

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-124186

(P2014-124186A)

(43) 公開日 平成26年7月7日(2014.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 C O 8 5
C O 7 K 14/78 (2006.01)	C O 7 K 14/78	4 H O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	

審査請求 有 請求項の数 28 O L (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-268028 (P2013-268028)	(71) 出願人	390023582
(22) 出願日	平成25年12月25日 (2013.12.25)		財団法人工業技術研究院
(31) 優先権主張番号	101150029		台湾新竹縣竹東鎮中興路四段195號
(32) 優先日	平成24年12月26日 (2012.12.26)		195 Chung Hsing Rd.
(33) 優先権主張国	台湾 (TW)		, Sec. 4, Chutung, Hsin
(31) 優先権主張番号	13/761,569	(74) 代理人	100075409
(32) 優先日	平成25年2月7日 (2013.2.7)		弁理士 植木 久一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100129757
(31) 優先権主張番号	102136456		弁理士 植木 久彦
(32) 優先日	平成25年10月9日 (2013.10.9)	(74) 代理人	100115082
(33) 優先権主張国	台湾 (TW)		弁理士 菅河 忠志
		(74) 代理人	100125243
			弁理士 伊藤 浩彰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多価抗体フラグメントおよびその三量体化複合体

(57) 【要約】

【課題】本発明は、多価 F a b フラグメントを作製する方法を提供する。

【解決手段】 F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合カラーゲン様ペプチドを含む遺伝子構築体と、 I g G の軽鎖部分からなる遺伝子構築体との哺乳類細胞における共発現により三量体 F a b フラグメントを生成させる方法を提供する。本発明の方法により生成される分子の利用も開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多価 F a b フラグメントを作製する方法であって、

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、

を宿主細胞中で共発現させるステップを含む方法。

【請求項 2】

前記ヒト I g G が、I g G₁、I g G₂、I g G₃、および I g G₄ からなる群より選ばれる請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記(1)の遺伝子構築体が、ヒト I g G 由来のヒンジ領域をコードする配列をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ヒト I g G が、I g G₁、I g G₂、I g G₃、および I g G₄ からなる群より選ばれる請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ヒンジ領域をコードする前記配列が、前記遺伝子構築体における前記 F a b フラグメントと前記コラーゲン様ペプチドとの間に位置する請求項 3 または 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記(1)の遺伝子構築体が、一本鎖 F v をコードする配列をさらに含む請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記(2)の遺伝子構築体が、ヒト I g G₁ のカッパ軽鎖を含む請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記多価 F a b フラグメントを、ヒト I g G のカッパ軽鎖に結合するリガンドで精製するステップをさらに含む請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法により作製される多価 F a b フラグメント。 30

【請求項 10】

少なくとも多価 F a b フラグメントのコラーゲン様ドメインにより結合される、請求項 9 に記載の多価 F a b フラグメントを 3 つ含む三量体多価 F a b フラグメント。

【請求項 11】

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と、

を含む多価抗体フラグメント。 40

【請求項 12】

前記ヒト I g G が、I g G₁、I g G₂、I g G₃、および I g G₄ からなる群より選ばれる請求項 11 に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 13】

前記(1)のアミノ酸配列が、ヒト I g G 由来のヒンジ領域のアミノ酸配列を含む請求項 11 に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 14】

前記ヒト I g G が、I g G₁、I g G₂、I g G₃、および I g G₄ からなる群より選ばれる請求項 13 に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 15】

前記ヒンジ領域が、前記アミノ酸配列における前記 F a b フラグメントと前記コラーゲン様ペプチドとの間に位置する請求項 1 3 または 1 4 に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 1 6】

前記 (1) のアミノ酸配列が、一本鎖 F v の配列をさらに含む請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 1 7】

前記 (2) のアミノ酸配列が、ヒト I g G₁ のカッパ軽鎖配列を含む請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 1 8】

前記多価抗体フラグメントが二重特異性である請求項 1 6 に記載の多価抗体フラグメント。

10

【請求項 1 9】

前記多価抗体フラグメントのリガンドがヒト C D 3 である請求項 1 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 2 0】

前記多価抗体フラグメントのリガンドがヒト C D 3 およびヒト上皮成長因子受容体である請求項 1 8 に記載の多価抗体フラグメント。

【請求項 2 1】

請求項 1 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の多価抗体フラグメントを 3 つ含む三量体多価抗体フラグメント。

20

【請求項 2 2】

請求項 1 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の多価抗体フラグメントをコードする核酸。

【請求項 2 3】

宿主細胞に導入される、請求項 1 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の多価抗体フラグメントを発現する発現ベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 5】

リガンドの生物活性を調節する方法であって、

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレーション融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

30

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と、

を含む多価抗体フラグメントを培養するステップを含む方法。

【請求項 2 6】

被験体における自己免疫疾患を治療する方法であって、

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレーション融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と、

40

を含む有効量の多価抗体フラグメントを、それを必要としている被験体に投与するステップを含む方法。

【請求項 2 7】

前記多価抗体フラグメントのリガンドがヒト C D 3 である請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

リガンドを検出する方法であって、

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレーション融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と

(3) 標識と、

50

を含む三量体多価抗体フラグメント複合体をリガンドと共に培養するステップ、ならびに前記三量体多価抗体フラグメント複合体の結合を検出するステップ、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は多価抗体フラグメント (multivalent antibody fragment) およびその作製方法に関する。当該多価抗体フラグメントは、Fabフラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチド (in-frame fused collagen-like peptide) を含むアミノ酸配列と、ヒト IgG の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメイン (kappa light chain constant domain) を含むアミノ酸配列とを含んでいる。

10

【背景技術】

【0002】

機能的親和力 (アビディティ (avidity)) は、多数の抗原決定基を有する抗原の総和的な結合強度の尺度である。抗原結合パートナーの重合は、標的細胞に非常に接近して一群の特定の同じリガンドに結合するそれらの有効性 (または価数) を著しく高め、その結果としてより強い標的結合強度、低い解離速度、およびリガンドの調節を延長すると共に生物学的効果を促進することのできる架橋効果をもたらす。

【0003】

20

一本鎖可変領域フラグメント (scFv) は、免疫グロブリンの重鎖 (V_H) および軽鎖 (V_L) の可変領域の融合タンパク質であり、短いリンカーペプチドで連結される。scFv の主な欠点は、対応する二価の免疫グロブリン G (IgG) と比べ、多価結合によるアビディティの増大を妨げる産物の一価性 (monovalency) にある。アビディティを高めるため、scFv の多量体化についていくつかのストラテジーが開発されている。

【0004】

プロコラーゲンの C - プロペプチド、コレクチンファミリータンパク質のコイルドコイルネックドメイン (coiled-coil neck domain)、FasL の C - 末端部およびバクテリオファージ T4 フィブリチンフォールドドメイン (bacteriophage T4 fibrin foldon domain) (非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3) を含む三量体化ドメインを用いた三価一本鎖抗体フラグメント (scFv) 融合タンパク質の組み換え体の作製が報告されている。自己三量体化および C - あるいは N - 末端方向からの異種融合タンパク質の増殖の能力を持つ短いヘリックスコラーゲン様ペプチド (alpha-helical collagen-like peptide) がまた、特許文献 1 において報告されている。この特許文献 1 で用いられた異種融合ドメインは scFv 抗体フラグメントとして示された。しかしながら、治療応用のための多価の点で、scFv は欠点がある。

30

【0005】

IgG の Fc フラグメントへの結合によるプロテイン A または G コンジュゲートレジンを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製できることから結果として精製スキームの第 1 ステップで生成物の均一性 (homogeneity) が 98% 以上となる免疫グロブリン G (IgG) 分子とは異なり、治療応用に供する多量体 scFv 融合体の精製は、利用できる市販のアフィニティークラムがないため、困難な作業である。多価 scFv は、それらが構築される特定の可変ドメインに応じて安定性が著しく異なったものとなる (非特許文献 4、非特許文献 5)。キメラ抗 CD20 一本鎖 Fv - Fc 融合タンパク質の多量体化は可変ドメインの交換 (variable domain exchange) を介してなされ、このことが異種抗体の変異を生じさせることが報告されている (非特許文献 6)。

40

【0006】

50

CFY196は、ヒト免疫グロブリンDのヒンジ部由来のリンカーと融合したmAb 1A616のヒト化のFabフラグメント、およびヒト転写因子ATFのコイルドコイル配列由来の四量体化ドメインからなる(非特許文献7)。しかし、ATFは血漿由来タンパク質ではなく、治療応用の可能性を大幅に制限し得る免疫反応のリスクに関連している可能性がある。

【0007】

特許文献2は、GPPトリプレットを含む自己三量体化コラーゲン様スキャホールド(self-trimerization collagen-like scaffold)と融合した抗CD3 scFv N末端が3つの一本鎖ペプチドから構成される三量体抗体フラグメントを形成する能力があることを証明している。しかし、これらコラーゲン様スキャホールド融合体の三量体scFvの下流精製(downstream purification)は、三量体scFvを効率的に精製するためのアフィニティレジンがないことから、煩雑であった。加えて、上記三量体scFvの低いタンパク質発現量および熱的不安定性は、バイオ療法への利用に適していなかった。よって、新たな形式の三量体コラーゲンスキャホールド抗体を設計する必要がある。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】欧州特許第1798240号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2008/0176247号明細書

20

【特許文献3】米国特許第5,641,870号明細書

【特許文献4】米国特許出願第13/588,752号明細書

【特許文献5】米国特許第5,208,020号明細書

【特許文献6】米国特許第5,475,092号明細書

【特許文献7】米国特許第5,585,499号明細書

【特許文献8】米国特許第5,846,545号明細書

【特許文献9】米国特許第5,908,626号明細書

【特許文献10】米国特許第5,223,409号明細書

【特許文献11】国際公開第92/18619号

【特許文献12】国際公開第91/17271号

30

【特許文献13】国際公開第92/20791号

【特許文献14】国際公開第92/15679号

【特許文献15】国際公開第93/01288号

【特許文献16】国際公開第92/01047号

【特許文献17】国際公開第92/09690号

【特許文献18】国際公開第90/02809号

【特許文献19】国際特許出願第91/00906号

【特許文献20】国際公開第91/10741号

【特許文献21】国際特許出願第92/03918号

【特許文献22】国際特許出願第92/03917号

40

【特許文献23】国際公開PCT/US86/02269号

【特許文献24】欧州特許出願第184,187号明細書

【特許文献25】欧州特許出願第171,496号明細書

【特許文献26】欧州特許出願第173,494号明細書

【特許文献27】国際特許出願第86/01533号

【特許文献28】米国特許第4,816,567号明細書

【特許文献29】欧州特許出願第125,023号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Hoppe, H. J., P. N. Barlow, et al. (199

50

- 4) . " A parallel three stranded alpha - helical bundle at the nucleation site of collagen triple - helix formation . " FEBS Lett 344 (2 - 3) : 191 - 195 ;
- 【非特許文献2】Frank, Kammerer et al. 2001 " Stabilization of short collagen - like triple helices by protein engineering . " J Mol Biol 308 (5) : 1081 - 1089
- 【非特許文献3】Holler, N. , A. Tardivel, et al. (2003) . " Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death - inducing signaling complex . " Mol Cell Biol 23 (4) : 1428 - 1440 10
- 【非特許文献4】Jung, S. , A. Honegger, et al. (1999) . " Selection for improved protein stability by phage display . " J Mol Biol 294 (1) : 163 - 180
- 【非特許文献5】Worn, A. and A. Pluckthun (2001) . " Stability engineering of antibody single - chain Fv fragments . " J. Mol Biol 305 (5) : 989 - 1010 20
- 【非特許文献6】Wu, A. M. , G. J. Tan, et al. (2001) . " Multimerization of a chimeric anti - CD20 single - chain Fv - Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange . " Protein Eng 14 (12) : 1025 - 1033
- 【非特許文献7】Charles, Luo et al. (2003) . " Prevention of human rhinovirus infection by multivalent fab molecules directed against ICAM - 1 . " Antimicrob Agents Chemother 47 (5) : 1503 - 1508 30
- 【非特許文献8】Zapata et al. , Protein Eng. 8 (10) : 1057 - 1062 [1995]
- 【非特許文献9】Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. , Springer - Verlag, New York , pp. 269 - 315 (1994)
- 【非特許文献10】Fan, et al. (2008) " Production of multivalent protein binders using a self - trimerizing collagen - like peptide scaffold . " FASEB J 22 (11) : 3795 - 3804 40
- 【非特許文献11】Frank et al. , (2001) " Stabilization of short collagen - like triple helices by protein engineering . " J. Mol. Biol. 308 (5) : 1081 - 1089
- 【非特許文献12】Persikov et al. , (2000) Biochemistry 39 , 14960 - 14967
- 【非特許文献13】Persikov et al. , (2004) Protein Sci. 13 : 893 - 902
- 【非特許文献14】Mohs et al. , (2007) J. Biol. Chem. 2 50

82 : 29757 - 29765

【非特許文献15】Nucl. Acids Res. 12 : 387, 1984

【非特許文献16】J. Mol. Biol. 48 : 443, 1970

【非特許文献17】Smith and Waterman (Adv. Appl. Math 2 : 482, 1981)

【非特許文献18】Gribskov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14 : 6745, 1986

【非特許文献19】Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353 - 358, 1979

10

【非特許文献20】Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)

【非特許文献21】Richards et al (2003) "Engineered fibronectin type III domain with a RGDW XE sequence binds with enhanced affinity and specificity to human alphav beta3 integrin." J. Mol. Biol. 326 (5) : 1475 - 1488

【非特許文献22】Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif

20

【非特許文献23】Gluzman (1981) Cell 23 : 175 - 182

【非特許文献24】Bird et al. (1988) Science 242 : 423 - 426

【非特許文献25】Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5879 - 5883

【非特許文献26】Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9 : 1370 - 1372

【非特許文献27】Hay et al. (1992) Hum Antibod Hyb 3 : 81 - 85

30

【非特許文献28】Huse et al. (1989) Science 246 : 1275 - 1281

【非特許文献29】Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12 : 725 - 734

【非特許文献30】Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226 : 889 - 896

【非特許文献31】Clackson et al. (1991) Nature 352 : 624 - 628

【非特許文献32】Gram et al. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89 : 3576 - 3580

40

【非特許文献33】Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9 : 1373 - 1377

【非特許文献34】Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19 : 4133 - 4137

【非特許文献35】Barbas et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 : 7978 - 7982

【非特許文献36】Lonberg, et al. (1994) Nature 368 : 856 - 859

【非特許文献37】Green, L. L. et al. (1994) Nature Ge 50

50

net.7:13-21

【非特許文献38】Morrison et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855

【非特許文献39】Bruggeman et al. (1993) Year Immunol 7:33-40

【非特許文献40】Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724

【非特許文献41】Bruggeman et al. (1991) Eur J Immunol 21:1323-1326

【非特許文献42】Better et al. (1988) Science 240:1041-1043 10

【非特許文献43】Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443

【非特許文献44】Liu et al., (1987) J Immunol. 139:3521-3526

【非特許文献45】Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218

【非特許文献46】Nishimura et al., (1987) Canc. Res. 47:999-1005

【非特許文献47】Wood et al. (1985) Nature 314:446-449 20

【非特許文献48】Shaw et al., (1988) J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559

【非特許文献49】Li, J., J. Davis, et al. (2006). "Modulation of antigen-specific T cell response by a non-mitogenic anti-CD3 antibody." Int Immunopharmacol 6(6):880-891.

【非特許文献50】Cole, M. S., C. Anasetti, et al. (1997). "Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are non-mitogenic to T cells." J Immunol 159(7):3613-3621 30

【非特許文献51】Ochi et al., (2006) "Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+CD25-LAP+ T cells." Nat Med 12(6):627-635

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

多価s c F vは、それらが構築される特定の可変ドメインに応じて安定性が著しく異なったものとなり、かつキメラ抗CD20一本鎖Fv-Fc融合タンパク質の多量体化は可変ドメインの交換(variable domain exchange)を介してなされ、これにより異種抗体の変異がもたらされることが報告されている。IgGのFcフラグメントへの結合によるプロテインAまたはGコンジュゲートレジンを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより容易に精製できることから結果として精製スキームの第1ステップで生成物の均一性が98%以上となる免疫グロブリンG(IgG)分子とは異なり、治療応用に供する多量体s c F v融合体の精製は、利用できる市販のアフィニティークラムがないため、困難な作業である。

【0011】

さらに、これらコーゲン様スキャホールド融合体の三量体s c F vの下流精製は、上記三量体s c F vを効率的に精製するためのアフィニティークラムがないことから、煩雑

40

50

であった。加えて、上記三量体 s c F v の低いタンパク質発現レベルおよび熱的不安定性は、バイオ療法への利用に適していなかった。

【0012】

よって、新たな形式の三量体コラーゲンスキャホールド抗体を設計する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、新たな形式の三量体コラーゲンスキャホールド抗体を設計する必要があるため、真核細胞中で新規な多価 F a b フラグメントを作製する方法を提供する。

【0014】

当該方法は、F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレイム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、を宿主細胞（例えば真核細胞）中で共発現させるステップを含み得る。

10

【0015】

本発明の実施形態は、

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレイム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、

を宿主細胞（例えば真核細胞）中で共発現させるステップを含む、真核細胞中で多価 F a b フラグメントを作製する方法を含む。

20

【0016】

1 実施形態において、前記(1)の遺伝子構築体は、ヒト I g G 由来のヒンジ領域をコードする配列をさらに含む。

【0017】

1 実施形態において、ヒト I g G は、I g G₁、I g G₂、I g G₃、および I g G₄ からなる群より選ばれるものである。

【0018】

1 実施形態において、ヒンジ領域をコードする配列は、遺伝子構築体における F a b フラグメントとコラーゲン様ペプチドとの間に位置する。

30

【0019】

1 実施形態において、前記(1)の遺伝子構築体は、一本鎖 F v をコードする配列をさらに含む。

【0020】

1 実施形態において、前記(2)の遺伝子構築体は、ヒト I g G₁ のカッパ軽鎖を含む。

【0021】

本発明の実施形態は、前記多価 F a b フラグメントを、ヒト I g G のカッパ軽鎖に結合するリガンドで精製するステップをさらに含む。

【0022】

本発明の実施形態は、上記方法により作製される多価 F a b フラグメントを含む。

40

【0023】

別の実施形態は、少なくとも多価 F a b フラグメントのコラーゲン様ドメインにより結合される、多価 F a b フラグメントを3つ含む三量体多価 F a b フラグメントを含む。

【0024】

さらなる実施形態は、

(1) F a b フラグメントの重鎖部分およびインフレイム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2) ヒト I g G の軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と、を含む多価抗体フラグメントを包含する。

50

【0025】

1実施形態において、前記(1)のアミノ酸配列は、ヒトIgG由来のヒンジ領域のアミノ酸配列を含む。

【0026】

1実施形態において、前記ヒンジ領域は、前記アミノ酸配列における前記Fabフラグメントと前記コラーゲン様ペプチドとの間に位置する。

【0027】

1実施形態において、前記(1)のアミノ酸配列は、一本鎖Fvの配列をさらに含む。

【0028】

1実施形態において、前記(2)のアミノ酸配列は、ヒトIgG₁のカッパ軽鎖配列を含む。

10

【0029】

1実施形態において、多価抗体フラグメントは二重特異性(bispecific)である。

【0030】

上述した実施形態の多価抗体フラグメントのリガンドは、ヒトCD3、またはヒトCD3およびヒト上皮成長因子受容体であってよい。

【0031】

別の実施形態は、タンパク質の実施形態をコードする核酸、タンパク質の実施形態を発現する発現ベクター、または発現ベクターおよび/もしくは核酸を含む宿主細胞である。

20

【0032】

本発明のさらなる実施形態は、リガンドの生物活性を調節する方法であって、

(1)Fabフラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2)ヒトIgGの軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と、

を含む多価抗体フラグメントを培養するステップを含む。

【0033】

本発明のさらなる実施形態は、被験体における自己免疫疾患を治療する方法であって、

(1)Fabフラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2)ヒトIgGの軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と、

を含む有効量の多価抗体フラグメントを、それを必要としている被験体に投与するステップを含む。

30

【0034】

本発明のさらなる実施形態は、リガンドを検出する方法であって、

(1)Fabフラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列と、

(2)ヒトIgGの軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列と

(3)標識と、

を含む三量体多価抗体フラグメント複合体をリガンドと共に培養するステップ、ならびに前記三量体多価抗体フラグメント複合体の結合を検出するステップ、

を含む。

40

【0035】

本発明は、T細胞媒介性免疫疾患、特に自己免疫疾患の症状を、抗CD3抗体フラグメントの使用により治療、予防または改善する方法を提供する。具体的には、本発明の方法は、ヒトCD3複合体内のイプシロンサブユニットと特異的に結合する抗体の投与を提供する。かかる抗体はT細胞受容体/アロ抗原相互作用を調節し、よって、自己免疫疾患に関連するT細胞媒介性細胞傷害性を制御する。さらに、本発明は、非修飾抗CD3抗体に

50

比べ、修飾抗CD3抗体がエフェクター機能およびT細胞活性化の低減または排除を示す、抗CD3抗体の修飾を提供する。サイトカイン放出症候群は、例えば頭痛、吐き気、嘔吐、発熱、筋肉痛、関節痛および震えなどが現れ、例えばIL-2、IL-6、IL-10、TNF およびIFN の血清中のレベルの上昇によって引き起こされ得る。

【発明の効果】

【0036】

本発明によれば、上述した従来の問題を全て解決できる多価抗体フラグメントが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、本発明の実施形態による抗体フラグメント分子のそれぞれ異なる形式の略図を示している。形式A：FabCSAであって、重鎖フラグメントがヒンジ領域および自己三量体化できるコラーゲン様ペプチドと融合された、Fabフラグメントからなる三量体抗体フラグメントである。形式B：FabCSA-scFvであって、自己三量体化できるコラーゲン様ペプチドのN-およびC-末端にそれぞれ位置するFabフラグメントおよび一本鎖抗体からなる三量体二重特異性抗体フラグメントである。形式C：FabCSA-sdAbであって、自己三量体化できるコラーゲン様ペプチドのN-およびC-末端にそれぞれ位置するFabフラグメントおよびシングルドメイン抗体(sdAb)からなる三量体二重特異性抗体フラグメントである。

【図2】図2は、本発明の実施形態に基づいた、Kappa SelectおよびSuperdex 200カラムでの連続クロマトグラフィーによって培地から精製したh145 FabCSA分子の構造的な特性評価を示している。(A)ゲルろ過によるh145 FabCSA種の分離。Kappa Selectカラムから溶出したサンプルを濃縮し、PBS (pH 7.4)で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラムにロードした。(B)それぞれ異なるピーク画分(A中、ピーク1から3に番号が付されている)およびサンプルの負荷を、非還元(レーン2、4、6、および8)、ならびにサンプルをDTT 50 mMで75 10分処理した還元(レーン3、5、7、および9)条件下、SDS-PAGEにより分析した。(C)Bにおいて表示された矢印で示されているタンパク質バンドに対応する構造の略図。点線は推定ジスルフィド結合を示す。同量のタンパク質を含む全てのサンプルを、4~12% SDS/Bis-Trisポリアクリルアミドゲル上で、ランニングバッファーとしてMESを用い、電気泳動した。Instant Blueタンパク質染色液でゲルを染色した。

【図3】図3は、本発明の実施形態に基づいた、Kappa SelectおよびSuperdex 200カラムでの連続クロマトグラフィーによって培地から精製したhOKT3 FabCSA分子の構造的な特性評価を示している。Kappa Selectカラムから溶出したサンプルを濃縮し、PBS (pH 7.4)で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラムに負荷した。上方右側のパネル：Superdex 200で分離したそれぞれ異なるピーク画分(ピーク1から3に番号が付されている)を非還元条件下SDS-PAGEにより分析した。hOKT3 FabCSA三量体および単量体に対応するタンパク質バンドがそれぞれ矢印で示されている。全てのサンプルを、4~12% SDS/Bis-Trisポリアクリルアミドゲル上で、ランニングバッファーとしてMESを用い、電気泳動した。Instant Blueタンパク質染色液でゲルを染色した。

【図4】図4は、非還元(レーン2、3および4)、ならびにサンプルをDTT 50 mMで75 10分処理した還元(レーン5、6および7)条件下SDS-PAGEで分離した三量体hOKT3 FabCSA(図3におけるピーク2)、低-Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3 IgG-AA(プロテインAカラムで精製したもの)、およびムロモナブ-CD3(OKT3)の純度分析を示している。同量のタンパク質を含む全てのサンプルを、4~12% SDS/Bis-Trisポリアクリルアミドゲル上で、ランニングバッファーとしてMESを用い、電気泳動した。M, BenchMark(登録商標)分子量スタンダード。

10

20

30

40

50

【図5】図5は、本発明の実施形態に基づいた、三量体 h O K T 3 F a b C S A (図 3 中のピーク2から分離)、低-Fc結合抗ヒトCD3抗体-h O K T 3 I g G - A A (二量体)、および単量体 h O K T 3 F a b C S A (図 3 中のピーク3から分離)の精製したヒトTリンパ球に対する結合親和力を示している。

【図6】図6は、本発明の実施形態に基づいた、抗マウスCD3抗体-145-2C11および三量体 h 1 4 5 F a b C S A (図 2 A 中のピーク2から分離)の精製したマウス脾臓Tリンパ球に対する結合親和力を示している。

【図7】図7は、本発明の1実施形態に基づいた、2つの独立した競合置換結合アッセイ (competitive displacement binding assays) を示している。CD3 (+) T細胞受容体を発現するジャーカット細胞を、それぞれ抗CD3抗体-精製 h O K T 3 F a b C S A 三量体 (黒丸)、および O K T 3 (白丸) の段階希釈液と共に4で1時間培養した。飽和量のFITCコンジュゲートO K T 3 を加え、さらに1時間培養した。細胞を洗浄し、結合したFITCコンジュゲートO K T 3 をフローサイトメトリーで定量化した。値は最大蛍光強度の抑制率 (percentage inhibition) として表しており、これは抗CD3抗体の事前ブロッキングなしに、FITCコンジュゲートO K T 3 を加えることで得られた平均蛍光強度として定義される。

10

【図8】図8は、精製したO K T 3、低Fc結合抗ヒトCD3抗体-h O K T 3 I g G - A A および h O K T 3 F a b C S A 三量体に応じたT細胞増殖を示している。ヒトP B M C を3人の健常ドナーから採取し、O K T 3 (黒丸)、h O K T 3 I g G - A A (白丸) または h O K T 3 F a b C S A (白三角) の段階対数希釈液と共に66時間個別に培養し、さらに6時間BrdU 10 μ M でパルスした。化学発光免疫測定法を用いBrdU-ELISAにより細胞増殖を測定して、DNA合成時におけるBrdUの取り込みを定量化した。各ポイントは3人のドナーの平均±標準偏差を表している。

20

【図9】図9は、精製したO K T 3、h O K T 3 I g G - A A および h O K T 3 F a b C S A 三量体により誘導されたサイトカインの放出を示している。ヒトP B M C を3人の健常ドナーから採取し、O K T 3 (黒丸)、h O K T 3 I g G - A A (白丸) または h O K T 3 F a b C S A (白三角) の段階対数希釈液と共に個別に培養した。培養上清中のIL-2および表示されている残りのサイトカインのレベルをELISAにより24および72時間の時点で測定した。各ポイントは3人のドナーの平均±標準偏差を表している。

30

【図10】図10は、精製したO K T 3、h O K T 3 I g G - A A および h O K T 3 F a b C S A 三量体による混合リンパ球反応の抑制を示している。レスポンドー (responder) P B M C とマイトマイシンCで処理したスティミュレーター (stimulator) P B M C とを混合したものを、それぞれ異なる濃度のO K T 3 (黒丸)、h O K T 3 I g G - A A (白四角) または h O K T 3 F a b C S A (白三角) の存在下で5日間共培養し、さらに16時間BrdUでパルスした。BrdU-ELISAにより細胞増殖を測定した。抗体の非存在下でレスポンドーP B M C とマイトマイシンCで処理したスティミュレーターP B M C とを混合したものを、それぞれ黒四角および黒三角で示した。抗体の非存在下における未処理のスティミュレーターP B M C の細胞増殖を白丸で示している。

40

【図11】図11は、精製した h O K T 3 F a b C S A (三量体)、h O K T 3 I g G - A A (二量体) および h O K T 3 F a b C S A (単量体) によるT細胞受容体 (T C R) - C D 3 の調節/コーティングの定量化を示している。CD3調節のデータは、未処理CD5陽性T細胞の表面におけるT C R - C D 3 複合体の割合として、処理CD5陽性T細胞の表面におけるT C R - C D 3 複合体のパーセンテージを表している。CD3コーティングは、FITCコンジュゲートO K T 3 により検出されなかったT C R - C D 3 複合体の割合として示されている。

【図12】図12は、本発明に基づいた、マウスにおける精製 h 1 4 5 F a b C S A 三量体の血中クリアランスを示している。雄性B A L B / c マウスに h 1 4 5 F a b C S A 三量体 2 5 μ g を静脈注射した。血液サンプルをそれぞれ異なる時間に採取した。血漿中に

50

残る抗体レベルを、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒトカップパ軽鎖を検出抗体として用い、抗ヒトF dを塗布したE L I S Aプレートにより測定した。結果は、各時点における3匹の平均をとったものである。

【図13】図13は、本発明の実施形態に基づいた、実験的自己免疫性脳脊髄炎(E A E)マウス疾患モデルに対する異なる抗マウスC D 3抗体の生物学的効果を示している。(A) E A Eマウスに対する異なる生物製剤の有効性。溶媒(ハムスター対照I g G)、145-2C11(ハムスターI g G)および精製した三量体h145F a b C S Aのグループについて、(矢印で示された)5日間連続して1日1回それぞれ投与量レベル1.0、0.1および1.0 μ g/マウスでマウスに静脈注射した。インターフェロン-1a(陽性対照)グループについては、全治療期間にわたり1日1回、投与量レベル10000ユニット/マウスでマウスに腹腔内注射した。結果は、2つの独立した実験からの代表的実験の各グループ(n=10)の平均 \pm 標準偏差として示されている。(B) E A Eマウスへのh145-2C-11 I g Gおよび三量体h145F a b C S A治療に対するT r e g細胞集団のフローサイトメトリー。最後の静脈注射の1日後、溶媒(ハムスター対照I g G)、145-2C11 I g Gおよび三量体h145F a b C S Aグループの各々から3匹のマウスの脾臓リンパ細胞を個別に準備し、次いでフローサイトメトリーを行うべくL A P - A P CおよびC D 4 - F I T Cで染色した。T r e g集団の測定は、L A P +細胞にゲートをかけた。データは3つの実験における1匹の代表的なマウスからのものである。

【図14】図14AおよびBは、145-2C11 I g Gおよびh145F a b C S A三量体のS L Eマウスモデルに対する治療効果を示している。

【図15】図15は、単回用量50 μ gとして異なる抗マウスC D 3抗体を静脈注射した後のマウスの血清サイトカインレベルに関する経時的研究を示している。マウスをグループ分けし、精製した145-2C11 I g G(薄灰色の四角)、低F c結合抗マウスC D 3抗体-145 I g G - A A(濃い灰色の四角)、またはh145F a b C S A三量体(白四角)50 μ gを静脈内投与した。0(プレブリード(pre-bleed))、0.5、24、および144時間の時点で血液(100 μ l/マウス)を採取した。サイトカインのレベルをE L I S Aを用いて測定した。各ポイントは3つのウェルの平均 \pm 標準偏差を表している。P B S(黒四角)を対照として用いた。

【図16】図16は、非単一(A)または単一安定クローン(B)由来のh O K T 3 F a b C S A 7 6 3 s c F v分子の構造的な特性評価を示している。各培地をK a p p a S e l e c tおよびS u p e r d e x 200カラムでの連続クロマトグラフィーによって精製した。(A)ゲルろ過による非単一クローン由来のh O K T 3 F a b C S A 7 6 3 s c F v種の分離。上方右側のパネル：それぞれ異なるピーク画分(ピーク1から3に番号を付してある)を、非還元条件下S D S - P A G Eにより分析した。ジスルフィド結合三量体(T)、非ジスルフィド結合三量体(M t)、および単量体(M m)の構造に対応するバンドの位置が矢印で示されている。(B)ゲルろ過による安定クローン由来のh O K T 3 F a b C S A 7 6 3 s c F v種の分離。非還元条件下S D S - P A G Eによりピーク画分を分析した。ジスルフィド結合三量体(T)および非ジスルフィド結合三量体(M t)の構造に対応するバンドの位置が矢印で示されている。全てのサンプルを、M E Sをランニングバッファーとして用い、4~12% S D S / B i s - T r i s ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。I n s t a n t B l u e タンパク質染色液でゲルを染色した。

【図17】図17は、図16Bに示された非ジスルフィド結合体およびジスルフィド結合三量体の両方を含む三量体のピーク画分から得られた、三量体二重特異性抗C D 3 \times E G F R抗体、h O K T 3 F a b C S A 7 6 3 s c F vとE G F R (+)細胞-A 4 3 1、W i D r、H C T 1 1 6、およびC D 3 (+)ジャーカットT細胞との結合のフローサイトメトリー分析を示している。

【図18】図18は、ヒトP B M Cにより、E G F R発現腫瘍細胞に対する三量体二重特異性抗C D 3 \times E G F R抗体、h O K T 3 F a b C S A 7 6 3 s c F vの細胞傷害性を示している。様々な三量体h O K T 3 F a b C S A 7 6 3 s c F vの濃度下、刺激ヒトP B

10

20

30

40

50

MCをそれぞれ異なるE/T比でA431細胞と共に(A)、または一定の比10:1でWidrまたはHCT116細胞と共に(B)培養した。

【図19】図19は、三量体二重特異性hOKT3FabCSA763scFvによるEGFR過剰発現腫瘍細胞の再誘導された溶解(redirected lysis)の微速度写真を示している。A431細胞をPKH26で染色前(prestained)のヒトTリンパ球と、三量体hOKT3FabCSA763scFv 1 μ g/mlの非存在下(上図)、または存在下(下図)で、表示されている時点(時間:分)まで共培養し、微速度顕微鏡により画像をそれぞれ記録した。共培養13時間後にT細胞によるA431細胞のアポトーシスの完了が観察されたことに注目されたい。

【図20】図20は、HCT116結腸がんNOD/SCIDマウスモデルにおける三量体hOKT3FabCSA763scFvのインビボでの有効性を示している。0日目、2つのグループ-763IgGおよびPBS対照に、ヒトPBMCの非存在下、 5×10^6 HCT116細胞を皮下接種した。残りの3つのグループには、 5×10^6 HCT116細胞および 5×10^6 健康ドナー由来非刺激ヒトPBMCの混合物を0日目に皮下接種し、続いて1日目にPBS溶媒対照(100 μ l)、hOKT3FabCSA763scFv 50 μ gおよび15 μ gを尾静脈注射し、連続10日間行った。表示されたnの数の動物からなる各群より得られた腫瘍成長曲線が示されている。hOKT3FabCSA763scFv群と非刺激ヒトPBMC対照グループの投与の間の統計的有意差($P < 0.001$)が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0038】

以下の詳細な説明において、説明の目的で、開示される実施形態が十分に理解されるよう、多数の具体的詳細が記載される。しかしながら、これら具体的詳細がなくとも1つまたはそれ以上の実施形態が実施され得ることは明らかであろう。別の場合では、図を簡潔とするため、周知の構造および装置は概略的に示される。

【0039】

本開示は、宿主細胞(例えば、真核細胞)中で多価抗体フラグメントを作製する方法であって、

(1)抗体フラグメントの重鎖部分およびインフレーム融合コラーゲン様ペプチドを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、

(2)ヒトIgGの軽鎖可変領域およびカッパ軽鎖定常ドメインを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子構築体と、

を発現させるステップを含む方法を包含する。

【0040】

前記(1)の遺伝子構築体は、IgGのヒンジ領域および/またはscFvをさらに含んでいてもよい。

【0041】

上述の本方法において記載される多価抗体フラグメントは、次いで三量体構築体(trimERIC construct)に会合してもよい。

【0042】

本開示は、多価抗体フラグメントをコードする核酸と、宿主細胞に導入されると多価抗体フラグメントを発現する発現ベクターとを包含する。本開示はまた、多価抗体フラグメントを発現する発現ベクターを含む宿主細胞をも包含する。

【0043】

本開示は、3つの多価抗体フラグメントを含む三量体をリガンドと共に培養するステップを含む、リガンドの生物活性を調節(つまり、抑制または増大)するための方法およびキットを包含する。

【0044】

本開示はまた、T細胞媒介性免疫疾患、特に自己免疫疾患の症状を、多価抗CD3抗体フラグメントの投与により治療、予防または改善する方法をも提供する。

【0045】

定義

1. 抗体フラグメント

本開示の多価抗体フラグメントには、“抗体領域 (antibody region)”、“抗体ドメイン (antibody domain)”または“抗原結合ドメイン (antigen binding domain)”とも称される1つまたは複数の“抗体フラグメント”が含まれる。本明細書で述べられる“抗体フラグメント”は、完全 (intact) 抗体の一部、例えば完全抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂ および Fv フラグメント、ディアボディ (diabodies)、線状抗体 (linear antibody) (米国特許第 5,641,870 号明細書 (特許文献 3)、実施例 2; Zapata et al., Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 [1995] (非特許文献 8) を参照)、一本鎖抗体分子、ならびに多重特異性抗体が含まれる。

10

【0046】

抗体のパイニン分解は、“Fab”フラグメントと呼ばれる2つの同じ抗原結合フラグメントと、容易に結晶化する能力を示す呼び名の、残りの“Fc”フラグメントとを生じる。Fab フラグメントは、全てのL鎖と、H鎖の可変領域ドメイン (V_H) および1本の重鎖の第1の定常ドメイン (C_{H1}) とを含み得る。軽鎖の定常領域はラムダまたはカッパ型のいずれかであってよい。各 Fab フラグメントは、抗原結合に関して一価である、つまりそれは単一の抗原結合部位を有する。

20

【0047】

Fd または Fd フラグメントは、V_H および C_{H1} ドメインからなる抗体重鎖フラグメントである。

【0048】

抗体のペプシン処理は、二価抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合を有する Fab フラグメントにほぼ相当し、かつ抗原を架橋させる能力も備える単一の大きい F(ab')₂ フラグメントを生じさせる。Fab' フラグメントは、抗体ヒンジ領域の1つまたは複数のシステイン等の、C_{H1} ドメインのカルボキシ末端に数個の残基をさらに有する点で、Fab フラグメントとは異なる。

【0049】

本発明の多価抗体フラグメントは、重鎖の一部、軽鎖 (もしくはその一部)、または重鎖の一部および軽鎖もしくはその一部の両方を含み得る。

30

【0050】

抗体フラグメントには一本鎖 Fv が含まれ得る。“sFv”または“scFv”とも略される“一本鎖 Fv”は、一本鎖ポリペプチド鎖をなすようにつながった V_H および V_L 抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。1実施形態において、scFv ポリペプチドは、scFv が抗原結合にとって好ましい構造を形成できる、V_H および V_L ドメイン間のポリペプチドリンカーをさらに含む。scFv の説明については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) (非特許文献 9); Borrebaeck 1995 を参照されたい (以下参照)。

40

【0051】

“シングルドメイン”抗体 (sdAb) は、その相補性決定領域がシングルドメインポリペプチドの一部である抗体である。例には、重鎖抗体、軽鎖が自然欠損している抗体、従来の4鎖抗体由来のシングルドメイン抗体、改変抗体および抗体由来のもの以外のシングルドメインスキャホールドが含まれる。シングルドメイン抗体は、当該技術分野のいずれのものであってもよいし、またはそれ以外のシングルドメイン抗体であってもよい。シングルドメイン抗体は、限定はされないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、サメ、ヤギ、ウサギおよびウシを含む任意の種由来のものとすることができる。

50

【 0 0 5 2 】

”二重特異性抗体”は、少なくとも2つの異なる抗原に対し結合特異性を有する抗体である。

【 0 0 5 3 】

本発明の実施形態におけるF d - C Sは、本発明の抗体F dフラグメント、続いてヒトI g G₁のヒンジ領域、およびコラーゲン様ペプチドからなる融合ポリペプチド鎖である。

【 0 0 5 4 】

”単量体”という用語は、本明細書では、単一のコラーゲン様ペプチドを有する多価抗体フラグメントの実施形態を説明するのに用いられ得る。1実施形態において、”単量体”は、重鎖と軽鎖が会合している多価抗体フラグメントを表すのに用いられ得る。当該”単量体”は、多価抗体フラグメントの”三量体化”構造とは区別される。

【 0 0 5 5 】

1実施形態における多価抗体フラグメントは二重特異性のものである。1実施形態において、本発明の単量体構造は、単に抗体フラグメントのみならず、2つ以上の抗原結合ドメインを有してよく、かつ2種以上の抗原を結合させることができる。例えば、本発明の多価抗体フラグメントの単一の単量体構造は、単量体構造のN末端にF a b領域を有すると共に、単量体構造のC末端にs c F v領域を有し得る。

【 0 0 5 6 】

2. ヒンジ領域

本発明の実施形態のタンパク質は、任意で”ヒンジ領域”を含む。1実施形態において、ヒンジ領域はおよそ4～15アミノ酸長の配列である。ヒンジ領域は、ヒトI g Gのヒンジ領域またはグリシンリンカーであり得る。1実施形態において、ヒトI g Gのヒンジ領域は、ヒトI g G₁、I g G₂、I g G₃またはヒトI g G₄のヒンジ領域である。

【 0 0 5 7 】

F a n , e t a l . (2 0 0 8) ” P r o d u c t i o n o f m u l t i v a l e n t p r o t e i n b i n d e r s u s i n g a s e l f - t r i e r i z i n g c o l l a g e n - l i k e p e p t i d e s c a f f o l d . ” F A S E B J 2 2 (1 1) : 3 7 9 5 - 3 8 0 4 (非特許文献10) によりすでに証明されているように、コラーゲン様ペプチド、(G P P)₁₀は単独で非共有結合した三量体融合タンパク質の形成を促すことができる。よって、”ヒンジ領域”は任意であり、たとえ存在するとしても、融合ペプチドに対し三量体化の効果は有さない。

【 0 0 5 8 】

3. コラーゲン様ペプチド

コラーゲンは、哺乳動物において最も豊富なタンパク質である。コラーゲンは、G l y - X a a - Y a aの繰り返しのトリプレット配列を有する1つまたは複数の三重らせん領域(コラーゲンドメインまたはコラーゲン”スキャホールド”)を含む細胞外基質タンパク質であり、X a aおよびY a aは任意のアミノ酸残基であり、プロリン(アミノ酸コード、PまたはP r o)は最も高い頻度で組み込まれる残基である。Y a a位置において、通常P r oは酵素修飾されて4 - ヒドロキシプロリン(アミノ酸コード、OまたはH y p)になり、これによってG l y - P r o - H y pがコラーゲン中で最も多く、同時に最も安定化作用のあるトリプレットとなる。かかるトリプレットの存在により、3本のコラーゲンポリペプチド鎖(鎖)が折り畳まれて三重らせん構造を形成できるようになる。コラーゲン様ペプチドの説明は、米国特許出願第13 / 5 8 8 , 7 5 2号明細書(特許文献4)のコラーゲン様ドメインについての記述に見出すことができ、当該出願は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。本発明のコラーゲン様ポリペプチドは、別個の三量体化ドメインを要せずに、単独でF a bフラグメントの重鎖部分を三量体化して三価構造にすることができる。本発明のコラーゲン様ポリペプチドは、少なくとも5、少なくとも10のG l y - P r o - P r oまたはG l y - P r o - H y pトリプレットの連続的な繰り返し配列を少なくとも1つ含む。本発明のコラーゲン様ペプチドは、G l y

10

20

30

40

50

- Pro - ProもしくはGly - Pro - Hypモチーフおよび/または他のGly - Xaa - Yaaモチーフを含んでいてもよく、XaaおよびYaaは任意のアミノ酸残基である。本発明のコラーゲン様ペプチドは、完全な繰り返しGly - Xaa - Yaaトリプレットを含んでいてもよいが、Glyの第1の位置またはYaaの第3の位置の残基が欠失し、短い欠陥(short imperfection)によって中断(interrupted)されてもよく、これは多くの天然に存在するコラーゲンおよびコラーゲン様ドメインを含むタンパク質に見られる。

【0059】

コラーゲン多量体構造の安定性は、三量体の融解温度を測定することによって決定することができる。多くの研究が、G - P - X1リピートの融解温度/安定性を検証している。Frank et al., (2001) "Stabilization of short collagen-like triple helices by protein engineering." J. Mol. Biol. 308 (5): 1081 - 1089 (非特許文献11); Persikov et al., (2000) Biochemistry 39, 14960 - 14967 (非特許文献12), Persikov et al., (2004) Protein Sci. 13: 893 - 902 (非特許文献13)、およびMohs et al., (2007) J. Biol. Chem. 282: 29757 - 29765 (非特許文献14)。これらの研究を基に、各種繰り返し構造の安定性を予測することができる。

10

【0060】

4. リンカー

リンカーは、抗体フラグメントとコラーゲン様ペプチド領域との間、または結合ドメインとコラーゲン様ペプチド領域との間に任意で配置され得る短いペプチド配列である。scFvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成できる、V_HおよびV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、いずれの場合でも、リンカーは4から10アミノ酸の間の長さである。

20

【0061】

本発明の多価抗体フラグメントは、結合ドメインにおいてリガンドを結合させることができる。リガンドは、本発明の実施形態の結合ドメインと共に複合体を形成する生体分子である。リガンドは、ある特定の機能的親和力で分子間力により結合ドメインと結合することができる。1実施形態において、多価抗体フラグメントのリガンドに対する機能的親和力は 10^{-6} Mより大きい。1実施形態において、多価抗体フラグメントのリガンドに対する機能的親和力は 10^{-8} Mより大きい。1実施形態において、多価抗体フラグメントのリガンドに対する機能的親和力は 10^{-10} Mより大きい。特定の実施形態では、可溶性三量体または六量体融合タンパク質のリガンドに対する機能的親和力(またはアビディティ)は、 10^{-7} Mから 10^{-12} Mの間、 10^{-8} Mから 10^{-11} Mの間、 10^{-7} Mから 10^{-10} Mの間、 10^{-8} Mから 10^{-10} Mの間、および 10^{-9} Mから 10^{-10} Mの間である。

30

【0062】

1実施形態において、多価抗体フラグメントから構成される三量体または六量体タンパク質は可溶性タンパク質である。可溶性タンパク質は、生理的条件下で溶け易いタンパク質である。1実施形態では、多価抗体フラグメントの可溶性三量体または六量体構築体は分泌タンパク質である。分泌融合タンパク質は、細胞より分泌されるタンパク質である。タンパク質の分泌は、抗体ドメインを含むポリペプチド上にシグナル配列またはシグナルペプチドを持つことにより、対象とすることができる。

40

【0063】

シグナル配列は次の配列を含み得る。

【0064】

MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuTrpValProGlySerThrGly (配列番号: 11)

50

【 0 0 6 5 】

シグナルペプチドは、発現、会合、および/または分泌過程で切断され得る。マウス骨髄腫 NS0 細胞は、組み換えコラーゲンまたはコラーゲン様タンパク質の産生、および本発明の融合タンパク質の発現に適した発現系である。さらに、CHO および CHO-S 細胞が、組み換えコラーゲンまたはコラーゲン様タンパク質の産生、および本発明の融合タンパク質の発現に用いられ得る。

【 0 0 6 6 】

本発明の実施形態の会合した三量体は、3つの単量体、つまり第1、第2および第3の多価抗体フラグメントを含む(多価抗体フラグメント複合体を形成する)。1実施形態において、上記第1、第2および第3の多価抗体フラグメントは実質的に同じものであって、相互に少なくとも75%(例えば、75%以上100%以下の任意の数、例として75%、76%...95%、96%、97%、98%、または99%)の配列同一性を有する。3つの同じ多価抗体フラグメントにより形成される複合体はホモ三量体である。3つの多価抗体フラグメントは機能的等価であり得る。"機能的等価"とは、共通のポリペプチドのポリペプチド誘導体、例えば、1つまたは複数の点変異、挿入、欠失、切断を有するタンパク質、融合タンパク質、またはこれらの組み合わせ、三重らせんコイルを形成する能力、およびリガンドへの結合のような異種ドメインの活性を実質的に保持するタンパク質のことをいう。1実施形態では、第1の単量体多価抗体フラグメント構造の3つのコピー、および第2の多価抗体フラグメント構造の3つのコピーである。1実施形態では、第1の多価抗体フラグメント構造の2つのコピー、第2の多価抗体フラグメント構造の2つのコピー、および第3のポリペプチド構造の2つのコピーであってよい。

【 0 0 6 7 】

同一性パーセントは、例えば、Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984 (非特許文献15))に記述され、かつUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWCG) から入手可能なGAPコンピュータプログラムバージョン6.0を用い、配列情報を比較することによって決定することができる。GAPプログラムは、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981 (非特許文献17))が修正した、Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970 (非特許文献16))のアライメント法を利用する。GAPプログラムのデフォルトパラメータには、(1)ヌクレオチドについての単項比較マトリックス(同一に対し1、非同一直し0の値を含む)、およびSchwartz and Dayhoff eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979 (非特許文献19)に記述されている、Gribskov and Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986 (非特許文献18)の加重比較マトリックス、(2)各ギャップにつき3.0のペナルティ(penalty)および各ギャップ中の各シンボルにつき0.10の追加のペナルティ、ならびに(3)最後のギャップについてはペナルティなし、が含まれる。

【 0 0 6 8 】

本明細書で用いられる用語"コンセンサス配列"は、関連配列のファミリーにおいて最も高い頻度で現れるアミノ酸(またはヌクレオチド)から形成される配列のことをいう(例えば、Winnaker, From Genes to Clones Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987 (非特許文献20)、またRichard et al., (2003) "Engineered fibronectin type III domain with a RGDWE sequence binds with enhanced affinity and specificity to human alpha v beta 3 integrin." J. Mol. Biol. 326(5):1475-1488 (非特許文

10

20

30

40

50

献 2 1) 図 9 を参照)。タンパク質のファミリーにおいて、コンセンサス配列の各位置は、ファミリーにおけるその位置に最も高い頻度で現れるアミノ酸によって占められる。2 つのアミノ酸が同等の頻度で現れる場合は、どちらもコンセンサス配列に含まれ得る。

【 0 0 6 9 】

異種のポリペプチド、核酸、または遺伝子は、天然では会合しない別のポリペプチド、核酸、または遺伝子と会合するポリペプチド、核酸、または遺伝子である。2 つの融合ドメインまたは配列は、天然に存在するタンパク質または核酸においてそれらが互いに近接していない場合、互いに対して異種である。

【 0 0 7 0 】

” 単離 ” ポリペプチド (もしくは多価抗体フラグメント) またはタンパク質複合体とは、天然で会合される分子が実質的に含まれないポリペプチドまたはタンパク質複合体のことをいい、つまり、それは乾燥重量で少なくとも 7 5 % (すなわち、7 5 % 以上 1 0 0 % 以下の任意の数) 純度である。純度は任意の適した標準的手法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または H P L C 分析で測定することができる。本発明の実施形態の単離ポリペプチドまたはタンパク質複合体は、天然源から精製され、組み換え DNA 技術によって作製され得る。

10

【 0 0 7 1 】

三量体化されて三量体多価抗体フラグメントを形成する 3 つの単量体抗体フラグメントは、隣接していなくてもよい (non - c o n t i g u o u s) 。別の実施形態では、三量体化されて三量体多価抗体フラグメントを形成する 3 つの単量体抗体フラグメントは隣接している、つまり単一の翻訳生成物として翻訳される。

20

【 0 0 7 2 】

一方、6 つの結合ドメインのうち 2 またはそれ以上が互いに同じであるとき、従来の抗体または受容体に比べ、タンパク質複合体は 1 つの結合パートナー (例えば抗原) に特異的な 1 ~ 3 個の結合ドメインを持つことができ、従来の抗体または受容体はかかるドメインを 1 つまたは 2 つしか持たない。言い換えると、抗原に対して一価または二価のみの従来の抗体または受容体とは異なり、タンパク質複合体は、二、三、四、五、または六価であり得る。結果として、従来の抗体または受容体よりも高い親和力を持つように作製することができる。より高い親和力のために、所望の目標、例えば治療効果を達成するのに、従来の抗体に比べより少量のタンパク質複合体およびより短い培養時間が要求され、これによって治療コストが低減すると共に副作用 (例えば、望ましくない免疫反応) が最小限に抑えられることとなる。

30

【 0 0 7 3 】

また一方、6 つのドメインのうち 2 つまたはそれ以上が互いに異なるとき、本発明のタンパク質複合体は、2 ~ 6 個の異なる結合パートナーに特異的な 2 ~ 6 個の結合ドメインを有し得る。異なる特異性の多数の結合パートナー部位を 1 つのユニットにまとめることによって、多数の結合パートナーをまとめる能力を備えることとなり、このため治療、組織再建、および活性タンパク質機構 (例えばマルチサブユニット酵素) の組み立てにおいて、ナノメートルレベルで望ましく使用できる。

【 0 0 7 4 】

本発明の実施形態のタンパク質複合体は、細胞毒素、治療薬、または放射性イオンのような治療成分にコンジュゲートされ得る。細胞毒素または細胞毒性薬には、細胞に有害な任意の物質が含まれる。例には、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド (t e n o p o s s i d e) 、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1 - デヒドロテストステロン (1 - d e h y d r o t e s t o s t e r o n e) 、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、メイタンシノイド (m a y t a n s i n o i d s) 、例えばメイタンシノール (m a y t a n s i n o l) (米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号明細書 (特

40

50

許文献 5) 参照)、CC-1065 (米国特許第 5,475,092 号明細書 (特許文献 6)、米国特許第 5,585,499 号明細書 (特許文献 7)、および米国特許第 5,846,545 号明細書 (特許文献 8) 参照) ならびにそのアナログまたはホモログが含まれる。治療薬には、限定はされないが、代謝拮抗物質 (例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤 (例えばメクロレタミン、チオエパクロラムブシル (thioepac hlorambucil)、CC-1065、メルファラン、カルムスチン (BSNU) とロムスチン (CCNU)、シクロトスファミド (cyclophosphamide)、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、およびシスジクロロジアミン白金 (II) (DDP) (シスプラチン)、アントラサイクリン (例えばダウノルピシン (旧ダウノマイシン) およびドキシソルピシン)、抗生物質 (例えばダクチノマイシン、(旧アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン (AMC))、ならびに抗有糸分裂剤 (例えばピンクリスチン、ピンブラスチン、タキソールおよびメイトンシノイド) が含まれる。

10

【0075】

本発明の実施形態において考えられる放射性イオンには、限定はされないが、 ^{111}In インジウム、 ^{113}In インジウム、 ^{99}Ru レニウム、 ^{105}Ru レニウム、 ^{101}Ru レニウム、 ^{99}M テクニウム、 ^{121}M テルリウム、 ^{122}M テルリウム、 ^{125}M テルリウム、 ^{165}T ッリウム、 ^{167}T ッリウム、 ^{168}T ッリウム、 ^{123}I ヨード、 ^{125}I ヨード、 ^{126}I ヨード、 ^{131}I ヨード、 ^{133}I ヨード、 ^{81}Kr クリプトン、 ^{33}Xe キセノン、 ^{90}Y イットリウム、 ^{213}Bi ビスマス、 ^{77}As 臭素、 ^{18}F フッ素、 ^{95}Lu ルテニウム、 ^{97}Lu ルテニウム、 ^{103}Lu ルテニウム、 ^{105}Lu ルテニウム、 ^{107}Hg 水銀、 ^{203}Hg 水銀、 ^{67}Ga ガリウム、 ^{68}Ga ガリウム、 ^{35}S 硫黄、および ^{14}C 炭素が含まれる。

20

【0076】

コンジュゲートは、コンジュゲートを宿主に投与することによって、所定の生物学的反応を修飾するのに用いることができる。薬物成分は古典的な化学治療薬に限定されると解されるべきではない。例えば、薬物成分は、所望の生物学的活性を備えるタンパク質またはポリペプチドであってもよい。かかるタンパク質には、例として、アブリン、リシン A、緑膿菌外毒素もしくはジフテリア毒素のような毒素、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベータのようなタンパク質、または、例えばリンホカイン、インターロイキン-1 ("IL-1")、インターロイキン-2 ("IL-2")、インターロイキン-6 ("IL-6")、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ("GM-CSF")、顆粒球コロニー刺激因子 ("G-CSF") もしくはその他の成長因子のような生物学的反応修飾物質が含まれ得る。

30

【0077】

さらなる実施形態において、多価抗体 (またはその三量体複合体) は、蛍光剤または放射性薬剤のような標識薬剤 (つまり、"マーキング薬剤") にコンジュゲートまたは結合され得る。マーカータンパク質には、限定はされないが、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質、および高感度緑色蛍光タンパク質が含まれる。マーカータンパク質を含む本発明の実施形態の多価抗体は、診断および分子イメージングに用いることができる。本発明の実施形態において、マーカータンパク質または放射性イオン、あるいは他の融合成分を含む多価抗体フラグメントは、多価抗体フラグメントおよび特定の分子のイメージングに必要な他の試薬を含むキット中に包装されてもよい。これら試薬には、限定はされないが、生体サンプルの作製に用いる試薬、およびマーカータンパク質の可視化に用いる試薬が含まれ得る。

40

【0078】

本発明のさらなる実施形態において、多価抗体フラグメント (またはその三量体複合体) は、ポリマーにコンジュゲートされ得る。かかるポリマーには、限定はされないが、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、およびポリオキシエチル化ポリオ-

50

ルが含まれる。

【0079】

本発明の実施形態はまた、先ほど述べた多価抗体フラグメントをコードする配列または該配列の相補体を含む単離核酸も包含する。核酸とは、DNA分子（例えばcDNAもしくはゲノムDNA）、RNA分子（例えばmRNA）、またはDNAもしくはRNAアナログのことをいう。DNAまたはRNAアナログはヌクレオチドアナログから合成されたものであってもよい。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよいが、1実施形態では二本鎖DNAである。“単離核酸”とは、その構造が、天然に存在する任意の核酸の構造とも、または天然に存在する任意のゲノム核酸のフラグメントの構造とも同一でない核酸である。よってこの用語は、例えば（a）天然に存在するゲノムDNA分子の一部の配列を有するが、天然に存在する生物のゲノムにおける分子のその部分に隣接する2つのコーディング配列が両側にはないDNA、（b）得られる分子が天然に存在する任意のベクターまたはゲノムDNAとも同一にならないような形で、原核生物または真核生物のベクターまたはゲノムDNAに取り込まれる核酸、（c）例えばcDNA、ゲノムフラグメント、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により作製されたフラグメントまたは制限フラグメントのような分離された分子、および（d）ハイブリッド遺伝子、つまり融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である組み換えヌクレオチド配列、を包含する。上述した核酸は本発明のポリペプチドを発現するのに用いることができる。この目的のために、適した調節配列に核酸を操作可能に連結させて発現ベクターを生成することができる。

10

【0080】

ベクターとは、それが連結された別の核酸を運ぶ能力のある核酸分子のことをいう。ベクターは自己複製し得る、または宿主DNAに組み込まれ得る。ベクターの例には、プラスミド、コスミド、またはウイルスベクターが含まれる。本発明のベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形式の核酸を含む。ベクターは、発現されるべき核酸配列に操作可能に連結した1つまたは複数の調節配列を含む。1実施形態において、発現ベクターはpSecTag2/Hygro（Invitrogen）である。

20

【0081】

“調節配列”には、プロモーター、エンハンサー、またはその他の発現制御要素（例えばポリアデニル化シグナル）が含まれる。調節配列には、組織特異的な調節および/または誘導性配列のみならず、ヌクレオチド配列の構成的発現を誘導するものも含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどといった要素によって決まる。発現ベクターは、宿主細胞に導入されて、本発明のポリペプチドを生成することができる。上述した核酸を含む宿主細胞もまた本発明の実施形態の範囲内に含まれる。例には、E. coli細胞、昆虫細胞（例えばショウジョウバエS2細胞もしくはバキュロウイルスに感染した昆虫細胞を使用）、酵母細胞、または哺乳類細胞（例えばマウス骨髄腫NS0細胞）が含まれる。例えば、Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif (非特許文献22)を参照されたい。

30

【0082】

本発明の単量体構造をコードする配列に、同定および精製を可能にするヌクレオチドまたはタンパク質配列が含まれていてもよい。かかる配列には、ヌクレオチドまたはタンパク質配列を精製または同定するための制限酵素認識部位、標識、スパーサー、およびその他の手段が含まれ得る。多くの場合、かかる配列はヌクレオチド中に含まれ、かつ長さが4~6アミノ酸の短いアミノ酸配列をコードする。それらは多価抗体フラグメントのドメインの間に人工産物として現れることが多いが、本発明の基本的かつ新規な特徴に實質的に影響を与えることはない。

40

【0083】

多価抗体フラグメントを作製するため、核酸によりコードされるポリペプチドの発現を可能とする条件下にて培地中で宿主細胞を培養し、培養細胞または細胞の培地からポリペ

50

プチドを精製することができる。コラーゲン様ペプチドを含むペプチドは、親和性標識 (a f f i n i t y t a g s) が ない場合、精製することが難しい場合がある。本発明の多価抗体フラグメントにおいては、F a b 領域が精製に役立つ。あるいは、本発明の核酸は、例えばT7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用い、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0084】

本発明の実施形態のタンパク質複合体を作製するため、上述した第1、第2および第3の融合ポリペプチドをそれぞれコードする第1、第2および第3の核酸を含む宿主細胞を、これら3つの核酸によりコードされるポリペプチドの発現、および発現されたポリペプチド間の三重らせんコイルの形成を可能にする条件下にて培地中で培養し、培養細胞または細胞の培地からタンパク質複合体を精製することができる。宿主細胞は、プロリン残基をヒドロキシル化する酵素活性を含む真核細胞である。

10

【0085】

宿主細胞は任意の原核または真核細胞であってよい。本発明の実施形態のタンパク質は、細菌細胞 (例えば E . c o l i) 、昆虫細胞、酵母、または哺乳類細胞 (例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞 (C H O) もしくはC O S 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞 C V - 1 o r i g i n S V 4 0 細胞 ; G l u z m a n (1 9 8 1) C e l l 2 3 : 1 7 5 ~ 1 8 2 (非特許文献 2 3)) 中で発現され得る。他の適した宿主細胞は当業者には既知である。

20

【0086】

ベクターDNAは、従来 of 形質転換またはトランスフェクション技術によって、宿主細胞中に導入することができる。本明細書において、" 形質転換 " および " トランスフェクション " という用語は、外来核酸 (例えば DNA) を宿主細胞に導入するための当該分野で承認されている様々な技術を指すことが意図されており、それにはリン酸カルシウムもしくは塩化カルシウムの共沈、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション (D E A E - d e x t r a n - m e d i a t e d t r a n s f e c t i o n) 、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。

【0087】

ヒトにおけるインビボでの使用では、本発明の実施形態の多価抗体フラグメントはヒト由来のものである。例えば多価抗体フラグメントは、ヒト由来のコラーゲン様ドメインにインフレームで融合された配列を含み得る。コラーゲンドメインを有する多くのコラーゲン様タンパク質は血中で極めて安定であることから、当該多価抗体フラグメントも同様に血中で構造的完全性を保つはずである。さらに、ヒンジ領域およびFcドメインは、ヒトI g G またはヒト化抗体から得ることができる。

30

【0088】

本発明の実施形態は、T細胞媒介性免疫疾患、特に自己免疫疾患の症状を、多価抗CD3抗体フラグメントの使用により治療、予防または改善する方法をも提供する。具体的には、本発明の方法は、ヒトCD3複体内のイプシロンサブユニットと特異的に結合する多価抗体フラグメントまたは抗体の投与を提供する。かかる抗体および抗体フラグメントは、T細胞受容体/Ap抗原相互作用を調節し、よって、自己免疫疾患に関連するT細胞媒介性細胞傷害を制御する。さらに、本発明は、非修飾抗CD3抗体と比較して、修飾抗CD3抗体がエフェクター機能およびT細胞活性化の低減または除去を示す、抗CD3抗体または抗CD3抗体フラグメントの修飾を提供する。

40

【0089】

自己免疫疾患とは、免疫システムが健全な生体組織を誤って攻撃して破壊し、これにより組織損傷を引き起こす疾患のことをいう。自己免疫疾患には、限定はされないが、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、強直性脊椎炎、多発性硬化症、1型糖尿病、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス、混合性結合組織疾患、進行性全身性強皮症、抗リン脂質抗体症候群、乾癬、強皮症、糸球体腎炎、皮膚筋炎、橋本甲状腺炎およびグレーブス病が含まれる。

50

【0090】

エフェクター機能は、補体依存性細胞傷害（CDC）を通しての抗体被覆粒子の食作用および崩壊、抗体Fcフラグメントとナチュラルキラー細胞のような活性化されたエフェクター細胞のFc受容体との架橋結合による、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を通しての抗体被覆標的細胞の溶解、細胞膜の破壊、IL-1、IL-1、IL-6、およびTNFを含む炎症性メディエータの放出、ならびに免疫グロブリン産生のコントロールによって示され得る。

【0091】

T細胞活性化は、T細胞受容体（TCR）に対する抗原またはアゴニスト抗体でのT細胞の刺激によるT細胞増殖を測定することで示され得る。TCR活性化は、特定のタンパク質チロシンキナーゼ（PTK）の誘導、ホスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸（PIP2）の分解、タンパク質キナーゼC（PKC）の活性化、および細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を含むシグナル伝達経路の開始をもたらし得る。これら初期のイベントが核に伝達され、結果として、T細胞のクローン性増殖、セル表面における活性化マーカーのアップレギュレーション、エフェクター細胞への分化、細胞毒性またはIL-2のようなサイトカイン分泌の誘導、アポトーシスの誘導が生じる。

【0092】

サイトカイン放出症候群は、例えば頭痛、吐き気、嘔吐、発熱、筋肉痛、関節痛および震えなどが現れ、例えばIL-1、IL-1、IL-2、IL-6、IL-10、TNFおよびIFNの血清中のレベルの上昇によって引き起こされる可能性がある。

【0093】

上述したタンパク質複合体は、異種結合ドメインの特異性に依りて、自己免疫疾患、炎症疾患、代謝疾患、線維症疾患、がん、および心血管疾患を含む様々な疾患を治療するのに用いることができる。これら疾患の具体的な症状には頭痛、吐き気、嘔吐、発熱、筋肉痛、関節痛および震えが含まれ、例えばIL-2、IL-6、IL-10、TNFおよびIFNの血清中のレベルの上昇によって引き起こされる可能性がある。よって、本発明は、例えばそれを必要とする被験体に有効量の本発明のタンパク質複合体を投与して疾患を治療することにより、このような疾患を治療する方法を特徴とする。治療されるべき被験体は、当該疾患により特徴付けられる状態を有している、またはそのような状態になるリスクがあると見なされ得る。本方法は、単独で、または他の薬物もしくは治療法と併用して実施することができる。

【0094】

1実施形態は、T細胞受容体/Ap抗原相互作用により引き起こされる、または悪化する疾患を治療するのに用いられ、よって、自己免疫疾患に関連するT細胞媒介性細胞傷害を制御する。別の実施形態では、本発明は、それを必要とする患者におけるCD3の生物活性、CD3シグナル伝達のレベル、またはT細胞受容体/Ap抗原相互作用を調節するのに用いられる。1実施形態において、本発明は、未結合CD3またはCD3シグナル伝達のレベルを低下させる。

【0095】

本発明のタンパク質複合体の多重特異性という特徴のために、これを用いて通常は互いに会合しない分子または細胞を架橋させることができる。この特徴は、細胞療法（cell-based therapies）に特に有用である。1例において、本発明の多価Fab抗体フラグメントはCD3を1つのドメインに結合させることができ、一方で別のドメインはEGFRと結合する。

【0096】

細胞傷害性T細胞の活性化は、本発明のタンパク質複合体により細胞傷害性T細胞の表面上にエフェクター抗原としてのCD3抗原を結合させることによって起こり得る。他のリンパ系細胞結合性エフェクター抗原（lymphoid cell-associated effector antigens）には、ヒトCD16抗原、NKGD2D抗原、NKp46抗原、CD2抗原、CD28抗原、CD25抗原、CD64抗原、およびC

10

20

30

40

50

D 8 9 抗原が含まれる。これらエフェクター抗原との結合は、単球、好中性顆粒球、および樹状細胞のようなエフェクター細胞の活性化につながる。そして、これら活性化された細胞は、標的細胞に対して細胞傷害またはアポトーシスの効果をもたらす。

【0097】

”治療 (treating)” という用語は、疾病、疾病の症状、疾病に続発する病状、本発明のタンパク質のリガンドにより悪化する疾病、または病気にかかり易い素因を治癒する、緩和する、軽減する、治す、予防する、または改善することを目的とした、被験体への組成物を投与として定義される。”有効量”とは、治療を受ける被験体において例えば上述したような医学的に望ましい結果を生じさせることのできる組成物の量のことである。

10

【0098】

1つのインビボアプローチでは、治療用組成物(例えば本発明のタンパク質複合体を含む組成物)が被験体に投与される。通常、該複合体は薬学的に許容される担体(例えば生理食塩水)中に懸濁され、経口でもしくは静脈内注射により投与される、または皮下、筋肉、髄腔内、腹腔内、直腸内、腔内、鼻腔内、胃内、気管内もしくは肺内に注射もしくは移植される。

【0099】

必要な投与量は、投与経路の選択、剤形の性質、被験体の疾病の性質、被験体の大きさ、体重、表面積、年齢および性別、投与されている他の薬物、ならびに主治医の判断によって決まる。適した投与量は0.01~100.0 mg/kgの範囲である。適した投与量は0.01~100.0 mg/kgの範囲である。より詳細には0.1~100、0.1~75、0.1~50、0.1~25、0.1~10、0.5~100、0.5~75、0.5~50、0.5~25、0.5~10、1~100、1~75、1~50、もしくは1~25 mg/kgの範囲である。投与量には、1~10、10~100、10~75、10~50、10~25、25~50、50~75、25~100、25~50、50~100、または75~100 mg/kgが含まれ得る。あるいは、投与量は1~2、3~4、5~6、7~8、または9~10 mg/kgであってもよい。

20

【0100】

本発明の実施形態の治療用組成物は、約1から10週間の間、例えば2から8週間の間、または約3から7週間の間、さらには約4、5、もしくは6週間、毎日、週に1回、2回、3回またはそれ以上、投与することができる。使用できる組成物の種類および各種投与経路のそれぞれ異なる効率を考慮すると、必要とされる投与量の変動が予想される。例えば、経口投与は、静脈注射による投与よりも高い投与量を要することが予想される。これら投与量のレベルの変動は、当該分野においてよく理解されているように、至適化のための標準的な実験によって調整することができる。適した運搬媒体(例えば高分子微粒子または埋め込み型装置)内への組成物のカプセル封入は、特に経口デリバリーにおいて、運搬の効率を向上させることができる。

30

【0101】

薬学的に許容される担体には、溶剤、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、ならびに等張および吸収遅延剤が含まれる。具体的には、これらの物質には、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のようなバッファー、ならびに、塩化ナトリウムまたはデキストロースのような張度調節に用いる物質が含まれ得る。医薬組成物のpHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基によって調節することができる。

40

【0102】

薬学的に許容される担体および有効量の本発明の実施形態のタンパク質複合体を含有する医薬組成物もまた、本発明の実施形態の範囲に入る。医薬組成物は、上に挙げた疾患を治療するのに用いることができる。薬学的に許容される担体には、溶剤、分散媒、コーテ

50

ィング、抗菌剤および抗真菌剤、ならびに等張剤および吸収遅延剤が含まれる。医薬組成物は、従来の方法を用い、それぞれ異なる投与経路に合った剤形に処方することができる。

【0103】

本発明の実施形態の組成物の有効性はインビトロとインビボの両方において評価することができる。インビボ試験では、組成物を動物（例えばマウスモデル）に注射することができ、そしてその治療効果を評価する。その結果に基づいて、適切な投与量の範囲と投与経路を決定できる。

【0104】

本明細書において、“～に対する (directed against)” および “～に特異的に結合する (specifically bind to)” という用語は、本発明の融合タンパク質が抗体ドメインを含み、抗体または抗体のフラグメントがそのリガンドに対し少なくとも 10^{-6} M の機能的親和力を有することを意味する。

10

【0105】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細が、添付の図面および以下の記述において示される。本発明の他の特徴、目的および長所は、当該記述および図面、ならびにクレームから明らかとなるであろう。

【0106】

II. 実施形態の構成

A. 抗体フラグメント

20

1 実施形態による本発明の多価抗体フラグメントの単量体は、単一の抗体フラグメント（結合ドメイン/領域もしくは抗原結合フラグメントを含む）または2つ以上の抗体フラグメントを有し得る。多価抗体フラグメントを表すモノマーの抗体フラグメントの例には、限定はされないが、(i) V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインからなる一価フラグメントである Fab フラグメント、(ii) ヒンジ領域にてジスルフィド架橋により連結される2つの Fab フラグメントを含む二価フラグメントである $F(ab')_2$ フラグメント、(iii) V_H および C_{H1} ドメインからなる Fd フラグメント、(iv) 抗体の1本のアームの V_L および V_H ドメインからなる Fv フラグメント、(v) V_H ドメインからなる dAb フラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546)、(vi) 単離された相補性決定領域 (CDR)、ならびに (vii) V_L または V_H ドメインが含まれる。

30

【0107】

1 実施形態では、抗体フラグメントは Fab フラグメントである。

【0108】

さらに、Fv フラグメントの2つのドメイン、 V_L および V_H は、別々の遺伝子によりコードされるが、組み換え法を用い、これらを V_L および V_H 領域が対になって一価分子を形成する1本のタンパク質鎖とさせることのできる合成リンカーにより、連結することができる（一本鎖 Fv (scFv) として知られる。例えば Bird et al., (1988) Science 242: 423 - 426 (非特許文献24)、および Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883 (非特許文献25)）。このような一本鎖抗体 (scFv) もまた、抗体の “抗原結合フラグメント” という用語に包含される。これらの抗体フラグメントは当業者に知られる従来的手法を用いて得ることができ、かつ、当該フラグメントは実用に供することのできるよう、完全 (intact) 抗体と同じ方式で選別される。

40

【0109】

1 実施形態において、抗体フラグメントは scFv である。

【0110】

1 実施形態において、多価抗体は2つの抗体フラグメント、Fab および scFv を含む。

【0111】

50

F_dまたはF_dフラグメントは、V_HおよびC_{H1}ドメインからなる抗体重鎖フラグメントである。

【0112】

抗体はモノクローナル抗体であってよい。1実施形態において、抗体は、組み換え技術、例えばファージディスプレイまたはコンビナトリアル手法により作製することができる。抗体を生成するためのファージディスプレイおよびコンビナトリアル手法は当該技術分野において既知である（例えば、Ladner et al. 米国特許第5,223,409号明細書（特許文献10）；Kang et al. 国際公開第92/18619号パンフレット（特許文献11）；Dower et al. 国際公開第91/17271号パンフレット（特許文献12）；Winter et al. 国際公開第92/20791号パンフレット（特許文献13）；Markland et al. 国際公開第92/15679号パンフレット（特許文献14）；Breitling et al. 国際公開第93/01288号パンフレット（特許文献15）；McCafferty et al. 国際公開第92/01047号パンフレット（特許文献16）；Garrard et al. 国際公開第92/09690号パンフレット（特許文献17）；Ladner et al. 国際公開第90/02809号パンフレット（特許文献18）；Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372（非特許文献26）；Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85（非特許文献27）；Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281（非特許文献28）；Grif 20
fths et al. (1993) EMBO J 12:725-734（非特許文献29）；Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896（非特許文献30）；Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628（非特許文献31）；Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580（非特許文献32）；Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377（非特許文献33）；Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137（非特許文献34）、およびBarbas et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982（非特許文献35）を参照されたく、これらすべての内容は参照することにより本明細書に 30
組み込まれる）。1実施形態において、抗体は、完全ヒト抗体（例えば、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体を産生するよう遺伝子操作を受けたマウスで作られた抗体）、または非ヒト抗体、例えば齧歯動物（マウスもしくはラット）、ヤギ、霊長類（例えばサル）、もしくはラクダの抗体である。1実施形態において、非ヒト抗体は齧歯動物（マウスまたはラット抗体）である。齧歯動物抗体を作製する方法は当該技術分野において既知である。

【0113】

ヒトモノクローナル抗体は、マウスの系ではなく、ヒト免疫グロブリン遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて生成することができる。目的の抗原で免疫化されたこれらトランスジェニックマウス由来の脾細胞は、ヒトタンパク質由来のエピトープに対し特 40
異的親和性があるヒトmAbを分泌するハイブリドーマを作製するのに用いられる（例えば、Wood et al. 国際特許出願第91/00906号（特許文献19）；Kucherlapati et al. 国際特許出願第91/10741号（特許文献20）；Lonberg et al. 国際特許出願第92/03918号（特許文献21）；Kay et al. 国際特許出願第92/03917号（特許文献22）；Lonberg et al. 1994 Nature 368:856-859（非特許文献36）, Green, L.L. et al. (1994) Nature Genet. 7:13-21（非特許文献37）；Morrisson et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855（非特許文献38）；Bruggeman et al. (1993) Year Immunol 7:33 50

- 40 (非特許文献39); Tuailion et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720 - 3724 (非特許文献40); Bruggeman et al. 1991 Eur J Immuno 21: 1323 - 1326 (非特許文献41)を参照)。

【0114】

ヒトモノクローナル抗体の1例は、パニツムマブ (panitumumab) (VECTIBIX (登録商標)) であって、旧名はABX-EGFで、上皮成長因子受容体 (EGFR) に特異的な完全ヒトモノクローナル抗体である。パニツムマブは、EGFRを発現する、結腸または直腸の転移性がん罹患する患者を治療するのに用いられる。

【0115】

抗体は、可変領域、またはその一部、例えばCDRが、非ヒト生物、例えばラットまたはマウスにおいて作製されたものであってよい。キメラ、CDR-グラフト、およびヒト化抗体が使用可能である。非ヒト生物、例えばラットまたはマウスで作製されてから、ヒトにおける抗原性を低下させるために例えば可変フレームワークまたは定常領域が修飾された抗体は、本発明の範囲に入る。

【0116】

キメラ抗体は、当該技術分野において公知である組み換えDNA技術によって作製することができる。例えば、マウス (またはその他の種の) モノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子を制限酵素により消化して、マウスFcをコードする領域を除去し、そしてヒトFc定常領域をコードする遺伝子の相当部分で置換する (Robinson et al., 国際公開PCT/US86/02269号パンフレット (特許文献23); Akira et al., 欧州特許出願第184,187号明細書 (特許文献24); Taniguchi, M、欧州特許出願第171,496号明細書 (特許文献25); Morrison et al., 欧州特許出願第173,494号明細書 (特許文献26); Neuberger et al., 国際特許出願第86/01533号 (特許文献27); Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号明細書 (特許文献28); Cabilly et al., 欧州特許出願第125,023号明細書 (特許文献29); Better et al. (1988) Science 240: 1041 - 1043 (非特許文献42); Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439 - 3443 (非特許文献43); Liu et al., (1987) J Immunol. 139: 3521 - 3526 (非特許文献44); Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214 - 218 (非特許文献45); Nishimura et al., (1987) Canc. Res. 47: 999 - 1005 (非特許文献46); Wood et al. (1985) Nature 314: 446 - 449 (非特許文献47); および Shaw et al., (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553 - 1559 (非特許文献48)を参照)。

【0117】

ヒト化またはCDRグラフト抗体は、少なくとも1つまたは2つ、ただし通常は3つ全ての (重および/または軽免疫グロブリン鎖の) レシピエントCDRが、ドナーCDRで置き換えられることとなる。抗体が非ヒトCDRの少なくとも1部で置き換えられてもよいし、あるいは、CDRのいくつかだけが非ヒトCDRで置き換えられてもよい。ヒト化抗体またはそのフラグメントの結合に要されるCDRの数だけ置き換えればよい。ドナーは齧歯動物の抗体、例えばラットまたはマウス抗体であってよく、かつレシピエントはヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークである。一般に、CDRを提供する免疫グロブリンは "ドナー" と呼ばれ、フレームワークを提供する免疫グロブリンは "アクセプター" と呼ばれる。1実施形態において、ドナー免疫グロブリンはヒト以外 (例えば齧歯動物) である。アクセプターのフレームワークは、天然に存在する (例えばヒト) フレームワークまたはコンセンサスフレームワーク、あるいは、それと約85%もしくはそれ以上、または90%、95%、99%もしくはそれ以上同一な配列である。

10

20

30

40

50

【0118】

1実施形態において、リガンドまたは抗原はCD3である。1実施形態において、リガンドまたは抗原はEGFRである。1実施形態において、二重特異性構造は、抗CD3領域および抗EGFR領域の両方を有する。

【0119】

1実施形態において、Fabは抗CD3であり、かつ次の構造の1つまたは複数を含んでいてよい。

【0120】

h145FabCSA中に含まれる結合領域

抗体フラグメントの結合領域は抗CD3抗体に由来するものであってよいし、重鎖および軽鎖の両方を含んでいてもよい。例えば、ハムスター抗マウスCD3抗体(145-2C11)由来の重鎖可変領域は、次のとおりである。

10

【0121】

AspGluValGlnLeuGlnGluSerGlyGlyGlyLeuVal
GlnProGlyLysSerLeuLysLeuSerCysGluAlaSerG
lyPheThrPheSerGlyTyrGlyMetHisTrpValArgGl
nAlaProGlyArgGlyLeuGluSerValAlaTyrIleThr
SerSerSerIleAsnIleLysTyrAlaAspAlaValLysG
lyArgPheThrValSerArgAspAsnAlaLysAsnLeuLe
uPheLeuGlnMetAsnIleLeuLysSerGluAspThrAla
MetTyrTyrCysAlaArgPheAspTrpAspLysAsnTyrT
rpGlyGlnGlyThrMetValThrValSerSer(配列番号12)

20

【0122】

ハムスター抗マウスCD3抗体(145-2C11)由来の軽鎖可変領域は、次のとおりである。

【0123】

AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuProAla
SerLeuGlyAspArgValThrIleAsnCysGlnAlaSerG
lnAspIleSerAsnTyrLeuAsnTrpTyrGlnGlnLysPr
oGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrTyrThrAsnLys
LeuAlaAspGlyValProSerArgPheSerGlySerGlyS
erGlyArgAspSerSerPheThrIleSerSerLeuGluSe
rGluAspIleGlySerTyrTyrCysGlnGlnTyrTyrAsn
TyrProTrpThrPheGlyProGlyThrLysValGluIleL
ys(配列番号13)

30

【0124】

hOKT3FabCSA中に含まれる結合領域

ヒト化ムロモナブ-CD3(オルソクロンOKT3抗体)の重鎖可変領域は次のとおりである。

【0125】

AspGlnValGlnLeuValGlnSerGlyGlyGlyValVal
GlnProGlyArgSerLeuArgLeuSerCysLysAlaSerG
lyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValArgGl
nAlaProGlyLysGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleAsn
ProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysValLysA
spArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsnThrAl
aPheLeuGlnMetAspSerLeuArgProGluAspThrGly
ValTyrPheCysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrCysL
euAspTyrTrpGlyGlnGlyThrProValThrValSerSe
r(配列番号14)

40

50

【0126】

ヒト化ムロモナブ - CD3 (オルソクロンOKT3) の軽鎖可変領域は次のとおりである。

【0127】

AspAspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSer
AlaSerValGlyAspArgValThrIleThrCysSerAlaS
erSerSerValSerTyrMetAsnTrpTyrGlnGlnThrPr
oGlyLysAlaProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLys
LeuAlaSerGlyValProSerArgPheSerGlySerGlyS
erGlyThrAspTyrThrPheThrIleSerSerLeuGlnPr
oGluAspIleAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTrpSerSer
AsnProPheThrPheGlyGlnGlyThrLysLeuGlnIleT
hr (配列番号15)

10

【0128】

Fabにおいて、重鎖はヒトIgG₁のC_H₁ドメインおよびヒンジ領域を含み得る。この配列の1例は次のとおりである。

【0129】

AlaSerThrLysGlyProSerValPheProLeuAlaPro
SerSerLysSerThrSerGlyGlyThrAlaAlaLeuGlyC
ysLeuValLysAspTyrPheProGluProValThrValSe
rTrpAsnSerGlyAlaLeuThrSerGlyValHisThrPhe
ProAlaValLeuGlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerS
erValValThrValProSerSerSerLeuGlyThrGlnTh
rTyrIleCysAsnValAsnHisLysProSerAsnThrLys
ValAspLysLysValGluProLysSerCysAspLysThrH
isThrCysProProCysPro (配列番号16)

20

【0130】

Fabにおいて、IgG₁のカッパ軽鎖定常ドメインが、軽鎖可変領域のC末端に加えられてよい。カッパ軽鎖定常ドメインの1例は次のとおりである。

【0131】

ArgThrValAlaAlaProSerValPheIlePheProPro
SerAspGluGlnLeuLysSerGlyThrAlaSerValValC
ysLeuLeuAsnAsnPheTyrProArgGluAlaLysValGl
nTrpLysValAspAsnAlaLeuGlnSerGlyAsnSerGln
GluSerValThrGluGlnAspSerLysAspSerThrTyrS
erLeuSerSerThrLeuThrLeuSerLysAlaAspTyrGl
uLysHisLysValTyrAlaCysGluValThrHisGlnGly
LeuSerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGlu
Cys (配列番号17)

30

【0132】

1実施形態において、多価抗体フラグメントはscFvを含む。このようなscFvの1つの配列は以下に示される、EGFRに対するものである(763scFv)。

【0133】

AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAla
SerValGlyAspArgValThrIleThrCysGlnAlaSerG
lnAspIleSerAsnTyrLeuAsnTrpTyrGlnGlnLysPr
oGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsn
LeuGluThrGlyValProSerArgPheSerGlySerGlyS
erGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSerLeuGlnPr
oGluAspIleAlaThrTyrPheCysGlnHisPheAspHis

40

50

LeuProLeuAlaPheGlyGlyGlyThrLysValGluIleLysGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlnValGlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValLysProSerGluThrLeuSerLeuThrCysThrValSerGlyGlySerValSerSerGlyAspTyrTyrTrpThrTrpIleArgGlnSerProGlyLysGlyLeuGluTrpIleGlyHisIleTyrTyrSerGlyAsnThrAsnTyrAsnProSerLeuLysSerArgLeuThrIleSerIleAspThrSerLysThrGlnPheSerLeuLysLeuSerSerValThrAlaAlaAspThrAlaIleTyrTyrCysValArgAspArgValThrGlyAlaPheAspIleTrpGlyGlnGlyThrMetValThrValSerSer (配列番号9)

10

【0134】

B. ヒンジ領域

本発明の融合タンパク質は”ヒンジ領域”を含んでいてもよい。1実施形態において、ヒンジ領域はおよそ4~15アミノ酸長の配列である。ヒンジ領域は、ヒトIgGのヒンジ領域またはグリシンリンカーであり得る。1実施形態において、ヒトIgGのヒンジ領域は、ヒトIgG₁またはIgG₂のヒンジ領域である。

【0135】

1実施形態において、“ヒンジ領域”は次の配列のうちの1つを有する。

20

【0136】

GluProLysSerGlyAspLysThrHisThrCysProProCysPro (配列番号18)、または、

【0137】

GluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysPro (配列番号19)、または、次のうちの1つ。

【0138】

【表1】

ヒト免疫グロブリンのヒンジ領域のアミノ酸配列		
配列番号20	ヒトIgG ₁	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
配列番号21	ヒトIgG ₂	ERKCCVECPPECPAPPVAGP
配列番号22	ヒトIgG ₃	ELKTPLGDTTHTCPRCPAPELLGGP
配列番号23	ヒトIgG ₄	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGP

30

【0139】

1実施形態において、“ヒンジ領域”にはグリシンリンカーが含まれる。

【0140】

グリシンリンカー (G-linker) の例には次のものが含まれ得る。

40

【0141】

(GGGG)₃ (配列番号24)。最もよく用いられるscFvのリンカーは、グリシンおよびセリン残基の15アミノ酸の組み合わせを含む。

【0142】

米国特許第5,908,626号明細書(特許文献9):ペプチドリンカーで連結されたインターフェロン-と免疫グロブリンFcを有するハイブリッドにおいて示されているGGSGSGSGSGSGSGSGSGSG (配列番号25)。

【0143】

scFv-RG3から得られるRGRGRGRGRGRGGGS (配列番号26)。

【0144】

50

以下の具体例は、説明にすぎず、いかなる方式においてもこの開示以外のものを限定はしないと解されるべきである。詳述はしなくとも、当業者は、本明細書の記載に基づいて、本発明を最大限利用できると思われる。本明細書に引用されるすべての刊行物は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0155】

実施例 1

h145 FabCSA、hOKT3 FabCSAおよびhOKT3 FabCSA763scFvの構築

以下に記載するのは、h145 FabCSAの重鎖のポリペプチド配列（配列番号1）およびそれをコードするcDNA配列（配列番号2）である。h145 FabCSAの重鎖のコーディング領域は、N-からC-末端へ、シグナルペプチド（下線）（配列番号11）、ハムスター抗マウスCD3抗体（145-2C11）由来の重鎖可変領域（太字）（配列番号12）、ヒトIgG₁のC_H₁ドメインおよびヒンジ領域（斜字体）（配列番号16）を含み、そして（GPP）₁₀ コラーゲン様ドメイン（二重下線）（配列番号31）が続くものであった。この合成配列（配列番号2）をオーバーラッピングPCRにより作製した。

【0156】

配列番号1

MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuTrpValProGlySerThrGlyAspGluValGlnLeuGlnGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyLysSerLeuLysLeuSerCysGluAlaSerGlyPheThrPheSerGlyTyrGlyMetHisTrpValArgGlnAlaProGlyArgGlyLeuGluSerValAlaTyrIleThrSerSerSerIleAsnIleLysTyrAlaAspAlaValLysGlyArgPheThrValSerArgAspAsnAlaLysAsnLeuLeuPheLeuGlnMetAsnIleLeuLysSerGluAspThrAlaMetTyrTyrCysAlaArgPheAspTrpAspLysAsnTyrTrpGlyGlnGlyThrMetValThrValSerSerAlaSerThrLysGlyProSerValPheProLeuAlaProSerSerLysSerThrSerGlyGlyThrAlaAlaLeuGlyCysLeuValLysAspTyrPheProGluProValThrValSerTrpAsnSerGlyAlaLeuThrSerGlyValHisThrPheProAlaValLeuGlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerSerValValThrValProSerSerSerLeuGlyThrGlnThrTyrIleCysAsnValAsnHisLysProSerAsnThrLysValAspLysLysValAlaAlaAlaGluProLysSerGlyAspLysThrHisThrCysProProCysProArgSerIleProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGlyIleCysAspProSerLeuCysThrGly

【0157】

配列番号2

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCT
 GGGTTCCAGGTTCCACTGGTGATGAAGTGCAGCTGCAGGA
 GTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAAAGTCCCTGAAA
 CTCTCCTGTGAGGCCTCTGGATTCACCTTCAGCGGCTATG
 GCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGGCTGGA
 GTCGGTCGCATACATTACTAGTAGTAGTATTAATATCAAA
 TATGCTGACGCTGTGAAAGGCCGGTTCACCGTCTCCAGAG
 ACAATGCCAAGA AACTTACTGTTTCTACAAATGAACATTCT
 CAAGTCTGAGGACACAGCCATGTACTACTGTGCAAGATTC
 GACTGGGACAAAAATTACTGGGGCCAAGGAACCATGGTCA
 CCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC
 CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
 GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTCGTGGA AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
 GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGCGGCCGCTGAGCCC
 AAATCTGGTGACAAA AACTCACACATGCCACCCGTGCCAA
 GATCTATTCTGGGCCACCTGGTCCCCCAGGTCCTCCAGG
 ACCCCCAGGGCCCCCAGGCCCCCCCGGGCCGCCTGGACCC
 CCAGGGCCACCAGGCCCCCCAGGCATCTGCGACCCATCAC
 TATGTACCGGTAA

10

20

30

【 0 1 5 8 】

以下に記載するのは、h 1 4 5 F a b C S A の軽鎖のポリペプチド配列（配列番号 3）およびそれをコードする c D N A 配列（配列番号 4）である。h 1 4 5 F a b C S A の軽鎖のコーディング領域は、N - から C - 末端へ、シグナルペプチド（下線）（配列番号 1 1）、ハムスター抗マウス C D 3 抗体（1 4 5 - 2 C 1 1）由来の軽鎖可変領域（太字）（配列番号 1 3）を含み、そしてヒト I g G₁ のカッパ軽鎖定常ドメイン（斜字体）（配列番号 1 7）が続くものであった。この合成配列（配列番号 4）はオーバーラッピング PCR により作製した。

【 0 1 5 9 】

40

配列番号3

MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuT
 rpValProGlySerThrGlyAspAspIleGlnMetThrGln
 nSerProSerSerLeuProAlaSerLeuGlyAspArgVal
 ThrIleAsnCysGlnAlaSerGlnAspIleSerAsnTyrLeu
 AsnTrpTyrGlnGlnLysProGlyLysAlaProLysLeu
 LeuIleTyrTyrThrAsnLysLeuAlaAspGlyValPro
 SerArgPheSerGlySerGlySerGlyArgAspSerSerP
 heThrIleSerSerLeuGluSerGluAspIleGlySerTy
 rTyrCysGlnGlnTyrTyrAsnTyrProTrpThrPheGly
 ProGlyThrLysValGluIleLysArgThrValAlaAlaP
 roSerValPheIlePheProProSerAspGluGlnLeuLy
 sSerGlyThrAlaSerValValCysLeuLeuAsnAsnPhe
 TyrProArgGluAlaLysValGlnTrpLysValAspAsnA
 laLeuGlnSerGlyAsnSerGlnGluSerValThrGluGln
 nAspSerLysAspSerThrTyrSerLeuSerSerThrLeu
 ThrLeuSerLysAlaAspTyrGluLysHisLysValTyrA
 laCysGluValThrHisGlnGlyLeuSerSerProValTh
 rLysSerPheAsnArgGlyGluCys

10

20

【 0 1 6 0 】

配列番号4

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCT
 GGGTTCCAGGTTCCACTGGTGATGACATCCAGATGACCCA
 GTCTCCATCATCACTGCCTGCCTCCCTGGGAGACAGAGTC
 ACTATCAATTGTCAGGCCAGTCAGGACATTAGCAATTATT
 TAAACTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCT
 CCTGATCTATTATACAAATAAATTGGCAGATGGAGTCCCA
 TCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGTTCTGGGAGAGATTCTTCTT
 TCACTATCAGCAGCCTGGAATCCGAAGATATTGGATCTTA
 TTA CTGTCAACAGTATTATAACTATCCGTGGACGTTCCGGA
 CCTGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCAC
 CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
 ATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG
 CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA
 GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
 CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC
 AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

30

40

【 0 1 6 1 】

50

次いで、哺乳類細胞における抗体発現のために、h145FabCSAの重鎖および軽鎖挿入物(inserts)をpSecTag2/Hygro(Invitrogen)由来の二重発現(dual expression)ベクター中にクローニングした。以下に記載するのは、hOKT3FabCSAの重鎖のポリペプチド配列(配列番号5)およびそれをコードするcDNA配列(配列番号6)である。hOKT3FabCSAの重鎖のコーディング領域は、N-からC-末端へ、シグナルペプチド(下線)(配列番号11)、ヒト化ムロモナブ-CD3(オルソクローンOKT3)の重鎖可変領域(太字)(配列番号14)、ヒトIgG₁のC_H₁ドメインおよびヒンジ領域(斜字体)(配列番号16)を含み、そして(GPP)₁₀コラーゲン様ドメイン(二重下線)(配列番号31)が続くものであった。この合成配列(配列番号6)はオーバーラッピングPCRにより作製した。

10

【0162】

配列番号5

MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuT
rpValProGlySerThrGlyAspGlnValGlnLeuValG
 lnSerGlyGlyGlyValValGlnProGlyArgSerLeuA
 rgLeuSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgT
 yrThrMetHisTrpValArgGlnAlaProGlyLysGlyL
 euGluTrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrT
 hrAsnTyrAsnGlnLysValLysAspArgPheThrIleS
 erArgAspAsnSerLysAsnThrAlaPheLeuGlnMetA
 spSerLeuArgProGluAspThrGlyValTyrPheCysA
 laArgTyrTyrAspAspHisTyrCysLeuAspTyrTrpG
 lyGlnGlyThrProValThrValSerSerAlaSerThrL
 ysGlyProSerValPheProLeuAlaProSerSerLysSe
 rThrSerGlyGlyThrAlaAlaLeuGlyCysLeuValLys
 AspTyrPheProGluProValThrValSerTrpAsnSerG
 lyAlaLeuThrSerGlyValHisThrPheProAlaValLe
 uGlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerSerValValThr
 ValProSerSerSerLeuGlyThrGlnThrTyrIleCysA
 snValAsnHisLysProSerAsnThrLysValAspLysLy
 sValGluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysPro
 ProCysProAlaProGluLeuLeuGlyGlyProProGlyP
roProGlyProProGlyProProGlyProProGlyProPr
oGlyProProGlyProProGlyProProGlyProProGly
 IleCysAspProSerLeuCysThrGly

20

30

40

【0163】

配列番号6

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCT
 GGGTTCCAGGTTCCACTGGTGATCAGGTGCAGCTGGTGCA
 GAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCTGGCAGGAGCCTGAGG
 CTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGGTACA
 CCATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGA
 GTGGATCGGCTACATCAACCCTAGCAGGGGCTACACCAAC
 TACAACCAGAAGGTGAAGGACAGGTTTACCATCAGCAGGG
 ACAACAGCAAGAATACCGCCTTCCTGCAGATGGACAGCCT
 GAGGCCTGAGGACACCGGCGTGTACTTCTGCGCCAGGTAC
 TACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCA
 CCCCTGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGTCCATC
 GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
 CCGAACCTGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC
 CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
 CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGAGGGCCACCTGGTCCCCCAGGTCC
 TCCAGGACCCCCAGGGCCCCCAGGCCCCCCCGGGCCGCCT
 GGACCCCCAGGGCCACCAGGCCCCCCCAGGCATCTGCGACC
 CATCACTATGTACCGGTAA

10

20

30

【0164】

以下に記載するのは、hOKT3F**a**bCSAの軽鎖のポリペプチド配列（配列番号7）およびそれをコードするcDNA配列（配列番号8）である。hOKT3F**a**bCSAの軽鎖のコーディング領域は、N-からC-末端へ、シグナルペプチド（下線）（配列番号11）、ヒト化ムロモナブ-CD3（オルソクロンOKT3）の軽鎖可変領域（太字）（配列番号15）を含み、そしてヒトIgG₁のカッパ軽鎖定常ドメイン（斜字体）（配列番号17）が続くものであった。この合成配列（配列番号8）はオーバーラッピングPCRにより作製した。

【0165】

配列番号7

MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuT
 rpValProGlySerThrGlyAspAspIleGlnMetThrG
 lnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGlyAspArgV
 alThrIleThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyrM
 etAsnTrpTyrGlnGlnThrProGlyLysAlaProLysA
 rgTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAlaSerGlyValP
 roSerArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspTyrT
 hrPheThrIleSerSerLeuGlnProGluAspIleAlaT
 hrTyrTyrCysGlnGlnTrpSerSerAsnProPheThrP
 heGlyGlnGlyThrLysLeuGlnIleThrArgThrValA
 laAlaProSerValPheIlePheProProSerAspGluG
 lnLeuLysSerGlyThrAlaSerValValCysLeuLeuAsn
 AsnPheTyrProArgGluAlaLysValGlnTrpLysValA
 spAsnAlaLeuGlnSerGlyAsnSerGlnGluSerValTh
 rGluGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerLeuSerSer
 ThrLeuThrLeuSerLysAlaAspTyrGluLysHisLysV
 alTyrAlaCysGluValThrHisGlnGlyLeuSerSerPr
 oValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCys

10

20

【 0 1 6 6 】

配列番号8

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCT
 GGGTTCCAGGTTCCACTGGTGATGACATCCAGATGACCCA
 GAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTG
 ACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGA
 ACTGGTACCAGCAGACCCCTGGCAAGGCCCTAAGAGGTG
 GATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCCTAGC
 AGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCTTCA
 CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACATCGCCACCTACTA
 CTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCTTTCACCTTCGGCCAG
 GGCACCAAGCTGCAGATCACCCGTACGGTGGCTGCACCAT
 CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
 TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
 CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC
 TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGA
 CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
 GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
 GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

30

40

【 0 1 6 7 】

50

続いて、哺乳類細胞における抗体発現のため、hOKT3FabCSAの上記重鎖および軽鎖挿入物をpSecTag2/Hygro(Invitrogen)由来の二重発現(dual expression)ベクター中にクローニングした。以下に記載するのは、763一本鎖Fv、763scFvのポリペプチド配列(配列番号9)およびそれをコードするcDNA配列(配列番号10)である。763scFvのV_LおよびV_HをコードするcDNAを、公開されたヌクレオチド配列(米国特許第6,235,883号明細書)に基づき、抗EGFRモノクローナル抗体であるパニツムマブ(VECTIBIX(登録商標)、Amgen, Inc.)の対応するcDNAからのプライマーセットを用いてPCR増幅した。V_LおよびV_H鎖と配列番号9中で下線が引かれたグリシンリンカー(GGGGS)₃(配列番号24)とを連結することによって、763のscFv PCR融合を生じさせた。

10

【0168】

抗CD3×EGFR二重特異性抗体、hOKT3FabCSA763scFvを次のようにして生成した。763scFvをコードするcDNA配列を、AgeIおよびBamHI部位におけるhOKT3FabCSAの重鎖のC-末端にインフレームでクローニングして、hOKT3Fabの重鎖からなる重鎖構築体、ヒトIgG₁のヒンジ領域、(GPP)₁₀コラーゲン様ドメイン(配列番号31)を作り、これに763scFvが続いた。次いで、哺乳類細胞における抗体発現のため、上述の重鎖構築体およびhOKT3FabCSAの軽鎖構築体(配列番号8)をpSecTag2/Hygro(Invitrogen)由来の二重発現ベクター中にクローニングした。

20

【0169】

配列番号9

AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSer
 erValGlyAspArgValThrIleThrCysGlnAlaSer
 GlnAspIleSerAsnTyrLeuAsnTrpTyrGlnGlnLysP
 roGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSer
 AsnLeuGluThrGlyValProSerArgPheSerGlySerG
 lySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSerLeu
 GlnProGluAspIleAlaThrTyrPheCysGlnHisPheA
 sphHisLeuProLeuAlaPheGlyGlyGlyThrLysVal
 GluIleLysGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerG
lyGlyGlyGlySerGlnValGlnLeuGlnGluSerGly
 ProGlyLeuValLysProSerGluThrLeuSerLeuThrC
 ysThrValSerGlyGlySerValSerSerGlyAspTyr
 TyrTrpThrTrpIleArgGlnSerProGlyLysGlyLeuG
 luTrpIleGlyHisIleTyrTyrSerGlyAsnThrAsn
 TyrAsnProSerLeuLysSerArgLeuThrIleSerIleA
 spThrSerLysThrGlnPheSerLeuLysLeuSerSer
 ValThrAlaAlaAspThrAlaIleTyrTyrCysValArgA
 spArgValThrGlyAlaPheAspIleTrpGlyGlnGly
 ThrMetValThrValSerSer

30

40

【0170】

配列番号10

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCA
 GCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCCAGGCCAGCCA
 GGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCT
 GGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCAACC
 TGGAGACCGGCGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAG
 CGGCACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCACTTCGACCACC
 TGCCTCTGGCCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA
 GGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGC
 GGATCGCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGG
 TGAAGCCTAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAG
 CGGCGGCAGCGTGAGCAGCGGCGACTACTACTGGACCTGG
 ATCAGGCAGAGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCC
 ACATCTACTACAGCGGCAACACCAACTACAACCCTAGCCT
 GAAGAGCAGGCTGACCATCAGCATCGACACCAGCAAGACC
 CAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACA
 CCGCCATCTACTACTGCGTGAGGGACAGGGTGACCGGCGC
 CTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGC
 AGC

10

20

【0171】

テプリズマブ (teplizumab) (MGA031およびhOKT3-1 (Ala-Ala))とも称される)に類似する構造特徴を有する低Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3 IgG-AAを構築すべく、hOKT3の重鎖および軽鎖の可変領域をpSecTag2/Hygro (Invitrogen)由来ヒトIgG₁発現ベクター中にクローニングし、その中で重鎖定常領域のアミノ酸234および235における野生型ロイシン残基は2つのアラニン残基で置換された。低Fc結合抗マウスCD3抗体-145 IgG-AAを構築すべく、ハムスター抗マウスCD3抗体(145-2C11)の重鎖および軽鎖の可変領域をマウスIgG_{2a}発現ベクター (InvivoGen)中にクローニングし、その中で重鎖定常領域のアミノ酸234および235における野生型ロイシン残基は2つのアラニン残基で置換された。パニツムマブ (Vectibix (登録商標))に類似する構造特徴を有する抗ヒトEGFR抗体-763 IgGを構築すべく、パニツムマブの重鎖および軽鎖の可変領域をpSecTag2/Hygro (Invitrogen)由来ヒトIgG₂発現ベクター中にクローニングした。

30

40

【0172】

実施例2

h145 FabCSA、145 IgG-AA、hOKT3 FabCSA、hOKT3 IgG-AA、763 IgGおよびhOKT3 FabCSA 763 scFvの発現および精製

h145 FabCSA、145 IgG-AAおよびhOKT3 IgG-AAの発現構築体 (expression constructs)を用いて、Effectene (Qiagen)のメーカーの使用説明書にしたがってマウス骨髄腫NS0細胞 (European Collection of Animal Cell Cultures, Wiltshire, UK)にトランスフェクトした。ハイグロマイシB (400 μg/m

50

1) による選択の後、安定なクローンを振とうフラスコ内で、初期播種密度 5×10^5 cells/ml とし、化学的組成の明らかな培地 (chemically-defined medium) である HyQCDM4NS0 (Hyclone) で培養した。その培養物を 5 日間 37 °C で 130 rpm に維持した。Amamax Nucleofector デバイス (Amamax, Inc., Gaithersburg, Md.) を使用し、メーカーの使用説明書にしたがって、エレクトロポレーションにより、hOKT3 FabCSA、hOKT3 FabCSA763 scFv、および 763 IgG の発現構築体を用いて CHO-S 細胞 (Life Technologies Corporation) にそれぞれトランスフェクトした。ハイグロマイシン B ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$) による選択の後、安定なクローンを振とうフラスコ内で、初期播種密度 3×10^5 cells/ml とし、化学的組成の明らかな培地である CD OptiCHO (登録商標) (Life Technology) で培養した。その培養物を 12 日間 37 °C で 130 rpm に維持した。グルコース溶液 $30 \text{ mg}/\text{ml}$ の添加によりグルコースを $2 \text{ mg}/\text{L}$ にコントロールした。

10

【0173】

h145 FabCSA、hOKT3 FabCSA および hOKT3 FabCSA763 scFv を精製すべく、ろ過した培地各々約 1 L を、流速 $60 \text{ ml}/\text{h}$ で、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 (0.01 M のリン酸バッファー、 0.0027 M の KCl、 0.14 M の NaCl) で平衡化した Kappa Select カラム (ベッドボリュームで 5 ml 、GE Healthcare) に加えた。同じバッファーで洗浄した後、それら組み換え抗体をリン酸ナトリウムバッファー 50 mM 、pH 2.5 で溶出した。UV 吸光度を 280 nm でモニターし、ピーク画分を集め、重炭酸ナトリウム 1.0 M で中和して pH 7.5 にした。次いで、中和されたサンプルを、UltraCel-30 膜を備える Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA) を用い限外ろ過により濃縮した。5 ミリリットルの濃縮液を、線流速 $1.5 \text{ ml}/\text{min}$ で、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 で平衡化した HiLoad 16/600 Superdex 200 カラム (GE Healthcare) にかけた。

20

【0174】

h145 IgG-AA、hOKT3 IgG-AA、および 763 IgG を精製すべく、ろ過した培地各々約 1 L を、流速 $60 \text{ ml}/\text{h}$ で、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 (0.01 M のリン酸バッファー、 0.0027 M の KCl、 0.14 M の NaCl) で平衡化した HiTrap Protein A HP カラム (ベッドボリュームで 5 ml 、GE Healthcare) に加えた。同じバッファーで洗浄した後、それら組み換え抗体をリン酸ナトリウムバッファー 50 mM 、pH 2.5 で溶出した。UV 吸光度を 280 nm でモニターし、ピーク画分を集め、重炭酸ナトリウム 1.0 M で中和して pH 7.5 にした。中和されたサンプルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 に対して透析した。

30

【0175】

MES をランニングバッファー (Invitrogen, San Diego, CA) とし 4 ~ 12% いずれかの NuPAGE ビス-トリスポリアクリルアミドゲルを用い、SDS-PAGE を行った。Instant Blue (Expedeon, Cambridge, UK) でタンパク質を染色した。Bench Mark (Invitrogen, San Diego, CA) を分子量スタンダードとして用いた。

40

【0176】

結果: h145 FabCSA のクロマトグラフィーおよび構造的な特性評価

図 2 は、本発明の実施形態に基づいた、Kappa Select および Superdex 200 カラムでの連続クロマトグラフィーによって培地から精製した h145 FabCSA 分子の構造的な特性評価を示している。(A) ゲルろ過による h145 FabCSA

50

種の分離。Kappa Selectカラムから溶出したサンプルを濃縮し、PBS (pH 7.4) で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラムにロードした。(B)それぞれ異なるピーク画分(A中、ピーク1から3に番号が付されている)およびサンプル負荷を、非還元(レーン2、4、6、および8)、ならびにサンプルをDTT 50 mMで75 10分処理した還元(レーン3、5、7、および9)条件下、SDS-PAGEにより分析した。(C) Bに示されるSDS-PAGEにより分離された種に対応する構造の略図。

【0177】

これら結果は、本発明のコラーゲン様ペプチドが抗マウスCD3 Fdフラグメントを三量体化させる能力を持ち、かつ完全Fabフラグメントが真核細胞内で会合し、安定な三量体として分泌され得ることを証明した。

10

【0178】

結果：hOKT3 Fab CSAのクロマトグラフィーおよび構造的 특성評価

図3は、本発明の実施形態に基づいた、Superdexクロマトグラフィーにより単離したhOKT3 Fab CSA分子の構造的 特性評価を示している。Kappa Selectカラムから溶出したサンプルを濃縮し、PBS (pH 7.4) で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラムにロードした。上方右側のパネル：非還元条件下SDS-PAGEにより異なるピーク画分(ピーク1から3に番号が付されている)を分析した。ピーク2はhOKT3 Fab CSA三量体を含む主画分であり、一方ピーク3の画分は単量体を含む。ピーク1に示される主要な上方のバンドは、三量体の鎖間ジスルフィド結合された二量体であると思われる。

20

【0179】

この場合も同様に、これら結果は、本発明のコラーゲン様ペプチドが抗ヒトCD3 Fdフラグメントを三量体化させる能力を持ち、かつ完全Fabフラグメントが真核細胞内で会合し、安定な三量体として分泌され得ることを証明した。

【0180】

結果：SDS-PAGEによるhOKT3 Fab CSA三量体、hOKT3 IgG-AA、およびOKT3の純度分析

図4は、非還元(レーン2、3および4)、ならびにサンプルをDTT 50 mMで75 10分処理した還元(レーン5、6および7)条件下での、図3におけるピーク2画分からのhOKT3 Fab CSA、低Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3 IgG-AA、およびOKT3抗体のSDS-PAGEによる純度分析を示している。等量のタンパク質を含む全てのサンプルを、ランニングバッファーとしてMESを用い4~12% SDS/Bis-Trisポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。Instant Blue Protein Stain液でゲルを染色した。M, BenchMark(登録商標)分子量スタンダード。

30

【0181】

非還元条件下、hOKT3 Fab CSAの主要バンドがジスルフィド結合したFab三量体として現れ(レーン2)、一方、変性条件下で非ジスルフィド結合Fd-Csおよび軽鎖が分離されていた(レーン5)。hOKT3 IgG-AAおよびOKT3抗体は、通常のIgG₁の形式となっており、2つの重鎖および2つの軽鎖を含んでいる(非還元条件下のレーン3および4、還元条件下のレーン6および7)。

40

【0182】

実施例3

CD3結合活性の決定

ネガティブセレクション用のPan T cell isolation Kit(Miltenyi Biotec, CA)により、メーカーの使用説明書にしたがってPBMcからヒトT細胞(1×10^6 / ml)を単離した。それら細胞をFcブロッカー($2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、eBioscience, CA)により4 で30分処理してから、精製した低Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3 IgG-AA、hOKT3 Fab CSA三量

50

体および単量体の段階希釈液と共に4で30分培養した。洗浄後、それら細胞をヤギ抗ヒトIgG(H+L)-Alexa Fluor 647(Invitrogen)で4で30分間染色し、フローサイトメトリーにより抗体のT細胞への結合を検出し、平均蛍光強度(MFI)として示した。図5に示されるように、三量体hOKT3 FabCSA(計算された $K_D = 0.02$ nM)は、二価の対応物(counterpart)、hOKT3 IgG-AA(計算された $K_D = 0.15$ nM)よりも7.5倍大きいヒトTリンパ球への結合強度を示した。一価形態のhOKT3 FabCSAは、弱く、有意でないCD3+ヒトT細胞への結合親和力を示した。

【0183】

145-2C11ハムスターIgGと比較した、精製したh145 FabCSA三量体のマウス脾臓Tリンパ球への結合親和力を決定するのにも、この実験を行った(図6)。この場合も同様に、三量体145 FabCSA(計算された $K_D = 4$ nM)は、親(parental)ハムスターIgG、145-2C11(計算された $K_D = 15$ nM)より3.75倍大きいマウスTリンパ球への結合強度を示した。

【0184】

実施例4

競合置換結合(Competitive displacement binding)アッセイ

OKT3およびhOKT3 FabCSAはCD3鎖上の同じエピトープを認識するため、hOKT3 FabCSAはOKT3のT細胞への結合を競合的に阻害することができる。ヒトT細胞の細胞表面におけるCD3分子への結合についてのhOKT3 FabCSAおよびOKT3の活性を、飽和濃度のフルオレセインコンジュゲートOKT3をコンペティターとして、抗体置換アッセイを用いフローサイトメトリー分析により比較した。下記の手順は全て4で行った。CD3(+)ジャーカットT細胞、クローンE6-1(ATCC番号TIB-152)を、細胞の総数 1×10^6 で、0.1 mlの染色バッファー(2%ウシ胎仔血清および0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水)中に懸濁させた。それら細胞をhOKT3 FabCSAまたはOKT3 IgGの段階希釈液と共に1時間培養した。固定された、飽和量(0.25 μ g/ml、フローサイトメトリーにより決定)のFITCコンジュゲートOKT3(eBioscience, San Diego, CA)を直接添加した。1時間の培養後、それら細胞を染色バッファーで洗浄し、FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)システムでフローサイトメトリーを行うことにより免疫蛍光を分析した。そのデータは最大蛍光強度の阻害率(percent inhibition)として示され、それはブロッキングmAbの非存在下T細胞をOKT3-FITCで染色することにより得られた平均蛍光強度として定義されるものである。最大蛍光強度の半分(IC_{50})を阻害するのに要される各mAbの濃度を計算した。

【0185】

IC_{50} 値の比較によって、ジャーカットT細胞を用い同じ阻害効果を達成するのに、OKT3はhOKT3 FabCSAよりおよそ2倍高い濃度を必要とすることが示された(図7、2つの独立した実験が示されている)。これらの結果は、アビディティー効果のために、ヒト化三価hOKT3 FabCSAが、その親マウスIgG形(parental murine IgG form)、OKT3よりも結合強度が強いことを示した。

【0186】

実施例5

T細胞増殖

T細胞活性化におけるOKT3、hOKT3 IgG-AAおよびhOKT3 FabCSAを比較する試験を、細胞増殖アッセイにより行った。3人の健常なドナーから採取したヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、10%FBSを含むRPMI-1640培地100 μ l中に 2×10^5 cells/wellで黒色96ウェル平底組織培養プレートにOKT3(eBioscience, Inc.)、hOKT3 IgG-AAおよびhOKT3

10

20

30

40

50

F a b C S A の 10 倍段階希釈液の存在下播種し、37 で66時間置いた。続いて、細胞をさらに6時間BrdU 10 μMでパルスした。培地を除去した後、細胞を固定し、DNAをFix Denat (Roche Applied Science, Indianapolis IN)を用い1ステップで変性させた。その後、細胞をペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体(抗BrdU POD、Fabフラグメント)と共に1.5時間、室温で培養した。マイクロプレートルミノメーター(Hidex, CHAMELEON detection platform, Finland)を用いて化学発光検出および定量を行った。図8に示される各ポイントは3人のドナーの平均±標準偏差を表している。

【0187】

図8における結果は、OKT3が、非常に低い濃度のときでさえ、T細胞増殖を有意に誘導したことを示した。低Fc結合hOKT3 IgG-AAもまた、誘導作用が弱いものであるが、比較的高い抗体濃度でT細胞増殖を誘導した。これらの結果は、Liらによって先に出版された著作物(Li, J., J. Davis, et al., (2006). "Modulation of antigen-specific T cell response by a non-mitogenic anti-CD3 antibody." Int Immunopharmacol 6(6): 880-891. (非特許文献49))と一致している。一方、hOKT3 FabCSAにより誘導された検出可能なT細胞増殖はなかった。よって、非FcのhOKT3 FabCSA三量体は、異なる抗CD3抗体形式の中で最も弱いT細胞増殖の誘導物質(inducer)である。

【0188】

実施例6

サイトカイン測定

3人の健常なドナー由来のヒトPBMCを、OKT3、hOKT3 IgG-AAおよびhOKT3 FabCSAの10倍段階希釈液の存在下、10%FBSを含むRPMI-1640培地0.1ml中に 2×10^5 cells/wellで37 で播種した。培養上清中のIL-2および残りのサイトカイン(IL-1、IL-6、IL-10、およびIFN-)のレベルを、ヒトサイトカイン免疫測定キット(eBioscience, Inc.)を用い、24および72時間の時点でそれぞれ測定した。

【0189】

マウスOKT3の細胞分裂活性(mitogenic activity)は、FcR-ポジティブ細胞への結合を介した広範囲のT細胞受容体(TCR)-CD3の架橋結合によって生じる。よって近年、Fc受容体への結合を変えることにより抗CD3の細胞分裂を促進しない形態(non-mitogenic forms)を開発する試みがなされている。OKT3、hOKT3 IgG-AAおよび三量体hOKT3 FabCSAのサイトカイン(IL-1、IL-2、IL-6、IL-10、およびIFN-)を誘導する能力を測定した。予期したように、OKT3 IgGは非常に少ない用量でサイトカイン産生を著しく誘導した。テプリズマブ(teplizumab)(MGA031およびhOKT3-1(A1a-A1a)とも称される)に類似する構造特徴を有する低Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3 IgG-AAもまた、作用は弱いものの、比較的高い抗体濃度でサイトカイン産生を誘導した。これらの結果は、Liによって先に出版された著作物(Li, J., J. Davis et al., (2006)(非特許文献49))と一致している。一方、三量体hOKT3 FabCSAは、100 μg/mlまでの濃度において検出可能なIL-2およびIFN-を誘導しない。hOKT3 IgG-AAと比べ、hOKT3 FabCSAの10 μg/ml以上の濃度におけるIL-1、IL-6、およびIL-10の誘導レベルはより低かった。これら結果は、hOKT3 FabCSAが、異なる抗CD3抗体形式の中で最も弱い細胞分裂促進であることを示した(図9)。

【0190】

実施例7

10

20

30

40

50

混合リンパ球反応 (MLR)

一方向混合リンパ球反応における免疫抑制を次のように評価した。ヒトPBM Cを2人の健康ドナーから得た(ステイミュレーターおよびレスポンダー)。ステイミュレーターまたはレスポンダー細胞を完全培地(10%ヒトAB血清、2mMグルタミン、50nM 2-メルカプトエタノール、ならびにペニシリンおよびストレプトマイシン各100units/mlが添加されたRPMI 1640)中にてマイトマイシンC(Sigma-Aldrich)25μg/mlで、5%CO₂を含有する加湿空気中において30分37で処理し、続いてRPMI 1640培地中で3回洗浄した。レスポンダー細胞を単独で、またはマイトマイシンCで処理したステイミュレーターもしくはマイトマイシンCレスポンダー細胞と1:1の割合で混合し、 2×10^5 cells/wellで完全培地200μl中で培養した。レスポンダー細胞の播種後速やかに、精製したhOKT3FabcSA三量体、hOKT3IgG-AA、またはOKT3を異なる濃度で培養物に加えた。5日後、培養細胞をBrdU10μMでパルスし、24時間後に回収した。5-プロモモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)細胞増殖アッセイを行った。培地を除去した後、細胞を固定し、FixDenatを用い1ステップでDNAを変性させた。その後、細胞をペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体(抗BrdU POD、Fabフラグメント)と共に1.5時間室温で培養した。マイクロプレートルミノメーター(Hidex, CHAMELEON detection platform, Finland)を用いて化学発光検出および定量化を行った。

【0191】

三量体hOKT3FabcSAが、CD3(+)T細胞に対する結合アビディティーの増大により、親(parental)OKT抗体および低Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3IgG-AAを上回る免疫抑制活性を示し得るか否かを判定するため、一方向混合リンパ球反応(MLR)におけるT細胞分裂活性化について抗体の試験を行った。抗体処理をせずに5日間培養した混合PBM C培養物(マイトマイシンCで処理したステイミュレーター+レスポンダー)中で、混合リンパ球反応(MLR)がT細胞活性化の同種刺激の結果として生じた(図10、黒四角)。混合PBM C培養物をOKTで処理すると、0.1から1.0ng/mlの低い濃度レベルでT細胞増殖が刺激された(図10、黒丸)。抗体濃度が10ng/mlより高くなると、OKT3の免疫抑制は有意となる。低Fc結合抗ヒトCD3抗体-hOKT3IgG-AAは有意なT細胞活性化の抑制を示さなかった(図10、白四角)。これとは対照的に、MLRにおけるhOKT3FabcSA三量体の作用(potency)は有意なものであり、0.1ng/mlの濃度でバックグラウンドレベルに達した(図10、白三角)。これらの結果は、三量体hOKT3FabcSAがインビトロで分裂促進性の低下を示すと同時に、T細胞増殖の強力な免疫抑制剤であることを示した。

【0192】

実施例8

T細胞受容体(TCR)調節

健康ドナー由来のPBM Cを 2×10^6 cells/wellで24ウェルプレート(Nunc)中に播種し、10%FCSを含むRPMI 1640中で様々な量のhOKT3FabcSA(三量体)、hOKT3IgG-AA(二量体)、およびhOKT3FabcSA(単量体)と共に培養した。24時間培養した後、細胞を回収し、FITCコンジュゲートOKT3または抗TCR / mAb IP26(eBioscience)で染色した。染色した細胞を、T細胞に対し、フィコエリトリンコンジュゲート抗CD5 mAb UCHT2(eBioscience)で対比染色し、フローサイトメトリーで分析した。CD3調節およびコーティングの計算を先に記載されたように行った(Cole, M.S., C. Anasetti et al., (1997). "Human IgG₂ variants of chimeric anti-CD3 are non-mitogenic to T cells." J Immunol 159(7): 3613-3621. (非特許文献50))。

【 0 1 9 3 】

【 数 1 】

$$\% \text{CD3 調節} = 100 \times \frac{\text{対照細胞 F抗TCR} - \text{抗体処理細胞 F抗TCR}}{\text{対照細胞 F抗TCR}}$$

$$\% \text{CD3 コーティング} = 100 \times \frac{\text{抗体処理細胞 F抗TCR}}{\text{対照細胞 F抗TCR}} - \frac{\text{抗体処理細胞 FOKT3}}{\text{対照細胞 FOKT3}}$$

ここで、Fは染色した細胞の平均蛍光を表す。

10

【 0 1 9 4 】

図 1 1 において、三価 h O K T 3 F a b C S A により達成される T C R - C D 3 複合体の調節およびコーティングの組み合わせは、0 . 1 n g / m l から 1 0 μ g / m l の抗体濃度において、低 F c 結合抗ヒト C D 3 抗体 - h O K T 3 I g G - A A よりも大きい。T C R に対する低い架橋活性のために、一価 h O K T 3 F a b C S A は、対応する各濃度において、はるかに低い T C R コーティングおよび調節を示した。これら結果は、三量体 h O K T 3 F a b C S A の結合強度の改善が T C R 調節の程度の向上をもたらすことを証明した。

【 0 1 9 5 】

実施例 9

20

薬物動態アッセイ (P h a r m a c o k i n e t i c a s s a y s)

h 1 4 5 F a b C S A 血中クリアランスを評価するため、雄性 B A L B / c マウス 1 5 匹 (無作為に 5 つのグループに分けた) に、単回投与量レベル (s i n g l e d o s e l e v e l) 2 5 μ g / マウス、投与容積 (d o s e v o l u m e) 0 . 1 m l / マウスで、精製した h 1 4 5 F a b C S A 三量体を静脈内投与した。0、2、5、15、30分、1、2、4、6、8、24、48、72、および96時間の時点で順次マウスから血液 (1 0 0 μ l / マウス) を採取し、E D T A でコートしたチューブへ移した。E L I S A を用い、各時点の血漿サンプル中の残存 h 1 4 5 F a b C S A を、h 1 4 5 F a b C S A 標準物質の段階希釈の標準曲線への内挿によって定量化した。抗ヒト F d および西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒトカップ軽鎖をそれぞれ捕捉および検出抗体として用いた。3、3'、5、5'、-テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質として用いた。マウスにおける h 1 4 5 F a b C S A の薬学動態プロファイルが図 1 2 に示されている。

30

【 0 1 9 6 】

非コンパートメントモデルの動態 (K i n e t i c s) を決定した。血漿中の免疫反応性濃度は二相性を示して低下し、最終消失相半減期 (t e r m i n a l e l i m i n a t i o n p h a s e h a l f - l i f e) (t _{1/2}) は 8 . 8 5 時間であった。

【 0 1 9 7 】

実施例 1 0

生体内分布

40

精製した h 1 4 5 F a b C S A 三量体をヨード - 1 3 1 で放射性標識し、雄性 B A L B / c マウス 3 0 匹における ¹³¹I - h 1 4 5 F a b C S A の生体内分布を評価した。5 匹のマウスのグループに h 1 4 5 F a b C S A を静脈内投与した (比放射能 : 1 . 2 μ C i / μ g ; 3 0 μ C i / マウス) 。 h 1 4 5 F a b C S A の分析の時点は、0 . 5、1、2、6、24、および48時間とした。これら選択された時点に安楽死させ、組織のグラム当たりの注入用量のパーセント (% I D / g) を決定した。¹³¹I - h 1 4 5 F a b C S A 三量体は48時間までに急速な血中クリアランスを示し、大部分が除去された (表 1) 。しかしながら、¹³¹I - h 1 4 5 F a b C S A は脾臓内局在を示し、0 . 5 時間で 3 3 . 7 6 ± 1 . 5 6 % I D / g、24 時間で最大の 4 2 . 0 9 ± 1 . 6 4 % I D / g に達した。

50

【 0 1 9 8 】

【 表 2 】

表2 BALB/cマウスにおける¹³¹I-h 1 4 5 F a b C S A三量体の生体内分布

器官	0.5時間	1時間	2時間	6時間	24時間	48時間
全血	167.21±10.4	151.21±3.43	119.32±1.95	68.12±1.06	15.29±0.54	2.77±0.22
脳	3.50±0.29	3.67±0.19	2.66±0.10	1.72±0.15	0.53±0.06	0.12±0.01
胸腺	9.22±0.84	8.41±0.80	6.94±0.90	9.23±0.57	4.69±0.46	2.84±0.40
筋肉	8.45±1.08	7.24±0.55	7.72±1.35	5.70±0.57	2.91±0.44	1.39±0.11
骨	31.84±3.27	29.79±1.97	28.58±1.83	26.33±1.60	25.42±2.88	8.82±0.88
心臓	27.02±1.90	23.62±0.68	20.60±0.90	16.13±0.38	8.09±0.46	4.90±0.30
肺	59.65±5.71	55.33±5.36	45.41±3.66	28.73±2.84	7.76±0.34	4.13±0.72
肝臓	24.81±2.58	21.64±0.40	23.04±1.23	22.67±1.19	15.09±1.00	9.12±0.77
腎臓	38.16±2.31	37.14±1.13	32.41±1.32	25.85±0.70	10.61±1.00	5.89±0.35
大腸	7.78±0.43	6.56±1.03	10.48±2.26	17.72±6.60	5.44±0.56	3.62±0.34
小腸	23.42±3.63	30.59±2.71	51.28±2.59	46.45±3.93	18.99±2.62	13.87±1.52
脾臓	33.76±1.56	38.82±0.52	37.14±0.91	42.09±1.64	40.23±1.44	37.87±2.15
胃	8.25±0.73	7.52±0.39	9.12±0.55	13.36±0.98	6.63±0.74	3.58±0.32
精巣	5.74±0.62	7.38±0.36	8.32±0.36	10.63±0.30	6.80±0.57	4.77±0.21
膀胱	8.59±1.25	10.42±1.26	9.01±0.66	11.17±0.26	7.35±0.55	4.14±0.15

注：器官の取り込みはグラム当たりの注入用量のパーセント (%ID/g) として表され

ている。

【 0 1 9 9 】

実施例 1 1

実験的自己免疫性脳脊髄炎マウス疾患モデル

実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) は、広く用いられている多発性硬化症のマウスモデルである。この試験では、まひの調節に対する h 1 4 5 F a b C S A の治療効果を調べるために、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 誘導マウス EAE を用いた。6 から 8 週齢の雌性 C 5 7 B L / 6 マウス (National Laboratory Animal Center, Taiwan) に、ヒト型結核菌 H 3 7 R A 5 0 0 μg を含有する完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant) 内のエマルジョン 2 0 0 μL 中の MOG (3 5 - 5 5) 2 0 0 μg を皮下免疫した。免疫した直後に、百日咳毒素 5 0 0 n g をマウスに腹腔内投与し、4 8 時間後に再度投与した。次の基準を用いて臨床 EAE スコアを評価した。0 = 無症状、0 . 5 = 遠位部の虚弱 (distal weak) または尾の痙攣 (spastic tail)、1 = 尾の完全な下垂 (completely limp tail)、1 . 5 = 尾の下垂および後肢虚弱 (hindlimb weakness) (ケージの格子から足が滑り出る)、2 . 0 = 片側の部分的な後肢まひ (unilateral partial hindlimb paralysis)、2 . 5 = 両側の部分的な後肢まひ (bilateral partial hindlimb paralysis)、3 . 0 = 完全な両側の後肢まひ (complete lateral hindlimb paralysis)、3 . 5 = 完全な後肢および片側の部分的な前肢まひ (complete hindlimb and unilateral partial forelimb paralysis)、4 . 0 = 瀕死状態 (moribund) ならびに 5 = 死亡。全部で 4 0 匹のマウスを、マウス 1 0 匹ずつ 4 つのグループ (溶媒: ハムスター Ig G アイソタイプ対照、治療: 1 4 5 - 2 C 1 1 Ig G および h 1 4 5 F a b C S A (三量体)、ならびに陽性対照: インターフェロン - 1 a) のそれぞれに割り当てた。治療は EAE の最初の臨床兆候が発症した時に開始し、まひの調節に対する異なる被験物質の効果を試験した。溶媒、1 4 5 - 2 C 1 1 Ig G および h 1 4 5 F a b C S A のグループでは、連続 5 日間 1 日 1 回、それぞれ投与量レベル 1 . 0、0 . 1 および 1 . 0 μg / マウスでマウスに静脈注射した。インターフェロン - 1 a のグループでは、全治療期間にわたり 1 日 1 回、投与量レベル 1 0 , 0 0 0 ユニット / マウスでマウスに腹腔内注射をした。

【0200】

初めに、0.2 μg / マウスをこえる投与量レベルで145-2C-11 IgG治療したEAEマウスは、治療後1日で死亡率が50%になった。巨視的解剖観察 (Gross necropsy observation) によって、全ての死亡マウスに、深刻な無制御の全身炎症反応 (major systemic uncontrolled inflammatory response) またはサイトカインストームを示す、脾腫があったことがわかった。よって、145-2C-11グループの実験投与量レベルを1マウス当たり0.1 μgに減らした。三量体145 FabCSAのグループでは、投与量レベル1.0 μg / マウスで治療を行った。これらの結果は、三量体h145 FabCSAが、免疫付与の全ての段階で比較的低いレベルのまひを生じさせることを示した (図13A参照)。詳細に言うと、h145 FabCSAで治療したマウスは、145-2C-11 IgGで治療したマウスまたは対照治療グループに比してより程度の低いまひを示し、h145 FabCSA治療グループと145-2C-11 IgG治療グループの間で統計的により低いまひを示した。最終的に、未治療グループが完全な両側の後肢まひと同程度に重症な症状を示したのに対し、h145 FabCSA治療グループにより示された最高レベルのまひは片側の後肢まひ (つまり臨床基準2) よりも重くないものであった。

10

【0201】

制御性T (Treg) 細胞の誘導は、自己免疫疾患の免疫療法における主要な目的の一つである。経口投与されるCD3特異抗体についての過去の研究は、CD4+CD25-LAP+Treg細胞が誘導されたことを証明している (Ochi et al., (2006) "Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+CD25-LAP+ T cells." Nat Med 12(6): 627-635 (非特許文献51))。h145-2C-11 IgGおよび三量体h145 FabCSA治療後のEAEマウスにおけるTreg集団の比較を行った。最後の静脈注射の1日後、溶媒 (ハムスター対照IgG)、145-2C-11 IgGおよび三量体h145 FabCSAグループの各々から3匹のマウスの脾臓リンパ細胞を個別に準備し、次いでフローサイトメリーのためにLAP-APCおよびCD4-FITCで染色した。脾細胞を、フローサイトメリーのためにLAP-APCおよびCD4-FITCで染色した。Treg集団の決定は、LAP+細胞にゲートをかけた。

20

30

【0202】

これら結果は、h145 FabCSA治療後、CD4+LAP+T細胞集団が、アイソタイプIgG対照および145-2C-11グループと比べて増加したことを示した (図13B参照)。特に、h145 FabCSA治療グループでは、CD8+LAP+T細胞を示し得る、CD4-LAP+T細胞集団も増加した。

【0203】

実施例12

マウスモデルにおける全身性エリテマトーデス (SLE)

自然発症紅斑性狼瘡 (spontaneously developed lupus) に罹患したNZB/W F1マウスに対する145-2C-11 IgGおよびh145 FabCSA三量体の抗CD3抗体の治療効果を調べた。自然紅斑性狼瘡 (spontaneous lupus) を発症した約6週齢の雌性NZB/W F1マウスを、12週間にわたって隔週ごと5日間6コース、静脈注射により5 μgのアイソタイプIgG対照、145-2C-11 IgGまたはh145 FabCSA (三量体) で治療した。図14Aに示されるように、h145 FabCSAで治療したマウスはアイソタイプIgG対照で治療したマウスよりも長期間生存し、145-2C-11およびアイソタイプIgG対照に比べ、三量体h145 FabCSAがSLEマウスモデルの治療においてより効果的であることが示された。

40

【0204】

実施例13

50

二本鎖 (dsDNA) に対するマウス血清抗体の測定

紅斑性狼瘡が活動性のときは、大量の血清抗 dsDNA 抗体が存在する。よって、抗 dsDNA 自己抗体試験によって、SLE マウスモデルにおける疾患の進行を測定した。抗 dsDNA 自己抗体の検出のために、上述した治療グループからのマウス血清の ELISA を次のように測定した。96 ウェルポリスチレン ELISA プレートにウシ血清由来メチル化ウシアルブミン (Sigma) 50 μ l (蒸留水中で 50 μ g/ml) を塗布し、37 °C で 1 時間培養した。次いで、dsDNA 50 μ l (10 μ g/ml) を PBS 中に加える前に、リン酸緩衝生理食塩水で各ウェルを 3 回洗浄した。dsDNA は、S1ヌクレアーゼ (Sigma) 1 U/mg でウシ胸腺 DNA (Sigma) を 30 分 37 °C で処理することによりを準備した。4 °C で一晩培養した後、プレートを PBS で 4 回洗浄した。そして非特異的結合が生じないようにこれらを 2% BSA 100 μ l (Sigma) の入った PBS で処理し、1 時間 37 °C で培養してから、0.05% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) (Sigma) で 5 回洗浄した。試験血清サンプルを PBS-T で 80 0 倍希釈し、50 μ l のアリコートウェルに 2 連で (in duplicate) 加えた。1 時間 37 °C で培養した後、プレートを PBS-T で 6 回洗浄した。全 IgG 抗体の検出のため、5000 倍希釈した HRP コンジュゲートラット抗マウス抗体 (BD Biosciences) 50 μ l / ウェルを加え、37 °C で 1 時間培養した。PBS-T で 7 回洗浄した後、テトラメチルベンゼン (Sigma-Aldrich) が 1 mg/ml で入ったクエン酸リン酸緩衝液 100 μ l / ウェルで反応を起こし、1 N HCl 50 μ l / ウェルを加えることにより停止させた。ELISA リーダーにより 450 nm での吸光度を測定した。

【0205】

図 14B に示されるように、h145 FabCSA 治療マウスにおける抗 dsDNA 自己抗体のレベルは、対照のアイソタイプ IgG グループにおけるそれに比べて有意に低く、145-2C11 IgG で治療した動物の大部分に比べても低いようであった。これらの結果は、三量体 h145 FabCSA が SLE マウスモデルの治療において有効であり、治療の時間的経過を通して疾患の進行はなかったことを示した。

【0206】

実施例 14

インビボでの前炎症性サイトカイン分析

すでに抗マウス CD3 抗体、145-2C11 の投与は、T 細胞増殖および IL-2、IFN γ 、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 および IL17A を含む特定のサイトカインの誘導と関連付けられている。単回用量 50 μ g の異なる抗 CD3 抗体の静脈注射後におけるマウスの血清前炎症性サイトカインレベルについての経時的試験 (time course study) を行って、非 Fc の h145 FabCSA (三量体) が非細胞分裂促進性 (non-mitogenicity) を伴う治療効果に有用かを評価した。マウスをグループ分けし、50 μ g の精製した 145-2C11 IgG (淡い灰色の四角)、低 Fc 結合抗マウス CD3 抗体-145 IgG-AA (濃い灰色の四角)、または h145 FabCSA 三量体 (白四角) を静脈内投与した。血液 (100 μ l / マウス) を 0 (プレブリード)、0.5、24、および 144 時間の時点で採取した。ELISA を使ってサイトカインのレベルを測定した。各ポイントは、3 種のウェルの平均 \pm 標準偏差を表している。PBS (黒四角) を対照として用いた。

【0207】

結果が図 15 に示されている。予期どおりに、145-2C11 グループにおいて最も多くのサイトカインが有意に産生された。低 Fc 結合の 145 IgG-AA は、IL-2、TNF α 、IL-6、および IL-10 の中程度の一時的な誘導をもたらす。非 Fc の h145 FabCSA (三量体) の投与は、無視できるレベルのサイトカイン誘導を示した。これらの結果は、最初の注射の後に三量体 h145 FabCSA はインビボでサイトカイン産生を誘導しないということを示した。

【0208】

10

20

30

40

50

実施例 15

三価二重特異性抗CD3×EGFR抗体、hOKT3FabCSA763scFvのクロマトグラフィーおよび構造特性評価

本発明の多価抗体フラグメントは、どちらか一方の末端におけるコラーゲンスキャホールド(scaffolds)による2つの異なる抗体フラグメントの融合によって二重特異性抗体を作るのに特に適している。三価二重特異性抗CD3×EGFR抗体、hOKT3FabCSA763scFvは、CD3およびEGFRの両方を標的とするものであり、そのようなモダリティ(modality)の使用を実証するために創出された。図16は、非単一(A)または単一安定クローン(B)由来のhOKT3FabCSA763scFv分子の構造的な特性評価を示している。各培地をKappaSelectおよびSuperdex 200カラムでの連続クロマトグラフィーによって精製した。(A)ゲルろ過による非単一クローン由来のhOKT3FabCSA763scFv種の分離。上方右側のパネル：それぞれ異なるピーク画分(ピーク1から3に番号を付してある)を、非還元条件下SDS-PAGEで分析した。ジスルフィド結合三量体(T)、非ジスルフィド結合三量体(Mt)、および単量体(Mm)の構造が示されている。(B)ゲルろ過による安定クローン由来のhOKT3FabCSA763scFv種の分離。ピーク画分を非還元条件下SDS-PAGEで分析した。ジスルフィド結合三量体(T)および非ジスルフィド結合三量体(Mt)の構造が示されている。

【0209】

これら結果により、真核細胞の発現系において、本発明のコラーゲン様ペプチドがN-末端のFdフラグメントおよびC-末端のscFvフラグメントを同時に三量体化する能力を持つことが実証された。さらに、軽鎖は三量体化されたポリペプチド鎖のFd部分と会合し、図1Bに示される構造形式を有する完全Fab三量体を形成することができる。

【0210】

実施例 16

EGFR(+)およびCD3(+)細胞に対する三量体二重特異性抗体-hOKT3FabCSA763scFvの結合特異性

各抗原へのhOKT3FabCSA763scFvの結合をフローサイトメトリーで確認した。A431、WiDr、およびHCT116細胞(EGFRポジティブ)およびジャーカットT細胞(CD3ポジティブ、図17)で強い反応度が観察された。

【0211】

実施例 17

細胞傷害性アッセイ

蛍光ベースEu-TDA非放射性細胞傷害性アッセイ(Perkin Elmer, Boston, MA)を用い、刺激ヒトPBMCをエフェクターとして、異なるEGFRを持つ(EGFR-bearing)腫瘍細胞株に対する三量体hOKT3FabCSA763scFvの細胞毒性を比較した。1人の健康ドナー由来のヒトPBMCを、50units/ml(または0.2ng/ml)のIL-2を含有するRPMI+10%FBS中、OKT3を塗布した(2μg/ml)プレート中の増殖細胞により72時間刺激した。約 1×10^6 の標的細胞を、メーカーの使用説明書にしたがってDELFLIA BATTERDA Reagentで標識した。細胞をPBSで3回洗浄してから、完全培地(CM)中に濃度 5×10^4 cells/mlでEu³⁺標識標的細胞を再懸濁させた。標的細胞のアリコート100μl(5×10^4 cells)を96ウェルV底滅菌マイクロタイタープレートのウェルに加えた。等容量のエフェクターPBMCを各ウェルに加え、それぞれA431細胞については50:1から2.5:1、WiDrおよびHCT116細胞については一定の10:1のエフェクター/ターゲット(E/T)比とした。マイクロプレートを5%CO₂の加湿フード内で2時間37℃で培養した。全てのアッセイは3連で(in triplicate)行った。培養後、プレートを再度遠心分離機にかけ、放出されたEu³⁺の測定のために上清を回収した。放出されたEu³⁺を検出すべく、上清の20μlアリコートを平底96ウェルマイクロプレートのウェルに移し、増強試薬(e

enhancement solution) の 200 μ l アリコートを各ウェルに加えた。

【0212】

回転式振とう機で室温にて15分混合した後、時間分解蛍光計 (Hidex, CHAMELEON detection platform, Finland) で蛍光を測定した。特異的細胞傷害性のパーセンテージを (実験的放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出) \times 100 として算出した。自然放出は、エフェクター細胞の代わりに CM100 μ l で標的細胞を培養することによって決定し、最大放出は溶解バッファー (0.5% Triton-X100) 100 μ l で標的を培養することによって決定した。

【0213】

三量体二重特異性 hOKT3 FabCSA763 scFv の、A431、WiDr および HCT116 細胞株を含む異なる EGFR 発現腫瘍細胞の溶解を促す能力を、ヒト PMBC によって評価した。図18は、E/T比の異なる A431 細胞 (A)、および一定の E/T比 10:1 の WiDr または HCT116 細胞 (B) に対する、各種濃度の三量体 hOKT3 FabCSA763 scFv の特異的細胞傷害性を示している。刺激ヒト PMBC の存在下における EGFR 過剰発現 A431 腫瘍細胞の溶解が、用量および E/T比 依存的に三量体二重特異性 hOKT3 FabCSA763 scFv により特異的に惹起された (図18A)。この結果、hOKT3 FabCSA763 scFv の濃度レベル 0.05 μ g/ml、E/T比 20:1 で特異的細胞傷害性が最大 ~ 80% となった (黒四角)。hOKT3 FabCSA763 scFv の非存在下では、刺激ヒト PMBC は単独で A431 細胞を有効に殺傷することはできなかった。一定の E/T比 10:1 で三量体 OKT3 FabCSA763 scFv と共に WiDr または HCT116 細胞株のどちらかを培養することによっても、同様の結果が得られた (図18B)。これらの結果は、三量体 hOKT3 FabCSA763 scFv がヒト PMBC (恐らくは細胞傷害性 T細胞) による EGFR を持つ腫瘍細胞の溶解を有効に誘導し得ることを実証した。

【0214】

実施例 18

経時的顕微鏡検査

図19における経時的顕微鏡写真は、三量体 hOKT3 FabCSA763 scFv による腫瘍細胞溶解へのヒト細胞傷害性 Tリンパ球の再誘導 (redirecting) をさらに実証している。三価 hOKT3 FabCSA763 scFv は、CD および標的抗原 - EGFR をそれぞれ同時に結合させることにより、T細胞と腫瘍細胞を一時的に結合させることができる。このことは T細胞活性化を惹起し、続いて架橋された腫瘍細胞への攻撃が起こる。攻撃された腫瘍細胞はプログラム細胞死 (アポトーシス) を起こす。遊離 T細胞は新たに別の腫瘍細胞に向かい、別の hOKT3 FabCSA763 scFv と架橋することによって殺傷することができる。hOKT3 FabCSA763 scFv の非存在下では、ヒト Tリンパ球は腫瘍細胞 A431 の増殖に影響しなかった。図19下図において、三量体 hOKT3 FabCSA763 scFv の存在下、ヒト Tリンパ球と A431 細胞とは架橋していた。Tリンパ球は活性化され、腫瘍細胞を攻撃し始めた。13時間の培養時間において、腫瘍細胞の大部分がアポトーシス経路で溶解に至った。hOKT3 FabCSA763 scFv の非存在下では、24時間の共培養時間の後でも、A431 細胞と Tリンパ球との間に架橋は観察されなかった (図19上図)。

【0215】

実施例 19

腫瘍異種移植マウスモデル

抗腫瘍活性を評価するためのインビボ試験を、8から10週齢の雌性 NOD/SCID マウス (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/JNarl, National Laboratory Animal Center, Taiwan) で行った。0日目に1人の健康ドナー由来の非刺激ヒト PMBC (エフェクター) を HTC116 腫瘍細胞 (ターゲット) と予め混合し、次いで混合した細胞を NOD/SCID マウスに皮下注射した

10

20

30

40

50

。1：1と低い細胞の（エフェクター対ターゲット）比を用いた。表示されている用量のhOKT3FabCSA763scFvまたはPBS溶媒対照を、1日目から開始し10日間連続で1日1回尾静脈注射により投与した。腫瘍の進行を外部キャリパー測定器によって週に2回測定し、腫瘍体積を標準的な半楕円体（hemielipsoid）の式： $(長さ \times 幅^2) / 2$ を用いて計算した。

【0216】

結果が図20に示されている。図20は、HCT116結腸がんNOD/SCIDマウスモデルにおける三量体hOKT3FabCSA763scFvの抗腫瘍効果を示している。ヒトPBMCの非存在下、2つのグループのNOD/SCIDマウスに 5×10^6 HCT116細胞を皮下接種した（抗EGFR 763 IgGおよびPBS対照）。残りの3つのグループには、 5×10^6 HCT116細胞および健康ドナー由来の 5×10^6 非刺激ヒトPBMCの混合物を皮下注射した。0日目にHCT116細胞を接種した後、1日目から連続10日間、PBS溶媒対照（ $100 \mu\text{l}$ ）、三量体hOKT3FabCSA763scFv $50 \mu\text{g}$ および $15 \mu\text{g}$ を尾静脈注射で投与した。nで示された動物の数の各グループから導き出された腫瘍成長曲線が示されている。

10

【0217】

三量体hOKT3FabCSA763scFvグループと非刺激ヒトPBMC対照グループの投与の間の統計的有意差（ $P < 0.001$ ）が示されている。これら結果は、ヒトPBMCの存在下でhOKT3FabCSA763scFvの二重特異性抗CD3xEGFR抗体が腫瘍増殖を有効に低減し得ることを示した。

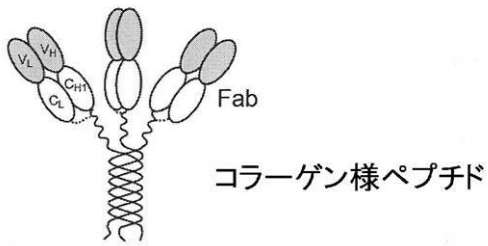
20

【0218】

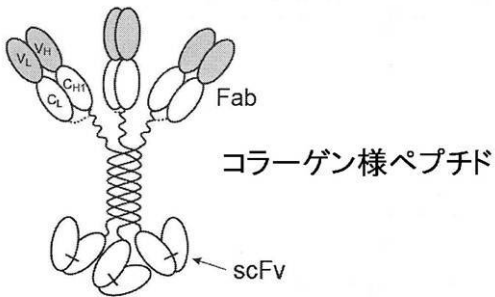
開示された実施形態に対し様々な変更および変化を加え得ることは、当業者には明らかであろう。発明の詳細および実施例は単に例示として見なされることが意図されており、本開示の真の範囲は以下の特許請求の範囲およびそれらの均等物によって示される。

【図1】

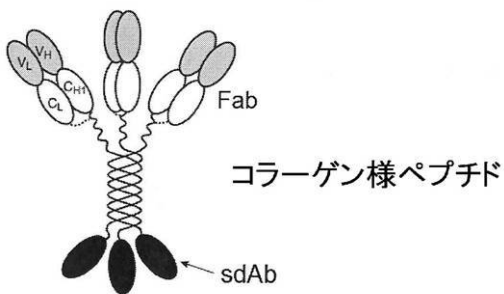
A



B

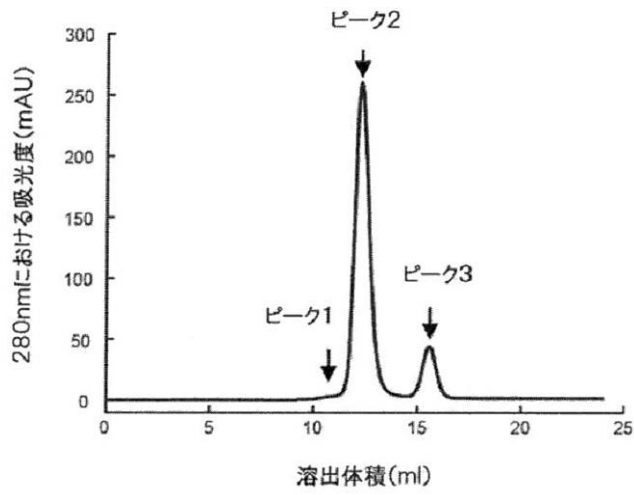


C

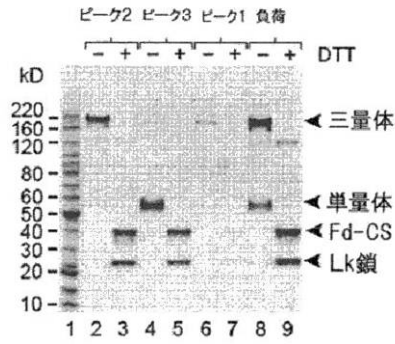


【 図 2 】

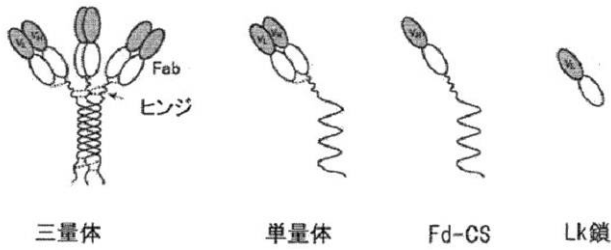
A



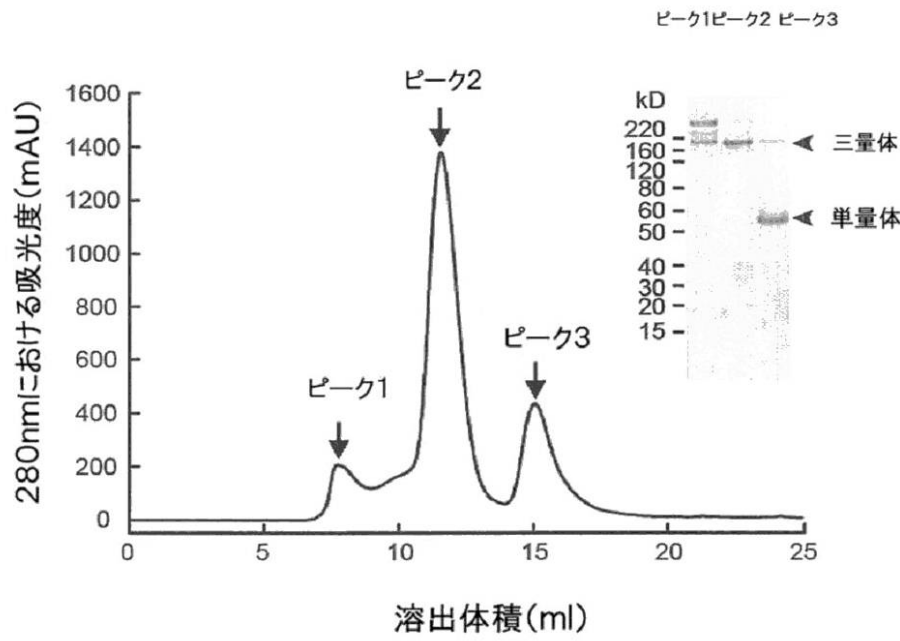
B



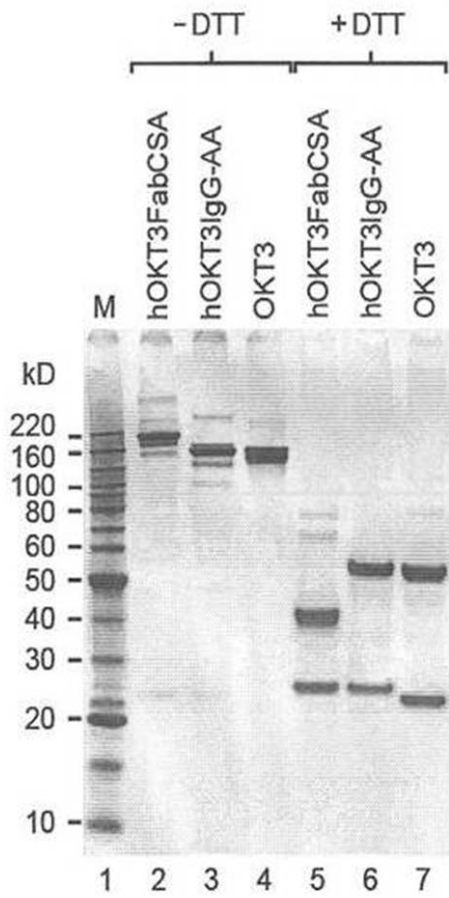
C



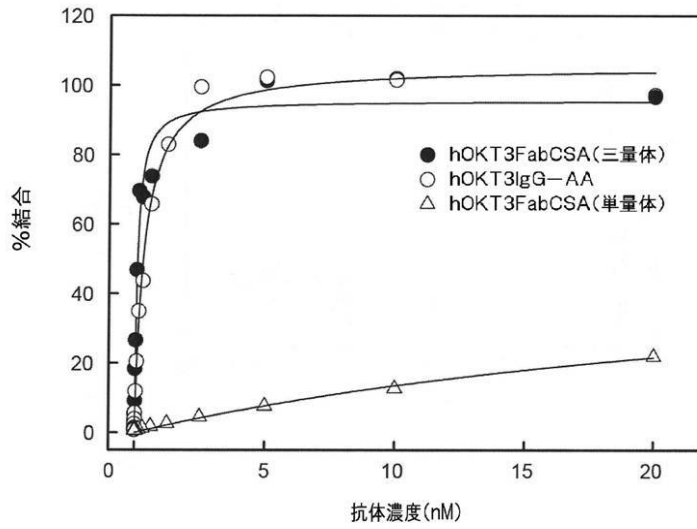
【 図 3 】



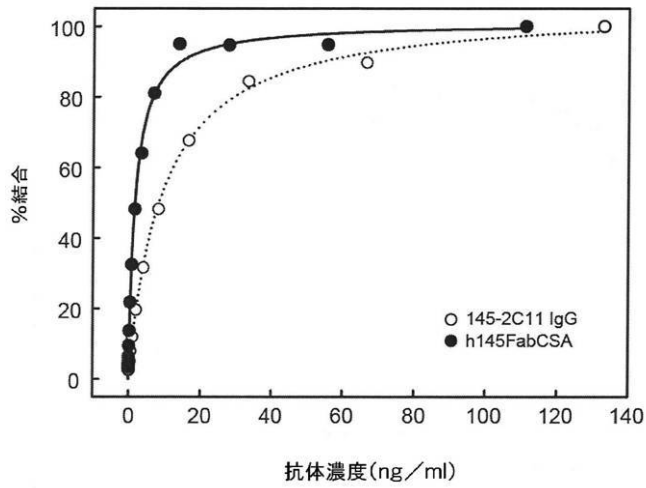
【 図 4 】



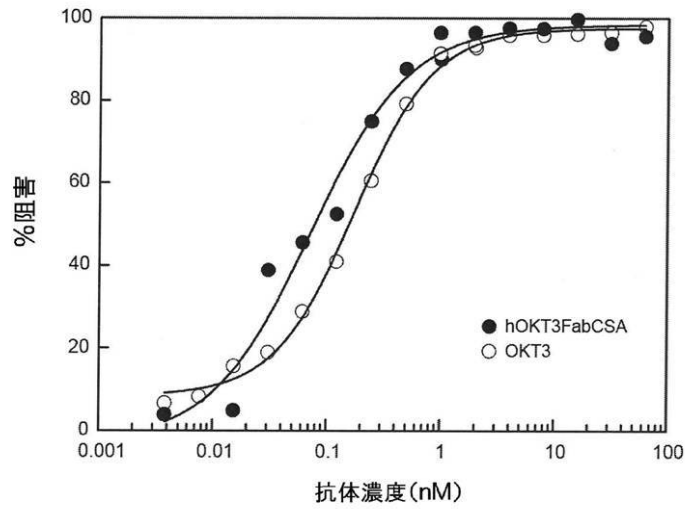
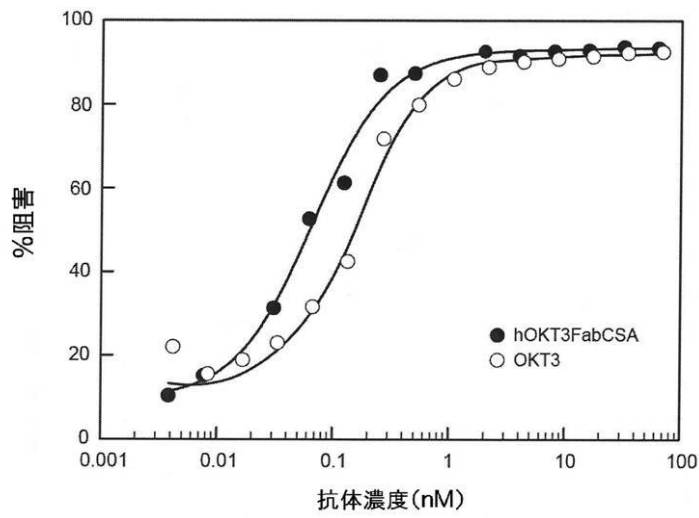
【 图 5 】



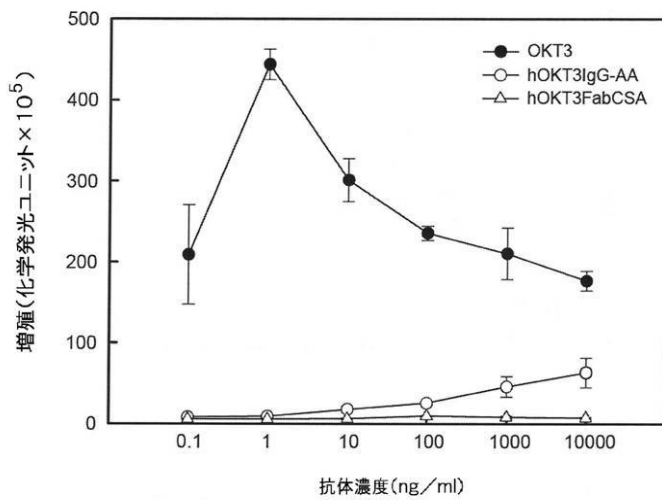
【 图 6 】



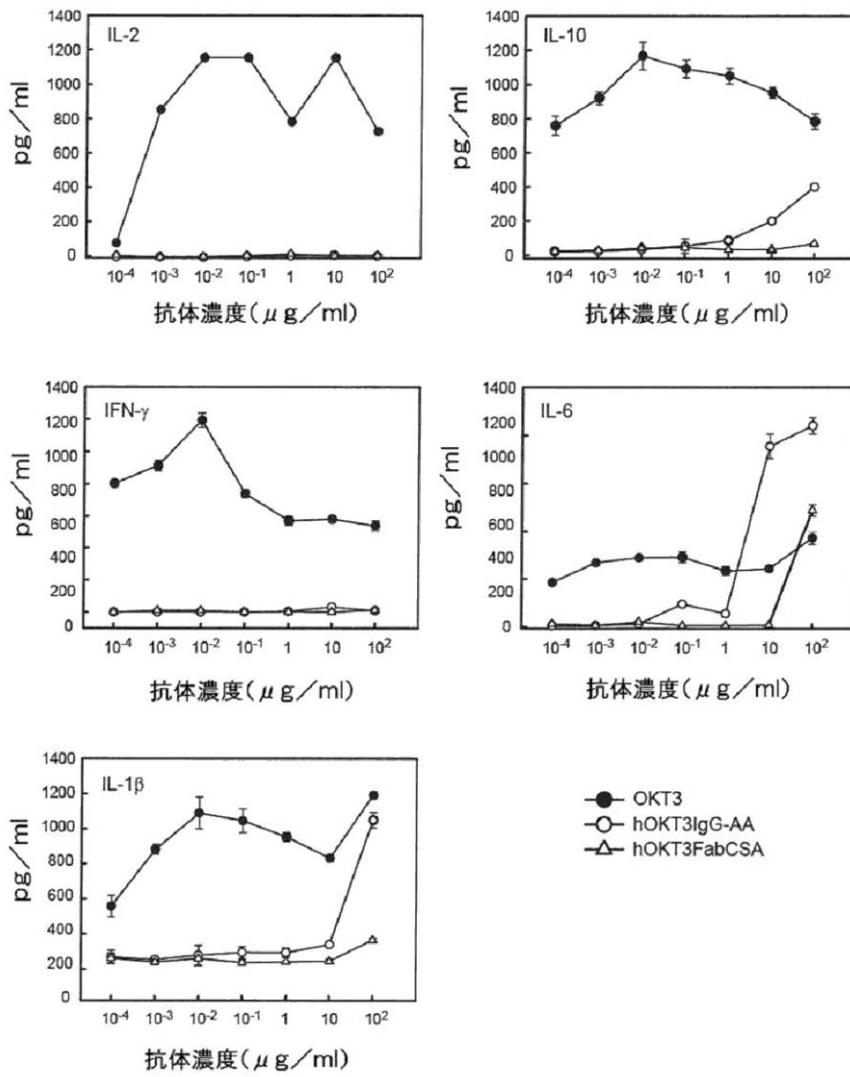
【 図 7 】



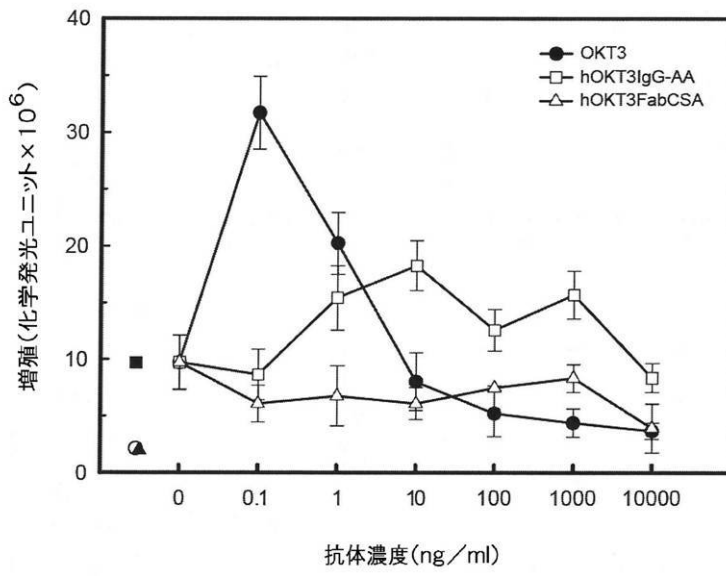
【 図 8 】



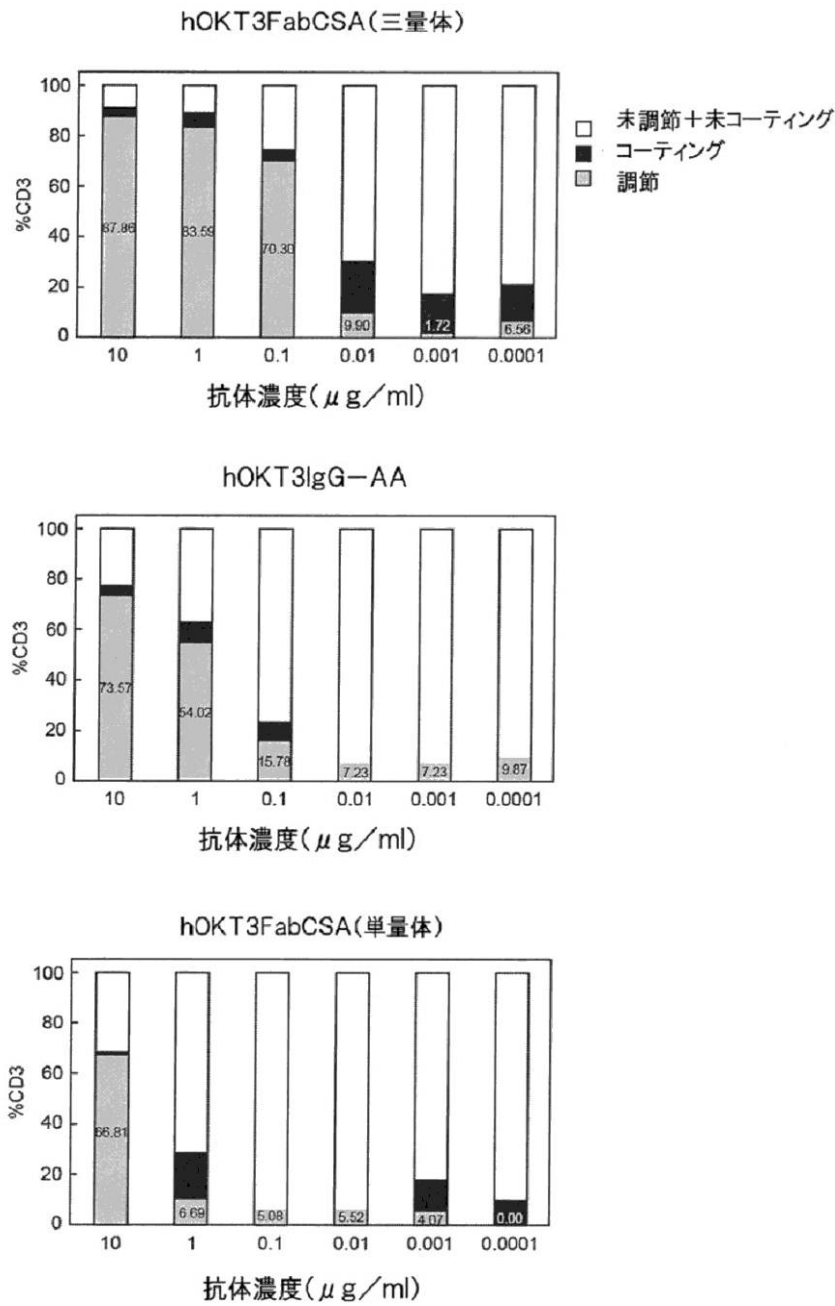
【 图 9 】



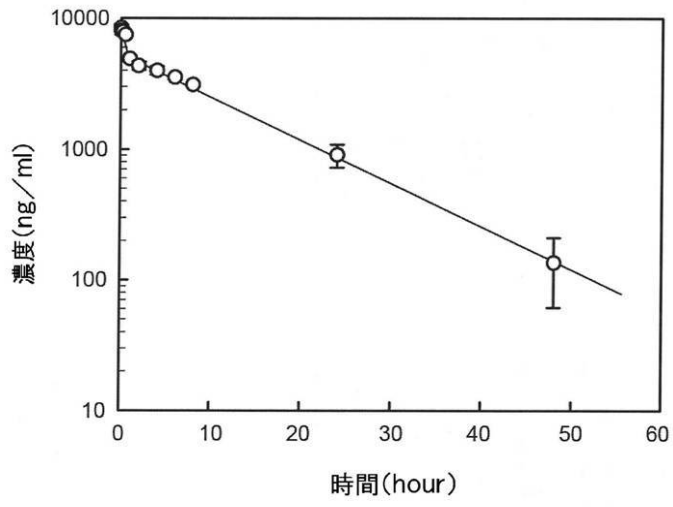
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

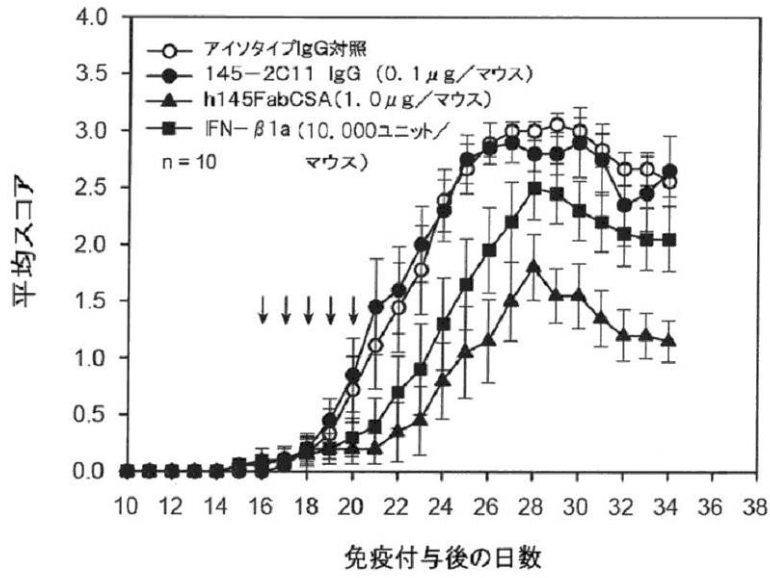


【 図 1 2 】

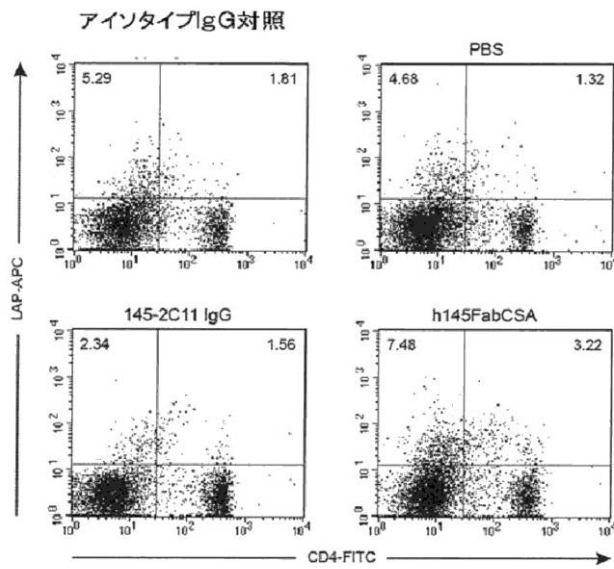


【図 13】

A

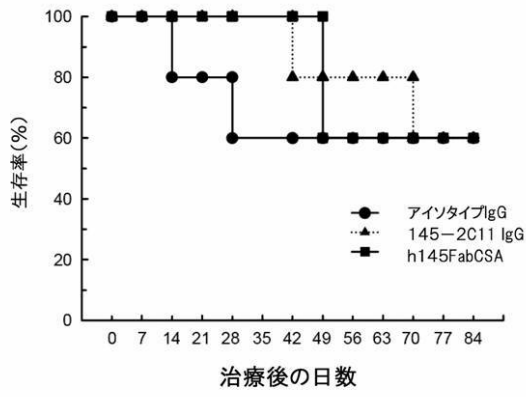


B

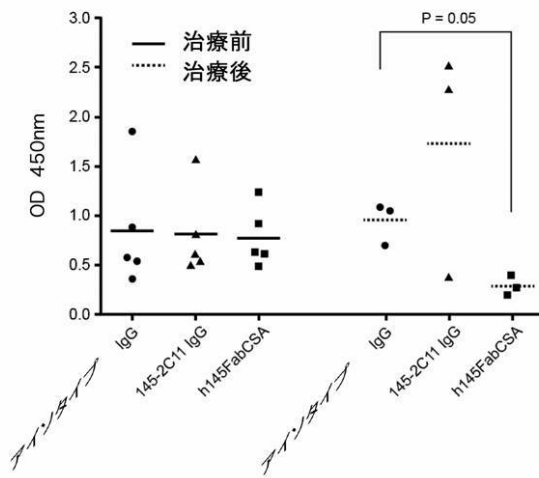


【 図 1 4 】

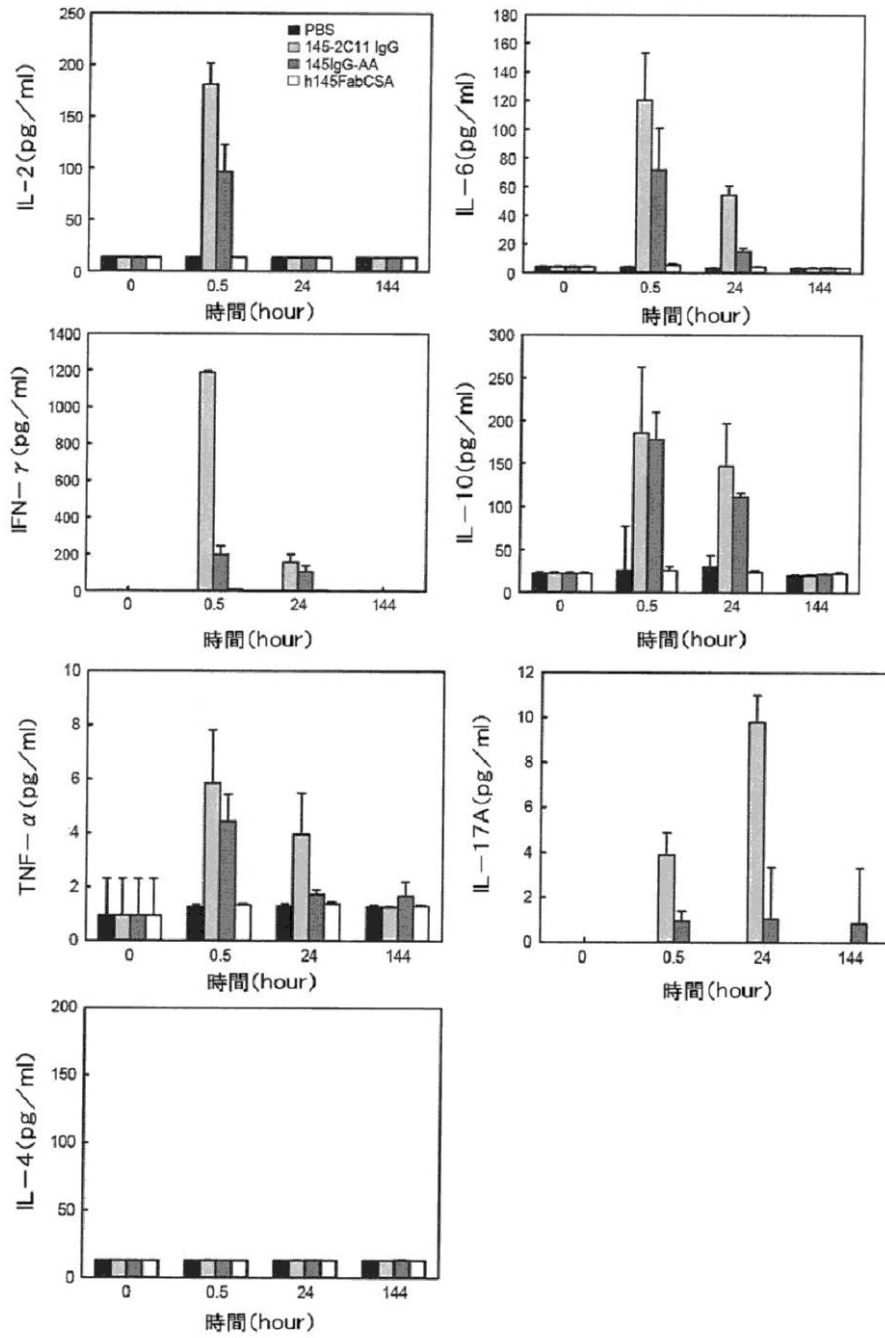
A



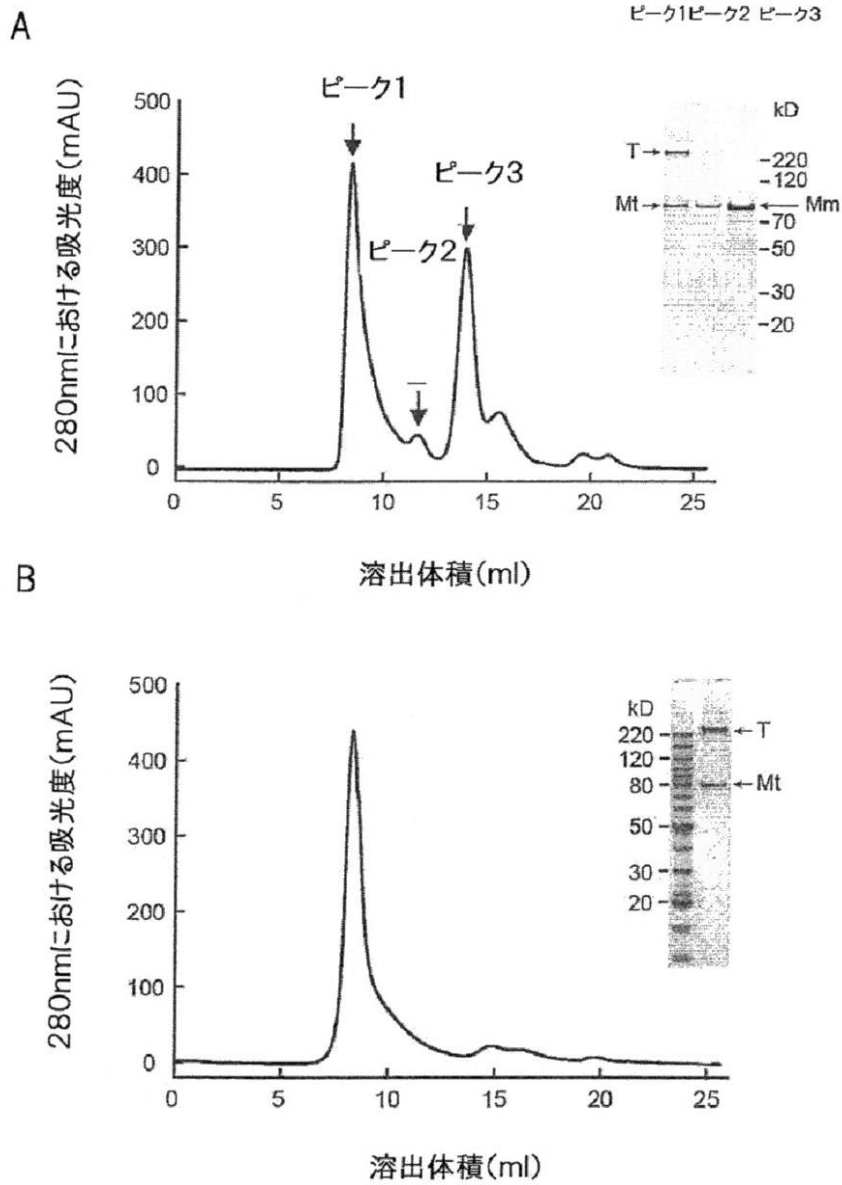
B



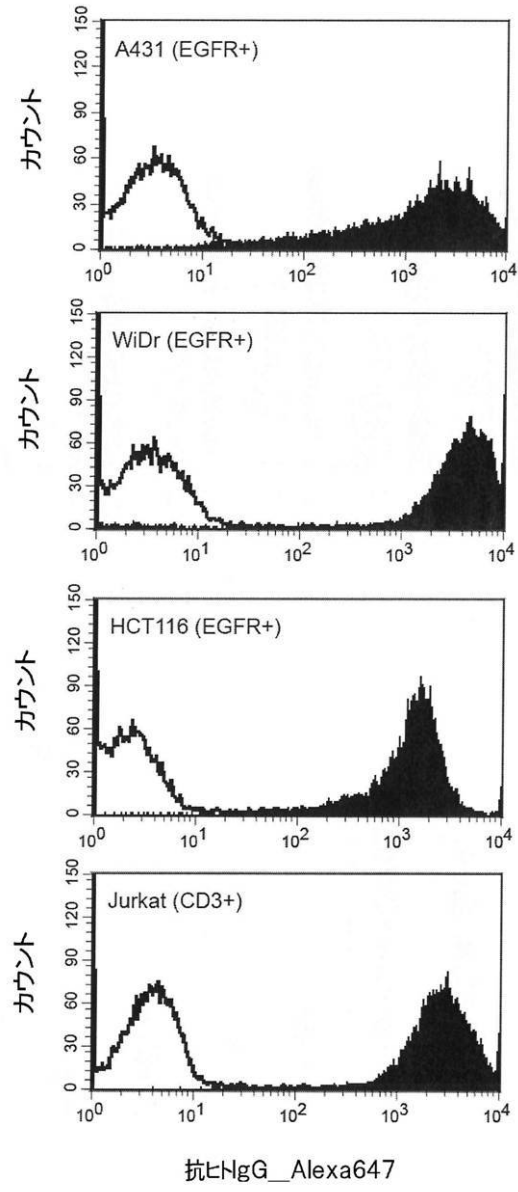
【 図 1 5 】



【図16】

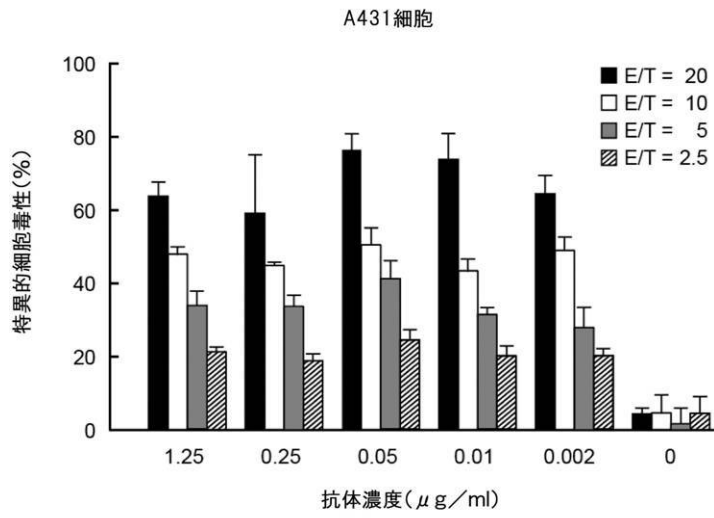


【 図 17 】

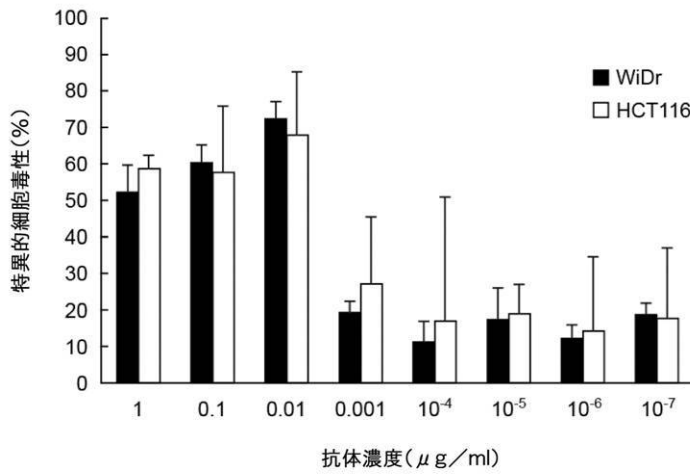


【 図 1 8 】

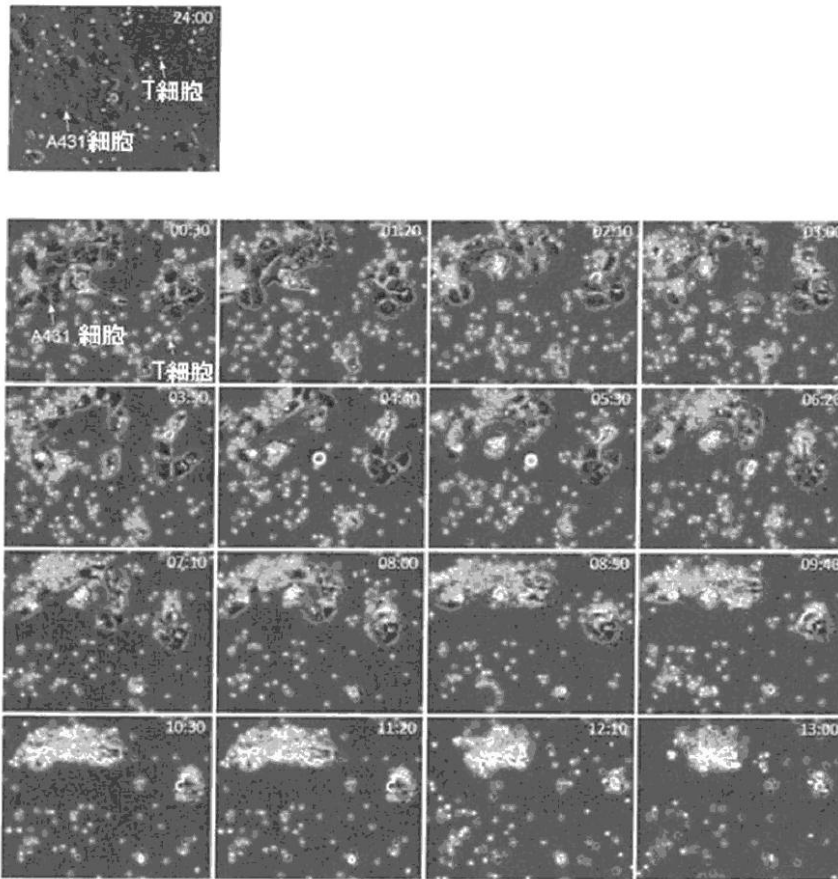
A



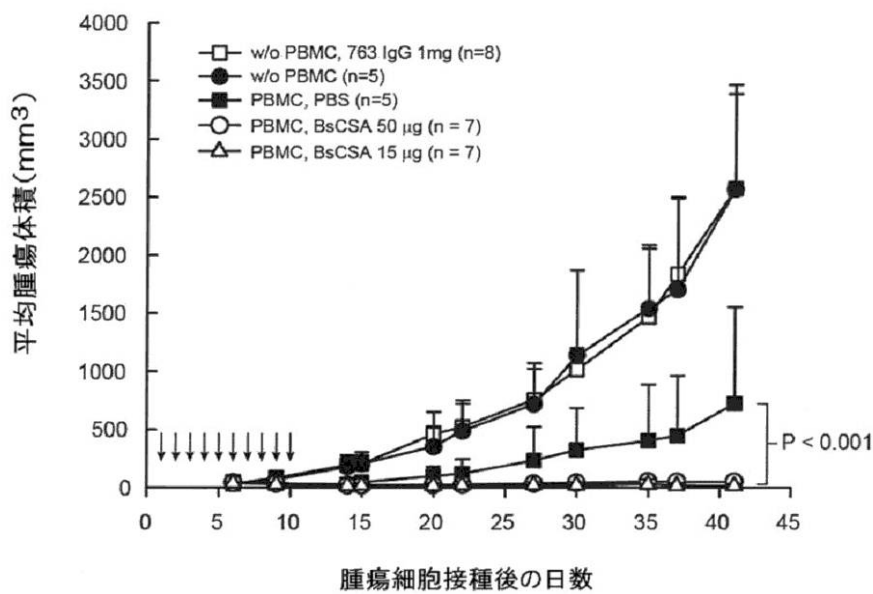
B



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 配 列 表 】

2014124186000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
G 0 1 N	33/563 (2006.01)	G 0 1 N	33/563	

(72)発明者 周 民元

台湾台北市文山區萬年里1鄰羅斯福路四段202號9樓之3

(72)発明者 黄 娟娟

台湾新竹市民享街173巷47號

(72)発明者 李 秀娟

台湾新竹縣寶山鄉寶斗村5鄰寶深路168巷21號

(72)発明者 賴 雅萍

台湾新竹縣竹東鎮員山里1鄰員山路316巷22號

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA41 CA06 CA07 DA02 EA04 FA20 GA11
 GA18 HA01 HA03
 4B065 AA92X AB01 AC14 BA01 BD14 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 BB36 BB41 BB43 BB50 CC01 DD62 DD90 EE01 GG02
 GG03 GG05 GG06 GG08
 4H045 AA11 AA30 BA05 BA09 BA41 BA70 CA42 DA76 EA20 EA50
 FA74 GA21 GA26

专利名称(译)	多价抗体片段及其三聚化复合物		
公开(公告)号	JP2014124186A	公开(公告)日	2014-07-07
申请号	JP2013268028	申请日	2013-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
[标]发明人	周民元 黄娟娟 李秀娟 赖雅萍		
发明人	周 民元 黄 娟娟 李 秀娟 赖 雅萍		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K16/00 C07K14/78 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12N1/21 A61P37/06 A61K39/395 G01N33/531 G01N33/563		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K16/00 C07K14/78 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/00.101 C12N1/21 A61P37/06 A61K39/395.U G01N33/531.A G01N33/563 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/62.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA41 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA03 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC01 4C085/DD62 4C085/DD90 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA05 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA21 4H045/GA26		
代理人(译)	Kankawa忠 伊藤 浩彰		
优先权	101150029 2012-12-26 TW 13/761569 2013-02-07 US 102136456 2013-10-09 TW		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了产生多价Fab片段的方法。通过在哺乳动物细胞中共表达包含Fab片段的重链部分和框内融合胶原样肽的基因构建体以及包含IgG的轻链部分的基因构建体来产生三聚体Fab片段。提供一种方法。还公开了通过本发明的方法产生的分子的用途。[选择图]无

ヒト免疫グロブリンのヒンジ領域のアミノ酸配列

配列番号20	ヒトIgG ₁	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
配列番号21	ヒトIgG ₂	ERKCCVECPPCPAPPVAGP
配列番号22	ヒトIgG ₃	ELKTP LGDTTHTCPRCPAPELLGGP
配列番号23	ヒトIgG ₄	ESKYGPPCPCPAPEFLGGP