(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-19519
(P2016-19519A)
(43)公開日　平成28年2月4日(2016.2.4)

(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
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4H045

審査請求 有　請求項の数 7　ＯＬ　（全 85 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-134150 (P2015-134150)
(22)出願日　平成27年7月3日 (2015.7.3)
(62)分割の表示　特願2011-88687 (P2011-88687)の分割
原出願日　平成13年8月7日 (2001.8.7)
(31)優先権主張番号　60/223,360
(32)優先日　平成12年8月7日 (2000.8.7)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/236,826
(32)優先日　平成12年9月29日 (2000.9.29)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　09/920,137
(32)優先日　平成13年8月1日 (2001.8.1)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　509087759
ヤンセン　バイオテツク，インコーポレーテツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０４４ホーシヤム・リツジビユードライブ８００／８５０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100093676
弁理士　小林　純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100149010
弁理士　星川　亮

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗－ＴＮＦ抗体、組成物、方法および使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】特定の配列を有する少なくとも１つの抗-腫瘍壊死因子アルファ（TNF）抗体、及び、前記抗体の作成法と使用法の提供。
【解決手段】特定の配列を有する少なくとも１つの抗-TNF抗体、前記抗体をコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子、前記核酸分子を含む組換えベクター、及び、前記核酸分子又は前記ベクターを含む宿主細胞。前記抗体及び医薬的に許容されるキャリアー又は希釈剤を含んで成る組成物、及び、前記抗体を含む診断用又は治療用組成物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号:16，17，18のアミノ酸配列をそれぞれ有するmAb TNV148の重鎖相補性決定領域(CDR)1，2，3；および
配列番号:22，23，24のアミノ酸配列をそれぞれ有するmAb TNV148の軽鎖CDR1，2，3を含む抗体。
【請求項２】
請求項1記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子。
【請求項３】
請求項2記載の核酸分子を含む組換えベクター。
【請求項４】
請求項2記載の核酸分子または請求項3記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項５】
請求項1記載の抗体、および医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。
【請求項６】
請求項1記載の抗体を含む、診断用または治療用組成物。
【請求項７】
免疫関連疾患治療用の請求項6記載の組成物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（技術分野）

発明の背景

発明の分野
本出願は、2000年8月7日に出願された米国特許仮出願第60/223,360号および2000年9月29日に出願された同第60/236,826号に一部基づき、そしてその優先権を主張する（この各々は引用により全部、本明細書に編入する）。
【０００２】
本発明は少なくとも１つの腫瘍壊死因子アルファ（TNF）タンパク質またはそれらのフラグメントに特異的な特定部分または変異体を含む抗体、ならびにそのような抗-TNF抗体をコードする核酸、相補的核酸、ベクター、宿主細胞、および治療用の製剤、投与およびデバイスを含むそれらの作成および使用法に関する。
関連分野
TNFアルファは、17kDタンパク質サブユニットの可溶性のホモ三量体である（Smith et al.,J.Biol.Chem.262:6951-6954(1987)）。膜に結合した26kDのTNFの前駆体形態も存在する（Kriegler et al.,Cell 53:45-53(1988)）。TNFの総説に関しては、Beutler et al.,Nature 320:584(1986);Old,Science 230:630(1986);およびLe et al.,Lab.Invest.56:234(1987)を参照にされたい。
【０００３】
単球またはマクロファージ以外の細胞もTNFアルファを生産する。例えば、ヒト非単球腫瘍細胞系はTNFアルファを生産する（Rubin et al.,J.Exp.Med.164:1350(1986);Spriggs et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:6563(1987)）。CD4+およびCD8+末梢血Ｔリンパ球および幾つかの培養したＴおよびＢ細胞系（Cuturi et al.,J.Exp.Med.165:1581(1987);Sung et al.,J.Exp.Med.168:1539(1988);Turner et al.,Eur.J.Immunol.17:1807-1814(1987)）もTNFアルファを生産する。
【０００４】
TNFアルファは、軟骨および骨の分解（Saklatvala,Nature 322:547-549(1986);Bertolini,Nature 319:516-518(1986)のような組織損傷、接着分子の誘導、血管内皮細胞に対す

る前凝血（procoagulant）活性の誘導（Pober et al.,J.Immunol.136:1680(1986)）、好中球およびリンパ球の接着の上昇（Pober et al.,J.Immunol.138:3319(1987)）、およびマクロファージ、好中球および血管内皮細胞から血小板活性化因子の放出の刺激（Camussi et al.,J.Exp.Med.166:1390(1987）を生じる前-炎症作用を引き起こす。

【０００５】

最近の証拠は、TNFアルファを感染（Cerami et al.,Immunol.Today 9:28(1988)）、免疫障害、新生物の病理学（Oliff et al.,Cell 50:555(1987)）、自己免疫病理学および移植片対宿主病（Piguet et al.,J.Exp.Med.166:1280(1987)）と関連づけている。TNFアルファとガンおよび感染性の病理学との関連は、しばしば宿主の異化状態に関係する。体重の減少に苦しむガン患者は通常、食欲不振と関連している。

【０００６】

ガンおよび他の疾患に伴う激しい消耗は、「悪液質」として知られている（Kern et al.,J.Parent.Enter.Nutr.12:286-298(1998)）。悪液質には進行性の体重減少、食欲不振および悪性の増殖に応答して痩せた身体（body mass）の持続的な衰退を含む。この悪液質的状態がガンのより病的な状態および死亡率を高める。TNFアルファがガン、感染性の病理および他の異化状態の悪液質に関与しているという証拠がある（例えば、Beutler and Cerami,Ann.Rev.Immunol.7:625-655(1989)を参照にされたい）。

【０００７】

TNFアルファは、熱、不定愁訴、食欲不振および悪液質を含むグラム－陰性敗血症およびエンドトキシンショックにも中心的な役割を果たすと考えられている（Michie et al., Br.J.Surg.76:670-671(1989);Debets et al.,Second Vienna Shock Forum,p.463-466(1989);Simpson et al.,Crit.Care Clin.5:27-47(1989)）。エンドトキシンは、TNFアルファおよび他のサイトカインの単球／マクロファージ生産および分泌を強力に活性化する（Kornbluth et al.,J.Immunol.137-2585-2591(1986)）。TNFアルファおよび他の単球に由来するサイトカインは、エンドトキシンに対する代謝的および神経ホルモン的応答を媒介する（Michie et al.,New Engl.J.Med.318:1481-1486(1988)）。エンドトキシンのヒトの有志への投与は、熱を含む流感様の症状、頻脈、代謝速度の上昇およびストレスホルモンの放出を含む急性の病気を生じる（Revhaug et al.,Arch.Surg.123:162-170(1998)）。グラム－陰性敗血症に罹患している患者において、循環しているTNFアルファは上昇する（Waage et al.,Lancet 1:355-357(1987);Hammerle et al.,Second Vienna Shock Forum,p.715-718(1989);Debets et al.,Crit.Care Med.17:489-497(1989);Calandra et al.,J.Infect.Dis.161:982-987(1990)）。

【０００８】

このように、TNFアルファは炎症疾患、自己免疫疾患、ウイルス、細菌および寄生体の感染、悪性および／または神経変性的疾患に深く関与し、そして慢性関節リウマチおよびクローン病のような疾患の特異的な生物学的治療に有用な標的である。TNFアルファに対するキメラモノクローナル抗体（cA2）を用いたオープン-ラベル試験での有益な効果が、炎症の抑制および慢性関節リウマチ（Elliott et al.,Arthritis Rheum.36:1681-1690(1993);およびElliott et al.,Lancet 344:1125-1127(1994)）、およびクローン病（Van Dullemen et al.,Gastroenterology 109:129-135(1995)）における再発後に、成功裏の再処置であると報告された。cA2を用いた無作為の二重盲検プラセボ-対照実験の有益な結果でも、慢性関節リウマチで炎症の抑制が報告された（Elliott et al.,Lancet 344:1105-1110(1994)）。カケクチン（後にTNFと同一であることが分かった）と特性づけられた「モジュレーター」物質に対する抗体が、Cerami et al.,（欧州特許出願公開第0212489号明細書、1987年3月4日）により開示された。そのような抗体は、診断的イムノアッセイおよび細菌感染におけるショックの治療に有用であると言われた。Rubin et al.（欧州特許出願公開第0218868号明細書、1987年4月22日）はヒトTNFに対するモノクローナル抗体、そのような抗体を分泌するハイブリドーマ、そのような抗体の生産法、およびそのような抗体のTNFのイムノアッセイにおける使用を開示した。Yone et al.（欧州特許出願公開第0288088号明細書、1988年10月26日）は、mAbsを含む抗-TNF抗体、およびそれらの病気（特に、

川崎病および細菌感染)のイムノアッセイ診断における用途を開示した。川崎病（幼児の急性熱性の皮膚粘膜リンパ節症候群；Kawasaki,T.Allergy 16:178(1967);Kawasaki,T.Shonica (Pediatrics)26:935(1985))の患者の体液は、病気の進行に伴ってレベルが上昇するTNFを含むと言われた（Yone et al.,同上）。

【０００９】

他の研究者はインビトロで活性を中和した組換えヒトTNFに特異的なmAbsを記載した（Liang,C-M.et al.,(Biochem.Biophys,Res.Comm.137:847-854(1986);Meager,A.et al.,Hybridoma 6:305-311(1987);Fendly et al.,Hybridoma 6:359-369(1987);Bringman,T.S.et al.,Hybridoma 6:489-507(1987);Hirai,M.et al.,J.Immunol.Meth.96:57-62(1987);Moller,A.et al.,(Cytokine 2:162-169(1990))。これらのmAbsの中にはヒトTNFのエピトープをマップし、そして酵素イムノアッセイを開発し（Fendly et al.、同上；Hirai et al.、同上；Moller et al.、同上）、そして組換えTNFの精製を補助するために使用されたものもある（Bringman et al.,同上）。しかしこれらの研究は、免疫原性、特異性および／または医薬品としての適性の欠如から、ヒトにおけるインビボでの診断または治療的使用に使用することができる、TNFを中和する抗体を生産する基礎は提供していない。

【００１０】

TNFに対する中和抗血清またはmAbsは、ヒト以外の哺乳動物で悪い生理学的変化を排除し、そして実験的な内毒素症および菌血症で致命的な攻撃後の死を防ぐことが示された。この効果は例えば齧歯類の死亡率アッセイおよび霊長類の病気のモデル系で証明された(Mathison J.C.et al.,J.Clin.Invest.81:1925-1937(1988);Beutler,B.et al.,Science 229:869-871(1985);Tracey,K.J.et al.,Nature 330:662-664(1987);Shimamoto,Y.et al.,Immunol.Lett.17:311-318(1988);Silva,A.T.et al.,J.Infect.Dis.162:421-427(1990);Opal,S.M.et al.,J.Infect.Dis.161:1148-1152(1990);Hinshaw,L.B.et al.,Circ.Shock 30:279-292(1990))。

【００１１】

hTNFの推定される受容体結合部位がEck and Sprang(J.Biol.Chem.264(29),17595-17605(1989)）により開示され、彼らはアミノ酸11～13、37～42、49～57および155～157から成るようなTNF-aの受容体結合部位も同定した。国際公開第91/02078号明細書（優先日、1989年8月7日）は、以下のエピトープを有するモノクローナル抗体に結合することができるTNFリガンドを開示する：1～20、56～77および108～127の少なくとも１つ；1～20、56～77、108～127および138～149の少なくとも２つ；1～18、58～65、115～125および138～149のすべて；1～18および108～128のすべて；56～79、110～127および135～または136～155のすべて；1～30、117～128および141～153のすべて；1～26、117～128および141～153のすべて；22～40、49～96または～97、110～127および136～153のすべて；12～22、36～45、96～105および132～157のすべて；1～20および76～90の両方のすべて；22～40、69～97、105～128および135～155のすべて；22～31および146～157のすべて；22～40および49～98のすべて；22～40、49～98および69～97の少なくとも1つ、22～40および70～87の両方。

【００１２】

非ヒト哺乳動物、キメラ、ポリクローナル（例えば抗-血清)および/またはモノクローナル抗体（Mabs）およびフラグメント（例えばそれらのタンパク質溶解的消化または融合タンパク質生成物）は、幾つかの場合で特定の疾患を処置するために試され調査された有望な治療薬である。しかしそのような抗体またはフラグメントは、ヒトに投与した時に免疫応答を誘導し得る。そのような免疫応答は、免疫複合体が媒介する循環からの抗体またはフラグメントのクリアランスを生じる可能性があり、しかも治療のために反復投与を不適とし、これにより患者に対する治療的利益を減らし、抗体またはフラグメントの再投与を限定する。例えば非ヒト部分を含んで成る抗体またはフラグメントの反復投与は、血清病および／またはアナフラキシーを導き得る。これらのおよび他の問題を回避するために、当該技術分野ではそのような抗体およびそれらの部分の免疫原性を下げるために周知なキメラ化およびヒト化を含む多くの取り組みが行われてきた。しかしこれらのおよび他の

取り組みは、幾らかの免疫原性、低い親和性、低いアビディティーをまだ有する抗体またはフラグメントを生成し、あるいは細胞培養、スケールアップ、生産および／または低収量に問題がある。すなわちそのような抗体またはフラグメントは、製造または治療用タンパク質としての使用に理想的に適するものではない。

【００１３】

したがって、これらの１以上の問題を克服し、ならびに既知の抗体またはそれらのフラグメントが改良された抗-TNF抗体またはフラグメントを提供する必要がある。

【００１４】

発明の要約

本発明は、当該技術分野で既知である事柄と組み合わせて本明細書に記載し、そして可能とされる、単離されたヒト、霊長類、齧歯類、哺乳動物、キメラ、ヒト化および／またはCDR-移植化抗-TNF抗体、免疫グロブリン、それらの開裂産物および他の特定部分および変異体、ならびに抗-TNF抗体組成物、コードするまたは相補的核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、製剤、デバイス、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物およびそれらの作成および使用法を提供する。

【００１５】

また本発明は、本明細書に記載する少なくとも１つの単離された抗-TNF抗体を提供する。本発明の抗体は限定するわけではないが、重または軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（CDR）、またはそれらのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレイムワーク領域、または本発明の抗体に包含することができるそれらの任意の部分のような少なくとも１つの免疫グロブリン分子の部分を含んで成る任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。本発明の抗体は、限定するわけではないがヒト、マウス、ウサギ、ラット、齧歯類、霊長類またはそれらの任意の組み合わせ等のような任意の哺乳動物を含むか、または由来することができる。

【００１６】

１つの観点では、本発明は少なくとも１つの特定した配列、ドメイン、部分またはそれらの変異体を含んで成る、特異的な抗-TNF抗体をコードするポリヌクレオチドを含んで成る、それに相補的またはハイブリダイズする単離された核酸分子を提供する。さらに本発明は、該抗-TNF抗体核酸分子を含んで成る組換えベクター、そのような核酸および／または組換えベクターを含む宿主細胞、ならびにそのような抗体核酸、ベクターおよび／または宿主細胞の作成および／または使用法を提供する。

【００１７】

本発明の少なくとも１つの抗体は、少なくとも１つのTNFタンパク質、サブユニット、フラグメント、部分またはそれらの任意の組み合わせに特異的な少なくとも１つの特定したエピトープに結合する。少なくとも１つのエピトープは、該タンパク質の少なくとも１つの部分を含んで成る少なくとも１つの抗体結合領域を含んで成ることができ、このエピトープは好ましくは、限定するわけではないが該タンパク質の少なくとも１つの機能的、細胞外、可溶性、親水性、外部または細胞質ドメインまたはそれらの任意の部分のような、それらの少なくとも１つの部分の少なくとも１～５アミノ酸から成る。

【００１８】

少なくとも１つの抗体は、場合により少なくとも１つの相補性決定領域（CDR）（例えば重または軽鎖可変領域のCDR1、CDR2またはCDR3）および／または少なくとも１つの定常または可変フレイムワーク領域またはそれらの任意の部分の少なくとも１つの特定した部分を含んで成ることができる。少なくとも１つの抗体のアミノ酸配列は、さらに場合により本明細書に記載するかまたは当該技術分野で既知の少なくとも１つの特定した置換、挿入または欠失を含んで成ることができる。

【００１９】

また本発明は、本明細書に記載する少なくとも１つの単離された抗-TNF抗体を提供し、ここで抗体は限定するわけではないがTNFが誘導する細胞接着分子の阻害、TNFの受容体への結合の阻害、マウスモデルにおける関節炎指数の向上（例えば実施例３～７を参照にさ

れたい）のような少なくとも１つの活性を有する。抗-TNF抗体はこのように、限定するわけではないがTNFタンパク質に対する少なくとも１つの生物学的活性のような対応する活性について既知の方法に従いスクリーニングすることができる。

【００２０】

本発明はさらに、本発明の少なくとも１つのTNF抗体に対する少なくとも１つのTNF抗-イディオタイプ抗体を提供する。抗-イディオタイプ抗体には限定するわけではないが、少なくとも１つの重または軽鎖の相補性決定領域（CDR）またはそれらのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレイムワーク領域、または本発明の抗体に包含することができるそれらの任意の部分のような免疫グロブリン分子の少なくとも部分を含んで成る分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを含む。本発明の抗体は限定するわけではないがヒト、マウス、ウサギ、ラット、齧歯類、霊長類等のような任意の哺乳動物を含むか、またはそれらに由来することができる。

【００２１】

１つ観点では本発明は、少なくとも１つの特定した配列、ドメイン、部分またはそれらの変異体を含んで成る少なくとも１つのTNF抗-イディオタイプ抗体をコードするポリヌクレオチドを含んで成る、相補的またはハイブリダイズする単離された核酸分子を提供する。本発明はさらに、該TNF抗-イディオタイプ抗体をコードする核酸分子を含んで成る組換えベクター、そのような該核酸および／または組換えベクターを含む宿主細胞、ならびにそのような抗-イディオタイプ抗体核酸、ベクターおよび／または宿主細胞の作成および／または使用法を提供する。

【００２２】

また本発明は、少なくとも１つの抗-TNF抗体、またはTNF抗-イディオタイプ抗体を宿主細胞中で発現させる少なくとも１つの方法を提供し、この方法は本明細書に記載する宿主細胞を、少なくとも１つの抗-TNF抗体が検出可能かつ／または回収可能な量で発現する条件下で培養することを含んで成る。

【００２３】

また本発明は、（ａ）本明細書に記載の単離された抗-TNF抗体をコードする核酸および／または抗体；および（ｂ）適当なキャリアーまたは希釈剤を含んで成る少なくとも１つの組成物を提供する。キャリアーまたは希釈剤は場合により、既知のキャリアーまたは希釈剤に従い医薬的に許容され得る。組成物は場合によりさらに少なくとも１つのさらなる化合物、タンパク質または組成物を含んで成ることができる。

【００２４】

さらに本発明は、当該技術分野で既知であり、かつ／または本明細書に記載するように、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも１つのTNF関連状態を調節(modulate)または処置するために治療に有効量を投与するため、および／または関連する状態の前、後または最中に投与するための少なくとも１つの抗-TNF抗体法または組成物を提供する。

【００２５】

また本発明は、本発明に従い治療的または予防的に有効量の少なくとも１つの抗-TNF抗体を送達するための少なくとも１つの組成物、デバイスおよび／または方法を提供する。

【００２６】

さらに本発明は当該技術分野で既知であり、かつ／または本明細書に記載するように、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも１つのTNF関連状態を診断するため、および／または関連状態の前、後または最中に診断するための少なくとも１つの抗-TNF抗体法または組成物を提供する。

【００２７】

また本発明は本発明に従い診断するための少なくとも１つの抗-TNF抗体の少なくとも１つの組成物、デバイスおよび／または送達法も提供する。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】ハイブリドーマ細胞上清中のTNV mAbが、TNF∀の組換えTNF受容体への結合を阻

害する能力のアッセイを示すグラフ表示である。既知の量のTNV mAbを含有する種々の量のハイブリドーマ細胞上清を、固定濃度（５ng/ml）の^{125}Ｉ標識TNF∀とプレインキューベーションした。混合物は、p55-sf2、組換えTNF受容体／IgG融合タンパク質を前以てコートした96-ウェルOptiplateに移した。mAbの存在下でp55受容体に結合したTNF∀の量は、非結合材料を洗浄した後に、そしてガンマカウンターを使用して測定した。８種のTNV mAbサンプルをこれらの実験で試験し、簡便にするためにDNA配列分析により他のTNV mAb（5.2.2章を参照にされたい）の１つと同一であると分析される３種のmAbは、ここで示していない。各サンプルは二重（duplicate）で試験した。示す結果は２つの独立した実験の代表例である。

【図２Ａ】TNV mAb重鎖可変領域のDNA配列を示す。示した生殖細胞系遺伝子はDP-46遺伝子である。'TNVs'は、示した配列がTNV14、TNV15、TNV148およびTNV196の配列であることを示す。TNV配列中の最初の３個のヌクレオチドは、翻訳開始Metコドンを定める。TNV mAb遺伝子配列の点線は、ヌクレオチドが生殖細胞系配列中のものと同じであることを示す。TNV配列の最初の19ヌクレオチド（下線を引いた）は、可変領域をPCR増幅するために使用したオリゴヌクレオチドに対応する。成熟mAbで始まるアミノ酸翻訳（１文字略号）は、生殖細胞系遺伝子についてのみ示す。生殖細胞系のアミノ酸翻訳における３種のCDRドメインを太字および下線で示す。TNV148(B)と標識した系は、示した配列がTNV148およびTNV148Bの両方に属することを示す。生殖細胞系DNA配列（CDR3）中のギャップは、知られていないか、または生殖細胞系遺伝子には存在しない配列による。TNV mAb重鎖はJ6連結領域を使用する。

【図２Ｂ】TNV mAb重鎖可変領域のDNA配列を示す。示した生殖細胞系遺伝子はDP-46遺伝子である。'TNVs'は、示した配列がTNV14、TNV15、TNV148およびTNV196の配列であることを示す。TNV配列中の最初の３個のヌクレオチドは、翻訳開始Metコドンを定める。TNV mAb遺伝子配列の点線は、ヌクレオチドが生殖細胞系配列中のものと同じであることを示す。TNV配列の最初の19ヌクレオチド（下線を引いた）は、可変領域をPCR増幅するために使用したオリゴヌクレオチドに対応する。成熟mAbで始まるアミノ酸翻訳（１文字略号）は、生殖細胞系遺伝子についてのみ示す。生殖細胞系のアミノ酸翻訳における３種のCDRドメインを太字および下線で示す。TNV148(B)と標識した系は、示した配列がTNV148およびTNV148Bの両方に属することを示す。生殖細胞系DNA配列（CDR3）中のギャップは、知られていないか、または生殖細胞系遺伝子には存在しない配列による。TNV mAb重鎖はJ6連結領域を使用する。

【図３】TNV mAb軽鎖可変領域のDNA配列を示す。示した生殖細胞系遺伝子はヒトカッパ生殖細胞系可変領域遺伝子のVg/38Kファミリーの代表的員である。TNV mAb遺伝子配列の点線は、ヌクレオチドが生殖細胞系配列中のものと同じであることを示す。TNV配列の最初の16ヌクレオチド（下線を引いた）は、可変領域をPCR増幅するために使用したオリゴヌクレオチドに対応する。成熟mAbのアミノ酸翻訳は（１文字略号）、生殖細胞系遺伝子についてのみ示す。生殖細胞系のアミノ酸翻訳における３つのCDRドメインを太字および下線で示す。TNV148(B)と標識した系は、示した配列がTNV148およびTNV148Bの両方に属することを示す。生殖細胞系DNA配列（CDR3）中のギャップは、知られていないか、または生殖細胞系遺伝子には存在しない配列による。TNV mAb軽鎖はJ3連結配列を使用する。

【図４】TNV mAb重鎖可変領域の推定アミノ酸配列を示す。示したアミノ酸配列（１文字略号）は、非クローン化PCR産物およびクローン化PCR産物の両方から決定したDNA配列から推定した。アミノ酸配列は分泌シグナル配列（シグナル）、フレイムワーク（FW）および相補性決定領域（CDR）ドメインに分割して示す。DP-46生殖細胞系遺伝子に関するアミノ酸配列は、各ドメインの上の行に示す。点線はTNV mAb中のアミノ酸が生殖細胞系遺伝子と同一であることを示す。TNV148(B)は、示した配列がTNV148およびTNV148Bの両方に属することを示す。'TNVs'は、示した配列が異なる配列を示さない限り、すべてのTNV mAbに属することを示す。生殖細胞系配列（CDR3）中の破線は、配列が知られていないか、または生殖細胞系遺伝子には存在しないことを示す。

【図５】TNV mAb軽鎖可変領域の推定アミノ酸配列を示す。示したアミノ酸配列（１文字

略号）は、非クローン化PCR産物およびクローン化PCR産物の両方から決定したDNA配列から推定した。アミノ酸配列は分泌シグナル配列（シグナル）、フレイムワーク（FW）および相補性決定領域（CDR）ドメインに分割して示す。Vg/38K型の軽鎖生殖細胞系遺伝子に関するアミノ酸配列は、各ドメインの上の行に示す。点線はTNV mAb中のアミノ酸が生殖細胞系遺伝子と同一であることを示す。TNV148(B)は、示した配列がTNV148およびTNV148Bの両方に属することを示す。'All'は、示した配列がTNV14、TNV15、TNV148、TNV148BおよびTNV186に属することを示す。

【図６】rTNV148B-発現C466細胞を作成するために使用した重鎖および軽鎖発現プラスミドの概略的説明を示す。p1783は重鎖プラスミドであり、そしてp1776は軽鎖プラスミドである。rTNV148B可変および定常領域コードドメインは、黒色の箱として示す。J-Cイントロン中の免疫グロブリンエンハンサーは灰色の箱として示す。関連する制限部位を示す。プラスミドはAb遺伝子の転写が時計方向に進むような方向性で示す。プラスミドp1783は19.53kb長であり、そしてp1776は15.06kb長である。両プラスミドの完全なヌクレオチド配列は既知である。p1783中の可変領域コード配列は、BsiWI/BstI制限フラグメントを置き換えることにより別の重鎖可変領域配列に容易に置き換えることができる。p1776中の可変領域コード配列は、SalI/AflII制限フラグメントを置き換えることにより別の可変領域配列に置き換えることができる。

【図７】５種のrTNV148B生産細胞系の成長曲線分析のグラフ表示を表す。培養は細胞をT75フラスコ中のI5Q＋MHX培地にまくことにより開始して（0日）、30ml容量中に1.0×10^5細胞／mlの生きている細胞密度とした。３つの実験に使用した細胞培養物は、トランスフェクションおよびサブクローニングを行うので連続培養であった。翌日、Ｔフラスコ中の細胞を徹底的に再懸濁し、そして0.3mlの培養物のアリコートを取り出した。成長曲線実験は、細胞の計数が1.5×10^5細胞／ml未満に落ちた時に終了した。アリコート中の生きている細胞数はトリパンブルーでの排除により測定し、そしてアリコートの残りは後のmAb濃度決定のために保存した。ヒトIgGに関するELISAを同時にすべてのサンプルアリコートについて行った。

【図８】変動するMHX選択の濃度の存在下で、細胞成長速度の比較のグラフ表示を示す。細胞のサブクローンC466AおよびC466BをMHXを含まない培地（IMDM、５％FBS、２mMグルタミン）に解凍し、そしてさらに２日間培養した。両細胞培養物は、MHXなし、0.2×MHXまたは1×MHXのいずれかを含む３種の培養に分割した。１日後、新しいT75フラスコに1×10^5細胞／mlの出発密度で培養にまき、そして細胞を１週間、24時間間隔で計数した。最初の5日間の倍化時間は、SOP PD32.025の式を使用して計算し、そして棒の上に示す。

【図９】２種類のrTNV148B生産細胞系に由来する期間中のmAb生産の安定性のグラフ表示を示す。トランスフェクションおよびサブクローニングを行ってから、連続培養であった細胞のサブクローンを用いて、24ウェル培養皿中での長期連続培養を始めた。細胞はMHX選択を含むか、または含まないI5Q培地で培養した。細胞は４～６日毎に培養物を分けることにより連続して継代して、新たな生きている培養を維持し、同時に前の培養物を消耗させた。消耗した細胞上清のアリコートは培養が消耗した直後に集め、そしてmAb濃度を測定するまで保存した。ヒトIgGに関するELISAを同時にすべてのサンプルアリコートについて行った。

【図１０】本発明の抗-TNF抗体に対応する関節炎マウスモデルマウスTg197の体重変化を、実施例４の対照と比較して示す。約４週齢のTg197実験マウスを性別および体重に基づき９つの処置群の１つに割り当て、そしてダルベッコのPBS（D-PBS）または１mg/kgもしくは10mg/kgのいずれかの本発明の抗-TNF抗体（TNV14、TNV148またはTNV196）を単回、腹腔内ボーラス投与で処置した。体重を投与前からの変化として分析した時、10mg/kgのcA2で処置した動物は実験を通してD-PBS-処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。この体重増加は３～７週間で有意であった。10mg/kgのTNV148で処置した動物も、実験の７週目に有意な体重増加に達した。

【図１１】図１１Ａ～Ｃは、実施例４に示す関節炎指数に基づき疾患の重篤度の進行を表す。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数は、D-PBS対照群よりも３週目から始まり、

その後の実験中、低かった（７週）。１mg/kg TNV14で処置した動物および１mg/kg cA2で処置した動物は、D-PBS処置群と比べた時に３週間後のAIに有意な減少を示すことができなかった。各々を他の同様な用量と比較した時(10mg/kg TNV14、148および196と比べた10mg/kg cA2）、10mg/kgの処置群間に有意差はなかった。１mg/kgの処置群を比較した時、１mg/kgのTNV148は１mg/kgのcA2よりも３、４および７週で有意に低いAIを示した。また１mg/kgのTNV148は、１mg/kgのTNV14-処置群よりも３および４週で有意に低かった。TNV196は実験の６週までAIにおいて有意な低下を示したが（D-PBS処置群と比較した時）、TNV148はこの実験の終了時に有意のままであったた唯一の１mg/kg処置群であった。

【図１２】実施例５の対照と比較して、本発明の抗-TNF抗体に応答する関節炎マウスモデルマウスTg197の体重変化を示す。約４週齢のTg197実験マウスを、体重に基づき８処置群の１つに割り当て、そして対照品（D-PBS）または３mg/kgの抗体（TNV14、TNV148)(０週）の腹腔内ボーラス投与を用いて処置した。注射は１、２、３および４週にすべての動物で繰り返した。群１～６は試験品の効力について評価した。群７および８において動物から得た血清サンプルは、２、３および４週にTNV14またはTNV148の免疫応答の誘導および薬物動力学的クリアランスについて評価した。

【図１３】図１３Ａ～Ｃは関節炎指数に基づく実施例５の疾患の重篤度の進行を表すグラフである。10mg/kgのcA2処置群の関節炎指数は、D-PBS対照群よりも２週目から始まり、その後の実験中、有意に低かった（５週）。１mg/kgまたは３mg/kgのcA2で処置した動物および３mg/kgのTNV14で処置した動物は、d-PBS処置群と比べた時に実験を通して任意の時点でAIに有意な低下を示すことができなかった。３mg/kgのTNV148で処置した動物は、d-PBS処置群と比べた時に３週目から始まり、その後５週まで続いて有意な減少を示した。10mg/kgのcA2で処置した動物は、実験の４および５週目でより低用量の両cA2（１mg/kgおよび３mg/kg）と比べてAIに有意な低下を示し、そしてまた３～５週目でTNV14で処置した動物よりも有意に低かった。３mg/kgの処置群間に有意差はなかったようだが、３mg/kgのTNV14で処置した動物に関するAIは同じ時点で10mg/kgよりも有意に高く、一方TNV148で処置した動物は10mg/kgのcA2で処置した動物と有意に異ならなかった。

【図１４】実施例６の対照と比較して、本発明の抗-TNF抗体に応答する関節炎マウスモデルマウスTg197の体重変化を示す。約４週齢のTg197実験マウスを、性別および体重に基づき６処置群の１つに割り当て、そして３mg/kgまたは５mg/kgのいずれかの抗体（cA2またはTNV148）の単回腹腔内ボーラス投与を用いて処置した。この実験はD-PBSおよび10mg/kgのcA2対照群を利用した。

【図１５】実施例６に与えるように、関節炎指数に基づく疾患の重篤度の進行を表す。すべての処置群が初期の時点で幾らかの保護を示し、５mg/kgのcA2および５mg/kgのTNV148は、１～３週のAIに有意な低下を示し、そしてすべての処置群が２週で有意な低下を示した。実験の後期に、５mg/kgのcA2で処置した動物は幾らかの保護を示し、４、６および７週で有意に低下した。低用量（３mg/kg）の両cA2およびTNV148は６で有意な低下を示し、そしてすべての処置群が７週で有意な低下を示した。実験の終わりまで（８週）有意な低下を維持した処置群はなかった。任意の時点で任意の処置群間（塩水対照群は除く）に有意差はなかった。

【図１６】実施例７の対照と比較して、本発明の抗-TNF抗体に応答した関節炎マウスモデルマウスTg197の体重変化を示す。TNV148（ハイブリドーマ細胞に由来する）およびrTNV148B（トランスフェクトした細胞に由来する）の単回腹腔内投与の効力を比較するために。約４週齢のTg197実験マウスを、性別および体重に基づき９処置群の１つに割り当て、そしてダルベッコPBS（D-PBS)または１mg/kgの抗体（TNV148、rTNV148B）の単回腹腔ボーラス投与を用いて処置した。

【図１７】実施例７に与えるように、関節炎指数に基づく疾患重篤度の進行を表す。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数はD-PBS対照群よりも、４週から始まり、そして残る実験を通して（８週）有意に低かった。TNV148で処置した群および１mg/kgのcA2で処置した両群は、４週でAIにおける有意な低下を示した。以前の実験（P-099-017）は、TNV148が単回の１mg/kgの腹腔内ボーラス後の関節炎指数の低下にわずかにより効果的であるこ

とを示したが、この実験ではTNV抗体の両変更体で処置した群からのAIがわずかにに高いことを示した。（６週を除き）１mg/kgのcA2で処置した群は、10mg/kgのcA2で処置した群と比べた時に有意に上昇せず、そしてTNV148で処置した群は７および８週で有意に高いが、１mg/kgのcA2、１mg/kgのTNV148および１mg/kgのTNV148B間には実験の任意の時点でAIに有意差はなかった。

【００２９】

発明の説明

本発明は単離された組換えおよび／または合成抗-TNFヒト、霊長類、齧歯類、哺乳類、キメラ、ヒト化またはCDR-移植化抗体、およびそれに対するTNF抗-イディオタイプ抗体、ならびに組成物および少なくとも１つの抗-TNF抗体または抗-イディオタイプ抗体をコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを含んで成るコード核酸分子を提供する。さらに本発明は限定するわけではないがそのような核酸および抗体および抗-イディオタイプ抗体の作成および使用法を含み、診断用および治療用組成物、方法およびデバイスを含む。

【００３０】

本明細書で使用するように、「抗-腫瘍壊死因子アルファ抗体」、「抗-TNF抗体」、「抗-TNF抗体部分」または「抗-TNF抗体フラグメント」および／または「抗-TNF抗体変異体」等は、限定するわけではないが重または軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（CDR）またはそれらのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレイムワーク領域、またはそれらの任意の部分、または本発明の抗体に包含することができるTNF受容体または結合タンパク質の少なくとも１つの部分のような、免疫グロブリン分子の少なくとも部分を含んで成る分子を含む任意のタンパク質またはペプチドを含む。そのような抗体はさらに場合により、限定するわけではないがそのような抗体が少なくとも１つのTNF活性または結合、またはTNF受容体活性または結合を、インビトロ、インシトゥーおよび／またはインビボで調節し、下げ、上げ、拮抗し、作用させ、静め、緩和し、遮断し、阻害し、排除しおよび／または妨害するように、特異的リガンドに影響を及ぼす。非限定的な例として、本発明の適当な抗-TNF抗体、特定した部分または変異体は、少なくとも１つのTNFまたは特定した部分、それらの変異体またはドメインと結合することができる。適当な抗-TNF抗体、特定した部分または変異体は場合により、限定するわけではないがRNA、DNAまたはタンパク質合成、TNF放出、TNF受容体シグナル伝達、膜TNF開裂、TNF活性、TNF生産および／または合成のような少なくとも１つのTNF活性または機能に影響を及ぼすことができる。用語「抗体」は、さらに抗体、消化フラグメント、特定した部分およびそれらの変異体を包含することを意図し、抗体模造物を含むか、または抗体もしくは特定したフラグメントまたはそれらの部分の構造および／または機能を模する抗体の部分（１本鎖抗体およびそれらのフラグメントを含む）を含んで成る。機能的フラグメントには、哺乳動物のTNFに結合する抗原－結合フラグメントを含む。例えばTNFまたはそれらの部分に結合することができる抗体フラグメント（限定するわけではないがFab（例えばパパイン消化による）、Fab'（例えばペプシン消化および部分的還元による)およびF(ab')$_2$（例えばペプシン消化による）、facb（例えばプラスミン消化による）、pFc'（例えばペプシンまたはプラスミン消化による）、Fd（例えばペプシン消化、部分的還元および再凝集による）、FvまたはscFv（例えば分子生物学的手法による）フラグメントを含む）は、本発明に包含する（例えばColligan,Immnology、同上を参照にされたい）。

【００３１】

そのようなフラグメントは、当該技術分野で既知の、かつ／または本明細書に記載するように酵素的開裂、合成または組換え法により生成することができる。抗体は、１以上の終結コドンが自然な終結部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して、種々の短縮化された形態で生成され得る。例えばF(ab')$_2$重鎖部分をコードする組み合わせ遺伝子は、CH_1ドメインおよび／または重鎖のヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計することができる。抗体の種々の部分は、通例の技法により化学的に一緒に連結することができ、または遺伝子操作法を使用して連続するタンパク質として調製することができる。

【００３２】
本明細書で使用する用語「ヒト抗体」は、タンパク質の実質的に各部分（例えばCDR、フレイムワーク、C_L、C_Hドメイン（例えばC_H1、C_H2、C_H3）、ヒンジ、（V_L、V_H））が、実質的にヒトに非免疫原性であり、わずかな配列の変化または変異があるだけの抗体を称する。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジー等）、齧歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター等）および他の哺乳動物を指定した抗体は、そのような種、亜属、属、サブ－ファミリー、ファミリーに特異的な抗体を指す。さらにキメラ抗体には上記の任意の組み合わせを含む。そのような変化または変異は場合により、そして好ましくはヒトまたは他の種での免疫原性を非－修飾抗体に比べて保持するか、または減らす。すなわちヒト抗体はキメラまたはヒト化抗体とは明らかに異なる。ヒト抗体は、機能的に再配列されたヒト免疫グロブリン（例えば重鎖および／または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核または真核細胞により生産され得ると指摘される。さらにヒト抗体が一本鎖抗体である時、これは自然なヒトの抗体中には見られないリンカーペプチドを含んで成ることができる。例えばFvは、重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を連結する２から約８個のグリシンまたは他のアミノ酸残基のようなリンカーペプチドを含んで成ることができる。そのようなリンカーペプチドは、ヒト起源であると考えられる。

【００３３】
少なくとも２つの異なる抗原に結合特異性を有する、モノクローナル、好ましくはヒトまたはヒト化された抗体である二重特異性、ヘテロ特異性、ヘテロ結合体または類似の抗体を使用することもできる。本発明の場合では、結合特異性の１つは少なくとも１つのTNFタンパク質に関し、もう１つは任意の他の抗原に関する。二重特異性抗体の作成法は、当該技術分野では既知である。従来から二重特異性抗体の組換え生産は、２つの免疫グロブリンの重－軽鎖対の同時発現に基づき、ここで２つの重鎖は異なる特異性を有する（Milstein and Cuello,Nature 305:537(1983)）。免疫グロブリンの重および軽鎖の無作為な取り合わせにより、これらのハイブリドーマ（クワドローマ）は、10種の異なる抗体分子の有望な混合物を生産し、この中の１つだけが正しい二重特異性構造を有する。通常はアフィニティクロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製はやや煩わしく、そして生成物の収量は低い。類似の方法が例えば、ＷＯ ９３／０８８２９，ＵＳ Patent Nos，６２１０６６８，６１９３９６７，６１３２９９２，６１０６８３３，６０６０２８５，６０３７４５３，６０１０９０２，５９８９５３０，５９５９０８４，５９５９０８３，５９３２４４８，５８３３９８５，５８２１３３３，５８０７７０６，５６４３７５９，５６０１８１９，５５８２９９６，５４９６５４９，４６７６９８０，ＷＯ ９１／００３６０，ＷＯ ９２／００３７３，ＥＰ ０３０８９，Traunecker et al.，ＥＭＢＯＪ．１０：３６５５（１９９１），Suresh et al.，Methods in Enzymology １２１：２１０（１９８６）に記載され、これら各々は引用により全部、本明細書に編入する。

【００３４】
本発明の方法および組成物に有用な抗-TNF抗体（TNF抗体とも呼ぶ）は場合により、TNFに対する高い親和性の結合および場合により、そして好ましくは低い毒性を特徴とすることができる。特に本発明の抗体、特定したフラグメントまたは変異体は、可変領域、定常領域およびフレイムワークのような個々の成分が個別に、かつ／または集合的に、場合により、そして好ましくは低い免疫原性を有する場合、本発明に有用である。本発明に使用することができる抗体は場合により、症状の測定可能な緩和および低いおよび／または許容できる毒性で、長期間患者を処置するそれらの能力を特徴とする。低いか、または許容できる免疫原性および／または高い親和性、ならびに他の適当な特性は、達成される治療的結果に貢献し得る。本明細書では「低い免疫原性」とは、処置した患者の約75％未満、または好ましくは約50％未満に有意なHAHA、HACAまたはHAMA応答を生じ、かつ／または処置した患者に低い力価（二重抗原酵素イムノアッセイで測定した時に約300未満、好ましくは約100未満）を生じることと定める（Elliott et al.,Lancet 344:1125-1127(1994)、引用により全部、本明細書に編入する）。

用途

本発明の単離された核酸は、少なくとも１つの抗-TNF抗体またはそれらの特定した変異体の生産に使用することができ、これは限定するわけではないが少なくとも１つの免疫障害または疾患、心血管障害または疾患、感染、悪性および／または神経障害または疾患から選択される少なくとも１つのTNF状態を診断、監視、調節、処置、緩和、発生の防止を助け、または症状を減らすために、細胞、組織、器官または動物（哺乳動物およびヒトを含む）を測定または影響を及ぼすために使用することができる。

【００３５】

そのような方法は、少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る有効量の組成物または医薬組成物を、症状、効果またはメカニズムにおいてそのような調節、処置、緩和、防止または減少が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んで成ることができる。有効量は、単回（例えばボーラス）、多回または連続投与あたり約0.001～500mg/kgの量を含んで成るか、あるいは単回、多回または連続投与あたり0.01～5000μg/mlの血清濃度の血清濃度を達成するための量を含んで成るか、あるいは本明細書に記載する、関連する技術分野で知られている既知の方法を使用してなされ、そして定められた任意の効果的な範囲または値を含んで成ることができる。

引用

本明細書に引用するすべての刊行物または特許は全部、それらが本発明のこの時点の技術の状態を示し、かつ／または本発明の説明および可能性（enablement）を提供するので参考により本明細書に編入する。刊行物とは任意の科学的または特許公報、あるいはすべての記録された、電子的または印刷形式を含む任意の媒体形式で入手できる任意の他の情報を称する。以下の技術文献は引用により全部、本明細書に編入する：Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY,(1997-2001)。

本発明の抗体

本発明の少なくとも１つの抗-TNF抗体は、場合により当該技術分野で周知な細胞系、混合細胞系、不死化細胞または不死化細胞のクローン群により生産することができる。例えばAusubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY,(1997-2001)を参照にされたい（各々は全部、引用により本明細書に編入する）。

【００３６】

ヒトTNFタンパク質またはそれらのフラグメントに特異的なヒト抗体は、単離された、および／またはTNFタンパク質またはそれらの部分（合成ペプチドのような合成分子を含む）のような適当な免疫原抗原に対して生じることができる。他の特異的または一般的な哺乳動物抗体も同様に生じることができる。免疫原性抗原の調製およびモノクローナル抗体の生産は、任意の適当な技法を使用して行うことができる。

【００３７】

１つの取り組みでは、ハイブリドーマは適当な不死化細胞系（例えば、限定するわけではないがSp2/0、Sp2/0-AG14、NSO、NS1、NS2、AE-1、L.5、＞243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SSI、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A等のミエローマ細胞系、またはヘテロミエローマ、それらの融合産物、またはそれらから派生する任意の細胞ま

たは融合細胞、または当該技術分野で周知な他の適当な細胞系と融合させることにより生産される。例えばwww.atcc.org.、www.lifetech.com.等と、限定するわけではないが、単離またはクローン化された脾臓、末梢血、リンパ節、扁桃または他の免疫もしくはＢ細胞を含む細胞のような抗体生産細胞、あるいは組換えもしくは内因性、ウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳類、齧歯類、ウマ、ヒツジ（ovine）、ヤギ、ヒツジ（sheep）、霊長類、真核生物のゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAまたはRNA、クロロプラストDNAまたはRNA、hmRNA、mRNA、tRNA、１本鎖、２本鎖もしくは３本鎖、ハイブリダイズしたもの、およびそれらの任意の組み合わせのような、内因性または異種の核酸として、重鎖または軽鎖定常または可変またはフレイムワークまたはCDR配列を発現している任意の他の細胞を参照にされたい。例えばAusubel, 同上およびColligan、Immunology、同上、第２章を参照にされたい（全部、引用により本明細書に編入する）。

【００３８】

抗体生産細胞は、目的抗原で免疫感作したヒトまたは他の適当な動物の末梢血、または好ましくは脾臓またはリンパ節から得ることもできる。任意の他の適当な宿主細胞を、本発明の抗体、特定したフラグメントまたはそれらの変異体をコードするヘテロロガスなまたは内因性の核酸を発現するために使用することもできる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は、選択的な培養条件または他の適当な既知の方法を使用して単離し、そして限界希釈法またはセルソーティングまたは他の既知の方法によりクローン化することができる。所望の特異性をもつ抗体を生産する細胞を、適当なアッセイにより選択することができる（例えばELISA）。

【００３９】

必要な特異性の抗体を生産または単離する他の適当な方法を使用することができ、それらには限定するわけではないがペプチドまたはタンパク質ライブラリー（例えば限定するわけではないが、バクテリオファージ、リボソーム、オリゴヌクレオチド、RNA、cDNA等、展示ライブラリー；例えばケンブリッジ抗体テクノロジーズ（Cambridge antibody Technologies）、ケンブリッジシャー、英国；モルホシス（MorphoSys)、マルチンスレイド／プラネッグ、独国；バイオバーション（Biovation）、アブレデーン、スコットランド、英国；バイオインベント（BioInvent）、ルンド、スウェーデン；ダイアックス社（Dyax Corp)、エンゾン、アフィマックス(Affymax)／バイオサイト（Biosite）；キソーマ（Xoam), バークレイ、カリフォルニア州：イクシス（Ixsys)から入手することができる)から組換え抗体を選択する方法を含む。当該技術分野で既知の、および／または本明細書に記載するヒト抗体のレパートリーを生産することができる、例えばEP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989(MorphoSys); WO95/16027(BioInvent); WO88/06630; WO90/3809(Dyax); US 4,704,692(Enzon); PCT/US91/02989(Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149(Ixsys)；または確率論的に生産されるペプチドまたはタンパク質-米国特許第5723323号、同第5763192号、同第5814476号、同第5817483号、同第5824514号、同第5976862号明細書、国際公開第86/05803号明細書、欧州特許第590 689号明細書（イクシス(Ixsys)、現在はアプライド モレキュラー エボリューション（Applied Molecular Evolution:AME)、各々は引用により全部、本明細書に編入する）、またはトランスジェニック動物の免疫感作に依る方法（例えばSCIDマウス、Nguyen et al.,Microbiol.Immunol.41:901-907(1997);Sandhu et al.,Crit.Rev.Biotechnol.16:95-118(1996);Eren et al.,Immunol.93:154-161(1998)、各々、ならびに関連する特許および出願は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。そのような技法は限定するわけではないが、リボソーム展示（Hanes et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:4937-4942(1997年5月)；Hanes et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95:14130-14135(1998年11月)）；単一細胞抗体生産法（例えば選択したリンパ球抗体法（“SLAM")(米国特許第5,627,052号明細書

、Wen et al.,J.Immunol.17:887-892(1987);Babcook et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7843-7848(1996))；ゲルミクロドロップおよびフローサイトメトリー（Powell et al.,Biotechnol.8:333-337(1990)；１細胞系、ケンブリッジ、マサチューセッツ州；Gray et al.,J.Imm.Meth.182:155-163(1995)；Kenny et al.,Bio/Technol.13:787-790(1995))；Ｂ-細胞選択（Steenbakkers et al.,Molec.Biol.Reports 19:125-134(1994);Jonak et al.,プログレスバイオテック(Progress Biotech)、第５巻、ハイブリドーマ技法におけるインビトロ免疫感作（In Vitro Immunization in Hybridoma Technology)、Borrebaeck編集、エルセビアサイエンス（Elsevier Science)出版 B.V.,アムステルダム、オランダ（1988））を含む。

【００４０】

非－ヒトまたはヒト抗体を工作またはヒト化する方法も使用することができ、そして当該技術分野では周知である。一般にヒト化または工作した抗体は、非ヒト、例えば限定するわけではないがマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類または他の哺乳動物が起源の１以上のアミノ酸残基を有する。これらのヒトアミノ酸残基はしばしば「輸入」残基と呼ばれるが、典型的には「輸入」可変、定常または既知のヒト配列の他のドメインを形成する。既知のヒトIg配列は例えば、

【００４１】

【表１】

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/;
www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.chime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)

【００４２】

に開示され、各々は引用により全部、本明細書に編入する。

【００４３】
そのような輸入された配列を使用して、免疫原性を低下させるか、あるいは、結合、親和性、オン－レイト（on-rate）、オフ－レイト（off-rate）、アビディティー、特異性、半減期または当該技術分野で既知の任意の他の適当な特性を下げ、強化し、またはモディファイすることができる。一般に、非ヒトまたはヒトCDR配列の一部または全部が維持されると同時に、可変および定常領域の非ヒト配列はヒトまたは他のアミノ酸に置き換えられる。また抗体は場合によりヒト化され、抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持する。この目的を達成するために、ヒト化抗体は場合により元のおよびヒト化配列の３次元モデルを使用して、元の配列および種々の概念のヒト化産物の分析処理により調製することもできる。３次元の免疫グロブリンモデルは市販されており、そして当該技術分野ではよく知られている。選択された候補の免疫グロブリン配列の可能な３次元立体構造を具体的に説明し、そして表すコンピュータープログラムを利用することができる。これらの展示の推測から、候補の免疫グロブリン配列の機能における残基の役割の見込みが分析できるようになり、すなわち候補の免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析が可能となる。このように、標的抗原（１つまたは複数）に対する親和性の上昇のような所望の抗体の特性を達成するように、コンセンサスおよび輸入配列からFR残基を選択し、そして合わせることができる。一般にCDR残基は抗原結合の影響に直接的かつ最も実質的に関与している。本発明の抗体のヒト化または工作は、限定するわけではないが Winter (Jones et al., Nature 321:522(1986); Riechmann et al., Nature 332:323(1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534(1988)), Sims et al., J.Immunol. 151:2296(1993); Chothia and Lesk, J.Mol. Biol. 196:901(1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992); Presta et al., J.Immunol. 151:2623(1993), US patent Nos：５７２３３２３，５９７６８６２，５８２４５１４，５８１７４８３，５８１４４７６，５７６３１９２，５７２３３２３，５，７６６８８６，５７１４３５２，６２０４０２３，６１８０３７０，５６９３７６２，５５３０１０１，５５８５０８９，５２２５５３９；４８１６５６７，ＰＣＴ／：ＵＳ９８／１６２８０，ＵＳ９６／１８９７８，ＵＳ９１／０９６３０，ＵＳ９１／０５９３９，ＵＳ９４／０１２３４，ＧＢ８９／０１３３４，ＧＢ９１／０１１３４，ＧＢ９２／０１７５５；ＷＯ９０／１４４４３，ＷＯ９０／１４４２４，ＷＯ９０／１４４３０，ＥＰ２２９２４６（各々は、その中で引用される文献を含め、引用により全部、本明細書に編入する）に記載されているような任意の既知の方法を使用して行うことができる。

【００４４】
抗－ＴＮＦ抗体も本明細書に記載し、かつ／または当該技術分野で既知であるようにヒト抗体のレパートリーを生産することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、非－ヒト霊長類等）の免疫感作により任意に生成することができる。ヒト抗－ＴＮＦ抗体を生産する細胞をそのような動物から単離し、そして本明細書に記載する方法のような適当な方法を使用して不死化することができる。

【００４５】
ヒト抗原に結合するヒト抗体のレパートリーを生産できるトランスジェニックマウスは、既知の方法により作出することができる（例えば限定するわけではないが、Lonberg et al.に発効されたU.S. Pat. Nos: ５,７７０,４２８, ５,５６９,８２５, ５,５４５,８０６, ５,６２５,１２６, ５,６２５,８２５, ５,６３３,４２５, ５,６６１,０１６および５,７８９,６５０；Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al. US Pat. No.,5,545,807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438 474 Bl, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, Lonberg et al. Nature 368:856-859(1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4)579-591(1994), Green et al, Nature Genetics 7:13-21(1994), Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156(1997), Taylor et al., Nu

cleic Acids Research 20(23):6287-6295(1992), Tuaillon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8)3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93(1995) and Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7):845-851(1996)、各々、引用により全部、本明細書に編入する）。一般にこれらのマウスは、機能的に再配列された、または機能的な再配列を受けることができる少なくとも１つのヒト免疫グロブリン座に由来するＤＮＡを含んで成る少なくとも１つの導入遺伝子を含んで成る。そのようなマウスの内因性の免疫グロブリン座は破壊され、または削除されてその動物が内因性遺伝子によりコードされる抗体を生産する能力を排除する。

【００４６】

類似のタンパク質またはフラグメントに対する特異的結合について抗体をスクリーニングすることは、ペプチド展示ライブラリーを使用して都合よく行うことができる。この方法には所望する機能または構造を有する個々の員について、ペプチドの大規模な集団をスクリーニングすることを含む。ペプチド展示ライブラリーの抗体スクリーニングは、当該技術分野では周知である。展示されたペプチド配列は、３～５０００以上のアミノ酸長、多くは５～１００アミノ酸長であり、そしてしばしば約８～２５アミノ酸長であることができる。ペプチドライブラリーを作成するための直接的な化学合成法に加えて、幾つかの組換えＤＮＡ法も記載された。１つの種類にはバクテリオファージまたは細胞の表面上のペプチド配列の展示が含まれる。各バクテリオファージまたは細胞は、特定の展示されたペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む。そのような方法は国際公開第９１／１７２７１、同第９１／１８９８０号、同第９１／１９８１８号および同第９３／０８２７８号明細書に記載されている。ペプチドのライブラリーを作成するための他のシステムには、インビトロ化学合成および組換え法の両観点がある。例えば、国際公開第９２／０５２５８、同第９２／１４８４３号および同第９６／１９２５６号明細書を参照にされたい。また米国特許第５，６５８，７５４号；および同第５，６４３，７６８号明細書も参照にされたい。ペプチド展示ライブラリー、ベクターおよびスクリーニングキットは、インビトロゲン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）（カールスバッド、カリフォルニア州）、およびケンブリッジアンチボディテクノロジーズ（ケンブリッジシャー英国）から販売されいる。例えば、エンゾンへの U.S.Pat.Nos. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456; ディアックスへの 5223409, 5403484, 5571698, 5837500; アフィマックスへの 5427908, 5580717; ケンブリッジアンテボディテクノロジーへの 5885793; ジェネンテックスへの 5750373; キソーマへの 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417；Colligan, 同上; Ausubel, 同上; or Sambrook, 同上（各々は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【００４７】

本発明の抗体は、そのような抗体を乳の中に生産するヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジ等のトランスジェニック動物または哺乳動物を提供するために、少なくとも１つの抗－ＴＮＦ抗体をコードする核酸を使用して調製することもできる。そのような動物は既知の方法を使用して提供することができる。例えば限定するわけではないが、米国特許第５，８２７，６９０号；同第５，８４９，９９２号；同第４，８７３，３１６号；同第５，８４９，９９２号；同第５，９９４，６１６号；同第５，５６５，３６２号；同第５，３０４，４８９号明細書等（これらの各々は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【００４８】

本発明の抗体は、そのような抗体、特定した部分または変異体を、植物の一部またはそれらから培養した細胞中に生産するトランスジェニック植物および培養植物細胞（例えば限定するわけではないが、タバコおよびトウモロコシ）を提供するために、少なくとも１つの抗－ＴＮＦ抗体をコードする核酸を使用してさらに調製することができる。非限定的な例として、組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコの葉が、例えば誘導性プロモーターを使用して大量の組換えタンパク質を成功裏に提供するために使用された

。例えばＣｒａｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４０：９５－１１８（１９９９）およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。また他の組換え系で生産されたものに、または天然の起源から精製されたものに等しい生物学的活性を持つ、工業的生産レベルで哺乳動物のタンパク質を発現するために、トランスジェニックトウモロコシが使用された。例えばＨｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．４６４：１２７－１４７（１９９９）およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。１本鎖抗体（ｓｃＦｖ’ｓ）のような抗体フラグメントを含め抗体はタバコ種子およびジャガイモの塊茎を含むトランスジェニック植物の種子からも大量に生産された。例えばＣｏｎｒａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３８：１０１－１０９（１９９８）およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。すなわち本発明の抗体は、既知の方法に従いトランスジェニック植物を使用して生産することもできる。また例えば、Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108(Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7(1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6(1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944(1994);およびそこに引用されている技術文献を参照にされたい。また一般に抗体の植物発現については、限定するわけではないが、上記の技術文献は引用により本明細書に編入する。

【００４９】

本発明の抗体は、ヒトＴＮＦに広い範囲の親和性（K_D）で結合することができる。好適な態様では、本発明の少なくとも１つのヒトｍＡｂは場合によりヒトＴＮＦと高い親和性で結合することができる。例えばヒトｍＡｂはヒトＴＮＦに、限定するわけではないが０．１～９．９（またはその中の任意の範囲または値）×10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}またはその中の任意の範囲または値のような約10^{-7}Ｍ以下のK_Dで結合することができる。

【００５０】

抗原に関する抗体の親和性またはアビディティーは、任意の適当な方法を使用して実験的に定めることができる。（例えばＢｅｒｚｏｆｓｋｙ，ｅｔ ａｌ．，「抗体－抗原相互作用（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ａｎｔｉｇｅｎ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ）」、基本的免疫学（Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）で、Ｐａｕｌ，Ｗ．Ｅ．編集、ラベン（Ｒａｖｅｎ）出版：ニューヨーク、ＮＹ、（１９８４）；Ｋｕｂｙ，Ｊａｎｉｓ 免疫学（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）、Ｗ．Ｈ．フリーマン アンド カンパニー（Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ）：ニューヨーク、ＮＹ、（１９９２）；およびそこに記載されている方法を参照にされたい）。特定の抗体－抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件下（例えば、塩濃度、ｐＨ）で測定すれば変動し得る。すなわち親和性および他の抗原－結合パラメーター（例えばK_D、K_a、K_d）の測定は、好ましくは抗体および抗原の標準化された溶液、本明細書に記載するバッファーのような標準化バッファーを用いて作成される。

核酸分子

少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５、６、７、８、特定したフラグメント、それらの変異体またはコンセンサス配列の連続するアミノ酸の少なくとも７０～１００％をコードするヌクレオチド配列、あるいはこれらの配列の少なくとも１つを含んでなる寄託されたベクターのような本明細書に提供する情報を使用して、少なくとも１つの抗－ＴＮＦ抗体をコードする本発明の核酸分子を、本明細書に記載する方法または当該技術分野で既知の方法を使用して得ることができる。

【００５１】

本発明の核酸分子は、ｍＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｔＲＮＡまたは他の任意の形態のようなＲＮＡの形態、あるいは限定するわけではないがクローニングまたは合成的に生成されるｃＤＮＡおよびゲノムＤＮＡのようなＤＮＡの形態、またはそれらの任意の組み合わせの形態であることができる。ＤＮＡは３本鎖、２本鎖または１本鎖、またはそれらの任意の組み合わせであることができる。ＤＮＡまたはＲＮＡの少なくとも１つの鎖の任意の部分

がコード鎖（センス鎖としても知られている）であることができ、またはそれは非コード鎖（アンチ－センス鎖とも言われる）であることができる。

【００５２】

本発明の単離された核酸分子は、場合により１以上のイントロン、例えば限定するわけではないが少なくとも１つの重鎖（例えば配列番号１～３）または軽鎖（例えば配列番号４～６）のＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３として少なくとも１つのＣＤＲの少なくとも１つの特定した部分を持つオープンリーディングフレイム（ＯＲＦ）を含んでなる核酸分子；抗－ＴＮＦ抗体または可変領域（例えば配列場合７、８）のコード配列を含んで成る核酸分子；および上記とは実質的に異なるが、遺伝子暗号の縮重によりそれでも本明細書に記載し、かつ／または当該技術分野で既知の少なくとも１つの抗－ＴＮＦ抗体をコードするヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子を含むことができる。もちろん遺伝子暗号は当該技術分野では周知である。すなわち当業者には本発明の特異的な抗－ＴＮＦ抗体をコードするそのような縮重核酸変異体を生成することは日常的なことである。例えばＡｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ　ａｌ．，同上を参照にされたい、そしてそのような核酸変異体を本発明に包含する。本発明の単離された核酸分子の非限定的な例には、配列番号１０、１１、１２、１３、１４、１５、対応してそれぞれＨＣ　ＣＤＲ１、ＨＣ　ＣＤＲ２、ＨＣ　ＣＤＲ３、ＬＣ　ＣＤＲ１、ＬＣ　ＣＤＲ２、ＬＣ　ＣＤＲ３、ＨＣ可変領域およびＬＣ可変領域をコードする核酸の非限定的例を含む。

【００５３】

別の観点では、本発明は命名されたクローン名＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿およびＡＴＣＣ寄託番号＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿としてそれぞれ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿に寄託されたプラスミド中に含まれる核酸によりコードされるアミノ酸配列を有する抗－ＴＮＦ抗体をコードする単離された核酸分子を提供する。

【００５４】

本明細書に示すように、抗TNF抗体をコードする核酸を含んでなる本発明の核酸分子は、

抗体フラグメントのみのアミノ酸配列；抗体全体またはその一部の配列；抗体、そのフラグメントまたはその一部の配列、および

さらなる配列（例えば、少なくとも１つのシグナルリーダー配列または融合ペプチド）をコードするもの（核酸）を含むことができ、

上述のさらなる配列（例えば、少なくとも１つのイントロン）を含んでも含まなくてもよく、

さらなる非コード配列、例えば５’および３’の非コード配列（例えば、転写、mRNAプロセッシングの際の役割（例えば、リボソーム結合性およびmRNA安定性）を果たす、転写され翻訳されない配列であって、例えばスプライシングシグナルおよびポリアデニレーションシグナル）が挙げられるがこれらに限定されない配列を一緒に含むことができ、

さらなるアミノ酸配列（例えば、さらなる機能性をもたらすもの）をコードするさらなるコード配列を含むことができるが、これら配列に限定されない（nucleic acid molecules of the present invention which comprise a nucleic acid encoding an anti-TNF antibody can include, but are not limited to, those encoding the amino acid sequence of an antibody fragment. by itself; the coding sequence for the entire antibody or a portion thereof; the coding sequence for an antibody, fragment or portion, as well as additional sequences, such as the coding sequence of at least one signal leader or fusion peptide, with or without the aforementioned additional coding sequences, such as at least one intron, together with additional, non-coding sequences, including but not limited to, non-coding 5’and 3’ sequences, such as the transcribed, non- translated sequences that play a role in transcription, mRNA processing, including splicing and polyadenylation signals (for example - ribosome binding and stability of mRNA); an additional coding sequence that codes for additional amino acids, such as those that provide additional functiona

lities）。すなわち抗体をコードする配列は、抗体フラグメントまたは一部を含んで成る融合抗体の精製を容易にするペプチドをコードする配列のようなマーカー配列と融合させることができる。

本明細書に記載するポリヌクレオチドと選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド

本発明は選択的なハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に開示するポリヌクレオチドとハイブリダイズする単離された核酸を提供する。すなわち本態様のポリヌクレオチドは、そのようなポリヌクレオチドを含んで成る核酸を単離し、検出し、かつ／または定量するために使用することができる。例えば本発明のポリヌクレオチドを使用して、寄託されたライブラリー中の部分的または完全長クローンを同定し、単離し、または増幅することができる。幾つかの態様ではポリヌクレオチドは単離されたゲノムまたはｃＤＮＡ配列であり、そうでければヒトまたは哺乳動物核酸ライブラリーに由来するｃＤＮＡの相補的である。

【００５５】

好ましくはｃＤＮＡライブラリーは少なくとも８０％完全長の配列、好ましくは少なくとも８５％または９０％完全長の配列、そしてより好ましくは少なくとも９５％完全長の配列を含んで成る。ｃＤＮＡライブラリーは稀な配列の提示を上げるために標準化することができる。低または中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は典型的には（排他的ではなく）、相補的配列に比べて低下した配列同一性を有する配列に採用する。中および高ストリンジェンシー条件も、より大きな同一性の配列のために場合により使用することができる。低ストリンジェンシー条件により、約７０％の配列同一性を有する配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能とし、そしてオルトロガス（ｏｒｔｈｏｌｏｇｏｕｓ）またはパラロガス（ｐａｒａｌｏｇｏｕｓ）配列を同定するために使用することができる。

【００５６】

場合により本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に開示するポリヌクレオチドによりコードされる抗体の少なくとも一部をコードするだろう。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドへの選択的ハイブリダイゼーションに使用できる核酸配列を包含する。例えばＡｕｓｕｂｅｌ、同上；Ｃｏｌｌｉｇａｎ、同上を参照にされたい（各々、引用により全部、本明細書に編入する）。

核酸の構築

本発明の単離された核酸は、当該技術分野で周知な（ａ）組換え法、（ｂ）合成法、（ｃ）精製法、またはそれらの組み合わせを使用して作成することができる。

【００５７】

核酸は本発明のポリヌクレオチドに加えて配列を都合よく含んで成ることができる。例えばポリヌクレオチドの単離を補助するために、１以上のエンドヌクレアーゼ制限部位を含んで成るマルチクローニング部位を核酸に挿入することができる。また翻訳可能な配列を本発明の翻訳されたポリヌクレオチドの単離を補助するために挿入することができる。例えばヘキサ－ヒスチジンマーカー配列は、本発明のタンパク質を精製するための便利な手段を提供する。本発明の核酸（コード配列を除く）は場合により、本発明のポリヌクレオチドのクローニングおよび／または発現のためのベクター、アダプターまたはリンカーである。

【００５８】

クローニングおよび／または発現におけるクローニングおよび／または発現配列の機能を至適化するために、ポリヌクレオチドの単離を補助するために、またはポリヌクレオチドの細胞への導入を向上させるために、そのような配列にさらなる配列を加えることができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は、当該技術分野では周知である（例えばＡｕｓｕｂｅｌ、同上；またはＳａｍｂｒｏｏｋ、同上を参照にされたい）。

核酸を構築するための組換え法

ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡまたはそれらの組み合わせのような本発明の単離され

た核酸組成物は、当業者に既知な多数のクローニング法を使用して生物起源から得ることができる。幾つかの態様では、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡライブラリー中の所望する配列を同定するために、ストリンジェントな条件下で本発明のポリヌクレオチドと選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを使用する。ＲＮＡの単離、およびｃＤＮＡおよびゲノムライブラリーの構築は、当業者には周知である（例えばＡｕｓｕｂｅｌ、同上；またはＳａｍｂｒｏｏｋ、同上を参照にされたい）。

核酸スクリーニングおよび単離法

ｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーは、本明細書に開示するような本発明のポリヌクレオチドの配列に基づくプローブを使用してスクリーニングすることができる。プローブは同じまたは異なる生物中のホモロガスな遺伝子を単離するために、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡ配列とハイブリダイズさせるために使用することができる。当業者は様々な程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションをアッセイに使用することができ；そしてハイブリダイゼーションまたは洗浄媒質のいずれかがストリンジェントであることができることを知っている。ハイブリダイゼーション条件がよりストリンジェントになると、２本鎖形成が起こるためにプローブと標的との間の相補性の程度がより大きくならなければならない。ストリンジェンシーの程度は、温度、イオン強度、ｐＨおよびホルムアミドのような部分的変性溶媒の存在の１以上により制御することができる。例えばハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば０％～５０％の範囲でホルムアミドの濃度の操作を通して反応溶液の極性を変えることにより都合よく変動させる。検出可能な結合に必要な相補性（配列同一性）の程度は、ハイブリダイゼーション媒質および／または洗浄媒質のストリンジェンシーに従い変動するだろう。相補性の程度は最適には１００％または７０～１００％、あるいはその中の任意の範囲または値となろう。しかしプローブおよびプライマー中のわずかな配列の変化は、ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄媒質のストリンジェンシーを下げることにより補うことができると理解すべきである。

【００５９】

ＲＮＡまたはＤＮＡの増幅法は当該技術分野では周知であり、そして本明細書に与える教示および指針に基づき、過度に実験することなく本発明に従い使用することができる。

【００６０】

既知のＤＮＡまたはＲＮＡの増幅法は限定するわけではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）および関連する増幅法（例えばMullis et al への U.S.Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188; Tabor et al への 4,795,699 および 4,921,794; Innis への 5,142,033; Wilson et al への 5,122,464; Innis への 5,091,310; Gyllensten et al への 5,066,584; Gelfand et al への 4,889,818; Silver et al への 4,994,370; Biswas への 4,766,067; Ringold への 4,656,134を参照にされたい）、および二重鎖ＤＮＡ合成のための鋳型としての標的配列に対してアンチーセンスＲＮＡを使用するＲＮＡが媒介する増幅（Ｍａｌｅｋ　ｅｔ　ａｌへの米国特許第５，１３０，２３８号明細書、登録名前ＮＡＳＢＡで）を含み、この技術文献の内容は引用により全部、本明細書に編入する。（例えばＡｕｓｕｂｅｌ、同上；またはＳａｍｂｒｏｏｋ、同上を参照にされたい）。

【００６１】

例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）法を使用して、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡライブラリーから直接、本発明のポリヌクレオチドの配列および関連する遺伝子を増幅することができる。ＰＣＲおよび他のインビトロ増幅法も、例えば発現するタンパク質をコードする核酸配列をクローン化するために、サンプル中に所望のｍＲＮＡの存在を検出するためのプローブとして使用するための核酸を作成するために、核酸シークエンシングに、または他の目的に有用となり得る。インビトロ増幅法を通して当業者を指導するために十分な技術の例は、Ｂｅｒｇｅｒ、同上、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、同上、およびＡｕｓｕｂｅｌ、同上、ならびにＭｕｌｌｉｓ，ｅｔ　ａｌ．，米国特許第４，６８３，２０２号明細書（１９８７）；およびＩｎｎｉｓ，ｅｔ　ａｌ、ＰＣＲ法　方法および応用に対する指針（ＰＣＲ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ａ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐ

ｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）、アカデミック出版編集、サンディエゴ、カリフォルニア州（１９９０）から見いだされる。ゲノムＰＣＲ増幅に関して市販されているキットが当該技術分野では知られている。例えば、アドバンテイジ－ＧＣ　ゲノムＰＣＲキット（クローンテック：Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）。さらに例えばＴ４　遺伝子３２タンパク質（ベーリンガーマンハイム：Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）を使用して、長いＰＣＲ産物の収量を向上させることができる。

核酸を構築するための合成法

本発明の単離された核酸は、既知の方法により直接的な化学合成により調製することができる（例えばＡｕｓｕｂｅｌ、同上を参照にされたい）。化学合成は一般に１本鎖オリゴヌクレオチドを生成し、これを相補的配列とのハイブリダイゼーションにより、または１本鎖を鋳型として使用してＤＮＡポリメラーゼによる重合化により２本鎖ＤＮＡに転換することができる。当業者はＤＮＡの化学合成は約１００以上の塩基配列に限定され得るが、より長い配列は短い配列の連結により得ることができると認識するだろう。

組換え発現カセット

本発明はさらに、本発明の核酸を含んで成る組換え発現カセットを提供する。本発明の核酸配列、例えば本発明の抗体をコードするｃＤＮＡまたはゲノム配列は、少なくとも１つの所望する宿主細胞に導入することができる組換え発現カセットを構築するために使用することができる。組換え発現カセットは典型的には、意図する宿主細胞でポリヌクレオチドの転写を支配する転写開始調節配列に操作可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含んで成る。ヘテロロガスおよび非ヘテロロガス（すなわち内因性）の両方のプロモーターを使用して、本発明の核酸の発現を支配することができる。

【００６２】

幾つかの態様では、プロモーター、エンハンサーまたは他の要素として役立つ単離された核酸は、本発明のポリヌクレオチドの発現をアップまたはダウンレギュレートするように、非ヘテロロガス状態の本発明のポリヌクレオチドを適当な位置（上流、下流またはイントロン中）に導入することができる。例えば内因性プロモーターを突然変異、欠失および／または置換によりインビボまたはインビトロで改変することができる。

ベクターおよび宿主細胞

本発明は、本発明の単離された核酸分子を含むベクター、組換えベクターにより遺伝的に操作された宿主細胞、および当該技術分野で周知な組換え法による少なくとも１つの抗－ＴＮＦ抗体の生産に関する。例えばＳａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ　ａｌ．、同上；Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．、同上（各々、引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【００６３】

ポリヌクレオチドは場合により、宿主中での増殖のための選択可能なマーカーを含むベクターに連結することができる。一般にプラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿のような沈殿で、または荷電した脂質との複合体で導入される。ベクターがウイルスである場合、適当なパッケージング細胞系を使用してインビトロでパッケージングされ、そして次いで宿主細胞に形質導入される。

【００６４】

ＤＮＡ挿入物は適当なプロモーターに操作可能に連結するべきである。発現構築物は転写開始のための部位、終結のための部位および転写領域において翻訳のためのリボソーム結合部位を含むだろう。構築物により発現された成熟転写産物のコード部分は、好ましくは最初に翻訳開始および翻訳されるｍＲＮＡの終わりに適切に位置する終結コドン（例えばＵＡＡ、ＵＧＡまたはＵＡＧ）を含み、ＵＡＡおよびＵＡＧが哺乳動物または真核細胞の発現には好適である。

【００６５】

発現ベクターは好ましくは、しかし任意に少なくとも１つの選択可能なマーカーを含む。そのようなマーカーには例えば限定するわけではないが、真核細胞培養についてはメトトレキセート（ＭＴＸ）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ、米国特許第４，３９９

，２１６号；同第４，６３４，６５５号；同第４，６５６，１３４号；同第４，９５６，２８８号；同第５，１４９，６３６号；同第５，１７９，０１７号明細書、アンピシリン、ネオマイシン（Ｇ４１８）、マイコフェノール酸、またはグルタミンシンテターゼ（ＧＳ、米国特許第５，１２２，４６４号；同第５，７７０，３５９号；同第５，８２７，７３９号細書）耐性、そして大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）および他の細菌または原核細胞での培養にはテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む（上記の特許明細書は引用により全部、本明細書に編入する）。上記の宿主細胞に関する適当な培養基および条件は、当該技術分野では既知である。適当なベクターは当業者には直ちに明らかである。ベクター構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の既知の方法により行うことができる。そのような方法はＳａｍｂｒｏｏｋ、同上、第１～４および１６～１８章；Ａｕｓｕｂｅｌ、同上、第１、９、１３、１５、１６章のように当該技術分野で記載されている。

【００６６】

本発明の少なくとも１つの抗体は、融合タンパク質のように修飾された形態で発現することができ、そして分泌シグナルだけでなく、さらにヘテロロガスな機能的領域を含むことができる。例えばさらなるアミノ酸の領域、特に荷電したアミノ酸を抗体のＮ－末端に付加し、精製中の宿主細胞中での、あるいは後の取り扱いおよび保存中での安定性および持続性を向上させることができる。またペプチド部分を本発明の抗体に付加して、精製を容易にすることができる。そのような領域は抗体またはそれらの少なくとも１つのフラグメントの最終調製前に除去することができる。そのような方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、同上、第１７．２９～１７．４２および１８．１～１８．７４章；Ａｕｓｕｂｅｌ、同上、第１６、１７および１８章のような多くの標準的な研究室用マニュアルに記載されている。

【００６７】

当業者は本発明のタンパク質をコードする核酸の発現に利用可能な多数の発現系についての知識がある。

【００６８】

あるいは本発明の核酸は、本発明の抗体をコードする内因性ＤＮＡを含む宿主細胞中で、（操作による）転機（ｔｕｒｎｉｎｇ　ｏｎ）により宿主細胞中で発現することができる。そのような方法は例えば米国特許第５，５８０，７３４号；同第５，６４１，６７０号；同第５，７３３，７４６号および同第５，７３３，７６１号明細書（引用により全部、本明細書に編入する）に記載されているように、当該技術分野で周知である。

【００６９】

抗体、それらの特定した部分または変異体の生産に有用な細胞培養の具体例は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は細胞の単層状態であることが多いが、哺乳動物細胞懸濁液またはバイオリアクターも使用することができる。完全なグリコシル化タンパク質を発現することができる多数の適当な宿主細胞系が当該技術分野で開発され、そしてそれにはＣＯＳ－１（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５０）、ＣＯＳ－７（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１６５１）、ＨＥＫ２９３、ＢＨＫ２１（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１０）、ＣＨＯ（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６１０）およびＢＳＣ－１（例えばＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２６）細胞系、Ｃｏｓ－７細胞、ＣＨＯ細胞、ｈｅｐ　Ｇ２細胞、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、ＳＰ２／０－Ａｇ１４、２９３細胞、ＨｅＬａ細胞等を含み、これらは例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション、マナッサス、バージニア州から容易に入手できる（ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ）。好適な宿主細胞はミエローマおよびリンパ腫細胞のようなリンパ節起源の細胞を含む。特に好適な宿主細胞は、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ寄託番号　ＣＲＬ－１５８０）およびＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞（ＡＴＣＣ寄託番号　ＣＲＬ－１８５１）である。特に好適な態様では、組換え細胞はＰ３Ｘ６３Ａｂ８．６５３またはＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞である。

【００７０】

これらの細胞の発現ベクターは、限定するわけではないが１以上の以下の発現制御配列を含むことができる；複製起点；プロモーター（例えば後期または初期ＳＶ４０プロモーター、ＣＭＶプロモーター（米国特許第５，１６８，０６２号；同第５，３８５，８３９号明細書）、ＨＳＶ　ｔｋプロモーター、ｐｇｋ（ホスホリグリセレート　キナーゼ）プロモーター、ＥＦ－１　アルファプロモーター（米国特許第５，２６６，４９１号明細書）、少なくとも１つのヒト免疫グロブリンプロモーター；エンハンサーおよび／またはリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニレーション部位（例えばＳＶ４０ラージＴＡｇポリＡ付加部位）および転写終結配列のようなプロセッシング情報部位。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ　ａｌ．、同上；Ｓａｍｂｒｏｏｋ、ｅｔ　ａｌ．、同上を参照にされたい。本発明の核酸またはタンパク質の生産に有用な他の細胞は知られており、かつ／または例えば細胞系およびハイブリドーマのアメリカンタイプカルチャーコレクションカタログ（ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ）あるいは他の既知または市販のものから入手可能である。

【００７１】

真核宿主細胞を使用する時、ポリアデニレーションまたは転写終結配列を典型的にはベクターに包含する。終結配列の例は、ウシ成長ホルモン遺伝子に由来するポリアデニレーション配列である。転写の正確なスプライシング配列も含むことができる。スプライシング配列の例は、ＳＶ４０に由来するＶＰ１イントロン（Ｓｐｒａｇｕｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．４５：７７３－７８１（１９８３））である。さらに宿主細胞中で複製を制御する遺伝子配列は　、当該技術分野で既知であるようにベクターに包含することができる。

抗体の精製

抗－ＴＮＦ抗体は、限定するわけではないがプロテインＡ精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知な方法により、組換え細胞培養から回収し、そして精製することができる。高性能液体クロマトグラフィー（“ＨＰＬＣ”）も精製に使用することができる。例えばＣｏｌｌｉｇａｎ、免疫学における現在の手法（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）、またはタンパク質科学における現在の手法（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）、ジョンウィリー　＆　サンズ（Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ）、ＮＹ、ＮＹ、（１９９７－２００１）、例えば第１、４、６、８、９、１０章を参照にされたい（各々が全部、引用により本明細書に編入する）。

【００７２】

本発明の抗体には、自然に精製された生成物、化学合成法の生成物、および例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物を含む真核細胞宿主から組換え法により生産される産物を含む。組換え生産法で使用する宿主に依存して、本発明の抗体はグリコシル化されることができ、または非グリコシル化であることができるが、グリコシル化が好適である。そのような方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、同上、第１７．３７～１７．４２；Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ　ａｌ．、同上、第１０、１２、１３、１６、１８および２０章、Ｃｏｌｌｉｇａｎ、タンパク質科学（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）、同上、第１２～１４のような多くの標準的な研究室マニュアルに記載されている（各々は引用により全部、本明細書に編入する）。

抗－ＴＮＦ抗体

本発明の単離された抗体は、任意の適当なポリヌクレオチドによりコードされる本明細書に開示された抗体のアミノ酸配列、または任意の単離されたまたは調製された抗体を含んで成る。好ましくはヒト抗体または抗原－結合フラグメントはヒトＴＮＦに結合し、そしてそれによりタンパク質の少なくとも１つの生物活性を部分的にまたは実質的に中和する。少なくとも１つのＴＮＦタンパク質またはフラグメントの少なくとも１つの生物活性

を部分的に、または好ましくは実質的に中和する抗体、またはそれらの特定した部分または変異体は、タンパク質またはフラグメントに結合することができ、これによりＴＮＦのＴＮＦ受容体への結合を通して、または他のＴＮＦ－依存的または媒介メカニズムを通して媒介される活性を阻害する。本明細書で使用する用語「中和抗体」とは、アッセイに依存して約２０～１２０％まで、好ましくは少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００％以上までＴＮＦ－依存的活性を阻害することができる抗体を称する。ＴＮＦ－依存的活性を阻害するための抗－ＴＮＦ抗体の能力は、好ましくは本明細書に記載し、かつ／または当該技術分野で知られているような少なくとも１つの適当なＴＮＦタンパク質または受容体アッセイにより評価される。本発明のヒト抗体は、任意のクラス（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＤ等）またはアイソタイプであることができ、そしてカッパまたはラムダ軽鎖を含んで成ることができる。１つの態様では、ヒト抗体はＩｇＧ重鎖または特定したフラグメント、例えば少なくとも１つのアイソタイプ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４を含んで成る。このタイプの抗体は、本明細書に記載し、かつ／または当該技術分野で知られているように、少なくとも１つのヒト軽鎖（例えばＩｇＧ、ＩｇＡおよびＩｇＭ（例えばγ１、γ２、γ３、γ４）導入遺伝子を含んで成るトランスジェニックマウスまたは他のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を使用することにより調製することができる。別の態様では、抗－ヒトＴＮＦヒト抗体はＩｇＧ１重鎖およびＩｇＧ１軽鎖を含んで成る。

【００７３】

本発明の少なくとも１つの抗体は、少なくとも１つのＴＮＦタンパク質、サブユニット、フラグメント、部分または任意のそれらの組み合わせに対して特異的な少なくとも１つの特定のエピトープに結合する。少なくとも１つのエピトープは、該タンパク質の少なくとも１つの部分を含んで成る少なくとも１つの抗体結合領域を含んで成り、このエピトープは該タンパク質の好ましくは少なくとも１つの細胞外、可溶性、疎水性、外部または細胞質部分から成る。少なくとも１つの特定したエピトープは、配列番号９の連続するアミノ酸の少なくとも１～３アミノ酸から特定する全部分の少なくとも１つのアミノ酸配列の任意の組み合わせ（any combination of at least one amino acid sequence of at least 1-3 amino acids to the entire specified portion of contiguous amino asids of the SEQ ID NO:9）を含んで成ることができる。

【００７４】

一般に、本発明のヒト抗体または抗原－結合フラグメントは、少なくとも１つのヒト相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）または少なくとも１つの重鎖可変領域の変異体、および少なくとも１つのヒト相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３）または少なくとも１つの軽鎖可変領域の変異体を含んで成る抗原－結合領域を含んで成る。非限定的な例として、抗体または抗原結合部分または変異体は少なくとも１つの、配列番号３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、および／または配列番号６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を含んで成ることができる。特定の態様では、抗体または抗原－結合フラグメントは、ＣＤＲｓ１、２および／または３（例えば配列番号１、２および／または３）に対応するアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖ＣＤＲ（すなわちＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３）の少なくとも１部分を含んで成る抗原－結合領域を有することができる。別の特定の態様では、抗体または抗原－結合部分または変異体は、ＣＤＲｓ１、２および／または３（例えば配列番号４、５および／または６）に対応するアミノ酸配列を有する少なくとも１つの軽鎖ＣＤＲ（すなわちＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３）の少なくとも１部分を含んで成る抗原－結合領域を有することができる。好適な態様では、抗体または抗原－結合フラグメントの３つの重鎖ＣＤＲおよび３つの軽鎖ＣＤＲは、本明細書に記載する少なくとも１つのｍＡｂ　ＴＮＶ１４８、ＴＮＶ１４、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１９６、ＴＮＶ１５、ＴＮＶ１１８、ＴＮＶ３２、ＴＮＶ８６の対応するＣＤＲのアミノ酸配列を有する。そのような抗体は、通例の技法を使用して抗体の種々の部分（例えばＣＤＲ、フレイムワーク）を化学的に一緒に連結するこ

とにより、通例の組換えＤＮＡ法を使用して抗体をコードする（すなわち１以上の）核酸分子を調製および発現することにより、または任意の他の適当な方法を使用することにより、調製することができる。

【００７５】

抗-TNF抗体は、定めたアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重または軽鎖可変領域を含んで成ることができる。例えば好適な態様では、抗-TNF抗体は任意に配列番号７のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの少なくとも１つの重鎖可変領域および／または任意に配列番号８のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの軽鎖可変領域を含んで成る。ヒトTNFに結合し、そして定めた重または軽鎖可変領域を含んで成る抗体は、ファージ展示（Katsube,Y.,et al.,Int J Mol. Med,1(5):863-868(1998)）のような適当な方法、または当該技術分野で既知で、かつ／または本明細書に記載するトランスジェニック動物を採用する方法を使用して調製することができる。例えば機能的に再配列されたヒトの免疫グロブリン重鎖導入遺伝子および機能的な再配列を受けることができるヒト免疫グロブリン軽鎖座に由来するDNAを含んで成る導入遺伝子を含んで成るトランスジェニックマウスを、ヒトTNFまたはそれらのフラグメントで免疫感作して抗体の生産を誘導することができる。所望により抗体生産細胞を単離し、そしてハイブリドーマまたは他の不死化抗体-生産細胞を本明細書に記載するように、かつ／または当該技術分野で知られているように調製することができる。あるいは抗体、特定した部分または変異体は、適当な宿主細胞中でコード核酸またはそれらの部分を使用して発現させることができる。

【００７６】

本発明はまた、本明細書に記載するアミノ酸配列と実質的に同じである配列中のアミノ酸を含んで成る抗体、抗原－結合フラグメント、免疫グロブリン鎖およびCDRに関する。好ましくはそのような抗体または抗原－結合フラグメントおよびそのような鎖またはCDRを含んで成る抗体は、ヒトTNFと高い親和性で（例えば約10^{-9}M以下のK_D）で結合することができる。本明細書に記載する配列と実質的に同じアミノ酸配列には、保存的アミノ酸置換、ならびにアミノ酸欠失および／または挿入を含んで成る配列を含む。保存的アミノ酸置換とは、第１アミノ酸と類似の化学的および／または物理的特性（例えば、荷電、構造、極性、疎水性／親水性）を有する第２のアミノ酸に、第１アミノ酸を置き換えることを言う。保存的置換には、以下の群内で１つのアミノ酸が別のアミノ酸に置き換わることを含む：リシン(Ｋ)、アルギニン(Ｒ)およびヒスチジン(Ｈ)；アスパラギン酸(Ｄ)およびグルタミン酸(Ｅ)；アスパラギン(Ｎ)、グルタミン（Ｑ)、セリン(Ｓ)、トレオニン(Ｔ)、チロシン(Ｙ)、Ｋ、Ｒ、Ｈ、ＤおよびＥ；アラニン(Ａ)、バリン(Ｖ)、ロイシン（Ｌ)、イソロイシン(Ｉ)、プロリン(Ｐ)、フェニルアラニン(Ｆ)、トリプトファン(Ｗ)、メチオニン(Ｍ)、システイン(Ｃ)およびグリシン(Ｇ)；Ｆ、ＷおよびＹ；Ｃ、ＳおよびＴ。

アミノ酸暗号

本発明の抗-TNF抗体を作るアミノ酸は、略されることが多い。アミノ酸の命名は当該技術分野で周知であるように１文字暗号、その３文字暗号、名前または３個のヌクレオチドコドン（１つまたは複数）によりアミノ酸を示すことにより同定することができる（Alberts,B.,et al.,細胞の分子生物学（Molecular Biology of The Cell）、第３版、ガーランド（Garland）出版社、ニューヨーク、1994を参照にされたい）：

【００７７】

【表２】

1文字暗号	3文字暗号	名前	3ヌクレオチド暗号
A	Ala	アラニン	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	システイン	UGC, UGU
D	Asp	アスパラギン酸	GAC, GAU
E	Glu	グルタミン酸	GAA, GAG
F	Phe	フェニルアラニン	UUC, UUU
G	Gly	グリシン	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	ヒスチジン	CAC. CAU
I	Ile	イソロイシン	AUA, AUC, AUU
K	Lys	リシン	AAA, AAG
L	Leu	ロイシン	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	メチオニン	AUG
N	Asn	アスパラギン	AAC, AAU
P	Pro	プロリン	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	グルタミン	CAA, CAG
R	Arg	アルギニン	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	セリン	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	トレオニン	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	バリン	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	トリプトファン	UGG
Y	Tyr	チロシン	UAC, UAU

【００７８】
本発明の抗-TNF抗体は、本明細書で特定するように自然な突然変異またはヒトの操作からの１以上のアミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。
【００７９】
もちろん当業者は上記に記載したものを含め、多くの因子に依存して多数のアミノ酸置換を作成することができるだろう。一般的に、上記抗-TNF抗体、フラグメントまたは変異体に関する多数のアミノ酸置換、挿入または欠失は、本明細書で特定するように１～30またはその中の任意の範囲または値のような40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、９、８、７、６、５、４、３、２、１より多くはないだろう。
【００８０】
機能に必須な本発明の抗-TNF抗体のアミノ酸は、当該技術分野で既知の部位-特異的突然変異誘発法またはアラニン-走査突然変異誘発法（例えばAusubel、同上、第8、15章；Cunningham and Wells,Science 244:1081-1085(1989)を参照にされたい）により同定することができる。後者の手法は、１つのアラニン突然変異を分子の各残基に導入する。生成した突然変異体分子は次いで、限定するわけではないが少なくとも１つのTNF中和活性のような生物活性に関して試験される。抗体結合に重要な部位も、結晶化、核磁気共鳴または光親和性標識のような構造分析により同定することができる（Smith,et al.,J.Mol.Biol.224:899-904(1992)およびde Vos,et al.,Science 255:306-312(1992)）。
【００８１】
本発明の抗-TNF抗体は限定するわけではないが、少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５、６の５からすべての連続するアミノ酸から選択される少なくとも１つの部分、配列または組み合わせを含むことができる。
【００８２】
抗-TNF抗体はさらに場合により、配列場合７、８の少なくとも１つの連続するアミノ酸の少なくとも１つの70～100％のポリペプチドを含んで成ることができる。
【００８３】

１つの態様では、免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列またはそれらの部分（例えば可変領域、CDR）は、少なくとも１つの配列番号７、８の対応する鎖のアミノ酸配列に対して、約70～100％の同一性（例えば70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはこの中の任意の範囲または値）を有する。例えば軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号８の配列に匹敵することができ、または重鎖CDR3のアミノ酸配列は配列番号７に匹敵することができる。好ましくは70～100％のアミノ酸同一性（すなわち、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはこの中の任意の範囲または値）が、当該技術分野で知られている適当なコンピューターアルゴリズムを使用して決定される。

【００８４】

重および軽鎖可変領域配列の例を、配列番号７、８に提供する。本発明の抗体またはそれらの特定した変異体は、本発明の抗体に由来する任意の数の連続するアミノ酸残基を含んで成ることができ、ここでその数は抗-TNF抗体中の連続する残基数の10～100％から成る整数群から選択される。場合によりこの連続するアミノ酸サブシークエンスは、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250個以上のアミノ酸長、またはその中の任意の範囲または値である。さらにそのようなサブシークエンスの数は、少なくとも２、３、４または５のような１～20から成る群から選択される任意の整数であることができる。

【００８５】

当業者は、本発明が少なくとも１つの生物的に活性な本発明の抗体を含むと考えるだろう。生物的に活性な抗体は、天然（非－合成）、内因性または関連する既知の抗体の少なくとも20％、30％または40％、そして好ましくは少なくとも50％、60％または70％、そして最も好ましくは少なくとも80％、90％または95％～1000％の特異的活性を有する。酵素活性および基質特異性の測定をアッセイし、そして定量する方法は、当該技術分野では周知である。

【００８６】

別の観点では、本発明は本明細書に記載するヒト抗体および抗原－結合フラグメントに関し、これらは有機部分の共有結合により修飾される。そのような修飾は抗体または抗原－結合フラグメントに改善された薬物動態学的特性（例えばインビボ血清半減期の上昇）を生じることができる。この有機部分は直鎖または分岐した親水性のポリマー性基、脂肪酸基、または脂肪酸エステル基であることができる。特定の態様では親水性のポリマー性基は約800～約120,000ダルトンの分子量を有することができ、そしてポリアルカングリコール（例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)）、炭水化物ポリマー、アミノ酸ポリマーまたはポリビニルピロリドンであることができ、そして脂肪酸または脂肪酸エステル基は約８～約40個の炭素原子を含んで成ることができる。

【００８７】

本発明の修飾された抗体および抗原－結合フラグメントは、直接的または間接的に抗体に共有的に結合した１以上の有機部分を含んで成ることができる。本発明の抗体または抗原－結合フラグメントに結合する各有機部分は、独立して親水性ポリマー性基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であることができる。本明細書で使用する用語「脂肪酸」は、モノ-カルボン酸およびジ-カルボン酸を包含する。本明細書で使用する用語「親水性のポリマー性基」とは、オクタンよりも水中でより溶解性の有機ポリマーを称する。例えばポリリシンはオクタンよりも水中でより溶解性である。すなわちポリリシンの共有結合により修飾された抗体は、本発明に包含する。本発明の抗体を修飾するために適する親水性ポリマーは直鎖または分岐であることができ、そして例えばポリアルカングリコール（例えば、PEG、モノメトキシ-ポリエチレングリコール(mPEG）、PPG等）、炭水化物（例えばデキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖等）、親水性アミノ酸のポリマー（例えばポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパルテート等）、ポリアルカンオキシド（例えばポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド等）、およびポリビニルピロリドンを含む。好ましくは本発明の抗体を修飾する親水性ポリマーは、別の分子量の実体として約800～約1

50,000ダルトンの分子量を有する。例えばPEG_{5000}および$PEG_{20,000}$（ここで下付文字は、ダルトンでのポリマーの平均分子量である）を使用することができる。親水性のポリマー性基は１～約６個のアルキル、脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換され得る。脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換される親水性ポリマーは、適当な方法を使用することにより調製することができる。例えばアミノ基を含んで成るポリマーは、脂肪酸または脂肪酸エステルのカルボキシレートにカップリングし、そして脂肪酸または脂肪酸エステル上で活性化されたカルボキシレート（例えばN,N-カルボニルジイミダゾールにより活性化される）を、ポリマー上のヒドロキシル基にカップリングすることができる。

【００８８】

本発明の抗体を修飾するために適切な脂肪酸および脂肪酸エステルは飽和であることができ、あるいは１以上の不飽和単位を含むことができる。本発明の抗体を修飾するために適切な脂肪酸には、例えばn-ドデカノエート（C_{12}、ラウレート)、n-テトラデカノエート（C_{14}、ミリステート）、n-オクタデカノエート（C_{18}、ステアレート）、n-エイコサノエート（C_{20}、アラキデート）、n-ドコサノエート（C_{22}、ベヘネート）、n-トリアコンタノエート（C_{30}）、n-テトラコンタノエート（C_{40}）、シス-Δ9-オクタデカノエート（C_{18}、オレート）、オールシス-Δ5,8,11,14-エイコサテトラエノエート（C_{20}、アラキドネート)、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸等を含む。適当な脂肪酸エステルには、直鎖もしくは分岐低級アルキル基を含んで成るジカルボン酸のモノ－エステルを含む。低級アルキル基は、１から約12、好ましくは約６個の炭素原子を含んで成ることができる。

【００８９】

修飾されたヒト抗体および抗原－結合フラグメントは、１以上の修飾剤を用いた反応によるような適当な方法を使用して調製することができる。本明細書で使用する用語「修飾剤」は、活性化基を含んで成る適当な有機基（例えば親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）を称する。「活性基」は、適当な条件下で第２の化学基と反応し、これにより修飾剤と第２の化学基との間に共有結合を形成することができる化学的部分または官能基である。例えばアミン－反応性の活性基には、トシラート、メシラート、ハロ（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)等のような求電子性基を含む。チオールと反応することができる活性基には、例えばマレイミド、ヨードアセチル、アクリロリル、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール(TNB-チオール)等を含む。アルデヒド官能基をアミン-またはヒドラジド-を含有する分子にカップリングさせることができ、そしてアジド基を三価のリン基と反応させてホスホルアミデートまたはホスホルイミド結合を形成することができる。活性基を分子に導入する適当な方法は、当該技術分野で既知である（例えば、Hermanson,G.T.,生物結合法（Bioconjugate Techniques）、アカデミック出版；サンディエゴ、カリフォルニア州(1996)を参照にされたい)。活性化基は有機基（例えば親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）に直接、またはリンカー部分、例えば二価のC_1－C_{12}基（ここで１以上の炭素原子が酸素、窒素または硫黄のようなヘテロ原子に置き換わることができる）を介して結合することができる。適当なリンカー部分には、例えばテトラエチレングリコール、$-(CH_2)_3-$、$-NH-(CH_2)_6-NH-$、$-(CH_2)_2-NH-$および$-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$を含む。リンカー部分を含んで成る修飾剤は、例えばモノ-Boc-アルキルジアミン（例えばモノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン）を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC）の存在下で脂肪酸と反応させて、遊離アミンと脂肪酸カルボキシレートとの間にアミド結合を形成することにより生成することができる。Boc保護基はトリフルオロ酢酸（TFA）を用いた処理により生成物から除去し、記載した別のカルボキシレートにカップリングすることができる１級アミンを露出することができるか、または無水マレイン酸と反応させ、そして生じた生成物を環化して脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成することができる（例えばThompson,et al.,国際公開第92/16221号明細書を参照にされたい、これは引用により本明細書に編入する）。

【００９０】

本発明の修飾した抗体は、ヒト抗体または抗原－結合フラグメントを修飾剤と反応させることにより生成することができる。例えば有機部分を、アミン-反応性修飾剤（例えばPEGのNHSエステル）を使用することにより非－部位特異的様式で抗体に結合することができる。修飾したヒト抗体または抗原－結合フラグメントは、抗体または抗原－結合フラグメントのジスルフィド結合（例えば鎖内ジスルフィド結合）を還元することにより調製することもできる。還元された抗体または抗原－結合フラグメントは、次いでチオール－反応性の修飾剤と反応させて本発明の修飾した抗体を生成することができる。本発明の抗体の特異的部位に結合した有機部分を含んで成る修飾したヒト抗体および抗原－結合フラグメントは、逆タンパク質溶解（Fisch et al.,Bioconjugate Chem.,3:147-153(1992);Werlen et al.,Bioconjugate Chem.,5:411-417(1994);Kumaran et al.,Protein Sci.6(10):2233-2241(1997);Itoh et al.,Bioorg.Chem.,24(1);59-68(1996);Capellas et al.,Biotechnol.Bioeng.,56(4):456-463(1997))のような適当な方法、およびHermanson,G.T.,生物結合法（Bioconjugate Techniques）、アカデミック出版；サンディエゴ、カリフォルニア州(1996)に記載されているような適当な方法を使用して調製することができる。

抗-TNF抗体組成物に対する抗-イディオタイプ抗体

モノクローナルまたはキメラ抗-TNF抗体に加えて、本発明は本発明のそのような抗体に特異的な抗-イディオタイプ抗体（抗-Id）抗体も対象とする。抗-Id抗体は、一般には別の抗体の抗原－結合領域に関連する独自の決定基を認識する抗体である。抗-Idは、Id抗体の起源と同種および属のタイプの動物(例えばマウス系統（strain）)を、抗体またはそれらのCDR含有領域で免疫感作することにより調製することができる。免疫感作した動物は、免疫した抗体のイディオタイプ決定基を認識し、そして応答し、そして抗-Id抗体を生産する。抗-Id抗体は別の動物にも免疫応答を誘導する「免疫原」としても使用することができ、いわゆる抗-抗-Id抗体を生産する。

抗-TNF抗体組成物

また本発明は、本明細書に記載し、かつ／または当該技術分野で既知の、自然には存在しない組成物、混合物または形態である、それらの少なくとも１つの、少なくとも２つの、少なくとも３つの、少なくとも４つの、少なくとも５つの、少なくとも６以上の抗-TNF抗体を含んで成る少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物を提供する。そのような組成物は、配列番号１、２、３、４、５、６、７、８の連続するアミノ酸の70～100％またはそれらの特定したフラグメント、ドメインまたは変異体から成る群から選択される抗-TNF抗体アミノ酸配列の少なくとも１または２つの完全長、Ｃ-および／またはＮ-末端が欠失した変異体、ドメイン、フラグメントまたは特定した変異体を含んで成る自然には存在しない組成物を含んで成る。好適な抗-TNF抗体組成物は、配列番号１、２、３、４、５、６の70～100％の抗-TNF抗体配列部分、またはそれらの特定したフラグメント、ドメインまたは変異体を含む少なくとも１つのCDRまたはLBRとして、少なくとも１または２つの完全長、フラグメント、ドメインまたは変異体を含む。さらに好適な組成物は、配列番号１、２、３、４、５、６の少なくとも１つの70～100％の40～99％、またはそれらの特定したフラグメント、ドメインまたは変異体を含んで成る。そのよう組成物の割合は、当該技術分野で既知の、または本明細書に記載するように重量、容量、濃度、モル濃度、あるいは液体または乾燥溶液、混合物、懸濁液、乳液またはコロイドとしての重量モル濃度による。

【００９１】

本発明の抗-TNF抗体組成物は、そのような調節、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に対する少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る、少なくとも１つの任意の適当かつ有効量の組成物または医薬組成物をさらに含んで成ることができ、場合によりさらに少なくとも１つのTNFアンタゴニスト（例えば、しかし限定するわけではないがTNF抗体またはフラグメント、可溶性TNF受容体またはフラグメント、それらの融合タンパク質、または低分子TNFアンタゴニスト）、抗リウマチ薬(例えばメトトレキセート、オーラノフィン、金チオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオマレイン酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサラジン）、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬

、神経筋遮断剤、抗菌剤（例えばアミノグルコシド、抗菌・カビ剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤、カルバペネム（carbapenem）、セファロスポリン、フルロルキノロン(flurorquinolone）、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗微生物剤）、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、糖尿病関連薬、無機類、栄養、甲状腺剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳剤、悪心制止剤、抗潰瘍剤、下剤、抗凝血剤、エリトロポエチン（例えばエポエチン アルファ）、フィルグラスチム（filgrastim)(例えばG-CSF、Neupogen）、サルグラモスチム（sargramostim)(GM-CSF、Leukine）、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤（例えばバシリキシマブ（basiliximab）、シクロスポリン、ダクリズマブ（daclizumab)）、成長ホルモン、ホルモン代用剤、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳剤（mydriatic)、毛様体麻痺薬、アルキル化剤、代謝拮抗薬、有糸分裂阻害剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗躁剤、抗精神病剤、抗不安剤、睡眠薬、交感神経作用薬、刺激物質、ドネペジル、タクリン、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、ロイコトリエン インヒビター、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは同族体、ドルナーゼ アルファ（Pulmozyme）、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つをさらに含んで成る。そのようなサイトカインの非限定的例には、限定するわけではないが任意のIL-1～IL-23を含む。適当な投薬用量は、当該技術分野では周知である。例えばWells et al.,薬物療法ハンドブック（Pharmacotherapy Handbook）、第２版、Appleton and Lange, スタンフォード、コネチカット州(2000)；PDR 薬局方、タラスコン ポケット薬局方（Tarascon Pocket Pharmacopoeia）(2000)、豪華版、タラスコン出版社、ローマ リンダ、カリフォルニア州(2000)（その各々は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【００９２】

そのような抗-ガンまたは抗-感染剤には、本発明の少なくとも１つの抗体に会合した、結合した、同時に配合(co-formulated）されたまたは一緒に投与されたトキシン分子も含むことができる。トキシンは場合により病原性細胞または組織を選択的に殺すように作用することができる。病原性細胞はガン細胞または他の細胞であり得る。そのようなトキシンは限定するわけではないが、例えば少なくとも１つリシン、ジフテリアトキシン、蛇毒トキシンまたは細菌のトキシンから選択されるトキシンの少なくとも１つの機能的な細胞傷害性ドメインを含んで成る精製された、または組換えトキシンまたはトキシンフラグメントであることができる。用語トキシンはまた、死を引き起こし得るトキシンショックを含む任意の病理的状態をヒトまたは他の哺乳動物に引き起こすかもしれない任意の自然に発生する突然変異体または組換え細菌またはウイルスにより生産されるエンドトキシンおよびエキソトキシンの両方を含む。そのようなトキシンは限定するわけではないが、腸内毒素生産性大腸菌（E.coli）熱に不安定なエンテロトキシン（LT）、熱安定性エンテロトキシン（ST）、シゲラ(Shigella)のサイトトキシン、アエロモナス（Aeromonas）のエンテロトキシン、毒素性ショック症候群トキシン-1（TSST-1）、ブドウ球菌のエンテロトキシンA（SEA）、B（SEB）またはC（SEC）、ブドウ球菌のエンテロトキシン等を含むことができる。そのような細菌には限定するわけではないが、エンテロトキシン生産性の大腸菌（E.coli）株（ETEC）、腸内出血性大腸菌（E.coli）（例えば血清型0157;H7）、ブトウ球菌(Staphylococcus)種（例えば、黄色ブトウ球菌（Staphylococcus aureus）、スタフィロコッカス ピロゲネス(Staphylococcus pyogenes）、シゲラ(Shigella)種（例えばシゲラ ジセンテリア(Shigella dysenteriae）、シゲラ フレキシネリ(Shigella flexneri)、シゲラ ボイディ(Shigella boydii）およびシゲラ ソンネイ(Shigella sonnei））、サルモネラ（Salmonella）種（例えばチフス菌（Salmonella typhi）、サルモネラ コレラ-スイス（Salmonella cholera-suis）、腸炎菌（Salmonella enteritidis）、クロストリジウム（Clostridium）種（例えばクロストリジウム パーフリンゲンス（Clostridium perfringens）、クロストリジウム ディフィシル（Clostridium dificile）、クロストリジウム ボツリナム（Clostridium botulinum））、カンピロバクター種（Camphlobacter）種（例えばカンピロバクター ジェジュニ（Camphlobacter jejuni）、カンピロバクター フェタス（Camphlobacter fetus））、ヘリオバクター（Heliobacter）種（例えば、ヘ

リオバクター ピロリ（Heliobactor pylori）、アエロモナス（Aeromonas）種（例えばアエロモナス ソブリア（Aeromonas sobria）、アエロモナス ヒドロフィーラ（Aeromonas hydrophila）、アエロモナス カビエ（Aeromonas caviae）、プレイソモナス シゲロイデス（Pleisomonas shigelloides）、エルシナ エンテロコリティカ（Yersina enterocolitica）、ビブリオス（Vibrios）種（コレラ菌（Vibrios cholerae）、ビブリオス パラヘモリチカス(Vibrios parahemolyticus）、クレブシエーラ（Klebsiella）種、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）およびストレプトコッカイ（Streptococci）を含む。例えば

【００９３】

【表３】

Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990);
Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254,
Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, Principles and Practice of Infectious
Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds.,
The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al,
FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack et al, Science, 248:705-711 (1990)

【００９４】

（この内容は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【００９５】

本発明の抗-TNF抗体化合物、組成物または組み合わせは、さらに限定するわけではないが希釈剤、結合剤、安定化剤、バッファー、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバント等のような少なくとも１つの任意の適切な補助剤を含んで成ることができる。医薬的に許容される補助剤が好適である。そのような滅菌溶液の非限定的な例および調製法は、限定するわけではないがGennaro、編集、レミングトンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Science）、第18版、マック出版社（イーストン、ペンシルバニア州）、1990のように当該技術分野では周知である。当該技術分野で周知であり、または本明細書に記載するように抗-TNF抗体、フラグメントまたは変異体組成物の投与様式、溶解性および／または安定性に適する医薬的に許容されるキャリアーは、日常的に選択され得る。

【００９６】

本組成物に有用な医薬用賦形剤および添加剤は、限定するわけではないがタンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物（例えば単糖、二-、三-、四-およびオリゴ糖を含む糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化糖等のような誘導化糖；および多糖または糖ポリマー）を含み、これは単独または組み合わせて存在することができ、単独または１～99.99重量または容量％で組み合わせて含んで成る。タンパク質賦形剤の例には、ヒト血清アルブミン(HSA）、組換えヒトアルブミン(rHA）のような血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン等を含む。緩衝能において機能することもできる代表的なアミノ酸／抗体成分には、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等を含む。１つの好適なアミノ酸はグリシンである。

【００９７】

本発明の使用に適する炭水化物賦形剤には、例えばフルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボース等のような単糖；ラクトース、シュクロース、トレハロース、セルビオース糖の二糖；ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、澱粉等の多糖；マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトール等のアルジトールを含む。本発明の使用に適する好適な炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロースおよびラフィノースである。

【００９８】
抗-TNF抗体組成物は、バッファーまたはｐＨ調整剤を含むこともできる；典型的にはバッファーは有機酸または塩基から調製される塩である。代表的なバッファーには、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、カルボン酸、酒石酸、コハク酸、酢酸またはフタル酸の塩のような有機酸塩；Tris、トロメタミン、塩酸塩またはリン酸バッファーを含む。本組成物の使用に好適なバッファーはクエン酸塩のような有機酸塩である。
【００９９】
さらに本発明の抗-TNF抗体組成物は、ポリビニルピロリドン、フィコール（ポリマー性糖）、デキストレート（例えば2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンのようなシクロデキストリン）、ポリエチレングリコールのようなポリマー性賦形剤／添加剤、香料、抗微生物剤、甘味剤、酸化防止剤、帯電防止剤、表面活性剤（例えば“TWEEN 20"および“TWEEN 80"のようなポリソルベート）、脂質（例えばリン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えばコレステロール）および錯化剤（例えばEDTA)を含むことができる。
【０１００】
本発明による抗-TNF抗体、部分または変異体組成物で使用するために適するこれらのおよびさらに知られている医薬賦形剤および／または添加剤は当該技術分野では既知であり、例えば「レミングトン：薬学の科学＆実践（Remington:The Science & Practice of Pharmacy)」、第19版、ウィリアムス＆ウィリアムス（Williams & Williams)、(1995)および「医師の卓上レファレンス（Physician's Desk Reference）」、第52版、メディカルエコノミックス、モントバレー、ニュージャージー州(1998)に列挙され、この開示は引用により全部、本明細書に編入する。好適なキャリアーまたは賦形剤材料は炭水化物（例えば糖およびアルジトール）およびバッファー（例えばクエン酸塩）またはポリマー性剤である。
製剤
上記のように本発明は安定な製剤を提供し、これは好ましくは食塩水または選択した塩を含むリン酸バッファー、ならびに保存剤を含有する保存溶液および製剤、ならびに医薬または獣医学的使用に適する多用途保存製剤であり、少なくとも１つの抗-TNF抗体を医薬的に許容される製剤中に含んで成る。保存製剤は少なくとも１つの既知の保存剤または任意に少なくとも１つのフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マンガン（例えばヘキサヒドレート）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサール、またはそれらの混合物から成る群から選択される保存剤を水性希釈剤中に含む。適当な濃度または混合物は、0.001～５％のような、または限定するわけではないが0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9またはこの中の任意の範囲または値のような当該技術分野で知られているように使用することができる。非限定的な例には、保存剤なし、0.1～２％ m-クレゾール（例えば0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0％）、0.1～３％ベンジルアルコール（例えば0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5％）、0.001～0.5％チメロサール（例えば0.005、0.01）、0.001～2.0％フェノール（例えば0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0％）、0.0005～1.0％アルキルパラベン（１つまたは複数）（例えば0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0％）等を含む。
【０１０１】
上記のように、本発明は包装材料および場合により水性希釈剤中に処方されたバッファーおよび／または保存剤を含む少なくとも１つの抗-TNF抗体の溶液を含んで成る少なくとも１つのバイアルを含んで成る製品を提供し、ここで該包装材料は、そのような溶液が１

、２、３、４、５、６、９、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72時間以上保持できることを示すラベルを含んで成る。本発明はさらに、包装材料、凍結乾燥した少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る第１バイアル、および処方されたバッファーまたは保存剤の水性希釈剤を含んで成る第２バイアルを含んで成る製品を含んで成り、ここで該包装材料は患者が少なくとも１つの抗-TNF抗体を水性希釈剤中に再構成して、24時間以上の期間にわたり保持できる溶液を形成することを指示するラベルを含んで成る。

【０１０２】

本発明に従い使用する少なくとも１つの抗-TNF抗体は、哺乳動物細胞またはトランスジェニック調製物を含む組換え手段により生産できるか、または本明細書に記載し、または当該技術分野で既知の他の生物起源から精製することができる。

【０１０３】

本発明の生成物中の少なくとも１つの抗-TNF抗体の範囲は、湿潤／乾燥系である場合、再構成時に約1.0μg/ml～約1000mg/mlの濃度を生じる量を含むが、より低および高濃度も操作可能であり、そして意図する送達賦形剤に依存し、例えば溶液組成は経皮用パッチ、肺、経粘膜または浸透圧もしくはミクロポンプ法とは異なるだろう。

【０１０４】

好ましくは水性希釈剤は場合によりさらに医薬的に許容できる保存剤を含んで成る。好適な保存剤には、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサール、またはそれらの混合物から成る群から選択されるものを含む。製剤中に使用する保存剤の濃度は、抗-微生物効果を生じるために十分な濃度である。そのような濃度は選択した保存剤に依存し、そして当業者により容易に決定される。

【０１０５】

他の賦形剤、例えば張性調整剤、バッファー、酸化防止剤、保存強化剤を場合により、そして好ましくは希釈剤に加えることができる。グリセリンのような張性調整剤は既知の濃度で通常に使用される。生理学的に許容されるバッファーは好ましくはpH制御の改善を提供するために加える。製剤は約pH４～約pH10のような広いpH範囲を網羅することができ、そして好ましい範囲は約pH５～約pH９、そして最も好ましくは約6.0～約8.0の範囲である。好ましくは本発明の製剤は約6.8から約7.8の間のpHを有する。好適なバッファーにはリン酸バッファー、最も好ましくはリン酸ナトリウム、特にリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を含む。

【０１０６】

Tween 20（ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート）、Tween 40（ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート)、Tween 80（ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート)、Pluronic F68（ポリオキシエチレン ポリオキシプロピレン ブロック コポリマー）およびPEG（ポリエチレングリコール）、あるいはポリソルベート20もしくは80、またはポリオキサマー184もしくは188、Pluronic(商標)ポリリス(polyls)、他のブロック コポリマーのような非イオン性表面活性剤のような医薬的に許容される可溶化剤、およびEDTAおよびEGTAのようなキレーターのような他の添加剤を、凝集を減らすために製剤または組成物に場合により加えることができる。これらの添加剤は製剤を投与するためにポンプまたはプラスチック容器が使用される場合に特に有用である。医薬的に許容される表面活性剤の存在は、タンパク質が凝集する傾向を緩和する。

【０１０７】

本発明の製剤は、少なくとも１つの抗-TNF抗体およびフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンズエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサールまたはそれらの混合物から成る群から選択される保存剤を水性希釈剤中で混合することを含んで成る方法により調製することができる。少なくとも１つの抗-TNF抗体および保存剤を水性希釈剤中で混合することは、通例の

溶解および混合手順を使用して行う。適当な製剤を調製するためには、例えば所望の濃度のタンパク質および保存剤を提供するために十分な量で、バッファー溶液中の計測した少なくとも１つの抗-TNF抗体量を、バッファー溶液中の所望の保存剤と合わせる。この方法の変法は当業者により認識されているだろう。例えば加える成分の順序、さらなる添加剤を使用してもしなくても、製剤が調製される温度およびpHは、濃度および使用する投与の手段のために至適化されるすべての因子であり得る。

【０１０８】

特許請求する製剤は、透明溶液として、または水、保存剤および／または賦形剤、好ましくはリン酸バッファーおよび／または食塩および選択した塩を水性希釈剤中に含む第２バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも１つの抗-TNF抗体の１つのバイアルを含んで成る２個のバイアルの状態で患者に提供することができる。単一溶液のバイアルまたは再構成が必要な２個のバイアルのいずれかは複数回、再使用され、そして患者処置の単回または多回サイクルを満たし、そしてこれにより現在利用できるものより都合よい処置法を提供することができる。

【０１０９】

特許請求する製品は、すぐに、そして24時間以上の期間にわたり投与するために有用である。したがってここで特許請求する製品は、患者に重要な利点を提供する。本発明の製剤は場合により約２～約40℃の温度で安全に保存し、そして長期間にわたりタンパク質の生物活性を保持することができ、すなわちその溶液が６、12、18、24、36、48、72または96時間以上の期間にわたり保持し、かつ／または使用できることを示す包装ラベルを付けることを可能とする。保存希釈剤を使用する場合、そのようなラベルは１～12カ月、半年、および１年半および／または２年までの使用を含むことができる。

【０１１０】

本発明の少なくとも１つの抗-TNF抗体の溶液は、少なくとも１つの抗体を水性希釈剤中で混合することを含んで成る方法により調製することができる。混合は通例の溶解および混合手順を使用して行う。適当な希釈剤を調製するためには、例えば所望の濃度のタンパク質および場合により保存剤またはバッファーを提供するために十分な量で、水またはバッファー中の計測した少なくとも１つの抗-TNF抗体量を合わせる。この方法の変法は当業者により認識されているだろう。例えば加える成分の順序、さらなる添加剤を使用してもしなくても、製剤が調製される温度およびpHは、濃度および使用する投与の手段のために至適化され得るすべての因子である。

【０１１１】

特許請求する製品は、透明溶液として、または水性希釈剤を含む第２バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも１つの抗-TNF抗体のバイアルを含んで成る２個のバイアルとして患者に提供することができる。単一溶液のバイアルまたは再構成が必要な２個のバイアルのいずれかは複数回再使用することができ、そして患者処置の単回または多回サイクルを満たし、そしてこれにより現在利用できるものより都合よい処置法を提供する。

【０１１２】

特許請求する製品は、薬局、医院または他のそのような研究所および施設に、透明溶液または水性希釈剤を含む第２バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも１つの抗-TNF抗体のバイアルを含んで成る２個のバイアルを提供することより、患者に間接的に提供することができる。この場合、透明溶液は１リットルまで、またはそれより大きなサイズであることができ、大きなリザーバーを提供して、そこからより小さいバイアルに移すために、より少量の少なくとも１つの抗体溶液を１または多数回引き出し、そして薬局または医院により使用者および／または患者に提供され得る。

【０１１３】

これらの単一バイアル系を含んで成る認識されているデバイスは、例えばベクトンデッキンソン(Becton Dickenson)(フランクリン レイク、ニュージャージー州、www.bectondickenson.com）、ジセトロニック(Disetronic)(バーグドルフ、スイス、www.disetronic.com；、バイオジェクト(Bioject)(ポートランド、オレゴン州)(www.bioject.com)、ナショ

ナルメディカルプロダツク(National Medical Products)、ウェストン メディカル(ピーターブロー、英国、www.weston-medical.com)、メディ－ジェクト社(Medi-Ject Corp)(ミネアポリス、ミネソタ州、www.mediject.com) により作成され、そして開発されたBD Pen、BD Autojector(商標)、Humaject(商標)、NovoPen(商標)、B-D(商標)Pen、AutoPen(商標)およびOptiPen(商標)、GenotropinPen(商標)、Genotronorm Pen(商標)、Humatro Pen(商標)、Reco-Pen(商標)、Roferon Pen(商標)、Biojector(商標)、iject(商標)、J-tip Needle-Free Injector(商標)、Intraject(商標)、Medi-Ject(商標)のような溶液送達のためのペン－注入デバイスを含む。２個のバイアル系を含んで成る認識されているデバイスは、HumatroPen(商標)のような再構成された溶液を送達するための、カートリッジ中で凍結乾燥された薬剤を再構成するためのペン-注入系を含む。

【０１１４】

ここで特許請求する製品には包装材料を含む。包装材料は管理会社が必要とする情報に加えて、製品を使用できる条件を提供する。本発明の包装材料は、２つのバイアルの湿潤／乾燥製品について、患者が水性希釈剤中で少なくとも１つの抗-TNF抗体を再構成して溶液を形成し、そして２～24時間以上の期間にわたり溶液を使用するための使用説明を提供する。単一バイアルの溶液製品については、ラベルはそのような溶液が２～24時間以上にわたり使用できることを示す。ここで特許請求する製品は、ヒトの医薬品としての使用に有用である。

【０１１５】

本発明の製剤は少なくとも１つの抗-TNF抗体および選択されたバッファー、好ましくは食塩水または選択した塩を含むリン酸バッファーを混合することを含んで成る方法により調製することができる。少なくとも１つの抗体およびバッファーを水性希釈剤中で混合することは、通例の溶解および混合法を使用して行う。適当な製剤を調製するためには、例えば所望の濃度のタンパク質およびバッファーを提供するために十分な量で、水またはバッファー中の計測した少なくとも１つの抗体量を、水中の所望の緩衝剤と合わせる。この方法の変法は当業者により認識されているだろう。例えば加える成分の順序、さらなる添加剤を使用するかどうか、製剤が調製される温度およびpHは、濃度および使用する投与の手段のために至適化され得るすべての因子である。

【０１１６】

特許請求する安定な、または保存された製剤は、透明溶液として、または水性希釈剤中に保存剤またはバッファーおよび賦形剤を含む第２バイアルで再構成する凍結乾燥した少なくとも１つの抗-TNF抗体のバイアルを含んで成る２個のバイアルとして患者に提供することができる。単一溶液のバイアルまたは再構成が必要な２個のバイアルのいずれも多数回、再使用することができ、そして単回または複数のサイクルで患者を処置するために十分であり、すなわち現在利用できるものよりも都合良い処置法を提供することができる。

【０１１７】

本明細書に記載する安定または保存された製剤または溶液のいずれかの中の少なくとも１つの抗-TNF抗体は、本発明に従いSCまたはIM注射；経皮、肺、経粘膜、インプラント、浸透圧ポンプ、カートリッジ、ミクロポンプまたは当業者により、あるいは当該技術分野で周知であるような他の手段を含む種々の送達法を介して患者に投与することができる。

治療的応用

本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも１つのTNF関連疾患を、本発明の少なくとも１つの二重インテグリン抗体を使用して、既知であるように、または本明細書に記載するようにモジュレートまたは処置するための方法も提供する。

【０１１８】

また本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者の、限定するわけではないが少なくとも１つの肥満症、免疫関連疾患、心血管疾患、感染性疾患、悪性疾患または神経疾患を含む少なくとも１つのTNF関連疾患をモジュレートまたは処置するための方法も提供する。

【０１１９】

また本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者の、限定するわけではないが少なくとも１つの慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、若年性関節リウマチの全身的発症、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、胃潰瘍、セロネガティブ関節症、変形性関節症、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、抗リン脂質症候群、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、特発性肺線維症、全身性脈管炎／ヴェーゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、精巣炎／精管除去術、アレルギー／アトピー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、湿疹、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎、移植、臓器移植拒絶、対宿主性移植片病、全身性炎症応答症候群、敗血症症候群、グラムポジティブ敗血症、グラムネガティブ敗血症、カルチャーネガティブ敗血症、真菌性敗血症、好中球減少熱、尿路性敗血症、髄膜炎菌血症、外傷／出血、火傷、イオン化照射暴露、急性膵炎、成人呼吸窮迫症候群、慢性関節リウマチ、アルコール誘導型肝炎、慢性炎症病、サルコイドーシス、クローン病、鎌状赤血球貧血、糖尿病、ネフローゼ、アトピー性疾患、過敏症反応、アレルギー性鼻炎、枯草熱、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、喘息、蕁麻疹、全身性アナフラキシー、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小板減少症、任意の臓器または組織の移植片拒絶、腎臓移植拒絶、心臓移植拒絶、肝臓移植拒絶、膵臓移植拒絶、肺移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、皮膚同種移植拒絶、軟骨移植拒絶、骨移植拒絶、小腸移植拒絶、胎児胸腺移植拒絶、上皮小体移植拒絶、任意の臓器または組織の異種移植拒絶、同種移植拒絶、抗-受容体過敏症反応、Graves病、Raynoud病、Ｂ型インスリン-耐性糖尿病、喘息、重症筋無力症、抗体-媒介細胞傷害、III型過敏症反応、全身性エリテマトーデス、POEMS症候群（多発性神経障害、臓器巨大、内分泌障害、モノクローナルガンモパシー、および皮膚変化症候群）、ポリニューロパシー、臓器巨大、内分泌障害、モノクローナルガンモパシー、皮膚変化症候群、抗リン脂質症候群、天疱瘡、強皮症、混合結合組織病、特発性Addison病、真性糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、脈管炎、MI-後心臓切開症候群、IV型過敏症、接触皮膚炎、過敏性肺炎、同種移植拒絶、細胞内生物による肉芽腫、薬剤感受性、代謝性／特発性Wilson病、ヘマクロマトーシス（hemachromatosis）、アルファ-1-アンチトリプシン 欠損、糖尿病網膜炎、ハシモト甲状腺炎、骨粗鬆症、視床下部-下垂体-副腎 軸評価、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、家族性ヘマトファゴシティック（hematophagocytic）リンパ組織球増多症、皮膚学的条件、乾癬、脱毛、ネフローゼ症候群、腎炎、糸状体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒症、毒性、子かん前症、okt3療法、抗-cd3療法、サイトカイン療法、化学療法、放射線療法（例えば限定するわけではないが、トーステニア（toasthenia）貧血、悪液質等）、慢性サリチル酸中毒等を含む少なくとも１つの免疫関連疾患を、モジュレートまたは処置するための方法も提供する。例えばメルクマニュアル（Merck Manual）、第12～17版、メルク＆カンパニー、ラカーウェイ、ニュージャージー州（1972、1977、1982、1987、1992、1999）、薬物療法ハンドブック（Pharmacotherapy Handbook）、Wells et al.編集、第２版、Appleton and Lange、スタムフォード、コネチカット州(1998、2000)（各々引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。
（各々は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【０１２０】

また本発明は、細胞、組織、器官、動物または患者の、限定するわけではないが少なくとも１つの心失神（cardiac stun）症候群、心筋梗塞、うっ血性心不全、発作、虚血性発作、出血、動脈硬化症、アテローム硬化症、再狭窄、糖尿病性動脈硬化性疾患、高血圧症、動脈性高血圧症、腎血管性高血圧症、失神、ショック、心血管系梅毒、心不全、肺性心、原発性肺高血圧症、心律動異常、心房異所性拍動、心房粗動、心房細動（持続的または発作性）、潅流後症候群、心肺バイパス炎症反応、無秩序または多源性心房頻拍、規則的な細いQRS心房頻拍、特別な不整脈、心室細動、ヒス束不整脈、房室ブロック、脚ブロック、心筋虚血性疾患、冠状動脈疾患、狭心症、心筋梗塞、心筋症、拡張型うっ血性心筋症、拘束型心筋症、弁心臓（valvular heart)疾患、心内膜炎、心膜疾患、心腫瘍、大動脈および末梢動脈瘤、大動脈解離、大動脈の炎症、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、末梢

脈管障害、閉塞性大動脈障害、末梢アテローム硬化症、閉塞性血栓血管炎、機能的末梢動脈障害、Raynaud現象および疾患、先端チアノーゼ、先端紅痛症、静脈疾患、静脈血栓症、拡張蛇行静脈、動静脈瘻、リンパ水腫、脂肪浮腫、不安定狭心症、再潅流損傷、ポストポンプ症候群、虚血的再潅流損傷等を含む少なくとも１つの心血管疾患を、モジュレートまたは処置するための方法も提供する。そのような方法は場合により、少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る有効量の組成物または医薬組成物を、そのようなモジュレーション、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んで成る。

【０１２１】

本発明はまた、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも１つの感染性疾患をモジュレートまたは処置する方法を提供し、そのような感染性疾患には限定するわけではないが少なくとも１つの：急性または慢性細菌疾患、細菌、ウイルスおよび菌・カビ感染を含む急性および慢性寄生性または感染性プロセス、HIV感染／HIVニューロパシー、髄膜炎、肝炎（Ａ、ＢまたはＣ等）、敗血性関節炎、腹膜炎、肺炎、咽頭蓋炎、大腸菌0157:h7、溶血性尿毒症症候群／血栓性血小板減少性紫斑症、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア症、らい病、毒素性ショック症候群、ストレプトコッカス筋炎、ガス壊疽、マイコバクテリウム結核症、マイコバクテリウム アビウムイントラセルラール、ニューモシスティス カリニ肺炎、骨盤炎症状疾患、精巣炎／精巣上体炎、レジオネラ属、ライム病、インフルエンザ、エプスタイン－バールウイルス、バイタル随伴ヘマファゴシティック(vital-associated hemaphagocytic）症候群、バイタル(vital)脳炎／無菌髄膜炎等を含む；

本発明はまた、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも１つの悪性疾患をモジュレートまたは処置する方法を提供し、そのような悪性疾患には限定するわけではないが少なくとも１つの；白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、Ｂ-細胞、Ｔ－細胞またはFAB ALL、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）、ヘアリーセル白血病、骨髄異形性症候群（MDS）、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カポジ肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、鼻咽頭癌、悪性組織球症、悪性の新生物随伴症候群／高カルシウム血症、充実性腫瘍、腺癌、肉腫、悪性黒色腫、血管腫、転移性疾患、癌に関連する骨の吸収、癌に関連する骨痛（bone pain）等を含む。

【０１２２】

本発明はまた、細胞、組織、器官、動物または患者の少なくとも１つの神経疾患をモジュレートまたは処置する方法を提供し、そのような神経疾患には限定するわけではないが少なくとも１つの；神経変性疾患、多発性硬化症、偏頭痛、AIDS痴呆複合体、多発性硬化症および急性横断脊髄炎のような脱髄疾患；皮質脊髄系の損傷のような錐体外路および小脳障害；脳幹神経節または小脳障害のような障害；ハンチントン舞踏病および老年舞踏病のような運動亢進の運動障害；CNSドーパミン受容体を遮断する薬剤により誘導されるような薬剤が誘導する運動障害；パーキンソン病のような運動低下の運動障害；進行性核上麻痺；小脳の構造的損傷；脊髄性運動失調、Friedreich運動失調、小脳皮質性萎縮症、多系統変性症（Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-DragerおよびMachado-Joseph)のような旧小脳変性；全身性疾患（レフサム病、無β-リポ蛋白血症、運動失調、毛細管拡張症およびミトコンドリア多系統障害）；多発性硬化症、急性横断脊髄炎のような脱髄コア（demyelinating core）障害；および神経性筋肉萎縮症のような運動単位の障害（筋萎縮側索硬化症、乳児脊髄性筋萎縮症および若年性脊髄性筋萎縮症のような前角細胞変性）；アルツハイマー病；中年のダウン症候群；びまん性Lewy小体病；Lewy小体病型の老年痴呆；ヴェルニッケ－コルサコフ症候群；慢性アルコール依存症；クロイツフェルト－ヤコブ病；亜急性硬化性汎脳炎、Hallerrorden-Spatz病；および拳闘化痴呆等を含む。そのような方法は場合により少なくとも１つのTNF抗体または特定の部分または変異体を含んで成る有効量の組成物または医薬組成物を、そのようなモジュレーション、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んで成ることができる。例えばメル

クマニュアル（Merck Manual）、第16版、メルク＆カンパニー（Merck & Company）、ラーウェイ、ニュージャージー州(1992)の参照にされたい。

【０１２３】

本発明の任意の方法は、少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る有効量の組成物または医薬組成物を、そのようなモジュレーション、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んで成ることができる。そのような方法は任意にさらにそのような免疫疾患を処置するために同時投与または併用療法を含んで成ることができ、ここで該少なくとも１つ抗-TNF抗体、それらの特定部分または変異体の投与は、さらに事前、同時および／または後に、少なくとも１つのTNFアンタゴニスト（例えば限定するわけではないが、TNF抗体またはフラグメント、可溶性TNF受容体またはフラグメント、それらの融合タンパク質、または低分子TNFアンタゴニスト）、抗リウマチ薬（例えばメトトレキセート、オーラノフィン、金チオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオマレイン酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサラジン）、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤（例えばアミノグルコシド、抗菌・カビ剤、駆虫剤、抗ウイルス剤、カルバペネム（carbapenem）、セファロスポリン、フルオロルキノロン（flurorquinolone）、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗微生物剤）、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、糖尿病関連薬、無機類、栄養、甲状腺剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳剤、悪心制止剤、抗潰瘍剤、下剤、抗凝血剤、エリトロポエチン（例えばエポエチン アルファ）、フィルグラスチム（filgrastim)(例えばG-CSF、Neupogen）、サルグラモスチム（sargramostim)(GM-CSF、Leukine）、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤（例えばバシリキシマブ（basiliximab）、シクロスポリン、ダクリズマブ（daclizumab））、成長ホルモン、ホルモン代用剤、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳剤（mydriatic)、毛様体麻痺薬、アルキル化剤、代謝拮抗薬、有糸分裂阻害剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗躁剤、抗精神病剤、抗不安剤、睡眠薬、交感神経作用薬、刺激物質、ドネペジル、タクリン、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、ロイコトリエン インヒビター、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは同族体、ドルナーゼ アルファ（Pulmozyme）、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つをさらに投与することを含んで成る。適当な投薬用量は当該技術分野で周知である。例えばWells et al.編集、薬物療法ハンドブック（Pharmacotherapy Handbook）、第２版、Appleton and Lange, スタンフォード、コネチカット州(2000)；PDR 薬局方、タラスコン ポケット薬局方（Tarascon Pocket Pharmacopoeia）(2000)、豪華版、トランスコン出版社、ローマリンダ、カリフォルニア州(2000)（その各々は引用により全部、本明細書に編入する）を参照にされたい。

【０１２４】

本発明の組成物、併用療法、同時投与、デバイスおよび／または方法に適するTNFアンタゴニスト（さらに本発明の少なくとも１つの抗体、それらの特定部分および変異体を含む)には、限定するわけではないが、抗-TNF抗体、それらの抗原結合フラグメント、およびTNFに特異的に結合する受容体分子；サリドマイド、テニダップ(tenidap)、ホスホジエステラーゼインヒビター(たとえばペントキシフィリンおよびロリプラム（rolipram））のようなTNF合成、TNFの放出またはその標的細胞に対する作用を防止および／または阻害する化合物、A2bアデノシン受容体アゴニストおよびA2bアデノシン受容体エンハンサー；マイトジェン活性化タンパク質（MAP）キナーゼインヒビターのようなTNF受容体シグナル伝達を防止および／または阻害する化合物；メタロプロティナーゼインヒビターのような膜TNF開裂を遮断および／または阻害する化合物；アンギオテンシン転換酵素（ACE）インヒビター（例えばカプトプリル）のようなTNF活性を遮断および／または阻害する化合物；およびMAPキナーゼインヒビターのようなTNF生産および／または合成を遮断および／または阻害する化合物を含む。

【０１２５】

本明細書で使用する「腫瘍壊死因子抗体」、「TNF抗体」、「TNFα抗体」またはフラグメント等は、インビトロ、インシトゥーおよび／または好ましくはインビボでTNFα活性を低下させ、遮断し、阻害し、排除し、または妨害する。例えば本発明の適当なTNFヒト抗体はTNFαに結合することができ、そして抗-TNF抗体、それらの抗原結合フラグメント、そして特にTNFαに結合するそれらの特定した突然変異体またはドメインを含む。適当なTNF抗体またはフラグメントは、TNF RNA、DNAまたはタンパク質合成、TNF放出、TNF受容体シグナル伝達、膜TNF開裂、TNF活性、TNF生産および／または合成を低下させ、遮断し、排除し、妨害し、防止し、および／または阻害することもできる。

【０１２６】

キメラ抗体cA2は、A2と命名された高親和性の中和マウス抗-ヒトTNFα IgG抗体の抗原結合可変領域、およびヒトIgG1カッパ免疫グロブリンの定常領域から成る。ヒトIgG1 Fc領域は同種抗体エフェクター機能を向上させ、循環する血清半減期を上昇させ、そして抗体の免疫原性を低下させる。キメラ抗体cA2のアビディティおよびエピトープ特異性は、マウス抗体A2の可変領域に由来する。特定の態様では、マウス抗体A2の可変領域をコードする核酸の好適な供給源はA2ハイブリドーマ細胞系である。

【０１２７】

キメラA2（cA2）は、自然なおよび組換えヒトTNFαの両方の細胞傷害効果を用量依存的様式で中和する。キメラ抗体cA2および組換えヒトTNFαの結合アッセイから、キメラ抗体cA2の親和性定数を$1.04\times10^{10}M^{-1}$と算出した。モノクローナル抗体の特異性および親和性を競合阻害により決定する好適な方法は、Harlow,et al., 抗体：ア ラボラトリーマニュアル（antibodies:A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、1988；Colligan et al.編集、免疫学における現在のプロトコール（Current Protocols in Immunology）、グリーネ出版アソシエイツ アンド ウィリー インターサイエンス（Greene Publishing Assoc.and Wiley Interscience）、ニューヨーク、(1992-2000)；Kozbor et al.,Immunol.Today,4;72-79(1983)；Ausubel et al.編集、分子生物学における現在のプロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）、ウィリー インターサイエンス（ Wiley Interscience）、ニューヨーク、(1987-2000)；およびMuller,Meth.Enzymol.,92:589-601(1983)に見いだすことができ、これらは引用により全部、本発明に編入する。

【０１２８】

特定の態様では、マウスモノクローナル抗体A2はc134Aと命名された細胞系により生産される。キメラ抗体cA2はc168Aと命名された細胞系により生産される。

【０１２９】

さらに本発明に使用することができるモノクローナル抗-TNF抗体の例は、従来技術により記載されている（例えば

【０１３０】

【表４】

U.S. Patent No. 5,231,024; Möller, A. *et al.*, *Cytokine 2*(3):162-169 (1990); U.S. Application No. 07/943,852 (1992年9月11日出願); Rathjen *et al.*, International Publication No. WO 91/02078 (1991年2月21日公開); Rubin *et al.*, EPO Patent Publication No. 0 218 868 (1987年4月2日公開); Yone *et al.*, EPO Patent Publication No. 0 288 088 (1988年10月26日); Liang, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm. 137*:847-854 (1986); Meager, *et al.*, *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly *et al.*, *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, *et al.*, *Hybridoma* 6:489-507 (1987); およびHirai, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987)

【０１３１】

を参照にされたい、これらは引用により全部、本明細書に編入する）。
TNF受容体分子
本発明に有用な好適なTNF受容体分子は、TNFαに高親和性で結合するものであり（例えばFeldmann et al.、国際公開第92/07076号明細書(1992年4月30日公開)；Schall et al.,Cell 61:361-370(1990)；およびLoetscher et al.,Cell 61:351-359(1990)を参照にされたい、これらは引用により全部、本明細書に編入する）、そして場合により低い免疫原性を有する。特に55KDa（p55 TNF-R）および75kDa（p75 TNF-R）TNF細胞表面受容体が本発明に有用である。受容体またはそれらの機能的部分の細胞外ドメイン（ECD）を含んで成るこれらの受容体の短縮された形態も（例えばCorcoran et al.,Eur.J.Biochem.223:831-840(1994)を参照にされたい）、本発明に有用である。ECDを含んで成るTNF受容体の短縮化形は、尿および血清中に30kDaおよび40kDaのTNFα阻害結合タンパク質として検出された（Engelmann,H.,et al.,J.Biol.Chem.265:1531-1536(1990)）。TNF受容体多量体分子およびTNF免疫受容体融合分子、およびそれらの誘導体およびフラグメントまたは部分は、本発明の方法および組成物に有用であるTNF受容体分子のさらなる例である。本発明で使用できるTNF受容体分子は、症状の良好から優れた緩和および低い毒性で長期間、患者を処置するためのそれらの能力が特徴である。低い免疫原性および／または高い親和性、ならびに他の不確定な特性が達成される治療的結果に寄与し得る。
【０１３２】
本発明に有用なTNF受容体多量体分子は、１以上のポリペプチドリンカーまたはポリエチレングリコール（PEG）のような他の非ペプチドリンカーを介して連結された２以上のTNF受容体のECDのすべてまたは機能的部分を含んで成る。多量体分子はさらに多量体分子を発現させるために、分泌されるタンパク質のシグナルペプチドを含んで成ることができる。これらの多量体分子およびそれらの生産法は、米国特許出願第08/437,533号明細書（1995年5月9日出願）に記載され、その内容は引用により全部、本明細書に編入する。
【０１３３】
本発明の方法および組成物に有用なTNF免疫受容体融合分子は、１以上の免疫グロブリン分子の少なくとも一部および１以上のTNF受容体のすべてまたは機能的部分を含んで成る。これらの免疫受容体融合分子は、単量体またはヘテロ－もしくはホモ－多量体として集成することができる。この免疫受容体融合分子は、一価または多価であることができる。そのようなTNF免疫受容体融合分子の例は、TNF受容体／IgG融合タンパク質である。TNF免疫受容体融合分子およびそれらの調製法は従来技術に記載されている（
【０１３４】
【表５】

Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol. 21*:2883-2886 (1991); Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*:10535-10539 (1991); Peppel *et al.*, *J. Exp. Med. 174*:1483-1489 (1991); Kolls *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91*:215-219 (1994); Butler *et al.*, *Cytokine 6*(6):616-623 (1994); Baker *et al.*, *Eur. J. Immunol. 24*:2040-2048 (1994); Beutler *et al.*, U.S. Patent No. 5,447,851;およびU.S. Application No. 08/442,133 (1995年5月16日出願)

【０１３５】
、これらの各々は引用により全部、本明細書に編入する）。免疫受容体融合分子の調製法も、Capon et al.、米国特許第5,116,964号明細書；Capon et al.、米国特許第5,225,538号明細書；およびCapon et al.,Nature 337:525-531(1989)にも見いだすことができ、これらの技術文献は引用により全部、本明細書に編入する。
【０１３６】
TNF受容体分子の機能的均等物、誘導体、フラグメントまたは領域とは、本発明に使用することができる（例えば高親和性でTNFに結合し、そして低い免疫原性を有する）、TNF

受容体分子に機能的に似ている十分なサイズおよび配列であるTNF受容体分子の部分、またはTNF受容体分子をコードするTNF受容体分子の配列の部分を称する。TNF受容体分子の機能的均等物も、本発明に使用することができるTNF受容体分子に機能的に似ている修飾TNF受容体分子も含む（例えば高い親和性でTNFに結合し、そして低い免疫原性を有する）。例えばTNF受容体分子の機能的均等物は、“SILENT"コドンまたは１以上のアミノ酸置換、欠失または付加（例えば１つのアミノ酸の別のアミノ酸への置換；または同じかまたは異なる疎水性アミノ酸をコードする１コドンの疎水性アミノ酸をコードする別のコドンへの置換）を含むことができる。Ausubel et al.、分子生物学における現在のプロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）、グリーネ出版アソシエイツ アンド ウィリー インターサイエンス、ニューヨーク、(1987-2000)を参照にされたい。

【０１３７】

サイトカインには任意の既知のサイトカインを含む。例えばCopewithCytokines.comを参照にされたい。サイトカインアンタゴニストには、限定するわけではないが任意の抗体、フラグメントまたは模造物、任意の可溶性受容体、フラグメントまたは模造物、任意の低分子アンタゴニスト、またはそれらの組み合わせを含む。治療的処置。本発明の任意の方法はTNFが媒介する障害を処置するための方法を含んで成ることができ、この方法は少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る有効量の組成物または医薬組成物を、そのようなモジュレーション、処置または治療が必要な細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含んで成る。そのような方法は任意にさらにそのような免疫疾患を処置するための同時投与または併用療法を含んで成ることができ、ここで該少なくとも１つの抗-TNF抗体、それらの特定部分または変異体の投与は、さらに事前に、同時におよび／または後に、少なくとも１つのTNFアンタゴニスト（例えば限定するわけではないが、TNF抗体またはフラグメント、可溶性TNF受容体またはフラグメント、それらの融合タンパク質、または低分子TNFアンタゴニスト）、抗リウマチ薬（例えばメトトレキセート、オーラノフィン、金チオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオマレイン酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサラジン）、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤（例えばアミノグルコシド、抗菌・カビ剤、駆虫剤、抗ウイルス剤、カルバペネム（carbapenem)、セファロスポリン、フルオロルキノロン(flurorquinolone)、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、他の抗微生物剤）、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、糖尿病関連薬、無機類、栄養、甲状腺剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、止瀉薬、鎮咳剤、悪心制止剤、抗潰瘍剤、下剤、抗凝血剤、エリトロポエチン（例えばエポエチン アルファ）、フィルグラスチム（filgrastim)(例えばG-CSF、Neupogen）、サルグラモスチム（sargramostim)(GM-CSF、Leukine）、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤（例えばバシリキシマブ（basiliximab）、シクロスポリン、ダクリズマブ（daclizumab))、成長ホルモン、ホルモン代用剤、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳剤（mydriatic)、毛様体麻痺薬、アルキル化剤、代謝拮抗薬、有糸分裂阻害剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗躁剤、抗精神病剤、抗不安剤、睡眠薬、交感神経作用薬、刺激物質、ドネペジル、タクリン、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、ロイコトリエン インヒビター、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは同族体、ドルナーゼ アルファ（Pulmozyme）、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つ少なくとも１つから選択される少なくとも１つを投与することをさらに含んで成る。

【０１３８】

典型的には病的状態の処置は少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物の有効量または投薬用量を投与することにより行われ、これは組成物中に含まれる特異的活性に依存して全部で、平均して、範囲で少なくとも約0.01から500ミリグラムの少なくとも１つの抗-TNF抗体（患者１キログラムの投与あたり）、好ましくは単回または多回投与にわたり少なくとも約0.1～100ミリグラム抗体／患者体重（kg）である。あるいは効果的な血清濃度は、単回または多回投与あたり0.1～5000μg/mlの血清濃度を含んで成ることができる。適当な投

薬用量は医師が知っており、そしてもちろん特定の疾患状態、投与する組成物の特異的活性、および処置を受ける特定の患者に依存する。場合により所望する治療的量を達成するために、繰り返し投与、すなわち特定の監視され、または計量された用量の反復個体投与を提供することが必要となり得、ここで個体への投与は所望の毎日の用量または効果が達成されるまで繰り返される。

【０１３９】

好適な用量は任意に、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、１、２、３、４、５、６、７、８、９、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99および／または100～500 mg/kg投与、あるいはそれらの任意の範囲、値または画分を含むことができ、あるいは単回または多回投与あたり0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5, 6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500および／または5000μg／ml血清濃度あるいはそれらの任意の範囲、値または画分の血清濃度を達するために含むことができる。

【０１４０】

あるいは投与する用量は、特定の薬剤の薬物動態学的特性、およびその投与の様式および経路；受容体の年齢、健康および体重；症状の性質および程度、現行処置の種類、処置の頻度、および所望する効果のような既知の因子に大変依存し得る。通常、有効成分の投薬用量は、体重１キログラムあたり約0.1～100ミリグラムとなり得る。多くは投与あたりまたは徐放性形態において１キログラムにつき0.1～50、そして好ましくは0.1～10ミリグラムが所望の効果を得るために効果的である。

【０１４１】

非限定的な例として、ヒトまたは動物の処置は、単回、注入または反復投与を使用して１日あたり0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、２、３、４、５、６、７、８、９、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90または100mg/kgのような0.1～100mg/kgの本発明の少なくとも１つの抗体を１回に、または周期的用量で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40日に少なくとも１回、あるいはまたは加えて１、２、３、４、５、６、７、８、９、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51または52週に少なくとも１回、あるいはまたは加えて１、２、３、４、５、６、７、８、９、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20年に少なくとも１回、あるいはそれらの任意の組み合わせで提供することができる。

【０１４２】

内部投与に適する剤形（組成物）は、一般に単位または容器あたり約0.1ミリグラム～約500ミリグラムの有効成分を含む。これらの医薬組成物では、有効成分は通常、組成物の総重量に基づき約0.5～99.999重量％の量で存在するだろう。

【０１４３】

非経口投与には、抗体は溶液、懸濁液、乳液または凍結乾燥粉末として製剤することができ、一緒にまたは別に医薬的に許容される非経口賦形剤が提供される。そのような賦形剤の例は、水、塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液および１～10％ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油のような非水性賦形剤を使用することもできる。賦形剤または凍結乾燥粉末は、等張性（例えば塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性（例えばバッファーおよび保存剤）を維持するための添加剤を含むことができる。製剤は既知のまたは適当な方法で滅菌される。

【０１４４】

適当な医薬キャリアーは、この分野の標準的な参考書である最新版のレミングトンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Science)、A.Osolに記載されている。

代替投与

多くの既知の、および開発された様式を、医薬的に有効量の本発明の少なくとも１つの抗-TNF抗体を投与するために、本発明に従い使用することができる。肺投与は処方どおりに使用するが、他の投与様式は本発明に従い使用して適切な結果をもたらすことができる。

【０１４５】

本発明のTNF抗体はキャリアー中で、溶液、乳液、コロイドまたは懸濁液として、あるいは乾燥粉末として、吸入または本明細書または当該技術分野内もしくは当該技術分野で既知の他の様式により、投与のために適当な種々のデバイスおよび方法のうちの任意のものを使用して送達することができる。

非経口製剤および投与

非経口投与用の製剤は、通常の賦形剤として滅菌水または塩水、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化ナフタレン等を含むことができる。注入用の水性または油性懸濁液は、既知の方法に従い適当な乳化剤または湿潤剤および懸濁剤を使用して調製することができる。注入用の薬剤は、水溶液または滅菌の注入可能溶液または溶媒中の懸濁液のような非毒性で、非経口投与性の希釈剤であることができる。使用可能な賦形剤または溶剤として、水、リンゲル溶液、等張性塩水等を利用できる；通例の溶媒、または懸濁溶媒として、滅菌の非揮発性油を使用することができる。これらの目的のために、任意の種類の非揮発性油および脂肪酸を使用でき、それらには天然または合成または半合成の脂肪油または脂肪酸；天然または合成または半合成のモノ－またはジ－またはトリ－グリセリドを含む。非経口投与は当該技術分野で知られており、そして限定するわけではないが通例の注入手段、米国特許第5,851,198号明細書に記載されたガスで圧縮した針を含まない注入デバイス、および米国特許第5,839,446号明細書に記載されたレーザーパーホレーターデバイスを含む（これらの明細書は引用により全部、本明細書に編入する）。

代替送達

本発明はさらに少なくとも１つの抗-TNF抗体を、非経口的、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮による投与に関する。少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物は、非経口（皮下、筋肉内または静脈内）あるいは任意の他の投与、特に液体溶液または懸濁液で使用するために；膣または直腸投与、特に限定するわけではないがクリームおよび坐薬のような半固体で使用するために；限定するわけではないが錠剤またはカプセル形態のようなバッカル、舌下投与に；あるいは限定するわけではないが粉末、点鼻またはエーロゾルまたは確定薬剤（certain agent）の状態のような鼻内に；あるいは皮膚構造をモディファイし、または経皮パッチ中の薬剤濃度を上げるためのジメチルスルフォキシドのような化学的エンハンサー（Junginger et al.、「薬剤の浸透強化（Drug Permeation Enhancement)」；Hsieh,D.S.、編集、第59-60（マルセルデッカー（Marcel Dekker)社、ニューヨーク 1994、引用により全部、本明細書に編入する）を用いて、またはタンパ

ク質またはペプチドを含む製剤の皮膚上への適用を可能にする酸化剤（国際公開第98/53847号明細書）を用いて、またはエレクトロポレーションのような一過性の輸送路を作るために電場を適用して、またはイオン導入法のような皮膚を通る荷電した薬剤の移動性を上げるために、またはソノホレシス（sonophoresis）のような超音波を適用して（米国特許第4,309,989号および同第4,767,402号明細書）、限定するわけではないがゲル、軟膏、ローション、懸濁液またはパッチ送達系のように経皮的に使用するために調製することができる（上記の刊行物および特許は引用により全部、本明細書に編入する）。

肺／鼻投与

肺投与には、好ましくは少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物は、肺または洞のより低い気道に到達するために効果的な粒子サイズで送達される。本発明に従い、少なくとも１つの抗-TNF抗体は吸入による治療薬の投与について当該技術分野で既知の種々の吸入または鼻デバイスのうちの任意のものにより送達することができる。エーロゾル化した製剤を患者の洞腔または肺胞に沈積することができるこれらのデバイスには、計量用量呼吸器（metered dose inhaler）、ネブライザー、乾燥粉末ジェネレーター、噴霧器等を含む。抗体の肺または鼻投与を対象とするために適当な他のデバイスも当該技術分野では既知である。すべてのそのようなデバイスが、エーロゾル中の抗体を分配するための投与に適する製剤に使用することができる。そのようなエーロゾルは、溶剤（水性または非水性の両方）または固体粒子のいずれかから成ることができる。Ventolin(商標)計量用量呼吸器のような計量用量呼吸器は、多くは噴射剤ガスを使用し、そして吸息中の作動が必要である（例えば国際公開第94/16970号、同第98/35888号明細書を参照にされたい）。Turbuhaler(商標)(アストラ:Astra）、Rotahaler(商標)(グラクソ:Glaxo）、Diskus(商標)(グラクソ）、Spiros(商標)呼吸器（ジュラ：Dura）、インハーレセラピューティクス（Inhale Therapeutics）により販売されているデバイスおよびSpinhaler(商標)粉末呼吸器(フィソンス:Fisons）は、混合粉末の呼吸作動を使用する（米国特許第4668218号明細書 アストラ、欧州特許第237507号明細書 アストラ、国際公開第97/25086号明細書 グラクソ、国際公開第94/08552号明細書 ジュラ、米国特許第5458135号明細書　インハーレ、国際公開第94/06498号明細書 フィソンス、すべて引用により本明細書に編入する）。AERx(商標)アラディギム（Aradigm）、Ultravent(商標)ネブライザー(マリンクロッド:Mallinckrodt)、およびAcornII(商標)ネブライザー（マークエスト メディカル プロダクツ:Marquest Medical Products）（米国特許第5404871号明細書 アラディギム、国際公開第97/22376号明細書）（上記技術文献は引用により全部、本明細書に編入する）は溶液からエーロゾルを生成するが、計量用量呼吸器、乾燥粉末呼吸器等は、小さい粒子のエーロゾルを生成する。市販されている呼吸器デバイスのこれらの具体的態様は、本発明の実施に適する具体的なデバイスの代表であることが意図され、本発明の範囲を限定するものではない。好ましくは少なくとも１つの抗-TNF抗体を含んで成る組成物は、乾燥粉末呼吸器または噴霧器により送達される。これらは本発明の少なくとも１つの抗体を投与するための吸入デバイスの幾つかの望ましい特徴である。例えば吸入デバイスによる送達は有利には、信頼性があり、再現性があり、そして正確である。吸入デバイスは場合により、良好な呼吸適性のために小さい乾燥粒子（例えば約10μm未満、好ましくは約１～５μm）を送達することができる。

噴霧としてTNF抗体組成物の投与

TNF抗体組成物タンパク質を含む噴霧は、少なくとも１つの抗-TNF抗体の懸濁液または溶液を加圧下のノズルを通すことにより生成することができる。ノズルのサイズはおよび形状、かける圧力および液体供給速度は、所望の出力および粒子サイズを達成するために選択することができる。電気噴霧は例えば毛細管またはノズル供給部に連結した電場により生成できる。有利には噴霧器により送達される少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物タンパク質の粒子は、約10μm未満、好ましくは約１～約５μmの範囲、そして最も好ましくは約２μm～約３μmの粒子サイズを有する。

【０１４６】

噴霧器で使用するために適当な少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物タンパク質の製剤は

典型的には水溶液中、１mlの溶液あたり、またはmg/gmで約0.1mg～約100mgの少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物タンパク質、またはその中の任意の範囲または値の濃度で抗体組成物タンパク質を含み、例えば限定するわけではないが0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、１、２、３、４、５、６、７、８、９、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90または100mg/mlまたはmg/gmを含む。製剤は賦形剤、バッファー、等張剤、保存剤、表面活性剤および好ましくは亜鉛のような作用物質（agent）を含むことができる。製剤はまた、抗体組成物タンパク質を安定化するためにバッファー、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物のような賦形剤または作用物質を含むことができる。抗体組成物タンパク質を製剤するために有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミン等を含む。抗体組成物タンパク質を製剤するために有用な典型的な炭水化物には、シュクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコース等を含む。抗体組成物タンパク質製剤はエーロゾルを形成する溶液の噴霧化により引き起こされる抗体組成物タンパク質の表面が誘導する凝集を下げ、または防止することができる表面活性剤を含むこともできる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコールおよびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルのような種々の通例の表面活性剤を使用することができる。量は一般に製剤の0.001から14重量％の間である。本発明の目的に特に好適な表面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート80、ポリソルベート20等である。さらなるTNF抗体または特定部分または変異体のようなタンパク質の製剤のために当該技術分野で既知のさらなる作用物質も製剤に含むことができる。

ネブライザーによるTNF抗体組成物の投与

抗体組成物タンパク質は、ジェットネブライザーまたは超音波ネブライザーのようなネブライザーにより投与することができる。典型的にはジェットネブライザーでは、圧縮空気源を使用してオリフィスを通る高速エアジェットを作成する。ガスがノズルを越えて膨張すると低圧領域が作成され、これが液体リザーバーに連結された毛細管を通って抗体組成物タンパク質の溶液を引き出す。毛細管からの液体流は、管から出る時に不安定なフィラメントおよび液滴に剪断され、エーロゾルを作成する。ある範囲の形状、流速、およびそらせ板型を使用して、上記のジェットネブライザーから所望の性能特性を達成することができる。超音波ネブライザーでは、高周波電気エネルギーを使用して、典型的には圧電変圧器を使用して、振動的、機械的エネルギーを作成することができる。このエネルギーを直接的に、またはカップリング流体を通すいずれかで抗体組成物タンパク質の製剤に伝え、抗体組成物タンパク質を含むエーロゾルを作成する。有利にはネブライザーにより送達される抗体組成物タンパク質の粒子は、約10μm未満、好ましくは約１μm～約５μmの範囲、そして最も好ましくは約２μm～約３μmの粒子サイズを有する。

【０１４７】

ジェットまたは超音波のいずれのネブライザーを用いても、使用するために適当な少なくとも１つの抗-TNF抗体の製剤は、典型的には１mlの溶液あたり約0.1mg～約100mgの少なくとも１つの抗-TNF抗体タンパク質の濃度を含む。製剤は賦形剤、バッファー、張性調整剤、保存剤、表面活性剤および好ましくは亜鉛のような作用物質を含むことができる。製剤はまた、バッファー、還元剤、バルクタンパク質または炭水化物のような、少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物タンパク質を安定化するための賦形剤または作用物質を含むこともできる。少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物タンパク質を製剤するために有用なバルクタンパク質には、アルブミン、プロタミン等を含む。少なくとも１つの抗-TNF抗体を製剤するために有用な典型的な炭水化物には、シュクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコース等を含む。少なくとも１つの抗-TNF抗体製剤はエーロゾルを形成する溶液の噴霧化により引き起こされる少なくとも１つの抗-TNF抗体の表面が誘導する凝集を下げ、または防止することができる表面活性剤を含むこともできる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコールおよびポリオキシエチレンソルビタル脂肪酸エステルのような種々の通例の表面活性剤を使用することができる。量は一般に製剤の0.001から４重量％の間の範囲である。本発明の目的に特に好適な表面活性剤は、ポリオキシエチ

レンソルビタンモノオレート、ポリソルベート80、ポリソルベート20等である。抗体タンパク質のようなタンパク質の製剤のために当該技術分野で既知のさらなる作用物質も製剤に含むことができる。

計量用量呼吸器によるTNF抗体組成物の投与

計量用量呼吸器（metered dose inhaler:MDI）では、噴射剤ガス、少なくとも１つの抗-TNF抗体および任意の賦形剤または他の添加剤を、液化圧縮ガスを含む混合物としてキャニスターに含む。計量バルブの作動は好ましくは、約10μm未満、好ましくは約１μm～約５μm、そして最も好ましくは約２μm～約３μmの範囲のサイズの粒子を含むエーロゾルとしての混合物を放出する。所望のエーロゾル粒子サイズは、ジェット-ミル（jet-milling）、噴霧乾燥、臨界点縮合等を含む当業者に既知の種々の方法により生成される抗体組成物タンパク質の製剤を使用することにより得ることができる。好適な計量用量呼吸器には、３Ｍまたはグラクソにより製造されたものを含み、そしてヒドロフルオロカーボン噴射剤を採用するものを含む。

【０１４８】

計量用量呼吸器デバイスで使用するための少なくとも１つの抗-TNF抗体の製剤は、一般に少なくとも１つの抗-TNF抗体を含む細かく分割した粉末を、懸濁液として非水性媒質中に、例えば表面活性剤により噴射剤に懸濁して含む。噴射剤は、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび1,1,1,2-テトラフルオロエタン、HFA-134a（ヒドロフルオロアルカン-134a）、HFA-227（ヒドロフルオロアルカン-227）等を含むクロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルロカーボンまたは炭化水素のような、この目的に使用される任意の通例の材料であることができる。好ましくは噴射剤はヒドロフルオロカーボンである。表面活性剤は、噴射剤中の懸濁液として少なくとも１つの抗-TNF抗体を安定化するために、化学分解等に対して活性剤を保護する等のために選択することができる。適当な表面活性剤にはソルビタントリオレート、ダイズ レシチン、オレイン酸等を含む。場合により溶液エーロゾルは、エタノールのような溶媒を使用することが好ましい。タンパク質のようなタンパク質の製剤に当該技術分野で既知のさらなる作用物質を、製剤に含むこともできる。

【０１４９】

当業者は、本発明の方法を本明細書に記載していないデバイスを介して少なくとも１つの抗-TNF抗体組成物を肺投与することにより達成できることを認識しているだろう。

経口製剤および投与

経口用の製剤は、腸壁の透過性を人工的に上げるための補助剤（例えばレゾルシノールおよびポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンのような非イオン性表面活性剤）の同時投与、ならびに酵素的分解を阻害するための酵素インヒビター（例えば膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェート(DFF)およびトラシロール）の同時投与に依存する。経口投与用の固体型の剤形の活性成分化合物を、シュクロース、ラクトース、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、澱粉、寒天、アルギネート、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントゴム、アラビアゴム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成もしくは半合成ポリマーおよびグリセリドを含む少なくとも１つの添加剤と混合することができる。これらの剤形は他の種類（１つまたは複数）の添加剤、例えば不活性な希釈剤、ステアリン酸マグネシウム、パラベンのような潤滑剤、ソルビン酸、アスコルビン酸、アルファートコフェロールのような保存剤、システインのような酸化防止剤、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、甘味料、フレーバー（flavoring agent）、香料等も含むことができる。

【０１５０】

錠剤およびピルはさらに腸溶性コート調製物に加工することができる。経口投与用の液体調製物には、医学的使用が可能な乳液、シロップ、エリキシル、懸濁液および溶液調製物を含む。これらの調製物は該分野で通常使用されている不活性希釈剤、例えば水を含むことができる。インスリンおよびヘパリンの薬剤送達系としてリポソームも記載された（

米国特許第4,239,754号明細書）。さらに最近では、混合アミノ酸（プロテイノイド）の人工ポリマーの微小球も薬剤を送達するために使用された（米国特許第4,925,673号明細書）。さらに米国特許第5,879,681号および同第5,5,871,753号明細書に記載されたキャリアー化合物も生物学的に活性な作用物質を経口で送達するために使用され、そして当該技術分野で既知である。

粘膜製剤および投与

粘膜表面を通して吸収させるために、少なくとも１つの抗-TNF抗体を投与する組成物および方法には、複数のミクロン以下の粒子、粘膜接着性高分子、生物活性ペプチドおよび水性の連続相を含んで成る乳液を含み、これは乳液粒子の粘膜接着を達成することにより粘膜表面を通る吸収を促進する（米国特許第5,514,670号明細書）。本発明の乳液の適用に適する粘膜表面には、角膜、結膜、頬、舌、鼻、膣、肺、胃、腸および直腸経路の投与を含む。膣および直腸投与の製剤、例えば坐薬は、賦形剤として例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ脂等を含むことができる。鼻内投与用の製剤は固体であることができ、そして賦形剤として例えばラクトースを含み、または点鼻の水性もしくは油性溶液であることができる。バッカル投与には賦形剤は糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、前固化澱粉等を含む（米国特許第5,849,695号明細書）。

経皮組成物および投与

経皮投与には、少なくとも１つの抗-TNF抗体をリポソームまたはポリマー性ナノ粒子、ミクロ粒子、ミクロカプセルまたは微小球（特に言及しない限り、集合的にミクロ粒子と呼ぶ）のような送達デバイスにカプセル化する。多数の適当なデバイスが知られており、それらにはポリ乳酸、ポリグリコール酸およびそれらのコポリマーのようなポリヒドロキシ酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物およびポリホスファゼンのような合成ポリマー、ならびにコラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミンおよび他のタンパク質、アルギネートおよび他の多糖およびそれらの組み合わせのような天然ポリマーから作られたミクロ粒子を含む（米国特許第5,814,599号明細書）。

持効性投与および組成物

本発明の化合物は個体に長期間、例えば単回投与で１週間から１年間にわたり送達することがしばしば望ましい場合がある。種々の緩効性、貯蔵またはインプラント剤形を利用することができる。例えば剤形は、体液中での溶解性が低い化合物の医薬的に許容される非毒性塩、例えば（ａ）リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パーム酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレン モノ-またはジ-スルホン酸、ポリガラクツロン酸等のような多塩基性酸との酸付加塩；（ｂ）亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム等のような多価金属カチオン、または例えばN,N'-ジベンジル-エチレンジアミンまたはエチレンジアミンから形成される有機カチオンとの塩；あるいは（ｃ）（ａ）および（ｂ）の組み合わせ、例えばタンニン酸亜鉛塩を含むことができる。さらに本発明の化合物は、または好ましくは今ちょうど記載したような比較的不溶性の塩はゲル、例えば注入に適するゴマ油を含む例えばモノステアリン酸アルミニウムゲルに配合することができる。特に好適な塩は、亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パーム酸塩等である。注入用の別の種類の緩効性貯蔵製剤は、例えば米国特許第3,773,919号明細書に記載されているようなポリ乳酸／ポリグリコール酸ポリマーのような緩効分解型の非毒性、非抗原性ポリマー中にカプセル化するために分散した化合物または塩を含む。化合物または好ましくは上記の比較的不溶性の塩は、特に動物で使用するために、コレステロールマトリックスシラスティック（silastic）ペレット中に配合することもできる。さらなる緩効性の、貯蔵またはインプラント製剤、例えばガスまたは液体リポソームは技術文献で知られている（米国特許第5,770,222号明細書および「徐放性および放出制御薬剤送達系（Sustained and Controlles Release Drug Delivery Systems)」、J.R.Robinson 編集、マルセルデッカー社、ニューヨーク、1978)。

【０１５１】

本発明を一般的に記載してきたが、これは具体的説明により提供し、そして限定を意味しない以下の実施例を参照することにより、より容易に理解できるだろう。

【実施例】
【０１５２】
実施例１：哺乳動物細胞中でのTNF抗体のクローニングおよび発現
典型的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介する少なくとも１つのプロモーター要素、抗体コード配列および転写の終結および転写物のポリアデニレーションに必要なシグナルを含む。さらなる要素にはエンハンサー、Kozak配列およびRNAスプライシングのための供与および受容部位により挟まれた介在配列を含む。高度に効率的な転写はSV40に由来する初期および後期プロモーター、レトロウイルス、例えばRSV、HTLVI、HIVIに由来する長い末端反復配列（LTRS）、およびサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーターにより達成され得る。しかし細胞要素（例えばヒトアクチンプロモーター）も使用することができる。本発明を実施するために適当な発現ベクターには、例えばpIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSNまたはpLNCX（クローンテック ラボズ(Clonetech Labos）、パロアルト、カリフォルニア州）、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo((+/-)またはpcDNA3.1/Hygro(+/-)（インビトロゲン（Invitrogen)）、PSVLおよびPMSG（ファルマシア(Pharmacia)、ウプサラ、スウェーデン）、pRSVcat(ATCC37152）、pSV2dhfr(ATCC37146)およびpBC12MI(ATCC67109)を含む。使用できた哺乳動物宿主細胞には、ヒトHela 293、H9およびJurkat細胞、マウスNIH3T3およびC127細胞、Cos1、Cos7およびCV1、quailQC1-3細胞、マウスＬ細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を含む。
【０１５３】
あるいは遺伝子は染色体に組み込まれた遺伝子を含む安定な細胞系で発現させることができる。dhfr、gpt、ネオマイシンまたはヒグロマイシンのような選択可能なマーカーを用いたコートランスフェクション（co-transfection）により、トランスフェクトした細胞の同定および単離が可能となる。
【０１５４】
トランスフェクトした遺伝子は、大量のコードされた抗体を発現させるために増幅することもできる。DHFR（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）マーカーは、数百またはさらに数千の目的遺伝子のコピーを持つ細胞系の開発するために有用である。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ（GS)(Murphy,et al.,Biochem.J.227:277-279(1991);Bebbington,et al.,Bio/Technology 10:169-175(1992))である。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培地で成長させ、そして最高の耐性を持つ細胞を選択する。これらの細胞系は、染色体に組み込まれた増幅した遺伝子（１つまたは複数）を含む。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）およびNSO細胞は、抗体の生産によく使用される。
【０１５５】
発現ベクターpC1およびpC4は、ラウス肉腫ウイルス（Cullen et al.,Molec.Cell.Biol.5:438-447(1985))の強力なプロモーター（LTR）に加えてCMV-エンハンサーのフラグメント（Boshart,et al.,Cell 41:521-530(1985))を含む。多クローニング部位（例えば制限酵素開裂部位であるBamHI、XbaIおよびAsp718を含む）は、目的遺伝子のクローニングを容易にする。ベクターは３'イントロンに加えて、ラットのプレプロインスリン遺伝子のポリアデニレーションおよび終結シグナルを含む。
CHO細胞中でのクローニングおよび発現
ベクターpC4をTNF抗体の発現に使用する。プラスミドpC4は、プラスミドpSV2-dhfr（ATCC寄託番号37146）の誘導体である。プラスミドはマウスDHFR遺伝子をSV40初期プロモーターの制御下に含む。これらのプラスミドでトランスフェクトしたジヒドロ葉酸活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣－または他の細胞は、細胞を化学療法剤であるメトトレキセートを補充した選択培地（例えばアルファマイナスMEM、ライフテクノロジーズ（Life Technologies）、ゲチスバーグ、メリーランド州）中で成長させることにより選択することができる。メトトレキセート（MTX）に対して耐性の細胞中のDHFR遺伝子の増幅が十分に示された（例えば、F.W.Alt,et al.,J.Biol.Chem.253:1357-1370(1978);J.L.Hamlin and C.Ma.Biochem.et Biophys.Acta 1097:107-143(1990);およびM.J.Page and M.A.Sydenham,Biotechnology 9:64-68(1991)を参照にされたい）。MTXの濃度を上昇させて成長させた

細胞は、DHFR遺伝子の増幅の結果として目的酵素であるDHFRの過剰生産により薬剤への耐性を生じる。第２遺伝子がDHFR遺伝子に連結されている場合、これは通常、同時に増幅され（co-amplified）、そして過剰に発現される。当該技術分野では、この取り組みが1000コピー以上の増幅した遺伝子（1つまたは複数）を持つ細胞系を発生するために使用できることが知られている。続いてメトトレキセートを離脱する時、宿主細胞の１以上の染色体（１つまたは複数）に組み込まれた増幅された遺伝子を含む細胞系が得られる。

【０１５６】

プラスミドpC4は目的遺伝子を発現するために、ラウス肉腫ウイルス（Cullen et al.,Molec.Cell.Biol.5:438-447(1985))の長い末端反復配列の強力なプロモーター（LTR）に加えて、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）の前初期遺伝子のエンハンサーから単離されたフラグメント（Boshart,et al.,Cell 41:521-530(1985))を含む。プロモーターの下流は、遺伝子の組み込みを可能とするBamHI、XbaIおよびAsp718制限酵素開裂部位である。これらのクローニング部位の後ろに、プラスミドはラットのプレプロインスリン遺伝子の３'イントロンおよびポリアデニレーション部位を含む。他の高効率プロモーター、例えばヒトb-アクチンプロモーター、SV40初期および後期プロモーターまたは他のレトロウイルス（例えばHIVおよびHTLVI）に由来する長い末端反復配列も発現に使用することができる。クローンテックのTet-OffおよびTet-On遺伝子発現系および同様な系は、哺乳動物細胞中で調節された様式でTNFを発現させるために使用できる（M.Gossen,and H.Bujard,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992)）。mRNAのポリアデニレーションには、他のシグナル、例えばヒト成長ホルモンまたはグロビン遺伝子に由来するシグナルも使用することができる。染色体に組み込まれた目的の遺伝子を持つ安定な細胞系は、gpt、G418またはヒグロマイシンのような選択可能マーカーを用いたコ-トランスフェクションでも選択できる。始めに１より多くの選択可能なマーカーを（例えばG418に加えてメトトレキセート）使用することが有利である。

【０１５７】

プラスミドpC4は制限酵素で消化し、そして次いでウシの腸ホステァターゼを使用して既知の手法により脱リン酸化される。次いでベクターは１％アガロースゲルから単離される。

【０１５８】

単離された可変および定常領域をコードするDNAおよび脱リン酸化ベクターは、次いでT4 DNAリガーゼで連結される。大腸菌（E.coli）HB101またはXL-1ブルー細胞を形質転換し、そして細菌が例えば制限酵素分析を使用してプラスミドpC4中に挿入されたフラグメントを含むことを確認する。

【０１５９】

活性なDHFR遺伝子を欠くチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞をトランスフェクションに使用する。５ｇの発現プラスミドpC4を0.5gのプラスミドpSV2-neoを用いてリポフェクチンを使用してコ-トランスフェクトする。プラスミドpSV2neoは、G418を含む抗生物質群に対して耐性を付与する酵素をコードするTn5に由来する優性選択性マーカーであるneo遺伝子を含む。この細胞を、１g/mlのG418を補足したアルファマイナスMEMにまく。２日後、細胞をトリプシン処理し、そして10、25または50ng/mlのメトトレキセートに加えて１g/mlのG418を補足したハイブリドーマクローニングプレート（グレイナー（Greiner）、独国）（アルファマイナスＭＥＭ中）にまく。約10～14日後、１つのクローンをトリプシン処理し、そして異なる濃度のメトトレキセート（50nM、100nM、200nM、400nM、800nM）を使用して６-ウェルのペトリ皿または10mlのフラスコにまく。最高濃度のメトトレキセートで成長させたクローンを、さらにより高濃度のメトトレキセート（１mM、２mM、５mM、10mM、20mM）を含む新たな６-ウェルプレートに移す。100～200mM濃度で成長するクローンが得られるまで、同じ手順を繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を例えばSDS-PAGEおよびウエスタンブロットにより、または逆相HPLC分析により分析する。

実施例２：トランスジェニックマウスを使用したヒトTNFに反応性の高親和性ヒトIgGモノクローナル抗体の生成

要約

ヒト重および軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスを使用して、１以上のTNF-媒介疾患を処置するためにTNFの作用を治療的に阻害するために使用できる高親和性の完全にヒトのモノクローナル抗体を生成した。重および軽鎖の両方のヒト可変および定常領域抗体導入遺伝子を含む（CBA/JxC57/BL6/J)F_2ハイブリッドマウスを、ヒト組換えTNFで免疫感作する（Taylor et al.,Intl.Immunol.6:579-591(1993):Lonberg,et al.,Nature 368:856-859(1994);Neuberger,M.,Nature Biotech.14:826(1996);Fishwild,et al.,Nature Biotechnology.14:845-851(1996)）。幾つかの融合物が完全なヒトTNF反応性IgGモノクローナル抗体の１以上のパネルを生じた。完全なヒト抗-TNF抗体をさらに特徴つける。すべてがIgG1である。そのような抗体は１×10^9から９×10^{12}の間あたりの親和性定数を有することがわかる。これらの完全なヒトモノクローナル抗体の予期せぬ高親和性により、TNF関連疾患、病理または障害における治療的応用に適する候補となる。

略号

BSA－ウシ血清アルブミン
CO_2－二酸化炭素
DMSO－ジメチルスルフォキシド
EIA－酵素イムノアッセイ
FBS－ウシ胎児血清
H_2O_2－過酸化水素
HRP－西洋ワサビペルオキシダーゼ
ID－皮内
Ig－免疫グロブリン
TNF－組織壊死因子アルファ
IP－腹腔内
IV－静脈内
Mab－モノクローナル抗体
OD－光学密度
OPD－o-フェニレンジアミン ジヒドロクロライド
PEG－ポリエチレングリコール
RSA－ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン
RT－室温
SQ－皮下
v/v－容量あたりの容量
w/v－容量あたりの重量

材料および方法

動物

ヒト免疫グロブリンを発現するがマウスIgMまたはIgを発現しない、ヒト抗体を発現できるトランスジェニックマウスは当該技術分野では知られており、そして市販されている（例えば、ジェンファーム インターナショナル(GenPharm International)、サンジョーズ、カリフォルニア州；アビジェニックス(Abgenix)、フリーモント、カリフォルニア州、およびその他から）。例えばそのようなトランスジェニックマウスは、V(D)J連結、重鎖クラススイッチ、および免疫グロブリンのヒト配列のレパートリーを生成する体性の突然変異を受けるヒト配列導入遺伝子を含む（Lonberg,et al.,Nature 368:856-859(1994)）。軽鎖導入遺伝子は、例えば一部は生殖細胞系ヒトＶ領域のほぼ半分を含む酵母人工染色体クローンに由来することができる。加えて、重鎖導入遺伝子はヒトμおよびヒト１(Fishwild,et al.,Nature Biotechnology 14:845-851(1996))および／または３定常領域の両方をコードすることができる。適当な遺伝子系統に由来するマウスを免疫感作および融合法に使用して、TNFに対する完全なヒトモノクローナル抗体を生成することができる。

免疫感作

１以上の免疫感作スケジュールを使用して、抗-TNFヒトハイブリドーマを作成すること

ができる。例示的な免疫感作プロトコールにしたがった後、最初に幾つかの融合を行うことができるが、他の類似の既知のプロトコールを使用することもできる。数匹の14～20週齢のメスおよび／または外科的に精巣を除去したトランスジェニック体のオスのマウスを、100～400μl（例えば200）の最終容量中に等容量のTITERMAXまたは完全フロインドアジュバントで乳化した１～1000μgの組換えヒトTNFを用いてIPおよび／またはIDで免疫感作する。各マウスは場合により１～10μg（100μLの生理食塩水中）を２つの各SQ部位に受容することができる。マウスは１～７、５～12、10～18、17～25および／または21～34日後にIP（1～400μg）およびSQ（１～400μg×２）で、等容量のTITERMAXまたは不完全フロインドアジュバントで乳化したTNFを免疫感作することができる。マウスは12～25および25～40日後に、後－眼窩穿刺により抗凝固剤無しで採血することができる。次いで血液をRTで1時間凝固させ、そして血清を集め、そしてTNF ELISAアッセイを使用して既知の方法に従い滴定する。融合は反復注射が力価の上昇を引き起こさない時に行う。その時点で、マウスには100μLの生理食塩水中に希釈した１～400μgのTNFの最後のIV追加注射を与えることができる。３日後、マウスは頸部転位により屠殺し、そして脾臓を無菌的に摘出し、そして100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシンおよび0.25μg/mLのアンホテリシンＢ（PSA）を含む10mLの冷リン酸緩衝化生理食塩水(PBS）に浸漬する。脾臓細胞は、脾臓にPSA-PBSを無菌的に潅流することにより回収する。細胞を冷PSA-PBS中で１回洗浄し、トリパン ブルー色素による排除を使用して計数し、そして25mM Hepesを含むRPMI 1640培地に再懸濁する。

細胞融合

融合は、1:1～1:10の比率のマウスミエローマ細胞対生きている脾臓細胞で、例えば当該技術分野で既知の知られている方法に従い行うことができる。非限定的例として、脾臓細胞およびミエローマ細胞を一緒にペレットとすることができる。次にペレットをゆっくりと30秒間にわたり、37℃で１mLの50(重量／容量）％のPEG／PBS溶液に再懸濁する（PEGの分子量は1,450、シグマ）。次いで融合は25mM Hepes(37C)を含有する10.5mLのRPMI1640培地を１分間にわたりゆっくりと加えることにより停止することができる。融合した細胞を500～1500rpmで５分間遠心する。次いで細胞をHAT培地（25mM Hepes、10％胎児クローンI血清(ハイクローン(Hyclone)、１mM ピルビン酸ナトリウム、４mM L-グルタミン、10μg/mL ゲンタマイシン、2.5％オリジェン（Origen)培養補給物（フィッシャー:Fisher）、10％ 653-コンディショニングRPMI1640/Hepes培地、50μM 2-メルカプトエタノール、100μM ヒポキサンチン、0.4μM アミノプテリンおよび16μM チミジン）に再懸濁し、そして次いで200μL/ウェルで15個の96ウェルの平底組織培養プレートにまく。次いでプレートは５％CO_2および95％空気を含む37Ｃの加湿インキューベーター中に７～10日間、置く。

マウス血清中のヒトIgG抗-TNF抗体の検出

固相EIA'sを使用して、ヒトTNFに特異的なヒトIgG抗体についてマウス血清をスクリーニングすることができる。簡単に説明すると、プレートを２μg/mLのTNF(PBS中)で一晩コートすることができる。0.02(容量／容量)％のTween 20を含む0.15Mの塩水で洗浄した後、ウェルを１(重量／容量)％BSA(PBS中）、200μL／ウェルでRTにて１時間ブロックすることができる。プレートは直ちに使用するか、または使用するまで－20Ｃで凍結する。マウス血清の希釈物は、TNFをコートしたプレート上で50μL/ウェルでRTにて１時間インキューベーションする。プレートを洗浄し、そして次いで1:30,000に希釈した（１％ BSA-PBS中）50μL/ウェルのHRP-標識ヤギ抗-ヒトIgG、Fc特異的でRTにて１時間、釣り上げる。再度プレートを洗浄し、そして100μL／ウェルのクエン酸-リン酸基質溶液（0.1M クエン酸および0.2M リン酸ナトリウム、0.01％H_2O_2および１mg/mL OPD）をRTで15分間加えることができる。次いで停止溶液（４N 硫酸）を25μL/ウェルで加え、そしてODは490nmで自動化プレート分光光度計を介して読む。

ハイブリドーマ上清中の完全なヒト免疫グロブリンの検出

完全なヒト免疫グロブリンを分泌する成長陽性ハイブリドーマは、適当なEIAを使用して検出することができる。簡単に説明すると、96ウェルポップ-アウト（pop-out）プレー

ト（VWR、610744）を10μg/mLのヤギ抗-ヒトIgG Fc（炭酸ナトリウムバッファー中）で４℃にて一晩コートすることができる。プレートを洗浄し、そして１％BSA-PBSで37℃にて１時間ブロックし、そして直ちに使用するか、または－20Ｃに凍結する。希釈していないハイブリドーマ上清をプレート上で37℃で１時間インキューベーションする。プレートを洗浄し、そしてHRP標識ヤギ抗-ヒトカッパ（１％BSA-PBS中で1:10,000に希釈）で37℃にて１時間、釣り上げる。次いでプレートを基質溶液と上記のようにインキューベーションする。

完全なヒト抗-TNF反応性の測定

上記のようなハイブリドーマを、適当なRIAまたは他のアッセイを使用してTNFに対する反応性について同時にアッセイすることができる。例えば上清をヤギ抗-ヒトIgG Fcプレート上で上記のようにインキューベーションし、洗浄し、そして次いでウェルあたり適切なカウントを持つ放射標識TNFでRTにて１時間釣り上げる。ウェルをPBSで２回洗浄し、そして結合した放射標識TNFを適当なカウンターを使用して定量する。

【０１６０】

ヒトIgG1抗-TNF分泌ハイブリドーマを細胞培養で拡大し、そして限界希釈により連続的にサブクローン化することができる。生成したクローン群を拡大し、そして凍結媒質（95％FBS、５％DMSO）中で寒冷保存し、そして液体窒素中で保存することができる。

アイソタイピング

抗体のアイソタイプの決定は、特異的力価についてマウス免疫血清をスクリーニングするために使用したものと同じ形式のEIAを使用して行うことができる。TNFは上記のように96-ウェルプレートにコートし、そして精製した２μg/mLの抗体をプレート上でRTにて１時間インキューベーションすることができる。プレートを洗浄し、そしてHRP標識ヤギ抗-ヒトIgG_1またはHRP標識ヤギ抗-ヒトIgG_3（１％BSA-PBS中で1:4,000に希釈）でRTにて１時間、釣り上げる。次いでプレートを再度、洗浄し、そして基質溶液と上記のようにインキューベーションする。

ヒト抗-ヒトTNF抗体とヒトTNFとの結合動力学

抗体の結合特性は、例えばTNF捕捉EIAおよびBIAcore法を使用して適当に評価することができる。精製したヒトTNF抗体の段階的濃度を、上記のようなアッセイで２μg/mLのTNFでコートしたEIAプレートへの結合について評価することができる。ODは相対的結合効率を示す半－対数プロットとして与えることができる。

【０１６１】

定量的な結合定数は、例えば以下のように、または任意の既知の適当な方法により得ることができる。BIAcoreCM-5（カルボキシメチル）チップをBIAcore2000ユニットに置く。HBSバッファー（0.01M HEPES、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005容量／容量% P20表面活性剤、pH7.4）を、安定なベースラインが得られるまで５μL/分でチップのフローセルに流す。100μLの15mgのEDC（N-エチル-N'-(3-ジメチル-アミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロライド）の溶液（200μLの水中）を100μLの2,3mg NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)の溶液（200μLの水中）に加える。40μLの生成した溶液をチップに注入する。６μLのヒトTNF溶液（10mM 酢酸ナトリウム、pH4.8中の15μg/mL）をチップに注入し、約500RUの上昇を生じる。バッファーをTBS/Ca/Mg/BSAラニングバッファー(20mM Tris、0.15M塩化ナトリウム、２mM 塩化カルシウム、２mM 酢酸マグネシウム、0.5%Triton X-100、25μg/mL BSA、pH7.4)に変え、そしてチップを平衡化し、そして任意の未反応スクシンイミドエステルを加水分解またはキャップするためにチップ上に一晩流す。

【０１６２】

抗体をラニングバッファーに33.33、16.67、8.33および4.17nMで溶解する。流速は30μL/分、そして装置温度は25℃に調整する。２つのフローセルを動力学実験に使用し、１つにはTNFが固定化され（サンプル）、そして２つ目は非誘導化フローセル（ブランク）である。各濃度の抗体120μLをフローセルに30μL/分で注入し（結合相）、続いて連続した360秒間のバッファー流を注入する(解離相)。チップの表面は、30μLの各２M グアニジンチオシアネートを２回連続して注入することにより再生する（組織壊死因子アルファ／抗

体複合体の解離）。

【０１６３】

データの分析は、当該技術分野で既知のBIA評価3.0またはCLAMP2.0を使用して行う。各抗体濃度について、ブランクのセンソグラム（sensogram）をサンプルのセンソグラムから引く。全体的な適合は、解離（K_d、sec^{-1})および結合（K_a、$mol^{-1}sec^{-1}$)について行い、そして解離定数（K_D、mol)を算出する（k_d／k_a）。捕捉された抗体のRUが＞100であるほど抗体の親和性が十分に高い場合、さらに抗体を希釈して実験する。

結果および考察

抗-ヒトTNFモノクローナル抗体の生成

幾つかの融合を行い、そして各融合は15プレート（1440ウェル／融合）にまいて、ヒトTNFに特異的な数ダースの抗体を得る。もちろん中にはヒトおよびマウスIg鎖の組み合わせから成るものもある。残りのハイブリドーマは、ヒト重鎖および軽鎖のみから成る抗-TNF抗体を分泌する。ヒトのハイブリドーマはすべて、IgG1になると予想される。

ヒト抗-ヒトTNF抗体の結合動力学

ELISA分析では、これらのほとんどのハイブリドーマに由来する精製抗体が濃度依存的様式でTNFに結合することを確認する。図１～２は、これら抗体の相対的結合効率の結果を示す。この場合、抗体のそのコグネイト抗原（エピトープ）に関するアビディティを測定する。EIAプレートへのTNFの直接結合はタンパク質の変性を引き起こし、そして外見上の結合親和性は非変性タンパク質に対する結合を反映できないことに注目すべきである。50％の結合が１つの濃度範囲で見られる。

【０１６４】

定量的な結合定数はヒト抗体のBIAcore分析を使用して得、そして幾つかのヒトモノクローナル抗体が1×10^{-9}～7×10^{-12}の範囲のK_Dの高い親和性であることが明らかである。

結論

幾つかの融合は、ヒトTNFを免疫感作したヒト可変およびヒト定常領域抗体の導入遺伝子を含むハイブリッドマウスの脾臓細胞を使用して行う。数セットの完全なヒトTNF反応性IgGモノクローナル抗体IgG1アイソタイプを生成する。完全なヒト抗-TNF抗体をさらに特性決定する。幾つかの生成した抗体は、1×10^{9}から9×10^{12}の間の親和定数を有する。予期せずに、これら完全なヒトモノクローナル抗体の高親和性により、それらはTNF依存性疾患、病理または関連状態における治療的応用に適するようになる。

実施例２：ヒトTNF∀に反応性のヒトIgGモノクローナル抗体の生成

要約

重および軽鎖に関するヒト可変および定常領域抗体導入遺伝子を含む(CBA/JxC57BL/6J)F_2ハイブリッドマウス(１～４)は、組換えヒトTNF∀で免疫感作した。GenTNVと命名された１つ融合体は、固定化した組換えヒトTNFαに結合する８つの全部のヒトIgG1κモノクローナル抗体を生じた。同定してからすぐに、８つの細胞系をさらに特性決定するために分子生物学へ移した。これらのMabは配列が全部ヒトであるので、cA2（Remicade）よりはヒト対する免疫原性が低いと予想される。

略号

BSA－ウシ血清アルブミン

CO_2－二酸化炭素

DMSO－ジメチルスルフォキシド

EIA－酵素イムノアッセイ

FBS－ウシ胎児血清

H_2O_2－過酸化水素

HC－重鎖

HRP－西洋ワサビペルオキシダーゼ

Ig－免疫グロブリン

IP－腹腔内

IV－静脈内
Mab－モノクローナル抗体
OD－光学密度
OPD－o-フェニレンジアミン ジヒドロクロライド
PEG－ポリエチレングリコール
RSA－ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン
RT－室温
SQ－皮下
TNF∀－腫瘍壊死因子アルファ
v/v－容量あたりの容量
w/v－容量あたりの重量

はじめに

ヒトの重および軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスを使用して、組換えヒトTNF∀に特異的な全部がヒトのモノクローナル抗体を生成した。cA2（Remicade）がTNF∀が媒介する疾患に関与する炎症プロセスを治療的に阻害するために使用されるように、これらの独自な抗体は血清半減期を上げ、そして免疫原性に関連する副作用を下げて使用できることが期待される。

材料および方法

動物

ヒト免疫グロブリンを発現するがマウスIgMまたはIgκを発現しないトランスジェニックマウスは、ジェンファーム インターナショナルにより開発された。これらのマウスは、V(D)J連結、重鎖クラススイッチ、および抗原－特異的なヒトの免疫グロブリンのレパートリーを生成する体性の突然変異を受ける機能的なヒト抗体導入遺伝子を含む（１）。軽鎖導入遺伝子は、一部は生殖細胞系ヒトＶκ座のほぼ半分を含む酵母人工染色体クローンに由来する。幾つかのVH遺伝子に加えて、重鎖（HC）導入遺伝子はヒトμおよびヒトγ１(２)および／またはγ３定常領域の両方をコードする。HCo12/KCo5遺伝子型系統に由来するマウスを、ここに記載するモノクローナル抗体を生成するための免疫感作および融合法に使用した。

ヒトTNF∀の精製

ヒトTNF∀はC237A細胞に由来する組織培養上清からアフィニティークロマトグラフィーにより、Sepharose 4B（ファルマシア）にカップリングしたTNF∀受容体－Fc融合タンパク質（p55-sf2)を充填したカラムを使用して精製した。細胞上清はその1/9容量の10×ダルベッコのPBS（D-PBS）と混合し、そして４℃で４mL/分でカラムに通した。次いでカラムをPBSで洗浄し、そしてTNF∀を0.1M クエン酸ナトリウム、pH3.5で溶出し、そして２M Tris-HCl、pH8.5で中和した。精製したTNF∀は10mM Tris、0.12M 塩化ナトリウムpH7.5にバッファーを変え、そして0.2μmのシリンジフィルターを通して濾過した。

免疫感作

メスのGenPharmマウス（約16週齢）は、０、12および28日に等容量のTitermaxアジュバントで乳化した100μgのTNF∀(ロット番号JG102298またはJG102098）を用いてIP（200μL）およびID（100μL、尾の基部に）免疫感作した。マウスは21および35日に、後－眼窩穿刺により抗凝固剤無しで採血した。血液をRTで1時間凝固させ、そして血清を集め、そしてTNF∀固相EIAアッセイを使用して滴定した。GenTNVと命名された融合はマウスが28日に注射した後７週間、休ませた後に行った。TNF∀に対して1:160の特異的ヒトIgG力価を持つマウスに、100μLの生理食塩水で希釈した50μgのTNF∀を最後のIV追加免疫注射で与えた。３日後、マウスは頸部転位により屠殺し、そして脾臓を無菌的に摘出し、そして100U/mLのペニシリン、100μg/mLのストレプトマイシンおよび0.25μg/mLのアンホテリシンＢ（PSA）を含む10mLの冷リン酸緩衝化生理食塩水(PBS）に浸漬した。脾臓細胞は、脾臓にPSA-PBSを滅菌的に潅流することにより回収した。細胞を冷PSA-PBS中で１回洗浄し、コールター（Coulter）カウンターを使用して計数し、そして25mM Hepesを含むRPMI 1640培地に再懸濁した。

細胞系

非分泌マウスミエローマ融合パートナー、653は、セントコールの製品開発グループ（Centocor's Products Development group）から細胞生物学ーサービス(CBS)に5-14-97に受けた。細胞系は、10(容量／容量)％FBS（セル カルチャーラボズ；Cell Culture Labs)、1mM ピルビン酸ナトリウム、0.1mM NEAA、2mM L-グルタミン（すべてJRHバイオサイエンス:Biosciencesから）を補充したRPMI培地（JRH Biosciences）で拡大し、そして95％FBSおよび５％DMSO（シグマ）中で寒冷保存し、そしてCBS中で蒸気相液体窒素フリザー中で保存した。細胞バンクは滅菌状態であり（クオリティコントロールセントコール（Quality Control Centocor)、マルベラン（Malvern））、そしてマイコプラズマを含まなかった（バイオユニーク ラボラトリーズ(Bionique Laboratories））。細胞は融合まで対数相カルチャーで維持した。それらをPBS中で洗浄し、計数し、そして融合前にトリパンブルー色素での排除により生存性（＞95％）を測定した。

【０１６５】

ヒトTNF∀は、セントコールの分子生物学で生成したC237Aという名の組換え細胞系により生産した。細胞は５（容量／容量）％FBS（セル カルチャーラボズ）、２mM L-グルタミン（すべてJRHバイオサイエンスから）、および0.5:g/mLのマイコフェノール酸を補充したIMDM培地（JRHバイオサイエンス）中で拡大し、そして95％FBSおよび５％DMSO（シグマ）中で寒冷保存し、次いでCBS中で蒸気相液体窒素フリザー中で保存した(13)。細胞バンクは滅菌状態であり（クオリティコントロールセントコール、マルベラン）、そしてマイコプラズマを含まなかった（バイオユニーク ラボラトリーズ）。

細胞融合

細胞融合は、1:1比率の653マウスミエローマ細胞および生きているマウス脾臓細胞を使用して行った。簡単に説明すると、脾臓細胞およびミエローマ細胞を一緒にペレットとした。次にペレットをゆっくりと30秒間にわたり、１mLの50(重量／容量）％のPEG／PBS溶液に37℃で再懸濁した（PEGの分子量は1,450g/モル、シグマ）。次いで融合は10.5mLのRPMI培地（添加物無し)(JRH）(37℃)を１分間にわたりゆっくりと加えることにより停止した。融合した細胞を750rpmで５分間遠心した。次いで細胞をHAT培地（10％ウシ胎児血清(JRH)、１mM ピルビン酸ナトリウム、２mM L-グルタミン、10μg/mL ゲンタマイシン、2.5％オリジェン（Origen)培養補給物（フィッシャー）、50μM 2-メルカプトエタノール、１％ 653コンディショニングRPMI培地、100μM ヒポキサンチン、0.4μM アミノプテリンおよび16μM チミジンを含むRPMI/HEPES培地）に再懸濁し、そして次いで200μL/ウェルで５個の96ウェルの平底組織培養プレートにまいた。次いでプレートは５％CO_2および95％空気を含む37℃の加湿インキューベーター中に７～10日間、置いた。

マウス血清中のヒトIgG抗-TNF∀抗体の検出

固相EIAsを使用して、ヒトTNF∀に特異的なヒトIgG抗体についてマウス血清をスクリーニングした。簡単に説明すると、プレートを１μg/mLのTNF∀（PBS中）で一晩コートした。0.02（容量／容量）％のTween 20を含む0.15Mの塩水で洗浄した後、ウェルを１（重量／容量）％BSA(PBS中)、200μL／ウェルでRTにて１時間ブロックした。プレートは直ちに使用したか、または使用するまで－20℃で凍結した。マウス血清は、ヒトTNF∀をコートしたプレート上に50μL/ウェルで２倍の連続希釈でRTにて１時間インキューベーションした。プレートを洗浄し、そして次いで1:30,000に希釈した（１％ BSA-PBS中）50μL/ウェルのHRP-標識ヤギ抗-ヒトIgG、Fc特異的（アキュレート（Accurate））でRTにて１時間、釣り上げた。再度プレートを洗浄し、そして100μL／ウェルのクエン酸-リン酸基質溶液（0.1M クエン酸および0.2M リン酸ナトリウム、0.01％H_2O_2および１mg/mL OPD）をRTで15分間加えた。次いで停止溶液（４N 硫酸）を25μL/ウェルで加え、そしてODは490nmで自動化プレート分光光度計を介して読んだ。

ハイブリドーマ上清中の全部ヒトの免疫グロブリンの検出

GenPharmマウスはマウスおよびヒト免疫グロブリン鎖の両方を生産することができるので、２つの別個のEIAアッセイを使用して、ヒト軽鎖およびヒト重鎖の両方の存在について成長陽性ハイブリドーマクローンを試験した。プレートは上記のようにコートし、そし

て希釈していないハイブリドーマ上清を37℃で１時間プレート上でインキューベーションした。プレートを洗浄し、そしてHRP結合ヤギ抗-ヒトカッパ（サザンバイオテック（Southern Biotech）抗体（１％BSA-HBSS中で1:10,000に希釈）またはHRP-結合ヤギ抗-ヒトIgG Fc特異的抗体（１％BSA-HBSS中で1:30,000に希釈）で37℃にて１時間、釣り上げた。次いでプレートを基質溶液と上記のようにインキューベーションした。抗-ヒトカッパおよび抗-ヒトIgG Fc EIA形式の両方で陽性のシグナルを与えなかったハイブリドーマクローンは捨てた。

アイソタイピング

抗体のアイソタイプの決定は、特異的力価についてマウス免疫血清をスクリーニングするために使用したものと同じ形式のEIAを使用して行った。EIAプレートは上記のようにヤギ抗－ヒトIgG（H+L)を10: g/ml（炭酸ナトリウムバッファー中）で4ECにて一晩コートし、そしてブロックした。24ウェルカルチャーからのそのままの上清をプレート上でRTにて１時間インキューベーションした。プレートを洗浄し、そして1:4000で１％BSA-PBSに希釈したHRP標識ヤギ抗-ヒトIgG_1、IgG_2、IgG_3またはIgG_4（バインディングサイト（Binding Site））でRTにて１時間、釣り上げた。プレートを再度洗浄し、そして基質溶液と上記のようにインキューベーションした。

結果および考察

全部がヒトの抗-ヒトTNFαモノクローナル抗体の生成

GenTNVという名の１つの融合を、組換えヒトTNFαタンパク質で免疫感作したジェンファームのマウスから行った。この融合から196個の成長陽性ハイブリドーマがスクリーニングされた。ヒトTNFαと反応性の全部がヒトのIgG抗体を分泌した８個のハイブリドーマ細胞系を同定した。これらの８個の細胞系は各々が、ヒトIgG1κアイソタイプの免疫グロブリンを分泌し、そしてすべてが限定希釈により２回サブクローン化されて、安定な細胞系（＞90％均一）を得た。細胞系の名前および各々のＣコード表示は、表１に与える。各細胞系は、12-バイアルの研究細胞バンクで液体窒素中にて凍結された。

【０１６６】

各８つの細胞系について24-ウェルの培養皿のウェルから集めた元の細胞を、トランスフェクションおよびさらなる特性決定のために分子生物学グループに2-18-99に渡した。

【０１６７】

【表６】

表1：GenTNV細胞系名

名前	Cコード表示
GenTNV14.17.12	C414A
GenTNV15.28.11	C415A
GenTNV32.2.16	C416A
GenTNV86.14.34	C417A
GenTNV118.3.36	C418A
GenTNV122.23.2	C419A
GenTNV148.26.12	C420A
GenTNV196.9.1	C421A

【０１６８】
結論
GenTNV融合は、セントコールで調製した組換えヒトTNF∀で免疫感作したヒト可変およびヒト定常領域抗体の導入遺伝子を含むハイブリッドマウスの脾臓細胞を使用して行った。８つの全部がヒトのTNF∀-反応性IgGモノクローナル抗体IgG1κアイソタイプが生成した。元の細胞系は、さらなる特性決定および開発のために分子生物学グループに移した。これらの新しいヒト抗体の１つが抗-炎症に有用であることを示し、Remicadeに比べて免疫原性およびアレルギー性の合併症が低い利点を示すことができる。
【０１６９】
【表７】

参考文献

1. Taylor, et al.,. International Immunology 6:579-591 (1993).
2. Lonberg, et al., Nature 368:856-859 (1994).
3. Neuberger, M. Nature Biotechnology 14:826 (1996).
4. Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996).
5. Scallon, et al., Cytokine 7:759-770 (1995).

【０１７０】
実施例３：ヒト 抗-TNV∀抗体を発現する細胞系のクローニングおよび調製
要約
TNVの名を持つ８つのヒトモノクローナル抗体（mAb）のパネルは、明らかに高いアビデ

ィティで固定化ヒトTNF∀に結合することが分かった。８つのうちの７つのmAbは、組換えTNF受容体に結合するhuTNF∀を効率的に遮断することが示された。７つのmAbをコードするDNAの配列分析により、すべてのmAbがヒトＶ領域を有することが確認された。DNA配列は、３対のmAbが互いに同一であるので、元の８つのmAbパネルがわずか４種のmAb、TNV14、TNV15、TNV148およびTNV196 により表されることも明らかとなった。mAbの推定されるアミノ酸配列およびインビトロTNF∀中和データの結果の分析に基づき、mAbTNV148およびTNV14がさらなる実験に選択された。

【０１７１】

TNV148重鎖中の75位（フレイムワーク３）のプロリン残基は、データベースの調査中に同じサブグループの他のヒト抗体中のその位置に見いだせなかったので、部位－特異的DNA突然変異誘発法を行い、既知の生殖細胞系フレイムワークe配列と一致させるためにその位置にセリン残基をコードした。セリン修飾mAbはTNV148Bと命名した。TNV148BおよびTNV14の重鎖および軽鎖可変領域をコードするPCR増幅したDNAを、2000年10月7日に出願した米国特許出願第＿＿＿＿＿＿＿＿号明細書（引用により全部、本明細書に編入する）にIL-12抗体、組成物、方法および使用（IL-12 Antibodies,Compositions,Methods and Uses）という表題で開示された、別のヒトmAb（12B75)の最近クローン化された重および軽鎖遺伝子に基づく新たに調製された発現ベクターにクローン化した。

【０１７２】

P3X63Ag8.653(653)細胞またはSp2/0-Ag14(Sp2/0）マウスミエローマ細胞を、各重および軽鎖発現プラスミドでトランスフェクトし、そして高レベルの組換えTNV148BおよびTNV14（rTNV148BおよびrTNV14)mAbを生産する細胞系について２回のサブクローニングを行ってスクリーニングした。期間にわたる成長曲線およびmAb生産の安定性の評価は、653-トランスフェクション体クローンC466DおよびC466Cが約125:g/mlのrTNV148BmAbをスペント（spent）培養で安定に生産する一方、Sp2/0トランスフェクション体1.73-12-122(C467A)は約25:g/mlのrTNV148B mAbをスペント培養で安定に生産したことを示した。同様の分析で、Sp2/0－トランスフェクション体クローンC476Aが18:g/mlのrTNV14をスペント培養で生産したことを示した。

はじめに

ヒトTNV∀－免疫感作Genpharma／Medarexマウス（HCo12/KCo5遺伝子型）に由来する８つのmAbパネルは以前、ヒトTNV∀に結合し、そして全部がヒトのIgG1、カッパアイソタイプを有することが示された。単純な結合アッセイを使用して、本発明の例示的なmAbもTNF∀-中和活性を有するのかどうかを、それらが組換えTNF受容体への結合からTNF∀を遮断する能力について評価することにより決定した。いくつかのmAbのこれらの結果、DNA配列結果およびインビトロ特性に基づき、TNV148をさらに特性決定するために選択した。

【０１７３】

TNV148mAbをコードするDNA配列をクローン化し、適当な定常領域をコードする遺伝子発現ベクターに合うように修飾し、十分に特性が知られた653およびSp2/0マウスミエローマ細胞に導入し、そして生成したトランスフェクトした細胞系は、サブクローンが元のハイブリドーマ細胞系よりも40倍多いmAbを生産することを確認するまでスクリーニングした。

材料および方法

試薬および細胞

TRIZOL試薬はギブコ(Gibco)BRLから購入した。プロティナーゼＫは、シグマケミカルカンパニーから得た。逆転写酵素はライフサイエンス社から得た。Taq DNAポリメラーゼはパーキンエルマーシータス(Perkin Elmer Cetus）またはギブコBRLから得た。制限酵素はニューイングランドバイオラボズ（New England Biolabs）から購入した。QIAquick PCR精製キットは、キアジェン(Qiagen）からであった。QuickChange 部位特異的突然変異誘発キットはストラタジーン(Stratagene)から購入した。WizardプラスミドminiprepキットおよびRNaseはプロメガからであった。Optiplateはパッカードから得た。^{125}ヨウ素はアマーシャム（Amersham）から購入した。カスタムオリゴメクレオチドはキーストーン／バ

イオソース インターナショナル(Keystone/Biosource International)から購入した。この実験で使用したオリゴヌクレオチド名、確認番号および配列は、表１に示す。
表１．TNV mAb遺伝子をクローン化し、工作し、または配列決定するために使用するオリゴヌクレオチド。オリゴヌクレオチド5'14sおよびHuH-J6によりコードされるアミノ酸を、配列の上に示す。'M'アミノ酸残基は、翻訳開始コドンを表す。オリゴヌクレオチド5'14sおよびHuH-J6中の下線を付した配列は、それぞれBsiWIおよびBstBＩ制限部位を記す。HuH-J6中のスラッシュは、エキソン／イントロン境界に対応する。配列がマイナス鎖に対応するオリゴヌクレオチドは、３'－５'方向で書くことに注意されたい。

【０１７４】

【表８】

名前	I.D.	配列
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5'
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5'
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5'
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5'
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5'
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5'
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5'
		BsiWI M D W T W S I
5'14s	366	5-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3'
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3'
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3'
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3'
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3'
		T V T V S S BstBI
HuH-J6	388	3'-GTGCCAGTGGCAGAGGAGTC/CATTCAAGCTTAAGTT-5'
		SalI M D M R V
LK7s	362	5'-TTTGTCGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3'
LVgs	363	5'-TTTGTCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3'
		T K V D I K Afl2
HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAGAATTCGGCGCCTTT
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATtCCAAGAACACGCTGTATC-3'
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5'

【０１７５】

653マウスミエローマ細胞の１つの凍結バイアルを得た。このバイアルをその日に解凍し、そしてＴフラスコ中でIMDM、５％FBS、２mM グルタミン（培地）で拡大した。これら

の細胞は、本明細書に記載するように抗-TNF DNAを用いて２～３週間後にトランスフェクトするまで連続培養で維持した。幾らかのカルチャーを解凍日から５日後に回収し、遠心によりペレット化し、そして95% FBS、５% DMSO中に再懸濁し、30バイアルのアリコートとし、凍結し、そして将来使用するまで保存した。同様にSp2/0マウスミエローマ細胞の１つの凍結バイアルを得た。このバイアルを解凍し、新たに上記のようにフリーズ－ダウン調製し、そして凍結バイアルをCBCフリーザーボックスAAおよびABに保存した。これらの細胞を解凍し、そして本明細書に記載するようにすべてのSp2/0トランスフェクションに使用した。

受容体に対するTNF結合の阻害に関するアッセイ

TNV mAbを含むハイブリドーマ細胞上清を使用して、mAbが^{125}I-標識TNF∀が組換えTNF受容体融合タンパク質、p55-sf2に対する結合を遮断する能力についてアッセイした（Scallon et al.(1995) Cytokine 7:759-770）。50:1のp55-sf2を0.5:g/ml（PBS中）でOptiplateに加えて37℃で１時間のインキューベーション中、ウェルをコートした。８つのTNV細胞上清の連続希釈は、PBS/0.1%BSAを希釈物として使用して96-ウェル丸底プレート中に調製した。抗-IL-18 mAbを含む細胞上清を陰性対照として含め、そしてcA2（抗-TNFキメラ抗体、Remicade、米国特許第5,770,198号明細書（引用により全部、本明細書に編入する))でスパイクした同じ抗-IL-18上清を、陽性対照として含んだ。^{125}I-標識TNF∀（58:Ci/:g、D.Shealy）を100：1の細胞上清に加えて、５ng/mlの最終TNF∀濃度とした。混合物をRTで１時間、プレインキューベーションした。コートしたOptiplateを洗浄して非結合p55-sf2を除去し、そして50:1の^{125}I-標識TNF∀／細胞上清混合物をOptiplateに移した。RTで２時間後、OptiplateをPBS-Tweenで３回洗浄した。100:1のMicroscint-20を加え、そして結合したcpmをTopCountガンマカウンターを使用して測定した。

Ｖ遺伝子の増幅およびDNA配列分析

ハイブリドーマ細胞はTRIZOL試薬をRNA調製物に加える前にPBSで１回洗浄した。７×10^6から1.7×10^7の間の細胞を１mlのTRIZOに再懸濁した。200μlのクロロホルムを加えた後、試験管を激しく振盪した。サンプルを４℃で10分間遠心した。水性相を新しいミクロ遠心管に移し、そして等容量のイソプロパノールを加えた。試験管を激しく振盪し、そして室温で10分間インキューベーションした。次いでサンプルを４℃で10分間遠心した。ペレットを１回、１mlの70%エタノールで洗浄し、そして真空乾燥機でかるく乾燥した。RNAペレットを40μlのDEPC-処理水に再懸濁した。RNA調製物の品質は１%アガロースゲル中で0.5μlを分画することにより決定した。RNAを－80℃の冷凍庫で使用するまで保存した。

【０１７６】

重および軽鎖cDNAを調製するために、３μlのRNAおよび１μgのオリゴヌクレオチド119（重鎖）またはオリゴヌクレオチド117（軽鎖）のいずれか（表１を参照にされたい)を含む混合物を11.5μlの容量中に調製した。混合物を70℃で10分間、水浴中でインキューベーションし、そして氷上で10分間冷却した。別の混合物を調製し、これは2.5μlの10×逆転写酵素バッファー、10μlの2.5mM dNTPs、１μlの逆転写酵素（20単位）、および0.4μlのリボヌクレアーゼインヒビターRNasin（１単位)から作られた。13.5μlのこの混合物を11.5μlの冷却したRNA／オリゴヌクレオチド混合物に加え、そして反応物を42℃で40分間、インキューベーションした。cDNA合成反応物を－20℃の冷蔵庫に使用するまで保存した。

【０１７７】

非精製重および軽鎖cDNAを鋳型として使用して、可変領域コード配列をPCR増幅した。５個のオリゴヌクレオチド対（366/354、367/354、368/354、369/354、370/354、表１）を、それらが重鎖DNAの増幅をプライムする能力について同時に試験した。２個のオリゴヌクレオチド対（362/208および363/208）を、それらが軽鎖DNAの増幅をプライムする能力について同時に試験した。PCR反応は２単位のPLATIUM(商標)高忠実度(HIFI)Taq DNAポリメラーゼを使用して、全50μlの容量で行った:各反応物には２μlのcDNA反応物、10pmolの各オリゴヌクレオチド、0.2mM dTNPs、５μlの10×HIFIバッファーおよび２mMの硫酸

マグネシウムを含んだ。熱循環プログラムは95℃で５分間、続いて30サイクルの（94℃で30秒、62℃で30秒、68℃で1.5分）であった。次いで68℃で10分間の最終インキューベーションであった。

【０１７８】

直接的なDNAシークエンシング用のPCR産物を調製するために、それらをQIAquick（商標）PCR精製キットを使用して製造元のプロトコールに従い精製した。DNAは50μｌの滅菌水を使用してスピンカラムから溶出し、そして次いで真空乾燥機を使用して10μｌの容量に下げた。次いでDNAシークエンシング反応は、１μｌの精製PCR産物、10μMのオリゴヌクレオチドプライマー、４μｌのBigDye Terminator(商標)即反応ミックスおよび14μｌの滅菌水を20μｌの全容量に設定した。オリゴヌクレオチド対367/354で作成した重鎖PCR産物を、オリゴヌクレオチドプライマー159および360で配列決定した。オリゴヌクレオチド対363/208で作成した軽鎖PCR産物は、オリゴヌクレオチド34および163で配列決定した。シークエンシングの熱循環プログラムは、（96℃で30秒、50℃で15秒、60℃で４分）の25サイクル、続いて４℃で一晩であった。反応生成物をポリアクリルアミドゲルを通して分画し、そしてABI377 DNAシークエンサーを使用して検出した。

アミノ酸を変えるための部位特異的突然変異法

TNV148mAb中のPro^{75}をセリン残基に置き換えるために、TNV148重鎖可変領域DNA配列中の１つのヌクレオチドを変えた。相補的オリゴヌクレオチド、399および400（表１）を設計し、そしてこの変化を　　使用して　　注文製造元のプロトコールに従い、翻訳開始部位のすぐ上流の独自なBsiWIクローニング部位。生成したプラスミドをp1747と命名した。可変領域の３'末端にBstBI部位を導入するために、SalIおよびBstBI部位を持つ５'オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。このプライマーをpUC逆プライマーと使用して、p1747から2.75kbフラグメントを増幅した。次いでこのフラグメントを12B75可変領域中の自然に存在するSalI部位およびHindIII部位にクローン化して戻し、これにより独自のBstBI部位を導入した。生成した中間ベクター(p1750と命名）は、BsiWIおよびBsiBI末端を持つ可変領域フラグメントを受けることができた。定常領域も12B75遺伝子に由来する重鎖ベクターの変更体を調製するために、HindIII部位の下流にEcoRI部位を持つために、p1750中のBamHI－HindIII挿入物をpBR322に移した。生成したプラスミドp1768を次いでHindIIIおよびEcoRIで消化し、そしてp1744（p1560からの大きなBamHI－BamHIフラグメントをpBCにクローニングすることに由来するサブクローン）からの5.7kbのHindIII－EcoRIフラグメントに連結した。生成したプラスミドp1784は、次いでBsiWおよびBstBI末端を持つTNV Ab cDNAフラグメント用のベクターとして用いた。12B75遺伝子に由来するIgG1定常領域を含み、そしてそれらが含む12B75重鎖J-Cイントロンがどれだけ違うかにより互いに異なる発現ベクターp1788およびp1798を調製するためにさらなる作業を行った。

【０１７９】

プラスミドp1558中の12B75軽鎖遺伝子を修飾するために、12Ｂ75プロモーターおよび可変領域を含む5.7kb SalI/AflIIフラグメントを、p1558からプラスミドL28のXhoI/AflII部位に移した。この新規プラスミドp1745は突然変異誘発工程でより小さい鋳型を提供した。オリゴヌクレオチド（C340salIおよびC340sal2）を使用して、QuikChange(商標)突然変異誘発法により可変領域の５'末端に独自なSalI制限部位を導入した。生成した中間ベクターであるp1746は独自なSalIおよびAflII制限部位を有し、これに可変領域フラグメントをクローン化することができた。p1746にクローン化された任意の可変領域フラグメントは、好ましくは軽鎖遺伝子の３'半分に連結された。この目的に使用することができる12B75軽鎖遺伝子の３'半分から制限フラグメントを調製するために、オリゴヌクレオチドBAHN-1およびBAHN-2を互いにアニール化して、制限部位BsiWI、AflII、HindIIIおよびNotIを含み、そしてKpnIおよびSacI部位に連結できる末端を含む２本鎖リンカーを形成した。このリンカーをpBCのKpnIとSacI部位の間にクローン化してプラスミドp1757を得た。AflIIを用いたp1558の消化により生成した12B75軽鎖定常領域を含む7.1kbのフラグメントをHindIIIで部分消化し、p1757のAflIIおよびHindIII部位の間にクローン化してp1762を得た。

この新規プラスミドは、BsiWIおよびAflIIに関する独自な部位を含み、この中にプロモーターおよび可変領域を含むBsiWI／AflIIフラグメントを移して遺伝子の２つの半分をつなげた。

cDNAクローニングおよび発現プラスミドの集成

すべてのRT-PCR反応物（上記参照）は、クレノー酵素で処理してさらにDNA末端を満たした。重鎖PCRフラグメントを制限酵素BsiWIおよびBstBIで処理し、次いでプラスミドL28のBsiWIとBstBI部位を間にクローン化した（L28は12B75に基づく中間ベクターp1750がまだ調製されていなかったので使用した）。クローン化した挿入物のDNA配列分析は、生成した構築物が正しく、そしてPCR増幅中に導入された誤りがなかったことを示した。これらのL28プラスミド構築物に割り当てられた確認番号（TNV14、TNV15、TNV148、TNV148BおよびTNV196）を表２に示す。

【０１８０】

TNV14、TNV148およびTNV148B重鎖に関するBsiWI／BstBI挿入物はL28ベクターから新たに調製された中間ベクターp1750に移された。これらの中間プラスミドに割り当てられた確認番号を表２に示す。このクローニング工程および続く工程は、TNV15およびTNV196については行わなかった。可変領域を次いで２つの異なるヒトIgG1発現ベクターに移した。制限酵素EcoRIおよびHindIIIを使用して、可変領域をセントコールにより以前に使用したIgGベクターであるp104に移した。Gm(f+)アロタイプのIgG1をコードする生成した発現プラスミドを、p1781(TNV14)、p1782(TNV148）およびp1783（TNV148B）と命名した(表２を参照にされたい）。可変領域も12B75(ジェンファーム)遺伝子に由来するIgG1定常領域の上流にクローン化した。G1m(z)アロタイプのIgG1をコードするこれらの発現プラスミドも表２に掲げる。

表２．種々の重および軽鎖プラスミドのプラスミド確認番号。

L28ベクターまたはpBCベクターは、最初のAb cDNAクローンを表す。これらプラスミド中の挿入物を、不完全12B75に基づくベクターに移して中間プラスミドを作成した。さらなる転移工程により直線化された後に細胞に導入されるか、または細胞のトランスフェクション前にmAb遺伝子挿入物を精製するために使用する最終的な発現プラスミドを得た。（ND）＝行わず。

【０１８１】

【表９】

mAb	L28 ﾍﾞｸﾀｰ ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞ ID	中間体 ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞ ID	Gm(f+) 発現 ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞ ID	G1m(z) 発現 ﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞ ID
重鎖				
TNV14	p1751	p1777	p1781	p1786
TNV15	p1752	(ND)	(ND)	(ND)
TNV148 p1753	p1778	p1782	p1787	
TNV148B p1760	p1779	p1783	p1788	
TNV196 p1754	(ND)	(ND)	(ND)	

【０１８２】

【表１０】

	pBC ベクター プラスミド ID	中間体 プラスミド ID	発現 プラスミド ID
軽鎖			
TNV14	p1748	p1755	p1775
TNV15	p1748	p1755	p1775
TNV148	p1749	p1756	p1776
TNV196	p1749	p1756	p1776

【０１８３】

軽鎖PCR産物を制限酵素SalIおよびSacIIで消化し、次いでプラスミドpBCのSalIおよびSacII部位の間にクローン化した。１つのアミノ酸が異なる２つの異なる軽鎖変更体を、p1748およびp1749と命名した（表２）。DNA配列分析では、これらの構築物が正しい配列を有することが確認された。p1748およびp1749のSalI／AflIIフラグメントを、次いで中間ベクターp1746のSalIとAflII部位との間にクローン化して、それぞれp1755およびp1756を作成した。軽鎖遺伝子のこれら５'半分は、p1755およびp1756に由来するBsiWI／AflIIフラグメントを新たに調製した構築物p1762に移すことにより、遺伝子の３'半分と連結し、最終的な発現プラスミドp1775およびp1776をそれぞれ調製した（表２）。

細胞のトランスフェクション、スクリーニングおよびサブクローニング

マウスミエローマ細胞の全部で15のトランスフェクションは、種々のTNV発現プラスミドを用いて行った（結果および考察の章の表３を参照にされたい）。これらのトランスフェクションは、（１）宿主細胞がSp2/0か、または653か；（２）重鎖定常領域がセントコールの以前のIgG1ベクターまたは12B75重鎖定常領域によりコードされるのか；（３）mAbがTNV148B、TNV148、TNV14または新たなHC/LCの組み合わせか；（４）DNAが直線化されたプラスミドか、または精製されたAb遺伝子挿入物か；および（５）重鎖遺伝子中の完全なJ-Cイントロン配列が存在するか、存在しないのかにより分けられた。さらに幾つかのトランスフェクションを繰り返して、多数のクローンをスクリーニングする見込みを上げた。

【０１８４】

Sp2/0細胞および653細胞は各々、すでに記載された標準的条件下（Knight DM et al.(1993)Molecular Immunology 30:1443-1453）でエレクトロポレーションにより重および軽鎖DNA（各々８～12:g）の混合物でトランスフェクトした。トランスフェクション番号１、２、３および16については、トランスフェクション前に制限酵素での消化により適当な発現プラスミドを直線化した。例えばSalIおよびNotI制限酵素を使用して、それぞれTNV148B重鎖プラスミドp1783および軽鎖プラスミドp1776を直線化した。残りのトランスフェクションについては、mAb遺伝子のみを含むDNA挿入物を、重鎖プラスミドをBamHIで、そして軽鎖プラスミドをBsiWIおよびNotIで消化することによりプラスミドベクターから分離した。次いでmAb遺伝子挿入物は、アガロースゲル電気泳動およびQiex精製樹脂により精製した。精製した遺伝子挿入物によりトランスフェクトした細胞は、選択可能なマーカーの供給源として３～５:gのPstI-直線化pSV2gptプラスミド（p13）を用いて同時にトランスフェクションした。エレクトロポレーション後、細胞を96-ウェル組織培養皿中のIMDM、15%FBS、２mM グルタミンにまき、そして37℃で５%CO_2インキューベーター中でインキューベーションした。２日後、等容量のIMDM、5%FBS、２mM グルタミン、２×MHX選択（１XMHX＝0.5:g/mlマイコフェノール酸、2.5:g/mlヒポキサンチン、50:g/ml キサンチン）を加え、そしてプレートをさらに２～３週間インキューベーションし、この間にコロニ

ーが形成した。

【０１８５】

コロニーを含むウェルから集めた細胞上清は、記載のようにELISAによりヒトIgGについてアッセイした。簡単に説明すると、希釈を変動させた細胞上清をポリクローナルヤギ抗-ヒトIgG Fcフラグメントでコートした96-ウェルのEIAプレート中でインキューベーションし、そして結合したヒトIgGをアルカリホスファターゼ－結合ヤギ抗-ヒトIgG(H+L)および適当な発色基質を使用して検出した。標準として細胞上清中で測定される同じ精製mAbを使用した標準曲線を、各EIAプレートに含めて上清中のヒトIgGの定量を可能とした。最もヒトIgGを生産しているように見えるこれらのコロニー中の細胞を、スペント培養でのさらなる生産測定のために24-ウェルプレートで継代し、そして最高に生産している元のコロニーを引き続き同定した。

【０１８６】

最高に生産している元のクローンをサブクローン化して、より高い生産サブクローンを同定し、そしてより均一な細胞系を調製した。96-ウェル組織培養プレートにウェルあたり１細胞またはウェル４細胞をIMDM、５％FBS、２mM グルタミン、１×MHX中にまき、そして37℃で５％CO_2インキュベーター中で12～20日間、コロニーが現れるまでインキューベーションした。細胞上清は、ウェルあたり１つのコロニーを含むウェルから集め、そしてELISAにより記載のように分析した。選択したコロニーを24-ウェルプレートで継代し、そしてカルチャーを消耗させた（spent）後にそれらの上清中のヒトIgGレベルを定量することにより最も生産しているサブクローンを同定した。選択した第１回目のサブクローンを第２回目のサブクローニングに供して、この工程を繰り返した。最良の第２回目のサブクローンを生育のための細胞系として選択した。

細胞サブクローンの特性

最良の２回目のサブクローンを選択し、そしてmAb生産レベルおよび細胞増殖特性を評価するためのに成長曲線を作成した。T75フラスコに１×10^5細胞／ml（30mlのIMDM、５％FBS、２mM グルタミンおよび１×MHX（または無血清培地）中）でまいた。300μlのアリコートを24時間の間隔で採取し、そして生きている細胞の密度を決定した。分析は生きている細胞数が１×10^5細胞／ml未満になるまで続けた。集めた細胞上清のアリコートを存在する抗体の濃度についてアッセイした。ELISAアッセイは標準としてrTNV148BまたはrTNV14JG92399を使用して行った。サンプルは１時間、ポリクローナルヤギ抗-ヒトIgG Fcをコートしたプレート上でインキューベーションし、そして結合したmAbを1:1000希釈でアルカリホスファターゼ－結合ヤギ抗-ヒトIgG(H+L)を用いて検出した。

【０１８７】

変動するMHX選択量の存在下での成長速度を比較する目的で、異なる成長曲線分析を２つの細胞系について行った。細胞系C466AおよびC466BをMHXを含まない培地（IMDM、５％FBS、２mM グルタミン）中で解凍し、そしてさらに２日間培養した。次いで両細胞カルチャーは、MHX無し、0.2X MHXまたは1X MHX（1X MHX＝0.5:g/mlマイコフェノール酸、2,5:g/mlヒポキサンチン、50:g/ml キサンチン）を含む３つのカルチャーに分割した。１日後、新しいT75フラスコに１×10^5細胞／mlの出発密度のカルチャーを用いてまき、そして細胞を１週間、24時間間隔で計数した。mAb生産に関するアリコートは集めなかった。これらのサンプルについて、SOP PD32.025で与えられた式を使用して倍化時間を算出した。

【０１８８】

さらなる実験を行って時間経過にわたるmAb生産の安定性を評価した。カルチャーは24-ウェルプレート中のIMDM、５％FBS、２mM グルタミン、MHX選択有り、または無しで成長させた。カルチャーはコンフルエントになった時にはいつでも新しい培養に分け、そして古いカルチャーを消耗（spent）させた。この時点で、上清のアリコートを採取し、そして４℃で保存した。アリコートは55～78日間採取した。この期間の終わりに、記載のように上清は抗-ヒトIgG Fc ELISAにより存在する抗体の量を試験した。

結果および考察

組換え受容体へのTNF結合の阻害

簡単な結合アッセイを行って、ハイブリドーマの細胞上清中に含まれる８種のTNV mAbが受容体へのTNF∀の結合を遮断することができるかどうかを決定した。各細胞上清中のTNV mAb濃度を、最初にヒトIgGについて標準ELISA分析により決定した。次いで組換えp55TNF受容体／IgG融合タンパク質であるp55-sf2をEIAプレートにコートし、そして^{125}I-標識TNF∀を変動するTNV mAb量の存在下でp55受容体に結合させた。図１に示すように、８つのTNV mAbのうち１つ（TNV122）を除き、p55受容体へのTNF∀結合を効率的に遮断した。実際にTNV mAbは、陰性対照であるハイブリドーマ上清に誘起したcA2陽性対照mAbよりもTNF∀結合を効率的に阻害するように見えた。これらの結果はTNV mAbが細胞に基づくアッセイおよびインビボにおいてTNF∀生物活性を遮断し、それゆえにさらなる分析は高度に保証されるであろうことを示していると解釈された。

DNA配列分析

RNAがヒトmAbをコードする確認

受容体結合アッセイでTNF∀-遮断活性を示した７種のTNV mAb(TNV14、TNV15、TNV32、TNV86、TNV118、TNV148およびTNV196）を特性決定する第１段階として、全RNAをこれらmAbを生産する７種のハイブリドーマ細胞系から単離した。次いで各RNAサンプルを使用して、各mAbの完全なシグナル配列、完全な可変領域配列および定常領域配列の一部を含むヒト抗体の重鎖または軽鎖cDNAを調製した。次いでこれらのcDNA生成物をPCR反応で増幅し、そしてPCR-増幅DNAを最初にフラグメントをクローニングすることなく直接配列決定した。配列決定した重鎖cDNAは、マウス中に存在する５個のヒト生殖細胞系遺伝子の１つ、DP-46と＞90％同一であった（図２）。同様に配列決定した軽鎖cDNAは、マウス中に存在するヒト生殖細胞系遺伝子の１つと100％または98％同一であった（図３）。これらの配列結果により、cDNAに転写された、そして配列決定されたRNA分子がヒト抗体の重鎖およびヒト抗体の軽鎖をコードしたことが確認された。可変領域はシグナル配列コード配列の５'末端にマップされるオリゴヌクレオチドを使用してPCR増幅したので、シグナル配列の最初の幾つかのアミノ酸は元のTNV翻訳産物の実際の配列ではないかもしれないが、それらは組換えTNV mAbの実際の配列を表す。

独自な中和mAb

各mAbに関する重鎖および軽鎖の両方の全可変領域に関するcDNA配列の分析により、TNV32がTNV15と同一であり、TNV118がTNV14と同一であり、そしてTNV86がTNV148と同一であることが明らかとなった。受容体結合アッセイの結果はDNA配列分析と一致し、すなわちTNF結合の遮断においてTNV86およびTNV148の両方は、TNV118およびTNV14よりもおよそ４倍良かった。したがって続く作業は独自なTNV mAbであるTNV14、TNV15、TNV148およびTNV196にのみ焦点をあてた。

４種のmAbの関連性

DNA配列の結果は、４種のTNV mAbの重鎖をコードする遺伝子がすべて互いに高度に相同的であることが明らかとなり、しかもすべて同じ生殖細胞系遺伝子であるDP-46に由来すると思われる（図２）。さらに各重鎖CDR3配列は大変類似し、そして同じ長さであるので、そしてそれらはすべてJ6エキソンを使用するので、それらは各々のmAbを独自にする体性変化が続く１つのVDJ遺伝子再配列反応（event）から明らかに生じた。DNA配列分析は、４種のmAb間に２つの明かに異なる軽鎖遺伝子があることが明らかとなった（図３）。TNV14およびTNV15中の軽鎖可変領域コード配列は互いに同一であり、そしてヒトカッパ鎖のVg/38Kファミリーの代表的な生殖細胞系配列と同一である。TNV148およびTNV196軽鎖コード配列は互いに同一であるが、２つのヌクレオチド位置で生殖細胞系配列とは異なる（図３）。

【０１８９】

４種のmAbに関する推定されるアミノ酸配列では、実際のmAbの関係性が明らかとなった。４種のmAbは４つの異なる重鎖を含むが（図４）、２つだけ異なる軽鎖を含む（図５）。TNV mAb配列と生殖細胞系配列との間の差異は、CDRドメインにほとんど限定されたが、３つのmAb重鎖もフレイムワーク領域の生殖細胞系配列からは異なった（図４）。DP-46生殖細胞系をコードするAbのフレイムワーク領域と比べると、TNV14は同一であり、TNV15は

１つのアミノ酸が異なり、TNV148は２つのアミノ酸が異なり、そしてTNV196は３つアミノ酸が異なった。

cDNAのクローニング、部位特異的突然変異誘発法および最終発現プラスミドの集成

cDNAのクローニング

PCR-増幅した可変領域のDNA配列に基づき、発現ベクター中にクローン化するコード配列に適合させる目的で別のPCR増幅を行うために、新しいオリゴヌクレオチドを注文した。重鎖の場合は、この第２回目のPCR産物を制限酵素BsiWIおよびBstBIで消化し、そしてプラスミドベクターL28にクローン化した（プラスミドの確認番号については表２に示す）。軽鎖の場合は、第２回目のPCR産物を制限酵素SalIおよびAflIIで消化し、そしてプラスミドベクターpBCにクローン化した。次いで個々のクローンを配列決定して、それらの配列がPCR産物の直接的シークエンシングから得た前の配列と同一であることを確認し、これにより分子の潜在的に異質な群において各位置に最も多いヌクレオチドが明らかになった。

TNV148を変えるための部位特異的突然変異誘発法

mAb TNV148およびTNV196は、TNF∀生物活性の中和において次に最高なmAb(TNV14）よりも４倍以上効力があると一貫して観察された。しかし上記のように、TNV148およびTNV196重鎖フレイムワーク配列は生殖細胞系フレイムワーク配列とは異なった。TNV148重鎖配列を他のヒト抗体と比較することにより、多数の他のヒトmAbがフレイムワーク１の28位にIle残基を含む（成熟配列のみを数えた）が、フレイムワーク３の75位のPro残基はその位置で通常のアミノ酸ではないことが示された。

【０１９０】

TNV196重鎖の同様な比較では、フレイムワーク３の生殖細胞系配列とは異なる３個のアミノ酸がヒトmAbでは稀であり得ることを示唆した。これらの差異はTNV148およびTNV196をヒトに投与する場合、それらを免疫原性とし得る可能性がある。TNV148は関心のある唯一のアミノ酸残基を有し、そしてこの残基がTNF∀結合に重要ではないと考えられたので、部位特異的突然変異誘発法を使用して、75位でPro残基の代わりに生殖細胞系Ser残基がコードされるように、TNV148重鎖コード配列中（プラスミドp1753中）の１つのヌクレオチドを変えた。生成したプラスミドをp1760と命名した（表２を参照にされたい）。生成した遺伝子およびmAbをTNV148Ｂと命名して、元のTNV148遺伝子およびmAbとは区別した（図５を参照にされたい）。

最終的な発現プラスミドの集成

ゲノムのフラグメントとして以前にクローン化した12B75重鎖および軽鎖遺伝子に基づく新たな抗体発現ベクターを調製した。種々のTNV発現プラスミドを調製したが（表２を参照にされたい）、各々の場合で５'フランキング配列、プロモーターおよびイントロンエンハンサーは各12B75遺伝子に由来した。軽鎖発現プラスミドに関して、完全なJ-Cイントロン、定常領域コード配列および３'フランキング配列も、12B75軽鎖遺伝子に由来した。最終的な生産細胞系をもたらす重鎖発現プラスミド（p1781およびp1783、以下の参照にされたい）については、ヒトIgG1定常領域コード配列は、セントコールの以前に使用した発現ベクター（p104）に由来した。重要なことは、ここで報告された最終的な生産細胞系が元の、ハイブリドーマに由来するTNV-mAb(G1m(z))とは異なるアロタイプ（Gmf(+)）のTNV mAbを発現することである。これはジェンファームのマウスに由来する12B75重鎖遺伝子がCH1ドメインのＣ-末端でArg残基をコードする一方、セントコールのIgG1発現ベクターp104がその位置でLysをコードするからである。ここでJ-Cイントロン、完全な定常領域コード配列および３'フランキング配列は12B75重鎖遺伝子に由来するが、これらの遺伝子でトランスフェクトされた細胞系は生産細胞系として選択されなかった別の重鎖発現プラスミド（例えばp1786およびp1788）を調製した。ベクターは慎重に設計して、最終的な発現プラスミドをもたらす将来のPCR増幅されるＶ領域の１段階クローニングを可能とした。

【０１９１】

PCR増幅した可変領域cDNAはL28またはpBCベクターから、中間段階の12B75に基づくベクター（プロモーター領域およびJ-Cイントロンの一部を提供する）に移した（プラスミド

確認番号については表２を参照にされたい）。抗体遺伝子の５'半分を含む制限フラグメントをこれらの中間段階のベクターから、各遺伝子の３'半分を提供する最終発現ベクターに移して、最終的な発現プラスミドを形成した（プラスミド確認番号については表２を参照にされたい）。

細胞のトランスフェクションおよびサブクローニング

発現プラスミドは制限消化により直線化するか、または各プラスミド中の抗体遺伝子挿入物をプラスミド骨格から精製した。Sp2/0および653マウスミエローマ細胞を重鎖および軽鎖DNAを用いてエレクトロポレーションによりトランスフェクトした。15種類のトランスフェクションを行った。そのほとんどが遺伝子が直線化された全プラスミド上でも、または精製された遺伝子挿入物でも、および宿主細胞系でも、Ab遺伝子に特徴的な性質のAbにより定められるように独自であった（表３にまとめた）。マイコフェノール酸に耐性のクローンに由来する細胞上清はELISAによりヒトIgGの存在についてアッセイし、そして参照標準曲線として精製したrTNV148Bを使用して定量した。

最高に生産するrTNV148B細胞系

rTNV148トランスフェクション２から最高に生産する653の元の系の10個（スペント24-ウェル培養で５～10:g/mlを生産した）をサブクローン化して、より高く生産している細胞系をスクリーニングし、そしてより均一な細胞群を調製した。元の系2.320からの２つのサブクローン2,320-17および2,320-20が、スペント24-ウェル培養で約50:g/mlを生産し、これはそれらの元の系より５倍増加した。サブクローン化した系2.320-17および2.320-20の２回目のサブクローニングは導いた（A second round of subcloning of subcloned lines 2.320-17 and 2.320-20 led）。

表３．細胞トランスフェクションのまとめ。各mAbをコードする重鎖および軽鎖プラスミドの確認番号を示す。精製したmAb遺伝子挿入物を用いて行ったトランスフェクションの場合、プラスミドp13（pSV2gpt）をgpt選択性マーカーの供給源として含めた。重鎖定常領域は、Remicade（旧）をコードするために使用した同じヒトIgG1発現ベクター、または12B75(ジェンファーム／メダレックス）重鎖遺伝子（新）に含まれる定常領域のいずれかによりコードされた。H1/L2は、TNV14重鎖およびTNV148軽鎖から作られた「新規」mAbと呼ぶ。プラスミドp1783およびp1801はどれくらい多くのJ-Cイントロンをそれらの重鎖遺伝子が含むかにより異なるだけである。細胞クローンに関する属名の最初の番号を定めるトランスフェクション番号を右に示す。ここに記載するrTNV148B-生産細胞系C466（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ）およびC467Aはそれぞれトランスフェクション番号２および１に由来した。rTNV14-生産細胞系C476Aはトランスフェクション番号３に由来した。

【０１９２】

【表１１】

mAb	プラスミド HC/LC/gpt	HC ベクター	DNA 形状	トランスフェクション番号 Sp2/0	653
rTNV148B	1783/1776	旧	直線状	1	2
rTNV14	1781/1775	旧	直線状	3	-
rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19 :g/ml	

【０１９３】

サブクローン化した細胞系の特性決定

細胞系の成長特性をより注意深く特性決定し、そして大規模でのmAb生産レベルを決定

するために、T75培養を使用して成長曲線分析を行った。結果は細胞系のC466シリーズの４種が各々、1.0×10^{6}から1.25×10^{6}細胞／mlの間のピーク細胞密度、および110から140:g/mlの間の最大mAb蓄積レベルに達したことを示した（図７）。対照的に、最高に生産するSp2/0サブクローンであるC467Aは2.0×10^{6}細胞／mlのピーク細胞密度、および25:g/mlの最大mAb蓄積レベルに達した（図７）。成長曲線分析は、rTNV14-生産細胞系、C476Aについては行わなかった。

【０１９４】

さらなる成長曲線分析を行って、異なる濃度のMHX選択における成長速度を比較した。この比較は、MHXの不存在下で培養されたC466細胞が標準量のMHX(1×)で培養した同じ細胞よりも早く成長すると思われ最近の観察により促された。マイコフェノール酸のような細胞傷害的濃度の化合物は、傾向　　なので（Because the cytotoxic concentrations of compounds such as mycophenolic acid tend）

数桁にわたって測定することで（to be measured over orders of magnitude）、mAb生産の安定性を犠牲にすることなく細胞の倍化時間を有意に速める、より低濃度のMHXの使用を考えることが可能であった。細胞系C466AおよびC466Bは:MHX無し、0.2X MHXまたは１X MHXのいずれかで培養した。生きている細胞数を７日間、24時間の間隔で取った。結果はMHX濃度に依存的な細胞の成長速度が明らかとなった（図８）。細胞系C466Aは１X MHX中での25.0時間の倍化時間を示したが、MHX無しではわずか20.7時間であった。同様に細胞系C466Bは１X MHX中での32.4時間の倍化時間を示したが、MHX無しではわずか22.9時間であった。重要であるのは両方の細胞系について0.2X MHXでの倍化時間が１X MHXよりもMHX無しで観察された時間により近いことであった（図８）。この観察により倍化時間が重要なパラメーターであるバイオリアクター中での強化された細胞性能が、より少ないMHXを使用して実現できることになる可能性が高まる。しかし安定性の試験結果は（以下を参照にされたい）、細胞系C466DがMHXが存在しなくても少なくとも60日間、rTNV148Bを安定に生産できることを示唆し、そしてまた安定性試験はMHXの不存在下に比べてMHXの存在下での細胞を培養した時により高いmAb生産レベルを示した。

【０１９５】

約60日の期間にわたり、種々の細胞系からのmAb生産を評価するために、安定性試験はMHX選択を含むか、または含まないいずれかの培養で行った。すべての細胞系が高いmAb生産を維持したわけではなかった。培養からちょうど２週間後、クローンC466Aは実験の始のおよそ45％未満を生産した。クローンC466Bからの生産も有意に低下したようにみえた。しかしクローンC466CおよびC466Dはかなり安定な生産を維持し、C466Dは最高の絶対生産レベルを示した（図９）。

結論

ヒトTNF∀に対する８種のヒトmAbの最初のパネルから、タンパク質配列およびTNF中和効力を含む幾つかの基準に基づきTNV148BならびにTNV14が好適であると選択された。100:g/mlのrTNV148Bおよび19:g/ml rTNV14より多くを生産する細胞系を調製した。

実施例４．単回のボーラス注射を使用した、抗-TNF抗体および対照を使用した関節炎マウス実験

約４週齢のTg197実験マウスを、性別および体重に基づき９処置群の１つに割り当て、そしてダルベッコのPBS（D-PBS）または１mg/kgもしくは10mg/kgのいずれかの本発明の抗-TNF抗体（TNV14、TNV148またはTNV196）を単回、腹腔内ボーラス投与で処置した。

結果：体重を投与前からの変化として分析した時、10mg/kgのcA2で処置した動物は実験を通してD-PBS-処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。この体重増加は３～７週間で有意であった。10mg/kgのTNV148で処置した動物も、実験の７週間目に有意な体重増加に達した。（図１０を参照にされたい）。

【０１９６】

図１１Ａ～Ｃは、関節炎指数に基づき疾患の重篤度の進行を表す。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数は、D-PBS対照群よりも３週間目から始まり、その後の実験中、低かった（７週）。１mg/kg TNV14で処置した動物および１mg/kg cA2で処置した動物は、D-PB

S処置群と比べた時に３週間後のAIに有意な減少を示すことができなかった。各々を他の同様な用量と比較した時(10mg/kg TNV14、148および196と比べた10mg/kg cA2）、10mg/kgの処置群間に有意差はなかった。１mg/kgの処置群を比較した時、１mg/kgのTNV148は１mg/kgのcA2よりも３、４および７週で有意に低いAIを示した。また１mg/kgのTNV148は、１mg/kgのTNV14-処置群よりも３および４週で有意に低かった。TNV196は実験の６週までAIにおいて有意な減少を示したが（D-PBS処置群と比較した時）、TNV148はこの実験の終了時に有意なままである唯一の１mg/kg処置群であった。

実施例５：多回のボーラス投与として抗-TNF抗体および対照を使用した関節炎マウス実験

約４週齢のTg197実験マウスを、体重に基づき８処置群の１つに割り当て、そして対照（D-PBS）または３mg/kgの抗体（TNV14、TNV148）（０週）の腹腔内ボーラス投与を用いて処置した。注射は１、２、３及び４週にすべての動物に繰り返した。群１～６は試験品の効力について評価した。群７および８において動物から得た血清サンプルは、２、３および４週にTNV14またはTNV148の免疫応答の誘導および薬物動力学的クリアランスについて評価した。

結果：投与前からの変化として体重を分析した時、有意差は注目されなかった。10mg/kgのcA2を用いて処置した動物は、実験を通してD-PBS処置した動物よりも一貫して高い体重の増加を示した。（図１２を参照にされたい）。

【０１９７】

図１３Ａ～Ｃは関節炎指数に基づく疾患の重篤度の進行を表す。10mg/kg cA2処置群の関節炎指数は、D-PBS対照群よりも２週間目から始まり、その後の実験中、有意に低かった（５週）。１mg/kgまたは３mg/kgのcA2で処置した動物および３mg/kgのTNV14で処置した動物は、d-PBS処置群と比べた時に実験を通して任意の時点でAIに有意な減少を示すことができなかった。３mg/kgのTNV148で処置した動物は、d-PBS処置群と比べた時に３週間目から始まり、その後５週まで続いて有意な減少を示した。10mg/kgのcA2で処置した動物は、実験の４および５週目で両方のより低用量のcA2（１mg/kgおよび３mg/kg）と比べてAIに有意な低下を示し、そしてまた３～５週目でTNV14で処置した動物よりも有意に低かった。３mg/kgの処置群間に有意差はなかったようだが、３mg/kgのTNV14で処置した動物に関するAIは同じ時点で10mg/kgよりも有意に高く、一方TNV148で処置した動物は10mg/kgのcA2で処置した動物と有意に異ならなかった。

実施例６：単回の腹腔内ボーラス投与として抗-TNF抗体および対照を使用した関節炎マウス実験

約４週齢のTg197実験マウスを、性別および体重に基づき６処置群の１つに割り当て、そして３mg/kgまたは５mg/kgのいずれかの抗体（cA2またはTNV148）の単回腹腔内ボーラス投与を用いて処置した。この実験はD-PBSおよび10mg/kgのcA2対照群を利用した。

【０１９８】

投与前からの変化として体重を分析した時、すべての処置が同様の体重増加を達成した。３または５mg/kgのTNV148または５mg/kgのcA2のいずれかを用いて処置した動物は、実験の初期に有意な量の体重が増加した（２および３週）。TNV148で処置した動物だけが後の時点で有意な体重増加を維持した。３および５mg/kgの両方でTNV148で処置した動物は７週で有意を示し、そして３mg/kgのTNV148動物は注射８週後でも有意に上昇した（図１４の参照にされたい）。

【０１９９】

図１５は関節炎指数に基づく疾患の重篤度の進行を表す。すべての処置群がより早い時点で幾らかの保護を示し、５mg/kg cA2および５mg/kg TNV148は１～３週でAIに有意な低下を示し、そしてすべての処置群は、２週で有意な減少を示した。実験の後期に、５mg/kgのcA2で処置した動物は幾らかの保護を示し、４、６および７週で有意に低下した。低用量（３mg/ml）の両cA2およびTNV148は６で有意な低下を示し、そしてすべての処置群が７週に有意な低下を示した。実験の終わりまで（８週）有意な低下を維持した処置群はなかった。任意の時点で任意の処置群間（塩水対照群は除く）に有意差はなかった。

実施例７：単回の腹腔内ボーラス投与として抗-TNF抗体および対照を使用した、

抗-TNF抗体および修飾抗-TNF抗体間の関節炎マウス実験

TNV148（ハイブリドーマ細胞に由来する）およびrTNV148B（トランスフェクトした細胞に由来する）の単回腹腔内投与の効果を比較するために、約４週齢のTg197実験マウスを、性別および体重に基づき９処置群の１つに割り当て、そしてダルベッコSPBS（D-PBS)または１mg/kgの抗体（TNV148、rTNV148B）の単回腹腔ボーラス投与を用いて処置した。

【０２００】

投与前からの変化として体重を分析した時、10mg/kgのcA2で処置した動物は、実験を通してD-PBS処置動物よりも一貫して高い体重増加を示した。この体重増加は１および３～８週で有意であった。１mg/kgのTNV148で処置した動物も、実験の５、６および８週で有意な体重増加に達した。

【０２０１】

図１７は関節炎指数に基づく疾患の重篤度の進行を表す。10mg/kgのcA2で処置した群の関節炎指数はD-PBS対照群よりも、４週から始まり、そして残りの実験を通して（８週）有意に低かった。TNV148で処置した群および１mg/kgのcA2で処置した群は両方とも４週でAIにおける有意な低下を示した。以前の実験（P-099-017）は、TNV148が単回の１mg/kgの腹腔内ボーラス後の関節炎指数の低下にわずかに効果的であることを示したが、この実験ではTNV抗体の両変更体で処置した群からのAIはわずかに高いことが示された。１mg/kgのcA2で処置した群は、10mg/kgのcA2で処置した群と比べた時に有意に上昇せず（６週を除く）、そしてTNV148で処置した群は７および８週で有意に高いが、１mg/kgのcA2、１mg/kgのTNV148および１mg/kgのTNV148B間には実験の任意の時点でAIに有意差はなかった。

【０２０２】

本発明は前述の説明および実施例に特に記載した以外にも実施することができるのは明らかである。

【０２０３】

本発明の種々の修飾および変更は、上記の教示に照らして可能であり、したがってそれらは前記特許請求の範囲内である。

【０２０４】

本発明により、以下が提供される：

［１］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を含んで成る、少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体。

［２］　上記抗体が、少なくとも10^{-9}M、少なくとも10^{-10}M，少なくとも10^{-11}Mまたは少なくとも10^{-12}Mから選択される少なくとも１つの親和性でTNFに結合する、［１］に記載のTNF抗体。

［３］　上記抗体が少なくとも１つのTNFタンパク質の少なくとも１つの活性を実質的に中和する、［１］に記載のTNF抗体。

［４］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体をコードする単離された核酸。

［５］　［４］に記載の単離された核酸を含んで成る単離された核酸ベクター。

［６］　［５］に記載の単離された核酸を含んで成る原核生物または真核生物宿主細胞。

［７］　上記宿主細胞が、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、ミエローマまたはリンパ腫細胞、またはそれらから誘導され、不死化されまたは形質転換した細胞のすべてから選択される少なくとも１つである、［６］に記載の宿主細胞。

［８］　TNF抗体が検出可能または回収可能な量で発現するように、［４］に記載の核酸をインビトロ、インビボまたはインシトゥーの条件下で翻訳することを含んで成る、少なくとも１つの抗-TNF抗体の生産法。

［９］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体、および少なくとも１つの医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。

［１０］　少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物をさらに含んで成る、［９］に記載の組成物。

［１１］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体に特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体またはフラグメント。

［１２］　細胞、組織、器官または動物のTNF関連状態を診断または処置する方法であって：

（ａ）配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の有効量を含んで成る組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んで成る上記方法。

［１３］　上記の有効量が、0.001～50mg／キログラムの該細胞、組織、器官または動物である、［１２］に記載の方法。

［１４］　上記の接触または上記の投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式による、［１２］に記載の方法。

［１５］　上記（ａ）の接触または投与の前、と同時または後に、少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物を投与することをさらに含んで成る、［１２］に記載の方法。

［１６］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体を含んで成る医療用デバイスであって、該デバイスが非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式により、上記の少なくとも１つの抗-TNF抗体を接触または投与するために適する、上記医療用デバイス。

［１７］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の溶液または凍結乾燥状態を含んで成る包装材料および容器を含んで成る、ヒトの薬剤または診断に使用するための製品。

［１８］　上記の容器が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮送達デバイスまたはシステムの部品である、［１７］に記載の製品。

［１９］　配列番号７または８を含んで成る少なくとも１つの可変領域を有する少な

くとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の生産法であって、回収可能な量の該抗体を発現することができる宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞を提供することを含んで成る上記方法。

［２０］　［１９］に記載された方法により生産された少なくとも１つの抗-TNF抗体。

［２１］　（i）配列番号１、２および３の重鎖相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべてのいずれかを含んで成る、少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体。

［２２］　上記抗体が、少なくとも10^{-9}M、少なくとも10^{-10}M，少なくとも10^{-11}Mまたは少なくとも10^{-12}Mから選択される少なくとも１つの親和性でTNFに結合する、［２１］に記載のTNF抗体。

［２３］　上記抗体が少なくとも１つのTNFタンパク質の少なくとも１つの活性を実質的に中和する、［２１］に記載のTNF抗体。。

［２４］　（i）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべてのいずれか、少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体をコードする単離された核酸（An isolated nucleic acid encoding at least one isolated mammalian anti-TNF antibody either (i) all of the heavy chain CDR amino acid sequences of SEQ ID NOS: 1, 2 , and 3; or (ii) all of the light chain CDR amino acids sequences of SEQ ID NOS: 4, 5, and 6.）。

［２５］　［４］に記載の単離された核酸を含んで成る単離された核酸ベクター。

［２６］　［２５］に記載の単離された核酸を含んで成る原核または真核生物宿主細胞。

［２７］　上記宿主細胞が、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、ミエローマまたはリンパ腫細胞、またはそれらから誘導され、不死化されまたは形質転換した細胞のすべてから選択される少なくとも１つである、［２６］に記載の宿主細胞。

［２８］　TNF抗体が検出可能または回収可能な量で発現するように、［２４］に記載の核酸をインビトロ、インビボまたはインシトゥーの条件下で翻訳することを含んで成る、少なくとも１つの抗-TNF抗体の生産法。

［２９］　（i）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべて、のいずれかを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体、および少なくとも１つの医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。

［３０］　少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物をさらに含んで成る、［２９］に記載の組成物。

［３１］　（i）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべて、のいずれかを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体に特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体またはフラグメント。

［３２］　細胞、組織、器官または動物のTNF関連状態を診断または処置する方法であって、

（ａ）（i）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべて、のいずれかを有する少なくとも１

つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の有効量を含んで成る組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んで成る上記方法。

［３３］　上記の有効量が、0.001～50mg／キログラムの該細胞、組織、器官または動物である、［３２］に記載の方法。

［３４］　上記の接触または上記の投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式による、［３２］に記載の方法。

［３５］　上記（ａ）の接触または投与の前、と同時または後に、少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物を投与することをさらに含んで成る、［３２］に記載の方法。

［３６］　（ｉ）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべて、のいずれかを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体を含んで成る医療用デバイスであって、該デバイスが該少なくとも１つの抗-TNF抗体を、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式により接触または投与することに適する上記医療用デバイス。

［３７］　（ｉ）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべて、のいずれかを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の溶液または凍結乾燥形態を含んで成る包装材料および容器を含んで成る、ヒトの薬剤または診断に使用するための製品。

［３８］　上記の容器が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮送達デバイスまたはシステムの部品である、［３７］に記載の製品。

［３９］　（ｉ）配列番号１、２および３の重鎖CDRアミノ酸配列のすべて；または（ii）配列番号４、５および６の軽鎖CDRアミノ酸配列のすべて、のいずれかを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の生産法であって、回収可能な量の該抗体を発現することができる宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞を提供することを含んで成る上記方法。

［４０］　［３９］に記載の方法により生産された少なくとも１つの抗-TNF抗体。

［４１］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る、少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体。

［４２］　上記抗体が、少なくとも10^{-9}M、少なくとも10^{-10}M，少なくとも10^{-11}Mまたは少なくとも10^{-12}Mから選択される少なくとも１つの親和性でTNFに結合する、［４１］に記載のTNF抗体。

［４３］　上記抗体が少なくとも１つのTNFタンパク質の少なくとも１つの活性を実

質的に中和する、［４１］に記載のTNF抗体。

［４４］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体をコードする単離された核酸。

［４５］　［４４］に記載の単離された核酸を含んで成る単離された核酸ベクター。

［４６］　［４５］に記載の単離された核酸を含んで成る、原核または真核生物宿主細胞。

［４７］　上記宿主細胞が、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、ミエローマまたはリンパ腫細胞、またはそれらから誘導され、不死化されまたは形質転換した細胞のすべてから選択される少なくとも１つである、［４６］に記載の宿主細胞。

［４８］　TNF抗体が検出可能または回収可能な量で発現するように、［４４］に記載の核酸をインビトロ、インビボまたはインシトゥーの条件下で翻訳することを含んで成る、少なくとも１つの抗-TNF抗体の生産法。

［４９］　配列番号１、２、３、４、５または６の少なくとも１つのアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体、および少なくとも１つの医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。

［５０］　少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物をさらに含んで成る、［４９］に記載の組成物。

［５１］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体に特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体またはフラグメント。

［５２］　細胞、組織、器官または動物のTNF関連状態を診断または処置する方法であって：

（ａ）少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の有効量を含んで成る組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んで成る上記方法。

［５３］　上記の有効量が、0.001～50mg／キログラムの該細胞、組織、器官または動物である、［５２］に記載の方法。

［５４］　上記の接触または上記の投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式による、［５２］に記載の方法。

［５５］　上記（ａ）の接触または投与の前、と同時または後に、少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なく

とも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物を投与することをさらに含んで成る、［５２］に記載の方法。

［５６］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体を含んで成る医療用デバイスであって、該デバイスが非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式により、該少なくとも１つの抗-TNF抗体を接触または投与するために適する、上記医療用デバイス。

［５７］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の溶液または凍結乾燥形態を含んで成る包装材料および容器を含んで成る、ヒトの薬剤または診断に使用するための製品。

［５８］　上記の容器が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮送達デバイスまたはシステムの部品である、［５７］に記載の製品。

［５９］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の生産法であって、回収可能な量の該抗体を発現することができる宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞を提供することを含んで成る上記方法。

［６０］　［５９］に記載の方法により生産された少なくとも１つの抗-TNF抗体。

［６１］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体。

［６２］　上記抗体が、少なくとも10^{-9}M、少なくとも10^{-10}M，少なくとも10^{-11}Mまたは少なくとも10^{-12}Mから選択される少なくとも１つの親和性でTNFに結合する、［６１］に記載のTNF抗体。

［６３］　上記抗体が、少なくとも１つのTNFタンパク質の少なくとも1つの活性を実質的に中和する、［６１］に記載のTNF抗体。

［６４］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体をコードする単離された核酸。

［６５］　［６４］に記載の単離された核酸を含んで成る単離された核酸ベクター。

［６６］　［６５］に記載の単離された核酸を含んで成る原核生物または真核生物宿主細胞。

［６７］　上記宿主細胞が、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、ミエローマまたはリンパ腫細胞、またはそれらから誘導され、不死化されまたは形質転換した細胞のすべてから選択される少なくとも１つである、［６６］に記載の宿主細胞。

［６８］　TNF抗体が検出可能または回収可能な量で発現するように、［６４］に記載の核酸をインビトロ、インビボまたはインシトゥーの条件下で翻訳することを含んで成る、少なくとも１つの抗-TNF抗体の生産法。

［６９］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域

に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体、および少なくとも１つの医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。

［７０］　少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物をさらに含んで成る、［６９］に記載の組成物。

［７１］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体に特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体またはフラグメント。

［７２］　細胞、組織、器官または動物のTNF関連状態を診断または処置する方法であって：

（ａ）少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の有効量を含んで成る組成物を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んで成る上記方法。

［７３］　上記の有効量が、0.001～50mg／キログラムの該細胞、組織、器官または動物である、［７２］に記載の方法。

［７４］　上記の接触または上記の投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式による、［７２］に記載の方法。

［７５］　上記（ａ）の接触または投与の前、と同時または後に、少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物を投与することをさらに含んで成る、［７２］に記載の方法。

［７６］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体を含んで成る医療用デバイスであって、該デバイスが非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式により、上記の少なくとも１つの抗-TNF抗体を接触または投与するために適する、上記医療用デバイス。

［７７］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の溶液または凍結乾燥状態を含んで成る包装材料および容器を含んで成る、ヒトの薬剤または診断に使用するための

製品。

［７８］　上記の容器が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮送達デバイスまたはシステムの部品である、［７７］に記載の製品。

［７９］　少なくとも１つの配列番号１、２、３、４、５または６のアミノ酸配列を有する少なくとも１つの重鎖または軽鎖CDRを含んで成る抗体と同じTNFタンパク質の領域に結合する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の生産法であって、回収可能な量の該抗体を発現することができる宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞を提供することを含んで成る上記方法。

［８０］　［７９］に記載された方法により生産された少なくとも１つの抗-TNF抗体。

［８１］　少なくとも１つのヒトCDRを含んで成る少なくとも1つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体であって、該抗体が配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する上記抗体（At least one isolated mammalian anti-TNF antibody, comprising at least one human CDR, wherein said antibody specifically binds at least one epitope comprising at least 1-3, to the entire amino acid sequence of SEQ ID NO: 9.）。

［８２］　上記抗体が、少なくとも10^{-9}M、少なくとも10^{-10}M, 少なくとも10^{-11}Mまたは少なくとも10^{-12}Mから選択される少なくとも１つの親和性でTNFに結合する、［８１］に記載のTNF抗体。

［８３］　上記抗体が少なくとも１つのTNFタンパク質の少なくとも１つの活性を実質的に中和する、［８１］に記載のTNF抗体。

［８４］　少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも1つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体をコードする単離された核酸であって、該抗体が配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する上記核酸（An isolated nucleic acid encoding at least one isolated mammalian anti-TNF antibody having at least one human CDR, wherein said antibody specifically binds at least one epitope comprising at least 1-3, to the entire amino acid sequence of SEQ ID NO: 9.）。

［８５］　［８４］に記載の単離された核酸を含んで成る、単離された核酸ベクター。

［８６］　［８５］に記載の単離された核酸を含んで成る原核生物または真核生物宿主細胞。

［８７］　上記宿主細胞が、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、ミエローマまたはリンパ腫細胞、またはそれらから誘導され、不死化されまたは形質転換した細胞のすべてから選択される少なくとも１つである、［８６］に記載の宿主細胞。

［８８］　TNF抗体が検出可能または回収可能な量で発現するように、［８４］に記載の核酸をインビトロ、インビボまたはインシトゥーの条件下で翻訳することを含んで成る、少なくとも１つの抗-TNF抗体の生産法。

［８９］　少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体（ここで該抗体は、配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する）、および少なくとも１つの医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。

［９０］　少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、

ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物をさらに含んで成る、［８９］に記載の組成物。

［９１］　少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体に特異的に結合する（ここで該抗体は配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する）、抗-イディオタイプ抗体またはフラグメント。

［９２］　細胞、組織、器官または動物のTNF関連状態を診断または処置する方法であって：

（ａ）少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体の有効量を含んで成る組成物（ここで該抗体は配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する）を、該細胞、組織、器官または動物に接触または投与することを含んで成る上記方法。

［９３］　上記の有効量が、0.001～50mg／キログラムの該細胞、組織、器官または動物である、［９２］に記載の方法。

［９４］　上記の接触または上記の投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式による、［９２］に記載の方法。

［９５］　上記（ａ）の接触または投与の前、と同時または後に、少なくとも１つの検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、麻薬、非-ステロイド系抗炎症剤（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断剤、抗菌剤、止痒剤、コルチコステロイド、同化性ステロイド、エリトロポエチン、免疫感作、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン代用剤、放射性薬品、抗鬱剤、抗精神病剤、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたは同族体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも１つの化合物またはタンパク質の有効量を含んで成る少なくとも１つの組成物を投与することをさらに含んで成る、［９２］に記載の方法。

［９６］　少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体（ここで該抗体は配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する）を含んで成る医療用デバイスであって、該デバイスが非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮から選択される少なくとも１つの様式により、該少なくとも１つの抗-TNF抗体を接触または投与するために適する、上記医療用デバイス。

［９７］　少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体（ここで該抗体は配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する）の溶液または凍結乾燥状態を含んで成る包装材料および容器を含んで成る、ヒトの薬剤または診断に使用するための製品。

［９８］　上記の容器が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、網内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、窩内、腔体内、小脳内、脳室内、結腸内、頸内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜腔内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊椎内、滑液包内、胸内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、バッカル、舌下、鼻内または経皮送達デバイスまたはシステムの部品である、［９７］に記載の製品。

［９９］　少なくとも１つのヒトCDRを有する少なくとも１つの単離された哺乳動物の抗-TNF抗体（ここで該抗体は配列番号９の少なくとも１～３から全アミノ酸配列を含んで成る少なくとも１つのエピトープに特異的に結合する）の生産法であって、回収可能な量の該抗体を発現することができる宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞を提供することを含んで成る上記方法。

［１００］　［９９］に記載された方法により生産された少なくとも１つの抗-TNF抗体。

［１０１］　本明細書に記載の発明。

【図１】

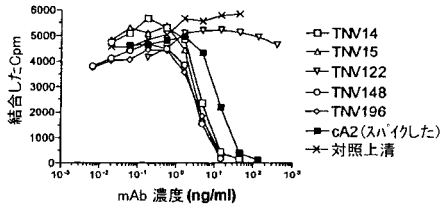

FIGURE 1

【図２Ａ】

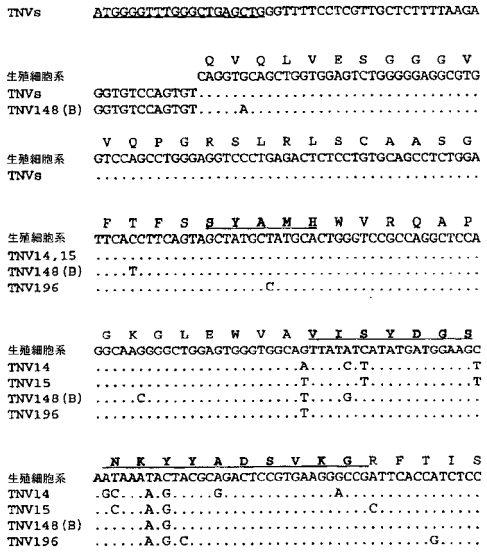

FIGURE 2A

【図２Ｂ】

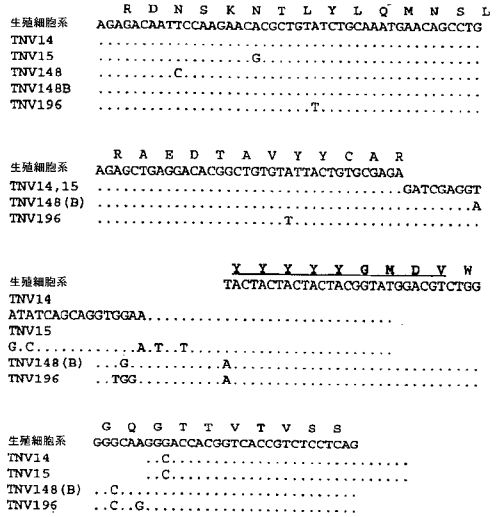

FIGURE 2B

【図３】

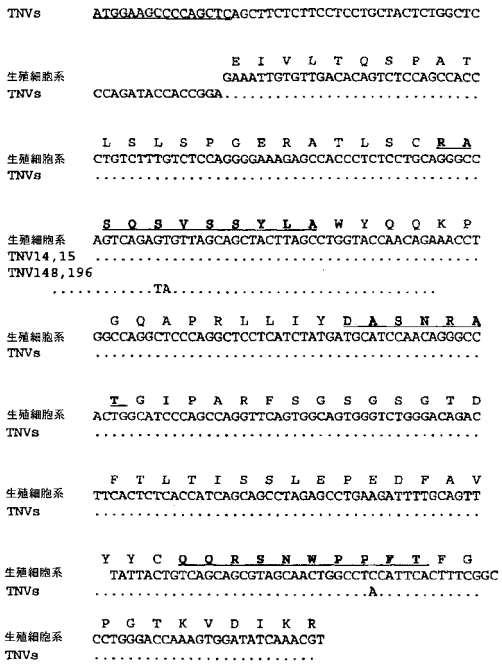

FIGURE 3

【図４】

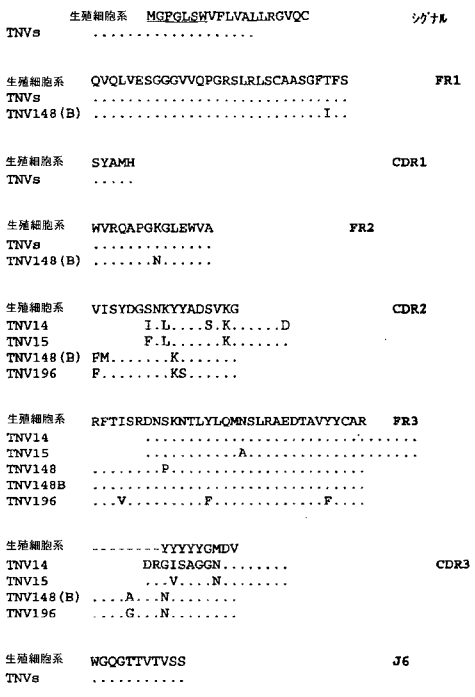

FIGURE 4

【図５】

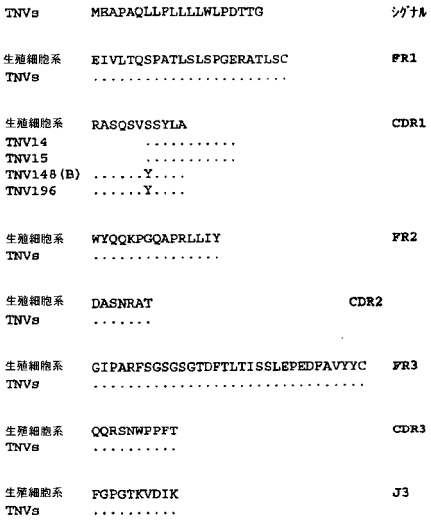

FIGURE 5

【図６】

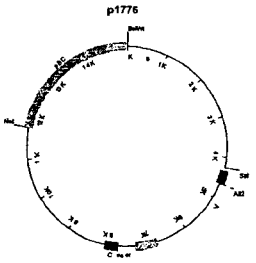

FIGURE 6

【図７】

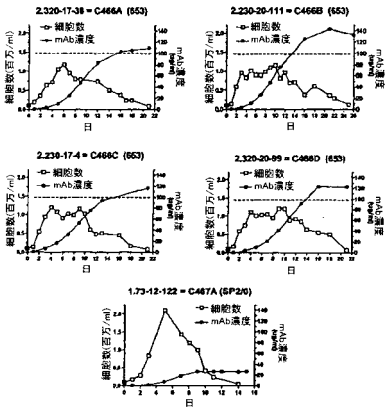

FIGURE 7

【図８】

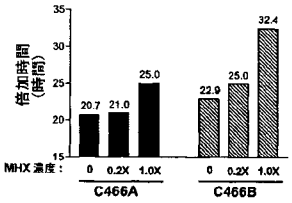

FIGURE 8

【図９】

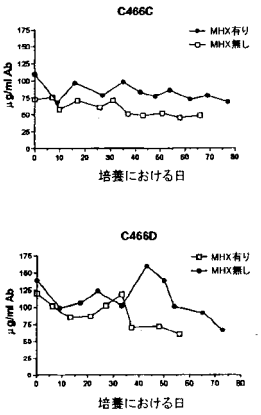

FIGURE 9

【図１０】

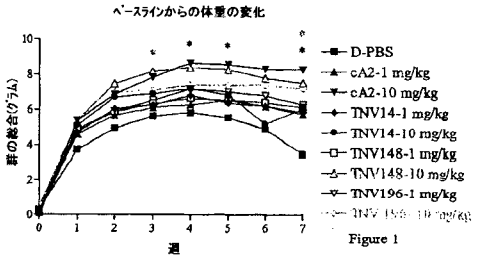

FIGURE 10

【図１１】

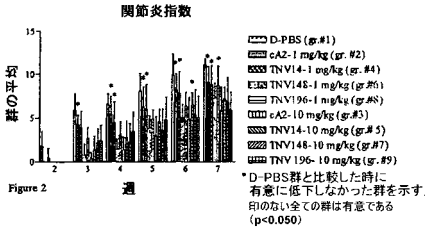

FIGURE 11A

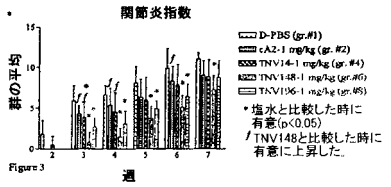

FIGURE 11B

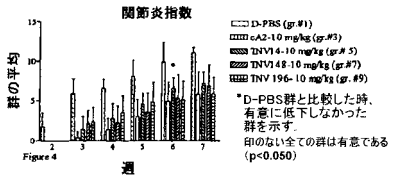

FIGURE 11C

【図１２】

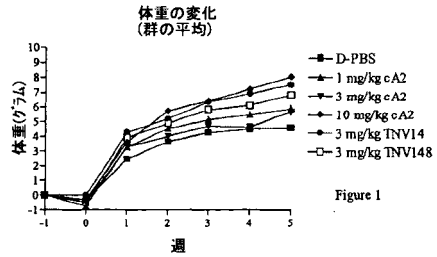

FIGURE 12

【図１３】

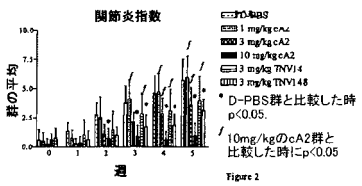

FIGURE 13A

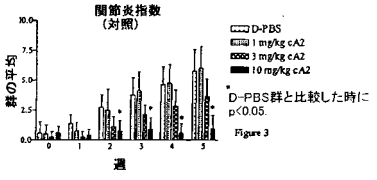

FIGURE 13B

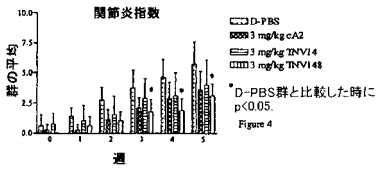

FIGURE 13C

【図１４】

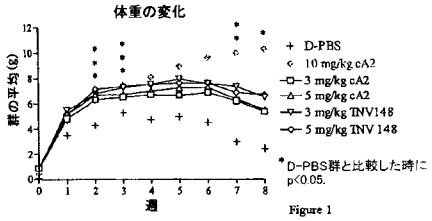

FIGURE 14

【図１５】

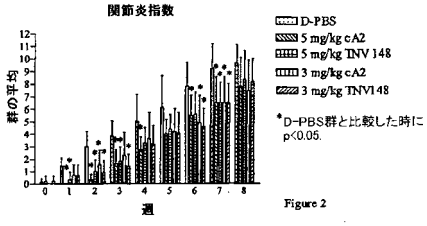

FIGURE 15

【図１６】

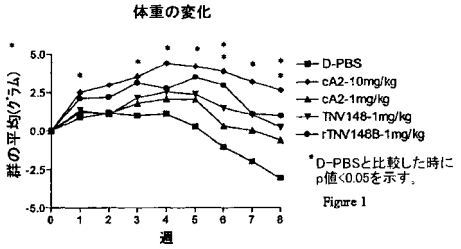

FIGURE 16

【図１７】

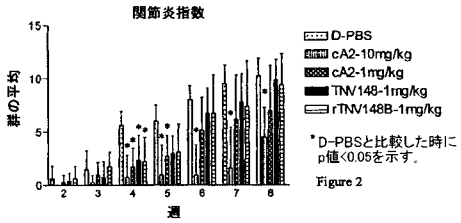

FIGURE 17

【配列表】
2016019519000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成27年7月31日(2015.7.31)
【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】
配列番号:16，17，18のアミノ酸配列をそれぞれ有するmAb TNV148の重鎖相補性決定領域(CDR)1，2，3；および
配列番号:22，23，24のアミノ酸配列それぞれを有するmAb TNV148の軽鎖CDR1，2，3を含み、$1x10^{-11}$ M～$7x10^{-12}$ Mの範囲のK_DのTNFへの結合親和性である、抗体。
【請求項２】
請求項1記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子。
【請求項３】
請求項2記載の核酸分子を含む組換えベクター。
【請求項４】
請求項2記載の核酸分子または請求項3記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項５】
請求項1記載の抗体、および医薬的に許容されるキャリアーまたは希釈剤を含んで成る組成物。
【請求項６】
請求項1記載の抗体を含む、診断用または治療用組成物。
【請求項７】
免疫関連疾患治療用の請求項6記載の組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/10	***(2006.01)***	C12N	5/00	101	
C12N 15/02	***(2006.01)***	C12N	15/00	C	
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	
A61P 37/02	***(2006.01)***	A61P	37/02		
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P	21/08		

(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72)発明者 ギルズ－コマー，ジル
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３５５ダウニングタウン・ブレイクリーロード３１
(72)発明者 ナイト，デイビツド・エム
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３１２バーウイン・ホワイトホースロード２４３０
(72)発明者 ヘブナー，ジヨージ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３５５マルバーン・オークグレンドライブ６
(72)発明者 スカロン，バーナード
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９４２６カレツジビル・ヘムロツクドライブ１３９
(72)発明者 シーリー，デイビツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９３３５ダウニングタウン・ペンズリツジプレイス１３５１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04
GA01 GA11 HA01 HA11
4B064 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 CC23 DD62 DD63
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74