

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7641908号

(P7641908)

(45)発行日 令和7年3月7日(2025.3.7)

(24)登録日 令和7年2月27日(2025.2.27)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N Z N A

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

A 6 1 K 9/08

A 6 1 P 37/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 K 47/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/12

請求項の数 27 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-557128(P2021-557128)

(86)(22)出願日 令和2年3月27日(2020.3.27)

(65)公表番号 特表2022-528230(P2022-528230
A)

(43)公表日 令和4年6月9日(2022.6.9)

(86)国際出願番号 PCT/CN2020/081701

(87)国際公開番号 WO2020/200099

(87)国際公開日 令和2年10月8日(2020.10.8)

審査請求日 令和5年3月14日(2023.3.14)

(31)優先権主張番号 201910249953.4

(32)優先日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 510166892

ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニ
ー リミテッド

J I A N G S U H E N G R U I M E D
I C I N E C O . , L T D .

中華人民共和国 ジェンス 2 2 2 0 0 2
リエンユンガン エコノミック・アンド
・テクノロジー・ディベロップメント
・ゾーン クンルンシャン ロード ナン
パー 7

(73)特許権者 508209602

シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティ
カル カンパニー リミテッド

S H A N G H A I H E N G R U I P H
A R M A C E U T I C A L C O . , L

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L - 5 に対する抗体を含有する医薬組成物及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 抗 I L - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメント、

(b) バッファーであって、該バッファーは、酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー又はコ
ハク酸 - コハク酸ナトリウムバッファーであり、p H が 5 . 0 ~ 6 . 5 であり、濃度が 1
0 m M ~ 4 0 m M である、バッファー；

(c) 界面活性剤であって、該界面活性剤はポリソルベート 8 0 であり、該ポリソルベ
ート 8 0 の濃度は 0 . 1 m g / m l ~ 0 . 6 m g / m l である、界面活性剤；

(d) 安定剤であって、該安定剤はスクロースであり、該スクロースの濃度は 5 0 m g
/ m l ~ 8 0 m g / m l である、安定剤

を含む、医薬組成物であって、

抗 I L - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメントが、

それぞれアミノ酸配列番号：1 6、1 7 及び 1 8 に示された H C D R 1、H C D R 2 及び
H C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに

それぞれアミノ酸配列番号：1 9、2 0 及び 2 1 に示された L C D R 1、L C D R 2 及び
L C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

前記バッファーの p H が、5 . 0 ~ 5 . 8 である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記バッファーの p H が、約 5 . 5 である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記バッファの濃度が、20 mM ~ 30 mMである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記バッファの濃度が、約 30 mM又は約 32 mMである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメントの濃度が、1 mg / ml ~ 120 mg / mlである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメントの濃度が、80 mg / ml ~ 120 mg / mlである、請求項 6 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 8】

前記抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメントの濃度が、約 100 mg / mlである、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

ポリソルベート 80 の濃度が、0.2 mg / ml ~ 0.6 mg / mlである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

ポリソルベート 80 の濃度が、約 0.4 mg / ml 又は約 0.6 mg / mlである、請求項 9 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 11】

前記スクロースの濃度が、70 mg / ml ~ 75 mg / mlである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記スクロースの濃度が、約 72 mg / mlである、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

次の成分を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物：

1 mg / ml ~ 120 mg / ml の抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメント；

pH が 5.0 ~ 6.5 の 10 mM ~ 40 mM の酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファ；

0.1 mg / ml ~ 0.6 mg / ml のポリソルベート 80；及び

50 mg / ml ~ 80 mg / ml スクロース。

30

【請求項 14】

80 mg / ml ~ 120 mg / ml の抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメント、

pH が 5.0 ~ 5.8 の 10 mM ~ 30 mM の酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファ、

0.2 mg / ml ~ 0.6 mg / ml のポリソルベート 80 及び

70 mg / ml ~ 80 mg / ml のスクロース

を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

約 100 mg / ml の抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメント、

pH が約 5.5 の約 30 mM の酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファ、

約 0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び

約 72 mg / ml のスクロース

を含む、請求項 14 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 16】

前記抗 IL - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメントが、マウス抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記ヒト化抗 IL - 5 抗体が、配列番号：49、50 及び 51 のいずれか 1 つに示された、若しくは配列番号：49、50 及び 51 のいずれか 1 つとの間に 95 % の配列相同性を有する、重鎖可変領域；並びに、

50

配列番号：４６、４７及び４８のいずれか１つに示された、若しくは配列番号：４６、４７及び４８のいずれか１つとの間に９５％の配列相同性を有する、軽鎖可変領域を含む、請求項１６に記載の医薬組成物。

【請求項１８】

前記ヒト化抗ＩＬ－５抗体が、配列番号：５１に示された重鎖可変領域及び配列番号：４７に示された軽鎖可変領域を含む、請求項１７に記載の医薬組成物

【請求項１９】

前記抗ＩＬ－５抗体が、ヒト抗体定常領域を含む、請求項１に記載の医薬組成物。

【請求項２０】

前記抗ＩＬ－５抗体が、配列番号：５２に示されたヒト抗体重鎖定常領域及び配列番号：５３に示されたヒト抗体軽鎖定常領域を含む、請求項１９に記載の医薬組成物。

10

【請求項２１】

前記抗ＩＬ－５抗体が、配列番号：８３に示された重鎖及び配列番号：８４に示された軽鎖を含む、請求項２０に記載の医薬組成物。

【請求項２２】

抗ＩＬ－５抗体又はその抗原結合性フラグメントのストック溶液をバッファーによって置きかえるステップを含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の医薬組成物を調製するための方法であって、バッファーが酢酸－酢酸ナトリウムバッファーである、方法。

【請求項２３】

請求項１～２１のいずれか一項に記載の医薬組成物の凍結乾燥形態である、抗ＩＬ－５抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む凍結乾燥製剤。

20

【請求項２４】

予備凍結ステップ、一次乾燥ステップ及び二次乾燥ステップを順次含む、請求項２３に記載の凍結乾燥製剤を得る方法。

【請求項２５】

請求項２３に記載の凍結乾燥製剤の復元形態である、抗ＩＬ－５抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む復元溶液。

【請求項２６】

請求項１～２１のいずれか一項に記載の医薬組成物又は請求項２３に記載の凍結乾燥製剤又は請求項２５に記載の復元溶液を含む容器を含む、物品。

30

【請求項２７】

ＩＬ－５媒介性疾患を処置するための請求項１～２１のいずれか一項に記載の医薬組成物であって、前記ＩＬ－５媒介性疾患が、ぜんそく、慢性肺炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球増加症、チャージ－ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、オンコセルカ症皮膚炎、間欠性血管性浮腫、好酸球性筋痛症候群、好酸球性胃腸炎、寄生虫感染症、ホジキン病、鼻茸、レフラー症候群、じんま疹、過好酸性気管支炎、結節性動脈炎、副鼻腔炎、好酸球性食道炎、アレルギー性好酸球性食道炎、アレルギー性結膜炎、オンコセルカ症皮膚炎、子宮内膜症及びステロイド依存性好酸球性気管支炎からなる群より選択される、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【０００１】

本開示は、医薬製剤の分野に属し、特に、抗ＩＬ－５抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む医薬組成物と、ＩＬ－５関連疾患のための診断用薬及び治療薬としての、この医薬組成物の使用とに関する。

【背景技術】

【０００２】

本明細書における記載事項は、本開示に関連付けられた背景情報を提供するにすぎず、必ずしも従来技術を校正するとは限らない。

【０００３】

50

インターロイキン - 5 (I L - 5) は、インターロイキンファミリーの重要なメンバーの1つであるが、主にヘルパーT細胞2 (T h 2) によって分泌されるホモダイマー型糖タンパク質であるT細胞代行因子 (T R F : T c e l l r e p l a c i n g f a c t o r)、B細胞増殖因子 - I I (B C G F - I I)、I g A 増強因子 (I g A - E F) 又は好酸球分化因子 (E D F) としても公知である。ヒト I L - 5 は、134個のアミノ酸残基から構成され、22個のアミノ酸及び2つのグリコシル化部位から構成されるシグナルペプチドを含む。活性 I L - 5 は、逆平行構成になった2本のペプチド鎖がジスルフィド結合によって連結されたオリゴダイマーであるが； I L - 5 モノマーは、生物活性を有さない (A d v I m m u n o l . 1994 ; 57 : 145 ~ 90)。

【0004】

10

好酸球 (E O S) は、アレルギー性反応に関連付けられたアレルギー性疾患を含む、様々な肺の炎症性疾患に関連付けられている。ぜんそくは、慢性炎症性呼吸器疾患である。世界中で約3億人の患者が存在し、発症率は10%である。ぜんそくの発病機序は、様々なサイトカインに関連付けられている。I L - 5 及び受容体 I L - 5 R は、ぜんそくの発病機序において、重要な役割を担う。現在、ぜんそくを処置する最も効果的な方法は、ぜんそくに関与するいくつかの重要なメディエーター (I L - 5 を含む) の発現を阻害し、これにより、肺の炎症を低減するようにステロイドを経鼻又は経口投与することである。しかしながら、ステロイド剤の長期的な施用には、数多くの副作用がある。したがって、ぜんそくの処置のための新規な創薬ターゲットを見つけ出すことが必要である。研究により、抗 I L - 5 抗体の投与は、I L - 5 受容体への I L - 5 の結合を阻害し；肺における好酸球の蓄積を有意に低減し、血液、組織及び喀痰中における好酸球のレベルを低下させ；好酸球によって媒介され得る炎症反応を低減し；肺機能を改善し；好酸球性ぜんそく及び再発性ぜんそくに好ましい影響を与えることが示されている (D r u g s . 2017年5月 ; 77 (7) : 777 ~ 784)。

20

【0005】

抗体剤は、高い分子量及び複雑な構造を有する。製造、輸送及び貯蔵のプロセスにおいて、抗体にはしばしば、粒子の変性、凝集、汚染及び形成を原因とする課題がつきまとう。抗体を効果的なものに保つためには、製造中、精製、中輸送中及び貯蔵中に抗体の生物活性が維持されなければならない。現在、高度に精製された多数のモノクローナル抗体を製造すべく、製造及び精製のための新技術が開発されている。しかしながら、どのようにしてこれらの抗体を輸送及び貯蔵中に安定させるか、及びどのようにして投与に適した剤形の抗体を用意するかが常に課題となってきた。

30

【0006】

抗 I L - 5 抗体に関しては、G S K のメボリズマブ及び T e v a P h a r m a のレスリズマブのみが、現在、市販を承認されている。関連特許は、国際公開第2018/119016号、国際公開第2017/033121号、国際公開第2014/141149号、国際公開第2016/040007号、国際公開第2015/095539号、国際公開第2012/138958号及び国際公開第95/35375号等を含む。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0007】

【文献】国際公開第2018/119016号

【文献】国際公開第2017/033121号

【文献】国際公開第2014/141149号

【文献】国際公開第2016/040007号

【文献】国際公開第2015/095539号

【文献】国際公開第2012/138958号

【文献】国際公開第95/35375号

【非特許文献】

【0008】

50

【文献】Adv Immunol. 1994; 57: 145~90

【文献】Drugs. 2017年5月; 77(7): 777~784

【発明の概要】

【0009】

本開示は、IL-5抗体又はその抗原結合性フラグメント、バッファー及び界面活性剤を含む、医薬組成物であって、バッファーが、酢酸-酢酸ナトリウムバッファー、コハク酸-コハク酸ナトリウムバッファー、ヒスチジン-塩酸塩バッファー及びクエン酸-クエン酸ナトリウムバッファーからなる群より選択されるいずれか1つであり、好ましくは、酢酸-酢酸ナトリウムバッファー又はコハク酸-コハク酸ナトリウムバッファーであり；抗IL-5抗体又はその抗原結合性フラグメントが、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、

10

(i) 重鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：16、17及び18に示されたHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、

軽鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：19、20及び21に示されたLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み；

(ii) 重鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：22、23及び24に示されたHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、

軽鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：25、26及び27に示されたLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み；

(iii) 重鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：28、29及び30に示されたHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、

20

軽鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：31、32及び33に示されたLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み；

(iv) 重鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：34、35及び36に示されたHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、

軽鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：37、38及び39に示されたLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み；

(v) 重鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：40、41及び42に示されたHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、

軽鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：43、44及び45に示されたLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み；又は、

30

(vi) 重鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：34、82及び36に示されたHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、

軽鎖可変領域が、それぞれアミノ酸配列番号：37、38及び39に示されたLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、

医薬組成物を提供する。

【0010】

代替的な実施形態において、医薬組成物中におけるバッファーのpHは、約5.0~約6.5、好ましくは約5.5~約6.5、好ましくは約6.0~約6.5、好ましくは約5.0~約6.0、好ましくは約5.5~約6.0、好ましくは約5.0~約5.5、好ましくは約5.0~約5.8、好ましくは約5.2~約5.8であり；バッファーのpHの非限定的な例は、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4、約5.5、約5.6、約5.7、約5.8、約5.9、約6.0、約6.5を含み、最も好ましくは約5.5が最も好ましい。

40

【0011】

代替的な実施形態において、医薬組成物中におけるバッファーの濃度は、約10mM~約40mM、約10mM~約30mM、好ましくは約15mM~約30mM、好ましくは約20mM~約30mM、好ましくは約25mM~約30mM、好ましくは約10mM~約25mM、好ましくは約15mM~約25mM、好ましくは約20mM~約25mM、好ましくは約10mM~約15mMであり；バッファーの濃度の非限定的な例は、約10

50

mM、約12mM、約14mM、約16mM、約18mM、約20mM、約22mM、約24mM、約26mM、約28mM、約30mM、約32mM、約34mMを含み、約30mMが最も好ましい。

【0012】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中における抗IL-5抗体又はその抗原結合性フラグメントの濃度は、約1mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約1mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約10mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約20mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約30mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約40mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約50mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約60mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約70mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約80mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約90mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約100mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約110mg/ml～約120mg/ml、好ましくは約20mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約30mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約40mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約50mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約60mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約70mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約80mg/ml～約100mg/ml、好ましくは約90mg/ml～約100mg/mlであり；非限定的な例として、抗IL-5抗体又はその抗原結合性フラグメントの濃度は、約80mg/ml、約85mg/ml、約90mg/ml、約91mg/ml、約92mg/ml、約93mg/ml、約94mg/ml、約95mg/ml、約96mg/ml、約97mg/ml、約98mg/ml、約99mg/ml、約100mg/ml、約101mg/ml、約102mg/ml、約103mg/ml、約104mg/ml、約105mg/ml、約106mg/ml、約107mg/ml、約108mg/ml、約109mg/ml、約110mg/ml、約115mg/ml、約120mg/ml、最も好ましくは約100mg/mlである。

【0013】

代替的な実施形態において、本医薬組成物に含まれる界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポリヒドロキシアルキレン、Triton、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ラウリルスルホン酸ナトリウム、ナトリウムオクチルグリコシド、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステアリルサルコシン、リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、セチルベタイン、ラウラミドプロピルベタイン、ココミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミタミドプロピルベタイン、イソステアミドプロピルベタイン(isosteamidopropyl-betaine)、ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パームアミドプロピルジメチルアミン(palmamidopropyl-dimethylamine)、イソステアラミドプロピルジメチルアミン、ナトリウムメチルココイル(sodium methylcocoyle)、メチルオレオイルタウリン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー等からなる群より選択することができる。好ましい界面活性剤は、ポリソルベート80又はポリソルベート20であり、より好ましくはポリソルベート80である。

【0014】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中におけるポリソルベート80の濃度は、約0.05mg/ml～約0.6mg/ml、好ましくは約0.1mg/ml～約0.6mg/ml、好ましくは約0.2mg/ml～約0.6mg/ml、好ましくは約0.3mg/ml～約0.6mg/ml、好ましくは約0.4mg/ml～約0.6mg/ml、好ましくは約0.5mg/ml～約0.6mg/ml、好ましくは約0.2mg/ml～約0.5mg/ml、好ましくは約0.3mg/ml～約0.5mg/ml、好ましくは

約 0.4 mg/ml ~ 約 0.5 mg/ml、好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 約 0.4 mg/ml であり、非限定的な例として、本医薬組成物中における界面活性剤の濃度は、約 0.2 mg/ml、約 0.3 mg/ml、約 0.4 mg/ml、約 0.45 mg/ml、約 0.5 mg/ml、約 0.55 mg/ml、約 0.6 mg/ml、最も好ましくは約 0.4 mg/ml である。

【0015】

さらに、代替的な実施形態において、本医薬組成物は、賦形剤をさらに含み、賦形剤は、安定剤から選択される。

【0016】

代替的な実施形態において、安定剤は、糖又はアミノ酸から選択され；糖は、スクロース、トレハロース、マンニトール及びソルビトールからなる群より選択することができ、好ましくはスクロースである。アミノ酸は、グリシン、メチオニン及びプロリンからなる群より選択される。

10

【0017】

代替的な実施形態において、糖の濃度は、約 50 mg/ml ~ 約 80 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 約 80 mg/ml、好ましくは約 70 mg/ml ~ 約 80 mg/ml、好ましくは約 75 mg/ml ~ 約 80 mg/ml、好ましくは約 70 mg/ml ~ 約 75 mg/ml であり；非限定的な例として、本医薬組成物中における安定剤の濃度は、約 70 mg/ml、約 71 mg/ml、約 72 mg/ml、約 73 mg/ml、約 74 mg/ml、約 75 mg/ml、約 76 mg/ml、約 77 mg/ml、約 78 mg/ml、約 79 mg/ml、約 80 mg/ml、より好ましくは約 72 mg/ml を含む。

20

【0018】

代替的な実施形態において、アミノ酸の濃度は、約 8 mg/ml である。

【0019】

代替的な実施形態において、本医薬組成物は、

(a) 約 1 mg/ml ~ 約 120 mg/ml の抗 IL-5 抗体又はその抗原結合性フラグメント；(b) pH 約 5.0 ~ 6.5 の約 10 mM ~ 約 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；及び (c) 約 0.1 mg/ml ~ 約 0.6 mg/ml のポリソルベート 80 を含む。

30

【0020】

代替的な実施形態において、本医薬組成物は、

(a) 約 80 mg/ml ~ 約 100 mg/ml の抗 IL-5 抗体又はその抗原結合性フラグメント；(b) pH 約 5.0 ~ 約 6.0 の約 10 mM ~ 約 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；及び (c) 約 0.1 mg/ml ~ 約 0.4 mg/ml のポリソルベート 80 を含む。

【0021】

代替的な実施形態において、本医薬組成物は、

(d) 約 80 mg/ml ~ 約 120 mg/ml の IL-5 抗体又はその抗原結合性フラグメント；(e) pH 約 5.0 ~ 約 5.8 の約 10 mM ~ 約 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；(f) 約 0.2 mg/ml ~ 約 0.6 mg/ml のポリソルベート 80；及び (g) 約 70 mg/ml ~ 約 75 mg/ml のスクロースを含む；好ましくは、本医薬組成物は好ましくは、

40

(h) 約 100 mg/ml の IL-5 抗体又はその抗原結合性フラグメント、(i) pH 約 5.5 の約 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー、(j) 約 0.4 mg/ml のポリソルベート 80 及び (k) 約 72 mg/ml のスクロースを含む。

【0022】

一部の好ましい実施形態によれば、本開示の医薬組成物中の抗 IL-5 抗体又はその抗

50

原結合性フラグメントは、マウス抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体である。

【 0 0 2 3 】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中のヒト化抗 I L - 5 抗体は、配列番号： 4 9、5 7、6 3、6 9 若しくは 7 5 に示された重鎖可変領域又はそのバリエーションを含み；バリエーションは、それぞれ配列番号： 4 9、5 7、6 3、6 9 又は 7 5 に示された重鎖可変領域配列中に 1 ～ 1 0 個のアミノ酸復帰変異を含む。

【 0 0 2 4 】

代替的な実施形態において、バリエーションは、

(i) 配列番号： 4 9 に示された重鎖可変領域中にある S 4 9 T、V 9 3 T 及び K 9 8 S からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション；

10

(i i) 配列番号： 5 7 に示された重鎖可変領域中にある S 4 9 T、V 9 3 T 及び K 9 8 T からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション；

(i i i) 配列番号： 6 3 に示された重鎖可変領域中にある R 3 8 K、M 4 8 I、R 6 7 K、V 6 8 A、M 7 0 L、R 7 2 V、T 7 4 K 及び L 8 3 F からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション；

(i v) 配列番号： 6 9 に示された重鎖可変領域中にある F 2 9 I、R 3 8 K、V 4 8 I、R 7 2 A 及び T 9 7 F からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異及び / 若しくは C D R 中にある N 5 5 V 変異を含む、バリエーション；又は、

(v) 配列番号： 7 5 に示された重鎖可変領域中にある R 3 8 K、M 4 8 I、R 6 7 K、V 6 8 A、R 7 2 A、T 7 4 K、M 8 1 L、L 8 3 F 及び D 8 9 E からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション

20

からなる群より選択されるいずれか 1 つに示されたバリエーションである。

【 0 0 2 5 】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中のヒト化抗 I L - 5 抗体は、

配列番号： 5 0 若しくは 5 1 に示された重鎖可変領域；又は、

配列番号： 5 8 若しくは 5 9 に示された重鎖可変領域；又は、

配列番号： 6 4、6 5 及び 6 6 からなる群より選択されるいずれか 1 つに示された重鎖可変領域；又は、

配列番号： 7 0 若しくは 7 1 に示された重鎖可変領域；又は、

配列番号： 7 6、7 7、7 8 及び 7 9 からなる群より選択されるいずれか 1 つに示された重鎖可変領域を含む。

30

【 0 0 2 6 】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中のヒト化抗 I L - 5 抗体は、配列番号： 4

6、5 4、6 0、6 7 若しくは 7 2 に示された軽鎖可変領域又はそのバリエーションを含み；

バリエーションは、配列番号： 4 6、5 4、6 0、6 7 又は 7 2 に示された軽鎖可変領域中にある 1 ～ 1 0 個のアミノ酸復帰変異を含む。

【 0 0 2 7 】

代替的な実施形態において、バリエーションは、

(i) 配列番号： 4 6 に示された軽鎖可変領域中にある A 4 3 S、L 4 7 V、G 6 6 R、T 6 9 S、F 7 1 Y 及び Y 8 7 F からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション；

40

(i i) 配列番号： 5 4 に示された軽鎖可変領域中にある A 4 3 S、L 4 7 M、F 7 1 Y 及び Y 8 7 F からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション；

(i i i) 配列番号： 6 0 に示された軽鎖可変領域中にある E 1 D、I 2 T、I 5 7 V、V 8 4 T 及び Y 8 6 F 又はこれらの組合せからなる群より選択されるアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション；

(i v) 配列番号： 6 7 に示された軽鎖可変領域中にある M 4 L、A 4 2 S、L 4 5 P 及び L 4 6 W からなる群より選択される 1 種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーション

50

;並びに、

(v) 配列番号：72に示された軽鎖可変領域中にあるA43S、I48V及びF71Yからなる群より選択される1種以上のアミノ酸復帰変異を含む、バリエーションからなる群より選択されるいずれか1つに示されたバリエーションである。

【0028】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中のヒト化抗IL-5抗体は、

配列番号：47若しくは48に示された軽鎖可変領域；又は、

配列番号：55若しくは56に示された軽鎖可変領域；又は、

配列番号：61若しくは62に示された軽鎖可変領域；又は、

配列番号：68に示された軽鎖可変領域；又は、

配列番号：73若しくは74に示された軽鎖可変領域

を含む。

【0029】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中のヒト化抗IL-5抗体は、

(i) 配列番号：49、50及び51のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：49、50及び51のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、重鎖可変領域；並びに、

配列番号：46、47及び48のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：46、47及び48のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、軽鎖可変領域；

(ii) 配列番号：57、58及び59のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：57、58及び59のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、重鎖可変領域；並びに、

配列番号：54、55及び56のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：54、55及び56のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、軽鎖可変領域；

(iii) 配列番号：63、64、65及び66のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：63、64、65及び66のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、重鎖可変領域；並びに、

配列番号：60、61及び62のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：60、61及び62のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、軽鎖可変領域；

(iv) 配列番号：69、70及び71のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：69、70及び71のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、重鎖可変領域；並びに、

配列番号：67及び68のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：67及び68のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、軽鎖可変領域；又は、

(v) 配列番号：75、76、77、78及び79のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：75、76、77、78及び79のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、重鎖可変領域；並びに、

配列番号：72、73及び74のいずれか1つに示された、若しくは配列番号：72、73及び74のいずれか1つとの間に95%の配列相同性を有する、軽鎖可変領域を含み；好ましくは、ヒト化抗IL-5抗体は、

(a) 配列番号：51に示された重鎖可変領域及び配列番号：47に示された軽鎖可変領域；

(b) 配列番号：65に示された重鎖可変領域及び配列番号：62に示された軽鎖可変領域；

(c) 配列番号：58に示された重鎖可変領域及び配列番号：56に示された軽鎖可変領域；

(d) 配列番号：71に示された重鎖可変領域及び配列番号：68に示された軽鎖可変領域；又は、

(e) 配列番号：79に示された重鎖可変領域及び配列番号：73に示された軽鎖可変領域

10

20

30

40

50

を含む。

【 0 0 3 0 】

上記少なくとも 9 5 % の配列相同性を有するアミノ酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列相同性を有し、より好ましくは、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 以上の配列相同性を有し、最も好ましくは、少なくとも 9 9 % 以上の配列相同性を有し、上記少なくとも 9 5 % の配列相同性を有するアミノ酸配列は、変異によって得られた 1 個以上のアミノ酸の欠失、挿入又は置換を含む。

【 0 0 3 1 】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中の抗 I L - 5 抗体は、ヒト抗体定常領域、好ましくは、配列番号：5 2 に示されたヒト抗体重鎖定常領域及び配列番号：5 3 に示されたヒト抗体軽鎖定常領域を含む。

10

【 0 0 3 2 】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中の抗 I L - 5 抗体は、

- (i) 配列番号：8 3 に示された重鎖及び配列番号：8 4 に示された軽鎖；
- (i i) 配列番号：8 5 に示された重鎖及び配列番号：8 6 に示された軽鎖；
- (i i i) 配列番号：8 7 に示された重鎖及び配列番号：8 8 に示された軽鎖；
- (i v) 配列番号：8 9 に示された重鎖及び配列番号：9 0 に示された軽鎖；又は、
- (v) 配列番号：9 1 に示された重鎖及び配列番号：9 2 に示された軽鎖

を含む。

【 0 0 3 3 】

代替的な実施形態において、本医薬組成物中の抗 I L - 5 抗体は、I L - 5 への結合に関しては上記抗 I L - 5 抗体又はその抗原結合性フラグメントと競合する、モノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントである。

20

【 0 0 3 4 】

好ましい一実施形態において、本開示の医薬組成物中の抗原結合性フラグメントは、F a b、F a b'、F (a b')₂、一本鎖抗体 (s c F v)、ダイマー化 V 領域 (二重特異性抗体) 及びジスルフィド結合安定化 V 領域 (d s F v) からなる群より選択される。

【 0 0 3 5 】

本開示は、抗 I L - 5 抗体のストック溶液をバッファーによって置きかえるステップを含む、上記医薬組成物を調製するための方法をさらに提供する。代替的な実施形態において、好ましくは、バッファーは、酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファーである。バッファーの pH は、約 5 . 0 ~ 約 6 . 5、好ましくは約 5 . 5 ~ 約 6 . 5、好ましくは約 6 . 0 ~ 約 6 . 5、好ましくは約 5 . 0 ~ 約 6 . 0、好ましくは約 5 . 5 ~ 約 6 . 0、好ましくは約 5 . 0 ~ 約 5 . 5、好ましくは約 5 . 2 ~ 約 5 . 8 であり、バッファーの pH 値の非限定的な例は、約 5 . 0、約 5 . 1、約 5 . 2、約 5 . 3、約 5 . 4、約 5 . 5、約 5 . 6、約 5 . 7、約 5 . 8、約 5 . 9、約 6 . 0、約 6 . 5 を含み、約 5 . 5 が最も好ましい。代替的な実施形態において、本医薬組成物におけるバッファーの濃度は、約 1 0 m M ~ 約 3 0 m M、好ましくは約 1 5 m M ~ 約 3 0 m M、好ましくは約 2 0 m M ~ 約 3 0 m M、好ましくは約 2 5 m M ~ 約 3 0 m M、好ましくは約 5 m M ~ 約 2 5 m M、好ましくは約 1 0 m M ~ 約 2 5 m M、好ましくは約 1 5 m M ~ 約 2 5 m M、好ましくは約 2 0 m M ~ 約 2 5 m M、好ましくは約 5 m M ~ 約 2 0 m M、好ましくは約 1 0 m M ~ 約 1 5 m M であり；バッファーの濃度の非限定的な例は、約 1 0 m M、約 1 2 m M、約 1 4 m M、約 1 6 m M、約 1 8 m M、約 2 0 m M、約 2 2 m M、約 2 4 m M、約 2 6 m M、約 2 8 m M、約 3 0 m M を含み、最も好ましくは約 3 0 m M が最も好ましい。

30

40

【 0 0 3 6 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、1 0 0 m g / m l の抗 I L - 5 抗体 h 1 7 0 5 - 0 0 8、p H 5 . 5 の 1 0 m M 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0 . 2 m g / m l のポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 3 7 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、1 0 0 m g / m l の抗 I L - 5 抗体 h 1 7

50

0.5 - 0.08、pH 5.5 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0038】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム及び 0.2 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0039】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 5.5 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム及び 0.2 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

10

【0040】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 6.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム及び 0.2 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0041】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0042】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 5.5 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

20

【0043】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 6.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0044】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 6.5 の 10 mM クエン酸 - クエン酸ナトリウム及び 0.2 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

30

【0045】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 5.5 の 10 mM クエン酸 - クエン酸ナトリウム及び 0.2 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0046】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 6.0 の 10 mM クエン酸 - クエン酸ナトリウム及び 0.2 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0047】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 6.5 の 10 mM クエン酸 - クエン酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

40

【0048】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 5.5 の 10 mM クエン酸 - クエン酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

【0049】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 h1705 - 008、pH 6.0 の 10 mM クエン酸 - クエン酸ナトリウム及び 0.05 mg/mL のポリソルベート 80 を含む。

50

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH6.5の10mMクエン酸-クエン酸ナトリウム及び0.2mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の10mMクエン酸-クエン酸ナトリウム及び0.2mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH6.0の10mMヒスチジン-塩酸及び0.2mg/mlのポリソルベート80を含む。

10

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH6.5の10mMヒスチジン-塩酸及び0.05mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の10mMヒスチジン-塩酸及び0.05mg/mlのポリソルベート80を含む。

20

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH6.0の10mMヒスチジン-塩酸及び0.05mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mMコハク酸-コハク酸ナトリウム及び0.1mg/mlのポリソルベート20を含む。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mMコハク酸-コハク酸ナトリウム及び0.1mg/mlのポリソルベート80を含む。

30

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mMコハク酸-コハク酸ナトリウム、50mg/mlのスクロース及び0.1mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mMコハク酸-コハク酸ナトリウム、50mg/mlのトレハロース及び0.1mg/mlのポリソルベート80を含む。

40

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mMコハク酸-コハク酸ナトリウム、50mg/mlのマンニトール及び0.1mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mMコハク酸-コハク酸ナトリウム、50mg/mlのソルビトール及び0.1mg/mlのポリソルベート80を含む。

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h17

50

0.5 - 0.08、pH 5.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム、8 mg / mL のグリシン及び 0.1 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0063】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム、8 mg / mL のメチオニン及び 0.1 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0064】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム、8 mg / mL のプロリン及び 0.1 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

10

【0065】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.5 の 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム、70 mg / mL のスクロース及び 0.4 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0066】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、80 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.8 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.2 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0067】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.4 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.6 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

20

【0068】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、80 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.4 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.4 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0069】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、80 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.2 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

30

【0070】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.4 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.2 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0071】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、80 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.8 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.6 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0072】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、120 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.2 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

40

【0073】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、80 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.0 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.6 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

【0074】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、120 mg / mL の抗 IL - 5 抗体 h 1705 - 008、pH 5.8 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム及び 0.6 mg / mL のポリソルベート 80 を含む。

50

【 0 0 7 5 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、120mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.4の10mM酢酸-酢酸ナトリウム及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.4の10mM酢酸-酢酸ナトリウム及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 7 7 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、120mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mM酢酸-酢酸ナトリウム及び0.6mg/mLのポリソルベート80を含む。

10

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、120mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.8の10mM酢酸-酢酸ナトリウム及び0.2mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 7 9 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.0の10mM酢酸-酢酸ナトリウム及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

20

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.8の10mM酢酸-酢酸ナトリウム及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の10mM酢酸-酢酸ナトリウム、70mg/mLのスクロース及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の20mM酢酸-酢酸ナトリウム、70mg/mLのスクロース及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

30

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の30mM酢酸-酢酸ナトリウム、70mg/mLのスクロース及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の30mM酢酸-酢酸ナトリウム、73mg/mLのスクロース及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

40

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態において、本医薬組成物は、100mg/mlの抗IL-5抗体h1705-008、pH5.5の30mM酢酸-酢酸ナトリウム、75mg/mLのスクロース及び0.4mg/mLのポリソルベート80を含む。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態において、本開示の医薬組成物は、少なくとも3か月間、少なくとも6か月間、少なくとも12か月間、少なくとも18か月間又は少なくとも24か月間2~8で安定である。本医薬組成物は、少なくとも3か月間、少なくとも6か月間25で安定であり得る。

【 0 0 8 7 】

50

本開示は、上記医薬組成物を凍結乾燥させるステップを含む、抗 I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤を調製するための方法をさらに提供する。

【 0 0 8 8 】

代替的な一実施形態において、抗 I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤を調製するための方法における凍結乾燥は、予備凍結ステップ、一次乾燥ステップ及び二次乾燥ステップを順次含む。凍結乾燥は、製剤を凍結させた後、一次乾燥に適した温度で水を昇華させることによって実施される。このような条件下では、生産物の温度は、製剤の共晶点又は分解温度より低い。一般的に約 5 0 ~ 2 5 0 m T o r r の範囲である適切な圧力下では、一次乾燥のための貯蔵温度は通常、約 - 3 0 ~ 2 5 である（一次乾燥中には生産物が凍結状態のままであると仮定する）。製剤、サンプル容器（例えば、ガラスバイアル）のサイズ及び種類並びに液体の体積が、乾燥に必要な期間を決定するが、この期間は、数時間～数日の範囲（例えば、4 0 ~ 6 0 時間）であり得る。二次乾燥は、約 0 ~ 4 0 で実施することができるが、これは主に、容器の種類及びサイズ及び使用されるタンパク質の種類に左右される。二次乾燥の期間は、生産物の望ましい残留湿分レベルによって決定されるが、通常、少なくとも約 5 時間を必要とする。一般に、低圧下で調製された凍結乾燥製剤の含水量は、約 5 % 未満、好ましくは約 3 % 未満である。二次乾燥の圧力は、一次乾燥ステップにおいて適用された圧力と同じであってもよく；好ましくは、二次乾燥において使用される圧力は、一次乾燥において使用される圧力より低い。凍結乾燥のための条件は、製剤及びバイアルのサイズに応じて変化し得る。

【 0 0 8 9 】

本開示は、上記抗 I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤を調製するための方法によって調製された、I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤をさらに提供する。

【 0 0 9 0 】

一部の実施形態において、凍結乾燥製剤は、少なくとも 3 か月間、少なくとも 6 か月間、少なくとも 1 2 か月間、少なくとも 1 8 か月間又は少なくとも 2 4 か月間 2 ~ 8 で安定である。一部の実施形態において、凍結乾燥製剤は、少なくとも 7 日間、少なくとも 1 4 日間又は少なくとも 2 8 日間 4 0 で安定である。

【 0 0 9 1 】

本開示は、抗 I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤を復元するステップを含む、抗 I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤の復元溶液 (r e c o n s t i t u t e d s o l u t i o n) を調製するための方法であって、復元のために使用される溶液が、限定されるわけではないが注射用水、生理食塩水又はグルコース溶液を含む、方法をさらに提供する。

【 0 0 9 2 】

本開示は、上記抗 I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤の復元溶液を調製するための方法によって調製された、I L - 5 抗体を含む凍結乾燥製剤の復元溶液をさらに提供する。

【 0 0 9 3 】

本開示は、本明細書における安定な医薬組成物のいずれかを含む容器を含む、物品又はキットをさらに提供する。一部の実施形態において、容器は、中性ホウケイ酸ガラス製の注射用バイアルである。

【 0 0 9 4 】

本開示は、上記医薬組成物又は凍結乾燥製剤又は凍結乾燥製剤の復元溶液を含む容器を含む、物品をさらに提供する。

【 0 0 9 5 】

本開示は、治療有効量の上記医薬組成物若しくは上記凍結乾燥製剤若しくは上記復元溶液又は上記製造物を、それを必要としている対象に投与することを含む、I L - 5 媒介疾患を処置するための方法であって、I L - 5 媒介疾患が好ましくは、ぜんそく、慢性肺炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球増加症、チャージ - ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、オンコセルカ症皮膚炎、間欠性血管性浮腫、好酸球性筋痛症候群、好酸球性胃腸炎、寄生虫感染症、ホジキン病、鼻茸、レフラー症候群、じんま疹、過好酸性気管支炎、結節性動脈炎、副鼻腔炎、好酸球性食道炎、アレルギー

性好酸球性食道炎、アレルギー性結膜炎、オンコセルカ症皮膚炎、子宮内膜症及びステロイド依存性好酸球性気管支炎からなる群より選択される、方法をさらに提供する。

【0096】

本開示は、IL-5 媒介性疾患を処置するための医薬品の調製における、上記医薬組成物若しくは上記凍結乾燥製剤若しくは上記凍結乾燥製剤の復元溶液又は上記製造物の使用であって、IL-5 媒介性疾患が好ましくは、ぜんそく、慢性肺炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球増加症、チャージ-ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、オンコセルカ症皮膚炎、間欠性血管性浮腫、好酸球性筋痛症候群、好酸球性胃腸炎、寄生虫感染症、ホジキン病、鼻茸、レフラー症候群、じんま疹、過好酸性気管支炎、結節性動脈炎、副鼻腔炎、好酸球性食道炎、アレルギー性好酸球性食道炎、アレルギー性結膜炎、オンコセルカ症皮膚炎、子宮内膜症及びステロイド依存性好酸球性気管支炎からなる群より選択される、使用をさらに提供する。

10

【0097】

本開示は、IL-5 媒介性疾患の処置用の治療用医薬品としての使用のための、上記医薬組成物若しくは上記凍結乾燥製剤若しくは上記凍結乾燥製剤の復元溶液又は上記製造物であって、IL-5 媒介性疾患が好ましくは、ぜんそく、慢性肺炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球増加症、チャージ-ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、オンコセルカ症皮膚炎、間欠性血管性浮腫、好酸球性筋痛症候群、好酸球性胃腸炎、寄生虫感染症、ホジキン病、鼻茸、レフラー症候群、じんま疹、過好酸性気管支炎、結節性動脈炎、副鼻腔炎、好酸球性食道炎、アレルギー性好酸球性食道炎、アレルギー性結膜炎、オンコセルカ症皮膚炎、子宮内膜症及びステロイド依存性好酸球性気管支炎からなる群より選択される、上記医薬組成物若しくは上記凍結乾燥製剤若しくは上記凍結乾燥製剤の復元溶液又は上記製造物をさらに提供する。

20

【0098】

当業者には周知のように、本開示における各実施形態の特徴のうちの1つ、いくつか又はすべてをさらに組み合わせ、本開示の他の実施形態を形成することもできる。上記本開示の実施形態及び組合せによって得られたさらなる実施形態については、以下の詳細な説明によってさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1】抗IL-5抗体がIL-5受容体へのIL-5の結合を阻止する、FACS実験の結果を示す、図である。

30

【図2】Th2サイトカインに対する抗IL-5抗体の結合特異性の検出結果を示す、図である。

【図3】抗IL-5抗体が間欠呼吸(Penh)のレベルを向上させることを示す、図である。G1：正常コントロール群(PBS)；G2：モデル群(IgG)；G3：h1705-008抗体10mpk群；G4：h1705-008抗体2mpk群；G5：h1706-009抗体10mpk群；G6：h1706-009抗体2mpk群；G7：Hu39D10 10mpk群；* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ (ANOVA/BonferroniによるG2群との比較)。

40

【図4A】ぜんそくマウスの肺におけるBALF好酸球のレベルを示す、図である。

【図4B】ぜんそくマウスの気管粘膜厚さのスコアを示す、図である。G1：正常コントロール群；G2：モデル群；G3：h1705-008抗体10mpk群；G4：h1705-008抗体2mpk群；G5：h1706-009抗体10mpk群；G6：h1706-009抗体2mpk群；G7：Hu39D10 10mpk群。

【図4C】ぜんそくマウスの肺におけるBALF好酸球の百分率を示す、図である。

【図5A】BALFにおける好酸球のレベルを低下させるIL5モノクローナル抗体の能力を示す、図である。

【図5B】BALFにおける好酸球のレベルを低下させるIL5モノクローナル抗体の能力を示す、図である。

50

【発明を実施するための形態】

【0100】

用語

本開示をより容易く理解するために、特定の専門用語及び科学技術用語が、以下に厳密に規定されている。本明細書において使用されているすべての他の専門用語及び科学技術用語は、そうではないと明示的に規定されていない限り、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有する。

【0101】

「バッファー」は、酸 - 塩基共役成分の作用により、pHの変化に耐性のあるバッファーを指す。pHを適切な範囲に制御するバッファーの例には、酢酸バッファー、コハク酸バッファー、グルコン酸バッファー、ヒスチジン塩バッファー、シュウ酸バッファー、乳酸バッファー、リン酸バッファー、クエン酸バッファー、酒石酸バッファー、フマル酸バッファー、グリシル - グリシンバッファー及び他の有機酸バッファーが挙げられる。

10

【0102】

「ヒスチジン塩バッファー」は、ヒスチジンイオンを含むバッファーである。ヒスチジン塩バッファーの例には、ヒスチジン - 塩酸塩バッファー、ヒスチジン - 酢酸バッファー、ヒスチジン - リン酸バッファー及びヒスチジン - 硫酸バッファー等が挙げられるが；ヒスチジン - 酢酸バッファー又はヒスチジン - 塩酸塩バッファーが好ましく；ヒスチジン - 酢酸バッファーは、ヒスチジン及び酢酸によって調製され、ヒスチジン塩バッファーは、ヒスチジン及びHClによって調製される。

20

【0103】

「クエン酸バッファー」は、クエン酸イオンを含むバッファーである。クエン酸バッファーの例には、クエン酸 - クエン酸ナトリウムバッファー、クエン酸 - クエン酸カリウムバッファー、クエン酸 - クエン酸カルシウムバッファー及びクエン酸 - クエン酸マグネシウムバッファー等が挙げられる。好ましいクエン酸バッファーは、クエン酸 - クエン酸ナトリウムバッファーである。

【0104】

「コハク酸バッファー」は、コハク酸イオンを含むバッファーである。コハク酸バッファーの例には、コハク酸 - コハク酸ナトリウムバッファー、コハク酸 - コハク酸カリウムバッファー及びコハク酸 - コハク酸カルシウムバッファー等が挙げられる。好ましいコハク酸バッファーは、コハク酸 - コハク酸ナトリウムバッファーである。

30

【0105】

「リン酸バッファー」は、リン酸イオンを含むバッファーである。リン酸バッファーの例には、リン酸水素二ナトリウム - リン酸二水素ナトリウムバッファー、リン酸水素二ナトリウム - リン酸二水素カリウムバッファー及びリン酸水素二ナトリウム - クエン酸バッファー等が挙げられる。好ましいリン酸バッファーは、リン酸水素二ナトリウム - リン酸二水素ナトリウムバッファーである。

【0106】

「酢酸バッファー」は、酢酸イオンを含むバッファーである。酢酸バッファーの例には、酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー、ヒスチジン酢酸バッファー、酢酸 - 酢酸カリウムバッファー、酢酸 - 酢酸カルシウムバッファー及び酢酸 - 酢酸マグネシウムバッファー等が挙げられる。好ましい酢酸バッファーは、酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファーである。

40

【0107】

「医薬組成物」は、本明細書に記載された化合物（又は生理学的な／薬学的に許容されるその塩若しくはプロドラッグ）の1種以上と、他の化学成分（生理学的な／薬学的に許容されるキャリア及び賦形剤等）とを含む、混合物を意味する。医薬組成物の目的は、活性成分の吸収及び生物活性を増進するように、抗体活性成分の安定性を維持し、生物への投与を容易にすることである。

【0108】

本明細書において使用されているとき、「医薬組成物」及び「製剤」は、互換的に使用

50

されている。

【0109】

本開示における「糖」は、従来の $(CH_2O)_n$ と、単糖、二糖、三糖、多糖、糖アルコール、還元性のある糖、還元性のない糖等を含む、 (CH_2O) の誘導体とを含む。糖は、グルコース、スクロース、トレハロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、デキストラン、グリセロール、エリトリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、メリビオース、メレジトース、メリトリオース、マンノトリオース、スタキオース、マルトース、ラクツロース、マルツロース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、イソマルツロース等からなる群より選択することができる。好ましい糖は、非還元性二糖、より好ましくはスクロースである。

10

【0110】

本開示によれば、本医薬組成物の溶液形態に含まれる溶媒は、そうではないと指定されていない限り、水である。

【0111】

「凍結乾燥製剤」は、医薬組成物又は製剤の液体又は溶液形態を真空凍結乾燥することによって得られた、製剤又は医薬組成物を意味する。

【0112】

本開示における凍結乾燥は、予備凍結、一次乾燥及び二次乾燥を含む。予備凍結の目的は、生産物を凍結させて、結晶性の固体を得ることである。予備凍結温度及び予備凍結速度は、2つの重要なプロセスパラメータである。本開示において、予備凍結温度は、 -45 に設定されており、予備凍結速度は、 $1/min$ である。一次乾燥は、乾燥とも呼ばれ、サンプルを凍結乾燥させるための主要段階である。一次乾燥の目的は、生産物への損傷を最小レベルに限定するように、生産物の形状を維持しながら生産物から氷を除去することである。一次乾燥温度及び真空度が適切に選択されていない場合、生産物は崩壊する。温度及び真空度を高めると、凍結乾燥の効率が加速的に高まるが、生産物崩壊の危険性も増大する。本発明における一次乾燥の温度は、 $-30 \sim 0$ 等、当技術分野における慣用的な温度であってよい。二次乾燥は真空乾燥とも呼ばれ、最高真空 (ultimate vacuum) (0.01 mbar) を引き、温度 ($20 \sim 40$) を上げることによって生産物から結合水を除去する、主要ステップである。大部分の生物学的製剤 (biological product) は温度に対して鋭敏であるため、選択された二次乾燥温度は、温度範囲の下限である 25 にすべきである。凍結乾燥の期間、冷凍機、凍結乾燥すべき製剤の用量及び凍結乾燥すべき製剤の容器に関連付けられている。当業者ならば、どのようにしてこのような期間を調整するかについてはよく知っている。

20

30

【0113】

本明細書において使用されているとき、「約」及び「およそ」という用語は、ある値が、当業者によって測定された特定の値の許容誤差範囲内であることを意味する。前述の特定の値は、どのようにして値が測定又は決定されるか (すなわち、測定システムの限界) に部分的に依存する。例えば、当技術分野におけるいかなる慣行においても、「約」は、標準偏差が1以内又は1超であることを意味する。一代替形態として、「約」又は「実質的に含む」は、最大 $\pm 20\%$ の範囲を意味し、例えば、約 5.5 の pH は、 $pH 5.5 \pm 1.1$ を意味する。さらに、特に生物系又は生物学的プロセスに関しては、「約」という用語は、ある値の最大10倍又は最大5倍を意味する。そうではないと指定されていない限り、特定の値が本出願及び特許請求の範囲に示されている場合、「約」又は「実質的に含む」の意味は、特定の値の許容誤差範囲内であるべきである。

40

【0114】

本開示の医薬組成物は、安定な効果をもたらすことができ、すなわち、本医薬組成物に含まれる抗体は、貯蔵後でも物理的安定性及び/若しくは化学的安定性、並びに/又は、生物活性を実質的に保持している。好ましくは、本医薬組成物は、貯蔵後でも、物理的安定性及び化学的安定性並びに生物活性を実質的に保持している。一般に、貯蔵期間は、本医薬組成物の所定の貯蔵寿命に基づいて決定される。現在、タンパク質の安定性を測定す

50

るための分析法は複数存在するが、これらの分析法を使用して、選定された期間にわたって選択された温度で貯蔵された後の安定性を測定することができる。

【0115】

安定な抗体の医薬製剤は、低温（2～8℃）で少なくとも3か月間、好ましくは6か月間、より好ましくは1年間、さらにより好ましくは最大2年間貯蔵されるという条件下において、有意な物理的及び／又は化学的及び／又は生物学的変化が観察されない製剤である。さらに、安定な液体製剤は、25℃の温度で1か月間、3か月間又は6か月間貯蔵された後に望ましい特性を示す液体製剤を含む。一般的に、安定な製剤に関する基準は、次のとおりである：SEC-HPLCによって測定したときに、分解される抗体モノマーが一般的には約10%以下、好ましくは約5%以下であること；目視検査によると、抗体の医薬製剤が、明るい黄色であり、ほぼ無色透明な液体であり、若しくは無色であり、又は透明～わずかに淡い色がついたものであること；製剤の濃度、pH及び質量オスモル濃度のバラつきが±10%以下であること；観察される減少が一般に約10%以下、好ましくは約5%以下であること；形成される凝集が一般に約10%以下、好ましくは約5%以下であること。

10

【0116】

色及び／又は透明性についての目視検査により、又は紫外光散乱、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）及び動的光散乱（DLS）によって測定されたときに、抗体が有意に増大した凝集、沈殿及び／又は変性を示さない場合、抗体は、医薬製剤中で「物理的安定性を保持している」と考えられる。タンパク質立体構造の変化は、タンパク質の三次構造を決定する蛍光分光法、及びタンパク質の二次構造を決定するFTIR分光法によって評価することができる。

20

【0117】

抗体が有意な化学的修飾を示さない場合、抗体は、医薬製剤中で「化学的安定性を保持している」と考えられる。化学的安定性は、化学的に改変されたタンパク質の形態を検出及び定量化することによって、評価することができる。タンパク質の化学的構造を高頻度で改変する分解プロセスは、加水分解又はトランケーション（サイズ排除クロマトグラフィー及びSDS-PAGE等の方法によって評価される）、酸化（質量分析又はMALDI/TOF/MSと組み合わせたペプチド分光法等の方法によって評価される）、脱アミド（イオン交換クロマトグラフィー、キャピラリー等電点電気泳動、ペプチド分光法、イソアスパラギン酸測定等の方法によって評価される）及び異性化（イソアスパラギン酸の含量の測定、ペプチド分光法等の方法によって評価される）を含む。

30

【0118】

所与の時間が経ったときの抗体の生物活性が、依然として、医薬製剤が最初に調製されたときの時点において示された生物活性に対して所定の範囲に収まっている場合、抗体は、医薬製剤中で「生物活性を保持している」と考えられる。抗体の生物活性は、例えば、抗原結合アッセイによって測定することができる。

【0119】

本開示において使用されているアミノ酸に関する3文字のコード及び1文字のコードは、J. Biol. Chem. 243, p 3558 (1968)で説明されている。

40

【0120】

本開示において使用されている「抗体」は、免疫グロブリンを指し；完全な抗体は、鎖間ジスルフィド結合によって結合した2本の同一の重鎖及び2本の同一の軽鎖から構成される、テトラペプチド鎖構造である。

【0121】

本開示において、本開示の抗体軽鎖は、軽鎖定常領域をさらに含み、軽鎖定常領域は、ヒト又はマウス 鎖、 鎖又はこれらのバリエーションを含む。

【0122】

本開示において、本開示の抗体重鎖は、重鎖定常領域をさらに含み、重鎖定常領域は、ヒト又はマウスIgG1、IgG2、IgG3、IgG4又はこれらのバリエーションを含む。

50

【 0 1 2 3 】

抗体重鎖及び軽鎖のN末端に隣接する約110個のアミノ酸は可変性が高く、可変領域（Fv領域）として知られており；C末端に近いアミノ酸配列の残り部分は比較的安定であり、定常領域として知られている。可変領域は、3つの超可変領域（HVR）及び4つの比較的保存的なフレームワーク領域（FR）を含む。抗体の特異性を決定する3つの超可変領域は、相補性決定領域（CDR）としても公知である。軽鎖可変領域（LCVR、VL）及び重鎖可変領域（HCVR、VH）のそれぞれは、3つのCDR領域及び4つのFR領域からなり、アミノ末端からカルボキシル末端までの順番は、次のとおりである：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4。軽鎖の3つのCDR領域は、LCDR1、LCDR2及びLCDR3を指し、重鎖の3つのCDR領域は、HCDR1、HCDR2及びHCDR3を指す。本開示に記載された抗体又はその抗原結合性フラグメント中のLCVR領域及びHCVR領域に属するCDRアミノ酸残基の数及び位置は、公知のKabat式ナンバリング基準（LCDR1～3、HCDR1～3）に従っている。

10

【 0 1 2 4 】

本開示の抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体を含み、好ましくはヒト化抗体が好ましい。

【 0 1 2 5 】

本開示において、「抗体の抗原結合性フラグメント」又は「機能的フラグメント」は、抗原結合活性を有するFabフラグメントと、Fab'フラグメントと、F(ab')₂フラグメント、及び、抗体に結合するFvフラグメントとscFvフラグメントを指す。Fvフラグメントは、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むが、定常領域を有さず、Fvフラグメントは、すべての抗原結合部位を有する最も小さい抗体フラグメントである。一般に、Fv抗体は、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに備え、抗原結合に必要な構造を形成することができる。異なるリンカーを使用して、2つの抗体可変領域を連結し、これにより、一本鎖抗体及び単鎖Fv（sFv）と呼ばれるポリペプチド鎖を形成することもできる。

20

【 0 1 2 6 】

本開示の「抗原結合部位」という用語は、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントによって認識される抗原における、連続的又は非連続的な三次元空間の部位を指す。

30

【 0 1 2 7 】

本開示における「マウス抗体」という用語は、当技術分野における知識及び技能に従って調製された、ヒトIL-5に対するモノクローナル抗体を指す。調製中には、試験対象にIL-5抗原を注射した後、所望の配列又は機能的特徴を有する抗体を発現させるハイブリドーマを単離する。

【 0 1 2 8 】

「キメラ抗体」という用語は、マウス抗体の可変領域と、マウス抗体によって誘導される免疫反応を低減するヒト抗体の定常領域とを融合させることによって形成された、抗体である。キメラ抗体を樹立するためには、マウス特異的モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを新たに樹立し；次いで、マウスハイブリドーマ細胞から可変領域遺伝子をクローニングし；次いで、必要に応じてヒト抗体の定常領域遺伝子をクローニングし；マウス可変領域遺伝子をヒト定常領域遺伝子と組み合わせ、キメラ遺伝子を形成し、このキメラ遺伝子をヒトベクターに挿入し、最後に、キメラ抗体分子を、工業的な真核生物系又は工業的な原核生物系中で発現させる。本開示の好ましい一実施形態において、IL-5キメラ抗体の軽鎖は、ヒト鎖、鎖又はこれらのバリエーションの軽鎖定常領域をさらに含む。IL-5キメラ抗体の重鎖は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4又はこれらのバリエーションの重鎖定常領域をさらに含む。ヒト抗体の定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4又はこれらのバリエーションの重鎖定常領域からなる群より選択することが可能であり、好ましくは、ヒトIgG2若しくはIgG4重鎖定常領域、又は、アミノ酸の変異後にADCC毒性（抗体依存性細胞介在性細胞傷害）を有さ

40

50

ないIgG4を含む。

【0129】

CDRグラフト化抗体としても知られる「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体可変領域フレームワークへのマウスCDR配列のグラフト化によって生成された抗体、すなわち、異なる種類のヒト生殖細胞系列抗体フレームワーク配列において生成された抗体を指す。ヒト化抗体は、多数のマウスタンパク質成分を保有するキメラ抗体によって誘導される、異種性による強い反応を回避する。このようなフレームワーク配列は、生殖細胞系列抗体遺伝子配列を収載した公開DNAデータベース又は公開されている参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖可変領域及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖細胞系列配列データベース(www.mrccpe.com.ac.uk/vbaseで利用可能)で確認することもできるし、さらには、Kabata, EAら 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版で確認することもできる。免疫原性の低下によって起きる活性の低下を回避するために、ヒト抗体可変領域中のフレームワーク配列には、活性を維持するように最小限の逆変異(reverse-mutation)又は復帰変異を発生させてもよい。本開示のヒト化抗体は、CDRアフィニティ成熟がファージディスプレイによって実施された、ヒト化抗体も指す。

10

【0130】

本開示において、「ADCC」(すなわち、抗体依存性細胞介在性細胞傷害)は、Fc受容体を発現した細胞が、抗体のFcセグメントを認識することにより、抗体で覆われた標的細胞を直接死滅させることを意味する。抗体のADCCエフェクター機能は、IgGのFcセグメントの修飾によって低下させ、又はなくすことができる。修飾は、IgG1におけるN297A、L234A、L235A; IgG2/4キメラ、IgG4におけるF234A/L235A変異からなる群より選択されるもの等の変異が、抗体の重鎖定常領域に発生することを指す。

20

【0131】

本開示における変異配列中の「変異」は、限定されるわけではないが、「復帰変異」、「保存的修飾(conservative modification)」又は「保存的置きかえ(conservative replacement)若しくは保存的置換(conservative substitution)」を含む。本開示において使用されている「保存的修飾」又は「保存的置きかえ若しくは保存的置換」は、タンパク質の生物活性を変化させることなく高頻度で置きかえを実施できるように、類似の特性(電荷、側鎖のサイズ、疎水性/親水性、骨格の立体構造及び剛直性等)を有する他のアミノ酸を使用して、タンパク質中のアミノ酸を置きかえることを指す。当業者ならば、一般に、ポリペプチドの必須でない領域における単一のアミノ酸置換が、生物活性を実質的に変化させないことを知っている(例えば、Watsonら、(1987) Molecular Biology of the Gene、The Benjamin/Cummings Pub. Co.、224頁、(第4版)を参照されたい。)。さらに、類似の構造又は機能によるアミノ酸の置換は、生物活性を乱す可能性が低い。

30

【0132】

本開示における「変異配列」は、本開示のヌクレオチド配列及び/又はアミノ酸配列とは異なる配列相同性の百分率を有するヌクレオチド配列及び/又はアミノ酸配列が得られるように、本開示のヌクレオチド配列及び/又はアミノ酸配列が変異(置換、挿入又は欠失等)によって適切に修飾されていることを指す。本開示において、配列相同性は、少なくとも85%、90%又は95%、好ましくは少なくとも95%であり得る。非限定的な例としては、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%が挙げられる。配列アラインメント及び2種の配列間の同一性の百分率の決定は、National Center For Biotechnology Instituteのウェブサイトで利用可能なBLASTN/BLASTPアルゴリズムのデフォルト設定によって実施すること

40

50

ができる。

【0133】

「IL-5への結合」という用語は、IL-5、好ましくはヒトIL-5との相互作用を指す。

【0134】

「抗IL-5抗体」及び「IL-5抗体」という用語は、互換的に使用されており、これらは両方とも、IL-5に結合する抗体を指す。

【0135】

本開示において、融合タンパク質は、DNA組換えによる2つの遺伝子の共発現によって得られた、タンパク質生成物である。組換えIL-5細胞外領域Fc融合タンパク質は、DNA組換えによるIL-5細胞外領域と、ヒト抗体Fcフラグメントとの共発現によって得られた、融合タンパク質である。IL-5細胞外領域は、細胞膜の外部に発現したIL-5タンパク質を指し、IL-5細胞外領域の配列は、配列番号：1に提示のとおりである。

【0136】

抗体及び抗原結合性フラグメントを生成及び精製するための方法は周知であり、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor press、第5～8章及び15章等の従来技術においても提供されている。例えば、マウスは、ヒトIL-5又はそのフラグメントによって免疫化することが可能であり、得られた抗体は、復元及び精製されてもよく、従来の方法を用いることによってアミノ酸シーケンシングを実施することもできる。抗原結合性フラグメントは、従来の方法を用いることによって調製することもできる。本開示による抗体又は抗原結合性フラグメントは、1つ以上のヒトFR領域を非ヒトCDR領域にグラフト化するよう遺伝子操作されている。ヒトFR生殖細胞系列配列は、Immunogenetics (IMGT) のウェブサイト <http://imgt.cines.fr> から得ることもできるし、又はThe Immunoglobulin Journal、2001 ISBN 012441351から得ることもできる。

【0137】

人工抗体(engineered antibody)又はその抗原結合性フラグメントは、慣用的な方法によって調製及び精製することができる。例えば、重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列をクローニングし、GS発現ベクター内に組み換えることができる。組換え免疫グロブリンの発現ベクターは、CHO細胞に安定してトランスフェクションすることができる。推奨される一従来技術として、ほ乳類発現系により、抗体を、特に、Fc領域に属する高度に保存的なN末端位をグリコシル化することができる。安定なクローンは、ヒトIL-5に特異的に結合する抗体を発現させることによって、得られる。陽性クローンをバイオリアクターの無血清培地中で増やして、抗体を産生する。抗体が分泌された培地は、慣用的な技法によって精製することができる。例えば、調整済みのバッファーを含むプロテインA又はプロテインG Sepharose FFカラムが、精製のために使用されてもよい。非特異的に結合した成分は、洗い流される。次いで、結合した抗体をpHグラジエントによって溶出させ、抗体フラグメントをSDS-PAGEによって検出し、収集する。抗体は、慣用的な方法によってろ過及び濃縮することができる。可溶性の混合物及びマルチマーは、慣用的な方法、例えば分子ふるい及びイオン交換によって除去することもできる。得られた生成物は、-70℃等で直ちに凍結し、又は凍結乾燥させるべきである。

【0138】

「任意選択による」又は「任意選択により」は、これらの用語の後に続く事象又は環境が発生してもよいし、発生しなくてもよいことを意味するが、その記載には、事象又は環境が発生する場合又は発生しない場合が含まれる。例えば、「任意選択により、抗体の1～3つの重鎖CDR領域を含んでもよい」は、特異的配列を有する抗体の重鎖CDR領域が存在してもよいが、必ずしも存在するとは限らないことを意味する。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 9 】

動物、人間、実験対象、細胞、組織、器官又は生物体液に適用された場合、「投与する」及び「処置する」は、外因性医薬品、治療剤、診断薬又は組成物と、動物、人間、対象、細胞、組織、器官又は生物体液との接触を指す。「投与する」及び「処置する」は、例えば処置、薬物動態、診断、研究及び実験方法を指し得る。細胞の処置は、試薬と細胞との接触及び試薬と流体との接触を含み、この場合、流体は、細胞と接触している。「投与する」及び「処置する」は例えば、インビトロ及びエクスピボでの試薬、診断薬、結合作用のある組成物 (binding composition) 又は別の細胞による細胞の処置も意味する。ヒト、獣医学的対象又は研究対象に適用された場合の「処置する」は、治療処置、予防又は予防的措置、研究及び診断の適用を指す。

10

【 0 1 4 0 】

「処置」は、内用又は外用治療剤、例えば、本開示の結合作用のある化合物 (binding compound) のいずれか 1 種を含む組成物を、それに対して治療剤が治療効果を有することが知られている 1 種以上の疾患症状のある患者に施用することを意味する。一般に、治療剤は、処置された患者又は集団の 1 種以上の疾患症状を緩和するのに効果的な量で与えられ、これによって、臨床的に検出できる任意の程度までこのような症状の後退を誘導し、又はこのような症状の発症を阻害する。何らかの特定の疾患症状を緩和するのに効果的な治療剤の量 (「治療有効量」とも呼ばれる) は、様々な因子、例えば患者の疾患状態、年齢及び体重、並びに、望ましい治療効果を患者に生じさせる治療剤の能力に応じて変化し得る。疾患症状が緩和されたかどうかは、症状の重症度又は進行を評価するために医師又は他の医療専門家によって一般的に使用されている任意の臨床検査法によって、評価することができる。本開示の一実施形態 (例えば、処置方法又は製造物) は、ターゲットとする各疾患症状を緩和するのに有効ではないこともあるが、スチューデントの t 検定、カイ二乗検定、マン - ホイットニーの U 検定、クラスカル - ウォリス検定 (H 検定)、ボンフェローニ検定及びウィルコクソン検定等の当技術分野において知られた任意の統計学的な試験方法によって判定されたときに、統計学的に有意な数の患者にあるターゲットとする疾患症状を緩和するはずである。

20

【 0 1 4 1 】

その疾患が IL - 5 に関連付けられた疾患である限り、IL - 5 に関連付けられた疾患に制限はない。例えば、本開示の分子によって誘導される治療反応は、ヒト IL - 5 への結合後に好酸球の刺激効果を遮断又は阻害することによって、発生させることができる。したがって、治療用途に適した調製物及び製剤に応用された場合、本開示の医薬組成物は、アレルギー及び/若しくはアトピー反応に苦しんでいる、又は、限定されるわけではないがぜんそく、ぜんそくの増悪、悪性のぜんそくの発症、慢性肺炎、アレルギー性鼻炎、通年性アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球増加症、チャージ - ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、オンコセルカ症皮膚炎、間欠性血管性浮腫、好酸球性筋痛症候群、好酸球性胃腸炎、寄生虫感染症、ホジキン病、鼻茸、レフラー症候群、じんま疹、過好酸性気管支炎、結節性動脈炎、副鼻腔炎、好酸球性食道炎、アレルギー性好酸球性食道炎、アレルギー性結膜炎、オンコセルカ症皮膚炎、子宮内膜症若しくはステロイド依存性好酸球性気管支炎等の好酸球に関連付けられた反応に苦しんでいる対象にとっては、非常に有用である。好ましい一実施形態において、処置は、肺組織への好酸球の浸潤を阻害又は緩和することができる。本医薬組成物の投与頻度は、1 日当たり 3 回から、6 か月ごとに 1 回までとすることができる。投与経路は、静脈内経路、皮下経路、筋肉内経路、非経口経路又は局所的経路であってよい。

30

40

【 0 1 4 2 】

本開示の製剤は、IL - 5 媒介性疾患を処置するために使用することができる。例えば、製剤は、限定されるわけではないが、インビボ及びインビトロにおける IL - 5 によって媒介される炎症反応及び好酸球の成熟、活性化、脱顆粒又は組織浸潤を阻害又は緩和し；IL - 5 によって引き起こされる平滑筋の過剰なストレスを抑制し；肺、気道又は血液における IL - 5 のレベルを低下させるために使用することができる。好ましくは、本開

50

示の製剤は、IL-5 媒介性疾患を処置するために使用することができ、好ましくは、IL-5 媒介性疾患は、ぜんそく、慢性肺炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、好酸球増加症、チャージ-ストラウス症候群、アトピー性皮膚炎、オンコセルカ症皮膚炎、間欠性血管性浮腫、好酸球性筋痛症候群、好酸球性胃腸炎、寄生虫感染症、ホジキン病、鼻茸、レフラー症候群、じんま疹、過好酸性気管支炎、結節性動脈炎、副鼻腔炎、好酸球性食道炎、アレルギー性好酸球性食道炎、アレルギー性結膜炎、オンコセルカ症皮膚炎、子宮内膜症及びステロイド依存性好酸球性気管支炎からなる群より選択される。

【0143】

「有効量」は、医学的疾患の症状又は状態を改善又は予防するのに十分な量を含む。有効量は、診断を可能にし、又は容易にするのに十分な量も指す。特定の患者又は獣医学的対象に関する有効量は、次の因子に応じて変化し得る：例えば、処置すべき状態、患者の全身状態、投与経路及び投薬量、並びに副作用の重症度。有効量は、有意な副作用又は毒性作用を回避する最大用量又は投与スケジュールであり得る。

【0144】

「交換」は、抗体タンパク質を溶解させるために使用される溶媒系の交換を指す。例えば、抗体タンパク質を含む高塩濃度の又は高張性の溶媒系が、物理的な操作により、安定な製剤のバッファー系によって置き換えられ、この結果、抗体タンパク質は、安定な製剤中に存在することになる。物理的操作には、限定されるわけではないが、限外ろ過、透析又は遠心分離後の復元が挙げられる。

【実施例】

【0145】

(実施例及び試験例)

以下、例と組み合わせて本開示をさらに説明するが、これらの例は、本開示の範囲を限定しない。本開示の例において特定の条件を採用していない実験方法は通常、Cold Spring Harbor Laboratory 制作の Antibodies: A Laboratory Manual、Molecular Cloning という刊行物を参考にする等、慣用的な条件によるものであり；又は、材料若しくは製品の製造業者によって推奨されている条件によるものである。特定の供給源が示されていない試薬は、市場から購入した慣用的な試薬である。

【0146】

(実施例1)

IL-5 抗原の調製、及びその検出に使用されたタンパク質

1.1 IL-5 抗原の設計及び発現

His タグ付きのヒト IL-5 と、His タグ付きのアカゲザル IL-5 と、His タグ付きのマウス IL-5 と、His タグ付きのラット IL-5 と、ヒト IgG1-Fc フラグメントを含むヒト IL-5 R 受容体細胞外領域融合タンパク質とをコードする配列を、cphr ベクターにクローニングし、発現プラスミドを構築し、次いで、HEK293 にトランスフェクションした。トランスフェクションから6日目に、サンプルを収集し、4500rpmでの10分間の遠心分離によって細胞上清を収集した。組換え IL-5 及び IL-5 受容体タンパク質を含む上清を、ニッケルカラムの使用によって精製し、組換えヒト IL-5-Fc 融合タンパク質を、プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーカラムの使用によって精製した。精製されたタンパク質は、後続の実験に使用することができる。特異的なタンパク質抗原の配列は、以下のとおりである。

【0147】

his タグ (rhIL-5-his) 付きのヒト IL-5 のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【化 1】

MRMLLHLSLLALGAAYVYAIPTEIPTSA LVKETLALLSTHRTL LIANETLRIPVPVHKNHQLCT
EEIFQGIGTLESQTVQGGTVERLFKNLSLIK KYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDY LQEFLGVMN
TEWIIESHHHHHH

注記：イタリック体の部分は、H i s 6 タグを表す。

配列番号：1

【0148】

h i s タグ付きのカニクイザル I L - 5 のアミノ酸配列

10

【化 2】

MRMLLHLSLLALGAAYVYAIPTEIPASALVKETLALLSTHRTL LIANETLRIPVPVHKNHQLCT
EEIFQGIGTLESQTVQGGTVERLFKNLSLIK KYIGGQKKKCGEERRRVNQFLDY LQEFLGVMN
TEWIIESHHHHHH

配列番号：2

注記：イタリック体の部分は、H i s 6 タグを表す。

【0149】

h i s タグ付きのマウス I L - 5 のアミノ酸配列

20

【化 3】

MEIPMSTVVKETLTQLSAHRALLTSNETMRLPVPTHKNHQLCIGEIFQGLDILKNQTVRGGTV
EMLFQNLSLIK KYIDRQKEKCGEERRRTRQFLDY LQEFLGVMSTEWAMEGHHHHHH

配列番号：3

注記：イタリック体の部分は、H i s 6 タグを表す。

【0150】

h i s タグ付きのラット I L - 5 のアミノ酸配列

【化 4】

MEIPMSTVVKETLIQLSTHRALLTSNETMRLPVPTHKNHQLCIGEIFQGLDILKNQTVRGGTVE
ILFQNLSLIK KYIDGQKEKCGEERRKTRHFLDY LQEFLGVMSTEWAMEVHHHHHH

配列番号：4

注記：イタリック体の部分は、H i s 6 タグを表す。

【0151】

ヒト F c フラグメントに融合したヒト I L - 5 受容体のアミノ酸配列

40

50

【化 5】

DLLPDEKISLLPPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRIT
SKCVTILHKGFASVVRTILQNDHSLASSWASAEHLHAPPGSPGTSIVNLTCTTNTTEDNYSRLRS
YQVSLHCTWLVGTDAPEDTQYFLYYRYGSWTEECQEYSKDTLGRNIACWFPRTFILSKGRDW
LAVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHAIDQINPPLNVTAEIEGTRLSIQWEKPVSAPFIHCFDYEVKI
HNTRNGYLQIEKLMTNAFISIIDDLISKYDVQVRAAVSSMCREAGLWSEWSQPIYVGNDEHKPL
REWIEGRMDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号：5

注記：イタリック体の部分は、ヒト I g G 1 - F c タグを表す。

【0152】

(実施例2)

組換え I L - 5 受容体及び I L - 5 / 受容体細胞株の構築及び同定

機能的抗体をスクリーニングするために、本開示は、I L - 5 を発現させる C H O - S / I L - 5 細胞株、及び、I L - 5 と I L - 5 との両方を発現させる C H O - S / I L - 5 / I L - 5 細胞株を構築した。

20

【0153】

具体的には、ヒト I L - 5 完全長遺伝子 (Q 0 1 3 4 4) をほ乳類細胞発現ベクター p T a r g e T にクローニングし、直線化したプラスミドを C H O - S 細胞にエレクトロトランスフェクションし、G 4 1 8 の存在下で2週間スクリーニングした後、限界希釈を2回実施した。F A C S によって細胞表面上の I L - 5 遺伝子を検出し、I L - 5 発現レベルが高い C H O - S / I L - 5 細胞株を選択した。これをベースにして、直線化した p c D N A 3 . 1 - I L - 5 をエレクトロトランスフェクションし、G 4 1 8 及び z e o c i n の存在下で2週間スクリーニングした後、限界希釈を2回実施した。F A C S によって細胞表面上の I L - 5 及び I L - 5 遺伝子を検出し、I L - 5 及び I L - 5 の発現レベルが高い C H O - S / I L - 5 / I L - 5 細胞株を選択した。

30

【0154】

(実施例3)

抗ヒト I L - 5 マウスモノクローナル抗体の調製

2種の用量の組換えタンパク質 r h I L - 5 - h i s 、フロイントアジュバント C F A (S i g m a 、ロット番号 S L B Q 1 1 0 9 V) 及び I F A (S i g m a 、ロット番号 S L B J 2 8 4 5 V) (1 0 0 g / 5 0 g / 5 0 g (高用量) 及び 2 5 g / 1 2 . 5 g / 1 2 . 5 g (低用量)) を使用して、それぞれ2つの B a l b / c マウス群 (5 マウス / 群) 及び4つの S J L マウス群 (5 マウス / 群) を免疫化した。E L I S A 、リガンド - 受容体遮断アッセイ及び T F - 1 増殖阻害アッセイによって血清力価を検出することにより、I L - 5 に対する特異的免疫反応を測定した。良好な特異的免疫反応が良好だったマウスを選択して 殺し；脾臓細胞を収集し、骨髓腫細胞と融合させた。

40

【0155】

一次スクリーニングを、ヒト I L - 5 に対する E L I S A 結合アッセイによって実施した。ハイブリドーマ細胞を24ウェルプレートに移したらすぐに、ヒト、カニクイザル及びマウス I L - 5 に対する E L I S A 結合アッセイ、I L - 5 に対する E L I S A ベース受容体遮断アッセイ及び T F - 1 増殖の阻害アッセイを用いることにより、上清を再びスクリーニングした。陽性クローンを2回サブクローニングした後には、ハイブリドーマクローンが得られたが、これを抗体の製造のために使用し；得られた抗体を、アフィニティ

50

クロマトグラフィーによって精製した。

【 0 1 5 6 】

精製済みの抗体には、SEC - HPLC、エンドトキシン含量の検出、様々な種IL - 5に対するBiacoreアフィニティアッセイ、IL - 5に対するFACSベース受容体遮断アッセイ、TF - 1増殖の阻害アッセイ、好酸球の接着試験、並びに、インビボでのぜんそくのマウスモデル及びモルモットの中和モデルにおける有効性評価を施し；インビボ及びインビトロで好ましい活性を示したモノクローナルハイブリドーマ細胞株mAb 1705、mAb 1706、mAb 1780、mAb 1773及びmAb 1779を選択した。

【 0 1 5 7 】

陽性ハイブリドーマから配列をクローニングするためのプロセスは、次のとおりだった。対数増殖期のハイブリドーマ細胞を収集し、Trizol (Invitrogen、カタログ番15596 - 018)を用いて、キットの取扱説明書に従ってRNAを抽出し、PrimeScript (商標) 逆転写酵素キット (Takara、カタログ番号2680A) を使用して逆転写した。逆転写によって得られたcDNAを、Mouse Ig - Primer Set (Novagen、TB326 Rev. B0503) を使用したPCRによって増幅した後、シーケンシングした。mAb 1705、mAb 1706、mAb 1780、mAb 1773及びmAb 1779の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域DNA配列に対応するアミノ酸配列が得られた (VH/VL CDRのアミノ酸残基は、Kabata式ナンバリング基準に従って決定し、注釈を付けた。)。

【 0 1 5 8 】

mAb 1705 マウス重鎖可変領域の配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCTASGFTFSHYYMAWVRQA
PKKGLEWVTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNAKSTLY
LQMNSLRSEDTATYYCASQTLRESFDYWGGVMVTVSS
配列番号：6

【 0 1 5 9 】

mAb 1705 マウス軽鎖可変領域の配列

DIQMTQSPSSMSVSLGDRVITITCRASQDIANYLSWYQQKI
ARSPKLVIIYGTSNLEVGVPSRFSGSRSGSDYSLTINTLES
EDTGIYFCLQDKEFPRTFGGGTRLLELK
配列番号：7

【 0 1 6 0 】

mAb 1706 マウス重鎖可変領域の配列

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSHYYMAWVRQA
PKKGLEWVTSINYEGNSAYYGDSVKGRFTISRDNAKSTLY
LQMDSLRSSEDTATYYCATETLRESLDYWGQGMVTVSS
配列番号：8

【 0 1 6 1 】

mAb 1706 マウス軽鎖可変領域の配列

DIQMTQSPSSMSVSLGDRVITITCRASQDIGNYLSWYQQKL
GKSPKLMIHSASNLEVGVPSRFSGSRSGSDYSLTINTLES
EDPGIYFCLQHKKQFPRTFGGGTKLELK
配列番号：9

【 0 1 6 2 】

mAb 1780 マウス重鎖可変領域の配列

QVKLLQSGAALVKPGDSVKMSCKASDYTFTEYLIHWVKQS
QGRSLEWIGYINPYSGGTVYNEKFKSKATLTVDKFSSTAY
MEFRRLTFEDSAIYYCARDDGGYSDPDYWGQGMVTVSS
配列番号：10

10

20

30

40

50

【 0 1 6 3 】

m A b 1 7 8 0 マウス軽鎖可変領域の配列

D T V L T Q S P A L A V S P G E R V S I S C R A S E G L T S Y M H W Y Q Q K P G
 Q Q P K L L I Y K A S N L A S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I D P V E A D
 D A A T Y F C Q Q N W N D P W T F G G G T K L E L K

配列番号 : 1 1

【 0 1 6 4 】

m A b 1 7 7 3 マウス重鎖可変領域の配列

E V Q L Q Q S L A E L V R P G A S V T L S C T A S G F N I K N T Y I H W V K Q R
 P E Q G L E W I G R I D P A N G D T K H G P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
 L Q F S S L T S E D T A I Y Y C F R Y G I Y P D H W G Q G T P L T V S S

10

配列番号 : 1 2

【 0 1 6 5 】

m A b 1 7 7 3 マウス軽鎖可変領域の配列

Q I V L T Q S P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S V N Y I Y W Y Q Q K P R
 S S P K P W I Y L T A T L A S G V P A R F S G S G S G T S F S L T I S R M E A E
 D A A T Y Y C Q Q W N S Y P Y T F G G G T K L E I E

配列番号 : 1 3

【 0 1 6 6 】

m A b 1 7 7 9 マウス重鎖可変領域の配列

Q V K L L Q S G A A L V K P G D S V K M S C K A S G Y T F T D Y I I H W V K Q S
 H G K S L E W I G Y F N P N S G G S N Y N E N F K R K A T L T A D K S S S T A Y
 L E F S R V T S E D S A I Y Y C G R R I A W D H W Y F D F W G P G T M V T V S S

20

配列番号 : 1 4

【 0 1 6 7 】

m A b 1 7 7 9 マウス軽鎖可変領域の配列

D I Q M T Q S P A S L S A S L G E T V S I E C L A S E G I S N D V A W Y Q Q K S
 G R S P Q L L V Y A A S R L Q D G V P S R F S G S G S G T R Y F F K I S G M Q P
 E D E A D Y F C Q Q G Y K T P L T F G S G T K L E I K

配列番号 : 1 5

30

【 0 1 6 8 】

各抗体の軽鎖及び重鎖の C D R 配列は、表 1 に示されている。

【 0 1 6 9 】

40

50

【表 1】

表 1. 各抗体の重鎖及び軽鎖中の C D R 領域の配列

抗体	重鎖		軽鎖	
mAb1705	HCDR1	HYUMA 配列番号： 1 6	LCDR1	RASQDIANYLS 配列番号： 1 9
	HCDR2	SISYEGDITYYGDSVKG 配列番号： 1 7	LCDR2	GTSNLEV 配列番号： 2 0
	HCDR3	QTLRESFDY 配列番号： 1 8	LCDR3	LQDKEFPRT 配列番号： 2 1
mAb1706	HCDR1	HYUMA 配列番号： 2 2	LCDR1	RASQDIGNYLS 配列番号： 2 5
	HCDR2	SINYEGRSAYYGDSVKG 配列番号： 2 3	LCDR2	SASNLEV 配列番号： 2 6
	HCDR3	ETLRESLDY 配列番号： 2 4	LCDR3	LQHKQFPRT 配列番号： 2 7
mAb1780	HCDR1	EYLIH 配列番号： 2 8	LCDR1	RASEGLTSYMH 配列番号： 3 1
	HCDR2	YINPYSGGTVYNEKFKS 配列番号： 2 9	LCDR2	KASNLAS 配列番号： 3 2
	HCDR3	DGGYSDPLDY 配列番号： 3 0	LCDR3	QQNWNDPWT 配列番号： 3 3
mAb1773	HCDR1	NTYIH 配列番号： 3 4	LCDR1	SASSSVNYIY 配列番号： 3 7
	HCDR2	RIDPANGDTKHGPKFQG 配列番号： 3 5	LCDR2	LTATLAS 配列番号： 3 8
	HCDR3	YGIYPDH 配列番号： 3 6	LCDR3	QQWNSYPYT 配列番号： 3 9
mAb1779	HCDR1	DYIIH 配列番号： 4 0	LCDR1	LASEGISNDVA 配列番号： 4 3
	HCDR2	YFNPNSGGSNYNENFKR 配列番号： 4 1	LCDR2	AASRLQD 配列番号： 4 4
	HCDR3	RIAWDHWYFDF 配列番号： 4 2	LCDR3	QQGYKTPLT 配列番号： 4 5

【 0 1 7 0 】

B i a c o r e による活性の検出結果は、表 2 で確認することができる。

【 0 1 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. I L - 5 マウス抗体のインビトロ活性

抗体	H u I L - 5 アフィニティ (KD (M))
mAb1705	7.27E-11
mAb1706	3.83E-11
mAb1780	8.99E-11
mAb1773	1.29E-10
mAb1779	4.58E-10

10

20

【 0 1 7 2 】

上記結果により、本開示のマウス抗体が、抗原に対する高いアフィニティを有することが示されている。

【 0 1 7 3 】

(実施例 4) I L - 5 関連組換えタンパク質の精製並びにハイブリドーマ抗体及び組換え抗体の精製

4 . 1 I L - 5 - F l a g - H i s 組換えタンパク質の精製ステップ：

サンプルを高速で遠心分離して、不純物を除去し、適切な体積になるまで濃縮した。N I - N T A アフィニティカラム (Q I A G E N 、カタログ番号 3 0 7 2 1) を P B S によって平衡させ、カラム容積の 2 ~ 5 倍で洗浄した。不純物の除去後、細胞発現上清サンプルをカラムにロードした。A 2 8 0 測定値が低下してベースラインに至るまで、P B S によってカラムを洗浄した。P B S によってカラムを洗浄して、汚染タンパク質を除去し、サンプルを収集した。標的タンパク質を、洗浄バッファー (2 0 m M イミダゾール) 及び溶出バッファー (3 0 0 m M イミダゾール) によって順次溶出させ、溶出ピークを収集した。

30

【 0 1 7 4 】

収集された溶出液を、イオン交換 (H i l l o a d 1 6 / 6 0 0 s u p e r d e x 2 0 0 カラム) によってさらに精製した。カラム容積の約 2 倍の P B S によってカラムを平衡させて、p H が確実に 7 . 4 になるようにした。同定された標的タンパク質を含む溶出バッファーを濃縮してロードし、サンプルを収集し、S D S - P A G E 及び L C - M S による同定によって確認し、アリコート化して使用した。

40

【 0 1 7 5 】

4 . 2 ハイブリドーマ発現抗体及び F c 融合タンパク質の精製

細胞発現上清サンプルを高速で遠心分離して、不純物を除去した。ハイブリドーマ発現上清をプロテイン G カラムによって精製し、F c 融合タンパク質発現上清をプロテイン A カラムによって精製した。A 2 8 0 測定値が低下してベースラインに至るまで、カラムを P B S によって洗浄した。p H 3 . 0 の 1 0 0 m M 酢酸によって標的タンパク質を溶出させ、p H 8 . 0 の 1 M T r i s - H C l によって中和した。溶出したサンプルを適切に濃縮した後、P B S によって平衡させたゲルクロマトグラフィー S u p e r d e x 2 0 0

50

(G E) によってサンプルをさらに精製し、凝集物を含まないピークを収集した後、アリコート化して使用に供した。

【 0 1 7 6 】

(実施例 5) 抗ヒト I L - 5 モノクローナル抗体のヒト化の設計

当技術分野における数多くの参考文献において開示されているようにして、マウス抗ヒト I L - 5 モノクローナル抗体のヒト化を実施した。簡単に言うと、マウス抗体の定常領域をヒト定常領域によって置き換え、マウス抗体の C D R を、最も高い相同性を有する F R ヒトテンプレートにグラフト化し、F R 領域中のアミノ酸に復帰変異を発生させた。

【 0 1 7 7 】

I M G T ヒト抗体重鎖可変領域及び軽鎖可変領域生殖細胞系列遺伝子データベースに対して整合させることにより、m A b - 1 7 0 5、m A b - 1 7 0 6、m A b 1 7 8 0、m A b 1 7 7 3 及び m A b 1 7 7 9 抗体のアミノ酸配列のそれぞれに対して高い同一性を有する重鎖可変領域及び軽鎖可変領域生殖細胞系列を、テンプレートとして選択し、マウス抗体の C D R を、対応するヒトテンプレートにグラフト化して、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 の順番の可変領域を形成した。アミノ酸残基は、K a b a t 式ナンバリング基準に従って決定し、注釈を付けた。

【 0 1 7 8 】

ヒト F R 領域及びアミノ酸復帰変異の選択

得られたマウス抗体 V H / V L C D R の典型的な構造に基づいて、軽鎖可変領域 (V L) 及び重鎖可変領域 (V H) 相同配列をヒト生殖細胞系列データベースから検索し、F R 相同性に応じて (降順に) ランク付けし ; F R 相同性が最も高い生殖細胞系列を、主要なテンプレートとして選択した。マウス抗体の C D R 領域をヒトテンプレートにグラフト化した後、F R 残基を変異させ、アミノ酸残基を最適化すると、最終的なヒト化分子が得られた。

【 0 1 7 9 】

5 . 1 ハイブリドーマクローン m A b 1 7 0 5 に関するヒト化フレームワークの選択

h 1 7 0 5 に関しては、I G H V 3 - 2 3 * 0 4 を V H 用のテンプレートとして選択し、I G K V 1 - 1 2 * 0 1 を V L 用のテンプレートを選択した。m A b 1 7 0 5 の C D R をヒトテンプレートにグラフト化し ; 組み込まれた残基と、C D R 領域 (ソフトウェアによって発見された) と直接相互作用した残基とを復帰変異させた。表 3 に示されているように、様々なヒト化抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域が得られた。

【 0 1 8 0 】

【 表 3 】

表 3 . h 1 7 0 5 に関するテンプレートの選択及び復帰変異の設計

h1705_VL		h1705_VH	
h1705_VL.1	グラフト化	h1705_VH.1	グラフト化
h1705_VL.1A	A43S, G66R	h1705_VH.1A	K98S
h1705_VL.1B	A43S, L47V, G66R, T69S, F71Y, Y87F	h1705_VH.1B	S49T, V93T, K98S

注記 : 「グラフト化」は、マウス抗体 C D R をヒト生殖細胞系列 F R 領域配列にグラフト化したことを表す。例えば、アミノ酸配列の天然ナンバリングに従えば、A 4 3 S は、「グラフト化」の 4 3 位の A が変異して、S に戻ったことを表す。

【 0 1 8 1 】

【表 4】

表 4. h1705 ヒト化抗体重鎖可変領域と軽鎖可変領域との組合せ

	h1705_VH.1	h1705_VH.1A	h1705_VH.1B
h1705_VL.1	h1705-003	h1705-004	h1705-005
h1705_VL.1A	h1705-006	h1705-007	h1705-008
h1705_VL.1B	h1705-009	h1705-010	h1705-011

注記：この表は、様々な変異の組合せによって得られた配列を示している。h1705-007によって示されているように、ヒト化マウス抗体h1705-007は、2種の変異体、すなわち、軽鎖h1705_VL.1A及び重鎖h1705_VH.1A等を含む。

【0182】

ヒト化抗体h1705の可変領域の特異的配列は、以下のとおりである。

> h1705_VL.1 (配列番号：46)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDIANYLSWYQQKP
GKAPKLLIYGTSNLEVGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSSLQP
EDFATYYC LQDKEFPRTFGGGTKVEIK

【0183】

> h1705_VL.1A (配列番号：47)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDIANYLSWYQQKP
GKSPKLLIYGTSNLEVGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSSLQP
EDFATYYC LQDKEFPRTFGGGTKVEIK

【0184】

> h1705_VL.1B (配列番号：48)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDIANYLSWYQQKP
GKSPKLV IYGTSNLEVGVP SRFSGSRSGSDYTLTISSSLQP
EDFATYFCLQDKEFPRTFGGGTKVEIK

【0185】

> h1705_VH.1 (配列番号：49)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHY YMAWVRQA
PGKGLEWVSSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCAKQTLRESFDYWGQG TLT VTVSS

【0186】

> h1705_VH.1A (配列番号：50)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHY YMAWVRQA
PGKGLEWVSSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCASQTLRESFDYWGQG TLT VTVSS

【0187】

> h1705_VH.1B (配列番号：51)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHY YMAWVRQA
PGKGLEWVTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTATYYCASQTLRESFDYWGQG TLT VTVSS

【0188】

上記軽鎖可変領域のそれぞれを軽鎖定常領域と組み合わせて、軽鎖配列を形成し、重鎖可変領域のそれぞれを重鎖定常領域と組み合わせて、重鎖配列を形成した。例示的なヒト化抗体定常領域配列が、以下に示されている。

【0189】

> 重鎖IgG1定常領域：

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L Y I I R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

配列番号：52

10

注記：アンダーライン部分は、M252Y、S254T、T256E変異を表す。

【0190】

> 軽鎖 定常領域：

R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

配列番号：53

【0191】

5.2 ハイブリドーマクローンmAb1706に関するヒト化フレームワークの選択

h1706に関しては、IGHV3-23*04をVH用のテンプレートとして選択し、IGKV1-12*01をVL用のテンプレートを選択した。マウス抗体mAb1706のCDRを、選択したヒト化テンプレートにグラフト化し；FRアミノ酸を復帰変異させた。表5に示されているように、ヒト化抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域が得られた。

20

【0192】

【表5】

表5. h1706に関するテンプレートの選択及び復帰変異の設計

h1706_VL		h1706_VH	
h1706_VL.1	グラフト化	h1706_VH.1	グラフト化
h1706_VL.1A	A43S	h1706_VH.1A	K98T
h1706_VL.1B	A43S, L47M, F71Y, Y87F	h1706_VH.1B	S49T, V93T, K98T

30

注記：「グラフト化」は、マウス抗体CDRをヒト生殖細胞系列FR領域にグラフト化したことを表す。例えば、アミノ酸配列の天然ナンバリングに従えば、A43Sは、「グラフト化」の43位のAが変異して、Sに戻ったことを表す。

40

【0193】

表6に示されているように、設計したヒト化分子を組み合わせ、下記の表に提示の様々な抗体を形成した。

【0194】

50

【表 6】

表 6. h1706 ヒト化抗体重鎖可変領域と軽鎖可変領域との組合せ

	h1706_VH.1	h1706_VH.1A	h1706_VH.1B
h1706_VL.1	h1706-002	h1706-003	h1706-004
h1706_VL.1A	h1706-005	h1706-006	h1706-007
h1706_VL.1B	h1706-008	h1706-009	h1706-010

10

【0195】

h1706 ヒト化抗体の可変領域の特異的配列は、以下のとおりである。

> h1706__VL.1 (配列番号: 54)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIGNYLSWYQQKPK
GKAPKLLIYSASNLEVGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCLQHKQFPRTFGGGTKVEIK

【0196】

> h1706__VL.1A (配列番号: 55)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIGNYLSWYQQKPK
GKSPKLLIYSASNLEVGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCLQHKQFPRTFGGGTKVEIK

20

【0197】

> h1706__VL.1B (配列番号: 56)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIGNYLSWYQQKPK
GKSPKLMIYSASNLEVGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP
EDFATYFCLQHKQFPRTFGGGTKVEIK

【0198】

> h1706__VH.1 (配列番号: 57)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYHMAWVRQA
PGKGLEWVSSINYE GNSAAYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKETLRESLDYWGQGTMVTVSS

30

【0199】

> h1706__VH.1A (配列番号: 58)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYHMAWVRQA
PGKGLEWVSSINYE GNSAAYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCATETLRESLDYWGQGTMVTVSS

【0200】

> h1706__VH.1B (配列番号: 59)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYHMAWVRQA
PGKGLEWVTSINYE GNSAAYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTATYYCATETLRESLDYWGQGTMVTVSS。

40

【0201】

上記軽鎖可変領域のそれぞれを軽鎖定常領域と組み合わせて、軽鎖配列を形成した。重鎖可変領域のそれぞれを重鎖定常領域と組み合わせて、重鎖配列を形成した。

【0202】

5.3 ハイブリドーマクローン mAb 1780 に関するヒト化フレームワークの選択

h1780 に関しては、IGHV1-2*02 を VH 用のテンプレートとして選択し、IGKV3-11*01 を VL 用のテンプレートを選択した。マウス抗体 mAb 1780 の CDR を、選択したヒト化テンプレートにグラフト化し；FR アミノ酸を復帰変異させ

50

た。表 7 に示されているように、ヒト化抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域が得られた。

【 0 2 0 3 】

【表 7】

表 7. h 1 7 8 0 に関するテンプレートの選択及び復帰変異の設計

h1780_VL		h1780_VH	
h1780_VL.1	グラフト化	h1780_VH.1	グラフト化
h1780_VL.1A	E1D,I2T	h1780_VH.1A	M70L,R72V,T74K
h1780_VL.1B	E1D,I2T,I57V, V84T,Y86F	h1780_VH.1B	M48I,V68A,M70L,R72V,T74K,L 83F
		h1780_VH.1C	R38K,M48I,R67K,V68A,M70L,R 72V,T74K,L83F

10

注記：「グラフト化」は、マウス抗体 C D R をヒト生殖細胞系列 F R 領域にグラフト化したことを表す。例えば、アミノ酸配列の天然ナンバリングに従えば、E 1 D は、「グラフト化」の 1 位の E が変異して、D に戻ったことを表す。

20

【 0 2 0 4 】

表 8 に示されているように、設計したヒト化分子を組み合わせて、下記の表に提示の様々な分子を形成した。

【 0 2 0 5 】

【表 8】

表 8. h 1 7 8 0 ヒト化抗体重鎖可変領域と軽鎖可変領域との組合せ

	h1780_VH.1	h1780_VH.1A	h1780_VH.1B	h1780_VH.1C
h1780_VL.1	h1780-007	h1780-008	h1780-009	h1780-010
h1780_VL.1A	h1780-011	h1780-012	h1780-013	h1780-014
h1780_VL.1B	h1780-015	h1780-016	h1780-017	h1780-018

30

【 0 2 0 6 】

h 1 7 8 0 ヒト化抗体の可変領域の特異的配列は、以下のとおりである。

> h 1 7 8 0 _ V L . 1 (配列番号 : 6 0)

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E G L T S Y M H W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y K A S N L A S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
E D F A V Y Y C Q Q N W N D P W T F G G G T K V E I K

40

【 0 2 0 7 】

> h 1 7 8 0 _ V L . 1 A (配列番号 : 6 1)

D T V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E G L T S Y M H W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y K A S N L A S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
E D F A V Y Y C Q Q N W N D P W T F G G G T K V E I K

【 0 2 0 8 】

> h 1 7 8 0 _ V L . 1 B (配列番号 : 6 2)

D T V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E G L T S Y M H W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y K A S N L A S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
E D F A T Y F C Q Q N W N D P W T F G G G T K V E I K

50

【0209】

> h1780__VH.1 (配列番号: 63)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYL IHWVRQA
PGQG LEWMGYINPYSGGT VYNEKFKSRVTMTTRDTSISTAY
MELSRRLRSDDTAVYYCARDGGYS DPLDYWGQG TMVTVSS

【0210】

> h1780__VH.1A (配列番号: 64)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYL IHWVRQA
PGQG LEWMGYINPYSGGT VYNEKFKSRVTLTVDKSIISTAY
MELSRRLRSDDTAVYYCARDGGYS DPLDYWGQG TMVTVSS

10

【0211】

> h1780__VH.1B (配列番号: 65)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYL IHWVRQA
PGQG LEWIGYINPYSGGT VYNEKFKSRATLTVDKSIISTAY
MEFSRLRSDDTAVYYCARDGGYS DPLDYWGQG TMVTVSS

【0212】

> h1780__VH.1C (配列番号: 66)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYL IHWVKQA
PGQG LEWIGYINPYSGGT VYNEKFKSKATLTVDKSIISTAY
MEFSRLRSDDTAVYYCARDGGYS DPLDYWGQG TMVTVSS。

20

【0213】

上記軽鎖可変領域のそれぞれを軽鎖定常領域と組み合わせて、軽鎖配列を形成した。重鎖可変領域のそれぞれを重鎖定常領域と組み合わせて、重鎖配列を形成した。

【0214】

5.4 ハイブリドーマクローン mAb1773 に関するヒト化フレームワークの選択

h1773 に関しては、IGHV3-73*01 を VH 用のテンプレートとして選択し、IGKV1-39*01 を VL 用のテンプレートを選択した。マウス抗体 mAb1773 の CDR を、選択したヒト化テンプレートにグラフト化し；アミノ酸を復帰変異させた。表 9 に示されているように、ヒト化抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域が得られた。さらに、h1773 HCDR2 (RIDPANGDTK HGPKFQG) 中の N を V に変異させて（すなわち、N55V）、重鎖可変領域 HCDR2 バリエントを形成した（変異した HCDR2 の配列は、配列番号: 82: RIDPAVGDTKHGPKFQG に示されたとおりである。）。

30

【0215】

【表 9】

表 9. h1773 に関するテンプレートの選択及び復帰変異の設計

h1773_VL		h1773_VH	
h1773_VL.1	グラフト化	h1773_VH.1	グラフト化
h1773_VL.1A	M4L,A42S,L45P,L46W	h1773_VH.1A	F29I,R72A,T97F + N55V
		h1773_VH.1B	F29I,R38K,V48I, R72A,T97F + N55V

40

注記：「グラフト化」は、マウス抗体 C D R をヒト生殖細胞系列 F R 領域にグラフト化したことを表す。例えば、アミノ酸配列の天然ナンバリングに従えば、M 4 L は、「グラフト化」の 4 位の M が変異して、L に戻ったことを表す。

【 0 2 1 6 】

表 1 0 に示されているように、設計したヒト化分子を組み合わせて、下記の表に提示の様々な分子を形成した。

【 0 2 1 7 】

【表 1 0 】

表 1 0 . h 1 7 7 3 ヒト化抗体重鎖可変領域と軽鎖可変領域との組合せ

10

	h1773_VH.1	h1773_VH.1A	h1773_VH.1B
h1773_VL.1	h1773-002	h1773-003	h1773-004
h1773_VL.1A	h1773-005	h1773-006	h1773-007

【 0 2 1 8 】

h 1 7 7 3 ヒト化抗体の可変領域の特異的配列は、以下のとおりである。

> h 1 7 7 3 __ V L . 1 (配列番号 : 6 7)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S S S V N Y I Y W Y Q Q K P G
K A P K L L I Y L T A T L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
D F A T Y Y C Q Q W N S Y P Y T F G G G T K V E I K

20

【 0 2 1 9 】

> h 1 7 7 3 __ V L . 1 A (配列番号 : 6 8)

D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S S S V N Y I Y W Y Q Q K P G
K S P K P W I Y L T A T L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E
D F A T Y Y C Q Q W N S Y P Y T F G G G T K V E I K

【 0 2 2 0 】

> h 1 7 7 3 __ V H . 1 (配列番号 : 6 9)

【化 6 】

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNTYIHWVRQASGKGLEWVGRIDPAV
GDTKHGPKFQGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRYGIYPDHWGQGT
LTVSS

【 0 2 2 1 】

> h 1 7 7 3 __ V H . 1 A (配列番号 : 7 0)

【化 7 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTISNTYIHWVRQASGKGLEWVGRIDPAV
GDTKHGPKFQGRFTISADDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCFRYGIYPDHWGQGT
LTVSS

40

【 0 2 2 2 】

> h 1 7 7 3 __ V H . 1 B (配列番号 : 7 1)

【化 8 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTISNTYIHWVKQASGKGLEWIGRIDPAVG
DTKHGPKFQGRFTISADDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCFRYGIYPDHWGQGTL
VTVSS.

【 0 2 2 3 】

50

上記軽鎖可変領域のそれぞれを、配列番号：５３に示された軽鎖定常領域配列と組み合わせ、最終的な完全軽鎖配列を形成した。重鎖可変領域のそれぞれを、配列番号：５２に示された重鎖定常領域と組み合わせ、最終的な完全重鎖配列を形成した。

【０２２４】

５．５ ハイブリドーマクローン mAb 1779 に関するヒト化フレームワークの選択

h1779 に関しては、IGHV1-2*02 を VH 用のテンプレートとして選択し、IGKV1-33*01 を VL 用のテンプレートを選択した。マウス抗体 h1779 の CDR を、選択したヒト化テンプレートにグラフト化し；アミノ酸を復帰変異させた。表 11 に示されているように、ヒト化抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域が得られた。

【０２２５】

【表 11】

10

表 11. h1779 に関するテンプレートの選択及び復帰変異の設計

h1779_VL		h1779_VH	
h1779_VL.1	グラフト化	h1779_VH.1	グラフト化 + D89E
h1779_VL.1A	A43S	h1779_VH.1 A	R72A,T74K + D89E
h1779_VL.1B	A43S, I48V, F71Y	h1779_VH.1 B	M48I,V68A,R72A,T74K + D89E
		h1779_VH.1 C	M48I,V68A,R72A,T74K,M81L, L83F + D89E
		h1779_VH.1 D	R38K,M48I,R67K,V68A,R72A,T74 K, M81L,L83F + D89E

20

30

注記：「グラフト化」は、マウス抗体 CDR をヒト生殖細胞系列 FR 領域にグラフト化したことを表す。例えば、アミノ酸配列の天然ナンバリングに従えば、A43S は、「グラフト化」の 43 位の A が変異して、S に戻ったことを表す。

【０２２６】

表 12 に示されているように、設計したヒト化分子を組み合わせ、下記の表に提示の様々な分子を形成した。

【０２２７】

【表 12】

40

表 12. h1779 ヒト化抗体重鎖可変領域と軽鎖可変領域との組合せ

	h1779_VH.1	h1779_VH.1A	h1779_VH.1B	h1779_VH.1C	h1779_VH.1D
h1779_VL.1	h1779-005	h1779-006	h1779-007	h1779-008	h1779-009
h1779_VL.1A	h1779-010	h1779-011	h1779-012	h1779-013	h1779-014
h1779_VL.1B	h1779-015	h1779-016	h1779-017	h1779-018	h1779-019

50

【0228】

h1779ヒト化抗体の可変領域の特異的配列は、以下のとおりである。

> h1779__VL.1 (配列番号: 72)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASEGISNDVAWYQQKPG
GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQP
EDIATYYCQQGYKTPLTFGQGTKLEIK

【0229】

> h1779__VL.1A (配列番号: 73)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASEGISNDVAWYQQKPG
GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQP
EDIATYYCQQGYKTPLTFGQGTKLEIK

10

【0230】

> h1779__VL.1B (配列番号: 74)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASEGISNDVAWYQQKPG
GKSPKLLVYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTFITISSLQP
EDIATYYCQQGYKTPLTFGQGTKLEIK

【0231】

> h1779__VH.1 (配列番号: 75)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTDYIIHWVRQA
PGQGLEWMGYFNPNSGGSNYNENFKRRVTMTSDTSTAY
MELSLRLRSEDTAVYYCARRIAWDHWYFDFWGQGTMTVTVSS

20

【0232】

> h1779__VH.1A (配列番号: 76)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTDYIIHWVRQA
PGQGLEWMGYFNPNSGGSNYNENFKRRVTMTADKSTAY
MELSLRLRSEDTAVYYCARRIAWDHWYFDFWGQGTMTVTVSS

【0233】

> h1779__VH.1B (配列番号: 77)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTDYIIHWVRQA
PGQGLEWIGYFNPNSGGSNYNENFKRRATMTADKSTAY
MELSLRLRSEDTAVYYCARRIAWDHWYFDFWGQGTMTVTVSS

30

【0234】

> h1779__VH.1C (配列番号: 78)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTDYIIHWVRQA
PGQGLEWIGYFNPNSGGSNYNENFKRRATMTADKSTAY
LEFSRLRSEDTAVYYCARRIAWDHWYFDFWGQGTMTVTVSS

【0235】

> h1779__VH.1D (配列番号: 79)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTDYIIHWVKQA
PGQGLEWIGYFNPNSGGSNYNENFKRKATMTADKSTAY
LEFSRLRSEDTAVYYCARRIAWDHWYFDFWGQGTMTVTVSS

40

【0236】

上記軽鎖可変領域のそれぞれを、配列番号: 53に示された軽鎖定常領域配列と組み合わせ、軽鎖配列を形成した。重鎖可変領域のそれぞれを、配列番号: 52に示された重鎖定常領域と組み合わせ、重鎖配列を形成した。

【0237】

例示的なヒト化抗体の完全長配列は、以下のとおりである。

h1705-008重鎖:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYMAWVRQA
PGKGLEWVTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLY

50

L Q M N S L R A E D T A T Y Y C A S Q T L R E S F D Y W G Q G T L V T V S S A S
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I
C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S
V F L F P P K P K D T L Y I T R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
S L S L S P G K

10

配列番号：83

【0238】

h1705 - 008 軽鎖：

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q D I A N Y L S W Y Q Q K P
G K S P K L L I Y G T S N L E V G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C L Q D K E F P R T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
L S S P V T K S F N R G E C

配列番号：84

20

【0239】

h1706 - 009 重鎖：

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S H Y Y M A W V R Q A
P G K G L E W V S S I N Y E G N S A Y Y G D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A T E T L R E S L D Y W G Q G T M V T V S S A S
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I
C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S
V F L F P P K P K D T L Y I T R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
S L S L S P G K

30

配列番号：85

【0240】

h1706 - 009 軽鎖：

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q D I G N Y L S W Y Q Q K P
G K S P K L M I Y S A S N L E V G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y F C L Q H K Q F P R T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
L S S P V T K S F N R G E C

40

配列番号：86

【0241】

h1780 - 017 重鎖：

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E Y L I H W V R Q A
P G Q G L E W I G Y I N P Y S G G T V Y N E K F K S R A T L T V D K S I S T A Y
M E F S R L R S D D T A V Y Y C A R D G G Y S D P L D Y W G Q G T M V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W

50

NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSLSPGK

配列番号：87

【0242】

h1780 - 017 軽鎖：

DTVLTQSPATLSLSLSPGERATLSCRASEGLTSMHWYQQKP
GQAPRLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELP
EDFATYFCQQNWNDPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC

配列番号：88

【0243】

h1773 - 007 重鎖：

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTISNTYIHWVKQA
SGKGLEWIGRIDPAVGDTKHGPKFQGRFTISADDSKNTAY
LQMNSLKTEDTAVYYCFRYGIYPDHWGQGTLLTVVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL
LSLSPGK

配列番号：89

【0244】

h1773 - 007 軽鎖：

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVNYIYWYQQKPG
KSPKPKWIYLTATLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSELP
EDFATYFCQQWNSYPYTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

配列番号：90

【0245】

h1779 - 014 重鎖：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITDYIHWVKQA
PGQGLEWIGYFNPNSGGSNYNENFKRKATMTADKSI STAY
LEFSRLRSEDTAVYYCARRIAWDHWYFD FFWGQGTMTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

10

20

30

40

50

P S V F L F P P K P K D T L Y I T R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

配列番号：9 1

【0 2 4 6】

h 1 7 7 9 - 0 1 4 軽鎖：

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C L A S E G I S N D V A W Y Q Q K P
G K S P K L L V Y A A S R L Q D G V P S R F S G S G S G T D Y T F T I S S L Q P
E D I A T Y Y C Q Q G Y K T P L T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q
G L S S P V T K S F N R G E C

10

配列番号：9 2；

【0 2 4 7】

国際公開第2012/083370号におけるIL5に対する抗体Hu39D10を、
本開示においてはポジティブコントロールとして使用したが、その重鎖配列及び軽鎖配列
が、それぞれ配列番号：80及び配列番号：81に示されている。

20

【0 2 4 8】

Hu39D10重鎖の配列

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G L S L T S N S V N W I R Q A
P G K G L E W V G L I W S N G D T D Y N S A I K S R F T I S R D T S K S T V Y L
Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E Y Y G Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K
G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G
A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N
V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F P
P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V
H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S
L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S
L G K

30

配列番号：80

【0 2 4 9】

Hu39D10軽鎖の配列

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C L A S E G I S S Y L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y G A N S L Q T G V P S R F S G S G S A T D Y T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q S Y K F P N T F G Q G T K V E V K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
L S S P V T K S F N R G E C

40

配列番号：81。

【0 2 5 0】

(実施例6)組換えキメラ抗体及びヒト化抗体の調製

1.組換えキメラ抗体の分子クローニング

ハイブリドーマのスクリーニングによって陽性抗体分子を得た後、可変領域をコードする
遺伝子配列をシーケンシングによって得た。得られた配列をベースにして、フォワード
プライマー及びリバープライマーを設計し、シーケンシングされた遺伝子をテンプレ

50

トとして使用して、PCRによって各抗体VH/VK遺伝子フラグメントを構築した後、相同組換えによって(シグナルペプチド及びhIgG1/h定常領域遺伝子(CH1-Fc/CL)フラグメントを有する)発現ベクターpHrに挿入して、組換えキメラ抗体完全長発現プラスミドVH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHrを構築して、5種のキメラ抗体Ch1705、Ch1706、Ch1780、Ch1773及びCh1779を得た。

【0251】

2. ヒト化抗体の分子クローニング

ヒト化抗体配列にコドン最適化を施した後は、ヒトコドン選好性を有するコーディング遺伝子配列が得られ;プライマーを設計して、PCRによって各抗体VH/VK遺伝子フラグメントを構築し、次いでこれを、相同組換えによって(シグナルペプチド及びhIgG1/h定常領域遺伝子(CH1-Fc/CL)フラグメントを有する)発現ベクターpHrにして、ヒト化抗体完全長発現プラスミドVH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHrを構築した。

【0252】

3. 組換えキメラ抗体及びヒト化抗体の発現及び精製

抗体軽鎖又は重鎖を発現したプラスミドを、HEK293E細胞に別々にトランスフェクションした。6日後、発現上清を収集し、高速で遠心分離して、不純物を除去し、プロテインAカラムによって精製した。A280測定値が低下してベースラインに至るまで、カラムをPBSによって洗浄した。pH3.0~pH3.5の酸性溶出バッファーによって標的タンパク質を溶出させ、pH8.0~9.0の1M Tris-HClによって中和した。溶出したサンプルを適切に濃縮し、PBSによってあらかじめ平衡させたゲルクロマトグラフィーSuperdex200(GE)によってさらに精製して、凝集物を除去し、モノマーピークを収集し、アリコート化して使用した。

【0253】

次の試験方法を使用して、本開示の抗体の性能及び有益な効果を確認した。

【0254】

インビトロ活性の生物学的評価

試験例1. Biacoreアッセイによる異なる種のIL-5へのマウスIL-5抗体の結合

試験すべきマウスIL-5抗体とヒトIL-5とのアフィニティを、Biacore T200(GE)機器によって測定した。

【0255】

プロテインAバイオセンサチップを使用して、試験すべき分子をアフィニティ捕捉した後、抗原(実施例1において調製された組換えヒト及びカニクイザルIL-5)がチップの表面を流れて通過したら、Biacore T200機器によって反応シグナルをリアルタイムで検出して、結合曲線及び解離曲線を得た。各実験サイクルの解離が完了したら、バイオセンサチップを洗浄し、グリシン-塩酸再生溶液(pH1.5)によって再生した。BIA評価バージョン4.1 GEソフトウェアを使用して、(1:1)Langmuirモデルに対してデータを当てはめ、アフィニティ値を得て表13に示した。

【0256】

10

20

30

40

【表 1 3】

表 1 3. B I A c o r e アッセイによるマウス I L - 5 抗体と異なる種の I L - 5 とのアフィニティの結果

抗原	KD (M)				
	mAb1705	mAb1706	mAb1780	mAb1773	mAb1779
ヒト I L - 5	7.27E-11	3.83E-11	8.99E-11	1.29E-10	4.58E-10
カニクイザル I L - 5	2.05E-10	2.77E-10	3.12E-10	4.76E-10	9.98 E-9

10

【 0 2 5 7】

この例は、本開示の抗体 m A b 1 7 0 5、m A b 1 7 0 6、m A b 1 7 8 0、m A b 1 7 7 3 及び m A b 1 7 7 9 が、異なる種の I L - 5 (ヒト、サル) に対する高いアフィニティを有することを実証している。

【 0 2 5 8】

試験例 2 . B i a c o r e アッセイによる異なる種の I L - 5 に対するヒト化 I L - 5 抗体のアフィニティ

試験すべきヒト化 I L - 5 抗体とヒト I L - 5 とのアフィニティを、B i a c o r e T 2 0 0 (G E) 機器によって測定した。

20

【 0 2 5 9】

プロテイン A バイオセンサチップを使用して、試験すべき分子をアフィニティ捕捉した後、抗原 (例 1 において調製) がチップの表面を流れて通過したら、B i a c o r e T 2 0 0 機器によって反応シグナルをリアルタイムで検出して、結合曲線及び解離曲線を得た。各実験サイクルの解離が完了したら、バイオセンサチップを洗浄し、グリシン - 塩酸型再生溶液 (p H 1 . 5) によって再生した。B I A 評価バージョン 4 . 1 G E ソフトウェアを使用して、(1 : 1) L a n g m u i r モデルに対してデータを当てはめ、アフィニティ値を得て表 1 4 に示した。

【 0 2 6 0】

30

40

50

【表 1 4】

表 1 4. B I A c o r e アッセイによるヒト I L - 5 に対する
ヒト化 I L - 5 抗体のアフィニティの結果

抗体	KD(M)	抗体	KD(M)
h1705-003	3.35E-09	h1706-003	1.89E-11
h1705-006	4.11E-09	h1706-006	1.73E-11
h1705-009	4.55E-09	h1706-009	5.45E-11
h1705-004	2.14E-11	h1780-017	7.78E-11
h1705-007	2.21E-11	h1773-007	2.07E-10
h1705-010	2.05E-11	h1779-014	4.12E-10
h1705-005	2.16E-11		
h1705-008	3.42E-11		
h1705-011	2.30E-11		

10

20

【 0 2 6 1】

上記結果により、すべてのヒト化 I L - 5 抗体は、ヒト I L - 5 に対する高いアフィニティを有することが示されている。

【 0 2 6 2】

試験例 3 . I L - 5 受容体への I L - 5 の結合を遮断するマウス I L - 5 抗体の E L I S A ベースアッセイ

組換え発現した I L - 5 受容体タンパク質の細胞外領域への I L - 5 の結合を遮断する I L - 5 抗体の能力を確認するために、I L - 5 (P B S 中の $5 \mu\text{g} / \text{ml}$) を E L I S A プレートに塗り、 37°C で 1 時間インキュベートし；液体を取り除き、P B S によって希釈した $200 \mu\text{l} / \text{well}$ の 5 % 脱脂乳ブロッキング溶液を加え、ブロッキングのためにお 37°C のインキュベーター内で 2 . 5 時間インキュベートした。ブロッキング後、ブロッキング溶液を除去し、プレートを P B S T バッファー (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を含む $\text{pH} 7 . 4$ の P B S) によって 5 回洗浄し；ビオチン標識キット (T o j i n C h e m i c a l , L K 0 3) によって標識された $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の I L - 5 R (1 % B S A 中) $25 \mu\text{l}$ を加えた後、勾配希釈された $25 \mu\text{l}$ の抗体を加え (抗体は、I L - 5 との結合に関しては I L - 5 R と競合した。) 、 37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、マイクロタイタープレート中の反応溶液を取り除き、プレートを P B S T によって 5 回洗浄し、サンプル希釈溶液によって 1 : 6 0 0 に希釈された $50 \mu\text{l} / \text{well}$ のストレプトアビジン - ペルオキシダーゼポリマー (S i g m a , S 2 4 3 8 - 2 5 0 U G) を加え、 37°C で 1 時間インキュベートした。プレートを P B S T によって 5 回洗浄し、 $50 \mu\text{l} / \text{well}$ の T M B 発色基質 (K P L , 5 2 - 0 0 - 0 3) を加え、室温で 3 ~ 1 0 分間インキュベートし； $50 \mu\text{l} / \text{well}$ の 1 M H_2SO_4 を加えて、反応を停止させ；NOVOSTAR マイブプレートリーダーを使用して、 450nm における吸光度の値を読み取り；I L - 5 R への I L - 5 の結合を遮断する I L - 5 抗体の I C 50 値を計算した。その結果は、表 1 5 に示されている。本開示の抗体は、I L - 5 受容体への I L - 5 の結合を効果的に阻害することができる。

30

40

【 0 2 6 3】

50

【表 15】

表 15. IL-5 α 受容体への IL-5 の結合を遮断するマウス IL-5 抗体の ELISA の結果

	mAb1705	mAb1706
IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	0.42	0.40

10

【0264】

試験例 4. IL-5 受容体への IL-5 の結合を遮断する IL-5 抗体の FACS ベースアッセイ

細胞表面上の IL-5 受容体を遮断することができるスクリーニングされた IL-5 抗体を確認するために、IL-5 R / という 2 種の受容体を高発現させる CHO S 組換え細胞株を構築した。この実験により、IL-5 抗体はそれぞれ、それぞれ CHO S 細胞株の表面上の組換え IL-5 / 受容体への IL-5 の結合を遮断できることが実証された。

【0265】

特定の方法は、次のとおりだった。100 ng/ml の G418 及び 25 ng/ml の zeozin を含む CD-CHO を使用して、CHO-S-IL-5 R 及び を培養した。細胞培養中、濃度は、 3×10^6 細胞/ml を超えるべきではない。良好な状態の IL-5 R / -CHO S 細胞を (1000 rpm で 5 分間) 遠心分離し、PBS 中の 10% FBS によって 1 回洗浄し、細胞をカウントし、細胞濃度を 4×10^6 細胞/ml に調整し、25 μl を取り出し、丸底 96 ウェルプレートに加えた。試験すべき抗体を、10% FBS を含む PBS 溶液によって希釈した。初期濃度は 200 $\mu\text{g/ml}$ だったが、8 種の勾配希釈物になるように 1:10 に希釈した。ビオチン標識キット (Tojin Chemical, LK03) によって標識された 100 ng/ml の IL-5 25 μl を加え、各濃度の希釈抗体 50 μl と完全に混合したら、細胞を加えておいた 96 ウェルプレートに加え、4 で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルを 4 で遠心分離 (400 g、5 分間) し、上清を取り除き、プレートを、あらかじめ冷却した 200 μl の PBS を用いた遠心分離によって洗浄し、これを 2 回繰り返す; 1:1333 に希釈された PE-Avidin 二次抗体を加え、暗所において 4 で 40 分間インキュベートし、4 (400 g、5 分) で遠心分離し; 上清を除去し、あらかじめ冷却した 200 μl の PBS を加えて、細胞をピペティングし; プレートを遠心分離によって 4 で 3 回洗浄し; 100 μl の PBS を加え、プレートを機械で読み取り; IL-5 R / への IL-5 の結合を遮断する IL-5 抗体の IC50 値を、蛍光シグナル値によって計算した。その結果は、表 16 及び図 1 に示されている。

【0266】

【表 16】

表 16. IL-5 R α/β への IL-5 の結合を遮断する IL-5 抗体の試験結果

抗体	IgG	hu39D10	h1705-008	h1706-009	h1780-017	h1779-014
IC50 (ng/ml)	8777	25.07	14.51	24.74	16	49.64

【0267】

上記結果により、抗体 h1705-008、h1706-009、h1780-017 及び h1779-014 は、細胞表面上の IL-5 受容体への IL-5 の結合を遮断する

50

強力な能力を呈することが示されている。

【 0 2 6 8 】

試験例 5 . I L - 5 抗体は、I L - 5 によって誘導される T F 1 細胞の増殖を阻害する

I L - 5 は、T F - 1 細胞の増殖を誘導することが可能であり、I L - 5 抗体は、I L - 5 が、T F - 1 細胞の増殖を刺激しないようにすることができる。

具体的には、T F - 1 細胞 (T C C 、 C R L - 2 0 0 3) を、1 0 % F B S 及び 2 n g / m L の r h G M - C S F (L I N K B i o 、 カ タ ロ グ 番 号 9 6 - A F - 3 0 0 - 0 3 - 2 0) を含む R P M I 1 6 4 0 中で培養し、3 7 ° C 、 5 % C O ₂ インキュベーターに入れたが、細胞密度は、1 × 1 0 ⁶ 細胞 / m l を超えない。抗体を検出するために、対数増殖期の細胞を P B S によって 3 回洗浄し、8 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し ; R P M I 1 6 4 0 (F B S : 2 % 、 組 換 え ヒ ト I L - 5 : 1 0 n g / m l) を用いて、細胞密度を 6 0 0 0 細胞 / w e l l / 9 0 μ l に調整し ; 勾配希釈された試験すべき抗体 1 0 μ l を、培養するために 9 6 ウェルプレートに加え、培養から 3 日後、3 0 μ l の細胞タイター溶液を加え、検出のために混合し、I C 5 0 を測定値によって計算した。試験結果は、以下の表 1 7 に示されている。

【 0 2 6 9 】

【 表 1 7 】

表 1 7 . I L - 5 によって誘導される T F 1 細胞の増殖を阻害する I L - 5 ヒト化抗体の試験結果

抗体	IC50 (nM)	抗体	IC50 (nM)
Hu39D10	0.30	h1706-003	0.31
h1705-004	0.30	h1706-004	0.30
h1705-005	0.30	h1706-006	0.34
h1705-007	0.25	h1706-007	0.28
h1705-008	0.20	h1706-009	0.25
h1705-010	0.30	h1773-007	0.38
h1705-011	0.28	h1780-017	0.16
		h1779-014	0.20

【 0 2 7 0 】

試験例 6 . I L 5 によって誘導される好酸球の接着を阻害する I L 5 抗体の試験

I L 5 は、好酸球の分化、成熟、遊走及び活性化を誘導し、呼吸器の炎症を起こし、ぜんそくを発症させる可能性がある。この実験は、I L - 5 サイトカインが好酸球の接着及び活性化を促進できる原理に基づいている。ヒト末梢血から好酸球を収集し、精製して、I L - 5 経路に対する I L - 5 特異的抗体の遮断効果を試験し、インビトロで I L 5 によって媒介される好酸球の接着に対する I L - 5 抗体の遮断効果を検出した。

【 0 2 7 1 】

具体的には、ヒト末梢血を、2 m M E D T A を含む P B S によって 5 倍希釈し、P e r c o l l (商 標) (1 . 0 8 8 の 密 度 勾 配) を使用して、単球及び顆粒球を単離した。顆粒球を含む赤血球層を慎重に吸引し、赤血球溶解溶液を使用して、赤血球を除去し ; 残存の細胞をカウントし、C D 1 6 抗体を備える分離用磁性ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c 、 カ タ ロ グ 番 号 1 3 0 - 0 4 5 - 7 0 1) を 相 応 に 加 え 、 3 0 分 間 インキュベートし、磁性ビーズカラムに流して通過させ、分集団 (主に好酸球) はカラムに直接流して通過させ、負の選択によって収集した。単離された好酸球をカウントし、I g G 抗体をあらかじめ塗っておいた 9 6 ウェル細胞培養プレートに、ウェル 1 個当たり約 1 × 1 0 ⁴

個の細胞になるように加え；異なる濃度（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ から出発で、3 倍希釈、10 点の濃度点）のヒト IL - 5（ $20 \text{ ng}/\text{ml}$ ）及び IL - 5 抗体分子を加え；細胞培養プレート（37 °C の 5 % CO_2 インキュベーターに入れ、1 時間インキュベートした後、培養プレートを取り出し、0.3 % CTAB を加えて、細胞を溶解させ、最後に、ペルオキシダーゼ反応基質 TMB を加えて発色させ、OD 450 吸収値をマイプロプレートリーダーによって読み取った。IL - 5 のみを加えられたウェルの測定値は、最大吸収値であり；IL - 5 及び抗体型作用物質を不含のウェルは、バックグラウンドコントロールとして採用し；最大吸着値に対する各濃度における抗体型作用物質の阻害値を計算し =（最大吸着値 - [抗体型作用物質]）/（最大吸着値 - バックグラウンドコントロール値） $\times 100\%$ 、IC50 を計算した。その結果は、表 18 に示されている。

10

【0272】

【表 18】

表 18. IL-5 抗体は、IL-5 によって誘導される好酸球の接着を遮断する

	Hu39D10	h1705-008	h1706-009	h1780-017
IC50 (ng/ml)	11.79	4.85	4.3	21.19

【0273】

20

上記結果により、本開示のヒト化抗体は、IL5 によって媒介される好酸球の接着を遮断する強力な能力を呈することが示されている。

【0274】

試験例 7. Th2 サイトカインに対するヒト化 IL - 5 抗体の特異性の評価

IL - 5 は、Th2 サイトカインのうちの 1 つだった。IL - 5 抗体が IL - 5 のみを特異的にターゲティングし、他のサイトカインとの間で交差反応しないことを確認するために、Fortebio して、IL - 5 との間で 受容体を共有する、IL2 (R&D、202-IL-010/CF)、IL4 (R&D、204-IL-050/CF)、IL - 5 (R&D、205-IL-025/CF)、IFN γ 、IL6 (R&D、7270-IL-025/CF)、IL9 (R&D、209-IL-010/CF)、IL10 (R&D、217-IL-025/CF)、IL13 (R&D、213-ILB-025/CF)、IL25 (R&D、8134-IL-025/CF)、IL31 (R&D、2824-IL-010/CF) 及び IL3 (203-IL-050/CF) 並びに GMCSF (R&D、215-GM-010/CF) を含む 12 種類の Th2 及び関連サイトカインを検出した。

30

【0275】

具体的には、プロテイン A バイオセンサー (PAL L Fortebio、18-5010) を使用して、抗体を捕捉し、捕捉シグナルを記録した後、40 nM サイトカインのそれぞれを注入し、結合シグナルを記録した。最後に、IL - 5 との結合シグナルを 100 % として規定した。他のサイトカインと抗体との結合シグナルを観察したが、その結果は、図 2 に示されている。

40

【0276】

上記結果により、12 種の関連サイトカインの中でも、ヒト化 IL - 5 抗体 h1705-008 及び h1706-009 のみは、IL - 5 に特異的に結合し、他の Th2 サイトカインとの交差反応性を有さないことが示されている。

【0277】

インビボ活性の生物学的評価

試験例 8. OVA 誘導性マウスぜんそくモデルにおける IL - 5 抗体の有効性の評価

この試験は、気道炎症反応及び気道リモデリングに基づいて、オバルブミン (OVA) エアロゾルによって誘導された BALB / c マウスぜんそくモデルにおける IL - 5 抗体

50

の有効性を評価する。

【0278】

マウスは体重に応じて、各群が10匹のマウスを含むように7つの群にランダムに分けられた：正常コントロール群（G1）；モデル群（G2）；試験すべき抗体のそれぞれが2種の用量（10mpk及び2mpk）のときの、試験すべき2種の抗体の処置群h1705-008（G3及びG4）及びh1706-009（G5及びG6）；並びに、陽性抗体Hu39D10コントロール群（G7、10mpk）。1日目及び14日目には、すべてのマウスを、アレルゲン溶液の腹腔内注射によって感作した。28日目、29日目及び30日目には、エアロゾルOVA惹起溶液により、6つのマウス群（第1の群を除く）に30分間チャレンジした。チャレンジの2時間前に、第2の群（G2）にリン酸バッファ

10

【0279】

31日目には、WBPシステムを使用して、動物の気道過敏性を試験した。すべての動物には、2倍に増えていく濃度（1.5625mg/mL、3.125mg/mL、6.25mg/mL、12.5mg/mL、25mg/mL及び50mg/mL）のメタコリンを摂取するように、エアロゾルによって投与し、対応する濃度における呼吸休止期の延長（respiratory enhanced pause）の値を測定した。

20

【0280】

31日目には、WBPシステムによる気道過敏性の検出から1時間後、直径1.2mmの気管チューブを気管に挿入して固定し、肺洗浄を2回実施したが、毎回、1%BSA及び0.6mM EDTAを含む0.8mLリン酸バッファを用いて実施した。洗浄液の回収体積を記録した。

【0281】

BALFを、300gにおいて4で5分間遠心分離した。上清は、サイトカイン分析のために維持した。遠心分離後には、細胞を1.5mLのPBS（1%BSA及び0.6mM EDTAを含む）に再懸濁させて、細胞をカウントした。血球計数機及びトリパンブルー染色実験を用いて、BALF中の細胞の総数をカウントした。細胞をスライドになすりつけ、ライト染色溶液によって1分間染色し、次いで、ギムザ染色によって7分間染色して、好酸球、好中球、マクロファージ及びリンパ球を識別した。光学顕微鏡下でカウントした。

30

【0282】

洗浄後、肺組織を収集し、10%中性ホルムアルデヒド溶液によって染色した後、10%中性ホルムアルデヒド溶液中に固定した。固定組織をパラフィンに包埋し、トリミングし、H&Eによって染色し、スコア付けした。試験結果は、図3、図4A及び図4Bに示されている。

【0283】

上記結果により、本開示の抗体分子h1705-008及びh1706-009は、用量依存的に肺機能を有意に改善することができるが、高用量（10mpk）の陽性化合物は、肺機能を改善できないことが示されている（図3を参照されたい。）。一方、2種の抗体は、同じ用量（10mpk）で好酸球のレベル及び粘膜の厚さを有意に減少させており、陽性抗体のものより強力な好酸球減少能力を示している（図4A及び図4Bを参照されたい。）。同じ種類のマウスぜんそくモデルにおいて、繰返し実験により、1mg/mLのh1705-008、h1706-009及びh1780-017が、陽性抗体の場合に比べてBALF中における好酸球のレベルを有意に低下させることも確認した（図4Cを参照されたい。）。

40

【0284】

50

試験例 9 . 外因性ヒト IL - 5 によって誘導されたモルモット急性ぜんそくモデルにおける IL - 5 抗体のインビボ有効性の評価

この実験においては、雄モルモットを選択して、ヒト IL - 5 によって誘導された急性ぜんそくモデルを確立し、これにより、ヒト IL - 5 によって誘導されたモルモット肺の気管支洗浄液 (BALF) 中における好酸球の増加に対する、本開示の 5 種の IL - 5 ヒト化 mAb の阻害効果を評価したが ; hu39D10 を陽性抗体として使用した。モルモットは、それぞれが 8 ~ 10 匹の動物を含む 9 つの群に分けられた : 正常コントロール群、モデル群、hu39D10 (1 mg / kg) 群、h1705 - 008 (1 mg / kg) 群、h1706 - 009 (1 mg / kg) 群、h1780 - 017 (1 mg / kg) 群、h1773 - 007 (1 mg / kg) 群及び h1779 - 014 (1 mg / kg) 群。モデル群及び投与群のモルモットのそれぞれには、1 日目に刺激のために 100 µl のヒト IL 5 (5 µg の IL 5 抗原を含む) を気管経由で注入し ; 正常コントロール群には、PBS を気管経由で注入した。投与群には、刺激の 2 時間前に 5 ml / kg の投与量になるように、1 mg / kg の上記 IL 5 モノクローナル抗体を腹腔内注射し ; モデル群には、対応する IgG 抗体を投与し ; 正常コントロール群には、PBS 溶媒を腹腔内投与した。モルモットには、気管への注入から 24 時間後に麻酔をかけ、肺気管支洗浄液を抜き出した。細胞濃度を 5×10^6 / ml に調整し、15 µl をスライドに滴下し、乾燥させて固定し ; HE 染色を実施し、全細胞の数及び好酸球の数を 400 倍の顕微鏡下でカウントし、好酸球の百分率を計算した。その結果は、図 5 A 及び図 5 B に示されており、本開示の 5 種のヒト化抗体が、BALF 中における好酸球のレベルを有意に低下させることが示されている。

10

20

【0285】

製剤中における成分の選択及び安定性評価

抗体の医薬組成物 (製剤) のための例示的な調製プロセス :

ステップ 1 :

ある特定の量の精製済みの抗 IL - 5 抗体溶液をとり、抗体不含バッファー (pH 5 . 5 の 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー等) を使用して、(好ましくは限外ろ過によって) 溶媒交換を置き換え ; 少なくとも 6 倍の体積を限外ろ過膜によって交換し、タンパク質を約 120 mg / mL に濃縮した。スクロースの最終濃度が 72 mg / mL になるように、ある特定の体積のスクロースストック溶液を加え、混合した。ポリソルベート 80 の最終濃度が 0 . 4 mg / mL になるように、ある特定の体積のポリソルベート 80 ストック溶液を加え、混合した。ある特定の体積になるまで、pH 5 . 5 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファーを加えることにより、タンパク質濃度を 100 mg / mL にした (試験すべき他の製剤又は安定な製剤も、同様のステップに従って調製した。)。

30

【0286】

上記生産物をろ過した後、病原性作用物質が存在しないように集中管理方式のサンプリングによって試験した。ストック溶液を 0 . 22 µm PVD F フィルターに通し、ろ液を収集した。

【0287】

ステップ 2 :

体積を 1 . 2 ml に調整し、栓を装着した 2 ml バイアルにろ液を充填し、チャレンジの開始時、中頃及び終了時に集中管理方式のサンプリングを実施して、チャレンジ体積の差を検出した。

40

【0288】

ステップ 3 :

フタ付け機を始動させて、アルミニウム製のフタを装着し、フタ付けを実施した。

【0289】

ステップ 4 :

目視検査を実施して、不正確な充填等の欠陥が生産物にないことを確認した。バイアルラベルを印刷して貼り付け ; カートンラベルを印刷し ; カートンを折りたたんで梱包し ;

50

箱のラベルを貼り付けた。

【 0 2 9 0 】

試験例 1 0 . バッファー系のスクリーニング

タンパク質濃度が 1 0 0 m g / m L の h 1 7 0 5 - 0 0 8 製剤を、p H 5 . 0 ~ 6 . 5 の一連のバッファー中に調製したが、振とう用サンプルは、0 . 2 m g / m l のポリソルベート 8 0 (P S 8 0) を含み、他のサンプルは、0 . 0 5 m g / m L の P S 8 0 を含んでいた。バッファー系は、次のとおりだった：p H 5 . 0、5 . 5 の 1 0 m M 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー (A A) ; p H 5 . 0、5 . 5、6 . 0 の 1 0 m M コハク酸 - コハク酸ナトリウムバッファー (S A) ; p H 5 . 5、6 . 0、6 . 5 の 1 0 m M クエン酸 - クエン酸ナトリウムバッファー (C A) ; p H 5 . 5、6 . 0、6 . 5 の 1 0 m M ヒスチジン - 塩酸塩バッファー (H i s) ; p H 6 . 0、6 . 5 の 1 0 m M リン酸バッファー (P B) 。各製剤をろ過し、充填し、栓を装着し、フタをつけた。サンプルを強制分解実験に供し；外観、S E C、i C I E F は、評価指標として採用した。

10

【 0 2 9 1 】

上記の結果は、表 1 9 に示されている。外観データにより、振とう (3 0 0 r p m、2 5) されたサンプル及び 4 0 のサンプルは、様々な度合いの粒子形成を呈することが示されている。概して、外観は、p H が低下するほど良化し、酢酸 - 酢酸ナトリウム及びコハク酸 - コハク酸ナトリウムのバッファー系は良化しており；S E C データにより、A A p H 5 . 5 群は、4 0 ではわずかに良化していることが示されており；i C I E F データにより、A A p H 5 . 5 群、H i s p H 5 . 5 群、C A p H 6 . 5 群は、4 0 ではわずかに良化していることが示されているが；物理的及び化学的安定性を総合的に考慮すると、p H 5 . 5 の A A が好ましい。

20

【 0 2 9 2 】

30

40

50

【表 19 - 1】

表 19. pH及びバッファー系に関するスクリーニングの結果

バッチ番号	条件	外観	SEC (%)	iCIEF 中性ピーク (%)
01 AA5.0	T0	透明	98.3	75.3
	D 4 振とう	透明	96.2	N/A
	40℃-D13	微粒子	94.8	62.3
02 AA5.5	T0	透明	98.0	75.4
	D 4 振とう	透明	96.0	N/A
	40℃-D13	綿状小型粒子	95.4	64.2
03 SA5.0	T0	透明	98.2	74.9
	D 4 振とう	透明	96.5	N/A
	40℃-D13	微粒子+	94.8	59.3
04 SA5.5	T0	透明	98.2	74.7
	D 4 振とう	大量の小型粒子	96.2	N/A
	40℃-D13	小型粒子	94.8	62.1
05 SA6.0	T0	透明	97.9	75.8
	D 4 振とう	透明、わずかに乳光あり	95.7	N/A
	40℃-D13	小型粒子	95.0	63.7
06 His5.5	T0	透明	98.2	75.7
	D 4 振とう	透明、粒子はほとんどなし	96.2	N/A
	40℃-D13	小型粒子	94.9	64.8
07 His6.0	T0	透明	98.3	74.6
	D 4 振とう	大量の粒子	96.2	N/A
	40℃-D13	中型粒子	94.6	65.8
08 His6.5	T0	透明	98.1	74.6
	D 4 振とう	重度の乳光あり	95.8	N/A
	40℃-D13	中型粒子	94.3	62.3
09	T0	透明	98.2	74.8

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

バッチ番号	条件	外観	SEC (%)	iCIEF 中性ピーク (%)
CA5.5	D 4 振とう	透明、わずかに乳光あり	N/A	N/A
	40℃-D13	微粒子	94.7	60.9
10 CA6.0	T0	透明	98.0	75.3
	D 4 振とう	明白な乳光あり、大量の粒子	N/A	N/A
	40℃-D13	中型粒子	94.6	61.5
11 CA6.5	T0	透明	97.9	74.6
	D 4 振とう	重度の乳光あり、大量の粒子	N/A	N/A
	40℃-D13	小型粒子	95.0	64.4
12 PB6.0	T0	透明	98.0	74.4
	D 4 振とう	粒子あり	N/A	N/A
	40℃-D13	微粒子	94.3	63.0
13 PB6.5	T0	透明	97.9	74.7
	D 4 振とう	重度の乳光あり、大量の粒子	N/A	N/A
	40℃-D13	大型粒子	93.9	61.9

注記：N/Aは、検出なしを表し、Dは、日数を表し、T0は、0日目を表す。

【0293】

試験例11．製剤中の賦形剤のスクリーニング

タンパク質濃度が100mg/mLのh1705-008製剤を、下記の様々な種類の賦形剤を含む10mM SA(pH5.0)バッファー中に調製した。特に、賦形剤は、以下のとおりだった：

- 1) 0.1mg/mLのポリソルベート20(PS20)
- 2) 0.1mg/mLのポリソルベート80(PS80)
- 3) 50mg/mLのスクロース+0.1mg/mLのPS80
- 4) 50mg/mLのトレハロース+0.1mg/mLのPS80
- 5) 50mg/mLのマニトール+0.1mg/mLのPS80
- 6) 50mg/mLのソルビトール+0.1mg/mLのPS80
- 7) 8mg/mLのアルギニン(Arg)+0.1mg/mLのPS80
- 8) 8mg/mLのリシン(Lys)+0.1mg/mLのPS80
- 9) 8mg/mLのグリシン(Gly)+0.1mg/mLのPS80
- 10) 8mg/mLのメチオニン(Met)+0.1mg/mLのPS80
- 11) 8mg/mLのプロリン(Pro)+0.1mg/mLのPS80
- 12) 8mg/mLの塩化ナトリウム(NaCl)+0.1mg/mLのPS80。

各製剤をろ過し、充填し、栓を装着し、フタをつけて使用に供した。サンプルは、40における強制分解実験に供したが、その結果により、次のことが示されている(表20)。各サンプル群間には、SEC、CE及びiCIEFの試験結果に有意差がなく、Arg/Lys/NaCl群は外観が劣っているが、他の群間には有意差がない。スクロース、トレハロース、マニトール、ソルビトール、グリシン、プロリン及びメチオニンは、タンパク質の安定性に好ましい影響を与える。

【0294】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表 2 0 . 賦形剤のスクリーニングの結果

バッチ 番号	状態	外観	SEC (%)	iCIEF 中性ピーク(%)	CE-SDS (%)
1	D0	透明	96.6	75.16	95.05
	40°C D12	透明	94.29	59.24	93.53
2	D0	透明	96.64	74.39	94.96
	40°C D12	透明	94.33	58.99	93.31
3	D0	透明	96.59	74.51	95.44
	40°C D12	透明	94.33	58.33	93.3
4	D0	透明	96.63	74.87	95.26
	40°C D12	透明	94.43	58.14	93.68
5	D0	透明	96.63	74.8	95.33
	40°C D12	透明	94.47	59.79	93.43
6	D0	透明	96.63	74.25	95.29
	40°C D12	透明	94.39	58.04	93.41
7	D0	透明、軽度の乳光あり	96.6	74.31	95.19
	40°C D12	乳光あり、大量の粒子	94.27	59.18	93.45
8	D0	透明、軽度の乳光あり	96.56	74.7	95.2
	40°C D12	乳光あり	94.26	59.62	93.56
9	D0	透明	96.54	73.77	95.47
	40°C D12	透明	94.38	58.82	93.56
10	D0	透明	96.56	75.68	95.5
	40°C D12	透明	94.45	59.57	93.71
11	D0	透明	96.43	75.22	95.02
	40°C D12	透明	94.47	61.1	95.32
12	D0	透明、乳光あり	96.51	73.63	95.02
	40°C D12	乳光あり、大量の粒子	93.99	60.51	93.21

注記：D は、日数を表す。

【 0 2 9 5】

試験例 1 2 . 界面活性剤のスクリーニング

pH 5 . 5 の 1 0 m M S A、7 0 m g / m l のスクロース、0 . 4 m g / m l の P S 2 0 又は P S 8 0 を含む h 1 7 0 5 - 0 0 8 製剤を、タンパク質濃度が 1 0 0 m g / m l になるように調製した。

【 0 2 9 6】

サンプルを 4 に置いて、安定性を調査した。その結果は、表 2 1 に示されている。その結果により、P S 8 0 群は、4 においては 4 か月間にわたって透明な外観を呈し、S E C、C E 及び i C I E F の有意な変化を呈さないことが示されており、このことは、好ましい安定性を示しているが；P S 2 0 群においては、大量の粒子が観察されている。し

たがって、P S 8 0 は、P S 2 0 より良好である。さらに、製剤への P S 8 0 の添加は、より良好な安定化効果を h 1 7 0 5 - 0 0 8 に及ぼしており、製剤の安定性が良化していることも分かる。

【 0 2 9 7 】

【表 2 1】

表 2 1. 4℃における h 1 7 0 5 - 0 0 8 の安定性の結果

群	時間 (M)	外観	SEC (%)	非還元型 CE-SDS (%)	iCIEF 中性ピーク (%)
PS80	0	透明	97.2	94.4	71.2
	4	透明	97.6	95.0	71.6
PS20	0	透明	97.1	94.3	72.7
	4	大量の粒子	N/A	N/A	N/A

注記：Mは、月数を表し；N / A は、検出なしを表す。

【 0 2 9 8 】

試験例 1 3 . D O E 製剤の設計及びスクリーニング

D O E (実験計画法) は、1 0 m M 酢酸バッファー (A A) の p H、タンパク質濃度及び T w e e n 濃度を変数として用いて実施され；一連の製剤は、次の因子及びレベルに基づいて設計した：p H は、5 . 0 ~ 5 . 8 であり、P S 8 0 の濃度は、0 . 2 ~ 0 . 6 m g / m L であり、抗体 h 1 7 0 5 - 0 0 8 の濃度は、8 0 ~ 1 2 0 m g / m L である。製剤は、表 2 2 に示されている。サンプルを 4 0 の高温で強制分解した。外観、S E C、非還元型 C E 及び i C I E F を、評価指標として使用した。その結果は、表 2 3 に示されている。

【 0 2 9 9 】

【表 2 2】

表 2 2. D O E 製剤に関するスクリーニング実験及び設計

バッチ番号	pH	PS80 (mg/mL)	タンパク質の量 (mg/mL)
1	5.8	0.2	80
2	5.4	0.6	100
3	5.4	0.4	80
4	5.0	0.2	80
5	5.4	0.2	100
6	5.8	0.6	80
7	5.0	0.2	120
8	5.0	0.6	80
9	5.8	0.6	120
10	5.4	0.4	120
11	5.4	0.4	100
12	5.0	0.6	120
13	5.8	0.2	120
14	5.0	0.4	100
15	5.8	0.4	100
16	5.4	0.4	100

10

20

【 0 3 0 0 】

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3. D O E 製剤のスクリーニング実験の結果

バッチ 番号	条件	外観	SEC (%)	iCIEF 中性 ピーク (%)	非還元型 CE-SDS (%)
1	D0	透明	98.9	63.9	93.8
	40°C D15	透明	97.8	49.9	92.5
2	D0	透明	98.9	64.5	93.8
	40°C D15	透明	97.5	49.8	92.9
3	D0	透明	98.9	64.3	94.0
	40°C D15	透明	97.6	49.6	92.2
4	D0	透明	99.0	63.6	93.9
	40°C D15	透明	97.7	50.3	92.4
5	D0	透明	98.9	63.4	93.8
	40°C D15	透明	97.6	49.7	92.2
6	D0	透明	98.9	63.5	93.9
	40°C D15	透明	97.7	51.5	92.4
7	D0	透明	98.9	64.3	93.7
	40°C D15	透明	97.6	49.2	92.4
8	D0	透明	99.0	64.4	93.9
	40°C D15	透明	97.7	49.6	92.3
9	D0	透明	98.7	66.2	93.8
	40°C D15	透明	97.3	50.6	92.4
10	D0	透明	98.8	64.1	93.9
	40°C D15	透明	97.4	50.9	92.3
11	D0	透明	98.8	64.5	94.0
	40°C D15	透明	97.5	50.6	92.4
12	D0	透明	99.0	64.4	93.7
	40°C D15	透明	97.6	49.9	92.3
13	D0	透明	98.8	63.7	93.8
	40°C D15	透明	97.4	50.8	92.6
14	D0	透明	99.0	63.6	93.9
	40°C D15	透明	97.7	50.9	92.1
15	D0	透明	98.8	63.0	93.6
	40°C D15	透明	97.6	51.1	92.4
16	D0	透明	98.8	64.9	93.8
	40°C D15	透明	97.5	50.0	92.3

注記：D は、日数を表す。

【 0 3 0 1】

上記結果により、各製剤の外観は、透明であり；SEC、CE 及び iCIEF は、それぞれ 2 % 未満、2 % 未満及び約 1 4 % 低下しているが許容範囲内であり；製剤の安定性は、好ましいものであることが示されており；したがって、製剤は、8 0 ~ 1 2 0 m g / m l のタンパク質濃度を有し、0 . 2 ~ 0 . 6 m g / m l の P S 8 0 を含み、5 . 0 ~ 5 . 8 の p H を有する。最適な製剤は、次のものである：1 0 0 m g / m l のタンパク質、0

． 4 m g / m l の P S 8 0 、 p H 5 . 5 。

【 0 3 0 2 】

試験例 1 4 . 安定性試験

p H 5 . 5 の 1 0 m M A A 、 7 0 m g / m l のスクロース及び 0 . 4 m g / m l の P S 8 0 を含む h 1 7 0 5 - 0 0 8 製剤を、タンパク質濃度が 1 0 0 m g / m l になるように調製し；サンプルは、 4 及び 2 5 で安定性の調査に供した。その結果は、表 2 4 に示されている。

【 0 3 0 3 】

上記結果により、高温条件下においては、h 1 7 0 5 - 0 0 8 製剤の S E C 、 C E 及び i C I E F がわずかに低下しているが、この低下は許容範囲内であり；他の条件下ではすべての指標に有意な変化がないことが示されている。製剤は、好ましい安定性を有し、6 か月以内までの 4 における h 1 7 0 5 - 0 0 8 の安定性を確実なものにすることができる。

【 0 3 0 4 】

【表 2 4 】

表 2 4 . 2 5 ° C 及び 4 ° C における h 1 7 0 5 - 0 0 8 の安定性の結果

条件	外観	SEC (%)	iCIEF 中性 ピーク (%)	非還元型 CE-SDS (%)
T0	透明	98.0	59.8	94.5
25°C -M3	透明	97.6	55.2	93.4
25°C -M6	透明	96.7	51.7	91.7
4°C -M3	透明	98.5	59.7	94.6
4°C -M6	透明	98.7	60.0	94.0

注記：Mは、月数を表す。

【 0 3 0 5 】

試験例 1 5 . イオン強度のスクリーニング

1 0 0 m g / m l のタンパク質濃度を有し、7 0 m g / m l のスクロース及び 0 . 4 m g / m l の P S 8 0 を含む h 1 7 0 5 - 0 0 8 製剤を、イオン強度が異なる（ナトリウム）酢酸バッファー中に調製し；交換のために使用されたバッファーの p H 及び最終的な製剤の p H を測定した。その結果は、表 2 5 に示されている。この結果により、イオン強度が高いほど、p H のずれが減少することが示されている。イオン強度が 3 0 m M である場合、p H のずれは、0 . 1 未満である。

【 0 3 0 6 】

【表 2 5 】

表 2 5 . イオン強度が異なる製剤の p H の結果

イオン強度	バッファーの p H	ストック溶液の形成の p H	△pH
10mM	5.50	5.71	0.21
20mM	5.50	5.66	0.16
30mM	5.50	5.59	0.09

【 0 3 0 7 】

試験例 16．糖の濃度のスクリーニング

100 mg/mL のタンパク質濃度を有し、pH 5.5 の 30 mM AA と、0.4 mg/mL の PS80 とを含む h1705-008 製剤を、濃度が異なるスクロースを含む後述のバッファー中に調製した。浸透圧を測定した。その結果は、表 26 に示されている。
【0308】

上記結果により、糖濃度が 70 ~ 75 mg/mL である場合、浸透圧は、290 ~ 310 mosm の最適な等張範囲であり；70 mg/mL 群及び 73 mg/mL 群の浸透圧データによれば、糖濃度が 72 mg/mL である場合、浸透圧は、約 300 mosm の最も良い値になることが示されている。

【0309】

【表 26】

10

表 26．糖濃度が異なる h1705-008 製剤の浸透圧の比較

糖の濃度 (mg/ml)	70	73	75
浸透圧 (mosm)	290	306	310

【0310】

試験例 17．製剤の安定性試験

100 mg/mL のタンパク質濃度を有し、pH 5.5 の 30 mM AA と、72 mg/mL のスクロースと、0.4 mg/mL の PS80 とを含む h1705-008 製剤を調製して、4 及び 25 における安定性を調査した。その結果は、表 27 に示されている。その結果により、高温条件下においては、h1705-008 製剤の SEC、CE 及び IEC がわずかに低下しているが、この低下は許容範囲内であり；4 条件ではすべての指標に有意な変化がないことが示されており、このことは、製剤が好ましい安定性を有することを示している。

【0311】

【表 27】

20

30

表 27．h1705-008 製剤の安定性

条件	外観	SEC (%)	IEC 中性ピーク (%)	非還元型 CE-SDS (%)
T0	透明	98.4	63.5	97.6
25°C -M3	N/A	96.8	55.0	96.5
4°C -M3	透明	98.4	61.9	97.3

40

注記：M は、月数を表し、T は、時間を表し、N/A は、検出なしを表す。

【0312】

試験例 18．さらなる任意選択による製剤

さらに、本開示は、抗 IL-5 抗体医薬製剤のためのさらなる配合も提供し、限定されるわけではないが、以下のものを含む：

(1) 1 mg/mL の抗 IL-5 抗体 (h1705-008)、72 mg/mL のスクロース、0.4 mg/mL のポリソルベート 80 及び pH 5.5 の 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(2) 100 mg/mL の抗 IL-5 抗体 (h1705-008)、72 mg/mL のスクロース、0.4 mg/mL のポリソルベート 80 及び pH 5.5 の 20 mM 酢酸 - 酢

50

酸ナトリウムバッファー；

(3) 120 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、72 mg / ml のスクロース、0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.5 の 40 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(4) 100 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、80 mg / ml のスクロース、0.6 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.0 の 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(5) 80 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、75 mg / ml のスクロース、0.6 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.4 の 20 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

10

(6) 100 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、80 mg / ml のスクロース、0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.5 の 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(7) 90 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、74 mg / ml のスクロース、0.5 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.6 の 25 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(8) 90 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、76 mg / ml のスクロース、0.3 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.4 の 35 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(9) 80 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、72 mg / ml のスクロース、0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.6 の 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

20

(10) 100 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、72 mg / ml のスクロース、0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.5 の 40 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー；

(11) 100 mg / ml の抗 IL - 5 抗体 (h 1 7 0 5 - 0 0 8)、80 mg / ml のスクロース、0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び pH 5.5 の 40 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー。

【0313】

上記実験結果により、上記 IL - 5 抗体製剤は、好ましい安定性を有し、IL - 5 抗体型作用物質の調製に応用することができることが示されている。

30

【0314】

試験例 19 . 抗 IL - 5 抗体製剤の凍結乾燥

72 mg / ml のスクロース、0.4 mg / ml のポリソルベート 80 及び 100 mg / ml の濃度の抗 IL - 5 抗体を含む h 1 7 0 5 - 0 0 8 抗体製剤を、pH 5.5 の 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウムバッファー中に調製した。抗体を 2.15 mL / バイアルで 6 mL バイアルに充填し、凍結乾燥のために凍結乾燥チャンバに入れた。凍結乾燥プロセスは、予備凍結、一次乾燥及び二次乾燥を含む。凍結乾燥プロセスが終わったら、バイアルを真空を適用し、栓を装着した。復元したサンプルは、凍結乾燥前の対応物と比較した。その結果により、復元溶液は、液体製剤の性能と同様の好ましい性能を維持できることが

40

【0315】

【表 2 8】

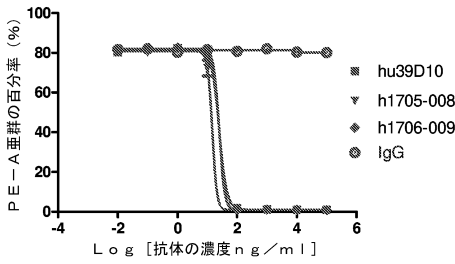
表 2 8. 製剤の凍結乾燥ステップ

凍結乾燥の プロセスパラメータ	温度設定 (℃)	真空度 (mBar)
予備凍結	5	N/A
	-45	N/A
一次乾燥	-27	0.1
二次乾燥	25	0.1
	25	0.01

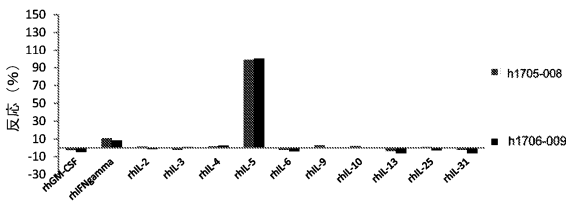
注記：N / A は、上記表が適用不可であることを表す。

【図面】

【図 1】

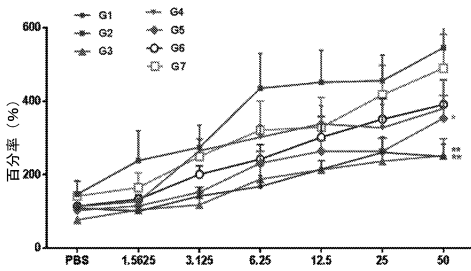


【図 2】

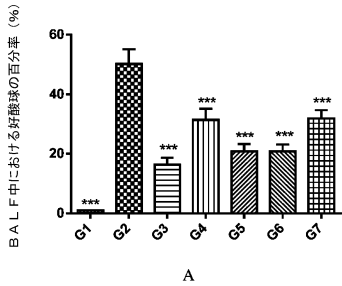


10

【図 3】

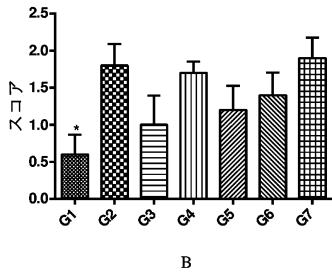


【図 4 A】

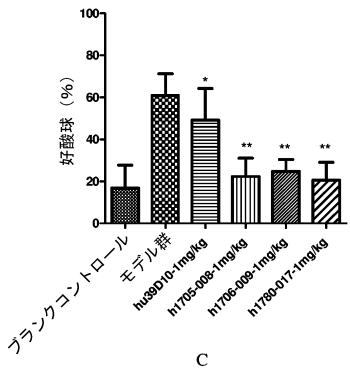


20

【図 4 B】



【図 4 C】

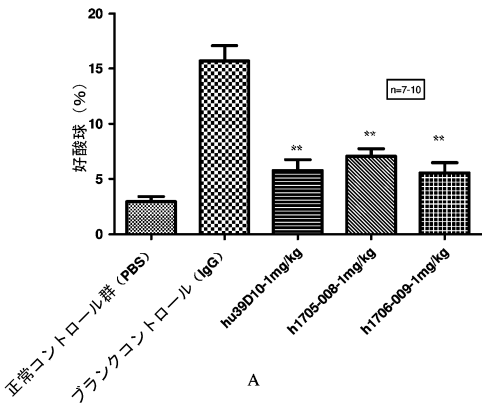


30

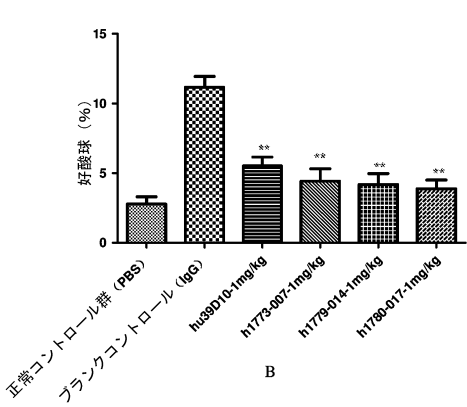
40

50

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



10

【 配列表 】

0007641908000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/18	(2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/04
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00

T D .

中華人民共和国 シャンハイ, ミンシン・ディストリクト, ウェンジン・ロード No. 279

(74)代理人 100147485

弁理士 杉村 憲司

(74)代理人 230118913

弁理士 杉村 光嗣

(74)代理人 100119530

弁理士 富田 和幸

(72)発明者 ウー ティンティン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバー 279

(72)発明者 リー ハオ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバー 279

(72)発明者 リウ シュン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバー 279

(72)発明者 タオ ウェイカン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード ナンバー 279

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特表2018-526369(JP, A)

国際公開第2018/226339(WO, A1)

J KANG; ET AL, RAPID FORMULATION DEVELOPMENT FOR MONOCLONAL ANTIBODIES - BIOPROCESS INTERNATIONAL, 【ONLINE】, 2016年04月12日, PAGE(S):1 - 5, <http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/formulation/rapid-formulation-development-for-monoclonal-antibodies/>

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Volume 78, Issue 2, 2011, Pages 208-212

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)