

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4231862号
(P4231862)

(45) 発行日 平成21年3月4日(2009.3.4)

(24) 登録日 平成20年12月12日(2008.12.12)

(51) Int.Cl. F I
C O 7 K 16/28 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

請求項の数 2 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2005-232483 (P2005-232483)
(22) 出願日 平成17年8月10日(2005.8.10)
(62) 分割の表示 特願平6-181568の分割
原出願日 平成6年8月2日(1994.8.2)
(65) 公開番号 特開2005-336207 (P2005-336207A)
(43) 公開日 平成17年12月8日(2005.12.8)
審査請求日 平成17年8月10日(2005.8.10)
(31) 優先権主張番号 93112330-1
(32) 優先日 平成5年8月2日(1993.8.2)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

微生物の受託番号 DSM ACC2118
微生物の受託番号 DSM ACC2119

(73) 特許権者 591032596
メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
ト ベシュレンクテル ハフツング
Merck Patent Gesell
schaft mit beschrae
nkter Haftung
ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
ルムシュタット フランクフルター シュ
トラーセ 250
Frankfurter Str. 25
0, D-64293 Darmstadt
, Federal Republic o
f Germany
(74) 代理人 100123788
弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リンパ球抗原CD2および腫瘍抗原を認識する二特異性トリガー分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

DSM ACC2118の寄託番号下で寄託された細胞系1H10からの単離によって得られる、抗原CD2を認識するモノクローナル抗体であって、同種腫瘍浸潤リンパ球をエフェクター細胞として利用する、抗体誘導腫瘍溶解を引き起こすことが可能であり、

該抗体は、組み換え発現型ヒトCD2分子を免疫原として使用して、創製されたモノクローナル抗体である、モノクローナル抗体AICD2.M1。

【請求項2】

DSM ACC2119の寄託番号下で寄託された細胞系7D3からの単離によって得られる、抗原CD2を認識するモノクローナル抗体であって、単独でヒト末梢血白血球の増殖を誘導することが可能であり、

該抗体は、組み換え発現型ヒトCD2分子を免疫原として使用して、創製されたモノクローナル抗体である、モノクローナル抗体AICD2.M2。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リンパ球CD2抗原および任意の可変腫瘍抗原を認識する新規の二特異性抗体フラグメントに関する。好ましくは上皮増殖因子レセプター(EFG-R)の抗原決定基を腫瘍抗原として用いる。さらに本発明はAICD2.M1およびAICD2.M2と称する二つの新規のモノクローナル抗体およびそれらの合わせての腫瘍溶解への正の影響

に関し、少なくともそれらの一つが二特異性抗体フラグメントである。抗体および抗体フラグメントは腫瘍の治療および診断に有効に使用することができる。

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞を排除する場合、Ｔリンパ球はおそらく最も有効な免疫系構成要素である。しかし、ほとんどの癌患者は腫瘍細胞と特異的に反応する細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を充分には保持していない（例えば、Knuthら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81、3511）。ＣＴＬの溶解能をすべて活性化するためには、これら細胞が天然特異性を有しない腫瘍細胞に対することができるよう全細胞を処理しなければならない。腫瘍細胞上のある種の巻く抗原にモノクローナル抗体を結合させることによって、Ｔ細胞は活性化されて増殖、サイトカイン分泌および細胞溶解活性が認められる。

10

【0003】

腫瘍関連抗原を一方の結合肢で認識してＴ細胞マーカーをもう一方の結合肢で認識する二特異性抗体（ＢＡｂ）は、一特異性ＣＴＬと悪性細胞とを架橋することが示された（例えば、Staerzら、1985、Nature 314、628）。

【0004】

これら人工的抗体によるＴ細胞活性化はＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）／ＣＤ３複合体を通して起き得るが、ここでＴＣＲは抗原認識およびＴＣＲ－抗原相互作用によって生じるシグナルのトランスダクションのためのＣＤ３エピトープに関与する（例えば、H. Nelson、Cancer Cells、May 1991、163の総説およびその引用文献を参照されたい）。

20

【0005】

エフェクター細胞活性化は、Ｔリンパ球およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞上に存在する糖タンパク質であるＣＤ２抗原を介して起きる（例えば、Huenigら、1987、Nature 326、298）。ＣＤ２は、エフェクター細胞と標的細胞上の天然リガンドＬＦＡ３（ＣＤ５８）との相互作用を支持する。三つの機能的に重要なエピトープ（Ｔ１１．１、Ｔ１１．２およびＴ１１．３）がＣＤ２上に同定された。抗体結合の際に転形（モジュレーション）を起こすＣＤ３抗原とは対照的に、ＣＤ２を抗体で標的攻撃した後のＣＤ２転形は今までのところ報告されていない。抗ＣＤ２抗体を活性化に用いた以前の研究によると、ＣＤ２抗原を介しての二段階活性化が現実的のようである。これまで活性化に用いられてきた共働的に作用する抗ＣＤ２特異性は、抗Ｔ１１．２プラス抗Ｔ１１．１またはＴ１１．２プラス抗Ｔ１１．３などの抗体によって特徴づけられる。Ｔ１１．３は抗Ｔ１１．２による活性化の後にアクセス可能になる、隠れた（cryptic）エピトープであることが報告されている。今までのところ用いられる抗体のほとんどが、天然ＣＤ２リガンドＬＦＡ－３と結合を競合することが明かである（例えば、Bolhuisら、1991、Cancer Immunol. Immunother. 34、1およびその引用文献）。

30

【非特許文献１】Knuth et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), Vol. 81, 3511 (1984)

40

【非特許文献２】Staerz et al. Nature, Vol. 314, 628 (1985)

【非特許文献３】H. Nelson, Cancer Cells, May 1991, 161

【非特許文献４】Huenig et al. Nature, Vol. 326, 298 (1987)

【非特許文献５】Bolhuis et al. Cancer Immunol. Immunother., Vol. 34, 1 (1991)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 6 】

したがって、抗腫瘍抗体に由来する新規の二特異性抗体、および二段階活性化の後に影響を受けないCD2/LFA3を介して細胞の正常の交叉反応(cross-talk)を維持しながら細胞毒性を発揮することができる一対の共働的に作用する抗CD2抗体を開発することが、本発明の目的であった。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明による新規の二特異性抗体は次のような好ましい性質を有することが見出された。すなわち、腫瘍細胞に対する強い親和性、T細胞およびNK細胞に対する強い親和性、LFA3に対する非競合性、LFA3との非共働性、非レセプター転形性、高いNK細胞およびT細胞特異性、二段階活性化を介してのみの有効性(これはそのような一つのBAbはT細胞活性化および腫瘍細胞溶解にそれぞれ影響しないことを意味する)である。

10

【 0 0 0 8 】

したがって本発明の目的は、腫瘍細胞の溶解に有用な二特異性分子であり、これは腫瘍細胞のエピトープと結合する第一結合部位およびCD2抗原のエピトープと結合する第二結合部位からなり、BAb<X、AICD2.M1>YまたはBAb<X、AICD2.M2>Yで表される。但し、BAbは二特異性抗体を意味し、Xは腫瘍抗原を認識する抗体決定基であり、AICD2.M1、AICD2.M2はCD2抗原を認識する新規のモノクローナル抗体であり、そしてYは全抗体の一部である。

20

【 0 0 0 9 】

AICD2.M1およびAICD2.M2は新規のモノクローナル抗体であり、これは遺伝子工学的に作出されたCD2抗原でマウスを免疫して、適当なマウスハイブリドーマ細胞から抗体を分離して精製することによって得られ(詳細は実施例を参照されたい)、T細胞およびNK細胞のCD2抗原に高い特異性を示す。

【 0 0 1 0 】

本発明の対象は、したがって、AICD2.M1と称するモノクローナル抗体であって、これはCD2抗原を認識し、DSM ACC 2 1 1 8のアクセス番号の下に寄託されている細胞系1H10からの単離によって得ることができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の対象はまた、AICD2.M2と称するモノクローナル抗体であって、これはCD2抗原を認識し、DSM ACC 2 1 1 9のアクセス番号の下に寄託されている細胞系7D3からの単離によって得ることができる。

30

【 0 0 1 2 】

該抗体を産生する新規の細胞系は、ブダペスト条約に従って、「Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen」(DSM、Braunschweig、FRG)に1993年2月23日に寄託された。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、AICD2.M1およびAICD2.M2の天然または人工的な変種または突然変異体であって、遺伝子的に修飾または操作されたモノクローナル抗体に関し、好ましくはヒト遺伝子と結合させたものおよびキメラ型が含まれる。

40

【 0 0 1 4 】

本発明による二特異性分子は、AICD2.M1またはAICD2.M2の結合肢および、任意の腫瘍抗原を認識する抗体の別の結合肢からなる。抗腫瘍抗原の選択は、二特異性抗体のT細胞活性化および腫瘍細胞溶解に関する有効性には重要な影響を及ぼさない。本発明の好ましい実施態様において、該第二結合肢はモノクローナル抗腫瘍抗体MAb425、MAb361またはMAb15の結合肢に代表されるが、本発明によれば、修飾された、好ましくはヒト化されたものまたはキメラ型および遺伝子操作による最小フラグメントが含まれる。

【 0 0 1 5 】

本発明の対象は、したがって、上記および請求の範囲に定義された二特異性抗体フラグ

50

メントを提供することにあり、ここでXはモノクローナル抗体MAb 425、MAb 361またはMAb 15に由来する抗体決定基である。

【0016】

MAb 425は、広く公知のヒトA431癌腫細胞系(ATCC CRL 1555)に対して作出されたネズミモノクローナル抗体であって、ヒトEGF-Rの外側ドメインのポリペプチドエピトープと結合して、EGFの結合を阻害する。MAb 425(ATCC HB 9629)は、インビトロで腫瘍細菌毒性を媒介して、類表皮腫および結腸直腸癌腫由来の細胞系の腫瘍細胞増殖をインビトロで抑制することが見出された(Rodeckら、1987、Cancer Res. 47、3692)。MAb 425のヒト化およびキメラ型はWO 92/15683に開示された。

10

【0017】

MAb 361は、IgG2aネズミモノクローナル抗体(ATCC HB 9325)であって、ガングリオシドGD2抗原およびGD3抗原に特異的に結合する。これらガングリオシドは黒色腫に富んでいる(EP 0280 209、USSN 016902)。

【0018】

MAb 361は、GD2抗原を発現する腫瘍細胞に対してインビトロで有意なレベルの細胞毒性を示す(Thurinら、1987、Cancer Res. 47、1229)。

【0019】

MAb 15は、ヒト小細胞肺癌細胞TKB-2による免疫で生じたIgG1ネズミモノクローナル抗体である(Endoら、1986、Cancer Res. 46、6369)。抗体は早期分化抗原を認識する。

20

【0020】

本発明による二特異性抗体は、全抗体のフラグメントであり、例えば、 $F(ab')_2$ 分子またはミニ抗体(Fv 分子)、好ましくは $F(ab')_2$ 分子である。全抗体と対照的に、 $F(ab')_2$ およびミニ抗体のようなフラグメントは、固体腫瘍の腫瘍実質により容易に浸入して、細胞毒性および腫瘍内部での細胞溶解力を発揮することができる。さらに、ネズミ起源に由来する $F(ab')_2$ 分子およびミニ抗体は通常、低減したヒト抗マウス抗体応答(HAMA)を示す。

【0021】

30

したがって、本発明の好ましい目的は、上記に定義した二特異性抗体フラグメントを提供することであって、ここでYは $F(ab')_2$ 分子である。とくに好ましい実施態様は以下の群から選択される。

【0022】

BAb < 425、AICD2 . M1 > $F(ab')_2$

BAb < 425、AICD2 . M2 > $F(ab')_2$

BAb < 361、AICD2 . M1 > $F(ab')_2$

BAb < 361、AICD2 . M2 > $F(ab')_2$

BAb < 15、AICD2 . M1 > $F(ab')_2$

BAb < 15、AICD2 . M2 > $F(ab')_2$

40

完全な抗体またはフラグメントを基にして二特異性抗体を産生する種々の方法が記述されている(例えば、Brissinckら、1992、Drugs of the Future 17(11)、1003の総説を参照されたい)。二特異性抗体フラグメントを構築する一つの方法としては、全抗体をタンパク質分解によって(一特異性) $F(ab')_2$ 分子に変換して、これらフラグメントを Fab' 分子に分割して、異なる特異性を有する Fab' 分子を組み替えて二特異性 $F(ab')_2$ 分子にする方法がある(例えば、EP 0179872 B1を参照されたい)。

【0023】

このように、本発明の目的は腫瘍細胞のエピトープへの第一結合部位およびCD2抗原のエピトープへの第二結合部位からなる腫瘍細胞の溶解に有用な二特異性抗体 $F(ab'$

50

)₂フラグメントの調製法を提供することであって、これは各二つの同一のL(軽鎖)-H(重鎖)半分子からなっていて一つまたはそれ以上のジスルフィド結合によって連結されている二つの異なるモノクローナル抗体を酵素的変換によって二つのF(ab')₂分子にすること、各F(ab')₂分子を還元条件下でFab'チオールへ分割すること、各抗体のこれらFab'分子の一つをチオール活性化剤を用いて誘導体化することおよび、所望の二特異性抗体F(ab')₂フラグメントを得るために腫瘍特異性を有する活性化Fab'分子を白血球特異性を有する非活性化Fab'分子と(または逆にして)組み合わせることによって行うが、これはモノクローナル抗体AICD2.M1およびAICD2.M2を白血球抗原を認識する抗体として使用することを特徴とする。

【0024】

抗体をそのF(ab')₂分子に変換するために適する酵素としては、ペプシンおよびパパインが用いられる。場合によってはトリプシンまたはブロメリンが適している。しかし、ペプシンが本発明の工程では好ましく用いられる。ジスルフィド結合の遊離のSH-基(Fab'分子)への変換は、ジチオトレイトール(DTT)、メルカプトエタノールおよびメルカプトエチルアミンなどの還元試薬によって行うことができる。チオール半分子の再結合を防ぐ本発明によるチオール活性化剤は、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、二硫化2, 2'-ジピリジン、二硫化4, 4'-ジピリジンまたはテトラチオナート/亜硫酸ナトリウム(Rasora, 1982, Cancer Res. 42, 457およびその引用文献もまた参照されたい)である。好ましくはDTNBが本発明による工程に用いられる。

【0025】

チオール活性化剤を用いる処理は、二つのFab'フラグメントの一つとのみ行われる。原則的には、二つのFab'のうちのどちらを活性化Fab'フラグメント(例えばFab'TNB)に変換しても違いはない。しかし、一般に、より不安定なFab'フラグメントがチオール活性化剤で修飾される。本発明の場合、抗腫瘍特異性を有するフラグメントの方がわずかにより不安定であり、したがって、好ましくはこの工程に用いられる。二価F(ab')₂抗体を作出するための第二Fab'分子の遊離ヒンジ-SH基と活性化Fab'誘導体との抱合は、0~30の温度で自然に起きる。精製F(ab')₂抗体の収率は20~40%(全抗体から出発して)である。

【0026】

上記したように、本発明はまた、二特異性ミニ抗体を含む。ミニ抗体は二つの一本鎖Fvフラグメント(scFvフラグメントは、通常遺伝子工学的に、V_H-リンカー-V_LまたはV_L-リンカー-V_Hとして結合されている)からなる抗体フラグメントであって、これらは自己凝集によってまたはC末端でヒンジ領域と互いに融合することによって結合されており、(適宜)可変性を提供するか、そして/または両親媒性ヘリックスを提供して二量体形成をする。ヘリックスは、四ヘリックス団デザインまたはロイシンジッパーから得られる(例えば、PackおよびPlueckthun, 1992, Biochem. 31, 1579)。上記に定義されたミニ抗体の調製は、例えばWO93-00082に開示されている。

【0027】

本発明による二特異性抗体フラグメントを、次のような性質に関してインビトロ/エクスピボで試験した。すなわち、特異的腫瘍細胞およびT細胞への結合能、免疫修飾(T細胞増殖)および細胞毒性(腫瘍細胞溶解)である。試験は標準的文献に記載の方法による。詳細および結果は実施例に示す。

【0028】

本発明による二特異性抗体フラグメントは、ヒト患者に治療のために投与することができる。したがって、本発明の目的はまた、活性成分として上記および請求の範囲に定義した二特異性抗体フラグメントの少なくとも一つを、一つまたはそれ以上の製薬学的に容認し得る担体、賦形剤または希釈剤と組み合わせて含んでなる薬剤調製物を提供することである。

【 0 0 2 9 】

多くの場合、本発明の抗体フラグメントは静脈注射によって非経口的に投与される。一般に、二特異性抗体フラグメントは所望の腫瘍抑制および腫瘍溶解効果を生じるのに十分な範囲の用量で投与される。投与量は、年齢、健康状態、性別および患者の病気の程度によって異なるが、 0.1 mg / kg から 200 mg / kg の範囲まで変化することができる。1日に1回またはそれ以上の投与で 0.1 mg / kg から 100 mg / kg / 投与で1日または数日の投与が好ましい。

【 0 0 3 0 】

非経口投与の調製物には、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリブ油などの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルおよびこれらの目的に適した当業者に公知の他の溶媒があげられる。本発明の二特異性抗体は、生理学的に容認し得る担体からなる組成物中に用いることができる。そのような適当な担体の例としては、生理的食塩水、PBS、リンゲル液または乳酸塩化リンゲル液などがある。また、保存剤および抗生物質、抗酸化剤およびキレート剤などの他の添加剤を薬剤調製物に含ませてもよい。二特異性抗体フラグメントはまた、それらの細胞毒性を維持するためにIL-2などのサイトカインを公知の方法によって抱合させることができる。

【 0 0 3 1 】

本発明の薬剤調製物は、黒色腫、神経膠腫、癌腫それに循環系の腫瘍および固体腫瘍などのあらゆる種類の腫瘍の治療に適している。好ましい調製物は、一つの結合肢がモノクローナル抗体MAb 425、MAb 361およびMAb 15の結合部位を有する二特異性抗体フラグメントからなる。

【 0 0 3 2 】

本発明は、二つの異なる抗体または二特異性抗体フラグメントをそれぞれ投与することによるきわめて効果的な白血球の二段階活性化を開示する。

【 0 0 3 3 】

したがって、本発明の目的はまた、二特異性抗体フラグメントBA b < X、A I C D 2 . M 2 > Y からなる上記または請求の範囲に定義した第一薬剤調製物 (I) および、MA b A I C D 2 . M 1 またはMA b < A I C D 2 . M 1 > Y またはBA b < X、A I C D 2 . M 1 > Y からなる第二の別の薬剤調製物 (II) [ここでXおよびYは既記の意味を有する] からなる薬剤組成物キット (A) を提供することである。この薬剤組成物キットにおいて、調製物 (I) はMA b A I C D 2 . M 2 上に、調製物 (II) はMA b A I C D 2 . M 1 上に見出だされる。

【 0 0 3 4 】

あるいはまた、本発明は、調製物 (I) がMA b A I C D 2 . M 1 に基づき、調製物 (II) がMA b A I C D 2 . M 2 に見出だされる組成物キット (B) に関する。このように、本発明のさらなる目的は、二特異性抗体フラグメントBA b < X、A I C D 2 . M 1 > Y からなる第一薬剤調製物 (I) および、MA b A I C D 2 . M 2 またはMA b < A I C D 2 . M 2 > Y またはBA b < X、A I C D 2 . M 2 > Y からなる第二の別の薬剤調製物 (II) [ここでXおよびYは既記の意味を有する] からなる薬剤組成物キットを提供することである。

【 0 0 3 5 】

組成物 (A) と (B) との間の違いは、通常あまり重要ではない。MA b 425 の場合は、調製物 (I) がMA b A I C D 2 . M 1 に基づく組成物 (B) の方がより有効であることが認められた。

【 0 0 3 6 】

組成物 (A) と (B) との間の腫瘍結合部位の違いもまた、あまり重要ではない。しかし、本発明による薬剤組成物キットの結合能、免疫修飾 (白血球増殖) および細胞毒性に関する有効性は、抗体A I C D 2 . M 1 およびA I C D 2 . M 2 に由来する二特異性抗体フラグメントの結合部位の影響に依存する。本発明の好ましい実施態様では同様の性質を

10

20

30

40

50

示す。

【 0 0 3 7 】

調製物 (I) (あるいはまた、全抗体、一特異性抗体フラグメントまたは B A b) に関する治療効果の違いはまた、著しく大きくはない。しかし、適当な一特異性抗体フラグメントからなる調製物 (I I) が好ましい。

【 0 0 3 8 】

薬剤組成物キットは次のようにして用いられる。医療処理は本発明による薬剤組成物キットの一つである調製物 (I) を患者に注射することによって開始される。二特異性抗体はその特異性によって腫瘍の表面のみに結合するのではなく、その小サイズの故に固体腫瘍塊に浸入する。本発明による二特異性抗体フラグメントの投与によって、注射された免疫グロブリンが腫瘍の局部領域において富化されるが、有意な免疫応答を引き起こすまでには到らない。数時間から数日のそれぞれの期間 (病気の程度、腫瘍の種類、健康状態、患者の性別および年齢などによって異なる) の後に、調製物 (I I) を投与する。免疫学的応答がただちに誘導される。調製物 (I) および (I I) は好ましくは等モル量が投与される。エックスピボ実験によって、通常は腫瘍に対して有意な細胞毒性 (細胞溶解) を誘導することができない同原および同種の腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を該処理によって高度に活性化することができる (図 6 a、b、図 7)。

【 0 0 3 9 】

本発明の薬剤組成物キットを使用することによって、エックスピボ腫瘍細胞を骨髓調製物中で一掃することが可能である。細胞毒性効果を強めるために、外来性 T リンパ球を加えることも可能である。

【 0 0 4 0 】

したがって、最後に、本発明の目的はまた、同原骨髓移植において上記および請求の範囲に定義した薬剤組成物キットを用いて、適宜追加の T リンパ球の存在下で、エックスピボで腫瘍細胞を洗浄する方法を提供することであって、これは最初に細胞を調製物 (I) で処理して、その後で調製物 (I I) で処理して、適宜従来の精製工程を続けて行う。エックスピボの骨髓洗浄の手法は当業者に自体公知である。

(図面の簡単な説明)

[図 1] B A b の合成を示した模式図である。

【 0 0 4 1 】

[図 2] 抗体フラグメントおよび B A b の S D S - P A G E を示した説明図である。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : $M A b < A I C D 2 . M 1 > F (a b ') _2$ (D T T による還元前)

レーン 3 : $M A b < 4 2 5 > F (a b ') _2$ (D T T による還元前)

レーン 4 : $M A b < A I C D 2 . M 1 > F (a b ') _2$ (D T T による還元および D T N B による誘導体化後)

レーン 5 : $M A b < 4 2 5 > F (a b ') _2$ (D T T による還元および D T N B による誘導体化後)

レーン 6 : B A b (精製前)

レーン 7 : B A b (精製後)

[図 3] $B A b < 4 2 5$ 、 $A I C D 2 . M 1 > F (a b ') _2$ のヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィー溶出図である。

左縦軸 : 吸光度 O D (2 8 0 n m)、

右縦軸 : リン酸塩緩衝液 (p H = 7 . 0) 濃度、

横軸 : 溶出時間 (分)。二特異性抗体フラグメントはピーク II で示される。ピーク I および III は少量不純物である。

【 0 0 4 2 】

[図 4] B A b / M A b の E G F - R への競合的結合を示す説明図である。

縦軸 : % 吸光度 (4 9 0 n m)、

横軸：抗体フラグメント濃度（ $\text{mol} / \text{リットル}$ 、対数目盛り）。ビオチン標識 $\text{MAb } 425$ を非標識 $\text{MAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$ または BAb との EGF-R への結合に対する競合に用いた。

$\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$ 、 $\text{AICD2} \cdot \text{M1} > \text{F}(\text{ab}')_2$

$\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$ 、 $\text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$

$\text{MAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$

〔図5〕 ヒト末梢血白血球（ PBL ）の増殖を示す説明図である。

縦軸： ^3H -チミジンの%取り込み量、

横軸：抗体フラグメント濃度（ $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）。

$\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2 + \text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$ 10

$\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2 + \text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M1} > \text{F}(\text{ab}')_2$

$\text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$

$\text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M1} > \text{F}(\text{ab}')_2$

$\text{MAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$

〔図6〕 aは、 BAb 誘導腫瘍溶解（エフェクター細胞としての同種 TIL を使用）を説明するグラフ図である。

縦軸：%細胞毒性、

横軸：

1 = $\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2 + \text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$

2 = $\text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M1} > \text{F}(\text{ab}')_2$

3 = $\text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$

4 = $\text{MAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$

bは、 BAb 誘導腫瘍溶解（エフェクター細胞としての同原 TIL を使用）を説明するグラフ図である。

縦軸：%細胞毒性、

横軸：

1 = $\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2 + \text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$ 30

2 = $\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2 + \text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M1} > \text{F}(\text{ab}')_2$

3 = $\text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M1} > \text{F}(\text{ab}')_2$

4 = $\text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$

5 = $\text{MAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2$

棒グラフの上の線：平均偏差

〔図7〕 BAb 媒介 T 細胞標的攻撃および腫瘍細胞溶解を示す写真図である。

図7AおよびBは40/1のエフェクター/標的比における腫瘍浸潤リンパ球（ TIL ）と同原悪性細胞の培養物を示す。

共培養は $\text{BAb } < 425 > \text{F}(\text{ab}')_2 + \text{MAb } < \text{AICD2} \cdot \text{M2} > \text{F}(\text{ab}')_2$ を含まない（図7A、対照）および含む（各 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、図7B）状態で4時間インキュベートして行った。 CD2BAb の存在下で、多数の T リンパ球が同原腫瘍細胞に付着して密集し、続いて黒色腫細胞を傷害する。

図7Bの矢印は TIL の破壊された黒色腫との抱合を示す。 TIL と黒色腫細胞との共培養は、10% FCS を含む培養培地中において、24ウェルプレート中で行った。

顕微鏡写真は反射型顕微鏡（改良位相差コントラスト、オリジナルの倍率100）を用いて行った。

【実施例】

【0043】

以下の実施例によって本発明を詳細に説明する。

【0044】

[実施例 1]

MAb AICD2・M1およびAICD2・M2の調製：

Balb/Cマウスを遺伝子工学的に作出したCD2によって2週間のうちに4回免疫した。ヒトCD2のDNA配列およびそのクローニングは、Sayreら(1987、Proc. Natl. Acad. USA 84、2941)によって記述されている。CD2遺伝子発現は文献(Fraser 1992、Current Topics in Microbiol. Immunol. 158、131およびその引用文献)によって公知の方法によってバキュロウイルス(Baculovirus)系において行った。

10

【0045】

免疫したマウスの脾臓細胞を分離して、黒色腫細胞系(Ag8.653、ATCC CRL1580)と融合させた。ヒトTリンパ球(CD2陽性)上で増殖しているハイブリドーマの上清を蛍光活性化細胞選別器(FACS)を用いて試験することによって、ハイブリドーマを特異的モノクローナル抗体産生についてスクリーニングした。陽性ハイブリドーマを「限定希釈クローニング」の方法によって回収した。選択されたハイブリドーマの上清を免疫沈降反応およびウエスタンブロット分析によって調べた。選択されたモノクローナル抗体の単離は、Eyら(1978、Immunochemistry 15、429)による培養上清物の精製によって行った。

【0046】

20

抗体に対するCD2抗原の機能的分析は、増殖試験(^3H -チミジンの取り込み)によって行った。CD2抗原と反応する一連のモノクローナル抗体から選択された二つの抗体はT細胞の増殖を強く誘導した。これらモノクローナル抗体はAICD2・M1およびAICD2・M2と命名して、Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismenに寄託した。

【0047】

用いた方法はすべて、標準的手法によって行った。その多くは、例えば「Antibodies, a Laboratory Manual」(HarlowおよびLane、1988、Cold Spring Harbor)およびその引用文献)に開示されている。

30

【0048】

[実施例 2]

BAb 425、AICD2・M1 > F(ab')₂の合成：

合成は、10mgの抗体AICD2・M1および10mgの抗体MAb 425から出発した。用いられる抗体はクエン酸緩衝液(3mM EDTA、pH 5.5)中で前活性化パパイン処理(10mg/ml)した。タンパク質分解の後、F(ab')₂をタンパク質Aセファロースカラムの溶出液から回収した。F(ab')₂の回収率は通常ほぼ100%である。0.5mM DTTを用いて30で40分間処理することによって両F(ab')₂フラグメントをそれぞれFab'フラグメントに変換した。還元工程後、ゲル濾過(スーパーデックス(登録商標)200)を介して過剰のDTTを除去してFab'を回収した。工程の進行中に、MAb 425フラグメントを0.5mMエルマン試薬(5、5-ジチオール-ピス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB))を用いて4で60分間処理することによってFab'-TNB誘導体が生じた。過剰のDTNBをゲル濾過によって除去した。6mgのそれぞれの抱合相手(Fab'-AICD2・M1およびFab'-TNB MAb 425)を抱合相手混合物を4で18時間攪拌することによって最終抱合工程に用いた。二特異性抗体を反応混合物からゲル濾過クロマトグラフィー(スーパーデックス(登録商標)200)によって回収した。合成F(ab')₂調製物の収量は3~4mg(約30%)であった。BAb合成のための一連の操作概要を図1に示した。

40

【0049】

50

[実施例 3]

B A b < 3 6 1、A I C D 2 . M 1 > F (a b ')₂の合成：

実施例 2 と同様にして、二特異性抗体を M A b A I C D 2 . M 1 および M A b 3 6 1 から出発して調製した。B A b の収率は約 3 4 % であった。

【 0 0 5 0 】

[実施例 4]

B A b < 1 5、A I C D 2 . M 1 > F (a b ')₂の合成：

実施例 2 と同様にして、二特異性抗体を M A b A I C D 2 . M 1 および M A b 1 5 から出発して調製した。B A b の収率は約 2 3 % であった。

【 0 0 5 1 】

[実施例 5]

B A b < 4 2 5、A I C D 2 . M 2 > F (a b ')₂の合成：

実施例 2 と同様にして、二特異性抗体を M A b A I C D 2 . M 2 および M A b 4 2 5 から出発して調製した。B A b の収率は約 3 0 % であった。

【 0 0 5 2 】

[実施例 6]

B A b < 4 2 5、A I C D 2 . M 1 > (s c F v)₂の合成：

A I C D 2 . M 1 および M A b 4 2 5 の V_L および V_H ドメインからなる二つの一本鎖タンパク質を分子工学的手法 (W i n t e r ら、1991、Nature 349、293 ~ 299) によって調製した。発現プラスミドは p H E N 1 (H o o g e n b o o m ら、N u c l e i c A c i d R e s . 19、4133 ~ 4137) に由来するものであって、これは抗 - E G F - R ネズミハイブリドーマ (M A b 4 2 5) または抗 - C D 2 ネズミハイブリドーマ (A I C D 2 . M 1) のいずれかに由来する V_L および V_H ドメインの構造遺伝子を含む。P e l B リーダー配列を大腸菌中におけるペリプラズム分泌の媒介に用いた。s c F v をアフィニティークロマトグラフィーによって精製して、二特異性 s c F v の構築に用いた。E G F - R と C D 2 - 特異性 s c F v の化学的交差を試薬 2 - イミノチオランおよびヘテロ二官能基クロスリンカー S P D P を用いて行った。10 m g の M A b < 4 2 5 > s c F v から出発して、本発明者は S P D P を介して s c F v 分子当たり 1 分子の 2 - ピリジルジスルフィドの統計的取り込み量に近づいた。誘導体の精製は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて行った。反応性 - S H 基の M A b < A I C D 2 . M 1 > s c F v への導入は 10 m g の s c F v の 2 - イミノチオランを用いる誘導体化によって達成された。誘導体の精製をゲル濾過クロマトグラフィーによって行った。等モル量の 2 - ピリジルジスルフィド活性化 M A b < 4 2 5 > s c F v および 2 - イミノチオラン修飾 M A b < A I C D 2 . M 1 > s c F v を中性 p H で一緒にカップリングさせた。カップリング反応をピリジン 2 - チオンの放出をモニターすることによって追跡した。最終二特異性産物をゲル濾過クロマトグラフィーで回収して、約 5 % の収量を得た。

【 0 0 5 3 】

[実施例 7]

二特異性抗体の特徴づけ：

B A b 合成の各工程を、通常の公知の手法に従って S D S - P A G E によってモニターした。化学合成の中間体および最終二特異性産物を図 2 に示す。S D S - P A G E 分析に加えて、B A b の純度および均質性をヒドロキシアパタイトカラム上のクロマトグラフィーによって評価した。B A b の溶出をリン酸塩緩衝液 (p H = 7 . 0、0 ~ 0 . 3 モル / リットル) の勾配によって行った。図 3 は、B A b < 4 2 5、A I C D 2 . M 1 > F (a b ')₂ のクロマトグラフ溶出図を示す。B A b は主要ピーク II によって表され、小ピーク I および III は少量の混入物である。

【 0 0 5 4 】

[実施例 8]

B A b < 4 2 5、A I C D 2 . M 1 > F (a b ')₂ の E G F - R への結合特性：

二特異性抗体の結合特性を競合的 E L I S A 分析によって比較した。すなわち、ビオチ

10

20

30

40

50

ン標識したM A b 4 2 5 を非標識抗体またはB A b とのE G F - R への結合を競合させるために用いた。E G R - R をA 4 3 1 細胞 (A T C C C R L 1 5 5 5) から公知の方法によって単離した。A 4 3 1 細胞はC D 2 陰性である。検出をP O D - 抱合ストレプトアビジンおよび基質とインキュベートした後に行った。データから阻害曲線を作図した (図 4) 。右にシフトした両B A b の阻害曲線は、二価から一価の結合に変化したための親和性の欠失を示す。

【 0 0 5 5 】

[実施例 9]

B A b < M A b 4 2 5 、 M A b A I C D 2 . M 2 > F (a b ') ₂ のE G F - R への結合特性：

10

実施例 8 と同様にして、二特異性抗体の結合特性を調べた (図 4) 。両B A b はそれらの抗原標識に対して同じ親和性を示した。

【 0 0 5 6 】

[実施例 1 0]

二特異性および一特異性抗体フラグメントのC D 2 抗原への結合特性：

ジャーカット細胞 (ヒト急性T細胞白血病、C D 2 、C D 3 陽性、E G F - R 陰性、A T C C T I B 1 5 2、 1×10^6 細胞 / サンプル) を二特異性 / 一特異性抗体フラグメントの対数希釈液とともに4 で15分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄して、第二段階抗血清としてのヤギ - 抗マウス - F I T C とともにインキュベートした。細胞を再び洗浄して、免疫蛍光をファクスター・プラス (F A C S t a r p l u s 、登録商標) を用いて分析した。リスト・モード・データ取得と、単レーザー励起を用いるファクスター・プラスを、生細胞の抗体染色を分析するために使用した。全細胞群の特異的蛍光強度および抗体反応性細胞の割合を決定した。第二段階抗血清で染色した細胞の蛍光分布は陰性対照としてのみ用いられる。

20

ジャーカット細胞上の異なる二特異性 / 一特異性抗体フラグメントの結合強度の測定値として、半飽和濃度を以下に表示する。1 / 2 飽和濃度値は、滴定曲線 (蛍光強度 (直線) 対抗体濃度) に基づき読み取るが、従って、凡その推定値である。

【 0 0 5 7 】

抗体フラグメント	1 / 2 飽和濃度
M A b < A I C D 2 . M 1 > F (a b ') ₂	3×10^8
B A b < 4 2 5 , A I C D 2 . M 1 > F (a b ') ₂	$> 1 \times 10^7$ (非飽和)
B A b < 3 6 1 , A I C D 2 . M 1 > F (a b ') ₂	1×10^7 (非飽和)
M A b < A I C D 2 . M 2 > F (a b ') ₂	2×10^8
B A b < 4 2 5 , A I C D 2 . M 2 > F (a b ') ₂	$> 1 \times 10^7$ (非飽和)
B A b < 1 5 , A I C D 2 . M 2 > F (a b ') ₂	1×10^7 (非飽和)
M A b < 4 2 5 > F (a b ') ₂	陰性

30

[実施例 1 1]

白血球の精製末梢血単核白血球をI L - 2 (2 0 U / m l) およびI L - 4 (1 0 0 0 U / m l) を添加した培地 (R P M I 1 6 4 0) 中で放射線照射 (3 0 G y) した同原腫瘍細胞とともに共培養した。応答細胞を同原腫瘍細胞を用いて毎週再刺激した。

40

【 0 0 5 8 】

健康な供血者または黒色腫患者から新鮮に調製したヒト末梢血白血球 (h u P B L) を96ウェル平底マイクロタイタープレート中で200 μ l の最終容量で 1×10^5 細胞 / ウェルの濃度で培養した。細胞を一特異性または一特異性 + 二特異性抗体フラグメントと指示濃度でインキュベートした。72時間後、細胞を0.5 μ C i ³H - チミジンと混合し、一晚インキュベートして、回収した。³H - チミジンの取り込みを液体シンチレーション プレート計数によって測定して、結果を平均 c p m で表した。M A b 4 2 5 に由来する抗体フラグメントの結果の詳細を図5に見ることができる。同様の結果がM A b 3 6 1 およびM A b 1 5 に由来する抗体フラグメントを用いても得られた。抗体フラグメン

50

トを組み合わせ投与する場合、それぞれの場合において増殖を有意に誘導する。

【0059】

[実施例12]

B A b誘導腫瘍溶解高度に浸入性で自然転移性でE G F - R陽性のヒト黒色腫細胞系の細胞系C 8 1 6 1 (W e l c h ら、1991、I n t . J . C a n c e r 47、227およびその引用文献)を、同種および同原腫瘍浸潤Tリンパ球(T I L)によるE G F - R依存性標的攻撃の標的として用いた。他のE G F - R陽性ヒト黒色腫細胞系を用いることもできる。T I L大量培養は黒色腫標本から確立された。腫瘍細胞およびT I Lの培養条件は既述されている(例えば、S h i m i z u ら、1991、C a n c e r R e s . 51、6153)。

10

【0060】

安定なC T Lクローンの産生をM L T C 応答細胞を用いて限定希釈条件下で行った。M T L C 応答T細胞を1ウェル当たり1細胞の割合でI L - 2およびI L - 4添加培地中に支持細胞としての同原刺激細胞および同原E B V - 変換B細胞とともに96ウェルプレート中に接種した。コロニーを同原腫瘍細胞および支持細胞で毎週再刺激した。

【0061】

新鮮腫瘍生検片からのTリンパ球を固定化抗C D 3抗体で活性化して、I L - 2およびI L - 4を添加したR P M I 中で増殖展開させた。

【0062】

インビトロ細胞毒性分析を ^{51}Cr -標識腫瘍細胞を用いて行った。標的細胞を ^{51}Cr (100mCi / 10^7 細胞)を用いて約1時間標識して、3回洗浄した。定常数の標識細胞(2×10^3 / ウェル)を、一特異性または二特異性抗体または両者の組み合わせおよびエフェクターT I L (エフェクター / 標識比: 7 / 1)とともにインキュベートした。C T Lを100 μ lの培地中で96ウェルマイクロタイター中で連続希釈(各三組)した。標識細胞を加えた後、プレートを10% CO_2 中で37℃で4時間インキュベートした。分析を遠心分離によって終結させた。上清を集めて、放射活性をガイガーカウンターによって測定した。特異的 ^{51}Cr 放出率(%)を次式によって算出した。

20

特異的 ^{51}Cr 放出(%) = $100 \times (\text{実験放出} - \text{自然放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然放出})$

M A b 4 2 5に由来する抗体フラグメントに関する結果の詳細は、図6 a、6 bおよび図7に見ることができる。同様の結果が、M A b 3 6 1およびM A b 1 5に由来する抗体フラグメントを用いて得られた。抗体フラグメントの組み合わせの投与によって、それぞれの場合で腫瘍溶解が有意に誘導された。

30

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、B A bの合成を示した模式図である。

【図2】図2は、抗体フラグメントおよびB A bのS D S - P A G Eを示した説明図である。

【図3】図3は、B A b < 4 2 5、A I C D 2 . M 1 > F (a b ')₂のヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィー溶出図である。

【図4】図4は、B A b / M A bのE G F - Rへの競合的結合を示す説明図である。

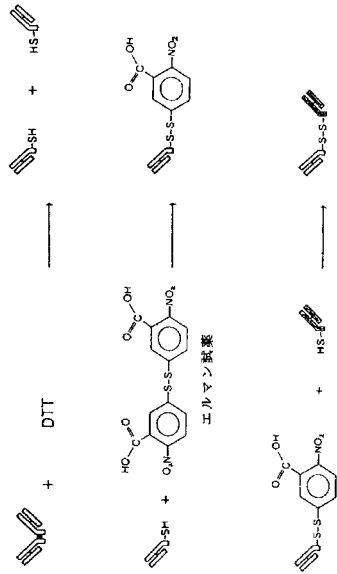
40

【図5】図5は、ヒト末梢血白血球(P B L)の増殖を示す説明図である。

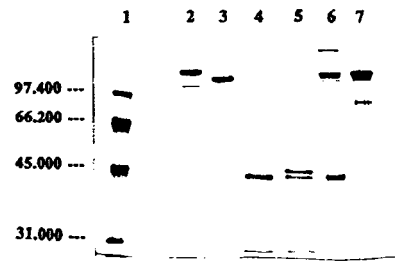
【図6】図6 aは、B A b誘導腫瘍溶解(エフェクター細胞としての同種T I Lを使用)を説明するグラフ図である。図6 bは、B A b誘導腫瘍溶解(エフェクター細胞としての同原T I Lを使用)を説明するグラフ図である。

【図7】図7は、B A b媒介T細胞標的攻撃および腫瘍細胞溶解を示す写真図である。図7 AおよびBは40 / 1のエフェクター / 標的比における腫瘍浸潤リンパ球(T I L)と同原悪性細胞の培養物を示す。

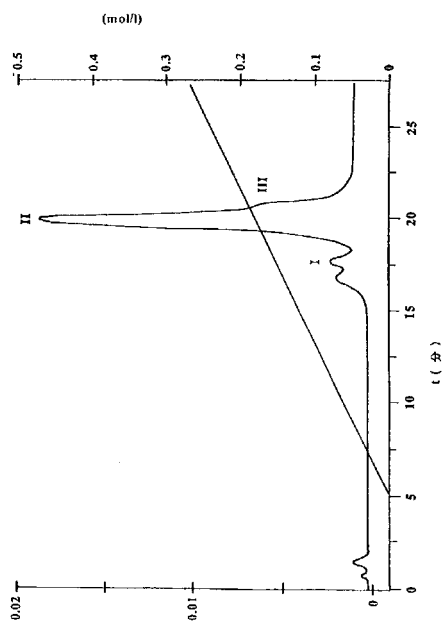
【図 1】



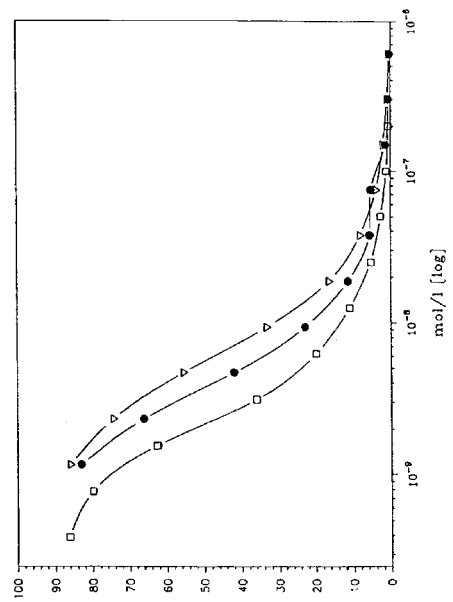
【図 2】



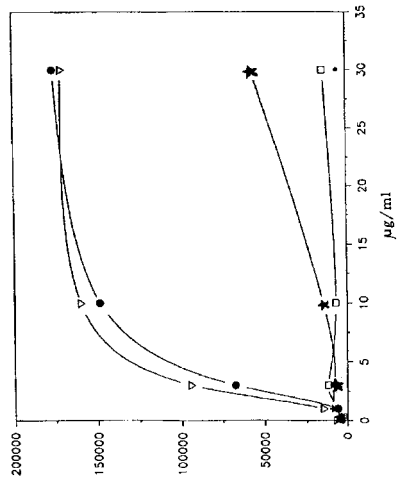
【図 3】



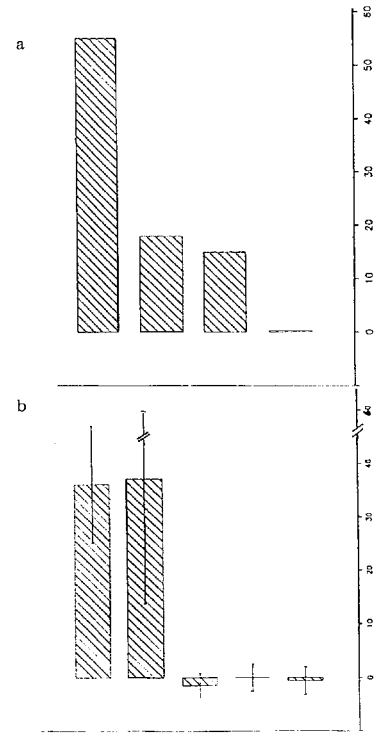
【図 4】



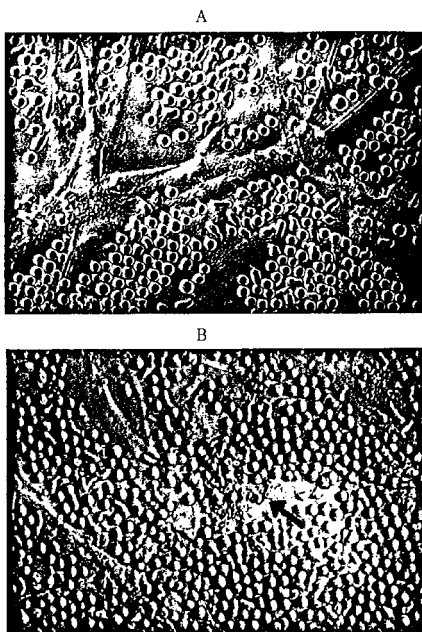
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

- (74)代理人 100106138
弁理士 石橋 政幸
- (74)代理人 100120628
弁理士 岩田 慎一
- (74)代理人 100127454
弁理士 緒方 雅昭
- (72)発明者 ヴォルフガング シュトリットマター
ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 3 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 2 5 0
- (72)発明者 カルロタ - シルビア イエーグレ
ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 3 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 2 5 0
- (72)発明者 シュテファン モイアー
ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 3 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 2 5 0
- (72)発明者 ブルクハルト シュラーフェン
ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 3 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 2 5 0
- (72)発明者 マルティン ヴィルト
ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 3 ダルムシュタット フランクフルター シュトラーセ 2 5 0

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 Cellular Immunology, 1992, Vol. 142, Vol. 1, p. 145-158
Cell, 1984, Vol. 36, No. 4, p. 897-906

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S (S T N)
C A (S T N)
C 0 7 K 1 6 / 2 8
C 1 2 P 2 1 / 0 8

专利名称(译)	双特异性触发分子识别淋巴细胞抗原CD2和肿瘤抗原		
公开(公告)号	JP4231862B2	公开(公告)日	2009-03-04
申请号	JP2005232483	申请日	2005-08-10
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ヴォルフガングシュトリットマター カルロタシルビアイエーグレ シュテファンモイアー ブルクハルトシュラーフェン マルティンヴィルト		
发明人	ヴォルフガング シュトリットマター カルロタ-シルビア イエーグレ シュテファン モイアー ブルクハルト シュラーフェン マルティン ヴィルト		
IPC分类号	C07K16/28 C12P21/08 G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K1/113 C07K14/485 C07K14/52 C07K14/705 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/46 C07K19/00 C12N15/00 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/13 C12N15/28 C12R1/91 G01N33/531 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/2806 A61K38/00 C07K16/30 C07K2317/74		
FI分类号	C07K16/28 C12P21/08 A61K39/395.N A61P35/00 C07K16/18 C07K16/30 C07K19/00		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4C085/AA14 4C085/DD61 4C085 /EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA32 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	宫崎昭雄 岩田慎一 绪方明		
优先权	93112330-1 1993-08-02 DE		
其他公开文献	JP2005336207A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种高效的新型双特异性抗原片段，识别淋巴细胞CD2抗原和各种肿瘤抗原。双特异性抗原片段包含结合肿瘤细胞表位的第一结合位点和结合CD2抗原表位的第二结合位点，其中BA₁ Y或BA₂ Y.当BA₁是双特异性抗体时，X是识别肿瘤抗原的抗体决定簇，AICD2.M1，AICD2.M2是识别CD2抗原的单克隆抗体，Y是这是一个部分。点域1

