

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5089582号
(P5089582)

(45) 発行日 平成24年12月5日(2012.12.5)

(24) 登録日 平成24年9月21日(2012.9.21)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

請求項の数 44 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-515021 (P2008-515021)	(73) 特許権者	502233344
(86) (22) 出願日	平成18年6月6日(2006.6.6)		エスバテック、アン アルコン バイオメ
(65) 公表番号	特表2008-545433 (P2008-545433A)		ディカル リサーチ ユニット、エルエル
(43) 公表日	平成20年12月18日(2008.12.18)		シー
(86) 国際出願番号	PCT/CH2006/000300		ESBATech, an Alcon
(87) 国際公開番号	W02006/131013		Biomedical Research
(87) 国際公開日	平成18年12月14日(2006.12.14)		Unit, LLC
審査請求日	平成21年1月19日(2009.1.19)		スイス国、シーエイチー8952 シュリ
(31) 優先権主張番号	60/687, 971	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成17年6月7日(2005.6.7)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	60/785, 353		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成18年3月23日(2006.3.23)	(74) 代理人	100096013
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 富田 博行
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TNF α を阻害する安定な可溶性抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TNF と特異的に結合する、安定な可溶性の抗体又は抗体誘導体であって、配列番号 1 に示される配列若しくは配列番号 1 に示される配列から誘導される配列から成る軽鎖可変領域(VL)が、配列番号 2 に示される配列若しくは配列番号 2 に示される配列から誘導される配列から成る重鎖可変領域(VH)と結合されたものを含む抗体又は抗体誘導体であり、

前記抗体誘導体は、ミニボディー、二重特異性抗体、直鎖状抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体断片、又はFab断片であり、

前記配列が誘導された配列の場合には、配列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 3 1、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、又は配列番号 3 8を含む、前記抗体又は抗体誘導体。

【請求項 2】

ヒトTNF に対する特異性を有する、請求項 1 に記載の抗体又は抗体誘導体。

【請求項 3】

前記VL及びVH領域がリンカーで連結された、scFv抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体誘導体。

【請求項 4】

VL-リンカー-VHという配列構成を含む、請求項 3 記載のscFv抗体。

【請求項 5】

前記リンカーが、配列番号 1 0 に示される配列を有するか、又は該配列から誘導されて

いる、請求項 3 又は 4 記載の scFv 抗体。

【請求項 6】

前記リンカーの少なくとも1のグリシンが、より極性の又は帯電したアミノ酸へと変異している、請求項 5 記載の scFv 抗体。

【請求項 7】

前記リンカーが、配列番号 39 に示される配列を有する、請求項 6 記載の scFv 抗体。

【請求項 8】

前記 VL 領域が、ヒト Ig 鎖の定常領域に融合し、前記 VH 領域が、ヒト IgG の CH1 領域に融合し、そして該2本の融合ポリペプチドが、鎖間のジスルフィド架橋により連結している Fab 断片である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体誘導体。

10

【請求項 9】

標識されているか、又は化学的に修飾されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の scFv 抗体又は Fab 断片。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又は抗体誘導体をコードする DNA 分子。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の DNA 配列を含むクローニング又は発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 記載の発現ベクターで形質転換された適切な宿主細胞。

【請求項 13】

原核細胞又は真核細胞である、請求項 12 記載の宿主細胞。

20

【請求項 14】

大腸菌、酵母、植物、昆虫又は哺乳動物の細胞である、請求項 12 記載の宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又は抗体誘導体の分子の生産方法であって、該抗体分子の合成を可能にする条件下で請求項 12 ~ 14 のいずれかに記載の宿主細胞を培養し、該培養物から前記抗体分子を回収することを含む、前記方法。

【請求項 16】

医薬としての請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体又は抗体誘導体。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体又は抗体誘導体の、TNF 関連疾患の治療用薬物の製造のための使用、又は該疾患の検出のためのインビトロ診断薬としての使用。

30

【請求項 18】

TNF 関連疾患が、変形性関節症、ブドウ膜炎若しくは炎症性腸疾患である、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体を、薬剤的に許容できる担体、希釈剤又は賦形剤と共に含む診断薬又は治療薬組成物。

【請求項 20】

ヒト及び/又は動物体内での遺伝子治療用途の医薬としての、請求項 11 記載のベクター。

40

【請求項 21】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体又は抗体誘導体を含有し、該抗体又は抗体誘導体が局所または表面に投与される、TNF 関連疾患の治療剤。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の VL 及び/又は VH 配列の発現ベクター中での使用。

【請求項 23】

治療に有効な量の請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の、先に凍結乾燥されていない抗体又は抗体誘導体と、pH が 4.8 から 5.5 である酢酸緩衝液と、界面活性剤と、ポリオールとを含み、浸透圧を増大させる量 (tonicifying amount) の塩化ナトリウムを含まない、安定

50

な水溶性医薬製剤。

【請求項 2 4】

等張性である、請求項 2 3 記載の製剤。

【請求項 2 5】

2-8 の温度において、少なくとも1年間安定である、請求項 2 3 又は 2 4 記載の製剤。

【請求項 2 6】

前記製剤の凍結融解を行った後に安定である、請求項 2 3 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 7】

30 において、少なくとも1ヶ月間安定である、請求項 2 3 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の製剤。 10

【請求項 2 8】

前記ポリオールが、非還元性の糖である、請求項 2 3 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 9】

前記非還元性の糖が、トレハロースである、請求項 2 8 に記載の製剤。

【請求項 3 0】

前記非還元性の糖が、スクロースである、請求項 2 8 に記載の製剤。

【請求項 3 1】

前記抗体が、抗体断片である、請求項 2 3 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の製剤。 20

【請求項 3 2】

前記抗体断片が、scFvである、請求項 3 1 記載の製剤。

【請求項 3 3】

前記抗体が、TNF に結合する、請求項 2 3 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 3 4】

2-8 の温度において、少なくとも2年間安定である、請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 3 5】

前記製剤中の前記抗体の濃度が、0.1 mg/ml乃至50 mg/mlである、請求項 2 3 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の製剤。 30

【請求項 3 6】

前記界面活性剤が、ポリソルベートである、請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 3 7】

前記scFvが、TNF に結合する、請求項 3 2 記載の製剤。

【請求項 3 8】

前記酢酸が、5-30 mMの量で存在する、請求項 2 3 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 3 9】

前記酢酸が、10-30 mMの量で存在する、請求項 3 8 記載の製剤。 40

【請求項 4 0】

更に保存剤を含む、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 4 1】

前記保存剤が、ベンジルアルコールである、請求項 4 0 記載の製剤。

【請求項 4 2】

前記抗体が、30-50 mg/mlの量で存在する、請求項 3 7 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 4 3】

前記緩衝液がpH5の10-30 mMの酢酸ナトリウムであり、前記ポリオールが2-10% w/vの量のトレハロースであり、前記界面活性剤が0.01-0.1% v/vの量のポリソルベートであり、 50

更に保存剤としてベンジルアルコールを含み、そして、2-8 の温度において、少なくとも2年間安定である、請求項4 2記載の製剤。

【請求項4 4】

治療に有効な量の、先に凍結乾燥されていない抗体と、pHが4.8から5.5である酢酸緩衝液と、界面活性剤と、ポリオールとを含み、浸透圧を増大させる量(tonicifying amount)の塩化ナトリウムを含まない、安定な水溶性医薬製剤を収容した容器を含む製品であって、前記抗体が、請求項1 ~ 9のいずれか一項に記載の抗体又は抗体誘導体である、製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍壊死因子アルファ(TNF)に結合し、その機能をブロックし、TNF 関連疾患の診断及び/又は治療、予防若しくは回復に有用な最適化された抗体及び抗体誘導体；それらのコード配列、産生、並びに薬理的に適切な組成物における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壊死因子 (TNF 、カケクチンとしても知られる)は、エンドトキシン又は他の刺激に応答して、単球及びマクロファージ等の多くの細胞種により産生される天然の哺乳動物由来サイトカインである。TNF は、炎症反応、免疫反応及び病態生理学的反応の主要なメディエーターである(Grell,M.ら(1995) Cell, 83: 793-802)。

【0003】

可溶性TNF は、前駆体である膜貫通型タンパク質の開裂により生成され(Krieglerら(1988) Cell 53: 45-53)、分泌された17kDaのポリペプチドは、集合して可溶性のホモトリマー複合体を形成する(Smithら(1987), J. Biol. Chem. 262: 6951-6954 ; TNFの概説としては、Butlerら(1986), Nature 320:584; Old (1986), Science 230: 630を参照)。これらの複合体は、その後多様な細胞に見出されるレセプターに結合する。この結合は、(i)インターロイキン(IL)-6、IL-8及びIL-1等の他の炎症誘発性サイトカインの放出、(ii)マトリックスメタロプロテイナーゼの放出、及び(iii)内皮接着分子の発現のアップレギュレーションを含む多くの炎症誘発性効果をもたらす、更には血管外組織に白血球を誘引することにより、炎症性の及び免疫性のカスケードを増幅させる。

【0004】

数多くの疾患が高いレベルのTNF に関連し、それらの多くは、医療上非常に重要である。TNF は、例えば、関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)等の慢性疾患、クローン病及び潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患、敗血症、鬱血性心不全、気管支ぜんそく並びに多発性硬化症等を含む数多くのヒトの疾患においてアップレギュレートされることが示されてきた。ヒトTNF のトランスジェニックマウスは、高いレベルのTNF を恒常的に産生し、RAに類似する突発性の有害な多発性関節炎を発現する(Kefferら、1991, EMBO J., 10 ,4025- 4031)。従ってTNF は、炎症誘発性サイトカインと呼ばれる。

【0005】

現在TNF は、多関節の炎症及び破壊により特徴付けられ、熱及び倦怠感及び疲労といった全身症状を伴う、慢性の、進行性且つ消耗性の疾患であるRAの発生の際の要として十分確立されている。RAはまた、頻繁に関節軟骨及び骨の破壊に進行する慢性の滑膜炎の原因となる。増加した濃度のTNF は、RAを患う患者の滑液及び末梢血の両方で見出される。TNF 遮断薬がRAを患う患者に投与される場合には、これらは炎症を低減させ、症状を改善し、関節損傷を遅延させる(McKownら(1999), Arthritis Rheum. 42:1204-1208)。

【0006】

生理学的には、TNF は特定の感染からの保護にも関連する(Cerami.ら(1988), Immunol . Today 9:28) 。TNF は、グラム陰性細菌のリポポリサッカライドにより活性化されたマクロファージにより放出される。TNF はそれ自体としては、細菌性敗血症に関連するエンドトキシンショックの発生及び病原に係る主要な内在性のメディエーターであると思われる(Michie,ら(1989), Br. J. Surg.76 : 670-671.; Debets .ら(1989), 第2

10

20

30

40

50

回ウィーンショックフォーラム (Second Vienna Shock Forum), 第463-466頁; Simpsonら(1989) Crit. Care Clin. 5: 27-47; Waageら(1987). Lancet 1: 355-357; Hammerleら(1989)第2回ウィーンショックフォーラム (Second Vienna Shock Forum) 第715-718頁; Debetsら(1989), Crit. Care Med. 17:489-497; Calandraら(1990), J. Infect. Dis. 161:982-987; Revhaugら(1988), Arch. Surg. 123:162-170)。

【 0 0 0 7 】

他の器官系のように、TNF も、中枢神経系、特に多発性硬化症、ギラン・バレー症候群及び重症筋無力症等の神経系の炎症性及び自己免疫性障害、並びにアルツハイマー病、パーキンソン病及びハンチントン病等の神経系の変性障害において重要な役割を果たすことが示されてきた。TNF はまた、視神経炎、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、皮膚筋炎、筋萎縮性側索硬化症及び筋ジストロフィー等の、網膜及び筋肉の関連系の障害、並びに、外傷性脳損傷、急性脊椎損傷及び脳卒中等の神経系の損傷にも関係する。

10

【 0 0 0 8 】

肝炎は、数ある要因の中でも、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス、及びA-E型肝炎ウイルス等のウイルス感染により引き起こされる可能性のある、別のTNF 関連炎症性疾患である。肝炎は、門脈域及び小葉域において急性肝炎症を引き起こし、後に線維症及び腫瘍進行に至る。

【 0 0 0 9 】

TNF は、癌において悪質液を媒介し、これは最も高い癌の罹患率及び死亡率をもたらす(Tisdale M.J. (2004), Langenbecks Arch Surg. 389:299-305)。

20

炎症、細胞の免疫応答及び多くの疾患の病態においてTNF が果たす重要な役割により、TNF のアンタゴニストの探索へと導かれた。

【 0 0 1 0 】

TNF は、重要なサイトカインであり、その全身でのブロックが、臨床的に明確な感染の頻度及び重症度を増加させるリスク、特に潜在性結核の再活性化のリスク、並びにリンパ腫、脱髄性疾患及び心不全の誘発等の他のリスクを伴う。

【 0 0 1 1 】

TNF 媒介性疾患の治療用に設計されたTNF アンタゴニストの1種は、TNF に特異的に結合し、それによりその機能をブロックする抗体及び抗体断片である。抗TNF 抗体の使用は、TNF の遮断が、IL-1,GM-CSF,IL-6,IL-8,接着分子の減少及び組織破壊等のTNF に起因する効果を逆転できることを示す(Feldmannら. (1997), Adv. Immunol. 1997:283-350)。

30

【 0 0 1 2 】

TNF に対する抗体は、エンドトキシンショックの予防及び治療用に提案されてきた(Beutlerら(1985) Science :234, 470-474)。敗血症ショックの治療における抗TNF 抗体の使用は、Bodmerら(1993)(Critical Care Medicine, 21:441-446,1993)、Wherryら(1993)(Critical Care Medicine, 21:436-440) 及びKirschenbaumら(1998)(Critical Care Medicine, 26:1625-1626)により議論されている。

【 0 0 1 3 】

抗TNF モノクローナル抗体又はそのTNF 結合断片を投与することによるヒトの神経変性疾患の治療法は、米国特許公開公報第US2003147891号に開示されている。

40

【 0 0 1 4 】

国際公開公報第国際公開公報第W00149321号には、TNF により引き起こされる神経性疾患及び関連疾患を治療するための抗TNF 抗体を含むTNF ブロッカーの使用が教示されている。ここでは、TNF アンタゴニストの投与により該疾患を治療する方法が提示されている。

【 0 0 1 5 】

国際公開公報第国際公開公報第W003047510号には、TNF に対する種々のモノクローナル抗体及び人工抗体、それらの産生、それらを含む化合物並びに医薬における使用が開示されている。

50

【 0 0 1 6 】

TNF 媒介性疾患の治療に有用な抗体は、通常、ハイブリドーマ技術により、通常マウス等の天然の供給源から産生されるモノクローナル抗体か、又は人工抗体のいずれかである。後者は、完全長の重鎖及び軽鎖を含む自然抗体、又はタンパク質分解開裂により自然抗体からも作り出すことが可能なFab断片、又は重鎖及び軽鎖の可変領域の断片がペプチドリンカーにより連結される一本鎖scFv抗体のいずれかに相当する。

【 0 0 1 7 】

抗体の重鎖及び軽鎖はいずれも、定常性及び可変性領域を含む。非ヒト抗体は免疫原性であるため、抗体中のヒト様配列の含量は、しばしば所謂「ハイブリッド」抗体中において増加され、これは、ヒトIgGの定常領域、及び動物抗体、殆どの場合所望の特異性を有するマウス抗体の配列に一致する可変領域を含む。これらの可変領域は、次いで、変異導入により典型的なヒト抗体に一層類似するように更に適合され、「ヒト化」抗体に至る。更にこれに代わるアプローチにおいては、即ちマウス抗体の可変領域の抗原結合部位、即ち相補性決定領域(CDR)のみがヒト抗体のフレームワークに結合され、「CDR移植」抗体に至る。

10

【 0 0 1 8 】

TNF に対するモノクローナル抗体は、先行技術において記載されてきた。Meager ら(1087) (Hybridoma 6:305-311)には、組換えTNF に対するマウスのモノクローナル抗体が記載されている。Shimamoto ら(1988) (Immunology Letters 17:311-318)には、マウス体内でのエンドトキシンショックの予防に、TNF に対するマウスモノクローナル抗体を使用することが記載されている。

20

【 0 0 1 9 】

米国特許公開公報第US5919452号には、抗TNF キメラ抗体、及びTNF の存在に関連する病態の治療におけるその使用が記載されている。

RA及びクローン病の治療における抗TNF 抗体の使用は、Feldmanら(1998) (Transplantation Proceedings 30:4126-4127)、Adoriniら(1997) (Trends in Immunology Today 18:209-211)、及びFeldmannら(1997) (Advanced Immunology 64:283-350)で議論されている。このような治療に使用されるTNF に対する抗体は、一般的に米国特許公開公報第US5919452号に記載されるようなキメラ抗体である。

【 0 0 2 0 】

米国特許公開公報第US20003187231号には、少なくとも1の結合特性が改善された非ヒトCDR領域を有するヒト化抗TNF 抗体が開示されている。更に、国際特許出願国際公開公報第WO 92/11383には、TNF に特異的なCDR移植抗体を含む組換え抗体が開示されている。Rankinら(1995) (British J. Rheumatology 34:334-342)には、RAの治療におけるそのようなCDR移植抗体の使用が開示されている。

30

【 0 0 2 1 】

国際公開公報第国際公開公報第W09211383号には、マウスのモノクローナル抗体61E7、hTNF1、hTNF3又は101.4から得られた、組換えによるTNF 特異的ヒト化CDR移植抗体が開示され、TNF 関連障害の診断及び/又は治療において、該抗体を産生及び使用することを教示している。

40

【 0 0 2 2 】

最近初めて市販されたTNF 特異的阻害剤の中でも、TNF に対するマウス-ヒトキメラモノクローナル抗体(インフリキシマブ(infliximab)、レミケード(Remicade (商標)、セントコア社(Centocor Corporation)/ジョンソン・エンド・ジョンソン(Johnson & Johnson))は、RAの治療における臨床的な有効性を示した(Elliottら(1994), Lancet 344:1105-1110; Maniら(1998), Arthritis & Rheumatism 41:1552-1563)。インフリキシマブ(infliximab)はまた、炎症性腸障害であるクローン病の治療に臨床的な有効性も示した(Baertら、(1999)、Gastroenterology 116:22-28.)。

【 0 0 2 3 】

米国特許公開公報第US22002037934号には、インフリキシマブ(infliximab)等の抗TNF

50

抗体の投与による肝炎の治療が開示されている。

米国特許公開公報第US6428787号には、インフリキシマブ(infliximab)、CDP571及びD2E7を含む抗TNF抗体による、神経性のTNF 関連疾患の治療が教示されている。

【 0 0 2 4 】

ヒト抗TNF モノクロナール抗体 (アボット (Abbott) 社) であるD2E7 (アダリムマブ (Adalimumab)) は、RA及びクローン病を治療するために開発された (国際公開公報第国際公開公報第W09729131号)。セルテック (Celltech) 社は、クローン病を治療するための抗TNF ヒト化モノクロナールIgG4抗体であるCDP571 (欧州特許公開公報第EP0626389号)、及びRAを治療するための抗TNF ヒト化モノクロナール抗体断片であるCDP870を開発している。局所性障害の治療のために該抗体を局所投与することは、米国特許公開公報第US2003 10 185826号に開示されている。

【 0 0 2 5 】

多くの一本鎖抗体(scFvs)は、特に、高い結合能力を得るために、例えばファージディスプレイ又はリボソームディスプレイ等の技術を用いて容易に選択できることから、多くの異なる抗原に対して生成された。更に、scFv抗体は、治療用の完全長を有する抗体の産生と比較して、より低いコストを伴う微生物系 において産生され得る。

【 0 0 2 6 】

従来 of 細胞外及びインビトロでの用途に加えて、scFvsはまた細胞内での用途に対してもうまく使用されており (Wornら、2000, JBC, 28;275 (4) :2795-2803; Auf der Maurら、2002, JBC, 22;277 (47) : 45075-45085; Stocks MR, 2004, Drug Discov Today. 15; 9 (22) : 960-966)、故に、細胞内抗原に対するscFvsが開発された。一般に、機能性scFvsの細胞内発現は、その不安定性、不溶性及び凝集体を形成する傾向により制限される。この理由から、細胞内の環境 (例えば、核、細胞質) に典型的な還元性条件下で、特に可溶性で安定なscFv抗体に対するインビボでのスクリーニング系は、所謂「品質管理」スクリーニングを用いてうまく開発され (国際公開公報第W00148017; Auf der Maurら (2001), FEBS Lett. 508:407-412; Auf der Maurら (2004), Methods 34:215-224)、このような目的のために、特に安定で可溶性のscFvフレームワーク配列の同定に至った (国際公開公報第W003097697)。更に、これらのフレームワークは、著しい発現レベルを示し、細胞外環境における自然な、酸性条件下でも、向上した安定性及び可溶特性を示す。故に、これらの好ましい生物物理学的及び生化学的特性は、好ましい高い産生収率へと転換し、特異 30 的な抗原に対するものであったこれらの抗体断片を、特定の治療分野におけるタンパク質療法として局所的に及び/又は全身的に投与可能にする。完全長の抗体とは対照的に、scFv抗体及びFab断片の両方は、例えばナチュラルキラー細胞等の単球のFcレセプターにより認識されるFc部分を欠くため、これらは、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を誘起せず、よって非標的細胞上のFcレセプターへの結合による非特異的な毒性を誘発しない。

【 0 0 2 7 】

従って、現在RA等のTNF 関連障害の治療、特に、副作用の程度が低い、局所投与により持続性があり、制御された治療法を提供可能な治療のための抗体について、新たな有効な形態に対する要求が存在する。本発明は、関節炎及び他のTNF 媒介性障害の炎症過程、又は病理学的メカニズム、特に種々の形態の痛みに対する、有効且つ継続的な治療のた 40 めの抗体、組成物及び方法を提供する。

本発明で引用される全ての刊行物及び参考文献は、その全体が参照により本明細書に含まれる。

【 発明の開示 】

【 0 0 2 8 】

よって、本発明の一般的な目的は、インビトロ及びインビボでTNF に特異的に結合する安定な可溶性抗体及び抗体誘導体を提供することにある。好ましい態様においては、該抗体誘導体は、scFv抗体又はFab断片である。

【 0 0 2 9 】

本発明のこれらの及び更なる目的を執行するために (本明細書の記載につれて、より容 50

易に明らかになるものであるが)、前記の抗体及び抗体誘導体は、配列番号1に示される配列若しくは配列番号1に示される配列から誘導される配列から成る軽鎖可変領域が、配列番号2に示される配列若しくは配列番号2に示される配列から誘導される配列から成る重鎖可変領域と結合されたものを含むという特徴により明らかにされ、ここで、前記配列が誘導された配列の場合には、該配列は、前記VL領域のフレームワーク中に最大で5個の変異を有し及び/又は前記VH領域のフレームワーク中に最大で9個の変異を有する。

【0030】

本発明の好ましい態様は、前記抗体及び抗体誘導体であり、ここで1又は2以上のアミノ酸の変異が、フレームワーク内のいずれかの位置、好ましくはVL領域の第4番目、第46番目、第65番目、第67番目、第70番目及び第83番目の位置から成る群から選択される1又は2箇所以上の位置、及び/又はVH領域の第11番目、第16番目、第28番目、第43番目、第48番目、第68番目、第70番目、第71番目、第72番目、第73番目、第76番目、第77番目、第79番目、第93番目及び第112番目の位置から成る群から選択される1又は2箇所以上の位置に導入される。より好ましくは、少なくとも1の変換が、VLのための配列番号3に、VHのための配列番号4に存在するアミノ酸に至り、更に好ましくは、全体で最大13箇所の変換が存在する。

10

【0031】

最も好ましくは、前記抗体及び抗体誘導体は、配列番号1に示される配列のVL領域及び/又は配列番号2に示される配列若しくはこれから誘導されるVH領域、又は配列番号11に示される配列のVL領域及び配列番号4に示される配列のVH領域を含む。本発明の抗体のVH領域が、配列番号1のVL領域を含む場合には、好ましい態様においては、第68番目の位置のフェニルアラニンがアラニン、ロイシン、イソロイシン又はパリンのいずれかに変異するように、VH配列が配列番号2から誘導される。VH内での追加的な変異は任意である。この種のscFv抗体は、配列番号31、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36及び配列番号37に示される。

20

【0032】

本発明の別の好ましい態様においては、前記抗体又は抗体誘導体は、配列番号1に示されるVL配列及び配列番号2に示されるVH配列を有する抗体から誘導され、配列番号5に示されるVL配列及び/又は配列番号6若しくは配列番号25に示されるVH配列の対応するCDRに存在する残基に、少なくとも1のCDRにおいて変異される少なくとも1のアミノ酸残基を含む。

30

【0033】

本発明の一層好ましい態様においては、前記抗体又は抗体誘導体においては、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR2又はVH CDR3から成る群の少なくとも1のCDRが、配列番号5に示されるVL配列及び/又は配列番号25若しくは配列番号6に示されるVH配列の対応するCDRに変換される。

【0034】

最も好ましくは、前記抗体又は抗体誘導体は、以下のVL/VH配列の組み合わせを含む。

配列番号7のVL配列/配列番号2のVH配列

配列番号8のVL配列/配列番号2のVH配列

配列番号1のVL配列/配列番号9のVH配列

配列番号1のVL配列/配列番号25のVH配列

配列番号1のVL配列/配列番号28のVH配列

配列番号1のVL配列/配列番号29のVH配列

配列番号26のVL配列/配列番号30のVH配列

配列番号27のVL配列/配列番号30のVH配列

40

【0035】

別の好ましい態様においては、本発明の抗体又は抗体誘導体は、ヒトTNFに対する特異性を有する。好ましくは、抗原結合は、100nM以下の K_d により特徴付けられる。更に好ましくは、10nM以下の K_d を有する抗体であり、最も好ましくは、1nM以下の K_d を有する

50

抗体である。

【0036】

本発明の抗体誘導体は、例えばFc融合体、毒素融合体、酵素活性との融合体、ミニボディー(minibodies)、二重特異性抗体(diabodies)、直鎖状抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体断片、特にscFv及びFab断片等の異なる型である。

【0037】

本発明の別の好ましい目的は、そのVL領域及びVH領域がリンカー、好ましくはVL-リンカー-VHという配列構成で結合されるscFvである。より好ましくは該リンカーは配列番号10に示される配列を有する。

【0038】

本発明の別の好ましい目的は、配列番号40から誘導されるscFv抗体(TB-A)である。このような抗体は変異導入により得ることができ、いずれかのフレームワーク、CDR及び/又はリンカー配列に3個以下の突然変異を含む。好ましくはscFv抗体は、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37又は配列番号38に示される配列を有する。

【0039】

本発明の別の好ましい目的は、ヒトIg(カッパ)鎖の定常領域に融合したVL領域、及びヒトIgGのCH1領域に融合したVH領域を含むFab断片であり、これにより2本の融合ポリペプチドが、鎖間のジスルフィド架橋により連結される。

【0040】

更に別の局面においては、本発明の抗体又は抗体誘導体、例えば抗体断片は、標識されているか化学的に修飾されている。

本発明は、本発明のいずれかの抗体又は抗体誘導体をコードするDNA配列、並びに該DNA配列を含むクローニングベクター又は発現ベクターをも提供する。更に、該DNA配列で形質転換された適切な宿主細胞が提供され、これは優先的には、大腸菌、酵母菌又は哺乳動物細胞である。

【0041】

更には、本発明の抗体又は抗体誘導体を産生するための方法であって、該抗体又は抗体誘導体の合成を可能にする条件下において、前記抗体又は抗体誘導体のいずれかをコードするDNAで形質転換された宿主細胞を培養し、該培養物から該分子を回収することを含む方法が提供される。好ましくは、該方法は、大腸菌から精製されたscFv抗体又はFab断片を提供する。

【0042】

本発明の別の局面は、本発明により提供される抗体又は抗体誘導体を、インビトロ診断のための診断用具及び/又は医薬として使用することである。この使用は、任意のTNF関連障害において特に好ましい。

【0043】

本発明はまた、本発明の抗体又は抗体誘導体を、薬剂的に許容できる担体、希釈剤又は賦形剤と共に含む組成物を包含し、該組成物はTNF関連疾患の治療のための薬物として使用される。

【0044】

更なる特徴においては、本発明は、本発明の抗体又は抗体誘導体を、好ましくはTNFに特異的な抗体又は抗体誘導体ではない第2の化合物と共に含む配合剤を提供する。

【0045】

本発明の更に別の特徴においては、本発明のscFv抗体をコードするDNA配列を含むベクターが遺伝子治療のために使用される。

【0046】

TNF関連疾患の治療は、TNFと抗体又は抗体誘導体の強い相互作用によるTNFのブロッキングにより達成される。好ましくは、自己免疫性障害、急性又は慢性炎症症状、癌

10

20

30

40

50

関連疾患、疼痛、神経障害及び神経変性障害、感染性疾患及び心血管疾患の治療が想定される。

【0047】

以下に詳述される本発明及びその目的の記載を考慮すれば、本発明がよりよく理解され、上記の説明以外の目的が明らかになるであろう。このような記載において、添付図面を参照する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

所謂「品質管理」スクリーニング(国際公開公報第W00148017号)において同定されるフレームワークを含む抗体又は抗体誘導体が、一般的に高い安定性及び/又は溶解性により特徴付けられ、それ故にTNF α の中和等の細胞外での用途においても有用であることが見出された。本発明は、TNF α を特異的に認識してこれに結合し、それ故にインビボでTNF α の機能をブロックするのに適する、高い安定性及び溶解性により特徴付けられる抗体又は抗体誘導体を提供する。該抗体又は抗体誘導体は、欧州特許公開公報第EP1479694号に開示される、その抗原結合部位とは独立した、特に安定で可溶性フレームワークを有する抗体を得るための「品質管理(quality control)」スクリーニングから得られた特別なフレームワークにより特徴付けられる。スクリーニングで使用されるフレームワークがヒト抗体フレームワークである場合には、これらは、ヒトへの適用に関して非免疫原性のフレームワークとして考えられる。本発明の抗体のCDRは、ヒトTNF α に高い親和力($K_D = 0.4$ nM)で特異的に結合し、TNF α のレセプターへの結合をブロックできる、マウスモノクローナル抗体Di62(Doringら、1994年)のCDRと同一であるか、又はこれから誘導される。更に、Di62は、マウスL929細胞内でのヒトTNF α 誘導性細胞毒性を阻害する。未決定の抗原結合特性を有し明らかに最適なヒトレセプターフレームワーク上に、マウス抗体からCDRを移植する分かりやすい工程であって、該フレームワークが配列番号5に示されるVL配列及び配列番号6に示されるVH配列を有し、該配列が、(GGGG) $_4$ リンカー(配列番号10)により連結されるような工程により、以下の配列を有するscFv抗体を結果として生じ、

【0049】

DIVLTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKRLIYSAFNRYTG
VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSG
GGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCTASGYSFTHYGMNWVRQAPGQ
GLEWMMGWIINTYTGEPTYADKFKDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARER
GDAMDYWGQGLTVTVSS (配列番号3+配列番号10+配列番号4)

【0050】

前記scFv抗体はTB-Bと称される。TB-Bは、タンパク質発現において良好な収率を示すが(図3a)、TNF α に特異的に結合できなかった(図4a)。

【0051】

故に、(i)TNF α へ結合するために十分に特異的であり、(ii)効率的な産生及び精製を可能にし、インビボでTNF α をブロックするために十分に可溶性であり、(iii)迅速な劣化を被ることなく医薬として有用であるために十分安定であり、及び、(iv)十分に非免疫原性である、抗体又は抗体誘導体を得るために、最高の可溶性と最高の抗原結合特性との間の折衷が、フレームワークとCDRを変更させることにより探求された。本発明は、基準(i-iv)の組み合わせについて最適化されたVL及びVHのための配列を提供する。(GGGG) $_4$ リンカーにより該VH(配列番号2)に連結した該VL(配列番号1)を含むscFv抗体は、TB-Aと称される。TB-Aの配列は、配列番号40に示される。この抗体は、依然として適度に安定且つ可溶であり、大腸菌から発現され精製された場合、良好な収率を与え(図3A)、また凝集することがない(図3B)。TNF α に対するその結合特性は優れており、0.8 mMの K_D を有する。

【0052】

本発明は、様々な方法でTB-Aに存在する配列から誘導されるVL及びVH配列をも開示する。まず第一に、VLのフレームワーク中で5箇所までの位置、及び/又はVHのフレームワー

10

20

30

40

50

ク中で9箇所までの位置での点変異、特に、該フレームワークをよりTB-Bに類似させる、即ち、VLについては配列番号3に、VHについては配列番号4に類似させる点変異が、許容可能であることが見出された。(GGGGS)₄リンカーにより連結された配列番号11に示される配列のVL領域と配列番号4に示される配列のVH領域を含むscFv抗体は、VLの第46番目の位置においてのみ、TB-Bと異なることから、TB-B R46Lと称される。TB-Bとは対照的に、この抗体は依然として、TNF に対する良好な結合特性(K_d 100nM)を示す。これは、TB-Aに対するTB-B R46Lにおける変異の数が、可変領域フレームワークにおける変異のおおよその上限を表わすことを示唆する。

【0053】

本発明の好ましい態様においては、1箇所の又は2箇所での点変異のみが、TB-AのVL及び/又はVHフレームワークに導入される。変異のための好ましいフレームワーク残基は、VLについては第4番目、第46番目、第65番目、第67番目、第70番目及び第83番目の位置であり、VHについては第11番目、第16番目、第28番目、第43番目、第48番目、第68番目、第70番目、第71番目、第72番目、第73番目、第76番目、第77番目、第79番目、第93番目及び第112番目の位置である。該位置は、配列表の番号付けに従って番号付けがなされている。アミノ酸の置換は、「保存的」であるか、又は置換されるアミノ酸がTB-B配列に存在する対応するアミノ酸とより類似するものであるか、若しくは、好ましくは、これと同一であることが好ましい。例えば、TB-A中のVHのA76は、TB-B中に存在するようにI76に変異されてもよいが、類似する側鎖を有する別のアミノ酸、即ち、V又はL等の非極性側鎖を有するアミノ酸に変異されてもよい。これが、「保存的」アミノ酸置換の例である。本発明で使用されるような「保存的」置換に適する類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術において、塩基性側鎖(K, R, H)、酸性側鎖(D, E)、非帯電性極性側鎖(Q, N, S, T, Y, C)、非極性側鎖(G, A, V, L, I, P, F, M, W)、 β -分枝側鎖(T, V, I)及び芳香族側鎖(Y, F, W, H)を含むものとして定義されている。好ましい保存的変異は、VがF(配列番号26)又はA(配列番号27)のいずれかに変異する、VLの第83番目の位置での変異である。しかし、配列番号32においては、VL中の非保存的変異はV83Eであり、これはCDRI中の変異、即ちN31D-、及びVH中のV79Aと組み合わせられる。別の特別なTB-A変異体は、第2番目の位置でGを置換したRを有するリンカーによりVLに結合されたVH中に保存的F68L置換を有する配列番号33の変異体である。

【0054】

特に好ましい単一アミノ酸置換は、VL中ではR65S又はY67Sであり、VH中ではK43Q、又はF68のV、L若しくはAへの置換である。特に好ましい二重変異は、VH中のF70L/L72R又はA76I/S77Gである。前記変化を有するTB-A配列を含んだScFv抗体は、L929細胞中でのTNF誘導性細胞毒性を阻害する。これらのいくつかの結果を図5Bに示す。これらの配列は以下の通りである：

【0055】

配列番号18 = TB-A H_K43Q (TB-A H43)
 配列番号19 = TB-A H_F68V (TB-A H68)
 配列番号20 = TB-A H_F70L/L72R (TB-A H70/72)
 配列番号21 = TB-A H_A76I/S77G (TB-A H76/77)
 配列番号22 = TB-A L_L46R (TB-A L46)
 配列番号23 = TB-A L_R65S (TB-A L65)
 配列番号24 = TB-A L_Y67S (TB-A L67)

【0056】

好ましい態様においては、上述したあらゆるVH領域を、上述したあらゆるVL領域と組み合わせることができる。

【0057】

本発明の別の好ましい態様においては、TB-A及びTB-BのVL及びVH領域は、TB-AのVL領域(配列番号1)がTB-BのVH領域(配列番号4)と組み合わせられ、又はTB-BのVL領域(配列番号4)がTB-AのVH領域(配列番号2)と結合されるように混合される。特に好ましい態様

10

20

30

40

50

においては、scFvにおいて得られた該シャフルされた型は、配列番号10に示される配列の(GGGGS)₄リンカーに連結され、それぞれscFv抗体TB-AB(配列番号12)又はTB-BA(配列番号13)を生じる。該(GGGGS)₄リンカーは、該抗体をより可溶性にするような、グリシンをより親水性の、即ち、極性の、又は帯電性のアミノ酸にするアミノ酸置換を有することが可能である。これらの型の内、配列GRGGS-(GGGGS)₃(配列番号39)を有するものが好ましい。

【0058】

TB-B様配列のVL又はVH領域を、TB-A様配列のVH又はVL領域と組み合わせることは本発明の範囲内にあるが、ここで、TB-B/TB-A様とは、その配列が他の配列よりもTB-B/TB-Aに近似していることを意味する。

10

【0059】

本発明の更に別の好ましい態様においては、1又は2以上のアミノ酸が、TB-AのVL及び/又はVH配列を有するCDR領域において変異され、VLの配列番号5及び/又はVHの配列番号6若しくは配列番号25で示される選択された配列中に存在する対応するアミノ酸に一致することになる。特に好ましいのは、VLのCDR(VL CDR2若しくはVL CDR3)及び/又はVHのCDR(CDR2若しくはCDR3)の1つにおける変異であり、最も好ましいのは、各々配列番号7若しくは配列番号8で示されるVL配列、及び/又は配列番号25若しくは配列番号9で示されるVH配列に至る変異である。

【0060】

本発明の別の好ましい態様においては、配列番号26若しくは配列番号27で示されるVL配列は、配列番号30で示されるVH配列と結合される。本発明の更に別の好ましい態様においては、配列番号1で示されるVL配列は、配列番号28若しくは配列番号29で示されるVH配列と結合される。

20

一般的に、開示された任意のVL配列は、開示された任意のVH配列と結合されても良い。

【0061】

本発明の目的は、抗体及び抗体断片であり、特にVL若しくはVHポリペプチド、一本鎖抗体(scFv)又はFab断片である。scFv抗体の場合には、選択されたVL領域が、選択されたVH領域に、可動性リンカーによりいずれの配向で連結されていてもよい。最先端の適切なリンカーは、GGGGSの反復アミノ酸配列又はその変異体から構成される。本発明の好ましい態様においては、配列番号10に示される(GGGGS)₄リンカー、又は配列番号39に示されるその誘導体を使用されるが、1-3反復の変異体もまた可能である(Holligerら(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。本発明で使用できる他のリンカーは、Alfthanら(1995), Protein Eng. 8:725-731、Choiら(2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106、Huら.(1996), Cancer Res. 56:3055-3061、Kipriyanovら.(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56、及びRooversら.(2001), Cancer Immunol. Immunother. 50:51-59.に記載されている。

30

【0062】

Fab断片の場合には、選択された軽鎖可変領域VLはヒトIg鎖の定常領域に融合され、一方適切な重鎖可変領域VHはヒトIgGの第1(N末端)定常領域CH1に融合される。本発明の典型的な態様においては、ヒトC領域は配列番号14に示される配列を有し、Fab断片の構成に使用されるCH1領域は配列番号15に示される配列を有する。図2は、Fab断片の例を示し、その中では、VL領域がヒト定常領域に直接連結して、以下の配列に至り、

40

【0063】

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTG VPSRFSGRGGYGTDFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDST YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号1+配列番号14)

及び、VH領域が第1の定常領域(CH1)に融合され、以下の配列に至るように、TB-AのVL及びVH領域が使用される。

【0064】

50

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGE PTYADKFKDRFTFSLETSASTV
 YMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLT VSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFSEPVTVSW
 NSGALTSVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCTS

(配列番号 2+配列番号 1 5)

【 0 0 6 5 】

C末端においては、鎖間のジスフイド架橋が 2 つの定常領域の間に形成される。

本発明の抗体又は抗体誘導体は、0.8-10000 nMの範囲の解離定数 K_d でヒトTNF に対する親和性を有し得る。本発明の好ましい態様においては、 K_d は10nM以下である。抗原に対する抗体の親和性は、適切な方法(Berzofskyら、「抗体-抗原相互作用 (Antibody-Antigen Interactions)」, in Fundamental Immunology, Paul, W.E. 編集, レイヴン出版 (Raven Press) : ニューヨーク市, ニューヨーク州(1992); Kuby, J. 「免疫学 (Immunology)」, W.H.フリーマン・アンド・カンパニー社 (W. H. Freeman and Company) : ニューヨーク市, ニューヨーク州)、及びその中に記載された方法を用いて実験的に測定することができる。

10

【 0 0 6 6 】

本発明の 1 つの局面においては、抗体又は抗体誘導体、特にscFv又はFab断片は、標識される。TNF 特異的抗体又は抗体誘導体の検出可能な標識は、これらを、当業者に周知の方法である酵素免疫測定法(EIA)又は酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)において使用される酵素に結合させることで実現される (例えば、「免疫学における最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」, Coliganら. 編集, ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社 (John Wiley & Sons), 2005)。

20

【 0 0 6 7 】

TNF -特異性抗体又は抗体誘導体を放射性標識することにより、放射性免疫測定法(RIA)の使用によりTNF を検出することが可能である(例えば Workら, 「分子生物学における実験技術及び生化学 (Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology)」, ノース・ホーランド出版社 (North Holland Publishing Company), ニューヨーク州 (1978)を参照)。放射性同位体は、カウンター若しくはシンチレーションカウンターの使用、又はオートラジオグラフィにより検出できる。特に有用な同位体は、 ^3H 、 ^{13}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C であり、好ましくは ^{125}I である。

30

【 0 0 6 8 】

本発明の抗体又は抗体誘導体は、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フトアルデヒド(o-phthaldehyde)及びフルオレサミン等の蛍光標識化合物、又はルミノール、イソルミノール、テロマチックアクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾールアクリジニウム塩及びシュウ酸エステル等の化学発光化合物で標識することもできる。

【 0 0 6 9 】

標識及び検出手順は当業者に周知である。例えば、それらは「抗体の使用：実験マニュアル：携帯型プロトコル (Using Antibodies : A Laboratory Manual: Portable Protocol)」 NO. 1 (Harlow, E. 及び Lane, D., 1998) から入手可能である。

【 0 0 7 0 】

本発明の標識された抗体又は抗体誘導体は、診断目的、特に患者から取り出された生物サンプル中のTNF の検出に有用である。例えば血液、血清、リンパ液、尿、炎症性滲出液、脳脊髄液、羊膜液、組織抽出物若しくは破砕物等のような体液、又はインサイチュで検出するための組織学的標本等のTNF を含有するあらゆるサンプルが使用できる。

40

【 0 0 7 1 】

製剤 (Pharmaceutical preparations)

定義： 「医薬製剤」という用語は、抗体又は抗体誘導体の生物活性が明確に有効となる形態にあり、該製剤が投与される対象にとって有毒な、追加成分を含まない製剤を指す。「薬剂的に許容される」賦形剤 (媒体、添加剤) とは、対象哺乳動物に投与されることで用いられる有効成分の有効量が適度に与えられるようになるものである。

50

【0072】

「安定な」製剤とは、その中の抗体又は抗体誘導体が、保存の際、本質的にその物理的安定性及び／又は化学的安定性及び／又は生物活性を保持するものである。タンパク質の安定性を測定する種々の分析法が当該技術分野において利用可能であり、これらは例えば「ペプチド及びタンパク質のドラッグデリバリー (Peptide and Protein Drug Delivery)」、p.247-301、Vincent Lee 編集、Marcel Dekker社、ニューヨーク市、ニューヨーク州、1991年出版、及びJones, A.による「高度ドラッグデリバリーレビュー (Adv. Drug Delivery Rev.) 10」p.29-90 (1993) において概説されている。安定性は、選択された温度で選択された期間測定することができる。好ましくは、製剤は、室温(約30)若しくは40 で少なくとも1ヶ月安定であり、そして／又は約2から8 で少なくとも1年間、少なくとも2年間安定である。更に、製剤は、好ましくは、凍結(例えば、-70 まで)融解を行なった後安定である。

10

【0073】

色及び／若しくは透明度の外観検査の際に、又は、紫外線光散乱若しくはサイズ排除クロマトグラフィーにより測定される凝集、沈殿及び／又は変性の徴候を示さない場合、抗体又は抗体誘導体は、医薬製剤において、「その物理的安定性を保持する」。

【0074】

ある時点での化学的安定性が、以下に規定される生物活性をタンパク質がなお保持していると考えられるようなものである場合、抗体又は抗体誘導体は、医薬製剤において、「その化学的安定性を保持している」。化学的安定性は、化学的に変化したタンパク質を検出して定量することにより評価することができる。化学的変化(chemical alteration)は、例えばサイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE及び／又はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法／飛行時間質量分析法(MALDI/TOF MS)を用いて評価することのできる大きさの変化(例えば、クリッピング(clipping))を伴ってもよい。他種の化学的変化(alter)には、例えば、イオン交換クロマトグラフィーにより評価することのできる荷電変化(例えば、アミド分解の結果として起こる)を含む。

20

【0075】

ある時点での抗体の生物活性が、例えば、抗原結合アッセイで測定されるた、医薬製剤が調製された時に示され、生物活性の約10%以内(アッセイの誤差の範囲内)にある場合、抗体又は抗体誘導体は、医薬製剤において、「その生物活性を保持している」。抗体のための他の「生物活性」アッセイは、以下で詳細に説明される。

30

【0076】

「等張液」とは、対象となる製剤が実質的にヒトの血液と等浸透圧であることを意味する。等張製剤は一般的に約250から300 mOsmの浸透圧を有する。等張性は、例えば蒸気圧法又は氷点降下法による浸透圧計を用いて計測することができる。

【0077】

「ポリオール」とは、複数の水酸基を有する物質であり、糖(還元及び非還元糖)、糖アルコール及び糖酸を含む。ここで、好ましいポリオールは、約600 kD未満(例えば、約120から約400 kDの範囲)の分子量を持つ。「還元糖」は、金属イオンを還元することができるものであり、「非還元糖」は、還元糖のこれらの特性を有しないものである。還元糖の例として、フルクトース、マンノース、マルトース、ラクトース、アラビノース、キシロース、リボース、ラムノース、ガラクトース、及びグルコースが挙げられる。非還元糖の例として、スクロース、トレハロース、ソルボース、メレジトース及びラフィノースが挙げられる。マニトール、キシリトール、エリスリトール、トレイトール、ソルビトール及びグリセロールは糖アルコールの例である。糖酸に関しては、L-グルコン酸及びその金属塩がこれらに含まれる。製剤が凍結溶融において安定であることが望ましい場合、ポリオールは、製剤内での抗体を不安定化する凍結温度(例えば、-20)において結晶化しないものが好ましい。スクロース及びトレハロースのような非還元糖は、ここで好ましいポリオールであり、トレハロースは溶液安定性に優れているため、トレハロースがスクロース

40

50

より好ましい。

【0078】

ここで、「緩衝液」とは、その共役な酸・塩基成分の働きにより、pH変化に耐える緩衝溶液を指す。本発明の緩衝液は、約4.5から約6.0の範囲のpHを有し；好ましくは、約4.8から約5.5の範囲のpHを有し；最も好ましくは、約の5.0のpHを有する。この範囲にpHを調節する緩衝液の例には、アセテート（例えば、酢酸ナトリウム）、スクシネート（例えば、コハク酸ナトリウム）、グルコネート、ヒスチジン、シトレート及び他の有機酸緩衝剤が含まれる。凍結溶融において安定である製剤が望ましい場合、緩衝剤は、好ましくは、ホスフェートでない。

【0079】

薬理的な意味において、本発明の文脈では、「治療有効量」の抗体又は抗体誘導体とは、抗体又は抗体誘導体が治療に効果的な障害の、予防又は治療に有効な量を指す。「疾患/障害」とは、抗体又は抗体誘導体の治療から利益を得るであろう、あらゆる状態である。これは、哺乳動物を問題の障害に罹患させる病態を含む慢性及び急性の障害又は疾患を含む。

【0080】

「保存剤」とは、製剤に含まれていてよい化合物であり、これにより製剤内での細菌作用を本質的に減らし、従って、例えば多目的の製剤の製造が容易になるような化合物である。保存剤の例となり得るものとしては、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンズアルコニウム（アルキル基が長鎖化合物である塩化アルキルベンジルジメチルアンモニウムの混合物）及び塩化ベンゼトニウムが含まれる。他の種類の保存剤には、フェノール、ブチル及びベンジルアルコールのような芳香族アルコール、メチル又はプロピルパラベンのようなアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール並びにm-クレゾールが含まれる。ここで最も好ましい保存剤はベンジルアルコールである。

【0081】

本発明は、少なくとも1つの生理学的に許容される担体又は賦形剤と共に、1又は2種類以上の抗体又は抗体誘導体化合物を含む医薬組成物をもまた提供する。医薬組成物には、例えば、水、緩衝液（例えば、中性緩衝食塩水若しくはリン酸緩衝食塩水）、エタノール、鉱油、植物油、ジメチルスルホキシド、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロース若しくはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、アジュバント、ポリペプチド若しくはグリシンのようなアミノ酸、酸化防止剤、EDTA若しくはグルタチオンのようなキレート剤及び/又は保存剤の1又は2以上が含まれていてよい。上記のように、他の有効成分は、ここで提供される医薬組成物に（含まれてる必要はないが、）含まれていてもよい。

【0082】

担体は、多くの場合、化合物の安定性又はバイオアベイラビリティを調節するために、患者に投与する前に、抗体又は抗体誘導体に結合させてもよい物質である。このような製剤内に用いられる担体には、一般的に生体適合性であり、そして生分解性があってもよい。例として、担体には、血清アルブミン（例えば、ヒト又はウシの）、卵アルブミン、ペプチド、ポリリジン、並びにアミノデキストラン及びポリアミドアミンのような多糖といった一価又は多価の分子が含まれる。担体には、例えばポリラクテート、ポリグリコレート、ポリ（ラクチド-コ-グリコリド）、ポリラクテート、ラテックス、スターチ、セルロース又はデキストランを含むビーズ及びマイクロ粒子のような固体支持物質も含まれる。担体には、共有結合（直接又はリンカー基を介してのいずれか）、非共有結合性相互作用、又は混合を含む種々の状態で化合物が含まれていてよい。

【0083】

医薬組成物は、例えば、局所投与、経口投与、経鼻投与、直腸投与又は非経口投与を含む、あらゆる適切な方法によって処方することができる。特定の態様においては、経口で用いるのに適した形態にある組成物が好ましい。このような形態には、例えば、丸剤、錠剤

10

20

30

40

50

、トローチ剤、ロゼンジ、水性若しくは油性の懸濁剤、分散性粉剤若しくは分散性顆粒剤、エマルジョン、硬カプセル剤若しくは軟カプセル剤、又はシロップ剤若しくはエリキシル剤が含まれる。更に他の態様において、ここで提供された組成物は凍結乾燥物として処方してもよい。ここで用いられる「非経口」という用語には、皮下注射、皮内注射、血管内(例えば、静脈内)注射、筋肉内注射、脊髄注射、頭蓋内注射、クモ膜下腔注射及び腹腔内注射、並びに、同様のあらゆる注射又は浸剤の手法が含まれる。

【0084】

経口投与用の組成物は、医薬組成物の製造のための当該技術分野で公知のあらゆる方法に従って調製することができ、訴求力があり、味のよい製剤を提供するために、甘味剤、香料、着色剤、及び保存剤のような剤を1種類又は2種類以上含んでいてよい。錠剤には、その製造に適した、生理学的に許容可能な賦形剤と混合された有効成分を含んでいてよい。このような賦形剤には、例えば、不活性の希釈剤(例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウム)、造粒剤及び崩壊剤(例えば、コーンスターチ又はアルギン酸)、結合剤(例えば、デンプン、ゼラチン又はアラビアゴム)並びに潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又は滑石)が含まれる。錠剤はコートされていなくてもよく、又は、胃腸管における分解及び吸収を遅らせるために公知の手法によりコートされてもよく、これにより、より長期間の持続作用が提供される。例えば、グリセリルモノステアレート又はグリセリルジステアレート等の遅延物質を用いることができる。

【0085】

経口投与用の製剤は、有効成分が不活性な固体希釈剤(例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム又はカオリン)と共に混合された硬ゼラチンカプセル、又は有効成分が水又は油媒体(例えば、ピーナツオイル、流動パラフィン又はオリーブオイル)と共に混合した軟ゼラチンカプセルとして提供されてもよい。水性懸濁液には、水性懸濁液の製造に適した賦形剤と混合された抗体又は抗体誘導体が含まれる。このような賦形剤には、懸濁剤(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム及びアラビアゴム);及び分散剤又は湿潤剤(例えば、レシチンのような天然のホスファチド、ステアリン酸ポリオキシエチレンのようなアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合物、ヘプタデカエチレンオキシセタノールのようなエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合物、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエートのようなエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトールから誘導される部分エステル縮合物、又はポリエチレンソルビタンモノオレエートのようなエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール無水物類から誘導された部分エステル縮合物)が含まれる。水性懸濁液には、例えばエチル又はn-プロピル p-ヒドロキシ安息香酸のような1種類又は2種類以上の保存剤、1種類又は2種類以上の着色剤、1種類又は2種類以上の香料、及び1種類又は2種類以上のスクロース又はサッカリンのような甘味剤が含まれていてもよい。シロップ剤及びエリキシル剤はグリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール又はスクロースのような甘味剤と共に処方してよい。このような製剤には、1種類又は2種類以上の粘滑薬、保存剤、香料、及び/又は着色剤も含まれていてよい。

【0086】

油性懸濁液は、植物油(例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、又はココナツ油)又は流動パラフィンのような鉱油に有効成分を懸濁させることにより処方することができる。油性懸濁液には、蜜蝋、固形パラフィン、又はセチルアルコールのような増粘剤が含まれていてよい。上記で説明したような甘味剤、及び/又は香料を添加して、味のよい経口剤を提供することもできる。このような懸濁液は、アスコルビン酸のような酸化防止剤の添加により保存されてもよい。

【0087】

水の添加による水性懸濁液の調製に適した、分散性粉剤及び分散性顆粒剤は、分散剤又は湿潤剤、懸濁剤及び1種類若しくは2種類以上の保存剤と混合された有効成分を提供する

。適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤は既に上記で言及したものによって例示される。例えば、甘味剤、香料、着色剤のような追加的賦形剤が存在していてもよい。

【0088】

医薬組成物は、水中油滴型エマルジョンの形態であってもよい。油層は、植物油（例えば、オリーブ油又はラッカセイ油）、鉱油（例えば、流動パラフィン）、又はその混合物であってもよい。適切な乳化剤として、天然のゴム（例えば、アラビアゴム及びトラガントゴム）、天然のホスファチド（例えば、ダイズ、レシチン、及び脂肪酸及びヘキシトールから誘導されるエステル又は部分エステル）、無水物（例えば、ソルビタンモノオレエート）、並びに脂肪酸及びヘキシトールからエチレンオキッドにより誘導される部分エステルの縮合物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）が含まれる。エマルジョンには1種類又は2種類以上の甘味剤及び/又は香料が含まれていてもよい。

10

【0089】

医薬組成物は、修飾物質が、使用される媒体及び濃度に依存して、媒体中で懸濁しているか溶解しているかのいずれかであるような、滅菌された注射可能な水性又は油性懸濁液として調製することができる。このような組成物は、上記のような、適切な分散剤、湿潤剤及び/又は懸濁剤を用いた、公知の技術に従って調製することができる。用いることのできる許容可能な媒体及び溶媒には、1,3-ブタンジオール、リンガー溶液及び等張性の塩化ナトリウム溶液がある。更に、滅菌された不揮発性油を、溶媒又は懸濁媒体として用いてもよい。この目的のために、合成のモノ-又はジグリセリドを含むいずれかの滅菌された不揮発性油を用いることができる。更に、オレイン酸のような脂肪酸を、注射可能な組成物の調製に用いてもよく、局所麻酔薬のようなアジュバント、保存剤及び/又は緩衝剤が媒体に溶解していてもよい。

20

【0090】

医薬組成物は徐放製剤（例えば、投与後に修飾物質が徐々に放出されるカプセルのような製剤）として処方することができる。このような製剤は、一般に公知の技術を用いて調製され、例えば、経口、直腸、又は皮下移植、又は所望の目標部位への移植により投与することができる。このような製剤中に用いられる担体には生体適合性があり、また生分解性であってもよい；好ましくは、該製剤は比較的一定レベルの修飾物質の放出を提供する。徐放製剤に含まれる抗体及び抗体誘導体の量は、例えば、移植部位、放出速度及び予想される持続時間、並びに治療又は予防すべき疾患/障害の特性に依存する。

30

【0091】

ここで提供される抗体又は抗体誘導体は、検出可能な程度にTNF に結合し、TNF に関連する疾患/障害を予防又は抑制するために十分な体液濃度を達成する量で、一般に投与される。ここに記載されているような患者に対する判別可能な利益が結果として得られた場合、投与量は有効であると考えられる。好ましい全身投与量は1日毎に体重1 kg当たり約0.1 mgから約140 mgの範囲（1日患者一人当たり約0.5 mgから約7 g）であり、経口投与では、一般に静脈内での投与量に比べて約5から20倍多い。1回量の剤形を製造するための、担体物質と組み合わせるとよい可能な抗体又は抗体誘導体の量は、治療される宿主及び特定の投与方法に応じて異なることになる。投与単位の剤形は一般的に、約1 mgから約500 mgの有効成分を含む。

40

【0092】

医薬組成物は、TNF- に対する抗体又は抗体誘導体に応答性の処置条件用に包装することができる。包装された医薬組成物は、少なくとも1種類のここに記載された抗体又は抗体誘導体を有効量保持可能な容器、及び、含まれる組成物が、患者へ投与した後、1種類の抗体又は抗体誘導体に応答性の疾患/障害を治療するために用いられるものであることを表示した説明書（例えば、ラベル）が含まれていてもよい。

【0093】

本発明の抗体又は抗体誘導体は化学修飾がなされていてもよい。好ましい修飾基はポリマーであり、例えば、置換されていてもよい直鎖若しくは分枝鎖のポリアルケン、ポリアルケニレン、又はポリオキシアルキレンポリマー又は分枝若しくは直鎖のポリサッカライ

50

ドである。このようなエフェクター基はインビボにおける抗体の半減期を増加させることができる。合成高分子の特別な例には、置換されていてよい直鎖又は分枝鎖のポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)、ポリ(ビニルアルコール)又はその誘導体が含まれる。特別の天然のポリマーには、ラクトース、アミロース、デキストラン、グリコーゲン又はその誘導体を含む。ポリマーのサイズは所望により異なるが、一般的に、平均分子量が500 Daから50000 Daの範囲にある。抗体が組織を貫通するように設計された局所投与では、ポリマーの好ましい分子量は、およそ5000 Daである。ポリマー分子は抗体に結合させることができ、特にW00194585に記載されるように、共有結合的に結合したヒンジペプチドを介してFab断片重鎖のC末端に結合させることができる。PEG部分の結合に関しては、「ポリ(エチレングリコール)の化学、生命工学及び生命医学における応用(Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnological and Biomedical Applications)」、1992年、J. Milton Harris(編集)、Plenum出版、ニューヨーク、及び「バイオメディカルサイエンスのための生体接合タンパク質カップリング法(Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences)」、1998年、M. Aslam 及びA. Dent著、Grove出版、ニューヨーク、で言及がなされている。

10

【0094】

製剤の調製

上記のように対象となる抗体又は抗体誘導体の調製を行なった後、これを含む医薬組成物を調製する。処方される抗体は、先に凍結乾燥を行わず、ここで対象となる製剤は水性製剤である。好ましくは、製剤における抗体又は抗体誘導体は、scFvのような抗体断片である。製剤に存在する治療に有効な量の抗原は、例えば、所望の投与量及び投与方法を考慮に入れて決定される。約0.1 mg/mlから約50 mg/ml、好ましくは約0.5 mg/mlから約25 mg/ml、最も好ましくは2 mg/mlから10 mg/mlが製剤内の抗体の例示的な濃度である。

20

【0095】

水性製剤は、抗体又は抗体誘導体をpH緩衝液に含むように調製される。本発明の緩衝液は、pHが約4.5から約6.0の範囲であり、好ましくは、約4.8から約5.5の範囲であり、最も好ましくはpHが約5.0である。この範囲にpHを調節する緩衝液の例には、アセテート(例えば、酢酸ナトリウム)、スクシネート(例えばコハク酸ナトリウム)、グルコネート、ヒスチジン、シトレート及び他の有機脂肪酸緩衝液が含まれる。緩衝液の濃度は、約1 mMから約50 mMであってよく、好ましくは、約5 mMから約30 mMであってよく、これは、例えば、緩衝液及び製剤の所望の等張性に依存する。好ましい緩衝液は酢酸ナトリウム(約10 mM)、pH 5.0である。

30

【0096】

等張化剤(tonicifier)として働き、抗体を安定化することのできるポリオールが製剤に含まれる。好ましい態様において、抗体若しくは抗体誘導体が沈殿し、及び/又は低pHにおいて酸化してしまうため、製剤は塩化ナトリウムのような塩を等張化させる量(tonicifying amount)含まない。好ましい態様において、ポリオールは、スクロース又はトレハロースのような非還元糖である。製剤の所望の等張性に依りて異なってよい量のポリオールが、製剤に加えられる。好ましくは、水性製剤は等張性であり、この場合、製剤におけるポリオールの適切な濃度は、例えば、約1%から約15% w/vの範囲にあり、好ましくは約2%から約10% w/vの範囲にある。しかし、高張又は低張の製剤もまた適している。添加されたポリオールの量は、ポリオールの分子量に応じて変わってもよい。例えば、ジサッカライド(例えば、トレハロース)に比べて、より少ない量のモノサッカライド(例えば、マンニトール)が加えられてよい。

40

【0097】

抗体又は抗体誘導体制剤に、界面活性剤も添加される。例示的な界面活性剤には、ポリソルベート(例えば、ポリソルベート20、80等)、又はポロキサマー(poloxamer)(例えば、ポロキサマー(poloxamer)188)のような非イオン性界面活性剤が包含される。添加される界面活性剤の量は、製剤した抗体/抗体誘導体の凝集が減り、そして/又は製剤における微粒子の形成が最小限となり、そして/又は吸着が減るような量である。例

50

えば、界面活性剤は、約0.001%から約0.5%の量で存在してよく、好ましくは、約0.005%から約0.2%の量で存在してよく、そして最も好ましくは、約0.01%から約0.1%の量で存在してよい。

【0098】

1つの態様において、製剤は、上記で規定した物質（即ち、抗体又は抗体誘導体、緩衝液、ポリオール及び界面活性剤）を含み、そして、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、クロロブタノール及び塩化ベンゼトニウムのような、1種類又は2種類以上の保存剤を実質的に含有しない。別の態様において、特に、製剤が複数回投与性（multidose）の製剤である場合、保存剤が製剤に含まれていてよい。保存剤の濃度は、約0.1%から約2%の範囲であり、最も好ましくは、約0.5%から約1%の範囲である。レミントン薬学第21版（Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition）、Osol, A. 編集。（2006年）に記載されてるような、1種類又は2種類以上の他の薬剤的に許容される担体、賦形剤又は安定剤が、製剤の所望の特性に悪影響を及ぼさないという条件の下で、製剤に含まれていてよい。許容される担体、賦形剤又は安定剤は、使用される投与量及び濃度において、レシピエントにとって無毒であり、更なる緩衝剤；共溶媒；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；EDTAのようなキレート剤；金属錯体（例えば、亜鉛-タンパク質錯体）；ポリエステルのような生分解性ポリマー；及び/又はナトリウムのような塩形成対イオンを含む。

10

【0099】

インビボ投与に用いられる製剤は滅菌されていなければならない。これは、製剤の調製の前又は後に、滅菌ろ過膜を通する過により容易に実現される。

20

【0100】

製剤の投与

製剤は、抗体による治療を必要とする哺乳動物、好ましくはヒトに、静脈内一括投与若しくは一定期間にわたる継続的点滴、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、クモ膜下腔内、経口、局所又は吸入等の経路による公知の方法に従って、投与される。好ましい態様において、製剤は静脈内投与により哺乳動物に投与される。このような目的のため、製剤は例えばシリンジを用いて、又はIVラインを通して注射されてよい。

【0101】

抗体の適切な投与量（治療に有効な量）は、例えば、治療すべき病状、病状の重症度及び経過、抗体が予防目的で投与されるか又は治療目的で投与されるか、治療歴、患者の病歴及び抗体に対する応答、用いられる抗体の種類、並びに主治医の自由裁量に依存する。抗体又は抗体誘導体は、患者に一度で、又は一連の治療を通して、適切に投与されるが、診断後であればいずれの時点において患者に投与されてもよい。抗体又は抗体誘導体は、対象とする病状を治療に有用な、単一の治療として、又は他の薬又は治療と共に投与されてもよい。

30

【0102】

一般的な提案として、投与される抗体又は抗体誘導体の治療に有効な量は、一回の投与であっても複数の投与であっても患者の体重に対して約0.1から約50 mg/kgの範囲であり、使用される抗体について典型的な範囲は、約0.3から約20 mg/kgの範囲であり、例えば、より好ましくは約0.3から約15 mg/kgの範囲で毎日投与される。しかし、他の投与計画が有用な場合もある。この治療の経過は従来技術により容易にモニターすることができる。

40

【0103】

製品

本発明の別の態様において、製品は、本発明の水溶性製剤を収容する、容器を含んで提供され、そして任意にその使用説明書が提供される。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル及びシリンジが包含される。前記容器は、ガラス又はプラスチックのような種々の材料から形成することができる。例示としての容器は、3-20 ccの使い捨てのガラスバイアルである。また、これに代わり、複数回投与用の製剤については、容器は3-100 ccのガラス

50

バイアルであってよい。前記容器は製剤を収容し、ラベルが張られているか、又は付随しており、容器に使用方法を提示してよい。製品は更に、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用説明を有する添付文書を含む、商業的及び使用者の視点から所望される他の材料を更に含んでいてもよい。

【0104】

本発明の抗体の作製

本発明の抗体又は抗体誘導体は組換え遺伝学の分野におけるルーチン技術を用いて作製することができる。ポリペプチドの配列を知ることにより、それらをコードするcDNAを遺伝子合成によって作成することができる(www.genescript.com)。これらのcDNAは適切なベクタープラスミドにクローニングすることができる。VL及び/又はVH領域をコードするDNAが得られたならば、例えば変異導入プライマーを用いたPCRにより、部位特異的変異導入を行って、種々の誘導体を得ることができる。最適な「開始」配列は、VL及び/又はVH配列内に所望される変異の数に基づいて選択することができる。好ましい配列は、TB-Aの配列であり、そして、その誘導体、例えばscFv配列又はFab融合ペプチド配列等は、PCRによる変異導入及び/又はクローニング用の鋳型として選択される。

10

【0105】

当業者によく知られた基本的なクローニング技術と変異導入技術を用いて、Fab断片を作製するために、リンカーを結合させ、ドメインをシャフルし、又は融合体を構築することができる。本発明の一般的な方法を開示する基本的なプロトコルは、「分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」(Sambrook & Russell, 第3版, 2001)及び「分子生物学における最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」(Ausubelら., 1999)に記載されている。

20

【0106】

scFvポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNA配列、又は、Fab断片であれば、VL-C_K及びVH-CH1融合体(図2)をコードする2つの別々の遺伝子、又は該2つの遺伝子を含む2シストロンオペロンをコードする遺伝子を含むDNA配列が、適切な発現ベクター、好ましくは誘導プロモーターを有する発現ベクターにクローニングされる。それぞれの遺伝子上流に、翻訳を確実にするためのリボソーム結合部位(図2のRBS)が存在していることに留意しなければならない。また、本発明の抗体は、開示された配列から成るのではなく、むしろ該配列を含むものであるということが理解されなければならない。例えば、クローニングの計画では、1又は2, 3個の追加的残基をN末端に有する抗体が存在するところからコンストラクトを作成することが要求される。具体的には、開始コドンから誘導されるメチオニンは、翻訳後に切断されていない場合、最終的なタンパク質に存在する可能性がある。ほとんどのscFv抗体のためのコンストラクトは、N末端に追加のアラニンが生じる。本発明の好ましい態様においては、大腸菌内のペリプラズムでの発現用の発現ベクターが選択される(Krebber, 1997)。前記ベクターは切断可能なシグナル配列の上流にプロモーターを含む。次に、抗体ペプチドのコーディング配列は、切断可能なシグナル配列とフレームを合わせて融合される。これにより、発現されたポリペプチドを、シグナル配列が切断される細菌のペリプラズムにターゲティングすることが可能となる。そして、抗体はフォールディングする。Fab断片の場合、VL-C_K及びVH-CH1の融合ペプチドは、双方が移行シグナルに結合していなければならない。ペプチドがペリプラズムに到達した後、C末端システインにおいてS-S共有結合が形成される。抗体の細胞質内での発現が好ましい場合、前記抗体は、通常、他の細胞断片及びタンパク質から用意に分離できる封入体から高収率で得られる。この場合、封入体は、例えば塩酸グアニジン(GndHCl)のような変性剤中に可溶化し、また、当業者によく知られたの再生過程により、リフォールディングする。

30

40

【0107】

scFv又はFabポリペプチドを発現するプラスミドは、適切な宿主、好ましくは、細菌、酵母又は哺乳動物細胞、最も好ましくは、適切な大腸菌であり、例えば、ペリプラズム発現にはJM83又は細胞質内発現にはBL21等に導入される。ポリペプチドは、ペリプラズム又

50

は細胞質のいずれかから回収することができ、当業者に公知のイオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー及び/又はゲルろ過のような標準的な技術を用いて精製することができる。

【0108】

本発明の抗体又は抗体誘導体は、インビトロでの収率、可溶性及び安定性により特徴付けることができる。TNF、好ましくは、ヒトTNFへの結合能を、国際公開公報第W09729131号に記載される組換えヒトTNFを用いて、インビトロでELISAにより又は表面プラズモン共鳴法(BIACore)により試験することができ、後者の方法により、好ましくは 10^{-3}s^{-1} 未満となるはずの k_{off} 速度定数を測定することも可能である。10 nM以下の K_d 値が好ましい。

10

【0109】

本発明の抗体又は抗体誘導体のインビボでの中和活性は、L929細胞毒性アッセイを用いて評価することができる。ヒト組換えTNFは、培養マウスL929繊維芽細胞に対して濃度依存的に細胞毒性を示す。このTNF誘導性の細胞毒性は、TNF中和抗体により抑制される(Doring, 1994)。最大半減阻害剤濃度に相当する好ましい IC_{50} 値は、 100 ngml^{-1} 以下である。

【0110】

TNFは、種々のヒトの疾患、特に、炎症性障害、免疫障害及び免疫制御障害、敗血症ショック、内毒素ショック及び心臓血管ショックを引き起こす感染、神経変性疾患、悪性腫瘍疾患において、確証された病態生理学的な役割を有する。TNFは、その数が着実に増加している更なるヒトの疾患において、疾患関連の役割を果たすと考えられているため、将来におけるTNF阻害物質の臨床応用範囲の完全表示を保証する、包括的な提示のリストを提供することは困難である。従って、本発明の抗体又は抗体誘導体は、以下のリストに列挙される疾患を治療するために適用することができるが、該リストは、完全な又は限定的なリストとして考慮されるべきではない。

20

【0111】

自己免疫性炎症又は慢性炎症：

慢性及び/又は自己免疫性炎症全般、免疫媒介炎症性障害全般、炎症性CNS疾患、眼、関節、皮膚、粘膜、中枢神経系、胃腸管、尿路又は肺に影響を及ぼす炎症性疾患、ブドウ膜炎全般、網膜炎、HLA-B27+ブドウ膜炎、ベーチェット病、眼乾燥症候群、緑内障、シェーグレン症候群、糖尿病(糖尿病性神経障害を含む)、インスリン抵抗性、関節炎全般、関節リウマチ、変形性関節症、反応性関節炎及びライター症候群、若年性関節炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、サルコイドーシス、糸球体腎炎、慢性腎臓病、膀胱炎、乾癬(乾癬性関節炎を含む)、化膿性汗腺炎、皮下脂肪組織炎、壊疽性膿皮症、SAPHO症候群(滑膜炎、座瘡、膿疱症、骨化過剰症及び骨炎)、座瘡、スウィート症候群、天疱瘡、クローン病(腸外症状を含む)、潰瘍性大腸炎、気管支喘息、過敏性肺臓炎、アレルギー全般、アレルギー性鼻炎、アレルギー性副鼻腔炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺線維症、ウェゲナー肉芽腫症、川崎病、巨細胞性動脈炎、チャーグストラウス血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、結節性多発性動脈炎、火傷、移植片対宿主病、宿主対移植片反応、器官又は骨髄移植後の拒絶エピソード、全身性及び局所的な血管炎全般、全身性及び円板状エリテマトーデス、多発性筋炎及び皮膚筋炎、強皮症、子癩前症、急性及び慢性膵炎、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎。

30

40

【0112】

急性炎症及び/又は手術後若しくは外傷後の炎症と疼痛の予防：

術後炎症の予防全般、目の手術(例えば、白内障の手術(眼内レンズの交換)又は緑内障の手術)、関節手術(関節鏡視下手術を含む)、関節関連組織(例えば靭帯)の手術、口腔及び/又は歯科手術、低侵襲心臓血管処置(例えば、PTCA、アテレクトミー、ステント留置術)、腹腔鏡下及び/又は内視鏡下での腹腔内処置並びに婦人科処置、内視鏡下泌尿器処置(例えば、前立腺手術、子宮鏡検査、膀胱鏡検査、間質性膀胱炎)、術中炎症

50

(予防) 全般。

【 0 1 1 3 】

神経性疾患及び神経変性疾患：

アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ベル麻痺、クロイツフェルトヤコブ病。

癌：

癌性骨溶解、癌性炎症、癌性疼痛、癌性悪質液、骨転移。

【 0 1 1 4 】

疼痛：

TNF の中枢的又は末梢的効果により生じたものかどうかに関係なく、そして、炎症性疼痛、侵害受容性疼痛、又は神経障害性疼痛、坐骨神経痛、腰痛、手根管症候群、複合性局所疼痛症候群 (CRPS)、痛風、疱疹後神経痛、線維筋痛症、局所的疼痛状態、転移性腫瘍に起因する慢性疼痛、月経困難として分類されるかどうかに関係ない急性疼痛及び慢性疼痛。

10

感染：

細菌性敗血症、ウイルス性敗血症、又は真菌性敗血症、結核、エイズ。

心血管疾患：

アテローム性動脈硬化、冠状動脈疾患、高血圧症、異脂肪血症、心不全及び慢性心不全。

【 0 1 1 5 】

本発明の好ましい実施形態においては、骨関節炎又はぶどう膜炎又は炎症性腸疾患の治療は、本発明にかかる抗体又は抗体誘導体により実現することができる。

20

【 0 1 1 6 】

本発明は、本発明の抗体又は抗体誘導体分子を薬剂的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体との組み合わせで含む組成物をも提供する。

【 0 1 1 7 】

医薬組成物は、好ましくは、治療に有効な量、すなわちTNF 関連疾患又は障害を治療、改善又は予防するのに必要な、又は検出可能な治療効果又は予防効果を示すのに必要な量の本発明の抗体を含む。治療に有効な投与量は、細胞培養アッセイ、又は動物モデル、通常、げっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ又は霊長類のいずれかにおいて評価される。動物モデルは、適切な投与濃度及び投与経路を決定するためにも用いられる。本発明の抗体又は抗体誘導体の効果を観察するのに適切な動物モデルは、急性単関節炎のラットモデルである (Bolonら。(2004)、Vet. Pathol .41 : 235-243)。ヒトTNF をラットの膝関節に関節内注射し、該注射された関節内で急性の自己限定性単関節炎を引き起こさせる。抗TNF 抗体 (誘導体) の生物活性は、TNF 誘導性の膝関節腫脹の減少、及び又は炎症の組織学的パラメーターの減少により、定量可能である。

30

【 0 1 1 8 】

本発明の抗体又は抗体誘導体は非常に可溶性であるため、高い抗体濃度 (60 mgml⁻¹以上) により、少量の適用量を用いることが可能である。

【 0 1 1 9 】

本発明の抗体又は抗体誘導体は、ヒト又は動物の体内に存在する生物活性TNF の濃度を低下させることが望ましいあらゆる治療において利用することができる。TNF は体内を循環しているか、体内の特定の部位に望ましくない程度に高い濃度で局所的に存在しているであろう。本発明は、以下の方法を含む、全身的並びに局所的な適用方法の全般を提供するが、これらに限定されるものではない：経口的適用、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射、関節内注射、硝子体内注射、皮内注射又は実質内注射、エアゾール吸入、皮膚、粘膜又は眼への局所的適用、移植可能なミニポンプを介した全身的若しくは局所的放出又は徐放を可能にする移植可能な製剤 / 装置を介した局所的放出、漿膜への局所的適用、くも膜下又は脳室内適用、消化管の選択部分におけるへの制御された内腔での放出を可能にする経口適用、適切な製剤 / 装置 (例えばステント) からの局所的管内放出、膀胱への局所輸送、局所内腔放出 (例えば、胆管、輸尿管へ)、又は内視鏡装置を通じた局所輸送、

40

50

又は、コンタクトレンズ（コンタクト）からの放出。好ましい適用は、関節内注射、又は、例えば、眼への適用のような局所的適用である。双方の好ましい適用のためには、本発明の抗体は溶液内に存在する必要がある。

【0120】

本発明は、本発明の抗体又は抗体誘導体のTNF 関連疾患治療用薬物の製造のための使用をも開示する。この場合、抗体又は抗体誘導体は、治療用組成物に含まれることになる。該組成物は、薬物として、最も好ましくはTNF 関連疾患の予防又は治療のための薬物として用いられる。

【0121】

別の側面において、本発明のscFv抗体は遺伝子治療、特に養子細胞遺伝子治療において用いられる。自己免疫障害とは、自己組織へ向けられた不適切な免疫応答を意味する。抗原特異的なCD4+ T細胞及び抗原を提示した樹状細胞（DC）は、自己免疫疾患の発病における重要なメディエーターであり、従って、治療用遺伝子導入への生体外でのアプローチである養子細胞遺伝子治療のための理想的な候補である。レトロウイルスにより形質転換された細胞及びビルシフェラーゼ生物発光を用いることで、ターナーら.(2003, Ann. N. Y. Acad. Sci. 998:512-519)は、多発性硬化症、関節炎、及び肥満の動物モデルにおいて原発性のT細胞、T細胞ハイブリドーマ及びDCが、急速に及び選択的に、炎症部位に向かうことを実証している。インターロイキン及び抗TNFscFvのような、種々の「調節タンパク質」の発現を引き起こすレトロウイルスベクターにより形質導入されたこれらの細胞により、これらの免疫調節タンパク質は炎症性病巣へ輸送され、実験的な自己免疫脳炎、コラーゲン誘導性の関節炎、及び非肥満性糖尿病マウスの治療が可能になる。例えば、本発明の抗体又は抗体誘導体が、適切なレトロウイルスベクターに保持される導入遺伝子から発現される場合、該抗体又は抗体誘導体の安定可溶性フレームワークは、抗原を細胞内に輸送するのに特に適している。養子細胞遺伝子治療により、抗TNF scFvが局所的に発現されそして分泌される。Smithら.(2003)により、TNF 中和モノクローナル抗体から得られたcsFvは、(i)インビトロでTNF を中和することが可能であり、(ii)全身性ではなく、関節内で局所的にコラーゲン誘導性の関節炎を患ったマウス内におけるサイトカインの発現パターンを変化させることが可能であることが実証されている。あるいは、遺伝子治療上のアプローチの別の可能性として、抗TNF scFv抗体を連続的に発現させる適切なベクター（例えばウイルス）の、直接的な全身又は局所注射が考えられる。

【0122】

本発明の配列は以下のものである。

配列番号1 TB-AのVL

DIVMTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSRGRGYGDTFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKR

配列番号2 TB-AのVH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCTASGYTFTHYGMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRFTFSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLTIVTSS

【0123】

配列番号3 TB-BのVL

DIVLTQSPSSLSASVGDVTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKRLIYSAFNRYTGVPSPRFSRSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKR

【0124】

配列番号4 TB-BのVH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCTASGYSFTHYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADKFKDRVTLTRDTSIGTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLTIVTSS

配列番号5 FW2.3のVL

DIVLTQSPSSLSASVGDVTLTCRASQGI RNELAWYQQRPGKAPKRLIYAGSILQSGVPSRFSRSGSGTEFTLTISLQPEDVAVYYCQQYSLPYMFGQGTKLEVKR

配列番号6 FW2.3のVH

10

20

30

40

50

VTVSS

【 0 1 3 3 】

配列番号19 TB-A H_F68V、別称TB-A H68

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGYGTDFTLT I SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRVTF SLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT L
VTVSS

配列番号20 TB-A H_F70L/L72R、別称TB-A H70/72

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGYGTDFTLT I SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRFTLSRETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT L
VTVSS

10

【 0 1 3 4 】

配列番号21 TB-A H_A76I/S77G、別称TB-A H76/77

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGYGTDFTLT I SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRFTSLETS I GTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT L
VTVSS

配列番号22 TB-A L_L46R、別称TB-A L46

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKRL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGYGTDFTLT I SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT L
VTVSS

20

【 0 1 3 5 】

配列番号23 TB-A L_R65S、別称TB-A L65

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGSGYGTDFTLT I SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT L
VTVSS

【 0 1 3 6 】

配列番号24 TB-A L_Y67S、別称TB-A L67

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGSGTDFTLT I SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRFTSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT L
VTVSS

30

【 0 1 3 7 】

配列番号25 D66Gを有するTB-AのVH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHYGMNWRQAPGKGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKGRFTSLETSASTVY
MELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT LVTVSS

配列番号26 V83Fを有するTB-AのVL

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGYGTDFTLT I SSLQP
EDFAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KR

40

【 0 1 3 8 】

配列番号27 V83Aを有するTB-AのVL

DI VMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLL I YSAFNRYTGVP SRFSGRGYGTDFTLT I SSLQP
EDAAYYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEV KR

配列番号28 TB-A H43/70/71/73/77のVH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCTASGYTFTHYGMNWRQAPGQGLEWMGW INTYTGEPTYADKFKDRFTLTLDT SAGTVY
MELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT LVTVSS

【 0 1 3 9 】

50

配列番号29 TB-A H43/70/71のVH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHYGMNWRQAPGGGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDRFTLTLETSASTVY
MELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGLTVTVSS

【 0 1 4 0 】

配列番号30 TB-A H11/16/43/66/70/71/73/77/93/112のVH

QVQLVQSGAEDKKPGGSVKVSCTASGYTFTHYGMNWRQAPGGGLEWMGWINTYTGEPYADKFKGRFTLTLDTSAGTVY
MELTSLSDDTATYYCARERGDAMDYWGQGTSVTVSS

【 0 1 4 1 】

配列番号31 TB-A H_M48L/F68I

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWLGWINTYTGEPYADKFKDR|TFSLETSASTVYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

10

【 0 1 4 2 】

配列番号32 TB-A L_V83E H_V79A

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDEAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDRFTFSLETSASTAYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

【 0 1 4 3 】

20

配列番号33 TB-A Linker_G2R H_F68L

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDR|TFSLETSASTVYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

【 0 1 4 4 】

配列番号34 TB-A H_K43R/F68I

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGRGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDR|TFSLETSASTVYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

30

【 0 1 4 5 】

配列番号35 TB-A H_F68L

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDR|TFSLETSASTVYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

【 0 1 4 6 】

配列番号36 TB-A H_F68A

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDR|TFSLETSASTVYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

40

【 0 1 4 7 】

配列番号37 TB-A H_F68V/F70L

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQRPKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDR|TFSLETSASTVYMEELTSLSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGL
TVTVSS

【 0 1 4 8 】

50

配列番号38 TB-A H_F70L

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDRFTLSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT
LTVSS

配列番号39 Linker G2R

GRGGSGGGSGGGGSGGGG

【0149】

配列番号40 TB-A

DIVMTQSPSSLSASVGDRTLTCTASQSVSNDVVWYQQRPGKAPKLLIYSAFNRYTGVPSPRFSGRGYGTDFTLT|SSLQP
EDVAVYYCQQDYNSPRTFGQGTKLEVKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCTASGYTFTHY
GMNWRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPYADKFKDRFTSLETSASTVYMELTSLTSDDTAVYYCARERGDAMDYWGQGT
LTVSS

10

【0150】

本発明は以下の実施例を参照することにより、より完全に理解される。しかし、これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきものではない。全ての文献及び特許の引用は本明細書に参照により組み入れられる。

【実施例】

【0151】

実験1：scFv抗体の構築

20

ヒト化抗ヒトTNF 抗体、又は、一本鎖断片 (scFv) 又はFab断片のような抗体誘導体を作製するための出発原料は、マウスモノクローナル抗体Di62であった。軽鎖と重鎖の可変領域の配列は、Doringら。(1994, Mol. Immunol. 31:1059-1067)に記載されている。このモノクローナル抗体の特性についても、同刊行物において議論されている。簡潔に言えば、Di62は、ヒトTNF に対して濃度依存的に特異的に結合する。Di62は、高親和性抗体($K_d = 0.4nM$) であり、TNF のそのレセプターへの結合をブロックすることができる。これに加え、Di62は、ヒトTNF 誘導性の細胞毒性を、マウスL929細胞内において阻害する。

【0152】

Di62を、その報告された配列に基づいて、VL-リンカー-VHという方向にあり、該リンカー配列が、4個のグリシン及び1個のセリン残基から成る4回のリピート(Gly_4Ser)₄から構成される、一本鎖抗体誘導体 (scFv) として構築した。このscFvは、配列番号16に示すVLと配列番号17に示すVHを備えており、ここで、該scFvをTB-wtと称する。

30

【0153】

a) 潜在的な免疫原性を最小化するために、上記抗体誘導体をよりヒトの配列と類似させ、そしてb) 該抗体誘導体をより安定で溶解性のものにするを目的として、該抗体誘導体をヒト化するために、TB-wt CDR配列を、安定な可溶性のヒトフレームワーク (Auf der Maurら。(2001), FEBS Lett. 508:407-412; Auf der Maurら。(2004), Methods 34:215-224)に移植した。ヒトVL- サブグループI及びVHサブグループIを、最も近似するヒトサブファミリーとして同定した。例えば、安定性、溶解性及び発現特性のような、有益な生化学的並びに生物物理学的特性のために選択された、ヒトVLとVHの配列のプール (Auf der Maurら。(2001), FEBS Lett. 508:407-412; Auf der Maurら。(2004), Methods 34:215-224)から、適切なアクセプターフレームワークを選択した。これらの抗体フレームワークの単離と特性は、国際公開公報第W003097697号/欧州特許公開公報EP1506236号に記載されている。上記プールから、未決定の抗原結合特性を有する一本鎖抗体のフレームワークを適切なアクセプターとして同定した。このアクセプターは、ヒトVL- I領域 (配列番号5) とヒトVHI領域 (配列番号6) の組み合わせから成る。ここで、このアクセプターフレームワークを、FW2.3と称する。VLフレームワークの81個の残基のうち、TB-wtとFW2.3は、55個の同一アミノ酸残基を共有しており、これは、67%の同一性となる。VHフレームワークの87個の残基のうち、TB-wtとFW2.3は、55個の同一残基を有しており、これは、63%の同一性となる。両一本鎖抗体誘導体は、FW2.3でより長いVH-CDR3を除くと、同一のCDR

40

50

長を有する。CDR残基内のアミノ酸組成は、両scFvで異なっている。抗体可変領域のヒト化については種々の方法が記載されている(Riechmannら。(1998), Nature 332:323-327; Padlan, E. A. (1991). Mol. Immunol. 28:489-498; Roguskaら。(1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; Gonzalesら。(2005), Tumor Biol. 26:31-43; Ewert, S.,ら。(2004), Methods 34:184-199)。最小のアプローチとして、最初に、即ちTB-wtからFW2.3への全マウスCDRループの保存的転移を行った。得られたscFvは、TB-Bと称され、配列番号3に示すVL配列と配列番号4に示すVH配列を有する。TB-wt中のCDRループは、Kabat番号付け方式(Kabatら。(1991), 免疫関連性タンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第5版, Natl. Inst. Health, ベセスダ, メリーランド州)により定義され、該CDRループには、以下の残基が閉じ込められていた(図1参照):

【0154】

VL

CDR1: L24-L34 (同様のKabat番号付け)

CDR2: L50-L56 (同様のKabat番号付け)

CDR3: L89-L97 (同様のKabat番号付け)

VH

CDR1: H31-H35 (同様のKabat番号付け)

CDR2: H50-H66 (Kabat番号付け H50-H65)

CDR3: H99-H106 (Kabat番号付け H95-H102)。

【0155】

上記抗体は、TNF に効果的に結合することができなかった(図4A)。次の工程は、これら成分のどの残基を置換すると、生じるヒト化抗体の特性が最適化されるのかを決定することであった。

【0156】

外来性のアミノ酸配列の導入により、ヒト体内における抗体又は抗体誘導体の免疫原性のリスクが高まることから、ヒトアミノ酸残基の他のアミノ酸との置換は最小に留めるべきであるので(Gonzalesら。(2005), Tumor Biol. 26:31-43)、複数の変異体を構築した。免疫原性のリスクを最小化するが依然として十分な結合活性を示すことを目的として、ここでTB-B L46 (VLが配列番号11; VHが配列番号4)と称する、前記変異体のうちの1つを構築した。この変異体は、TB-Bをその基本とし、VLの第46番目の位置に、即ちRからLへの単一アミノ酸変異を1つ含む。このアミノ酸は、軽鎖の上部コア内に位置し、二量体の接合に参与する。該アミノ酸は、L-CDR1のコンフォメーション決定に参与しており、VH/VLのパッキングに影響を与える。この特別の位置においては、ロイシン残基が好ましいことが報告された(PCT/US03/19333)。TB-Bとは対照的に、scFv TB-B L46は、一定のTNF特異的結合を維持する(図4A; K_d 100 nM)。

【0157】

更にTNF 結合活性を改善するため、VLの第4番目、第46番目、第65番目、第67番目、第70番目の残基、及び/又はVHの第28番目、第43番目、第68番目、第70番目、第71番目、第72番目、第73番目、第76番目、第77番目の残基の1又は2箇所以上において、1又は2個以上の更なる置換を作り出した。ここで、全ての位置において置換を有する変異体を、TB-Aと称する(VLが配列番号1; VHが配列番号2)。

【0158】

更に、本発明に係る特定の抗TNF 抗体に関し、L-CDR1及びL-CDR2から誘導されたペプチドを用いた競合アッセイでは、両CDRループが、scFvの該抗原への結合に重要なことが示された(Doringら。(1994), Mol. Immunol. 31:1059-1067)。

【0159】

結合の維持に必要な非ヒト残基の数を最小化し、そして生物物理学的特性(安定性及び可溶性)を最適化することを狙った更なる実験では、系統的変異導入とドメインシャフリングを用いて、マウスVL及びVH領域並びにヒト化VL及びVH領域間の機能的差異を明らかにした。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 0 】

ドメインシャufflingにより、二種類の変異体を得た。第一の変異体は、グリシンセリンリンカー（配列番号 1 0）を介してTB-B由来のVH領域と連結したTB-A由来のVL領域から構成され、TB-AB（配列番号 1 2）を生じた。第二の変異体、TB-BAは、前記第一の変異体の反対であり、即ち、TB-B由来のVL領域が、TB-AのVH領域と組み合わせられている（配列番号 1 3）。

【 0 1 6 1 】

TB-Aの系統的変異導入により、更なる変異体を作製した。図 1 には、TB-AとTB-BのVL及びVH配列の配列比較が示されている。TB-AとTB-B間では、全部で、14個のフレームワーク残基が異なっている（アスタリスク）。それらのうち、第4番目及び第70番目のVL残基、並びに第28番目、第71番目及び第73番目のVH残基の5つの残基だけが、その大きさと特性において僅かな差異のみを示しており、従って、この時点においては、変異導入として考慮されなかった。以下のフレームワークの位置を、TB-B由来の対応するアミノ酸で置換した。これらのTB-Aの単一又は二重変異体は、以下の通りである：

【 0 1 6 2 】

TB-A H43 KからQへ 接合部（配列番号 1 8）
 TB-A H68 FからVへ 外部ループVH（配列番号 1 9）
 TB-A H70/72 FからL、LからRへ 外部ループVH（配列番号 2 0）
 TB-A H76/77 AからI、SからGへ 外部ループVH（配列番号 2 1）
 TB-A L46 LからRへ 接合部（配列番号 2 2）
 TB-A L65 RからSへ 外部ループVL 配列番号 2 3）
 TB-A L67 YからSへ 外部ループVL（配列番号 2 4）

【 0 1 6 3 】

種々の要因が、抗体又は抗体誘導体の免疫原性に影響する可能性がある(Gonzalesら. (2005), Tumor Biol. 26:31-43)。ヒト化TB-A scFvの可変領域の非ヒト含有量を更に低下させるため、マウスVLのCDR2ループ及びCDR3ループ、並びにマウスVHのCDR2ループを、FW 2.3からの対応するヒトCDRループと置換した。得られた構築物を、ここで、それぞれTB_L2（配列番号 7）、TB_L3（配列番号 8）、及びTB_H2（配列番号 9）と称する。

【 0 1 6 4 】

マウスモノクローナル抗体Di62の一本鎖型と、TB-B及びTB-Aの2種類のヒト化型をコードするcDNAを、遺伝子合成（www.genscript.com）により作製した。標準的なクローニング方法に従って、PCR誘導性の部位特異的変異導入により他の変異体（TB-B L46、TB-A H43、TB-A H67、TB-A H69/71、TB-A H75/76、TB-A L46、TB-A L65、TB-A L67、TB-A V83F、TB-A V83A、TB-A D66G）の全ての点変異を導入した。PCRと最新のクローニング方法により、TB-AのマウスCDRループの、FW2.3からのヒトCDRループとの置換を達成した。配列番号 2 8、配列番号 2 9、及び配列番号 3 0 に開示される全てのVH TB-A変異体をコードするcDNAを、完全長遺伝子合成により実現した。

【 0 1 6 5 】

いくつかの更なる好ましいTB-Aが、配列番号 3 1 乃至配列番号 3 8 に開示されている。これらの抗体は、以下の表 1 に示すように、非常に安定で可溶性であることが判明した。

全てのscFv断片を、大腸菌内でのペリプラズム生成用の発現ベクター（Krebberら. (1997), J. Immunol. Methods 201:35-55）にクローニングした。

【 0 1 6 6 】

上記の一本鎖抗体誘導体（scFv）に加え、対応するFab断片を以下のように作製した。選択した軽鎖可変領域（VL）をヒトIg 鎖の定常領域に融合させ、一方で、適切な重鎖可変領域（VH）をヒトIgGの第1（N末端）定常領域（CH1）に融合させた。ヒト脾臓cDNAライブラリーから、PCRにより両ヒト定常領域を増幅すると、c -のための配列番号 1 4 に示す配列と、CH1のための配列番号 1 5 が生じた。

【 0 1 6 7 】

実験2：ヒト化scFv又はFab抗体の発現、生産及び安定性

10

20

30

40

50

TB-wt、そのヒト化誘導体、又はFab断片をコードするプラスミドを、ペリプラズム発現用の適切な大腸菌株（例えば、JM83）に導入した。前記scFv変異体を、例えば、BL21大腸菌株内で、封入体としても発現させた。封入体のリフォールディングと、これに続く、例えば、ゲルろ過等の精製により、機能的な一本鎖抗体を得た。

【0168】

通常の振とうフラスコを用いた標準的な実験室培養条件下（dYT培地で、200 rpmの振とう下で、30 にて約3時間の誘導時間）での前記scFvのペリプラズム発現により、1リットルの培養毎に0.5 mgないし12 mgの範囲の発現が得られた。安定性と溶解性に基づいて選択されたフレームワークについての我々の先の分析（Auf der Maur, ら. (2004), Methods 34:215-224）から予想されるように、一般的に、ヒト化誘導体の配列が、アクセプターフレームワーク（FW2.3）の配列に近似する程、バクテリア内での発現でより高い収量が得られることが観察された。例えば、TB-Bの発現から得られる収量は、TB-Aの発現から得られる収量よりも遥かに高い。この発見に従い、TB-A内に存在する異なったアミノ酸残基数を減少させることで、発現収量に対するプラスの効果が示された（図3A）。

【0169】

本発明に係る抗体又は抗体誘導体の他の重要な特徴は、その溶解性である。図3Bには、リン酸緩衝食塩水中における可溶性における、フレームワークTB-Aのドナーフレームワーク（TB-wt）に対する優位性が示されている。分析用ゲルろ過においては、TB-Aは、主にモノマー状態で移動するが（70mlにおいてピーク）、一方で、TB-wtは、凝集体を形成する強い傾向を示す（50mlにおいてピーク）。上記に加え、TB-Aとその特定の誘導体の最大溶解度を、PEG沈降法により評価した（Athar .DH. ら. JBC. 1981, 256;23. 12108-12117）。簡潔に言うと、テストタンパク質の見かけの溶解度を、ポリエチレングリコール3000（PEG3000）の存在下で測定した。タンパク質-PEG300混合物を遠心した上澄中のタンパク質濃度を測定することにより、溶解度曲線を決定した。全ての曲線は、 $\log S$ (mg/ml) がPEG3000の濃度(%、w/v)に直線的に依存していることを示した。テストタンパク質の最大溶解度 (S_{max}) を、0%のPEGに対する線形回帰の外挿により評価した（表1）。TB-Aについては、 S_{max} は約70 mg/mlであると計算された。全てのテストタンパク質が、格別に良好な可溶性を示した。第二のアプローチでは、（self-interaction -chromatography）（SIC）と呼ばれる手法を用いて、PBS（pH 6.5で50 mMのリン酸、150 mMのNaCl）中で1 mg/mlの濃度にある、TB-A（配列番号40）、TB-A リンカー_G2R_H_F68L（配列番号33）、TB-A H_K43R/F68L（配列番号34）及びTB-A H_F68L（配列番号35）の分子間引力/斥力を評価した。この方法では、対象タンパク質は、多孔性の固定相に固定化されてカラムに充填される。遊離タンパク質（移動層）と固定化タンパク質間の相互作用は、保持容量のシフトとして検出される。分子間引力/斥力の尺度となる、タンパク質浸透第2ヴィリオン係数 B_{22} （protein osmotic second virion coefficient B_{22} ）を、Tessier, PM ら. Biophys . J. 2002, 82: 1620-1632、に従って計算した（表1）。 B_{22} がより高い正值であるほど、テストタンパク質の分子間引力は小さく、従って、その溶解度が高い。テストタンパク質配列の高い類似性から、異なるタンパク質の B_{22} 値が、相互に直接比較可能であると仮定した。

【0170】

【表 1】

表 1 : TB-A誘導体の可溶性特性

配列	pI	Log S _{max}	B ₂₂ 値 (SIC)
TB-A	7.8	1.84 ± 0.13	-24.5x10 ⁻⁴ ± 3.8x10 ⁻⁴
TB-A H_M48L/F68I	7.8	nd	nd
TB-A L_V83E H_V79A	6.58	nd	nd
TB-A リンカー_G2R H_F68L	8.2	1.91 ± 0.09	1.59x10 ⁻³ ± 5.9x10 ⁻⁵
TB-A H_K43R/F68I	7.8	1.86 ± 0.02	1.28x10 ⁻³ ± 3.0x10 ⁻⁴
TB-A H_F68L	7.8	1.88 ± 0.07	1.06x10 ⁻⁴ ± 2.9x10 ⁻⁵
TB-A H_F68A	7.8	nd	nd
TB-A H_F68V/F70L	7.8	nd	nd
TB-A H_F70L	7.8	nd	nd

10

20

【 0 1 7 1 】

また、本発明に係る抗体又は抗体誘導体の他の関連する特徴は、その高い安定性である。TB-A、TB-A H_M48L/F68I (配列番号 3 1)、TB-A リンカー_G2R H_F68L (配列番号 3 3)、TB-A H_K43R/F68I (配列番号 3 4)及びTB-A H_F68L (配列番号 3 5)のタンパク質安定性を、アンフォールディングが開始する温度を218 nmと292 nmの両方における円二色性及び光散乱によって測定することにより評価した(表 2)。この実験において、TB-Aは、53

の温度でアンフォールディングを開始したが、その誘導体であるTB-A H_M48L/F68I (配列番号 3 1)、TB-A リンカー_G2R H_F68L (配列番号 3 3)、TB-A H_K43R/F68I (配列番号 3 4)及びTB-A H_F68L (配列番号 3 5)は、増加した熱安定性を示した(56 及び58)。

全てのテストタンパク質は、不可逆性の変性を示し、アンフォールディングにより沈殿し、融解温度を決定することが可能となった。不可逆的過程における移行の midpoint を決定するため、塩酸グアニジン (GdnHCl)によりアンフォールディングを誘発し、アンフォールディングしたタンパク質を溶液中に維持した。このアプローチでは、蛍光放出極大を蛍光測定法により測定して、アンフォールディングを追跡した。この装置において、TB-Aは、2.07 MのGdnHClにおいて移行の midpoint を有する良好な安定性を再度示した。熱によるアンフォールディングからの結果と一致して、誘導体であるTB-A リンカー_G2R H_F68L (配列番号 3 3)及びTB-A H_K43R/F68I (配列番号 3 4)は、より高い移行 midpoint、各2.33 Mと2.3 M

30

40

【 0 1 7 2 】

【表 2】

表 2 : TB-A誘導体の安定性特性

配列	変性の開始[°C]	移行中点での [GdnHCl]
TB-A	53	2.07 M
TB-A H_M48L/F68I	58	nd
TB-A L_V83E H_V79A	nd	nd
TB-A リンカー_G2R H_F68L	58	2.33 M
TB-A-QC15.2	56	2.30 M
TB-A-QC23.2	58	nd
TB-A H_F68A	nd	nd
TB-A H_F68V/F70L	nd	nd
TB-A H_F70L	nd	nd

10

20

【 0 1 7 3 】

ヒト血清、ヒト尿、ブタ硝子体液及びブタ前房液中のTB-Aの安定性を、各体液、又はポジティブコントロールとしてのアッセイ用バッファー (TBSTM) 中で37 °Cにて3日間インキュベーションした後に、TB-AのTNF 結合活性を測定することにより評価した。TB-Aを、10 µMの終濃度となるまで体液で希釈した。前記インキュベーション時間の後、TB-Aの結合定数 K_d を決定するために、サンプルの希釈系列をELISAでアッセイした (図 1 1)。体液のサンプルをポジティブコントロールのTBSTMサンプルと比較した場合、 K_d のより高い濃度へのシフトは、前記インキュベーション時間における活性タンパク質の減少を示すものとなるであろう。しかしながら、我々の実験では、そのようなシフトは検出できず、抗体の高い安定性により、全ての体液アッセイにおいて、完全に活性なTB-Aの量が一定に保たれたことが示されている。

30

【 0 1 7 4 】

実験 3 : ヒト化抗体誘導体の結合特性

全てのヒト化scFv変異体の組換えヒトTNF に対する結合特性を、ELISAにて試験した。全変異体の解離定数 (K_d) は、0.8から10'000nMを超える範囲内にあった。ヒトのアクセプターフレームワークに対するホモロジーの程度と、個々の結合体の親和性の間には、負の相関関係が存在するように思われる (図 4 A)。にも関わらず、TB-Bの配列の方に向かう突然変異を含むいくつかのTB-A変異体は、TB-Aと同程度のヒトTNF に対する親和性を示した。図 4 B には、ELISAで比較した場合に、TB-Aと類似する親和性を示す、発現収量が向上された2種類のTB-Aの誘導体 (図 3 A と比較) が示されている。

40

【 0 1 7 5 】

TB-Aは、発現収量の見掛け上のトレードオフと親和性との間に良好な折衷を現している。親和性に関して、TB-Aの一本鎖型とFab断片型の間には有意差は検出できなかった (データは提示されない)。

【 0 1 7 6 】

TB-AのTNF に対する親和性と結合速度も、表面プラスモン共鳴 (BIACore) で測定したところ、解離定数 $K_d = 0.8$ nM、オフ速度 $k_{off} = 4.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 及び オン速度 $k_{on} = 5 \times$

50

$10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ という結果になった。

【 0 1 7 7 】

実験 4 : L929細胞毒性アッセイ

インビボでTNF を中和する抗体又は抗体誘導体の機能は、培養マウスL929繊維芽細胞、又はこれに代わるものとしてヒトKYM-1骨髄肉腫細胞に対するTNF の細胞毒性の阻害を測定することにより試験することができる(表3)。Di62のヒト化scFv誘導体は、図5Bに示すように、L929アッセイにおいて異なる有効性を示す。いくつかのscFv誘導体は、5ng/mlの範囲の IC_{50} (50%の阻害を達成する抑制濃度)値を示すが、それ以外のものは、L929アッセイにて効果を示さなかった。ELISAのデータとL929アッセイの結果が、必ずしも相関関係を有するわけではない。しかしながら、KYM-1データとL929の結果は、効果を認めるためにより一層高い濃度の組換えヒトTNFと、その結果としてより一層高い濃度のアンタゴニストを必要としたという唯一の違いを有するだけで、良好な相関関係を示した。従って、主としてKYM-1を用いてL929の結果を確認した。テストタンパク質の直接比較のため、力価をTB-Aに対して正規化された相対値($EC_{50}X / EC_{50}TB-A$)として表した。しかしながら、一般的に、結合体の配列がヒトアクセプターフレームワーク(FW2.3)に近似するにつれて、 IC_{50} 値は再度高くなるものである。図5では、TB-Aの異なる誘導体の、マウスL929繊維芽細胞に対するTNF 誘導性細胞毒性をブロックするための力価が比較されている。450nmの吸光度は、細胞の生存と関連している。

【 0 1 7 8 】

TB-Aと抗hTNF IgGインフリキシマブ(Infliximab)(登録商標)は、L929アッセイにおいて同程度の IC_{50} 値を示すが、一方で、ヒトTNF 誘導性細胞毒性をブロックするTB-wtの力価は、著しく低いものであった(図5A)。TB-A誘導体を、そのTNF 誘導性細胞毒性をブロックする能力についてTB-Aと比較した場合、TB-H43を除くこれら誘導体の殆どが、L929において低下した有効性を有する(図5B)。

【 0 1 7 9 】

【表3】

表3 : TB-A誘導体の機能特性

配列	相対力価 : $EC_{50}X / EC_{50}TB-A$	
	L929細胞	KYM-1細胞
TB-A	1.0	1.0
TB-A H_M48L/F68I	1.1	1.6
TB-A L_V83E H_V79A	nd	nd
TB-A リンカー_G2R H_F68L	0.8	1.3
TB-A-QC15.2	1.37	1.5
TB-A-QC23.2	1.32	1.5
TB-A-H_F68A	1.14	nd
TB-A H_F68V/F70L	1.28	nd
TB-A H_F70L	2.7	nd

【 0 1 8 0 】

前記ELISAのデータと一致して、TB-AのscFv型とFab型の間に、TNF 誘導性細胞毒性をブロックする能力に有意差はない(図5C)。TB-A Fab型の IC_{50} 値は、TB-A scFv型の IC_{50} 値の2倍よりも高く(図5C)、恐らく主として、Fab断片のより高い分子量の結果生じたものであろう。

【0181】

実験5：抗TNF 抗体誘導体を用いた動物実験

5.1. 実験の説明

ESBATech社の抗TNF 抗体誘導体(scFvとFab)が、インビボでの状況においてヒトTNFの生物活性を機能的に中和する有効性を試験するために、最近発表された急性単関節炎のラットモデルを用いた。このモデルについては、Bolonとその同僚によりその多くが説明されている(Bolonら.(2004), Vet. Pathol. 41:235-243を参照)。簡潔に言うと、この関節炎モデル動物については、オスのLewisラットの膝関節に、ヒトTNF が関節内注射される。ヒトTNF 注射は、注射された関節において、急性の、自己限定性単関節炎を引き起こす。関節炎は、関節腫脹の測定と組織学的採点法により定量化することができる。従って、個々のTNF アンタゴニストの生物活性は、TNF 誘導性関節腫脹の減少及び/又は炎症の組織学的パラメーターの減少により定量化することができる。

【0182】

5.2. 材料と方法

[実験の設計]

市販の抗体インフリキシマブ(Infliximab)(レミケード(Remicade)(登録商標))を用いて、上記の系列の代表的なscFv抗体と、代表的なFab抗体の、適切な関節炎動物モデル内でヒトTNFの生物活性を阻害するそれぞれの能力を試験するように、本実験を設計した。Bolonとその同僚は、先に、10マイクログラムの組換えヒトTNFをラットの膝関節へ関節内投与することにより、標準的な巨視的及び微視的解析により定量可能な、急性の、自己限定性単関節炎が引き起こされることを示した。従って、この動物モデルは、局所的に投与される抗体誘導体の治療効果を評価する理想的な系として機能した。2種類の実験を連続して完了させた(表4及び5)。1)抗体のヒトTNF 誘導性単関節炎をブロックする全体的な能力を評価する、基本的な効果実験;及び2)抗体誘導体の相互の相対的效果を評価する用量反応実験。サイトカインと抗体誘導体の両方を、以下に記載するように、別々の注射により一回だけ投与した。使用されたサイトカインの投与量は、Bolonとその同僚による発表に基づくものであったが、抗体誘導体の投与量の範囲は、利用可能な細胞培養データと経験に基づく推測に基づくものであった。一般的な動物保護ガイドラインに沿って実験を行った。

【0183】

[動物と飼育]

若い成体のオスのLewisラット(6-7週で175-200g)を無作為に処理群に選定し(n=3/コホート)、そしてBolonら.((2004), Vet. Pathol. 41:235-243)に従って飼育した。

【0184】

[サイトカインと抗体の点滴注入]

Bolonとその同僚による記載に従って、麻酔とサイトカインの注射を行った。50マイクロリットルの総関節内注射量を超えさせないため、10マイクログラムの組換えヒトTNFを10マイクロリットルのフィルター滅菌リン酸緩衝食塩水(PBS)中のものとして注射し、各投与量の各抗体を40マイクロリットルのフィルター滅菌リン酸緩衝食塩水中のものとして、サイトカインと抗体誘導体を2つの別々の関節内注射により点滴注射した。関節内投与されたインフリキシマブ(Infliximab)/レミケード(Remicade)(登録商標)で処理された動物に、ヒトTNFの関節内注射の3時間前に抗体誘導体を腹腔内注射した。関節内投与された抗体で処理された全ての動物体内に、ヒトTNF注射の5分前に各抗体投与量を注射した。コントロールの動物には、ヒトTNFを含まないPBSを10マイクロリットル注射した。

【0185】

本実験で使用したインフリキシマブ (Infliximab) /レミケード (Remicade) (登録商標) は、スイス国内の正式な薬局から購入した。抗ヒトTNF 特異的scFv及びFab (TB-A) 抗体と、前記用量反応実験で非特異的コントロール抗体として用いた未処置のscFv抗体フレームワークを、大腸菌内で発現させて、標準的方法により精製した。リポ多糖成分は、TNF の潜在的な誘発因子であるので、エンドトキシンの混入を、全ての調製において、タンパク質1ミリグラム中に10EU未満に維持した。

組換えヒトTNF は、ペプロテックECリミテッド社 (PeptoTech EC Ltd) から購入した。

【0186】

〔関節直径の測定〕

それぞれ腹腔内若しくは関節内に投与される抗体誘導体の注射の直前、又は、コントロール動物の場合は、PBS又はTNF の注射の前に、注射される膝関節の直径を標準的なカリパスにより測定した。TNF (又はコントロール動物ではPBS) の注射の48時間後、かつ動物を安楽死させる直前に、注射された膝関節の直径を再度測定し、第一の直径測定値から第二の直径測定値を差し引くことにより、関節腫脹を計算した (図6及び9)。

10

【0187】

〔組織処理〕

TNF (又はコントロール動物ではPBS) の注射の48時間後に、動物を安楽死させた。Boltonとその同僚により記載されるように、検死時に注射した膝を足と大腿から分離し、70%エタノールへの浸漬により無傷のまま固定し、標準的なヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を進めた。

20

【0188】

〔形態学的分析〕

関節の炎症を測定するための組織学的採点分析を、Boltonとその同僚により記載される通りに行った。関節の炎症を評価するための組織学的採点基準を、Boltonとその同僚に従って適用した (図7、8及び10)。

【0189】

5.3. 結果

表4に示すように、第一の一連の実験において、関節内に投与されたESBATEch社のscFv抗体、TB-A、及び対応する関節内に投与されたESBATEch社のFab抗体の代表例を、それらの関節内と腹腔内に投与されたインフリキシマブ (Infliximab) /レミケード (Remicade) (登録商標) による急性単関節炎の誘発をブロックする能力について比較した：

30

【0190】

【表 4】

表 4：注射の図式 実験1

群	PBS中のTNF α (μ g)	阻害剤	投与量 (μ g)
1 (n=3)	0	無し	
2 (n=3)	10	無し	
3 (n=3)	0	TB-A scFv	180
4 (n=3)	10	TB-A scFv	180
5 (n=3)	0	TB-A Fab抗体	450
6 (n=3)	10	TB-A Fab抗体	450
7 (n=3)	10	TB-A Fab抗体	180
8 (n=3)	0	インフリキシマブ (Infliximab) (関節内)	450
9 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (関節内)	450
10 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (関節内)	180
11 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (腹腔内)	450
12 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (腹腔内)	180

10

20

30

【0191】

膝の直径の変化に対する治療効果 (TNF 誘導性関節腫脹に対する効果の指標として) に関して得られた結果を図 6 に示した。全ての抗体は、TNF 誘導性関節腫脹を完全にブ

40

ロックした。

【0192】

関節の炎症に対する治療効果を評価するため、HE染色された組織スライドの組織学的採点を行った。以下の基準に従って関節の炎症を採点した (代表的な採点例については図 7 を参照) :

【0193】

スコア 0 : 正常

スコア 1 : 滑膜表層の軽度の肥厚

スコア 2 : 滑膜表層の肥厚とサブライニング (sublining) の軽度の炎症

スコア 3 : 滑膜表層の肥厚とサブライニング (sublining) の中程度の炎症

50

【 0 1 9 4 】

組織学的炎症スコアに対する治療効果に関して得られた結果を図 8 に示す。

組織学的炎症スコアに対して、全ての治療で同程度の効果が観察された。

【 0 1 9 5 】

第二の一連の実験において、評価対象の抗体誘導体に対する相対的な用量反応を比較した。表 5 に示すように、実験1の代表的な関節内に投与されたESBATech社のscFv抗体TB-A及び対応する関節内に投与されたFab抗体を、関節内及び腹腔内に投与された（Infliximab）/レミケード（Remicade）（登録商標）及びヒトTNF に対する結合活性が完全に欠如した無関係のscFv抗体と、実験1と比較してより広く異なる投与量の範囲に渡って比較した。

【 0 1 9 6 】

【表 5】

表 5 : 注射の図式 実験 2

群	PBS中のTNF α (μ g)	阻害剤	投与量 (μ g)
1 (n=3)	0	無し	
2 (n=3)	10	無し	
3 (n=3)	10	無関係のscFv抗体	180
4 (n=3)	10	TB-A scFv抗体	156
5 (n=3)	10	TB-A scFv抗体	45
6 (n=3)	10	TB-A scFv抗体	11
7 (n=3)	10	TB-A Fab抗体	156
8 (n=3)	10	TB-A Fab抗体	45
9 (n=3)	10	TB-A Fab抗体	11
10 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (関節内)	156
11 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (関節内)	45
12 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (関節内)	11
13 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (腹腔内)	156
14 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (腹腔内)	45
15 (n=3)	10	インフリキシマブ (Infliximab) (腹腔内)	11

【 0 1 9 7 】

膝の直径の変化に対する治療効果 (TNF 誘導性関節腫脹に対する効果の指標として) に関して得られた結果を図 9 に示す。

組織学的炎症スコアに対する治療効果に関して得られた結果を図 10 に示す。

【 0 1 9 8 】

まとめると、代表的なESBATEch社の抗TNF scFv及び代表的なESBATEch社の抗TNF Fa

10

20

30

40

50

b抗体の両方が、局所（関節内）投与により、ヒトTNF 誘導性単関節炎のブロッキングに非常に効果的であった。

【0199】

以上に本発明の好ましい態様を示し、説明しているが、本発明はこれに限定されるものではなく、以下の請求項の範囲内で、他の方法で様々な具現化可能であり、そして実行可能であることが明確に理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0200】

【図1】図1は、最も高頻度な変異の範囲を区切るTB-A及びTB-Bの配列と共に、scFv抗体のスキームを示す。アスタリスクは、本発明の抗体のフレームワークにおいて、アミノ酸の変異が許容される位置を示す。CDR（CDRはグレーの背景で強調される）の下に示されたアミノ酸は、各々のCDRにおいて使用できる。

10

【図2】図2は、Fab断片の発現に関する典型的なスキームを示す。

【図3A】図3は、大腸菌中で発現された際のscFvsの産生収率を示す。図3Aは、発現されたタンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。

【図3B】図3Bは、TB-Aの優れた溶解性を示すTB-A及びTB-wtのゲルろ過分析。

【図4】図4は、ELISAにより測定されたTNF に対する異なるscFv抗体の親和性の比較を示す。

【図5A】図5は、マウスL929繊維芽細胞中でのヒトTNF 誘導性細胞障害性の阻害を示す。図5AはTB-wt及びインフリキシマブ(infliximab)とのIC₅₀値を用いた比較における、TB-Aの濃度依存阻害。

20

【図5B】図5Bは、ブロックTNF 誘導性細胞毒性を阻害するTB-A誘導体の比較。

【図5C】図5Cは、TB-AのScFv型とFab型との比較。

【図6】図6は、ラット体内でのヒトTNF 誘導性関節腫脹に対する抗体治療の効果を示す（実験：5.3.、実験1）。

【図7】図7は、病理組織学的な炎症採点法のための採点スキームを示す。

【図8】図8は、ラット体内でのヒトTNF 誘発関節炎症に対する抗体治療の効果を示す（実験：5.3.、実験1）。

【図9】図9は、ラット体内でのヒトTNF 誘導性関節腫脹に対する抗体治療の効果を示す（実験：5.3.、実験2）。

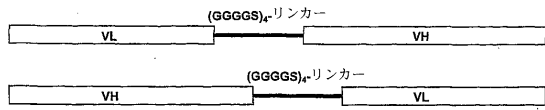
30

【図10】図10は、ラット体内でのヒトTNF 誘導性関節炎症に対する抗体治療の効果を示す（実験：5.3.、実験2）。

【図11】図11は、異なる体液中でのTB-Aの安定性を示す。

【図1】

ScFv抗体



VL

TB-A DIVMTQSPSS LSASVGRVLTCTASGQVYSDYNYQQRPGKAPKLLI
 TB-B DIVLTQSPSS LSASVGRVLTCTASGQVYSDYNYQQRPGKAPKRLI
 * R GIR ELA * A

TB-A ~~Y~~LVVYGVPS RFGSGRGYTD FLLTISSLQPEDVAVIYCDYNSPRRFGQ
 TB-B ~~Y~~LVVYGVPS RFGSGSGYTE FLLTISSLQPEDVAVIYCDYNSPRRFGQ
 GSILQS * * * * Y SL YM

TB-A GTKLEVKR
 TB-B GTKLEVKR

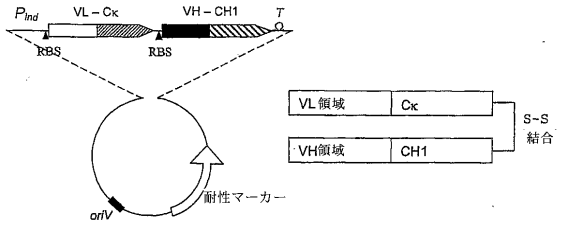
VH

TB-A QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCTASGYTFT ~~Y~~WGHWVRQA PGKLEWMC
 TB-B QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCTASGYSTF ~~Y~~WGHWVRQA PGQLEWMC
 * * * * G FLH * * R

TB-A ~~Y~~LVVYGVPS ~~Y~~LVVYGVPS SLETSASTVY MELTSLTSDDTAVIYCAR
 TB-B ~~Y~~LVVYGVPS ~~Y~~LVVYGVPS TRDTSIGTVY MELTSLTSDDTAVIYCAR
 PDS DTI Q QG * * * * * * * * * * * VP

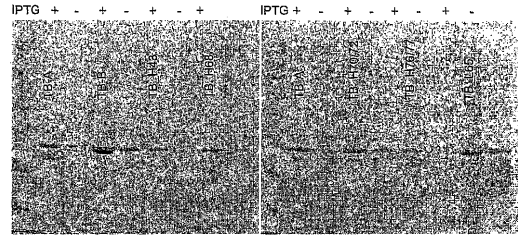
TB-A RG ~~Y~~LVVYGVPS ~~Y~~LVVYGVPS TLTVSS
 TB-B RG ~~Y~~LVVYGVPS ~~Y~~LVVYGVPS TLTVSS
 TYLDPW Y F * *

【図2】

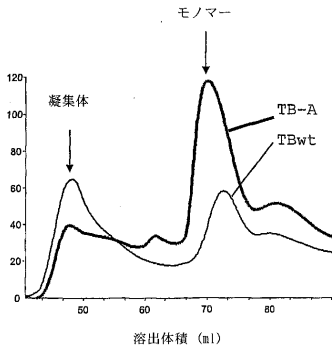


【図3A】

大腸菌内での発現による scFv の生産収量

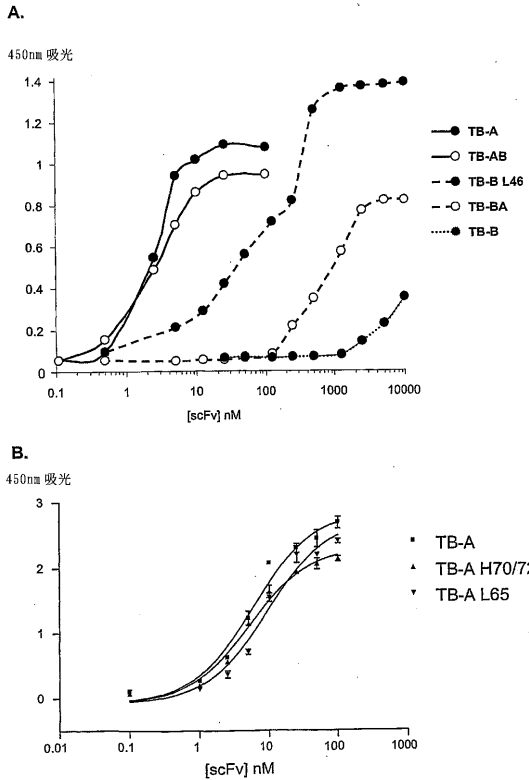


【図3B】



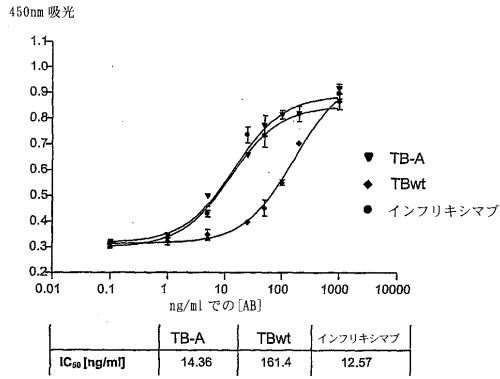
【図4】

ELISAによる親和性の比較

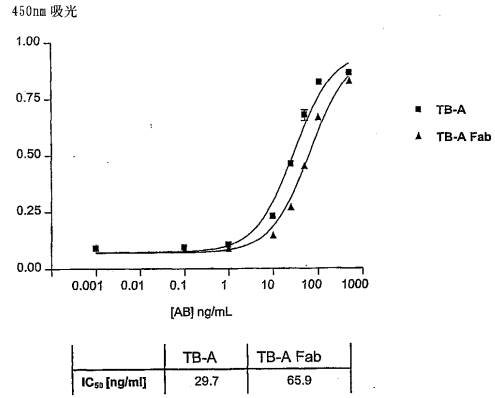


【 図 5 A 】

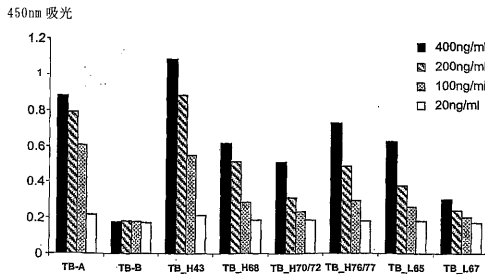
L929 細胞内での TNF 誘導性細胞毒性の阻害



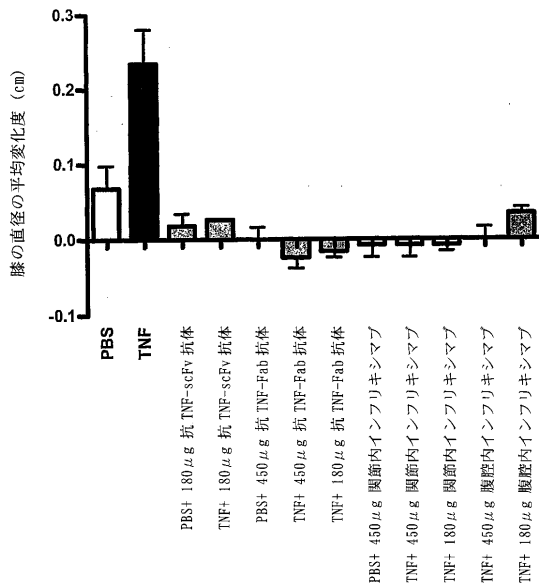
【 図 5 C 】



【 図 5 B 】

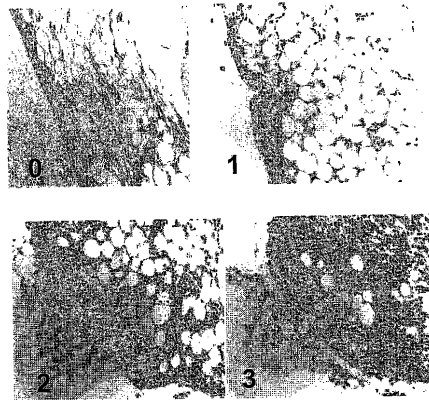


【 図 6 】

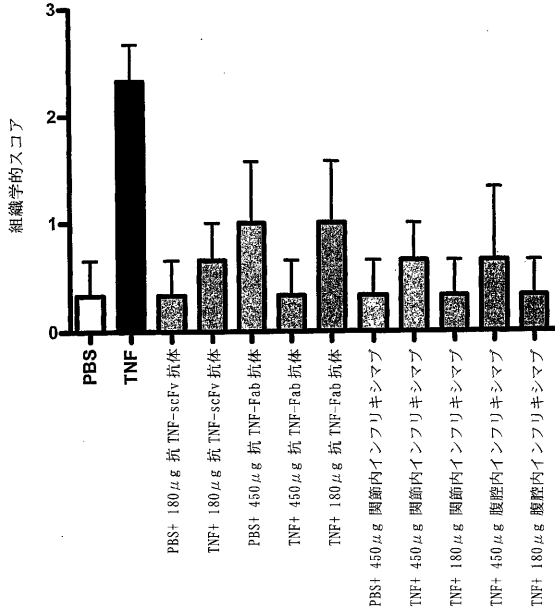


【 図 7 】

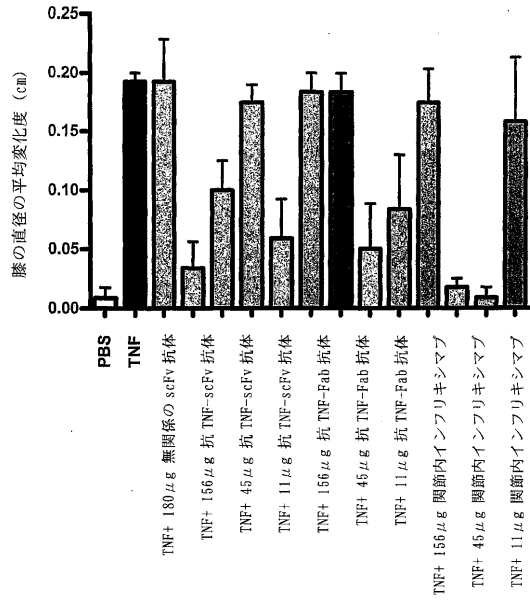
Figure 7



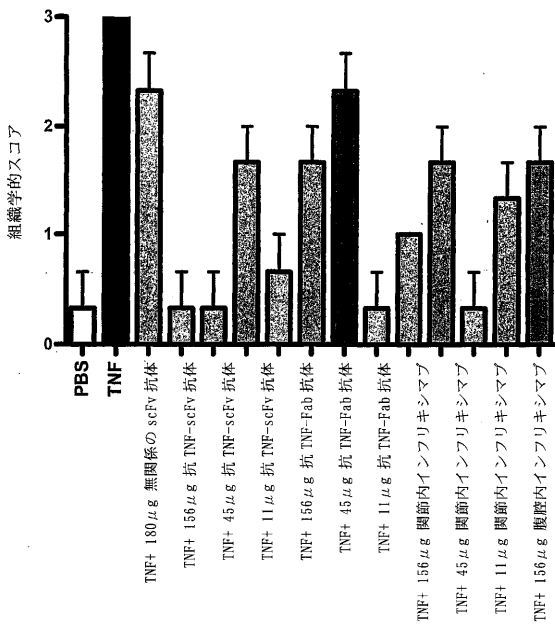
【 図 8 】



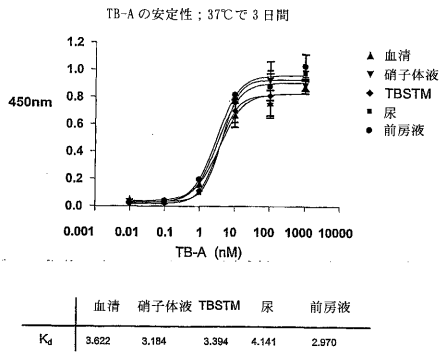
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【配列表】

0005089582000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00 1 0 1

(74)代理人 100092967

弁理士 星野 修

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 エヴェルト, シュテファン

スイス国 4 1 2 3 アルシュヴィル, バーセルマツヴェーク 2 1 1 ベー

(72)発明者 バルベリス, アルツィド

スイス国 8 1 4 2 ウィティコン, シュリエレンシュトラッセ 5

(72)発明者 ウーレヒ, ダーヴィット・エム

スイス国 8 7 0 8 メンネドルフ, シュレイナーヴェーク 5

(72)発明者 アオフ・デア・マオル, アードリアン

スイス国 8 0 5 0 チューリヒ, ヘルプストヴェーク 1 1 0

(72)発明者 リヒトレン, ペーター

スイス国 8 1 3 4 アードリスヴィル, ゾオドライン 3

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 Molecular immunology. 1994, Vol.31, No.14, p.1059-1067

Methods. 2005 May, Vol.36, No.1, p.11-24

Journal of molecular biology. 2001, Vol.305, No.5, p.989-1010

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-19/00

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq