

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-506384

(P2012-506384A)

(43) 公表日 平成24年3月15日 (2012.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00 Z N A	4 C O 7 6
C 0 7 K 1/16 (2006.01)	C O 7 K 1/16	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 6
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-532334 (P2011-532334)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月20日 (2009.10.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年6月13日 (2011.6.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/061335
 (87) 国際公開番号 W02010/048190
 (87) 国際公開日 平成22年4月29日 (2010.4.29)
 (31) 優先権主張番号 61/196,752
 (32) 優先日 平成20年10月20日 (2008.10.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 10
 O
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ヒツクマン、ロバート・ケイ
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・O1
 605、ウースター、ハイビスカス・ドラ
 イブ・6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1 L - 1 2 に結合する抗体およびそれを精製する方法

(57) 【要約】

本明細書において、抗 I L - 1 2 抗体が開示され、これは、この抗原結合部分を包含する。試料母体から抗 I L - 1 2 抗体を単離および精製するための 1 つ以上の方法が示される。これらの単離された抗 I L - 1 2 抗体は、臨床現場および研究開発に使用することができる。単離された抗 I L - 1 2 抗体を含む医薬組成物も記載される。

• Anti-IL-12 Antibody (ABT-874) Heavy Chain Variable Region Sequence

```

1      10      20      30      40
QVQLVESGGG VVQFGRSLRL SCAASGPTFS SYGMHWVQA
CDR1

PGKSLBOVAF IRYDGSNKYY ADSVEGRFTI SRDNSKNFLY
CDR2

LQMNSLRARD TAVIYCKTHG SHDNWQQSTM VIVSS
CDR3

```

• Anti-IL-12 Antibody (ABT-874) Light Chain Variable Region Sequence

```

1      10      20      30      40
QSVLTQPFVS SGAPGQRTI SCSSGRBNIG SNTVKKVQQL
CDR1

PGTAPKLLIV YGNDQRPBGV PDRPSSGSGT SASLAITGVQ
CDR2

AEDEADYICQ SYDRIYHPAL LFGIGTKVTVLG
CDR3

```

FIG.1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗体および少なくとも 1 つの宿主細胞タンパク質 (H C P) を含む試料混合物から H C P 減少型抗体調製物を生成するための方法であって、

(a) 試料母体を p H の低下に供して一次回収試料を形成するステップであり、前記 p H の低下が 3 および 4 の間であるステップ、

(b) 前記一次回収試料を約 4 . 5 および 6 の間の p H に調整し、続いて前記一次回収試料をイオン交換樹脂に通し、イオン交換試料を収集するステップ、

(c) 前記イオン交換試料を疎水性相互作用クロマトグラフィ (H I C) 樹脂に通し、H I C 試料を収集するステップであり、前記 H I C 試料が前記 H C P 減少型抗体調製物を含むステップ

を含む、方法。

【請求項 2】

前記 p H の低下が、適した酸と前記試料混合物とを混合することによって達成され、ならびに前記適した酸が、クエン酸、酢酸、カプリル酸などから成る群から選択される、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記イオン交換樹脂が、陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂のいずれかである、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

前記イオン交換樹脂が陽イオン交換樹脂である、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

前記陽イオン交換樹脂が、カルボキシメチル (C M)、スルホエチル (S E)、スルホプロピル (S P)、リン酸 (P) およびスルホン酸 (S) から成る群から選択される、請求項 4 の方法。

【請求項 6】

前記陽イオン交換樹脂がカルボキシメチルである、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

前記イオン交換樹脂が陰イオン交換樹脂である、請求項 3 の方法。

【請求項 8】

前記陰イオン交換樹脂が、Q S e p h a r o s e、ジエチルアミノエチル (D E A E)、4 級アミノエチル (Q A E) および 4 級アミン (Q) 基から成る群から選択される、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

前記陰イオン交換樹脂が Q S e p h a r o s e である、請求項 8 の方法。

【請求項 10】

前記イオン交換ステップが、第 1 のイオン交換ステップおよび第 2 のイオン交換ステップを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 11】

前記第 1 のイオン交換ステップが陽イオン交換ステップであり、第 2 の陰イオン交換ステップが続く、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

前記第 1 および前記第 2 のイオン交換ステップの間に起こる濾過ステップである中間ステップをさらに含む、請求項 10 の方法。

【請求項 13】

前記濾過ステップが、捕獲限界濾過 / 透析濾過によって達成される、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

前記 H I C が、1 つ以上の疎水基を含むカラムを用いて達成される、請求項 1 の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記１つ以上の疎水基が、アルキル基、アリル基およびこれらの組合せから成る群から選択される、請求項１４の方法。

【請求項１６】

前記カラムが、Phenyl Sepharose (Phenyl Sepharose (商標) 6 Fast Flowカラム、Phenyl Sepharose (商標) High Performanceカラムなど)、Octyl Sepharose (商標) High Performanceカラム、Fractogel (商標) EMD Propyl、Fractogel (商標) EMD Phenylカラム、Macro-Prep (商標) Methyl、Macro-Prep (商標) t-Butyl Supports、WP HI-Propyl (C₃) (商標)カラムおよびToyopearl (商標) エーテル、フェニルまたはブチルカラムから成る群から選択される、請求項１４の方法。

10

【請求項１７】

前記カラムがPhenyl Sepharoseを含む、請求項１６の方法。

【請求項１８】

前記HIC試料を濾過に供してウイルス粒子を除去し、バッファー交換を促進させる、濾過ステップをさらに含む、請求項１の方法。

【請求項１９】

前記HCP減少型抗体調製物が、抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分を含む、請求項１の方法。

20

【請求項２０】

前記抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分が、ヒト化抗体、キメラ抗体または多価抗体である、請求項１９の方法。

【請求項２１】

前記抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分がヒト化抗体である、請求項２０の方法。

【請求項２２】

前記抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分が、共に表面プラズモン共鳴による測定にて約 1×10^{-8} M以下の K_d 速度定数および約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以下の K_{off} 速度定数でヒトIL-12から解離する単離されたヒト抗体である、請求項２０の方法。

30

【請求項２３】

前記抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分が、インビボおよびインビトロの両方でIL-12を中和する、請求項１９の方法。

【請求項２４】

前記調製物がHCPを実質的に含まない、請求項１の方法。

【請求項２５】

抗体および少なくとも１つの宿主細胞タンパク質(HCP)を含む試料混合物からHCP減少型抗体調製物を生成するための方法であって、

(a) 試料母体をpHの低下に供して一次回収試料を形成するステップであり、前記pHの低下が約3.5までであるステップ、

40

(b) 前記一次回収試料を約4.9のpHに調整し、続いて前記一次回収試料を陽イオン交換樹脂に通し、陽イオン交換試料を収集するステップ、

(c) 前記陽イオン交換試料を陰イオン交換樹脂に通し、陰イオン交換試料を収集するステップ、ならびに

(d) 前記陰イオン交換試料を疎水性相互作用クロマトグラフィ(HIC)樹脂に通し、HIC試料を収集するステップであり、前記HIC試料が、前記HCP減少型抗体調製物を含むステップ

を含む、方法。

【請求項２６】

抗体および少なくとも１つの宿主細胞タンパク質(HCP)を含む試料混合物からHCP

50

P 減少型抗体調製物を生成するための方法であって、

(a) 試料母体を pH の低下に供して一次回収試料を形成するステップであり、前記 pH の低下が約 3 . 5 までであるステップ、

(b) 前記一次回収試料を約 4 . 9 の pH に調整し、続いて前記一次回収試料を陽イオン交換樹脂に通し、陽イオン交換試料を収集するステップ、

(c) 前記陽イオン交換試料を濾過に供し、濾過物を収集するステップ、

(d) (c) からの前記濾過物を陰イオン交換樹脂に通し、陰イオン交換試料を収集するステップ、ならびに

(e) 前記陰イオン交換試料を疎水性相互作用クロマトグラフィ (H I C) 樹脂に通し、H I C 試料を収集するステップであり、前記 H I C 試料が、前記 H C P 減少型抗体調製物を含むステップ

10

を含む、方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 の方法によって生成される H C P 減少型抗体調製物および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記抗体が、抗 I L - 1 2 抗体またはこの抗原結合部分である、請求項 2 7 の医薬組成物。

【請求項 2 9】

H C P を実質的に含まない、請求項 2 7 の医薬組成物。

20

【請求項 3 0】

I L - 1 2 によって促進される障害を中和するために使用される、請求項 2 7 の医薬組成物。

【請求項 3 1】

前記障害が、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、皮膚炎 強皮症、アトピー性皮膚炎、移植片対宿主疾患、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、粥状動脈硬化、播種性血管内凝固、川崎病、グレーブス病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホシェー
ンライン紫斑、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ぶどう膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性、多腺性欠乏症 I 型および多腺性欠乏症 I I 型、シュミット症候群、成人 (急性) 呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎 (s e r o n e g a t i v e a r t h o p a t h y) 、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、関節症に伴うエルシニアおよびサルモネラ、脊椎関節症、アテローム性疾患 / 動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱症、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 I g A 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎 / ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、C 型肝炎、一般変異型免疫不全 (分類不能型低ガンマグロブリン血症) 、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、間質性肺疾患に伴う結合組織病、肺疾患に伴う混合性結合組織病、間質性肺疾患に伴う全身性硬化症、間質性肺疾患に伴う関節リウマチ、肺疾患に伴う全身性エリテマトーデス、肺疾患に伴う皮膚筋炎 / 多発性筋炎、肺疾患に伴うシェーグレン病、肺疾患に伴う強直性脊椎炎、血管炎性びまん性肺疾患、肺疾患に伴うヘモシデリン沈着症、薬剤性間質性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質

30

40

50

性肺疾患、痛風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖、黒色表皮腫を伴うB型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、骨関節症、原発性硬化性胆管炎、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患NOS、糸球体腎炎、顕微鏡的腎血管炎、ライム病、円板状エリテマトーデス、男性不妊特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（全サブタイプ）、インスリン依存性糖尿病、交感性眼炎、結合組織病に対する二次的な肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、ぶどう膜炎、原発性血管炎ならびに白斑から成る群から選択される、請求項30の医薬組成物。本発明のヒト抗体および抗体部分は、自己免疫疾患、特にリウマチ性脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病および自己免疫性ぶどう膜炎が挙げられる、炎症を伴う疾患を治療するために使用することができる。

10

【請求項32】

非ステロイド性またはステロイド性抗炎症薬をさらに含む、請求項27の医薬組成物。

【請求項33】

非ステロイド性抗炎症薬を含む、請求項32の医薬組成物。

20

【請求項34】

前記非ステロイド性抗炎症薬が、イブプロフェン、副腎皮質ステロイド、プレドニゾロンから成る群から選択される、請求項33の医薬組成物、

【請求項35】

ステロイド性抗炎症薬を含む、請求項32の医薬組成物。

【請求項36】

1つ以上の他の抗体またはこの抗原結合部分をさらに含む、請求項27の医薬組成物。

【請求項37】

医薬品をさらに含む、請求項27の医薬組成物。

【請求項38】

前記医薬品が、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリンスルファサラジン、メサラジン、オルサラジクロロキニン/ヒドロキシクロロキン、ペンシルアミン、金チオリンゴ酸、アザチオプリン、コチシン、副腎皮質ステロイド、 β -2アドレナリン受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル）、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリク酸、ネドクロミル、ケトチフェン、イブラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラバマイシン、ミコフェノレートモフェチル、レフルノミド、ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデンソシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害薬、アドレナリン系薬剤、TNF α またはIL-1などの炎症誘発性サイトカインによってシグナル伝達に干渉する薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤（例えばVx740）、抗P7、pセレクチン糖タンパク質リガンド（PSGL）、TNF α 変換酵素（TACE）阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体および誘導体p75TNFRIGG（Enbre1（商標））およびp55TNFRIGG（Lenercept）、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、可溶性IL-13受容体（sIL-13））および抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β ）から成る群から選択される、請求項37の医薬組成物。

30

40

【請求項39】

前記HCP減少型抗体調製物が、1つ以上の抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分

50

を含み、ならびに標識される、請求項 1、25 および 26 の方法。

【請求項 40】

前記標識が放射性である、請求項 39 の方法。

【請求項 41】

前記放射性標識が、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^3H から成る群から選択される、請求項 40 の方法。

【請求項 42】

前記標識が非放射性である、請求項 39 の方法。

【請求項 43】

前記 HCP 減少型抗体調製物が、1 つ以上の抗 IL - 12 抗体またはこの抗原結合部分を含み、ならびにペグ化される、請求項 1、25 および 26 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への参照)

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、2008 年 10 月 20 日に出願した米国仮出願第 61 / 196,752 号の利益を主張するものである。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ヒトインターロイキン 12 (IL - 12) は、独特の構造および多面的作用を有するサイトカインとして特徴づけられた。IL - 12 は、免疫および炎症応答に関わるいくつかの疾患に伴う病状に重要な役割を果たす。IL - 12、その生物活性および疾患におけるその役割の概説は、Gateley ら (1998) Ann. Rev. Immunol. 16 : 495 - 521 頁に見出すことができる。

【0003】

構造的に、IL - 12 は、両方がジスルフィド架橋により一緒になって結合される、35 kDa のサブユニット (p35) および 40 kDa のサブユニット (p40) を含むヘテロ二量体タンパク質である (「p70 サブユニット」と呼ばれる)。ヘテロ二量体タンパク質は、単球、マクロファージおよび樹状細胞などの抗原提示細胞によって主に産生される。これらの細胞型はまた、p70 サブユニットと比べて過剰な p40 サブユニットを分泌する。p40 および p35 サブユニットは、一般的に関連はなく、p40 ホモ二量体は IL - 12 アンタゴニストとして機能できるが、どちらも生物活性をもたないことが報告された。

【0004】

機能的に、IL - 12 は、抗原特異的なヘルパー T 型 (Th1) および 2 型 (Th2) リンパ球の間のバランスを制御する中心的役割を果たす。Th1 および Th2 細胞は、自己免疫障害の惹起および進行を支配し、IL - 12 は、Th1 リンパ球の分化および成熟の制御に重要である。Th1 細胞によって放出されるサイトカインは炎症性であり、これは、インターフェロン γ (IFN γ)、IL - 2 およびリンホトキシン (LT) を包含する。Th2 細胞は、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 10 および IL - 13 を分泌し、液性免疫、アレルギー応答および免疫抑制を促進する。

【0005】

自己免疫疾患における Th1 応答の優勢および IFN γ の炎症誘発活性と一致して、IL - 12 は、関節リウマチ (RA)、多発性硬化症 (MS) およびクローン病などの多くの自己免疫および炎症性疾患に伴う病状に、主要な役割を果たし得る。

【0006】

MS を有するヒトの患者では、急性 MS のブランクにおける p40 の mRNA レベルによって示されたように、IL - 12 発現の増加が実証された。さらに、MS 患者由来の CD40L 発現性 T 細胞で抗原提示細胞をエキスピボで刺激することにより、対照の T 細胞

10

20

30

40

50

と比較して I L - 1 2 産生の増加が起こり、C D 4 0 / C D 4 0 L 相互作用が I L - 1 2 の強力なインデューサーであるという観察と一致した。

【 0 0 0 7 】

I L - 1 2 p 7 0 の上昇したレベルは、健常な対照と比較して、R A 患者の滑膜において検出された。R A 滑膜におけるサイトカインのメッセンジャーリボ核酸 (m R N A) 発現プロファイルにより、T h 1 サイトカインが優勢に確認された。I L - 1 2 は、クローン病 (C D) に伴う病状にも重要な役割を果たすようである。I F N γ および I L - 1 2 の増加した発現は、この疾患を有する患者の腸粘膜において観察された。C D 患者の固有層由来の T 細胞のサイトカイン分泌プロファイルは、非常に上昇した I F N γ レベルを含む、優勢的な T h 1 応答の特徴を示す。その上、C D 患者由来の大腸の組織切片では、豊富な I L - 1 2 発現性マクロファージおよび I F N γ 発現性 T 細胞が示される。

10

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 G a t e l y ら (1 9 9 8) A n n . R e v . I m m u n o l . 1 6 : 4 9 5 - 5 2 1 頁

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

様々なヒトの障害におけるヒト I L - 1 2 の役割のために、治療戦略が、I L - 1 2 活性を阻害または相殺するように設計された。特に、I L - 1 2 と結合し、これを中和する抗体が、I L - 1 2 活性を阻害する手段として探求された。I L - 1 2 に対する抗体を含む治療計画が、高純度のものであることが重要である。本発明は、プロテイン A カラムの使用または同等のプロテイン A ベースの精製ステップなしに、この必要性に取り組む。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

(発明の要旨)

ある種の実施形態では、本発明は、I L - 1 2 に結合する、精製され単離された抗体および抗体フラグメント、ならびにかかる抗体およびフラグメントを含む医薬組成物を対象とする。ある種の実施形態では、本発明は、ヒト I L - 1 2 に結合する、単離された抗体またはこの抗原結合部分に関する。本発明の単離された抗 I L - 1 2 抗体は、臨床現場および研究開発に使用することができる。ある種の実施形態では、本発明は、配列番号 1 および 2 で確認される重鎖および軽鎖配列を含む抗 I L - 1 2 抗体を対象とする。

30

【 0 0 1 1 】

本発明のある種の実施形態は、それらが宿主細胞タンパク質 (「 H C P 」) を実質的に含まないようにするために、試料母体から抗 I L - 1 2 抗体またはこの抗原結合部分を精製する方法を対象とする。ある種の態様では、試料母体 (または単に 「 試料 」) は、本発明の抗 I L - 1 2 抗体を産生するために採用される細胞株を含む。特定の態様では、試料は、ヒト抗 I L - 1 2 抗体を産生するために使用される細胞株を含む。

【 0 0 1 2 】

40

本発明のある種の実施形態では、推定上の抗 I L - 1 2 抗体またはこの抗原結合部分を含む試料母体は、p H 調整に供する。ある種の態様では、p H は、約 3 . 5 に調整する。低 p H は、とりわけ、試料に混入し得る p H 感受性ウイルスの減少および / または不活性化を促進する。適した期間の後、p H をおよそ 5 . 0 に調整し、試料をイオン交換クロマトグラフィに供して溶出液を生成する。ある種の態様では、イオン交換の溶出液を収集し、疎水性相互作用クロマトグラフィにさらに供して、溶出液を生成する。疎水性相互作用クロマトグラフィの溶出液は、次いでさらなる処理または使用のために収集することができる。

【 0 0 1 3 】

ある種の実施形態では、本発明は、とりわけ、細胞および細胞の残骸を除去するための

50

一次回収ステップを含む、IL-12抗体の精製方法を提供する。上記方法のある種の実施形態では、一次回収ステップは、1つ以上の遠心分離または深層濾過のステップを含む。例えば、限定するものではないが、かかる遠心分離ステップは、およそ7000×gからおよそ11,000×gで行うことができる。さらに、上記方法のある種の実施形態は、デリピッド深層濾過ステップなどの深層濾過ステップを含む。

【0014】

上記方法のある種の実施形態では、イオン交換ステップは、陽イオンもしくは陰イオン交換クロマトグラフィのいずれかまたは両方の組合せであってよい。このステップは、陽イオン交換ステップに続いて陰イオン交換ステップまたはその逆などの複数のイオン交換ステップを含むことができる。ある種の態様では、イオン交換ステップは、2つのステップのイオン交換工程を含む。かかる2つのステップの工程は、例えば、限定するものではないが、第1陽イオン交換ステップに続いて第2の陰イオン交換ステップによって達成することができる。典型的な陽イオン交換カラムは、固定相が陰イオン基を含む、CM Hyper DF（商標）カラムなどのカラムである。このイオン交換捕獲クロマトグラフィステップは、一次回収の混合物からの抗IL-12抗体の単離を促進する。適した陰イオン交換カラムは、固定相が陽イオン基を含むカラムである。かかるカラムの例は、Q Sepharose（商標）カラムである。1つ以上のイオン交換ステップは、宿主細胞タンパク質およびDNA、適用できる場合は親和性基質タンパク質のような不純物を減少させることによって抗IL-12抗体をさらに単離する。この陰イオン交換手順は、クロマトグラフィのフロースルー様式であり、抗IL-12抗体は、陰イオン交換樹脂（または固相）と相互作用または結合しない。しかし、多くの不純物は、陰イオン交換樹脂と相互作用および結合する。

10

20

【0015】

ある種の実施形態では、第1および第2のイオン交換ステップは、一次回収に続いて行う。かかる実施形態のある種のものでは、イオン交換試料は、第1のイオン交換ステップの前、2つのイオン交換ステップの間、または両方のいずれかで、中間濾過ステップに供する。ある種の態様では、この濾過ステップは、捕獲限外濾過/透析濾過（「UF/DF」）を含む。他の活動の中で、かかる濾過は、抗IL-12抗体およびその抗原結合部分の濃縮およびバッファー交換を促進させる。

【0016】

本発明のある種の実施形態は、1つ以上の疎水性相互作用クロマトグラフィ（「HIC」）ステップを含む方法を提供する。適したHICカラムは、固定相が疎水基を含むものである。かかるカラムの非限定的な例は、Phenyl HP Sepharose（商標）カラムである。ある種の環境では、抗IL-12抗体は、単離/精製工程の間に凝集体を形成する。1つ以上のHICステップを含むことにより、かかる凝集の減少または排除が促進される。HICは、不純物の除去にも役立つ。ある種の実施形態では、HICステップは、抗IL-12抗体（またはその凝集）と疎水性カラムとの相互作用を促進するために、高塩濃度バッファーを採用する。抗IL-12抗体は、次いでより低い濃度の塩を用いて溶出することができる。

30

【0017】

ある種の実施形態では、HIC溶出液は、これに限定されないが、Ultipor DV50（商標）フィルター（Pall Corporation、East Hills、N.Y.）などのウイルス性除去フィルターを用いて濾過する。Viresolve（商標）フィルター（Millipore、Billerica、Mass.）、Zeta Plus VR（商標）フィルター（CUNO；Meriden、Conn.）およびPlanova（商標）フィルター（旭化成ファーマ、Planova Division、Buffalo Grove、Ill.）などの代替的なフィルターも、かかる実施形態で使用することができる。

40

【0018】

ある種の実施形態では、本発明は、単離された抗IL-12抗体またはこの抗原結合部

50

分および許容可能な担体を含む、1つ以上の医薬組成物を対象とする。1つの態様では、組成物は、抗IL-12抗体に加えて、1つ以上の抗体またはこの抗原結合部分をさらに含む。別の態様では、組成物は、1つ以上の医薬品をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】非限定的な例の抗IL-12抗体(ABT-847)の重鎖および軽鎖の可変領域配列を開示する図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

(発明の詳細な記述)

本発明は、IL-12に結合する抗体を対象とする。1つの態様では、本発明は、ヒトIL-12に結合する、単離された抗体またはこの抗原結合部分に関する。本発明の単離された抗IL-12抗体は、臨床現場および研究開発に使用することができる。本発明は、抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分を精製するための方法にも関する。本発明に関連して精製できる適した抗IL-12抗体は、(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)米国特許第6,914,128号明細書に開示されており、これに限定されないが、その特許においてJ695と同定され、続いてABT-874と同定された抗IL-12抗体が挙げられる。ABT-874の重鎖および軽鎖の可変領域の配列は、図1ならびに配列番号1および2に示される。本発明は、本明細書で記載された、抗IL-12抗体またはこの抗原結合部分を含む医薬組成物にも関する。

10

20

【0021】

明確にするために、限定するものではないが、この詳細な記述は、次の従属部に分割される：

1. 定義、
 2. 抗体の生成、
 3. 抗体の産生、
 4. 抗体の精製、
 5. 試料純度をアッセイする方法、
 6. さらなる修飾、
 7. 医薬組成物および
 8. 抗体の使用
1. 定義

30

本発明をより容易に理解するために、ある種の用語を最初に定義する。

【0022】

用語「抗体」は、4つのポリペプチド鎖、すなわちジスルフィド結合によって相互接続された2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖から成る免疫グロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖の可変領域(本明細書でHCVRまたはVHと省略される)および重鎖の定常領域(CH)から成る。重鎖の定常領域は、3つのドメイン、すなわちCH1、CH2およびCH3から成る。各軽鎖は、軽鎖の可変領域(本明細書でLCVRまたはVLと省略される)および軽鎖の定常領域から成る。軽鎖の定常領域は、1つのドメイン、すなわちCLから成る。VHおよびVL領域は、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存される領域が散在し、相補性決定領域(CDR)と称される、超可変性の領域にさらに細分することができる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に次の順番：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置される、3つのCDRおよび4つのFRから構成される。

40

【0023】

抗体の「抗原結合部分」(または「抗体部分」という用語は、抗原(例えば、hIL-12)と特異的に結合する能力を保持する抗体のフラグメントを含む。抗体の抗原結合の機能は、完全長抗体のフラグメントによって果たせることが示された。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合性フラグメントの例には、(i) Fabフラグメン

50

ト、すなわちVL、VH、CLおよびCH1ドメインを含む1価のフラグメント、(ii)F(ab')₂フラグメント、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む2価のフラグメント、(iii)VHおよびCH1ドメインを含むFdフラグメント、(iv)抗体の単一の腕のVLおよびVHドメインを含むFvフラグメント、(v)VHドメインを含むdAbフラグメント(その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Wardら(1989)Nature 341: 544-546頁)ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン、すなわちVLおよびVHは、別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を用いて連結されることができ、合成リンカーによって、VLおよびVH領域対により一価の分子を形成できる単一タンパク質鎖としてそれらをつくることが可能になる(単一鎖Fv(scFv)として知られる; 例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Birdら(1988)Science 242: 423-426頁およびHoustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883頁を参照されたい)。かかる単一鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることを意図する。二重特異性抗体などの単一鎖抗体の他の形態も包含される。二重特異性抗体は、2価の二重特異的な抗体であり、VHおよびVLドメインが、単一ポリペプチド鎖上で発現するが、短すぎて同じ鎖上の2つのドメイン間で対にできないリンカーを用い、それによってドメインを別の鎖の相補性ドメインと対にさせ、2つの抗原結合部位がつくられる(例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Holliger, P.ら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448頁; Poljak, R. J.ら(1994)Structure 2: 1121-1123頁を参照されたい)。その上さらに、抗体またはこの抗原結合部分は、抗体または抗体部分と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドと共有または非共有結合によって形成される、より大きな免疫接着分子の一部であってよい。かかる免疫接着分子の例には、ストレプトアビジンのコア領域を用いて四量体のscFv分子をつくること(その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Kipriyanov, S. M.ら(1994)Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101頁)、およびシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジンタグを用いて2価のビオチン化scFv分子をつくること(その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Kipriyanov, S. M.ら(1994)Mol. Immunol. 31: 1047-1058頁)が挙げられる。FabおよびF(ab')₂フラグメントなどの抗体部分は、全抗体のそれぞれに、パインまたはペプシン消化などの従来技法を用いて、全抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体部分および免疫接着分子は、本明細書に記載のような標準的な組換えDNA技法を用いて得ることができる。1つの態様では、抗原結合部分は、完全ドメインまたは完全ドメインの対である。

【0024】

表現「ヒトインターロイキン12」(本明細書でhIL-12またはIL-12と省略される)は、本明細書で使用する時、マクロファージおよび樹状細胞によって主に分泌されるヒトサイトカインを含む。用語は、ジスルフィド架橋により一緒になって連結される35kDのサブユニット(p35)および40kDのサブユニット(p40)を含むヘテロ二量体タンパク質を含む。ヘテロ二量体タンパク質は、「p70サブユニット」と呼ばれる。ヒトIL-12の構造は、例えば、Kobayashiら(1989)J. Exp. Med. 170: 827-845頁; Sederら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10188-10192; Lingら(1995)J. Exp. Med. 154: 116-127; Podlaskiら(1992)Arch. Biochem. Biophys. 294: 230-237にさらに記載され、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる。IL-12をコードする核酸は、GenBank Accession No. NM_000882として入手でき、ポリペプチド配列は、GenBank Accession No. NP_000873.2として入手す

10

20

30

40

50

ることができる。用語ヒトIL-12は、標準的な組換え発現方法によって調製できる、組換えヒトIL-12(rhIL-12)を含むことを意図する。

【0025】

用語「Kabattの番号付け」、「Kabattの規定」および「Kabattの標識化」は、本明細書では互換的に使用される。当技術分野で認識されるこれらの用語は、抗体またはこの抗原結合部分の重鎖および軽鎖の可変領域における他のアミノ酸残基より可变的(すなわち、超可变的)であるアミノ酸残基を番号付けるシステムをいう(その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Kabattら(1971)Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391頁およびKabatt, E. A.ら(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)。重鎖の可変領域について、超可変領域は、CDR1についてはアミノ酸位置31から35、CDR2についてはアミノ酸位置50から65、およびCDR3についてはアミノ酸位置95から102に及ぶ。軽鎖の可変領域について、超可変領域は、CDR1についてはアミノ酸位置24から34、CDR2についてはアミノ酸位置50から65、およびCDR3についてはアミノ酸位置89から97に及ぶ。

10

【0026】

用語「ヒト抗体」は、Kabattらによって記載されたような、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列に対応する、可変および定常領域を有する抗体を含む(Kabattら(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)。本発明のヒト抗体は、例えばCDR、特にCDR3において、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異)を含むことができる。変異は、「選択的変異誘発アプローチ」を用いて導入することができる。ヒト抗体は、アミノ酸残基、例えば、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列によってコードされない活性増強型アミノ酸残基と置換された、少なくとも1つの位置を有することができる。ヒト抗体は、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列の一部ではないアミノ酸残基と置換された、最大20個の位置を有することができる。他の実施形態では、最大10、最大5、最大3または最大2つの位置が置換される。1つの実施形態では、これらの置換は、CDR領域内である。しかし、用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用する時、CDR配列が、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来し、ヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含まないことを意図する。

20

30

【0027】

表現「選択的変異誘発アプローチ」は、少なくとも1つの適した選択的変異誘発位置、高頻度変異および/または接触位置で、CDRアミノ酸を選択し、個々に変異させることによって、抗体の活性を改善する方法を含む。「選択的に変異させた」ヒト抗体は、選択的変異誘発アプローチを用いて選択された位置での変異を含む抗体である。別の態様では、選択的変異誘発アプローチは、抗体の重鎖可変領域のCDR1、CDR2もしくはCDR3(下文ではそれぞれH1、H2およびH3)または軽鎖可変領域のCDR1、CDR2もしくはCDR3(下文ではそれぞれL1、L2およびL3という)において、選択された個々のアミノ酸残基を優先的に変異させる方法を提供することを意図する。アミノ酸残基は、選択的変異誘発位置、接触位置または高頻度変異位置から選択することができる。個々のアミノ酸は、軽鎖または重鎖の可変領域におけるそれらの位置に基づいて選択される。高頻度変異位置が、接触位置であってもよいことを理解されたい。1つの態様では、選択的変異誘発アプローチは、「標的型アプローチ」である。言葉「標的型アプローチ」は、標的型、例えば、「群に対する標的型アプローチ」または「CDRに対する標的型アプローチ」において、抗体の重鎖可変領域のCDR1、CDR2もしくはCDR3また

40

50

は軽鎖可変領域のCDR1、CDR2もしくはCDR3において選択された個々のアミノ酸残基を変異させる方法を含むことを意図する。「群に対する標的型アプローチ」では、特定の群における個々のアミノ酸残基は、群I（L3およびH3を含む）、II（H2およびL1を含む）およびIII（L2およびH1を含む）を含む選択的変異について標的にされ、前記群は、標的の優先度の順番で載せる。「CDRに対する標的型アプローチ」では、特定のCDRにおける個々のアミノ酸は、次のような標的の優先度の順番：H3、L3、H2、L1、H1およびL2で、選択的変異について標的にされる。選択されたアミノ酸残基は、例えば、少なくとも2つの他のアミノ酸残基に変異させ、抗体の活性への変異の効果を決定する。活性は、抗体の結合特異性／親和性、および／または抗体の中和効力における変化として測定する。選択的変異誘発アプローチは、ファージ提示、ヒトIgG生殖系列遺伝子を有するトランスジェニック動物、ヒトB細胞から単離したヒト抗体が挙げられる任意の供給源に由来する任意の抗体の最適化に使用することができることを理解されたい。選択的変異誘発アプローチは、ファージ提示技術を用いてさらに最適化できない抗体に置いて使用することができる。ファージ提示、ヒトIgG生殖系列遺伝子を有するトランスジェニック動物、ヒトB細胞から単離したヒト抗体が挙げられる任意の供給源由来の抗体を、選択的変異誘発アプローチの前または後に逆突然変異に供することができることを理解されたい。

10

20

30

40

50

【0028】

表現「組換えヒト抗体」は、宿主細胞に形質移入した組換え発現ベクターを用いて発現した抗体、組換え体から単離した抗体、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリ、ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離した抗体（例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Taylor, L. D. ら（1992）Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295頁を参照されたい）または他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライスを含む任意の他の手段によって調製、発現、作成もしくは単離した抗体などの、組換え手段によって調製、発現、作成または単離するヒト抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する可変および定常領域を有する（Kabatt, E. A. ら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）。しかし、ある種の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロでの変異誘発（または、ヒトIg配列のトランスジェニック動物を使用するときは、インビボでの体細胞変異誘発）に供し、したがって組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のVHおよびVL配列に由来および関連するが、インビボにおいて生殖系列のヒト抗体レパートリー内に天然には存在し得ない配列である。しかし、ある種の実施形態では、かかる組換え抗体は、選択的変異誘発アプローチもしくは逆突然変異または両方の結果である。

【0029】

「単離した抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を含む（例えば、hIL-12と特異的に結合する単離した抗体は、hIL-12以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。hIL-12と特異的に結合する単離した抗体は、他の種由来のIL-12分子と結合することができる。さらに、単離した抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含み得ない。

【0030】

「中和抗体」（またはhIL-12活性を中和した抗体）は、hIL-12との結合により、hIL-12の生物活性の阻害をもたらす抗体を含む。hIL-12の生物活性のこの阻害は、フィトヘマグルチニンの芽細胞増殖アッセイ（PHA）におけるフィトヘマグルチニンのヒト芽細胞増殖の阻害またはヒトIL-12受容体結合アッセイにおける受容体結合の阻害などの、hIL-12の生物活性の1つ以上の指標を測定することによって評価することができる。hIL-12の生物活性のこれらの指標は、当技術分野で既知

のインビトロまたはインビボにおける１つ以上のいくつかの標準的なアッセイによって評価することができる。

【００３１】

用語「活性」は、例えば、ＩＬ－１２抗原に結合する抗ｈＩＬ－１２抗体などの抗体の抗原に対する結合特異性／親和性、および／または例えば、ｈＩＬ－１２との結合により、ｈＩＬ－１２の生物活性を阻害する抗ｈＩＬ－１２抗体などの抗体の中和効力、例えば、ＰＨＡ芽細胞増殖の阻害またはヒトＩＬ－１２受容体結合アッセイにおける受容体結合の阻害などの活性を含む。

【００３２】

表現「表面プラズモン共鳴」は、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，ＳｗｅｄｅｎおよびＰｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムの生体特異的相互作用の解析を可能にする光学現象を含む。さらなる説明については、その全体の教示が本明細書に組み込まれる、Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．ら（１９９３）Ａｎｎ．Ｂｉｏｌ．Ｃｌｉｎ．５１：１９－２６頁；Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．ら（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １１：６２０－６２７頁；Ｊｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂ．ら（１９９５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．８：１２５－１３１頁およびＪｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂ．ら（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８：２６８－２７７頁を参照されたい。

10

【００３３】

用語「 K_{off} 」は、本明細書で使用する時、抗体／抗原複合体からの抗体の解離についての解離速度定数をいうことを意図する。

20

【００３４】

用語「 K_d 」は、本明細書で使用する時、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数をいうことを意図する。

【００３５】

表現「核酸分子」は、ＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子を含む。核酸分子は、単一鎖または二重鎖でよいが、１つの態様では、二重鎖ＤＮＡである。

【００３６】

ｈＩＬ－１２と結合する（単離した抗体を含む）抗体または抗体部分（例えば、ＶＨ、ＶＬ、ＣＤＲ３）をコードする核酸に関して本明細書で使用する時、表現「単離した核酸分子」は、抗体または抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、ｈＩＬ－１２以外の抗原と結合する抗体または抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列を含まず、他の配列が、天然ではヒトゲノムＤＮＡにおける該核酸に隣接し得る、核酸分子を含む。したがって、例えば、抗ＩＬ－１２抗体のＶＨ領域をコードする本発明の単離した核酸は、ＩＬ－１２以外の抗原と結合する他のＶＨ領域をコードする他の配列を含まない。表現「単離した核酸分子」は、ＶＨおよびＶＬ領域が、二重特異性抗体の配列以外の他の配列を含まない二重特異性抗体などの、２価の二重特異的な抗体をコードする配列を含むことも意図する。

30

【００３７】

表現「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、組換え発現ベクターが導入された細胞を含む。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなく、かかる細胞の子孫もいうことを意図すると理解されたい。変異または環境の影響のいずれかにより、後の世代である種の改変が起こり得るため、かかる子孫は、実際には親細胞と同一ではあり得ないが、本明細書で使用する時、用語「宿主細胞」の範囲内にやはり含まれる。

40

【００３８】

用語「改変」は、本明細書で使用する時、抗体またはこの抗原結合部分における１つ以上のアミノ酸の変更をいうことを意図する。変更は、１つ以上の位置でアミノ酸を付加、置換または欠失させることによって生じさせることができる。変更は、ＰＣＲ変異誘発などの既知の技法を用いて生じさせることができる。

50

【0039】

用語「約」は、本明細書で使用する時、基準値よりおよそ10 - 20 %大きいまたは小さい範囲をいうことを意図する。ある種の環境では、当業者は、基準値の性質のため、用語「約」は、その値から10 - 20 %より多くまたは少なく逸脱することを意味できると理解する。

【0040】

表現「ウイルスの減少 / 不活性化」は、本明細書で使用する時、特定の試料中のウイルス粒子の数の低下（「減少」）および例えば、これに限定されないが、特定の試料中のウイルス粒子の感染力または複製能などの活性の低下（「不活性化」）をいうことを意図する。ウイルス粒子の数および / または活性のかかる低下は、およそ約1 %から約99 %、好ましくは約20 %から約99 %、より好ましくは約30 %から約99 %、より好ましくは約40 %から約99 %、さらにより好ましくは約50 %から約99 %、さらにより好ましくは約60 %から約99 %、さらにより好ましくは約70 %から約99 %、さらにより好ましくは約80 %から約99 %、さらにより好ましくは約90 %から約99 %程度であってよい。ある種の非限定的な実施形態では、ウイルスの量は、精製した抗体産物中に少しでも存在すれば、そのウイルスについてID50（標的集団の50 %に感染するウイルスの量）より少なく、好ましくはそのウイルスについてID50より少なくとも10倍少ない、より好ましくはそのウイルスについてID50より少なくとも100倍少ない、さらにより好ましくはそのウイルスについてID50より少なくとも1000倍少ない。

10

【0041】

表現「接触位置」は、26の既知の抗体 - 抗原構造のうち1つにおいて、抗原と接触するアミノ酸によって占められる抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のCDR1、CDR2またはCDR3におけるアミノ酸位置を含む。26の既知の解明された抗体 - 抗原複合体の構造のいずれかにおいて、CDRアミノ酸が抗原と接触すれば、そのときそのアミノ酸は接触位置を占めると考えることができる。接触位置は、抗原と接触するアミノ酸によって占められる確率が、非接触位置より高い。1つの態様では、接触位置は、26の構造の3つより多い構造において抗原と接触するアミノ酸を含むCDR位置である（> 1.5 %）。別の態様では、接触位置は、25の構造のうち8つより多い構造において抗原と接触するアミノ酸を含むCDR位置である（> 32 %）。

20

【0042】

2. 抗体の生成

用語「抗体」は、このセクションで使用する時、インタクトな抗体またはこの抗原結合フラグメントをいう。

30

【0043】

本開示の抗体は、対象とする抗原による動物の免疫化を含む様々な技法に続き、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば、KohlerおよびMilstein（1975）Nature 256: 495頁の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法によって生成させることができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順が原則として好ましいが、モノクローナル抗体を産生するための他の技法、例えば、Bリンパ球のウイルス性または発癌性形質転換を採用することができる。

40

【0044】

ハイブリドーマを調製するための1つの好ましい動物系は、マウス系である。ハイブリドーマの産生は、非常によく確立された手順である。免疫化プロトコールおよび融合のために免疫化した脾細胞を単離するための技法は、当技術分野で既知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合手順も既知である。

【0045】

抗体は、好ましくは、ヒト、キメラまたはヒト化抗体であってよい。本開示のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製された非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖の免疫グロブリンをコードするDNAは、対象とする非ヒトハイブリドーマから得ることができ、標準的な分子生物学的技法を用いて、非

50

マウス（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作成するために、当技術分野で既知の方法を用いて、マウス可変領域を、ヒト定常領域に連結させることができる（例えば、C a b i l l yらの米国特許第4, 816, 567号明細書を参照されたい）。ヒト化抗体を作成するために、当技術分野で既知の方法を用いて、マウスCDR領域を、ヒトフレームワークに挿入することができる（例えば、W i n t e rらの米国特許第5, 225, 539号明細書ならびにQ u e e nらの米国特許第5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762および6, 180, 370号明細書を参照されたい）。

【0046】

1つの非限定的な実施形態では、本開示の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。I L - 12を対象とするかかるヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりむしろヒト免疫系の部分を保有するトランスジェニックまたはトランスクロモソミックマウスを用いて生成させることができる。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモソミックマウスは、H u M A b M o u s e（登録商標）（M e d a r e x , I n c . ）、K M M o u s e（登録商標）（M e d a r e x , I n c . ）およびX e n o M o u s e（登録商標）（A m g e n）として本明細書で称されるマウスを含む。

【0047】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスクロモソミック動物系は、当技術分野で入手でき、本開示の抗I L - 12抗体を産生させるために使用することができる。例えば、「T Cマウス」として称される、ヒト重鎖トランスクロモソームおよびヒト軽鎖トランスクロモソームの両方を保有するマウスを使用でき、かかるマウスは、T o m i z u k aら（2000）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 97: 722 - 727頁に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖トランスクロモソームを保有する雌ウシは、当技術分野で記載されており（例えば、K u r o i w aら（2002）N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 20: 889 - 894頁およびP C T出願W O 2002 / 092812）、本開示の抗I L - 12抗体を産生するために使用することができる。

【0048】

本明細書で開示される、抗I L - 12抗体もしくはその抗体結合性部分または抗I L - 12関連抗体を含む本発明の組換えヒト抗体は、コンビナトリアル組換え抗体ライブラリ、例えば、ヒトリンパ球に由来するm R N Aから調製したヒトV LおよびV H c D N Aを用いて調製したs c F vファージ提示ライブラリの選別によって単離することができる。かかるライブラリを調製および選別するための方法論は、当技術分野で既知である。ファージ提示ライブラリを作成するための市販のキット（例えば、その全体の教示が本明細書に組み込まれる、P h a r m a c i a R e c o m b i n a n t P h a g e A n t i b o d y S y s t e m、カタログ番号27 - 9400 - 01およびS t r a t a g e n e S u r f Z A P（商標）ファージ提示キット、カタログ番号240612）に加えて、抗体提示ライブラリの作成および選別の使用に特に適した方法および試薬の例は、例えば、L a d n e rらの米国特許第5, 223, 409号明細書；K a n gらのP C T出願W O 92 / 18619；D o w e rらのP C T出願W O 91 / 17271；W i n t e rらのP C T出願W O 92 / 20791；M a r k l a n dらのP C T出願W O 92 / 15679；B r e i t l i n gらのP C T出願W O 93 / 01288；M c C a f f e r t yらのP C T出願W O 92 / 01047；G a r r a r dらのP C T出願W O 92 / 09690；F u c h sら（1991）B i o / T e c h n o l o g y 9: 1370 - 1372頁；H a yら（1992）H u m A n t i b o d H y b r i d o m a s 3: 81 - 85頁；H u s eら（1989）S c i e n c e 246: 1275 - 1281頁；M c C a f f e r t yら、N a t u r e（1990）348: 552 - 554頁；G r i f f i t h sら（1993）E M B O J 12: 725 - 734頁；H a w k i n sら（1992）J M o l B i o l 226: 889 - 896頁；C l a c k s o nら（1991）N a t u r e 352: 624 - 628頁；G r a mら（1992）P N A S

10

20

30

40

50

89:3576-3580頁; Garrardら(1991) Bio/Technology 9:1373-1377頁; Hoogenboomら(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137頁および Barbassら(1991) PNAS 88:7978-7982頁で見出すことができ、その全体の教示が本明細書に組み込まれる。

【0049】

本開示のヒトモノクローナル抗体は、ヒト抗体応答が免疫化において生成できるようにヒト免疫細胞を再構築したSCIDマウスを用いて調製することもできる。かかるマウスは、例えば、Wilsonらの米国特許第5,476,996および5,698,767号明細書に記載されている。

10

【0050】

1つの実施形態では、本発明の方法は、抗IL-12抗体および抗体部分、抗IL-12関連抗体および抗体部分、ならびに低度の解離速度によるhIL-12との高親和性結合および高中和能などの、抗IL-12抗体と同等の特性を有するヒト抗体および抗体部分を含む。1つの態様では、本発明は、共に表面プラズモン共鳴による測定にて約 1×10^{-8} M以下の K_d 速度定数および 1×10^{-3} s $^{-1}$ 以下の K_{off} 速度定数でhIL-12から解離する単離されたヒト抗体またはこの抗原結合部分を用いる治療を提供する。具体的な非限定的な実施形態では、本発明に従って精製した抗IL-12抗体は、生理的条件下で、ABT-874とIL-12との結合を競合的に阻害する。

20

【0051】

本発明のさらなる別の実施形態では、抗IL-12抗体またはこのフラグメントは、変化させることができ、抗体の定常領域が、非改変の抗体と比較して、少なくとも1つの定常領域媒介性生物学的エフェクター機能を低下させるように改変される。本発明の抗体がFc受容体との低下した結合性を示すように、それを改変するために、抗体の免疫グロブリンの定常領域セグメントを、Fc受容体(FcR)相互作用に必要な特定の領域で変異させることができる(例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、CanfieldおよびMorrisson(1991) J. Exp. Med. 173:1483-1491頁ならびにLundら(1991) J. of Immunol. 147:2657-2662頁を参照されたい)。抗体のFcR結合能の低下により、オプソニン作用および食作用および抗原依存性細胞毒性などの、FcR相互作用に頼る他のエフェクター機能も低下させることができる。

30

【0052】

3. 抗体の産生

本発明の抗体を発現させるために、遺伝子が、転写および翻訳調節配列に操作的に連結されるように、部分的または完全長軽鎖および重鎖をコードするDNAは、1つ以上の発現ベクターに挿入される(例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,914,128号明細書を参照されたい)。この文脈では、用語「操作的に連結される」は、ベクター内の転写および翻訳調節配列が、それらが目的とする抗体遺伝子の転写および翻訳の制御機能を果たすように、抗体遺伝子がベクター中にライゲートされることを意味すると意図する。発現ベクターおよび発現調節配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体の軽鎖遺伝子および抗体の重鎖遺伝子は、別々のベクター中に挿入でき、またはより典型的には、両遺伝子は、同じ発現ベクター中に挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法(例えば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位がなければ平滑末端のライゲーション)によって発現ベクターに挿入される。抗体または抗体関連軽鎖または重鎖配列の挿入の前に、発現ベクターは、抗体の定常領域配列を既に保有することができる。例えば、抗IL-12抗体または抗IL-12抗体関連VHおよびVL配列を、完全長抗体遺伝子に転換する1つのアプローチは、VHセグメントが、ベクター内のCHセグメント(複数可)に操作的に連結し、VLセグメントが、ベクター内のCLセグメントに操作的に連結するように、重鎖の定常および軽鎖の定常領域をそれぞれ既にコードする発現ベク

40

50

ター中にそれらを挿入することである。追加的または代替的には、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進させるシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクター中にクローニングさせることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンのシグナルペプチドまたは異種のシグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であってよい。

【0053】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を調節する1つ以上の制御配列を保有することができる。用語「制御配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を調節するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。かかる制御配列は、例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。制御配列の選択を含む発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのような因子によって決められることは、当業者に理解されよう。哺乳動物宿主細胞の発現に適した制御配列は、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター/エンハンサーなど)、サルウイルス40(SV40)(SV40プロモーター/エンハンサーなど)、アデノウイルス（例えば、主要な後期プロモーター(AdMLP)）およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーなどの、哺乳動物細胞における高いタンパク質発現レベルを指示するウイルス性エレメントを含む。ウイルス性制御エレメントおよびその配列のさらなる説明については、例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Stinskiによる米国特許第5,168,062号明細書、Bellらによる米国特許第4,510,245号明細書およびSchaffnerらによる米国特許第4,968,615号明細書を参照されたい。

【0054】

抗体鎖遺伝子および制御配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中のベクターの複製を制御する配列（例えば、複製開始点）などの1つ以上の追加の配列および/または選択可能なマーカー遺伝子を保有することができる。選択可能なマーカー遺伝子により、ベクターが導入された宿主細胞の選択が促進される（例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、全てAxelらによる米国特許第4,399,216、4,634,665および5,179,017号明細書を参照されたい）。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞において、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を与える。適した選択可能なマーカー遺伝子には、(メトトレキサートの選択/増幅を用いるdhfr宿主細胞の使用については)ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子および(G418の選択については)ネオ遺伝子が挙げられる。

【0055】

本発明の抗体または抗体部分は、宿主細胞における免疫グロブリンの軽鎖および重鎖遺伝子の組換え発現によって調製することができる。組換えで抗体を発現させるために、軽鎖および重鎖が、宿主細胞中で発現され、宿主細胞を培養する培地中に分泌され、抗体が培地から回収できるように、宿主細胞に、抗体の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖をコードするDNAフラグメントを保有する1つ以上の組換え発現ベクターを形質移入する。抗体の重鎖および軽鎖遺伝子を得て、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込み、ベクターを宿主細胞中に導入するために、標準的な組換えDNA方法論が使用され、これらは、その全体の教示が本明細書に組み込まれる、Sambrook、FritschおよびManiatis(編)、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)、Ausubelら(編)Current Protocols in Mol

10

20

30

40

50

ecular Biology, Greene Publishing Associates、(1989)ならびに米国特許第4,816,397および6,914,128号明細書などに記載されている。

【0056】

軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター（複数可）は、標準的な技法によって宿主細胞中に形質移入される。用語「形質移入」の様々な形態は、原核または真核宿主細胞中への外来性DNAの導入に一般的に使用される幅広い様々な技法、例えば、電気穿孔法、カルシウム-リン酸沈殿、DEAE-デキストラン形質移入などを包含することを意図する。原核または真核宿主細胞のいずれかにおいて、本発明の抗体を発現させることは理論上可能であるが、かかる真核細胞、特に哺乳動物細胞は、
10 原核細胞に比べて、正確にフォールドされた免疫学的な活性抗体を会合および分泌しやすいため、哺乳動物宿主細胞などの真核細胞中での抗体の発現が適している。抗体遺伝子の原核生物の発現は、活性抗体の高収率の産生に効果がないことが報告された（その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、BossおよびWood(1985) Immunology Today 6:12-13頁）。

【0057】

本明細書でベクターにおけるDNAのクローニングまたは発現に適した宿主細胞は、上記の原核生物、酵母またはより高等な真核生物である。この目的に適した真核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物などの真正細菌、例として、例えばE.コリ(E. coli)などのエシュリキア属(Escherichia)、エンテロバクター属(Enterobacter)、
20 エルウィニア属(Erwinia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、プロテウス属(Proteus)、例えばサルモネラ・チフィムリウム(Salmonella typhimurium)などのサルモネラ属(Salmonella)、例えばセラチア・マルセセンス(Serratia marcescans)などのセラチア属(Serratia)およびシゲラ属(Shigella)などの腸内細菌科(Enterobacteriaceae)ならびにB.サブチリス(B. subtilis)およびB.リケニフォルミス(B. licheniformis)(例えば、1989年4月12日に出版されたDD266,710に開示されたB.リケニフォルミス41P)などのバチリ属(Bacilli)、P.アエルギノーサ(P. aeruginosa)などのシュードモナス属(Pseudomonas)ならびにストレプト
30 ミセス属(Streptomyces)が挙げられる。E.コリB、E.コリX1776(ATCC31,537)およびE.コリW3110(ATCC27,325)などの他の菌株が適しているが、宿主をクローニングする1つの適したE.コリは、E.コリ294(ATCC31,446)である。これらの例は、限定というよりむしろ実例となるものである。

【0058】

原核微生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物が、ベクターをコードするポリペプチドに適したクローニングまたは発現宿主である。サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)または一般的なパン酵母が、より下等な真核宿主微生物の中でもっとも一般的に使用される。しかし、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe); K.ラクティス(K. lactis)、K.フラジリス(K. fragilis)(ATCC12,424)、K.ブルガリカス(K. bulgaricus)(ATCC16,045)、K.ウイケラミ(K. wickerhamii)(ATCC24,178)、K.ワルティ(K. waltii)(ATCC56,500)、K.ドロソフィラム(K. drosophilum)(ATCC36,906)、K.サーモトレランス(K. thermotolerans)およびK.マルキシアナス(K. marxianus)などのクリベロミセス属(Kluyveromyces)宿主; ヤロウィア属(yarrowia)(EP402,226); ピキア・パストリス(Pichia pastoris)(EP183,070); カンジダ属(Candida); トリコデルマ・リーシア(Tric
40
50

hoderma reesia) (EP 244, 234); ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa); スクワニオミセス・オキシデンタリス (Schwanniomycetes occidentalis) などのスクワニオミセス属 (Schwanniomycetes); ならびに例えば、ニューロスポラ属 (Neurospora)、ペニシリウム属 (Penicillium)、トリボクラミジウム属 (Toly pocladium) ならびに A. ニデュランス (A. nidulans) および A. ニガー (A. niger) などのアスペルギルス属 (Aspergillus) 宿主などの糸状菌などの多くの他の属、種および菌株が一般的に入手でき、本明細書に有用である。

【0059】

グリコシル化された抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株および変異体ならびにスポドプテラ・フルギベルダ (Spodoptera frugiperda) (イモムシ)、アエデス・アエギプティ (Aedes aegypti) (蚊)、アエデス・アルボピクタス (Aedes albopictus) (蚊)、ドロソフィラ・メラノガスタ (Drosophila melanogaster) (ショウジョウバエ) およびボンピクス・モリ (Bombyx mori) などの対応する許容昆虫宿主細胞が同定された。形質移入のための様々なウイルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニア (Autographa californica) NPV の L-1 変異体およびボンピクス・モリ NPV の Bm-5 菌株が公的に利用でき、かかるウイルスは、本発明に従う本明細書でのウイルスとして、特に、スポドプテラ・フルギベルダ細胞の形質移入のために使用することができる。ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。

【0060】

本発明の組換え抗体の発現に適した哺乳動物宿主細胞には、(例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Kaufman および Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621 頁に記載のような DHFR 選択可能なマーカーを用いて使用される、Urlaub および Chasin (1980) PNAS USA 77: 4216-4220 頁に記載の dhfr-CHO 細胞を含む) チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞)、NSO 骨髓腫細胞、COS 細胞および SP2 細胞が挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを、哺乳動物宿主細胞中に導入する場合、宿主細胞中での抗体の発現または宿主細胞を増殖させる培養液中への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって、抗体は産生される。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 によって形質転換されるサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651); ヒト胚性腎臓株 (懸濁培養物中での増殖のためにサブクロニングした 293 または 293 細胞、Graham ら、J. Gen. Virol. 36: 59 頁 (1977)); ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / DHFR (CHO、Urlaub ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 頁 (1980)); マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、Biol. Reprod. 23: 243-251 頁 (1980)); サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2); イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2、HB 8065); マウス乳房腫瘍 (MMT060562、ATCC CCL 51); TRI 細胞 (Mather ら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 頁 (1982)); MRC 5 細胞; FS 4 細胞; およびヒト肝細胞種株 (Hep G2) であり、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる。

【0061】

宿主細胞は、抗体産生のために上記の発現またはクローニングベクターで形質転換し、

プロモーターの誘導、形質転換体の選択または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修正された従来の栄養培地で培養する。

【0062】

抗体を産生するために使用する宿主細胞は、様々な培地で培養することができる。HamのF10(商標)(Sigma)、Minimal Essential Medium(商標)(MEM)、Sigma)、RPMI-1640(Sigma)およびDulbeccoのModified EagleのMedium(商標)(DMEM)、Sigma)などの市販の培地は、宿主細胞の培養に適している。さらに、Hamら、Meth. Enz. 58:44頁(1979)、Barnesら、Anal. Biochem. 102:255頁(1980)、米国特許第4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655または5,122,469号明細書;WO90/03430;WO87/00195;または米国特許第Re.30,985号明細書に記載の任意の培地を、宿主細胞用の培養液として使用でき、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる。任意のこれらの培地は、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の増殖因子(インスリン、トランスフェリンまたは上皮増殖因子など)、塩(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩など)、バッファー(HEPESなど)、ヌクレオチド(アデノシンおよびチミジンなど)、抗生物質(ゲンタマイシン薬など)、微量元素(通常マイクロモラーの範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義する)およびグルコースまたは同等のエネルギー源を補充することができる。任意の他の必要な補充も、当業者に既知である適切な濃度で含むことができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞に以前に使用したものであり、当業者には明白である。

10

20

【0063】

宿主細胞は、FabフラグメントまたはscFv分子などの、インタクトな抗体の部分を産生するために使用することもできる。上記の手順のバリエーションが、本発明の範囲内であることは理解されよう。例えば、宿主細胞に、本発明の抗体の軽鎖または重鎖のいずれか(両方ではない)をコードするDNAを形質移入することを所望することができる。IL-12、具体的にはhIL-12との結合に必要ではない軽鎖および重鎖のいずれかまたは両方をコードするいくらかまたは全てのDNAを除去するために、組換えDNA技術を使用することもできる。かかる切断されたDNA分子から発現された分子も、本発明の抗体に包含される。さらに、標準的な化学的架橋法により、本発明の抗体と第2抗体を架橋することによって、一方の重鎖および一方の軽鎖が、本発明の抗体であり、他方の重鎖および軽鎖が、IL-12以外の抗原に特異的である二機能性抗体を、産生することができる。

30

【0064】

本発明の抗体またはこの抗原結合部分の組換え発現のための適した系では、抗体の重鎖および抗体の軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターは、リン酸カルシウム媒介型形質移入によって、dhfr-CHO細胞中に導入される。組換え発現ベクター内では、抗体の重鎖および軽鎖遺伝子は、CMVエンハンサー/AdMLPプロモーターの制御エレメントにそれぞれ操作的に連結して、遺伝子の高レベルの転写を駆動する。組換え発現ベクターは、DHFR遺伝子も保有し、これにより、メトトレキサートの選択/増幅を用いて、ベクターに形質移入したCHO細胞を選択することが可能になる。選択された形質転換体宿主細胞は、抗体の重鎖および軽鎖の発現を可能にするために培養され、インタクトな抗体は、培養液から回収される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞に形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培養液から抗体を回収するために、標準的な分子生物学的技法が用いられる。

40

【0065】

組換え技法を使用するとき、抗体は、細胞膜周辺腔中で細胞内に産生され得、または培地中に直接分泌され得る。1つの態様では、抗体が細胞内に産生されれば、第1ステップとして、(例えば、遠心分離の結果として生じた)粒状の残骸、宿主細胞または溶解した

50

細胞のいずれかを、例えば、遠心分離または限界濾過によって除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、かかる発現系からの懸濁液を、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限界濾過ユニットを用いて、まず濃縮することができる。

【0066】

本発明の工程の前に、細胞の残骸から抗体を精製するための手順を、抗体の発現部位によって最初に決める。いくつかの抗体は、細胞から増殖培地の周辺に直接分泌され得、他の抗体は、細胞内につくられる。後者の抗体について、精製工程の第1ステップは、典型的には、機械的な剪断、浸透圧ショックまたは酵素処理が挙げられる様々な方法によって起こり得る細胞の溶解を伴う。かかる破壊により、細胞の全体的な内容物が破砕物中に放出され、さらに、それらの小ささのために除去するのが難しい細胞内の断片が産生される。これらは、一般的に、異なる遠心分離によって、または濾過によって除去される。抗体が分泌される場合、かかる発現系からの懸濁液は、一般的に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限界濾過ユニットを用いて、まず濃縮される。抗体が培地中に分泌される場合、組換え宿主細胞は、例えば、接線流濾過によって、細胞培養液から分離することもできる。抗体は、本発明の抗体精製方法を用いて、培養液からさらに回収することができる。

10

【0067】

4. 抗体の精製

4.1 一般的な抗体の精製

20

本発明は、抗体および少なくとも1つのHCPを含む混合物から精製された（または「HCP減少型」）抗体調製物を生成するための方法を提供する。本発明の調製工程は、上記の方法および当技術分野の従来する方法を用いて抗体を生成する場合、分離のステップで始まる。当技術分野において典型的には、最初の精製ステップとして、抗体-HCP混合物をプロテインAの捕獲（例えば、プロテインAカラム）に供し、抗体はプロテインAに結合する一方、HCPは通り抜けて流れる。本発明の精製方法は、精製方法における最初のステップまたは任意のステップとして、抗体および少なくとも1つのHCPを含む混合物を、プロテインAの捕獲（例えば、プロテインAカラム）に供する必要があるという利点を有する。表1に、精製計画の1つの実施形態をまとめる。この計画のバリエーションが想定され、これは本発明の範囲内である。

30

【0068】

【表1】

表1 精製ステップとそれら関連の目的

精製ステップ	目的
一次回収	試料母体の清澄化
陽イオン交換クロマトグラフィ	抗体の捕獲、宿主細胞タンパク質および関連の不純物の減少
限界濾過/透析濾過	濃縮およびバッファーの交換
陰イオン交換クロマトグラフィ	宿主細胞タンパク質およびDNAの減少
Phenyl SepharoseHPクロマトグラフィ	抗体の凝集体および宿主細胞タンパク質の減少
ウイルス性濾過	存在する場合、大きいウイルスの除去
最終の限界濾過/透析濾過	抗体の濃縮および処方

40

【0069】

抗体を含む清澄化した溶液または混合物を得たらすぐに、細胞が産生したHCPなどの他のタンパク質からの抗体の分離を、イオン交換分離ステップ（複数可）および疎水性相互作用分離ステップ（複数可）を含む異なる精製技法の組合せを用いて行う。分離ステップにより、それらの電荷、疎水性の程度または大きさに基づいて、タンパク質の混合物が分離される。本発明の1つの態様では、分離は、陽イオン、陰イオンおよび疎水性相互作用が挙げられるクロマトグラフィを用いて行う。いくつかの異なるクロマトグラフィ樹脂

50

をこれらの各技法に利用でき、関連する特定のタンパク質に対する精製計画の正確な組立てを可能にする。各分離方法の本質は、タンパク質が、異なる速度でカラムを横切り落ちることにより、カラムをさらに通って落ちにつれて物理的分離の増加が達成されること、または分離媒体に選択的に付着することにより、次いで異なる溶媒によって別個に抽出されることのいずれかをもたらせることである。いくつかの場合では、不純物がカラムに特異的に付着し、抗体が付着しない、すなわち抗体がフロースルー中に存在するとき、抗体は不純物から分離される。

【0070】

上述のように、精製計画の正確な組立ては、精製するタンパク質の濃度に依存する。ある種の実施形態では、本発明の分離ステップは、1つ以上のHCPから抗体を分離するステップが採用される。本明細書に記載の方法を用いてうまく精製できる抗体には、これに限定されないが、ヒトIgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄およびIgM抗体が挙げられる。ある種の実施形態では、本発明の精製戦略は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーの使用を除外する。かかる実施形態は、IgG₃抗体が、プロテインAに非効率に結合することが知られているため、特にIgG₃抗体の精製に有用である。精製計画の具体的な組立てを可能にする他の因子には、これに限定されないが、(例えば、抗体のFabフラグメントと比べて完全長抗体に関連する)Fc領域の存在または非存在、対象とする抗体の生成に採用する特定の生殖系列の配列および抗体のアミノ酸組成(例えば、抗体の一次配列および分子の全体の変化/疎水性)が挙げられる。1つ以上の特徴を共有する抗体は、その特徴を利用するように組み立てた精製戦略を用いて精製することができる。

10

20

【0071】

4.2 一次回収

本発明の精製方法の最初のステップは、清澄化の第1相および試料母体からの抗IL-12抗体の一次回収に関連する。さらに、一次回収工程は、試料母体中に存在し得るウイルスを不活性化する時点であってもよい。例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,534,972号明細書のような、熱不活性化(低温殺菌)、pH不活性化、溶媒/洗剤処理、UVおよびγ線照射ならびにβ-プロピオラクトンまたは例えば銅フェナントリンなどの追加のある種の化学的不活性化が挙げられる、任意の1つ以上の様々なウイルス不活性化方法を、精製の一次回収相の間に使用することができる。本発明のある種の実施形態では、試料母体は、一次回収相の間にpHウイルス不活性化に供する。

30

【0072】

pHのウイルス不活性化の方法には、これに限定されないが、低pHである期間混合物を温置するステップ、続いてpHを中和するステップ、および濾過によって粒子を除去するステップが挙げられる。ある種の実施形態では、混合物は、pH2から5、好ましくはpH3から4、より好ましくはpH3.5で温置する。試料母体のpHは、これに限定されないが、クエン酸、酢酸、カプリル酸が挙げられる任意の適した酸または他の適した酸によって低下させることができる。pHレベルの選択は、主として抗体産物の安定性プロファイルおよびバッファー成分に依存する。低pHのウイルス不活性化の間の標的抗体の質は、pHおよび低pH温置の持続時間に影響を受けることが知られている。ある種の実施形態では、低pH温置の持続時間は、0.5時間から2時間、好ましくは0.5時間から1.5時間であり、より好ましくは、持続時間は1時間である。ウイルス不活性化は、タンパク質濃度に加えて、高濃度で不活性化を低下させ得るこれらのいくつかのパラメータに依存する。したがって、タンパク質濃度、pHおよび不活性化の持続時間の適したパラメータは、ウイルス不活性化の所望のレベルを達成するように選択することができる。

40

【0073】

ある種の実施形態では、ウイルスの不活性化は、適したフィルターの使用によって達成することができる。適したフィルターの非限定的な例は、Pall社のUltipor DV50(商標)フィルターである。本発明のある種の実施形態は、一次回収相の間にか

50

かる濾過を採用するが、他の実施形態では、それは、精製の最後から2番目または最終ステップのいずれかが挙げられる、精製工程の他の相で採用する。ある種の実施形態では、これに限定されないが、Viresolve (商標) フィルター (Millipore、Billerica、Mass.) ; Zeta Plus VR (商標) フィルター (CUNO; Meriden、Conn.) および Planova (商標) フィルター (旭化成ファーマ、Planova Division、Buffalo Grove、Ill.) などの代替的なフィルターが、ウイルスの不活性化に採用される。

【0074】

それらの実施形態では、ウイルスの不活性化を採用する場合、必要に応じて、さらなる精製ステップのために、試料母体を調整することができる。例えば、低pHのウイルス不活性化に続いて、試料母体のpHは、典型的には精製工程を続ける前に、より中性pH、例えば、約5.0から約8.5に調整する。さらに、混合物を注射用水(WFI)で流して、所望の伝導性を得ることができる。

【0075】

ある種の実施形態では、一次回収は、試料母体をさらに清澄化し、それによって抗IL-12抗体の精製を助ける1つ以上の遠心分離ステップを含む。試料の遠心分離は、例えば、限定するものではないが、7,000×gからおよそ12,750×gで実行することができる。大規模な精製に関して、かかる遠心分離は、例えば、限定するものではないが、結果として生じる懸濁液において150NTUの濁度レベルに達成する流速設定によりオンラインで行うことができる。かかる懸濁液は、次いでさらなる精製のために収集することができる。

【0076】

ある種の実施形態では、一次回収は、試料母体をさらに清澄化し、それによって抗IL-12抗体の精製を助ける1つ以上の深層濾過ステップの使用を含む。深層濾過は、段階的密度を有する濾過媒体を含む。かかる段階的密度により、より大きい粒子はフィルターの表面付近で捕捉する一方、より小さい粒子はフィルターの表面のより大きく開いた部分を透過し、フィルターの中央により近いより小さい開きのみで捕捉することが可能になる。ある種の実施形態では、深層濾過ステップは、デリピッド深層濾過ステップであってよい。ある種の実施形態は、一次回収相の間のみ深層濾過ステップを採用するが、他の実施形態は、1つ以上の追加の精製の相の間にデリピッド深層濾過を含む深層濾過を採用する。本発明に関して使用できる深層濾過の非限定的な例には、Cuno (商標) モデル30/60ZA深層フィルター(3M社)および0.45/0.2μmのSartopore (商標) 二重層フィルターカートリッジが挙げられる。

【0077】

4.3 イオン交換クロマトグラフィ

ある種の実施形態では、本発明は、抗体を含む溶出液が得られるように、少なくとも1つのイオン交換分離ステップに混合物を供することによって、抗体および少なくとも1つのHCPを含む混合物からHCP減少型抗体調製物を生成するための方法を提供する。イオン交換分離は、2つの基質を、それらのそれぞれのイオン電荷の差に基づいて分離する任意の方法を含み、陽イオン交換物質または陰イオン交換物質のいずれかを採用することができる。

【0078】

陽イオン交換物質対陰イオン交換物質の使用は、タンパク質の全体の電荷に基づく。したがって、陽イオン交換ステップの使用の前に陰イオン交換ステップ、または陰イオン交換ステップの使用の前に陽イオン交換ステップを採用することは、本発明の範囲内である。さらに、陽イオン交換ステップのみ、陰イオン交換ステップのみまたは2つの任意の連続的な組合せを採用することも、本発明の範囲内である。

【0079】

分離の実行において、最初の抗体混合物は、任意の様々な技法を用いて、例えば、バッチ精製技法またはクロマトグラフィ技法を用いて、イオン交換物質と接触させることがで

きる。

【0080】

例えば、バッチ精製に関して、イオン交換物質は、所望の開始バッファー中で調製する、またはそれに平衡化する。調製または平衡化において、イオン交換物質のスラリーを得る。抗体溶液をスラリーに接触させて、分離する抗体をイオン交換物質に吸着させる。イオン交換物質に結合しないHCP（複数可）を含む溶液は、例えば、スラリーの定着を可能にし、懸濁液を除去することによって、スラリーから分離する。スラリーは、1つ以上の洗浄ステップに供することができる。必要であれば、スラリーを、より高い伝導性の溶液に接触させて、イオン交換物質に結合したHCPを脱着させることができる。結合したポリペプチドを溶出するために、バッファーの塩濃度を上昇させることができる。

10

【0081】

イオン交換クロマトグラフィは、イオン交換分離技法として使用することもできる。イオン交換クロマトグラフィは、分子の全体の電荷の間の差に基づいて分子を分離する。抗体の精製について、抗体は、結合するために、イオン交換物質、例えば樹脂に付着される官能基の電荷と反対の電荷をもたなければならない。例えば、一般的にそのpIより低いpHのバッファー中で、全体的に正電荷を有する抗体は、負に荷電した官能基を含む陽イオン交換物質によく結合する。

【0082】

イオン交換クロマトグラフィにおいて、溶質の表面上の荷電したバッチは、クロマトグラフィのマトリックスに付着した反対の電荷によって誘引され、これにより周囲のバッファーのイオン強度は低くなる。溶出は、一般的にイオン交換マトリックスの荷電部位について溶質と競合するようにバッファーのイオン強度（すなわち、伝導性）を増加させることによって達成される。pHを変更し、これにより溶質の電荷を変化させることは、溶質の溶出を達成する別のやり方である。伝導性またはpHの変更は、漸進的（勾配溶出）または段階的（段階溶出）であってよい。

20

【0083】

陰イオンまたは陽イオン置換基は、クロマトグラフィのための陰イオンまたは陽イオン担体を形成するために、マトリックスに付着させることができる。陰イオン交換置換基の非限定的な例には、ジエチルアミノエチル（DEAE）、4級アミノエチル（QAE）および4級アミン（Q）基が挙げられる。陽イオン置換基には、カルボキシメチル（CM）、スルホエチル（SE）、スルホプロピル（SP）、リン酸（P）およびスルホン酸（S）が挙げられる。DE23（商標）、DE32（商標）、DE52（商標）、CM-23（商標）、CM-32（商標）およびCM-52（商標）などのセルロースイオン交換樹脂は、Whatman社、メイドストーン、ケント、U.K.から入手することができる。SEPHADEX（登録商標）ベースのおよびロクロスリンク型イオン交換体も既知である。例えば、DEAE-、QAE-、CM-およびSP-SEPHADEX（登録商標）ならびにDEAE-、Q-、CM-およびS-SEPHAROSE（登録商標）ならびにSEPHAROSE（登録商標）Fast Flowは、Pharmacia ABから全て入手することができる。さらに、TOYOPEARL（商標）DEAE-650SまたはMおよびTOYOPEARL（商標）CM-650SまたはMなどのDEAEおよびCM両方の誘導体化エチレングリコール-メタクリル酸コポリマーは、Toso Haas社、フィラデルフィア、Pa.から入手することができる。

30

40

【0084】

抗体および不純物、例えばHCP（複数可）を含む混合物は、陽イオン交換カラムなどのイオン交換カラム上に負荷する。例えば、限定するものではないが、混合物は、使用するカラムに依存して、約80gのタンパク質/L樹脂の負荷で負荷する。適した陽イオン交換カラムの例は、ベッドボリュームが約116Lであり、直径80cm×長さ23cmのカラムである。この陽イオンカラム上に負荷された混合物は、続いて洗浄用バッファー（平衡バッファー）で洗浄することができる。抗体は、次いでカラムから溶出し、最初の溶出液を得る。

50

【0085】

このイオン交換ステップにより、対象とする抗体の捕獲が促進される一方、HCPなどの不純物が減少する。ある種の態様では、イオン交換カラムは、陽イオン交換カラムである。例えば、限定するものではないが、かかる陽イオン交換カラムに適した樹脂は、CM Hyper DF樹脂である。これらの樹脂は、Pall社などの商業的供給源から入手することができる。この陽イオン交換手順は、室温またはその付近で行うことができる。

【0086】

4.4 限界濾過 / 透析濾過

本発明のある種の実施形態は、抗IL-12抗体試料をさらに精製および濃縮するために、限界濾過および / または透析濾過ステップを採用し、限界濾過は、「Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications」、L. ZemanおよびA. Zydney (Marcel Dekker社、New York、N.Y.、1996)および「Ultrafiltration Handbook」、Munir Cheryan (Technomic Publishing、1986; ISBN No. 87762-456-9)に詳細に記載されている。好ましい濾過方法は、Milliporeカタログの表題「Pharmaceutical Process Filtration Catalogue」、177-202頁(ベッドフォード、Mass.、1995/96)に記載のような接線流濾過である。限界濾過とは、一般的に0.1 μ mより小さい孔径を有するフィルターを用いる濾過をいう。かかる小さい孔径を有するフィルターを採用することによって、試料の体積が、フィルターを通る試料バッファの透過により減少できる一方、抗IL-12抗体は保持される。

【0087】

透析濾過は、塩、糖、非水溶媒の除去および交換、結合した種からの遊離した種の分離、低分子量の物質の除去またはイオンおよび / もしくはpH環境の迅速な変化を引き起こすために、限界フィルターを用いる方法である。かかるマイクロ溶質は、限界濾過速度と同等の速度で限界濾過する溶液に溶媒を添加することによって、もっとも効率的に除去される。これにより、一定体積で溶液から微細種が洗浄され、保持された抗体が効率的に精製される。本発明のある種の実施形態では、透析濾過ステップは、場合によってさらなるクロマトグラフィまたは他の精製ステップの前に、および抗体調製物から不純物を除去するために、本発明に関連して使用される様々なバッファを交換するために採用される。

【0088】

4.5 疎水性相互作用クロマトグラフィ

本発明は、疎水性相互作用分離ステップをさらに含み、抗体および少なくとも1つのHCPを含む混合物からHCP減少型抗体調製物を生成するための方法も取り上げる。例えば、減少したレベルのHCPを有する第2溶出液が得られるように、イオン交換カラムから得た最初の溶出液を、疎水性相互作用物質に供することができる。本明細書に記載されているものなどの疎水性相互作用クロマトグラフィステップは、一般的に抗体凝集体などのタンパク質凝集体および工程関連不純物を除去するために行う。

【0089】

分離の実行において、試料混合物は、例えば、バッチ精製技法を用いて、またはカラムを用いてHIC物質と接触させる。HIC精製の前に、例えば、混合物をプレカラムに通すことによって、任意のカオトロピック剤または非常に疎水的な物質を除去することを所望することができる。

【0090】

例えば、バッチ精製に関して、HIC物質は、所望の平衡バッファ中で調製する、またはそれに平衡化する。HIC物質のスラリーを得る。抗体溶液をスラリーと接触させて、分離する抗体をHIC物質に吸着させる。HIC物質に結合しないHCPを含む溶液は、例えば、スラリーの定着を可能にし、懸濁液を除去することによって、スラリーから分離する。スラリーは、1つ以上の洗浄ステップに供することができる。必要であれば、ス

ラリーをより低い伝導性の溶液と接触させて、H I C 物質に結合した抗体を脱着させることができる。結合した抗体を溶出するために、塩濃度を低下させることができる。

【0091】

イオン交換クロマトグラフィは、抗体の電荷に依存してそれらを単離する一方、疎水性相互作用クロマトグラフィは、抗体の疎水性特性を用いる。抗体上の疎水基は、カラム上の疎水基と相互作用する。より疎水的なタンパク質ほど、より強くカラムと相互作用する。したがって、H I C ステップにより、宿主細胞由来の不純物（例えば、DNAならびに他の高および低分子量産物関連種）が除去される。

【0092】

疎水性相互作用は、高いイオン強度でもっとも強く、したがって、この分離の形態は、塩析またはイオン交換手順に続いて便利に行われる。H I C カラムへの抗体の吸着は、高い塩濃度が好ましいが、実際の濃度は、抗体の性質および選択された特定のH I C リガンドに依存して、非常に広範にわたることができる。様々なイオンは、それらが疎水性相互作用を促進するか（塩析効果）、または水の構造を破壊し（カオトロピック効果）、疎水性相互作用の減退を引き起こすかどうかによって依存する、いわゆる疎溶媒性系列において配置することができる。Ba⁺⁺、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺、Li⁺、Cs⁺、Na⁺、K⁺、Rb⁺、NH₄⁺のような陽イオンは、塩析効果の増加に関して位置づけられる一方、PO₄³⁻、SO₄²⁻、CH₃CO₃⁻、Cl⁻、Br⁻、NO₃⁻、ClO₄⁻、I⁻、SCN⁻のような陰イオンは、カオトロピック効果の増加に関して位置づけることができる。

10

20

【0093】

一般的に、Na、KまたはNH₄の硫酸塩は、H I C におけるリガンド - タンパク質相互作用を効果的に促進する。次の関係： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NaBr} > \text{NaSCN}$ によって相互作用の強度に影響を与える塩を処方することができる。一般的に、約0.75から2 Mの間の塩濃度の硫酸アンモニウムまたは約1から4 Mの間のNaClが有用である。

【0094】

H I C カラムは、通常、疎水性リガンド（例えば、アルキルまたはアリル基）が共役する基盤マトリックス（例えば、架橋結合したアガロースまたは合成コポリマー物質）を含む。適したH I C カラムは、フェニル基で置換されたアガロース樹脂を含む（例えば、Phenyl Sepharose（商標）カラム）。多くのH I C カラムが、商業的に入手可能である。例には、これに限定されないが、低いまたは高い置換を有するPhenyl Sepharose（商標）6 Fast Flowカラム（Pharmacia LKB Biotechnology、AB、スウェーデン）；Phenyl Sepharose（商標）High Performanceカラム（Pharmacia LKB Biotechnology、AB、スウェーデン）；Octyl Sepharose（商標）High Performanceカラム（Pharmacia LKB Biotechnology、AB、スウェーデン）；Fractogel（商標）EMD PropylまたはFactogel（商標）EMD Phenylカラム（E. Merck、ドイツ）；Macro - Prep（商標）MethylまたはMacro - Prep（商標）t - Butyl Supports（Bio - Rad、カリフォルニア）；WP HI - Propyl（C3）（商標）カラム（J. T. Baker、ニュージャージー）およびToyopearl（商標）フェニルまたはブチルいずれかのカラム（TosoHaas、PA）が挙げられる。

30

40

【0095】

4.6 模範的な精製戦略

ある種の実施形態では、一次回収は、産生バイオリアクターの収集物から細胞および細胞残骸（HCPを含む）を除去するために、pHの低下、遠心分離および濾過のステップを連続的に採用することによって進行することができる。例えば、限定するものではないが、抗体、培地および細胞を含む培養物は、およそ1時間、約3.5のpHを用いてpH

50

不活性化に供することができる。pHの低下は、クエン酸、例えば3Mのクエン酸などの既知の酸調製を用いて促進することができる。pH感受性ウイルス混入物を完全に排除しない場合、かかるpHの低下により、この混入物を減少および/または不活性化させ、いくらかの培地/細胞混入物を沈殿させる。かかる低下に続いて、水酸化ナトリウム、例えば3Mの水酸化ナトリウムなどの塩基を用いて、約20から約40分間、pHを約4.9または5.0に調整する。この調整は、およそ20で行うことができる。ある種の実施形態では、pH調製した培養物を、次いでおよそ7000×gからおよそ11,000×gで遠心分離する。ある種の実施形態では、結果として生じる試料懸濁液を、多数の深層フィルターを含むフィルタートレインに通す。ある種の実施形態では、フィルタートレインは、およそ12個の16インチのCuno(商標)モデル30/60ZA深層フィルター(3M社)および3つの30インチの0.45/2μmのSartopore(商標)2フィルターカートリッジ(Sartorius)を装着したおよそ3回転のフィルターハウジングを含む。清澄化した懸濁液は、事前に滅菌した収集容器などの容器中に収集し、およそ8で維持する。この温度は次いで、捕獲クロマトグラフィステップまたは以下に概説するステップの前に、およそ20に調整する。当業者は、上述の条件を変えることができ、これも本発明の範囲内であることに注目されたい。

【0096】

清澄化した懸濁液は、次いで陽イオン交換カラムを用いてさらに精製することができる。ある種の実施形態では、陽イオン交換カラムに使用する平衡化バッファーは、約5.0のpHを有するバッファーである。適したバッファーの例は、pH5.0の約210mMの酢酸ナトリウムである。平衡化に続いて、カラムに、上記の一次回収ステップから調製した試料を負荷する。カラムに、GE HealthcareのCM Sepharose(商標)Fast Flowなどの陽イオン交換樹脂を充填する。カラムを、次いで平衡化バッファーを用いて洗浄する。カラムは、次に平衡化または洗浄用バッファーと比較して、より大きいイオン強度を有するバッファーを用いて、溶出ステップに供する。例えば、適した溶出バッファーは、pH5.0の約790mMの酢酸ナトリウムであってよい。抗IL-12抗体を溶出し、OD_{280nm}でセットしたUV分光光度計を用いてモニターすることができる。特定の実施例では、溶出収集物は、上側3OD_{280nm}から下側8OD_{280nm}であってよい。当業者は条件を変えることができ、これもさらに本発明の範囲内であることを理解されたい。

【0097】

ある種の実施形態では、一次回収から得た清澄化した懸濁液は、代わりに陰イオン交換カラムを用いてさらに精製する。このステップに適したカラムの非限定的な例は、ベッドボリュームが約85Lであり、直径60cm×長さ30cmのカラムである。カラムに、GE HealthcareのQ Sepharose(商標)Fast Flowなどの陰イオン交換樹脂を充填する。カラムは、約7つのカラム容積のトリス/塩化ナトリウムなどの適切なバッファーを用いて平衡化することができる。適した条件の例は、pH8.0の、25mMのトリス、50mMの塩化ナトリウムである。再び当業者は条件を変えられるが、これも本発明の範囲内である。カラムに、上記で概説した一次回収ステップから収集した試料を負荷する。別の態様では、カラムは、陽イオン交換の間に収集された溶出液から負荷する。カラムの負荷に続いて、カラムを平衡バッファー(例えば、トリス/塩化ナトリウムバッファー)で洗浄する。抗IL-12抗体を含むフロースルーは、UV分光光度計を用いてOD_{280nm}でモニターすることができる。この陰イオン交換ステップにより、核酸様DNAおよび宿主細胞タンパク質などの工程関連不純物が減少する。対象とする抗体が、カラムの固相、例えば、Q Sepharose(商標)と相互作用も結合もしないが、多くの不純物が、カラムの固相と相互作用および結合するという事実により、分離は起こる。陰イオン交換は、約12で行うことができる。

【0098】

ある種の実施形態では、イオン交換ステップが最初に採用されることに依存して、陽イオン交換または陰イオン交換溶出液は、次に例えば16インチのCuno(商標)デリビ

ッドフィルターを用いて濾過する。デリピッドフィルターを用いるこの濾過に続いて、例えば、30インチの0.45/0.2 μm のSartopore（商標）二重層フィルターカートリッジを用いることができる。イオン交換溶出バッファーは、フィルター中に残る残留量を流すために使用でき、限界濾過/透析濾過のために調製することができる。

【0099】

限界濾過/透析濾過ステップを遂行するために、濾過媒体は、可溶性バッファー、例えば、pH 7.0の20 mMのリン酸ナトリウム中で調製する。塩化ナトリウムなどの塩、例えば100 mM塩化ナトリウムを添加して、イオン強度を増加させることができる。この限界濾過/透析濾過ステップは、抗IL-12抗体の濃縮、酢酸ナトリウムの除去およびpHの調整に役立つ。商業的なフィルターが、このステップを達成するために利用可能である。例えば、Milliporeは、30 kDの分子量のカットオフ(MWCO)セルロース限界フィルターメンブレンカセットを製造している。この濾過手順は、室温またはその付近で行うことができる。

【0100】

ある種の実施形態では、上記の捕獲濾過ステップからの試料を、第2のイオン交換分離に供する。好ましくは、この第2のイオン交換分離は、第1のイオン交換分離の反対の電荷に基づいた分離を含む。例えば、陰イオン交換ステップを一次回収後に採用すれば、第2のイオン交換クロマトグラフィステップは、陽イオン交換ステップである。反対に、一次回収ステップに続いて陽イオン交換ステップを行えば、そのステップに続いて陰イオン交換ステップを行う。ある種の実施形態では、第1のイオン交換の溶出を、適切なバッファーの条件に調整する場合、第1のイオン交換の溶出は、第2のイオン交換クロマトグラフィステップに直接供することができる。適した陰イオンおよび陽イオン分離の物質および条件は、上記に説明する。

【0101】

本発明のある種の実施形態では、抗IL-12抗体を含む試料は、疎水性相互作用分離ステップを用いてさらに処理される。かかるステップに適したカラムの非限定的な例は、ベッドボリュームが約75 Lである、直径80 cm×長さ15 cmのカラムであり、これに限定されないが、Amersham Biosciences、ウブサラ、スウェーデンのPhenyl HP Sepharose（商標）などのHICに使用される適切な樹脂を充填する。対象とする抗体を含む、前の陰イオン交換クロマトグラフィステップから得たフロースルー調製物は、pH 7.0の同等量のおよそ1.7 Mの硫酸アンモニウム、50 mMのリン酸ナトリウムで希釈することができる。これを、次いで0.45/0.2 μm のSartopore（商標）2重層フィルターまたはその同等物を用いて、濾過に供することができる。ある種の実施形態では、疎水性クロマトグラフィ手順は、2つ以上のサイクルを含む。

【0102】

ある種の実施形態では、HICカラムは、適したバッファーを用いて最初に平衡化する。適したバッファーの非限定的な例は、pH 7.0の、0.85 Mの硫酸アンモニウム、50 mMのリン酸ナトリウムである。当業者は、緩衝剤の濃度を変化させることによって、および/または同等のバッファーを代用することによって、平衡化バッファーを変えることができ、これも本発明の範囲内である。ある種の実施形態では、カラムに、次いで陰イオン交換のフロースルー試料を負荷し、複数回、例えば3回、硫酸アンモニウム/リン酸ナトリウムなどの適した緩衝系で洗浄する。適した緩衝系の例には、およそ7.0のpHを有する、1.1 Mの硫酸アンモニウム、50 mMのリン酸ナトリウムバッファーが挙げられる。場合によって、カラムは、さらなる洗浄サイクルを受けることができる。例えば、第2洗浄サイクルは、適切な緩衝系を用いて、例えば1から7回の複数のカラム洗浄を含むことができる。適した緩衝系の非限定的な例には、pH 7.0の、0.85 Mの硫酸アンモニウム、50 mMのリン酸ナトリウムが挙げられる。1つの態様では、負荷したカラムは、適切な緩衝系を用いて、第3洗浄をさらに受ける。カラムは、およそpH 7.0で、1.1 Mの硫酸アンモニウム、50 mMのリン酸ナトリウムなどの緩衝系を用いて

、複数回、例えば 1 から 3 回洗浄することができる。再び当業者は緩衝条件を変えることができ、これも本発明の範囲内である。

【0103】

カラムは、適切な溶出バッファーを用いて溶出する。かかる溶出バッファーの適した例は、およそ pH 7.0 の 0.5 M の硫酸アンモニウム、15 mM のリン酸ナトリウムである。対象とする抗体は、ピークの上側 30 D_{280nm} から下側 30 D_{280nm} まで従来の分光光度計を用いて検出および収集することができる。

【0104】

本発明のある種の態様では、疎水性クロマトグラフィステップからの溶出液は、存在すれば、インタクトなウイルスを含むウイルス粒子の除去のために、濾過に供することができる。適した濾過の非限定的な例は、Pall社のUltipor DV50（商標）フィルターである。他のウイルス用フィルターをこの濾過ステップに使用でき、当業者によく知られている。HIC溶出液は、約 0.1 μm の事前に湿らしたフィルターおよびおよそ 34 psig で 2 × 30 インチのUltipor DV50（商標）フィルタートレインに通す。ある種の実施形態では、濾過工程に続いて、フィルターハウジング中に保持された任意の抗体を除去するために、例えばHIC溶出バッファーを用いて、フィルターを洗浄する。フィルターは、およそ 12 で事前に滅菌した容器中に保管することができる。

10

【0105】

ある種の実施形態では、上記からの濾液を、再び限界濾過 / 透析濾過に供する。当業者の終点が、例えば医薬製剤における抗体の使用であれば、このステップは重要である。この工程を採用する場合、これにより、抗体の濃縮、事前に使用する緩衝塩の除去および特定の処方用バッファーとこれとの交換を促進することができる。ある種の実施形態では、処方用バッファーの複数容量、例えば 2 容量を用いる連続的な透析濾過を行う。適した処方用バッファーの非限定的な例は、pH 5.9 の、5 mM のメチオニン、2 % のマンニトール、0.5 % のショ糖のバッファー（Tween は含まない）である。このダイアボリウム交換が完了すると、抗体は濃縮される。抗体が所定の濃度に達成されると、次いで当業者は、Tween の最終濃度が約 0.005 % (v/v) に達するように添加すべきである 10 % の Tween の量を計算することができる。

20

【0106】

本発明のある種の実施形態は、さらなる精製ステップを含む。イオン交換クロマトグラフィ方法の前、間または後に行うことができる追加の精製手順の例には、エタノール沈殿、等電点電気泳動、逆相 HPLC、シリカにおけるクロマトグラフィ、ヘパリン Sepharose（商標）におけるクロマトグラフィ、さらなる陰イオン交換クロマトグラフィおよび / またはさらなる陽イオン交換クロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティクロマトグラフィ（例えば、プロテイン A、プロテイン G、抗体、特異的な基質、リガンドまたは捕獲剤としての抗原を用いる）が挙げられる。

30

【0107】

本発明のある種の実施形態では、抗 IL-12 抗体は、図 1 に概説される重鎖および軽鎖の可変領域の配列を含む IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ または IgM のアイソタイプの抗体である。好ましい実施形態では、抗 IL-12 抗体は、図 1 に概説される重鎖および軽鎖の可変領域の配列を含む IgG₁、IgG₂、IgG₃ または IgG₄ のアイソタイプの抗体であり、より好ましくは、抗 IL-12 抗体は、図 1 に概説される重鎖および軽鎖の可変領域の配列を含む IgG₁ 抗体である。

40

【0108】

5. 試料純度のアッセイ方法

本発明は、単離 / 精製した抗体組成物中の宿主細胞タンパク質（HCP）の残留レベル

50

を決定するための方法も提供する。上記のように、H C P は、望ましくは最終標的物質産物、すなわち抗 I L - 1 2 抗体から排除される。典型的な H C P は、抗体産生の源から生じるタンパク質を含む。標的抗体から H C P を同定し、十分に除去できなければ、低下した有効性および / または被験者の有害な反応を引き起こし得る。

【 0 1 0 9 】

本明細書で使用するとき、用語「H C P E L I S A」は、アッセイに使用する二次抗体が、抗体、すなわち抗 I L - 1 2 抗体を生成するために使用される細胞、例えば C H O 細胞から産生される H C P に特異的である場合の E L I S A をいう。二次抗体は、当業者に既知の従来の方法によって産生することができる。例えば、二次抗体は、見せかけの産生および精製の実行によって得られる H C P を用いて、産生することができる、すなわち、対象とする抗体を産生するために使用する同じ細胞株を使用するが、細胞株に抗体 D N A を形質移入しない。典型的な実施形態では、二次抗体は、最適な細胞発現系、すなわち、標的抗体を産生するために使用する細胞発現系において発現する H C P と同様のものを用いて産生する。

10

【 0 1 1 0 】

一般的に、H C P E L I S A は、抗体の 2 つの層、すなわち一次抗体および二次抗体の間に H C P を含む液体試料をサンドイッチするステップを含む。試料中の H C P が一次抗体、例えばこれに限定されないが、アフイニティ精製したヤギ抗 C H O (C y g n u s) によって捕獲される時間の間、試料を温置する。抗体を生成するために使用した細胞から精製した H C P に特異的な、標識した二次抗体または抗体のブレンド、例えばビオチン化した抗 C H O H C P を添加し、試料内の H C P に結合させる。ある種の実施形態では、一次および二次抗体は、ポリクローナル抗体である。ある種の態様では、一次および二次抗体は、H C P に対して産生されたポリクローナル抗体のブレンド、例えば、これに限定されないが、ビオチン化ヤギ抗宿主細胞タンパク質混合物 5 9 9 / 6 2 6 / 7 4 8 である。試料中に含まれる H C P の量は、二次抗体の標識に基づく適切な試験を用いて決定される。

20

【 0 1 1 1 】

H C P E L I S A は、上記のセクション I I I に記載した方法を用いて得た溶出液またはフロースルーなどの抗体組成物中の H C P のレベルを決定するために使用することができる。本発明は、抗体を含む組成物も提供し、H C P の酵素結合免疫吸着測定法 (「E L I S A」) によって決定するとき、前記組成物は、検出可能なレベルの H C P を有さない。

30

【 0 1 1 2 】

6 . さらなる修飾

本発明の抗 I L - 1 2 抗体は、修飾することができる。いくつかの実施形態では、抗 I L - 1 2 抗体またはこの抗原結合フラグメントを化学的に修飾し、所望の効果をもたらす。例えば、本発明の抗体および抗体フラグメントのペグ化は、例えば、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる次の文献 : F o c u s o n G r o w t h F a c t o r s 3 : 4 - 1 0 頁 (1 9 9 2) ; E P 0 1 5 4 3 1 6 および E P 0 4 0 1 3 8 4 に記載のような、当技術分野で既知の任意のペグ化反応によって行うことができる。1 つの態様では、ペグ化は、ポリエチレングリコール分子 (または類似の反応性水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応によって行う。本発明の抗体および抗体フラグメントのペグ化のための適した水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール (P E G) である。本明細書で使用するとき、「ポリエチレングリコール」は、モノ (C 1 - C 1 0) アルコキシまたはアリーロキシポリエチレングリコールなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用される P E G の任意の形態を包含することを意味する。

40

【 0 1 1 3 】

本発明のペグ化された抗体および抗体フラグメントを調製するための方法は、一般的に (a) 抗体または抗体フラグメントが、1 つ以上の P E G 基に付着するのに適した条件下で、抗体または抗体フラグメントと、P E G の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体な

50

どのポリエチレングリコールとを反応させるステップおよび (b) 反応生成物を得るステップを含む。既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて、最適な反応条件またはアシル化反応を選択することは、当業者に明らかである。

【0114】

ペグ化した抗体および抗体フラグメントは、一般的に本明細書に記載の抗 IL - 12 抗体および抗体フラグメントを投与することによって、本発明の IL - 12 関連障害を治療するために使用することができる。一般的に、ペグ化した抗体および抗体フラグメントは、非ペグ化抗体および抗体フラグメントと比較して、増加した半減期を有する。ペグ化した抗体および抗体フラグメントは、単独に、一緒にまたは他の医薬組成物との組合せで、採用することができる。

10

【0115】

本発明の抗体または抗体部分は、別の機能性分子 (例えば、別のペプチドまたはタンパク質) に誘導体化または連結することができる。したがって、本発明の抗体および抗体部分は、イムノアドヘシン分子を含む、本明細書に記載の誘導体化および他のやり方で修飾したヒト抗 h IL - 12 抗体の形態を含むことを意図する。例えば、本発明の抗体または抗体部分は、別の抗体 (例えば、二重特異的な抗体または二重特異性抗体)、検出可能な薬剤、細胞毒性薬、医薬品および / または抗体もしくは抗体分子と (ストレプトアビジンのコア領域またはポリヒスチジンタグなどの) 他の分子との会合を媒介できるタンパク質もしくはペプチドなどの 1 つ以上の分子要素に、(化学的共役、遺伝子的融合、非共有結合または他のやり方によって) 機能的に連結することができる。

20

【0116】

誘導体化した抗体の 1 つのタイプは、(例えば、二重特異的な抗体を作成する、同じタイプまたは異なるタイプの) 2 つ以上の抗体と架橋結合することによって生成する。適したクロスリンカーは、適切なスペーサーによって明瞭に分離される 2 つの反応基を有するヘテロ二重機能的 (例えば、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) またはホモ二重機能的 (例えば、ジスクシンイミジルスベレート) なものが挙げられる。かかるリンカーは、Pierce Chemical Company、ロックフォード、IL から入手することができる。

【0117】

本発明の抗体または抗体部分を誘導体化できる有用な検出可能な薬剤は、蛍光性化合物を含む。典型的な検出可能な蛍光性薬剤には、フルオレセン、フルオレセンイソチオシアネート、ローダミン、5 - ジメチルアミン - 1 - ナフタレンスルフォニルクロリド、フィコエリトリンなどが挙げられる。抗体は、アルカリンホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素で誘導体化することもできる。抗体を検出可能な酵素で誘導体化するとき、それは、酵素が検出可能な反応産物の生成に使用する追加の試薬を添加することによって検出することができる。例えば、検出可能な薬剤の西洋ワサビペルオキシダーゼが存在するとき、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加により、検出可能な有色の反応生成物がもたらされる。抗体は、ビオチンを用いて誘導体化することもでき、アビジンまたはストレプトアビジン結合の直接的な測定によって検出することもできる。

30

40

【0118】

7. 医薬組成物

本発明の抗体および抗体部分は、患者への投与に適した医薬組成物中に組み込むことができる。典型的に、医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用する時、「薬学的に許容される担体」は、生理的に適合性のある任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的に許容される担体の例には、1 つ以上の水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなどおよびこれらの組合せが挙げられる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えばマンニトール、ソルビトールなどの糖、多価アルコールまたは塩化ナトリウムを含むことが望ましい。薬学的に許

50

容される担体は、抗体または抗体部分の有効期間または効果を増強させる、少量の湿潤剤または乳化剤などの補助物質、保存剤またはバッファーをさらに含むことができる。

【0119】

本発明の抗体および抗体部分は、非経口投与に適した医薬組成物中に組み込むことができる。抗体または抗体部分は、例えば、 $0.1 - 250 \text{ mg/mL}$ の抗体を含む注射可能な溶液として調製することができる。注射可能な溶液は、フリントまたはアンバーバイアル中の液体または凍結乾燥型投与形態、アンプルまたは事前に満たしたシリンジのいずれかから構成することができる。バッファーは、 $\text{pH } 5.0$ から 7.0 （最適は $\text{pH } 6.0$ ）の L-ヒスチジン およそ $1 - 50 \text{ mM}$ （最適は $5 - 10 \text{ mM}$ ）であってよい。他の適したバッファーには、これに限定されないが、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムが挙げられる。塩化ナトリウムは、 $0 - 300 \text{ mM}$ の濃度（最適は液体型投与形態について 150 mM ）で、溶液の毒性を修正するために使用することができる。抗凍結剤は、凍結乾燥型投与形態について、主に $0 - 10\%$ のスクロース（最適は $0.5 - 1.0\%$ ）を含むことができる。他の適した抗凍結剤には、トレハロースおよびラクトースが挙げられる。バルク剤は、凍結乾燥型投与形態について、主に $1 - 10\%$ のマニトール（最適は 2.4% ）を含むことができる。安定化剤は、液体および凍結乾燥型投与形態の両方で使用でき、主に $1 - 50 \text{ mM}$ の L-メチオニン （最適は $5 - 10 \text{ mM}$ ）である。他の適したバルク剤には、グリシン、アルギニンが挙げられ、 $0 - 0.05\%$ のポリソルベート 80 （最適は $0.005 - 0.01\%$ ）として含むことができる。追加の界面活性剤には、これに限定されないが、ポリソルベート 20 および BRIJ 界面活性剤が挙げられる。

10

20

【0120】

1つの態様では、医薬組成物は、約 $0.01 \text{ mg/kg} - 10 \text{ mg/kg}$ の投薬量で抗体を含む。別の態様では、抗体の投薬量には、1週間おきの投与でおよそ 1 mg/kg または毎週の投与でおよそ 0.3 mg/kg が挙げられる。当業者は、患者への投与のために適切な投薬量および投与計画を突き止めることができる。

【0121】

本発明の組成物は、様々な形態であってよい。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射および注入可能な溶液）、分散剤または懸濁液、錠剤、丸剤、粉末、リボソームおよび坐薬などの液体、半固体および固体の投与形態が挙げられる。形態は、例えば目的とする投与様式および治療の適用に依存する。典型的な組成物は、他の抗体によるヒトの受動免疫化に使用するものと同様の組成物などの、注射および注入可能な溶液の形態である。1つの投与様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。1つの態様では、抗体は、静脈内注射または注入によって投与する。別の態様では、抗体は、筋肉内または皮下注射によって投与する。

30

【0122】

治療用組成物は、典型的に、製品および貯蔵の条件下で無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散剤、リボソームまたは高い薬物濃度に適した他の整った構造として処方することができる。無菌の注射可能な溶液は、適切な溶媒中で必要とされる量の活性化化合物（すなわち、抗体または抗体部分）に、上記に列挙される成分の1つまたは組合せを組み込むことによって調製することができ、必要に応じて、続いて濾過滅菌する。一般的に、分散剤は、基本的な分散剤媒体および上記の列挙からの必要とされる他の成分を含む無菌媒介物中に、活性化化合物を組み込むことによって調製する。無菌の注射可能な溶液を調製するための無菌の凍結乾燥した粉末の場合、調製方法は、前に滅菌濾過したその溶液から、活性成分の粉末に加えて任意の追加の所望の成分を生成する、真空乾燥および噴霧乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散剤の場合に必要とされる粒子サイズの維持および界面活性剤の使用によって維持することができる。注射可能な組成物の遷延性吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアレート塩およびゼラチンを含むことによってもたらすことができる。

40

50

【0123】

本発明の抗体および抗体部分は、当技術分野で既知の様々な方法によって投与することができ、投与の1つの経路/様式は、皮下注射、静脈内注射または注入である。当業者に理解されるように、投与の経路および/または様式は、所望の結果に依存して変わる。ある種の実施形態では、活性化合物は、移植、経皮パッチおよびマイクロカプセル化した送達系が挙げられる放出調節した製剤などの、迅速な放出に対して化合物を保護する担体とともに調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤を調製するための多くの方法は、特許を取られている、または一般的に当業者に既知である。例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson、編、Marcel Dekker社、New York、1978を参照されたい。

10

【0124】

ある種の態様では、本発明の抗体または抗体部分は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な食用担体を用いて、経口的に投与することができる。化合物（および所望されれば他の成分）は、錠剤中に圧縮したまたは患者の食事の中に直接組み込んだ硬いまたは柔らかいゼラチンシェル中に封入することもできる。経口の治療用投与のために、組成物は、賦形剤とともに組み込むことができ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハーなどの形態でを使用することができる。非経口投与以外によって本発明の化合物を投与するために、その不活性化を防ぐ物質で化合物をコートするまたはそれと化合物とを共投与することが必要になり得る。

20

【0125】

補充的な活性化合物も、組成物中に組み込むことができる。ある種の態様では、本発明の抗体または抗体部分は、IL-12活性が有害である障害を治療するのに有用である1つ以上の追加の治療剤と共処方および/または共投与する。例えば、本発明の抗hIL-12抗体または抗体部分は、他の標的と結合する1つ以上の追加の抗体（例えば、他のサイトカインと結合するまたは細胞表面分子と結合する抗体）と共処方および/または共投与することができる。さらに、本発明の1つ以上の抗体は、2つ以上の前述の治療剤と組み合わせ使用することができる。かかる組合せ治療は、より低い投薬量の投与される治療剤を好都合に利用することができる、したがって可能性のある毒性または様々な単独治療に関連する合併症を回避することができる。本発明の抗体を、組合せ治療の一部として使用するとき、抗体を単独で患者に投与するときより、低い投薬量の抗体を所望することができることは当業者に理解される（例えば、相乗的な治療効果が、組合せ治療の使用によって達成でき、順により低い用量の抗体の使用により、所望の治療効果の達成が可能になる）。

30

【0126】

本発明の抗体またはこの抗原結合部分が、単独でまたは追加の薬剤、例えば治療剤と組み合わせ使用でき、前記追加の薬剤が、その意図する目的のために当業者によって選択されることは理解されたい。例えば、追加の薬剤は、本発明の抗体によって治療する疾患または状態を治療するのに有用であると当技術分野で認識されている治療剤であってよい。追加の薬剤は、治療用組成物に有益な貢献をもたらす薬剤、例えば、組成物の粘性に影響する薬剤であってもよい。

40

【0127】

本発明内に含まれ得る組合せが、それらの意図する目的に有用なそれらの組合せであることもさらに理解されたい。以下に示される薬剤は例示であり、限定することを意図していない。本発明の一部である組合せは、本発明の抗体および以下のリストから選択される少なくとも1つの追加の薬剤であってよい。組合せは、1つ以上の追加の薬剤、例えば、形成される組成物がその意図される機能を果たせるような組合せであれば、2または3つの追加の薬剤を含むこともできる。

50

【0128】

いくつかの組合せは、イブプロフェン様薬物を含むNSAIDsともいわれる非ステロイド性抗炎症薬（複数可）である。他の組合せは、プレドニゾロンを含む副腎皮質ステロイドであり、よく知られているステロイド使用の副作用は、本発明の抗IL-12抗体と組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を減らすことによって、低下または排除することさえできる。本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができる、関節リウマチ用の治療剤の非限定的な例には、次のもの：サイトカイン抑制性抗炎症薬（複数可）（CSAIDs）；他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、TNF、LT、IL-I、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGFに対する抗体またはこのアンタゴニストが挙げられる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80（B7.1）、CD86（B7.2）、CD90またはCD154を含むそれらのリガンド（gp39またはCD40L）などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。

10

【0129】

治療剤のいくつかの組合せは、自己免疫および続く炎症カスケードにおける異なる時点で干渉でき、例にはTNFアンタゴニスト様キメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体、D2E7、（その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、1996年2月9日に出版された米国出願第08/599,226号明細書）、cA2（Remicade（商標））、CDP571、抗TNF抗体フラグメント（例えばCDP870）および可溶性p55またはp75TNF受容体、その誘導体、すなわちp75TNFRlgG（Enbrel（商標））またはp55TNFR1lgG（Lenercept）、可溶性IL-13受容体（sIL-13）およびTNF α 変換酵素（TACE）阻害剤も挙げられ、同様にIL-1阻害剤（例えば、Vx740またはIL-1RAなどのインターロイキン1変換酵素阻害剤）は、同じ理由から効果的であり得る。他の組合せは、インターロイキン11、抗P7およびpセレクチン糖タンパク質リガンド（PSGL）を含む。さらなる他の組合せは、IL-12の機能に平行、依存または協調して働き得る自己免疫応答の他のキープレーヤーを含み、特に、IL-18抗体もしくは可溶性IL-18受容体またはIL-18結合タンパク質を含むIL-18アンタゴニストが含まれる。IL-12およびIL-18は、オーバーラップを有するが、両方に対するアンタゴニストの異なる機能および組合せは、もっとも効果的であり得ることが示された。さらなる別の組合せは、非枯渴性抗CD4阻害剤を含む。さらなる他の組合せは、抗体、可溶性受容体またはアンタゴニストのリガンドを含む、同時刺激経路CD80（B7.1）またはCD86（B7.2）のアンタゴニストを含む。

20

30

【0130】

本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリンスルファサラジン、メサラジン、オルサラジクロロキニン/ヒドロキシクロロキン、ペンシルアミン、金チオリンゴ酸（筋肉内および経口）、アザチオプリン、コチシン、副腎皮質ステロイド（経口、吸入および局所注射）、 β -2アドレナリン受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル）、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリク酸、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラバマイシン、ミコフェノレートモフェチル、レフルノミド、NSAIDs、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどの副腎皮質ステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデンソシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害薬、アドレナリン系薬剤、TNF α またはIL-1などの炎症誘発性サイトカインによってシグナル伝達に干渉する薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤（例えばVx740）、抗P7、pセレクチン糖タンパク質リガンド（PSGL）、TNF α 変換酵素（TACE）阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スル

40

50

ファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば、可溶性 p55 または p75 TNF 受容体および誘導体 p75 TNFR IgG (Enbrel, TM.) および p55 TNFR IgG (Lenercept)、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、可溶性 IL-13 受容体 (sIL-13)）および抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 および TGFβ）などの薬剤と組み合わせることができる。いくつかの組合せは、メトトレキサートまたはレフルノミドを含み、中等度または重度の関節リウマチの場合、シクロスプリンを含む。

【0131】

本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができる炎症性腸疾患用の治療剤の非限定的な例には、次のもの：ブデノシド、上皮増殖因子、副腎皮質ステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リボキシゲナーゼ阻害薬、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化薬、トロンボキサン阻害剤、IL-1 受容体アンタゴニスト、抗 IL-1α モノクローナル抗体、抗 IL-16 モノクローナル抗体、増殖因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニルイミダゾール化合物、他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、TNF、LT、IL-I、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF および PDGF に対する抗体またはこのアンタゴニストが挙げられる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90 などの細胞表面分子またはそれらのリガンドに対する抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスプリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノレートモフェチル、レフルノミド、NSAIDs、例えばイブプロフェン、プレドニゾロンなどの副腎皮質ステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデノシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害薬、アドレナリン系薬剤、TNFα または IL-1 などの炎症誘発性サイトカインによってシグナル伝達に干渉する薬剤（例えば IRAK、NIK、IKK、p38 または MAPキナーゼ阻害剤）、IL-1β 変換酵素阻害剤（例えば Vx740）、抗 P7、pセレクチン糖タンパク質リガンド (PSGL)、TNFα 変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などの T 細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば、可溶性 p55 または p75 TNF 受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、可溶性 IL-13 受容体 (sIL-13)）および抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 および TGFβ）などの薬剤と組み合わせることができる。

【0132】

抗体または抗原結合部分と組み合わせることができるクローン病用の治療剤の例には、次のもの：TNF アンタゴニスト、例えば、抗 TNF 抗体、D2E7（その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、1996年2月9日に出版された米国出願第08/599,226号明細書）、cA2 (Remicade (商標))、CDP571、抗 TNF 抗体フラグメント（例えば CDP870）、TNFR-Ig 構築物 (p75 TNFR IgG (Enbrel (商標)) および p55 TNFR IgG (Lenercept)、抗 P7、pセレクチン糖タンパク質リガンド (PSGL)、可溶性 IL-13 受容体 (sIL-13) および PDE4 阻害剤が挙げられる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、副腎皮質ステロイド、例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾンと組み合わせることができる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジン、ならびに IL-1 などの炎症誘発性サイトカインの合成または作用に干渉する薬剤、例えば IL-1 変換酵素阻害剤（例えば Vx740）および IL-1ra とともに組み合わせることができる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、T 細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤 6-メルカプトプリンとも使用

10

20

30

40

50

することができる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、IL-11と組み合わせることができる。

【0133】

本発明の抗体または抗体部分と組み合わせることができる多発性硬化症用の治療剤の非限定的な例には、次のもの：副腎皮質ステロイド、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、4-アミノピリジン、チザニジン、IFN β 1a (Avonex; Biogen)、IFN β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex)、コポリマー1 (Cop-1、Copaxone、Teva Pharmaceutical Industries社)、高圧酸素、静脈内免疫グロブリン、クラプリビン、他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、TNF、LT、IL-I、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGFに対する抗体またはこのアンタゴニストが挙げられる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90またはそれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラバマイシン、ミコフェノレートモフェチル、レフルノミド、NSAIDs、例えばイブプロフェン、プレドニゾロンなどの副腎皮質ステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデノシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害薬、アドレナリン系薬剤、TNF α またはIL-1などの炎症誘発性サイトカインによってシグナル伝達に干渉する薬剤（例えばIRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤（例えばVx740）、抗P7、pセレクチン糖タンパク質リガンド(PSGL)、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびその誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、可溶性IL-13受容体(sIL-13)）および抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β ）などの薬剤と組み合わせることもできる。

10

20

30

【0134】

抗体またはこの抗原結合タンパク質と結合することができる多発性硬化症用の治療剤の例には、IFN β 、例えばIFN β 1aおよびIFN β 1b、コパキソン、副腎皮質ステロイド、IL-1阻害剤、TNF阻害剤ならびにCD40リガンドおよびCD80に対する抗体が挙げられる。

【0135】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体または抗体部分の「治療的有效量」または「予防的有效量」を含むことができる。「治療的有效量」とは、所望の治療結果を達成するために必要な投薬量および期間での効果的な量をいう。抗体または抗体部分の治療的有效量は、病態、年齢、性別および個人の体重などの因子ならびに個人において所望の応答を誘発する抗体または抗体部分の能力によって変えることができる。治療的有效量は、抗体または抗体部分の任意の毒性または有害な効果より、治療的に有益な効果が勝るものでもある。「予防的有效量」とは、所望の予防効果を達成するために必要な投薬量および期間での効果的な量をいう。典型的に、予防的用量は、疾患の初期段階より前またはそのときに患者において使用し、予防的有效量は、治療的有效量より少なくなる。

40

【0136】

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば、治療または予防の応答）をもたらすように調整することができる。例えば、単回ボラスを投与でき、いくつかの分割した用量を経時的に投与でき、または治療状況の緊急性が示されるとき、用量を比例的に減少または増加させることができる。ある種の実施形態では、各投与についての投薬単位形態および投与の均一性において、非経口組成物を処方することは特に好都合である。本明細書で使用する

50

るとき、投薬単位形態とは、治療する哺乳動物の患者に対する単一の投薬量として適した、物理的に別々の単位をいい、各単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすために計算された、活性化合物の所定の量を含む。本発明の投薬単位形態に関する規格は、(a) 活性化合物の独特の特徴および達成すべき特定の治療または予防効果ならびに (b) 個人における感受性の治療のための、かかる活性化合物の配合の当技術分野における固有の制限によって決定され、およびこれに直接依存する。

【0137】

本発明の抗体または抗体部分の治療的または予防的有効量に関する典型的な非限定的範囲は、0.01 - 20 mg / kg または 1 - 10 mg / kg または 0.3 - 1 mg / kg である。投薬量の値が、緩和すべき状態のタイプおよび重症度とともに変わり得ることに注目されたい。任意の特定の患者に関する具体的な投与計画は、個人の必要性および投与するまたは組成物の投与を監督する人の専門的な判断に従って、経時的に調整されるべきであり、本明細書に示される投薬量の範囲は、単に模範例であり、特許請求される組成物の範囲または実行を制限することを意図しないことをさらに理解されたい。

【0138】

8. 本発明の抗体の使用

8.1 一般的な使用

IL-12 に結合するそれらの能力を所与とし、本発明の抗 IL-12 抗体またはこの部分は、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) または組織の免疫組織化学などの従来のイムノアッセイを用いて、(例えば、試料母体、1つの態様では血清または血漿などの生物試料中の) IL-12、1つの態様では hIL-12 を検出するために使用することができる。本発明は、本発明の抗体または抗体部分と試料を接触させるステップおよび IL-12 に結合した抗体 (もしくはは抗体部分) または結合していない抗体 (もしくはは抗体部分) のいずれかを検出し、それによって試料中の IL-12 を検出するステップを含む、生物試料中の IL-12 を検出するための方法を提供する。抗体は、検出可能な物質で直接または間接的に標識し、結合したまたは結合していない抗体の検出を促進する。適した検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が挙げられる。適した酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、βガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、適した補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、適した蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセン、フルオレセンイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ、発光物質の例には、ルミノールが挙げられ、適した放射性物質の例には、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S または ³H が挙げられる。試料中の IL-12 の検出は、診断状況、例えば、増加した IL-12 に関連する状態の診断に有用であり得、および/または抗 IL-12 抗体での治療から恩恵を受け得る患者を同定するのに有用であり得る。

【0139】

抗体の標識の代替として、例えば、検出可能な物質で標識した rhIL-12 基準物質および標識していない抗 hIL-12 抗体などの抗 IL-12 抗体を利用して、競合的イムノアッセイによって試料中で IL-12 をアッセイすることができる。このアッセイにおいて、試料、標識 rhIL-12 標準物質および抗 hIL-12 抗体を組合せ、非標識抗体に結合した標識 rhIL-12 標準物質の量を決定する。試料中の hIL-12 の量は、抗 hIL-12 抗体に結合した標識 rhIL-12 標準物質の量に反比例する。

【0140】

本発明の抗体および抗体部分は、インビトロおよびインビボでの IL-12 活性、1つの態様では hIL-12 活性を中和することができる。したがって、本発明の抗体および抗体部分は、例えば、IL-12 を含む細胞培養物中、ヒト患者中または本発明の抗体が架橋反応する IL-12 を有する他の哺乳動物患者 (例えば、ヒヒ、カニクイザルおよびアカゲザルなどの霊長類) 中で、IL-12 活性を阻害するために使用することができる

。１つの態様では、本発明は、ヒトＩＬ－１２ならびにヒヒＩＬ－１２、マーモセットＩＬ－１２、チンパンジーＩＬ－１２、カニクイザルＩＬ－１２およびアカゲザルＩＬ－１２から成る群から選択される少なくとも１つの追加の霊長類ＩＬ－１２の活性を中和するが、マウスＩＬ－１２の活性は中和しない、単離されたヒト抗体またはこの抗体結合部分を提供する。１つの態様では、ＩＬ－１２は、ヒトＩＬ－１２である。例えば、ｈＩＬ－１２を含むまたは含む疑いのある細胞培養物中で、本発明の抗体または抗体部分を培養液に添加し、培養物中のｈＩＬ－１２活性を阻害することができる。

【０１４１】

別の態様では、本発明は、ＩＬ－１２活性が有害である障害に苦しむ患者において、ＩＬ－１２活性を阻害するための方法を提供する。ＩＬ－１２は、幅広い様々な障害の病態生理において関連付けられた（その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Windhagenら（１９９５）*J. Exp. Med.* 182: 1985-1996頁；Moritaら（１９９８）*Arthritis and Rheumatism*. 41: 306-314頁；Buchtaら（１９９６）*Clin. Exp. Immunol.* 103: 347-367頁；Faisら（１９９４）*J. Interferon Res.* 14: 235-238頁；Pyrronchiら（１９９７）*Am. J. Path.* 150: 823-832頁；Monteleoneら（１９９７）*Gastroenterology*. 112: 1169-1178頁およびBerrebiら（１９９８）*Am. J. Path.* 152: 667-672頁；Pyrronchiら（１９９７）*Am. J. Path.* 150: 823-832頁）。本発明は、かかる障害に苦しむ患者において、ＩＬ－１２活性を阻害するための方法を提供し、方法は、患者においてＩＬ－１２活性を阻害するように、本発明の抗体または抗体部分を患者に投与するステップを含む。１つの態様では、ＩＬ－１２はヒトＩＬ－１２であり、患者はヒトの患者である。あるいは、患者は、本発明の抗体が架橋反応するＩＬ－１２を発現する哺乳動物であってよい。よりさらなる患者は、（例えば、ｈＩＬ－１２の投与またはｈＩＬ－１２導入遺伝子の発現によって）ｈＩＬ－１２を導入した哺乳動物であってよい。本発明の抗体は、治療目的のためにヒト患者に投与することができる。その上、本発明の抗体は、獣医学の目的のため、またはヒト疾患の動物モデルとして、抗体が架橋結合するＩＬ－１２を発現する非ヒト哺乳動物に投与することができる。後者に関して、かかる動物モデルは、本発明の抗体の治療的有効性の評価に有用であり得る（例えば、投薬量の試験および投与の時間経過）。

【０１４２】

本明細書で使用する時、表現「ＩＬ－１２活性が有害である障害」は、障害に苦しむ患者においてＩＬ－１２の存在が、障害または障害の悪化に寄与する因子のいずれかの病態生理の原因であることが示された、またはその疑いがある疾患および他の障害を含むことを意図する。したがって、ＩＬ－１２活性が有害である障害は、ＩＬ－１２活性の阻害により、障害の症状および／または進行が緩和することが期待される障害である。かかる障害は、例えば、障害に苦しむ患者の体液中のＩＬ－１２濃度の増加（例えば、患者の血清、血漿、滑液などにおけるＩＬ－１２濃度の増加）によって証明でき、例えば、上記のような抗ＩＬ－１２抗体を用いて検出することができる。ＩＬ－１２活性が有害である障害の例は多数ある。１つの態様では、抗体またはこの抗原結合部分は、本明細書に記載の疾患または障害を扱う治療に使用することができる。別の態様では、抗体またはこの抗原結合部分は、本明細書に記載の疾患または障害を治療するための医薬品の製造に使用することができる。数種の非限定的で具体的な疾患の治療における本発明の抗体および抗体部分の使用は、以下にさらに議論する。

【０１４３】

インターロイキン１２は、免疫および炎症の要素に関わる様々な疾患に関連する病理において、重要な役割を果たす。これらの疾患には、これに限定されないが、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、アトピー性皮膚

炎、移植片対宿主疾患、臓器移植拒絶、臓器移植に伴う急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、粥状動脈硬化、播種性血管内凝固、川崎病、グレーブス病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホシェーンライン紫斑、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ぶどう膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、散発性、多腺性欠乏症Ⅰ型および多腺性欠乏症Ⅱ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎（*seronegative arthropathy*）、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、関節症に伴うエルシニアおよびサルモネラ、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱症、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、原因不明の自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、C型肝炎、一般変異型免疫不全（分類不能型低ガンマグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、原因不明の線維化肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、間質性肺疾患に伴う結合組織病、肺疾患に伴う混合性結合組織病、間質性肺疾患に伴う全身性硬化症、間質性肺疾患に伴う関節リウマチ、肺疾患に伴う全身性エリテマトーデス、肺疾患に伴う皮膚筋炎／多発性筋炎、肺疾患に伴うシェーグレン病、肺疾患に伴う強直性脊椎炎、血管炎性びまん性肺疾患、肺疾患に伴うヘモシデリン沈着症、薬剤性間質性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、痛風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介型低血糖、黒色表皮腫を伴うB型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に伴う急性免疫疾患、臓器移植に伴う慢性免疫疾患、骨関節症、原発性硬化性胆管炎、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患NOS、糸球体腎炎、顕微鏡的腎血管炎、ライム病、円板状エリテマトーデス、男性不妊特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（全サブタイプ）、インスリン依存性糖尿病、交感性眼炎、結合組織病に対する二次的な肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、ぶどう膜炎、原発性血管炎ならびに白斑が挙げられる。本発明のヒト抗体および抗体部分は、自己免疫疾患、特にリウマチ性脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病および自己免疫性ぶどう膜炎が挙げられる、炎症を伴う疾患を治療するために使用することができる。

【0144】

ある種の態様では、本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病および乾癬を治療するために使用される。

【0145】

8.2 関節リウマチにおける使用

インターロイキン12は、関節リウマチなどの炎症性疾患に役割を果たすことが関連付けられた。誘発性IL-12p40のメッセージは、関節リウマチ患者由来の滑液中に検出され、IL-12は、関節リウマチを有する患者由来の滑液中に存在することが示された（例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Moritaら（1998）*Arthritis and Rheumatism* 41:306-314頁を参照されたい）。IL-12陽性細胞は、関節リウマチの滑膜の下内層中に存在することが見出された。本発明のヒト抗体および抗体部分は、例えば、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、ライム関節炎、リウマチ性脊椎炎、骨関節炎および痛風性関節炎を治療する

ために使用することができる。典型的に、抗体または抗体部分は、全身的に投与されるが、ある種の障害については、抗体または抗体部分の局所投与が有益であり得る。本発明の抗体または抗体部分は、自己免疫疾患の治療に有用な1つ以上の追加の治療剤とともに投与することもできる。

【0146】

関節リウマチ用のコラーゲン誘発関節炎(CIA)マウスモデルにおいて、関節炎より前に、抗IL-12 mAb(ラット抗マウスIL-12モノクローナル抗体、C17.15)でマウスを処置することにより、発症が大いに抑制され、疾患の発症率および重症度が低下した。関節炎の発症後、早期に抗IL-12 mAbで処置することにより、重症度は低下したが、疾患発症後に抗IL-12 mAbでマウスを処置する後者は、疾患重症度に最小の効果を有した。

10

【0147】

8.3 クローン病における使用

インターロイキン12は、炎症性腸疾患、すなわちクローン病にも役割を果たす。IFN- γ およびIL-12の増加した発現が、クローン病を有する患者の腸粘膜において起こる(例えば、その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Faissら(1994)J. Interferon Res. 14:235-238頁; Pyrronchira(1997)Amer. J. Pathol. 150:823-832頁; Monteleoneら(1997)Gastroenterology 112:1169-1178頁; Berrebiら(1998)Amer. J. Pathol. 152:667-672頁を参照されたい)。抗IL-12抗体は、大腸炎のマウスモデル、例えば、TNBS誘導型大腸炎IL-2ノックアウトマウスおよび最近ではIL-10ノックアウトマウスにおいて、疾患を抑制することが示された。したがって、本発明の抗体および抗体部分は、炎症性腸疾患の治療に使用することができる。

20

【0148】

8.4 多発性硬化症における使用

インターロイキン12は、多発性硬化症の主要なメディエーターとして関連付けられた。誘導性IL-12 p40のメッセージまたはIL-12自体の発現は、多発性硬化症を有する患者の病変において実際に示すことができる(その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Windhagenら(1995)J. Exp. Med. 182:1985-1996頁、Drulovicら(1997)J. Neurol. Sci. 147:145-150頁)。多発性硬化症を有する慢性進行性の患者は、IL-12の上昇した血中濃度を有する。多発性硬化症を有する患者由来のT細胞および抗原提示細胞(APC)を用いる研究により、Th1型免疫応答を引き起こす進行性多発性硬化症の基礎として、免疫相互作用の自己永続的な一連が明らかになった。T細胞からのIFN- γ の増加した分泌により、APCによるIL-12の増加した産生が引き起こされ、Th1型免疫活性化および疾患の慢性状態を引き起こす循環が永続化した(その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Balashovら(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. 94:599-603頁)。多発性硬化症におけるIL-12の役割は、マウスおよびラットの多発性硬化症の実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)モデルを用いて研究した。マウスにおける多発性硬化症の再発寛解型EAEモデルにおいて、抗IL-12 mAbを用いて前処理することにより、麻痺が遅延され、臨床スコアが減少した。麻痺のピークで、または続く寛解期間の間に、抗IL-12 mAbで処理することにより、臨床スコアが減少した。したがって、本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、ヒトにおいて多発性硬化症に関連する症状を緩和させる働きをし得る。

30

40

【0149】

8.5 インスリン依存性糖尿病における使用

インターロイキン12は、インスリン依存性糖尿病(IDDM)の重要なメディエーターとして関連付けられた。IDDMは、IL-12の投与によってNODマウスにおいて誘発され、抗IL-12抗体は、IDDMの養子伝達モデルにおいて保護的であった。早

50

期発症の I D D M 患者は、いくつかの残りの島細胞機能が維持される、いわゆる「ハネムーン期間」をしばしば経験する。これらの残りの島細胞は、インスリンを産生し、インスリン投与より優れた血中グルコース濃度を制御する。抗 I L - 1 2 抗体でこれらの早期発症患者を治療することにより、島細胞のさらなる破壊を防ぐことができ、それによってインスリンの内在性供給源が維持できる。

【 0 1 5 0 】

8 . 6 乾癬における使用

インターロイキン 1 2 は、乾癬における主要なメディエーターとして関連付けられた。乾癬は、T H 1 型サイトカイン発現プロファイルに関連する急性および慢性皮膚病変に関わる（その全体の教示が参照により本明細書に組み込まれる、Hamid ら（1996）J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . 1 : 2 2 5 - 2 3 1 頁；Turk a ら（1995）M o l . M e d . 1 : 6 9 0 - 6 9 9 頁）。I L - 1 2 p 3 5 および p 4 0 の m R N A は、罹患したヒトの皮膚試料中に検出された。したがって、本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、慢性皮膚障害であるかか乾癬を緩和させる働きをし得る。

【実施例】

【 0 1 5 1 】

1 . 抗 I L - 1 2 抗体の単離 / 精製

この実施例は、宿主細胞タンパク質（H C P）および他の不純物から抗 I L - 1 2 抗体を精製する 1 つの計画を提供する。

【 0 1 5 2 】

一次回収

p H の低下による一次回収、遠心分離および濾過を、産生バイオリアクターの収集物から細胞および細胞残骸を除去するために用いた。対象とする抗体、培地および細胞を含む培養物を、1 時間 p H 3 . 5 にして不活性化し、3 0 0 0 L の産生バイオリアクターにおいて、可能性のある p H 感受性ウイルス混入物を死滅させ、培地 / 細胞混入物を沈殿させた。培養物を次いで p H 4 . 9 まで調整した。p H の低下は、2 0 から 4 0 分の経過にわたって 3 M のクエン酸で達成した。p H の上昇は、2 0 から 4 0 分の経過にわたって 3 M の水酸化ナトリウムを用いて行った。これらの操作は、2 0 の温度で起きた。p H 不活性化後、培養物を、貯蔵タンクとして使用される別のバイオリアクター中に遠心分離した。遠心分離は、2 8 L / 分の供給速度で 1 1 , 0 0 0 × g で実行した。排出間隔量を 3 0 0 秒に設定し、1 5 0 の低い濁度レベルを達成した。遠心分離フィルターを、1 2 個の 1 6 インチの C u n o （商標）モデル 3 0 / 6 0 Z A 深層フィルターおよび 3 つの 3 0 インチの 0 . 4 5 / 0 . 2 μ m の S a r t o p o r e （商標）フィルターカートリッジを装着した 3 つの円形フィルターハウジングを含むフィルタートレインに通した。清澄化した懸濁液を、事前に滅菌した 3 0 0 0 L の固定型収集タンク中に収集し、8 で維持した。イオン交換クロマトグラフィーの前に、温度を 2 0 まで調整した。

【 0 1 5 3 】

2 8 0 8 5 B I、2 8 2 0 4 B I、2 8 2 0 6 B I、2 8 2 0 7 B I および 3 4 1 4 2 B I と名付けた様々な試料について、収穫での A B T - 8 7 4 の力価は、平均 3 . 9 1 m g / m L で 3 . 7 6 から 4 . 0 5 m g / m L の範囲に及んだ。細胞培養プロセスの p H 低下の保持および続く p H 上昇ならびに収集物の遠心分離により、平均 8 2 % および標準偏差 2 . 7 7 で 7 7 % から 8 4 % の範囲に及ぶ大量の回収率がもたらされた（表 2 および 3 を参照されたい）。抗体の定量化は、このステップ全体にわたって（当業者によく知られている）P o r o s A （商標）定量化アッセイを用いて決定した。

【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

【表 2】

表2 様々な試料ロットの一次回収データ

一次回収					
発酵ロット#	28085BI	28204BI	28206BI	28207BI	34142BI
工程ステップ					
収集でのAb(産物)濃度(g/L)	3.9	4.05	3.84	3.99	3.76
最終培養物重量(Kg)	2439	2387	2467	2494	2464
収集での全産物(g)	9512	9667	9473	9951	9265
3Mのクエン酸添加(g)	78	62	79	95	81
低下の間のpH	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
低pHの持続時間(分)	63	70	60	69	64
3Mの水酸化ナトリウム添加(g)	111	89	117	142	116
pH低下後のpH	4.89	4.9	4.9	4.9	4.85
最終清澄化収集物重量(Kg)	2478	2402	2531	2447	2449
産物の清澄化した収集物濃度(g/L)	3.23	3.33	3.09	3.15	3.11
全産物の清澄化した収集物(g)	8004	7997	7821	7708	7616
全体の収集産物ステップの収率(%)	84	83	83	77	82

10

【0155】

20

【表 3】

表3 一次回収ステップの解析

一次回収平均	5つの試料ロット		
工程ステップ	*AVG	*SD	*%CV
収集での産物濃度(g/L)	3.91	0.116	2.97
最終培養物重量(Kg)	2450	40.3	1.64
収集での全産物(g)	9574	255.1	2.66
最終清澄化収集物重量(Kg)	2461	47.6	1.93
産物の清澄化した収集物濃度(g/L)	3.18	0.1	3.14
全産物の清澄化した収集物(g)	7829	172.4	2.2
全体の収集産物ステップの収率(%)	82	2.77	3.38

30

* AVE=平均、SD=標準偏差、%CV=変動のパーセント係数

【0156】

陽イオン交換

陽イオン交換捕獲クロマトグラフィステップの目的は、深層濾過からの抗体の捕獲および工程関連不純物（例えば、低分子量種の抗体および培地成分に関連する宿主細胞タンパク質）の減少である。CM Hyper DF（商標）樹脂（Pall社）を、この工程ステップに利用した。CM Hyper DF（商標）捕獲ステップは、外気温で行った。

40

【0157】

直径80cm×長さ23cmのカラム（ベッドボリューム116L）を、この操作に使用した。事前の平衡化、平衡化、負荷、洗浄および再生カラムステップを、16.0L/分（線速度=191cm/時）で行った。溶出、取り除き、洗浄、中和、衛生化および貯蔵のカラムステップを、9.2L/分（線速度=110cm/時）で行った。カラムを、pH5.0の210mM酢酸ナトリウムで平衡化した。平衡化に続いて、カラムに、USP精製水でインラインで希釈する清澄化した収集物を負荷した。カラムに、樹脂1リットルにつき最大80gのタンパク質で負荷した（1サイクルにつき9248g）。カラムを次いで洗浄して平衡バッファーでベースラインにした。産物を、pH5.0の790mMの酢酸ナトリウムで溶出した。溶出の収集物は、抗体の溶出ピークの上側3OD₂₈₀

50

n_m から下側 800 nm までであった。

【0158】

カラムを 1 M の塩化ナトリウムで再生し、 1 M の酢酸 / 20% のイソプロピルアルコールで脂質洗浄し、 $\text{pH } 5.0$ の 790 mM の酢酸ナトリウムで洗浄し、 0.5 M の水酸化ナトリウムに続いて 790 mM の酢酸ナトリウム、 $\text{pH } 5.0$ で衛生化し、 25 mM のリン酸ナトリウム、 20% のイソプロピルアルコール (IPA) で貯蔵した。

【0159】

CM HyperDF (商標) クロマトグラフィステップの 1 サイクルを、試験する各試料ロットについて行った。試料ロットについての平均負荷は、 65.27 から 68.62 g/L の範囲に及ぶ 1.37 の標準偏差で、 67.38 g 抗体 / L CM HyperDF (商標) 樹脂であった (表 4 および 5 を参照されたい)。産物の回収率は、ロット 29001BF、29008BF、30005BF、30006BF および 35036BF について平均 88% および標準偏差 5.17 で、 83% から 96% の範囲に及んだ。清澄化した収集物について、抗体の定量化を、Poros A (商標) 定量化アッセイを用いて決定し、CM HyperDF (商標) 溶出液について、 $A_{280\text{ nm}}$ の定量化を用いた。CM HyperDF (商標) の溶出産物ピークの下側についてのカッティング基準は、二重鎖の産物関連抗体種をカットして産物純度を達成するために高くした。これにより、全体の CM HyperDF (商標) クロマトグラフィステップの収率の進行がおよそ 95% から中央 80% になった。

【0160】

5 サイクルについて、サイズ排除 (SE) HPLC による純度の有意差がなかったことに注目した。表 16 は、標準偏差 0.67 で単量体 IgG について 94.76% の平均を示す。

【0161】

【表 4】

表 4 CM HyperDF (商標) クロマトグラフィのデータ

CM HyperDF (商標) クロマトグラフィ					
試料ロット #	29001	29008	30005	30006	35036
工程ステップ	BF	BF	BF	BF	BF
清澄化収集物の負荷体積 ($\text{Kg}=\text{L}$)	2464	2380	2512	2418	2434
CM HyperDF (商標) 上に負荷した 産物濃度 (清澄化収集物) (g/L)	3.23	3.33	3.09	3.15	3.11
CM HyperDF (商標) 上に負荷した全産物 (g)	7959	7926	7761	7615	7571
CM HyperDF (商標) 樹脂に対する 産物負荷能力 (g/L)	68.62	68.33	66.90	65.65	65.27
プログラムからの溶出液ピークの開始体積 (L)	89.8	88.5	64.9	72.9	58.6
プログラムからの溶出液ピークの終了体積 (L)	288.1	286	306.1	295.0	329.6
CM HyperDF (商標) の溶出液体積 (Kg/L)	200.8	199.1	245.2	227.7	275.8
CM HyperDF (商標) の溶出液濃度 (g/L)	33.05	35.6	26.72	31.97	24.39
CM HyperDF (商標) 溶出液の全産物 (g)	6636	7088	6552	7280	6727
ステップについての全体の産物収率 (%)	83	89	84	96	89

【0162】

【表 5】

表5 CM HyperDF(商標)クロマトグラフィステップの解析

CM HyperDF(商標)クロマトグラフィの平均 工程ステップ	5つの試料ロット		
	AVG	SD	%CV
清澄化収集物の負荷体積(Kg/L)	2442	49.5	2.03
CM HyperDF(商標)上に負荷した産物濃度(清澄化収集物)(g/L)	3.18	0.099	3.11
CM HyperDF(商標)上に負荷した全産物(g)	7767	175.9	2.26
CM HyperDF(商標)樹脂に対する産物負荷能力(g/L)	67.38	1.374	2.04
プログラムからの溶出液ピークの開始体積(L)	74.9	13.93	18.6
プログラムからの溶出液ピークの終了体積(L)	301	17.83	5.92
CM HyperDF(商標)の溶出液体積(Kg/L)	229.7	32.18	14.01
CM HyperDF(商標)の溶出液濃度(g/L)	30.35	4.642	15.29
CM HyperDF(商標)溶出液の全産物(g)	6857	312.6	4.56
ステップについての全体の産物収率(%)	88	5.17	5.88

10

【0163】

捕獲限界濾過 / 透析濾過 (UF / DF)

CM HyperDF(商標)溶出液を、デリピッド深層濾過(1×16インチ、Cuno(商標)Corporation)に続いて0.45/0.2μmのSartopore(商標)二重層フィルターカートリッジ(1×30インチ)により濾過した。CM HyperDF(商標)溶出バッファの790mMの酢酸ナトリウム、pH5.0を、フィルターに残った残留量を流すために使用した。デリピッドのCM HyperDF(商標)溶出液の限界濾過 / 透析濾過(UF / DF)を、対象とする抗体を濃縮し、酢酸ナトリウムを除去し、pH7.0の100mMの塩化ナトリウム、20mMのリン酸ナトリウム中の産物のバッファ交換をするために行った。30kDaの分子量カットオフ(MWCO)を用いるMillipore社の再生セルロース限界濾過型メンブレンカセットを、外気温でこのステップに使用した。

20

【0164】

産物の添加開始の前に、30kDの再生したセルロースメンブレンを、pH5.0の790mLの酢酸ナトリウムで流した。デリピッドのCM HyperDF(商標)溶出液を、入口圧力20-30psigおよび出口圧力10-15psigで、40g/Lタンパク質に濃縮し、残余分は速度52L/分から104L/分で流した。最少でpH7.0の、100mMの塩化ナトリウム、20mMのリン酸ナトリウムの6容量を用いて連続的透析濾過を行った。UF系から、次いで標的濃度42.5g/Lタンパク質で産物を排出した。系を、透析濾過バッファでリンスし、系において維持した産物を回収した。濃縮および洗浄を組み合わせて、透析濾過したABT-874を生成した。このステップは、外気温で行った。試料母体を、OpticapXL30(商標)カプセルの2.0/1.2μmのフィルターに続いて0.45/0.2μmのSartopore(商標)二重層フィルターカートリッジ(1×30インチ)で濾過した。

30

40

【0165】

CM HyperDF(商標)溶出液のデリピッド濾過およびUF / DFステップにより、様々な試料ロット(すなわち、29001BF、29008BF、30005BF、30006BFおよび35036BF)について、80%-94%の範囲に及ぶ、平均産物回収収量5.92Kgがもたらされた(表6および7を参照されたい)。

【0166】

SE-HPLCによる純度は、5サイクルについて許容可能であった。表16は、標準偏差0.57でIGGについて平均95.79%を示す。

【0167】

【表 6】

表6 試料ロットのCM HyperDF溶出液のデリピッド濾過およびUF/DFデータ

CM HyperDF(商標)溶出液のデリピッド濾過およびUF/DF					
精製試料ロット#	29001BF	29008BF	30005BF	30006BF	35036BF
工程ステップ					
CM HyperDF(商標)溶出液の開始体積(Kg=L)	200. 8	199. 1	245. 2	227. 7	275. 8
CM HyperDF(商標)の溶出液濃度(g/L)	33. 05	35. 6	26. 72	31. 97	24. 39
CM HyperDF(商標)溶出液の全産物(g)	6636	7088	6552	7280	6727
デリピッドフィルターを流すためのCM溶出バッファの体積(L)	70	71	135	143	141
使用した透析濾過バッファの体積(L)	1003	1106	913	1034	1051
UF/DF残余分の体積(Kg=L)	136. 8	163. 6	149. 9	189. 8	163. 6
UF/DF残余分の濃度(g/L)	38. 93	36. 47	40. 36	31. 18	38. 72
UF/DF残余分の全産物(g)	5326	5966	6050	5918	6334
ステップについての全体の産物収率(%)	80	84	92	81	94

10

【0168】

【表 7】

20

表7 CM HyperDF(商標)溶出液のデリピッド濾過およびUF/DF解析データ

デリピッド濾過およびUF/DFの平均	5つの試料ロット		
工程ステップ	AVG	SD	%CV
CM HyperDF(商標)溶出液の開始体積(Kg=L)	229. 72	32. 175	14. 01
CM HyperDF(商標)の溶出液濃度(g/L)	30. 35	4. 642	15. 29
CM HyperDF(商標)溶出液の全産物(g)	6857	312. 6	4. 56
デリピッドフィルターを流すためのCM溶出バッファの体積(L)	112	38	33. 93
使用した透析濾過バッファの体積(L)	1021	71. 1	6. 96
UF/DF残余分の体積(Kg=L)	160. 7	19. 694	12. 26
UF/DF残余分の濃度(g/L)	37. 13	3. 607	9. 71
UF/DF残余分の全産物(g)	5919	368. 9	6. 23
ステップについての全体の産物収率(%)	86	6. 42	7. 47

30

【0169】

陰イオン交換クロマトグラフィ

陰イオン交換クロマトグラフィにより、DNAおよび宿主細胞タンパク質などの工程関連不純物が減少した。この工程ステップは、主な抗体産物がQ Sepharose(商標)に結合しないが、不純物が結合する場合、フロースルー様式のクロマトグラフィである。このステップおよび続くステップは、捕獲UF/DF中間産物を、可動性密封タンク中の最終生成物一式に移行させた後、 12 ± 2 でClass 10, 000精製スーツにおいて行った。

40

【0170】

直径60cm×長さ30cmのカラム(ベッドボリューム85L)を使用した。カラムに、Q Sepharose(商標)Fast Flow陽イオン交換クロマトグラフィ樹脂(Amersham Biosciences、ウプサラ、スウェーデン)を充填した。全カラムステップは、3.5L/分で行うカラムの保管を除いて、7.0L/分(線速度=150cm/時)で行った。

【0171】

50

pH 8.0 の、50 mM の塩化ナトリウム、25 mM のトリスの 7 つのカラム容積 (CV) を用いて、カラムを平衡化した。このステップについての最大のタンパク質負荷は、樹脂 1 L につき 50 g (1 サイクルにつき 4250 g) であった。サイクル間に 1 M の塩化ナトリウムの再生のみで、このカラムを 2 サイクル行った。捕獲 UF / DF 物質を、pH 8.0 の 25 mM のトリスで、およそ 2 倍希釈した。これにより、pH 7.5 から 8.1、約 7.0 mS / cm の Q 負荷になった。希釈した捕獲 UF / DF 物質の負荷後、カラムを平衡バッファーで洗浄した。対象とする抗体を含むフロースルーを、負荷後に洗浄を含む、ピークの上側 3 OD_{280nm} から下側 3 OD_{280nm} を収集した。これは、Q フロースルーに加えて洗浄 (Q FTW) であった。

【0172】

10

第 2 サイクルの後、カラムを 1 M の塩化ナトリウムで再生し、注射用水 (WFI) で洗浄し、1 M の水酸化ナトリウムで 1 時間衛生化し、pH 7.0 の、1 M の塩化ナトリウム、25 mM のリン酸ナトリウムで洗浄して pH の低下をもたらし、次いで 25 mM のリン酸ナトリウム、20 % の IPA で貯蔵した。

【0173】

Q Sepharose (商標) カラムの 2 サイクルを、生成した各試料ロットについて行った。1 サイクルにつき平均の負荷は、34.8 および 31 g / L 樹脂 (それぞれサイクル A およびサイクル B) であり、29.01 から 37.13 g / L の範囲に及んだ (表 8 および 9 を参照されたい)。両サイクルを含む全体のステップの収率は、標準偏差 17.8 で 92 % であった。このステップにより、典型的には 99 から 101 % が生成された (試料ロット 29001BF、29008BF、30005BF および 30006BF)。Q Sepharose (商標) FTW の全体の収量は、5 つのバッチについて 25.81 kg であった。Q 負荷の pH は、ロット 30006BF について約 6.0 から 6.7 mS / cm の伝導率で pH 7.5 であった。

20

【0174】

5 サイクルについて SE - HPLC による純度は、標準偏差 0.53 で IgG について平均 96.75 % を示す (表 16)。

【0175】

【表 8】

表8 試料ロットのQ Sepharose(商標)FFクロマトグラフィデータ

Q Sepharose(商標)FFクロマトグラフィ					
精製ロット#	29001BF	29008BF	30005BF	30006BF	35036BF
工程ステップ					
Q負荷で希釈していない UF/DF残余分の体積(Kg=L)	136. 8	163. 6	149. 9	189. 8	163. 6
UF/DF残余分濃度(g/L)	38. 93	36. 47	40. 36	31. 18	38. 72
UF/DF残余分の全産物(g)	5326	5966	6050	5918	6335
UF/DF残余分を希釈するために添加した pH8の25mMのトリス(Kg=L)	186. 8	223. 6	190	285. 7	204
Q負荷の全体積(L)	323. 6	387. 2	339. 9	475. 5	367. 6
Q負荷のpH	7. 5	7. 5	7. 5	7. 5	7. 5
Q負荷の伝導率(mS/cm)	6. 3	6. 3	6. 0	6. 7	6. 2
Q負荷の濃度(g/L)	16. 46	15. 4	17. 8	12. 4	17. 2
サイクルA					
カラム上に負荷した産物、サイクルA(g)	2667	2978	3028	2945	3156
負荷した体積、サイクルA(L)	162	193. 4	170. 1	237. 5	183. 5
産物/Q樹脂のLの実際の負荷能力、 サイクルA(g. 産物/L. Q樹脂)	31. 4	35. 04	35. 62	34. 65	37. 13
収集したフロースルーの体積、サイクルA(L)	117. 6	151. 7	129. 9	192	136. 8
収集した洗浄の体積、サイクルA(L)	76	78. 9	79. 3	76. 9	73. 6
フロースルー+洗浄の体積、サイクルA(Kg/L)	193. 6	230. 6	209. 2	268. 9	210. 4
サイクルB					
カラム上の負荷した産物、サイクルB(g)	2647	2894	2569	2754	2466
負荷した体積、サイクルB(L)	113	187. 9	100	222. 1	143. 4
産物/Q樹脂のLの実際の負荷能力、 サイクルB(g. 産物/L. Q樹脂)	31. 06	34. 05	30. 22	32. 40	29. 01
収集したフロースルーの体積、サイクルB(L)	115. 7	146. 4	109. 7	179. 7	94. 8
収集した洗浄の体積、サイクルB(L)	75. 7	81	78. 3	76. 1	72. 2
フロースルー+洗浄の体積、サイクルB(Kg/L)	191. 4	227. 4	188	255. 8	167
サイクルA+サイクルB					
サイクルA+サイクルBの負荷(g)	5314	5872	5597	5699	5622
Qフロースルー+洗浄の体積(Kg=L)	385	458	397. 2	524. 7	377. 4
Qフロースルー+洗浄の濃度(g/L)	13. 81	12. 74	13. 92	10. 95	8. 97
Qフロースルー+洗浄の全産物(g)	5317	5835	5529	5745	3385
ステップについての全体の産物収率(%)	100	99	99	101	60

【 0 1 7 6 】

10

20

30

40

【表 9】

表9 Q Sepharose(商標)FFクロマトグラフィ解析データ

Q Sepharose(商標)FFクロマトグラフィの平均 工程ステップ	5つの試料ロット		
	AVG	SD	%CV
Q負荷で希釈していないUF/DF残余分の体積(Kg=L)	160.74	19.7	12.26
UF/DF残余分濃度(g/L)	37.13	3.607	9.71
UF/DF残余分の全産物(g)	5919	368.9	6.23
UF/DF残余分を希釈するための添加したpH8の25mMのトリス(Kg=L)	218	40.52	18.59
Q負荷の全体積(L)	379	59.39	15.67
Q負荷のpH	7.5	0	0
Q負荷の濃度(g/L)	15.9	2.13	13.4
サイクルA			
カラム上に負荷した産物、サイクルA(g)	2955	179.8	6.08
負荷した体積、サイクルA(L)	189	29.53	15.62
産物/Q樹脂のLの実際の負荷能力、サイクルA(g. 産物/L. Q樹脂)	34.80	2.11	6.1
収集したフロースルーの体積、サイクルA(L)	146	28.71	19.66
収集した洗浄の体積、サイクルA(L)	77	2.32	3.01
フロースルー+洗浄の体積、サイクルA(Kg/L)	223	29.06	13.03
サイクルB			
カラム上の負荷した産物、サイクルB(g)	2666	165.5	6.21
負荷した体積、サイクルB(L)	153	51.22	33.48
産物/Q樹脂のLの実際の負荷能力、サイクルB(g. 産物/L. Q樹脂)	31.00	1.95	6.29
収集したフロースルーの体積、サイクルB(L)	129	33.8	26.26
収集した洗浄の体積、サイクルB(L)	77	3.27	4.25
フロースルー+洗浄の体積、サイクルB(Kg/L)	206	35.34	17.16
サイクルA+サイクルB			
サイクルA+サイクルBの負荷(g)	5621	202.4	3.6
Qフロースルー+洗浄の体積(Kg=L)	428	62.47	14.6
Qフロースルー+洗浄の濃度(g/L)	12.10	2.11	17.4
Qフロースルー+洗浄の全産物(g)	5162	1014	19.63
ステップについての全体の産物収率(%)	92	17.8	19.35

【0177】

HICクロマトグラフィ

疎水性相互作用クロマトグラフィ(HIC)を、抗体凝集体および工程関連不純物の除去に使用し、最終産物の規格にする。このステップは、クロマトグラフィの結合および溶出の様式である。陰イオン交換産物(試料)を、高塩濃度バッファー(硫酸アンモニウム)中に入れ、カラムに結合させ、3回洗浄後にカラムから溶出した。

【0178】

直径80cm×長さ15cmのカラム(ベッドボリューム75L)をこの手順に使用した。カラムに、Phenyl HP Sepharose(商標)疎水性相互作用樹脂(Amersham Biosciences、ウブサラ、スウェーデン)を充填した。QFTW(推定的に対象とする抗体を含む)を、pH7.0の、同等量の1.7Mの硫酸アンモニウム、50mMのリン酸ナトリウムで希釈し、次いで0.45/0.2μmのSartopore(商標)二重層フィルター(1×30インチ)に通して濾過した。Phenyl Sepharose(商標)HPを、Phenyl Sepharose(商標)HP樹脂1Lにつき40gのABT-874の最大の負荷で2サイクル実行した(1サイクルにつき3000g)。

【0179】

Phenyl 負荷をカラム上に負荷し、pH 7.0 の、0.85 M の硫酸アンモニウム、50 mM のリン酸ナトリウムの5つのCVで平衡化した。産物の負荷に続いて、カラムを洗浄1 (pH 7.0 の、1.1 M の硫酸アンモニウム、50 mM のリン酸ナトリウム) の3つのCV、洗浄2 (pH 7.0 の、85 M の硫酸アンモニウム、50 mM のリン酸ナトリウム) の1から7つのCV、次いで洗浄3 (pH 7.0 の、1.1 M の硫酸アンモニウム、50 mM のリン酸ナトリウム) の3つのCVで洗浄した。

【0180】

カラムを、溶出バッファー、すなわちpH 7.0 の、0.5 M の硫酸アンモニウム、15 mM のリン酸ナトリウムで溶出した。試料産物を、ピークの上側30D_{280nm}から下側30D_{280nm}で収集した。

10

【0181】

平衡化、負荷、洗浄1、洗浄2および洗浄3は、6.2 L / 分 (線速度 = 74 cm / 時)で行った。溶出、再生、WFI 洗浄、衛生化および貯蔵のカラムステップは、3.1 L / 分 (線速度 = 37 cm / 時)で行った。

【0182】

カラムを、サイクル間で注射用水 (WFI) の4つのCV、1 M のNaOHの3つのCVおよびサイクル間でWFIの4つのCVで再生した。最終サイクルの後、カラムを貯蔵バッファー、すなわち25 mM のリン酸ナトリウム、20 % のIPAの5つのCVに供した。

20

【0183】

HICの2サイクルを、各試料ロットについて行った。サイクルにつき平均の負荷は、32.54 および34.00 g / L 樹脂 (それぞれサイクルAおよびサイクルB) であり、21.77 から37.79 g / L の範囲に及んだ (表10および11を参照されたい)。サイクルAおよびBを組み合わせた全体の産物回収率は、試料ロット29001BF、29008BF、30005BF、30006BFおよび35036BFについて、平均84 %、標準偏差1.87で81 % から86 % の範囲に及んだ。合計20.94 Kg のABT-874が、全ての凝集性Phenyl Sepharose (商標) HPクロマトグラフィステップにわたって精製された。

【0184】

Phenyl バッチについてのSEC-HPLCによる純度は、標準偏差0.11でIgGについて平均99.63 %を有した (表16)。純度のパーセントは、抗体関連凝集体IgGおよび二重軽鎖 (低分子量種) を減少させる、対象とする抗体の精製物を用いる疎水性クロマトグラフィ手順の間に上昇した。これは、洗浄2 バッファー (SR-342 : pH 7 の、25 mM のリン酸ナトリウム、0.85 M の硫酸アンモニウム) で達成された。このバッファーは、二重軽鎖抗体の低分子量種を溶出し、A280nmがわずかに増加した後に実行され、負荷および洗浄1の流速の半分である流速 (1分につき6.2 から3.1 L の流速の低下) で、約1つのカラム体積で安定にする。凝集体は、カラムのPhenyl 樹脂に結合し、抗体が溶出するときの0.5 M の硫酸アンモニウムバッファーの基準では溶出しないことによって除去された。

30

【0185】

40

【表 10】

表10 試料ロットのPhenyl Sepharose(商標)HPクロマトグラフィデータ

Phenyl Sepharose(商標)HPクロマトグラフィ					
精製試料ロット#	29001BF	29008BF	30005BF	30006BF	35036BF
工程ステップ					
*Q FTW体積(L)= 希釈していないPhenyl負荷物	369. 2	441. 9	380. 2	507. 90	365. 5
Q FTW濃度(g/L)	13. 81	12. 74	13. 92	10. 95	8. 97
負荷した全産物(g)	5099	5630	5292	5562	3279
Q FTWを希釈するために添加した 1. 7Mの硫酸アンモニウム、 50mMのリン酸ナトリウム(Kg=L)	385	458. 21	397. 14	524. 64	377. 68
Phenyl負荷物の総体積(L)	770	916. 21	794. 34	1049. 34	755. 08
サイクルA					
カラム上の負荷した産物、サイクルA(g)	2297	2834	2651	2786	1645
クロムスキッドからの負荷体積、サイクルA(L)	332. 7	444. 9	380. 9	508. 9	366. 8
実際の産物の負荷/Phenyl樹脂のL、 サイクルA(g産物/L Phenyl樹脂)	30. 6	37. 79	35. 21	37. 15	21. 93
Phenyl溶出液の体積、サイクルA(L)	136	136	139. 8	130	134
サイクルB					
カラム上に負荷した産物、サイクルB(g)	2801	2796	2641	2775	1633
負荷体積、サイクルB(L)	405. 7	438. 9	379. 5	506. 9	364. 2
実際の産物の負荷/Phenyl樹脂のL、 サイクルB(g産物/L Phenyl樹脂)	37. 35	37. 28	35. 35	37. 00	21. 77
クロムスキッドからのPhenyl溶出液の体積、 サイクルB(L)	139	138	141	129	134
サイクルA+サイクルB					
サイクルA+サイクルBの負荷産物(g)	5099	5630	5292	5562	3279
貯蔵したPhenyl溶出液の体積(L)	275	274	280. 8	259	268
貯蔵したPhenyl溶出液の濃度(g/L)	15. 58	17. 19	16. 02	18. 56	9. 86
貯蔵したPhenyl溶出液の全産物(g)	4285	4710	4498	4807	2642
ステップについての全体の産物収率(%)	84	84	85	86	81

* 使用した体積は、Phenyl Sepharose(商標)HPについての負荷のサイクルAおよびサイクルBの終了の間の、実際のクロマトグラフィOITの体積の読み出しから得る。

【 0 1 8 6 】

【表 1 1】

表11 Phenyl Sepharose(商標)HPクロマトグラフィの解析データ

最終のPhenyl Sepharose(商標)HPクロマトグラフィの平均	5つの試料ロット		
工程ステップ	AVG	SD	%CV
Q FTW体積(L)=希釈していないPhenyl負荷物	413	61.42	14.87
Q FTW濃度(g/L)	12.10	2.11	17.4
全産物(g)	4972	970.4	19.52
Q FTWを希釈するために添加した1.7Mの硫酸アンモニウム、50mMのリン酸ナトリウム(Kg=L)	429	62.42	14.55
Phenyl負荷物の総体積(L)	857	124.88	14.57
サイクルA			
カラム上の負荷した産物、サイクルA(g)	2441	491.9	20.15
負荷体積、サイクルA(L)	407	70.07	17.22
実際の産物の負荷/Phenyl樹脂のL、サイクルA(g産物/L Phenyl樹脂)	32.54	6.563	20.17
Phenyl溶出液の体積、サイクルA(L)	135	3.57	2.64
サイクルB			
カラム上に負荷した産物、サイクルB(g)	2531	505.9	19.99
負荷体積、サイクルB(L)	419	56.71	13.53
実際の産物の負荷/Phenyl樹脂のL、サイクルB(g産物/L Phenyl樹脂)	34.00	6.75	19.85
Phenyl溶出液の体積、サイクルB(L)	136.2	4.764	3.5
サイクルA+サイクルB			
サイクルA+サイクルBの負荷産物(g)	4972	970.6	19.52
貯蔵したPhenyl溶出液の体積(L)	271	8.27	3.05
貯蔵したPhenyl溶出液の濃度(g/L)	15.40	3.33	21.6
貯蔵したPhenyl溶出液の全産物(g)	4189	887.4	21.18
ステップについての全体の産物収率(%)	84	1.87	2.23

10

20

30

【0187】

ウイルス濾過

HICステップからのPhenyl溶出液を、Ultipor DV50(商標)ウイルス除去濾過ステップを用いて濾過した。Ultipor DV50(商標)ステップにより、Phenyl Sepharose(商標)HPカラム溶出液中に存在し得る直径50nmの外来性ウイルスの物理的除去が可能になる。

【0188】

疎水性相互作用カラムの溶出液を、34psigで、事前に湿潤した0.1μmのフィルターおよび2×3インチのUltipor DV50(商標)フィルタートレイン(Pall社)に通した。濾過後、フィルターをHIC溶出バッファーで流し、フィルターハウジング中に保持された任意のABT-847を除去した。Ultipor DV50(商標)フィルターを、最終のUF/DFの処方ステップの前に、事前に滅菌したタンク中に12±2で貯蔵した。

40

【0189】

DV50(商標)濾過ステップからの産物回収率は、様々な試料の実行について、平均収率100%で97%から102%の範囲に及んだ(表12および13を参照されたい)。抗体産物の総量20.99Kgを、5つの試料ロットについて処理した。

【0190】

【表 1 2】

表12 試料ロットのウイルス濾過のデータ

ウイルス濾過					
精製試料ロット#	29001BF	29008BF	30005BF	30006BF	35036BF
工程ステップ					
DV50(商標)濾過前の貯蔵したPhenyl溶出液の体積(Kg=L)	275	274	280.8	259	268
貯蔵したPhenyl溶出液の濃度(g/L)	15.58	17.19	16.02	18.56	9.86
貯蔵したPhenyl溶出液の全産物(g)	4285	4710	4498	4807	2642
フィルターを流すために添加した0.5Mの硫酸アンモニウム、50mMのリン酸ナトリウム(Kg)	45.3	41.7	43.7	46.5	43.3
全ウイルス濾過物+バッファー流出物(Kg)	337.2	324.2	336.2	313.4	324.4
全ウイルス濾過物(L)*	324.23	311.73	323.27	301.35	311.92
ウイルス濾過物の濃度(g/L)	13.27	15.20	14.22	15.45	8.66
ウイルス濾過物の全産物(g)	4303	4738	4597	4656	2701
ステップについての全体の産物収率(%)	100	101	102	97	102

* 0.5Mの硫酸アンモニウム、50mMのリン酸ナトリウムの密度に関する修正は、Kg重量を密度1.04g/mLで割るとLにおける体積になる。

【0191】

【表 1 3】

表13 ウイルス濾過の解析データ

最終のウイルス濾過の平均	5つの試料ロット		
工程ステップ	AVG	SD	%CV
全ウイルス濾過物(L)	271	8.27	3.05
ウイルス濾過物の濃度(g/L)	15.40	3.33	21.6
ウイルス濾過物の全産物(g)	4189	887.4	21.18
フィルターを流すために添加した0.5Mの硫酸アンモニウム、50mMのリン酸ナトリウム(Kg)	44.1	1.85	4.2
全ウイルス濾過物+バッファー流出物(Kg)	327.1	9.85	3.01
全ウイルス濾過物(L)	314.5	9.47	3.01
ウイルス濾過物の濃度(g/L)	13.40	2.77	20.7
ウイルス濾過物の全産物(g)	4199	853.2	20.32
ステップについての全体の産物収率(%)	100	2.07	2.07

【0192】

最終の限界濾過 / 透析濾過 (UF / DF)

最終のUF / DFステップは、抗体の濃縮、硫酸アンモニウムの除去およびpH5.9の、5mMのヒスチジン、5mMのメチオニン、2%のマンニトール、0.5%のショ糖、0.005%のTween 80中の抗体産物の処方であった。30kDの分子量カットオフ(MWCO)を用いるMillipore社の再生セルロース限界濾過型メンブレンカセットをこのステップに使用した。

【0193】

Ultipor DV50(商標)濾過物を30g/Lタンパク質に濃縮した。pH5.9の、5mMのメチオニン、2%のマンニトール、0.5%のショ糖のバッファー(Tweenは含まない)の2容量の連続的透析濾過を行った。産物を次いで40g/Lに濃縮すると、ほとんどの硫酸アンモニウムが除去された。pH5.9の、5mMのメチオニン、2%のマンニトール、0.5%のショ糖のバッファー(Tweenは含まない)の6容量を用いる連続的透析濾過を行った。これらの6つのダイアボリュームの交換が完了す

ると、抗体は75 g/Lに濃縮された。UF系は、次いで産物を排出し、透析濾過バッファでリンスして、系に維持された産物を回収した。この濃縮および洗浄を組み合わせ、透析濾過したABT-874を生成し、続いて追加の処方バッファで65 g/Lに調整した。標的濃度を確認するとすぐに、計算を行って、濃縮したUF残余分に添加して薬物におけるTween 80の最終濃度を0.005% (v/v)にしなければならない10%のTween 80を含む処方バッファの量を決定した。処方した薬物の最終濃度は、65 g/Lであった。抗体試料を、Opticap XL T30 (商標) カプセル2.0/1.2 μmフィルターに続いて0.45/0.2 μmのSartopore (商標) 二重層フィルターから無菌容器中に濾過し、次いで最終の瓶詰めのために調製におけるClass 100領域に移行した。

10

【0194】

UF/DFステップからの産物回収率は、5つの実行について標準偏差2.22、平均収率97.0%で94%から100%の範囲に及んだ(表14および15を参照されたい)。この最終UF/DFの最後に、総量20.51 Kgの抗体産物が存在した。全体として、UF/DF濾過ステップは、実行するのに非常に一貫した実行であった。10 kDカットオフメンブレンよりむしろ30 kDカットオフメンブレンを使用した方が、収率を犠牲にすることなく、より速い処理時間を可能にした。

【0195】

【表14】

表14 試料ロットの最終UF/DF

20

最終UF/DF					
精製試料ロット#	29001BF	29008BF	30005BF	30006BF	35036BF
工程ステップ					
ウイルス濾過物(L)	324.23	311.73	323.27	301.35	311.92
ウイルス濾過物の濃度(g/L)	13.27	15.20	14.22	15.45	8.66
ウイルス濾過物の全産物(g)	4303	4738	4597	4656	2701
第1透析濾過の 作業用体積TK-2575(L)	135	150	145	147	82
第1透析濾過の バッファ体積(L)	291	318	315	311	216
第2透析濾過の 作業用体積TK-2575(L)	107.3	118.4	107.1	120	60.1
第2透析濾過の バッファ体積(L)	694	730	663	770	450
UF系から移行する前に測定したpH	5.8	5.8	5.9	5.8	6.0
UF系から移行する前に測定した 伝導率(mS/cm)	0	3	0	0	0
移行後のUF/DF濾過物(Kg)	67.3	71.2	71.2	68	44.8
添加した1%Tween、処方バッファ(L)	0.337	0.356	0.356	0.340	0.822
Lにおける濾過した最終UF/DF残余分(Kg)	65.1	71.2	68.4	66	42.4
最終UF/DF残余分の濃度(g/L)	65.70	66.48	63.90	69.70	59.66
最終UF/DF残余分の全産物(g)	4277	4733	4371	4600	2530
ステップについての全体の産物収率(%)	99	100	95	99	94

30

40

【0196】

【表 15】

表15 最終UF/DFの解析データ

最終UF/DFの平均	5つの試料ロット		
工程ステップ	AVG	SD	%CV
ウイルス濾過物の体積(Kg=L)	314. 5	9. 47	3. 01
ウイルス濾過物の濃度(g/L)	13. 4	2. 77	20. 7
ウイルス濾過物の全産物(g)	4199	853. 2	20. 32
第1透析濾過の作業用体積TK-2575(L)	131. 8	28. 4	21. 55
第1透析濾過のバッファー体積(L)	290. 2	42. 8	14. 75
第2透析濾過の作業用体積TK-2575(L)	102. 6	24. 5	23. 88
第2透析濾過のバッファー体積(L)	661. 4	124. 75	18. 86
UF系から移行する前に測定したpH	5. 86	0. 089	1. 52
UF系から移行する前に測定した伝導率(mS/cm)	0. 6	1. 342	223. 67
移行後のUF/DF濾過物(Kg)	64. 5	11. 16	17. 3
添加した1%Tween、処方バッファー(L)	0. 44	0. 212	48. 18
Lにおける濾過した最終UF/DF残余分(Kg)	62. 6	11. 55	18. 45
最終UF/DF残余分の濃度(g/L)	65. 1	3. 69	5. 7
最終UF/DF残余分の全産物(g)	4102	208. 8	5. 09
ステップについての全体の産物収率(%)	97	2. 22	2. 29

10

20

【 0 1 9 7 】

【表 16】

表16 5つの試料ロットの処理中のQC解析用試料の解析

細胞培養/ 工程ステップ	試験	方法	規格	AVG	SD	%CV
産生リアクター 収集試料	Poros A HPLC	QCA-228	報告値g/L	3.91	0.12	3.07
深層pH濾過後の 不活性化	Poros A HPLC	QCA-228	報告値g/L	3.46	0.13	3.76
清澄化収集物	Poros A HPLC	QCA-228	報告値g/L	3.18	0.1	3.14
精製/工程ステップ	試験	方法	規格			
CM HyperDF溶出液	Poros A HPLC	QCA-228	Poros A HPLC g/L	30.9	5.18	16.76
	SE-HPLC	QCA-232	パーセント純度の 報告値	94.76	0.67	0.71
濃縮した CM HyperDF(商標) 溶出液	A280	QCA-227-01	報告値g/L	37.13	3.61	9.72
	SE-HPLC	QCA-232	パーセント純度の 報告値	95.79	0.57	0.6
Q Sepharose(商標) フロースルー洗浄	A280	QCA-227-01	報告値g/L	12.08	2.11	17.47
	SE-HPLC	QCA-232	パーセント純度の 報告値	96.75	0.53	0.55
Phenyl Sepharose (商標)HP溶出液	A280	QCA-227-01	報告値g/L	15.44	3.33	21.57
	SE-HPLC	QCA-232	パーセント純度の 報告値	99.63	0.11	0.11
Ultipor(商標) VF濾過物	A280	QCA-227-01	報告値g/L	13.36	2.77	20.73
	SE-HPLC	QCA-232	パーセント純度の 報告値	99.63	0.09	0.09
処方した最終 UF/DF残余分	A280	QCA-227-01	報告値g/L	65.09	3.69	5.67
	SE-HPLC	QCA-232	パーセント純度	99.45	0.13	0.13

10

20

【0198】

2. 抗IL-12抗体組成物における宿主細胞タンパク質濃度の決定

この手順では、抗IL-12抗体試料中の残留宿主細胞タンパク質濃度を決定するための試験方法論を記載する。酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を使用して、特異抗体の2つの層の間に宿主細胞タンパク質(抗原)をサンドイッチする。これに続いて、カゼインを用いて非特異的部位をブロックする。宿主細胞タンパク質を、次いで抗原分子が一次抗体に捕獲される間、温置する(抗原のコーティング)。抗原(宿主細胞タンパク質)に固定する二次抗体(ビオチン化した抗宿主細胞タンパク質)を次いで添加する。ビオチン化抗宿主細胞タンパク質に結合するHRPコンジュゲート型ニュートラアビジンを添加する。これに続いてKブルーサブストレートを添加する。青色を生成する発色性基質を、結合した酵素コンジュゲート型抗体によって加水分解する。色を黄色に変える2MのH₃PO₄で反応を止める。色の強度は、ウェル中の結合した抗原の量に直接的に比例する。

30

40

【0199】

pH9.4の50mMの重炭酸ナトリウム(コーティングバッファー)の調製。1Lのビーカーに、900mLのMilli-Qウォーター; 4.20g±0.01gの重炭酸ナトリウムを添加する。完全に溶解するまで攪拌する。1NのNaOHでpH9.4まで調整する。1Lのメスフラスコに移行し、Milli-Qウォーターで体積を増やす。均一になるまで逆回転により混合する。0.22µmの無菌フィルターユニットに通して濾過する。調製の日から最大7日間、名目上4℃で貯蔵する。

【0200】

0.104MのNa₂HPO₄・7H₂O、1.37MのNaCl、0.027MのK

50

C1、0.0176 Mの KH_2PO_4 、 $\text{pH} = 6.8 - 6.9$ (10 × PBS) の調製。およそ400 mLのMilli-Qウォーターをガラスビーカーに添加する。13.94 g ± 0.01 gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ を添加する。40.0 g ± 0.1 gのNaClを添加する。1.00 g ± 0.01 gのKClを添加する。1.20 g ± 0.01 gの KH_2PO_4 を添加する。均一になるまで攪拌する。500 mLのメスフラスコに移行する。Milli-QウォーターでQSを500 mLの体積にする。逆回転により混合する。0.2 μmの無菌フィルターユニットに通して濾過する。室温で最大7日間貯蔵する。

【0201】

1 × PBS + 0.1 %のトリトンX - 100、 $\text{pH} 7.40$ (プレート洗浄バッファー) の調製。4 Lのメスシリンダー中で、400 mLの10 × PBS (ステップ5.2) と3500 mLのMilli-Qウォーターを混合する。 pH を確認し、必要に応じて1 NのHClまたは1 NのNaOHで 7.40 ± 0.05 に調整する。Milli-Qウォーターで体積を増やす。シリンダーをパラフィルムできつく覆い、均一になるまで逆回転により混合する。4 Lのボトルに移行する。4 mLの1 × PBSを除去し、捨てる。4 mLのトリトンX - 100を3996 mLの1 × PBSに添加する。攪拌プレート上に置き、完全に溶解するように攪拌する。希釈バッファーの調製に必要な量のプレート洗浄バッファーを、0.22 μmの無菌フィルターユニットに通して濾過する。最大7日間、室温で貯蔵する。

10

【0202】

コーティング抗体混合物：アフィニティ精製したヤギ抗CHO599 / 626 / 748 (ロット# G11201 @ 1.534 mg / mL) の調製。注意：バイアル中で名目上 - 80 で貯蔵した貯蔵物である。アリコート調製する。使用時に1プレートにつき1アリコート取り出す。使用する前にすぐに、次のように冷たい50 mMの重炭酸ナトリウム中で最終濃度4 μg / mLになるように抗体混合物を希釈する。例えば、31 μLのコーティング抗体混合物を11969 μLの冷たいコーティングバッファーに添加する。逆回転により穏やかに混合する。

20

【0203】

ビオチン化ヤギ抗宿主細胞タンパク質混合物、599 / 626 / 748 (ロット# G11202 @ 0.822 mg / mL) の調製。注意：バイアル中で名目上 - 80 で貯蔵した貯蔵物である。アリコート調製する。使用時に1プレートにつき1アリコート取り出す。使用する前にすぐに、次のように37 ± 2 のカゼイン中で最終濃度1 μg / mLになるようにビオチン化抗体混合物を希釈する。例えば、14.6 μLのビオチン化抗体混合物を11985 μLの37 ± 2 のカゼインに添加する。逆回転により穏やかに混合する。

30

【0204】

ニュートラアビジン - HRPの調製。次のように新しいロット (2 mg / バイアル) を1 mg / mLに再構築する。400 μLのMilli-Qウォーターをバイアルに添加し、次いで1600 μLの1 × PBSを添加し、全体で2 mLにする。混合するために穏やかにボルテックスする。名目上 - 20 で貯蔵する。1プレートにつき1アリコートを使用できるように、所望の体積のアリコートを調製する。ポリプロピレンチューブ中で調製する。新しいロットを限定して作業用濃度を決定する。調製の日から6カ月の終了を指定する。例えば、作業用濃度が0.2 μg / mLと決定されれば、次のように調製する。使用する前にすぐに、室温でニュートラアビジン - HRPのアリコートを解凍する。1 mg / mLのニュートラアビジン溶液を37 ± 2 のカゼインで0.1 mg / mL (100 μg / mL) に希釈する。例えば、× 10希釈し、50 μLのニュートラアビジンを450 μLのカゼインに添加する。混合するために穏やかにボルテックスする。100 μg / mL溶液を37 ± 2 のカゼインで0.2 μg / mLにさらに希釈する。例えば、× 500希釈し、24 μLのニュートラアビジン (100 μg / mL) を11976 μLのカゼインに添加する。混合するために穏やかにボルテックスする。

40

【0205】

50

5.72 Mのリン酸（停止液）の調製。次のように濃縮したリン酸から2 Mのリン酸溶液を調製する。ラベル上に提示された%リン酸、密度（1.685 g/mL）および式量（98 g/mol）から、2 Mのリン酸500 mLを調製するのに必要な濃縮したリン酸の体積を計算する。上記で計算した濃縮したリン酸の体積をフラスコに添加する。Milli-Qウォーターで体積を増やし、均一になるまで逆回転により混合する。調製の日から最大6カ月間、外気温で貯蔵する。

【0206】

希釈溶液（pH 7.4の1×PBS + 0.1%トリトンX 100中で×100希釈したカゼイン）の調製。（上記から得た）pH 7.4の0.22 μmの滅菌濾過した1×PBS + 0.1%トリトンX 100中で37 ± 2 のカゼインX 100を希釈する。例えば、1 mLの37 ± 2 のカゼインを99 mLの0.22 μmの滅菌濾過した1×PBS + 0.1%トリトンX 100、pH 7.4に添加する。ウェルを混合する。各使用について新鮮に調製する。

10

【0207】

標準物質の調製。宿主細胞タンパク質標準物質（抗原標準物質）（ロット# G11203 @ 1.218 mg/mL）。注意：70 μLアリコート中で名目上-80 で貯蔵した貯蔵物である。室温でアリコートを解凍する。希釈バッファーを用いて、ポリプロピレンチューブ中で連続希釈を行う。

【0208】

試料の調製。ポリプロピレンチューブにおいて、希釈バッファー中で最終バルク試料を24 mg/mLに希釈する。濃度を記録する。注意：スパイクした試料の調製および以下に参照の12 mg/mLの溶液の調製のために以下の溶液を使用する。ポリプロピレンマイクロチューブにおいて、希釈バッファー中で24 mg/mLの溶液を12 mg/mLにさらに希釈する。全部で6ウェルについて、プレート上に12 mg/mLの各溶液をトリPLICATEでウェルに負荷する。

20

【0209】

スパイクの調製。ポリプロピレンマイクロチューブにおいて、希釈バッファーで2×希釈することによって、上記で調製した20 ng/mLの標準物質から10 ng/mLの宿主細胞タンパク質スパイクを調製する。10 ng/mLのスパイク溶液をプレート上の3ウェルに負荷する。スパイク試料について、ステップ6.1から得た20 ng/mLの標準溶液を使用する。

30

【0210】

スパイクした試料の調製。ポリプロピレンマイクロチューブにおいて、24 mg/mLの各最終バルク溶液300 μLを、300 μLの20 ng/mLのスパイク溶液（6.1）でスパイクする。全部で6ウェルについて、スパイクした各試料溶液をトリPLICATEでウェルに負荷する。

【0211】

対照の調製。対照の範囲は、通例の試験で使用する前に、新しい対照貯蔵溶液ごとに設定しなければならない。対照貯蔵物は、150 μLのアリコートのバッチのABT-874薬物濃度を調製し、最大3年間、名目上-80 で凍結貯蔵する。

40

【0212】

作業用対照の調製。対照のアリコートを室温で解凍する。ポリプロピレンチューブ中で、希釈バッファーで対照を24 mg/mLに希釈する。ポリプロピレンマイクロチューブ中で、24 mg/mLの対照溶液を希釈バッファーで12 mg/mLにさらに希釈する。単一の希釈液を調製し、プレートの3ウェル中に対照を負荷する。

【0213】

ELISAの手順。プレート洗浄ボトルをプレート洗浄バッファーで満たす（ステップ5.3を参照されたい。1×PBS + 0.1%トリトンX-100）。プレートウォッシャーを用意する。次のパラメータを確認する。パラメータは、プレートタイプ：各サイクルについて1（全部で5サイクル）、体積：400 μL、浸漬時間：10秒、Asp. 時

50

間：4秒に設定すべきである。

【0214】

アッセイの手順。冷たい50mMの重炭酸ナトリウム中の4 μ g/mLのヤギコーティング抗体混合物を100 μ L/ウェルでプレートにコートする。コーティング溶液が、ウェルの底を均一に覆うまで、プレートの側面をたたき、密封テープで覆い、プレートシェーカー（または同等物）上で、18時間 $\pm$ 1時間、スピード3で振動させながら、名目上4で温置する。一晩中温置した後、冷蔵庫からプレートを取り出し、室温に平衡化することができる。コーティングを振り落とす。ペーパータオル上でプレートをプロットする。300 μ L/ウェルの37 $\pm$ 2のカゼインでブロックし、密封テープで覆い、Lab-line Environプレートシェーカー（または同等物）上で80rpm $\pm$ 5rpmで1時間、振動させながら、37 $\pm$ 2で温置する。ブロッキング温置の間、標準物質、試料、対照、スパイクおよびスパイクした試料を調製する。洗浄バッファーで5回プレートを洗浄する。ペーパータオル上でプレートをプロットする。8チャンネルピペットを用いて、100 μ L/ウェルの標準物質、試料、スパイク、スパイクした試料およびコントロールを、プレートのトリプリケートのウェル中にピペットで入れる。100 μ L/ウェルの希釈バッファーを、プレートの全て空のウェル中にピペットで入れ、ブランクとして役立てる。密封テープで覆い、Lab-line Environプレートシェーカー（または同等物）上で80rpm $\pm$ 5rpmで1時間、振動させながら、37 $\pm$ 2で温置する。鑄型を記入し、プレートに負荷するときにガイドとして使用する。

10

20

【0215】

プレートリーダーの設定。標準物質についての濃度を入力してテンプレートを設定する。試料、対照、スパイクまたはスパイクした試料についての希釈因子は入力しない。全ウェルから差し引く、ブランクとしての希釈液を含むウェルを指定する。プレートを洗浄バッファーで5回洗浄する。ペーパータオル上でプレートをプロットする。100 μ L/ウェルのビオチン化ヤギ抗体を添加する。密封テープで覆い、Lab-line Environプレートシェーカー（または同等物）上で80rpm $\pm$ 5rpmで1時間、振動させながら、37 $\pm$ 2で温置する。プレートを洗浄バッファーで5回洗浄する。ペーパータオル上でプレートをプロットする。100 μ L/ウェルのニュートラアビジン-HRPコンジュゲート溶液を添加する。密封テープで覆い、Lab-line Environプレートシェーカー（または同等物）上で80rpm $\pm$ 5rpmで1時間、振動させながら、37 $\pm$ 2で温置する。プレートを洗浄バッファーで5回洗浄する。ペーパータオル上でプレートをプロットする。100 μ L/ウェルの冷たいKブルーサブストレートを添加し、密封テープで覆い、Lab-lineタイタープレートシェーカー（または同等物）上でスピード3で振動させながら、室温で10分間温置する（基質を最初の列に添加したらすぐにタイマーを開始する）。100 μ L/ウェルの2Mのリン酸を添加することによって反応を停止させる（ステップ5.7）。スピード3で3-5分間プレートシェーカー上にプレートを置く。450nmでプレートを読み込む。

30

40

【0216】

データ解析および計算。注意：光学密度が標準曲線の実際的な定量化の限界内に入り、後述の%CVまたは%差の基準を満たす、試料、スパイク、スパイクした試料および対照のみが許容可能である。試料のODが、2.5ng/mLの標準物質より下に入れば、結果は2.5ng/mL以下として報告すべきである。この値を次いで希釈した試料濃度（12mg/mL）で割って、ng/mgでの値を報告すべきである。上記の標準曲線となる非スパイクおよび/またはスパイクした試料を引き起こす宿主細胞濃度において試料が高ければ、>100ng/mLとして値を報告する。この値を次いで希釈した試料濃度（12mg/mL）で割って、ng/mgでの値を報告すべきである。試料が、2.5ng/mLの標準物質より下であるとき、スパイクリカバリー計算について試料の値をゼロと考える。

【0217】

標準曲線。標準物質の濃度は、プロトコールのテンプレート中に入力すべきである。二

50

次曲線適合を用いる。決定係数は $= 0.99$ でなければならない、トリプリケートのウェル間の %CV は $= 20\%$ でなければならない。この基準が満たされなければ、1つの標準物質（1つの濃度、3ウェル）を滴下することができる。 1.25 ng/mL を滴下すれば、光学密度が 2.5 ng/mL 内に入る、および 100 ng/mL （維持標準曲線の点）の光学密度である試料およびスパイクした試料のみが許容可能である。さらに、各標準物質の濃度のトリプリケートについて、単一のウェルが明らかに汚染されているまたは低い結合性を示す場合、それを滴下することができる。標準物質の濃度でウェルに滴下すれば、維持複写は %差 $= 20\%$ をもたなければならない。プレートのバックグラウンド（ブランク）に近い OD 値を示すもっとも低い標準物質についての %CV は、 $= 30\%$ であるべきである。1つのウェルに滴下すれば、維持複写の %差は $= 35\%$ であるはずである。もっとも低い標準物質を滴下すれば、光学密度が維持標準曲線レベル光学密度内に入る試料およびスパイクした試料のみが許容可能である。

10

【0218】

試料。%CV は、トリプリケートのウェル間で $= 20\%$ であるべきである。トリプリケートのウェル間の %CV を報告する。各試料希釈からの1つのウェルを滴下することができる。維持複写は $= 20\%$ の %差をもたなければならない。注意：非スパイクの試料の OD が、 2.5 ng/mL の標準物質の OD より下であれば、%差の基準は、非スパイクの結果に適用しない。上記の計算を参照する。

【0219】

ng/mg における実際の宿主細胞濃度を、次のように平均 (ng/mL) 値から計算する： CHO 宿主細胞タンパク質 (ng/mg) = 平均の「非スパイクの試料の結果 (ng/mL)」 $\times$ 希釈した試料濃度 (12 mg/mL)。

20

【0220】

スパイク。%CV は、トリプリケートのウェル間で $= 20\%$ であるべきである。%CV を報告する。スパイクからの1つのウェルを滴下することができる。維持点は %差 $= 20\%$ でなければならない。上記の計算を参照する。 ng/mL における宿主細胞濃度を報告する。この結果は、スパイクリカバリー計算に使用する。スパイクについての結果の濃度 (ng/mL) は、理論上のスパイクの濃度の $\pm 20\%$ でなければならない。結果を報告し合否を示す。スパイクの結果が、理論上の 20% 以内でなければ、アッセイは繰り返さなければならない。平均のスパイク濃度 (ng/mL) $\times 100$ は、 $= 100\% \pm 20\%$ 10 ng/mL でなければならない。

30

【0221】

スパイクした試料。%CV は、トリプリケートのウェル間で $= 20\%$ であるべきである。トリプリケートのウェル間の %CV を報告する。スパイクした各試料希釈からの1つのウェルを滴下することができる。維持複写は、%差 $= 20\%$ をもたなければならない。上記の計算を参照する。各希釈について ng/mL で「スパイクした試料の結果」を報告する。デュプリケートの希釈物間での %差を報告する。希釈物間の %差は $= 25\%$ でなければならない。これらの結果はスパイクリカバリー計算に使用する。

【0222】

以下の式を用いて、各希釈物セットについて %スパイクリカバリーを計算する： $\% \text{スパイクリカバリー} = \text{スパイクした試料の値} - \text{非スパイクの試料の値} \times 100 / \text{スパイクの値}$ 。
(1) 非スパイク試料の値の OD が、 2.5 ng/mL の標準物質より下に入れば、%スパイクリカバリー計算においてゼロと値を考えることに注目する。%スパイクリカバリーは、各試料の各希釈について、 $100\% \pm 50\%$ ($50\% - 150\%$) でなければならない。結果および合否を報告する。

40

【0223】

対照。%CV は、トリプリケートのウェル間で $= 20\%$ であるべきである。%CV 結果を報告する。対照からの1つのウェルを滴下することができる。維持複写は %差 $= 20\%$ をもたなければならない。上記の計算を参照する。 ng/mL における対照での宿主細胞濃度を報告する。次のように ng/mg での宿主細胞濃度を計算する：宿主細胞タンパク

50

質 (n g / m g) = n g / m L での対照の宿主細胞タンパク質の結果。

【 0 2 2 4 】

様々な文献が本明細書に引用され、その内容はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 図 1 】

- 抗-IL-12抗体(ABT-874)重鎖可変領域配列

```

1         10         20         30         40
QVQLVESGGG VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA
                                   CDR1

PGKGLEQVAF IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
              CDR2

LQMNSLRAD TAVYICKTFG SHDNWGQGTIM VIVSS
                        CDR3

```

- 抗-IL-12抗体(ABT-874)軽鎖可変領域配列

```

1         10         20         30         40
QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCSGSRNIG SNTVKWYQQL
                                   CDR1

PGTAPKLLIY YGNDQRPSGV PDRFSGSKOT SASLAITGVQ
              CDR2

AEDEADYYCQ SYDRYTHPAL LFGTOTKVIVLG
                        CDR3

```

FIG.1

【配列表】

2012506384000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/00
ADD. C07K16/24

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISHIHARA ET AL: "Accelerated purification process development of monoclonal antibodies for shortening time to clinic" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL LNKD-DOI:10.1016/J.CHROMA.2007.10.104, vol. 1176, no. 1-2, 7 November 2007 (2007-11-07), pages 149-156, XP022373481	27-43
Y	ISSN: 0021-9673 figures 1,6,7 ----- -/-	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 April 2010

Date of mailing of the international search report

21/04/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/061335

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☒ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061335

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRORSON KURT ET AL: "Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins." BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 5 MAY 2003, vol. 82, no. 3, 5 May 2003 (2003-05-05), pages 321-329, XP002576451 ISSN: 0006-3592 results	1-26
Y	----- WO 2008/079280 A1 (MILLIPORE CORP [US]; MOYA WILSON [US]; JABER JAD [LB]) 3 July 2008 (2008-07-03) page 15; examples 1,2	1-26
Y	----- WO 95/22389 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; SHADLE PAULA J [US]; ERICKSON JOHN C [US]) 24 August 1995 (1995-08-24) page 14 - page 16; figure 1; examples 1,2 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/061335

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008079280 A1	03-07-2008	US 2009036651 A1 WO 2008079302 A2	05-02-2009 03-07-2008
WO 9522389 A1	24-08-1995	AT 218387 T AU 689552 B2 AU 1843395 A BR 9507100 A CA 2183888 A1 CN 1146730 A CZ 9602481 A3 DE 69526929 D1 DE 69526929 T2 DK 746398 T3 EP 0746398 A1 ES 2177632 T3 HK 1013806 A1 HU 74845 A2 JP 4198751 B2 JP 9509658 T NO 963475 A NZ 281480 A PT 746398 E SI 746398 T1 US RE40070 E1 US 5429746 A ZA 9501372 A	15-06-2002 02-04-1998 04-09-1995 16-09-1997 24-08-1995 02-04-1997 16-04-1997 11-07-2002 02-01-2003 16-09-2002 11-12-1996 16-12-2002 07-02-2003 28-02-1997 17-12-2008 30-09-1997 21-10-1996 26-06-1998 31-10-2002 31-10-2002 19-02-2008 04-07-1995 24-10-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 37/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 5/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/04 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 7/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 33/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 7/06 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/14 (2006.01)
 A 6 1 P 31/10 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 15/08 (2006.01)
 A 6 1 P 5/14 (2006.01)
 A 6 1 P 5/16 (2006.01)
 A 6 1 K 31/192 (2006.01)
 A 6 1 K 31/573 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 K 51/00 (2006.01)
 A 6 1 K 49/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/48 (2006.01)
 A 6 1 K 47/34 (2006.01)
 C 0 7 K 16/24 (2006.01)

A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 37/00
 A 6 1 P 1/00
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/00
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 17/04
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 9/10 1 0 1
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 17/14
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 15/08
 A 6 1 P 5/14
 A 6 1 P 5/16
 A 6 1 K 31/192
 A 6 1 K 31/573
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 K 49/02 C
 A 6 1 K 49/00 A
 A 6 1 K 47/48
 A 6 1 K 47/34
 C 0 7 K 16/24

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

(72)発明者 ホワン, チン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 6 0 4、ウースター、オークウッド・レイン・ 5 1

(72)発明者 ペリリ - パーマー, バーバラ

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 0 1 7 4 0、ボルトン、ボーン・ヒル・ロード・ 7 0

F ターム(参考) 4C076 EE23 EE59

4C084	AA24	NA14	ZA02	ZA16	ZA36	ZA45	ZA55	ZA59	ZA66	ZA75
	ZA81	ZA92	ZA96	ZB07	ZB08	ZB09	ZB13	ZB15	ZB26	ZB27
	ZB35	ZB37	ZC01	ZC21						
4C085	AA13	AA14	BB17	DD34	DD62	DD63	EE01	HH03	KA29	KB02
	KB07	KB18								
4C086	AA01	AA02	AA04	DA10	MA01	MA02	MA03	MA04	NA14	ZA02
	ZA16	ZA36	ZA45	ZA55	ZA59	ZA66	ZA75	ZA81	ZA89	ZA92
	ZA96	ZB07	ZB08	ZB09	ZB13	ZB15	ZB26	ZB27	ZB35	ZB37
	ZC01	ZC21								
4C206	AA01	AA02	AA04	DA24	MA01	MA02	MA03	MA04	NA14	ZA02
	ZA16	ZA36	ZA45	ZA55	ZA59	ZA66	ZA75	ZA89	ZA92	ZA96
	ZB07	ZB08	ZB09	ZB13	ZB15	ZB26	ZB27	ZB35	ZB37	ZC01
	ZC21									
4H045	AA11	AA20	BA10	CA40	DA02	DA75	EA20	FA10	FA71	GA21
	GA23	GA25	GA26							