDRアミノ酸位置が考慮され、変異について同定されうる。合成DNA断片のセットを設計および構築することができ

、これは野生型の親 V_H または V_L および可能な全ての単一アミノ酸抗体変種をコードする。上記のランダム化NNKコドンを用いて、単一アミノ酸抗体変種を生成することができる。このように、CDR内の各位置のアミノ酸残基を変異させ、選択されたCDR領域に沿って単一アミノ酸点突然変異を生じさせることができる。その最終の結果が、ライブラリ中のメンバー間で異なる1つの残基を有する複数抗体の群である抗体変種ライブラリである。この例において、ライブラリはおよそ1000~1300種のメンバーを有し、ここで、選択された領域中の50~60種または65種のCDRアミノ酸位置の各々が、任意の所与の位置の計20種の異なるアミノ酸の代わりに、19種の天然アミノ酸のうちの1つで置換されている(すなわち、 $50 \times 20 = 1000$; $60 \times 20 = 1200$; または $65 \times 20 = 1300$)。

【0019】

抗体変種の発現:

ライブラリ構築の後、第2段階は、細胞表面ディスプレイによる選別のために抗体変種のライブラリを発現させることである。例えば、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、およびリボソームディスプレイなどのディスプレイに基づく方法を用いて変種のライブラリを発現させることができ、好ましくは、哺乳類細胞において発現させて、発現した変種の適切な折り畳みおよび翻訳後修飾を確実にする。

【0020】

哺乳類発現の場合、細胞表面上に四量体の免疫グロブリン分子を係留および提示するために用いられる膜貫通ドメインは、酵素的切断、化学切断、または光分解切断を介して除去できる任意の膜貫通ドメインでありうる。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、切断酵素によって認識および切断される切断部位に隣接する。例えば、切断酵素はリパーゼ、エステラーゼ、ホスファターゼ、グリコシダーゼ、またはカルボキシペプチダーゼでありうる。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、リボヌクレアーゼ(RNase)またはデオキシリボヌクレアーゼ(DNase)などのヌクレアーゼによって認識および切断される配列を有するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体を含む。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、プロテアーゼによって認識および切断されるペプチドまたはペプチド類似体を含む。

【0021】

いくつかの態様において、mRNAスプライシングを用いて、膜貫通ドメインを有するまたは有しない免疫グロブリンを産生することができる(例えば、全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,947,495号を参照されたい)。

【0022】

他の態様において、膜貫通ドメインは、リコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ認識部位に隣接する。リコンビナーゼ認識部位の例としては、lox部位、att部位、dif部位およびfrt部位が挙げられるが、これらに限定されることはない。リコンビナーゼの概説は、例えば、Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotech.* 5:521-527; Landy, 1993, *Curr. Opin. Biotech.* 3:699-707; Sadowski, 1993, *FASEB* 7:760-767; および米国特許出願公開第20040115814号を参照されたい。

【0023】

本明細書において記載される組成物および方法で用いるための膜貫通ドメインは、I型、II型、およびIII型膜タンパク質に由来することができる(例えば、Chesnut et al., 1996, *J. Imm. Methods*, 193: 17-27; Wahlberg et al., 1997, *J. Cell Biol.*, 137:555-562; Liao, 2001, *Biotech, and Bioeng.*, 73:313-323; ならびに米国特許第5,264,357号および同第6,686,168号を参照されたい)。本明細書において記載される膜貫通ドメインを用いて、融合タンパク質発現細胞の表面上に係留および提示される全長抗体(例えば、IgG)またはその断片を含む免疫グロブリン-膜貫通ドメイン融合タンパク質を産生することができる。

【0024】

本明細書において記載される組成物および方法において特に有用である膜貫通ドメインは、血小板由来成長因子受容体(PDGF-R)膜貫通ドメイン(例えば、Chesnut et al., 1996,

10

20

30

40

50

J. Imm. Methods, 193: 17-27を参照のこと)、B7-1膜貫通ドメイン(例えば、Chou et al., 1999, Biotech. & Bioeng., 65(2): 160-169を参照のこと)、およびアジアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)膜貫通ドメイン(例えば、Liao, 2001, Biotech. & Bioeng., 73:313-323を参照のこと)を含むが、これらに限定されることはない。いくつかの態様において、細胞表面係留ドメインは、グリコシジルホスファチジルイノシトール(GPI)リンカーを介して細胞表面への免疫グロブリンのアンカリングを指令するGPIシグナル配列を指す(例えば、Medof et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2007-2011; ならびに米国特許第5,109,133号および同第5,264,357号を参照のこと)。場合によっては、GPIシグナル配列はヒト崩壊促進因子(DAF)由来である。他の態様において、細胞表面膜貫通ドメインアンカーは、免疫グロブリンタンパク質由来である。

10

【0025】

哺乳類ディスプレイベクターを用いて、インタクトな抗体を提示することができるが、例えば、Fc、Fab'、F(ab)'₂、および一本鎖Fvなどの抗体断片を提示することもできる。重鎖および軽鎖の両方が配列内リボソーム侵入部位(IRES)要素の使用により単一の転写産物としてコードされてもよく、該要素は、可変軽鎖および定常軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列を、可変重鎖および定常重鎖をコードするポリヌクレオチドに連結する。

【0026】

1つの態様において、哺乳類ディスプレイベクターは、所望の結合特性および生物活性を有する抗体の単離を容易にするため、重鎖定常領域のC末端に融合された除去可能なGPIアンカーを含む。GPIアンカーは、存在する場合、免疫グロブリン分子が哺乳類宿主細胞の表面上に提示されることを可能にする。適切な制限エンドヌクレアーゼを用いた消化によるGPIアンカーの除去により、膜結合性の免疫グロブリン分子から可溶性の免疫グロブリン分子へ変えることが可能となる。

20

【0027】

適当な哺乳類宿主細胞の例としては、HeLa細胞(HeLa S3細胞, ATCC CCL2.2)、Jurkat細胞、Raji細胞、Daudi細胞、ヒト胎児腎臓細胞(293-HEK; ATCC 293c18, ATCC CRL 1573)、アフリカミドリザル腎臓細胞(CV-1; Vero; ATCC CRL 1587)、SV40形質転換サル腎臓細胞(COS-1; ATCC CRL 1650)、イヌ腎臓細胞(MDCK; ATCC CCL 34)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314)、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin et al., 1986, Som Cell Molec Genet, 12, 55

30

【0028】

1つの態様において、参照により全体が本明細書に組み入れられる米国特許第7,947,495号に記載されている方法およびベクターを用いることができる。哺乳類細胞表面ディスプレイ系は、自己複製ベクターおよび哺乳類細胞を含む。自己複製性の哺乳類ベクターは典型的には、(1) 自己複製性の複製起点; (2) 少なくとも1つの真核生物プロモーター; (3) 固定されたまたは除去可能な膜貫通ドメイン; (4) 軽鎖定常領域; (5) 重鎖定常領域; (6) 軽鎖および重鎖可変領域の挿入のための制限部位; (7) 配列内リボソーム侵入部位(IRES); ならびに(8) 少なくとも1つの選択可能マーカーを含む。加えて、ベクターは、原核生物の複製起点、転写終結因子、ポリアデニル化シグナルおよび/またはリーダー配列、ならびに真核生物宿主細胞における発現に必要な他の配列を含むことができる。形質転換されたら、抗体の発現が可能となる条件の下で宿主細胞をインキュベートする。得られたプラスミドは、記載されるように(例えば、Hirt, 1967, J. Mol. Biol., 26, 365-369を参照のこと)、細胞から容易に回収することができる。

40

【0029】

上記の技法に加えて、酵母表面ディスプレイライブラリを変種抗体ライブラリの細胞表面ディスプレイに利用することができる。酵母表面ディスプレイ技術(Boder and Wittrup, 2000, Methods in Enzymology 328:430-444によって概説されており、これはその全体

50

が参照により本明細書に組み入れられる)は、抗体ライブラリを、細胞選別法における分析のための標識分子との相互作用に利用できる形態で、酵母細胞壁上に発現させることができる。1つの態様において、変種は酵母AGA2タンパク質の全部または一部との融合タンパク質として発現され、これが下記の方法による選別のために、酵母細胞壁の表面上に提示されるようになる。例えば、Boder et al., 1997, Nat. Biotechnol. 15:553-557およびFeldhaus et al., 2003, Nat. Biotechnol. 21:163-170を参照されたい。

【0030】

抗体変種のファージディスプレイを用いることもできる。抗体鎖をファージの外表面からファージコートタンパク質との融合タンパク質として発現させることができる。その後、ディスプレイパッケージを、標的に結合する抗体の提示についてスクリーニングすることができる。1つの態様において、抗体変種は、1価の形で、繊維状ファージ粒子から、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合体として提示され、ファージの外部に発現される。抗体ファージディスプレイ法は、当業者に公知であり、例えば、Hogenboom, 「Overview of Antibody Phage-Display Technology and Its Applications」, Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display: Methods and Protocols (2002) 178: 1-37 (O'Brien and Aitken, eds., Human Press, Totowa, N.J.)に記載されている。

10

【0031】

別の態様において、リボソームディスプレイ技術(Hanes et al., 2000, Meth. Enzymol. 328: 403-430; Pluckthun et al., 2000, Adv. Prot. Chem. 55:367-403; Lipovsek and Pluckthun, 2004, J. Immunological Methods 290:51-67を参照のこと)を用いて、変種抗体を発現させる。リボソームディスプレイ技術には、抗Id抗体への低減された結合を有する変種抗体を選択するために、インビトロ翻訳、およびRNAなどの遺伝子型と変種抗体などのコードされる表現型との間の共有結合または非共有結合が取り入れられている。ライブラリは、後に転写されてmRNAのプールを産生する多様な配列のDNAプールを合成することによって作製される。インビトロ翻訳を用いて、提示されるコードされたポリペプチドまたはタンパク質を生成し、固定化された結合パートナーを用いて望ましい結合相互作用を選択する。結合実体をコードするmRNAを用いてcDNAを作製することができ、次にこれを増幅させることができ、このプロセスを繰り返して、所望の特徴を有する変種抗体をコードする遺伝子の集団を濃縮してもよい。個々のコード配列のクローニングおよびDNA配列決定によって、選択されたタンパク質を同定することができる。

20

30

【0032】

細菌ディスプレイ系を用いて、変種抗体を発現させることもできる。例えば、Skerra et al., 1988, Science 240: 1038-1041; Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043; Harvey et al., 2004, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101(25):9193-9198; およびMazor et al., 2007, Nat. Biotechnol. 25(5): 563-565を参照されたい。

【0033】

ライブラリ選別:

発現された抗体変種を提示している宿主細胞は、親和性に基づく濃縮アッセイ法を用いて選別することができる。変種抗体は、(1) 抗Idへの結合の喪失、(2) 任意で、標的抗原への結合の保持、および(3) 任意で、発現レベルに基づき、選別することができる。抗Idは、他の抗体の可変領域に対して作られた抗体である。このため、抗Idの抗原結合部位は、抗Idによって認識される抗体が結合する標的分子と類似し得る。抗Idを作製する方法は、当技術分野において公知であり、一般に、基準抗体に関して以下に記載されるものなどの従来の手段により抗体を生成するために免疫原として関心対象の抗体(例えば、基準抗体)を用いることを伴う。抗Id抗体は、ヒト由来または動物由来のどちらかのモノクローナルでありうる。

40

【0034】

抗体変種の選別で用いるのに適したアッセイ法の例としては、蛍光活性化細胞選別(FACS)法、磁気ビーズ選別法、Trellis Bioscience, Inc. (South San Francisco, CA)による

50

CellSpot(商標)抗体スクリーニング技術、および/またはGenetix Ltd. (Hampshire, United Kingdom)によるClonePix FL哺乳類細胞クローンスクリーニング装置が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0035】

FACS選別の場合、基準抗体と、類似の親和性を有する変種との間の最大の識別のため、基準抗体の親和性に関する解離定数(K_D)に近い濃度で、蛍光標識された抗体(例えば、変種の非突然変異誘発部分における共通のエピトープを検出する抗体もしくは抗Id)または標的抗原とともに細胞をインキュベートする。関心対象の特性を有する変種の頻度が、関連する亜集団において増加または減少するように、染色された細胞が1つまたは複数の亜集団へ選別される。

10

【0036】

抗Idの結合についての選別は、上記の方法のいずれかを用いて行うことができる。一般的に、抗体変種を発現している細胞を、抗Idとともにインキュベートし、結合した抗Idの量によって選別する。基準抗体を発現している細胞からベースライン結合値を得ることができ、ベースライン値を上回るまたは下回る、結合した抗Idを有している亜集団へ細胞を選別することによって抗Idへの結合の低下を示す細胞を同定することができる。

【0037】

任意で、抗体変種を発現している細胞は、発現レベルに基づいて選別されてもよい。例えばFACS中に、抗体変種を発現している細胞に結合した蛍光抗体または抗原の総量は、提示された変種抗体の結合親和性および総量の両方に関連している。提示される変種抗体の量は、クローンによって異なりうる。したがって、場合によっては、関心対象の変種抗体、例えば、膜貫通ドメインアンカーを介して細胞表面に係留された全長IgGを発現している細胞は、(抗Idの結合について選別することに加えて)免疫グロブリンに対する蛍光標識抗体(例えば、抗IgG抗体)を用いてFACSにより選別することができる。異なる特性の検出のために用いられる異なる抗体、例えば、抗Idおよび発現レベルを検出するために用いられる抗IgG抗体を、典型的には、異なる励起および/または発光スペクトルを有するフルオロフォアで標識し、それによって2色検出系を提供する。

20

【0038】

標的の結合について細胞を選別することもできる。典型的には、標的への結合を保持する抗体変種、例えば、基準抗体と比較して標的分子へのほぼ等しい結合またはより大きな結合を有する変種を選択することが望ましいであろう。抗Idおよび標的分子で同時染色されたライブラリを、FACSにより2つの亜集団、つまり標的結合についてある閾値を上回る第1の集団、ならびに標的結合についておよび低下した抗イディオタイプ結合について二重で選別された第2の集団へ、選別することができる。異なる特性の検出のために用いられる異なる分子、例えば、抗Idおよび標的分子を、典型的には、異なる励起および/または発光スペクトルを有するフルオロフォアで標識し、それによって2色検出系を提供する。

30

【0039】

さらに他の態様において、細胞を抗Id結合、発現レベル、および標的結合について選別することができる。これらの態様において、3つの識別可能な標識を用いた3色検出系を用いることができる。

40

【0040】

抗Id結合ならびに発現レベルおよび/または標的結合についての同時選別のために二重または三重染色が用いられる場合、標識される標的および標識される抗体を、典型的には、異なる励起および/または発光スペクトルを有するフルオロフォアで標識し、それによって2色または3色検出系を提供する。異なる集団へ選別することは、連続的に行われてもよい。例えば、抗Idへの低減された結合を有する亜集団へ選別された細胞は、標的結合および発現レベルに基づきさらなる亜集団へ選別することができ、標的結合および発現レベルに基づく選別は、同時にまたは連続的に行われる。他の態様において、抗イディオタイプ抗体の結合についての選別の間に同定された変種(およびそれらが発現している宿主細胞)

50

胞)は、下記の独立した検証方法を用い標的結合について特徴付けられる。

【0041】

選別された集団の分析:

亜集団への選別の後、各亜集団における各抗体変種の頻度を、変種をコードするプラスミドを配列決定することによって決定することができる。本開示の好ましいDNA配列決定法は、「大規模並列配列決定法」または「大規模並列パイロシーケンシング」である(例えば、米国特許第6,787,308号; 同第6,833,246号; 同第6,897,023号; 同第6,956,114号; 同第7,057,026号; 同第7,115,400号、同第7,211,390号; および同第7,232,656号を参照のこと)。この方法は、DNAの迅速かつ安価な配列決定を可能にし、望ましい活性または特徴を有する特定の抗体変種の同定を速める。

10

【0042】

配列決定の後で、配列の統計分析を行って、所望の変種を同定することができる。そのような分析は、未加工のDNA配列のコンピュータ分析を含むことができる。未加工のDNA配列をタンパク質配列へ翻訳し、基準抗体とアライメントおよび比較して、変異を同定してもよい。各位置で観察された各アミノ酸の頻度を、分類のタイプ(例えば、低下した免疫原性、および増大した、低下したまたは中位の発現または標的分子に対する親和性)について一覧にし、基準抗体と比較してもよい。選択された集団においては、例えば、免疫原性を低減するもの、発現を保持するもの、および/または標的分子への結合を保持するものなどの、所望の活性を有する変種は濃縮されると考えられる一方で、選択された集団においては、望ましくない活性を有する変種は枯渇すると考えられる。

20

【0043】

各変種について濃縮比(ER)を算出することができ、これは、他の変種および/または基準抗体と比較して、集団における変種の濃縮または枯渇の程度の指標を提供する。細胞が、(a) ある閾値を上回る発現レベルおよび(b) 抗イディオタイプへの低い結合に基づいて選別される態様(「選別された」集団)において、所与の位置に変異が見出される回数を、その位置が配列決定された回数に対して規格化し、1000配列あたりの頻度として表現する。次に、選別された集団における変異の頻度を、発現された集団における頻度で割って、変異が、発現された集団と比較して選別された集団において濃縮または枯渇したかどうか、およびどの程度であるかを示唆する濃縮比(ER)を得る。選別された集団において濃縮される変異は、抗イディオタイプへの低下した結合を有していると考えられる一方で、枯渇する変異は、抗イディオタイプへの増大した結合を有していると考えられる。同様に、標的に対する増大した、低下した、または同様の(中位の)親和性にしたがって選別された各変種について、濃縮比を算出することができる。

30

【0044】

細胞が抗イディオタイプへの結合の低下についてのみ選別される態様、例えば、細胞が発現レベルについて同時に選別されない態様において、基準抗体を発現している細胞から決定されたベースライン値を下回る、結合した抗イディオタイプを有する亜集団における変異の頻度を、ベースライン値のまたはベースライン値を上回る、結合した抗イディオタイプを有する亜集団における変異の頻度で割ることにより、濃縮比を決定することができる。

40

【0045】

個々の変種の検証:

個々に発現された変種ポリペプチドの結合特性を種々の技法により分析して、ライブラリとの関連でその挙動を確認することができる。これらの技法には、BIAcore、FACS、ELISA、AlphaLisa、およびKinExAが含まれる。BIAcoreアッセイ法では、表面プラズモン共鳴(SPR)、つまり非標識の相互作用物の検出を可能にする光学現象を用いて結合について測定し、BIAcoreアッセイ法を用いて、個々の抗体変種の結合親和性を決定することができる(例えば、米国特許出願第2008/0274114号; およびChe et al., 2009, J. Pharm. and Biomed. Analysis 50(2): 183-188)。AlphaLISAを用いて、標的分子に対する個々の変種の結合親和性を決定することができる(例えば、Ullman et al., 1996, Clinical Chemistry

50

、42(9): 1518-1526; およびHideharu et al., 2007, Cancer Science 98(8): 1275-1280を参照のこと)。KinExA (動力的除外アッセイ法)では、受容体、リガンド(L)、およびLR複合体の混合物における非複合体化受容体(R)分子の濃度を測定する。非複合体化Rの濃度は、ごく短時間の間、固相に固定化されたLに溶液相混合物を曝露することによって測定される。溶液相混合物と固相に固定化されたLとの間の「接触時間」は、十分に短く維持されるので、LR複合体の解離はわずかしかない。LR複合体の顕著な解離の可能性が動力的に除外される場合、非複合体化(「遊離」)Rのみが固相に結合することができる。(二次標識からの蛍光発光によって測定される)固相に結合する遊離Rの量は、溶液相サンプル中の遊離Rの濃度に正比例する。KinExAを用いて、標的分子に対する個々の変種の結合親和性を決定することもできる(例えば、米国特許出願第2008/0274114号; およびDarling et al., 2004, ASSAY and Drug Development Technologies 2:647-657を参照のこと)。

10

【0046】

6.2. 変種抗TNF- 抗体

上記の方法は、D2E7と比較して抗イディオタイプ抗体に対する低減された親和性を有する変種を同定するために、アダリムマブとしても知られる抗TNF- 抗体D2E7に対して適用された。抗イディオタイプ抗体に対する低減された親和性を呈する変種は、「低減された免疫原性」の変種と呼ばれる。

【0047】

ある局面において、本開示は、D2E7と比較して低減された免疫原性を有する抗TNF- 抗体を提供する。本開示の抗TNF- 抗体は、典型的には、D2E7のCDRと比較してそのCDRの中に1つまたは複数のアミノ酸置換を有し、ここで該少なくとも1つまたは複数の置換がD2E7と比較して抗体の免疫原性を低減させる。ある態様において、低減された免疫原性は、1つまたは複数のB細胞エピトープを排除するまたは弱めることから生じる。

20

【0048】

D2E7の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:4により表されており、それぞれ、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:3によりコードされる。重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、図1Aにも描かれている。D2E7のCDRのアミノ酸配列、および対応するそれらの識別子は、図1Bに示されている。米国特許第6,090,382号において公開されている通りの、D2E7の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は、図1Cに示されている。SEQ ID NO:2またはSEQ ID NO:4をコードする他の任意のヌクレオチド配列は、公開されている配列の代わりに本開示の組成物および方法において用いることができる。

30

【0049】

ある局面において、低減された免疫原性を有する本開示の抗TNF- 抗体は、D2E7と比べてTNF- への同等な結合または改善された結合を有する。親和性は、例えば、6.1節に記載されている検証方法によって試験することができる。

【0050】

D2E7と比較して排除されたまたは弱められたB細胞エピトープを有しかつより低い免疫原性を有する抗TNF- 抗体をもたらす例示的な置換は、図2および図3(すなわち、図3A~3B)に記載されている。適当な置換には、CDR-L1中のG5F、CDR-L1中のG5I、CDR-L1中のG5V、CDR-L1中のG5W、CDR-L1中のG5Y、CDR-L1中のR7I、CDR-L1中のR7T、CDR-L1中のR7V、CDR-L1中のN8A、CDR-L1中のN8D、CDR-L1中のN8E、CDR-L1中のN8L、CDR-L1中のN8M、CDR-L1中のN8Q、CDR-L1中のN8R、CDR-L2中のA1I、CDR-L2中のA1T、CDR-L2中のA1V、CDR-L2中のT4D、CDR-L3中のR2G、CDR-L3中のN4F、CDR-L3中のN4M、CDR-L3中のN4W、CDR-L3中のN4Y、CDR-L3中のR5L、CDR-L3中のR5N、CDR-L3中のR5W、CDR-L3中のR5Y、CDR-H1中のD1S、CDR-H1中のY2A、CDR-H1中のY2C、CDR-H1中のY2K、CDR-H1中のY2M、CDR-H1中のY2R、CDR-H1中のY2S、CDR-H1中のY2V、CDR-H1中のH5C、CDR-H1中のH5D、CDR-H1中のH5E、CDR-H1中のH5S、CDR-H1中のH5T、CDR-H2中のT3A、CDR-H2中のT3G、CDR-H2中のW4A、CDR-H2中のW4F、CDR-H2中のW4H、CDR-H2中のW4L、CDR-H2中のW4M、CDR-H2中のW4V、CDR-H2中のN5G、CDR-H2中のS6D、CDR-H2中のS6L、CDR-H2中のI9K、CDR-H2中のD10L、CDR-H2中のY11A、CDR-H2中のY11C、

40

50

CDR-H2中のY11E、CDR-H2中のY11F、CDR-H2中のY11G、CDR-H2中のY11H、CDR-H2中のY11I、CDR-H2中のY11K、CDR-H2中のY11L、CDR-H2中のY11M、CDR-H2中のY11N、CDR-H2中のY11Q、CDR-H2中のY11R、CDR-H2中のY11S、CDR-H2中のY11V、CDR-H2中のY11W、CDR-H2中のA12Y、CDR-H2中のD13N、CDR-H2中のV15D、CDR-H2中のV15L、CDR-H2中のV15M、CDR-H2中のV15Q、CDR-H2中のV15T、CDR-H2中のE16F、CDR-H2中のE16H、CDR-H2中のE16K、CDR-H2中のE16T、CDR-H2中のE16W、CDR-H2中のG17A、CDR-H2中のG17C、CDR-H2中のG17E、CDR-H2中のG17H、CDR-H2中のG17I、CDR-H2中のG17K、CDR-H2中のG17L、CDR-H2中のG17M、CDR-H2中のG17P、CDR-H2中のG17Q、CDR-H2中のG17R、CDR-H2中のG17S、CDR-H2中のG17T、CDR-H2中のG17Y、CDR-H3中のV1G、CDR-H3中のV1R、CDR-H3中のV1W、CDR-H3中のL4T、CDR-H3中のL4V、CDR-H3中のT6V、CDR-H3中のS9K、CDR-H3中のS9W、CDR-H3中のS9Y、およびCDR-H3中のD11Vが含まれる。

10

【 0 0 5 1 】

本開示の抗TNF- 抗体は、単独でまたは組み合わせで、図2および3に記載されている置換のいずれか、および任意で1つまたは複数のさらなる置換を含むことができる。D2E7と比較して排除されたまたは弱められたT細胞エピトープを有しかつより低い免疫原性を有する抗体をもたらす例示的なCDR-L1置換は、それぞれ参照により全体が組み入れられる米国特許出願公開第2010/0266613 A1号およびPCT国際公開公報第2010/121140号の表11に記載されている。CDR-L1における適当な置換および置換の組み合わせには、R7Q; A11S; R7Q + A11S; N8T; N8T + A11S; I6T; A11G; I6T + A11G; Q4G; Q4G + A11S; Q4G + A11G; Q4H; Q4H + A11S; Q4R; Q4R + A11S; G5S; G5S + A11S; N8S + A11S; I6T + A11S; およびN8T + A11Gが含まれる。

20

【 0 0 5 2 】

D2E7と比較してTNF- に対する増大した親和性を有する抗体をもたらす例示的な置換は、米国特許出願公開第2010/0266613 A1号およびPCT国際公開公報第2010/121140号の表12および25に記載されている。適当な置換には、CDR-L2中のS3K、CDR-L2中のS3R、CDR-L2中のS3N、CDR-L2中のT4H、CDR-L2中のT4Q、CDR-L2中のT4V、CDR-L2中のT4F、CDR-L2中のT4W、CDR-L2中のT4Y; CDR-L2中のL5R、CDR-L2中のL5K、CDR-L2中のQ6K、CDR-L2中のQ6R、CDR-H1中のD1G、CDR-H1中のY2H、CDR-H1中のA3G、およびCDR-H2中のT3Nが含まれる。

【 0 0 5 3 】

本開示の抗体は、米国特許出願公開第2010/0266613 A1号およびPCT国際公開公報第2010/121140号の表11~25に記載されている1つまたは複数の置換を含むことができる。

30

【 0 0 5 4 】

本開示の抗TNF- 抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヘテロコンジュゲート抗体(例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)、およびテトラボディ(tetrabody))、ならびに例えばFab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rlgG、およびscFv断片を含む抗体の抗原結合断片を含むが、これらに限定されない、モノクローナル抗体、遺伝子操作された抗体形態および別の方法で改変された抗体形態でありうる。さらに、他に指定のない限り、「モノクローナル抗体」(mAb)という用語は、タンパク質に特異的に結合できる、インタクトな分子ならびに抗体断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片など)の両方を含むと意図される。

40

【 0 0 5 5 】

FabおよびF(ab')₂断片は、インタクトな抗体のFc断片を欠き、動物または植物の循環からより迅速に消失し、インタクトな抗体よりも低い非特異的な組織結合を有しうる(Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316)。Fab断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(C_H1)を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つまたは複数のシステインを含む重鎖C_H1ドメインのカルボキシル末端の数個の残基の付加によってFab断片とは異なる。F(ab')断片は、F(ab')₂ペプシン消化産物のヒンジシステインにおけるジスルフィド結合の切断によって産生される。「Fv」断片は、完全な標的認識結合部位を含んだ最小抗体断片である。この領域は、強固に非共有結合性に会合している1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体(V_H-V_L二量体)からなる。「一本鎖Fv」また

50

は「scFv」抗体断片は単一のポリペプチド鎖内に抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含み、同様に本開示の範囲内である。本開示によって包含される他の抗体には、「単ドメイン抗体」が含まれ、これは、標的分子に対する十分な親和性を示す単一のV_HまたはV_Lドメインから構成される。特定の態様において、単ドメイン抗体は、ラクダ科動物抗体である(例えば、Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38を参照のこと)。

【0056】

本開示の抗TNF- α 抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本明細書において用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって産生された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体を指し、それが産生される方法ではない。本開示に関連して有用なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組み換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当技術分野において公知の多種多様な技法を用いて調製される。本開示の抗体には、キメラ抗体、霊長類化抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体が含まれる。

10

【0057】

本開示の抗TNF- α 抗体は、二重特異性抗体でありうる。二重特異性抗体は、少なくとも2種の異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体、多くの場合にはヒト抗体またはヒト化抗体である。本開示においては、結合特異性の1つは、任意の2種の抗原、例えば細胞表面タンパク質、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、ウイルス由来タンパク質、ウイルスによりコードされるエンベロープタンパク質、細菌由来タンパク質、または細菌表面タンパク質などに対するものでありうる。

20

【0058】

本開示の抗TNF- α 抗体には、誘導体化抗体が含まれる。例えば、限定されるものではないが、誘導体化抗体は、典型的には、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって修飾されている。数多くの化学修飾のいずれも、特異的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含むがこれらに限定されない、公知の技法によって行われうる。さらに、例えば、ambrx技術(例えば、Wolfson, 2006, Chem. Biol. 13(10): 1011-2を参照のこと)を用いて、誘導体

30

【0059】

本開示のさらに別の態様において、抗TNF- α 抗体は、その配列が、対応する野生型配列と比べて少なくとも1つの定常領域媒介性生物学的エフェクタ機能を変化させるように改変された抗体でありうる。例えば、いくつかの態様において、本開示の基準抗体および/または抗体変種は、未改変抗体と比べて少なくとも1つの定常領域媒介性生物学的エフェクタ機能を低減させるように、例えば、Fc受容体(Fc γ R)への結合を低下させるように改変される。Fc γ R結合は、Fc γ R相互作用に必要な特定の領域において抗体の免疫グロブリン定常領域セグメントを変異させることによって低減される(例えば、Canfield and Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173: 1483-1491; およびLund et al., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662を参照のこと)。抗体のFc γ R結合能の低減は、オプソニン作用、食作用および抗原依存性細胞傷害(「ADCC」)などの、Fc γ R相互作用に依存する他のエフェクタ機能をも低減させうる。

40

【0060】

本開示の他の態様において、基準抗体および/または抗体変種は、未改変抗体と比べて少なくとも1つの定常領域媒介性生物学的エフェクタ機能を獲得または改善するように、例えば、Fc γ R相互作用を増強するように改変される(例えば、US 2006/0134709を参照のこと)。例えば、本開示の基準抗体および/または抗体変種は、対応する野生型定常領域よりも高い親和性でFc γ RIIA、Fc γ RIIBおよび/またはFc γ RIIIAと結合する定常領域を有しうる。

50

【 0 0 6 1 】

したがって、本開示の抗TNF- 抗体は、オプソニン作用、食作用、またはADCCの増大または低下をもたらす生物活性の変化を有しうる。そのような変化は、当技術分野において公知である。例えば、ADCC活性を低減させる抗体の改変は、米国特許第5,834,597号に記載されている。ADCCが低下している例示的な変種は、残基236が欠失し、かつ残基234、235および237 (EU付番を使用)がアラニンで置換されている「変異体3」(米国特許第5,834,597号の図4に示されている)に対応する。

【 0 0 6 2 】

いくつかの態様において、本開示の抗TNF- 抗体は低レベルのフコースを有するか、またはフコースを欠く。フコースを欠く抗体は、特に低用量の抗体で、ADCC活性の増強と関連付けられている。Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-73を参照されたい。フコースのない抗体を調製する方法には、ラット骨髄腫YB2/0細胞(ATCC CRL 1662)内での増殖が含まれる。YB2/0細胞は、低レベルのFUT8 mRNAを発現し、FUT8 mRNAは、ポリペプチドのフコシル化に必要な酵素である -1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードしている。

10

【 0 0 6 3 】

さらに別の局面において、抗TNF- 抗体は、例えば、FcRn相互作用に關与する特定の領域で免疫グロブリン定常領域セグメントを変異させることにより、胎児Fc受容体FcRnに対するその結合親和性を増大または低減するように改変された抗体でありうる(例えば、WO 2005/123780を参照のこと)。特定の態様において、重鎖定常領域のアミノ酸残基250、314および428のうちの少なくとも1つが、単独で置換されるように、またはそれらの任意の組み合わせで、例えば、位置250および428で、または位置250および314で、または位置314および428で、または位置250、314および428で、特定の組み合わせでは位置250および428で、置換されるように、IgGクラスの基準抗体および/または抗体変種を変異させる。位置250の場合、アミノ酸残基の置換は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、バリン、トリプトファン、またはチロシンを含むがこれらに限定されない、トレオニン以外の任意のアミノ酸残基でありうる。位置314の場合、アミノ酸残基の置換は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、またはチロシンを含むがこれらに限定されない、ロイシン以外の任意のアミノ酸残基でありうる。位置428の場合、アミノ酸残基の置換は、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、またはチロシンを含むがこれらに限定されない、メチオニン以外の任意のアミノ酸残基でありうる。そのような変異はFcRnへの抗体の結合を増大させ、これは抗体を分解から防御し、その半減期を増大させる。

20

30

【 0 0 6 4 】

さらに他の局面において、基準抗体および/または抗体変種は、例えばJung and Pluckthun, 1997, Protein Engineering 10:9, 959-966; Yazaki et al., 2004, Protein Eng. Des. Sel. 17(5):481-9. Epub 2004 Aug 17; および米国特許出願第2007/0280931号に記載されているように、その超可変領域の1つまたは複数へ挿入された1つまたは複数のアミノ酸を有する。

40

【 0 0 6 5 】

本開示の抗TNF- 抗体には、例えば、共有結合がTNF- への結合を妨げないように、任意のタイプの分子を該抗体と共有結合させることにより改変されている抗体結合体が含まれる。

【 0 0 6 6 】

50

ある局面において、本開示の抗TNF- 抗体は、エフェクタ部分または標識と結合させることができる。本明細書において用いられる「エフェクタ部分」という用語は、例えば、抗腫瘍薬、薬物、毒素、生物学的に活性なタンパク質、例えば酵素、他の抗体または抗体断片、合成または天然ポリマー、核酸(例えば、DNAおよびRNA)、放射性核種、特に放射性ヨウ素、放射性同位体、キレート化された金属、ナノ粒子およびレポーター基、例えば蛍光化合物、またはNMRもしくはESR分光法により検出される化合物を含む。

【0067】

一例においては、抗TNF- 抗体は、所与の生物学的応答を改変するために、エフェクタ部分、例えば細胞毒性薬、放射性核種または薬物部分と結合させることができる。エフェクタ部分は、例えば限定されるものではないが、毒素(例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス(Pseudomonas)外毒素、もしくはジフテリア(Diphtheria)毒素)、シグナル伝達分子(例えば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子もしくは組織プラスミノゲン活性化因子)、血栓症薬もしくは抗血管新生薬(例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン)またはサイトカインもしくは成長因子などの生物応答修飾因子(例えば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-6 (IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、もしくは神経成長因子(NGF))などの、タンパク質またはポリペプチドでありうる。

10

【0068】

別の例においては、エフェクタ部分は細胞毒または細胞毒性薬でありうる。細胞毒および細胞毒性薬の例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。

20

【0069】

エフェクタ部分は、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシル デカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC5およびシス-ジクロロジアミン白金(II) (DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(旧名ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(旧名アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン(AMC)、カリケアマイシンまたはデュオカルマイシン)、ならびに抗有糸分裂薬(例えば、ピンクリスチンおよびピンプラスチン)も含むが、これらに限定されることはない。

30

【0070】

他のエフェクタ部分は、放射性核種、例えば限定されるものではないが、 ^{111}In および ^90Y 、 ^{177}Lu 、ビスマス 213 、カリフォルニウム 252 、イリジウム 192 およびタンゲステン $^{187\text{s}}$ /レニウム 188 、ならびに薬物、例えば限定されるものではないが、アルキルホスホコリン、トポイソメラーゼI阻害剤、タキソイドおよびスラミンを含むことができる。

40

【0071】

そのようなエフェクタ部分を抗体と結合させるための技法は、当技術分野において周知である(例えば、Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., pp. 623-53 (Robinson et al., eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58およびDubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics 83:67-123を参照のこと)。

【0072】

ある局面において、抗TNF- 抗体を小分子毒素と結合させる。ある例示的な態様におい

50

て、本開示の抗TNF- 抗体はドラスタチンまたはドラスタチンペプチド類似体もしくは誘導体、例えばオーリスタチン(米国特許第5,635,483号および同第5,780,588号)と結合させる。ドラスタチンまたはオーリスタチン薬物部分は、抗体と、そのN(アミノ)末端またはC(カルボキシル)末端を介して付着されうる(WO 02/088172)。例示的なオーリスタチンの態様には、参照により全体が本明細書に組み入れられる米国特許第7,498,298号(例えば、リンカー、ならびにリンカーに結合されるMMAEおよびMMAFなどのモノメチルバリン化合物を調製する方法を開示している)に開示されているような、N末端連結モノメチルオーリスタチン薬物部分DEおよびDFが含まれる。

【0073】

他の例示的な態様において、小分子毒素は、カリケアマイシン、メイタンシン(米国特許第5,208,020号)、トリコテン(trichothene)、およびCC1065を含むが、これらに限定されることはない。本開示の1つの態様において、抗体は1つまたは複数のメイタンシン分子(例えば、抗体1分子あたりメイタンシン約1~約10分子)に結合される。メイタンシンは、例えば、May-SS-Meに変換されうるが、May-SS-MeはMay-SH3に還元され、抗体と反応して(Chari et al., 1992, Cancer Research 52: 127-131)、メイタンシノイド-抗体またはメイタンシノイド-Fc融合結合体を生じうる。同様に使用されうるカリケアマイシンの構造類似体は、 C_1^1 、 C_3^1 、N-アセチル- C_1^1 、PSAG、および C_1^1 (Hinman et al., 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode et al., 1998, Cancer Research 58:2925-2928; 米国特許第5,714,586号; 米国特許第5,712,374号; 米国特許第5,264,586号; 米国特許第5,773,001号)を含むが、これらに限定されることはない。

【0074】

本開示の抗体は標的化された送達のためにリボソームと結合させることもできる(例えば、Park et al., 1997, Adv. Pharmacol. 40:399-435; Marty & Schwendener, 2004, Methods in Molecular Medicine 109:389-401を参照のこと)。

【0075】

本明細書において用いられる「標識」という単語は、本開示の抗TNF- 抗体に直接的または間接的に結合されうる検出可能な化合物または組成物を指す。標識はそれ自体が検出可能であり得るか(例えば、放射性同位体標識もしくは蛍光標識)、または、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒しうる。有用な蛍光部分は、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリンなどを含むが、これらに限定されることはない。有用な酵素標識は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどを含むが、これらに限定されることはない。

【0076】

6.3. 核酸および発現系

本開示の抗TNF- 抗体は、宿主細胞内での免疫グロブリン軽鎖遺伝子および免疫グロブリン重鎖遺伝子の組み換え発現によって調製することができる。抗体を組み換えにより発現させるため、抗体の免疫グロブリン軽鎖および重鎖をコードするDNA断片を保有する1つまたは複数の組み換え発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクションし、軽鎖および重鎖を宿主細胞内で発現させ、任意で、宿主細胞を培養している培地内へ分泌させ、この培地から抗体を回収することができる。Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds.), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989)および米国特許第4,816,397号に記載されているものなどの標準的な組み換えDNA法を用いて、抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を得て、これらの遺伝子を組み換え発現ベクターへ組み込み、ベクターを宿主細胞へ導入する。

【0077】

本開示の抗体を原核宿主細胞または真核宿主細胞のいずれかにおいて発現させることが可能である。ある態様において、適切に折り置かれた、免疫学的に活性な抗体の最適な分泌のために、抗体の発現は真核細胞、例えば哺乳類宿主細胞において行われる。本開示の

組み換え抗体を発現させるための例示的な哺乳類宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えば、Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621に記載されているDHFR選択マーカールとも用いられる、Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されたDHFR⁻ CHO細胞を含む)、NS0骨髄腫細胞、COS細胞、293細胞およびSP2/0細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組み換え発現ベクターが哺乳類宿主細胞へ導入される場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現または宿主細胞を増殖している培地への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間、宿主細胞を培養することによって産生される。

【0078】

宿主細胞を用いて、Fab断片またはscFv分子などの、インタクトな抗体の部分を産生することもできる。組み換えDNA技術を用いて、TNF- α への結合に必要なでない軽鎖および重鎖の一方または両方をコードするDNAの一部または全部を除去することもできる。そのようなトランケートされたDNA分子から発現される分子も、本開示の抗体によって包含される。

10

【0079】

本開示の抗TNF- α 抗体の組み換え発現のため、本開示の2つの発現ベクター、つまり重鎖由来ポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖由来ポリペプチドをコードする第2のベクターで宿主細胞を同時トランスフェクションすることができる。典型的には、この2つのベクターはそれぞれ、別々の選択可能マーカールを含有する。あるいは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを用いることができる。

20

【0080】

D2E7の1つもしくは複数の部分をコードする核酸、またはD2E7のCDR配列に関連したCDR配列を有する抗TNF- α 抗体の1つもしくは複数の部分をコードする核酸が生成されたら、さらなる変更または変異をコード配列へ導入して、例えば、異なるCDR配列を有する抗体、Fc受容体に対する低減された親和性を有する抗体、または異なるサブクラスの抗体をコードする核酸を生成することができる。

【0081】

本開示の抗TNF- α 抗体が組み換え発現により産生されたら、それを、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野において公知のいずれかの方法により、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換クロマトグラフィー、特にプロテインAまたはプロテインG選択後のTNF- α に対する親和性による、アフィニティークロマトグラフィー、およびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のためのいずれかの他の標準的な技法により、回収および精製することができる。さらに、本開示の抗TNF- α 抗体またはその断片は、精製を促進するための、本明細書に記載されているまたは当技術分野において知られている異種ポリペプチド配列に融合させることができる。

30

【0082】

抗TNF- α 抗体は、単離されたら、所望により、例えば高速液体クロマトグラフィー(例えば、Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980)を参照のこと)によって、またはSuperdex(商標) 75カラム(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)上でのゲルろ過クロマトグラフィーによってさらに精製することができる。

40

【0083】

6.4. 治療的使用

本開示のTNF- α 抗体は、さまざまな免疫病変および自己免疫病変の障害または症状ならびに炎症性疾患を処置するのに有用である。

【0084】

本開示の抗TNF- α 抗体で処置できるTNF- α に関連した病変および疾患は、以下を含むが、それらに限定されることはない:

- ・急性および慢性の免疫病変および自己免疫病変、例えば、全身性エリテマトーデス、関

50

節リウマチ、チロイドーシス(thyroidosis)、移植片対宿主病、強皮症、糖尿病、グレーブス病など;

- ・急性または慢性細菌感染から生じる敗血症症候群、悪液質、循環虚脱およびショック、急性および慢性の寄生虫病および/または細菌性、ウイルス性もしくは真菌性感染症、例えばエイズ(悪液質、自己免疫障害、エイズ認知症複合症および感染症などの続発症を含む)を含むがこれらに限定されない、感染症;

- ・炎症性疾患、例えば、サルコイドーシス、慢性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎およびクローン病変などの慢性炎症性病変、ならびに限定されるものではないが播種性血管内凝固症候群、アテローム性動脈硬化症および川崎病変などの血管炎症性病変を含む、慢性炎症性病変および血管炎症性病変;

- ・多発性硬化症および急性横断脊髄炎などの、脱髄疾患; 皮質脊髄系の病変などの、錐体外路および小脳障害; 大脳基底核の障害または小脳障害; ハンチントン舞踏病および老年舞踏病などの運動過剰性運動障害、薬剤誘発性運動障害、例えばCNS、ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発されるもの; パーキンソン病などの、運動低下性運動障害; 進行性核上性麻痺、小脳および脊髄小脳障害、例えば小脳の非構造的(astructural)病変;

- 脊髄小脳変性(脊髄性運動失調症、フリードライヒ運動失調症、小脳皮質変性症、多系統変性症(Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager、およびMachado-Joseph); ならびに全身性障害(レフサム病、無リポタンパク血症、運動失調症、毛細血管拡張症、およびミトコンドリア多系統障害); 脱髄性コア障害(demyelinating core disorder)、例えば多発性硬化症、急性横断脊髄炎; 運動単位の障害、例えば、神経原性筋萎縮症(前角細胞変性、例えば筋萎縮性側索硬化症、乳児脊髄性筋萎縮症および若年性脊髄性筋萎縮症); アルツハイマー病; 中年期におけるダウン症候群; びまん性レビー小体病; レビー小体型老年認知症、ウェルニッケコルサコフ症候群; 慢性アルコール依存症; クロイツフェルトヤコブ病; 亜急性硬化性全脳炎; ハラーホルデン-スパッツ病、およびボクサー認知症、またはそれらのいずれかのサブセットを含むがこれらに限定されない、神経変性疾患;

- ・TNF- 分泌性腫瘍を含む悪性病変、またはTNF- が関与する他の悪性疾患、例えば限定されるものではないが、白血病(急性、慢性骨髄性、慢性リンパ性および/または骨髄異形成症候群); リンパ腫(ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、例えば悪性リンパ腫(パーキットリンパ腫または菌状息肉腫)、ならびに

- ・アルコール誘発性肝炎。

【0085】

ある特定の態様において、本開示の抗体を用いて、アダリムマブが承認されている任意の適応症、例えば、関節リウマチ(RA) (成人における中等度から重度のRAを含む)、多関節若年性特発性関節炎(JIA) (4歳およびそれ以上の患者における中等度から重度のJIAを含む)、乾癬性関節炎(PsA) (成人におけるPsAを含む)、強直性脊椎炎(AS) (成人におけるASを含む)、クローン病(CD) (成人における中等度または重度のCDを含む)、乾癬、例えば、慢性尋常性乾癬(Ps) (成人における中等度から重度の慢性尋常性乾癬を含む)、ならびに軸性脊椎関節炎(axSpA) (X線による、構造的な損傷の証拠のない成人患者における重度のaxSpAを含む)を処置する。

【0086】

したがって、本開示は、本開示の抗TNF- 抗体を患者に投与する段階を含む、処置を必要としている患者において前記疾患のいずれかを処置する方法を提供する。任意で、前記投与は、例えば、1日後、2日後、3日後、5日後、1週間後、2週間後、または1ヵ月後に反復されてもよい。反復投与は、同じ用量または異なる用量であってよい。投与は1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回またはそれ以上、反復されうる。例えば、ある投薬計画によれば、患者は、長期間、例えば6ヶ月、1年またはそれ以上の間、抗TNF- 療法を受ける。患者に投与される抗TNF- 抗体の量は、ある態様において、治療的有効量である。本明細書において用いられる場合、TNF- 抗体の「治療的有効」量は、単回投与として、または治療計画の経過にわたって、例えば、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、1年またはそれ以上にわたって投与されうる。典型的な投薬量は、患者お

10

20

30

40

50

よび疾患の重症度に依るだろうが、典型的には、10 mg ~ 160 mgの範囲(例えば、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、60 mg、80 mg、100 mg、120 mg、140 mg、または160 mgである。特定の態様において、本開示は、上記の値のいずれかによりくられる投薬量範囲内の、抗TNF- 抗体を含む薬学的組成物、または本明細書において開示される障害の1つもしくは複数の処置の方法を提供する。本開示の抗TNF- 抗体の治療計画は、患者の年齢、体重、および疾患状態に依って変化するであろう。治療計画は、2週間から無期限で継続しうる。特定の態様において、治療計画は、2週間から6ヶ月間、3ヶ月間から5年間、6ヶ月間から1年間または2年間、8ヶ月間から18ヶ月間などの間、継続される。本開示の抗TNF- 抗体が投与される患者は、好ましくはヒトである。ある局面において、ヒトは小児患者である。他の局面において、ヒトは成人患者である。

10

【0087】

本開示の抗TNF- 抗体は、少なくとも1つの他の治療剤(「第2の治療剤」)と組み合わせることで投与することができる。抗TNF- 抗体および第2の治療剤は、一斉に(同時にもしくは逐次的に)または別々に投与することができる。

【0088】

ある局面において、第2の治療剤は抗リウマチ薬、抗炎症剤、化学療法剤、放射線治療薬、免疫抑制剤、または細胞毒性薬である。

【0089】

抗リウマチ薬は、オーラノフィン、アザチオプリン、クロロキン、D-ペニシラミン、金チオリンゴ酸ナトリウム、ヒドロキシクロロキン、ミオクリシン(Myocrisin)およびスルファサラジン、メトトレキサートを含むが、これらに限定されることはない。

20

【0090】

抗炎症剤は、デキサメタゾン、ペンタサ、メサラジン、アサコール、リン酸コデイン、ベノリレート、フェンブフェン、ナプロシン、ジクロフェナク、エトドラクおよびインドメタシン、アスピリンならびにイブプロフェンを含むが、これらに限定されることはない。

【0091】

化学療法剤は、放射性分子、細胞の生存に有害な任意の薬剤を含む細胞毒または細胞毒性薬とも呼ばれる毒素、薬剤、および化学療法化合物を含有するリボソームまたは他の小胞を含むが、これらに限定されることはない。適当な化学療法剤の例としては、1-デヒドロテストステロン、5-フルオロウラシルデカルバジン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アクチノマイシンD、アドリアマイシン、アルデスロイキン、アルキル化剤、アロプリノールナトリウム、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、アントラマイシン(AMC)、抗有糸分裂薬、シス-ジクロロジアミン白金(II) (DDP) (シスプラチン)、ジアミノジクロロ白金、アントラサイクリン、抗生物質、代謝拮抗剤、アスパラギナーゼ、BCG生菌(膀胱内)、リン酸ベタメタゾンナトリウムおよび酢酸ベタメタゾン、ピカルタミド、硫酸プレオマイシン、プスルファン、ロイコボリンカルシウム、カリケアマイシン、カベシタピン、カルボプラチン、ロムスチン(CCNU)、カルムスチン(BSNU)、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、コルヒチン、結合型エストロゲン、シクロホスファミド、シクロソスファミド(Cyclophosphamide)、シタラピン、シタラピン、サイトカラシンB、シトキササン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダクチノマイシン(旧名アクチノマイシン)、ダウニルピシンHCL (daunirubicin HCL)、クエン酸ダウニルピシン、デニロイキンジフチトクス、デクスラゾキササン、ジプロモマンニトール、ジヒドロキシアントラシンジオン、ドセタキセル、メシル酸ドラセトロン、ドキシソルピシンHCL、ドロナビノール、大腸菌(E. coli) L-アスパラギナーゼ、エメチン、エボエチン、エルウィニア(Erwinia) L-アスパラギナーゼ、エステル化エストロゲン、エストラジオール、リン酸エストラムスチンナトリウム、臭化エチジウム、エチニルエストラジオール、エチドロネート、エトポシド シトロボラム因子、リン酸エトポシド、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルコナゾール、リン酸フルダラピン、フルオロウラシル、フルタミド、フォルリン酸、ゲムシタピンHCL、グルココルチコイド、酢酸ゴセレリン、グラミシジンD、グラニセ

30

40

50

トロンHCL、ヒドロキシ尿素、イダルピシンHCL、イホスファミド、インターフェロン -2 b、イリノテカンHCL、レトロゾール、ロイコボリンカルシウム、酢酸ロイプロリド、レバミソールHCL、リドカイン、ロムスチン、メイタンシノイド、メクロレタミンHCL、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファランHCL、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキセート、メチルテストステロン、ミトラマイシン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、酢酸オクトレオチド、オンダンセトロンHCL、パクリタキセル、パミドロン酸二ナトリウム、ペントスタチン、ピロカルピンHCL、プリマイシン、ポリフェプロザン20とカルムスチンインプラント、ポルフィマーナトリウム、プロカイン、プロカルバジンHCL、プロプラノロール、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、タキソール、テニボシド、テノボシド、テストラクトン、テトラカイン、チオエパクロラムブシル(thioepa chlorambucil)、チオグアニン、チオテパ、トボテカンHCL、クエン酸トレミフェン、D2E7、トレチノイン、バルルピシン、硫酸ピンラスチン、硫酸ピンクリスチン、ならびに酒石酸ピノレルピンが挙げられるが、これらに限定されることはない。

10

【0092】

本開示のさらに他の局面において、第2の治療剤は、本開示の抗TNF- 抗体以外のTNF- アンタゴニストである。そのようなTNF- アンタゴニストの例としては、可溶性TNF- 受容体；エタネルセプト(ENBRELE; Immunex)またはその断片、誘導体もしくは類似体；インフリキシマブ(REMICADE; Centacor)またはその誘導体、類似体もしくは抗原結合性断片；インターフェロン- 活性化マクロファージを介してTNF- の産生を遮断することが知られているIL-10 (Oswald et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8676-8680)、TNFR-IgG (Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539)；マウス産物TBP-1 (Serono/Yeda)；ワクチンCytoTAb (Protherics)；アンチセンス分子104838 (ISIS)；ペプチドRDP-58 (SangStat)；サリドマイド(Celgene)；CDC-801 (Celgene)；DPC-333 (Dupont)；VX-745 (Vertex)；AGIX-4207 (AtheroGenics)；ITF-2357 (Italfarmaco)；NPI-13021-31 (Nereus)；SC10-469 (Scios)；TACE標的物(Immunix/AHP)；CLX-120500 (Calyx)；チアゾロピリム(Thiazolopyrim) (Dynavax)；オーラノフィン(Ridaura) (SmithKline Beecham Pharmaceuticals)；キナクリン(メパクリンジクロロヒドレート)；テニダップ(Enablex)；メラニン(Melanin) (Large Scale Biological)；およびUriachによる抗p38 MAPK剤が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

30

【0093】

抗TNF- 抗体との併用において有用なさらなる第2の治療剤、およびそのような第2の治療剤との併用療法が有用な特定の適応症は、WO 2004/004633に開示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0094】

6.5. 薬学的組成物および薬学的投与

本開示の抗TNF- 抗体は、患者への投与に適した薬学的組成物に組み入れることができる。典型的には、薬学的組成物は、抗TNF- 抗体および薬学的に許容される担体を含む。本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容される担体」は、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに生理学的に適合性である同様のものを含む。薬学的に許容される担体の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどのうちの1つまたは複数、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。多くの場合、組成物の中に等張剤、例えば、糖、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。薬学的に許容される担体は、抗体または抗体部分の保存寿命または有効性を増強する、湿潤剤もしくは乳化剤、保存料または緩衝液などの少量の補助物質をさらに含んでもよい。

40

【0095】

本発明の組成物は、さまざまな形態であってもよい。これらは、例えば、液体溶液(例えば、注射可能および点滴可能な溶液)、分散液または懸濁液、および粉末などの、液体

50

、半固体および固体剤形を含む。好ましい形態は、意図される投与および治療用途の様式に依る。典型的な好ましい組成物は、注射可能または点滴可能な溶液の形態である。好ましい投与の様式は、非経口(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。好ましい態様において、抗TNF- 抗体は静脈内の点滴または注射によって投与される。別の好ましい態様において、抗TNF- 抗体は筋肉内または皮下注射によって投与される。

【0096】

本開示の抗TNF- 抗体は、薬学的キットにおいて提供することができる。薬学的キットは、(例えば、凍結乾燥した形態のまたは水溶液としての)本開示の抗TNF- 抗体および任意で以下の1つまたは複数を含むパッケージである: 例えば上記の、第2の治療剤; 抗TNF- 抗体を投与するための装置、例えばペン、注射針および/または注射器; ならびに抗体が凍結乾燥した形態である場合には抗体を再懸濁するための医薬等級の水または緩衝液。

10

【0097】

ある局面において、抗TNF- 抗体の各単位用量は別々にパッケージングされ、キットは1つまたは複数の単位用量(例えば、2単位用量、3単位用量、4単位用量、5単位用量、8単位用量、10単位用量またはそれ以上)を含有することができる。特定の態様において、1つまたは複数の単位用量は、注射器またはペンにそれぞれ収容される。典型的な単位用量は、抗TNF- 抗体10 mg ~ 160 mg (例えば、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、60 mg、80 mg、100 mg、120 mg、140 mg、または160 mg)を含む。特定の態様において、本開示は、前記の値のいずれかによってくくられる範囲内の抗TNF- 抗体を含む単位用量を提供する。

20

【0098】

加えて、他の添加物、例えば、安定剤、緩衝液(例えば、ブロック緩衝液または溶解緩衝液)などを含めることができる。特定の態様において、溶解時に適切な濃度を有する溶液を提供する賦形剤を含め、通常は凍結乾燥されている、乾燥粉末として(別梱または同梱で)抗体および1種または複数種の添加物は提供されうる。

【実施例】

【0099】

7. 実施例

7.1. 実施例1: 発現および細胞表面提示のためのベクター

D2E7 (アダリムマブ)についての合成可変軽鎖(V_L)ドメインおよび合成可変重鎖(V_H)ドメインは、市販の遺伝子合成供給元(DNA 2.0 Inc., Menlo Park, CA)によって構築された。図1A~1Cは、合成D2E7 V_H および V_L 断片のDNA配列、翻訳されたアミノ酸配列、隣接する制限部位、およびCDRを示す。相補性決定領域(CDR)は、太字の下線の文字列によって示されている。合成D2E7 V_H および V_L を、ベクターpYA206、すなわち哺乳類細胞の表面上での抗体の発現および提示のためのエプスタイン・バーウイルス由来エピソームベクターへクローニングした。pYA206はプラスミドpYA104の派生物であり(Akamatsu et al., J. Immunol Methods, 2007 Oct 31; 327(1-2):40-52)、以下の改変を有する: 1) ヒトC 定常ドメインがヒトC 定常ドメインで置き換えられている、2) グリコシジルホスファチジルイノシトール連結シグナル(GPIアンカー)が血小板由来成長因子受容体(PDGF-R)の膜貫通ドメインで置き換えられている、3) 特有のNotIおよびXhoI部位が、C とインフレイムで V_L ドメインをクローニングするためにC ドメインの上流に存在する、ならびに4) 特有のNgoMIVおよびSacI部位が、IgG₁定常領域とインフレイムで V_H ドメインをクローニングするためにIgG₁の上流に存在する。

30

40

【0100】

pCW600はプラスミドpYA206の派生物であり、CH遺伝子がFabで置き換えられている。

【0101】

D2E7 V_H 断片をNgoMIVおよびSacIで消化し、D2E7 V_L 断片をNotIおよびXhoIで消化した。両断片をプラスミドpYA206へクローニングして、プラスミドpYA206-D2E7を作製した。図4は、pYA206-D2E7の構造を示す。このプラスミドは、エピソームとして哺乳類細胞内での複製を可能にするエプスタイン・バーウイルス由来のoriPおよびEBNA-1遺伝子を含む。pU

50

C複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子は、プラスミドを大腸菌内で増殖可能にする。SV40プロモーター制御下のピューロマイシン耐性遺伝子を用いて、哺乳類細胞形質転換体を選択する。CMVプロモーターおよび配列内リボソーム侵入部位(IRES)は、提示される抗体重鎖および軽鎖の発現を可能にする。発現された抗体は、IgG₁定常ドメインの末端に融合されたPDGF-R膜貫通ドメインを介して細胞膜に係留される。

【0102】

D2E7 V_H断片をNcoIおよびSacIで消化し、D2E7 V_L断片をNotIおよびXhoIで消化し、両断片をプラスミドpCW600へクローニングして、プラスミドpCW600-D2E7を作製した。図4は、pCW600-D2E7の構造を示す。このプラスミドは、エピソードとして哺乳類細胞内での複製を可能にするエプスタイン・バーウイルス由来のoriPおよびEBNA-1遺伝子を含む。pUC複製起点およびアンピシリン耐性遺伝子は、プラスミドを大腸菌内で増殖可能にする。SV40プロモーター制御下のピューロマイシン耐性遺伝子を用いて、哺乳類細胞形質転換体を選択する。CMVプロモーターおよび配列内リボソーム侵入部位(IRES)は、提示されるFab重鎖および軽鎖の発現を可能にする。発現されたFabは、IgG₁定常ドメインの末端に融合されたPDGF-R膜貫通ドメインを介して細胞膜に係留される。

【0103】

7.2. 実施例2: D2E7の表面提示およびFACS力価測定アッセイ法

EBNA-1タンパク質を発現する293c18細胞(American Type Culture Collection, Manassas, VA)をpYA206-D2E7で形質転換した。10%ウシ胎仔血清(FBS)および0.25 mg/ml G418を補充したDMEM培地中で293c18細胞を培養した。pYA206-D2E7またはpCW600-D2E7プラスミド0.125 μgを、キャリアプラスミドとしてのpUC19 25 μgと1:200で混合しリポフェクトアミン(Invitrogen, CA) 60 μlを加えて、これを293c18細胞2 × 10⁷個に添加した。200倍過剰のキャリアプラスミドは、多くても単一のD2E7含有プラスミドによって各細胞が形質転換されることを確実にするためであった。48時間後、形質転換された細胞をピューロマイシンの添加によって選択し、その後、FACS分析の前にさらに18日間培養した。

【0104】

ヒトTNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN)をAlexa Fluor 647 (Invitrogen, CA)で標識した。ヒトTNF- α 1 mgを室温で30分間Alexa Fluor 647試薬84 μgと反応させ、次に、ゲルろ過カラムを用いて未反応の試薬から精製した。pCW600-D2E7をトランスフェクションした293c18細胞を1時間氷上にて、200分の1希釈のPE標識抗ヒトIgG (Southern Biotech)およびさまざまな濃度のAlexa Fluor 647標識TNF- α で二重染色し、FACS緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水(PBS) + 0.5%ウシ血清アルブミン(BSA))で洗浄し、FacsCalibur (BD)にて分析した。20 nMから0.26 nMの範囲の濃度のAlexa Fluor 647標識TNF- α で滴定曲線を行った。最大半量の結合が起きる各曲線の midpoint を、抗体/抗原複合体のEC₅₀と定義する。野生型D2E7の結果を図5に示す。このアッセイ法において、表面に提示されたD2E7 Fabは、0.15 nMのEC₅₀でTNF- α に結合する。

【0105】

抗D2E7抗体1H11、5A1、および10F8 (抗イデオタイプ、抗Id)にビオチンを結合させた。各抗Id 1 mgを室温で2時間、スルホ-NHS-LC-ビオチン(Pierce)試薬43 μgと反応させた。Amicon微小遠心フィルタ中で回転させることによって過剰のビオチンを除去した。pCW600-D2E7をトランスフェクションした293c18細胞を1時間、200分の1希釈のPE標識抗ヒトIgG (Southern Biotech)およびビオチン化抗Idで二重染色し、FACS緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水(PBS) + 0.5%ウシ血清アルブミン(BSA))で洗浄し、次に200分の1希釈のストレプトアビジン-APCで染色した。20 nMから0.26 nMの範囲の濃度の抗Idで滴定曲線を行った。最大半量の結合が起きる各曲線の midpoint を、抗Id/D2E7複合体のEC₅₀と定義する。各抗イデオタイプの結果を図6に示す。このアッセイ法において、表面に提示されたD2E7 Fabは、抗Id 1H11、5A1、および10F8に、それぞれ0.77 nM、0.37 nM、および1.28 nMのEC₅₀で結合する。

【0106】

7.3. 実施例3: D2E7単一アミノ酸変異体のライブラリの構築

各D2E7 CDRアミノ酸位置(図1Aにおいて下線が引かれている)、つまり計34種のV_H位置および27種のV_L位置を、NNKランダム化の標的とした。以下の理由から、NNKコーディングスキームを用いた(ここで、N = A、C、G、またはT、およびK = GまたはT)：1) 全20種の天然アミノ酸をコードするのに32種のコドンしか必要でないため、2) 32種のなかには単一の停止コドン(TAG)しか含まれないため、および3) 完全な64種のコドン遺伝暗号のなかに現れる最大6倍の縮重ではなく、最大の縮重(単一のアミノ酸をコードしている異なるコドンの数)が3であるため。

【0107】

各々が異なるCDR位置にNNK縮重を有する、61種の異なるDNA断片が、合成遺伝子の商業的供給元(DNA 2.0, Menlo Park, CA)によって合成された。これらの断片をプライマー
D2E7reampFwd (5'-

10

CTCGAAAATAATAAAGGGAAAATCAG - 3') (SEQ ID NO:11)およびD2E7reampRev (5'-
TGGTAGTGTGGGGACTC - 3') (SEQ ID NO:12)

でPCR増幅した。PCR産物を精製し、次にV_H断片をNcoIおよびSacIで消化し、V_L断片をNotIおよびXhoIで消化した。全ての断片をアガロースゲル上で泳動し、精製し、反対側の野生型可変領域断片を保有しているプラスミドpCW600-D2E7へサブクローニングした。得られたプラスミドを大腸菌Top 10細胞(Invitrogen, CA)へ別々に形質転換させて、61種の異なるDNA断片の各々についての形質転換体のサブライブラリを形成した。各サブライブラリにおける可能なコドンの総数よりも少なくとも10倍多くの大腸菌形質転換体を得られるように、形質転換を行った。得られたV_HおよびV_Lのサブライブラリをプールして、2種の最終ライブラリ、すなわち34種の位置および1088種の異なるコドンを含むD2E7 V_Hライブラリ、ならびに27種の位置および計864種の異なるコドンを含むD2E7 V_Lライブラリを作製した。

20

【0108】

7.4. 実施例4: TNF- α 結合についてのD2E7 V_HおよびV_L点突然変異体FabライブラリのFACS染色および4方向選別

D2E7 V_HおよびV_Lライブラリを、ライブラリプラスミド0.5 μ g、pUC19キャリアプラスミド100 μ gおよびリポフェクトアミン250 μ lにより293c18細胞へトランスフェクションし、2日後に0.8 μ g/mlのピューロマイシンで選択し、FACS選別の前にさらに18日間培養した。細胞を0.15ナノモルのAlexa Fluor 647-TNF- α および1:200のPE標識抗IgG (Southern Biotech)で染色し、MoFlo FACS機器(Dako North America Inc., Carpinteria, CA)にて選別した。野生型D2E7およびV_H点突然変異ライブラリのFACS選別プロファイルを図7A~7Bに示す。パネルAは、野生型D2E7 Fab発現プラスミドpCW600で形質転換された細胞のFACSプロファイルを示す；x軸はPE-抗IgGによる染色を示し、y軸はAlexa Fluor 647-TNF- α による染色を示す。抗体の発現は細胞集団において不均一であるので、FACSプロファイルは、右上の象限の方向へ向かう対角線に沿っておおまかに整列された個々のデータ点を示す。

30

【0109】

V_H点突然変異ライブラリのTNF- α 染色細胞を、FACSゲートに基づいて4つの亜集団へ選別した(図7A~7B、パネルB)。類似のFACS条件下での野生型抗体の挙動を用いてゲートを設定し、細胞を、より高い親和性(H)集団(R4)、中位のまたは「中間の」親和性(M)集団(R5)、より低い親和性(L)集団(R6)、およびIgG非発現(Z)集団(R3)に選別した。x軸は抗IgG-PE染色を示し、y軸はヒトTNF- α -AF647による染色を示す。

40

【0110】

7.5. 実施例5: 抗Id結合についてのD2E7 V_HおよびV_L点突然変異体FabライブラリのFACS染色および2方向選別

D2E7を発現している細胞を、0.15ナノモルのAlexa Fluor 647-TNF- α およびEC₅₀のビオチン化抗イディオタイプmAb (0.77 nMの1H11、0.37 nMの5A1、および1.28 nMの10F8)によ

50

って同時染色し、その後、室温で2時間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、4 で1時間ストレプトアビジン-APCおよび抗ヒトIgG -FITCとともにインキュベートした。細胞を洗浄し、次いでMoFlo FACS機器(Dako North America Inc., Carpinteria, CA)にて選別した。1H11で染色された野生型D2E7およびV_HライブラリのFACS選別プロファイルを図8A~8Bに示す。抗IgG-PE染色をx軸に示し、抗Id1H11-APC染色をy軸に示す。2方向選別を行い、「選別」(抗イデオタイプへの低い結合を有する細胞)ゲートおよび「発現」(抗ヒトIgG FITCが陽性の細胞)ゲートにおいて最低200万個の細胞を集めた。

【0111】

抗体の発現は細胞集団において不均一であるので、FACSプロファイルは、右上の象限の方向へ向かう対角線に沿っておおまかに整列された個々のデータ点を示す。D2E7 WTおよびVH点突然変異ライブラリのFACSプロファイルを、それぞれ、図8のパネルAおよびBに示す。発現された点突然変異の全てを適切な頻度でライブラリ中に含む各ライブラリの基準細胞集団を集めるために、ゲートは左端をy軸に平行にして引いた；これらのゲートでの選別により、提示された抗体が抗Idにいかによく結合するかにかかわらず、あるレベルを超えるIgGを発現する全ての細胞が集められる。これらを「発現ゲート」および「発現された集団」と称した(パネルB「R4」)。他の選別は、野生型集団の主対角線にほぼ平行でかつ該主対角線の真下に引かれたゲートの上部で行われた；これらのゲートは、IgG発現の全体的なレベルにかかわらず、抗イデオタイプに対する結合親和性の低減を有する抗体を発現した細胞を集めるように設計された。これらのゲートおよび集団は、「選別ゲート」および「選別された集団」と呼んだ(パネルB「R3」)。およそ2,000,000個の細胞が「選別」および「発現」ゲートの両方において集められた。

【0112】

7.6. 実施例6: 「発現された」および「選別された」集団の大規模並列配列決定

プラスミドを「発現された」および「選別された」細胞集団から回収し、PCR増幅を行って、大規模並列配列決定に適した短い単位複製配列を調製した。D2E7 V_HおよびV_LドメインのCDR1およびCDR3領域のすぐ外側にアニールするPCRプライマーを用いた。プライマーは、V_Hフォワードプライマー-D2E7_VH_CDR1_for

5'-TTAGTTGTGCTGCATCAGGTTT-3' (SEQ ID NO:13)

; V_Hリバースプライマー-D2E7_VH_CDR3_rev

5'-GGTCACCAGTGTTCCCTGAC-3' (SEQ ID NO:14)

; V_Lフォワードプライマー-D2E7_VL_CDR1_for

5'-GTAGGCGACAGGGTCACAAT-3' (SEQ ID NO:15)

; およびV_Lリバースプライマー-D2E7_VL_CDR3_rev

5'-AGTCCGTTTGATCTCGACCTT-3' (SEQ ID NO:16)

であった。したがって、各単位複製配列には、全ての点突然変異の位置を特定し一覧にするために完全なCDR1、CDR2、およびCDR3領域が含まれたが、フレームワーク1および4の多くが含まれなかった。D2E7 V_HおよびV_Lライブラリの「選別された」および「発現された」単位複製配列を次に、製造業者(454 Life Sciences, Branford, CT)による指示の通りにGenome Sequencer FLXを用いて配列決定した。

【0113】

コンピュータプログラムを用いて、配列を調べ、「発現された」および「選別された」集団において各点突然変異が見出された回数を一覧にした。コンピュータプログラムは最初に、各コドンを読み出して、一覧にする。2種以上のコドンを有するアミノ酸の場合、プログラムは各アミノ酸についての異なるコドンの出現を足し合わせて、各亜集団におけるそのアミノ酸変種の挙動の全体概要を作成する。

【0114】

10

20

30

40

50

TNF- α への結合を評価するためのD2E7ライブラリの4方向選別の場合、各コドン変種について濃縮比(ER)スコアを与える。ERは、H集団においてその変種が見出される頻度がその全体的な頻度と比較して、どれだけ多いかまたは少ないかを示す。同様に、M、L、およびZ集団の各々において各変種について濃縮比を算出することができる。より高親和性の変種は、H集団において濃縮され(ER>1)、L集団において枯渇する(ER<1)と予想される。逆に、より低親和性の変異体は、H集団において枯渇し(ER<1)、L集団において濃縮される(ER>1)と予想される。単に、H集団についての濃縮比を調べることによって、より高い、より低い、および中位の親和性の変種を同定することが可能である。

【0115】

抗イディオタイプへのD2E7ライブラリの結合を評価するための2方向FACS分析においては、「選別された」集団は、抗イディオタイプに、より低く結合する変種を含む。この場合、選別された変種のより高いERは、抗イディオタイプへの結合の低下を示す。

【0116】

7.7. 実施例7: 所望の特性を有する点突然変異体の同定

データを分析するため、所与の位置に変異が見出される回数を、その位置が配列決定された回数に対して規格化し、1000配列あたりの頻度として表現する。次に、選別された集団における変異の頻度を、発現された集団における頻度で割って、変異が、発現された集団と比較して選別された集団において濃縮または枯渇したかどうか、およびどの程度であるかを示唆する濃縮比(ER)を得る。選別された集団において濃縮される変異は、TNF- α への増強された結合を有していると考えられる一方で、枯渇する変異は、低下した結合を有していると考えられる。同様に、抗イディオタイプへの低下した結合を有していた選別された細胞は、その特定の抗イディオタイプについて高い濃縮比を有すると考えられる。

【0117】

7.8. 実施例8: サイレント野生型コドン分析

選別された亜集団においてライブラリ中の変種が濃縮または枯渇したかどうかを判定するうえで、同じ実験条件の下で変種の挙動を野生型タンパク質の挙動と比較することは有用である。これは、サイレントWTコドン、つまりWTタンパク質をコードするが、NNKランダム化により生じるサイレントなコドン変化を含む変種DNA配列の挙動を追跡することによって容易に行うことができる。例えば、野生型コドンがGGG (グリシン)であるライブラリの位置では、NNKランダム化により、同じくグリシンをコードするが、本明細書において記載される選別および統計分析のプロセスにおいて任意の他の変種と同様に追跡されるGGTコドンが生じる。開始コドンに依り、大体0から3個のサイレントな野生型コドンが任意の位置に生じうる; 実際のところ、これにより、50~65種の異なる位置を網羅している典型的なCDRライブラリにおいて数十のサイレントな野生型コドンが利用可能であることが確実となる。これらのサイレントな野生型の濃縮比の平均を用いて、実験の中間点を決定することができる; 改善された親和性変種はこの中間点よりも上で見出され、より低親和性の変種はこの中間点よりも下で見出され、中位の変種はこの中間点の近くで見出されると考えられる。図9は、サイレントな野生型コドンの分析の結果を示す。有益な変異(すなわち抗イディオタイプ1H11への低下した結合およびTNF- α への中位の結合を有するもの)であれば、0.25 (平均 + 1SD)よりも高い1H11-ERおよび1.21~1.59 (平均 +/- 1SD)のTNF- α -ERを有するであろう。

【0118】

7.9. 実施例9: 1点FACS分析

抗イディオタイプへの低下した結合をもたらすであろうCDR中の位置を予測するため、96ウェルプレートにプレATINGされた293c18細胞に、1つの位置のみが32種の可能なコドンに変異しているサブライブラリをトランスフェクションした(図10)。培養2日後に、細胞を収集し、EC₅₀のPE結合型抗イディオタイプおよびEC₅₀のTNF- α -647で染色した。FACS分析により、抗イディオタイプへの低い結合を有する細胞の大集団が得られる位置が示された。図11は、V_H中のいくつかの位置(丸で囲った)を変異させて、1H11結合を低下させられること、および類似の効果をもたらさうV_L位置はないことを示す。同様に、図12は

10

20

30

40

50

、抗イディオタイプ5A1および10F8による結合が V_L 鎖中の特定の位置における変異によって低下されうることを示す。 V_H 鎖中の変異は、5A1および10F8への結合を低下させない。

【0119】

1H11の結合に重要であると予測される V_H 中の位置がグレーアウトされたD2E7のPymolモデルを、図13A~13Dに示す。予測されたエピトープは、その位置が3つのCDR間に散在しているが、それらはこのモデルにおいて隣接しており、立体構造的でかつ不連続的なエピトープを形成することを示す。同様に、図14A~14Dは、5A1および10F8の結合において重要な V_L 中の位置が立体構造的なまたは不連続的なエピトープを形成することを示す。

【0120】

抗イディオタイプへの結合の低下を確認するため、単一変異体の全長IgGを細胞表面上に発現させ、次に EC_{50} のAF647結合型抗イディオタイプ、および抗IgG-PEで染色する。標的への中位の結合を確認するため、細胞表面上の全長IgGを EC_{50} のTNF- α -AF647および抗IgG-PEで染色する。

10

【0121】

V_H CDR1-2 (Y32)は、YからK、R、S、T、またはVへ変異した。図15は、変異体の1点FACS分析を示す。抗イディオタイプ1H11によるFACS染色により、変種全ての結合の低下が確認される。TNF- α 染色は、Tを除く全ての変異体について中位の結合を示し、図16におけるこの変異体より低いERと相関している。図16に示されたD2E7 V_L 中の有益な変異は、1H11への低下した結合(0.25よりも高い1H11-ER)およびTNF- α への中位の結合(1.21~1.60のTNF- α -ER)を有するものとして選択された。グレー内は、望ましくない変異である。

20

【0122】

図17は、位置による平均の1H11濃縮比を提供する。高い平均ERを有するD2E7 V_H 中の位置は、抗Id 1H11への低下した結合を有する抗体をもたらす可能性のより高いアミノ酸置換を有する。

【0123】

図18は、位置による平均の5A1濃縮比を提供する。高い平均ERを有するD2E7 V_L 中の位置は、抗イディオタイプ5A1への低下した結合を有する抗体をもたらす可能性のより高いアミノ酸置換を有する。

【0124】

図19は、位置による平均の10F8濃縮比を提供する。高い平均ERを有するD2E7 V_L 中の位置は、抗イディオタイプ10F8への低下した結合を有する抗体をもたらす可能性のより高いアミノ酸置換を有する。

30

【0125】

7.10. 実施例10: D2E7架橋アッセイ法

ヒトドナーから得られた抗アダリムマブ抗体(ADAb)へのD2E7の結合を可視化するために、D2E7架橋アッセイ法が開発された。イモビロン高結合ELISAプレートを終夜4 にて、PBMS中0.5 μ g/mlの野生型D2E7抗体によりコーティングした。翌日、0.1% Tween-20を含有するPBS (PBS/Tween)でプレートを洗浄した。プレートを1~2時間、室温にてPBS中1%のヒトAB血清(huAB/PBS)でブロックした。ヒト血清サンプル(Bioreclamation, NY)をhuAB/PBS中で希釈し、ELISAプレートに加えた。最後に、ビオチン化野生型D2E7抗体を15 ng/mlの終濃度まで加えた。プレートを終夜4 にてインキュベートした。翌日、プレートをPBS/Tweenで洗浄した。ストレプトアビジン-HRPO (MABTECH)を製造業者の推奨にしたがってhuAB/PBS中で1:1000に希釈し、100 μ l/ウェルをプレートに加えた。プレートを室温にて30分間インキュベートし、その後、PBS/Tweenで1回および蒸留水で2回洗浄した。TMB One Component (BioFX Laboratories)を加え、15分間発色させた。プレートを650 nmで読み取った。陽性対照(マウス抗ヒトD2E7モノクローナル抗体)を含めた。

40

【0126】

7.11. 実施例11: D2E7 V_H および V_L 点突然変異体を検証するための阻害アッセイ法

同意書に薬物療法としてメトトレキサートではなく、アダリムマブを挙げているヒトドナー由来の市販血清サンプルを、実施例10の架橋アッセイ法を用いて抗アダリムマブ(「A

50

DAb」)の存在についてスクリーニングした。ADAbの証拠を示したドナーをさらなる研究のために選択した。下記の陽性対照および陰性対照を用いて阻害アッセイ法を行うことにより、ADAbの特異性を確認した。選択したドナーのADAbは、D2E7のFab断片に特異的であった。

【0127】

D2E7と比較してマウス抗イディオタイプ抗体への結合の低減を有すると同定された変種抗体を、D2E7架橋アッセイ法での阻害についてスクリーニングした。変種抗体による架橋アッセイ法での阻害は、変種が、依然として患者血清ADAbにより結合されうること示す。それゆえ、架橋アッセイ法を妨げない変種は、ADAbと交差反応せず、それゆえ、D2E7の抗体結合エピトープ内の変異を表す。

【0128】

イモビロンELISAプレートを0.5 $\mu\text{g/ml}$ の野生型D2E7で終夜コーティングし、洗浄し、ブロッキングした。別の96ウェルプレートにおいて、D2E7変種抗体をhuAB/PBS中で10 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した。各変種を二つ組で試験した。ハーセプチンおよびDP10、つまりD2E7と無関係のIgG₁抗体を、抗アダリムマブ抗体結合の陰性対照として用いた。野生型D2E7抗体を阻害の陽性対照として用いた。DP10およびD2E7 Fab断片も、それぞれ、陰性対照および陽性対照として用いた。アダリムマブに対する免疫応答を示しているドナー由来の血清を、huAB/PBS中で1:25まで希釈し、100 μl を変種および対照を含有しているウェルに加えた。ドナー血清の終濃度は、1:50であった。添加された変種および対照と希釈された血清100 μl をD2E7コーティング・プレートに移した。huAB/PBS中30 ng/mlのビオチン化D2E7 100 μl を、速やかにプレートに加えた。プレートを終夜4 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。翌日、プレートを洗浄し、希釈されたストレプトアビジン-HRPOを加えた。プレートをPBS/Tween-40で1回洗浄し、TMB One Component (BioFX Laboratories)を加え、15分間発色させた。プレートを650 nmで読み取った。

【0129】

無関係の抗体DP10を全ての試験において対照として含め、これは、プレート上のD2E7へのADAbの結合に影響を与えなかった。DP10へのADAbの結合の阻害率は、平均すると88 +/- 12%であった。阻害アッセイ法を4人の商業的ドナー由来のADAb陽性血清サンプルで行った。その結果はドナー4人の全員でほとんど一致して、ADAbの結合に最も大きな影響を与えるV_H CDR3に対する変化があった(図20A~20B)。好ましい変種を2通りの方法で選択した：図21Aは、試験した全ての変種についての平均を上回って2標準偏差よりも大きな阻害率を有していた全変種の一覧を示す。図21Bは、ドナー4人のいずれかにおいて任意の有意な活性を有していた全変種を示す。同定された最良の点突然変異は、53 +/- 10%の阻害率を有するT100Vであった。2番目に良いものは、47%の平均を有するV95Wであった。V_H CDR3の外側での最良の変種は、平均割合23%の2つの変種アミノ酸置換を有するV_L R30であった。

【0130】

単一の変種についてのデータに基づいて、組み合わせ変種を作製した。V_HおよびV_Lの両方に変化を含んだ組み合わせを構築したが、いくつかの場合では、WO 2010/121140において最初に記載されたようなCDR-L1におけるG5S + A11Sの組み合わせに対応する、CDR-L1における置換G28SおよびA34S (Kabat付番)を有する変種V_Lになるよう置換を組み入れた。G5S + A11S置換を有する変種V_L骨格は、本明細書においてV_L-SSと呼ばれる。変種抗体を発現させ、精製し、ADAb阻害アッセイ法において、およびTNF- α 結合親和性アッセイ法において試験した。ADAb結合の結果をドナー2人以上で平均化した。表面プラズモン共鳴試験(Biacore)を用いて結合を評価した。結果を図22に示す。変種Y32K/SS-R30TおよびY32K/SS-R30Iは、ADA結合低減の最良の組み合わせを示し、かつ抗TNF- α 親和性を保持していた。

【0131】

本出願において引用されている全ての刊行物、特許、特許出願および他の文書の全体は、各個の刊行物、特許、特許出願または他の文書があらゆる目的で参照により本明細書に組み入れられると個々に示されている場合と同等に、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 2 】

さまざまな特定の態様を例示し記載してきたが、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなくさまざまな変更がなされうるものと理解されよう。

【 図 1 A 】

D2E7(アガリムマブ、ヒュミラ) V_H (SEQ.ID NO:2)

EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFDYAMHWVROAPGKLEWVSAITWNSGHIDYADSVVEGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVTVSS

D2E7(アガリムマブ、ヒュミラ) V_L (SEQ.ID NO:4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIRNYLAWYQQKPKGAPKLLIYAASLTQSGVPSRFRSGSGSCT DFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYIFGQGTKEIK

【 図 1 B 】

抗体鎖	CDR No.	配列	SEQ ID NO.
重鎖	1	DYAMH	5
重鎖	2	AITWNSGHIDYADSVVEG	6
重鎖	3	VSYLSTASSLDY	7
軽鎖	1	RASQGIRNYLA	8
軽鎖	2	AASLTQSG	9
軽鎖	3	QRYNRAPYT	10

【 図 1 C 】

GAGGTGCGAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC 60
 TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCCTGGGI CCGGCAAGCT 120
 CCAGGGAAGG GCCTGGAAAG GGTCTCAGCT ATCAGTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT 180
 GGGACTCTG TGGAGGCGG AITCACCATC TCCAGAGACA AGGCCAAGAA CTCCTGTAT 240
 CTGCAAAIGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG 300
 TACCITAGCA CCGCCTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGI CACCCTCTCG 360
 AGT 363

D2E7可変重鎖のヌクレオチド配列

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCGTGCAI CTGTAGGGGA CAGAGTCACC 60
 ATCACTGTGC GGCCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCARAAACCA 120
 GGGAAAGGCC CTAGCTCTCT GATCTATGCT GCATCCACTI TGCAATCAGG GGTCCACACT 180
 CGGTCAGATG GCAATGGATC TGGGACAGAT TTCACITCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT 240
 GAAGATGTTG CAACCTATTA CTCTCAAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG 300
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA A 321

D2E7可変軽鎖のヌクレオチド配列

【 図 2 】

位置	kabat	WTアミノ酸	V _L における有益な変異
L1-1	24	R	
L1-2	25	A	
L1-3	26	S	
L1-4	27	Q	
L1-5	28	G	F ^{ab} , I ^{ab} , V ^b , W ^{bc} , Y ^{ab}
L1-6	29	I	
L1-7	30	R	I ^{ab} , T ^{abc} , V ^{abc}
L1-8	31	N	A ^{abc} , D ^{ac} , E ^{ac} , G ^{abc} , L ^{abc} , M ^{abc} , Q ^{abc} , R ^{abc} , T ^{abc}
L1-9	32	Y	
L1-10	33	L	
L1-11	34	A	
L2-1	50	A	I ^{bc} , T ^{bc} , V ^{abc}
L2-2	51	A	
L2-3	52	S	
L2-4	53	T	D ^{bc}
L2-5	54	L	
L2-6	55	Q	
L2-7	56	S	
L3-1	89	Q	
L3-2	90	R	G ^a
L3-3	91	Y	
L3-4	92	N	F ^{abc} , M ^{ab} , W ^{abc} , Y ^c
L3-5	93	R	L ^a , N ^a , W ^{ab} , Y ^a
L3-6	94	A	
L3-7	95	P	
L3-8	96	Y	
L3-9	97	T	Y ^c

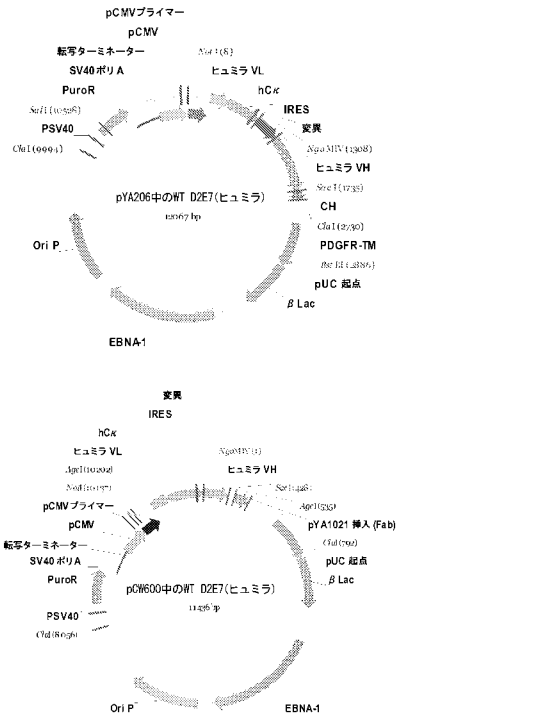
【 図 3 A 】

位置	kabat	WTアミノ酸	V _H における有益な変異
H1-1	31	D	S ^d
H1-2	32	Y	A ^d , C ^d , K ^d , M ^d , R ^d , S ^d , V ^d
H1-3	33	A	
H1-4	34	M	
H1-5	35	H	C ^d , D ^d , E ^d , S ^d , T ^d
H2-1	50	A	
H2-2	51	I	
H2-3	52	T	A ^d , G ^d , N ^d
H2-4	52a	W	A ^d , F ^d , H ^d , L ^d , M ^d , V ^d
H2-5	53	N	G ^e
H2-6	54	S	D ^e , L ^e
H2-7	55	G	
H2-8	56	H	
H2-9	57	I	K ^{ef}
H2-10	58	D	L ^d
H2-11	59	Y	A ^{ef} , C ^{ef} , E ^{ef} , F ^{ef} , G ^{ef} , H ^{ef} , I ^{ef} , K ^{ef} , L ^{ef} , M ^e , N ^{ef} , Q ^e , R ^{ef} , S ^{ef} , V ^{ef} , W ^{ef}
H2-12	60	A	Y ^e
H2-13	61	D	N ^f
H2-14	62	S	
H2-15	63	V	D ^{ef} , L ^{ef} , M ^{ef} , Q ^{ef} , T ^{ef}
H2-16	64	E	F ^{ef} , H ^e , K ^{ef} , R ^{ef} , T ^{ef} , W ^{ef}
H2-17	65	G	A ^{ef} , C ^{ef} , E ^{ef} , H ^e , I ^{ef} , K ^{ef} , L ^{ef} , M ^{ef} , N ^{ef} , P ^{ef} , Q ^{ef} , R ^{ef} , S ^{ef} , T ^{ef} , Y ^{ef}

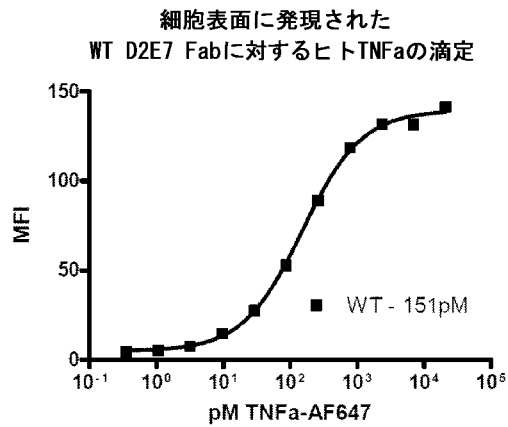
【 図 3 B 】

位置	kabat	WTアミノ酸	V _H における有益な変異
H3-1	95	V	G ^d , R ^d , W ^d
H3-2	96	S	
H3-3	97	Y	
H3-4	98	L	T ^d , V ^d
H3-5	99	S	
H3-6	100	T	V ^d
H3-7	100a	A	
H3-8	100b	S	
H3-9	100c	S	K ^d , W ^e , Y ^e
H3-10	100d	L	
H3-11	101	D	V ^d
H3-12	102	Y	

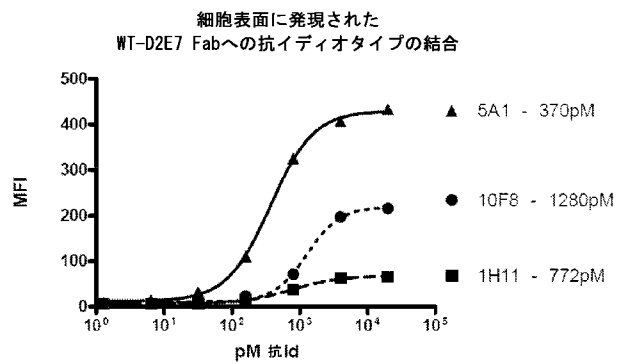
【 図 4 】



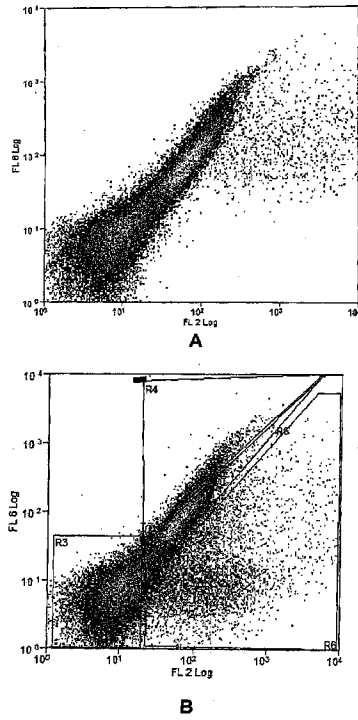
【 図 5 】



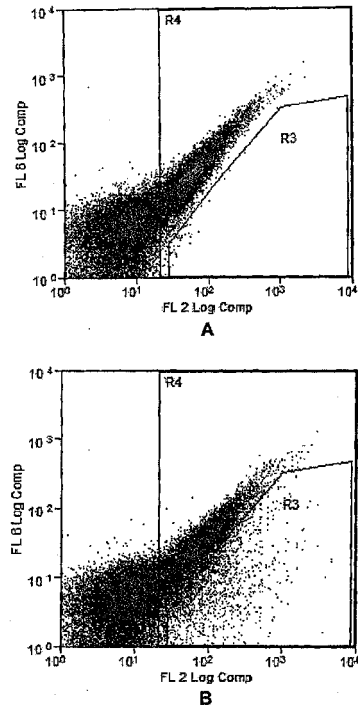
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

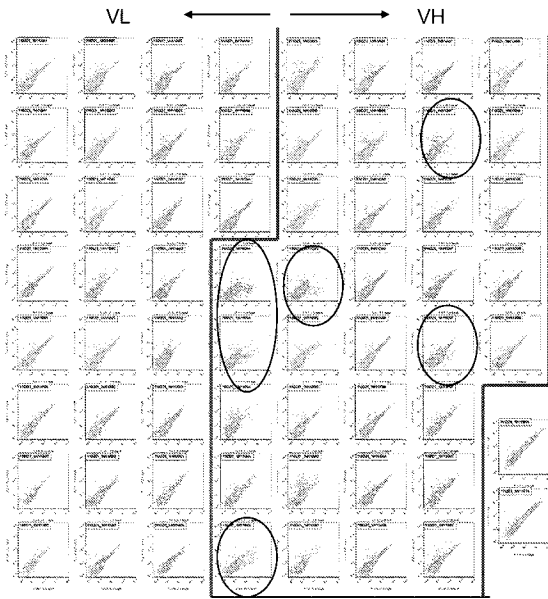
WT-AA	WT	AA	変異体	CDR	位置	1H11 ER	TNF- α ER
D	GAC	D	GAT	CDR-H1	1	0.29	1.47
A	GCC	A	GCG	CDR-H1	3	0.06	1.64
A	GCC	A	GCT	CDR-H1	3	0.4	1.33
H	CAC	H	CAT	CDR-H1	5	0.14	1.46
A	GCG	A	GCT	CDR-H2	1	0.3	1.08
I	ATC	I	ATT	CDR-H2	2	0.08	1.23
T	ACG	T	ACT	CDR-H2	3	0.44	1.36
N	AAC	N	AAT	CDR-H2	5	0.27	1.63
G	GGC	G	GGG	CDR-H2	7	0.16	1.46
G	GGC	G	GGT	CDR-H2	7	0.07	1.27
H	CAC	H	CAT	CDR-H2	8	0.19	1.38
I	ATA	I	ATT	CDR-H2	9	0.01	1.85
A	GCA	A	GCT	CDR-H2	12	0.02	1.47
A	GCA	A	GCG	CDR-H2	12	0.02	1.11
S	AGC	S	TCT	CDR-H2	14	0.01	1.57
S	AGC	S	TCG	CDR-H2	14	0	1.58
S	AGC	S	AGT	CDR-H2	14	0.07	1.14
V	GTG	V	GTT	CDR-H2	15	0.04	1.52
E	GAA	E	GAG	CDR-H2	16	0.13	1.72
G	GGA	G	GGT	CDR-H2	17	0.02	1.29
G	GGA	G	GGG	CDR-H2	17	0.02	1.44
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	2	0.12	1.27
L	CTC	L	CTT	CDR-H3	4	0.07	1.43
L	CTC	L	TTG	CDR-H3	4	0.02	1.43
L	CTC	L	CTG	CDR-H3	4	0.02	1.50
S	TCA	S	TCG	CDR-H3	5	0.2	1.45
S	TCA	S	TGT	CDR-H3	5	0.01	1.40
S	TCA	S	AGT	CDR-H3	5	0.04	1.39
T	ACA	T	ACT	CDR-H3	6	0.08	1.14
A	GCT	A	GCG	CDR-H3	7	0.27	1.22
S	TCC	S	AGT	CDR-H3	8	0	1.53
S	TCC	S	TCG	CDR-H3	8	0.02	1.53
S	TCC	S	TCT	CDR-H3	8	0.46	0.92
S	AGC	S	TCG	CDR-H3	9	0	1.63
S	AGC	S	AGT	CDR-H3	9	0.14	1.19
L	CTA	L	TTG	CDR-H3	10	0	1.34
Y	TAC	Y	TAT	CDR-H3	12	0.34	1.34

	1H11	TNF- α	TNF- α への 中位の割合
平均	0.12	1.40	1.21-1.59
SD	0.13	0.19	

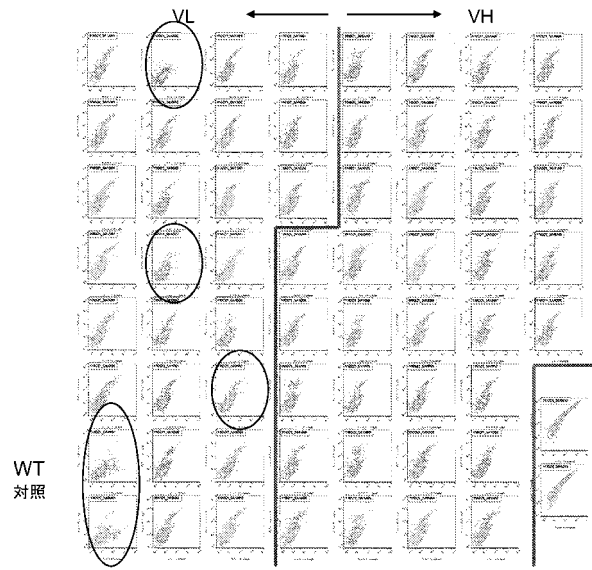
【 図 10 】

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	VL CDR1-1 R24	VL CDR1-9 Y32	VL CDR2-6 Q55	VL CDR3-7 P95	VH CDR2-1 A50	VH CDR2-9 I57	VH CDR2-17 G65	VH CDR3-8 S100b
B	VL CDR1-2 A25	VL CDR1-10 L33	VL CDR2-7 S56	VL CDR3-8 Y96	VH CDR2-2 I51	VH CDR2-10 D98	VH CDR3-1 V95	VH CDR3-9 S100c
C	VL CDR1-3 S26	VL CDR1-11 A34	VL CDR3-1 Q89	VL CDR3-9 T97	VH CDR2-3 T52	VH CDR2-11 Y59	VH CDR3-2 S96	VH CDR3-10 L100d
D	VL CDR1-4 Q27	VL CDR2-1 A50	VL CDR3-2 R90	VH CDR1-1 D31	VH CDR2-4 W52a	VH CDR2-12 A60	VH CDR3-3 Y97	VH CDR3-11 D101
E	VL CDR1-5 G28	VL CDR2-2 A51	VL CDR3-3 Y91	VH CDR1-2 Y32	VH CDR2-5 N53	VH CDR2-13 D61	VH CDR3-4 L98	VH CDR3-12 Y102
F	VL CDR1-6 I29	VL CDR2-3 S52	VL CDR3-4 N92	VH CDR1-3 A33	VH CDR2-6 S54	VH CDR2-14 S82	VH CDR3-5 S99	
G	VL CDR1-7 R30	VL CDR2-4 T53	VL CDR3-5 R93	VH CDR1-4 M34	VH CDR2-7 G55	VH CDR2-15 V63	VH CDR3-6 T100	
H	VL CDR1-8 N31	VL CDR2-5 L54	VL CDR3-6 A94	VH CDR1-5 H35	VH CDR2-8 H56	VH CDR2-16 E64	VH CDR3-7 A100a	

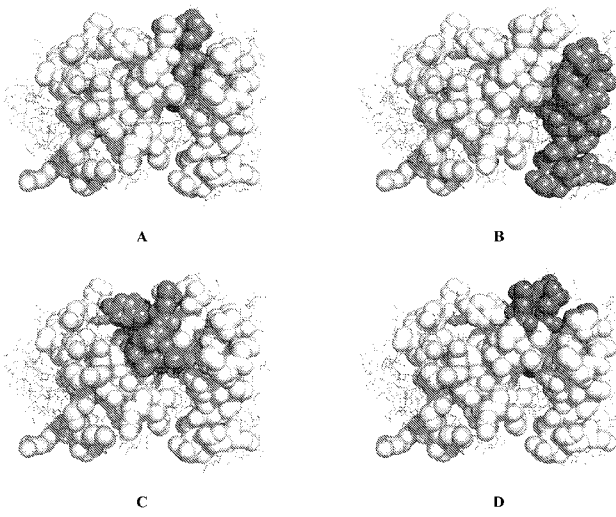
【图 1 1】



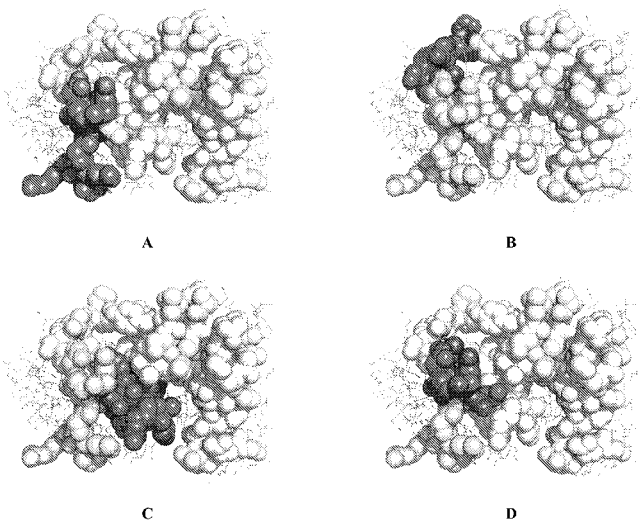
【图 1 2】



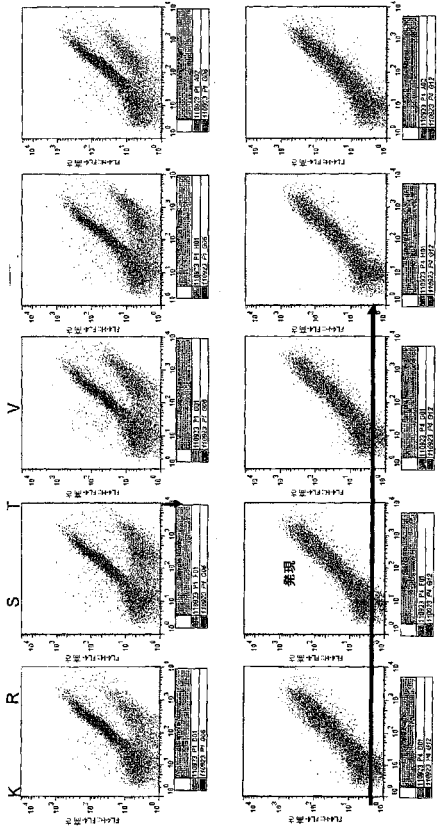
【图 1 3】



【图 1 4】



【 図 15 】

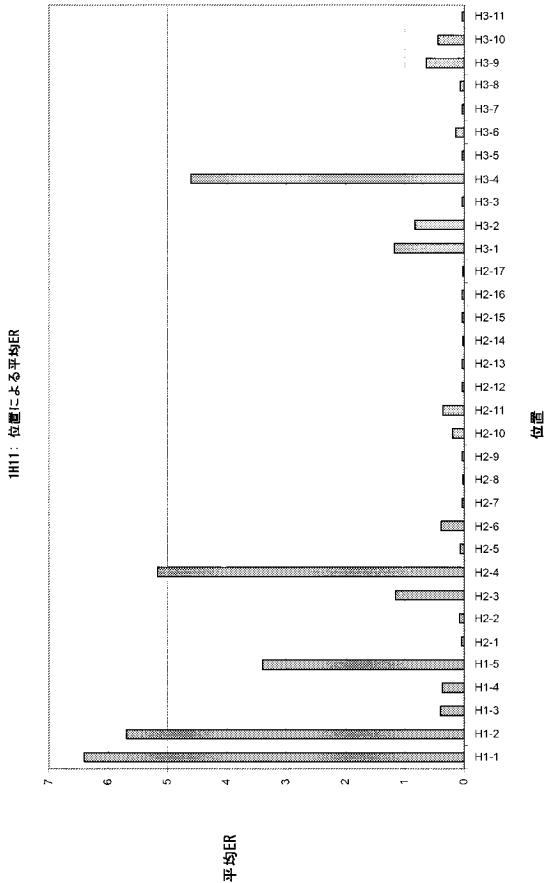


【 図 16 】

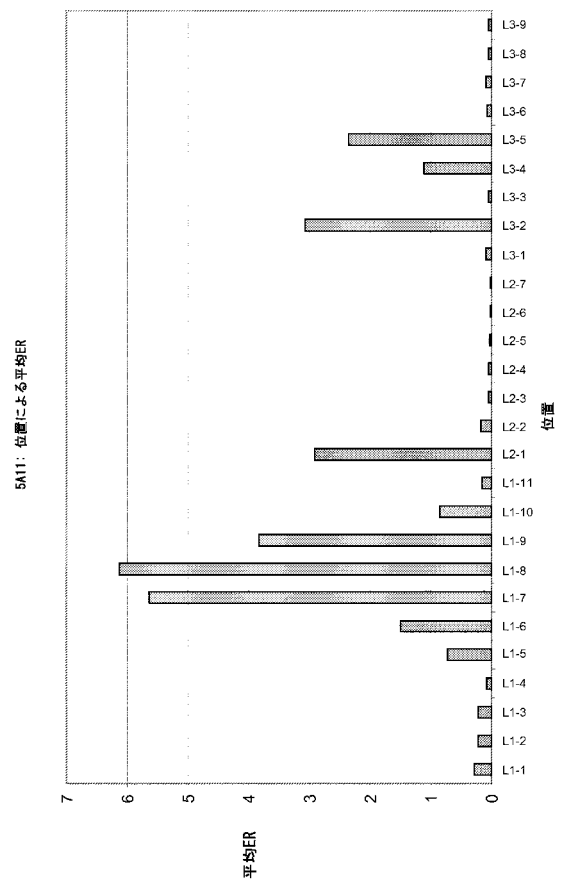
AA	CDR	位置	1H11 ER	位置での平均1H11 ER	TNF α -ER
A	CDR-H1	2	5.22	5.69	1.37
A	CDR-H1	2	6.21	5.69	1.32
C	CDR-H1	2	11.17	5.69	1.22
D	CDR-H1	2	0.56	5.69	0.03
E	CDR-H1	2	0.44	5.69	0.00
F	CDR-H1	2	0.03	5.69	1.32
G	CDR-H1	2	6.95	5.69	0.39
G	CDR-H1	2	5.42	5.69	0.25
H	CDR-H1	2	3.58	5.69	1.14
I	CDR-H1	2	6.80	5.69	1.20
K	CDR-H1	2	9.58	5.69	1.47
L	CDR-H1	2	1.44	5.69	0.95
L	CDR-H1	2	1.40	5.69	0.91
L	CDR-H1	2	1.29	5.69	0.64
M	CDR-H1	2	4.37	5.69	1.25
N	CDR-H1	2	8.40	5.69	1.60
P	CDR-H1	2	1.22	5.69	0.38
P	CDR-H1	2	1.03	5.69	0.33
Q	CDR-H1	2	9.41	5.69	1.18
R	CDR-H1	2	8.02	5.69	1.65
R	CDR-H1	2	6.88	5.69	1.46
R	CDR-H1	2	10.28	5.69	1.45
S	CDR-H1	2	7.32	5.69	1.65
S	CDR-H1	2	9.20	5.69	1.44
S	CDR-H1	2	6.28	5.69	1.28
T	CDR-H1	2	9.51	5.69	1.2
T	CDR-H1	2	6.48	5.69	1.14
V	CDR-H1	2	9.34	5.69	1.41
V	CDR-H1	2	6.44	5.69	1.28
W	CDR-H1	2	6.50	5.69	1.19

TNF α へのWTの結合: 1.21 - 1.60
 1H11へのWTの結合: 0.00 - 0.25

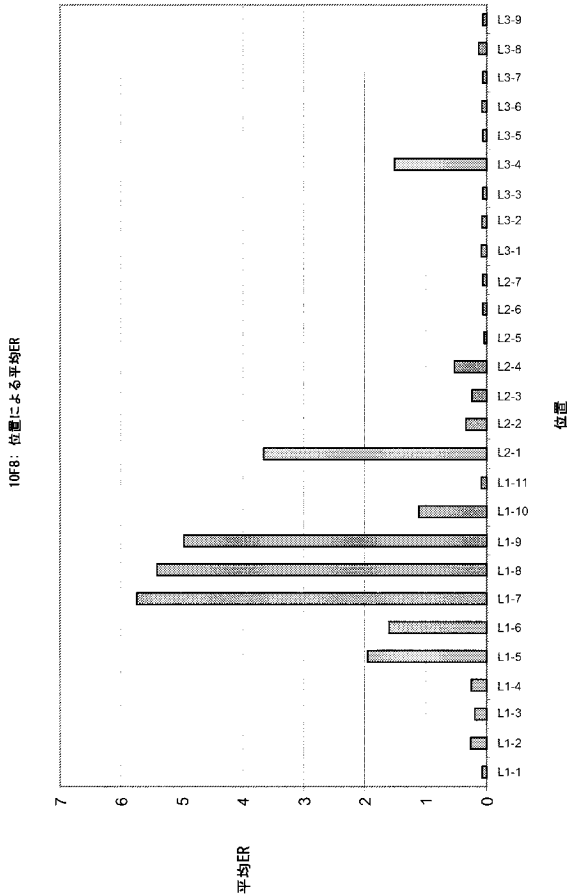
【 図 17 】



【 図 18 】



【図 19】



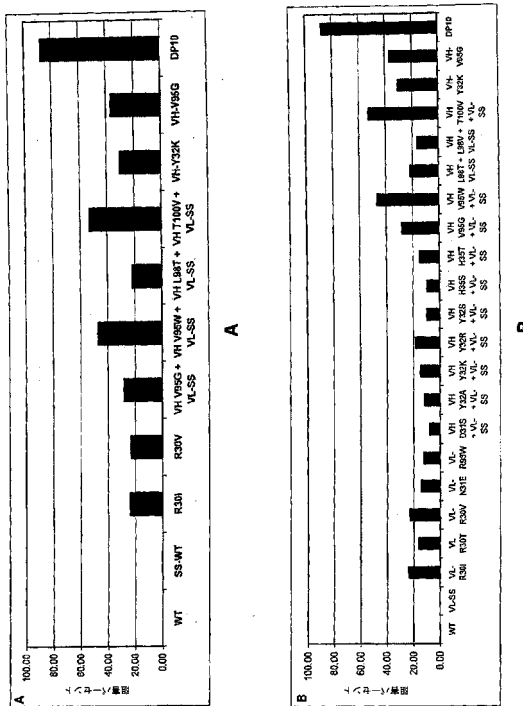
【図 20 A】

表記	37440	23709	90814	84111	平均	SD	
WT	WT	1.67	-1.16	0.00	-0.44	0.02	1.20
VL-SS	VL-SS	-2.90	3.79	0.35	-0.33	0.23	2.76
VL R30T	VL4	8.44	26.36	18.92	11.19	16.23	8.08
VH Y59I + VL-SS	VH16-SS	0.13	1.60	-0.66	-0.46	0.15	1.02
VH Y59R + VL-SS	VH20-SS	-1.23	2.82	-1.08	-1.24	0.44	1.95
VH V63D + VL-SS	VH24-SS	-0.77	-0.37	-0.69	-0.54	-0.59	0.18
VL G28F	VL1	3.15	15.50	0.69	0.22	4.89	7.19
VL G28V	VL2	-5.29	10.13	-0.71	-0.07	1.01	6.51
VL G28Y	VL3	-1.46	8.33	-0.16	0.00	1.68	4.48
VL N31D	VL5	-0.46	13.13	0.56	1.32	3.64	6.37
VL N31L	VL6	3.77	10.88	1.19	1.68	4.38	4.48
VL N31T	VL7	3.43	8.70	1.04	0.88	3.51	3.65
VL A50T	VL9	1.77	15.45	0.01	-0.19	4.26	7.51
VL T53D	VL10	0.00	3.77	-1.25	-0.50	0.51	2.24
VL N92F	VL11	5.96	24.50	4.50	4.41	9.85	9.80
VL N92Y	VL12	7.62	22.66	6.17	6.19	10.66	8.03
VL R93L	VL13	2.14	17.92	1.19	1.92	5.79	8.09
VL R93N	VL14	1.79	15.93	1.22	1.48	5.10	7.22
VH D31S + VL-SS	VH1-SS	3.20	25.37	2.20	1.63	8.10	11.53
VH Y32A + VL-SS	VH2-SS	8.88	31.91	4.01	2.69	11.87	13.62
VH Y32R + VL-SS	VH3-SS	11.81	52.68	5.85	3.80	18.54	23.02
VH Y32S + VL-SS	VH4-SS	7.34	25.95	4.08	2.21	9.90	10.91
VH H35E + VL-SS	VH6-SS	0.99	20.58	0.07	0.23	5.47	10.08
VH H35T + VL-SS	VH7-SS	14.67	33.27	2.20	10.15	15.07	13.18
VH T52A + VL-SS	VH8-SS	-1.98	18.61	0.64	0.86	4.53	9.48
VH T52G + VL-SS	VH9-SS	2.32	24.96	1.61	1.36	7.56	11.60
VH I57K + VL-SS	VH10-SS	-2.69	8.43	-1.23	-0.42	1.02	5.03
VH Y59A + VL-SS	VH12-SS	-2.32	4.80	-1.31	-1.09	0.02	3.23
VH Y59C + VL-SS	VH13-SS	-4.39	4.37	-1.01	-0.49	-0.38	3.61
VH Y59F + VL-SS	VH14-SS	-1.51	7.70	-0.01	-0.23	1.49	4.19
VH Y59H + VL-SS	VH15-SS	-0.38	6.28	-0.49	-0.04	1.34	3.30
VH Y59L + VL-SS	VH18-SS	-0.74	5.37	-1.39	-0.48	0.69	3.14
VH Y59M + VL-SS	VH19-SS	0.58	2.92	-1.25	-0.53	0.43	1.82
VH Y59S + VL-SS	VH21-SS	-2.89	6.58	-1.41	-1.08	0.30	4.26
VH Y59V + VL-SS	VH22-SS	-1.52	4.05	-1.24	0.20	0.37	2.56
VH Y59W + VL-SS	VH23-SS	-1.16	8.76	1.03	-0.24	2.10	4.53
VH V63L + VL-SS	VH25-SS	-0.41	7.11	-0.45	-0.10	1.54	3.72
VH G65A + VL-SS	VH26-SS	-2.74	6.44	-1.32	-0.31	0.52	4.07
VH G65E + VL-SS	VH27-SS	-2.55	8.87	-0.38	-0.46	1.37	5.10
VH G65L + VL-SS	VH28-SS	-2.94	1.80	-1.25	-1.10	-0.88	1.97
VH G65M + VL-SS	VH29-SS	-2.30	3.73	-0.30	-1.12	0.00	2.62
VH G65Q + VL-SS	VH30-SS	-1.54	5.57	1.01	-0.46	1.14	3.13
VH G65R + VL-SS	VH31-SS	3.27	7.88	-0.47	-0.14	2.63	3.88

【図 20 B】

表記	37440	23709	90814	84111	平均	SD	
VH G65S + VL-SS	VH32-SS	-1.77	5.59	-1.30	-0.46	0.51	3.43
VH V95R + VL-SS	VH33-SS	-1.47	9.95	-0.32	0.35	2.13	5.27
VH V95W + VL-SS	VH34-SS	26.86	59.72	63.70	37.73	47.00	17.63
VH L98T + VL-SS	VH35-SS	22.01	43.07	13.08	8.65	21.70	15.29
VH L98V + VL-SS	VH36-SS	9.75	45.57	6.23	3.32	16.22	19.75
VH T100V + VL-SS	VH37-SS	47.11	61.75	60.87	42.04	52.94	9.89
VH D101V + VL-SS	VH38-SS	0.93	13.57	-0.32	0.55	3.68	6.61
VH Y32K + VL-SS	VH39-SS	13.28	35.32	6.92	4.34	14.97	14.08
VH Y32V + VL-SS	VH40-SS	7.07	19.62	2.17	1.36	7.56	8.43
VH H35C + VL-SS	VH41-SS	2.04	24.36	0.94	0.77	7.03	11.57
VH H35S + VL-SS	VH42-SS	3.09	30.19	4.08	1.16	9.63	13.76
VH V95G + VL-SS	VH43-SS	29.10	53.62	18.01	13.00	28.43	18.09
G28I		5.05	15.84		-0.10	6.93	8.14
G28W		3.54	14.89		-0.05	6.13	7.80
R30I		18.99	44.28		8.46	23.91	18.41
R30V		19.04	40.09		10.16	23.10	15.37
N31E		10.69	29.20		3.37	14.42	13.31
N31G		6.16	19.35		1.03	8.85	9.45
V31R		5.80	13.38		0.78	6.65	6.35
A50V		2.15	15.98		-0.01	6.04	8.68
R93W		6.25	28.88		2.34	12.49	14.33
VH-Y32K		36.31	24.20			30.26	8.56
VH-Y32V		21.20	13.50			17.35	5.44
VH-H35C		12.70	19.40			16.05	4.74
VH-H35S		13.99	22.56			18.28	6.06
VH-V95G		34.70	38.58			36.64	2.75
DP10		99.82	84.18	95.33	71.54	87.72	12.63

【図 21】



【 図 2 2 】

VH	VL	ADAb 架構	親和性 倍数	親和性 pM
WT	WT	5	100	83 +/- 10
WT	SS	0.4	82	150
Y32K/T100V	SS	28	142	61
Y32K/V95G/T100V	SS	24	122	71
Y32K	SS/R30T	45	55	130
Y32K	SS/R30I	48	50	149
V95G/T100V	SS	15	25	335
Y32M	SS	0	21	411
V95W	R30I	95	23	379
V95W	R30T	97	0	>10,000

【 配 列 表 】

2015537190000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2013/060480
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/24 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, FSTA, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONZALES NOREEN R ET AL: "Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application", TUMOR BIOLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 26, no. 1, 28 February 2005 (2005-02-28), pages 31-43, XP008081934, ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1159/000084184 the whole document	1-27
X	----- WO 2009/032128 A1 (ABBOTT BIOTECH LTD [GB]; KAYMAKALAN ZEHRA [US]; XIONG LIMIN [US]) 12 March 2009 (2009-03-12) page 32, line 9 - page 33, line 6 ----- -/--	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
12 August 2014	25/09/2014	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hinchliffe, Philippe	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/060480

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARDING FIONA A ET AL: "The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions", MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 2, no. 3, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 256-265, XP009137415, ISSN: 1942-0870, DOI: 10.4161/MABS.2.3.11641 see introduction; figure 4	1-27
X	----- YOON SUN OK ET AL: "Construction, affinity maturation, and biological characterization of an anti-tumor-associated glycoprotein-72 humanized antibody", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 281, no. 11, 17 March 2006 (2006-03-17), pages 6985-6992, XP002495980, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M511165200 see experimental; page 6989, column 1	1-27
A	----- Olivier Léger: "Humanization of Antibodies", 12 July 2012 (2012-07-12), XP055032589, Retrieved from the Internet: URL:http://www.icpress.co.uk/etextbook/p743/p743_chap01.pdf [retrieved on 2012-07-12] cited in the application see sections 1.4.2 , 1.4.6 & 1.4.7 -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/060480

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

28(partially)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2013/ 060480

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-27

A method of screening for antibody/ies that have a reduced immunogenicity over a reference antibody using an anti idiotypic antibody to the reference antibody in a panel of antibodies with single amino acid substitutions.

2. claim: 28(partially)

An antibody that is called a reference antibody to TNFalpha and is made up of an unknown scaffold with the 6 CDRs being defined by seqs 5-10.

3-110. claim: 28(partially)

A variant of what is referred to as a reference antibody defined by CDRs seq.id.5-10 wherein one substitution is made in selected from the 100 possibilities in this claim

111-880. claims: 28-44, 46-50(all partially)

A variant of, what is referred to as, a reference antibody defined by CDRs seq.id.5-10 wherein 2-110 substitutions are made in selected CDRs from the 110 possibilities in this claim to a maximum of 8 changes. The number of possible antibodies covered is not calculated but is well beyond the range of a normal search. The subsequent claims (except 45) cover subsets of the possibilities covered by claim 28.

881. claim: 45

An antibody that is called a reference antibody to TNFalpha and is made up of an unknown scaffold with the vH and vL being defined by seqs 2 & 4.

882-1762. claims: 28-50(partially)

A variant of, what is referred to as, a reference antibody defined by vH & vL defined by seqs. 2 & 4, wherein 110 substitutions are made in selected CDRs from the 110 possibilities in claim 28 to a maximum of 8 changes. The number of possible antibodies covered is not calculated but is well beyond the range of a normal search.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/060480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009032128 A1	12-03-2009	CA 2696210 A1	12-03-2009
		CN 101802005 A	11-08-2010
		EP 2193145 A1	09-06-2010
		JP 2010537983 A	09-12-2010
		US 2009068172 A1	12-03-2009
		WO 2009032128 A1	12-03-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 7
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 15/14 (2006.01)	G 0 1 N 15/14	C
G 0 1 N 21/64 (2006.01)	G 0 1 N 15/14	D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 21/64	F
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
C 4 0 B 40/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 4 0 B 40/02	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/005	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
	C 0 7 K 16/28	

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

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ハーディング フィオナ エイ .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ クララ ルイス ストリート 772

(72)発明者 ラゾ オリビア ジェニファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ニューアーク ミラボー ドライブ 6 3 6 4

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA05 EA01

2G045 CB01 DA37 FA37 FB03 FB12

4B024 AA01 AA11 BA58 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA03

EA04 GA11 HA01 HA08 HA11

4B063 QA01 QA06 QA07 QA17 QQ02 QQ03 QR08 QR33 QR55 QS25

QS32 QS33 QX01 QX02

4B065 AA90X AA90Y AB04 AC20 BA01 CA44 CA46

4C085 AA14 BB11 CC08 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA40 BA41 CA01 DA75 DA76 EA20

EA22 FA74 GA21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015537190A5	公开(公告)日	2016-11-04
申请号	JP2015533163	申请日	2013-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	avvi生物疗法		
申请(专利权)人(译)	AVVI生物治疗公司		
[标]发明人	ハーディングフィオナエイ ラゾオリビアジェニファー		
发明人	ハーディング フィオナ エイ. ラゾ オリビア ジェニファー		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C07K16/24 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 G01N33/543 G01N33/536 G01N33/15 G01N33/50 G01N15/14 G01N21/64 A61K39/395 A61P37/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P1/04 C40B40/02 C07K14/005 C07K19/00 C07K16 /28		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 C07K16/241 C07K16/4208 C40B40/10 G01N33/6854 G01N2500/10 G01N2333/525		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N C12Q1/68.Z C07K16/24 C12Q1/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.C G01N33/543.597 G01N33/536.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N15/14.C G01N15/14. D G01N21/64.F A61K39/395.N A61P37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P1 /04 C40B40/02 C07K14/005 C07K19/00 C07K16/28		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA05 2G043/EA01 2G045/CB01 2G045/DA37 2G045/FA37 2G045 /FB03 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA58 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024 /HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA07 4B063/QA17 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QX01 4B063 /QX02 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/703170 2012-09-19 US		
其他公开文献	JP2015537190A		

摘要(译)

描述了鉴定与参考抗体相比具有降低的免疫原性的参考抗体变体的方法。进一步描述了与参考抗TNF- α 参考抗体相比具有降低的免疫原性的参考抗TNF- α 抗体的变体。

