

(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2014-503202

(P2014-503202A)

(43) 公表日 平成26年2月13日(2014.2.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-543343 (P2013-543343)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月8日 (2011.12.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月7日 (2013.8.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/063955
 (87) 国際公開番号 W02012/078878
 (87) 国際公開日 平成24年6月14日 (2012.6.14)
 (31) 優先権主張番号 61/420,999
 (32) 優先日 平成22年12月8日 (2010.12.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512212195
 アッヴィ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、
 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ
 ード・1
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 シエ, チュン-ミン
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02
 459、ニュートン、オールド・フィール
 ド・ロード・22
 (72) 発明者 グッドリュー, キヤリー
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 056、ラッドロー、ステイブンス・ス
 トリート・201

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TNF- α 結合性タンパク質

(57) 【要約】

TNF- に結合するキメラ、CDRグラフティングおよびヒト化抗体を含むTNF- 結合性タンパク質を提供する。結合性タンパク質はTNF- に対する高いアフィニティを有し、TNF- 活性を中和する。結合性タンパク質は完全長抗体またはそのTNF- 結合性部分でありうる。結合性タンパク質の製造方法および使用方法も記載されている。TNF- 結合性タンパク質は、例えば、TNF- 活性が有害である疾患または障害に罹患したヒト対象における、TNF- の検出およびTNF- 活性の抑制に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5 または配列番号 4 6 を含む抗体またはその抗原結合性部分。

【請求項 2】

配列番号 3 1 (C D R - H 1) の残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 1 (C D R - H 2) の残基 5 0 - 6 6、配列番号 3 1 (C D R - H 3) の残基 9 9 - 1 1 3、配列番号 3 2 (C D R - L 1) の残基 2 4 - 3 4、配列番号 3 2 (C D R - L 2) の残基 5 0 - 5 6 または配列番号 3 2 (C D R - L 3) の残基 8 9 - 9 7 を含む少なくとも 1 つの C D R を含む、T N F に結合しうる抗体またはその抗原結合性部分。

10

【請求項 3】

結合性タンパク質が少なくとも 3 つの C D R を含む、請求項 2 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 4】

少なくとも 3 つの C D R が、

(a) 配列番号 3 1 (C D R - H 1) の残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 1 (C D R - H 2) の残基 5 0 - 6 6 および配列番号 3 1 (C D R - H 3) の残基 9 9 - 1 1 3、または
(b) 配列番号 3 2 (C D R - L 1) の残基 2 4 - 3 4、配列番号 3 2 (C D R - L 2) の残基 5 0 - 5 6 および配列番号 3 2 (C D R - L 3) の残基 8 9 - 9 7 の可変ドメイン C D R セットを含む、請求項 3 に記載の結合性タンパク質。

20

【請求項 5】

少なくとも 2 つの可変ドメイン C D R セットを含む、請求項 4 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 6】

結合性タンパク質が、

(a) 配列番号 3 1 (C D R - H 1) の残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 1 (C D R - H 2) の残基 5 0 - 6 6 および配列番号 3 1 (C D R - H 3) の残基 9 9 - 1 1 3、ならびに
(b) 配列番号 3 2 (C D R - L 1) の残基 2 4 - 3 4、配列番号 3 2 (C D R - L 2) の残基 5 0 - 5 6 および配列番号 3 2 (C D R - L 3) の残基 8 9 - 9 7 の両方を含む、請求項 5 に記載の結合性タンパク質。

30

【請求項 7】

ヒトアクセプターフレームワークを更に含む、請求項 6 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 8】

ヒトアクセプターフレームワークが配列番号 1 0 ~ 1 9 または配列番号 2 0 ~ 3 0 のいずれか 1 つを含む、請求項 7 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 9】

ヒトアクセプターフレームワークが少なくとも 1 つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、フレームワークのアミノ酸配列がヒトアクセプターフレームワークの配列に対して少なくとも 6 5 % 同一であり、ヒトアクセプターフレームワークと同一である少なくとも 7 0 個のアミノ酸残基を含む、請求項 7 または 8 に記載の結合性タンパク質。

40

【請求項 10】

ヒトアクセプターフレームワークが、C D R に隣接した残基、グリコシル化部位残基、稀有残基、ヒト T N F - と相互作用しうる残基、C D R と相互作用しうる残基、カノニカル (c a n o n i c a l) 残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域との接触残基、バーニエ (V e r n i e r) 領域内の残基、およびチョチア (C h o t h i a) により定義された可変領域鎖 C D R 1 とカバト (K a b a t) により定義された第 1 重鎖フレームワークとの間で重複する領域内の残基に、少なくとも 1 つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含む、請求項 8 に記載の結合性タンパク質。

50

【請求項 1 1】

残基が 1 H、2 H、6 7 H、6 9 H、7 1 H、8 2 H、8 5 H、9 1 H および 2 L、4 3 L、4 4 L、4 9 L、7 1 L または 8 7 L である、請求項 1 0 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 2】

結合性タンパク質がコンセンサスヒトアクセプターを含む、請求項 1 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 3】

(a) 配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1 および配列番号 4 2 を含む可変重鎖ポリペプチド、ならびに

(b) 配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5 および配列番号 4 6 を含む可変軽鎖ポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

10

【請求項 1 4】

結合性タンパク質が、以下のそれぞれのアミノ酸配列：

配列番号 3 1 および配列番号 3 2 ；

配列番号 3 3 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 3 および配列番号 3 6 ；

20

配列番号 3 3 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 4 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 4 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 7 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 3 ；

30

配列番号 3 7 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 7 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 8 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 8 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 6 ；

40

配列番号 3 9 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 9 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 6 ；

配列番号 4 0 および配列番号 3 5 ；

配列番号 4 0 および配列番号 4 3 ；

配列番号 4 0 および配列番号 4 4 ；

配列番号 4 0 および配列番号 3 6 ；

50

配列番号 40 および配列番号 45 ;
 配列番号 40 および配列番号 46 ;
 配列番号 41 および配列番号 35 ;
 配列番号 41 および配列番号 43 ;
 配列番号 41 および配列番号 44 ;
 配列番号 41 および配列番号 36 ;
 配列番号 41 および配列番号 45 ;
 配列番号 41 および配列番号 46 ;
 配列番号 42 および配列番号 35 ;
 配列番号 42 および配列番号 43 ;
 配列番号 42 および配列番号 44 ;
 配列番号 42 および配列番号 36 ;
 配列番号 42 および配列番号 45 ; または
 配列番号 42 および配列番号 46

10

を含む可変重鎖ポリペプチドおよび可変軽鎖ポリペプチドを含む、請求項 13 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 15】

結合性タンパク質が免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合 Fv、モノクローナル抗体、scFv、キメラ抗体、単ドメイン抗体、CDR グラフティング抗体、ジアボディ、ヒト化抗体、多重特異性抗体、Fab、二重特異性抗体、DVD-Ig タンパク質、Fab'、二重特異性抗体、F(ab')₂ または Fv である、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

20

【請求項 16】

結合性タンパク質が、ヒト IgM 定常ドメイン、ヒト IgG4 定常ドメイン、ヒト IgG1 定常ドメイン、ヒト IgE 定常ドメイン、ヒト IgG2 定常ドメイン、ヒト IgG3 定常ドメインまたはヒト IgA 定常ドメインを含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 17】

配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列を有する重鎖定常領域を更に含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

30

【請求項 18】

配列番号 4 または配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域を更に含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 19】

結合性タンパク質がヒト TNF- α を中和しうる、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 20】

結合性タンパク質が、表面プラズモン共鳴による測定で少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、標的に対するオン (on) 速度定数 (K_{on}) を有する、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

40

【請求項 21】

結合性タンパク質が、表面プラズモン共鳴による測定で多くとも約 10^{-3} s^{-1} 、多くとも約 10^{-4} s^{-1} 、多くとも約 10^{-5} s^{-1} または多くとも約 10^{-6} s^{-1} の、標的に対するオフ (off) 速度定数 (K_{off}) を有する、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 22】

結合性タンパク質が、多くとも約 10^{-7} M 、多くとも約 10^{-8} M 、多くとも約 10^{-9} M 、多くとも約 10^{-10} M 、多くとも約 10^{-11} M 、多くとも約 10^{-12} M または多くとも 10^{-13} M の、標的に対する解離定数 (KD) を有する、請求項 1 に記載

50

の結合性タンパク質。

【請求項 23】

結合性タンパク質が、多くとも約 10^{-7} M、多くとも約 10^{-8} M、多くとも約 10^{-9} M、多くとも約 10^{-10} M、多くとも約 10^{-11} M、多くとも約 10^{-12} M または多くとも 10^{-13} M の、TNF- α に対する解離定数 (KD) を有する、請求項 22 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 24】

結合性タンパク質が、免疫接着分子、イメージング剤、治療用物質または細胞毒性物質を更に含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 25】

イメージング剤が放射能標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである、請求項 24 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 26】

放射能標識が ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である、請求項 25 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 27】

治療用または細胞毒性物質が代謝拮抗物質、アルキル化物質、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生物質、抗有糸分裂物質、アントラサイクリン、毒素およびアポトーシス性物質である、請求項 24 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 28】

結合性タンパク質がヒトグリコシル化パターンを有する、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 29】

結合性タンパク質が結晶化結合性タンパク質である、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 30】

請求項 1 に記載の結合性タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 31】

請求項 1 に記載の結合性タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸を含むベクター。

【請求項 32】

ベクターが pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pHybE または pBJ である、請求項 31 に記載のベクター。

【請求項 32】

請求項 31 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 33】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 34】

宿主細胞が真核細胞である、請求項 32 に記載の宿主細胞。

【請求項 35】

真核細胞が原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞または昆虫細胞である、請求項 34 に記載の宿主細胞。

【請求項 36】

真核細胞が *S. cerevisiae* (S. cerevisiae)、CHO 細胞、COS 細胞または SF9 細胞である、請求項 35 に記載の宿主細胞。

【請求項 37】

TNF- α に結合しうる結合性タンパク質を産生するのに十分な条件下、請求項 32 に記載の宿主細胞を培地内で培養する工程を含む、TNF- α に結合しうるタンパク質の製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

請求項 37 に記載の製造方法により製造されるタンパク質。

【請求項 39】

請求項 1 または請求項 37 に記載の結合性タンパク質と医薬として許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 40】

TNF - 活性が有害である障害を治療するための少なくとも 1 つの追加的物質を更に含む、請求項 39 に記載の医薬組成物。

【請求項 41】

追加的物質が、治療用物質、イメージング物質、細胞毒性物質、血管新生インヒビター、キナーゼインヒビター、共刺激分子ブロッカー、接着分子ブロッカー、抗サイトカイン抗体またはその機能性フラグメント、メトトレキサート、シクロスポリン、ラバマイシン、FK506、検出可能な標識またはレポーター、TNF アンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩薬、麻酔薬、非ステロイド抗炎症薬 (NSAID)、鎮痛薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗微生物薬、抗乾癬薬、コルチコステロイド、タンパク質同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制物質、成長ホルモン、ホルモン補充療法薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神病薬、興奮薬、喘息治療薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、経口ステロイド、エピネフリンまたはその類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、請求項 40 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 42】

請求項 39 に記載の組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物の治療方法。

20

【請求項 43】

ヒト TNF - 活性が低減するように、ヒト TNF - を請求項 1 に記載の結合性タンパク質と接触させることを含む、ヒト TNF - 活性を低減するための方法。

【請求項 44】

TNF - 活性が有害である障害に罹患しているヒト対象においてヒト TNF - 活性を低減するための方法であって、ヒト対象におけるヒト TNF - 活性が低減するように、請求項 1 に記載の結合性タンパク質をヒト対象に投与することを含む方法。

【請求項 45】

TNF - 活性が有害である疾患または障害に対する対象の治療方法であって、治療が達成されるように、請求項 1 に記載の結合性タンパク質を対象に投与することによる治療方法。

30

【請求項 46】

障害が自己免疫および/または炎症障害である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 46】

障害がクローン病、尋常性乾癬、関節リウマチ、乾癬性関節炎、骨関節炎、若年性特発性関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、インスリン依存性糖尿病、自己免疫性糖尿病、アレルギーおよび自己免疫ブドウ膜炎である、請求項 46 に記載の方法。

40

【請求項 47】

障害が、呼吸障害；喘息；アレルギー性および非アレルギー性喘息；感染による喘息；呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 感染による喘息；慢性閉塞性肺疾患 (COPD)；気道炎症を伴う状態；好酸球増加症；線維症および過剰粘液産生；嚢胞性線維症；肺線維症；アトピー性障害；アトピー性皮膚炎；蕁麻疹；湿疹；アレルギー性鼻炎；アレルギー性胃腸炎；皮膚の炎症性および/または自己免疫状態；胃腸器官の炎症および/または自己免疫状態；炎症性腸疾患 (IBD)；潰瘍性大腸炎；クローン病；肝臓の炎症および/または自己免疫状態；肝硬変；肝線維症；B 型および/または C 型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝線維症；強皮症；腫瘍または癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；リンパ腫；ホジキンリンパ腫；ウイルス感染；細菌感染；寄生虫感染症；HTLV - 1 感染；防御 1 型免疫

50

応答の発現の抑制、およびワクチン接種中の防御1型免疫応答の発現の抑制である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

請求項1に記載の結合性タンパク質を、第2物質の投与前、それと同時またはその後で投与することを含む、TNF- α が有害である障害に罹患した患者の治療方法であって、第2物質が、以下のものに結合しうる抗体またはそのフラグメント：ヒトIL-12；PGE2；LPA；NGF；CGRP；SubP；RAGE；ヒスタミン；ヒスタミン受容体ブロッカー；ブラジキニン；IL-1 α ；IL-1 β ；VEGF；PLGF；メトトレキサート；コルチコステロイド；グルココルチコイド受容体モジュレーター；シクロスポリン、ラパマイシン、FK506または非ステロイド性抗炎症物質である、治療方法。

10

【請求項49】

請求項1に記載の結合性タンパク質を、第2物質の投与前、それと同時またはその後で投与することを含む、TNF- α が有害である障害に罹患した患者の治療方法であって、第2物質が、TNFアンタゴニスト；TNF受容体の可溶性断片；ENBREX（登録商標）；TNF酵素アンタゴニスト；TNF変換酵素（TACE）インヒビター；ムスカリン性受容体アンタゴニスト；TGF- β アンタゴニスト；インターフェロンガンマ；ピルフェニドン（perfenidone）；化学療法剤、メトトレキサート、レフルノミド；シロリムス（ラパマイシン）またはその類似体、CCI-779；COX2またはcPLA2インヒビター；NSAID；免疫調節物質；p38インヒビター；TPL-2、MK-2およびNF κ Bインヒビター；ブデノシド；上皮増殖因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチル酸；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼインヒビター；メサラミン；オラサラジン；バルサラジド；抗酸化物質；トロンボキサンインヒビター；IL-1受容体アンタゴニスト；抗IL-1 β 抗体；抗IL-6抗体；増殖因子；エラスターゼインヒビター；ピリジニル-イミダゾール化合物；TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、EMAP-II、GM-CSF、FGFまたはPDGFの抗体またはアゴニスト；CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはそれらのリガンドの抗体；FK506；ラパマイシン；ミコフェノール酸モフェチル；イブプロフェン；プレドニゾロン；ホスホジエステラーゼインヒビター；アデノシンアゴニスト；抗血栓剤；補体インヒビター；アドレナリン作動性物質；IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼインヒビター；IL-1変換酵素インヒビター；TNF α 変換酵素インヒビター；T細胞シグナリングインヒビター；メタロプロテイナーゼインヒビター；6-メルカプトプリン；アンジオテンシン変換酵素インヒビター；可溶性サイトカイン受容体；可溶性p55 TNF受容体；可溶性p75 TNF受容体；sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R；抗炎症性サイトカイン；ならびにTGF β から選択される、治療方法。

20

30

40

【請求項50】

対象への投与が、少なくとも非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内、腹腔内、小脳内、脳室内、結腸内、子宮頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸内、子宮内、膀胱内、ポラス、膻、直腸、頬、舌下、鼻腔内または経皮によるものである、請求項40～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

(i) 請求項1に記載のTNF- α 結合性タンパク質またはそのTNF- α 結合性部分とサンプルを接触させ、

50

(i i) サンプル中の T N F - と T N F - 結合性タンパク質またはその結合性部分との複合体の形成を検出する (サンプル中の対照サンプルまたは関連 T N F - のものと比較した場合の、サンプル中の複合体の形成の統計的に有意な変化) ことを含む、サンプル中のヒト T N F - を検出する方法。

【請求項 5 2】

サンプルが全血、血漿、血清、尿、唾液または組織生検である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 3】

ヒト対象におけるヒト T N F - を検出する方法であって、

(i) 請求項 1 に記載の T N F - 結合性タンパク質またはその T N F - 結合性部分を、ヒト T N F - への T N F - 結合性タンパク質またはその T N F - 結合性部分の結合を可能にする条件下、試験対象または対照対象に投与し、

(i i) 結合性タンパク質またはその結合性部分と T N F - との複合体の形成を検出することを含み、ここで、対照対象と比較した場合またはより早い時点での試験対象における複合体の形成と比較した場合の、試験対象における複合体の形成の統計的に有意な変化が、T N F - の存在を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

T N F - 結合性タンパク質、ならびに急性および慢性免疫疾患、例えば関節リウマチ、骨関節症、乾癬、多発性硬化症および他の自己免疫疾患の予防および / または治療におけるその用途を提供する。

【背景技術】

【0002】

T N F - に結合しうる改良された抗体が当技術分野において必要とされている。

【発明の概要】

【0003】

(概括)

T N F - への結合能、高いアフィニティでの T N F - への結合能ならびに T N F - に結合し中和する能力を有する結合性タンパク質、C D R グラフティング抗体、ヒト化抗体ならびにそれらのフラグメントの新規ファミリーを提供する。配列番号 3 1 ~ 4 6 のいずれかのアミノ酸配列を含む、T N F - に結合しうる抗体およびその抗原結合性部分も提供する。

【0004】

(詳細な説明)

T N F - 結合性タンパク質、例えば、T N F - に結合する抗体またはその抗原結合性部分を提供する。種々の態様は、抗体および抗体フラグメント、ならびにそれらの医薬組成物、ならびにそのような抗体およびそのフラグメントを製造するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞に関する。ヒト T N F - を検出するための、およびヒト T N F - をインビトロまたはインビボのいずれかで抑制するための、および遺伝子発現を調節するための、該結合性タンパク質の使用方法も含まれる。

【0005】

本明細書中で特に定められていない限り、本明細書中で用いられる科学技術用語は、当業者に一般に理解されている意味を有するものとする。該用語の意味および範囲は明らかにならずであるが、潜在的多義性が存在する場合には、本明細書に記載されている定義がいずれの辞書的または非本質的定義にも優先する。更に、文脈に矛盾しない限り、単数形用語はその複数形を含むものとし、複数形用語はその単数形を含むものとする。特に示されていない限り、「または」なる語は「および / または」を含む。「含み」、「含む」または「含んでいた」なる語の使用は限定的なものではない。また、特に示されていない限り、「要素」または「成分」のような語は、1つの単位を含む要素および成分ならびに2以

10

20

30

40

50

上のサブユニットを含む要素および成分の両方を含む。

【0006】

該方法および技術は、一般に、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーション、分析化学、合成有機化学、医化学および薬化学、医薬製剤、処方および運搬、ならびに患者の治療の分野でよく知られた通常の方法により行われる。そのような技術は、本明細書中で引用されている参考文献にも記載されている。酵素反応および精製技術は、当技術分野で一般に公知のとおり、またはさもなければ本明細書に記載されているとおり、製造業者の仕様に従い行われる。

【0007】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」なる語は、アミノ酸の重合鎖を意味するものとして互換的に用いられる。「ポリペプチド」なる語は、天然または人工タンパク質、タンパク質断片、およびタンパク質配列の類似体を含む。ポリペプチドは単量体または重合体でありうる。

【0008】

「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」なる語は、その天然状態で付随する成分を伴わないタンパク質またはポリペプチドを意味する。例えば、それは同一種由来の他のタンパク質または細胞成分を実質的に含有せず、異なる種からの細胞により発現され、あるいは天然に存在しない。したがって、化学合成された、またはそれが天然で由来する細胞とは異なる細胞系において合成されたポリペプチドは、その天然で付随する成分から「単離」されていることになる。また、タンパク質は、当技術分野でよく知られたタンパク質精製を用いる単離により、天然で付随する成分を実質的に含有しない状態にされうる。

【0009】

「回収」なる語は、例えば当技術分野でよく知られたタンパク質精製を用いる単離により、ポリペプチドのような化学種を、天然で付随する成分を実質的に含有しない状態にする方法を意味する。

【0010】

「ヒトTNF- α 」(本明細書ではhTNF- α と略される)なる語は二量体サイトカインタンパク質を含む。該用語は、3つの17.5kD TNF- α タンパク質を含むホモ三量体タンパク質を含む。該ホモ三量体タンパク質は「TNF- α タンパク質」と称される。ヒト「TNF- α 」なる語は、標準的な組換え発現法により製造されうる組換えヒトTNF- α (TNF- α)を含むと意図される。ヒトTNF- α の配列を表1に示す。

【0011】

【表1】

表1: ヒトTNF- α の配列

タンパク質	配列番号	配列
		123456789012345678901234567890
ヒト TNF- α	配列番号 1	VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGLQWLN DRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYS QVLFKGGQCPSTHVLTLTHTISRIVASYQTK VNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYIL GGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQV YFGIIAL

【0012】

「生物活性」なる語は、分子の、全ての固有生物学的特性を意味する。TNF- α の生物学的特性はTNF受容体への結合を含むが、これに限定されるものではない。

【0013】

抗体、タンパク質またはペプチドが第2の化学種と相互作用することに関する「特異的結合」または「特異的に結合する」なる語は、該相互作用が、該化学種上の特定の構造(

10

20

30

40

50

例えば、抗原決定基またはエピトープ)の存在に依存すること、例えば、抗体が、全てのタンパク質ではなく特定のタンパク質構造を認識し、それに結合することを意味する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識された「A」および該抗体を含有する反応における、エピトープAを含有する分子(すなわち、遊離した標識されていないA)の存在は、該抗体に結合した標識されたAの量を減少させるであろう。

【0014】

「結合性タンパク質」なる語は任意の抗体またはその抗原結合性部分を含むが、これらに限定されるものではない。結合性タンパク質はまた、標的に対する結合アフィニティを維持している他の構築物を含む。幾つかの場合には、それらの結合性タンパク質は抗体またはその抗原結合性部分に対する構造的類似性を有することがあり、それらはまた、それらを抗体またはその抗原結合性部分から区別する構造的相違を有することがある。

【0015】

「抗体」なる語は、広義には、4本のポリペプチド鎖、すなわち、2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖から構成される任意の免疫グロブリン(Ig)分子、またはIg分子の必須のエピトープ結合特性を保有する、その任意の機能性フラグメント、突然変異体、変異体もしくは誘導体を意味する。そのような突然変異体、変異体または誘導体抗体形態は当技術分野で公知であり、その非限定的な実施形態を後記に記載する。

【0016】

完全長抗体においては、各重鎖は重鎖可変領域(本明細書ではHCVRまたはVHと略される)および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は3つのドメイン、すなわち、CH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は軽鎖可変領域(本明細書ではLCVRまたはVL)および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は1つのドメイン、すなわち、CLから構成される。VHおよびVL領域は更に、相補性決定領域(CDR)と称される、超可変性の領域、およびそのなかに介在する、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存された領域に細分される。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へ以下の順序で配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫グロブリン分子は、いずれかのタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラスのものでありうる。

【0017】

抗体の「抗原結合性部分」なる語は、抗原(例えば、hTNF)に特異的に結合する能力を保有する、抗体の1以上のフラグメントを意味する。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のフラグメントにより果たされうる。そのような抗体実施形態は、二重特異性、二重特異的または多重特異性形態(すなわち、2以上の異なる抗原に特異的に結合する形態)でありうる。抗体の「抗原結合性部分」なる語に含まれる結合性フラグメントの例には、(i)VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価フラグメントであるFabフラグメント、(ii)ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントであるF(ab')₂フラグメント; (iii)VHおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント; (iv)抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFvフラグメント; (v)単一可変ドメインを含むdAbフラグメント(Wardら, (1989) Nature 341: 544-546, Winterら, PCT公開番号WO 90/05144); ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。更に、Fvフラグメントの2つのドメインであるVLおよびVHは別々の遺伝子によりコードされているが、それらは、VLおよびVH領域がペアになって一価分子を形成するようにそれらが単一タンパク質鎖として製造されることを可能にする合成リンカーにより、組換え法を用いて連結されうる(一本鎖Fv(scFv)として公知である; 例えば、Birdら(1988) Science 242: 423-426; およびHoustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい)。そのような一本鎖抗体(scF

10

20

30

40

50

v) も抗体の「抗原結合性部分」なる語に含まれると意図される。一本鎖抗体の他の形態、例えばジアボディも含まれる。ジアボディは二価二重特異性抗体であり、この場合、VHおよびVLドメインは単一ポリペプチド鎖上で発現されるが、同一鎖上のそれらの2つのドメインの対形成が可能となるには短過ぎるリンカーを用いており、したがって、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインと対形成し、2つの抗原結合部位を形成する(例えば、Holligerら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljakら, (1994) Structure 2:1121-1123を参照されたい)。そのような抗体結合部分は当技術分野で公知である(KontermannおよびDubel編, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5))。

10

【0018】

「抗体構築物」なる語は、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常ドメインに連結された1以上の抗原結合部分を含むポリペプチドを意味する。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合により連結された2以上のアミノ酸残基を含み、1以上の抗原結合性部分を連結するために使用される。そのようなリンカーポリペプチドは当技術分野でよく知られている(例えば、Holligerら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljakら(1994) Structure 2:1121-1123を参照されたい)。免疫グロブリン定常ドメインは重()鎖または軽(カッパおよびデルタ)鎖定常ドメインを意味する。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は当技術分野で公知であり、表2に示される。

20

【0019】

【表2】

表2: ヒトIgG重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインの配列

タンパク質	配列番号	配列
lgガンマ-1定常領域	配列番号2	12345678901234567890123456789012 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
lgガンマ-1定常領域 突然変異体	配列番号3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
lgカッパ定常領域	配列番号4	TVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
lgラムダ定常領域	配列番号5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

30

40

【0020】

更にまた、抗体またはその抗原結合性部分は、1以上の他のタンパク質またはペプチド

50

との該抗体または抗原結合性部分の共有結合または非共有結合により形成される、より大きな免疫接着分子の一部でありうる。そのような免疫接着分子の例には、四量体 s c F v 分子を形成させるためのストレプトアビジンコア領域の使用 (K i p r i y a n o v ら (1995) Human Antibod. Hybridom. 6:93-101)、ならびに二価およびビオチン化 s c F v 分子を形成させるためのシステイン残基、マーカーペプチドおよび C 末端ポリヒスチジンタグの使用 (K i p r i y a n o v ら (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058) が含まれる。抗体の抗原結合性部分、例えば F a b および F (a b ')₂ フラグメントは、完全抗体のそれぞれパインまたはペプシン消化のような通常の技術を用いて、完全抗体から製造されうる。更に、抗体、その抗原結合性部分および免疫接着分子は、本明細書に記載されている標準的な組換え D N A 技術を用いて得られうる。

10

【0021】

「単離された抗体」なる語は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含有しない抗体を意味する (例えば、h T N F に特異的に結合する単離された抗体は、h T N F 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含有しない)。しかし、h T N F に特異的に結合する単離された抗体は、他の抗原、例えば他の種に由来する T N F 分子に対する交差反応性を有しうる。さらに、単離された抗体は、他の細胞性物質および/または化学物質を実質的に含有しないことが可能である。

【0022】

「ヒト抗体」なる語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含む。該ヒト抗体は、例えば C D R、特に C D R 3 において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってはコードされないアミノ酸残基 (例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発により又はインビボでの体細胞突然変異により導入された突然変異) を含みうる。しかし、「ヒト抗体」なる語は、別の哺乳類種 (例えば、マウス) の生殖系列に由来する C D R 配列がヒトフレームワーク配列上にグラフト化された抗体を含むことを意図しない。

20

【0023】

「組換えヒト抗体」なる語は、組換え手段により製造、発現、作製もしくは単離された全てのヒト抗体、例えば、宿主細胞内にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体 (後記第 I I 節で更に詳しく説明される)、組換え組合せ (コンビナトリアル) ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体 (H o o g e n b o o m (1997) T I B Tech. 15:62-70; A z z a z y および H i g h s m i t h (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; G a v i l o n d o および L a r r i c k (2002) BioTechniques 29:128-145; H o o g e n b o o m および C h a m e s (2000) Immunol. Today 21:371-378)、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックである動物 (例えば、マウス) から単離された抗体 (例えば、T a y l o r ら, (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; K e l l e r m a n n および G r e e n (2002) Current Opin. Biotechnol. 13:593-597; L i t t l e ら (2000) Immunol. Today 21:364-370 を参照されたい)、または他の D N A 配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含むいずれかの他の手段により製造、発現、作製もしくは単離された抗体を含むと意図される。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかし、ある実施形態においては、そのような組換えヒト抗体はインビトロ突然変異誘発 (あるいは、ヒト I g 配列に関してトランスジェニックである動物が使用される場合には、インビボ体細胞突然変異誘発) に付され、したがって、組換え抗体の V H および V L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列 V H および V L 配列に由来しそれらと関連しているがインビボにおいてヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然で存在しない可能性のある配列である。

30

40

【0024】

50

「キメラ抗体」なる語は、1つの種からの重鎖および軽鎖可変領域配列と、別の種からの定常領域配列とを含む抗体、例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を意味する。

【0025】

「CDRグラフトイング(グラフト化)抗体」なる語は、1つの種からの重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体であって、VHおよび/またはVL領域のCDR領域の1以上の配列が別の種のCDR配列で置換されている抗体、例えば、ヒトCDR(例えば、CDR3)の1以上がマウスCDR配列で置換された、ヒト重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を意味する。

【0026】

「CDR」なる語は抗体可変配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて、該可変領域のそれぞれに関する、CDR1、CDR2およびCDR3と称される3つのCDRが存在する。「CDRセット」なる語は、抗原結合部位の単一可変領域(すなわち、VHまたはVL)内に存在する3つのCDRの群を意味する。これらのCDRの厳密な境界は、様々な系に従い様々に定義されている。Kabata(Kabataら(1987, 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland))により記載されている系は、抗体の任意の可変領域に適用可能な明確な残基番号付け系を提供するだけでなく、それらの3つのCDRを定める厳密な残基境界をも提供する。これらのCDRは Kabata CDRと称されうる。Chothiaら(ChothiaおよびLesk(1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917ならびにChothiaら(1989) Nature 342: 877-883)は、Kabata CDR内の或る小部分が、アミノ酸配列レベルで大きな多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同じペプチドバックボーンコンホメーションを取ることを見出した。これらの小部分はL1、L2およびL3またはH1、H2およびH3と命名された。ここで、「L」および「H」は、それぞれ軽鎖および重鎖領域を示す。これらの領域はChothia CDRと称されることがあり、これらは、Kabata CDRと重複する境界を有する。Kabata CDRと重複するCDRを定める他の境界はPadlanら(1995) FASEB J. 9: 133-139およびMacCallum(1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-745に記載されている。更に他のCDR境界の定義は前記系の1つに厳密に従わないかもしれないが、それでも、Kabata CDRに重複している。尤も、特定の残基もしくは残基群または更にはCDR全体は抗原結合に有意な影響を及ぼさないという予測または実験的知見を考慮して、それらは短く又は長くなっていることがある。ある実施形態は、KabataまたはChotiaにより定義されたCDRを用いているが、本発明で用いられる方法は、これらの系のいずれに従い定義されたCDRをも用いることが可能である。

【0027】

「Kabata番号付け」、「Kabata定義」および「Kabata標識」なる語は本明細書中では互換的に用いられる。これらの用語は、抗体またはその抗原結合性部分の重鎖および軽鎖可変領域内のアミノ酸残基を番号付けする系を意味する(Kabataら(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391およびKabataら(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of HealthおよびHuman Services, NIH Publication No. 91-3242)。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1ではアミノ酸31~35位、CDR2ではアミノ酸50~65位、そしてCDR3ではアミノ酸95~102位の範囲である。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1ではアミノ酸24~34位、CDR2ではアミノ酸50~56位、そしてCDR3ではアミノ酸89~97位の範囲である。

10

20

30

40

50

【0028】

過去20年間にわたる可変重鎖および軽鎖領域のアミノ酸配列の膨大な公開データベースの増大および分析は可変領域配列内のフレームワーク領域(FR)とCDR配列との間の典型的な境界の理解につながっており、Kabata番号付け、Chotia番号付け又は他の系に従いCDRを当業者が正確に決定することを可能にしている。例えば、Martin, In KontermannおよびDubel編, Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), 第31章, 432-433頁を参照されたい。可変重鎖(VH)および軽鎖(VL)領域のアミノ酸配列内のKabata CDRのアミノ酸配列を決定するための有用な方法を以下に示す。

10

【0029】

CDR-L1アミノ酸配列を特定するためには：

VL領域のアミノ末端からの約24個のアミノ酸残基から開始する；

CDR-L1配列の前の残基は常にシステイン(C)である；

CDR-L1配列の後の残基は常にトリプトファン(W)残基であり、典型的にはTrp-Tyr-Gln(W-Y-Q)であるが、Trp-Leu-Gln(W-L-Q)、Trp-Phe-Gln(W-F-Q)およびTrp-Tyr-Leu(W-Y-L)でもある；

長さは典型的には10~17アミノ酸残基である；

CDR-L2アミノ酸配列を特定するためには：

20

CDR-L1の末端の後の常に16残基から開始する；

CDR-L2配列の前の残基は一般にIle-Tyr(I-Y)であるが、Val-Tyr(V-Y)、Ile-Lys(I-K)およびIle-Phe(I-F)でもある；

長さは常に7アミノ酸残基である；

CDR-L3アミノ酸配列を特定するためには：

CDR-L2の末端の後の常に33アミノ酸から開始する；

CDR-L3アミノ酸配列の前の残基は常にシステイン(C)である；

CDR-L3配列の後の残基は常にPhe-Gly-X-Gly(F-G-X-G)(配列番号6)(ここで、Xは任意のアミノ酸である)である；

長さは典型的には7~11アミノ酸残基である；

30

CDR-H1アミノ酸配列を特定するためには：

VH領域のアミノ末端からの約31アミノ酸残基、および常にシステイン(C)の後の9残基から開始する；

CDR-H1配列の前の残基は常にCys-X-X-X-X-X-X-X-X(配列番号7)(ここで、Xは任意のアミノ酸である)である；

CDR-H1配列の後の残基は常にTrp(W)、典型的にはTrp-Val(W-V)であるが、Trp-Ile(W-I)およびTrp-Ala(W-A)でもある；

長さは典型的には5~7アミノ酸残基である；

CDR-H2アミノ酸配列を特定するためには：

常にCDR-H1の末端の後の15アミノ酸残基から開始する；

40

CDR-H2配列の後の残基は典型的にはLeu-Glu-Trp-Ile-Gly(L-E-W-I-G)(配列番号8)であるが、他の変異体でもある；

CDR-H2配列の後の残基はLys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala(K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A)である；

長さは典型的には16~19アミノ酸残基である；

CDR-H3アミノ酸配列を特定するためには：

常にCDR-H2の末端の後の33アミノ酸残基、および常にシステイン(C)'の後の3アミノ酸残基から開始する；

CDR-H3配列の前の残基は常にCys-X-X(C-X-X)(ここで、Xは任意

50

のアミノ酸である)、典型的にはCys - Ala - Arg (C - A - R)である;

CDR - H3配列の後の残基は常にTrp - Gly - X - Gly (W - G - X - G) (配列番号9) (ここで、Xは任意のアミノ酸である)である;

長さは典型的には3 ~ 25アミノ酸残基である。

【0030】

「アクセプター」および「アクセプター抗体」なる語は、フレームワーク領域の1以上のアミノ酸配列の少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または100%を提供またはコードする抗体または核酸配列を意味する。幾つかの実施形態においては、「アクセプター」なる語は、定常領域を提供またはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を意味する。更にもう1つの実施形態においては、「アクセプター」なる語は、フレームワーク領域および定常領域の1以上を提供またはコードする抗体アミノ酸または核酸配列を意味する。特定の実施形態においては、「アクセプター」なる語は、フレームワーク領域の1以上のアミノ酸配列の少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または100%を提供またはコードするヒト抗体アミノ酸または核酸配列を意味する。この実施形態においては、アクセプターは、ヒト抗体の特定の位置の1以上に存在しない少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個または少なくとも10個のアミノ酸残基を含有しうる。アクセプターフレームワーク領域および/またはアクセプター定常領域は、例えば、生殖系列抗体遺伝子、成熟抗体遺伝子、機能性抗体(例えば、当技術分野でよく知られた抗体、開発中の抗体または商業的に入手可能な抗体)から誘導または入手されうる。

10

20

【0031】

「カノニカル(canonical)」残基なる語は、Chothiaら(1987) J. Mol. Biol. 196:901-907およびChothiaら(1992) J. Mol. Biol. 227:799により定義される特定のカノニカルCDR構造を定めるCDRまたはフレームワーク内の残基を意味する。Chothiaらによると、多数の抗体のCDRの決定的に重要な位置は、アミノ酸配列レベルでの大きな多様性にもかかわらず、ほぼ同一のペプチドバックボーンコンホメーションを有する。各カノニカル構造は、主として、ループを形成するアミノ酸残基の連続的断片に関するペプチドバックボーンねじれ角の組合せを定める。

30

【0032】

「ドナー」および「ドナー抗体」なる語は、1以上のCDRを提供する抗体を意味する。特定の実施形態においては、ドナー抗体は、フレームワーク領域が入手または誘導された抗体とは異なる種からの抗体である。ヒト化抗体の場合、「ドナー抗体」なる語は、1以上のCDRを提供する非ヒト抗体を意味する。

【0033】

「フレームワーク」または「フレームワーク配列」なる語は、可変領域からCDRを除いた残存配列を意味する。CDR配列の厳密な定義は様々な系により決定されうるため、フレームワーク配列の意味もそれに依じて様々に解釈される。また、6個のCDR(軽鎖のCDR-L1、-L2および-L3ならびに重鎖のCDR-H1、-H2および-H3)は軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の4個の小領域(FR1、FR2、FR3およびFR4)に分割し、ここで、CDR1はFR1とFR2との間に位置し、CDR2はFR2とFR3との間に位置し、CDR3はFR3とFR4との間に位置する。その他により命名されるフレームワーク領域は、特定の領域をFR1、FR2、FR3またはFR4として定めることなく、単一の天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域内の組合せられたFRを表す。1つのFRはそれらの4個の小領域の1つを表し、複数のFRは、フレームワーク領域を構成する4つ的小領域の2以上を表す。

40

【0034】

ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は当技術分野で公知である。1つの実施形態においては、ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、V-base (<http://vba>

50

se.mrc-cpe.cam.ac.uk/)またはIMGT(登録商標)、international Immunogenetics information system(登録商標)(http://imgt.cines.fr/textes/IMGTreertoire/LocusGenes/)に列挙されている配列から選択される。もう一つの実施形態においては、ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、表3および表4に記載されている配列から選択される。

【0035】

【表3】

表3: 重鎖アクセプター配列

配列番号	タンパク質領域	配列
		12345678901234567890123456789012
10	VH1-18 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
11	VH1-18 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
12	VH1-18 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
13	VH7-4.1 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT
14	VH7-4.1FR2	WVRQAPGQGLEWMG
15	VH7-4.1 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR
16	JH1/JH4/JH5 FR4	WGQGTLVTVSS
17	JH2 FR4	WGRGTLVTVSS
18	JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
19	JH3 FR4	WGQGMVTVSS

10

20

【0036】

【表4】

表4: 軽鎖アクセプター配列

配列番号	タンパク質領域	配列
		12345678901234567890123456789012
20	1-39/012 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
21	1-39/012 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
22	1-39/012 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
23	6D-41/A14 FR1	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC
24	6D-41/A14 FR2	WYQQKPDQAPKLLIK
25	6D-41/A14 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTFITISLEAEDAATYYC
26	JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
27	JK5 FR4	FGQGTRLEIKR
28	JK1 FR4	FGQGTKVEIKR
29	JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
30	JK3 FR4	FGPGTKVDIKR

30

40

【0037】

「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」なる語は、特定の免疫グロブリンの発現のための遺伝的再編成および突然変異を招く成熟過程を受けていない非リンパ系細胞によりコードされる免疫グロブリン配列を意味する(例えば、Shapiroら(2002) Crit.Rev.Immunol.22(3):183-200; Marchalon

50

isら(2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30(2001)を参照されたい)。種々の実施形態によりもたらされる利点の1つは、生殖系列抗体遺伝子が、成熟抗体遺伝子の場合より、種における個体に特徴的な必須アミノ酸配列構造を保存している可能性が高く、したがって、その種で治療用に使用された場合に外来物として認識される可能性が低いという認識から生じるものである。

【0038】

「鍵」残基なる語は、抗体、特にヒト化抗体の結合特異性および/またはアフィニティに、より大きな影響を及ぼす、可変領域内の或る残基を意味する。鍵残基には、以下の1以上が含まれるが、それらに限定されるものではない：CDRに隣接する残基、潜在的グリコシル化部位(N-またはO-グリコシル化部位でありうる)、稀有残基、該抗原と相互作用しうる残基、CDRと相互作用しうる残基、カノニカル残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域との接触残基、パーニア領域内の残基、および可変重鎖CDR1のChotia定義と第1重鎖フレームワークのKabata定義とで重複する領域内の残基。

10

【0039】

「ヒト化抗体」なる語は、非ヒト種(例えば、マウス)からの重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体であるが、VHおよび/またはVL配列の少なくとも一部が、より「ヒト様」となるように、すなわち、ヒト生殖系列可変配列に、より類似したものとなるように改変されている抗体を意味する。1つのタイプのヒト化抗体はCDRグラフティング抗体であり、この場合、非ヒトCDR配列がヒトVHおよびVL配列内に導入されていて、対応する非ヒトフレームワーク(FR)配列に取って代わっている。例えば、「ヒト化抗体」は、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域と非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域(CDR)とを含む、関心のある抗原に免疫特異的に結合する抗体またはその変異体、誘導體、類似体もしくはフラグメント(断片)である。CDRの文脈における「実質的」なる語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または少なくとも約99%同一であるアミノ酸配列を有するCDRに関するものである。ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)の実質的に全てを含み、ここで、CDR領域の全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のものに対応し、フレームワーク領域の全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。1つの実施形態においては、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)(典型的にはヒト免疫グロブリンのもの)の少なくとも一部を含む。幾つかの実施形態においては、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインとの両方を含有する。該抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域を含みうる。幾つかの実施形態においては、ヒト化抗体はヒト化軽鎖だけを含有する。幾つかの実施形態においては、ヒト化抗体はヒト化重鎖だけを含有する。特定の実施形態においては、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび/またはヒト化重鎖だけを含有する。

20

30

【0040】

該ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含む任意のクラス、ならびにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4(これらに限定されるものではない)を含む任意のイソタイプの免疫グロブリンから選択されうる。該ヒト化抗体は2以上のクラスまたはイソタイプからの配列を含むことが可能であり、個々の定常ドメインは、当技術分野でよく知られた技術を用いて所望のエフェクター機能を最適化するように選択されうる。

40

【0041】

ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は親配列に厳密に対応している必要はなく、例えば、ドナー抗体CDRまたはコンセンサスフレームワークは少なくとも約1個のアミノ酸残基の置換、挿入および/または欠失により突然変異誘発されることが可能であり、その結果、その部位のCDRまたはフレームワーク残基はドナー抗体またはコンセン

50

サスフレームワークに対応していないことが可能である。特定の実施形態においては、そのような突然変異は広範なものではない。通常、該ヒト化抗体残基の少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、そして少なくとも約95%は親FRおよびCDR配列のものに対応しているであろう。「コンセンサスフレームワーク」なる語はコンセンサス免疫グロブリン配列内のフレームワーク領域を意味する。「コンセンサス免疫グロブリン配列」なる語は、関連免疫グロブリン配列のファミリーにおける最も頻繁に見出されるアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を意味する（例えば、Winnaker, (1987) From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germanyを参照されたい)。したがって、「コンセンサス免疫グロブリン配列」は「コンセンサス可変ドメイン」および/または「コンセンサス定常ドメイン」を含みうる。そして「コンセンサス可変ドメイン」は1以上の「コンセンサスフレームワーク領域」および/または1以上の「コンセンサスCDR」を含みうる。免疫グロブリンのファミリーにおいては、コンセンサス配列内の各位置は、該ファミリーにおけるその位置に最も頻繁に見出されるアミノ酸により占有されている。2つのアミノ酸が等しく頻繁に見出される場合、いずれかがコンセンサス配列内に含まれうる。

10

20

30

40

50

【0042】

「バーニア」領域なる語は、FooteおよびWinter (1992) J. Mol. Biol. 224: 487-499に記載されているとおり、CDR構造を調節し抗原に対する嵌合を微調整しうる、フレームワーク残基の部分集合を意味する。バーニア領域残基は、CDRの基礎をなす層を形成し、CDRの構造および抗体のアフィニティに影響を及ぼしうる。

【0043】

「多価結合性タンパク質」なる語は、本明細書においては、2以上の抗原結合性部位を含む結合性タンパク質を示すために用いられる。1つの実施形態においては、多価結合性タンパク質は、3以上の抗原結合性部位を有するように操作され、一般に、天然に存在する抗体ではない。「多重特異性結合性タンパク質」なる語は、2以上の関連または無関連標的に結合しうる結合性タンパク質を意味する。二重可変ドメイン(DVD)結合性タンパク質は、2以上の抗原結合性部位を含む結合性タンパク質であり、四価または多価結合性タンパク質である。そのようなDVD結合性タンパク質は単一特異性（すなわち、1つの抗原に結合可能）または多重特異性（すなわち、2以上の抗原に結合可能）でありうる。2つの重鎖DVDポリペプチドと2つの軽鎖DVDポリペプチドとを含むDVD結合性タンパク質はDVD-Ig（商標）分子と称される。DVD-Igの各半分は重鎖DVDポリペプチドおよび軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合性部位を含む。各結合性部位は重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含み、抗原結合性部位1個当たり合計6個のCDRが抗原結合に関与している。DVD結合性タンパク質およびDVD結合性タンパク質の製造方法は米国特許第7,612,181号に開示されている。

【0044】

1つの態様は、TNFに結合しうる結合性タンパク質を含むDVD結合性タンパク質に関する。1つの実施形態においては、該DVD結合性タンパク質はTNF-および第2の標的に結合しうる。

【0045】

「中和」なる語は、結合性タンパク質がサイトカインに結合する場合の、該サイトカインの生物活性の中和を意味する。1つの実施形態においては、中和結合性タンパク質は、hTNF-への結合がhTNF-の生物活性の抑制をもたらす、中和抗体である。1つの実施形態においては、中和結合性タンパク質はhTNF-に結合し、hTNF-の生物活性を少なくとも約120%、少なくとも約40%、少なくとも約60%、少なくとも約80%、少なくとも約85%またはそれ以上低下させる。中和結合性タンパク質によるhTNF-の生物活性の抑制は、当技術分野でよく知られたhTNF-生物活性の1以上の指標を測定することにより評価されうる。例えば、L929細胞に対するTNF

の細胞毒性の中和。

【0046】

「活性」なる語は、抗原に対する抗体（例えば、TNF - 抗原に結合する抗hTNF - 抗体）の結合特異性/アフィニティのような活性、および/または抗体（例えば、hTNF - に結合することによりhTNF - の生物活性を抑制する抗hTNF - 抗体）の中和効力（例えば、L929細胞に対するTNF の細胞毒性の中和）を含む。

【0047】

「エピトープ」なる語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合しうる任意のポリペプチド決定基を含む。ある実施形態においては、エピトープ決定基は、分子の、化学的に活性な表面基、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルを含み、ある実施形態においては、特定の三次元構造特性および/または特定の電荷特性を含む。エピトープは、抗体が結合する、抗原の領域である。したがって、エピトープは、特定の結合相手上の相補的部位に結合することが知られている抗原（またはその断片）の領域のアミノ酸残基からなる。抗原断片は2以上のエピトープを含有しうる。ある実施形態において、抗体が抗原に特異的に結合すると言えるのは、それがタンパク質および/または巨大分子の複合混合物内のその標的抗原を優先的に認識する場合である。したがって、エピトープは、特定の結合相手上の相補的部位に結合することが知られている抗原（またはその断片）の領域のアミノ酸残基からなる。抗原断片は2以上のエピトープを含有しうる。

10

【0048】

「表面プラズモン共鳴」なる語は、例えばBIACORE系（Biacore International AB (GE Healthcare company), Uppsala, Sweden および Piscataway, New Jersey) を使用して、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによりリアルタイムの生物特異的相互作用の分析を可能にする光学的現象を意味する。更に詳細な説明は、Jonssonら(1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19 - 26; Jonssonら(1991) Biotechniques 11: 620 - 627; Johanssonら(1995) J. Mol. Recognit. 8: 125 - 131; および Johnsonら(1991) Anal. Biochem. 198: 268 - 277を参照されたい。

20

30

【0049】

「Kon」なる語は、当技術分野で公知のとおり、例えば抗体/抗原複合体を形成するための、抗原への結合性タンパク質（例えば、抗体）の会合に関するオン(on)速度定数を意味する。「Kon」は「会合速度定数」または「Ka」なる語としても公知であり、これらは本明細書においては互換的に用いられる。抗体のその標的抗原への結合の速度または抗体と抗原との間の複合体形成の速度を示すこの値は、式：

抗体(「Ab」) + 抗原(「Ag」) $Ab - Ag$
によっても示される。

【0050】

「Koff」なる語は、当技術分野で公知のとおり、例えば抗体/抗原複合体からの、結合性タンパク質（例えば、抗体）の解離に関するオフ(off)速度定数を意味する。「Koff」は「解離速度定数」または「Kd」なる語としても公知であり、これらは本明細書においては互換的に用いられる。この値は、抗体のその標的抗原からの解離の速度、または遊離抗体および抗原へのAb - Ag複合体の経時的な分離を示し、以下の式：

$Ab + Ag \rightleftharpoons Ab - Ag$

により示される。

40

【0051】

本明細書において互換的に用いられる「平衡解離定数」または「KD」なる語は、平衡時に力価測定において、または解離速度定数(koff)を会合速度定数(kon)により割り算することにより得られる値を意味する。会合速度定数、解離速度定数および平衡

50

解離定数は、抗原に対する抗体の結合アフィニティを表すために用いられる。会合および解離速度定数を決定するための方法は当技術分野でよく知られている。蛍光に基づく技術の利用は、高い感度、および平衡時の生理的バッファー中のサンプルを検査する能力をもたらす。他の実験アプローチおよび装置、例えばB I A C O R E (生体分子相互作用分析)アッセイも用いられうる(例えば、B i a c o r e I n t e r n a t i o n a l A B (G E H e a l t h c a r e c o m p a n y), U p p s a l a, S w e d e n から入手可能な装置)。また、S a p i d y n e I n s t r u m e n t s (B o i s e, I d a h o) から入手可能なK i n e X A (登録商標)(K i n e t i c E x c l u s i o n A s s a y)アッセイも用いられうる。

【0052】

「標識(された)結合性タンパク質」なる語は、該結合性タンパク質が何であることを示す標識を有するタンパク質を意味する。1つの実施形態においては、標識は、検出可能なマーカー、例えば、放射能標識アミノ酸の取り込み、またはマーカー付きアビジン(例えば、光学的方法または比色法により検出されうる蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン)により検出されうるビオチン化部分の、ポリペプチドへの結合である。ポリペプチドに対する標識の例には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない:放射性同位体または放射性核種(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho および/または ^{153}Sm)；蛍光標識(例えば、F I T C、ローダミンおよびランタニドりん光体)、酵素標識(例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)；化学発光マーカー；ビオチニル基；第2のレポーターにより認識される所定ポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメインおよびエピトープタグ)；および磁性物質、例えばガドリニウムキレート。

【0053】

「抗体コンジュゲート」なる語は、第2の化学的部分(例えば、治療用または細胞毒性物質)に化学的に連結された結合性タンパク質(例えば、抗体)を意味する。「物質」なる語は、化合物、化合物の混合物、生物学的巨大分子、または生物学的材料から調製された抽出物を示す。1つの実施形態においては、該治療用または細胞毒性物質には、百日咳毒素、タキソール(taxol)、サイトカラシン(cytochalasin) B、グラミシジン(gramicidin) D、臭化エチジウム、エメチン(emetine)、マイトマイシン(mitomycin)、エトポシド(etoposide)、テノポシド(tenoposide)、ビンクリスチン(vincristine)、ビンブラスチン(vinblastine)、コルヒシン(colchicine)、ドキシソルピシン(doxorubicin)、ダウノルピシン(daunorubicin)、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン(mitoxantrone)、ミトラマイシン(mithramycin)、アクチノマイシン(actinomycin) 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(procaine)、テトラカイン(tetracaine)、リドカイン(lidocaine)、プロプラノロール(propranolol)およびピューロマイシン(puromycin)ならびにそれらの類似体またはホモログが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0054】

「結晶」または「結晶化」なる語は、結晶の形態で存在する抗体またはその抗原結合性部分に関するものである。結晶は物質の固体状態の一形態であり、これは、アモルファス固体状態または液体結晶状態のような他の形態から区別される。結晶は、原子、イオン、分子(例えば、抗体のようなタンパク質)または分子集合体(例えば、抗原/抗体複合体)の、規則的な反復性三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、当分野で十分に理解されている特定の数学的關係に従い配置されている。結晶において反復される基本単位、すなわち、ビルディングブロック(構成単位)は、非対称単位と称される。ある与えられた十分に定められた結晶対称に合致する配置における非対称単位の反復は結晶の「

10

20

30

40

50

単位格子」を与える。全ての三次元における規則的な並進による単位格子の反復は結晶を与える。GiegeおよびDucruix(1999) *Crystallization of Nucleic AcidsおよびProteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York*)を参照されたい。

【0055】

「ポリヌクレオチド」なる語は2以上のヌクレオチドの重合形態を意味し、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたはいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾形態を含む。該用語はDNAまたはRNAの一本鎖および二本鎖形態を含む。

【0056】

「単離(された)ポリヌクレオチド」なる語は、天然でそれに付随する、または天然でそれに機能的に連結されている、またはより大きな配列の一部として天然でそれと共に存在するポリヌクレオチドの全部または一部を伴わないポリヌクレオチド(例えば、ゲノム、cDNAもしくは合成由来のもの、またはそれらの組合せ)を意味する。

【0057】

「ベクター」なる語は、それに連結されている別の核酸を運搬しうる核酸分子を意味する。1つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは、追加的DNA断片が連結されうる環状二本鎖DNAループを意味する。もう1つのタイプのベクターはウイルスベクターであり、この場合、ウイルスゲノム内に追加的DNA断片が連結されうる。あるベクターは、それが導入される宿主細胞において自律複製する能力を有する(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は宿主細胞内への導入に際して宿主細胞のゲノム内に組込まれることが可能であり、それにより、宿主ゲノムと共に複製されうる。更に、あるベクターは、それが機能的に連結されている遺伝子の発現を導きうる。そのようなベクターは本明細書においては「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用される形態のベクターであるため、本明細書においては「プラスミド」および「ベクター」は互換的に用いられうる。しかし、該実施形態は、同等の機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような他の形態の発現ベクターを含むと意図される。

【0058】

「機能的に連結(された)」なる語は、意図される状態で機能するような成分の配置を意味する。コード配列に「機能的に連結」された制御配列は、該制御配列に適合した条件下で該コード配列の発現が達成されるように連結されている。「機能的に連結」された配列は、関心のある核酸に隣接した発現制御配列、およびトランスで作用する(すなわち、関心のある核酸とは異なる核酸分子上に位置するが、それでも、関心のある核酸に対する制御をもたらす)発現制御配列、および関心のある核酸と同じ核酸分子上に位置するが、該関心核酸から或る距離を隔てて位置する発現制御配列を含む。「発現制御配列」なる語は、それが連結されているコード配列の発現およびプロセッシングを行うのに必要なポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列には、適当な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列; 効率的RNAプロセッシングシグナル、例えばスプライシングおよびポリアデニル化シグナル; 細胞質mRNAを安定化する配列; 翻訳を効率的に増強する配列(すなわち、コザックコンセンサス配列); タンパク質安定性を増強する配列; 所望により、タンパク質分泌を増強する配列が含まれる。そのような制御配列の性質は宿主生物に応じて様々であり、原核生物においては、そのような制御配列は一般にプロモーター、リボソーム結合部位および転写終結配列を包含し、真核生物においては、一般に、そのような制御配列はプロモーターおよび転写終結配列を包含する。「制御配列」なる語は、発現およびプロセッシングのために存在が必須である成分を含むと意図され、存在することが有利である追加的成分、例えばリーダー配列および融合相手の配列をも含むうる。

10

20

30

40

50

【0059】

本明細書中で定義される「形質転換」は、外在性DNAが宿主細胞に進入する任意の過程を意味する。形質転換は、例えば、原核または真核宿主細胞内への外来核酸配列の挿入のための当技術分野でよく知られた種々の方法を用いて、天然または人工的条件下で行われうる。該方法は、形質転換される宿主細胞に基づいて選択され、ウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクションおよび粒子射出（これらに限定されるものではない）を含みうる。そのような「形質転換」細胞には、自律複製性プラスミドとして又は宿主染色体の一部として宿主挿入DNAが複製されうる安定に形質転換された細胞が含まれる。それらにはまた、挿入されたDNAまたはRNAを一定期間にわたり一過性に発現する細胞が含まれる。

10

【0060】

「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）なる語は、外在性DNAが導入された細胞を意味する。そのような用語は、個々の対象細胞だけでなく、そのような細胞の後代をも意味すると理解されるべきである。突然変異または環境的影響により、後続世代において、ある修飾が生じうるため、そのような後代は、実際には、親細胞と同一でない可能性があるが、「宿主細胞」なる語の範囲内に尚も含まれる。1つの実施形態においては、宿主細胞には、生物界のいずれかから選択される原核細胞および真核細胞が含まれる。1つの実施形態においては、真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞が含まれる。1つの実施形態においては、宿主細胞には、原核細胞系である大腸菌(*E. coli*)；哺乳類細胞系であるCHO、HEK293およびCOS；昆虫細胞系であるSf9；ならびに真菌細胞であるサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0061】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成ならびに組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーションおよびリポフェクション）には、標準的な技術が用いられうる。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明に従い、または当技術分野で一般に行われているとおりに、または本明細書に記載されているとおりに行われうる。前記技術および方法は、一般に、当技術分野でよく知られている通常の方法に従い、ならびに本明細書の全体にわたって引用され記載されている種々の全般的な及びより具体的な参考文献に記載されているとおりに行われうる。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))を参照されたい。

30

【0062】

「トランスジェニック生物」なる語は、トランスジーンを含有する細胞を有する生物を意味し、ここで、該生物（または該生物の祖先）内に導入されたトランスジーンは、該生物内で天然では発現されないポリペプチドを発現する。「トランスジーン」は、トランスジェニック生物が発生する細胞のゲノム内に安定かつ機能的に組込まれたDNA構築物であり、トランスジェニック生物の細胞型または組織の1以上におけるコード化遺伝子産物の発現を導く。

40

【0063】

「調節」および「モジュレーション」なる語は互換的に用いられ、関心のある分子の活性（例えば、hTNF- α の生物活性）の変化または改変を意味する。モジュレーションは、関心のある分子の或る活性または機能の大きさの増加または減少でありうる。分子の典型的な活性および機能には、結合特性、酵素活性、細胞受容体活性およびシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0064】

それに対応して、「モジュレーター」なる語は、関心のある分子の活性または機能（例えば、hTNF- α の生物活性）を変化させ又は改変しうる化合物を意味する。例えば、モジュレーターは、該モジュレーターの非存在下で観察される活性または機能の大きさと

50

比較して、分子の或る活性または機能の大きさの増加または減少を引き起こしうる。ある実施形態においては、モジュレーターはインヒビターであり、これは、分子の活性または機能の少なくとも1つの大きさを減少させる。典型的なインヒビターには、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチボディ、炭水化物または小さな有機分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。ペプチボディは例えばW O 0 1 / 8 3 5 2 5に記載されている。

【0065】

「アゴニスト」なる語は、関心のある分子と接触した場合に、該アゴニストの非存在下で観察される活性または機能の大きさと比較して該分子の或る活性または機能の大きさの増加を引き起こすモジュレーターを意味する。関心のある特定のアゴニストには、TNF - ポリペプチドまたはポリペプチド、核酸、炭水化物、またはhTNF - に結合するいずれかの他の分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0066】

「アンタゴニスト」または「インヒビター」なる語は、関心のある分子と接触した場合に、該アンタゴニストの非存在下で観察される活性または機能の大きさと比較して該分子の或る活性または機能の大きさの減少を引き起こすモジュレーターを意味する。関心のある特定のアンタゴニストには、hTNF - の生物活性または免疫活性を遮断またはモジュレーションするものが含まれる。hTNF - のアンタゴニストおよびインヒビターには、タンパク質、核酸、炭水化物、またはhTNF - に結合するいずれかの他の分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0067】

「有効量」なる語は、障害またはその症状の1以上の重症度および/または持続時間を軽減または改善し、障害の進行を妨げ、障害の退縮を引き起こし、障害に関連した1以上の症状の再発、発生、開始または進行を妨げ、障害を検出し、あるいは別の療法（例えば、予防用または治療用物質）の予防または治療効果を増強または改善するのに十分である療法の量を意味する。

【0068】

「生物学的サンプル」なる語は、生きている生物または以前は生きていた生物からの、いずれかの量の物質を含む。そのような生物には、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよび他の動物が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような物質には、血液、血清、尿、滑液、細胞、生物、組織、骨髄、リンパ節および脾臓が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0069】

I. ヒトTNF - に結合する抗体

1つの態様は、高いアフィニティ、遅いオフ（off）速度および高い中和能でTNF に結合する単離されたマウスモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。第2の態様は、TNF - に結合するキメラ抗体を提供する。第3の態様は、TNF - に結合するCDRグラフティング抗体またはその抗原結合性部分を提供する。第4の態様は、TNF - に結合するヒト化抗体またはその抗原結合性部分を提供する。1つの実施形態においては、該抗体またはその一部分は、単離された抗体である。1つの実施形態においては、該抗体は中和ヒト抗TNF - 抗体である。

40

【0070】

A. 抗TNF - 抗体の製造方法

抗体は、当技術分野で公知の幾つかの技術のいずれかにより製造されうる。

【0071】

1. ハイブリドーマ技術を用いる場合の抗TNF - モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え体およびファージ提示技術またはそれらの組合せの利用を含む当技術分野で公知の多種多様な技術を用いて製造されうる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、例えば、当技術分野で公知であり例えばHarlowら, Antibodies: A Laboratory Manual,

50

2nd ed., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerlingら編, in: Monoclonal Antibodiesおよび T-Cell Hybridomas "In Research Monographs in Immunology, vol. 3 (総編集者: J. L. Turk) (Elsevier, N. Y., 1981)に教示されているものを用いて製造されうる。「モノクローナル抗体」なる語は、ハイブリドーマ技術により製造された抗体には限定されない。「モノクローナル抗体」なる語は、任意の真核生物、原核生物またはファージクローンを含む単クローンから誘導された抗体を意味し、それが製造された方法に関するものではない。

【0072】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を製造しスクリーニングするための方法は当技術分野で常套的なものであり、よく知られている。1つの実施形態は、モノクローナル抗体を作製する方法を提供し、また、抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することを含む方法により製造された抗体を提供し、ここで、1つの実施形態においては、該ハイブリドーマは、抗原で免疫化されたマウスから単離された脾細胞を骨髄腫細胞と融合させ、該融合から生じたハイブリドーマを、ポリペプチドに結合しうる抗体を分泌するハイブリドーマクローンに関してスクリーニングすることにより作製される。簡潔に説明すると、マウスをTNF- 抗原で免疫化することが可能である。1つの実施形態においては、該TNF- 抗原は、免疫応答を刺激するためにアジュバントと共に投与される。そのようなアジュバントには、完全もしくは不完全フロイントアジュバント、RIBI (ムラミジペプチド) またはISCOM (免疫刺激性複合体) が含まれる。そのようなアジュバントは、該ポリペプチドを、それを局所沈着物中に隔離することにより、迅速な分散を防ぎ、あるいはそれは、マクロファージに関して走化性である因子および免疫系の他の成分を分泌するように宿主を刺激する物質を含有しうる。1つの実施形態においては、ポリペプチドが投与される場合、該免疫化計画は、数週間にわたる、該ポリペプチドの、2以上の投与を含むであろう。

【0073】

TNF- 抗原での動物の免疫化の後、該動物から抗体および/または抗体産生細胞が得られうる。該動物からの採血または該動物の犠死により、該動物から抗TNF- 抗体含有血清を得る。該血清は、該動物から得られたままの状態で使用されることが可能であり、あるいは該血清から免疫グロブリン画分が得られることが可能であり、あるいは該血清から抗TNF- 抗体が精製されることが可能である。このようにして得られた血清または免疫グロブリンはポリクローナルであり、したがって一連の不均一な特性を有する。

【0074】

免疫応答が検出されたら (例えば、抗原TNF- に特異的な抗体がマウス血清中で検出されたら)、該マウス脾臓を摘出し、脾細胞を単離する。ついで該脾細胞を、よく知られた技術により、いずれかの適当な骨髄腫細胞 (例えば、ATCCから入手可能な細胞系P20からの細胞) と融合させる。ハイブリドーマを選択し、クローニングする (これは、限界希釈により行う)。ついで、当技術分野で公知の方法により、該ハイブリドーマを、TNF- に結合しうる抗体を分泌する細胞に関してアッセイする。一般に高レベルの抗体を含有する腹水が、陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫化することにより得られうる。

【0075】

もう1つの実施形態においては、該免疫化動物から抗体産生不死化ハイブリドーマが製造されうる。免疫化後、該動物を犠死させ、当技術分野でよく知られているとおりに、脾B細胞を不死化骨髄腫細胞と融合させる。例えば、HarlowおよびLane, 前掲を参照されたい。1つの実施形態においては、該骨髄腫細胞は免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない (非分泌細胞系)。融合および抗生物質選択の後、TNF- もしくはその一部分、またはTNF- を発現する細胞を使用して、該ハイブリドーマをスクリーニングする。1つの実施形態においては、酵素結合イムノアッセイ (ELISA) またはラジ

10

20

30

40

50

オイムノアッセイ (RIA) を用いて、初期スクリーニングを行う。ELISAスクリーニングの一例はPCT公開番号WO 00/37504に記載されている。

【0076】

抗TNF- 抗体産生ハイブリドーマを選択し、クローニングし、後記で更に詳しく記載されているとおり、活発なハイブリドーマ成長、高い抗体産生および望ましい抗体特性を含む望ましい特性に関して更にスクリーニングする。インビボで同系動物において、免疫系を欠く動物 (例えば、ヌードマウス) において、またはインビトロで細胞培養において、ハイブリドーマを培養し、増殖させることが可能である。ハイブリドーマの選択、クローニングおよび増殖のための方法は当業者によく知られている。

【0077】

1つの実施形態においては、該ハイブリドーマは前記のマウスハイブリドーマである。もう1つの実施形態においては、該ハイブリドーマは、非ヒト非マウス種、例えばラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマにおいて産生される。もう1つの実施形態においては、該ハイブリドーマはヒトハイブリドーマであり、この場合、ヒト非分泌性骨髄腫を、抗TNF- 抗体を発現するヒト細胞と融合させる。

【0078】

特異的エピトープを認識する抗体フラグメントは公知技術により作製されうる。例えば、FabおよびF(ab')₂フラグメントは、パパイン (Fabフラグメントを製造する場合) またはペプシン (F(ab')₂フラグメントを製造する場合) のような酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により製造されうる。F(ab')₂フラグメントは可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含有する。

【0079】

2. SLAMを用いる場合の抗TNF- モノクローナル抗体

もう1つの態様においては、米国特許第5,627,052号、PCT公開番号WO 92/02551およびBabcookら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848に記載されている選択リンパ球抗体法 (selected lymphocyte antibody method) (SLAM) と当技術分野で呼ばれている方法を用いて、単一の単離されたリンパ球から組換え抗体を製造する。この方法においては、関心のある抗体を分泌する単一細胞 (例えば、免疫化動物から誘導されたリンパ球) を、抗原特異的溶血ブランクアッセイを用いてスクリーニングする。この場合、抗原TNF-、TNF- のサブユニットまたはそれらの断片を、例えばビオチンのようなリンカーを使用してヒツジ赤血球に結合させ、それを使用して、TNF- に対する特異性を有する抗体を分泌する単一細胞を特定する。関心のある抗体分泌細胞の特定の後、逆転写PCRにより、重鎖および軽鎖可変領域cDNAを該細胞からレスキューし、ついで、哺乳類宿主細胞、例えばCOSまたはCHO細胞内で、適当な免疫グロブリン定常領域 (例えば、ヒト定常領域) のコンテキストで、これらの可変領域を発現させることが可能である。インビボで選択されたリンパ球から誘導された、増幅免疫グロブリン配列でトランスフェクトされた宿主細胞を次いで、例えば、該トランスフェクト化細胞をパンニングして、TNF- に対する抗体を発現する細胞を単離することにより、更なる分析およびインビトロでの選択に付すことが可能である。該増幅免疫グロブリン配列を更に、例えばインビトロアフィニティ成熟法 (例えば、PCT公開番号WO 97/29131およびWO 00/56772に記載されているもの) により、インビトロで操作することが可能である。

【0080】

3. トランスジェニック動物を使用する場合の抗TNF- モノクローナル抗体

もう1つの実施形態においては、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含む非ヒト動物をTNF- 抗原で免疫化することにより、抗体を製造する。1つの実施形態においては、該非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大断片を含む、マウス抗体産生を欠損している操作マウス系統であるXENOMOUSE (登録商標) トランスジェニックマウスである。例えば、Greenら (1994) Nature Genet. 7

10

20

30

40

50

: 13 - 21 ならびに米国特許第 5, 916, 771 号、第 5, 939, 598 号、第 5, 985, 615 号、第 5, 998, 209 号、第 6, 075, 181 号、第 6, 091, 001 号、第 6, 114, 598 号および第 6, 130, 364 号を参照されたい。また、PCT 公開番号 WO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560 および WO 00/37504 も参照されたい。XENOMOUSE (登録商標) トランスジェニックマウスは完全ヒト抗体の成体様ヒトレパトワを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を産生する。XENOMOUSE (登録商標) トランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座および \times 軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖系列配置 YAC 断片の導入により、ヒト抗体レパトワの約 80% を含有する。Mendezら (1997) Nature Genet. 15: 146 - 156 ならびに Green および Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188: 483 - 495 を参照されたい。

10

【0081】

4. 組換え抗体ライブラリーを使用する場合の抗 TNF - モノクローナル抗体

該抗体を製造するために、インビトロ法も用いられうる。この場合、抗体ライブラリーをスクリーニングして、所望の結合特異性を有する抗体を特定する。組換え抗体ライブラリーのそのようなスクリーニングのための方法は当技術分野でよく知られており、例えば以下のものに記載されている方法を含む：米国特許第 5, 223, 409 号；PCT 公開番号 WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690；WO 97/29131；Fuchsら (1991) Bio/Technology 9: 1369 - 1372；Hayら (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81 - 85；Huseら (1989) Science 246: 1275 - 1281；McCaffertyら (1990) Nature 348: 552 - 554；Griffithsら (1993) EMBO J. 12: 725 - 734；Hawkinsら (1992) J. Mol. Biol. 226: 889 - 896；Clacksonら (1991) Nature 352: 624 - 628；Gramら (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576 - 3580；Garrardら (1991) Bio/Technology 9: 1373 - 1377；Hoogenboomら (1991) Nucl. Acids Res. 19: 4133 - 4137；および Barbasaら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978 - 7982、および米国特許公開第 2003/0186374 号。

20

30

【0082】

該組換え抗体は、TNF - または TNF - の一部分で免疫化された対象からのものでありうる。あるいは、該組換え抗体ライブラリーは、ナイーブ対象、すなわち、TNF - で免疫化されていない者からのもの、例えば、ヒト TNF - で免疫化されていないヒト対象からのヒト抗体ライブラリーでありうる。ヒト TNF - を含むペプチドで組換え抗体ライブラリーをスクリーニングし、それにより、TNF - を認識する抗体を選択することにより、抗体を選択する。そのようなスクリーニングおよび選択を行うための方法は当技術分野でよく知られており、例えば、前段落における参考文献に記載されている。hTNF - に対する特定の結合アフィニティを有する抗体 (例えば、特定の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離するもの) を選択するためには、表面プラズモン共鳴の当技術分野で公知の方法を用いて、所望の k_{off} 速度定数を有する抗体を選択することが可能である。hTNF - に対する特定の中和活性を有する抗体 (例えば、特定の IC_{50} を有するもの) を選択するためには、hTNF - 活性の抑制を評価するための当技術分野で公知の標準的な方法が用いられうる。

40

【0083】

50

1つの態様は、ヒトTNF- α に結合する単離された抗体またはその抗原結合性部分に関する。1つの実施形態においては、該抗体は中和抗体である。種々の実施形態においては、該抗体は組換え抗体またはモノクローナル抗体である。

【0084】

例えば、該抗体は、当技術分野で公知の種々のファージ提示法を用いることによっても製造されうる。ファージ提示法においては、機能性抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を含有するファージ粒子の表面上に提示される。特に、レパトワまたは組合せ抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現された抗原結合性ドメインを提示させるために、そのようなファージが使用されうる。関心のある抗原に結合する抗原結合性ドメインを発現するファージは、例えば、標識抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して、該抗原で選択または特定されうる。これらの方法において使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIタンパク質に組換え的に融合しているFab、Fvまたはジスルフィドにより安定化されたFv抗体ドメインを伴ってファージから発現されるfdおよびM13結合性ドメインを含む繊維状ファージである。該抗体を製造するために用いられうるファージ提示法の例には、以下のもの開示されているものが含まれる：Brinkmannら（1995）*J. Immunol. Methods* 182:41-50；Amesら（1995）*J. Immunol. Methods* 184:177-186；Kettlboroughら（1994）*Eur. J. Immunol.* 24:952-958；Persicら（1997）*Gene* 187:9-18；Burtonら（1994）*Adv. Immunol.* 57:191-280；PCT出願番号PCT/GB91/01134；PCT公開番号WO 90/02809；WO 91/10737；WO 92/01047；WO 92/18619；WO 93/11236；WO 95/15982；WO 95/20401；ならびに米国特許第5,698,426号；第5,223,409号；第5,403,484号；第5,580,717号；第5,427,908号；第5,750,753号；第5,821,047号；第5,571,698号；第5,427,908号；第5,516,637号；第5,780,225号；第5,658,727号；第5,733,743号および第5,969,108号。

【0085】

ファージ選択後、該ファージから抗体コード領域を単離し、それを使用して、ヒト抗体を含む完全抗体またはいずれかの他の所望の抗原結合性フラグメントを得ることが可能であり、該抗体コード領域は、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含むいずれかの所望の宿主内で発現されうる（例えば、本明細書に詳細に記載されているとおりに行われうる）。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを組換え製造するための技術も、当技術分野で公知の方法、例えば、PCT公開番号WO 92/22324；Mullinaxら（1992）*BioTechniques* 12(6):864-869；Sawaiら（1995）*Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34；およびBetterら（1988）*Science* 240:1041-1043に開示されているものを用いて利用されうる。一本鎖Fvおよび抗体を製造するために用いられうる技術の例には、米国特許第4,946,778号および第5,258,498号；Houstonら（1991）*Methods Enzymol.* 203:46-88；Shuら（1993）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999；ならびにSkerraら（1988）*Science* 240:1038-1041に記載されているものが含まれる。

【0086】

ファージ提示による組換え抗体ライブラリーのスクリーニングの代替手段として、大きな組合せライブラリースクリーニングするための当技術分野で公知の他の方法が二重特異性抗体の特定のために適用されうる。1つのタイプの代替的発現系は、PCT公開番号WO 98/31700ならびにRobertsおよびSzostak（1997）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302に記載されて

10

20

30

40

50

いるとおりの、組換え抗体ライブラリーがRNA-タンパク質融合体として発現されるものである。この系においては、mRNAとそれがコードするペプチドまたはタンパク質との間に、それらの3'末端にピューロマイシン(ペプチジルアクセプター抗生物質である)を含有する合成mRNAのインビトロ翻訳により共有結合融合が生じる。したがって、コード化ペプチドまたはタンパク質(例えば、抗体またはその一部分)の特性(例えば、二重特異性抗原への該抗体またはその一部分の結合)に基づいて、特異的mRNAがmRNAの複合混合物(例えば、組合せライブラリー)から富化されうる。そのようなライブラリーのスクリーニングから回収された、抗体またはその一部分をコードする核酸配列は、前記のとおり(例えば、哺乳類宿主細胞内で)、組換え手段により発現されることが可能であり、更に、最初に選択された配列内に突然変異が導入されたmRNA-ペプチド融合体の追加的ラウンドのスクリーニングによる、または前記のとおり組換え抗体のインビトロでのアフィニティ(親和性)成熟のための他の方法による更なるアフィニティ成熟に付されることが可能である。

10

20

30

40

50

【0087】

もう1つのアプローチにおいては、該抗体は、当技術分野で公知の酵母提示法を用いることによっても製造されうる。酵母提示法においては、抗体ドメインを酵母細胞壁に連結し、それらを酵母の表面上に提示するために、遺伝的方法が用いられる。特に、そのような酵母は、レパトワまたは組合せ抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現された抗原結合性ドメインを提示するために使用されうる。該抗体を製造するために用いられうる酵母提示法の例には、米国特許第6,699,658号に開示されているものが含まれる。

【0088】

B. 組換えTNF- 抗体の製造

抗体は、当技術分野で公知の幾つかの技術のいずれかにより製造されうる。例えば、宿主細胞からの発現が挙げられ、この場合、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターが標準的な技術により宿主細胞内にトランスフェクトされる。「トランスフェクション」なる語の種々の形態は、外在性DNAを原核または真核宿主細胞内に導入するために一般的に用いられる多種多様な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを含むと意図される。原核または真核宿主細胞のいずれにおいても、1つの実施形態においては哺乳類宿主細胞において、該抗体を発現させることが可能であるが、真核細胞(および特に哺乳類細胞)は、適切に折り畳まれており免疫学的に活性な抗体を構築し分泌する可能性が原核細胞の場合より高い。

【0089】

組換え抗体を発現させるための哺乳類宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えばKaufmanおよびSharp(1982)J. Mol. Biol. 159:601-621に記載されているDHFR選択マーカールと共に使用される、UrlaubおよびChasin(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されているdhfr- CHO細胞を含む)、NS0骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞が含まれる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞内に導入したら、該宿主細胞における該抗体の発現、および宿主細胞が培養される培地内への該抗体の分泌を可能にするのに十分な期間にわたって、該宿主細胞を培養することにより、該抗体を産生させる。標準的なタンパク質精製方法を用いて、該培地から抗体を回収することが可能である。

【0090】

機能性抗体フラグメント、例えばFabフラグメントまたはscFv分子を製造するためにも、宿主細胞が使用されうる。前記方法の変法も該実施形態の範囲内であると理解されるであろう。例えば、抗体の軽鎖および/または重鎖の機能性フラグメントをコードするDNAで宿主細胞をトランスフェクトすることが望ましいかもしれない。組換えDNA技術は、関心のある抗原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のDNAの一部または全部を除去するためにも使用されうる。そのようなトランケート化DNA分

子から発現される分子も該抗体に含まれる。また、一方の重鎖および一方の軽鎖が抗体であり、他方の重鎖および軽鎖が、関心のある抗原以外の抗原に特異的である、二官能性抗体が、標準的な化学的架橋法により抗体を第2の抗体に架橋することにより製造されうる。

【0091】

抗体またはその抗原結合性部分の組換え発現のための典型的な系においては、抗体重鎖と抗体軽鎖との両方をコードする組換え発現ベクターをリン酸カルシウム媒介性トランスフェクションにより dhfr - CHO細胞内に導入する。該組換え発現ベクターにおいては、該抗体重鎖および軽鎖遺伝子はそれぞれ、該遺伝子の高レベルの転写を駆動するために CMVエンハンサー / AdMLPプロモーター調節要素に機能的に連結されている。該組換え発現ベクターはまた、該ベクターでトランスフェクトされた CHO細胞の、メトトレキセート選択 / 増幅を用いる選択を可能にする DHFR 遺伝子を含有する。選択された形質転換宿主細胞を、該抗体重鎖および軽鎖の発現が可能となるように培養し、完全抗体を培地から回収する。該組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、該抗体を培地から回収するためには、標準的な分子生物学的技術を用いる。更にまた、組換え抗体が合成されるまで適当な培地内で宿主細胞を培養することによる組換え抗体の合成方法を提供する。該方法は更に、該組換え抗体を培地から単離することを含みうる。

10

【0092】

1. 抗 hTNF - 抗体

表5はマウス抗 hTNF - 抗体の VH および VL 領域のアミノ酸配列の一覧である。

20

【0093】

【表5】

表5: マウス抗 hTNF- α 抗体の VH および VL 領域のアミノ酸配列の一覧

配列番号	タンパク質領域		配列
			123456789012345678901234567890
31	VH MAK199		QIQLVQSGPELKKPGETVMISCKASGYTFT NYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY ADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNED TATYFCARKFLTTVVVTDYAMDYWGQGTSV TVSS
	VH MAK199 CDR-H1	配列番号 31 の 残基 31-35	NYGMN
	VH MAK199 CDR-H2	配列番号 31 の 残基 50-66	WINTYTGEPTYADDFKG
	VH MAK199 CDR-H3	配列番号 31 の 残基 99-113	KFLTTVVVTDYAMDY
32	VL MAK199		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIS NYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLQSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPPTFGVGTKLELK
	VL MAK199 CDR-L1	配列番号 32 の 残基 24-34	RASQDISNYLN
	VL MAK199 CDR-L2	配列番号 32 の 残基 50-56	YTSRLQS
	VL MAK199 CDR-L3	配列番号 32 の 残基 89-97	QQGNTLPPT

10

20

30

50

【0094】

2. 抗 hTNF - キメラ抗体

キメラ抗体は、由来する動物種によって異なる抗体部分を含有する分子、例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体である。キメラ抗体の製造方法は当技術分野で公知であり、実施例に詳細に記載されている。例えば、Morrisson (1985) Science 229:1202; Oira (1986) BioTechniques 4:214; Gilliesら (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; ならびに米国特許第5,807,715号、第4,816,567号および第4,816,397号を参照されたい。また、適当な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子を、適当な生物活性のヒト抗体分子からの遺伝子と共にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の製造のために開発された技術が用いられうる (Morrissonら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neubergerら (1984) Nature 312:604-608; Takedaら (1985) Nature 314

40

50

: 452 - 454)。

【0095】

1つの実施形態においては、第1節に記載されているマウスモノクローナル抗ヒトTNF-抗体の重鎖定常領域をヒトIgG1定常領域で置換することにより、該キメラ抗体を製造する。

【0096】

3. 抗TNF-CDRグラフティング抗体

CDRグラフティング(CDRグラフト化)抗体は、V_Hおよび/またはV_LのCDR領域の1以上がマウス抗体のCDR配列で置換されている、ヒト抗体からの重鎖および軽鎖可変領域配列を含む。いずれかのヒト抗体からのフレームワーク配列がCDRグラフティングのための鋳型として働きうる。しかし、そのようなフレームワーク上への一直線の鎖の置換は、しばしば、抗原に対する結合アフィニティの幾らかの低下を招く。ヒト抗体が元のマウス抗体に対して相同になればなるほど、マウスCDRとヒトフレームワークとの組合せが、アフィニティを低下させうる該CDRにおける欠損を招く可能性は低くなるであろう。したがって、1つの実施形態においては、CDRは別として、マウス可変フレームワークを置換するために選択されるヒト可変フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークに対して少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、約100%の配列同一性を有する。CDRグラフティング抗体の製造方法は当技術分野で公知であり、そのようなCDRグラフティング抗体のヒト化と共に実施例において(また、EP特許番号EP 0 239 400; PCT公開番号WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号、第5,530,101号および第5,585,089号も参照されたい); ベニアリング(veneering)またはリサーフェシング(resurfacing)(EP特許番号EP 0 592 106およびEP 0 519 596; Padlan(1991)Mol. Immunol. 28(4/5): 489-498; Studnickaら(1994)Protein Eng. 7(6): 805-814; Roguskaら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973)および鎖シャフリング(米国特許第5,565,352号)と共に詳細に記載されている。

【0097】

特定の実施形態は、表6に記載されているとおり、V_Hおよび/またはV_L鎖を有するCDRグラフティング抗体を提供する。

【0098】

10

20

30

【表 6】

表 6: CDR グラフティング抗体

配列番号	タンパク質領域	配列
		123456789012345678901234567890
33	hMAK199VH. 1z	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT NYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTY ADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCARKFLTTVVVTDYAMDYWGQGT TVSS
34	hMAk199VH. 2z	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTY ADDFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARKFLTTVVVTDYAMDYWGQGT TVSS
35	hMAK199VL. 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIS NYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ GNTLPPTFGQGTKLEIK
36	hMAK199VL. 2	DVVMVTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQDIS NYLNWYQQKPDQAPKLLIKYTSRLQSGVPS RFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQ GNTLPPTFGQGTKLEIK

10

20

【 0 0 9 9 】

4. 抗 h T N F - ヒト化抗体

ヒト化抗体は、ヒト種からの 1 以上の相補性決定領域 (C D R) およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する抗体分子である。公知のヒト I g 配列は例えば以下のものに関連されている: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ / [query.fcgi;www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); www.sciquest.com/; www.abc.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhiro/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; [30](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-</p>
</div>
<div data-bbox=)

40

50

ks.html;www.biotech.ufl.edu/.about.fccl
 /protocol.html;www.isac-net.org/sites_ge
 o.html;aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.
 rek/AEP-Start.html;baserv.uci.kun.nl/.a
 bout.jraats/links1.html;www.recab.uni-hd
 .de/immuno.bme.nwu.edu/;www.mrc-cpe.cam.
 ac.uk/imt-doc/pu-blic/INTRO.html;www.ib
 t.unam.mx/vir/V_mice.html;imgt.cnusc.fr:
 8104/;www.biochem.ucl.ac.uk/.about.marti
 n/abs/index.html;antibody.bath.ac.uk/;ab
 gen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;www.u
 nizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slid
 e01.html;www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubc
 g07s/;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaew
 g.htm;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-
 umanisation/TAHHP.html;www.ibt.unam.mx/v
 ir/structure/stat_aim.html;www.biosci.mi
 ssouri.edu/smithgp/index.html;www.cryst.
 bioc.cam.ac.uk/.abo-ut.fmolina/Web-page
 s/Pept/spottech.html;www.jerini.de/fr ro
 ducts.htm;www.patents.ibm.com/ibm.html.K
 abatã, Sequences of Proteins of Immunolog
 ical Interest, U.S. Dept. Health (1983)。免疫原
 性を低下させ、あるいは結合、アフィニティ、オン速度、オフ速度、特異性、半減期また
 は当技術分野で公知のいずれかの他の適当な特性を低減、増強または修飾するために、そ
 のような移入配列が使用されうる。

【0100】

抗原結合を改変、改善するために、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基を
 CDRドナー抗体からの対応残基で置換することが可能である。これらのフレームワーク
 置換は、当技術分野でよく知られた方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基
 を特定するための、CDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに
 特定の位置における特異なフレームワーク残基を特定するための配列比較により特定され
 る（例えば、米国特許第5,585,089号;Riechmannら(1988)Na
 ture 332:323-327を参照されたい)。三次元免疫グロブリンモデルは一
 般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の
 可能な三次元コンホメーション構造を図示し表示するコンピュータプログラムが利用可能
 である。これらの表示の精査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能な役
 割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原への結合能に影響を及ぼす残基の分
 析を可能にする。このようにして、FR残基を選択し、コンセンサス配列および移入配列
 から構築して、望ましい抗体特性、例えば、標的抗原に対するアフィニティの増加を達成
 することが可能である。一般に、CDR残基は抗原結合への影響に直接的および最も実質
 的に関与している。抗体は、種々の技術、例えば以下のものに記載されている技術（それ
 らに限定されるものではない）を用いてヒト化されうる: Jonesら(1986)Na
 ture 321:522-525;Verhoeyenら(1988)Science
 239:1534-1536;Simsら(1993)J.Immunol.151:
 2296-2308;ChothiaおよびLesk(1987)J.Mol.Biol
 .196:901-917;Carterら(1992)Proc.Natl.Acad
 .Sci.USA 89:4285-4289;Prestara(1993)J.Imm
 unol.151:2623-2632;Padlan(1991)Mol.Immun
 ol.28(4/5):489-498;Studnickaら(1994)Prote

in Eng. 7 (6) : 805 - 814 ; Roguskař (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 969 - 973 ; PCT公開番号 WO 91 / 09967、WO 99 / 06834 (PCT / US 98 / 16280)、WO 97 / 20032 (PCT / US 96 / 18978)、WO 92 / 11272 (PCT / US 91 / 09630)、WO 92 / 03461 (PCT / US 91 / 05939)、WO 94 / 18219 (PCT / US 94 / 01234)、WO 92 / 01047 (PCT / GB 91 / 01134)、WO 93 / 06213 (PCT / GB 92 / 01755)、WO 90 / 14443、WO 90 / 14424 および WO 90 / 14430 ; 欧州公開番号 EP 0592106、EP 0519596 および EP 0239400 ; 米国特許第 5,565,332 号、第 5,723,323 号、第 5,976,862 号、第 5,824,514 号、第 5,817,483 号、第 5,814,476 号、第 5,763,192 号、第 5,723,323 号、第 5,766,886 号、第 5,714,352 号、第 6,204,023 号、第 6,180,370 号、第 5,693,762 号、第 5,530,101 号、第 5,585,089 号、第 5,225,539 号 および 第 4,816,567 号。

10

【0101】

C. 抗体および抗体産生細胞系の製造

1つの実施形態においては、抗 TNF - 抗体は、例えば、当技術分野で公知の幾つかのインビトロおよびインビボアッセイのいずれかによるアッセイで、TNF - 活性を低減または中和する高い能力を示す。

20

【0102】

特定の実施形態においては、単離された抗体またはその抗原結合性部分はヒト TNF - に結合し、ここで、該抗体またはその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、約 0.1 s^{-1} またはそれ未満の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離し、あるいはそれは約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ またはそれ未満の IC_{50} でヒト TNF - 活性を抑制する。あるいは、該抗体またはその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、約 $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ またはそれ未満の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離することが可能であり、あるいは約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ またはそれ未満の IC_{50} でヒト TNF - 活性を抑制することが可能である。あるいは、該抗体またはその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ またはそれ未満の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離することが可能であり、あるいは約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ またはそれ未満の IC_{50} でヒト TNF - 活性を抑制することが可能である。あるいは、該抗体またはその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ またはそれ未満の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離することが可能であり、あるいは約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ またはそれ未満の IC_{50} でヒト TNF - 活性を抑制することが可能である。あるいは、該抗体またはその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ またはそれ未満の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離することが可能であり、あるいは約 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ またはそれ未満の IC_{50} でヒト TNF - 活性を抑制することが可能である。あるいは、該抗体またはその抗原結合性部分は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、約 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ またはそれ未満の k_{off} 速度定数でヒト TNF - から解離することが可能であり、あるいは約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ またはそれ未満の IC_{50} でヒト TNF - 活性を抑制することが可能である。

30

40

【0103】

ある実施形態においては、該抗体は、例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM または IgD 定常領域のような重鎖定常領域を含む。1つの実施形態においては、該重鎖定常領域は IgG1 重鎖定常領域または IgG4 重鎖定常領域である。更に、該抗体は kappa 軽鎖定常領域または lambda 軽鎖定常領域のいずれかの軽鎖定常領域を含みうる。もう1つの実施形態においては、該抗体は kappa 軽鎖定常領域を含む。あるいは、該抗原結合性部分は、例えば Fab フラグメントまたは一本鎖 Fv フラグ

50

メントでありうる。

【0104】

抗体エフェクター機能を改変するための、Fc部分におけるアミノ酸残基の置換は、当技術分野で公知である（米国特許第5,648,260号および第5,624,821号）。抗体のFc部分は、幾つかの重要なエフェクター機能、例えばサイトカイン誘導、抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）ならびに抗体および抗原-抗体複合体の半減期/クリアランス速度をもたらす。幾つかの場合には、これらのエフェクター機能は治療用抗体に望ましいが、他の場合には、治療目的によっては、不必要または更には有害である可能性があるであろう。あるヒトIgGイソタイプ、特にIgG1およびIgG3は、それぞれFcRおよび補体C1qへの結合によりADCCおよびCDCをもたらす。新生児Fc受容体（FcRn）は、抗体の循環半減期を決定する極めて重要な成分である。更にもう1つの実施形態においては、該抗体のエフェクター機能が改変されるように、少なくとも1つのアミノ酸残基が該抗体の定常領域、例えば該抗体のFc領域において置換されている。

10

【0105】

1つの実施形態は、標識された結合性タンパク質を提供し、ここで、抗体またはその抗原結合性部分は誘導体化されており、または別の機能性分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）に連結されている。例えば、標識された結合性タンパク質は、抗体もしくはその抗原結合性部分を（化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合などにより）1以上の他の分子、例えば別の抗体（例えば、二重特異性抗体またはジアボディ）、検出可能な物質、細胞毒性物質、医薬物質、および/または該抗体もしくはその抗原結合性部分の、別の分子（例えば、ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグ）との結合を媒介しうるタンパク質もしくはペプチドに機能的に連結させることにより誘導されうる。

20

【0106】

抗体または抗原結合性部分が誘導体化される場合に使用されうる有用な検出可能な物質には、蛍光化合物が含まれる。典型的な蛍光検出可能物質には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホンニルクロリド、フィコエリトリンなどが含まれる。抗体はまた、検出可能な酵素、例えばアルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどで誘導体化されうる。抗体が検出可能酵素で誘導体化される場合、それは、検出可能な反応産物を産生するために該酵素が利用する追加的な試薬を加えることにより検出される。例えば、該検出可能物質であるホースラディッシュペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は着色反応産物を与え、これは検出可能である。また、抗体はビオチンにより誘導体化されることが可能であり、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定により検出されうる。

30

【0107】

もう1つは結晶化結合性タンパク質を提供する。もう1つの実施形態は、本明細書に開示されている完全抗TNF-抗体およびそのフラグメントの結晶、ならびにそのような結晶を含む製剤および組成物に関する。1つの実施形態においては、該結晶化結合性タンパク質は、該結合性タンパク質の可溶性対応物より長いインビボ半減期を有する。もう1つの実施形態においては、該結合性タンパク質は結晶化後に生物活性を保有する。

40

【0108】

結晶化結合性タンパク質は、当技術分野で公知の方法に従い、およびPCT公開番号WO 02/72636に開示されているとおりに製造されうる。

【0109】

もう1つの実施形態はグリコシル化結合性タンパク質を提供し、ここで、抗体またはその抗原結合性タンパク質は1以上の炭水化物残基を含む。新生インビボタンパク質産物は、翻訳後修飾として公知の更なるプロセッシングを受けうる。特に、糖（グリコシル）残基が酵素により付加されることがあり、この過程はグリコシル化として公知である。共有結

50

合オリゴ糖側鎖を含有する生じるタンパク質はグリコシル化タンパク質または糖タンパク質として公知である。タンパク質グリコシル化は、関心のあるタンパク質のアミノ酸配列、および該タンパク質が発現される宿主細胞に左右される。生物は、その生物によって異なるグリコシル化酵素（例えば、グリコシルトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼ）を産生することがあり、その生物によって異なる利用可能な基質（例えば、ヌクレオチド糖）を有しうる。そのような要因により、タンパク質グリコシル化パターンおよびグリコシル残基の組成は、個々のタンパク質が発現される宿主系によって異なりうる。有用なグリコシル残基には、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、n-アセチルグルコサミンおよびシアル酸が含まれるが、これらに限定されるものではない。1つの実施形態においては、該グリコシル化結合性タンパク質は、グリコシル化パターンがヒトのものとなるように、グリコシル残基を含む。

10

【0110】

タンパク質グリコシル化が異なれば、それによって生じるタンパク質特性も異なりうる。例えば、当業者に公知である。例えば、微生物宿主、例えば酵母において産生され、酵母内在性経路を利用してグリコシル化された治療用タンパク質の効力は、哺乳類細胞、例えばCHO細胞系において発現された同じタンパク質の場合と比較して低下しうる。そのような糖タンパク質はまた、ヒトにおいて免疫原性であることがあり、投与後のインビボ半減期の短縮を示しうる。ヒトおよび他の動物における特異的受容体は特異的グリコシル残基を認識し、血流からの該タンパク質の迅速な消失を促進しうる。他の悪影響には、タンパク質フォールディング、可溶性、プロテアーゼに対する感受性、トラフィッキング、輸送、区画化、分泌、他のタンパク質または因子による認識、抗原性またはアレルギー性における変化が含まれうる。したがって、実施者は、グリコシル化の特異的組成およびパターン（例えば、ヒト細胞において、または意図される対象動物の種特異的細胞において産生されるものと同じ又は少なくとも類似したグリコシル化組成およびパターン）を有する治療用タンパク質を好みうる。

20

【0111】

宿主細胞のものとは異なるグリコシル化タンパク質の発現は、異種グリコシル化酵素を発現するように該宿主細胞を遺伝的に修飾することにより達成されうる。当技術分野で公知の技術を用いて、実施者は、ヒトタンパク質グリコシル化を示す抗体またはその抗原結合性部分を製造することが可能である。例えば、ある酵母株は、天然に存在しないグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に修飾されていて、その結果、これらの酵母株において産生されたグリコシル化タンパク質（糖タンパク質）は、動物細胞、特にヒト細胞の場合と同じタンパク質グリコシル化を示す（米国特許第7,449,308号および第7,029,872号）。

30

【0112】

更に、関心のあるタンパク質は、種々のグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に操作された宿主細胞のライブラリーを使用して発現されることが可能であり、この場合、該ライブラリーの一員である宿主細胞は、変異グリコシル化パターンを有するその関心のあるタンパク質を産生する、と当業者により理解されるであろう。ついで実施者は、特定の新規グリコシル化パターンを有する、関心のあるタンパク質を選択し、単離することが可能である。1つの実施形態においては、特別に選択された新規グリコシル化パターンを有するタンパク質は、改善または改変された生物学的特性を示す。

40

【0113】

D. 抗TNF - 抗体の用途

該結合性タンパク質、例えば抗ヒトTNF - 抗体またはその抗原結合性部分は、ヒトTNF - に結合するそれらの能力を考慮すると、当技術分野で利用可能な、抗体に基づく免疫検出系を用いて、TNF - （例えば、生物学的サンプル、例えば、全血、血清、血漿、尿、唾液または組織サンプルにおけるもの）を検出するために使用されうる。そのような免疫検出系には、免疫沈降、免疫プロット法（ウエスタンプロット）、酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、組織免疫組

50

織化学法、表面プラズモン共鳴（SPR）、サンドイッチイムノアッセイ、抗体に基づくアフィニティ法（例えば、アフィニティビーズ、アフィニティカラム）、免疫競合アッセイ、免疫チップアッセイ（シリコンチップに結合された結合性タンパク質）および蛍光標示式細胞分取（FACS）が含まれるが、これらに限定されるものではない。幾つかの免疫検出系では、TNF-結合性タンパク質（またはその結合性部分）（またはその部分）は固体基体に結合される。これは、抗体分子を同じ固体基体に結合させるための当技術分野で利用可能な方法を用いて行われ、この場合、結合された結合性タンパク質は、個々の免疫検出系における使用中に、ヒトTNF-へのその結合能を保有する。そのような固体基体には、セルロースに基づく濾紙（例えば、セルロース、ニトロセルロース、酢酸セルロース）、ナイロンフィルター、プラスチック表面（例えば、マイクロタイタープレート、抗体ディップスティック）、ガラス基体（例えば、フィルター、ビーズ、スライド、ガラスウール）、重合体粒子（例えば、アガロース、ポリアクリルアミド）およびシリコンチップが含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、インビトロのサンプル（例えば、生物学的サンプル、例えば、全血、血清、血漿、組織、尿、唾液、組織生検）中のTNF-の存在を検出するための方法において、免疫検出系が使用されうる。そのような方法は、疾患または障害、例えば免疫細胞関連障害を診断するために用いられうる。該方法は、(i)試験サンプルまたは対照サンプルを、本明細書に記載されているTNF-結合性タンパク質またはそのTNF-結合性部分と接触させ、(ii)該試験サンプル中または該対照サンプル中の該抗TNF-結合性タンパク質（またはその結合性部分）とTNF-との複合体の形成を検出することを含み、ここで、該対照サンプルと比較した場合（またはより早い時点で採取された別の試験サンプル中の該複合体の形成と比較した場合）の、該試験サンプル中の該複合体の形成の統計的に有意な変化は、該サンプル中のTNF-の存在を示す。

10

20

【0114】

もう1つの例としては、インビボ（例えば、被験者におけるインビボイメージング）においてヒトTNF-の存在を検出するための方法が用いられうる。該方法は、疾患または障害、例えばTNF-関連障害を診断するために用いられうる。該方法は、(i)本明細書に記載されているTNF-結合性タンパク質またはそのTNF-結合性部分を、TNF-への該結合性タンパク質またはそのTNF-結合性部分の結合を可能にする条件下、試験対象（被験者）または対照対象に投与し、(ii)該試験サンプル中または該対照サンプル中の該結合性タンパク質またはその結合性部分とTNF-との複合体の形成を検出することを含み、ここで、該対照対象と比較した場合（またはより早い時点での該試験対象における該複合体の形成と比較した場合）の、該試験対象における該複合体の形成の統計的に有意な変化は、TNF-の存在を示す。

30

【0115】

サンプル（例えば、生物学的サンプル）中のTNF-を検出するための方法は、サンプルを、本明細書に記載されているTNF-結合性タンパク質（またはそのTNF-結合性部分）と接触させ、TNF-に結合した該結合性タンパク質（またはその結合性部分）または未結合の結合性タンパク質（または未結合のその結合性部分）を検出し、それにより、該サンプル中のTNF-を検出することを含む。結合した又は未結合の結合性タンパク質（またはその部分）の検出を促進するために、該結合性タンパク質（またはその部分）は、検出可能な物質で直接的または間接的に標識される。そのような検出可能な物質は当技術分野で公知であり、限定的なものではないが、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質を包含する。適当な酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、b-カラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適当な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適当な発光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の一例にはルミノールが含まれる。適当な放射性物質の例には、放射性同位体

40

50

³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Hoおよび¹⁵³Smが含まれる。

【0116】

該結合性タンパク質を標識する代わりに、検出可能な物質で標識された組換えヒト(rh)TNF-標準物および未標識のTNF-結合性タンパク質を使用する競合イムノアッセイにより、サンプル(例えば、生物学的流体)中でヒトTNF-をアッセイすることが可能である。このアッセイにおいては、該サンプル、該標識rhTNF-標準物および該TNF-結合性タンパク質と一緒にし、該未標識結合性タンパク質に結合した標識rhTNF-標準物の量を決定する。該サンプル中のヒトTNF-の量は、該抗TNF-結合性タンパク質に結合した標識rhTNF-標準物の量に反比例する。同様に、ヒトTNF-はまた、検出可能な物質で標識されたrhTNF-標準物および未標識の抗TNF-結合性タンパク質を使用する競合イムノアッセイにより、サンプルにおいてアッセイされうる。

10

【0117】

1つの実施形態においては、該抗体および抗原結合性部分はインビトロおよびインビボの両方においてヒトTNF-活性を中和しうる。したがって、そのような結合性タンパク質は、例えば、hTNF-を含有する細胞培養において、またはヒト対象において、または抗体が交差反応するTNF-を有する他の哺乳類対象において、TNF-活性を抑制するために使用されうる。1つの実施形態は、hTNF-活性が抑制されるように、hTNF-を抗体または抗原結合性部分と接触させることを含む、hTNF-活性を抑制するための方法を提供する。例えば、hTNF-を含有する又は含有する疑いのある細胞培養において、培地内のhTNF-活性を抑制するために、抗体または抗原結合性部分を該培地に加えることが可能である。

20

【0118】

もう1つの実施形態は、好ましくは、TNF-活性が有害である疾患または障害に罹患している対象から、対象におけるhTNF-活性を低減するための方法を提供する。そのような疾患または障害に罹患している対象におけるTNF-活性を低減するための方法を提供し、該方法は、該対象におけるTNF-活性が低減するように、抗体または抗原結合性部分を該対象に投与することを含む。もう1つの実施形態においては、該TNF-はヒトTNF-であり、該対象はヒト対象である。あるいは、該対象は、抗体が結合しうるTNF-を発現する哺乳動物でありうる。更にまた、該対象は、(例えば、TNF-の投与により、またはTNF-トランスジーンが発現により)TNF-が導入された哺乳動物でありうる。結合性タンパク質は治療目的でヒト対象に投与されうる。更に、結合性タンパク質は、該結合性タンパク質が結合しうるTNF-を発現する非ヒト哺乳動物に獣医学的目的で又はヒト疾患の動物モデルとして投与されうる。後者に関しては、そのような動物モデルは、抗体の治療効力の評価(例えば、投与量および投与時間経過の試験)に有用でありうる。

30

【0119】

「TNF-活性が有害である障害」なる語は、該障害に罹患している対象におけるTNF-の存在が該障害の病態生理を引き起こすこと又は該障害の悪化に寄与する要因であることが示されている又はその疑いのある疾患および他の障害を含むと意図される。したがって、TNF-活性が有害である障害は、TNF-活性の低減が該障害の症状および/または進行を軽減すると予想される障害である。そのような障害は、例えば、該障害に罹患している対象の生物学的流体中のTNF-の濃度の増加(例えば、該対象の血清、血漿、滑液などにおけるTNF-の濃度の増加)により実証されることが可能であり、これは、例えば、本明細書に記載されている抗TNF-結合性タンパク質を使用して検出されうる。該抗体で治療されうる障害の非限定的な例には、該結合性タンパク質の医薬組成物に関して後記の節に記載されている障害が含まれる。

40

【0120】

D. 医薬組成物

50

結合性タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合性部分と、医薬として許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。抗体を含む医薬組成物は、障害もしくはその1以上の症状の診断、検出、モニター、予防、抑制、治療、処置もしくは改善または研究（これらに限定されるものではない）において使用される。特定の実施形態においては、組成物は1以上の結合性タンパク質を含む。もう1つの実施形態においては、該医薬組成物は、1以上の結合性タンパク質、およびTNF-活性が有害である障害を治療するための抗体以外の1以上の予防用または治療用物質を含む。更にもう1つの実施形態においては、障害またはその1以上の症状の予防、治療、処置または改善において有用であることが知られている又はそれらにおいて使用されたことがある若しくは現在使用されている予防用または治療用物質。これらの実施形態においては、該組成物は更に、担体、希釈剤または賦形剤を含みうる。

10

【0121】

該結合性タンパク質は、対象への投与に適した医薬組成物中に配合されうる。典型的には、該医薬組成物は、結合性タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合性部分と、医薬として許容される担体とを含む。「医薬として許容される担体」なる語は、生理的に適合しうる全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌物質、等張化および吸収遅延剤などを含む。医薬として許容される担体の例には、水、塩類液、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1以上およびそれらの組合せが含まれる。等張化剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを該組成物中に加えることが好ましいかもしれない。医薬として許容される担体は更に、該抗体またはその抗原結合性部分の貯蔵寿命または有効性を増大させる少量の補助物質、例えば湿潤又は乳化剤、保存剤またはバッファーを含みうる。

20

【0122】

種々の運搬系が公知であり、1以上の結合性タンパク質、あるいは1以上の抗体と、障害またはその1以上の症状の予防、処理、治療または改善に有用な予防用または治療用物質との組合せを投与するために使用可能であり、例えば、リボソーム中の封入、微粒子、マイクロカプセル、該抗体または抗体フラグメントを発現しうる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシス（WuおよびWu（1987）J. Biol. Chem. 262: 4429-4432）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などが挙げられる。予防用または治療用物質の投与方法には、非経口投与（例えば、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与および粘膜投与が含まれるが、これらに限定されるものではない（米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号および第4,880,078号；ならびにPCT公開番号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346およびWO 99/66903）。1つの実施形態においては、結合性タンパク質、併用療法または組成物は、Alkermes AIR（登録商標）肺薬物運搬技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts）を用いて投与される。該予防用または治療用物質は、いずれかの簡便な経路により、例えば、注入またはポラス注射により、上皮または粘膜皮膚裏打ち層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を介した吸収により投与されることが可能であり、他の生物学的に活性な物質と共に投与されうる。投与は全身的または局所的でありうる。

30

40

【0123】

特定の実施形態においては、該予防用または治療用物質を、治療を要する領域に、例えば局所的注入、注射またはインプラントにより、局所的に投与することが望ましいかもしれない。インプラントは、例えばシアラスチック（silastic）膜、重合体、繊維性マトリックス（例えば、Tissue1（登録商標））またはコラーゲンマトリックスのような膜およびマトリックスを含む多孔性または非孔性物質のものでありうる。1つの実施形態においては、障害またはその症状を予防、治療、処置および/または改善する

50

ために、対象の罹患領域に局所的に1以上の抗体の有効量を投与する。もう1つの実施形態においては、障害またはその症状を予防、治療、処置および/または改善するために、対象の罹患領域に局所的に、1以上の抗体の有効量を、結合性タンパク質以外の1以上の療法（例えば、1以上の予防用または治療用物質）の有効量と組合せて投与する。

【0124】

もう1つの実施形態においては、該予防用または治療用物質はコントロールリリース（制御放出）または徐放系において運搬されうる。1つの実施形態においては、コントロールリリースまたは徐放を達成するためにポンプが使用されうる（例えば、Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; Sefton (1987) *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240; Buchwaldら (1980) *Surgery* 88:507-516; Saudekら (1989) *N. Engl. J. Med.* 321:574-579)。もう1つの実施形態においては、該療法のコントロールリリースまたは徐放を達成するために、重合体（高分子）物質が使用されうる（例えば、*Medical Applications of Controlled Release*, (LangerおよびWise編) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design*および*Performance*, (SmolenおよびBall編) (Wiley, New York, 1984); LangerおよびPeppas (1983) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* C23:61-126を参照されたい; また、Levyら (1985) *Science* 228:190-192; Duringら (1989) *Ann. Neurol.* 25:351-356; Howardら (1989) *J. Neurosurg.* 71:105-112); 米国特許第5,679,377号、第5,916,597号、第5,912,015号、第5,989,463号および第5,128,326号; ならびにPCT公開番号WO 99/15154およびWO 99/20253を参照されたい)。徐放製剤において使用される重合体の例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる: ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセタート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステル。1つの実施形態においては、徐放製剤において使用される重合体は不活性であり、浸出性不純物を含みせず、貯蔵時に安定であり、無菌であり、生分解性である。更にもう1つの実施形態においては、コントロールリリースまたは徐放系は予防または治療標的に接近して配置され、したがって、全身投与量のごく一部を要するに過ぎない（例えば、Goodson, J. M., Chapter 6, *In Medical Applications of Controlled Release*, Vol. II, *Applications*および*Evaluation*, (LangerおよびWise編) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), pp. 115-138を参照されたい)。

【0125】

コントロールリリース系はLanger (1990) *Science* 249:1527-1533による総説において考察されている。1以上の治療用物質を含む徐放製剤を製造するためには、当業者に公知のいずれかの技術が用いられうる。例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開番号WO 91/05548およびWO 96/20698; ならびにNingら (1996) *Radiother. Oncol.* 39:179-189; Songら (1996) *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 50:372-377; Cleekら (1997) *Proceed Int'l Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; ならびにLamら (1997) *Proceed. Int'l Symp. Control*

10

20

30

40

50

Rel. Bioact. Mater. 24: 759 - 760を参照されたい。

【0126】

該組成物が、予防用または治療用物質をコードする核酸である、特定の実施形態においては、該核酸は、そのコード化予防用または治療用物質の発現を促進するためにインピボで投与されうる。これは、適当な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築し、それが細胞内状態となるようにそれを投与することにより行われうる。該投与は、例えば、レトロウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照されたい）の使用により、あるいは直接注射により、あるいは微粒子射出（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）または脂質もしくは細胞表面受容体での被覆またはトランスフェクト化剤の使用により、あるいは核に進入することが知られているホメオボックス様ペプチド（例えば、Joliotら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864 - 1868を参照されたい）に連結させてそれを投与することにより行われうる。あるいは、核酸は、細胞内および宿主細胞DNA内に、相同組換えによる発現により導入されうる。

10

【0127】

医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例には、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口、鼻腔内（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜および直腸投与が含まれるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態においては、該組成物は、ヒトへの静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻腔内または局所投与に適した医薬組成物として、通常の方法に従い製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は無菌等張性水性バッファー中の溶液である。必要に応じて、該組成物は、安定剤、および注射部位の疼痛を軽減するための例えばリグノカムネ（lignocaine）のような局所麻酔薬をも含むうる。

20

【0128】

該組成物を局所投与する場合、該組成物は、軟膏剤、クリーム剤、経皮パッチ、ローション剤、ゲル剤、シャンプー、噴霧剤、エアゾール剤、溶液剤（水剤）、乳剤の形態または当業者によく知られた他の形態で製剤化されうる。例えば、Remington's Pharmaceutical SciencesおよびIntroduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995)を参照されたい。非噴霧可能局所剤形の場合、局所適用に適しており好ましくは水より大きな粘性率を有する担体または1以上の賦形剤を含む粘性ないし半固体または固体形態が典型的に使用される。他の適当な製剤には、懸濁剤、散剤、リニメント剤、口剤などが含まれるが、これらに限定されるものではない。1つの実施形態においては、そのような製剤は滅菌され、または例えば浸透圧のような種々の特性に影響を及ぼすための補助物質（例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤、バッファーまたは塩）と混合される。他の適当な局所剤形には、噴霧可能なエアゾール剤が含まれ、この場合、例えば固体または液体不活性担体と組合された有効成分が、加圧揮発性物質（例えば、気体プロペラント、例えばFREON（登録商標））との混合物として、またはスクイズボトル内に充填される。所望により、医薬組成物および剤形に保湿剤または湿潤剤も加えられうる。そのような追加的成分の例は当技術分野でよく知られている。

30

40

【0129】

該方法が組成物の鼻腔内投与を含む場合、該組成物は、エアゾール形態、噴霧剤、ミストまたは滴剤の形態で製剤化されうる。特に、予防用または治療用物質は、適当なプロペラント（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当な気体）の使用により、加圧パックまたはネプライザーから、エアゾール噴霧剤の形態で簡便に運搬されうる。加圧エアゾールの場合、一定量を運搬するための弁を設けることにより投与単位が定められうる。吸入器または通気器において使用されるカプセル剤およびカートリッジ剤（例えばゼラチンから構成されるもの）は、該化合物と適当な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）との

50

粉末混合物を含有するように製剤化されうる。

【0130】

該方法が経口投与を含む場合、組成物は、錠剤、カプセル剤、カシェ剤、ゲルカップ、溶液剤（水剤）、懸濁剤などの形態で経口投与用に製剤化されうる。錠剤またはカプセル剤は、医薬として許容される賦形剤、例えば、結合剤（例えば、前ゼラチン化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えば、ラクトース、微晶質セルロースまたはリン酸水素カルシウム）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンまたはナトリウムデンプングリコラート）、または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）を使用して、通常的手段により製造されうる。錠剤は、当技術分野でよく知られた方法によりコーティングされうる。経口投与用の液体製剤は溶液剤、シロップ剤または懸濁剤（これらに限定されるものではない）の形態をとりうる。あるいはそれらは、使用前に水または他の適当なビヒクルで還元（再構成）するための乾燥製品として提供されうる。そのような液体製剤は、医薬として許容される添加剤、例えば、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體または水素化可食脂肪）、乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油性エステル、エチルアルコールまたは分別植物油）および保存剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）を使用して、通常的手段により製造されうる。該製剤は、適当な場合には、バッファー塩、香味剤、着色剤および甘味剤をも含有しうる。経口投与用の製剤は、適切には、予防用または治療用物質の遅延放出、コントロールリリースまたは徐放用に製剤化されうる。

10

20

【0131】

該方法は、エアゾール化剤が配合された組成物の、例えば吸入器またはネブライザーの使用による肺投与を含みうる。例えば、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号および第4,880,078号；ならびにPCT公開番号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346およびWO 99/66903を参照されたい。特定の実施形態においては、抗体、併用療法および/または組成物は、Alkermes AIR（登録商標）肺薬物運搬技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts）を用いて投与される。

30

【0132】

該方法は、注射（例えば、ボラス注射または連続的注入）による非経口投与用に製剤化された組成物の投与を含みうる。注射用製剤は、添加された保存剤を含有する単位投与形（例えば、アンプル内または多用量容器内）として提供されうる。該組成物は油性または水性ビヒクル中の懸濁剤、溶液剤または乳剤のような形態をとることが可能であり、懸濁化剤、安定剤および/または分散剤のような製剤化用物質を含有しうる。あるいは、該有効成分は、使用前に適当なビヒクル（例えば、無菌発熱物質非含有水）で還元（再構成）するための粉末形態でありうる。

40

【0133】

該方法は更に、デポ製剤として製剤化された組成物の投与を含みうる。そのような長時間作用性製剤は移植（例えば、皮下または筋肉内）または筋肉内注射により投与されうる。したがって、例えば、該組成物は、適当な重合体物質または疎水性物質（例えば、許容される油中のエマルジョンとしてのもの）またはイオン交換樹脂で、または難溶性誘導體（例えば、難溶性塩）として製剤化されうる。

【0134】

該方法は、中性または塩形態として製剤化された組成物の投与を含む。医薬として許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるもののような陰イオンと共に形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノー

50

ル、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されるもののような陽イオンと共に形成されるものが含まれる。一般に、組成物の成分は、別々に、または単位投与形として、例えば、活性物質の量を表示しているアンプルまたは薬袋のような密閉容器内の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、一緒に混合されて供給される。投与方法が注入である場合には、組成物は、医薬等級の無菌水または塩類液を含有する注入ボトルで分注されうる。投与方法が注射によるものである場合には、投与前に成分が混合されうるように、注射用無菌水または塩類液のアンプルが提供されうる。

【0135】

1つの実施形態においては、1以上の該予防用もしくは治療用物質または医薬組成物は、該物質の量を表示しているアンプルまたは薬袋のような密閉容器内にパッケージング（包装）される。1つの実施形態においては、1以上の該予防用もしくは治療用物質または医薬組成物は密閉容器内の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給され、対象への投与のための適当な濃度に（例えば、水または塩類液）で還元（再構成）されうる。1つの実施形態においては、1以上の該予防用もしくは治療用物質または医薬組成物は、少なくとも約5mg、少なくとも約10mg、少なくとも約15mg、少なくとも約25mg、少なくとも約35mg、少なくとも約45mg、少なくとも約50mg、少なくとも約75mgまたは少なくとも約100mgの単位投与量で、密閉容器内の無菌凍結乾燥粉末として供給される。該凍結乾燥予防用もしくは治療用物質または医薬組成物は、その元の容器内で2～8で貯蔵されるべきであり、該予防用もしくは治療用物質または医薬組成物は、還元（再構成）された後、約1週間以内、約5日以内、約72時間以内、約48時間以内、約24時間以内、約12時間以内、約6時間以内、約5時間以内、約3時間以内または約1時間以内に投与されるべきである。もう1つの実施形態においては、1以上の該予防用もしくは治療用物質または医薬組成物は、該物質の量および濃度を表示している密閉容器内の液体形態で供給される。1つの実施形態においては、該投与組成物の液体形態は、少なくとも約0.25mg/ml、少なくとも約0.5mg/ml、少なくとも約1mg/ml、少なくとも約2.5mg/ml、少なくとも約5mg/ml、少なくとも約8mg/ml、少なくとも約10mg/ml、少なくとも約15mg/kg、少なくとも約25mg/ml、少なくとも約50mg/ml、少なくとも約75mg/mlまたは少なくとも約100mg/mlで密閉容器内で供給される。該液体形態は、その元の容器内で2～8で貯蔵されるべきである。

【0136】

該結合性タンパク質は、非経口投与に適した医薬組成物中に含有されうる。1つの態様においては、該結合性タンパク質は、約0.1～約250mg/mlの抗体を含有する注射可能溶液として製造される。該注射可能溶液は、フリントまたは琥珀色バイアル、アンプルまたは前充填シリンジ内の液体または凍結乾燥剤形から構成されうる。該バッファは、最適には約5～約10mMの、pH5.0～7.0（最適にはpH約6.0）のL-ヒスチジン（約1～約50mM）でありうる。他の適当なバッファには、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムが含まれるが、これらに限定されるものではない。該溶液の毒性を改変するために、約0～約300mM（例えば、液体剤形では約150mM）の濃度の塩化ナトリウムが使用されうる。凍結乾燥剤形の場合、凍結保護剤、主に、約0～約10% スクロース（例えば、約0.5～約1.0%）が含まれうる。他の適当な凍結保護剤には、トレハロースおよびラクトースが含まれる。凍結乾燥剤形の場合、増量剤、主に、約1～約10% マンニトール（例えば、約2～約4%）が含まれうる。液体および凍結乾燥剤形の両方において、安定剤、主に、約1～約50mM L-メチオニン（最適には約5～約10mM）が使用されうる。他の適当な増量剤として、グリシン、アルギニンが、約0～約0.05% ポリソルベート-80（最適には約0.005～約0.01%）として含まれうる。追加的な界面活性剤には、ポリソルベート20およびBRJ界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0137】

10

20

30

40

50

該組成物は種々の形態でありうる。これらには、例えば、液体、半固体および固体剤形、例えば、液体溶液（例えば、注射可能および注入可能な溶液）、分散剤（分散液）または懸濁剤、錠剤、丸剤、散剤、リポソームおよび坐剤が含まれる。該形態は、意図される投与方法および治療用途に左右される。典型的な組成物は、注射可能または注入可能な溶液、例えば、他の抗体でのヒトの受動免疫に使用されるものに類似した組成物の形態である。1つの実施形態においては、投与方法は非経口的（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。1つの実施形態においては、該抗体は静脈内注入または注射により投与される。もう1つの実施形態においては、該抗体は筋肉内または皮下注射により投与される。

【0138】

治療用組成物は、典型的には、無菌であり、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない。該組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソームまたは高い薬物濃度に適した他の秩序だった構造として製剤化されうる。無菌の注射可能溶液は、必要量の該活性化化合物（例えば、抗体またはその抗原結合性部分）を、必要に応じて前記成分の1つ又は組合せと共に、適当な溶媒中に含有させ、ついで濾過滅菌を行うことにより製造されうる。一般に、分散液は、該活性化化合物を、基礎分散媒および前記のものからの必要な他の成分を含有する無菌ビヒクル中に含有させることにより製造される。無菌の注射可能溶液の製造のための無菌凍結乾燥粉末の場合には、典型的な製造方法は、有効成分およびいずれかの追加的な所望の成分の粉末を、予め滅菌濾過されたその溶液から与える真空乾燥および噴霧乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合には、必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持されうる。注射可能組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアレート塩およびゼラチンを該組成物中に含有させることによりもたらされうる。

【0139】

多数の治療用途の場合、投与の典型的な経路/方法は皮下注射、静脈内注射または注入であるが、該抗体および抗原結合性部分は、当技術分野で公知の種々の方法により投与されうる。当業者により理解されるとおり、投与の経路および/または方法は、所望の結果に応じて様々なものとなるであろう。ある実施形態においては、該活性化化合物は、インプラント、皮内パッチおよびマイクロカプセル化運搬系を含むコントロールリリース製剤のように、該化合物の迅速な放出を防ぐ担体を使用して製造されうる。生分解性生体適合性重合体、例えばエチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸が使用されうる。そのような製剤の多数の製造方法は特許されており、または当業者に一般に公知である。例えば、SustainedおよびControlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0140】

ある実施形態においては、抗体またはその抗原結合性部分は、例えば不活性希釈剤または同化可能可食担体と共に経口投与されうる。該化合物（および所望により他の成分）はまた、硬もしくは軟殻ゼラチンカプセル内に封入され、または錠剤へと圧縮され、または対象の食事に直接加えられうる。経口治療投与の場合、該化合物は賦形剤と共に配合され、摂食可能な錠剤、パッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエファーなどの形態で使用されうる。非経口投与以外で化合物を投与するためには、該化合物を、その不活性化を防ぐ物質でコーティングすること、または該化合物を該物質と共に投与することが必要かもしれない。

【0141】

補助活性化化合物も該組成物中に配合されうる。ある実施形態においては、結合性タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合性部分）は、TNF-活性が融合である障害を治療するのに有用である1以上の追加的治療用物質と共に配合される、および/または該追

10

20

30

40

50

加的治療用物質と共投与される。例えば、抗hTNF-抗体または抗原結合性部分は、他の標的に結合する1以上の追加的抗体（例えば、他のサイトカインに結合する、または細胞表面分子に結合する抗体）と共配合されること、および/または該追加的抗体と共投与されることが可能である。更に、1以上の抗体は前記治療用物質の2以上と組合せて使用されうる。そのような併用（組合せ）療法は、有利には、投与される治療用物質の、より低い投与量を用いて、種々の単独療法に伴う考えられうる毒性または合併症を避けることが可能である。

【0142】

ある実施形態においては、TNF-に対する抗体またはそのフラグメントは、当技術分野で公知の、半減期を延長するビヒクルに連結される。そのようなビヒクルには、Fcドメイン、ポリエチレングリコールおよびデキストランが含まれるが、これらに限定されるものではない。そのようなビヒクルは、例えば米国特許第6,660,843号および公開PCT公開番号WO 99/25044に記載されている。

10

【0143】

特定の実施形態においては、結合性タンパク質または別の予防用もしくは治療用物質のポリペプチドの1以上をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子は、遺伝子治療により障害またはその1以上の症状を治療、予防、処置または改善するために投与される。遺伝子治療は、対象への発現核酸または発現可能核酸の投与により行われる療法を意味する。この実施形態においては、該核酸は、予防または治療効果をもたらす結合性タンパク質または治療用もしくは予防用物質の、そのコード化結合性ポリペプチドを産生する。

20

【0144】

当技術分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が用いられうる。遺伝子治療の方法の総説としては、Goldspear (1993) Clin. Pharm. 12: 488-505; WuおよびWu (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan (1993) Science 260: 926-932; ならびにMorganおよびAnderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; Robinson, C. (1993) Trends Biotechnol. 11(5): 155を参照されたい。用いられうる組換えDNA技術の当技術分野で一般に公知の方法はAusubelら(編) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); およびKriegler, Gene TransferおよびExpression, A Laboratory Manual (Stockton Press, New York, 1990)に記載されている。遺伝子治療の種々の方法の詳細な説明はUS 2005/0042664に開示されている。

30

【0145】

TNF-は、例えば以下のような、免疫および炎症因子に関わる種々の疾患に関連した病理において役割を果たしている：自己免疫疾患、特に炎症に関連したもの、例えばクローン病、乾癬（尋常性乾癬を含む）、関節炎（関節リウマチ、乾癬性関節炎、変形性関節症または若年性特発性関節炎を含む）、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、糖尿病（インスリン依存性糖尿病または自己免疫性糖尿病を含む）、アレルギー、および自己免疫ブドウ膜炎。したがって、本発明における結合性タンパク質は、これらの疾患を治療するために使用されうる。もう1つの実施形態においては、該障害は呼吸障害；喘息；アレルギー性および非アレルギー性喘息；感染による喘息；呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染による喘息；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気道炎症を伴う状態；好酸球増加症；線維症および過剰粘液産生；嚢胞性線維症；肺線維症；アトピー性障害；アトピー性皮膚炎；蕁麻疹；湿疹；アレルギー性鼻炎；アレルギー性胃腸炎；皮膚の炎症性および/または自己免疫状態；胃腸器官の炎症および/または自己免疫状態；炎症性腸疾患（IBD）；潰瘍性大腸炎；肝臓の炎症および/または自己免疫状態；肝硬変；肝

40

50

線維症；B型および/またはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝線維症；強皮症；腫瘍または癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；リンパ腫；ホジキンリンパ腫；ウイルス感染；細菌感染；寄生虫感染症；HTLV-1感染；防御1型免疫応答の発現の抑制、ワクチン接種中の防御1型免疫応答の発現の抑制、神経変性疾患、ニューロン再生および脊髄損傷である。

【0146】

TNF- はまた、免疫および炎症因子に関わる種々の疾患に関連した病理において役割を果たしている可能性がある。これらの疾患には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：後天性免疫不全症候群；後天性免疫不全関連疾患；後天性悪性貧血；急性冠状動脈症候群；急性および慢性疼痛（種々の形態の疼痛）；急性特発性多発性神経炎；臓器移植に関連した急性免疫疾患；臓器移植に関連した急性または慢性免疫疾患；急性炎症性脱髄性多発神経根障害；急性虚血；急性肝疾患；急性リウマチ熱；急性横断性脊髄炎；アジソン病；成人（急性）呼吸窮迫症候群；成人スティル病；アルコール性肝硬変；アルコール性肝障害；アレルギー疾患；アレルギー；脱毛症；円形脱毛症；アルツハイマー病；アナフィラキシー；強直性脊椎炎；強直性脊椎炎関連肺疾患；抗リン脂質抗体症候群；再生不良性貧血；動脈硬化症；関節症；喘息；アテローム病/動脈硬化症；アテローム性動脈硬化症；アトピー性アレルギー；アトピー性湿疹；アトピー性皮膚炎；萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症；自己免疫性水疱性疾患；自己免疫性皮膚炎；自己免疫性糖尿病；連鎖球菌の感染に関連した自己免疫障害；自己免疫性腸疾患；自己免疫性溶血性貧血；自己免疫性肝炎；自己免疫性難聴；自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）；自己免疫媒介性低血糖症；自己免疫性心筋炎；自己免疫性好中球減少症；自己免疫性発卵巣不全；自己免疫性血小板減少症（AITP）；自己免疫性甲状腺疾患；自己免疫性ブドウ膜炎；閉塞性細気管支炎；ベーチェット病；眼瞼炎；気管支拡張症；水疱性類天疱瘡；悪液質；心血管疾患；破壊的抗リン脂質症候群；セリアック病；頸椎症；クラミジア、コレオサタティス（*choleosattis*）；慢性活動性肝炎；慢性好酸球性肺炎；慢性疲労症候群；臓器移植に関連した慢性免疫疾患；慢性虚血；慢性肝疾患；慢性皮膚粘膜カンジダ症；癬痕性類天疱瘡；多発性硬化症のリスクを伴う臨床孤立症候群（CIS）；分類不能型原発性免疫不全症（分類不能型原発性低ガンマグロブリン血症）；間質性肺疾患に関連した結合組織疾患；結膜炎；クームス陽性溶血性貧血；小児発症性精神障害；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；クローン病；特発性自己免疫性肝炎；特発性線維化肺胞炎；涙嚢炎；うつ病；強皮症皮膚炎；皮膚筋炎；皮膚筋炎/多発性筋炎関連肺疾患；糖尿病性網膜症；糖尿病；拡張型心筋症；円盤状エリテマトーデス；椎間板ヘルニア；椎間板脱出；播種性血管内凝固；薬物誘発性肝炎；薬物誘発性間質性肺疾患；薬物誘発性免疫溶血性貧血；心内膜炎；子宮内膜症；眼内炎；腸炎性滑膜炎；上強膜炎；多形紅斑；重症多形紅斑；女性不妊症；線維症；線維性肺疾患；妊娠類天疱瘡；巨細胞性動脈炎（GCA）；糸球体腎炎；甲状腺腫自己免疫甲状腺機能低下（橋本病）；グッドパスチャー症候群；痛風性関節炎；移植片対宿主病（GVHD）；グレーブス病；B群連鎖球菌（BGS）感染症；ギラン-バレー症候群（BGS）；ヘモジデリン沈着関連肺疾患；枯草熱；心不全；溶血性貧血；ヘーノホ-シェーライン紫斑病；B型肝炎；C型肝炎；ヒューズ症候群；ハンチントン舞踏病；甲状腺機能亢進症；副甲状腺機能低下症；特発性白血球減少症；特発性血小板減少症；特発性パーキンソン病；特発性間質性肺炎；異常肝疾患；IgE媒介性アレルギー；免疫性溶血性貧血；封入体筋炎；感染症；感染性眼炎症性疾患；炎症性腸疾患；炎症性脱髄性疾患；炎症性心疾患；炎症性腎疾患；インスリン依存性糖尿病；間質性肺炎；IPF/UIP；虹彩炎；若年性慢性関節炎；若年性悪性貧血；若年性関節リウマチ（JRA）；川崎病；角膜炎；眼球乾燥症候群；クスマウル疾患またはクスマウル-マイヤー病；ランドリー麻痺；ランゲルハンス細胞組織球症；線状IgA疾患；網状皮斑；ライム関節炎；リンパ球浸潤性肺疾患；黄斑変性症；特発性男性不妊またはNOS；悪性疾患；顕微鏡的腎臓血管炎；顕微鏡的多発性血管炎；混合性結合組織疾患関連肺疾患；モルブス・ベクテレブ（*Morbus Bechterev*）；運動ニューロン障害；粘膜性類天疱瘡；多発性硬化症（すべてのサブタイプ：一次的進行性、二次的進行性、再発

10

20

30

40

50

性寛解など)；多臓器不全；筋痛脳炎／慢性疲労症候群；重症筋無力症；骨髓異形成症候群；心筋梗塞；心筋炎；ネフローゼ症候群；神経根障害；神経障害；非アルコール性脂肪性肝炎；非A非B型肝炎；視神経炎；臓器移植拒絶；変形性関節症；骨溶解；卵巣癌；卵巣機能不全；膵炎；寄生虫疾患；パーキンソン病；少数関節性JRA；類天疱瘡；落葉状天疱瘡；尋常性天疱瘡；末梢動脈閉塞性疾患(PAOD)；末梢血管疾患(PVD)；末梢動脈疾患(PAD)；水晶体生成性ブドウ膜炎；静脈炎；結節性多発性動脈炎(または結節性動脈周囲炎)；多発性軟骨炎；リウマチ性多発性筋痛；白毛症；多関節性JRA；多内分泌腺不全症候群；多発性筋炎；I型多腺不全およびII型多腺不全；リウマチ性多発筋痛(PMR)；感染後間質性肺疾患；炎症後間質性肺疾患；ポスト・ポンプ(post pump)症候群；早発卵巣不全；原発性胆汁性肝硬変；原発性粘液水腫；パーキンソン病；原発性硬化性胆管炎；原発性硬化性肝炎；原発性血管炎；前立腺および直腸癌および造血悪性疾患(白血病およびリンパ腫)；前立腺炎；乾癬；1型乾癬；2型乾癬；乾癬性関節炎；乾癬性関節症；結合組織疾患に続発する肺高血圧；結節性多発性動脈炎の肺症状；赤芽球ろう；原発性副腎不全；放射線線維症；反応性関節炎；ライター病；再発性視神経脊髄炎；腎疾患NOS；再狭窄；関節リウマチ；関節リウマチ関連間質性肺疾患；リウマチ性心疾患；SAPHO(滑膜炎、にきび、膿疱症、増殖症および骨炎)；サルコイドーシス；統合失調症；シュミット症候群；強皮症；続発性アミロイドーシス；ショック肺；強膜炎；坐骨神経痛；続発性副腎機能低下症；敗血症症候群；敗血症性関節炎；敗血症性ショック；血清陰性関節症；シリコーン関連結合組織疾患；シェーグレン病関連肺疾患；シェーグレン症候群；スネドン ウィルキンソン皮膚病；精子自己免疫；脊椎関節症；脊椎炎強直症；ステーブンス-ジョンソン症候群(SJS)；ステイル病；脳卒中；交感性眼炎；全身性炎症応答症候群；全身性エリテマトーデス；全身性エリテマトーデス関連肺疾患；全身性硬化症；全身性硬化症関連間質性肺疾患；高安病／動脈炎；側頭動脈炎；Th2型およびTh1型タイプ媒介性疾患；甲状腺炎、毒素性ショック症候群；トキソプラズマ網膜炎；中毒性表皮壊死症；横断性脊髄炎；TRAPS(腫瘍壊死因子1型受容体(TNFR)関連周期性症候群)；黒色表皮症を伴うB型インスリン抵抗性；1型アレルギー反応；1型自己免疫性肝炎(古典的自己免疫性またはルポイド肝炎)；2型自己免疫性肝炎(抗LKM抗体肝炎)；II型糖尿病；潰瘍性大腸炎関節症；潰瘍性大腸炎；蕁麻疹、通常型間質性肺炎(UIP)；ブドウ膜炎；血管炎びまん性肺疾患；血管炎、春季カタル；ウイルス性網膜炎；白斑；フォクト-小柳-原田症候群(VKH症候群)；ウェゲナー肉芽腫症；滲出型黄斑変性；創傷治癒；エルシニアおよびサルモネラ関連関節症。

【0147】

TNF- 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は、単独で、または例えば自己免疫および炎症疾患の治療に有用な追加的治療用物質と組合されて、そのような疾患を治療するために使用されうる。該結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は、単独で、または追加的物質(例えば、治療用物質)組合されて使用されうる、と理解されるべきである。該追加的物質は、その意図される目的に基づいて、当業者により選択される。例えば、該追加的物質は、該抗体により治療されている疾患または状態を治療するために有用であると当技術分野で認識されている治療用物質でありうる。該追加的物質はまた、該治療用組成物に有益な特性を付与する物質(例えば、該組成物の粘度に影響を及ぼす物質)でありうる。

【0148】

該組合せは、本明細書に記載されているTNF- 結合性タンパク質またはその抗原結合性フラグメントおよび後記の少なくとも1つの追加的物質を含む。該組合せはまた、形成される組成物がその意図される機能を果たしうるような組合せであれば、2以上の追加的物質、例えば、2個または3個の追加的物質を含みうる。

【0149】

1つの実施形態においては、組合せは、TNF- 結合性タンパク質またはその抗原結合性フラグメント、および以下のものに結合しうる抗体またはそのフラグメント：ヒトI

L - 12 ; P G E 2 ; L P A ; N G F ; C G R P ; S u b P ; R A G E ; ヒスタミン ; ヒスタミン受容体ブロッカー ; ブラジキニン ; I L - 1 アルファ ; I L - 1 ベータ ; V E G F ; P L G F ; メトトレキサート ; コルチコステロイド ; グルココルチコイド受容体モジュレーター ; シクロスポリン、ラパマイシン、F K 5 0 6 または非ステロイド性抗炎症物質を含む。

【0150】

もう1つの実施形態においては、典型的な組合せは、本明細書に記載されているTNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性フラグメント、および非ステロイド性抗炎症薬 (N S A I D)、例えばイブプロフェンを含む。他の典型的な組合せは、本明細書に記載されている抗体またはその抗原結合性フラグメント、およびコルチコステロイド、例えばプレドニゾロンを含む。ステロイド使用の副作用は、該TNF - 結合性タンパク質と組合せて、患者を治療する際に必要とされるステロイド用量を漸減させることにより軽減または除去されうる。抗体または抗体部分が組合せられる、関節リウマチに対する治療物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる : サイトカイン抑制性抗炎症薬 (C S A I D) ; 他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えばTNF、LT、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 15、IL - 16、IL - 18、IL - 21、インターフェロン、EMAP - II、GM - CSF、FGFおよびPDGF、TNFファミリーメンバー、例えばTRAIL、FASL、APRILなどの抗体またはアンタゴニスト、およびプロスタグランジン、例えばPGE2、S1P、LPAなどのような疾患の脂質メディエータに対する抗体。他の疾患メディエータには、スクレロスチン (s c l e r o s t i n)、NGF、サブスタンスP、CGRPおよび他の疼痛メディエータが含まれる。抗体またはその抗原結合性フラグメントは、以下のものに対する抗体 : CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80 (B 7 . 1)、CD86 (B 7 . 2)、CD90、CTLAのような細胞表面分子、またはそれらリガンド、例えばCD154 (g p 3 9 または C D 4 0 L) と組合せられる。

【0151】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性フラグメントと組合せるための典型的な治療物質は、自己免疫および後続の炎症カスケードにおける種々の点において阻害し、例えば以下のものを含む : キメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体のようなTNFアンタゴニスト、D2E7 (P C T 公開番号 W O 9 7 / 2 9 1 3 1)、CA2 (R E M I C A D E (登録商標))、CDP 571 および可溶性p55またはp75 TNF受容体、それらの誘導体 (p 7 5 T N F R 1 g G (E N B R E L (登録商標)) または p 5 5 T N F R 1 g G (L e n e r c e p t))、そしてまた、TNF - 変換酵素 (T A C E) インヒビター、および他のIL - 1 インヒビター (インターロイキン - 1 変換酵素インヒビター、IL - 1 R A など)。該抗体およびその抗原結合性フラグメントと組合せるための他の物質には、インターロイキン11、TNF - 機能と並行して、依存的に又は共同的に作用する物質、例えばIL - 18アンタゴニスト (例えば、IL - 18結合性タンパク質、例えば、抗体または可溶性IL - 18受容体またはその抗原結合性フラグメント) が含まれる。該抗体およびその抗原結合性フラグメントと組合せるための追加的物質には、非枯渇性 (n o n - d e p l e t i n g) 抗CD4インヒビター、共刺激経路CD80 (B 7 . 1) またはCD86 (B 7 . 2) のアンタゴニスト、例えば抗体、可溶性受容体、アンタゴニスト性リガンドまたはそれらの抗原結合性フラグメントが含まれる。

【0152】

該結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は、例えば以下のような、関節リウマチの治療のための物質とも組合せられる : メトトレキサート (m e t h o t r e x a t e)、6 - M P、アザチオプリン スルファサラジン (a z a t h i o p r i n e s u l p h a s a l a z i n e)、メサラジン (m e s a l a z i n e)、オルサラジン クロロキニン / ヒドロキシクロロキニン (o l s a l a z i n e c h l o r o q u i n i n e / h y d r o x y c h l o r o q u i n i n e)、ペンシラミン (p e n c i l l a m i n e

10

20

30

40

50

)、オーロチオマラート(aurothiomalate)(筋肉内および経口)、アザチオプリン(azathioprine)、コルヒシン(colchicine)、コルチコステロイド(経口、吸入および局所注射)、ベータ-2 アドレナリン受容体アゴニスト(サルブタモール(salbutamol)、テルブタリン(terbutaline)、サルメテラル(salmeteral))、キサンチン(テオフィリン(theophylline)、アミノフィリン(aminophylline))、クロモグリカート(cromoglycate)、ネドクロミル(nedocromil)、ケトチフェン(ketotifen)、イプラトロピウム(ipratropium)およびオキシトロピウム(oxitropium)、シクロスポリン(cyclosporin)、FK506、ラパマイシン(rapamycin)、ミコフェノール酸モフェチル(mycophenolate mofetil)、レフルノミド(leflunomide)、NSAID、例えばイブプロフェン(ibuprofen)、コルチコステロイド、例えばプレドニゾロン(prednisolone)、ホスホジエステラーゼインヒビター、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体インヒビター、アドレナリン作動性物質、TNF- またはIL-1のような炎症性サイトカインによるシグナリングを阻害する物質(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38およびMAPキナーゼインヒビター)、IL-1ベータ変換酵素インヒビター、TNF- 変換酵素(TACE)インヒビター、T細胞シグナリングインヒビター、例えばキナーゼインヒビター、メタロプロテイナーゼインヒビター、スルファサラジン(sulfasalazine)、アザチオプリン(azathioprine)、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素インヒビター、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体(例えば、p55またはp75 TNF受容体および誘導体p75 TNFR IgG(ENBREL(商標)およびp55 TNFR IgG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、抗炎症性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF)、セレコキシブ(celecoxib)、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ(rofecoxib)、エタネルセプト(etanercept)、インフリキシマブ(infliximab)、ナプロキセン(naproxen)、バルデコキシブ(valdecoxib)、スルファサラジン(sulfasalazine)、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、メロキシカム(meloxicam)、酢酸メチルプレドニゾロン、金ナトリウムチオマラート、アスピリン、トリアムシノロンアセトニド(triamcinolone acetonide)、プロポキシフェンナプシラート(propoxyphene napsylate)/apap、フォラート、ナブメトン(nabumetone)、ジクロフェナック(diclofenac)、ピロキシカム(piroxicam)、エトドラック(etodolac)、ジクロフェナック(diclofenac)ナトリウム、オキサプロジン(oxaprozin)、オキシコドン(oxycodone)hcl、酒石酸水素ヒドロコドン/apap、ジクロフェナック(diclofenac)ナトリウム/ミソプロストール(misoprostol)、フェンタニル(fentanyl)、アナキンラ(anakinra)、ヒト組換え体、トラマドール(tramadol)hcl、サルサラート(salsalate)、スリンダック(sulindac)、シアノコバラミン(cyanocobalamin)/fa/ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロン酸ナトリウムナート、プレドニゾロン(prednisolone)、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン(indomethacin)、グルコサミンsulfl/コンドロイチン、アミトリプチリン(amitriptyline)hcl、スルファジアジン(sulfadiazine)、オキシコドン(oxycodone)hcl/アセトアミノフェン(acetaminophen)、オロパタジン(olopatadine)hcl、ミソプロストール(misoprostol)、ナプロキセン(naproxen)ナトリウム、オメプラゾール(omeprazole)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、リツキシマブ(rituximab)、IL-1 TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18 BP、抗IL-18、抗

10

20

30

40

50

IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX-740、ロフルミラスト(Roflumilast)、IC-485、CDC-801 およびメソプラム(Mesopram)。

【0153】

TNF- 結合性タンパク質(例えば、抗体)またはその抗原結合性部分が組合せられる、炎症性腸疾患に対する治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる: ブデノシド(budenoside); 上皮増殖因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン(sulfasalazine)、アミノサリシラート、6-メルカプトプリン、アザチオプリン(azathioprine)、メトロニダゾール(metronidazole)、リボキシゲナーゼインヒビター、メサラミン(mesalamine)、オルサラジン(olsalazine)、バルサラジド(balsalazide)、抗酸化物質、トロンボキサンインヒビター、IL-1受容体アンタゴニスト、抗IL-1モノクローナル抗体、抗IL-6モノクローナル抗体、増殖因子、エラスターゼインヒビター、ピリジニル-イミダゾール化合物、他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGFに対する抗体またはアンタゴニスト。抗体またはその抗原結合性部分は、細胞表面分子、例えばCD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90およびそれらのリガンドに対する抗体と組合せられる。該結合性タンパク質または抗原結合性部分は、メトトレキサート(methotrexate)、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン(rapamycin)、ミコフェノール酸モフェチル(mycophenolate mofetil)、レフルノミド(lef lunomide)、NSAID、例えばイブuprofen、コルチコステロイド、例えばプレドニゾロン(prednisolone)、ホスホジエステラーゼインヒビター、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体インヒビター、アドレナリン作動性物質、TNF- またはIL-1のような炎症性サイトカインによるシグナリングを阻害する物質(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38およびMAPキナーゼインヒビター)、IL-1変換酵素インヒビター、TNF- 変換酵素インヒビター、T細胞シグナリングインヒビター、例えばキナーゼインヒビター、メタロプロテインナーゼインヒビター、スルファサラジン(sulfasalazine)、アザチオプリン(azathioprine)、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素インヒビター、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体(例えば、可溶性p55またはp75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)および抗炎症性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF)とも組合せられる。

【0154】

本明細書に記載されているTNF- 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、クローン病に対する治療用物質の典型例には、以下のものが含まれる: TNFアンタゴニスト、例えば抗TNF抗体、D2E7(PCT公開番号WO 97/29131; HUMIRA(登録商標))、CA2(REMICADE(登録商標))、CDP571、TNFR-Ig構築物(p75TNFRIgG(ENBREL(登録商標))およびp55TNFRIgG(Lenercept))インヒビター、他のTNFアンタゴニスト、例えばゴリムマブ(Golimumab)(シンボニ(Simponi))およびPDE4インヒビター。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は、コルチコステロイド、例えばブデノシド(budenoside)およびデキサメタゾン(dexamethasone)と組合せられる。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は、スルファサラジン(sulfasalazine)、5-アミノサリチル酸およびオルサラジン(olsalazine)のような物質、ならびに炎症性サイトカイン、例えばIL-1の合成または作用を阻害する物質、例えばIL-1変換酵素インヒビターおよびIL-1RAとも組合せられる。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分はまた、T

10

20

30

40

50

細胞シグナリングインヒビター、例えばチロシンキナーゼインヒビターである6-メルカプトプリンと共に使用されうる。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分はIL-11と組合せられうる。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は以下のものと組合せられうる：メサラミン(mesalamine)、プレドニゾン(prednisone)、アザチオプリン(azathioprine)、メルカプトプリン(mercaptopurine)、インフリキシマブ(infliximab)、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)ナトリウムスクシナート、ジフェノキシラート/atropスルファート、塩酸ロペラミド(loperamide)、メトトレキサート(methotrexate)、オメプラゾール(omeprazole)、フォラート、シプロフロキサシン(ciprofloxacin)/デキストロース-水、酒石酸水素ヒドロコドン/apap、塩酸テトラサイクリン、フルオシノニド(fluocinonide)、メトロニダゾール(metronidazole)、チメロサル(thimerosal)/ホウ酸、コレステラミン(cholestyramine)/スクロース、塩酸シプロフロキサシン(ciprofloxacin)、硫酸ヒヨスチアミン、塩酸メペリジン(meperidine)、塩酸ミダゾラム(midazolam)、オキシコドン(oxycodone)hcl/アセトアミノフェン(acetaminophen)、塩酸プロメタジン(promethazine)、リン酸ナトリウム、スルファメトキサゾール(sulfamethoxazole)/トリメトプリム(trimethoprim)、セレコキシブ(celecoxib)、ポリカルボフィル(polycarbophil)、プロボキシフェン(propoxyphene)ナブシラート、ヒドロコルチゾン(hydrocortisone)、総合ビタミン、バルサラジド(balsalazide)二ナトリウム、リン酸コデイン/apap、コレセベラム(colesevelam)hcl、シアノコバラミン、葉酸、レボフロキサシン(levofloxacin)、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、ナタリズマブ(natalizumab)およびインターフェロン-ガンマ。

【0155】

TNF 結合性タンパク質または抗原結合性部分が組合せられうる、多発性硬化症に対する治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：コルチコステロイド、プレドニゾロン(prednisolone)、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、アザチオプリン(azathioprine)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、シクロスポリン(cyclosporine)、メトトレキサート(methotrexate)、4-アミノピリジン、チザニジン(tizanidine)、インターフェロン-1a(AVONEX(登録商標); Biogen)、インターフェロン-1b(BETASERON(登録商標); Chiron/Berlex)、インターフェロン-n3(Interferon Sciences/Fujimoto)、インターフェロン-(Alfa Wassermann/J&J)、インターフェロン-1A-IF(Serono/Inhale Therapeutics)、ペグインターフェロン(Peginterferon)2b(Enzon/Schering-Plough)、コポリマー(Copolymer)1(Cop-1; COPAXONE(登録商標); Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)、高圧酸素、静脈内投与用免疫グロブリン、クラブリピン(clabribine)、他のヒトサイトカインまたは増殖因子およびそれらの受容体、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-1A、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF、およびPDGFに対する抗体またはアンタゴニストまたはインヒビター。抗体またはその抗原結合性部分は、細胞表面分子、例えばCD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90またはそれらのリガンドに対する抗体と組合せられうる。該抗体またはその抗原結合性部分は、FK506、ラパマイシン(rapamycin)、ミコフェノール酸モフェチル(mycophenolate mofetil)、レフルノ

ミド (leflunomide)、NSAID、例えばイブプロフェン (ibuprofen)、ホスホジエステラーゼインヒビター、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体インヒビター、アドレナリン作動性物質、TNF - またはIL - 1のような炎症性サイトカインによるシグナリングを阻害する物質 (例えば、IRAK、NIK、IKK、p38 およびMAPキナーゼインヒビター)、IL - 1 変換酵素インヒビター、TACEインヒビター、T細胞シグナリングインヒビター、例えばキナーゼインヒビター、メタロプロテイナーゼインヒビター、スルファサラジン (sulfasalazine)、アザチオプリン (azathioprine)、6 -メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素インヒビター、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体 (例えば、可溶性p55またはp75 TNF受容体、sIL - 1RI、sIL - 1RII、sIL - 6R)、抗炎症性サイトカイン (例えば、IL - 4、IL - 10、IL - 13およびTGF)、COPAXONE (登録商標)ならびにカスパーゼインヒビター、例えばカスパーゼ - 1のインヒビターのような物質とも組合せられる。

10

20

30

40

50

【0156】

該TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は以下のような物質とも組合せられる：アテムツズマブ (alemtuzumab)、ドロナビノール (dronabinol)、ウニメド (Unimed)、ダクリズマブ (daclizumab)、ミトザントロン (mitoxantrone)、塩酸キサリプロデン (xaliproden)、ファミプリジン (fampridine)、酢酸グラチラマー (glatiramer)、ナタリズマブ (natalizumab)、シンナビドール (sinnabidol)、a - イムノカイン (immunokine) NNSO3、ABR - 215062、AnergiX .MS、ケモカイン受容体アンタゴニスト、BBR - 2778、カラグアリン (calagualine)、CPI - 1189、LEM (リポソーム封入ミトザントロン)、THC .CBD (カンナビノイドアゴニスト) MBP - 8298、メソプラム (mesopram) (PDE4インヒビター)、MNA - 715、抗IL - 6受容体抗体、ニューロバックス (neurovax)、ピルフェニドン アロトラップ (pirfenidone allotrap) 1258 (RDP - 1258)、sTNF - R1、タランパネル (talampanel)、テリフルノミド (teriflunomide)、TGF - 2、チプリモチド (tiplimotide)、VLA - 4アンタゴニスト (例えば、TR - 14035、VLA4 Ultrahaler, Antegran - ELAN / Biogen)、インターフェロンガンマアンタゴニスト。

【0157】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、アングイナの治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、アスピリン、ニトログリセリン、一硝酸イソソルビド (isosorbide)、コハク酸メトプロロール (metoprolol)、アテノロール (atenolol)、酒石酸メトプロロール (metoprolol)、ベシル酸アモロジピン (amlodipine)、塩酸ジルチアゼム (diltiazem)、二硝酸イソソルビド (isosorbide)、硫酸水素クロピドグレール (clopidogrel)、ニフェジピン (nifedipine)、アトルバスタチン (atorvastatin) カルシウム、塩化カリウム、フロセミド (furosemide)、シンバスタチン (simvastatin)、ベラパミル (verapamil) hcl、ジゴキシン (digoxin)、塩酸プロプラノロール (propranolol)、カルベジロール (carvedilol)、リシノプリル (lisinopril)、スピロノラクトン (spironolactone)、ヒドロクロロチアジド (hydrochlorothiazide)、マレイン酸エナラプリル (enalapril)、ナドロール (nadolol)、ラミプリル (ramipril)、エノキサパリン (enoxaparin) ナトリウム、ヘパリンナトリウム、バルサルタン (valsartan)、塩酸ソタロール (sotalol)、フェノフィブラート (fenofibrate)、エゼチミブ (ezetimibe)、ブメタニド (bumetanide)、ロサルタン (losartan) カリウム、リシノプリル (lisinop

ril) / ヒドロクロチアジド、フェロジピン (felodipine)、カプトプリル (captopril) およびフマル酸ビソプロロール (bisoprolol)。

【0158】

結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、強直性脊椎炎の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：イブプロフェン (ibuprofen)、ジクロフェナック (diclofenac) およびミソプロストール (misoprostol)、ナプロキセン (naproxen)、メロキシカム (meloxicam)、インドメタシン (indomethacin)、ジクロフェナック (diclofenac)、セレコキシブ (celecoxib)、ロフェコキシブ (rofecoxib)、スルファサラジン (sulfasalazine)、メトトレキセート (methotrexate)、アザチオプリン (azathioprine)、ミノサイクリン (minocyclin)、プレドニゾン (prednisone)、エタネルセプト (etanercept) およびインフリキシマブ (infliximab)。

10

【0159】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、喘息の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：アルブテロール (albuterol)、サルメテロール (salmeterol) / フルチカゾン (fluticasone)、モンテルカスト (montelukast) ナトリウム、フロピオン酸フルチカゾン (fluticasone)、ブデソニド (budesonide)、プレドニゾン (prednisone)、サルメテロール (salmeterol) キシナフォート、レバルブテロール (levalbuterol) hcl、硫酸アルブテロール (albuterol) / イプラトロピウム (ipratropium)、プレドニゾロン (prednisolone) ナトリウムホスファート、トリアムシノロンアセトニド (triamcinolone acetate)、ニプロピオン酸ベクロメタゾン (beclomethasone)、臭化イプラトロピウム (ipratropium)、アジスロマイシン (azithromycin)、塩酸ピルブテロール (pirbuterol)、プレドニゾロン (prednisolone)、無水テオフィリン (theophylline)、メチルプレドニゾロン (methylprednisolone) ナトリウムスクシナート、クラリスロマイシン (clarithromycin)、ザフィルルカスト (zafirlukast)、フマル酸フォルモテロール (formoterol)、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾロン (methylprednisolone)、アモキシシリン (amoxicillin) 三水和物、フルニソリド (flunisolide)、アレルギー注射、クロモリン (cromolyn) ナトリウム、塩酸フェクソフェナジン (fexofenadine)、フルニソリド (flunisolide) / メントール、アモキシシリン (amoxicillin) / クラブラナート、レボフロキサシン (levofloxacin)、吸入補助装置、グアイフェネシン (guaifenesin)、デキサメタゾン (dexamethasone) ナトリウムホスファート、モキシフロキサシン (moxifloxacin) hcl、ドキシサイクリン (doxycycline) ヒクラート、グアイフェネシン (guaifenesin) / d-メトルファン (methorphan)、p-エフェドリン (ephedrine) / コド (cod) / クロルフェニル (chlorphenir)、ガチフロキサシン (gatifloxacin)、塩酸セチリジン (cetirizine)、モメタゾン (mometasone) フロアート、サルメテロール (salmeterol) キシナフォート、ベンゾナタート、セファレキシン (cephalexin)、pe / ヒドロコドン (hydrocodone) / クロルフェニル (chlorphenir)、セチリジン (cetirizine) hcl / プソイドエフェド (pseudoephed)、フェニルエフリン (phenylephrine) / コド (cod) / プロメタジン (promethazine)、コデイン (codeine) / プロメタジン (promethazine)、セフプロジル (cefprozil)、

20

30

40

50

デキサメタゾン (dexamethasone)、グアイフェネシン (guaifenesin) / プソイドエフェドリン (pseudoephedrine)、クロルフェニラミン (chlorpheniramine) / ヒドロコドン (hydrocodone)、ネドクロミル (nedocromil) ナトリウム、硫酸テルブタリン (terbutaline)、エピネフリン (epinephrine)、メチルプレドニゾロン (methylprednisolone) および硫酸メタプロテレノール (metaproterenol)。

【0160】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、COPDの治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：硫酸アルブテロール (albuterol) / イプラトロピウム (ipratropium)、臭化イプラトロピウム、サルメテロール (salmeterol) / フルチカゾン (fluticasone)、アルブテロール (albuterol)、サルメテロール (salmeterol) キシナフォアート、プロピオン酸フルチカゾン (fluticasone)、プレドニゾン (prednisone)、無水テオフィリン (theophylline)、メチルプレドニゾロン (methylprednisolone) ナトリウムスクシナート、モンテルカスト (montelukast) ナトリウム、ブデソニド (budesonide)、フマル酸ホルモテノール (formoterol)、トリアムシノロンアセトニド (triamcinolone acetoneide)、レボフロキサシン (levofloxacin)、グアニフェネシン (guaifenesin)、アジトロマイシン (azithromycin)、ジプロピオン酸ベクロメタゾン (beclomethasone)、レバルブテロール (lev albuterol) hcl、フルニソリド (flunisolide)、セフトリアキソン (ceftriaxone) ナトリウム、アモキシシリン (amoxicillin) 三水和物、ガチフロキサシン (gatifloxacin)、ザフィルルカスト (zafirlukast)、アモキシシリン (amoxicillin) / クラブラナート、フルニソリド (flunisolide) / メントール、クロルフェニラミン (chlorpheniramine) / ヒドロコドン (hydrocodone)、硫酸メタプロテレノール (metaproterenol)、メチルプレドニゾロン (methylprednisolone)、モメタゾン (mometasone) フロアート、p - エフェドリン (ephedrine) / コド (cod) / クロルフェニル (chlorphenir)、酢酸ビルブテロール (pirbuterol)、p - エフェドリン (ephedrine) / ロラタジン (loratadine)、硫酸テルブタリン (terbutaline)、臭化チオトロピウム (tiotropium)、(R, R) - ホルモテノール (formoterol)、TgAAT、シロミラスト (cilomilast) およびロフルミラスト (roflumilast)。

【0161】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、HCVの治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：インターフェロン - アルファ - 2a、インターフェロン - アルファ - 2b、インターフェロン - アルファ - con1、インターフェロン - アルファ - n1、ペジル化 (pegylated) インターフェロン - アルファ - 2a、ペジル化インターフェロン - アルファ - 2b、リバビリン (ribavirin)、ペグインターフェロンアルファ - 2b + リバビリン、ウルソデオキシコール酸、グリシリジン酸、チマルファシン (thymalfasin)、マキサミン (maxamine)、VX - 497、および以下の標的：HCVポリメラーゼ、HCVプロテアーゼ、HCVヘリカーゼ、HCV IRES (内部リボソーム進入部位) への介入によりHCVを治療するために使用されるいずれかの化合物。

【0162】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、特発性肺線維症の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：プ

10

20

30

40

50

レドニゾン (prednisone)、アザチオプリン (azathioprine)、アルブテロール (albuterol)、コルヒチン (colchicine)、硫酸アルブテロール、ジゴキシン (digoxin)、ガンマイインターフェロン、メチルプレドニゾン (methylprednisolone) ソド (sod) スクシ (succ)、ロラゼパム (lorazepam)、フロセミド (furosemide)、リシノプリル (lisinopril)、ニトログリセリン、スピロラクトン、シクロホスファミド、臭化イpratropium (ipratropium)、アクチノマイシン (actinomycin) d、アルテプラゼ (alteplase)、プロピオン酸フルチカゾン (fluticasone)、レボフロキサシン (levofloxacin)、硫酸メタプロテレノール (metaproterenol)、硫酸モルヒネ、オキシコドン (oxycodone) HCl、塩化カリウム、トリアムシノロンアセトニド (triamcinolone acetonide)、無水タクロリムス (tacrolimus)、カルシウム、インターフェロン - アルファ、メトトレキサート (methotrexate)、ミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil) およびインターフェロン - ガンマ - 1b。

10

【0163】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、心筋梗塞の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：アスピリン、ニトログリセリン、酒石酸メトプロロール (metoprolol)、エノキサパリン (enoxaparin) ナトリウム、ヘパリンナトリウム、硫酸水素クロピドグレル (clopidogrel)、カルベジロール (carvedilol)、アテノロール (atenolol)、硫酸モルヒネ、コハク酸メトプロロール (metoprolol)、ワルファリン (warfarin) ナトリウム、リシノプリル (lisinopril)、一硝酸イソソルビド (isosorbide)、ジゴキシン、フロセミド (furosemide)、シンバスタチン (simvastatin)、ラミプリル (ramipril)、テネクテプラゼ (tenecteplase)、マレイン酸エナラプリル (enalapril)、トルセミド (torsemide)、レタバース (retavase)、ロサルタン (losartan) カリウム、キナプリル (quinapril) hcl/mag carb、ブメタニド (bumetanide)、アルテプラゼ (alteplase)、エナラプリラト (enalaprilat)、アミオダロン (amiodarone) 塩酸、チロフィバン (tirofiban) hcl m - 水和物、ジルチアゼム (diltiazem) 塩酸、カプトプリル (captopril)、イルベサルタン (irbesartan)、バルサルタン (valsartan)、塩酸プロプラノロール (propranolol)、フォシノプリル (fosinopril) ナトリウム、塩酸リドカイン (lidocaine)、エプチフィバチド (eptifibatide)、セファゾリン (cefazolin) ナトリウム、硫酸アトロピン (atropine)、アミノカプロン酸、スピロラクトン、インターフェロン、ソタロール (sotalol) 塩酸、塩化カリウム、ドキュセート (docusate) ナトリウム、ドブタミン (dobutamine) hcl、アルプラゾラム (alprazolam)、プラバスタチン (pravastatin) ナトリウム、アトルバスタチン (atorvastatin) カルシウム、塩酸ミダゾラム (midazolam)、塩酸メペリジン (mepiridine)、二硝酸イソソルビド (isosorbide)、エピネフリン (epinephrine)、ドパミン (dopamine) 塩酸、ビバリルジン (bivalirudin)、ロスバスタチン (rosuvastatin)、エゼチミブ (ezetimibe) / シンバスタチン (simvastatin)、アバシミブ (avasimibe) およびカリポリド (cariporide)。

20

30

40

【0164】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、乾癬の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：カルシポトリエン (calcipotriene)、プロピオン酸クロベタゾール (clobetas

50

ol)、トリアムシノロンアセトニド(triamcinolone acetonide)、プロピオン酸ハロベタゾール(halobetasol)、タザロテン(tazarotene)、メトトレキサート(methotrexate)、フルオシノニド(fluciclonide)、ベタメタゾン(betamethasone)ジプロップ(diprop)増強体、フルオシノロンアセトニド(fluciclonolone acetonide)、アシトレチン(acitretin)、タールシャンプー、吉草酸ベタメタゾン(betamethasone)、モメタゾン(mometasone)フロアート、ケトコナゾール(ketoconazole)、プラモキシム(pramoxine)/フルオシノロン(fluciclonolone)、吉草酸ヒドロコルチゾン(hydrocortisone)、フルランドレノリド(flurandrenolide)、尿素、ベタメタゾン(betamethasone)、プロピオン酸クロベタゾール(clobetasol)/emoll、プロピオン酸フルチカゾン(fluticasone)、アジスロマイシン(azithromycin)、ヒドロコルチゾン、保湿剤、葉酸、デソニド(desonide)、ピメクロリムス(pimecrolimus)、コールタール、二酢酸ジフロラゾン(diflorasone)、葉酸エタネルセプト(etanercept)、乳酸、メトキサレン(methoxsalen)、hc/ピスマスsubgal/znox/resor、酢酸メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、プレドニゾン(prednisone)、日焼け止め、ハルシノニド(halcinonide)、サリチル酸、アントラリン(anthralin)、クロコルトロン(clocortolone)ピバラート、石炭抽出物、コールタール/サリチル酸、コールタール/サリチル酸/硫黄、デソキシメタゾン(desoximetasone)、ジアゼパム(diazepam)、皮膚軟化薬、フルオシノニド/皮膚軟化薬、鉱油/ヒマシ油/nalact、鉱油/ラッカセイ油、石油/イソプロピルミリスタート、ソラレン(psoralen)、サリチル酸、石炭/トリブロムサラン(tribromsalan)、チメロサル(thimerosal)/ホウ酸、セレコキシブ(celecoxib)、インフリキシマブ(infliximab)、シクロスポリン(cyclosporine)、アレファセプト(alefacept)、エファリズマブ(efalizumab)、タクロリムス(tacrolimus)、ピメクロリムス(pimecrolimus)、PUVA、UVBおよびスルファサラジン(sulfasalazine)。

【0165】

TNF-結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、乾癬性関節炎の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：メトトレキサート(methotrexate)、エタネルセプト(etanercept)、ロフェコキシブ(rofecoxib)、セレコキシブ(celecoxib)、葉酸、スルファサラジン(sulfasalazine)、ナプロキセン(naproxen)、レフルノミド(lefloxacin)、酢酸メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、インドメタシン(indomethacin)、硫酸ヒドロキシクロロキノン(hydroxychloroquine)、プレドニゾン(prednisone)、スリンダック(sulindac)、ベタメタゾン(betamethasone)ジプロップ(diprop)増強体、インフリキシマブ(infliximab)、メトトレキサート(methotrexate)、フォラート、トリアムシノロンアセトニド(triamcinolone acetonide)、ジクロフェナック(diclofenac)、ジメチルスルホキシド、ピロキシカム(piroxicam)、ジクロフェナック(diclofenac)ナトリウム、ケトプロフェン(ketoprofen)、メロキシカム(meloxicam)、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、ナブメトン(nabumetone)、トルメチン(tolmetin)ナトリウム、カルシポトリエン(calcipotriene)、シクロスポリン(cyclosporine)、ジクロフェナック(diclofenac)ナトリウム/ミソプロストール(misoprostol)、フルオシノニド(f

luocinonide)、硫酸グルコサミン(glucosamine)、金ナトリウムチオマラト、酒石酸水素ヒドロコドン(hydrocodone)/apap、イブプロフェン(ibuprofen)、リセドロナート(risedronate)ナトリウム、スルファジアジン(sulfadiazine)、チオグアニン(thioguanine)、バルデコキシブ(valdecobox)、アレファセプト(alefacapt)およびエファリズマブ(efalizumab)。

【0166】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、再狭窄の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：シロリムス(sirolimus)、パクリタキセル(paclitaxel)、エベロリムス(everolimus)、タクロリムス(tacrolimus)、ABT-578およびアセトアミノフェン(acetaminophen)。

10

【0167】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、坐骨神経痛の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：酒石酸水素ヒドロコドン/apap、ロフェコキシブ(rofecoxib)、シクロベンザプリン(cyclobenzaprine)hcl、メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、ナプロキセン(naproxen)、イブプロフェン(ibuprofen)、オキシコドン(oxycodone)hcl/アセトアミノフェン(acetaminophen)、セレコキシブ(celecoxib)、バルデコキシブ(valdecobox)、酢酸メチルプレドニゾロン(methylprednisolone)、プレドニゾン(prednisone)、リン酸コデイン(codeine)/apap、トラマドール(tramadol)hcl/アセトアミノフェン(acetaminophen)、メタキサロン(metaxalone)、メロキシカム(meloxicam)、メトカルバモール(methocarbamol)、塩酸リドカイン(lidocaine)、ジクロフェナック(diclofenac)ナトリウム、ガバペンチン(gabapentin)、デキサメタゾン(dexamethasone)、カリソプロドール(carisoprodol)、ケトロラクトロメタミン(ketorolactromethamine)、インドメタシン(indomethacin)、アセトアミノフェン(acetaminophen)、ジアゼパム(diazepam)、ナブメトン(nabumetone)、オキシコドン(oxycodone)hcl、チザニジン(tizanidine)hcl、ジクロフェナック(diclofenac)ナトリウム/ミソプロストール(misoprostol)、プロボキシフェン(propoxyphene)ナブシラート/apap、asa/オキシコド(oxycod)/オキシコドン(oxycodone)ter、イブプロフェン(ibuprofen)/ヒドロコドン(hydrocodone)bit、トラマドール(tramadol)hcl、エトドラック(etodolac)、プロボキシフェン(propoxyphene)hcl、アミトリプチリン(amitriptyline)hcl、カリソプロドール(carisoprodol)/コデインphos/asa、硫酸モルヒネ、総合ビタミン、ナプロキセン(naproxen)ナトリウム、クエン酸オルフェナドリン(orphenadrine)およびテマゼパム(temazepam)。

20

30

40

【0168】

TNF - 結合性タンパク質またはその抗原結合性部分が組合せられる、全身性エリテマトーデス(SLE)の治療または予防のための治療用物質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：NSAID、例えばジクロフェナック(diclofenac)、ナプロキセン(naproxen)、イブプロフェン(ibuprofen)、ピロキシカム(piroxicam)、インドメタシン(indomethacin)COX2インヒビター、例えばセレコキシブ(celecoxib)、ロフェコキシブ(rofecoxib)、バルデコキシブ(valdecobox)、抗マラリア薬、例えばヒドロキシクロロキン(hydroxychloroquine)、ステロイド、例えばプレドニゾン

50

(prednisone)、プレドニゾロン(prednisolone)、ブデノシド(budenoside)、デキサメタゾン(dexamethasone)、細胞毒、例えばアザチオプリン(azathioprine)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ミコフェノール酸モフェチル(mycophenolate mofetil)、メトトレキサート(methotrexate)、PDE4インヒビターまたはプリン合成インヒビター、例えばCELLCEPT(登録商標)。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は以下のような物質とも組合せられる：スルファサラジン(sulfasalazine)、5-アミノサリチル酸、オルサラジン(olsalazine)、Imuran、および炎症性サイトカイン、例えばIL-1の合成、産生または作用を阻害する物質、例えばカスパーゼインヒビター、例えばIL-1変換酵素インヒビターおよびIL-1ra。結合性タンパク質またはその抗原結合性部分は、T細胞シグナリングインヒビター、例えばチロシンキナーゼインヒビター、またはT細胞活性化分子を標的化する分子、例えばCTLA-4-IgGまたは抗B7ファミリー抗体。結合性タンパク質または抗原結合性部分は以下のものと組合せられる：IL-11または抗サイトカイン抗体、例えばホノトリズマブ(fonotolizumab)(抗IFNγ抗体)または抗受容体受容体抗体、例えば抗IL-6受容体抗体、およびB細胞表面分子に対する抗体。結合性タンパク質または抗原結合性部分はまた、以下のものと共に使用される：LJP 394(アベチムス(abetimus))、B細胞を枯渇または不活性化する物質、例えばリツキシマブ(rituximab)(抗CD20抗体)、リンホスタット(lymphostat)-B(抗BlyS抗体)、TNFアンタゴニスト、例えば抗TNF抗体、D2E7(PCT公開番号WO 97/29131; HUMIRA(登録商標))、CA2(REMICADE(登録商標))、CDP 571、TNFR-Ig構築物(p75TNFR-IgG(ENBREL(登録商標))およびp55TNFR-IgG(Lenercept))。

【0169】

該医薬組成物はTNF結合性タンパク質またはその抗原結合性部分「治療的有効量」または「予防的有効量」を含む。「治療的有効量」は、所望の治療結果を達成するための、必要な投与における及び期間にわたる、有効な量を意味する。本明細書に記載されている結合性タンパク質またはその抗原結合性タンパク質の治療的有効量は、当業者により決定されることが可能であり、個体の病態、年齢、性別および体重ならびに個体において所望の応答を惹起する該抗体またはその抗原結合性部分の能力のような要因に応じて変動する。治療的有効量はまた、該抗体またはその抗原結合性部分のいずれかの毒性の又は有害な作用より、治療的に有益な作用が勝っている場合のものである。「予防的有効量」は、所望の予防効果を達成するための、必要な投与における及び期間にわたる、有効な量を意味する。典型的には、疾患の発症前またはより早い病期で対象において予防用量が用いられるため、予防的有効量は治療的有効量より少ないであろう。

【0170】

投与計画は、最適な所望の応答(例えば、治療または予防応答)をもたらすように調節される。例えば、単一ボラスが投与されることが可能であり、幾つかの分割量が経時的に投与されることが可能であり、あるいは治療状況の要求に応じて用量が比例的に低減または増加されることが可能である。投与の容易さ及び投与の均一性のためには、非経口組成物を単位投与形に製剤化することが特に有利である。単位投与形は、治療すべき哺乳類対象に対する単位投与として適した物理的に分離した単位を意味し、各単位は、必要な医薬担体と共に、所望の治療効果をもたらすよう計算された活性化合物の所定量を含有する。該単位投与形の仕様は、(a)活性化合物の特有の特性および達成すべき個々の治療または予防効果、ならびに(b)個体における感受性の対処のためのそのような活性化合物の調剤技術に固有の制限によって決まり、直接的に左右される。

【0171】

TNF結合性タンパク質またはその抗原結合性部分の治療的または予防的有効量の典型的な非限定的な範囲は約0.1~約20mg/kg、約1~約10mg/kgである。

投与量値は、軽減すべき状態のタイプおよび重症度によって変動しうる。いずれかの個々の対象の場合、具体的な投与計画は、該組成物を投与する又は該組成物の投与を監督する者の専門的判断および個々の要求に応じて経時的に調節されるべきである。本明細書に記載されている投与量範囲は典型例に過ぎず、特許請求されている組成物の範囲または実施を限定するものではない。

【0172】

本明細書に記載されている組成物および方法の、他の適当な修飾および応用は明らかであり、該開示または本明細書に開示されている実施形態の範囲から逸脱することなく、適当な均等物を用いて行われうるものが、当業者に容易に理解されるであろう。本実施形態は、以下の実施例を参照することにより、より明らかに理解されるであろう。該実施例は例示目的で記載されているに過ぎず、限定的なものではない。

10

【実施例】

【0173】

[実施例1]：抗ヒトTNF - モノクローナル抗体の作製
マウス抗ヒトTNF - モノクローナル抗体を以下のとおりに得る。

【0174】

[実施例1.1]：ヒトTNF - 抗原でのマウスの免疫化
完全フロイントアジュバントまたはImmuno easyアジュバント (Qiagen, Valencia, CA) と混合された20マイクログラムの組換え精製ヒトTNF - (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を5匹の6~8週齢のBalb/Cマウス、5匹のC57B/6マウスおよび5匹のAJマウスに第1日に皮下注射する。第24日、第38日および第49日に、不完全フロイントアジュバントまたはImmuno easyアジュバントと混合された20マイクログラムの組換え精製ヒトTNF - 抗原を同じマウスに皮下注射する。第84日または第112日または第144日に、1 μ gの組換え精製ヒトTNF - 抗原をマウスに静脈内注射する。

20

【0175】

[実施例1.2]：ハイブリドーマの作製

実施例1.1に記載されている免疫化マウスから得られた脾細胞を、KohlerおよびMilstein (1975) Nature 256:495に記載されている確立された方法により、SP2/O-Ag-14細胞と5:1の比で融合させて、ハイブリドーマを得る。融合産物を、96ウェルプレート内の、アザセリンおよびヒポキサンチンを含む選択培地内で、ウェル当たり 2.5×10^6 個の脾細胞の密度でプレティングする。融合の7~10日後、肉眼的ハイブリドーマコロニーが観察される。ハイブリドーマコロニーを含む各ウェルからの上清を、TNF - に対する抗体の存在に関して、ELISAにより試験する。ついで、TNF - 特異的活性を示す上清を、L929バイオアッセイにおいてTNF - を中和する能力の存在に関して試験する (実施例2.7に記載されているとおり)。

30

【0176】

[実施例1.3]：抗ヒトTNF - モノクローナル抗体の特定および特徴づけ

TNF - に結合する抗体、およびTNF - に特異的に結合しうる抗体、および特に、L929バイオアッセイにおいて5nMまたはそれ未満のIC50値を有する抗体を産生するハイブリドーマを拡大させ、限界希釈によりクローニングする。

40

【0177】

ハイブリドーマ細胞を、10% 低IgGウシ胎児血清 (HyClone #SH30151, Logan, UT) を含む培地内で増殖させる。平均250mLの各ハイブリドーマ上清 (クローン集団由来のもの) を集め、濃縮し、標準的な方法によるプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。TNF - 活性を精製mAbが抑制する能力を、実施例2.7に記載されているとおり、L929バイオアッセイを用いて決定する。

【0178】

50

[実施例 1 . 4] : 各マウス抗ヒト TNF - モノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列の決定

各アミノ酸配列決定のために、約 10×10^6 個のハイブリドーマ細胞を遠心分離により単離し、加工して、全 RNA を単離する。これは、Trizol (Gibco BRL / Invitrogen, Carlsbad, CA) を該製造業者の説明に従い使用して行う。SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) を該製造業者の説明に従い使用して、全 RNA を第 1 鎖 DNA 合成に付す。ポリ (A) + RNA を選択するために第 1 鎖合成をプライミングするために、オリゴ (dT) を使用する。ついで該第 1 鎖 cDNA 産物を、マウス免疫グロブリン可変領域の増幅のために設計されたプライマー (Ig - Primer Sets, Novagen, Madison, WI) を使用する PCR により増幅する。PCR 産物をアガロースゲル上で分離し、切り出し、精製し、ついで TOPO Cloning キットを使用して pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) 内にサブクローニングし、TOP10 化学的コンピテント大腸菌 (E. coli) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 内に形質転換する。コロニー PCR を該形質転換体上で行って、インサートを含むクローンを特定する。QIAprep Miniprep キット (Qiagen, Valencia, CA) を使用して、インサートを含むクローンからプラスミド DNA を単離する。M13 フォワードおよび M13 リバースプライマー (Fermentas Life Sciences, Hanover MD) を使用して、該可変重鎖または可変軽鎖 DNA 配列を決定するために、該プラスミド内のインサートを両鎖上で配列決定する。該抗 TNF - モノクローナル抗体の可変重鎖および可変軽鎖配列を表 5 に示す。

【 0179 】

[実施例 2] : 組換え抗ヒト TNF - 抗体

[実施例 2 . 1] : 組換えキメラ抗ヒト TNF - 抗体の構築および発現

マウス抗ヒト TNF - モノクローナル抗体 MAK199 の重鎖定常領域をコードする DNA を、細菌内の相同組換えにより、2 個のヒンジ - 領域アミノ酸突然変異を含むヒト IgG1 定常領域をコードする cDNA 断片により置換した。これらの突然変異は、234 位 (EU 番号付け) のロイシンからアラニンへの変化、および 235 位のロイシンからアラニンへの変化である (Lundra (1991) J. Immunol. 147: 2657)。これらの抗体のそれぞれの軽鎖定常領域をヒトカッパ定常領域により置換した。pHybE 発現プラスミド (米国特許公開第 US 20090239259 号) 内に連結されたキメラ重鎖および軽鎖 cDNA のコトランスフェクションにより、完全長キメラ抗体を HEK293-6E 細胞内で一過性に発現させた。組換えキメラ抗体を含む細胞上清をプロテイン A セファロースクロマトグラフィーにより精製し、結合抗体を酸バッファの添加により溶出した。抗体を中和し、PBS 中に透析した。

【 0180 】

ついで該精製キメラ抗ヒト TNF - モノクローナル抗体を、ELISA により、hTNF - タンパク質へのそれらの結合能に関して試験して、抗原結合を確認した。

【 0181 】

[実施例 2 . 2] : CDR グラフティング抗ヒト TNF - 抗体の構築

当技術分野でよく知られた標準的な方法を適用することにより、モノクローナル抗体 MAK199 の VH および VL 鎖の CDR 配列 (前記表 5 を参照されたい) を種々のヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列内にグラフティングする。

【 0182 】

モノクローナル抗体 MAK199 の VH および VL 配列に対する配列 VH および VL のアライメントに基づいて、以下の公知ヒト配列を選択する :

- a) VH1-18 (IGHV1-18) および VH7-4.1 (IGHV7-4-1)、ならびに重鎖アクセプター配列を構築するための連結配列 hJH6 ;
- b) 1-39/12 および 6-D1/A14、ならびに軽鎖アクセプター配列を構築

10

20

30

40

50

するための h J K 2。

【 0 1 8 3 】

MAK199の対応VHおよびVL CDRを該アクセプター配列内にグラフティングすることにより、CDRグラフティングヒト化および修飾VHおよびVL配列を調製した(前記表6も参照されたい)。

【 0 1 8 4 】

[実施例2.3]: CDRグラフティング抗体におけるフレームワーク復帰突然変異の構築

ヒト化抗体フレームワーク復帰突然変異を作製するために、可変ドメインのデノボ(denovovo)合成により、ならびに/または突然変異誘発性プライマーおよびPCR、および当技術分野でよく知られた方法を用いて、実施例2.2により調製されたCDRグラフティング抗体配列内に突然変異を導入する。種々の組合せの復帰突然変異および他の突然変異を、以下のとおり、CDRグラフトのそれぞれに関して構築する。これらの突然変異に関する残基番号はKabata番号付け系に基づいている。

【 0 1 8 5 】

重鎖hMAK199VH.2zに関しては、以下のバーニアおよびVH/VL界面残基の1以上を以下のとおりに復帰突然変異させる: V2 I、Y91 F。

【 0 1 8 6 】

追加的な突然変異には以下のものが含まれる: Q1 E。

【 0 1 8 7 】

重鎖hMAK199VH.2zに関しては、以下のバーニアおよびVH/VL界面残基の1以上を以下のとおりに復帰突然変異させる: V2 I、V67 F、M69 F、T71 L、Y91 F。

【 0 1 8 8 】

追加的な突然変異には以下のものが含まれる: Q1 E、R82 S、D85 E。

【 0 1 8 9 】

軽鎖hMAK199Vk.1に関しては、以下のバーニアおよびVH/VL界面残基の1以上を以下のとおりに復帰突然変異させる: A43 T、P44 V、F71 Y、およびY87 F。

【 0 1 9 0 】

軽鎖hMAK199Vk.2に関しては、以下のバーニアおよびVH/VL界面残基の1以上を以下のとおりに復帰突然変異させる: V2 I、A43 T、P44 V、K49 Y、F71 Y、およびY87 F。

【 0 1 9 1 】

[実施例2.4]: CDRグラフティング抗体におけるフレームワーク復帰突然変異を含有するヒト化抗HTNF抗体の作製

該配列を使用して、標準的なDNA合成または増幅技術により核酸を合成し、標準的な組換えDNA技術を用いて所望の抗体フラグメントを発現ベクターへと合体させ、細胞内での発現を行うことが可能である。例えば、アミノ酸配列から核酸コドンが決定され、Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA USAによりオリゴヌクレオチドDNAが合成される。該オリゴヌクレオチドを300~2,000塩基対の二本鎖DNAへと合体させ、プラスミドベクター内にクローニングし、配列を確認する。酵素法を用いて、クローン化断片を合体させて、完全な遺伝子を得、発現ベクター内にサブクローニングする(7,306,914;7,297,541;7,279,159;7,150,969;20080115243;20080102475;20080081379;20080075690;20080063780;20080050506;20080038777;20080022422;20070289033;20070287170;20070254338;20070243194;20070225227;20070207171;20070150976;20070135620;20070128

10

20

30

40

50

190 ; 20070104722 ; 20070092484 ; 20070037196 ;
20070028321 ; 20060172404 ; 20060162026 ; 2006
0153791 ; 20030215458 ; および20030157643を参照されたい)。

【0192】

例えば、前記のインシリコで構築されたヒト化抗体をpHybEベクター(米国特許公開第US 2009/0239259号)内のマルチクローニング部位内に挿入することが可能である。細菌コロニーを単離し、プラスミドDNAを抽出し、cDNAインサートの全体を配列決定する。各抗体に対応する正しいヒト化重鎖および軽鎖をHEK293-6E細胞内にトランスフェクトして、完全長ヒト化抗ヒトTNF-抗体を一過性に産生させる。該重鎖グラフィングcDNAおよび該軽鎖グラフィングcDNAを含有するpHybEベクターをHEK293-6E細胞内にコトランスフェクトした。組換えキメラ抗体を含有する細胞上清をプロテインAセファロースクロマトグラフィーにより精製し、結合抗体を酸バッファの添加により溶出する。抗体を中和し、PBS中に透析する。ヒト化抗体を表7に示す。

【0193】

【表7】

表7: ヒト化抗TNF α 抗体

配列番号	タンパク質領域	配列
		123456789012345678901234567890
37	hMAK199VH.1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTY ADDFKGR RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAR KFLTTVVVTDYAMDY WGQGT TVSS
38	hMAK199VH.1a	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTY ADDFKGR RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYFCAR KFLTTVVVTDYAMDY WGQGT TVSS
39	hMAK199VH.1b	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTY ADDFKGR RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYFCAR KFLTTVVVTDYAMDY WGQGT TVSS
40	hMAK199VH.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTY ADDFKGR VTMTTDTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR KFLTTVVVTDYAMDY WGQGT TVSS
41	hMAK199VH.2a	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTY ADDFKGR FTFTLDTSSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR KFLTTVVVTDYAMDY WGQGT TVSS
42	hMAK199VH.2b	EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT NYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTY ADDFKGR VTFTTDTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR KFLTTVVVTDYAMDY WGQGT TVSS
43	hMAK199VL.1a	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDIS NYLNWY QQKPGKTKLLI YTSRLQS GVPS RFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFC QQ GNTLPPT FGQGTKLEIK
44	hMAK199VL.1b	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDIS NYLNWY QQKPGKAPKLLI YTSRLQS GVPS RFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATY YCQQ GNTLPPT FGQGTKLEIK
45	hMAK199VL.2a	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQDIS NYLNWY QQKPDQTVKLLI YTSRLQS GVPS RFGSGSGTDYFTISSLAEADAATYFC QQ GNTLPPT FGQGTKLEIK
46	hMAK199VL.2b	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASQDIS NYLNWY QQKPDQAPKLLI YTSRLQS GVPS RFGSGSGTDYFTISSLAEADAATY YCQQ GNTLPPT FGQGTKLEIK

10

20

30

40

【0194】

[実施例2.5]: ヒト化抗hTNF hMAK199抗体VH/VLペア形成

【0195】

【表 8】

ABT ユニーク ID	VH	VL
AB351	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1
AB352	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1a
AB353	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1b
AB354	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2
AB355	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2a
AB356	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2b
AB357	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1
AB358	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1a
AB359	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1b
AB360	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2
AB361	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2a
AB362	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2b
AB363	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1
AB364	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1a
AB365	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1b
AB366	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2
AB367	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2a
AB368	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2b
AB369	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1
AB370	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1a
AB371	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1b
AB372	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2
AB373	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2a
AB374	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2b
AB375	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1
AB376	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1a
AB377	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1b
AB378	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2
AB379	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2a
AB380	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2b
AB381	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1
AB382	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1a
AB383	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1b
AB384	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2
AB385	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2a
AB386	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2b

10

20

30

40

【 0 1 9 6 】

【 実施例 2 . 6 】 : B I A C O R E 技術を用いるアフィニティの決定

【 0 1 9 7 】

【表 9】

表 8 : Biacore 分析において使用した試薬

抗原	販売業者による表示	販売業者	カタログ#
TNF α	組換えヒト TNF- α /TNFSF1A	R&D systems	210-TA

【0198】

BIACORE法:

BIACOREアッセイ (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) は、オン速度およびオフ速度定数の速度論的測定により、抗体のアフィニティを決定する。標的抗原 (例えば、精製組換え標的抗原) への抗体の結合は、25 で、ランニング HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA および 0.005% 界面活性剤 P20) を使用する Biacore (登録商標) 1000 または 3000 装置 (Biacore (登録商標) AB, Uppsala, Sweden) での、表面プラズモン共鳴に基づく測定により決定される。全ての化学物質は Biacore (登録商標) AB (Uppsala, Sweden) から得られ、そうでなければ、記載されている異なる入手元から得られる。例えば、10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中に希釈された約 5000 RU のヤギ抗マウス IgG, (Fc), フラグメント特異的ポリクローナル抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) を、25 μ g/ml で、標準的なアミンカップリングキットを製造業者の説明および手順に従い使用して、CM5 研究等級バイオセンサーチップに直接固定化する。バイオセンサー表面上の未反応部分をエタノールアミンでブロッキングする。フローセル 2 および 4 における修飾カルボキシメチルデキストラン表面を反応表面として使用する。フローセル 1 および 3 におけるヤギ抗マウス IgG を含有しない未修飾カルボキシメチルデキストランを参照表面として使用する。速度論的分析のために、1:1 ラングミュア結合モデルから導き出された速度式を、Biaevaluation 4.0.1 ソフトウェアを使用して、(グローバル・フィット解析を用いて) 8 つ全ての注入の会合および解離段階に同時にフィットさせる。ヤギ抗マウス IgG 特異的反応表面上の捕捉のために、精製抗体を HEPES 緩衝食塩水中で希釈する。リガンドとして捕捉されるべき抗体 (25 μ g/ml) を 5 μ l/分の流速で反応マトリックスに注入する。会合および解離速度定数 k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) および k_{off} (s^{-1}) を 25 μ l/分の連続的流速下で決定する。速度定数は、10 ~ 200 nM の範囲の種々の抗原濃度において速度論的結合測定を行うことにより導き出される。ついで抗体と標的抗原との反応の平衡解離定数 (M) を、以下の式: $K_D = k_{off} / k_{on}$ により、該速度論的速度定数から計算する。時間の関数として結合を記録し、速度論的速度定数を計算する。このアッセイにおいては、 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ という速いオン速度および $10^{-6} s^{-1}$ という遅いオフ速度が測定されうる。

【0199】

【表 10】

表 9: 抗 hTNF α 抗体の BIACORE 分析

抗体 ID	VH	VL	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	k_D (M)
AB351	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1	2.00E+06	6.80E-04	3.50E-10
AB352	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1a	2.10E+06	9.40E-04	4.50E-10
AB353	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1b	2.00E+06	9.20E-04	4.60E-10
AB354	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2	2.00E+06	1.00E-03	5.20E-10
AB355	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2a	2.40E+06	1.40E-03	5.90E-10
AB356	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2b	1.30E+06	8.90E-04	6.70E-10
AB357	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1	1.90E+06	1.30E-03	6.70E-10
AB358	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1a	1.40E+06	9.70E-04	7.00E-10
AB359	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1b	1.30E+06	9.30E-04	7.30E-10
AB360	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2	1.20E+06	9.70E-04	7.80E-10
AB361	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2a	1.20E+06	9.80E-04	7.90E-10
AB362	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2b	1.30E+06	1.10E-03	8.30E-10
AB363	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1	1.40E+06	1.20E-03	8.60E-10
AB364	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1a	1.20E+06	1.10E-03	8.90E-10
AB365	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1b	1.10E+06	1.00E-03	9.10E-10
AB366	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2	1.60E+06	1.50E-03	9.30E-10
AB367	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2a	1.00E+06	1.00E-03	1.00E-09
AB368	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2b	1.10E+06	1.10E-03	1.00E-09
AB369	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1	9.40E+05	1.00E-03	1.10E-09
AB370	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1a	1.00E+06	1.20E-03	1.10E-09
AB371	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1b	1.50E+06	1.70E-03	1.20E-09
AB372	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2	9.50E+05	1.10E-03	1.20E-09
AB373	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2a	9.40E+05	1.20E-03	1.20E-09
AB374	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2b	1.20E+06	1.50E-03	1.30E-09
AB375	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1	9.00E+05	1.10E-03	1.30E-09
AB376	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1a	1.10E+06	1.40E-03	1.30E-09
AB377	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1b	1.10E+06	1.50E-03	1.40E-09
AB378	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2	8.80E+05	1.30E-03	1.40E-09
AB379	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2a	8.90E+05	1.60E-03	1.80E-09
AB380	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2b	8.20E+05	1.50E-03	1.80E-09
AB381	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1	8.60E+05	1.70E-03	1.90E-09
AB382	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1a	7.40E+05	1.50E-03	2.00E-09
AB383	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1b	8.30E+05	1.80E-03	2.10E-09
AB384	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2	6.60E+05	1.40E-03	2.10E-09
AB385	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2a	8.80E+05	1.90E-03	2.20E-09
AB386	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2b	6.60E+05	1.50E-03	2.30E-09

10

20

30

40

【0200】

B i a c o r e 技術により特徴づけられる全てのヒト化構築物の結合が維持され、それ

50

はマウス親抗体のものに匹敵した。

【0201】

[実施例2.7]：ヒトTNF の中和

L929細胞を半コンフルエント密度まで増殖させ、0.25% トリプシン(Gibco #25300)を使用して回収した。該細胞をPBSで洗浄し、計数し、 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ アクチノマイシンDを含有するアッセイ培地内に $1\text{E}6$ 細胞/mLで再懸濁させた。該細胞を96ウェルプレート(Costar #3599)内に $100\mu\text{L}$ の容量および $5\text{E}4$ 細胞/ウェルで播いた。該抗体および対照IgGをアッセイ培地中で4倍濃度まで希釈し、系列1:4希釈を行った。huTNF をアッセイ培地内で $400\text{pg}/\text{mL}$ まで希釈した。抗体サンプル($200\mu\text{L}$)をhuTNF ($200\mu\text{L}$)に1:2の希釈系で加え、室温で0.5時間インキュベートした。

10

【0202】

該抗体/ヒトTNF 溶液を $100\mu\text{L}$ でプレート化細胞に加えて、 $100\text{pg}/\text{mL}$ huTNF および $150\text{nM} \sim 0.0001\text{nM}$ 抗体の最終濃度にした。該プレートを37、5% CO_2 で20時間インキュベートした。生存性を定量するために、 $100\mu\text{L}$ を該ウェルから取り出し、 $10\mu\text{L}$ のWST-1試薬(Roche cat #11644807001)を加えた。プレートをアッセイ条件下で3.5時間インキュベートした。該プレートをSpectromax 190 ELISAプレートリーダーでOD $420 \sim 600\text{nm}$ で読取った。幾つかのアッセイからの平均EC50が表10に含まれている。

20

【0203】

【表 1 1】

表 10: ヒト化抗 hTNF α 抗体でのヒト TNF α 中和アッセイ

抗体 ID	VH	VL	TNF α 中和アッセイ IC50 nM
AB351	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1	1.06
AB352	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1a	0.35
AB353	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1b	0.66
AB354	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2	ND
AB355	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2a	1.90
AB356	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2b	0.87
AB357	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1	1.94
AB358	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1a	0.21
AB359	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1b	3.78
AB360	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2	ND
AB361	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2a	0.82
AB362	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2b	2.11
AB363	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1	0.32
AB364	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1a	0.35
AB365	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1b	1.52
AB366	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2	ND
AB367	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2a	0.53
AB368	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2b	1.09
AB369	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1	>20
AB370	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1a	3.78
AB371	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1b	>20
AB372	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2	ND
AB373	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2a	>20
AB374	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2b	>20
AB375	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1	11.45
AB376	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1a	3.65
AB377	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1b	>20
AB378	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2	ND
AB379	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2a	>20
AB380	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2b	>20
AB381	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1	5.90
AB382	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1a	1.19
AB383	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1b	>20
AB384	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2	ND
AB385	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2a	9.76
AB386	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2b	>20

10

20

30

40

【 0 2 0 4】

全ての抗 hTNF 抗体が該 TNF 中和アッセイにおいて中和を示した。

【 0 2 0 5】

50

[実施例 2 . 8] : ヒト化モノクローナル抗体の物理化学的およびインビトロ安定性分析

サイズ排除クロマトグラフィー

抗体を水で 2 . 5 m g / m L に希釈し、T S K ゲル G 3 0 0 0 S W X L カラム (T o s o h B i o s c i e n c e , c a t # k 5 5 3 9 - 0 5 k) を使用して、2 0 m L を S h i m a d z u H P L C 系で分析した。サンプルを 2 1 1 m M 硫酸ナトリウム、9 2 m M リン酸ナトリウム (p H 7 . 0) で 0 . 3 m L / 分の流速で該カラムから溶出した。H P L C 系運転条件は以下のとおりであった。

移動相 : 2 1 1 m M $N a_2 S O_4$ 、9 2 m M $N a_2 H P O_4 \cdot 7 H_2 O$ 、p H 7 . 0

勾配 : 無勾配

流速 : 0 . 3 m L / 分

検出器波長 : 2 8 0 n m

オートサンプラー冷却温度 : 4

カラムオープン温度 : 外界

実施時間 : 5 0 分

【 0 2 0 6 】

表 1 1 は、前記方法により決定された、%単量体 (単量体百分率) (予想分子量の非凝集タンパク質) として表された抗体構築物の複数のデータを含む。

【 0 2 0 7 】

10

20

【表 1 2】

表 11: サイズ排除クロマトグラフィーにより決定された抗 hTNF α 抗体の純度

抗体 ID	VH	VL	%単量体(純度)
AB351	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1	97
AB352	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1a	97
AB353	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1b	96
AB354	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2	97
AB355	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2a	98
AB356	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2b	96
AB357	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1	96
AB358	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1a	97
AB359	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1b	95
AB360	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2	96
AB361	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2a	96
AB362	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2b	97
AB363	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1	98
AB364	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1a	100
AB365	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1b	100
AB366	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2	99
AB367	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2a	100
AB368	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2b	98
AB369	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1	95
AB370	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1a	94
AB371	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1b	95
AB372	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2	88
AB373	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2a	88
AB374	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2b	91
AB375	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1	97
AB376	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1a	98
AB377	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1b	97
AB378	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2	92
AB379	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2a	98
AB380	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2b	99
AB381	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1	85
AB382	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1a	81
AB383	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1b	83
AB384	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2	87
AB385	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2a	83
AB386	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2b	84

10

20

30

40

【 0 2 0 8 】

抗 h T N F 抗体は優れた S E C プロファイルを示し、最良体は > 9 5 % 単量体を示した。

【 0 2 0 9 】

50

S D S - P A G E

還元および非還元の両方の条件下、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) により抗体を分析する。アダリムマブのロット A F P 0 4 C を対照として使用する。還元条件の場合、該サンプルを、100 mM D T T を含有する 2 × トリスグリシン S D S - P A G E サンプルバッファー (I n v i t r o g e n , c a t # L C 2 6 7 6 , l o t # 1 3 2 3 2 0 8) と 1 : 1 で混合し、60 で 30 分間加熱する。非還元条件の場合、該サンプルをサンプルバッファーと 1 : 1 で混合し、100 で 5 分間加熱する。該還元サンプル (10 mg / レーン) を 12 % プレキャスト トリス - グリシングル (I n v i t r o g e n , c a t # E C 6 0 0 5 b o x , l o t # 6 1 1 1 0 2 1) 上にローディングし、該非還元サンプル (10 mg / レーン) を 8 % ~ 16 % プレキャスト トリス - グリシングル (I n v i t r o g e n , c a t # E C 6 0 4 5 b o x , l o t # 6 1 1 1 0 2 1) 上にローディングする。See Blue Plus 2 (I n v i t r o g e n , c a t # L C 5 9 2 5 , l o t # 1 3 5 1 5 4 2) を分子量マーカーとして使用する。該ゲルを X C e l l S u r e L o c k ミニセルゲルボックス (I n v i t r o g e n , c a t # E I 0 0 0 1) においてランニングさせ、まず、該ゲル内で該サンプルを積層させることにより 75 ボルトの電圧を適用し、ついで、色素先端が該ゲルの底に達するまで 125 ボルトの一定電圧を適用することにより、該タンパク質を分離する。使用したランニングバッファーは、10 × トリスグリシン S D S バッファー (A B C , M P S - 7 9 - 0 8 0 1 0 6) から調製された 1 × トリスグリシン S D S バッファーである。該ゲルをコロイド性青色染料 (I n v i t r o g e n c a t # 4 6 - 7 0 1 5 , 4 6 - 7 0 1 6) で一晩染色し、バックグラウンドが透明になるまで M i l l i - Q 水で脱染する。ついで該染色ゲルを、E p s o n E x p r e s s i o n スキャナー (モデル 1 6 8 0 , S / N D A S X 0 0 3 6 4 1) を使用してスキャンする。

【 0 2 1 0 】

沈降速度分析

抗体を 3 個の標準的な 2 セクターカーボンエポンセンターピース (t w o - s e c t o r c a r b o n e p o n c e n t e r p i e c e) のそれぞれのサンプルチャンバ内にローディングする。これらのセンターピースは 1 . 2 c m の光路長を有し、サファイア・ウィンドウ (s a p p h i r e w i n d o w) を備えている。参照バッファーには P B S を使用、各チャンバの容積は 140 μ L であった。Beckman Proteome Lab XL - I 分析用超遠心機 (シリアル # P L 1 0 6 C 0 1) において 4 穴 (A N - 6 0 T i) ローターを使用して、全てのサンプルを同時に検査する。

【 0 2 1 1 】

実施条件をプログラムし、Proteome Lab (v 5 . 6) を使用して遠心機の制御を行う。該サンプルおよびローターを 1 時間にわたって熱的に平衡させた後、分析を行う (20 . 0 \pm 0 . 1) 。適切な細胞ローディングの確認を 3000 rpm で行い、単一のスキャンを各セルに関して記録する。沈降速度条件は以下のとおりである：

サンプルセル容積：420 mL

参照セル容積：420 mL

温度：20

ローター (回転) 速度：35,000 rpm

時間：8 : 00 時間

UV 波長：280 nm

ラジアルステップサイズ：0 . 003 cm

データ収集：シグナル平均化を伴わずに、ステップ当たり、1 データ点

スキャン総数：100。

【 0 2 1 2 】

完全抗体の LC - MS 分子量測定

完全抗体の分子量を LC - MS により分析する。各抗体を約 1 mg / mL まで水で希釈する。タンパク質マイクロトラップ (M i c h r o m B i o r e s o u r c e s , I n

c, cat # 004 / 25109 / 03) を有する 1100 HPLC (Agilent) 系を使用して、5 mg の該サンプルを脱塩し、API Qstar パルサー i 質量分析計 (Applied Biosystems) 内に導入する。短い勾配を用いて、該サンプルを溶出する。該勾配は、移動相 A (0.08% FA, 0.02% TFA (HPLC 水中)) および移動相 B (0.08% FA および 0.02% TFA (アセトニトリル中)) で 50 mL / 分の流速で行う。該質量分析計は、2000 ~ 3500 の質量対電荷比のスキャン範囲で、4.5 k ボルトのスプレー電圧で操作する。

【0213】

抗体軽鎖および重鎖の LC - MS 分子量測定

抗体軽鎖 (LC)、重鎖 (HC) および脱グリコシル化 HC の分子量測定を LC - MS により分析する。抗体を 1 mg / mL まで水で希釈し、該サンプルを最終濃度 10 mM の DTT で 37 で 30 分間、LC および HC に還元する。該抗体を脱グリコシル化するために、100 mg の該抗体を、100 mL の合計体積中、2 mL の PNGase F、5 mL の 10% N - オクチルグルコシドと共に 37 で一晩インキュベートする。脱グリコシル化後、該サンプルを最終濃度 10 mM の DTT で 37 で 30 分間還元する。C4 カラム (Vydac, cat # 214TP5115, S/N 060206537204069) を有する Agilent 1100 HPLC 系を使用して、該サンプル (5 mg) を脱塩し、API Qstar パルサー i 質量分析計 (Applied Biosystems) 内に導入する。短い勾配を用いて、該サンプルを溶出する。該勾配は、移動相 A (0.08% FA, 0.02% TFA (HPLC 水中)) および移動相 B (0.08% FA および 0.02% TFA (アセトニトリル中)) で 50 mL / 分の流速で行う。該質量分析計は、800 ~ 3500 の質量対電荷比のスキャン範囲で、4.5 k ボルトのスプレー電圧で操作する。

【0214】

ペプチドマッピング

抗体を 75 mM 炭酸水素アンモニウム中の最終濃度 6 M の塩酸グアニジンで室温で 15 分間変性させる。該変性サンプルを最終濃度 10 mM の DTT で 37 で 60 分間還元し、ついで暗所にて 37 で 30 分間、50 mM ヨード酢酸 (IAA) でのアルキル化を行う。アルキル化後、該サンプルを 4 リットルの 10 mM 炭酸水素アンモニウムに対して 4 で一晩透析する。該透析サンプルを 1 mg / mL の 10 mM 炭酸水素アンモニウム (pH 7.8) で希釈し、100 mg の抗体をトリプシン (Promega, cat # V5111) または Lys - C (Roche, cat # 11047825001) で 1 : 20 (w/w) のトリプシン / Lys - C : 抗体比にて 37 で 4 時間消化する。消化物を 1 mL の 1 N HCl でクエンチする。質量分析計での検出を用いるペプチドマッピングのために、40 mL の該消化物を、Agilent 1100 HPLC 系を用いる C18 カラム (Vydac, cat # 218TP51, S/N NE960610.3.5) 上での逆相高速液体クロマトグラフィー (RPHPLC) により分離する。該ペプチド分離は、移動相 A (0.02% TFA および 0.08% FA (HPLC 等級水中)) および移動相 B (0.02% TFA および 0.08% FA (アセトニトリル中)) を用いる勾配で 50 mL / 分の流速で行う。該 API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 k ボルトのスプレー電圧および 800 ~ 2500 の質量対電荷比のスキャン範囲で正モードで操作する。

【0215】

ジスルフィド結合マッピング

該抗体を変性させるために、100 mM の該抗体を 100 mM 炭酸水素アンモニウム中の 300 mL の 8 M グアニジン HCl と混合する。pH が 7 ~ 8 となるように pH を調べ、該サンプルを、最終濃度 6 M のグアニジン HCl 中、室温で 15 分間変性させる。該変性サンプルの一部 (100 mL) を 600 mL の Milli - Q 水で希釈して、1 M の最終グアニジン - HCl 濃度を得る。該サンプル (220 mg) をトリプシン (Promega, cat # V5111, ロット # 22265901) または Lys - C (Ro

10

20

30

40

50

che, cat# 11047825001, ロット# 12808000) で 1:50 のトリプシンまたは Lys-C:抗体 (w/w) 比 (4.4 mg 酵素:220 mg サンプル) にて 37 で約 16 時間消化する。更に 5 mg のトリプシンまたは Lys-C を該サンプルに加え、消化を 37 で更に 2 時間進行させる。1 mL の TFA を各サンプルに加えることにより、消化を停止させる。Agilent HPLC 系で C18 カラム (Vydac, cat# 218TP51 S/N NE020630-4-1A) を使用する RPHPLC により、消化されたサンプルを分離する。該分離は、50 mL/分の流速で移動相 A (0.02% TFA および 0.08% FA (HPLC 等級水中)) および移動相 B (0.02% TFA および 0.08% FA (アセトニトリル中)) を用いて、ペプチドマッピングに用いたのと同じ勾配で行う。該 HPLC 操作条件は、ペプチドマッピングに用いたものと同じである。該 API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 kV のスプレー電圧および 800~2500 の質量対電荷比のスキャン範囲で正モードで操作する。該ペプチドの観察された MW を、ジスルフィド結合により連結されたトリプシンまたは Lys-C 処理ペプチドの予想 MW と合致させることにより、ジスルフィド結合を帰属する。

【0216】

遊離スルフィドリル決定

抗体における遊離システインを定量するために用いた方法は、特徴的な発色産物 5-チオ-(2-ニトロ安息香酸) (TNB) を与える、スルフィドリル基 (SH) とのエルマン試薬 5,5'-ジチオ-ビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) の反応に基づくものである。該反応は、式:



で示される。

【0217】

Cary 50 分光光度計を使用して、該 TNB⁻ の吸光度を 412 nm で測定する。2-メルカプトエタノール (b-ME) の希釈液を遊離 SH 標準物として使用して、吸収曲線をプロットし、該タンパク質中の遊離スルフィドリル基の濃度を該サンプルの 412 nm における吸光度から決定する。

【0218】

該 b-ME 標準ストックは、0.142 mM の最終濃度までの HPLC 等級水での 14.2 M の b-ME の系列希釈により調製する。ついで各濃度に関する 3 通りの標準物を調製する。アミコンウルトラ (amicon ultra) 10,000 MWCO 遠心フィルター (Millipore, cat# UFC801096, ロット# L3KN5251) を使用して抗体を 10 mg/mL に濃縮し、該バッファーを、アダリムマブに使用される製剤化バッファー (5.57 mM 第一リン酸ナトリウム、8.69 mM 第二リン酸ナトリウム、106.69 mM NaCl、1.07 mM クエン酸ナトリウム、6.45 mM クエン酸、66.68 mM マンニトール、pH 5.2、0.1% (w/v) Tween) に変更する。該サンプルを振とう機上で室温で 20 分間混合する。ついで 180 mL の 100 mM トリスバッファー (pH 8.1) を各サンプルおよび標準物に加え、ついで 10 mM リン酸バッファー (pH 8.1) 中の 300 mL の 2 mM DTNB を加える。十分に混合した後、該サンプルおよび標準物を Cary 50 分光光度計で 412 nm の吸光度に関して測定する。b-ME 標準物の OD₄₁₂ および遊離 SH の量をプロットすることにより、標準曲線を得る。ブランクの差し引きの後、この曲線に基づいてサンプルの遊離 SH 含量を計算する。

【0219】

弱陽イオン交換クロマトグラフィー

抗体を 10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.0) で 1 mg/mL に希釈する。WCX-10 ProPac 分析用カラム (Dionex, cat# 054993, S/N 02722) と共に Shimadzu HPLC 系を使用して、電荷不均一性を分析する。該サンプルを、80% 移動相 A (10 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0) および

20% 移動相 B (10 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl、pH 6.0) 中の該カラム上にローディングし、1.0 mL/分の流速で溶出する。

【0220】

オリゴ糖のプロファイリング

抗体の PNG アーゼ F 処理の後に遊離したオリゴ糖を 2 - アミノベンズアミド (2 - AB) 標識試薬で誘導体化する。順相高速液体クロマトグラフィー (NPHPLC) により該蛍光標識オリゴ糖を分離し、既知標準物との保持時間の比較に基づいて種々の形態のオリゴ糖を特徴づけする。

【0221】

まず、N 結合オリゴ糖を重鎖の Fc 部分から切断するために、該抗体を PNG アーゼ F で消化する。該抗体 (200 mg) を 2 mL の PNG アーゼ F および 3 mL の 10% N - オクチルグルコシドと共に 500 mL エッペンドルフチューブ内に配置する。リン酸緩衝食塩水を加えて最終体積を 60 mL にする。該サンプルを、700 RPM に設定されたエッペンドルフ・サーモミキサー内で 37 で一晩インキュベートする。アダリムマブのロット AFP04C も対照として PNG アーゼ F で消化する。

10

【0222】

PNG アーゼ F 処理後、該サンプルを、750 RPM に設定されたエッペンドルフ・サーモミキサー内で 95 で 5 分間インキュベートして、該タンパク質を析出させ、ついで該サンプルをエッペンドルフ遠心機内に 10,000 RPM で 2 分間配置して、該沈殿タンパク質を遠心沈殿させる。該オリゴ糖を含有する上清を 500 mL エッペンドルフチューブに移し、スピード・バック (speed - vac) 内で 65 で乾燥させる。

20

【0223】

Prozyme から購入した 2AB 標識キット (cat # GKK - 404, ロット # 132026) を使用して、該オリゴ糖を 2AB で標識する。該標識試薬を該製造業者の説明に従い調製する。酢酸 (150 mL, キットにおいて提供されているもの) を DMSO バイアル (キットにおいて提供されているもの) に加え、該溶液を上下に数回ピペティングすることにより混合する。該酢酸 / DMSO 混合物 (100 mL) を 2 - AB 染料のバイアルに移し (使用の直前)、該染料が完全に溶解するまで混合する。ついで該染料溶液を還元剤のバイアル (キットにおいて提供されているもの) に加え、十分に混合する (標識試薬)。該標識試薬 (5 mL) を各乾燥オリゴ糖サンプルバイアルに加え、十分に混合する。該反応バイアルを、65 および 700 ~ 800 RPM に設定されたエッペンドルフ・サーモミキサー内に 2 時間の反応時間にわたって配置する。

30

【0224】

該標識反応後、Prozyme からの GlycoClean S Cartridges (cat # GKI - 4726) を使用して過剰の蛍光染料を除去する。該サンプルを加える前に、該カートリッジを 1 mL の milli - Q 水で洗浄し、ついで 5 イッシュ (ish) の 1 mL の 30% 酢酸溶液で洗浄する。該サンプルを加える直前に、1 mL のアセトニトリル (Burdick および Jackson, cat # AH015 - 4) を該カートリッジに加える。

【0225】

該アセトニトリルの全てが該カートリッジを通過した後、該サンプルを、新たに洗浄されたディスクの中心にスポットし、該ディスク上に 10 分間吸着させる。該ディスクを 1 mL のアセトニトリルで洗浄し、ついで 5 イッシュの 1 mL の 96% アセトニトリルで洗浄する。該カートリッジを 1.5 mL エッペンドルフチューブ上に配置し、該 2 - AB 標識オリゴ糖を 3 イッシュ (各イッシュにつき 400 mL) の milli - Q 水で溶出する。

40

【0226】

Shimadzu HPLC 系に接続された GlycoSep N HPLC (cat # GKI - 4728) カラムを使用して、該オリゴ糖を分離する。該 Shimadzu HPLC 系は、系コントローラ、脱気装置、バイナリーポンプ、サンプル冷却器を伴う

50

オートサンプラー、および蛍光検出器からなる。

【0227】

高温での安定性

該抗体の最終濃度を適当なバッファー、界面活性剤、安定剤および/または糖で2 mg/mLに調節する。ついで該抗体溶液を濾過滅菌し、0.25 mLのアリコートは無菌条件下で調製する。該アリコートを-80、5、25 または40 で1、2または3週間放置する。該インキュベーション期間の終了時に、該サンプルをサイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEにより分析する。

【0228】

該安定性サンプルを還元性および非還元性の両方の条件下でSDS-PAGEにより分析する。用いる方法は、本明細書に記載されているものと同じである。該ゲルをコロイド性青色染料(Invitrogen cat# 46-7015, 46-7016)で一晩染色し、バックグラウンドが透明になるまでMilli-Q水で脱染する。ついで、Epson Expressionスキャナー(モデル1680, S/N DASX003641)を使用して、該染色ゲルをスキャンする。より高い感度を得るために、銀染色キット(Owl Scientific)を使用して、同じゲルを銀染色し、該製造業者により提供される推奨方法を用いる。

10

【0229】

[実施例2.9]: HEK 293-6E細胞におけるトランスフェクションおよび発現

20

該抗hTNF抗体ベクター構築物をタンパク質産生のために293細胞内にトランスフェクトした。用いた293一過性トランスフェクション法は、Durocherら(2002)Nucleic Acids Res. 30(2): E9およびPhamら(2005)Biotech. Bioengineering 90(3): 332-44に公開されている方法の変法である。該トランスフェクションにおいて使用した試薬には以下のものが含まれていた。

- ・130 rpm、37 °Cおよび5% CO₂に設定された加湿インキュベーターにおいて使い捨てエーレンマイヤーフラスコ内で培養されたHEK 293-6E細胞(EBNA1を安定に発現するヒト胎児腎細胞系; National Research Council Canadaから入手)。

30

- ・培地: FreeStyle 293発現培地(Invitrogen 12338-018)+25 μg/L ゲネチシン(G418)(Invitrogen 10131-027)および0.1% プルロニックF-68(Invitrogen 24040-032)。

- ・トランスフェクション培地: FreeStyle 293発現培地+10 mM HEPES(Invitrogen 15630-080)。

- ・ポリエチレンイミン(PEI)ストック: 直鎖状25 kDa PEI(Poly Sciences)を使用して調製され-15 °C未満で貯蔵された1 mg/mL 無菌ストック溶液(pH 7.0)。

- ・トリプトン供給培地: FreeStyle 293発現培地内のトリプトンN1(Organotechnie, 19554)の5% w/v 無菌ストック。

40

【0230】

トランスフェクションのための細胞調製: トランスフェクションの約2~4時間前に、HEK 293-6E細胞を遠心分離により集め、生細胞約100万個/mLの細胞密度で培地に再懸濁させた。各トランスフェクションのために、40 mLの該細胞懸濁液を使い捨ての250 mL エーレンマイヤーフラスコ内に移し、2~4時間インキュベートした。

【0231】

トランスフェクション: トランスフェクション培地およびPEIストックを室温(RT)に予め加温した。各トランスフェクションに関して、25 μgのプラスミドDNAおよ

50

び 50 μ g のポリエチレンイミン (PEI) を 5 mL のトランスフェクション培地内で一緒にし、室温で 15 ~ 20 分間インキュベートして、DNA : PEI 複合体を形成させた。BR3-Ig トランスフェクションのために、25 μ g の BR3-Ig プラスミドをトランスフェクションごとに使用した。それぞれの 5 mL の DNA : PEI 複合体混合物を、予め調製された 40 mL の培養に加え、130 rpm、37 °C および 5% CO₂ に設定された加湿インキュベータに戻した。20 ~ 28 時間後、5 mL のトリプトン供給培地を各トランスフェクションに加え、該培養を 6 日間継続した。

【0232】

表 12 は、HEK 293-6E 細胞における、ミリグラム/リットルとして表された親抗体に関する収量データを含む。

【0233】

【表 1 3】

表 12: HEK 293-6E 細胞における抗 hTNF α 抗体の収量: 一過性発現

抗体 ID	VH	VL	発現収量 (mg/L)
AB351	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1	67
AB352	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1a	56
AB353	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 1b	87
AB354	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2	81
AB355	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2a	54
AB356	hMAK199VH. 1	hMAK199VL. 2b	22
AB357	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1	78
AB358	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1a	63
AB359	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 1b	92
AB360	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2	92
AB361	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2a	52
AB362	hMAK199VH. 1a	hMAK199VL. 2b	30
AB363	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1	27
AB364	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1a	2
AB365	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 1b	4
AB366	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2	4
AB367	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2a	3
AB368	hMAK199VH. 1b	hMAK199VL. 2b	3
AB369	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1	28
AB370	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1a	20
AB371	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 1b	31
AB372	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2	107
AB373	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2a	73
AB374	hMAK199VH. 2	hMAK199VL. 2b	59
AB375	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1	105
AB376	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1a	83
AB377	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 1b	106
AB378	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2	120
AB379	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2a	75
AB380	hMAK199VH. 2a	hMAK199VL. 2b	10
AB381	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1	48
AB382	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1a	55
AB383	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 1b	70
AB384	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2	74
AB385	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2a	75
AB386	hMAK199VH. 2b	hMAK199VL. 2b	42

10

20

30

40

【0 2 3 4】

全ての抗体が HEK 293-6E 細胞において良好に発現された。ほとんどの場合、 $> 50 \text{ mg/L}$ の精製抗体が HEK 293-6E 細胞の上清から容易に入手可能であった。

50

【0235】

本開示は、分子生物学の分野でよく知られた技術の全体を、出典明示により援用するものである。これらの技術には、限定的なものではないが以下の刊行物に記載されている技術が含まれる。

Ausubelら編, Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY (ISBN 0-471-32938-X).

LuおよびWeiner編, Cloningおよび Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press, Westborough, MA, 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

KontermannおよびDubel編, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, NY, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

OldおよびPrimrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. Studies in Microbiology; V. 2: 409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6).

Winnacker, From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (翻訳: Horst Ibelgauf), 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

【0236】

出典明示による援用

本出願の全体にわたって引用されうる全ての引用参考文献(文献参照物、特許、特許出願およびウェブサイトを含む)の内容の全体を、それらにおいて引用されている参考文献も同様に、あらゆる目的で、参照により本明細書に明示的に組み込むこととする。本実施形態の実施は、特に示されていない限り、当技術分野でよく知られている免疫学、分子生物学および細胞生物学の通常の技術を用いる。

【0237】

均等物

該実施形態は、その精神または必須特徴から逸脱することなく、他の特定の形態においても実施されうる。したがって、前記実施形態は、全ての点において、限定的なものではなく例示的なものであるとみなされるべきである。したがって、前記の説明ではなく添付の特許請求の範囲によって範囲が示されており、したがって、特許請求の範囲の均等論の意義および範囲内に含まれる全ての変更が本発明に含まれると意図される。

【配列表】

[2014503202000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成25年8月7日(2013.8.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

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 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5 または配列番号 4 6 を含む抗体またはその抗原結合性部分。

【請求項 2】

配列番号 3 1 (C D R - H 1) の残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 1 (C D R - H 2) の残基 5 0 - 6 6、配列番号 3 1 (C D R - H 3) の残基 9 9 - 1 1 3、配列番号 3 2 (C D R - L 1) の残基 2 4 - 3 4、配列番号 3 2 (C D R - L 2) の残基 5 0 - 5 6 または配列番号 3 2 (C D R - L 3) の残基 8 9 - 9 7 を含む少なくとも 1 つの C D R を含む、T N F に結合しうる抗体またはその抗原結合性部分。

【請求項 3】

結合性タンパク質が少なくとも 3 つの C D R を含む、請求項 2 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 4】

少なくとも 3 つの C D R が、

(a) 配列番号 3 1 (C D R - H 1) の残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 1 (C D R - H 2) の残基 5 0 - 6 6 および配列番号 3 1 (C D R - H 3) の残基 9 9 - 1 1 3、または
(b) 配列番号 3 2 (C D R - L 1) の残基 2 4 - 3 4、配列番号 3 2 (C D R - L 2) の残基 5 0 - 5 6 および配列番号 3 2 (C D R - L 3) の残基 8 9 - 9 7 の可変ドメイン C D R セットを含む、請求項 3 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 5】

少なくとも 2 つの可変ドメイン C D R セットを含む、請求項 4 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 6】

結合性タンパク質が、

(a) 配列番号 3 1 (C D R - H 1) の残基 3 1 - 3 5、配列番号 3 1 (C D R - H 2) の残基 5 0 - 6 6 および配列番号 3 1 (C D R - H 3) の残基 9 9 - 1 1 3、ならびに
(b) 配列番号 3 2 (C D R - L 1) の残基 2 4 - 3 4、配列番号 3 2 (C D R - L 2) の残基 5 0 - 5 6 および配列番号 3 2 (C D R - L 3) の残基 8 9 - 9 7 の両方を含む、請求項 5 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 7】

ヒトアクセプターフレームワークを更に含む、請求項 6 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 8】

ヒトアクセプターフレームワークが配列番号 1 0 ~ 1 9 または配列番号 2 0 ~ 3 0 のいずれか 1 つを含む、請求項 7 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 9】

ヒトアクセプターフレームワークが少なくとも 1 つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含み、フレームワークのアミノ酸配列がヒトアクセプターフレームワークの配列に対して少なくとも 6 5 % 同一であり、ヒトアクセプターフレームワークと同一である少なくとも 7 0 個のアミノ酸残基を含む、請求項 7 または 8 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 0】

ヒトアクセプターフレームワークが、C D R に隣接した残基、グリコシル化部位残基、稀有残基、ヒト T N F - と相互作用しうる残基、C D R と相互作用しうる残基、カノニカル (c a n o n i c a l) 残基、重鎖可変領域と軽鎖可変領域との接触残基、バーニエ (V e r n i e r) 領域内の残基、およびチョチア (C h o t h i a) により定義された可変領域鎖 C D R 1 とカバト (K a b a t) により定義された第 1 重鎖フレームワークとの間で重複する領域内の残基に、少なくとも 1 つのフレームワーク領域アミノ酸置換を含む、請求項 8 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 1】

残基が 1 H、2 H、6 7 H、6 9 H、7 1 H、8 2 H、8 5 H、9 1 H および 2 L、4 3 L、4 4 L、4 9 L、7 1 L または 8 7 L である、請求項 1 0 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 2】

結合性タンパク質がコンセンサスヒトアクセプターを含む、請求項 1 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 3】

(a) 配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1 および配列番号 4 2 を含む可変重鎖ポリペプチド、ならびに

(b) 配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5 および配列番号 4 6 を含む可変軽鎖ポリペプチド

を含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 1 4】

結合性タンパク質が、以下のそれぞれのアミノ酸配列：

配列番号 3 1 および配列番号 3 2 ；

配列番号 3 3 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 3 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 3 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 4 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 4 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 4 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 7 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 7 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 7 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 8 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 8 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 8 および配列番号 4 6 ；

配列番号 3 9 および配列番号 3 5 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 3 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 4 ；

配列番号 3 9 および配列番号 3 6 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 5 ；

配列番号 3 9 および配列番号 4 6 ；

配列番号 4 0 および配列番号 3 5 ；

配列番号 4 0 および配列番号 4 3 ；

配列番号 4 0 および配列番号 4 4 ；

配列番号 4 0 および配列番号 3 6 ；

配列番号 40 および配列番号 45 ;
配列番号 40 および配列番号 46 ;
配列番号 41 および配列番号 35 ;
配列番号 41 および配列番号 43 ;
配列番号 41 および配列番号 44 ;
配列番号 41 および配列番号 36 ;
配列番号 41 および配列番号 45 ;
配列番号 41 および配列番号 46 ;
配列番号 42 および配列番号 35 ;
配列番号 42 および配列番号 43 ;
配列番号 42 および配列番号 44 ;
配列番号 42 および配列番号 36 ;
配列番号 42 および配列番号 45 ; または
配列番号 42 および配列番号 46

を含む可変重鎖ポリペプチドおよび可変軽鎖ポリペプチドを含む、請求項 13 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 15】

結合性タンパク質が免疫グロブリン分子、ジスルフィド結合 Fv、モノクローナル抗体、scFv、キメラ抗体、単ドメイン抗体、CDR グラフティング抗体、ジアボディ、ヒト化抗体、多重特異性抗体、Fab、二重特異性抗体、DVD-Ig タンパク質、Fab'、二重特異性抗体、F(ab')₂ または Fv である、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 16】

結合性タンパク質が、ヒト IgM 定常ドメイン、ヒト IgG4 定常ドメイン、ヒト IgG1 定常ドメイン、ヒト IgE 定常ドメイン、ヒト IgG2 定常ドメイン、ヒト IgG3 定常ドメインまたはヒト IgA 定常ドメインを含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 17】

配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列を有する重鎖定常領域を更に含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 18】

配列番号 4 または配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域を更に含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 19】

結合性タンパク質がヒト TNF- α を中和しうる、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 20】

結合性タンパク質が、表面プラズモン共鳴による測定で少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、標的に対するオン (on) 速度定数 (K_{on}) を有する、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 21】

結合性タンパク質が、表面プラズモン共鳴による測定で多くとも約 10^{-3} s^{-1} 、多くとも約 10^{-4} s^{-1} 、多くとも約 10^{-5} s^{-1} または多くとも約 10^{-6} s^{-1} の、標的に対するオフ (off) 速度定数 (K_{off}) を有する、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 22】

結合性タンパク質が、多くとも約 10^{-7} M 、多くとも約 10^{-8} M 、多くとも約 10^{-9} M 、多くとも約 10^{-10} M 、多くとも約 10^{-11} M 、多くとも約 10^{-12} M または多くとも 10^{-13} M の、標的に対する解離定数 (KD) を有する、請求項 1 に記載

の結合性タンパク質。

【請求項 23】

結合性タンパク質が、多くとも約 10^{-7} M、多くとも約 10^{-8} M、多くとも約 10^{-9} M、多くとも約 10^{-10} M、多くとも約 10^{-11} M、多くとも約 10^{-12} M または多くとも 10^{-13} M の、TNF- α に対する解離定数 (KD) を有する、請求項 22 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 24】

結合性タンパク質が、免疫接着分子、イメージング剤、治療用物質または細胞毒性物質を更に含む、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 25】

イメージング剤が放射能標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである、請求項 24 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 26】

放射能標識が ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である、請求項 25 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 27】

治療用または細胞毒性物質が代謝拮抗物質、アルキル化物質、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生物質、抗有糸分裂物質、アントラサイクリン、毒素およびアポトーシス性物質である、請求項 24 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 28】

結合性タンパク質がヒトグリコシル化パターンを有する、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 29】

結合性タンパク質が結晶化結合性タンパク質である、請求項 1 に記載の結合性タンパク質。

【請求項 30】

請求項 1 に記載の結合性タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 31】

請求項 1 に記載の結合性タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸を含むベクター。

【請求項 32】

ベクターが pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pHybE または pBJ である、請求項 31 に記載のベクター。

【請求項 33】

請求項 31 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 34】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 33 に記載の宿主細胞。

【請求項 35】

宿主細胞が真核細胞である、請求項 33 に記載の宿主細胞。

【請求項 36】

真核細胞が原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞または昆虫細胞である、請求項 35 に記載の宿主細胞。

【請求項 37】

真核細胞がエス・セレビスイエ (*S. cerevisiae*)、CHO 細胞、COS 細胞または SF9 細胞である、請求項 36 に記載の宿主細胞。

【請求項 38】

TNF- α に結合しうる結合性タンパク質を産生するのに十分な条件下、請求項 33 に記載の宿主細胞を培地内で培養する工程を含む、TNF- α に結合しうるタンパク質の製造方法。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の製造方法により製造されるタンパク質。

【請求項 40】

請求項 1 または請求項 39 に記載の結合性タンパク質と医薬上許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 41】

TNF - 活性が有害である障害を治療するための少なくとも 1 つの追加的物質を更に含む、請求項 40 に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

追加的物質が、治療用物質、イメージング物質、細胞毒性物質、血管新生インヒビター、キナーゼインヒビター、共刺激分子ブロッカー、接着分子ブロッカー、抗サイトカイン抗体またはその機能性フラグメント、メトトレキサート、シクロスポリン、ラバマイシン、FK506、検出可能な標識またはレポーター、TNF アンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩薬、麻酔薬、非ステロイド抗炎症薬 (NSAID)、鎮痛薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗微生物薬、抗乾癬薬、コルチコステロイド、タンパク質同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制物質、成長ホルモン、ホルモン補充療法薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神病薬、興奮薬、喘息治療薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、経口ステロイド、エピネフリンまたはその類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、請求項 41 に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

請求項 40 に記載の組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物の治療方法。

【請求項 44】

ヒト TNF - 活性が低減するように、ヒト TNF - を請求項 1 に記載の結合性タンパク質と接触させることを含む、ヒト TNF - 活性を低減するための方法。

【請求項 45】

TNF - 活性が有害である障害に罹患しているヒト対象においてヒト TNF - 活性を低減するための方法であって、ヒト対象におけるヒト TNF - 活性が低減するように、請求項 1 に記載の結合性タンパク質をヒト対象に投与することを含む方法。

【請求項 46】

TNF - 活性が有害である疾患または障害に対する対象の治療方法であって、治療が達成されるように、請求項 1 に記載の結合性タンパク質を対象に投与することによる治療方法。

【請求項 47】

障害が自己免疫および/または炎症障害である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

障害がクローン病、尋常性乾癬、関節リウマチ、乾癬性関節炎、骨関節炎、若年性特発性関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、強直性脊椎炎、インスリン依存性糖尿病、自己免疫性糖尿病、アレルギーおよび自己免疫ブドウ膜炎である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

障害が、呼吸障害；喘息；アレルギー性および非アレルギー性喘息；感染による喘息；呼吸器合胞体ウイルス (RSV) 感染による喘息；慢性閉塞性肺疾患 (COPD)；気道炎症を伴う状態；好酸球増加症；線維症および過剰粘液産生；嚢胞性線維症；肺線維症；アトピー性障害；アトピー性皮膚炎；蕁麻疹；湿疹；アレルギー性鼻炎；アレルギー性胃腸炎；皮膚の炎症性および/または自己免疫状態；胃腸器官の炎症および/または自己免疫状態；炎症性腸疾患 (IBD)；潰瘍性大腸炎；クローン病；肝臓の炎症および/または自己免疫状態；肝硬変；肝線維症；B 型および/または C 型肝炎ウイルスによって引き起こされる肝線維症；強皮症；腫瘍または癌；肝細胞癌；神経膠芽腫；リンパ腫；ホジキンリンパ腫；ウイルス感染；細菌感染；寄生虫感染症；HTLV - 1 感染；防御 1 型免疫

応答の発現の抑制、およびワクチン接種中の防御1型免疫応答の発現の抑制である、請求項46に記載の方法。

【請求項50】

請求項1に記載の結合性タンパク質を、第2物質の投与前、それと同時またはその後で投与することを含む、TNF- α が有害である障害に罹患した患者の治療方法であって、第2物質が、以下のものに結合しうる抗体またはそのフラグメント：ヒトIL-12；PGE2；LPA；NGF；CGRP；SubP；RAGE；ヒスタミン；ヒスタミン受容体ブロッカー；ブラジキニン；IL-1 α ；IL-1 β ；VEGF；PLGF；メトトレキサート；コルチコステロイド；グルココルチコイド受容体モジュレーター；シクロスポリン、ラパマイシン、FK506または非ステロイド性抗炎症物質である、治療方法。

【請求項51】

請求項1に記載の結合性タンパク質を、第2物質の投与前、それと同時またはその後で投与することを含む、TNF- α が有害である障害に罹患した患者の治療方法であって、第2物質が、TNFアンタゴニスト；TNF受容体の可溶性断片；ENBREX（登録商標）；TNF酵素アンタゴニスト；TNF変換酵素（TACE）インヒビター；ムスカリン性受容体アンタゴニスト；TGF- β アンタゴニスト；インターフェロン γ ；ピルフェニドン（perfenidone）；化学療法剤、メトトレキサート、レフルノミド；シロリムス（ラパマイシン）またはその類似体、CCI-779；COX2またはcPLA2インヒビター；NSAID；免疫調節物質；p38インヒビター；TPL-2、MK-2およびNF κ Bインヒビター；ブデノシド；上皮増殖因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチル酸；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼインヒビター；メサラミン；オラサラジン；バルサラジド；抗酸化物質；トロンボキサンインヒビター；IL-1受容体アンタゴニスト；抗IL-1 β 抗体；抗IL-6抗体；増殖因子；エラスターゼインヒビター；ピリジニル-イミダゾール化合物；TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、EMAP-II、GM-CSF、FGFまたはPDGFの抗体またはアゴニスト；CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはそれらのリガンドの抗体；FK506；ラパマイシン；ミコフェノール酸モフェチル；イブプロフェン；プレドニゾロン；ホスホジエステラーゼインヒビター；アデノシンアゴニスト；抗血栓剤；補体インヒビター；アドレナリン作動性物質；IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼインヒビター；IL-1変換酵素インヒビター；TNF α 変換酵素インヒビター；T細胞シグナリングインヒビター；メタロプロテイナーゼインヒビター；6-メルカプトプリン；アンジオテンシン変換酵素インヒビター；可溶性サイトカイン受容体；可溶性p55 TNF受容体；可溶性p75 TNF受容体；sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R；抗炎症性サイトカイン；ならびにTGF β から選択される、治療方法。

【請求項52】

対象への投与が、少なくとも非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内、腹腔内、小脳内、脳室内、結腸内、子宮頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸内、子宮内、膀胱内、ポラス、膻、直腸、頬、舌下、鼻腔内または経皮によるものである、請求項43～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

(i) 請求項1に記載のTNF- α 結合性タンパク質またはそのTNF- α 結合性部分とサンプルを接触させ、

(i i) サンプル中の T N F - と T N F - 結合性タンパク質またはその結合性部分との複合体の形成を検出する (サンプル中の対照サンプルまたは関連 T N F - のものと比較した場合の、サンプル中の複合体の形成の統計的に有意な変化) ことを含む、サンプル中のヒト T N F - を検出する方法。

【請求項 5 4】

サンプルが全血、血漿、血清、尿、唾液または組織生検である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

ヒト対象におけるヒト T N F - を検出する方法であって、

(i) 請求項 1 に記載の T N F - 結合性タンパク質またはその T N F - 結合性部分を、ヒト T N F - への T N F - 結合性タンパク質またはその T N F - 結合性部分の結合を可能にする条件下、試験対象または対照対象に投与し、

(i i) 結合性タンパク質またはその結合性部分と T N F - との複合体の形成を検出することを含み、ここで、対照対象と比較した場合またはより早い時点での試験対象における複合体の形成と比較した場合の、試験対象における複合体の形成の統計的に有意な変化が、T N F - の存在を示す、方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	G 0 1 N 33/532 A	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/02	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
	A 6 1 P 33/00	

(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, MD, RU, T J, TM), 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ガユール, タリク
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 7 4 6、ホリストン、ワシントン・ストリート・1 0 1
4

(72)発明者 メーラー, アヒム
ドイツ国、6 7 2 6 9・グリユーンシュタット、イム・ツアウンリユツケン・1 0

(72)発明者 ボーズ, サハナ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 7 5 2、マールボロー、フローブス・アベニュー・4 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA01 DA02 DA05 DA12 EA04 GA11 HA01
HA15
4B064 AG27 BJ12 CA06 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA80X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084 AA19 BA44 DA01 DA58 DB22 DB56 MA55 MA56 MA59 MA63
NA14 ZA341 ZA342 ZA591 ZA592 ZA601 ZA602 ZA681 ZA682 ZA751
ZA752 ZA891 ZA892 ZB021 ZB022 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB131
ZB132 ZB151 ZB152 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZC351

ZC352

4C085 AA14 AA33 CC23

4H045 AA11 AA20 AA30 BA52 BA63 BA70 BA71 CA40 DA76 EA27

EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	TNF- α 结合蛋白		
公开(公告)号	JP2014503202A	公开(公告)日	2014-02-13
申请号	JP2013543343	申请日	2011-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	阿布维公司		
申请(专利权)人(译)	AVVI公司		
[标]发明人	シエチユンミン グツドリユーキャリー ガユールタリク メーラーアヒム ポーズサハナ		
发明人	シエ,チユン-ミン グツドリユー,キャリー ガユール,タリク メーラー,アヒム ポーズ,サハナ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12N15/02 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/532 A61K39/395 A61K45/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/00 A61P17/00 A61P11/02 A61P17/04 A61P1/16 A61P35/00 A61P31/02 A61P31 /12 A61P33/00		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/02 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/24 A61P29/00 A61P31/00 A61P31 /02 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61K47/6845 C07K16/241 C07K2317/24 C07K2317 /567 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K45/06 A61K49/0058 A61K51/1021 A61K2039/505 A61K2039/54 A61K2039/545 C07K2317/14 C07K2317/20 C07K2317/21 C07K2317/31 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/622 C07K2317/624 C07K2317 /626 C07K2319/30 G01N33/6863		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12N15/00.C C12N5/00.101 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/532.A A61K39/395.N A61K45/00 A61P37/02 A61P29/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P25/00 A61P3/10 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/00 A61P17/00 A61P11/02 A61P17/04 A61P1/16 A61P35/00 A61P31/02 A61P31/12 A61P33/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA80X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084 /BA44 4C084/DA01 4C084/DA58 4C084/DB22 4C084/DB56 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/NA14 4C084/ZA341 4C084/ZA342 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZA601 4C084/ZA602 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA751 4C084/ZA752 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZB021 4C084/ZB022 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZB371 4C084/ZB372 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C085/AA14 4C085/AA33 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA52 4H045/BA63 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045 /CA40 4H045/DA76 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	61/420999 2010-12-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了TNF- α 结合蛋白，包括结合TNF- α 的嵌合，CDR-移植和人源化抗体。结合蛋白对TNF- α 具有高亲和力并中和TNF- α 活性。结合蛋白可以是全长抗体或其TNF- α 结合部分。还描述了制备方法和使用结合蛋白的方法。TNF- α 结合蛋白可用于检测TNF- α 和抑制TNF- α 活性，包括在患有TNF- α 活性有害的疾病或病症的人类受试者中。

				特表2014-5 (P2014-5 (43)公表日 平成26年2月13日(201	
(51) Int. Cl.		F I			テーマコード (参)
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA		4B024
C07K 16/24	(2006.01)	C07K 16/24			4B064
C12N 15/02	(2006.01)	C12N 15/00	C		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00	1O1		4C084
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08			4C085
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 87 頁) 最終					
(21) 出願番号	特願2013-543343 (P2013-543343)	(71) 出願人	512212195		
(86) (22) 出願日	平成23年12月8日 (2011.12.8)		アツヴィ・インコーポレイテッド		
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月7日 (2013.8.7)		アメリカ合衆国、イリノイ・GOO		
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/063855		ノース・シカゴ、ノース・ワウキガ		
(87) 国際公開番号	W02012/078878		ード・1		
(87) 国際公開日	平成24年6月14日 (2012.6.14)	(74) 代理人	110001173		
(31) 優先権主張番号	61/420,999		特許業務法人川口国際特許事務所		
(32) 優先日	平成22年12月8日 (2010.12.8)	(72) 発明者	シエ、チユンミン		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、マサチューセツ		
			459、ニュートン、オールド・フ		
			ド・ロード・22		
		(72) 発明者	グツドリユ、キヤリー		
			アメリカ合衆国、マサチューセツ		
			056、ラッドロー、ステイーブン		
			トリート・201		
			最終頁に		

図A 【発明の名称】 TNF- α 結合性タンパク質