

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-530068

(P2007-530068A)

(43) 公表日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 4
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-505621 (P2007-505621)  
 (86) (22) 出願日 平成17年3月29日 (2005.3.29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月27日 (2006.11.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/001147  
 (87) 国際公開番号 W02005/095457  
 (87) 国際公開日 平成17年10月13日 (2005.10.13)  
 (31) 優先権主張番号 0407197.3  
 (32) 優先日 平成16年3月30日 (2004.3.30)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 0407193.2  
 (32) 優先日 平成16年3月30日 (2004.3.30)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 397009934  
 グラクソ グループ リミテッド  
 GLAXO GROUP LIMITED  
 イギリス ミドルセックス ユービー6  
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ  
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム  
 ハウス (番地なし)  
 Glaxo Wellcome Hous  
 e, Berkeley Avenue G  
 reenford, Middlesex  
 UB6 ONN, Great Brita  
 in  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリン

## (57) 【要約】

本発明は、オンコスタチン M (OSM)、特にヒト OSM (hOSM) に特異的に結合し、かつ OSM と gp130 の相互作用をモジュレートする、抗体のような免疫グロブリンに関する。典型的な実施形態では、OSM はグリコシル化されている。本発明はまた、OSM のサイト II およびサイト III と、それらに対応する相互作用パートナーとの相互作用をモジュレートする抗体に関する。医薬組成物、スクリーニング方法および医学的治療法についてもさらに開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

OSM、特にhOSM、に特異的に結合し、かつOSMとgp130の相互作用をモジュレートする治療用抗体。

## 【請求項 2】

配列番号 3 のCDRH3を含む、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

さらに、

配列番号 1 のCDRH1、

配列番号 2 のCDRH2、

配列番号 4 のCDRL1、

配列番号 5 のCDRL2、

配列番号 6 のCDRL3、

を含む、請求項 2 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

配列番号 42 のCDRH3を含む、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 5】

さらに、

配列番号 40 のCDRH1、

配列番号 41 のCDRH2、

配列番号 43 のCDRL1、

配列番号 44 のCDRL2、

配列番号 45 のCDRL3、

を含む、請求項 4 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

前記抗体が、完全抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、ヘテロコンジュゲート抗体からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。

## 【請求項 7】

前記抗体が完全抗体である、請求項 6 に記載の抗体。

## 【請求項 8】

完全抗体がマウス、ラット、ウサギ、霊長類またはヒトの抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

## 【請求項 9】

完全抗体がヒトの抗体である、請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 10】

前記抗体がキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 6 に記載の抗体。

## 【請求項 11】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 12】

ヒトアクセプター可変重鎖フレームワーク領域の残基 28、29、30、71 および 94、ならびにヒトアクセプター可変軽鎖フレームワークの 49 位および 71 位が、CDRH3 の由来となるドナー抗体フレームワーク中の対応する残基で置換されている、請求項 2 に記載のヒト化抗体。

## 【請求項 13】

ヒト重鎖フレームワークが以下の残基もしくはその保存的置換残基：

位置	残基
28	S
29	L
30	T
71	K

10

20

30

40

50

94 K

を有し、かつヒト軽鎖が以下の残基もしくはその保存的置換残基：

位置 残基

49 E

71 Y

を有する、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体であって、配列番号9のV<sub>H</sub>ドメインおよび配列番号10のV<sub>L</sub>ドメインを含む前記抗体。

10

【請求項 1 5】

hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体であって、配列番号11の重鎖および配列番号12の軽鎖を含む前記抗体。

【請求項 1 6】

hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体であって、配列番号48のV<sub>H</sub>ドメインおよび配列番号49のV<sub>L</sub>ドメインを含む前記抗体。

【請求項 1 7】

hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体であって、配列番号50の重鎖および配列番号51の軽鎖を含む前記抗体。

20

【請求項 1 8】

IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgMからなる群より選択されるヒト重鎖定常領域をさらに含む、請求項 1 ~ 17のいずれか 1 項に記載の治療用抗体。

【請求項 1 9】

定常領域がIgGアイソタイプ、例えばIgG1またはIgG4、のものである、請求項18に記載の治療用抗体。

【請求項 2 0】

定常領域がIgG1のものである、請求項19に記載の治療用抗体。

【請求項 2 1】

定常領域が、前記抗体を非溶解性とするように突然変異されている、請求項20に記載の治療用抗体。

30

【請求項 2 2】

前記抗体がhOSMのサイトIIとgp130との相互作用をモジュレートする、請求項 1 ~ 21のいずれか 1 項に記載の治療用抗体。

【請求項 2 3】

前記抗体が前記相互作用を阻害する、請求項22に記載の治療用抗体。

【請求項 2 4】

前記抗体が前記相互作用を遮断する、請求項23に記載の抗体。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 24のいずれか 1 項に記載の治療用抗体の抗原結合フラグメント。

40

【請求項 2 6】

前記フラグメントがFab、Fab'、Fd、F(ab)<sub>2</sub>、ScFvからなる群より選択される、請求項25に記載のフラグメント。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 26のいずれか 1 項に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。

【請求項 2 8】

hOSMとgp130との相互作用のモジュレーションに応答性である疾患または障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

50

## 【請求項 29】

慢性の炎症性疾患または障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 30】

関節炎性疾患または障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 31】

前記患者が慢性関節リウマチおよび/または変形性関節症を患っている、請求項30に記載の方法。

## 【請求項 32】

喘息またはCOPDなどの炎症性肺疾患を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 33】

乾癬を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 34】

アテローム性動脈硬化症などの心血管疾患もしくは障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 35】

カポジ肉腫を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項27に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

## 【請求項 36】

慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、喘息、COPDのような、hOSMとgp130との相互作用のモジュレーションに応答性である疾患を治療するための医薬の製造における、請求項1～26のいずれか1項に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの使用。

## 【請求項 37】

請求項1～20のいずれか1項に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを含んでなる医薬。

## 【請求項 38】

請求項1～26のいずれか1項に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの重鎖および/または軽鎖をコードするプラスミドのようなベクターであって、例えば請求項39～46のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む、前記ベクター。

## 【請求項 39】

配列番号9のV<sub>H</sub>ドメインをコードするポリヌクレオチドであって、配列番号17の配列を含むか、または実質的に配列番号17の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 40】

配列番号10のV<sub>L</sub>ドメインをコードするポリヌクレオチドであって、配列番号18の配列を含むか、または実質的に配列番号18の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 41】

配列番号11の重鎖をコードするポリヌクレオチドであって、配列番号19の配列を含むか、または実質的に配列番号19の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 42】

配列番号12の軽鎖をコードするポリヌクレオチドであって、配列番号20の配列を含むか、または実質的に配列番号20の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 43】

配列番号48のV<sub>H</sub>ドメインをコードするポリヌクレオチドであって、配列番号54の配列を含むか、または実質的に配列番号54の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 44】

配列番号49のV<sub>L</sub>ドメインをコードするポリヌクレオチドであって、配列番号55の配列

10

20

30

40

50

を含むか、または実質的に配列番号55の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

【請求項45】

配列番号50の重鎖をコードするポリヌクレオチドであって、配列番号56の配列を含むか、または実質的に配列番号56の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

【請求項46】

配列番号51の軽鎖をコードするポリヌクレオチドであって、配列番号57の配列を含むか、または実質的に配列番号57の配列からなる前記ポリヌクレオチド。

【請求項47】

請求項38に記載のベクターを含む、安定に形質転換されたまたはトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

10

【請求項48】

配列番号17のポリヌクレオチドを含む第1のベクターと、配列番号18のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む、安定に形質転換されたまたはトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

【請求項49】

配列番号19のポリヌクレオチドを含む第1のベクターと、配列番号20のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む、安定に形質転換されたまたはトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

【請求項50】

配列番号54のポリヌクレオチドを含む第1のベクターと、配列番号55のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む、安定に形質転換されたまたはトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

20

【請求項51】

配列番号56のポリヌクレオチドを含む第1のベクターと、配列番号57のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む、安定に形質転換されたまたはトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

【請求項52】

前記細胞が脊椎動物細胞である、請求項47～51のいずれか1項に記載の宿主細胞。

【請求項53】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項52に記載の宿主細胞。

30

【請求項54】

前記細胞がCHOまたはNS0である、請求項53に記載の宿主細胞。

【請求項55】

請求項47～51のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、治療用抗体の製造方法。

【請求項56】

請求項15に記載の治療用抗体とOSM、特にhOSM、さらに特定するとhOSMのサイトII、との結合を、ELISAに基づくアッセイにおいて、競合的に阻害する抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該競合抗体が配列番号42のCDRH3を含まないことを条件とする、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項57】

請求項56に記載の競合抗体を含む医薬組成物。

【請求項58】

hOSMとgp130との相互作用のモジュレーションに応答性である(関節炎性疾患、例えば慢性関節リウマチおよび/または変形性関節症のような)疾患または障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、治療に有効な量の請求項57に記載の組成物を投与することを含んでなる前記方法。

【請求項59】

慢性関節リウマチ、若年性関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎のような関節炎性疾患、慢性ブランク疾患のような乾癬、COPDまたは重症喘息のような炎症性肺疾患、MS、アル

50

ツハイマー病のような認知症、神経因性疼痛または炎症性疼痛のような疼痛、アテローム性動脈硬化症、癌(例えば前立腺癌)のような細胞周期調節の疾患、骨髄腫からなる群より選択される疾患または障害を治療するための医薬の製造における、グリコシル化hOSMのタンパク質バックボーンに特異的に結合する(請求項15または17に記載の抗体のような)治療用抗体の使用。

【請求項60】

hOSMに特異的に結合し、かつhOSMのサイトIIとgp130との相互作用をモジュレートする第1の治療用抗体、ならびに、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMのサイトIIIとOSMR および/またはLIFRとの相互作用をモジュレートする第2の治療用抗体を含む医薬組成物。

【請求項61】

hOSMに結合し、かつ(a) hOSMのサイトIIとgp130との相互作用、ならびに(b) hOSMのサイトIIIとOSMR および/またはLIFRとの相互作用、の両方をモジュレートする二重特異性治療用抗体を含む医薬組成物。

【請求項62】

hOSMに結合し、かつ(a) hOSMのサイトIIとgp130との相互作用、ならびに(b) hOSMのサイトIIIとOSMR および/またはLIFRとの相互作用、の両方をモジュレートする少なくとも第1のアンタゴニストを含む医薬組成物。

【請求項63】

gp130および/またはOSMR および/またはLIFRに結合し、かつ(a) gp130とhOSMとの相互作用、ならびに(b) OSMR および/またはLIFRとhOSMとの相互作用をモジュレートする(例えば阻害または遮断する)少なくとも第1のアンタゴニスト(例えば抗体などのタンパク質性アンタゴニスト)を含む医薬組成物。

【請求項64】

OSM、特にhOSM、に結合すると予想される抗体(例えばOSM/hOSMに対して誘発された抗体)をスクリーニングする方法であって、以下のステップ:

- (a) 前記抗体をグリコシル化OSM、特にグリコシル化hOSMと、結合を可能にする条件下でインキュベートすること;
  - (b) 前記抗体の結合親和性を測定すること;
  - (c) 前記抗体が1  $\mu$ Mより強い、典型的には100nMより強い結合親和性を有する場合は、その抗体を選択すること;
  - (d) ステップ(c)の抗体をコードするポリヌクレオチドを用意して、該ポリヌクレオチドを含むベクターを用いて哺乳動物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすること;
  - (e) 前記抗体の培地中への分泌を許容する条件下でステップ(d)の宿主細胞を培養すること;
  - (f) 場合により、ステップ(e)の培地を精製すること;
  - (g) ステップ(e)または(f)の抗体を医薬組成物に組み入れること;
- を含む前記方法。

【請求項65】

OSM、特にhOSM、に結合すると予想される抗体(例えばOSM/hOSMに対して誘発された抗体)をスクリーニングする方法であって、以下のステップ:

- (a) 前記抗体をグリコシル化OSM、特にグリコシル化hOSMと、結合を可能にする条件下でインキュベートすること;
  - (b) 前記抗体の結合親和性を測定すること;
  - (c) 前記抗体が1  $\mu$ Mより強い、典型的には100nMより強い結合親和性を有する場合は、その抗体を選択すること;
- を含む前記方法。

【請求項66】

OSMがCHOのような哺乳動物宿主細胞によりグリコシル化されている、請求項64または65に記載の方法。

【請求項67】

10

20

30

40

50

hOSMが天然のグリコシル化hOSMである、請求項64または65に記載の方法。

【請求項68】

hOSMがヒト、特にRAのような関節炎性疾患を患っているヒト、の滑液から分離されたものである、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

請求項65～68のいずれか1項に記載の方法により同定された抗体。

【請求項70】

請求項69に記載の抗体および製薬上の不活性担体を含む医薬組成物。

【請求項71】

hOSMに結合可能であることに加え、cOSMにも結合可能である、請求項1に記載の治療用抗体。 10

【請求項72】

生物学的サンプル、特にヒト滑液またはヒト血清、中のhOSMの検出方法であって、ELISAに基づくアッセイにおいてサイトIII抗体を捕捉抗体として使用することを含む前記方法。

【請求項73】

ELISAに基づくアッセイが本質的に実施例16のものである、請求項72に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オンコスタチンM(OSM)、特にヒトOSM(hOSM)に特異的に結合する免疫グロブリンに関する。より詳細には、本発明はhOSMに特異的に結合する抗体に関する。本発明はまた、前記免疫グロブリンを用いた疾患または障害の治療方法、前記免疫グロブリンを含む医薬組成物、および製造方法に関する。本発明の他の態様は以下の記載から明らかとなる。 20

【背景技術】

【0002】

オンコスタチンMは28kDaの糖タンパク質であり、サイトカインのインターロイキン6(IL-6)ファミリーに属する。このファミリーにはIL-6、白血病阻害因子(LIF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、カルジオトロピン-1(CT-1)およびカルジオトロピン-1様サイトカインも含まれ(Kishimoto Tら(1995) Blood 86: 1243-1254を参照のこと)、これらはgp130膜貫通型シグナル伝達受容体を共有している(Taga T and Kishimoto T(1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819を参照されたい)。OSMはそもそもメラノーマ細胞系A375の増殖を阻害する能力によって発見された(Malik N(1989)ら Mol Cell Biol 9: 2847-2853を参照されたい)。その後、他にも多くの作用が発見され、OSMはIL-6ファミリーの他のメンバーと同様に多機能型メディエーターであることが見出された。OSMは種々の細胞型で産生され、細胞型の例としてはマクロファージ、活性化T細胞(Zarling JM(1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743を参照のこと)、多形核好中球(Grenier Aら(1999) Blood 93:1413-1421を参照のこと)、好酸球(Tamura Sら(2002) Dev. Dyn. 225: 327-31を参照のこと)、樹状細胞(Suda Tら(2002) Cytokine 17:335-340を参照のこと)が挙げられる。またOSMの発現は、膵臓、腎臓、精巣、脾臓、胃および脳(Znoyko Iら(2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283: 182-186を参照のこと)、ならびに骨髄(Psenak Oら(2003) Acta Haematol 109: 68-75を参照のこと)でも見られる。その主要な生物学的作用としては、内皮細胞の活性化(Brown TJら(1993) Blood 82: 33-7を参照のこと)、急性期反応の活性化(Benigni Fら(1996) Blood 87: 1851-1854を参照のこと)、細胞増殖または細胞分化の誘導、炎症性メディエーター放出および造血のモジュレーション(Tanaka Mら(2003) 102: 3154-3162を参照のこと)、骨の改造(de Hooge ASK(2002) Am J Pathol 160: 1733-1743を参照のこと)、ならびに、血管新生の促進(Vasse Mら(1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:1835-1842を参照のこと)および創傷治癒の促進が挙げられる。 40

【0003】

OSMのレセプター (OSMレセプター、「OSMR」)は多様な細胞で発現され、例えば上皮細胞、軟骨細胞、繊維芽細胞(Langdon Cら(2003) J Immunol 170: 548-555を参照のこと)、神経細胞、平滑筋、リンパ節、骨、心臓、小腸、肺および腎臓(Tamura Sら(2002) Mech Dev 115: 127-131を参照のこと)、ならびに内皮細胞によって発現される。いくつかの証拠から、内皮細胞がOSMの主要な標的であることが示唆されている。内皮細胞は高親和性型と低親和性型の両受容体を10~20倍多く発現し、OSMで刺激された後は顕著で長期的な表現型の変化を示す(Modur Vら(1997) J Clin Invest 100: 158-168を参照のこと)。その上OSMは、内皮細胞が起源であると考えられているカポジ肉腫の主要な自己分泌増殖因子である(Murakami-Mori Kら(1995) J Clin Invest 96:1319-1327を参照のこと)。

10

## 【0004】

他のIL-6ファミリーのサイトカインと同様に、OSMは膜貫通型シグナル伝達糖タンパク質gp130に結合する。gp130サイトカインの主要な特徴は、リガンドに応じて1以上の共受容体とgp130を含むオリゴマー受容体複合体を形成することである(Heinrich PCら(2003) Biochem J. 374: 1-20に総説されている)。結果としてこれらのサイトカインは、形成される受容体複合体の組成に応じてin vitroおよびin vivoで、共通の生物学的活性と固有の生物学的活性を両方とも仲介することができる。ヒトOSM(hOSM)は他のIL-6サイトカインと相違しており、つまりヒトOSMはgp130と2種類の共受容体のいずれか一方(LIFRまたはオノスタチン受容体(OSMR))と複合体を形成しうる点で相違する。図1にhOSMと、gp130、LIFRおよびOSMRとの相互作用を示してある。hOSMの結晶構造は解明されており、hOSMが2箇所の潜在的グリコシル化部位を有するヘリックスの4本束を含むことが示された。部位特異的突然変異誘発を行うことにより、hOSM分子には2つの分離したリガンド結合サイトが同定された(Deller MCら(2000) Structural Fold Des. 8:863-874を参照されたい)。サイトIIと呼ばれる(「サイト2」とも呼ばれる)最初のサイトはgp130と相互作用し、該分子の反対側の末端に存在するサイトIIIと呼ばれる(「サイト3」とも呼ばれる)2つ目のサイトはLIFRまたはOSMRのいずれかと相互作用する。突然変異誘発実験から、LIFRおよびOSMRの結合サイトはほぼ同一であるが、1個のアミノ酸の突然変異によってこれら2つを区別できることが明らかにされた。

20

## 【0005】

OSMは、疎水性の25アミノ酸(AA)N末端シグナル配列および33アミノ酸のC末端プロペプチドを含むプロタンパク質として合成され、これらが両方とも切断されて成熟OSMが生成する。OSMプロタンパク質は生物学的活性を示すが、その活性はC末端プロペプチドの切断によって著しく増加する(Bruce A.G.ら(1992) Prog.Growth Factor Res. 4: 157-170およびMalik Nら(1989) Mol.Cell Biol. 9: 2847-2853を参照されたい)。OSMは「コンパクトな樽状分子」と記載されており、その寸法は約20 × 27 × 56 である。4つのヘリックス領域(ヘリックスA 10~37AA、ヘリックスB 67~90AA、ヘリックスC 105~131AAおよびヘリックスD 159~185AA; AAの番号付けはシグナル配列が除去された後から開始する)が存在する。ヘリックスAおよびCには「ねじれ」がある。これらのヘリックスは2つのオーバーハンドループ(ABループ38~66AA、CDループ130~158AA)によって一緒にされ、2つの逆平行ペア(A-DおよびB-C)として配置される。(Deller M.Cら(2000) Structure 8; 863-874を参照のこと)。

30

40

## 【0006】

OSMのサイトIIを介したgp130との結合は、別のOSM分子がサイトIII相互作用によってgp130に結合することを可能にするようである。OSMはまた、サイトIIIを介してLIFRまたはOSMRにも結合する。従ってOSMは、1個のgp130分子、1個のLIFRまたはOSMR分子、および2個のOSM分子からなる、その受容体との複合体を形成する。(Sporeno E(1994) J.Biol.Chem.269: 10991-10995、Staunton Dら(1998) Prot.Engineer 11:1093-1102およびGearring D.P(1992) Science 225:306-312を参照のこと)。

## 【0007】

突然変異誘発を用いると、サイトII OSM - gp130結合に重要な残基はGln20、Gly120、Gl

50

n16およびAsn124である。サイトIII OSM - OSMR結合については、重要な残基はPhe160およびLys163である。このことからOSM サイトII相互作用は、hOSM上のGln20、Gly120、Asn124に依存し、これらほどではないがGln16にも依存する。gp130中の3つの相補的な残基(Phe169、Tyr196およびGlu282)が、OSMとgp130の相互作用において特に重要な残基として同定された。(Deller Mら (2000) Structure 8:863-874、Aasland Dら (2002) J.Mol.Biol. 315: 637-646、Timmermann Aら (2000) FEBS Lett.468: 120-124を参照されたい)。

## 【0008】

hOSMの1位から開始されるアミノ酸配列は、配列番号13に示した通りである：

```
MGVLLTQRTLLSLVLALLFSPMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQD
TSRLLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLOTLNAT
LGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLOMARPNILGLRNNIYCM
AQLLDNSDTAEPKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHS
VGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTSPSRKGRMLMTRGQLPR
```

10

(配列番号13)

特に重要なサイトII残基は、太字で強調するとともに下線を引いた。

## 【0009】

hOSMをコードするcDNAは配列番号14に示す：

```
ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC
CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAG
TACCGCGTGCTCCTTGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGAC
ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATGTTCCCT
AAACTGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCCAGTGAGGAG
ACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCCTGCAGACCCTCAATGCCACA
CTGGGCTGCGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCCTCCCCAAG
GCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATCGAGGACTTGAGAGAAGCTG
CAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATCTACTGCATG
GCCAGCTGCTGGACAACTCAGACACGGCTGAGCCCACGAAGGCTGGCCGG
GGGGCCTCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTGCCTCGGATGCTTTTCAGCGC
AAGCTGGAGGGCTGCAGGTTCTGCATGGCTACCATCGCTTCATGCACTCA
GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGA
CACAGCCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGGGTGCAGGACCAGACCCTCC
AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG
```

30

40

(配列番号14)

## 【0010】

慢性関節リウマチ(RA)は、明確に区別されるが相互に関連した一連の病的過程を含む。これらは、局所性および全身性炎症、滑膜細胞の増殖、血管新生およびマトリックス沈着であり、軟骨と骨に侵入してこれらを破壊するパンヌス組織の形成をもたらす、結果的に

50

奇形と身体障害を生じる。この病理を支えているのは、炎症を起こした関節に入り込みそこに定着する細胞からの、また、内在性関節組織細胞からのサイトカインおよび炎症性メディエーターの慢性的な放出である (Firestein G (2003) in *Rheumatology*. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 855-884を参照されたい)。RAを発病するイベントは不明であるが、豊富な証拠から、外来の抗原または自己由来の「自己」抗原によるTリンパ球の活性化が関わっていることが示唆される (Firestein G (2004) *J Clin Invest* 114: 471-4を参照されたい)。ひとたび病的過程が開始されたら、進行中の病的過程を維持するのにどの程度のT細胞が必要なのかも定かではないが、T細胞を特異的に標的とするCTLA4Igなどの治療剤は進行した疾患には有効でありうる (Kremer JMら (2003) *New Engl J Med* 349: 1907-15、Moreland Lら (2004) Annual meeting of the American College of Rheumatology Abstract 1475を参照されたい)。

#### 【0011】

リウマチ性滑膜炎の発生の初期イベントでは、単核および多核細胞が動員されて滑膜内層の毛細管の内皮を横断する必要がある。多形核細胞が滑液(SF)内に移動するのに対して、リンパ球は毛細管の付近にとどまり、その後異所性リンパ系小節に組織化される。この免疫細胞の流入の後に繊維芽細胞様滑膜細胞 (FLS)が増殖する。それらの正常な対応細胞と異なり、RA FLSは増殖の停止とアポトーシスをもたらす調節プロセスから逸脱して、それらを継続的に蓄積させるようである (Yamanishi Yら (2004) *Arthritis Res Ther* 7: 12-18を参照のこと)。その上、新たに出現するパンヌス組織がこのとき細胞外マトリックスに支えられた新しい血管を形成させ、さらなる増殖を可能にする。繊維芽細胞増殖、マトリックス改造および血管新生を伴うこのプロセスは、制御されていない創傷治癒イベントに酷似している。単球は発達中のパンヌス組織内に移動し、長期的に活性化された表現型を有するマクロファージへの分化を遂げる。同様にB細胞は最終分化を遂げて、抗体 (リウマチ因子も含まれる) を分泌する長命の形質細胞を形成する。炎症を起こした滑膜が骨髓細胞およびリンパ球様細胞の局所的分化を維持する能力は、一部には、GM-CSFおよびIL-6などの増殖因子の局所的産生に基づく。FLSおよび常在する単核白血球はいずれも、血液からのさらなる炎症性細胞の動員を刺激しかつ、極めて重要なことだが、疾患過程の次のステップ (すなわち、関節軟骨の破壊と骨の改造) を推進する可溶性因子を放出する。パンヌス組織は侵襲性である。その最先端は、軟骨や骨の構造的完全性を維持する細胞の表現型を変更する、MMPなどの破壊的な酵素およびサイトカインを分泌する。その結果、プロテオグリカンが失われ、また、II型コラーゲンが不可逆的に切断されて、軟骨の弱体化と損失をもたらす。骨にもいくつかの顕著な変化が生じるが、例えば病巣の侵食や肋軟骨下の骨粗鬆症である。最終的にこれらの変化は、進行したRAで観察される、特徴的な関節の奇形と不全脱臼をもたらす (Gordon D and Hastings D (2003) in *Rheumatology*. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 765-780を参照されたい)。

#### 【0012】

RAは全身性の疾患であるが、それはおそらく炎症性メディエーターが関節から血液に回る結果である。これは皮膚、眼、肝臓、腎臓、脳および血管内膜を含む身体の多くの器官系を冒し、罹病率と死亡率を増加させる (Matteson EL (2003) in *Rheumatology*. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 781-792を参照のこと)。死亡率増加の大部分はアテローム性動脈硬化症によって引き起こされる心血管疾患が原因である。なぜならばリウマチ性滑膜炎の発生に関わる病態形成過程の多くはアテローム性動脈硬化性プラークの形成に共通しているからである。

#### 【0013】

RAの治療は、疼痛を制御し、炎症を低減させ、組織破壊をもたらすプロセスを阻止することに狙いを定めている。伝統的にはRAは非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs)、低用量のステロイド剤、およびいわゆる疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) を用いて治療されてきた。低レベルの薬効、遅い薬効の発現、毒性、低い許容性、および経時的な抵抗性の増加のため、メトトレキセート (MTX)、スルファサラジン、金およびレフルノミドを含むこれらの

治療薬の使用には悩まされる。最近では、サイトカインの1種である腫瘍壊死因子(TNF)を阻害するEnbrel<sup>TM</sup>、Remicade<sup>TM</sup>およびHumira<sup>TM</sup>などの生物学的薬剤の導入が大きな進展をとげた(Roberts L and McColl GJ (2004) Intern Med J 34:687-93を参照されたい)。

#### 【0014】

従って本発明の目的は、RAならびに他の疾患および障害、特に変形性関節症や乾癬などといった慢性炎症性疾患および障害の処置に対する治療アプローチを提供することである。具体的には本発明の目的は、OSM(例えばhOSM、特にそのサイトII)に特異的に結合し、かつOSMとgp130の相互作用をモジュレート(すなわち阻害または遮断)する免疫グロブリン、特に抗体を、前記相互作用のモジュレーションに応答する疾患および障害の処置において提供することである。

10

#### 【0015】

OSM - gp130相互作用をモジュレートすることが、これらの疾患および障害の治療に有用であるという仮説を裏付ける証拠は増えつつある。

#### 【0016】

##### 臨床的証拠

OSMはヒトRA患者のSFに存在する(Hui W ら (1997) 56: 184-7を参照されたい)。OSMのレベルは、SF中の好中球の数、SF中のTNF (「TNF」とも言う)のレベル、および軟骨破壊のマーカーと相関する(Manicourt DH ら (2000) Arthritis Rheum 43: 281-288)。その上、RA患者由来の滑膜組織は体外でOSMを自発的に分泌する(Okamoto H ら (1997) Arthritis and Rheumatism 40: 1096-1105を参照されたい)。OSMは滑膜マクロファージ中に存在することにも実証されており(Cawston TE ら (1998) Arthritis Rheum 41: 1760-1771)、また、前述のようにOSM受容体およびgp130は内皮細胞、滑膜繊維芽細胞、軟骨細胞および骨芽細胞上で発現されている。さらに、アテローム性プラークおよび大動脈瘤に浸潤している細胞はOSMを発現し、このことは該サイトカインと慢性炎症の関連性を示唆している(Mirshahi F ら (2001) Ann NY Acad Sci 936: 621-4を参照のこと)。

20

#### 【0017】

##### in vitro 証拠

内皮細胞は、他の細胞型よりも10~20倍の数のOSM受容体を発現する(Brown TJ ら (1991) J Immunol 147: 2175-2180、Linsley PS ら (1989) J Biol Chem 264: 4282-4289を参照のこと)。OSMは、単独でまたは他のサイトカインと組み合わせさせて相乗的に、内皮を活性化してサイトカインおよびケモカインを放出させ、また、好中球、単核白血球およびリンパ球に結合して滑膜組織へのそれらの血管外遊出を媒介する (Modur V ら (1997) J Clin Invest 100: 158-168を参照のこと)。OSMはまた、血管新生の強力な刺激物質であること(Vasse M ら (1999) Atheroscler Thromb Vasc Biol 19: 1835-1842を参照のこと)、滑膜繊維芽(FLS)細胞の活性化と増殖(そのことによりパンヌス組織の形成、IL-6やMMPの放出を促進する)を強く刺激する物質であること、ならびにTNFおよびIL-1と相乗的に作用してこうしたメディエーター放出を誘導すること(Langdon C ら (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196を参照のこと)が実証されている。OSMはまた、IL-1とともに、軟骨からのコラーゲンおよびプロテオグリカン放出を誘導することが実証されている(Cawston T ら (1995) Biochem Biophys Res Commun 215: 377-385を参照のこと)。その上、OSMは肝細胞からの急性期タンパク質の放出およびIL-6受容体の産生を誘導し(Cichy J ら (1997) J Immunol 159: 5648-5643、Kurash JK (2004) Exp Cell Res 292: 342-58を参照のこと)、そのためリウマチ様炎症の全身作用(疲労も含まれる)の一因となりうる。さらに、OSMはin vitroで破骨細胞の分化および活動を誘導する(Palmqvist P ら (2002) J Immunol 169: 3353-3362を参照されたい)。

30

40

#### 【0018】

##### in vivo 証拠

正常マウスの関節でマウスOSM(mOSM)をアデノウイルスにより発現させると、結果的に深刻な炎症性で侵食性の関節炎が生じる(Langdon C ら (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196を参照されたい)。同様の侵襲性疾患が、アデノウイルスmOSM送達後に、TNF、IL-1、IL

50

-6およびiNOSを欠いたノックアウトマウスにおいて観察され(de Hooge ASKら (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761を参照のこと)、このことはOSMが関節炎病理学のあらゆる面を仲介することを実証している。アデノウイルス発現mOSMベクターを用いたマウスOSMの発現は、若年性特発性関節炎に典型的な成長板への損傷を引き起こす(de Hooge ASKら (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761を参照されたい)。コラーゲン誘発関節炎の実験モデルでは、マウスに治療用に投与された抗OSM抗体が、疾患のさらなる進行を全て防止した。ヒト疾患との関連を示す再発/寛解型モデルであるプリスタン誘発関節炎のマウスに抗OSM抗体を予防的に投与したところ、同様の結果が観察された(Plater-Zyberk Cら (2001) Arthritis and Rheumatism 44: 2697-2702を参照のこと)。サルについては、皮下注入されたOSMは急性期反応および局所慢性炎症を誘発させる(Loy JKら (1999) Toxicol Pathol 27: 151-155を参照されたい)。OSMは、ヤギ関節に注入すると、単核球およびPMN(多核白血球細胞)の浸潤およびプロテオグリカンの放出を誘発することが実証されている(Bell MCら (1999) Arthritis Rheum 42: 2543-2551を参照のこと)。マウスリンパ節でのmOSMのトランスジェニック過剰発現は、胸腺外T細胞成熟、記憶T細胞の増殖、および自己免疫T細胞除去の失敗をもたらす(Louis Iら (2003) Blood 102: 1397-1404を参照のこと)。脾臓でのOSMのトランスジェニック過剰発現は、進行したRA滑膜で観察されるものと類似した広範な繊維症を引き起こす(Malik Nら (1995) Mol Cell Biol 15: 2349-2358を参照のこと)。

10

## 【0019】

国際公開第99/48523号において、本発明者らは炎症性疾患および障害の治療におけるOSMアンタゴニストの使用を開示した。この開示は関節炎のマウスモデルにおいて抗マウスOSM抗体を用いた。

20

## 【0020】

本明細書に開示するあらゆる特許文献および学術文献は、参照することにより本明細書にその全体をそのまま組み入れるものとする。

## 【発明の開示】

## 【0021】

発明の概要

本発明者らは、hOSMに特異的に結合する抗体を用いてhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートすること(特に遮断すること)は、あらゆる潜在的OSM受容体複合体によるシグナル伝達をモジュレートし、このサイトカインの生物学的活性を治療上有意な程度に効果的に中和するであろうと予想する。それにもかかわらず、本発明者らは、hOSMのサイトIIとサイトIIIの両方を遮断することが、このサイトカインの中和を驚くほど改善することを見出した。その上、本発明者らは、hOSMのグリコシル化が、hOSMに特異的に結合する抗体とhOSMとの結合イベントにおいて予期せざる役割を果たすことを見出した。

30

## 【0022】

従って本発明は、hOSMに特異的に結合しかつhOSMのサイトIIと相互作用する治療用抗体15E10または10D3(これはキメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントであってもよい)を提供する。下記の表Aを参照されたい。

## 【0023】

本発明のある実施形態においては、hOSMに特異的に結合しかつhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。いくつかの実施形態において治療用抗体またはその抗原結合フラグメントはhOSMのサイトIIに特異的に結合する。

40

## 【0024】

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合しかつ配列番号3または配列番号42のCDRH3を含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

## 【0025】

本発明の別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合しかつ次のCDR:

CDRH1: 配列番号1

50

CDRH2：配列番号 2

CDRH3：配列番号 3

CDRL1：配列番号 4

CDRL2：配列番号 5

CDRL3：配列番号 6

を含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 2 6 】

本発明の別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合しかつ次のCDR：

CDRH1：配列番号 40

CDRH2：配列番号 41

CDRH3：配列番号 42

CDRL1：配列番号 43

CDRL2：配列番号 44

CDRL3：配列番号 45

を含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 2 7 】

本明細書全体を通して、「CDR」、「CDRL1」、「CDRL2」、「CDRL3」、「CDRH1」、「CDRH2」、「CDRH3」という用語は、Kabatら；Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987に記載された通りの、Kabatのナンバリングシステムに従う。従って本発明におけるCDRは以下のように定義される：

CDR： 残基

CDRH1：31～35B

CDRH2：50～65

CDRH3：95～102

CDRL1：24～34

CDRL2：50～56

CDRL3：89～97

【 0 0 2 8 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号7の配列を有する $V_H$ ドメインおよび配列番号8の配列を有する $V_L$ ドメインを含むマウス治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号46の配列を有する $V_H$ ドメインおよび配列番号47の配列を有する $V_L$ ドメインを含むマウス治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明のある実施形態においては、配列番号9に記載の配列を有する $V_H$ 鎖および配列番号10に記載の配列を有する $V_L$ ドメインを含むヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 3 1 】

本発明のある実施形態においては、配列番号48に記載の配列を有する $V_H$ 鎖および配列番号49に記載の配列を有する $V_L$ ドメインを含むヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 3 2 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号11に記載の配列を有する重鎖および配列番号12に記載の配列を有する軽鎖を含むヒト化治療用抗体を提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号50に記載の配列を有する重鎖および配列番号51に記載の配列を有する軽鎖を含むヒト化治療用抗体を提供する。

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

本発明の別の実施形態においては、hOSMとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0035】

本発明の別の実施形態においては、配列番号7または配列番号9または配列番号46または配列番号48に記載の配列を含む(または本質的にこれらの配列からなる)抗体の単離されたV<sub>H</sub>ドメインを提供する。

【0036】

本発明の別の実施形態においては、配列番号7、配列番号9、配列番号46および配列番号48からなる群より選択されるV<sub>H</sub>ドメインを含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0037】

本発明の別の実施形態においては、配列番号3のCDRH3を含む治療用抗体の結合を競合的に阻害する治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0038】

本発明の別の実施形態においては、配列番号1、2、3、4、5および6のCDRを含む治療用抗体とhOSMの結合を競合的に阻害する治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0039】

本発明の別の実施形態においては、配列番号11の重鎖および配列番号12の軽鎖を含む治療用抗体とhOSMの結合を競合的に阻害する治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0040】

本発明の別の実施形態においては、hOSMとgp130の相互作用のモジュレーションに応答性である疾患または障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0041】

本発明の別の実施形態においては、炎症性疾患または障害を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0042】

本発明の別の実施形態においては、関節炎性疾患、特に慢性関節リウマチ、若年性関節炎または変形性関節症を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0043】

本発明の別の実施形態においては、軟骨の劣化を患っている(または軟骨の劣化を受けやすい)ヒト患者における軟骨劣化を軽減または予防する方法であって、該患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0044】

本発明の別の実施形態においては、TNF $\alpha$ の減少に応答性の疾患または障害を患っている患者におけるTNF $\alpha$ の産生量を減少させる方法であって、該患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

【0045】

本発明の別の実施形態においては、関節炎性疾患または障害の関節外症状の治療法であって、関節炎性疾患または障害の関節外症状を患っているヒト患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【0046】

本発明の別の実施形態においては、内皮細胞を起源とするの疾患を患っているヒト患者の治療法であって、該患者に、有効量の本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを投与するステップを含んでなる前記方法を提供する。

## 【0047】

本明細書に記載の疾患および障害の治療用の医薬の製造における、本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの使用もまた提供される。

## 【0048】

本発明の別の実施形態においては、本明細書に記載の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの製造方法を提供する。

10

## 【0049】

本発明の別の実施形態においては、OSM(特にhOSM)と相互作用パートナー(例えばgp130、LIFR、OSMR)との相互作用を検査するためのアッセイ法(特にELISAアッセイ法)であって、前記検査のためにグリコシル化OSM(典型的には哺乳動物宿主細胞などの脊椎動物宿主細胞によりグリコシル化されたもの、例えばCHOグリコシル化されたもの)のサンプルを用意するステップを含んでなる前記アッセイ法を提供する。

## 【0050】

本発明の別の実施形態においては、天然のグリコシル化hOSMに特異的に結合し、かつ天然のグリコシル化hOSMと、gp130、LIFR、およびOSMR からなる群より選択される相互作用パートナーとの相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)治療用抗体

20

## 【0051】

hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)治療用抗体を含む医薬組成物の製造方法をさらに提供するが、該方法は次のステップ：

- (a) 候補抗体を用意すること；
  - (b) グリコシル化OSM(特に組換えにより形質転換されたCHO細胞などの、組換えにより形質転換もしくはトランスフェクトされた哺乳動物宿主細胞から産生されるhOSMおよび/または天然のグリコシル化hOSM)を用意すること；
  - (c) 結合を可能にする条件下でステップ(a)の抗体をステップ(b)のhOSMと接触させること
  - ；
  - (d) ステップ(c)における抗体がhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするかを確認すること；
  - (e) 場合により前記ステップ(a)または(d)の抗体をヒト化すること；
  - (f) 前記ステップ(d)または(e)の抗体を医薬組成物に組み入れること；
- を含んでなる。

30

## 【0052】

本発明の他の構成、目的および効果は以下の説明から明らかとなる。

## 【0053】

発明の詳細な説明

40

1. 抗体構造1.1 完全抗体

完全な抗体は通常、少なくとも2本の重鎖および2本の軽鎖を含むヘテロ多量体糖タンパク質である。IgMはさておき、完全な抗体は2本の同一の軽(L)鎖および2本の同一の重(H)鎖で構成される約150Kdaのヘテロ四量体糖タンパク質である。典型的には、それぞれの軽鎖は1つのジスルフィド共有結合により重鎖に連結されているが、種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間のジスルフィド結合の数は変動する。それぞれの重鎖および軽鎖はまた、鎖内ジスルフィド結合をも有する。それぞれの重鎖は一方の端に可変ドメイン( $V_H$ )を有し、それにいくつかの定常領域が続く。それぞれの軽鎖は可変ドメイン( $V_L$ )を有し、その反対の端に1つの定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定

50

常領域と整列しており、かつ軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。ほとんどの脊椎動物種由来の抗体の軽鎖は、定常領域のアミノ酸配列に基づいて およびと呼ばれる2つ型のどちらかに割り当てることができる。重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、ヒト抗体は異なる5つのクラスIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMに分類することができる。IgGおよびIgAはさらにサブクラスであるIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4；ならびにIgA1およびIgA2に分類することができる。マウスおよびラットについては種変異型が存在し、少なくともIgG2a、IgG2bを有する。抗体の可変ドメインは、特定の領域が相補性決定領域(CDR)と呼ばれる特定の可変性を示して、抗体に結合特異性を付与する。可変領域の相対的に保存されている部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれている。完全な重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ3つのCDRにより連結された4つのFRを含む。各鎖のCDRは、FR領域によって近接した状態で一緒に保持され、他方の鎖からのCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常領域は抗体が抗原に結合することに直接には関与しないが、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)への関与、Fc 受容体への結合を介した食作用、新生児Fc受容体(FcRn)を介した半減期/クリアランス速度、補体カスケードのC1q構成要素を介した補体依存性細胞傷害を示す。

10

#### 【0054】

従ってある実施形態においては、hOSMに特異的に結合する完全な治療用抗体であって、hOSMとgp130の相互作用をモジュレートする該抗体を提供する。前記抗体はhOSMのサイトIに特異的に結合して、hOSMと、OSM相互作用に関与するgp130上の対応する残基との相互作用を阻害または遮断することができる。実施例に記載のELISAプロトコルを使用して、ある特定の抗体またはその抗原結合フラグメントが、hOSMとgp130の相互作用をモジュレートするかを確認することができる。治療用の完全抗体は上述した任意のアイソタイプまたはそのサブクラスの定常領域(重鎖または軽鎖のいずれか)を含み得る。ある実施形態において、抗体はIgGアイソタイプ、特にIgG1型のものである。抗体はラット、マウス、ウサギ、霊長類またはヒト抗体であってよい。ある典型的な実施形態においては、抗体は霊長類(例えばカニクイザル、旧世界ザルまたは類人猿など、例えば国際公開W099/55369、国際公開W093/02108を参照のこと)またはヒト抗体である。

20

#### 【0055】

別の実施形態においては、配列番号3または配列番号42のCDRH3を含む治療用完全抗体を提供する。別の実施形態においては、配列番号1、2、3、4、5および6のCDRを有する可変領域、または配列番号40、41、42、43、44および45の可変領域を含む治療用完全抗体を提供する。

30

#### 【0056】

別の実施形態においては、配列番号7の配列を有するV<sub>H</sub>ドメインおよび配列番号8の配列を有するV<sub>L</sub>ドメインを含むマウス治療用完全抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

#### 【0057】

別の実施形態においては、配列番号46の配列を有するV<sub>H</sub>ドメインおよび配列番号47の配列を有するV<sub>L</sub>ドメインを含むマウス治療用完全抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

40

#### 【0058】

##### 1.1.2 ヒト抗体

ヒト抗体は当業者に知られたいくつかの方法により製造することができる。ヒト抗体は、ヒトミエローマ細胞またはマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系を利用するハイブリドーマ法を用いて生成することができる。Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984)およびBrodur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987)を参照のこと。代替の方法としては、ヒトV領域レパートリーを利用するファージライブラリーまたはトランスジェニックマウスの使用が挙げられる(Winter G, (1994), Annu.Rev.Immunol 12,433-455、Green LL (1999), J.Immunol.methods 231, 11-23を参照されたい)。マウス免疫グロブリン遺伝子座がヒト免疫グロブリン遺伝子セ

50

グメントで置き換えられている、いくつかのトランスジェニックマウス系統が今や入手可能である (Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851、Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156を参照のこと)。このようなマウスは抗原チャレンジによりヒト抗体のレパトリーを産生することができ、そのレパトリーから対象の抗体を選択することができる。

#### 【0059】

特に注目すべきものは、ヒトリンパ球を放射線照射マウスに移植したTrimera(商標)系 (Eren R ら, (1998) Immunology 93:154-161を参照されたい); ヒト(または他の生物種)リンパ球を大規模プールin vitro抗体作製法とその後のデコンビュレートされた (deconvulated) 限界希釈・選択方法に効果的に付す、選択リンパ球抗体系 (Selected Lymphocyte Antibody System: SLAM, Babcookら, PNAS (1996) 93:7843-7848を参照のこと); ならびに Xenomouse II (商標) (Abgenix社) である。Morphodoma(商標)技術を利用してMorphotek社から別のアプローチも利用可能である。

10

#### 【0060】

ファージディスプレイ法を用いてヒト抗体(およびそのフラグメント)を製造することが可能である (McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990)およびGriffiths AD ら (1994) EMBO 13:3245-3260を参照のこと)。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、M13またはfdなどの糸状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーなコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面に機能性抗体フラグメントとして(通常はヘルパーファージの助けをかりて)提示させる。抗体の機能的特性に基づく選択は、結果としてその特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。ファージディスプレイ法は、上述の疾患または障害を患っている個体あるいは免疫されていないヒトドナーより得られたヒトB細胞から作製されたライブラリーから抗原特異的抗体を選択するために使用可能である (Marks; J. Mol. Bio. 222,581-597, 1991を参照されたい)。Fcドメインを含む完全なヒト抗体が望まれるときは、ファージディスプレイされ誘導されたフラグメントを、所望の定常領域を有しかつ安定な発現細胞系を確立する哺乳動物発現ベクターに再クローニングすることが必要である。

20

#### 【0061】

結合親和性を改善するには親和性成熟技術 (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) が利用可能である。この方法では、一次ヒト抗体の親和性が、HおよびL鎖のV領域を天然の変異体で連続的に置換して、改善された結合親和性に基づいて選択することにより改善される。この方法の変法である「エピトープすり込み」なども今日では利用可能である (国際公開W093/06213を参照のこと)。Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993)も参照されたい。

30

#### 【0062】

従って別の実施形態では、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ヒト治療用完全抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。別の実施形態では、hOSMのサイトIIに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ヒト治療用完全抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

40

#### 【0063】

別の実施形態では、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)、配列番号3または配列番号42のCDRH3を含むヒト治療用完全抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。別の実施形態では、配列番号1、2、3、4、5および6のCDRを有する可変領域、または配列番号40、41、42、43、44および45の配列を有する可変領域を含むヒト治療用完全抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

#### 【0064】

### 1.2 キメラ抗体およびヒト化抗体

ヒト疾患または障害の治療における完全非ヒト抗体の使用は、今日では詳しく立証され

50

ている潜在的免疫原性の問題、特に抗体の反復投与による免疫原性の問題を伴い、すなわち患者の免疫系が非ヒト完全抗体を非自己と認識して中和応答を起こす。完全にヒトの抗体を開発する(上記参照)ことに加えて、こうした問題を克服するための種々の技術が長年に渡り開発されており、そうした技術には、一般に治療用完全抗体中の非ヒトアミノ酸配列の組成を低減し、なおかつ免疫した動物(例えばマウス、ラットまたはウサギ)から非ヒト抗体を比較的容易に取得できることが必要である。これを達成するために大きく分けて2つのアプローチが用いられる。第1のアプローチはキメラ抗体であり、これは通常ヒト定常領域に融合された非ヒト(例えばマウスなどの齧歯類)可変ドメインを含む。抗体の抗原結合部位は可変領域内に局在することから、キメラ抗体は抗原に対する結合親和性を保持する一方で、ヒト定常領域のエフェクター機能を獲得しており、それゆえ上記のようなエフェクター機能を発揮することができる。キメラ抗体は一般に組換えDNA法を用いて作製される。抗体をコードするDNA(例えばcDNA)を慣用方法により単離して、配列決定する。これは例えば本発明の抗体のHおよびL鎖をコードする遺伝子(例えば上記の配列番号1、2、3、4、5および6の配列をコードするDNA)に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの典型的な供給源として役立つ。DNAが単離されたら、そのDNAを発現ベクターに導入し、次いでその発現ベクターを、大腸菌、COS細胞、CHO細胞またはミエローマ細胞のような宿主細胞(トランスフェクトされなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない)中にトランスフェクトして抗体の産生を得る。DNAは、非ヒト(例えばマウス)HおよびL鎖定常領域を対応するヒトLおよびH鎖のコード配列と置き換えて改変してもよい。例えば Morrison; PNAS 81, 6851 (1984)を参照のこと。

#### 【0065】

第2のアプローチはヒト化抗体の作製に関するものであり、この方法では可変領域をヒト化することにより抗体の非ヒト含量を低減させる。2つのヒト化技術が一般に受け入れられている。最初の技術はCDRをグラフトすることによるヒト化である。CDRは抗体のN末端付近でループを形成し、そこでCDRはフレームワーク領域が提供する足場に固定された表面を形成する。抗体の抗原結合特異性は、主にそのCDR表面の形状と化学的特性によって決定される。これらの性状はもともと、個々のCDRのコンフォメーション、CDRの相対的配置、そしてCDRを構成する残基の側鎖の性質および配置により決まる。非ヒト(例えばマウス)抗体(「ドナー」抗体)のCDRのみを適当なヒトフレームワーク(「アクセプターフレームワーク」)およびヒト定常領域へとグラフトすることにより、免疫原性を大幅に減少させることができる(Jonesら (1986) Nature 321, 522-525およびVerhoeyen Mら (1988) Science 239, 1534-1536を参照されたい)。しかしながら、CDRのグラフト化それ自体は抗原結合特性の完全な保持という結果にならない可能性があり、顕著な抗原結合親和性を回復させるのであれば、ヒト化分子中にドナー抗体のいくつかのフレームワーク残基を保存する(「逆変異」とも言う)必要があることがしばしば見出される(Queen Cら (1989) PNAS 86, 10,029-10,033およびCo, Mら (1991) Nature 351, 501-502を参照のこと)。この場合、非ヒトドナー抗体に最も高い配列相同性(典型的には60%以上)を示すヒトV領域をデータベースから選択して、ヒトフレームワーク(FR)を用意することができる。ヒトFRは共通のヒト抗体または個々のヒト抗体から選択することができる。必要であれば、ドナー抗体由来のキー残基をヒトアクセプターフレームワーク内へと置換してCDRコンフォメーションを保存する。抗体のコンピューターモデリングを用いて、そのような構造的に重要な残基を同定することの助けとすることができる。国際公開W099/48523を参照のこと。

#### 【0066】

これとは別に、「ベニアリング」(vennering)と呼ばれるプロセスによりヒト化を実現することができる。ユニークなヒトおよびマウスの免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域の統計的解析から、露出された残基の厳密なパターンはヒト抗体とマウス抗体では異なり、ほとんどの個々の表面位置は、少数の異なる残基のほうを優先的に好むことが明らかにされた(Padlan E.A.ら; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498およびPedersen J.T.ら (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973を参照されたい)。従って、ヒト抗体に通常存在する残基

とは異なる、非ヒト抗体のフレームワーク領域中の露出された残基を置き換えることにより、非ヒトFvの免疫原性を低減させることが可能である。タンパク質の抗原性は表面への接近可能性と相関しうることから、表面残基の置換は、マウス可変領域をヒト免疫系に「見えなく」するのに十分なものでありうる (Handbook of Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp105-134中のMark G.E. ら (1994)も参照されたい)。このヒト化方法は「ペニアリング」と呼ばれており、それは抗体の表面のみが変更され、支持残基は影響を受けないままであるからである。さらなる別の方法は国際公開W004/006955に記載されている。

**【0067】**

従って本発明の別の実施形態においては、ヒト定常領域 (IgGアイソタイプ、例えばIgG1のものでありうる) に融合された非ヒト (例えば齧歯類) 可変ドメインを含むキメラ治療用抗体であって、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする前記抗体を提供する。 10

**【0068】**

別の実施形態においては、非ヒト (例えば齧歯類) 可変領域およびヒト定常領域 (IgGアイソタイプ、例えばIgG1型のものでありうる) を含むキメラ治療用抗体であって、hOSMに特異的に結合し、配列番号3または配列番号42のCDRH3をさらに含む前記抗体を提供する。このような抗体はさらに、IgGアイソタイプ、例えばIgG1のヒト定常領域を含んでもよい。

**【0069】**

別の実施形態においては、非ヒト (例えば齧歯類) 可変領域およびヒト定常領域 (IgGアイソタイプ、例えばIgG1型のものでありうる) を含むキメラ治療用抗体であって、hOSMに特異的に結合し、配列番号1、2、3、4、5および6のCDRまたは配列番号40、41、42、43、44および45のCDRを有する前記抗体を提供する。 20

**【0070】**

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする (すなわち阻害または遮断する) ヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

**【0071】**

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつ配列番号3または配列番号42のCDRH3を含むヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。このような抗体は、IgGアイソタイプ、例えばIgG1のヒト定常領域を含んでもよい。 30

**【0072】**

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつ配列番号1、2、3、4、5および6のCDRまたは配列番号40、41、42、43、44および45のCDRを含むヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。このような抗体は、IgGアイソタイプ、例えばIgG1のヒト定常領域を含んでもよい。

**【0073】**

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートし、かつ配列番号11の重鎖および配列番号12の軽鎖を含む (または実質的にそれらからなる) ヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。 40

**【0074】**

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントであって、配列番号50の重鎖および配列番号51の軽鎖を含む (または実質的にそれらからなる) 前記抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

**【0075】**

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントであって、配列番号3のCDRH3を含み、場合によりさらに配列番号1、2、4、5および6のCDRを含み、ヒトアク 50

セプター重鎖フレームワーク領域の28、29、30、71および94位の残基、ならびにヒトアクセプター軽鎖フレームワーク領域の49および71位の残基が、CDRH3の由来となるドナー抗体フレームワーク中に存在する対応する残基で置換されている、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0076】

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレートするヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントであって、配列番号42のCDRH3を含み、場合によりさらに配列番号40、41、43、44および45のCDRを含み、ヒトアクセプター重鎖フレームワーク領域の28、44、48、67、69、71および73位の残基、ならびにヒトアクセプター軽鎖フレームワーク領域の36、38、46、47、および71位の残基が、CDRH3の由来となるドナー抗体フレームワーク中に存在する対応する残基で置換されている、前記抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

10

【0077】

当業者であれば、「由来となる」(derived)という用語は、その物質の物理的起源であるという意味で供給源を規定するだけでなく、その物質と構造的に同一であるがその基準供給源から生じたものではない物質をも規定するものと理解するであろう。従って「CDRH3の由来となるドナー抗体中に存在する残基」とは、必ずしもドナー抗体から精製されたものである必要はない。

【0078】

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合するヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するが、ここで前記抗体またはそのフラグメントは配列番号3のCDRH3を含み、場合によりさらに配列番号1、2、4、5および6のCDRを含み、かつヒト重鎖フレームワークは次の残基(またはその保存的置換残基)：

20

位置 残基

28 S

29 L

30 T

71 K

94 K

の1個以上(例えば全部)を有し、かつヒト軽鎖は次の残基(またはその保存的置換残基)：

30

位置 残基

49 E

71 Y

のいずれか一方または両方を有する。

【0079】

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合するヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するが、ここで前記抗体またはそのフラグメントは配列番号1、2、3、4、5および6のCDRを含み、かつヒト重鎖フレームワークは次の残基(またはその保存的置換残基)：

位置 残基

28 S

29 L

30 T

71 K

94 K

の1個以上(例えば全部)を有し、かつヒト軽鎖は次の残基(またはその保存的置換残基)：

40

位置 残基

49 E

71 Y

のいずれか一方または両方を有する。

50

## 【 0 0 8 0 】

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合するヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するが、ここで前記抗体またはそのフラグメントは配列番号42のCD RH3を含み、場合によりさらに配列番号40、41、43、44、45のCDRを含み、かつヒト重鎖フレームワークは次の残基(またはその保存的置換残基)：

位置 残基

28 I  
48 I  
44 K  
67 A  
69 L  
71 V  
73 K

10

の1個以上(例えば全部)を有し、かつヒト軽鎖は次の残基(またはその保存的置換残基)：

位置 残基

36 F  
38 K  
46 R  
47 W  
71 Y

20

の1個以上(例えば全部)を有する。

## 【 0 0 8 1 】

別の実施形態においては、hOSMに特異的に結合するヒト化治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを提供するが、ここで前記抗体またはそのフラグメントは配列番号40、41、42、43、44、45のCDRを含み、かつヒト重鎖フレームワークは次の残基(またはその保存的置換残基)：

位置 残基

28 I  
48 I  
44 K  
67 A  
69 L  
71 V  
73 K

30

の1個以上(例えば全部)を有し、かつヒト軽鎖は次の残基(またはその保存的置換残基)：

位置 残基

36 F  
38 K  
46 R  
47 W  
71 Y

40

の1個以上(例えば全部)を有する。

## 【 0 0 8 2 】

当技術分野では、特定のアミノ酸置換が「保存的」であるとみなされることは広く知られている。アミノ酸は側鎖の共通の性質に基づいてグループ分けされており、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントの結合親和性を全てまたは実質的に全て維持するような同じグループ内の置換は、保存的置換であるとみなされる。次の表を参照されたい：

側鎖	メンバー
疎水性	met, ala, val, leu, ile
中性親水性	cys, ser, thr
酸性	asp, glu
塩基性	asn, gln, his, lys, arg
鎖の配向性に影響を及ぼす残基	gly, pro
芳香族	trp, tyr, phe

10

## 【0083】

## 1.3 二重特異性抗体

二重特異性抗体とは、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。そのような抗体の作製方法は当技術分野で知られている。従来、二重特異性抗体の組換え生産は、2つの免疫グロブリンH鎖-L鎖ペアの共発現に基づき、前記2つのH鎖は異なる結合特異性を有する。Millsteinら、Nature 305 537-539 (1983)、国際公開W093/08829およびTrauneckerら EMB0, 10, 1991, 3655-3659を参照されたい。H鎖とL鎖がランダムに組み合わせることから、10種類の異なる構造をした抗体の混合物が生成される可能性があり、そのうちの1種類のみが所望の結合特異性を有する。別の方法は、所望の結合特異性を有する可変ドメインを、ヒンジ領域の一部、CH2領域およびCH3領域を少なくとも含む重鎖定常領域に融合するというものである。軽鎖結合に必要なサイトを含むCH1領域が、融合体の少なくとも1つに存在することが好ましい。これらの融合体および所望であればL鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、その後適当な宿主生物に同時トランスフェクトさせる。また、2本または3本全ての鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することも可能である。ある好ましい方法では、二重特異性抗体は、一方のアームに第1の結合特異性を有するH鎖と、他方のアームに第2の結合特異性を有するH-L鎖対から構成される。国際公開W094/04690を参照のこと。またSureshら Methods in Enzymology 121, 210, 1986も参照されたい。

20

30

## 【0084】

本発明のある実施形態においては、二重特異性抗体の少なくとも1つの結合特異性がhOSMに対するものである二重特異性治療用抗体が提供されるが、ここで前記抗体はhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)。このような抗体はIgGアイソタイプ、例えばIgG1のヒト定常領域を更に含んでもよい。

## 【0085】

本発明のある実施形態においては、少なくとも1つの結合特異性がhOSMに対するものである二重特異性治療用抗体が提供されるが、ここで前記抗体は配列番号3または配列番号42のCDRH3を少なくとも1つ含む。このような抗体はIgGアイソタイプ、例えばIgG1のヒト定常領域を更に含んでもよい。

40

## 【0086】

本発明のある実施形態においては、少なくとも1つの結合特異性がhOSMに対するものである二重特異性治療用抗体が提供されるが、ここで前記抗体は配列番号1、2、3、4、5および6または配列番号40、41、42、43、44および45のCDRを少なくとも含む。このような抗体はIgGアイソタイプ、例えばIgG1のヒト定常領域を更に含んでもよい。

## 【0087】

## 1.4 抗体フラグメント

本発明の特定の実施形態においては、OSM(特にhOSM)とgp130の相互作用をモジュレートする治療用抗体フラグメントを提供する。このようなフラグメントは、完全抗体および/またはヒト化抗体および/またはキメラ抗体の機能性抗原結合フラグメント、例えば前記

50

の抗体のFab、Fd、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ScFvフラグメントであり得る。従来、このようなタンパク質フラグメントは完全抗体のタンパク質分解、例えばパパイン消化(例えば国際公開W094/29348を参照のこと)により製造されているが、組換えにより形質転換された宿主細胞に直接産生させることも可能である。ScFvの製造については、Birdら ;(1988) Science, 242, 423-426を参照されたい。さらに、抗体フラグメントは、下記に記載する種々の組換え技術を利用して製造することができる。

【0088】

Fvフラグメントは、Fabフラグメントと比較して、その2本の鎖の相互作用エネルギーが低いようである。V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインの結合を安定化するために、これらはペプチド(Birdら, (1988) Science 242, 423-426、Hustonら, PNAS, 85, 5879-5883)、ジスルフィド架橋(Glockshuberら, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367)、および「knob in hole」突然変異で連結されている(Zhuら (1997), Protein Sci., 6, 781-788)。ScFvフラグメントは当業者に知られた方法で製造可能である。Whitlowら (1991) Methods company Methods Enzymol, 2, 97-105およびHustonら (1993) Int.Rev.Immunol 10, 195-217を参照のこと。ScFvは大腸菌(E. coli)などの細菌細胞で製造することもできるが、より一般的には真核細胞中で製造される。ScFvの欠点は産物が一価であること(この性質は多価結合による結合活性の増加を不可能にする)および半減期が短いことである。こうした問題を克服する試みとしては、追加のC末端システインを有するScFvを化学的にカップリングさせることにより製造される二価の(ScFv')<sub>2</sub>(Adamsら (1993) Can.Res 53, 4026-4034 およびMcCartneyら (1995) Protein Eng. 8, 301-314)、または対を成していないC末端システイン残基を有するScFvの自発的な部位特異的二量体化(Kipriyanovら (1995) Cell. Biophys 26, 187-204を参照のこと)が挙げられる。あるいは、ScFvは、ペプチドリンカーを3~12残基まで短縮して「ダイアボディー」(diabody)を形成させること(Holligerら PNAS (1993), 90, 6444-6448を参照)により、多量体を強制的に形成させることができる。リンカーをさらに短縮すると、ScFv三量体(「トリアボディー」、Korttら (1997) Protein Eng, 10, 423-433参照)および四量体(「テトラボディー」、Le Gallら (1999) FEBS Lett, 453, 164-168参照)が生じる。二価ScFv分子の構築はまた、タンパク質二量体化モチーフと遺伝的に融合させて「ミニ抗体」(Packら (1992) Biochemistry 31, 1579-1584参照)および「ミニボディー」(Huら (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061参照)を形成させることにより、達成することができる。ScFv-ScFvタンデム体((ScFv)<sub>2</sub>)もまた製造可能であり、これは2つのScFv単位を第3のペプチドリンカーで連結させることによる(Kuruczら (1995) J.Immol.154, 4576-4582を参照のこと)。二重特異性ダイアボディーは、2つの一本鎖融合産物(ある抗体由来のV<sub>H</sub> ドメインと別の抗体のV<sub>L</sub> ドメインが短いリンカーで連結されている)を非共有結合で会合させることにより製造可能である(Kipriyanovら (1998), Int.J.Can 77,763-772を参照のこと)。このような二重特異性ダイアボディーの安定性は、上述したようにジスルフィド架橋もしくは「knob in hole」突然変異を導入することにより、または2本のハイブリッドScFvフラグメントがペプチドリンカーにより連結されている一本鎖ダイアボディー(ScDb)を形成させることにより、増強することができる(Kontermannら (1999) J. Immunol. Methods 226 179-188を参照のこと)。四価の二重特異性分子は、例えばScFvフラグメントをIgG分子のCH3ドメインに、またはヒンジ領域を介してFabフラグメントに融合させることにより作製することができる(Colomaら (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163を参照のこと)。あるいはまた、四価の二重特異性分子は、二重特異性一本鎖ダイアボディー同士を融合させることにより作製される(Altら, (1999) FEBS Lett 454, 90-94を参照されたい)。より小さな四価の二重特異性分子も形成可能であるが、これは、ScFv-ScFvタンデム体をヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフを含有するリンカーで二量体化させる(DiBiミニ抗体、Mullerら (1998) FEBS Lett 432, 45-49を参照されたい)か、または分子内対合を防止するような配置で4つの抗体可変ドメイン(V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> )を含む一本鎖分子を二量体化させる(タンデムダイアボディー、Kipriyanovら, (1999) J.Mol.Biol. 293, 41-56を参照のこと)ことによる。二重特異性F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、Fab'フラグメントを化学的にカップリングさせることに

10

20

30

40

50

より、またはロイシンジッパーによりヘテロ四量体化させることにより作製できる (Shalabyら, (1992) J.Exp.Med. 175, 217-225およびKostelnyら (1992), J.Immunol. 148, 1547-1553を参照されたい)。単離されたV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインもまた入手可能である (Domantis plc) (米国特許第6,248,516号;同第6,291,158号;同第6,172,197号を参照のこと)。

#### 【0089】

ある実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130の相互作用をモジュレート(すなわち阻害または遮断)する治療用抗体(例えばScFv、Fab、Fd、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>または上述のような操作された抗体フラグメント)を提供する。治療用抗体フラグメントは、配列番号3の配列を有するCDRH3を、場合により配列番号1、2、4、5および6の配列を有するCDRと共に含むか、または、配列番号42のCDRH3を、場合により配列番号40、41、43、44および45の配列を有するCDRと共に含む。

10

#### 【0090】

##### 1.5 ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた、本発明の一実施形態を成す。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の適当な架橋方法を用いて形成される共有結合により一緒になった2つの抗体から構成される。米国特許第4,676,980号を参照されたい。

#### 【0091】

##### 1.6 その他の改変

抗体のFc領域と種々のFc受容体(Fc R)の相互作用は抗体のエフェクター機能を仲介すると考えられ、そうしたエフェクター機能としては抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)、補体の固定、食作用、および抗体の半減期/クリアランスが挙げられる。本発明の抗体のFc領域は所望のエフェクター特性に応じて多様に改変させることができる。例えば、溶解性の抗体を非溶解性にするFc領域の特定の突然変異が、欧州特許第0629240B1号および欧州特許第0307434B2号に詳述されており、または、抗体中にサルベージ受容体結合エピートプを組み入れて血清半減期を延ばすことも可能である(米国特許第5,739,277号を参照のこと)。現在5種類のヒトFc受容体、すなわちFc R(I)、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIaおよび新生児FcRnの存在が確認されている。Shieldsら, (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604は、IgG1残基の共通のセットが全種類のFc Rへの結合に関わる一方、Fc RIIとFc RIIIはこの共通のセットの外側にある明確に区別される部位を利用することを実証した。IgG1残基の1グループは、アラニンに変更されたときに全種類のFc Rへの結合を弱めた: Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297およびPro-239。これらはいずれもIgG CH2ドメインに存在し、CH1とCH2を接合するヒンジの近くにクラスター化されている。Fc RIは結合のためにIgG1残基の共通のセットのみを利用するのに対して、Fc RIIとFc RIIIはその共通のセットのほかに明確に区別される残基とも相互作用する。いくつかの残基の変異は、Fc RII(例えばArg-292)またはFc RIII(例えばGlu-293)への結合のみを弱めた。いくつかの変異体は、Fc RIIまたはFc RIIIのいずれか一方への結合の強化を示したが、他方の受容体への結合には影響しなかった(例えばSer-267AlaはFc RIIへの結合を強化したが、Fc RIIIへの結合は影響を受けなかった)。他の変異体はFc RIIまたはFc RIIIへの強化された結合を示す一方、もう片方の受容体への結合は弱められた(例えばSer-298 AlaはFc RIIIへの結合を強化し、Fc RIIへの結合を弱めた)。Fc RIIIaについては、最も強く結合するIgG1変異体は、Ser-298、Glu-333およびLys-334でのアラニン置換の組み合わせを有していた。新生児FcRn受容体は抗体のクリアランスおよび組織横断トランスサイトシスの両方に関わると考えられている(Junghans R.P (1997) Immunol.Res 16, 29-57およびGhetieら (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766を参照されたい)。ヒトFcRnと直接相互作用することが判明しているヒトIgG1残基としては、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434およびHis435が挙げられる。従って本発明は、上述した残基の変異をいずれか1つ(またはそれ以上)有し、半減期/クリアランスおよび/またはエフェクター機能(例えばADCC)および/または補体溶解が改変された本発明の抗体に関する。本発明のさらなる態様においては、hOSMに特異的に結合しかつhOSMとgp130の相互作用をモ

20

30

40

50

ジュレートするヒト化治療用抗体であって、235位および237位にアラニン置換(例えばL235AおよびG237A)(または他の中断させる置換)を有する前記抗体を提供する。本発明のさらなる実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつ配列番号61の重鎖および配列番号12の軽鎖を有するヒト化治療用抗体を提供する。

#### 【0092】

他の改変としては本発明の抗体のグリコシル化変異体が挙げられる。定常領域中の保存位置における抗体のグリコシル化は、抗体機能、特に上述したようなエフェクター機能に対して多大な効果を及ぼすことが知られている(例えばBoydら(1996), Mol.Immunol. 32, 1311-1318を参照されたい)。1以上の炭水化物成分が付加、置換、欠失または改変された、本発明の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントのグリコシル化変異体が考えられる。アスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-トレオニンモチーフの導入は、炭水化物成分が酵素的に結合される可能性のある部位を創出し、従って抗体のグリコシル化を操作するために利用可能である。Rajuら(2001) Biochemistry 40, 8868-8876によると、TNFR-IgGイムノアドヘシンの末端シアリル化は、-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼおよび/または、2,3シアリルトランスフェラーゼを用いた再ガラクトシル化および/または再シアリル化により増加した。末端シアリル化の増加は免疫グロブリンの半減期を延ばすと考えられている。抗体は、ほとんどの糖タンパク質と同様に、天然では一般的にグリコフォーム(glycoform)の混合物として産生される。この混合物は、抗体が真核細胞、特に哺乳動物細胞中で産生されるときに特に明白である。所定のグリコフォームを製造するための種々の方法が開発されている(Zhangら Science (2004), 303, 371、Searsら, Science, (2001) 291, 2344、Wackerら (2002) Science, 298 1790、Davisら (2002) Chem.Rev. 102, 579、Hangら (2001) Acc.Chem.Res 34, 727を参照されたい)。従って本発明は、本明細書に記載する複数種の治療用(典型的にはモノクローナル)抗体(IgGアイソタイプ、例えばIgG1のものでありうる)であって、該抗体またはその抗原結合フラグメントの所定の数(例えば7以下、例えば5以下、例えば2もしくは単一の)グリコフォームを含むものに関する。

#### 【0093】

本発明のさらなる実施形態は、非タンパク質性ポリマー(例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンなど)にカップリングされた本発明の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを包含する。タンパク質をPEGにコンジュゲートさせることは、タンパク質の半減期を延ばすため、ならびにタンパク質の抗原性および免疫原性を低減させるための確立された技術である。様々な分子量および形状(線状または分枝状)を伴うPEG化の使用が、完全抗体およびFab'フラグメントを用いて検討されている(Koumenis I.L.ら (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95を参照されたい)。

#### 【0094】

脳への治療用抗体の送達は、血液脳関門(BBB)の存在によって阻まれる。本発明の抗体または抗体フラグメントを血液脳関門を越えて送達することが望まれる場合、必要に応じてそのような送達を増強するための種々の戦略が提唱されている。

#### 【0095】

血液から必要な栄養素や因子を得るために、BBBは循環血液から脳へと化合物を輸送するいくつかの特異的受容体を有している。いくつかの研究によって、一部の化合物、例えばインスリン(Duffy KRら (1989) Brain Res. 420:32-38を参照)、トランスフェリン(Fishman JBら (1987) J.Neurosci 18:299-304を参照)、インスリン様増殖因子1および2(Pardridge WM (1986) Endocrine Rev.7:314-330 およびDuffy KRら (1986) Metabolism 37:136-140を参照のこと)は受容体媒介トランスサイトシスを介してBBBを越えることが示されている。従ってこれらの分子に対する受容体は、いわゆる「ベクタード」(vectored)抗体を使用して本発明の抗体および/または本発明の抗体フラグメントを脳に接近させるための潜在的手段を提供する(Pardridge WM (1999) Advanced Drug Delivery Review 36:299-321を参照されたい)。例えばトランスフェリン受容体に対する抗体は脳実質に動的

10

20

30

40

50

に輸送されることが示されている(Friden PMら (1991) PNAS 88:4771-4775およびFriden PMら (1993) Science 259:373-377を参照されたい)。従って1つの可能性のあるアプローチは、上記のような二重特異性抗体または二重特異性フラグメントを作製することであり、その際、第1の特異性はhOSMのサイトIIに向けられ(例えば第1の特異性は配列番号3のCDRH3を、場合により配列番号1、2、4、5および6のCDRと共に含むか、または配列番号42のCDRH3を、場合により配列番号40、41、43、44、45のCDRと共に含む)、第2の特異性はBBBに存在する輸送受容体に向けられる(例えば第2の特異性はトランスフェリン輸送受容体に向けられる)。

【0096】

## 2. 競合免疫グロブリン

本発明はまた、免疫グロブリン、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに他のタンパク質化学種(例えばイムノアドヘシン)であって、hOSMに特異的に結合し、かつ、配列番号11の重鎖と配列番号12の軽鎖を含む本発明の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントとhOSMとの結合を競合的に阻害するものを提供する。競合する免疫グロブリン、抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに他のタンパク質化学種(例えばイムノアドヘシン)は、等モル濃度で、少なくとも25%阻害、典型的には35%以上、より典型的には少なくとも50%阻害を示す。

【0097】

従って本発明のある実施形態においては、候補となる抗体または抗体フラグメントが本明細書に記載した競合抗体であるか否かを確認するための、候補抗体または抗体フラグメントのスクリーニング方法を提供するが、この方法は以下のステップを含む；

(a) 候補となる抗体または抗体フラグメントを、配列番号11の重鎖と配列番号12の軽鎖を含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントとインキュベートするステップ；

(b) ステップ(a)の候補抗体またはその抗体フラグメントが、治療用抗体またはその抗原結合フラグメントとOSM、特にhOSMとの結合を競合的に阻害するか否かを確認するステップ。典型的にはELISAに基づくアッセイ(実施例に記載のELISAアッセイなど)を用いる。典型的にはOSMおよび/またはhOSMはグリコシル化されている。典型的にはOSMおよび/またはhOSMは、哺乳動物細胞(例えば組換えにより形質転換されたCHO、NSO細胞もしくはヒト細胞)によりグリコシル化されている。他の実施形態では、OSMおよびhOSMは、その由来となる天然細胞によってグリコシル化されており、すなわち、hOSMはヒト細胞によってグリコシル化されている(例えばhOSMは人体から単離されたものである)。

【0098】

従って、配列番号1、2、3、4、5および6の配列を有するCDRを含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの結合を競合的に阻害する競合治療用抗体またはその抗原結合フラグメントもまた提供される。

【0099】

配列番号11の重鎖と配列番号12の軽鎖を含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの結合を競合的に阻害する競合治療用抗体またはその抗原結合フラグメントもまた提供される。

【0100】

競合治療用抗体またはその抗原結合フラグメントは、上述のいずれの抗体構造のものであってもよい。例えば競合治療用抗体は、霊長類またはヒト完全抗体またはヒト化抗体であって、典型的にはIgGアイソタイプ、例えばIgG1またはIgG4のものである。競合治療用抗体フラグメントはFab、Fab'、Fd、F(ab')<sub>2</sub>、ScFvなどである。競合治療用抗体は本明細書に開示する方法により作製することができる。

【0101】

上述のスクリーニング方法の典型的なプロトコルを下記の実施例に記載する。

【0102】

10D3は本発明の競合抗体の一例である。下記の表Aを参照されたい。

【0103】

10

20

30

40

50

## 2.1 他のスクリーニング方法

本発明のさらなる態様は部分的には、hOSMのグリコシル化が、抗hOSM抗体とhOSMの結合イベントにおいて予期せぬ役割を果たすという新たな知見に基づくものである。従って本発明は、hOSMに特異的に結合する抗体のスクリーニング方法であって、該抗体をグリコシル化OSM、特にグリコシル化hOSMと、結合が可能な条件下でインキュベートすること、および抗体の結合親和性を測定することを含む前記方法にも及ぶ。以下に詳述するELISAプロトコルはこのようなスクリーニング方法を可能にする。抗体(上述の構造のいずれであってもよい)は、結合親和性(Kd)が1  $\mu$ Mより強い、典型的には100nMより強い、より典型的には1 nMよりも強い(例えば100pMより強い)ことを基準に選択することができる。抗体は非グリコシル化OSM、例えば非グリコシル化hOSMに結合する能力に基づいてさらに選択 10  
することができる。従って抗体は典型的には、グリコシル化OSM、例えばグリコシル化hOSMに結合する能力、さらに同じかまたは類似した程度に非グリコシル化OSM、例えば非グリコシル化hOSMにも結合する能力(例えばBiacore(商標)アッセイで測定して同一のまたは類似の結合親和性を有する)に基づいて選択される。

### 【0104】

本方法に基づいて選択された抗体をさらに操作し(例えば、必要に応じて抗体をコードするポリヌクレオチドを操作することによりヒト化し)、医薬組成物に組み入れることができる。本方法により選択された抗体およびそのような抗体をコードするポリヌクレオチドは、本発明の一実施形態を成す。従って本発明は、OSMに結合すると予想される抗体、特にhOSMに結合すると予想される抗体(例えばOSM/hOSMに対して誘導された抗体)のスクリー 20  
ニング方法を提供し、この方法は以下のステップを含んでなる：

- (a) 前記抗体を、結合を可能にする条件下でグリコシル化OSM、特にグリコシル化hOSMとインキュベートすること；
- (b) 前記抗体の結合親和性を測定すること；
- (c) 前記抗体が1  $\mu$ Mより強い、典型的には100nMより強い結合親和性を示す場合は、その抗体を選択すること；
- (d) ステップ(c)の抗体をコードするポリヌクレオチドを用意して、該ポリヌクレオチドを含むベクターを用いて哺乳動物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすること；
- (e) ステップ(d)の宿主細胞を、前記抗体が培地中に分泌され得る条件下で培養すること 30  
；
- (f) 場合によりステップ(e)の培地を精製すること；
- (g) ステップ(e)または(f)の抗体を医薬組成物に組み入れること。

### 【0105】

以下に詳述する疾患または障害の治療のための医薬の製造における、本方法により同定された抗体の使用もまた提供される。

### 【0106】

以下に詳述する疾患または障害の治療のための医薬の製造における、天然のグリコシル化hOSMに特異的に結合し(特に天然のグリコシル化hOSMのサイトIIエピトープに結合し)、かつ前記天然グリコシル化hOSMとgp130の相互作用をモジュレートする抗体(例えば完全抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体)の使用もまた提供される。さらに、同じ実験条 40  
件下で非グリコシル化hOSMに結合するのと同じまたは類似の結合親和性で天然のグリコシル化hOSMに特異的に結合する抗体も提供される。本発明のある実施形態はグリコシル化OSMに特異的に結合する抗体、特に天然のグリコシル化hOSMに結合する抗体である。15E10抗体はグリコシル化hOSMに特異的に結合する抗体の一例である。

### 【0107】

いくつかの実施形態においては、本方法は哺乳動物宿主細胞(CHOやNS0など)によりグリコシル化されたhOSMを用いる。他の実施形態では、本方法は、ヒト細胞(例えば組換えにより形質転換もしくはトランスフェクトされたヒト宿主細胞)によりグリコシル化されたhOSM、または人体から単離された天然hOSM(例えば慢性関節リウマチのような関節炎のヒト患者の滑液中に存在する細胞により産生されるhOSM)を用いる。 50

## 【 0 1 0 8 】

## 3. 製造方法

本発明の抗体はポリクローナル集団として製造することができるが、より典型的には、モノクローナル集団(すなわち特定の抗原結合部位に対する同一抗体の実質的に均一な集団)として製造する。本発明の抗体は、トランスジェニック生物、例えばヤギ(Pollockら(1999), J.Immunol.Methods 231:147-157を参照のこと)、ニワトリ(Morrow KJJ (2000) Genet.Eng.News 20:1-55を参照)、マウス(Pollockら 同上を参照)、または植物(Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204、Ma JK-C (1998), Nat.Med. 4; 601-606、Baez Jら, BioPharm (2000) 13: 50-54、Stoger Eら; (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590を参照)において製造可能である。抗体を化学合成により製造することも可能である。しかし、本発明の抗体は典型的には、当業者によく知られた組換え細胞培養技術を用いて製造される。抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、さらなるクローニング(増幅)または発現のために複製ベクター(プラスミドなど)に挿入する。1つの有用な発現系はグルタミン酸シンターゼ系(例えばLonza Biologicsから販売)であり、これは特に宿主細胞がCHOかNS0である場合である(下記参照)。抗体をコードするポリヌクレオチドは慣用技術(例えばオリゴヌクレオチドプローブ)を用いて容易に単離し、配列決定することができる。使用可能なベクターとしては、プラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾン、ミニ染色体などが挙げられるが、その中でもプラスミドが典型的な例である。一般にこうしたベクターはさらにシグナル配列、複製起点、1以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列を、軽鎖および/または重鎖ポリヌクレオチドに機能的に連結させた状態で含み、そのことにより発現が促進される。軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチドを別々のベクターに挿入して同一の宿主細胞に(例えばエレクトロポレーションにより)導入してもよく、所望により重鎖と軽鎖を両方とも宿主細胞をトランスフェクトするための同一のベクターに挿入してもよい。従って本発明のある実施形態においては、本発明の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖および/または重鎖をコードするベクターを構築する方法であって、ベクターに本発明の治療用抗体の軽鎖および/または重鎖をコードするポリヌクレオチドを挿入するステップを含んでなる前記方法を提供する。下の表Aを参照されたい。

10

20

## 【 0 1 0 9 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号15または配列番号52の配列を有するマウス  $V_H$  ドメインをコードするポリヌクレオチドを提供する。

30

## 【 0 1 1 0 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号16または配列番号53の配列を有するマウス  $V_L$  ドメインをコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【 0 1 1 1 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号17または配列番号54の配列を有するヒト化  $V_H$  ドメインをコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【 0 1 1 2 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号18または配列番号55の配列を有するヒト化  $V_L$  鎖をコードするポリヌクレオチドを提供する。

40

## 【 0 1 1 3 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号19または配列番号56の配列を有するヒト化重鎖をコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【 0 1 1 4 】

本発明の別の実施形態においては、配列番号20または配列番号57の配列を有するヒト化軽鎖をコードするポリヌクレオチドを提供する。

## 【 0 1 1 5 】

当業者であれば、遺伝暗号の縮重のため、本明細書に開示するポリヌクレオチドとは別のポリヌクレオチドもまた、本発明のポリペプチドをコードするのに利用可能であることが容易に理解できるであろう。

50

## 【0116】

## 3.1 シグナル配列

本発明の抗体は、成熟タンパク質のN末端に特異的切断部位を有する、異種シグナル配列との融合タンパク質として製造可能である。シグナル配列は宿主細胞により認識され、プロセッシングされるべきである。原核宿主細胞の場合、シグナル配列はアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼまたは熱安定性エンテロトキシンIIのリーダー配列であり得る。酵母による分泌の場合、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー配列、因子リーダー配列、または酸性ホスファターゼリーダー配列などである。例えば国際公開W090/13646を参照のこと。哺乳動物細胞系では、ウイルス由来分泌リーダー配列(例えば単純ヘルペスgDシグナル配列)や天然免疫グロブリンシグナル配列(ヒトIg重鎖など)が利用可能である。一般的にシグナル配列は本発明の抗体をコードするDNAと読み枠を合わせて連結される。

10

## 【0117】

## 3.2 複製起点

複製起点は当技術分野で周知であり、ほとんどのグラム陰性細菌についてはpBR322、ほとんどの酵母については2 $\mu$ プラスミド、そしてほとんどの哺乳動物細胞については種々のウイルス起点(SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、VSVまたはBPVなど)が適している。一般に哺乳動物発現ベクターには複製起点成分は必要ないが、SV40は初期プロモーターを含むため使用してもよい。

## 【0118】

## 3.3 選択マーカー

典型的な選択遺伝子は、(a)抗生物質や他の毒素(例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリン)に対して耐性を付与するか、または(b)栄養要求性欠陥を補足したり、もしくは合成培地中に存在しない栄養素を供給する、タンパク質をコードする。選択スキームは宿主細胞の増殖を停止させることが必要かもしれない。本発明の治療用抗体をコードする遺伝子での形質転換が成功した細胞は、選択マーカーが付与する薬剤耐性などのために生存する。別の例はいわゆるDHFR選択マーカーであり、これを用いる場合は形質転換体をメトトレキセートの存在下で培養する。CHO細胞は、DHFR選択に特に有用な細胞系である。DHFR系を用いて宿主細胞を増幅し選択する方法は当技術分野で広く確立されている。Kaufman R.J.ら J.Mol.Biol. (1982) 159, 601-621を参照されたい。総説としてはWerner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Augを参照されたい。さらなる例はグルタミン酸シンターゼ発現系(Lonza Biologics)である。酵母に使用するのに適した選択遺伝子はtrp1遺伝子である; Stinchcombら Nature 282, 38, 1979を参照のこと。

20

30

## 【0119】

## 3.4 プロモーター

本発明の抗体の発現に適したプロモーターは、抗体をコードするDNA/ポリヌクレオチドに機能的に連結される。原核細胞宿主用のプロモーターとしては、phoAプロモーター、  
-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファンプロモーターならびにハイブリッドプロモーター(例えばTacプロモーター)が挙げられる。酵母細胞での発現に適当なプロモーターとしては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素(例えばエノラーゼ)、グリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース六リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、およびグルコキナーゼなどのプロモーターが挙げられる。誘導可能な酵母プロモーターとしてはアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロームC、酸性ホスファターゼ、メタロチオネインおよび窒素代謝またはマルトース/ガラクトース利用に関与する酵素のプロモーターが挙げられる。

40

## 【0120】

50

哺乳動物細胞系での発現に適切なプロモーターとしては、ウイルスプロモーター、例えばポリオーマウイルスプロモーター、鶏痘ウイルスプロモーターおよびアデノウイルスプロモーター(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルスプロモーター、トリ肉腫ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス(特に前初期遺伝子プロモーター)プロモーター、レトロウイルスプロモーター、B型肝炎ウイルスプロモーター、アクチンプロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターおよび初期または後期シミアンウイルス40プロモーターが挙げられる。言うまでもなく、プロモーターの選択は発現に用いられる宿主細胞との適合性に基づいて行われる。

【0121】

### 3.5 エンハンサーエレメント

適宜に、例えば高等真核生物での発現の場合には、ベクター中のプロモーターエレメントに機能的に連結させたエンハンサーエレメントを用いることができる。適当な哺乳動物エンハンサー配列としては、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、フェトプロテインおよびインスリン由来のエンハンサーエレメントが挙げられる。あるいは、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーエレメント、例えばSV40エンハンサー(bp100~270に)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、バキュロウイルスエンハンサーまたはマウスIgG2a遺伝子座由来のエンハンサーエレメントを使用してもよい(国際公開W004/009823を参照)。エンハンサーは典型的にはベクターにおいてプロモーターの上流の部位に配置される。

【0122】

### 3.6 宿主細胞

本発明の抗体をコードする発現ベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞は、原核細胞、酵母または高等真核細胞である。適当な原核細胞としては、真正細菌、例えば腸内細菌、エシェリキア属、例えば大腸菌(例: ATCC番号31,446、31,537、27,325)、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属(例えばネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*))、セラチア属(例えばセラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*))およびシゲラ属の細菌が挙げられ、また、バチルス属、例えば枯草菌(*Bacillus subtilis*)およびバチルス・リチェニホルミス(*B. licheniformis*)(DD 266710を参照)、シュードモナス属、例えば緑膿菌(*P. aeruginosa*)およびストレプトマイセス属の細菌が挙げられる。酵母宿主細胞としては、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロマイセス属(*Kluyveromyces*)(例えばATCC番号16,045; 12,424; 24178; 56,500)、アルカン資化酵母(*Yarrowia*)(欧州特許第402,226号)、メタノール資化酵母(*Pichia pastoris*)(欧州特許第183,070号、他にはPengら *J. Biotechnol.* 108 (2004) 185-192も参照のこと)、カンジダ属、トリコデルマ・リーセイ(*Trichoderma reesei*)(欧州特許第244,234号)、青カビ属(*Penicillium*)、トリボクラジウム属ならびにアスペルギルス属の酵母宿主、例えばアスペルギルス・ニデュラン(*Aspergillus nidulans*)およびクロコウジカビ(*A. niger*)も考えられる。

【0123】

本発明においては原核生物および酵母宿主細胞が特に考えられるが、また一方、典型的には本発明の宿主細胞は脊椎動物細胞である。適当な脊椎動物宿主細胞としては、哺乳動物細胞、例えばCOS-1(ATCC番号CRL-1650)、COS-7(ATCC番号CRL-1651)、ヒト胚性腎細胞系293、小児ハムスター腎細胞(BHK)(ATCC番号CRL-1632)、BHK570(ATCC番号CRL-10314)、293(ATCC番号CRL-1573)、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO(例えばCHO-K1、ATCC番号:CCL-61、DHFR-CHO細胞系、例えばDG44(Urlaubら、(1986) *Somatic Cell Mol. Genet.* 12, 555-556を参照のこと))、特に懸濁培養用に順応させたCHO細胞系、マウスセルトリー細胞、サル腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞(ATCC番号CRL-1587)、HELA細胞、イヌ腎細胞(ATCC番号CCL-34)、ヒト肺細胞(ATCC番号CCL-75)、Hep G2およびミエローマ細胞またはリンパ腫細胞、例えばNS0(米国特許第5,807,715号を参照のこと)、Sp2/0、Y0などが挙げられる。

【0124】

10

20

30

40

50

従って本発明のある実施形態においては、本明細書に記載する治療用抗体またはその抗原結合フラグメントの重鎖および/または軽鎖をコードするベクターを含む、安定的に形質転換された宿主細胞を提供する。このような宿主細胞は典型的には軽鎖をコードする第1のベクターと重鎖をコードする第2のベクターを含有する。

【0125】

#### 細菌発酵

細菌系は抗体フラグメントの発現に特に適している。発現するフラグメントは細胞内にまたはペリプラズム内に局在化される。ペリプラズム内の不溶性タンパク質は、当業者に公知の方法を用いて抽出し、リフォールディング(再生)させて、活性型タンパク質を形成させることができる。Sanchezら (1999) *J. Biotechnol.* 72, 13-20およびCupit PMら (1999) *Lett Appl Microbiol*, 29, 273-277を参照されたい。

【0126】

#### 3.7 細胞培養法

本発明の治療用抗体またはその抗原結合フラグメントをコードするベクターで形質転換された宿主細胞は、当業者に知られたあらゆる方法で培養することができる。宿主細胞は、スピナーフラスコ、ローラーボトルまたは中空繊維システムで培養することもできるが、大規模生産には攪拌型タンク反応器の使用が好ましく、特に浮遊培養の場合がそうである。典型的には攪拌型タンクは、スパージャー、バッフル、または低剪断インペラーなどを用いて通気するように適合させる。気泡塔反応器およびエアリフト反応器の場合、空気または酸素の気泡で直接通気することも可能である。宿主細胞を無血清培地で培養する場合には、その培地に細胞保護剤(pluronic F-68など)を添加して、通気の結果生じる細胞損傷を防止するようにすることが好ましい。宿主細胞の特性に応じて、足場依存性細胞系についてはマイクロキャリアを増殖基体として使用してもよいし、または細胞を浮遊培養用に適合させてもよい(後者が典型的である)。宿主細胞、特に脊椎動物宿主細胞の培養には、種々の操業モデル、例えば流加培養、反復バッチ培養(Drapeauら (1994) *cytototechnology* 15: 103-109を参照)、延長バッチ培養または灌流培養などが利用可能である。組換え形質転換された哺乳動物宿主細胞は血清含有培地、例えばウシ胎仔血清(FSC)を含む培地で培養することもできるが、好ましくはそのような宿主細胞は、合成無血清培地(例えばKeenら (1995) *Cytotechnology* 17:153-163に開示されたもの)、または市販の培地(例えばProCHO-CDMもしくはUltraCHO(商標)(Cambrex NJ, USA))にエネルギー源(グルコースなど)および合成増殖因子(組換えインスリンなど)を必要に応じて添加した培地で培養する。宿主細胞を無血清培養するには、細胞を無血清状態で増殖するように順応させる必要がある。ある順応アプローチでは、このような宿主細胞を血清含有培地で培養し、血清培地の80%を無血清培地と繰り返し交換して、宿主細胞が無血清状態に順応するように習得させる(例えばScharfenberg Kら (1995) in *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C.ら編), pp619-623, Kluwer Academic publishersを参照されたい)。

【0127】

培地に分泌された本発明の抗体は、種々の方法を用いて培地から回収し精製して、意図する用途に適した精製度を得ることができる。例えば、本発明の治療用抗体をヒト患者の治療に使用するには、典型的には治療用抗体を含む培地と比較して少なくとも95%、より典型的には98%または99%の純度が必要である。まず初めに、培地からの細胞破片を典型的には遠心分離法で除去し、その後上清の清澄化ステップを、例えば精密濾過法、限外濾過法および/または体積濾過法を用いて行う。種々の他の技術、例えば透析およびゲル電気泳動ならびにクロマトグラフィー技術、例えばヒドロキシアパタイト(HA)、アフィニティークロマトグラフィー(場合によりポリヒスチジンなどのアフィニティークロマトグラフィーシステムを用いる)および/または疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC、米国特許第5,429,746号を参照)も利用可能である。ある実施形態においては、本発明の抗体は、種々の清澄化ステップを経た後、プロテインAもしくはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーを用いて捕捉され、その後さらなるクロマトグラフィーステップ、例えばイオン交

換および/またはHAクロマトグラフィー、アニオンもしくはカチオン交換、サイズ排除クロマトグラフィーおよび硫酸アンモニウム沈降を行う。一般的には、様々なウイルス除去ステップ(例えばDV-20フィルターを用いたナノ濾過法)も行う。こうした種々のステップ後に、少なくとも75mg/ml以上、例えば100mg/ml以上の本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む精製された(典型的にはモノクローナルな)調製物が得られ、これは本発明の一実施形態を成す。好ましくは、こうした調製物は凝集形態の本発明の抗体を実質的に含まない。

【0128】

#### 4. 医薬組成物

上述のような本発明の抗体の精製調製物(特にモノクローナル抗体調製物)は、ヒト疾患および障害(上に概略したものなど)の治療に使用するために医薬組成物に組み入れることができる。典型的にはこうした組成物はさらに、許容される製薬実務においていわゆる製薬上許容される(すなわち不活性な)担体として知られるものを含む。例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, (1980), Mack Publishing Co.を参照されたい。こうした担体の例としては、滅菌された担体、例えば生理食塩水、リンゲル液またはデキストロース液(適当なバッファーでpH5~8となるよう緩衝させたもの)が挙げられる。注射用(例えば静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋内または門脈内注射)または連続注入用の医薬組成物は、好ましくは目視可能な粒状物質を実質的に含まず、かつ抗体を0.1ng~100mg、典型的には抗体を5mg~25mg含み得る。こうした医薬組成物の調製方法は当業者に広く知られている。ある実施形態において、医薬組成物は本発明の治療用抗体0.1ng~100mgを単位用量の形態で含み、場合により使用説明書も一緒に添付される。本発明の医薬組成物は、投与前に再調製できるように、当業者に既知または周知の方法を用いて凍結乾燥(フリーズドライ)することができる。本発明の実施形態がIgG1アイソタイプの本発明の抗体を含む場合、銅のキレート剤、例えばクエン酸塩(クエン酸ナトリウムなど)またはEDTAまたはヒスチジンを医薬組成物に添加して、銅によって媒介されるこのアイソタイプの抗体の分解の度合いを低減させることができる(欧州特許第0612251号を参照のこと)。

【0129】

本発明の抗体を投与するにあたっての有効な用量と治療計画は一般に経験に基づいて決定され、患者の年齢、体重および健康状態ならびに治療される疾患または障害などといった諸要因に左右される。これらの要因は主治医が判断する範囲に含まれる。適当な用量を選定するための指針は、Smithら(1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New Yorkに見出されるが、一般には1mg~1000mgである。ある実施形態において、RAを患っているヒト患者を治療するための用量計画は、本発明の抗体(またはその抗原結合フラグメント)をおおよそ100mg(すなわち50mg~200mg)、毎週または隔週、皮下投与するというものである。本発明の組成物は予防法にも使用可能である。

【0130】

治療する疾患または障害に合わせて、治療上有効な量の本発明の抗体を含む医薬組成物を、同時に、別々に、または連続的に、有効量の他の医薬、例えば抗炎症剤(例えばNSAID、メトトレキセート、ブシラミン、チオリンゴ酸ナトリウム)または1以上の抗TNF治療薬(例えばEnbrel(商標)(etanercept)、Remicade(商標)(infliximab)、Humira(商標)(adalimumab)および/もしくはCDP870)と共に使用することができる。本発明の抗体は、有効量の抗TNF受容体抗体と組み合わせて使用することができる、Davis MWら(2000) Ann Rheum Dis 59(Suppl 1): 41-43を参照のこと。他の実施形態では、本発明の抗体は、以下の物質を標的とする薬剤と組み合わせて使用することができる; IL-1/IL-1R(例えばKineret(商標)), CTLA4-Ig、IL-6(Choyら, (2002) Ann.Rheum.Dis 61(suppl 1): 54を参照)、IL-8、IL-15、VEGF、IL-17、IL-18 (Taylorら (2001) Curr.Opin.Immunol.13: 611-616を参照)、抗ICAM抗体および/または抗CD4抗体、MMPファミリーのメンバー(例えばMMP-1、2、3および/または13)を標的とする薬剤。本発明の抗体はまた、炎症過程に関わることが知られている細胞を除去する薬剤と組み合わせて使用することができ、例えばMabthera(商標)を使用してCD20陽性B細胞を除去する。本発明の抗体と併用される他の治療薬とし

ては、抗血管新生治療薬、例えばインテグリン V<sub>3</sub>のアンタゴニスト、クリングル1~5 (Sumariwalla Pら (2003), Arthritis Res Ther 5:R32-R39を参照)、可溶性Flt-1(Miotlaら, (2000) Lab. Invest. 80:1195-1205を参照)または抗COX-2剤が挙げられる。都合のよいことに、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントを、このような他の薬剤と一緒に、場合により使用説明書と共に含むパーツキットからなる医薬組成物ももまた本発明に包含される。本発明はさらに、サイトII OSMとgp130の相互作用のモジュレーションにตอบสนอง性である疾患の治療に用いるための、治療に有効な量の本明細書に記載するモノクローナル治療用抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物を提供する。また、配列番号11の配列を有する重鎖および配列番号12の配列を有する軽鎖を含んでなる、治療に有効な量のモノクローナル治療用抗体を含む医薬組成物も提供される。

10

## 【0131】

また、配列番号50の配列を有する重鎖および配列番号51の配列を有する軽鎖を含んでなる、治療に有効な量のモノクローナル治療用抗体を含む医薬組成物も提供される。

## 【0132】

## 4.1 サイトIIおよびサイトIIIの両方の相互作用をモジュレートするための医薬組成物

本発明の一態様は、少なくとも部分的には、hOSMのサイトIIとサイトIIIの両方と、それらのそれぞれの相互作用パートナー(すなわち、サイトIIについてはgp130、サイトIIIについてはOSMR および/またはLIFR、および/または第2のOSM分子の結合についてはgp130)との相互作用をモジュレートすることが、これら2サイトのいずれか一方のみの相互作用をモジュレートすることに比較して、相乗効果を示す、という予期せざる知見に基づいている。

20

## 【0133】

従って本発明は、hOSMとgp130とLIFRおよび/またはOSMR との相互作用をモジュレートする方法を提供し、この方法は、hOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ことができるサイトIIアンタゴニストを用意すること; ならびに、hOSMのサイトIIIとOSMRおよび/またはLIFR、ならびにgp130(第2のOSM分子の結合の場合)との相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ことのできるサイトIIIアンタゴニストを用意することを含んでなる。

## 【0134】

従って本発明は、hOSMとgp130とLIFRおよび/またはOSMR との相互作用をモジュレートする方法を提供し、この方法は、hOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ことができるサイトIIアンタゴニストを用意すること; ならびに、hOSMのサイトIIIとOSMRおよび/またはLIFRとの相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)ことのできるサイトIIIアンタゴニストを用意することを含んでなる。

30

## 【0135】

ある実施形態においては、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとgp130との相互作用をモジュレートする第1の治療用抗体(サイトII抗体、その例は本明細書により提供される)、ならびに、hOSMに特異的に結合し、かつhOSMとOSMRおよび/またはLIFRとの相互作用をモジュレートする第2の治療用抗体(サイトIII抗体、その例はR&D systemsより市販されているMAB295である)を含む医薬組成物を提供する。第2の治療用抗体は、実施例に記載するELISA型アッセイにおいてhOSMとOSMR および/またはLIFRとの相互作用をモジュレートする(すなわち阻害または遮断する)能力、すなわち、実施例のKBアッセイにおいてOSMを中和しかつ実施例のELISAアッセイにおいてOSMとgp130の結合を阻害しない能力により認識される。サイトII抗体は、実施例のELISAアッセイにおいてOSMの結合を阻害する能力により認識され得る。典型的には第1および第2の治療用抗体はいずれもモノクローナルである。言うまでもなく、医薬組成物は必ずしも2種類のアンタゴニスト成分(例えば2種類の治療用抗体成分)を含む必要はないことが当業者には明らかだろう。なぜならば、例えばhOSMに特異的に結合し、かつサイトIIおよびサイトIIIとそれらのそれぞれの相互作用パートナーとの相互作用をモジュレートする、二重特異性抗体を用意することが可能

40

50

だからである。

【0136】

別の実施形態では、第1の医薬組成物と第2の医薬組成物を、場合により使用説明書と一緒に、含むパーツキットを提供し、ここで第1の医薬組成物はhOSMに特異的に結合し、かつhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする治療用抗体を含み、第2の医薬組成物はhOSMに特異的に結合し、かつhOSMのサイトIIIとOSMR および/またはLIFRとの相互作用をモジュレートする治療用抗体を含む。

【0137】

別の実施形態では、hOSMとその相互作用パートナー(例えばgp130ならびにOSMR および/またはLIFR)との相互作用のモジュレーションに応答性である疾患または障害、例えば炎症性疾患もしくは障害(例えば関節炎性疾患、例えば慢性関節リウマチもしくは変形性関節症)を患っているヒト患者の治療方法を提供し、この方法は、hOSMに特異的に結合しかつhOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする有効量の第1の治療用アンタゴニスト(例えば抗体)、ならびに、hOSMに特異的に結合しかつhOSMのサイトIIIとOSMR および/またはLIFRとの相互作用をモジュレートする有効量の第2の治療用アンタゴニスト(例えば抗体)を、同時に、連続的に、または別々に投与することを含んでなる。言うまでもなく、gp130に結合し、かつ(a)gp130とhOSMの相互作用、さらに(b)OSMR および/またはLIFRとhOSMとの相互作用、をモジュレートする(例えば遮断する)少なくとも第1のアンタゴニスト(抗体など)が上記と同じ目的を達成できることは、当業者であれば明らかだろう。

【0138】

5. 臨床用途

本発明の抗体は、hOSMのサイトIIとgp130の相互作用をモジュレートする治療に応答性である様々な疾患および障害を治療するために使用することができる。病理学的レベルのTNF の産生に関連する疾患もしくは障害(すなわちTNF 介在疾患もしくは障害)、および軟骨(特に関節軟骨)の分解もしくは破壊を特徴とする疾患もしくは障害が特に言及される。上に詳述した通り、本発明の抗体は、炎症性関節症(例えばRA)の治療において、単独療法として、またはそのような関節症のための別の療法との併用療法として使用することができる。本発明の抗体は、臨床的に確立された形態の疾患を治療するため、または易罹病性の患者の発症を予防するため、または臨床上重大な状態への疾患の進行を遅らせるもしくは停止させるために使用することができる。RA治療において、本発明の抗体は、疾患が一旦緩和された後の再発を防止するために使用することができる。患者が断続的な形態の疾患を患っている場合は、本発明の抗体を用いて、疾患の急性期と急性期の時間間隔を引き延ばすことができる。本発明の抗体はまた、RAの関節以外の徴候、例えばフェルティ症候群の治療、および/またはアテローム性プラークの形成の治療に使用することもできる。RA治療については、本発明の抗体と上述した医薬との組み合わせを使用することができる。本発明の抗体の投与が有効な他の関節炎性疾患としては、若年性関節炎、乾癬性関節炎、および強直性脊椎炎が挙げられる。

【0139】

変形性関節症(OA)は原因不明の慢性変性疾患であり、関節軟骨および関節機能の漸次減少を特徴とする。変形性関節症(OA)は現在、2つのグループに分類される。原発性OAは局部的または全身性であり、全身性OAは更年期後の女性に一般的に見られ、ヘバーデン結節の形成を伴う。二次性OAには、外傷、肥満、パジェット病または炎症性関節炎などといった根本的な原因がある。関節軟骨の消失は多くの場合、肥大性骨変形を伴い、骨棘形成、軟骨下骨肥厚および滑膜の炎症が見られる。特に懸念されるのは、体重を支える関節、例えば膝、手および腰などを侵す身体障害である。OAは極度の衰弱性疾患であり、最も重症の場合、運動性を回復させ関節痛を阻止するためには関節置換術が必要である。腰の変形関節症は、患者が巨大な骨棘を形成する傾向に基づき、肥大性および萎縮性の形態に分類されている(Solomon L (1976) J Bone Joint Surg 58, 176を参照のこと);他の関節も前記疾患の存在に対して同じような反応を示す。肥大性OAはピロリン酸結晶沈着や汎発性特

10

20

30

40

50

発性骨増殖症を伴うことがある。現在の療法としては、非オピオイド性鎮痛薬(アセトアミノフェンやトラマドールなど)、COX-2特異的阻害剤などのNSAIDS(例えばセレコキシブやロフェコキシブなど)、オピオイド系鎮痛薬、ならびに硫酸グルコサミンおよび硫酸コンドロイチンの使用が挙げられる。従って本発明のある実施形態においては、変形性関節症(例えば原発性または二次性)を患っている患者を治療する方法であって、本明細書に記載される本発明の治療用抗体またはそのフラグメントを有効量にて該患者に投与することを含む前記治療方法を提供する。本発明はまた、本発明の治療用抗体と、別の治療薬、特に1以上の上述したOA治療薬との併用療法を包含する。

#### 【0140】

乾癬は慢性の皮膚病であり、コーカサス人の約2%が罹患するという罹患率の高い病である。この疾患は、大半の人にとっては比較的軽い病であるが、罹患している者には深刻な影響を及ぼす。病院で治療中の乾癬患者の障害は、狭心症患者のそれと類似しており、また心不全患者のそれとほぼ同じである(Finlayら, (1990); Br.J.Dermatol, 123, 751)。乾癬の最も一般的な形態は慢性プラーク疾患である。この疾患では明確な赤い鱗状のプラークが典型的には頭皮、腰および手足の伸展側に分布して顕れる。臨床的な変種疾患としては滴状乾癬、脂漏性乾癬および該疾患の膿疱性形態が挙げられる。少数の患者は血清反応陰性の炎症性関節炎も罹患する。顕微鏡学的には病変した皮膚には、ケラチノサイトの増殖の増加および異常分化、活性化Tヘルパーリンパ球および好中球による浸潤、ならびに皮膚血管系の活性化が見られる。こうした変化は増殖因子とその受容体、炎症性サイトカインおよび血管新生ペプチドの過剰発現に一致する。しかし、徹底的な研究にもかかわらず、この疾患の原因と発症機序は依然としてはっきりしないものの、活性化T細胞が中心的役割を果たすことが動物モデル系で実証されている(Nickoloffら (1999) Arch.Dermatol.135, 546-552を参照されたい)。現在の治療薬としては、ビタミンD類似体、コルチコステロイド、ジトラノール(dithranol)およびレチノイド、例えばタザロテン(Tazarotene)ゲルなどの局所治療薬が挙げられる。光線療法としては、紫外線Bまたはプソラレンおよび紫外線A、ならびにエキシマーレーザー処置の使用が挙げられる。全身レチノイド治療薬としては、エトレチナート(Etretinate)およびアシトレチン(acitretin)、イソトレチノイン(isotretinoin)、リアロゾール(liarozole)が挙げられる。他の治療薬としては、メトトレキサート、ヒドロキシウレア、シクロスポリンおよびカルシニューリンアンタゴニスト、6-チオグアニン、アザチオプリン、スルファサラジンならびにフマル酸エステルが挙げられる。最近では、生物学的治療薬、例えばOntak(商標)(Denileukin Diftitox)、Zenapax(商標)(Daclizumab)、Basiliximab、抗CD4抗体、Efalizumab、Alefacept(商標)、Siplizumab、IDEC-114およびBMS 188667 (CTLA4Ig)などがこの疾患の治療に有用であると提唱され、または実証されている。さらに、抗TNF治療薬、例えばEnbrel(商標)(etanercept)、Remicade(商標)(infliximab)、Humira(商標)(adalimumab)および/またはCDP870などを、本発明の抗体と併用して乾癬(臨床的な変種疾患も含む)の治療に使用することができる。

#### 【0141】

乾癬病変におけるOSMの役割を示す証拠は、Boinfatiら (1998) Arch.Dermatol. Res 290:9, 13に見出される。オンコスタチンMは、病変乾癬皮膚の短期培養物から自然発生的に分泌される(Bonifatiら 同上を参照されたい)。さらに、マウス・ケラチノサイト中でのSTAT3(OSM受容体の下流の主要なシグナル伝達分子)の構成的活性化は、乾癬病変の自然発生をもたらす(Sanoら (2005) Nature Medicine 11:43-49を参照されたい)。

#### 【0142】

従って本発明の抗体は、乾癬(慢性プラーク乾癬、滴状乾癬、脂漏性乾癬、膿疱性乾癬、血清反応陰性炎症性関節炎を伴う乾癬)、アトピー性皮膚炎/湿疹、ざ瘡、魚鱗癬、天疱瘡、ウイルス性いぼの治療において、単剤療法としてまたはこうした上述の治療薬との併用療法として使用することができる。

#### 【0143】

全身性エリテマトーデス(SLE)は全身性の自己免疫疾患であり、自己抗体の産生、免疫

複合体の形成および免疫学的に仲介される組織損傷を特徴とする(Rheumatology (2003). Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby.1291-1430に概説されている)。病理的徴候としては、フィブリノイドの壊死、ヘマトキシリン体の形成、血管損傷、および皮膚の真皮と表皮の接合部の崩壊、炎症性関節炎ならびに糸球体腎炎が挙げられる。SLEの徴候はあらゆる年齢に見られ、これには新生児も含まれる。SLEは、出産適齢期の女性を侵す最も頻繁に見られる疾患の一つであり、男性よりも女性に明らかに多く見られ、コーカサス人よりも明らかに頻繁にアフリカ起源の人々を侵す。SLEの発生率は米国では毎年100,000人当たり1.8~7.6件と見積もられている。SLEは、主に感染症による死亡率の増大、ならびに腎臓およびCNSの合併症を伴う。狼瘡およびその合併症の治療は、個々の患者の要望に応じて決められる。非ステロイド系抗炎症薬は、骨格筋症状、構成的徴候および軽度の漿膜炎に対する重要な一次治療薬である。抗マラリア薬(例えばヒドロキシクロロキン、クロロキンおよびキナクリン)は、非ステロイド薬および低用量ステロイド薬の効かない骨格筋症状および構成的徴候を治療するために使用される。ステロイド薬での治療はSLEのほとんどの臨床的兆候に効果があるが、こうした薬剤の副作用は治療の用量および継続期間を制限する。免疫抑制薬、特にアザチオプリンは、より重症の疾患の治療に使用する。最近ではB細胞枯渇性抗体であるリツキサン(Rituxan)を用いた治療がSLEに有望な効果を示した(Looney RJら (2005) Curr Dir Autoimmune 8:193-205に概説されている)。オンコスタチンMはSLE患者の血清中に高レベルで存在し、そのレベルは疾患の活動性と相関することが示されている(Robak Eら (1997) Eur Cytokine Netw 8: 281-286を参照されたい)。従って、本発明はSLEの治療(単剤療法として、または1以上の上述した現在のSLE治療薬との併用療法として)における本発明の抗体の使用に関する。

10

20

#### 【0144】

全身性硬化症(SS)(強皮症の変種疾患およびレイノー現象も含まれる)は、皮膚および臓器の全身性障害である。全身性硬化症は皮膚および内臓の細胞外マトリクス蓄積を特徴とする。オンコスタチンMは過剰な細胞外マトリクス蓄積を促進する(Bamber Bら (1997) J Mol Med Abstract Vol 76: 61-69を参照のこと)。オンコスタチンMは全身性硬化症患者由来の培養単核球から自然発生的に産生され(Hasegawa Mら (1999) Rheumatology (Oxford) 38: 612-617を参照)、強皮症の肺線維症由来の気管支肺胞洗浄液中に存在する(Atama SP and White B (2003) Cytokine growth Factor Rev 14: 537-550に概説されている)。

30

#### 【0145】

OSMは、急性肺障害、特に肺炎の症例における患者の気管支肺胞洗浄液(BAL)から検出される(Tamura Sら (2002) Develop Dyman 225:327-331)。こうした患者におけるOSMの細胞性供給源は好中球のようであり、BAL液のOSM濃度はPMN数と相関する。好中球がOSMの供給源であり、活性化されるとOSMを分泌することから、OSMは好中球が気道炎症(COPDおよび重症の喘息も含まれる)の重要な成分である患者の肺に存在すると考えられる。その上、OSMは(マウス)組織好酸球からも発現され、該好酸球は炎症におけるOSMの重要な供給源である可能性がある(Tamura同上を参照されたい)。

40

#### 【0146】

OSMをアデノウイルスベクターによりマウス気道で過剰発現させると、重度の好酸球炎症およびマトリクス沈着が誘導され(Langdon Cら (2003) J. Immunol. 170:548-555を参照)、またTIMP-1発現が誘導される(Kerr Cら (1999) J. Interfer. Cytokine Res., 19:1195-1205参照)。マウス肺繊維芽細胞をOSMに曝露すると、好酸球の強力な化学誘因物質であるエオタキシンの放出が促進される。その上OSMは、ヒト肺繊維芽細胞に対して、増殖を促進し、コラーゲン産生を誘導し、アポトーシスを抑制する(Scaffidi, A.K.ら (2002) Brit. J. Pharmacol 136:793-801を参照のこと)。こうした観察結果の背後にある機構は不明であるが、マトリクス沈着は部分的には、 $\alpha_1$ プロテイナーゼ阻害剤合成の強力かつ特異的なアップレギュレーションの結果であるかもしれない(Cichy, J.ら (1998) Biochem. J

50

329:335-339を参照)。OSMはまた、繊維芽細胞依存性マスト細胞増殖およびヒスタミン含量の著しい増加を促進することが見出されている(Gyotoku Eら (2001) Arch.Dermatol.Re s 293:508-514を参照されたい)。OSMを単離したラット肺に直接滴下すると、急性で持続性のIL-6分泌が誘導された(Li, H.L. (2002) J.Drug Targ 10:55-62を参照されたい)。従って、本発明は炎症性肺疾患、例えば喘息およびCOPD(慢性閉塞性肺疾患)などの治療(単剤療法として、または他の薬剤との併用療法として)における本発明の抗体の使用に関する。

#### 【0147】

OSMは多発性硬化症(MS)患者の脳で検出され、そこではミクログリア、アストロサイトおよび浸潤性白血球に局在化される(Ruprecht Kら Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. 60(11): 1087-98, 2001 Novを参照されたい)。OSMは脳内皮細胞からのIL-6およびMCP-1分泌を誘導し、また、OSMをTNF と一緒に添加すると相乗的な応答が引き起こされる。OSMはまた、脳微小血管内皮細胞上のICAM1発現を誘導し、これは白血球が脳組織内へと浸潤するのを促進する可能性がある(Ruprecht Kら 同上)。脳内の炎症を促進することの他に、OSMは神経喪失に直接関与しているかもしれない。HIV患者の単球上清は、神経芽細胞増殖を著しく阻害し、神経細胞死を引き起こすが、こうした影響を仲介するメディエーターはオンコスタチンMであることが示された。多くのHIV患者が神経細胞喪失の引き起こす脳萎縮を患っていることから、OSMはこの病理のメディエーターの一つである可能性がある。明らかに、OSMは神経が喪失する他のCNS疾患の一因になりうる。興味深いことにアルツハイマー病(AD)では、 $\alpha_1$ 抗キモトリプシン(ACT)はアミロイド会 20  
合タンパク質の一種であり、その発現は疾患部位で著しく増大しており、おそらくアミロイドプラークおよび神経原線維変化における異常タンパク質の沈着を促進している。浸潤性の活性化T細胞および単球細胞ならびにミクログリアから分泌されることが知られているOSMは、ACTの強力な誘導因子でもあり、そのことからAD病理に関与している可能性がある(Kordula Tら (1998) J Biol.Chem. 273:4112-4118およびKordula T Journal of Neuro 20  
science. 20(20): 7510-6, 2000を参照されたい)。

#### 【0148】

Tamuraらによる研究は、OSMが神経因性疼痛の発生と維持に関与することを示唆している(Tamura S.ら (2003) Eur.J.Neurosci. 17:2287-2298を参照されたい)。彼らの研究は、OSM 受容体を発現する侵害受容性感覚ニューロンのサブセットの存在を明らかにした 30  
。全てのOSM 受容体陽性ニューロンはVR1およびP2X3受容体も発現しており、これら(VR1およびP2X3受容体)は神経因性疼痛および炎症性疼痛の発生に極めて重要であることが示されている(Jarvis M.F.ら (2002) PNAS 99:179-184およびWalker K.Mら (2003) J. Phar 30  
macol. Exp. Ther 304, 56-62を参照されたい)。その上OSM-/-マウスでは、化学的、熱的、内臓の、および機械的な疼痛に対する有害な応答が低減されており、これはVR1<sup>+ve</sup> P2X 3<sup>+ve</sup>小型ニューロンの減少と相関していた(Morikawa, Y.ら (2004): J Neurosci 24, 194 1-1947を参照されたい)。

#### 【0149】

従って本発明は、上述したような中枢神経系疾患または障害、例えば多発性硬化症(MS)、アルツハイマー病(AD)および他の認知症などの治療における本発明の抗体の使用(単剤 40  
療法として、または他の薬剤との併用療法として)に関し、さらに疼痛、特に神経因性疼痛および/または炎症性疼痛の治療における使用に関する。

#### 【0150】

OSMは、アテローム硬化症病変中の組織型マクロファージに存在し(Modur V.ら J.Clin Invest. 100, 158-168を参照)、血管新生因子として、血管壁の脆弱性に寄与すると考えられているアテローム硬化症プラークの新血管形成特性を促進している可能性がある。血管新生応答の他に、OSMは内皮細胞のIL-6分泌を誘導し(内皮細胞ではOSMの効果はIL-1と相加的であり、TNF と相乗的である)、またCOX-2発現を誘導する(Brown J.Tら (1991) J .Immunol.147: 2175-2180を参照されたい)。OSMの血管新生特性には、内皮細胞のCOX-2誘導が必要である(Brown J.Tら, 同上を参照)。また一方、OSMは内皮細胞において他の血管 50

新生因子、すなわちVEGF (Vasse, Mら (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1835-1842)およびbFGF (Wijeloh E.S.ら (1997) *J.Cell Sci* 110:871-879)の発現も誘導する。興味深いことに、ヒト内皮細胞は他の細胞よりも約10~20倍大きいOSM受容体密度を有する (Modur V.ら 同上を参照)。

【0151】

内皮細胞に対する作用の他に、OSMはまた血管平滑筋細胞 (VSMC)におけるIL-6およびCOX-2発現を誘導し、また、細胞形態の著しい変化を引き起こす (Bernard C.ら (1999) *Circ. Res.* 85:1124-1131)。カルシウム沈着は通常は進行したアテローム硬化症病変に見られ、そこではマクロファージが主要な炎症細胞である。マクロファージはOSMの主要な供給源であり、興味深いことに、このサイトカインはVSMC培養物において骨型アルカリホスファターゼおよびカルシウム沈着を誘導する (Shioi A.ら (2002) *Circ.Res.* 91:9-16)。OSMはまたVSMCからの組織因子 (TF)分泌を誘導し、かつVSMCからのTF経路凝固インヒビター (TFPI)分泌を抑制するため、結果的にVSMC培養上清において強力な血液凝固促進活性を生じる (Mirshahi F.ら (2002) *Blood Coag.Fibrinol.* 13:449-455)。さらにOSMは、内皮細胞からのフォンビルブランド因子、組織型プラスミノゲンアクチベーターおよびPAI-1の分泌に、「OSMはアテローム硬化症病変の形成に重要な役割を果たす」ことを示唆する様式で、影響を及ぼす (Pourtau Jら (1998) *Blood Coag.Fibrinol.* 9,609-615)。

10

【0152】

フィブリノーゲンの血清レベルは重要な血管のリスク因子であり、OSMはフィブリノーゲン分泌の強力な誘導因子であることがヘパトーマ細胞系を用いた研究で明らかになっている (Vasse.Mら (1996) *Haemostasis* 26, Suppl 4, 331-339)。また一方、高濃度 (50 ng/ml)ではOSMはヒトLDL受容体の発現をも増大させる (Liuら (2003) *Aterio.Thromb. Vasc. Biol.* 23: 90-96)。最後に、OSMはJ774単球マクロファージにおけるコレステロールのエステル化を促進し、したがってアテローム硬化症病変における泡沫細胞形成の過程でこのプロセスに寄与する可能性がある (Maziere Cら (1996) *Biochem. Biophys Acta* 1300, 30-34)。

20

【0153】

したがって本発明は、心血管系の疾患または障害の治療における本発明の抗体の使用に関する。また、アテローム硬化症および内皮細胞起源の疾患の治療における本発明の抗体の使用も考えられる。さらに、HIV患者の治療、特にカポジ肉腫などのウイルス感染の結果生じる症状の治療における本発明の抗体の使用も考えられる。

30

【0154】

本発明の抗体はまた、細胞周期調節の疾患、例えば癌 (前立腺癌など)や骨髄腫に使用することができる。

【0155】

本発明を主に、ヒトの疾患または障害の治療に関連して記載したが、本発明はまた、非ヒト哺乳動物における類似の疾患または障害の治療にも用途を見出すことができる。

【0156】

表A

タンパク質またはポリヌクレオチド(PN)	15E10 抗体	10D3 抗体
CDRH1	配列番号 1	配列番号 40
CDRH2	配列番号 2	配列番号 41
CDRH3	配列番号 3	配列番号 42
CDRL1	配列番号 4	配列番号 43
CDRL2	配列番号 5	配列番号 44
CDRL3	配列番号 6	配列番号 45
V <sub>H</sub> ドメイン(マウス)	配列番号 7	配列番号 46
V <sub>L</sub> ドメイン(マウス)	配列番号 8	配列番号 47
V <sub>H</sub> ドメイン(ヒト化、B3)	配列番号 9	配列番号 48
V <sub>L</sub> ドメイン(ヒト化、L2)	配列番号 10	配列番号 49
重鎖(ヒト化)	配列番号 11	配列番号 50
軽鎖(ヒト化)	配列番号 12	配列番号 51
V <sub>H</sub> ドメイン(マウス、PN)	配列番号 15	配列番号 52
V <sub>L</sub> ドメイン(マウス、PN)	配列番号 16	配列番号 53
V <sub>H</sub> ドメイン(ヒト化、PN、B3)	配列番号 17	配列番号 54
V <sub>L</sub> ドメイン(ヒト化、PN、L2)	配列番号 18	配列番号 55
重鎖(ヒト化、PN)	配列番号 19	配列番号 56
軽鎖(ヒト化、PN)	配列番号 20	配列番号 57
V <sub>H</sub> ドメイン(B4、ヒト化)	配列番号 21	N/A
重鎖(ヒト化、Fc 変異型)	配列番号 61	N/A
重鎖(ヒト化、Fc 変異型、PN)	配列番号 62	N/A

10

20

30

## 【実施例】

## 【0157】

以下に本発明を実施例により説明する。特許請求の範囲は、以下の1以上の実施例を一般化したものを含むことができる。

実施例1～6は、抗体15E10の作製と遺伝子操作に関する。実施例7は抗体10D3の作製と遺伝子操作に関する。

40

## 【0158】

## 1. モノクローナル抗体の製造

モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞により産生され、これは通常、E Harlow and D Lane, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載の方法に従って行う。これはマウス・ミエローマ細胞と、標的抗原で免疫したマウス由来のBリンパ球とを融合させた結果である。得られるハイブリドーマ細胞はミエローマ融合パートナーにより不死化され、抗体産生能力はBリンパ球により付与される。

## 【0159】

4匹のSJLマウスを、CHO細胞により産生されたグリコシル化ヒトOSM(hOSM)をRIBIアジ

50

ユバント(Sigma)中に懸濁したものを腹腔内注射することにより免疫した。マウスは2週間経過した後にhOSMのみで追加免疫し、次いでさらに2週間経過した後に抗サイトIIIモノクローナル抗体で中和したhOSM(OM4/11.17; OSM: Mab 1:1.5 重量:重量)で追加免疫して免疫応答をサイトIIのほうに向かわせ、次いでさらに2.5週間後にOSM-MAb複合体で再度追加免疫し、最後に5週間後にOSMのみで追加免疫した。最初の免疫感作から3ヶ月後に脾臓を取り出し、Bリンパ球とP3X細胞由来のマウス・ミエローマ細胞とをPEG1500(Boehringer)を使用して融合し、ハイブリドーマを作製した。個々のハイブリドーマ細胞系を限界希釈法によりクローン化した(E Harlow and D Lane)。単一コロニーの入ったウェルを顕微鏡で確認し、上清を活性について試験した。最も活性の高いクローンからの細胞を低温保存や抗体産生などのために増殖させた。最初のOSM抗体選択は、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイで評価した、ヒトグリコシル化OSMを中和する際の特異性および効力に基づいて行った。KB細胞アッセイはOSM特異性の確認を提供するものである(下記参照)。十分な効力と正しい特異性を有する抗体を同定した後、さらなる選択基準を適用した:

10

- 1 / カニクイザルOSMに対する交差反応性
- 2 / プールしたヒトAB血清の存在下でのヒトOSMに対する活性の維持
- 3 / ヒト好中球OSMライブラリーおよびRA滑液細胞由来OSMに対する活性の維持

1920個のハイブリドーマをgp130阻害ELISAでスクリーニングした。43個は50%を上回る阻害を与え、15個について限定用量応答実験を行い、そのうち6個をさらなる研究のために選択した。これらをサブクローニングし、マスタークローンを選択した。

20

#### 【0160】

2種類の抗体、クローン15E10およびクローン10D3(実施例7を参照のこと)を効力に基づいて選択した。15E10マウス抗体は一貫してgp130阻害ELISAでより高い効力を示したが、ヒトOSMを標的抗原とした場合にはKB細胞アッセイにおいて10D3と同じような効力を示した。しかしながら、15E10マウス抗体は、10D3と比較して、カニクイザルOSMに対しては両方のアッセイでかなり優れた効力を示した。

#### 【0161】

#### 2. クローン15E10の可変領域のクローニング

クローン15E10ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出し、重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAを逆転写により生成させたが、これにはマウス・リーダー配列およびあらかじめ決定されたアイソタイプ(IgG2a/)の抗体定常領域に特異的なプライマーを使用した。重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAをその後、配列決定のためにpCR2.1ベクターにクローニングした。

30

#### 【0162】

#### 2.1 RNA抽出

全RNAは、ハイブリドーマ・クローン15E10の $10^6$ 個の細胞のペレットから、Promega社のSV Total RNA Isolation Systemを用いてメーカーの使用説明書に従い抽出した。

#### 【0163】

#### 2.2 逆転写

RNAを逆転写して、重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAを生成させたが、これにはマウス・リーダー配列およびマウスIgG 2a/ 定常領域に特異的なプライマーを使用した。使用したプライマーの混合物はJones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991)に記載されている。

40

#### 【0164】

マウス $V_H$ および $V_L$ リーダー配列フォワードプライマーのプールは50 $\mu$ Mに調製した。マウス 2aおよび 定常領域リバースプライマーの溶液も50 $\mu$ Mに調製した。

#### 【0165】

#### 2.3 逆転写PCR(RT-PCR)

可変重鎖および軽鎖領域をコードするRNAの逆転写は、Promega社のAccess RT-PCR Systemを用いてメーカーの使用説明書に従い2回反復して行った。 $V_H$ および $V_L$ フォワード

50

およびリバース・プライマーは上記のものを用いた。

【0166】

### 3. 上記2.3のPCR産物のクローニング

#### 3.1 ゲル精製

RT-PCRの産物 ( $2 \times V_H$  および  $2 \times V_L$ ) をゲルローディング溶液で0.01%臭化エチジウムを含有する分離用1%アガロースゲルにロードし、100Vで1時間、TAEバッファーで泳動させ、V領域のバンドを切り出した。100bp DNAラダーもゲルに流して、 $V_H$  および  $V_L$  バンドを同定できるようにした。

【0167】

DNA断片は、Qiagen社のQIAquick<sup>TM</sup> Gel抽出キットをメーカーの使用説明書に従って使用してゲルから抽出し、精製した。 10

【0168】

#### 3.2 連結

精製したRT-PCR断片 ( $2 \times V_H$  および  $2 \times V_L$ ) は、Invitrogen社のTAクローニングキットを用いてメーカーの使用説明書に従いpCR2.1ベクターにクローニングした。

【0169】

#### 3.3 形質転換

連結したプラスミドを、TAクローニングキットの使用説明書に従い、TOP10F'細胞に形質転換した。50  $\mu$ l および200  $\mu$ lの形質転換細胞を、100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するL-アガープレート上に広げ、500mMのIPTG溶液8  $\mu$ l およびDMF中の50mg/ml X-Gal溶液16  $\mu$ lをコーティングした。プレートを37  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。 20

【0170】

#### 3.4 配列決定

5個の白いコロニーを、100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加した5mlのLB培地で37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

15E10の  $V_H$  および  $V_L$  ドメインを含有するpCR2.1プラスミドは、Qiagen社のQIAprep Spin Miniprepキットをメーカーの使用説明書に従って使用して抽出し、精製した。

$V_H$  および  $V_L$  ドメインはT7、M13フォワードおよびM13リバース・プライマーを用いて配列決定した。

15E10  $V_H$  ドメインのアミノ酸配列(2つのRT-PCR反応から得られた10個のクローンで一致): 配列番号7 30

15E10  $V_L$  ドメインのアミノ酸配列(2つのRT-PCR反応から得られた10個のクローンで一致): 配列番号8

【0171】

### 4. キメラ抗体

上記3.4の親マウスV領域をヒトIgG1/k野生型C領域にグラフトしたもものからなるキメラ抗体を、正しいマウスV領域のクローニングを確認するため、およびヒト化構築物を試験するときの対照として使用するために設計した。キメラ抗体をCHO細胞で発現させ、精製し、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイにおいてOSMサイトIIに対する親和性について試験した(下記参照)。クローニングしたマウスV領域はPCRで増幅することにより、哺乳動物発現ベクターR1dおよびR1nにクローニングするのに必要な制限酵素部位を導入した。Hind IIIおよびSpe I部位は、 $V_H$  ドメインを挟み、ヒト  $V_H$  野生型C領域を含む改変R1dベクターへのクローニングを可能にするために設計された。Hind IIIおよびBsiw I部位は、 $V_L$  ドメインを挟み、ヒト  $V_L$  C領域を含む改変R1nベクターへのクローニングを可能にするために設計された。 40

【0172】

#### 4.1 PCR増幅

$V_H$  フォワードプライマー:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGC TGT CCT AGG GCT ACT C-3' (配列番号22)

Hind III制限部位を下線で、Kozak配列を太字で示す。

【0173】

V<sub>H</sub> リバースプライマー：

5'-GAT GGA CTA GTG TCC CTG TGC CCC AGA C-3' (配列番号 23)

Spe I制限部位を下線で示す。

【0174】

V<sub>L</sub> フォワードプライマー：

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT T-3' (配列番号 24)

10

Hind III制限部位を下線で、Kozak配列を太字で示す。

【0175】

V<sub>L</sub> リバースプライマー：

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA ACT TTG TCC C-3' (配列番号 25)

BsiW I制限部位を下線で示す。

【0176】

PCR反応：

水	66 μl
10× PCRバッファー	10 μl
dNTP (2 mM)	10 μl
プライマー 1 (5 μM)	4 μl
プライマー 2 (5 μM)	4 μl
AmpliTaqポリメラーゼ	2 μl
精製プラスミド	4 μl
総容量	100 μl

20

プライマー 1：V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> フォワードプライマー

プライマー 2：V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> リバースプライマー

精製プラスミド：Qiagen Minipreps (200×希釈)で精製したpCR2.1 V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> プラスミド

30

PCRサイクル：

- 1 - 95 で 4 分間
- 2 - 95 で 1 分間
- 3 - 55 で 1 分間
- 4 - 72 で 1 分間
- 5 - 72 で 7 分間

ステップ 2 ~ 4 を 30 回繰り返した。

【0177】

#### 4.2 哺乳動物発現ベクターへのクローニング

PCR産物は、Qiagen社のMinElute PCR精製キットを用いてメーカーの使用説明書に従い精製した。

40

【0178】

##### 4.2.1 制限酵素切断

V<sub>H</sub> PCR産物およびRid hC 1wt哺乳動物発現ベクターをHind III-Spe Iで切断した：

10× バッファー (NEBuffer2)	5 μl
BSA 100× (NEB)	0.5 μl
DNA	5 μl
Hind III (Promega)	2 μl
Spe I (NEB)	2 μl
水	35.5 μl

50

総容量 50  $\mu$ l

DNA：精製  $V_H$  PCR産物またはRId hC 1wtベクター (0.25mg/mlにて)

37 で2時間インキュベートした。

【0179】

$V_L$  PCR産物およびRIn hC 哺乳動物発現ベクターをHind III-BsiW Iで切断した：

10 $\times$ バッファー (NEBuffer2) 5  $\mu$ l

DNA 5  $\mu$ l

Hind III (Promega) 2  $\mu$ l

水 38  $\mu$ l

総容量 50  $\mu$ l

10

DNA：精製  $V_L$  PCR産物またはRIn hC ベクター (0.25mg/mlにて)

37 で2時間インキュベートした。

BsiW I (NEB)を2  $\mu$ l添加し、55 で2時間インキュベートした。

【0180】

#### 4.2.2 ゲル精製

制限酵素切断の産物をゲルローディング溶液で、0.01%臭化エチジウムを含有する分離用1%アガロースゲルにロードし、100Vで1時間、TAEバッファーで泳動させ、RIdおよびRInベクターならびに $V_H$  および $V_L$  PCR断片のバンドを切り出した。100bp DNAラダーもゲルに流して、 $V_H$ 、 $V_L$  およびベクターのバンドを同定できるようにした。DNAは、Qia gen社のQIAquick(商標)Gel抽出キットをメーカーの使用説明書に従って使用し、ゲルから抽出して精製した。

20

【0181】

#### 4.2.3 連結

Hind III-Spe Iで切断した $V_H$  PCR断片を、Hind III-Spe Iで切断したRId hC 1wtベクターに連結させた。

Hind III-BsiW Iで切断した $V_L$  PCR断片を、Hind III-BsiW Iで切断したRIn hC ベクターに連結させた。

連結反応はPromega社のLigaFast Rapid DNA連結システムを使用してメーカーの使用説明書に従い、次のものを用意して行った：

$V_H$  : ベクター： Hind III-Spe I切断したRId hC 1wt

インサート： Hind III-Spe I切断した $V_H$  PCR断片

30

$V_L$  : ベクター： Hind III-BsiW I切断したRIn hC

インサート： Hind III-BsiW I切断した $V_L$  PCR断片

【0182】

#### 4.2.4 形質転換

連結産物をDH5 コンピテント細胞に形質転換した：

200  $\mu$ lのDH5 の入ったバイアルを氷上で解凍した。

50  $\mu$ lのアリコート成形質転換チューブに用意した。

2  $\mu$ lの連結産物混合液を添加し、ピペットの先端で穏やかに混合し、その後氷上で30分間インキュベートした。

40

混合物を、振とうせずに42 で45秒間インキュベートした。

その後これを氷上に移して2分間静置した。

450  $\mu$ lのSOC培地を添加し、チューブを振とうインキュベーターで37 にて1時間インキュベートした。

培養物100  $\mu$ lを、100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加したL-アガープレート上に広げ、37 で一晩インキュベートした。

【0183】

#### 4.2.5 配列決定

$V_H$  および $V_L$  クローンを、100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加した5 mlのLB培地で37 で一晩培養した。

50

V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを含有するそれぞれRIdおよびRInプラスミドを、Qiagen社のQIApreap Spin Miniprepキットをメーカーの使用説明書に従って使用することにより抽出し精製した。

V<sub>H</sub> 領域は、RIdベクターおよびシグナル配列に基づくフォワードプライマーと、ヒトC1領域に基づくリバースプライマーを用いて配列決定した。

V<sub>L</sub> 領域は、RInベクターおよびシグナル配列に基づくフォワードプライマーと、ヒトC領域に基づくリバースプライマーを用いて配列決定した。

正しいV<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> 配列を有するクローンを同定し、CHO細胞での発現のためにプラスミドを調製した。

【0184】

10

#### 4.3 CHO細胞におけるキメラ抗体発現

15E10 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを含有するそれぞれRIdおよびRInプラスミドを用いて、CHO細胞を一過性に同時トランスフェクトして発現させた。産生されたキメラ抗体を、rProtein Aセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製し、OSMに対する親和性を、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイで評価した(下記参照)。

【0185】

##### 4.3.1 プラスミド精製

RId-15E10 V<sub>H</sub> および RIn-15E10 V<sub>L</sub> プラスミドを含むDH5<sup>+</sup> 細胞を、100 μg/mlのアンピシリンを添加した5 mlのLB培地で、振とうインキュベーター内で37 °Cにて8時間培養した。

20

100 μg/mlのアンピシリンを添加した200mlのLB培地に、1 mlの日中培養物を播種し、振とうインキュベーター内で37 °Cにて一晩インキュベートした。

プラスミドは、Qiagen社のQIAfilter Plasmid Maxiキットをメーカーの使用説明書に従って使用して抽出し精製した。得られたエタノールペレットを200 μlのTEバッファーに再懸濁し、プラスミド濃度は、ストック溶液を100倍に希釈した後、260nmでの吸光度により測定した。

【0186】

##### 4.3.2 トランスフェクション

CHO細胞を、4 × 175cm<sup>2</sup> BD Falcon組織培養フラスコに入れた、超低ウシ胎仔血清 (Ultra Low Fetal Bovine Serum) および1%ペニシリン - ストレプトマイシンを添加したGlutamax-1含有ダルベッコMEM (DMEM)培地で37 °Cにてコンフルエントになるまで培養した。

30

各フラスコについて、50ml Falconチューブに以下の試薬を添加してボルテックス混合した：

Glutamax-1を含むOptimem 1 8 ml

RId-15E10 V<sub>H</sub> 精製プラスミド 20 μg

RIn-15E10 V<sub>L</sub> 精製プラスミド 20 μg

TransFastトランスフェクション試薬 240 μl

この混合物を室温 (RT)で10~15分間インキュベートした。

DMEM培地をフラスコから除いてから、混合物をボルテックスし、フラスコに加えた。

40

この混合物を37 °Cで1時間インキュベートした。

32mlのOptimemをこのフラスコに添加し、37 °Cで48~72時間インキュベートした。

【0187】

##### 4.3.3 キメラ抗体の精製

全ての175cm<sup>2</sup> フラスコからの培地をプールして、MSE Mistral 2000で1500rpm、3分間遠心分離し、上清を500mLフィルターシステム0.22 μm CAに通した。

抗体は清澄化した上清からAmersham Biosciences社製のAkta ExplorerでUnicornソフトウェアを使用して精製した。

使用したカラムは1 mlのHiTrap rProtein AセファロースFFであった。

流速を1 ml/minとした。

50

カラムを10CVのダルベッコPBSで平衡化してから、ポンプAから清澄化上清をロードした。

【0188】

カラムを20CVのダルベッコPBSで洗浄し、ポンプAを洗浄して洗浄液をそのまま流し、さらに10CVのダルベッコPBSをカラムに通すことで上清の完全なクリアランスを確かなものとした。

抗体を10CVのImmunoPure IgG溶出バッファー(Pierce)で溶出させ、100 $\mu$ lの1M Trizma-HCl pH8.0中和バッファーを含む1ml画分として回収した。

カラムを5CVのダルベッコPBSで再度平衡化した。

溶出画分中の抗体は、10倍容量のImmunoPure IgG溶出バッファー + 1倍容量の1M Trizma-HCl pH8.0を含むブランク溶液に対して280nmでの吸光度を読み取ることにより定量し、十分な量の純粋な抗体を含む画分をプールし、100 $\mu$ lのアリコートとして-20 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

【0189】

4.4 キメラ抗体の解析

精製した15E10および10D3(下記参照)キメラ抗体を、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイで解析して、これらのキメラ抗体がヒトおよびカニクイザルOSM(hOSMおよびcOSM)を中和する能力を調べた。gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイのプロトコルを以下に示す。

【0190】

表1：15E10 および 10D3 マウスおよびキメラ抗体の IC50( $\mu$ g/ml)値

	gp130 ELISA	KB 細胞アッセイ
15E10 マウス	0.059	0.195
15E10 キメラ	0.036	0.110
10D3 マウス	0.107	0.114
10D3 キメラ	0.057	0.107

15E10および10D3キメラ抗体はどちらも、gp130阻害ELISA(図2)およびKB細胞アッセイ(図3)においてhOSMおよびcOSMを中和した。キメラ抗体15E10のカニクイザルOSMに対する親和性は、キメラ抗体10D3のそれよりも強く、これは親マウス抗体について観察されたのと同様であった。キメラ抗体はどちらも曲線的なプロファイルを示し、親マウス抗体と似たIC50値を示した(表1)。カニクイザルOSM(cOSM)のアミノ酸配列およびcDNA配列を、それぞれ配列番号63および配列番号64に示す；

配列番号 63 :

MGVPLTRRTLLSLILALLFPSMASMAAMGSCSKEYRMLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDIP  
 KLREHCRESFGAFPSEETLRGLGRRGFLOTLNATLGCVLHRLADLEQHLPKAQLDERSGLNIEDLEKL  
 QMARPNVLGLRNNVYCMAQLLDNSDMTEPTKAGRGTPOPTPTPTSDVFQRKLEGCSFLRGYHRFMHS  
 VGRIFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTTRPSRKGNRLMPRGQLPR

配列番号 64 :

ATGGGGGTACCGCTCACACGGAGGACGCTGCTCAGTCTGATCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGC  
 AAGCATGGCGGCTATGGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGCATGCTCCTTGCCAGCTCCAGAAGCAGA  
 CAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGGCTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCTGGATATTCCT  
 AAAGTGAAGAGACTGCAGAGAGAGCCCTGGGGCCTTCCCCAGCGAGGAGACCCCTGAGGGGGCTGGG  
 CAGGCGGGGCTTCTACAGACGCTCAATGCCACACTGGGCTGCGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAG  
 AGCAGCATCTCCCAAGGCCAGGACTTGAGAGGTCTGGGCTGAACATAGAGGACTTAGAGAAGCTG  
 CAGATGGCGAGGCCGAATGTCCTCGGGCTCAGGAACAACGTCTACTGCATGGCCAGCTGCTGGACAA  
 CTCAGACATGACTGAGCCACGAAGGCCGGCCGGGGACCCCTCAGCCGCCACCCACCCCTACCT  
 CAGATGTTTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGTTTCTGCGTGGCTACCATCGTTTCATGCACTCA  
 GTGGGGCGGATCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCACCAGGC  
 CCTGCGGAAGGGGGTGCAGGACGAGACCCTCCAGGAAAGGCAATAGACTCATGCCAGGGGACAGC  
 TGCCCCGGTAG

この結果から、正しい15E10可変領域が確かにクローニングされており、ヒトおよびカ  
 ニクイザル0SMのサイトIIに結合可能な抗原結合性キメラ抗体をもたらしたことが確認さ  
 れる。こうして15E10可変重鎖および軽鎖ドメインは今やヒト化することができる。

【0191】

#### 5.1.1 マウスデータベースの検索

15E10 V<sub>H</sub> アミノ酸配列と最も相同性の高い15種類のマウス配列、および同V<sub>L</sub> アミノ  
 酸配列と最も相同性の高い10種類のマウス配列を、ペプチドデータベースを検索すること  
 により同定した。

15E10 V<sub>H</sub> アミノ酸配列を、データベース検索からの全15種類のマウス配列と比較し、  
 次のフレームワーク残基が重要であることを特定した：

位置	15E10 V <sub>H</sub>	マウス	出現頻度
75	R	K	15/15
105	T	Q	14/15

位置はKabatらのナンバリングシステム(上述)に従ったものである。

【0192】

15E10 V<sub>L</sub> アミノ酸配列を、データベース検索からの全10種類のマウス配列と比較し、  
 次のフレームワーク残基が重要であることを特定した：

位置	15E10 V <sub>L</sub>	マウス	出現頻度
9	T	A	8/10
38	E	Q	10/10
49	E	Y	10/10

60 A V 10/10

【0193】

## 5.1.2 ヒトデータベースの検索

15E10 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> フレームワークと最も相同性の高いヒトフレームワーク配列を、EasyBlastを用いてペプチドデータベースから同定した。

15E10 V<sub>H</sub> については2組のヒト配列を同定した：  
グループAとして次のフレームワークをヒト化用を選択した：

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSR  
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSPSSGSYYYYYYGMDVWGQGT<sup>26</sup>TVTVSS

10

(配列番号 26)

CDRを下線で示す。

【0194】

グループBとして次のフレームワークをヒト化用を選択した：

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGR  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGGPLYWYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 27)

CDRを下線で示す。

【0195】

以下のフレームワーク残基は、親和性を回復させるのにおそらく重要なものとして特定され、逆変異させる必要があるかもしれない：

位置 (Kabatナンバリング)	15E10 V <sub>H</sub>	グループ A	グループ B
27	F	G	F
28	S	S	T
29	L	I	F
30	T	S	S
48	L	I	V
49	G	G	A
67	L	V	F
71	K	V	R
73	N	T	N
78	V	F	L
94	K	R	R

20

30

【0196】

種々の逆変異を有する8種類のヒト化V<sub>H</sub>構築物を設計したが、このとき4種類はグループAのヒトフレームワーク(A1、A2、A3およびA4)に基づき、4種類はグループBのヒトフレームワーク(B1、B2、B3およびB4)に基づくものであった。

【0197】

15E10 V<sub>L</sub> について1組のヒト配列を同定し、次の配列をヒト化用を選択した：  
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSKYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG  
SGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKLEI (配列番号 28)

40

CDRを下線で示す。

【0198】

以下の残基は、親和性を回復させるのにおそらく重要なものとして特定され、逆変異させる必要があるかもしれない：

位置 (Kabatナンバリング)	15E10 V <sub>L</sub>	ヒト V <sub>L</sub>
49	E	Y
71	Y	F

50

## 【 0 1 9 9 】

2種類の構築物を設計した。一方はそのまま直接グラフトしたもの(L1)であり、他方は両方の残基に逆変異を導入したもの(L2)である。

## 【 0 2 0 0 】

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 A1 :

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGSTDYNAAFMSR  
VTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGQGTTS (配列番号 29)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 A2 :

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGSTDYNAAFMSR  
VTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGQGTTS (配列番号 30)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 A3 :

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGSTDYNAAFMSR  
VTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGQGTTS (配列番号 31)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 A4 :

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRGGSTDYNAAFMSR  
LTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGQGTTS (配列番号 32)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 B1 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSR  
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPNSNFYWFYFDVWGRGTLV (配列番号 33)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 B2 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSR  
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLV (配列番号 34)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 B3 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSR  
FTISKDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLV (配列番号 35)

ヒト化V<sub>H</sub>構築物 B4 :

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSR  
LTISKDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLV (配列番号 36)

ヒト化V<sub>L</sub>構築物 L1 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLSGIPARFSGSGS  
GTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK (配列番号 37)

ヒト化V<sub>L</sub>構築物 L2 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLSGIPARFSGSGS  
GTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK (配列番号 38)

## 【 0 2 0 1 】

10

20

30

40

50

## 5.2 15E10のヒト化

ヒト化  $V_H$  および  $V_L$  構築物は、制限酵素部位 (RidおよびRin哺乳動物発現ベクターにクローニングするため) およびヒトシグナル配列を有する重複したオリゴヌクレオチドを組み立てることにより *de novo* で作製した。ヒト 1野生型定常領域を含むRidにクローニングするために、ヒトシグナル配列を含む  $V_H$  ドメインを挟むようにHind IIIおよびSpe I制限部位を導入した。ヒト 定常領域を含むRinにクローニングするために、ヒトシグナル配列を含む  $V_L$  ドメインを挟むようにHind IIIおよびBsiW I制限部位を導入した。ヒトシグナル配列: MGWSCIILFLVATATGVHS (配列番号39)

8種類のヒト化  $V_H$  構築物および2種類のヒト化  $V_L$  構築物を設計した。これらからは16種類の異なる鎖の組み合わせがあり得る。可変領域のオリゴヌクレオチド組立ては時間を要することから、 $V_H$  ドメインについては最も少なくおよび最も多く逆変異を行った構築物 (A1、A4、B1およびB4)のみを最初に調製し、2種類のヒト化  $V_L$  構築物と組み合わせてヒト化抗体を製造することにした。

### 【0202】

最小限18塩基の重複を有する60塩基長のオリゴヌクレオチド10種類を組立て用に設計した。

### 【0203】

#### 5.2.1 オリゴヌクレオチド組立て

オリゴヌクレオチドをプールした溶液は、100  $\mu$ Mの濃度の各オリゴヌクレオチドのストック溶液 5  $\mu$ lから調製した。重複するオリゴヌクレオチドを組立てることによるヒト化  $V_H$  および  $V_L$  遺伝子の合成は、概ねStemmer WPら (1995) Gene 164(1):49-53に従い、Ertl PFら (2003) Methods 31:199-206に記載のソフトウェアを使用して行った。

### 【0204】

#### 5.2.1.1 アセンブリPCR反応:

水	41.5 $\mu$ l
10x ProofStart PCRバッファー	5 $\mu$ l
dNTP (10mM)	1.5 $\mu$ l
オリゴヌクレオチドプール	1 $\mu$ l
ProofStart DNAポリメラーゼ	1 $\mu$ l
総容量	50 $\mu$ l

#### アセンブリPCRサイクル:

- 1 - 94 で2分間
- 2 - 94 で30秒間
- 3 - 40 で2分間
- 4 - 72 で10秒間
- 5 - 94 で15秒間
- 6 - 40 で30秒間
- 7 - 72 で20秒間 + 3秒/サイクル

ステップ4~7は25回繰り返した。

### 【0205】

#### 5.2.1.2 回収PCR

プライマー1および2は、アセンブリPCRに用いた最も上流側および下流側のオリゴヌクレオチドである。回収PCRは完全なV遺伝子の増幅を可能にする。

#### 回収PCR反応:

水	42 $\mu$ l
10xProofStart PCR バッファー	4 $\mu$ l
dNTP (10mM)	1.5 $\mu$ l
プライマー1 (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
プライマー2 (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
アセンブリPCR反応	1 $\mu$ l

10

20

30

40

50

ProofStart DNAポリメラーゼ 0.5  $\mu$ l  
 総容量 50  $\mu$ l

	プライマー 1	プライマー 2
15E10-A1/A4	15E10-A4-U1	15E10-A4-L1
15E10-B1	15E10-B1-U1	15E10-B1-L1
15E10-B4	15E10-B1-U1	15E10-B4-L1
15E10-L1/L2	15E10-L1-U1	15E10-L1-L1

回収PCRサイクル： 1 - 94 で2分間  
 2 - 94 で45秒間  
 3 - 60 で30秒間  
 4 - 72 で2分間  
 5 - 72 で4分間

10

ステップ2～4を25回繰り返した。

回収PCR産物はQiagen社のMinElute PCR精製キットをメーカーの使用説明書に従って使用することにより精製した。

【0206】

#### 5.2.2 制限酵素切断

ヒト化15E10  $V_H$  構築物のA1、A4、B1およびB4をHind III - Spe Iで切断し、2種類のヒト化15E10  $V_L$  をHind III - BsiW Iで切断したが、これは上記4.2.1に記載したように行った。

20

【0207】

#### 5.2.3 ゲル精製

制限酵素切断の産物を、上記4.2.2に記載したように精製した。

【0208】

#### 5.2.4 連結

Hind III - Spe I切断した15E10ヒト化  $V_H$  断片をHind III - Spe I切断したRId hC 1wtベクター内に連結した。

Hind III - BsiW I切断した15E10ヒト化  $V_L$  断片をHind III - BsiW I切断したRIn hCベクター内に連結した。

30

連結反応は、Promega社のLigaFast Rapid DNA連結システムをメーカーの使用説明書に従って使用して行った。

【0209】

#### 5.2.5 形質転換

上記4.2.5と同様に行った。

【0210】

#### 5.2.6 配列決定

各反応プレートからのコロニーを、100  $\mu$ g/mlアンピシリンを添加した5 mlのLB培地で37にて一晩培養した。

40

プラスミドを、Qiagen社のQIAprep Spin Miniprepキットをメーカーの使用説明書に従って使用することにより抽出して精製し、上記4.2.5に記載のプライマーを用いて配列決定した。

正しいヒト化  $V_H$  および  $V_L$  配列を有するクローンを同定し、CHO細胞での発現のためにプラスミドを調製した。

【0211】

### 6. CHO細胞におけるヒト化抗体の発現

4種類のヒト化  $V_H$  構築物(A1、A4、B1およびB4)ならびに2種類のヒト化  $V_L$  構築物(L1およびL2)をRId hC 1wtおよびRIn hC 哺乳動物発現ベクター内に調製した。8種類のプラスミドの重鎖 - 軽鎖組み合わせ(A1L1、A1L2、A4L2、B1L2、B4L1およびB4L2)をCHO細

50

胞内に一過性に同時トランスフェクトし、小スケールで発現させて8種類の異なるヒト化抗体を得た。産生された上清中の抗体をgp130阻害ELISAで解析した(下記参照)。

#### 【0212】

##### 6.1 プラスミド精製

セクション6のプラスミドのいずれか1種を含むDH5細胞を、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加した5mlのLB培地で、振とうインキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cにて8時間培養した。100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加した200mlのLB培地に、1mlの日中培養物(day culture)を播種し、振とうインキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。

プラスミドは、Qiagen社のQIAfilter Plasmid Maxiキットをメーカーの使用説明書に従って使用して抽出し、精製した。得られたエタノールペレットを200 $\mu$ lのTEバッファーに再懸濁し、プラスミド濃度は、ストック溶液を100倍に希釈した後、260nmでの吸光度により測定した。

#### 【0213】

##### 6.2 トランスフェクション

10<sup>6</sup>個のCHO細胞をCorning Costar 3506 6ウェルプレートの9ウェルに播種し、超低ウシ胎仔血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したGlutamax-1含有ダルベッコMEM (DMEM)培地で37 $^{\circ}$ Cにて一晩培養した。

各ウェルについて、以下の試薬を5mlのBijou内にボルテックス混合しながら添加した：

Glutamax-1含有Optimem	1	1 ml
ヒト化V <sub>H</sub> を担うプラスミド	5 $\mu$ g	
ヒト化V <sub>L</sub> を担うプラスミド	5 $\mu$ g	
TransFastトランスフェクション試薬	30 $\mu$ g	

各トランスフェクション反応は異なる組み合わせの軽鎖および重鎖を含むようにした。インキュベーションは室温で10~15分間行った。

#### 【0214】

DMEM培地をウェルから除去してから、混合物をボルテックスし、適当なウェルに加えた。インキュベーションを37 $^{\circ}$ Cで1時間行った。

各ウェルに2mlのOptimemを添加し、37 $^{\circ}$ Cで48~72時間インキュベートした。

#### 【0215】

##### 6.3 ヒト化抗体の解析

各ウェルから培地を回収し、Eppendorf 5415R卓上型遠心分離機を用いて13000rpmで1分間遠心分離し、上清を0.2 $\mu$ mのPall Acrodisc 25mm型シリンジ・フィルターに通した。8種類のヒト化抗体(4種類はグループAのヒトフレームワークに基づき、4種類はグループBのヒトフレームワークに基づく)および15E10キメラ抗体を、gp130阻害ELISAにて解析し、hOSMおよびcOSMを中和する能力について調べた(図4参照)。

#### 【0216】

表2：gp130阻害ELISAにおけるヒト化抗体B1L1、B1L2、B4L1およびB4L2のIC50値

	ヒト OSM	カニクイザル OSM
B1L1	NA	NA
B1L2	0.334	0.110
B4L1	NA	0.167
B4L2	0.048	0.040
15E10 キメラ抗体	0.070	0.060

IC50値を $\mu$ g/mlで示す

NA：阻害は50%未満であった

10

20

30

40

50

## 【0217】

発現されたヒト化抗体に含まれる逆変異のレベルは、gp130阻害ELISAにおいて、ヒトおよびカニクイザルOSMに対して直接的な影響を及ぼした。逆変異の最も少ない抗体(B1L1)はカニクイザルOSMに対して検出可能な親和性を示さず、ヒトOSMに対してもバックグラウンドよりわずかに高い親和性しか示さなかった。一方、逆変異の最も多い抗体(B4L2)がヒトおよびカニクイザルOSMに対して示した親和性は、キメラ15E10抗体のそれと少なくとも同程度であった。逆変異された軽鎖を含む2種類のヒト化抗体は、直接グラフトされた軽鎖を含む2種類のヒト化抗体よりも強い親和性を示した。

## 【0218】

ヒトグループAフレームワークに基づく4種類のヒト化抗体はいずれもgp130阻害ELISAにおいて阻害シグナルを示さなかった。事実、これらの抗体はいずれも完全ヒトIgG1抗体についてのELISAで検出することができなかった(このELISAでは、ヒト重鎖に対するヤギのポリクローナル抗体を捕捉抗体とし、ヒト軽鎖に対するヤギのポリクローナル抗体を検出抗体とした)。

## 【0219】

これら4種類の抗体を含む上清を、ヒトIgG重鎖特異的および軽鎖特異的ELISAでさらに解析したところ、両アッセイとも陽性のシグナルを示した。いずれのELISAでも捕捉抗体はヒトIgG重鎖および軽鎖に対するヤギ抗体を使用し、一方検出抗体は重鎖特異的ELISAではヒトIgG鎖に対する抗体を使用し、軽鎖特異的ELISAではヒトIgG鎖に対する抗体を使用した。

## 【0220】

これらの結果から、重鎖がグループAヒトフレームワークから設計されたヒト化抗体は、重鎖と軽鎖を発現するものの、2つの鎖は効果的に機能する抗体をもたらすように組み合わせられないことが示唆される。

## 【0221】

ヒトグループBフレームワーク(B4)に基づく最も多く逆変異させた $V_H$ 構築物と、逆変異させた軽鎖(L2)との組み合わせが、最も強力なヒト化抗体であることが明らかにされた。グループB由来の $V_H$ を含む3種類のヒト化抗体(B2L2、B3L2およびB4L2)を作製し、精製し、解析して、候補選択に最も適したヒト化抗体を決定した。

## 【0222】

#### 6.4 上記6.3のヒト化 $V_H$ 構築物の調製

2種類のヒト化構築物B2およびB3を上記5.2.1~5.2.6に記載したように調製した。

## 【0223】

#### 6.5 CHO細胞におけるヒト化抗体の発現

3種類のヒト化 $V_H$ を含有するプラスミド(B2、B3およびB4)を、最も多く逆変異させたヒト化 $V_L$ を含有するプラスミド(L2)(セクション6より)と組み合わせて、CHO細胞に一過性に同時トランスフェクトし、発現させた。産生された3種類のヒト化抗体を、rProtein Aセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製し、それらのOSMに対する親和性を、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイにより15E10キメラ抗体を対照として使用し、評価した。

## 【0224】

プラスミド精製は上記4.3.1のように行った。トランスフェクションは上記4.3.2のように行った。ヒト化抗体の精製は上記4.3.3に記載したように行った。

## 【0225】

#### 6.6 セクション6.5のヒト化抗体の解析

セクション6.5の精製されたヒト化抗体を、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイ(下記参照)を用いて、それらがヒトおよびカニクイザルOSMを中和する能力を解析した。アッセイは種々の供給源からのヒトOSM、特にCHOにより産生されたOSM、CHOにより産生されたOSM+25%のヒトAB血清、好中球OSMおよびRA患者の滑液OSMについて行った。

## 【0226】

10

20

30

40

50

gp130阻害ELISA：実験データは図5～図10に示す。

【0227】

KB細胞アッセイ：実験データは図11～図16に示す。

【0228】

これらの結果は、ヒト化抗体(B3L2およびB4L2)が15E10キメラ抗体と同程度の効力を有し、ヒト化抗体B2L2よりも高い効力を有することを示している。このことは、ヒト化戦略、特に逆変異の選択が、結果的に抗原に対する親和性の完全な回復をもたらしたことを示している。

【0229】

B4のV<sub>H</sub>鎖のアミノ酸配列は、

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYL  
QMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFVDVWGRGTLVTVSS

(配列番号21)であり、V<sub>L</sub>鎖のそれは配列番号12である。

【0230】

配列番号21のV<sub>H</sub>鎖および配列番号12のV<sub>L</sub>鎖を含む治療用抗体またはその抗原結合フラグメントは、本発明の競合抗体と見なすことができ、従って本発明の一実施形態を成す。

【0231】

#### 6.7 B3L2ヒト化抗体とキメラ抗体および親マウス抗体との比較

ヒト化抗体B3L2を15E10キメラ抗体および親マウス抗体と比較したが、これはヒトおよびカニクイザルOSMを標的抗原として使用するgp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイ(下記参照)により行った。

【0232】

定常重鎖に2つの点突然変異(235位のLeuと237位のGlyがAlaで置換される)を有するヒト化B3L2抗体を設計し、CHO細胞で発現させ、精製した。これらの突然変異は抗体がエフェクター機能に関わる能力、特に補体因子を動員する能力を低下させる。インタクトな重鎖を有する候補ヒト化抗体B3L2をB3L2 wt(野生型)と言い、一方、突然変異させたB3L2抗体を図17～図19ではB3L2変異体と呼ぶ。

【0233】

表4：gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイにおいて親マウス抗体およびキメラ抗体と比較したヒト化B3L2野生型抗体のIC50値

	gp130 ELISA	KB細胞アッセイ
マウス15E10抗体	0.009	0.053
キメラ15E10抗体	0.019	0.079
B3L2 wt抗体	0.035	0.123

IC50値はμg/mlで示した。

【0234】

これらの結果から、ヒト化B3L2抗体が親マウス抗体15E10と同程度の効力を有することが確認された。

ヒト化B3L2重鎖のアミノ酸配列を配列番号11に示し、ヒト化B3L2軽鎖のそれを配列番号12に示す。

【0235】

#### 実施例7 抗体10D3

##### 7.1 モノクローナル抗体の作製

ハイブリドーマ10D3は上記実施例1に詳述したように作製した。

【0236】

10

20

30

40

50

## 7.2 クローン10D3の可変領域のクローニング

クローン10D3ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出し、重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAを逆転写により生成させたが、これにはマウス・リーダー配列およびあらかじめ決定されたアイソタイプ(IgG1/ )の抗体定常領域に特異的なプライマーを使用した。重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAをその後、配列決定するためにpCR2.1ベクターにクローニングした。

【0237】

### 7.2.1 RNA抽出

全RNAは、ハイブリドーマ・クローン10D3の $10^6$ 個の細胞のペレットから、Promega社のSV Total RNA Isolation Systemを用いてメーカーの使用説明書に従い抽出した。

【0238】

### 7.2.2 逆転写

RNAを逆転写して、重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAを生成させたが、これにはマウス・リーダー配列およびマウスIgG 2a/ 定常領域に特異的なプライマーを使用した。使用したプライマーの混合物はJones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991)に記載されている。

【0239】

マウス $V_H$  および $V_L$  リーダー配列フォワードプライマーは $50 \mu M$ に調製した。マウス2aおよび 定常領域リバースプライマーの溶液も $50 \mu M$ に調製した。

【0240】

### 7.2.3 逆転写PCR(RT-PCR)

重鎖および軽鎖可変領域をコードするRNAの逆転写は、Promega社のAccess RT-PCR Systemを用いてメーカーの使用説明書に従い2回反復して行った。 $V_H$  および $V_L$  フォワードおよびリバース・プライマーは上記のものを用いた。

【0241】

## 7.3 上記7.2.3のPCR産物のクローニング

### 7.3.1 ゲル精製

RT-PCR ( $2 \times V_H$  および  $2 \times V_L$ )の産物をゲルローディング溶液で0.01%臭化エチジウムを含有する分離用1%アガロースゲルにロードし、100Vで1時間、TAEバッファーで泳動させ、V領域のバンドを切り出した。 $V_H$  および $V_L$  バンドを同定できるように、100bp DNAラダーもゲルに流した。

【0242】

DNA断片は、Qiagen社のQIAquick<sup>TM</sup> Gel抽出キットをメーカーの使用説明書に従って使用してゲルから抽出し、精製した。

【0243】

### 7.3.2 連結

精製したRT-PCR断片( $2 \times V_H$  および  $2 \times V_L$ )は、Invitrogen社のTAクローニングキットを用いてメーカーの使用説明書に従いpCR2.1ベクターにクローニングした。

【0244】

### 7.3.3 形質転換

連結したプラスミドをTAクローニングキットの説明書に従い、TOP10F'細胞に形質転換した。 $50 \mu l$ および $200 \mu l$ の形質転換細胞を、 $100 \mu g/ml$ のアンピシリンを含有するL-アガープレート上に広げ、500mMのIPTG溶液  $8 \mu l$ およびDMF中の50mg/ml X-Gal溶液 $16 \mu l$ でコーティングした。プレートを37 で一晩インキュベートした。

【0245】

### 7.3.4 配列決定

5個の白いコロニーを、 $100 \mu g/ml$ のアンピシリンを添加した5mlのLB培地で37 にて一晩培養した。

10D3の $V_H$  および $V_L$  ドメインを含有するpCR2.1プラスミドは、Qiagen QIAprep Spin Miniprepキットをメーカーの使用説明書に従って使用することにより抽出し精製した。

10

20

30

40

50

V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインは T7、M13 フォワード および M13 リバース・プライマー を用いて配列決定した。

10D3 V<sub>H</sub> ドメイン アミノ酸配列 (2 つの RT-PCR 反応から得られた 10 個のクローンで一致)  
: 配列番号 46

10D3 V<sub>L</sub> ドメイン アミノ酸配列 (2 つの RT-PCR 反応から得られた 10 個のクローンで一致)  
: 配列番号 47

【 0 2 4 6 】

#### 7.4 キメラ抗体

上記 7.3.4 の親マウス V 領域を ヒト IgG1/k 野生型 C 領域にグラフトしたものからなるキメラ抗体を、正しいマウス V 領域のクローニングを確認するため、およびヒト化構築物を試験するときに対照として使用するために設計した。キメラ抗体は CHO 細胞で発現させ、精製し、gp130 阻害 ELISA および KB 細胞アッセイにおいて OSM サイト II に対する親和性について試験した。クローニングしたマウス V 領域は PCR で増幅することにより、哺乳動物発現ベクター R1d および R1n にクローニングするのに必要な制限酵素部位を導入した。Hind III および Spe I 部位は、V<sub>H</sub> ドメインを挟み、ヒト 1 野生型 C 領域を含む改変 R1d ベクターへのクローニングを可能にするために設計された。Hind III および BsiW I 部位は、V<sub>L</sub> ドメインを挟み、ヒト C 領域を含む改変 R1n ベクターへのクローニングを可能にするために設計された。

【 0 2 4 7 】

##### 7.4.1 PCR 増幅

V<sub>H</sub> フォワードプライマー :

Hind III 制限部位を下線で示し、Kozak 配列を太字で示す。

V<sub>H</sub> フォワード : 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGG ATG GAG CTG GGT CTT T-3'

(配列番号 58)

V<sub>H</sub> リバース : 5'-GAT GGA CTA GTG TGC CTT GGC CCC AAT A-3' (配列番号 65)

Spe I 制限部位を下線で示す。

【 0 2 4 8 】

V<sub>L</sub> フォワードプライマー :

V<sub>L</sub> フォワード : 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT ACA GGT GCA GAT T-3'

(配列番号 59)

Hind III 制限部位を下線で示し、Kozak 配列を太字で示す。

V<sub>L</sub> リバース : 5'-GAT GCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TCC C-3' (配列番号 60)

BsiW I 制限部位を下線で示す。

【 0 2 4 9 】

PCR 反応 :

水	66 μl
10 × PCR バッファー	10 μl
dNTP (2 mM)	10 μl
プライマー 1 (5 μM)	4 μl
プライマー 2 (5 μM)	4 μl
Ampli Taq ポリメラーゼ	2 μl
精製 プラスミド	4 μl
総容量	100 μl

プライマー 1 : V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> フォワードプライマー

プライマー 2 :  $V_H$  または  $V_L$  リバースプライマー

精製プラスミド : Qiagen Minipreps (200×希釈)で精製した pCR2.1  $V_H$  または  $V_L$  プラスミド

PCRサイクル :

1 - 95 で 4 分間

2 - 95 で 1 分間

3 - 55 で 1 分間

4 - 72 で 1 分間

5 - 72 で 7 分間

ステップ 2 ~ 4 を 30 回繰り返した。

10

【 0 2 5 0 】

#### 7.4.2 哺乳動物発現ベクターへのクローニング

PCR産物は、Qiagen社のMinElute PCR精製キットを用いてメーカーの使用説明書に従い精製した。

【 0 2 5 1 】

##### 7.4.2.1 制限酵素切断

$V_H$  PCR産物およびRId hC 1wt哺乳動物発現ベクターをHind III-Spe Iで切断した :

10×バッファー (NEBuffer2) 5  $\mu$  l

BSA 100× (NEB) 0.5  $\mu$  l

DNA 5  $\mu$  l

Hind III (Promega) 2  $\mu$  l

Spe I (NEB) 2  $\mu$  l

水 35.5  $\mu$  l

総容量 50  $\mu$  l

20

DNA : 精製  $V_H$  PCR産物またはRId hC 1wtベクター (0.25mg/mlにて)

37 で 2 時間インキュベートした。

【 0 2 5 2 】

$V_L$  PCR産物およびRIn hC 哺乳動物発現ベクターをHind III-BsiW Iで切断した :

10×バッファー (NEBuffer2) 5  $\mu$  l

DNA 5  $\mu$  l

Hind III (Promega) 2  $\mu$  l

水 38  $\mu$  l

総容量 50  $\mu$  l

30

DNA : 精製  $V_L$  PCR産物またはRIn hC ベクター (0.25mg/mlにて)

37 で 2 時間インキュベートした。

BsiW I (NEB) を 2  $\mu$  l 添加し、55 で 2 時間インキュベートした。

【 0 2 5 3 】

##### 7.4.2.2 ゲル精製

制限酵素切断の産物をゲルローディング溶液で、0.01%臭化エチジウムを含有する分離用 1%アガロースゲルにロードし、100Vで1時間、TAEバッファーで泳動させ、RIdおよびRInベクターならびに  $V_H$  および  $V_L$  PCR断片のバンドを切り出した。  $V_H$ 、 $V_L$  およびベクターのバンドを同定できるように、100bp DNAラダーもゲルに流した。DNAは、Qiagen社のQIAquick<sup>TM</sup> Gel抽出キットをメーカーの使用説明書に従って使用し、ゲルから抽出して精製した。

40

【 0 2 5 4 】

##### 7.4.2.3 連結

Hind III-Spe Iで切断した  $V_H$  PCR断片を、Hind III-Spe Iで切断したRId hC 1wtベクターに連結させた。

Hind III-BsiW Iで切断した  $V_L$  PCR断片を、Hind III-BsiW Iで切断したRIn hC ベクターに連結させた。

50

連結工程はPromega社のLigaFast Rapid DNA連結システムを使用してメーカーの使用説明書に従い、次のものを用意して行った：

V<sub>H</sub> : ベクター： Hind III-Spe I切断したRId hC 1wt  
 インサート：Hind III-Spe I切断したV<sub>H</sub> PCR断片  
 V<sub>L</sub> : ベクター： Hind III-BsiW I切断したRIn hC  
 インサート：Hind III-BsiW I切断したV<sub>L</sub> PCR断片

#### 【0255】

##### 7.4.2.4 形質転換

連結産物をDH5 コンピテント細胞に形質転換した：

200 μlのDH5 の入ったバイアルを氷上で解凍した。

50 μlのアリコート成形質転換チューブに用意した。

2 μlの連結産物混合液を添加し、ピペットの先端で穏やかに混合し、その後氷上で30分間インキュベートした。

混合物を、振とうせずに42 °Cで45秒間インキュベートした。

その後、これを氷上に移し、2分間静置した。

450 μlのSOC培地を添加し、チューブを振とうインキュベーターで37 °Cにて1時間インキュベートした。

培養物100 μlを、100 μg/mlのアンピシリンを添加したL-アガープレート上に広げ、37 °Cで一晩インキュベートした。

#### 【0256】

##### 7.4.2.5 配列決定

V<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> クローンを、100 μg/mlのアンピシリンを添加した5 mlのLB培地で37 °Cにて一晩培養した。

V<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> ドメインを含有するそれぞれRIdおよびRInプラスミドを、Qiagen社のQIAprep Spin Miniprepキットをメーカーの使用説明書に従って使用することにより抽出し精製した。

V<sub>H</sub> 領域は、RIdベクターおよびシグナル配列に基づくフォワードプライマーと、ヒトC<sub>H</sub>1領域に基づくリバースプライマーを用いて配列決定した。

V<sub>L</sub> 領域は、RInベクターおよびシグナル配列に基づくフォワードプライマーと、ヒトC<sub>L</sub>領域に基づくリバースプライマーを用いて配列決定した。

正しいV<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> 配列を有するクローンを同定し、CHO細胞での発現のためにプラスミドを調製した。

#### 【0257】

##### 7.4.3 CHO細胞におけるキメラ抗体発現

10D3 V<sub>H</sub> およびV<sub>L</sub> ドメインを含有するそれぞれRIdおよびRInプラスミドを用いて、CHO細胞を一過性に同時トランスフェクトして発現させた。産生されたキメラ抗体を、rProtein A セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製し、OSMに対する親和性を、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイを用いて評価した(下記参照)。

#### 【0258】

##### 7.4.3.1 プラスミド精製

RId-10D3 V<sub>H</sub> およびRIn-10D3 V<sub>L</sub> プラスミドを含むDH5 細胞を100 μg/mlのアンピシリンを添加した5 mlのLB培地で、振とうインキュベーター内で37 °Cにて8時間培養した。

100 μg/mlのアンピシリンを添加した200mlのLB培地に、1 mlの日中培養物を播種し、振とうインキュベーター内で37 °Cにて一晩インキュベートした。

プラスミドは、Qiagen社のQIAfilter Plasmid Maxiキットをメーカーの使用説明書に従って使用して抽出し、精製した。得られたエタノールペレットを200 μlのTEバッファーに再懸濁し、プラスミド濃度は、ストック溶液を100倍に希釈した後、260nmでの吸光度により測定した。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 5 9 】

## 7.4.3.2 トランスフェクション

CHO細胞を、4 × 175cm<sup>2</sup> BD Falcon組織培養フラスコに入れた、超低ウシ胎仔血清および1%ペニシリン - ストレプトマイシンを添加したGlutamax-1含有ダルベッコMEM (DMEM)培地を37 °Cにてコンフルエントになるまで培養した。

## 【 0 2 6 0 】

各フラスコについて、50ml Falconチューブに以下の試薬を添加してボルテックス混合した：

Glutamax-1含有Optimem 1	8 ml	
R1d-10D3 V <sub>H</sub> 精製プラスミド	20 μg	10
R1n-10D3 V <sub>L</sub> 精製プラスミド	20 μg	
TransFastトランスフェクション試薬	240 μl	

この混合物をRTで10～15分間インキュベートした。

DMEM培地をフラスコから除いてから、混合物をボルテックスし、フラスコに加えた。

この混合物を37 °Cで1時間インキュベートした。

32mlのOptimemをこのフラスコに添加し、37 °Cで48～72時間インキュベートした。

## 【 0 2 6 1 】

## 7.4.3.3 キメラ抗体の精製

全ての175cm<sup>2</sup>フラスコからの培地をプールして、MSE Mistral 2000で1500rpm、3分間遠心分離し、上清を500mL フィルターシステム 0.22 μm CAに通した。

抗体は清澄化した上清からAmersham Biosciences社製のAkta ExplorerでUnicornソフトウェアを使用して精製した。

使用したカラムは1mlのHiTrap rProtein AセファロースFFであった。

流速は1 ml/minとした。

カラムを10CVのダルベッコPBSで平衡化してから、ポンプAから清澄化上清をロードした。

カラムを20CVのダルベッコPBSで洗浄し、ポンプAを洗浄して洗浄液をそのまま流し、さらに10CVのダルベッコPBSをカラムに通すことで上清の完全なクリアランスを確かなものとした。

## 【 0 2 6 2 】

抗体を10CVのImmunoPure IgG溶出バッファー (Pierce)で溶出させ、100 μlの1 M Trizma-HCl pH8.0中和バッファーを含む1 ml画分として回収した。

カラムを5CVのダルベッコPBSで再度平衡化した。

溶出画分中の抗体は、10倍容量のImmunoPure IgG溶出バッファー + 1倍容量の1 M Trizma-HCl pH8.0を含むブランク溶液に対して280nmでの吸光度を測定することにより定量し、十分な量の純粋な抗体を含む画分をプールし、100 μlのアリコートとして - 20 °Cで貯蔵した。

## 【 0 2 6 3 】

## 7.4.4 キメラ抗体の解析

10D3キメラ抗体を、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイ(下記参照)で解析して、これらのキメラ抗体がヒトおよびカニクイザルOSMを中和する能力を調べた。gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイのプロトコルは以下に示す。

## 【 0 2 6 4 】

10D3キメラ抗体は、gp130阻害ELISAおよびKB細胞アッセイにおいてOSMを中和した。この結果から、正しい可変領域が確かにクローニングされており、ヒトおよびカニクイザルOSMのサイトIIに結合可能な抗原結合性キメラ抗体をもたらしたことが確認された。こうして10D3可変重鎖および軽鎖ドメインは今やヒト化することができる。

## 【 0 2 6 5 】

マウス可変領域をクローニングし、配列決定し、その後ヒト 1/k定常領域にグラフトしてキメラ抗体を作製した。gp130阻害ELISA及びKB細胞アッセイにおいて、キメラ10D3抗

10

20

30

40

50

体がヒトおよびカニクイザルOSMに対して示した効力は、親マウス抗体のそれと同程度であった(下記参照)。

【0266】

マウス抗体を「ベストフィット」戦略を用いてヒト化した。可変重鎖ドメインについては、65%同一の配列を選択して、マウスCDRをヒトフレームワークにグラフトした。いくつかの構築物は、親和性を回復させるために、フレームワークに種々の逆変異を有するように設計した。これらの構築物は次の通りである：

構築物	逆変異
A	T28I
B	T28I、R71V、T73K
C	T28I、V67A、M69L、R71V、T73K
D	T28I、M48I、G44K、V67A、M69L、R71V、T73K

10

【0267】

可変軽鎖ドメインについては、60%同一の配列を選択して、マウスCDRをヒトフレームワークにグラフトした。いくつかの構築物は、親和性を回復させるためにフレームワークに種々の逆変異を有するように設計した。これらの構築物は次の通りである：

構築物	逆変異
LA	無し(直接グラフトした)
LB	L46R、L47W
LC	Y36F、Q38K
LD	Y36F、Q38K、L46R、L47W
LE	Y36F、Q38K、L46R、L47W、F71Y

20

【0268】

最も少なくおよび最も多く逆変異させた構築物(A、D、LA、LE)のみを、重複するオリゴヌクレオチドを組立てることにより合成した。4種類のヒト化抗体の組み合わせ(ALA、ALE、DLA、DLE)をCHO細胞内で小スケールにて発現させ、上清をgp130 ELISAで抗体親和性について解析した。

【0269】

ヒト化抗体のうち、ALEおよびDLEのみがgp130 ELISAで阻害を示したが、ALEによる阻害は上清中の抗体濃度が低かったため不十分であり、そのためDLEを選択した。

30

【0270】

ヒト化抗体DLEの製造は、CHO細胞でスケールアップし、抗体を精製してgp130 ELISAおよびKB細胞アッセイにおいて10D3キメラ抗体を対照として解析した。

【0271】

IC50値(gp130 ELISA) (μg/ml)：

	hOSM	cOSM
キメラ抗体	0.032	0.246
DLE	0.021	0.059

ヒト化抗体10D3 DLEは、gp130 ELISAで解析したところ、ヒトOSMおよびカニクイザルOSMに対して、キメラ抗体よりも強力でないにしても、少なくとも同程度に強力であった。

40

【0272】

ヒト化10D3 DLEおよび10D3キメラ抗体をKB細胞アッセイにて解析した。10D3 DLEはヒトOSMに対して0.205 μg/mlのIC50値を示し、また、カニクイザルOSMに対して0.07 μg/mlのIC50値を示した。

【0273】

結論として、抗ヒトOSMサイトII抗体10D3は確かにヒト化されており、親マウス抗体のそれと同程度の効力を示した。

【0274】

材料

SV 全RNA分離システム： Promega Z3100

50

Access RT-PCRシステム : Promega A1250	
QIAquickゲル抽出キット : Qiagen 28704	
ゲルローディング溶液 : Sigma G7654	
アガロース : Invitrogen 15510-019	
臭化エチジウム : Sigma E1510	
TAEバッファー : 実験室内で調製	
100bp DNAラダー : New England Biolabs N3231S	
TAクローニングキット : Invitrogen 45-0046	
TOP10F'細胞 : Invitrogen 44-0300	
L-アガー + 100 µg/mlアンピシリン : 実験室内で調製	10
X-Gal、DMF中で50mg/ml : Promega V394A	
AmpliTaq DNA ポリメラーゼ : Applied Biosystems	
10× PCR バッファー : Applied Biosystems	
電気泳動ゲル1.2%アガロース : Invitrogen G501801	
LB培地 + 100 µg/mlアンピシリン : 実験室内で調製	
QIAprep Spin Miniprepキット : Qiagen 27106	
MinElute PCR精製キット : Qiagen 28004	
NEBuffer2 10× conc : New England Biolabs B7002S	
精製BSA 100× conc : New England Biolabs B9001S	
BsiW I : New England Biolabs R0553L	20
Hind III : Promega R604A	
Spe I : New England Biolabs R0133S	
LigaFast Rapid DNA連結システム : Promega M8225	
最高形質転換効率DH5 化学的コンピテント細胞 : Invitrogen 18258-012	
SOC培地 : 実験室内で調製	
QIAfilter Plasmid Maxi kit : Qiagen 12263	
Glutamax-1含有ダルベッコMEM : Invitrogen 31966-021	
Glutamax-1含有Optimem 1 : Invitrogen 51985-026	
TransFastトランスフェクション試薬 : Promega E2431	
1 ml HiTrap rProtein A セファロースFF : Amersham Biosciences 17-5079-01	30
ダルベッコPBS : Sigma D8537	
ImmunoPure IgG溶出バッファー : Pierce 21009	
1 M Trizma-HCl pH8.0 : Sigma T2694	
ProofStart DNAポリメラーゼ : Qiagen 1016816	
ProofStart PCRバッファー : Qiagen 1016961	

### 【 0 2 7 5 】

#### 実施例 8 gp130阻害ELISA

OSMは連続的に、gp130と、そしてOSM受容体またはLIF受容体と結合する。本明細書に記載するアッセイ法は、gp130に結合したOSM(例えばhOSM)をELISAプレート上で測定することを可能にする。さらに、このアッセイ法は、OSMサイトIIに対する抗体による、gp130受容体へのOSM結合の阻害を測定することを可能にする。

### 【 0 2 7 6 】

#### 8.1 材料

- 1 . Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
- 2 . ヒトgp130-Fc 100 µg/ml (R&D Systems, 671-GP-100)
- 3 . PBS
- 4 . BSA (Sigma A7030)
- 5 . ヒト組換えOSM抗体 10 µg/ml (R&D Systems, 非グリコシル化)
- 6 . ビオチン化抗ヒトOSM抗体 50 µg/ml (R&D Systems, BAF295)
- 7 . ストレプトアビジンHRP (Amersham RPN4401)

8. 3,3',5,5'-テトラメチレンベンジジン (TMB) (Sigma)
9. 硫酸
10. Tween 20 (Sigma P7949)

【0277】

### 8.2 試薬の調製

1. プレートの調製：ヒトgp130-FcをPBS中で1 µg/mlに希釈する。各ウェルに50 µlを加え、カバーをして4 で一晩インキュベートする。
2. 洗浄バッファー：1LのPBSに500 µl Tween 20を添加する(0.05%)。
3. ブロッキングバッファー：500mlのPBSに5gのBSAを添加する(1%)。

【0278】

### 8.3 方法

1. プレートを標準プレート洗浄プロトコルにより洗浄し、タップして乾燥させる。
2. 各ウェルに200 µlのブロッキングバッファーを加え、室温で1時間インキュベートする。
3. ステップ1と同様に洗浄する。
4. 各ウェルに50 µlのOSM標準品、またはサンプルを加える。カバーをして室温で2時間攪拌する。(OSMを、サンプルに応じてブロッキングバッファーまたは組織培養培地で希釈して100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563および0 ng/mlとする)
5. ステップ1と同様に洗浄する。
6. 各ウェルに50 µlのビオチン化抗ヒトOSM抗体(ブロッキングバッファーで30ng/mlに希釈したもの)を加える。カバーをして室温で1時間攪拌する。
7. ステップ1と同様に洗浄する。
8. 各ウェルに50 µlのストレプトアビジンHRP(ブロッキングバッファーで1/4000に希釈したもの)を加える。カバーをして室温で30分間攪拌する。
9. ステップ1と同様に洗浄する。
10. 各ウェルに100 µlのTMB基質を加える。カバーをして室温で30分間攪拌する。
11. 各ウェルに1 MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を50 µl加える。
12. OD 450nmを測定する。

【0279】

### 8.4 gp130 - OSM結合の抗体介在阻害を解析するためのアッセイの使用

- 1) 25 ng/mlのOSMを種々の濃度の抗OSM抗体、またはOSM抗体を含む種々の抗血清の希釈液と混合する。室温で1時間インキュベートする。
- 2) 50 µl/ウェルの抗体 - OSM混合物を、gp130を結合させた96ウェルプレート(上記のように調製したもの)に加える。
- 3) 上述のようにアッセイを行う。

【0280】

### 9. KBアッセイ

#### はじめに

KB細胞(ヒト上皮細胞系)は、gp130のmRNAを発現し、またLIFおよびOSM受容体も発現する(Mosley, J. Biol Chem., 271 (50) 32635-32643)。OSMおよびLIFはいずれもKB細胞からのIL-6放出を誘導する。この細胞系を、OSMとgp130の相互作用をモジュレートするモノクローナル抗体を同定するために使用した。

【0281】

#### 9.1 方法

KB細胞をECACCから入手し(受託番号94050408)、グルタミンを添加したDMEM + 10% 熱不活性化FCS(「KB培地」)中で維持した。細胞を単層として増殖させ、毎週2回分割した。Sigma社製の非酵素性の細胞解離媒体またはVerseneを使用して細胞を剥がした。

【0282】

1.  $2 \times 10^4$  細胞/100 µl/ウェル/96ウェルプレートを添加し、一晩インキュベートした(37 °C、5% CO<sub>2</sub>)。

10

20

30

40

50

2. 培地中でOSM標準品を調製する。
3. 1 ng/ml OSM + 抗体 / 血清希釈液を調製する。室温で1時間インキュベートする。
4. KB細胞プレートから慎重に培地を除き、OSM標準品およびOSM抗体の混合物を加える。
5. 37 で16~18時間インキュベートする。
6. 培地を除き、IL-6についてアッセイする。

【0283】

注記：

- ・培地は、解析に供するまで凍結しておく。
- ・培地は、アッセイのために約20倍に希釈すべきである。
- ・ハイブリドーマをスクリーニングするに当たり、クローニング培地とKB培地の比率は一定に保つべきであり、OSM標準品はこの混合物中で調製すべきである。
- ・約100 ng/mlのOSMでKB細胞を刺激すると、最大のIL-6分泌がもたらされるが、抗体中和活性を測定するには1 ng/mlで十分である。

10

【0284】

#### 10. 競合アッセイ

このアッセイでは、配列番号11の重鎖および配列番号12の軽鎖を有するヒト化抗体(この実施例では15E10-B3L2と表す)と可溶性グリコシル化hOSMとの結合が、hOSMのサイトIIに特異的に結合する非ヒト抗体候補により阻害されることを測定することができる。この実施例のアッセイの略図を図20に示す。

20

【0285】

プレートを、抗サイトIIIモノクローナル抗体(本明細書ではOM4-11.31と言う)でコーティングする。

標準曲線については、15E10-B3L2精製標準品を1 μg/mlから連続的に希釈し、50ng/mlの可溶性グリコシル化ヒトOSMとインキュベートする。抗体はサイトIIを介してOSMに結合し、その後複合体は、サイトIIIに対する一次抗体によりプレート上に捕捉される。

【0286】

競合アッセイでは、候補抗体を1 μg/mlから連続的に希釈し、50ng/mlの可溶性グリコシル化ヒトOSM、および150ng/mlの15E10-B3L2とインキュベートする。

複合体を形成した15E10-B3L2の存在を、抗ヒト鎖二次抗体により検出する。

30

【0287】

#### 方法

##### 1 / コーティング

Nunc Maxisorpイムノプレートに、ウェル当たり50 μlの抗ヒトOSMサイトIII抗体 (OM4-11.31、実験室で調製したもの)(PBS中4 μg/ml)をコーティングした。プレートを4 で一晩インキュベートした。

【0288】

##### 2 / ブロッキング

プレートをPBS + 0.05% Tween (PBST)で3回洗浄した。PBS中の1% BSA (Sigma A7030) 100 μlを各ウェルに添加した。プレートを振とうしながら室温で2時間インキュベートした。

40

【0289】

##### 3 / プレインキュベーション

15E10 B3L2標準品：

50ng/mlのヒトOSMを含むブロックバッファー中に1 μg/mlで溶解させた15E10-B3L2抗体の溶液を調製し、これを未吸着96ウェルプレートのA列の2つのウェルに67 μl加えた。この抗体を、50ng/mlのヒトOSMを含むブロックバッファー50 μlで、B列からG列まで1 : 3に連続希釈した。

【0290】

競合抗体：

50

150ng/mlの15E10-B3L2+50ng/mlのh0SMを含むブロックバッファー中に1 µg/mlで溶解させた競合抗体の溶液を調製し、これを未吸着96ウェルプレートのA列の2つのウェルに100 µl加えた。この抗体を、150ng/mlの15E10-B3L2+50ng/mlのヒト0SMを含むブロックバッファー50 µlで、B列からG列まで1:1に連続希釈した。2つのウェルを、競合抗体を含まない希釈剤と共にインキュベートした。

このプレインキュベーションプレートを、室温で1時間、静置状態でインキュベートした。

#### 【0291】

##### 4 / インキュベーション

コーティングしたプレートをPBSTで3回洗浄した。

45 µlずつの各標準品およびサンプルを、プレインキュベーションプレートから、コーティングしたプレート上の対応するウェルに移した。ブランクのウェルにはPBSを加えた。プレートを振とうしながら室温で2時間インキュベートした。

#### 【0292】

##### 5 / 二次抗体

プレートをPBSTで3回洗浄した。

50 µlのヤギ抗ヒト鎖抗体 - ペルオキシダーゼ (Sigma A6029) をブロックバッファーで2000倍に希釈し、各ウェルに加えた。プレートを振とうしながら室温で1時間インキュベートした。

#### 【0293】

##### 6 / 基質

プレートをPBSTで3回洗浄した。

OPD基質 (Sigma P9187) を、メーカーの使用説明書に従い水で調製した。これを各ウェルに50 µl添加した。プレートを室温でインキュベートした。

#### 【0294】

##### 7 / 反応停止

十分に発色したら、各ウェルに10 µlの3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して発色反応を停止させた。ブランクウェルの吸光度を0として、プレートリーダーを使って490nmでプレートを読み取った。

#### 【0295】

15E10濃度に対する490nmでの吸光度の標準曲線をプロットした。競合抗体を含むサンプル中の複合体化15E10の濃度を、標準曲線から読み取った。阻害%は以下のように計算した：

$$100 - [(ng/mlで表したサンプル中の15E10濃度 \div 150ng/ml) \times 100]$$

競合抗体濃度に対する阻害%の曲線をプロットし、競合抗体(150ng/mlの競合抗体)と等モル量の15E10の阻害%を曲線から読み取った。

#### 【0296】

##### 実施例10.1 競合抗体としての10D3

267 µg/mlのマウス10D3クローンE9抗体(ストック)を、15E10の競合抗体として使用した。10D3は、上記の表Aに記載の軽鎖および重鎖CDRを有する。

#### 【0297】

##### 結果

10

20

30

40

10D3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	複合体化 15E10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	阻害%
1	0.019	87.3
0.5	0.029	80.7
0.25	0.044	70.7
0.125	0.062	58.7
0.062	0.092	38.7
0.031	0.132	12.0
0.016	0.146	2.7

10

等モル濃度 ( $0.15 \mu\text{g/ml}$ ) における 10D3 競合抗体による 15E10 の阻害率は 62.3% であった。図 21 を参照のこと。

【0298】

#### 実施例 11 OSM に結合しかつ OSM のサイト II または サイト III に特異的な抗体の同定

生物学的に機能するためには、OSM は gp130、および LIFR または OSMR と相互作用する必要がある。最初に起こる OSM と gp130 との相互作用は OSM サイト II を介するものであり、これに対して OSM と OSMR または LIFR との相互作用は サイト III を介して起こる。このことから、サイト II もしくは サイト III OSM 配列を標的とする抗体、または抗体の結合がこれらのサイトを塞いでしまうほどこれらのサイトに十分近接したエピトープを標的とする抗体は、OSM 活性を中和すると考えられる。

20

【0299】

OSM - gp130 結合を測定するアッセイは実施例 8 で説明した。典型的な標準曲線 ( $1 \mu\text{g/ml}$  の gp130) を図 22 に示す。

【0300】

アッセイの条件を ( $4 \mu\text{g/ml}$  に) 変更することにより、図 22b に示すように感度を大幅に改善することができた。

【0301】

上述のデータは非グリコシル化 OSM を用いて得られたものであるが、さらに、グリコシル化 OSM もまたこのアッセイで gp130 に結合する。図 22c を参照のこと。

30

【0302】

市販の中和抗 OSM 抗体 (Mab 295, R&D Systems) をこのアッセイに用いて、該抗体が OSM - gp130 相互作用をブロックするかを確認した。驚くべきことに、図 23 に示すようにこの抗体は OSM シグナルをむしろ増強した。

【0303】

Mab 295 ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) を OSM に加えたところ、それは、OSM 濃度が  $> 10 \text{ ng/ml}$  であるときに、OSM のみと比較して、ELISA からの OD 測定値をおよそ 2 倍にする。gp130 をプレートから省くと、OSM + Mab295 が生成するシグナルは、バックグランドレベルまで減少する。本発明者らは次の解釈を仮定する；Mab295 は OSM サイト II に結合しないかまたは OSM サイト II を遮断しない。OSM 濃度が低いときには、MAB295 抗体分子は 1 つの OSM としか結合せず、一方その OSM は サイト II が空いていることから自由に gp130 とも結合することができる。より高濃度では、抗体分子は 2 個の OSM 分子に結合し、そのどちらも gp130 に結合可能であり、そのことから各 gp130 分子につき 2 個の OSM 分子が結合する (一方は gp130 に直接結合し、他方は抗体が二価であるという性質の結果束縛される) 可能性がある。どのような非サイト II OSM 抗体もこうした作用を示すと予想されるが、Mab 295 は中和抗体であるので (図 24 参照)、OSM サイト III に結合しているか、または OSM サイト III を遮断しているはずである。従って、実施例 8 の gp130 - OSM ELISA アッセイおよび実施例 9 の KB 細胞アッセイの使用は、中和 OSM 抗体を、サイト II または サイト III 特異的なものとして同定することを可能にする。

40

50

より詳細には、サイトIII抗体はKB細胞アッセイにおいてOSMを中和するが、ELISAアッセイではOSM - gp130結合を中和しないであろう。サイトII抗体は、ELISAおよびKB細胞アッセイのいずれにおいてもOSMを中和するであろう。

【0304】

gp130 - OSM ELISAアッセイを一次ハイブリドーマ・スクリーニングとして用いて、実施例1で作成した抗体のうちgp130 - OSM相互作用を阻害する抗体を検出した。さらに、ハイブリドーマはOSM結合活性の検出についてもスクリーニングした。強いOSM結合を示すが実施例8のELISAアッセイでOSM - gp130結合を阻害しなかったハイブリドーマ上清は、実施例9のKB細胞アッセイでOSM中和について検査した。この検査からいくつかのサイトIII特異的OSM抗体が同定された。そのような抗体の1つをOM4-11.31と呼ぶ。

10

【0305】

サイトIII OSM特異的抗体をgp130 - OSM ELISAに使用したときには、それらの抗体は図25に示すようにOSMシグナルを大幅に増加させた。

【0306】

サイトII抗体である1B5 (1 μg/ml)は、OSM - gp130結合を完全に阻害する。一方、サイトIII OSM抗体であるOM4-11.3.1は、OSM結合の二相性の用量依存的増強を引き起こす。OM4-11.3.1を最高濃度で用いたときのシグナルは、OSMのみのシグナルの約2倍であった。抗体濃度が減少するにつれてシグナルは増加し、やがてピーク値に到達するが、おそらくこれはgp130に結合可能な抗体 - OSM複合体が形成される結果である。OM4-11.31に対する対照のアイソタイプIgGは、OSM - gp130結合に全く影響を及ぼさなかった。図25はサイトI

20

【0307】

実施例11.1 OSM - gp130 ELISAアッセイにおけるサイトIIおよびサイトIII特異的抗OSM抗体の効果

サイトIIおよびサイトIII OSM特異的抗体を一緒に混合した場合、サイトII抗体は、図26に示すように、実施例8のgp130 - OSM ELISAにおいて卓越した効果を有する。

【0308】

OSMのみのシグナルはサイトIII特異的OSM抗体OM4-11.17により大幅に増強される。この増強は対照IgGを添加しても影響されないが、サイトII特異的OSM抗体OM4-5.3を添加するとシグナルは大幅に減少する。図26の最も右側のカラムに見られる微小な識別可能なシグナルは、gp130プレートに加える前のサイトII mAbおよびサイトIII - OSM複合体のインキュベーション時間が最適状態に及ばなかったためと考えられる。

30

【0309】

gp130 - OSM ELISAは、図27a、27bおよび27cに示すように、ヒトOSMで免疫したマウスの抗血清中のサイトII特異的OSM抗体の出現(実施例1を参照)をモニターすることを可能にする。

【0310】

1回目の追加免疫後に、主に非サイトII抗体が生成されたが、2回目の追加免疫後にはサイトII特異的抗体が出現しはじめ、3回目の追加免疫後にはサイトII抗体の優位性がより高い血清濃度から明確に認められる。

40

【0311】

実施例11.2 OSM中和に対するOSMサイトIIおよびサイトIII特異的抗体の相乗効果

OSMサイトIIおよびサイトIIIがOSMの機能に必須であることから、この両方のサイトを標的とする抗体の組み合わせは、OSM中和において相乗的に作用し得る。OSMサイトIIIはOSMR およびLIFRとの相互作用に使用されるだけでなく、第2のOSM分子とgp130との結合にも使用され、このことは、サイトII特異的抗体と比較してサイトIII特異的抗体の増強された効力に寄与し得る。

【0312】

図28aおよび図28bは、サイトII特異的抗体とサイトIII特異的抗体の組み合わせが、ど

50

ちらかの抗体を単独で使用した場合と比べて、OSM中和の効力を大幅に増強することを実証するKBアッセイを示す。

【0313】

組み合わせに使用した抗体の濃度を、以下の表に示す。

【0314】

[17H100]	[ヒト化 15E10]
ng/ml	ng/ml
20	120
7	40
2.2	13.3
0.7	4.4
0.3	1.5
0.082	0.5
0.027	0.165
0.0091	0.55

10

最も活性の高いサイトIIおよびサイトIII特異的抗体を比較したところ、後者がOSM中和においてより強力であることが明らかになった。しかし、サイトIIおよびサイトIII抗体と他の生物種由来のOSMとの交差反応性は異なることが明らかになった。なぜならば、効力のある全てのサイトII抗体はカニクイザルOSMを(gp130 - OSM ELISAおよびKB細胞アッセイにて)中和したのに対して、サイトIII抗体は中和しなかった(KB細胞アッセイのみ)。

20

【0315】

OSMとgp130との、およびOSMR またはLIFRとの相互作用の遮断は、サイトIIおよびサイトIII抗体のOSM中和における相乗効果の基礎をなすと推定される。しかしながら、ある抗体の結合が、異なるサイトを標的とする別の抗体の結合を促進する可能性もある。

【0316】

実施例11.3 サイトIIおよびサイトIII特異的OSM抗体の併用によるOSM中和の最適化

サイトIIおよびサイトIII OSM抗体の組み合わせが中和の効力を大幅に増強したことから、最適濃度を得るための戦略を、個々の抗体の結合親和性に基づいて想定することができる。実施例11.3は理論上のものである。

30

【0317】

まず、あらかじめサイトIIIまたはサイトII特異的抗体をそれぞれ結合させたOSMに対するサイトIIまたはサイトIII特異的抗体の親和性を、プラズモン共鳴技術を用いて測定する。結合定数(Kd)が、単一の抗体がOSMに結合したときのそれと著しく異なるならば、サイトII抗体とサイトIII抗体の協調的な相互作用が起こっている。

【0318】

これらの抗体結合試験のデータに基づき、サイトII抗体およびサイトIII抗体の濃度を、2倍希釈法により、Kd値よりも10倍高い濃度から10倍低い濃度の範囲で調製する。さらに、両抗体の組み合わせは、サイトII抗体の各濃度がサイトIII抗体のどの濃度とも組み合わせるように調製する。これは、サイトII抗体またはサイトIII抗体のOSMへの同等の結合、ならびにサイトII抗体およびサイトIII抗体結合の優位性を検査することを可能にする。全ての抗体希釈物および組み合わせを、KB細胞アッセイを用いてOSM中和について試験する。このアッセイからのデータは、OSM中和に最も有効だった抗体の組み合わせの選択を可能にする。

40

【0319】

実施例12 抗サイトII OSM特異的抗体がRA滑膜繊維芽細胞のOSM刺激を阻害する能力

先に、本発明者らはサイトIIおよびサイトIII特異的OSM抗体がKB細胞のOSM刺激を阻害できることを示した。しかしながら、KB細胞は上皮細胞であり、形質転換されており、必ずしもリウマチ性の滑膜に存在する細胞を代表するものではない。そこで本発明者らは、サイトII特異的OSM抗体がRA滑膜繊維芽細胞のOSM刺激を阻害する効力を検討した。

50

## 【0320】

繊維芽細胞を96ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  細胞/ウェルで播種し、10%のFCSを含むDMEM中でほぼコンフルエントになるまで培養し、培地を週に3回交換した。その後、培地を、OSM不含培地、1 ng/mlのOSMを含む培地、または種々の濃度の抗OSM抗体と培地中で1時間プレインキュベートした1 ng/mlのOSMを含む培地と交換した。48時間後、培養上清を移して、-20℃で貯蔵した後、ELISAでIL-6の濃度を解析した。

## 【0321】

図29は4種類のRA滑膜繊維芽細胞株からの代表的なデータを示す。抗体の効力は個々の株においていくらか変動したものの、OSM抗体はOSM刺激によるIL-6分泌の完全な阻害を引き起こした。

## 【0322】

実施例13 OSMのグリコシル化が抗OSM抗体の中和能力に及ぼす影響

抗OSM抗体は、先に記述した方法を用いてマウスを非グリコシル化OSMで免疫することにより誘発させた。これらの抗体をスクリーニングしたところ、図30に示すように、OSMとgp130の結合を妨害する強力な中和抗体(OM4-5.3)が同定された。

## 【0323】

OM5-5.3はグリコシル化OSM(CHO細胞によるグリコシル化)に対して同様の効力を有すると推測された。しかしながら、この抗体のサブクローン(OM4-5.3.1)がグリコシル化OSM(CHO細胞によりグリコシル化されたhOSM)とgp130との結合を阻害する能力を測定したところ、図31aに示すように、効力の著しい低下が観察された。さらに、非グリコシル化OSMと比較した場合のグリコシル化OSMに対するこの効力の低下は、図31bに示すように、マウスを非グリコシル化OSMで免疫して誘発させた他のサイトII特異的抗体においても認められた。

## 【0324】

その上、非グリコシル化OSMによる免疫から誘発されたサイトIII抗体もまた、KB細胞アッセイにおいて、非グリコシル化OSMと比較してグリコシル化OSMに対して約10倍の効力低下を示した。下の表1を参照されたい。

## 【0325】

表1

抗体	非グリコシル化OSM	グリコシル化OSM
	IC50 ng/ml	IC50 ng/ml
OM4-11.17	4.1	45.5
OM4-11.31	7.7	89.6

非グリコシル化OSMによる免疫感作が、結果的にグリコシル化形態よりも非グリコシル化OSMに対して強力な抗体を生じたことから、本発明者らは、グリコシル化OSMを用いた免疫感作が、この形態のOSMに対してより強力な抗体をもたらす可能性があると考えた。実際にその通りであった。図32aおよび32bは、グリコシル化OSMによる免疫から誘発された2種類のサイトII特異的OSM抗体(15E10および5H2)の、gp130-OSM ELISAにおけるグリコシル化および非グリコシル化OSMに対する活性を示す。

## 【0326】

実施例14 RA患者における血清OSMレベルと滑液OSMレベルの相関

高レベルのOSMがRA患者の滑液中から検出されることから、該患者におけるOSM産生の主要な場所の一つは炎症関節である。対照的に、RA患者の血清OSMレベルは非常に低く、下記の実施例16に記載したような高感度ELISAの開発によって、こうしたOSMレベルを正確に測定することができるようになった。本発明者らは、RA患者の滑液および血清サンプルを一組にして測定することにより、炎症関節のOSM濃度と循環系中のOSM濃度の相関性を検討した。

## 【0327】

下記のELISAアッセイ(OM4-11.31抗体を用いたOSMの捕捉)で測定した血清および滑液中

10

20

30

40

50

のOSMレベルを下の表に示し、また図33にこの2つの測定の相関を示す。サンプルは採取した後冷凍し、これらの測定の直前に解凍した。この2つのパラメーターの相関係数を線形回帰法で求めたところ0.9447であった。

【0328】

患者	血清 [OSM]	滑液(SF) [OSM]
	pg/ml	pg/ml
1	9.8	43.24
2	13.7	101.445
3	0	0
4	88.56	397
5	22.64	142.12
6	18	147.4
7	13	9.2
8	13.8	29.88
9	10.68	14.76

10

【0329】

血清OSMとSF OSMのレベルの良好な相関性は、炎症関節以外のOSM産生部位が循環OSMレベルに比較的小さな影響しか及ぼさないか、さもなくばそれらの部位が関節における産生と相関する様式でOSM産生をモジュレートすることを示唆する。いずれにせよ、本発明者らは、この相関性が血清OSMの測定から関節OSMレベルの予測を可能にし、またRA患者の治療においてOSM中和抗体の用量設定に応用可能であると考えている。

20

【0330】

#### 実施例15 OA患者由来の滑液(SF)および血清中のOSMの測定

軟骨の劣化が変形性関節症(OA)の特徴であること、およびOSMが、特にIL-1などのサイトカインと相乗的に、軟骨の分解を誘導することから、OA患者由来の滑液および血清中のOSMレベルを測定した。

【0331】

細胞を遠心分離によりSFサンプルから除去した。上清を0.1U/mlのヒアルロニダーゼ(FIuka, 53725)で室温にて1時間処理し、その後それらを4000rpmで10分間遠心分離した。上清を移し、分注して、解析するまで-80で貯蔵した。

30

【0332】

OA SF中のOSM濃度を、実施例16に記載のELISAアッセイを用いて解析した。これは図34aおよび図34bならびに図35に示す2つの実験によって行った。

【0333】

46種類のOA SFのうち、13種類からはOSMが検出されなかったが、他の多くにはOSMが比較的高レベル(>200pg/ml)で含まれ、3種類のサンプルからは1000pg/mlより高濃度のOSMが検出された。

【0334】

#### 実施例15.1 OA血清中のOSM濃度

OA滑液中に高濃度のOSMが存在することは予想外であった。なぜならば、これまでの報告は、OA滑液中のOSMレベルがRA SF中のOSMレベルよりもどちらかといえば低いことを示唆していたからである(Manicourt DHら(2000) Arthritis Rheum. 43(2): 281-88を参照されたい)。本発明者らはまた、臨床試験中のOA患者からの血清中のOSMレベルを、12ヶ月間にわたって様々な時点で、下記の実施例16のELISAアッセイを用いて測定した。図36は、血清のOSM濃度がこれらの患者では低いまたは検出不能であることを示している。しかし、サンプルが対になっていなかったため、OA患者の血清中および滑液中のOSMレベルを相関させることはなかった。

40

【0335】

#### 実施例16 生物学的サンプル中の低濃度のOSMを検出するための高感度ELISA

50

本発明者らは、生物学的サンプル中のOSMを測定するための、サイトIII OSM特異的捕捉抗体OM4-11.31を用いた高感度ELISAを開発した。このELISAは、図37に示すように< 2 pg/mlまでのOSMの検出が可能であり、血清および滑液サンプルの解析に使用した。

#### 【0336】

このELISAを血清および滑液のサンプルに対して使用するプロトコルを下に記載する。

#### 【0337】

### OSM ELISAプロトコル

#### 材料および試薬

11. Nunc Immunoplate F96 maxisorp (Life Technologies 4-39454A)
12. モノクローナル抗ヒトOSM抗体 (OM4-11.31 GSK) 10
13. グリコシル化hOSM@420 μg/ml (CHO細胞グリコシル化)
14. ビオチン化ヤギ抗ヒトOSM抗体 50 μg/ml (R&D Systems BAF295)
15. ストレプトアビジンHRP (Amersham RPN4401)
16. PBS (SIGMA D8537 1L)
17. BSA (SIGMA A7888 500g)
18. フェノールレッド溶液0.5% (SIGMA P0290 100ml)
19. TMB (SIGMA T-8665 1L)
20. プールされたAB正常雄血清対照 (SIGMA H4522) バッチ番号043K0500
21. 硫酸@ 1 M
22. PBS錠 (SIGMA P4417 100錠) 20
23. Tween 20 (Sigma P7949)
24. プレートシーラー

#### 【0338】

#### 試薬の調製

##### プレートの調製

モノクローナル抗ヒトOSM抗体をPBSで4 μg/mlに希釈する。各ウェルに50 μlを加え、密封用ストリップで覆い、4 で一晩インキュベートする。

##### 洗浄バッファー

5Lの脱イオン水に25個のPBS錠 + 2.5ml Tween 20 (0.05%)を加える。

##### ブロッキングバッファー

500mlのPBSに10gのBSAを加える(2%)。(800 μlのフェノールレッドを添加し、pHが中性になるまで5 M NaOHを加える)

##### AB血清対照

100mlをSorvall遠心分離機で30秒間、16Kで回転させる(0.02gに調整した4 × Oakridgeチューブを使用)。上清を滅菌ガーゼに通して(依然として濁っているが微粒子は見られない)、分注して冷凍する。

アッセイの当日、AB血清を解凍し、13Kで5分間微量遠心し、PBSで1 4希釈する(血清は不透明であるが、使用に支障はない)。

#### 【0339】

##### 標準品の調製

血清の解析の場合は、PBSで1 4希釈したAB血清中に標準品を調製する。SFの解析の場合は、1% BSA-PBS中に標準品を調製する。

#### 【0340】

最大限の感度が望まれる場合：

112、56、28、14、7、3.5、1.75および0 pg/ml OSMの標準品を使用する。

#### 【0341】

##### 方法

1. プレートを洗浄バッファーで4回洗浄し、タップ乾燥させる。
2. 各ウェルに200 μlのブロッキングバッファーを加え、プレートを密封し、室温で2時間振とうするか、または4 で一晩静置する。

3. ステップ1と同様に洗浄する。
4. 各ウェルに50 $\mu$ lの標準品またはサンプルを加える。カバーを施し、室温で2時間攪拌する。(血清サンプルを解析するのであれば、標準品を25%のプールしたAB血清で希釈する)
5. ステップ1と同様に洗浄する。
6. 50 $\mu$ l/ウェルのビオチン化抗ヒトOSM抗体(1%ヤギ血清を含むブロッキングバッファで50ng/mlに希釈したもの)を加える。カバーを施し、室温で1時間攪拌する。
7. ステップ1と同様に洗浄する。
8. 50 $\mu$ l/ウェルのストレプトアビジンHRP(ブロッキングバッファで1/4000に希釈したもの)を加える。カバーを施し、室温で30分間攪拌する。
9. ステップ1と同様に洗浄する。
10. 100 $\mu$ lのTMB基質を加える。カバーを施し、室温で40分間攪拌する。
11. 50 $\mu$ l/ウェルの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え、アッセイ反応を停止させる。
12. プレートを振とうさせた後、直ちに450nmで読み取る。

10

## 【0342】

配列番号1

NYGVH

配列番号2

VIWRGGSTDYNAAFMS

配列番号3

SPNSNFYWFYFDV

配列番号4

SGSSSVSYMY

配列番号5

DTSNLAS

配列番号6

QQWSSYPPT

配列番号7

QVQLKQSGPGLVQPQSLISITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNAAFMSRSLITKDNSRSQVFF  
KMNSLQADDTAIYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGTGTTVTVSS

30

配列番号8

QIVLTQSPTIMASPGKVTMTCSGSSSVSYMYWYQKPGSSPRLLIEDTSNLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISRMEAE  
DAATYYCQQWSSYPPTFGSGTKLEIK

配列番号9

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYL  
QMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLTVSS

配列番号10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPE  
DFAVYYCQQWSSYPPTFGGQTKLEIK

配列番号11

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYL  
QMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

配列番号12

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPE  
DFAVYYCQQWSSYPPTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

配列番号 15

CAGGTGCAACTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTT  
CTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGAG  
GTGGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAAGGACAACCTCCAGGAGCCAAGTTTTCTTT  
AAAATGAACAGTCTACAAGCTGATGACACTGCCATATACTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACCTTTTACTGGTATTT  
CGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

配列番号 16

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTC  
AAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAGGAGAAGCCAGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTGAAGACACATCCAACCTGG  
CTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAA  
GATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTATCCACCCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATCAAA

10

配列番号 17

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT  
CTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAG  
GTGGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCATTCCACCATCTCCAAGGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACCTTTTACTGGTATTT  
CGATGTCTGGGGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

配列番号 18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTC  
AAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGG  
CTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAACCTAGAGCCTGAA  
GATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

20

配列番号 19

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT  
CTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAG  
GTGGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCATTCCACCATCTCCAAGGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACCTTTTACTGGTATTT  
CGATGTCTGGGGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCcT  
CCtCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG  
TGGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG  
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG  
TGGACAAGAAAAGTTGAGCCAAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA  
CCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC  
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCA tCGAGAAAACC aTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG  
AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG  
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTcTTCTC  
ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCGGGTAAA

30

40

配列番号 20

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTC  
AAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGG  
CTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAACCTAGAGCCTGAA  
GATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACG  
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCC  
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA  
ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

配列番号 21

50

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYL  
QMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFVWGRGTLVTVSS

配列番号 40

DYNMD

配列番号 41

DINPNNGGTIDNQKFKD

配列番号 42

GIYYYGSHYFDY

配列番号 43

SATSSVSMH

配列番号 44

DTSKLAS

配列番号 45

QQWSSNPLT

配列番号 46

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYIFTDYNMDWVKQSHGKLEWIGDINPNNGGTIDNQKFKDKATLTVDKSSSTAY  
MELRSLTSEDVAVYYCARGIYYYGSHYFDYWGQGTLLTVSS

配列番号 47

QIVLTQSPA IMSASPGKVTMTCSATSSVSMHWFQKKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPTFRFSGSGSGTSYSLTISSEAE  
DTATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLELK

配列番号 48

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNNGGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVY  
MELSSLRSEDVAVYYCARGIYYYGSHYFDYWGQGTLLTVSS

配列番号 49

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRFSGSGSGTDYTLTISLQPE  
DFATYYCQQWSSNPLTFGGGKVDIK

配列番号 50

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNNGGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVY  
MELSSLRSEDVAVYYCARGIYYYGSHYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 51

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRFSGSGSGTDYTLTISLQPE  
DFATYYCQQWSSNPLTFGGGKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

配列番号 52

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCCTCTGGATA  
CATATTCAGTACTACAACATGGACTGGGTGAAGCAGAGCCATGAAAGAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTA  
ATAATGGTGGTACTATCGACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTAC  
ATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTTATTACTACGGTAGTCACTA  
CTTTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

配列番号 53

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCACCTC  
AAGTGTAAGTGCATGCACTGGTCCAGAAGAAGTCAGGTACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGG  
CTTCTGGAGTCCCTACTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGTAGCATGGAGGCTGAA  
GATACTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCACTCACGTTCCGTTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

配列番号 54

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATA

10

20

30

40

50

CATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTA  
ATAATGGTGGTACTATCGACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGTCTAC  
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGATTTATTACTACGGTAGTCACTA  
CTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACAGTCTCCTCA

配列番号 55

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCACCTC  
AAGTGTAAGTGCATGCACTGGTTCAGAAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAACTGG  
CTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA  
GATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAA

配列番号 56

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATA  
CATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTA  
ATAATGGTGGTACTATCGACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGTCTAC  
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGATTTATTACTACGGTAGTCACTA  
CTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC  
CcTCCtCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG  
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
CAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA  
AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG  
GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
AAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCaTcGAGAAAACCaTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC  
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCaTCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA  
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC  
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTcTT  
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

配列番号 57

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCCACCTC  
AAGTGTAAGTGCATGCACTGGTTCAGAAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAACTGG  
CTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA  
GATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAACG  
TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC  
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAG  
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA  
ACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

配列番号 61

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYL  
QMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFVWGRGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELAGA  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 62

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATT  
CTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAG  
GTGGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCATTACCATCTCCAAGGACAATTCGAAGAACACGCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACCTTTTACTGGTATTT  
CGATGTCTGGGGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT  
CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCCG

10

20

30

40

50

TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG  
 CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG  
 TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCAGCCTGAACTCGCGGGGGCA  
 CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTGGTGGT  
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC  
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTACAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG  
 AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
 GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG  
 CTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC  
 ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

10

【図面の簡単な説明】

【0343】

【図1】 OSMとgp130、LIFRおよびOSMR との相互作用の模式図。

【図2】 実施例に記載のプロトコルに従い15E10および10D3キメラ抗体を用いた、hOSM(上のパネル)およびcOSM(下のパネル)に対するgp130阻害ELISAを示す。詳細については上記説明を参照のこと。

【図3】 実施例に記載のプロトコルに従い実施例に記載の15E10および10D3キメラ抗体を用いた、hOSM(上のパネル)およびcOSM(下のパネル)に対するKB細胞アッセイを示す。

【図4】 hOSM(上のパネル)およびcOSM(下のパネル)に対するgp130阻害ELISAを示すが、ここで阻害%は4種類のヒト化抗体(B1L1、B1L2、B4L1、B4L2)およびキメラ15E10の抗体濃度の関数としてプロットした。

20

【図5】 種々のヒト化抗体(B2L2、B3L2、B4L2)がCHO産生hOSMへの結合についてキメラ15E10と比較される、実施例のgp130阻害ELISAを示す。

【図6】 hOSMの代わりにcOSMを用いた図5のアッセイを示す。

【図7】 CHO産生hOSMを25%のヒトAB血清中で用いた図5のアッセイを示す。

【図8】 hOSMの代わりにcOSMを用いた図7のアッセイを示す。

【図9】 ヒト化抗体B2L2、B3L2、B4L2およびキメラ15E10を用いた、4種類の異なるヒトサンプル由来の好中球OSMのgp130阻害ELISAを示す。

【図10】 3種類のヒト化抗体(B2L2、B3L2、およびB4L2)ならびに15E10キメラ抗体を用いた、ヒトRA患者の滑液から分離されたhOSMに対するgp130阻害ELISAを示す。

30

【図11】 gp130阻害ELISAの代わりにKB細胞アッセイを用いた図5～10の状態の結果を図11～16に示す。ただし、図15の好中球OSMのKB細胞アッセイだけは好中球OSMの単一のヒトサンプルを使用した。図11にはCHO産生hOSMのKB細胞アッセイを示す。

【図12】 CHO産生cOSMのKB細胞アッセイを示す。

【図13】 25%ヒトAB血清中のCHO産生hOSMのKB細胞アッセイを示す。

【図14】 25%ヒトAB血清中のCHO産生cOSMのKB細胞アッセイを示す。

【図15】 好中球OSMのKB細胞アッセイを示す。

【図16】 RA患者のSF細胞から分離されたOSMのKB細胞アッセイを示す。

【図17】 親マウス15E10抗体、キメラ15E10抗体、ヒト化抗体構築物B3L2およびB3L2のFc溶解性変異体の、CHO産生hOSMに対するgp130阻害ELISAを示す。詳細については上記説明を参照されたい。

40

【図18】 cOSMを用いた図17のアッセイを示す。

【図19】 親マウス15E10、キメラ15E10、ヒト化抗体構築物B3L2およびB3L2のFc溶解性変異体の、CHO産生hOSMに対するKB細胞アッセイを示す。

【図20】 実施例の競合アッセイの模式図を示す。

【図21】 実施例のマウス10D3競合抗体による15E10(B3L2ヒト化構築物)の阻害を示す。等モル量(0.15 μg/ml)での10D3競合体による15E10の阻害パーセントは62.3%であった。

【図22】 図22aは、非グリコシル化OSMを使用するgp130 - OSM ELISAにおける典型的な標準曲線を示し、この場合のELISAプレートにコーティングするためのgp130濃度は1 μg/ml

50

である。図22bは、プレートのコーティングに使用したgp130濃度を4 µg/mlに増加したときのgp130 - OSM ELISAの感度の向上を示す。図22cは、gp130 - OSM ELISAがグリコシル化および非グリコシル化OSMのいずれを用いても機能することを示す。非グリコシル化OSMを黒塗りの丸で表し、グリコシル化OSMを白抜き三角で表す。ELISAの感度は非グリコシル化OSMの方が高いことに注目されたい。これはおそらくグリコシル化が用いた検出抗体により認識されるエピトープをマスキングしている結果であろう。

【図23】図23aは、gp130 - OSM ELISAにおけるOSM中和抗体Mab295 (R&D Systems)の効果を示す。OSMのみ；白丸、OSM+Mab295；黒三角、OSM+Mab295 (ELISAプレート上にgp130無し)；黒四角。図23bは、gp130 - OSM ELISAにおいてMab295がOSMシグナルをどのように増強するかを表した模式図である。

10

【図24】Mab 295によるOSM中和の有効性を示すKB細胞アッセイからのデータを示す。細胞は1 ng/ml OSMのみで刺激したか、またはアッセイ前に種々の濃度のMab295と混合した同濃度のOSMで刺激した。OSMのみ；黒三角、OSM+Mab295；白丸、OSM刺激なし；黒四角。

【図25】gp130 - OSM ELISAにおけるOSMサイトIII特異的抗体OM4-11.31の効果を示す。OSMのみ；白丸、OSM+アイソタイプ対照IgG；黒の逆三角、OSM+サイトII OSM特異的抗体；白四角、OSM+OM4-11.31；黒丸。

【図26】OSMとサイトIII特異的抗体(OM4-11.17)の複合体と、gp130との結合の、サイトII特異的OSM抗体OM4-5.3による阻害を示す。12.5ng/ml OSMのみ；中実のバー、OSM+OM4-11.17；対角線のバー、OSM+OM4-11.17+対照IgG；網状線のバー、OSM+OM4-11.17+OM4-5.3；点描バー。

20

【図27】gp130 - OSM ELISAを用いて検出された、ヒトOSMで免疫したマウスの血清中のサイトIIおよび非サイトII特異的OSM抗体の出現を示す。ヒトOSMを用いて追加免疫を1回、2回および3回行った後の血清の解析をそれぞれa、bおよびcに示す。OSM+免疫前血清；白丸、OSM+免疫マウス由来の抗血清；黒の逆三角、OSM+免疫マウス由来の抗血清(ELISAプレート上にgp130無し)；白の逆三角。

【図28】KB細胞アッセイで測定された、サイトII OSM特異的抗体(「hum 15E10」、ヒト化15E10)とサイトIII特異的OSM抗体(17H10)とのOSM中和における相乗効果を示す。17H10単独(a)またはヒト化15E10単独(b)によるOSM中和；黒丸、抗体の組合せによるOSM中和；白三角。

【図29】RA滑膜繊維芽細胞からのOSM刺激IL-6分泌を阻害する際のヒト化15E10抗体の効力を示す。各記号は異なる患者から得られた繊維芽細胞をさす。

30

【図30】抗OSM抗体OM4-5.3によるOSMとgp130との結合の阻害を示す。ELISAプレートに加える前に、OSM(25ng/ml)を、図に示す濃度のOM4-5.3とともにプレインキュベートした。OSMのみ；黒丸、OSM+OM4-5.3；白丸。

【図31】図31aは、グリコシル化および非グリコシル化OSMとgp130との結合を阻害する際のOM4-41.5の効力の差を示す。非グリコシル化OSM；黒丸、グリコシル化OSM；白三角。図31bは、グリコシル化および非グリコシル化OSMとgp130との結合を阻害する際のOM4-5.3.1の効力の差を示す。非グリコシル化OSM；黒丸、グリコシル化OSM；白三角。

【図32】gp130 - OSM ELISAにおけるグリコシル化OSM(黒丸)および非グリコシル化OSM(白三角)に対する2種類のサイトII OSM特異的抗体(a；15E10、b；5H2)の活性を示す。

40

【図33】RA患者から得られた血清とSFのサンプル対中の血清OSMおよび滑液OSM間の相関を示す。

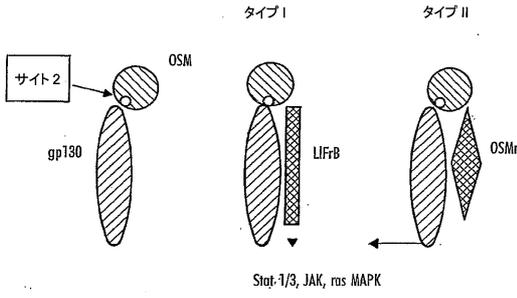
【図34】図34aおよび図34bは、実施例に記載のOSM ELISAを用いて測定されたOA滑液のOSM濃度を示す。図34bは、2つのサンプルのOSM滑液濃度が特に高かったことを示す。

【図35】実施例に記載のOSM ELISAを用いて測定されたOA滑液のOSM濃度を示す。

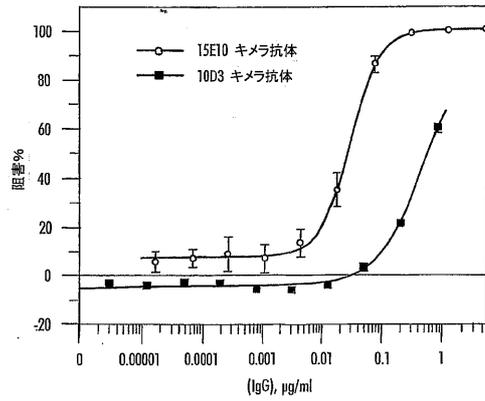
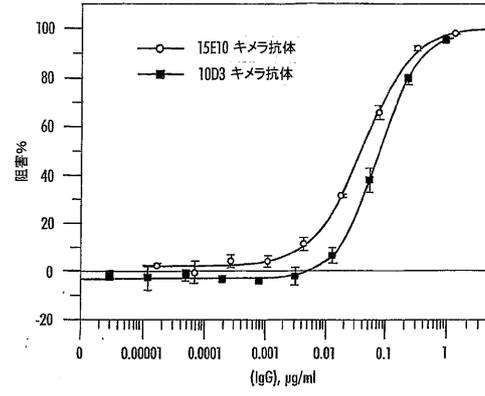
【図36】12ヶ月の臨床試験期間にわたりOA患者の血清中に見られたOSM濃度を示す。#番号は患者識別番号である。

【図37】25%ヒトAB血清における典型的OSM標準曲線を示す。

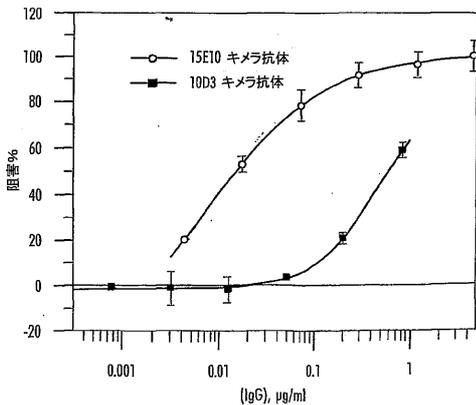
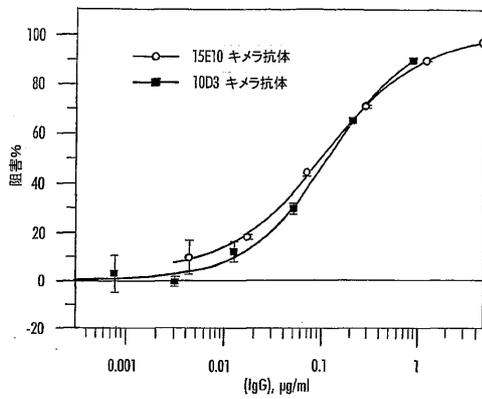
【 図 1 】



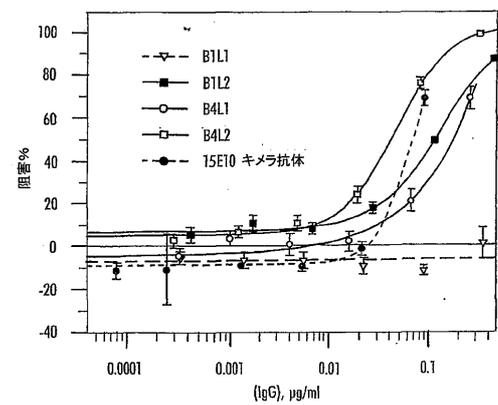
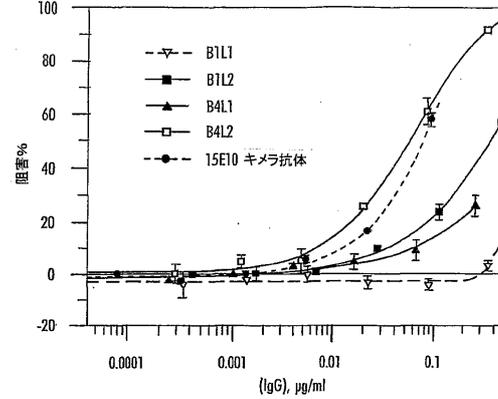
【 図 2 】



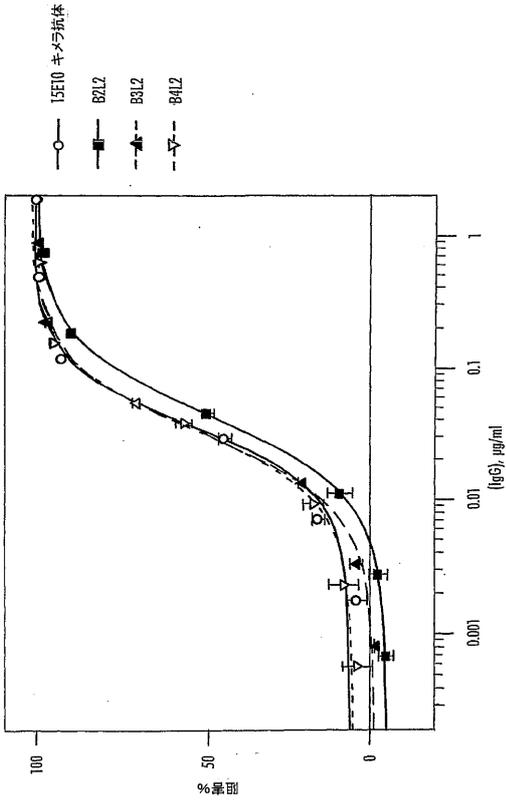
【 図 3 】



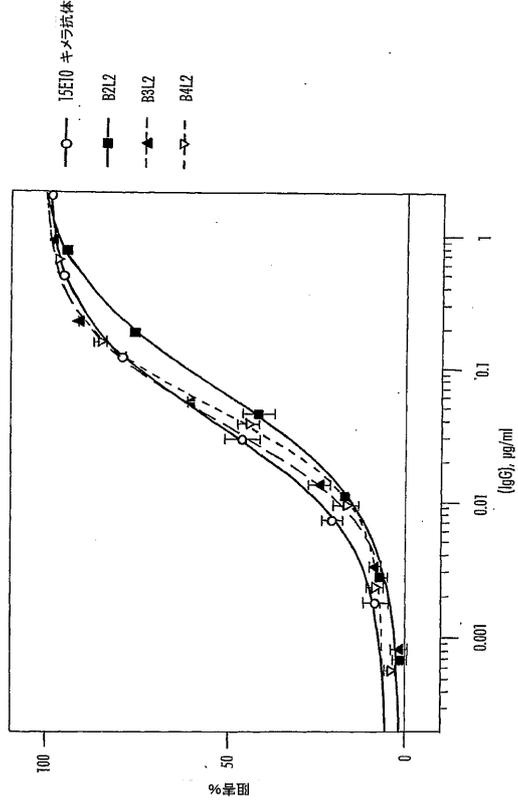
【 図 4 】



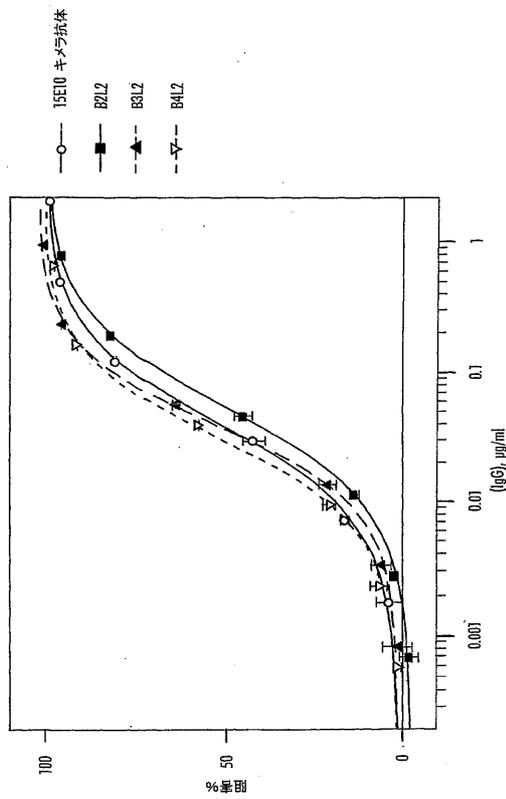
【 図 5 】



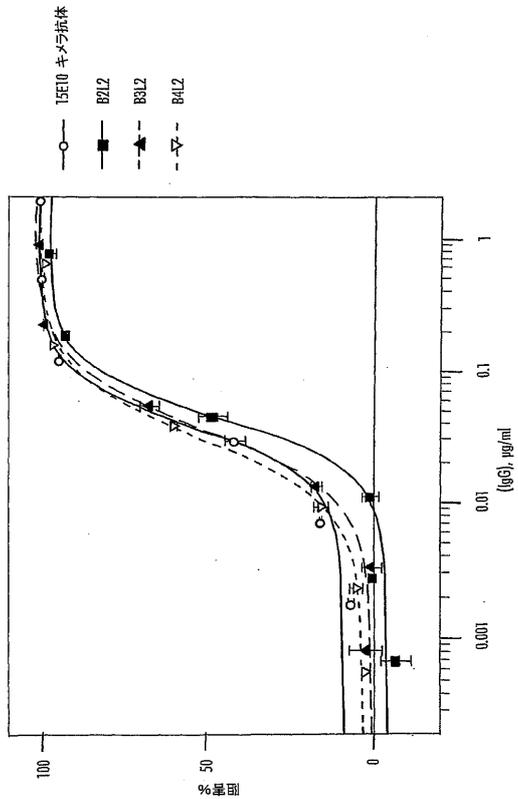
【 図 6 】



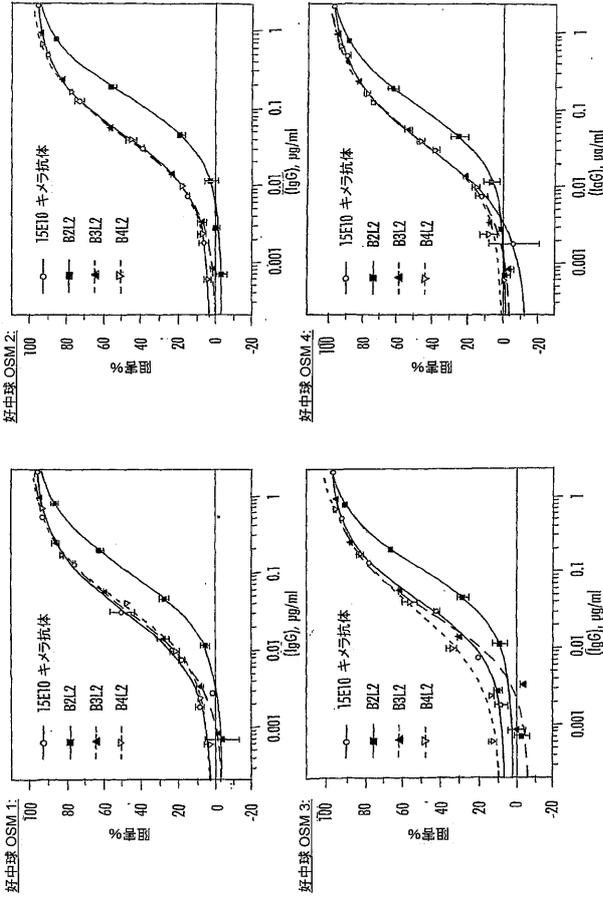
【 図 7 】



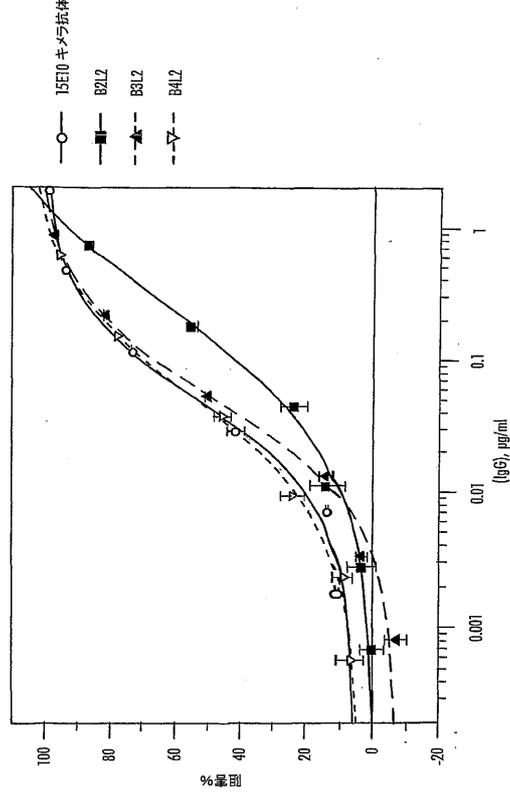
【 図 8 】



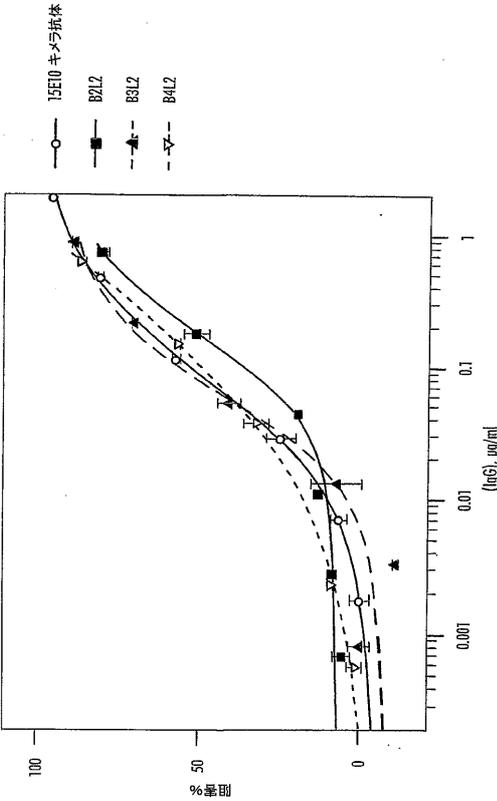
【 図 9 】



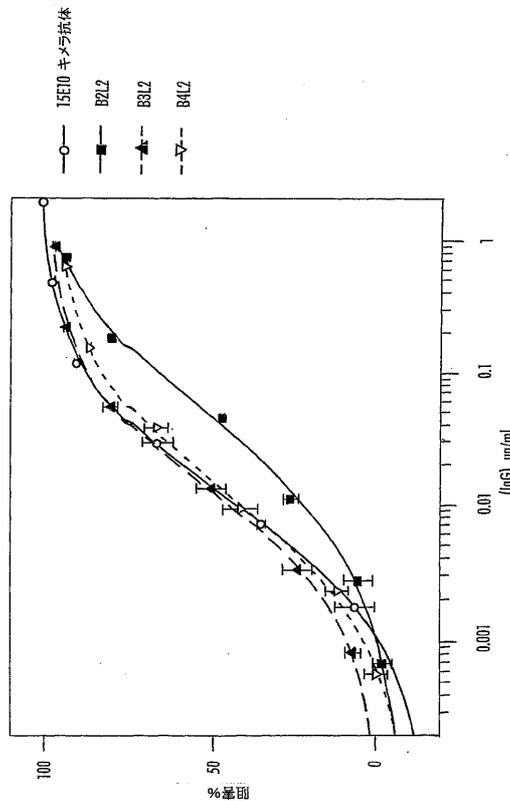
【 図 10 】



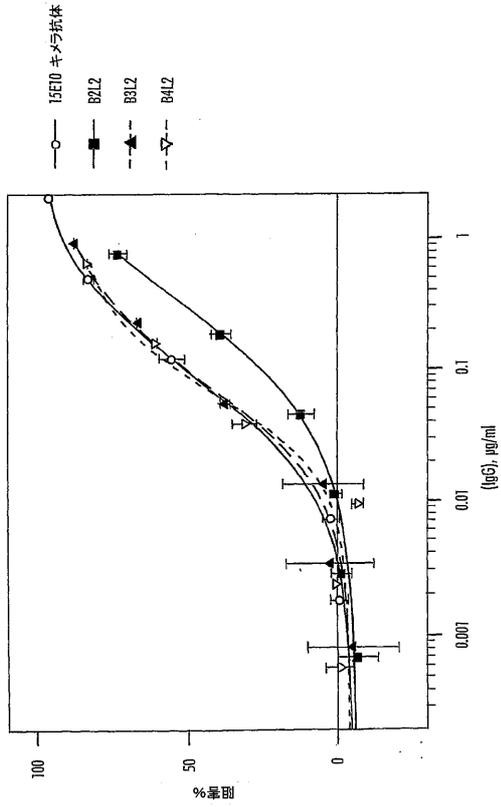
【 図 11 】



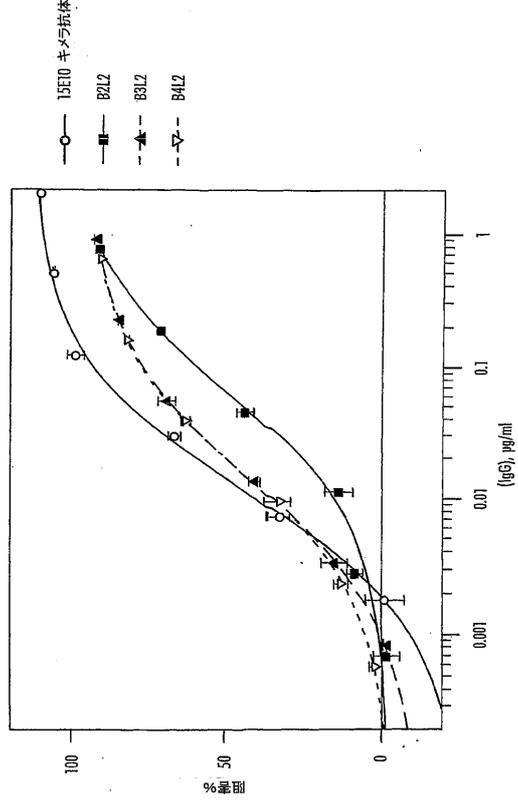
【 図 12 】



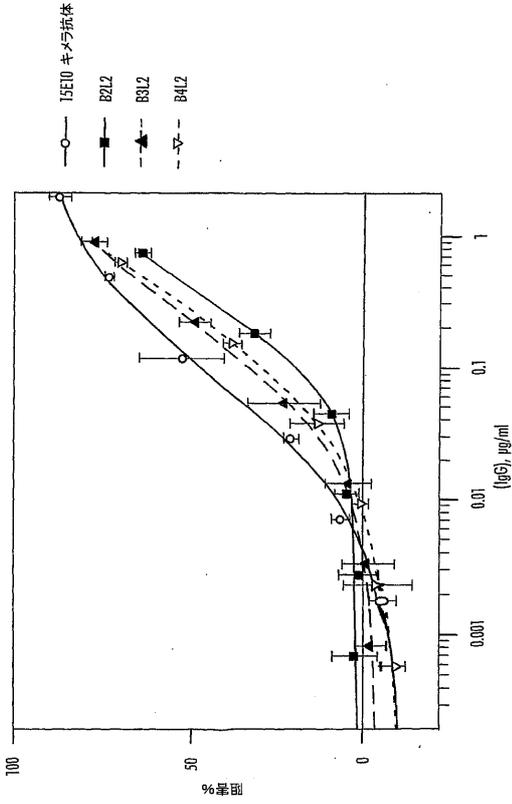
【 図 1 3 】



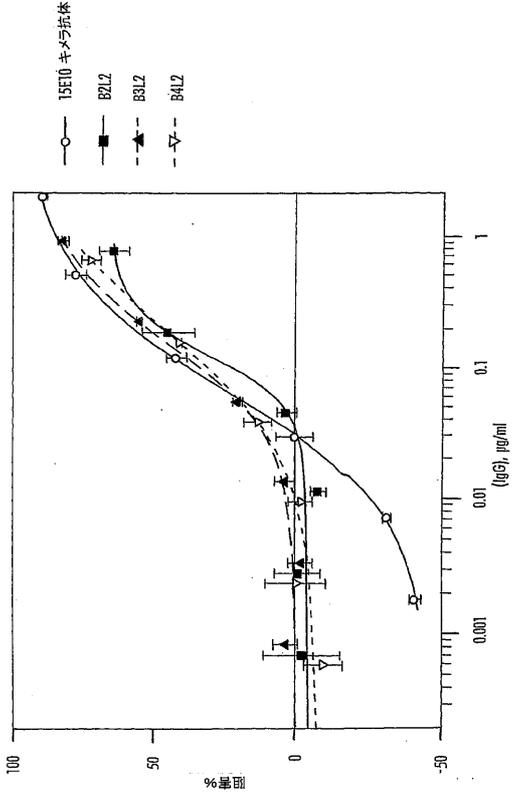
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

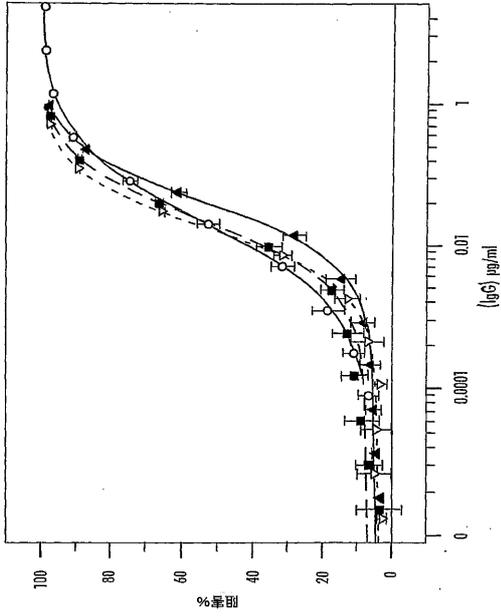


【 図 1 6 】



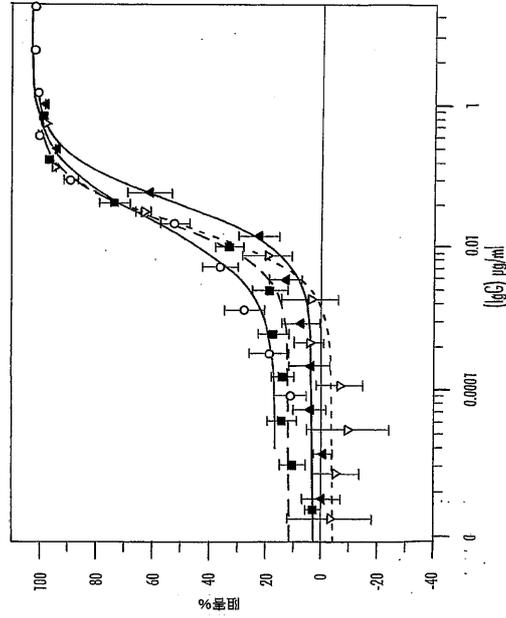
【 図 17 】

- マウス 15E10 抗体
- 15E10 キメラ抗体
- ▲— B3L2
- ▽--- B3L2-Fc 変異体



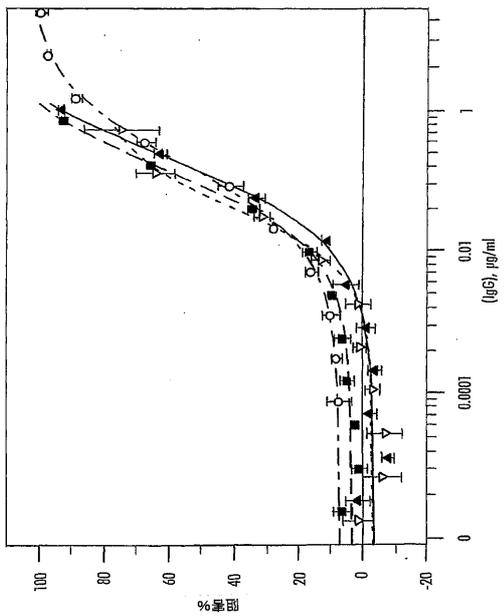
【 図 18 】

- マウス 15E10 抗体
- 15E10 キメラ抗体
- ▲— B3L2
- ▽--- B3L2-Fc 変異体

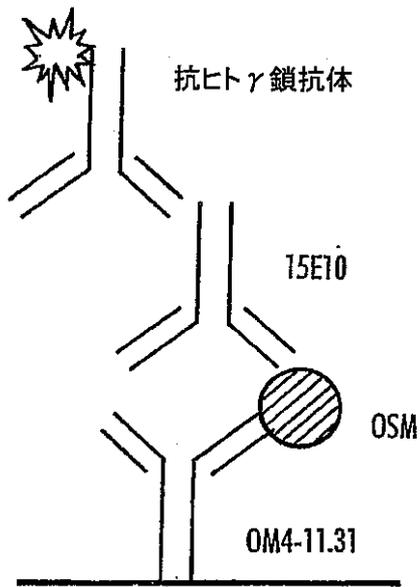


【 図 19 】

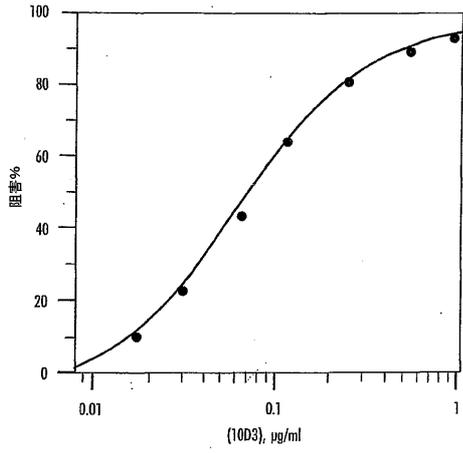
- マウス 15E10 抗体
- 15E10 キメラ抗体
- ▲— B3L2
- ▽--- B3L2-Fc 変異体



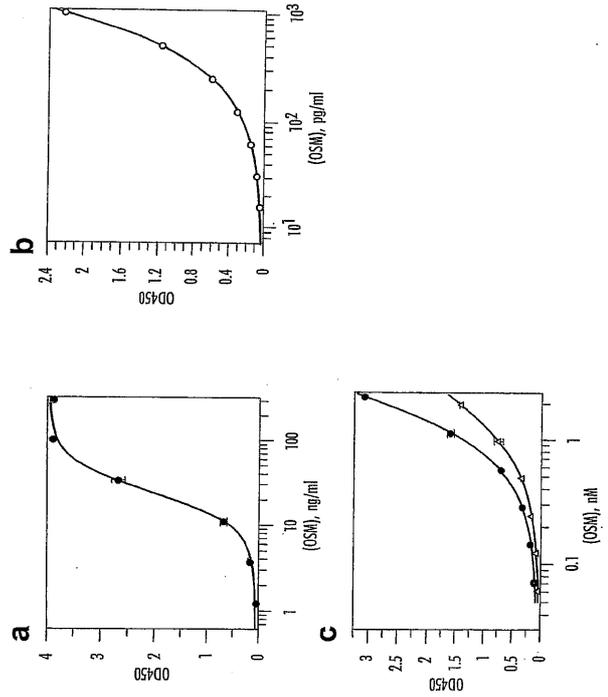
【 図 20 】



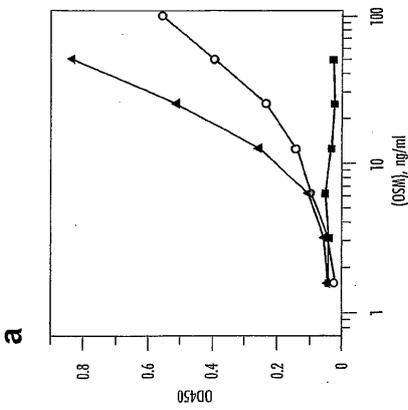
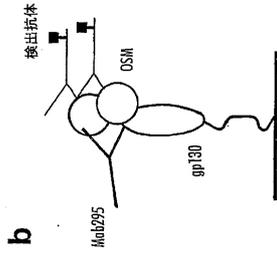
【 2 1 】



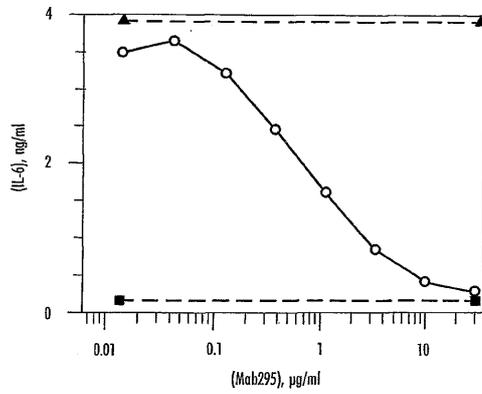
【 2 2 】



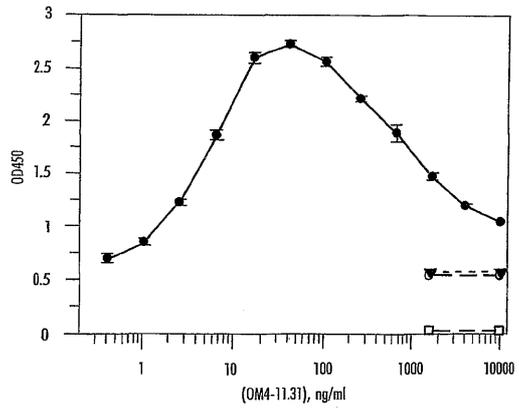
【 2 3 】



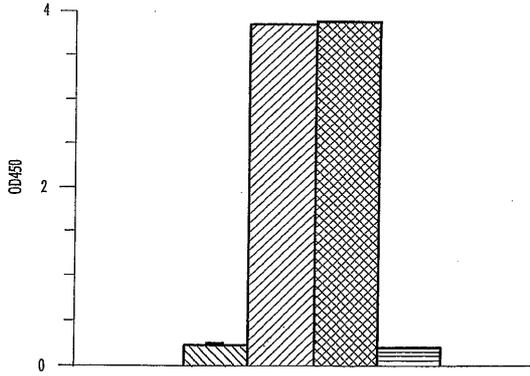
【 2 4 】



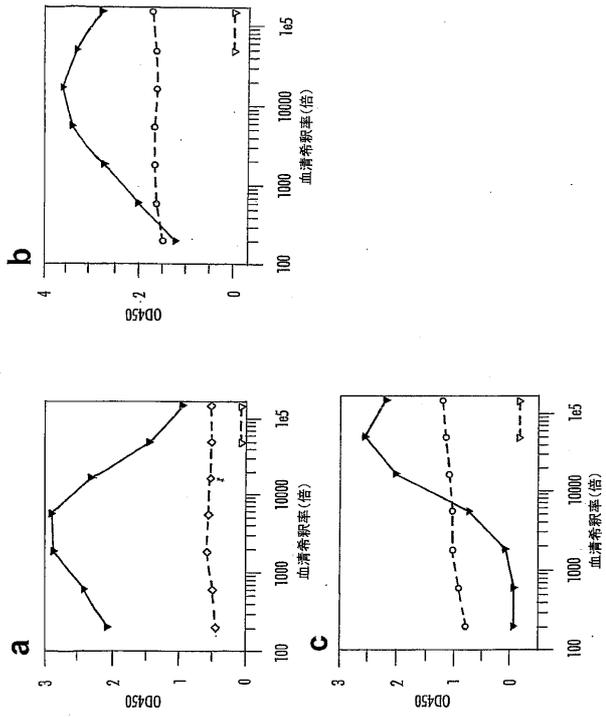
【 2 5 】



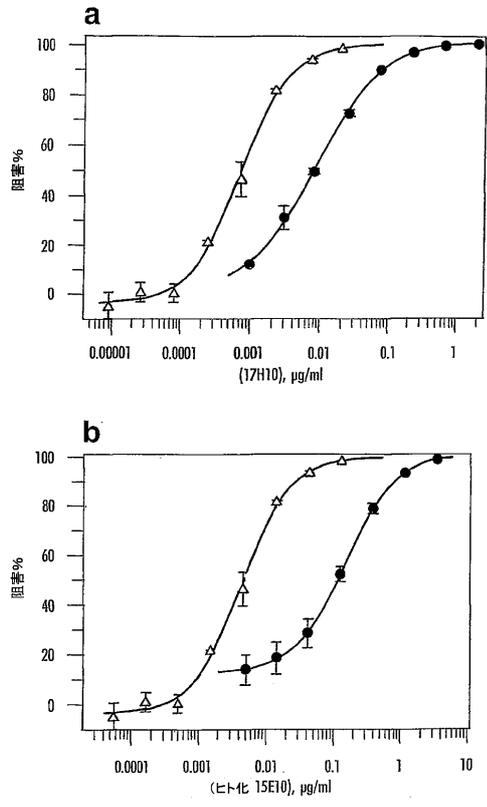
【 26 】



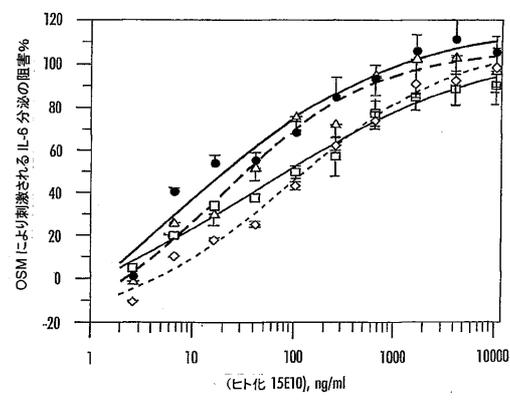
【 27 】



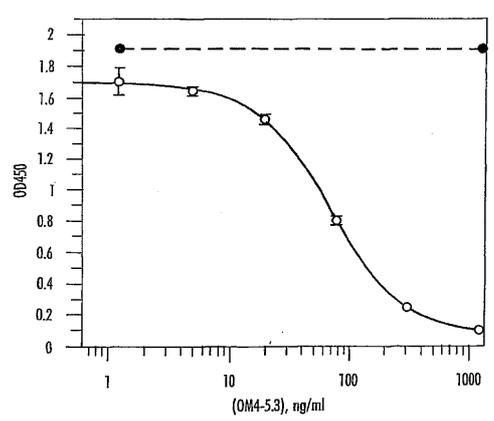
【 28 】



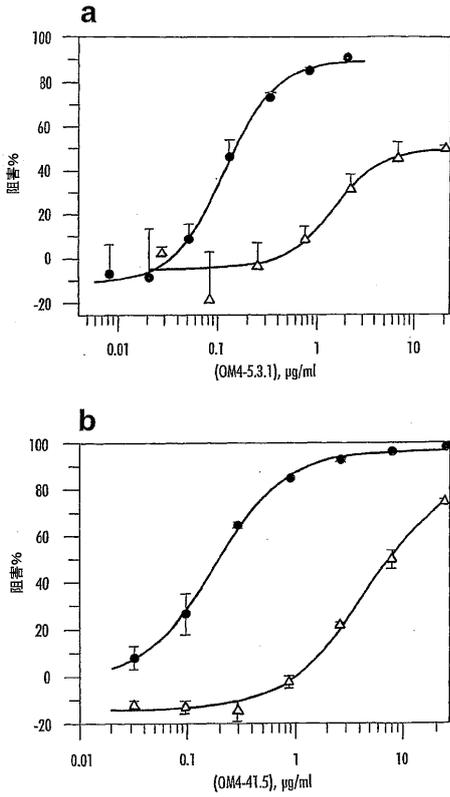
【 29 】



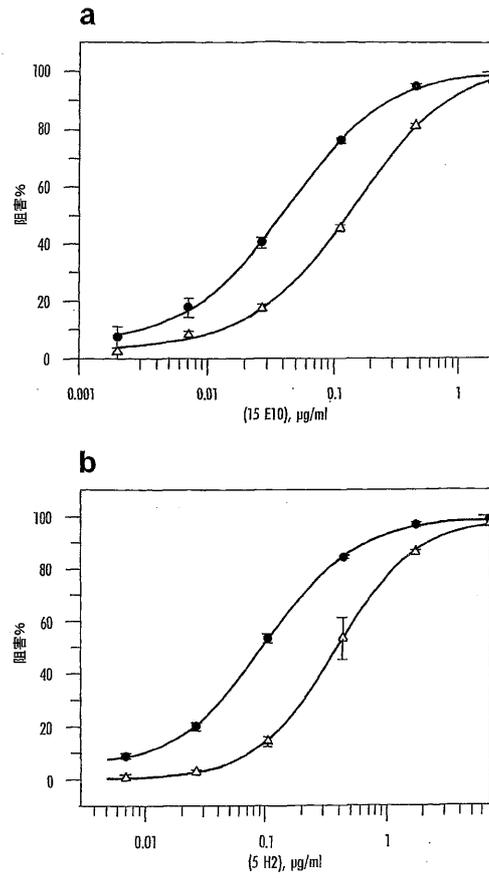
【 30 】



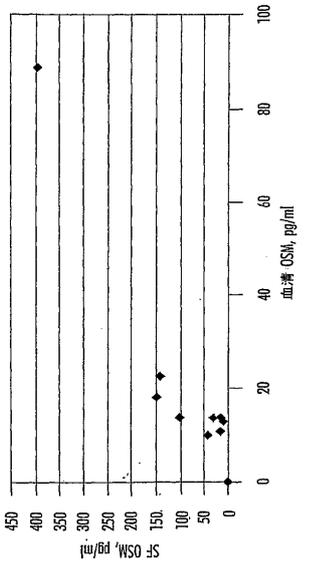
【 3 1 】



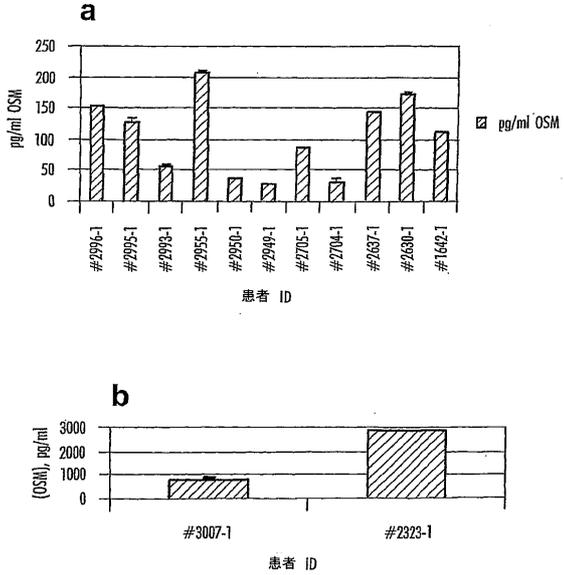
【 3 2 】



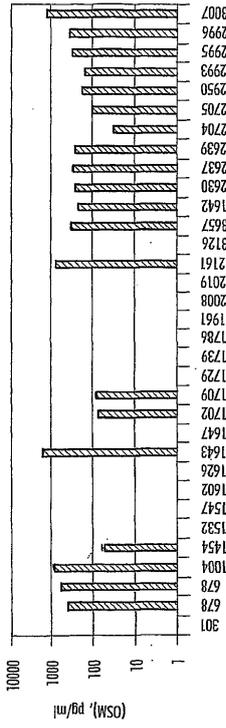
【 3 3 】



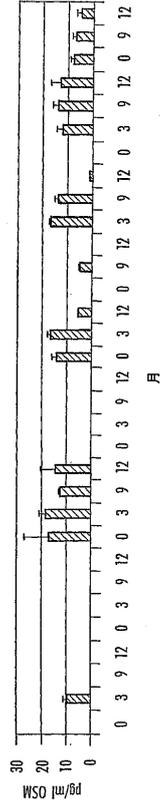
【 3 4 】



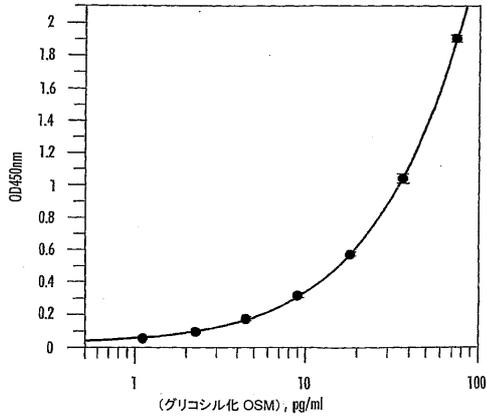
【 3 5 】



【 3 6 】



【 3 7 】



【配列表】

2007530068000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No  
PCT/GB2005/001147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/24 A61K39/395 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/48523 A (GLAXO GROUP LIMITED; LIFE, PAUL, FREDERICK) 30 September 1999 (1999-09-30) cited in the application claims 1-14; examples 6,9	1-73
A	OGATA I ET AL: "Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION. AUG 2000, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 750-757, XP002364877 ISSN: 1360-9947 abstract figure 7	1-73
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search  2 February 2006		Date of mailing of the international search report  14/02/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  van Klompenburg, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	Application No
	PCT/GB2005/001147

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CARROLL G ET AL: "Antagonism of the IL-6 cytokine subfamily--a potential strategy for more effective therapy in rheumatoid arthritis"</p> <p>INFLAMMATION RESEARCH, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 47, 1997, pages 1-7, XP002115636 ISSN: 1023-3830 the whole document</p> <p>-----</p>	1-73

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB 2005/001147**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claims 28-35,58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter ...	Application No
	PCT/GB2005/001147

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9948523	A	30-09-1999	
		AU 3046399 A	18-10-1999
		BR 9909077 A	05-12-2000
		CA 2325585 A1	30-09-1999
		CN 1295482 A	16-05-2001
		EP 1071449 A2	31-01-2001
		HU 0101690 A2	28-08-2001
		JP 2002507580 T	12-03-2002
		PL 343431 A1	13-08-2001
		US 6706266 B1	16-03-2004
		ZA 200005076 A	21-09-2001

## 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 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 25/28	
	A 6 1 P 25/04	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	C 0 7 K 16/24	

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

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 エリス, ジョナサン, ヘンリー

イギリス国 エスジー-1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 エオン-デュヴァル, アレクサンドル

イギリス国 エスジー-1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ゲルマシェウスキー, フォルカー

イギリス国 エスジー-1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 プランプトン, クリストファー

イギリス国 エスジー-1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ラブソン, ニコラス, ティモシー

イギリス国 エスジー-1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズウッド ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ウェスト, マイケル, ロバート

イギリス国 エスジー-1 2 エヌワイ ハートフォードシャー, スティーヴネイジ, ガンネルズウッド ロード, グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA56 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065	AA26X	AA90X	AA92X	AB01	AB05	AC14	BA02	BB14	BB37	CA25
	CA44	CA46								
4C085	AA13	AA14	AA15	AA16	AA34	BB12	BB17	BB36	BB41	BB43
	CC02	CC05	CC22	CC23	DD62	DD88	EE06			
4H045	AA11	CA40	DA76	EA20	EA50	FA74	GA26			

专利名称(译)	免疫球蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007530068A</a>	公开(公告)日	2007-11-01
申请号	JP2007505621	申请日	2005-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
[标]发明人	エリスジョナサンヘンリー エオンデュヴァルアレクサンドル ゲルマシエウスキーフォルカー プランプトンクリストファー ラブソンニコラスティモシー ウェストマイケルロバート		
发明人	エリス, ジョナサン, ヘンリー エオン-デュヴァル, アレクサンドル ゲルマシエウスキー, フォルカー プランプトン, クリストファー ラブソン, ニコラス, ティモシー ウェスト, マイケル, ロバート		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/46 A61K39/395 A61P29/00 A61P19/02 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P9/10 A61P35/00 A61P25/28 A61P25/04 A61P43/00 C07K16/24 C12N15/11 C12N15/63 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/04 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/248 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12P21/08 C07K16/46 A61K39/395.D A61K39/395.H A61K39/395.Y A61P29/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P9/10.101 A61P9/10 A61P35/00 A61P25/28 A61P25/04 A61P43/00.111 C07K16/24		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB14 4B065/BB37 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/AA34 4C085/BB12 4C085/BB17 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE06 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2004007197 2004-03-30 GB 2004007193 2004-03-30 GB		
其他公开文献	JP2007530068A5 JP4809828B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及免疫球蛋白，例如抗体，其特异性结合制瘤素M ( OSM ) ，特别是人OSM ( hOSM ) 并调节OSM和gp130之间的相互作用。进一步公开了药物组合物，筛选和医学治疗方法。

表1：15E10 および 10D3 マウスおよびキメラ抗体の IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 値

	gp130 ELISA	KB 細胞アッセイ
15E10 マウス	0.059	0.195
15E10 キメラ	0.036	0.110
10D3 マウス	0.107	0.114
10D3 キメラ	0.057	0.107