

(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2014-503177

(P2014-503177A)

(43) 公表日 平成26年2月13日(2014.2.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-530530 (P2013-530530)	(71) 出願人	506405437
(86) (22) 出願日	平成23年9月30日 (2011. 9. 30)		ツェンドゥー カンホン バイオテクノロ
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月22日 (2013. 5. 22)		ジーズ カンパニー リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/CN2011/001668		中華人民共和国, スーチョワン プロヴィ
(87) 国際公開番号	W02012/041018		ンス 6 1 0 0 3 6, ツェンドゥー シテ
(87) 国際公開日	平成24年4月5日 (2012. 4. 5)		ィ, ジンニェウ ディストリクト, シュー
(31) 優先権主張番号	201010297255.0	(74) 代理人	100075409
(32) 優先日	平成22年9月30日 (2010. 9. 30)		弁理士 植木 久一
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(74) 代理人	100129757
			弁理士 植木 久彦
		(74) 代理人	100115082
			弁理士 菅河 忠志
		(74) 代理人	100125243
			弁理士 伊藤 浩彰
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 抗体およびその抗原結合性フラグメント (F a b) およびその使用方法

(57) 【要約】

ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体およびその抗原結合性フラグメント (F a b) を開示する。更に、前記抗体またはその前記抗原結合性フラグメント (F a b) からなる組織、および腫瘍壊死因子 に関連する病気の治療における前記抗体またはその前記抗原結合性フラグメント (F a b) の使用を開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を含み、

前記重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 または 3 の配列で示され、

前記軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 15、9、11、7、13 および 5 の配列のいずれか一つで示され、且つ

前記配列番号 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンであることを特徴とするヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体または前記抗体の抗原結合性フラグメント Fab。

【請求項 2】

下記 a) ~ l) のいずれか一つであり、配列番号 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである請求項 1 に記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

a) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 15 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH08、を有する KS10。

b) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 9 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH05、を有する KS03。

c) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 11 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH06、を有する KS06。

d) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 15 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH08、を有する KS12。

e) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 9 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH05、を有する KS04。

f) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 11 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH06、を有する KS07。

g) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH03、を有する KS02。

h) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH04、を有する KS08。

i) 配列番号 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH02、および配列番号 13 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH07、を有する KS11。

j) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH03、を有する KS01。

k) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH04、を有する KS05。

l) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 SH01、および配列番号 13 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 SH07、を有する KS09。

【請求項 3】

重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を含み、

10

20

30

40

50

前記重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 27 の第 1 ~ 120 番目、または配列番号 25 の第 1 ~ 120 番目に相当し、

前記軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 の第 1 ~ 109 番目、または配列番号 29 の第 1 ~ 109 番目に相当する

ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗原結合性フラグメント F a b。

【請求項 4】

定常領域のアミノ酸配列がヒト抗体の重鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である重鎖、および

定常領域のアミノ酸配列がヒト抗体の軽鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である軽鎖から成る請求項 1 または 2 に記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

10

【請求項 5】

前記重鎖の定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 17 の配列で示され、且つ

前記軽鎖の定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 19 の配列で示される

請求項 1、2 または 4 に記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

【請求項 6】

前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 21 の配列で示され、

前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 23 の配列で示され、且つ

前記配列番号 21 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである請求項 1、2、4、および 5 のいずれか一つに記載のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体。

20

【請求項 7】

前記重鎖の可変領域および重鎖の定常領域 C H 1 から成る重鎖フラグメントと、

前記軽鎖の可変領域および軽鎖の定常領域から成る軽鎖から成り、

前記 C H 1 のアミノ酸配列はヒト抗体重鎖の定常領域 C H 1 のアミノ酸配列と同一であり、且つ

前記軽鎖の定常領域のアミノ酸配列はヒト抗体軽鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である請求項 1 または 3 に記載の抗原結合性フラグメント F a b。

【請求項 8】

前記 C H 1 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 33 の配列で示され、且つ

前記軽鎖の定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 19 の配列で示される

請求項 1、3 または 7 のいずれかに記載の抗原結合性フラグメント F a b。

30

【請求項 9】

下記 b 1) ~ b 3) のいずれか一つである請求項 3、7 または 8 のいずれかに記載の抗原結合性フラグメント F a b。

b 1) K S - 7 F : 前記重鎖フラグメントのアミノ酸配列は配列表の配列番号 27 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 で示される。

b 2) K S - 7 A : 前記重鎖フラグメントのアミノ酸配列は配列表の配列番号 25 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 で示される。

b 3) K S - 2 E : 前記重鎖フラグメントのアミノ酸配列は配列表の配列番号 25 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 29 で示される。

40

【請求項 10】

抗原結合性フラグメント A は F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントであり、

抗原結合性フラグメント B は F a b'、F (a b')₂、F v、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントである

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれかに記載の抗体に由来する抗原結合性フラグメント A、または

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれかに記載の F a b に由来する抗原結合性フラグメント B。

50

【請求項 1 1】

下記 A) ~ C) のいずれか一つのタンパク質をコードする遺伝子。

A) 請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体。

B) 請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b。

C) 請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 2】

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、および配列表の配列番号 2 または 4 の配列で示される請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント A、の重鎖の可変領域のコード配列、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、および配列表の配列番号 16、10、12、8、14 および 6 のいずれか一つの配列で示される請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント A、の軽鎖の可変領域のコード配列、

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b、および配列表の配列番号 2、4、28、および 26 のいずれか一つの配列の第 1 ~ 360 番目と同一の請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント B、の重鎖の可変領域のコード配列、または

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b、および配列表の配列番号 16、10、12、8、14、6、32、および 30 のいずれか一つの配列の第 1 ~ 327 番目に相当する請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント B、の軽鎖の可変領域のコード配列、

である請求項 11 に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 1 3】

前記抗体の重鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 18 の配列で示され、且つ

前記抗体の軽鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 20 の配列で示され、

前記 F a b の C H 1 のコード配列は配列表の配列番号 34 の配列で示され、且つ

前記 F a b の軽鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 20 の配列で示される

請求項 11 または 12 に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 1 4】

前記抗体の重鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 22 の配列で示され、且つ

前記抗体の軽鎖の定常領域のコード配列は配列表の配列番号 24 の配列で示され、

請求項 3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の F a b のコード配列は、下記 c 1) ~ c 3) のいずれか一つである

請求項 11 ~ 13 のいずれか一つに記載のタンパク質をコードする遺伝子。

c 1) K S - 7 F : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 28 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 32 で示される。

c 2) K S - 7 A : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 26 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 32 で示される。

c 3) K S - 2 E : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 26 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 30 で示される。

【請求項 1 5】

遺伝子材料であって、

請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子を含む

組み換えベクター、組み換え菌、組み換え細胞株、組み換えウイルス、または発現カセットである遺伝子材料。

【請求項 1 6】

前記組み換えベクターは、前記 F a b、抗体、または抗原結合性フラグメントを発現させるための原核生物または真核生物発現ベクターであり、

前記組み換え菌は、前記遺伝子を有する大腸菌であり、

前記組み換え細胞株は、前記遺伝子を組み込んだ哺乳動物細胞株であり、

前記細胞株は好ましくは C H O 細胞株、または 293 細胞株およびその亜系統であり、

前記組み換えウイルスは、前記遺伝子を運搬する組み換えアデノウイルスまたはアデノ

10

20

30

40

50

随伴ウイルスである

請求項 15 に記載の遺伝子材料。

【請求項 17】

d 1) ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気の予防および / または治療のための薬の調整

d 2) ヒト腫瘍壊死因子 を中和するための生成物の調整、または

d 3) ヒト腫瘍壊死因子 を定性的もしくは定量的に検出するためのキットの調整のための、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の Fab、

請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント、

請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子、または

請求項 15 または 16 に記載の遺伝子材料、

の使用方法。

10

【請求項 18】

補助材料および有効成分を含み、

前記有効成分は、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の Fab、

請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント、

請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子、および

請求項 15 または 16 に記載の遺伝子材料の少なくとも一つを含み、

前記補助材料は薬学的に許容できる担体または賦形剤である

医薬組成物。

20

【請求項 19】

ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気の治療での材料の使用方法であって、

請求項 1、2、4、5 および 6 のいずれか一つに記載の抗体、

請求項 1、3、7、8 および 9 のいずれか一つに記載の Fab、

請求項 10 に記載の抗原結合性フラグメント、

請求項 11 ~ 14 のいずれか一つに記載の遺伝子、

請求項 15 または 16 に記載の遺伝子材料、および

請求項 18 に記載の医薬組成物

のいずれか一つの材料の使用方法。

30

【請求項 20】

前記ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、ヒト腫瘍壊死因子 の増加が原因の病気であり、前記病気として好ましくは、関節リウマチ、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である請求項 17 または 19 に記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 (TNF-) 抗体およびその抗原結合性フラグメント (Fab) およびその使用方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

自己免疫疾患の発症および進行は、多くの活性サイトカインの制御のアンバランスが起因となる複雑な過程を経る。腫瘍壊死因子 (TNF-) は多数のサイトカインの中で免疫調節に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、その過剰発現は自己免疫疾患などの主要因の一つであることが実証されている。従って腫瘍壊死因子 の活性を抑える生物医薬品の使用は、このような疾病の治療に最も成功した治療の一つになっている。

50

主として承認された適応症は、関節リウマチ、クローン病、ブランク乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎および若年性特発性関節炎を含み、その一方で様々な他の関連疾患について臨床試験が行われている。

【0003】

現在、ヨーロッパおよび米国市場では、Remicadeのような抗腫瘍壊死因子抗体薬剤および抗体様Fc融合タンパク質が入手できる。しかし、Remicadeの生体内での半減期は、およそ9日であり短い。更に、Remicadeは抗原との結合親和力、生物活性および臨床適用があり、配列の1/3がマウス由来配列、および配列の2/3がヒト由来配列からなるキメラ抗体であり、患者の約10%~47%はRemicadeの投与後に免疫反応が起き、一般に、ヒト抗マウス抗体(HAMA)の産生をもたらし、抗体の性能および長期適用に影響する。従って、マウス由来率を減少させ、人の病気の治療の際に安全に使用できるように、より高度のヒト化と、マウス由来配列の割合を最大限に減少させた抗腫瘍壊死因子抗体が要求されている。抗体をヒト化する一般的な過程は、事前に選択したヒト化抗体のフレームワーク領域の中へ、マウス由来抗体の可変領域(V_H 、 V_K)の相補性決定領域(CDR)の部分を組み込む過程である。その合成抗体は、ほぼヒト由来配列からなり、同じ抗原に対して当初のマウス由来抗体の選択性を保持することができる。しかし、その過程は、一般に抗体親和性の減少をもたらす。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明の目的の一つは、ヒト腫瘍壊死因子に対する親和性が、ヒト-マウスキメラ抗体であるRemicadeと同等か、またはそれより高い、ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子抗体および前記抗体の抗原結合性フラグメント(Fab)を提供することにある。

20

【0005】

本発明に係るヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子抗体またはFabは、重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を含み、前記重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号1または3の配列で示され、前記軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号15、9、11、7、13および5の配列のいずれか一つで示され、且つ前記配列番号1の第1番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである。

【0006】

詳細には、前記抗体は下記a)~l)のいずれか一つから選ばれ、配列番号1の第1番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである。a)配列番号1の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH01、および配列番号15の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH08を有するKS10、b)配列番号1の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH01、および配列番号9の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH05を有するKS03、c)配列番号1の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH01、および配列番号11の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH06を有するKS06、d)配列番号3の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH02、および配列番号15の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH08を有するKS12、e)配列番号3の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH02、および配列番号9の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH05を有するKS04、f)配列番号3の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH02、および配列番号11の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH06を有するKS07、g)配列番号3の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH02、および配列番号5の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH03を有するKS02、h)配列番号3の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH02、および配列番号7の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域SH04を有するKS08、i)配列番号3の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域SH02、および配列番号13の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の

30

40

50

可変領域 S H 0 7 を有する K S 1 1、j) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、および配列番号 5 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 3 を有する K S 0 1、k) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、および配列番号 7 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 4 を有する K S 0 5、l) 配列番号 1 の配列で示されるアミノ酸配列を有する重鎖の可変領域 S H 0 1、および配列番号 1 3 の配列で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖の可変領域 S H 0 7 を有する K S 0 9。

【0007】

本発明の他の目的は、ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗原結合性フラグメント F a b を提供することにある。前記 F a b は、重鎖の可変領域のアミノ酸配列が配列表の配列番号 2 7 または配列番号 2 5 の第 1 ~ 1 2 0 番目に相当する重鎖、および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 1 または配列番号 2 9 の第 1 ~ 1 0 9 番目に相当する軽鎖、を含む。

10

【0008】

本発明で提供する抗体は、定常領域のアミノ酸配列がヒトの重鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である重鎖、および定常領域のアミノ酸配列がヒトの軽鎖の定常領域のアミノ酸配列と同一である軽鎖から成る。

【0009】

前記抗体の重鎖定常領域は、いずれかのクラス (I g G、I g A、I g M、I g E、I g D) またはサブクラス (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M 1、I g M 2、I g A 1、I g A 2) のヒト由来定常領域であっても良く、前記抗体の軽鎖定常領域は、ヒト由来定常領域のいずれかのクラス (または) 若しくはサブクラス (1、2、3、4) 又はアロタイプ (m (1)、m (2)、m (3)) であっても良い。

20

【0010】

前記抗体の重鎖の定常領域のアミノ酸配列は詳細には配列表の配列番号 1 7 の配列で示され、且つ前記抗体の軽鎖の定常領域のアミノ酸配列は詳細には配列表の配列番号 1 9 の配列で示される。

【0011】

前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 1 の配列で示され、前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 2 3 の配列で示される。配列番号 2 1 の第 1 ~ 1 2 0 番目のアミノ酸配列は前記重鎖の可変領域に相当し、且つ第 1 2 1 ~ 4 5 0 番目のアミノ酸配列は前記重鎖の定常領域に相当する。配列番号 2 3 の第 1 ~ 1 0 9 番目のアミノ酸配列は前記軽鎖の可変領域に相当し、且つ第 1 1 0 ~ 2 1 4 番目のアミノ酸配列は前記軽鎖の定常領域に相当する。前記、配列番号 2 1 の第 1 番目のアミノ酸はグルタミン酸またはグルタミンである。

30

【0012】

本発明で提供する F a b は、重鎖 F d フラグメントおよび軽鎖から成り、前記重鎖 F d フラグメントは V_H と C H 1 を含み、前記軽鎖は V_K および軽鎖定常領域を含み、前記 C H 1 のアミノ酸配列はヒト抗体重鎖の C H 1 定常領域のアミノ酸配列と同一であり、且つ、前記軽鎖定常領域のアミノ酸配列はヒト抗体軽鎖の定常領域と同一である。

40

【0013】

前記 F d の F d フラグメントの C H 1 は、いずれかのクラス (I g G、I g A、I g M、I g E、I g D) またはサブクラス (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M 1、I g M 2、I g A 1、I g A 2) のヒト由来の C H 1 定常領域であっても良い。前記 F a b の軽鎖定常領域は、いずれかのクラス (または) またはサブクラス (1、2、3、4) またはアロタイプ (m (1)、m (2)、m (3)) のヒト由来の軽鎖定常領域であっても良い。

【0014】

C H 1 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 3 3 の配列で示され、前記軽鎖定常領域のア

50

ミノ酸配列は配列表の配列番号 19 の配列で示される。

【0015】

本発明の特定の実施形態では、前記 F a b は、下記 b 1) ~ b 3) のいずれか一つである。

b 1) K S - 7 F : 前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 27 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 で示される。

b 2) K S - 7 A : 前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 25 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 31 で示される。

b 3) K S - 2 E : 前記重鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 25 で示され、且つ前記軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号 29 で示される。

10

【0016】

本発明の更に別の目的は、抗原結合性フラグメント A または抗原結合性フラグメント B を提供することであり、前記抗原結合性フラグメント A は F a b、F a b'、F (a b')₂、F v (抗体の可変領域フラグメント)、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントであり、これらは前記抗体に由来し、前記抗原結合性フラグメント B は F a b'、F (a b')₂、F v、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントまたは軽鎖の可変領域から選ばれたポリペプチドフラグメントであり、これらは前記 F a b に由来する。

【0017】

前記 F (a b')₂ は、軽鎖 1 対および F d より僅かに大きい重鎖 (F d' と称される) 1 対を含む。ペプシンによる I g G 分子の加水分解は F (a b')₂ フラグメントを産生し、F (a b')₂ は 2 つの F a b を含み、そのため 2 つの抗原エピトープと結合することができる。F d' は約 235 アミノ酸残基を含み、V_H、C H 1、およびヒンジ領域を含む。F v は軽鎖の可変領域 (V_L) および重鎖の可変領域 (V_H) から成り、それらは非共有結合により会合している。F v は単一の抗原結合部位を有し、F v の分子量は完全な抗体分子の約 6 分の 1 の分子量である。F v は S c F v (単一鎖の抗体)、D s F v (ジスフィルド結合安定化抗体) 等を含む。S c F v は、1 つの適切なオリゴヌクレオチド (リンカー) により結合した V_H および V_L からできる 1 つのペプチド鎖である。D s F v は、軽鎖および重鎖の可変領域の適切な部位にそれぞれ 1 つのシステインを導入することにより形成された、ジスルフィド結合固定 F v フラグメントである。D s F v は、S c F v よりも結合能および安定性に優れていることが示されている。

20

30

【0018】

更に、次のタンパク質 A) ~ C) のうち、いずれか 1 つをコードする遺伝子は、特許請求の範囲に含まれる。A) 前記抗体、B) 前記 F a b、C) 抗原結合性フラグメント A または B。

【0019】

抗体および抗原結合性フラグメント A の両方の重鎖可変領域のコード配列は配列表の配列番号 2 または 4 で示される。抗体および抗原結合性フラグメント A の両方の軽鎖可変領域のコード配列は、配列表の配列番号 16、10、12、8、14 および 6 のうちの 1 つから選ばれる。F a b および抗原結合性フラグメント B の両方の重鎖可変領域のコード配列は、配列表の配列番号 2、4、28 のいずれかの配列の第 1 ~ 360 番目および配列番号 26 の配列の第 1 ~ 360 番目に相当する。F a b および抗原結合性フラグメント B の両方の軽鎖可変領域のコード配列は配列表の配列番号 16、10、12、8、14、6、32 のいずれかの配列の第 1 ~ 327 番目、および配列番号 30 の第 1 ~ 327 番目に相当する。

40

【0020】

前記配列において、配列番号 6、8、14、10、12 および 16 は全て 327 ヌクレオチドを有する一方、配列番号 2、4 は 360 ヌクレオチドを有する。

【0021】

50

抗体の重鎖定常領域のコード配列は、配列表の配列番号 18 で示され、抗体の軽鎖定常領域のコード配列は、配列表の配列番号 20 で示される。

【0022】

F a b の C H 1 領域のコード配列は、配列表の配列番号 34 で示され、F a b の軽鎖定常領域のコード配列は配列表の配列番号 20 で示される。

【0023】

本発明の実施態様では、抗体の重鎖のコード配列は詳細には配列表の配列番号 22 で示され、抗体の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 24 で示される。

【0024】

前記 F a b のコード配列は以下、c 1) ~ c 3) のいずれか一つである。

c 1) K S - 7 F : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 28 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 32 で示される。

c 2) K S - 7 A : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 26 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 32 で示される。

c 3) K S - 2 E : F a b の重鎖フラグメントのコード配列は配列表の配列番号 26 で示され、且つ F a b の軽鎖のコード配列は配列表の配列番号 30 で示される。

【0025】

配列番号 22 の第 1 ~ 360 番目および 360 ~ 1350 番目の位置のヌクレオチドは前記重鎖の可変領域の配列および重鎖の定常領域の配列にそれぞれ相当する一方、配列番号 24 の第 1 ~ 327 番目および第 328 ~ 642 番目の位置のヌクレオチドは、前記軽鎖の可変領域の配列および軽鎖の定常領域の配列にそれぞれ相当する。

【0026】

本発明の別の目的は、次の遺伝子材料を提供することにある。遺伝子材料は、前記遺伝子セットを含む、組み換えベクター、組み換え菌、組み換え細胞株、組み換えウイルス、または発現カセットである。

【0027】

組み換えベクターは、抗体、F a b、または抗原結合性フラグメントを発現する、原核生物または真核生物発現ベクターである。組み換え菌は、前記遺伝子セットを有する大腸菌 (*Escherichia coli*) である。組み換えの細胞株は、遺伝子組み換え細胞株が融合細胞株であり、遺伝子組み換え細胞株は、本発明のヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体、F a b、抗原結合性フラグメントをコードする遺伝子をトランスファーした哺乳動物細胞株であっても良く、好ましくは、C H O 細胞株、または 293 細胞株およびその亜系統である。融合細胞株は本発明の前記ヒト化抗ヒト腫瘍壊死因子 抗体を分泌できるハイブリドーマ細胞である。組み換えウイルスは組み換えアデノウイルスまたは組み換えのアデノ随伴ウイルス等であり、前記遺伝子セットを運搬する。発現カセットは、上流から下流に、プロモーター、プロモーターより転写が開始される抗体または F a b または抗原結合性フラグメント、およびターミネーターの 3 つのフラグメントを含む D N A 分子である。

【0028】

宿主細胞を、抗体、F a b、または抗原結合性フラグメントをコードする遺伝子を含む組み換えベクターにより、トランスフェクトまたはトランスフォームすると、対応するタンパク質が発現され、抗体、F a b、抗原結合性フラグメントが得られる。前記宿主細胞は、哺乳動物細胞を含むが、これに限られず、バクテリア、酵母、昆虫細胞等を含む、真核細胞であっても良いし、原核細胞であっても良い。大量のタンパク質発現に有用である哺乳動物細胞は多種多様存在し、293、C H O、S P 2 0、N S 0、C O S、B H K、または P e r C 6 細胞等である。細胞をトランスフェクトする方法は多様であり、電気穿孔、リポソーム媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションなどを含むが、これらに限定されない。

【0029】

抗体、F a b、または抗原結合性フラグメントの好ましい発現方法は以下の通りである

。組換え型タンパク質の発現量を増加させるために、安定してトランスフェクトした宿主細胞中の組み換えベクターにより遺伝子増幅を行なう。例えば、D H F R 欠損宿主細胞は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (D H F R) を含む組み換えのベクターで安定してトランスフェクトされ、次にメトトレキサート (M T X) は、宿主細胞中の組み換えベクターのコピー数を増加させるのに十分な濃度で、細胞培養液へ加えることができる。

【 0 0 3 0 】

コーディング遺伝子配列の組み合わせから成る F a b または I g G の発現の後に、酵素免疫測定法 (E L I S A) または他の測定により、培地中のタンパク質濃度を決定することができる。F a b フラグメントについては、プロテイン G を使用して、アフィニティークロマトグラフィーで精製することができる。また、I g G タンパク質はプロテイン A を使用して、アフィニティークロマトグラフィーで精製することができる。

10

【 0 0 3 1 】

更に、抗体、F a b、抗原結合性フラグメント、遺伝子、以下の遺伝子材料の使用方法も特許請求の範囲に含む。

d 1) ヒト腫瘍壊死因子 に関連した病気の予防および / または治療のための薬の調整、または、

d 2) ヒト腫瘍壊死因子 を中和するための生成物の調整、または

d 3) ヒト腫瘍壊死因子 を定性的もしくは定量的に検出するためのキットの調整。

【 0 0 3 2 】

ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、ヒト腫瘍壊死因子 の増加により引き起こされる病気であり、前記病気として好ましくは、関節リウマチ、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である。

20

【 0 0 3 3 】

本発明の更に別の目的は、補助材料および有効成分を含む医薬組成物を提供することであり、有効成分は、前記の抗体、F a b、抗原結合性フラグメント、遺伝子、および遺伝物質の材料のうち少なくとも 1 つを含み、補助材料は薬学的に許容可能な担体または賦形剤である。医薬組成物の中の有効成分は、前記の F a b または抗体のいずれか一つであっても良いし、前記の抗原結合性フラグメントのいずれか一つであっても良いし、前記の遺伝子のいずれか一つであっても良いし、前記の遺伝子材料のいずれか一つであっても良い。

30

【 0 0 3 4 】

更に特許請求の範囲には、ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気の治療での、前記の抗体、F a b、抗原結合性フラグメント、遺伝子、遺伝子材料、および医薬組成物の材料のうちいずれか一つの使用も含まれる。

【 0 0 3 5 】

ヒト腫瘍壊死因子 に関連する病気は、ヒト腫瘍壊死因子 の増加によって引き起こされ、前記病気として好ましくは、自己免疫性ぶどう膜炎、関節リウマチ、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 6 】

【 図 1 】 図 1 は、腫瘍壊死因子 の抑制下での、ヒト化 F a b の生物活性の E L I S A による検出結果を示す。

【 図 2 】 図 2 は、腫瘍壊死因子 の中和下における L 9 2 9 細胞毒性試験による、ヒト化 F a b の生物活性の検出結果を示す。

【 図 3 】 図 3 は、異なる種の腫瘍壊死因子 抗原に対する K S 1 0 の結合解析の結果を示す。

【 図 4 】 図 4 は、K S 1 0 を用いた関節リウマチ試験用ラットの治療に関するスコアを示す。左から順に、正常群、負対照群、モデル群、K S 1 0 5 m g / k g 群、K S 1 0

50

10 mg / kg 群、KS10 20 mg / kg の群、を示す。

【図5】図5は、関節リウマチ試験用ラットの関節の滑液/組織中のIL-1 レベルに対するKS10の影響を示す。左から順に、正常群、負対照群、モデル群、KS10 5 mg / kg 群、KS10 10 mg / kg 群、KS10 20 mg / kg の群、を示す。

【図6】図6は、関節リウマチ試験用ラットの関節の滑液/組織中のIL-6レベルに対するKS10の影響を示す。左から順に、正常群、負対照群、モデル群、KS10 5 mg / kg 群、KS10 10 mg / kg 群、KS10 20 mg / kg の群、を示す。

【実施例】

【0037】

以下、発明の理解を助けるために実施例を示すが、本発明の範囲がこれらによって制限されるものではない。特に記載していない限り、以下に記載の実験方法はすべて従来の実験的方法である。特に記載していない限り、実施例の中で使用される実験材料はすべて、生化学試薬の一般的な店で購入可能である。以下の実施例の定量試験は3回繰り返して行い、結果は平均値である。

10

【0038】

ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の重鎖および軽鎖のCDRの接合、PCRによる特定部位の変異誘発、および本発明で述べる突然変異体ライブラリーのスクリーニングを、従来の遺伝子組換え技術および抗原抗体相互作用に基づく免疫学技術によって行い、更に、詳細な実験の手順および手段は、Joseph Sambrook, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Science Press, 3rd edition および同様の実験ハンドブックに記載されている。以下の実施例におけるEC₅₀を、結果のグラフを作成中に、ソフトウェアGraphPad Prism5に光学濃度(OD₄₅₀)の値を入力することにより得た。

20

【0039】

実施例1：ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体のFabの発現とその活性の検出

本実施例では、ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体の3つのFab (Fabは重鎖Fdフラグメントと抗体の軽鎖から成る)、即ちKS-2E, KS-7A, およびKS-7Fを含む。

【0040】

手順1. KS-2E, KS-7A および KS-7F の発現ベクターの作成

30

(1) 軽鎖および重鎖の配列の取得

ヒトの腫瘍壊死因子 (R&D社, カタログ番号: 210-TA-050) の免疫性を付与したマウスから、ハイブリドーマ細胞を得て、モノクローナルスクリーニングを行い、全RNAを抽出し、テンプレートとして用い、重鎖可変領域のヌクレオチド配列を一般的なプライマーである、P1: 5' - GCGAATTCAAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG - 3'、P2: 5' - TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCCAG - 3' を用い、PCRにより増幅し、且つ軽鎖可変領域のヌクレオチド配列は、一般的なプライマーP3: 5' - GACATTCCTGMTSACMCAGMCTCC - 3'、P4: 5' - GTTAGATCTCGAGCTTGGTCCC - 3' を用い、PCRにより増幅した。目的のバンドを含むゲル断片を、回収のために切り取った。抗体の軽鎖および重鎖の増幅産物は夫々、ベクターpMD18-T (Takara社、カタログ番号: D101C) に挿入した。単一のコロニーを別々に選び、抗体の重鎖および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列を確認するためにシーケンシングを行った。

40

【0041】

(2) ヒト化Fabの作成

アミノ酸配列の相同性の比較は、生成物の軽鎖可変領域とヒト化抗体の軽鎖可変領域、および、生成物の重鎖可変領域とヒト化抗体の重鎖可変領域とを比較した。配列相同性は、IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)、およびIMGT (ImmunoGenetics, IMGT: <http://www.imgt.org>) で夫々検索した。検索結果に基づいて、軽鎖および重鎖

50

共に相同性の高い配列を有する抗体をヒト化抗体のテンプレートとして選んだ。生成物の重鎖可変領域VHを、より配列の相同性が高いヒト化抗体IGHV3-15*07(登録番号:M99406)のフレームワーク領域へ接合し、生成物の軽鎖可変領域VKは、より配列の相同性が高いヒト化抗体IGKV6-21*01(登録番号:X63399)のフレームワーク領域へ接合した。

【0042】

ヒト由来重鎖フラグメント(Fd)および軽鎖の多数の変異サイクルの後、様々な軽鎖および重鎖破片(Fd)の組み合わせを、ベクターpTLR(a modified pET22b(+))vector)に挿入した。詳細には、各末端に制限酵素サイトBamHIおよびEcoRIを夫々有する軽鎖用の様々なDNA、および各末端に制限酵素サイトNotIおよびXhoIを夫々有する重鎖Fdフラグメント用の様々なDNAを準備した。DNAの2群を、夫々ベクターpTLRの対応する制限酵素サイト間へ移動、即ち、軽鎖用の様々なDNAを制限酵素サイトBamHIおよびEcoRIの間に挿入し、重鎖フラグメント(Fd)用の様々なDNAを、制限酵素サイトNotIおよびXhoIの間に挿入し、様々なFab発現ベクター(KS-2E、KS-7A、KS-7F、を夫々発現する3つのFab発現ベクターを含む)を作成した。

10

【0043】

前記した軽鎖および重鎖フラグメント(Fd)の様々な組み合わせは、3つのFab KS-2E、KS-7A、およびKS-7Fを含む。KS-2Eの重鎖フラグメントのアミノ酸配列は、配列表の配列番号25で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号26で示され、且つ、KS-2Eの軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号29で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号30で示される。KS-7Aの重鎖フラグメントのアミノ酸配列は、配列表の配列番号25で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号26で示され、且つKS-7Aの軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号31で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号32で示される。KS-7Fの重鎖フラグメントのアミノ酸配列は、配列表の配列番号27で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号28で示され、且つKS-7Fの軽鎖のアミノ酸配列は配列表の配列番号31で示され、そのヌクレオチド配列は配列番号32で示される。

20

【0044】

前述のpTLRベクターを得るためのpET22b(+))ベクター組み換え手順の詳細は、以下の通りである。第1に、DNA断片(T-L-R DNA塩基配列に短縮され、配列表の配列番号35で示される)を、人工的に合成し、それは両末端に制限酵素サイトSalIおよびNotIを有するT7プロモーター、ラクトース・オペレーターおよびリボソーム結合部位(RBS)を含み、pET22b(+))ベクター(ovage社製、アメリカ)およびT-L-R DNA塩基配列を、SalIおよびNotI制限酵素の両方で夫々切断し、その後、T4 DNAリガーゼにより結合シトランスフォームし、最後に単一コロニーを従来方法により選び、適切に組み換えベクターを選びシーケンシングを行った。

30

【0045】

手順2. KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fの原核生物の発現
E. coli株Top10に上述の作成したFab発現ベクター(KS-2E、KS-7A、KS-7F、を夫々発現する3つのFab発現ベクターを含む)をトランスフォームし、その後、クロラムフェニコールと共に2-YTプレート(ペプトン1.6%、酵母エキス1%、NaCl 0.5%、および寒天末1.5%)上に蒔いた。翌日、いくつかの単一コロニーを選択するために適切なコロニー密度のプレートを選んだ。各陽性のコロニーから、8つの単一コロニーを選び、96穴ディープウェルプレートに蒔き、発現用のIPTGを用いて誘導した。各単一コロニーを、クロラムフェニコールを含む6mLの2-YT液体培地(ペプトン1.6%、酵母エキス1%、およびNaCl 0.5%)入りのチューブに加え、37℃、12時間、250rpmで振とうした。細菌懸濁液の0.2μLを各チューブからピペットで取り、保管のためにクロラムフェニコールを含む2-Y

40

50

Tプレート上に移した。5 mLの細菌懸濁液を、500 mLのクロラムフェニコール含有2-YT液体培地に播種し、OD₆₀₀が0.6に達するまで、33、300 rpmで培養した。IPTGは3時間の誘導時間で様々なFabの発現を誘導させるために、培地へ最終濃度50 μg/mLの濃度で加えた。誘導した発現が完了した後に、培地を10、15分間、5100 rpmで遠心分離した。上清を廃棄し、バクテリアの沈殿を40 mLの予冷したTES溶液で完全に再懸濁した。水で20%まで薄め予冷したTES 66 mLを、再懸濁したバクテリアの溶液へ再び加え、氷上で40分間インキュベートし、その後、4、10分、13000 rpmで遠心分離した。遠心分離の後、Fabタンパク質(KS-2E、KS-7A、またはKS-7Fタンパク質)を含むペリプラズム抽出物である上清を集めた。ペリプラズム抽出物をG-25(GE社、17-0034-01)カラムを通して、脱塩した。プロテインG(GE社、17-0618-04)充填済みカラムを準備し、平衡溶液(20 mMリン酸緩衝液、pH 6.5)で平衡にし、タンパク質サンプルをロードした。サンプルのロード後、カラムを平衡溶液で連続して洗い、次に平衡溶液(0.1 M Gly-HCl、pH 2.5)で直接的に溶出した。溶出画分を集め、その収集前に分画収集チューブに1.0 M トリス塩酸緩衝液(pH 9.0)を、トリス緩衝液と溶出画分が1:9の体積比率となるように添加しておき、溶出画分をpH 7.0に迅速に調節した。収集した液体は目的のタンパク質を含む。タンパク質の純度をSDS-PAGEによって分析し、タンパク質サンプル中のタンパク質濃度を測定した。最後に、タンパク質サンプルをサブパッケージし、-80℃で保管し、これにより、高純度のFabタンパク質(3つのタンパク質、KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fを含む)を得た。

10

20

【0046】

手順3. KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fの生物活性の測定

1) ELISAによる腫瘍壊死因子へのヒト化Fabの結合分析

腫瘍壊死因子に結合するFabを次の手順によりスクリーニングした。ELISAプレートを、1ウェルあたり基質として100 ngのヒト由来腫瘍壊死因子(R&D社、カタログ番号: 210-TA-050)でコーティングした。Fabタンパク質(手順2で準備した、3つのタンパク質、KS-2E、KS-7AおよびKS-7Fを含む)40 nMを2倍希釈したものを添加し、インキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトC-Kappa二次抗体(シグマ社、カタログ番号: K3502)を加え、最後に、TMBを反応の進行のために加え、2 M硫酸は反応を止めるために入れ、これにより、腫瘍壊死因子結合Fabタンパク質を測定した。このようなスクリーニング手順により、高い活性の3つのFabを得た。それはKS-2E、KS-7FおよびKS-7Aであり、これらのタンパク質は全体で2つの異なるVH(VH01およびVH02; VH01のアミノ酸配列は配列番号25で示され、ヌクレオチド配列は配列番号26で示され、VH02のアミノ酸配列は配列番号27で示され、ヌクレオチド配列は配列番号28で示される)、および2つの異なるVK(VK03およびVK05; VK03のアミノ酸配列は配列番号29で示され、且つそのヌクレオチド配列は配列番号30で示され、VK05のアミノ酸配列は配列番号31で示され、且つヌクレオチド配列は32で示される(表1))を含む。

30

【0047】

ELISAによる腫瘍壊死因子へのヒト化Fab結合能の試験結果を図1に示す。その結果が示すように、前記の得られた3つのヒト化Fabは、ヒト-マウスキメラ抗体であるRemicadeのFabフラグメントと同様に抗原親和性を示し、その中でKS-7AおよびKS-7Fは腫瘍壊死因子への結合に関するEC₅₀値において、ヒト-マウスキメラ抗体RemicadeのFabフラグメントよりも優れている(表2)。

40

【0048】

【表 1】

ヒト化抗腫瘍壊死因子 α 抗体のF a b

F a bフラグメント	VH	VK
KS-2E	VH01	VK03
N/A	VH02	VK03
KS-7F	VH01	VK05
KS-7A	VH02	VK05

注：N/Aは、弱い活性のためF a bフラグメントが特定されなかったことを示す。

10

【 0 0 4 9 】

【表 2】

E L I S Aによる、ヒト化抗腫瘍壊死因子 α 抗体のF a b
の腫瘍壊死因子 α への結合に関するE C₅₀

サンプル	EC ₅₀ (nM)
Remicade Fab	3.324
KS-2E	6.659
KS-7A	3.027
KS-7F	2.740

20

注：表2のデータは3回の実験の平均値。

【 0 0 5 0 】

2) L 9 2 9細胞毒性試験による腫瘍壊死因子 抑制中のヒト化F a bの生物活性の検出

更に、腫瘍壊死因子 の中和における前記の3つのヒト化F a b (K S - 2 E、K S - 7 FおよびK S - 7 A)の生物活性は、細胞生物学実験であるL 9 2 9細胞毒性試験で検証した。この実験では、対数増殖期の 1×10^4 個のL 9 2 9細胞を、96穴プレートのD M E M (1 0 % F B S、G i b c o社)培地中に播種した。24時間後に、ヒト由来腫瘍壊死因子 (R & D社、カタログ番号：2 1 0 - T A - 0 5 0)を0.5 ng / mL、およびアクチノマイシンD (F l u k a)を0.5 μ g / mL加えた。細胞を4つの群に分け、前記の3つのヒト化F a b、および対照の抗体R e m i c a d eのF a bフラグメントを各群にそれぞれ添加し、細胞を別途24時間培養した。最後に、細胞の生存率をC C K 8キット (D o j i n d o研究所)で分析した。結果を図2に示す。この結果は、前記の3つのヒト化F a bは、腫瘍壊死因子 を効率的に中和する生物活性を発揮できることを示し、その中で、腫瘍壊死因子 の中和においてK S - 7 Aの生物活性は、ヒト-マウスメラ抗体R e m i c a d eのF a bフラグメントの生物活性よりも優れていた。図2のデータは、3回行った実験の平均値 \pm 標準偏差である。

30

40

【 0 0 5 1 】

実施例2：ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体のF a bのC D R 3に関する親和性成熟ライブラリーの作成

更に、前記のヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体のF a bフラグメントの抗原への親和性を増加させるために、ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体のF a bの発現ベクター内の、重鎖V H 0 2 C D R 3および軽鎖V K 0 5 C D R 3の親和性成熟ライブラリーを別々に作成した。重鎖と軽鎖のC D R 3領域は、抗体の抗原への結合のために最も重要な領域であるので、C D R 3領域の部位飽和変異誘導を行いスクリーニングすることが、より高い親和性を有する抗体作成につながる可能性がある。重鎖および軽鎖のC D R 3の部位飽和変異誘導ライブラリーの作成のために、部位特異的変異誘導のための一組のプライマーを設計し、

50

PCR反応で使用した。PCR反応により増幅した反応生成物は、一組のプライマーと同一の縮重比率で共に混在しており、ヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの発現ベクターにクローニングした。軽鎖CDR3の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成は、以下のように行った。プライマー5シリーズおよび軽鎖下流プライマー6(5'-CGGAATTCCTACGTTTCACTTCCAGATTGG-3')を用い、且つ目的部分のDNA産物を産生するための鋳型として軽鎖のDNAを用い、PCRを行い、DNA産物をFab発現ベクターにクローニングし、エレクトロトランスファーを行い、軽鎖CDR3の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成のために播種した。プライマー5シリーズはCDR3の変異部位を含み、総じて表3に記載の19個のプライマーを含む。CDR3の重鎖の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成は、以下のように行った。変異プライマー7シリーズおよび重鎖下流プライマー8(5'-CCGCTCGAGGCGCTCACGGTCAAGGTGGTGCCTG-3')を用い、且つ目的部分のDNA産物を産生するための鋳型として重鎖のDNAを用い、PCRを行い、DNA産物をFab発現ベクターにクローニングし、エレクトロトランスファーを行い、重鎖CDR3の特定部位の突然変異誘発ライブラリーの作成のために播種した。プライマー7シリーズはCDR3の変異部位を含み、総じて表4に記載の22個のプライマーを含む。最終的に確立した軽鎖および重鎖の変異ライブラリーより、抗腫瘍壊死因子(R&D社)への高い結合能を有する抗腫瘍壊死因子抗体のFabを、ELISAの結果に基づき選択した。高い活性を有する2つの重鎖可変領域、即ち、SH01およびSH02を得るために重鎖変異体をスクリーニングした。また高い活性を有する6つ軽鎖可変領域、即ち、SH03、SH04、SH05、SH06、SH07およびSH08を得るために軽鎖変異体をスクリーニングした。

10

20

【0052】

【表3】

軽鎖CDR3の特定部位の変異誘発に関するプライマー5シリーズ

記号	配列
プライマー 5-1Q1	GCAACCTACTACTGC N BKCAGAGCCATAGCTGG
プライマー 5-1Q2	GCAACCTACTACTGC D AKCAGAGCCATAGCTGG
プライマー 5-1Q3	GCAACCTACTACTGC C ATCAGAGCCATAGCTGG
プライマー 5-2Q1	GCAACCTACTACTGCCAG N BKAGCCATAGCTGGCCG
プライマー 5-2Q2	GCAACCTACTACTGCCAG D AKAGCCATAGCTGGCCG
プライマー 5-2Q3	GCAACCTACTACTGCCAG C ATAGCCATAGCTGGCCG
プライマー 5-3S1	GCAACCTACTACTGCCAGCAG B DKCATAGCTGGCCGTTT
プライマー 5-3S2	GCAACCTACTACTGCCAGCAG V TCATAGCTGGCCGTTT
プライマー 5-3S3	GCAACCTACTACTGCCAGCAG A WKCATAGCTGGCCGTTT
プライマー 5-4H1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC N BKAGCTGGCCGTTTACC
プライマー 5-4H2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC D AKAGCTGGCCGTTTACC
プライマー 5-4H3	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGC C AGAGCTGGCCGTTTACC
プライマー 5-5S1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCAT B DKTGGCCGTTTACCCTT
プライマー 5-5S2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCAT V CTTGGCCGTTTACCCTT
プライマー 5-5S3	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCAT A WKTGGCCGTTTACCCTT
プライマー 5-6W1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGC H NKCCGTTTACCCTT GGC
プライマー 5-6W2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGC N GTCCGTTTACCCTT GGC
プライマー 5-6P1	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGCTGG N DKTTCACCTT GGCAGC
プライマー 5-6P2	GCAACCTACTACTGCCAGCAGAGCCATAGCTGG D CTTTCACCTT GGCAGC

30

40

【0053】

【表 4】

重鎖CDR3の特定部位の変異誘発に関するプライマー7シリーズ

記号	配列
プライマー 7-1N1	GTATTACTGCAGCCGT NB KTACTACGGCAGCACC
プライマー 7-1N2	GTATTACTGCAGCCGT BA KTACTACGGCAGCACC
プライマー 7-1N3	GTATTACTGCAGCCGT AA ATACTACGGCAGCACC
プライマー 7-2Y1	GTATTACTGCAGCCGT ATNB KTACGGCAGCACCTACG
プライマー 7-2Y2	GTATTACTGCAGCCGT ATVA KTACGGCAGCACCTACG
プライマー 7-3Y1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACNB KGGCAGCACCTACGATTA C
プライマー 7-3Y2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACVA KGGCAGCACCTACGA TTAC
プライマー 7-4G1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACNH KAGCACCTACGA TTACTG
プライマー 7-4G2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACH GKAGCACCTACGA TTACTG
プライマー 7-5S1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC BDKACCTACGA TTACTGGGC
プライマー 7-5S2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC VCTACCTACGATTA CTGGGC
プライマー 7-5S3	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC AWKACCTACGATTA CTGGGC
プライマー 7-6T1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCNDKTACGATTA CTGGGCC
プライマー 7-6T2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCBCTTACGATTA CTGGGCC
プライマー 7-7Y1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCN BK GATTA CTGGGGCCAGG
プライマー 7-7Y2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCV AK GA TTACTGGGGCCAGG
プライマー 7-8D1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCTAC NB KTA CTGGGGCCAGGGC
プライマー 7-8D2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCTAC HA KTA CTGGGGCCAGGGC
プライマー 7-8D3	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCTAC GA ATA CTGGGGCCAGGGC
プライマー 7-9Y1	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCTACGAT NB KTGGGGCCAGGGCACC
プライマー 7-9Y2	GTATTACTGCAGCCGT ATTACTACGGC CAGCACCTACGAT VA KTGGGGCCAGGGCACC

10

20

30

40

50

【0054】

実施例3：高親和性のヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの発現と活性評価

この実施例は、それぞれFA01およびFA02の名称を持つ2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabに関する。FA01の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号15で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号16で示される）、その軽鎖定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号19で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号20で示される）、その重鎖Fdフラグメントの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号2で示され）、その重鎖定常領域CH1のアミノ酸配列は配列表の配列番号33で示される（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号34で示される）。FA02の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号9で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号10で示される）、その軽鎖定常領域のアミノ酸配列は配列表の配列番号19で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号20で示される）、その重鎖Fdフラグメントの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列表の配列番号1で示され（そのヌクレオチド配列は配列表の配列

番号2で示され)、その重鎖定常領域CH1のアミノ酸配列は配列表の配列番号33で示される(そのヌクレオチド配列は配列表の配列番号34で示される)。

【0055】

手順1. 高親和性のヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの作成と発現

2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabを作成する過程は実施例1と同様である。前記の2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの重鎖および軽鎖をコードするDNAを、FA01に関するpFA01Fab発現ベクターを得るため、FA02に関するpFA02Fab発現ベクターを得るために、それぞれpTLRベクターの対応する領域に挿入した。前記の実施例1に記載の手順に従い、高純度のFA01およびFA02タンパク質を得た。

10

【0056】

手順2. 高親和性のヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFabの生物活性の検出

L929細胞毒性試験によって、前記の2つのヒト化抗腫瘍壊死因子抗体のFab(FA01およびFA02)の生物活性を解析した。手順の詳細は実施例1と同様である。OD450値の結果を、EC50を計算するためにソフトウェアGraphPadプリズム5に入力した。結果を表5に示す。この結果は、FA01およびFA02の活性がRemicade抗体のFabフラグメントの活性より強力であることを示唆する。

【0057】

【表5】

腫瘍壊死因子αの中和中のヒト化Fabの生物活性

20

群	EC ₅₀ (nM)
Remicade Fab	3.184
FA01	2.582
FA02	2.870

注: 表5のデータは3回の実験の平均値である。

【0058】

実施例4: ヒト化腫瘍壊死因子抗体のIgG発現およびその活性の検出

30

手順1. ヒト化腫瘍壊死因子抗体IgGに関する組み換え発現ベクターの作成

実施例1および2において得た、2つの重鎖Fdフラグメント(SH01とSH02をそれぞれ含む)および6つの軽鎖(SH03、SH05、SH04、SH06、SH07およびSH08をそれぞれ含む)をコードするDNAフラグメントを、表6に示す様に相互に結合し、オーバーラップ伸長PCR(overlap extension PCR)によりIgG1Fc定常領域に関するDNAフラグメントを共に組み立て、組み換えにより発現プラスミドpcDNA3.1(+)に挿入した。CHO細胞を、作成した組み換え発現プラスミドでトランスフェクションし、完全長ヒト化抗体を発現させた。

【0059】

手順の詳細は以下に述べる通りである。(1)軽鎖に関するDNAフラグメントを組換えによって、真核細胞発現ベクターpcDNA3.1(+)に直接挿入した。以下のプライマー、5'-TGAAAGCTTATGGAAATTGTGCTGACTCAGTCTC-3'(下線部は制限酵素部位HindIII)、5'-AATCTCGAGTCAACACTCTCCCTGTTGAAGCT-3'(下線部は制限酵素部位XhoI)を設計し、PCR増幅反応で使用した。増幅産物を制限酵素HindIII(R0104L、NEB社製)およびXhoI(R0146L、NEB社製)を用いてダブルダイジェストし、T4DNAリガーゼを用いて、同じ酵素を用いダブルダイジェストしたpcDNA3.1(+)の大きいフラグメントをライゲーションした。(2)重鎖用DNA断片は、オーバーラップ伸長PCRによりIgG1Fc定常領域用のDNA断片と共に組み立て、且つ組換えによってpcDNA3.1(+)に挿入する必要がある。以下のプライマ

40

50

一、5' - ACTGGTACCATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GG - 3' (下線部は制限酵素部位KpnI)、5' - GATGGGCCCTTGGTGC
CTAGCGGAGCTCACGGTTCAGGGTGGTGC - 3' ; 5' - GA
TGGGCCCTTGGTGCCTAGCGGAGCTCACGGTTCAGGGTGGT
GCC - 3' ; 5' - AATCTCAGATCATTTACCCGGAGACAGGG
AGAGG - 3' (下線部は制限酵素部位XhoI)を設計し、PCR増幅反応で使用し
た。集めたPCR産物を、制限酵素KpnI (R0142L、NEB社製)およびXho
I (R0146L、NEB社製)でダブルダイジェストし、同じ制限酵素でダブルダイ
ジェストした発現プラスミドpcDNA3.1(+)に組み換えにより挿入し、適切な組み
換え体を得るために切断解析およびシーケンシングにより確認した。

10

【0060】

表7の18個の抗体用の発現ベクターを、前記の手順に従い準備した。

KS01(Glu)、KS03(Glu)、KS05(Glu)、KS06(Glu)
、KS09(Glu)およびKS10(Glu)の重鎖可変領域をコードするDNA配列
はすべて、配列表の配列番号2(ヌクレオチド配列の第1~3番目はGAGである)で示
され、且つ配列番号1(第1番目のアミノ酸はGluである)に示される重鎖の可変領域
をコードする。KS01(Gln)、KS03(Gln)、KS05(Gln)、KS0
6(Gln)、KS09(Gln)およびKS10(Gln)の重鎖可変領域をコードす
るDNA配列はすべて、ヌクレオチド配列の第1~3番目をCAGに置換した配列表の配
列番号2で示され、且つ配列番号1で示される重鎖可変領域(第1番目のアミノ酸はGln
である)をコードする。KS02、KS04、KS07、KS08、KS11およびK
S12の重鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番号4で示され、
配列番号3のように示される重鎖可変領域をコードし、KS01(Glu)、KS01(G
ln)およびKS02の軽鎖可変領域をコードするDNA配列の全ては配列表の配列番
号6で示され、且つ配列番号5に示される軽鎖可変領域をコードする。KS03(Glu
)、KS03(Gln)およびKS04の軽鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて
、配列表の配列番号10で示され、配列番号9で示される軽鎖可変領域をコードする。K
S05(Glu)、KS05(Gln)およびKS08の軽鎖可変領域をコードするDN
A配列はすべて、配列表の配列番号8に示され、配列番号7に示されるような軽鎖可変領
域をコードする。KS06(Glu)、KS06(Gln)およびKS07の軽鎖可変領
域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番号12に示され、配列番号11に示
される軽鎖可変領域をコードする。KS09(Glu)、KS09(Gln)およびKS
11の軽鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番号14に示され、
配列番号13に示される軽鎖可変領域をコードする。KS10(Glu)、KS10(G
ln)およびKS12の軽鎖可変領域をコードするDNA配列はすべて、配列表の配列番
号16に示され、配列番号15に示される軽鎖可変領域をコードする。18個の抗体の重
鎖定常領域をコードするDNA配列は配列表の配列番号18で示され、配列番号17で示
される重鎖定常領域をコードする。18個の抗体の軽鎖定常領域をコードするDNA配列
は配列表の配列番号20で示され、配列番号19で示される軽鎖定常領域をコードする。

20

30

40

【0061】

手順2. 完全長ヒト化抗腫瘍壊死因子 IgG抗体の発現と精製

手順1で得た軽鎖組み換えプラスミドおよび重鎖組み換えプラスミドを、完全長ヒト化
抗体を発現させるためにCHO細胞に同時導入した。表6に示されるような組み合わせに
対応するプラスミドを、従来方法によりCHO細胞にそれぞれ安定的に同時導入した後、
12個の対応する完全長組み換え抗体が細胞培養の上清に分泌された。上清を対応する完
全長IgG抗体を得るために精製した。精製の手順の詳細は以下の通りである。

【0062】

1) クロマトグラフィーの充填材

Mabselect Sure (GE社製)、Superdex 200 (GE社製)

【0063】

50

2) 緩衝液

アフィニティー平衡化緩衝液 (PBS) : 0.2 M リン酸水素ナトリウム : 82.5 mL / L ; 0.2 M ナトリウム二水素ナトリウム : 17.5 mL / L ; 2 M 塩化ナトリウム : 75 mL / L ; に超純水を加えて、完全にかき混ぜてよく混合し、1 M 水酸化ナトリウムまたは1 M 塩化水素を用いて pH を 7.1 ~ 7.3 に調整した。

アフィニティー溶出緩衝液 : NaCl 2.922 g / L、無水酢酸ナトリウム 0.49 g / L、氷酢酸 2.9 mL / L 添加、pH 3.4 ~ 3.6。

アフィニティー再生緩衝液 : 5.8 mL / L 氷酢酸、pH 3.0。

アフィニティー定置洗浄 (CIP) 緩衝液 : 1 M 水酸化ナトリウム 100 mL / L。

ゲル濾過クロマトグラフィー溶液 (PBS) : 0.2 M リン酸水素ナトリウム : 82.5 mL / L ; 0.2 M リン酸二水素ナトリウム : 17.5 mL / L ; 2 M 塩化ナトリウム : 75 mL / L ; 超純水を加え、完全にかき混ぜよく混合し、1 M 水酸化ナトリウムまたは1 M 塩化水素を用いて、pH を 6.8 に調整した。

10

【0064】

3) サンプルの準備 (清澄濾過)

遠心分離 : サンプルは、10 ~ 15 分、5000 ~ 6000 rpm で遠心分離した。

ろ過 : 遠心分離の後、サンプルの上清は H7 (0.45 + 0.2 μm) フィルターでろ過した。

【0065】

4) アフィニティー・クロマトグラフィー

A K T A 精製システム (A K T A purification system) およびアフィニティー・クロマトグラフィー・カラム (Mabselect or Mabselect Sure) を設置する。カラム体積の2倍体積量の超純水で洗浄する。基線が安定するまでカラム体積の5倍体積量のアフィニティー平衡化緩衝液で洗浄し、サンプルを注入する。サンプルの注入後、カラム体積の5 ~ 10 倍体積量のアフィニティー平衡化緩衝液で洗浄する。その後、カラムをアフィニティー溶出緩衝液で、1カラム体積量で連続して溶出し、280 nm のメジャー吸光度ピーク (major absorbance peak) に対応する画分を集めた。そのカラムはカラム体積の3倍体積量のアフィニティー再生緩衝液で溶出した。アフィニティー平衡化緩衝液で中性の pH になるように洗浄した。カラム体積の5倍体積量の Mabselect CIP 緩衝液もしくは Mabselect Sure CIP 緩衝液を用い、定置洗浄を行う。基線が安定するまで、カラム体積の3倍体積量のアフィニティー平衡化緩衝液で洗浄する。基線が安定するまで、カラム体積の3倍体積量の超純水で洗浄する。カラム体積の3倍体積量の20% エタノールで洗浄し、アフィニティー・クロマトグラフィー・カラムを保管する。

20

30

【0066】

5) ゲル濾過クロマトグラフィー

A K T A 精製システムおよび Superdex 200 ゲル濾過クロマトグラフィーカラムを設置する。5 mL / 分に流量を調整して、1カラム体積量の超純水で洗浄し、カラム体積の2倍体積量の Superdex 200 カラム・クロマトグラフィー平衡化液で洗浄する。2.5 mL / 分に流量を調整して、アフィニティー・クロマトグラフィー・ピークに対応する画分を集め、pH 値を調整し、カラム上に直接注入した。サンプル注入の後、Superdex 200 カラム・クロマトグラフィー平衡化液で溶出し、目的の280 nm ピークを集めた。引き続き1カラム体積量で洗浄した。クロマトグラフィーカラムは0.01 M 水酸化ナトリウムで保管した。

40

【0067】

手順3. ヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体 IgG の活性の検出

手順2 で得た12個のヒト化抗腫瘍壊死因子 抗体 IgG を、L929 細胞毒性試験 (操作の詳細は実施例1に述べた通り) により腫瘍壊死因子 の中和の生物活性を試験し、その結果の OD₄₅₀ 値を得て、EC₅₀ を計算するためにソフトウェア Graph Pad Prism 5 に入力した。腫瘍壊死因子 の活性を抑制するための12個のヒト化抗腫瘍壊

50

死因子 抗体 IgG の EC_{50} 値を表 7 に示した。その結果は、ヒト化抗腫瘍壊死因子抗体の生物活性はかなり増加し、KS10 は最も高い生物活性があることを示す。従って、更なる抗体活性の詳細な調査は、主として KS10 に関して行った。

【 0 0 6 8 】

【表 6】

高親和性ヒト化抗腫瘍壊死因子 α 抗体

IgG 抗体	VH	VK	
KS01	SH01	SH03	
KS02	SH02	SH03	10
KS03	SH01	SH05	
KS04	SH02	SH05	
KS05	SH01	SH04	
KS06	SH01	SH06	
KS07	SH02	SH06	
KS08	SH02	SH04	
KS09	SH01	SH07	
KS10	SH01	SH08	
KS11	SH02	SH07	
KS12	SH02	SH08	20

【 0 0 6 9 】

【表 7】

腫瘍壊死因子 α の中和中の完全長ヒト化

抗腫瘍壊死因子 α 抗体の生物活性

群	EC_{50} (nM)	
KS01 (Glu)	0.081	
KS01 (Gln)	0.087	30
KS02	0.109	
KS03 (Glu)	0.087	
KS03 (Gln)	0.093	
KS04	0.126	
KS05 (Glu)	0.051	
KS05 (Gln)	0.064	
KS06 (Glu)	0.059	
KS06 (Gln)	0.068	
KS07	0.100	
KS08	0.113	
KS09 (Glu)	0.036	40
KS09 (Gln)	0.032	
KS10 (Glu)	0.028	
KS10 (Gln)	0.025	
KS11	0.059	
KS12	0.136	
Remicade	0.174	

【 0 0 7 0 】

実施例 5 : KS10 (Glu) のヒト腫瘍壊死因子 への結合の動態評価

ヒト腫瘍壊死因子 (R&D社, 210-TA-050) および NHS-LCLC- β 50

オチン (Thermo-fisher社製, カタログ番号: 21338) をモル比で 1 : 3 の比率で一様に混合し、1 時間室温で保持した。その後、残りの NHS-LCLC ビオチンは、PD-10 脱塩カラム (GE社製, カタログ番号: 17-0851-01) によって取り除いた。得られた最終結合産物は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のビオチン-ヒト腫瘍壊死因子であった。

【0071】

KS10 のヒト腫瘍壊死因子 への結合動態パラメータは Octet RED 96 システム (ForteBio社) in the Octet technology platform によって決定した。試験の手順を機器の取り扱い説明書に従い設定した。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ビオチン-ヒト腫瘍壊死因子 をローディング (Loading) することにより Streptavidin パイオセンサー (SA) に結合させた。その抗体濃度の適切な範囲を以下の通り、6000 nM、2000 nM、666.7 nM、222.2 nM、74.1 nM および 24.7 nM のパイロット試験により決定した。Remicade はポジティブコントロールとして使用し、PBS (pH 7.4) はブランクのコントロールとして使用した。その結果 (表 8) は、KS10 の KD 値は Remicade の KD 値よりも小さいことを示し、それは KS10 のヒト腫瘍壊死因子 への親和性がヒト-マウスキメラ抗体 Remicade の親和性よりも高いことを示唆する。

10

【0072】

更に、チンパンジー腫瘍壊死因子 (配列番号 36 で示されるアミノ酸配列および配列番号 37 で示されるヌクレオチド配列)、アカゲザル腫瘍壊死因子 (配列番号 38 で示されるアミノ酸配列および配列番号 39 で示されるヌクレオチド配列)、マウス腫瘍壊死因子 (mTNF-) (PROSPEC製, カタログ番号: CYT-252)、およびヒト TNF (PROSPEC製, カタログ番号: CYT-224) への KS10 の結合親和性を決定した。Octet RED 96 システムの親和性評価基準に従い、抗原の抗体への結合に起因する光波の変位距離は、2 つの物質間の親和性を間接的に反映し、光波の変位距離が長いと、親和性は高い。その結果 (図 3) は、KS10 がヒト腫瘍壊死因子 にかなり強力に結合すること、チンパンジーの腫瘍壊死因子 にも大いに結合すること、アカゲザルの腫瘍壊死因子 に弱く結合すること、マウス腫瘍壊死因子 およびヒト腫瘍壊死因子 にほとんど結合しないことを示す。従って、本発明において抗体はヒト化の後に特異的結合能を有することを確認した。

20

30

【0073】

【表 8】

ヒト腫瘍壊死因子 α への KS10 の結合の動態パラメーター

抗体の分類	KD (M)	kon (l/Ms)	kdis (l/s)
Remicade	8.12E-12	1.95E+04	1.58E-07
KS10	2.18E-12	4.69E+04	1.02E-07

注: KD は親和定数; kon は結合定数; kdis は解離定数である。

40

【0074】

実施例 6: ヒト腫瘍壊死因子 を誘発した関節リウマチモデルラットへの KS10 (Glucocorticoid) の影響

SPF グレード、半分が雄で半分が雌、体重 140 ~ 180 g、72 匹の 4 ~ 6 週齢 Sprague Dawley ラット (laboratory animal license: SCXK (Sichuan) 2008-24) を使用した。ラットを 1 週間慣らし、無作為に 1 群 12 匹で 6 群、即ち、正常群、負対照群、モデル対照群、KS10 5 mg/kg 群、KS10 10 mg/kg 群および KS10 20 mg/kg 群に分けた。試験の初めに、正常群を除く各群のラットに 10% 抱水クロラール (350 mg/kg)

50

で麻酔をかけた。モデリングの前に、ラットに3つの異なる量のKS10 (5 mg/kg、10 mg/kg および 20 mg/kg) を尾静脈注入し、負対照群およびモデル対照群のラットには等量の食塩水を尾静脈注入した。15分後に、0.5 mg/mLのヒト腫瘍壊死因子 (R&D社, カタログ番号: 210-TA-050) (1% BSAで溶かし、60 µL/ラットの量を注入した) を1 mLの注射器で、3つのKS10投与群およびモデル対照群に急性関節炎 (1つの足首のモデリング) を引き起こすために、ラットの左足首の関節腔に注入し、等量の1% BSAを負対照群ラットの左足首の関節腔に注入した。注入の成功は、関節腔の両側のくぼみの漸次腫脹によって示された。正常群ラットには前記の注入は行わなかった。

【0075】

モデルは18時間後に確立され、各群中のラットの左足首関節の腫脹度を以下のように0~4の変調段階基準 (modified gradation criteria) でそれぞれ採点した。0: 発赤と腫脹なし、1: 足首関節のみ発赤および/または腫脹、2: 足首関節の発赤と腫脹および足底の腫脹、3: 足首関節および足底の発赤と腫脹、4: 足首関節、足底および足の表面の発赤および腫脹 (R Williams, M Feldmann, and R Maini, "Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis", Proc Natl Acad Sci U S A, 1992 October 15; 89(20): 9784-9788 を参照)。モデルを確立した20時間後に、滑膜関節液を抜いた。関節周辺の柔組織を分離し、均質化し、遠心し-70で凍結した。IL-1 および IL-6のレベルはラットELISAキット (IL-1 R&D社製, カタログ番号: RLB00; IL-6 R&D社製, カタログ番号: R6000B) を用いて決定した。

【0076】

スコア (図4) は、KS10の3つの投与量で、ヒト腫瘍壊死因子が誘発するラットの関節の発赤および腫脹を、大いに緩和することができ、ヒト腫瘍壊死因子が誘発する関節リウマチの進行に大いに拮抗できることを示す。サイトカイン評価では、KS10の3つの投与量で、滑液および関節周辺の柔組織でIL-1 (図5) およびIL-6 (図6) のレベルを大いに下げることが示され、このことは、KS10がヒト腫瘍壊死因子によって誘発されるIL-1 およびIL-6の増加レベルを完全にブロックすることができ、KS10のヒト腫瘍壊死因子に対する活性の証拠となることを示す。

【0077】

実施例7: ヒト腫瘍壊死因子を誘発したぶどう膜炎モデルラットへのKS10 (Gluc) 処理効果

40匹の健康なLewisラットを、正常群、モデル群、負対照群、KS10群に分けた。ラットに、10% 抱水クロラル (0.35 mL/kg 1回投与) を腹腔内に注入した。ラットに麻酔をかけた後、モデル群および負対照群のそれぞれのラットに、毛様体筋の平らな部分を通してガラス体に生理食塩水10 µLを注入し (30 G1/2針を使用)、4 mg/mLのKS10溶解液 (PBSで作成した) を10 µL、KS10群のラットそれぞれに同様に注入した。30分後、10 µLのヒト腫瘍壊死因子 (約0.5 mg/mL) をモデル群およびKS10群の各ラットの静脈内に注入し、10 µLの1% BSAを負対照群の各ラットの静脈内に注入した。最初の投与によりモデルが形成されてから24時間および48時間後に、ラットを麻酔し、細隙灯の下観察し、それぞれ採点した。採点基準は、文献 (Fleisher LN, Ferrell JB, Smith MG, McGahan MC, "Lipid mediators of tumor necrosis factor-induced uveitis" Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991 Jul; 32(8): 2393-9) および改訂版を参照したものであり、虹彩の充血0~2 (0: 充血なし、1: 少し充血、2: 重度の充血)、縮瞳0~1 (0: 正常な瞳孔、1: 縮瞳)、前房滲出0~2 (0: 前房滲出なし、1: 少し前房滲出; 2: 重度の前房滲出)、暗瞳孔 (caligo pup

10

20

30

40

50

i l l a e) または虹彩後癒着 0 ~ 2 (0 : 癒着なし、 1 : 一方の部位で癒着、 2 : 両方の部位で癒着) である。

【 0 0 7 8 】

採点結果を表 9 に示す。これは K S 1 0 が、眼内の透明度を増加させ、虹彩充血、繊維素性滲出および暗瞳孔 (c a l i g o p u p i l l a e) または虹彩後癒着を抑えることを示すぶどう膜炎評価基準のスコアを、著しく低下できることを示す。従って、K S 1 0 がヒト腫瘍壊死因子 により誘発されるぶどう膜炎への重大な拮抗作用を発揮することが示された。

【 0 0 7 9 】

【表 9】

10

ラットモデルのヒト腫瘍壊死因子 α 誘発ぶどう膜炎の治療に対する K S 1 0 のスコア

群	初回投与によるモデル形成後の時間	
	24 時間	48 時間
正常	0.88±0.834	0.38±0.518
負対照	0.90±0.737	0.38±0.744
モデル対照	3.5±0.971	3.78±1.202
KS10	2.5±0.971*	1.55±2.422*

20

注:*モデル群と比較して* $P < 0.05$,であることを示す

($\bar{x} \pm SD$, n=10)

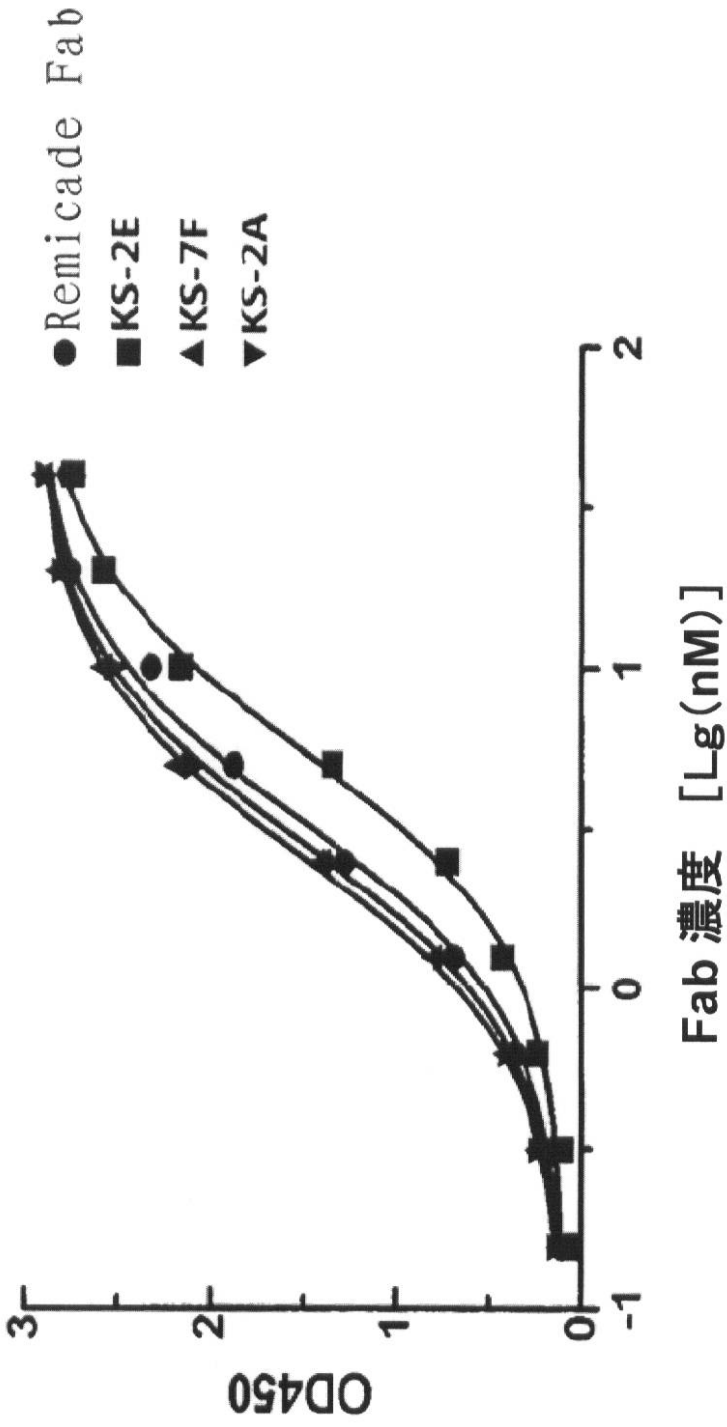
【産業上の利用可能性】

【 0 0 8 0 】

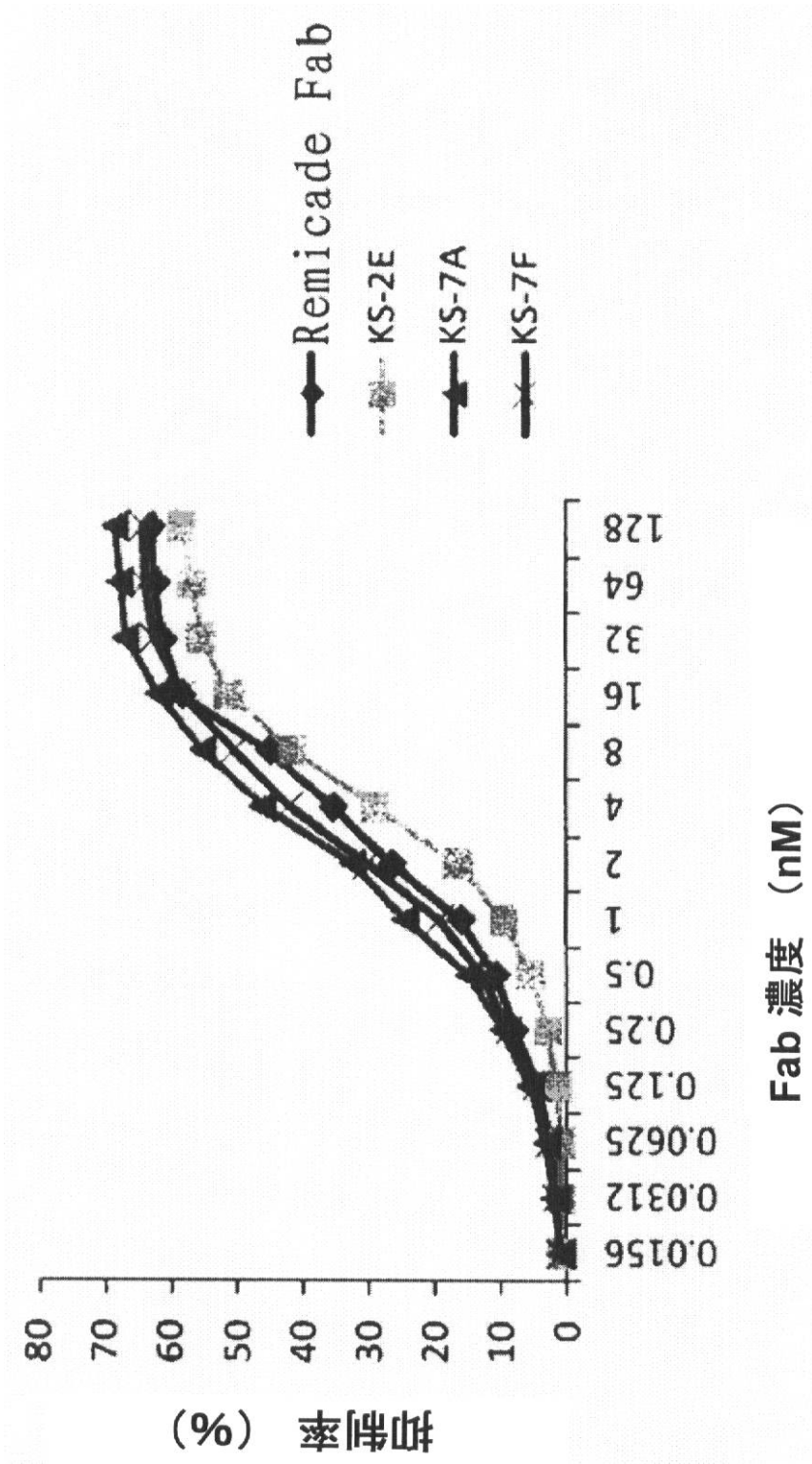
本発明は、ヒト化抗体 (マウス由来抗体の可変領域 (V H、V K) の相補性決定領域 (C D R) を、ヒト化抗体のフレームワーク領域へ直接接合した) の従来方法では抗体の親和性が低下するという欠陥を、C D R グラフト化抗体の変異生成により、効果的に克服し、最終的に最初の抗体 (i n i t i a l a n t i b o d y) に類似する抗体を得た。本発明で提供する F a b と I g G 抗体は、ヒト化の程度 (最大で 9 5 % 超) がかなり高く、ヒト - マウスキメラ抗体である R e m i c a d e と同様か又はそれより高い親和性および生物活性を有すること、ヒト腫瘍壊死因子 の中和効果により優れ、腫瘍壊死因子 に関連する疾病の治療により効果的であることを実験的に立証した。前記疾病として好ましくは、関節リウマチ、自己免疫性ぶどう膜炎、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎、または若年性特発性関節炎である。

30

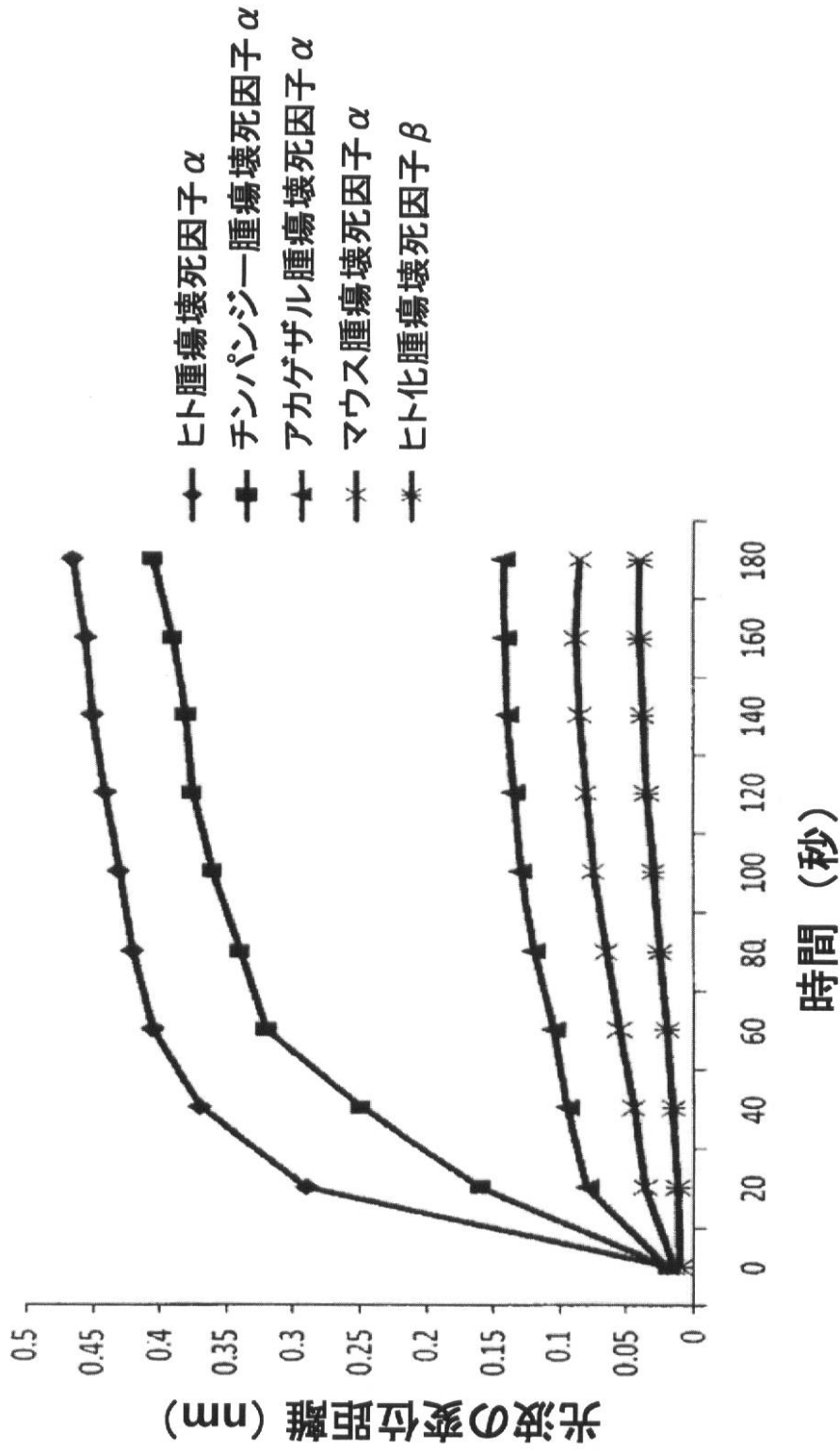
【図1】



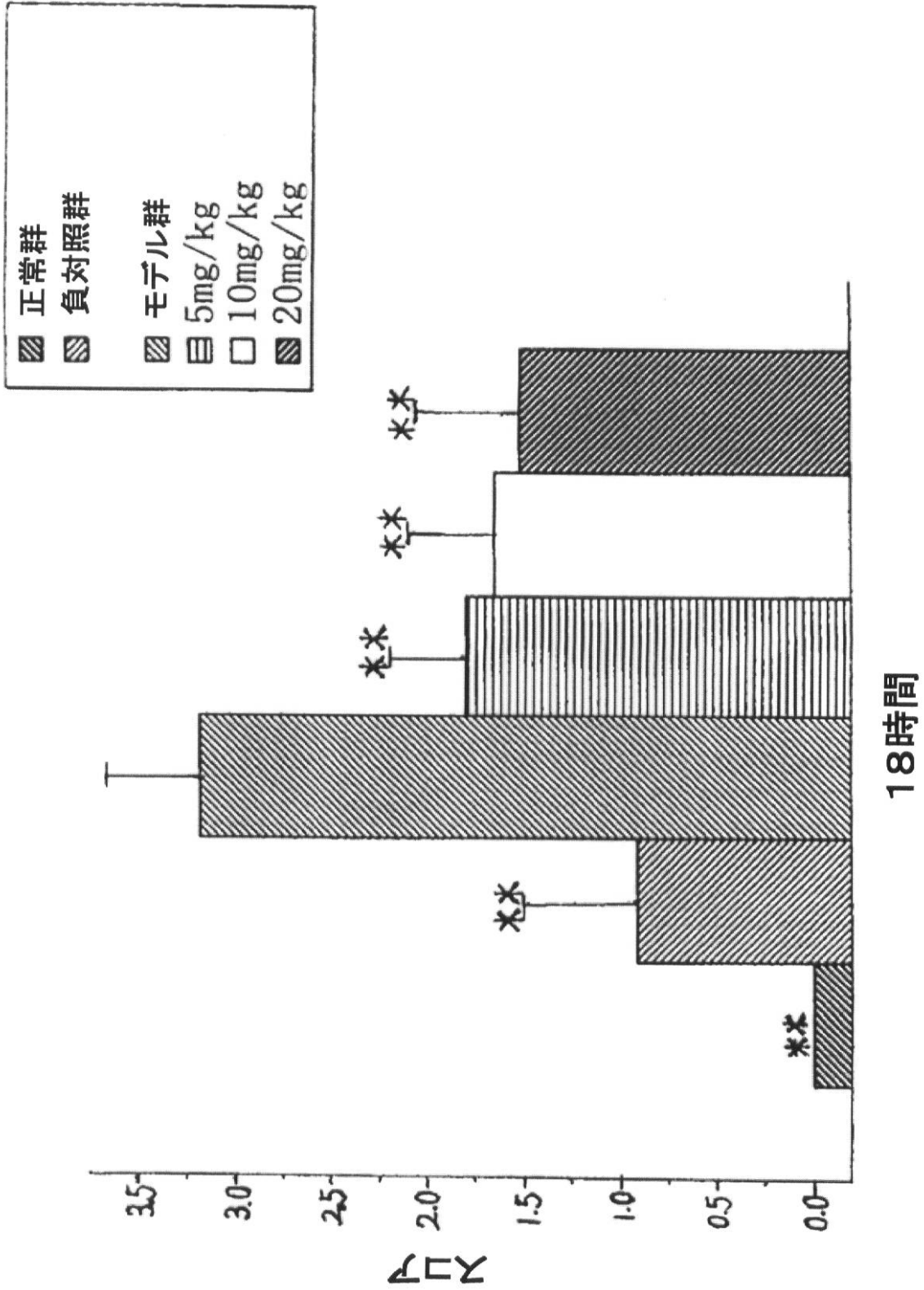
【 図 2 】



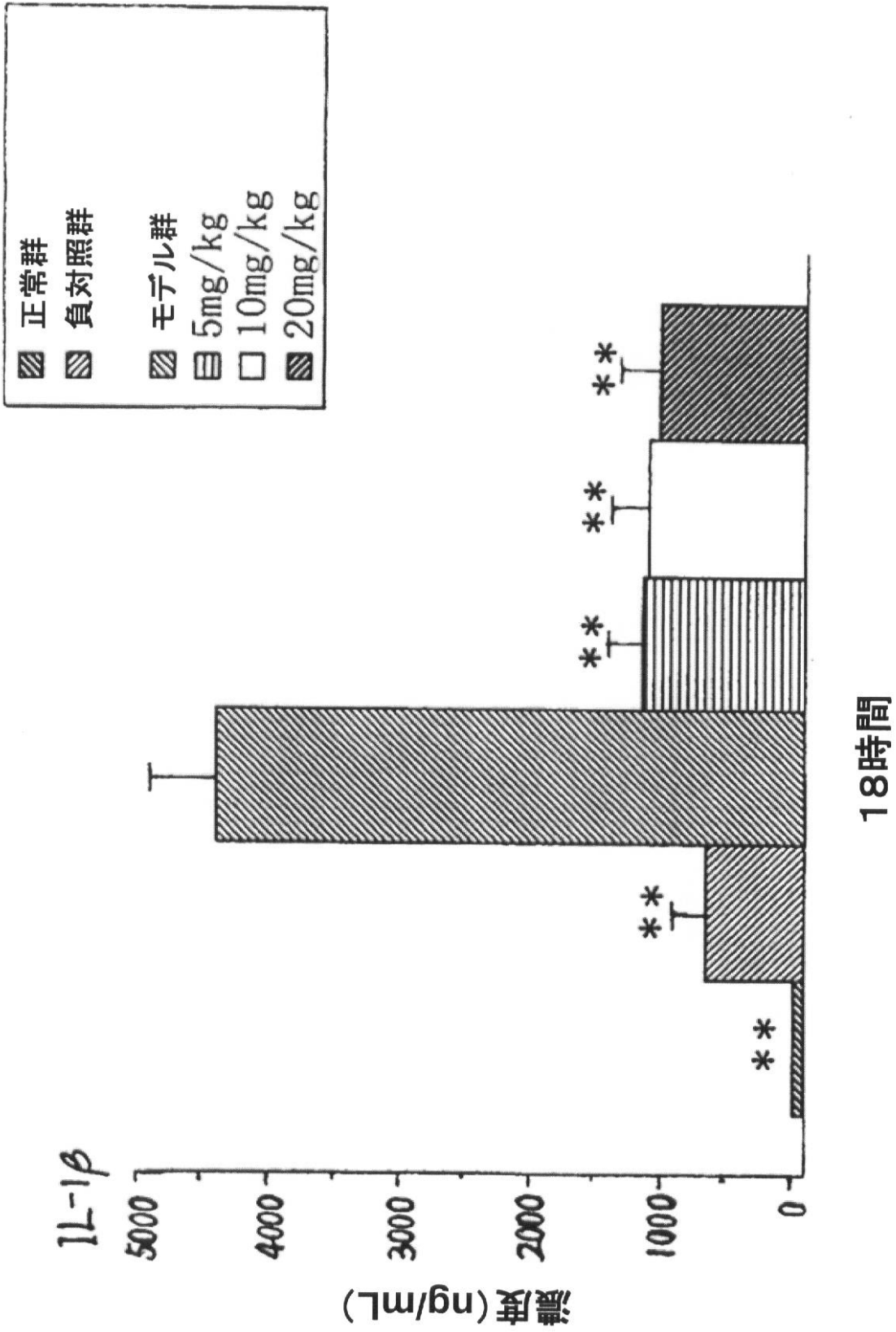
【 図 3 】



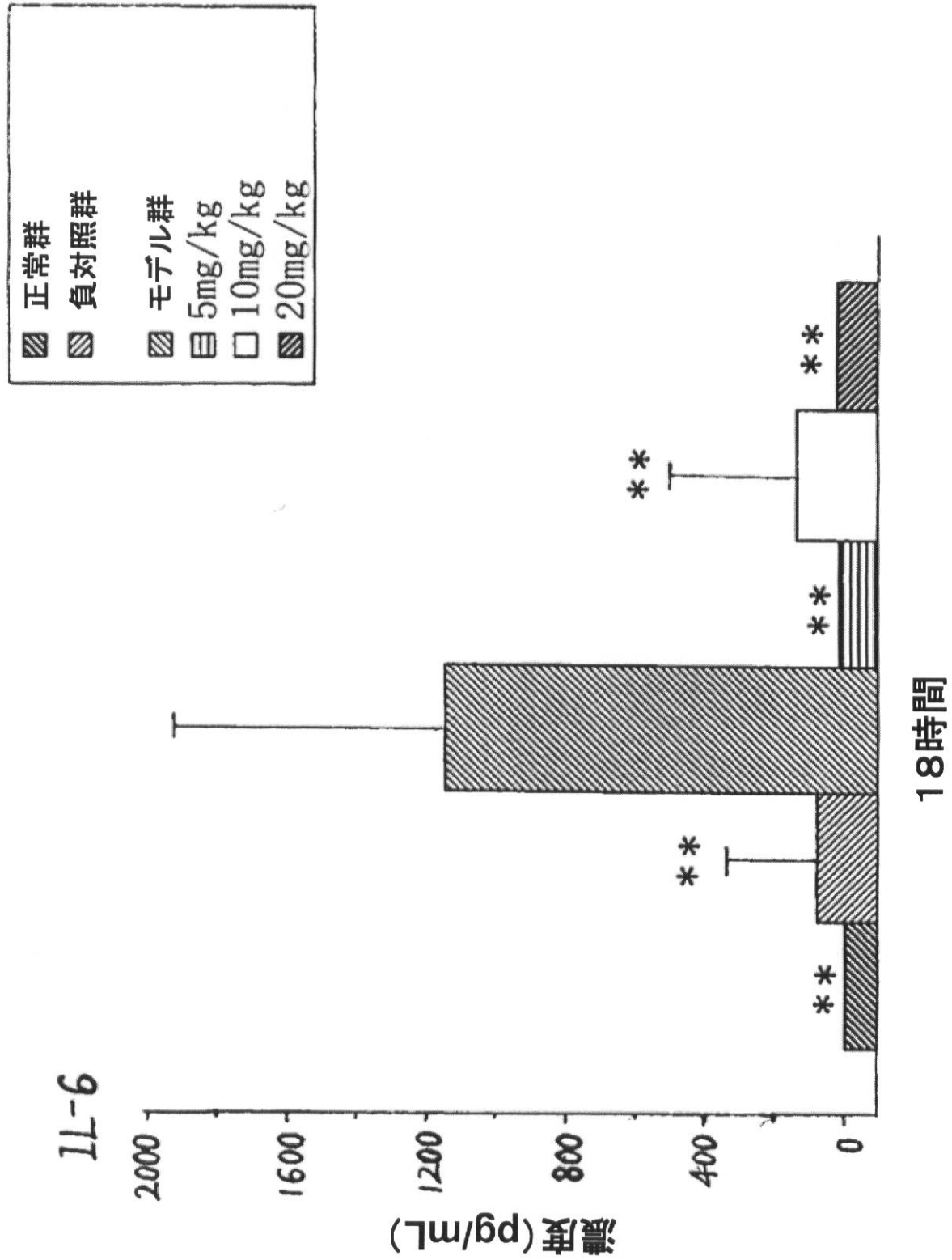
【 図 4 】



【図5】



【図6】



【配列表】

2014503177000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2011/001668
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
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)		
IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
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 practicable, search terms used)		
CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: TNF α , tumor necrosis factor, antibody, humanized, antigen binding fragment, monoclonal, mAb, Remicade, autoimmune disease, autoimmune disorder, GenBank; EMBL: sequence search on SEQ ID NOS: 1-39.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN101407546 A(UYCH-N), 15 Apr.2009(15.04.2009), see whole document.	1-20
A	WO2009132037A1(EPITOMICS INC, et. al.), 29 Jan.2009(29.01.2009), see whole document.	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&"document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 07 Dec.2011(07.12.2011)		Date of mailing of the international search report 19 Jan.2012(19.01.2012)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer ZHAO, Yanhao Telephone No. (86-10)62411028

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/001668**Box No. 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.:19-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19-20 are directed to a method of treatment of human/animal body by therapy (Rules 39.1 (iv) PCT), however, the search has been carried out and based on the alleged effects of the antibodies.
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 No. 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/001668

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101407546 A	15.04.2009	None	
WO2009132037 A1	29.01.2009	US2009269357 A1	29.01.2009
		EP2274332 A1	19.01.2011
		CA2721983 A1	29.01.2009
		CN102037012 A	27.04.2011
		JP2011519836 A	14.07.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/001668

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/24 (2006.01) i
C12N 15/13 (2006.01) i
A61K 39/395 (2006.01) i
A61P 37/02 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2011/001668
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: 肿瘤坏死因子 α , TNF α , 抗体, 人源化, 抗原结合片段, Fab, 单克隆, 单抗, 英夫利昔, 自身免疫性疾病, tumor necrosis factor, antibody, humanized, antigen binding fragment, monoclonal, mAb, Remicade, autoimmune disease, autoimmune disorder, GenBank; EMBL: 对序列 1-39 的序列检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101407546A (中国药科大学) 15.4 月 2009 (15.04.2009), 参见全文	1-20
A	WO2009132037A1 (EPITOMICS INC 等), 29.1 月 2009 (29.01.2009) 参见全文	1-20
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“&” 同族专利的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 07.12 月 2011(07.12.2011)	国际检索报告邮寄日期 19.1 月 2012 (19.01.2012)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 赵彦豪 电话号码: (86-10) 62411028	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2011/001668

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 19-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
根据 PCT 细则第 39.1 (iv), 权利要求 19-20 属于人体或动物体的疾病治疗方法, 但是基于抗体的预期效果进行了检索。
2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:
3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说, 是权利要求:
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。
 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2011/001668	
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101407546 A	15.04.2009	无	
WO2009132037 A1	29.01.2009	US2009269357 A1	29.01.2009
		EP2274332 A1	19.01.2011
		CA2721983 A1	29.01.2009
		CN102037012 A	27.04.2011
		JP2011519836 A	14. 07. 2011

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/001668

A.主题的分类

C07K 16/24 (2006.01) i

C12N 15/13 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/14 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 27/14	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 クェ, シャオ

中華人民共和国, スーチョワン 6 1 0 0 3 6, ツェンドゥー, ジンニウ ディストリクト, シューシー ロード ナンバー 3 6

(72)発明者 ガオ, シャオピン

中華人民共和国, スーチョワン 6 1 0 0 3 6, ツェンドゥー, ジンニウ ディストリクト, シューシー ロード ナンバー 3 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA56 CA02 CA20 DA06 EA04 GA11 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA12 CA19 CC15 CC24 CE10 CE12 DA01
 4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 BD14 CA25 CA44
 4C084 AA13 NA14 ZA331 ZA681 ZA891 ZA961 ZB071 ZB111 ZB131 ZB151
 ZC021
 4C085 AA13 AA14 BB17 BB41 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA68 ZA89 ZA96
 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15
 4H045 AA11 BA09 CA42 DA76 EA22 FA74 GA26

专利名称(译)	人源化抗人肿瘤坏死因子 α (tnf- α) 抗体及其抗原结合片段 (fab) 及其使用方法		
公开(公告)号	JP2014503177A	公开(公告)日	2014-02-13
申请号	JP2013530530	申请日	2011-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	成都康弘生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	Tsuendu安本生物技术有限责任公司		
[标]发明人	クエシアオ ガオシアオピン		
发明人	クエ,シアオ ガオ,シアオピン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/7088 A61P43/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P27/14 A61P37/08 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/08 G01N33/53 C12N7/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P27/14 A61P29/00 C07K16/241 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K16/249		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.D A61K39/395.U A61K48/00 A61K31/7088 A61P43/00.111 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P27/14 A61P37/08 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/08 G01N33/53.D C12N7/00 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA681 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZC021 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB41 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	Kankawa忠 伊藤 浩彰		
优先权	201010297255.0 2010-09-30 CN		
其他公开文献	JP5767708B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了人源化的抗人肿瘤坏死因子- α 抗体及其抗原结合片段 (Fab)。还公开了包含所述抗体或其抗原结合片段 (Fab) 的组织, 以及所述抗体或其抗原结合片段 (Fab) 在治疗与肿瘤坏死因子 α 有关的疾病中的用途。[选择图]无

サンプル	EC ₅₀ (nM)
Remicade Fab	3.324
KS-2E	6.659
KS-7A	3.027
KS-7F	2.740

: 表2のデータは3回の実験の平均値。