

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5767708号  
(P5767708)

(45) 発行日 平成27年8月19日(2015.8.19)

(24) 登録日 平成27年6月26日(2015.6.26)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C 0 7 K</b>	<b>16/24</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	16/24	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/15	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/19	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 21 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-530530 (P2013-530530)
(86) (22) 出願日	平成23年9月30日 (2011.9.30)
(65) 公表番号	特表2014-503177 (P2014-503177A)
(43) 公表日	平成26年2月13日 (2014.2.13)
(86) 国際出願番号	PCT/CN2011/001668
(87) 国際公開番号	W02012/041018
(87) 国際公開日	平成24年4月5日 (2012.4.5)
審査請求日	平成25年5月22日 (2013.5.22)
(31) 優先権主張番号	201010297255.0
(32) 優先日	平成22年9月30日 (2010.9.30)
(33) 優先権主張国	中国 (CN)

(73) 特許権者	506405437
	ツェンドゥー カンホン バイオテクノロ ジーズ カンパニー リミテッド 中華人民共和国, スーチョワン プロヴィ ンス 610036, ツェンドゥー シテ ィ, ジンニェウ ディストリクト, シュー シー ロード ナンバー 36
(74) 代理人	100075409
	弁理士 植木 久一
(74) 代理人	100129757
	弁理士 植木 久彦
(74) 代理人	100115082
	弁理士 菅河 忠志
(74) 代理人	100125243
	弁理士 伊藤 浩彰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 抗体およびその抗原結合性フラグメント (F a b) およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を含み、  
前記重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 または 3 の配列で示され、  
前記軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 5、9、1 1、7、1 3 およ  
び 5 の配列のいずれか一つで示され、且つ  
前記配列番号 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンであることを特  
徴とするヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体または前記抗体の抗原結合性フラグメント F a  
b。

【請求項 2】

下記 a) ~ 1) のいずれか一つであり、配列番号 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン  
酸またはグルタミンであることを請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

a) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、およ  
び配列番号 1 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 8、を有す  
る K S 1 0。

b) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、およ  
び配列番号 9 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 5、を有する  
K S 0 3。

c) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、およ  
び配列番号 1 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 6、を有す

10

20

る K S 0 6。

d) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 2、および配列番号 1 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 8、を有する K S 1 2。

e) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 2、および配列番号 9 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 5、を有する K S 0 4。

f) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 2、および配列番号 1 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 6、を有する K S 0 7。

10

g) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 2、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 3、を有する K S 0 2。

h) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 2、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 4、を有する K S 0 8。

i) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 2、および配列番号 1 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 7、を有する K S 1 1。

j) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 3、を有する K S 0 1。

20

k) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 4、を有する K S 0 5。

l) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、および配列番号 1 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 7、を有する K S 0 9。

【請求項 3】

重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を含み、  
前記重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 7 の第 1 ~ 1 2 0 番目、または配列番号 2 5 の第 1 ~ 1 2 0 番目に相当し、  
前記軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 1 の第 1 ~ 1 0 9 番目に相当する

30

ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗原結合性フラグメント F a b。

【請求項 4】

定常領域のアミノ酸配列がヒト抗体の重鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である重鎖、および

定常領域のアミノ酸配列がヒト抗体の軽鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である軽鎖から成る請求項 1 または 2 に記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

40

【請求項 5】

前記重鎖の定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 7 の配列で示され、且つ

前記軽鎖の定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 9 の配列で示される

請求項 1、2 または 4 に記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

【請求項 6】

前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 1 の配列で示され、

前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 3 の配列で示され、且つ

前記配列番号 2 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである請求項 1、2、4、および 5 のいずれか一つに記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

【請求項 7】

50

前記重鎖の可変領域および重鎖の定常領域 C H 1 から成る重鎖フラグメントと、  
前記軽鎖の可変領域および軽鎖の定常領域から成る軽鎖から成り、  
前記 C H 1 のアミノ酸配列はヒト抗体重鎖の定常領域 C H 1 のアミノ酸配列と同一であり、且つ

前記軽鎖の定常領域のアミノ酸配列はヒト抗体軽鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である請求項 1 または 3 に記載の抗原結合性フラグメント F a b。

【請求項 8】

前記 C H 1 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 3 の配列で示され、且つ

前記軽鎖の定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 9 の配列で示される

請求項 1、3 または 7 のいずれかに記載の抗原結合性フラグメント F a b。

10

【請求項 9】

下記 b 1) ~ b 3) のいずれか一つである請求項 3、7 または 8 のいずれかに記載の抗原結合性フラグメント F a b。

b 1) K S - 7 F : 前記重鎖フラグメントのアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 7 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 1 で示される。

b 2) K S - 7 A : 前記重鎖フラグメントのアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 5 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 1 で示される。

b 3) K S - 2 E : 前記重鎖フラグメントのアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 5 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 9 で示される。

【請求項 10】

20

抗原結合性フラグメント A は F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントであり、

抗原結合性フラグメント B は F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントである

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれかに記載の抗体に由来する抗原結合性フラグメント A、または

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれかに記載の F a b に由来する抗原結合性フラグメント B。

30

【請求項 11】

下記 A) ~ C) のいずれか一つのタンパク質をコードする遺伝子。

A) 請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体。

B) 請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b。

C) 請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント。

【請求項 12】

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、および配列表の配列番号 2 または 4 の配列で示される請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント A、の重鎖の可変領域のコード配列、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、および配列表の配列番号 1 6、1 0、1 2、8、1 4 および 6 のいずれか一つの配列で示される請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント A、の軽鎖の可変領域のコード配列、

40

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b、および配列表の配列番号 2、4、2 8、および 2 6 のいずれか一つの配列の第 1 ~ 3 6 0 番目と同一の請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント B、の重鎖の可変領域のコード配列、または

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b、および配列表の配列番号 1 6、1 0、1 2、8、1 4、6、3 2、および 3 0 のいずれか一つの配列の第 1 ~ 3 2 7 番目に相当する請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント B、の軽鎖の可変領域のコード配列、

である請求項 11 に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

50

## 【請求項 13】

前記抗体の重鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 18 の配列で示され、且つ前記抗体の軽鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 20 の配列で示され、前記 F a b の C H 1 のコード配列は配列表の配列番号 34 の配列で示され、且つ前記 F a b の軽鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 20 の配列で示される請求項 11 または 12 に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

## 【請求項 14】

前記抗体の重鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 22 の配列で示され、且つ前記抗体の軽鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 24 の配列で示され、

請求項 3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b のコード配列は、下記 c 1) ~ c 3) のいずれか一つである

請求項 11 ~ 13 のいずれか一つに記載のタンパク質をコードする遺伝子。

c 1) K S - 7 F : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 28 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 32 で示される。

c 2) K S - 7 A : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 26 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 32 で示される。

c 3) K S - 2 E : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 26 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 30 で示される。

## 【請求項 15】

遺伝子材料であって、

請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子を含む

組み換えベクター、組み換え菌、組み換え細胞株、組み換えウイルス、または発現カセットである遺伝子材料。

## 【請求項 16】

前記組み換えベクターは、前記 F a b、抗体、または抗原結合性フラグメントを発現させるための原核生物または真核生物発現ベクターであり、

前記組み換え菌は、前記遺伝子を有する大腸菌であり、

前記組み換え細胞株は、前記遺伝子を組み込んだ哺乳動物細胞株であり、

前記組み換えウイルスは、前記遺伝子を運搬する組み換えアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスである

請求項 15 に記載の遺伝子材料。

## 【請求項 17】

前記組み換え細胞株は、C H O 細胞株、または 293 細胞株およびその亜系統である請求項 16 に記載の遺伝子材料。

## 【請求項 18】

d 1) ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気の予防および/または治療のための薬の調整

d 2) ヒト腫瘍壊死因子 を中和するための生成物の調整、または

d 3) ヒト腫瘍壊死因子 を定性的もしくは定量的に検出するためのキットの調整のための、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b、

請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント、

請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子、または

請求項 15 ~ 17 のいずれか一つに記載の遺伝子材料、

の使用方法。

## 【請求項 19】

補助材料および有効成分を含み、

前記有効成分は、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、

10

20

30

40

50

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b、  
請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント、  
請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子、および  
請求項 15 ~ 17 のいずれか一つに記載の遺伝子材料の少なくとも一つを含み、  
前記補助材料は薬学的に許容できる担体または賦形剤である  
医薬組成物。

【請求項 20】

前記ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、ヒト腫瘍壊死因子 の増加が原因の病気で  
ある請求項 18 に記載の使用方法。

【請求項 21】

前記ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、関節リウマチ、自己免疫性ぶどう膜炎、ク  
ローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発  
性関節炎である請求項 20 に記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 ( T N F - ) 抗体およびその抗原結合性フラ  
グメント ( F a b ) およびその使用方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

自己免疫疾患の発症および進行は、多くの活性サイトカインの制御のアンバランスが起  
因となる複雑な過程を経る。腫瘍壊死因子 ( T N F - ) は多数のサイトカインの中で  
免疫調節に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、その過剰発現は自己免疫疾  
患などの主要因の1つであることが実証されている。従って腫瘍壊死因子 の活性を抑え  
る生物医薬品の使用は、このような疾病の治療に最も成功した治療の1つになっている。  
主として承認された適応症は、関節リウマチ、クローン病、プラーク乾癬、乾癬性関節炎  
、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎および若年性特発性関節炎を含み、その一方で様々な他の  
関連疾患について臨床試験が行われている。

【0003】

現在、ヨーロッパおよび米国市場では、R e m i c a d e のような抗腫瘍壊死因子 抗  
体薬剤および抗体様 F c 融合タンパク質が入手できる。しかし、R e m i c a d e の生体  
内での半減期は、およそ9日であり短い。更に、R e m i c a d e は抗原との結合親和力  
、生物活性および臨床適用があり、配列の 1 / 3 がマウス由来配列、および配列の 2 / 3  
がヒト由来配列からなるキメラ抗体であり、患者の約 10% ~ 47% は R e m i c a d e  
の投与後に免疫反応が起き、一般に、ヒト抗マウス抗体 ( H A M A ) の産生をもたらし、  
抗体の性能および長期適用に影響する。従って、マウス由来率を減少させ、人の病気の治  
療の際に安全に使用できるように、より高度のヒト化と、マウス由来配列の割合を最大限  
に減少させた抗腫瘍壊死因子 抗体が要求されている。抗体をヒト化する一般的な過程は  
、事前を選択したヒト化抗体のフレームワーク領域の中へ、マウス由来抗体の可変領域 (   
V<sub>H</sub>、V<sub>K</sub> ) の相補性決定領域 ( C D R ) の部分を組み込む過程である。その合成抗体は、  
ほぼヒト由来配列からなり、同じ抗原に対して当初のマウス由来抗体の選択性を保持する  
ことができる。しかし、その過程は、一般に抗体親和性の減少をもたらす。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の目的の一つは、ヒト腫瘍壊死因子 に対する親和性が、ヒト - マウスキメラ抗  
体である R e m i c a d e と同等か、またはそれより高い、ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子  
抗体および前記抗体の抗原結合性フラグメント ( F a b ) を提供することにある。

【0005】

本発明に係るヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体または F a b は、重鎖の可変領域および

10

20

30

40

50

軽鎖の可変領域を含み、前記重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 または 3 の配列で示され、前記軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 15、9、11、7、13 および 5 の配列のいずれか一つで示され、且つ前記配列番号 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである。

【0006】

詳細には、前記抗体は下記 a) ~ l) のいずれか一つから選ばれ、配列番号 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである。a) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 15 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH08 を有する KS10、b) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 9 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH05 を有する KS03、c) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 11 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH06 を有する KS06、d) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 15 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH08 を有する KS12、e) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 9 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH05 を有する KS04、f) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 11 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH06 を有する KS07、g) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH03 を有する KS02、h) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH04 を有する KS08、i) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 13 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH07 を有する KS11、j) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH03 を有する KS01、k) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH04 を有する KS05、l) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 13 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH07 を有する KS09。

【0007】

本発明の他の目的は、ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗原結合性フラグメント Fab を提供することにある。前記 Fab は、重鎖の可変領域のアミノ酸配列が配列表の配列番号 27 または配列番号 25 の第 1 ~ 120 番目に相当する重鎖、および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 または配列番号 29 の第 1 ~ 109 番目に相当する軽鎖、を含む。

【0008】

本発明で提供する抗体は、定常領域のアミノ酸配列がヒトの重鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である重鎖、および定常領域のアミノ酸配列がヒトの軽鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である軽鎖から成る。

【0009】

前記抗体の重鎖定常領域は、いずれかのクラス (IgG、IgA、IgM、IgE、IgD) またはサブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM1、IgM2、IgA1、IgA2) のヒト由来定常領域であっても良く、前記抗体の軽鎖定常領域は、ヒト由来定常領域のいずれかのクラス (または ) 若しくはサブクラス (1、2、3、4) 又はアロタイプ (m(1)、m(2)、m(3)) であっても良い。

【0010】

10

20

30

40

50

前記抗体の重鎖の定常領域のアミノ酸配列は詳細には配列表の配列番号 17 の配列で示され、且つ前記抗体の軽鎖の定常領域のアミノ酸配列は詳細には配列表の配列番号 19 の配列で示される。

【0011】

前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 21 の配列で示され、前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 23 の配列で示される。配列番号 21 の第 1 ~ 120 番目のアミノ酸配列は前記重鎖の可変領域に相当し、且つ第 121 ~ 450 番目のアミノ酸配列は前記重鎖の定常領域に相当する。配列番号 23 の第 1 ~ 109 番目のアミノ酸配列は前記軽鎖の可変領域に相当し、且つ第 110 ~ 214 番目のアミノ酸配列は前記軽鎖の定常領域に相当する。前記、配列番号 21 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミン

10

【0012】

本発明で提供する Fab は、重鎖 Fd フラグメントおよび軽鎖から成り、前記重鎖 Fd フラグメントは V<sub>H</sub> と C<sub>H</sub>1 を含み、前記軽鎖は V<sub>K</sub> および軽鎖定常領域を含み、前記 C<sub>H</sub>1 のアミノ酸配列はヒト抗体重鎖の C<sub>H</sub>1 定常領域のアミノ酸配列と同一であり、且つ、前記軽鎖定常領域のアミノ酸配列はヒト抗体軽鎖の定常領域と同一である。

【0013】

前記 Fd の Fd フラグメントの C<sub>H</sub>1 は、いずれかのクラス ( I g G、I g A、I g M、I g E、I g D ) またはサブクラス ( I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M 1、I g M 2、I g A 1、I g A 2 ) のヒト由来の C<sub>H</sub>1 定常領域であっても良い。前記 Fab の軽鎖定常領域は、いずれかのクラス ( または ) またはサブクラス ( 1、2、3、4 ) またはアロタイプ ( m ( 1 )、m ( 2 )、m ( 3 ) ) のヒト由来の軽鎖定常領域であっても良い。

20

【0014】

C<sub>H</sub>1 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 33 の配列で示され、前記軽鎖定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 19 の配列で示される。

【0015】

本発明の特定の実施形態では、前記 Fab は、下記 b 1 ) ~ b 3 ) のいずれか一つである。

b 1 ) K S - 7 F : 前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 27 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 で示される。

30

b 2 ) K S - 7 A : 前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 25 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 で示される。

b 3 ) K S - 2 E : 前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 25 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 29 で示される。

【0016】

本発明の更に別の目的は、抗原結合性フラグメント A または抗原結合性フラグメント B を提供することであり、前記抗原結合性フラグメント A は Fab、Fab'、F ( ab' )<sub>2</sub>、Fv ( 抗体の可変領域フラグメント )、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントであり、これらは前記抗体に由来し、前記抗原結合性フラグメント B は Fab'、F ( ab' )<sub>2</sub>、Fv、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントであり、これらは前記 Fab に由来する。

40

【0017】

前記 F ( ab' )<sub>2</sub> は、軽鎖 1 対および Fd より僅かに大きい重鎖 ( Fd' と称される ) 1 対を含む。ペプシンによる I g G 分子の加水分解は F ( ab' )<sub>2</sub> フラグメントを産生し、F ( ab' )<sub>2</sub> は 2 つの Fab を含み、そのため 2 つの抗原エピトープと結合することができる。Fd' は約 235 アミノ酸残基を含み、V<sub>H</sub>、C<sub>H</sub>1、およびヒンジ領域を含む。Fv は軽鎖の可変領域 ( V<sub>L</sub> ) および重鎖の可変領域 ( V<sub>H</sub> ) から成り、それら

50

は非共有結合により会合している。F<sub>v</sub>は単一の抗原結合部位を有し、F<sub>v</sub>の分子量は完全な抗体分子の約6分の1の分子量である。F<sub>v</sub>はS<sub>c</sub>F<sub>v</sub>(単一鎖の抗体)、D<sub>s</sub>F<sub>v</sub>(ジスフィルド結合安定化抗体)等を含む。S<sub>c</sub>F<sub>v</sub>は、1つの適切なオリゴヌクレオチド(リンカー)により結合したV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>からできる1つのペプチド鎖である。D<sub>s</sub>F<sub>v</sub>は、軽鎖および重鎖の可変領域の適切な部位にそれぞれ1つのシステインを導入することにより形成された、ジスルフィド結合固定F<sub>v</sub>フラグメントである。D<sub>s</sub>F<sub>v</sub>は、S<sub>c</sub>F<sub>v</sub>よりも結合能および安定性に優れていることが示されている。

【0018】

更に、次のタンパク質A)~C)のうち、いずれか1つをコードする遺伝子は、特許請求の範囲に含まれる。A)前記抗体、B)前記Fab、C)抗原結合性フラグメントAまたはB。

10

【0019】

抗体および抗原結合性フラグメントAの両方の重鎖可変領域のコード配列は配列表の配列番号2または4で示される。抗体および抗原結合性フラグメントAの両方の軽鎖可変領域のコード配列は、配列表の配列番号16、10、12、8、14および6のうちの一つから選ばれる。Fabおよび抗原結合性フラグメントBの両方の重鎖可変領域のコード配列は、配列表の配列番号2、4、28のいずれかの配列の第1~360番目および配列番号26の配列の第1~360番目に相当する。Fabおよび抗原結合性フラグメントBの両方の軽鎖可変領域のコード配列は配列表の配列番号16、10、12、8、14、6、32のいずれかの配列の第1~327番目、および配列番号30の第1~327番目に相当する。

20

【0020】

前記配列において、配列番号6、8、14、10、12および16は全て327ヌクレオチドを有する一方、配列番号2、4は360ヌクレオチドを有する。

【0021】

抗体の重鎖定常領域のコード配列は、配列表の配列番号18で示され、抗体の軽鎖定常領域のコード配列は、配列表の配列番号20で示される。

【0022】

FabのCH1領域のコード配列は、配列表の配列番号34で示され、Fabの軽鎖定常領域のコード配列は配列表の配列番号20で示される。

30

【0023】

本発明の実施態様では、抗体の重鎖のコード配列は詳細には配列表の配列番号22で示され、抗体の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号24で示される。

【0024】

前記Fabのコード配列は以下、c1)~c3)のいずれか一つである。

c1)KS-7F: Fabの重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号28で示され、且つFabの軽鎖のコード配列は配列表の配列番号32で示される。

c2)KS-7A: Fabの重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号26で示され、且つFabの軽鎖のコード配列は配列表の配列番号32で示される。

c3)KS-2E: Fabの重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号26で示され、且つFabの軽鎖のコード配列は配列表の配列番号30で示される。

40

【0025】

配列番号22の第1~360番目および360~1350番目の位置のヌクレオチドは前記重鎖の可変領域の配列および重鎖の定常領域の配列にそれぞれ相当する一方、配列番号24の第1~327番目および第328~642番目の位置のヌクレオチドは、前記軽鎖の可変領域の配列および軽鎖の定常領域の配列にそれぞれ相当する。

【0026】

本発明の別の目的は、次の遺伝子材料を提供することにある。遺伝子材料は、前記遺伝子セットを含む、組み換えベクター、組み換え菌、組み換え細胞株、組み換えウイルス、または発現カセットである。

50

## 【 0 0 2 7 】

組み換えベクターは、抗体、F a b、または抗原結合性フラグメントを発現する、原核生物または真核生物発現ベクターである。組み換え菌は、前記遺伝子セットを有する大腸菌 (*E s c h e r i c h i a c o l i*) である。組み換えの細胞株は、遺伝子組み換え細胞株か融合細胞株であり、遺伝子組み換え細胞株は、本発明のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体、F a b、抗原結合性フラグメントをコードする遺伝子をトランスファーした哺乳動物細胞株であっても良く、好ましくは、C H O細胞株、または293細胞株およびその亜系統である。融合細胞株は本発明の前記ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体を分泌できるハイブリドーマ細胞である。組み換えウイルスは組み換えアデノウイルスまたは組み換えのアデノ随伴ウイルス等であり、前記遺伝子セットを運搬する。発現カセットは、上流から下流に、プロモーター、プロモーターより転写が開始される抗体またはF a bまたは抗原結合性フラグメント、およびターミネーターの3つのフラグメントを含むD N A分子である。

10

## 【 0 0 2 8 】

宿主細胞を、抗体、F a b、または抗原結合性フラグメントをコードする遺伝子を含む組み換えベクターにより、トランスフェクトまたはトランスフォームすると、対応するタンパク質が発現され、抗体、F a b、抗原結合性フラグメントが得られる。前記宿主細胞は、哺乳動物細胞を含むが、これに限られず、バクテリア、酵母、昆虫細胞等を含む、真核細胞であって良いし、原核細胞であっても良い。大量のタンパク質発現に有用である哺乳動物細胞は多種多様存在し、293、C H O、S P 2 0、N S 0、C O S、B H K、またはP e r C 6細胞等である。細胞をトランスフェクトする方法は多様であり、電気穿孔、リポソーム媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションなどを含むが、これらに限定されない。

20

## 【 0 0 2 9 】

抗体、F a b、または抗原結合性フラグメントの好ましい発現方法は以下の通りである。組換え型タンパク質の発現量を増加させるために、安定してトランスフェクトした宿主細胞中の組み換えベクターにより遺伝子増幅を行なう。例えば、D H F R欠損宿主細胞は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (D H F R) を含む組み換えのベクターで安定してトランスフェクトされ、次にメトトレキサート (M T X) は、宿主細胞中の組み換えベクターのコピー数を増加させるのに十分な濃度で、細胞培養液へ加えることができる。

30

## 【 0 0 3 0 】

コーディング遺伝子配列の組み合わせから成るF a bまたはI g Gの発現の後に、酵素免疫測定法 (E L I S A) または他の測定により、培地中のタンパク質濃度を決定することができる。F a bフラグメントについては、プロテインGを使用して、アフィニティークロマトグラフィーで精製することができる。また、I g Gタンパク質はプロテインAを使用して、アフィニティークロマトグラフィーで精製することができる。

## 【 0 0 3 1 】

更に、抗体、F a b、抗原結合性フラグメント、遺伝子、以下の遺伝子材料の使用方法も特許請求の範囲に含む。

d 1) ヒト腫瘍壊死因子 に関連した病気の予防および/または治療のための薬の調整、または、

40

d 2) ヒト腫瘍壊死因子 を中和するための生成物の調整、または

d 3) ヒト腫瘍壊死因子 を定性的もしくは定量的に検出するためのキットの調整。

## 【 0 0 3 2 】

ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、ヒト腫瘍壊死因子 の増加により引き起こされる病気であり、前記病気として好ましくは、関節リウマチ、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である。

## 【 0 0 3 3 】

本発明の更に別の目的は、補助材料および有効成分を含む医薬組成物を提供することで

50

あり、有効成分は、前記の抗体、F a b、抗原結合性フラグメント、遺伝子、および遺伝物質の材料のうち少なくとも1つを含み、補助材料は薬学的に許容可能な担体または賦形剤である。医薬組成物の中の有効成分は、前記のF a bまたは抗体のいずれか一つであっても良いし、前記の抗原結合性フラグメントのいずれか一つであっても良いし、前記の遺伝子のいずれか一つであっても良いし、前記の遺伝子材料のいずれか一つであっても良い。

【0034】

更に特許請求の範囲には、ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気の治療での、前記の抗体、F a b、抗原結合性フラグメント、遺伝子、遺伝子材料、および医薬組成物の材料のうちいずれか一つの使用も含まれる。

10

【0035】

ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、ヒト腫瘍壊死因子 の増加によって引き起こされ、前記病気として好ましくは、自己免疫性ぶどう膜炎、関節リウマチ、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、腫瘍壊死因子 の抑制下での、ヒト化F a bの生物活性のE L I S Aによる検出結果を示す。

【図2】図2は、腫瘍壊死因子 の中和下におけるL 9 2 9細胞毒性試験による、ヒト化F a bの生物活性の検出結果を示す。

20

【図3】図3は、異なる種の腫瘍壊死因子 抗原に対するK S 1 0の結合解析の結果を示す。

【図4】図4は、K S 1 0を用いた関節リウマチ試験用ラットの治療に関するスコアを示す。左から順に、正常群、負対照群、モデル群、K S 1 0 5 m g / k g群、K S 1 0 1 0 m g / k g群、K S 1 0 2 0 m g / k gの群、を示す。

【図5】図5は、関節リウマチ試験用ラットの関節の滑液/組織中のI L - 1 レベルに対するK S 1 0の影響を示す。左から順に、正常群、負対照群、モデル群、K S 1 0 5 m g / k g群、K S 1 0 1 0 m g / k g群、K S 1 0 2 0 m g / k gの群、を示す。

【図6】図6は、関節リウマチ試験用ラットの関節の滑液/組織中のI L - 6レベルに対するK S 1 0の影響を示す。左から順に、正常群、負対照群、モデル群、K S 1 0 5 m g / k g群、K S 1 0 1 0 m g / k g群、K S 1 0 2 0 m g / k gの群、を示す。

30

【実施例】

【0037】

以下、発明の理解を助けるために実施例を示すが、本発明の範囲がこれらによって制限されるものではない。特に記載していない限り、以下に記載の実験方法はすべて従来の実験的方法である。特に記載していない限り、実施例の中で使用される実験材料はすべて、生化学試薬の一般的な店で購入可能である。以下の実施例の定量試験は3回繰り返して行い、結果は平均値である。

【0038】

40

ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の重鎖および軽鎖のC D Rの接合、P C Rによる特定部位の変異誘発、および本発明で述べる突然変異体ライブラリーのスクリーニングを、従来の遺伝子組換え技術および抗原抗体相互作用に基づく免疫学技術によって行い、更に、詳細な実験の手順および手段は、Joseph Sambrook, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Science Press, 3rd editionおよび同様の実験ハンドブックに記載されている。以下の実施例におけるE C <sub>50</sub>を、結果のグラフを作成中に、ソフトウェアGraph Pad Prism 5に光学濃度(O D<sub>450</sub>)の値を入力することにより得た。

【0039】

実施例1：ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体のF a bの発現とその活性の検出

50

本実施例では、ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の3つのFab (Fabは重鎖Fdフラグメントと抗体の軽鎖から成る)、即ちKS-2E, KS-7A, およびKS-7Fを含む。

#### 【0040】

手順1. KS-2E, KS-7AおよびKS-7Fの発現ベクターの作成

(1) 軽鎖および重鎖の配列の取得

ヒトの腫瘍壊死因子 (R&D社, カタログ番号: 210-TA-050) の免疫性を付与したマウスから、ハイブリドーマ細胞を得て、モノクローナルスクリーニングを行い、全RNAを抽出し、テンプレートとして用い、重鎖可変領域のヌクレオチド配列を一般的なプライマーである、P1: 5'-GCGAATTCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3', P2: 5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCCAG-3'を用い、PCRにより増幅し、且つ軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は、一般的なプライマーP3: 5'-GACATTCTGMTSACMCAGMCTCC-3', P4: 5'-GTTAGATCTCGAGCTTGGTCCC-3'を用い、PCRにより増幅した。目的のバンドを含むゲル断片を、回収のために取り取った。抗体の軽鎖および重鎖の増幅産物は夫々、ベクターpMD18-T (Takara社, カタログ番号: D101C) に挿入した。単一のコロニーを別々に選び、抗体の重鎖および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列を確認するためにシーケンシングを行った。

#### 【0041】

(2) ヒト化Fabの作成

アミノ酸配列の相同性の比較は、生成物の軽鎖可変領域とヒト化抗体の軽鎖可変領域、および、生成物の重鎖可変領域とヒト化抗体の重鎖可変領域とを比較した。配列相同性は、IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)、およびIMGT (ImMunoGeneTics, IMGT: <http://www.imgt.org>) で夫々検索した。検索結果に基づいて、軽鎖および重鎖共に相同性の高い配列を有する抗体をヒト化抗体のテンプレートとして選んだ。生成物の重鎖可変領域VHを、より配列の相同性が高いヒト化抗体IGHV3-15\*07 (登録番号: M99406) のフレームワーク領域へ接合し、生成物の軽鎖可変領域VKは、より配列の相同性が高いヒト化抗体IGKV6-21\*01 (登録番号: X63399) のフレームワーク領域へ接合した。

#### 【0042】

ヒト由来重鎖フラグメント (Fd) および軽鎖の多数の変異サイクルの後、様々な軽鎖および重鎖破片 (Fd) の組み合わせを、ベクターpTLR (a modified pET22b (+) vector) に挿入した。詳細には、各末端に制限酵素サイトBamHIおよびEcoRIを夫々有する軽鎖用の様々なDNA、および各末端に制限酵素サイトNotIおよびXhoIを夫々有する重鎖Fdフラグメント用の様々なDNAを準備した。DNAの2群を、夫々ベクターpTLRの対応する制限酵素サイト間へ移動、即ち、軽鎖用の様々なDNAを制限酵素サイトBamHIおよびEcoRIの間に挿入し、重鎖フラグメント (Fd) 用の様々なDNAを、制限酵素サイトNotIおよびXhoIの間に挿入し、様々なFab発現ベクター (KS-2E, KS-7A, KS-7F、を夫々発現する3つのFab発現ベクターを含む) を作成した。

#### 【0043】

前記した軽鎖および重鎖フラグメント (Fd) の様々な組み合わせは、3つのFab KS-2E, KS-7A, およびKS-7Fを含む。KS-2Eの重鎖フラグメントのアミノ酸配列は、配列表の配列番号25で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号26で示され、且つ、KS-2Eの軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号29で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号30で示される。KS-7Aの重鎖フラグメントのアミノ酸配列は、配列表の配列番号25で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号26で示され、且つKS-7Aの軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号31で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号32で示される。KS-7Fの重鎖フラグメントのアミノ酸配列は、

配列表の配列番号27で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号28で示され、且つKS-7Fの軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号31で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号32で示される。

#### 【0044】

前述のpTLRベクターを得るためのpET22b(+)ベクター組み換え手順の詳細は、以下の通りである。第1に、DNA断片(T-L-R DNA塩基配列に短縮され、配列表の配列番号35で示される)を、人工的に合成し、それは両末端に制限酵素サイトSalIおよびNotIを有するT7プロモーター、ラクトース・オペレーターおよびリボソーム結合部位(RBS)を含み、pET22b(+)ベクター(ovage社製、アメリカ)およびT-L-R DNA塩基配列を、SalIおよびNotI制限酵素の両方で夫々切断し、その後、T4 DNAリガーゼにより結合シトランスフォームし、最後に単一コロニーを従来方法により選び、適切に組み換えベクターを選びシーケンシングを行った。

#### 【0045】

手順2. KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fの原核生物の発現

E. coli株Top10に上述の作成したFab発現ベクター(KS-2E、KS-7A、KS-7F、を夫々発現する3つのFab発現ベクターを含む)をトランスフォームし、その後、クロラムフェニコールと共に2-YTプレート(ペプトン1.6%、酵母エキス1%、NaCl 0.5%、および寒天末1.5%)上に蒔いた。翌日、いくつかの単一コロニーを選択するために適切なコロニー密度のプレートを選んだ。各陽性のコロニーから、8つの単一コロニーを選び、96穴ディープウェルプレートに蒔き、発現用のIPTGを用いて誘導した。各単一コロニーを、クロラムフェニコールを含む6mLの2-YT液体培地(ペプトン1.6%、酵母エキス1%、およびNaCl 0.5%)入りのチューブに加え、37、12時間、250rpmで振とうした。細菌懸濁液の0.2μLを各チューブからピペットで取り、保管のためにクロラムフェニコールを含む2-YTプレート上に移した。5mLの細菌懸濁液を、500mLのクロラムフェニコール含有2-YT液体培地に播種し、OD<sub>600</sub>が0.6に達するまで、33、300rpmで培養した。IPTGは3時間の誘導時間で様々なFabの発現を誘導させるために、培地へ最終濃度50μの濃度で加えた。誘導した発現が完了した後に、培地を10、15分間、5100rpmで遠心分離した。上清を廃棄し、バクテリアの沈殿を40mLの予冷したTES溶液で完全に再懸濁した。水で20%まで薄め予冷したTES66mLを、再懸濁したバクテリアの溶液へ再び加え、氷上で40分間インキュベートし、その後、4、10分、13000rpmで遠心分離した。遠心分離の後、Fabタンパク質(KS-2E、KS-7A、またはKS-7Fタンパク質)を含むペリプラズム抽出物である上清を集めた。ペリプラズム抽出物をG-25(GE社、17-0034-01)カラムを通して、脱塩した。プロテインG(GE社、17-0618-04)充填済みカラムを準備し、平衡溶液(20mMリン酸緩衝液、pH6.5)で平衡にし、タンパク質サンプルをロードした。サンプルのロード後、カラムを平衡溶液で連続して洗い、次に平衡溶液(0.1M Gly-HCl、pH2.5)で直接的に溶出した。溶出画分を集め、その収集前に分画収集チューブに1.0Mトリス塩酸緩衝液(pH9.0)を、トリス緩衝液と溶出画分が1:9の体積比率となるように添加しておき、溶出画分をpH7.0に迅速に調節した。収集した液体は目的のタンパク質を含む。タンパク質の純度をSDS-PAGEによって分析し、タンパク質サンプル中のタンパク質濃度を測定した。最後に、タンパク質サンプルをサブパッケージし、-80で保管し、これにより、高純度のFabタンパク質(3つのタンパク質、KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fを含む)を得た。

#### 【0046】

手順3. KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fの生物活性の測定

1) ELISAによる腫瘍壊死因子へのヒト化Fabの結合分析

腫瘍壊死因子に結合するFabを次の手順によりスクリーニングした。ELISAプレートに結合するFabを次の手順によりスクリーニングした。ELISAプレートを、1ウェルあたり基質として100ngのヒト由来腫瘍壊死因子(R&D社、

10

20

30

40

50

カタログ番号：210-TA-050)でコーティングした。Fabタンパク質(手順2で準備した、3つのタンパク質、KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fを含む)40nMを2倍希釈したものを添加し、インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトC-Kappa二次抗体(シグマ社、カタログ番号：K3502)を加え、最後に、TMBを反応の進行のために加え、2M硫酸は反応を止めるために入れ、これにより、腫瘍壊死因子結合Fabタンパク質を測定した。このようなスクリーニング手順により、高い活性の3つのFabを得た。それはKS-2E、KS-7FおよびKS-7Aであり、これらのタンパク質は全体で2つの異なるVH(VH01およびVH02; VH01のアミノ酸配列は配列番号25で示され、ヌクレオチド配列は配列番号26で示され、VH02のアミノ酸配列は配列番号27で示され、ヌクレオチド配列は配列番号28で示される)、および2つの異なるVK(VK03およびVK05; VK03のアミノ酸配列は配列番号29で示され、且つそのヌクレオチド配列は配列番号30で示され、VK05のアミノ酸配列は配列番号31で示され、且つヌクレオチド配列は32で示される(表1))を含む。

10

【0047】

ELISAによる腫瘍壊死因子へのヒト化Fab結合能の試験結果を図1に示す。その結果が示すように、前記の得られた3つのヒト化Fabは、ヒト-マウスキメラ抗体であるRemicadeのFabフラグメントと同様に抗原親和性を示し、その中でKS-7AおよびKS-7Fは腫瘍壊死因子への結合に関するEC<sub>50</sub>値において、ヒト-マウスキメラ抗体RemicadeのFabフラグメントよりも優れている(表2)。

20

【0048】

【表1】

ヒト化抗腫瘍壊死因子α抗体のFab

Fabフラグメント	VH	VK
KS-2E	VH01	VK03
N/A	VH02	VK03
KS-7F	VH01	VK05
KS-7A	VH02	VK05

30

注：N/Aは、弱い活性のためFabフラグメントが特定されなかったことを示す。

【0049】

【表2】

ELISAによる、ヒト化抗腫瘍壊死因子α抗体のFabの腫瘍壊死因子αへの結合に関するEC<sub>50</sub>

サンプル	EC <sub>50</sub> (nM)
Remicade Fab	3.324
KS-2E	6.659
KS-7A	3.027
KS-7F	2.740

40

注：表2のデータは3回の実験の平均値。

【0050】

2) L929細胞毒性試験による腫瘍壊死因子抑制中のヒト化Fabの生物活性の検出

更に、腫瘍壊死因子の中和における前記の3つのヒト化Fab(KS-2E、KS-7FおよびKS-7A)の生物活性は、細胞生物学実験であるL929細胞毒性試験で検

50

証した。この実験では、対数増殖期の  $1 \times 10^4$  個の L929 細胞を、96 穴プレートの DMEM (10% FBS、Gibco 社) 培地中に播種した。24 時間後に、ヒト由来腫瘍壊死因子 (R&D 社, カタログ番号: 210-TA-050) を  $0.5 \text{ ng/mL}$ 、およびアクチノマイシン D (Fluka) を  $0.5 \mu\text{g/mL}$  加えた。細胞を 4 つの群に分け、前記の 3 つのヒト化 Fab、および対照の抗体 Remicade の Fab フラグメントを各群にそれぞれ添加し、細胞を別途 24 時間培養した。最後に、細胞の生存率を CCK8 キット (Dojindo 研究所) で分析した。結果を図 2 に示す。この結果は、前記の 3 つのヒト化 Fab は、腫瘍壊死因子 を効率的に中和する生物活性を発揮できることを示し、その中で、腫瘍壊死因子 の中和において KS-7A の生物活性は、ヒト-マウスキメラ抗体 Remicade の Fab フラグメントの生物活性よりも優れていた。図 2 のデータは、3 回行った実験の平均値  $\pm$  標準偏差である。

10

#### 【0051】

実施例 2: ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の Fab の CDR3 に関する親和性成熟ライブラリーの作成

更に、前記のヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の Fab フラグメントの抗原への親和性を増加させるために、ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の Fab の発現ベクター内の、重鎖 VH02 CDR3 および軽鎖 VK05 CDR3 の親和性成熟ライブラリーを別々に作成した。重鎖と軽鎖の CDR3 領域は、抗体の抗原への結合のために最も重要な領域であるので、CDR3 領域の部位飽和変異誘導を行いスクリーニングすることが、より高い親和性を有する抗体作成につながる可能性がある。重鎖および軽鎖の CDR3 の部位飽和変異誘導ライブラリーの作成のために、部位特異的変異誘導のための一組のプライマーを設計し、PCR 反応で使用した。PCR 反応により増幅した反応生成物は、一組のプライマーと同一の縮重比率で共に混在しており、ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の Fab の発現ベクターにクローニングした。軽鎖 CDR3 の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成は、以下のように行った。プライマー 5 シリーズおよび軽鎖下流プライマー 6 (5' - CGGAATTCCGTACGTTTCACTTCCAGATTGG - 3') を用い、且つ目的部分の DNA 産物を産生するための鋳型として軽鎖の DNA を用い、PCR を行い、DNA 産物を Fab 発現ベクターにクローニングし、エレクトロトランスファーを行い、軽鎖 CDR3 の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成のために播種した。プライマー 5 シリーズは CDR3 の変異部位を含み、総じて表 3 に記載の 19 個のプライマーを含む。CDR3 の重鎖の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成は、以下のように行った。変異プライマー 7 シリーズおよび重鎖下流プライマー 8 (5' - CCGCTTCGAGGCGCTCACGGTTCAGGGTGGTGCCCTG - 3') を用い、且つ目的部分の DNA 産物を産生するための鋳型として重鎖の DNA を用い、PCR を行い、DNA 産物を Fab 発現ベクターにクローニングし、エレクトロトランスファーを行い、重鎖 CDR3 の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成のために播種した。プライマー 7 シリーズは CDR3 の変異部位を含み、総じて表 4 に記載の 22 個のプライマーを含む。最終的に確立した軽鎖および重鎖の変異ライブラリーより、抗腫瘍壊死因子 (R&D 社) への高い結合能を有する抗腫瘍壊死因子 抗体の Fab を、ELISA の結果に基づき選択した。高い活性を有する 2 つの重鎖可変領域、即ち、SH01 および SH02 を得るために重鎖変異体をスクリーニングした。また高い活性を有する 6 つ軽鎖可変領域、即ち、SH03、SH04、SH05、SH06、SH07 および SH08 を得るために軽鎖変異体をスクリーニングした。

20

30

40

#### 【0052】

【表 3】

軽鎖CDR 3の特定部位の変異誘発に関するプライマー5シリーズ

記号	配列
プライマー 5-1Q1	GCAACCTACTACTGC <b>NBK</b> CAGAGCCATAGCTGG
プライマー 5-1Q2	GCAACCTACTACTGC <b>DAK</b> CAGAGCCATAGCTGG
プライマー 5-1Q3	GCAACCTACTACTGCCATCAGAGCCATAGCTGG
プライマー 5-2Q1	GCAACCTACTACTGCCAG <b>NBK</b> AGCCATAGCTGGCCG
プライマー 5-2Q2	GCAACCTACTACTGCCAG <b>DAK</b> AGCCATAGCTGGCCG
プライマー 5-2Q3	GCAACCTACTACTGCCAGC <b>AT</b> AGCCATAGCTGGCCG
プライマー 5-3S1	GCAACCTACTACTGCCAGCAG <b>BDK</b> CATAGCTGGCCGTTT
プライマー 5-3S2	GCAACCTACTACTGCCAGCAG <b>VCT</b> CATAGCTGGCCGTTT
プライマー 5-3S3	GCAACCTACTACTGCCAGCAG <b>AWK</b> CATAGCTGGCCGTTT
プライマー 5-4H1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC <b>NBK</b> AGCTGGCCGTTTACC
プライマー 5-4H2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC <b>DAK</b> AGCTGGCCGTTTACC
プライマー 5-4H3	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC <b>AG</b> AGCTGGCCGTTTACC
プライマー 5-5S1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCC <b>ATBDK</b> TGGCCGTTTACCTTC
プライマー 5-5S2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCC <b>ATVCT</b> TGGCCGTTTACCTTC
プライマー 5-5S3	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCC <b>ATAWKT</b> GCCGTTTACCTTC
プライマー 5-6W1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGC <b>HNK</b> CCGTTTACCTTC GGC
プライマー 5-6W2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGC <b>NGT</b> CCGTTTACCTTC GGC
プライマー 5-6P1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGCTGG <b>NDK</b> TTTACCTTC GGCAGC
プライマー 5-6P2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGCTGG <b>DC</b> TTTACCTTC GGCAGC

10

20

【 0 0 5 3 】

【表 4】

重鎖CDR3の特定部位の変異誘発に関するプライマー7シリーズ

記号	配列
プライマー 7-1N1	GTATTACTGCAGCCGT <b>N</b> BKTACTACGGCAGCACC
プライマー 7-1N2	GTATTACTGCAGCCGT <b>B</b> AKTACTACGGCAGCACC
プライマー 7-1N3	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> AATACTACGGCAGCACC
プライマー 7-2Y1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> AT <b>N</b> BKTACGGCAGCACCTACG
プライマー 7-2Y2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> AT <b>V</b> AKTACGGCAGCACCTACG
プライマー 7-3Y1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>N</b> BKGGCAGCACCTACGATTA C
プライマー 7-3Y2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>V</b> AKGGCAGCACCTACGA TTAC
プライマー 7-4G1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>N</b> HKAGCACCTACGA TTACTG
プライマー 7-4G2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>H</b> GKAGCACCTACGA TTACTG
プライマー 7-5S1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GC <b>B</b> DKACCTACGA TTACTGGGC
プライマー 7-5S2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GC <b>V</b> CTACCTACGATTA CTGGGC
プライマー 7-5S3	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GC <b>A</b> WKACCTACGATTA CTGGGC
プライマー 7-6T1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGC <b>N</b> DKTACGATTA CTGGGCCC
プライマー 7-6T2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGC <b>B</b> CTTACGATTA CTGGGCCC
プライマー 7-7Y1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> NBKATTA CTGGGGCCAGG
プライマー 7-7Y2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> VAKGA TTACTGGGGCCAGG
プライマー 7-8D1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> T <b>A</b> C <b>N</b> BKTA CTGGGGCCAGGGC
プライマー 7-8D2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> T <b>A</b> C <b>H</b> AKTA CTGGGGCCAGGGC
プライマー 7-8D3	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> T <b>A</b> C <b>G</b> AATA CTGGGGCCAGGGC
プライマー 7-9Y1	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> T <b>A</b> C <b>G</b> AT <b>N</b> <b>K</b> TGGGGCCAGGGCACC
プライマー 7-9Y2	GTATTACTGCAGCCGT <b>A</b> ATT <b>A</b> C <b>G</b> GCAGCAC <b>C</b> T <b>A</b> C <b>G</b> AT <b>V</b> <b>K</b> TGGGGCCAGGGCACC

10

20

30

## 【 0 0 5 4 】

実施例 3：高親和性のヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の F a b の発現と活性評価

この実施例は、それぞれ F A 0 1 および F A 0 2 の名称を持つ 2 つのヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の F a b に関する。F A 0 1 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 5 で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号 1 6 で示される）、その軽鎖定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 9 で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号 2 0 で示される）、その重鎖 F d フラグメントの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号 2 で示され）、その重鎖定常領域 C H 1 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 3 で示される（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号 3 4 で示される）。F A 0 2 の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号 9 で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号 1 0 で示される）、その軽鎖定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 9 で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号 2 0 で示される）、その重鎖 F d フラグメントの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号 1 で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列

40

50

番号2で示され)、その重鎖定常領域CH1のアミノ酸配列は配列表の配列番号33で示される(そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号34で示される)。

【0055】

手順1. 高親和性のヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの作成と発現

2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabを作成する過程は実施例1と同様である。前記の2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの重鎖および軽鎖をコードするDNAを、FA01に関するpFA01Fab発現ベクターを得るため、FA02に関するpFA02Fab発現ベクターを得るために、それぞれpTLRベクターの対応する領域に挿入した。前記の実施例1に記載の手順に従い、高純度のFA01およびFA02タンパク質を得た。

10

【0056】

手順2. 高親和性のヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの生物活性の検出

L929細胞毒性試験によって、前記の2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFab(FA01およびFA02)の生物活性を解析した。手順の詳細は実施例1と同様である。OD<sub>450</sub>値の結果を、EC<sub>50</sub>を計算するためにソフトウェアGraphPadプリズム5に入力した。結果を表5に示す。この結果は、FA01およびFA02の活性がRemicade抗体のFabフラグメントの活性より強力であることを示唆する。

【0057】

【表5】

腫瘍壊死因子αの中和中のヒト化Fabの生物活性

20

群	EC <sub>50</sub> (nM)
Remicade Fab	3.184
FA01	2.582
FA02	2.870

注: 表5のデータは3回の実験の平均値である。

【0058】

実施例4: ヒト化腫瘍壊死因子抗体のIgG発現およびその活性の検出

30

手順1. ヒト化腫瘍壊死因子抗体IgGに関する組み換え発現ベクターの作成

実施例1および2において得た、2つの重鎖Fdフラグメント(SH01とSH02をそれぞれ含む)および6つの軽鎖(SH03、SH05、SH04、SH06、SH07およびSH08をそれぞれ含む)をコードするDNAフラグメントを、表6に示す様に相互に結合し、オーバーラップ伸長PCR(overlap extension PCR)によりIgG1Fc定常領域に関するDNAフラグメントを共に組み立て、組み換えにより発現プラスミドpcDNA3.1(+ )に挿入した。CHO細胞を、作成した組み換え発現プラスミドでトランスフェクションし、完全長ヒト化抗体を発現させた。

【0059】

手順の詳細は以下に述べる通りである。(1)軽鎖に関するDNAフラグメントを組換えによって、真核細胞発現ベクターpcDNA3.1(+ )に直接挿入した。以下のプライマー、5'-TGAAAGCTTATGGAAATTGTGCTGACTCAGTCTC-3'(下線部は制限酵素部位HindIII)、5'-AATCTCGAGTCAACACTCTCCCTGTTGAAGCT-3'(下線部は制限酵素部位XhoI)を設計し、PCR増幅反応で使用した。増幅産物を制限酵素HindIII(R0104L、NEB社製)およびXhoI(R0146L、NEB社製)を用いてダブルダイジェストし、T4DNAリガーゼを用いて、同じ酵素を用いダブルダイジェストしたpcDNA3.1(+ )の大きいフラグメントをライゲーションした。(2)重鎖用DNA断片は、オーバーラップ伸長PCRによりIgG1Fc定常領域用のDNA断片と共に組み立て、且つ組換えによってpcDNA3.1(+ )に挿入する必要がある。以下のプライマ

40

50

一、5' - ACTGGTACCATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG  
 GG - 3' (下線部は制限酵素部位KpnI)、5' - GATGGGCCCTTGGTG  
 CTAGCGGAGCTCACGGTTCAGGGTGGTGCCC - 3' ; 5' - GA  
 TGGGCCCTTGGTGCTAGCGGAGCTCACGGTTCAGGGTGGT  
 GCCC - 3' ; 5' - AATCTCGAGTCATTTACCCGGAGACAGGG  
 AGAGG - 3' (下線部は制限酵素部位XhoI)を設計し、PCR増幅反応で使用し  
 た。集めたPCR産物を、制限酵素KpnI (R0142L、NEB社製)およびXho  
 I (R0146L、NEB社製)でダブルダイジェストし、同じ制限酵素でダブルダイ  
 ジェストした発現プラスミドpcDNA3.1 (+)に組み換えにより挿入し、適切な組み  
 換え体を得るために切断解析およびシーケンシングにより確認した。

10

## 【0060】

表7の18個の抗体用の発現ベクターを、前記の手順に従い準備した。

KS01 (Glu)、KS03 (Glu)、KS05 (Glu)、KS06 (Glu)  
 、KS09 (Glu)およびKS10 (Glu)の重鎖可変領域をコードするDNA配列  
 はすべて、配列表の配列番号2 (ヌクレオチド配列の第1~3番目はGAGである)で示  
 され、且つ配列番号1 (第1番目のアミノ酸はGluである)に示される重鎖の可変領域  
 をコードする。KS01 (Gln)、KS03 (Gln)、KS05 (Gln)、KS0  
 6 (Gln)、KS09 (Gln)およびKS10 (Gln)の重鎖可変領域をコードす  
 るDNA配列はすべて、ヌクレオチド配列の第1~3番目をCAGに置換した配列表の配  
 列番号2で示され、且つ配列番号1で示される重鎖可変領域 (第1番目のアミノ酸はG  
 lnである)をコードする。KS02、KS04、KS07、KS08、KS11およびK  
 S12の重鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番号4で示され、  
 配列番号3のように示される重鎖可変領域をコードし、KS01 (Glu)、KS01 (G  
 ln)およびKS02の軽鎖可変領域をコードするDNA配列の全ては配列表の配列番  
 号6で示され、且つ配列番号5に示される軽鎖可変領域をコードする。KS03 (Glu  
 )、KS03 (Gln)およびKS04の軽鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて  
 、配列表の配列番号10で示され、配列番号9で示される軽鎖可変領域をコードする。  
 KS05 (Glu)、KS05 (Gln)およびKS08の軽鎖可変領域をコードするDN  
 A配列はすべて、配列表の配列番号8に示され、配列番号7に示されるような軽鎖可変領  
 域をコードする。KS06 (Glu)、KS06 (Gln)およびKS07の軽鎖可変領  
 域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番号12に示され、配列番号11に示  
 される軽鎖可変領域をコードする。KS09 (Glu)、KS09 (Gln)およびKS  
 11の軽鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番号14に示され、  
 配列番号13に示される軽鎖可変領域をコードする。KS10 (Glu)、KS10 (G  
 ln)およびKS12の軽鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番  
 号16に示され、配列番号15に示される軽鎖可変領域をコードする。18個の抗体の重  
 鎖定常領域をコードするDNA配列は配列表の配列番号18で示され、配列番号17で示  
 される重鎖定常領域をコードする。18個の抗体の軽鎖定常領域をコードするDNA配列  
 は配列表の配列番号20で示され、配列番号19で示される軽鎖定常領域をコードする。

20

30

## 【0061】

手順2. 完全長ヒト化抗腫瘍壊死因子 IgG抗体の発現と精製

手順1で得た軽鎖組み換えプラスミドおよび重鎖組み換えプラスミドを、完全長ヒト化  
 抗体を発現させるためにCHO細胞に同時導入した。表6に示されるような組み合わせに  
 対応するプラスミドを、従来方法によりCHO細胞にそれぞれ安定的に同時導入した後、  
 12個の対応する完全長組み換え抗体が細胞培養の上清に分泌された。上清を対応する完  
 全長IgG抗体を得るために精製した。精製の手順の詳細は以下の通りである。

40

## 【0062】

1) クロマトグラフィーの充填材

Mabselect Sure (GE社製)、Superdex 200 (GE社製)

## 【0063】

50

## 2) 緩衝液

アフィニティー平衡化緩衝液 (PBS) : 0.2 M リン酸水素ナトリウム : 82.5 mL / L ; 0.2 M ナトリウム二水素ナトリウム : 17.5 mL / L ; 2 M 塩化ナトリウム : 75 mL / L ; に超純水を加えて、完全にかき混ぜてよく混合し、1 M 水酸化ナトリウムまたは1 M 塩化水素を用いて pH を 7.1 ~ 7.3 に調整した。

アフィニティー溶出緩衝液 : NaCl 2.922 g / L、無水酢酸ナトリウム 0.49 g / L、氷酢酸 2.9 mL / L 添加、pH 3.4 ~ 3.6。

アフィニティー再生緩衝液 : 5.8 mL / L 氷酢酸、pH 3.0。

アフィニティー定置洗浄 (CIP) 緩衝液 : 1 M 水酸化ナトリウム 100 mL / L。

ゲル濾過クロマトグラフィー溶液 (PBS) : 0.2 M リン酸水素ナトリウム : 82.5 mL / L ; 0.2 M リン酸二水素ナトリウム : 17.5 mL / L ; 2 M 塩化ナトリウム : 75 mL / L ; 超純水を加え、完全にかき混ぜよく混合し、1 M 水酸化ナトリウムまたは1 M 塩化水素を用いて、pH を 6.8 に調整した。

## 【0064】

## 3) サンプルの準備 (清澄濾過)

遠心分離 : サンプルは、10 ~ 15 分、5000 ~ 6000 rpm で遠心分離した。

ろ過 : 遠心分離の後、サンプルの上清は H7 (0.45 + 0.2 μm) フィルターでろ過した。

## 【0065】

## 4) アフィニティー・クロマトグラフィー

AKTA 精製システム (AKTA purification system) およびアフィニティー・クロマトグラフィー・カラム (Mabselect or Mabselect Sure) を設置する。カラム体積の 2 倍体積量の超純水で洗浄する。基線が安定するまでカラム体積の 5 倍体積量のアフィニティー平衡化緩衝液で洗浄し、サンプルを注入する。サンプルの注入後、カラム体積の 5 ~ 10 倍体積量のアフィニティー平衡化緩衝液で洗浄する。その後、カラムをアフィニティー溶出緩衝液で、1 カラム体積量で連続して溶出し、280 nm のメジャー吸光度ピーク (major absorbance peak) に対応する画分を集めた。そのカラムはカラム体積の 3 倍体積量のアフィニティー再生緩衝液で溶出した。アフィニティー平衡化緩衝液で中性の pH になるように洗浄した。カラム体積の 5 倍体積量の Mabselect CIP 緩衝液もしくは Mabselect Sure CIP 緩衝液を用い、定置洗浄を行う。基線が安定するまで、カラム体積の 3 倍体積量のアフィニティー平衡化緩衝液で洗浄する。基線が安定するまで、カラム体積の 3 倍体積量の超純水で洗浄する。カラム体積の 3 倍体積量の 20% エタノールで洗浄し、アフィニティー・クロマトグラフィー・カラムを保管する。

## 【0066】

## 5) ゲル濾過クロマトグラフィー

AKTA 精製システムおよび Superdex 200 ゲル濾過クロマトグラフィーカラムを設置する。5 mL / 分に流量を調整して、1 カラム体積量の超純水で洗浄し、カラム体積の 2 倍体積量の Superdex 200 カラム・クロマトグラフィー平衡化液で洗浄する。2.5 mL / 分に流量を調整して、アフィニティー・クロマトグラフィー・ピークに対応する画分を集め、pH 値を調整し、カラム上に直接注入した。サンプル注入の後、Superdex 200 カラム・クロマトグラフィー平衡化液で溶出し、目的の 280 nm ピークを集めた。引き続き 1 カラム体積量で洗浄した。クロマトグラフィーカラムは 0.01 M 水酸化ナトリウムで保管した。

## 【0067】

## 手順 3 . ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体 IgG の活性の検出

手順 2 で得た 12 個のヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体 IgG を、L929 細胞毒性試験 (操作の詳細は実施例 1 に述べた通り) により腫瘍壊死因子 の中和の生物活性を試験し、その結果の OD<sub>450</sub> 値を得て、EC<sub>50</sub> を計算するためにソフトウェア Graph Pad Prism 5 に入力した。腫瘍壊死因子 の活性を抑制するための 12 個のヒト化抗腫瘍壊

10

20

30

40

50

死因子 抗体 I g G の E C <sub>50</sub> 値を表 7 に示した。その結果は、ヒト化抗腫瘍壊死因子抗体の生物活性はかなり増加し、K S 1 0 は最も高い生物活性があることを示す。従って、更なる抗体活性の詳細な調査は、主として K S 1 0 に関して行った。

【 0 0 6 8 】

【表 6】

高親和性ヒト化抗腫瘍壊死因子  $\alpha$  抗体

IgG 抗体	VH	VK	
KS01	SH01	SH03	
KS02	SH02	SH03	10
KS03	SH01	SH05	
KS04	SH02	SH05	
KS05	SH01	SH04	
KS06	SH01	SH06	
KS07	SH02	SH06	
KS08	SH02	SH04	
KS09	SH01	SH07	
KS10	SH01	SH08	
KS11	SH02	SH07	
KS12	SH02	SH08	20

【 0 0 6 9 】

【表 7】

腫瘍壊死因子  $\alpha$  の中和中の完全長ヒト化

抗腫瘍壊死因子  $\alpha$  抗体の生物活性

群	EC <sub>50</sub> (nM)	
KS01 (Glu)	0.081	
KS01 (Gln)	0.087	30
KS02	0.109	
KS03 (Glu)	0.087	
KS03 (Gln)	0.093	
KS04	0.126	
KS05 (Glu)	0.051	
KS05 (Gln)	0.064	
KS06 (Glu)	0.059	
KS06 (Gln)	0.068	
KS07	0.100	
KS08	0.113	
KS09 (Glu)	0.036	40
KS09 (Gln)	0.032	
KS10 (Glu)	0.028	
KS10 (Gln)	0.025	
KS11	0.059	
KS12	0.136	
Remicade	0.174	

【 0 0 7 0 】

実施例 5 : K S 1 0 ( G l u ) のヒト腫瘍壊死因子 への結合の動態評価

ヒト腫瘍壊死因子 ( R & D 社 , 2 1 0 - T A - 0 5 0 ) および N H S - L C L C - ピ 50

オチン (Thermo-fisher社製, カタログ番号: 21338) をモル比で 1 : 3 の比率で一様に混合し、1 時間室温で保持した。その後、残りの NHS-LCLC ピオチンは、PD-10 脱塩カラム (GE社製, カタログ番号: 17-0851-01) によって取り除いた。得られた最終結合産物は 50 μg/mL のピオチン-ヒト腫瘍壊死因子であった。

【0071】

KS10 のヒト腫瘍壊死因子 への結合動態パラメータは Octet RED 96 システム (ForteBio社) in the Octet technology platform によって決定した。試験の手順を機器の取り扱い説明書に従い設定した。50 μg/mL ピオチン-ヒト腫瘍壊死因子 をローディング (Loading) することにより Streptavidin バイオセンサー (SA) に結合させた。その抗体濃度の適切な範囲を以下の通り、6000 nM、2000 nM、666.7 nM、222.2 nM、74.1 nM および 24.7 nM のパイロット試験により決定した。Remicade はポジティブコントロールとして使用し、PBS (pH 7.4) はブランクのコントロールとして使用した。その結果 (表 8) は、KS10 の KD 値は Remicade の KD 値よりも小さいことを示し、それは KS10 のヒト腫瘍壊死因子 への親和性がヒト-マウスキメラ抗体 Remicade の親和性よりも高いことを示唆する。

10

【0072】

更に、チンパンジー腫瘍壊死因子 (配列番号 36 で示されるアミノ酸配列および配列番号 37 で示されるヌクレオチド配列)、アカゲザル腫瘍壊死因子 (配列番号 38 で示されるアミノ酸配列および配列番号 39 で示されるヌクレオチド配列)、マウス腫瘍壊死因子 (mTNF-) (PROSPEC 製、カタログ番号: CYT-252)、およびヒト TNF (PROSPEC 製、カタログ番号: CYT-224) への KS10 の結合親和性を決定した。Octet RED 96 システムの親和性評価基準に従い、抗原の抗体への結合に起因する光波の変位距離は、2 つの物質間の親和性を間接的に反映し、光波の変位距離が長いと、親和性は高い。その結果 (図 3) は、KS10 がヒト腫瘍壊死因子 にかかなり強力に結合すること、チンパンジーの腫瘍壊死因子 にも大いに結合すること、アカゲザルの腫瘍壊死因子 に弱く結合すること、マウス腫瘍壊死因子 およびヒト腫瘍壊死因子 にほとんど結合しないことを示す。従って、本発明において抗体はヒト化の後の特異的結合能を有することを確認した。

20

30

【0073】

【表 8】

ヒト腫瘍壊死因子 α への KS10 の結合の動態パラメーター

抗体の分類	KD (M)	kon (l/Ms)	kdis (l/s)
Remicade	8.12E-12	1.95E+04	1.58E-07
KS10	2.18E-12	4.69E+04	1.02E-07

注: KD は親和定数; kon は結合定数; kdis は解離定数である。

40

【0074】

実施例 6: ヒト腫瘍壊死因子 を誘発した関節リウマチモデルラットへの KS10 (Glu) の影響

S PF グレード、半分が雄で半分が雌、体重 140 ~ 180 g、72 匹の 4 ~ 6 週齢 Sprague Dawley ラット (laboratory animal license: SCXK (Sichuan) 2008-24) を使用した。ラットを 1 週間慣らし、無作為に 1 群 12 匹で 6 群、即ち、正常群、負対照群、モデル対照群、KS10 5 mg/kg 群、KS10 10 mg/kg 群および KS10 20 mg/kg 群に分けた。試験の初めに、正常群を除く各群のラットに 10% 抱水クロラール (350 mg/kg)

50

で麻酔をかけた。モデリングの前に、ラットに3つの異なる量のKS10 (5 mg/kg、10 mg/kgおよび20 mg/kg)を尾静脈注入し、負対照群およびモデル対照群のラットには等量の食塩水を尾静脈注入した。15分後に、0.5 mg/mLのヒト腫瘍壊死因子 (R&D社, カタログ番号: 210-TA-050) (1% BSAで溶かし、60 µL/ラットの量を注入した)を1 mLの注射器で、3つのKS10投与群およびモデル対照群に急性関節炎 (1つの足首のモデリング)を引き起こすために、ラットの左足首の関節腔に注入し、等量の1% BSAを負対照群ラットの左足首の関節腔に注入した。注入の成功は、関節腔の両側のくぼみの漸次腫脹によって示された。正常群ラットには前記の注入は行わなかった。

#### 【0075】

モデルは18時間後に確立され、各群中のラットの左足首関節の腫脹度を以下のように0~4の変調段階基準 (modified gradation criteria)でそれぞれ採点した。0: 発赤と腫脹なし、1: 足首関節のみ発赤および/または腫脹、2: 足首関節の発赤と腫脹および足底の腫脹、3: 足首関節および足底の発赤と腫脹、4: 足首関節、足底および足の表面の発赤および腫脹 (R Williams, M Feldmann, and R Maini, "Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis", Proc Natl Acad Sci U S A, 1992 October 15; 89(20): 9784-9788 を参照)。モデルを確立した20時間後に、滑膜関節液を抜いた。関節周辺の柔組織を分離し、均質化し、遠心し-70で凍結した。IL-1およびIL-6のレベルはラットELISAキット (IL-1 R&D社製, カタログ番号: RLB00; IL-6 R&D社製, カタログ番号: R6000B)を用いて決定した。

#### 【0076】

スコア (図4)は、KS10の3つの投与量で、ヒト腫瘍壊死因子が誘発するラットの関節の発赤および腫脹を、大いに緩和することができ、ヒト腫瘍壊死因子が誘発する関節リウマチの進行に大いに拮抗できることを示す。サイトカイン評価では、KS10の3つの投与量で、滑液および関節周辺の柔組織でIL-1 (図5)およびIL-6 (図6)のレベルを大いに下げることが示され、このことは、KS10がヒト腫瘍壊死因子によって誘発されるIL-1およびIL-6の増加レベルを完全にブロックすることができ、KS10のヒト腫瘍壊死因子に対する活性の証拠となることを示す。

#### 【0077】

実施例7: ヒト腫瘍壊死因子を誘発したぶどう膜炎モデルラットへのKS10 (Glucocorticoid) 処理効果

40匹の健康なLewisラットを、正常群、モデル群、負対照群、KS10群に分けた。ラットに、10% 抱水クロラル (0.35 mL/kg 1回投与)を腹腔内に注入した。ラットに麻酔をかけた後、モデル群および負対照群のそれぞれのラットに、毛様体筋の平らな部分を通してガラス体に生理食塩水10 µLを注入し (30 G1/2針を使用)、4 mg/mLのKS10溶解液 (PBSで作成した)を10 µL、KS10群のラットそれぞれに同様に注入した。30分後、10 µLのヒト腫瘍壊死因子 (約0.5 mg/mL)をモデル群およびKS10群の各ラットの静脈内に注入し、10 µLの1% BSAを負対照群の各ラットの静脈内に注入した。最初の投与によりモデルが形成されてから24時間および48時間後に、ラットを麻酔し、細隙灯の下観察し、それぞれ採点した。採点基準は、文献 (Fleisher LN, Ferrell JB, Smith MG, McGahan MC, "Lipid mediators of tumor necrosis factor-induced uveitis" Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991 Jul; 32(8): 2393-9)および改訂版を参照したものであり、虹彩の充血0~2 (0: 充血なし、1: 少し充血、2: 重度の充血)、縮瞳0~1 (0: 正常な瞳孔、1: 縮瞳)、前房滲出0~2 (0: 前房滲出なし、1: 少し前房滲出; 2: 重度の前房滲出)、暗瞳孔 (caligo pup

10

20

30

40

50

illae)または虹彩後癒着0~2(0:癒着なし、1:一方の部位で癒着、2:両方の部位で癒着)である。

【0078】

採点結果を表9に示す。これはKS10が、眼内の透明度を増加させ、虹彩充血、繊維素性滲出および暗瞳孔(caligo pupillae)または虹彩後癒着を抑えることを示すぶどう膜炎評価基準のスコアを、著しく低下できることを示す。従って、KS10がヒト腫瘍壊死因子により誘発されるぶどう膜炎への重大な拮抗作用を発揮することが示された。

【0079】

【表9】

ラットモデルのヒト腫瘍壊死因子 $\alpha$ 誘発ぶどう膜炎の治療に対するKS10のスコア

群	初回投与によるモデル形成後の時間	
	24 時間	48 時間
正常	0.88±0.834	0.38±0.518
負対照	0.90±0.737	0.38±0.744
モデル対照	3.5±0.971	3.78±1.202
KS10	2.5±0.971*	1.55±2.422*

注:\*モデル群と比較して\* $P < 0.05$ ,であることを示す

( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=10$ )

【産業上の利用可能性】

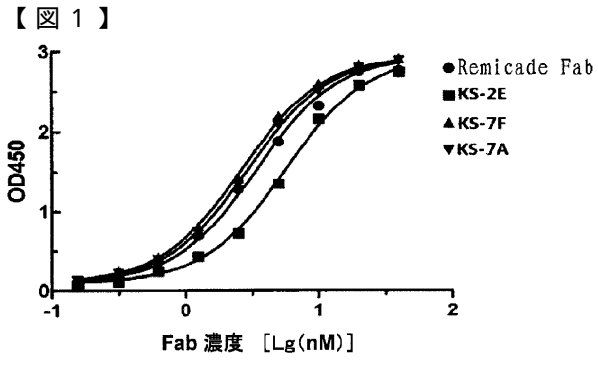
【0080】

本発明は、ヒト化抗体(マウス由来抗体の可変領域(VH、VK)の相補性決定領域(CDR)を、ヒト化抗体のフレームワーク領域へ直接接合した)の従来方法では抗体の親和性が低下するという欠陥を、CDRグラフト化抗体の変異生成により、効果的に克服し、最終的に最初の抗体(initial antibody)に類似する抗体を得た。本発明で提供するFabとIgG抗体は、ヒト化の程度(最大で95%超)がかなり高く、ヒト-マウスキメラ抗体であるRemicadeと同様か又はそれより高い親和性および生物活性を有すること、ヒト腫瘍壊死因子の中和効果により優れ、腫瘍壊死因子に関連する疾病の治療により効果的であることを実験的に立証した。前記疾病として好ましくは、関節リウマチ、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である。

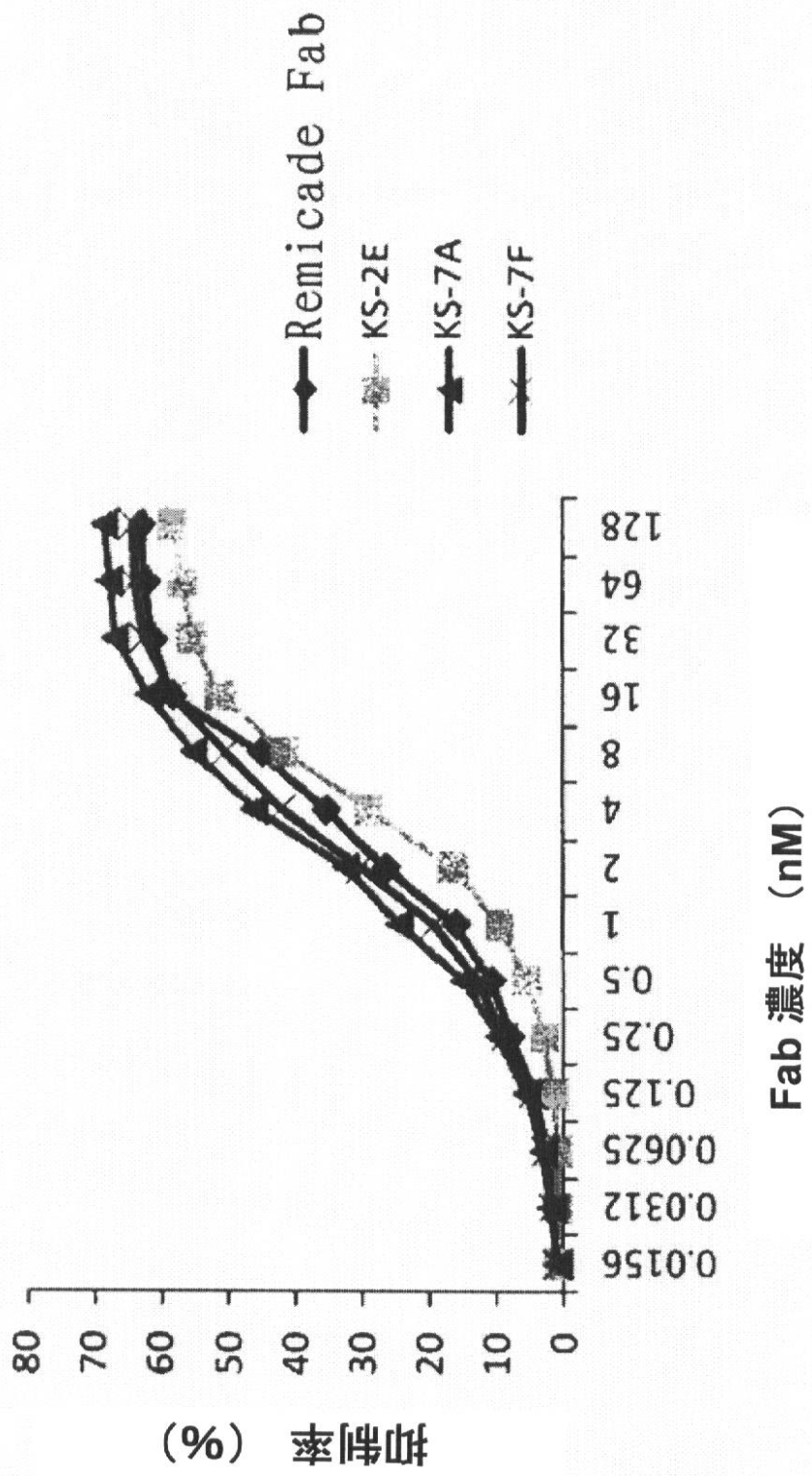
10

20

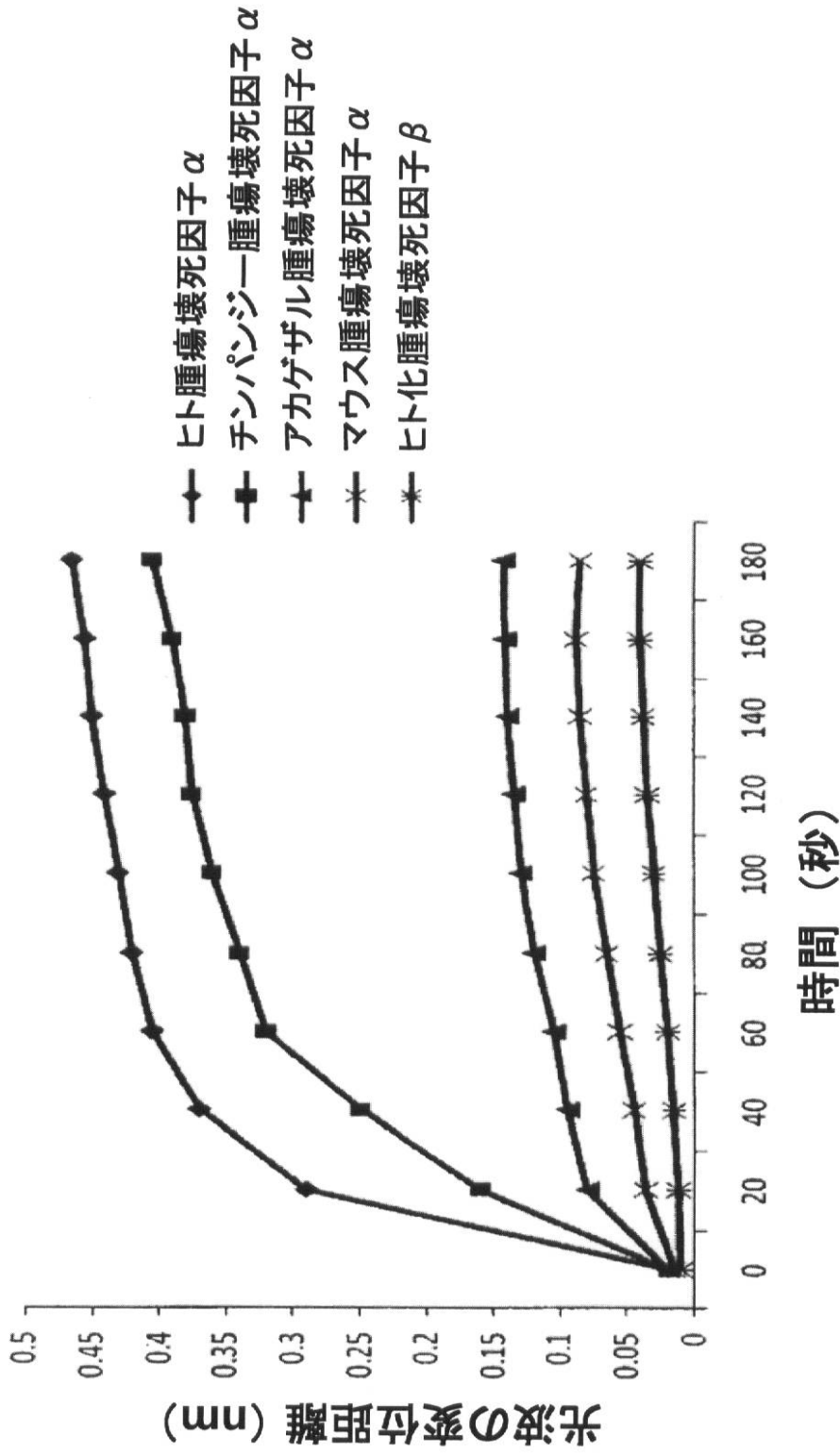
30



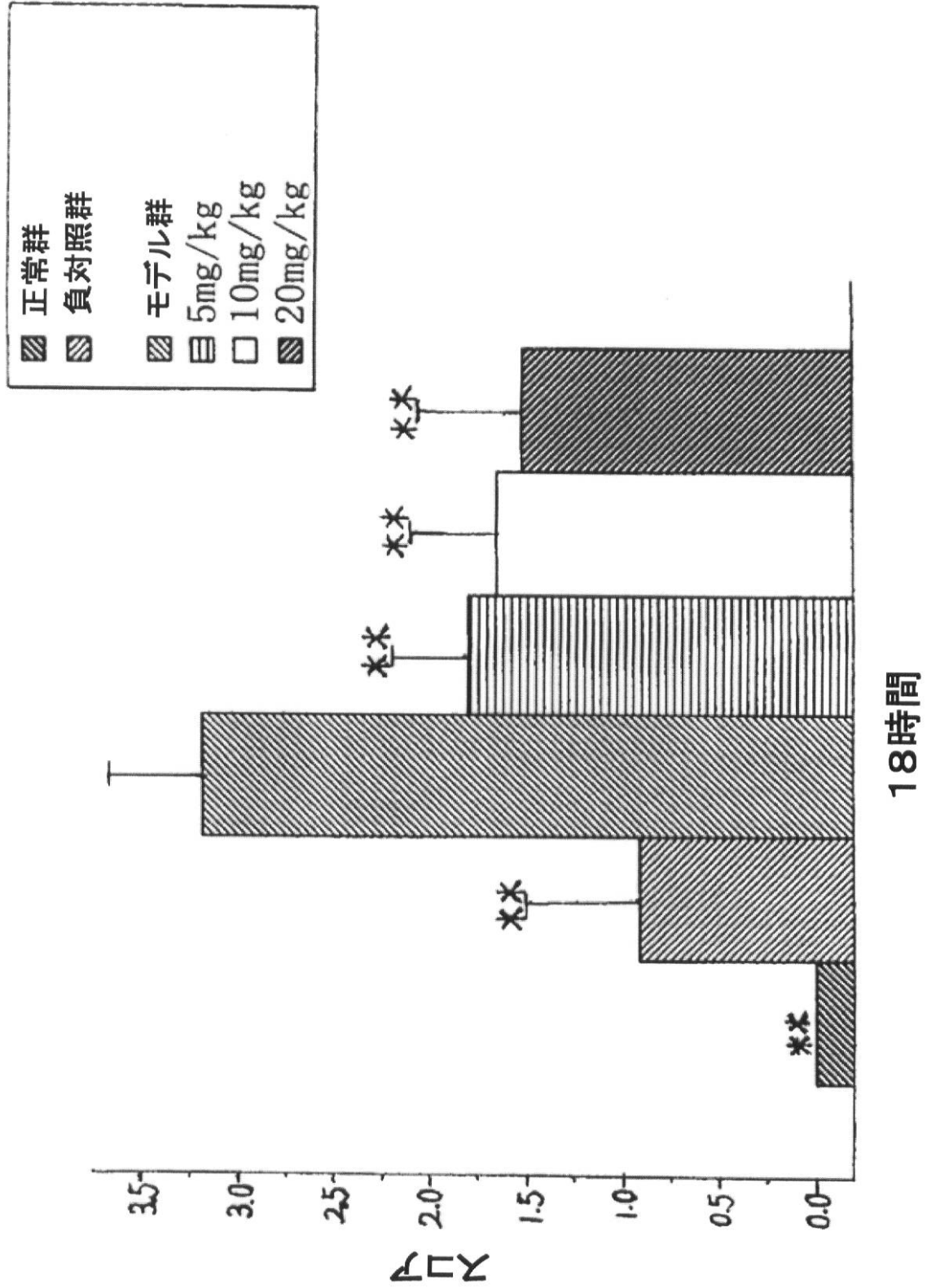
【 図 2 】



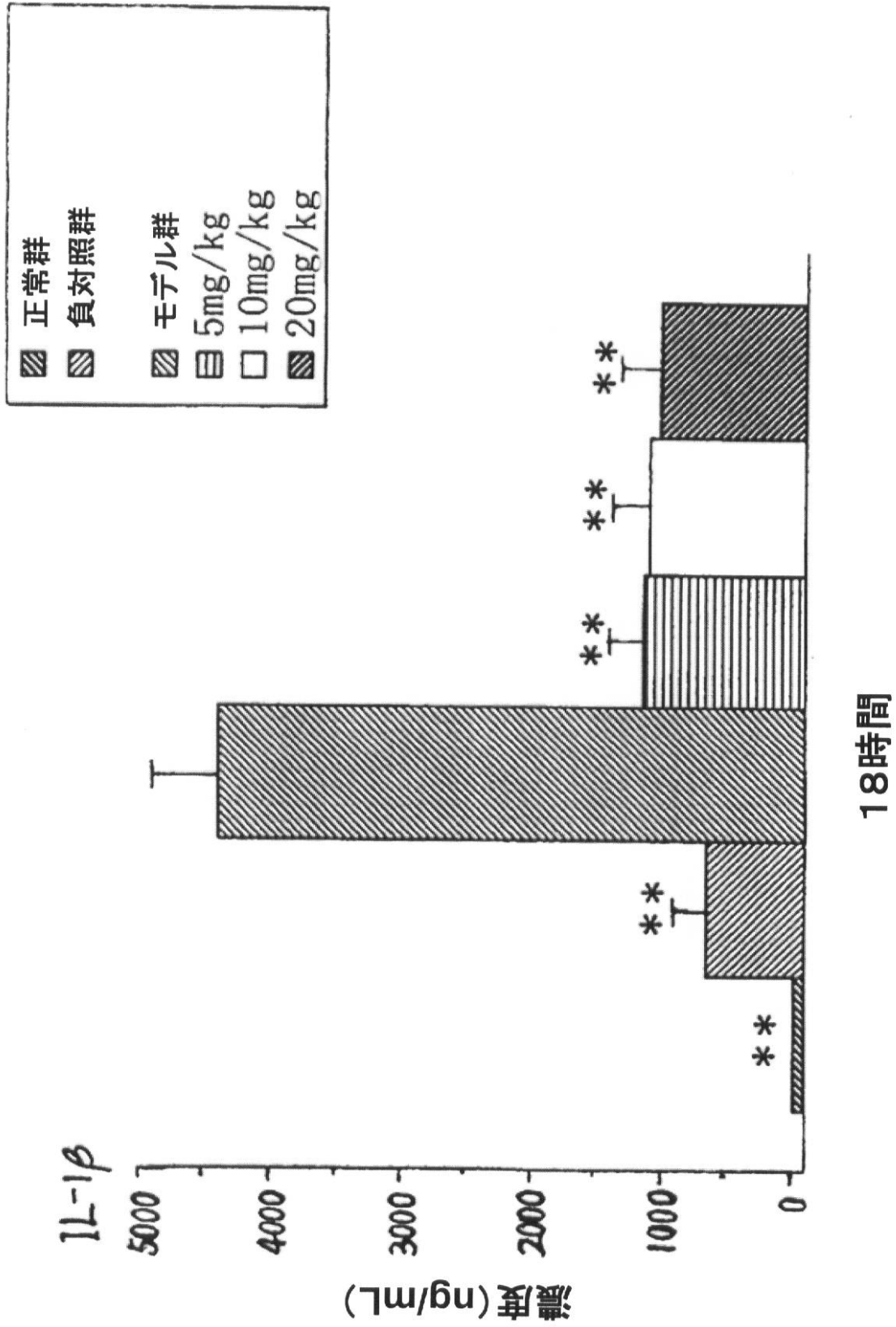
【 図 3 】



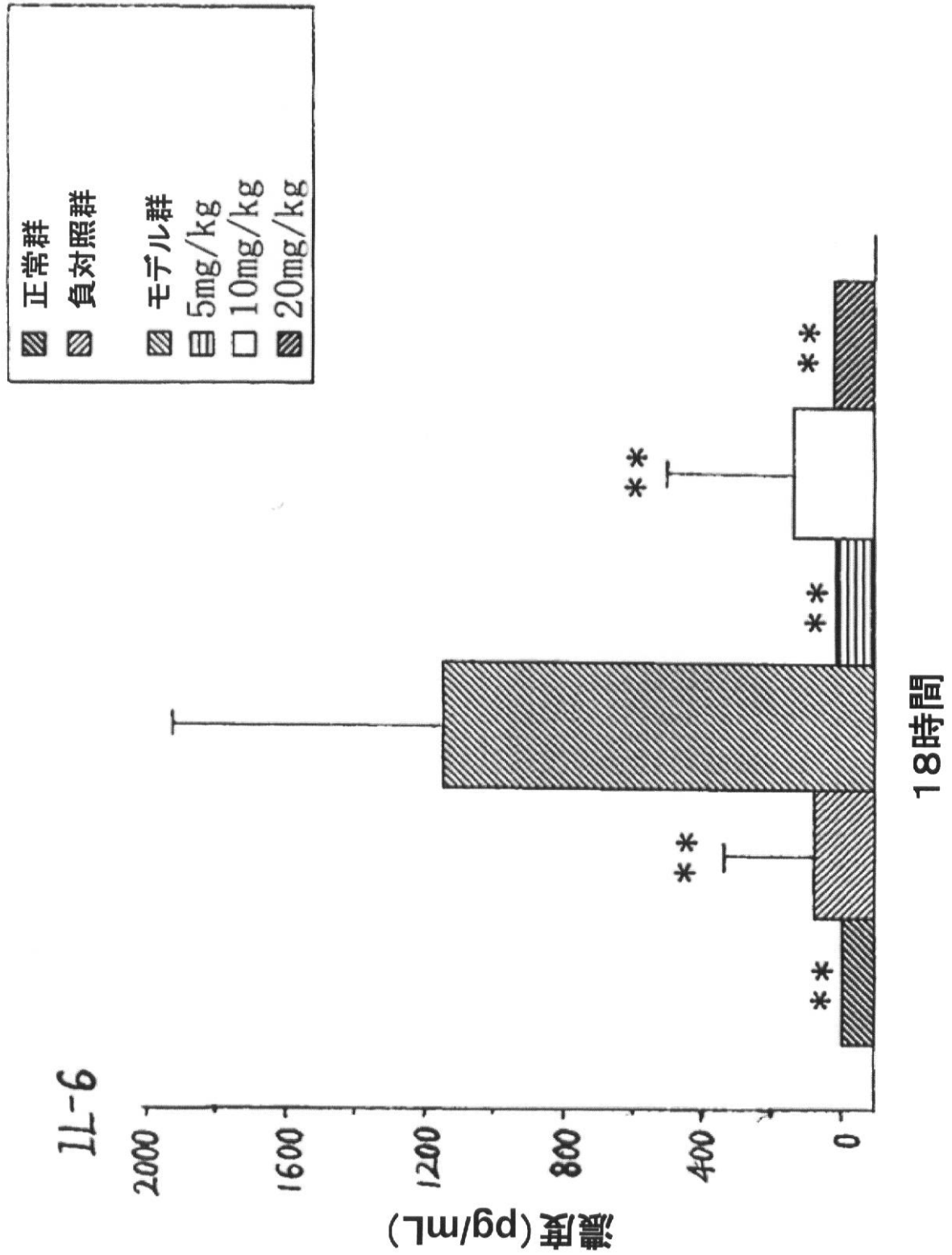
【 図 4 】



【図5】



【図6】



【配列表】

0005767708000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>D</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>39/395</i>	<i>U</i>
<i>A 6 1 K</i>	<i>31/7088</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>48/00</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 K</i>	<i>31/7088</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>19/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>43/00</i>	<i>1 1 1</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>19/02</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>27/14</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>29/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>27/14</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>1/04</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>37/08</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>17/06</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>1/04</i>	
<i>A 6 1 P</i>	<i>19/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>17/06</i>	
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>A 6 1 P</i>	<i>19/08</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>7/00</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>D</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>7/00</i>	
			<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	

- (72)発明者 クェ, シャオ  
中華人民共和国, スーチョワン 6 1 0 0 3 6, ツェンドウ, ジンニュー ディストリクト, シューシー ロード ナンバー 3 6
- (72)発明者 ガオ, シャオピン  
中華人民共和国, スーチョワン 6 1 0 0 3 6, ツェンドウ, ジンニュー ディストリクト, シューシー ロード ナンバー 3 6

審査官 田中 耕一郎

- (56)参考文献 特表2005-510216(JP, A)  
国際公開第2010/105446(WO, A1)  
国際公開第2008/112640(WO, A1)  
D.Tracey, et al., Pharmacology & Therapeutics, 2008, 117, pp244-279  
S.Mazumdar, et al., MAbs, 2009, 1(5), pp422-431  
P.C.Taylor, Current Opinion in Pharmacology, Jun.2010, 10(3), pp308-315

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
*C 1 2 N* 1 / 0 0 - *C 1 2 N* 1 5 / 9 0  
SwissProt / GeneSeq  
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

专利名称(译)	人源化抗人肿瘤坏死因子α ( TNF-α ) 抗体及其抗原结合片段 ( Fab ) 及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5767708B2</a>	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	JP2013530530	申请日	2011-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	成都康弘生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	Tsuendu安本生物技术有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	Tsuendu安本生物技术有限责任公司		
[标]发明人	クエシアオ ガオシアオピン		
发明人	クエ,シアオ ガオ,シアオピン		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/09 C12N11/15 C12N11/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/7088 A61P43/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P27/14 A61P37/08 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/08 G01N33/53 C12N7/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P27/14 A61P29/00 C07K16/241 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K16/249		
FI分类号	C07K16/24 C12N15/00.ZNA.A C12N11/15 C12N11/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.D A61K39/395.U A61K48/00 A61K31/7088 A61P43/00.111 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P27/14 A61P37/08 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/08 G01N33/53.D C12N7/00 C12P21/08		
代理人(译)	Kankawa忠 伊藤 浩彰		
审查员(译)	田中一郎		
优先权	201010297255.0 2010-09-30 CN		
其他公开文献	JP2014503177A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了一种人源化抗人肿瘤坏死因子 - 抗体及其抗原结合片段 ( Fab )。本发明还公开了包含所述抗体或其抗原结合片段 ( Fab ) 的组合物，以及所述抗体或其抗原结合片段 ( Fab ) 在治疗与肿瘤坏死因子相关的疾病中的用途。

(21) 出願番号	特願2013-530530 (P2013-530530)	(73) 特許権者	506405437
(86) (22) 出願日	平成23年9月30日 (2011. 9. 30)		ツェンドゥー カンホン バイオテクノロ
(65) 公表番号	特表2014-503177 (P2014-503177A)		ジーズ カンパニー リミテッド
(43) 公表日	平成26年2月13日 (2014. 2. 13)		中華人民共和国、スーチャワン プロヴィ
(86) 国際出願番号	PCT/CN2011/001668		ンス 610036, ツェンドゥー シテ
(87) 国際公開番号	W02012/041018		ィ, ジンニウ ディストリクト, シュー
(87) 国際公開日	平成24年4月5日 (2012. 4. 5)		シー ロード ナンバー 36
審査請求日	平成25年5月22日 (2013. 5. 22)	(74) 代理人	100075409
(31) 優先権主張番号	201010297255.0		弁理士 榎木 久一
(32) 優先日	平成22年9月30日 (2010. 9. 30)	(74) 代理人	100129757
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		弁理士 榎木 久彦
		(74) 代理人	100115082
			弁理士 菅河 忠志
		(74) 代理人	100125243
			弁理士 伊藤 浩彰