

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-87144

(P2012-87144A)

(43) 公開日 平成24年5月10日 (2012.5.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24 Z N A	4 B O 2 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H O 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-4156 (P2012-4156)	(71) 出願人	594032322
(22) 出願日	平成24年1月12日 (2012.1.12)		ニューヨーク・ユニバーシティ
(62) 分割の表示	特願2011-117072 (P2011-117072) の分割		New York University
原出願日	平成4年3月18日 (1992.3.18)		アメリカ合衆国 10012 ニューヨー ク、ニューヨーク、ワシントン・スクエア ・サウス 70
(31) 優先権主張番号	670, 827	(71) 出願人	509087759
(32) 優先日	平成3年3月18日 (1991.3.18)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー テッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1904 4 ホーシヤム・リッジビュードライブ80 0/850
		(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト腫瘍壊死因子に特異的なモノクローナルなキメラ抗体

(57) 【要約】

【課題】マウス抗体免疫発現に関する諸問題を克服し、免疫発現の低い、そして中和活性の高い新規な T N F 抗体を提供すること。

【解決手段】ヒト腫瘍壊死因子 - α (T N F α) に特異的であり、かつ T N F に仲介される種々の疾患や症状の i n v i v o での診断および治療に有用な抗 T N F 抗体、そのフラグメントおよび領域部分、並びに、マウスとのキメラ抗体をコードするポリヌクレオチド、前記抗体の製造方法、並びに前記抗 T N F 抗体、そのフラグメント、領域およびそれらの誘導体の免疫学的分析や免疫学的治療への応用に関する種々のアプローチを提供する。

。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部および非ヒト免疫グロブリンの可変領域を含むキメラ抗腫瘍壊死因子 α (TNF α)モノクローナル抗体であって、

親和定数 (Ka) として測定される少なくとも $1.8 \times 10^9 \text{ L/mol}$ の親和性で TNF α に結合し

；
かつ、オーバーラップする複数の TNF フラグメントのペプチドピンを合成することを含むエピトープマッピング法により決定される SEQ ID NO: 1 の 59 - 80 位および 87 - 108 位のアミノ酸残基内のヒト TNF α のエピトープで TNF α に結合する、前記キメラ抗 TNF α モノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は 1991 年 3 月 18 日に出願された米国特許出願 07/670,827 号の継続出願であり、同出願の内容は参照によってすべて本願に取り込まれている。

免疫学と医学の分野に属する本発明はヒトの腫瘍壊死因子 - アルファ (hTNF α) ; そのフラグメント、領域部分 (原文: regions) および誘導体; その薬用組成物および診断用組成物、ならびにその産生、それによる診断および治療法に関する。本発明は、またそのような抗体、フラグメント、領域部分をコードするヌクレオチド配列、ならびにそのような配列を含むベクターおよび宿主と、さらにその製法とに関する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壊死因子 - アルファ (TNF α ; カケクチンとも称せられる) として知られるサイトカイン (cytokine) は、主として単球およびマクロファージによって内毒素ないし他の刺激に反応して分泌される、17 kD の蛋白質サブユニットの可溶性ホモトリマーとしての、蛋白質である (Smith, R. A. et al., J. Biol. Chem. 262: 6951 - 6954 (1987))。TNF 由来の、膜に結合した 26 kD の前駆体形もまた、記載されている (Kriegler, M. et al., Cell 53 45 - 53 (1988))。TNF についての総説は、Beutler, B. et al., Nature 320: 584 (1986) ; Old, L. J., Science 230: 630 (1986) ; および Le, J. et al., Lab Invest. 56: 2334 (1987) を参照されたい。TNF は、もともと細菌ワクチン (bacillus Calmette - Guerin, BCG) または内毒素 (Cariwell, E. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3666 (1975)) の連続注射を受けた動物の血清中に見出された。

【0003】

TNF α をコードする遺伝子の発現は、単球 / マクロファージ族の細胞に限定されるものではない。数種のヒトの非単球腫瘍細胞系列が TNF α を産生することが、報告されている (Rubbini, B. Y. et al., J. Exp. Med. 164: 1350 (1986) ; Spriggs, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6563 (1987))。TNF はまた、CD4⁺ および CD8⁺ 末梢血管血液 T リンパ球、または種々の培養された T および B 細胞系列によって産生される (Cuturi, M. C. et al., J. Exp. Med. 165: 1581 (1987) ; Sung, S. - S. J. et al., J. Exp. Med. 168: 1539 (1988))。

【0004】

蓄積されつつある証拠は、TNF が多面発現性生物学的活性を有する調節サイトカインであることを示す。これらの活性は、リボ蛋白質リパーゼ合成の阻害 (カケクチン (cachectin) 活性) (Beutler, B. et al., Nature 316: 552 (1985))、多形核白血球の活性化 (Klebanoff, S. J. et al.

10

20

30

40

50

、J. Immunol. 136: 4220 (1986); Perussia, B., et al., J. Immunol. 138: 765 (1987))、細胞成育の阻害もしくは刺激 (Vilcek, J. et al., J. Exp. Med. 163: 632 (1986); Sugarman, B. J. et al., Science 230: 943 (1985); Lachman, L. B. et al., J. Immunol. 138: 2913 (1987))、ある種の形質転換細胞タイプに対する細胞毒活性 (Lachman, L. B. et al., 上掲文献; Darzynkiewicz, Z. et al., Canc. Res. 44: 83 (1984))、抗ウイルス活性 (Kohase, M. et al., Cell 45: 659 (1986); Wong, G. H. W. et al., Nature 323: 819 (1986))、骨再吸収の刺激 (Bertolini, D. R. et al., Nature 319: 516 (1986); Saklatvala, J., Nature 322: 547 (1986))、コラゲナーゼとプロスタグランジンE2産生の刺激 (Dayer, J. - M. et al., J. Exp. Med. 162: 2163 (1985))；そしてT細胞の活性化を含む免疫調節作用 (Yokota, S. et al., J. Immunol. 140: 531 (1988))、B細胞の活性化 (Kehrl, J. H. et al., J. Exp. Med. 166: 786 (1987))、単球の活性化 (Philip, R. et al., Nature 323: 86 (1986))、胸腺リンパ球の活性化 (Ranges, G. E. et al., J. Exp. Med. 167: 1472 (1988))、主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) クラスIおよびIIの細胞表面への出現の刺激 (Collins, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 466 (1986); Pujol-Borrell, R. et al., Nature 326: 304 (1987)) も報告されている。

【0005】

TNFは、脈管内皮細胞に対する凝集誘導作用のような組織破壊に到る炎症支援作用 (Pober, J. S. et al., J. Immunol. 136: 1680 (1986))、好中球およびリンパ球付着増進作用 (Pober, J. S. et al., J. Immunol. 138: 3319 (1987))、マクロファージ、好中球および脈管内皮細胞から血少板活性化因子を解放する刺激 (Cammussi, G. et al., J. Exp. Med. 166: 1390 (1987)) によっても知られている。

【0006】

最近の証拠によると、TNFが、多くの感染において (Cerani, A. et al., Immunol. Today 9: 28 (1988))、免疫不全、悪性形質変換性疾患、例えばある種の悪性腫瘍に伴う悪液質において (Oliff, A. et al., Cell 50: 555 (1987))、自己免疫性疾患および移植片体宿主疾患 (原文: graft versus host pathology) において (Piguet, P. - F. et al., J. Exp. Med. 166: 1280 (1987))、発病因に関係するようである。TNFと癌および感染疾患の病理の関連性は、しばしば宿主の異化作用 (物質分解代謝) に関係がある。癌患者における主要問題は、通常食欲不振に由来する体重減少である。全体的消耗が、通常「悪液質」として知られる結果を惹起する (Kern, K. A. et al., J. Parent. Enter. Nutr. 12: 286 - 298 (1988))。悪液質は、進行性体重減少、食欲不振、腫瘍の成長に伴う執ような身体のびらんを含む。基本的な生理上の障害は、エネルギー消費に対する食物摂取の減退である。悪液質状態はかくして重要な疾病状態に関係し、癌死亡率の重要な要因である。多数の研究が、TNFが癌と感染性疾患の病理と他の異化作用による悪液質の仲介者となっていることを、示唆する。

【0007】

TNFはグラム陰性菌による敗血症と内毒素ショックとの病理生理学的帰趨において中心的役割を演ずると考えられており (Michie, H. R. et al., Br. J. Surg. 76: 670 - 671 (1989); Debets, J. M. H. et al.

、Second Vienna Shock Forum , p . 463 - 466 (1989) ; Simpson , S . Q . et al . , Crit . Care Clin . 5 : 27 - 47 (1989))、その範囲は発熱、倦怠感、食欲不振、悪液質を含む。内毒素は、TNFとその他のサイトカインの産生と分泌とを刺激する潜在的単球 / マクロファージ活性化剤である (Kornbluth , S . K . et al . , J . Immunol . 137 : 2585 - 2591 (1986) およびその他)。TNFは、内毒素の生理的効果を模倣するから、内毒素に関連する疾患の臨床的所見に対して責任ある中心的仲介者であると結論付けられる。TNFおよび他の単球から誘導されるサイトカインは、内毒素に対する代謝的ならびに神経ホルモンの反応を仲介する (Michie , H . R . et al . , N . Eng . J . Med . 318 : 1481 - 1486 (1988))。ヒトの有志被検者に対する投与は、発熱、頻脈、代謝の増大、ストレスによるホルモン分泌を含むインフルエンザ様症状を伴う急性疾患を惹起する (Revhaug , A . et al . , Arch . Surg . 123 : 162 - 170 (1988))。グラム陰性菌による敗血症の患者では、高レベルのTNFの循環が見られる (Waage , A . , et al . , Lancet 1 : 355 - 357 (1987) ; Hammerle , A . F . et al . , Second Vienna Shock Forum p . 715 - 718 (1989) ; Debets , J . M . H . et al . , Crit . Care Med . 17 : 489 - 497 (1989) ; Calandra , T . et al . , J . Infect . Dis . 161 : 982 - 987 (1990))。

10

20

その殺腫瘍活性の故になされるTNFによる癌患者の治療は、 $545 \mu\text{g} / \text{m}^2 / 24 \text{ hr}$ より多い投与で、健康人に対する内毒素 $4 \text{ ng} / \text{kg}$ の注射によって惹起されるのに似た変化を惹き起こすことがわかり (Michie , H . R . et al . , Surgery 104 : 280 - 286 (1988))、敗血症と内毒素に対する反応の主たる宿主の仲介者としてのTNFの役割を支持している。ヒトまたはラットへの長期間にわたる静脈内注入は食欲不振、体液うっ滞、急性反応、負の窒素バランス (すなわち、古典的異化効果) に関係し、重篤な疾患において見られる多くの変化に対する原因であるという結論に導かれる (Michie , H . R . et al . , Ann . Surg . 209 : 19 - 24 (1989))。

【0008】

上に論じたように、中和作用を有するTNFに向けられた受動的免疫療法はこの様な病理状態で、増大したTNF産生と高められたTNFレベルに基づいて、グラム陰性菌敗血症と内毒素症に有利な効果を有するであろう。

30

【0009】

後にTNFと同一物であることが見出されたカケクチンとして特徴付けられる変調因子物質に対する抗体は、Ceramiet al .によって開示されている (ヨーロッパ特許公報 No . 0212489 , 1987年3月4日)。そのような抗体は、診断用免疫学的検定と細菌感染におけるショックの治療とに有用であると言われていた。Rubinet al . は、ヒトのTNFに対する単クローン抗体、そのような抗体を分泌するハイブリドーマ、そのような抗体を産生する方法、TNFの免疫学的検定におけるそのような抗体の使用を開示した (ヨーロッパ特許公報 No . 0218868)。Yoneet al . は、mAbを含む抗TNF抗体類と、その、諸疾患、特に川崎病と細菌感染の免疫学的診断における有用性とを開示した (ヨーロッパ特許公報 No . 0288088)。川崎病 (小児急性有熱性粘膜皮膚リンパ結節症候群、Kawasaki , T . . Allergy 16 : 178 (1967) ; Kawasaki , T . , Shonika (Pediatrics) 26 : 935 (1985)) の患者の体液は高レベルのTNFを含み、病変の進展に関係があると言われていた (Yoneet al . , 上記文献)。

40

【0010】

他の研究者等は、試験管内で中和作用を有する組換えヒトTNFに特異的であるmAbを記載した (Liang , C - M . et al . , Biochem . Biophys . Res . Comm . 137 : 847 - 854 (1986) ; Meager , A . et al .

50

., Hybridoma 6:305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6:359-369; Bringman, T.S. et al., Hybridoma 6:489-507 (1987); Hirai M. et al., J. Immunol. Meth. 96:57-62 (1987); Moller, A. et al., (Cytokine 2:162-169 (1990)). これらのmAbのあるものは、ヒトのTNFのマッピングと酵素の免疫学的検定の開発に使用され (Fendly et al., 上掲文献; Hirai et al., 上掲文献; Moller et al., 上掲文献)、また組換えTNFの生成の助剤とされた (Bringman et al., 上掲文献)。しかしながら、これらの研究は、ヒトにおける生体内診断または治療に使用できるTNF中和抗体産生の基礎を提供するものではない。

10

【0011】

抗TNF免疫療法の採用に対する最も直接的な支持が、ヒト以外の動物の生体内保護の研究から得られる。TNFに対する中和作用を有する抗血清またはmAbが、ヒト以外の哺乳類について、実験的に惹起された内毒素血症と菌血症における致死の後に不利な生理的变化を停止し死を阻止することが示された。この効果は、例えば、げっ歯類致死率検定と霊長類病理モデル系において実証された (Mathison, J.C., et al., J. Clin. Invest. 81:1925-1937 (1988); Beutler, B. et al., Science 229:869-871 (1985); Tracey, K.J. et al., Nature 330:662-664 (1987); Shimamoto, Y. et al., Immuol. Lett. 17:311-318 (1988); Silva, A.T. et al., J. Infect. Dis. 162:421-427 (1990), Opal, S.M. et al., J. Infect. Dis. 161:1148-1152 (1990); Hinshaw, L.B. et al., Circ. Shock 30:279-292 (1990))。例えば、抗TNFmAbを中和するF(ab')フラグメントは、ヒトにおけるE.coli生菌によって惹起された敗血症によるショックを阻止することができた (Tracey, K.J. et al., 上掲文献)。

20

【0012】

hTNF α の推定されるレセプター結合位置がEckとSprangとによって示された (J. Biol. Chem. 264 (29), 17595-17605 (1989))。彼等は、TNF α のレセプター結合位置をアミノ酸11-13、37-42、49-57および155-157と同定した。国際特許出願WO91/02078 (優先権主張日; 1989年8月7日)は、次の様なエピトープ、すなわち1-20、56-77および108-127の少なくとも一つ、1-20、56-77、108-127および138-149の少なくとも二つ、1-18、58-65、115-125および138-149のすべて、1-18、および108-128のすべて、56-79、110-127および135-または136-155のすべて、1-30、117-128および141-153のすべて、1-26、117-128および141-153のすべて、22-40、49-96または-97、110-127および136-153のすべて、12-22、36-45、96-105および132-157のすべて、1-20と76-90の両者のすべて、22-40、69-97、105-128および135-155のすべて、22-31および146-157のすべて、22-40および49-98のすべて、22-40、49-98および69-97の少なくとも一つ、そして22-40と70-87の両者を有するモノクローナル抗体に結合することのできるTNFリガンドを、開示している。

30

40

【0013】

今日までのところ、ヒトにおける抗TNFmAb療法についての実験は限られている。一つのフェイズI研究では、14人の重篤な敗血症ショックの患者が、中和作用を有するマウスの抗TNFmAbを0.4-10mg/kgの投与を1回受けた (Exley, A. R., Lancet 335:1275-1277 (1990))。しかしながら、1

50

4人中7人の患者がこの治療に対してヒトの抗マウス抗体反応を起こし、マウス抗体の重鎖（原文；heavy chain）および軽鎖（原文；light chain）部分による免疫発現による既知の諸問題をこうむった。そのような免疫発現は、続く投与の有効性を減じ、マウス抗TNF抗体の診断的または治療的投与を受けた患者に、免疫拒絶反応の故に、治療効果を無効にすることがある。

【0014】

重篤な移植片体宿主疾患（原文；graft vs host pathology）を患う患者に対するマウスTNFmAbの投与についてもまた報告されている（Herve, P. et al., Lymphoma Res. 9: 591 (1990)）。

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、マウス抗体免疫発現に関する諸問題を克服し、免疫発現の低い、そして中和活性の高い新規なTNF抗体の提供が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の目的は、従来技術の欠陥を克服することである。

【0017】

本発明の他の目的は、マウス抗組織壊死因子（TNF）抗体とキメラ抗体とそれらのフラグメントおよび領域部分であって、生体内でTNFの生物学的活性を阻害ないし中和し、ヒト腫瘍壊死因子-アルファ（hTNF α ）に特異的であるものを提供することである。一つの好適実施態様において、本発明の抗TNF抗体はA2抗体のTNFへの結合を完全に阻害する。

20

【0018】

他の好適実施態様においては、本発明の抗TNF抗体は、（SEQ ID NO: 1における）hTNF α の残基87-108または残基59-80および87-108の両者の少なくとも5個のアミノ酸のエピトープと結合するが、（SEQ ID NO: 1における）アミノ酸配列1-20、11-13、37-42、49-57または155-157のようなTNFの既知あるいは推定されている結合部位には結合しない。

【0019】

30

本発明のそのような抗TNF抗体、そのフラグメント、領域部分は、マウス/マウスハイブリドーマのようなハイブリドーマと、マウス/ヒトキメラ抗体のような少なくとも可変領域をコードする異種（非対応）核酸を発現する組換え細胞の両方から産生されるものを含む。すなわち、TNF特異性抗体およびそのフラグメントと領域部分である。

【0020】

ハイブリドーマと遺伝子工学技術を用いて抗TNF抗体、そのフラグメントおよび領域部分を提供する本発明の他の目的は、上述の様なTNFに関連するヒトの疾病の生体内診断および治療に有用な製品を提供することである。

【0021】

本発明の他の目的は、TNF α の部分に相当するhTNF α の抗体ポリペプチドを提供することであり、これらのポリペプチドのエピトープがTNF特異性抗体に結合するとき、生体内においてTNF α の生物学的活性を中和または阻害する。本発明のさらに他の目的は、図15に示されるようなhTNF α （SEQ ID NO: 1における）残基87-108または59-80および87-108から選ばれる少なくとも5個のアミノ酸に相当するポリペプチドの特定エピトープに結合するハイブリドーマまたは組換え宿主から産生される抗体を提供することである。

40

【0022】

本発明のさらに他の目的は、生体内においてTNF α を阻害および/または中和する活性を有し、悪液質を含むTNF α に関連する疾患、細菌性疾患、ウイルス性疾患、真菌性疾患を含む急性慢性の感染性および寄生虫性疾患、または自己免疫疾患、アルコール誘発

50

性肝炎、悪性形質転換疾患等を含む急性および慢性の炎症性および免疫性疾患の診断および治療のための、薬用および診断用の組成物として提供され得る抗TNF α および/またはそのフラグメント、領域部分を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、生体内において、TNF α 阻害ないし中和作用を有し、悪液質を含むTNF α に関連する疾患、細菌性疾患、ウィルス性疾患、および真菌性疾患のような急性および慢性の感染性および寄生虫性疾患、自己免疫疾患、アルコール誘発性肝炎、悪性形質転換疾患等を含む急性および慢性の炎症性および免疫性疾患の診断および治療のための、薬用および診断用の組成物として提供することのできる抗TNF α および/またはそのフラグメント、領域部分を提供することである。治療用に好適なのは、高親和性抗TNF α 抗体で、モノクローナルキメラ抗体であって、組換えによりまたはハイブリドーマによって産生されるものを含み、それは少なくとも約1 μ g/ml、より好ましくは、少なくとも約100ng/ml、もっとも好ましくは約15ng/mlの阻害投与量50(ID50)で生体内でヒトのTNF α を阻害ないし中和する。

【0023】

本発明の他の様相によれば、抗TNF α mAbまたはキメラmAbまたはそのTNF α 結合性フラグメントは、TNF α の産生に関連する症状を病むと疑われる患者の体内でヒトTNF α を検出するための診断法において特に有用であり、本発明の高親和性マウス抗TNF α 抗体またはキメラ抗TNF α 抗体が、患者または、検出された抗原抗体反応から得られる生物学的物質と接触させられる方法を含む。本発明はまた、本発明の高親和性マウス抗TNF α 抗体および/またはキメラ抗TNF α 抗体を、好ましくは、検出できるようにラベルされた形で含む、生物学的流体(体液)中のTNF α を検出するためのキットをも含む。

【0024】

本発明のキメラ抗体はmAbの有利な特徴の組合せを具体化するものである。本発明のキメラ抗体は、マウスmAbと同様に、ヒトのTNFを認識し、これと結合する。しかし、マウスmAbとは異なり、このキメラ抗体の「ヒトに特異的な」性質が、抗体に対する免疫応答の可能性を低下させ、そして浄化値(原文; clearance)の低下により血液循環中で長く維持される。さらに、本発明によって開示された方法を採用することにより、どのような所望のヒト免疫グロブリンのイソタイプでもその一定領域において所望の抗原結合部位と結合できる。

【0025】

本発明の一つの実施態様は、ヒトTNF α に特異的であるA2と名付けられる高親和性のマウスmAbに関する。この抗体は、検出可能にラベルされた形で使用される。別の実施態様では、hTNF α のポリププチド部分であって、そのペプチド部分に含まれるエピトープに特異的な抗体またはそのフラグメントによって無傷のTNF α 分子の一部として結合するときに、生体内においてTNF α 活性を阻害または中和するものが提供される。

【0026】

本発明のさらに別の目的は、HまたはLのキメラ免疫グロブリン鎖であって、可変または不変(恒常)領域を有し、TNFの一以上のエピトープに対する特異性を有する、好ましくは、(SEQ ID NO: 1における)hTNF α の、残基59-80および87-108の両者の組合せまたは残基87-107の少なくとも5個のアミノ酸のエピトープ、に対する特異性を有するものを提供することである。好適実施態様において、エピトープアミノ酸は、(SEQ ID NO: 1における)hTNF α の11-13、37-42、49-57または155-157の少なくとも一つの残基からのアミノ酸を含まない。ヒト/マウス-キメラ免疫グロブリン鎖は、天然のヒト免疫グロブリン中に存在するものに実質的に類似の不変(C)領域と、好ましくはTNFエピトープに対する高親和性と所望の特異性を有する可変(V)領域を含む。本発明はまた、分子全体が所望の抗原認識作用および結合作用を示すように会合させられたキメラHおよびL鎖を有する抗原、そのフラグメント、領域部分を提供する。

【0027】

具体的には、本発明は二つの軽鎖と二つの重鎖を有し、そのおのものがヒトの不変領域の少なくとも一部と非ヒト起源のhTNF α に対する特異性を有する(V)可変領域の少なくとも一部とを有し、hTNF α の阻害性および/または中和性エピトープに対して高親和結合性を有するキメラ抗体に関する。本発明はまたそのような抗体のフラグメントまたは誘導体を含む。好ましくは、V領域は、非ヒト起源のものであり、もっとも好ましくはマウス起源のものである。好適実施態様において、V領域は、A2 mAbのエピトープから誘導されるか、それに結合する。別の好適実施態様においては、キメラA2(cA2)と名付けられるキメラ抗体が、cA2とTNF α の結合を競合的に阻害するヒト/マウス-キメラ抗TNF mAbのエピトープと結合する抗体を提供する。

【0028】

好ましくは、このキメラ抗体は、生体内で、少なくとも約1 μ g/ml、より好ましくは少なくとも約100ng/ml、最も好ましくは、少なくとも約15、30、50もしくは80ng/mlのID50の投与で、hTNF α を阻害または中和する。

【発明の効果】

【0029】

予想外のこととして、本発明のmAbsは、EckおよびSprang(J. Biol. Chem., 264(29), 17595-17605(1989))によって、(SEQ ID NO: 1における)hTNF α の11-13、37-42、49-57および155-157である複数のアミノ酸であるとして示されたように、推定されたレセプター結合位置に結合することなく、TNF- α の活動を遮断することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本発明は、マウス抗組織壊死因子(TNF)抗体とネズミ/ヒトキメラ抗体とそれらのフラグメントおよび領域部分であって、生体内(原文; *in vivo*)でTNF生物学的活性を阻害ないし中和し、そして、ヒト腫瘍壊死因子-アルファ(hTNF α)に対して特異的であるもの、かつ、診断上および治療上の目的のために、通常健康な被検体に存在するよりも過剰の量で存在する抗TNF抗体特にgTNF α と反応活性である物質の存在に付随した状態または病理学的状態にある被検体に、使用されるものを、提供する。本発明の、抗体、ならびにそれらのフラグメント、領域部分および誘導体は、生体内で(原文; *in vivo*)生物学的活性を阻害ないし中和するTNFのエピトープを認識するところの、V領域部分を少なくとも好ましく含有する。

【0031】

予想外のこととして、本発明のmAbsは、EckおよびSprang(J. Biol. Chem., 264(29), 17595-17605(1989))によって、(SEQ ID NO: 1における)hTNF α の11-13、37-42、49-57および155-157である複数のアミノ酸であるとして示されたように、推定されたレセプター結合位置に結合することなく、TNF- α の活動を遮断することができる。

【0032】

本発明の好ましい抗体は、ネズミ抗体または高親和性ヒト/ネズミキメラ抗TNF α 抗体、ならびにそれらのフラグメントもしくは領域部分であり、それらは生体内で(原文; *in vivo*)ヒトTNF α に対して効力のある阻害活性および/または中和活性を有する。そのような抗体およびキメラ抗体は、精製された組み換えhTNF α (SEQ ID NO: 1)またはそれらのペプチドフラグメントを使用する免疫感作によって生じたものを含む。そのようなフラグメントは、(SEQ ID NO: 1の複数のアミノ酸に相当する)hTNF α の残基59-80および残基87-107の両方の組み合わせまたは残基87-107の内の少なくとも5分子のアミノ酸のエピトープを含む。さらに、本発明の好ましい抗体、抗TNF抗体のフラグメントおよび抗TNF抗体の領域部分は、(SEQ ID NO: 1の)hTNF α における複数のアミノ酸11-13、37-42、49-57または155-157の少なくともひとつから由来する複数のアミノ酸(原文; *amino acids*)を認識しない。

【0033】

TNFの循環濃度は非敗血症個体中で約10 pg/mlの程度で非常に低く、一方、敗血症患者では約50 pg/mlに達し(Hammerle, A. F. et al., 1989, 上掲書)、あるいは、病理学的にTNFでメディエートされたサイトで検出され得るだけであるから、病理学的にTNFでメディエートされた免疫検定および療法の両方のために、生体内で(原文; *in vivo*) TNF阻害および/または中和する高親和性および/または効力のある抗体、そのフラグメント、またはその領域部分を使用するのが好ましい。そのような抗体、フラグメントおよび領域部分は、Kaとして発現された、たとえば $5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、 $8 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 、 $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、 $6 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、 $8 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ のような少なくとも 10^8M^{-1} 、より好ましくは少なくとも 10^9M^{-1} のhTNF α に対する親和性を好適に有している。

10

【0034】

ヒトに対する治療学的使用に対して好適であるのは、TNF誘導IL-6分泌を遮断するところの、生体内で(原文; *in vivo*) TNF α 阻害活性および/またはTNF α 中和活性を有する、本発明の高アフィニティを有するネズミとのキメラ抗体ならびにそれらのフラグメント、領域部分および誘導体である。ヒトに対する治療学的使用に対してまた好適であるのは、生体内外およびその位置において(原文; *in vivo*, *in situ*, and *in vitro*)、ELAM-1およびICAM-1のような細胞接着分子のTNF誘導発現を遮断すること、および、TNFマイトジエン活性を遮断することを含めて、TNF誘導プロ凝固活性(原文; *procoagulant activity*)を遮断するところの、高親和性を有するネズミとのキメラ抗TNF α 抗体、ならびにそれらのフラグメント、領域部分および誘導体である。

20

【0035】

好ましい抗TNF mAbsは、ネズミの抗TNF α mAb A2、キメラmAb cA2または、前記フラグメントおよび領域部分と同様に特別の結合特性を実質的に備えた抗体のヒトTNF α への結合を競合的に生体内で(原文; *in vivo*) 阻害することのできるものである。本発明の好ましい抗体はA2およびcA2により認識されたエピトープを結合したものであり、そのエピトープは、(SEQ ID NO: 1の相当するアミノ酸として) hTNF α における59-80および/または87-108の複数のアミノ酸中に含まれ、ヒトhTNF α の上記部分から由米する少なくとも1分子のアミノ酸を有する少なくとも5分子のアミノ酸からなる。競合的阻害によるmAbの特異性および親和性を決定する好適な方法は、Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983)により見出されることができ、その内容は参照によってこの明細書の内容として完全に組み込まれる。

30

【0036】

本発明における抗体の例として、本発明のネズミmAb A2が、c134Aとして指定される細胞系により産生される。キメラ抗体cA2が、c168Aとして指定される細胞系により産生される。細胞系c134Aは、セントコア セル バイオロジー サービス デポジトリ(原文; Centocor Cell Biology Services Depository)にあるリサーチセルバンク(原文; research cell bank)に預託され、また、細胞系c168A(RCB)は、セントコア コーポレート セル カルチャー リサーチ アンド デベロップメント デポジトリ(原文; Centocor Corporate Cell Culture Research and Development Depository)に預託されている。なお、両者とも、セントコア, 200 グレート バレイ パークウェイ, マルバーン, ペンシルベニア州, 19355に位置している。そのc168A細胞系は、また、オランダ国ライデンのセントコアBVに預託されている。

40

【0037】

さらに、c168Aは、本願の出願日に、培地安全預託(原文: Culture Safe Deposit)として、メリーランド州のロックビルにあるアメリカン タイプ

50

カルチャー コレクション (原文; American Type Culture Collection) に、預託された。

【0038】

用語の「エピトープ」は、抗体により認識されることができ、かつ抗体に結合されることのできるその部位を指すものとして、意味される。エピトープは、通常、複数のアミノ酸または複数の糖側鎖のような、化学的に活性な複数の分子の集合表面からなり、特異的な電荷特性のみならず特異的な三次元構造特性を有している。「阻害し、および/または中和するエピトープ」とは、TNFリセプターへのTNFの結合を含めて、生体内外およびその位置において (原文; *in vivo*, *in vitro* and *in situ*)、より好ましくは生体内で (原文; *in vivo*)、抗体が結合するとエピトープを含む分子または組織の生物学的活性を喪失するエピトープを意図する。本発明の好ましい抗体、抗TNF抗体のフラグメントおよびその領域部分は、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108のアミノ酸からの、または残基59 - 80および87 - 108の両方のアミノ酸からの少なくとも1分子のアミノ酸を有する5分子のアミノ酸を含むエピトープを認識する。本発明の好ましい抗体、抗TNF抗体のフラグメントおよびその領域部分は、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の11 - 13、37 - 42、49 - 57または155 - 157のアミノ酸の少なくともひとつから由来するエピトープを認識しない。好ましい態様においては、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方からの少なくとも2分子のアミノ酸を含有する。他の好ましい態様においては、エピトープは、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基59 - 80および残基87 - 108からの少なくとも3分子のアミノ酸を含有する。その他の好ましい態様においては、エピトープは、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方からの少なくとも4分子のアミノ酸を含有する。その他の好ましい態様においては、エピトープは、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方からの少なくとも5分子のアミノ酸を含有する。その他の好ましい態様においては、エピトープは、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方からの少なくとも6分子のアミノ酸を含有する。その他の好ましい態様においては、エピトープは、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方からの少なくとも7分子のアミノ酸を含有する。

【0039】

「抗原」は、その抗原のエピトープに結合することのできる抗体を産生するために動物を誘導することのできる抗体によって結合されることができ分子であるか、または分子の一部である。一つの抗原は、一以上のエピトープを含有していても良い。上記の特異的な反応は、抗原が高度に選択的な挙動で、その対応する抗体と反応することができるが、他の抗原により引き起こされる多数の他の抗体とは反応することがないということを示すものとして、意味される。抗体、本発明の抗TNF α のフラグメントおよび領域部分を結合する好ましい抗原は、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α の残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方からのアミノ酸の少なくとも一つを含有する少なくとも5分子のアミノ酸を含む。抗体、本発明の抗TNF α のフラグメントおよび領域部分を結合する好ましい抗原は、(SEQ ID NO: 1における) hTNF α のアミノ酸11 - 13、37 - 42、49 - 57または155 - 157からのアミノ酸を含まない。

【0040】

用語の「抗体」は、TNFによるTNFリセプターへの結合を阻害するTNFの部分と結合することのできる、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、ならびにそのフラグメントおよび領域部分を、それらの誘導体と同様に、含んで意味される。フラグメントは、たとえば、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvを含む。これらのフラグ

メントは、抗体そのもののFcフラグメントを欠き、循環からより迅速に清透になり（原文；clear more rapidly from the circulation）、そして抗体そのものよりも非特異的でない組織結合を有している（原文；may have less non-specific tissue binding than an intact antibody）（Wahlet al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)）。これらのフラグメントは、この技術分野に良く知られた方法、たとえば（Fabフラグメントを得るには）パバインのような酵素、あるいは（F(ab')₂を得るには）ペプシンのような酵素を使用するタンパク質分解により、抗体そのものから得られる。本発明の抗TNF抗体の領域は、重鎖定常領域（H_c）、重鎖可変領域（H_v）、軽鎖可変領域（L_v）および軽鎖定常領域（L_c）の少なくとも一つを含み、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それらのフラグメントおよび領域部分が、TNFの一部を結合し、かつTNF生物学的活性を阻害するところの、少なくとも一つの重鎖可変領域（H_v）または軽鎖可変領域（L_v）を含む。

10

【0041】

好適な態様においては、抗体は、ハイブリドーマまたは組み換え宿主により産生されるところの、その抗体がA2、rA2、またはcA2と指定されるTNFのエピトープのアミノ酸を結合する、モノクローナル抗体である。他の好適な態様では、抗体は、A2により認識されたエピトープを認識するところの、キメラ抗体である。更に好適な態様においては、抗体は、キメラA2（cA2）と指定されるキメラ抗体である。

本発明におけるマウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域部分は、個々の重（H）鎖免疫グロブリン鎖および軽（L）鎖免疫グロブリン鎖からなる。キメラH鎖は、ヒトH鎖C領域の少なくとも一部に結合された、TNFに対して特異的な非ヒト抗体のH鎖から誘導された抗原結合領域を有する。

20

【0042】

本発明のキメラL鎖は、ヒトL鎖C領域（L_c）の少なくとも一部に結合された、TNFに対して特異的な非ヒト抗体のL鎖から誘導された抗原結合領域からなる。

【0043】

ここで使用されているように、用語の「抗原結合領域」は、抗原と相互作用をし、抗原に対するその特異性および親和性を抗体に付与するところのアミノ酸残基を含有する抗体分子のその部位を示すものとされる。抗体領域は、抗原結合残基の適当な構造を維持するために必要な「読み取り枠」アミノ酸残基を含む。

30

【0044】

この明細書で使用されるものとして、用語の「キメラ抗体」は、一価、二価または多価の免疫グロブリンを含む。一価のキメラ抗体は、キメラL鎖とジスルフィド架橋で結合されたキメラH鎖により形成された二量体（HL）である。二価のキメラ抗体は、少なくとも一つのジスルフィド架橋で結合された二つのHL二量体から形成された四量体（H₂L₂）である。多価キメラ抗体は、たとえば、凝集するC_H領域（たとえばIgMのH鎖またはμ鎖から）を用いることによって得ることができる。

【0045】

本発明はまた、ネズミのまたはキメラ抗体、そのフラグメント、その領域部分、またはそれらの誘導体について「誘導体」を規定し、その用語は、免疫グロブリンと機能的に類似する分子種を生成する、切り縮められ、または修飾された遺伝子によりコードされたそれらのタンパクを含む。その修飾は、植物毒および細菌毒のような細胞毒タンパクをコードする遺伝子配列の付加を含むが、それらに限定はされない。そのフラグメントおよび誘導体は、この発明のいかなる宿主からも産生されることができる。また、抗TNF抗体、フラグメントおよび領域部分は、細胞毒タンパクまたは化合物に生体外で（原文；in vitro）結合されて、TNFリセプターを有する細胞を選択的に殺す細胞毒の抗TNF抗体を産生する。

40

【0046】

同一または相違するV領域を特異的に結合するキメラH鎖およびキメラL鎖を有する抗

50

体、フラグメント、または誘導体は、たとえば Searset al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 353-357 (1975) により教示されたように、個々のポリペプチド鎖の適当な会合により得られることができる。そのやり方の場合、キメラH鎖（またはそれらの誘導体）を発現する宿主がキメラL鎖（またはそれらの誘導体）を発現する宿主とは別々にして培養され、そして免疫グロブリンが別々に回収されて会合される。また別に、複数の宿主が同時培養されることができ、複数の鎖が培地中で自発的に会合させられ、会合した免疫グロブリン、フラグメンまたは誘導体が回収される。

【0047】

本発明のキメラ抗体の抗原結合領域は、ヒトTNFに対して特異的な非ヒト抗体から好適に得られる。そのような非ヒト抗体をコードする好ましいDNA源は、抗体を産生する細胞系、好ましくはハイブリドーマとして普通に知られている雑種細胞系を含む。好ましいハイブリドーマはA2ハイブリドーマ細胞系である。

雑種細胞は、非ヒト抗hTNF α 抗体産生細胞、典型的には天然のもしくは組み換えヒトTNFまたはヒトTNF α タンパク配列のペプチドフラグメントに対して免疫された動物の脾臓細胞の融合によって形成される。また、非ヒト抗TNF抗体産生細胞は、血液、脾臓、リンパ節またはTNFで免疫された動物の他の組織から得られたBリンパ球であっても良い。

【0048】

本発明におけるキメラ抗体の抗原結合領域をコードするヌクレオチド配列に寄与する抗体産生細胞は、霊長類のような非ヒト細胞またはヒト細胞の形質転換により産生される。たとえば、抗TNF抗体を産生するBリンパ球は、エプスタイン-バールウィルス（原文；Epstein-Barr virus）のようなウィルスで感染され、形質転換されて、不滅の抗TNF抗体産生細胞を生成する（Kozboret al., Immunology Today 4: 72-79 (1983)）。また、そのBリンパ球は、この技術分野で良く知られているように、形質転換遺伝子または形質転換遺伝子産生物を与えることにより、形質転換されても良い。

【0049】

好ましくは、抗原結合領域部分は、ネズミ起源である。他の態様においては、抗原結合領域部分は、他の動物種、特にウサギ、ラットまたはハムスターのような嚙歯類から得られる。

【0050】

永続的機能を与える第2の融合相手は、リンパ球様細胞またはそれ自身抗体産生細胞ではないが悪性である形質細胞腫もしくはミエローマの細胞であっても良い。好ましい融合相手細胞は、SP2/0（ATCC CRL 1581）と略されるハイブリドーマSP2/0-Ag14、およびミエローマP3X63Ag8（ATCC TIB9）もしくはその誘導体（参照：Hartlow, E. et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)）を含む。

【0051】

ヒトTNF α に特異的なmAbを産生するネズミハイブリドーマは、マウス融合相手細胞たとえばSP2/0と、精製されたhTNF α 、組み換えhTNF α 、（SEQ ID NO: 1における）TNFの残基59-80および87-108から選択される5以上のアミノ酸を含む、天然もしくは人工のTNFペプチドで免疫されたマウスの脾臓細胞との融合によって形成される。マウスを免疫するために、従来の種々の異なる実験記録が参照される。

【0052】

（SEQ ID NO: 1における）TNFにおけるTNF残基87-108もしくは残基59-80および87-108の両方、フラグメント、またはそれらの中に含まれるペ

10

20

30

40

50

プチドの組み合わせが、本来のTNF分子の脈絡（原文；context）中に存在するペプチド配列を認識する抗体を形成するために、免疫源として有効である。

【0053】

本発明における、抗体によって認識されるエピトープ、ならびにそのフラグメントおよび領域部分は、高TNF活性を有し、本発明の抗体、フラグメント、それらの可変領域部分によって認識されるTNFの局所的エピトープを提供する、以下に示されるTNFのアミノ酸配列の各々もしくは両方の少なくとも一つのアミノ酸を含有する5分子以上のアミノ酸を含む。

【0054】

59 - 80 : Tyr - Ser - Gln - Val - Leu - Phe - Lys - Gly - Gl
i - Gly - Cys - Pro - Ser - Thr - His - Val - Leu - Leu - Th
r - His - Thr - Ile (SEQ ID NO : 1のAA 59 - 80) および
87 - 108 : Tyr - Gly - Thr - Lys - Val - Asn - Leu - Leu - S
er - Ala - Ile - Lys - Ser - Pro - Cys - Gln - Arg - Glu - T
hr - Pro - Glu - Gly (SEQ ID NO : 1のAA 87 - 108)

【0055】

本発明の抗体を発生させるのに使用されることのできる特別のペプチドが、残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の両方の少なくともいずれかから選択されるところの、抗TNF抗体、フラグメントおよびそれらの領域部分により結合されたTNFエピトープを形成するために結合された、そして、その結合が抗TNF生物学的活性を発生させるアミノ酸の組み合わせを含む。そのようなエピトープは、TNFの他のアミノ酸との結合により長さとして少なくとも5分子のアミノ酸のエピトープを生成するところの、残基87 - 108または残基59 - 80および87 - 108の各々から選択される少なくとも1 - 5分子のアミノ酸および22未満のアミノ酸を含む。

【0056】

本発明の抗体を、遊離のもしくは接合した形でまたは大きなペプチドの脈絡における本来の配列として存在する時にそれらの配列を認識し、かつ結合する小さなペプチド配列にする技術は、この技術分野において良く知られている。それらの抗体は、この技術分野で知られたハイブリドーマまたは組み換え技術によって産生されたところの、Eネズミ抗体、ネズミ/ヒト抗体およびヒト/ヒト抗体を含む。

【0057】

本発明のmAbsによって認識されたこれらのペプチド配列の同定は、結合特性を有する付加的なモノクローナル抗体を発生させるに必要な情報およびこの好適な適用に匹敵する治療学上の有用性を提供する。

【0058】

好適な態様において、エピトープのアミノ酸は、(SEQ ID NO : 1における) hTNF α のアミノ酸11 - 13、37 - 42、49 - 57および155 - 157に関連しない。

【0059】

細胞融合は、免疫学の分野における当業者に良く知られた標準的な手法によって達成される(Kohler and Milstein, Nature 256: 495 - 497 (1975) およびU.S.特許第4,376,110号; Hartlow, E. et al., 上掲書; Campbell, A., "Monoclonal Antidiy Technology," In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13 (Burdon, r., et al., eds.), Elsevier, Amsterdam (1984); Kennett et al., Monoclonal Antibodies (Kennett et al. eds. pp. 365 - 367, Plenum Press, NY, 1980); de St. Groth, S.F., et al. J. Immunol. Meth. 35: 1 - 21 (1980); Galfre, G. et al., , M

10

20

30

40

50

ethods Enzymol. 73: 3 - 46 (1981); Goding, J. W. 1987. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 2nd ed. Academic Press, London, 1987);

【0060】

融合相手細胞系と、ハイブリドーマを選択しかつ融合し、およびmAbsをスクリーニングするための方法とは、この技術分野において良く知られている(Hartlow, E. et al., 上掲書; Kawamoto, T. et al., Meth. Enzymol. 121: 266 - 277 (1986); Kearney, J. F. et al., J. Immunol. 123: 1548 - 1550 (1979); Kilmartin, J. V. et al., J. Cell Biol. 93: 576 - 582 (1982); Kohler, G. et al., Eur. J. Immunol. 6: 292 - 295 (1976); Lane, D. P. et al., J. Immunol. Mueller, U. W. et al., J. Immunol. Meth. 87: 193 - 196 (1986); Pontecorvo, D., Somatic Cell Genet. 1: 397 - 400 (1975); Sharo, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1420 - 1424 (1979); Shulman, M. et al., Nature 276: 269 - 270 (1978); Springer, T. A. (ed), Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine, Plenum Press, New York, 1985; and Taggart, R. T. et al., Science 219: 1228 - 1230 (1982)。

10

20

【0061】

本発明の、hTNF α に特異的なネズミmAbまたはヒトmAbは、抗体を分泌するハイブリドーマまたはトランスフェクトーマ細胞をネズミの腹腔内に注射するか、適当な時間の経過後に高力価のmAbに達している腹水症液を収集し、それからmAbを単離するかによって、大量に生産されることができる。そのような、非ネズミハイブリドーマ(たとえばラットまたはヒト)によるmABの生体内で(原文; *in vivo*)の産生のために、ハイブリドーマ細胞が、照射されたマウスまたは胸腺欠損マウス中で好適に成長される。

30

【0062】

また、抗体は、ハイブリドーマまたはトランスフェクトーマ細胞を生体外で(原文; *in vitro*)培養し、そして選択されたmAbをその細胞培地から単離することによって産生されることがもできる。

【0063】

本発明のモノクローナル抗体は、(SEQ ID NO: 1における)TNFの残基87 - 108または残基59 - 80と87 - 108との両方の非隣接配列内に位置された非隣接残基を含むエピトープを認識する。好適な抗TNFmAbは、これらの一以上のペプチド配列に結合する能力によってヒトTNF α のそのリセプターへの結合を阻害するものである。これらの抗体は、(SEQ ID NO: 1における)TNFの87 - 108および/または110 - 128を含む配列のエピトープに結合することによって、TNFの活性を遮断する。そのような結合は、ここに述べられたように、TNF活性を阻害するために例証される。

40

【0064】

本発明の抗体をスクリーニングするために使用されることができる特別なペプチドは、少なくとも残基87 - 108または残基59 - 80と87 - 108との両方のいずれかから選択されたところのアミノ酸の組み合わせを含み、それらのアミノ酸は、本発明の抗TNF抗体、そのフラグメントおよびその領域部分により結合されたTNFのエピトープを提供するために結合され、その結合は抗TNF生物学的活性を提供する。そのようなエピトープは、少なくとも1 - 5分子のアミノ酸および22未満のアミノ酸を含むか、または

50

残基 59 - 80 および 87 - 108 の各々のアミノ酸を含み、それらは少なくとも 5 分子長のアミノ酸のエピトープを形成する。

【0065】

抗 TNF 活性抗体の組み換え体の発現

アミノ酸配列中に (SEQ ID NO: 1 における) hTNF α の残基 87 - 108 または残基 59 - 80 と 87 - 108 との両方のいずれかが含まれたエピトープを結合しかつ TNF を阻害するところの、組み換え体であるネズミ抗体、またはネズミ/ヒトキメラ抗体もしくはヒト/ヒトキメラ抗体は、ここに提供された教示に基づく既知の手法を使用する本発明に従って提供される。

【0066】

本発明の抗 TNF 抗体をコードする DNA は、重鎖定常領域 (H_c)、重鎖可変領域 (H_v)、軽鎖定常領域 (L_c) および軽鎖可変領域 (L_v) の内の少なくとも一種をコードするところの、ゲノム DNA または cDNA であっても良い。ネズミの V 領域における抗原結合セグメントをコードする DNA 源としての染色体遺伝子フラグメントを使用することの外に取り得ることは、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構成のための cDNA を使用することであり、このことは Liu et al., (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 3439 (1987) および J. Immunology 139: 3521 (1987) により報告されており、その内容は参照することによってここに完全に組み込まれる。cDNA を使用するには、所望のタンパクを合成するために宿主細胞に好適な遺伝子発現要素が遺伝子と結合されることを、要する。cDNA 配列の使用には、適当な RNA スプライシング系を欠いている細菌または他の宿主中で cDNA 配列が発現されることができるという点で、(イントロンを含む)ゲノム配列を使用する以上に利点がある。

【0067】

本発明におけるネズミのキメラ抗体、フラグメントおよびそれらの領域部分の定常 (C) 領域をコードするヒト遺伝子は、ヒト胎生肝の遺伝子ライブラリーから、既知の方法により得られることができる。C 領域をコードするヒト遺伝子は、ヒト免疫グロブリンを発現し産生するものを初めとするヒト細胞から得られることができる。ヒト C_H 領域は、既知のクラス、またはガンマ、 μ 、 α 、 δ または ϵ を初めとするヒト H 鎖のイソタイプおよび G1、G2、G3 および G4 のようなヒト H 鎖のサブタイプのいずれからも得られることができる。H 鎖のイソタイプは抗体の種々のエフェクター機能に対して応答するので、C_H 領域の選択が、所望のエフェクター機能、たとえば補体結合または抗体依存性細胞障害 (ADCC) における活性によって案内される。好ましくは、C_H 領域は、ガンマ 1 (IgG4)、ガンマ 3 (IgG3)、ガンマ 4 (IgG4) または μ (IgM) から得られる。

【0068】

ヒト C_L 領域はヒト L 鎖イソタイプ、カッパまたはガンマから得られる。

【0069】

ヒト免疫グロブリンの C 領域をコードする遺伝子は、標準的なクローニング技術によってヒト細胞から得られることができる (Sambrook, J. et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) and Ausbel et al, eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987 - 1991))。ヒト C 領域遺伝子は、L 鎖の二つのクラス、H 鎖の五つのクラスおよびそれらのサブクラスを表す既知のクローンから入手される。キメラ抗体フラグメントたとえば F(ab')₂ および Fab は、適当に切り縮められたキメラ H 鎖遺伝子を設計することにより得られることができる。たとえば、F(ab') フラグメントの H 鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、C_H1 ドメインおよび H 鎖のヒンジ部分をコードし、切り縮められた分子を生成するための翻訳停止コドンを含む。

【 0 0 7 0 】

一般的には、本発明の、ネズミのまたはヒト / ネズミのキメラ抗体、フラグメントおよびその領域部分は、ネズミのまたはヒト / ネズミのキメラ免疫グロブリンをコードする遺伝子を産生するために、TNFに特異的な抗体のH鎖およびL鎖における抗原結合領域をコードするDNAをクローニングすること、およびこれらのDNAセグメントをC_H領域およびC_L領域をそれぞれコードするDNAに結合することによって産生される。

【 0 0 7 1 】

このように、好適な態様においては、結合(J)セグメントを備えた機能的に再編成されたV領域のような非ヒト起源の抗原結合領域を少なくともコードし、かつ、ヒトC領域の少なくとも一部をコードする第2DNAに結合された第1のDNAセグメントからなる融合キメラ遺伝子が創生される。

10

【 0 0 7 2 】

それ故に、抗体におけるV領域およびC領域をコードするcDNAならびに本発明におけるキメラ抗体を産生する方法は、以下の段階を含み、その概要が以下に説明される。

1. 抗TNF抗体を産生する細胞系から、および重鎖定常領域と軽鎖定常領域とを与える任意選択の付加的な抗体から、メッセンジャーRNA(mRNA)を単離し、クローニングし、cDNAを産生すること。

2. L鎖遺伝子およびH鎖遺伝子における適当なV領域遺伝子および / またはC領域遺伝子が、(i)適当なプローブで同定され、(ii)順序良く配列され(原文: sequence)、および(iii)キメラ抗体のためにその他の抗体からC遺伝子セグメントまたはV遺伝子セグメントと一致させられる、そのような精製したmRNAから全長のcDNAライブラリーを合成すること。

20

3. 上述されたように、クローニングされた特定のV領域遺伝子セグメントを、クローニングされたC領域遺伝子を結合することによって、完全なH鎖またはC鎖をコードする遺伝子が形成されること。

4. ネズミ / ネズミ、ヒト / ネズミ、ヒト / ヒトまたはヒト / ネズミ抗体を産生するための原核細胞および真核細胞を含む、選択された宿主中でL鎖およびH鎖の発現と産生が行われること。

【 0 0 7 3 】

全ての免疫グロブリンにおけるH鎖およびL鎖の遺伝子、およびそれらがコードするmRNAにおける共通の特徴は、J領域である。H鎖およびL鎖におけるJ領域は異なる配列を有するが、高度の配列相同性が(80%以上の割合で)各グループの間に、特にC領域の近傍に、存在する。この相同性はこの方法で開発され、そして、H鎖およびL鎖におけるJ領域の一致した配列が、V領域セグメントをヒトC領域セグメントにその後結合するためのJ領域に有益な制限サイトを導入するためのプライマーとして使用するための、オリゴヌクレオチドを設計するのに使用される。

30

【 0 0 7 4 】

ヒト細胞から調製されたC領域のcDNAベクターが、サイトの指定された突然変異誘発によって修飾されて、ヒト配列中の類似の位置に制限サイトを配置することができる。たとえば、完全なヒトカッパ鎖C(C_K)領域および完全なヒトガンマー1C領域(C_{gamma-1})がクローニングされることができる。この場合、C領域ベクター源としてのゲノムC領域クローンを基礎にした別の方法では、介在配列を除去するのに必要な酵素が存在しないような細菌系でこれらの遺伝子が発現されない。クローン化されたV領域セグメントが切り出され、そして、LまたはH鎖C領域ベクターに連結される。また別に、ヒトC_{gamma-1}領域が、Fab分子H鎖部分をコードする遺伝子配列をそれによって発生する停止コドンを導入することにより修飾される。結合されたV領域およびC領域を有するコード配列が、原核または真核の適当な宿主中での発現のために、適当な発現ベクター中に転移される。

40

【 0 0 7 5 】

もしもトリプレット読み枠の改変または中断なしに結合が翻訳可能な配列となっている

50

ならば、二種のコードDNA配列が「操作的に結合された」(原文: operably linked)と称される。もしも結合が、コード配列が発現するようにその遺伝子発現要素の適当な機能を有するならば、DNAコード配列が、遺伝子発現要素に、操作的に結合される。

【0076】

発現ビークルは、プラスミドまたは他のベクターを含む。これらの中でも好ましいのは、適当な付着末端を有するいかなる V_H または V_L 鎖配列もその中に挿入されることができるように設計された適当な制限サイトを有する機能的に完全なヒト C_H または C_L 鎖配列を運ぶビークルである。ヒト C_H または C_L 鎖配列含有ビークルは、どのような適当な宿主中でどのような所望の完全なHまたはL鎖の発現のための中間としても、働く。

10

【0077】

キメラ抗体、たとえばネズミノヒトまたはヒトノヒトキメラ抗体が、典型的には、形成のために使用されたネズミのHおよびL鎖V領域に備わっている染色体遺伝子プロモータにより駆動される遺伝子から合成されることができ、その場合通常、スプライシングが、ネズミのJ領域中のスプライス供与サイトとヒトC領域に先立つスプライス受容サイトとの間であり、ヒト C_H 領域内で発生するスプライス領域で、発生し、ポリアデニル化および転写停止がヒトコード領域の下流側にある生来の染色体サイトで起こる。

【0078】

cDNA遺伝子の発現のために有益である遺伝子発現要素は、(a)ウィルス性転写プロモータおよびそれらのエンハンサー要素、たとえばSV40初期プロモータ(Okayama, H. et al., Mol. Cell. Biol. 3: 280 (1983))、ラウス肉腫ウィルスLTR(Gorman, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777 (1982))、およびモロニーネズミ白血病ウィルスLTR(原文: Moloney murine leukemia virus LTR)(Grosschedl, R. et al., Cell 41: 885 (1985))、(b)スプライス領域およびポリアデニル化サイト、たとえばSV40後期領域から得られたもの(Okayama et al., 上掲書)および(c)ポリアデニル化サイト、たとえばSV40中のそれ(Okayama et al., 上掲書)を含む。

20

【0079】

免疫グロブリンcDNA遺伝子は、Liu et al., 上掲書およびWeidlee et al., Gene 51: 21 (1987)に記載されたように、発現要素として、SV40初期プロモータおよびそのエンハンサー、ネズミ免疫グロブリンH鎖プロモータエンハンサー、SV40後期領域mRNAスプライシング(原文: SV40 late region mRNA splicing)、ウサギβグロブリン介在配列、免疫グロブリンおよびウサギβグロブリンポリアデニル化サイト、ならびにSV40ポリアデニル化要素を使用して、発現されることができる。部分cDNA、部分ゲノムcDNA(Whittle et al., Protein Engineering 1: 499 (1987))を有する免疫グロブリン遺伝子のために、転写プロモータはヒトサイトメガロウィルスであり、プロモータエンハンサーはサイトメガロウィルスおよびネズミノヒト免疫グロブリンであり、また、mRNAスプライシングおよびポリアデニル化サイトは将来の染色体免疫グロブリン配列由来である。

30

40

【0080】

一つの態様において、嚙歯類細胞中のcDNA遺伝子の発現のために、転写プロモータはウィルス性LTR配列であり、転写プロモータエンハンサーはマウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーおよびウィルス性LTRエンハンサーのいずれかまたは両方であり、スプライス領域は31bp以上のイントロンを含有し、ならびに、ポリアデニル化領域および転写終結領域は、合成される免疫グロブリン鎖に相当する生来の染色体配列に由来される。他の態様においては、他のタンパクをコードするcDNA配列は、哺乳類細胞中でタンパクの発現を達成するために、上に引用された発現要素に結合される。

【0081】

50

各融合遺伝子が発現ベクター中で組み立てられ、あるいはそれに挿入される。キメラ免疫グロブリン鎖遺伝子産物を発現することのできる宿主細胞が、キメラHまたはL鎖コード遺伝子で形質移入（トランスフェクション）され、あるいは、キメラH鎖遺伝子およびキメラL鎖遺伝子で同時形質移入される。トランスフェクトされた宿主細胞が、組み込まれた遺伝子が発現するような条件下に培養され、発現した免疫グロブリン鎖または無傷の抗体またはフラグメントが培地から回収される。

【0082】

一つの態様において、キメラH鎖またはキメラL鎖をコードする、またはそれらのタンパクをコードする融合遺伝子が、宿主細胞を同時形質移入するために使用される分離した発現ベクター中で組み立てられる。

10

【0083】

各ベクターは二種の選択可能な遺伝子を含有していても良く、第1の選択可能な遺伝子は細菌系内での選択のために設計され、第2の選択可能な遺伝子は真核生物系内での選択のために設計され、いずれのベクターも相違する一対の遺伝子を有する。この方法は、細菌系内で融合遺伝子を産生し、それを増殖させるベクター内で行われる。細菌宿主内でそのように産生し増殖された遺伝子は、真核細胞を同時トランスフェクトし、所望のトランスフェクトされた遺伝子を有する同時トランスフェクトされた細胞の選択をするために引き続き使用される。

【0084】

細菌系内での使用のための選択可能な遺伝子の例として、アンピシリンに対する耐久性を付与する遺伝子、およびクロラムフェニコールに対する耐久性を付与する遺伝子がある。真核生物系形質移入体（原文：eukaryotic transfectant）中での使用のための好適な選択可能な遺伝子は、キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（省略名は g p t）およびTn5由来のトランスフェラーゼ遺伝子（省略名は n e o）を含む。g p tを発現する細胞の選択は、この遺伝子によってコードされた酵素はプリンヌクレオチド合成のための基質としてキサンチンを使用するが類似の内生の酵素はそうではないという事実に基づく。（1）イノシン酸（原文：inosine monophosphate）をキサンチン酸（原文：xanthine monophosphate）に変換するのを遮断するマイコフェノール酸（原文：mycophenolic acid）、および（2）キサンチンを含有する培地中で、g p t遺伝子が発現する細胞のみが生き残る。n e oの産生物は、構成物質G418およびネオマイシンク拉斯の他の構成物質により、タンパク合成の障害を遮断する。

20

30

【0085】

二種の選択手法が、二種の相違するDNAベクターで真核生物細胞中に導入された免疫グロブリン鎖遺伝子の発現を選択するために、同時にまたは連続的に使用されることができる。真核生物細胞のために、相違する選択可能なマーカーを含むことは必要ではなく、それぞれが選択可能なベクターを含有しているH鎖ベクターおよびL鎖ベクターが、同時トランスフェクトされる。適正な耐久性を有する細胞を選択した後に、大多数のクローンが、H鎖ベクターおよびL鎖ベクターの両方が一体となった複製を含んでいる。

【0086】

また、キメラHおよびL鎖をコードする融合遺伝子は、同じ発現ベクターで組み立てられることができる。

40

【0087】

発現ベクターおよびキメラ抗体の産生のために、好適な宿主細胞系はミエローマ細胞である。ミエローマ細胞は、トランスフェクトされた免疫グロブリン遺伝子によりコードされた免疫グロブリンを合成し、組み立て、そして分泌することができ、免疫グロブリンのグリコシル化のための機作を有する。特に好適な宿主細胞は、Ig非産生ミエローマ細胞SP2/0（ATCC#CRL8287）である。SP2/0細胞は、トランスフェクトされた遺伝子によりコードされた免疫グロブリンのみを産生する。ミエローマ細胞は、培地中またはマウスの腹腔中で成長することができ、そのような培地または腹腔中で、分泌

50

された免疫グロブリンが腹水液から得られることができる。他の適当な宿主細胞は、リンパ球細胞たとえばヒトまたは非ヒト起源のBリンパ球、ヒトまたは非ヒト起源のハイブリドーマ細胞、または種間ヘテロハイブリドーマ細胞を含む。

【0088】

本発明のキメラ抗体の構造を運ぶ発現ベクターは、トランスフォーメーション、トランスフェクション、接合、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈澱法、およびジエチルアミノエチル(DEAE)デキストランなどのポリカチオンの投与のような生物化学的手段、ならびにエレクトロポレーション、ダイレクトマイクロインジェクションおよびマイクロプロジェクトイルボンバードメント(原文; *microparticle bombardment*) (*Johnson et al., Science* 240: 1538 (1988))のような機械的手段等の種々の好適な方法によって、適当な宿主細胞に導入される。リンパ系細胞にはエレクトロポレーションによってDNAを導入するのが好ましい(*Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7161 (1984); *Yoshikawa, K. et al., Jpn. J. Cancer Res.* 77: 1122 - 1133)。この方法においては、組み込むDNAの存在下に受容体細胞を電気パルスにさらす。一般的には、トランスフェクションの後に、細胞を完全培地中で約24時間回復させる。次いで、選択培地の存在下に96穴カルチャープレートに植え付ける。G418セクションは、約0.4から0.8 mg/mlのG418を用いて行われる。ミコフェノール酸セクション(原文; *mycophenolic acid selection*)は6 µg/mlのミコフェノール酸と約0.25 mg/mlのキサンチンとを使用する。エレクトロポレーション技術は、Sp2/0細胞に対して約 10^{-5} から約 10^{-4} の割合でトランスフェクション頻度をもたらすと期待される。プロトプラスト融合法では、リゾチームは、キメラ抗体遺伝子を有する組み換えプラスミドを包含しているカタルから、細胞壁を除去する。結果として得られるスフェロプラストは、ポリエチレングリコールでミエローマ細胞と融合される。

【0089】

本発明の免疫グロブリン遺伝子は、哺乳動物の非リンパ系細胞中、酵母のような他の真核細胞中、原核細胞中または特定のバクテリア中で、発現し得る。

【0090】

免疫グロブリンのH鎖およびL鎖を製造するという点で、酵母はバクテリアよりかなり有用である。酵母は、糖鎖形成を含む翻訳後のペプチド修飾を行う。今日では、強力なプロモーター配列と、酵母中で所望の蛋白を生産するために用いることのできる高複製数のプラスミドとを使用するDNA組換え方法が多数存在している。酵母は哺乳動物のクローン遺伝子生産物のリーダー配列を認識し、リーダー配列を生じさせるペプチド(即ち、ブレペプチド)を分泌する(*Hitzman, et al., 11th International Conference on Yeast, Genetics and Molecular Biology, Montpellier, France, September 13 - 17, 1982*)。

【0091】

酵母の遺伝子発現システムを用いると、キメラH鎖およびL鎖蛋白、ならびに組み込まれたマウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域の製造、分泌および安定性の程度を評価することができる。酵母がグルコースに富んだ培地で培養されたときに大量に生産される解糖酵素をコードする活性発現遺伝子から、プロモーターと終結要素とを組み込むという遺伝子発現システムの酵母であれば、いかなるシリーズのものも使用することができる。公知の解糖遺伝子も非常に効率的な転写調節信号を与えることができる。例えば、ホスホグリセレートキナーゼ(PGK)遺伝子のプロモーターおよびターミネーター信号を利用することができる。酵母中でクローン免疫グロブリンcDNAを発現するのに最適な発現プラスミドを評価するにあたっては数多くの取り組みがなされている(*Glover, D.M., ed., DNA Cloning, Vol. II, pp 45 - 66, IRL Press, 1985*を見よ)。

【0092】

細菌株も、本発明で記述する抗体分子または抗体フラグメントの製造のホストとして使用することができる。E. coli W3110 (ATCC 27325) のような E. coli K12 株、サルモネラ ティフィムリウム (原文; *Salmonella typhimurium*) もしくはセラティア マルセシエンス (原文; *Serratia marcescens*) のような他のエンテロバクテリア、および様々なシュードモナス (原文; *Pseudomonas*) 種を用いることができる。

【0093】

宿主細胞と適合性のある種から得られるレプリコンおよびコントロール配列を有するプラスミドベクターは、これらの細菌性宿主に関連して使用することができる。該ベクターは、トランスフォームされた細胞中で表現型の選択を提供することのできる特定の遺伝子は勿論のこと、複製部位も運ぶことができる。マウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域の産生、または細菌中でクローンされた免疫グロブリン cDNA によってコードされた抗体鎖の産生に関して、発現プラスミドを評価する数多くの試みがなされている (Glover, D.M., ed., DNA Cloning, Vol. I, IRL Press, 1985 を見よ)。

10

【0094】

好ましい宿主は、生体内で (原文; *in vivo*) もしくは生体外で (原文; *in vitro*) で成長した哺乳動物の細胞である。哺乳動物の細胞は、免疫グロブリン蛋白分子に対して、翻訳後に、リーダーペプチドの除去、H鎖およびL鎖の折り畳みと組立、抗体分子の糖鎖形成および機能性抗体蛋白の分泌等の修飾を行う。

20

【0095】

上記のリンパ球系起源の細胞に加えて、抗体蛋白を製造するための宿主として有用な哺乳動物の細胞は、ベロ (原文; *Vero*) (ATCC CRL 81) または CHO-K1 (ATCC CRL 61) のような繊維芽細胞起源の細胞を含む。

【0096】

哺乳動物の細胞では、クローンされたHおよびL鎖の発現に多くのベクター系を使用することができる (Glover, D.M., ed., DNA Cloning, Vol. II, pp 143 - 238, IRL Press, 1985 を見よ)。引き続き異なる方法を行うことにより、完全な H_2L_2 抗体を得ることができる。上で議論したように、同じ細胞内で、H鎖とL鎖とを共発現させて、H鎖とL鎖との細胞内会合および結合から完全な四量体の H_2L_2 抗体を達成することができる。該共発現は、同じ宿主内で、同じもしくは異なるプラスミドを使用することによって起こすことができる。H鎖とL鎖との両方の遺伝子は同じプラスミドに入れることができ、次いで該プラスミドを細胞にトランスフェクトし、それによって、両鎖を発現する細胞を直接的に選択する。他の方法としては、片方の鎖、例えばL鎖をコードしたプラスミドで細胞を最初にトランスフェクトし、次いで、得られた細胞系を第2の選択可能なマーカーを有するH鎖プラスミドでトランスフェクトする。いずれかの方法によって H_2L_2 分子を製造する細胞系は、さらに他の選択マーカーと接続したH鎖、L鎖およびHプラスL鎖の複製をコードするプラスミドでトランスフェクトされて、組み立てられた H_2L_2 抗体分子の生産が高度化する、もしくはトランスフェクトされた細胞系の安定性が増すなどの、優れた特性を有する細胞系を産生する。

30

40

【0097】

モノクローナルまたはキメラ抗TNF抗体に加えて、本発明は、本願の抗TNF抗体に特異的な抗イディオタイプ (以下、「抗Id」と略すことがある) 抗体にも関するものである。一般に、抗Id抗体は、他の抗体の抗原結合領域に関連する特有の決定基を認識する抗体である。TNFに特有の抗体が、イディオタイプあるいはId抗体と名付けられる。抗Idは、同種および遺伝子型が同じである (例えば、マウス菌株) 動物をId抗体源とし、該動物をId抗体もしくはその抗原結合領域で免疫感作することによって調製することができる。免疫感作された動物は、その動物を免疫感作した抗体のイディオタイプ決

50

定基を認識して反応し、抗 I d 抗体を製造する。該抗 I d 抗体はさらに他の動物に免疫反応を起こさせ、抗 - 抗 I d 抗体を製造させる「免疫原」としても用いることができる。抗 - 抗 I d は、その抗原決定基が前記抗 I d を誘起した元々の抗体と全く同じである可能性がある。このように m A b のイディオタイプ決定基への抗体を用いることによって、特異性が全く同じである抗体を発現する他のクローンを同定することが可能である。

【 0 0 9 8 】

したがって、本発明の T N F に抗して生成した m A b s は、B A L B / c マウスのような適切な動物内において、抗 I d 抗体を誘起するのに用いることができる。免疫感作された B A L B / c 等のマウスから取り出した脾臓細胞は、抗 I d m A b を分泌する抗 I d ハイブリドーマを製造するのに使用することができる。さらに、得られた抗 I d m A b をキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) のようなキャリアと結び付けることもできるし、さらに他の B A L B / c マウスを免疫感作するのに用いることもできる。これらのマウスから取り出した血清は、ある T N F エピトープに特異的な元の m A b の結合特性を有する抗 - 抗 I d 抗体を含んでいるであろう。

【 0 0 9 9 】

本発明の抗体、フラグメントおよび誘導体は、抗 T N F 抗体、特に T N F と反応する物質が正常で健康な人に存するレベルを越える量で存在することに関連する疾患あるいは状態を有する患者の治療に有益である。上記の疾患としては、悪液質、循環虚脱および急性あるいは慢性の細菌感染に起因するショックを含む敗血症候群；細菌性、ウイルス性および菌性の急性および慢性の寄生虫もしくは感染性の経過 (原文 ; p r o c e s s e s) ；全身系の紅斑性狼そうおよびリウマチ様関節炎のような急性および慢性の免疫および自己免疫疾患；アルコール誘導肝炎；サイコイドーシスおよびクローン病のような慢性炎症性疾患；播種性血管内凝固症のよな血管炎症性疾患；移植片対宿主病；川崎病；および T N F - 分泌性腫瘍に関わる悪性病等を挙げることができるが、これらには限定されない。

【 0 1 0 0 】

前記治療は、抗体、フラグメントおよび誘導体の一回分または複数回分を非経口的に投与することからなる。人体用の薬剤に使用するものとして好適であるものは、本発明の、高度の親和性がある h T N F α - 阻害型および / または中和型のマウスとのキメラの抗体、フラグメントおよび領域である。

【 0 1 0 1 】

モノクローナル抗体は、哺乳動物の体内の薬剤が作用すべき位置に効力のある薬剤が届くような方法であれば、いかなる方法で投与されてもよい。本発明の抗体の場合は、モノサイトとマクロファージとから放出される T N F に到達して該 T N F と結合することができるということが重要である。蛋白は、経口で投与されると消化されやすいので、静脈注射、皮下注射および筋肉注射などの非経口投与が、通常、吸収を最大限にするために用いられる。

【 0 1 0 2 】

モノクローナル抗体は個別の治療薬剤として投与されてもよいし、他の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。モノクローナル抗体は単独で投与することもできるが、通常は、投与のルートと標準的な薬剤投与のプラクティスとに基づいて選択された薬学的キャリアと共に投与される。

【 0 1 0 3 】

言うまでもなく、投与量は、この薬剤の薬力学的性質、投与の型およびルート；患者の年齢、健康状態および体重；ならびに、症状の性質と程度、同時に行う処置の種類、処置の頻度および望まれる効果などの公知の因子に応じて変化することになる。一般的には、有効成分の一日の投与量は、体重 1 キログラム当たり約 0 . 1 から 1 0 0 ミリグラムである。一日に体重 1 キログラムに対して、通常、0 . 5 から 5 0 ミリグラム、好ましくは 1 から 1 0 ミリグラムを、1 回から 6 回に分け、あるいは持続的放出の形態で投与すると、望ましい結果を得るのに効果的である。

【 0 1 0 4 】

体内投与に適した投薬剤（投与組成物）は、一般的に、単位当たり約 1 ミリグラムから約 500 ミリグラムの有効成分を含有するものである。これら薬剤組成物においては、有効成分は、通常、組成物の全重量に対して 0.5 ~ 95 重量%の量で存在することになる。

【0105】

非経口投与用に、前記抗体は、薬剤として適用し得る非経口ビヒクルと共に、溶液、懸濁液、エマルジョンあるいは凍結乾燥粉末として製剤することができる。前記ビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロゼ溶液および 5% のヒトの血清アルブミンを挙げることができる。リポソームや固定オイルのような非水性ビヒクルも使用することができる。ビヒクルあるいは凍結乾燥粉末は等張性（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性（例えば、緩衝液および防腐剤）を維持するための添加剤を含んでもよい。得られた製剤を通常使用されている方法によって滅菌する。

10

【0106】

好適な薬剤キャリアは、この分野において標準的な参考文献である A. Osol 著の「レミントンズ ファーマスーティカルサイエンス（原文；Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol）」の最新版に記載されている。

【0107】

例えば、注射による投与に好適なある非経口組成物は、0.9%の塩化ナトリウム溶液に 1.5 重量%の有効成分を溶解して調製する。

20

【0108】

本発明の抗体は、表面に TNF が結合した細胞に対する抗体依存性細胞障害作用（ADCC）および/または補体依存性細胞障害作用（CDC）を媒介する（mediate）作用を有するので、効力ある治療薬として好適である。上記作用には、エフェクター細胞の内性源（原文；endogenous source）または外性源（原文；exogenous source）のいずれか（ADCC に対する）、あるいは、補体成分（CDC に対して）を利用することができる。本発明のマウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域、それらのフラグメントおよび誘導体は、免疫接合体として治療に用いることができる（Dilman, R. O., Ann. Int. Med. 111: 592 - 603 (1989) を参照）。本発明のマウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域、それらのフラグメントおよび誘導体は、リチン-A、シュードモナストキシン、ジフテリトキシンおよび TNF 等の（限定はされない）細胞毒蛋白と結び付けることができる。抗体または他の配位子に接合した毒は、この分野では公知である（例えば、Olsnes, S. et al., Immunol. Today 10: 291 - 295 (1989) を参照）。植物および細菌の毒は、一般に、蛋白合成機構を破壊するものである。

30

【0109】

本発明の抗体は、放射性核種、細胞毒性剤および薬剤を含む（限定はされない）その他の型の治療薬と接合させることができる。抗体と結合することができ、生体外での抗原の位置に送ることができる放射性核種の例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹⁸⁶Re および ⁹⁰Y を挙げることができるが、これらは完全に研究されたものではない。放射線治療の技術分野で知られていることであるが、放射性核種は細胞に局部的に細胞毒の照射を行い様々な細胞内外傷をもたらすことによって、細胞毒性効果を作用させる。

40

【0110】

抗体と接合して、次いで生体外で治療に用いることのできる薬剤としては、ダウノルビシン（原文；daunorubicin）、ドクソルビシン（原文；doxorubicin）、メトトレキサート（原文；methotrexate）およびマイトマイシン C（原文；Mitomycin C）を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。細胞毒性薬剤は、DNA、RNA および蛋白の合成を含む細胞の重要なプロセスを阻害する。この分野で知られているこのクラスの薬剤のより完全な説明と作用のメカニズムとに関しては、Goodman, A. G., et al., Goodman and

50

d Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THE THERAPEUTICS, 7th Ed., Macmillan Publishing Co., 1985を参照。

【0111】

本発明の抗体は、他のモノクローナルまたはマウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域、または、リンフォカインまたは造血成長因子などと結び付けると、効果的に使用することができる。このように結び付けることにより、抗体と相互作用するエフェクター細胞の活性または数を増加させることができる。

【0112】

本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体は、TNFの好ましくない副作用を妨げるために、TNFによる治療と組み合わせて使用してもよい。癌治療の最近のアプローチは、癌患者へのTNFの直接投与、または癌患者へのリンフォカイン活性化キラー細胞(LAK)(Rosenberg et al., New Eng. J. Med. 313:1485-1492 (1985))もしくは腫瘍浸潤リンフサイト(TIL)(Kurnick et al. (Clin. Immunol. Immunopath. 38:367-380 (1986); Kradinet al., Cancer Immunol. Immunother. 24:76-85 (1987); Kradinet al., Transplant. Proc. 20:336-338 (1988))による免疫治療等である。現在、修飾されたLAK細胞もしくはTNF遺伝子でトランスフェクトされて多量のTNFを産するようになったTILを使用した実験が進行中である。このような治療法は、TNFの上記の多面的な作用によって引き起こされる数多くの望ましくない副作用を伴いがちである。本発明によると、TNFを受容するものあるいは多量のTILを製造する細胞を、本発明の抗体、フラグメントもしくは誘導体で同時に処理することにより、このような副作用を低下させることができる。効果的な投与量は上で述べた通りである。TNFの主要な抗腫瘍効果を損ねることなく副作用をブロックするためには、投与されるTNFやTNFを産する細胞の投与量に応じて投与量レベルを調整する必要がある。当業者であれば不要な実験をすることなく、そのような投与量を決定する方法を知っている。

【0113】

固体の担体に付着した本発明のマウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域、またはそれらのフラグメントまたは誘導体は、液体または組織抽出物もしくは細胞抽出物からTNFを取り除くのに用いることができる。好ましい態様では、上記のものは血液あるいは血漿生成物からTNFを除去するのに用いられる。他の好ましい態様では、マウスとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域は、体外の免疫吸着装置で有効に利用される。このことは当該技術分野では知られていることである(例えば、Seminars in Hematology, Vol. 26 (2 Suppl. 1) (1989)を参照)。患者の血液あるいは他の被験者の液体を抗体の付着した担体に曝すと、循環するTNF(遊離であるかもしくは免疫複合体中にある)は部分的あるいは完全に除去され、次いで、TNFを除去された液体は体内に戻される。この免疫吸収は、細胞の遠心分離ステップを伴ってあるいは伴わないで、持続流方式で実施することができる。例えば、Terman, D. S. et al., J. Immunol. 117:1971-1975 (1976)を参照。

【0114】

本発明は、以下に述べるように、検出用に標識された上記抗体、フラグメントおよび誘導体をも提供する。これらはTNF α が介在する病気であることがわかっている、あるいは、疑われている患者のTNF α を検出する診断方法に使用することができる。

【0115】

本発明の抗体は、試料中のTNFもしくは抗TNF抗体を検出あるいは定量する免疫検定に有効である。TNFの免疫検定は、一般に、選択的にTNFに結合することのできる検出用に標識された本発明の高親和性抗体の存在下で生物試料を保温し、試料に結びついた標識された抗体を検出することからなる。様々な臨床的免疫検定の手続はImmuno

10

20

30

40

50

assays for the 80's, A. Voller et al., eds., University Park, 1981に記載されている。

【0116】

したがって、本発明のこの面においては、細胞、細胞粒子または可溶蛋白を固定し得るニトロセルロースまたは他の固体担体に、抗体もしくは生物試料を添加する。該担体は適当な緩衝液で洗浄され、次いで、検出用に標識されたTNFに特異的な抗体で処理される。結合していない抗体を除去するために、固相担体は緩衝液で二度目の洗浄を受ける。前記固体担体に結合した標識の量は従来手段で検出される。

【0117】

「固相担体」あるいは「キャリア」という言葉は、抗原あるいは抗体を結合し得るあらゆる担体を示すものである。よく知られている担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱を含む。本発明の目的を考慮すると、キャリアの性質はある程度可溶か不溶性のものである。結合した分子がTNFあるいは抗TNF抗体に結合し得る限り、担体材料は実質的にあらゆる実在する構造的形状を有するものであってよい。したがって、担体の形状は、ビーズのような球形、試験管の内面あるいは棒の外面のような円筒状のものであってよい。あるいは、その表面がシートやテストストリップ等のような平面状でもよい。好ましい担体はポリスチレンビーズを含む。当業者であれば、抗体もしくは抗原を結合させるのに適当な他の多くのキャリアを知っているか、または、ルーチン試験によって抗体もしくは抗原を結合させるのに適当な他の多くのキャリアを確認することができる。

【0118】

抗TNF抗体の任意のロットの結合活性は、公知の方法に従って決定することができる。当業者はルーチン試験によって有効で最適な分析条件を各分析について決定することができる。

【0119】

TNF特異性抗体を検出用に標識することのできる方法の1つは、該抗体を酵素に結合させることによるものであり、酵素免疫分析(EIA)もしくは酵素結合免疫吸収分析(ELISA)で用いられているものである。引き続いて該酵素をその基質に曝すと、該酵素は基質と反応して、例えば、分光光度分析的手段、蛍光光度分析的手段もしくは視覚的手段によって検出することのできる化学的部分を発生する。本発明のTNFに特異的な抗体を検出用に標識するのに使用することのできる酵素は、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 δ -5-ステロイド異性化酵素、アルコール酵母脱水素酵素、 α -グリセリンリン酸脱水素酵素、リン酸トリオース異性化酵素、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、RNA分解酵素、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース6-ホスファターゼ脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼ等であるが、これらに限定されない。

【0120】

TNF特異性抗体を放射能を用いて標識することにより、放射性同位元素標識免疫測定(RIA)の使用を通じてTNFを検出することができる(例えば、Work, T. S., et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N.Y. (1978)を参照)。放射性同位体は、ガンマカウンターもしくはシンチレーション計数計を使用する手段によって、またはオートラジオグラフ法によって検出することができる。本願の目的に特に有用なアイソトープは ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^{14}C であり、好ましくは ^{125}I である。

【0121】

蛍光化合物でTNF特異性抗体に標識を付けることも可能である。蛍光性の標識が付いた抗体が適当な波長の光に曝されると、その存在を蛍光によって検出することができる。

最も一般的に使用される蛍光性ラベリング化合物には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、藻紅素、藻青紫、アロフィコシアニン（原文；*allophycocyanin*）、*o*-フタルデヒド（原文；*o-phthalaldehyde*）およびフルオレスカミン（原文；*fluorescamine*）がある。

【0122】

前記TNF特異性抗体は、 ^{152}Eu や他のランタニド元素のような蛍光発光金属を用いて検出可能に標識を付けることもできる。これらの金属はジエチレントリアミンペンタ酢酸（DPTA）もしくはエチレンジアミン-テトラ酢酸（EDTA）などの金属をキレート化する化合物を用いてTNF特異性抗体に付着させることができる。

【0123】

TNF特異性抗体は、化学発光をする化合物に結合させることによって、検出可能に標識することもできる。化学発光によって標識された抗体の存在は、化学反応の間に生じる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光ラベリング化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティックアクリディニウムエステル（原文；*theromatic acridinium ester*）、イミダゾール、アクリディニウム塩およびオキサレートエステルである。

【0124】

同様に、生物発光化合物も本発明のTNF特異性抗体、フラグメントおよび誘導体に標識を付けるのに使用することができる。生物発光は、触媒蛋白が化学発光反応の効率を増加させる生物系で発見された化学発光の一種である。生物発光蛋白の存在は発光の存在を検出することによって決定される。標識を付けるという目的に対して重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

【0125】

TNF特異性抗体、フラグメントまたは誘導体の検出は、例えば検出可能な標識が γ 線放射体である場合はシンチレーション計数計が、例えば標識が蛍光性のものである場合は蛍光光度計が必要である。酵素標識の場合は、検出には、該酵素用の基質を使用する比色法が必要である。比色法による検出では、同様に調製された基準と比較して基質の酵素反応の程度を視覚的に比較することも必要である。

【0126】

本発明の目的に対しては、上記分析で検出されたTNFが生物試料中に存在しても良い。試料としては、TNFを含有するあらゆるものを使用することができる。好ましくは、試料は、例えば血液、血清、リンパ、尿、炎症性滲出液、髄液、羊水、組織の抽出物もしくはホモジェネートなどの生物液体である。しかしながら、本発明はこれらの試料のみを使用した分析に限定されない。当業者には他の試料を使用するのに適した条件を定めることができる。

【0127】

生体内原位置の検査は、患者から組織標本を切除し、その標本に本発明の標識の付いた抗体を結合させることによってなされる。本発明においては、標識の付いた抗体（もしくはフラグメント）を生物試料に塗布またはかぶせるのが好ましい。そのようにすることで、TNFの存在だけでなく、被検組織中のTNFの分布も決定することができる。本発明を利用して、多岐に渡る組織学的方法（染色法などの）のいかなるものも上記生体内原位置の検査を行うのに適宜変更し得ることを、当業者は理解するであろう。

【0128】

本発明の抗体、フラグメントもしくは誘導体は、「ツーサイト（原文；*two-site*）」または「サンドウィッチ（原文；*sandwich*）」分析としても知られている免疫測定分析において利用することができる。典型的な免疫測定分析においては、多量の標識されていない抗体（あるいは抗体のフラグメント）は被検液体に不溶の固体担体に結合しており、検出用に標識されている一定量の可溶抗体が固相の抗体、抗原および標識された抗体で形成された三元複合体の検出および/または定量をすべく添加される。

【0129】

一般的で好ましい免疫測定分析の1つとして、固相と抗体TNFとの二元複合体の形成による試料からTNFを抽出するために、前記固相に結合している抗体を最初に被検試料に接触させる「フォワード（原文；forward）」分析を挙げることができる。該分析においては、適当な時間保温した後に、固体担体は、もし存在すれば未反応TNFを含有する液体試料の残さを除去するために洗浄され、次いで、公知の量の標識された抗体（「レポーター分子」として機能する）を含有する溶液と接触させられる。標識されていない抗体を通して固体担体に結合しているTNFと標識された抗体との複合体を形成するための2度目の保温を経て、未反応の標識された抗体を除去するために、固体担体は2度目の洗浄を受ける。このタイプの「フォワードサンドウィッチ（原文；forward sandwich）」は、TNFが存在するかどうかを決定する単純な「イエス/ノー」分析か、予めわかっている量のTNFを含有している標準試料について得られた測定値と標識された抗体の測定値とを比較することによって定量的になされるものである。このような「ツーサイト（原文；two-site）」または「サンドウィッチ（原文；sandwich）」分析については、Wideが論文を書いている（Radioimmune Assay Method, Kirkham, ed., E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970, pp. 199 - 206）。

10

20

30

40

50

【0130】

他のタイプの「サンドウィッチ（原文；sandwich）」分析であって、やはりTNFに関して有用であるものは、いわゆる「同時（原文；simultaneous）」分析と「リバーズ（原文；reverse）」分析である。同時分析は保温ステップが1段であり、そのステップでは、固体担体に結合した抗体と標識が付いた抗体との両方を同時に被検試料に添加する。保温が終了すると、固体担体は液体試料の残渣と複合体を形成していない標識の付いた抗体とを除去するために洗浄される。固体担体と結合した標識の付いた抗体の存在は、従来の「フォワード」サンドウィッチ（原文；“forward” sandwich）分析と同様に決定される。

【0131】

「リバーズ（原文；reverse）」分析においては、最初に標識の付いた抗体の溶液を流体試料に段階的に添加し、次いで、適当な保温時間を経た後に、固体担体に結合した標識の付いていない抗体を添加する、という方法が使用される。2度目の保温の後に、被検試料の残渣と未反応の標識が付いた溶液とを除去するために従来法で固相を洗浄する。固体担体に結合した標識の付いた抗体の測定は「同時（原文；simultaneous）」分析および「フォワード（原文；forward）」分析と同様に行う。一態様として、個々のエピトープに特異的な本発明の抗体を組み合わせによって、感度の良い3サイト（原文；three-site）免疫放射測定分析を構成することができる。

【0132】

今まで一般的に発明を記述してきたが、説明の為のみに本願に含まれ、そうでない旨の記載がない限り本発明を限定することのない具体的な実施例を参照することによって、本発明はさらに理解されるであろう。

【実施例】

【0133】

実施例 I

マウス抗ヒトTNFモノクローナル抗体の生産

TNFモノクローナル抗体の臨床研究を容易にするために、A2と呼ばれる、阻害および/または中和能のある高親和性のマウス抗ヒトTNF免疫グロブリンG1モノクローナル抗体が生産された。10週齢のBALB/c雌マウスは、ジャクソン・ラボラトリー社（バー・ハーバー）から得られた。0.4ml中に完全フロイント・アジュバント（ディフコ・ラボラトリーズ社から得られた）の40μgと共に乳剤化される、精製されたE. Coli由来組換えヒトTNFの40μgが、マウスの皮下および腹腔（以下、i.p.と称することがある。）に注射された。一週間後、アジュバントを含まないTNFの10μgが連続4回腹腔に注射された後、不完全フロイント・アジュバント中に含まれるrh

TNFの5 µgが腹腔に注射された。最後の注射から8週間後、マウスは、TNFの10 µgで腹腔に追加免疫された。

【0134】

4日後、マウスは犠牲にされ、その脾臓が得られ、脾細胞の懸濁液が調製された。脾細胞は、30%ポリエチレングリコール、PEG1450の0.3 ml中で、非分泌性ハイブリドーマの細胞であるSp2/0 (ATCC CRL 1581)と、脾細胞とSp2/0との比が4:1で融合された。37℃で6時間の培養後、融合細胞は、 2×10^4 個のSp2/0細胞/ウエルの濃度で、96穴プレート中に0.2 mlのアリクオットに配分された。 5×10^4 個の正常BALB/c脾細胞が、各ウエルに添加された。

【0135】

使用される増殖培地は、熱不活性化された10%の子ウシ血清（ヒクロン（HyClone）社）、0.1 mMのMEM非必須アミノ酸、1 mMのビルビン酸ナトリウム、2 mMのL-グルタミン、100 U/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン（ギブコ・ラボラトリーズ社）、および選択のためのヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン（以下、HATと称することがある。）（ベーリンガー・マンハイム社）を含有するRPM1-1640培地からなる。

【0136】

固相ラジオイムノアッセイ（以下、RIAと称することがある。）は、rhTNFαに特異的なモノクローナル抗体の存在する上清をスクリーニングするのに用いられた。このアッセイについては、以下の実験2において詳述される。このアッセイにおける結合のバックグラウンドは、約500 cpmであった。上清は、2000 cpm以上の結合を生じたならば陽性とみなされた。

【0137】

スクリーンされた322の上清の内の25が、RIAにより陽性を示した。これら25の内、結合の値が最高（4800 cpm）であった1つは、A2と名付けられた。陽性を示すウエルは、添加されたマウス細胞に限界希釈された状態でサブクローンされた。中和アッセイにおける前記上清の更なる分析に関して、A2は、阻害および/または中和活性を示す唯一の陽性クローンとして発見された。このように、ハイブリドーマ系A2が選択された。この系は、10%の子ウシ血清（ギブコ・ラボラトリーズ社）、0.1 mMの非必須アミノ酸、1 mMのビルビン酸ナトリウム、2 mMのL-グルタミン、100 U/mlのペニシリン、および100 µg/mlのストレプトマイシンを含有するRPM1-1640培地中に保存された。

【0138】

TNFの生物活性を阻害する抗TNF抗体は、上述したように、rTNFタンパクの代わりに用いられる、TNF（SEQ ID No. 1の）の87~108のアミノ酸残基あるいは59~80および87~108の両アミノ酸残基、あるいはその中に含まれるペプチド結合の組合せにおける、少なくとも5つのアミノ酸を含むペプチドへの結合によって、選択的にスクリーニングされ得る。

【0139】

実施例 I I

この発明における抗TNF抗体の特長

A. ラジオイムノアッセイ

E. coli由来のrhTNFは、pH 9.6のBCB緩衝液中に1 µg/mlの濃度に希釈され、この溶液の0.1 mlが各アッセイウエルに添加された。4℃で一昼夜培養した後、各ウエルは、BCBで簡単に洗浄され、それから37℃で1時間、BCB中の1%ウシ血清アルブミン（以下、BSAと称することがある。）でシールされた。各ウエルは、それから0.05%ツイーン-20を含有するPBS（以下、PBS-Tweenと称することがある。）で3回洗浄され、希釈されたA2腹水の70 µlが、各ウエルに添加された。各ウエルは、37℃で2時間培養され、PBS-Tweenで3回洗浄された。その後、1%BSAを含有するPBS-Tweenの50 µl中に含まれる、 ^{125}I で

10

20

30

40

50

標識された、ヒツジ抗マウスIg抗体のF(a b') 2フラグメントのおよそ50,000 c p mが、各ウエルに添加され、各ウエルは、更に37 で2時間培養された。各ウエルは、各々PBS - Tweenで4回洗浄され、切り離され、計数された。2つの測定の結果が図1に示されている。

【0140】

PBSに含まれる5 μ g / m l の r h T N F は、60 で加熱された。種々の時点における加熱処理されたT N F 試料のアリクオットが、迅速に4 に冷却され、B C B 中で5倍に希釈され、R I A マイクロプレートウエルをコートするのに使用された。R I A は、上述した通りに行われた。2つの測定の結果が図2に示されている。60 での培養は、h T N F α の生物活性を実質上低下させたので、この実験は、A 2 モノクローナル抗体は熱不活性化ヒトT N F α には結合できないことを示している。

10

【0141】

B . 中和アッセイ

A 2 および c A 2 の試料は、プロテインA・アフィニティー・クロマトグラフィーにより、C 1 3 4 A、C 1 6 8 A (上述) とそれぞれ呼ばれる細胞系のハイブリドーマ組織培養上清から精製され、p H 7 . 2 のリン酸緩衝生理食塩水 (以下、P B S と称することがある。) でダイアフィルトレーションされた。

【0142】

一定の腫瘍細胞系におけるT N F の細胞障害作用は、実験試料および生体液中における i n v i t r o でのT N F レベルと適合する。T N F 感受性標的細胞A 6 3 7 (ヒト横紋筋腫細胞系) を用いる、J . I m m u n o l . 1 4 3 : 3 5 1 7 - 3 5 2 3 (1 9 8 9) に記載の A d e r k a e t a l . により改良された、J . I m m u n o l . 1 3 8 : 6 3 5 - 6 4 0 (1 9 8 7) に記載の F e i n m a n e t a l . のアッセイ法は、T N F の細胞障害作用を阻害あるいは中和するA 2 の能力を研究するのに用いられた。

20

【0143】

培養されたヒトA 6 7 3 / 6 細胞は、39 で一昼夜、20 μ g / m l のシクロヘキシミドの存在下、種々の濃度のモノクローナル抗体A 2 と、ナチュラル (原文 ; n a t u r a l) のヒトT N F α (ジェンザイム社、ボストン、MA) あるいは組換えヒトT N F α (サントリー (株)、大阪、日本) の40 p g / m l と共に培養された。対照には、各ウエルにおいて、培地のみ、あるいは培地とT N F とを含有するものを用いた。細胞の死は、ナフトール・ブルー・ブラックで染色することにより測定され、その結果が、630 n m の波長で光学的に測定された。この波長での吸光度は、現存する生細胞数と相関する。

30

【0144】

線量依存法において、A 2 は、天然および組換えヒトT N F の両方の細胞障害作用を阻害あるいは中和したことがわかった (図3) 。

【0145】

他の実験において、この阻害および / または中和活性の特異性が試験された。A 6 7 3 / 6 細胞は、T N F のバイオアッセイの前に、 3×10^4 細胞 / ウエルの割合で20時間種培養された。r h T N F、E . c o l i 由来組換えヒトリンホトキシン (T N F β)、および E . c o l i 由来組換えネズミT N F の2倍系列希釈液が、調製された。A 2 ハイブリドーマ上清は、希釈されたT N F 試料液に等量添加され、その混合物は室温で30分間インキュベートされた。0 . 1 m l のアリクオットは、A 6 7 3 / 6 細胞を含むウエルに移され、シクロヘキシミドの20 μ g / m l が添加され、細胞は39 で一昼夜培養された。細胞は、それから固定され、細胞障害作用の評価のために染色された。結果は、A 2 モノクローナル抗体は、ヒトリンホトキシン (T N F β) (図4) あるいはネズミT N F (図5) に作用しないが、r h T N F の細胞障害作用を特異的に阻害あるいは中和したことを示している。

40

【0146】

次に、A 2 モノクローナル抗体の非ヒト霊長類由来のT N F との交叉反応性を分析するため、実験が行われた。

50

B 5 1 4 (ヒビ)、J 9 1 (カニクイザル)、および R H 3 8 3 (アカゲザル) の血液からフィコール比重差遠心により分離された単球は、T N F 生産を誘導するため、3 7 で3時間あるいは16時間、5 % F B S および $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ の E . c o l i L P S を含む R P M 1 1 6 4 0 培地中で、 1×10^5 細胞 / ウェルの割合で培養された。同じウェルからの各上清は、上述の A 6 7 3 / 6 細胞を用いる T N F のバイオアッセイが行われるまで、4 で20時間未満、貯蔵された。培養上清の2倍希釈液は、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の最終濃度で、培地あるいは精製された A 2 モノクローナル抗体のいずれかと共に混合され、室温で30分間インキュベートされ、そして、アリクオットは、指示細胞に移された。結果としては、A 2 モノクローナル抗体は、ヒビ、カニクイザルおよびアカゲザルの単球により生産される T N F の細胞障害作用を阻害あるいは中和していなかった。

10

【0147】

更なる実験は、チンパンジー T N F を用いて行われた。C H 5 6 3 (チンパンジー) の血液から分離された単球は、上述のように、T N F を含有する上清を生成するために培養された。これらの上清の生物活性を阻害あるいは中和する A 2 モノクローナル抗体の $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の能力は、上記のようにアッセイされた。ヒト T N F は、ポジティブ・コントロールとして使用された。図6に示されるように、結果としては、A 2 モノクローナル抗体は、ヒト T N F に対する活性能(図7)に類似した、チンパンジー T N F に対する阻害および/または中和活性能を有していた。

【0148】

A 2 モノクローナル抗体の阻害および/または中和活性は、T N F - 1、T N F - 2 および T N F - 3 と名付けられたヒト T N F に特異的な他の3つのネズミモノクローナル抗体、およびコントロール用モノクローナル抗体と比較された。精製されたモノクローナル抗体の2倍系列希釈液は、r h T N F ($40 \mu\text{g} / \text{ml}$) と共に混合され、室温で30分間インキュベートされ、そして、アリクオットは、上述のように T N F 生物活性について試験された。T N F - 1、T N F - 2、および T N F - 3 の各モノクローナル抗体は、類似した適度の阻害および/または中和活性を有していたことがわかった。対照的に、A 2 モノクローナル抗体は、より高い阻害および/または中和活性能を有していた。

20

【0149】

実施例 I I I

抗体の V および C 遺伝子をクローニングするための一般的な方法

30

上述の抗 T N F 抗体を分泌する A 2 ハイブリドーマからの H 鎖および L 鎖遺伝子についての V 領域をクローニングするための方法は、機能的に再編成される(および発現される) I g 遺伝子についての、V 領域および対応する J 領域間のゲノムにおける連結に基づいて行われた。J (結合) 領域の D N A プローブは、J 領域にリンクされる D N A を分離するため、ゲノム・ライブラリーをスクリーンするのに用いられた。生殖細胞系の配列における(すなわち、未再編成された) D N A は、J プローブにハイブリッド化するにもかかわらず、この D N A は、I g の V 領域のシークエンスにリンクせず、分離されたクローンの制限酵素分析により同定され得る。

【0150】

ここで用いられるクローニング法は、J_H および J_K プローブを用いて、再編成された H 鎖および L 鎖遺伝子由来の V 領域を分離する方法である。これらのクローンは、ノーザンブロッティングにより A 2 ハイブリドーマ中にこれらのシークエンスが発現されるかどうかを観察するために試験された。発現されたシークエンスを含むこれらのクローンは、ヒト C 領域を含む発現ベクター中にクローンされ、抗体が生産されるかどうかを測定するため、マウス骨髄腫細胞にトランスフェクトされた。細胞が生産した抗体は、その後、結合の特異性について試験され、ネズミ A 2 抗体と機能的に比較された。

40

【0151】

実施例 I V

L 鎖ゲノム・ライブラリーの構築

A 2 ハイブリドーマからの L 鎖の V 領域遺伝子を分離するため、大きさの選択されたゲ

50

ノム・ライブラリーは、 λ ファージベクターシャロン（原文；Charon）27を用いて構築された。高分子量DNAが、A2ハイブリドーマ細胞から分離され、制限エンドヌクレアーゼHindIIIで完全に切断された。DNAは、それから0.8%アガロースゲル上で分画され、およそ3 kb、4 kbおよび6 kbという3つの異なる大きさのDNAフラグメントが、電気泳動によりゲルから分離された。ライブラリー構築についての大きさの範囲は、サザンブロッティングにおいてJ κ プローブとハイブリッド化したHindIIIフラグメントの大きさに基づいて選択された。フェノール/クロロホルム溶出およびエタノール沈澱の後、同じ大きさのクラスからのDNAフラグメントは、 λ シャロン（原文；Charon）27のアームと結合され、ストラタジーン社からの得たギガバック・ゴールドを用いて*in vitro*でファージ粒子中にパッケージされた。

10

【0152】

これらのライブラリーは、 ^{32}P 標識されたJ κ プローブを用いて、およそ20,000ブラック/150 mmペトリ皿の密度で直接的にスクリーンされた。マウスのL鎖のJ κ プローブは、全5つのJ κ セグメントを含む2.7 kbのHindIIIフラグメントであった。そのプローブは、ベーリンガー・マンハイム社から得られたキットを用いて、ランダム・プライミング（random priming）により ^{32}P で標識された。フリーなヌクレオチドは、セファロースG-50カラムを通じて遠心分離により除去された。そのプローブの特異的な活性は、およそ 10^9 cpm/ μg であった。

【0153】

ブラック・ハイブリダイゼーションは、5倍濃度のSSC、50%ホルムアミド、2倍濃度のデンハルト（Denhardt）溶液、および42℃で18~20時間変性された200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子DNAの系において行われた。最終の洗浄は、65℃で0.5倍濃度のSSCおよび0.1%のSDSを用いて行われた。ポジティブクローンは、オートラジオグラフィーの後に同定された。

20

【0154】

実施例 V

H鎖ゲノム・ライブラリーの構築

A2のH鎖についてのV領域遺伝子を分離するため、ゲノム・ライブラリーが、 λ gt10ベクター系において構築された。高分子量のDNAは、制限エンドヌクレアーゼEcoRIで完全に切断され、およそ7.5 kbのフラグメントが、アガロースゲル電気泳動後に分離された。これらのフラグメントは、 λ gt10アームと共に結合され、ギガバック・ゴールドを用いて*in vitro*でファージ粒子中にパッケージされた。

30

【0155】

このライブラリーは、J μ プローブを用いて、20,000ブラック/150 mmプレートの密度でスクリーンされた。J μ プローブは、J3およびJ4セグメントを含む、2 kbのBamHI/EcoRIフラグメントであった。

そのプローブは、実験3のように標識され、同様の比放射活性を有していた。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、実験3において用いた条件と同様とした。

【0156】

実施例 VI

TNFに特異的なV遺伝子領域のクローニング

幾つかのポジティブ・クローンが、J μ およびJ κ プローブをそれぞれ用いて、各ライブラリーからおよそ 10^6 個のブラックをスクリーニングした後に、HおよびL鎖ライブラリーから分離された。ブラック精製に続いて、バクテリオファージDNAが、各ポジティブ・クローンのために分離され、EcoRI（H鎖クローン）あるいはHindIII（L鎖クローン）で切断され、1%アガロースゲルにおいて分画された。DNAは、ニトロセルロースに移され、プロットはJ μ あるいはJ κ プローブでハイブリッド化された。

【0157】

J μ プローブにハイブリッド化した7.5 kbのEcoRI・DNAフラグメントを含んだ幾つかのH鎖クローンが得られた。L鎖ライブラリーについては、J κ プローブにハ

40

50

イブリッド化するH i n d I I Iフラグメントを含む、大きさの選択された3つの各ライブラリーから幾つかのクローンが、分離された。L鎖については、2 k bライブラリーから独自に得られた、幾つかの2 . 9 k bのH i n d I I Iフラグメントは、S P 2 / 0 m R N Aでなく、A 2からの1 2 5 0 b pのm R N Aと共にハイブリッド化した(実施例V I I参照)。加えて、4 k bのライブラリー由来の幾つかのH i n d I I Iフラグメントは、A 2 m R N Aおよび融合相手のm R N Aにハイブリッド化した。6 k bのライブラリー由来の5 . 7 k bのH i n d I I Iフラグメントは、両方のR N Aのいずれにもハイブリッド化しなかった。

【0158】

ハイブリッド化するA 2 m R N Aの観察された長さは、H鎖およびL鎖m R N Aの正確な大きさに相当した。R N A発現は、A 2ハイブリドーマに制限されたので、7 . 5 k bのH鎖フラグメントおよび2 . 9 k bのL鎖フラグメントは、A 2由来の正しいV領域シーケンスを含むと仮定された。各型についてのある実験が、更なる研究のために選択された。重要な機能の試験は、これらのV領域シーケンスが、適当なC領域シーケンスと結合したとき、ネズミA 2抗体と同様の特異性および親和性を有する抗体の合成を指示し得ることの証明である。

【0159】

7 . 5 k bのH鎖フラグメントおよび2 . 9 k bのL鎖フラグメントは、ネズミ骨髓腫細胞中のマウス/ヒト・キメラタンパクの発現を許容するプラスミド・ベクターにサブクローンされた(実施例V I I Iおよび実施例I X参照)。完全な抗体分子が分泌されるかどうか、もしそうであるならば、これらの抗体分子が適当な特異性および親和性を有するものであるかどうかを確かめるため、これらのプラスミドは、S P 2 / 0細胞中にトランスフェクトされた。対照のトランスフェクションは、推測上の抗T N F H鎖と、無関係な、しかし発現されるL鎖とを組合せることにより、また、推測上の抗T N F L鎖と、無関係な、しかし発現されるH鎖とを組合せることにより行われた。結果は、7 . 5 k bのH鎖フラグメントは発現され得るが、2 . 9 k bのL鎖フラグメントは発現され得ないことを示した。このことは、他の公知のL鎖アミノ酸シーケンスと比較したときに、コード領域の部分が、適当なアミノ酸読み枠(リーディング・フレーム)中に存在しないことを示した、D N Aシーケンス分析によって確認された。

【0160】

2 . 9 k bのH i n d I I Iフラグメントは、機能できるV遺伝子を含んでいないようであったので、L鎖ライブラリーから分離された4 . 0 k bおよび5 . 7 k bのH i n d I I Iフラグメントが、発現ベクター中にクローンされ、7 . 5 k bのH鎖とのトランスフェクションの後、キメラ抗体の発現について試験された。5 . 7 k bのH i n d I I Iフラグメントは抗体発現を支持し得るが、4 . 0 k b H i n d I I Iフラグメントは抗体発現を強く支持した。7 . 5 k bの推測上のH鎖V領域および4 . 0 k bのL鎖V領域のトランスフェクションから生じた抗体は、精製され、固相T N F結合アッセイにおいて試験され、そして不活性であることがわかった。4 . 0 k bのH i n d I I Iフラグメントに含まれるV領域は、正しい抗T N FのV領域ではなく、融合相手によってハイブリドーマに付与されたものであったと結論された。このことは、A 2ハイブリドーマおよび融合相手に由来するc D N Aのシーケンス分析によって、その後確認された。

【0161】

A 2 m R N Aとハイブリッド化した2 . 9 k bのH i n d I I Iフラグメントを含む、独自に得られた他のL鎖クローンが、より詳細に特徴づけられた。制限地図は類似していたにもかかわらず、クローンは、A c c I酵素部位の存在あるいは欠損に関し、二つのクラスに分かれた。オリジナル(機能のない)の2 . 9 k bフラグメント(クローン8 . 3と呼ばれる)には、幾つかの他のクローン(クローン4 . 3に代表される)中におけるA c c I部位が欠損していた。クローン4 . 3のD N Aシーケンスは、クローン8 . 3に極めて類似していたが、クローン8 . 3と異なる、公知のL鎖に近い相同性を有する一つのアミノ酸リーディング・フレームを含んでいた。クローン4 . 3からの2 . 9 k bのH

10

20

30

40

50

i n d I I I フラグメントは、L 鎖発現ベクター中にサブクローンされ、S P 2 / 0 細胞中に推測上の抗 T N F H 鎖と共にトランスフェクトされた。抗体は合成され、精製され、固相 T N F 結合アッセイにより試験された。この抗体は、T N F に結合した。したがって、クローン 4 . 3 の L 鎖 V 領域が、正しい抗 T N F の V 領域であると仮定された。

【 0 1 6 2 】

A 2 ネズミハイブリドーマは、再編成された少なくとも 4 つの L 鎖 V 領域遺伝子を含むことが示された。これらの内の少なくとも 2 つ、即ちクローン 4 . 3 (正しい抗 T N F の L 鎖遺伝子)、および 4 . 0 k b の H i n d I I I フラグメント (融合相手によって与えられた) 中に含まれる遺伝子は、タンパクとして発現される。2 つの L 鎖の発現は、ネズミ・ハイブリドーマから分泌された抗体は、実際には、正しい L 鎖を用いた抗体、正しくない L 鎖を用いた抗体、およびこれらを各一つずつ用いた抗体の混合物であることを意味する。ネズミ A 2 抗体における 2 つの異なる L 鎖の存在は、S D S ゲルおよび精製された抗体の N 末端タンパクシーケンス分析によって確認された。A 2 キメラ抗体の構築は、個々の H および L 鎖遺伝子のクローニング、および非生産性細胞系でのそれらの発現を含んでいるので、生じた抗体は、正しい L 鎖のみを有し、したがって、より能力の高い抗体である (実施例 X、X I および X I I 参照)。

10

【 0 1 6 3 】

実施例 V I I

クローンされた D N A のノーザン分析

A 2 ハイブリドーマからの標準の H 鎖および L 鎖 V 領域に相当する、クローンされた D N A は、A 2 m R N A にハイブリッド化することが予想される。H 鎖あるいは L 鎖の遺伝的な位置での機能をもたない D N A の再編成は、当然発現されない。

20

【 0 1 6 4 】

全細胞質 R N A の 1 0 μ g は、1 % アガロース / ホルムアルデヒド・ゲル (S a m b r o o k e t a l .) において電気泳動され、ニトロセルロースに移された。プロットは、5 0 % ホルムアミド、2 倍濃度のデンハルト (原文 ; D e n h a r d t) 溶液、5 倍濃度の S S C、および 4 2 ° で 1 0 時間変性された 2 0 0 μ g / m l のサケ精子 D N A の系において、ランダム・プライム (原文 ; r o n d o m p r i m e d) された D N A プローブと共にハイブリッド化された。最終の洗浄条件は、6 5 ° で 0 . 5 倍濃度の S S C および 0 . 1 % の S D S を用いる条件であった。

30

【 0 1 6 5 】

サブクローンされた D N A フラグメントは、ランダム・プライムによって ³² P で標識され、A 2 細胞、あるいは A 2 の融合相手である S P 2 / 0 細胞に由来の全 R N A を含むノーザン・プロットにハイブリッド化された。7 . 5 k b の E c o R I ・ H 鎖フラグメントは、S P 2 / 0 m R N A とではなく、A 2 からの 2 k b の m R N A とハイブリッド化した。同様に 2 . 9 k b の L 鎖 H i n d I I I フラグメント (クローン 4 . 3) は、S P 2 / 0 m R N A とではなく、A 2 からの 1 2 5 0 b p の m R N A とハイブリッド化した。ハイブリッド化する A 2 m R N A の観察された長さは、H 鎖および L 鎖 m R N A それぞれについての正しいサイズであった。このことは、これらの D N A フラグメントにおける V 領域配列が、A 2 ハイブリドーマ細胞中で発現されることを確証している。

40

【 0 1 6 6 】

実施例 V I I I

発現ベクターの構築

上述の推測上の L 鎖 (クローン 4 . 3) および H 鎖 V 遺伝子は、発現ベクター中においてヒト κ (原文 ; h u m a n k a p p a) および γ 1 定常領域遺伝子 (原文 ; g a m m a l c o n s t a n t r e g i o n) に連結された。A 2 からの推測上の V_H 領域遺伝子に相当する 7 . 5 k b の E c o R I フラグメントは、p A 2 H G l a p g p t と呼ばれるプラスミドを生ずる、ヒト C γ₁ 遺伝子 (原文 ; h u m a n C_{g a m m a l} g e n e) および E c o g p t 遺伝子を含む発現ベクター中にクローンされた (図 8 参照)。

50

【 0 1 6 7 】

クローン 4 . 3 からの 2 . 9 k b の推測上の V_L フラグメントは、動物細胞における分泌を許容する、ヒト $\kappa C \kappa$ 遺伝子（原文；human kappa C κ ）および E c o g p t 遺伝子を含むベクター中にクローンされた。生じたプラスミドは、p A 2 H u K a p g p t と指定された。（図 8 参照）。

【 0 1 6 8 】

実施例 I X

キメラ抗体遺伝子の発現

キメラ H 鎖および L 鎖遺伝子を発現させるため、発現プラスミドは、非生産性マウスミエローマ（骨髄腫）細胞系である S P 2 / 0 中にトランスフェクトされた。トランスフェクトされるプラスミド DNA は、エチジウムブロマイド / セシウムクロライド・グラジュエント中での 2 回の平衡遠心によって精製された。プラスミド DNA（10 ~ 50 μ g）が、ハンク塩（原文；Hank's salts）を含有する培地中の 10^7 個の S P 2 / 0 細胞に添加され、この混合物は、バイオラッド社製のエレクトロポレーション装置中に配置された。96 穴マイクロプレート中に細胞がプレートされた後、エレクトロポレーションが 20 V で行われた。

【 0 1 6 9 】

24 時間後にマイコフェノール酸（原文；Mycophenolic acids）選択が行われ、薬剤耐性細胞のコロニーは、1 ~ 2 週間後に同定された。耐性細胞のコロニーは、安定した細胞系に発展させられ、これらの細胞系からの組織培養上清が、ヤギ抗ヒト I g G $\cdot$ F_c 抗体およびアルカリホスファターゼで結合されたヤギ抗ヒト H + L（ジャクソン・ラボラトリーズ社から得られた）を用いる E L I S A アッセイにより、抗体について試験された。

【 0 1 7 0 】

キメラ A 2 抗体は、プロテイン A - セファロース・クロマトグラフィーにより組織培養上清から精製された。上清は、0 . 1 M トリス、0 . 002 M の E D T A を用いて p H 8 . 0 に調整され、同じバッファー中で平衡されたプロテイン A - セファロース・カラムに充填された。I g G は、p H 3 . 5 の 0 . 1 M クエン酸塩で溶出され、1 M トリスで阻害あるいは中和され、そして、リン酸緩衝生理食塩水（以下、P B S と称することがある。）中に透析された。

【 0 1 7 1 】

精製されたキメラ抗体は、その結合、ならびに阻害および / または中和活性について評価された。

【 0 1 7 2 】

実施例 X

抗 T N F キメラ抗体の特異性

c A 2 のドメインと結合する抗体はネズミ A 2 に由来するので、これらのモノクローナル抗体は、T N F における同じ結合部位に拮抗（競合）することが予想される。r h T N F（大日本、大阪、日本）で被覆された 96 穴マイクロプレート中で、固定された濃度のキメラ A 2 およびネズミ m A b A 2 が、増加する濃度のネズミキメラ A 2 の拮抗（競合）体で、それぞれインキュベートされた。抗ヒト免疫グロブリンと結合したアルカリ・ホスホターゼおよび抗マウス免疫グロブリン第二抗体が、それぞれ、ネズミキメラ A 2 の結合のレベルを検出するのに用いられた。T N F 抗原に対する交叉競合が、この固層 E L I S A フォーマットにおいて観察された（図 9）。この発見は、c A 2 およびネズミ A 2 の予想される同一のエピトープ特異性と矛盾していない。

【 0 1 7 3 】

マウス A 2 および c A 2 モノクローナル抗体の r h T N F α への結合についての親和定数は、スカッチャード分析（Scatchard, G., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949)）により決定された。この結果が、図 10 に示されている。この分析は、96 穴プレート中に固定された r h T N F α への、 125 I 標識された c A 2 の直接の結合を測定することを意味する。抗体は、ヨードゲン（原文；iodogen）

n) 法により約 $9.7 \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ の比活性 (原文; *Specific activity*) に各々標識された。マウス A2 モノクローナル抗体については、 $0.5 \times 10^9 \text{ l} / \text{mol}$ の親和定数 (K_a) が算出された。予想しないことに、キメラ A2 抗体は、 K_a が $1.8 \times 10^9 \text{ l} / \text{mol}$ という高い親和性を有していた。このように、この発明のキメラ抗 TNF α 抗体は、親株のネズミ A2 モノクローナル抗体のヒト TNF α への結合の親和性よりも、高く重要なヒト TNF α への結合の親和性を示すことが、証明された。ネズミとのキメラ抗体、フラグメントおよび領域は、親株のモノクローナル抗体の親和性と等しいかあるいは低い親和性を有することが予想されるので、この発見は驚くべきことであった。

【0174】

TNF α への結合の親和性が、 K_a で表すと少なくとも $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、好ましくは $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ である、このような高親和性抗 TNF 抗体は、生体液中の極微量レベルの TNF を検出するイムノアッセイに好適である。加えて、このような高親和性を有する抗 TNF 抗体は、TNF α に介在される健康状態あるいは病状の診断に好適である。

【0175】

TNF に対する cA2 の特異性は、ヒト・リンホトキシン (TNF - β) の交叉中和反応について試験することにより確認された。リンホトキシンは、幾つかの配列の相同性、および、例えば TNF による腫瘍細胞の細胞障害作用などの一定の生物活性を共有している (Pennica, D. et al., *Nature* 312: 724 - 729 (1984))。培養されたヒト A673 細胞は、39 で一昼夜、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ のシクロヘキシミドの存在下で、 $4 \mu\text{g} / \text{ml}$ のキメラ A2 を含むあるいは含まない、増加する (異なる) 濃度のヒトリンホトキシン (ジェネンテック社) と共にインキュベートされた。細胞の死は、上述のナフトール・ブルー・ブラックでの致命的な染色を行うことにより測定された。結果は、cA2 はヒト・リンホトキシンの阻害および / または中和性に影響しなかったことを示した。これは、キメラ抗体の TNF α 特異性を確認している。

【0176】

異なる動物種由来の TNF と反応する、A2 あるいは cA2 の能力がまた評価された。最初に言及したように、阻害および / または中和性のモノクローナル抗体が結合するヒト TNF に多重エピトープが存在する (Moller, A. et al.)。ヒト TNF は、宿主動物種の広い範囲において生物活性を有する。しかしながら、ヒト TNF における一定の阻害および / または中和性のエピトープは、異なる動物種間で維持されるにもかかわらず、その外は、ヒトおよびチンパンジーに限定された。

【0177】

中和反応実施例は、TNF 源として新たに分離したヒト、チンパンジー、アカゲザル、カニクイザル、ヒヒ、ブタ、イヌ、ウサギ、あるいはラットの単球からの、細胞障害活性化された細胞上清を用いた。上述したように、ネズミ A2 モノクローナル抗体は、ヒトあるいはチンパンジー TNF のみの活性を阻害あるいは中和し、その他の霊長類あるいは低級動物に由来する TNF に対する効能を有していなかった。A2 は、また、組換えマウス TNF の細胞障害作用を阻害あるいは中和しなかった。

【0178】

このように、A2 により認識されるエピトープは、ヒトおよびチンパンジー TNF α により共有されるエピトープである。また、キメラ A2 は、この方法でラット、ウサギ、イヌおよびブタからの単球由来の TNF との交叉反応性についても、精製された組換えマウス TNF α および天然あるいは組換えヒト TNF α との交叉反応性についても試験された。キメラ A2 は、天然あるいは組換え TNF α のみを阻害あるいは中和した。したがって、cA2 は、ネズミ A2 との種特異性を共有するようである。

【0179】

実施例 XI

キメラ抗 TNF 抗体の生体外 (原文; *in vitro*) 活性と中和能力

ネズミキメラ抗 TNF - α 抗体すなわち A2 および cA2 の両抗体が、有効な TNF 阻

10

20

30

40

50

害および／または中和活性を有することが示された。前述の細胞障害性分析において、ネズミ A 2 は、約 125 ng/ml の濃度で、40 pg/ml 濃度の rhTNF α の生物学的活性を完全に阻害または中和した。二つの独立した系で阻害および／または中和能を調べた結果、50% 阻害投与量 (ID50) は、15.9 $\pm$ 1.01 および 17.9 $\pm$ 1.6 ng/ml (平均値 $\pm$ 標準誤差) と測定された。よって、mAb A 2 は約 17 ng/ml の ID50 値を有する。

【0180】

同一の実験系による、TNF に対して同程度の結合親和性を有する他の 3 つのネズミ抗 TNF - α 抗体 (TNF - 1、TNF - 2、TNF - 3 と定義する。) の試験の結果、これらは 1 ~ 2 オーダー大きい ID 値を有すること、つまり A 2 と比較すると明らかに小さい中和活性しか有さないことが判明した。

10

【0181】

c A 2 の生体外での (原文; *in vitro*) ヒト TNF - α の生物学的活性に対する阻害および／または中和活性の評価は、上述したバイオアッセイ系を用いて行われた。培養 A 673 細胞が、40 pg/ml のノーマル TNF (ゲンザイム (Genzyme) 社製、ボストン、MA) または組換えヒト TNF (サントリー社製、大阪、日本) と共に、抗体の存在下または抗体非存在下に上述の方法で培養された。そして、生体染色によって細胞の生死が測定された。A 2 ネズミ mAb の前記結果に基づいた予想通り、細胞障害性アッセイにおいて、c A 2 も同様にノーマルヒト TNF および組換えヒト TNF の活性の投与量に応じて阻害または中和した (図 11)。この実験系において、c A 2 は 125 ng/ml 程度の濃度で完全に TNF の細胞障害作用を消失させた。実験を繰り返した結果、前記 c A 2 は元のネズミ A 2 mAb よりも強い TNF 阻害および／または中和活性を示すことが判明した。このような抗体濃度 1 μ g/ml 以下での阻害および／または中和活性は、抗体を投与した患者の血液中において容易に達成することができる。従って、このような強力な阻害および／または中和活性 (特にキメラ抗体の活性) は、TNF により介される病気や健康状態の治療上好ましい。

20

【0182】

前述の通り、TNF は細胞の IL - 6 の分泌を誘起させる。更に、その症候群における詳細な役割は不明であるが、IL - 6 は敗血症の病理学的状態に関与していることが明らかにされている (Fong, Y. *et al.*, *J Exp Med* 170: 1627 ~ 1633 (1989); *Starnes Jr.*, H. F. *et al.*, *J Immunol* 145: 4185 ~ 4191 (1990))。TNF により誘起される IL - 6 の分泌に対する、c A 2 の阻害または中和活性が、培養ヒト二倍体 FS - 4 繊維芽細胞を用いて調べられた。

30

表 1 に示す結果は、c A 2 が TNF 添加で一晩培養された細胞の IL - 6 の分泌を阻害するのに有効であることを示している。TNF に誘導される IL - 6 の分泌は、mAb の非存在下または他の抗原に特異的なコントロール mAb の存在下においては、阻害を受けなかった。

【表 1】

表1 in vitroにおけるTNF誘導IL-6分泌の中和作用				
抗 体	TNF濃度 (ng/ml)			
	0	0.3	1.5	7.5
無添加	<0.20	1.36	2.00	2.56
コントロールmAb	<0.20	1.60	1.96	2.16
cA2	<0.20	<0.20	<0.20	0.30

値は、二つの系の平均IL-6濃度 (ng/ml) である。培養FS-4繊維芽細胞にrhTNF (サントリー、大阪府、日本) を、単独で若しくは4 μg/mlの抗体と共に添加し、18時間後にその上清中のIL-6量をクオンティカイン (原文; quantikine) ヒトIL-6イムノアッセイ (R&Dシステムズ社、ミネアポリス MNより入手) により測定した。コントロールmAb=キメラ ネズミ/ヒト IgG1抗血小板 (原文; anti-platelet) mAb (7E3)。

10

20

【0183】

TNFの有する内皮細胞 (EC) のプロ凝固活性上昇や接着分子作用を誘導する機能は、病理学の病理生理学において重要な内容である。特に、血管の損傷、播種性血管内凝固、および敗血症の症状と関連する重厚な高血圧とも関連する。そのため、cA2が、TNFに誘導される、培養ヒトさい帯の、動脈内皮細胞 (HUVEC) の活性を阻害するか否かが評価された。未変性 (原文; intact) のHUVEC細胞を、抗体の存在下および非存在下においてTNFに4時間接触させた後、細胞溶解産物 (原文; lysate) をヒト結漿 (原文; plasma) 凝固分析 (原文; clotting assay) することにより、TNFのプロ凝固活性への刺激性が調べられた。表2に示された結果は、予想されたTNFのHUVECのプロ凝固活性に対する正の制御 (upregulation) を示している (凝固時間の減少に反映される。)。キメラ抗体cA2は、TNFの活性を投与量に応じて、効果的に阻害または中和した。

30

【表 2】

表2 in vitroにおけるTNF誘導プロ凝固活性				
抗 体	$\mu\text{g/ml}$	TNF濃度 (ng/ml)		
		250	25	0
無添加	—	64 $\pm$ 4*	63 $\pm$ 1	133 $\pm$ 13
コントロールAb	10.00	74 $\pm$ 6	N.D.	178 $\pm$ 55
c A 2	10.00	114 $\pm$ 5	185 $\pm$ 61	141 $\pm$ 18
c A 2	3.30	113 $\pm$ 2	147 $\pm$ 3	N.D.
c A 2	1.10	106 $\pm$ 1	145 $\pm$ 8	N.D.
A 2	0.37	73 $\pm$ 17	153 $\pm$ 4	N.D.
c A 2	0.12	64 $\pm$ 1	118 $\pm$ 13	N.D.

* 値は、結漿の凝固時間 (秒) を示す ($\pm$ S. D.)。凝固時間は、抗体の存在下若しくは非存在下にrhTNF (大日本、大阪府、日本) 処理したHUV EC細胞の溶解産物 (原文; lysate) をカルシウム存在下、37℃において、正常なヒトの結漿と混合して測定した。N.D. =不実施、コントロールAb = キメラ ネズミ/ヒト IgG1抗CD4抗体

【0184】

プロ凝固活性を上昇させる作用に加えて、TNFは内皮細胞にELAM-1やICAMの等の接着分子 (原文; adhesion molecules) の産生を誘導する機能を有する。このTNFの活性を阻害または中和活性をELAM-1を検出する放射免疫定量法によって調べた。培養したHUV ECに、抗体添加、または無添加で250 ng/ml rhTNF (大日本製薬製、大阪府、日本) による刺激が与えられ、37℃において一晩96穴プレート上に培養された。ネズミ抗ヒトELAM-1 mAbおよび¹²⁵Iで標識したウサギ抗ネズミ免疫グロブリンを4℃において、この順に直接培養プレートに添加することによりELAM-1の細胞表面への発現が、評価された。

【0185】

図12に示すように、TNFは培養HUV ECの表面へのELAM-1の発現を誘導した。また、c A 2の添加量に相関し、このTNFの活性が効果的に阻害される。

【0186】

最後に、TNFは培養繊維芽細胞に対して分裂促進 (マイトジェン) 活性を有することが知られている。キメラA2本発明はTNFに誘導されるヒト二倍体FS-4培養繊維芽細胞の有糸分裂 (原文; mitogenesis) を阻害および/または中和する作用を有する、これによりA2がin vitroにおいて、更にTNFの幅広い生物学的活性に渡って阻害および/または中和活性を有することが確信される。

【0187】

実施例XII

c A 2抗体の生体内 (原文; in vivo) 活性と機能

c A 2の種交叉反応性が高度に制限的であるので、人間やチンパンジー以外の動物の生体内での (原文; in vivo) この抗体の機能を調べるための試験は厳しい制約を受ける。それでもなお、c A 2の生体外での (原文; in vitro) 強い阻害および/または中和作用が生体内 (原文; in vivo) においても発現されるという証明が望まれていた。過去の動物実験は、実験動物へのTNFの投与は、グラム陰性細菌の感染ま

たはエンドトキシンの直接的投与により呈される病理学的状態に類似することを示した (Tracey, K. J. et al., 1986. 前出; Tracey, K. J. et al., 1987, 前出; Lehmann, V. et al., 前出)。

【0188】

ガラクトサミン感作のネズミにヒトTNFの致死量を投与する生体内での (原文; *in vivo*) 実験系 (Lehmann, V. et al., 前出) を、cA2の生体内での (原文; *in vivo*) のTNF阻害または中和作用の評価をする実験に採用した。rhTNFを5 μ g (0.25mg/kg) 腹腔投与した結果、cA2未処理のコントロール用動物および投与後15~30分後に生理食塩水または2mg/kgのコントロール用抗体 (キメラIgG1; ネズミ7E3抗血小板 (原文; *platelet*) mAb由来) を静脈注射 (*i.v.*) により投与した場合には80~90%の致死率であった。

これに対し、cA2による処理は、致死率を0.4mg/kgの抗体を投与した場合には0~30%に、20mg/kgの場合に0~10%に低下させた。これらの結果を表3にまとめて記載したが、この結果は、*in vitro*と同様に生体内での (原文; *in vivo*) においても、cA2がTNFの生物学的活性を阻害および/または中和する作用を有することが示された。

【表3】

表3 キメラA2によるヒトTNFが生起する致死の防止 結果 (生存数/試験個体数)		
抗 体	試 験#1	試 験#2
無添加	I/10	N. D.
コントロール Ab,		
2mg/kg	2/10	1/10
cA2 (2mg/kg)	9/10	10/10
(P=0.0001)	(P=0.0055)	
cA2 (0.4mg/kg)	7/10	10/10
(P=0.0001)	(P=0.07)	

メスのC3H/HeNネズミに5 μ gのrhTNF (大日本、大阪、日本) +18mgガラクトサミンが腹腔投与された。投与後48時間後の生存数を記録した。コントロールmAbは、ネズミ/ヒトのキメラIgG1抗血小板 (原文; *anti-platelet*) MAB (7E3) であり、N. D. は試験しなかったことを示す。P値はコントロール Abとの比較である。

【0189】

実施例XIII

cA2により認識されるヒトTNF- α のアミノ酸配列 (抗原決定基) の決定

試 薬 下記の市販の試薬は容易に入手可能である。FMOC-L-Ala-OPfp、FMOC-L-Cys(Trt)-OPfp、FMOC-L-Asp(OtBu)-OPfp、FMOC-L-Glu(OtBu)-OPfp、FMOC-L-Phe-OPfp、FMOC-Gly-OPfp、FMOC-L-His(Boc)-OPfp、FMOC-L-Ile-OPfp、FMOC-L-Lys(Boc)-OPfp、FMOC-L-Leu-OPfp、FMOC-L-Asn-OPfp、FMOC-L-Pro-OPfp、FMOC-L-Gln-OPfp、FMOC-L-Arg(Mtr)-OPfp、FMOC-L-Ser(tBu)-ODhbt、FMOC-L-Thr(tBu)-ODhb

t、F M O C - L - V a l - O P f p、F M O C - L - T r p - O P f p、F M O C - L - T r y (t B u) - O P f p、および 1 - ヒドロキシベノトリアゾール (H O B T) をケンブリッジ リサーチ バイオケミカルズより入手した。ピペリジン (原文 ; p i p e r i d i n e) はアプライド バイオシステム社より入手した。1 - メチル - 2 - ピロリジノン (N M P) を E M サイエンスより入手した。以下、メタノールを J T ベーカーより、無水酢酸をアプライド バイオシステムズ社より、トリフルオロ酢酸 (T F A) をアプライド バイオシステムズ社より、ジイソプロピルアミン (D I E A)、トリエチルアミン、ジチオスレート (D T T) およびアニソールをアルドリッチ社より、塩酸 (H C l) を J T ベーカー社よりそれぞれ入手した。

【 0 1 9 0 】

略 号 F M O C は 9 - フルオレニルメトキシカルボニルを、t B u は t - ブチルエーテルを、O t B は t - ブチルエステルを、B o c は t - ブチルオキシカルボニルを、M t r は 4 - メトキシ - 2 , 3 , 6 - トリメチルベンゼンスルホニルを、T r t はトリチルを、O P f p はペンタフルオロエニルエステルを、O D h b t はオキソベンゾトリアゾンエステルを示す。

【 0 1 9 1 】

本発明のキメラ抗体 (c A 2 と表示される抗体) が、T N F アミノ酸配列の内のどの部分が抗体による阻害的結合に関与しているかをエピトープマッピングにより調べるために、用いられた。これによって、c A 2 によって認識される T N F - α のアミノ酸配列が決定された。

【 0 1 9 2 】

ヒト T N F α の完全な一次構造 (P e n n i c a e t a l , Nature 3 1 2 : 7 2 4 - 7 2 9 (1 9 8 4) による) を図 1 3 に示した。

ヒト T N F α の全アミノ酸配列に渡る、二つ毎のアミノ酸より開始し、オーバーラップする、デカペプチドがポリエチレン ピン上に G y s e n の方法を用いて合成された (G y s e n e t a l . , Peptides: Chemistry and biological , アメリカン ペプチド シンポジウム文書 , p . 5 1 9 ~ 5 2 3 , E d . G . R . M a r s h a l l , E s c o m , L e i d n , 1 9 8 8) 。アセチル化 N - 末端を有するペプチドのピン群と、遊離の N - 末端を有するペプチドのピン群がそれぞれ調製された。以下に示すように、ヒト T N F - α のエピトープを構成するアミノ酸配列を決定するため、これらペプチドピンの両群が、抗 T N F m A B c A 2 含有溶液中にインキュベートされた。

図 1 4 A に、それら全部でヒト T N F - α の全配列を網羅する、オーバーラップしているデカペプチドのそれぞれについて、結合試験の結果を示した。O . D . は直接 c A 2 の結合の増加と相関する。図 1 4 B は、T N F - α の存在下における同一のペプチドピン群に対する c A 2 の結合を調べた結果である。この競合的結合試験により、c A 2 に対し非特異的に結合するペプチドが示された。

【 0 1 9 3 】

c A 2 に認識される互いに隣接しない T N F - α ペプチド配列は、少なくとも二以上ある。N 末端アミノ酸を 1 とする通常の蛋白質の順番付与方法を用いると、c A 2 m A B は、少なくとも S E Q I D N O : 1 により示される T N F の 8 7 - 1 0 8 番の残基中、または 5 9 - 8 0 番の残基および 8 7 - 1 0 8 番の残基の両残基中に存在するアミノ酸部分に形成されるエピトープを認識する。

図 1 5 は、T N F 中に存在するこれらの非隣接の配列を示したものである。これらの配列の空間配置図を図 1 6 B に示し、同時に T N F 単量体の空間配置図を 1 6 A に示した。

【 0 1 9 4 】

予想に反し、m A B c A 2 は、T N F - α のリセプターの結合位置と推定される位置 (例えば S E Q I D N O : 1 の h T N F α における 1 1 - 1 3 、 3 7 4 2 、 4 9 - 5 7 、 1 5 5 - 1 5 7) に結合することなく、T N F - α の活性を阻害する。好ましい抗 T N F m A B としては、これらのペプチド配列の一つ若しくはいくつかに結合することによ

10

20

30

40

50

て、ヒトTNF- α の対応するレセプターへの結合を阻害するものである。このような抗体はcA2エピトープに結合することによってTNFの活性を阻害することができる。この結合がTNFの活性を阻害することは証明されている。

cA2によって認識されるこれらのペプチド配列を同定によって、本発明の態様に類似する結合特性および治療上の利用性を有する他のモノクローナル抗体の調製に必要な情報が得られた。

【0195】

ペプチドピンの合成 ケンブリッジ リサーチ バイオケミカルズ社(CRB)より購入したエピトープ マッピング キットを用いて、ヒトTNF- α の全配列に対応するドデカペプチドをポリエチレンセイ製のピン上に合成した。

10

【0196】

合成スケジュールが、CRBエピトープ マッピング ソフトウェアを用いて作成された。最初のアミノ酸をカップリングする前に、予め20%ピペリジンのNMP溶液中での、室温下、30分処理することにより、脱保護された。脱保護されたピンは室温下においてNMPで5回洗浄され、さらにメタノールで3回洗浄された。洗浄後、最低10分以上空気中で乾燥した。

【0197】

各カップリングサイクル毎に以下の操作が行なわれた。

1) 前記アミノ酸誘導体および前記HOBTの前記合成スケジュールにおける必要量が秤量された。

20

2) 前記HOBTの前記合成スケジュールによる適当量がNMPに溶解された。

3) 前記アミノ酸誘導体が適量のHOBT溶液に溶解され、次いでピペットによりその150 μ lが合成スケジュールのウェル位置表(原文; Sheet)の示す適切なウェルに注入された。

4) ピンを有するブロックが前記ウェル中に入れられ、この「サンドイッチ」ユニットはプラスチック製容器中で、18時間30分の湯浴中に保持された。

5) ピンがウェルより取り出され、NMPにより1回(5分間)、メタノールにより3回(2分間)洗浄された後、10分間空気中で乾燥された。

6) ピンが前記と同様に脱保護され、さらに、この操作が繰り返された。

30

【0198】

一つのブロックのピン上のペプチドをアセチル化するためには、前記ペプチドピンは洗浄され、脱保護され、NMP; 無水酢酸: トリエチルアミン(5:2:1)を含有する溶液の150 μ lで30分間において90分間処理され、次いで前に概説した洗浄方法により洗浄された。他のペプチドピンの群は、Z末端フリーアミノ酸残基を得るために、アセチル化されず、脱保護された。

【0199】

側鎖保護基を除去するための最後の脱保護は、TFA: アニソール: ジチオスレイトールの混合溶液、95:2.5:2.5(V:V:W)を用いて、4時間、周囲の温度で処理することにより行われた。脱保護の後、10分間空気乾燥され、次いで1%塩酸のメタノール-蒸留水の1:1混合溶液中で超音波処理(原文; sonication)が行われた。一晚乾燥され、試験に供するピンが得られた。

40

【0200】

cA2のTNF- α ペプチドへの結合を調べるためのELISA分析

試薬: ディスラプション バッファー: リン酸二水素ナトリウム(31.2g, シグマ社(原文; Sigma) cat# S-0751または同等物)およびドデシル硫酸ナトリウム(20.0g, シグマ社 cat# L-3771または同等物)を2.0LのミリQ(原文; milliQ)水に溶解した。次いで、50% w/w 水酸化ナトリウム(VWR社 cat# VW6730-3または同等物)によりpHを7.2 $\pm$ 0.1に調整した。

【0201】

50

ブロッキング バッファー：リン酸二水素ナトリウム（0.39 g, シグマ社 cat # S-0751 または同等物）、リン酸水素二ナトリウム（1.07 g, ベーカー社（原文；Baker）cat # 3828-1 または同等物）および塩化ナトリウム（8.50 g, ベーカー社 cat # 3624-5 または同等物）をミリQ水 1.0 L に溶解した。50 % w/w 水酸化ナトリウム（原文；VWR社 cat # VW6730-3 または同等物）により pH を 7.2 ± 0.1 に調整した。

鶏卵アルブミン（10.0 g, シグマ社 cat # A-5503 または同等物）および牛血清アルブミン（10.0 g, シグマ社 cat # L-3294 または同等物）を室温下で緩やかに撹拌しながら溶解した。この溶液を濾過し、濾過液に、ツウィーン（原文；Tween）20（2.0 ml シグマ社 cat # 13.79 または同等物）を添加した。さらに 40 分間室温にて緩やかに撹拌し、濾過した後、40 に保存した。

【0202】

PBS / ツウィーン（原文；Tween）20：リン酸二水素ナトリウム（3.90 g, シグマ社 cat # S-0751 または同等物）、リン酸水素二ナトリウム（10.70 g, ベーカー社 cat # 3828-1 または同等物）および塩化ナトリウム（85.0 g, ベーカー社 cat # 3624-5 または同等物）をミリQ水 1.0 L に溶解することによって、濃度 10 溶液を調製した。次いで、50 % w/w 水酸化ナトリウム（VWR社 cat # VW6730-3 または同等物）により pH を 7.2 ± 0.1 に調整した。この溶液に対しツウィーン（原文；Tween）20（5.0 ml シグマ社 cat # P-1379 または同等物）を添加し、この混合液を緩やかに撹拌した。使用する直前に、この溶液 100 ml をミリQ水で 1.0 L に希釈した。

【0203】

基質溶液：クエン酸（4.20 g, Malinckrodt cat # S-0627 または同等物）およびリン酸二ナトリウム（7.10 g, ベーカー社 cat # 3828-1 または同等物）をミリQ水 1.0 L に溶解し基質用バッファーを調製した。次いで、50 % w/w 水酸化ナトリウム（VWR社 cat # VW6730-3 または同等物）により pH を 5.00 に調整した。使用直前に OPD 基質錠（30 mg, シグマ社 cat # P-8412 または同等物）および 30 % v/v 過酸化水素（40 μl, シグマ社 cat # P-1379 または同等物）を基質バッファーに添加した。この溶液はアルミホイルで包んで十分に撹拌した。

【0204】

4 N 硫酸：硫酸（53 ml, イーエムサイエンス社（EM Science）cat # SX1244-5 または同等物）をミリQ水（447 ml）に徐々に添加し、使用前に室温迄に冷却した。

【0205】

装置：モレキュラーデバイシス モデル nu-max プレートリーダーまたは同等物、サイエンティフィックプロダクツ モデル R4140 卓上振盪機または同等物、プランソン モデル 5200 超音波バスまたは同等物、フィンピペット モデル 4172317 マルチチャンネル ピペッターまたは同等物、コーニング（原文；corning）モデル 25801 96 ウェル ディスポーザブル ポリスチレン Elisa プレート

【0206】

使用前にまたは下記に示す使用の後に、ペプチドピンは以下に示す手順で洗浄された。ディブラブション バッファーは 60 に加熱され、ヒューム（原文；fume）フード中の超音波バスに注入された。このディスラブション バッファーにジチオスレイトール（2.5 g, シグマ社 cat # D-0632 または同等物）が添加された。ペプチドピンが溶液中で 30 分間超音波処理され、処理後ミリQ水で完全に洗浄された。次いで沸騰エタノール中に 2 分浸漬され、その後空気乾燥された。

【0207】

ディスポーザブル ポリスチレン Elisa プレートの 96 のウェル中に、ブロッキング バッファー（200 μl）が、分注され、これらのウェル中にペプチドピンが保持

10

20

30

40

50

された。このペプチドピンおよびプレートは室温下、卓上振盪機上で2時間インキュベートされた。次いで、このプレートおよびペプチドピンはPBS / ツウィーン (原文; Tween) 20で洗浄された (4回)。個々のウェルにそれぞれ20 μ g / ml 濃度のcA2抗体を注入された (ブロッキング バッファーにより希釈した。175 μ L / ウェル)。TNF競合の方は、TNF - α (40 μ g / ml) およびcA2 (20 μ g / ml) を含有するBSA / 卵アルブミン / BBS中に室温下、3時間インキュベートすることによって行われた。ペプチドピンはプレート中に保持され、4 で一晩インキュベートされた。一晩インキュベート後に、このペプチドピンおよびプレートはPBS / ツウィーン (原文; Tween) 20で洗浄された (4回)。各ウェルに、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識の抗ヒトの山羊の抗体 (ブロッキング バッファーで2000倍に希釈、175 μ L / ウェル, ジャクソン イムノ リサーチ ラボラトリーズ (原文; Jackson Immuno Research Labs)) が添加された。このプレート中にペプチドピンが保持され、室温下で卓上振盪機上で1時間インキュベートされた。インキュベート後、プレートおよびペプチドピンはPBS / ツウィーン (原文; Tween) 20で洗浄された (4回)。各ウェル中に調製直後の基質溶液が分注され (150 μ L / ウェル)、室温下において1時間、卓上振盪機上のこのプレート中でペプチドピンがインキュベートされた。インキュベート後、ペプチドピンは取り外され、各ウェル中に4N硫酸 (50 μ L) が添加された。このプレートをモレキュラー デバイシス プレートリーダーにより読み取らせ (490nmの値, ブランク値として650nmの値を減ずる)、この結果が、前記の通り、図14Aおよび図14Bに示した。

【0208】

実施例XIV

TNFペプチドフラグメントを使用したネズミの抗ヒトTNFモノクローナル抗体の作製

TNF (SEQ ID NO: 1により示される) における上述の非隣接の配列59 - 80、87 - 108中、または両配列59 - 80、87 - 108中に存在する少なくとも5アミノ酸残基である抗TNFエピトープを含有するE. coli由来組換えヒトTNF (rhTNF) フラグメントの精製品40 μ gを、等量の完全フロイント・アジュバンド (ディフコ・ラボラトリーズ社から入手) により乳化し、0.4mlとしたものが、実施例Iにおけるのと同様に、BALB / c 雌ネズミの皮下および腹腔に注射された。一週間後、不完全フロイント・アジュバンド中の前記rhTNFフラグメント5 μ gが腹腔に追加免疫として注射され、次いで、TNF (SEQ ID NO: 1により示される) における配列59 - 80、87 - 108中、または両配列59 - 80、87 - 108中にのアミノ酸残基を有する抗TNFエピトープを含有するTNFフラグメントが、アジュバントなしで、4回連続して腹腔注射された。最後の注射から8週間後に、ネズミはTNF10 μ gにより追加免疫された。

【0209】

4日後、ネズミは犠牲にされた。その脾臓を得、脾臓細胞の懸濁液が調製された。脾臓細胞は、30%ポリエチレングリコール、PEG1450の0.3ml中で、非分泌性ハイブリドーマ細胞であるSp2/0 (ATCC CRL 1581) と、4:1の比で融合された。37 で6時間インキュベートした後、融合細胞は、Sp2/0細胞濃度が1ウエル当たり 2×10^4 個になるように、96穴プレート中に0.2mlづつ配分された。 5×10^4 個の正常BALB / c脾臓細胞が、各ウェルに添加された。

【0210】

使用された増殖培地は、RPM1 - 1640培地、熱で不活性化された10%の子ウシ血清 (HBS) (ヒクローン (原文; Hyclone) 社製)、0.1mMのMEM非必須アミノ酸、1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのL - グルタミン、100U / mlのペニシリン、100 μ g / mlのストレプトマイシン (ギブコ・ラボラトリーズ社製)、および選択のためのヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン (HAT) (ベーリンガー・マンハイム社製) よりなる。

【0211】

10

20

30

40

50

固相放射性免疫アッセイ (R I A) が、配列 5 9 - 8 0、8 7 - 1 0 8、または両配列 5 9 - 8 0、8 7 - 1 0 8 中に存在するアミノ酸残基を含有する r h T N F α フラグメントに特異的なモノクローナル抗体が存在する上清を選択するために、採用された。このアッセイについては、前記実験 2 において詳述した。このアッセイにおける結合のバックグラウンドは、約 5 0 0 c p m である。上清は、2 0 0 0 c p m またはそれ以上結合しているならば陽性とみなした。

【 0 2 1 2 】

選択された上清の内の一つまたはいくつかの上清が通常の R I A により同定された。これら陽性の上清の中で、最も高い結合性を有する (より c p m 値を示すことで判定される。) ものが、ネズミのフィーダー細胞添加の限定希釈法によりサブクローニングされた。中和アッセイにおける前記上清の更なる分析において、一つまたはいくつかの抗体が、阻害および / または中和作用を有することを確認した。そして、これらの陽性であり、阻害および / または中和作用を有するハイブリドーマ系列が選択され、1 0 % F B S (ギブコ社製)、0 . 1 m M の M E M 非必須アミノ酸、1 m M のビルビン酸ナトリウム、2 m M の L - グルタミン、1 0 0 U / m l のペニシリン、および 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシンを含有する R P M 1 - 1 6 4 0 培地に保存 (m a i n t a i n) された。

【 0 2 1 3 】

実施例 X V

T N F ペプチドを用いたネズミとのキメラ抗体、そのフラグメントおよび領域の作製

ネズミとのキメラ抗体、そのフラグメントおよび領域が、実施例 X I V で得られたネズミ抗体の可変領域とヒト定常領域とのキメラ発現媒体を構築することによって、前記実施例 4 ~ 9 に示した方法によって作製された。

【 0 2 1 4 】

キメラ A 2 抗体は、タンパク A セファロース クロマトグラフィーによって組織培養上清より精製され得られた。上清は 0 . 0 0 2 M E D T A 加 0 . 1 M トリスによって p H 8 . 0 に調整され、同バッファーにより平衡化されたタンパク A セファロースカラムにアプライされた。p H 3 . 5 のクエン酸バッファーにより I g G が溶出され、1 M トリスで中和された後に、リン酸バッファーによる緩衝能を有する生理食塩水中で透析された。

【 0 2 1 5 】

こうして得られたネズミとのキメラ抗体、そのフラグメントおよび領域について、その結合能、阻害および / または中和活性が評価された。

【 0 2 1 6 】

実施例 X V I

キメラ抗 T N F 抗体の i n v i t r o の活性と中和活性

例えば、阻害作用が 5 0 % 阻害投与量として表わされる T N F 細胞障害作用のアッセイにおいて、実施例 X I V と実施例 X V において得られたネズミ抗体およびキメラ抗 T N F 抗体のいずれも、阻害および / または中和活性を有することが確認された。

【 0 2 1 7 】

同一の実験系による評価試験により、同程度の結合親和性を有する他の 3 つのネズミ抗 T N F - α 抗体 (T N F - 1、T N F - 2、T N F - 3 と定義する。) を評価したところ、I D 値が 1 ~ 2 オーダー大きいこと、つまり本発明のネズミ抗体およびキメラ抗 T N F 抗体と比較すると、明らかに小さい中和活性しか有さないことが判明した。

【 0 2 1 8 】

実施例 X I V と実施例 X V において得られたネズミ抗体およびキメラ抗 T N F 抗体の両抗体の生体外での (原文 ; i n v i t r o) ヒト T N F - α に対する阻害および / または中和活性の評価は、上述したバイオアッセイ系を用いて行われた。実施例 X I V と実施例 X V において得られたネズミ抗体またはキメラ抗 T N F 抗体を産生する培養細胞が、4 0 p g / m l のノーマル T N F (ゲンザイム (原文 ; G e n z y m e) 社製、ボストン、M A) または組換えヒト T N F (サントリー社製、大阪、日本) と、抗体の存在下または抗体非存在下に上述の方法で培養された。そして、生体染色によって細胞の生死が測定

された。

TNFの細胞障害アッセイにおいて、予想通り、実施例XIVと実施例XVにおいて得られた本発明のネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体は、共に投与量に応じた、ノーマルおよびrhTNFの活性の阻害または中和活性を示した。このような、抗体濃度1μg/ml以下での阻害および/または中和能は抗体を投与された患者の血液中でも容易に達成することができる。従って、このような抗TNF抗体、特にキメラ抗体は、その高い阻害および/または中和能によって、TNFによってもたらされる病気や病理学的状態の治療に好適である。

培養ヒト二倍体FS-4繊維芽細胞を用いて、cA2のTNFによるIL-6の分泌の阻害または中和能を評価した。望ましい結果は、実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体が共に、TNFの存在下に一晚培養した細胞においてIL-6の産生の阻害活性を示すという結果である。TNFによって誘導されるIL-6の産生は、mABの非存在下または他の抗原に対するコントロールmABの存在下においては阻害されなかった。

【0219】

TNFの有する内皮細胞(EC)のプロ凝固活性上昇や接着分子作用を誘導する機能は、病理学の病理生理学において重要な内容である。特に、血管の損傷、播種性血管内凝固、および敗血症の症状と関連する重厚な高血圧とも関連する。

そのため、実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体について、TNFに誘導される、培養ヒトさい帯の、動脈内皮細胞(HUVEC)の活性を阻害するか否かが評価された。未処理のHUVEC細胞を、抗体の存在下および非存在下においてTNFに4時間接触させた後、細胞溶解産物(原文; lysate)をヒト結漿(原文; plasma)凝固分析(原文; clotting assay)することにより、TNFのプロ凝固活性への刺激性が調べられた。予想される結果は、TNFがHUVECのプロ凝固活性に対し正の制御を示すことである。本発明の実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体は、TNFの活性を投与量に応じて阻害または中和することが予想される。

【0220】

プロ凝固活性を上昇させる作用に加えて、TNFは内皮細胞にELAM-1やICAMの等の接着分子(原文; adhesion molecules)の産生を誘導する機能を有する。本発明の実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体の両抗体は、このTNFの活性を阻害または中和することが予想されるが、これについてELAM-1を検出する放射免疫定量法によって調べた。培養したHUVECに抗体添加、または無添加で250ng/ml rhTNF(大日本、大阪、日本)による刺激が与えられ、37℃において一晚96穴プレート上に培養された。ネズミ抗ヒトELAM-1 mABおよび¹²⁵Iで標識したウサギ抗ネズミ免疫グロブリンを4℃において、この順に直接培養プレートに添加することによりELAM-1の細胞表面への発現が、評価された。

【0221】

TNFは、ELAM-1の培養HUVEC細胞表面の発現を誘導することが予想され、さらに本発明の実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体のいずれによっても添加量に応じて、このTNFの活性が阻害されることが予想される。

【0222】

最後に、TNFは培養繊維芽細胞において分裂促進(マイトジェン)活性を有することが知られている。本発明の実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体の両抗体とも、TNFに誘導されるヒト二倍体FS-4培養繊維芽細胞の有糸分裂(原文; mitogenesis)を阻害および/または中和することが期待され、本発明の実施例XIVと実施例XVにおいて得られたネズミ抗体およびキメラ抗TNF抗体の両抗体が、in vitroにおいてTNFの生物学的活性を幅広く阻害お

10

20

30

40

50

よび / または中和することが確信される。

【0223】

実施例XV I I

生体内での (原文 ; i n v i v o) における c A 2 抗体の活性および効力

実施例X I Vと実施例X Vにおいて得た本発明のネズミ抗体またはキメラ抗T N F抗体が生体内での (原文 ; i n v i v o) においてT N Fの阻害または中和作用を有するかどうかを調べるために、ガラクトサミンで感作したネズミに致死量のヒトT N Fを投与する生体内での (原文 ; i n v i v o) 実験系が採用された。

5 μ g (0 . 2 5 m g / k g) の r h T N F を腹腔投与された結果、未処理のコントロール用動物および投与後15 ~ 30分後に生理食塩水または2 m g / k g のコントロール用抗体 (キメラI g G 1 ; ネズミ7 E 3 抗血小板 (原文 ; p 1 a t e l e t) m A B 由来) が静脈注射 (i . v .) により投与された場合には80 ~ 90 % の致死率であった。

これに対し、実施例X I Vと実施例X Vにおいて得た本発明のネズミ抗体およびキメラ抗T N F抗体で処理されたものは、致死率が、0 . 4 m g / k g の抗体を投与した群は0 ~ 30 % に、20 m g / k g s の群は0 ~ 10 % に低下することが予想される。この予想の結果によって、実施例X I Vと実施例X Vにおいて得られた本発明のネズミ抗体およびキメラ抗T N F α 抗体が生体外 (原文 ; i n v i t r o) のみならず生体内 (原文 ; i n v i v o) においてもT N Fの生物学的活性を阻害および / または中和する効力を有することを示されることになる。

【0224】

実施例XV I I I

c A 2 抗体の臨床的活性および効力

抗ヒトT N FのキメラI g G 1 モノクローナル抗体c A 2 が健康な男性ボランティアに投与された。N I H 標準エンドトキシン4 n g / k g の投与の一時間後に、ボランティアに、コントロールとしての生理食塩水または0 . 0 1 , 0 . 1 0 または10 m g / k g のc A 2 が製剤の形態で投与された。血清中のT N F 値が経時的に追跡された結果、T N F 値の最高値はc A 2 の投与に応じた減少することが示され、c A 2 を10 m g / k g 投与したボランティアについてはT N F は検出されなかった。したがって、本発明の抗T N F 抗体による処置は、人体中のT N F によってもたらされる作用を阻害することが予想される。

【0225】

エンドトキシンを受けた (原文 ; r e c e i v i n g) 患者は、白血球の辺縁趨向が原因と考えられる白血球減少を示す。白血球が活性化されるにことによって、内皮に結合可能となりその結果として内皮の損傷を生じる。1 . 0 ~ 10 . 0 m g / k g の投与により、この白血球減少は認められなくなる、これに対し、0 . 0 1 ~ 0 . 1 m g / k g の投与では白血球数の減少が観察された。この減少は特に多形核の細胞系列において顕著であった。その後、全ての患者において白血球は増加した。この過程はc A 2 によって何ら影響を受けなかった。この白血球の辺縁趨向の防止効果はT N F による内皮細胞の損傷を防止できることを意味すると考えられる。この分野において、このT N F による内皮の損傷は敗血症による症状や死において重要な役割を果たしていると考えられている。従って、本発明の抗T N F 抗体は、ここに示されたように、このような損傷効果に対する予防効果を有することが予想される。

【0226】

前記各引用文献の内容は、特に組込むことの明記がなくても、ここに言及することにより全て本発明の内容に含めるものとする。

【0227】

以上、本発明について充分に開示したのであるから、この分野における通常の知識を有するものが、本発明の精神と目的の範囲内において、また不適当な (原文 ; u n d u e) 実験でない限りにおいて、幅広い範囲について数値、濃度、条件を適当に変更して本発明を実施することができる。

【 0 2 2 8 】

本願は本発明の特定の一態様について記載したのであるが、他にも様々な態様が可能である。本出願は、本発明の原理に一般的に従い、この発明が属する技術の分野における公知のあるいは慣習的なプラクティスの範囲内に入るような変更であって、かつ、以下に示されたクレームの範囲内から外れることなく、本発明の本質的特長に適合するような変更を含む、本発明の全ての態様、使用、または応用をも包含することを意図している。

本願における用語の選択および用語の定義は記述上の便宜のためのものでありこれらに制限されるものではない。

【 0 2 2 9 】

本発明の実施態様ならびに目的生成物を挙げれば以下のとおりである。

1 . ヒトの腫瘍壊死因子 α ($TNF\alpha$) に対する高親和性マウスモノクローナル抗体であって、(a) 抗体 A 2 の TNF との結合を競合的に阻害し、(b) ヒト $TNF\alpha$ の中和性エピトープに結合する抗体。

2 . 請求項 1 に記載のマウスモノクローナル抗体であって、検出可能にラベルされているもの。

3 . ヒトの免疫グロブリンの不変領域の少なくとも一部と、ヒトの $TNF\alpha$ に特異性を有するヒト以外の免疫グロブリンの可変部分の少なくとも一部を含むキメラ免疫グロブリン鎖。

4 . 請求項 3 に記載のキメラ免疫グロブリン鎖であって、H鎖とL鎖を有するもの。

5 . 請求項 3 に記載のキメラ免疫グロブリン鎖であって、不変領域がヒト起源のものであるもの。

6 . 2 個の L 鎖と 2 個の H 鎖を有し、そのおのおのが不変領域の少なくとも一部と可変領域の少なくとも一部からなり、可変領域がヒト $TNF\alpha$ に対して特異性を有し、生体内で、ヒト $TNF\alpha$ の中和作用を有するエピトームに高い親和性をもって結合するキメラ抗体分子。

7 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、 $TNF\beta$ に結合しないもの。

8 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、可変領域および不変領域がマウス起源であるもの。

9 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、その可変領域がヒト $TNF\alpha$ の中和作用を有するエピトープに結合する高親和性マウスモノクローナル抗体から誘導されるもの。

10 . 請求項 9 に記載のキメラ抗体であって、該マウスモノクローナル抗体が A 2 または c A 2 の $TNF\alpha$ に対する結合を競合的に阻害するもの。

11 . 請求項 9 に記載のキメラ抗体であって、該マウスモノクローナル抗体が A 2 であるもの。

12 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、会合定数 (K_a) で示される親和性が少なくとも $1 \times 10^8 \text{ l / mol}$ であるもの。

13 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、会合定数 (K_a) で示される親和性が少なくとも $1 \times 10^9 \text{ l / mol}$ であるもの。

14 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、少なくとも $1 \mu\text{g / ml}$ で、ID50 でヒト $TNF\alpha$ を中和するもの。

15 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、少なくとも 100 ng / ml で、ID50 でヒト $TNF\alpha$ を中和するもの。

16 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、少なくとも 15 ng / ml で、ID50 でヒト $TNF\alpha$ を中和するもの。

17 . 請求項 6 に記載のキメラ抗体であって、検出可能にラベルされているもの。

18 . 請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、ハイブリドーマにより、または組換えにより産生される検出可能にラベルされたもの。

19 . 請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、h $TNF\alpha$ の残基 87 - 108、または 59 - 80 および 87 - 108 の両者と結合する抗原結合領域を有するもの。

20 . 請求項 1 に記載のモノクローナル抗体であって、それ自身、そのフラグメント、

10

20

30

40

50

または領域が SEQ ID NO: 1 の hTNF α のアミノ酸 11 - 13、37 - 42、49 - 57 または 155 - 157 に含まれる 1 個以上のエピトープに結合しないもの。

21. (a) モノクローナル抗体 A2 のマウスモノクローナル抗体、または (b) モノクローナル抗体 cA2 のマウス/ヒトキメラモノクローナル抗体に相当する抗 TNF 結合領域またはそのフラグメントを有する抗 TNF 抗体。

22. SEQ ID NO: 1 のアミノ酸残基 87 - 108 または 59 - 80 および 87 - 108 の両者からなる群から選ばれる少なくとも 5 個のアミノ酸からなる TNF ペプチドであって、TNF の TNF レセプターへの結合を実質的に阻害するように、レセプター結合配列と結合することによる抗 TNF 生物学的活性を有する抗 TNF 抗体のエピトープを有する TNF ポリペプチド。

10

23. 請求項 22 に記載の TNF ポリペプチドであって、実質的に、SED ID NO: 1 のアミノ酸 59 - 80 としての Tyr - Ser - Gln - Val - Leu - Phe - Lys - Gly - Gln - Gly - Cys - Pro - Ser - Thr - His - Val - Leu - Leu - Thr - His - Thr - Ire; および SED ID NO: 1 のアミノ酸 87 - 108 として Tyr - Gln - Thr - Lys - Val - Asn - Leu - Leu - Ser - Ala - Ile - Lys - Ser - Pro - Cys - Gln - Arg - Glu - Thr - Pro - Glu - Gly の少なくとも一つの配列の 3 ないし 22 個のアミノ酸からなる TNF ポリペプチド。

24. 請求項 1 に記載の抗体もしくはそのフラグメント、領域部分、またはその薬学的に許容されエステル、エーテル、硫酸塩、炭酸塩、グルクロン化物もしくはその塩、および薬学的に許容される担体からなる薬学的組成物。

20

25. 単離 TNF ポリヌクレオチドであって、請求項 6 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列からなり、該ヌクレオチド配列が、少なくとも一つの不変領域との作動連鎖(連鎖)において少なくとも一つの不変領域をコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド。

26. 請求項 25 に記載のポリヌクレオチドであって、ゲノム DNA 配列または cDNA 配列から選ばれるヌクレオチド配列を有するもの。

27. 請求項 25 に記載のポリヌクレオチドであって、それ自身が発現担体であるもの。

28. 請求項 25 に記載のポリヌクレオチドで転換され、またはトランスフェクトされた宿主。

30

29. 請求項 28 に記載の宿主であって、真核細胞または細菌細胞であるもの。

30. 請求項 29 に記載の宿主であって、哺乳類の細胞であるもの。

31. 請求項 6 に記載の抗体またはそのフラグメント、領域部分の製法であって、

(a) 請求項 28 に記載の宿主を抗体が回収可能な量で発現するように培養し、

(b) 該抗体、またはそのフラグメント、領域部分を宿主または培養物から回収することからなる製法。

32. TNF α によって仲介される疾患を有する患者の治療法であって、患者に請求項 24 に記載の薬学的組成物の治療量を投与することからなる治療法。

33. TNF α によって仲介される疾患を有する患者の治療法であって、患者に請求項 42 に記載の薬学的組成物の治療量を投与することからなる治療法。

40

34. 試料から TNF α もしくはそのフラグメントまたは該 TNF α を含む免疫複合体から該 TNF α を除去するための、

(a) 該試料を、請求項 1 に記載の抗体またはそのフラグメント、領域部分であって、該 TNF α 、その部分または免疫複合体が固定された抗体、フラグメント、または領域部分が可逆的に結合して、結合した TNF α 、その部分または免疫複合体を生成するように支持体に結合されたもの、を含む手段と接触させ、

(b) 該結合抗体、フラグメント、または領域部分から、結合した TNF α 、その部分、または免疫複合体を回収することからなる方法。

35. 試料から TNF α もしくはそのフラグメントまたは該 TNF α を含む免疫複合体

50

から該 $\text{TNF } \alpha$ を除去するための、

(a) 該試料を、請求項 6 に記載の抗体またはそのフラグメント、領域部分であって、該 $\text{TNF } \alpha$ 、その部分または免疫複合体が固定された抗体、フラグメント、または領域部分に可逆的に結合して、結合した $\text{TNF } \alpha$ 、その部分または免疫複合体を生成するように支持体に結合されたもの、を含む装置と接触させ、

(b) 該結合抗体、フラグメント、または領域部分から、結合した $\text{TNF } \alpha$ 、その部分、または免疫複合体を回収することからなる方法。

36. 体液中の高レベルの $\text{TNF } \alpha$ に関係する疾患または症状を有することを疑われている患者を治療するための、

(a) 請求項 34 に記載の方法によって、該体液から該 $\text{TNF } \alpha$ を除去し、

(b) 該体液を患者に戻すことからなる方法。

37. 体液中の高レベルの $\text{TNF } \alpha$ に関係する疾患または症状を有することを疑われている患者を治療するための、

(a) 請求項 35 に記載の方法によって、該体液から該 $\text{TNF } \alpha$ を除去し、

(b) 該体液を患者に戻すことからなる方法。

38. 試料中のヒトの $\text{TNF } \alpha$ 検出する免疫検定方法であって、

(a) 該試料を請求項 1 に記載の抗体、またはそのフラグメント、領域部分と接触させ、

(b) 抗体と該 $\text{TNF } \alpha$ の結合を検出することからなる方法。

39. 試料中のヒトの $\text{TNF } \alpha$ 検出する免疫検定方法であって、

(a) 該試料を請求項 6 に記載の抗体、またはそのフラグメント、領域部分と接触させ、

(b) 抗体と該 $\text{TNF } \alpha$ の結合を検出することからなる方法。

40. 請求項 32 に記載の患者の治療方法であって、該疾患が敗血症症候群、悪液質、循環虚脱、急性および慢性の細菌感染、ウイルス感染、真菌感染によるショック、紅斑性狼瘡、リウマチ性関節炎、アルコール誘発性肝炎、慢性炎症性疾患、脈管炎症性疾患、GVH 疾患、カイサキ病、および悪性疾患の一つである方法。

41. 請求項 33 に記載の患者の治療方法であって、該疾患が敗血症症候群、悪液質、循環虚脱、急性および慢性の細菌感染、ウイルス感染、真菌感染によるショック、紅斑性狼瘡、リウマチ性関節炎、アルコール誘発性肝炎、慢性炎症性疾患、脈管炎症性疾患、GVH 疾患、カイサキ病、および悪性疾患の一つである方法。

42. 請求項 6 に記載の抗体、もしくはそのフラグメント、領域部分、またはその薬学的に許容されるエステル、エーテル、硫酸塩、炭酸塩、グルコン化物もしくはその塩と、薬学的に許容できる担体からなる薬学的組成物。

【産業上の利用可能性】

【0230】

予想外のこととして、本発明の mAbs は、Eck および Sprang (J. Bio 1. Chem., 264 (29), 17595 - 17605 (1989)) によって、(SEQ ID NO: 1 における) $\text{hTNF } \alpha$ の 11 - 13、37 - 42、49 - 57 および 155 - 157 である複数のアミノ酸であるとして示されたように、推定されたレセプター結合位置に結合することなく、 $\text{TNF } - \alpha$ の活動を遮断することができる。

【図面の簡単な説明】

【0231】

【図 1】図 1 は、ヒト $\text{TNF } \alpha$ に対する、マウス mAb A2 の結合に依存する用量 (原文; dose) を示すグラフである。

【図 2】図 2 は、 mAb A2 による、熱で不活性化されたヒト $\text{TNF } \alpha$ の認識の欠如を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、ネズミの A2 による生体内での TNF 細胞毒作用の中和を示すグラフである。対照: 天然のヒト TNF を有する、ネズミの IgG 1 抗脂質 A mAb (8A1) 。対照に対する平均吸光度値は次のとおりである: TNF なし = 1.08; 天然 TNF 、抗体なし = 0.290; 組み替え TNF 、抗体なし = 0.500。

【図 4】図 4 は、 mAb A2 およびキメラ A2 がヒトリンホトキシン ($\text{TNF } \beta$) を阻

10

20

30

40

50

害または中和しないことを示すグラフである。

【図 5】図 5 は、m A b ネズミ A 2 およびキメラ C A 2 がネズミ T N F α を阻害または中和しないことを示すグラフである。

【図 6】図 6 は、m A b A 2 が、チンパンジー単球および r h T N F α によって産生された T N F を阻害または中和することを示すグラフである。

【図 7】図 7 は、m A b A 2 が、チンパンジー単球および r h T N F α によって産生された T N F を阻害または中和することを示すグラフである。

【図 8】図 8 は、キメラ A 2 抗体のキメラ H 鎖 (p A 2 H G 1 a p g p t) およびキメラ L 鎖 (p A 2 H u K a p g p t) の発現のために使用されたプラスミドを示す模式図である。

【図 9】図 9 は、ネズミの A 2 (m A 2) およびキメラ抗体 (c A 2) で競合的にエピトープ E L I S A を交差ブロック (原文 ; c r o s s - b l o c k i n g) した結果を示すグラフである。

【図 10】図 10 は、マイクロタイタープレート (原文 ; m i c r o t i t e r) 上に固定された組み換えヒト T N F α に結合する、¹²⁵I でラベルされた m A b A 2 (m A 2) およびキメラ A 2 (c A 2) に関するスキャチャード分析のグラフである。各 K a 値は、二つの独立した測定値の平均から計算された。

【図 11】図 11 は、キメラ A 2 による T N F 細胞毒作用の中和を示すグラフである。対照は、天然のヒト T N F と反応するキメラマウス / ヒト I g G 1 抗血小板 m A b (7 E 3) である。対照に対する平均吸光度値は、T N F なし = 1 . 0 8 ; 天然 T N F 、 A b なし = 0 . 2 9 0 ; 組み換え T N F 、 A b なし = 0 . 5 0 0 である。

【図 12】図 12 は、キメラ A 2 による、T N F 導入 E L A M - 1 発現の生体外 (原文 ; i n v i t r o) での中和を示すグラフである。対照は、キメラマウス / ヒト I g G 抗 C D 4 抗体である。

【図 13】図 13 は、S E Q I D N O : 1 としての、ヒト T N F のアミノ酸の配列を示す。

【図 14 A】図 14 A は、ヒト T N F ペプチドピンへの c A 2 の相対的な結合を示すキメラ m A b c A 2 のエピトープ地図を示すグラフ表示である。

【図 14 B】図 14 B は、ヒト T N F の存在下におけるヒト T N F ペプチドピンへの c A 2 の相対的な結合を示すキメラ m A b c A 2 のエピトープ地図を示すグラフ表示である。

【図 15】図 15 は、c A 2 により認識されたエピトープの部分の有する配列を示している、ヒト T N F のアミノ酸配列を表す。

【図 16】図 16 は、ヒト T N F モノマーのモデルを示す三次元画像および c A 2 により認識されたヒト T N F の非隣接ペプチド配列のモデルを示す三次元画像である。

【 0 2 3 2 】

10

20

30

配列表

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: リー, ユンミン (原文; Le, Junming)

ヴィルチェック, ヤン (原文; Vilcek, Jan)

ダッドーナ, ピーター・イー.

(原文; Daddona, Peter E.)

グレイエップ, ジョン (原文; Ghrayeb, John)

ナイト, デイビッド・エム.

(原文; Knight, David M.)

シーゲル, スコット・エイ.

(原文; Siegel, Scott A.)

(ii) 発明の名称: ヒト腫瘍壊死因子に特異的なモノクローナルなキメラ抗体

(iii) 配列の数: 1

(iv) 通信宛先

(A) 宛先: ブラウディ アンド ナイマーク

(原文; Browdy and Neimark)

(B) ストリート: 419 セブンス ストリート, エヌダブリュ

(C) シティ: ワシントン

(D) ステイト: DC

(E) 郵便番号: 20004

(v) コンピューターの読み込み形式:

(A) 記録媒体: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC コンパチブル

(C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: Patent In Release #1.0, V

ersion #1.25

(vi) 本願に関するデータ:

(A) 出願番号:

10

20

30

40

(B) 出願日:

(C) 分類:

(v i i) 先の出願のデータ

(A) 出願番号: US 07/670, 827

(B) 出願日: 1991年3月18日

(i x) 通信先

(A) 電話番号: 212-628-5197

(B) ファクシミリ番号: 212-737-3528

(2) SEQ ID NO: 1に関する情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 157個のアミノ酸

(B) 種: アミノ酸

(C) トポロジー: 一次配列

(i i) 分子種: ペプチド

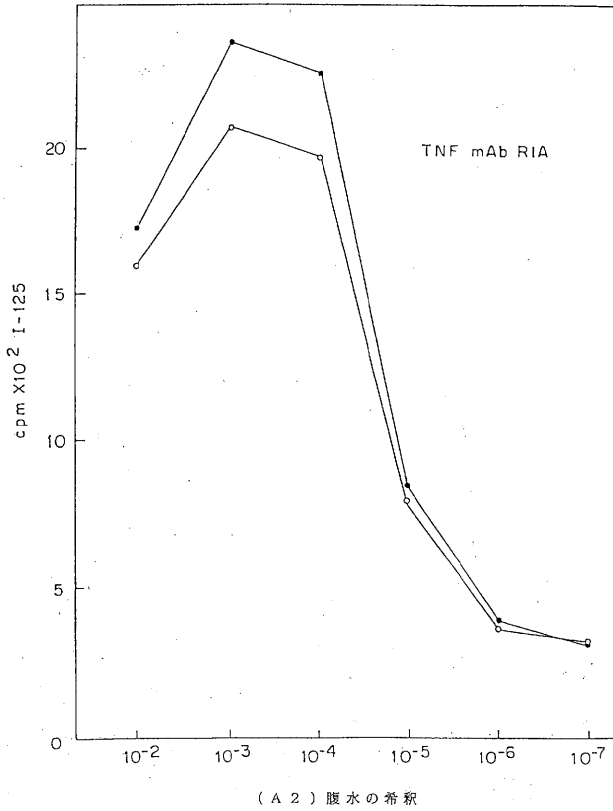
(x i) 配列の描写: SEQ ID NO: 1:

```

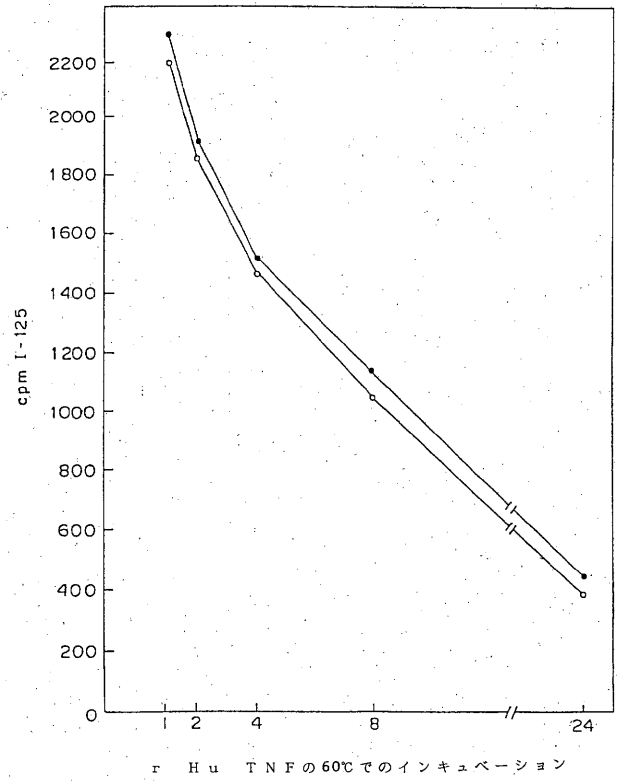
Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1      5      10      15
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
20      25      30
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35      40      45
Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50      55      60
Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65      70      75      80
Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
85      90      95
Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100     105     110
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115     120     125
Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130     135     140
Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145     150     155

```

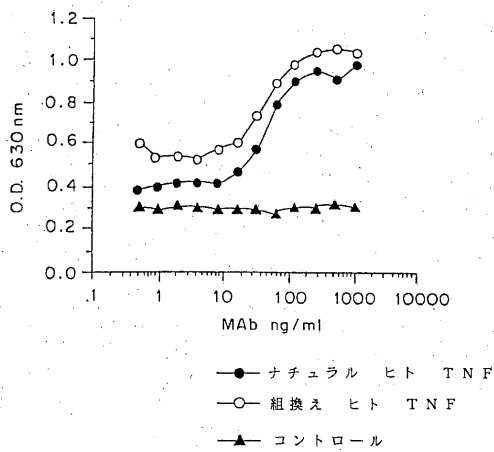
【図 1】



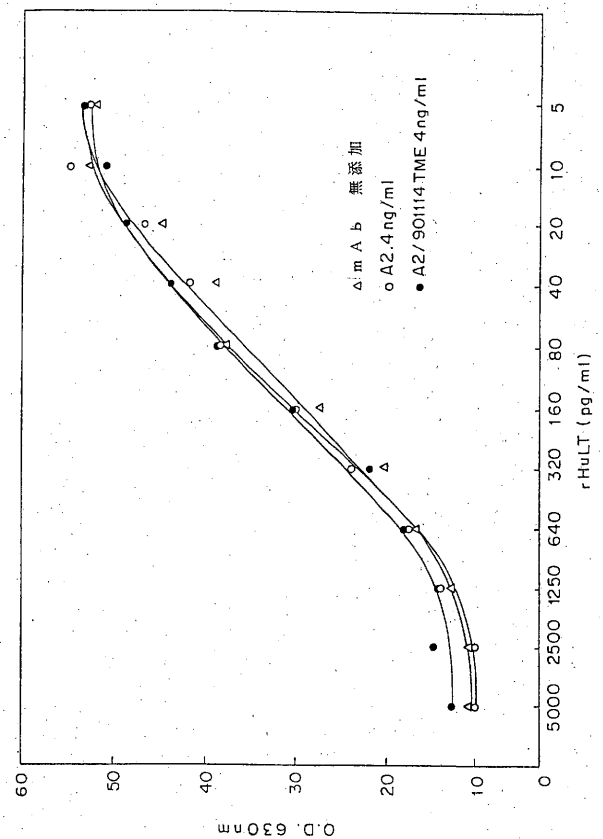
【図 2】



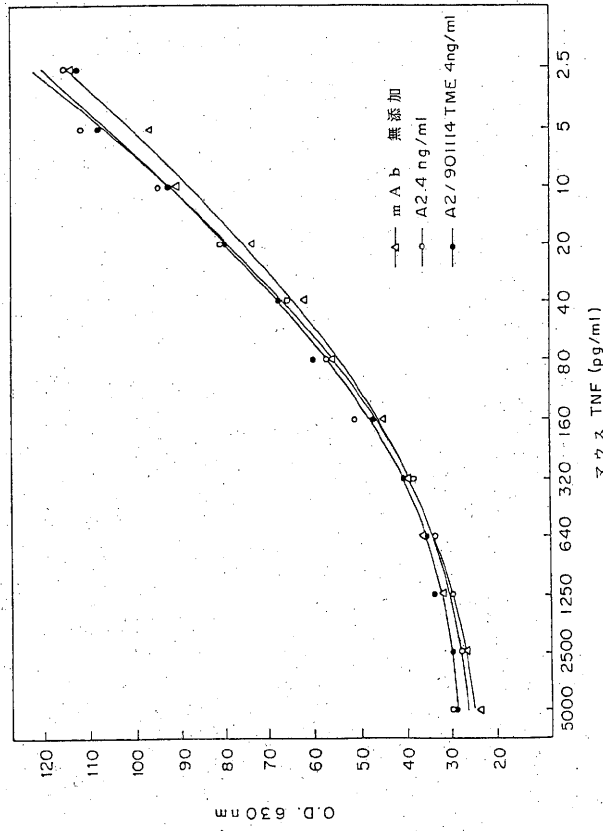
【図 3】



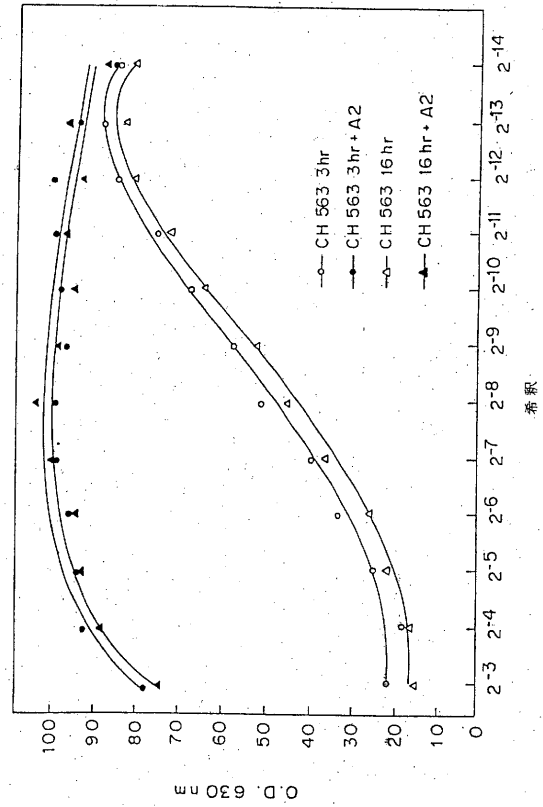
【図 4】



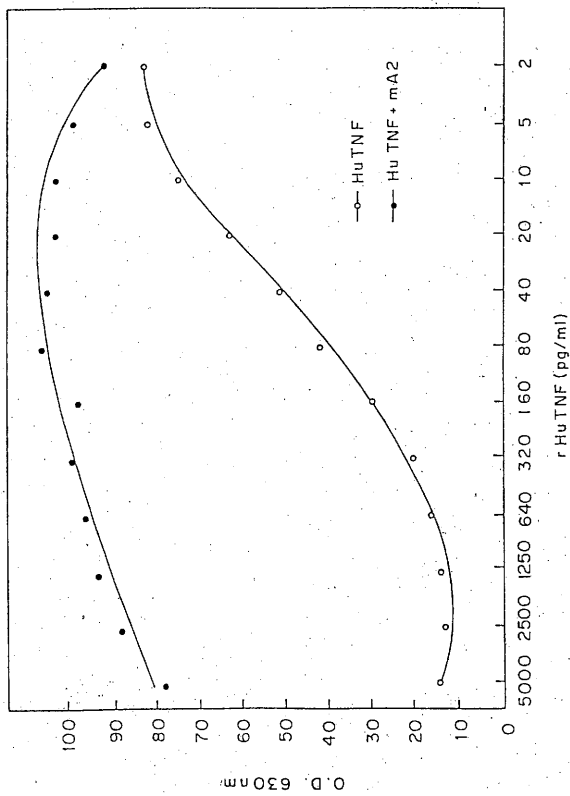
【図 5】



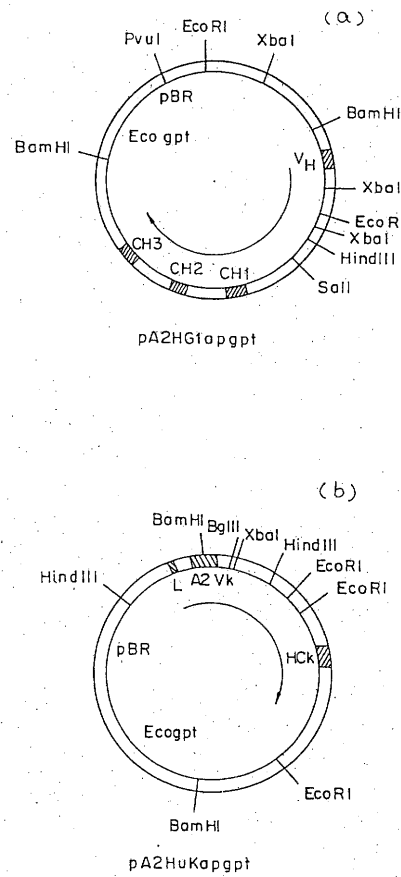
【図 6】



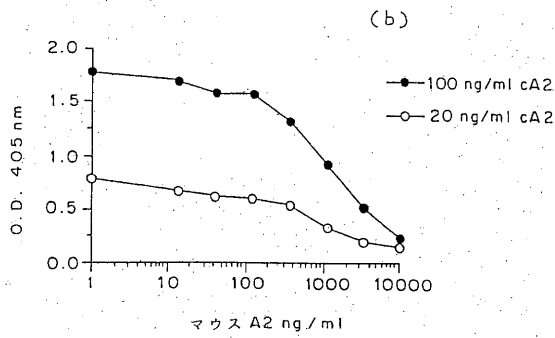
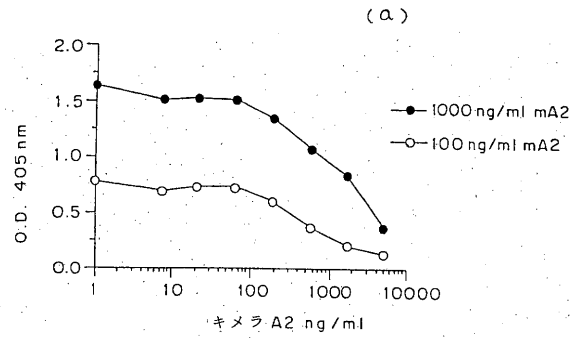
【図 7】



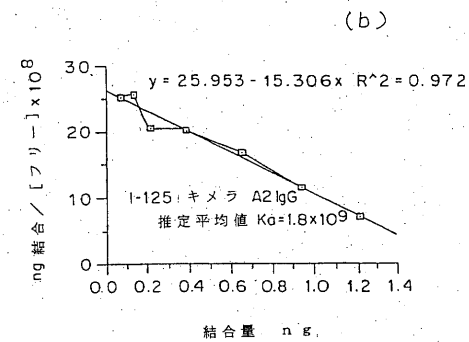
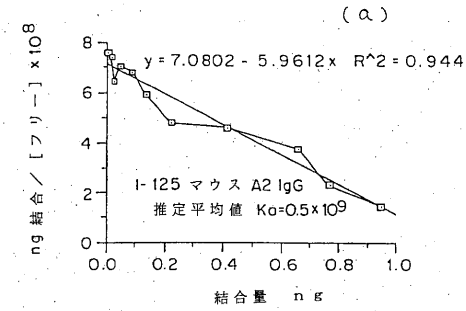
【図 8】



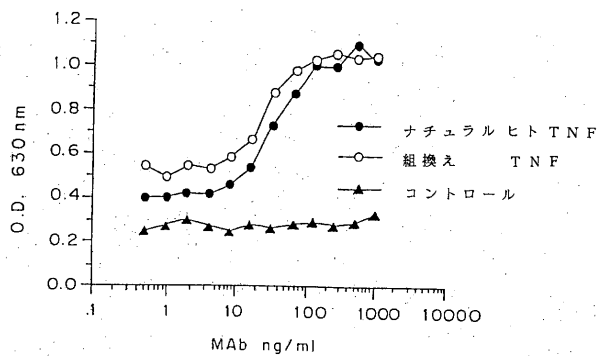
【図 9】



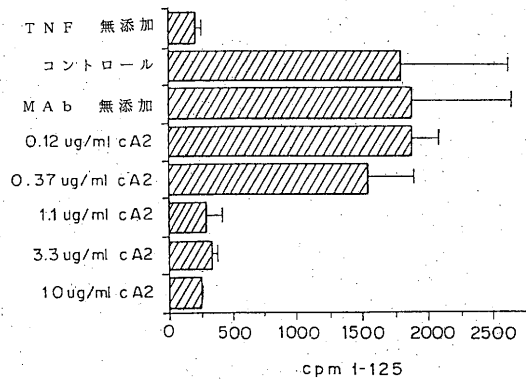
【図 10】



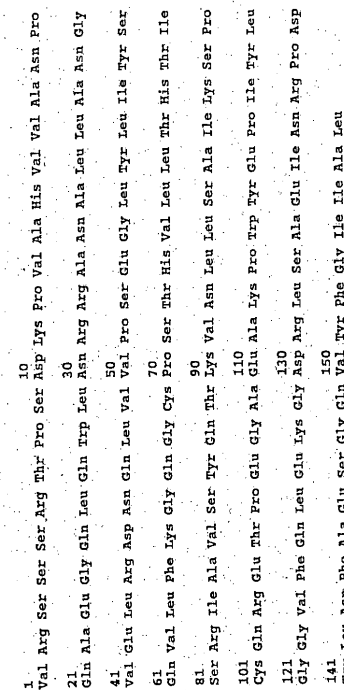
【図 11】



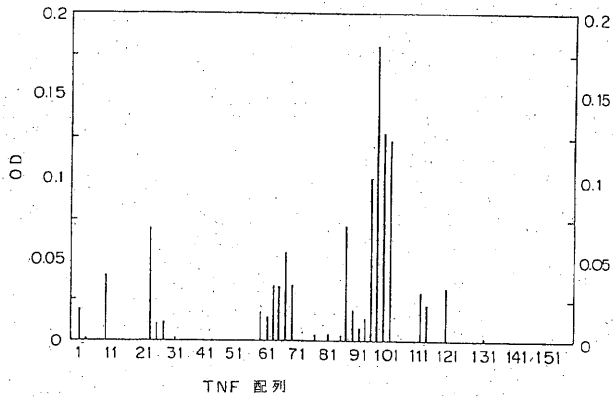
【図 12】



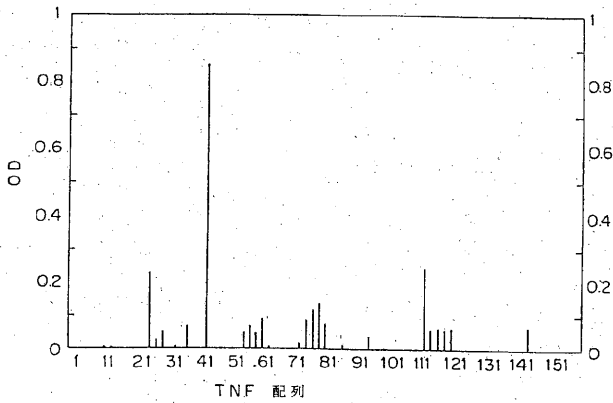
【図 13】



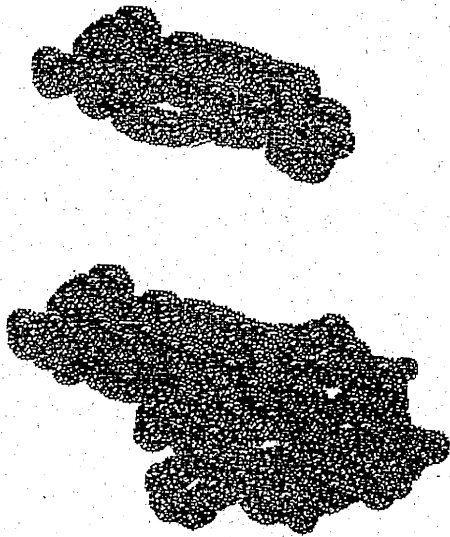
【図 14 A】



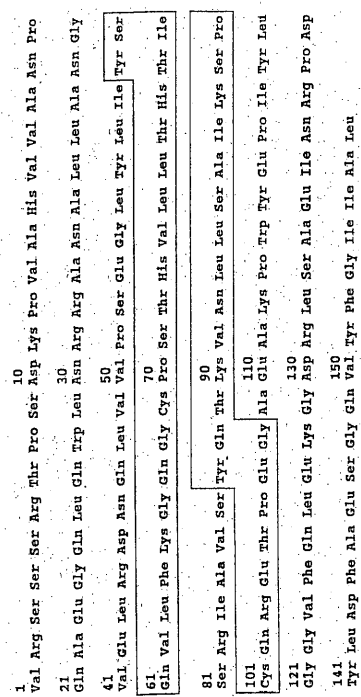
【図 14 B】



【図 16】



【図 15】



【配列表】

2012087144000001.app

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 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100093676

弁理士 小林 純子

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100149010

弁理士 星川 亮

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 リー, ユンミン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 1 3 7 2 ジャックソン・ヘイツ, ナインティ・セカンド・ストリート, 3 3 - 2 6, エイピーティー. 3 エックス

(72)発明者 ヴィルチェック, ヤン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 2 1 ニューヨーク, セブンティ・ナインス・ストリート, 1 8 0 イー,

(72)発明者 ダッドーナ, ピーター・イー.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 8 0 ウエスト・チェスター, メアリーデル・ドライブ 6 4 2

(72)発明者 グレイエップ, ジョン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 7 2 スローンディール, レイ・ロード 3 2 0 2

(72)発明者 ナイト, デイビット・エム.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 0 1 バオリ, フェザント・ラン・ドライブ 2 0 8

(72)発明者 シーゲル, スコット・エイ.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 8 0 ウエスト・チェスター, ハンター・レーン 1 4 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA56 CA07 DA06 EA04

4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13

4C085 AA14 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 BA10 BA41 DA76 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	一种特异于人肿瘤坏死因子的单克隆嵌合抗体		
公开(公告)号	JP2012087144A	公开(公告)日	2012-05-10
申请号	JP2012004156	申请日	2012-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	纽约大学 詹森生物科技公司		
申请(专利权)人(译)	纽约大学 扬森Baiotetsuku , Incorporated的忘川每次		
[标]发明人	リーユンミン ヴィルチェックヤン ダッドーナピーターイー グレイエップジョン ナイトデイビットエム シーゲルスコットエイ		
发明人	リー, ユンミン ヴィルチェック, ヤン ダッドーナ, ピーター・イー. グレイエップ, ジョン ナイト, デイビット・エム. シーゲル, スコット・エイ.		
IPC分类号	C07K16/24 C07K16/46 A61K39/395 A61P43/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/10 A61P33/00 A61P37/06 A61P1/16 A61P29/00 C12P21/08 C12N15/09 A61K35/00 A61K38/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P19/02 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 C07K1/22 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/52 C07K14/525 C07K16/00 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/13 C12P21/02 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P39/02 A61P43/00 C07K14/525 C07K16/241 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/00		
FI分类号	C07K16/24.ZNA C07K16/46 A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/10 A61P33/00 A61P37/06 A61P1/16 A61P29/00 C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/13 C12N15/28 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA56 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 小林顺子 铃木康仁		
优先权	07/670827 1991-03-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的TNF抗体，其克服鼠抗体免疫原性的问题并且提供降低的免疫原性和增加的中和活性。溶剂：本发明涉及：抗TNF抗体，其对人肿瘤特异的片段和区域坏死因子- α (TNF α)，可用于体内诊断和治疗许多TNF介导的病理和病症;编码鼠和嵌合抗体的多核苷酸;产生抗体的方法;以及将抗TNF抗体或其片段，区域或衍生物应用于免疫测定和免疫治疗的各种方法。

表1 in vitroにおけるTNF誘導IL-6分泌の中和作用				
抗 体	TNF濃度 (ng/ml)			
	0	0.3	1.5	7.5
無添加	<0.20	1.36	2.00	2.56
17D-mAb	<0.20	1.60	1.96	2.16
cA2	<0.20	<0.20	<0.20	0.30

値は、二つの系の平均IL-6濃度 (ng/ml) である。培養FS-4織