

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 抗体 2 2 5 の L 鎖の可変領域 (2 L : 配列番号 2) 及び H 鎖の可変領域 (2 H : 配列番号 4)、並びに、抗 CD 3 抗体 OK T 3 の L 鎖のヒト型化可変領域 (O L : 配列番号 6) 及び H 鎖のヒト型化可変領域 (O H : 配列番号 8) を含む二重特異性抗体。

【請求項 2】

ダイアボディ型二重特異性抗体である請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

各ポリペプチドにおいて L 鎖可変領域が H 鎖可変領域の N 末側にある、請求項 1 又は 2 記載の二重特異性抗体。 10

【請求項 4】

(2 L 2 H) - (ペプチドリンカー) - (O H O L) で示される構造を有するタンデム型の 1 本鎖抗体 (s c F v) である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

更にヒンジ領域、並びに、Fc 領域を含む請求項 1 記載の抗体。

【請求項 6】

抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 及び CD 3 に対する二重特異性抗体である請求項 1 乃至 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載された抗体を構成する一本鎖ポリペプチド。 20

【請求項 8】

請求項 7 記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 9】

請求項 8 記載の核酸を含有する複製可能なクローニングベクター又は発現ベクター。

【請求項 10】

プラスミドベクターである、請求項 9 記載のベクター。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 12】

哺乳動物細胞である請求項 11 記載の宿主細胞。 30

【請求項 13】

請求項 11 記載の宿主細胞を培養して宿主細胞中で該核酸を発現せしめ、請求項 7 に記載の一本鎖ポリペプチドを回収し、精製し、得られた該一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された抗体を分離・回収することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載された抗体の製造方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項 15】

腫瘍細胞を排除する、殺傷する、傷害する及び / 又は減少せしめるためのものであることを特徴とする請求項 14 記載の医薬組成物。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、安定性に優れ、がん特異的免疫療法に使用することのできる二重特異性抗体、それを構成する一本鎖ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸、該抗体の製造方法、及び、それらの医薬として用途等に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

がん（悪性腫瘍）及びリウマチ等に対する安全な治療法として、近年、免疫療法が用いられている。がんに対する免疫療法では、がんに対して特異的に細胞傷害活性を示す抗体が使用される。このような抗体から成る抗体医薬は、副作用の少ない、安心安全で治療効果の高いことが認められる一方、確立された動物細胞を用いて製造する必要があるためにコスト高が問題となっている。

【0003】

このため、投与量を大幅に軽減して低コスト化を計る手段として、極めて強力な活性を有する組換え抗体の作製が試みられてきた。

【0004】

例えば、このような組換え抗体のうちの一つである二重特異性抗体(Bispecific Antibody:BsAb)は2つの異なる抗原に対して特異的に結合することが可能であるため、この特性を生かして特異的な抗腫瘍効果を持った治療薬としての利用法が可能であるとして、その研究が盛んに行われている。ダイアボディ(diabody:Db)とはこのような二重特異性抗体の最小単位であり、それぞれ同じ親抗体由来の重鎖(H鎖)の可変領域(V領域)（「VH」と表わされる）VHと軽鎖(L鎖)の可変領域(V領域)（「VL」と表わされる）VLとが互いに非共有結合によりヘテロ二量体を形成するという性質を利用し考案されたものである（非特許文献1）。又、ダイアボディ型二重特異性抗体以外の二重特異性抗体の調製等は、例えば、非特許文献2及び非特許文献3記載されている。

【0005】

本発明者等は、これまでに、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1(Her1)抗体528及び抗CD3抗体OKT3を用いて作製したダイアボディ型二重特異性抗体(Ex3)及び該抗体をヒト型化したダイアボディ型二重特異性抗体(hExh3)が極めて強力な抗腫瘍効果を有していることを見出している（特許文献1）。更に、このヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体等に基づき多様な構造を有する高機能性二重特異性抗体を開発している（特許文献2）。

【0006】

更に、本発明者は、ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体を構成する各ポリペプチドにおいてL鎖可変領域がN末側にある「LH型」であることを特徴とするLH型二重特異性抗体及び該LH型二重特異性抗体を含む高機能性二重特異性抗体を開発した（特許文献3）。又、Her1抗体528のH鎖又はL鎖に各種のアミノ酸変異・置換を有するこれらの抗体（特許文献4及び特許文献5）も開発した。

【0007】

上記特許文献2～5に記載された高機能性二重特異性抗体は、夫々、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528及び抗CD3抗体OKT3のL鎖及びH鎖を含む可変領域に加えてFc領域を含む、二重特異性抗体である。このような構造を有するヒト型化高機能性二重特異性抗体は、Ex3に比べて細胞傷害活性が格段に向上し、各抗原に対して二価で結合可能であり、プロテアーゼ消化によりTag等の付加配列を最小限にした二重特異性抗体が容易に調製され、プロテインAによる簡易精製が可能となる。更に、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び補体依存性細胞傷害(CDC)作用の誘導等のエフェクター効果を誘導する機能が新たに付与される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特許第3803790号明細書

【特許文献2】国際公開第WO2007/108152号パンフレット

【特許文献3】国際公開第WO2010/109924号パンフレット

【特許文献4】国際公開第WO2011/062112号パンフレット

【特許文献5】国際公開第WO2012/020622号パンフレット

【非特許文献】

【0009】

10

20

30

40

50

【非特許文献 1】Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448, 1993

【非特許文献 2】Alt M, et. al. Novel tetravalent and bispecific IgG-like antibody molecules combining single-chain diabodies with the immunoglobulin gamma1 Fc or CH3 region. FEBS Lett., 454, 90-4. (1999)

【非特許文献 3】Lu D, et. al. A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. J Biol Chem., 280, 19665-72. (2005)

【非特許文献 4】J Biol Chem. 2005:280 (20)19665-72

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上記の各種の二重特異性抗体は非常に優れた特性を有するが、これらの抗体を用いた最終的な治療薬を開発する途上において、様々な要因からドロップアウトせざるを得ない可能性もあり、そのような場合に備えて、ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 に対する抗体として、上記の抗体 528 とは異なる抗体の可変領域由来を構成要素として含む、ダイアボディ型二重特異性抗体及び各種の高機能性二重特異性抗体を開発することが求められている。

【0011】

従って、本発明の課題は、抗体 528 とは別の新たなヒト上皮細胞成長因子受容体 1 (EGFR) に対する抗体を用いて作製した、二重特異性抗体及び各種の高機能性二重特異性抗体等の二重特異性抗体を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、抗EGFR抗体として、528抗体に代えて225抗体を用いることによって、より高い抗腫瘍効果等の優れた特性を有する二重特異性抗体を作製することに成功し、本発明を完成した。

【0013】

即ち、本発明は以下に示す各態様に係るものである。

[態様 1]

30

抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 抗体 225 の L 鎖の可変領域 (2L: 配列番号 2) 及び H 鎖の可変領域 (2H: 配列番号 4)、並びに、抗 CD3 抗体 OKT3 の L 鎖のヒト型化可変領域 (OL: 配列番号 6) 及び H 鎖のヒト型化可変領域 (OH: 配列番号 8) を含む二重特異性抗体。

[態様 2]

ダイアボディ型二重特異性抗体である態様 1 記載の抗体。

[態様 3]

各ポリペプチドにおいて L 鎖可変領域が H 鎖可変領域の N 末側にある、態様 1 又は 2 記載の二重特異性抗体。

[態様 4]

40

(2L2H) - (ペプチドリンカー) - (OHOL) で示される構造を有するタンデム型の 1 本鎖抗体 (scFv) である、態様 1 に記載の抗体。

[態様 5]

更にヒンジ領域、並びに、Fc 領域を含む態様 1 記載の抗体。

[態様 6]

抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 及び CD3 に対する二重特異性抗体である態様 1 乃至 5 に記載の抗体。

[態様 7]

態様 1 ~ 6 のいずれか一項に記載された抗体を構成する一本鎖ポリペプチド。

[態様 8]

50

態様 7 記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

[態様 9]

態様 8 記載の核酸を含有する複製可能なクローニングベクター又は発現ベクター。

[態様 10]

プラスミドベクターである、態様 9 記載のベクター。

[態様 11]

態様 9 又は 10 記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

[態様 12]

哺乳動物細胞である態様 11 記載の宿主細胞。

[態様 13]

態様 11 記載の宿主細胞を培養して宿主細胞中で該核酸を発現せしめ、態様 7 に記載の一本鎖ポリペプチドを回収し、精製し、得られた該一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された抗体を分離・回収することを特徴とする、態様 1 ~ 6 のいずれか一項に記載された抗体の製造方法。

[態様 14]

態様 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

[態様 15]

腫瘍細胞を排除する、殺傷する、傷害する及び / 又は減少せしめるためのものであることを特徴とする態様 14 記載の医薬組成物。

【発明の効果】

【0014】

以下の実施例に示されるように、本発明の二重特異性抗体において、本発明のダイアボディ型二重特異性抗体の中で LH 型は、細胞傷害活性、サイトカイン分泌誘導能、及び、担がんマウスを用いた *in vivo* での抗腫瘍活性等の点で高い効果を示した。

【0015】

更に、抗体 528 と抗体 225 とは互いに結合阻害が起こることが知られており (Mol Biol Med. 1983;1(5):511-29)、又、マウスを用いた治験実験においても、同等な効果であることが報告されている (Cancer Res. 1993;53(19):4637-42) が、本発明の LH 型のダイアボディ型二重特異性抗体は、528 抗体由来の可変領域を構成要素とした LH 型のダイアボディ型二重特異性抗体 (特許文献 3) と比較しても、上記の活性に関して顕著に高い活性を有していることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図 1】HL 型共発現ベクター (b) LH 型共発現ベクター (c) tandem scFv 型発現ベクターを示す。

【図 2】不溶性画分から調製した E₂₂₅x3 の細胞傷害性試験の結果を示す。

【図 3】細胞傷害性試験 (E₂₂₅x3 と Ex3 の比較) の結果を示す。

【図 4】E₂₂₅x3 Db の配向性を示す。

【図 5】pRA1-E₂₂₅x3 O2G1 の作製を示す。

【図 6】pRA1-E₂₂₅x3 20G1 の作製を示す。

【図 7】各種 E₂₂₅x3 Db のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。

【図 8】各種 E₂₂₅x3 Db の細胞傷害活性の比較を示す。

【図 9】EGFR に対する各種 E₂₂₅x3 Db の SPR 測定結果を示す。

【図 10】各種 E₂₂₅x3 Db の架橋能比較：a (A431、E₂₂₅x3 Db、CD3-FITC)、b (T-LAK、E₂₂₅x3 Db、EGFR-FITC) を示す。

【図 11】各種 E₂₂₅x3 Db の IFN- γ 分泌量比較 (上)、及び、TNF- α 分泌量比較 (下) を示す。

【図 12】MTS アッセイによる Ex3 Db と E₂₂₅x3 Db の細胞傷害活性比較を示す。

【図 13】Ex3 LHG1 と E₂₂₅x3 LHG1 の細胞傷害活性の比較を示す。

10

20

30

40

50

【図14】Tumor early stage modelおよびTumor establish modelの概要を示す。

【図15】Ex3 LHG1とE₂₂₅x3 LHG1のin vivo活性評価(Tumor early stage model)の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の抗体の第一の態様は、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体225のL鎖の可変領域(2L:配列番号2)及びH鎖の可変領域(2H:配列番号4)、並びに、抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域(OL:配列番号6)及びH鎖のヒト型化可変領域(OH:配列番号8)を含む二重特異性抗体に係る。その結果、本発明抗体は、対抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1及びCD3に対する二重特異性を有する。

10

【0018】

このような二重特異性抗体の代表例として、ダイアボディ型二重特異性抗体(「E₂₂₅x3」と表記する)を挙げることが出来る。なお、これら二重特異性抗体を構成する各ポリペプチドにおいてL鎖可変領域がH鎖可変領域のN末側にある(LH型)二重特異性抗体がより高い効果を示す場合があり、好適である。

【0019】

抗EGFR抗体(225抗体)の可変領域の配列は公知であり、例えばInt J Cancer. 1995 Jan 3;60(1):137-44.に示されている。

【0020】

具体的には、225抗体のL鎖の可変領域の塩基配列(配列番号1)及びH鎖の可変領域の塩基配列(配列番号3)は以下の通りである。又、それらは、夫々、L鎖の可変領域(2L:配列番号2)及びH鎖の可変領域(2H:配列番号4)をコードしている。一方、抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域(OL)をコードする塩基配列及びアミノ酸配列、並びに、抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域(OH)をコードする塩基配列及びアミノ酸配列は、特許文献4又は特許文献5において、夫々、配列番号5及び配列番号6、並びに、配列番号7及び配列番号8として記載されており、公知である。

20

【0021】

【表1】

(配列番号1)

```
GATATCCAAGTCCAGTCTCCAGTTCATCTGTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCCAGAGTATTGGCACAACATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
AATGGTTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
GAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCAACCACGTTCCGGTGCT
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA
```

30

【表2】

(配列番号3)

```
CAGGTACAAGTGCAGGAGTCCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATC
ACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACATACTATGGTGTACACTGGGTTCCGAGTCT
CCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTATATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAAT
ACACCTTTACATCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATCCAAGAGCCAAGTTTTCTTT
AAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAGCCCTCACC
TACTATGATTACGAGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACCACGGTCACCGTTTCCTCG
```

40

【0022】

本発明のダイアボディ型二重特異性抗体において、各可変領域の配向性を考慮すると、

50

以下に示す4つの種類の構造を取り得る。

- (1) HL型：各ポリペプチドにおいてH鎖可変領域がN末側
- (2) LH型：各ポリペプチドにおいてL鎖可変領域がN末側
- (3) O2型：各ポリペプチドにおいてOKT3の可変領域がN末側
- (4) 2O型：各ポリペプチドにおいて抗体225の可変領域がN末側。

【0023】

本発明の抗体の第二の態様は、(2L2H) - (ペプチドリンカー) - (OHOL)で示される構造を有するタンデム型の1本鎖抗体(scFv)に係る。

【0024】

上記のscFvは、特許文献2に「第六の型」として挙げられている構造を有する抗体であって、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体抗体225のH鎖及びL鎖の可変領域を含む一本鎖Fv(225 scFv)(5HL)と抗CD3抗体OKT3のH鎖及びL鎖のヒト型化可変領域を含む一本鎖Fv(OKT3 scFv)とをポリペプチドリンカーで縦列に連結させて、全体としてシングルポリペプチド鎖となったものである。尚、225 scFv又はOKT3 scFvのいずれかが一本鎖ポリペプチドにおけるN末端側になっても良く、更に、225 scFv及びOKT3 scFvの夫々において、各H鎖及びL鎖のいずれがN末端側になっても良い。その結果、夫々2種類あるH鎖及びL鎖の順序を考慮すると、本発明BsAbの第六の型は総計8種類の一本鎖ポリペプチドを含むものである。

【0025】

本発明抗体のその他の1本鎖抗体としては、特許文献2において第一の型として記載されているような構造、(OH2L) - (ペプチドリンカー) - (2HOL)で示される構造($E_{225} \times 3$ scDb)を有する。即ち、上記の $E_{225} \times 3$ を構成する2種類のポリペプチド鎖であるOH2L及び2HOLが更にペプチドリンカーにより結合されて、全体としてシングルポリペプチド鎖となったものである。この結果、BsAb分子の構造が $E_{225} \times 3$ に比べてより安定化される。更に、このBsAbを製造する際に必要な発現ベクターは一種で済み、その結果、 $E_{225} \times 3$ に比べてより均一なBsAb分子を調製することが可能である。尚、「scDb」は一本鎖(Single Chain) ダイアボディ抗体を意味する。

【0026】

尚、上記ペプチドリンカーは、5H及び5Lの間、又は、OH及びOLの間のいずれかに挿入されていても良い。更に、各 $E_{225} \times 3$ 単位において、VH又はVLのいずれがポリペプチド鎖のN末側に位置していても良い。即ち、このような型の抗体は、(i) N末側：OH - 2L - (ペプチドリンカー) - 2H - OL；C末側、(ii) N末側：2H - OL - (ペプチドリンカー) - OH - 2L；C末側、(iii) N末側：2L - OH - (ペプチドリンカー) - OL - 2H；C末側、又は、(iv) N末側：OL - 2H - (ペプチドリンカー) - 2L - OH；C末側のいずれかの順で各可変領域を含んで成るものである。尚、この中の(iii)及び(iv)は、LH型のダイアボディ型二重特異性抗体を構成する1本鎖ポリペプチドを結合させて得られる構造に相当する。

【0027】

更に、本発明抗体の他の態様としては、基本的な構成要素として、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体225のL鎖の可変領域(2L：配列番号2)及びH鎖の可変領域(2H：配列番号4)、抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域(OL：配列番号6)及びH鎖のヒト型化可変領域(OH：配列番号8)を含む可変領域に加えて、更に、ヒンジ領域及びFc領域を含む抗体を挙げることが出来る。尚、「Fc領域」とは、定常領域(C領域)を構成するH鎖のC末端側の2個のドメイン(CH2及びCH3)及びヒンジ部を含む領域を意味する。

【0028】

このような高機能性二重特異性抗体の例として、例えば、特許文献2において、第二の型(Ex3-Fc)及び第三の型(Ex3 scDb-Fc)として記載されている通常のIgG型抗体分子である高機能性二重特異性抗体、並びに、上記の構成要素に加えて更にL鎖定常領域(CL)及びH鎖定常領域(CH1)を含む第四の型(Ex3 scFv-Fc)として記載されてい

10

20

30

40

50

る高機能性二重特異性抗体と同様の構造を有し、「Ex3」に代えて、「E₂₂₅x3」を含む各種抗体を挙げることが出来る。

【0029】

以上の本発明の第二の型、第三の型及び第四の型のBsAbは何れもヒトFc領域を有しているために、プロテインAによる精製が容易であり、又、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性及び補体依存性細胞傷害(CDC)作用を誘導することが出来、更には、各抗原に対して二価で結合することが可能、というE₂₂₅x3には見られない効果を奏する。

【0030】

これらの型二重特異性抗体に含まれるFc領域、L鎖定常領域(CL)及びH鎖定常領域(CH1)はヒト抗体に由来するものである限り特に制限はない。例えば、CLは または鎖の何れに由来するものでも良い。Fc領域又はCH1としては、通常、IgG1型の鎖に由来するものが使用される。CH1、Fc領域及びCLの一例として、夫々、特許文献2に開示された配列番号29、配列番号30及び配列番号33に示したアミノ酸配列を有するものを挙げることができる。更に、エフェクター効果の誘導能がより低いIgG2型(GenBankのhuman IgG2 遺伝子配列(BX640623.1)のFc領域を用いることも出来る。

10

【0031】

より具体的には、上記の第二の型(E₂₂₅x3-Fc)は、OH2L及び2HOLの二種類のポリペプチドから構成されるダイアボディ型二重特異性抗体(E₂₂₅x3)がいずれか一方のポリペプチドによりヒンジ領域を介してヒト抗体の2つのFc領域に結合しているものである。即ち、具体的には、ヒンジ領域を介してヒト抗体のFc領域と結合したE₂₂₅x3を構成する2種類のポリペプチドの何れか一方のポリペプチド(例えば、(2HOL)-ヒンジ領域-Fc領域)、及び、E₂₂₅x3を構成するもう一方のポリペプチド(例えば、(OH2L))の2種類のポリペプチドから構成されるものである。該抗体はこれら2種類の一本鎖ポリペプチドを共発現させた後に会合せしめることによって製造することが出来る。

20

【0032】

この型の抗体において、2HOL又はOH2Lの何れかのポリペプチドをヒンジ領域を介してヒト抗体のFc領域に結合させることができ、更に、各一本鎖ポリペプチドに含まれるH鎖可変領域又はL鎖可変領域の何れがヒンジ領域と結合していても良い。

【0033】

上記の第三の型(E₂₂₅x3 scDb-Fc)は、上記の第二の型におけるEx3の代わりに、E₂₂₅x3 scDb、即ち、E₂₂₅x3を構成する2種類のポリペプチド鎖であるOH2L及び2HOLが更にペプチドリンカーにより結合された(OH2L)-(ペプチドリンカー)-(2HOL)で示される構造を有するシングルポリペプチド鎖、(OH2H)-(ペプチドリンカー)-(2LOL)で示されるシングルポリペプチド鎖、又は、(2L2H)-(ペプチドリンカー)-(OHOL)で示されるタンデム型のシングルポリペプチド鎖がヒンジ領域を介してヒト抗体のFc領域に結合した構造を有している。尚、以上の一本鎖ポリペプチドに含まれる2種類のH鎖可変領域又はL鎖可変領域の何れがヒンジ領域と結合していても良い。

30

【0034】

上記の第二の型及び第三の型を構成するドメインの数はIgGタイプの免疫グロブリン分子と同じであり、これらの抗体は該免疫グロブリン分子に近い立体的構造を有しているものと考えられる。更に、これら本発明BsAbの第二の型(ii)及び第三の型(iii)において、E₂₂₅x3又はE₂₂₅x3 scDbとヒンジ領域の間にプロテアーゼ切断部位を介在させることにより、これらのBsAbをプロテアーゼ消化し、その後、後述する各種精製操作を適宜行うことによって、E₂₂₅x3又はE₂₂₅x3 scDbを容易に製造することが可能となる。

40

【0035】

上記の第四の型(E₂₂₅x3 scFv-Fc)は、抗体(免疫グロブリン分子)のVH及びVLを、夫々、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体抗体225のH鎖及びL鎖の可変領域を含む一本鎖Fv(scFv)(2HL)又は抗CD3抗体OKT3のH鎖及びL鎖のヒト型化可変

50

領域を含む一本鎖 Fv (OHL) で置換して成る抗体である。即ち、該抗体は、IgGタイプの免疫グロブリン分子においてH鎖の定常領域を構成するCH1ドメインのN末端側にscFvであるOHL又は2HLのいずれか一方が結合してなるポリペプチド、及びL鎖の定常領域CLのN末端側にもう一方のscFvが結合してなるポリペプチドの2種類の一本鎖ポリペプチドから構成されるものである。尚、scFvに含まれるH鎖可変領域又はL鎖可変領域の何れがこれら領域と結合していても良い。従って、該抗体はこれら2種類の(一本鎖)ポリペプチドを共発現させた後に会合せしめることによって製造することが出来る。

【0036】

又、本発明の二重特異性抗体等を構成する各ポリペプチドにおいて、非特許文献3に記載されているようなL鎖可変領域がH鎖可変領域のN末側にあること(LH型)を特徴とする各種の抗体も本発明に含まれる。即ち、例えば、第三の型(E₂₂₅x3 scDb-Fc)におけるこのようなLH型の例として、(OL2H) - (ペプチドリンカー) - (2LOH)で示される構造を有するシングルポリペプチド鎖がヒンジ領域を介してヒト抗体のFc領域に結合した構造を挙げることができる。

10

【0037】

更に、本発明の二重特異性抗体等を構成する各ポリペプチドにおいて、特許文献4及び特許文献5に記載されているように、Her1抗体225のH鎖又はL鎖に各種のアミノ酸変異・置換を導入することもできる。

【0038】

本発明抗体を構成する一本鎖ポリペプチドは、例えば、特許文献2の図3-3及び図3-4に開示された、PreScission配列、ペプチドリンカー、シグナルペプチド等のアミノ酸配列を含むことができる。尚、PreScission配列はプロテアーゼ切断部位を含む配列である。使用するプロテアーゼの種類に特に制限はなく、例えば、Thrombin及びFactor Xa等の当業者に公知の酵素を使用することが出来、それに応じて、プロテアーゼ切断部位を含むアミノ酸配列を適宜選択することが出来る。

20

【0039】

発明抗体の断片化をより効果的に抑制するためには、PreScission配列等のプロテアーゼ切断部位は含まれていないことが好ましい。

【0040】

一方、抗CD3抗体OKT3を産生するハイブリドーマは東北大学加齢医学研究所付属医用細胞資源センターに寄託されている(ID:TKG0235)。又、OKT3抗体を産生するハイブリドーマはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)においてATCC No. CRL-8001として保管されており、かかる寄託機関からも容易に入手可能である。

30

【0041】

これを用いて、当業者に公知の方法によってcDNAを調製することが出来る。例えば、ISOG EN(ニッポンジーン社)を用いmRNAを抽出、First-Strand cDNA Synthesis Kit(Amersham Biosciences社)によりcDNAを調製し、参考論文(Krebber, A. et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. J Immunol Methods 201, 35-55. (1997))に基づき合成したクローニングプライマーを用いPCRを行いこの抗体のH鎖及びL鎖の可変領域の配列を決定することができる。

40

【0042】

本発明の二重特異性抗体を構成する一本鎖ポリペプチドに含まれる可変領域の「ヒト型化」とは、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)のヒト型化可変領域における相補性決定領域(complementarity-determining region; CDR)の残基の少なくとも一部において、マウス、ラット、またはウサギといったような非ヒト動物(ドナー抗体)であり且つ所望の特異性、親和性、および能力を有するCDRに由来する残基によって置換されている抗体を意味する。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク(FR)残基が対応する非ヒト残基によって置換される場合もある。さらに、ヒト型化抗体は、

50

レシピエント抗体および導入されたCDR またはフレームワーク配列のいずれにおいても見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに優れたものあるいは最適なものとするために行われる。更に詳しくは、Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); EP-B-239400; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992); およびEP-B-451216 を参照することができる。

【0043】

このような抗体のヒト型化可変領域のヒト型化は当業者に公知の方法に従って実施することが出来る。例えば、レシピエント抗体及びドナー抗体の3次元イムノグロブリンモデルを使用し、種々の概念的ヒト型化生成物を分析する工程により、ヒト型化抗体が調製される。3次元イムノグロブリンモデルは、当業者にはよく知られている。更に詳細については、WO92/22653等を参照することができる。

10

【0044】

従って、ヒト型化されたヒト型化可変領域の例として、ヒト型化可変領域における相補性決定領域(CDR)がマウス抗体由来であり、その他の部分がヒト抗体由来である抗体を挙げることができる。

【0045】

本発明では更に、ヒト型化によって抗体自身の機能低下等が生起する場合があるので、一本鎖ポリペプチド中の適当な部位、例えば、CDR構造に影響を与える可能性があるフレームワーク(FR)中の部位、例えば、canonical 配列又はvernier 配列において部位特異的変異を起こさせることによってヒト型化抗体の機能の改善をすることが出来る。

20

【0046】

ヒト型化OKT3ヒト型化可変領域はすでに報告されており、マウスOKT3に比べて十分に活性を保持していることも確かめられている(Adair, J. R. et al. Humanization of the murine anti-human CD3 monoclonal antibody OKT3. Hum Antibodies Hybridomas 5, 41-7. (1994))。この文献に記載されているヒト型化OKT3ヒト型化可変領域のアミノ酸配列を基に、オーバーラップPCR法により遺伝子の全合成を行った。この際にコドンは宿主細胞における至適コドンをを用いることが好ましく、至適コドンに置換した全合成遺伝子を用いることでの宿主細胞における発現量の増加はすでに報告されている。

【0047】

各一本鎖ポリペプチドの構造において示されるペプチドリinkerに加えて、各L鎖可変領域断片及びH鎖可変領域断片は適当なペプチドリinkerで連結されていることが好ましい。該ペプチドリinkerは、一本鎖抗体の分子内での相互作用を困難にし、複数の一本鎖抗体による多量体の形成を可能ならしめ、その結果、互いに別の一本鎖抗体に由来するVHとVLが適切に会合することによって、オリジナルのタンパク質(当該ポリペプチドは該オリジナルのタンパク質に由来するものあるいは該オリジナルのタンパク質から誘導されたものである)の機能、例えば生物活性などの一部あるいはその全てを模擬又は促進する構造をとることができるようなものであれば特に限定されず、例えば当該分野で広く知られたものあるいは該公知のリンカーを改変したものの中から選択して使用することが可能である。例えば、ペプチドリinkerは1~20個、好ましくは1~15個、より好ましくは2~10個のアミノ酸の長さであることが好ましい。

30

40

【0048】

更に、各一本鎖ポリペプチドは上記のペプチドリinkerを含まずに、二つの可変領域断片が直接結合していても良い。このような場合には、各一本鎖抗体の三次元的自由度を高めて多量体化を促進させるために、各一本鎖ポリペプチドにおいてN末端側にある可変領域断片のC末端の1ないし数個のアミノ酸、又は、C末端側にある可変領域断片のN末端の1ないし数個のアミノ酸が除去されていることが好ましい。

【0049】

更に、上記の各配列番号で示される各アミノ酸配列において、一個又は数個(例えば、2~5個)のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列であって、元のアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能・活性、例えば、可変領域断片の抗原特異性と

50

つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータープログラム法としては、GC G プログラムパッケージ (Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215: 403 (1990)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

【0053】

更に、上記の各核酸分子は、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ上記配列番号で示された各ポリペプチドの機能・活性と実質的に同じものを有するポリペプチドをコードするDNAを含むものである。

10

【0054】

ここで、ハイブリダイゼーションは、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001) に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0055】

ハイブリダイゼーションは、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)) に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

20

【0056】

本明細書において、DNAのハイブリダイズにおける「ストリンジェント (stringent) な条件」は、塩濃度、有機溶媒 (例えば、ホルムアミド)、温度、及びその他公知の条件の適当な組み合わせによって定義される。すなわち、塩濃度を減じるか、有機溶媒濃度を増加させるか、またはハイブリダイゼーション温度を上昇させるかによってストリンジェンシー (stringency) は増加する。更に、ハイブリダイゼーション後の洗浄の条件もストリンジェンシーに影響する。この洗浄条件もまた、塩濃度と温度によって定義され、塩濃度の減少と温度の上昇によって洗浄のストリンジェンシーは増加する。

【0057】

従って、「ストリンジェントな条件」とは、各塩基配列間の相同性の程度が、例えば、全体の平均で約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上であるような、高い相同性を有する塩基配列間のみで、特異的にハイブリッドが形成されるような条件を意味する。具体的には、例えば、温度60 ~ 68 において、ナトリウム濃度150~900mM、好ましくは600~900mM、pH 6~8であるような条件を挙げることが出来る。ストリンジェントな条件の一具体例としては、5 x SSC (750 mM NaCl、75 mM クエン酸三ナトリウム)、1% SDS、5 x デンハルト溶液50% ホルムアルデヒド、及び42 の条件でハイブリダイゼーションを行い、0.1 x SSC (15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸三ナトリウム)、0.1% SDS、及び55 の条件で洗浄を行うものである。

30

【0058】

更に、各一本鎖ポリペプチドにおける可変領域断片をコードする核酸を作製する場合には、予め設計されたアミノ酸配列に基づきオーバーラップPCR法により全合成することができる。尚、「核酸」とは、一本鎖ポリペプチドをコードする分子であれば、その化学構造及び取得経路に特に制限はなく、例えば、g DNA、c DNA、化学合成DNA及びmRNA等を含むものである。

40

【0059】

具体的には、cDNAライブラリーから、文献記載の配列に基づいてハイブリダイゼーションにより、あるいはポリメラーゼチェーンリアクション(PCR) 技術により単離されうる。一旦単離されれば、DNA は発現ベクター中に配置され、次いでこれを、大腸菌 (E. coli) 細胞、COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、またはイムノグロブリ

50

ンを産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞にトランスフェクションさせ、該組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成させることができる。PCR 反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば R. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988 ; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989 ; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) ; M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990)); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR 法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

10

【0060】

DNA など核酸の配列決定は、例えば Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)などを参考にすることができる。また一般的な組換えDNA 技術は、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (ed.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)及び D. M. Glover et al. (ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)などを参考にできる。

20

【0061】

こうして取得された本発明の抗体を構成する一本鎖ポリペプチド又はそれに含まれる各領域をコードする核酸は、目的に応じて、当業者に公知の手段により適宜所望のペプチド又はアミノ酸をコードするように改変することができる。この様にDNA を遺伝子的に改変又は修飾する技術は、Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. Mcpherson (Ed.), (IRL Press, Oxford, UK(1991)における総説において示されており、例えば、位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)、カセット変異誘発法及びポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)変異生成法を挙げることができる。

30

【0062】

ここで、核酸の「改変」とは、得られたオリジナルの核酸において、アミノ酸残基をコードする少なくとも一つのコドンにおける、塩基の挿入、欠失または置換を意味する。例えば、オリジナルのアミノ酸残基をコードするコドンを、別のアミノ酸残基をコードするコドンにより置換することにより一本鎖ポリペプチドを構成するアミノ酸配列自体を改変する方法がある。

【0063】

又は、アミノ酸自体は変更せずに、CHO細胞等の宿主細胞にあったコドン(至適コドン)を使用するように、一本鎖ポリペプチドをコードする核酸を改変することも出来る。このように至適コドンに改変することによって、宿主細胞内における一本鎖ポリペプチドの発現効率等の向上を図ることが出来る。

40

【0064】

本発明の抗体は、当業者に公知の方法、例えば、遺伝子工学的手法又は化学合成等の各種手段を用いて製造することが出来る。遺伝子工学的手法としては、例えば、該二重特異性抗体を構成する夫々の一本鎖抗体のポリペプチドをコードする核酸を含有する複製可能なクローニングベクター又は発現ベクターを作製し、このベクターで宿主細胞を形質転換せしめ、該形質転換された宿主細胞を培養して一本鎖ポリペプチドを発現させ、該ポリペプチドを回収・精製し、それらの一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された抗体分子を分離・回収することによって製造することが出来る。

【0065】

50

ここで、「複製可能な発現ベクター(replicable expression vector)」および「発現ベクター(expression vector)」は、DNA(通常は二本鎖である)の断片(piece)をいい、該DNAは、その中に外来のDNAの断片を挿入せしめることができる。外来のDNAは、異種DNA(heterologous DNA)として定義され、このものは、対象宿主細胞においては天然では見出されないDNAである。ベクターは、外来DNAまたは異種DNAを適切な宿主細胞に運ぶために使用される。一旦、宿主細胞中に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAとは独立に複製することが可能であり、そしてベクターおよびその挿入された(外来)DNAのいくつかのコピーが生成され得る。さらに、ベクターは外来DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にするのに不可欠なエレメントを含む。従って、外来DNAによってコードされるポリペプチドの多くの分子が迅速に合成されることができ。

10

【0066】

このようなベクターは、適切な宿主中でDNA配列を発現するように、適切な制御配列(control sequence)とそれが機能するように(operably)(即ち、外来DNAが発現できるように)連結せしめられたDNA配列を含有するDNA構築物(DNA construct)を意味している。そうした制御配列としては、転写(transcription)させるためのプロモーター、そうした転写を制御するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードしている配列、エンハンサー、リアデニル化配列、及び転写や翻訳(translation)の終了を制御する配列等が挙げられる。更にベクターは、当業者に公知の各種の配列、例えば、制限酵素切断部位、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子(選択遺伝子)、シグナル配列、リーダー配列等を必要に応じて適宜含むことが出来る。これらの各種配列又は要素は、外来DNAの種類、使用する宿主細胞、培養培地等の条件に応じて、当業者が適宜選択して使用することが出来る。更に、製造した一本鎖ポリペプチドの検出及び精製等を容易にする目的のために、当業者に公知の各種のペプチドタグ(例えば、c-mycタグ及びHis-tag)をコードする配列を一本鎖ポリペプチドに対応する配列の末端等に含ませることが出来る。

20

【0067】

該ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、あるいは単純にゲノムの挿入体(genomic insert)等の任意の形態が可能である。一旦、適切な宿主の中に形質転換で導入せしめられると、該ベクターは宿主のゲノムとは独立して複製したり機能するものであり得る。又は、該ベクターはゲノムの中に組み込まれるものであってもよい。

30

【0068】

本発明の抗体を構成する一本鎖ポリペプチドを製造する為に使用する各種の発現ベクターは、当業者であれば、当該技術分野における公知技術を用いて容易に作製することが出来る。その一例として、特許文献1、特に、実施例1、2、11及び12の記載及び特許文献2における各実施例を挙げることが出来る。

【0069】

宿主細胞としては当業者に公知の任意の細胞を使用することが出来るが、例えば、代表的な宿主細胞としては、大腸菌(E. coli)等の原核細胞、及び、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、ヒト由来細胞などの哺乳動物細胞、酵母、昆虫細胞等の真核細胞が挙げることが出来る。形質転換菌は当業者に公知の任意の抵当な条件・方法で培養することが出来る。宿主として、例えば、BL21 star(DE3)株、培地として2xYT培地、培養温度28前後、0.5 mM程度のIPTGで発現を誘導することによって、培養上清又は可溶性画分における本発明の抗体の収量を大幅に向上させることができ、製造効率を高めることが可能となる。

40

【0070】

このような宿主細胞における発現等により得られた一本鎖ポリペプチドは一般に分泌されたポリペプチドとして培養培地から回収されるが、それが分泌シグナルを持たずに直接に産生された場合には宿主細胞溶解物から回収することが出来る。一本鎖ポリペプチドが膜結合性である場合には、適当な洗浄剤(例えば、トライトン-X100)を使用して膜から遊離せしめることができる。

50

【 0 0 7 1 】

精製操作は当業者に公知の任の方法を適宜組み合わせることが出来る。例えば、必用に応じてPEG化等の化学修飾を行った後、遠心分離、硫酸アンモニウム沈殿、クロソフロ濃縮、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースでのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン樹脂クロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラム等）、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及びアフィニティークロマトグラフィーによって好適に精製される。アフィニティークロマトグラフィーは、一本鎖ポリペプチドが有するペプチドタグとの親和力を利用した効率が高い好ましい精製技術の一つである。

10

【 0 0 7 2 】

回収された一本鎖ポリペプチドは不溶性画分に含まれている場合には、精製操作は、一本鎖ポリペプチドを可溶化し変性状態にした上で行うことが好ましい。この可溶化処理は、エタノールなどのアルコール類、各種試薬類、グアニジン塩酸塩、尿素などの解離剤として当業者に公知の任意の薬剤を使用することが出来る。更に、こうして精製された同一種類又は2種類の一本鎖ポリペプチドを会合（巻き戻し）せしめ、形成された抗体を分離して回収することによって、本発明の抗体を製造することが出来る。

【 0 0 7 3 】

会合処理は、単独の一本鎖ポリペプチドを適切な空間的配置に戻すことによって、所望の生物活性を有する状態に戻すことを意味する。従って、会合処理は、ポリペプチド同志あるいはドメイン同志を会合した状態に戻すという意味も有しているので「再会合」ともいうことができるし、所望の生物活性を有するものにするという意味で、再構成ということもでき、或いは、リフォールディング (refolding)とも呼ぶことが出来る。会合処理は当業者に公知の任意の方法で行うことが出来るが、例えば、透析操作により、一本鎖ポリペプチドを含むバッファ溶液中の変性剤（例えば、塩酸グアニジン）の濃度を段階的に下げる方法が好ましい。この過程で、凝集抑制剤、及び酸化剤を反応系に適宜添加することによって、酸化反応の促進を図ることも可能である。形成された多量体化低分子抗体の分離及び回収も当業者に公知の任意の方法で行うことが出来る。

20

【 0 0 7 4 】

以上に示したように、本発明の抗体は、例えば、培養宿主細胞の培養培地上清、ペリプラズム画分、菌体内可溶性画分、又は、菌体内不溶性画分から調製することが可能である。

30

【 0 0 7 5 】

本発明のベクターとして、本発明の抗体を構成する一本鎖ポリペプチドに対応する核酸分子を共に含む共発現ベクターを用いることによって、又は、一本鎖ポリペプチドの夫々をコードする核酸分子を含む発現ベクターを同一の宿主細胞を形質転換せしめ、該形質転換菌内で夫々の一本鎖ポリペプチドが発現した後に抗体分子が形成され、それを培養宿主細胞の培養培地上清又は可溶性画分から調製することが可能である。従って、このような場合には、上記の会合（巻き戻し）処理は不要となり、低コストで高生産性が得られる。

【 0 0 7 6 】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体、一本鎖ポリペプチド、核酸、ベクター、及び形質転換された宿主細胞から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする。かかる有効成分は、以下の実施例に示されているように、インビトロ及びインビボで上皮細胞成長因子受容体を発現する（陽性）腫瘍細胞を有意に排除・殺傷・傷害する作用を有しているので、本発明の医薬組成物はこのような腫瘍細胞に対する抗腫瘍剤として使用することが出来る。

40

【 0 0 7 7 】

本発明の有効成分の有効量は、例えば治療目的、腫瘍の種類、部位及び大きさ等の投与対象における病状、患者の諸条件、及び投与経路等によって当業者が適宜決めることが出来る。典型的な1回の投与量又は日用量は、上記の条件に応じ、可能ならば、例えば当分

50

野で既知の腫瘍細胞の生存又は生長についての検定法を使用して、まずインビトロで、そして次に、人間の患者のための用量範囲を外挿し得る適切な動物モデルで、適当な用量範囲を決定することもできる。

【0078】

本発明の医薬組成物には、有効成分の種類、薬剤形態、投与方法・目的、投与対象の病態等の各種条件に応じて、有効成分に加えて当業者に周知の薬学上許容し得る各種成分（例えば、担体、賦形剤、緩衝剤、安定化剤、等）を適宜添加することが出来る。

【0079】

本発明の医薬組成物は、上記各種条件に応じて、錠剤、液剤、粉末、ゲル、及び、噴霧剤、或いは、マイクロカプセル、コロイド状分配系（リボソーム、マイクロエマルジョン等）、及びマクロエマルジョン等の種々薬剤形態をとり得る。

10

【0080】

投与方法としては、静脈内、腹腔内、脳内、脊髄内、筋肉内、眼内、動脈内、特に胆管内、又は病変内経路による注入又は注射、及び持続放出型システム製剤による方法が挙げられる。本発明の活性物質は、輸液により連続的に、または大量注射により投与されることができる。尚、本発明の医薬組成物を投与する場合には、食作用又は細胞傷害活性を有する細胞と共に投与することが好ましい。或いは、投与前に本発明のLH型ダイアボディ型二重特異性抗体のような有効成分と上記細胞とを混合することによって、投与前に該抗体を予め該細胞に結合させておくことが好ましい。

【0081】

持続放出製剤は、一般的には、そこから本発明の活性物質をある程度の時間放出することができる形態のものであり、持続放出調製物の好適な例は、蛋白質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性担体を含み、該担体は、例えばフィルムまたはマイクロカプセル等の成型物の形態のものである。

20

【0082】

本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十三改正 日本薬局方解説書、平成8年7月10日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して製造することができる。

【0083】

尚、本明細書及び図面において、用語はIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

30

【0084】

以下に実施例を参照して本発明を具体的に説明するが、これらは単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。

【0085】

全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。尚、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNA クローニングでは J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 及び D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 特にPCR 法では、H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) 及び M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990)に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試

40

50

薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書(protocols) や添付の薬品等を使用している。

【実施例 1】

【0086】

E₂₂₅x3発現ベクター(HL型、LH型、tandem scFv型)の作製

pRA1-2HOL及びpRA1-OH2Lの作製

発現ベクターは既に作製されているEGFR及びCD3を標的としたヒト型化ダイアボディ型発現ベクター-pRA-5HOL、pRA-OH5L(特許文献1)を基に作製した。配列番号9および配列番号10のプライマーで2HをPCR増幅させ、NcoIとEagIで消化後、ライゲーション反応によりpRA-5HOLの5H部位と入れ換えることでpRA1-2HOLを作製した。続いて、配列番号11および配列番号12のプライマーで2LをPCR増幅させ、EcoRVとSacIIで消化後、ライゲーション反応によりpRA-OH5Lの5L部位と入れ換えることでpRA1-OH2Lを作製した。

10

【0087】

back primer (NcoI-225H) 5' -NNCCATGGCCAGGTACAACCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGC-3' (配列番号9)

forward primer (225H-EagI) 5' -NNCGGCCGAGGAAACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAAGC-3' (配列番号10)

back primer (EcoRV-225L) 5' -NNNGATATCCAACCTGACCCAGTCT-3' (配列番号11)

forward primer (225L-SacII) 5' -NNCCGCGGCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3' (配列番号12)

20

【0088】

(1) HL型E₂₂₅x3 Db共発現ベクターの作製

pRA1-2HOLを下記のプライマーを用いてPCRし、そのPCR産物とpRA1-OH2LをSpeI、EcoRIで消化後、ライゲーションすることでHL型共発現ベクター(pRA1-E₂₂₅x3 HLG1)を作製した(図1a)。

【0089】

<<pRA1-E₂₂₅x3 HLG1作製用プライマー>>

back primer (SpeI-peIb) 5' -NNNACTAGTTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATAC-3' (配列番号13)

forward primer (T7term-EcoRI) 5' -NNNGAATTCATCCGGATATAGTTCCTCCTTTTCAG-3' (配列番号14)

30

【0090】

(2) LH型E₂₂₅x3 Db共発現ベクターの作製

pRA1-2H2Lの作製

配列番号9および配列番号15のプライマーで2HをPCR増幅させ、NcoIとEcoRVで消化後、ライゲーション反応により前述のpRA1-OH2LのOH部位と入れ換えることでpRA1-2H2Lを作製した。

back primer (NcoI-225H) 5' -NNCCATGGCCAGGTACAACCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGC-3' (配列番号9)

forward primer (225H-G3-EcoRV)

40

5' -NNNGATATCGGATCCGCCACCGCCGACCCGCCACCGCCGCTACCGCCCCGCGGCCGAGGAAACGGTGACCGTG-3' (配列番号15)

【0091】

まず、前述のpRA1-2H2L、すでに既に作製されているpRA1-5LOH(特許文献3のpRA-h5Lh0Lと同義)を鋳型として下記のプライマーを用い1^s PCRを行い、NcoI-2L-G1-OH、2L-G1-OH-SacII及びNcoI-OL-G1-2H、OL-G1-2H-SacIIを作製した。それらを鋳型として2nd PCRを行いNcoI-2L-G1-OH-SacII、NcoI-OL-G1-2H-SacIIを作製し、NcoI、SacIIで消化後、同様に消化して得られたpRA1ベクターとライゲーションすることでpRA1-2LOH、pRA1-OL2Hを作製した。以降、HL型と同様の処理を行うことによりLH型共発現ベクター(pRA1-E₂₂₅x3 LHG1)を作製した(図1b)。

50

【 0 0 9 2 】

<<pRA1-E₂₂₅x3 LHG1作製用プライマー>>1ndPCR

back primer (NcoI-2L) 5' -NNNCCATGGCCGATATCCAAGTACCCAGTCTCCAGTCATCCT-3' (配列番号 16)

forward primer (2L-G1-OH) 5' -ACCTGGCCACCGCCACCAGATTTGATCTCCAGCTTGGTCCCAGCACCGAA-3' (配列番号 17)

back primer (2L-G1-OH) 5' -AGATCAAATCTGGTGGCGGTGGCCAGGTGCAACTGGTGCA-3' (配列番号 18)

forward primer (OH-SacII) 5' -NNNAGCCGCGGAGCTAACGGTCACCGGGTGCCTGGCC-3' (配列番号 19)

2ndPCR

back primer (NcoI-2L) forwardプライマー (OH-SacII) 配列は上記。

【 0 0 9 3 】

<<pRA1-OL2H作製用プライマー>>

1ndPCR

back primer (NcoI-OL) 5' -NNNCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAGCCCG-3' (配列番号 20)

forward primer (OL-G1-2H) 5' -TTGTACCTGGCCACCGCCACCAGAGGTAATCTGCAGTTTGG-3' (配列番号 21)

back primer (OL-G1-2H) 5' -ATTACCTCTGGTGGCGGTGGCCAGGTACAACGCAGGAGTCAGGACCT-3' (配列番号 22)

forward primer (2H-SacII) 5' -NNNCCGCGGAGGAAACGGTGACCGTGGTCC-3' (配列番号 23)

2ndPCR

back primer (NcoI-OL), forwardプライマー (2H-SacII) 配列は上記。

【 0 0 9 4 】

(3) tandem scFv型E₂₂₅x3発現ベクターの作製pRA1-5L5HOHOLの作製

既に作製されているEx3 tandem scFv発現ベクター-pKH1-Ex3 tandem scFv(特許文献2)を鑄型に、配列番号24および配列番号25のプライマーを用いてPCR増幅させ、NcoI、SacIIで消化後、ライゲーション反応によりpRA-OH5LのOH5L部位と入れ換えることでpRA1-5L5HOHOLを作製した。

【 0 0 9 5 】

back primer (NcoI-5L) 5' -NNNCCATGGCCGATATTGTGATGACCCAGAGCCCG-3' (配列番号 24)

forward primer (OL-SacII) 5' -NNNAGCCGCGGCGGGTAATCTGCAGTTTGGTACC-3' (配列番号 25)

【 0 0 9 6 】

pRA1-2H2Lを鑄型として下記のプライマーを用い1stPCRを行い、NcoI-2L-EcoRI, 2L-G3-2H-SacIIを作製した。それらを鑄型として2ndPCRを行いNcoI-2L-G3-2H-SacIIを作製し、NcoI, SacIIで消化後、同様に消化して得られたpRA1ベクターに挿入しpRA1-2L2Hを作製した。次にpRA1-2L2H, pRA1-5L5HOHOLを鑄型として下記のプライマーを用いて1stPCRを行い、NcoI-2L-G3-2H, 2H-G1-OH-OL-SacIIを作製した。それらを鑄型として2ndPCRを行いNcoI-2L-G3-2H-G1-OH-OL-SacIIを作製し、NcoI, SacIIで消化後、同様に消化して得られたpRA1ベクターとライゲーションでpRA1-2L2HOHOLを作製した(図1c)。

【 0 0 9 7 】

<<pRA1-2L2H作製用プライマー>>

1stPCR

back primer (NcoI-2L) 5' -NNNCCATGGCCGATATCCAAGTACCCAGTCTCCAGTCATCCT-3' (配列

番号 26)

番号 1 6)

forward primer (T7term-EcoRI) 5' -NNNGAATTCATCCGGATATAGTTCCTCCTTTTCAG-3' (配列番号 1 4)

back primer (2L-G3-2H) 5' -AAAGGCGGGGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGGTCGGGCGGTGGCGGATCCCAGGTACAACGCAGGAGTC- 3' (配列番号 2 6)

forward primer (2H-SacII) 5' -NNNCCGCGGAGGAAACGGTGACCGTGGTCC-3' (配列番号 2 3)

2ndPCR

back primer (NcoI-2L), forwardプライマー(2H-SacII) 配列は上記。

【 0 0 9 8 】

<<pRA1-2L2HOHOL作製用プライマー>>

1stPCR

back primer (NcoI-2L) 5' -NNCCATGGCCGATATCCAACGACCCAGTCTCCAGTCATCCT-3' (配列番号 1 6)

forward primer (2L-G3-2H) 5' -CTGGGATCCGCCACCGCCCGACCCGCCACCGCCGCTACCGCCCCGCCTT TGATCTCCAGCTTGGTCC-3' (配列番号 2 7)

back primer (2H-G1-OH) 5' -GTTTCCTCCGCGGGGGCGGTTTCGAGGTGCAA-3' (配列番号 2 8)

forward primer (OL-SacII) 5' -NNNAGCCGCGGCGCGGTAATCTGCAGTTTTGGTACC- 3' (配列番号 2 5)

2ndPCR

backプライマー(NcoI-2L), forwardプライマー(OL-SacII) 配列は上記。

【 実施例 2 】

【 0 0 9 9 】

E_{2.25}x3 (HL型、LH型、tandem scFv型)の調製

実施例 1 で作製したベクターを用いて市販のコンピテントセルBL21(DE3)及びBL21(DE3) Star (ライフテクノロジー株式会社)を形質転換し、試験管スケール(LB培地3 mL)、28 ℃で培養後SDS-PAGEとウェスタンブロットティングにより発現確認を行った。その結果BL21(DE3)Starに濃いバンドがみられたため、今後BL21(DE3)Starを用いて培養を行うことにした。

【 0 1 0 0 】

BL21(DE3)Starを用いて培養を行った結果、HL型、LH型E_{2.25}x3は、「28 ℃ 20 (O.D.=0.8の時)」という条件においてもっともよく発現が確認出来、可溶性画分からも発現が確認された。またtandem scFv型E_{2.25}x3は「28 ℃を維持」という条件においてもっともよく発現が確認されたが、可溶性画分からはあまり発現が確認されなかった。従って、この条件を用いて大量培養を行うことにした。

【 0 1 0 1 】

上記培養条件で培養後、遠心分離により培地上清を可溶性画分として回収した。沈殿はOsmotic Shock処理を行った後、遠心分離を行うことでペリプラズム画分に存在する可溶性タンパク質を可溶性画分として培地上清と一緒に回収した(可溶性画分(1))。さらに、その沈殿をBugBuster試薬で可溶化、遠心し、上清(可溶性画分(2))と沈殿(不溶性画分)に分けた。

【 0 1 0 2 】

当業者に公知の方法を用いたSDS-PAGE及びウェスタンブロットティングにより各画分のサンプルの発現を確認した。その結果、HL型はBugBuster試薬処理後の可溶性画分以外で、LH型はすべての画分で発現が確認出来た。tandem scFv型は超音波破碎後の可溶性画分および不溶性画分では発現が確認されたが、他の画分では発現が確認できなかった。

【 0 1 0 3 】

硫酸沈殿法を用いた可溶性画分からの調製

上記の可溶性画分(1)に質量の6割の硫酸アンモニウムを徐々に溶かし低温で一晩攪拌し続けた後、遠心分離により回収した沈殿をPBSに溶出させた。そのサンプルを以

10

20

30

40

50

下の条件を用いて(金属キレートアフィニティークロマトグラフィー：IMAC)により精製した。各精製度をSDS-PAGE及びウェスタンブロットティングにより確認し、HL型，LH型は溶出画分3を、tandem scFv型は溶出画分2

をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。その結果、HL型はきれいな目的バンドが確認されたため高純度のHL型E₂₂₅x3が得られたことがわかった。吸光度から収量を求めると、25 µg/Lであった。LH型，tandem scFv型からは目的バンドが確認出来なかった。

【0104】

【表3】

<p>Ni-Sepharose精製後 M：マーカー 1：素通り画分 2：洗浄画分(PBS) 3：溶出画分1(50 mM) 4：溶出画分2(150 mM) 5：溶出画分3(300 mM ①) 6：溶出画分4(300 mM ②) 7：溶出画分5(1 M ①) c：コントロール(HLG1) 溶出液：イミダゾール・PBS(pH 8.0)</p>

10

20

【0105】

クロスフローを用いた可溶性画分からの調製

硫酸沈殿法を用いた可溶性画分からの調製ではLH型は共雑が多すぎたので再度培養し可溶性画分(1)をクロスフローを用いて濃縮した。tandem scFv型に関しては発現が確認されなかったため精製をしなかった。濃縮したサンプルを表3に記載の条件でIMACで精製後、精製度をSDS-PAGE及びウェスタンブロットティングにより確認し、HL型及びLH型ともに溶出画分4をゲルろ過クロマトグラフィーで精製した。その結果、HL型は共雑が多く精製出来なかった。LH型は多少共雑は見られたが精製できた。吸光度から収量を求めると96 µg/Lであった。

30

【0106】

BugBuster試薬処理後の可溶性画分からの調製

可溶性画分(2)をまずPBSで透析し、表3に記載の条件でIMAC精製した。各精製度をSDS-PAGEおよびウェスタンブロットティングにより確認し、硫酸沈殿法を用いた可溶性画分からの調製と同様に、HL型，LH型は溶出画分3を、tandem scFv型は溶出画分2をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。その結果、HL型，LH型，tandem scFv型すべて目的バンドにたいして共雑が多すぎて精製できなかったことがわかった。

【0107】

巻き戻し法を用いた不溶性画分からの調製

不溶性画分を6 M Guanidinium chloride PBS水溶液で可溶化し、以下に記載の条件でIMACにより精製した。各サンプルの精製度をSDS-PAGE及びウェスタンブロットティングにより確認し、HL型，LH型，tandem scFv型すべて溶出画分4(300 mM)に目的タンパク質を精製できた。この画分を透析膜内に入れ、外液のGuanidinium chloride水溶液濃度を6 Mから6時間おきに3 M、2 M、1 M、その後12時間おきに0.5 M、0 Mと徐々に下げていき(1 M、0.5 M、0 Mでは凝集抑制剤として400 mM L-アルギニンを添加)、最後にL-アルギニンを除去することで巻き戻し操作を行った。可溶化率はHL型，LH型，tandem scFv型の順に、16 %，12 %，6 %であった。巻き戻し後の内液を遠心し凝集したタンパク質を取り除き、上清をゲルろ過クロマトグラフィーで精製した。その結果、HL型，LH型，tandem scFv型すべてきれいな目的バンドが確認できたため高純度なE₂₂₅x3を得られたことがわかった。吸光度から収量を求めると、HL型，LH型，tandem scFv型の順に340 µg/L，192 µg/L，126 µg/Lであ

40

50

った。

【 0 1 0 8 】

【 表 4 】

Ni-Sepharose精製後
M : マーカー
1 : 素通り画分
2 : 洗浄画分 (PBS)
3 : 溶出画分1 (20 mM①)
4 : 溶出画分2 (20 mM②)
5 : 溶出画分3 (20 mM ③)
6 : 溶出画分4 (300 mM)
7 : 溶出画分5 (1 M)
c : コントロール (HLG1)
溶出液:イミダゾール・PBS(pH 8.0)

10

【 実施例 3 】

【 0 1 0 9 】

本発明抗体の細胞傷害試験

不溶性画分から調製したHL型, LH型, tandem scFv型E₂₂₅x3及び硫酸沈殿法を用いて可溶性画分から調製したHL型E₂₂₅x3の4サンプルで細胞傷害性試験を行った。表 5 に示したように、活性化リンパ球(T-LAK)を用いた細胞傷害性試験(MTS assay)により、EGFR陽性のヒト胆管がん細胞株であるTFK-1細胞に対する細胞傷害性を調べ、この4種のE₂₂₅x3を比較した。その結果を図 2 に示す。尚、TFK-1は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター ID:TKG036に寄託されている。

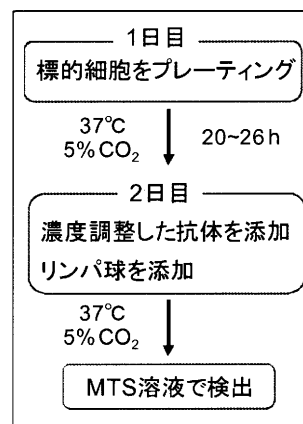
20

【 0 1 1 0 】

【 表 5 】

30

条件
標的細胞: TFK-1(5000 cell / well)
培地: RPMI + 10% FBS + PC/SM
プレート: 100 μL / well
検出日: 4日目



40

【 0 1 1 1 】

その結果、不溶性画分から調製したE₂₂₅x3において、細胞傷害性は高い方から tandem scFv型, LH型, HL型E₂₂₅x3であることがわかった。Ex3において細胞傷害性は、tandem scFv型 LH型>HL型であったことを考えると、HL型よりLH型, tandem scFv型の方が細胞傷害性が高いという点では共通していることがわかった。また、HL型E₂₂₅x3に着目すると、不溶性画分から調製するより可溶性画分から調製した方が細胞傷害性が高いことがわかった

50

。Ex3において可溶性画分から調製した場合と不溶性画分から調製した場合では細胞傷害性にあまり差が見られなかったことを考えると、E₂₂₅x3はEx3と異なり巻き戻しの際に正しくフォールディングされにくい分子であることが示唆された。

【0112】

そこで次に、可溶性画分から調製したHL型E₂₂₅x3及び LH型E₂₂₅x3とHL型Ex3及び LH型Ex3の細胞傷害性を比較した。E₂₂₅x3に関して、HL型は硫安沈殿法を用い可溶性画分から調製し、LH型はクロスフローを用い可溶性画分から調製したサンプルを用いた。その結果を図3に示す。

【0113】

図3の結果から、E₂₂₅x3、Ex3ともにHL型よりLH型の方が細胞傷害性が高いことがわかった。しかしHL型に関してはE₂₂₅x3、Ex3ともに同程度の細胞傷害性であるのに対し、LH型に関してはE₂₂₅x3の方がEx3よりも細胞傷害性が高かった。このことから、低分子二重特異性抗体においてHL型よりLH型の方が細胞傷害性は高いが、その影響の程度は抗体によってことなることが示唆された。

10

【実施例4】

【0114】

配向性が異なる4種のE₂₂₅x3 Dbの調製と機能解析

本発明のE₂₂₅x3 Dbに関して4種類の配向性の分子の調製と機能解析を行った。E₂₂₅x3 Dbの4種類の配向性(図4)のうち、OKT3由来のドメインをN末端側に配置したO2型(O2G1)、及び、225由来のドメインをN末端側に配置した20型(20G1)の共発現ベクターを、実施例1に記載のベクターに基づき、以下のように作製した。

20

【0115】

E₂₂₅x3 O2G1共発現ベクターの作製

E₂₂₅x3 O2G1共発現ベクターの作製に向けて、実施例1で作製したpRA1-OL2Hを鋳型とし、以下の条件でポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction: PCR)を行った。なお、2Lの遺伝子配列中にはBamHIサイト(GGATCC)が存在するため、BamHIを使用しない方法で遺伝子作製を目指した。

【0116】

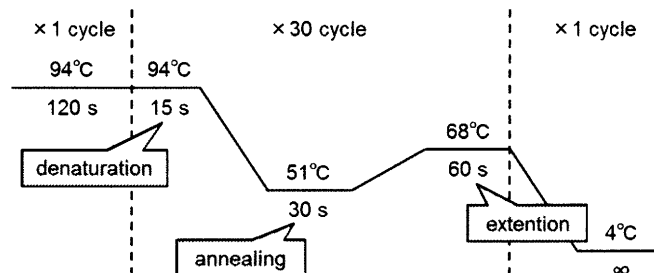
【表 6】

PCR(鑄型:pRA1-OL2H、アニーリング温度:51°C、伸長時間:60 s)

[PCR反応溶液の組成]

鑄型	1 μ l
primer①(10 pmol/ μ l)	1 μ l
primer②(10 pmol/ μ l)	1 μ l
10 \times PCR buffer for KOD ⁺	10 μ l
dNTPs 2 mM each	10 μ l
25 mM MgSO ₄	4 μ l
KOD ⁺ polymerase	1 μ l
ddH ₂ O	72 μ l
Total	100 μ l

[PCR反応条件]



primer① : *NheI*-pelB(back)

NNNGCTAGCTATTTCAAGGAGACAGTCATA

primer② : T7term-*EcoRI*(forward)

NNNGAATTCATCCGGATATAGTTCCTCCTTTTCAG

【 0 1 1 7 】

上記のPCRで増幅したOL2H断片(インサート側)を*NheI*、*EcoRI*で、また当研究室既存のpRA1-OH2L(ベクター側)を*SpeI*、*EcoRI*で制限酵素消化し、これらをライゲーションすることで、pRA1-E₂₂₅x3 O2G1を作製した(図5)。NheI消化断片と*SpeI*消化断片は同じ付着末端(C TAG)となるため、ライゲーションが可能である。

【 0 1 1 8 】

E₂₂₅x3 2OG1共発現ベクターの作製

E₂₂₅x3 2OG1共発現ベクターは、E₂₂₅x3 O2G1共発現ベクター作製時と同様の条件でPCRを行うことで増幅した2LOH断片(インサート側)を*NheI*、*EcoRI*で制限酵素消化後、pRA1-2HOL(ベクター側)の*SpeI*、*EcoRI*サイトに挿入することで作製した(図6)。

【 0 1 1 9 】

4種類のE₂₂₅x3 Dbの調製

実施例1で作製した共発現ベクターpRA1-E₂₂₅x3 HLG1、pRA1-E₂₂₅x3 LHG1(図1)と、これらの共発現ベクターpRA1-E₂₂₅x3 O2G1、pRA1-E₂₂₅x3 2OG1をそれぞれ用いてBL21(DE3)starを形質転換し、実施例2に記載のように、培地上清画分とペリプラズム画分を併せ、クロスフローにより濃縮・透析を行う調製法を用いた。尚、E₂₂₅x3 HLG1、E₂₂₅x3 LHG1に関してはそれぞれ2 \times YT培地2 Lと4 L、E₂₂₅x3 O2G1、E₂₂₅x3 2OG1に関しては3 Lで大量培養を行った。以下に詳細を記す。

【 0 1 2 0 】

SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる発現確認の結果、E₂₂₅x3 HLG1、E₂₂₅x3 LHG1、E₂₂₅x3 2OG1に関しては可溶性画分に目的タンパク質の発現がみられたが、E₂₂₅x3 O2G1に関してはほとんど確認することができなかった。原因としては、E₂₂₅x3 O2G1が他の配向性に比べ可溶性画分に分泌されにくい分子であるということや、検出用のタグが切れていた、もしくはSDS-PAGE用のサンプル調製時における人為的なミスが考えられる。しかしながら、Ex3 Dbと同様に配向性の異なる4種類を同じ画分から調製し収量を比較す

るため、E₂₂₅x3 O2G1に関しても培地上清画分およびペリプラズム画分からの調製を行った。

【 0 1 2 1 】

クロスフローによる濃縮・透析後のIMAC精製結果、300 mMのイミダゾール濃度で溶出した画分に最も多くの目的タンパク質がみられたが、Ex3 Dbとは異なり多くの夾雑タンパク質が混在していた。また、ウェスタンブロッティングの結果からE₂₂₅x3 20G1はデグラデーションし易い分子であることが明らかになった。目的タンパク質の純度を高めるために、300 mMイミダゾール溶出画分を回収し、リン酸生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS)で透析後、再びIMAC精製を行った。

【 0 1 2 2 】

その結果、E₂₂₅x3 HLG1とE₂₂₅x3 LHG1に関してはある程度純度の高い画分を得ることができたため、300 mMイミダゾール溶出画分を用いてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。一方、E₂₂₅x3 O2G1とE₂₂₅x3 20G1は目的タンパク質と近い分子量の夾雑タンパク質を除くことができなかったため、300 mMイミダゾール溶出画分を回収し透析後、さらにIMAC精製を行った。

【 0 1 2 3 】

その結果、E₂₂₅x3 O2G1とE₂₂₅x3 20G1に関してもある程度純度の高い画分を得ることができたため、300 mMイミダゾール溶出画分を用いてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。各種E₂₂₅x3 Dbのゲルろ過クロマトグラフィー精製結果を図7に示した。ゲルろ過クロマトグラフィーによる最終精製、次いでフィルター滅菌を行った後に、各種E₂₂₅x3 Dbの培地1 Lあたりの収量を算出し、Ex3 Dbの収量と比較した(表7)。Ex3 Dbと同様の培養条件で調製した場合、E₂₂₅x3 Dbの収量はEx3 Dbに比べ大幅に低くなること

【 0 1 2 4 】

【表7】

各種 E₂₂₅x3 Db および Ex3 Db の収量比較

E ₂₂₅ x3 Db	収量 [mg/L]	Ex3 Db	収量 [mg/L]
HLG1	0.103	HLG1	3.2
LHG1	0.046	LHG1	0.7
O2G1	0.034	O5G1	2.1
20G1	0.056	50G1	2.2

【 0 1 2 5 】

4種類のE₂₂₅x3 Dbの細胞傷害活性比較

Ex3 Dbは配向性の違いによりその細胞傷害活性に差が生じたが、E₂₂₅x3 Dbでは4種類の配向性間での比較は行われていない。そこで、各種E₂₂₅x3 Dbの細胞傷害活性を比較するために、標的細胞にTFK-1、エフェクター細胞にT-LAKを用いてMTSアッセイを行った(図8)。その結果、配向性の異なる4種類のE₂₂₅x3 Dbの細胞傷害活性は「LHG1 > HLG1 > O2G1 > 20G1」となり、Ex3 Dbと同様にLHG1の活性が最も高いということが示され、用いる抗EGFR抗体を528から225に変えても機能的配向性はLHG1で共通している、ということが明らかになった。その一方で、他の配向性の活性差に関してはEx3 Dbとは傾向が異なっていることが示された。そこで次に、このような各種E₂₂₅x3 Dbの活性差が何に起因しているのかを調べるために、種々の手法を用いて機能解析を行った。

【 0 1 2 6 】

4種類のE₂₂₅x3 DbのEGFRに対する親和性比較

まず、各種E₂₂₅x3 Dbの細胞傷害活性の差と抗原に対する親和性の相関を調べるために、EGFR(固定化量1318 RU)に対する親和性をSPR(J Biol Chem. 2010 Jul 2;285(27):20844-9)により評価した。SPRの測定結果を図9に、それにより算出した結合・解離定数を表8に示した。

【0127】

【表8】

	EGFR固定化量 [RU]	k_a [1/(M·s)]	k_d [1/s]	K_A [1/M]	K_D [M]
E ₂₂₅ x3 HLG1	1318	8.76×10^5	1.66×10^{-3}	5.27×10^8	1.90×10^{-9}
E ₂₂₅ x3 LHG1	1318	8.16×10^5	4.29×10^{-3}	1.90×10^8	5.26×10^{-9}
E ₂₂₅ x3 O2G1	1318	4.05×10^2	1.41×10^{-3}	2.87×10^5	3.48×10^{-6}
E ₂₂₅ x3 2OG1	1318	3.93×10^5	3.96×10^{-3}	9.92×10^7	1.01×10^{-8}

k_a : 結合速度定数 k_d : 解離速度定数 K_A : 結合平衡定数 K_D : 解離平衡定数

10

20

【0128】

結合平衡定数の値は、「HLG1 > LHG1 > 2OG1 > O2G1」となり、EGFRに対する親和性と細胞傷害活性には相関がみられなかったことから、Ex3 Dbのように各種E₂₂₅x3 Dbの活性差もEGFRに対する親和性には起因していないことが明らかになった。また、O2G1のEGFRに対する親和性は他の配向性に比べ大幅に低いということが示された。

【0129】

4種類のE₂₂₅x3 Dbの架橋能の比較

続いて、当業者に公知の方法(例えば、特許文献5の実施例2に記載の方法)に準じた方法を用いたフローサイトメトリー(FCM)により各種E₂₂₅x3 Dbの架橋能を比較した。E₂₂₅x3 DbとCD3-FITCを等mol量混合した後にヒト扁平上皮がん細胞株であるA431細胞(ATCC No. CRL-1555)表面上のEGFRへの結合を検出した結果を図10aに、E₂₂₅x3 DbとEGFR-FITCを等mol量混合した後に細胞傷害性T細胞であるT-LAK(CD3⁺)表面上のCD3への結合を検出した結果を図10bに示した。

30

【0130】

図10の結果から、E₂₂₅x3 Db-CD3複合体のA431表面上EGFRへの結合は2OG1を除く3種類で検出され、その蛍光強度はLHG1が最も強く、次いでHLG1、O2G1の順であった。従って、架橋能の優位性がE₂₂₅x3 LHG1の高い細胞傷害活性に寄与していると考えられる。E₂₂₅x3 Dbでは、架橋能と細胞傷害活性の間に相関がみられた。

一方、E₂₂₅x3 Db-EGFR複合体のT-LAK表面上CD3への結合は、すべての配向性で検出されなかった。因みに、E₂₂₅x3 Db単独では細胞表面上CD3への結合がみられた。従って、細胞表面上のTCR等の存在によってE₂₂₅x3 Db-EGFR複合体がCD3へ結合する際に立体障害が生じており、それが架橋能に影響したのではないかと推測できる。

40

【0131】

4種類のE₂₂₅x3 Dbのサイトカイン分泌誘導能の比較

各種E₂₂₅x3 Dbに関して当業者に公知の方法(J Biol Chem. 2011 Jan 21;286(3):1812-8)でELISAによって抗腫瘍性サイトカインを検出し、活性との相関を調べた。TFK-1存在下・非存在下、TFK-1:T-LAK=1:10の場合においてIFN- γ およびTNF- α を検出した結果をそれぞれ図11(上、下)に示した。また、コントロールとしてマウスOKT3 Fabを用いた。

50

【 0 1 3 2 】

図 1 1 の結果から、TFK-1、E₂₂₅x3 Db、T-LAK共培養時での各種サイトカインの分泌量は、IFN- γ : LHG1 > 20G1 > O2G1 > HLG1、及び、TNF- α : LHG1 > 20G1 > O2G1 > HLG1、となり、抗腫瘍性サイトカインの分泌誘導に最も優れているのは、高活性かつ架橋能に有利な配向性であるLHG1であった。この結果から、標的細胞とエフェクター細胞の架橋により惹起されるサイトカイン誘導、つまりT-LAKの活性化がE₂₂₅x3 Dbによる細胞傷害においても重要な機構であることが示唆された。TFK-1非存在下ではサイトカイン分泌量が大幅に低いため、やはりサイトカイン誘導には標的細胞とエフェクター細胞の接着が関与していると推測できる。また、マウスOKT3 FabはTFK-1の有無に関わらずサイトカインの分泌を促進していた。

10

【 実施例 5 】

【 0 1 3 3 】

E₂₂₅x3 Db およびEx3 Dbを用いた細胞傷害活性評価

Ex3 DbとE₂₂₅x3 Dbは共にEGFRとCD3を標的としていることから、共通の標的細胞およびエフェクター細胞を用いた細胞傷害性試験において活性を比較することが可能であり、また重要である。そこで本実施例では、Ex3 DbとE₂₂₅x3 Dbのin vitroやin vivoにおける細胞傷害活性を比較した。

【 0 1 3 4 】

まず、実施例 4 で作製した配向性の異なる4種類のEx3 DbおよびE₂₂₅x3 Dbを用いて、MTSアッセイにより細胞傷害活性を比較した結果を図 1 2 に示した。

20

【 0 1 3 5 】

更に、MTSアッセイによりEx3 LHG1とE₂₂₅x3 LHG1の活性差を調べるために細胞傷害活性を比較した(図 1 3)。その結果、E₂₂₅x3 LHG1の細胞傷害活性はEx3 LHG1より約100倍高いことが示された。

【 実施例 6 】

【 0 1 3 6 】

Ex3 LHG1とE₂₂₅x3 LHG1のin vivo活性比較

実施例 5 で示されたように、4種類のEx3 DbおよびE₂₂₅x3 Dbはin vitroでは細胞傷害活性を有していたが、in vivoでの活性比較は行われていない。そこで、SCIDマウスを用いてTumor early stage model(図 1 4)でのin vivo活性評価を行った。ネガティブコントロール(PBS単独投与)のほかに、mOKT3 IgGをコントロールとして用いた。

30

図 1 5 に示したように、Ex3 LHG1の場合は腫瘍の効果的な成長抑制がみられたのは2 μ g投与時であったのに対し、E₂₂₅x3 LHG1は0.2 μ g投与で完全な腫瘍成長抑制効果がみられたことから、これらの抗腫瘍活性の優劣に関してはin vitroとの相関が認められた。

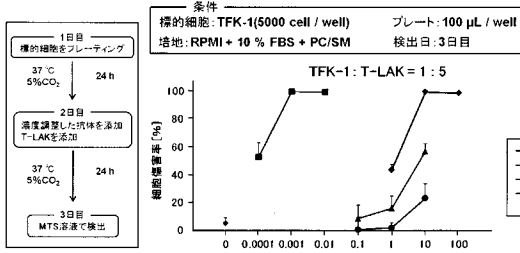
【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 3 7 】

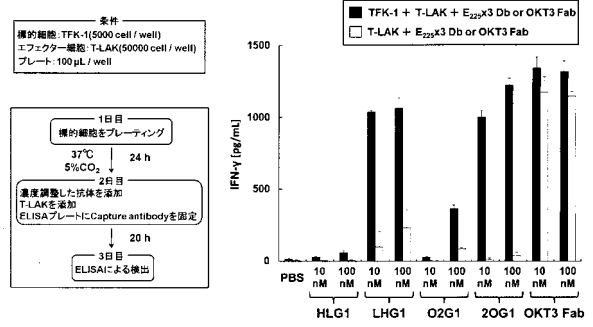
本発明によって、528抗体及び225抗体のように、標的抗原が同一で結合特性が類似している場合であっても、二重特異性抗体に利用した際には、その機能が大きく変化することが明らかになった。従って、標的抗原に対する抗体の種類を検討することによって、より高機能な二重特異性抗体を開発できる可能性が示された。

40

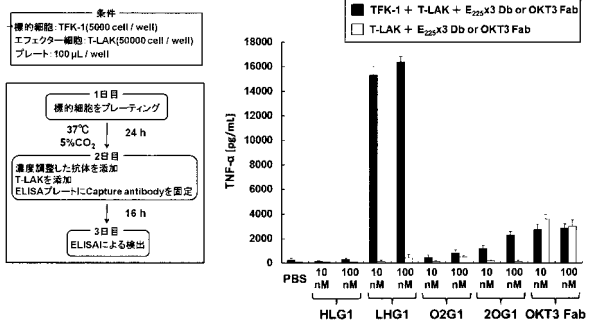
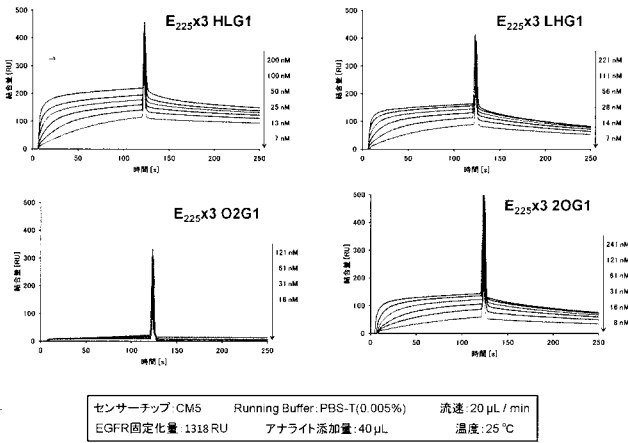
【 図 8 】



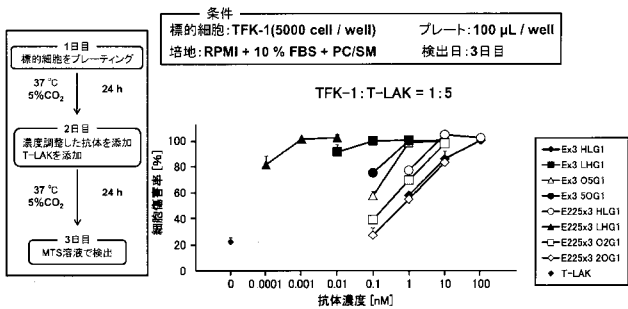
【 図 1 1 】



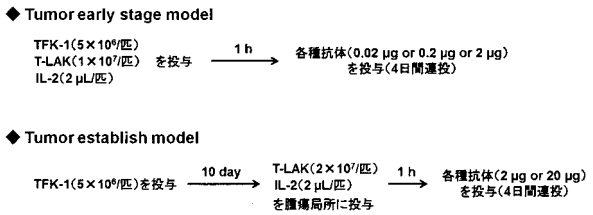
【 図 9 】



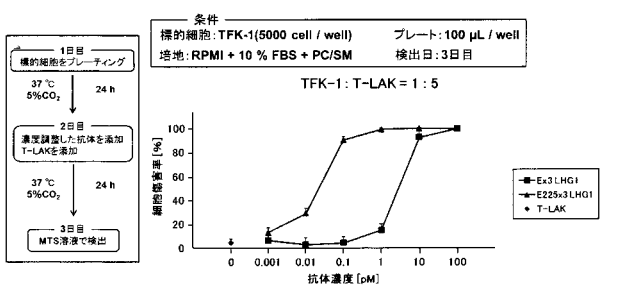
【 図 1 2 】



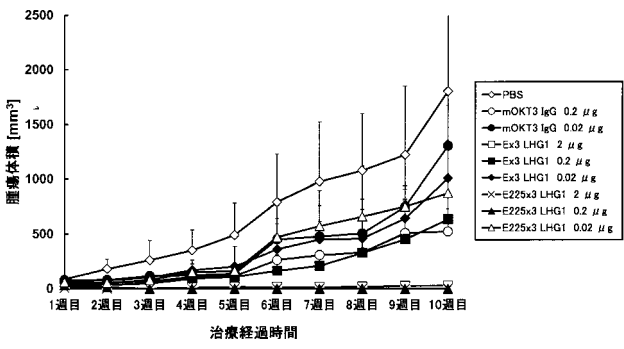
【 図 1 4 】



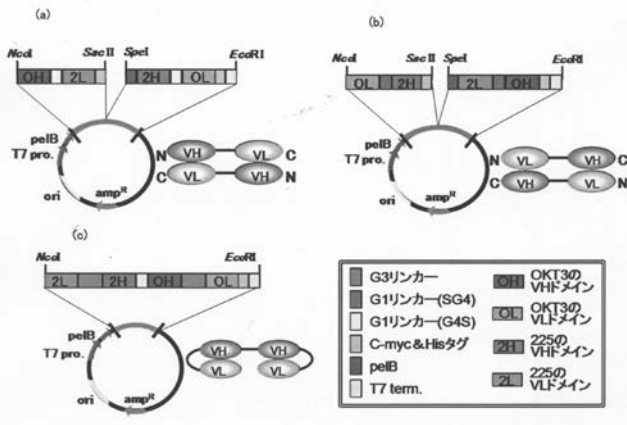
【 図 1 3 】



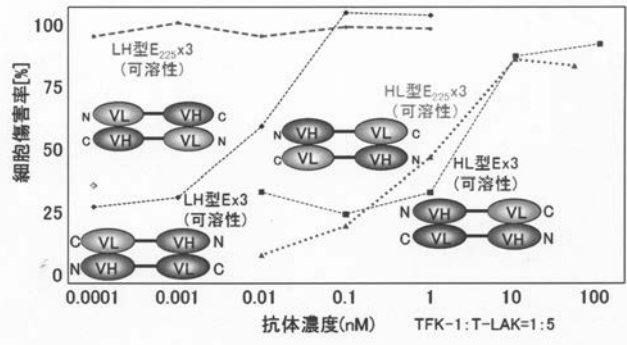
【 図 1 5 】



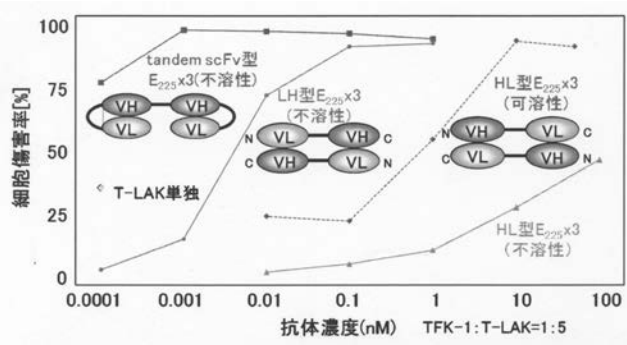
【 図 1 】



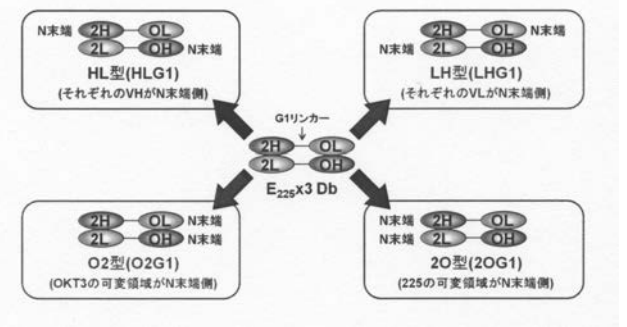
【 図 3 】



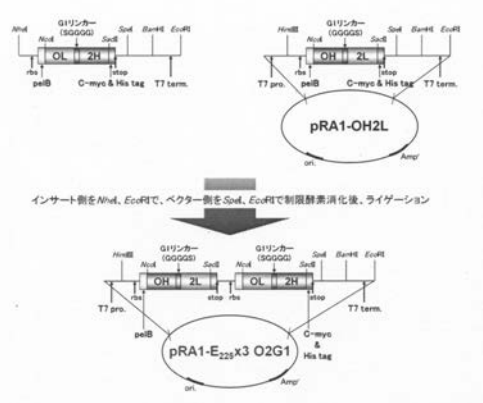
【 図 2 】



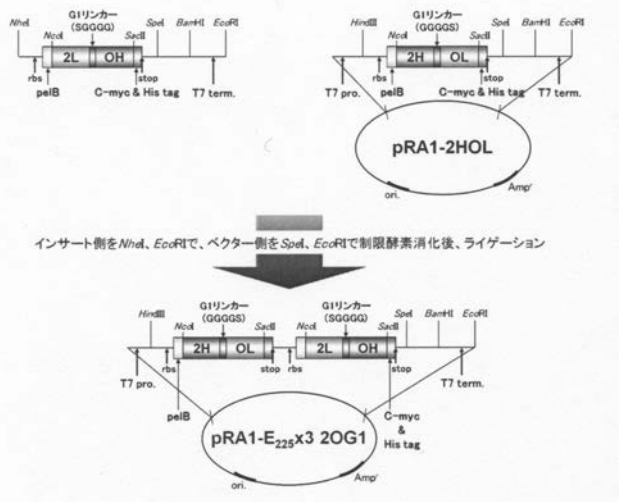
【 図 4 】



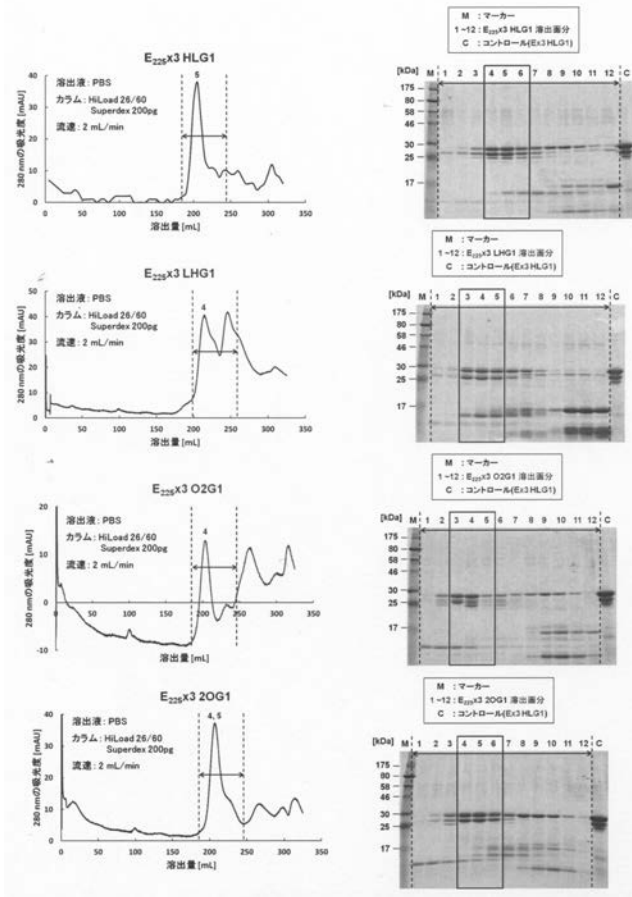
【 図 5 】



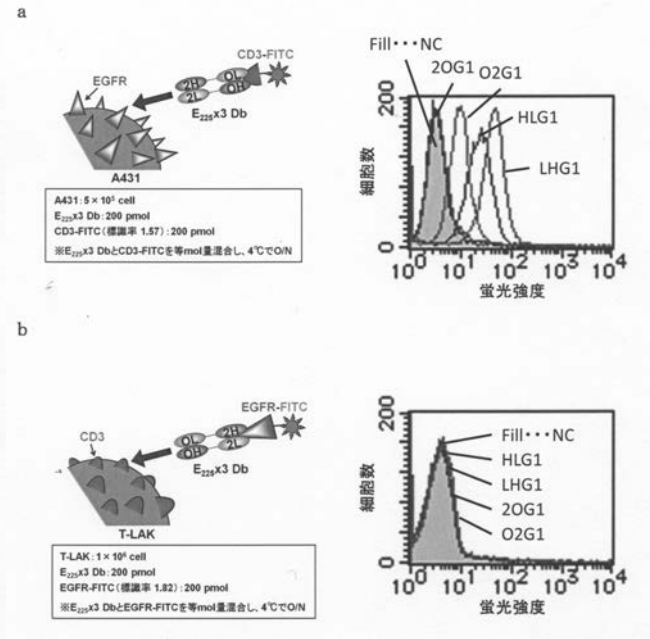
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 10 】



【 配列表 】

201514643800001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/055357
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i 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) C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2004-242638 A (Tohoku Techno Arch Co., Ltd.), 02 September 2004 (02.09.2004), abstract; claims; examples & US 2006/0210564 A1 & EP 1454917 A2 & DE 60332596 D & AT 468355 T	1-2, 4-15 3
Y A	WO 2010/109924 A1 (Tohoku University), 30 September 2010 (30.09.2010), abstract; claims; examples; fig. 1 & US 2012/0095191 A1 & EP 2412808 A1	1-2, 4-15 3
Y A	WO 2011/062112 A1 (Tohoku University), 26 May 2011 (26.05.2011), abstract; claims; examples & US 2013/0131320 A1 & EP 2502936 A1	1-2, 4-15 3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2015 (15.05.15)		Date of mailing of the international search report 26 May 2015 (26.05.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/055357

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ASANO R. et al., 'Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody', Protein Eng. Des. Sel., 2013, 26(5), pp.359-367	1-2,4-15 3
Y A	MASUI H. et al., 'Mechanism of antitumor activity in mice for anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different isotypes', Cancer Res., 1986, 46(11), pp.5592-5598	1-2,4-15 3
Y A	MENDELSON J., 'Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies as potential anti-cancer agents', J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1990, 37(6), pp.889-892	1-2,4-15 3
Y A	FAN Z. et al., 'Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts', Cancer Res., 1993, 53(19), pp.4637-4642	1-2,4-15 3
Y A	EP 0739984 A1 (SAN TUMORFORSCHUNGS-GMBHDE), 30 October 1996 (30.10.1996), SEQ ID NO:1 to 2 (Family: none)	1-2,4-15 3

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 5 3 5 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	JP 2004-242638 A (株式会社東北テクノアーチ) 2004.09.02, 要約、特許請求の範囲、実施例	1-2, 4-15	
A	& US 2006/0210564 A1 & EP 1454917 A2 & DE 60332596 D & AT 468355 T	3	
Y	WO 2010/109924 A1 (国立大学法人東北大学) 2010.09.30, 要約、請求の範囲、実施例、図1	1-2, 4-15	
A	& US 2012/0095191 A1 & EP 2412808 A1	3	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 15.05.2015		国際調査報告の発送日 26.05.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹内 祐樹	4 B 5 0 8 2 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 5 3 5 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2011/062112 A1 (国立大学法人東北大学) 2011.05.26, 要約、請求の範囲、実施例 & US 2013/0131320 A1 & EP 2502936 A1	1-2, 4-15 3
Y A	ASANO R. et al., 'Domain order of a bispecific diabody dramatically enhances its antitumor activity beyond structural format conversion: the case of the hEx3 diabody', Protein Eng. Des. Sel., 2013, 26(5), pp.359-367	1-2, 4-15 3
Y A	MASUI H. et al., 'Mechanism of antitumor activity in mice for anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different isotypes', Cancer Res., 1986, 46(11), pp.5592-5598	1-2, 4-15 3
Y A	MENDELSON J., 'Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies as potential anti-cancer agents', J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1990, 37(6), pp.889-892	1-2, 4-15 3
Y A	FAN Z. et al., 'Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts', Cancer Res., 1993, 53(19), pp.4637-4642	1-2, 4-15 3
Y A	EP 0739984 A1 (SAN TUMORFORSCHUNGS-GMBHDE) 1996.10.30, 配列番号1-2 (ファミリーなし)	1-2, 4-15 3

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 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	

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

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA25 CA44
 4C085 AA13
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74
 GA22

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。