(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-510795
(P2010-510795A)
(43)公表日　平成22年4月8日(2010.4.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24	ZNA	4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C085
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 88 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-538774 (P2009-538774)
(86)(22)出願日　平成19年11月28日 (2007.11.28)
(85)翻訳文提出日　平成21年7月17日 (2009.7.17)
(86)国際出願番号　PCT/GB2007/004527
(87)国際公開番号　WO2008/065378
(87)国際公開日　平成20年6月5日 (2008.6.5)
(31)優先権主張番号　60/861,704
(32)優先日　平成18年11月30日 (2006.11.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　300022641
アストラゼネカ　アクチボラグ
スウェーデン国　１５１　８５　セーデルテルイェ（無番地）
(71)出願人　506042265
メディミューン　リミテッド
イギリス国　シービー２１　６ジーエイチ　ケンブリッジシャー，ケンブリッジ，グランタ　パーク，ミルステイン　ビルディング
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インターロイキン６に対する結合性メンバー

(57)【要約】
インターロイキン6（IL-6）と結合しかつその生物学的効果を中和する結合性メンバー、例えばヒト抗体分子を提供する。医療処置での、例えばIL-6と関連した炎症性疾患および腫瘍を治療するための、IL-6に対する結合性メンバーの使用を提供する。
【選択図】　図１

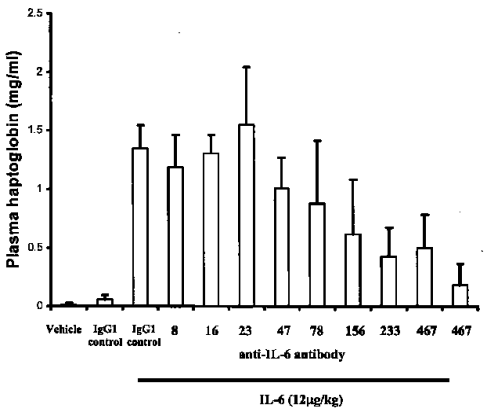


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバーであって、表面プラズモン共鳴によって定められる30 pM以下のK_DでヒトIL-6と結合する、結合性メンバー。
【請求項２】
K_Dが10 pM以下である、請求項１に記載の結合性メンバー。
【請求項３】
ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバーであって、ヒトIL-6と残基Phe102および／またはSer204（該残基ナンバリングは配列番号１６１の完全長ヒトIL-6アミノ酸配列にしたがって定められる）で結合する、結合性メンバー。
【請求項４】
ヒトIL-6と残基Arg207で結合する、請求項３に記載の結合性メンバー。
【請求項５】
ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバーであって、0.6 pMヒトIL-1βおよび2.4 nM可溶性ヒトIL-6Rαで刺激されたヒト滑膜線維芽細胞からのVEGF放出の阻害についてのアッセイにおいて1 nM未満のIC_{50}を有する、結合性メンバー。
【請求項６】
カニクイザルIL-6と結合する結合性メンバーであり、該カニクイザルIL-6が、支持体上に固定された結合性メンバーに対する標識ヒトIL-6の結合の阻害に関する時間分解蛍光アッセイにおいて、非標識ヒトIL-6のIC_{50}と10倍未満の差のあるIC_{50}を有し、該アッセイでは、標識ヒトIL-6が、該結合性メンバーとのその相互作用のKdの2倍と等しい終濃度である、請求項１～５のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項７】
20 pMヒトIL-6に応答したTF-1細胞の増殖の阻害に関するアッセイにおいて100 pM未満のIC_{50}を有する、請求項１～６のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項８】
CDRセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、該CDRセットが、CDRセット
［該セット中：
HCDR1は配列番号３のアミノ酸配列を有し；
HCDR2は配列番号４のアミノ酸配列を有し；
HCDR3は配列番号１１５のアミノ酸配列を有し；
LCDR1は配列番号８のアミノ酸配列を有し；
LCDR2は配列番号９のアミノ酸配列を有し；および
LCDR3は配列番号１２０のアミノ酸配列を有する］
からの22個以下のアミノ酸変化を有し、かつ
20 pMヒトIL-6に応答したTF-1細胞の増殖の阻害に関するアッセイにおいて100 pM未満のIC_{50}を有する、
ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバー。
【請求項９】
CDRセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、該CDRセットが、CDRセット
［該セット中：
HCDR1は配列番号３のアミノ酸配列を有し；
HCDR2は配列番号４のアミノ酸配列を有し；
HCDR3は配列番号１１５のアミノ酸配列を有し；
LCDR1は配列番号８のアミノ酸配列を有し；
LCDR2は配列番号９のアミノ酸配列を有し；および
LCDR3は配列番号１２０のアミノ酸配列を有する］
からの22個以下のアミノ酸変化を有する、

請求項１～７のいずれかに記載の、ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバー。
【請求項１０】
CDRセット
［該セット中：
HCDR1は配列番号３のアミノ酸配列を有し；
HCDR2は配列番号４のアミノ酸配列を有し；
HCDR3は配列番号１１５のアミノ酸配列を有し；
LCDR1は配列番号８のアミノ酸配列を有し；
LCDR2は配列番号９のアミノ酸配列を有し；および
LCDR3は配列番号１２０のアミノ酸配列を有する］
からの20個以下の置換を有するCDRセットを含み、かつ
場合により、配列番号１１５と比べてHCDR3の長さを増大させる1残基の挿入を有し、かつ／または配列番号１２０と比べてLCDR3の長さを増大させる1残基の挿入を有する、
請求項８または請求項９に記載の結合性メンバー。
【請求項１１】
Kabat残基35がIle、ThrまたはValであるHCDR1を含む、請求項８～１０のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項１２】
HCDR1が配列番号３である、請求項１１に記載の結合性メンバー。
【請求項１３】
Kabat残基64がLysまたはArgであるHCDR2を含む、請求項８～１２のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項１４】
HCDR2が配列番号４のアミノ酸配列を有する、請求項１３に記載の結合性メンバー。
【請求項１５】
HCDR3中のKabat残基95がTrpであり、かつ／またはHCDR3中のKabat残基101がAspである、請求項８～１４のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項１６】
請求項１～１５のいずれかに記載の結合性メンバーであって、
Kabat残基96がAlaまたはGluであり；
Kabat残基97がAsp、GluまたはAsnであり；
Kabat残基98がAsp、Gly、GluまたはHisであり；
Kabat残基99がHis、GlyまたはThrであり；
Kabat残基100がPro、Tyr、Asn、Arg、TrpまたはAlaであり；
Kabat残基100Aがpro、Tyr、Ala、Arg、Thr、Gly、Asn、ProまたはSerであり；
Kabat残基100BがTrp、Tyr、His、Gln、ProまたはThrであり；
Kabat残基100CがIle、Ala、Val、His、TyrまたはLeuであり；および
Kabat残基102がLeu、Val、His、MetまたはIleである、HCDR3を含む、
結合性メンバー。
【請求項１７】
HCDR3が配列番号１１５のアミノ酸配列を有する、請求項１６に記載の結合性メンバー。
【請求項１８】
LCDR1中のKabat残基34がAlaまたはThrである、請求項８～１７のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項１９】
LCDR1が配列番号８である、請求項１８に記載の結合性メンバー。
【請求項２０】
LCDR2が配列番号９である、請求項８～１９のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項２１】

請求項１～２０のいずれかに記載の結合性メンバーであって、
Kabat残基89がGln、MetまたはAlaであり；
Kabat残基90がGln、Asn、SerまたはAlaであり；
Kabat残基91がSer、Asn、Gly、AlaまたはHisであり；
Kabat残基92がTrp、Tyr、Ser、LysまたはPheであり；
Kabat残基93がLeu、Ser、Lys、ArgまたはAlaであり；
Kabat残基94がGly、Thr、AlaまたはProであり；
Kabat残基96がGlyまたはTrpであり；および
Kabat残基97がSerまたはThrである、LCDR3を含む、
結合性メンバー。

【請求項２２】
配列番号１２０のアミノ酸配列を有するLCDR3を含む、請求項２１に記載の結合性メンバー。

【請求項２３】
抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22または23のいずれかの抗体のHCDR3、LCDR3および／またはCDRセットを含む、ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバー。

【請求項２４】
CDRセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3
［ここで：
HCDR1は配列番号３であり；
HCDR2は配列番号４であり；
HCDR3は配列番号１１５であり；
LCDR1は配列番号８であり；
LCDR2は配列番号９であり；および
LCDR3は配列番号８０である］
を含む、請求項１～２３のいずれかに記載の結合性メンバー。

【請求項２５】
抗体VHドメインおよび抗体VLドメインを含み、ここで該抗体分子は該CDRセットを含み、VHドメインはHCDR1、HCDR2、HCDR3およびフレームワークを含み、かつVLドメインはLCDR1、LCDR2、LCDR3およびフレームワークを含む、請求項１～２４のいずれかに記載の結合性メンバー。

【請求項２６】
抗体分子が抗体定常領域を含む、請求項２５に記載の結合性メンバー。

【請求項２７】
抗体分子がIgG1である、請求項２６に記載の結合性メンバー。

【請求項２８】
VHおよび／またはVLドメインのフレームワーク領域がヒト生殖細胞系列遺伝子セグメント配列へと生殖細胞系列化されている、請求項２５～２７のいずれかに記載の結合性メンバー。

【請求項２９】
抗体VHドメインが、ヒト生殖細胞系列フレームワークVh3_DP-86_(3-66)へと生殖細胞系列化されたフレームワーク領域を含む、請求項２８に記載の結合性メンバー。

【請求項３０】
VHドメインがフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4を含み、FR1が配列番号１６７、FR2が配列番号１６８、FR3が配列番号１６９およびFR4が配列番号１７０のアミノ酸配列を有する、請求項２９に記載の結合性メンバー。

【請求項３１】
抗体VHドメインが配列番号１１２に示されるVHドメインアミノ酸配列を有する、請求項３０に記載の結合性メンバー。

【請求項３２】
抗体VLドメインが、ヒト生殖細胞系列フレームワークVk1_L12へと生殖細胞系列化されたフレームワーク領域を含む、請求項２８～３１のいずれかに記載の結合性メンバー。
【請求項３３】
VLドメインがフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4を含み、FR1が配列番号１７１、FR2が配列番号１７２、FR3が配列番号１７３およびFR4が配列番号１７４のアミノ酸配列を有する、請求項３２に記載の結合性メンバー。
【請求項３４】
抗体VLドメインが配列番号１１７に示されるVLドメインアミノ酸配列を有する、請求項３３に記載の結合性メンバー。
【請求項３５】
配列番号１１２のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１１７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、単離された抗体分子。
【請求項３６】
IL-6と結合する単離された抗体分子であって、配列番号１１２に対して少なくとも90％同一のVHドメインアミノ酸配列および配列番号１１７に対して少なくとも90％同一のVLドメインアミノ酸配列を含む、抗体分子。
【請求項３７】
IgGである、請求項３５または請求項３６に記載の抗体分子。
【請求項３８】
IgGがIgG1である、請求項３７に記載の抗体分子。
【請求項３９】
請求項２５～３８のいずれかに記載の抗体分子の単離されたVHドメイン。
【請求項４０】
請求項２５～３８のいずれかに記載の抗体分子の単離されたVLドメイン。
【請求項４１】
請求項１～３４のいずれかに記載の単離された結合性メンバー、または請求項３５～３８のいずれかに記載の抗体分子、および製薬的に許容される賦形剤を含む組成物。
【請求項４２】
療法によるヒトまたは動物体の治療方法において使用するための、請求項１～３４のいずれかに記載の単離された結合性メンバー、または請求項３５～３８のいずれかに記載の抗体分子を含む、組成物。
【請求項４３】
IL-6と関連した疾患の治療に使用するための、請求項４２に記載の組成物。
【請求項４４】
IL-6と関連した疾患を治療するための医薬を製造するための、請求項１～３４のいずれかに記載の単離された結合性メンバー、または請求項３５～３８のいずれかに記載の抗体分子の、使用。
【請求項４５】
疾患が炎症性疾患および／または自己免疫疾患である、請求項４３に記載の組成物または請求項４４に記載の使用。
【請求項４６】
疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、悪液質、慢性閉塞性肺疾患、若年性特発性関節炎、喘息、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、クローン病またはアテローム性動脈硬化症である、請求項４５に記載の組成物または使用。
【請求項４７】
疾患が関節リウマチである、請求項４５に記載の組成物または使用。
【請求項４８】
疾患が腫瘍および／または癌である、請求項４３に記載の組成物または請求項４４に記載の使用。

【請求項４９】
個体におけるIL-6と関連した疾患の治療方法であって、請求項１～３４のいずれかに記載の結合性メンバー、または請求項３５～３８のいずれかに記載の抗体分子を、個体に投与するステップを含む、方法。
【請求項５０】
疾患が炎症性疾患および／または自己免疫疾患である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、悪液質、慢性閉塞性肺疾患、若年性特発性関節炎、喘息、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、クローン病またはアテローム性動脈硬化症である、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
疾患が関節リウマチである、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
疾患が腫瘍および／または癌である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５４】
請求項１～３４のいずれかに記載の結合性メンバー、請求項３９に記載のVHドメイン、請求項４０に記載のVLドメイン、または請求項３５～３８のいずれかに記載の抗体分子をコードする、ヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項５５】
請求項５４に記載の核酸でin vitroで形質転換された宿主細胞。
【請求項５６】
結合性メンバー、抗体分子または抗体VHもしくはVLドメインの製造方法であって、結合性メンバー、抗体分子または抗体VHもしくはVLドメインの製造のための条件下で請求項５５に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、方法。
【請求項５７】
結合性メンバー、抗体分子、VHドメインまたはVLドメインを単離および／または精製するステップをさらに含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
結合性メンバー、抗体分子、VHドメインまたはVLドメインを製剤化して少なくとも1種の追加の成分を含む組成物とするステップをさらに含む、請求項５６または請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
IL-6に対する抗体抗原結合ドメインの製造方法であって、以下のステップ：
HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む親VHドメインのアミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸の付加、欠失、置換または挿入によって、親VHドメインのアミノ酸配列変異体であるVHドメインを提供し、ここで該親VHドメインHCDR1、HCDR2およびHCDR3は表7に示されるHCDRセットであり、かつ場合により、そのように得られたVHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせて1つ以上のVH/VLの組み合わせを提供するステップ；および
親VHドメインのアミノ酸配列変異体である該VHドメインまたは該VH/VLの組み合わせもしくは複数の該組み合わせを試験して、IL-6に対する抗体抗原結合ドメインを同定するステップ
を含む、方法。
【請求項６０】
該1つ以上のVLドメインを、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む親VLドメインのアミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸の付加、欠失、置換または挿入によって提供し、ここで親VLドメインLCDR1、LCDR2およびLCDR3は表7に示されるVL CDRセットであり、各々が親VLドメインのアミノ酸配列変異体である1つ以上のVLドメインを作製する、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
親VHドメインのアミノ酸配列変異体である該VHドメインをCDR突然変異誘発によって提

供する、請求項５９または請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
IgG、scFvまたはFab抗体分子の構成要素として抗体抗原結合ドメインを製造するステップをさらに含む、請求項５９～６１のいずれかに記載の方法。
【請求項６３】
IL-6と結合する結合性メンバーの製造方法であって、以下のステップ：
VHドメインをコードする出発核酸または各々がVHドメインをコードする出発核酸レパートリーを提供し、ここで該VHドメインまたは複数のVHドメインは、置換対象のHCDR1、HCDR2および／またはHCDR3を含むか、またはHCDR1、HCDR2および／またはHCDR3コード領域を欠いている、ステップ；
該出発核酸または出発核酸レパートリーを、表7に示されるHCDR1、HCDR2、および／またはHCDR3をコードするかまたは表7に示されるHCDR1、HCDR2、および／またはHCDR3のアミノ酸配列の突然変異によって生成されたドナー核酸または複数のドナー核酸と組み合わせて、該ドナー核酸または複数のドナー核酸が出発核酸または出発核酸レパートリーのCDR1、CDR2および／またはCDR3領域に挿入されるようにして、VHドメインをコードする核酸の生成物レパートリーを提供するステップ；
該生成物レパートリーの核酸を発現させて、生成物VHドメインを作製するステップ；
場合により、該生成物VHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせるステップ；
IL-6に対する結合性メンバーを選択し、ここで該結合性メンバーは生成物VHドメインおよび場合によりVLドメインを含む、ステップ；および
該結合性メンバーまたはそれをコードする核酸を回収するステップ
を含む、方法。
【請求項６４】
ドナー核酸が該HCDR1および／またはHCDR2の突然変異によって生成される、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
ドナー核酸がHCDR3の突然変異によって生成される、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
ドナー核酸を核酸のランダム突然変異によって提供するステップを含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６７】
回収された結合性メンバー内に含まれる生成物VHドメインを抗体定常領域に連結させるステップをさらに含む、請求項５９～６６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６８】
生成物VHドメインおよびVLドメインを含むIgG、scFvまたはFab抗体分子を提供するステップを含む、請求項５９～６７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６９】
IL-6と結合する抗体抗原結合ドメインまたは結合性メンバーを、IL-6を中和する能力について試験するステップをさらに含む、請求項５９～６８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７０】
IL-6と結合しかつそれを中和する抗体分子を含む結合性メンバーを得る、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
抗体分子がscFvである、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
抗体分子がIgGである、請求項７０に記載の方法。
【請求項７３】
抗体分子組成物を製造するための方法であって、請求項５６～７２のいずれかに記載の方法を使用して抗体分子を得るステップ、および抗体分子を製剤化して少なくとも1種の追加の成分を含む組成物とするステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、IL-6の生物学的効果を阻害する、結合性メンバー、特に抗体分子に関する。該結合性メンバーは、IL-6と関連している疾患の治療に有用であり、該疾患には、炎症性疾患および腫瘍が含まれる。
【背景技術】
【０００２】
インターロイキン6（IL-6）は、種々の細胞タイプによって産生される26kDaの多面的な炎症性サイトカインであり、該細胞タイプには、刺激された線維芽細胞、単球および内皮細胞が含まれ、それらはin vivoでIL-6の主要な供給源となる。T細胞、B細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、骨芽細胞およびいくつかの他の細胞等の細胞は刺激されるとIL-6を産生することができる。IL-6はまた、腫瘍セルラインおよび腫瘍細胞、例えば肺癌、前立腺癌、骨髄腫、副腎腫および心臓粘液腫由来の細胞から発現される[1，2]。非炎症条件下では、脂肪組織からIL-6が分泌される[3]。
【０００３】
IL-6発現の調節はそれを産生している細胞タイプに依存する。多発性骨髄腫細胞では、IL-6は正のフィードバックループ（細胞の増殖を刺激するとともにIL-6をさらに産生させる）で作用するようである[4，5]。他の細胞タイプでは、IL-6は細胞の増殖および活性化を阻害するようであり、いくつかの炎症性サイトカインに対する負の調節因子として作用するかもしれない。
【０００４】
細胞のシグナル伝達を開始させるために、IL-6は、膜貫通受容体、IL-6受容体アルファ（IL-6Rα、IL-6Ra、IL-6R、gp80またはCD126とも称される）に低親和性で結合し、複合体「IL-6:IL-6Ra」を形成する。この複合体はgp130シグナル受容体と結合する。すなわちIL-6Rαおよびgp130は一緒になって高親和性IL-6結合部位を形成し、各2コピーのIL-6、IL-6Raおよびgp130から構成される六量体の形成を導く[6]。IL-6Raの膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインはシグナル伝達に必要とされない。IL-6Raは可溶性分泌型（sIL-6RまたはsIL-6Ra）としても存在するからである。可溶性受容体はIL-6Raメッセージのディファレンシャルスプライシングまたはタンパク質分解による分断によって生成される。sIL-6RはIL-6とのリガンド・レセプター複合体「IL-6:sIL-6Ra」を形成可能である。この複合体は細胞上のgp130と結合することができ、それによって該細胞がIL-6Raを発現しない場合でさえgp130陽性細胞での細胞のシグナル伝達を開始させる。ゆえに、sIL-6RはIL-6に応答性の細胞のレパートリーを広げる能力を有し、IL-6媒介性炎症において重要な役割を果たすと考えられる[7]。
【０００５】
ヒトIL-6リガンドの結晶構造は解明されている[6]。ヒトIL-6Raの細胞外ドメインの結晶構造[8]、およびIL-6/IL-6R/gp130複合体の六量体構造[9]も解明されている。これらの構造は、突然変異誘発研究と組み合わされて、種々の受容体構成要素との複合体中のIL-6の機能的活性に関与するIL-6表面上の3つの部位を同定した。部位1の残基はIL-6とIL-6Raの間の相互作用に関与する。部位2の残基はIL-6とgp130サイトカイン結合ドメインの間の相互作用に関与する。IL-6の部位3中の残基は、六量体の複合体中の第二のgp130のIg様ドメインとの相互作用に関与する。六量体のIL-6/IL-6R/gp130複合体中でIL-6がIL-6の第二分子と相互作用するIL-6上の第四の部位も同定されている[10]。
【０００６】
いくつかの抗IL-6リガンドモノクローナル抗体が単離されている。マッピング研究が実施され、上記のようにヒトIL-6表面の異なる結合部位にこれらが結合することを示している[11，12，13，14，15]。
【０００７】
また、いくつかの抗IL-6Raモノクローナル抗体が作製されていて、IL-6Ra上のそれらの

結合部位がマップされている[16，14，15，17]。

【０００８】

IL-6は、インターロイキン-11（IL-11）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、オンコスタチンM（OsM）、白血病抑制因子（LIF）、カルジオトロフィン様サイトカイン（CLC）、およびカルジオトロフィン1（CT-1）が含まれるサイトカインファミリーに属する。このファミリーの各メンバーはそれら自身の特異的受容体アルファサブユニットを有し、共通の受容体サブユニットgp130と複合体を形成する。gp130遺伝子をターゲティング破壊すると胚致死となる[18，19]。IL-6ファミリーのすべてのメンバーは肝細胞からの急性期タンパク質の発現を誘発することができる。

【０００９】

IL-6シグナル伝達は、JAKファミリーキナーゼによるチロシンリン酸化、およびその後の2つの主要な細胞内シグナル伝達カスケードであるSHP2/ERK MAPKおよびSTAT1/3経路の活性化を伴い、NF-IL-6およびAP-1を介する遺伝子発現を生じる[18，20]。

【００１０】

IL-6は広範囲の生物学的機能を示し、それには造血、急性期応答の誘発、T細胞活性化、抗体分泌の刺激、感染に対する宿主防御、骨髄腫細胞および破骨細胞活性化が含まれる[21，22]。IL-6の効果についてのレビューに関しては、参考文献を参照のこと[23]。IL-6はT細胞によって生成されるB細胞分化因子として最初に同定された[24]が、その後、多数の細胞タイプの強力なアクチベーターおよび増殖促進因子として同定されている。それはB細胞の最終的成熟を誘導して抗体産生細胞にし、かつT細胞活性化および増殖に必須の補助因子である。研究では、IL-6が自己反応性Tリンパ球の活性化ならびに細胞傷害性T細胞の増殖および分化に関与することが示されている。IL-6は補因子として造血にかかわり、造血幹細胞の活性化および分化を生じさせることが示されている。急性期応答に対するIL-6の影響も十分に報告されている[25]。IL-6は種々の急性期タンパク質、例えばフィブリノーゲン、アルファ抗キモトリプシン、血清アミロイドAおよびC反応性タンパク質をヒト肝細胞から誘導する。急性期タンパク質は免疫応答および炎症を制御し、組織再構築に影響を及ぼす。IL-6の血清中レベルは、種々の病理においてC反応性タンパク質の血清中レベルと良く相関する。それはIL-6が急性期応答の原因的役割を果たすことを示唆する。IL-6は骨芽細胞によって生産されることも示されていて、破骨細胞活性化および骨吸収に関与するようである[26，27，28]。逆説的に、IL-6が炎症性サイトカインとして役割を有するだけでなく、特定の状況および細胞タイプにおいて、他の炎症性サイトカインの効果を弱め、炎症の低減をもたらしうることが示唆されている。

【００１１】

IL-6は種々の生物学的効果を有するため、IL-6の増加は種々の疾患徴候に重要なサイトカインとしてかかわることが示されている。循環IL-6のレベルは、関節リウマチ、キャッスルマン病、若年性特発性関節炎およびクローン病等の疾患において増加することが示されている[29]。このため、IL-6はこれらの炎症性徴候での病理の駆動にかかわることが示されている。さらにまた、種々の腫瘍タイプはIL-6によって刺激されることが示されていて、該腫瘍タイプには、黒色腫、腎細胞癌、カポジ肉腫、卵巣癌、リンパ腫および白血病、多発性骨髄腫、および前立腺癌が含まれる[30]。さらにIL-6の循環レベルの増加がいくつかの癌で報告されている。いくつかの癌徴候では、IL-6レベルの増加が該疾患の予後指標として使用されている。

【００１２】

疾患でのIL-6の役割に起因して、種々のマウスおよびキメラ抗ヒトIL-6モノクローナル抗体が治療薬候補として開発されている。

【００１３】

US5856135は、マウスモノクローナル抗体「SK2」由来のIL-6に対する再構築ヒト抗体を報告している。

【００１４】

JP-10-66582は、IL-6に対するキメラ抗体を報告している。該抗体はIL-6のヘリックスD

領域（部位1）を認識すると示唆している。

【００１５】

WO2004/020633（EP1536012）は、ファージディスプレイ技術を使用して単離されたIL-6に対するヒトscFv抗体分子を記載している。該scFvは13 nMの親和性を有すると報告されている。

【００１６】

マウス抗IL-6抗体である、エルシリモマブ（elsilimomab）（B-E8としても知られる）は、多発性骨髄腫[31, 32]、腎細胞癌[33]および関節リウマチ[34]を有する患者を治療するために使用されていて、特定の診断マーカーの改善が3つの疾患全てでそれらを有する治療された患者において観察された。BE-8は、免疫芽球性または多形性大細胞リンパ腫を有するHIV陽性患者を治療するためにも使用されていて[35]、患者のおよそ50％で全身症状（すなわち発熱、発汗、悪液質）が軽減し、リンパ腫の自発成長が抑制される。

【００１７】

しかし、elsilimomabに対するヒト抗マウス抗体（HAMA）の産生に起因するこの抗体の急速なクリアランスおよびアナフィラキシー性反応の可能性のせいで、診療所でのその使用は制限されている[36]。

【００１８】

一般に、マウスモノクローナル抗体の臨床使用は制限される。そのような抗体はHAMAを誘導することが多いからである。マウス免疫グロブリンのFc部分に対するHAMAが生成されることがよくあり、それは抗IL-6 mAbの急速なクリアランスおよびアナフィラキシー性反応の可能性を生じさせる[36]。また、ヒトでのマウス抗体の薬物動態はヒト抗体と異なり、半減期が短く、クリアランスの割合が高いことが知られている。

【００１９】

ヒトでのマウス抗体の免疫原性を低減するため、マウス可変領域とヒト定常領域とを有するキメラ抗体が構築されている。キメラヒト・マウス抗IL-6抗体cCLB8（CNTO 328として知られる）は多発性骨髄腫を有する患者を治療するために使用されていて[5, 37]、大多数の患者で疾患安定化が観察されている。

【００２０】

しかし、キメラ抗体はマウスMAbより低免疫原性ではあるが、ヒト抗キメラ抗体（HACA）応答が報告されている[38]。

【００２１】

cCLB8に関するマッピング研究が行われている。該研究は、それがIL-6活性の部位Iインヒビターであることを示す。Brakenhoff et al [39]は、cCLB8がIL-6アミノ末端欠失突然変異体のPro46、Ser49、Glu51、Ile53、Asp54と結合し、欠失突然変異体のAsp62およびMet77とも（低い親和性ではあるが）結合することを実証した。同著者らは、cCLB8がB9細胞増殖アッセイにおいて野生型IL-6を阻害するがC末端欠失5を阻害しないこと、およびcCLB8が、C末端の最後の4アミノ酸残基が欠失しているIL-6 del C-4と結合しないことを示す。このデータは、cCLB8が、IL-6のC末端残基を含むエピトープと結合することを示唆する。

【００２２】

Kalai et al [17]は、cCLB8がIL-6突然変異体F106E、F102E/F106EまたはR207E/R210Eを認識できないことを実証した。しかし該抗体はIL-6突然変異体R207EおよびR207Wを認識する。突然変異体R207W＆R207Eに対するcCLB8の結合は野生型と比べて約50％である。このことは、残基F106およびR210がcCLB8結合エピトープに関与すること、および残基R207が結合に関与するが残基F106およびR210より影響が少ないことを示唆する。cCLB8は、野生型と比べて100％の活性で、IL-6部位I突然変異体R196M、K199N/Q203LおよびQ203Lと結合する。Brakenhoff et al [13]は、cCLB8が以下のIL-6変異体；Q182H、N183K、W185Q、W185G、W185R、T190P、Q182H/Q184P、W185R/S197N、Q187E/T190P、I164L/L186R/M189Iと結合することを実証した。このことは驚くにはあたらない。これらの変異の大多数がIL-6部位1残基から遠く離れているからである。

【００２３】
癌および炎症性疾患でのIL-6シグナル伝達を阻害する好ましい効果は、ヒト化抗IL-6Ra抗体トシリズマブ（Tocilizumab）（hPM-1、MRAおよびActemraとしても知られる）の使用によってさらに注目を浴びた。これはマウス抗IL6Ra抗体PM-1のヒト化型である。この抗体での患者の治療は、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、クローン病、骨髄増殖性疾患、キャッスルマン病および全身性エリテマトーデスを含む多くの疾患で有効であることが証明されている[40]。
【発明の概要】
【００２４】
発明者らは、IL-6に対する、非常に強力な高親和性結合性メンバーを単離することに成功した。その高親和性および効力、および本明細書中に記載の機能的研究におけるその性能のおかげで、本発明の結合性メンバーはヒトまたは動物体の治療処置および／または診断処置での使用に特に好適である。
【００２５】
該結合性メンバーは、本明細書中の他の箇所で詳細に記載されるように、IL-6と関連した疾患の治療に有用である。
【００２６】
炎症性疾患および癌の治療のためのヒト抗IL-6抗体は、既存のアプローチより優れた大きな利点を提供する。例えば、ヒト抗体はHAMAまたはHACA応答を誘発せず、非ヒトまたはキメラ抗体と比較して長いin vivo半減期を有する。
【００２７】
発明者らはまた、IL-6に対する結合性メンバーが、IL-6Raに対する結合性メンバーと比べて、特にin vivo投与および処置に関して、大きな利点を提供することを認識している。それは本明細書中の他の箇所で記載される通りである。
【００２８】
実施例でさらに詳細に記載されるように、発明者らは、表7に示されるCDR配列セットを有する、CAN022D10と称される親抗体分子を単離した。最適化プロセスを経て、発明者らは、その親CDR配列由来でかつ表7で指定される位置に置換を有するCDR配列を有する一群の抗体クローン：抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23を作製した。
【００２９】
ゆえに、例えば、抗体2は、Kabat（カバット）残基35がThrで置換されている親HCDR1配列（配列番号１３）を有することが表7からわかる。抗体14および22はHCDR3中に追加の残基、すなわちアミノ酸挿入：Kabat残基100D位のIle（配列番号５の親HCDR3配列中には存在しない）を含有する。抗体7、8、10、16-19、21および23はLCDR3中にKabat残基95を含有しないが、親LCDR3（配列番号１０）はKabat残基95位にProを含む。親HCDR3、および抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のすべての抗体のHCDR3配列は、Kabat残基95位のTrpおよびKabat残基101位のAspを有する。このことは、H95 TrpおよびH101 Aspが本発明の結合性メンバーにおけるIL-6への結合および／または効力に寄与しうることを示す。
【００３０】
本明細書中に記載の親抗体CAN022D10、および抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23の、VHドメイン、VLドメインおよびCDR配列は、添付の配列表に示される。
【００３１】
以下でさらに詳細に記載されるように、本発明の結合性メンバーは強力にIL-6を中和することが示されている。中和とは、IL-6の生物学的活性の阻害を意味する。本発明の結合性メンバーはIL-6の1種以上の活性を中和しうる。阻害される生物学的活性は、典型的には、IL-6の、1種以上のその結合パートナーに対する結合である。例えば、阻害される生物学的活性は膜貫通および／または可溶性IL-6Rαに対するIL-6の結合であってよい。こ

のことは、ここで簡潔に記載され、以下でさらに詳細に記載される次のアッセイにおいて実証される：TF-1アッセイは、TF-1細胞が可溶性IL-6Raを産生しないと思われるために、本発明の結合性メンバーが膜IL-6Raに対するIL-6の結合を阻害することを示す。そのような場合、本発明の結合性メンバーは膜受容体に対するIL-6の結合を阻害する。滑膜線維芽細胞アッセイでは、それが機能するためにsIL-6Raをこのアッセイに加える必要があることから、本発明の結合性メンバーは可溶性IL-6Raに対するIL-6の結合を阻害する。添加したIL-1ベータにより内因性IL-6の産生が誘発され、該IL-6は、本発明の結合性メンバーによって阻害されると、VEGF生産を妨げる。

【００３２】

本発明では、IL-6Rαに対するヒトまたは非ヒト霊長類の、例えばカニクイザルのIL-6の結合を阻害することができ、例えば結合性メンバーはIL-6Rαに対する成熟ヒトIL-6の結合を阻害することができる。

【００３３】

生物学的活性の阻害は部分的または完全阻害であってよい。結合性メンバーは、IL-6の生物学的活性を、該結合性メンバーの不存在下での活性の100％、または少なくとも95％、少なくとも90％、少なくとも85％、少なくとも80％、少なくとも75％、少なくとも70％、少なくとも60％、または少なくとも50％阻害しうる。

【００３４】

結合性メンバーの中和効力を測定することができる。特に記載しない限り、効力は通常IC_{50}値としてnM単位で表記される。機能的アッセイでは、IC_{50}は、生物学的応答をその最大応答の50％低下させる結合性メンバーの濃度である。リガンド結合研究では、IC_{50}は、リガンド-受容体複合体の形成を最大特異的結合レベルの50％低下させる濃度である。IC_{50}は、最大生物学的応答の％を結合性メンバー濃度の対数の関数としてプロットし、かつPrism（GraphPad）またはOrigin（Origin Labs）等のソフトウェアプログラムを使用してシグモイド関数をデータにフィッティングし、IC_{50}値を得ることによって算出することができる。効力は、当業者に公知のおよび／または本明細書中に記載のもしくは本明細書中で言及される1種以上のアッセイを使用して決定または測定することができる。

【００３５】

本明細書中に記載のアッセイ、例えばTF-1増殖アッセイまたは下記の他の細胞ベースのアッセイでの結合性メンバーによるIL-6活性の中和は、結合性メンバーがIL-6と結合しかつそれを中和することを示す。結合性メンバーとIL-6との結合を測定するために使用できる他の方法には、ELISA、ウエスタンブロッティング、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィーおよび生化学アッセイが含まれる。

【００３６】

本明細書中に記載の結合性メンバーは、内因性ヒトIL-6と結合しかつその生物学的効果を中和することが実証された。このことは、本明細書中の実施例1.7および2.7で報告される、内因性ヒトIL-6に応答したヒト滑膜線維芽細胞からのVEGF放出の阻害についてのアッセイで示される通りである。このアッセイでは、関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞がIL-1βおよび可溶性IL-6Rαでの刺激に応答してIL-6を産生し、IL-6誘発性のVEGF分泌を生じる。ゆえにヒト滑膜線維芽細胞によって産生されたIL-6は内因性ヒトIL-6である。内因性IL-6はヒトにおける医療処置の分子標的であるから、内因性IL-6の中和は該結合性メンバーの治療能力の重要な指標である。該アッセイは関節リウマチ患者から得られた滑膜線維芽細胞を用いて行われたため、その結果は関節リウマチを治療するための結合性メンバーの使用に特に関連する。VEGF放出アッセイで試験した最適化抗体分子の中和効力は既知の抗Il-6抗体CNTO-328の効力に勝るものであった。

【００３７】

本発明の結合性メンバーは、0.6 pMヒトIL-1βおよび2.4 nM可溶性ヒトIL-6Rαで刺激されたヒト滑膜線維芽細胞からのVEGF放出の阻害アッセイにおいて50 nM未満、例えば5 nM未満、例えば1 nM未満のIC_{50}を有しうる。

【００３８】

内因性IL-6はグリコシル化および非グリコシル化形態の混合物であることが知られている。内因性IL-6に対する本発明の結合性メンバーの結合は滑膜線維芽細胞アッセイで実証されている。このアッセイではヒト滑膜線維芽細胞由来のIL-6、すなわち内因性IL-6を利用するためである。

【００３９】

本発明の結合性メンバーはTF-1細胞のIL-6誘発性増殖を阻害する。TF-1は赤白血病患者から確立されたヒト前骨髄細胞（premyeloid）細胞系統である（Kitamura et al 1989）。TF-1細胞系統は生存および増殖に成長因子の存在を必要とする。TF-1細胞が応答できる個々の成長因子には、IL-6、GM-CSFおよびオンコスタチンMが含まれる。本発明の結合性メンバーは、20 pMヒトIL-6に応答したTF-1細胞の増殖の阻害に関するアッセイにおいて、100 nM未満、例えば20 nM、10 nMまたは1 nM未満、例えば100 pM、70 pM、50 pM、40 pM、30 pM、20 pMまたは10 pM未満のIC_{50}を有する。本明細書中に記載のように（実施例1.5を参照のこと）、親IgG「CAN022D10」はTF-1増殖アッセイにおいて約93 nMのIC50を有することが示され、その後、発明者らは、実質的に増加した効力（概して100 pM未満のIC_{50}）を有するCAN022D10の最適化変異体を作製した。このことは、実施例2.2、2.5および2.6（それぞれ表3、4および5）に示される通りである。特に、最適化クローンのいくつか、例えば生殖細胞系列化IgG抗体7、抗体17および抗体18に関するIC_{50}値は5 pM以下程度の低い値であることが測定された。このことは、これらの抗体の極めて高い中和効力を示す。

【００４０】

本発明の結合性メンバーはB9細胞のIL-6誘発性増殖を阻害する。B9細胞は、IL-6に対するその特異的応答に基づいて選択されたマウスB細胞ハイブリドーマ細胞系統B13.29のサブクローンである。B9細胞は生存および増殖にIL-6を必要とし、非常に低濃度のIL-6に応答する。そのような場合、IL-6抗体の存在下でのこれらの細胞の増殖を評価し、該抗体の親和性を決定することができる。本明細書中の実施例2.10は、抗体18がIL-6に応答したB9細胞の増殖を阻害し、このアッセイにおいて高親和性を示したことを示す。

【００４１】

関節リウマチでの自己抗体産生はほとんどがIgMクラスの抗体である。SKW6.4はクローン性IgM分泌ヒトリンパ芽球様B細胞系統である。IL-6で刺激されると、これらの細胞はIgMを分泌し、ゆえにこのアッセイは関節リウマチに関連していると理解された。SKW6.4細胞をアッセイにおいて使用し、IL-6に応答したIgM分泌の阻害を測定することによってIL-6の中和についての結合性メンバーの効力を決定することができる。本発明の結合性メンバーは、100 pMヒトIL-6に応答したIgM分泌の阻害についてのSKW6.4細胞アッセイにおいて10 pM未満、例えば5 pM未満のIC_{50}を有しうる。抗体18はこのアッセイでIL-6の影響を中和することが示された - 実施例2.11（表9）を参照のこと。

【００４２】

本発明は、ヒトIL-6に対する高親和性結合性メンバーを提供する。カニクイザル由来のIL-6に対する高親和性も実証された。本発明の結合性メンバーは、1 nM以下、例えば100 pM、50 pM、30 pMまたは10 pM以下のK_DでヒトIL-6および／またはカニクイザルIL-6と結合できる。該K_Dは表面プラズモン共鳴、例えばBIAcore（登録商標）によって決定することができる。親和性のBIAcore（登録商標）測定については本明細書中の実施例2.9に記載されている。特に、抗体7および18の親和性はBIAcore（登録商標）機器を使用して測定可能な限界を超えることが見出された。このことは10 pM未満のK_D値であることを示す。

【００４３】

本明細書中の他の箇所で記載されるように、表面プラズモン共鳴は、支持体に付着させたリガンド上に液体相のアナライトを通過させて、アナライトとリガンドとの間の結合を測定することを含む。例えば、表面プラズモン共鳴は、それにより支持体に付着させた結合性メンバー上に液体相のIL-6を通過させることにより実施すればよい。表面プラズモン共鳴データを一価アナライトデータモデルにフィッティングすることができる。親和性定数Kdは、一価アナライトデータモデルを使用して、表面プラズモン共鳴によって測定された速度定数kd/kaの比から算出することができる。

【００４４】
あるいは、IL-16に対する結合性メンバーの親和性を、例えば種々の濃度のヒトIL-6に応答したTF-1細胞の増殖の阻害についてのアッセイに基づいて、シルド分析（Schild analysis）によって算出することができる。本発明の結合性メンバーは、シルド分析によって算出すると、10 pM未満、例えば1 pM未満の親和性を有する。本明細書中の実施例2.10で報告されるように、ヒトIL-6に対する抗体18の親和性はシルド分析を使用して0.4 pMであると算出された。
【００４５】
本発明の結合性メンバーは、場合により、以下のもの：白血病阻害因子（LIF）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、IL-11またはオンコスタチンM、のうち1種以上またはすべてと交差反応しないものでもよい。
【００４６】
本発明の結合性メンバーは、場合により、ラットIL-6、マウスIL-6および／またはイヌIL-6と交差反応しないものでもよい。
【００４７】
他のタンパク質または非ヒトIL-6との結合に関する結合性メンバーの交差反応性は、例えば実施例1.6に記載のDELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイ等の、支持体上に固定された結合性メンバーに対するヒトIL-6結合の阻害に関する時間分解蛍光アッセイにおいて試験することができる。例えば、任意のまたはすべてのLIF、CNTF、IL-11、オンコスタチンM、ラットIL-6およびマウスIL-6は、支持体上に固定された結合性メンバーに対する標識ヒトIL-6結合の阻害に関する時間分解蛍光アッセイにおいて、阻害を示さないか、50％未満の阻害を示すか、または0.5 mMより大きいかもしくは1 mMより大きいIC_{50}を有しうる。例えば、LIF、CNTF、IL-11、オンコスタチンM、ラットIL-6およびマウスIL-6のいずれかまたはすべては、交差反応性を試験するための時間分解蛍光アッセイにおいて、阻害を示さないか、または非標識ヒトIL-6のIC_{50}の少なくとも10倍または100倍のIC_{50}を有しうる。このアッセイでは、標識野生型成熟ヒトIL-6を、結合性メンバーとのその相互作用のKdである終濃度で使用する。
【００４８】
本発明の結合性メンバーはカニクイザルIL-6と交差反応しうる。交差反応性は、上記時間分解蛍光アッセイにおける支持体上に固定された結合性メンバーに対する標識ヒトIL-6結合の阻害として決定することができる。例えば、カニクイザルIL-6は、この時間分解蛍光アッセイにおいて5 nM未満、例えば2.5 nM未満、例えば約1 nMのIC_{50}を有する。カニクイザルIL-6は、このアッセイにおける非標識ヒトIL-6のIC_{50}とは10倍未満の差、例えば5倍未満の差を示すIC_{50}を有しうる。
【００４９】
交差反応性を決定するための時間分解蛍光アッセイに関する詳細なプロトコルは材料および方法セクションに記載する。このアッセイで得られる交差反応性データの例は実施例1.6の表2に示される。
【００５０】
実施例2.8で報告するように、本明細書中に記載の結合性メンバーはカニクイザルIL-6と高い交差反応性を示し、ラット、マウスまたはイヌIL-6とは交差反応性を示さないか、または限られた交差反応性しか示さなかった。
【００５１】
交差反応性データによって示されることは、本明細書中に記載の結合性メンバーが、ヒトおよびカニクイザルIL-6配列間で保存されているがマウス、ラットおよびイヌIL-6配列中ではヒト配列と比べて異なっている、IL-6上のエピトープと結合することである。
【００５２】
本明細書中に記載の結合性メンバーは、IL-6の「部位1」領域と結合すると考えられる。該「部位1」領域は、IL-6Rαと相互作用する領域である。ゆえに本発明の結合性メンバーは、IL-6Rαに対するIL-6結合を競合的に阻害し、それによってIL-6Rαによって媒介さ

れるIL-6の生物学的効果を中和する。

【００５３】

発明者らは、本明細書中に記載の抗体の1つである抗体18が、部位1残基中に突然変異が遺伝子工学的に導入されている突然変異体ヒトIL-6と結合する能力を調べた。実施例3に記載のように、発明者らは、抗体18による結合の低下を生じさせるヒトIL-6中の突然変異を同定した。このことは、その突然変異残基が、抗体18による認識に関与したこと、およびこの抗体が結合するIL-6上のエピトープの部分を構成することを示す。

【００５４】

例えば、支持体上に固定されている抗体18に対する標識野生型ヒトIL-6の結合の阻害に関する時間分解蛍光アッセイでは、Arg207Glu突然変異体ヒトIL-6（配列番号１７７）については阻害が観察されなかった。このことは抗体18がヒトIL-6と残基Arg207で結合することを示す。

【００５５】

抗体18および抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、19、21、22および23はすべて、親抗体CAN22C10由来であり、かつそれらすべてが構造的に関連したCDRを有するため、すべてのこれらの抗体分子は同一または非常に類似のオーバーラップエピトープと結合すると予測される。したがって、抗体18を用いて得られたエピトープマッピングの結果は、本明細書中に記載の他の最適化抗体であるCAN22D10を代表するものと予測される。

【００５６】

本発明の結合性メンバーは、ヒトIL-6とPhe102および／またはSer204で結合する。本発明の結合性メンバーはまた、ヒトIL-6とArg207で結合する。場合により、結合性メンバーは、Phe102および／またはSer 204との結合に加えて、IL-6分子中の隣接する残基または構造的に隣接する残基と結合しうる。従来通り、残基の番号付けは完全長ヒトIL-6（配列番号１６１）に対応する。しかし、成熟ヒトIL-6を使用して結合を決定してもよい。IL-6残基に対する結合は、以下で説明されるように、部位特異的突然変異誘発によって決定される。

【００５７】

構造を活性と相関させるためのタンパク質の単一のアミノ酸および領域の突然変異誘発は当業者に周知であり、抗体と結合するタンパク質の領域を定めるために使用されている[41]。突然変異体ヒトIL-6との結合および／またはその中和は、結合性メンバーがPhe102、Ser204および／またはArg207と結合するかどうかを評価するために使用することができる。野生型と比較した、突然変異体IL-6の場合の結合もしくは中和の不存在、または結合もしくは中和の顕著な低下は、結合性メンバーがその突然変異残基と結合することを示す。

【００５８】

IL-6中の残基に対する結合は、支持体上に固定されている結合性メンバーに対する標識野生型ヒトIL-6の結合の阻害についての時間分解蛍光アッセイにおいて、選択した残基の位置で突然変異させたIL-6を使用して決定することができる。該アッセイでは、標識野生型成熟ヒトIL-6は、結合性メンバーとのその相互作用のKdと等しい終濃度である。このアッセイおよび得られる競合データの例は実施例3に示され、結果は表10に記載される。突然変異体IL-6が結合性メンバーに対する標識野生型IL-6の結合を阻害しない場合、または突然変異体IL-6が非標識野生型IL-6のIC50より大きい（例えば10倍または100倍より大きい）IC50を有する場合、このことは、その突然変異残基と結合性メンバーが結合することを示す。

【００５９】

Phe102Glu突然変異体ヒトIL-6（配列番号１７５）、Ser204Glu突然変異体ヒトIL-6（配列番号１７６）、および／またはArg207Glu突然変異体ヒトIL-6（配列番号１７７）は、支持体上に固定されている本発明の結合性メンバーに対する標識野生型ヒトIL-6の結合の阻害に関する時間分解蛍光アッセイにおいて、阻害を示さないか、または野生型ヒトIL-6（配列番号１６５）のIC_{50}の100倍を超えるIC_{50}を有しうる。該アッセイでは、標識野生

型ヒトIL-6は、結合性メンバーとのその相互作用のKdと等しい終濃度である。

【００６０】

本発明の結合性メンバーは、場合により、残基Phe102、Ser204および／またはArg207の位置での突然変異、例えば突然変異Phe102Glu、Ser204Glu、Ser204Tyrおよび／またはArg207Gluを有する突然変異体ヒトIL-6と結合せず、かつ／またはそれを中和しないものでありうる。突然変異体ヒトIL-6配列の例は配列番号１７５～１７７である。ゆえに、本発明の結合性メンバーはIL-6Rαに対するこれらの突然変異体IL-6分子の1種以上の結合を阻害しない場合がある。

【００６１】

本発明の結合性メンバーは抗体分子、例えばヒト抗体分子を含みうる。該結合性メンバーは通常、抗体VHおよび／またはVLドメインを含む。結合性メンバーのVHおよびVLドメインもまた、本発明の部分として提供される。各VHおよびVLドメインには、相補性決定領域（「CDR」）およびフレームワーク領域（「FR」）が含まれる。VHドメインはHCDRセットを含み、VLドメインはLCDRセットを含む。抗体分子は、VH CDR1、CDR2およびCDR3ならびにフレームワークを含む抗体VHドメインを含みうる。それは、あるいはまたはさらに、VL CDR1、CDR2およびCDR3ならびにフレームワークを含む抗体VLドメインを含みうる。VHまたはVLドメインフレームワークは以下の構造でCDRが組み入れられている4つのフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4を含む。

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

本発明の抗体VHおよびVLドメインおよびCDRの例は、本開示内容の一部分を構成する添付の配列表に列挙されている通りである。追加のCDRは以下および表7に開示される。本明細書中で開示されるすべてのVHおよびVL配列、CDR配列、CDRセットおよびHCDRセットおよびLCDRセットは、本発明の態様および実施形態である。本明細書中に記載のように、「CDRセット」はCDR1、CDR2およびCDR3を含む。ゆえに、HCDRセットとは、HCDR1、HCDR2およびHCDR3に言及するものであり、LCDRセットとは、LCDR1、LCDR2およびLCDR3に言及するものである。特に記載しない限り、「CDRセット」には、HCDRおよびLCDRが包含される。典型的には、本発明の結合性メンバーはモノクローナル抗体である。

【００６２】

本発明の結合性メンバーは、さらに以下で考察されるように、非抗体タンパク質骨格（scaffold）中の1つ以上のCDR、例えばCDRセットによって通常提供される、非抗体分子内の抗原結合部位を含みうる。

【００６３】

本明細書中で記載されるのは、親CAN022D10に関して表7に示される親CDRセットを含む結合性メンバーであり、該セットでは、HCDR1は配列番号３（Kabat残基31-35）であり、HCDR2は配列番号４（Kabat残基50-65）であり、HCDR3は配列番号５（Kabat残基95-102）であり、LCDR1は配列番号８（Kabat残基24-34）であり、LCDR2は配列番号９（Kabat残基50-56）であり、LCDR3は配列番号１０（Kabat残基89-97）である。

【００６４】

本発明の結合性メンバーは、本明細書中に記載の1つ以上のCDR、例えばCDR3を含んでよく、場合によりさらにCDR1およびCDR2を含んでCDRセットを構成してよい。該CDRまたはCDRセットは親CDRまたは親CDRセットであるか、または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22または23のいずれかの抗体のCDRまたはCDRセットであるか、または本明細書中に記載のそれらの変異体であってよい。

【００６５】

例えば、本発明の結合性メンバーまたはVLドメインは配列番号１２０のアミノ酸配列を有するLCDR3を含んでよい。

【００６６】

結合性メンバーは、開示されているHおよび／またはL CDRセット内に1つ以上のアミノ酸突然変異を有する、親抗体、または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22または23のいずれかのHおよび／またはL CDRセットを含んでよい。各アミノ酸突然

変異は1アミノ酸の置換、欠失または挿入である。例えば、Hおよび／またはL CDRセット内に20個まで、例えば12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2個までの突然変異、例えば置換が存在しうる。例えば、HCDR3中に6、5、4、3または2個までの突然変異、例えば置換が存在し、かつ／またはLCDR3中に6、5、4、3、または2個までの突然変異、例えば置換が存在しうる。HCDR3および／またはLCDR3は、場合により、開示されているHおよび／またはLCDRセットと比較して1アミノ酸の挿入または欠失を含有する。置換は、例えば、表7に示される、抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22または23のいずれかにおいて置換されている位置のものであってよい。ゆえに置換は、場合により、以下から選択されるKabat番号の位置のものでありうる：

HCDR1中のKabat残基35；
HCDR2中のKabat残基64；
HCDR3中のKabat残基96、97、98、99、100、100A、100B、100Cおよび／または102；
LCDR1中のKabat残基34；
LCDR3中のKabat残基89、90、91、92、93、94、96または97。

【００６７】

アミノ酸突然変異は表7に示される突然変異、例えば記載されたアミノ酸置換を含んでよい。

【００６８】

例えば、本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基Ile 35がThrまたはValによって置換された親HCDR1を含んでよい。

【００６９】

本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基Lys 64がArgによって置換された親HCDR2を含んでよい。

【００７０】

結合性メンバーまたはVHドメインは、以下の突然変異のうち1つ以上を有する親HCDR3を含んでよい：

Kabat残基Ala 96がGluによって置換されている；
Kabat残基Asp 97がGluまたはAsnによって置換されている；
Kabat残基Asp 98がGly、GluまたはHisによって置換されている；
Kabat残基His 99がGlyまたはThrによって置換されている；
Kabat残基Tyr 100がPro、Asn、Arg、TrpまたはAlaによって置換されている；
Kabat残基Tyr 100AがAla、Arg、Thr、Gly、Asn、ProまたはSerによって置換されている；
Kabat残基100BがHis、Trp、Gln、ProまたはThrによって置換されている；
Kabat残基Ile 100CがAla、Val、His、TyrまたはLeuによって置換されている；
IleがKabat残基100D位に挿入されている；
Kabat残基Val 102がLeu、His、MetまたはIleによって置換されている。

【００７１】

ゆえに、本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基100DがIleであるかまたはKabat残基100Dが不存在であるHCDR3を含んでよい。

【００７２】

本発明の結合性メンバーまたはVLドメインは、Kabat残基Ala 34がThrによって置換された親LCDR1を含んでよい。

【００７３】

本発明のVLドメインの結合性メンバーは、以下の突然変異のうち1つ以上を有する親LCDR3を含んでよい：

Kabat残基Gln 89がMetまたはAlaによって置換されている；
Kabat残基Gln 90がAsn、SerまたはAlaによって置換されている；
Kabat残基Ser 91がAsn、Gly、AlaまたはHisによって置換されている；
Kabat残基Tyr 92がTrp、Ser、LysまたはPheによって置換されている；

Kabat残基Ser 93がLeu、Lys、ArgまたはAlaによって置換されている；
Kabat残基Thr 94がAla、GlyまたはProによって置換されている；
Kabat残基Pro 95が欠失している；
Kabat残基Trp 96がGlyによって置換されている；
Kabat残基Thr 97がSerによって置換されている。

【００７４】

ゆえに、本発明の結合性メンバーまたはVLドメインは、Kabat残基95がProであるかまたはKabat残基95が不存在であるLCDR3を含んでよい。

【００７５】

本発明は、ヒトIL-6に対する単離された結合性メンバーであって、CDRセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3（該CDRセットは、CDRセット［該セット中、
HCDR1は配列番号３のアミノ酸配列を有し；
HCDR2は配列番号４のアミノ酸配列を有し；
HCDR3は配列番号１１５のアミノ酸配列を有し；
LCDR1は配列番号８のアミノ酸配列を有し；
LCDR2は配列番号９のアミノ酸配列を有し；および
LCDR3は配列番号１２０のアミノ酸配列を有する］
からの22個以下のアミノ酸変化、例えば21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1個までの変化を有するかまたは変化を有さない）を含む、上記結合性メンバーを提供する。

【００７６】

アミノ酸変化は置換、挿入または欠失であってよい。置換対象でありうるKabat位置の例、および残基置換の例は以下で述べられ、表7はいくつかの置換を例示する。

【００７７】

表7に示されるように、HCDR3およびLCDR3の長さは、本明細書中に記載の異なる最適化抗体間で様々である。CAN022D10の親CDRと比べて、Kabat残基100～102の間の挿入（表7ではKabat残基100Dの位置に示される）がいくつかの抗体で観察され、Kabat残基92～97の間の欠失が他の抗体で観察された。Kabat残基95の位置での欠失は挿入と一緒には観察されなかった。ゆえに、より長い12残基のHCDR3配列を、より長い9残基のLCDR3配列と組み合わせることが有益であるかもしれず、より短い11残基のHCDR3配列を、より短い8残基のLCDR3配列と組み合わせることが有益であるかもしれない。

【００７８】

Kabatナンバリングシステムによれば、LCDR3の残基は89～97にナンバリングされる。9残基よりも短いLCDR3配列はKabatナンバリングシステムによって想定されていない。本発明では、結合性メンバーは、9残基より短いLCDR3を有してよく、例えば表7に示されるようにLCDR3は8残基長であってよい。発明者らは、LCDR3の8残基をそれぞれ89、90、91、92、93、94、96および97とナンバリングする。ゆえに表7では、欠失はKabat残基95の位置で示される。しかし、該欠失の効果はLCDR3配列の長さを低減させることであり、および原則として、該欠失が残基89～97のいずれかの位置、例えば残基92～97のいずれかの位置で起きていると考えることができることが、理解されよう。

【００７９】

HCDR3では、Kabatナンバリングシステムを、Kabat残基100～101間でのナンバリングシステムの拡張によってCDR長の可変性に対応させる。例えば、必要に応じて、9残基のHCDR3では残基100Aを含ませ、10残基のHCDR3では100Bを加え、11残基のHCDR3では100Cを加え、12残基のHCDR3では100Dを加える。表7では、親HCDR3と比較して、いくつかの最適化クローンのHCDR3における追加のアミノ酸の挿入はKabat残基100Dの位置に示される。しかし、原則として、この挿入はKabat残基100～102の任意の位置で起きていると考えてよいことが理解されよう。

【００８０】

本明細書中で示されるように、結合性メンバーの1つ以上のCDR、例えばHCDR3および／

またはLCDR3中に1つ以上の挿入または欠失が存在してもよい。例えば、本発明の結合性メンバーは、抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかまたは本明細書中に記載のその変異体のCDRセットを含んでよく、各CDRは、場合により、1残基だけCDRの長さを増大させる挿入を有するかまたは1残基だけCDRの長さを減少させる1残基の欠失を有する。挿入および／または欠失はHCDRおよび／またはLCDR、例えばHCDR3および／またはLCDR3中に生じていてもよい。

【００８１】

例えば、結合性メンバーは、例えば、CDRセット（このセットにおいて：
HCDR1は配列番号３のアミノ酸配列を有し；
HCDR2は配列番号４のアミノ酸配列を有し；
HCDR3は配列番号１１５のアミノ酸配列を有し；
LCDR1は配列番号８のアミノ酸配列を有し；
LCDR2は配列番号９のアミノ酸配列を有し；および
LCDR3は配列番号１２０のアミノ酸配列を有する）
において20個以下のアミノ酸置換を有するCDRセットを含み、
該結合性メンバーは、場合により、HCDR3の長さを増大させる1残基の挿入またはHCDR3の長さを減少させる1残基の欠失を有し、かつ／または
LCDR3の長さを増大させる1残基の挿入またはLCDR3の長さを減少させる1残基の欠失を有する。

【００８２】

本発明の結合性メンバーは、配列番号１１５のHCDR3中の1残基の挿入および／または配列番号１２０のLCDR3中の1残基の挿入を有してよい。

【００８３】

挿入または欠失はCDR中の任意の位置で生じていてよい。例えば、HCDR3中では、挿入または欠失はKabat残基95-102のいずれかの残基、例えばKabat残基100-102のいずれかの残基のものであってよい。例えば、LCDR3中では、挿入または欠失はKabat残基89-97のいずれかの残基、例えばKabat残基92-97のいずれかの残基のものであってよい。

【００８４】

本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基35がIle、ThrまたはValであるHCDR1を含んでよい。

【００８５】

本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基64がLysまたはArgであるHCDR2を含んでよい。

【００８６】

本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは、Kabat残基95がTrpでありかつ／またはKabat残基101がAspであるHCDR3を含んでよい。

【００８７】

本発明の結合性メンバーまたはVHドメインは：
Kabat残基96がAlaまたはGluであり；
Kabat残基97がAsp、GluまたはAsnであり；
Kabat残基98がAsp、Gly、GluまたはHisであり；
Kabat残基99がHis、GlyまたはThrであり；
Kabat残基100がPro、Tyr、Asn、Arg、TrpまたはAlaであり；
Kabat残基100AがPro、Tyr、Ala、Arg、Thr、Gly、Asn、ProまたはSerであり；
Kabat残基100BがTrp、Tyr、His、Gln、ProまたはThrであり；
Kabat残基100CがIle、Ala、Val、His、TyrまたはLeuであり；および
Kabat残基102がLeu、Val、His、MetまたはIleである
HCDR3を含んでよい。

【００８８】

本発明の結合性メンバーまたはVLドメインは、Kabat残基34がAlaまたはThrであるLCDR1

を含んでよい。

【００８９】

本発明の結合性メンバーまたはVLドメインは：
Kabat残基89がGln、MetまたはAlaであり；
Kabat残基90がGln、Asn、SerまたはAlaであり；
Kabat残基91がSer、Asn、Gly、AlaまたはHisであり；
Kabat残基92がTrp、Tyr、Ser、LysまたはPheであり；
Kabat残基93がLeu、Ser、Lys、ArgまたはAlaであり；
Kabat残基94がGly、Thr、AlaまたはProであり；
Kabat残基96がGlyまたはTrpであり；および
Kabat残基97がSerまたはThrである
LCDR3を含んでよい。

【００９０】

本発明は、親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のHCDR1、HCDR2および／またはHCDR3、および／または親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のLCDR1、LCDR2および／またはLCDR3、例えば表7に示される親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のCDRセットを含む結合性メンバーを提供する。

【００９１】

例えば、本発明の結合性メンバーはCDRセット：HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3（ここで、HCDR1は配列番号１１３であり；HCDR2は配列番号１１４であり；HCDR3は配列番号１１５であり；LCDR1は配列番号１１８であり；LCDR2は配列番号１１９であり；およびLCDR3は配列番号１２０であり、これは抗体18のCDRに相当する）を含んでよい。

【００９２】

結合性メンバーはこれらの抗体のうちの1つの抗体のVH CDRセットを含んでよい。場合により、それは、これらの抗体のうちの1つの抗体のVL CDRセットを含んでもよく、該VL CDRはVH CDRと同一または異なる抗体由来であってよい。

【００９３】

親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のHCDRセットを含むVHドメイン、および／または親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のLCDRセットを含むVLドメインもまた、本発明によって提供される。

【００９４】

典型的には、VHドメインをVLドメインと対にして抗体抗原結合部位を提供するが、さらに以下で考察されるように、VHまたはVLドメイン単独を使用して抗原と結合させることができる。抗体2のVHドメインを抗体2のVLドメインと対にして、抗体2のVHおよびVLドメインをともに含む抗体抗原結合部位を形成させることができる。本明細書中で開示される他のVHおよびVLドメインに関して、類似の実施形態が提供される。他の実施形態では、抗体2のVHを該抗体のVL以外のVLドメインと対にする。軽鎖の混合（promiscuity）は当技術分野において十分に確立されている。やはり、本明細書中で開示される他のVHおよびVLドメインに関して、類似の実施形態が本発明によって提供される。

【００９５】

ゆえに、親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のVHを親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかの抗体のVLと組み合わせてもよい。

【００９６】

結合性メンバーは、抗体フレームワーク内に1つ以上のCDR、例えばCDRセットを有する抗体分子を含んでよい。例えば、抗体の1つ以上のCDRまたはCDRセットをフレームワーク

（例えばヒトフレームワーク）内に移植して抗体分子を提供することができる。該フレームワーク領域はヒト生殖細胞系列遺伝子セグメント配列のフレームワーク領域であってよい。ゆえに、該フレームワークを生殖細胞系列化し、それによりフレームワーク内の1個以上の残基を、最も類似するヒト生殖細胞系列フレームワーク中の等価な位置の残基に適合するよう変化させてよい。当業者は、抗体のフレームワーク配列に配列が最も類似している生殖細胞系列セグメントを生殖細胞系列化前に選択し、該抗体の親和性または活性を試験して、生殖細胞系列化が本明細書中に記載のアッセイでの抗原結合または効力を顕著に低下させないことを確認することができる。ヒト生殖細胞系列遺伝子セグメント配列は当業者に公知であり、例えばVBaseコンピレーション（compilation）から入手することができる。

【００９７】

本発明の結合性メンバーは、ヒト生殖細胞系列フレームワーク、例えばVh3_DP-86_(3-66)中のHCDRセットを含むVHドメインを有する、単離されたヒト抗体分子であってよい。ゆえに、VHドメインフレームワーク領域FR1、FR2および／またはFR3はヒト生殖細胞系列遺伝子セグメントのフレームワーク領域Vh3_DP-86_(3-66)を含んでよく、かつ／またはこのヒト生殖細胞系列遺伝子セグメントのフレームワーク残基に適合するようにフレームワーク残基を突然変異させることによって生殖細胞系列化することができる。FR4はヒト生殖細胞系列jセグメントJH2のフレームワーク領域を含んでよい。VH FR1のアミノ酸配列は配列番号１６７であってよい。VH FR2のアミノ酸配列は配列番号１６８であってよい。VH FR3のアミノ酸配列は配列番号１６９であってよい。VH FR4のアミノ酸配列は配列番号１７０であってよい。

【００９８】

通常、結合性メンバーはまた、例えばヒト生殖細胞系列フレームワーク（例えばVk1_L12）中の、LCDRセットを含むVLドメインを有する。ゆえに、VLドメインフレームワーク領域はヒト生殖細胞系列遺伝子セグメントVk1_L12のフレームワーク領域FR1、FR2および／またはFR3を含んでよく、かつ／またはこのヒト生殖細胞系列遺伝子セグメントのフレームワーク残基に適合するようにフレームワーク残基を突然変異させることによって生殖細胞系列化することができる。FR4はヒト生殖細胞系列jセグメントJK2のフレームワーク領域を含んでよい。VL FR1のアミノ酸配列は配列番号１７１であってよい。VL FR2のアミノ酸配列は配列番号１７２であってよい。VL FR3のアミノ酸配列は配列番号１７３であってよい。VL FR4のアミノ酸配列は配列番号１７４であってよい。

【００９９】

生殖細胞系列化VLドメインは、バーニア（Vernier）残基の位置で生殖細胞系列化してもしなくてもよいが、通常はそうしない。

【０１００】

本発明の抗体分子またはVHドメインは、以下の重鎖フレームワーク領域セット：
FR1配列番号１６７；
FR2配列番号１６８；
FR3配列番号１６９；
FR4配列番号１７０；
を含むか、または1、2、3、4または5個のアミノ酸変化、例えば置換、を有する該重鎖フレームワーク領域セットを含んでよい。

【０１０１】

本発明の抗体分子またはVLドメインは、以下の軽鎖フレームワーク領域セット：
FR1配列番号１７１；
FR2配列番号１７２；
FR3配列番号１７３；
FR4配列番号１７４；
を含むか、または1、2、3、4または5個のアミノ酸変化、例えば置換、を有する該軽鎖フレームワーク領域セットを含んでよい。

【０１０２】
アミノ酸変化は置換、挿入または欠失であってよい。
【０１０３】
例えば、本発明の抗体分子は、重鎖および軽鎖フレームワーク領域セット
（ここで、
重鎖FR1は配列番号１６７であり；
重鎖FR2は配列番号１６８であり；
重鎖FR3は配列番号１６９であり；
重鎖FR4は配列番号１７０であり；
軽鎖FR1は配列番号１７１であり；
軽鎖FR2は配列番号１７２であり；
軽鎖FR3は配列番号１７３であり；
軽鎖FR4は配列番号１７４である）
を含むか、または10個以下、例えば5個以下のアミノ酸変化、例えば置換、を有する該重鎖および軽鎖フレームワーク領域セットを含んでよい。例えば、該重鎖および軽鎖フレームワーク領域セット中に1個または2個のアミノ酸置換が存在してもよい。
【０１０４】
非生殖細胞系列化抗体分子は、生殖細胞系列化抗体分子と比べて同一のCDRを有するが、異なるフレームワークを有する。本明細書中の添付の配列表に示される抗体配列のうち、抗体番号7、10、17および18の配列が、生殖細胞系列化されている。生殖細胞系列化抗体2～5、8、14、16、19および21～23は、これらの抗体について本明細書中で示されるVHおよびVLドメイン配列のフレームワーク領域を生殖細胞系列化することによって製造することができる。
【０１０５】
抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のそれぞれのカッパ（κ）VLドメインのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列中に示される3'のcgtコドン、および対応するアルギニン残基を、これらの抗体の発現scFvおよびIgG配列中に含めた。該配列のC末端アルギニン残基はKabat残基108に相当する。この残基およびそのコーディングトリプレットcgtの起源は以下で説明する。
【０１０６】
該IgGの軽鎖を発現するために、VLドメインをコードする第一エキソン、CLドメインをコードする第二エキソン、および第一エキソンと第二エキソンを分離するイントロンを含む抗体軽鎖をコードするヌクレオチド配列を用意した。通常条件下で、該イントロンは細胞のmRNAプロセシング機構によってスプライシング除去され、第一エキソンの3'末端と第二エキソンの5'末端が連結される。そこで、該ヌクレオチド配列を有するDNAをRNAとして発現させて、第一および第二エキソンをスプライシングして一緒にした。スプライシングされたRNAの翻訳によってVLドメインおよびCLドメインを含むポリペプチドが得られる。定常ドメインの選択は、カッパ軽鎖については、橋渡しをしているアミノ酸がアルギニンでありcgaコドンによって形成されること、その最初のシトシンはエキソン１中にコードされ、グアニンとアデニンはエキソン２中にコードされることが、重要である。
【０１０７】
スプライシング後、抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23では、Kabat残基108に位置するArgはVLドメインフレームワーク4配列の最後の塩基（c）およびCLドメインの最初の2塩基（gt）によってコードされる。
【０１０８】
Kabat残基108のアルギニン残基は該抗体分子のVLドメインのC末端残基であると考えられる。
【０１０９】
本発明の結合性メンバーは、（i）IL-6と結合し、かつ（ii）本明細書中に開示されている結合性メンバー、VHおよび／またはVLドメイン、CDR、例えばHCDR3、および／または

CDRセットを含む任意の結合性メンバーと、IL-6との結合に関して競合する結合性メンバーであってよい。

【０１１０】

結合性メンバー間の競合は、例えばELISAを使用して、かつ／またはタグが付いていない1種以上の他の結合性メンバーの存在下で検出できる特定のレポーター分子を1結合性メンバーにタグ付けすることによって、in vitroで容易にアッセイすることができ、同一エピトープまたは重複するエピトープに結合する結合性メンバーの同定が可能になる。そのような方法は当業者に自明であり、本明細書中にさらに詳細に記載される（詳細な説明、ならびに実施例の材料および方法のセクション中のエピトープ競合アッセイを参照されたい）。ゆえに、本発明の別の態様は、IL-6への結合に関して、抗体分子、例えば、親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかのVHおよび／またはVLドメイン、CDR、例えばHCDR3、またはCDRセットを含む抗体分子と競合するヒト抗体抗原結合部位を含む結合性メンバーを提供する。

【０１１１】

別の態様では、本発明は、本発明の結合性メンバー、VHドメインおよび／またはVLドメインをコードする配列を含む単離された核酸、および本発明の結合性メンバー、VHドメインおよび／またはVLドメインの製造方法であって、該結合性メンバー、VHドメインおよび／またはVLドメインの生成を生じさせる条件下で該核酸を発現させるステップ、およびそれを回収するステップを含む方法を提供する。

【０１１２】

本発明の別の態様は、本明細書中で開示されるVH CDRまたはVL CDR配列をコードする、通常は単離されている、核酸を提供する。

【０１１３】

別の態様は、本発明の核酸を含有するかまたは本発明の核酸で形質転換されている宿主細胞を提供する。

【０１１４】

本発明の別の態様は、本発明の結合性メンバーを含有する組成物、およびIL-6と結合し、それを阻害し、かつ／または中和する方法でのその使用を提供する。該方法には、治療法によってヒトまたは動物体を治療する方法が含まれる。

【０１１５】

本発明の結合性メンバーは、ヒトまたは動物体の（例えばヒト患者の）疾患または障害の治療または診断方法、例えば治療（予防処置を含んでよい）方法であって、本発明の結合性メンバーの有効量を該患者に投与するステップを含む方法において使用することができる。本発明にしたがって治療可能な状態には、本明細書中の他の箇所で詳細に考察されるように、IL-6が役割を果たす任意の状態が含まれる。

【０１１６】

本発明の前記態様および他の態様を以下にさらに詳細に記載する。

【０１１７】

用語

ここで、本明細書中で使用される「および／または」は、2つの指定された特徴または構成要素のそれぞれの具体的開示として解釈され、他方を含んでも含まなくてもよいものとすることを指摘すると都合がよい。例えば「Aおよび／またはB」は、ちょうど本明細書中にそれぞれが個別に記載されているように、（ｉ）A、（ｉｉ）Bならびに（ｉｉｉ）AおよびBのそれぞれの具体的開示であると解釈されるものとする。

【０１１８】

IL-6およびIL-6受容体

IL-6とはインターロイキン6である。IL-6は本明細書では「抗原」と呼ばれることもある。

【０１１９】

ヒトIL-6の全長アミノ酸配列は配列番号１６１である。この配列はin vivoで切断され

てN末端リーダーペプチドが除去され、成熟IL-6が生成される。成熟ヒトIL-6は配列番号１６５のアミノ酸配列を有する。該成熟配列はin vivo循環IL-6であり、それは本明細書中に記載の治療およびin vivo診断用途の標的抗原である。したがって、本明細書中で言及されるIL-6は通常、文脈上特に指定されない限り、成熟ヒトIL-6である。

【０１２０】

IL-6は、例えば本明細書に記載のアッセイで使用するために、HIS FLAGなどの検出可能な標識にコンジュゲートさせてもよい。例えば、HIS FLAG配列にコンジュゲートさせたIL-6を含む融合タンパク質を使用してもよい。HIS FLAGタグ付きヒトIL-6の配列は配列番号１６２である。

【０１２１】

IL-6受容体a、IL-6Raは、インターロイキン6の受容体である。IL-6RaはIL-6Rα、IL-6Ra、IL-6RおよびCD126としても知られる。IL-6Raはin vivoで膜貫通型および可溶性型で存在する。IL-6Raに対する言及は、文脈上特に指定されない限り、膜貫通IL-6Raおよび／または可溶性IL-6Raである。

【０１２２】

本明細書で言及するIL-6受容体は、別途記載しない限り、通常はヒトIL-6受容体である。ヒト可溶性IL-6Ra（sIL-6Ra、sIL-6R）のアミノ酸配列は配列番号１６３である。ヒト膜貫通IL-6Raのアミノ酸配列は配列番号１６４である。

【０１２３】

IL-6はIL-6Raと結合して複合体IL-6:IL-6Raを形成する。該複合体は可溶性（sIL-6Raの場合）または膜結合型（膜貫通IL-6Raの場合）であってよい。IL-6Raが可溶性型である場合、複合体はIL-6:sIL-6Raと示される。IL-6:IL-6Raへの言及には、文脈上特に指定されない限り、膜貫通IL-6Raまたは可溶性IL-6Raと複合体を形成したIL-6が含まれる。

【０１２４】

gp130

gp130はIL-6:IL-6Ra複合体の受容体である。gp130のクローニングおよび特徴付けはHibi et al, Cell 63:1149-1157 (1990)に報告されている。ヒトgp130の配列は配列番号１６６に記載されている。

【０１２５】

結合性メンバー

この用語は、互いに結合する分子ペアの1メンバーを説明する。該結合ペアのメンバーは天然由来であってもよく、全体的または部分的に合成によって生成してもよい。該分子ペアの1メンバーはその表面上の領域または空洞を有し、該領域または空洞が、分子ペアの他方のメンバーの特定の空間的および極性構成と結合し、したがってそれに相補的である。結合ペアのタイプの例は、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモン受容体、受容体-リガンド、酵素-基質である。本発明は抗原-抗体タイプの反応に関係している。

【０１２６】

結合性メンバーは通常、抗原結合部位を有する分子を含む。例えば、結合性メンバーは抗体分子または、抗原結合部位を含む非抗体タンパク質である。

【０１２７】

抗原結合部位は、非抗体タンパク質骨格（scaffold）上、例えばフィブロネクチンまたはシトクロムB等上でのCDRの配置を用いて[42, 43, 44]、または所望の標的に対する結合特異性を付与するようタンパク質骨格内ループのアミノ酸残基をランダマイズするかもしくは突然変異させることによって提供してよい。タンパク質中の新規結合部位を加工操作するための骨格はNygren et al. [44]によって詳細にレビューされている。擬似抗体（antibody mimics）のためのタンパク質骨格はWO/0034784（参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）に開示されている。該文献で、その発明者らは、少なくとも1つのランダマイズされたループを有するフィブロネクチンIII型ドメインを含むタンパク質（擬似抗体）を報告している。1つ以上のCDR、例えばHCDRセットを移植するために好適な骨

格は、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの任意のドメインメンバーによって提供することができる。該骨格はヒトまたは非ヒトタンパク質であってよい。非抗体タンパク質骨格の利点は、それが、少なくともいくつかの抗体分子より小さくかつ／または製造が容易な骨格分子中に抗原結合部位を提供することである。結合性メンバーのサイズが小さいと、有用な生理学的特性、例えば細胞に入る能力、組織に深く浸透する能力または他の構造内の標的に到達する能力、または標的抗原のタンパク質空洞内に結合する能力がもたらされる。非抗体タンパク質骨格中の抗原結合部位の使用はWess, 2004 [45]にレビューされている。安定な主鎖および1つ以上の可変ループを有し、該ループまたは複数のループのアミノ酸配列が、標的抗原と結合する抗原結合部位を創出するよう特異的にまたはランダムに突然変異させられているタンパク質が典型的である。そのようなタンパク質には、S. aureus由来のタンパク質AのIgG結合ドメイン、トランスフェリン、テトラネクチン（tetranectin）、フィブロネクチン（例えば第10フィブロネクチンIII型ドメイン）、リポカリン（lipocalins）ならびにガンマクリスタリン（gamma-crystalline）および他のAffilin™骨格（Scil Proteins）が含まれる。他のアプローチの例には、分子内ジスルフィド結合を有するサイクロチド-小タンパク質に基づく合成「ミクロボディ（Microbodies）」、Microproteins（Versabodies™, Amunix）およびアンキリン反復タンパク質（DARPins, Molecular Partners）が含まれる。

【０１２８】

抗体配列および／または抗原結合部位に加えて、本発明の結合性メンバーは、例えば折り畳まれたドメイン等のペプチドまたはポリペプチドを形成するかまたは抗原に結合する能力に加えて別の機能的特徴を分子に付与する他のアミノ酸を含んでよい。本発明の結合性メンバーは検出可能な標識を保持してよく、毒素またはターゲティング部分または酵素に（例えばペプチジル結合またはリンカーを介して）コンジュゲートしてもよい。例えば、結合性メンバーは触媒部位（例えば酵素ドメイン中の触媒部位）ならびに抗原結合部位を含んでよく、該抗原結合部位は抗原と結合し、ゆえに触媒部位を抗原に標的化する。該触媒部位は例えば切断によって抗原の生物学的機能を阻害する。

【０１２９】

上記のように、CDRを非抗体骨格によって担持させることができるが、本発明のCDRまたはCDRセットを担持するための構造は、概して、抗体重鎖もしくは軽鎖配列またはその重要部分である。その場合、CDRまたはCDRセットは、再配置された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる天然に存在するVHおよびVL抗体可変ドメインのCDRまたはCDRセットに相当する位置に位置する。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabat, et al., 1987 [46]、およびその改訂版を参照することによって決定することができる。このデータベースに問い合わせるために、いくつかの学術的および商業的オンラインリソースが利用可能である。例えば、参考文献[47]および関連オンラインリソース（現在のウェブアドレスhttp://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html）を参照のこと。

【０１３０】

CDR領域またはCDRとは、Kabat et al. 1991 [48]、および改訂版によって定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を示すものとする。抗体は典型的に3つの重鎖CDRおよび3つの軽鎖CDRを含有する。用語「CDRまたは複数のCDR」は、場合により、認識対象の抗原またはエピトープに対する抗体の親和性による結合を担うアミノ酸残基の大部分を含有する前記領域の1つまたは前記領域の数個、さらにはその全体を示すために本明細書中で使用される。

【０１３１】

6つの短いCDR配列のうち、重鎖の第3のCDR（HCDR3）は高いサイズ可変性（それを生じさせる遺伝子の配置機構に本質的に起因する大きな多様性）を有する。それは短ければ2アミノ酸でありうるが、既知の最長サイズは26である。CDRの長さは、具体的な基礎となるフレームワークによって収容できる長さにしたがって変動してもよい。機能上、HCDR3は抗体の特異性の決定に部分的に役割を果たす[参考文献49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56]。

【０１３２】
HCDR1は、Kabat残基31～35からなる5アミノ酸長であってよい。
HCDR2は、Kabat残基50～65からなる17アミノ酸長であってよい。
HCDR3は、Kabat残基95～102からなる11または12アミノ酸長であってよく、これは場合によりKabat残基100Dを含む。
LCDR1は、Kabat残基24～34からなる11アミノ酸長であってよい。
LCDR2は、Kabat残基50～56からなる7アミノ酸長であってよい。
LCDR3は、Kabat残基89～97からなる8または9アミノ酸長であってよく、これは場合によりKabat残基95を含む。

抗体分子

この用語は、天然であるかまたは部分的もしくは完全に合成によって生成されるかにかかわらず、免疫グロブリンを説明する。この用語はまた、抗体抗原結合部位を含む任意のポリペプチドまたはタンパク質を含む。ここで、本発明は天然の形態での抗体に関するものではなく、すなわちそれらはその天然環境中に存在しないが、それらは天然供給源から単離可能であったか、または精製によって取得可能であったか、または遺伝子組換え、もしくは化学合成によって取得可能であったものであり、かつ後に記載されるようにそれらは非天然アミノ酸を含有できることが理解されなければならない。抗体抗原結合部位を含む抗体断片には、非限定的に、Fab、Fab'、Fab'-SH、scFv、Fv、dAbおよびFd等の分子が含まれる。1つ以上の抗体抗原結合部位を含む種々の他の抗体分子が作製されていて、それには、例えばFab_2、Fab_3、ダイアボディ（diabodies）、トリアボディ（triabodies）、テトラボディ（tetrabodies）およびミニボディー（minibodies）が含まれる。抗体分子およびそれらの構築および使用のための方法は[57]に記載されている。

【０１３３】
モノクローナルおよび他の抗体を使用し、かつ組換えDNA技術の技術を使用して標的抗原と結合する他の抗体またはキメラ分子を製造することが可能である。そのような技術は、抗体の免疫グロブリン可変領域、またはCDRをコードするDNAを異なる免疫グロブリンの定常領域、または定常領域プラスフレームワーク領域に導入することを必要とするかもしれない。例えばEP-A-184187、GB 2188638AまたはEP-A-239400、および大多数の以後の文献を参照のこと。ハイブリドーマまたは、抗体を産生する他の細胞を遺伝子突然変異または他の変化に供してもよく、それらは、産生される抗体の結合特異性を変化させてもさせなくてもよい。

【０１３４】
抗体は様々な方法で改変できるので、用語「抗体分子」は、必要な特異性を示す抗体抗原結合部位を有し、かつ／または抗原と結合する、任意の結合性メンバーまたは物質を含むと解釈されるべきであろう。ゆえに、この用語は抗体の断片および誘導体を含み、それには、天然であるか完全または部分的に合成されたものであるかにかかわらず、抗体抗原結合部位を含む任意のポリペプチドが含まれる。したがって、別のポリペプチド（例えば別の種由来または別の抗体クラスまたはサブクラスに属するポリペプチド）に融合された抗体抗原結合部位または等価物を含むキメラ分子が含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現はEP-A-0120694およびEP-A-0125023、および大多数の以後の文献に記載されている。

【０１３５】
抗体工学分野で利用可能なさらなる技術によってヒト抗体およびヒト化抗体を単離することが可能になる。例えば、ヒトハイブリドーマはKontermann & Dubel [58]によって記載されるように作製することができる。結合性メンバーの作製のための別の既存技術であるファージディスプレイは、多数の刊行物で詳細に記載されている。該刊行物は、例えばKontermann & Dubel [58]およびWO92/01047（さらに以下で考察される）、および米国特許US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160、US6521404である。

【０１３６】
マウス抗体遺伝子が不活性化され、かつヒト抗体遺伝子で機能的に置換されつつ、マウス免疫系のインタクトの他の構成要素を残しているトランスジェニックマウスを、ヒト抗体の単離に使用することができる[59]。ヒト化抗体は、当技術分野において公知の技術を使用して生成することができ、該技術は、例えばWO91/09967、US 5,585,089、EP592106、US 565,332およびWO93/17105に開示されている技術等である。さらに、WO2004/006955は、非ヒト抗体の可変領域のCDR配列の標準的CDR構造タイプを、ヒト抗体配列、例えば生殖細胞系抗体遺伝子セグメント、のライブラリーから得られる対応するCDRの標準的CDR構造タイプと比較することによる、ヒト抗体遺伝子由来の可変領域フレームワーク配列の選択に基づいて、抗体をヒト化するための方法を記載している。非ヒトCDRと類似の標準的CDR構造タイプを有するヒト抗体可変領域は、ヒトフレームワーク配列の選択元のメンバーヒト抗体配列のサブセットを構成する。該サブセットメンバーをヒトおよび非ヒトCDR配列間のアミノ酸類似性に基づいてさらに分類してよい。WO2004/006955の方法では、選択したサブセットメンバーヒトフレームワークを使用して、ヒトCDR配列を非ヒトCDR対応物で機能的に置換するキメラ抗体を構築するためのフレームワーク配列を提供するために最高位にランキングされたヒト配列を選択し、それによって、非ヒト抗体とヒト抗体との間のフレームワーク配列を比較する必要なく、高親和性でかつ低免疫原性のヒト化抗体を提供する。該方法によって作製されたキメラ抗体もまた開示される。

【０１３７】
合成抗体分子は、例えばKnappik et al. [60]またはKrebs et al. [61]によって記載されるように、合成されかつ好適な発現ベクター内に組み立てられたオリゴヌクレオチドを用いて作製された遺伝子から発現させることによって作製してよい。

【０１３８】
全抗体の断片は抗原と結合する機能を達成できることが示されている。結合性断片の例は（i）VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなるFab断片；（ii）VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；（iii）単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFv断片；（iv）dAb断片[62, 63, 64]（VHまたはVLドメインからなる）；（v）単離されたCDR領域；（vi）F(ab')2断片（2つの連結されたFab断片を含む二価断片）（vii）一本鎖Fv分子（scFv）（VHドメインとVLドメインが、2つのドメインが結合して抗原結合部位を形成することを可能にするペプチドリンカーによって連結されている）[65, 66]；（viii）二重特異性一本鎖Fv二量体（PCT/US92/09965）および（ix）遺伝子融合によって構築された「ダイアボディ」、多価または多重特異性断片（WO94/13804; [67]）である。VHおよびVLドメインを連結するジスルフィド架橋を組み込むことによってFv、scFvまたはダイアボディ分子を安定化してもよい[68]。CH3ドメインに連結されたscFvを含むミニボディを作製してもよい[69]。結合性断片の他の例はFab'およびFab'-SHである。Fab'は、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端に少数の残基が付加されていることによってFab断片と異なり、抗体ヒンジ領域由来の1個以上のシステインを含む。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基（群）が遊離のチオール基を保持するFab'断片である。

【０１３９】
Qui et al. [70]は、フレームワーク領域によって連結されている2つのCDRしか含有しない抗体分子を報告した。VHまたはVLドメイン由来のCDR3は、他のドメインのCDR1またはCDR2ループに連結された。選択CDR1またはCDR2のC末端とCDR3のN末端がFR領域を介して連結された。Qui et al.は最少の疎水性部分しか有さないFR領域を選択した。試験抗体の最良の組み合わせは、VH FR2によってVH CDR3に連結されたVL CDR1であることが見出された（VHCDR1-VHFR2-VLCDR3）。約3 kDaの分子量であるこれらの抗体分子は、完全免疫グロブリン（約150 kDa）またはscFv（約28 kDa）と比較して改善された組織浸透性の点で利点を提供する。

【０１４０】
本発明の抗体断片は、酵素、例えばペプシンまたはパパインによる消化等の方法および／または化学的還元によるジスルフィド架橋の切断によって、親抗体分子または抗体分子

2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかから出発して取得することができる。別の様式では、本発明に含まれる抗体断片は、やはり当業者に周知の遺伝子組換え技術または例えばApplied Biosystems等の企業によって供給されるような自動ペプチドシンセサイザーを用いるペプチド合成、または核酸合成および発現によって取得することができる。

【０１４１】

本発明の機能的抗体断片には、化学修飾、特にペグ化、またはリポソームへの取り込みによって半減期が長くされた任意の機能的断片が含まれる。

【０１４２】

dAb（ドメイン抗体）は抗体の単量体の抗原結合性小断片であり、すなわち抗体重鎖または軽鎖の可変領域である[64]。VH dAbはラクダ科動物（例えばラクダ、ラマ）に天然に存在し、ラクダ科動物を標的抗原で免疫化し、抗原特異的B細胞を単離し、個々のB細胞からdAb遺伝子を直接クローニングすることによって生成することができる。dAbはまた、細胞培養で生成可能である。その小さいサイズ、良好な溶解度および温度安定性によって、それらは特に生理学的に有用であり、かつ選択および親和性成熟に好適である。ラクダ科動物のVH dAbは「nanobodies™」の名称で治療用途に開発中である。本発明の結合性メンバーは、実質的に本明細書中に記載されているVHもしくはVLドメイン、または実質的に本明細書中に記載されているCDRセットを含むVHもしくはVLドメインを含むdAbであってよい。

【０１４３】

二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる可変領域が同一分子中で組み合わされている第二世代のモノクローナル抗体を構成する[71]。その有用性は、新規エフェクター機能を補充するかまたは腫瘍細胞表面のいくつかの分子を標的にするその能力から、診断分野および治療分野でともに実証されている。二重特異性抗体が使用される場合、これらは慣用の二重特異性抗体であってよい。該二重特異性抗体は種々の方法で製造することができ[72]、例えば化学的にまたはハイブリッドハイブリドーマから製造するか、または上述の二重特異性抗体断片のいずれかであってよい。これらの抗体は、化学的方法[73, 74]または体細胞法（somatic method）[75, 76]によって取得することができるが、同様かつ優先的に、ヘテロ二量体化を強制することが可能で、ゆえに目的の抗体の精製プロセスを容易にする遺伝子工学技術によって取得することができる[77]。二重特異性抗体の例には、BiTE™技術の二重特異性抗体が含まれる。該抗体では、異なる特異性を有する2つの抗体の結合ドメインを使用し、かつ短いフレキシブルペプチドを介して直接連結することができる。これは短い単一ポリペプチド鎖上で2つの抗体を組み合わせる。ダイアボディおよびscFvは、可変ドメインのみを使用して、Fc領域を用いずに構築することができ、潜在的に抗イディオタイプ反応の影響を低減することができる。

【０１４４】

二重特異性抗体は、完全IgGとして、二重特異性Fab'2として、Fab'PEGとして、ダイアボディとして、または二重特異性scFvとして構築することができる。さらに、当技術分野において公知の慣用の方法を使用して2つの二重特異性抗体を連結し、四価抗体を形成させることができる。二重特異性完全抗体とは対照的に二重特異性ダイアボディが特に有用であることもある。その理由は、容易に構築することができ、かつE.coliで発現させることができるからである。適切な結合特異性のダイアボディ（および多数の他のポリペプチド、例えば抗体断片）は、ファージディスプレイ（WO94/13804）を使用してライブラリーから容易に選択することができる。ダイアボディの一方のアームが一定に保たれて、例えばIL-6に対する特異性を有する場合、他方のアームが変動するライブラリーを作製することができ、適切な特異性の抗体を選択することができる。Ridgeway et al., 1996 [78]に記載されるような代替の操作方法によって二重特異性完全抗体を作製してもよい。

【０１４５】

当技術分野においてIL-6に対する抗体を取得するための種々の方法が利用可能である。抗体は特にヒト、マウス、キメラまたはヒト化起源のモノクローナル抗体であってよく、

それは当業者に周知の標準的方法にしたがって取得することができる。

【０１４６】

一般に、特にマウス起源のモノクローナル抗体またはその機能的断片の製造では、特にマニュアル「Antibodies」[79]に記載の技術またはKoehlerおよびMilstein [80]に記載のハイブリドーマからの製造技術を参照することが可能である。

【０１４７】

モノクローナル抗体は、IL-6、または該モノクローナル抗体によって認識されるエピトープを含有するその断片の1つに対して免疫化された動物B細胞から取得することができる。それらを含む好適な断片およびペプチドまたはポリペプチドは本明細書中に記載されている。それを使用して、動物を免疫し、IL-6に対する抗体を作製することができる。該IL-6、またはその断片の1つは、特に、IL-6またはその断片をコードするcDNA配列に含有される核酸配列から出発する遺伝子組換えによって、IL-6および／またはその断片のペプチド配列に含まれるアミノ酸配列から出発するペプチド合成によって、通常の作業方法にしたがって製造することができる。

【０１４８】

モノクローナル抗体は、例えば、アフィニティーカラムで精製することができ、該カラムには、IL-6、または該モノクローナル抗体によって認識されるエピトープを含有するその断片の1つが事前に固定されている。さらに具体的には、モノクローナル抗体の精製は、プロテインAおよび／またはGでのクロマトグラフィーを行い、その後、残留するタンパク質混入物ならびにDNAおよびLPS自体を排除するためのイオン交換クロマトグラフィーを行うかまたは行わずに、その後、二量体または他の多量体の存在に起因する潜在的凝集物を排除するためのセファロースゲルでの排除クロマトグラフィーを行うかまたは行わずに達成することができる。一実施形態では、これらの全技術を同時にまたは連続して使用することができる。

【０１４９】

抗原結合部位

この用語は、標的抗原の全体または部分と結合し、かつそれと相補的な分子の部分を説明する。抗体分子では、それは抗体抗原結合部位と称され、標的抗原の全体または部分と結合し、かつそれと相補的な抗体の部分を含む。抗原が大きい場合、抗体は抗原の特定部分にしか結合せず、該部分はエピトープと称される。抗体抗原結合部位は1つ以上の抗体可変ドメインによって提供されるかもしれない。抗体抗原結合部位は抗体軽鎖可変領域（VL）および抗体重鎖可変領域（VH）を含んでよい。

【０１５０】

WO2006/072620は、免疫グロブリンドメインのβ鎖間に延びる構造（非CDR）ループ中の抗原結合部位の遺伝子操作を開示する。抗原結合部位は、CDRの天然の位置から離れた抗体分子の一領域において、例えばVHまたはVLドメインのフレームワーク領域中で、または抗体定常ドメイン（例えばCH1および／またはCH3）中で、遺伝子操作されうる。構造領域において遺伝子操作された抗原結合部位は、VHおよびVLドメインのCDRセットによって形成された抗原結合部位に加えて、またはそれに代えて存在しうる。複数の抗原結合部位が抗体分子中に存在する場合、それらは同じ抗原（IL-6）に結合し、それにより結合性メンバーの結合価を増加させるものでもよい。あるいは、複数の抗原結合部位は異なる抗原（IL-6および１以上の別の抗原）に結合しうる。これはエフェクター機能を追加し、抗体分子の半減期を延長させるかまたはそのin vivo送達を改善するために使用されうる。

【０１５１】

単離された

この用語は、本発明の結合性メンバー、または該結合性メンバーをコードする核酸が、概して本発明に基づいている状態を表す。ゆえに、本発明の結合性メンバー、VHおよび／またはVLドメイン、およびコード核酸分子およびベクターは、実質的に純粋または均質な形態で、例えばその天然環境から単離および／または精製されている状態、または核酸の場合、必要な機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の起源の核酸または遺伝子

を含まないかまたは実質的に含まない状態で提供することができる。単離されたメンバーおよび単離された核酸は、それらに天然に付随している物質、例えばその天然環境、または該製造がin vitroもしくはin vivoで実施される組換えDNA技術に基づく場合には、それらが製造される環境（例えば細胞培養）中で、それらとともに見出される他のポリペプチドまたは核酸を含まないかまたは実質的に含まない。メンバーおよび核酸は希釈剤またはアジュバントとともに製剤化することができ、依然として事実上単離されている。例えば、該メンバーは、イムノアッセイで使用するためのマイクロタイタープレートをコーティングするために使用されるならば、通常ゼラチンまたは他の担体と混合され、診断または治療で使用される場合、製薬的に許容される担体または希釈剤と混合される。結合性メンバーは、天然にまたは異種真核細胞（例えばCHOまたはNS0（ECACC 85110503）細胞）の系によってグリコシル化されているか、または（例えば原核細胞での発現によって生成される場合）非グリコシル化状態であってよい。

【０１５２】

抗IL-6抗体分子を含む不均一調製物もまた、本発明の部分を構成する。例えば、そのような調製物は、完全長重鎖および、C末端リシンを欠いている重鎖を有し、種々の程度のグリコシル化を有し、かつ／または誘導体化アミノ酸、例えばピログルタミン酸残基を形成するN末端グルタミン酸の環化を有する抗体の混合物であってよい。

【０１５３】

本明細書中で使用されるフレーズ「実質的に記載されている」とは、本明細書中に記載の結合性メンバーのVHまたはVLドメインの関連CDRの特徴（群）が、本明細書中に配列が記載されている指定領域と同一であるかまたは非常に類似していることを表す。本明細書中に記載のように、1つ以上の可変ドメインの指定領域（群）に関するフレーズ「非常に類似」は、1～約5、例えば1～4、例えば1～3、または1もしくは2、または3もしくは4個のアミノ酸置換をCDRおよび／またはVHまたはVLドメイン中で生じていてもよいことが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０１５４】

【図１】この図は、マウスにおけるin vivoでのヒト組換えIL-6誘発性ヘパトグロビン増加に対する、抗IL-6抗体（抗体18）の投与の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１５５】

発明の詳細な説明

上記のように、本発明の結合性メンバーはIL-6の生物学的活性をモジュレートし、かつ中和することができる。本明細書で述べる通り、本発明のIL-6結合性メンバーは、その中和効力について最適化されていてもよい。一般に、効力の最適化は、選択された結合性メンバーの配列（通常は抗体の可変ドメイン配列）を突然変異させて、結合性メンバーのライブラリーを作製することを含み、そして該ライブラリーを効力に関してアッセイし、より強力な結合性メンバーを選択する。こうして選択された「効力最適化」結合性メンバーは、ライブラリーの作製元であった結合性メンバーより高い効力を有する傾向がある。しかし、最適化を行わずに高い効力の結合性メンバーを取得してもよい。例えば、初期スクリーニング、例えば生化学的中和アッセイから直接、高い効力の結合性メンバーを取得することができる。「効力最適化」結合性メンバーとは、IL-6の特定の活性または下流の機能の中和効力が最適化されている結合性メンバーを表す。アッセイおよび効力は本明細書中の他の箇所でより詳細に記載されている。本発明は、効力最適化および非最適化結合性メンバーの両方ならびに選択された結合性メンバーから効力を最適化するための方法を提供する。本発明はゆえに、当業者が、高い効力を有する結合性メンバーを作製することを可能にする。

【０１５６】

別の態様では、本発明は、抗原と結合可能な1種以上の結合性メンバーの取得方法であって、本発明の結合性メンバーのライブラリーと該抗原を接触させるステップ、および該

抗原と結合可能なライブラリーの1種以上の結合性メンバーを選択するステップを含む方法を提供する。

【０１５７】

該ライブラリーは、粒子または分子複合体、例えば複製可能遺伝的パッケージ、例えば酵母粒子、細菌粒子またはバクテリオファージ（例えばT7）粒子、ウイルス、細胞または共有結合性、リボソーム性または他のin vitroディスプレイ系上で提示することができ、各粒子または分子複合体は、その表面に提示される抗体VH可変ドメイン、およびさらに、場合により、存在する場合には提示されるVLドメイン、をコードする核酸を含有する。ファージディスプレイは、WO92/01047および例えば米国特許US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160およびUS6521404に記載されている。該各文献は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる。

【０１５８】

抗原と結合可能でかつバクテリオファージまたは他のライブラリー粒子もしくは分子複合体上に提示される結合性メンバーの選択後に、該選択した結合性メンバーを提示するバクテリオファージまたは他の粒子もしくは分子複合体から核酸を採取することができる。該選択した結合性メンバーを提示するバクテリオファージまたは他の粒子もしくは分子複合体から採取された核酸の配列を有する核酸からの発現によって、以後の結合性メンバーまたは抗体VHもしくはVL可変ドメインの製造に該核酸を使用することができる。

【０１５９】

該選択した結合性メンバーの抗体VH可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体VH可変ドメインは、そのようなVHドメインを含む結合性メンバーと同様に、単離された形態で提供してよい。

【０１６０】

IL-6と結合する能力をさらに試験してよく、さらに、IL-6との結合に関して、例えば親抗体分子または抗体分子2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22もしくは23（例えばscFv形態および／またはIgG形態、例えばIgG1）と競合する能力も測定してよい。本明細書中の他の箇所でさらに考察されるように、IL-6を中和する能力を試験してもよい。

【０１６１】

本発明の結合性メンバーは、親抗体分子もしくは他の抗体分子、例えばscFv、または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23の１つ、例えばIgG1の親和性で、またはさらに良好な親和性で、IL-6と結合することができる。

【０１６２】

本発明の結合性メンバーは、親抗体分子もしくは他の抗体分子、抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のうちの１つ、例えばscFvまたはIgG1、の効力で、またはさらに良好な効力で、IL-6の生物学的活性を中和することができる。

【０１６３】

異なる結合性メンバーの結合親和性および中和効力を適切な条件下で比較することができる。

【０１６４】

本発明のVHおよびVLドメインおよびCDRの変異体（アミノ酸配列が本明細書中に記載されているもの、および本発明の結合性メンバー中で用いることができるものを含む）は、配列を改変または突然変異させ、かつ所望の特性を有する抗原結合性メンバーをスクリーニングする方法を用いて取得することができる。所望の特性の例には、非限定的に以下の特性が含まれる。

－　抗原に特異的な既知の抗体と比較して高い、抗原に対する結合親和性

－　抗原活性が既知である場合は、抗原に特異的な既知の抗体と比較して高い、抗原活性の中和性

－　特定モル比での、抗原に対する既知の抗体またはリガンドとの、所定の競合能力

－　複合体を免疫沈降させる能力
－　指定エピトープと結合する能力
　　－　線形エピトープ、例えば、本明細書中に記載のペプチド結合スキャン（例えば線形および／または拘束コンフォメーションでスクリーニングされたペプチドを使用する）を使用して同定されるペプチド配列
　　－　不連続残基によって形成される立体構造エピトープ
－　IL-6または下流の分子の新規生物学的活性をモジュレートする能力。

【０１６５】
そのような方法もまた、本明細書中で提供される。

【０１６６】
本明細書中で開示される抗体分子の変異体を製造し、本発明において使用してよい。多変量データ解析技術を構造／特性－活性関係に対して適用する場合の計算化学の手引き[81]にしたがって、周知の数学的手法、例えば統計回帰、パターン認識および分類[82, 83, 84, 85, 86, 87]を使用して抗体の定量的活性－特性関係を導き出すことができる。抗体の特性は、抗体配列、機能的および3次元構造の経験的および理論的モデル（例えば、接触候補残基の分析または計算上の物理化学的特性）から導き出すことができ、これらの特性は単一でおよび組み合わせて考慮することができる。

【０１６７】
VHドメインおよびVLドメインからなる抗体抗原結合部位は、典型的に、6つのポリペプチドループによって形成される。該ループの3つは軽鎖可変ドメイン（VL）由来であり、3つは重鎖可変ドメイン（VH）由来である。既知の原子構造の抗体についての分析により、抗体結合部位の配列と3次元構造との間の関係が解明されている[88, 89]。これらの関連性は、VHドメイン中の第三領域（ループ）を除いて、結合部位ループが少数の主鎖コンフォメーション：標準構造のうちの1つを有することを意味する。特定ループ中で形成される標準構造は、そのサイズおよび、ループおよびフレームワークの両領域中の重要部位での特定残基の存在によって決定されることが示されている[88, 89]。

【０１６８】
配列－構造関係についてのこの研究は、そのCDRループの3次元構造の維持に重要な、ゆえに結合特異性を維持する、配列が既知で3次元構造が未知の抗体中の残基を予測するために使用することができる。これらの予測は、先の最適化実験からの出力と該予測を比較することによって確認することができる。構造的アプローチでは、任意の無料で利用可能なパッケージまたは市販パッケージ、例えばWAM [91]を使用して、抗体分子のモデルを作製することができる[90]。そしてタンパク質視覚化および解析ソフトウェアパッケージ、例えばInsight II（Accelrys, Inc.）またはDeep View [92]を使用して、CDR中の各位置での置換候補を評価してよい。この情報を使用して、活性に関して最小または有益な影響を有する可能性が高い置換を施してよい。

【０１６９】
CDR、抗体VHまたはVLドメインおよび結合性メンバーのアミノ酸配列内で置換を施すために必要とされる技術は概して当技術分野において利用可能である。活性に関して最小または有益な影響を有すると予測されるかされない置換を施して変異体配列を作製し、IL-6と結合し、かつ／またはそれらを中和する能力および／または任意の他の所望の特性に関して試験してよい。

【０１７０】
本明細書中で配列が具体的に開示されている任意のVHおよびVLドメインの可変ドメインアミノ酸配列変異体を、考察されるように、本発明にしたがって用いてよい。

【０１７１】
本発明のVLドメインの変異体、およびそれらを含む結合性メンバーまたは抗体分子には、Kabat残基108位にアルギニンが存在しない（例えばKabat残基108位が異なる残基であるかまたは欠失している）VLドメインが含まれる。例えば、定常ドメインを欠いている抗体分子、例えばscFv等の抗体分子は、本明細書中に記載のVLドメイン配列またはその変異体

を有するVLドメインであって、Kabat残基108位のアルギニンがアルギニン以外のアミノ酸残基であるかまたは欠失しているVLドメインを含んでよい。

【０１７２】

本発明の別の態様は、添付の配列表に示される抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかのVHドメインと、少なくとも60、70、80、85、90、95、98または99％のアミノ酸配列同一性を有するVHドメインを含み、かつ／または、添付の配列表に示される抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれかのVLドメインと、少なくとも60、70、80、85、90、95、98または99％のアミノ酸配列同一性を有するVLドメインを含む抗体分子である。2つのアミノ酸配列の％同一性を算出するために使用できるアルゴリズムには、例えばBLAST [93]、FASTA [94]、またはSmith-Waterman アルゴリズム[95]（例えばデフォルトパラメータを用いる）が含まれる。

【０１７３】

具体的な変異体は、1つ以上のアミノ酸配列改変（アミノ酸残基の付加、欠失、置換および／または挿入）を含んでよい。

【０１７４】

1つ以上のフレームワーク領域および／または1つ以上のCDRにおいて改変を施してよい。該改変は、通常、機能喪失を生じさせず、したがって、そのように改変されたアミノ酸配列を含む結合性メンバーはIL-6と結合しかつ／またはそれらを中和する能力を保持する。それは、例えば本明細書中に記載のアッセイにおいて測定された場合に、改変が施されていない結合性メンバーと同一の定量的結合および／または中和能力を保持する。そのように改変されたアミノ酸配列を含む結合性メンバーは、IL-6と結合しかつ／またはそれらを中和する能力の改善を示すかもしれない。改変は、1個以上のアミノ酸残基を、天然に存在しないかまたは非標準アミノ酸で置換すること、1個以上のアミノ酸残基を修飾して、天然に存在しないかまたは非標準型にすること、または1個以上の天然に存在しないかまたは非標準アミノ酸を配列内に挿入することを含んでよい。本発明の配列中の改変の数および位置の例は本明細書中の他の箇所で記載されている。天然に存在するアミノ酸には、20種の「標準」L-アミノ酸が含まれ、その標準一文字コードによってG、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、Eとして同定される。非標準アミノ酸には、ポリペプチド主鎖に組み込むことができるかまたは既存のアミノ酸残基の修飾から生じる任意の他の残基が含まれる。非標準アミノ酸は天然に存在しても天然に存在しなくてもよい。いくつかの天然に存在する非標準アミノ酸が当技術分野において公知であり、例えば4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリシン、3-メチルヒスチジン、N-アセチルセリン、等である[96]。N-アルファ位置で誘導体化されているアミノ酸残基はアミノ酸配列のN末端にしか位置しない。本発明では通常、アミノ酸はL-アミノ酸であるが、D-アミノ酸であってもよい。したがって、改変は、L-アミノ酸を修飾してD-アミノ酸にするか、またはL-アミノ酸をD-アミノ酸で置換することを含む。メチル化、アセチル化および／またはリン酸化型のアミノ酸もまた既知であり、本発明のアミノ酸は該修飾の対象である。

【０１７５】

本発明の抗体ドメインおよび結合性メンバー中のアミノ酸配列は上記の非天然または非標準アミノ酸を含んでよい。非標準アミノ酸（例えばD-アミノ酸）は、合成中に、またはアミノ酸配列の合成後に「元の」標準アミノ酸の修飾または置換によってアミノ酸配列に組み込んでよい。

【０１７６】

非標準および／または天然に存在しないアミノ酸の使用により、構造的および機能的多様性が高まり、ゆえに本発明の結合性メンバーにおける所望のIL-6結合および中和特性を達成するための潜在能力を高めることができる。さらに、D-アミノ酸および類似体は、動物、例えばヒトへの投与後のL-アミノ酸を有するポリペプチドのin vivo分解のせいで、標準L-アミノ酸と比較して異なる薬物動態学的プロファイルを有することが示されている。このことは、いくつかのin vivo適用では、D-アミノ酸が有益であることを意味する。

【０１７７】

本発明のCDR由来配列を保持する新規VHまたはVL領域は、可変ドメイン全体内の突然変異を生じさせる1つ以上の選択VHおよび／またはVL遺伝子のランダム突然変異誘発を使用して作製することができる。そのような技術はGram et al. [97]によって報告されている。彼らは誤りがちなPCR（error-prone PCR）を使用した。いくつかの実施形態では、可変ドメイン全体またはCDRセット内で1つまたは2つのアミノ酸置換を施す。

【０１７８】

使用してよい別の方法はVHまたはVL遺伝子のCDR領域に対する直接突然変異誘発である。そのような技術はBarbas et al. [98]およびSchier et al. [99]によって開示されている。

【０１７９】

すべての上記技術は、当技術分野においてそのような技術として公知であり、当業者は、該技術を使用し、当技術分野の所定の方法論を使用して本発明の結合性メンバーを得ることができる。

【０１８０】

本発明の別の態様は、IL-6に対する抗体抗原結合部位を取得するための方法であって、本明細書中に記載のVHドメインのアミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸の付加、欠失、置換または挿入を用いて、該VHドメインのアミノ酸配列変異体であるVHドメインを提供するステップ、場合により、そのように提供されたVHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせるステップ、およびVHドメインまたはVH/VLの組み合わせまたは複数の組み合わせを試験して、IL-6に対する結合性メンバーまたは抗体抗原結合部位（場合により1種以上の所望の特性、例えばIL-6活性を中和する能力を有する）を同定するステップを含む方法を提供する。該VLドメインは本明細書中に実質的に記載されるアミノ酸配列を有してよい。本明細書中で開示されるVLドメインの1つ以上の配列変異体を1つ以上のVHドメインと組み合わせる類似の方法を用いてもよい。上記のように、本明細書中に実質的に記載されるCDRアミノ酸配列は、ヒト抗体可変ドメインまたはその本質的部分中のCDRとして保持される。本明細書中に実質的に記載されるHCDR3配列は本発明の実施形態であり、これらの各配列はヒト重鎖可変ドメインまたはその本質的部分中のHCDR3として保持される。

【０１８１】

本発明で用いられる可変ドメインは、任意の生殖細胞または再配置（rearranged）ヒト可変ドメインから取得するかまたはそれに由来するか、または既知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列または実際の配列に基づく合成可変ドメインであってよい。可変ドメインは非ヒト抗体に由来するものであってよい。組換えDNA技術を使用して、CDR（例えばCDR3）を欠いている可変ドメインのレパートリーに本発明のCDR配列（例えばCDR3）を導入することができる。例えば、Marks et al. [100]は、抗体可変ドメインのレパートリーを製造する方法であって、該可変ドメイン領域の5'末端に対するかまたはそれに隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトVH遺伝子の第三フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーとともに使用して、CDR3を欠いているVH可変ドメインのレパートリーを得る方法を報告している。Marks et al. は、このレパートリーを特定の抗体のCDR3とどのように組み合わせるかをさらに報告している。類似の技術を使用して、本発明のCDR3由来配列を、CDR3を欠いているVHまたはVLドメインのレパートリーとシャッフルし、シャッフル済み完全VHまたはVLドメインを同族（cognate）VLまたはVHドメインと組み合わせて本発明の結合性メンバーを得ることができる。そして該レパートリーを好適な宿主系、例えばWO 92/01047（参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）、または後の多数の文献のいずれか（Kay, Winter & McCafferty [101]が含まれる）のファージディスプレイ系で提示して、好適な結合性メンバーが選択されるようにすることができる。レパートリーは、10^4の個別のメンバー以上、例えば少なくとも10^5、少なくとも10^6、少なくとも10^7、少なくとも10^8、少なくとも10^9または少なくとも10^{10}メンバーまたはそれ以上のいずれかから構成される。他の好適な宿主系には、非限定的に、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、T7ディスプレイ、ウイルスディスプレイ、細胞ディスプレイ、リボソームディスプレイおよび共有結合ディスプレイが含まれる。

【０１８２】
IL-6抗原に対する結合性メンバーの製造方法であって、以下のステップ：
（a） 置換対象のCDR3を含むかまたはCDR3コード領域を欠いているVHドメインをコードする核酸の出発レパートリーを提供するステップ；
（b） 該レパートリーを、VH CDR3に関して本明細書中に実質的に記載されるアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせて、該ドナー核酸がレパートリー中のCDR3領域に挿入されるようにし、VHドメインをコードする核酸の生成物レパートリーを得るステップ；
（c） 該生成物レパートリーの核酸を発現させるステップ；
（d） IL-6に対する結合性メンバーを選択するステップ；および
（e） 該結合性メンバーまたはそれをコードする核酸を回収するステップ
を含む方法を提供する。
【０１８３】
やはり、置換対象のCDR3を含むかまたはCDR3コード領域を欠いているVLドメインをコードする核酸のレパートリーと本発明のVL CDR3を組み合わせる類似の方法を用いてもよい。
【０１８４】
同様に、1つ以上の、またはすべての3つのCDRを、VHまたはVLドメインのレパートリーに移植し、そしてIL-6に対する結合性メンバーまたは複数の結合性メンバーに関してスクリーニングしてよい。
【０１８５】
例えば、親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22もしくは23のHCDR1、HCDR2およびHCDR3、または親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22もしくは23のHCDRセット、の1つ以上を用いてよく、かつ／または親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22もしくは23のLCDR1、LCDR2およびLCDR3、または親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22もしくは23のLCDRセット、の1つ以上を用いてよい。
【０１８６】
同様に、本明細書中で開示される他のVHおよびVLドメイン、CDRセットおよびHCDRセットおよび／またはLCDRセットを用いてよい。
【０１８７】
免疫グロブリン可変ドメインの本質的部分は少なくとも3つのCDR領域をそれらの間のフレームワーク領域とともに含む。該部分は第一および第四フレームワーク領域の一方または両方の少なくとも約50％を含んでもよく、該50％は第一フレームワーク領域のC末端の50％であり、第四フレームワーク領域のN末端の50％である。可変ドメインの本質的部分のN末端またはC末端の追加の残基は、天然に存在する可変ドメイン領域に通常付随しない残基であってよい。例えば、本発明の結合性メンバーの構築を組換えDNA技術によって行って、クローニングまたは他の操作ステップを容易にするために導入されるリンカーによってコードされるNまたはC末端残基を導入してよい。他の操作ステップには、本発明の可変ドメインを別のタンパク質配列に付着させるためのリンカーの導入が含まれ、該タンパク質配列には、本明細書中の他の箇所でさらに詳細に考察される抗体定常領域、他の可変ドメイン（例えばダイアボディを製造する場合）または検出可能／機能的標識が含まれる。
【０１８８】
本発明のいくつかの態様では、結合性メンバーはVHおよびVLドメインペアを含むが、VHまたはVLドメイン配列のいずれかに基づく単一の結合ドメインは本発明の別の態様を構成する。単一の免疫グロブリンドメイン、特にVHドメインは特異的様式で標的抗原と結合可能であることが知られている。例えば、上記dAbについての考察を参照のこと。いずれの単一結合ドメインの場合でも、これらのドメインを使用して、IL-6と結合することができる2ドメイン結合性メンバーを形成可能な相補的ドメインに関してスクリーニングすることができる。これは、WO92/01047（参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる）

で開示されるいわゆる階層的二重コンビナトリアルアプローチ（hierarchical dual combinatorial approach）を使用するファージディスプレイスクリーニング法によって達成することができる。該方法では、HまたはL鎖クローンを含有する個々のコロニーを使用して、他方の鎖（LまたはH）をコードするクローンの完全ライブラリーを感染させ、得られた2鎖結合性メンバーを該参考文献に記載のようなファージディスプレイ技術にしたがって選択する。この技術もMarks et al, 同書[100]に開示されている。

【０１８９】

本発明の結合性メンバーは、抗体定常領域またはその部分、例えばヒト抗体定常領域またはその部分をさらに含んでよい。例えば、VLドメインをそのC末端で、ヒトCκまたはCλ鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインに連結させてよい。同様に、VHドメインに基づく結合性メンバーをそのC末端で、任意の抗体アイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgEおよびIgMならびに任意のアイソタイプサブクラス、特にIgG1およびIgG4由来の免疫グロブリン重鎖の全体または部分（例えばCH1ドメイン）に連結させてよい。IgG1は、そのエフェクター機能および製造の容易さのおかげで有益である。これらの特性を有しかつ可変領域を安定化する任意の合成または他の定常領域変異体もまた、本発明において有用である。

【０１９０】

本発明の結合性メンバーは検出可能または機能的標識で標識することができる。ゆえに、検出可能および／または定量可能なシグナルを得るために、結合性メンバーまたは抗体分子をイムノコンジュゲートの形態で存在させることができる。イムノコンジュゲートは検出可能または機能的標識とコンジュゲートされた本発明の抗体分子を含んでよい。標識は、シグナルを生じさせるかまたはシグナルの発生を誘発できる任意の分子であってよく、それには、非限定的に、蛍光剤、放射性標識、酵素、化学発光剤（chemiluminescers）または光増感剤が含まれる。ゆえに、蛍光または発光、放射能、酵素活性または吸光度を検出することによって結合を検出および／または測定することができる。

【０１９１】

好適な標識には、限定的ではなく例示的に、以下のものが含まれる。

【０１９２】

- 酵素、例えばアルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（「G6PDH」）、アルファ-D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ；
- 色素；
- 蛍光標識または蛍光剤、例えばフルオレセインおよびその誘導体、蛍光色素、ローダミン化合物および誘導体、GFP（GFPは「緑色蛍光タンパク質」を表す）、ダンシル、ウンベリフェロン、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-フタルデヒド（o-phthaldehyde）、およびフルオレサミン；フルオロフォア、例えばランタニドクリプタートおよびキレート、例えばユーロピウム等（Perkin ElmerおよびCis Biointernationa1），
- 化学発光標識または化学発光剤、例えばイソルミノール、ルミノールおよびジオキセタン；
- 生物発光標識、例えばルシフェラーゼおよびルシフェリン；
- 増感剤；
- 補酵素；
- 酵素基質；
- 放射性標識、例えば非限定的に臭素77、炭素14、コバルト57、フッ素8、ガリウム67、ガリウム68、水素3（トリチウム）、インジウム111、インジウム113m、ヨウ素123m、ヨウ素125、ヨウ素126、ヨウ素131、ヨウ素133、水銀107、水銀203、リン32、レニウム99m、レニウム101、レニウム105、ルテニウム95、ルテニウム97、ルテニウム103、ルテニウム105、スカンジウム47、セレン75、イオウ35、テクネチウム99、テクネチウム99m、テルル121m、テルル122m、テルル125m、ツリウム165、ツリウム167、ツリウム168、イットリ

ウム199および本明細書中に記載の他の放射性標識；
- 粒子、例えばラテックスまたは炭素粒子：金属ゾル；微結晶；リポソーム；細胞、等（色素、触媒または他の検出可能な基でさらに標識してよい）；
- ビオチン、ジゴキシゲニン（digoxygenin）または5-ブロモデオキシウリジン等の分子；
- 毒素成分、例えばシュードモナス外毒素（PEまたはその細胞傷害性断片もしくは突然変異体）、ジフテリア（Diptheria）毒素またはその細胞傷害性断片もしくは突然変異体、ボツリヌス毒素A、B、C、D、EまたはF、リシンまたはその細胞傷害性断片、例えばリシンA、アブリンまたはその細胞傷害性断片、サポリン（saporin）またはその細胞傷害性断片、ポークウィード（pokeweed）抗ウイルス毒素またはその細胞傷害性断片およびブリョジン（bryodin）1またはその細胞傷害性断片の群から選択される毒素部分。

【０１９３】
好適な酵素および補酵素はLitman, et al., US4275149, およびBoguslaski, et al., US4318980に開示されている。該各文献は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる。好適な蛍光剤および化学発光剤はLitman、et al., US4275149に開示されている。該文献は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる。標識には、特別な同起源の検出可能部分、例えば標識アビジンまたはストレプトアビジンとの結合を介して検出できる化学的部分、例えばビオチンがさらに含まれる。検出可能な標識は、当技術分野において公知の慣用化学を使用して本発明の抗体に結合させてよい。

【０１９４】
イムノコンジュゲートまたはその機能的断片は当業者に公知の方法によって製造することができる。それらは、直接または、スペーサー基もしくは連結基、例えばポリアルデヒド、例えばグルタルアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレン-トリアミン五酢酸（DPTA）の仲介によって、または治療用コンジュゲートに関して上に記載されるようなカップリング剤の存在下で、酵素または蛍光標識にカップリングすることができる。フルオレセインタイプの標識を含有するコンジュゲートはイソチオシアン酸と反応させることによって製造することができる。

【０１９５】
直接または上記キレート剤、例えばEDTA、DTPAを介して治療用放射性同位体を抗体にカップリングするための既存の当業者に公知の方法を、診断で使用できる放射性元素に関して使用することができる。同様に、クロラミンT法[102]によるナトリウム125での標識化、またはCrockford et al., (US4424200（参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる））の技術によるかもしくはHnatowich（US4479930（参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる））によって記載されるようにDTPAを介して結合させるテクネチウム99mでの標識化を実施することが可能である。

【０１９６】
標識が、外部手段、例えば視覚的試験、電磁放射線、熱、および化学試薬によって検出可能なシグナルを生成できる多数の方法が存在する。本発明の抗体と結合する別の結合性メンバー、または支持体に標識を結合させることもできる。

【０１９７】
標識は、シグナルを直接生成することができ、したがってシグナルの生成に追加の成分は必要とされない。多数の有機分子、例えば蛍光剤は紫外光および可視光を吸収することができ、光吸収はこれらの分子にエネルギーを移し、それらを励起エネルギー状態に高める。この吸収エネルギーは第二の波長での光の放出によって消散する。この第二の波長での発光もまた、標識アクセプター分子にエネルギーを移し、その結果得られるエネルギーは、光の放出、例えば蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）によってアクセプター分子から消散する。シグナルを直接生成する他の標識には、放射性同位体および色素が含まれる。

【０１９８】
あるいは、標識は、シグナルを生成するために他の成分を必要とすることがあり、そして該シグナル生成系は測定可能なシグナルを生成するために必要とされるすべての成分を

含み、それには、基質、補酵素、エンハンサー、追加の酵素、酵素産物と反応する物質、触媒、アクチベーター、補助因子、インヒビター、スカベンジャー、金属イオン、およびシグナル生成物質の結合に必要とされる特定の結合物質が含まれる。好適なシグナル生成系についての詳細な考察はUllman, et al. US5185243に見出せる。該文献は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる。本発明は、本明細書中で提供されるIL-6に対する結合性メンバーの結合を生じさせるかまたは可能にするステップを含む方法を提供する。上記のように、そのような結合はin vivoで例えば結合性メンバー、または結合性メンバーをコードする核酸の投与後に生じるか、またはそれはin vitroで例えばELISA、ウエスタンブロッティング、免疫細胞化学、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィー、および生化学的または細胞に基づくアッセイ、例えばTF-1細胞増殖アッセイにおいて生じる。

【０１９９】

本発明はまた、本発明の結合性メンバーを例えばバイオセンサー系で用いることによって抗原レベルを直接測定することを提供する。例えば、本発明は、IL-6に対する結合の検出および／または測定方法であって、（ｉ）該結合性メンバーをIL-6に曝露するステップおよび（ii）IL-6に対する該結合性メンバーの結合を検出するステップ（結合は本明細書中に記載の任意の方法または検出可能な標識を使用して検出される）を含む方法を含む。この方法、および本明細書中に記載の任意の他の結合検出方法は、方法を実施する者が、例えば検出可能な標識を視覚的に観察することによって直接解釈することができる。あるいは、この方法、または本明細書中に記載の任意の他の結合検出方法では、オートラジオグラフ、写真、コンピュータプリントアウト、フローサイトメトリーレポート、グラフ、チャート、結果を含有する試験管または容器またはウェル、または本方法の結果についての任意の他の視覚的または物理的表現の形式でレポートを得ることができる。

【０２００】

IL-6に対する結合性メンバーの結合の量を測定することができる。定量化は、診断上重要な、試験サンプル中の抗原の量に関するものであってよい。IL-6結合に関するスクリーニングおよび／またはその定量化は、例えば本明細書中で言及される疾患または障害および／または、異常なIL-6発現および／または活性を伴う任意の他の疾患または障害についての患者のスクリーニングにおいて有用である。

【０２０１】

本発明の診断方法は、（ｉ）被験体から組織または液体サンプルを取得するステップ、（ii）該組織または液体サンプルを1種以上の本発明の結合性メンバーに曝露するステップ；および（iii）コントロールサンプルと比較して、結合済みIL-6を検出するステップ（コントロールと比較された場合のIL-6結合の量の増加は、IL-6の異常なレベルの発現または活性を示す）を含んでよい。検査対象の組織または液体サンプルには、血液、血清、尿、生検材料、腫瘍、または異常なIL-6レベルを含有すると疑われる任意の組織が含まれる。異常なIL-6レベルまたは活性に関して陽性であると検査された被験体はさらに、本明細書中で後に開示される治療方法によって恩恵を受ける。当業者は、本明細書中で開示される方法を考慮して、その好みおよび一般的知識にしたがって、抗原に対する結合性メンバーの結合を測定する好適な様式を選択することができる。

【０２０２】

サンプル中の結合性メンバーの反応性を任意の適切な手段によって測定することができる。ラジオイムノアッセイ（RIA）は一候補である。放射性標識抗原を非標識抗原（試験サンプル）と混合し、結合性メンバーと結合させる。結合済み抗原を未結合抗原から物理的に分離し、結合性メンバーと結合している放射性抗原の量を測定する。試験サンプル中に多くの抗原が存在するほど、少ない放射性抗原しか結合性メンバーと結合しない。レポーター分子に連結された抗原または類似体を使用して、非放射性抗原での競合結合アッセイを使用してもよい。該レポーター分子は、スペクトルによって分離される吸収または発光特性を有する蛍光色素、リン光体またはレーザー色素であってよい。好適な蛍光色素には、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッド、およびラン

タニドキレートまたはクリプタートが含まれる。好適な発色色素には、ジアミノベンジジンが含まれる。

【０２０３】

他のレポーターには、高分子コロイド粒子または微粒子材料、例えば有色、磁気または常磁性のラテックスビーズ、および視覚的に観察されるか、電子的に検出されるか、または別の方法で記録される対象の検出可能なシグナルを直接または間接的に生じさせることができる生物学的または化学的に活性な物質が含まれる。これらの分子は、例えば、発色させるかまたは変色させるかまたは電気的特性の変化を生じさせる反応を触媒する酵素であってよい。それらは、エネルギー状態間の電子遷移が特徴的スペクトル吸収または発光を生じさせるよう分子的に励起可能であってよい。それらには、バイオセンサーとともに使用される化学物質が含まれる。ビオチン／アビジンまたはビオチン／ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系を用いてよい。

【０２０４】

個々の結合性メンバー-レポーターコンジュゲートによって生成されるシグナルを使用して、サンプル（正常および試験サンプル）中の該当する結合性メンバーの結合についての定量可能な絶対的または相対的データを導き出すことができる。

【０２０５】

また、本発明の任意の態様または実施形態に記載の結合性メンバーを含むキットが本発明の態様として提供される。該キットでは、例えば以下でさらに記載されるように、結合性メンバーを標識して、サンプル中のその反応性の測定を可能にしてよい。さらに、結合性メンバーを固体支持体に付着させても付着させなくてもよい。キットの構成要素は概して滅菌されていて、密封バイアルまたは他の容器に含まれる。結合性メンバーが有用である診断解析または他の方法においてキットを用いることができる。キットは、方法、例えば本発明の方法での構成要素の使用に関する指示書を含有してよい。そのような方法を支援するかまたはその実施を可能にするための付属材料を本発明のキットに含ませてよい。該付属材料には、第一の結合性メンバーと結合する第二の異なる結合性メンバーが含まれ、検出可能な標識（例えば、蛍光標識、放射性同位体または酵素）にコンジュゲートされる。抗体に基づくキットは、免疫沈降を実施するためのビーズを含んでもよい。キットの各構成要素は概してそれ自身に好適な容器に含まれる。ゆえに、これらのキットは概して各結合性メンバーに好適な個別の容器を含む。さらに、該キットは、アッセイを実施するための指示書および該アッセイの実施から得られたデータを解釈および解析するための方法を含んでよい。

【０２０６】

本発明はまた、競合アッセイにおいて抗原レベルを測定するための上記結合性メンバーの使用、すなわち、本発明によって提供される結合性メンバーを競合アッセイで用いることによってサンプル中の抗原レベルを測定する方法を提供する。これは、結合済み抗原を未結合抗原から物理的に分離することが必要とされない場合であってよい。レポーター分子を結合性メンバーに連結し、結合時に物理的または光学的変化が生じるようにすることが一候補である。該レポーター分子は、直接または間接的に、検出可能なシグナルを生成してよく、該シグナルは定量可能であってよい。レポーター分子は、直接または間接的に、共有結合によって、例えばペプチド結合を介してまたは非共有結合によって連結してよい。ペプチド結合を介する連結は、抗体およびレポーター分子をコードする遺伝子融合物の組換え発現の結果であってよい。

【０２０７】

種々の態様および実施形態では、本発明は、本明細書中で定義される任意の結合性メンバー、例えば親抗体または抗体2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22および23のいずれか、例えばIgG1形態のもの、によるIL-6への結合に関して競合する結合性メンバーにまで及ぶ。結合性メンバー間の競合は、例えばタグが付いていない他方の結合性メンバー（群）の存在下で検出できる特定のレポーター分子を一方の結合性メンバーにタグ付けすることによって、in vitroで容易にアッセイすることができ、同一エピトープま

たはオーバーラップエピトープと結合する結合性メンバーの同定が可能になる。競合は、例えばELISAを使用して測定することができる。該ELISAでは、IL-6をプレートに固定し、タグが付いているかまたは標識されている第一の結合性メンバーを、タグが付いていないかまたは標識されていない1つ以上の他の結合性メンバーとともに該プレートに加える。タグが付いている結合性メンバーと競合する、タグが付いていない結合性メンバーの存在は、タグが付いている結合性メンバーによって放出されるシグナルの低下によって観察される。

【０２０８】

例えば、本発明は、IL-6結合化合物を同定する方法であって、（ｉ）IL-6を支持体に固定するステップ、（ii）該固定済みIL-6を、タグが付いているかまたは標識されている少なくとも1つの本発明の結合性メンバーおよびタグが付いていないかまたは標識されていない1つ以上の試験結合化合物と、同時にまたは段階的様式で接触させるステップ、および（iii）タグが付いている結合性メンバーからの結合タグ量の低下を観察することによって、新規IL-6結合化合物を同定するステップを含む方法を含む。マルチウェルまたはアレイ形式を使用して、そのような方法をハイスループット様式で実施することができる。そのようなアッセイを溶液中で実施してもよい。例えばU.S. 5,814,468を参照のこと。該文献は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる。上記のように、結合の検出は、該方法の実施者が直接、例えば検出可能な標識またはその存在の減少を視覚的に観察することによって解釈することができる。あるいは、本発明の結合方法は、オートラジオグラフ、写真、コンピュータプリントアウト、フローサイトメトリーレポート、グラフ、チャート、結果を含有する試験管または容器またはウェル、または本方法の結果についての任意の他の視覚的または物理的表現の形式でレポートを生成することができる。

【０２０９】

エピトープマッピングにおいて競合アッセイを使用することもできる。ある例では、エピトープマッピングを使用して、場合により最適化された中和および／またはモジュレーション特性を有する、IL-6結合性メンバーが結合するエピトープを同定することができる。そのようなエピトープは線形または立体構造エピトープでありうる。立体構造エピトープは、IL-6の少なくとも2つの異なる断片を含むことができ、該断片はIL-6がその三次元または四次元構造にフォールディングされる場合に互いに接近して位置して立体構造エピトープを形成し、それがIL-6のインヒビター、例えばIL-6結合性メンバーによって認識される。競合試験では、抗原のペプチド断片、特に、目的のエピトープを含むかまたは本質的にそれから構成されるペプチドを用いてよい。エピトープ配列に加えて両端に1個以上のアミノ酸を有するペプチドを使用してよい。本発明の結合性メンバーは、抗原に対するその結合が、上記配列を有するかまたは含むペプチドによって阻害されるようにしてよい。

【０２１０】

本発明はさらに、本発明の結合性メンバーをコードする、単離された核酸を提供する。核酸はDNAおよび／またはRNAを含んでよい。一方で、本発明は、上で定義される本発明のCDRまたはCDRセットまたはVHドメインまたはVLドメインまたは抗体抗原結合部位または抗体分子、例えばscFvまたはIgG1をコードする核酸を提供する。

【０２１１】

本発明はまた、少なくとも1つの上記ポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写または発現カセットの形態の構築物を提供する。

【０２１２】

本発明はまた、1つ以上の上記構築物を含む組換え宿主細胞を提供する。提供される任意のCDRまたはCDRセットまたはVHドメインまたはVLドメインまたは抗体抗原結合部位または抗体分子、例えばscFvまたはIgG1をコードする核酸は、それ自体が本発明の態様を構成し、そのコード対象の産物の製造方法であって、そのコード核酸からの発現ステップを含む方法と同様である。該核酸を含有する組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することによって、好都合に発現を達成することができる。発現による生成後、VHまたはVLドメイン

、または結合性メンバーを、任意の好適な技術を使用して単離しかつ／または精製し、次いで必要に応じて使用することができる。

【０２１３】

本発明の核酸はDNAまたはRNAを含んでよく、完全にまたは部分的に合成核酸であってよい。本明細書中に記載のヌクレオチド配列への言及は、文脈上特に要求されない限り、指定配列を有するDNA分子を包含し、かつ、Tの代わりにUが用いられる指定配列を有するRNA分子を包含する。

【０２１４】

さらに別の態様は、抗体VH可変ドメインの製造方法であって、コード核酸からの発現を生じさせるステップを含む方法を提供する。そのような方法は、該抗体VH可変ドメインの製造条件下で宿主細胞を培養するステップを含んでよい。

【０２１５】

VL可変ドメインおよび、VHおよび／またはVLドメインを含む結合性メンバーを製造するための類似の方法は本発明の別の態様として提供される。

【０２１６】

製造方法は、生成物を単離および／または精製するステップを含んでよい。製造方法は、生成物を製剤化して、少なくとも1種の追加の成分、例えば製薬的に許容される賦形剤を含む組成物とするステップを含んでよい。

【０２１７】

種々の異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニング系および発現系が周知である。好適な宿主細胞には、細菌、哺乳類細胞、植物細胞、糸状菌、酵母およびバキュロウイルス系およびトランスジェニック植物および動物が含まれる。原核細胞での抗体および抗体断片の発現は当技術分野において確立されている。レビューに関しては、例えばPluckthun [103]を参照のこと。一般的な細菌宿主はE. coliである。

【０２１８】

培養中の真核細胞での発現もまた、結合性メンバーを製造するための選択肢として当業者に利用可能である[104, 105, 106]。当技術分野において、異種ポリペプチドの発現に利用可能な哺乳類セルラインには、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞、NS0マウス黒色腫細胞、YB2/0ラット骨髄腫細胞、ヒト胚性腎細胞、ヒト胚性網膜細胞および多数の他の細胞が含まれる。

【０２１９】

適切な調節配列、例えばプロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および他の配列を必要に応じて含有する好適なベクターを選択または構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、例えばファージミド、またはウイルス、例えば「ファージ」であってよい[107]。核酸を操作するための多数の公知技術およびプロトコル、例えば核酸構築物の製造における、突然変異誘発、シークエンシング、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現、およびタンパク質の分析は、Ausubel et al. [108]に詳細に記載されている。

【０２２０】

本発明の別の態様は、本明細書中で開示されている核酸を含有する宿主細胞を提供する。そのような宿主細胞はin vitroであってよく、培養中であってよい。そのような宿主細胞はin vivoであってよい。宿主細胞がin vivoに存在すれば、本発明の結合性メンバーを「イントラボディー」または細胞内抗体として細胞内で発現することが可能になる。イントラボディーは遺伝子治療に使用することができる。

【０２２１】

さらに別の態様は、本発明の核酸を宿主細胞内に導入するステップを含む方法を提供する。該導入では、任意の利用可能な技術を用いてよい。真核細胞では、好適な技術には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクションおよびレトロウイルスまたは他のウイルス、例えばワクシニアまたは、昆虫細胞では、バキュロウイルスを使用する形質導入が含まれる。宿

主細胞、特に真核細胞での核酸の導入では、ウイルスまたはプラスミドに基づく系を使用することができる。プラスミド系はエピソームとして維持するか、または宿主細胞内または人工染色体内に組み込むことができる。組込みは、単一または複数の遺伝子座で1コピー以上をランダムにまたはターゲティングして組み込むことによって行うことができる。細菌細胞に好適な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーションおよびバクテリオファージを使用するトランスフェクションが含まれる。

【０２２２】

導入後に、例えば該遺伝子の発現条件下で宿主細胞を培養することによって、核酸からの発現を生じさせるかまたは可能にしてよい。発現産物の精製は、当業者に公知の方法によって達成してよい。

【０２２３】

本発明の核酸は宿主細胞のゲノム（例えば染色体）に組み込むことができる。標準的技術にしたがって、ゲノムとの組換えを促進する配列を含ませることによって組込みを促進することができる。

【０２２４】

本発明はまた、上記結合性メンバーまたはポリペプチドを発現するために、発現系で上記構築物を使用するステップを含む方法を提供する。

【０２２５】

本明細書中の他の箇所で考察されるように、種々の疾患でのIL-6の関与に関する証拠が存在する。したがって、IL-6と関連している疾患の診断または治療方法において本発明の結合性メンバーを使用することができる。そのような疾患は、例えば、炎症性および／または自己免疫性疾患、例えば関節リウマチ、骨関節炎、悪液質、慢性閉塞性肺疾患、若年性特発性関節炎、喘息、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、クローン病またはアテローム性動脈硬化症である。本発明の結合性メンバーを使用して、腫瘍および／または癌等の疾患を治療することもできる。

【０２２６】

本発明の結合性メンバーを、患者、動物、器官、組織または細胞において、少なくとも1種のIL-6関連疾患を診断または治療する方法に用いてもよく、該疾患には、非限定的に、以下の疾患が含まれる。

【０２２７】

（呼吸器）　閉塞性気道疾患、例えば慢性閉塞性肺疾患（COPD）；喘息、例えば気管支、アレルギー性、内因性、外因性および塵埃喘息、特に慢性または難治性喘息（例えば遅発型喘息および気道応答性亢進）；気管支炎；急性、アレルギー性、萎縮性鼻炎および慢性鼻炎、例えば乾酪性鼻炎（rhinitis caseosa）、肥大性鼻炎、化膿性鼻炎（rhinitis purulenta）、乾性鼻炎（rhinitis sicca）および薬物性鼻炎（rhinitis medicamentosa）；膜性鼻炎、例えばクループ性、線維素性および偽膜性鼻炎および腺病性鼻炎；季節性鼻炎、例えば神経性鼻炎（枯草熱）および血管運動性鼻炎、副鼻腔炎、特発性肺線維症（IPF）；サルコイドーシス、農夫肺および関連疾患、成人呼吸促迫症候群、過敏性肺炎、肺線維症および特発性間質性肺炎。

【０２２８】

（骨および関節）　関節リウマチ、若年性慢性関節炎、全身発症若年性関節炎、血清反応陰性脊椎関節症（例えば強直性脊椎炎、乾癬性関節炎およびライター病）、ベーチェット病、シェーグレン（Siogren）症候群および全身性硬化症、痛風、骨粗鬆症および骨関節炎。

【０２２９】

（皮膚）　乾癬、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎および他の湿疹性（eczmatous）皮膚疾患、アレルギー性接触皮膚炎、脂漏性（seborrhoetic）皮膚炎、扁平苔癬、強皮症、天疱瘡、水疱性類天疱瘡、表皮水泡症、じんま疹、皮膚脈管炎（angiodermas）、脈管炎（vasculitides）、紅斑、皮膚好酸球増加症、ブドウ膜炎、円形脱毛症、アレルギー性結膜炎および春季結膜炎（vernalvemal conjunctivitis）。

【０２３０】
（消化管） 胃潰瘍、セリアック病、直腸炎、好酸球性胃腸炎（eosinopilic gastro-enteritis）、肥満細胞症、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、抗リン脂質症候群））、腸から遠隔の影響を有する食物関連アレルギー、例えば片頭痛、鼻炎および湿疹。
【０２３１】
（他の組織および全身性疾患） 悪液質、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、後天性免疫不全症候群（AIDS）、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒症、局所または円板状エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、キャッスルマン病、ハシモト甲状腺炎、重症筋無力症、I型糖尿病、B型インスリン抵抗性糖尿病、鎌形赤血球貧血、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、腎炎症候群、好酸球増加症筋膜炎、ハイパーIgE症候群、全身性血管炎／ウェグナー肉芽腫症、睾丸炎／精管切除回復術、らい腫らい、アルコール誘発肝炎、セザリー症候群および特発性血小板減少症紫斑病；術後接着、ネフローゼ、全身性炎症反応症候群、敗血症症候群、グラム陽性敗血症、グラム陰性敗血症、培養陰性敗血症、真菌敗血症、好中球減少性発熱、急性膵炎、尿性敗血症、グレーブス病、レイノー病、抗体媒介細胞傷害性、III型過敏性反応、POEMS症候群（多発神経障害、臓器巨大症、内分泌疾患、単クローン性免疫グロブリン血症、および皮膚変化症候群）、混合結合組織病、特発性アジソン病、糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、MI（心臓切開）後症候群、IV型過敏症、細胞内生物に起因する肉芽腫、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス、アルファ-I-アンチトリプシン欠乏症、糖尿病網膜症、ハシモト甲状腺炎、視床下部・下垂体・副腎軸評価、甲状腺炎、脳脊髄炎、新生児慢性肺疾患、家族性食血細胞リンパ組織球増多症、脱毛症、放射線療法（例えば、非限定的に、無力症、貧血、悪液質、等が含まれる）、慢性サリチル酸中毒、睡眠時無呼吸、肥満症、心不全、および髄膜炎菌性敗血症。
【０２３２】
（同種移植拒絶） 例えば腎臓、心臓、肝臓、肺、膵臓、骨髄、骨、小腸、皮膚、軟骨および角膜の移植後の急性および慢性拒絶；および慢性移植片対宿主病。
【０２３３】
（悪性疾患） 白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、急性白血病、T細胞、B細胞、またはFAB ALL、慢性（chromic）骨髄性白血病（CML）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、有毛細胞白血病、脊髄形成異常（myelodyplastic）症候群（MDS）、任意のリンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、任意の悪性リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カポジ肉腫、腎細胞癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵癌、上咽頭癌、悪性組織球増殖症、悪性腫瘍の腫瘍随伴症候群／高カルシウム血症、固形腫瘍、腺癌、肉腫、悪性黒色腫、血管腫、転移性疾患、癌関連骨吸収、癌関連骨痛；癌転移の抑制；癌悪液質の改善。
【０２３４】
嚢胞性線維症、脳卒中、心臓、脳、末梢肢（peripheral limbs）および他の器官の再潅流傷害。
【０２３５】
やけど創傷、外傷／出血、電離放射線曝露、慢性皮膚潰瘍。
【０２３６】
生殖疾患（例えば排卵、月経および着床の障害、早期陣痛、子癇前症、子宮内膜症）。
【０２３７】
（感染症） 急性または慢性細菌感染、急性および慢性寄生または感染プロセス、例えば細菌、ウイルスおよび真菌感染、HIV感染／HIV神経疾患、髄膜炎、肝炎（A、BまたはC、または他のウイルス性肝炎等）、敗血性関節炎、腹膜炎、肺炎、喉頭蓋炎、大腸菌（e. coli）0157:h7、溶血性尿毒症症候群／血栓性血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、レーシュマニア症、ライ病、中毒性ショック症候群、連鎖球菌性筋炎、ガス壊疽、結核菌（mycobacterium tuberculosis）、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ（mycobacterium avium intracellulare）、カリニ肺炎、骨盤内炎症性疾患、睾丸

炎／エピディディミティス（epidydimitis）、レジオネラ、ライム病、インフルエンザa、エプスタイン・バーウイルス、生命関連赤血球貧食症候群（vital-associated hemaphagocytic syndrome）、ウイルス性脳炎／無菌性髄膜炎、等。

【０２３８】

したがって、本発明は、IL-6関連疾患の治療方法であって、それを必要としている患者に1種以上の本発明の結合性メンバーの有効量を、単独でまたは、当技術分野において公知もしくは本明細書中に記載の別の適切な薬物と併用療法で投与するステップを含む方法を提供する。

【０２３９】

特定の疾患にIL-6が関与する証拠は本明細書中の他の箇所で概説されている。それに加えて、本明細書中に記載のデータは、本発明の結合性メンバーを使用してそのような疾患を治療（該疾患の予防処置およびその重症度の低減が含まれる）することができることをさらに示す。したがって、本発明は、本明細書中に記載の任意の疾患の少なくとも1つの症状を治療するかまたはその重症度を低減する方法であって、それを必要としている患者に1種以上の本発明の結合性メンバーの有効量を、単独でまたは、当技術分野において公知もしくは本明細書中に記載の別の適切な薬物と併用療法で投与して、上記疾患のいずれかの少なくとも1つの症状の重症度が低減されるようにするステップを含む方法を提供する。

【０２４０】

ゆえに、本発明の結合性メンバーは、IL-6および／またはIL-6Ra発現および／または活性、特に異常な発現／活性が関与する疾患または障害の治療における治療物質として有用である。治療方法は、本発明の結合性メンバーの有効量を、それを必要としている患者に投与して、IL-6および／またはIL-6Raの異常な発現および／または活性を低下させるステップを含んでよい。治療方法は、（ｉ）例えば上記診断方法を使用して、異常なIL-6:IL-6Raレベルまたは活性を示す患者を同定するステップ、および（ii）本発明の結合性メンバーの有効量を患者に投与して、IL-6Raおよび／またはIL-6の異常な発現および／または活性を低下させるステップを含んでよい。本発明に基づく有効量は、治療される特定の疾患または障害の少なくとも1つの症状の重症度を低下または減少させるためにIL-6および／またはIL-6Raの異常な発現および／または活性を低下させる量であり、必ずしも該疾患または障害を治癒させる量ではない。

【０２４１】

本発明はまた、IL-6の少なくとも1つの作用にアンタゴナイズ（拮抗阻害）する方法であって、1種以上の本発明の結合性メンバーの有効量と接触させるかまたはそれを投与して、該IL-6の少なくとも1つの作用に対しアンタゴナイズするようにするステップを含む方法を提供する。本発明の方法によってアンタゴナイズすることができるIL-6の作用には、IL-6のgp130への結合、およびこの結合の結果として生じる下流の効果が含まれる。したがって、本発明の別の態様は、提供される結合性メンバーを投与するステップを含む治療方法、そのような結合性メンバーを含む医薬組成物、および例えば結合性メンバーを製薬的に許容される賦形剤とともに製剤化するステップを含む薬物または医薬組成物の製造方法における、投与用薬物の製造でのそのような結合性メンバーの使用を提供する。製薬的に許容される賦形剤は、医薬組成物に入るが二次反応を引き起こさず、かつ、例えば活性化合物（群）の投与を容易にし、身体内でのその寿命および／または効力を増加させ、溶液中のその溶解度を高め、またはその保存を改善する化合物または化合物の組み合わせであってよい。これらの製薬的に許容されるビヒクルは周知であり、選択される活性化合物（群）の性質および投与様式に応じて、当業者は該ビヒクルを適合させる。

【０２４２】

本発明の結合性メンバーは、通常、該結合性メンバーに加えて少なくとも1種の成分を含む医薬組成物の形態で投与される。ゆえに、本発明に基づく、本発明にしたがって使用するための医薬組成物は、活性成分に加えて、当業者に周知の製薬的に許容される賦形剤、担体、バッファー、安定剤または他の材料を含んでよい。そのような材料は無毒で、活

性成分の効力を妨げないべきであろう。担体または他の材料の厳密な性質は投与経路に依存し、該経路は、以下で考察されるように、経口、吸入、気管内、局所、膀胱内（intravesicular）であるかまたは注射による経路であってよい。

【０２４３】

経口投与用の医薬組成物、例えば単一ドメイン抗体分子（例えば「nanobodies™」）等もまた、本発明において想定される。そのような経口製剤は、錠剤、カプセル、粉末、液体または半固体の剤形であってよい。錠剤は、固体担体、例えばゼラチンまたはアジュバントを含んでよい。液体医薬組成物は、概して、液体担体、例えば水、石油、動物油または植物油、鉱油または合成油を含む。生理食塩水溶液、デキストロースまたは他のサッカライド溶液またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールを含ませることができる。

【０２４４】

静脈内注射、または罹患部位での注射では、活性成分は、パイロジェンを含まず、好適なpH、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水性溶液の剤形である。該当する当業者は、例えば等張性ビヒクル、例えば塩化ナトリウム液、リンガー液、乳酸加リンガー液を使用して、好適な溶液を調製することが十分に可能である。保存剤、安定剤、バッファー、酸化防止剤および／または他の添加物を必要に応じて用いることができる。それには、バッファー、例えばリン酸、クエン酸および他の有機酸；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；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；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン；単糖、二糖および他の炭水化物、例えばグルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成カウンターイオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および／または非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN™、PLURONICS™またはポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

【０２４５】

本発明の結合性メンバーは、分子の物理化学的特性および送達経路に応じて、液体、半固体または固体剤形で製剤化してよい。製剤には、賦形剤、または賦形剤の組み合わせ、例えば：糖、アミノ酸および界面活性剤を含ませてよい。液体製剤には、広範囲の抗体濃度およびpHを含ませてよい。固体製剤は、例えば、凍結乾燥、スプレー乾燥、または超臨界流体技術による乾燥によって製造することができる。結合性メンバーの製剤は、意図される送達経路に依存する。例えば、肺送達用製剤は、吸入時に肺に深く浸透することを保証する物性を有する粒子からなり；局所製剤（例えば瘢痕、例えば真皮瘢痕治療用の局所製剤）には、薬物が作用点に留まる期間を延長する粘性調節剤を含ませてよい。結合性メンバーは、該結合性メンバーを急速な放出から保護する担体とともに製造してよく、例えば制御放出製剤であり、それには、移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系が含まれる。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物（polyanhydrides）、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を使用することができる。そのような製剤を調製するための多数の方法が当業者に公知である[109]。

【０２４６】

治療は、経口で（例えば単一ドメイン抗体分子（例えば「nanobodies™」）のように）、注射によって（例えば皮下、関節内、静脈内、腹膜内、動脈内または筋肉内注射によって）、吸入によって、気管内、膀胱内経路（膀胱内への点滴注入）によって、または局所的に（例えば眼内、鼻内、経直腸、創傷内、皮膚上）施してよい。該治療は、パルス注入

によって、特に少ない用量の結合性メンバーを投与してよい。投与経路は、治療の物理化学的特性によって、疾患に関する特別な配慮によって、または効力を最適化するかもしくは副作用を最小にする必要性によって、決定することができる。特定の一投与経路は静脈内経路である。本発明の医薬組成物を投与する別の経路は皮下経路である。治療は診療所での使用に制限されないことが想定される。したがって、ニードルフリーデバイスを使用する皮下注射も有益である。

【０２４７】

組成物は、単独でまたは他の治療と組み合わせて、治療対象の症状に応じて同時にもしくは連続して投与することができる。

【０２４８】

本発明の結合性メンバーは、追加の治療構成要素と組み合わせた併用療法の部分として使用することができる。併用治療、特に本発明の結合性メンバーと1種以上の他の薬物の併用を使用して、大きな相乗効果を得ることができる。本発明の結合性メンバーは、本明細書中で列挙されている1種以上の症状の治療のために、別の治療物質または物質群と同時にまたは連続してまたは混合調製物として投与してよい。

【０２４９】

本発明の結合性メンバーは、細胞傷害性物質の治療効力を高めることができる化学増感剤として使用することができ、ゆえに1種以上の細胞傷害性物質と組み合わせて、同時にまたは連続して投与するために提供することができる。結合性メンバーは、放射線の効力を向上させる放射線増感剤として使用することもでき、ゆえに放射線と組み合わせて、同時にまたは連続して投与するために提供することができる。

【０２５０】

本発明の結合性メンバーは、1種以上の以下の物質と組み合わせてまたはそれらとともに提供することができる。

【０２５１】

- サイトカインまたはサイトカイン機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト（例えばサイトカインシグナル伝達経路に作用する物質、例えばSOCS系のモジュレーター）、例えばアルファ-、ベータ-および／またはガンマ-インターフェロン；インシュリン様成長因子I型（IGF-1）、その受容体および関連結合タンパク質；インターロイキン（IL）、例えば1種以上のIL-1～33、および／またはインターロイキンアンタゴニストまたはインヒビター、例えばアナキンラ（anakinra）；インターロイキンファミリーメンバーの受容体のインヒビターまたはそのような受容体の特定サブユニットのインヒビター、腫瘍壊死因子アルファ（TNF-α）インヒビター、例えば抗TNFモノクローナル抗体（例えばインフリキシマブ、アダリムマブ（adalimumab）および／またはCDP-870）および／またはTNF受容体アンタゴニスト、例えば免疫グロブリン分子（例えばエタネルセプト（etanercept））および／または低分子量物質、例えばペントキシフィリン（pentoxyfylline）。

【０２５２】

- B細胞のモジュレーター、例えばBリンパ球を標的にするモノクローナル抗体（例えばCD20（リツキシマブ）またはMRA-aIL16R）またはTリンパ球を標的にするもの（例えばCTLA4-Ig、HuMax Il-15またはアバタセプト（Abatacept））。

【０２５３】

- 破骨細胞活性を阻害するモジュレーター、例えばRANKLに対する抗体。

【０２５４】

- ケモカインまたはケモカイン受容体機能のモジュレーター、例えばCCR1、CCR2、CCR2A、CCR2B、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10およびCCR11（C-Cファミリー）；CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4およびCXCR5およびCXCR6（C-X-Cファミリー）およびCX_3CR1（$C\text{-}X_3\text{-}C$ファミリー）のアンタゴニスト。

【０２５５】

- マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、すなわち1種以上のストロメライシン、コラゲナーゼおよびゼラチナーゼならびにアグレカナーゼ（aggrecanase）、特にコラゲ

ナーゼ-1（MMP-1）、コラゲナーゼ-2（MMP-8）、コラゲナーゼ-3（MMP-13）、ストロメライシン-1（MMP-3）、ストロメライシン-2（MMP-10）および／またはストロメライシン-3（MMP-11）および／またはMMP-9および／またはMMP-12のインヒビター、例えばドキシサイクリン等の物質。

【０２５６】

- ロイコトリエン生合成インヒビター、5-リポキシゲナーゼ（5-LO）インヒビターまたは5-リポキシゲナーゼ活性化タンパク質（FLAP）アンタゴニスト、例えばジレウトン（zileuton）；ABT-761；フェンレウトン（fenleuton）；テポキサリン（tepoxalin）；Abbott-79175；Abbott-85761；N-(5-置換)-チオフェン-2-アルキルスルホンアミド；2,6-ジ-tert-ブチルフェノールヒドラゾン；メトキシテトラヒドロピラン、例えばZeneca ZD-2138；化合物SB-210661；ピリジニル置換2-シアノナフタレン化合物、例えばL-739,010；2-シアノキノリン化合物、例えばL-746,530；インドールおよび／またはキノリン化合物、例えばMK-591、MK-886および／またはBAY x 1005。

【０２５７】

- フェノチアジン-3-1、例えばL-651,392；アミジノ化合物、例えばCGS-25019c；ベンゾキサラミン（benzoxalamines）、例えばオンタゾラスト（ontazolast）；ベンゼンカルボキシミドアミド（benzenecarboximidamides）、例えばBIIL 284/260；および化合物、例えばザフィルルカスト（zafirlukast）、アブルカスト（ablukast）、モンテルカスト（montelukast）、プランルカスト（pranlukast）、ベルルカスト（verlukast）（MK-679）、RG-12525、Ro-245913、イラルカスト（iralukast）（CGP 45715A）およびBAY x 7195からなる群から選択されるロイコトリエン（LT）B4、LTC4、LTD4、およびLTE4の受容体アンタゴニスト。

【０２５８】

- ホスホジエステラーゼ（PDE）インヒビター、例えばメチルキサンタニン（methylxanthanine）、例えばテオフィリンおよび／またはアミノフィリン；および／または選択的PDEアイソザイム阻害剤、例えばPDE4インヒビターおよび／またはアイソフォームPDE4Dのインヒビターおよび／またはPDE5のインヒビター。

【０２５９】

- ヒスタミン1型受容体アンタゴニスト、例えばセチリジン（cetirizine）、ロラタジン（loratadine）、デスロラタジン（desloratadine）、フェキソフェナジン、アクリバスチン（acrivastine）、テルフェナジン、アステミゾール、アゼラスチン、レボカバスチン（levocabastine）、クロルフェニラミン、プロメタジン、シクリジン、および／またはミゾラスチン（mizolastine）（概して経口で、局所的にまたは非経口で投与される）。

【０２６０】

- プロトンポンプインヒビター（例えばオメプラゾール）または胃保護性ヒスタミン2型受容体アンタゴニスト。

【０２６１】

- ヒスタミン4型受容体のアンタゴニスト。

【０２６２】

- アルファ-1／アルファ-2アドレナリン受容体アゴニスト血管収縮性交感神経様作用薬、例えばプロピルヘキセドリン、フェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、エフェドリン、シュードエフェドリン、塩酸ナファゾリン、塩酸オキシメタゾリン、塩酸テトラヒドロゾリン、塩酸キシロメタゾリン、塩酸トラマゾリンおよび塩酸エチルノルエピネフリン。

【０２６３】

- 抗コリン作動薬、例えばムスカリン受容体（M1、M2、およびM3）アンタゴニスト、例えばアトロピン、ヒヨスチン、グリコピロレート、イプラトロピウムブロミド、チオトロピウムブロミド（tiotropium bromide）、オキシトロピウムブロミド、ピレンゼピンおよびテレンゼピン（telenzepine）。

【０２６４】
- ベータ-アドレナリン受容体アゴニスト（ベータ受容体サブタイプ1-4を含む）、例えばイソプレナリン、サルブタモール、フォルモテロール、サルメテロール、テルブタリン、オルシプレナリン、ビトルテロールメシレートおよび／またはピルブテロール、例えばそのキラルエナンチオマー。
【０２６５】
- クロモン、例えばクロモグリク酸ナトリウムおよび／またはネドクロミルナトリウム。
【０２６６】
- 糖質コルチコイド、例えばフルニソリド、トリアムシノロンアセトニド、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ブデソニド、プロピオン酸フルチカゾン（fluticasone propionate）、シクレソニド（ciclesonide）、および／またはフランカルボン酸モメタゾン（mometasone furoate）。
【０２６７】
- 核ホルモン受容体、例えばPPARをモジュレートする物質。
【０２６８】
- 免疫グロブリン（Ig）またはIg調製物またはIg機能をモジュレートするアンタゴニストもしくは抗体、例えば抗IgE（例えばオマリズマブ（omalizumab））。
【０２６９】
- 他の全身または局所適用の抗炎症剤、例えばサリドマイドまたはその誘導体、レチノイド、ジトラノール（dithranol）および／またはカルシポトリオール（calcipotriol）。
【０２７０】
- アミノサリチル酸およびスルファピリジンの組み合わせ、例えばスルファサラジン、メサラジン、バルサラジド（balsalazide）、およびオルサラジン（olsalazine）；および免疫調節剤、例えばチオプリン（thiopurines）；およびコルチコステロイド、例えばブデソニド。
【０２７１】
- 抗菌剤、例えばペニシリン誘導体、テトラサイクリン、マクロライド、ベータ-ラクタム、フルオロキノロン、メトロニダゾールおよび／または吸入アミノグリコシド；および／または抗ウイルス剤、例えばアシクロビル、ファムシクロビル（famciclovir）、バラシクロビル（valaciclovir）、ガンシクロビル、シドフォビル（cidofovir）；アマンタジン、リマンタジン；リバビリン；ザナマビル（zanamavir）および／またはオセルタマビル（oseltamavir）；プロテアーゼインヒビター、例えばインジナビル、ネルフィナビル、リトナビルおよび／またはサキナビル；ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、例えばジダノシン、ラミブジン、スタブジン、ザルシタビン、ジドブジン；非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、例えばネビラピン、エファビレンツ。
【０２７２】
- 心血管作動薬、例えばカルシウムチャネルブロッカー、ベータ-アドレナリン受容体ブロッカー、アンギオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター、アンギオテンシン-2受容体アンタゴニスト；脂質低下剤、例えばスタチンおよび／またはフィブラート（fibrate）；血液細胞形態のモジュレーター、例えばペントキシフィリン（pentoxyfylline）；血栓溶解剤および／または抗凝血剤、例えば血小板凝集インヒビター。
【０２７３】
- CNS作動薬、例えば抗うつ剤（例えばセルトラリン）、抗パーキンソン薬（例えばデプレニル、L-ドーパ、ロピニロール（ropinirole）、プラミペキソール；MAOBインヒビター、例えばセレギン（selegine）およびラサギリン（rasagiline）；comPインヒビター、例えばタスマル（tasmar）；A-2インヒビター、ドーパミン再摂取インヒビター、NMDAアンタゴニスト、ニコチンアゴニスト、ドーパミンアゴニストおよび／またはニューロン一酸化窒素シンターゼのインヒビター）および抗アルツハイマー薬、例えばドネペジル、リ

バスティグミン、タクリン、COX-2インヒビター、プロペントフィリンまたはメトリホナート。

【０２７４】

- 急性および慢性痛を治療するための物質、例えば中枢または末梢作用鎮痛剤、例えばオピオイド類似体または誘導体、カルバマゼピン、フェニトイン、バルプロ酸ナトリウム、アミトリプチリン（amitryptiline）または他の抗うつ剤、パラセタモール、または非ステロイド性抗炎症剤。

【０２７５】

- 非経口または局所適用（吸入を含む）局所麻酔剤、例えばリグノカインまたはその類似体。

【０２７６】

- 抗骨粗鬆症剤、例えばホルモン剤、例えばラロキシフェン、またはビホスホナート、例えばアレンドロナート（alendronate）。

【０２７７】

- （i）トリプターゼインヒビター；（ii）血小板活性化因子（PAF）アンタゴニスト；（iii）インターロイキン変換酵素（ICE）インヒビター；（iv）IMPDHインヒビター；（v）接着分子インヒビター、例えばVLA-4アンタゴニスト；（vi）カテプシン；（vii）キナーゼインヒビター、例えばチロシンキナーゼのインヒビター（例えばBtk、Itk、Jak3 MAP インヒビターの例にはゲフィチニブ、メシル酸イマチニブが含まれる）、セリン／スレオニンキナーゼ（例えばMAPキナーゼ、例えばp38、JNK、プロテインキナーゼA、BおよびCおよびIKKのインヒビター）、または細胞周期調節に関与するキナーゼ（例えばサイクリン依存性キナーゼ）；（viii）グルコース-6リン酸デヒドロゲナーゼインヒビター；（ix）キニン-B.sub1. -および／またはB.sub2. -受容体アンタゴニスト；（x）抗痛風剤、例えばコルヒチン；（xi）キサンチンオキシダーゼインヒビター、例えばアロプリノール；（xii）尿酸排泄剤、例えばプロベネシド、スルフィンピラゾン、および／またはベンズブロマロン；（xiii）成長ホルモン分泌促進剤；（xiv）トランスフォーミング成長因子（TGFβ）；（xv）血小板由来成長因子（PDGF）；（xvi）線維芽細胞成長因子、例えば塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）；（xvii）顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）；（xviii）カプサイシンクリーム；（xix）タキキニンNK.sub1.および／またはNK.sub3.受容体アンタゴニスト、例えばNKP-608C、SB-233412（タルネタント（talnetant））および／またはD-4418；（xx）エラスターゼインヒビター、例えばUT-77および／またはZD-0892；（xxi）TNF-アルファ変換酵素インヒビター（TACE）；（xxii）誘導性一酸化窒素シンターゼ（iNOS）インヒビターまたは（xxiii）TH2細胞上で発現される化学誘引物質受容体相同分子（例えばCRTH2アンタゴニスト）；（xxiv）P38のインヒビター（xxv）トール（Toll）様受容体（TLR）の機能をモジュレートする物質および（xxvi）プリン受容体の活性をモジュレートする物質、例えばP2X7；（xxvii）転写因子活性化、例えばNFkB、API、および／またはSTATSのインヒビター。

【０２７８】

インヒビターは特異的であるか、または混合インヒビター、例えば上述の2種以上の分子（例えば受容体）または分子クラスを標的にするインヒビターであってよい。

【０２７９】

結合性メンバーはまた、化学療法剤または別のチロシンキナーゼインヒビターとともに、同時投与でまたはイムノコンジュゲートの形態で使用することができる。該抗体の断片はまた、組換え機構または生化学的カップリングおよび次いで上記抗体の特異性を、IL-6が関連している活性に関与する他の分子を認識可能な他の抗体の特異性と結び付けることによって取得される二重特異性抗体において使用することができる。

【０２８０】

炎症性疾患の治療では、本発明の結合性メンバーを、1種以上の物質、例えば局所適用であるか全身適用であるかにかかわらず非ステロイド性抗炎症剤（以後NSAID）、例えば非選択的シクロオキシゲナーゼ（COX）-1／COX-2インヒビター、例えばピロキシカム、ジ

クロフェナク、プロピオン酸、例えばナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェンおよびイブプロフェン、フェナマート、例えばメフェナム酸、インドメタシン、スリンダク、アザプロパゾン、ピラゾロン、例えばフェニルブタゾン、サリチラート、例えばアスピリン）；選択的COX-2インヒビター（例えばメロキシカム、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、ルマロコキシブ（lumarocoxib）、パレコキシブ（parecoxib）およびエトリコキシブ（etoricoxib））；シクロオキシゲナーゼ阻害性一酸化窒素ドナー（CINOD）；グルココルチコステロイド（局所、経口、筋肉内、静脈内または関節内経路による投与のいずれでもよい）；メトトレキセート、レフルノミド（leflunomide）；ヒドロキシクロロキン、d-ペニシラミン、オーラノフィンまたは他の非経口もしくは経口金製剤；鎮痛剤；ジアセレイン（diacerein）；関節内治療薬、例えばヒアルロン酸誘導体；および栄養補助食品、例えばグルコサミンと組み合わせてよい。

【０２８１】

本発明の結合性メンバーは癌を治療するための既存の治療物質と組み合わせて使用することもできる。組み合わせて使用するために好適な物質には、以下の物質が含まれる。

【０２８２】

（i）内科的腫瘍学において使用される抗増殖性／抗悪性腫瘍薬およびその組み合わせ、例えばGleevec（メシル酸イマチニブ）、アルキル化剤（例えばシスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロランブシル、ブスルファンおよびニトロソ尿素）；代謝拮抗剤（例えば葉酸拮抗剤、例えばフルオロピリミジン、例えば5-フルオロウラシルおよびテガフール、ラルチトレキセド、メトトレキセート、シトシンアラビノシド、ヒドロキシ尿素、ゲムシタビンおよびパクリタキセル）；抗腫瘍性抗生物質（例えばアントラサイクリン、例えばアドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、ダウノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、マイトマイシン-C、ダクチノマイシンおよびミトラマイシン）；有糸分裂阻害剤（例えばビンカアルカロイド、例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンおよびビノレルビンおよびタキソイド（taxoids）、例えばタキソールおよびタキソテール）；およびトポイソメラーゼインヒビター（例えばエピポドフィロトキシン、例えばエトポシドおよびテニポシド、アムサクリン、トポテカンおよびカンプトセシン）；

（ii）細胞増殖抑制剤、例えば抗エストロゲン剤（例えばタモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン（droloxifene）およびヨードキシフェン（iodoxyfene））、エストロゲン受容体下方制御因子（例えばフルベストラント）、抗アンドロゲン剤（例えばビカルタミド、フルタミド、ニルタミドおよび酢酸シプロテロン）、LHRHアンタゴニストまたはLHRHアゴニスト（例えばゴセレリン、ロイプロレリン（leuprorelin）およびブセレリン）、プロゲストゲン（例えば酢酸メゲストロール）、アロマターゼインヒビター（例えばアナストロゾール、レトロゾール、ボラゾール（vorazole）およびエキセメスタン）および5α-レダクターゼインヒビター、例えばフィナステリド；

（iii）癌細胞侵襲を阻害する物質（例えばメタロプロテイナーゼインヒビター、例えばマリマスタット（marimastat）およびウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター受容体機能のインヒビター）；

（iv）成長因子機能のインヒビター、例えば成長因子抗体、成長因子受容体抗体（例えば抗erbb2抗体トラスツズマブおよび抗erbb1抗体セツキシマブ[C225]）、ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター、チロシンキナーゼインヒビターおよびセリン／スレオニンキナーゼインヒビター、例えば上皮細胞成長因子ファミリーのインヒビター（例えばEGFRファミリーチロシンキナーゼインヒビター、例えばN-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミン（ゲフィチニブ、AZD1839）、N-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン（エルロチニブ（erlotinib）、OSI-774）および6-アクリルアミド-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミン（CI 1033））、例えば血小板由来成長因子ファミリーのインヒビターおよび例えば肝細胞成長因子ファミリーのインヒビター；

（v）血管新生阻害剤、例えば血管内皮増殖因子の効果を阻害するもの（例えば抗血管内皮細胞増殖因子抗体ベバシズマブ（bevacizumab）、国際特許出願WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856およびWO 98/13354（各文献はその全体が本明細書中に組み入れられる）に開示されている化合物等の化合物および他の機構で働く化合物（例えばリノミド（linomide）、インテグリンαvβ3機能のインヒビターおよびアンギオスタチン）；

（vi）血管損傷剤、例えばコンブレタスタチン（combretastatin）A4および国際特許出願WO 99/02166、WO 00/40529、WO 00/41669、WO 01/92224、WO 02/04434およびWO 02/08213（各文献はその全体が本明細書中に組み入れられる）に開示されている化合物；

（vii）アンチセンス治療薬、例えば上で列挙される標的に対するアンチセンス治療薬、例えばISIS 2503、抗rasアンチセンス；

（viii）遺伝子治療アプローチ、例えば異常遺伝子、例えば異常p53または異常BRCA1またはBRCA2を置換するアプローチ、GDEPT（遺伝子指向性酵素プロドラッグ治療（gene directed enzyme pro-drug therapy）アプローチ、例えばシトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼまたは細菌性ニトロレダクターゼ酵素を使用するアプローチおよび化学療法または放射線療法に対する患者の耐容性を高めるアプローチ、例えば多剤耐性遺伝子治療；および

（ix）免疫療法アプローチ、例えば患者腫瘍細胞の免疫原性を高めるex vivoおよびin vivoアプローチ、例えばサイトカイン、例えばインターロイキン2、インターロイキン4または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子のトランスフェクション、T細胞不応答を低下させるアプローチ、トランスフェクトされた免疫細胞、例えばサイトカインでトランスフェクトされた樹状細胞を使用するアプローチ、サイトカインでトランスフェクトされた腫瘍セルラインを使用するアプローチおよび抗イディオタイプ抗体を使用するアプローチ。

【０２８３】

本発明の結合性メンバーおよび1種以上の上記追加薬用成分を医薬品の製造に使用してよい。該医薬品は個体に対する単独または複合投与用であってよく、したがって結合性メンバーおよび追加の成分を複合調製物または単独調製物として含んでよい。単独調製物を使用して、別々かつ連続した投与または同時投与を容易にし、異なる経路、例えば経口および非経口投与による成分の投与を可能にすることができる。

【０２８４】

本発明にしたがって提供される組成物を哺乳類に投与することができる。通常、投与は「治療有効量」で行われる。これは患者に利益を示すために十分な量である。そのような利益は少なくとも1つの症状の少なくとも改善であってよい。実際の投与量、および投与の割合および時間経過は、治療対象物の性質および重症度、治療対象の具体的な哺乳類、個々の患者の臨床症状、疾患の原因、組成物の送達部位、結合性メンバーのタイプ、投与方法、投与計画および医師に公知の他の要因に依存する。治療の処方、例えば用量等の決定は一般の開業医および他の医学博士の責任の範囲内であり、症状の重症度および／または治療対象の疾患の進行度に依存する。抗体の適切な用量は当技術分野において周知である[110, 111]。投与される医薬品のタイプに応じて本明細書中またはPhysician's Desk Reference（2003）に記載の具体的用量を使用してよい。本発明の結合性メンバーの治療有効量または好適な用量は、そのin vitro活性と動物モデルにおけるin vivo活性を比較することによって決定することができる。マウスおよび他の試験動物での有効量をヒトに対して外挿するための方法が公知である。厳密な用量はいくつかの要因に依存し、該要因には、抗体が診断用であるか、予防用であるか、または治療用であるか、治療対象の領域のサイズおよび位置、抗体の厳密な性質（例えば完全抗体、断片またはダイアボディ）および抗体に結合されている任意の検出可能な標識または他の分子の性質が含まれる。典型的な抗体用量は、全身適用では100μg～1 gの範囲であり、局所適用では1μg～1 mgの範囲である。最初に高負荷量を投与し、次いで1回以上の低用量を投与してよい。典型的に、抗体は完全抗体であり、例えばIgG1アイソタイプである。これは成体患者の一回治療に関する用量であり、子供および乳児に関して比例的に調節してよく、また、分子量に比例し

て他の抗体形態に関して調節してよい。治療は、医師の裁量で、毎日、週2回、毎週または毎月の間隔で反復してよい。治療は、皮下投与では2～4週毎であってよく、静脈内投与では4～8週毎であってよい。治療は定期的であってよく、投与間の期間は約2週間以上、例えば約3週間以上、約4週間以上、または約月一回である。治療は、外科手術前および／または後に施してよく、かつ／または外科治療の解剖部位に直接投与または適用してよい。

【０２８５】

本発明のIL-6結合性メンバーは、sIL-6Raに対する抗体と比較して、用量および投与要件に関する利点を提供する。本明細書中の他の箇所で記載されるように、疾患におけるIL-6の循環レベルはsIL-6Raの循環レベルよりかなり低い。したがって、IL-6結合性メンバーを使用すると、抗IL-6R結合性メンバーと対照的に、患者への各投与用に製造されるべき薬物の量がより少ない点で大きな利点を有する。また、抗IL6治療薬の用量が少なければ、低用量によって皮下注射ならびに静脈内（i.v.）注射が容易になる点において大きな利点がある。皮下投与は、投与あたりに必要とされる結合性メンバー、例えば抗体分子の量によって制限されうることが当業者に周知である。これは、皮膚の一部位に注射できる容量によって皮下注射が制限されるためである。1.2 ml以下の皮下注射容量が典型的に利用される。50mg/mlより高濃度で皮下注射用に結合性メンバーを製剤化することはますます困難であるため、この経路により100mgを超える用量は、通常、複数回の注射を必要とし、患者にとってより不快である。

【０２８６】

少ない用量の抗IL-6治療薬があれば、より高濃度である全身性sIL-6Raと比較してすべての全身性IL-6を阻害するために少ない「負荷」用量の抗体しか必要とされない。

【０２８７】

追加の利益は、IL-6受容体ではなくIL-6のターゲティングに関するものであり、それは、IL-6Raに対する結合性メンバーと比べた本発明の結合性メンバーの追加の利点である。

【０２８８】

例えば、疾患においてIL-6の循環レベルがsIL-6Raの循環レベルよりかなり低いことを示す文献報告がある[112, 113]。sIL-6Rのレベルは IL-6レベルよりかなり高いので、IL-6を中和するために必要とされる抗IL-6結合性メンバーの量と比較して、sIL-6Raを中和するためにはより多量の抗sIL-6R結合性メンバーが必要とされる。ゆえに、抗受容体結合性メンバーが使用される場合と比較して、少ない用量の抗リガンド結合性メンバーしか必要とされない。

【０２８９】

IL-6受容体ではなくIL-6リガンドのターゲティングにより、疾患におけるIL-6のレベルを低減することができるが、免疫応答の一部としてIL-6が上方制御される感染時には、IL-6レベルの増加が依然として可能である。

【０２９０】

Kawano et al. [4]は、IL-6が強力な成長因子であることを示し、また、患者から新たに単離された骨髄腫細胞がIL-6を産生しかつその受容体を発現することを示した。さらに、抗IL-6抗体は骨髄腫細胞のin vitro増殖を阻害する。これは、自己分泌ループがヒト骨髄腫の発癌において機能していることの直接的証拠である。該研究に続いて、Van Zaanen et al. [5]は、抗IL-6リガンド抗体で処置された場合に多発性骨髄腫患者でのIL-6の生産が減少することを実証した。

【０２９１】

多くの追加の研究で、他の細胞タイプ、例えば平滑筋細胞（SMC）[114]、U373-MG星細胞腫細胞[115]、3T3脂肪細胞[116]、ニューロン[117]、内皮細胞[118]およびカポジ肉腫細胞[119]においてIL-6が自己分泌フィードバックループに関与することが示されている。したがって、疾患において抗IL6結合性メンバーを使用してIL-6を阻害すると、基礎的な疾患IL-6生産を減少させることができる。

【０２９２】

さらに、抗IL-6結合性メンバーは体循環中のIL-6と結合するが、これは治療対象の疾患の病理に関与する細胞の表面上の受容体を占有するために組織に浸透することを必要とするIL-6受容体に対する結合性メンバーとは対照的である。

【０２９３】

IL-6に対する結合性メンバーは体循環中でIL-6と平衡状態を形成し、障壁、例えば滑膜を横切って勾配を生じさせる効果を有し、その連結部分から活性IL-6を除去しかつ該結合性メンバーと不活性複合体を形成させる正味の効果を有する。その結果、IL-6結合性メンバーは即座の作用発現を示し、その投与計画はIL-6R結合性メンバーと比較して異なりかつ潜在的に容易に最適化することができることになる。

【０２９４】

IL-6シグナル伝達はIL-6Rに対するIL-6結合およびgp130に対する該複合体の結合によって媒介される。IL-6とIL-6Raの結合がナノモル親和性（約5 nM）での結合であり、かつIL6:IL6R複合体とgp130の結合がピコモル親和性での結合であることを考慮すると、IL-6を標的とする結合性メンバーはIL-6結合に関して少量の競合にしか直面せず、ゆえにIL-6シグナル伝達を高い割合で抑制することができる。このことは可溶性IL-6Raを標的としかつIL-6:IL-6Ra複合体形成を妨げる結合性メンバーにも当てはまるが、IL-6Raが膜結合型である場合、立体障害のせいで、抗IL-6Raが、膜上に存在するIL-6Raと結合してそれを阻害することはより困難である。

【実施例】

【０２９５】

実施例1. 最初の単離

1.1 選択

繊維状ファージM13に基づくファージミドベクターにクローニングされたナイーブヒト一本鎖Fv（scFv）ファージディスプレイライブラリーを選択に使用した[120, 121]）。Vaughan et al [120]およびHawkins et al [122]によって以前に本質的に報告されているようにして、組換えヒトIL-6に対する一連の選択サイクルを使用してファージディスプレイライブラリーから抗IL-6特異的scFv抗体を単離した。簡単に言えば、バイオパニング選択のために、PBS（ダルベッコPBS, pH7.4）中のヒトIL-6をマイクロタイタープレートのウェルに4℃で一晩吸着させた。ウェルをPBSで洗浄し、PBS-Marvel（3%w/v）で1時間ブロックした。PBS-Marvel（3%w/v）中の精製ファージをウェルに加え、コーティングされた抗原と1時間結合させた。未結合ファージをPBS-Tween（0.1%v/v）およびPBSを使用する一連の洗浄サイクルによって除去した。結合したファージ粒子を溶出させ、細菌に感染させ、次の選択ラウンドのためにレスキューした[120]。

【０２９６】

1.2 粗製scFvによる、IL-6受容体へのIL-6結合の阻害

第二選択ラウンドから得られた代表数の個々のクローンを96ウェルプレートで増殖させた。ScFvを細菌ペリプラズム中で発現させ、それをHTRF（登録商標）（ホモジニアス時間分解蛍光, CIS Bio international）ヒトIL-6/ヒトIL-6受容体結合アッセイにおいてその阻害活性についてスクリーニングした。このアッセイでは、クリプタート標識ヒトIL-6（R&D Systems）に対する結合に関してビオチン化IL-6R（Peprotech）とサンプルを競合させた。参照抗IL-6 mAb（Biosource AHC0562）をすべての効力アッセイにポジティブコントロールとして含めた。詳細なアッセイ方法は材料および方法セクションに記載される。

【０２９７】

1.3 scFvからIgG1への再構築（reformatting）

VHおよびVLドメインを、それぞれ全抗体重鎖および軽鎖を発現するベクターにサブクローニングすることによってクローンをscFvからIgG形式に変換した。VHドメインを、哺乳類細胞で全IgG重鎖を発現させるためのヒト重鎖定常ドメインおよび調節要素を含有するベクター（pEU15.1）にクローニングした。同様に、ヒトκ（カッパ）軽鎖発現用のベクターpEU3.4またはヒトλ（ラムダ）軽鎖定常ドメイン発現用のpEU4.4に、哺乳類細胞において全IgG軽鎖を発現させるための調節要素とともにVLドメインをクローニングした。重

鎖および軽鎖発現用のベクターは参考文献[123]に最初に報告されたものである。Cambridge Antibody Technologyベクターは単にOriP要素を導入することによって操作した。IgGを得るために、重鎖および軽鎖IgG発現ベクターをEBNA-HEK293哺乳類細胞にトランスフェクトした。IgGを発現させ、培地に分泌させた。産物をプールし、精製前にろ過した。プロテインAクロマトグラフィーを使用してIgGを精製した。培養上清をセラミックプロテインA（BioSepra）の適切なサイズのカラムに添加し、50 mM Tris-HCl pH 8.0、250 mM NaClで洗浄した。0.1 Mクエン酸ナトリウム（pH 3.0）を使用して結合IgGをカラムから溶出させ、Tris-HCl（pH 9.0）を加えて中和した。溶出された物質を、Nap10カラム（Amersham, #17-0854-02）を使用してPBSにバッファー交換し、IgGのアミノ酸配列に基づく吸光係数を使用して分光光度法によってIgGの濃度を決定した[124]。精製IgGを、SEC-HPLCおよびSDS-PAGEを使用して凝集または分解に関して分析した。

【０２９８】

1.4　精製scFvおよびIgGによる、IL-6受容体に対するIL-6結合の阻害

粗製ペリプラズム抽出物としてIL-6:IL-6R相互作用に対する顕著な阻害効果を示したScFvをDNAシークエンシングに付した[120, 125]。固有のscFvを細菌で再度発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した（Bannister et al [126]に記載のようにして）。これらのクローンの精製IgGサンプルもセクション1.3に記載のようにして調製した。HIS FLAGタグ付きヒトIL-6（社内E. coli由来）に対する結合について、希釈系列の精製調製物をビオチン化sIL-6Rに対抗して競合させることによって、これらのサンプルの効力を測定した。

【０２９９】

scFvとしておよびヒト重鎖およびカッパ軽鎖定常ドメインを有するIgGとしての、クローンCAN022D10に関する結果を表1に挙げる。詳細なプロトコルは材料および方法セクションに記載される。

【０３００】

表1：受容体-リガンドHTRF生化学アッセイにおけるCAN022D10 scFvおよびIgGの効力

クローン	IC50 scFv (nM)	IC50 IgG (nM)
CAN022D10	45	0.31

【０３０１】

1.5　精製scFvおよびIgGによる、TF-1細胞のIL-6誘発増殖の阻害

ヒトおよびカニクイザルIL-6生物活性に対する精製scFv調製物の中和効力を、TF-1細胞増殖アッセイを使用して評価した。TF-1は赤白血病患者から確立されたヒト前骨髄細胞系統である[134]。TF-1細胞系統は生存および増殖に関して要因依存性である。TF-1細胞はヒトおよびカニクイザルIL-6（社内E.coli由来）の両者に応答することが示され、ヒトGM-CSF（4 ng/ml, R&D Systems）を含有する培地中で維持された。分裂中の細胞の新規合成DNAへのトリチウム化チミジンの取り込みの減少を測定することによってIL-6依存性増殖の阻害を測定した。プロトコルについての詳細な説明は材料および方法セクションに記載される。

【０３０２】

CAN022D10の精製scFv調製物は、試験した最大濃度でTF-1細胞のIL-6誘発増殖を阻害可能であったが、完全阻害は観察されなかった。したがって、得られた結果から正確なIC_{50}効力データを算出することはできなかった。精製IgGとして試験された場合、CAN022D10に関するIC_{50}は93 nMであると算出された。

【０３０３】

1.6　DELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイにおける抗体の選択性および種間交差反応性

DELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイを使用して、固定された各抗IL-6抗体と結合するビオチン化HIS FLAG IL-6（社内, E.coli由来）の阻害を測定することによって、I

L-6ファミリーメンバーに対する抗体の種間交差反応性および選択性を確認した。

【０３０４】

精製した白血病阻害因子（LIF）（Chemicon）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、IL-11およびオンコスタチンM（すべてR & D Systems）の滴定を、アッセイでのIC_{50}値によって測定される構造的に関連する各タンパク質について効力を確認するための各アッセイで行った。

【０３０５】

IL-6種（カニクイザル（社内E.Coli由来）、ヒトHIS FLAG IL-6（社内HEK-EBNA由来）、ラットおよびマウスIL-6（ともにR & D Systems）が含まれる）の滴定を、抗体の種間交差反応性を確認するための各アッセイで行った。この実験の代表的結果を表2に示す。プロトコルについての詳細は材料および方法セクションに記載される。

【０３０６】

表２：CAN22D10競合アッセイにおけるIL-6関連タンパク質および異なるIL-6種の効力

タンパク質	IC_{50} (nM)
ヒトIL-6	32*
カニクイザルIL-6	100*
マウスIL-6	阻害なし
ラットIL-6	阻害なし
ヒトIL-11	阻害なし
ヒトCNTF	阻害なし
ヒトLIF	阻害なし
ヒトオンコスタチンM	阻害なし

＊サンプルから不完全な曲線しか得られなかったため、値は近似である。

【０３０７】

1.7　精製IgGによる、ヒト滑膜線維芽細胞からの内因性IL-6誘発性VEGF放出の阻害

関節リウマチを有するドナーから外植されたヒト滑膜線維芽細胞からのIL-6誘発性VEGF放出の阻害について抗体の効力を評価した。この手順に関する詳細なプロトコルは材料および方法セクションに記載される。簡単に言えば、被験IgGの滴定を培養線維芽細胞に加え、ヒトIL-1βおよび可溶性ヒトIL-6Rαを加えることによってその細胞を刺激して、IL-6発現を誘発し、細胞のシグナル伝達を可能にしてVEGF発現を誘発した。48時間のインキュベーション後、上清を取り出し、市販のキット（R & D Systems）を使用して、ELISAによってVEGFの発現を試験した。これらのデータを使用して、CAN022D10に関するIC_{50}を決定し、それは45nMと算出された。

【０３０８】

実施例2.　抗体最適化

2.1　IL-6に対するリード抗体の結合を向上させるアミノ酸の同定

IL-6に対する結合を向上させる親抗体配列中の重要な残基を同定するためのストラテジーは、CAN022D10 scFv配列の全体にわたってランダムな突然変異を導入することによって実行した。これは、DiversifyTM PCRランダム突然変異誘発キット（BD biosciences）を製造元の使用説明書に従って使用して2ラウンドの突然変異誘発により達成し、突然変異誘発の各ラウンドあたりそして核酸配列のキロベースあたり平均で8.1個の突然変異を組み込んだ。該選択は、本質的に以前に記載されるようにして実施した（Hanes et al 2000; Methods in Enzymology. 328. 404-430）。簡単に言えば、親クローンのランダム突然変異誘発ライブラリーをmRNAに転写し、翻訳停滞（stalled translation）のプロセスを利用して、mRNA-リボソーム-scFv複合体を形成させた。これらの複合体をbio-huIL-6とともにインキュベートし、該抗原と結合した複合体をストレプトアビジンコーティング常磁

性ビーズ上に捕捉した。非特異的リボソーム複合体を洗浄除去し、結合リボソーム複合体からmRNAを単離し、それをcDNAに逆転写し、PCRによって増幅した。このDNAを次の選択ラウンドに使用し、かつ／またはスクリーニング用にクローニングした。漸減濃度のbio-huIL-6（4ラウンドにわたって100 nM～0.1 nM）の存在下で選択プロセスを反復した。リボソームディスプレイ構築物をNco1/Not1制限酵素（New England Biolabs）で消化し、次いでT4 DNAリガーゼ（New England Biolabs）を使用してNco1/Not1で消化したpCANTAB6中にライゲートすることによって、リボソームディスプレイによって単離されたScFvをファージミドベクターpCANTAB6中にクローニングした[127]。ライゲートDNAを化学的コンピテントTG-1細胞へと形質転換し、個々のクローン由来の粗製scFvを、リガンド-抗体生化学アッセイで試験されたHIS/FLAG IL-6に対する結合に関してCAN022D10 IgGに対抗して競合させた。

【０３０９】

2.2 抗体-リガンド生化学アッセイ（CAN022D10 IgG使用）を使用する改良クローンの同定

ラウンド3およびラウンド4生成物についての代表的な数の個々のクローンから得られた粗製scFv調製物を、CAN022D10 IgG-IL-6 HTRF（登録商標）結合アッセイでのその阻害活性についてスクリーニングした。このアッセイでは、クリプタート標識抗FLAGモノクローナル抗体およびストレプトアビジンXL$^{ent!}$（TM）を使用してビオチン化抗体とFLAGタグ付きIL-6の結合を検出した。詳細なアッセイ方法は材料および方法セクションに記載される。

【０３１０】

有意な阻害効果を示したScFvをシークエンシングし、セクション1.4に記載のように精製調製物として製造した。次いでHTRF抗体-リガンド生化学アッセイおよびTF-1増殖アッセイにおいて精製サンプルの連続希釈物を試験することによって得られたデータから、各scFvに関するIC_{50}値を算出した。TF-1増殖アッセイにおいて最も強力なクローンを、以前に記載のようにして、重鎖定常ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを有するIgGに変換し、それをTF-1増殖アッセイにおいて再試験した。各サンプルの精製scFvおよびIgGの両者に関する効力データの例を表3に示す。

【０３１１】

表３： リガンド-抗体生化学アッセイおよびTF-1増殖アッセイにおいて向上した効力を有する、リボソームディスプレイCAN022D10ランダム突然変異誘発ライブラリーから単離されたクローンの例

クローン	IC_{50} (pM)			
	生化学アッセイ		TF-1増殖アッセイ	
	scFv	IgG*	scFv	IgG
抗体2	35	36	9600	16
抗体3	22	43	7300	50
抗体4	24	43	13400	61
抗体5	65	26	12400	42

＊IgG効力決定用のプロトコルを改変したので、各クローンに関するscFvとIgGnの効力を直接比較するべきではない。改変の詳細に関しては、材料および方法セクションを参照のこと。

【０３１２】

2.3 標的化突然変異誘発による親クローンの最適化

リード抗体を、親和性に基づくファージディスプレイ選択を使用する標的化突然変異誘発法を使用して最適化した。標的化突然変異誘発法では、標準的な分子生物学技術を使用する可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）の相補性決定領域3（CDR3）のオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発（oligonucleotide-directed mutagenesis）によって、リードクロ

ーン由来の大きなscFv-ファージライブラリーを作製した[128]。該ライブラリーを、親和性に基づくファージディスプレイ選択に付して、IL-6に対する高い親和性を有する変異体を選択した。その結果、これらは、IL-6とその受容体の結合に対する向上した阻害活性を示すはずである。該選択は本質的に以前に記載されるようにして実施した[129]。簡単に言えば、scFvファージ粒子を溶液中の組換えビオチン化ヒトIL-6（bio-huIL-6，社内E.coli由来でかつ社内で改変）とともにインキュベートした。製造元の推奨に従ってストレプトアビジンコーティング常磁性ビーズ（Dynabeads（登録商標）M 280）上に、抗原と結合しているScFv-ファージを捕捉した。選択されたscFv-ファージ粒子を以前に記載されるようにしてレスキューし[125]、漸減濃度のbio-huIL-6（3ラウンドにわたって50 nM～0.1 nM）の存在下で該選択プロセスを反復した。

【０３１３】

3ラウンドの選択が完了したら、VHおよびVLランダム化ライブラリーを再び一緒にして、含まれるクローンが個々にランダム化されたVHおよびVL配列をランダムに組み合わせた単一ライブラリーを形成させた。以前に記載されるようにして、漸減濃度のbio-huIL-6（追加の4ラウンドにわたって0.1 nM～0.1 pM）の存在下で選択を継続した。

【０３１４】

2.4　抗体-リガンド生化学アッセイ（抗体5 IgG使用）を使用する、標的化突然変異誘発から得られた改良クローンの同定

標的化突然変異誘発の選択生成物から単離されたクローン由来の粗製scFvを、本質的にはセクション2.2に記載のようにして、抗体-リガンド生化学アッセイで試験した。これらの生成物に関して、抗体5 IgGを使用するよう該生化学アッセイを再構成した。この抗体はCAN02210の改良変異体であり、TF-1増殖アッセイにおいて高い効力を有する。この強力なIgGを組み入れることによって、高い効力のクローン間で識別可能なアッセイが得られた。この改変アッセイのプロトコルは、以下の変更を加えた上で、CAN022D10を使用するオリジナルの抗体-リガンド生化学アッセイに関して記載される通り行うものであった。まず、使用するHIS FLAG IL-6の濃度を1 nMから0.5 nMに減らした。第二に、抗IL-6抗体およびストレプトアビジンXL$^{ent!}$(TM)の濃度をそれぞれ1 nMおよび20 nMから16 nMおよび40 nMに増やした。有意な阻害効果を示したScFvをシークエンシングし、精製scFvおよびIgGとして製造し、TF-1増殖アッセイにおいて試験した。

【０３１５】

2.5.　最適化クローンの精製scFvおよびIgGによる、TF-1細胞のIL-6誘発性増殖の阻害

以前に記載されるようにIL-6誘発TF-1増殖アッセイを使用して最適化クローンの効力を決定した。精製scFv調製物および再構成されたIgGの両者としてクローンを試験した。scFvおよびIgGの両者についての結果の例を表4に示す。

【０３１６】

表4： TF-1細胞増殖アッセイで試験した場合の標的化突然変異誘発ライブラリーから同定されたクローンの効力例

クローン（非生殖細胞系列化）	IC_{50} (pM)	
	scFv	IgG
抗体 7	11	3
抗体 8	419	48
抗体 10	549	40
抗体 14	448	31
抗体 16	154	4.9
抗体 17	38	16
抗体 18	51	30
抗体 19	508	68
抗体 21	42	N.D.
抗体 22	41	N.D.
抗体 23	161	20
CNTO-328	*N.D.*	*74*

N.D. 測定せず。

【０３１７】

クローンは有意な阻害効果を示したが、精製scFvの連続希釈物から正確なIC_{50}値を決定することはできなかった。

【０３１８】

2.6. 生殖細胞系列化

最適化抗IL-6抗体のVHおよびVLドメインのアミノ酸配列をVBASEデータベース[130]中の公知のヒト生殖細胞系列配列とアライメントし、配列類似性によって最も近縁な生殖細胞系列を同定した。CANDY022D10抗体系列のV_Hドメインに関しては、最も近縁な生殖細胞系列vセグメントはVh3_DP-86_(3-66)であり、最も近縁な生殖細胞系列jセグメントはJH2であった。VLドメインに関して、最も近縁な生殖細胞系列vセグメントはVk1_L12であり、最も近縁な生殖細胞系列jセグメントはJK2であった。

【０３１９】

不変のままであったバーニア残基[131]を考慮せずに、V_Hドメインのフレームワークには3個の変化が存在し、V_Lドメインには4個の変化が存在した。適切な突然変異誘発プライマーを用いる標準的な部位特異的突然変異誘発技術を使用して、すべての前記変化を、ヒト抗体に完全に適合するように最も近縁な生殖細胞系列配列へと復帰させた。

【０３２０】

生殖細胞系から突然変異させたCAN022D10のscFv配列中でトータル5個のバーニア残基を同定した。これらは重鎖中のKabat残基29（Vの代わりにIが存在）、69（Iの代わりにM）、73（Nの代わりにI）および78（Lの代わりにV）の位置に存在した。また軽鎖配列中では、Kabat残基46（Lの代わりにV）の位置にも単一のバーニア突然変異が同定された。

【０３２１】

そして生殖細胞系列化IgGをIL-6誘発TF-1増殖アッセイにおいて再評価し、効力の低下が存在しなかったことを確認した。生殖細胞系列化（GL）抗体の効力の例を表5に示す。

【０３２２】

表5： IL-6誘発TF-1細胞増殖アッセイで評価した場合の生殖細胞系列化最適化クローンの効力データの例

クローン	IC_{50} (pM)
抗体 7 (GL)	5
抗体 10 (GL)	71
抗体 17 (GL)	1
抗体 18 (GL)	3
CNTO-328	*101*

【０３２３】

2.7. 最適化IgGによる、ヒト滑膜線維芽細胞からの内因性IL-6誘発VEGF放出の阻害

最適化IgGを滑膜線維芽細胞VEGF放出アッセイにおいて試験して、内因性発現されたIL-6に対抗する効力を評価した。この手順はセクション1.7で概説され、材料および方法セクションで詳細に記載されている。被験IgGの効力の例を表6aに示す。被験IgGの平均効力データを表6bに示す。

【０３２４】

表6a： IL-6誘発滑膜線維芽細胞VEGF放出アッセイにおいて内因性IL-6に対抗して評価した場合の最適化クローンに関する効力データ例

クローン(GL = 生殖細胞系列化クローン)	IC_{50} (nM)
抗体 2	0.59
抗体 3	0.38
抗体 4	0.52
抗体 5	0.70
抗体 7 (GL)	0.75
抗体 10 (GL)	0.55
抗体 17 (GL)	0.57
抗体 18 (GL)	0.93
CNTO-328	*1.31*

表6b： IL-6誘発滑膜線維芽細胞VEGF放出アッセイにおいて内因性IL-6に対抗して評価した場合の最適化クローンに関する平均効力データ

クローン(GL = 生殖細胞系列化クローン)	IC_{50} (nM) (95% CI)	n
抗体 7 (GL)	0.78 (0.54-1.11)	3
抗体 17 (GL)	0.57 (0.51-0.64)	3
抗体 18 (GL)	0.67 (0.20-2.25)	4
CNTO-328	*1.02 (0.39-2.63)*	*4*

【０３２５】

2.8. DELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイにおける最適化抗体の選択性および種間交差反応性

以前に記載のようにしてDELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイを使用して、一群のクローンについて選択性および種間交差反応性を再評価した（セクション1.6ならびに材料および方法セクションを参照のこと）。ヒトおよびカニクイザルIL-6では、オーバーラップする阻害曲線が得られ、したがってすべての被験IgGについて曖昧なIC_{50}値が得られた。抗体群に対して試験したマウス、ラットもしくはイヌIL-6または関連ヒトタンパク質のいずれについても阻害が観察されなかった。このデータは、その被験クローン群がカ

ニクイザルIL-6と交差反応性であるが、マウス、ラットもしくはイヌIL-6、またはヒトIL-6に最も関連したヒトタンパク質とは結合しないことを示す。

【０３２６】

2.9 BIAcoreを使用する、最適化クローンに関する親和性データの算出

本質的には参考文献[132]に記載のようにして、BIAcore 2000バイオセンサー（BIAcore AB）を使用する表面プラズモン共鳴によって、ヒトおよびカニクイザルIL-6に対する代表的抗体7および18の精製IgGサンプルの結合親和性を決定した。簡単に言えば、アミンカップリングキット（BIAcore）を使用してCM5センサーチップ表面に精製抗体をカップリングし、220～225 Ruの範囲の表面密度とした。HBS-EPバッファー中の200 nM～0.2 nMの濃度範囲のヒトおよびカニクイザルIL-6をセンサーチップ表面上に通過させた。得られたセンサーグラムを、BIA評価3.1ソフトウェアを使用して評価し、相対的結合データを提供した。

【０３２７】

BIAcore 2000^{TM}バイオセンサーの親和性測定範囲の下限は約10 pMである（BIAcore 2000 Instrument handbook）。得られたデータから、ヒトおよびカニクイザルの両IL-6に対する該抗体の親和性はこの10 pM限界未満であり、すなわち該抗体は測定可能な抗体よりずっと強力であった。したがって正確な親和性測定値は算出しなかった。この方法を使用して示される両IL-6種に対する両抗体の親和性は、10 pM未満であると考えられる。

【０３２８】

2.10 in vitro TF-1細胞増殖アッセイを使用する、最適化クローンに関する親和性データの算出

TF-1アッセイを使用し、シルド分析の使用によって抗体18の親和性を算出した。IL-6標準曲線（7.7 x 10^{-15} M～3 x 10^{-9} M）を一定範囲のIgG濃度（2.67 x 10^{-13} M～8.3 x 10^{-10} M）と二重に組み合わせた。Log10抗体濃度をLog10用量比に対してプロットすることによって、IgGの親和性を決定した。この方法を使用して、ヒトIL-6に対する抗体18（GL）の親和性を0.40 pMと算出した（95% CI 0.12 pM - 0.69 pM, n=6）。

【０３２９】

2.11 in vitro IL-6媒介性B9細胞増殖を使用する、ヒト組換えIL-6でのアンタゴニスト効力

抗体18およびアイソタイプコントロール抗体の存在下でIL-6誘発性B9細胞増殖を評価した。IL-6標準曲線（濃度範囲1 x 10^{-14} M～1 x 10^{-9} M）に対する、一定範囲の濃度の各抗体（1 x 10^{-13} M～1 x 10^{-9} M）の効果を評価した。データポイントは二重に取った。4日間のインキュベーション後にアラマーブルーの減少（蛍光法）によってB9増殖を測定した。

【０３３０】

抗体18はIL-6誘発性B9増殖を阻害することが示された。アイソタイプコントロールは阻害効果を有さなかった。平均データを表8に示す。

【０３３１】

表８： IL-6が誘発するB9増殖の阻害に関する平均Kb値

	平均 K_b pM (95% CI)	n
抗体18 (GL)	0.3 (0.1 - 0.5)	6

【０３３２】

2.12 in vitroでのSKW6.4細胞からのIL-6媒介性IgM放出を利用する、ヒト組換えIL-6でのアンタゴニスト効力

IL-6はヒトBリンパ芽球細胞系統SKW 6.4からのIgM分泌を誘発する。SKW6.4細胞を、一定範囲のIL-6濃度（1x10^{-13} M～3x$10^{-8.5}$ M）とともにインキュベートすると、IgM分泌について77pMの平均[A]50（n=3）が得られた。IL-6誘発性IgM分泌に対する抗ヒトIL-6抗体7、17および18ならびにアイソタイプコントロール抗体の効果を、100 pM IL-6の存在下で

の種々の抗体濃度（1 x $10^{-12.5}$ M～1 x 10^{-8} M）の阻害を観察することによって評価した。4日後に抗ヒトIgM ELISAによってIgM分泌を測定した。データポイントは二重に取った。

【０３３３】

抗体7、17および18はIL-6誘発性IgM分泌を阻害した。アイソタイプコントロールはこれらのアッセイにおいて阻害効果を有さなかった。平均データを表9に示す。

【０３３４】

表９：　SKW6.4細胞からのIgM分泌の平均阻害

	平均 IC50 pM	n
抗体 7 (GL)	2.64	3
抗体 17 (GL)	3.21	3
抗体 18 (GL)	2.63	3

【０３３５】

実施例3.　エピトープマッピング

3.1　抗IL-6抗体エピトープと公知の抗ヒトIL-6抗体との比較

抗体18（GL）のエピトープを2種の抗ヒトIL-6抗体B-E8およびcCLB8のエピトープと比較した。これらの両抗体はIL-6Raに対するIL-6の結合を阻害することが知られていて、潜在的治療物質として調べられてきた[5，31，34，37，133]。3種の抗体のエピトープの比較を可能にするために、各突然変異体が野生型（wt）配列と比較して単一のアミノ酸突然変異を含有する一群のIL-6突然変異体を構築した。そして、異なる抗体に対するこれらの突然変異体の結合を生化学競合アッセイにおいて評価した。これらの実験は実施例1.6に記載の生化学競合アッセイに基づき、但し必要に応じて抗体およびIL-6変異体の濃度に変更を加えた。簡単に言えば、抗体をPBS中2 nM（抗体18）または4 nM（B-E8およびcCLB8）の濃度で96ウェルNunc Maxisorpイムノアッセイプレート表面にコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。PBS中の3%(w/v) BSAを使用してウェル表面をブロックした後、200 nM～10 pMの濃度範囲のインヒビターの希釈物を、終濃度0.15 nMのビオチン化ヒトIL-6と混合して抗体コーティングウェルに加え、結合させた。ユーロピウム標識ストレプトアビジンを使用して抗体に対するビオチン化IL-6の結合を測定した。

【０３３６】

突然変異体について得られたIC_{50}値を非標識野生型ヒトIL-6と比較することによって、各突然変異体に関する効力比を確認することができた。そして、これらの比を異なる抗体間で比較することによって、IL-6分子に対する抗体の結合に対する個々の突然変異の効果を評価することができる。これらの実験の典型的な結果を表10に示す。該実験はさらに2度反復して行った。

【０３３７】

表10：抗ヒトIL-6抗体である抗体18、B-E8およびcCLB8に対する一群のIL-6突然変異体のIC_{50}および効力比

突然変異体	IC50 (M)			効力比		
	抗体18	CNTO-328	B-E8	抗体18	CNTO-328	B-E8
F102E	8.41E-08	2.80E-09	1.58E-08	310.951	3.021	57.246
F106E	1.43E-09	阻害なし	3.31E-09	5.283	-	11.989
無関係物質	阻害なし	阻害なし	阻害なし	-	-	-
wt IL-6	2.70E-10	9.26E-10	2.76E-10	1.000	1.000	1.000
R207E	阻害なし	5.13E-09	阻害なし	-	7.401	-
Q211A	3.07E-10	1.10E-07	8.51E-10	1.498	158.221	3.208
無関係物質	阻害なし	阻害なし	阻害なし	-	-	-
wt IL-6	2.05E-10	6.93E-10	2.65E-10	1.000	1.000	1.000
R58E	4.79E-10	1.73E-09	1.57E-08	2.009	1.682	79.083
S204E	2.57E-08	1.90E-09	4.83E-10	107.754	1.848	2.434
無関係物質	阻害なし	阻害なし	阻害なし	-	-	-
wt IL-6	2.39E-10	1.03E-09	1.98E-10	1.000	1.000	1.000
E200W	5.22E-10	2.68E-09	5.68E-10	2.130	3.817	2.287
R207L	1.31E-07	1.51E-09	9.41E-08	534.666	2.148	378.865
wt IL-6	2.45E-10	7.02E-10	2.48E-10	1.000	1.000	1.000

【０３３８】

表10における残基ナンバリングは完全長ヒトIL-6（配列番号１６１）のアミノ酸配列に対するものである。

【０３３９】

上記結果は、3種の抗体が、その一群のIL-6突然変異体に対して、異なる結合プロファイルを有し、したがってサイトカイン表面の異なるエピトープと結合することを示す。Kalai et al（1997）は、cCLB8がIL-6突然変異体F106Eを認識しないことを以前に観察した。このことは、それが該抗体に対するビオチン化IL-6の結合を阻害しないことから、本発明者らの実験で確認されてる。対照的に、IL-6突然変異体F106Eは、抗体18を使用する競合アッセイにおいて野生型（wt）IL-6より5倍低いだけの効力を有する。このことはそれがこの抗体と強く結合することを示す。突然変異体Q211Aの場合にも類似の結果が観察され、cCLB8に関する158と比較すると抗体18に対する効力比は1.5であった。逆に、突然変異体F102E、R207E、R207LおよびS204EはcCLB8アッセイにおいて強力なインヒビターであったが、抗体18アッセイではwt IL-6よりも効力がかなり低いことが観察された。

【０３４０】

突然変異体R58EおよびS204Eを用いて抗体18とB-E8の結合における差異が観察された。R58Eに関する効力比は、B-E8に関して79.083であることと比較すると、抗体18に関しては2.009であった。このことは、この突然変異がIL-6に対するB-E8の結合を低下させることを示す。突然変異S204Eの影響は、3種の被験抗体のうち抗体18に特異的であると思われる。cCLB8と同様に、この突然変異はB-E8に対するIL-6結合の効力に対してほとんど影響を及ぼさないが、この突然変異体は抗体18に対する生化学アッセイにおいて野生型IL-6より100倍以上低い効力を有する。

【０３４１】

実施例4. 抗IL-6抗体のin vivo投与

4.1 マウスにおけるヒト組換えIL-6誘発性好中球およびハプトグロビン増加に対する抗IL-6抗体投与の効果

IL-6の全身投与により、好中球および急性期タンパク質濃度の全身増加が生じることが知られている。雄C57/B/6/Jマウスへの腹腔内注射によってヒトIL-6を投与し、好中球および急性期タンパク質ハプトグロビンの濃度を測定するin vivoモデルを作製した。皮下注射によって投与された抗体18（GL）が該応答を阻害する能力を測定した。

【０３４２】

4.2 ハプトグロビンアッセイ

ヒトIL-6（5.2 nmol/kg、12 mg/kgに相当、1日2回（b.i.d.））を7日間腹腔内注射すると、IL-6処置群において0.02±0.01 mg/mL（ビヒクルコントロール）から1.19±0.27 mg/

mLへの血漿ハプトグロビンレベルの有意な増加が生じた（T検定，P<0.01）。IgG1アイソタイプコントロールは効果を有さなかったが、抗体18は用量依存的に該応答を阻害し、10.6 nmol/kg（156 mg/kg）以上の用量で有意な阻害（ANOVA，単独のIL-6に対してP<0.01）が認められた（図１）。

【０３４３】

4.3　好中球アッセイ

ヒトIL-6（5.2 nmol/kg、12 mg/kgに相当、1日2回（b.i.d.））を7日間腹腔内注射すると、IL-6処置群において1.1±0.44 x 10^9細胞/L（ビヒクルコントロール）から2.47±0.12 x 10^9細胞/Lへの好中球数の有意な増加が生じた（T検定，P<0.01）。IgG1アイソタイプコントロールは効果を有さなかったが、抗体18は用量依存的に該応答を阻害し、1.5 nmol/kg（23 mg/kg）以上の用量で有意な阻害（ANOVA，単独のIL-6に対してP<0.01）が認められた。

【０３４４】

これらの結果は、in vivoでIL-6の全身作用を阻害する抗IL-6抗体の能力を確認するものである。

【０３４５】

材料および方法

粗製scFvによる、IL-6受容体に対するIL-6結合の阻害

受容体-リガンド結合HTRF（登録商標）（ホモジニアス時間分解蛍光）アッセイ形式で、ビオチン化IL-6R（Peprotech 200-06 R）へのクリプタート標識ヒトIL-6（R&D Systems 206-IL）またはHIS FLAGタグ付きヒトIL-6（社内E. coli由来）のいずれかの結合の阻害について、選択生成物をスクリーニングした。

【０３４６】

200 mM hepesバッファーpH7.4、0.5 mM EDTAおよび0.5 Mショ糖中に調製されたペリプラズム抽出物を含有する未希釈の粗製scFvとしての先の単離の際の生成物をスクリーニングした。8 nMビオチン化ヒトIL-6Rを8 nMストレプトアビジンXL$^{ent!}$ (TM)（CIS Bio International 611SAXLA）とともに暗所で室温で30分間プレインキュベートした。すべての希釈は0.4 Mフッ化カリウムおよび0.1%BSAを含有するリン酸緩衝食塩水（PBS）（アッセイバッファー）中で実施した。

【０３４７】

試薬のプレインキュベーション後、10μlの粗製scFvサンプルを384ウェル少量アッセイプレート（Costar 3676）に加えた。その後、5μlのプレインキュベート済みビオチン化受容体およびストレプトアビジンXL$^{ent!}$ (TM)混合物を加え、次いで5μlの11.2nMクリプタート標識ヒトIL-6を加えた。

【０３４８】

そしてアッセイプレートを1000 rpmで室温で1分間遠心分離し、室温で2時間インキュベートした後、EnVisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を使用して発光波長620 nmおよび665 nmの時間分解蛍光を読み取った。

【０３４９】

精製scFvおよびIgGによる、IL-6受容体に対するIL-6結合の阻害

スクリーニングから同定された陽性クローン由来の精製scFvおよびIgGをHTRF（登録商標）アッセイにおいてビオチン化IL-6Rに対するHIS FLAGタグ付きヒトIL-6の結合の阻害について試験した。8 nMビオチン化ヒトIL-6Rを8 nMストレプトアビジンXL$^{ent!}$ (TM)とともに暗所で室温で30分間プレインキュベートした。すべての希釈は0.4 Mフッ化カリウムおよび0.1%BSAを含有するリン酸緩衝食塩水（PBS）（アッセイバッファー）中で実施した。

【０３５０】

精製サンプルの滴定を使用して、該アッセイでのIC_{50}値によって測定されるクローン効力を確認した。試薬のプレインキュベーション後、10μlの精製scFvサンプルの滴定を384ウェル少量アッセイプレート（Costar 3676）に加えた。その後、5μlのプレインキュベ

ート済みビオチン化受容体およびストレプトアビジンXLent! (TM)混合物を加えた。2nM HIS FLAGタグ付きヒトIL-6を、クリプタートで標識された1.732nM抗flag IgG（CIS Bio International 61FG2KLB）と混合し、直ちに5μlの混合物をアッセイプレートに加えた。

【０３５１】

そしてアッセイプレートを1000 rpmで室温で1分間遠心分離し、室温で2時間インキュベートした後、EnVisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を使用して発光波長620 nmおよび665 nmの時間分解蛍光を読み取った。

【０３５２】

データ解析

以下の方法を使用して、上記HTRF（登録商標）アッセイから得られたデータを解析した。

【０３５３】

各サンプルに関するデルタF%値を算出することによってデータを解析した。式1にしたがってデルタFを決定した。

【数１】

式１：

$$\text{デルタF\%} = \frac{(\text{サンプル 665nm/620nm比率値}) - (\text{非特異的コントロール 665nm/620nm比率値})}{(\text{非特異的コントロール 665nm/620nm比率値})} \times 100$$

【０３５４】

次いでデルタF%値を使用して、式2に記載されるようにして特異的結合%を算出した。

【数２】

式２：

$$\text{特異的結合\%} = \frac{\text{サンプルのデルタF\%}}{\text{合計結合コントロールのデルタF\%}} \times 100$$

【０３５５】

GraphPad Prismソフトウェアを使用して4パラメータロジスティック方程式（式3）を使用するカーブフィッティングによってIC_{50}値を決定した。

【０３５６】

式３：

Y=ボトム + (トップ-ボトム)/(1+10^((LogEC50-X)*ヒルスロープ))

Xは濃度の対数である。Yは特異的結合である。

Yはボトムで出発し、トップまでS字形に上昇する。

【０３５７】

ポジティブコントロールとして参照抗IL-6 mAb（Biosource AHC0562）をすべてのアッセイに含めた。

【０３５８】

精製scFvおよびIgGによる、TF-1細胞のIL-6誘発性増殖の阻害

TF-1細胞はR&D Systemsから譲り受け、付属のプロトコルにしたがって維持した。アッセイ培地は、5%ウシ胎児血清（JRH）および1%ピルビン酸ナトリウム（Sigma）を含有するGLUTAMAX I（Invitrogen）とともにRPMI-1640を含んだ。各アッセイ前に、300 x gで5分間の遠心分離によってTF-1細胞をペレット化し、吸引によって培地を除去し、アッセイ培地に細胞を再懸濁した。このプロセスを2回反復し、アッセイ培地中に5 x 10^5細胞/mlの終濃度で細胞を再懸濁した。96ウェルアッセイプレート中に100μl/ウェルを使用して細胞を播いた。プレートを37℃および5%CO_2で24時間インキュベートし、細胞からGM-CSFを枯渇させた。精製scFvまたはIgGの試験溶液（二重試験）をアッセイ培地中で所望の濃度に希釈した。IL-6を標的にしない無関係の抗体をネガティブコントロールとして使用し

た。組換え細菌由来のヒト（R&D）およびカニクイザル（社内）IL-6を加えて、100μl/ウェルの総量中の適切な被験抗体と混合した場合に終濃度が20pM（ヒトIL-6）または100pM（カニクイザル）になるようにした。アッセイで使用されるIL-6の濃度を、最終アッセイ濃度で最大増殖応答の約80％をもたらす用量として選択した。すべてのサンプルを室温で30分間インキュベートした。そして、100μlのIL-6および抗体混合物を100μlの細胞に加えて、200μl/ウェルのトータルアッセイ容量を得た。プレートを37℃および5％CO_2で24時間インキュベートした。そして20μlのトリチウム化チミジン（5μCi/ml）を各アッセイポイントに加え、プレートをインキュベーターに戻してさらに24時間置いた。セルハーベスターを使用してグラスファイバーフィルタープレート（Perkin Elmer）上で細胞を回収した。Packard TopCountマイクロプレート液体シンチレーションカウンターを使用してチミジン取り込みを測定した。そしてGraphpad Prismソフトウェアを使用してデータを解析した。

【０３５９】

固定された抗IL-6抗体に対するビオチン化ヒトIL-6結合の阻害についての時間分解蛍光アッセイのための方法

このアッセイに使用される、実施例2.6にその結果が記載されている具体的方法は、DELFIA（登録商標）試薬を用いる方法であった。該方法は上で記載されている。該方法はまた、以下でさらに一般的に記載される。該方法は、抗IL-6 MAbに対する他のIL-6形態および関連タンパク質の結合を測定および／または定量するためのアッセイとして好適である。

【０３６０】

このアッセイでは、抗IL-6モノクローナル抗体を固体支持体に結合させる。例えばFcを介して支持体に付着させる。ポリスチレン高タンパク質結合プレート、例えばNunc Maxisorbプレートを好適な支持体として使用してよい。

【０３６１】

- ウェルあたりPBS中50μl 抗IL-6 MAbを4℃で一晩プレート上にコーティングする。
- すべての以後のステップを室温で実施する。
- 0.05％Tween20を含有するPBS（PBST, Sigma P1379として現在入手可能）でプレートを3回洗浄した後、300μl / ウェルの3％(w/v) BSA含有PBS（Roche Diagnostics, 70129138として現在入手可能）を加えて1時間ブロックする。
- プレートをPBSTで3回洗浄する。
- 3％(w/v) BSA含有PBS中でインヒビター滴定物を調製し、「希釈」プレートに加え（40μl / ウェル）、次いで40μl / ウェルのビオチン化IL-6を加えて、抗体に対する該タンパク質のKDに相当するビオチン化IL-6の終濃度を得る。50μlのサンプルを希釈プレートからアッセイプレート中の対応するウェルに移す。
- プレートを1時間インキュベートする。
- プレートをPBSTで3回洗浄した後、0.9％NaCl、0.5％精製BSA、0.1％Tween20および20μM EDTAを含有する50 mM Tris-HCl, pH 7.5中の0.1μg/mlユーロピウム標識ストレプトアビジンを50μl / ウェルで各ウェルに加え、1時間インキュベートする。
- 0.05M Tris緩衝生理食塩水（0.138M NaCl, 0.0027M KCl）、0.05％(v/v) Tween20を含む洗浄バッファー, pH8.0（25℃）でプレートを7回洗浄する。
- 各ウェルに、キレート剤βNTAおよびTOPOとともにTriton X-100を含有する、酢酸で酸性化された50μlの増強溶液を加える。アルカリ性から酸性へのpHシフトが生じると、ストレプトアビジンコンジュゲートからユーロピウムイオンが急速に解離する。そして遊離ユーロピウムイオンは利用可能なキレート剤と蛍光発生キレートを形成する。TOPOの存在によって水が除去され、それによってキレートがミセルを形成することが可能になり、該キレートの蛍光発生が延長される。
- 5分間インキュベートした後、発光波長620 nmの時間分解蛍光を測定する。式1に従って蛍光データを特異的結合％に変換する。ビオチン化huIL-6を含有するが競合因子を含有しないコントロールウェルからトータル結合を決定する。ビオチン化huIL-6および100

倍過剰のhuIL-6を含有するウェルから非特異的結合を決定する。式2に従ってIC_{50}値を算出するために、得られたデータをシグモイド曲線にフィッティングする。

【０３６２】

生化学エピトープ競合アッセイに関する抗体コーティングおよびビオチン化huIL-6濃度の決定

エピトープ競合アッセイにおいて使用されるコーティングに使用される抗体の濃度およびビオチン化huIL-6の濃度は、2種の試薬の相互作用の親和性および抗体固定の効率に依存する。したがって、抗体コーティング用の標準濃度および必要なビオチン化huIL-6の濃度を各被験抗体について決定しなければならない。

【０３６３】

一般に、各アッセイで使用されるビオチン化huIL-6の終濃度は、飽和分析によって測定される、対応する抗体に対するリガンドのKDに相当する。コーティングに使用される抗体の濃度は、ビオチン化huIL-6がKDの濃度で加えられた場合に競合アッセイ条件下で検出して10:1の最小シグナル対バックグラウンド比が達成されるような濃度であるべきである。

【０３６４】

DELFIA（登録商標）エピトープ競合アッセイにおける抗体の選択性および種間交差反応性

精製IgGをPBS中で、ビオチン化ヒトIL-6をその特定IgGについてのその概算Kdの濃度で加えた場合に顕著なシグナルを生じさせる濃度で、96ウェルMaxisorpマイクロタイタープレート（Nunc）上に吸着させた。過剰のIgGをPBS-Tween（0.1%v/v）で洗浄除去し、PBS-Marvel（3%w/v）で1時間ウェルをブロックした。以下の各競合因子：ヒトIL-6、カニクイザルIL-6、ラットIL-6（R & D Systems 506-RL/CF）、マウスIL-6（R & D Systems 406-ML/CF）、ヒトCNTF（R & D Systems 257-NT/CF）、ヒトLIF（Chemicon, LIF1010）、ヒトIL-11（R & D Systems 518-IL/CF）、ヒトオンコスタチンM（R & D Systems 295-OM/CF）、の連続希釈物をPBS中で調製し、該連続希釈物は、ビオチン化ヒトIL-6とそれぞれのIgGとの間の相互作用についてのKd値の約200倍の濃度から出発した。非ビオチン化ヒトIL-6をポジティブコントロールとして使用した。この希釈系に対して、Kdの約2倍の濃度の等容量のビオチン化組換えヒトIL-6を加えた（その結果、約100:1の競合抗原：ビオチン化ヒトIL-6の比から出発する希釈系が得られた）。そしてこれらの混合物をブロック済みIgG上に移し、1.5時間平衡化させた。PBS-Tween（0.1%v/v）での洗浄によって未結合抗原を除去し、残留するビオチン化ヒトIL-6をストレプトアビジン-ユーロピウム3+コンジュゲート（DELFIA（登録商標）検出, PerkinElmer）によって検出した。EnVisionプレートリーダー（PerkinElmer）で620nmでの時間分解蛍光を測定した。蛍光データを特異的結合%に変換した（ビオチン化ヒトIL-6を含有するが競合因子を含有しないコントロールウェルからは100%と決定され、ビオチン化ヒトIL-6および100倍過剰の非ビオチン化ヒトIL-6を含有するウェルからは0%と決定された）。Prismカーブフィッティングソフトウェア（Graphpad）を使用して、得られたデータを解析し、式3に従ってIC50値を決定した。

【０３６５】

固定された抗IL-6抗体に対するビオチン化ヒトIL-6結合の阻害についての時間分解蛍光アッセイのための方法

このアッセイに使用される、実施例2.8にその結果が記載されている具体的方法はDELFIA（登録商標）試薬を用いる方法であった。該方法は上で記載されている。該方法はまた、以下でさらに一般的に記載されている。該方法は、抗IL-6 MAbに対する他のIL-6形態および関連タンパク質の結合を測定および／または定量するためのアッセイとして好適である。

【０３６６】

このアッセイでは、抗IL-6モノクローナル抗体を固体支持体に結合させる。例えばFcを介して支持体に付着させる。ポリスチレン高タンパク質結合プレート、例えばNunc Maxisorbプレートを好適な支持体として使用してよい。

【０３６７】

- ウェルあたりPBS中50μl 抗IL-6 MAbを4℃で一晩プレート上にコーティングする。

- すべての以後のステップを室温で実施する。

【０３６８】

- 0.05%Tween20を含有するPBS（PBST, Sigma P1379として現在入手可能）でプレートを3回洗浄した後、300μl / ウェルの3%(w/v) BSA含有PBS（Roche Diagnostics, 70129138として現在入手可能）を加えて1時間ブロックする。

【０３６９】

- プレートをPBSTで3回洗浄する。

【０３７０】

- 3%(w/v) BSA含有PBS中でインヒビター滴定物を調製し、「希釈」プレートに加え（40μl / ウェル）、次いで40μl / ウェルのビオチン化IL-6を加えて、抗体に対する該タンパク質のKDに相当するビオチン化IL-6の終濃度を得る。50μlのサンプルを希釈プレートからアッセイプレート中の対応するウェルに移す。

【０３７１】

- プレートを1時間インキュベートする。

【０３７２】

- プレートをPBSTで3回洗浄した後、0.9%NaCl、0.5%精製BSA、0.1%Tween20および20μM EDTAを含有する50 mM Tris-HCl, pH 7.5中の0.1μg/mlユーロピウム標識ストレプトアビジンを50μl / ウェルで各ウェルに加え、1時間インキュベートする。

【０３７３】

- 0.05M Tris緩衝生理食塩水（0.138M NaCl, 0.0027M KCl）、0.05%(v/v) Tween20を含む洗浄バッファー, pH8.0（25℃）でプレートを7回洗浄する。

【０３７４】

- 各ウェルに、キレート剤βNTAおよびTOPOとともにTriton X-100を含有する、酢酸で酸性化された50μlの増強溶液を加える。アルカリ性から酸性へのpHシフトが生じると、ストレプトアビジンコンジュゲートからユーロピウムイオンが急速に解離する。そして遊離ユーロピウムイオンは利用可能なキレート剤と蛍光発生キレートを形成する。TOPOの存在によって水が除去され、それによってキレートがミセルを形成することが可能になり、該キレートの蛍光発生が延長される。

【０３７５】

- 5分間インキュベートした後、発光波長620 nmで時間分解蛍光を測定する。式1に従って蛍光データを特異的結合%に変換する。ビオチン化huIL-6を含有するが競合因子を含有しないコントロールウェルからトータル結合を決定する。ビオチン化huIL-6および100倍過剰のhuIL-6を含有するウェルから非特異的結合を決定する。式2に従ってIC_{50}値を算出するために、得られたデータをシグモイド曲線にフィッティングする。

【０３７６】

生化学エピトープ競合アッセイに関する抗体コーティングおよびビオチン化huIL-6濃度の決定

エピトープ競合アッセイにおいて使用されるコーティングに使用される抗体の濃度およびビオチン化huIL-6の濃度は、2種の試薬の相互作用の親和性および抗体固定の効率に依存する。したがって、抗体コーティングに関する標準濃度および必要なビオチン化huIL-6の濃度を各被験抗体について決定しなければならない。

【０３７７】

一般に、各アッセイで使用されるビオチン化huIL-6の終濃度は、飽和分析によって測定される、対応する抗体に対するリガンドのKDに相当する。コーティングに使用される抗体の濃度は、ビオチン化huIL-6がKDの濃度で加えられた場合に競合アッセイ条件下で検出して10:1の最小シグナル対バックグラウンド比が達成されるような濃度であるべきである。

【０３７８】

抗体-リガンド生化学アッセイを使用する改良クローンの同定

先の最適化から得られた選択生成物を、エピトープ競合HTRF（登録商標）アッセイ形式で、ビオチン化抗IL-6抗体（先の単離から得られた社内IgG, CAN022D10）とのHIS FLAGタ

グ付きヒトIL-6（社内E. coli由来）の結合の阻害についてスクリーニングした。

【０３７９】

先の最適化の際の生成物を、50nM MOPSバッファーpH7.4、0.5mM EDTAおよび0.5Mソルビトール中で調製されたペリプラズム抽出物を含有する未希釈の粗製scFvとしてスクリーニングした。1 nMヒトHIS FLAG IL-6を、クリプタートで標識された1.732nM抗flag IgG（CIS Bio International 61FG2KLB）と暗所で室温で30分間プレインキュベートした。すべての希釈はアッセイバッファー中で実施した。並行して、1nMのビオチン化抗IL-6 IgG（該IgGに対する被験結合性メンバーの競合が検査対象であった）を、20nMのストレプトアビジンXL$^{ent!}$ (TM)（CIS Bio International 611SAXLB）とともに暗所で室温で30分間プレインキュベートした。

【０３８０】

試薬のプレインキュベーション後、10μlの粗製scFvサンプルをブラック384ウェルオプティプレート（Perkin Elmer Cat No.6007279）に加えた。その後、10μlアッセイバッファーをプレート全体に加えた。そして、10μlのプレインキュベート済みビオチン化抗IL-6 IgGおよびストレプトアビジンXL$^{ent!}$ (TM)混合物、および10μlのプレインキュベート済みHIS FLAGタグ付きヒトIL-6抗flagクリプタート混合物を加えた。

【０３８１】

そしてアッセイプレートを1000 rpmで室温で1分間遠心分離し、室温で2時間インキュベートした後、EnVisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を使用して発光波長620 nmおよび665 nmの時間分解蛍光を読み取った。以前に記載されるようにしてデルタF%および特異的結合%を算出することによってデータを解析した。

【０３８２】

ランダム突然変異誘発ライブラリーからリード改良物を同定した後、CDR3標的化突然変異誘発選択から得られた未希釈の粗製scFv生成物をエピトープ競合HTRF（登録商標）アッセイの変法においてスクリーニングした。該アッセイは、0.5 nMヒトHIS FLAG IL-6を、クリプタートで標識された1.732nM抗flag IgG（CIS Bio International 61FG2KLB）とともに暗所で室温で30分間プレインキュベートした点を、変更点として含んだ。並行して、16nMのビオチン化抗IL-6 IgG（抗体5, CAN022D10ランダム突然変異誘発選択から同定された社内IgG）を、40nMのストレプトアビジンXL$^{ent!}$ (TM)（CIS Bio International 611SAXLB）とともに暗所で室温で30分間プレインキュベートした。すべての他の条件はCAN022D10エピトープ競合アッセイに関して記載した通りであった。以前に記載されるようにしてデルタF%および特異的結合%を算出することによってデータを解析した。

【０３８３】

精製IgGによる、ヒト滑膜線維芽細胞からの内因性IL-6誘発性VEGF放出の阻害

関節全置換術由来の関節リウマチ膝のサンプルを抗生物質含有DMEM中に取得した。培地に浸した滑膜を関節から切り出し、細かく切り刻んだ。10%FCSを補充した培地で滑膜組織を洗浄した。37℃のCO_2インキュベーターにおいて、コラゲナーゼ溶液中で2時間、細胞懸濁液をインキュベートした。消化済み滑膜細胞懸濁液を10 mlピペットを通す反復吸引によって崩壊させ、細胞をろ過し、室温で5分間400 gで遠心分離した。細胞を10%FCS含有DMEM中に再懸濁し、細胞ろ過器に通し、1 x 10^6細胞/mlに調節し、37℃のCO_2インキュベーターにおいて225cm^2細胞培養フラスコ（3001, CoStar Corning Inc.）中でインキュベートした。接着後、大部分の培地を捨て、新鮮な培地に交換し、長期間のインキュベーションのためにインキュベーターに戻した。細胞を毎週調べ、集密時にはトリプシン処理によって3分の1の継代率で継代した。

【０３８４】

集密時の線維芽細胞（P3-5）を0.1%トリプシン-EDTA溶液（25300-054, Gibco Life Sciences）10 mL/フラスコとともに37℃で5～10分間インキュベートすることによって、フラスコから取り出した。10%FCSを補充した、等容量の、DMEMに基づく培養培地を細胞に加えた後、330 gでRTで5分間の遠心分離によってペレット化した。10%FCSを補充したDMEMに基づく培養培地での1回の洗浄ステップの後、細胞懸濁液（1 x10^5細胞/mL）を滅菌96

ウェル細胞培養クラスター平底ポリスチレンプレート（3598, Corning CoStar）のウェルに1.5 x10^4細胞/ウェルで加えた（150μL/ウェル）。10%FCSを補充したDMEMに基づく追加の培地を各ウェルに加えて（100μL/ウェル）、250μL/ウェルの総量を得た。細胞を37℃で一晩インキュベートして、接着および静止させた。

【０３８５】

96ウェルプレートを検査して、細胞が集密状態でかつ良好な状態（例えばコンタミネーションなし）であることを確認した。そして培地をウェルから吸引し、10%FCSを補充したDMEMに基づく培養培地100μLを直ちに加えた。これに、サンプルIgGまたは培地のみを含有する10%FCSを補充したDMEMに基づく培養培地50μLをウェルに加えた（アッセイに入ると5分の1に希釈される）。

【０３８６】

その後、組換えヒト可溶性(rhs)IL-6Rα（500 ng / mL; 12 nM）およびrhIL-1β（50 pg / mL; 2.95 pM, アッセイに入ると5分の1に希釈される）を含有する10%FCSを補充したDMEMに基づく培養培地50μL/ウェルを加えた。

【０３８７】

別のウェルでは、rh-IL-6（0, 100 ng / mL; 21.5 nM）、sIL-6Rα（500 ng / mL; 12 nM）、rhIL-1β（50 pg / mL; 2.95 pM）、または培地のみ、を含有する10%FCSを補充したDMEMに基づく培養培地50μLを加えた（アッセイに入ると5分の1に希釈される）。各ウェルの最終容量は250μLであった。

【０３８８】

プレートを37℃で48時間インキュベートした。プレート形式において記載されるようにインキュベーションは2重または3重のウェルで実施した。プレートを330 gでRTで5分間遠心分離し、上清培地を取り出し、マイクロタイター平底プレート（611F96, Sterilin）中で-40℃で保存した。

【０３８９】

ELISA（DY293B, R&D Systems）を製造元の使用説明書に従って用いてVEGFを測定した。簡単に言えば、ELISAプレートをマウス抗ヒトVEGF抗体で4℃で一晩コーティングし、1%BSA/PBSでブロックした。プレートを0.05%Tween 20/PBSで洗浄し、ヒト滑膜由来の線維芽細胞の培養上清およびビオチン化ヤギ抗ヒトVEGF抗体とともに室温で一晩インキュベートした。洗浄後、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼを使用することによってVEGFを検出した。1:1のH_2O_2:テトラメチルベンジジンを使用してプレートを発色させた。2 M H_2SO_4で反応を停止させ、540 nmの補正波長セットを用いて450nmでの光学密度を測定した。

【０３９０】

BIAcore測定

BIAcore 2000™を使用してBIAcore研究を行った。アミンカップリングキットを使用してCM-5センサーチップ表面に抗体をカップリングさせて、220～225 Ruの表面密度とした。HBS-EPバッファー中の200nM～0.2nMの濃度範囲のヒトIL-6をセンサーチップ表面上に通過させた。得られたセンサーグラムをBIA評価3.1ソフトウェアを使用して評価し、被験抗体に関するk_{on}、k_{off}およびK_D値を算出した。

【０３９１】

IL-6媒介性B9細胞増殖アッセイ

B9細胞は、IL-6に対するその特異的応答に基づいて選択されたマウスB細胞ハイブリドーマ細胞系統B13.29のサブクローンである。B9細胞は生存および増殖にIL-6を必要とし、非常に低濃度のIL-6に対して応答する。

【０３９２】

抗体18およびアイソタイプコントロール（CAT-002）の存在下でIL-6誘発性B9細胞増殖を評価した。IL-6標準曲線（濃度範囲1x10^{-14} M～1x10^{-9} M）に対する一定範囲の濃度の各抗体（1x10^{-13} M～1x10^{-9} M）の効果を評価した。データポイントは二重に取った。4日間のインキュベーション後にアラマーブルーの減少（蛍光法）によってB9増殖を測定した

。

【０３９３】

5%FCS、2 mM L-グルタミンおよび50μM 2-メルカプトエタノールを含有するRPMI-1640中でB9細胞を培養した。2～4日毎に0.05 x 10^6 mL^{-1}～0.1 x 10^6 mL^{-1}の範囲の密度になるように細胞を分け、5x10^{-13} Mヒト IL-6を補充した。実験に使用される細胞には、実験前の少なくとも48時間はIL-6を補充しなかったが、実験の96時間以内には補充されていた。アッセイで使用される細胞を0.8x10^6 mL^{-1}以下の密度でストックフラスコから採取した。

【０３９４】

各抗体をアッセイ培地（RPMI +5%FCS, 2 mM L-グルタミン, 50μM 2-メルカプトエタノール, ペニシリン100 UmL^{-1}およびストレプトマイシン100 $mgmL^{-1}$）中への適切な希釈によって原液から最大必要アッセイ濃度の10倍まで希釈した。培養培地中でさらに10倍希釈を行って、各抗体の必要濃度を得た。

【０３９５】

適切な容量の滅菌PBS+0.1%BSAを加えることによってIL-6を凍結乾燥粉末から1x10^{-5} M溶液に再構成した。培養培地中で1x10^{-8} Mにさらに希釈した。必要時まで1x10^{-8} Mアリコートを凍結保存した。アッセイ当日、1x10^{-8} Mアリコートを必要に応じて希釈して、必要な最終アッセイ濃度の10倍濃度の溶液範囲を達成した。

【０３９６】

必要な容量の細胞を培養フラスコから取り出し、300 gで8分間遠心分離した。上清を除去し、適切な容量の培養培地に細胞を再懸濁して0.5x10^6 mL^{-1}の細胞密度を達成した。

【０３９７】

平底の組織培養処理したポリスチレン96ウェルプレート中でアッセイを実施した。最終アッセイ容量は200μLであった。20μLの10倍濃度抗体（抗体18またはCAT-002）溶液または培養培地を各プレートの適切なウェルに加えた後、さらに140μLの培養培地および20μLの適切な濃度のIL-6または培養培地を加えた。

【０３９８】

プレートを加湿5%CO_2、37℃のインキュベーターに2時間置いた。そして20μLの細胞を各ウェルに加えた。最終的な細胞数/ウェルは10000個であった。そしてプレートを4日間インキュベーターに戻した。アラマーブルーの取り込みによって細胞増殖を評価した。10%v/vアラマーブルーを各ウェルに加え、プレートを6時間インキュベーターに戻した。そして544 nmで励起後の590 nmの蛍光を測定する分光蛍光計でプレートを読み取った。生データを各プレートのコントロールIL-6曲線に対して正規化し、最大蛍光が100%と定義され、基底蛍光が0%と定義されるようにした。Graph Pad Prism 4.01の非線形回帰、シグモイド用量応答（可変勾配）フィッティングプログラムを使用して正規化データをフィッティングした。コントロールpEC_{50}値および各濃度の抗体の存在下でのpEC_{50}値を使用して用量比（DR）を決定した。以下の化学的拮抗作用式を使用して、IL-6濃度-効果曲線の3倍以上のシフトを誘発した最低濃度の抗体に関するK_b値を決定した：

K_b = ([Ab]/(DR-1))

（Kenakin TP., Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interactions. 1st ed. New York: Raven Press; 1987. p. 205-24.）。

【０３９９】

IL-6媒介性SKW6.4細胞IgM放出アッセイ

IL-6はB細胞の抗体産生細胞への最終成熟（Bリンパ球分化）に関与する。SKW細胞は以前にB細胞応答の研究に使用されてきた（Nawata et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 557:230-238. 1989）。関節リウマチでの自己抗体産生はほとんどIgMクラスの抗体である。SKW6.4はクローンIgMを分泌するヒトリンパ芽球様B細胞系統である。細胞はATCCから供給されたものであり、リファレンス番号TIB 215であった。IL-6で刺激されると、これらの細胞はIgMを分泌し、ゆえにこのアッセイは関節リウマチに関連すると理解された。

【０４００】

CAT6001およびCAT-002（アイソタイプコントロール）の存在下でIL-6誘発性SKW6.4細胞IgM分泌を評価した。100 pM IL-6の存在下で一定範囲の濃度の各抗体（$1x10^{-12.5}$ M～$1x10^{-8}$ M）の効果を評価した。データポイントは二重に取った。抗ヒトIgM ELISAアッセイを使用して4日間のインキュベーション後に細胞上清中のIgM分泌を測定した。

【０４０１】

2mM L-グルタミンおよび10％(v/v)ウシ胎児血清を含有するRPMI1640中で37℃で95/5％(v/v)空気/CO_2で95％相対湿度でSKW 6.4細胞を培養した。0.4～2 x 10^6細胞/mlの範囲で細胞を維持した。慣用の細胞継代のため、300 x gで室温で5分間の遠心分離によって細胞を回収し、使用済み培地を除去し、必要量の新鮮な培地に細胞を再懸濁した。

【０４０２】

各抗体を原液から、アッセイ培地（RPMI +10％FCS, 2 mM L-グルタミン）中への適切な希釈によって最大必要アッセイ濃度の50倍に希釈した。培養培地中でさらに10倍希釈を行って各抗体の必要濃度を達成した。

【０４０３】

平底の組織培養処理したポリスチレン96ウェルプレート中でアッセイを実施した。SKW 6.4細胞ストックを希釈して、新鮮な培地中に$0.3x10^6$ ml^{-1}の細胞密度にし、100μl/ウェル（30,000細胞/ウェル）で播いた。そしてその指定終濃度となる抗体2μl、次いで終濃度100pMとなるIL-6 2μlを各ウェルに加えた。

【０４０４】

そしてプレートを37℃ 5％CO_2のインキュベーターに戻した。4日間のインキュベーション後に遠心分離によって細胞を含まない上清を回収した後、回収日にIgM ELISAによってアッセイするか、または追加の分析まで-20℃で凍結した。

【０４０５】

Serotecからの抗体ペアを使用してELISAを生じさせた。コーティング抗体はマウス抗ヒトIgM（MCA1662）であり、検出抗体はヤギ抗ヒトIgM: HRP連結（STAR98P）であった。アッセイを標準的方法によって最適化し、コーティング抗体（1:2000希釈（5μg/ml））および検出抗体（1:3500希釈（200ng/ml））を使用して良好なシグナル対ノイズ比を得た。

【０４０６】

IgM標準溶液（Cat# PHP003ヒトMカッパ精製タンパク質）をSerotecから購入し標準曲線を作製した。

【０４０７】

標準フィッティングプログラムを使用し、IgM標準曲線データに対する多項式フィッティングを使用してデータを解析した。抗体の不存在下でのコントロールIgM生産に対する各抗体サンプルの阻害パーセンテージを算出し、IC_{50}値を得た。

【０４０８】

エピトープマッピングのためのIL-6およびIL-6突然変異体タンパク質の作製

ヒトおよびcyno IL-6 cDNAのクローニング

ヒトおよびマカクIL-6の配列をEmblから入手した（ヒトおよびcynoについてそれぞれアクセッション番号BC015511およびAB000554）。これらの配列を用いて、ヒトおよびマカクIL-6をコードするcDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。N末端プライマーはヒトおよびcynoについてそれぞれhIL6_5'NdeIおよびmacIL6_5'NdeIであり、macIL6_3'NheIを両者についてC末端プライマーとして使用した（オリゴヌクレオチド配列に関しては表11を参照のこと）。

【０４０９】

表11： プライマー配列

プライマー	配列
macIL6_5'NdeI	5' TTATCAT-ATGGTACTCCCAGGAGAAGATTCCAA 3' (配列番号１８３)
macIL6_3'NheI	5' TTATGCTAGC-CTACATTTGCCGAAGAGCCC 3' (配列番号１８４)
hIL6_5'NdeI	5' TTATACATATG-GTACCCCCAGGAGAAGATTCC 3' (配列番号１８５)

【０４１０】

2種のcDNAを増幅するPCVR反応を実行した。各PCR反応の鋳型は、ヒト肝臓およびカニクイザル肝臓からそれぞれ得られた10ngのcDNAであった。各反応から増幅されたcDNAを精製し、トポイソメラーゼライゲーション反応を製造元にしたがって使用してpCR4blunt topo（Invitrogen）にクローニングした。

【０４１１】

ポジティブクローンを同定し、シークエンシングした。標準的技術を使用して、得られたcDNAを種々のE. coli T7プロモーター発現ベクター中にサブクローニングし、成熟ヒトまたはカニクイザルIL-6をコードするcDNAが、成熟IL-6のN末端バリンのすぐ上流のN末端HIS6-FLAGタグと、そのN末端で融合されるようにした。

【０４１２】

突然変異体の作製

StratageneのQuikchange XLキットを製造元のプロトコルに従って使用して部位特異的突然変異誘発を実施した。突然変異誘発プライマーの設計は製造元のプロトコルに従って実施した。プラスミドpT7flagHISIL-6を鋳型として使用して該プロトコルに従って突然変異誘発反応を実行した。その後、続いてDpnI消化を行い、化学的コンピテントTop10細胞に形質導入し、適切な抗生物質を含有する寒天プレート上で37℃で一晩選択を行った。個々の各突然変異誘発反応について、数個のクローンをシークエンシングし、各反応由来の1つの正しいクローンのプラスミドDNAを追加の使用のために保持した。

【０４１３】

IL-6およびIL-6突然変異体タンパク質の発現

IL-6発現プラスミドを化学的コンピテントBL21 (DE3) star細胞（Invitrogen）へと、製造元の方法を使用して形質転換した。形質転換細胞を使用してTerrific Brothの1L培養物に接種し、これらを37℃のオービタルインキュベーターでA600が0.5に達するまでインキュベートした。そしてIPTGを0.25 mMまで加え、インキュベーションを22℃で一晩継続した。遠心分離によって細胞を回収し、細胞ペレットを-80℃で保存した。

【０４１４】

IL-6およびIL-6突然変異体タンパク質の精製

細胞ペレットを解凍し、50ml/ペレットの、50mMリン酸カリウムpH7.4、10mMイミダゾール、0.3M NaCl、5mMβ-メルカプトエタノール、10％グリセロール（バッファーA）+完全EDTAフリープロテアーゼインヒビター（Roche）中に再懸濁した。氷上で3 x 30秒間の超音波処理によって細胞を溶解した。ライセートを100,000gで4℃で30分間遠心分離し、上清をNi NTAアフィニティークロマトグラフィーに付した。Ni-NTA Superflow（Qiagen）の5mlカラムを（バッファーA）で3ml/分で平衡化した。IL-6サンプルを添加し、10倍カラム容量のバッファーA中の15mMイミダゾールでカラムを洗浄した。その後、バッファーA中の30mMイミダゾールで10倍カラム容量の洗浄を行った。バッファーA中の0.3Mイミダゾールでの上昇流方向の5倍カラム容量洗浄を使用してカラムからIL-6を溶出させた。洗浄ステップの際に10mlフラクションを回収し、溶出ステップの際に5mlフラクションを回収した。AKTA Explorer100 Airを使用して4℃でカラムを走らせた。精製IL-6タンパク質を含有するフラクションをプールし、5LのPBSに対して4℃で一晩透析した。

【０４１５】

透析済みIL-6タンパク質を、ゲルろ過クロマトグラフィーを使用してさらに精製した。各精製では、透析済みIL-6タンパク質を100,000gで4℃で20分間遠心分離した。PBS中で2.5ml/分で平衡化した318ml Superdex 200 26/60カラム（GE Healthcare）に13mlまでアプライした。AKTA Purifierを使用して4℃でカラムを走らせた。追加の分析のために単量体IL-6タンパク質ピークを含有するフラクションをプールした。

【０４１６】

標準SDSクロマトグラフィーを使用して各タンパク質を純度について試験し、タンパク質濃度を測定し、Q-ToF質量分析を使用してタンパク質の質量を測定した。精製IL-6を液体窒素中で凍結し、-80℃で保存した。

【０４１７】

in vivo研究のための材料および方法

動物を試験群にランダムに割り当てた。そして各試験群のマウスをセット皮下投与量（10ml/kg）のビヒクルコントロール（PBS中の0.05％BSA）または467μg/kg IgG1アイソタイプコントロールまたは抗体18（467μg/kg～8μg/kgの範囲）で毎日処置した。同時に、腹腔内注射（10ml/kg）（1日2回（b.i.d.））のビヒクルコントロール（PBS中の0.05％BSA）または12μg/kgヒト組換えIL-6をマウスに投与した。

【０４１８】

7日目に、09:00hの時点の最終IL-6投与の2時間後に、マウスを犠牲にし、末端血液サンプルを採取した。Lab Tek 1ml EDTA血液チューブに血液を移し、それをローラーに5分間入れた。そして使用時までサンプルを氷上で保持した。Sysmex細胞カウンターを使用してディファレンシャル細胞カウントを実施した。残りのサンプルをエッペンドルフチューブに移し、回転させて（300g，5分）血漿を得た。該血漿をサブアリコートし、ハプトグロビンレベルについての分析時まで-20℃で保存した。

【０４１９】

BiognosisによるPHASE^{TM} RANGE TriDelta Formatキット（Hailsham，UK；cat. no. TP-801）において提供される使用説明書に従って、ハプトグロビンアッセイを実行した。

【０４２０】

すべての結果を平均±SEMで表した。データ解析は、対応のないT検定または一元配置ANOVAおよびその後のダネット検定（GraphPad Instat）によって行った。

【０４２１】

配列

結合性メンバーのVHドメイン、VLドメインおよびCDR配列は配列表に示される。配列表では、配列番号は以下のように対応する。

【０４２２】

1	CAN022D10 VHヌクレオチド	31	抗体4 VHヌクレオチド
2	CAN022D10 VHアミノ酸	32	抗体4 VHアミノ酸
3	CAN022D10 VH CDR 1 aa	33	抗体4 VH CDR 1アミノ酸
4	CAN022D10 VH CDR 2 aa	34	抗体4 VH CDR 2アミノ酸
5	CAN022D10 VH CDR 3 aa	35	抗体4 VH CDR 3アミノ酸
6	CAN022D10 VLヌクレオチド	36	抗体4 VLヌクレオチド
7	CAN022D10 VLアミノ酸	37	抗体4 VLアミノ酸
8	CAN022D10 VL CDR 1 aa	38	抗体4 VL CDR 1アミノ酸
9	CAN022D10 VL CDR 2 aa	39	抗体4 VL CDR 2アミノ酸
10	CAN022D10 VL CDR 3 aa	40	抗体4 VL CDR 3アミノ酸
11	抗体2 VHヌクレオチド	41	抗体5 VHヌクレオチド
12	抗体2 VHアミノ酸	42	抗体5 VHアミノ酸
13	抗体2 VH CDR 1アミノ酸	43	抗体5 VH CDR 1アミノ酸
14	抗体2 VH CDR 2アミノ酸	44	抗体5 VH CDR 2アミノ酸
15	抗体2 VH CDR 3アミノ酸	45	抗体5 VH CDR 3アミノ酸
16	抗体2 VLヌクレオチド	46	抗体5 VLヌクレオチド
17	抗体2 VLアミノ酸	47	抗体5 VLアミノ酸
18	抗体2 VL CDR 1アミノ酸	48	抗体5 VL CDR 1アミノ酸
19	抗体2 VL CDR 2アミノ酸	49	抗体5 VL CDR 2アミノ酸
20	抗体2 VL CDR 3アミノ酸	50	抗体5 VL CDR 3アミノ酸
21	抗体3 VHヌクレオチド	51	抗体7 VHヌクレオチド
22	抗体3 VHアミノ酸	52	抗体7 VHアミノ酸
23	抗体3 VH CDR 1アミノ酸	53	抗体7 VH CDR 1アミノ酸
24	抗体3 VH CDR 2アミノ酸	54	抗体7 VH CDR 2アミノ酸
25	抗体3 VH CDR 3アミノ酸	55	抗体7 VH CDR 3アミノ酸
26	抗体3 VLヌクレオチド	56	抗体7 VLヌクレオチド
27	抗体3 VLアミノ酸	57	抗体7 VLアミノ酸
28	抗体3 VL CDR 1アミノ酸	58	抗体7 VL CDR 1アミノ酸
29	抗体3 VL CDR 2アミノ酸	59	抗体7 VL CDR 2アミノ酸
30	抗体3 VL CDR 3アミノ酸	60	抗体7 VL CDR 3アミノ酸

61	抗体8 VHヌクレオチド	97	抗体16 VLアミノ酸
62	抗体8 VHアミノ酸	98	抗体16 VL CDR 1アミノ酸
63	抗体8 VH CDR 1アミノ酸	99	抗体16 VL CDR 2アミノ酸
64	抗体8 VH CDR 2アミノ酸	100	抗体16 VL CDR 3アミノ酸
65	抗体8 VH CDR 3アミノ酸	101	抗体17 VHヌクレオチド
66	抗体8 VLヌクレオチド	102	抗体17 VHアミノ酸
67	抗体8 VLアミノ酸	103	抗体17 VH CDR 1アミノ酸
68	抗体8 VL CDR 1アミノ酸	104	抗体17 VH CDR 2アミノ酸
69	抗体8 VL CDR 2アミノ酸	105	抗体17 VH CDR 3アミノ酸
70	抗体8 VL CDR 3アミノ酸	106	抗体17 VLヌクレオチド
71	抗体10 VHヌクレオチド	107	抗体17 VLアミノ酸
72	抗体10 VHアミノ酸	108	抗体17 VL CDR 1アミノ酸
73	抗体10 VH CDR 1アミノ酸	109	抗体17 VL CDR 2アミノ酸
74	抗体10 VH CDR 2アミノ酸	110	抗体17 VL CDR 3アミノ酸
75	抗体10 VH CDR 3アミノ酸	111	抗体18 VHヌクレオチド
76	抗体10 VLヌクレオチド	112	抗体18 VHアミノ酸
77	抗体10 VLアミノ酸	113	抗体18 VH CDR 1アミノ酸
78	抗体10 VL CDR 1アミノ酸	114	抗体18 VH CDR 2アミノ酸
79	抗体10 VL CDR 2アミノ酸	115	抗体18 VH CDR 3アミノ酸
80	抗体10 VL CDR 3アミノ酸	116	抗体18 VLヌクレオチド
81	抗体14 VHヌクレオチド	117	抗体18 VLアミノ酸
82	抗体14 VHアミノ酸	118	抗体18 VL CDR 1アミノ酸
83	抗体14 VH CDR 1アミノ酸	119	抗体18 VL CDR 2アミノ酸
84	抗体14 VH CDR 2アミノ酸	120	抗体18 VL CDR 3アミノ酸
85	抗体14 VH CDR 3アミノ酸	121	抗体19 VHヌクレオチド
86	抗体14 VLヌクレオチド	122	抗体19 VHアミノ酸
87	抗体14 VLアミノ酸	123	抗体19 VH CDR 1アミノ酸
88	抗体14 VL CDR 1アミノ酸	124	抗体19 VH CDR 2アミノ酸
89	抗体14 VL CDR 2アミノ酸	125	抗体19 VH CDR 3アミノ酸
90	抗体14 VL CDR 3アミノ酸	126	抗体19 VLヌクレオチド
91	抗体16 VHヌクレオチド	127	抗体19 VLアミノ酸
92	抗体16 VHアミノ酸	128	抗体19 VL CDR 1アミノ酸
93	抗体16 VH CDR 1アミノ酸	129	抗体19 VL CDR 2アミノ酸
94	抗体16 VH CDR 2アミノ酸	130	抗体19 VL CDR 3アミノ酸
95	抗体16 VH CDR 3アミノ酸	131	抗体21 VHヌクレオチド
96	抗体16 VLヌクレオチド	132	抗体21 VHアミノ酸

133	抗体21 VH CDR 1アミノ酸
134	抗体21 VH CDR 2アミノ酸
135	抗体21 VH CDR 3アミノ酸
136	抗体21 VLヌクレオチド
137	抗体21 VLアミノ酸
138	抗体21 VL CDR 1アミノ酸
139	抗体21 VL CDR 2アミノ酸
140	抗体21 VL CDR 3アミノ酸
141	抗体22 VHヌクレオチド
142	抗体22 VHアミノ酸
143	抗体22 VH CDR 1アミノ酸
144	抗体22 VH CDR 2アミノ酸
145	抗体22 VH CDR 3アミノ酸
146	抗体22 VLヌクレオチド
147	抗体22 VLアミノ酸
148	抗体22 VL CDR 1アミノ酸
149	抗体22 VL CDR 2アミノ酸
150	抗体22 VL CDR 3アミノ酸
151	抗体23 VHヌクレオチド
152	抗体23 VHアミノ酸
153	抗体23 VH CDR 1アミノ酸
154	抗体23 VH CDR 2アミノ酸
155	抗体23 VH CDR 3アミノ酸
156	抗体23 VLヌクレオチド
157	抗体23 VLアミノ酸
158	抗体23 VL CDR 1アミノ酸
159	抗体23 VL CDR 2アミノ酸
160	抗体23 VL CDR 3アミノ酸
161	完全長ヒトIL-6アミノ酸
162	HIS FLAGタグ付きヒトIL-6
163	可溶性IL-6Ra（ヒト）
164	膜貫通IL-6Ra（ヒト）
165	成熟ヒトIL-6アミノ酸
166	ヒトgp130
167	生殖細胞系列化VH FR1
168	生殖細胞系列化VH FR2
169	生殖細胞系列化VH FR3
170	生殖細胞系列化VH FR4
171	生殖細胞系列化VL FR1
172	生殖細胞系列化VL FR1
173	生殖細胞系列化VL FR1
174	生殖細胞系列化VL FR1
175	F102E突然変異体IL-6
176	S204E突然変異体IL-6
177	R207E突然変異体IL-6
178	F106E突然変異体IL-6
179	Q211A突然変異体IL-6
180	R58E突然変異体IL-6
181	E200W突然変異体IL-6
182	R207L突然変異体IL-6
183	プライマーmacIL6_5' NdeI
184	プライマーmacIL6_3' NheI
185	プライマーhIL6_5' NdeI

【０４２３】

抗体7、10、17および18の配列は生殖細胞系列化されている。

【０４２４】

参考文献

本明細書中のいずれかの箇所で引用されるすべての参考文献は、上のいずれかで引用されているものを含めて、参照によりその全体がすべての目的のために本明細書中に組み入れられる。

【０４２５】

1 Kishimoto, T., (1989) Blood 74:1-10
2 Smith P.C. et al. (2001) Cytokine and Growth factor Reviews 12:33-40
3 Wallenius et al., (2002) Nat. Med. 8:75
4 Kawano et al. (1988) Nature 332:83
5 Van Zaanen et al. (1996) J. Clin Invest. 98:1441-1448
6 Somers, W., et al (1997) 1.9 EMBO J. 16:989-997
7 Jones, S. A et al. (2001) FASEB J. 15:43-58
8 Varghese et al. (2002) PNAS USA 99:15959-15964
9 Boulanger et al (2003) Science 300:2101-2104
10 Menziani et al (1997) Proteins: Structure Function and Genetics 29, 528
11 Brakenhoff et al. (1990) J. Immunol. 145:561-568

12 Wijdenes et al. (1991) Mol Immunol. 28:1183-1191
13 Brakenhoff et al. (1994) JBC 269:86
14 Kalai et al. (1996) Eur J Biochem 238 714-723
15 Kalai et al. (1997) Blood 89:1319-1333
16 Hirata et al. (1989) J. Immunol 143:2900-2906
17 Kalai et al. (1997) Eur J. Biochem 249:690-700
18 Ernst, M. and B. J. Jenkins. (2004) Trends Genet. 20:23-32
19 Yoshida, K. et al (1996) PNAS USA 93:407-411
20 Heinrich, P. C. et al. (2003) Biochem.J. 374:1-20
21 Choy, E. (2004) Rheum.Dis.Clin.North Am. 30:405-415
22 Jones SA et al. (2001) FASEB J 15:43-58
23 Kishimoto (2006) Arthritis Research & Therapy 8:Supp 2/S2
24 Hirano T et al. (1986) Nature 324:73-76
25 Moshage (1997) J. Pathol. 181:257-266
26 Guillen, C. et al. (2004) Calcif.Tissue Int. 75:153-159
27 Tamura, T., et al. (1993) PNAS USA 90:11924-11928
28 Udagawa, N et al. (1995) J. Exp. Med. 182:1461-1468
29 Nishimoto N, and Kishimoto T. (2004) Curr Op in Pharmacology 4:386-391
30 Keller E.T. et al. (1996) Front Biosci. 1:340-57
31 Bataille et al. (1995) Blood 86:685-691
32 Lu et al. (1995) Blood 68:3123-3131
33 Blay et al. (1997) Int J. Cancer 424-430
34 Wendling et al. (1993) J. Rheumatol. 20:259-262
35 Emilie et al. (1994) Blood 84:2472-2479
36 Brochier J et al. (1995) Int. J. of Immunopharm. 17:41-48
37 van Zaanen et al. (1998) Brit. Journal. Haematology 102:783
38 Bell and Kamm, (2000) Aliment. Phamacol. Ther. 14, 501-514
39 Brakenhoff et al (1990) J. Immunol 145:651
40 Mihara et al. (2005) Expert Opinion on Biological Therapy. 5:683-90
41 Lu et al., (2005) Biochemistry 44:11106-14
42 Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6
43 Koide et al. (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151.
44 Nygren et al. (1997) Curr. Op. Structural Biology, 7: 463-469
45 Wess, L. (2004) In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7,
46 Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. (1987)
47 Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133
48 Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington
49 Segal et al., (1974) PNAS, 71:4298-4302

【０４２６】

50 Amit et al., (1986) Science, 233:747-753
51 Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917
52 Chothia et al., (1989) Nature, 342:877- 883
53 Caton et al., (1990) J. Immunol., 144:1965-1968
54 Sharon et al., (1990) PNAS, 87:4814-4817
55 Sharon et al., (1990) J. Immunol., 144:4863-4869

56 Kabat et al., (1991) J. Immunol., 147:1709-1719
57 Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 2005
58 Kontermann, R & Dubel, S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC ; 2001, ISBN: 3540413545
59 Mendez, M. et al. (1997) Nature Genet, 15(2): 146-156
60 Knappik et al. (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86
61 Krebs et al. (2001) J. Immunological Methods 254 67-84
62 Ward, E.S. et al., (1989) Nature 341, 544-546
63 McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552-554
64 Holt et al (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490
65 Bird et al, (1988) Science, 242, 423-426
66 Huston et al, (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883
67 Holliger, P. et al, (1993) PNAS USA 90 6444-6448
68 Reiter, Y. et al, (1996) Nature Biotech, 14, 1239-1245
69 Hu, S. et al, (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061
70 Qui et al., (2007) Nat. Biotechnol. 25:921-929
71 Holliger and Bohlen (1999) Cancer & Metastasis Rev. 18: 411-419
72 Holliger, P. and Winter G. (1993) Curr. Op. Biotech. 4, 446-449
73 Glennie M J et al. (1987) J. Immunol. 139, 2367-2375
74 Repp R. et al. (1995) J. Hematother. 4: 415-21
75 Staerz U. D. and Bevan M. J. (1986) PNAS USA 83: 1453-7
76 Suresh M. R. et al. (1986) Method Enzymol. 121: 210-228
77 Merchand et al. (1998) Nature Biotech. 16:677-681
78 Ridgeway, J. B. B. et al (1996) Protein Eng., 9, 616-621
79 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
80 Koehler and Milstein (1975) Nature, 256:495-497
81 Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
82 Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828
83 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
84 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089
85 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525
86 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369
87 Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
88 Chothia C. et al. (1992) J. Molecular Biology 227, 799-817
89 Al-Lazikani, et al. (1997) J. Molecular Biology 273(4), 927-948
90 Chothia, et al. (1986) Science, 223,755-758

91 Whitelegg, N.R.u. & Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824
92 Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) Electrophoresis 18, 2714-2723
93 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410
94 Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448
95 Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197
96 Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
97 Gram et al., (1992) PNAS USA, 89:3576-3580
98 Barbas et al., (1994) PNAS USA, 91:3809-3813
99 Schier et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:551-567
【０４２７】
100 Marks et al (1992) Bio/Technology 10:779-783
101 Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press
102 Hunter W. M. and Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495
103 Plueckthun, A. (1991) Bio/Technology 9: 545-551
104 Chadd HE and Chamow SM (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
105 Andersen DC and Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
106 Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418
107 Sambrook and Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
108 Ausubel et al. eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999
109 Robinson, J. R. ed., (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York
110 Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
111 Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
112 Desgeorges et al. (1997) J. Rheumatol 24:1510
113 Yokota et al. (2005) Arth & Rheum 52(3): 818-25
114 Klouche et al., (1999) J. Immunol. 163(8) 4583-9
115 Oh et al., (2001) J. Immunol. 166: 2695-704
116 Fasshauer et al., (2003) Horm. Metab. Res. 35(3) 147-52
117 Marz et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA 95(6) 3251-6
118 Modur et al., (1997) J. Clin. Invest. 100(1) 2752-6
119 Murakami-Morl et al., (1996) Cell Growth Differ. 7(12) 1697-703
120 Vaughan, T. J., et al. (1996) Nature Biotech. 14, 309-314.
121 Hutchings, C. (2001) Generation of Naive Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93
122 Hawkins et al (1992) Journal of Molecular Biology 226, 889-896
123 Persic L et al. (1997) Gene 187, 9-18.
124 Mach et al (1992) Anal. Biochem. 200(1): 20-26
125 Osbourn (1996) Immunotechnology. 2, 181-196
126 Bannister et al (2006) Biotechnology and Bioengineering, 94: 931-937
127 McCafferty et al (1994) Appl. Biochem. Biotech. 47: 157-71
128 Clackson and Lowman (2004) A Practical Approach, Oxford University Press
129 Thompson (1996) J. Molecular Biology. 256. 77-88
130 http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/
131 Foote J & Winter G (1992) J. Molecular biology 224(2) 487-99

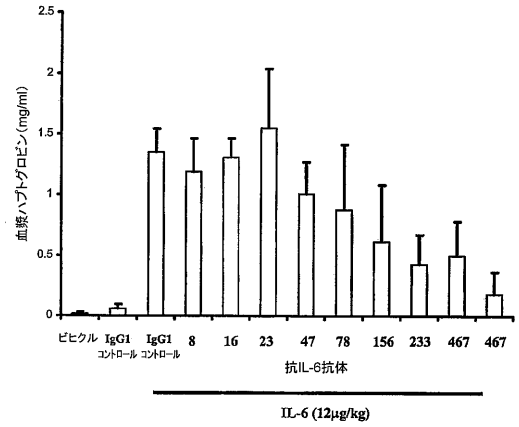
132 Karlsson et al (1991) J. Immunol Methods 145 (1-2) 229-240
133 Lu et al. (1995) Blood. 86: 3123-3131
134 Kitamura T et al (1989) J. Cellular Physiology 140. 323-334

【０４２８】

表7

| Kabatナンバリング | HCDR1 | | |

【図１】



【配列表】

2010510795000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/004527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24 A61K39/395 C12N15/13 A61P37/02 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/119115 A (CENTOCOR INC [US]; APPLIED MOLECULAR EVOLUTION IN [US]; CHEN YAN [US];) 9 November 2006 (2006-11-09) page 2, line 23 - page 3, line 30 page 8, line 14 - line 23 page 10, line 2 - line 16 page 43, line 16 - page 44, line 2 page 71, line 24 - page 80, line 5 examples 2-5; tables 1-9	1-58
X	EP 1 536 012 A (JURIDICAL FOUNDATION [JP] CHEMO SERO THERAPEUT RES INST [JP]) 1 June 2005 (2005-06-01) paragraphs [0001], [0009], [0010], [0012] - [0022]; claims 1-4,11-19; examples 6,7	1-58

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 May 2008	26/05/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bayer, Annette

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/004527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/039826 A (CENTOCOR INC [US]) 13 May 2004 (2004-05-13) page 4, line 20 - line 26 page 6, line 26 - page 7, line 17 page 8, line 21 - line 28 page 14, line 1 - page 15, line 9 page 16, line 20 - line 28 page 27, line 23 - line 27 claims 1-65	1-58
A	WO 03/055979 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC [US]; RUBEN STEVEN M [US]; BARASH STEVEN C [] 10 July 2003 (2003-07-10) e.g. sequences 2020, 2104, 2027, 2017, 1906	
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 the whole document	
A	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, September 1996 (1996-09), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 the whole document	
P,X	WO 2007/066082 A (UCB SA [BE]; GELINAS RICHARD EVAN [GB]; SINGHAL MITRA CHOUDHURY [GB];) 14 June 2007 (2007-06-14) the whole document, especially the examples and claims	1-58

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2007/004527

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

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

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

Although claims 49-53 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

1-22 (all complete), 23-58 (all partially)

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

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2007 /004527

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: claims 1,2 (complete), 6, 7, 9-22, 24-34, 39-58 (all partially)

An isolated binding member for human IL-6, which binds human IL-6 with a KD of not more than 30 pM as defined by surface plasmon resonance and related subject-matter.

Invention 2: claims 3, 4 (complete), 6, 7, 9-22, 24-34, 39-58 (all partially)

An isolated binding member for human IL-6, which binds human IL-6 at residue Phe102 and/or Ser204, the residue numbering being defined according to the full length human IL-6 amino acid sequence SEQ-ID NO: 161 and related subject-matter.

Invention 3: claims 5 (complete), 6, 7, 9-22, 24-34, 39-58 (all partially)

An isolated binding member for human IL-6, wherein the binding member has an IC50 of less than 1 nM in an assay of inhibition of VEGF release from human synovial fibroblasts stimulated with 0,6 pM human IL-1 and 2,4 nM soluble human IL-6R and related subject-matter.

Invention 4: claims 8 (complete), 6, 7, 9-22, 24-34, 39-58 (all partially)

An isolated binding member for human IL-6 as recited in claim 8 and related subject-matter.

Inventions 5-19: claims 23-58 (all partially)

Each of the antibodies 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 or 23 as disclosed and characterized by their sequences in the specification and related subject-matter.

Invention 20: claims 59-62 (complete), 67-73 (all partially)

A method for producing an antibody antigen-binding domain for IL-16 as recited in claim 59 and related subject-matter.

Invention 21: claims 63-66 (complete), 67-73 (all partially)

A method for producing a binding member that binds IL-6 as recited in claim 63 and related subject-matter.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2007/004527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006119115 A	09-11-2006	AR 053370 A1	02-05-2007
		AU 2006242347 A1	09-11-2006
		CA 2606348 A1	09-11-2006
		EP 1874351 A2	09-01-2008
		US 2006257407 A1	16-11-2006
EP 1536012 A	01-06-2005	AU 2003261787 A1	19-03-2004
		CA 2496523 A1	11-03-2004
		CN 1678744 A	05-10-2005
		WO 2004020633 A1	11-03-2004
		KR 20050058486 A	16-06-2005
		US 2006240012 A1	26-10-2006
WO 2004039826 A	13-05-2004	BR 0214168 A	14-09-2004
		CN 1694894 A	09-11-2005
		JP 2007528691 T	18-10-2007
WO 03055979 A	10-07-2003	AU 2002364954 A1	15-07-2003
		CA 2467521 A1	10-07-2003
		EP 1456347 A2	15-09-2004
WO 2007066082 A	14-06-2007	AR 057224 A1	21-11-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ 37/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 37/00		
Ａ６１Ｐ 19/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 11/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 19/00		
Ａ６１Ｐ 11/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 11/00		
Ａ６１Ｐ 1/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 1/04		
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 9/10		
Ａ６１Ｐ 19/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 17/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 19/06		
Ａ６１Ｐ 17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 17/00		
Ａ６１Ｐ 17/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 17/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 17/04		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 17/14		
Ａ６１Ｐ 31/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 7/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/18		
Ａ６１Ｐ 13/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 7/08		
Ａ６１Ｐ 5/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 13/12		
Ａ６１Ｐ 21/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 5/14		
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 21/00		
Ａ６１Ｐ 7/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 3/10		
Ａ６１Ｐ 27/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 7/06		
Ａ６１Ｐ 1/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 27/00		
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 1/16		
Ａ６１Ｐ 3/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ａ６１Ｐ 37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 3/04		
Ａ６１Ｐ 35/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ａ６１Ｐ 15/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 35/02		
Ａ６１Ｐ 31/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 15/00		
Ａ６１Ｐ 33/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/00		
Ａ６１Ｐ 31/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 33/00		
Ａ６１Ｐ 31/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/10		
Ａ６１Ｐ 33/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/12		
Ａ６１Ｐ 31/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 33/06		
		Ａ６１Ｐ 31/16		

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

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100122389

弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(72)発明者　マリンダー，フィリップ
イギリス国　エルイー１１　５アールエイチ　レスターシャー，ラフバラ，ベイクウェル　ロード，アストラゼネカ　アール　アンド　ディー　チャーンウッド
(72)発明者　レーン，スティーヴン，ゴドフリー
イギリス国　シービー２１　６ジーエイチ　ケンブリッジシャー，ケンブリッジ，グランタ　パーク，ミルステイン　ビルディング，メディミューン　リミテッド
(72)発明者　クルウィス，サイモン，チャールズ
イギリス国　エルイー１１　５アールエイチ　レスターシャー，ラフバラ，ベイクウェル　ロード，アストラゼネカ　アール　アンド　ディー　チャーンウッド

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 BA61 CA01 DA02 GA11 HA03
4B064 AG26 CA19 CC24 CE12 DA01
4C084 AA01 AA02 CA53 NA14 ZA02 ZA33 ZA36 ZA51 ZA55 ZA59
ZA66 ZA70 ZA75 ZA81 ZA89 ZA92 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08
ZB26 ZB27 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37 ZC02 ZC35
4C085 AA13 AA14 DD33 DD62 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA75 EA20 FA74