

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年9月30日(30.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/109924 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/050008

(22) 国際出願日: 2010年1月4日(04.01.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-075050 2009年3月25日(25.03.2009) JP
特願 2009-260576 2009年11月16日(16.11.2009) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 熊谷 泉 (KUMAGAI Izumi) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 浅野 竜太郎(ASANO Ryutaro) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学

内 Miyagi (JP). 梅津 光央(UMETSU Mitsuo) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

(74) 代理人: 阿部 正博(ABE Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目1番2号 安田ビル10階 千葉ユナイテッド特許事務所内 Chiba (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, HU, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

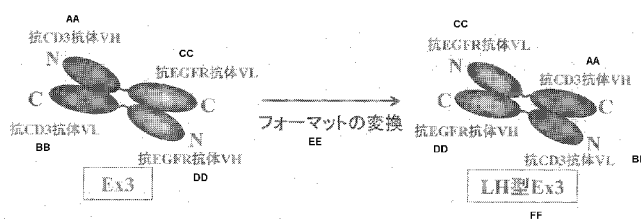
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,

[続葉有]

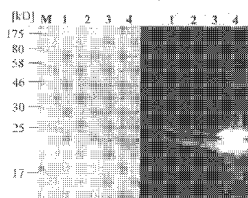
(54) Title: LH-TYPE BISPECIFIC ANTIBODY

(54) 発明の名称: LH型二重特異性抗体

[図1]



AA ANTI-CD3 ANTIBODY VH
BB ANTI-CD3 ANTIBODY VL
CC ANTI-EGFR ANTIBODY VH
DD ANTI-EGFR ANTIBODY VL
EE FORMAT CONVERSION
FF LH-TYPE Ex3
M MARKER
1 CULTURE SUPERNATANT
2 PERIPLASM FRACTION
3 INTRACELLULAR SOLUBLE FRACTION
4 INTRACELLULAR INSOLUBLE FRACTION



M: マーカー
1: 培地上清
2: ペリプラズム画分
3: 菌体内可溶性画分
4: 菌体内不溶性画分

(57) Abstract: Provided are a novel diabody type bispecific antibody, the function of which as a bispecific antibody is improved to provide a higher additional value, such as cost saving caused by a reduction in dose, to a drug; and a method for producing the same. A humanized diabody type bispecific antibody (LH-diabody type bispecific antibody) characterized in that an L-chain is located in the N-terminal side in each polypeptide (LH type); a humanized high-functional bispecific antibody which contains said LH diabody type bispecific antibody; a nucleic acid molecule encoding both of two kinds of single-stranded polypeptides constituting said bispecific antibody; and a method for producing said antibody which comprises culturing a host cell having been transformed by an expression vector containing said nucleic acid molecule.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/109924 A1



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

【課題】二重特異性抗体の更なる高機能化によって、投与量の軽減による低コスト化など、医薬品としての付加価値を高める新たなダイアボディ型二重特異性抗体及びその製造方法を提供すること。【解決手段】各ポリペプチドにおいてL鎖がN末側にあること(LH型)を特徴とするヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体(LH型ダイアボディ型二重特異性抗体)及び該LH型ダイアボディ型二重特異性抗体を含むヒト型化高機能性二重特異性抗体、該二重特異性抗体を構成する2種類の一本鎖ポリペプチドを共にコードする核酸分子、該核酸分子を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することを含む、該抗体の製造方法。

明 細 書

発明の名称： L H型二重特異性抗体

技術分野

[0001] 本発明は、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末側にあること（L H型）を特徴とする該二重特異性抗体及び該L H型ダイアボディ型二重特異性抗体を含むヒト型化高機能性二重特異性抗体（以上をまとめて、単に「L H型二重特異性抗体」ともいう）、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、それらを含む医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 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、ある抗体のVHとVLのドメインが一本のポリペプチド鎖中にある一本鎖抗体(scFv)のような低分子抗体の作製が世界的な潮流となっている。このような低分子抗体は安価な大腸菌でも製造可能であるが、分子量の低下によって体内半減期が低下し、薬効持続時間が減少することが懸念される。また、IgGの様な完全抗体は、標的抗原に対し多価で結合するのに対し、通常、低分子抗体は結合価が一価となるため、親和性の低下も問題となっている。更に、抗体医薬の主な作用機序はFc領域を介した抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)ともされているため、Fc領域を有さないscFvは効果の低さが懸念される。尚、scFvについては、非特許文献1を参照することができる。

[0004] このため、がん細胞と免疫細胞を架橋するよう特異付けた低分子二重特異性抗体などが開発されてきており、BiTEと呼ばれる、2つのscFv同士を連結させ

た tandem scFv 型の低分子二重特異性抗体が唯一臨床治験に進んでいる (Science. 2008 Aug 15; 321(5891):974-7.)。しかしながらこの BiTE は、動物細胞を用いて調製しているため、収量や製造コストが問題となっている。BiTE のような tandem scFv 型の低分子二重特異性抗体は、低分子であるものの大腸菌可溶性画からの調製は困難であるとの報告もあり (J Mol Biol. 2003 330(1):99-111.)、事実 BiTE は動物細胞を用いて調製されている。

[0005] 多重特異性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 (特許文献 2)。

[0006] このようなダイアボディ型二重特異性抗体の特徴としては、低分子 (分子量約 60,000) であることによる低免疫原性及び腫瘍組織への高浸透性、更には、例えば、大腸菌等の微生物を利用した安価な大量製造が可能であること、又、遺伝子工学を利用した機能改変が容易であることを挙げることができる。

[0007] 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) は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、他の抗体を用いて作製したダイアボディ型二重特異性抗体との比較により、該が上記の優れた効果を発揮する為には、ヒト型化 528 抗体及びヒト型化 OKT3 抗体のヒト型化可変領域自身の構造的安定性、及びこれらの組み合わせが非常に重要であることが推測された。

[0008] 更に、本発明者等は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）。

[0009] 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、以下の非特許文献3及び非特許文献4に記載されている。

特許文献1：特許第3803790号明細書

特許文献2：国際公開第W02007/108152号パンフレット

非特許文献1：Rosenburg and Moore (Ed.), “The Pharmacology of Monoclonal Antibodies”, Vol. 113, Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)

非特許文献2：Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448, 1993

非特許文献3：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4：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)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] このようにEx3のようなダイアボディ型二重特異性抗体は優れた活性を有しているが、主として大腸菌内で発現させて、その不溶性画分からの巻き戻し法により調製されている為に、少なくとも基礎研究レベルでは培地1Lあたり数mgの収量となっており(Biochem Soc Trans. 2002 30(4):507-11)、未だ、十分な生産効率を得られていない。従って、ダイアボディ型二重特異性抗体の更なる高機能化によって、投与量の軽減による低コスト化など、医薬品としての付加価値を高めることが求められている。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は上記課題を解決すべく研究の結果、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鎖をN末側にすることを特徴とするダイアボディ型二重特異性抗体（LH型ダイアボディ型二重特異性抗体：LH型Ex3）を開発し、更に、抗体の大腸菌、特にその可溶性画分からの新たな調製法を見出し、本発明を完成した。又、LH型を用いて作製した上記特許文献2に記載されているようなヒト型化高機能性二重特異性抗体（BsAb）はより高い細胞傷害性を示すことを確認した。

[0012] 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] N末端からC末端の順に抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）及び抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域（OH）を含んで成る第一のポリペプチドと、N末端からC末端の順に抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域（OL）及び抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）を含んで成る第二のポリペプチドから構成されることを特徴とする、ダイアボディ型二重特異性抗体。

[態様2] 抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）及びL鎖のヒト型化可変領域（5L）、並びに、抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域（OH）及びL鎖のヒト型化可変領域（OL）を含み、以下のいずれかの構造：

(i) (5LOH) - (ペプチドリンカー) - (OL5H) 又は (OL5H) - (ペプチドリンカー) - (5LOH) ；

(ii) (5LOH) 及び (OL5H) の2種類の一本鎖ポリペプチドから構成されるヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体がいずれか一方の一本鎖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領域に結合して成る抗体；

(iii) (5LOH) - (ペプチドリンカー) - (OL5H) 又は (OL5H) - (ペプチドリンカー) - (5LOH) から成る一本鎖ポリペプチドがヒンジ領域を介してヒト抗体の2つのFc領域に結合して成る抗体；

を有するヒト型化高機能性二重特異性抗体。

[態様 3] (ii) の構造を有する態様 2 記載のヒト型化高機能性二重特異性抗体であって、該ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体がプロテアーゼ切断部位を介してヒンジ領域に結合していることを特徴とする、前記ヒト型化高機能性二重特異性抗体。

[態様 4] (iii) の構造を有する態様 2 記載のヒト型化高機能性二重特異性抗体であって、一本鎖ポリペプチドがプロテアーゼ切断部位を介してヒンジ領域に結合していることを特徴とする、前記ヒト型化高機能性二重特異性抗体。

[態様 5] 各一本鎖ポリペプチドにおける L 鎖のヒト型化可変領域と H 鎖のヒト型化可変領域がペプチドリンカーで連結されている、態様 1 又は 2 記載のダイアボディ型二重特異性抗体。

[態様 6]

抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 抗体 5 2 8 の L 鎖のヒト型化可変領域 (5 L)、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 抗体 5 2 8 の H 鎖のヒト型化可変領域 (5 H)、抗 CD 3 抗体 OK T 3 の L 鎖のヒト型化可変領域 (O L)、及び、抗 CD 3 抗体 OK T 3 の H 鎖のヒト型化可変領域 (O H) が、夫々、配列番号 2, 4, 6 及び 8 で示されるアミノ酸配列から成る、態様 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

[態様 7] 態様 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を構成する一本鎖ポリペプチド。

[態様 8] 態様 7 に記載の一本鎖ポリペプチドをコードする核酸分子。

[態様 9] 態様 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を構成する 2 種類の本鎖ポリペプチドを共にコードする核酸分子。

[態様 10] 態様 8 又は 6 9 記載の核酸分子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 11] 共発現ベクターである、態様 10 記載のベクター。

[態様 12] プラスミドベクターである、態様 10 又は 11 記載のベクター

。

[態様 1 3] 態様 1 0 ないし 1 2 のいずれか一項に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

[態様 1 4] 原核細胞である態様 1 3 記載の宿主細胞。

[態様 1 5] 大腸菌である態様 1 4 記載の宿主細胞。

[態様 1 6] 態様 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の製造方法であって、態様 1 3 1 5 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し該二重特異性抗体を構成する 2 種類の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、該 2 種類の一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された二重特異性抗体を分離・回収することから成る、前記方法。

[態様 1 7] 原核細胞が大腸菌であり、2 種類の一本鎖ポリペプチドを大腸菌の培養培地上清、ペリズマ画分、菌体内可溶性画分、又は、菌体内不溶性画分から回収する、態様 1 6 記載の製造方法。

[態様 1 8] 態様 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の製造方法であって、態様 1 1 記載の共発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養し該二重特異性抗体を構成する 2 種類の一本鎖ポリペプチドを発現させ、該形質転換菌内でダイアボディ型二重特異性抗体を形成せしめ、形成された二重特異性抗体を分離・回収することから成る、前記方法。

[態様 1 9] 態様 3 又は 4 に記載のヒト型化高機能性二重特異性抗体をプロテアーゼで消化することにより F c 領域及びヒンジ領域を切断することから成る、夫々、5 L O H 及び O L 5 H の 2 種類のポリペプチドから構成されるヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体、又は態様 2 記載の (i) の構造を有するヒト型化高機能性二重特異性抗体の製造方法。

[態様 2 0] 態様 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性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 2 1] 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 2 0 記載の医薬組成物。

[書類名] 要約書

[課題] 二重特異性抗体の更なる高機能化によって、投与量の軽減による低コスト化など、医薬品としての付加価値を高める新たなダイアボディ型二重特異性抗体及びその製造方法を提供すること。

[解決手段] 各ポリペプチドにおいてL鎖がN末側にあること（LH型）を特徴とするヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体（LH型ダイアボディ型二重特異性抗体）及び該LH型ダイアボディ型二重特異性抗体を含むヒト型化高機能性二重特異性抗体、該二重特異性抗体を構成する2種類の一本鎖ポリペプチドを共にコードする核酸分子、該核酸分子を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することを含む、該抗体の製造方法。

発明の効果

[0013] 本発明のLH型ダイアボディ型二重特異性抗体は、以前に本発明者等が開発したヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体（Ex3）にFcが融合されたIgG様の高機能二重特異性抗体（Ex3-scDb-Fc：特許文献2）と同等の非常に高い細胞傷害活性を有する。更に、製造方法における諸条件の検討により、従来の各種二重特異性抗体の倍以上の高い抗体量を菌の可溶性画分から調製することに成功した。更に、LH型を用いて作製したヒト型化高機能性二重特異性抗体（LH型BsAb）は、上記のLH型ダイアボディ型二重特異性抗体に較べて、より高い細胞傷害性を示すことが確認された。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] LH型ダイアボディ型二重特異性抗体を大腸菌培養培地上清及び大腸菌菌体内各画分から調製した結果を示す。

[図2] ヒト扁平上皮がん細胞株であるA431細胞（ATCC No. CRL-1555）に対する、LH型ダイアボディ型二重特異性抗体、特許文献1に記載されたヒト型化Ex3及び特許文献2に記載されたEx3-scDb-Fcによる細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図3] ヒト乳がん細胞株であるSK-BR-3細胞（ATCC No. HTB-30）に対する、LH型ダイアボディ型二重特異性抗体、特許文献1に記載されたヒト型化Ex3及び特許文献2に記載されたEx3-scDb-Fcによる細胞増殖阻害試験の結果を示す。

。

[図4] ヒト乳がん細胞株（EGFR低発現株）であるMCF7細胞（ATCC No. HTB-22）に対する、LH型ダイアボディ型二重特異性抗体、特許文献1に記載されたヒト型化Ex3及び特許文献2に記載されたEx3-scDb-Fcによる細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図5] ヒト胆がん細胞株であるTFK-1（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）に対する、LH型ダイアボディ型二重特異性抗体及び特許文献1に記載されたヒト型化Ex3による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図6] ヒト胆がん細胞株であるTFK-1（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）に対する、LH型ダイアボディ型二重特異性抗体、特許文献1に記載されたヒト型化Ex3及び特許文献2に記載されたEx3-scDb-Fcによる細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図7] TFK-1に対する、LH型ダイアボディ型二重特異性抗体（LH型Ex3）及びLH型ヒト型化高機能性二重特異性抗体（LH型Ex3 scDb-Fc）による細胞増殖阻害試験の結果を示す。ここで、各抗体濃度において、左のバー（LH型Ex3）及び右のバー（LH型Ex3 scDb-Fc）を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 抗EGFR抗体産生マウスB細胞ハイブリドーマ528は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターに寄託されている（ID: TKG0555）。更に、528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. HB-8509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。

[0016] 一方、抗CD3抗体OKT3も東北大学加齢医学研究所附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。

[0017] これらを用いて、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、ISOGEN(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 (Kreber, 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を行いこれら各抗体の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。

[0018] 本発明のLH型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、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); Reichman 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。

[0019] 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、W092/22653等を

参照することができる。

- [0020] 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ができる。
- [0021] 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。
- [0022] 具体的には、528ヒト型化可変領域のヒト型化はCDR grafting法により行った。まずVH、VLそれぞれ相同性検索を行い、各CDR (complementarity determining region) の長さ等を考慮した上でもっとも相同性の高いFR (frame work) をもつヒト抗体配列を選択する。選択したヒト抗体のCDRを528のCDRと入れ換えたアミノ酸配列を設計し、対応するコドンについては先と同様に大腸菌至適コドンを用いることが好ましく、オーバーラップPCR法により遺伝子の全合成を行うことが出来る。
- [0023] 又、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。この際にコドンは大腸菌における至適コドン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大腸菌における発現量の増加はすでに報告されている。
- [0024] 本発明のLH型二重特異性抗体の構成要素である一本鎖ポリペプチドに含まれる、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）、抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域（O

L)、及び、抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域(OH)の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列の一例を、夫々、配列番号1及び2、配列番号3及び4、配列番号5及び6、並びに、配列番号7及び8で示す。

- [0025] 各一本鎖ポリペプチドにおけるL鎖ヒト型化可変領域及びH鎖ヒト型化可変領域は適当なペプチドリンカーで連結されていることが好ましい。該ペプチドリンカーは、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、ペプチドリンカーは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。
- [0026] 更に、各一本鎖ポリペプチドは上記のペプチドリンカーを含まずに、二つのヒト型化可変領域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末端側にあるヒト型化可変領域のC末端の1ないし数個のアミノ酸、又は、C末端側にあるヒト型化可変領域の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。
- [0027] 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、ヒト型化可変領域の抗原特異性と実質的に保持しているアミノ酸配列も本発明のLH型二重特異性抗体を構成する一本鎖抗体のポリペプチドとして使用することが出来る。欠失、置換、挿入若しくは付加されるアミノ酸は、好ましくは、同

族アミノ酸（極性・非極性アミノ酸、疎水性・親水性アミノ酸、陽性・陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸など）同士が置換されるか、又は、アミノ酸の欠失若しくは付加によって、蛋白質の三次元構造及び／又は局所的電荷状態に大きな変化が生じない、又は、実質的にそれらが影響を受けないようなものが好ましい。このような欠失、置換又は付加されるアミノ酸を有するポリペプチドは、例えば、部位特異的変異導入法（点突然変異導入及びカセット式変異導入等）、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、及びPCR法等の当業者に周知の方法を適宜組み合わせ、容易に作製することが可能である。尚、これらの一個又は数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は、元のアミノ酸配列全長に対して、90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の配列相同性を示すものということもできる。

[0028] ヒト型化高機能性二重特異性抗体（BsAb）に含まれる様々な型の具体的な構造は国際公開第W02007/108152号パンフレット（特許文献2）に記載されており、具体的には、例えば、以下に示す型を挙げることが出来る。

[0029] 本発明のLH型BsAbの第一の型（i）（LH型Ex3 scDb）は、（5LOH）－（ペプチドリンカー）－（OL5H）又は（OL5H）－（ペプチドリンカー）－（5LOH）で示される構造を有する。即ち、LH型Ex3を構成する2種類のポリペプチド鎖である5LOH及びOL5H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Ex3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、LH型Ex3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。

[0030] 上記ペプチドリンカーは、OH及びOL、並びに、5H及び5L同士を会合させて、夫々の抗原と特異的に反応し得る抗原結合部位が形成されるものである限り、その長さなどに特に制限はなく、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。尚、上記ペプチドリンカーは、5 H及び5 Lの間、又は、O H及びO Lの間のいずれかに挿入されていても良い。

[0031] 本発明のL H型BsAbの第二の型(ii) (L H型Ex3-Fc)は、5 L O H及びO L 5 Hの二種類のポリペプチドから構成されるヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体(L H型Ex3)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Ex3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、(O L 5 H) - ヒンジ領域 - Fc領域)、及び、L H型Ex3を構成するもう一方のポリペプチド(例えば、(5 L O H))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。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)を意味する。

[0032] 本発明のL H型BsAbの第三の型(iii) (L H型Ex3 scDb-Fc)は、本発明L H型BsAbの第二の型(ii)において、L H型Ex3の代わりに本発明BsAbの第一の型であるL H型Ex3 scDb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。即ち、ヒンジ領域には、(5 L O H) - (ペプチドリンカー) - (O L 5 H)、又は(O L 5 H) - (ペプチドリンカー) - (5 L O H)から成る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。

[0033] 本発明のL H型BsAbの第二の型(ii)及び第三の型(iii)を構成するドメインの数はIg G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L H型BsAbの第二の型(ii)及び第三の型(iii)において、L H型Ex3又はL H型Ex3 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L H型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、L H型Ex3又はL H型Ex

3 scDbを容易に製造することが可能となる。又、こうしたプロテアーゼ消化によって得られたL H型Ex3又はL H型Ex3 scDbは、従来の方法で作製したものと比較してより高い細胞傷害活性を示す。

[0034] 以上の本発明の第二の型 (ii) 及び第三の型 (iii) のL H型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) 及び細胞依存性サイトカイン (CDC) 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L H型Ex3には見られない効果を奏する。

尚、本発明L H型BsAbに含まれるペプチドリンカーは、例えば1~20個のアミノ酸からなるポリペプチドであってよく、好ましくは1~15個のアミノ酸からなるポリペプチド、さらに好ましくは2~10個のアミノ酸からなるポリペプチドが挙げられる。

[0035] 本発明のL H型BsAbに含まれる定常領域又はFc領域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 κ または λ 鎖の何れに由来するものでも良い。又、Fc領域又はH鎖定常領域は、通常、IgGの γ 鎖に由来するものが使用される。CH1、CH2及びCH3、並びに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及び配列番号30、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事ができる。

[0036] 更に、本発明のL H型BsAbを構成する一本鎖ポリペプチドに含まれる、PreSission配列、ヒンジ領域、ペプチドリンカー、シグナルペプチド等のアミノ酸配列の代表例として、特許文献2の図3-3及び図3-4に開示された配列を挙げる事が出来る。尚、PreSission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。

[0037] 本発明の各一本鎖ポリペプチドに含まれる各領域又は配列をコードする核酸分子 (オリゴヌクレオチド) の代表例は、上記の各配列番号に示された塩基

配列を有するものである。その他に、各配列番号に記載の塩基配列の全長と90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の配列相同性を示すような塩基配列から成る核酸分子は、上記の各領域又は配列と実質的に同等の活性又は機能を有するポリペプチドをコードしていると考えられるので、これらの核酸分子も上記の本発明の核酸に含まれる。このような核酸分子には本発明のダイアボディ型二重特異性抗体を構成する2種類の一本鎖ポリペプチドの少なくともいずれか一つのポリペプチドをコードする塩基配列が含まれているが、2種類の一本鎖ポリペプチドを夫々コードする2種類に塩基配列が共に含まれていることが好ましい。

[0038] 2つのアミノ酸配列又は塩基配列における配列相同性を決定するために、配列は比較に最適な状態に前処理される。例えば、一方の配列にギャップを入れることにより、他方の配列とのアラインメントの最適化を行なう。その後、各部位におけるアミノ酸残基又は塩基が比較される。第一の配列におけるある部位に、第二の配列の相当する部位と同じアミノ酸残基又は塩基が存在する場合、それらの配列は、その部位において同一である。2つの配列における配列相同性は、配列間での同一である部位数の全部位（全アミノ酸又は全塩基）数に対する百分率で示される。

[0039] ここで、「相同性」とは、ポリペプチド配列（あるいはアミノ酸配列）又はポリヌクレオチド配列（あるいは塩基配列）における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量（数）を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」（「同一性」とも言われる）なる用語は、当業者には周知である（例えば、Lesk, A. M. (Ed.), *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin,

A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), *Computer Analysis of Sequence Data: Part I*, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), *Sequence Analysis Primer*, M-Stockton Press, New York, (1991) 等)。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), *Guide to Huge Computers*, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. & Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988) 等に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二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、GCG 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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°C~68°C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°C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°Cの条件で洗浄を行うものである。

[0045] 更に、各一本鎖ポリペプチドにおけるヒト型化されたヒト型化可変領域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、gDNA、cDNA、化学合成DNA及びmRNA等を含むものである。

[0046] 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。

[0047] 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. Glo

ver 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。

- [0048] こうして取得された本発明のLH型二重特異性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。
- [0049] 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。
- [0050] 又は、本明細書の実施例に記載されているように、アミノ酸自体は変更せずに、大腸菌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。
- [0051] 本発明のLH型二重特異性抗体は、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宿主細胞中で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LH型二重特異性抗体を分離・回収することによって製造することが出来る。

[0052] 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出来る。

[0053] 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H

i s - t a g) 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。

- [0054] 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。
- [0055] 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できるが、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できる。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できる。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°C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LH型二重特異性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。
- [0056] 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。
- [0057] 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行うことが出来る。例えば、遠心分離、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、硫酸アンモニウム沈殿

、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。

[0058] 尚、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ことも多いために、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、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して行うことが出来る。更に、こうして精製された2種類の一本鎖ポリペプチドを会合（巻き戻し）せしめ、形成された抗体分子を分離して回収することによって、本発明のLH型二重特異性抗体を製造することが出来る。

[0059] 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。

[0060] 以上に示したように、本発明のLH型二重特異性抗体は、例えば、大腸菌など培養宿主細胞の培養培地上清、ペリズマ画分、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。

[0061] 本発明のベクターとして、本発明のLH型二重特異性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LH型二重特異性抗体が形成され、それを大腸菌など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。

[0062] 更に、該形質転換菌の菌体内可溶性画分からの調製量を向上させるためには、以下のような条件とすることが好ましい。宿主としてBL21 star (DE3) 株 (Invitrogen) を用い、培養は2xYT培地を用い28°Cで行う。一晚振盪培養後(600 nmのO.D.が約5)となったところで、終濃度0.5 mMのIPTGにより発現を誘導し、さらに16時間培養後に、培地上清画分と菌体を浸透圧処理後の画分(ペリプラズム画分)から目的タンパク質を回収する。

[0063] 本発明の医薬組成物は、本発明のLH型二重特異性抗体、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。

[0064] 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。

[0065] 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。

- [0066] 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（リポソーム、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。
- [0067] 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。
- [0068] 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の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。
- [0069] 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。
- [0070] なお、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。
- [0071] 以下に参考例及び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。

- [0072] 全ての参考例及び実施例は、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

- [0073] LH型ダイアボディ型二重特異性抗体の製造

本発明の LH 型ダイアボディ型二重特異性抗体を以下の概要で調製した。発現ベクターは既に開発されている 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 (特許文献 1、及び特許文献 2 の参考例 1 ~ 4) を基に以下の通り作製した。

- [0074] 即ち、A-B プライマーを用い PCR 法により ヒト型化 5L (以下 h5L) を、C-D プライマーを用い ヒト型化 OH (以下 hOH) をそれぞれ増幅後、得られた PCR 産物を混合し、さらに A-D プライマーを用いて PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を制限酵素 NcoI と SacII で消化し、pRA ベクターに挿入することで、SGGGG をリンカー配列として有する LH 型ダイアボディを構成する ヘテロ scFv の 1 つ h5LhOH を発現

させるためのベクター-pRA-h5Lh0Hを作製した。

E-Fプライマーを用いPCR法によりヒト型化0L(以下h0L)を、G-Hプライマーを用いヒト型化5H(以下h5H)をそれぞれ増幅後、得られたPCR産物を混合し、さらにE-Hプライマーを用いてPCR増幅を行った。得られたPCR産物を制限酵素NcoIとSacIIで消化し、pRAベクターに挿入することで、SGGGGをリンカー配列として有するLH型ダイアボディを構成するヘテロscFvの1つh0Lh5Hを発現させるためのベクター-pRA-h0Lh5Hを作製した。

さらに、I-Jライマーを用いPCR法によりh5Lh0Hを増幅後、得られたPCR産物を制限酵素SpeIとBamHIで消化し、pRA-h0Lh5H中のh0Lh5Hの後方に挿入することで、本発明のLH型ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体の製造用の共発現ベクターを構築した(図1)。

それぞれ、C末端側には検出のためのc-mycペプチドタグ、並びに精製のためのHis-tagが並列に導入されている。

[0075] A NcoI-5L : 5'-NNNNCCATGGCCGATATTGTGATGACCCAGAGCCCG-3' : [配列番号 : 9]

B 5LSG4 : 5'-CTGGCCACCGCCACCAGATTTAATTTCCACTTTGGTGCCACCGCC-3' [配列番号 : 10]

C SG40H : 5'-AAATCTGGTGGCGGTGGCCAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGC-3' [配列番号 : 11]

D 0H-SacII : 5'-NNNNAGCCGCGGAGCTAACGGTCACCGGGGTGCCCTGGCC-3' [配列番号 : 12]

E NcoI-0L : 5'-NNNNCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAGCCCG-3' [配列番号 : 13]

F 0LSG4 : 5'-CTGGCCACCGCCACCAGAGGTAATCTGCAGTTTGGTACCCTG-3' [配列番号 : 14]

G SG45H : 5'-ACCTCTGGTGGCGGTGGCCAGGTGCAACTGGTTCAGAGCGGC-3' [配列番号 : 15]

H 5H-Sac II : 5'-NNNNAGCCGCGGAGCTCACGGTAACCAGCGTACC-3' [配列番号 : 16]

6]

I Spel-pel-B : 5'-ACTAGTTATTTCAAGGAGACAGTCATAATG-3' [配列番号 : 17]

J His-BamHI : 5'-CACCATCATCACCACCATTAATAGCGGATTG-3' [配列番号 : 18]

[0076] C末端側には検出のためのc-mycペプチドタグ、並びに精製のためのHis-tag (Hisx6:ヒスチジン6量体tag)が並列に導入されている。常法に従って、上記の共発現ベクターで大腸菌を形質転換し、該形質転換菌を2xYT培地中で28°Cで一晩培養後、0.5 mMのIPTGで発現誘導し、培養培地上清及び大腸菌菌体内のペリプラズマ画分、可溶性画分、及び、不溶性画分から調製した結果を図1に示す。尚、各図中においては、こうして得られた本発明のヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体を「LH型Ex3」と示す。

[0077] こうして製造された本発明のLH型であるヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体の構成要素である一本鎖ポリペプチドに含まれる、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)、抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域(OL)、及び、抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域(OH)の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列は、夫々、夫々、配列番号1及び2、配列番号3及び4、配列番号5及び6、並びに、配列番号7及び8で示されたものである。

実施例 2

[0078] LH型高機能性二重特異性抗体の製造

特許文献2の実施例1に記載の方法(第一~三の型)に準じて上記各配列及び適当なPCRプライマーを用いてLH型高機能性二重特異性抗体(Ex3 scDb-Fc)用の発現ベクターを作製し、次いで、特許文献2の実施例2に準じてCHO細胞を宿主として用いてEx3 scDb-Fcを調製した。但し、まず、第一の型であるLH型高機能性二重特異性抗体(LH型Ex3 scDb)として、(5LOH)の上流にペプチドリンカーを介して(OL5H)を挿入することによって、(N末側)(OL5H)-(ペプチドリンカー)-(5LOH)(C末側)の構成を有するEx3 scDbを作製し、これに基づきEx3 scDb-Fcを作製し

た。その結果、精製後の抗体収量は培養液 1 L あたり約 1 mg であった。

実施例 3

[0079] LH型ダイアボディ型二重特異性抗体及びLH型高機能性二重特異性抗体 (Ex3 scDb-Fc) の細胞増殖阻害試験

実施例 1 で作製した本発明の LH型ダイアボディ型二重特異性抗体及び実施例 2 で作製した LH型高機能性二重特異性抗体について、以下の概要で細胞増殖阻害試験 (MTS アッセイ) を実施した。

[0080] MTS assay により、ヒト扁平上皮がん細胞株であるA431細胞 (ATCC No. CRL-1555)、ヒト乳がん細胞株であるSK-BR-3細胞 (ATCC No. HTB-30)、ヒト乳がん細胞株 (EGFR低発現株) であるMCF7細胞 (ATCC No. HTB-22)、及び、ヒト胆がん細胞株であるTFK-1 (東北大学加齢医学研究所付属医用細胞資源センター ID: TKG036) の増殖が LH型ダイアボディ型二重特異性抗体によりどれほど阻害されたかを、特許文献 1 に記載されたヒト型化Ex3 (図中、単に「Ex3」と表記) 及び特許文献 2 に記載されたEx3-scDb-Fcと比較した。セルカウントを行い、RPMI (10 % FBS) 100 μ Lあたり細胞 5×10^3 個になるよう調整し、96穴プレートに100 μ Lずつ分注、37°Cで一晩静置した。目的蛋白質を目的濃度になるようにRPMIで希釈、前日準備したプレートに抗体蛋白質を50 μ Lずつ分注し、T-LAK 細胞を目的E/T 比になるようにRPMIで希釈し、50 μ Lずつ分注し (E/T 比 : effector (T-LAK細胞)/target (標的がん細胞) 比)、37°Cで48時間培養した。プレートの培養液を取り除き、PBS により洗浄、MTS、PMS、RPMI を加え、37°Cで30~60分インキュベートした後、プレートリーダーで490nm の吸光度を測定した。その結果、図 2~6 に表されるように、いずれの細胞株に対しても、本発明の LH型ダイアボディ型二重特異性抗体は、ヒト型化Ex3 に較べて約 1 桁も優れた細胞傷害活性を示し、IgG様の高機能二重特異性抗体であるEx3-scDb-Fcと同等の細胞傷害活性を示すことが確認された。

更に、同様の方法でTFK-1の増殖に対する阻害作用を LH型Ex3と LH型Ex3 scDb-Fcとで比較した。その結果、LH型Ex3 scDb-FcはLH型Ex3よりも更に顕著な細胞傷害活性を有することが示された (図 7)。

(注) MTS 試薬 (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega社製)、PMS(CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega 社製)

産業上の利用可能性

- [0081] 抗体医薬はコスト高が大きな問題となっており、安価な大腸菌でも製造可能な低分子抗体の作製が世界的な潮流となっている。一方で、がん治療に向けた低分子抗体の開発から優に10年以上経過しているものの、製造や実際の治療効果の問題から、なかなか臨床試験へと展開していない。しかしながら、製造コスト又は機能性の面でより改良されれば、十分に医薬として成立し得ると、考えられている。
- [0082] 本発明によって、LH型二重特異性抗体及びその新たな製造方法が提供されたことによって、ダイアボディ型二重特異性抗体の一層の臨床応用が図られ、今後ますます、同様の分子が脚光を浴び、製薬企業における開発やシーズ探索が加速されるものと期待される。

請求の範囲

- [請求項1] N末端からC末端の順に抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)及び抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域(OH)を含んで成る第一のポリペプチドと、N末端からC末端の順に抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域(OL)及び抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)を含んで成る第二のポリペプチドから構成されることを特徴とする、ダイアボディ型二重特異性抗体。
- [請求項2] 抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)及びL鎖のヒト型化可変領域(5L)、並びに、抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域(OH)及びL鎖のヒト型化可変領域(OL)を含み、以下のいずれかの構造：
- (i) (5LOH) - (ペプチドリンカー) - (OL5H) 又は (OL5H) - (ペプチドリンカー) - (5LOH) ;
 - (ii) (5LOH) 及び (OL5H) の2種類の一本鎖ポリペプチドから構成されるヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体がいずれか一方の一本鎖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領域に結合して成る抗体；
 - (iii) (5LOH) - (ペプチドリンカー) - (OL5H) 又は (OL5H) - (ペプチドリンカー) - (5LOH) から成る一本鎖ポリペプチドがヒンジ領域を介してヒト抗体の2つのFc領域に結合して成る抗体；
- を有するヒト型化高機能性二重特異性抗体。
- [請求項3] (ii) の構造を有する請求項2記載のヒト型化高機能性二重特異性抗体であって、該ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体がプロテアーゼ切断部位を介してヒンジ領域に結合していることを特徴とする、前記ヒト型化高機能性二重特異性抗体。
- [請求項4] (iii) の構造を有する請求項2記載のヒト型化高機能性二重特異性

抗体であって、一本鎖ポリペプチドがプロテアーゼ切断部位を介してヒンジ領域に結合していることを特徴とする、前記ヒト型化高機能性二重特異性抗体。

- [請求項5] 各一本鎖ポリペプチドにおけるL鎖のヒト型化可変領域とH鎖のヒト型化可変領域がペプチドリンカーで連結されている、請求項1又は2記載のダイアボディ型二重特異性抗体。
- [請求項6] 抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）、抗CD3抗体OKT3のL鎖のヒト型化可変領域（OL）、及び、抗CD3抗体OKT3のH鎖のヒト型化可変領域（OH）が、夫々、配列番号2、4、6及び8で示されるアミノ酸配列から成る、請求項1～5のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
- [請求項7] 請求項1ないし6のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を構成する一本鎖ポリペプチド。
- [請求項8] 請求項7に記載の一本鎖ポリペプチドをコードする核酸分子。
- [請求項9] 請求項1ないし6のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を構成する2種類の一本鎖ポリペプチドを共にコードする核酸分子。
- [請求項10] 請求項8又は69記載の核酸分子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11] 共発現ベクターである、請求項10記載のベクター。
- [請求項12] プラスミドベクターである、請求項10又は11記載のベクター。
- [請求項13] 請求項10ないし12のいずれか一項に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。
- [請求項14] 原核細胞である請求項13記載の宿主細胞。
- [請求項15] 大腸菌である請求項14記載の宿主細胞。
- [請求項16] 請求項1ないし6のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の製造方法であって、請求項1315のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し

該二重特異性抗体を構成する２種類の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、該２種類の一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された二重特異性抗体を分離・回収することから成る、前記方法。

[請求項17] 原核細胞が大腸菌であり、２種類の一本鎖ポリペプチドを大腸菌の培養培地上清、ペリズマ画分、菌体内可溶性画分、又は、菌体内不溶性画分から回収する、請求項 16 記載の製造方法。

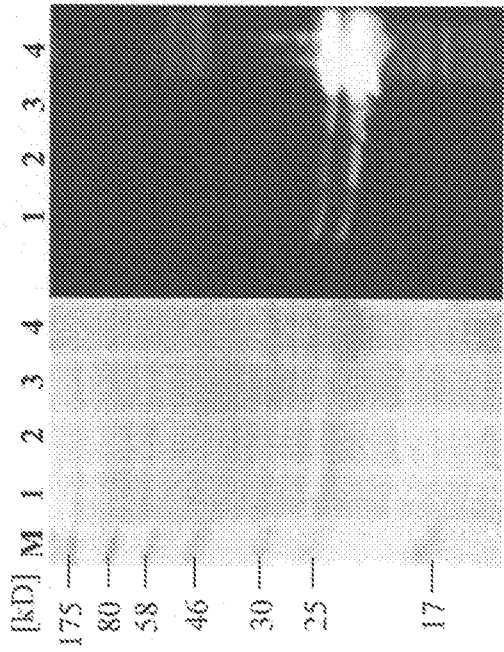
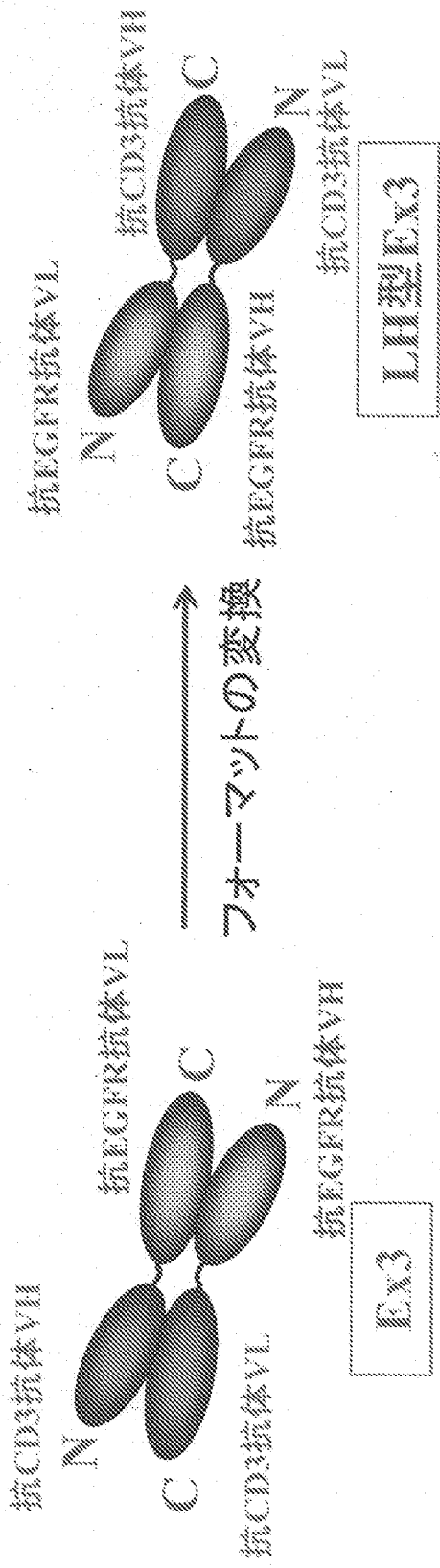
[請求項18] 請求項 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の製造方法であって、請求項 11 記載の共発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養し該二重特異性抗体を構成する２種類の一本鎖ポリペプチドを発現させ、該形質転換菌内でダイアボディ型二重特異性抗体を形成せしめ、形成された二重特異性抗体を分離・回収することから成る、前記方法。

[請求項19] 請求項 3 又は 4 に記載のヒト型化高機能性二重特異性抗体をプロテアーゼで消化することにより Fc 領域及びヒンジ領域を切断することから成る、夫々、5 L O H 及び O L 5 H の二種類のポリペプチドから構成されるヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体、又は請求項 2 記載の (i) の構造を有するヒト型化高機能性二重特異性抗体の製造方法。

[請求項20] 請求項 1 ないし 6 のいずれか一項に記載の二重特異性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。

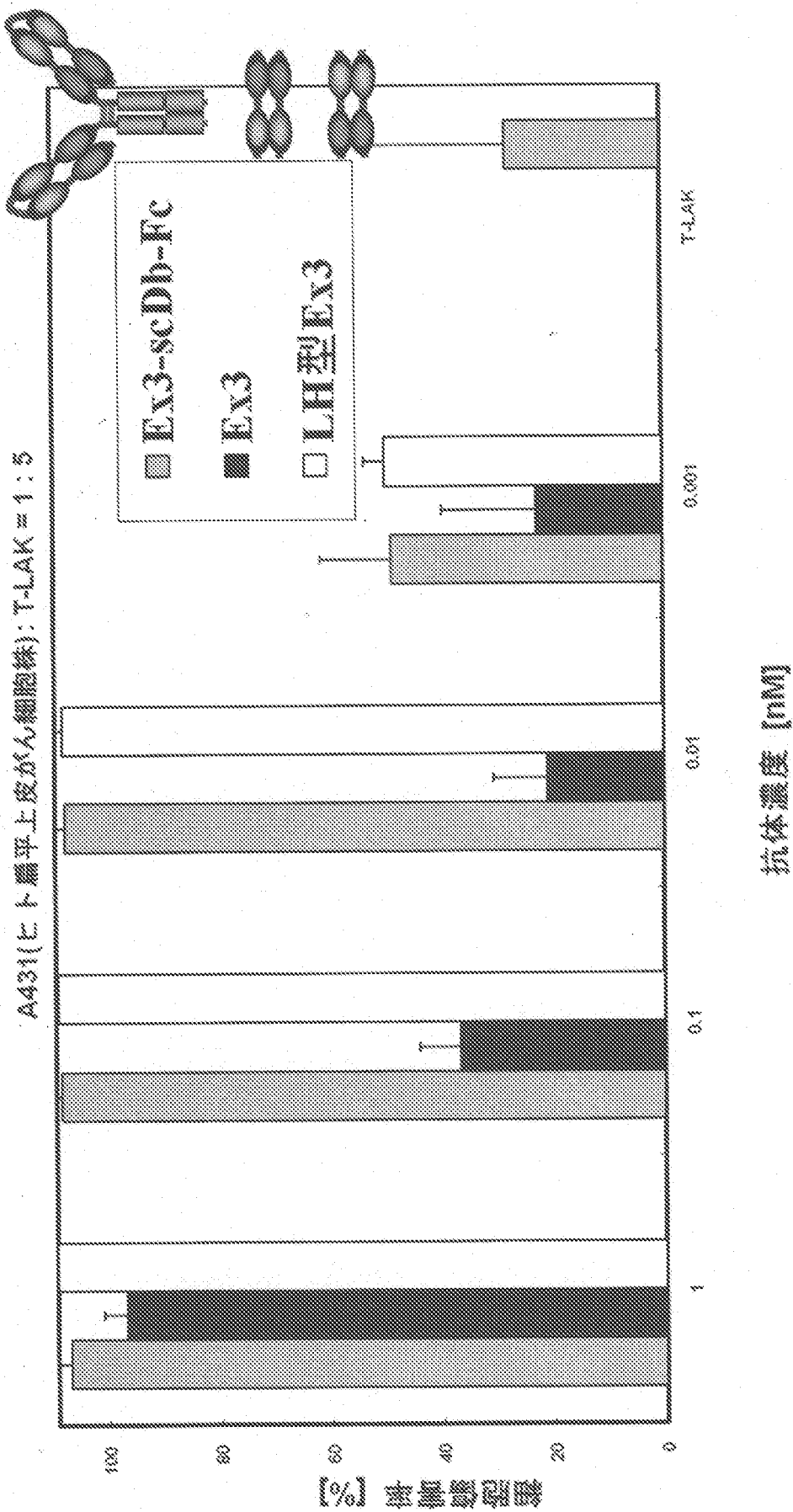
[請求項21] 腫瘍細胞を排除する、殺傷する、傷害する及び／又は減少せしめるためのものであることを特徴とする請求項 20 記載の医薬組成物。

[図1]

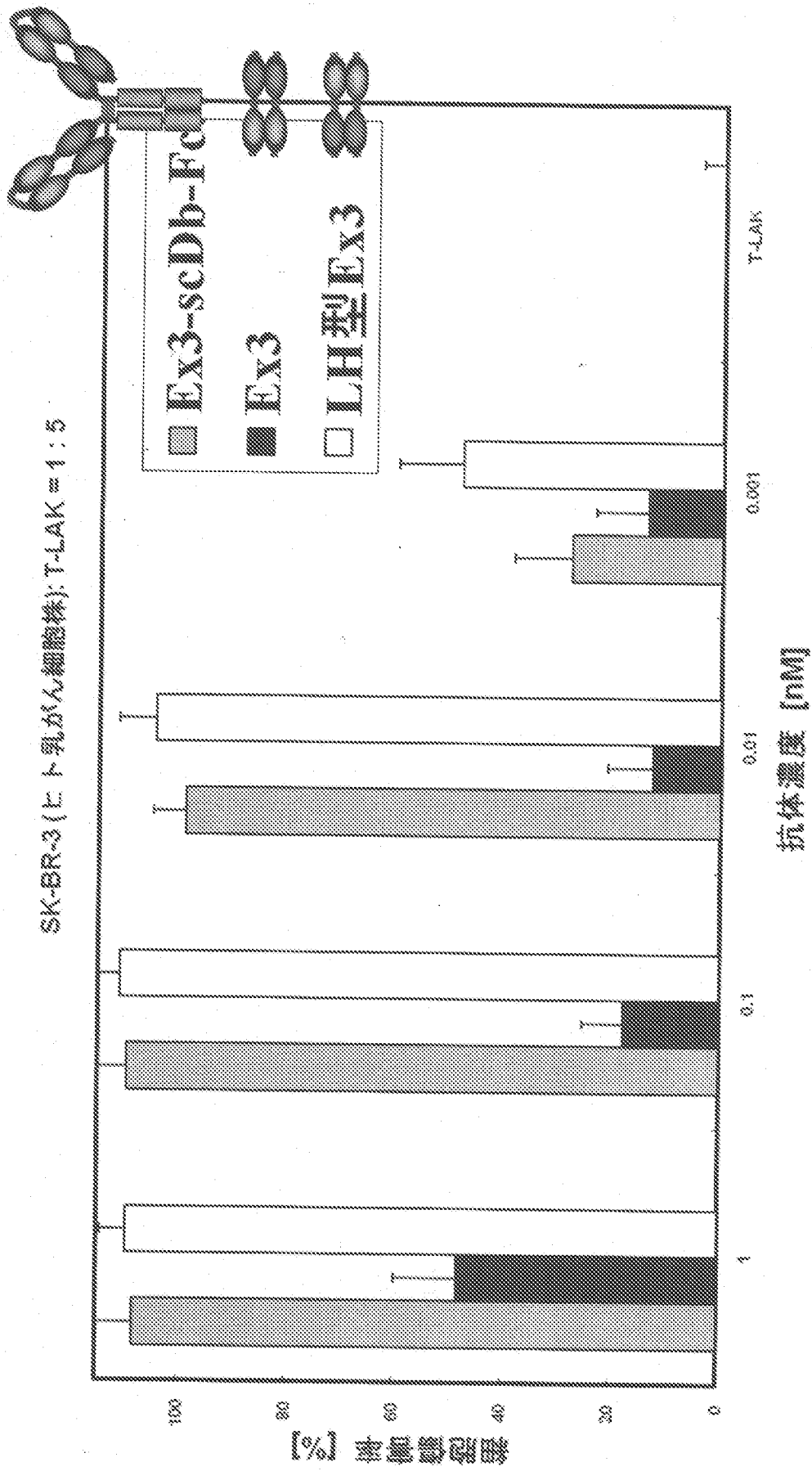


- M: マーカー
- 1: 培地上清
- 2: ペリプラズム画分
- 3: 菌体内可溶性画分
- 4: 菌体内不溶性画分

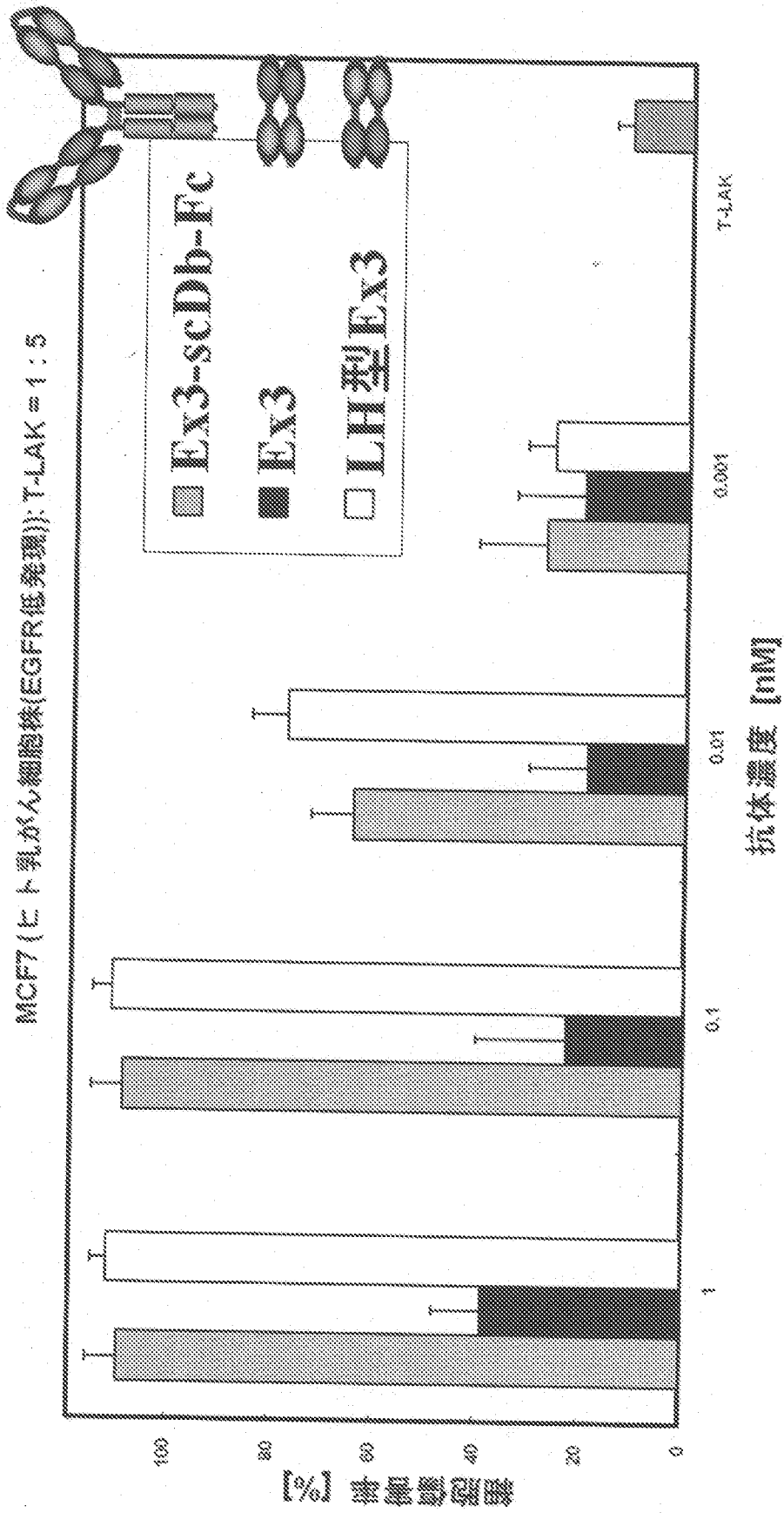
[図2]



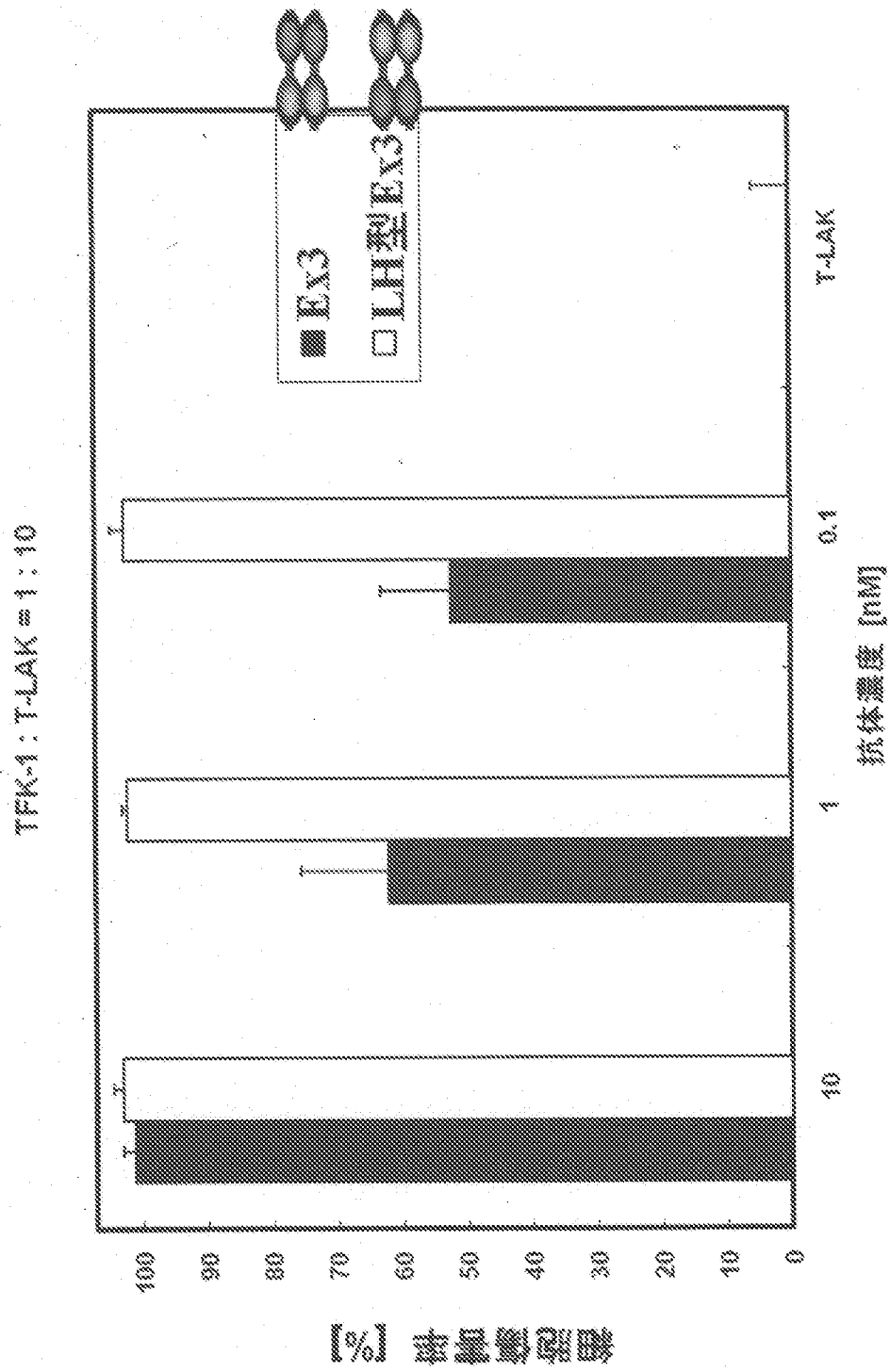
[図3]



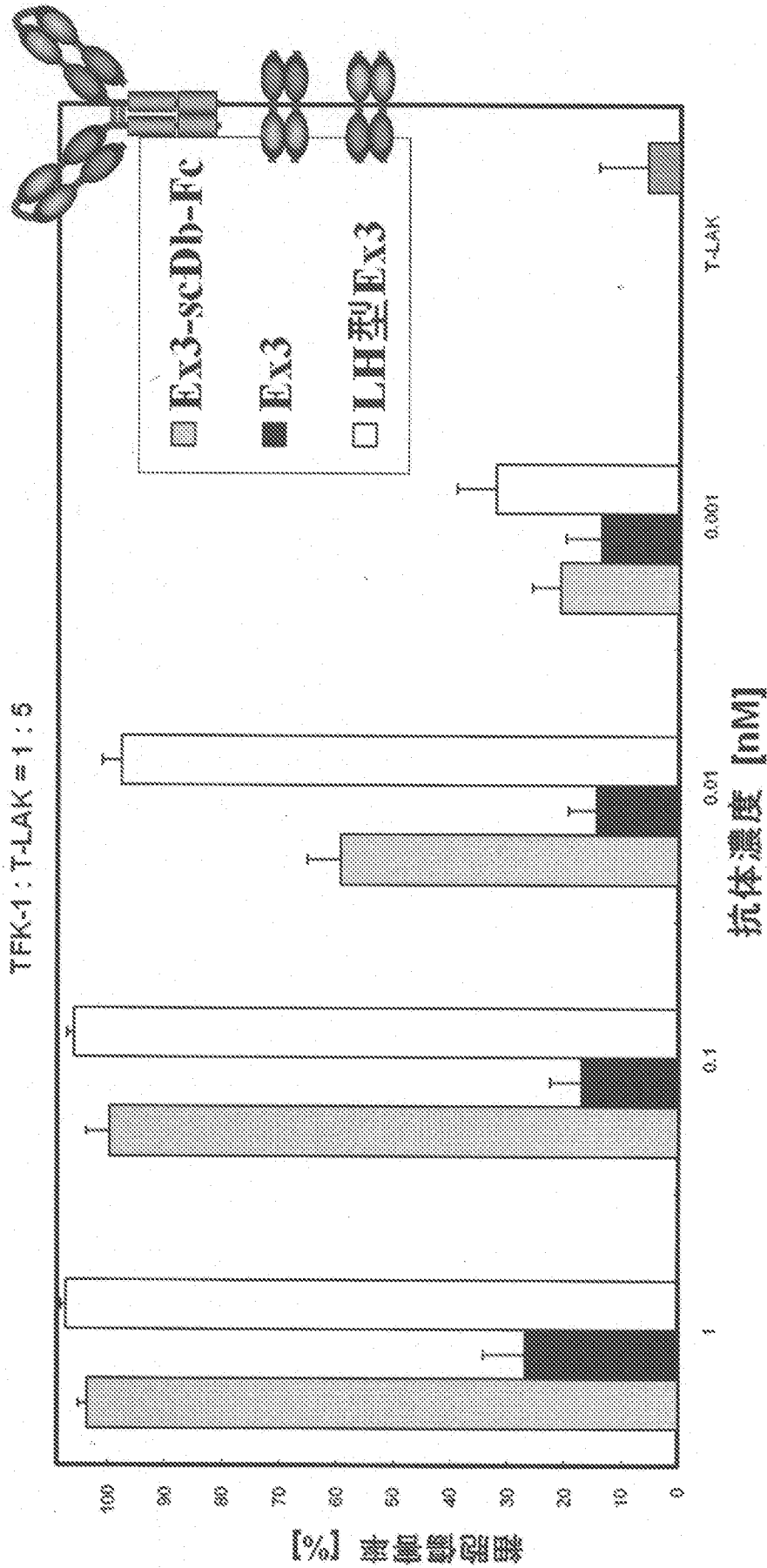
[図4]



[図5]

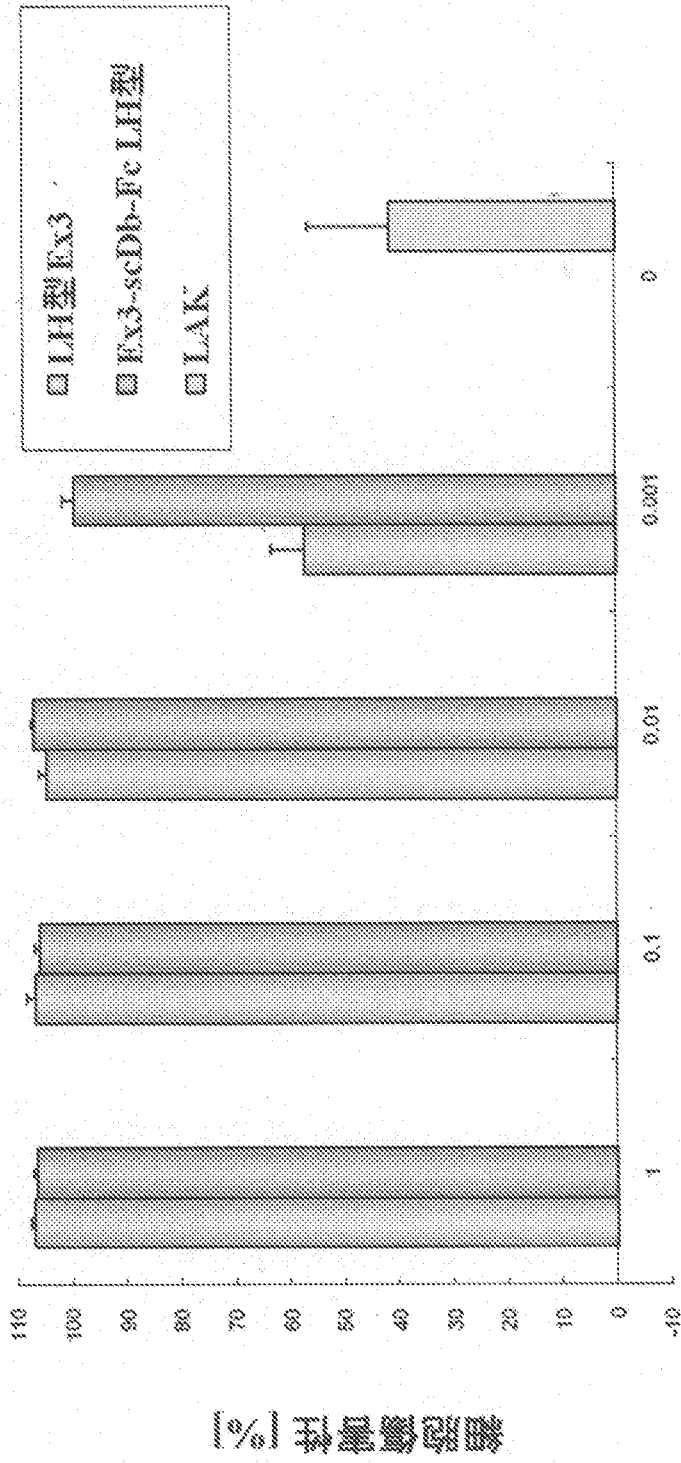


[図6]



[図7]

TFK-1:T-LAK = 1:5



抗体濃度 [nM]

ウイルス抑制率 [%]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/21(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)

C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C07K16/46, C12N1/21, C12P21/08

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2007/108152 A1 (Tohoku University), 27 September 2007 (27.09.2007), paragraphs [0010] to [0018], [0029], [0061] & US 2009/0202532 A & EP 2006379 A1	1-21/1-21
X/Y	JP 2004-242638 A (Tohoku Techno Arch Co., Ltd.), 02 September 2004 (02.09.2004), paragraphs [0011] to [0012], [0026] to [0028], [0049] & US 2006/0210564 A1 & EP 1454917 A2	1-2, 5-18, 20-21/1-21
Y	TODOROVSKA A. et al., Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting, J. Immunol. Methods, 2001.02.01, Vol.248, No.1-2, pp.47-66	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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
05 February, 2010 (05.02.10)

Date of mailing of the international search report
16 February, 2010 (16.02.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/050008

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LU D. et al., The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 2004.05.28, Vol.318, No.2, pp.507-513	1-21

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, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/21(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. C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C07K16/46, C12N1/21, C12P21/08

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 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
X/ Y	WO 2007/108152 A1 (国立大学法人東北大学) 2007.09.27, 段落 【0010】 - 【0018】, 【0029】, 【0061】 & US 2009/0202532 A & EP 2006379 A1	1-21/ 1-21
X/ Y	JP 2004-242638 A (株式会社東北テクノアーチ) 2004.09.02, 段落 【0011】 - 【0012】, 【0026】 - 【0028】, 【0049】 & US 2006/0210564 A1 & EP 1454917 A2	1-2, 5-18, 20- 21/ 1-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。 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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 05.02.2010	国際調査報告の発送日 16.02.2010
--------------------------	--------------------------

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) 小金井 悟	4B	3961
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

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	TODOROVSKA A. et al., Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting, J. Immunol. Methods, 2001.02.01, Vol.248, No.1-2, pp.47-66	1-21
Y	LU D. et al., The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004.05.28, Vol.318, No.2, pp.507-513	1-21