

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

**特許第4418745号  
(P4418745)**

(45) 発行日 平成22年2月24日(2010.2.24)

(24) 登録日 平成21年12月4日(2009.12.4)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/18

Z N A

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/395

N

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/53

D

請求項の数 8 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2004-506753 (P2004-506753)
(86) (22) 出願日	平成15年5月28日 (2003.5.28)
(65) 公表番号	特表2005-529154 (P2005-529154A)
(43) 公表日	平成17年9月29日 (2005.9.29)
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/016619
(87) 国際公開番号	W02003/099226
(87) 国際公開日	平成15年12月4日 (2003.12.4)
審査請求日	平成18年5月29日 (2006.5.29)
(31) 優先権主張番号	60/383,765
(32) 優先日	平成14年5月28日 (2002.5.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	PCT/US03/08608
(32) 優先日	平成15年3月20日 (2003.3.20)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	507073918 ユセベ フアルマ ソシエテ アノニム ベルギー国、バー — 1070 ブリュ ッセル、アレードラルシェルシュ 60
(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 瞳
(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 瞳
(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 嶰夫
(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体PEG位置異性体、それを含む組成物及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下に示す軽鎖と重鎖を有する、PEG結合抗体分子。

## 【化1】

軽鎖：

DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNVTNVAVYQQKPGKAPKALIY  
 SASFLYSGVPYRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNIYPLTFG  
 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQ  
**214**  
 GLSSPVTKSFNRGEC  
 |  
 PEG

10

重鎖：

K (挿入)

↓  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYVFTDYGMNWVRQAPGGLLEWMGWI  
 NTYIGEPIYADSVKGRFTSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYR  
 SYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  
 PEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC  
**221**      **227**  
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

20

## 【請求項2】

30

TNFに特異性を有する、請求項1記載のPEG結合抗体分子。

## 【請求項3】

Fab断片である、請求項1又は2記載のPEG結合抗体分子。

## 【請求項4】

前記PEGが分枝PEGである、請求項1から3の何れか1項に記載のPEG結合抗体分子。

## 【請求項5】

前記重鎖のCys221とCys227との間にジスルフィド結合を更に含む、請求項1から4の何れか1項にPEG結合抗体分子。

## 【請求項6】

40

前記重鎖のCys221及びCys227に付加物を更に含む、請求項1から4の何れか1項にPEG結合抗体分子。

## 【請求項7】

前記付加物がグルタチオン又はMEAである、請求項6記載のPEG結合抗体分子。

## 【請求項8】

請求項1から7の何れか1項に記載のPEG結合抗体分子と、医薬的に許容できる賦形剤、希釈剤又は担体とを含む、治療用又は診断用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

50

本出願は、2003年3月20日出願の国際出願番号PCT/US03/08608、及び米国特許法119条35項に基く2002年5月28日出願の米国仮出願番号60/383,765号に対して優先権を主張するものであり、参照することによってそれらの全てを本願に記載されているかのように組み入れられるものである。

(発明の分野)

本発明は、組換えタンパク質PEG位置異性体に関する。より詳しくは、ヒト腫瘍死因子アルファ(TNF)の抗原決定基に特異性を有する抗体のPEG位置異性体に関する。より詳しくは、CDP870のPEG位置異性体に関する。本発明はまた、そのPEG位置異性体を含む組成物及びその抗体の治療上の使用にも関する。

【背景技術】

10

【0002】

抗体分子には、2つの重鎖と2つの軽鎖がある。それぞれの重鎖と軽鎖はそのN末端に可変領域を有する。各可変領域は3つの相補的な決定領域(CDRs)とともに変化する4つのフレームワーク領域(FRs)で形成されている。可変領域中の残基は、従来、Kabatによって考案されたシステムに従って番号が付けられている。このシステムは、US Department of Health and Human Services, NIH, USA(以後「Kabat(上記参照)」)の「免疫学的に重要なタンパク質の配列、1987」に規定されている。この番号システムは、特に断らない限り、本明細書中で使用している。

【0003】

20

Kabatの残基の名称はアミノ酸残基の直線的な番号と直接対応していない。実際の直線的なアミノ酸配列は、フレームワークとCDRを問わず、基本的な可変領域構造の構造成分の短縮又は構造成分への挿入に対応して、厳密なKabatの番号に比べてより少ないか、又はアミノ酸を多く含む可能性がある。正確なKabatの残基の番号は、与えられた抗体について、「標準」のKabatの番号配列を有する抗体の配列中の相同性の残基配列によって決定してよい。

【0004】

重鎖可変領域のCDRsは、Kabatの番号付に従って、残基31-335(CDRH1)、残基50-56(CDRH2)及び残基95-102(CDRH3)に位置している。

30

【0005】

軽鎖可変領域のCDRsは、Kabatの番号付に従って、残基24-34(CDRL1)、残基50-56(CDRL2)及び残基89-97(CDRL3)に位置している。

【0006】

CDRがグラフトされた抗体の構造はEP-A-0239400に記載されており、それはマウスモノクロナール抗体のCDRsが、長いオリゴヌクレオチドを用いて、部位指向変異誘発によって、ヒト免疫グロブリンの可変領域のフレームワーク領域にグラフトされることを示している。CDRsは抗体の抗原結合特異性を決定し、可変領域のフレームワーク領域上に担持されている、比較的短いペプチド配列である。

40

【0007】

CDRグラフトによるヒト化モノクロナール抗体に関する初期の研究はNPのような合成抗原を認識するモノクロナール抗体について行われた。しかしながら、リゾチームを認識するマウスモノクロナール抗体及びヒトT細胞上の抗原を認識するラットモノクロナール抗体が、CDRグラフトによってヒト化された実施例が、それぞれVerhoevenら(Science, 239, 1534-1536, 1988)及びRiechmannら(Nature, 332, 323-324, 1988)によって記載されている。

【0008】

Riechmannらは、Kabatによって定義されたCDRs単独(Kabat(上記参照)及びWuら(J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970))によって記載されている。

50

によって記載されている)の転移は C D R フラフト製品中に満足な抗原結合活性を与えるのに十分でないことを見出した。フレームワーク残基の数がドナーのフレームワーク残領域の数に対応するように、フレームワーク残基の数を変えなければならないことが見出された。変更を要するフレームワーク残基の選択基準の提案が国際特許出願 W O 9 0 / 0 7 8 6 1 に記載されている。

#### 【 0 0 0 9 】

Vaughamら (Nature Biotechnology, 16, 535 - 539, 1998) を含め、C D R をグラフトした抗体について考察した多くの総説が公表されている。

#### 【 0 0 1 0 】

T N F は免疫系の細胞によって遊離され、又は免疫系の細胞と相互作用する催炎症性サイトカインである。従って、T N F はグラム陰性細菌のリポポリサッカライド (L P S) によって活性化されたマクロファージによって遊離される。従って、T N F は、細菌性敗血症に関連したエンドトキシンショックの発症と発生機序に関する特に重要な内因性メディエーターと思われる。T N F はまた、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎及び多発性硬化症のような慢性疾患を含む多数のヒトの疾患でアップレギュレートされていることも示されている。ヒト T N F の遺伝子移植マウスは本質的に T N F の濃度を高め、関節リウマチに似た自発的な、破壊的な多発関節炎を発症する (Kafflerら、EMBO J., 10, 4025 - 4031, 1991)。T N F は従って、催炎症性サイトカインと呼ばれる。

10

20

#### 【 0 0 1 1 】

T N F に対するモノクロナール抗体は従来の技術に記載されている。Meagerら (Hybridoma, 6, 305 - 311, 1987) は組換え T N F に対するネズミのモノクロナール抗体を記載している。Fendleyら (Hybridoma, 6, 359 - 370, 1987) は T N F 上の中和エピトープを定義するにおいて組換え T N F に対するネズミのモノクロナール抗体の使用を記載している。Shimamotoら (Immunology Letters, 17, 311 - 318, 1988) は T N F 7 に対するネズミのモノクロナール抗体の使用を記載し、マウスにおけるエンドトキシンショックの予防におけるそれらの使用を記載している。更に、国際特許出願 W O 9 2 / 11383 には、C D R グラフト抗体を含む、T N F に特異的な組換え抗体が開示されている。Rankinら (British J. Rheumatology, 34, 334 - 342, 1995) は関節リウマチの治療における、そのような C D R グラフト抗体の使用を記載している。米国特許第 5, 919, 452 号は抗 T N F キメラ抗体と 5 T N F の存在に関連した病理の治療におけるその使用を開示している。

30

#### 【 0 0 1 2 】

エンドトキシンショックの予防と治療に、T N F に対する抗体が提案されている (Beutlerら、Science, 234, 470 - 474, 1985)。Bodmerら (Critical Care Medicine, 21, S441 - S446, 1993) 及び Wherryら (Critical Care Medicine, 21, S436 - S440, 1993) は敗血症ショックの治療における抗 T N F 抗体の治療の可能性を考察している。敗血症ショックの治療における抗 T N F 抗体の使用は、Kirschenbaumら (Critical Care Medicine, 26, 1625 - 1626, 1998) も考察している。コラーゲン誘発関節炎は、抗 T N F モノクロナール抗体を使用して効果的に治療できる (Williamsら (PNAS - USA, 89, 9784 - 9788, 1992))。

40

#### 【 0 0 1 3 】

関節リウマチ患者の滑液及び抹消血の両方で、T N F の濃度の増加が見られた。関節リウマチ患者に T N F 遮断剤を投与すると、炎症が低減し、症状が改善し、関節の障害が遅れた (McKownら、Arthritis Rheum., 42, 1204 - 1208, 1999)。

50

## 【0014】

関節リウマチと20名のクローン病の治療における抗TNF 抗体の使用が Feldmanら(Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998)、Adoriniら(Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997)及びFeldmanら(Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997)によって考察されている。そのような治療で使用されるTNF に対する抗体は、一般に米国特許第5919452号に記載されているようなキメラ抗体である。

## 【0015】

現在、2つのTNF 遮断剤が関節リウマチの治療に許可されている。第一は、エタナーセプト(etanercept)と呼ばれ、Immunex CorporationがEnbrel(商標)として販売している。これはヒト免疫グロブリンのFc部分に結合した2つのp75可溶性TNF受容体領域を含む組換え融合タンパク質である。第二は、infliximabと呼ばれ、Centocor CorporationがRemicade(商標)として販売している。これはネズミの抗TNF 可変領域とヒトIg GI不变領域を有するキメラ抗体である。

## 【0016】

従来の技術の組換え抗TNF 抗体分子は一般に、それからその可変領域又はCDRsが誘導される抗体に比べて、TNF に対する親和性が低く、一般に哺乳動物細胞中で作られねばならず、製造コストが高い。従来の技術の抗TNF 抗体はStephensらがImmunology, 85, 668-674, 1995, GB-A-2 246 570及びGB-A-2 297 145に記載している。

## 【0017】

国際公開WO01/94585は、TNF に対して高親和性を有し、ヒトの免疫原性が低い抗体分子を記載し、これは慢性炎症性疾患の治療に繰り返し使用でき、容易に且つ効率的に製造できる。

## 【発明の開示】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0018】

## (発明の要約)

本発明は、組換えタンパク質PEG位置異性体、好ましくは、ヒト腫瘍壞死因子アルファ(TNF )に特異性を有する抗体のPEG位置異性体を含む。本発明はまた、当該異性体を含む組成物及び当該抗体の治療上の使用に関する。

## 【0019】

最初の態様において、本発明は、折一のPEG結合部位を有する組換えタンパク質PEG位置異性体を提供する。「抗体PEG位置(positional)異性体」は、優先的なPEG結合位置以外のPEG結合位置を有する抗体と定義される。好ましくは、PEG位置異性体は、ヒト腫瘍壞死因子アルファ(TNF )の抗原決定基に特異性を有する抗体である。好ましくは、TNF 抗体は国際公開WO01/94585に開示されたTNF 抗体である。好ましくは、抗体はCDP870である。

## 【0020】

国際公開WO01/94585は、可変領域が、CDRH1に対して、国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号1)の図3にH1として示した配列、CDRH2に対して、国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号2)の図3にH2'として、又は国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号7)の図3にH2として示した配列、CDRH3に対して、国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号3)の図3にH3として示した配列を有するCDR(Kabatら(上記参照)による定義)を含む重鎖を含む、TNF に特異性を有する抗体分子を提供する。

## 【0021】

10

20

30

40

50

国際公開WO01/94585の抗体分子は、重鎖の可変領域にH1、H2'又はH2及びH3(国際公開WO01/94585の配列番号1；配列番号2；又は配列番号7及び配列番号3)から選ばれた少なくとも1つのCDRを含む。好ましくは、抗体分子は重鎖の可変領域に少なくとも2つ、より好ましくは、3つのすべてのCDRsを含む。

## 【0022】

国際公開WO01/94585には、可変領域が、CDRL1に対して、国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号4)の図3にL1として示した配列、CDRL2に対して、国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号5)の図3にL2として示した配列、CDRL3に対して、国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号6)の図3にL3として示した配列を有するCDR(Kabatら(上記参照)による定義)を含む軽鎖を含む、TNFに特異性を有する抗体分子を提供する。  
10

## 【0023】

国際公開WO01/94585の抗体分子は、軽鎖の可変領域にL1、L2及びH3(国際公開WO01/94585の配列番号4から配列番号6)から選ばれた少なくとも1つのCDRを含む。好ましくは、抗体分子は軽鎖の可変領域に少なくとも2つ、より好ましくは、3つのすべてのCDRsを含む。

## 【0024】

好ましくは、国際公開WO01/94585の抗体分子は、それぞれ相補的軽鎖又は相補的重鎖を有する。  
20

## 【0025】

好ましくは、国際公開WO01/94585の抗体分子は、可変領域が、CDRH1に対して国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号1)の図3にH1として示した配列、CDRH2に対して国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号2又は配列番号7)の図3にH2'又はH2として示した配列、CDRH3に対して国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号3)の図3にH3として示した配列を有するCDR(Kabatら(上記参照)による定義)を含む重鎖、及び可変領域が、CDRL1に対して国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号4)の図3にL1として示した配列、CDRL2に対して国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号5)の図3にL2として示した配列、又はCDRL3に対して国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号6)の図3にL3として示した配列を有するCDR(Kabatら(上記参照)による定義)を含む軽鎖を含む。  
30

## 【0026】

国際公開WO01/94585の配列番号1及び3から7及び国際公開WO01/94585の図3に示したCDRsはマウスモノクロナール抗体hTNF40から誘導される。しかしながら、国際公開WO01/94585の配列番号2はハイブリッドCDRから構成される。ハイブリッドCDRはマウスモノクロナール抗体hTNF40(国際公開WO01/94585の配列番号7)からの重鎖CDR2の一部及びヒト群3の生殖細胞系V領域の配列からの重鎖CDR2の一部を含む。  
40

## 【0027】

マウスモノクロナール抗体hTNF40の可変領域の完全な配列を国際公開WO01/94585(軽鎖)(国際公開WO01/94585の配列番号99)の図6及び国際公開WO01/94585(重鎖)(国際公開WO01/94585の配列番号100)の図7に示す。このマウスの抗体は「ドナー抗体」と云う。

## 【0028】

国際公開WO01/94585の最初の別の態様は、それぞれ国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号99)の図6及び国際公開WO01/94585(国際公開WO01/94585の配列番号100)の図7に示した軽鎖と重  
50

鎖の可変領域配列を有するマウスモノクロナール抗体 hTNF40 である。hTNF40 の軽鎖の不变領域はカッパであり、重鎖の不变領域は IgG2a である。

【0029】

国際公開WO01/94585の第二の別の態様は、国際公開WO01/94585の第一又は第二の態様のいずれかによる抗体がマウス/ヒトのキメラ抗体分子であり、本明細書でキメラhTNF40抗体分子と云う。キメラ抗体分子はマウスモノクロナール抗体hTNF40(国際公開WO01/94585の配列番号99及び100)の可変領域とヒト不变領域を含む。好ましくは、キメラhTNF40抗体分子は軽鎖にヒトCカッパ領域(Hieterら、Cell, 22, 197-207, 1980、ジーンバンク受入番号J00241)を含み、重鎖にヒトガンマ4領域(Flanaganら、Nature, 300, 709-713, 1982)を含む。  
10

【0030】

国際公開WO01/94585の第三の別の態様は、抗体分子がCDRグラフト抗体分子である。用語「CDRグラフト抗体分子」は、本明細書に使用されているように、軽鎖及び/又は重鎖が、アクセプター抗体(例えばヒト抗体)の軽鎖及び/又は重鎖の可変領域のフレームワークにグラフトされた、ドナー抗体(例えばネズミモノクローナル抗体)からの1つ又はそれ以上のCDRs(望むならばハイブリッドCDRを含む)を含む抗体分子を意味する。

【0031】

好ましくは、そのようなCDRグラフト抗体は、ヒトのアクセプターフレームワーク領域を含む可変領域及び1つ又はそれ以上の上記のドナーのCDRsを含む。  
20

【0032】

CDRsがグラフトされる時、CDRsが、それから誘導されるドナー抗体のクラス/型に関して、マウス、靈長類及びヒトのフレームワーク領域を有する、すべての適切なアクセプターの可変領域のフレームワーク配列を用いてよい。国際公開WO01/94585のヒトのフレームワークの例はKOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及びPOM(Kabatら(上記参照))である。例えば、KOLとNEWMは重鎖に使用でき、REIは軽鎖に使用でき、EU、LAY及びPOMは重鎖と軽鎖両方に使用できる。軽鎖に対する好適なフレームワーク領域は図1(国際公開WO01/94585の配列番号83、85、87及び89)に示すヒト群1のフレームワーク領域である。重鎖に対する好適なフレームワーク領域は図2(国際公開WO01/94585の配列番号91、93、95及び97並びに配列番号106、107、108及び109)に示す、ヒト群1及び3のフレームワーク領域である。  
30

【0033】

また、国際公開WO01/94585のCDRグラフト抗体において、アクセプター抗体として、ドナー抗体の鎖と相同性の鎖を有する抗体を使用するのが好適である。アクセプターの重鎖及び軽鎖は同じ抗体から誘導される必要はなく、所望であれば、異なった鎖から誘導されるフレームワーク領域を有する複合鎖を含んでもよい。

【0034】

国際公開WO01/94585のCDRグラフト抗体において、フレームワーク領域は、アクセプター抗体のそれらと正確に同じ配列を有する必要はない。例えば、普通でない残基はそのアクセプター鎖のクラス又は型に対してより頻繁に生じる残基に変えてよい。代わりに、アクセプターフレームワーク領域中の選択された残基はドナー抗体中の同じ位置に見られる残基に対応するように、変えてよい。そのような変化は、ドナー抗体の親和性を回復するのに必要な最低限に留めるべきである。変更が必要な可能性があるアクセプターフレームワーク領域における、残基の選択のためのプロトコールは、国際公開WO91/09967に規定されている。  
40

【0035】

好ましくは、国際公開WO01/94585のCDRグラフト抗体分子中で、アクセプター重鎖がヒト群1のフレームワーク領域(国際公開WO01/94585の図2)に示す  
50

) (国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 9 1、9 3、9 5 及び 9 7) を有する場合、重鎖のアクセプターフレームワーク領域は 1 つ又はそれ以上のドナー CDRs に加えて、位置 2 8、6 9 及び 7 1 でドナー残基を含む (Kabat ら (上記参照) による)。

#### 【0036】

代わりに、アクセプター重鎖が群 1 のフレームワーク領域を有する場合、重鎖のアクセプターフレームワーク領域は 1 つ又はそれ以上のドナー CDRs に加えて、位置 2 8、3 8、4 6、6 7、6 9 及び 7 1 にドナー残基を含む (Kabat ら (上記参照) による)。

#### 【0037】

好ましくは、国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の CDR グラフト抗体分子中で、アクセプター重鎖がヒト群 3 のフレームワーク領域 (国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の図 2 に示す) (国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 0 6、1 0 7、1 0 8 及び 1 0 9) を有する場合、重鎖のアクセプターフレームワーク領域は 1 つ又はそれ以上のドナー CDRs に加えて、位置 2 7、2 8、3 0、4 8、4 9、6 9、7 1、7 3、7 6 及び 7 8 にドナー残基を含む (Kabat ら (上記参照) による)。

#### 【0038】

好ましくは、国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の CDR グラフト抗体分子中で、アクセプター軽鎖がヒト群 1 のフレームワーク領域 (国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の図 1 に示す) (国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 8 3、8 5、8 7 及び 8 9) を有する場合、軽鎖のアクセプターフレームワーク領域は位置 4 6 と 6 0 にドナー残基を含む (Kabat ら (上記参照) による)。

#### 【0039】

ドナー残基はドナー抗体、即ち CDRs がそれから始めに誘導された抗体である。

#### 【0040】

国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の抗体分子は完全長の重鎖及び軽鎖を有する完全な抗体分子、Fab、修飾 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 又は Fv 断片のようなその断片、軽鎖及び重鎖のモノマー又はダイマー、例えば重鎖及び軽鎖の可変領域がペプチドリンクで結合されている单鎖 Fv のような单鎖抗体を含む。同様に、重鎖及び軽鎖の可変領域は適宜他の抗体領域と結合してよい。

#### 【0041】

好ましくは、国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の抗体分子は Fab 断片である。好ましくは、Fab 断片は国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 1 で示される重鎖及び国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 3 で示される軽鎖を有する。国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 1 と配列番号 1 1 3 で示されるアミノ酸配列は、好ましくは、それぞれ国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 0 と配列番号 1 1 2 で示されるヌクレオチド配列でコード化される。

#### 【0042】

代わりに、国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の抗体分子は、その修飾が重鎖の C 末端に、1 つ又はそれ以上のアミノ酸を付加することにより、エフェクター又はリポータ分子の付着を可能にする修飾された Fab 断片であることが好適である。追加のアミノ酸は、それにエフェクター又はリポータ分子が付着できる 1 つ又は 2 つのシステイン残基を含む修飾された蝶番 (hinge) 領域を形成する。そのような Fab 断片は、好ましくは、国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 5 で示される配列を有する重鎖及び国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 3 で示される配列を有する軽鎖を有する。国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 5 で示されるアミノ酸配列は、好ましくは、国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の配列番号 1 1 4 で示されるヌクレオチド配列によってコード化される。

#### 【0043】

国際公開WO 0 1 / 9 4 5 8 5 の好適なエフェクター群はポリマー分子であり、それはインビボでの半減期を増加するために修飾した Fab 断片に付着してよい。

10

20

30

40

50

## 【0044】

ポリマー分子は一般に、合成又は天然のポリマー、例えばオプションで置換された直鎖又は分枝鎖のポリアルキレン、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、例えばホモ又はヘテロポリサッカライドのような分枝鎖又は非分枝鎖のポリサッカライドであってよい。

## 【0045】

オプションで上記合成ポリマー上に存在してよい、特別な置換基には、1つ又はそれ以上のヒドロキシ、メチル又はメトキシ基が含まれる。合成ポリマーの特別な例には、オプションで置換された直鎖又は分枝鎖のポリ(エチレングリコール)、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、特にオプションで置換された、例えばメトキシポリ(エチレングリコール)又はその誘導体のようなポリ(エチレングリコール)である。特別な天然由来のポリマーには、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が含まれる。本明細書で使われているように、「誘導体」は例えば、マレイミド類及び類似物のようなチオール選択性反応基のような反応性誘導体を含むことを意図している。反応基はポリマーに直接又はリンカー部分を介して結合してよい。そのような群の残基は、ある実施例では、抗体断片とポリマー間の結合基として、製品の一部を形成する。

10

## 【0046】

ポリマーの大きさは所望によって変え得るが、一般的に平均分子量は500Daから50000Daの範囲であり、好ましくは、5000から40000Da、より好ましくは、25000から40000Daの範囲である。ポリマーの大きさは、特にその製品の意図されている用途に基づいて選択される。従って、例えば、製品が循環を離れて組織に浸透する場合、例えば腫瘍の治療に用いる場合は、例えば、約5000Daの小さな分子量のポリマーを使用するのが有利である。製品が循環に留まるような用途の場合は、例えば、25000Daから40000Daの範囲の分子量を有する高分子量を使うのが有利である。

20

## 【0047】

特に好適なポリマーには、ポリ(エチレングリコール)又は、特にメトキシポリ(エチレングリコール)又はその誘導体、及び特に約25000Daから40000Daの分子量範囲のポリアルキレンポリマーが含まれる。

30

## 【0048】

修飾抗体断片に付着した各ポリマー分子は、断片中のシステイン残基の硫黄原子に共有結合してよい。共有結合は一般にジスルフィド結合又は特に硫黄-炭素結合である。

## 【0049】

所望の場合は、抗体断片はそれに付着した1つ又はそれ以上のエフェクター又はレポーター分子を有してよい。エフェクター又はレポーター分子は、例えばすべての遊離のアミノ基、イミノ基、ヒドロキシ基又は5カルボキシ基のような断片中に位置する利用できるアミノ酸側鎖又はアミノ酸機能性基を介して抗体断片に付着してよい。

## 【0050】

上記の様に、ポリマー修飾抗体断片の調製において、出発物質として活性化ポリマーを使用してよい。活性化ポリマーは例えばインドアセタミドの様な-ハロカルボン酸、例えばマレイミドのようなイミド、ビニルスルホン又はジスルフィドのようなチオール反応性基を含むすべてのポリマーであってよい。そのような出発物質は商業的に(例えばShearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA)入手できるか、又は商業的に入手できる物質から従来の化学的手順を用いて調製できる。

40

## 【0051】

付着しているポリ(エチレングリコール)(PEG)部分に関しては、“Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1992, J. Milton

50

Harris (ed), Plenum Press, "New York, Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New Yorkを参照すべきである。

#### 【0052】

エフェクター又はレポーター分子と結合した抗体断片を得ることを望む場合は、抗体断片が、活性化ポリマーとの反応前又は反応後に、エフェクター又はレポーター分子と直接又はカプリング剤を介して結合される標準的な化学手順又は組換えDNA手順によって適宜調製してよい。特別な化学手順には、例えば国際公開WO 93/62331、国際公開WO 92/22583、国際公開WO 90/00195及び国際公開WO 89/01476に記載されたものが含まれる。代わりに、エフェクター又はレポーター分子がタンパク質又はポリペプチドの場合は、結合は、例えば国際公開WO 86/01533及びEP-A 392 745に記載されている組換えDNA手順を用いて達成してよい。

#### 【0053】

好ましくは、国際公開WO 01/94585の修飾Fab断片は、EP-A 948 544に記載の方法に従ってPEG化（即ち共有結合でそれに付着したPEG（ポリ（エチレンギリコール））を有する）される。好ましくは、国際公開WO 01/94585の抗体分子は国際公開WO 01/94585の図13に示したように、PEG化した修飾Fab断片である。国際公開WO 01/94585の図13に示したように、修飾Fab断片は、修飾した蝶番領域中の単一のチオール基に共有結合で結合したマレイミド基を有する。リジン残基がマレイミド基に共有結合で結合している。リジン残基上のアミン基のそれぞれに分子量が約20,000Daのメトキシポリ（エチレンギリコール）ポリマーが付着している。従って、エフェクター分子全体の全分子量は約40,000Daである。これらのリジンが結合したPEGsは米国特許第6,113,906号、米国特許第5,919,455号、米国特許第5,643,575号及び米国特許第5,932,462号に開示されているように、「分枝PEG」又は「U-PEG」と云われる。

#### 【0054】

好ましくは、国際公開WO 01/94585の図13に示した化合物において、抗体部分の重鎖は国際公開WO 01/94585の配列番号115として示されている配列を有し、軽鎖は国際公開WO 01/94585の配列番号113として示されている配列を有する。この化合物は国際公開WO 01/94585の中で、CDP870と云われている。

#### 【0055】

国際公開WO 01/94585の抗体分子に不变領域がある場合は、提案された抗体分子の機能、特に要求されるエフェクター機能に関連して選択してよい。例えば、不变領域はIgA、IgD、IgE、IgG又はIgM領域であってよい。特にヒトのIgG不变領域を使用してよく、抗体分子が治療用に意図され、抗体エフェクター機能が要求される場合は、IgG1及びIgG3アイソタイプを使用する。代わりに、抗体分子が治療目的に意図され、抗体エフェクター機能が要求されない場合、例えば単にTNF活性を遮断するような場合は、IgG2及びIgG4アイソタイプを使用してよい。

#### 【0056】

また、国際公開WO 01/94585の抗体分子は、それに付着したエフェクター又はレポーター分子を有してよい。例えば、重金属原子をキレートするためのマクロサイクル(macrocycle)又は、それに共有結合によって付着したリシンのようなトキシンを有してよい。代わりに、完全な免疫グロブリン分子のFc断片(CH2、CH3及び蝶番領域)、CH2とCH3領域、又はCH3領域が、酵素又はトキシン分子のような、機

10

20

30

40

50

能性非免疫グロブリンタンパク質で置換され、又はペプチド結合で、酵素又はトキシン分子のような、機能性非免疫グロブリン分子に結合した抗体分子を作るために、組換えDNA技術の手順を用いてよい。

#### 【0057】

国際公開WO01/94585の抗体分子は、好ましくは、少なくとも $0.85 \times 10^{-10}$ M、より好ましくは、少なくとも $0.75 \times 10^{-10}$ M、最も好ましくは、少なくとも $0.5 \times 10^{-10}$ M(下記のように、国際公開WO01/94585の好適なヒト化抗体は少なくとも $0.5 \times 10^{-10}$ Mの親和性を有し、これは、それが由来するネズミのモノクロナル抗体の親和性よりもよいことに留意することは有意義である。)ネズミの抗体の親和性は約 $0.85 \times 10^{-10}$ Mである。

10

#### 【0058】

好ましくは、国際公開WO01/94585の抗体分子は、軽鎖の可変領域hTNF40-gL1(国際公開WO01/94585の配列番号8)及び重鎖の可変領域gh3hTNF40.4(国際公開WO01/94585の配列番号11)を含む。これら軽鎖及び重鎖の可変領域の配列をそれぞれ国際公開WO01/94585の図8と11に示す。

#### 【0059】

国際公開WO01/94585はまた、TNFへの親和性が改善された抗体分子の変種にも関する。そのような変種はCDRsの変異(YangらJ.Mol.Biol.,254,392-403,1995)、チェインシャフリング(chain shuffling)(Marksら、Bio/Technology,10,779-783,1992)、E.coliのミューターター(mutator)菌株の使用(Lowら、J.Mol.Biol.,250,359-368,1996)、DNAシャフリング(DNA shuffling)(Pattersonら、Curr.Opin.Biotechnol.,8,724-733,1997)、ファージディスプレイ(phage display)(Thompsonら、J.Mol.Biol.,256,77-88,1996)及び性別(sexual)PCR(Cramerら、Nature,391,288-291,1998)を含む多くの親和性変異プロトコールで得られる。Vaughanら(上記参照)は親和性成熟のこれらの方法について考察している。

20

#### 【0060】

国際公開WO01/94585はまた、抗体分子の重鎖及び/又は軽鎖をコード化しているDNA配列を提供する。

30

#### 【0061】

国際公開WO01/94585はまた、1つ又はそれ以上のDNA配列を含むクローニング又は発現ベクターに関する。好ましくは、クローニング又は発現ベクターは、抗体分子の軽鎖及び重鎖をコード化している2つのDNAを含む。

#### 【0062】

国際公開WO01/94585はまた、抗体分子をコード化しているDNA鎖の発現に用いられる宿主細胞/ベクター系にも関する。Fab及びF(ab')<sub>2</sub>断片、特にFv断片、及び例えば単鎖Fvsのような単鎖抗体断片の発現に、例えばE.coliのようなバクテリア及び他の微生物系を一部使用してよい。完全な抗体分子を含む、大きな抗体分子の生産に、例えば哺乳類のような真核宿主細胞発現系を用いてよい。適した哺乳類の宿主細胞にはCHO、メラノーマ又はハイブリドーマ細胞が含まれる。

40

#### 【0063】

国際公開WO01/94585はまた、ベクターを含む宿主細胞を、抗体分子をコード化するDNAからタンパク質の発現に導くのに適した条件下で培養すること、及び抗体分子を単離することを含む抗体分子の生産方法を提供する。

#### 【0064】

好ましくは、国際公開WO01/94585の抗体分子の生産方法はDNA配列を含むE.coli発現ベクターを含むE.coliを、DNA配列からタンパク質の発現に導くのに適した条件下で培養すること、及び抗体分子を単離することを含む。抗体分子は細

50

胞から分泌され、又は適したシグナル配列によってペリプラズムに標的化されてよい。代わりに、抗体分子は細胞の細胞質に蓄積してよい。好ましくは、抗体分子はペリプラズムに標的化されてよい。生産されている抗体分子と使用される方法によって、抗体分子が再び折りたたまれ、機能的な形状を探るようにすることが望ましい。抗体分子を再び折りたたむようにする手順は当業者には周知である。

#### 【0065】

抗体分子は単に重鎖又は軽鎖のポリペプチドだけを含んでよく、その場合、配列をコード化している重鎖又は軽鎖のポリペプチドだけを宿主細胞をトランスフェクトするために用いる必要がある。重鎖及び軽鎖の両方を含む製品の生産のために、軽鎖のポリペプチドをコード化している第一のベクターと重鎖のポリペプチドをコード化している第二のベクターの2つのベクターで細胞系をトランスフェクトしてよい。代わりに、軽鎖と重鎖のポリペプチドをコード化している配列を含む単一のベクターを用いてよい。

10

#### 【0066】

本発明の態様の1つは、軽鎖のCys214上にPEGを有するCDP870異性体(CDP870-PEG-1214)である。優先的なCDP870抗体の形は、軽鎖のCys214と重鎖のCys221との間にジスルフィド結合を有し、重鎖のCys227にPEGの結合を有するものである。予期しない位置のPEG異性体が当該CDP870において同定され、それは軽鎖のCys214にPEGを含有する。

#### 【0067】

本発明の他の態様は、軽鎖のCys214上にPEGを有し、重鎖のCys221及び重鎖のCys227に付加物を有するCDP870異性体である。

20

#### 【0068】

本発明の他の態様は、軽鎖のCys214上にPEGを有し、重鎖のCys221と重鎖のCys227との間にジスルフィド結合を有するCDP870異性体である。好ましい態様において、付加物はグルタチオン又はMEAである。

#### 【0069】

他の態様は、軽鎖のCys214にPEGが結合したCDP870異性体(CDP870-PEG-1214)を含む組成物である。当該組成物の好ましい態様において、CDP870-PEG-1214異性体は、全体の抗体濃度の約1%から約20%を含む。より好ましい態様において、CDP870-PEG-1214異性体は、全体の抗体濃度の約1%から約10%を含む。より好ましい態様において、CDP870-PEG-1214異性体は、全体の抗体濃度の約1%から約5%を含む。より好ましい態様において、CDP870-PEG-1214異性体は、全体の抗体濃度の約5%未満を含む。治療又は診断組成物は、例えば抗T細胞、抗IFNY又は抗LPS抗体又はキサンチンのような非抗体成分のような他の抗体成分を含む他の活性成分を伴ってよい。

30

#### 【0070】

他の態様において、組成物は、CDP870ジスルフィド異性体を更に含み、軽鎖のCys214と重鎖のCys227との間にジスルフィド結合を含有する(1214/h227)。好ましくは、CDP870ジスルフィド異性体(1214/h227)は、重鎖のCys221にPEGの結合を有する。好ましくは、CDP870-PEG-1214位置異性体は、全体の抗体濃度の約1%から約20%を含み、1214/h227ジスルフィドイソフォーム(isoform)は、全体のCDP870抗体濃度の約20%から約50%を含む。好ましくは、CDP870-PEG-1214位置異性体は、全体の抗体濃度の約5%未満を含み、h221/h227ジスルフィドイソフォームは、全体のCDP870抗体濃度の約30%から約40%を含む。

40

#### 【0071】

医薬組成物は、好ましくは、本発明の抗体の治療有効量を含むべきである。「治療有効量」と言う用語は、本明細書に用いられているように、標的疾患又は状態を治療し、軽減し、予防し、又は検出可能な治療又は予防効果を示すのに必要な治療剤の量を意味する。すべての抗体について、治療有効量は最初に、細胞培養アッセイ又はげっ歯類、ウサギ、

50

イヌ、ブタ又は靈長類の動物モデルで推定できる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲及び投与経路を決定するために用いてよい。そのような情報はヒトでの有用用量及び投与経路を決定するのに用いることができる。

#### 【0072】

ヒト対象についての正確な有効量は疾患の重症度、対象の一般的健康、年令、体重、性別、食事、投与時間と回数、併用薬、反応感受性及び治療への忍容性／応答に依存する。この量は日常的な検査で決定でき、医師の判断の範囲内である。一般に、有効用量は0.01 mg / kg から 50 mg / kg、好ましくは、0.1 mg / kg から 20 mg / kg、より好ましくは、約 15 mg / kg である。下記の実施例に示すように、リウマチ患者の治療には、1、5 及び 20 mg / kg の用量が用いられている。

10

#### 【0073】

組成物は患者に単剤で投与してもよく、又は他の薬剤、薬物又はホルモンと組み合わせて投与してよい。

#### 【0074】

本発明の抗体分子が投与される用量は、治療される状態の性質、TNF がそこまで中和されるべき程度、又は望ましい濃度以上に上昇が期待される濃度の程度、及び抗体分子が予防的に用いられているか、既存の状態を治療するために用いられるかによる。

#### 【0075】

従って、例えば、製品が、関節リウマチのような慢性炎症疾患の治療又は予防に用いられる場合、本発明の抗体分子の適した用量は0.5 と 50 mg / kg の間の範囲、より好ましくは、1 と 20 mg / kg の間の範囲、最も好ましくは、約 15 mg / kg である。投与回数は抗体分子の半減期とその効果の持続による。

20

#### 【0076】

抗体分子の半減期が短い場合（例えば 2 から 10 時間）は、1 日当たり 1 回又はそれ以上投与する必要がある。代わりに、抗体分子の半減期が長い場合（例えば 2 から 15 日）は、1 日 1 回、1 週間又は 1 月又は 2 月あたり 1 回投与するだけでよい。

#### 【0077】

医薬組成物は抗体の投与のために製剤学的に許容できる担体を含んでよい。担体は、それ自体、組成物を投与されている個体に有害な抗体の產生を誘導してはならないし、また毒性があってはならない。適した担体はタンパク質、ポリペプチド、リポソーム、ポリサッカライド、ポリアクリル酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸共重合体及び不活性ウイルス粒子のような、大きな代謝の遅い高分子であってよい。

30

#### 【0078】

製剤学的に許容できる塩、例えば塩酸、臭化水素酸、リン酸塩及び硫酸塩又は酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩及び安息香酸塩のような有機酸の塩を用いることができる。

#### 【0079】

治療用の組成物中の医薬的に許容できる担体は更に、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールのような液体を含んでよい。そのような組成物中に、更に湿潤剤又は乳化剤又は pH 緩衝剤のような助剤があつてよい。そのような担体は患者の服用のために医薬組成物を錠剤、ピル、糖剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー及び懸濁液に製剤化することを可能にする。

40

#### 【0080】

投与のための好適な剤型は非経口投与、例えばボーラス注射又は連続注入のような、注射又は注入による投与に適した剤型を含む。製品が注射又は注入用の場合は、油性又は水性溶媒中の懸濁液、溶液又はエマルジョンの剤型を探ってもよく、且つそれは懸濁剤、保存剤、安定化剤及び／又は分散剤のような製剤用剤を含んでよい。代わりに、抗体分子は使用前に適切な滅菌液で再構成する乾燥剤型であつてよい。

#### 【0081】

一度製剤化されると、本発明の組成物は直接対象に投与できる。対象は動物であることができる。しかしながら、組成物はヒトの対象への投与に適合することが好ましい。

50

## 【0082】

本発明の医薬組成物は経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、くも膜下、脳室内、経皮（国際公開WO 98 / 20743）、皮下、腹腔内、鼻腔内、経腸、局所、舌下、経膣又は直腸経路を含むすべての経路で投与してよい。本発明の医薬組成物を投与するためにハイポスプレー（hypospray）を用いてよい。通常、治療組成物は液体溶液又は懸濁液のいづれかの注射剤として調製してよい。注射前の液体溶媒中の溶液又は懸濁液に適した固体の剤型も調製してよい。

## 【0083】

組成物の直接のデリバリーは一般に皮下、腹腔内、静脈内又は筋肉内の注射によって達成されるか、又は組織の間質空間にデリバリーされる。組成物は病変に投与することもできる。投与は単回投与又は反復投与計画であってよい。10

## 【0084】

組成物の中の活性成分は抗体分子であることが評価されよう。従って、胃腸管内での分解に敏感であろう。従って、組成物が胃腸管を使う経路によって投与される場合は、組成物には、抗体を分解から保護するが、抗体が胃腸管から一旦吸収されたならば抗体を放出する薬剤が十分含まれる必要があろう。

## 【0085】

製剤学的に許容できる担体の完全な考察はRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991) で得られる。20

## 【0086】

本発明はまた、TNF が介在する疾患の治療に使用する本発明の抗体分子又は組成物を提供する。

## 【0087】

本発明は更に、TNF が介在する疾患の治療のための医薬品の製造における本発明の抗体分子又は組成物の使用を提供する。

## 【0088】

本発明の抗体分子又は組成物はヒト又は動物の体内に存在する生物学的に活性なTNF の濃度を低減することが望まれるすべての治療に利用してよい。TNF は体内を循環していてもよく、又は体内の特別な部位に望ましくない高濃度で存在してよい。30

## 【0089】

例えば、TNF の濃度の上昇は急性及び慢性の免疫及び免疫調整障害、敗血症、エンドтокシン及び心血管ショックを含む感染、炎症性障害、神経変性疾患、悪性疾患及びアルコール誘発肝炎に関係する。TNF の濃度の上昇に関連した多数の障害の詳細は米国特許第5,919,452号に規定されている。本発明の抗体分子又は組成物はTNF が介在する疾患の治療に利用してよい。本発明の抗体分子によって治療してよい特に関連した疾患には、敗血症、うっ血性心不全、敗血症又はエンドтокシンショック、悪液質、成人呼吸困難症候群、エイズ、アレルギー、乾癬、TB、炎症性骨障害、血液凝固障害、火傷、臓器又は組織移植後の拒絶反応、クローン病、甲状腺炎及びリウマチ性関節炎及び骨関節炎のような自己免疫疾患が含まれる。40

## 【0090】

更に、抗体分子又は組成物は新生物治療中のTNF の発生に関連した副作用の低減、抗リンパ球抗体の使用による移植片拒絶の治療又は予防に関連したショック関連の症状の排除又は低減、又は多臓器不全の治療に用いてよい。

## 【0091】

本発明の抗体分子又は組成物は、好ましくは、リウマチ又は骨関節炎の治療に使用する。

## 【0092】

本発明はまた、TNF が介在する障害のある又は障害の危険性のあるヒト又は動物対象の治療法を提供し、その治療法は本発明の抗体分子又は組成物の有効量を対象に投与す50

ることを含む。

【0093】

本発明の抗体分子又は組成物は、例えばインビボの診断及び上昇したTNFの濃度を含む疾患の状態のイメージングのような診断に用いてよい。

【0094】

本発明は、次の実施例においてのみ例示することによって更に説明され、添付されている図を引用する。

【0095】

本開示に引用したすべての出版物、特許及び特許出願の完全な内容を、それぞれの出版物、特許及び特許出願が特別に、且つ個々に参考として組み入れを指示されているかのように、本明細書に組み入れてある。過去の発明は理解を明確にする目的で説明と実施例によって、いくらか詳細に記載してあるが、当業者には、本発明の教示に照らして、本発明の精神と範囲から外れることなく、変更及び修飾ができるることは明白であろう。次の実施例は例示のためにのみ提供するもので、上に広義に記載した本発明の範囲を制限することを意図していない。

10

【実施例】

【0096】

(実施例1)

CDP870PEG位置異性体は、重鎖の標的Cys227の代わりに軽鎖のCys214残基に分枝PEGマレイミドを接合するという製造において產生される。この物質は、(1)HPLCによって分離されるペプチド-PEG断片の分析によって同定され、N末端配列決定及び(2)還元下のSDS-PAGEゲル電気泳動からの抽出物についての非-PEG化(pegylated)重鎖及びPEG化軽鎖の同定によって解析された。変性化サイズ排除HPLC等のその他の技術がこれらの発見を確証した。サンプルの不PEG化重鎖への還元は、PEG位置異性体内の重鎖/軽鎖会合がジスルフィド結合以外の非共有結合力に起因することの証拠である。

20

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】CDP870の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列、分子内ジスルフィドペアリング、軽鎖と重鎖間の優先的なジスルフィドペアリング及びPEG接合のシステインを示す。

30

【図2】PEGが軽鎖のCys-214に結合したCDP870(CDP870-PEG-1214)の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を示す。対象の残基(軽鎖cys-214、重鎖cys-221及び重鎖cys-227)を強調して示す。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia Corporation

<120> ANTIBODY PEG POSITIONAL ISOMERS, COMPOSITIONS COMPRISING SAME, AND USE THEREOF

<130> 01153/1/PCT

<150> 60/383,765

<151> 2002-05-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

10

<210> 1

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> humanized TNF alpha antibody light chain

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

20

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu  
85 90 95

30

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly' Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 2  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> humanized TNF alpha heavy chain antibody

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr  
 35 40 45

Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 50 55 60

Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 65 70 75 80

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg  
 85 90 95

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln  
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala  
 210 215 220

10

## 【図1】

軽鎖：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
 ASFLYSGVPYRFSGSGSG TD FTLTSSLQP EDFATYYC QQ YN IVPLTFGQ  
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWKV  
 DNAL QSGNSQ ESVTE QDSKD STYLSSTLT LSKAD YEKHK VYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC 配列番号1  
 重鎖：  
 EVQLVESCGGLVQPGGSLRLSCAASGVVFT DVGMMWVRQA PGK GLEWMGW  
 INTYIGEPIY ADSVKGRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGY  
 RSYAMDYWGQ GTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSK STSGGT AAL GCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTP SSSLGTQTYIC  
 NVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCAA 配列番号2  
 PEG

## 【図2】

軽鎖：

DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNVG TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
 SASFLYSGVPYRFSGSGSG TD FTLTSSLQP EDFATYYC QQ YN IVPLTFGQ  
 QGTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLNNFY PREAKVQWK  
 VDNAL QSGNSQESVTE QDSKD STYLSSTLT LSKAD YEKHK VYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSFNRGEC 配列番号1  
 PEG  
 軽鎖：  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVVFT DYGMNWVRQAPGGL EWMGW  
 INTYIGEPIY ADSVKGRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGY  
 SYAMDYWGQ GTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSK STSGGT AAL GCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTP SSSLGTQTYIC  
 221 227  
 NVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCAA 配列番号2

K (挿入)

---

フロントページの続き

(72)発明者 モジー、ヘッド、エム

アメリカ合衆国、ミシガン、セント チャールズ、ホワイト パイン ドライブ 335

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 國際公開第01/094585 (WO, A1)

特表2001-506990 (JP, A)

Nat. Biotechnol., 1999年, vol.17, no.8, p.780-783

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46

MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed