

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成23年7月7日(2011.7.7)

【公表番号】特表2010-528589(P2010-528589A)

【公表日】平成22年8月26日(2010.8.26)

【年通号数】公開・登録公報2010-034

【出願番号】特願2010-509535(P2010-509535)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	16/18	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	1/14	(2006.01)
A 6 1 P	3/02	(2006.01)
A 6 1 P	19/02	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	17/06	(2006.01)
A 6 1 P	1/04	(2006.01)
A 6 1 P	1/02	(2006.01)
A 6 1 P	19/10	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	3/04	(2006.01)
A 6 1 P	11/06	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/563	(2006.01)
G 0 1 N	33/574	(2006.01)
G 0 1 N	33/577	(2006.01)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	16/18	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	1/14	

A 6 1 P	3/02	
A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/28	
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	P
G 0 1 N	33/563	
G 0 1 N	33/574	Z
G 0 1 N	33/577	Z
C 0 7 K	16/46	

【手続補正書】

【提出日】平成23年5月23日(2011.5.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含有するヒト化抗体又は抗体断片であって、ここで軽鎖ポリペプチドは、少なくとも以下：(i) F R 1 から F R 3 に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の軽鎖の対応するアミノ酸残基に対する(ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比べた)そのより大きな相同意性(配列同一性パーセント)に基づいて該ライブラリーより選択されるヒト軽鎖生殖細胞系配列の C D R 1 及び C D R 2 領域が含まれる、F R 1 の第一残基から F R 3 の末端に至るアミノ酸残基；及び(ii)さらにここで、同じ親ウサギ抗体の軽鎖中の「選択性決定残基」に対応する C D R 1 及び C D R 2 中の C D R 残基は、対応するウサギ選択性決定残基で置き換えられている；(iii)同じ親ウサギ抗体の全 C D R 3 領域が含まれるアミノ酸残基；(iv)同じ親ウサギ抗体の軽鎖に含まれる対応する F R 4 領域に対するそのより大きな相同意性(配列同一性)に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれる抗体軽鎖の全 F R 4 領域が含まれるアミノ酸残基；及び(v)ここで、選択される相同的なヒト F R 領域中のヒト F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4 領域の F R 残基の中で、対応するウサギ F R 残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくないこと；を含有するヒト化軽鎖ポリペプチドである、前記ヒト化抗体又は抗体断片。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含有するヒト化抗体又は抗体断片であって、ここで重鎖は、少なくとも以下：(i) F R 1 から F R 3 に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の重鎖の対応するアミノ酸残基に対する(ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比べた)そのより大きな相同性(配列同一性パーセント)に基づいて該ライブラリーより選択されるヒト生殖細胞系配列によりコードされる C D R 1 及び C D R 2 領域が含まれる、F R 1 の第一残基から F R 3 の末端に至るアミノ酸残基；及び(i i)さらにここで、同じ親ウサギ抗体の重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域中の「選択性決定残基」に対応するヒト重鎖の C D R 1 及び C D R 2 中の C D R 残基は、ウサギ重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる対応する重鎖選択性決定残基で置き換えられている；(i i i)同じ親ウサギ抗体の全 C D R 3 領域が含まれるアミノ酸残基；(i v)同じ親ウサギ抗体の重鎖に含まれる対応する F R 4 領域に対するそのより大きな相同性(配列同一性)に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれる F R 4 領域；及び(v)ここでヒト重鎖 F R 1 領域の最終の 1 ~ 3 のアミノ酸は、対応するウサギ重鎖 F R 1 残基の末端の 1 ~ 3 のアミノ酸で置き換えられてもよい；及び/又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸は、ウサギ重鎖フレームワーク 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換えられてもよい；及び/又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸(典型的には、トリプトファン)は、対応するヒト C D R 2 残基(典型的には、セリン)で置き換えられてもよい；及び(v i)ここで、選択される相同的なヒト F R 領域の残る F R 残基の中で、対応するウサギ F R 残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくないこと；を含有するヒト化重鎖ポリペプチドである、前記ヒト化抗体又は抗体断片。

【請求項 3】

親ウサギ抗体が、ヒト、ウイルス、又は細菌の抗原に特異的であって、該抗体は I L - 6 、ヘプシジン、肝細胞増殖因子、又は T N F ポリペプチドに特異的であり、ここでヒト抗原は、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、又は癌抗原である、請求項 1 のヒト化抗体。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に引用されるヒト化抗体に含まれるヒト化抗体軽鎖をコードする核酸配列。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸配列を含有するベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のベクターを含有する細胞。

【請求項 7】

酵母、細菌、及び哺乳動物の細胞より選択される、請求項 6 の細胞。

【請求項 8】

二倍体の酵母細胞である、請求項 7 の細胞。

【請求項 9】

ピキア属(*Pichia*)又は他のメタノール資化性二倍体酵母である、請求項 8 の細胞。

【請求項 10】

少なくとも 1 つのヒト化軽鎖ポリペプチドを含有し、そしてさらに少なくとも 1 つの重鎖ポリペプチドを含んでなる請求項 1 のヒト化抗体であって、ここで少なくとも 1 つの重鎖は、少なくとも以下：(i) F R 1 から F R 3 に至る中で選択されるアミノ酸残基の、所望の抗原への特異性を有するヒト化される親ウサギ抗体の重鎖の対応するアミノ酸残基に対する(ヒト生殖細胞系配列のライブラリー中の他のヒト生殖細胞系配列に比べた)そのより大きな相同性(配列同一性パーセント)に基づいて該ライブラリーより選択されるヒト生殖細胞系配列によりコードされる C D R 1 及び C D R 2 領域が含まれる、F R 1 の第一残基から F R 3 の末端に至るアミノ酸残基；及び(i i)さらにここで、同じ親ウサギ抗体の重鎖の C D R 1 及び C D R 2 領域中の「選択性決定残基」に対応するヒト重鎖の

CDR1及びCDR2中のCDR残基は、ウサギ重鎖のCDR1及びCDR2領域に含まれる対応する重鎖選択性決定残基で置き換えられている；(i i i)同じ親ウサギ抗体の全CDR3領域が含まれるアミノ酸残基；(i v)同じ親ウサギ抗体の重鎖に含まれる対応するFR4領域に対するそのより大きな相同性（配列同一性）に基づいてヒト生殖細胞系配列のライブラリーから導かれるFR4領域；及び(v)ここでヒト重鎖FR1領域の最終の1～3のアミノ酸は、対応するウサギ重鎖FR1残基の末端の1～3のアミノ酸で置き換えられていてもよい；及び/又は、ヒト重鎖フレームワーク2領域の末端アミノ酸は、ウサギ重鎖フレームワーク2の対応する末端アミノ酸残基で置き換えられていてもよい；及び/又は、ウサギ重鎖CDR2の末端から4番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）は、対応するヒトCDR2残基（典型的には、セリン）で置き換えられていてもよい；及び(v i)ここで、選択される相同意向的なヒトFR領域の残るFR残基の中で、対応するウサギFR残基で置換されているものは、ほとんど又はまったくないこと；を含有するヒト化重鎖ポリペプチドである、前記ヒト化抗体。

【請求項11】

IL-6、ヘプシジン、肝細胞増殖因子、又はTNFポリペプチドに特異的である、請求項10のヒト化抗体。

【請求項12】

以下の工程：

(i) 所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からのウサギ軽鎖抗体配列をコードするDNAを入手して、フレームワーク1(FR1)の始まりからフレームワーク3(FR3)の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(i i) FR1の始まりからFR3配列の終わりに至る前記ウサギ軽鎖抗体アミノ酸配列を用いて、ヒト軽鎖抗体配列を含有するライブラリーに対する相同性検索を実行して、他のヒト生殖細胞系抗体軽鎖配列に比べてそれに対する実質的な配列相同性を示すヒト軽鎖抗体配列を同定する工程；

(i i i) ウサギとヒトの両方の軽鎖配列において、FR1、FR2、FR3、CDR1、CDR2の領域に対応する配置とその特異的残基(specific residues)を同定して、ウサギのこれらの離散領域と選択されるヒト抗体軽鎖を並置する工程；

(i v) 選択される相同意向的なヒト軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域が、ウサギ軽鎖配列のCDR1及びCDR2領域に含まれる対応する選択性決定残基によって置換されているDNA又はアミノ酸配列を構築する工程；

(v) 工程(i v)によって得られるDNA又はアミノ酸配列へ、ウサギCDR3軽鎖抗体配列の対応するアミノ酸残基をコードするDNA配列又はそれを含有するポリペプチドをさらに付ける工程；

(v i) ウサギ軽鎖に含まれるFR4に相同意向的であり、好ましくは、多くても2～4のアミノ酸残基だけそれから異なるヒト軽鎖フレームワーク4領域(FR4)をさらに選択して、前記ヒトFR4をコードするDNA配列又は前記ヒトFR4の対応するアミノ酸残基を、工程(v)の後で得られるDNA又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

(v i i) 工程(i)～(v i)より得られるヒト化ウサギ軽鎖配列をコードするか又は含有するDNA又はアミノ酸配列を合成する工程を含んでなる、ヒト化軽鎖抗体配列を产生するための方法。

【請求項13】

a) FR1を始めるアミノ酸がウサギ軽鎖シグナル配列の後で最初のアミノ酸である、

b) シグナル配列が約20～22のアミノ酸残基を含む、

c) ヒト軽鎖配列がヒト生殖細胞系可変軽鎖配列を含有するライブラリーより同定される、

d) ウサギ配列中のFR1、FR2、FR3、及びCDR1、及びCDR2領域が、ウサギFR1、FR2、FR3、及びCDR1、及びCDR2領域を対応するヒト軽鎖FR1、FR2、FR3、CDR1、及びCDR2領域と並置することによって同定される、

e) ウサギCDR3領域が9～15のアミノ酸残基を含む、

- f) ウサギ軽鎖 F R 4 領域が 1 1 のアミノ酸残基を含む、
 - g) F R 3 が Y Y C で終わる、
 - h) ウサギ軽鎖中の F R 4 が F G G G G で始まる（配列番号 1 0 6 8 ）、
 - i) 前記ウサギ F R 4 領域が V V K R アミノ酸配列で始まる、
 - j) 選択されるヒト F R 4 軽鎖配列が F G G G T K V E I K R を含む（配列番号 1 0 7 0 ）、または
 - k) 得られるヒト化ウサギ軽鎖を所望の抗原へ結合するヒト化抗体又はヒト化抗体断片の製造に使用する、
- 請求項 1 2 の方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 または請求項 1 3 の方法に従って產生される、ヒト化ウサギ軽鎖可変アミノ酸配列又はそれをコードする D N A 。

【請求項 1 5】

微生物抗原、ヒト抗原、ウイルス抗原、及びアレルゲンより選択される抗原に特異的である、請求項 1 4 のヒト化ウサギ軽鎖可変アミノ酸配列又は D N A 配列。

【請求項 1 6】

ヒト抗原が、ヒトの自己抗原、サイトカイン、受容体タンパク質、酵素、ホルモン、受容体リガンド、ステロイド、増殖因子、及び癌遺伝子より選択される、請求項 1 5 のヒト化ウサギ軽鎖可変アミノ酸又は D N A 配列。

【請求項 1 7】

請求項 1 2 または請求項 1 3 の方法に従って產生されるヒト化ウサギ軽鎖を含有する抗体又は抗体断片。

【請求項 1 8】

請求項 1 2 または請求項 1 3 の方法に従って產生される、エフェクター部分へ付くヒト化ウサギ軽鎖又はそれを含有する抗体。

【請求項 1 9】

エフェクター部分が、薬物、毒素、酵素、放射性核種、フルオロフォア、サイトカイン、アフィニティー標識、及び転座型ポリペプチドより選択される、請求項 1 8 のヒト化ウサギ軽鎖ポリペプチド。

【請求項 2 0】

請求項 1 2 または請求項 1 3 の方法に従って產生される、サイトカイン、増殖因子、又は腫瘍特異的ポリペプチドへ特異的に結合するウサギ抗体から導かれる、ヒト化ウサギ軽鎖ポリペプチド又はそれを含有する抗体又はそれらをコードする D N A 。

【請求項 2 1】

I L - 6 、 T N F 、 V E G F 、 I L - 1 2 、ヘプシジン、又は肝細胞増殖因子へ特異的に結合するウサギ抗体から導かれる、請求項 2 0 のヒト化ウサギ軽鎖ポリペプチド又は含有する抗体。

【請求項 2 2】

以下の工程：

(i) 所望の抗原へ特異的に結合するウサギ抗体からウサギ重鎖抗体配列を入手して、フレームワーク 1 (F R 1) の始まりからフレームワーク 3 (F R 3) の終わりを含む範囲のアミノ酸残基を同定する工程；

(i i) F R 1 の始まりから F R 3 配列の終わりに至る前記ウサギ重鎖抗体アミノ酸配列を使用する相同性検索を（例えば、ヒト生殖細胞系抗体配列含有ライブラリーの B L A S T 検索によって）実行して、それに対して相同的である、即ち、好ましくは、それに対してアミノ酸レベルで少なくとも 8 0 % ~ 9 0 % の同一性を保有するヒト重鎖抗体配列を同定する工程；

(i i i) ウサギとヒトの両方の重鎖配列において、 F R 1 、 F R 2 、 F R 3 、 C D R 1 、 C D R 2 の領域に対応する配置とその特異的残基を同定して、ウサギのこれらの離散領域を選択される相同的なヒト抗体重鎖の対応領域に対して並置する工程；

(i v) 選択される相同意向的なヒト重鎖配列の C D R 1 及び C D R 2 領域中の残基が、ウサギ重鎖配列の対応する C D R 1 及び C D R 2 領域に含まれる選択性決定残基によって置換されている D N A 又はアミノ酸配列を構築して、ヒト重鎖 F R 1 領域の末端の 1 ~ 3 のアミノ酸をウサギ重鎖 F R 1 の対応する末端の 1 ~ 3 のアミノ酸で置き換えてよい；及び／又は、ヒト重鎖フレームワーク 2 領域の末端アミノ酸をウサギ重鎖フレームワーク 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換えてよい；及び／又は、ウサギ重鎖 C D R 2 の末端から 4 番目のアミノ酸（典型的には、トリプトファン）を対応するヒト C D R 2 残基（典型的には、セリン）で置き換えてよい工程；

(v) 工程 (i v) によって得られる D N A 又はアミノ酸配列へ、同じウサギ重鎖抗体配列に含まれるウサギ重鎖 C D R 3 の対応するアミノ酸残基をコードする D N A 配列又はそれを有するポリペプチドをさらに付ける工程；

(v i) それに相同意向である（好ましくは、ヒト化ウサギ抗体重鎖配列に含まれる F R 4 より、多くても 4 つのアミノ酸残基だけ異なる）ヒト重鎖フレームワーク 4 領域（F R 4）をさらに選択して、前記選択された相同意向的なヒト F R 4 をコードする D N A 配列又は前記ヒト F R 4 の対応するアミノ酸残基を、工程 (v) の後で得られる D N A 又はアミノ酸配列の上へ付ける工程；並びに

(v i i) 工程 (i) ~ (v i) より得られるヒト化ウサギ重鎖配列をコードするか又は含有する D N A 又はアミノ酸配列を合成する工程を含んでなる、ヒト化重鎖抗体配列をウサギ重鎖抗体配列より產生するための方法。

【請求項 2 3】

- a) F R 1 を始めるアミノ酸がウサギ重鎖シグナル配列の後で最初のアミノ酸である、
 - b) F R 3 の終わりが F R 1 の第一残基の後の約 95 ~ 100 番目のアミノ酸残基である、
 - c) シグナル配列が 19 以下のアミノ酸残基を含む、
 - d) 相同意向的なヒト重鎖配列が抗体成熟化に先立って得られるヒト生殖細胞系配列の B L A S T 検索によって同定される、
 - e) 選択される相同意向的なヒト重鎖がウサギ重鎖の対応領域に対して少なくとも 90 ~ 95 % の配列同一性を保有する、
 - f) ウサギ重鎖配列中の F R 1 、 F R 2 、 F R 3 、及び C D R 1 、及び C D R 2 領域がウサギ F R 1 、 F R 2 、 F R 3 、及び C D R 1 、及び C D R 2 領域を対応するヒト重鎖 F R 1 、 F R 2 、 F R 3 、 C D R 1 、及び C D R 2 領域と並置することによって同定される、
 - g) ヒト F R 1 の最終の 3 つのアミノ酸残基を、 s e r - g l y が先行するウサギ F R 1 の対応する 3 つの残基で置き換える、
 - h) ヒト F R 2 の末端アミノ酸残基を、イソロイシン残基に先行される場合もあるグリシンを含むウサギ F R 2 の対応する末端アミノ酸残基で置き換える工程をさらに含む、
 - i) ウサギ C D R 2 の終わりより約 4 残基に位置するトリプトファン残基をセリン残基に変える工程をさらに含む、
 - j) ウサギ C D R 3 が 5 ~ 19 のアミノ酸残基を含む、
 - k) ウサギ C D R 3 に残基 W G 「 X 」 G (配列番号 1071) が続き、ここで「 X 」は、好ましくは Q (配列番号 1072) 又は P (配列番号 1073) である、
 - l) ウサギ F R 4 が 11 のアミノ酸残基を含む、または
 - m) ウサギ F R 4 が W G Q G T L V T V S S を含む (配列番号 1074) 、
- 請求項 2 2 の方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 または請求項 2 3 の方法により產生される、微生物抗原、ヒト抗原、ウイルス抗原、及びアレルゲンより選択される抗原に特異的なウサギ抗体から導かれるヒト化ウサギ重鎖可変アミノ酸配列又は D N A 配列。

【請求項 2 5】

ヒト抗原に特異的である、請求項 2 4 のヒト化ウサギ重鎖可変アミノ酸配列又は D N A

配列。

【請求項 2 6】

ヒト抗原が、ヒトの自己抗原、サイトカイン、受容体タンパク質、酵素、ホルモン、受容体リガンド、ステロイド、増殖因子、及び癌遺伝子より選択される、請求項2 5のヒト化ウサギ重鎖可変アミノ酸配列又はDNA配列。

【請求項 2 7】

請求項 2 2 または請求項 2 3 の方法に従って產生されるヒト化ウサギ重鎖可変配列を含有する抗体又は抗体断片。

【請求項 2 8】

請求項 2 2 または請求項 2 3 の方法に従って產生される、エフェクター部分へ付くヒト化ウサギ重鎖。

【請求項 2 9】

エフェクター部分が、薬物、毒素、酵素、放射性核種、フルオロフォア、サイトカイン、アフィニティー標識、及び転座型ポリペプチドより選択される、請求項2 8のヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド。

【請求項 3 0】

請求項 2 2 または請求項 2 3 の方法に従って產生される、サイトカイン、増殖因子、又は腫瘍特異的ポリペプチドへ特異的に結合するウサギ抗体から導かれるヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド又はそれをコードするDNA。

【請求項 3 1】

IL-6、TNF-、VEGF-、IL-12、ヘプシジン、又は肝細胞増殖因子へ特異的に結合するウサギ抗体から導かれる、請求項3 0のヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド。

【請求項 3 2】

非グリコシル化(aglycosylated)されている、請求項2 9のヒト化ウサギ重鎖ポリペプチド。

【請求項 3 3】

請求項 1 2 または請求項 1 3 の方法に従って產生される少なくとも1つのヒト化ウサギ重鎖と請求項 2 2 または請求項 2 3 の方法に従って產生される少なくとも1つのヒト化ウサギ重鎖を含んでなるヒト化ウサギ抗体。

【請求項 3 4】

ヒトの定常ドメインを含む、請求項3 3のヒト化ウサギ抗体。

【請求項 3 5】

IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4より選択される、請求項3 3のヒト化ウサギ抗体。

【請求項 3 6】

ヒト抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、病原体、寄生虫、酵母抗原、及び真菌抗原より選択される抗原へ結合する、請求項3 3のヒト化ウサギ抗体。

【請求項 3 7】

請求項 1 から 3 および請求項 1 0 から請求項 1 1 のいずれか 1 項記載のヒト化抗体または抗体断片を含む、改善された免疫療法又は免疫診断のための医薬組成物。

【請求項 3 8】

IL-6又はTNF-に関連した疾患又は障害の症状を改善又は抑制するための請求項3 7の医薬組成物。

【請求項 3 9】

IL-6又はTNF-に関連した前記疾患又は障害が癌又は炎症性状態である、請求項3 8の医薬組成物。

【請求項 4 0】

抗体が抗IL-6抗体であり、IL-6関連の疲労、悪液質、又は関節炎を治療するか又はその予後を診断するために使用される、請求項3 8の医薬組成物。

【請求項 4 1】

I L - 6 に関連した前記疾患又は障害が、全身疲労、運動誘発性疲労、癌関連疲労、炎症性疾患関連疲労、慢性疲労症候群、癌関連悪液質、心臓関連悪液質、呼吸関連悪液質、腎臓関連悪液質、加齢関連悪液質、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、全身型若年性特発性関節炎、乾癬、乾癬性関節症、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患（IBD）、リウマチ性多発性筋痛、巨細胞性動脈炎、自己免疫性脈管炎、移植片対宿主病（GVHD）、シェーグレン症候群、成人発症型スティル病、慢性関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、骨粗鬆症、骨ページェット病、骨関節炎、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前立腺癌、白血病、腎細胞癌、多中心型キャッスルマン病、卵巣癌、癌化学療法時の薬剤耐性、癌化学療法の毒性、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病、喘息、多発性硬化症、アルツハイマー病、及び脳血管系疾患より選択され、かつ、TNFに関連した前記疾患又は障害が、全身疲労、運動誘発性疲労、癌関連疲労、炎症性疾患関連疲労、慢性疲労症候群、癌関連悪液質、心臓関連悪液質、呼吸関連悪液質、腎臓関連悪液質、加齢関連悪液質、慢性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、全身型若年性特発性関節炎、乾癬、乾癬性関節症、強直性脊椎炎、炎症性腸疾患（IBD）、リウマチ性多発性筋痛、巨細胞性動脈炎、自己免疫性脈管炎、移植片対宿主病（GVHD）、シェーグレン症候群、成人発症型スティル病、慢性関節リウマチ、全身型若年性特発性関節炎、骨関節炎、骨粗鬆症、骨ページェット病、骨関節炎、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前立腺癌、白血病、腎細胞癌、多中心型キャッスルマン病、卵巣癌、癌化学療法時の薬剤耐性、癌化学療法の毒性、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、肥満、糖尿病、喘息、多発性硬化症、アルツハイマー病、及び脳血管系疾患より選択される、請求項 3 8 の医薬組成物。

【請求項 4 2】

ヒト化抗体又は抗体断片が、少なくとも 10 ~ 25 mg / リットルの前記抗体を安定的に発現して培養基へ分泌する倍数体酵母培養物において発現される、請求項 1 から請求項 3、請求項 10 から請求項 11、請求項 17 から請求項 18、請求項 20 から請求項 21、請求項 27、および請求項 33 から請求項 36 のいずれか 1 項記載のヒト化抗体または抗体断片の作製方法であって：

(i) プロモーター及びシグナル配列へ機能可能的に連結した前記ヒト化抗体又は断片をコードする 1 以上の異種ポリヌクレオチドを含有する少なくとも 1 つの発現ベクターを一倍体酵母細胞へ導入する工程；

(ii) 前記第一及び / 又は第二の一倍体酵母細胞より、接合又はスフェロプラスト融合によって、倍数体酵母を產生する工程；

(iii) 前記ヒト化抗体又は断片を安定的に発現する倍数体酵母細胞を選択する工程；及び

(iv) 少なくとも 10 ~ 25 mg / リットルの前記ヒト化抗体又は断片を培養基へ安定的に発現する前記倍数体酵母細胞より、安定した倍数体酵母培養物を產生する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 4 3】

前記酵母が以下の属：アルキシオザイマ（Arxiozyma）；アスコボトリオザイマ（Ascobotriozyma）；シテロマイセス（Citeromyces）；デバリオマイセス（Debaryomyces）；デッケラ（Dekkera）；エレモセシウム（Eremothecium）；イサットヘンキア（Issatchenka）；カザクスタニア（Kazachstania）；クルイベロマイセス（Kluyveromyces）；コダマエア（Kodamaea）；ロデロマイセス（Lodderomyces）；パチソレン（Pachysolen）；ピキア（Pichia）；サッカロマイセス（Saccharomyces）；サツニスポラ（Saturnispora）；テトラピシスポラ（Tetrapisispora）；トルラスピラ（Torulaspora）；ウィリオプシス（Williopsis）；及びザイゴサッカロマイセス（Zygosaccharomyces）より選択される、請求項 4 2 の方法。

【請求項 4 4】

前記酵母属がピキアである、請求項 4 3 の方法。

【請求項 4 5】

ピキアの種が、ピキア・パストリス (Pichia pastoris)、ピキア・メタノリカ (Pichia metanolica)、及びハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) (ピキア・アンゲスタ (Pichia angusta)) より選択される、請求項 4 4 の方法。

【請求項 4 6】

請求項 1 2 ~ 1 3 および請求項 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項記載の方法によって產生されるヒト化抗体ポリペプチドを含有するヒト化抗体又は抗体断片であって、 $5 \times 10^{-7} M^{-1}$ 、 $10^{-7} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-8} M^{-1}$ 、 $10^{-8} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-9} M^{-1}$ 、 $10^{-9} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-10} M^{-1}$ 、 $10^{-10} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-11} M^{-1}$ 、 $10^{-11} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-12} M^{-1}$ 、 $10^{-12} M^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-13} M^{-1}$ 、 $10^{-13} M^{-1}$ 、又は $5 \times 10^{-14} M^{-1}$ 以下の解離定数 (K_D) で抗原へ結合する、前記ヒト化抗体又は断片。

【請求項 4 7】

a) $5 \times 10^{-10} M^{-1}$ 以下の解離定数 (K_D) で抗原へ結合する、
 b) $10^{-4} S^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5} S^{-1}$ 、 $10^{-5} S^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6} S^{-1}$ 、 $10^{-6} S^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7} S^{-1}$ 、又は $10^{-7} S^{-1}$ 以下の解離速度 (K_{off}) で抗原へ結合する、

c) 親ウサギ抗体が 1 以上のウサギ B 細胞集団に由来する、または
 d) IL-6 の IL-6R との会合、又は TNF とその受容体との会合を阻害する、
 請求項 4 6 のヒト化抗体。

【請求項 4 8】

IL-6R が可溶性 L-6R (sIL-6R) であるか、または TNF 受容体 (TNFR) が可溶性である、請求項 4 7 のヒト化抗体。

【請求項 4 9】

請求項 1 から 3、または 10 ~ 11、および請求項 4 6 から 4 8 のいずれか 1 項に記載のヒト化ウサギ抗体を発現するベクター。

【請求項 5 0】

90

請求項 4 9 のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 5 1】

ピキア属に属する酵母細胞である、請求項 5 0 の宿主細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

[00082] 本明細書での「インターロイキン-6」又は (IL-6) という表現には、GenBank タンパク質受入番号 : NP_000591 として利用可能な以下の 212 のアミノ酸配列 : MNSFSTS AFGPVA FSLGL LVLPA A FPAPVPP GEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYI LDG I S A L R K E T C N K S N M C E S S K E A L A E N N L N L P K M A E K D G C F Q S G F N E E T C L V K I I T G L L E F E V Y L E Y L Q N R F E S S E E Q A R A V Q M S T K V L I Q F L Q K K A K N L D A I T T P D P T T N A S L L T K L Q A Q N Q W L Q D M T T H L I L R S F K E F L Q S S L R A L R Q M (配列番号 1075) だけではなく、この IL-6 アミノ酸配列のあらゆるプレプロ、プロ、及び成熟形態、並びにこの配列の突然変異体と対立遺伝子変異体が含まれる変異体が含まれる。