

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5183484号
(P5183484)

(45) 発行日 平成25年4月17日(2013.4.17)

(24) 登録日 平成25年1月25日(2013.1.25)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	16/24	(2006.01)	C O 7 K 16/24
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-543887 (P2008-543887)
 (86) (22) 出願日 平成18年12月4日(2006.12.4)
 (65) 公表番号 特表2009-518023 (P2009-518023A)
 (43) 公表日 平成21年5月7日(2009.5.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2006/004518
 (87) 国際公開番号 W02007/066082
 (87) 国際公開日 平成19年6月14日(2007.6.14)
 審査請求日 平成21年11月20日(2009.11.20)
 (31) 優先権主張番号 60/748,926
 (32) 優先日 平成17年12月9日(2005.12.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507073918
 ユセベ ファルマ ソシエテ アノニム
 ベルギー国、ペー - 1070 ブリュ
 ッセル、アレー ド ラ ルシエルシュ
 60
 (74) 代理人 100066692
 弁理士 浅村 皓
 (74) 代理人 100072040
 弁理士 浅村 肇
 (74) 代理人 100114719
 弁理士 金森 久司
 (74) 代理人 100088926
 弁理士 長沼 暉夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト I L - 6 に対して特異性を有する抗体分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 1 で表される配列 g H 1 3 を含む重鎖及び配列番号 1 3 で表される配列 g L 1 0 を含む軽鎖を有する、ヒト I L - 6 に対して特異性を有する中和抗体。

【請求項 2】

配列番号 1 6 で表される配列を含む重鎖及び配列番号 1 8 で表される配列を含む軽鎖を有する、請求項 1 に記載のヒト I L - 6 に対して特異性を有する中和抗体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体の重鎖及び / 又は軽鎖をコードする単離した D N A。

【請求項 4】

重鎖をコードする D N A が、配列番号 1 2 又は配列番号 1 5、あるいは配列番号 1 5 のヌクレオチド 5 8 ~ 2 0 0 8 で表される配列を含む請求項 3 に記載の単離した D N A。

【請求項 5】

軽鎖をコードする D N A が、配列番号 1 4 又は配列番号 1 7、あるいは配列番号 1 7 のヌクレオチド 6 1 ~ 7 0 5 で表される配列を含む請求項 3 に記載の単離した D N A。

【請求項 6】

請求項 3 から 5 までのいずれか一項に記載の 1 つ又は複数の D N A を含むクローニング又は発現ベクター。

【請求項 7】

配列番号 1 5 で表される配列及び配列番号 1 7 で表される配列を含む請求項 6 に記載の

ベクター。

【請求項 8】

請求項 6 又は請求項 7 に記載の 1 つ又は複数のクローニング又は発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9】

ヒト IL - 6 に対して結合特異性を有する抗体を産生する方法であって、請求項 8 に記載の宿主細胞を培養し、抗体を単離することを含む方法。

【請求項 10】

1 つ又は複数の薬学的に許容し得る賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて、請求項 1 又は 2 に記載の抗体を含む医薬組成物。

10

【請求項 11】

他の活性成分をさらに含む請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

IL - 6 により媒介されるか又は IL - 6 レベルの増加を伴う病理学的障害の治療又は予防のための、請求項 10 又は 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記病理学的障害が、ウイルス、細菌、真菌及び寄生生物による感染症；感染症と関連する内毒素性ショック；関節炎；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身型若年性特発性関節炎（JIA）；全身性エリテマトーデス（SLE）；喘息；骨盤腹膜炎；アルツハイマー病；クローン病；潰瘍性大腸炎；過敏性大腸症候群；キャスルマン病；強直性脊椎炎；皮膚筋炎；ブドウ膜炎；ペーロニー病；小児脂肪便症；胆嚢疾患；毛巣病；腹膜炎；乾癬；血管炎；手術に起因する癒着；脳卒中；I 型糖尿病；ライム病関節炎；髄膜脳炎；多発性硬化症及びギランバレー症候群を含む中枢神経系及び末梢神経系の免疫媒介炎症性疾患；他の自己免疫疾患；脾炎；外傷（手術）；移植片対宿主病；移植拒絶反応；癌；虚血性疾患及び心筋梗塞を含む心臓疾患；アテローム性動脈硬化；血管内凝固；骨吸収；熱傷；骨粗鬆症；歯周炎及びヒポクロリジア（hypochlorhydria）から成る群から選択される、請求項 12 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 14】

前記病理学的障害が、関節炎；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身型若年性特発性関節炎（JIA）；全身性エリテマトーデス（SLE）；喘息；クローン病；潰瘍性大腸炎；キャスルマン病；強直性脊椎炎；及び癌から成る群から選択される、請求項 13 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 15】

前記癌が、黒色腫；肝芽腫；肉腫；扁平上皮癌；移行細胞癌；卵巣癌；血液学的悪性腫瘍；急性骨髄性白血病；慢性骨髄性白血病；胃癌及び結腸癌から成る群から選択される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記病理学的障害が関節リウマチである、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、IL - 6 の抗原決定基に対して特異性を有する抗体分子に関する。また本発明はこの抗体分子の治療的使用及びこの抗体分子を産生する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

IL - 6 は、様々な細胞型により産生される多面的な多機能サイトカインである。これは最初、抗体産生細胞へと B 細胞の最終的な成熟を誘発する B 細胞分化因子（BSF - 2）として同定された（Hirano ら、1986 Nature 324、73 ~ 76）。IL - 6 は、免疫制御、炎症、造血及び発癌において中心的役割を果たしていることが示されている。免疫系の中で IL - 6 は B 細胞の抗体産生を誘発し、ポリクローナル免疫

50

グロブリンの量を増加させる。またこれは、T細胞上でインターロイキン-2(IL-2)レセプターの発現を誘発し(Nomuraら、1987、*Immunol. Letters*、15、3、249~253)、活性化されたT細胞でIL-2産生を促進し、それにより細胞毒性T細胞の増殖と分化の両方を誘発する(Okadaら、1988、*J Immunol*、141、5、1543~1549)。またIL-6は、マクロファージへの単核細胞の分化を決定することが知られている(Chomarat Pら、2000、*Nature Immunol.*、6、510~514)。

【0003】

IL-6が、造血、血小板新生、破骨細胞形成、C反応性タンパク質(CRP)及び血清アミロイドA(SAA)タンパク質の上昇をもたらす肝性急性期応答の誘発において作用するとき、IL-6の機能は免疫応答に限定されない。IL-6は、表皮ケラチン細胞、腎臓系球体間質細胞、ミエローム及びプラズマ細胞腫細胞の成長因子であることが知られている(Grossmanら、1989、*Prot Natl Acad Sci.*、86、(16)6367~6371; Horiiら、1989、*J Immunol*、143、12、3949~3955; Kawanoら、1988、*Nature* 332、6159、83~85)。IL-6は、単核細胞/マクロファージ、繊維芽細胞、表皮ケラチン細胞、血管内皮細胞、腎臓系球体間質細胞、グリア細胞、軟骨細胞、T及びB細胞並びに一部の腫瘍細胞を含む多様な細胞型により産生される(Akiraら、1990、*FASEB J.*、4、11、2860~2867)。構成的にIL-6を産生する腫瘍細胞を除いて、適切に刺激されない限り正常細胞はIL-6を発現しない。

【0004】

IL-6は、翻訳後修飾に依存して21~28kDの分子量を有する184個のアミノ酸分子の糖タンパク質である。代替性のスプライス変異体が、一部の細胞型で見いだされている(Kishimotoら、1995、*Blood*、86、4、1243~1254)。IL-6レセプター(IL-6R)複合体は、2つの機能的に異なる膜タンパク質である80kDのIL-6特異的結合鎖(gp80)及び130kDのシグナル伝達鎖(gp130)を含んでいる。IL-6はgp130に直接結合することはできないが、IL-6Rと結合してIL-6/IL-6R/gp130の高親和性三重複合体を生成することができる。IL-6Rは低親和性でIL-6を結合するが、IL-6Rは細胞内シグナル伝達ドメインを有さず、したがってこの連結は単独で細胞活性化を導かない。同様にIL-6Rの細胞表面発現は、細胞がIL-6刺激に应答性であることを意味しない。タンパク質分解性開裂は、循環血中のIL-6を結合できる可溶性のIL-6R(sIL-6R; sgp80)の放出を導き、IL-6の半減期を増加させる。細胞活性化のために、IL-6はまず細胞結合IL-6R又はsIL-6Rのいずれかに結合し、次いでこのヘテロ二量体IL-6/IL-6R複合体は、細胞表面糖タンパク質gp130と結合する。生じた三部から成るヘテロ複合体は、別のIL-6/IL-6R/gp130と結合し、続いてシグナル伝達が起こるので(BravoとHeath 2000、*EMBO J.*、19、(11)、2399~2411; Boulangerら、2003、*Science*、300、5628、2101~2104)、細胞結合IL-6R及び可溶性IL-6Rの両方が細胞の活性化に関与する。細胞結合IL-6Rを介したIL-6シグナル伝達を、シスシグナル伝達(cis signaling)と呼ぶのに対して、可溶性IL-6Rを介した細胞活性化は、トランスシグナル伝達(trans signaling)と述べられている。IL-6Rではなくgp130を発現している細胞は、sIL-6Rを介するIL-6により刺激することができる。

【0005】

ヒトIL-6に対する中和マウス抗体は、IL-6R(サイト1)又はgp130(サイト2及び3)へのヒトIL-6の結合を妨害できることが知られている(Kalaisら、1997、*Eur. J. Biochem.*、249、690~700; Brakenhoffら、1990、*Journal of Immunology*、145、561~568; Wendlingら、1993、*Journal of Rheumatology*

10

20

30

40

50

y、29、259～262)。

【0006】

米国特許第5,856,135号は、IL-6RへのIL-6の結合を阻止するヒトIL-6に対する再構築されたヒト抗体を開示している。これらの抗体はマウス抗体SK2の可変領域由来の相補性決定領域(CDR)が、ヒト抗体の可変領域に移植されているマウスモノクローナル抗体SK2から由来した。

【0007】

また、IL-6に対する中和ヒト自己抗体が知られている(Hansenら、Eur. J. Immunol、1995、25、348～354)。

【0008】

治療に用いるサイトキメラマウス/ヒト抗IL-6抗体が、WO2004039826に記載された。

【0009】

ヒト化抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体が、関節リウマチ治療のために第3相臨床試験中である(Kishimoto、2005、Annu Rev Immunol、23:1～21)。また同じ抗体が、クローン病の第2相試験において有効あることが報告されている。また有効性がNZB/W F₁マウスのループス様疾患において、抗IL-6及び抗IL-6R抗体の両方を用いて実証された(Finkら、1994 J. Clin. Invest. 94、585; Miharaら、1998、Clin. Exp. Immunol. 112、397)。マウスのIL-6レセプターに対する中和抗体は、疾患の養子移入モデルにおいて大腸炎を抑制した(Yamamotoら、2000 Journal of Immunology、164、4878; Atreyaら、2000 Nature Med 6、583)。また後者の研究では、大腸炎のIL-10ノックアウトマウスモデル及び腸炎症のTNBSモデルにおいて、抗レセプター抗体を用いて有効性を実証した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは、この度in vivoで、例えば本明細書に記載されるin vivoモデルにおいて特に有効である高親和性中和抗IL-6抗体を同定した。

【課題を解決するための手段】

【0011】

抗体の可変ドメインの残基は、通常、Kabatraによって考案された方式に従って番号付けされる。この方式は、Kabata et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (以下、Kabatra (上述))に記載されている。特に示さない限り本明細書でこの番号付け方式が用いられる。

【0012】

Kabataの残基命名は、アミノ酸残基の直線的な番号付けと必ずしも直接的には対応していない。実際の直線的なアミノ酸配列は、基本的可変ドメイン構造のフレームワーク若しくは相補性決定領域(CDR)にかかわらず、構造的成分の短縮又は挿入に対応して厳密なKabataの番号付けより少ないか若しくは追加のアミノ酸を含む場合がある。残基の正確なKabataの番号付けは、所定の抗体に対して「標準的」Kabata番号付けされた配列とこの抗体の配列中の相同性残基を整列させることにより決定できる。

【0013】

重鎖可変ドメインのCDRは、Kabata番号付け方式によれば、残基31～35(CDR-H1)、残基50～65(CDR-H2)及び残基95～102(CDR-H3)に存在する。しかし、Chothiaによれば(Chothia, C.とLesk, A. M., J. Mol. Biol., 196、901～917(1987))、CDR-H1

10

20

30

40

50

に相当するループは、残基26から残基32にわたっている。したがって本明細書中で用いられる「CDR-H1」は、Kabat番号付け方式とChothiaの位相的ループ定義の組合せにより記載されるように残基26から35を含む。

【0014】

軽鎖可変ドメインのCDRは、Kabat番号付け方式に従って残基24~34(CDR-L1)、残基50~56(CDR-L2)及び残基89~97(CDR-L3)中に存在する。

【0015】

本明細書中で用いられる、用語「中和抗体」とは、IL-6の生物学的シグナル伝達活性を、例えばgp130レセプターへのIL-6のサイト3での結合を阻止することにより中和できる抗体を意味する。

10

【0016】

本発明に使用する抗体は、当該技術で周知の任意の適切な方法を用いて得ることができる。IL-6ポリペプチド又はポリペプチドを発現している細胞を、IL-6を特異的に認識する抗体を産生するために用いることができる。このIL-6ポリペプチドは、「成熟した(mature)」ポリペプチド又はそれらの生物学的に活性なフラグメント若しくは誘導体であってもよい。このIL-6ポリペプチドは、成熟したポリペプチドであることが好ましい。IL-6ポリペプチドは、発現系を含む遺伝子操作した宿主細胞から、当分野でよく知られている工程により調製され得るか又はこれらは天然の生物源から回収され得る。本発明の適用において、用語「ポリペプチド」には、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質が含まれる。これらは特に明記しない限り互換的に用いられる。このIL-6ポリペプチドは場合によっては、例えばアフィニティー標識を融合した融合タンパク質等のより大きなタンパク質の部分であり得る。動物に免疫処置が必要な場合、動物に、好ましくヒト以外の動物に、周知の通常的手法を用いてIL-6ポリペプチドを投与することにより、このポリペプチドに対して生成された抗体を得ることができ、例えば、Handbook of Experimental Immunology、D.M.Weir編、第4巻、Blackwell Scientific Publishers、Oxford、England、1986を参照のこと)。多くの温血動物、例えばウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ又はブタを免疫してもよい。しかし、マウス、ウサギ、ブタ及びラットが通常好ましい。

20

30

【0017】

本発明に使用する抗体は、完全な抗体及びこれらの機能的に活性なフラグメント又は誘導体を含み、これに限定されるものではないがモノクローナル、ヒト化、完全なヒト又はキメラ抗体であってもよい。

【0018】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術(KohlerとMilstein、1975、Nature、256:495~497)、トリオーマ(trioma)技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983、Immunology Today、4:72)及びEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、pp77~96、Alan R Liss, Inc., 1985)等の任意の当分野で知られている方法により作成できる。

40

【0019】

本発明に使用する抗体は、特異的抗体産生のために選択された単一のリンパ球から生成された免疫グロブリン可変領域cDNAのクローニング及び発現により、単一のリンパ球抗体法を用いて生成することもでき、例えばBabcock, J.ら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843~78481; WO 92/02551; WO 2004/051268及び国際特許出願番号WO 2004/106377により記載された方法による。

【0020】

50

ヒト化抗体（CDR移植抗体を含む）は、ヒト以外の生物種由来の1つ又は複数の相補性決定領域（CDR）及びヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有するヒト以外の生物種由来の抗体分子である（例えばUS5,585,089；WO91/09967を参照のこと）。CDR全体よりはむしろ特異性を決定するCDRの残基を移植することのみが必要であることは理解されるであろう（例えばKashmiriら、2005、Methods、36、25～34を参照のこと）。ヒト化抗体は場合によってはさらに、そのCDRが由来したヒト以外の生物種由来の1つ又は複数のフレームワーク残基を含み得る。

【0021】

キメラ抗体とは、軽鎖及び重鎖遺伝子が、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構成されるように遺伝子操作された免疫グロブリン遺伝子によりコードされた抗体である。

【0022】

本発明に使用する抗体は、当分野で知られている多様なファージディスプレイ方法を用いて生成することもでき、Brinkmanら（in J. Immunol. Methods、1995、182：41～50）、Amesら（J. Immunol. Methods、1995、184：177～186）、Kettleboroughら（Eur. J. Immunol. 1994、24：952～958）、Persicら（Gene、1997 1879～18）、Burtonら（Advances in Immunology、1994、57：191～280）並びにWO90/02809；WO91/10737；WO92/01047；WO92/18619；WO93/11236；WO95/15982；WO95/20401；及びUS5,698,426；5,223,409；5,403,484；5,580,717；5,427,908；5,750,753；5,821,047；5,571,698；5,427,908；5,516,637；5,780,225；5,658,727；5,733,743；5,969,108に開示されているものが含まれる。

【0023】

完全ヒト抗体は、重鎖及び軽鎖両方（が存在する場合）の変領域及び定常領域は、全てヒト起源であるか又はヒト起源の配列と実質的に同一であり、必ずしも同じ抗体に由来しないヒト抗体である。完全ヒト抗体の例には、例えば上記のファージディスプレイ方法により産生された抗体及びマウスの免疫グロブリンの変領域及び定常領域遺伝子が、この遺伝子のヒト対応物により置換されたマウスで産生された抗体が含まれ得て、例えばEP0546073B1、US5,545,806、US5,569,825、US5,625,126、US5,633,425、US5,661,016、US5,770,429、EP0438474B1及びEP0463151B1に一般的に記載されている。

【0024】

一実施形態では、本発明は、重鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体を提供し、重鎖の変領域は、CDR-H1に対して配列番号5に記載の配列を有するCDR、CDR-H2に対して配列番号6に記載の配列を有するCDR及びCDR-H3に対して配列番号7に記載の配列を有するCDRのうちの少なくとも1つを含む。

【0025】

別の実施形態では、本発明は、重鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体であって、重鎖の変領域のCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3のうちの少なくとも2つが、以下の配列：CDR-H1に対して配列番号5に記載の配列、CDR-H2に対して配列番号6に記載の配列及びCDR-H3に対して配列番号7に記載の配列から選択される、中和抗体を提供する。例えば、抗体は、CDR-H1が配列番号5に記載の配列を有し、CDR-H2が配列番号6に記載の配列を有する重鎖を含むことができる。或いは、抗体は、CDR-H1が配列番号5に記載の配列を有し、CDR-H3が配列番号7に記載の配列を有する重鎖を含むことができ、又は抗体は、CDR-H2が配列番号6に記載の配列を有し、CDR-H3が配列番号7に記載の配列を有する重鎖

10

20

30

40

50

を含むことができる。疑義を回避するため、あらゆる置換を含むことは理解されよう。

【0026】

別の実施形態では、本発明は、重鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体であって、重鎖の可変ドメインが、CDR-H1に対して配列番号5に記載の配列、CDR-H2に対して配列番号6に記載の配列及びCDR-H3に対して配列番号7に記載の配列を含む、中和抗体を提供する。

【0027】

一実施形態では、本発明は、軽鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体であって、軽鎖の可変ドメインが、CDR-L1に対して配列番号8に記載の配列を有するCDR、CDR-L2に対して配列番号9に記載の配列を有するCDR及びCDR-L3に対して配列番号10に記載の配列を有するCDRのうちの少なくとも1つを含む、中和抗体を提供する。

10

【0028】

別の実施形態では、本発明は、軽鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体であって、軽鎖可変ドメインのCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3のうちの少なくとも2つが、以下の配列：CDR-L1に対して配列番号8に記載の配列、CDR-L2に対して配列番号9に記載の配列及びCDR-L3に対して配列番号10に記載の配列から選択される、中和抗体を提供する。例えばこの抗体は、CDR-L1が配列番号8に記載の配列を有し、CDR-L2が配列番号9に記載の配列を有する軽鎖を含むことができる。或いは、この抗体は、CDR-L1が配列番号8に記載の配列を有し、CDR-L3が配列番号10に記載の配列を有する軽鎖を含むことができ、又はこの抗体は、CDR-L2が配列番号9に記載の配列を有し、CDR-L3が配列番号10に記載の配列を有する軽鎖を含むことができる。疑義を回避するため、あらゆる置換を含むことは理解されよう。

20

【0029】

別の実施形態では、本発明は、軽鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体であって、この可変ドメインは、CDR-L1に対して配列番号8に記載の配列、CDR-L2に対して配列番号9に記載の配列及びCDR-L3に対して配列番号10に記載の配列を含む、中和抗体を提供する。

【0030】

IL-6に結合する抗体の能力及びIL-6活性を中和する抗体の能力を有意に変化させることなく、本発明により提供されたCDRに対して1つ又は複数のアミノ酸置換、付加及び/又は欠失がなされ得ることは理解されるであろう。任意のアミノ酸置換、付加及び/又は欠失の効果は、例えばIL-6の結合及び中和を測定する実施例に記載された方法を使用して、当業者により容易に調べることができる。したがって、一実施例では、本発明は、CDRH-1（配列番号5）、CDRH-2（配列番号6）、CDRH-3（配列番号7）、CDRL-1（配列番号8）、CDRL-2（配列番号9）及びCDRL-3（配列番号10）から選択される1つ又は複数のCDRを含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する抗体であって、CDRのうちの1つ又は複数における1つ又は複数のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている、中和抗体を提供する。

30

40

【0031】

本発明の抗体分子は、それぞれ相補的な軽鎖又は相補的な重鎖を含むことが好ましい。

【0032】

それゆえに、一実施形態では、本発明の抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、CDR-H1に対して配列番号5に記載の配列、CDR-H2に対して配列番号6に記載の配列及びCDR-H3に対して配列番号7に記載の配列を含み、軽鎖の可変ドメインは、CDR-L1に対して配列番号8に記載の配列、CDR-L2に対して配列番号9に記載の配列及びCDR-L3に対して配列番号10に記載の配列を含む。

【0033】

一実施例では、本発明は、重鎖及び軽鎖を含む、ヒトIL-6に対して特異性を有する

50

抗体であって、重鎖の可変ドメインは、CDR-H1に対して配列番号5に記載の配列、CDRH-2に対して配列番号6に記載の配列及びCDRH-3に対して配列番号7に記載の配列を含み、軽鎖の可変ドメインは、CDR-L1に対して配列番号8に記載の配列、CDR-L2に対して配列番号9に記載の配列及びCDR-L3に対して配列番号10に記載の配列を含み、CDRのうちの1つ又は複数における1つ又は複数のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている、中和抗体を提供する。

【0034】

一実施形態では、本発明の抗体は重鎖を含み、重鎖の可変ドメインは配列番号2に記載の配列を含む。

【0035】

別の実施形態では、本発明の抗体は重鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、配列番号2に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体は重鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、配列番号2に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

【0036】

本明細書で用いられる「同一性」とは、整列配列中の任意の特定の位置において、そのアミノ酸残基が配列間で同一であることを示す。本明細書で用いられる「類似性」とは、整列配列中の任意の特定の位置において、そのアミノ酸残基が配列間で類似したタイプであることを示す。例えば、ロイシンでイソロイシン又はバリンが置換され得る。互いにし

ばしば置換され得る他のアミノ酸には、限定されるものではないが、

- フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；
- リシン、アルギニン及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；
- アスパラギン酸及びグルタミン酸（酸性側鎖を有するアミノ酸）；
- アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；並びに
- システイン及びメチオニン（硫黄を含む側鎖を有するアミノ酸）が含まれる。同一性及び類似性の程度は、容易に算出することができる（Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編、Oxford University Press、New York、1988；Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編、Academic Press、New York、1993；Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. と Griffin, H.G. 編、Humana Press、New Jersey、1994；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press、1987；及び Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. と Devereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991）。

【0037】

一実施形態では、本発明の抗体は軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは配列番号4に記載の配列を含む。

【0038】

別の実施形態では、本発明の抗体は軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号4に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体は軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号4に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

【0039】

一実施形態では、本発明の抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖の可変ドメインは配列番号2に記載の配列を含み、軽鎖の可変ドメインは配列番号4に記載の配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

本発明の別の実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、配列番号2に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号4に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。抗体は重鎖及び軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号2に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号4に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含むことが好ましい。

【 0 0 4 1 】

一実施形態では、本発明の抗体は、重鎖の可変ドメインが配列番号2に記載の配列を含み、軽鎖の可変ドメインが配列番号4に記載の配列を含むラット抗体である。このラット抗体を、本明細書では「132E093」又は「ドナー」抗体と称する。ラット抗体132E09の重鎖の可変ドメインの完全なヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1及び2で提供される。ラット抗体132E09の軽鎖の可変ドメインの完全なヌクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号3及び4で提供される。配列番号5、6、7、8、9及び10に記載のCDRは、ラット抗体132E09に由来する。

【 0 0 4 2 】

一実施形態では、本発明の抗体はCDR移植抗体である。本明細書で用いられる用語「CDR移植抗体」とは、重鎖及び/又は軽鎖が、アクセプター抗体（例えばヒト抗体）の重鎖及び/又は軽鎖可変領域のフレームワークに移植されたドナー抗体（例えばラット抗体）由来の1つ又は複数CDR（必要に応じて、1つ又は複数の改変されたCDRを含む）を含む抗体を指す。Vaughanら、Nature Biotechnology、16、535～539、1998を参照することができる。1つ又は複数のCDRが、ラット抗体132E09から得られることが好ましい（配列番号5、6、7、8、9及び10）。一実施形態では、完全なCDRが移植されるよりもむしろ、上述したCDRのいずれか1つに由来する1つ以上の特異性決定残基のみがヒト抗体フレームワークへ移植される（例えば、Kashmiriら、2005、Methods、36、25～34を参照）。一実施形態では、上述したCDRの1つ又は複数に由来する特異性決定残基のみがヒト抗体フレームワークへ移植される。別の実施形態では、上述したCDRのそれぞれに由来する特異性決定残基のみがヒト抗体フレームワークへ移植される。

【 0 0 4 3 】

CDR又は特異性決定残基が移植される場合、そのCDRが由来するドナー抗体のクラス/タイプを考慮して、ラット、マウス、霊長類及びヒトフレームワーク領域を含む任意の適切なアクセプターの可変領域のフレームワーク配列を使用することができる。好ましくは、本発明のCDR移植抗体は、ヒトアクセプターフレームワーク領域及び1つ又は複数の上記のようなドナー抗体に由来するCDRを含む少なくとも1つの可変ドメインを有する。したがって可変ドメインは、ヒトアクセプターフレームワーク領域及びヒト以外の、好ましくはラットのドナーCDRを含む中和CDR移植抗体が提供される。

【 0 0 4 4 】

本発明で使用できるヒトフレームワークの例には、KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY及びPOMがある（Kabataら、前出）。例えば、KOL及びNEWMは重鎖に使用することができ、REIは軽鎖のために使用することができ、EU、LAY及びPOMは重鎖及び軽鎖両方に使用することができる。或いは、ヒト生殖細胞系配列を使用でき、これらの配列は、<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>で利用できる。

【 0 0 4 5 】

本発明のCDR移植抗体において、アクセプターの重鎖及び軽鎖は、必ずしも同じ抗体から由来する必要はなく、所望であれば異なる鎖に由来するフレームワーク領域を有する複合鎖を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0046】

本発明のCDR移植抗体の重鎖のための好ましいフレームワーク領域は、JH4と共にヒトサブグループVH3配列1-4 3-72に由来する(図2に示した配列番号19及び20)。したがって、少なくとも1つのヒト以外のドナーCDRを含む中和CDR移植抗体が提供され、この重鎖フレームワーク領域はJH4と共にヒトサブグループ配列1-4 3-72に由来する。ヒトJH4配列は、以下の通りである:(YFDY)WGQGT LVT VSS(配列番号20)。YFDYモチーフはCDR-H3の一部であり、フレームワーク4の一部ではない(Ravetch, J.V.ら、1981、Cell、27、583~591)。このドナー配列は図2に示した132E09 VH配列(配列番号2)であり、ドナーCDR(配列番号5、6及び7)には下線を施してある。

10

【0047】

本発明のCDR移植抗体の軽鎖のための好ましいフレームワーク領域は、図2(配列番号21及び22)に示したJK2と共にヒト生殖細胞系サブグループVK1配列2-1-(1)O12に由来する。したがって、少なくとも1つのヒト以外のドナーCDRを含む中和CDR移植抗体が提供され、軽鎖フレームワーク領域はJK2と共にヒトサブグループ配列VK1 2-1-(1)O12に由来する。JK2配列は以下の通りである:(YT)FGQGTKLEIKR(配列番号22)。YTのモチーフはCDR-L3の一部であり、フレームワーク4の一部ではない(Hietter, P.A.ら、1982、J. Biol. Chem.、257、1516~1522)。ドナー配列は、図2に示した(配列番号4)132E09 VL配列であり、ドナーCDR(配列番号8、9及び10)には下線を施してある。

20

【0048】

また本発明のCDR移植抗体において、フレームワーク領域はアクセプター抗体のフレームワーク領域と正確に同じ配列を有する必要はない。例えば、まれな残基をそのアクセプター鎖クラス又はタイプにおいて、より高頻度に現れる残基に変えてもよい。或いは、アクセプターフレームワーク領域中の選択した残基を、ドナー抗体において同じ位置に見られる残基に一致するように変更してもよい(Reichmannら、1998、Nature、332、323~324を参照のこと)。そのような変更は、ドナー抗体の親和性を回復するために必要最小限にとどめるべきである。アクセプターフレームワーク領域において、変更する必要がある残基を選択するためのプロトコルが、WO91/09967に述べられている。

30

【0049】

好ましくは、本発明のCDR移植抗体分子において、アクセプター重鎖がJH4と共にヒトVH3配列1-4 3-72を有する場合、重鎖のアクセプターフレームワーク領域は1つ又は複数のドナーCDRに加えて、少なくとも位置49(Kabatらによる(上述))にドナー残基を含む。したがって、重鎖可変ドメインの少なくとも位置49の残基がドナー残基であるCDR移植抗体が提供される。

【0050】

好ましくは、本発明のCDR移植抗体分子において、アクセプター軽鎖がJK2と共にヒトサブグループVK1配列2-1-(1)O12を有する場合、軽鎖のアクセプターフレームワーク領域にドナー残基は使用されず、1つ又は複数のドナーCDRのみが移植される。

40

【0051】

ドナー残基はドナー抗体、すなわちCDRがもともと由来する抗体から由来する残基であり、ドナー抗体は本発明の場合、ラット抗体132E09である。

【0052】

したがって、本発明は、重鎖可変領域がgH13(図2;配列番号11)の配列を含む抗体を提供する。

【0053】

本発明の一実施形態では、抗体は重鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、配列番号11に

50

記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。好ましくは、抗体は重鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、配列番号11に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

【0054】

さらに、本発明は、軽鎖可変領域がgL10(図2;配列番号13)の配列を含む抗体を提供する。

【0055】

本発明の一実施形態では、抗体は軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号13に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。好ましくは、抗体は軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号13に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

10

【0056】

好ましくは、本発明のCDR移植抗体は、gH13の配列(配列番号11)を含む重鎖及びgL10の配列(配列番号13)を含む軽鎖を含む。

【0057】

本発明の一実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖の可変ドメインは、配列番号11に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号13に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。好ましくは、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号11に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含み、軽鎖の可変ドメインは、配列番号13に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

20

【0058】

本発明の抗体分子は、完全長の重鎖及び軽鎖又はこれらのフラグメントを有する完全な抗体分子を含むことができ、これに限定されるものではないが、Fab、改変されたFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単ドメイン抗体、scFv、二価、三価又は四価抗体、Bis-scFv、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体及び上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントであってもよい(例えば、HolligerとHudson、2005、Nature Biotech. 23(9):1126~1136; AdairとLawson、2005、Drug Design Reviews - Online 2(3)、209~217を参照のこと)。これらの抗体フラグメントの作成及び製造方法は、当分野では周知である(例えば、Vermaら、1998、Journal of Immunological Methods、216、165~181を参照のこと)。本発明において使用する他の抗体フラグメントは、国際特許出願WO2005/003169、WO2005/003170及びWO2005/003171に記載されたFab及びFab'フラグメントを含む。多価抗体は、多重特異性を含んでもよく、又は単一特異性であってもよい(例えばWO92/22853及びWO05/113605を参照のこと)。

30

40

【0059】

本発明の抗体分子の定常領域ドメインは、存在する場合には抗体分子の提案された機能及び必要とされることのある特にエフェクター機能を考慮して選択され得る。例えば、定常領域ドメインは、ヒトIgA、IgD、IgE、IgG又はIgMドメインであってもよい。特に、ヒトIgG定常領域ドメインを使用してもよく、抗体分子が治療的使用を意図しており、抗体エフェクター機能が必要とされる場合は、特にIgG1及びIgG3アイソタイプの定常領域ドメインを使用することができる。或いは、抗体分子が治療目的を意図しており、抗体エフェクター機能が必要とされない場合、例えば単にIL-6活性の阻止が意図される場合は、IgG2及びIgG4アイソタイプを使用することができる。

50

これらの定常領域ドメインの配列変異体も使用され得ることは理解されるであろう。Angalら、Molecular Immunology、1993、30(1)、105～108に記載されているように、例えば位置241のセリンがプロリンに変更されたIgG分子を使用することができる。この変更を含むIgG4定常ドメインが特に好ましい。当業者なら、抗体が様々な翻訳後修飾を受けることがあることも理解するであろう。これらの修飾のタイプ及び程度は、しばしば抗体を発現するために用いた宿主細胞系及び培養条件に依存する。このような修飾は、グリコシル化、メチオニン酸化、ジケトピペリジン形成、アスパラギン酸異性化及びアスパラギン脱アミド化における変異を含み得る。頻度の高い修飾は、カルボキシペプチダーゼの作用によるカルボキシ末端塩基性残基（例えばリシン又はアルギニン）の損失である（Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129～134、1995に記載されているような）。したがって、配列番号16の抗体重鎖のC末端リシンは存在しない可能性がある。

10

【0060】

好ましい実施形態では、本発明によって提供される抗体は、重鎖定常領域がAngalら、前出、に記載されているように、241位のセリンがプロリンに置換されたヒトIgG4定常領域を含むヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体である。したがって、本発明は重鎖が配列番号16に記載の配列を含むか又はこの配列から成る抗体を提供する。軽鎖定常領域はc-であることが好ましい。

【0061】

一実施形態では、本発明は、重鎖が配列番号16に記載の配列を含むか又はこの配列から成り、軽鎖が配列番号18に記載の配列を含むか又はこの配列から成る抗体を提供する。

20

【0062】

本発明の一実施形態では、抗体は重鎖を含み、重鎖は、配列番号16に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。好ましくは、抗体は重鎖を含み、重鎖は、配列番号16に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

【0063】

本発明の一実施形態では、抗体は軽鎖を含み、軽鎖は、配列番号18に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。好ましくは、抗体は軽鎖を含み、軽鎖は、配列番号18に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

30

【0064】

本発明の一実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号16に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含み、軽鎖は、配列番号18に記載の配列に対して少なくとも60%の同一性又は類似性を有する配列を含む。好ましくは、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号16に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含み、軽鎖は、配列番号18に記載の配列に対して少なくとも70%、80%、90%、95%又は98%の同一性又は類似性を有する配列を含む。

40

【0065】

また本発明によって、本発明の抗体、特にCDR-H1（配列番号5）、CDR-H2（配列番号6）、CDR-H3（配列番号7）、CDR-L1（配列番号8）、CDR-L2（配列番号9）若しくはCDR-L3（配列番号10）のいずれか1つを含む抗体、例えば抗体132E09、又は重鎖可変領域配列gH13（配列番号11）及び/若しくは軽鎖可変領域配列gL10（配列番号13）を含む抗体が結合するヒトIL-6の特異的領域又はエピトープが提供される。

【0066】

ヒトIL-6ポリペプチドのこの特異的領域又はエピトープは、本発明により提供され

50

る抗体のいずれか1つと組み合わせて、当分野で知られている任意の適切なエピトープマッピング法により同定することができる。このような方法の実施例には、抗体により認識されるエピトープの配列を含む特異的に抗体に結合することができる最小フラグメントの本発明の抗体への結合に対して、IL-6に由来する様々な長さのペプチドをスクリーニングすることが含まれる。IL-6ペプチドは、合成的に又はIL-6ポリペプチドのタンパク分解によって作成されてもよい。抗体を結合するペプチドは、例えば質量分析によって同定できる。別の実施例では、NMR分光法を本明細書における実施例に記載されているように、本発明の抗体が結合するエピトープの同定に用いることができる。一度同定されると、本発明の抗体と結合するエピトープのフラグメントを、必要に応じて同じエピトープを結合する新たな中和抗体を得るために免疫原として用いることができる。

10

【0067】

一実施例では、本発明の抗体が結合するヒトIL-6のエピトープは、ヒトIL-6の少なくともアミノ酸残基S47、C50、E93、R104、F105、E106、T149、K150、A153、Q156、Q159及びS169を含む(残基の番号付けはBoulangierら、Science、300、2101~2104による)。一実施例では、本発明の抗体が結合するヒトIL-6のエピトープは、アミノ酸残基S47、C50、E93、R104、F105、E106、T149、K150、A153、Q156、Q159及びS169並びにC44、S53、A58、V96、Q152、Q154、N155、W157、T163、L165及びE172から選択される1つ又は複数の残基を含む。

20

【0068】

一実施例では、本発明の抗体が結合するヒトIL-6のエピトープは、アミノ酸残基C44、S47、C50、S53、A58、E93、V96、R104、F105、E106、T149、K150、Q152、A153、Q154、N155、Q156、W157、Q159、T163、L165、S169及びE172を含む。

【0069】

一実施形態では、本発明は、アミノ酸残基S47、C50、E93、R104、F105、E106、T149、K150、A153、Q156、Q159及びS169を含む成熟したヒトIL-6のエピトープに結合する、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体を提供する。

30

【0070】

一実施形態では、本発明は、アミノ酸残基S47、C50、E93、R104、F105、E106、T149、K150、A153、Q156、Q159及びS169並びにC44、S53、A58、V96、Q152、Q154、N155、W157、T163、L165及びE172から選択される1つ又は複数の残基を含む成熟したヒトIL-6のエピトープに結合する、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体を提供する。

【0071】

一実施形態では、本発明は、アミノ酸残基C44、S47、C50、S53、A58、E93、V96、R104、F105、E106、T149、K150、Q152、A153、Q154、N155、Q156、W157、Q159、T163、L165、S169及びE172を含む成熟したヒトIL-6のエピトープに結合する、ヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体を提供する。

40

【0072】

上記で命名した残基はまた、IL-6の未処理前駆体のアミノ酸番号付けに基づいて番号を付され得ることは理解されるであろう(Swiss Prot受入番号P05231)。この番号付けを用いて、上記の残基を前記Boulangierらに従って、C44、S47、C50、S53、A58、E93、V96、R104、F105、E106、T149、K150、Q152、A153、Q154、N155、Q156、W157、Q159、T163、L165、S169及びE172が、それぞれC72、S75、C78、S81、A86、E121、V124、R132、F133、E134、T177、

50

K 1 7 8、Q 1 8 0、A 1 8 1、Q 1 8 2、N 1 8 3、Q 1 8 4、W 1 8 5、Q 1 8 7、
T 1 9 1、L 1 9 3、S 1 9 7 及び E 2 0 0 になるように番号付けした。

【 0 0 7 3 】

本発明の抗体は、ヒト I L - 6 のサイト 3 に対する g p 1 3 0 レセプターの結合を阻止
することが好ましい。

【 0 0 7 4 】

I L - 6 に対する本発明の抗体の結合を交差阻止する抗体は、I L - 6 活性の中和にお
いて同様に有効であろう。したがって、また本発明は、ヒト I L - 6 に対する上記の抗体
のいずれか 1 つの結合を交差阻止する、及び / 又はそれらの抗体のいずれか 1 つにより I
L - 6 に対する結合が交差阻止される、ヒト I L - 6 に対して特異性を有する中和抗体が
提供される。一実施形態では、このような抗体は上述した抗体と同じエピトープに結合す
る。別の実施形態では、この交差阻止中和抗体は、上述した抗体が結合するエピトープと
隣接する及び / 又はオーバーラップするエピトープに結合する。別の実施形態では、本発
明のこの態様の交差阻止中和抗体は、本発明の抗体と同じエピトープ又は前記エピトープ
と隣接する及び / 又はオーバーラップするエピトープと結合しない。

10

【 0 0 7 5 】

ヒト I L - 6 への交差阻止抗体の結合が、本発明の抗体の結合を妨げる場合又はその逆
の場合、交差阻止抗体を当業界の任意の適切な方法を用いて、例えば、競合 E L I S A 又
は B I A c o r e を用いて同定することができる。

【 0 0 7 6 】

一実施形態では、ヒト I L - 6 に対して特異性を有する中和抗体が提供され、この中和
抗体は、ヒト I L - 6 に対する、抗体 1 3 2 E 0 9、又はその重鎖が配列 g H 1 3 (配列
番号 1 1) を含む抗体、又はその軽鎖が配列 g L 1 0 (配列番号 1 3) を含む抗体、又は
C D R - H 1 (配列番号 5)、C D R - H 2 (配列番号 6)、C D R - H 3 (配列番号 7
)、C D R - L 1 (配列番号 8)、C D R - L 2 (配列番号 9) 若しくは C D R - L 3 (配
列番号 1 0) のいずれか 1 つを含む抗体の結合を交差阻止する。一実施形態では、本発
明により提供される交差阻止抗体は、ヒト I L - 6 に対する、1 3 2 E 0 9、又はその重
鎖が配列 g H 1 3 (配列番号 1 1) を含む抗体、又はその軽鎖が配列 g L 1 0 (配列番号
1 3) を含む抗体、又は C D R - H 1 (配列番号 5)、C D R - H 2 (配列番号 6)、C
D R - H 3 (配列番号 7)、C D R - L 1 (配列番号 8)、C D R - L 2 (配列番号 9)
若しくは C D R - L 3 (配列番号 1 0) のいずれか 1 つを含む抗体の結合を 8 0 % 以上、
8 5 % 以上、9 0 % 以上、又は 9 5 % 以上阻害する。

20

30

【 0 0 7 7 】

これに代えて、又はこれに加えて、本発明のこの態様による中和抗体は、本発明の抗体
のいずれか 1 つにより、ヒト I L - 6 に対する結合が交差阻止され得る。したがって、抗
体 1 3 2 E 0 9、又はその重鎖が配列 g H 1 3 (配列番号 1 1) を含む抗体、又はその軽
鎖が配列 g L 1 0 (配列番号 1 3) を含む抗体、又は C D R - H 1 (配列番号 5)、C D
R - H 2 (配列番号 6)、C D R - H 3 (配列番号 7)、C D R - L 1 (配列番号 8)、
C D R - L 2 (配列番号 9) 若しくは C D R - L 3 (配列番号 1 0) のいずれか 1 つを含
む抗体により、ヒト I L - 6 に対する結合が交差阻止される、ヒト I L - 6 に対して特異
性を有する中和抗体分子も提供される。一実施形態では、本発明のこの態様によって提供
される中和抗体は、1 3 2 E 0 9、又はその重鎖が配列 g H 1 3 (配列番号 1 1) を含む
抗体、又はその軽鎖が配列 g L 1 0 (配列番号 1 3) を含む抗体、又は C D R - H 1 (配
列番号 5)、C D R - H 2 (配列番号 6)、C D R - H 3 (配列番号 7)、C D R - L 1
(配列番号 8)、C D R - L 2 (配列番号 9) 若しくは C D R - L 3 (配列番号 1 0) の
いずれか 1 つを含む抗体により、8 0 % 以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、又は 9 5 % 以上
ヒト I L - 6 に対する結合が阻害される。

40

【 0 0 7 8 】

本発明の抗体分子は、ヒト I L - 6 に対する高い結合親和性を有することが好ましく、
ピコモルでの親和性を有することが好ましい。親和性は本明細書実施例に記載のように B

50

I A c o r eを含む当分野で知られている任意の適当な方法を用いて測定してもよい。親和性は、本明細書に実施例記載のように組換え型ヒトIL-6を用いて測定することが好ましい。本発明の抗体分子は、500 pM未満のヒトIL-6に対する結合親和性を有することが好ましい。本発明の抗体分子は、50 pM未満のヒトIL-6に対する結合親和性を有することが好ましい。したがって、一実施形態では、本発明の抗体分子は約1~約500 pMの結合親和性を有する。一実施形態では、本発明の抗体分子は約1~約50 pMの結合親和性を有する。本発明の抗体分子は、約1~約20 pMのヒトIL-6に対する結合親和性を有することが好ましい。一実施形態では、本発明の抗体は8~12 pMのヒトIL-6に対する結合親和性を有する。本発明によって提供される抗体の親和性を、当分野で知られている任意の適当な方法を用いて変更することができることは理解されるであろう。したがって、本発明はまたヒトIL-6に対する改善された親和性を有する本発明の抗体分子の変異体に関する。このような変異体は、CDR変異誘発(Yangら、*J. Mol. Biol.*、254、392~403、1995)、鎖シャッフリング(Marksら、*Bio/Technology*、10、779~783、1992)、大腸菌(*E. coli*)の変異誘発株使用(Lowら、*J. Mol. Biol.*、250、359~368、1996)、DNAシャッフリング(Pattenら、*Curr. Opin. Biotechnol.*、8、724~733、1997)、ファージディスプレイ(Thompsonら、*J. Mol. Biol.*、256、77~88、1996)及びセクシャルPCR(sexual PCR)(Cramerら、*Nature*、391、288~291、1998)を含む多くの親和性成熟化プロトコルによって得ることができる。Vaughanら(上述)はこれらの親和性成熟化の方法について論じている。

【0079】

本発明の抗体分子は、例えば実施例で記載された*in vitro*及び*in vivo*でのアッセイでIL-6活性を中和することが好ましい。一実施形態では、これらの抗体はヒトIL-6のサイト3に結合する。

【0080】

一実施形態では、本発明は、0.038 nMのヒトIL-6の活性を100 pM未満の濃度で50%阻害することができるヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体を提供し、前記阻害活性は、IL-6に誘発されたT1165細胞増殖で測定される。一実施形態では、IL-6を50%阻害する抗体濃度は50 pM未満であり、20 pM未満であることがより好ましい。このアッセイで用いられるヒトIL-6は、ヒト組換え型IL-6であることが好ましい。一実施形態では、中和抗体はヒト化抗体又は完全ヒト抗体である。

【0081】

別の実施形態では、本発明は、3.84 nMヒトIL-6の活性を1 nM未満の濃度で50%阻害することができるヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体を提供し、前記阻害活性は、ヒトIL-6及びsIL-6Rに応答したHUVECによるMCP-1の産生に関して測定される。アッセイで用いられるヒトIL-6は、ヒト組換え型IL-6であることが好ましい。一実施形態では、中和抗体はヒト化抗体又は完全ヒト抗体である。

【0082】

所望であれば、本発明の抗体は1つ又は複数のエフェクター分子(複数可)とコンジュゲートすることができる。一実施形態では、このエフェクター分子は、単一のエフェクター分子又は本発明の抗体に付着することができる単一部分を形成するように結合された2つ以上のこのような分子を含んでもよいことは理解されるであろう。エフェクター分子とコンジュゲートした抗体フラグメントを得ることが望まれる場合は、これは標準的な化学的手段又は組換えDNA法によって調製してよく、ここでは抗体フラグメントは直接又はカップリング剤によりエフェクター分子に結合される。抗体に上記のエフェクター分子を結合する技術は、当分野においてよく知られている(Hellstromら、*Controlled Drug Delivery*、第2版、Robinsonら編、1987、

10

20

30

40

50

pp. 623~53; Thorpeら、1982、*Immunol. Rev.*、62: 119~58及びDubowchikら、1999、*Pharmacology and Therapeutics*、83、6~123を参照のこと)。具体的な化学的方法には、例えば、WO93/06231、WO92/22583、WO89/00195、WO89/01476及びWO03031581に記載されたものが含まれる。或いは、エフェクター分子がタンパク質又はポリペプチドである場合、結合は組換えDNA法、例えばWO86/01533及びEP0392745に記載されているような方法を用いて達成できる。

【0083】

本明細書で用いる用語エフェクター分子には、例えば、抗悪性腫瘍薬、薬剤、トキシン、生物学的に活性なタンパク質、例えば酵素、他の抗体又は抗体フラグメント、合成又は天然のポリマー、核酸及び核酸のフラグメント例えばDNA、RNA及びそのフラグメント、放射性核種、特に放射性ヨウ化物、放射性同位元素、キレート化金属、ナノ粒子並びに蛍光化合物又はNMR又はESR分光法で検出できる化合物等のレポーター基が含まれる。

10

【0084】

エフェクター分子の例には、細胞に有害である(例えば殺滅させる)任意の因子を含むサイトキニン又は細胞毒性因子が含まれ得る。これらの例としては、コンプレスタチン(*combrestatin*)、ドラスタチン(*dolastatin*)、エポチロン(*epothilone*)、スタウロスポリン(*staurosporin*)、メイタンシノイド(*maytansinoid*)、スポンジスタチン(*spongistatin*)、リゾキシン(*rhizoxin*)、ハリコンドリル(*halichondrin*)、ロリジン(*roridin*)、ヘミアステルリン(*hemiassterlin*)、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド(*tenoposide*)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン(*colchicine*)、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(*dihydroxy anthracin dione*)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、並びにピューロマイシン及びそのアナログ又はホモログが挙げられる。

20

30

【0085】

さらにエフェクター分子には、代謝拮抗剤(例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン(5-*fluorouracil decarbazine*)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオエパクロランブシル(*thioepa chlorambucil*)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド(*cyclophosphamide*)、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びシスジクロロジアミンプラチナ(II)(DDP)シスプラチン)、アンスラサイクリン(例えばダウノルピシン(以前はダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン(AMC)、カリケアマイシン又はデュオカルマイシン)、並びに有糸分裂阻害剤(例えばピンクリスチン及びピンブラスチン)が挙げられるが、これらに限定はされない。

40

【0086】

他のエフェクター分子には、キレート化放射性核種例えば ^{111}In 及び ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、ビスマス 213 、カリホルニウム 252 、イリジウム 192 及びタンゲステン 188 /レニウム 188 、又は薬剤例えば限定するものではないが、アルキルホスホコリン、トポイソメラーゼI阻害剤、タキソイド及びスラミンを挙げることができる。

【0087】

他のエフェクター分子には、タンパク質、ペプチド及び酵素が挙げられる。重要な酵素

50

には、限定されるものではないが、タンパク分解性酵素、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼが挙げられる。重要なタンパク質、ポリペプチド及びペプチドには、限定されるものではないが、免疫グロブリン、トキシン例えばアブリン、リシンA、シュードモナスエキソトキシン、若しくはジフテリアトキシン、タンパク質、例えばインシュリン、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子若しくはティシュープラスミノゲンアクティベーター、血栓性因子若しくは抗血管新生因子、例えばアンジオスタチン若しくはエンドスタチン、又は生物学的応答調節物質、例えばリンフォカイン、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-6 (IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、神経成長因子 (NGF) 若しくは他の成長因子及び免疫グロブリンが挙げられる。

10

【0088】

他のエフェクター分子は、例えば診断に有用な検出可能な物質を含み得る。検出可能な物質の例には、多様な酵素、補欠分子族、蛍光物質、ルミネセンス物質、生物発光物質、放射性核種、ポジトロン放射金属 (ポジトロン放出断層撮影用)、及び非放射性常磁性金属イオンが含まれる。一般的には、診断に使用する抗体とコンジュゲートできる金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適切な補欠分子族には、ストレプトアビジン、アビジン及びビオチンが含まれ；適切な蛍光物質には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセイ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イン、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンが含まれ；適切なルミネセンス物質には、ルミノールが含まれ；適切な生物発光物質には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが含まれ；並びに適切な放射性核種には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 及び ^{99}Tc が含まれる。

20

【0089】

別の実施例では、エフェクター分子 (複数可) は、*in vivo*での抗体の半減期を増大してもよく及び/又は抗体の免疫原性を減少してもよく及び/又は免疫の系に対する上皮性関門を越えて抗体の送達を増強してもよい。このタイプの適切なエフェクター分子の例としては、W005/117984 (2005年12月15日公開) に記載されているような、ポリマー、アルブミン、アルブミン結合タンパク質又はアルブミン結合性化合物が挙げられる。

30

【0090】

このエフェクター分子がポリマーである場合、これらは一般に合成若しくは天然のポリマー、例えば、任意に置換された直鎖若しくは分枝鎖ポリアルキレン、ポリアルケニレン若しくはポリオキシアルキレンポリマー又は分枝状若しくは非分枝状多糖、例えばホモ若しくはヘテロ多糖であり得る。

【0091】

上述の合成ポリマーの上に存在し得る具体的な任意の置換基には、1つ又は複数のヒドロキシ、メチル又はメトキシ基が含まれる。

40

【0092】

合成ポリマーの具体例には、任意に置換された直鎖若しくは分枝鎖のポリ (エチレングリコール)、ポリ (プロピレングリコール)、ポリ (ビニルアルコール) 又はこれらの誘導体、特に任意に置換されたポリ (エチレングリコール) 例えばメトキシポリ (エチレングリコール) 又はこれらの誘導体が含まれる。

【0093】

具体的な天然のポリマーには、ラクトース、アミロース、デキストラン、グリコーゲン又はこれらの誘導体が含まれる。

【0094】

本明細書で用いる「誘導体」とは、反応性誘導体、例えばマレイミドその他などのチオ

50

ール選択的反応性基を含むことを意図している。反応性基は、ポリマーに直接又はリンカーセグメントを介して結合され得る。このような基の残基は、ある場合には抗体フラグメントとポリマー間の連結基としての産物の一部形成することは理解されるであろう。

【0095】

ポリマーのサイズは所望により変動され得るが、一般には平均分子量500Daから50000Da、好ましくは5000から40000Da、より好ましくは20000から40000Daの範囲であろう。ポリマーサイズは、特に産物の意図された用途、例えば腫瘍などの特定の組織に局在する能力又は循環血中の半減期を延長する能力に基づき選択され得る（総論については、Chapman、2002、Advanced Drug Delivery Reviews、54、531~545を参照のこと）。したがって、例えば産物が血行から離れて組織に侵入することを意図している場合、例えば腫瘍の治療における使用のためには、低分子量ポリマー、例えば5000Da付近の分子量を有するポリマーを使用することは有益かもしれない。産物が血行中にとどまる用途においては、より高分子量のポリマー、例えば20000Daから40000Daの範囲の分子量を有するポリマーを使用することは有益であるかもしれない。

10

【0096】

特に好ましいポリマーには、ポリアルキレンポリマー、例えばポリ(エチレングリコール)又は、特にメトキシポリ(エチレングリコール)若しくはこれらの誘導体が含まれ、特に約15000Daから約40000Daの範囲の分子量を有するものが含まれる。

【0097】

一実施例では、本発明に使用する抗体は、ポリ(エチレングリコール)(PEG)部分に付着されている。1つの特定の実施例において、抗体は、抗体フラグメントであり、PEG分子は、任意の利用可能なアミノ酸側鎖又は抗体フラグメント中に存在する末端アミノ酸官能基例えば、任意の遊離のアミノ、イミノ、チオール、ヒドロキシル若しくはカルボキシル基を介して付着できる。上記のアミノ酸は、抗体フラグメントに天然に存在してもよく、又は組換えDNA法を用いてフラグメントに加工してもよい(例えばUS5,219,996、US5,667,425、WO98/25971を参照のこと)。一実施例では、本発明の抗体分子は改変されたFabフラグメントであって、その改変は、エフェクター分子の付着を可能にするために1つ又は複数のアミノ酸をその抗体の重鎖のC末端への付加することである。追加のアミノ酸が、エフェクター分子が付着し得る1つ又は複数のシステイン残基を含む改変されたヒンジ領域を形成することが好ましい。複数の部位を、2又はそれ以上のPEG分子を付着するために用いることができる。

20

30

【0098】

PEG分子は、抗体フラグメント中に存在する少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を介して共有結合的に結合されることが好ましい。改変された抗体フラグメントに付着したそれぞれのポリマー分子は、そのフラグメント中に存在するシステイン残基の硫黄原子に共有結合的に結合してもよい。共有結合は一般にジスルフィド結合又は、特に硫黄-炭素結合であろう。チオール基を付着部位として用いる場合、適切に活性化されたエフェクター分子、例えばマレイミド及びシステイン誘導体などのチオールに選択的な誘導体を使用することができる。上述したポリマー改変抗体フラグメントの調製において、活性化ポリマーを出発材料として使用することができる。活性化ポリマーは、-ハロカルボン酸又はエステル、例えばヨードアセトアミド、イミド、例えばマレイミド、ビニルスルホン又はジスルフィドなどのチオール反応性基を含む任意のポリマーであってもよい。そのような出発材料は商業的に入手し得るか(例えばNektar(以前はShearwater Polymers社、Huntsville、AL、USA)から)、又は通常の化学的方法を用いて市販の出発材料から調製され得る。特定のPEG分子は、20Kのメトキシ-PEG-アミン(Nektar(以前はShearwater)、Rapp Polymeric、及びSunBioから入手可能)並びにM-PEG-SPA(Nektar(以前はShearwater)から入手可能)を含む。

40

【0099】

50

一実施形態では、抗体は改変Fabフラグメント又はPEG化されている、すなわち例えばEP0948544又はEP1090037で開示される方法に記載のジFab (diFab) に対して共有結合で付着されたPEG (ポリ(エチレングリコール)) を有するジFabである[“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1992, J. Milton Harris編、Plenum Press、New York、“Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”, 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky編、American Chemical Society、Washington DC及び“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, 1998, M. AslamとA. Dent、Grove Publishers、New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531~545も参照のこと]。一実施例では、PEGはヒンジ領域中のシステインに付着している。一実施例では、PEG改変Fabフラグメントは、改変されたヒンジ領域中の単一のチオール基に共有結合的に結合したマレイミド基を有する。リシン残基はマレイミド基に共有結合的に結合されてもよく、リシン残基のそれぞれのアミン基に、約20,000 Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)ポリマーが付着されてもよい。したがって、Fabフラグメントに付着したPEGの総分子量は約40,000のDa

10

20

【0100】

一実施形態では、本発明は、配列番号11に記載の配列を含む重鎖及び配列番号13に記載の配列を含む軽鎖を有し、その重鎖のC末端にエフェクター分子が付着する少なくとも1つのシステイン残基を含む改変ヒンジ領域を有する改変FabフラグメントであるヒトIL-6に対して特異性を有する中和抗体分子を提供する。好ましくは、エフェクター分子はPEGであり、(WO98/25971及びWO2004072116)に記載されている方法を用いて付着し、それにより、重鎖のC末端でリシル-マレイミド基がシステイン残基に付着し、リシル残基のそれぞれのアミノ基は、それに共有結合的に結合した約20,000 Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)残基を有する

30

【0101】

別の実施例では、エフェクター分子は、国際特許出願WO2005/003169、WO2005/003170及びWO2005/003171に記載された方法を用いて、抗体フラグメントに付着され得る。

【0102】

また本発明は、本発明の抗体分子の重鎖及び/又は軽鎖(複数可)をコードする単離したDNA配列を提供する。このDNA配列は、本発明の抗体分子の重鎖又は軽鎖をコードすることが好ましい。本発明のDNA配列は、例えば化学的処理、cDNA、ゲノムDNA又はこれらの任意の組合せにより作成された合成DNAを含み得る。

40

【0103】

本発明の抗体分子をコードするDNA配列は、当業者には周知である方法により得ることができる。例えば、抗体の重鎖及び軽鎖の一部又は全部をコードするDNA配列は、所望により決定したDNA配列から又は対応するアミノ酸配列に基づき合成され得る。

【0104】

アクセプターフレームワーク配列をコードするDNAは、当業者には広く入手可能であり、その既知のアミノ酸配列に基づき容易に合成することができる。

【0105】

本発明の抗体分子をコードするDNA配列を調製するために、分子生物学の標準的な技法を使用することができる。所望のDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成技法を用いて

50

完全に又は部分的に合成することができる。適切ならば、部位特異的変異導入及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を使用することができる。

【0106】

適切なDNA配列の例が、配列番号1、配列番号3、配列番号12、配列番号14、配列番号15及び配列番号17に示されている。配列番号15のヌクレオチド1～57及び配列番号17の1～60は、切断されて本発明の中和抗体分子を与えるマウス抗体B72.3（Whittleら、1987、Protein Eng.、1（6）499～505）由来のシグナルペプチド配列をコードする。したがって、また本発明は、配列番号15のヌクレオチド58～2008を含む本発明の抗体の重鎖をコードする単離したDNA配列を提供する。また本発明は、配列番号17のヌクレオチド61～705を含む本発明の抗体の軽鎖をコードする単離したDNA配列を提供する。

10

【0107】

また本発明は、本発明の1つ又は複数のDNA配列を含むクローニング又は発現ベクターに関する。したがって、本発明の抗体をコードする1つ又は複数のDNA配列を含むクローニング又は発現ベクターが提供される。クローニング又は発現ベクターは、本発明の抗体分子のそれぞれ軽鎖及び重鎖をコードする2つのDNA配列を含むことが好ましい。本発明のベクターは、配列番号15及び17に記載の配列を含むことが好ましい。配列番号15のヌクレオチド1～57及び配列番号17の1～60は、最も好ましくは切断されて本発明の中和抗体分子を与えるマウス抗体B72.3由来のシグナルペプチド配列をコードする。

20

【0108】

ベクターを構築することができる一般的な方法であるトランスフェクション法及び培養法は、当業者によく知られている。この点に関して、“Current Protocols in Molecular Biology”、1999、F.M. Ausubel編、Wiley Interscience、New York及びCold Spring Harbor Publishingから出版されているManiatis Manualを参照することができる。

【0109】

また、本発明の抗体をコードする1つ又は複数のDNA配列を含む、1つ又は複数のクローニング又は発現ベクターを含む宿主細胞も提供される。本発明の抗体分子をコードするDNA配列の発現のために、任意の適切な宿主細胞/ベクター系を使用してもよい。細菌系、例えば大腸菌（E. coli）及び他の微生物系を用いてもよく、又は真核生物、例えば哺乳動物の宿主細胞発現系を用いてもよい、Vermaら、1998、Journal of Immunological Methods、216、165～181を参照のこと。適切な哺乳動物宿主細胞には、CHO、NS0、ミエローマ又はハイブリドーマ細胞が含まれる。適切な発現系の例には、WO87/04462に記載されているグルタミン合成酵素発現系が含まれる。

30

【0110】

本発明はまた、本発明のベクターを含む宿主細胞を、本発明の抗体分子をコードするDNAからタンパク質の発現を誘発するのに適した条件下で培養し、抗体分子を単離することを含む、本発明による抗体分子を産生する方法を提供する。

40

【0111】

抗体分子は、重鎖又は軽鎖ポリペプチドのみを含んでもよく、その場合は重鎖又は軽鎖ポリペプチドコード配列のみを宿主細胞にトランスフェクションするために使用する必要がある。重鎖及び軽鎖の両方を含む産物の産生のためには、細胞系に、2つのベクター、軽鎖ポリペプチドをコードする第1のベクター及び重鎖ポリペプチドをコードする第2のベクターをトランスフェクションされ得る。或いは軽鎖及び重鎖ポリペプチドをコードする配列を含む単一のベクターを使用してもよい。

【0112】

本発明の抗体は、病的状態の治療及び/又は予防に有用であるので、本発明はまた1つ

50

又は複数の薬学的に許容し得る賦形剤、希釈剤又は担体と組み合わせて本発明の抗体分子を含む薬学的又は診断用組成物を提供する。したがって、薬剤の製造のための本発明の抗体の使用が提供される。薬学的に許容し得る担体を通常は含む無菌の医薬組成物の一部として組成物は通常供給される。本発明の医薬組成物は、さらに薬学的に許容し得るアジュバントを含んでもよい。

【0113】

本発明はまた、1つ又は複数の薬学的に許容し得る賦形剤、希釈剤又は担体と共に本発明の抗体分子を添加し混合することを含む、薬学的又は診断用組成物を調製する方法を提供する。

【0114】

この抗体分子は、薬学的若しくは診断用組成物の中で唯一の活性成分であってもよく、或いは他の抗体構成分子を含む他の活性成分、例えば抗TNF抗体、抗IL-1抗体、抗T細胞抗体、抗INF抗体若しくは抗LPS抗体、又はキサンチンなどの非抗体構成分子を伴っていてもよい。

【0115】

この医薬組成物は、治療有効量の本発明の抗体を含むことが好ましい。本明細書で用いる用語「治療有効量」とは、対象とする疾病若しくは症状を治療、改善若しくは予防するために必要な、又は検知し得る治療的若しくは予防的効果を顕在化するために必要な治療剤の量を意味する。いずれの抗体についても、治療有効量は最初に細胞培養アッセイ又は動物モデル、通常はげっ歯類、ウサギ、イヌ、ブタ若しくは霊長類において評価することができる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも使用できる。このような情報は、次いでヒトにおける有用な用量及び投与のための経路を決定するために使用できる。

【0116】

ヒト対象に関する正確な治療有効量は、疾患状態の重篤度、対象の健康状態、年齢、対象の体重及び性別、食事、投与の時間及び頻度、併用する薬剤（複数可）、反応感受性並びに治療に対する寛容性/応答性に依存するであろう。この量は日常的な実験法によって決定することができ、医師の判断の範囲内である。一般に治療有効量は0.01mg/kg~50mg/kgであり、好ましくは0.1mg/kg~20mg/kgであろう。医薬組成物は、本発明の活性因子を用量当り所定の量を含む便利な単位投与剤形で提供することができる。

【0117】

組成物は患者に個々投与されてもよく、或いは他の物質、薬剤又はホルモンと組み合わせて（例えば同時に、経時的に又は別々に）投与されてもよい。

【0118】

本発明の抗体分子が投与される用量は、治療される症状の性質、存在する炎症の程度及び抗体分子が予防的に使用されるか又は既存の症状を治療するために使用されるかどうかに依存する。

【0119】

投与頻度は、抗体分子の半減期及びその効果の持続期間に依存する。抗体分子が短い半減期（例えば2~10時間）を有する場合、1日に1回又は複数回の投与が必要かもしれない。或いは抗体分子が長い半減期（例えば2~15日又は2~30日）を有する場合、1日に1回、1週間に1回又は1~2ヵ月毎に1回のみ投与しか必要でないかもしれない。

【0120】

薬学的に許容し得る担体は、それ自体その組成物を投与された患者に有害な抗体の産生を誘発してはならず、毒性であってはならない。適切な担体は、タンパク質、ポリペプチド、リポソーム、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマー及び不活性ウイルス粒子などの大きなゆっくり代謝される巨大分子であってよい。

【0121】

薬学的に許容し得る塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩及び硫酸塩などの鉱酸塩、又は酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩及び安息香酸塩などの有機酸塩を使用することができる。

【0122】

治療的組成物中の薬学的に許容し得る担体はさらに、水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールなどの液体を含み得る。さらに湿潤剤又は乳化剤又はpH緩衝化物質などの補助物質が、このような組成物中に存在し得る。このような担体は患者による摂取のために、医薬組成物を錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤及び懸濁剤として製剤化することを可能にする。

【0123】

投与のための好ましい形態には、非経口投与、例えば注射又は注入、例えばボラス注射又は連続注入によるものに適した形態が含まれる。産物が注射又はインフュージョン用である場合、これは油性若しくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又は乳液の形態をとることができ、懸濁剤、保存剤、安定化剤及び/又は分散剤などの製剤化剤を含んでいてもよい。或いは抗体分子は、使用前に適切な滅菌液体を用いて再構成する乾燥形態であってもよい。

【0124】

本発明の組成物は、製剤化されると、対象に直接投与することができる。治療する対象は動物であってもよい。しかしこの組成物は、ヒト対象に投与するために適合されることが好ましい。

【0125】

本発明の医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、鞘内、心室内、経皮、経皮膚（例えば、WO98/20734を参照）、皮下、腹腔内、鼻腔内、経腸的、局所的、舌下、腔内又は直腸経路を含むがこれに限定されない種々の経路によって投与されてもよい。またハイポスプレーも本発明の医薬組成物を投与するために使用できる。典型的には、この治療的組成物は注射可能薬物として、液体液剤又は懸濁液のいずれかとして調製することができる。注射に先立つ液状ビヒクル中の溶液又は懸濁液のために適切な固体形態も調製することができる。

【0126】

この組成物の直接的な送達は、一般には皮下、腹膜内、静注、若しくは筋肉内注射によって達成されるか、又は組織の間質腔に送達される。この組成物はまた病巣部へ投与することもできる。投薬治療は単回投与スケジュールであっても多回投与スケジュールであってもよい。

【0127】

この組成物の活性成分は抗体分子であることは理解されるであろう。したがってこれは消化管での分解に感受性であろう。したがってこの組成物が消化管を利用した経路によって投与される場合、この組成物は抗体を分解から保護するが、消化管から吸収されたならば抗体を放出する物質を含む必要がある。

【0128】

薬学的に許容し得る担体についての詳細な説明は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N. J. 1991) から得ることができる。

【0129】

本発明の抗体は、遺伝子治療を用いることにより投与され得ることも予測される。これを達成するためには、適切なDNA要素の制御下にある、抗体分子の重鎖及び軽鎖をコードするDNA配列を患者に導入し、抗体鎖をDNA配列から発現させin situでアセンブルさせる。

【0130】

本発明はまた、炎症性疾患の制御に用いる抗体分子を提供する。この抗体分子は、炎症過程を低減するために又は炎症過程を予防するために用いることができることが好ましい

10

20

30

40

50

【0131】

また、IL-6により媒介されるか又はIL-6レベルの増大を伴う病理学的障害の治療及び/又は予防に使用するための本発明の抗体分子が提供される。さらに本発明は、IL-6により媒介されるか又はIL-6レベルの増加を伴う病理学的障害の治療及び/又は予防のための医薬品の製造における、本発明の抗体分子の使用を提供する。好ましくは、病的状態は、感染症（ウイルス、細菌、真菌及び寄生生物）、感染症と関連する内毒素性ショック、関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、全身型若年性特発性関節炎（JIA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、喘息、骨盤腹膜炎、アルツハイマー病、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性大腸症候群、キャスルマン病、強直性脊椎炎、皮膚筋炎、ブドウ膜炎、ペーロニー病、小児脂肪便症、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、手術に起因する癒着、脳卒中、I型糖尿病、ライム病関節炎、髄膜脳炎、多発性硬化症及びギランバレー症候群などの中枢神経系及び末梢神経系の免疫媒介炎症性疾患、他の自己免疫疾患、膵炎、外傷（手術）、移植片対宿主病、移植拒絶反応、癌（両方の固形癌、例えば黒色腫、肝芽腫、肉腫、扁平上皮癌、移行細胞癌、卵巣癌及び血液学的悪性腫瘍及び特に急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、胃癌及び結腸癌）、心筋梗塞などの虚血性疾患を含む心臓疾患及びアテローム性動脈硬化、血管内凝固、骨吸収、熱傷患者、骨粗鬆症、歯周炎及びヒポクロリジア（hypochlorhydria）から成る群から選択される。

10

【0132】

この病理学的障害は、関節リウマチ又は全身性エリテマトーデス（SLE）であることが好ましい。

20

【0133】

本発明はまた、疼痛の治療又は予防に用いる本発明の抗体分子を提供する。

【0134】

本発明はさらに、疼痛の治療又は予防のための医薬品の製造における本発明の抗体分子の使用を提供する。

【0135】

本発明の抗体分子は、ヒト又は動物体内のIL-6の効果を低減することが望まれるどのような治療においても使用することができる。IL-6は体内において循環していることも又は望ましくない高レベルで体内の特定の部位に、例えば炎症部位に局在することもある。

30

【0136】

本発明の抗体分子は、炎症性疾患の制御に用いられることが好ましい。

【0137】

本発明はまた、IL-6により媒介される疾患に罹患しているか又はその危険のあるヒト又は動物対象の治療方法であって、対象に本発明の抗体分子の有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0138】

本発明の抗体分子は、診断、例えば、IL-6が関与する疾患状態の*in vivo*診断及び画像診断にも使用することができる。

40

【0139】

本発明はさらに、添付の図面を参照する以下の実施例において単なる例示として記載される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0140】

DNA操作及び一般的方法

大腸菌（*E. coli*）株INV F'（Invitrogen）を、トランスフォーメーション及びルーチン培養増殖に使用した。DNA制限酵素及び修飾酵素は、Roche Diagnostics社及びNew England Biolabsから入手し

50

た。プラスミド調製は、Maxiプラスミド精製キット(QIAGEN、カタログ番号12165)を用いて実施した。DNA塩基配列決定反応は、ABI Prism Big Dyeターミネーター配列決定キット(ABI Prism Big Dye terminator sequencing kit)(カタログ番号4304149)を用いて実施し、ABI 3100自動シーケンサー(Applied Biosystems)で実施した。データは、program AutoAssembler(Applied Biosystems)を用いて分析した。オリゴヌクレオチドはINVITROGENから入手した。合成遺伝子はEntelechonで作成した。Fab及びIgGの濃度は、アセンブリー-ELISA(assembly ELISA)を用いて決定した。

【実施例】

10

【0141】

(実施例1)

132E09の分離

ラットを3週間おきに、最初はフロイントの完全アジュバントと共に、その後はフロイント不完全アジュバントと共に組換え型ヒトIL-6(Peprotech)の皮下注射により免疫した。最後の免疫の1~2週間後に脾臓を採取し、単個細胞浮遊液を調製した。免疫したラットのリンパ球を、照射したマウス胸腺腫EL4細胞及びウサギT細胞馴化培地の存在下で、96穴マイクロタイタープレート中で1週間培養した。上清をヒトIL-6に特異的抗体の存在についてELISAでスクリーニングした。陽性のものをDS1細胞系アッセイでヒトIL-6の生物学的効果を中和する能力についてさらにスクリー

20

【0142】

適切な結合特性を有する抗体を分泌している個々のB細胞を、選択されたリンパ球抗体法(Selected Lymphocyte Antibody Method)により陽性のマイクロタイターウェルから分離し(Babcookら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93、7843~7848; WO92/02551)、重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子を単一のラットB細胞から逆転写PCRでクローニングした。結合を確かめるために可変領域を組換え型IgG形式で発現させ、抗体132E09をヒト化及び今後の研究のために選択した。ラット可変領域配列をCA030_00240として登録した。

30

この可変領域配列を、配列番号1~4に示す。

【0143】

(実施例2)

132E09のCDR移植

132E09由来のCDR超可変領域に加えて様々な数のフレームワーク残基がヒト可変領域アクセプターフレームワーク上へ移植された一連のヒト化VL及びVH領域を設計した。

【0144】

10の移植されたVL領域(gL1~10)を設計し、遺伝子をオリゴヌクレオチドアセンブリー及びPCR突然変異誘発により作成した。また2つの異なるフレームワーク領域、VH3 1-4 3-72及びVH3 1-3 3-21を用いて、合計13の移植されたVH領域(gH1~13)を作成した。ヒトC-カッパー定常領域(Km3アロタイプ)をコードするDNAを含む軽鎖移植配列を、ヒト軽鎖発現ベクターpKH10.1にサブクローニングした。ヒンジ安定化突然変異S241Pを含むヒトガンマ-4定常領域をコードするDNAを含む重鎖移植配列を、ヒトガンマ-4発現ベクターpVhg4PFLにサブクローニングした(Angalら、上記)。プラスミドを、CHO細胞に同時トランスフェクトし、産生された抗体をIL-6結合の活性及びin vivoアッセイでスクリーニングした。製造者(Invitrogen、カタログ番号11668)の指示に従いLipofectamine(商標)2000の手法を用いて、CHO細胞のトランスフェクションを行った。

40

50

【0145】

作成した13の重鎖移植片の中で、2つは49位に1つのフレームワークドナー残基(A1a)のみを含み、これらは2つの異なる重鎖フレームワークの両方を用いて作成した。このVH3 1-3 3-21移植片はCHO細胞で弱く発現し、IL-6に対して低減した親和性を示した。対照的に、VH3 1-4 3-72フレームワークを用いた移植片は良好に発現し、ドナー抗体の親和性を保持していた。1つのドナーフレームワーク残基のみを含むこの重鎖移植片を、CDRのみを移した軽鎖移植片gL10と組み合わせで選択した。

【0146】

図1は、ドナーラット配列132E09とアクセプターヒトフレームワーク間のアラインメントを示す。重鎖アクセプターフレームワークは、ヒト生殖細胞系配列VH3 1-3 3-72であり、ヒトJH領域生殖細胞系JH4のこの部分に由来するフレームワーク4を有する。軽鎖アクセプターフレームワークは、ヒト生殖細胞系配列VK1 2-1-(1)O12であり、ヒトJK領域生殖細胞系JK2のこの部分に由来するフレームワーク4を有する。gH13及びgL10についての移植配列(配列番号11、12、13及び14)を図1に示す。この移植された抗体を、CA030_00240.g1と名づける。これは、上述のように241位でセリンからプロリンへの置換を含む完全なIgG4として作成された。完全に翻訳された重鎖及び軽鎖配列を、それぞれ図2a及び2bに示す。重鎖の完全なアミノ酸配列が配列番号16で提供され、軽鎖の完全なアミノ酸配列が配列番号18で提供される。重鎖及び軽鎖をコードするDNA配列が、それぞれ配列番号15及び17で提供される。配列番号15及び図2aのヌクレオチド1~57は、マウス抗体B72.3 VH由来のシグナルペプチド配列をコードし、配列番号17及び図2bのヌクレオチド1~60は、マウス抗体B72.3 VL由来のシグナルペプチド配列をコードする。

マウス抗体B72.3は、Whittleら、1987、Protein Eng. 1(6)499~505に記載されている。

【0147】

(実施例3)

結合親和性

CA030_00240.g1結合親和性測定

Biacoreテクノロジーは、リアルタイムで標識化を必要とすることなく生体分子間結合をモニターする。リガンドと呼ばれる反応体の1つは固定された表面上に直接に固定されるか又は捕獲されるが、分析物と呼ばれる他のものは溶液中で捕獲された表面上を流れる。センサーは、表面上で分析物がリガンドと結合して複合体を形成するときのセンサー表面上の質量の変化を検出する。これは会合過程に対応する。解離過程は、分析物が緩衝液により置換されるときにモニターされる。親和性Biacoreアッセイにおいて、リガンドはCA030_00240.g1完全IgG4であり、分析物はヒトIL-6である。

【0148】

器具

Biacore(登録商標)3000、Biacore AB、Uppsala、Sweden

【0149】

センサーチップ

CM5(リサーチグレード)カタログ番号BR-1001-14、Biacore AB、Uppsala、Sweden。チップは4で保存した。

【0150】

BIA標準化溶液

70%(w/w)グリセロール。BIAMaintenanceキットカタログ番号BR-1002-51の一部、Biacore AB、Uppsala、Sweden。B

10

20

30

40

50

I A保存キットは4 に保存した。

【0151】

アミンカプリングキット

カタログ番号BR-1000-50、Biacore AB、Uppsala、Sweden。

エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドクロライド(EDC)。蒸留水で75mg/mLとし、-70 で200μLずつ保存した。

N-ヒドロキシスクシニミド(NHS)。蒸留水で11.5mg/mLとし、-70 で200μLずつ保存した。

1Mのエタノールアミンクロライド-NaOH pH8.5。-70 で200μLずつ保存した。

【0152】

緩衝液

泳動緩衝液：HBS-EP(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%の界面活性剤P20が存在している)。カタログ番号BR-1001-88、Biacore AB、Uppsala、Sweden。緩衝液は4 に保存した。

固定化緩衝液：アセテート5.0(10mM酢酸ナトリウムpH5.0が存在している)。カタログ番号BR-1003-51、Biacore AB、Uppsala、Sweden。緩衝液は4 に保存した。

【0153】

リガンドキャプチャ

Affinipure F(ab')₂フラグメントヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的。Jackson ImmunoResearch Inc(Pennsylvania、USA)カタログ番号109-006-098。試薬は4 に保存した。

【0154】

分析物

組換え型ヒトIL-6(R&D Systems Europe Ltd、Abingdon、Oxon。カタログ番号206-IL-050、ロット番号A131402A)は-70 に保存し、各アッセイ用に一度解凍した。

【0155】

組換え型カニクイザルIL-6及び組換え型アカゲザルIL-6は、CHO細胞の一過性のトランスフェクションにより作成した。この物質は、未精製の定量化されていない細胞培養上清として使用した。

【0156】

再生溶液

40mM HClは11.6Mストック溶液(BDH、Poole、England。カタログ番号101254H)から蒸留水で希釈して調製した。

5mM NaOHは50mMのストック溶液から蒸留水で希釈して調製した。

カタログ番号BR-1003-58、Biacore AB、Uppsala、Sweden。

【0157】

アッセイ方法

BIA(Biamolecular相互作用分析)は、BIAcore 3000(BIAcore AB)を用いて実施した。Affinipure F(ab')₂フラグメントヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的(Jackson ImmunoResearch)を、アミンカプリング化学によって約5000の応答単位(RU)のキャプチャレベルにCM5センサーチップ上に固定した。HBS-EP緩衝液(10mM HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%界面活性剤P20、BIAcore AB)を、流速10μl/分で泳動緩衝液として使用した

10

20

30

40

50

。4 μg/mLでCA030__240.g1の10 μL注入を、固定した抗ヒトIgG-Fcによるキャプチャのために使用した。流速30 μL/分で種々の濃度において、捕獲したCA030__240.g1についてヒトIL-6を滴定した。40 mM HClを10 μL注入し続いて流速10 μL/分で5 mM NaOHを5 μLの注入して表面を再生した。

【0158】

バックグラウンドサブトラクション結合曲線を、標準的方法に従ってBIAevaluationソフトウェア(バージョン3.2)を用いて分析した。キネティックパラメータ(Kinetic parameters)は、フィッティングアルゴリズムから決定した。

10

【0159】

CA030__240.g1の1つのバッチをこの研究で使用した。親和性は20 nM又は20 nM未満のヒトIL-6濃度で測定した。CA030__240.g1に対して決定された親和性値は9.02~10.50 pMの範囲であり、9.76 ± 0.74 pMの平均 ± 標準誤差を有した(表1.1)。IL-6を固定することは固有のコンフォメーションの喪失を生じるので、BIAcoreチップに固定されたヒトIL-6との親和性を測定することは不可能であった。

【0160】

カニクイザル又はアカゲザルのIL-6を定量化することは不可能であったので、CA030__00240.g1とIL-6の相互作用に関する正確なキネティックパラメータを決定することも不可能であった。しかし、結合センソグラム(sensorgrams)の目視検査では、CA030__00240.g1は、ヒトIL-6に対する親和性と類似した親和性で、これらヒト以外の霊長類のIL-6に結合することを示している。

20

【0161】

表1.1: ヒトIL-6に対するCA030__240.g1の親和性。

【表1】

参照	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_d (M)$	$K_d pM$
10017474/39-51	7.31E+05	7.68E-06	1.05E-11	10.5
10017474/39-51	8.52E+05	7.68E-06	9.02E-12	9.02

30

【0162】

(実施例5)

in vitroにおける中和アッセイ

40

抗体CA030__00240.g1(以後240.g1と略記する)の効力を、2つの異なるアッセイを用いて測定した。第1のアッセイは、マウス、アカゲザル、カニクイザル及びヒトIL-6に応答して増殖するT1165と呼ばれるマウスIL-6依存性細胞系を用いた。細胞表面IL-6レセプターへのこの直接的なIL-6のシグナル伝達は、gp130と呼ばれるシグナル伝達レセプターサブユニットと共に、シスシグナル伝達(cis-signaling)と名づける。第2のアッセイには、単核細胞ケモアトラクタント(chemoattractant)タンパク質-1(MCP-1)の産物である読み出し物と共に、IL-6と可溶性のIL-6レセプター(IL-6R)で刺激したヒト臍静脈血管内皮細胞(HUVEC)を使用した。このアッセイでは、IL-6は外部から添加するか又はサイトカインであるインターロイキン-17(IL-17)でHUVE

50

Cを刺激することにより産生することもできた。これらの2つのアッセイの変形は、IL-6及び可溶性IL-6Rをどちらも外部から添加するとき、HUV ECはIL-6Rを発現しないで応答のみができる、すなわちMCP-1を産生できるので、トランス-シグナル伝達(trans-signal ling)と名づけた。

【0163】

これらの種々のアッセイを用いて、ヒト(組換え型及び天然型)、アカゲザル、カニクイザル及びマウスのIL-6に対する240.g1のND50(中和用量50%)値を作成することができた。

【0164】

材料

10

培地

T1165培地-10%ウシ胎仔血清、ペニシリン(100単位/ml)、ストレプトマイシン(50µg/ml)、グルタミン(2mM)及び10ng/mlのヒト組換え型IL-6、R&D systems、UKを補充したRPMI1640。

【0165】

HUV EC培地-大血管内皮細胞基礎培地(LVECBM)TCS Cellworks、UK、大血管内皮細胞増殖補充物TCS Cellworks、UK及び抗生物質補充物TCS Cellworks、UK。

【0166】

インハウスで作成したPBS中、濃度6.83mg/mlのCA03000240.g1。ヒトIL-6 R&D systems、UK、ヒト哺乳動物由来のIL-6(インハウスでヒトIL-6 10017108/67でトランスフェクションしたCHO由来)、アカゲザルIL-6(インハウスでアカゲザルIL-6 10017108/67でトランスフェクションしたCHO由来)、カニクイザルIL-6(インハウスでカニクイザルIL-6 10017108/67でトランスフェクションしたCHO由来)、マウスIL-6 R&D systems、UK。抗ヒトMCP-1捕捉抗体(555055)及び抗ヒトMCP-1検出抗体(554664)及びヒト組換え型MCP-1(890225)、BD Biosciences、CA。ストレプトアビジン-HRP(AMDEX)Amersham bioscience、UK。トロンピン Merck Biosciences、Darmstadt、Germany。

20

sIL-6R R&D systems、UK。ヒトIL-17 R&D systems、UK。

30

T1165アッセイ-CellTiter 96(登録商標)Aqueous Pro mega、CA。

TM Blue(Serologicals、GA)。

【0167】

T1165細胞のIL-6依存性増殖を用いる240.g1活性の測定

T1165細胞は、使用の4日前に解凍し、10%FCS、抗生物質、グルタミン及び10ng/mlのヒトIL-6補充RPMI1640中で培養した。細胞生存率は、トリパンプルー排除を用いてモニターし、少なくとも90%生存可能であると考えられる細胞のみを使用した。使用前に細胞をヒトIL-6の非存在下でRPMI1640で2回洗浄した。次いで細胞を計数し、ウェル当り 5×10^4 /細胞の密度で96穴平底プレートに供給した。別々のプレートで、240.g1の階段希釈を、固定濃度1ng/ml(0.038nM)のヒト組換え型、ヒト哺乳動物由来(ヒトCHO IL-6とも呼ばれる)、アカゲザル、カニクイザル又はマウスのIL-6のいずれかの存在下でインキュベートした。次いで予め混合した240.g1及びIL-6の複合物を、T1165細胞を含むウェルへ移し、湿潤な5%CO₂の雰囲気下で37℃で48時間インキュベートした。最後の6時間のインキュベーション中に、20mlのCellTiter 96(登録商標)Aqueousを添加して増殖している細胞数を測定した。240.g1によるT1165細胞のIL-6依存性増殖阻害を、IL-6のみで処理したウェルから細胞は含むが

40

50

IL - 6 を含まない対照ウェルを引いたパーセンテージ阻害として表した。

【 0 1 6 8 】

ヒト組換え型、ヒト哺乳動物由来、アカゲザル、カニクイザル及びマウス IL - 6 に誘発された細胞系 T 1 1 6 5 の増殖に対する 2 4 0 . g 1 の活性が図 3 a に示されている。2 4 0 . g 1 は、ヒト組換え型、ヒト哺乳動物由来、アカゲザル、カニクイザルの IL - 6 活性を強力に阻害したが、マウスの IL - 6 活性は阻害しなかった。

【 0 1 6 9 】

ヒト組換え型の IL - 6 に対する ND 5 0 は、 $1.1 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ ($7.26 \pm 3.3 \text{ pM}$) であった。ヒト哺乳動物由来の IL - 6 に対する ND 5 0 は、 $3.6 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ ($23.76 \pm 15.84 \text{ pM}$) であった。アカゲザルの IL - 6 に対する ND 5 0 は、 $2.2 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$ ($14.52 \pm 7.26 \text{ pM}$) であった。カニクイザルの IL - 6 に対する ND 5 0 は、 $5.4 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$ ($35.64 \pm 7.26 \text{ pM}$) であった。

【 0 1 7 0 】

HUVEC において IL - 6 及び可溶性 IL - 6 レセプターで誘発された MCP - 1 産生を用いる 2 4 0 1 . g 1 活性の測定

HUVEC (TCS Cellworks, UK) を大血管内皮細胞基礎培地 (LVECBM) 中で増殖し、5 回を超えない継代培養を行った。使用前に細胞を 7 5 % コンフルエントになるまで増殖した。細胞をトリプシン / EDTA を用いて解離し、再懸濁して新鮮な LVECBM で 1 回洗浄した。次いで細胞を計数して、ウェル当り 2×10^4 / 細胞の密度で 9 6 穴平底プレートに投与した。続いて細胞を湿潤な 5 % CO₂ の雰囲気下で 3 7 で一夜培養した。翌日、細胞をビオチン化トロンピン (3 U / ml) を補充した新鮮な培地で洗浄して取りのけておいた。別々のプレート中で、2 4 0 . g 1 の階段希釈を、ヒト組換え型 IL - 6 (5 0 ng / ml ; 3 . 8 4 nM) 及び 5 0 0 ng / ml (1 0 . 1 5 nM) の固定濃度の s IL - 6 R の存在下でインキュベートした。さらに、2 4 0 . g 1 を、HUVEC を刺激して IL - 6 を産生するヒト組換え型 IL - 1 7 (2 5 ng / ml ; 1 . 1 8 nM)、及び 5 0 0 ng / ml (1 0 . 1 5 nM) の固定濃度の s IL - 6 R と共にインキュベートした。次いで予め混合した 2 4 0 . g 1 及び IL - 6 / s IL - 6 R 又は IL - 1 7 / s IL - 6 R の複合物を、HUVEC を含むウェルへ移し、湿潤な 5 % CO₂ の雰囲気下で 3 7 で 2 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、無細胞上清を採取し、ヒト MCP - 1 レベルをサンドイッチ ELISA により測定した (プロトコルは以下に示す)。2 4 0 . g 1 による IL - 6 / s IL - 6 R 又は IL - 1 7 / s IL - 6 R に誘発された MCP - 1 産生の阻害を、IL - 6 / s IL - 6 R 又は IL - 1 7 / s IL - 6 R で処理されたウェルから細胞を含むが刺激を与えていない対照ウェルを引いたパーセンテージ阻害として表した。さらに、s IL - 6 R 非存在下で添加したヒト IL - 6 に対する細胞応答を示すために対照を追加した。

【 0 1 7 1 】

MCP - 1 ELISA

Nunc Maxisorp プレートを、 $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度の抗 MCP - 1 捕捉抗体でコートした。プレートを + 4 で一夜インキュベートし、次いで PBS + 0 . 1 % tween 2 0 (洗浄緩衝液) で 2 回洗浄した。プレートを 1 時間、PBS + 5 % ウシ血清アルブミンでブロックした。次いでプレートを、洗浄緩衝液で 4 回洗浄し、標準物質及び試料を添加した。プレートを室温で 2 時間インキュベートした。次いでプレートを洗浄し、ビオチニル化抗 MCP - 1 抗体を 1 mg/ml の濃度で添加した。プレートをさらに 2 時間インキュベートした後、4 回洗浄した。次いでストレプトアビジン - HRP の 1 : 5 0 0 希釈を添加し、プレートを 3 0 分間インキュベートした。プレートを最後に 4 回洗浄し、TMB 基質を添加した。比色測定は 6 3 0 nm で行い、バックグラウンド測定は 4 9 2 nm で行った。MCP - 1 濃度は、Genesis III ソフトウェアに基づき、フォア - パラメータロジスティック曲線 (four - parameter logistic curve) 適合を用いる標準曲線から得た。

【0172】

HUVECにおけるヒト組換え型IL-6及びsIL-6Rに誘発されたトランスシグナル伝達に対する240.g1の活性が図3bに示されている。240.g1は、ヒト組換え型IL-6及びsIL-6Rに誘発されたHUVECによるMCP-1産生を強力に阻害した。このND50は、 $64 \pm 62 \text{ ng/ml}$ ($422 \pm 409 \text{ pM}$)であった。

【0173】

HUVECにおけるIL-17に誘発された内在性のIL-6及びsIL-6Rに誘発されたトランスシグナル伝達に対する240.g1の活性が図3cに示されている。240.g1は、HUVECによるIL-17に誘発された内在性のIL-6及びsIL-6Rに誘発されたMCP-1産生を強力に阻害した。このND50は、 $93 \pm 70 \text{ ng/ml}$ ($614 \pm 462 \text{ pM}$)であった。

10

【0174】

結論

IL-6シグナル伝達アッセイで、240.g1はヒト組換え型、ヒト哺乳動物由来、アカゲザル及びカニクイザルのIL-6の生物活性を中和することができるが、マウスのIL-6の生物活性の中和はできなかった。さらに240.g1は、組換え型又は内在性のIL-6のどちらかにより誘発されたトランスシグナル伝達IL-6を中和することができる。

【0175】

(実施例6)

In vivoにおける活性

IL-6は、急性期タンパク質を誘発することが知られている。マウスで、最も顕著な急性期タンパク質は血清アミロイドA(SAA)である。ヒトIL-6はマウスレセプターに作用することができ、したがってヒトIL-6をマウスに注射することは可能であり、血清中のSAA産生物を測定できる。

20

【0176】

Balb/cマウスに、サイト3特異的抗hIL-6抗体であるCA030_240.g1完全IgG4を皮下に注射した。24時間後、マウスに、hIL-6(Peptechカタログ番号200-06、ロット番号0203B16)を $30 \mu\text{g/kg}$ で腹腔内に注射した。20時間後に血液を心臓穿刺で採取し、血清をELISA(Trideltaロット番号22KT022)による血清アミロイドA(SAA)を算定するために採取した。図4に示すように、hIL-6によるSAA誘発は、0.3、0.1及び0.03mg/kgの用量で認められる統計的に有意なSAAの減少を伴いCA030_240.g1により阻害された。

30

$n = 7 \sim 8$ / 群、PBS $n = 6$ は除く。Bonferroni post testを用いるANOVAによる統計学的分析、** $P < 0.01$ IL-6単独と比較した。

さらに2つの実験で、CA030_240.g1による0.3及び0.1mg/kgの用量での有意なIL-6($30 \mu\text{g/kg}$)誘発性SAA阻害を認めた。

【0177】

(実施例7)

CA030_00240.g1のエピトープマッピング

CA030_00240.g1が認識するヒトIL-6上のエピトープを、Fab'フラグメントとして240.g1を使用しNMR技術を用いてマップした。これは、ヒトIL-6が大腸菌(E.coli)で発現し、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ の安定な同位元素で一様に標識されることを必要とした。完全な配列特異的バックボーン共鳴帰属が遊離のIL-6について得られ、CA030_00240.g1のFab'フラグメントの結合により誘発されたこれらのシグナルの位置の変化が、3D TROSY HNCOSペクトルを用いて検出された。

40

【0178】

組換え型ヒトIL-6の発現と精製：

50

ヒトIL-6を、このタンパク質の成熟形態のコード配列を含む大腸菌 (*E. coli*) 発現ベクター (pET3d) から調製した。タンパク質はTuner (DE3) pLysS細胞で発現し、高収量の不溶性産物をもたらした。 ^{15}N 、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 及び $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ で標識されたIL-6のサンプルを、適切に標識された富栄養培地 (Cel-tone) で増殖した細胞から調製した。

【0179】

IL-6を、十分に確立された方法を用いて形質転換した大腸菌 (*E. coli*) 細胞から精製した。最初に培養培地のうちの11から採取した細胞を、40 mLの緩衝液A [100 mM KCl、2 mM DTT、10 mM Tris-HCl pH 8.5、25 % (w/v) スクロース、溶解プロテアーゼインヒビター錠剤 (Boehringer)] に再懸濁した。10 mLの緩衝液B [300 mM Tris-HCl pH 8.5、100 mM EDTA、4 mg/mlのリソチーム] を添加し、この懸濁液を氷上で時々巡回しながら10~30分間インキュベートした。次いで50 mLの緩衝液C [1 M LiCl、20 mM EDTA、0.5 % (v/v) NP-40] を添加し、懸濁液を20,000 psiで2回フレンチプレスに通した。次いでホモジェネートを4で15分間、16,000 g rpmで遠心分離し、ペレットを保存した。ペレットを40 mLの緩衝液D [10 mM Tris-HCl pH 8.5、0.1 mM EDTA、0.5 M LiCl、0.5 % (v/v) NP-40、1 mM DTT、溶解プロテアーゼ錠剤] に再懸濁し、フレンチプレスに通して前記と同様に遠心分離した。この段階を繰り返した。次いでペレットを40 mLの緩衝液E [10 mM Tris-HCl pH 8.5、0.1 mM EDTA、0.5 % (v/v) NP-40、1 mM DTT、溶解プロテアーゼ錠剤] に再懸濁し、フレンチプレスに通して前述のように遠心分離する。この段階を繰り返す。最後にペレットを、6 mLの6 M GuHCl、50 mM Tris-HCl pH 8.0に溶解し、4で30分間、48,000 gで遠心分離して清澄化した。上清を保存し、可溶化したIL-6を分光光度的に定量した。

【0180】

可溶化したIL-6を、2.5 mg/mL [5 M GuHCl、50 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、2 mM GSH、0.2 mM GSSG、1 mM EDTA、pH 8.0] に希釈し、1時間25でインキュベートした。次いでサンプルを、滴下様式で250 µg/mL [50 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、2 mM GSH、0.2 mM GSSG、1 mM EDTA、pH 8.0] にさらに希釈し、25で3時間インキュベートした。この段階で形成された全ての析出物を、4で30分間、30,000 gで遠心分離して除去する。清澄化した物質を、50 mM Tris-HCl、10 % (v/v) グリセロール、pH 9.0に対して、4で最小限16時間、2回緩衝液を交換して透析した。透析後この溶液を4で30分間、30,000 gで遠心分離して清澄化した。上清を保存し、8 mLのmonoQ (Amersham Biosciences) イオン交換カラムにロードし、塩化ナトリウム (0~1.0 M) の直線濃度勾配を用いて溶出した。リフォールディングされたIL-6を含む分画をSDS-PAGEにより同定し、次いでプールして25 mM リン酸ナトリウム、100 mM NaCl、0.01 % (w/v) NaN_3 、pH 6.5中にろ過分離した。

【0181】

CA030__00240.g1のFab'フラグメントを作成し、精製して25 mM リン酸ナトリウム、100 mM NaCl、0.01 % (w/v) NaN_3 、pH 6.5中に調製した。IL-6とCA030__00240.g1のFab'フラグメント間の1:1の複合体を、このタンパク質の等モル量を約0.2~0.6 mMの濃度で混合してNMR分析用に調製した。

【0182】

NMR分光法:

NMR実験は、25 mMリン酸ナトリウム、100 mM塩化ナトリウム及び0.01 % (w/v) アジ化ナトリウム緩衝液、pH 6.5 (95 % H_2O 及び5 % D_2O) 中の0

10

20

30

40

50

．35 mlのタンパク質及び複合体サンプルで実施した。 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ 標識IL-6及びCA030_00240.g1の非標識Fab'フラグメント間の1:1複合体を、NMR分析用にこのタンパク質の等モル量を混合して0.1 mMの終濃度を達成することにより調製した。NMRデータは、遊離IL-6について及びCA030_00240.g1複合体のIL-6:Fab'フラグメントについて、三重共鳴($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^1\text{H}$)クライオプローブ(cryoprobe)を備えた800 MHzのBruker Avance分光計で25 で得た。標準HNCA CB、CBCA(CO)NH及びHNCOスペクトル(Wittekind, M.とMueller, L.(1993) J Magn Reson, Series B 101(2)、201; Grzesiek, S.とBax, A.(1993) J Biomol NMR 3(2)、185~204 ; Muhandiram, D. R.とKay, L. E.(1994) J Magn Reson, Series B 103(3)、203; Grzesiek, S.とBax, A.(1992) J Magn Reson 96(2)、432)を、0.9 mMの様に $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ で標識したサンプルを用いた遊離IL-6について、完全な配列特異的フレームワーク共鳴帰属(^{15}N 、 ^{13}C 及び ^1H)を作成するために使用した。

【0183】

CA030_00240.g1のFab'フラグメントの結合により誘発されたIL-6フレームワークシグナルの位置の変化が、3D TROSY-HNCOスペクトルを用いて検出された(Salzman, M.ら、(1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(23)、13585~13590)。全ての3D NMR実験のための典型的な収集パラメータを表1に示す。

【0184】

全てのスペクトルは、3Dデータの ^{15}N ディメンションにおける有効収集時間を約30 msに延長するために使用した線型予測を用いてNMR Pipe(Delaglio, F.ら、(1995) J Biomol NMR 6(3)、277~293)で処理した。軽度の解像度増強を、シフトしたサイン2乗関数を用いて全てのディメンションに適用した。スペクトルの解析は、Sparkyを用いて実施した(Goddard, T. D.とKneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco)。

【0185】

Fab結合データの解析:

ミニマルシフト法(minimal shift approach)(Farmer, B. T.ら、(1996) Nat Struct Mol Biol 3(12)、995; Muskett, F. W.ら、(1998) J Biol Chem 273(34)、21736~21743)を、CA030_00240.g1のFab'フラグメントの結合から生じるIL-6 NMRシグナルの位置における変化を測定するために使用した。最初に、遊離のIL-6の3D HNCOスペクトル及びg132E09 Fabに結合したIL-6の3D TROSY-HNCOスペクトルにおける全てのピークをその中心に選んだ。フレームワーク共鳴の化学シフトの ^{15}N 及び ^1H の値を、複合体と遊離タンパク質のスペクトル間の温度における差異について補正した(^{15}N に対して-0.8 ppm及び ^1H に対して-0.05 ppm)(Baxter, N. J.とWilliamson, M. P.(1997) J Biomol NMR 9(4)、359~369)。遊離及びFab結合IL-6間のピークに対する位置における最小の変化は、Microsoft Excelを用いて、Fab複合体のTROSY-HNCOスペクトルで全ての観察されたピークと比較して、遊離タンパク質のHNCOスペクトルでそれぞれの帰属するピークに対する ^{15}N 、 ^{13}C 及び ^1H における組み合わせた化学シフトの差異を算出することにより得られた。組み合わせたアミドプロトン、窒素及び炭素の化学シフトの差異()は以下の式(式1)により定義され、ここで δ_{HN} 、 δ_{N} 及び δ_{C} は、比較されたHNCOピークの一組間の ^1H 、 ^{15}N 及び ^{13}C シフトにおける差異に対応し、 δ_{N} 及び δ_{C} は、アミドプロトン、アミド窒素及び炭素の化学シフト範囲

10

20

30

40

50

における差異を説明するために必要とされる 0.2 及び 0.33 のスケーリングファクターである。個々の H N C O ピークに対する、F a b 結合により誘発されるミニマルシフトを、最低の可能な組み合わせたシフト値 () と見なした。

【数 1】

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_{N\alpha_N})^2 + (\Delta\delta_{C\alpha_C})^2} \quad (\text{式 1})$$

I L - 6 上の F a b 結合サイト (エピトープ) を同定するために、組み合わせたミニマルシフトに対するタンパク質配列のヒストグラムを、有意に乱れたシグナルを含む I L - 6 の領域を明らかにするために使用した。個々のアミノ酸に対する組み合わせた化学シフト変化のサイズが、それらのアミノ酸の全てに対する組み合わせた化学シフト変化の平均の閾値プラスその平均の標準偏差の 1 つ分を超える場合、これらの残基を F a b 結合サイトにおける接触可能な残基としてさらなる評価のために選択した。候補の結合サイト残基の位置を、最終的に I L - 6 の高解像度の構造上で調べ (X u , G . Y . ら、(1 9 9 7) J M o l B i o l 2 6 8 (2)、4 6 8 ~ 4 8 1)、タンパク質表面に位置する残基のみが F a b 結合に利用可能であると考えられた。

【 0 1 8 6 】

2 つの異なる閾値、平均ミニマルシフト + 1 S D (0 . 1 4 3) 及び平均ミニマルシフト + 2 S D (0 . 2 1 3) が、F a b により結合される残基を同定するために適用された。抗体の結合サイトは、T r p 1 5 7 の重要なサイト 3 サイン残基 (s i g n a t u r e r e s i d u e) を含むことが認められた (B o u l a n g e r ら、2 0 0 3、S c i e n c e、3 0 0、2 1 0 1 ~ 2 1 0 4)。上述の B o u l a n g e r らにおいて使用されたアミノ酸の番号付けを用いて、抗体 2 4 0 g . 1 は、少なくとも以下の残基、S 4 7、C 5 0、E 9 3、R 1 0 4、F 1 0 5、E 1 0 6、T 1 4 9、K 1 5 0、A 1 5 3、Q 1 5 6、Q 1 5 9 及び S 1 6 9 に結合することが認められた (平均 + 2 S D (0 . 2 1 3))。この抗体は以下の残基、C 4 4、S 4 7、C 5 0、S 5 3、A 5 8、E 9 3、V 9 6、R 1 0 4、F 1 0 5、E 1 0 6、T 1 4 9、K 1 5 0、Q 1 5 2、A 1 5 3、Q 1 5 4、N 1 5 5、Q 1 5 6、W 1 5 7、Q 1 5 9、T 1 6 3、L 1 6 5、S 1 6 9 及び E 1 7 2 の全てに結合する可能性がある (平均 + 1 S D (0 . 1 4 3))。

【 0 1 8 7 】

また同じ残基が、I L - 6 の未処理前駆体のアミノ酸番号付けに基づいて番号を付され得ることは理解されるであろう (S w i s s P r o t 受入番号 P 0 5 2 3 1)。この番号付けを用いて、抗体 2 4 0 g . 1 は少なくとも以下の残基、S 7 5、C 7 8、E 1 2 1、R 1 3 2、F 1 3 3、E 1 3 4、T 1 7 7、K 1 7 8、A 1 8 1、Q 1 8 2、Q 1 8 7 及び S 1 9 7 に結合する。この抗体は以下の残基、C 7 2、S 7 5、C 7 8、S 8 1、A 8 6、E 1 2 1、V 1 2 4、R 1 3 2、F 1 3 3、E 1 3 4、T 1 7 7、K 1 7 8、Q 1 8 0、A 1 8 1、Q 1 8 2、N 1 8 3、Q 1 8 4、W 1 8 5、Q 1 8 7、T 1 9 1、L 1 9 3、S 1 9 7 及び E 2 0 0 の全てに結合する可能性がある。

【 0 1 8 8 】

表 2 : N M R 実験の基本的パラメータ。

10

20

30

40

【表 2】

実験	インダイレクト ディメンション (Indirect dimension)	掃引幅 (Sweep width)[ppm]	キャリアー オフセット (Carrier offset)[ppm]	データ 採取時間 (Acquisition time) [ms]
HNCACB 及び CBCA(CO)NH	^{15}N (F2)	35	117.5	23.4
	^{13}C (F1)	70	44.7	9.6 (6.6)
HNCO	^{15}N (F2)	35	117.5	23
	^{13}C (F1)	12	177.5	17.7
TROSY-HNCO	^{15}N (F2)	35	117.5	17.6
	^{13}C (F1)	14	177.5	17.6

10

14 ppmの掃引幅及び85 msのデータ採取時間で、ダイレクト ^1H ディメンション (F3又はF2)を得た。

【0189】

本発明を実施例のみにより説明したが、いささかも限定することを意味するものではなく、詳細の変更が特許請求の範囲内になされることが当然理解されるであろう。それぞれの他の実施形態に関しては、本発明の各実施形態の好ましい特徴を準用する。本明細書で引用した特許及び特許出願を含むがこれに限定されるものではない全ての文献の内容は、個々の文献のそれぞれの内容が、具体的且つ個別的に十分に記載されているかのように本明細書中に参考として援用されるように、本明細書中で参考として援用されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0190】

【図1】240.g1重鎖(図2a;配列番号11)及び軽鎖(図2b;配列番号13)配列に対する移植片構成を示す図である。記号(|)は、ドナー:アクセプター:移植されたフレームワーク配列間の相違点を強調している。CDRには一重下線を付した。Kabata及びChothia定義の両方を包含するCDR-H1を除き、これらはKabataによって定義されている通りである。二重下線を付した配列は、移植片中に保持されたドナーフレームワーク残基である。

30

【図2a】240.g1 IGG4重鎖の翻訳された配列を示し、イントロン/エキソン境界を示す図である。

【図2b】240.g1軽鎖の翻訳された配列を示し、イントロン/エキソン境界を示す図である。

【図3a】抗体240.g1による、ヒト組換え型、ヒト哺乳動物由来、アカゲザル、カニクイザル及びマウスIL-6に誘発されたT1165細胞増殖の阻害を示す図である。

【図3b】抗体240.g1による、HUVECにおけるヒト組換え型IL-6及びsIL-6Rに誘発されたMCP-1産生の阻害を示す図である。

40

【図3c】抗体240.g1による、HUVECにおけるIL-17に誘発された内在性のIL-6及びsIL-6Rに誘発されたMCP-1産生の阻害を示す図である。

【図4】CA030_240.g1(サイト3抗体)の投与(n=7~8/群、PBS n=6を除外する)による、マウスにおけるhIL-6に誘発されたSAAのin vivo中和を示す図である。Bonferroni post testを用いるANOVAによる統計学的分析、**P<0.01 IL-6単独と比較した。

【 図 2 a - 4 】

```

1830      1840      1850      1860      1870      1880
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TTC TTC CTC TAC
TTG TTG ATG TTC TCG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGS CTG CCG AGS AAG AAG GAG ATG
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y>

1890      1900      1910      1920      1930      1940
AGC AGS CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGG TCC
TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG
S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S>

1950      1960      1970      1980      1990
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG
CAC TAC CTA CTC CGA GAC GTG TTG ATG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AAG GAC AQA GAC
V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L D>

2000
GGT AAA TGA
CCA TTT ACT
G K *>

```

【 図 2 b - 2 】

```

Y Y C L Q H N S A P Y T F G Q G T K L E I>

380      390      400      410      420      430      440
AAG CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT
TCT GCA TGC CAT CCG CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC GTC AAC TTT AGA
K R T V A A P S V P I F P P S D E Q L K S>

450      460      470      480      490      500
GGA ACT GCC TCT GTT GTG TCC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GGC AAA GTA CAG TGG
CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC
G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W>

510      520      530      540      550      560
AAG GTG GAT AAC GGC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG
TTC CAC CTA TTG CCG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG TGT CTC CTG TCG TTT
K V D N A L Q S S G H S Q B S V T E Q D S K>

570      580      590      600      610      620      630
GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA
CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CBT CTG ATG CTC TTT GTG TTT
D S T Y S L S S T L T L S K A D Y H K H K>

640      650      660      670      680      690
GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG
CAG ATG CCG ACG CTT CAG TGG GEA GTC CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC
V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R>

700
GGA GAG TGT TAG
CCT CTC ACA ATC
G E C *>

```

【 図 2 b - 1 】

(b) 軽鎖

```

10      20      30      40      50      60
ATG AGC GTG CCT ACC CAG GTC CTC GGC CTG TTG CTG CTC TGG CTG ACC GAT GCC CGC TGC GAT
TAC TCG CAC GSA TGG GTC CAG GAG CCG GAC AAC GAC CAG ACC GAC TGG CTA CCG GCG ACG CTA
M S V P T Q V L G L L L L W L T D A R C D>

70      80      90      100     110     120
ATC CAG ATG ACT CAA TCA CCC AGT TCC CTG AGC GGC TCT GTC GGC GAC AAG GTG ACC ATC ACA
TAG GTC TAC TGA GTT AGT GGG TCA AAG GAC TCG CCG AGA CAG CCG CTG TCC CAC TGG TAG TGT
I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T>

130     140     150     160     170     180
TGC CAG GCC TCT CAA GAC ATT GGC ATC AGC CTG TCC TGG TAC CAG CAA AAA CCC GGC AAG GCC
ACG GTC CCG AGA GTT CTG TAA CCG TAG TCG GAC AGS ACC ATG GTC GTT TTT GGG CCG TTC CCG
C Q A S Q D I G E S L S W Y Q Q K P G K A>

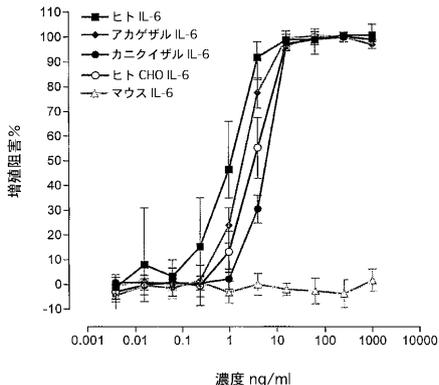
190     200     210     220     230     240     250
CCT AAG CTC CTG ATC TAC AAT GGT AAC AAC CTG GCC GAT GGC GTG CCT AGT AGS TTT AGC GGG
GGA TTC GAG GAC TAG ATG TTA CGA TTG TTG GAC CCG CTA CCG CAC GSA TCA TCC AAA TCG CCC
P K L L L I Y N A M N L A D G V P S R F S G>

260     270     280     290     300     310
TCT GGT TCC GGA ACA GAT TTC ACA CTC ACC ATC AGC TCA CTG CAG CCC GAG GAC TTC GCC ACT
AGA CCA AGG CCT TGT CTA AAG TGT GAG TGG TAG TCG AGT GAC GTC GGG CTC CTG AAG CCG TGA
S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T>

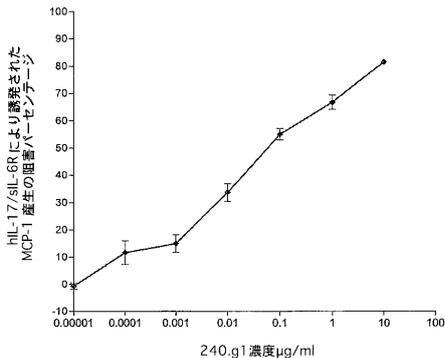
320     330     340     350     360     370
TAC TAT TGC CTG CAG CAC AAC AGC GCC CCC TAC ACC TTC GGA CAA GGC ACT AAA CTG GAG ATC
ATG ATA ACG GAC GTC GTG TTG TCG CCG GGG ATG TGG AAG CCT GTT CCG TGA TTT GAC CTC TAG

```

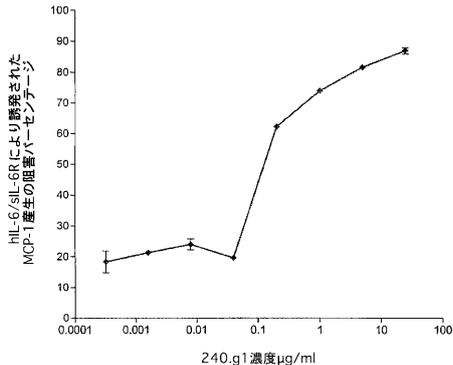
【 図 3 a 】



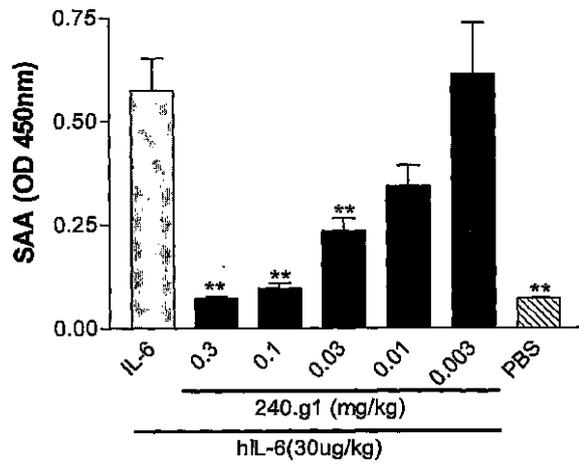
【 図 3 c 】



【 図 3 b 】



【 図 4 】
Figure 4



【 配列表 】
0005183484000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 U
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00

- (72)発明者 ゲリナス、リチャード、エバン
イギリス国、パークシャー、スラウ、 バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック
- (72)発明者 シンガル、ミトラ、チョードリー
イギリス国、パークシャー、スラウ、 バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック
- (72)発明者 チャン、イ
イギリス国、パークシャー、スラウ、 バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック
- (72)発明者 ポップルウェル、アンドリュウ、ジョージ
イギリス国、パークシャー、スラウ、 バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック
- (72)発明者 アダムス、ラルフ
イギリス国、パークシャー、スラウ、 バス ロード 2 0 8、ユセベ セルテック

審査官 藤井 美穂

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 3 9 8 2 6 (W O , A 1)
特開平 0 7 - 0 4 6 9 9 8 (J P , A)
特開平 0 2 - 0 0 9 3 9 4 (J P , A)
特開平 1 0 - 3 2 4 6 3 9 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 0 6 3 3 (W O , A 1)
J. Biochem. , 1 9 9 4 年 , Vol.115 , pp.345-350
Human Antibodies , 2 0 0 2 年 , Vol.11 , No.4 , pp.121-129
Eur. J. Biochem. , 1 9 9 7 年 , Vol.249 , pp.690-700
Biochemical and Biophysical Research Communications , 1 9 8 9 年 , Vol.165 , No.2 , pp.7
28-734
Eur. J. Immunol. , 1 9 8 8 年 , Vol.18 , pp.951-956

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
C12P 1/00 - 41/00
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)