(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3557206号
(P3557206)
(45)発行日　平成16年8月25日(2004.8.25)　(24)登録日　平成16年5月21日(2004.5.21)

(51)Int.Cl.[7]　F I
A61K 47/48　A61K 47/48
A61K 38/00　A61K 37/02

請求項の数 19　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願平6-513763
(86)(22)出願日　平成5年12月6日(1993.12.6)
(65)公表番号　特表平8-504202
(43)公表日　平成8年5月7日(1996.5.7)
(86)国際出願番号　PCT/EP1993/003429
(87)国際公開番号　WO1994/013322
(87)国際公開日　平成6年6月23日(1994.6.23)
審査請求日　平成12年12月5日(2000.12.5)
(31)優先権主張番号　9225448.1
(32)優先日　平成4年12月4日(1992.12.4)
(33)優先権主張国　英国(GB)

(73)特許権者
バイオビトラム・アクテイエボラーグ
スウエーデン国、エス・エー－１１２　７６・ストツクホルム
(74)代理人
弁理士　川口　義雄
(74)代理人
弁理士　小野　誠
(74)代理人
弁理士　一入　章夫
(74)代理人
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人
弁理士　相馬　貴昌

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ポリマー－生物活性物質結合体の改良合成法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリマーと生物活性を有する物質との結合体であって、該物質の活性ドメインがポリマーと結合しておらず、該物質が蛋白分解酵素であるとき、ポリマーはポリエチレングリコール以外のものであることを特徴とする前記結合体を製造する方法であって、
（ａ）前記生物活性を有する第１の物質を、第１の物質の活性ドメインと特異的に結合する第２の物質と接触させる段階と、
（ｂ）ポリマーを、第２の物質が結合した第１の物質に結合させる段階と、
（ｃ）ポリマーを結合させた第１の物質から第２の物質を除去する段階とを含む前記方法。
【請求項２】
第１の物質がモノクローナル抗体又はそのフラグメントであり、第２の物質が抗イデオタイプ抗体又は、モノクローナル抗体もしくはそのフラグメントが結合する抗原である請求項１に記載の方法。
【請求項３】
第１の物質がヒトTNFαに対して特異的な非ヒトモノクローナル抗体であり、第２の物質が対応する抗イデオタイプ抗体である請求項２に記載の方法。
【請求項４】
第１の物質がTNFαであり、第２の物質がTNFαと結合する抗体である請求項１に記載の方法。

【請求項５】
前記TNFαがヒトTNFαであり、第２の物質が対応する非ヒトモノクローナル抗体である請求項４に記載の方法。
【請求項６】
第２の物質が結合した第１の物質に結合させるポリマーがポリ（エチレングリコール）又はＮ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドポリマーである請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
請求項１乃至６のいずれか一項に記載の方法によって製造される結合体。
【請求項８】
前記物質がタンパク質又は糖タンパク質である請求項７に記載の結合体。
【請求項９】
前記物質がモノクローナル抗体又はそのフラグメントである請求項７に記載の結合体。
【請求項１０】
前記物質がTNFαに特異的な抗体である請求項７に記載の結合体。
【請求項１１】
前記抗体がヒトTNFαに特異的な抗体である請求項10に記載の結合体。
【請求項１２】
前記抗体がモノクローナル抗体である請求項10又は11に記載の結合体。
【請求項１３】
抗体がmAb78である請求項11に記載の結合体。
【請求項１４】
前記物質がTNFαである請求項７に記載の結合体。
【請求項１５】
TNFαがヒトTNFαである請求項14に記載の結合体。
【請求項１６】
ポリマーが不活性、合成、水溶性ポリマーキャリアーである請求項７～15のいずれか一項に記載の結合体。
【請求項１７】
ポリマーが、ポリ（エチレングリコール）（PEG）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アミノ酸）、ジビニルエーテル無水マレイン酸、エチレン－無水マレイン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド及びデキストランポリマー類から選択される請求項７に記載の結合体。
【請求項１８】
請求項７～17のいずれかに記載の結合体を含む医薬組成物。
【請求項１９】
医薬的に許容可能なキャリアー及び／又は希釈剤を含む請求項18に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
本発明は、ポリマーと生物活性物質の結合体の製造方法に関する。
過去十年間に治療薬又は診断薬として慣用的に臨床使用されるようになったタンパク質の数は着実に増加している（例えば、waldmann,T.A.,Science,252:1657－1662,1991;Jaffe,H.S.及びSherwin,S.A.,Drugs of Today,25:311－320,1989;並びにFoon,K.A.,Cancer Research,49:1621－1639,1989参照）。しかしながら、これらの物質の多くの効力は主に２つの理由で制限されている。
まず第１に、in vivo半減期が多くの場合は非常に短い（例えば、Ｍühlradt，Ｐ．Ｆ．及びＯpitz，Ｈ．Ｇ．，European Journal of Immunology,12:983－985,1982;Jacobs,C.A.,Lynch,D.H.,Roux,E.R.,Miller,R.,Davis

,B.,Widmer,M.B.,Wignall,J.,VanderBos,T.,Park,L.S.及びBeeckmann,M.P.,Blood,77:2396－2403,1991;並びにBlick,M.,Sherwin,S.A.,Rosenblum,M.及びGutterman,J.,Cancer Research,47:2986－2989,1987参照）。

第２に、異種タンパク質の場合には第１の問題に加えて別の問題がある。これは、異種タンパク質が被処置種の免疫系により外来物質（抗原）として認識され、免疫応答を誘発するので、第２回目の投与後に異種タンパク質の薬理活性が失われることに起因する（例えば、Shawler,D.L.,Bartholomew,R.M.,Smith,L.M.及びDillman,R.O.,Journal of Immunology,135:1530－1535,1985;Schroff,R.W.,Foon,K.A.,Beatty,S.M.,Oldham,R.K.及びMorgan,A.C.,Cancer Research,45:879－885,1985;並びにTraub,U.C.,De Jager,R.L.,Primus,F.L.,Losman,M.及びGoldenberg,D.M.,Cancer Research,48:4002－4006,1988参照）。

これらの理由から、上記問題の一方又は両方を解決する方法、即ちタンパク質のin vivo半減期を延長し、被処置種に対して異種タンパク質の場合にその抗原性を低下させる方法が求められている。既に試みられているアプローチの１つとしては、タンパク質を可溶性合成ポリマー類、特にポリ（エチレングリコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アミノ酸）、ジビニルエーテル無水マレイン酸、エチレン－無水マレイン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド及びデキストランと結合させる方法がある（例えば、Abuchowski,A.,Van Es,T.,Palczud,N.C.及びDavis,F.F.,Journal of Biological Chemistry,11,3578－3581,1977;Yasuda,Y.,Fujita,T.,Takakura,Y.,Hashida,M.,及びSezaki,H.,5hemistry and Pharmaceutical Bulletin 38,2053 2056,1990;Fagnani,R.,Hagan,M.S.及びBartholomew,Cancer Research 50,3638－3645（1990）;Suck,J.M.及びWild,B.S.US－Ａ－3679653,1972;Flanagan,P.A.,Duncan,R.,Rihova,B.,Subr,V.及びKopece,J.,Journal of Bioactive and Compatible Polymers 5,151－166,1990参照）。

40種を越えるタンパク質が主にポリ（エチレングリコール）を使用して修飾されているが、他の種々のポリマーを使用しても免疫原性の低下及びタンパク質の安定性を実現できることが報告されている。特にこのアプローチは、アルギナーゼ、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ガラクトシダーゼ、リパーゼ、プロウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、トリプシン及びウリカーゼを含む酵素（例えばNucci,M.L.,Shorr,R.及びAbuchowski,A.,Advanced Drug Delivery Reviews 6,133－151,1991;Veronese,F.M.,Caliceti,P.,Pastorino A.,Schisvon,o.,及びSartore.,Journal of Controlled Release 10,145－154,1989参照）；インターロイキン２及びヒト顆粒球コロニー刺激因子等のサイトカイン及び成長因子（例えばKatre,N.V.,Journal of Biological Chemistry 144,209－213,1990;Tanaka,H.,Satake－Ihikawa,R.,Ishikawa,M.,Matsuki,S.及びAsano,K.,Cancer Research 51,3710－3714,1991参照）、並びに抗体（例えばKitamura,K.,Takahashi,T.,Yamaguchi,T.,Noguchi,A.,Takashina,K.Tsurumi,H.,Inagake,M.,Toyokuni,T.及びHakomori,S.,Cancer Research 51,4310－4315,1991参照）を修飾するために使用されている。

ポリマーを生物活性タンパク質分子と結合する方法は多数のものが既に記載されている（例えばUS－Ａ－4179337、US－Ａ－4732863,Jacson C.－J.,Charlton,J.L.,Kuzminski,K.,Lang,G.M.及びSehon A.H.,Analytical Biochemistry 165,114－127,1987;Veronese,F.M.,Largajolli,R.,Boccu,E.,Benassi,C.A.及びSchiavon,O.,Applied Biochemistry and Biotechnology 11,141－152,1985;WO93/15189参照）。

しかしながら、結合に現在使用可能な方法には主に２つの欠点がある。まず第１に、通常ではWO93/15189に記載されているVeroneseのアプローチを除き、報告されている誘導体化手順は本来ランダムであるので、治療上又は診断上望ましい活性を媒介する分子ドメインにポリマー部分が導入されることになる。従って、分子はin vivo半減期の延長と、異種タンパク質の場合には免疫原性の低下を獲得できるが、所望の生物活性の多大又は完全な損失という犠牲を払わなければならない（例えば、Kitamura,K.,Takahashi,T.,Yamaguchi,T.,Noguchi,A.,Noguchi,A.,Takashima,K.－i.,Tsurumi,H.,Inagake,M.,Toyokuni,T.及びHakanori,S.－i.,Cancer Research,51:4310－4315,1991;並びにMaiti,P.K.,Lang.G.M.及

びSehon,A.H.,International Journal of Cancer,Supplement 3:17－22,1988参照）。

抗体と酵素の場合には、特に生物活性を生じるために修飾タンパク質を高分子物質又はレセプターと接触させることが不可欠である場合にポリマー結合後の生物活性の損失が観察された。他方、活性を媒介する領域がポリマー誘導体化に適した官能基を含まない場合、及び／又はポリマー分子の結合が低分子量酵素基質の接近を立体的に妨げない場合には、酵素活性の不活性化は必ずしもポリマー結合の結果ではないことが判明した。

実際に、アデノシンデアミナーゼ及びＬ－アスパラギナーゼ等の酵素はポリエチレングリコールと首尾よく結合されている（例えば、Hershfield,M.S.,Buckley,R.H.,Greenberg,M.L.,Melton,A.L.,Schiff,R.,Hatem,C.,Kurtzberg,J.,Markert,M.L.,Kobayashi,R.H.,Kobayashi,A.L.,及びAbuchowski,A.,The New England Journal of Medicine,316:589－596,1987;並びにTeske,E.,Rutteman,G.R.,van Heerde,P.及びMisdorp,W.,European Journal of Cancer,26:891－895,1990参照）。１例（アデノシンデアミナーゼ）では、結合産物はヒトにおける臨床使用を認可されている。しかしながら、こうした例は一般的というよりはむしろ例外である。

ポリマー－タンパク質結合体の合成に関連する第２の問題は、形成される産物の不均一性であった。ポリマーは本来不均一であり、任意サンプル内で一定範囲の分子量を示し、即ち多分散系であり、更に、任意調製物は修飾すべきタンパク質と結合するために利用可能な官能基の数において同様に不均一性を示す。従って、結合反応中に多数の異なる産物を形成する可能性がある。タンパク質の実質的な生物活性の維持を確保するためにはタンパク質修飾度を最小とするように注意深く制御する必要があると同時に、必要な免疫原性の低下とタンパク質安定化を助長するために十分な数のポリマー分子を導入する必要があるため、従来、この問題は一層悪化していた。

本発明によると、ポリマーとそのドメインにより媒介される生物活性を有する第１の物質との結合体の製造方法が提供され、該方法は、

（ａ）第１の物質を、第１の物質の前記ドメインと特異的に結合する第２の物質と接触させる段階と、

（ｂ）ポリマーを、第２の物質が結合した第１の物質に結合させる段階と、

（ｃ）ポリマーと結合させた第１の物質から第２の物質を除去する段階とを含み、

第１の物質がトリプシン、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミン、キモトリプシン、エラスターゼ及びカリクレインから選択されるタンパク分解酵素であるとき、ポリマーはポリエチレングリコール以外のものである。

この方法によると著しい改善が可能である。本発明の方法は、ポリマーと治療上又は診断上有用な分子との結合に起因する利点、即ちin vivo半減期の延長と異種タンパク質の場合の免疫原性の低下との利点を維持する。更に、所望の生物活性は失われず、均一産物が得られる。

本発明は、誘導体化する第１の物質の所望の生物活性を媒介するドメインを特異的に認識する第２の物質を利用するものである。第２の物質は特異的結合剤物質とみなすことができる。ポリマー結合を実施する前に第１の物質を特異的結合剤と相互作用させる。この結果、第１の物質の所望の生物活性を媒介する第１の物質のドメインは遮蔽され、従って、ポリマーによる誘導体化に利用できなくなる。特異的結合剤から溶離後、生物活性を完全に維持しながらポリマーと第１の物質との結合体を回収することができる。

第１の物質は所望の活性を有する任意分子であり得る。第１の物質は生理的活性物質であり得る。第１の物質は典型的にはタンパク質又は糖タンパク質等の有機高分子種である。第２の物質は第１の物質の活性を媒介する第１の物質の部位と結合する。こうして、第２の物質は第１の物質の活性部位を保護する。

本発明は広く適用することができる。第１の物質は抗体もしくは抗体フラグメント、サイトカイン、抗原、酵素、リガンド又はレセプターであり得る。第２の物質は夫々抗原もしくは抗イディオタイプ抗体、レセプターもしくは抗サイトカイン抗体、抗体、酵素基質、レセプター又はリガンドであり得る。いずれの場合も第２の物質は第１の物質と特異的に

結合し、第１の物質の活性の原因となる第１の物質のドメインを遮蔽する。第１の物質と第２の物質の組み合わせの例を以下に挙げる。

1.第１の物質がモノクローナル抗体（mAb）（抗イディオタイプ抗体及び抗抗イディオタイプ抗体を含む）又はmAbフラグメント（例えばFab'及びF（ab）$_2$フラグメント）であるとき、第２の物質はmAbもしく又はmAbフラグメント又は抗体（イディオタイプ抗体、抗イディオタイプ抗体、抗抗イディオタイプ抗体を含む）が結合する抗原であり得る。第１の物質を構成するmAb又はmAbフラグメントは、任意の適切な抗原、例えばヒト腫瘍壊死因子α（hu TNFα）に対して特異的であり得る。mAbフラグメントは非ヒトでもよく、例えばマウスmAb又はmAbフラグメントである。

2.第１の物質をタンパク質とし、第２の物質を該タンパク質の活性部位と特異的に結合するリガンドとしてもよい。第１の物質は、プロウロキナーゼ（pro－UK）、ウロキナーゼ（UK）又は組織プラスミノーゲンアクチベーター（tPa）等の繊維素溶解酵素でもよいし、ストレプトキナーゼ等の繊維素溶解物質でもよいし、β－グルクロニダーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ビリルビンオキシダーゼ又はスーパーオキシドジスムターゼ等の非プロテアーゼ酵素でもよい。第２の物質は、第１の物質の特異的活性部位に対するmAbであり得る。あるいは、第２の物質は第１の物質が通常相互作用するリガンドでもよい。例えば、

－第１の物質をストレプトキナーゼ又はヒルジンとし、第２の物質がプラスミノーゲン又はトロンビンとしてもよいし、

－第１の物質を成長因子（例えばFGF、EGF、PDGF、HGH又はHGF）、成長因子レセプター、リンホカインもしくはサイトカイン（例えばインターフェロン、インターロイキン、刺激因子、TNFα又はTNFβ）、又はリンホカインもしくはサイトカインレセプターとし、第２の物質をそれぞれ対応する成長因子レセプター、対応する成長因子、対応するリンホカインもしくはサイトカインレセプター、又は対応するリンホカインもしくはサイトカインとする。

第２の物質は低分子量リガンドでもよい。これは一般に、酵素活性を有する全治療用タンパク質とタンパク分解酵素に該当する。治療用タンパク質は繊維素溶解酵素（例えばプロUK、UK又はtPA）であり、第２の物質はベンズアミジン又はその誘導体であり得る。ヘパリン結合タンパク質、例えば成長因子（例えばFGF又はHGF）を第１の物質とし、典型的には低分子量と負電荷を有するヘパリンもしくはヘパリン様分子又はヘパリン誘導体を第２の物質としてもよい。

あるいは、第１の物質はペプチドリガンドと相互作用するタンパク質であり得る。これは任意の治療用タンパク質に該当し得る。第１の物質はDNA結合タンパク質であり、第２の物質はDNA又はオリゴヌクレオチドであり得る。

場合により、第１の物質の２つの別々のドメインにより媒介される生物活性を維持することが望ましい場合もある。その場合には、２つの生物活性ドメインの一方を各々認識する２種の特異的結合剤を使用することにより、両者生物活性を維持することができる。例えば、腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体は、一方ではその可変領域を介して抗原と結合し、他方ではその不変領域を介してキラー細胞（Ｋ細胞）に結合することにより関連ターゲット細胞を死滅させる。Ｋ細胞はこの点で、腫瘍生成ターゲット細胞を破壊する溶解プロセスの実際のエフェクターとなる。このプロセスは抗体依存性細胞毒性と呼称される。

この場合には、モノクローナル抗体と両者細胞型（腫瘍細胞とＫ細胞）との結合を維持することが望ましい。これは本発明によると、一方では腫瘍関連抗原で抗原結合領域を遮蔽し、他方ではモノクローナル抗体の不変領域のＫ細胞レセプターでＫ細胞の結合部位を遮蔽した後に、結合ステップを実施することにより達せられる。

従って、第１の物質の活性ドメインは第２の物質により保護される。こうして第１の物質をポリマーに結合させることができる。一般に、ポリマーは不活性、合成、ポリマーキャリヤーである。ポリマーは通常は水溶性である。

ポリマーはポリ（エチレングリコール）（PEG）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビ

ニルアルコール）、ポリ（アミノ酸）、ジビニルエーテル無水マレイン酸、エチレン－無水マレイン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド又はデキストランであり得る。ポリマーは使用前にそれ自体誘導化又は活性化してもよい。PEG化は、例えばモノメトキシポリエチレングリコール－スクシンイミジルスクシネート（mPEG）を使用して実施することができる。例えばUS－Ａ－4179337、US－Ａ－4732864、WO91/01758、WO91/15242、US－Ａ－4935465及びUS－Ａ－4415665に従い、当業者に既知の方法に類似の方法を使用してカップリングすることができる。

一般に、第１の物質に対して過剰モルのポリマーを使用する。本発明によると、モル過剰は１～500倍であり、機能活性を損失しなければそれ以上でもよい。結合は、結合手順中に第１の物質が第１の物質から解離しないような条件下で実施しなければならない。第１の物質が抗体であり、第２の物質が抗イディオタイプ抗体であるとき、反応媒体のpHは約７、典型的には約6.3～約7.8、特に約7.2である。好ましくは結合は、生物活性物質の免疫活性の低下又は半減期の延長を得るための置換レベルでポリマーが第１の物質と結合されるような条件下で実施する。当業者には、多数の他のポリマーをこの目的に使用できることが理解されよう。好適態様によると、ポリマー結合ステップ中に保護を与える特異的結合剤を、まず最初に固相（例えばカラム充填材料、例えばセファデックス又はアガロースビーズ）又は表面（例えば反応容器）と共有結合させる。こうすると、ポリマーで誘導体化した第１の分子を特異的結合剤から溶離により分離することができる。誘導体化した第１の物質を含有する流体相を、特異的結合剤が共有結合している固相から分離する。このような分離は、多数の他の手段でも実施することができる。例えば、第２の特異的結合剤（例えばストレプトアビジン）によりそれ自体認識され得る第３の分子（例えばビオチン）で特異的結合剤自体を誘導体化する。第２の特異的結合剤を固相に結合し、ポリマー誘導体化した第１の分子を第２の特異的結合剤－固相カラムに通すことにより第１の特異的結合体－第３の分子複合体から分離すると、溶離後、カラムにはポリマー誘導体化した第１の分子でなく第１の特異的結合剤－第３の分子複合体が保持される。ポリマーを結合させた第１の物質は、任意の適当な方法で第２の物質から分離し得る。脱保護は、第２の物質が第１の物質の活性ドメインから解離するような条件を提供することにより達せられる。ポリマーを結合させた抗体と抗イディオタイプ抗体との複合体は、pHを酸性又はアルカリ性のpHに調節することにより解離させることができる。

以下、実施例により本発明を説明する。

添付の図面中、

図１は、増加濃度のmAb78の存在下で1ng/mlのhuTNFαがLM細胞に及ぼす細胞毒性を示す。ｘ軸はmAb78濃度をng/mlで示し、ｙ軸は,1ng/mlのhuTNFα及び種々の濃度のmAb78の存在下でのLM細胞の生存率（％）を示す。図１には、1ng/mlのhuTNFαが50％細胞毒性を発揮するときのmAb78の濃度が示されている（6.7ng/ml）。

図２は、LM細胞において1ng/mlのhuTNFαが50％細胞毒性を発揮するときのmAb78または未保護のmAb78－mPEG結合体の濃度をng/mlで示す（ｙ軸）。（１）mAb78;（２）３倍モル過剰量のmPEGを添加して誘導体化した未保護のmAb78（mAb78＋mPEG3×）；（３）mAb78＋mPEG　15×；（４）mAb78＋mPEG　62.5×；（５）mAb78＋mPEG　125×；（６）mAb78＋mPEG　250×；（７）mAb78＋mPEG300×；（８）mAb78＋mPEG　500×。

図３は、LM細胞において1ng/mlのhuTNFαが50％細胞毒性を発揮するときのmAb78、未保護のmAb78－mPEGまたは保護されたmAb78－mPEGの濃度をng/mlで示す（ｙ軸）。（１）疑似誘導体化mAb78;（３）（mAb78濃度を基準に計算して）15倍モル過剰量のmPEGを添加して誘導体化した未保護のmAb78;（２）（mAb78＋mAb2の濃度を基準に計算して）15倍モル過剰量のmPEGを添加して誘導体化した、保護されたmAb78;（５）未保護のmAb78＋mPEG　100×；（６）（mAb78＋マウスIgGの濃度を基準に計算して）100倍モル過剰量のmPEGを添加して誘導体化した未保護のmAb78＋マウスIgG;（４）保護されたmAb78＋mPEG　100×；（７）（１）と同じ；（８）（４）と同じ；（９）（５）と同じ；（10）（１）と同じ；（12）未保護のmAb78＋mPEG　500×；（11）保護されたmAb78＋mPEG　500×。

図４は、マウスIgG特異的ELISAにおけるmAb78、未保護mAb78－mPEGまたは保護mAb78－mPE

G結合体の検出を示す。A:（●）疑似誘導体化mAb78;（△）100倍モル過剰量のmPEGを添加して誘導体化した未保護mAb78（未保護mAb78＋mPEG　100×）；（○）100倍モル過剰量のmPEGを添加して誘導体化した保護mAb78。B:（●）疑似誘導体化mAb78;（△）未保護mAb78＋mPEG　500×；（○）保護mAb78＋mPEG　500×。ｘ軸:mAb78の濃度（ng/ml）。ｙ軸:O.D.単位。

図５は、未保護のhuTNFα－mPEGによるか、または不溶化抗huTNFα　mAb78を用いて保護されたhuTNFα－mPEGによる、^{125}I－huTNFαの組換えTNF－R1レセプターへの結合の阻害を示す。ｙ軸：競合物質の量（μｇ）。

■

はhuTNFαを示し、

▨

はhuTNFα－PEG30×を示し、

▩

は保護huTNFα－PEG30×を示す。

本発明の別の目的は、ポリマーと、抗腫瘍壊死因子α抗体、好ましくはヒトTNFαに対するモノクローナル抗体との結合体を提供することである。

上記ポリマーは通常は不活性の合成ポリマー担体（またはキャリヤー）である。該ポリマーは一般に水溶性である。好ましい本発明のポリマーの例としては、ポリ（エチレングルコール）（PEG）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（アミノ酸）、ジビニルエーテル無水マレイン酸、エチレン－無水マレイン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドまたはデキストランが挙げられる。

TNFに対するモノクローナル抗体はヒトまたは非ヒト抗体であり得るが、典型的には欧州特許出願公開第0492488号明細書に記載のごときmAb78である。

本発明のポリマーとTNFに対するモノクローナル抗体との結合体は、当業者には公知の疾患及び投与経路に従って、ヒトを含む哺乳動物に投与し得る。

本発明のポリマーと抗腫瘍壊死因子α抗体との結合体は、TNFα及び／またはTNFβが病因作用を発揮することが知られている疾患状態において予防及び／または治療のために、ヒトを含む哺乳動物に使用し得る。典型的にはこのような疾患状態は、カヘキシー、敗血症性ショック、移植片対宿主疾患、AIDS、脳性マラリア、慢性関節リウマチ、慢性及び急性炎症性疾患、心筋虚血、並びにその他のTNFα及び／またはTNFβが有害な役割を果たすことが既に知られているかまたは今後知られるであろうものである。例えば、PEG－mAb78付加物については、敗血症性ショックを治療するには体重1kg当たり約0.5～約20mgの用量を成人に非経口投与することができる。担当医によって選択された用量及び投与パターンで、組成物を一回または複数回投与することができる。いずれの場合も、医薬製剤は、患者を効果的に治療したり予防処置するのに十分な抗体量を与えるべきである。

本発明は更に、適当な担体及び／または希釈剤と、有効成分としてのポリマーとTNFαに対する抗体、好ましくはヒトTNFαに対するモノクローナル抗体との結合体とを含む医薬組成物を提供する。

本発明の結合体は、医薬上容認可能な担体及び／または希釈剤と一緒に適量の結合体を含ませることにより、公知の方法に従って製剤化し得る。

以下、考え得る製剤の例を与える：

（凍結乾燥前の組成）

1.有効薬物　約0.05%～約0.5%w/v
増量剤＊　約2.50%～約5.0%w/v
界面活性剤＊＊　約0.0025%～約0.025%w/v
pH調整剤＊＊＊　pH6.5～７とするのに十分な量
を含むPEG－mAb78結合体凍結乾燥製剤；

2.有効薬物　約0.05%～約0.5%w/v
界面活性剤＊＊　約0.0025%～約0.025%w/v
pH調整剤＊＊＊　pH6.5～７とするのに十分な量

W.F.I 適量
を含むPEG－mAb78結合体「即使用可能」製剤。
等張水溶液を作製するため、外部物質（例えば塩化ナトリウム、ソルビトールまたはデキストロース）を等張レベルで添加してもよい。
＊ 例えば：ラクトースまたはマンニトール；
＊＊ 例えば：ポリソルベートまたはポロクサマー；
＊＊＊ 例えば:NaOH0.01Nまたは7HCl0.01N;
W.F.Iは注射用水を意味する。
実施例１
抗イディオタイプmAb2の作製
抗イディオタイプモノクローナル抗体（mAb2）を既に記載されているように作製した（M.Monestier,Cancer Research 49:123－126,1989）。BALB/Cマウスを、完全フロイントアジュバント中の精製BSA－mAb78 100μg/マウスを用いてi.p.注射によって２回免疫した。更に試験動物を、PBS中のBSA－mAb78 100μg/マウスを用いてi.p.によって２週間おきに３回追加免疫した。
最後の免疫の３日後に試験動物を犠牲にし、それらの脾細胞を標準方法（Galfre,C.Methods of Enzymology 73;3－46,1981）に従って非分泌性マウスミエローマNSOに融合した。
増殖したハイブリドーマ由来の培養上清を、抗イディオタイプ抗体の存在についてELISAによってスクリーニングした。
簡単に述べると、ヤギ抗マウスIgをリン酸緩衝液pH7.2で10μg/mlに希釈し、ポリ塩化ビニルの平底マイクロ滴定プレート（Falcon 3912）に添加した（100μl/ウェル）。
４℃で一晩インキュベートした後、プレートに100μl/ウェルのBSA（PBS中１％）を室温で３時間満たした。
培養上清を加え（50μl/ウェル）、37℃で１時間インキュベートした。
洗浄後、ビオチニル化mAb78（PBS－0.05％Tween－１％BSA中0.25μg/ml）を加え、37℃で１時間インキュベートした。洗浄後、PBS－Tween－BSA中0.25μg/mlのアビジン－ペルオキシダーゼ（Vector Laboratories,Burlingame,CA）を、37℃で１時間かけて加えた。十分に洗浄した後、100μｌのペルオキシダーゼ基質（OPD2,Chemicon,SCI,Rome,イタリア,1個の錠剤を5mlのクエン酸緩衝液中に溶解したもの,OPD4,Chemcon）を各ウェルに加えた。２分後に100μl/ウェルの4M H_2SO_4を用いて反応を停止させ、492nmにおける光学密度を読み取った。
mAb78のhuTNFαに対する結合を妨害し得る抗イディオタイプモノクローナル抗体の産生に対して選択された陽性ハイブリドーマの１つを限界希釈法により２回クローニングした。抗イディオタイプモノクローナル抗体（mAb2）を産生するクローン65を増殖（expand）し、産生されたmAb2を上清から精製し、後述の実施例２の実験ではこれを使用してmAb78のhuTNFαへの結合部位を保護した。
実施例２
1.方法
1.従来方法に従うmPEGによるmAb1の誘導体化
このために400μｇのmAb78（欧州特許出願公開第0492488号明細書;mAb1）を1mlのPBS（リン酸緩衝塩水溶液）pH7.2中で、種々のモル過剰量のmPEG（モノメトキシ－ポリエチレングリコールスクシンイミジルスクシネート,Polymer Labs.,Church Stretton、UK）の存在下または不在下で30分間インキュベートした。mAb78はhuTNFαに対するmAbである。１つのケースでは、保護誘導体化に使用した抗イディオタイプmAb2に等価の量（800μg,下記参照）のマウスIgGを添加し、モル過剰量のmPEGは、mAb78＋マウスIgGの濃度を基準に計算した。インキュベート終了時点でウシ血清アルブミン（BSA,Armour,Kankakee,イリノイ）を終濃度0.5％まで加え、反応しなかった遊離mPEGをクエンチした。
2.mAb2の固相への共有結合
このために5mgのmAb2をCNB_r活性化セファロース（Pharmacia LKB,Uppsala,スウェーデン

）に製造業者指示に従って結合させた。
3.mPEGによるmAb78の保護誘導体化
セファロースに結合したmAb2（800μｇ）を400μｇのmAb78と一緒に1mlのPBS pH7.2中で一定撹拌しながら、室温で４時間インキュベートした。次いで遠心してから、ビーズ－ペレットを、mPEGを含まないかまたは（mAb78＋mAb2濃度を基準に計算した）種々のモル過剰量のmPEGを含む1mlのPBS pH7.2中に、同じ条件下で30分間再懸濁した。セファロースに結合したmAb78/mAb2複合体を４回遠心し、グリシン－HCl,pH4緩衝液中に再懸濁し、再度遠心し、グリシン－HCl,pH2.8緩衝液中に５分間再懸濁し、mAb78を溶出した。最後の遠心後に上清を回収し、pHを中性に調整し、溶出したmAb78を市販キット（Bio－Rad Micro－Assay,Segrate,イタリア）を用いて製造業者指示に従って定量した。次いでBSAを終濃度0.5%まで加え、反応しなかった遊離mPEGをクエンチした。
4.mAb78またはmAb78－mPEG結合体の中和活性の測定
対数増殖期０日目のマウスLM細胞（Rubin,B.Y.ら,J.Exp.Med.,162:1099（1985））をトリプシン処理し、遠心し、５%FCS及び2mMグルタミンを補充したイーグルの最小必須培地1ml当たり３×10^5細胞の終濃度で再懸濁させた（完全MEM）。
この懸濁液100μｌを平底マイクロタイタープレート（Falcon 3072）のウェルに加えた。ウェルに添加したあとの終濃度が1ng/mlとなるようなhuTNFα（Fsquire Chemie,Zuerich,スイス）の完全MEMの希釈液を準備した。
mAb78またはmAb78－mPEG結合体を完全MEMで希釈し、終濃度200ng/ml～0.35ng/mlとなるようウェルに添加した。
50μｌの希釈huTNFαを、各々50μｌのmAb78もしくはmAb78－mPEG結合体希釈物または50μｌの完全MEMと一緒に、37℃で２時間インキュベートした。このインキュベーションの間にアクチノマイシンＤ（Fluka,Buchs,スイス）を含む溶液を完全MEMを用いて準備した。
ウェルに添加したあとのアクチノマイシンＤの終濃度は２μg/mlであった。インキュベーション終了時、mAb78－huTNFαまたはmAb78－mPEG結合体－huTNFα混合物と50μｌのアクチノマイシンＤとをマイクロタイタープレートのウェルに添加した。幾つかのウェルには100μｌのhuTNFαのみを添加した。幾つかの対照ウェルにはアクチノマイシンＤ及び完全MEMのみを添加した。次いでプレートを37℃で24時間インキュベートした。
インキュベーション後、PBS中5mg/mlのMTT（CALBIOCHEM 589511－La Jolla－CA）の新たな溶液を調製し、40μｌを各ウェルに移した。プレートを５%CO_2下37℃で４時間インキュベートした。インキュベーション終了後、培地を吸引した。DMSO（CARLO ERBA－ITALY）を添加し（200μl/ウェル）、激しく２～３回ピペッティングした。
次いで分光光度計において570nmでプレートを読み取った。
データは光学密度（OD）単位で表わされた。OD値は、対照ウェル（アクチノマイシンＤのみ）の値に対する%値で示された。
かかる%値を、ELISA－Soft PCプログラム（PERKIN－ELMER－NORWALK,CT USA）によって処理し、1ng/mlのhuTNFαの存在下で50%細胞毒性を与えるmAb78の濃度を決定した。
5.mAb78またはmAb78－mPEG結合体の測定のためのELISA
平底マイクロタイタープレートに、40mMリン酸緩衝液,pH7.4で希釈したヤギ抗マウスIg（Biosys,Compiegne,フランス,1μg/ウェル）を100μl/ウェルで添加した。４℃で一晩インキュベートした後、吸収されなかった抗体を除去し、１%BSAを補充したPBS,pH7.2を各ウェルに添加し、空いていたプラスチック部位を満たした。更にプレートを室温で３時間インキュベートし、次いで、0.1%Tween20（Merck,Schuchardt,hohenbrunn,FRG）及び0.01%メルチオラート（BDH,Pool,GB）を補充したPBS,pH7.2である洗浄用緩衝液（WB）で３回洗浄した。このインキュベーションの間に、mAb78またはmPEG－mAb78結合体の連続２倍希釈系列を調製した。全ての希釈物はPBS,pH7.2,1%BSAで作製した。各希釈物50μｌをウェルに添加し、プレートを37℃で60分間インキュベートし、次いで上記のごとき洗浄した。
次に、WBで1:2000に希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG（Biosys,Compiegne,フランス）100μｌを各ウェルに添加し、プレートを37℃で45分間インキュベートし、上

記のごとく洗浄した。次いで100μｌのペルオキシダーゼ基質（OPD2,Chemicon,SCI,Rome,イタリア,1個の錠剤を5mlのクエン酸緩衝液中に溶解したもの,OPD4,Chemcon）を各ウェルに添加した。室温で２分間反応させ、次いで100μl/ウェルの4M H_2SO_4を添加することにより発色を止めた。プレートELISA読取り装置において492nmで発色の程度を読み取った。

2.結果

従来方法に従うmPEGによるmAb1の誘導体化

分子（従来方法に従って作製される結合体）の非特異的ポリマー誘導体化がその生物学的活性に及ぼす影響を評価するため、本発明者らはhuTNFαに対するmAb1をモデル系として選択した。このmAb1（mAb78;欧州特許出願公開第0492488号明細書）はマウスLM細胞におけるhuTNFαの細胞毒性を中和する。即ち、かかる細胞毒性アッセイにおいて、1ng/mlのhuTNFαは85～90%のLM細胞を死滅させる。1ng/mlのhuTNFαを増加濃度のmAb78と一緒にインキュベートすると、細胞毒性の用量依存性阻害が認められる（図１）。このアッセイにおいて、1ng/mlのhuTNFαは、6.7ng/mlのmAb78の存在下で50%細胞毒性を発揮した。

次いで本発明者らは、種々のモル比のmPEG/mAb78を使用し、（従来方法に従って作製した）mAb78とmPEGの結合体を合成した。増加濃度の各mAb78－mPEG結合体の濃度を1ng/mlのhuTNFαと一緒にインキュベートし、50%細胞毒性が認められたときの各結合体の濃度を決定した。図２さら判るように、50%細胞毒性を与えるのに必要なmAb78－mPEG濃度の増加とmPEG/mAb78D結合体のモル比の増加とには相関がある。使用した最高の比（500:1）においては、mAb78－mPEG濃度49ng/mlで50%細胞毒性が認められた。これらの結果から、従来のmAb78のポリマー誘導体化では、結合ステップに使用するmPEG/mAb78のモル比を増加すると生物学的活性の損失が大きくなることが判る。このことは、1ng/mlのhuTNFαの細胞毒性を85～90%から50%まで低下させるのに必要なmAb78－mPEG濃度が増加したことに現れている。

本発明に従うmPEGによるmAb1の保護誘導体化

本発明に従いmAb78の抗原（huTNFα）結合領域がポリマー誘導体化から保護される条件下で結合ステップを実施するために、本発明者らは、mAb78のhuTNFαへの結合を妨害し、その結果mAb78によるhuTNFαの中和を妨害する抗イディオタイプmAb（mAb2）を利用した。この特性により、mAb2が結合過程でhuTNFα結合に関与するmAb78ドメインを遮蔽し、それによってmAb78の抗原（huTNFα）結合及び中和活性が保存されることが保証される。

本発明者らは、15:1、100:1、500:1のmPEG/mAb78＋mAb2比で、mAb2による保護の存在下でmAb78を誘導体化した。誘導体化されたmAb78は0.1Mグリシン－HClpH2.8で溶出して回収した。

実施した３つの実験の結果を表１及び図３に示す。本発明者らは各実験に対照として疑似誘導体化mAb78、即ち上記サンプルと同じ処理を実施したが、但しmPEGは加えないmAb78を含めた。更に別の対照として各実験に、従来方法に従って誘導体化したmAb78、即ちmAb2によって保護が与えられていないものも含めた。また実験２では、保護誘体化に使用されるmAb2と等価の濃度のマウスIgGの存在下で保護せずに誘導体化したmAb78を対照とした。これらの結果から、mAb2によって保護が与えられずにmAb78が誘導体化された場合は、マウスIgGの存在下であろうと不在下であろうと、予想された中和活性の低下が認められたことが判る。他方で、本発明に従って実施された誘導体化は、生物学的活性が完全に保存されたmAb78－mPEG結合体を回収し得た。かかる結果から、本発明に従う、即ち特異的結合体との相互作用によって活性領域が保護された生物活性分子のポリマー誘導体化は、結合ステップにおいて、所望の生物学的活性を完全に回復し得ることが判る。

保護及び未保護mAb78－mPEG結合体の抗マウスIgG抗体による認識

取扱うべき種に対して異種であるポリマー誘導体化タンパク質は、非誘導体化タンパク質を投与して産生される抗体にはかなり認識されにくいことが従来から良く知られている（概論は、Fuertges,F.及びAbuchowski,A.,Journal of Controlled Release,11:139－148,1990参照）。

従って本発明者らは、mAb2によって保護されていないかまたは保護されたmAb78－mPEG結合体と抗マウスIgG抗体との反応性をELISAにおいて比較した。かかる抗体は、IgGイソタ

イプの全てのマウス抗体に共通の抗原決定基と反応し、従って、IgG1,k抗体であるmAb78とも反応する。図４から判るように、mAb78－mPEG結合体の反応性は保護のあるものもないものも、未結合のmAb78と比較して同様に低下したことが判る。

実施例３

方法

1. 従来技術に基づくmPEGによるhuTNFαの誘導体化

このために、200μｇの組換えヒトTNF－α（WOC Ltd.Vaduz,Luxemburg;比活性:3.2×10^{7}ユニット/mg;純度：＞97%）を、異なるモル過剰のmPEG（メトキシポリエチレングリコール－塩化シアヌル;Sigma M3277,Milano,Italy）の不在下又は存在下、0.2mlの25mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）中で３時間インキュベートした。インキュベーション終了後、PBS（pH7.2）で平衡化したSephacryl S2000カラム（Pharmacia,Uppsala,Sweden）上でのゲル濾過によりmPEG過剰分を除去した。タンパク質濃度を市販キット（Bio－Rad Micro－assay,Segrate,Italy）により製造業者の指示に従って定量した。

2. mAb 78の固相との共有結合

このため、製造業者の指示に従って2mgのmAb 78を1mlのAFFI－ゲル10（Bio－Rad,Segrate,Italy）に結合した。

3. mPEGによるhuTNFαの保護誘導体化

Sepharose結合mAb 78（400μｇ）を、1mlのPBS（pH7.2）中、100μｇのhuTNFαと共に、定速回転下、室温で４時間インキュベートした。次いで、遠心分離及び洗浄を行った後、ビーズ－ペレットを同一条件下、25mMホウ酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）中に３時間再度懸濁させ、異なるモル過剰のmPEGを添加した（mAb 78＋huTNFα濃度を基準に計算）。Sepharose結合huTNFα/mAb78複合体を４回洗浄し、次いで万能緩衝液（6.7mMクエン酸、6.7mMオルトリン酸、11.4mMオルトホウ酸）（pH3.0）に再度懸濁させて、huTNFαを溶離した。最後の遠心分離を行った後、上清を収集し、中性pHに調整し、溶離したhuTNFαを市販キット（Bio－Rad Micro－assay,Segrate,Italy）により製造業者の指示に従って定量した。mPEGの取り込みを、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で平衡化したSuperose 6 HR 10/30カラム（Pharmacia,Uppsala,Sweden）上でのHPLC分析により、天然タンパク質と比べた分子量の増加として評価した。市販の分子量標準（Bio－Rad cat.151－1901;Milan,Italy）を用いてカラムを検量した。

4. 55kDaヒトTNFレセプターの細胞外ドメインのクローニング及び発現

ポリ－ヒスチジンコドンに結合したp55レセプターの細胞外ドメインであるヒト組換えTNFαレセプター（分子量19kd）が、Fountoulakis M.等が記載した手順（1990,J.B.C.265,13268－13275）に従ってFarmitalia Carlo Erba,Milan italyによりクローニング、産生され、（SDS－PAGEでの測定では95%を越える程度に）精製されて、均質化された。発表されている55kDaレセプターのヌクレオチド配列（Gray等,1990 PNAS USA 87,7380－7837）に従って設計された２個の合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いてλ gallライブラリー（Clontech）をスクリーニングすることにより、55kDaヒトTNFレセプターのcDNAを単離した。55kDa TNFRの細胞外ドメインをコードするcDNAを、polyHisテールとフレーム内で（inframe）融合したpQEシリーズ型IVのプラスミド（DIAGEN GmbH－Hilden－Germany）にクローニングした。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で増幅した後に、cDNAを挿入した。PCRプライマーを選択して、pQE9ポリリンカー中に存在する部位と相容性の制限部位を導入した。更には、細胞外ドメインの最後のアミノ酸に対応するヌクレオチドの後で翻訳終止コドンを作成した。プラスミドpFC228をK12誘導大腸菌株M15（pREP4）に形質転換した。新しい株はFICE 284と名付けた。5.THFα－mPEG結合体と不溶化組換えTNF－R1レセプターとの結合を測定するためのラジオイムノアッセイ

丸底マイクロタイタープレートを、FICE 284（0.1M炭酸塩緩衝液pH9.6中120ng/ウェル）から得たようなTNF－R1レセプターの組換え外部ドメイン0.1mlでコーティングした。４℃で一晩インキュベートした後、プレートをWBで３度洗浄し、室温で１時間１％BSAでオーバーコーティングし、前述のように洗浄した。次いで、プレートに、^{125}I－huTNFα（比活性:40.3μCi/μg;NEN Dreieich,W.Germany）50μｌ及び連続２倍希釈系列のhuTNFα、

非保護huTNFα－mPEG又は不溶化mAb 78で保護したhuTNFα－mPEG50μｌを添加した。２時間インキュベートした後、プレートをWBで３度洗浄し、各ウェルに存在する放射能をγカウンターで測定した。

結果

従来技術に基づくmPEGによるヒトTNF－αの誘導体化

非特異的ポリマー誘導体化がhuTNFαに及ぼす作用を評価するため、10倍、20倍及び30倍モル過剰のmPEGとhuTNFαとの一連の結合体を調製し、これらを細胞毒性アッセイ及びhuTNFαレセプターとの結合アッセイで試験した。マウスLM細胞を用いて、天然及び誘導体化huTNFαの細胞毒性活性を測定した。誘導体化huTNFαは、天然タンパク質に比べて細胞毒性の実質的な用量依存的減少を示した（表２）。結合アッセイで試験すると、全ての結合体は不溶化ヒトTNFαレセプターから^{125}I－huTNFαの結合を置換する能力の実質的な損失を示した（表５）。天然分子の量に対して100倍高い濃度で試験した場合の結合体が50％の放射能を置換し得るときでもmPEG－huTNFαとレセプターとの結合の損失は明白であった。

本発明に基づくmPEGによるhuTNFαの保護誘導体化

モノクローナル抗体による保護がhuTNFαとその特異レセプターとの結合部位に及ぼす作用を評価するため、huTNFαを不溶化mAb 78に結合した後に、huTNFαとmPEGとの一連の結合体をmPEG10倍及び30倍モル過剰（mAb 78＋huTNFα濃度を基準に計算）で調製した。huTNFαの細胞毒性活性を中和し得る後者のモノクローナル抗体は恐らく、レセプターによるサイトカインの認識に関与するエピトープを認識する。誘導体化した後、産物をHPLCで分析した。保護した結合体も保護していない結合体も共に、天然TNF－α（34Kd）よりも実質的に大きい分子量（128Kd）を示した。マウスLM細胞を用いて保護誘導体化huTNFαの細胞毒性活性を測定した。保護した結合体は、保護していない同類の結合体に比べて良好な生物活性保持を示した（表２）。更には、保護した結合体は、保護していない同類の結合体よりもかなり低濃度で、^{125}I－huTNFαと不溶化組換えヒトTNFαレセプターとの結合を置換することが可能であった（図５）。

従って、所望の生物活性を媒介するドメインが特異的結合剤との相互作用によって保護される本発明の生物活性分子のポリマー誘導体化では、非誘導体化分子に対する抗体との反応性が大幅に減少し、また従来技術で実施された誘導体化の場合に観察されるのと同様の減少が見られると結論づけることができる。しかしながら、後者の場合、これは、望ましい生物活性のかなりの低下を犠牲にして得られるが、本発明で得られる結合体では、生物活性は保持される。

表１

1ng/mlのhuTNFαがLM細胞に対して50％の細胞毒性活性を示す、mAb78、非保護mAb78-mPEG結合体又は保護mAb78-mPEG結合体の濃度

		濃度(ng/ml)
	mAb78[a]	6.7
	非保護mAb78+mPEG 15x[b]	23.6
	非保護mAb78+mPEG 100x	41.61
１．実験	非保護mAb78+マウス IgG	
	+mPEG 100x[c]	37.32
	保護mAb78+mPEG 15x[d]	7.0
	保護mAb78+mPEG 100x	7.16
	mAb78	6.93
２．実験	非保護mAb78+mPEG 100x	39.06
	保護mAb78+mPEG 100x	7.06
	mAb78	7.2
３．実験	非保護mAb78+mPEG 500x	49.0
	保護mAb78+mPEG 500x	7.8

a　擬似誘導体化mAb78

b　15倍モル過剰のmPEG（mAb78濃度を基準に計算）を添

加して誘導体化した非保護mAb78

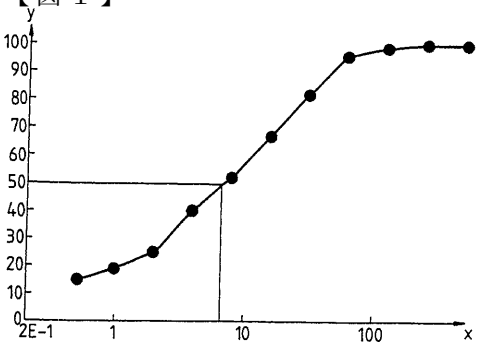
c　100倍モル過剰のmPEG（mAb78+マウスIgG濃度を基準に計算）を添加して誘導体化した非保護mAb78+マウスIgG

d　15倍モル過剰のmPEG（mAb78濃度及び特異的結合剤mAb2濃度を基準に計算）を添加して誘導体化した保護mAb78

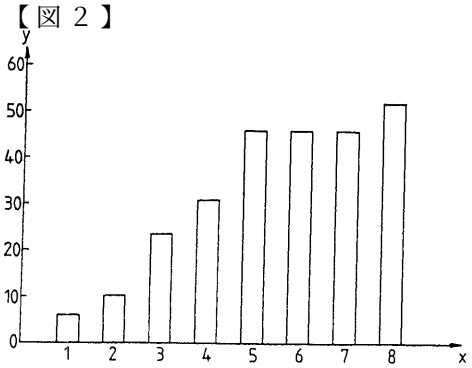
表２－ＬＭ細胞に対して５０％の細胞毒性を示す保護及び非保護ＴＮＦα－ｍＰＥＧの用量

mPEG（塩化シアヌル）	huTNFα - mPEG	保護 huTNFα-mPEG
0	0.03 ng/ml	0.03 ng/ml
10x	1.09 ng/ml	0.14 ng/ml
20x	3.90 ng/ml	-
30x	5.40 ng/ml	0.25 ng/ml

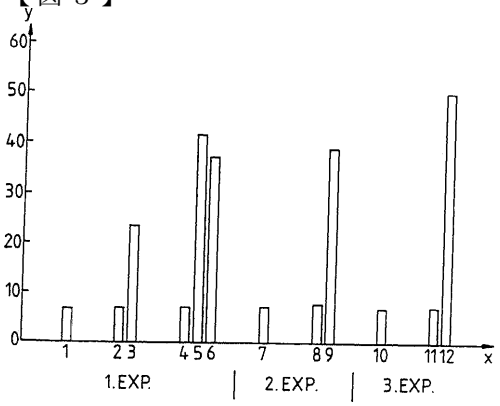
【図１】



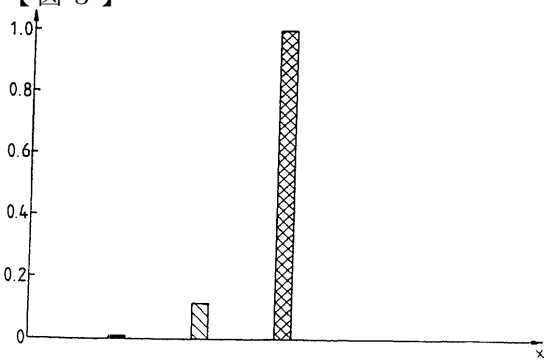
【図２】



【図３】

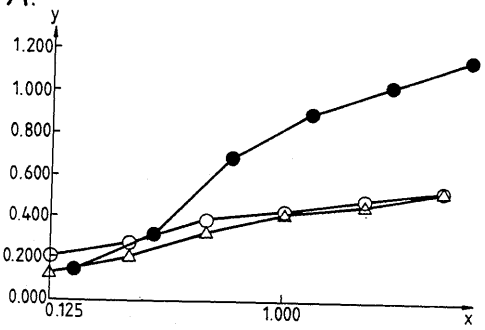


【図５】

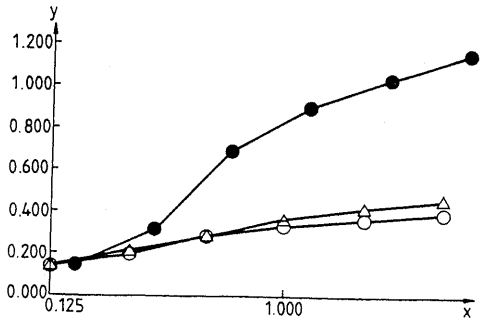


【図４】

A.



B.



フロントページの続き

(72)発明者　マルクツチ，フアブリツイオ
イタリー国、２００２５・レグナーノ（ミラン）、ピアツツア・デル・カロツチオ・２３
(72)発明者　グレゴリー，ルース
イタリー国、２０１２４・ミラン、ビアレ・ビツトリオ・ベネート・１２

審査官　伊藤　幸司

(56)参考文献　特表平０７－５０２９００（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－２０１１６２（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
A61K 47/48
A61K 38/00