

(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  
2011年5月26日(26.05.2011)

PCT

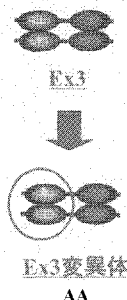
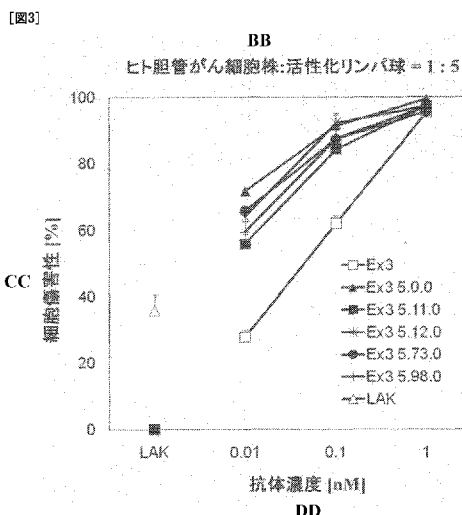
(10) 国際公開番号  
WO 2011/062112 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 16/28 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/070127
- (22) 国際出願日: 2010年11月11日(11.11.2010)
- (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 2009-263147 2009年11月18日(18.11.2009) 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). 中西 猛 (NAKANISHI Takeshi) [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 Ryutarō) [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14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, LR, 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

[続葉有]

(54) Title: HIGHLY-FUNCTIONAL MUTANT OF HUMANIZED ANTI-EGFR ANTIBODY VARIABLE REGION

(54) 発明の名称: ヒト型化抗EGFR抗体可変領域の高機能性変異体



AA Ex3 MUTANT  
 BB HUMAN BILE DUCT CANCER CELL LINE : ACTIVATED LYMPHOCYTES = 1 : 5  
 CC CYTOTOXICITY [%]  
 DD ANTIBODY CONCENTRATION [nM]

(57) Abstract: Disclosed is an antibody that exhibits excellent cytotoxicity and cell growth inhibition and that is based on an anti-human epithelial cell growth factor receptor (1) (Her1) antibody (528). Further disclosed is a method for producing same, and the like. The mutant of an H chain humanized variable region (5H) or an L chain humanized variable region (5L) of the anti-human epithelial cell growth factor receptor (1) (Her1) antibody (528) is the aforementioned antibody characterized by having one to a plurality (for example: 1 to 5, or 1 to 3) of amino acid mutations within CDR2. Further disclosed are antibody molecules containing said region, a nucleic acid molecule coding for these polypeptides, a method for producing said antibody molecules, and the like.

(57) 要約: 【課題】 抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528に基づき、より優れた細胞傷害性及び細胞増殖阻害性を示す抗体及びその製造方法等を提供すること。  
 【解決手段】 抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528

のH鎖のヒト型化可変領域 (5H) 又はH鎖のヒト型化可変領域 (5L) の変異体であって、CDR2内に1個~数個 (例えば、1個~5個、1個~3個) のアミノ酸変異を有することを特徴とする前記変異体、及び該領域を含む各種の抗体分子、それらのポリペプチドをコードする核酸分子、及び、該抗体分子の製造方法等。

WO 2011/062112 A1

(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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 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))

## 明 細 書

### 発明の名称： ヒト型化抗EGFR抗体可変領域の高機能性変異体 技術分野

[0001] 本発明は、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖又はL鎖のヒト型化可変領域（h5H、h5L）であってアミノ酸変異を有する該領域、及び該領域を含む各種の抗体分子等に関する。

### 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) と軽鎖 (L鎖) の可変領域 (V領域) (「VL」と表わされる) 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 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、該ダイアボディ型二重特異性抗体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] 尚、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。

[0010] 抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528はがん細胞の成長阻害効果を有する。しかしながら、既に記載したように、EGFRへの結合価が一価の場合、抗原との親和性が低く、その効果がほとんど見られないことが知られている。実際にヒト型化528の一本鎖抗体(scFv)にはがん細胞成長阻害効果が認められなかった。scFvが有するこのような欠点を克服するために、既にリンカーの改変によるscFvの多量体化が試みられてきた(非特許文献5)。近年では、リンパ腫にアポトーシスを誘導するscFv二量体なども報告されている(非特許文献6)。しかしながら、固形がんやEGFR陽性がん腫に対して、成長阻害効果を発揮するscFv多量体の例は報告されていない。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0011] 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

[0012] 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 B

iol Chem., 280, 19665-72. (2005)

非特許文献5: Biomol Eng. 2001 18(3):95-108

非特許文献6: Biochem Biophys Res Commun. 2004 315(4):912-8

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0013] 従って、本発明の主な目的は、抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528に基づき、より優れた細胞傷害性及び細胞増殖阻害性を示す抗体を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0014] 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] 配列番号4で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体、又は、配列番号2で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)の変異体であって、CDR2内に1個~数個のアミノ酸変異を有することを特徴とする前記変異体。

[態様2] 配列番号4で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体であって、該変異体を含むFv抗体の結合係数(Ka)が抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)を含むFv抗体の8~33倍となるような、前記変異体。

[態様3] 5Hの52番目のチロシンがトリプトファンに置換している、態様1又は2記載の変異体。

[態様4] 更に、55番目のセリンが置換している、態様3記載の変異体。

[態様5] 55番目のセリンがトレオニン、リシン、アルギニン、アスパラギン及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸に置換している、態様4記載の変異体。

[態様6] 更に、63番目のリシン、65番目のリシン、及び/又は66番

目のアスパラギンが置換している、態様4又は5記載の変異体。

[態様7] 63番目のリシンがグルタミンに置換している、態様6記載の変異体。

[態様8] 65番目のリシンがグルタミンに置換している、態様6記載の変異体。

[態様9] 66番目のアスパラギンがグルタミン、リシン、又はセリンに置換している、態様6記載の変異体。

[態様10] 更に、97番目のアラニンが変異している、態様6記載の変異体。

[態様11] 97番目のアラニンがトレオニンに変異している、態様10記載の変異体。

[態様12] 配列番号2で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)の変異体であって、該変異体を含むFv抗体の結合係数(Ka)が抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)を含むFv抗体の50~200倍となるような、前記変異体。

[態様13] 5Lにおける55番目のリシンがロイシンに、58番目のアスパラギン酸がアルギニンに、及び/又は、60番目のフェニルアラニンがセリン若しくはロイシンに置換している、態様1又は2記載の変異体。

[態様14] 態様1~13のいずれか一項に記載の変異体を構成要素として含む抗体分子。

[態様15] IgG型抗体分子、ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体、高機能性二重特異性抗体、抗体分子、及び、多量体化低分子抗体から成る群から選択される、態様13記載の抗体分子。

[態様16] 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、6及び8で示されるアミノ酸配列から成る、態様14又は

15 記載の抗体分子。

[態様 17] 態様 14～16 のいずれか一項に記載の抗体分子を構成する一本鎖ポリペプチド。

[態様 18] 態様 1～13 のいずれか一項に記載の変異体、又は、態様 16 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 19] 態様 14～16 のいずれか一項に記載の抗体分子を構成する 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 20] 態様 18 又は 19 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 21] 共発現ベクターである、態様 20 記載のベクター。

[態様 22] プラスミドベクターである、態様 20 又は 21 記載のベクター。

[態様 23] 態様 21 ないし 22 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 24] 態様 14～16 のいずれか一項に記載の抗体分子の製造方法であって、態様 21 に記載の宿主細胞を培養し、該抗体分子を構成する 2 種類の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・回収することから成る、前記方法。

[態様 25] 原核細胞が大腸菌であり、2 種類の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 24 記載の製造方法。

[態様 26] 態様 14～16 のいずれか一項に記載の抗体分子の製造方法であって、態様 21 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抗体分子を構成する 2 種類の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 27] 態様 14～16 のいずれか一項に記載の抗体分子を有効成分



として含有することを特徴とする医薬組成物。

[態様28] 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26記載の医薬組成物。

### 発明の効果

[0015] 本発明の抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(「5H」又は「h5H」で示す)及び／又はL鎖のヒト型化可変領域(「5L」又は「h5L」で示す)の変異体であって、該領域内、特に、そのCDR2内に1個～数个(例えば、1個～5個、1個～3個)のアミノ酸変異を有する変異体を構成要素として含む様々な型の抗体分子は、そのような変異を含まないh5Hを含む同じ構造の抗体分子に較べて、非常に優れた細胞傷害性及び細胞増殖阻害性を示すことが確認された。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]ヒト化型528可変領域断片の結晶構造を示す。

[図2]抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素として含むIgG抗体(IgG変異体)による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図3]抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素として含むダイアボディ型二重特異性抗体(Ex3変異体)による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図4]抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素として含む高機能二重特異性抗体(Ex3-scDb-Fc変異体)による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図5]抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素として含むLH型の高機能二重特異性抗体(Ex3-scDb-Fc変異体LH型)による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図6]抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素として含むLH型の高機能二重特異性抗体(Ex3-scDb-Fc変異体LH型)による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図7]抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素とし

て含む多量化低分子抗体（dimer変異体及びTrimer変異体）による細胞増殖阻害試験の結果を示す。

[図8]可溶性Fv中のVLとファージ提示VLのドメイン交換反応を利用するファージディスプレイによる抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）の変異体選択法の概略を示す。

[図9]各変異体VLにおける具体的なアミノ酸変異及びフローサイトメトリーによる結合評価の結果を示す。

[図10]抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）の変異体の表面プラズモン共鳴法による速度論解析の結果を示す。

[図11]抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）の変異体の等温滴定型熱量計による熱力学解析の結果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0017] 本発明の抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1（Her1）抗体528のH鎖（5H）又はL鎖（5L）のヒト型化可変領域の変異体は、配列番号4で示されるアミノ酸配列から成る該可変領域（5H）のCDR2内、又は、配列番号2で示されるアミノ酸配列から成る該可変領域（5L）のCDR2内の溶媒表面に露出した部分に、1個～数個（例えば、1個～5個、1個～3個）のアミノ酸変異を有することを特徴とする。本発明の5Hにアミノ酸変異を有する変異体を含む抗体の結合係数（Ka）は元の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）を含む抗体（h528Fv WT）の約8～33倍にまで増大していることを特徴とする。又、本発明の5Lにアミノ酸変異を有する変異体を含む抗体の結合係数（Ka）は元の抗体528のL鎖のヒト型化可変領域（5L）を含む抗体（h528Fv WT）の約50～200倍にまで増大していることを特徴とする。

[0018] 5Hにおけるアミノ酸変異の例として、52番目のチロシンがトリプトファンに置換する例を挙げることが出来る。更に、55番目のセリンが、例えば、トレオニン、リシン、アルギニン、アスパラギン及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸に置換している例を挙げることが出来る。以上の

置換に加えて、更に、63番目のリシン、65番目のリシン、及び／又は66番目のアスパラギンが置換している変異体を挙げることも出来る。ここで、63番目及び65番目のリシンの置換例としてグルタミン、並びに、66番目のアスパラギンの置換例としてグルタミン、リシン、又はセリンを挙げることが出来る。更に、97番目のアラニンが、例えば、トレオニンに変異している変異体を例示することが出来る。

一方、5Lにおけるアミノ酸変異の例として、55番目のリシンが、例えば、ロイシンに、58番目のアスパラギン酸が、例えば、アルギニンに、及び／又は、60番目のフェニルアラニンがセリン若しくはロイシンに置換する例を挙げることが出来る。

[0019] 本発明の変異体を構成要素として、様々な型の抗体分子を作製することが出来る。この例として、例えば、通常のIgG型抗体分子、ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体（特許文献1）及びヒト型化高機能性二重特異性抗体（特許文献2）を挙げることが出来る。

[0020] 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及びその製造方法は国際公開第W02007/108152号パンフレット（特許文献2）に詳細に記載されている。

[0021] 本発明の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 $\kappa$ または $\lambda$ 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 $\gamma$ 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ことができる。

[0022] 更に、本発明の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ことが出来る。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。

- [0023] 更に、ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体及び上記高機能性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末側にあること（LH型）を特徴とする各種の抗体（抗体分子）も本発明に含まれる。
- [0024] 又、本発明の変異体である抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1抗体528のH鎖及び／又はL鎖のヒト型化可変領域（h5H及び／又はh5Lを含む一本鎖抗体（scFv）から構成される多量体化低分子抗体を挙げることが出来る。該多量体化低分子抗体は、例えば、2～4個の該一本鎖抗体（scFv）が会合して成り、H鎖の可変領域とL鎖の可変領域とが1～9個のアミノ酸から成るペプチドリンカーで連結されて成り、更に、各一本鎖抗体において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ても良い。
- [0025] 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。
- [0026] 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。
- [0027] 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、参考文献（K

rebber, 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。

[0028] 本発明の可変領域の変異体又は抗体分子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); Reichmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); EP-B-239400; Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 593-596 (1992); およびEP-B-451216 を参照することができる。

[0029] 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。

[0030] 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事ができる。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 本発明の抗体分子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。

- [0035] 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。
- [0036] 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。
- [0037] 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、1個～5個、1個～3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（但し、配列番号4において本発明の変異体が有するアミノ酸変異は保持される）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抗体分子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。

[0038] 本発明の変異体及び各抗体分子に含まれる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（但し、配列番号4における本発明の変異体が有するアミノ酸変異は保持される）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。

[0039] 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。

[0040] 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) 等が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 (19

90)) 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。

- [0041] 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。
- [0042] 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。
- [0043] 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。
- [0044] 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。
- [0045] 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。ストリンジエ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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] こうして取得された本発明の抗体分子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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 本発明の抗体分子は、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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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抗体分子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。

- [0057] 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。
- [0058] 精製操作は当業者に公知の任の方法を適宜組み合わせて行うことが出来る。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。
- [0059] 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することが出来る。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、本発明の抗体分子を製造することが出来る。
- [0060] 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。

[0061] 以上に示したように、本発明の抗体分子は、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。

[0062] 本発明のベクターとして、本発明の抗体分子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。

[0063] 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。

[0064] 本発明の医薬組成物は、本発明の抗体分子、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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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、特には胆管内、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出来る。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。

[0069] 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。

- [0070] 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。
- [0071] 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。
- [0072] 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。
- [0073] 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

### [0074] ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 (Her1) 抗体 528 の H 鎖のヒト型化可変領域 (5H) の変異体の作製

まず、ヒト型化 528 抗体の結晶構造を分子置換法により決定した。その結果を表 1 及び図 1 に示す。こうして得られた構造に基づき、溶媒接触残基に着目、公知の位置指定変異導入法 (部位特異的変異導入法) を用いて、配列番号 4 で示される抗ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 (Her1) 抗体 528 の H 鎖のヒト型化可変領域 (5H) の CDR 内及び近傍に無作為に変異を導入した。それらをファージディスプレイ法に用いて、CHO 細胞及び EGF R を発現提示させるように形質転換した該 CHO 細胞を用いて、夫々、各変異体 VH を提示するファージをネガティブ選択及びポジティブ選択した。得られた各変異体 VH (「5.0.0」及び「5.11.0」等) における具体的なアミノ酸変異 (下線付記) 及び配列番号 4 で示される抗体 528 の H 鎖のヒト型化可変領域 (5H) のアミノ酸 (各 CDR の位置を含む) を表 2 及び表 3 に示す。

[0075] [表1]

### 分子置換法により結晶構造を決定

#### 結晶学データ

	ヒト型化528	マウス528
Space group	$P6_5$	$P6_2$
Unit cell dimension (Å)	$a=b=63.28$ $c=225.34$	$a=b=126.60$ $c=68.28$
Resolution (Å)	2.1	2.3
R factor	0.27	0.19
Free R factor	0.30	0.23

[0076]

[表2]

## 変異導入箇所

	CDR2	CDR3の前の3残基
<b>h528Fv WT</b>	NIYPGSGGTNYAEKFKN	CAR
<b>h528Fv 5.0.0</b>	NIWPGSGGTNYAEKFKN	CAR
<b>h528Fv 5.11.0</b>	NIWPGTGGTNYAEK <u>FQQ</u>	CAR
<b>h528Fv 5.12.0</b>	NIWPGKGGTNYAEK <u>FQK</u>	CAR
<b>h528Fv 5.73.0</b>	NIWPGNGGTNYAEQ <u>FKQ</u>	CAR
<b>h528Fv 5.98.0</b>	NIWPGQGGTNYAEK <u>FKS</u>	CAR
<b>h528Fv 5.11.T</b>	NIWPGTGGTNYAEK <u>FQQ</u>	<u>CTR</u>

[0077] [表3]

VII

```

      10      20      30      40      50      60
CAGGTGCAACTGGTTCAGAGCGGCGCGAAAGTGAAAAAGCCGGGCGCGTCGGTFAAAGTG
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
      70      80      90      100 CDR1110      120
AGCTGCAAAGCCTCAGGCTATAACCTTTACGAGCTACTGGATGCATIGGGTGCGCCAGGCC
S C K A S G Y T P T S Y W M H W V R Q A
      130      140      150      160      170 CDR2180
CCGGGTCAGGGCCTGGAATGGATGGGTAACATTATCCGGGCAGCGGTGGCAGCAACTAT
P G Q G L E W M G N I Y P G S G G T N Y
      190      200      210      220      230      240
GCGGAAAAATTTAAGAACC GCGGTGACCATGACGCGTGATAACCAGCATTTCGACGGCCTAT
A E K F K N R V T M T R D T S I S T A Y
      250      260      270      280      290 CDR3300
ATGGAAGTGAAGCCGCTGCGTAGCGATGACACCGCCGCGTATTACTGCGCGCGCAGTGGC
M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R S G
      310      320      330      340      350
GGTCCGTATTTTTGATTACTGGGGCCAGGGTACGCTGGTTACCGTGAGCTCG
G P Y F F D Y W G Q G T L V T V S S
    
```

全合成ヒト型化528のH鎖可変領域配列

[0078] 次に、各変異体VHと528のL鎖のヒト型化可変領域(VL)とのFv共発現ベクターを、夫々の変異体VHに関して構築した。形質転換した大腸菌BL21株の培養上清より金属キレートアフィニティークロマトグラフィーにより粗精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、さらに陽イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製を行った。その結果、精製後のFv抗体収量は培養液 1 Lあたり1 ~10 mg程度であった。

これらの変異体Fvを等温滴定型熱量計(ITC)により熱力学的解析を行った。標的抗原である可溶性のEGFRを別途CHO細胞発現系と金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる精製により調製し、測定セルに5 μMの濃度で添加

し、50  $\mu$ Mの変異体Fvを経時的に滴下した。その時の熱量変化から結合のエンタルピー ( $\Delta H$ ) と結合定数 ( $K_a$ ) を算出し、さらにそれぞれの値から自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) と結合エントロピー変化 ( $\Delta S$ ) を算出した。その結果を表4に示す。この結果、このような変異体を含むFv抗体の結合係数 ( $K_a$ ) は元の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域 (5H) を含むFv抗体 (h528Fv WT) の8~33倍にまで増大していることが確認された。

[0079]

[表4]



## h528変異体の抗原結合活性評価

	$Ka \times 10^7 [M^{-1}]$	$\Delta G$ [kJ/mol]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$T\Delta S$ [kJ/mol]
h528Fv WT	1.9	-41.5	-61.1	-19.5
h528Fv 5.0.0	14.9	-46.7	-87.9	-41.2
h528Fv 5.11.0	61.8	-50.4	-74.4	-24.0
h528Fv 5.12.0	44.2	-49.5	-69.9	-20.4
h528Fv 5.73.0	49.5	-49.8	-71.3	-21.5
h528Fv 5.98.0	50.5	-49.9	-76.8	-26.9
h528Fv 5.11.T	52.4	-49.7	-83.5	-33.8

## 実施例 2

### [0080] ヒト上皮細胞成長因子受容体 1 (Her1) 抗体 528 の H 鎖のヒト型化可変領域 (5H) の変異体を構成要素として含む抗体分子の作製

実施例 1 で作製した各変異体 V H を構成要素として含む I g G 抗体を以下の要領で作製した。

まず、各変異体 V H をヒト型化 528 I g G 発現ベクターの V H 部位と入れ換え、変異体ヒト型化 528 I g G 発現ベクターを構築した。ヒト胎児腎細胞 (HEK) を用いて一過性発現させ、プロテイン A カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、精製後の抗体収量は培養液 1 L あたり約 1 m g であった。

更に、実施例 1 で作製した各変異体 V H を構成要素として含むヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体 (E x 3) 変異体を特許文献 1 に記載の方法に準じて作製した。その結果、精製後の抗体収量は培養液 1 L あたり約 1 m g であった。

同様に、実施例 1 で作製した各変異体 V H を構成要素として含む高機能性二重特異性抗体 (E x 3 - s c D b - F c 変異体) を特許文献 2 に記載の方法に準じて作製した。その結果、精製後の抗体収量は培養液 1 L あたり約 1 m g であった。

## 実施例 3

### [0081] L H 型高機能性二重特異性抗体の製造

実施例 1 で作製した各変異体 V H を構成要素として含む L H 型高機能性二重特異性抗体を以下の要領で製造した。

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 P C R プライマーを用いて L H 型高機能性二重特異性抗体 (E x 3 - s c D b - F c) 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 C H O 細胞を宿主として用いて E x 3 s c D b - F c を調製した。但し、まず、特許文献 2 の第一の型である L H 型高機能性二重特異性抗体 (L H 型 E x 3 s c D b) として、(5 L O H) の上流にペプチドリンカーを介して (O L 5 H) を挿入することによって、(N 末側) (O L 5 H) - (ペプチドリンカー) - (5

LOH) (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変異体LH型を作製した。その結果、精製後の抗体収量は培養液1Lあたり約1mgであった。

#### 実施例 4

##### [0082] 多量体化低分子抗体の製造

各変異体VHを含む一本鎖抗体ペプチドでペプチドリンカーが除去された一本鎖抗体(scFv)から構成される多量体化低分子抗体(二量体)を以下の概要で調製した。

発現ベクターはすでに本発明者等によって構築されているEGFR及びCD3を標的としたヒト型化diabody発現ベクター(pRA-h5Hh0L、pRA-h0Hh5L:国内特許登録(380790号))を基に作製した。即ち、それぞれのベクターを制限酵素NcoIとEagIで消化後、h5H部位とh0H部位を入れ換えることで、5アミノ酸リンカー(GGGGS)を有するヒト型化528scFv発現ベクターpRA-h5Hh5L(G1)を作製した。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。

[0083] 更に、各変異体VHを含む一本鎖抗体ペプチドでペプチドリンカーが除去された一本鎖抗体(scFv)から構成される多量体化低分子抗体(三量体)を以下の概要で調製した。

A-Bプライマーを用いPCR法によりヒト型化5H(h5H)を、C-Dプライマーを用いヒト型化5L(h5L)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、リンカーを含まないVH-VL型ヒト型化528scFv発現ベクターpRA-h5Hh5L(HLG0)を作製した。

一方、E-Fプライマーを用いPCR法によりh5Lを、G-Hプライマーを用い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、リンカーを含まないVL-VH型ヒト型化528scFv発現ベクターpRA-h5Lh5H(LHG0)を作製した。

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。尚、元の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）を含む一本鎖抗体（scFv）の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号9及び10で示す。

- [0084] A:NcoI-5H : 5'-NNNCCATGGCCCAGGTGCAACTGGTTCA-3' [配列番号 : 11]  
B:5H-5L-inverse : 5'-GGGCTCTGGGTCATCAGGATATCCGAGCTCACGGTAACCAGCG-3' [配列番号12]  
C:5H-5L : 5'-GATATCGTGATGACCCAGAGCCC-3' [配列番号 : 13]  
D:5L-SacII : 5'-NNNCCGCGGGCGGTTTAATTTCCACTTT-3' [配列番号 : 14]  
E:NcoI-5L : 5'-NNNCCATGGATATTGTGATGACCCAGAG-3' [配列番号 : 15]  
F:5L-5H-inverse : 5'-CGCTCTGAACCAGTTGCACCTGTTTAATTTCCACTTTGGTGCCCTGGCC-3' [配列番号 : 16]  
G:5L-5H : 5'-CAGGTGCAACTGGTTCAGAGCG-3' [配列番号 : 17]  
H:5H-SacII : 5'-NNNCCGCGGAGCTCACGGTAACCAGCGT-3' [配列番号 : 18]

## 実施例 5

### [0085] 各種抗体分子の細胞増殖阻害試験（1）

実施例2及び3で作製した本発明の各種抗体分子について、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）、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）の増殖が各種抗体分子によりどれほど阻害されるかを検討した。セルカウントを行い、RPMI（10% FBS）100 $\mu$ Lあたり細胞 $5 \times 10^3$ 個になるよう調整し、96穴プレートに100 $\mu$ Lずつ分注、37 $^{\circ}$ 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 $\mu$ Lずつ分注し、T-LAK細胞あるいは末梢血単核球（PBMC）を目的E/T比になるようにRPMIで希釈し、50 $\mu$ Lずつ分注し（E/T比 : effector（T-LAK細胞あるいはPBMC）/target（標的がん細胞）比）、37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

- [0086] その結果、図2に表されるように、本発明の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）の変異体を構成要素として含むIgG抗体（IgG変異体）はかかる変異を含まないIgG抗体（IgGwt）に較べて抗腫瘍効果（細胞傷害性）が増強したことが確認された。
- [0087] 図3に表されるように、本発明の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）の変異体を構成要素として含むダイアボディ型二重特異性抗体（Ex3変異体）はかかる変異を含まないダイアボディ型二重特異性抗体（Ex3）に較べて抗腫瘍効果が増強したことが確認された。
- [0088] 図4に表されるように、本発明の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）の変異体を構成要素として含む高機能二重特異性抗体（Ex3-scDb-Fc変異体）はかかる変異を含まない高機能二重特異性抗体（Ex3-scDb-Fc）に較べて抗腫瘍効果が増強したことが確認された。
- [0089] 図5及び図6に表されるように、本発明の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域（5H）の変異体を構成要素として含むLH型の高機能二重特異性抗体（Ex3-scDb-Fc変異体LH型）はかかる変異を含まない高機能二重特異性抗体（Ex3-scDb-FcLH型）に較べて抗腫瘍効果が増強したことが確認された。

## 実施例 6

### [0090] 各種抗体分子の細胞増殖阻害試験（2）

実施例4で作製した本発明の多量体化低分子抗体について、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）の増殖阻害能を確認した。セルカウントを行い、RPMI（0.5% FBS）100 $\mu$ Lあたり細胞 $2 \times 10^3$ 個になるよう調整し、96穴プレートに100 $\mu$ Lずつ分注、37 $^{\circ}$ 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蛋白質を200 $\mu$ Lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで96時間培養。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 $^{\circ}$ 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。

（注）MTS 試薬（CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferatio

n Assay, Promega社製)、PMS(CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega 社製)

[0091] その結果、図7に表されるように、本発明の抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体を構成要素として含む多量化低分子抗体(dimer変異体、Trimer変異体)はかかる変異を含まない多量化低分子抗体(dimer、Trimer)に較べて抗腫瘍効果が増強したことが確認された。

### 実施例 7

[0092] ヒト上皮細胞成長因子受容体1(Her1)抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)

更に、ヒト型化528抗体の結晶構造に基づき、溶媒接触残基に着目、公知の位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)を用いて、配列番号2で示される抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1(Her1)抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)のCDR内及び近傍に無作為に変異を導入した。

[0093] 次に、従来のファージディスプレイ法で使用する可溶性VHを単独で調製することが困難であったために、代わりに可溶性Fvを調製して、可溶性Fv中のVLとファージ提示VL間のドメイン交換反応を利用して、EGFR陰性CHO細胞によるネガティブセレクション及びEGFR陽性CHO細胞によるポジティブセレクションを実施した(図8)。得られた各変異体VL(「LRS」及び「LRL」で示される)における具体的なアミノ酸変異及びフローサイトメトリーによる結合評価の結果を図9に示す。

[0094] 次に、各変異体VLと528のH鎖のヒト型化可変領域(VH)とのFv共発現ベクターを、夫々の変異体VLに関して構築した。実施例1と同様に形質転換した大腸菌BL21株の培養上清より金属キレートアフィニティクロマトグラフィーにより粗精製後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、さらに陽イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製を行った。その結果、精製後のFv抗体収量は培養液1Lあたり1~10mg程度であった。

[0095] 更に、標的抗原である可溶性のEGFRを別途CHO細胞発現系と金属キレートアフ

ィニティクロマトグラフィーによる精製により調製し、これらを用いて当業者に公知の表面プラズモン共鳴法によって、これらの変異体Fvの速度論解析を実施した。表面プラズモン共鳴法は、表面プラズモン共鳴測定装置、BIAcore2000は、センサーチップ、マイクロ流路、検出系の3つの技術によって構成され、その検出系に表面プラズモン共鳴（SPR）を利用して分子の相互作用をセンサーチップ上に再現することで、一切の標識を使わずにリアルタイムで測定を行い、結合速度定数、解離速度定数を算出できる装置で実施した。EGFRをリガンドとしてセンサーチップ上にアミンカップリング法により固定化し、変異体Fvをアナライトとして、25°Cで測定した。測定データの解析は、BIAevaluationソフトウェアを用いて、1:1ラングミュア結合モデルから速度論的パラメータを算出した。

尚、比較として、同様の方法で調製したマウス528Fv (m528Fv)、野生型ヒトFv (h528Fv) 及び2HH11 (5H変異体5.11.0を含む h528Fv) を試料として用いた。得られた結果から、本発明の各変異体VLと528のH鎖のヒト型化可変領域 (VH) は野生型ヒトFv (h528Fv) に較べて結合速度が向上し、解離速度が低下してことが確認された (図10)。

[0096] 次に、実施例1と同様に、等温滴定型熱量計 (ITC) により熱力学的解析を行った。標的抗原である可溶性のEGFRを別途CHO細胞発現系と金属キレートアフィニティクロマトグラフィーによる精製により調製し、測定セルに5  $\mu$  Mの濃度で添加し、50  $\mu$  Mの変異体Fvを経時的に滴下した。その時の熱量変化から結合のエンタルピー ( $\Delta H$ ) と結合定数 ( $K_a$ ) を算出し、さらにそれぞれの値から自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) と結合エントロピー変化 ( $\Delta S$ ) を算出した。その結果を図11に示す。

この結果、このような変異体を含むFv抗体の結合係数 ( $K_a$ ) は元の抗体528のL鎖のヒト型化可変領域 (5L) を含む野生型ヒトFv (h528Fv) の約50~200倍に達し、マウスFv抗体 (m528Fv) をも凌駕する非常に高い親和性を創出することに成功した。

**産業上の利用可能性**

- [0097] 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。
- [0098] 本発明によって、アミノ酸変異が導入されたヒト上皮細胞成長因子受容体1 (H e r 1) 抗体528のH鎖又はL鎖のヒト型化可変領域(5H)を構成要素として含む抗体分子が提供されたことによって、抗体医薬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] 配列番号4で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体、又は、配列番号2で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)の変異体であって、CDR2内に1個～数個のアミノ酸変異を有することを特徴とする前記変異体。
- [請求項2] 配列番号4で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)の変異体であって、該変異体を含むFv抗体の結合係数(Ka)が抗体528のH鎖のヒト型化可変領域(5H)を含むFv抗体の8～33倍となるような、前記変異体。
- [請求項3] 5Hの52番目のチロシンがトリプトファンに置換している、請求項1又は2記載の変異体。
- [請求項4] 更に、55番目のセリンが置換している、請求項3記載の変異体。
- [請求項5] 55番目のセリンがトレオニン、リシン、アルギニン、アスパラギン及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸に置換している、請求項4記載の変異体。
- [請求項6] 更に、63番目のリシン、65番目のリシン、及び/又は66番目のアスパラギンが置換している、請求項4又は5記載の変異体。
- [請求項7] 63番目のリシンがグルタミンに置換している、請求項6記載の変異体。
- [請求項8] 65番目のリシンがグルタミンに置換している、請求項6記載の変異体。
- [請求項9] 66番目のアスパラギンがグルタミン、リシン、又はセリンに置換している、請求項6記載の変異体。
- [請求項10] 更に、97番目のアラニンが変異している、請求項6記載の変異体。
- [請求項11] 97番目のアラニンがトレオニンに変異している、請求項10記載の

変異体。

- [請求項12] 配列番号2で示されるアミノ酸配列から成る抗ヒト上皮細胞成長因子受容体1 (Her1) 抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)の変異体であって、該変異体を含むFv抗体の結合係数(Ka)が抗体528のL鎖のヒト型化可変領域(5L)を含むFv抗体の50~200倍となるような、前記変異体。
- [請求項13] 5Lにおける55番目のリシンがロイシンに、58番目のアスパラギン酸がアルギニンに、及び/又は、60番目のフェニルアラニンがセリン若しくはロイシンに置換している、請求項1又は2記載の変異体。
- [請求項14] 請求項1~13のいずれか一項に記載の変異体を構成要素として含む抗体分子。
- [請求項15] IgG型抗体分子、ヒト型化ダイアボディ型二重特異性抗体、高機能性二重特異性抗体、抗体分子、及び、多量体化低分子抗体から成る群から選択される、請求項13記載の抗体分子。
- [請求項16] 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, 6及び8で示されるアミノ酸配列から成る、請求項14又は15記載の抗体分子。
- [請求項17] 請求項14~16のいずれか一項に記載の抗体分子を構成する一本鎖ポリペプチド。
- [請求項18] 請求項1~13のいずれか一項に記載の変異体、又は、請求項16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19] 請求項14~16のいずれか一項に記載の抗体分子を構成する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20] 請求項18又は19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。

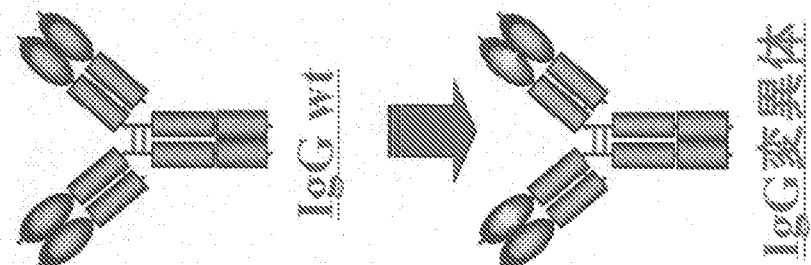
- [請求項21] 共発現ベクターである、請求項20記載のベクター。
- [請求項22] プラスミドベクターである、請求項20又は21記載のベクター。
- [請求項23] 請求項21ないし22のいずれか一項に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。
- [請求項24] 請求項14～16のいずれか一項に記載の抗体分子の製造方法であって、請求項21に記載の宿主細胞を培養し、該抗体分子を構成する2種類の一本鎖ポリペプチドを発現させ、該ポリペプチドを回収・精製し、該2種類の一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された抗体分子を分離・回収することから成る、前記方法。
- [請求項25] 原核細胞が大腸菌であり、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24記載の製造方法。
- [請求項26] 請求項14～16のいずれか一項に記載の抗体分子の製造方法であって、請求項21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抗体分子を構成する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27] 請求項14～16のいずれか一項に記載の抗体分子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28] 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26記載の医薬組成物。

[図1]

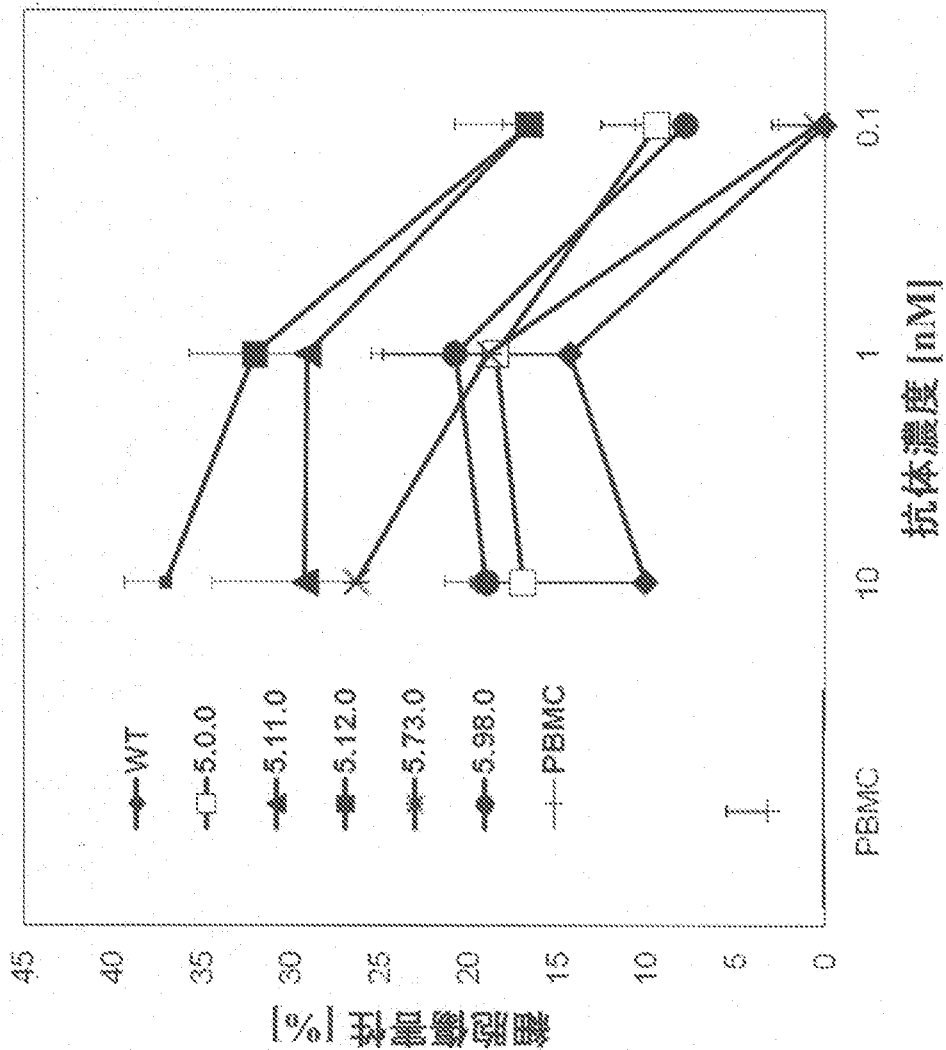


ヒト型化528可変領域断片(h528 Fv)の  
立体構造を基に変異導入

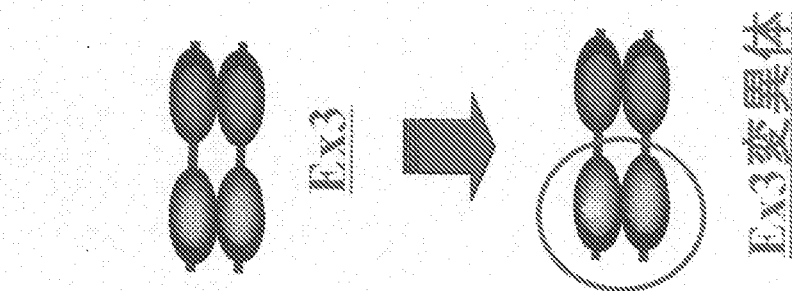
[図2]



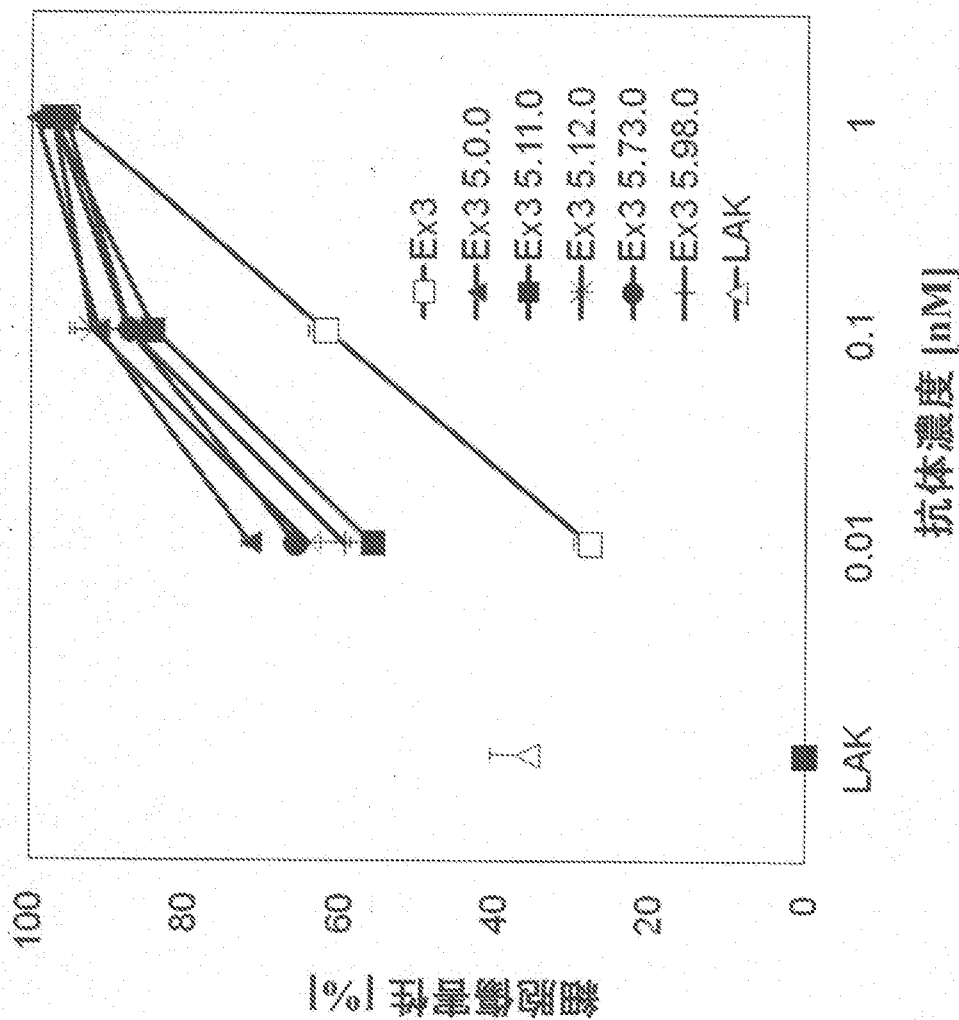
MTS assay  
 Effector cell: PBMC  
 (末梢血単核球)  
 Target cell: A431  
 (ヒト扁平上皮がん細胞)  
 (Effector cell/Target cell=10)



[図3]

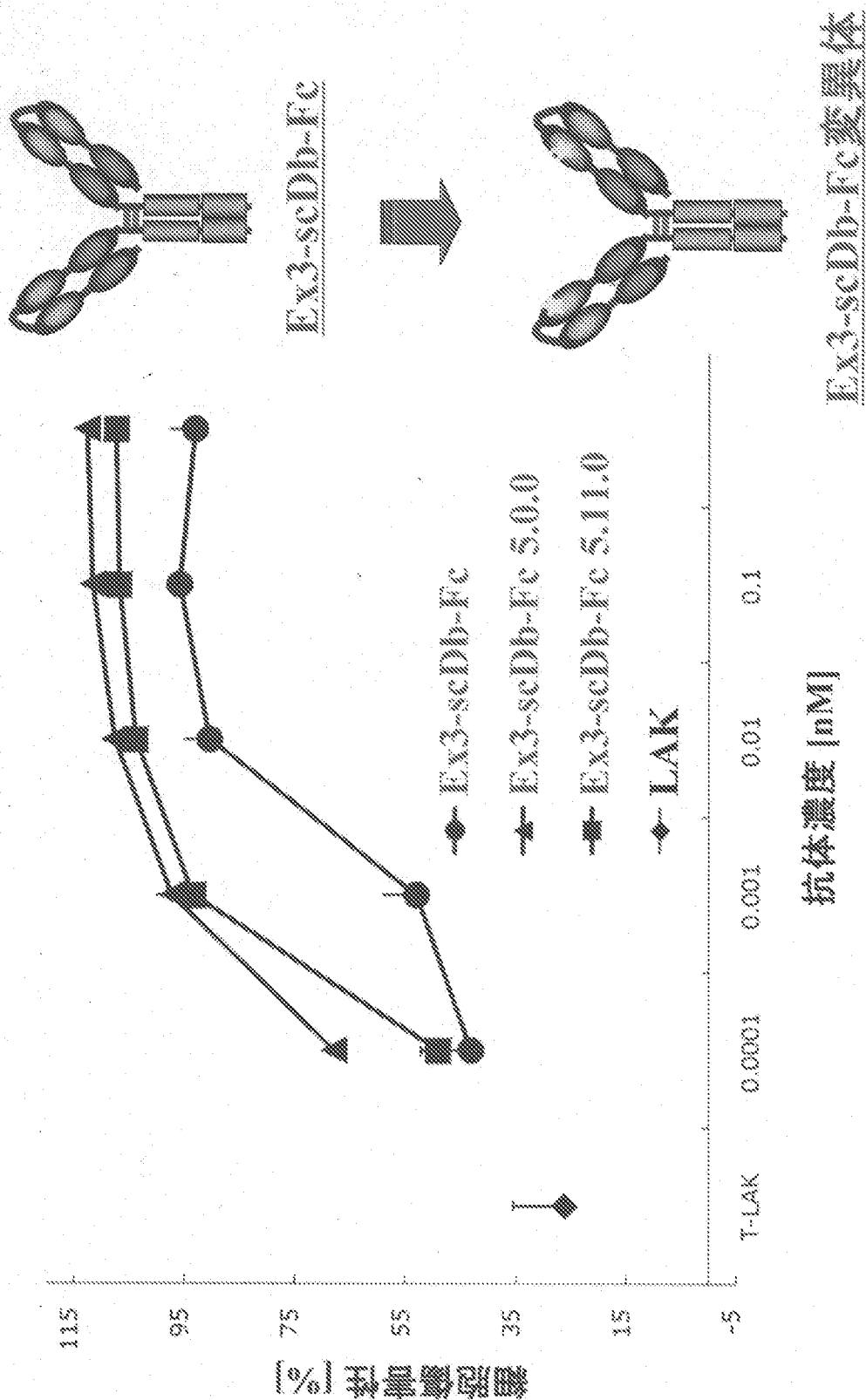


ヒト胆管がん細胞株: 活性化リンパ球 = 1 : 5

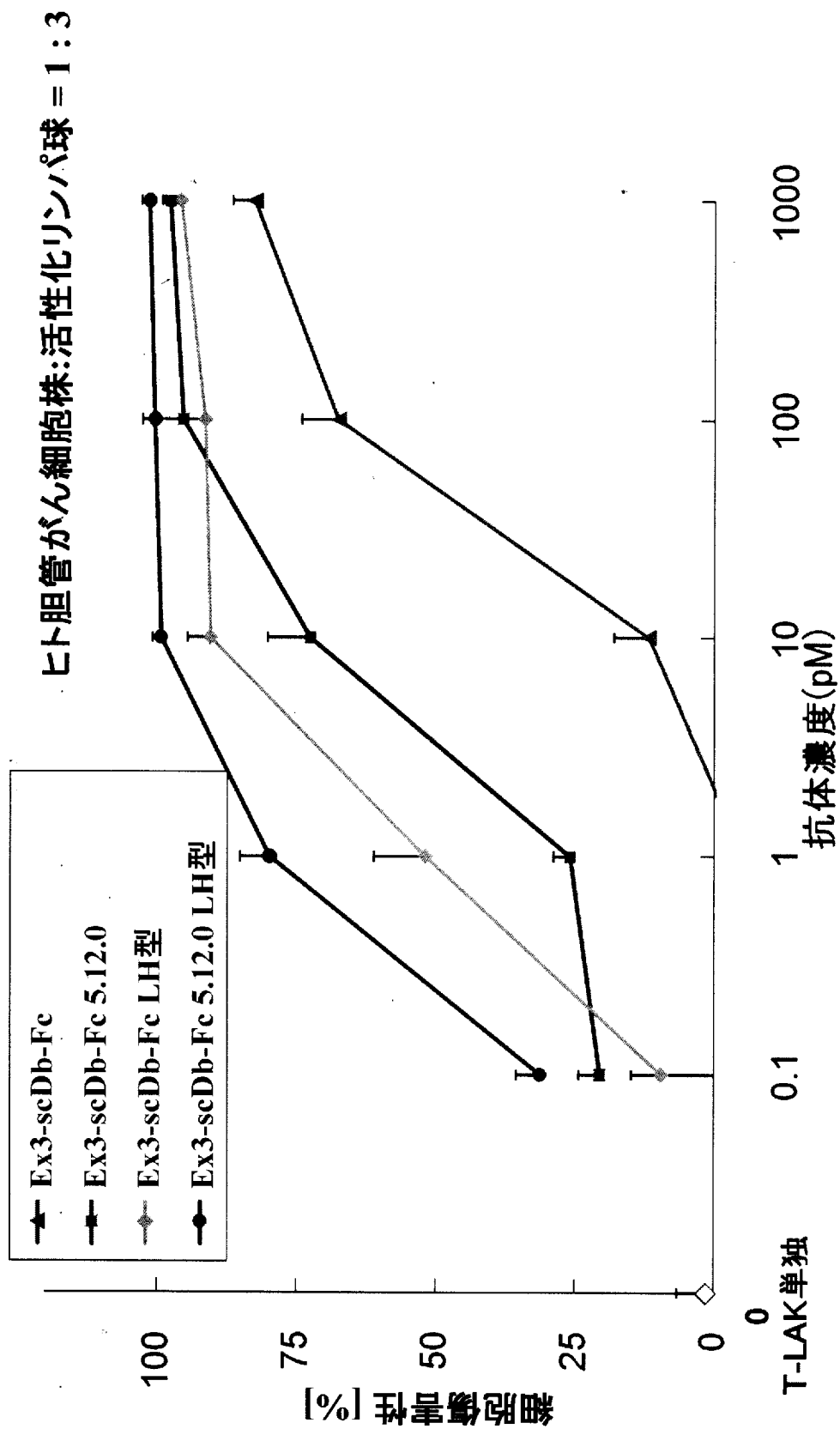


[図4]

ヒト胆管がん細胞株:活性化リンパ球 = 1:5

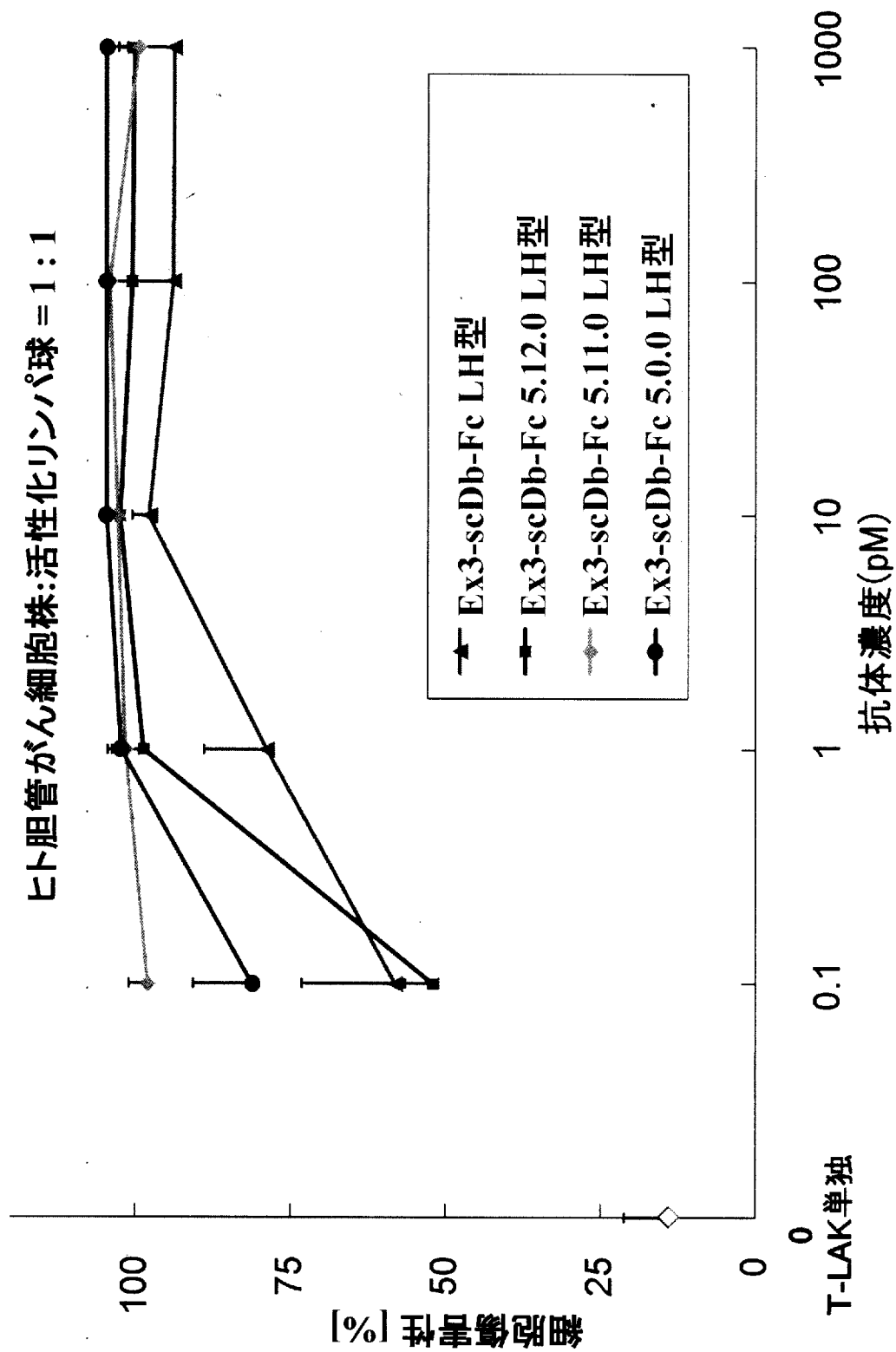


[図5]

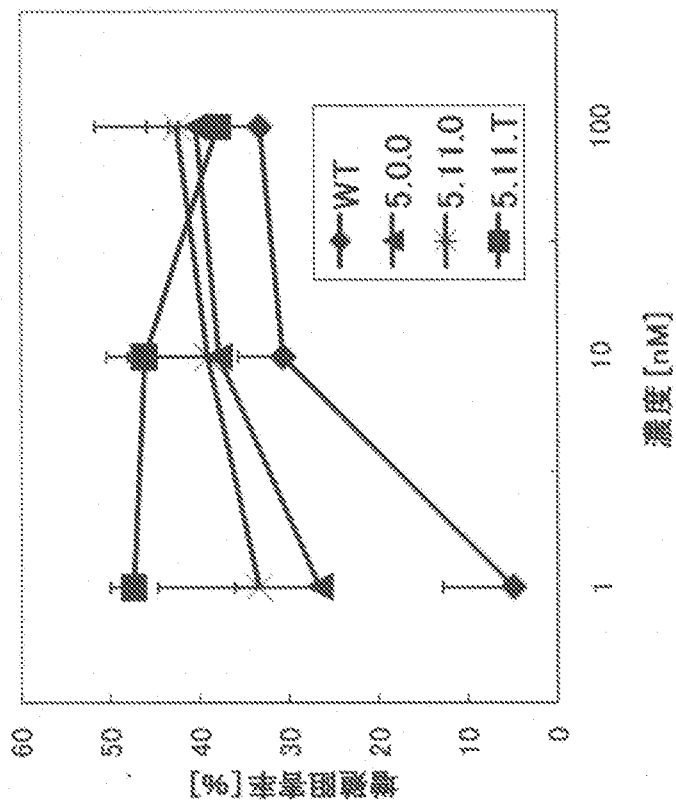
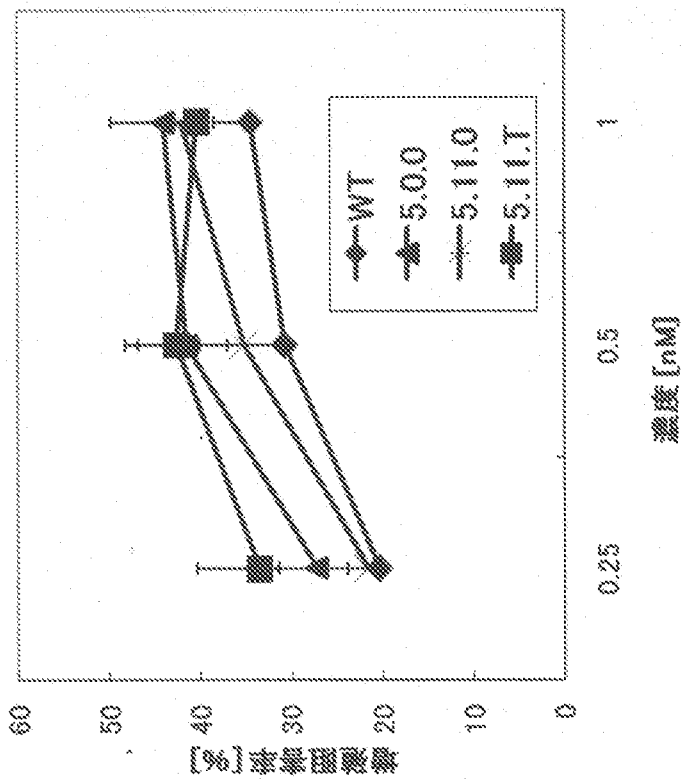
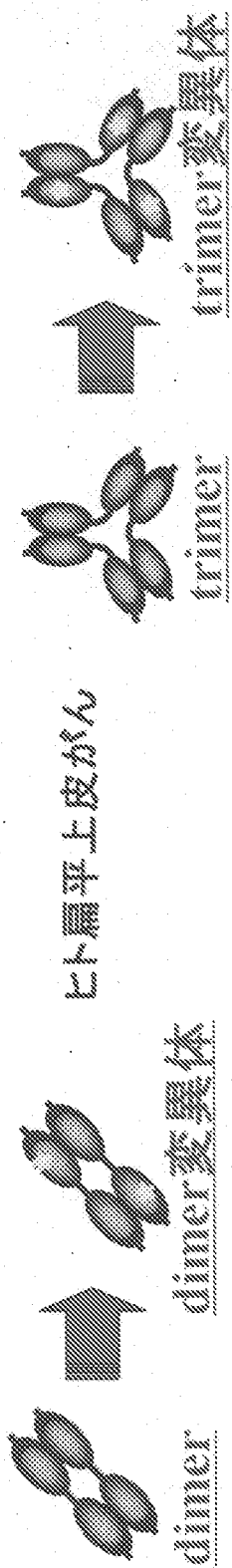




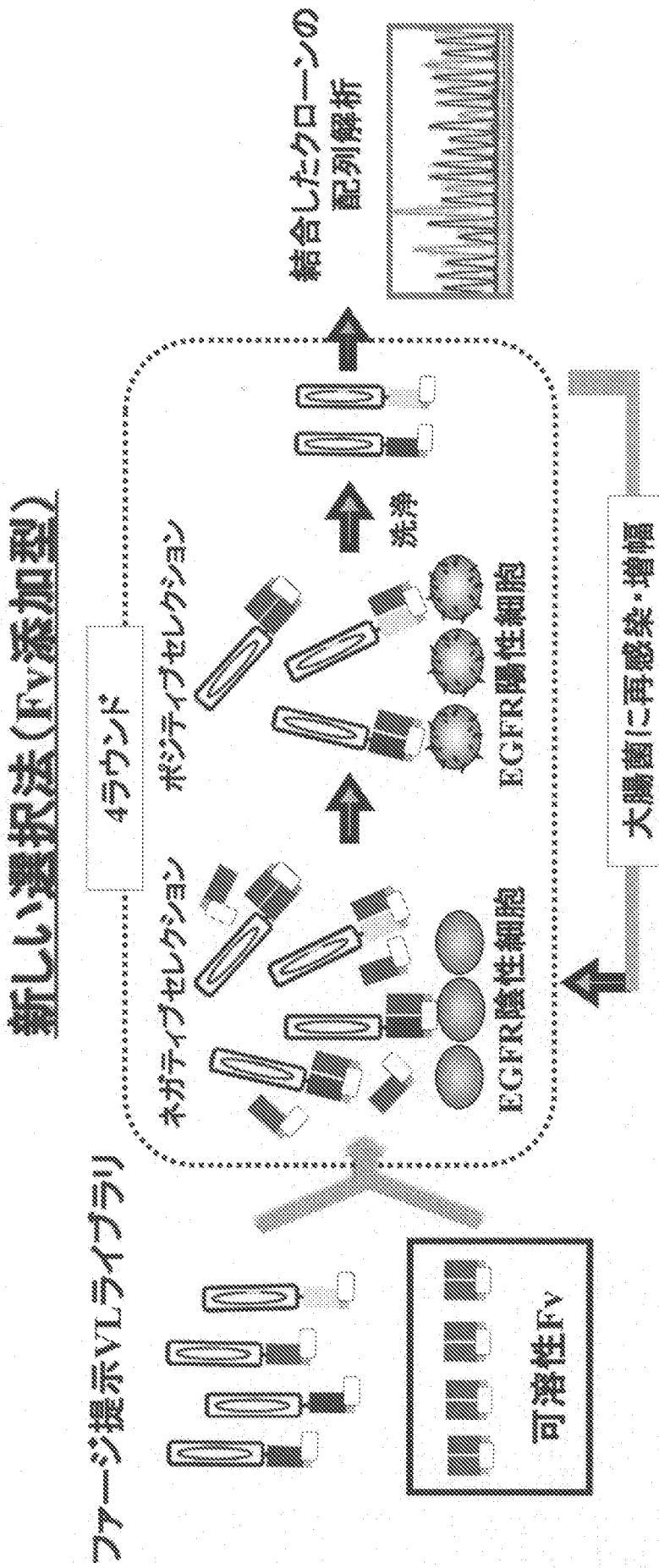
[図6]



[図7]



[図8]

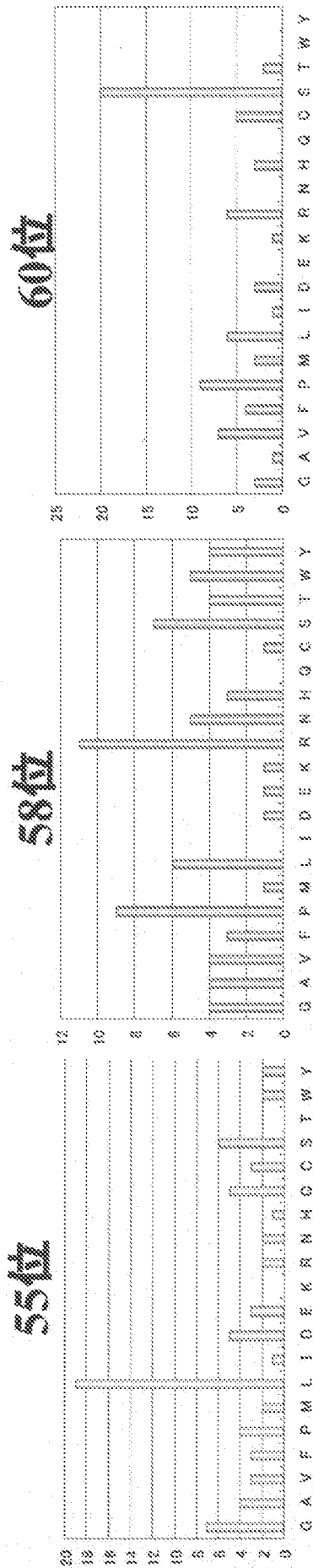


可溶性Fv濃度を検討

Fv=100 μM, 1 μM, 10 nM, 0.1 nM

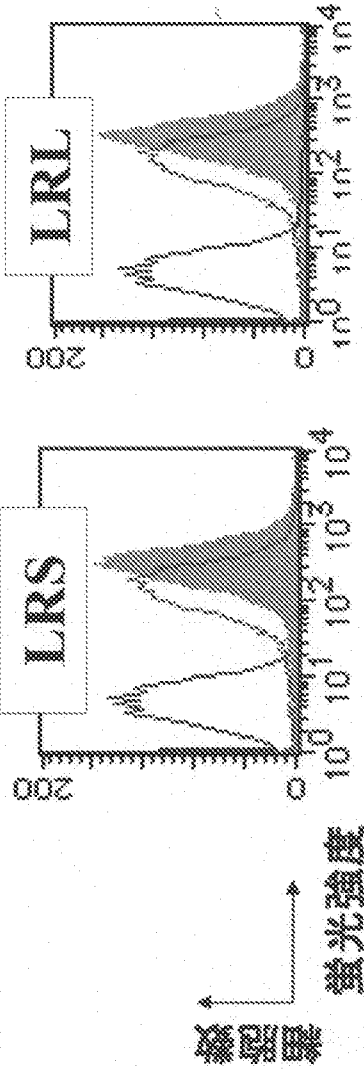
[図9]

可溶性Fv=10 nM で最もアミノ酸の偏り



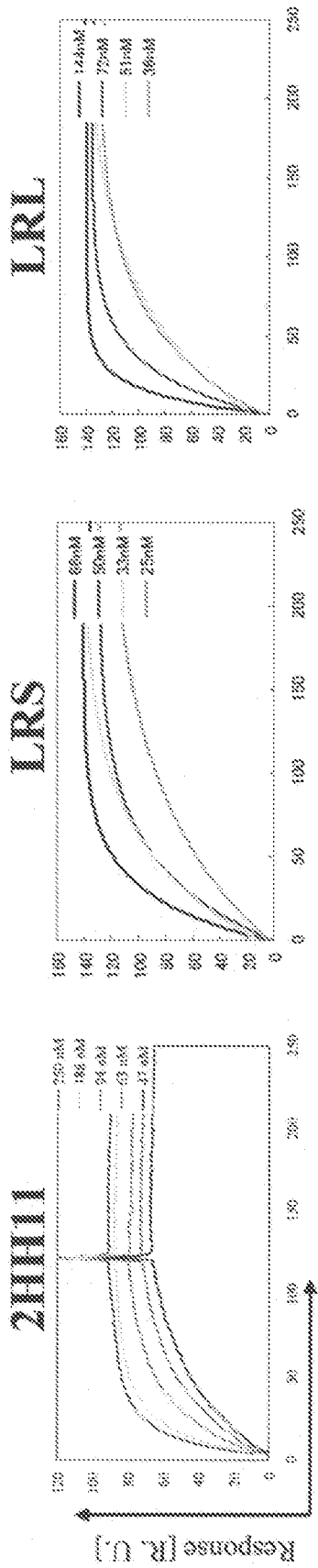
フローサイトメトリーを用いた結合評価

N.C.: 一次抗体添加無し  
P.C.: m528 Fv



クローン 55位 58位 60位  
LRS L R S  
LRL L R L

[図10]



Clone	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	$K_A$ [1/M]
m528 Fv	$7.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-4}$	$49 \times 10^8$
h528 Fv	$2.4 \times 10^5$	$6.0 \times 10^{-3}$	$0.4 \times 10^8$
2HH11	$2.7 \times 10^5$	$2.5 \times 10^{-4}$	$11.0 \times 10^8$
LRS	$5.3 \times 10^5$	$7.8 \times 10^{-4}$	$6.8 \times 10^8$
LRL	$3.0 \times 10^5$	$8.5 \times 10^{-4}$	$3.5 \times 10^8$

結合速度が向上 ⇔ 解離速度低下

[11]

	$K_A \times 10^7$ [1/M]	$\Delta G$ [kJ/mol]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$T\Delta S$ [kJ/mol]
m528 Fv	81.7	-50.9	-80.0	-29.1
2HH11	61.8	-50.4	-74.4	-24.0
h528 Fv	2.1	-41.8	-78.6	-36.8
LRS	105.2	-51.5	-108.7	-57.2
LRL	410.0	-54.8	-99.9	-45.1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070127

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(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)

C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, 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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CAPLus/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	JP 2004-242638 A (Tohoku Techno Arch Co., Ltd.),	1, 18, 20, 22, 23
Y	02 September 2004 (02.09.2004), particularly, examples; sequence no.29, 30 & US 2006/0210564 A1 & EP 1454917 A2	1-28
Y	WO 2007/108152 A1 (Tohoku University), 27 September 2007 (27.09.2007), particularly, paragraphs [0014] to [0026]; examples; fig. 1; sequence no.25, 26 & US 2009/0202532 A1 & EP 2006379 A1	1-28
Y	Urpo LAMMINMAKI et al., Expanding the Conformational Diversity by Random Insertions to CDRH2 Results in Improved Anti-estradiol Antibodies, J. Mol. Biol., 1999, Vol.291, p.589-602, entire text	1-28

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  
26 January, 2011 (26.01.11)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2011 (08.02.11)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/070127

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Karine MERIENNE et al., The Functional Architecture of an Acetylcholine Receptor-mimicking Antibody, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No.38, p.23775-23783, entire text	1-28
Y	Kohei TSUMOTO et al., "Thermodynamic and kinetic analyses of the antigen-antibody interaction using mutants", The Japanese Society for Artificial Intelligence Chishiki Base System Kenkyukai Shiryo, 2000, vol.49, pages 83 to 88, entire text	1-28
Y A	Alexander A. KORTT et al., Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting, Biomolecular Engineering, 2001, Vol.18, p.95-108, particularly, Abstract	15-28 1-14
P,A	JP 2010-119303 A (Tohoku University), 03 June 2010 (03.06.2010), (Family: none)	1-28
P,A	WO 2010/109924 A1 (Tohoku University), 30 September 2010 (30.09.2010), (Family: none)	1-28
A	WO 2002/06486 A1 (Tohoku Techno Arch Co., Ltd.), 24 January 2002 (24.01.2002), & AU 5708000 A	1-28



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(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. C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, 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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CAPlus/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	JP 2004-242638 A (株式会社東北テクノアーチ) 2004.09.02, 特に、 実施例、配列番号 29、30等参照 & US 2006/0210564 A1 & EP 1454917 A2	1, 18, 20, 22, 23
-		-
Y		1-28
Y	WO 2007/108152 A1 (国立大学法人東北大学) 2007.09.27, 特に、段 落 0014-0026, 実施例、図 1、配列番号 25、26等参照 & US 2009/0202532 A1 & EP 2006379 A1	1-28

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

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な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

26.01.2011

国際調査報告の発送日

08.02.2011

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)

北村 悠美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4501

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	Urpo LAMMINMAKI et al., Expanding the Conformational Diversity by Random Insertions to CDRH2 Results in Improved Anti-estradiol Antibodies, J. Mol. Biol., 1999, Vol.291, p. 589-602, 全文参照	1-28
Y	Karine MERIENNE et al., The Functional Architecture of an Acetylcholine Receptor-mimicking Antibody, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1997, Vol.272, No. 38, p. 23775-23783, 全文参照	1-28
Y	津本浩平 他, 変異体を用いた抗原抗体相互作用の熱力学的, 速度論的解析, 人工知能学会知識ベースシステム研究会資料, 2000, Vol. 49, p. 83-88, 全文参照	1-28
Y - A	Alexander A. KORTT et al., Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting, Biomolecular Engineering, 2001, Vol. 18, p. 95-108, 特に、Abstract 等参照	15-28 - 1-14
P, A	JP 2010-119303 A (国立大学法人東北大学) 2010.06.03, (ファミリーなし)	1-28
P, A	WO 2010/109924 A1 (国立大学法人東北大学) 2010.09.30, (ファミリーなし)	1-28
A	WO 2002/06486 A1 (株式会社東北テクノアーチ) 2002.01.24, & AU 5708000 A	1-28