

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-523205

(P2004-523205A)

(43) 公表日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 39/395
A61K 51/00
A61P 35/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 P 35/00
C 07 K 16/46

Z N A A
V
Y
A 61 P 35/00
C 07 K 16/46

テーマコード(参考)

4 B 02 4
4 B 06 4
4 B 06 5
4 C 08 4
4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-514197(P2002-514197)
(86) (22) 出願日 平成13年7月25日(2001.7.25)
(85) 翻訳文提出日 平成15年1月27日(2003.1.27)
(86) 國際出願番号 PCT/US2001/041386
(87) 國際公開番号 WO2002/008293
(87) 國際公開日 平成14年1月31日(2002.1.31)
(31) 優先権主張番号 60/220,782
(32) 優先日 平成12年7月25日(2000.7.25)
(33) 優先権主張国 米国(US)

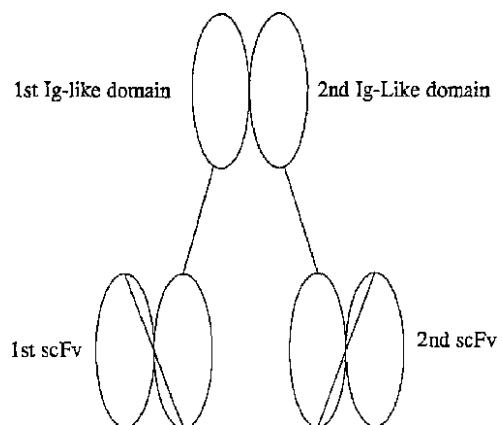
(71) 出願人 599176263
イムノメディクス、 インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、 07950 ニュー・ジャージー、 モリス・プレインズ、 アメリカ
ン・ロード 300
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100108774
弁理士 橋本 一憲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多価標的結合タンパク質

(57) 【要約】

第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも3つの標的結合部位を有する新規の多価標的結合タンパク質が記載されている。多価標的結合タンパク質の第一のポリペプチドは、第一のscFv分子、および免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメインを好ましくは含む、第一の免疫グロブリン様ドメインを含む。多価標的結合タンパク質の第二のポリペプチドは、第二のscFv分子、および、免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメインを好ましくは含む、第二の免疫グロブリン様ドメインを含む。好ましくは、第一のscFv分子および第一の免疫グロブリン様ドメインは、免疫グロブリン軽鎖定常領域ドメインを好ましくは含む第一の付加アミノ酸配列を介して結合している。好ましくは、第二のscFv分子および第二の免疫グロブリン様ドメインは、免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインを好ましくは含む第二の付加アミノ酸配列を介して結合している。好ましくは、第一および第二の付加アミノ酸配列は、少なくとも1つのジスルフィド結合を介して互いに会合する。本発明の多価標的結合タンパク質は、腫瘍および感染性病変を治療および検出



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a . 第一の一本鎖 F v 分子 (s c F v) と第一の免疫グロブリン様ドメインとを含む第一のポリペプチド、および

b . 第二の s c F V と第二の免疫グロブリン様ドメインとを含む第二のポリペプチドを含む標的結合タンパク質であって、

該第一および第二の s c F v がそれぞれ独立して 2 つの標的結合部位を形成するか、または該第一の s c F v が該第二の s c F v と会合して、2 つの標的結合部位を形成し、かつ該第一の免疫グロブリン様ドメインが該第二の免疫グロブリン様ドメインと会合して、第三の標的結合部位を形成する、標的結合タンパク質。

10

【請求項 2】

第一の s c F v と第一の免疫グロブリン様ドメインとが第一の付加アミノ酸配列 (extra amino acid sequence) を介して結合し、第二の s c F v と第二の免疫グロブリン様ドメインとが第二の付加アミノ酸配列を介して結合している、請求項 1 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 3】

第一の付加アミノ酸配列が第二の付加アミノ酸配列と会合する、請求項 2 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 4】

第一の付加アミノ酸配列が、少なくとも 1 つのジスルフィド結合によって第二の付加アミノ酸配列と会合する、請求項 2 または 3 記載の標的結合タンパク質。

20

【請求項 5】

第一の免疫グロブリン様ドメインが、免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメインまたはその派生ドメインを含み、第一の付加アミノ酸配列が、免疫グロブリンの軽鎖定常領域ドメインまたはその派生ドメインを含み、第二の免疫グロブリン様ドメインが、免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメインまたはその派生ドメインを含み、かつ第二の付加アミノ酸配列が、免疫グロブリンの重鎖定常領域ドメインまたはその派生ドメインを含む、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 6】

第一の免疫グロブリン様ドメインが、免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメインを含み、第一の付加アミノ酸配列が、免疫グロブリンの軽鎖定常領域ドメインを含み、第二の免疫グロブリン様ドメインが、免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメインを含み、かつ第二の付加アミノ酸配列が、免疫グロブリンの重鎖定常領域ドメインを含む、請求項 5 記載の標的結合タンパク質。

30

【請求項 7】

第一の s c F v および免疫グロブリンの軽鎖定常領域ドメインが、第一のペプチドリンカーを介して結合しており、第二の s c F v および免疫グロブリンの重鎖定常領域ドメインが、第二のペプチドリンカーを介して結合している、請求項 5 または 6 記載の標的結合タンパク質。

40

【請求項 8】

第一のペプチドリンカーが、アミノ酸配列
EPKSADKTHTCPPCPGGGS

を含み、第二のペプチドリンカーが、アミノ酸配列
EPKSCDKTHTCPPCPGGGS

を含む、請求項 7 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 9】

3 つの標的結合部位のうち少なくとも 2 つが異なった標的結合特異性を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 10】

3 つの標的結合部位のうち少なくとも 2 つが同一の標的結合特異性を有する、請求項 1 ~

50

8 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 1】

第一のポリペプチドまたは第二のポリペプチドが、付加的アミノ酸配列に、その N 末端または C 末端のいずれかで結合している、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 2】

付加的アミノ酸配列が、ペプチドタグ、シグナルペプチド、酵素、サイトカイン、毒素、薬剤、細胞毒性タンパク質、およびその他の機能的タンパク質からなる群より選択されるポリペプチドを含む、請求項 1 1 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 3】

第一のポリペプチドまたは第二のポリペプチドのいずれかが、さらに N - グリコシル化認識配列を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 4】

糖鎖が N - グリコシル化認識配列に結合している、請求項 1 3 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 5】

糖鎖が、薬剤、放射性化合物、キレート剤、酵素、毒素、サイトカイン、細胞毒性タンパク質、およびその他の機能的作用物質からなる群より選択される作用物質に結合している、請求項 1 4 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 6】

標的結合タンパク質が、薬剤、放射性化合物、キレート剤、酵素、毒素、サイトカイン、細胞毒性タンパク質、およびその他の機能的作用物質からなる群より選択される作用物質に結合している、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 7】

1 つの標的結合部位が、毒素、薬剤、サイトカイン、キレート剤、酵素、放射性化合物、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的作用物質に結合することができ、かつ他の 2 つの標的結合部位が腫瘍抗原に結合することができる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 8】

1 つの標的結合部位が腫瘍抗原に結合することができ、かつ他の 2 つの標的結合部位が、毒素、薬剤、サイトカイン、キレート剤、酵素、放射性化合物、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的作用物質に結合することができる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 1 9】

1 つの標的結合部位が腫瘍抗原に結合することができ、かつ他の 2 つの標的結合部位が、T 細胞または別のエフェクター細胞の表面タンパク質に結合することができる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質。

【請求項 2 0】

T 細胞の表面タンパク質が CD 28 および CD 3 である、請求項 1 9 記載の標的結合タンパク質。

【請求項 2 1】

請求項 1 記載の第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 記載の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

請求項 24 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 26】

請求項 25 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 27】

請求項 22 記載のベクターおよび請求項 25 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 28】

標的結合タンパク質を製造する方法であって、請求項 27 記載の宿主細胞を適当な培地中で培養する段階、および該培地から該標的結合タンパク質を分離する段階を含む方法。

【請求項 29】

請求項 1 記載の第一および第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項 30】

請求項 29 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 31】

請求項 30 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 32】

標的結合タンパク質を製造する方法であって、請求項 31 記載の宿主細胞を適当な培地中で培養する段階、および該培地から該標的結合タンパク質を分離する段階を含む方法。

【請求項 33】

腫瘍に対する免疫反応を誘導する方法であって、対象に請求項 19 または 20 記載の標的結合タンパク質を有効量投与する段階を含む方法。

【請求項 34】

対象における腫瘍を治療するのに有用な薬剤であって、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項記載の標的結合タンパク質を含む薬剤。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、多価標的結合タンパク質、および多価標的結合タンパク質を使用して、腫瘍および感染性病変を治療および検出する方法に関する。

【0002】**関連技術**

多価標的結合タンパク質は、腫瘍やその他の病気を治療または検出するのに役立つ。例えば、多価標的結合タンパク質は、腫瘍抗原と細胞毒性物質の両方に結合することが可能であり、放射性核種、薬剤、毒素、または他の細胞毒性物質を腫瘍細胞に送達するために用いることができる。

【0003】

標的結合タンパク質の結合価を増加させることが望ましい。結合価を増加させて、標的結合タンパク質の標的への結合活性を向上させることによって治療の特異性および安全性を向上させることができる。また、結合活性が増加した標的結合タンパク質は、異なった細胞毒性物質を 1 つの標的に同時に送達したり、1 つの細胞毒性物質をさまざまな標的に送達するのに役立ちうる。さらに、多価標的結合タンパク質を用いて、1 つの標的細胞に異なる免疫エフェクター細胞を補充し、それによって、標的細胞に対する免疫応答の増強を開始することができる。

【0004】

3 つ以上の異なる標的結合部位をもつ多価標的結合タンパク質を作出する努力が行われている。例えば、いくつかの Fab 様断片を化学リンカーによって架橋することにより多価標的結合タンパク質が作製されている。米国特許第 5,262,524 号を参照。また、米国特許第 5,091,542 号、およびランズドープ (Landsdorp) ら、「モノクローナル抗体の環状四分子複合体：新しいタイプの架橋剤 (Cyclic Tetra-

10

20

30

40

50

amolecular Complexes Of Monoclonal Antibodies : A New Type Of Cross-linking Agent」, Euro. J. Immunol., 16: 679~83 (1986) も参照。多価標的結合タンパク質は、いくつかの単鎖 Fv 分子 (scFv) を共有結合させて一本鎖ポリペプチドを形成することによって作製することができる。米国特許第 5,892,020 号を参照。基本的には、scFv 分子の集合体である多価標的結合タンパク質が、米国特許第 6,025,165 号および第 5,837,242 号に開示されている。3 つの scFv 分子を含む三価標的結合タンパク質が、クロット (Krott) ら、「5 残基および 10 残基のリンカーを含む、抗ノイラミニダーゼ抗体 NC10 の一本鎖 Fv 断片は二量体を形成し、無残基リンカーは三量体を形成する (Single-chain Fv Fragment of Anti-Neuraminidase Antibody NC10 Containing Five- and Ten-Residue Linkers Form Dimers and Zero-Residue Linker A Trimer)」、Protein Engineering, 10(4): 423~433 (1997)。しかし、上記の方法は、再現性がないか、または事前に選択した、異なる標的結合特異性をもつタンパク質を產生することができない。

10

20

30

40

50

【0005】

本発明は、事前に選択した異なる標的結合特異性をもつ、新規な型の多価標的結合タンパク質、およびそれを作製するための再現性のある方法を開示する。本発明の多価標的結合タンパク質は、会合して少なくとも 3 つの標的結合部位を形成する 2 つのポリペプチドを含む。また、本発明は、多価標的結合タンパク質を作製する新しい方法も提供する。

【0006】

発明の概要

したがって、本発明の目的は、少なくとも 3 つの標的結合部位を含む、新しい型の標的結合タンパク質を提供することである。

【0007】

また、本発明の目的は、腫瘍および感染性病変を治療および検出するために本発明の多価標的結合タンパク質を使用する方法を提供することである。

【0008】

これらの目的を達成する際に、本発明の一つの局面にしたがって、3 つの標的結合部位を含む標的結合タンパク質において、タンパク質が、第一の免疫グロブリン様ドメインに共有結合した第一の一本鎖 Fv 分子を含む第一のポリペプチドと、第二の免疫グロブリン様ドメインに共有結合した第二の一本鎖 Fv 分子を含む第二のポリペプチドとを含み、第一の一本鎖 Fv 分子が第一の標的結合部位を形成し、第二の一本鎖 Fv 分子が第二の標的結合部位を形成し、また、第一の免疫グロブリン様ドメインと第二の免疫グロブリン様ドメインが会合して第三の標的結合部位を形成する標的結合タンパク質が提供される。あるいは、第一および第二の一本鎖 Fv 分子が会合して 2 つの結合部位を形成するとともに、第一および第二の免疫グロブリン様ドメインが会合して第三の結合部位を形成することも可能である。

【0009】

本発明の別の局面によれば、第一の一本鎖 Fv 分子および第一の免疫グロブリン様ドメインは、第一の付加アミノ酸配列によって共有結合しており、第二の一本鎖 Fv 分子および第二の免疫グロブリン様ドメインは、第二の付加アミノ酸配列によって共有結合している。第一の付加アミノ酸配列は、好ましくは共有結合的相互作用によって、より好ましくは少なくとも 1 つのジスルフィド結合によって、第二の付加アミノ酸配列と会合する。

【0010】

本発明の別の局面において、第一の免疫グロブリン様ドメインは、免疫グロブリン軽鎖定常領域ドメイン、またはその派生ドメインによって第一の scFv 分子に共有結合している免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメイン、またはその派生ドメインを含み、かつ第二の免疫グロブリン様ドメインは、免疫グロブリン重鎖定常領域ドメイン、またはその派生ド

メインによって第二の s c F v 分子に共有結合している免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメイン、またはその派生ドメインを含む。

【 0 0 1 1 】

本発明のさらに別の局面において、第一の一本鎖 F v 分子および免疫グロブリン軽鎖定常領域ドメインが、好ましくはアミノ酸配列
EPKSADKTHTCPPCPGGGS

を含む第一のペプチドリンカーによって共有結合されており、かつ第二の一本鎖 F v 分子および免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインが、好ましくはアミノ酸配列
EPKSCDKTHTCPPCPGGGS

を含む第二のペプチドリンカーによって共有結合されている。 10

【 0 0 1 2 】

本発明の別の局面によれば、3つの標的結合部位のうち2つが異なった標的結合特異性を有する。

【 0 0 1 3 】

本発明のさらに別の局面によれば、3つの標的結合部位のうち2つが同一の標的結合特異性を有する。

【 0 0 1 4 】

また、本発明の別の局面によれば、第一または第二のポリペプチドは、そのN末端またはC末端において付加的なアミノ酸残基に共有結合している。付加アミノ酸残基は、好ましくは、ペプチドタグ、シグナルペプチド、酵素、サイトカイン、毒素、薬剤、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的タンパク質を含む。 20

【 0 0 1 5 】

本発明の別の局面において、糖鎖が、第一または第二のポリペプチドに作製されたN-グリコシル化認識配列を介して、第一または第二のポリペプチドに共有結合している。糖鎖は、好ましくは、さらに、薬剤、放射性化合物、キレート剤、酵素、毒素、サイトカイン、細胞毒性タンパク質、またはこれら以外の機能的作用物質に結合している。

【 0 0 1 6 】

本発明のさらに別の局面によれば、薬剤、放射性化合物、キレート剤、酵素、毒素、サイトカイン、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的作用物質は、多価結合タンパク質のアミノ酸残基の側鎖を介して、本発明の多価結合タンパク質に結合している。 30

【 0 0 1 7 】

本発明の別の局面によれば、本発明の多価タンパク質の標的結合部位の1つが毒素、薬剤、サイトカイン、キレート剤、酵素、放射性化合物、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的作用物質に結合し、他の2つの標的結合部位は腫瘍抗原に結合する。

【 0 0 1 8 】

本発明の1つの局面によって、多価タンパク質の標的結合部位の1つが腫瘍抗原に結合し、他の2つの標的結合部位が、T細胞または他のエフェクター細胞の表面タンパク質に結合する。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の局面によって、多価結合タンパク質の第一のポリペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド、および多価結合タンパク質の第二のポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチドを含む核酸分子が提供されている。 40

【 0 0 2 0 】

本発明のさらに別の局面において、多価結合タンパク質の第一のポリペプチドをコードする核酸分子、および多価結合タンパク質の第二のポリペプチドをコードする別の核酸分子である、2つの核酸分子が提供されている。さらに、本発明は、これらの核酸を含むベクター、および、さらに、これらのベクターを含む宿主細胞を提供する。

【 0 0 2 1 】

また、本発明の別の局面によって、本発明の多価結合タンパク質を作製する方法が提供されている。 50

【 0 0 2 2 】

本発明のさらに別の局面において、腫瘍の患者に本発明の多価標的結合タンパク質を有効量投与する段階を含む、腫瘍に対する増強された免疫反応を誘導する方法であって、タンパク質の標的結合部位の一つが腫瘍に結合し、残りの二つの標的結合部位が、T細胞または他のエフェクター細胞上にある二つの異なる表面タンパク質に結合するという方法が提供されている。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の局面においては、腫瘍の患者に本発明の多価標的結合タンパク質を有効量投与する段階を含む、腫瘍を治療または検出する方法であって、タンパク質の標的結合部位の一つが、毒素、薬剤、サイトカイン、キレート剤、酵素、放射性化合物、細胞毒性タンパク質、またはこれら以外の機能的作用物質に結合し、残りの二つの標的結合部位が腫瘍抗原に結合するという方法が提供されている。10

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに別の局面において、腫瘍の患者に本発明の多価標的結合タンパク質を有効量投与する段階を含む、腫瘍を治療または検出する方法であって、タンパク質の少なくとも一つの標的結合部位および好ましくは3つの標的結合部位が腫瘍抗原に結合し、一方で、毒素、薬剤、サイトカイン、キレート剤、酵素、放射性化合物、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的作用物質がタンパク質に結合しているという方法が提供されている。20

【 0 0 2 5 】

本発明のさらに別の測面において、本発明の標的結合タンパク質を用いて腫瘍を治療する方法が提供されている。

【 0 0 2 6 】**特定な態様の説明**

本発明は、少なくとも3つの標的結合部位を含む多価標的結合タンパク質を提供する。これら3つの標的結合部位は、同一または異なった標的を目的とすることができます。本発明の多価結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチドを含む。第一のポリペプチドは、好ましくは免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメインである第一の免疫グロブリン様ドメインに共有結合した第一の一本鎖Fv分子を含む。第二のポリペプチドは、好ましくは免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメインである第二の免疫グロブリン様ドメインに共有結合した第二の一本鎖Fv分子を含む。第一および第二の一本鎖Fv分子は、2つの標的結合部位を形成し、かつ第一および第二の免疫グロブリン様ドメインが会合して、第三の標的結合部位を形成する。あるいは、第一および第二の一本鎖Fv分子が会合して、一緒に2つの結合部位を形成し、第一および第二の免疫グロブリン様ドメインが会合して、第三の結合部位を形成することもできる。好ましくは、第一の一本鎖Fv分子と第一の免疫グロブリン様ドメインとが、好ましくは免疫グロブリン軽鎖定常領域ドメインを含む第一の付加アミノ酸配列を介して共有結合しており、第二の一本鎖Fv分子と第二の免疫グロブリン様ドメインとが、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域ドメインを含む第二の付加アミノ酸配列を介して共有結合している。より好ましくは、第一の付加アミノ酸配列と第二の付加アミノ酸配列とが第一のポリペプチドと第二のポリペプチドとの間の会合を安定化するために、好ましくはジスルフィド結合などの共有結合的相互作用によって互いに会合する。30

【 0 0 2 7 】

本明細書で、「抗体」という用語は、「免疫グロブリン」という用語と互換的に使用されている。「ドメイン」または「断片」とは、タンパク質のアミノ酸配列の一部を意味する。40

【 0 0 2 8 】**抗体の構造**

ヒトの抗体は、少なくとも5つのクラスがあり、各クラスは、それぞれ同一の基本構造をもつ。抗体の基本構造は、ヘテロ二量体が、それぞれ分子量約25kDaの軽鎖、および50

分子量約 50 ~ 77 kDa の重鎖からなる、同一のヘテロ二量体 2 つからなる四量体、またはその多量体型である。例えば、免疫グロブリン G (IgG) は、2 つの同じヘテロ二量体からなるが、免疫グロブリン M (IgM) は、5 つの同じヘテロ二量体からなる。 IgG 分子の 2 つのヘテロ 2 量体はジスルフィド結合を介して共有結合している。各ヘテロ二量体の軽鎖および重鎖も、少なくとも一つのジスルフィド結合を介して共有結合している。

【 0029 】

軽鎖または重鎖は、それぞれいくつかの領域に折り畳まれる。各領域は、約 110 アミノ酸残基からなり、保存された三次元立体構造を有する。軽鎖は、1 つの可変領域 (VL) と 1 つの定常領域 (CL) とを含む。重鎖は、1 つの可変領域 (VH) と 3 つの定常領域 (CH1、CH2、および CH3) とを含む。重鎖の CH1 領域および CH2 領域は、ヒンジ領域によって連結されている。抗体の VL および VH 領域が会合して抗原結合部位を形成する。この会合は、本来、非共有結合的相互作用を含む。「 Fv 」とは、VL および VH の会合によって形成される構造物を意味する。抗原結合部位と相互作用する抗原上の領域はエピトープと呼ばれる。エピトープは、抗体の抗原結合部位の立体構造の中にはまり込むと、抗体の抗原への結合が可能になる。抗原と抗原結合部位との相互作用によって、抗体の特異性が決定される。

【 0030 】

抗体の CL 領域と CH1 領域とが非共有結合的相互作用によって会合する。CL 領域は、ジスルフィド結合によって、重鎖のヒンジ領域にも結合する。例えば、軽鎖の型の Cys 214 (カバット (Kabat) の番号付け) は、重鎖ヒンジ領域の Cys 233 (カバットの番号付け) とジスルフィド結合を形成することができる。カバットの番号付けについては、カバット (Kabat EA) 、ウー (Wu TT) 、ペリー (Perry H M) 、ゴッテスマン (Gottesman KS) 、およびフォラー (Foeller C) (1991) 、「免疫学的な興味の対象となるタンパク質の配列 (Sequences of proteins of immunological interest) (第 5 版、米国保健社会福祉省、米連邦政府印刷局発行 (US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Office)) 」を参照のこと。この参考文献は、参考として本明細書に組み入れられる。CL 領域と CH1 領域との会合は、CL 領域とヒンジ領域とのジスルフィド結合とともに、抗体の三次元構造の安定化に寄与する。

【 0031 】

免疫グロブリン毎に、可変領域 (VL および VH) は、その構造およびアミノ酸組成においてかなりの変化を示す。しかし、定常領域 (CL 、 CH1 、 CH2 、および CH3) は、ほとんど変化を示さない。本明細書において「可変」とは、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列の多様性を意味する。可変領域の中には、抗体毎にアミノ酸配列が極端に可変な領域が見られる。これらのいわゆる「超可変」領域、または「相補性決定領域」 (CDR) は、軽鎖または重鎖の各可変領域に 3 つずつ見られる。各 CDR は、比較的保存されたフレームワーク (FR) に隣接している。FR は、可変領域の構造的な完全性を維持すると考えられている。軽鎖の CDR とそれに対応する重鎖の CDR とで抗原結合部位が形成される。CDR の「超可変性」によって、抗体の特異性が多様であることが説明される。

【 0032 】

天然の抗体分子をパパインプロテアーゼで切断すると、抗原結合部位を保持した断片が生成する。これらの断片は、一般的に Fab 断片として知られているが、抗体の軽鎖 (VL および CL) 、および重鎖の断片 (VH 、 CH1 、およびヒンジ領域の一部) を含む。軽鎖、および重鎖の断片は、少なくとも 1 つのジスルフィド結合によって共有結合している。

【 0033 】

抗体は、タンパク質の免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。このスーパーファミリーは、免疫グロブリン G (IgG) 、免疫グロブリン M (IgM) 、免疫グロブリン A (IgA) 、免疫グロブリン D (IgD) 、免疫グロブリン E (IgE) 、免疫グロブリン H (IgH) 、免疫グロブリン L (IgL) 、免疫グロブリン T (IgT) 、免疫グロブリン U (IgU) 、免疫グロブリン V (IgV) 、免疫グロブリン W (IgW) 、免疫グロブリン X (IgX) 、免疫グロブリン Y (IgY) など、多くの種類の免疫グロブリンを含む。

10

20

30

40

50

ーファミリーのメンバーには、T細胞レセプター、CD2、CD4、CD8、およびある種の型の細胞-細胞接着分子も含まれるが、それらに限定されるわけではない。「細胞の分子生物学(Molecular Biology of The Cell)」(第2版、ブルース・アルバーツ(Bruce Alberts)ら、ガーランド・パブリッシング社(Garland Publishing, Inc.)、1989)の1053~1054頁を参照。免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のメンバーの基本的な構成単位は、「免疫グロブリン様ドメイン」と名付けられている。「免疫グロブリン様ドメイン」は、アミノ酸約100からなり、2つの逆平行シートからできている特徴的なサンドイッチ構造に折り畳まれる。前掲参照。各天然の「免疫グロブリン様ドメイン」は、通常、別々のエクソンにコードされている。前掲参照。典型的な免疫グロブリン様ドメインは、抗体の可変領域と定常領域とを含んでいる。10

【0034】

一本鎖Fv分子

一本鎖Fv分子(scFv)は、VLドメインとVHドメインを含む。VLおよびVHドメインは会合して標的結合部位を形成する。さらに、これら2つのドメインに、ペプチドリンカー(L)が共有結合している。VLドメインがscFv分子のN末端部分であれば、scFv分子はVL-L-VHと示され、VHドメインがscFv分子のN末端部分であれば、VH-L-VLと表記される。scFv分子の作製法、および適当なペプチドリンカーを設計する方法は、米国特許第4,704,692号、米国特許第4,946,778号、ラーグ(R. Raag)およびウィットロー(M. Whitlow)、「一本鎖Fv(Single Chain Fvs)」FASEB Vol 9:73~80(1995)、ならびにバード(R. E. Bird)およびウォーカー(B. W. Walker)、「一本鎖抗体可変領域(Single Chain Antibody Variable Regions)」TIBTECH, Vol 9;132~137(1991)に記載されている。これらの参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。20

【0035】

VL-L-VHという構造をもつ一本鎖Fv分子は、VH-L-VLという構造をもつ一本鎖Fv分子と会合して、二価の二量体を形成する。この場合、第一のscFvのVLドメインと第二のscFv分子のVHドメインが会合して、一つの標的結合部位を形成し、第一のscFvのVHドメインと第二のscFvのVLドメインが会合して、もう一つの標的結合部位を形成する。30

【0036】

多価標的結合タンパク質

一つの態様において、多価標的結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチドが会合して構築される。図1参照。第一のポリペプチドは、好ましくは免疫グロブリンの軽鎖可変領域ドメインである第一の免疫グロブリン様ドメインに共有結合した第一の一本鎖Fv分子を含む。第二のポリペプチドは、好ましくは免疫グロブリンの重鎖可変領域ドメインである第二の免疫グロブリン様ドメインに共有結合した第二の一本鎖Fv分子を含む。第一および第二の一本鎖Fv分子は、それぞれ標的結合部位を形成し、第一および第二の免疫グロブリン様ドメインは会合して第三の標的結合部位を形成する。40

【0037】

好ましい態様において、第一の免疫グロブリン様ドメインは、抗体の軽鎖可変領域ドメイン(VLドメイン)、またはその派生ドメインを含み、第二の免疫グロブリン様ドメインは抗体の重鎖可変領域ドメイン(VHドメイン)、またはその派生ドメインを含む。VLおよびVHドメインは、国際公開公報第93/11236号に記載されているような技術を用いて、インビトロで構築した合成ドメインでもよい。VLドメイン、またはその派生ドメインは、VHドメイン、またはその派生ドメインと会合して、機能的標的結合部位を形成する。二つのドメインに、50%より高い、好ましくは70%より高い、最も好ましくは90%よりも高いアミノ酸配列同一性があれば、一方のドメインは、他方のドメインの派生ドメインである。「アミノ酸配列同一性」とは、当技術分野において認められてい50

る意味であり、公開されている技法によって計算することができる。「コンピュータ分子生物学（COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY）」、レスク（Lesk, A. M.）編、オックスフォード大学出版会（Oxford University Press）、ニューヨーク（New York）、1988；「バイオコンピューティング：情報学およびゲノムプロジェクト（BIOCOMPUTING: INFOMATICS AND GENOME PROJECTS）」スミス（Smith, D. W.）編、アカデミックプレス（Academic Press）、ニューヨーク（New York），1993；「配列データのコンピュータ解析（COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA）」、第一部、グリフィン（Griffin, A. M.）およびグリフィン（Griffin, H. G.）編、ヒューマナプレス（Human Press）、ニュージャージー（New Jersey），1994；「分子生物学における配列解析（SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY）」、フォン・ハインジ（Von Heijne, G.）アカデミックプレス（Academic Press）、1987；ならびに「配列解析プライマー（SEQUENCE ANALYSIS PRIMER）」、グリブスコフ（Gribskov, M.）およびデベロー（Devereux, J.）編、M. ストックトンプレス（M Stockton Press）、ニューヨーク（New York）、1991を参照。これらの参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。二つのアミノ酸配列間の同一性を測定する方法は数多くあるが、「同一性」という用語は、当業者に周知されている。カリロ（Carillo, H.）およびリプトン（Lipton, D.），SIAM J Applied Math（1988）48:1073を参照。本参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。二つの配列間の同一性または類似性を決定するために広く用いられている方法には、「大規模コンピュータへの手引き（Guide to Huge Computers）」、「マーティン・J・ビショップ（Martin J. Bishop）」編、アカデミックプレス（Academic Press）、サンディエゴ（San Diego）、1994；ならびにカリロ（Carillo, H.）およびリプトン（Lipton, D.），SIAM J Applied Math（1988）48:1073で開示されている方法があるが、それらに限定されない。同一性または類似性を決定する方法は、コンピュータプログラムでコード化されている。二つの配列間の同一性または類似性を決定する、好ましいコンピュータプログラムには、GCGプログラムパッケージ（デベロー（Devereux, J.）ら、Nucleic Acid Research（1984）12（1）:387）、BLASTP、BLASTN、FASTA（アッシュル（Atschul, S. F.）ら、J. Mol. Biol.（1990）215:403）、およびFASTDB（ブルトラーグ（Brutlag）ら、Comp. App. Biosci.（1990）6:237～245）があるが、これらに限定されない。

【0038】

また、クエリー配列（query sequence）（例えば、本発明の配列）と対象配列（subject subject）との間で最適な全体的一致率を測定するための、全体配列アラインメント法とも呼ばれる、より好ましいな方法は、ブルトラーグ（Brutlag）ら、（Comp. App. Biosci.（1990）6:237～245）のアルゴリズムに基づいたFASTDBコンピュータプログラムを用いて行われる。配列アラインメントにおいて、クエリー配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるか、アミノ酸配列である。この全体配列アラインメント法の結果は一致率（%）になる。FASTDBアミノ酸アラインメントで使用される好ましいパラメータは以下の通りである。マトリクス=PAM 0、K-タップル=2、ミスマッチ・ペナルティー=1、連結ペナルティー（joining penalty）=20、無作為化グループ長=0、カットオフ値=1、ウィンドウサイズ=配列長、ギャップ・ペナルティー=5、ギャップ・サイズ・ペナルティー=0.05、ウィンドウサイズ=500または対象アミノ酸配列長のどちらか短い方。対象配列が、内部欠失のせいではなく、N末端またはC末端の

欠失によってクエリー配列よりも短い場合には、結果に対し、手動で補正を行なう必要がある。これは、F A S T D B プログラムが、全体的な一致率を計算するとき、対象配列のN末端およびC末端の欠失を計算に入れないとある。クエリー配列に対してN末端およびC末端が欠失した対象配列については、対象配列のN末端およびC末端である、クエリー配列の残基であって、対応する対象配列の残基とは一致／整列しない残基の数を、クエリー配列の塩基総数の比率として計算することによって一致率(%)を補正する。ある残基が一致／整列するか否かは、F A S T D B 配列アラインメントの結果によって判定される。次に、この割合を、特定のパラメータを用いて上記F A S T D B プログラムによって計算された一致率から引いて、最終的な一致率スコアが得られる。この最終的な一致率スコアが、本発明の目的のために使用されるものである。対象配列のN末端およびC末端にある残基であって、対象配列と一致／整列しない残基のみが、一致率スコアを手動で調整するために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠位にあるN末端およびC末端の残基の外側にあるクエリー残基位置のみが考慮されるのである。例えば、90アミノ酸残基の対象配列を100残基のクエリー配列と整列させて一致率を決定するとする。欠失は、対象配列のN末端で起きているため、F A S T D B アラインメント法では、N末端側にある最初の10塩基の一致／整列を示すことができない。この10個の対応しない残基は、配列の10%に当たる((一致しないN末端およびC末端残基数)/(クエリー配列における全残基数))。したがって、F A S T D B プログラムによって計算された一致率スコアから10%を差し引く。残りの90残基が完全に一致していたとしても、最終的な一致率は90%になる。別の例において、90残基の対象配列を100残基のクエリー配列と比較する。このとき、欠失が内部欠失であるため、クエリー配列と一致／整列しない残基は、対象配列のN末端またはC末端にはない。この場合には、F A S T D B によって計算された一致率を手動で補正することはない。再び繰返すが、F A S T D B アラインメントで表示されているように、対象配列のN末端およびC末端の外側にある残基位置であって、クエリー配列と一致／整列しない残基位置のみが、手動による補正の対象となる。

【0039】

V L ドメインまたはその派生ドメインが、V H ドメインまたはその派生ドメインと会合して、機能的な標的結合部位を形成することができるか否かを、M 1 3 バクテリオファージディスプレイを用いて試験することができる。例えば、V L ドメインまたはその派生ドメインをコードするc D N Aと、V H ドメインまたはその派生ドメインをコードするD N Aを連結させてs c F v 配列を形成させることができる。このようにして形成されたs c F v 配列を、M 1 3 ファージディスプレイベクターにサブクローニングすることができる。そして、通常のファージディスプレイ技術を用いて、発現されたs c F v 分子の所望の標的に対する親和性を測定することができる。ファージディスプレイ技術については、「ペプチドおよびタンパク質のファージディスプレイ：実験マニュアル(Phage display of peptides and proteins: A Laboratory Manual)」(1996)(ケイ(Kay, B.)ら編、アカデミックプレス(Academic Press)、サンディエゴ(San Diego))；ダン(Dunn IS), Curr. Opin. Biotechnol., 7:547~553(1996);スマス(Smith GD)およびスコット(Scott JK), Methods Enzymol. 217:228~257(1993);オニール(O'Neill KT)およびヘス(Hoess RH), Curr. Opin. Struct. Biol. 5:443~449(1995)を参照。これらの参考文献は、本開示で引用されている参考文献と同様に、参照として本明細書に組み入れられる。また、V L ドメインまたはその派生ドメインと、V H ドメインまたはその派生ドメインとが機能的な標的結合部位を形成することができるか否かは、例えば、競合アッセイ法、酵素免疫測定法(E L I S A)、およびラジオイムノアッセイ法(R I A)など、当技術分野において公知の標準的測定法によって評価することができる。同様に、上記の方法を用いて、2つの免疫グロブリン様ドメインが会合して形成される標的結合部位の活性を測定することができる。本明細書で使用されるように、結合部位が、少なくとも 10^3 M^{-1} 、好ましくは少

10

20

30

40

50

なくとも 10^4 M^{-1} 、より好ましくは少なくとも 10^5 M^{-1} 、そして、最も好ましくは少なくとも 10^6 M^{-1} という親和性で所望の標的に結合することができれば、その結合部位は機能的である。

【0040】

別的好ましい態様では、第一の一本鎖 Fv 分子と第一の免疫グロブリン様ドメインは、第一の付加アミノ酸配列を介して共有結合しており、かつ第二の一本鎖 Fv 分子と第二の免疫グロブリン様ドメインは、第二の付加アミノ酸配列を介して共有結合している。好ましくは、第一および第二の付加アミノ酸配列は互いに会合して、多価標的結合タンパク質の第一および第二のポリペプチド間ににおける会合を安定化させる。例えば、第一および第二の付加アミノ酸配列は、ロイシンジッパー構造を形成するように、ロイシン残基を多く含ませることができる。より好ましくは、第一および第二の付加アミノ酸配列は互いに共有結合する。例えば、第一および第二の付加アミノ酸配列は、システイン残基を多く含み、互いにジスルフィド結合を形成する。

【0041】

一つの態様において、第一の付加アミノ酸配列は、軽鎖の定常領域ドメイン (CLドメイン) またはその派生ドメインを含み、第二の付加アミノ酸配列は、重鎖の定常領域ドメイン (CHドメイン) またはその派生ドメインを含む。好ましくは、CLドメインまたはその派生ドメイン、およびCHドメインまたはその派生ドメインは、多価標的結合タンパク質の第一および第二のポリペプチド間ににおける会合を安定化するために互いに会合する。CLドメインまたはその派生ドメインは、疎水的相互作用などの非共有結合的相互作用によって、CHドメインまたはその派生ドメインと会合する。

【0042】

好ましい態様において、第一の付加アミノ酸配列は、カバットの番号付けによると Cys 214 に相当するシステインを有する 型軽鎖 CLドメインを含むが、それに対し、第二の付加アミノ酸配列は、カバットの番号付けによると Cys 233 に相当するシステインを有する重鎖ヒンジ領域、またはその一部を含む。第一および第二の付加アミノ酸配列は、これら 2 つのシステイン残基の間のジスルフィド結合によって共有結合することができる。

【0043】

別的好ましい態様において、多価標的結合タンパク質の第一のポリペプチドは、可変領域 VL および定常領域 CL を含む免疫グロブリン軽鎖断片に共有結合した第一の scFv 分子を含み、かつ多価標的結合タンパク質の第二のポリペプチドは、可変領域 VH および定常領域 CH1 を含む免疫グロブリン重鎖断片に共有結合した第二の scFv 分子を含む。図 2 を参照のこと。VL 領域と VH 領域とが会合して標的結合部位を形成する。CL 領域と CH1 領域とが互いに会合して多価標的結合タンパク質を安定化させる。好ましくは、第一の scFv 分子と CL 領域とが、約 4 ~ 15 個のアミノ酸残基からなる第一のペプチドリンカーを介して共有結合する。好ましくは、第二の scFv 分子および CH1 領域も、好ましくは約 4 ~ 15 個のアミノ酸残基からなる第二のペプチドリンカーを介して共有結合する。好ましくは、第一のペプチドリンカーはアミノ酸配列 GGGG または EPKSADKTHTCPPCPGGGS

を有することができ、かつ第二のペプチドリンカーはアミノ酸配列 EPKSCGGGS または EPKSCDKTHTCPPCPGGGS

を有することができる。より好ましくは、第二のペプチドリンカー中のシステイン残基は、抗体の軽鎖と重鎖との間で形成されるジスルフィド結合と同様にして、CL 領域とジスルフィド結合を形成することができる。本態様の多価標的結合タンパク質の分子量は約 100 kDa である。

【0044】

一つの態様において、第一および第二の免疫グロブリン様ドメインは、ヒト化可変領域ドメインを含む。例えば、ネズミ抗体の相補性決定領域をヒト抗体のフレームワーク領域につなぐことができる。サハゲン (Sahagen) ら、J. Immunol., 137

10

20

30

40

50

: 1066 ~ 1074 (1986) ; サン (Sun) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214 ~ 218 (1987) ; ニシムラ (Nishimura) ら、Cancer Res., 47: 999 ~ 1005 (1987) ; リー (Lie) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439 ~ 3443 (1987) ; および米国特許第5,874,540号を参照。これらの参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。あるいは、ヒト抗体の可変領域を用いることもできる。ヒト抗体を単離する方法は、当技術分野においてよく知られており、例えば、ヒト抗体を產生するように改変されたトランスジェニック動物を用いること、またはヒト抗体ライブラリーのファージディスプレイから単離することができる。米国特許第6,075,181号および第5,969,108号を参照。これらは、参照として本明細書に組み入れられる。ヒト化可変領域ドメインが、別の可変領域ドメインと会合して、機能的な標的結合部位を形成することができるか否かを、M13バクテリオファージディスプレイ、または例えば、競合アッセイ法、酵素免疫測定法 (ELISA)、およびラジオイムノアッセイ法 (RIA) など、他の常法である測定法を用いて決定することができる。第一および第二のscFv分子の可変領域ドメインも、同様にしてヒト化することができる。また、ヒト抗体の定常領域ドメインを用いて、多価標的結合タンパク質の第一および第二のscFv分子を、それぞれ、第一および第二の免疫グロブリン様ドメインに共有結合させることができる。

10

20

30

【0045】

一つの態様において、多価結合タンパク質の3つの標的結合部位の少なくとも2つが、異なった標的結合特異性をもつ可能性がある。例えば、第一および第二のscFv分子が異なったアミノ酸配列をもち、異なる結合特異性を有することが可能である。3つの標的結合部位のそれぞれが、互いに異なる標的結合特異性をもつことも可能である。本明細書で使用されるように、2つの結合部位が、同じ標的結合特異性を持たなければ、これらは異なる標的結合特異性を有することになる。2つの結合部位が、同じような結合親和性をもって同じ標的に結合できるとき、それらは、「同じ」標的結合特異性をもつという。所与の抗原または標的に対する2つの標的結合部位の親和性定数の間の割合が約0.2～約5であるとき、これらの部位は「同じような」結合親和性をもつという。2つの標的結合部位が同じ標的に対して同じ結合特異性を持ってば、それらの部位は同一である。

30

40

【0046】

別の態様において、多価結合タンパク質の3つの標的結合部位の少なくとも2つが、同じ標的結合特異性をもつ可能性がある。例えば、第一および第二のscFv分子が同じアミノ酸配列をもち、同じ結合特異性を有することが可能である。3つの標的結合部位が、同じ標的結合特異性をもつことも可能である。これは、第一の免疫グロブリン様ドメイン、第一のscFv分子のVLドメイン、および第二のscFv分子のVLドメインが同じアミノ酸配列をもち、第二の免疫グロブリン様ドメイン、第一のscFv分子のVHドメイン、および第二のscFv分子のVHドメインが同一のアミノ酸配列をもつときに達成される。少なくとも2つの同一の結合部位をもつ標的結合タンパク質は、その標的に対して増強された結合活性を示すことができる。

40

【0047】

さらに別の態様において、多価結合タンパク質は、少なくとも2つのヘテロ二量体であって、それぞれが第一および第二のポリペプチドを含むヘテロ二量体を含む。第一のポリペプチドは、第一の付加アミノ酸配列を介して共有結合している第一の一本鎖Fv分子および第一の免疫グロブリン様ドメインを含む。第二のポリペプチドは、第二の付加アミノ酸配列を介して共有結合している第二の一本鎖Fv分子および第二の免疫グロブリン様ドメインを含む。第一のヘテロ二量体の第一または第二の付加アミノ酸配列は、好ましくは、ジスルフィド結合などの共有結合的相互作用によって、第二のヘテロ二量体の第一または第二の付加アミノ酸配列に会合することができる。

【0048】

本明細書で使用されるように、2つの分子が一緒に結合する性質を持つば、それらは互い

50

に会合する。2つの分子の会合は、共有結合的相互作用または非共有結合的相互作用のどちらか、または共有結合的相互作用および非共有結合的相互作用の両方を含むことができる。ある分子と別の分子が互いに会合すれば、その分子はもう一方の分子に連結または結合している。本明細書で使用されるように、「連結」および「結合」という用語は互換可能である。

【0049】

多価標的結合タンパク質のペプチドリンカー

多価標的結合タンパク質の $s_c F_v$ 分子に対するペプチドリンカーは、好ましくは、本質的に Gly および Ser 残基からなる。好ましいペプチドリンカーは $[GGGGS]_3$ である。 Glu および Lys 残基を含むこともできる。米国特許第4,946,778号に開示されている方法に従って、 $s_c F_v$ 分子に対する好適なペプチドリンカーを設計することができる。本参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0050】

多価結合タンパク質の $s_c F_v$ 分子に対するペプチドリンカーは、好ましくは少なくとも 12 個のアミノ酸残基を含む。より好ましくは、ペプチドリンカーは少なくとも 15 個のアミノ酸残基を含む。最も好ましくは、ペプチドリンカーは約 15 ~ 30 個のアミノ酸残基を含む。12 個のアミノ酸残基よりも短いペプチドリンカーは、 $s_c F_v$ 分子の VL ドメインと VH ドメインとの間の可動性を低下させることがある。

【0051】

本発明の多価結合タンパク質の第一および第二の $s_c F_v$ 分子は、VL - L - VH 構造かまたは VH - L - VL 構造をとりうる。同一の多価標的結合タンパク質の 2 つの $s_c F_v$ 分子は、同一または反対の構造をとることができる。

【0052】

一つの態様において、多価結合タンパク質の 2 つの $s_c F_v$ 分子のペプチドリンカーは、12 個よりも少ないアミノ酸残基を含み、そして 2 つの $s_c F_v$ 分子は、反対の構造をもつ。例えば、第一の $s_c F_v$ 分子が VL - LL - VH 構造をもち、第二の $s_c F_v$ 分子が VH - L - VL 構造をもつことも可能である。2 つの $s_c F_v$ 分子が会合して、2 つの標的結合部位を形成する。上記の例において、一つの標的結合部位は、第一の $s_c F_v$ 分子の VL ドメインと第二の $s_c F_v$ 分子の VH ドメインとの会合によって形成され、もう一つの標的結合部位は、第一の $s_c F_v$ 分子の VH ドメインと第二の $s_c F_v$ 分子の VL ドメインとの会合によって形成される。このようにして形成された 2 つの結合部位の結合特異性および親和性は、例えば、競合アッセイ法、酵素免疫測定法 (ELISA)、およびラジオイムノアッセイ法 (RIA) など、当技術分野において公知の標準的測定法によって評価することができる。

【0053】

別の態様において、多価標的結合タンパク質の第一のポリペプチドは、第一のペプチドリンカーを介して免疫グロブリンの軽鎖断片に共有結合している第一の $s_c F_v$ 分子を含み、多価標的結合タンパク質の第二のポリペプチドは、第二のペプチドリンカーを介して免疫グロブリンの重鎖断片に共有結合している第二の $s_c F_v$ 分子を含む。第一および第二のペプチドリンカーは、多価結合タンパク質の他の部分に対して $s_c F_v$ 分子の可動性を増大することができる。この可動性は、例えば、標的が大きいために、標的結合事象の一つが他の標的結合事象を妨害するときに大きくなる。好ましい態様において、免疫グロブリンの軽鎖断片は、VL および CL 領域を含み、免疫グロブリン重鎖断片は VH および CH1 領域を含む。第一および第二のペプチドリンカーは、好ましくは少なくとも 4 アミノ酸残基を含み、より好ましくは少なくとも 10 アミノ酸残基を含み、最も好ましくは少なくとも 15 アミノ酸残基を含む。好ましくは、第二のペプチドリンカーは、免疫グロブリンの軽鎖断片の CL 領域にある Cys214 (カバットの番号付け) とジスルフィド結合を形成することができるシステイン残基を含む。例えば、第二のペプチドリンカーはアミノ酸配列 EPKSCKGGGS を有し、第一のペプチドリンカーはアミノ酸配列 GGGS を有することが可能である。別の例として、第二のペプチドリンカーは以下のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

EPKSCDKTHTCPPCPGGGS

を有し、第一のペプチドリンカーはアミノ酸配列
EPKSADKTHTCPPCPGGGS

を有することが可能である。

【0054】

多価標的結合タンパク質と作用物質との結合

第一または第二のポリペプチドのN末端またはC末端のどちらかに付加的アミノ酸残基を付加することができる。付加的アミノ酸残基は、ペプチドタグ、シグナルペプチド、サイトカイン酵素（例えば、プロドラッグ活性化酵素）、シュードモナスの菌体外毒素などのペプチド毒、ペプチド薬、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的タンパク質を含むことができる。本明細書で使用されるように、機能的タンパク質とは、生物学的機能をもつタンパク質をいう。好ましい機能的タンパク質は細胞毒性タンパク質である。タンパク質のN末端またはC末端に付加アミノ酸残基を付加することは、当技術分野においてよく知られている。これは、例えば、付加的アミノ酸残基をコードするDNA配列をインフレームで第一または第二のポリペプチドをコードするDNA配列に連結させて行なうことができる。連結部位は、第一または第二のポリペプチドをコードするDNA配列の5'末端または3'末端のいずれでもよい。付加的アミノ酸残基は、好ましくは多価結合タンパク質の結合特異性または親和性に有意な影響を与えない。修飾されたタンパク質が 10^3 M⁻¹よりも低い親和性で目的とする標的に結合すれば、標的結合タンパク質の結合特異性は有意に影響を受けている。修飾されたタンパク質が未修飾のタンパク質の結合親和性と較べて10倍よりも低い親和性で目的とする標的に結合すれば、標的結合タンパク質の結合親和性は大きく影響を受けている。10

【0055】

一つの態様において、薬剤、毒素、放射性化合物、酵素、細胞毒性タンパク質、キレート剤、サイトカイン、およびその他の機能的作用物質を、好ましくは、例えば、アミン基、カルボキシリ基、フェニル基、チオール基、ヒドロキシリ基など、多価標的結合タンパク質のアミノ酸残基の側鎖への共有結合によって多価標的結合タンパク質に結合させることができる。例えば、ジイソシアネート、ジイソチオシアネート、ビス(ヒドロキシスクシンイミド)エステル、カルボジイミド、マレイミド-ヒドロキシスクシンイミドエステル、グルタルアルデヒドなど、さまざまな従来型のリンカーをこの目的に使用することができる。多価タンパク質への作用物質の結合は、好ましくはその標的に対する結合特異性または親和性に大きな影響を与えない。本明細書で使用されるように、機能的な作用物質とは、生物学的機能をもつ作用物質のことである。好ましい機能的な作用物質は細胞毒性剤である。20

【0056】

別の態様において、細胞毒性剤をポリマー担体に結合させることができ、次に、ポリマー担体を多価標的結合タンパク質に結合させることができる。この方法として、ライサー(Ryser)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:3867~3870, 1978、米国特許第4,699,784号、および米国特許第4,046,722号を参照。これらの参考文献は参照として本明細書に組み入れられる。結合は、好ましくは多価結合タンパク質の結合特異性または親和性に大きな影響を与えない。30

【0057】

多くの薬剤および毒素が、腫瘍細胞または微生物に対して細胞毒作用をもつことが知られている。これらの薬剤および毒素は、メルク・インデックスなどの医薬品集に記載されているよう。

【0058】

一つの態様において、少なくとも一つのN-グリコシリ化配列を、多価標的結合タンパク質の第一または第二のポリペプチドのいずれかに導入することができる。ハンセン(Hansen)ら、米国特許第5,443,953号、およびレオン(Leung)ら、米国仮出願特許第60/013,709号を参照のこと。ここでN-グリコシリ化配列が抗体40

50

の V L (H C N 1 部位) 領域または C H 1 (H C N 5 部位) 領域に導入されているこれらの参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。好ましくは、グリコシル化配列は標的結合部位から離れた部位に挿入して、配列のグリコシル化が多価標的結合タンパク質の結合特異性または親和性に大きな影響を与えないようにすることができる。より好ましくは、グリコシル化部位を標的結合部位から少なくとも 4 . 1 離れたところに挿入することができる。最も好ましくは、N - グリコシル化部位を、第一および第二の免疫グロブリン様ドメイン、ならびに第一および第二の s c F v 分子の外側に導入することができる。好ましい態様において、第一または第二の免疫グロブリン様ドメインを、それぞれ第一または第二の s c F v 分子に共有結合させる免疫グロブリン定常領域ドメインなど、第一および第二の付加アミノ酸配列中で N - グリコシル化部位を操作することができる。コンピュータによるモデリングが、N - グリコシル化認識配列を導入するのに適した部位を決める上で役立つかもしれない。10

【 0 0 5 9 】

部位特異的突然変異法を用いて、N - グリコシル化認識部位を第一または第二のポリペプチド中に操作することができる。可能であればいつでも、導入された変異は、タンパク質ドメインの最終的な三次構造を維持するため、本質的に保存的である。保存的変異は、一般的に、同じような大きさと臨床学的特性を別のものに置換することを含む。例えば、好ましい N - グリコシル化認識配列は、N X T または N X S であるが、ここで、N はアスパラギンを、T はトレオニンを、S はセリンを、そして X はあらゆるアミノ酸残基を表す。グルタミン (Q) 残基をアスパラギン (N) 残基で置換するのは、保存的置換と見なされるはずである。ただ一つのアミノ酸置換によってグルコシル化部位となりうる部位を提供する配列を注意深く選択することによって、構造特異的ができるように最終的な三次構造において考えられる動搖を最小限に抑えることができる。20

【 0 0 6 0 】

N - グリコシル化配列の挿入は、一例として記載されているに過ぎない。関係する原理は、O - グリコシル化にも等しく適用することができる。O - グリコシル化は、トレオニンまたはセリンで起こることが知られている。O - 結合型グリコシル化の受容体配列は比較的不明瞭である。ウィルソン (W i l s o n) ら、B i o c h e m . J . , 2 7 5 : 5 2 6 (1 9 9 1) を参照。これらの領域において、プロリン、セリン、およびトレオニンの含有量の高さに偏りがあるかもしれないが、正確な一次配列よりも接觸可能性によって、特定のトレオニンまたはセリン残基が O - グリコシル化されるか否かが決まる。それにもかかわらず、O - グリコシル化されていることが知られている別の抗体において同定された O - グリコシル化と思われる配列を、目的とする標的結合タンパク質の異なる位置に移植するための標準配列として使用することができる。チャンドラシェカラカン (C h a n d r a s h e k a r k a n) ら、J . B i o l . C h e m . 2 5 9 : 1 5 4 9 (1 9 8 1) 、スマイス (S m y t h) およびウツミ (U t s u m i) , N a t u r e , 2 1 6 : 3 2 2 (1 9 6 7) : キム (K i m) ら、J . B i o l . C h e m . 2 6 9 : 1 2 3 4 5 (1 9 9 4) を参照。グリコシル化認識部位配列の挿入、導入された配列のグリコシル化、またはその他の修飾は、好ましくは多価標的結合タンパク質の結合特異性および親和性に大きな影響を与えない。30

【 0 0 6 1 】

別の態様において、糖鎖を、操作されたグリコシル化配列に共有結合させることもできる。糖鎖の共有結合的付着は、グリコシル化認識配列を含む多価標的結合タンパク質を真核細胞の中で発現させて行なうことができる。多価結合タンパク質の第一または第二のポリペプチドの N 末端に好ましくはシグナルペプチド配列を導入することができる。真核細胞の中で発現されると、シグナルペプチドをもつ第一または第二のポリペプチドは、細胞質から小胞体 (E R) に転位することができ、そこで、操作されたグリコシル化認識配列を介してポリペプチドをグルコシル化することができる。40

【 0 0 6 2 】

さらに別の態様において、酵素、毒素、サイトカイン、薬剤、キレート剤、細胞毒性タン50

パク質、放射性化合物、またはその他の細胞毒性作用物質を、操作されたグリコシリ化認識部位を介して多価結合タンパク質に取り込まれた糖鎖に付着させることができる。ある作用物質を糖鎖に結合させるために、糖鎖中のヘミアセタール環を化学的に酸化して、反応性のアルデヒド基を作出することができる。このようにして形成されたアルデヒド基は、シップ塩基によって、タンパク質または作用物質のアミノ基に共有結合させることができる。タンパク質、または作用物質を糖鎖に付着させる一般的方法については、ハンセン(Hansen)ら、米国特許第5,443,953号、およびレオン(Leung)ら、米国仮出願特許第60/013,709号を参照。これらの参考文献の全体の内容は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0063】

10

多価標的結合タンパク質の発現ベクターの構築

多価結合タンパク質の第一または第二のポリペプチドのための発現ベクターは、免疫グロブリン様ドメイン、scFv分子、または付加アミノ酸配列をコードするDNAを、当業者により認められているDNAライゲーション技術を用いてインフレームで連結することにより得ることができる。サムブルック(Sambrook)ら、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、コールドスプリングハーバー研究所出版会(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、第2版(1989)を参照。scFv分子を多価結合タンパク質の他の部分に共有結合させるペプチドリンカーは、例えば、ペプチドリンカーをコードするDNA配列を取り込んだプライマーを使用して、PCR技術によって導入することができる。

【0064】

20

抗体の可変および定常領域ドメインをコードするDNA配列は、公開されている情報源から得ることができ、または当技術分野において既知の常法によって得ることもできる。例えば、米国保健社会福祉省(US Department of Health and Human Services)が発行した、カバット(Kabat)ら、「免疫学的な関心対象となるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、第4版(1991)は、その発行日よりも前に記載されていた抗体可変領域のほとんどの配列を開示している。

【0065】

30

抗体の可変または定常領域を合成するための一般的な技術は、例えば、オーランディ(Orlanedi)ら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 86:3833(1989)、およびラリック(Larrick)ら、「方法集：酵素学における方法の手引き(Methods: A Companion to Methods in Enzymology)」、2:106(1991)に記載されている。また、「モノクローナル抗体：原理と応用(MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS)」の137~185頁、ウォード(Ward)ら、「抗体の遺伝子操作法および発現法(Genetic Manipulation and Expression of Antibodies)」(ワイリー・リス社(Wiley-Liss, Inc.)1995)、および「モノクローナル抗体：作製、操作、および臨床応用(MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION)」、リッター(Ritter)ら編の166~179頁、コートニー・ラック(Courtney-Luck)、「モノクローナル抗体の遺伝子操作法(Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies)」、(ケンブリッジ大学出版会(Cambridge University Press)1995)を参照。

40

【0066】

また、抗体の可変および定常領域に対するDNA配列は、その抗体をコードするmRNAの逆転写によって得ることができる。抗体に対するmRNAの由来は、広範なハイブリ

50

ドーマから得ることができる。例えば、米国メリーランド州ロックビル、パークロンドライブ20309(20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA)にあるアメリカン・タイプカルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)の「ATCC細胞株およびハイブリドーマカタログ(the catalogue of ATCC Cell Lines and Hybridomas)」(1990)を参照。それには、多様な抗体に作用するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマが列挙されていて、コレクションから入手することが可能である。これらの細胞株、または同じような性質をもつ別の細胞株を、抗体の可変および定常領域をコードするmRNAの由来とすることができます。

【0067】

また、抗体の可変および定常領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物、最も好適にはマウスを免疫して得ることができる。免疫原は、目的の抗原であるか、ハプテンを目的とする場合は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などの抗原にハプテンを結合させた抗原接合体である。免疫は、宿主哺乳動物に、通常は2~3週間隔で免疫原を一回以上繰り返し注射して、常法にしたがって実施することができる。通常、最後の抗原投与から3日後に、脾臓を取り出して単細胞に解離し、当技術分野において知られている常法によって容易にmRNAを得ることができるハイブリドーマをもたらすための細胞融合に使用する。DNA配列は、mRNAの逆転写によって得ることができる。前記処理によって、例えば、細胞表面タンパク質、CD28やCD3などのT細胞マーカー、Fcレセプター、薬剤、毒素、サイトカイン、酵素、細胞毒性タンパク質、キレート剤、腫瘍抗原、または放射性である化合物など、選択された免疫原抗原に特異的な抗体を得ることができる。抗体の可変または定常領域をコードするDNA配列を用いて、本発明の多価標的結合タンパク質を構築することができる。

【0068】

抗体の可変および定常領域は、M13バクテリオファージディスプレイ法を用いて得ることができます。バートン(Burton)ら、Adv. Immunol. 57: 191~280(1994)参照。本質的には、Bリンパ球などの抗体産生細胞の集団から得られたmRNAより、抗体に対するcDNAライブラリーを作製する。増幅されたcDNAをM13ファージディスプレイベクターにクローニングして、ファージ表面上に抗体断片を発現するファージライブラリーを作出する。抗原に対する親和性を利用して、目的とする抗体断片を表示するファージを選択する。選択したファージを増幅して、目的とする抗体を产生する。

【0069】

sFcV分子に対するDNA配列の構築法が、例えば、欧州特許出願第239400号および米国特許第4,946,778号に開示されている。これらの参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。また、sFcV配列の構築は、バード(R.E. Bird)およびウォーカー(B.W. Walker)、「一本鎖抗体可変領域(Single Chain Antibody Variable Regions)」TIBTECH, Vol. 9; 132~137(1991)に記載されている。本参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。さらに、sFcV分子のVLおよびVH領域をコードするDNA配列は、上記したようにして調製できる抗体から得てもよい。

【0070】

好ましくは、抗体遺伝子に由来するシグナルペプチドを、例えば、シグナルペプチド配列を含む5'末端プライマーを用いたPCRなどの通常のDNAクローニング技術によって、標的結合タンパク質のN末端に付加することができる。あるいは、抗体mRNAの逆転写によって、シグナルペプチドを取り込むことができる。天然の抗体をコードするmRNAは、通常、シグナルペプチド配列を含んでいる。このmRNAの逆転写によって、シグナルペプチドおよび抗体の可変領域の両方をコードすることができるDNA配列が作り出される。このようにして得られたDNA配列を用いて、多価標的結合タンパク質の第一または第二の免疫グロブリン様ドメインを構築することができる。

10

20

30

40

50

【0071】

DNA配列は、サンガー(Sanger)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463(1977)に記載されている方法によって決定することができる。本参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0072】

多価標的結合タンパク質の発現

DNAベクターを宿主細胞に導入する方法には、当技術分野においてよく知られている。これらの中には、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、陽イオン性脂質、遺伝子銃、およびバイオリストラクチャ法(Biological)(バイオラド社(Bio-Rad))などがあるが、それらに限定されるものではない。

10

【0073】

多価標的結合タンパク質の第一および第二のポリペプチドを発現させるには、この2つのポリペプチドをコードするDNA配列を、宿主細胞における転写および翻訳による発現を制御する調節配列に操作可能に結合させなければならない。転写を制御する調節配列には、プロモーターおよびエンハンサーなどがある。宿主細胞は、原核細胞か真核細胞のいずれかである。また、発現ベクターは、発現ベクターを保持する宿主細胞を選択するためのマーカー遺伝子も含むことができる。

【0074】

原核宿主における発現に適したプロモーターは、抑制可能型、定常型、または誘導可能型でありうる。これらのプロモーターは、当業者によく知られている。これらのプロモーターには、T4ポリメラーゼ、T3ポリメラーゼ、Sp6ポリメラーゼ、およびT7ポリメラーゼを認識できるプロモーター、バクテリオファージのP_RおよびP_Lプロモーター、大腸菌のtrp、recA、ヒートショック、およびlacZなどのプロモーター、枯草菌(*B. subtilis*)の-アミラーゼ特異的、および²⁸特異的プロモーター、バシラス属(*Bacillus*)のバクテリオファージのプロモーター、ストレプトマイセス属(*Streptomyces*)のプロモーター、バクテリオファージのintプロモーター、pBR322のラクタマーゼ遺伝子のblaプロモーター、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターなどがあるが、それらに限定されるものではない。原核生物のプロモーターについては、グリック・ジェイ(Glick, J.)Ind. Microbiol., 1: 277(1987)、およびワトソン(Watson)ら、「遺伝子の分子生物学(MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE)」第4版、ベンジャミン・カミングス社(Benjamin Cummings)(1987)で概説されている。

20

【0075】

好ましい原核生物宿主は大腸菌である。好ましい大腸菌株には、Y1088、Y1089、CSH18、ER1451、およびER1647などがある。例えば、ブラウン(Brown)(編)「分子生物学実験情報(MOLECULAR BIOLOGY LABEX)」、アカデミックプレス(Academic Press)(1991)参照。別の好ましい宿主は枯草菌であって、BR151、YB886、MI119、MI120、およびB170などの菌株などがある。例えば、IRLプレス社(IRL Press)刊、グローバー(Glover)(編)「DNAクローニング: 実践的方法(DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH)」より、ハーディー(Hardy), 「バシラス菌のクローニング法(*Bacillus Cloning Methods*)」(1985)参照。

30

【0076】

原核生物宿主において抗体を発現させる方法は、当業者によく知られている。例えば、「モノクローナル抗体: 原理と応用(MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS)」の137~185頁、ウォード(Ward)ら、「抗体の遺伝子操作法と発現法(Genetic Manipulation and Expression of Antibodies)」(ワイリー・リス

40

50

社 (W i l e y - L i s s I n c . 1 9 9 5) 参照。さらに、原核細胞において抗体をクローニングするための発現系は市販されている。例えば、I M M U N O Z A P (商標) クローニング・発現システム (ストラタジーン・クローニングシステムズ社 (S t r a t a g e n e C l o n i n g S y s t e m s) ; カリフォルニア州ラホヤ (L a J o l l a , C A)) は、抗体の軽鎖および重鎖を大腸菌で発現させるためのベクターを提供する。当業者であれば、過度の実験を行なうことなく本発明の多価結合タンパク質を発現およびクローニングするために、原核細胞の中で抗体を発現およびクローニングする技術を用いることができると理解できよう。

【0077】

あるいは、本発明の多価結合タンパク質の第一および第二のポリペプチドは、真核生物である宿主細胞の中で発現させることができる。真核宿主細胞には、哺乳動物、昆虫、および酵母の細胞がある。好ましくは、真核宿主細胞は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞は、発現したポリペプチドに対して適切な翻訳後修飾を提供することができる。好適な哺乳動物細胞には、C O S - 7 細胞 (A T C C C R L 1 6 5 1) 、非分泌型ミエローマ細胞 (S P 2 / 0 - A G 1 4 ; A T C C C R L 1 5 8 1) 、ラット下垂体細胞 (G H₁; A T C C C C L 8 2) 、およびラットヘパトーマ細胞 (H - 4 - I I - E ; A T C C C R L 1 5 4 8) などがある。

【0078】

哺乳動物宿主については、転写および翻訳の調節シグナルは、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、およびシミアンウイルスなどのウイルス由来から派生させることができる。さらに、アクチン、コラーゲン、またはミオシンなど、哺乳動物の発現産物由來のプロモーターを使用することもできる。好ましくは、メタロチオニンプロモーターを用いることができる。あるいは、真核生物のプロモーターによって制御される、バクテリオファージT 3 RNAポリメラーゼプロモーターなどの原核生物プロモーターを用いることもできる。例えば、チョウ (Z h o u) ら、M o l . C e l l . B i o l . , 1 0 : 4 5 2 9 (1 9 9 0) 、およびカウフマン (K a u f m a n) ら、N u c l . A c i d s R e s . , 1 9 : 4 4 8 5 (1 9 9 1) 参照。遺伝子の発現を調節できるように、例えば、抑制または活性化させることができるように転写開始を制御するシグナルを選択することができる。

【0079】

通常、真核生物の制御領域は、RNA合成の開始を指令するのに十分なプロモーター領域を含む。このような真核生物プロモーターには、マウスマタロチオネインI遺伝子のプロモーター (ハーマー (H a m e r) ら、J . M o l . A p p l . G e n . 1 : 2 7 3 (1 9 8 2)) ; ヘルペスウイルスのTKプロモーター (マクナイト (M c K n i g h t) , C e l l 3 1 : 3 5 5 (1 9 8 2)) ; SV 4 0 初期プロモーター (ベノイスト (B e n o i s t) ら、N a t u r e (L o n d o n) 2 9 0 : 3 0 4 (1 9 8 1)) ; ラウス肉腫ウイルスプロモーター ; サイトメガロウイルスプロモーター (フォエッキング (F o e c k i n g) ら、G e n e 4 5 : 1 0 1 (1 9 8 0)) ; 酵母g a l 4 遺伝子プロモーター (ジョンストン (J o h n s t o n) ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) 7 9 : 6 9 7 1 (1 9 8 2) ; シルバー (S i l v e r) ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) 8 1 : 5 9 5 1 (1 9 8 4) ; およびI g Gプロモーター (オーランディー (O r l a n d i) ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 6 : 3 8 3 3 (1 9 8 9)) 。

【0080】

強力な調節配列が、本発明の好ましい調節配列である。このような好ましい調節配列の例には、SV 4 0 プロモーター・エンハンサー (I R L プレス社 (I R L P r e s s) 刊、グローバー (G l o v e r) (編) 「DNAクローニング：実践的方法 (D N A C L O N I N G : A P R A C T I C A L A P P R O A C H) 」第2巻、1 4 3 ~ 1 9 0 頁、ゴーマン (G o r m a n) 、「哺乳動物細胞への高効率遺伝子移入法 (H i g h E f f i c i e n c y G e n e T r a n s f e r i n t o M a m m a l i a n c e l l s

10

20

30

40

50

)」(1985)）、hCMV-MIEプロモーター・エンハンサー（ベビントン（Bellington）ら、Bio/Technology 10:169(1992)）、および抗体の重鎖プロモーター（オーランディー（Orlandi）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833(1989)）などである。また、好ましいのは、軽鎖を発現させるための鎖エンハンサー、およびIgHエンハンサー（W. H. フリーマン社（W. H. Freeman and Company）刊、ボラベック（C. Borrebaeck）（編）「抗体工学：実用的手引き（ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE）」の139～157頁、ギリース（Gillies）、「操作された抗体に適した発現ベクターの設計と哺乳動物細胞システム（Design of Expression Vectors and Mammalian Cell Systems Suitable for Engineered Antibodies）」）である。10

【0081】

プロモーターに操作可能に結合している、第一または第二のポリペプチドをコードするDNA配列は、非複製DNA分子として真核生物宿主細胞の中に導入することができる。これらのDNA配列は、直鎖状か、より好ましくは共有結合した閉環状である。これらのDNA分子は自律複製ができないため、コードされているタンパク質の発現は、導入されたDNA配列の一過的発現によって起こる。好ましくは、導入されたDNA配列が宿主の染色体に組み込まれたときに起こる可能性のある永久発現を利用することもできる。

【0082】

好ましくは、導入されたDNA配列はレシピエント宿主内で自律複製できるプラスミドベクターまたはウイルスベクターの中に取り込ませることができる。この目的のためにいくつか可能なベクター系を利用することができます。ベクターの種類の一つは、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来し自律複製する染色体外プラスミドを提供するDNA因子を利用する。二つ目の種類のウイルスは、所望のゲノムまたはcDNAの配列を宿主染色体に組み込みことに依存する。mRNAの最適な合成には、さらに別の因子も必要なことがある。これらの因子には、転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルの他に、スプライスシグナルがある。このような因子を取り込むcDNA発現ベクターは、オカヤマ（Okayama）、Mol. Cell. Biol. 3:280(1983)、サムブルック（Sambrook）ら、「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、コールドスプリングハーバー研究所出版会（Cold Spring Harbor Laboratory Press）第2版(1989)、およびフォーサー（Fousser）ら、Bio/Technology 10:1121(1992)に記載されているものなどである。イントロン配列を含むゲノムDNA発現ベクターも使用することができる。一般的には、ラーナー（Lerner）ら、（編）「抗体作製における新しい技術（NEW TECHNIQUES IN ANTIBODY GENERATION）」、Methods 2(2)(1991)を参照。30

【0083】

さらに、発現ベクターは、薬剤耐性マーカー、または宿主細胞によって選択可能な形質の発現をもたらすその他のマーカー等の選択マーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換えによって形質転換したり、または組換えDNA技術を用いて構築されたベクターによってトランスフェクトしたりできる細胞を意味する。薬剤耐性またはその他の選択マーカーは、一つには、形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にするためである。例えば、G418を用いて、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子を有する発現ベクターを保有するトランスフェクトされた細胞を選択することができる。サザン（Southern）ら、J. Mol. Appl. Gen., 1:327(1982)。あるいは、ハイグロマイシン-Bを用いて、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子を有する発現ベクターを保有するトランスフェクトさ4050

れた細胞を選択することができる。パーマー (P a l m e r) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 84 : 1055 (1987) 参照。あるいは、アミノプテリンとミコフェノール酸とを用いて、キサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を有する発現ベクターを保有するトランスフェクトされた細胞を選択することができる。マリガン (M u l l i g a n) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A , 78 : 2072 (1981) 参照。好ましくは、メトトレキセートを用いて、DHFR 遺伝子を有する発現ベクターを保有する、トランスフェクトされた SP2/0 細胞のようなトランスフェクトされた細胞を選択することができ、次に、所望のタンパク質の産生を増加させるため、選択されたトランスフェクトされた細胞のメトトレキセートの濃度を段階的に上昇させることができる。2種類の発現ベクターであって、それぞれのベクターが、多価結合タンパク質の異なったポリペプチドをコードするDNA配列を含むベクターを同時に保有する宿主細胞では、2種類の薬剤の組合せを用いることによって宿主細胞を選択することができるよう、各ベクターは、異なった選択マーカーを持つように設計されていることが好ましい。

【0084】

さらに、薬剤耐性マーカーなどの選択マーカーが存在することは、培養培地で混入した微生物が増殖できないようにするのに役立つかもしれない。この態様では、選択マーカーに関連する表現型が生き残るのに必要な条件下で細胞を培養することによって、形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の純粋な培養物が得られる。

【0085】

発現ベクター、および本発明の多価結合タンパク質の第一または第二のポリペプチドをコードするインサートが、適合する制限部位を挿入接合点に有すること、ならびにそれらの制限部位が、挿入する領域に一つしかないものであることが好ましい。ベクターおよびインサートを制限エンドヌクレアーゼで処理してから、サムブルック (S a m b r o o k) ら、「分子クローニング：実験マニュアル (M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l)」、コールドスプリングハーバー研究所出版会 (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s)、ニューヨーク、第2版 (1989) に記載されている方法など、さまざまあらゆる方法によってライゲーションする。

【0086】

一つの態様において、多価標的結合タンパク質の第一のポリペプチドをコードするDNA配列を含む発現ベクターは、タンパク質の第二のポリペプチドをコードするDNA配列も含む。これらのDNA配列のそれぞれは、転写および翻訳による発現を制御する調節配列の別々のセットに操作可能に結合されている。発現ベクターは、原核生物または真核生物の宿主細胞のいずれかに導入して、その中で発現させることができる。多価標的結合タンパク質を、好ましくは、宿主細胞の中で集合させ、下記の方法に従って単離することができる。あるいは、発現されたポリペプチドを単離し、次に会合させて、インビトロで多価結合タンパク質を形成させることができる。

【0087】

別の態様において、標的結合タンパク質の第一および第二のポリペプチドをコードするDNA配列を別々の発現ベクターにクローニングすることができる。各DNA配列を、転写および翻訳による発現を制御する調節配列に操作可能に結合する。各ベクターを原核生物または真核生物の宿主細胞のいずれかに導入して、その中で発現させることができる。產生された第一および第二のポリペプチドを、下記の方法にしたがって単離するか濃縮する。そして、単離されたか濃縮された第一および第二のポリペプチドを一緒に混合して会合させ、多価結合タンパク質を形成させる。下記の方法を用いて、多価結合タンパク質の最終産物を単離することができる。あるいは、同時発現させるために、第一および第二のポリペプチドをコードする2種類のベクターを同一の宿主細胞の中に導入することもできる。発現された第一および第二のポリペプチドを宿主細胞の中で集合させた後、単離することができる。

10

20

30

40

50

【0088】

多価標的結合タンパク質の単離

トランスフェクトまたは形質転換した宿主細胞を選択および培養し、その後洗浄剤または浸透圧ショックを用いて溶解することができる。発現したタンパク質を分泌させる、シグナルペプチドをもつ発現構築体では、細胞培養の上清を細胞溶解液とともに保持して、発現タンパク質を単離することができる。発現したタンパク質は、アフィニティーコロマトグラフィー、プロテインGアフィニティーコロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーなど、当技術分野において知られている標準的な技術を用いて単離または濃縮することができる。プロトコールの詳細については、コリガン(Colligan)ら(編)「免疫学の最新プロトコール(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY)」、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社(John Wiley & Sons)(1991)参照。アフィニティーコロマトグラフィーのカラムには、3つの標的結合部位のうち、少なくとも一つに結合する標的を結合させることができる。10

【0089】

原核生物宿主細胞の中で発現したポリペプチドは、リフラクタイル体(refractile bodies)または封入体の中で濃縮することができる。封入体は、細胞を溶解し、溶解した細胞を遠心分離し、生じたペレットを洗浄することを繰り返すことによって精製することができる。最終ペレットは単離された封入体を含む。単離された封入体は、グアニジン塩酸を用いて可溶化することができ、その後、ゲルろ過クロマトグラフィーを行なって、発現したタンパク質を単離することができる。グアニジン塩酸処理は、少なくとも1つのジスルフィド結合によって共有結合した第一および第二のポリペプチドを有する多価標的結合タンパク質にとって特に適している。20

【0090】

アフィニティーコロマトグラフィーは当業者によく知られている。簡単に言うと、多価標的結合タンパク質の標的とされているものを、アガロースビーズのようなクロマトグラフィーカラムの基質に結合させることができる。発現した多価標的結合タンパク質、またはその2つのポリペプチドの一方は、標的に特異的な機能的結合部位を有していれば、標的を結合したアフィニティーカラムによって保持されうる。その後、保持されたタンパク質は溶出されうる。また、当業者に認識されるように、プロテインGアフィニティーカラムを用いて、多価標的結合タンパク質を精製することができる。30

【0091】

イオン交換クロマトグラフィーは当業者によく知られている。ほとんどのタンパク質は正か負に荷電している。したがって、反対の種類の電荷をもつクロマトグラフィーカラムはタンパク質を保持しうる。

【0092】

ゲルろ過クロマトグラフィーは、ゲル様物質を用いて、タンパク質を分子量によって分離する。「ゲル」は、アガロースや重合されたアクリルアミドのような、通常、水とポリマーの基質である。当業者に認識されるように、本発明はゲルろ過HPLC(高速液体クロマトグラフィー)の使用を含む。40

【0093】

標準的な回収および収集手順は当技術分野においてよく知られている。発現したポリペプチドまたは多価標的結合タンパク質の回収は、好ましくは、アフィニティーカラム、イオン交換カラム、またはゲルろ過カラムのいずれかから、目的のピークを含む溶出画分を集めることを含む。手動または自動の画分採集法は当技術分野においてよく知られている。その後の処理には、集めた溶出物を凍結乾燥して、安定した固体にすること、またはさらに精製することを含むことができる。

【0094】

単離したポリペプチドまたは多価結合タンパク質の結合特異性および親和性などの活性は、例えば、競合アッセイ法、酵素免疫測定法(ELISA)、およびラジオイムノアッセ50

イ法(RIA)など、当技術分野において公知の標準的測定法によって評価することができる。

【0095】

多価標的結合タンパク質の安定化

一つの態様において、ジスルフィド結合などの共有結合的相互作用によって、多価標的結合タンパク質の第一および第二のポリペプチドを安定化することができる。例えば、第一および第二のポリペプチドそれぞれが、システインに富む付加アミノ酸配列を含むことができる。これらの付加アミノ酸配列は互いの間でジスルフィド結合を形成するため、第一および第二のポリペプチド間の結合を安定化する。好ましい態様において、第一のポリペプチドは、第一のscFv分子を第一の免疫グロブリン様ドメインに共有結合させるCL領域を含むことができ、かつ第二のポリペプチドは、重鎖ヒンジ領域の全長または一部を含むことができる。CL領域は、ジスルフィド結合によってヒンジ領域に共有結合することができる。

【0096】

ジスルフィド結合の形成は、宿主細胞の中で多価標的結合タンパク質を合成する過程で生じる。好適な宿主細胞は、原核細胞(大腸菌など)、酵母および昆虫の細胞であろう。好ましい宿主細胞は、培養されている哺乳動物細胞などである。また、ジスルフィド結合の形成は、コステルニー(Kostelny)ら、J. Immunol., 148: 1547~1553(1992)に記載された方法を用いて酸化することによってインピトロで行わせることもできる。この方法の下では、多価結合タンパク質の第一および第二のポリペプチドを混合し、酸化還元緩衝液に対して透析する。最終産物は、ゲルろ過クロマトグラフィーか、または第一および第二の免疫グロブリン様ドメインが会合して形成された標的結合部位に結合する標的を結合しているアフィニティークロマトグラフィーのいずれかによって精製することができる。

【0097】

望ましくないジスルフィド結合を防ぐために、例えば、部位特異的突然変異誘発法によって、望ましくないシステイン残基をシステインでない残基に置き換えることができる。可能であればいつでも、タンパク質ドメインの最終的三次構造を維持するために、導入される変異は性質上保存的である。例えば、システインをセリンで置換するのは、ある種の条件の下では保存的置換と見なすことができる。システイン残基の置換は、好ましくは多価標的結合タンパク質の結合特異性または安定性には大きな影響を与えない。

【0098】

第一のポリペプチドが、VLおよびCL領域を含む軽鎖断片を含み、第二のポリペプチドが、VHおよびCH1領域を含む重鎖断片を含むとき、図2を見ると、軽鎖断片と重鎖断片の間の会合を促進するために、この2つの断片の相互作用に関するアミノ酸残基に突然変異誘発法を行なうことができる。突然変異誘発を行なうのに適したアミノ酸残基は、抗体の結晶構造に基づいて決定することができる。抗体の結晶構造は当技術分野において知られている。候補となる突然変異誘発法は、イオン結合またはジスルフィド結合を導入するためのものであるか、疎水的相互作用または水素結合の数を増加させるためのものであろう。これらの残基の変異は、好ましくは多価標的結合タンパク質の結合特異性または親和性を大きく変えない。標的とされるものに結合したアフィニティークロマトグラフィーを用いて、突然変異誘発の最終産物を単離することができる。変異誘発が多価結合タンパク質の結合活性に大きな影響を与えないならば、タンパク質はアフィニティーカラムによって保持され、通常の採取技術を用いて回収することができる。

【0099】

多価標的結合タンパク質の応用

本発明の多価標的結合タンパク質には多くの用途がある。モノクローナル抗体やポリクローナル抗体、またはその断片に関する既知の用途の本質的にすべてに対して、本発明の多価標的結合タンパク質が対応することができる。多価結合タンパク質は、検出できるよう標識することができる。標識の種類は当業者によく知られている。それらは、放射性標識

10

20

30

40

50

、化学発光標識、蛍光染色標識、および発色団標識などである。その他の用途には、有効量の標識型多価タンパク質を投与して動物（ヒトを含む）の内部構造を画像化し、動物に伴う検出可能な放射物を測定することなどがある。また、それらは、標識抗体が標識された本発明の多価標的結合タンパク質に置き換わったサンドイッチ式免疫アッセイ法、競合免疫アッセイ法、およびその他の免疫アッセイ法などの改良免疫アッセイ法などである。

【0100】

多価標的結合タンパク質を用いて、ナチュラルキラー（NK）または細胞毒性T細胞などの細胞毒性細胞を、腫瘍細胞または感染細胞などの特異的細胞標的に対して補充することができる。ステルツ（Staerz）ら、Nature, 314: 628 (1985) 10 、ならびにソンギルヴィライ（Songilviliai）およびラクマン（Lachmann）、Clin. Exp. Immunol., 79: 315 (1990) 参照。また、多価標的結合タンパク質を用いて、毒素、薬剤、キレート剤、サイトカイン、プロドラッグ活性化酵素などの酵素、放射性化合物、細胞毒性タンパク質、またはその他の細胞毒性作用物質を腫瘍細胞または感染細胞に送達することができる。共有結合または非共有結合によって放射性化合物またはその他の細胞毒性作用物質に結合している多価標的結合タンパク質を使用することによって、これらの作用物質を腫瘍や病変部に直接送達する可能性が生まれ、それによって正常な組織を毒性因子に曝露することを制限する。ゴールデンバーグ（Goldenberg），Semin. Nucl. Med., 19: 33 20 2 (1989) 参照。近年、多価標的結合タンパク質（抗体を含む）を利用する治療法、および腫瘍関連抗原の局在化の正確さが、実験および臨床試験の両方において実証されている。例えば、ソープ（Thorpe）、TIBTECH, 11: 42 (1993) 、ゴールデンバーグ（Goldenberg）、Scientific American, Science & Medicine, 1: 64 (1994) ; 米国特許第4,925,922号および第4,916,213号；米国特許第4,918,163号；米国特許第5,204,095号；米国特許第5,196,337号；ならびに米国特許第5,134,075号および第5,171,665号参照。さらに、多価標的結合タンパク質は、インビトロ条件下で腫瘍細胞や感染細胞を標的する、例えば、単離された生物試料において、腫瘍細胞や感染細胞を処理または検出するのに役立つ。また、多価標的結合タンパク質は、骨髄からの白血球をエキソビオでページするのに役立つ。カネコ（Kaneko）ら、Blood, 81: 1333~1341 (1993) 参照。 30

【0101】

一つの態様において、多価標的結合タンパク質は、細胞毒性作用物質または細胞毒性細胞のいずれかに結合することができる標的結合部位を少なくとも1つ有し、腫瘍細胞または感染細胞上の抗原に結合できる別の結合部位を少なくとも1つ、好ましくは2つの別の結合部位を有する。

【0102】

別の態様において、多価結合タンパク質は、腫瘍細胞または感染細胞上の抗原に結合することができる結合部位を少なくとも1つ持ち、好ましくは結合部位を3つ持つ。好ましくは、タンパク質のアミノ酸残基の側鎖を介した、またはタンパク質に作り出した糖鎖を介した共有結合的な付着によって、細胞毒性作用物質を多価標的結合に結合させる。 40

【0103】

腫瘍細胞、感染細胞、腫瘍、または感染性病変を検出または治療するために、多価標的結合タンパク質を使用することができる。好ましくは、多価標的結合タンパク質は、ヒト患者またはヒト以外の動物に直接適用して特定の腫瘍もしくは感染性病変を治療したり、または対象が特定の腫瘍もしくは感染性病変をもっているか否かを判定することができる。ドーサル（Doussal）ら、Int. J. Cancer, Supplement 7: 58~62 (1992) ；ペルチャー（Peltier）ら、J. Nucl. Med., 34: 1267~1273 (1993) ；ソマサンダラム（Somasundaram）ら、Cancer Immunol. Immunother., 36: 337~345 (1993) ；ブルインク（Bruynck）ら、Br. J. Cancer, 50

67:436~440(1993)参照。例えば、多価標的結合タンパク質は、腫瘍-抗原結合部位およびハプテン結合部位をもつことができる。このタンパク質は、注射によって患者の体内に導入することができ、注射されたタンパク質は、インビボで腫瘍部位にある腫瘍抗原に結合する可能性がある。次に、金属キレート剤など、放射性標識されたハプテンを注射によって患者の体内に導入し、ハプテン結合部位を介してタンパク質に結合することによって腫瘍部位に局在化させ、それによって、腫瘍の検出または治療を可能にする。上記の例において、放射活性標識されたハプテンは、例えば、多価標的結合タンパク質に作出された糖鎖を介して多価標的結合タンパク質に結合することもできる。

【0104】

別の態様において、多価標的結合タンパク質は、標的細胞に特異的な標的結合部位を一つ有し、かつエフェクター細胞の細胞表面抗原に特異的な標的結合部位を2つ有することができる。好ましい標的細胞は、腫瘍細胞、感染細胞、またはあらゆる種類の望ましくない細胞などである。エフェクター細胞とは、抗原または標的細胞に対する免疫反応などの生理学的反応を発生させるか、またはその発生に関与することができる細胞のことである。好ましいエフェクター細胞には、T細胞、NK細胞、およびマクロファージ細胞を含むが、これらに限定されない。エフェクター細胞に特異的な2つの標的結合部位は、エフェクター細胞上の同一または異なった表面抗原に結合することができる。例えば、この2つの標的結合部位は、それぞれ細胞毒性T細胞の表面抗原およびNK細胞の表面抗原に結合することができる。このような多価標的結合タンパク質は、T細胞およびNK細胞を両方とも1つの標的細胞に補充することができるため、標的細胞に対して増強された免疫反応を生じさせることができる。

10

20

30

40

50

【0105】

好ましい態様において、多価標的結合タンパク質は、標的細胞（例えば腫瘍細胞）に特異的な標的結合部位を1つ有し、1つのエフェクター細胞（例えばT細胞）上にある2種類の異なった表面抗原に特異的な標的結合部位を二つ有することができる。したがって、多価標的結合タンパク質は、エフェクター細胞において2つの異なるシグナル伝達経路を開始させることができ、2種類の異なった表面抗原を介して、1つのエフェクター細胞に結合することができる。1つのエフェクター細胞において2つのシグナル経路を活性化させると、エフェクター細胞から増強された生理学的反応が生じる可能性がある。

【0106】

別の態様において、多価標的結合タンパク質は、感染細胞上にある腫瘍抗原または抗原に結合することができる標的結合部位を1つもち、それぞれ、T細胞表面タンパク質CD3およびCD28に結合することができる、他の2つの標的結合部位をもつ。したがって、この多価標的結合タンパク質は、標的細胞または感染細胞に対して、増強された免疫反応を生じさせるために、T細胞において、一つはCD3を介し、もう一つはCD28を介する2つの異なるシグナル伝達経路を開始させることができる。ホリガー(Hollier)ら、Cancer Research, 59:2099(1999)参照。

【0107】

別の態様において、多価標的結合タンパク質の3つの標的結合部位の一つが、細胞毒性作用物質、またはエフェクター細胞（T細胞のCD8またはCD4）の表面抗原に結合する。他の2つの標的結合部位は、CEA（抗癌胎児性抗原）またはCSAp（結腸特異的抗原p）などの腫瘍抗原に結合する。CEAもCSApも、結腸癌の表面上で発現することが発見されている。同一の腫瘍抗原に結合する2つの標的結合部位によって、多価標的結合タンパク質の、標的とする腫瘍細胞に対する結合活性が高くなるため、細胞毒性作用物質またはエフェクター細胞に随伴する細胞毒性作用に正常組織を曝露することを制限できるようになる。さらに別の態様において、2つの腫瘍-抗原結合部位は異なる結合特異性を持ち、例えば、一つはCEAに結合し、もう一つはCSApに結合することができる。2つの異なった腫瘍-標的結合特異性をもつと、腫瘍を標的する機会が増加し、したがって、抗原変調から生じる腫瘍回避の機会が減少する。

【0108】

別の態様において、多価標的結合タンパク質の第一または第二のポリペプチドは、付加的アミノ酸残基に、そのN末端またはC末端のところで共有結合している。これらの付加的アミノ酸残基は、ペプチドタグ、シグナルペプチド、プロドラッグ活性化酵素などの酵素、サイトカイン、ペプチド毒、ペプチド薬、細胞毒性タンパク質、またはその他の機能的タンパク質を含むことができる。この多価標的結合タンパク質は、腫瘍を治療または診断するのに役立つ。例えば、シュードモナスの菌体外毒素などのペプチド毒、または、IL-1、IL-2、IFN-、TNF-、およびGM-SFなどのサイトカインを、好ましくは、3つの腫瘍-抗原結合部位をもつ多価標的結合タンパク質のN末端またはC末端に付加することができる。3つの腫瘍-抗原結合部位によって、多価標的結合タンパク質の腫瘍に対する結合活性が高くなる可能性があり、したがって、結合した毒素またはサイトカインを、より効果的に標的する腫瘍部位に送達することができる。別の例として、3つの腫瘍-抗原結合部位をもつ多価標的結合タンパク質は、別の放射性標識された抗体によって認識されうるペプチドタグと結合していくてもよい。この多価結合タンパク質は、インビボで腫瘍を検出または治療するのに役立つかもしれない。3つの腫瘍結合部位によって、この多価標的結合タンパク質は、腫瘍を検出および治療するための、より感度の高い方法を提供することができる。

10

20

【0109】

好ましい態様において、「親和性増強システム」を用いて予め標的するために、多価標的結合タンパク質を用いることができる。例えば、多価標的結合タンパク質は、3つの標的結合部位をもつことができるが、2つは腫瘍抗原のためであり、1つは、In-DTPAハプテンなどのハプテンのためのものである。この2つの腫瘍抗原結合部位は、好ましくは、同一の抗原に結合するか、または同一の腫瘍細胞に随伴する異なった抗原に結合する。対象は、例えば、ヒト、またはヒト以外の動物でもよいが、標的結合タンパク質で予め処理することができる。本明細書で使用されるように、対象および患者という用語は互換的に使用することができる。所定の時間に、未結合の標的結合タンパク質を対象から一掃する。そして、対象にハプテンを有するペプチド担体、好ましくは、少なくとも2つのハプテンを有するペプチド担体を投与する。ペプチド担体は、放射性標識するか、薬剤、毒素、またはその他の毒性作用物質と結合させることができるために、標的となる腫瘍細胞の増殖に対する阻害作用を発揮することができる。

30

【0110】
本発明の多価標的結合タンパク質は、薬学的に有用な組成物または薬剤を調製するための既知の方法にしたがって処方することができ、それによって、タンパク質は、薬学的に許容される担体と混合物中で組み合わされる。滅菌したリン酸緩衝食塩水が、薬学的に許容される担体の一例である。この他の適当な担体は、当業者によく知られている。例えば、「レミントンの薬剤科学 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE)」第19版 (マックパブリッシング社 (Mack Publishing Co.)、1995) およびギルマン (GILMAN) 著「治療薬の薬理学的基礎 (THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS)」、第7版 (マクミランパブリッシング社 (Macmillan Publishing Co.)、1985) 参照。

40

【0111】

患者、またはヒト以外の動物への多価標的結合タンパク質の投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、くも膜下腔内、局所用カテーテルによる灌流、または直接的な病変部注射などである。多価標的結合タンパク質を注射で投与するときは、連続的な輸液によるか、単回または複数回のボーラスによる。

【0112】

腫瘍または感染性病変を治療または検出するため、または、腫瘍または感染性病変に対する免疫反応を誘導するために、多価標的結合タンパク質またはその他の作用物質を患者、またはヒト以外の動物に有効量投与する。腫瘍または感染性病変を治療するために、投与される量が生理学的に重要であれば、多価標的結合タンパク質またはその他の作用物質を

50

「有効量」投与する。用量によって、投与される患者、またはヒト以外の動物における少なくとも一つの標的細胞の生理機能に検出可能な変化をもたらす場合、好ましくは、レシピエントとなる患者、またはヒト以外の動物の腫瘍または感染性病変の生理機能に検出可能な変化をもたらす場合には、用量が生理学的に重要である。特に、用量は、少なくとも一つの標的腫瘍または感染細胞の増殖に阻害作用をもたらす場合には、好ましくは、標的となる腫瘍または感染性病変の増殖に対して阻害作用をもたらす場合には、生理学的に重要である。腫瘍または感染性病変を検出するためには、標的結合タンパク質またはその他の作用物質は、それがバックグラウンドでない検出可能なシグナルを発生しうる場合には、「有効量」投与すべきだと言われる。腫瘍または感染性病変に対する免疫反応を誘導するためには、投与される用量が、少なくとも一つの標的腫瘍または感染細胞に対する検出可能な免疫反応の上昇をもたらす場合、好ましくは、標的結合タンパク質または作用物質を投与しないときの免疫反応と比較して、標的となる腫瘍または感染性病変に対する検出可能な免疫反応が上昇する場合には、標的結合タンパク質または作用物質を「有効量」投与すべきであると言われる。

10

20

30

40

50

【0113】

本明細書において引用される参考文献はすべて、参照として本明細書に組み入れられる。

【0114】

本発明は、以下の実施例を参考することによって、より容易に理解されると思われる。実施例は、例示する目的で示されたものであり、本発明を制限することを意図したものではない。

【0115】

実施例1：734に対する2つのscFvを保有するhMN14-Fab分子を含み、一方が鎖のC末端に、もう一方がFd配列のC末端に融合されている、多価結合タンパク質をコードするDNA配列の構築

本明細書で用いられるように、DTPAとはジエチレントリアミン五酢酸を意味する。hMN-14は、ヒト化モノクローナル抗体MN-14を表す。hHMN-14は、米国特許第5,874,540号に記載されており、この文献は参考として本明細書に組み入れられる。抗体のFd部分は、ペプシン消化した後の抗体の重鎖部分である。抗体のFd部位は、VH、CH1、およびヒンジ領域の一部を含む。「734」とは、DTPAに対するモノクローナル抗体の名称である。鎖は、免疫グロブリンの軽鎖の1つの型である。

【0116】

734のscFvは734scFvと表され、以下のようにしてhMN14-FdのC末端にインフレームで挿入される。

【0117】

hMN14の重鎖Fdをインフレームで734scFvに連結させるのに必要とされる適当なリンカー配列を、特異的プライマーセットを用いたPCR反応によって、それぞれ734VLおよび734VKと表示される、734のVLドメインおよびVKドメインに導入した。734VLscFv5' (Cys) および734VLscFv3' というプライマーセットを用いて、734VLのPCR增幅を行なった。

【0118】

プライマー734VLscFv5' (Cys)は以下の配列を有する：

5' TCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGGCGGTTCACAGCTGGTTGTGACTCAG 3'

P K S C G G G S Q L V V T Q

【0119】

これは、ヒトIgG1ヒンジの最初の4残基(PKSC)が、734VLの最初の6残基(QLVVHQ)に、短い可動性リンカーGGGSを介してインフレームで結合した配列をコードするセンス鎖配列を示している。hMN14重鎖Fd-734scFv融合タンパク質とhMN14軽鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が必要なため、ヒトヒンジのCys1つを含ませた。PstI部位(下線部)を取り込んで、CH1ドメインとヒンジをつな

いでいるイントロン配列のところでライゲーションが簡単に行えるようにした。

【0120】

プライマー-734VLscFv3'は以下の配列を有する：

5' AGCCTCCGCCTCCTGATCCGCACCTCCTAAGATCTTCAGTTGGTCC 3'

G G G G S G G G L I K L K T G

【0121】

これは、734のVLドメインの最後の6残基(TKLKIL)と、VLドメインの下流にインフレームで融合している可動性リンカー配列の一部(GGGGSGGGG)

10

をコードするアンチセンス配列を表している。

【0122】

まず、PCR増幅産物(約400bp)をT4DNAポリメラーゼで処理して、PCR増幅の過程で末端に付加されたA残基を除去してから、PstIで消化した。得られた産物は、PstIの突出末端と平滑末端をもつ二本鎖DNA断片であった。

【0123】

734VHscFv5' と 734VHscFv3' (SacI) というプライマーセットを用いて、734VHのPCR増幅を行なった。

【0124】

プライマー-734VHscFv5'は以下の配列を有する：

20

5' CCGGAGGCGGTGGAGTGAGGTGAAACTGCAGGAGT 3'

S G G G G S E V K L Q E

【0125】

これは、VLとVHの配列をつないでいる可動性リンカー配列の残りの部分(SGGGGS)、および734VHドメインの最初の6残基(EVKLQE)をコードするセンス鎖配列を表す。

【0126】

プライマー-734VHscFv3' (SacI) は以下の配列を有する：

5' AACCTTGAGCTCGGCCGTCGCACTCATGAGGAGACGGTGACCGT 3'

30

* S S V T V T

【0127】

これは、734VHの最後の6残基(TVTVSS)をコードするアンチセンス鎖を表す。また、翻訳終止コドン(*)も含まれている。サブクローニングを容易にするため、終止コドンの下流に、制限酵素部位EagI(太字部)およびSacI(下線部)を取り込ませた。

【0128】

同様に、~400塩基対のPCR増幅したVH産物を、まずT4DNAポリメラーゼで処理して、PCR増幅産物の末端にある余分なA残基を除去してから、SacIで消化した。平滑末端-粘着末端という構成をもつVHのDNA断片が得られた。

40

【0129】

ヒトIgG1ゲノム配列のSacII断片を含む、pBlueScriptcript(ストラタジーン社(Stratagene)、ラホヤ)に基づくステージングベクター(stagging vector)(HC1kbpSK)を構築した。ゲノムSacII断片は、5'側イントロンの部分配列、ヒトIgG1CH1ドメイン、CH1をヒンジ配列に連結させているイントロン配列、ヒンジ配列、ヒンジをCH2ドメインに連結させているイントロン配列、およびCH2ドメインの一部を含む。HC1kbpSKのヒンジおよびCH2ドメインの一部を含む部分をPstI/SacI制限酵素消化によって取り出し、作出了クローニング部位を用いて、前記のとおり調製したVL(PstI/平滑)およびVH

50

(平滑 / Sac I) の PCR 産物と同時ライゲーションした。得られた構築体 (CH1 - 734 pSK) の中の CH1 ドメインを、イントロンを介して 734 scFv 遺伝子配列につなぐ。

【0130】

IgG1 のゲノム Sac II 断片は、CH1 ドメインに隣接する 5' イントロン配列を含んでいるだけなので、BamHI / Sac II 分節となっている残りのイントロン配列を、CH1 - 734 pSK の対応する部位に挿入して全長イントロン配列を回復した。次に、全長 5' イントロン、CH1 ドメイン、連結イントロン、5 つのヒンジ残基、短鎖 GG GS リンカー、および 734 scFv 配列を含む BamHI / Eag I を単離し、hMN 14 pdHL2 ベクター中のヒトゲノム IgG1 定常配列を含む HindIII / Eag I 分節を置換するために使用した。hMN14 pdHL2 ベクターは、レオン (Leung SO)、ロスマン (Losman MJ)、クー (Qu Z)、ゴールデンバーグ (Goldenberg DM)、およびハンセン (Hansen HJ)、「ヒト化抗癌胎児性抗原抗体産生の促進法 (Enhanced Production of a Humanized Anti-carcinoembryonic Antigen Antibody)」、Tumor Targeting 2:184 (#95) (1996) に説明されている。pdHL2 ベクターについては、ロスマン (Losman MJ)、クー (Qu Z)、クリシュナン (Krishnan IS)、ワン (Wang J)、ハンセン (Hansen HJ)、ゴールデンバーグ (Goldenberg DM) およびレオン (Leung SO)、「ヒト化抗体を産生する細胞株の作製と観察 (Generation and Monitoring of cell lines producing humanized antibodies,)」、Clin. Cancer Res., 5:3101s - 3105s (1999)、およびロスマン (Losman MJ)、ハンセン (Hansen HJ)、ドワラク (Dworak H)、クリシュナン (Krishnan IS)、クー (Qu Z)、シー (Shih LB)、ツエン (Zeng L)、ゴールデンバーグ (Goldenberg DM) およびレオン (Leung SO)、「ヒト化抗 B 細胞リンパ腫モノクローナル抗体 (hLL2) の高産生クローニングの作製 (Generation of a high-producing clone of a humanized anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody (hLL2))」、Cancer (suppl.)、80:2660 ~ 2666 (1997) を参照されたい。これらの参考文献は、本開示で引用されているすべての文献同様、参照として本明細書に組み入れられる。

【0131】

一方の末端に BamHI 突出をもち、他方の末端に HindIII 突出をもつ HNB リンカーを用いて、hMN14 pdHL2 ベクターの HindIII / Eag I 部位への BamHI / Eag I 断片のライゲーションを簡単に行なった。このリンカーは、次の配列を有する：

5' AGCTTGCGGCCGC 3'

3' ACGCCGGCGCTAG 5'

40

【0132】

得られたベクターを hMN14 - 734 pdHL2 と名付けた。

【0133】

734 scFv を hMN - 14 Fab の鎖の C 末端に挿入するために、以下で使用し説明するのと同様の方法を用いる：

【0134】

ヒト CK ドメインに隣接する 5' イントロンの一部を含む Sac I 断片と、CK 領域の配列のほとんどを、リンカー CKSB の存在下で、pBlueScript ベクターの Sac I / BamHI クローニング部位に同時ライゲーションした。CKSB リンカーは、アニールすると、短い可動性リンカー (GGGS) を付着させた C 末端に、ヒト IgG1 ヒ

50

ンジの最初の4残基をインフレームで融合している、ヒトCK領域の最後の13アミノ残基をコードする二本鎖DNAを生成させる2種類の合成DNAヌクレオチド含んでいる。

CKSB linkerは、以下の二本鎖配列を有する：

5' CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGTGAGCCCCAAATCTGGTGGCG 3'
3' TCGAGCGGGCAGTGTCTCGAAGTTGTCCCCCTCTCACACTCGGGTTAGACCACCGCCTAG 5'
S P V T K S F N R G E C E P K S G G G S

【0135】

CKSB linkerのSacI 3'突出を、CK断片のC末側SacIにライゲーションし、BamHI末端を、pBlueScriptベクターの対応するBamHI部位にライゲーションした。得られたステージングベクターをCK(B) pSKと名付けた。
10

【0136】

734のVL領域を734VLScFv5' (Bg1II) および734VLScFv3' のプライマーセットによってPCR増幅した。プライマー-734VLScFv5' (Bg1II) は以下の配列をもつ：

5' TCTAGATCTCAGCTGGTTGTGACTCAG 3'

S Q L V V T Q

【0137】

これは、734VLの最初の6残基(QLVVTQ)をコードするセンス鎖配列を表す。
20 5' Bg1II部位を組み込んで(下線部)、その後、CKドメインにつながっている一本鎖可動性リンクへのライゲーションを容易にした。

【0138】

734VLScFv3' の配列は上述している。

【0139】

734VLのPCR増幅産物をT4 DNAポリメラーゼとBg1IIとで処理して、平滑末端/Bg1II粘着末端断片を作製した。

【0140】

734VHscFv5' および734VHscFv3' (SalI) のプライマーセットを用いて734VHのPCR増幅を行なった。
30

【0141】

734VHscFv5' の配列は上述している。

【0142】

734VHscFv3' (SalI) の配列は、SalI(下線部)によってSacI部位が置き換わっている点以外、基本的には734VHscFv3' (SacI)と同じである。

5' AACCCTTGTCGACGGCGTCGACTCATGAGGAGACGGTGACCGT 3'

* S S V T V T

【0143】

同様に、まず、PCR増幅されたVH産物をT4 DNAポリメラーゼで処理して平滑末端を作出し、SalIで制限酵素消化して粘着末端断片を作出した。

ステージングベクターCK(B)pSKをBamHIとSalIで制限酵素消化し、露出したクローニング部位にVLとVHのPCR産物を挿入した。VLのBg1II突出は、制限酵素消化されたベクターのCK断片のC末端にあるBamHI突出と相補する。一方、SalI末端は、ベクターの下流側末端の対応する部位にライゲーションする。得られたベクターは、CK-734scFvpSKと名付けられたが、一本鎖ペプチドを介して734scFv配列に融合したゲノムCK配列を保有している。

【0144】

CK-734scFvpSKベクターを、まず、SalI部位を切断して平滑末端を生成
50

する HincII 酵素で直鎖化し、SaciI で部分消化して CK-734scFv 断片を切り出した。約 1.3 Kb の大きさをもつ CK-734scFv 遺伝子の配列を含む断片を単離し、hMN14pdHL2 ベクターの SacI / PflM1 部位にライゲーションして、本来の CK 配列を置き換えた。PflM1 部位は、CK 終止コドンの約 50 bp 下流にある 3' 非コード配列に位置しており、PflM1 消化でできた 3' 突出は、CK-734scFv 断片を hMN14-734pdHL2 ベクターにライゲーションする前にクレノウ酵素でフィルインした。最終的な発現ベクターは、hMN14-Di-734pdHL2 と名付られたが、734 に対する 2 つの scFv を持つ hMN14Fab 分子をコードしている。これら 2 つの scFv の一方は 鎖の C 末端に融合しており、もう一方は Fd 配列の C 末端に融合している。

10

【0145】

実施例 2：抗体 734 に由来する 2 つの抗 DTPA scFv に結合した CEA 特異的 Fab を含む三価の二重特異性抗体の発現と精製

抗体 734 に由来する 2 つの抗 DTPA scFv に結合した CEA 特異的 Fab を含む三価の二重特異性抗体を構築するために、734 scFv を hMN-14 Fd 配列の C 末端に融合して、Fd-scFv 遺伝子配列を形成させると、同じ 734 scFv 配列が、hMN14 の 鎖配列の C 末端に結合して、-scFv 遺伝子配列を形成する。Fd-scFv 配列および -scFv 配列を発現ベクター pdHL2 の中に構築する。得られた発現ベクターに hMN14-di-scFv 734pdHL2 という名前を付け、常法を用いたエレクトロポレーションによって SP2/0 細胞をトランスフェクトするために用いる。発現ベクターは、DHR 遺伝子を含んでおり、0.1 μM のメトキサート (MTX) を用いて、トランスフェクトされた細胞の選択マーカーとして利用することができる。抗体分泌クローニングを検出するために ELISA アッセイ法を用いることができ、次に、MTX 濃度を段階的に上昇させて增幅することができる。分泌された抗体をプロテイン G アフィニティカラムによって精製することができる。イオン交換クロマトグラフィーによって、さらなる精製を行なうことができる。

20

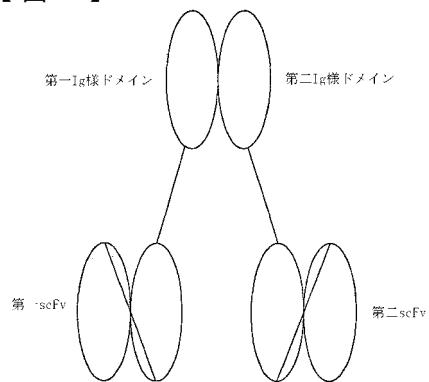
【図面の簡単な説明】

【図 1】2 種類のポリペプチドを含む多価標的結合タンパク質の概略図を示す。第一のポリペプチドは、第一の免疫グロブリン様ドメイン（第一 Ig 様ドメイン）に共有結合した第一の一本鎖 Fv 分子（第一 scFv）を含む。第二のポリペプチドは、第二の免疫グロブリン様ドメイン（第二 Ig 様ドメイン）に共有結合した第二の一本鎖 Fv 分子（第二 scFv）を含む。

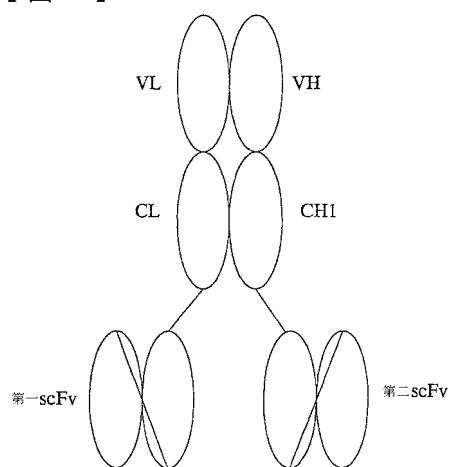
30

【図 2】2 種類のポリペプチドを含む多価標的結合タンパク質の概略図を示す。第一のポリペプチドは、定常領域 CL および可変領域 VL を含む免疫グロブリン軽鎖断片に共有結合した第一の一本鎖 Fv 分子（第一 scFv）を含む。第二のポリペプチドは、定常領域 CH1 および可変領域 VH を含む免疫グロブリン重鎖断片に共有結合した第二の一本鎖 Fv 分子（第二 scFv）を含む。

【図1】



【図2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08293 A2(51) International Patent Classification⁵: C07K 16/00(74) Agents: SAXE, Bernhard, D. et al.; Foley & Lardner,
Washington Harbour, 3000 K Street, N.W., Suite 500,
Washington DC 20007-5109 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/41386

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(22) International Filing Date: 25 July 2001 (25.07.2001)

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BE, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/220,782 25 July 2000 (25.07.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): IM-MUNOMEDICS INC. [US/US]; 300 American Road,
Morris Plains, NJ 07950 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): LEUNG, Shui-on
[-CN]; Hong Kong Institute of Biotechnology Ltd., 2
Biotechnology Avenue, 12 Miles, Tai Po Road, Shatin,
N.T. (HK).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

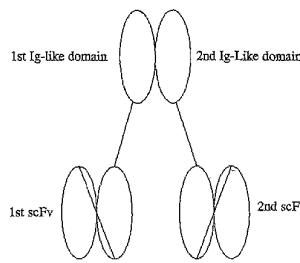
{Continued on next page}

(54) Title: MULTIVALENT TARGET BINDING PROTEIN



A2

WO 02/08293 A2



(57) **Abstract:** A novel multivalent target binding protein which comprises a first and a second polypeptides and has at least three target binding sites is described. The first polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a first scFv molecule and a first immunoglobulin-like domain which preferably comprises an immunoglobulin light chain variable region domain. The second polypeptide of the multivalent target binding protein comprise a second scFv molecule and a second immunoglobulin-like domain which preferably comprises an immunoglobulin heavy chain variable region domain. The first scFv molecule and the first immunoglobulin-like domain are preferably linked via a first extra amino acid sequence which preferably comprises an immunoglobulin light chain constant region domain. The second scFv molecule and the second immunoglobulin-like domain are preferably linked via a second extra amino acid sequence which preferably comprises an immunoglobulin heavy chain constant region domain. The first and second extra amino acid sequences preferably associate with each other via at least one disulfide bond. The multivalent target binding protein of the present invention is useful for treating and detecting tumors and infectious lesions.

WO 02/08293 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

MULTIVALENT TARGET BINDING PROTEIN**BACKGROUND OF THE INVENTION****Field of the Invention**

The present invention is directed to a multivalent target binding protein, and methods of using the multivalent target binding protein for treatment and detection of tumors and infectious lesions.

Related Art

Multivalent target binding proteins are useful for treating or detecting tumors and other diseases. For instance, a multivalent target binding protein may bind to both a tumor antigen and a cytotoxic agent, and can be used for delivery of radionuclides, drugs, toxins or other cytotoxic agents to tumor cells.

It is desirable to increase the valency of a target binding protein. The increased valency can improve the avidity of the target binding protein to its target, and therefore increase the specificity and safety of a treatment. A target binding protein with increased valency can also be useful for simultaneously delivering different cytotoxic agents to a single target, or for delivering a cytotoxic agent to different targets. A multivalent targeting binding protein can further be used to recruit different immune effector cells to a single target cell, and thus trigger an enhanced immune response against the target cell.

Efforts have been made to produce multivalent target binding proteins which have at least three different target binding sites. For example, multivalent target binding proteins have been made by cross-linking several Fab-like fragments via chemical linkers. See US Patent No. 5,262,524. See also US Patent No. 5,091,542 and Landsdorp, et al., "Cyclic Tetramolecular Complexes Of Monoclonal Antibodies: A New Type Of Cross-linking Agent," *Euro. J. Immunol.*, 16: 679-83 (1986). Multivalent target binding proteins also have been made by covalently linking several single chain Fv molecules (scFv) to form a single polypeptide. See US Patent No. 5,892,020. A multivalent target binding protein which is basically an aggregate of scFv molecules has been disclosed in US Patent Nos. 6,025,165 and

WO 02/08293

PCT/US01/41386

5,837,242. A trivalent target binding protein comprising three scFv molecules has been described in *Krott et al.*, "Single-chain Fv Fragment of Anti-Neuraminidase Antibody NC 10 Containing Five- and Ten-Residue Linkers Form Dimers and Zero-Residue Linker A Trimer" *Protein Engineering*, 10(4): 423-433 (1997). However, the above mentioned methods either lack reproducibility or lack the capability to produce a protein having different, pre-selected target-binding specificities.

The present invention discloses a novel form of multivalent target binding proteins having different, pre-selected binding specificities and the method for making which is reproducible. The multivalent binding protein of the present invention comprises two polypeptides which associate to form at least three target binding sites. The present invention also provides a new way for making multivalent target binding proteins.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

SUMMARY OF THE INVENTION

It is therefore an object of the present invention to provide a novel form of target binding protein that comprises at least three target binding sites.

It is also an object of the present invention to provide methods of using the multivalent binding protein of the present invention for treating and detecting tumors or infectious lesions.

In achieving these objects, there has been provided, in accordance with one aspect of the present invention, a target binding protein comprising three target binding sites, wherein said protein comprises a first polypeptide comprising a first single chain Fv molecule covalently linked to a first immunoglobulin-like domain, and a second polypeptide comprising a second single chain Fv molecule covalently linked to a second immunoglobulin-like domain, wherein said first single chain Fv molecule forms a first target binding site and said second single chain Fv molecule forms a second target binding site, and wherein said first immunoglobulin-like domain associates with said second immunoglobulin-like domain to form a third target binding site. Alternatively, the first and second single chain Fv molecules may associate together to form two binding sites, with the first and second immunoglobulin-like domains associating to form a third binding site.

In accordance with another aspect of the present invention, the first single chain Fv molecule and the first immunoglobulin-like domain are covalently linked via a first extra amino acid sequence, and the second single chain Fv molecule and the second immunoglobulin-like domain are covalently linked via a second extra amino acid sequence. The first extra amino acid sequence associates with said second extra amino acid sequence, preferably via covalent interactions, and more preferably via at least one disulfide bond.

In another aspect of the present invention, the first immunoglobulin-like domain comprises an immunoglobulin light chain variable region domain or a derivative thereof, which is covalently linked to the first scFv molecule via an immunoglobulin light chain constant region domain or a derivative thereof, and the second immunoglobulin-like domain comprises an immunoglobulin heavy chain variable region domain or a derivative thereof, which is covalently linked to the second scFv molecule via an immunoglobulin heavy chain constant region domain or a derivative thereof.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

In yet another aspect of the present invention, the first single chain Fv molecule and the immunoglobulin light chain constant region domain are covalently linked via a first peptide linker which preferably comprises the amino acid sequence EPKSADKTHTCPPCPGGGS, and the second single chain Fv and the immunoglobulin heavy chain constant region domain are covalently linked via a second peptide linker which preferably comprises the amino acid sequence EPKSCDKTHTCPPCPGGGS.

In accordance with another aspect of the present invention, two of the three target binding sites have different target binding specificities.

In yet another aspect of the present invention, two of the three target binding sites have the same target binding specificity.

There has also been provided, in accordance with another aspect of the present invention, that either the first or second polypeptide is covalently linked to additional amino acid residues at its N- or C-terminus. The additional amino acid residues preferably comprise a peptide tag, a signal peptide, an enzyme, a cytokine, a toxin, a drug, a cytotoxic protein, or another functional protein.

In another aspect of the present invention, a carbohydrate chain is covalently linked to either the first or second polypeptide via a N-glycosylation recognition sequence engineered to the first or second polypeptide. The carbohydrate chain is preferably further linked to a drug, a radioactive compound, a chelate, an enzyme, a toxin, a cytokine, a cytotoxic protein, or another functional agent.

In accordance with yet another aspect of the present invention, a drug, a radioactive compound, a chelate, an enzyme, a toxin, a cytokine, a cytotoxic protein, or another functional agent is conjugated to the multivalent binding protein of the present via the side chain of the amino acid residues of the multivalent binding protein.

In accordance with another aspect of the present invention, one target binding site of the multivalent binding protein of the present invention binds to a toxin, a drug, a cytokine, a chelate, an enzyme, a radioactive compound, a cytotoxic protein or other functional agents, while the other two target binding sites bind to tumor antigens.

A multivalent target binding protein has also been provided, in accordance with one aspect of the present invention, wherein one target binding site of the multivalent protein binds

WO 02/08293

PCT/US01/41386

to a tumor antigen and the other two target binding sites bind to the surface proteins of T cells or other effector cells.

There has been provided, in accordance with another aspect of the present invention, a nucleic acid molecule which comprises a first polynucleotide encoding the first polypeptide of the multivalent binding protein and a second polynucleotide encoding the second polypeptide of the multivalent binding protein.

In yet another aspect of the present invention, there has been provided two nucleic acid molecules, one encoding the first polypeptide of the multivalent binding protein and the other encoding the second polypeptide of the multivalent binding protein. Additionally, the current invention provides vectors comprising the nucleic acids, and, in turn, host cells comprising these vectors.

There has also been provided, in accordance with another aspect of the present invention, a method of making the multivalent binding protein of the present invention.

In yet another aspect of the present invention, there has been provided a method of eliciting an enhanced immune response against a tumor comprising administering to a patient suffering from said tumor an effective amount of the multivalent target binding protein of the present invention, wherein one target binding site of the protein binds to the tumor, and the other two target binding sites bind to two different surface proteins on T cells or other effector cells.

In yet another aspect of the present invention, there has been provided a method of treating or detecting a tumor comprising administering to a patient suffering from said tumor an effective amount of the multivalent target binding protein of the present invention, wherein one target binding site of the protein binds to a toxin, a drug, a cytokine, a chelate, an enzyme, a radioactive compound, a cytotoxic protein or other functional agents, and the other two target binding sites bind to tumor antigens.

In yet another aspect of the present invention, there has been provided a method of treating or detecting a tumor comprising administering to a patient suffering from said tumor an effective amount of the multivalent target binding protein of the present invention, wherein at least one target binding site, and preferably three target binding sites, of the protein binds to

WO 02/08293

PCT/US01/41386

tumor antigens, while a toxin, a drug, a cytokine, a chelate, an enzyme, a radioactive compound, a cytotoxic protein or another functional agent is conjugated to the protein.

In yet another aspect of the present invention, there has been provided a method of treating a tumor, using the target binding protein of the current invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a schematic representation of a multivalent target binding protein which comprises two polypeptides. A first polypeptide comprises a first single chain Fv molecule (1st scFv) covalently linked to a first immunoglobulin-like domain (1st Ig-like domain). A second polypeptide comprises a second single chain Fv molecule (2nd scFv) covalently linked to a second immunoglobulin-like domain (2nd Ig-like domain).

Figure 2 shows a schematic representation of a multivalent target binding protein which comprises two polypeptides. A first polypeptide comprises a first single chain Fv molecule (1st scFv) covalently linked to an immunoglobulin light chain fragment which comprises the constant region CL and the variable region VL. A second polypeptide comprises a second single chain Fv molecule (2nd scFv) covalently linked to an immunoglobulin heavy chain fragment which comprises the constant region CH1 and the variable region VH.

DESCRIPTION OF SPECIFIC EMBODIMENTS

This invention provides a multivalent target binding protein comprising at least three target binding sites. The three target binding sites can be directed to the same or different targets. The multivalent binding protein of the present invention comprises a first and a second polypeptide. The first polypeptide comprises a first single chain Fv molecule covalently linked to a first immunoglobulin-like domain which preferably is an immunoglobulin light chain variable region domain. The second polypeptide comprises a second single chain Fv molecule covalently linked to a second immunoglobulin-like domain which preferably is an immunoglobulin heavy chain variable region domain. The first and second single chain Fv

WO 02/08293

PCT/US01/41386

molecules form two target binding sites, and the first and second immunoglobulin-like domains associate to form a third target binding site. Alternatively, the first and second single chain Fv molecules may associate together to form two binding sites, with the first and second immunoglobulin-like domains associating to form a third binding site. Preferably, the first single chain Fv molecule and the first immunoglobulin-like domain are covalently linked via a first extra amino acid sequence which preferably comprises an immunoglobulin light chain constant region domain, and the second single chain Fv molecule and the second immunoglobulin-like domain are covalently linked via a second extra amino acid sequence which preferably comprises an immunoglobulin heavy chain constant region domain. More preferably, the first extra amino acid sequence and the second extra amino acid sequence associate with each other, preferably via covalent interactions such as disulfide bonds, so as to stabilize the association between the first and second polypeptides.

As used herein, the term "antibody" is used interchangeably with the term "immunoglobulin." The terms "domain" or "fragment" mean a portion of the amino acid sequence of a protein.

Antibody Structure

There are at least five classes of human antibodies, each class having the same basic structure. The basic structure of an antibody is a tetramer, or a multimeric form thereof, composed of two identical heterodimers, each heterodimer consisting of a light chain with a molecular weight of about 25 kDa and a heavy chain with a molecular weight of about 50-77 kDa. For instance, Immunoglobulin G (IgG) consists of two identical heterodimers, while Immunoglobulin M (IgM) has five identical heterodimers. The two heterodimers of an IgG molecule are covalently linked via disulfide bonds. The light chain and the heavy chain of each heterodimer also are covalently linked via at least one disulfide bond.

Each light or heavy chain folds into several regions. Each region consists of approximately 110 amino acid residues, and has a conserved three-dimensional conformation. The light chain comprises one variable region (VL) and one constant region (CL). The heavy chain comprises one variable region (VH) and three constant regions (CH1, CH2 and CH3). The CH1 region and CH2 region of the heavy chain are linked by a hinge region. The VL and

WO 02/08293

PCT/US01/41386

VH regions of an antibody are associated to form an antigen-binding site. This association primarily involves non covalent interactions. "Fv" denotes the structure formed by the association of VL and VH. The areas on an antigen that interact with the antigen-binding site are called epitopes. The epitopes fit into the conformational architecture of the antigen-binding site of an antibody, enabling the antibody to bind to the antigen. The interactions between the antigen and the antigen-binding site determines the specificity of an antibody.

The CL and CH1 regions of an antibody are associated via non covalent interactions. The CL region also is linked to the hinge region of the heavy chain via a disulfide bond. For example, Cys214 (Kabat's numbering) of the kappa type of light chain can form a disulfide bond with Cys233 (Kabat's numbering) of the hinge region of the heavy chain. For Kabat's numbering, see Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS and Foeller C. (1991), Sequences of proteins of immunological interest (5th edition, US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Office), which is hereby incorporated by reference. The association between the CL and CH1 regions, as well as the disulfide bond between the CL region and the hinge region, contribute to the stabilization of the three-dimensional structure of an antibody.

The variable regions (VL and VH) show considerable variability in structure and amino acid composition from one immunoglobulin molecule to another. The constant regions (CL, CH1, CH2 and CH3), however, show little variability. The term "variable" as used in this specification refers to the diverse nature of the amino acid sequences of the antibody heavy and light chain variable regions. Within the variable regions are found regions in which the amino acid sequence is extremely variable from one antibody to another. Three of these so-called "hypervariable" regions or "complementarity-determining regions" (CDR) are found in each variable region of the light or heavy chain. Each CDR is flanked by relatively conserved framework regions (FR). The FR are thought to maintain the structural integrity of the variable region. The CDRs of a light chain and the CDRs of a corresponding heavy chain form the antigen-binding site. The "hypervariability" of the CDRs accounts for the diversity of specificity of antibodies.

Cleavage of a naturally-occurring antibody molecule with the protease papain generates fragments which retain the antigen-binding site. These fragments, commonly known as Fab

WO 02/08293

PCT/US01/41386

fragments, comprise the light chain (VL and CL) and a fragment of the heavy chain (VH, CH1 and part of the hinge region) of the antibody. The light chain and the fragment of the heavy chain are covalently linked via at least one disulfide bond.

Antibodies are members of the immunoglobulin superfamily of proteins. Members of this superfamily also include, but are not limited to, T cell receptors, CD2, CD4, CD8, and certain types of cell-cell adhesion molecules. See *Molecular Biology of The Cell* (2nd edition, Bruce Alberts et al., Garland Publishing, Inc., 1989), pp 1053-1054. The basic building block for members of the immunoglobulin superfamily proteins is termed an "immunoglobulin-like domain." An "immunoglobulin-like domain" consists of about 100 amino acids, folded into a characteristic sandwichlike structure made of two antiparallel beta sheets. *See id.* Each naturally occurring "immunoglobulin-like domain" is usually encoded by a separate exon. *See id.* A typical immunoglobulin-like domain includes the variable and constant region of an antibody.

Single Chain Fv Molecule

A single chain Fv molecule (scFv) comprises a VL domain and a VH domain. The VL and VH domains associate to form a target binding site. These two domains are further covalently linked by a peptide linker (L). A scFv molecule is denoted as either VL-L-VH if the VL domain is the N-terminal part of the scFv molecule, or as VH-L-VL if the VH domain is the N-terminal part of the scFv molecule. Methods for making scFv molecules and designing suitable peptide linkers are described in US Patent No. 4,704,692, US Patent No. 4,946,778, R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs," PASEB Vol 9:73-80 (1995) and R.E. Bird and B.W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions," TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991). These references are incorporated herein by reference.

A single chain Fv molecule with the VL-L-VH configuration may associate with another single chain Fv molecule with the VH-L-VL configuration to form a bivalent dimer. In this case, the VL domain of the first scFv and the VH domain of the second scFv molecule associate to form one target binding site, while the VH domain of the first scFv and the VL domain of the second scFv associate to form the other target binding site.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

Multivalent Target Binding Protein

In one embodiment, a multivalent target binding protein is constructed by association of a first and a second polypeptide. *See* Figure 1. The first polypeptide comprises a first single chain Fv molecule covalently linked to a first immunoglobulin-like domain which preferably is an immunoglobulin light chain variable region domain. The second polypeptide comprises a second single chain Fv molecule covalently linked to a second immunoglobulin-like domain which preferably is an immunoglobulin heavy chain variable region domain. Each of the first and second single chain Fv molecules forms a target binding site, and the first and second immunoglobulin-like domains associate to form a third target binding site.

In a preferred embodiment, the first immunoglobulin-like domain comprises an antibody light chain variable region domain (VL domain) or a derivative thereof, and the second immunoglobulin-like domain comprises an antibody heavy chain variable region domain (VH domain) or a derivative thereof. The VL and VH domains may be synthetic domains constructed *in vitro* using techniques as described in WO 93/11236. The VL domain, or its derivative, associates with the VH domain or its derivative to form a functional target binding site. A domain is a derivative of another domain if the two domains have more than 50%, preferably more than 70%, most preferably more than 90%, amino acid sequence identity. "Amino acid sequence identify" has an art-recognized meaning and can be calculated using published techniques. *See* COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; BIocomputing: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, Von Heinje, G., Academic Press, 1987; and SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991. These references are hereby incorporated by reference. While there exist a number of methods to measure identity between two amino acid sequences, the term "identity" is well known to skilled artisans. *See* Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J Applied Math (1988) 48:1073, which is hereby incorporated by reference. Methods commonly employed to determine identity or similarity between two sequences include, but are not limited to, those disclosed in Guide to

WO 02/08293

PCT/US01/41386

Huge, Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J Applied Math (1988) 48:1073. Methods to determine identity and similarity are codified in computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, GCG program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. (1990) 215:403), and FASTDB (Brutlag et al., Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245).

A more preferred method for determining the best overall match, also referred to as a global sequence alignment, between a query sequence (for example, a sequence of the present invention) and a subject sequence can be determined using the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). In a sequence alignment the query and subject sequences are either both nucleotide sequences or both amino acid sequences. The result of said global sequence alignment is in percent identity. Preferred parameters used in a FASTDB amino acid alignment are: Matrix=PAM 0, k-tuple=2, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=zero, Cutoff Score = 1, Window Size=sequence length, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.05, Window Size=500 or the length of the subject amino acid sequence, whichever is shorter. If the subject sequence is shorter than the query sequence due to N- or C-terminal deletions, not because of internal deletions, a manual correction must be made to the results. This is because the FASTDB program does not account for N- and C-terminal truncations of the subject sequence when calculating global percent identity. For subject sequences truncated at the N- and C-termini, relative to the query sequence, the percent identity is corrected by calculating the number of residues of the query sequence that are N- and C-terminal of the subject sequence, which are not matched/aligned with a corresponding subject residue, as a percent of the total bases of the query sequence. Whether a residue is matched/aligned is determined by results of the FASTDB sequence alignment. This percentage is then subtracted from the percent identity, calculated by the above FASTDB program using the specified parameters, to arrive at a final percent identity score. This final percent identity score is what is used for the purposes of the present invention. Only residues N- and C-terminal to the subject sequence, which are not matched/aligned with the subject sequence, are considered for the purposes of

WO 02/08293

PCT/US01/41386

manually adjusting the percent identity score. That is, only query residue positions outside the farthest N-and C-terminal residues of the subject sequence are considered. For example, a 90 amino acid residue subject sequence is aligned with a 100 residue query sequence to determine percent identity. The deletion occurs at the N-terminus of the subject sequence and, therefore, the FASTDB alignment does not show a matching/alignment of the first 10 residues at the N-terminus. The 10 unpaired residues represent 10% of the sequence (number of residues at the N- and C- termini not matched/total number of residues in the query sequence). Thus, 10% is subtracted from the percent identity score calculated by the FASTDB program. If the remaining 90 residues were perfectly matched, the final percent identity would be 90%. In another example, a 90 residue subject sequence is compared with a 100 residue query sequence. This time the deletions are internal deletions so there are no residues at the N- or C-termini of the subject sequence which are not matched/aligned with the query sequence. In this case the percent identity calculated by FASTDB is not manually corrected. Once again, only residue positions outside the N- and C-terminal ends of the subject sequence, as displayed in the FASTDB alignment, which are not matched/aligned with the query sequence are manually corrected for.

Whether a VL domain or its derivative is able to associate with a VH domain or its derivative to form a functional target binding site may be tested using M13 bacteriophage display. For example, the cDNA encoding the VL domain or its derivative and the DNA encoding the VH domain or its derivative may be ligated to form a scFv sequence. The scFv sequence thus formed may be subcloned into a M13 phage display vector. The affinity of the expressed scFv molecule to the desired target may then be determined using routine phage display techniques. For phage display techniques, see *Phage display of peptides and proteins: A laboratory Manual* (1996) (Eds. Kay, B., et al., Academic Press, San Diego); Dunn IS, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7:547-553 (1996); Smith GD and Scott JK, *Methods Enzymol.* 217:228-257 (1993); O'Neil KT and Hoess RH, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:443-449 (1995). These references, as well as any cited references in this disclosure, are hereby incorporated by reference. Whether the VL domain or its derivative and the VH domain or its derivative can form a functional target binding site may also be evaluated by standard assays known in the art, for example, competition assays, enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), and

WO 02/08293

PCT/US01/41386

radioimmunoassay (RIA). Likewise, the activity of the target binding site formed by association of two immunoglobulin-like domains may be determined using the above described methods. As used herein, a binding site is functional if it can bind to the desired target with an affinity of at least 10^3 M⁻¹, preferably at least 10^4 M⁻¹, more preferably at least 10^5 M⁻¹, and most preferably at least 10^6 M⁻¹.

In another preferred embodiment, the first single chain Fv molecule and the first immunoglobulin-like domain are covalently linked via a first extra amino acid sequence, and the second single chain Fv molecule and the second immunoglobulin-like domain are covalently linked via a second extra amino acid sequence. Preferably, the first and second extra amino acid sequences associate with each other, so as to stabilize the association between the first and second polypeptides of the multivalent target binding protein. For example, the first and second extra amino acid sequences may be enriched with leucine residues in such a manner that they form a leucine zipper structure. More preferably, the first and second extra amino acid sequences covalently associate with each other. For example, the first and second extra amino acid sequences may be enriched with cysteine residues, so that they form disulfide bonds between each other.

In one embodiment, the first extra amino acid sequence comprises a light chain constant region domain (CL domain) or a derivative thereof, and the second extra amino acid sequence comprises a heavy chain constant region domain (CH domain) or a derivative thereof. Preferably, the CL domain or its derivative and the CH domain or its derivative associate with each other, so as to stabilize the association between the first and second polypeptide of the multivalent target binding protein. The CL domain or its derivative may associate with the CH domain or its derivative via non covalent interactions, such as hydrophobic interactions.

In a preferred embodiment, the first extra amino acid sequence comprises a kappa type light chain CL domain which has a cysteine corresponding to Cys214 according to Kabat's numbering, whereas the second extra amino acid sequence comprises a heavy chain hinge region, or a part thereof, which has a cysteine corresponding to Cys233 according to Kabat's numbering. The first and second extra amino acid sequences may be covalently linked via a disulfide bond between these two cysteine residues.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

In another preferred embodiment, the first polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a first scFv molecule covalently linked to an immunoglobulin light chain fragment which comprises the variable region VL and the constant region CL, and the second polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a second scFv molecule covalently linked to an immunoglobulin heavy chain fragment which comprises the variable region VH and the constant region CH1. *See* Figure 2. The VL region and VH region associate to form a target binding site. The CL region and CH1 region associate with each other to stabilize the multivalent target binding protein. Preferably, the first scFv molecule and the CL region are covalently linked via a first peptide linker which preferably consists of about 4 to about 15 amino acid residues. The second scFv molecule and the CH1 region are also preferably covalently linked via a second peptide linker which preferably consists of about 4 to about 15 amino acid residues. Preferably, the first peptide linker may have the amino acid sequence GGGG or EPKSADKTHTCPPCPGGGS, and the second peptide linker may have the amino acid sequence EPKSCGGGS or EPKSCDKTHTCPPCPGGGS. More preferably, the cysteine residue in the second peptide linker may form a disulfide bond with the CL region in a manner similar to the disulfide bond formed between an antibody light chain and heavy chain. The molecular weight of the multivalent target binding protein of this embodiment may be about 100 kDa.

In one embodiment, the first and second immunoglobulin-like domains may comprise humanized variable region domains. For instance, the complementarity-determining regions of a murine antibody may be grafted to the framework regions of a human antibody. See Sahagen et al., *J. Immunol.*, 137:1066-1074 (1986); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:214-218 (1987); Nishimura et al., *Cancer Res.*, 47:999-1005 (1987); Lie et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3439-3443 (1987); and US Patent No. 5,874,540. These references are incorporated herein by reference. Alternatively, human antibody variable regions may be used. Methods for isolating human antibodies are well known in the art, for example, by using a transgenic animal which has been modified to produce human antibodies, or from phage display of human antibody libraries. *See* US Patent Nos 6,075,181 and 5,969,108, which are hereby incorporated by reference. Whether a humanized variable region domain is able to associate with another variable region domain to form a functional target binding site may be determined

WO 02/08293

PCT/US01/41386

using M13 bacteriophage display or other standard assays, for example competition assays, enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), and radioimmunoassay (RIA). The variable region domains of the first and second scFv molecules may likewise be humanized. Human antibody constant region domains may also be used to covalently link the first and second scFv molecules of a multivalent target binding protein to the first and second immunoglobulin-like domains, respectively.

In one embodiment, at least two of the three target binding sites of a multivalent binding protein may have different target binding specificities. For example, the first and second scFv molecules may have different amino acid sequences and possess different binding specificities. Each of the three target binding sites may have a different binding specificity from each other. As used herein, two binding sites have different target binding specificities if they do not have the same target binding specificity. Two binding sites have the "same" target binding specificity if they can bind to the same target with a similar binding affinity. Two target binding sites have a "similar" binding affinity if the ratio between their affinity constants for a given antigen or target is between about 0.2 to about 5. Two binding sites are identical if they have the same binding specificity to the same target.

In another embodiment, at least two of the three target binding sites of a multivalent binding protein may have the same target binding specificity. For example, the first and second scFv molecules may have the same amino acid sequence and possess the same binding specificity. The three target binding site may have the same target binding specificity. This may be achieved when the first immunoglobulin-like domain, the VL domain of the first scFv molecule and the VL domain of the second scFv molecule have the same amino acid sequence, and the second immunoglobulin-like domain, the VH domain of the first scFv molecule and the VH domain of the second scFv molecule also have an identical amino acid sequence. A target binding protein with at least two identical binding sites can exhibit an enhanced avidity to its target.

In yet another embodiment, the multivalent binding protein comprises at least two heterodimers, each heterodimer comprising a first and a second polypeptides. The first polypeptide comprises a first single chain Fv molecule and a first immunoglobulin-like domain which are covalently linked via a first extra amino acid sequence. The second polypeptide

WO 02/08293

PCT/US01/41386

comprises a second single chain Fv molecule and a second immunoglobulin-like domain which are covalently linked via a second extra amino acid sequence. The first or second extra amino acid sequence of the first heterodimer may associate with the first or second extra amino acid sequence of the second heterodimer, preferably by covalent interactions, such as disulfide bonds.

As used herein, a molecule associates with another molecule if the two molecules have a propensity to join together. Association between two molecules may involve either covalently interactions or non-covalent interactions, or both covalent and non-covalent interactions. A molecule is linked or conjugated to another molecule if they associate with each other. As used herein, the terms "link" and "conjugate" are interchangeable.

Peptide Linker Of Multivalent Target Binding Protein

The peptide linkers for the scFv molecules of the multivalent target binding protein preferably consist essentially of Gly and Ser residues. A preferred peptide linker is [GGGGS]₃. Glu and Lys residues may also be included. Suitable peptide linkers for a scFv molecule may be designed in accordance with the methods disclosed in US Patent No. 4,946,778, which is hereby incorporated by reference.

The peptide linkers for the scFv molecules of the multivalent binding protein preferably comprise at least 12 amino acid residues. More preferably, the peptide linkers have at least 15 amino acid residues. Most preferably, the peptide linkers have about 15 to about 30 amino acid residues. A peptide linker shorter than 12 amino acids may reduce the flexibility between the VL and VH domains of a scFv molecule.

The first and second scFv molecules of a multivalent binding protein of the present invention may be either in the VL-L-VH configuration or in the VH-L-VL configuration. The two scFv molecules of the same multivalent binding protein may have the same or opposite configurations.

In one embodiment, the peptide linkers of the two scFv molecules of the multivalent binding protein comprise less than 12 amino acid residues, and the two scFv molecules have opposite configurations. For example, the first scFv molecule may have a VL-L-VH configuration, while the second scFv molecule has a VH-L-VL configuration. The two scFv

WO 02/08293

PCT/US01/41386

molecules associate to form two target binding sites. In the above example, one target binding site may be formed via association between the VL domain of the first scFv molecule and the VH domain of the second scFv molecule, and the other target binding site may be formed by association between the VH domain of the first scFv molecule and the VL domain of the second scFv molecule. The binding specificity and affinity of thus formed two binding sites may be evaluated by standard assays known in the art, for example competition assays, enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), and radioimmunoassay (RIA).

In another embodiment, the first polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a first scFv molecule covalently linked via a first peptide linker to an immunoglobulin light chain fragment, and the second polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a second scFv molecule covalently linked via a second peptide linker to an immunoglobulin heavy chain fragment. The first and second peptide linkers may increase the flexibility of the scFv molecules with respect to other parts of the multivalent binding protein. This flexibility becomes significant when one target binding event hinders another target binding event due to, for example, the large size of the target. In a preferred embodiment, the immunoglobulin light chain fragment comprises the VL and CL regions, and the immunoglobulin heavy chain fragment comprises the VH and CH1 regions. The first and second peptide linkers preferably comprise at least 4 amino acid residues, more preferably at least 10 amino acid residues, and most preferably at least 15 amino acid residues. Preferably, the second peptide linker comprises a cysteine residue which is capable of forming a disulfide bond with the Cys 214 (Kabat's numbering) of the CL region of the immunoglobulin light chain fragment. For example, the second peptide linker may have the amino acid sequence EPKSCGGGS, and the first peptide linker may have the amino acid sequence GGGS. For another example, the second peptide linker may have the amino acid sequence EPKSCDKTHTCPPCPGGGS, and the first peptide linker may have the amino acid sequence EPKSADKTHTCPPCPGGGS.

Conjugation Of Multivalent Target Binding Protein With An Agent

Additional amino acid residues may be added to either the N- or C-terminus of the first or the second polypeptide. The additional amino acid residues may comprise a peptide tag, a signal

WO 02/08293

PCT/US01/41386

peptide, a cytokine, an enzyme (for example, a pro-drug activating enzyme), a peptide toxin such as pseudomonas exotoxin, a peptide drug, a cytotoxic protein or other functional proteins. As used herein, a functional protein is a protein which has a biological function. A preferred functional protein is a cytotoxic protein. Adding extra amino acid residues at the N- or C-terminus of a protein is well known in the art. For instance, it may be achieved by ligating in-frame the DNA sequence encoding the additional amino acid residues with the DNA sequence encoding the first or second polypeptide. The ligation site may be at either the 5' or 3' end of the DNA sequence encoding the first or second polypeptide. The additional amino acid residues preferably does not significantly affect the binding specificity or affinity of the multivalent binding protein. A target binding protein's binding specificity is significantly affected if the modified protein binds to its purported target at an affinity of less than 10^3 M⁻¹. A target binding protein's binding affinity is significantly affected if the binding affinity of the modified protein to its purported target is 10 times less than that of the unmodified protein.

In one embodiment, drugs, toxins, radioactive compounds, enzymes, cytotoxic proteins, chelates, cytokines and other functional agents may be conjugated to the multivalent target binding protein, preferably through covalent attachments to the side chains of the amino acid residues of the multivalent target binding protein, for example amine, carboxyl, phenyl, thiol or hydroxyl groups. Various conventional linkers may be used for this purpose, for example, diisocyanates, diisothiocyanates, bis(hydroxysuccinimide) esters, carbodiimides, maleimide-hydroxysuccinimide esters, glutaraldehyde and the like. Conjugation of agents to the multivalent protein preferably does not significantly affect the protein's binding specificity or affinity to its target. As used herein, a functional agent is an agent which has a biological function. A preferred functional agent is a cytotoxic agent.

In another embodiment, cytotoxic agents may be conjugated to a polymeric carrier, and the polymeric carrier may subsequently be conjugated to the multivalent target binding protein. For this method, see Ryser et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3867-3870, 1978, US Patent No. 4,699,784 and US Patent No. 4,046,722, which are incorporated herein by reference. Conjugation preferably does not significantly affect the binding specificity or affinity of the multivalent binding protein.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

Many drugs and toxins are known to have cytotoxic effects on tumor cells or microorganisms. These drugs and toxins may be found in compendia of drugs and toxins, such as the Merck Index or the like.

In one embodiment, at least one N-glycosylation sequence may be introduced into either the first or second polypeptide of the multivalent target binding protein. See Hansen *et al.*, U.S. Patent No. 5,443,953, and Leung *et al.*, U.S. Provisional Patent Application 60/013,709, where a N-glycosylation sequence is introduced to the VL (HCN1 site) or CH1 (HCN5 site) region of an antibody. These references are incorporated herein by reference. Preferably, the glycosylation sequence may be inserted at a site distant from the target binding site, such that glycosylation of the sequence does not significantly affect the binding specificity or affinity of the multivalent target binding protein. More preferably, the glycosylation site may be inserted at least 4.1 Å away from the target binding site. Most preferably, the N-glycosylation site may be introduced outside the first and second immunoglobulin-like domains and the first and second scFv molecules. In a preferred embodiment, a N-glycosylation site may be engineered within the first and second extra amino acid sequences, such as an immunoglobulin constant region domain which covalently links the first or second immunoglobulin-like domain to the first or second scFv molecule, respectively. Computer modeling may help locate suitable sites for introducing the N-glycosylation recognition sequence.

N-glycosylation recognition sites may be engineered into the first or second polypeptide using site-directed mutagenesis. Whenever possible, the mutations introduced are conservative in nature, so as to maintain the final tertiary structure of the protein domains. A conservative mutation generally involves substitution of one for another by similar size and clinical properties. For example, a preferred N-glycosylation recognition sequence is NXT or NXS, wherein N denotes asparagine, T denotes threonine, S denotes serine and X denotes any amino acid residue. Replacement of a glutamine (Q) residue with an asparagine (N) residue would be considered a conservative substitution. Possible perturbations in the final tertiary structure may be minimized by carefully choosing sequences that only one single amino acid substitution therein is sufficient to provide a potential glycosylation site.

Insertion of the N-glycosylation sequence is described only as an example. The principles involved are equally applicable to O-glycosylation. O-glycosylation is known to

WO 02/08293

PCT/US01/41386

occur at either threonine or serine. The acceptor sequence for O-linked glycosylation is relatively ill defined. See Wilson *et al.*, *Biochem. J.*, 275: 526 (1991). There could be a bias for higher content of proline, serine and threonine in these regions, but accessibility, rather than the exact primary sequence may determine whether a particular threonine or serine residue will be O-glycosylated. Nevertheless, potential O-glycosylation sequences, such as those identified in other antibodies known to have O-glycosylation can be used as the standard sequences for grafting into different positions in the target binding proteins of interest. See Chandrashekarkan *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259: 1549 (1981), Smyth and Utsumi, *Nature*, 216: 322 (1967), Kim *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 12345 (1994). Insertion of glycosylation recognition sequences, glycosylation of the introduced sequences, or any other modifications preferably do not significantly affect the binding specificity and affinity of the multivalent target binding protein.

In another embodiment, a carbohydrate chain may be covalently linked to an engineered glycosylation sequence. Covalent attachment of a carbohydrate chain may be achieved by expressing the multivalent binding protein which comprises the glycosylation recognition sequence in a eukaryotic cell. A signal peptide sequence may preferably be introduced at the N-terminus of the first or second polypeptide of the multivalent binding protein. When expressed in a eukaryotic cell, the first or second polypeptide with the signal peptide may translocate from cytosol to endoplasmic reticulum (ER), where the polypeptide can be glycosylated via the engineered glycosylation recognition sequence.

In yet another embodiment, enzymes, toxins, cytokines, drugs, chelates, cytotoxic proteins, radioactive compounds or other cytotoxic agents may be attached to the carbohydrate chain which has been incorporated into the multivalent binding protein via the engineered glycosylation recognition site. To conjugate an agent to a carbohydrate chain, the hemiacetal rings in the carbohydrate chain may be chemically oxidized to generate reactive aldehyde groups. Aldehyde groups thus formed may be covalently bonded to the amino groups of a protein or an agent through Schiff bases. For general methods of attaching proteins or agents to a carbohydrate chain, see Hansen *et al.*, U.S. Patent No. 5,443,953, and Leung *et al.*, U.S. Provisional Patent Application 60/013,709, the entire contents of which are incorporated herein by reference.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

Construction of Expression Vectors for Multivalent Target Binding Protein

The expression vectors for the first or second polypeptides of the multivalent binding protein may be obtained by in-frame ligation of the DNA sequences encoding the immunoglobulin-like domain, the scFv molecule or the extra amino acid sequence using DNA ligation techniques as appreciated by one of skill in the art. See Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed. (1989). A peptide linker which covalently connects the scFv molecules to the other parts of the multivalent binding protein may be introduced by PCR techniques, for example, using a primer which incorporates the DNA sequence encoding the peptide linker.

The DNA sequences encoding the variable and constant region domains of an antibody may be obtained from published sources or can be obtained by standard procedures known in the art. For example, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th ed (1991), published by The U.S. Department of Health and Human Services, discloses sequences of most of the antibody variable regions that have been described prior to its publication date.

General techniques for the synthesis of antibody variable or constant regions are described, for example, by Orlandi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:3833 (1989) and Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:106 (1991). Also see, Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), pages 166-179 (Cambridge University Press 1995).

DNA sequences for the variable and constant regions of an antibody may also be obtained through reverse transcription of the mRNAs which encode the antibody. The source of mRNAs for antibodies may be obtained from a wide range of hybridomas. See, for example, the catalogue of ATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990). Hybridomas secreting monoclonal antibodies reactive with a wide variety of antigens are listed therein, and are

WO 02/08293

PCT/US01/41386

available from the collection. These cell lines or others of similar nature may be utilized as a source of mRNAs coding for the variable and constant regions of antibodies.

Variable and constant regions of antibodies may also be derived by immunizing an appropriate vertebrate, normally a domestic animal, and most conveniently a mouse. The immunogen will be the antigen of interest, or where a hapten is of interest, an antigenic conjugate of the hapten to an antigen such as keyhole limpet hemocyanin (KLH). The immunization may be carried out conventionally with one or more repeated injections of the immunogen into the host mammal, normally at two to three week intervals. Usually three days after the last challenge, the spleen is removed and dissociated into single cells to be used for cell fusion to provide hybridomas from which mRNAs can readily be obtained by standard procedures known in the art. DNA sequences may be obtained through reverse transcription of the mRNAs. The above procedures can produce an antibody which may be specific to any selected immunogenic antigens, for example, a cell surface protein, a T cell marker such as CD 28 and CD3, a Fc receptor, a drug, a toxin, a cytokine, an enzyme, a cytotoxic protein, a chelate, a tumor antigen, or a chemical compound which may be radioactive. The DNA sequences coding for the variable or constant regions of the antibody may be used to construct the multivalent target binding protein of the present invention.

Variable and constant regions of antibodies may be obtained using M13 bacteriophage display. See Burton et al, *Adv. Immuno.* 57:191-280 (1994). Essentially, a cDNA library for antibodies is generated from mRNAs obtained from a population of antibody-producing cells, such as B-lymphocytes. Amplified cDNAs are cloned into M13 phage display vectors creating a library of phage which express the antibody fragments on the phage surface. Phage which displays the antibody fragment of interest is selected using the affinity to the antigen. The selected phage is amplified to produce the antibody of interest.

Construction of the DNA sequences for scFv molecules is disclosed, for example, in European Patent Application No. 239400 and U.S. Patent No. 4,946,778. These references are incorporated herein by reference. Construction of scFv sequences also is described in R.E. Bird and B.W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions," TIBTECH, Vol 9: 132-137 (1991), which is incorporated herein by reference. In addition, the DNA sequences

WO 02/08293

PCT/US01/41386

encoding the VL and VH regions of scFv molecules may be obtained from antibodies which can be prepared as described above.

A signal peptide, preferably with antibody gene origin, may be added to the N-terminal end of a target binding protein by routine DNA cloning techniques, for instance, by a PCR using a 5' end primer comprising the signal peptide sequence. Alternatively, a signal peptide may be incorporated through reverse transcription of an antibody mRNAs. The mRNAs encoding a naturally-occurring antibody usually comprises signal peptide sequences. Reverse transcription of the mRNAs will produce a DNA sequence which may encode both a signal peptide and an antibody variable region. The DNA sequence thus obtained may be used to construct the first or second immunoglobulin-like domain of the multivalent target binding protein.

DNA sequence may be determined by methodologies described in Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 5463 (1977), which is incorporated herein by reference.

Expression of Multivalent Target Binding Protein

Methods for introducing a DNA vector into a host cell are well known in the art. These methods include, but are not limited to, electroporation, calcium phosphate, cationic lipid, gene gun, and Biostatic (Bio-Rad) method.

To express the first and second polypeptides of a multivalent target binding protein, the DNA sequences encoding the two polypeptides must be operably linked to regulatory sequences controlling transcriptional and translational expressions in host cells. Regulatory sequences that control transcription include promoters and enhancers. The host cell may be either prokaryotic or eukaryotic. The expression vectors may also include a marker gene for selection of host cells that carry the expression vectors.

Suitable promoters for expression in a prokaryotic host can be repressible, constitutive, or inducible. These promoters are well-known to those skilled in the art. These promoters include, but are not limited to, promoters capable of recognizing the T4, T3, Sp6 and T7 polymerases, the P_R and P_L promoters of bacteriophage lambda, the trp, recA, heat shock, and lacZ promoters of *E. coli*, the α -amylase and the σ^{28} -specific promoters of *B. subtilis*, the promoters of the bacteriophages of *Bacillus*, *Streptomyces* promoters, the int promoter of bacteriophage lambda,

WO 02/08293

PCT/US01/41386

the *bla* promoter of the β -lactamase gene of pBR322, and the CAT promoter of the chloramphenicol acetyl transferase gene. Prokaryotic promoters are reviewed by Glick, *J. Ind. Microbiol.*, 1: 277 (1987) and Watson *et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, 4th Ed., Benjamin Cummins (1987).

A preferred prokaryotic host is *E. coli*. Preferred strains of *E. coli* include Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, and ER1647. See, for example, Brown (Ed.), MOLECULAR BIOLOGY LABFAX, Academic Press (1991). An alternative preferred host is *Bacillus subtilis*, including such strains as BR151, YB886, MI119, MI120, and B170. See, for example, Hardy, "Bacillus Cloning Methods," in DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Glover (Ed.), IRL Press (1985).

Methods for expressing antibodies in prokaryotic hosts are well-known to those skilled in the art. See, for example, Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995). Moreover, expression systems for cloning antibodies in prokaryotic cells are commercially available. For example, the IMMUNO ZAPTM Cloning and Expression System (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, CA) provides vectors for the expression of antibody light and heavy chains in *E. coli*. One skilled in the art would understand that the techniques for expressing and cloning antibodies in prokaryotic cells may be employed for expressing and cloning the multivalent binding protein of the present invention without undue experimentation.

Alternatively, the first and second polypeptides of the multivalent binding protein of the present invention may be expressed in eukaryotic host cells. Eukaryotic host cells include mammalian, insect and yeast cells. Preferably, the eukaryotic host cell is a mammalian cell. Mammalian cells may provide proper post-translational modifications to the expressed polypeptides. Suitable mammalian host cells may include COS-7 cells (ATCC CRL 1651), non-secreting myeloma cells (SP2/0-AG14; ATCC CRL 1581), rat pituitary cells (GH₁; ATCC CCL 82), and rat hepatoma cells (H4-II-E; ATCC CRL 1548).

For a mammalian host, the transcriptional and translational regulatory signals may be derived from viral sources, such as adenovirus, bovine papilloma virus, and simian virus. In addition, promoters from mammalian expression products, such as actin, collagen, or myosin, may be employed. Preferably, a metallothionein promoter may be used. Alternatively, a

WO 02/08293

PCT/US01/41386

prokaryotic promoter, such as the bacteriophage T3 RNA polymerase promoter, may be employed, wherein the prokaryotic promoter is regulated by a eukaryotic promoter, for example, see Zhou *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:4529 (1990), and Kaufman *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19:4485 (1991). Transcriptional initiation regulatory signals may be selected so that expression of the genes can be modulated, for example, be able to subject to repression or activation.

In general, eukaryotic regulatory regions include a promoter region sufficient to direct the initiation of RNA synthesis. Such eukaryotic promoters include the promoter of the mouse metallothionein I gene (Hamer *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273 (1982)); the TK promoter of Herpes virus (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)); the SV40 early promoter (Benoist *et al.*, *Nature (London)* 290:304 (1981)); the Rous sarcoma virus promoter; the cytomegalovirus promoter (Foccking *et al.*, *Gene* 45:101 (1980)); the yeast *gal4* gene promoter (Johnston, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79:6971 (1982); Silver, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81:5951 (1984)); and the IgG promoter (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989)).

Strong regulatory sequences are the preferred regulatory sequences of the present invention. Examples of such preferred regulatory sequences include the SV40 promoter-enhancer (Gorman, "High Efficiency Gene Transfer into Mammalian cells," in DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH, Volume II, Glover (Ed.), IRL Press pp. 143-190 (1985)), the hCMV-MIE promoter-enhancer (Bebbington *et al.*, *Bio/Technology* 10:169 (1992)), and antibody heavy chain promoter (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989)). Also preferred are the kappa chain enhancer for the expression of the light chain and the IgH enhancer (Gillies, "Design of Expression Vectors and Mammalian Cell Systems Suitable for Engineered Antibodies," in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL GUIDE, C. Borrebaeck (Ed.), W.H. Freeman and Company, pp. 139-157 (1992)).

The DNA sequence encoding the first or second polypeptide, which is operably linked to a promoter, may be introduced into eukaryotic host cells as a non-replicating DNA molecule. These DNA sequences may be either in a linear form or, more preferably, in a closed covalent circular form. Because these DNA molecules are incapable of autonomous replication, the expression of the encoded proteins may occur through the transient expression of the introduced DNA sequences. Preferably, permanent expression may be used, which may occur when the introduced DNA sequences are integrated into the host chromosome.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

Preferably, the introduced DNA sequence will be incorporated into a plasmid or viral vector that is capable of autonomous replication in the recipient host. Several possible vector systems are available for this purpose. One class of vectors utilize DNA elements which provide autonomously replicating extra-chromosomal plasmids, derived from animal viruses such as bovine papilloma virus, polyoma virus, adenovirus, or SV40 virus. A second class of vectors relies upon the integration of the desired genomic or cDNA sequences into the host chromosome. Additional elements may also be needed for optimal synthesis of mRNA. These elements may include splice signals, as well as transcription promoters, enhancers, and termination signals. The cDNA expression vectors incorporating such elements include those described by Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 3:280 (1983), Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd Ed. (1989), and Fouser et al., *Bio/Technology* 10:1121 (1992). Genomic DNA expression vectors which include intron sequences may also be used. See generally, Lerner et al. (Eds.), *NEW TECHNIQUES IN ANTIBODY GENERATION, Methods* 2(2) (1991).

Additionally, it is preferred that the expression vector contains a selectable marker, such as a drug resistance marker or other marker which causes expression of a selectable trait by the host cell. "Host cell" refers to cells which can be recombinantly transformed or transfected with vectors constructed using recombinant DNA techniques. A drug resistance or other selectable marker is intended in part to facilitate in the selection of transformed or transfected host cells. For example, G418 can be used to select transfected cells carrying an expression vector having the aminoglycoside phosphotransferase gene. See Southern et al., *J. Mol. Appl. Gen.*, 1:327 (1982). Alternatively, hygromycin-B can be used to select transfected host cells carrying an expression vector having the hygromycin-B-phosphotransferase gene. See Palmer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:1055 (1987). Alternatively, aminopterin and mycophenolic acid can be used to select transfected cells carrying an expression vector having the xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. See Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072 (1981). Preferably, methotrexate can be used to select transfected cells, such as transfected SP2/0 cells, which carry an expression vector having the DHFR gene, and the selected transfected cells may subsequently be subject to step-wise increases in the concentration of methotrexate, in order to increase the production of the desired protein. For a host cell which

WO 02/08293

PCT/US01/41386

carries two expression vectors simultaneously, each vector comprising the DNA sequence encoding a different polypeptide of the multivalent binding protein, it is preferred that each vector is designed to have a different selectable marker so that the host cell may be selected by using a combination of two drugs.

Additionally, the presence of a selectable marker, such as a drug resistance marker, may be of use in keeping contaminating microorganisms from multiplying in the culture medium. In this embodiment, such a pure culture of transformed or transfected host cells may be obtained by culturing the cells under conditions which require for survival the phenotype associated with the selectable marker.

It is preferred that the expression vectors and the inserts which code for the first or second polypeptides of the multivalent binding protein of the present invention have compatible restriction sites at the insertion junctions and that those restriction sites are unique to the areas of insertion. Both vector and insert are treated with restriction endonucleases and then ligated by any of a variety of methods such as those described in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd Ed. (1989).

In one embodiment, the expression vector comprising the DNA sequence encoding the first polypeptide of the multivalent target binding protein also comprises the DNA sequence encoding the second polypeptide of the protein. Each of these DNA sequences is operably linked to a separate set of regulatory sequences controlling transcriptional and translational expressions. The expression vector may be introduced into either prokaryotic or eukaryotic host cells and expressed therein. The multivalent target binding protein preferably may be assembled within the host cells, and isolated according to the methods described below. Alternatively, the expressed polypeptides may be isolated, and then associate to form the multivalent binding protein *in vitro*.

In another embodiment, the DNA sequences encoding the first and second polypeptides of the target binding protein may be cloned into different expression vectors. Each DNA sequence is operably linked to regulatory sequences controlling transcriptional and translational expressions. Each vector is introduced into either prokaryotic or eukaryotic host cells and expressed therein. The produced first and second polypeptides are isolated or concentrated according to the methods described below. Then the isolated or concentrated first and second

WO 02/08293

PCT/US01/41386

polypeptides are mixed together to associate to form the multivalent binding protein. The final product of the multivalent binding protein may be isolated using the methods as described below. Alternatively, the two vectors encoding the first and second polypeptides may be introduced into the same host cell for co-expression. The expressed first and second polypeptides may be assembled within the host cell, and then isolated accordingly.

Isolation of Multivalent Target Binding Protein

The transfected or transformed host cells may be selected and cultured, and then lysed using detergents or osmotic shocking. For an expression construct having a signal peptide which allows the expressed protein to be secreted, the supernatant of the cell culture, together with the cell lysate, may be retained for isolation of the expressed protein. The expressed protein may be isolated or concentrated using standard techniques known in the art, such as affinity chromatography, protein G affinity chromatography, gel filtration chromatography, and ion-exchange chromatography. See Coligan *et al.* (eds.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, John Wiley & Sons (1991), for detailed protocols. The affinity chromatography column may be coupled with a target which binds to at least one of the three target binding sites.

Polypeptides expressed in prokaryotic host cells may be concentrated in refractile bodies or inclusion bodies. Inclusion bodies may be purified by lysing the cells, and repeatedly centrifuging the lysed cells and washing the resultant pellets. The final pellets contain isolated inclusion bodies. The isolated inclusion bodies may be solubilized using guanidine-HCl, followed by gel filtration chromatography, to isolate the expressed protein. Guanidine-HCl treatment is especially suitable for the multivalent target binding protein which has its first and second polypeptides covalently linked via at least a disulfide bond.

Affinity chromatography is well known to one of skill in the art. Briefly, the purported target of the multivalent target binding protein may be coupled to the matrix of the chromatography column, such as agarose beads. The expressed multivalent target binding protein or one of its two polypeptide may be retained by the target-coupled affinity column if they possess a functional binding site specific to the target. The retained proteins may

WO 02/08293

PCT/US01/41386

subsequently be eluted. Protein G affinity column may also be used to purify the multivalent target binding protein, as will be appreciated by one of ordinary skill in the art.

Ion-exchange chromatography is well-known to those of ordinary skill in the art. Most protein has either positive or negative charges. Thus, a chromatography column with the opposite type of charges may retain the proteins.

Gel filtration chromatography uses a gel-like material to separate proteins on the basis of their molecular weights. A "gel" is usually a matrix of water and a polymer, such as agarose or polymerized acrylamide. The present invention encompasses the use of gel filtration HPLC (high performance liquid chromatography), as will be appreciated by one of ordinary skill in the art.

Standard recovery and collection procedures are well known in the art. Recovering the expressed polypeptide or multivalent target binding protein preferably comprises collecting eluate fractions which contain the peak of interest from either an affinity column, an ion exchange column or a gel filtration column. Manual and automated fraction collection are well-known in the art. Subsequent processing may involve lyophilization of the collected eluate to produce a stable solid, or further purification.

The activity, including binding specificity and affinity, of the isolated polypeptide or multivalent binding protein may be assessed by standard assays known in the art, for example competition assays, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and radioimmunoassay (RIA).

Stabilization of Multivalent Target Binding Protein

In one embodiment, the first and second polypeptides of the multivalent target binding protein may be stabilized via covalent interactions, such as disulfide bonds. For instance, Each of the first and second polypeptides may comprise a cysteine-rich extra amino acid sequence. These extra amino acid sequences may form disulfide bonds between each other, and therefore stabilize the association between the first and second polypeptides. In a preferred embodiment, the first polypeptide may comprise a CL region which covalently links the first scFv molecule to the first immunoglobulin-like domain, and the second polypeptide may comprise a complete

WO 02/08293

PCT/US01/41386

or partial heavy chain hinge region. The CL region may be covalently linked to the hinge region via a disulfide bond.

Formation of disulfide bonds may occur during the synthesis of the multivalent target binding protein in host cells. Suitable host cells may include prokaryotic cells (such as *E. Coli*), yeast, and insect cells. Preferred host cells include cultured mammalian cells. Formation of disulfide bonds may also be driven *in vitro* by oxidation using the method as described in Kostelnik et al., *J. Immunol.*, 148:1547-1553 (1992). Under this method, the first and second polypeptides of the multivalent binding protein are mixed and dialyzed against a redox buffer. The final product may be purified by either gel filtration chromatography or affinity chromatography, in which the affinity chromatography column is coupled with the target which binds to the target binding site formed by the association between the first and second immunoglobulin-like domains.

To prevent undesirable disulfide bonds, undesirable cysteine residues may be replaced by non-cysteine residues, for example, by site-directed mutagenesis. Whenever possible, the mutations introduced are conservative in nature, so as to maintain the final tertiary structure of the protein domains. For example, a substitution of cysteine for serine may be considered a conservative substitution under certain conditions. Substitution of cysteine residues preferably does not significantly affect the binding specificity or stability of the multivalent target binding protein.

Where the first polypeptide comprises a light chain fragment comprising the VL and CL regions and the second polypeptide comprises a heavy chain fragment comprising the VH and CH1 region, see Figure 2, the amino acid residues involved in the interactions between the light chain fragment and the heavy chain fragment may be subject to mutagenesis in order to enhance the association between the two fragments. Suitable amino acid residues for mutagenesis may be determined based on the crystal structure of an antibody. The crystal structure of an antibody is known in the art. Candidate mutagenesis may be directed to introducing ionic bonds or disulfide bonds, or increasing hydrophobic interactions or the number of hydrogen bonds. Mutation of these residues preferably does not significantly change the binding specificity or affinity of the multivalent binding protein. The final product of mutagenesis may be isolated using affinity chromatography which is coupled with the

WO 02/08293

PCT/US01/41386

purported target. If the mutagenesis does not significantly affect the binding activity of the multivalent binding protein, the protein may be retained by the affinity column and recovered using routine collection techniques.

Application of Multivalent Target Binding Protein

The multivalent target binding protein of the present invention has many applications. Essentially all of the known uses for which monoclonal or polyclonal antibodies, or fragments thereof, can be addressed by the multivalent target binding protein of the present invention. A multivalent binding protein may be detectably-labeled. Types of labels are well-known to those of ordinary skill in the art. They include radiolabeling, chemiluminescent labeling, fluorochromic labeling, and chromophoric labeling. Other uses include imaging the internal structure of an animal (including a human) by administering an effective amount of a labeled form of the multivalent protein and measuring detectable radiation associated with the animal. They also include improved immunoassays, including sandwich immunoassay, competitive immunoassay, and other immunoassays wherein the labeled antibody can be replaced by the labeled multivalent target binding protein of the present invention.

The multivalent target binding protein may be used to recruit cytotoxic cells, such as natural killer (NK) or cytotoxic T cells, to specific cellular targets, such as tumor cells or infectious cells. See Staerz et al., *Nature*, 314:628 (1985), and Songilvilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315 (1990). The multivalent target binding protein may also be used to deliver toxins, drugs, chelates, cytokines, enzymes such as pro-drug activating enzymes, radioactive compounds, cytotoxic proteins or other cytotoxic agents to tumor cells or infectious cells. The use of multivalent targeting binding proteins which are conjugated, either covalently or non-covalently, with radioactive compounds or other cytotoxic agents offers the possibility of delivering these agents directly to the tumor or lesion sites, thereby limiting the exposure of normal tissues to toxic agents. See Goldenberg, *Semin. Nucl. Med.*, 19: 332 (1989). In recent years, multivalent target binding protein (including antibodies) based therapy and its accuracy in the localization of tumor-associated antigens have been successfully demonstrated both in the laboratory and clinical studies. See, e.g., Thorpe, *TIBTECH*, 11: 42 (1993); Goldenberg, *Scientific American, Science & Medicine*, 1: 64 (1994); US Patent Nos. 4,925,922 and

WO 02/08293

PCT/US01/41386

4,916,213; US Patent No. 4918163; US Patent No. 5,204,095; US Patent No. 5,196,337; and US Patent Nos. 5,134,075 and 5,171,665. In addition, multivalent target binding proteins may be useful for targeting tumor cells or infectious cells in *in vitro* conditions, for example, treating or detecting tumor cells or infectious cells in isolated biological samples. The multivalent target binding protein may also be useful for *ex vivo* purging of leukemia cells from bone marrow. See Kaneko et al., *Blood*, 81:1333-1341 (1993).

In one embodiment, the multivalent binding protein has at least one target binding site capable of binding to either a cytotoxic agent or a cytotoxic cell, and has at least another binding sites, preferably two other binding sites, capable of binding to antigens on tumor cells or infectious cells.

In another embodiment, the multivalent binding protein has at least one binding site, preferably three binding sites, capable of binding to antigens on tumor cells or infectious cells. Cytotoxic agents are conjugated to the multivalent binding protein, preferably by covalent attachments such as via the side chains of the amino acid residues of the protein, or via the carbohydrate chain engineered to the protein.

The multivalent target binding protein may be used for detecting or treating tumor cells, infectious cells, tumors or infectious lesions. Preferably, the multivalent target binding protein may be directly applied to a human patient or a non-human animal to treat a particular tumor or infectious lesion or to determine whether the subject has a particular tumor or infectious lesion. See Doussal et al., *Int. J. Cancer*, Supplement 7:58-62 (1992); Peltier et al., *J. Nucl. Med.*, 34: 1267-1273 (1993); Somasundaram et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 36: 337-345 (1993); Bruynck et al., *Br. J. Cancer*, 67: 436-440 (1993). For example, a multivalent target binding protein may have a tumor-antigen binding site and a hapten binding site. This protein may be introduced into a patient via injection, and the injected protein binds to the tumor antigen at the tumor site *in vivo*. A radioactively labeled hapten, such as a metal chelate, is then introduced to the patient via injection, and localized to the tumor site by binding to the protein via the hapten binding site, thereby enabling detection or treatment of the tumor. In the above example, the radioactively labeled hapten may also be conjugated to the multivalent target binding protein, for example, via the carbohydrate chain engineered to the multivalent target binding protein.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

In another embodiment, the multivalent target binding protein may have one target binding site specific to a target cell, and two target binding sites specific to cell-surface antigens of effector cells. Preferred target cells include tumor cells, infectious cells, or any other types of undesirable cells. Effector cells are those cells that can generate or participate in generation of a physiological response, such as an immune response, against an antigen or a target cell. Preferred effector cells include, but are not limited to, T cells, NK cells and macrophage cells. The two target binding sites specific to effector cells may bind to the same or different surface antigens on the effector cells. For example, the two target binding sites may bind to a surface antigen of cytotoxic T cell and a surface antigen of NK cell, respectively. Such a multivalent target binding protein is capable of recruiting both cytotoxic T cells and NK cells to a single target cell, and therefore may create an enhanced immune response against the target cell.

In a preferred embodiment, the multivalent target binding protein may have one target binding site specific to a target cell (e.g. a tumor cell), and two target binding sites specific to two different surface antigens on a single effector cell (e.g. a T cell). Thus, the multivalent target binding protein may bind to a single effector cell via two different surface antigens, which may trigger two different signal transduction pathways in the effector cell. Activation of two signal pathways in a single effector cell may produce an enhanced physiological response from the effector cell.

In another preferred embodiment, the multivalent target binding protein has one target binding site capable of binding to a tumor antigen or an antigen on an infectious cell, and the other two target binding sites capable of binding to T cell surface proteins CD3 and CD28, respectively. This multivalent target binding protein is, therefore, able to trigger two different signal transduction pathways in the T cell, one via CD3 and the other via CD28, so as to create an enhanced immune response against the targeted tumor or infectious cell. *See Holliger et al., Cancer Research, 59:2099 (1999).*

In another embodiment, one of the three target binding site of the multivalent target binding protein binds to a cytotoxic agent or a surface antigen of an effector cell (such as CD8 or CD4 of T cell). The other two target binding sites bind to tumor antigens, such as CEA(anti-carcinoembryonic antigen) or CSAp (Colon-Specific Antigen p). Both CEA and

WO 02/08293

PCT/US01/41386

CSAp are found to be expressed on the surface of colon cancers. With two target binding sites binding to the same tumor antigen, the multivalent target binding protein may have a higher avidity to the targeted tumor cells, thus limiting the exposure of normal tissues to the cytotoxic effects associated with the cytotoxic agent or effector cell. In yet another embodiment, the two tumor-antigen binding sites may have different binding specificities, for example, one binding to CEA and the other binding to CSAp. Having two different tumor-target binding specificities may increase the chance of tumor targeting and therefore reduce the chance of tumor evasion resulting from antigen modulation.

In another embodiment, either the first or second polypeptide of the multivalent target binding protein is covalently linked to additional amino acid residues at either N- or C-terminus thereof. These additional amino acid residues may comprise a peptide tag, a signal peptide, an enzyme such as a pro-drug activating enzyme, a cytokine, a peptide toxin, a peptide drug, a cytotoxic protein or other functional proteins. This multivalent target binding protein may be useful for treating or diagnosing tumors. For example, a peptide toxin, such as pseudomonas exotoxin, or a cytokine, such as IL-1, IL-2, IFN. γ , TNF. α . and GM-SF, may be added at the N- or C-terminus of the multivalent target binding protein, which preferably has three tumor-antigen binding sites. With three tumor-antigen binding sites, the multivalent binding protein may have a higher avidity to the tumor, and therefore may more effectively deliver the attached toxin or cytokine to the targeted tumor site. For another example, the multivalent target binding protein which has three tumor-antigen binding sites may be attached with a peptide tag which can be recognized by another radiolabeled antibody. This multivalent binding protein may be useful for detecting or treating tumors *in vivo*. With three tumor binding sites, this multivalent target binding protein may provide a more sensitive way for detection and treatment of tumors.

In a preferred embodiment, the multivalent target binding protein may be employed for pretargeting using the "affinity enhancement system." For example, the multivalent target binding protein may have three target binding sites, two for tumor antigens and one for a hapten such as the In-DTPA hapten. The two tumor antigen binding sites preferably bind to the same antigen, or different antigens associated with the same tumor cell. A subject, which may be, for example, a human or a non-human animal, may be pretreated with the target

WO 02/08293

PCT/US01/41386

binding protein. As used herein the terms subject and patients can be used interchangeably. At a predetermined time, the unbound target binding proteins are cleared from the subject. The subject is then administered with a peptide carrier carrying the hapten, preferably the peptide carrier carrying at least two haptens. The peptide carrier may be radiolabeled, or conjugated with drugs, toxins or other toxic agents, and therefore may exert a inhibitory effect on the growth of the targeted tumor cells.

The multivalent target binding protein of the present invention may be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions or medicaments, whereby the protein is combined in a mixture with a pharmaceutically acceptable carrier. Sterile phosphate-buffered saline is one example of a pharmaceutically acceptable carrier. Other suitable carriers are well-known to those skilled in the art. See, for example, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), and GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985).

Administration of a multivalent target binding protein to a patient or a non-human animal may be intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intrapleural, intrathecal, by perfusion through a regional catheter, or by direct intralesional injection. When administering a multivalent target binding protein by injection, the administration may be by continuous infusion or by single or multiple boluses.

For treating or detecting tumors or infectious lesions, or for eliciting an immune response against tumors or infectious lesions, the multivalent target binding protein or another agent is administered to a patient or a non-human animal in an effective amount. For purpose of treating tumors or infectious lesions, a multivalent target binding protein or another agent is administered in an "effective amount" if the amount administered is physiologically significant. An amount is physiologically significant if it results in a detectable change in the physiology of at least one targeted cell in the recipient patient or non-human animal, preferably if it results in a detectable change in the physiology of the targeted tumor or infectious lesion in the recipient patient or non-human animal. In particular, an amount is physiologically significant for treating a tumor or an infectious lesion if it results in an inhibitory effect on the growth of at least one targeted tumor or infectious cell, preferably if it results in an inhibitory effect on the growth of the targeted tumor

WO 02/08293

PCT/US01/41386

or infectious lesion. For purpose of detecting tumors or infectious lesions, a target binding protein or another agent is said to be administered in an "effective amount" if it can create a non-background detectable signal. For purpose of eliciting an immune response against tumors or infectious lesions, a target binding protein or another agent is said to be administered in an "effective amount" if the amount administered results in an elevated detectable immune response against at least one targeted tumor or infectious cell, preferably if it results in an elevated detectable immune response against the targeted tumor or infectious lesion, as compared to the immune response without administering said target binding protein or agent.

All references cited herein are hereby incorporated by reference.

The present invention will be understood more readily by reference to the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended to be limiting of the present invention.

Example 1: Construction of the DNA Sequences Encoding a Multivalent Binding Protein Comprising a hMN14 Fab Molecule Carrying Two ScFv For 734, One Fused to the C-terminal of the Kappa Chain, the Other to the C-terminal End of the Fd sequence.

As used herein, DTPA denotes diethylenetriaminepentaacetic acid. hMN-14 represents a humanized monoclonal antibody MN-14. hMN-14 is described in US Patent No. 5,874,540, which is incorporated herein by reference. The Fd portion of an antibody is the heavy chain portion of an antibody after pepsin digestion. The Fd portion of an antibody comprises the VH, CH1 and part of the hinge region. "734" denotes a monoclonal antibody against DTPA. Kappa chain is a type of immunoglobulin light chain.

The scFv for 734, denoted as 734scFv, is inserted in-frame at the C-terminal end of hMN14 Fd as follows:

Appropriate linker sequences necessary for the in-frame connection of the hMN14 heavy chain Fd to 734scFv were introduced into the VL and VK domains of 734, denoted as 734VL and 734VK, respectively, by PCR reactions using specific primer sets. PCR-amplification of 734VL was performed using the primer set 734VLscFv5'(Cys) and 734VLscFv3'.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

The primer 734VLscFv5'(Cys) has the sequence of:

5' TCTCTGCAGAGCCCCAAATCTTGTGGTGGCGGTTCAACAGCTGGTTGTGACTCAG 3'
 P K S C G G G S Q L V V T Q

It represents the sense-strand sequence encoding the first four residues (PKSC) of the human IgG1 hinge, linked in-frame to the first six residues (QLVVTQ) of 734 VL, via a short flexible linker, GGGS. One Cys of the human hinge was included because it is required for the interchain disulfide linkage between the hMN14 heavy chain Fd-734scFv fusion and the hMN14 light chain. A PstI site was incorporated (underline) to facilitate ligation at the intronic sequence connecting the CH1 domain and the hinge.

The primer 734VLscFv3' has the sequence of:

5' AGCCTCCGCCCTCTGATCCGCACCTCTTAAGATCTTCAGTTGGTTCC 3'
 G G G G S G G G L I K L K T G

It represents the anti-sense sequence encoding the last six residues (TKLKIL) of the 734 VL domain, and part of the flexible linker sequence (GGGGSGGG), which is fused in-frame downstream of the VL domain.

The PCR-amplified product (~400 bp) was first treated with T4 DNA polymerase to remove the extra A residue added to the termini during PCR-amplification, and was subsequently digested with PstI. The resultant product was a double-stranded DNA fragment with a PstI overhang and a blunt end.

PCR amplification of 734VH was performed using the primer set 734VHscFv5' and 734VHscFv3'(Sac1).

The primer 734VHscFv5' has the sequence of:

5' CCUGAGGGGGTGGGAGTGAGGTGAAACTGCAAGAGT 3'
 S G G G S E V K L Q E

It represents the sense-strand sequence encoding the remaining part of the flexible linker sequence (SGGGGS) connecting the VL and VH sequences, and the first six residues (EVKLQE) of the 734 VH domain.

The primer 734VHscFv3'(Sac1) has the sequence of:

5' AACCTTGAGCTCGGCCGTCGCACTCATGAGGGAGACGGTGACCGT 3'
 * S S V T V T

WO 02/08293

PCT/US01/41386

It represents the anti-sense sequence encoding the last six residues (TVTVSS) of 734 VH. Also included is a translation stop codon (*). At position downstream of the stop codon, the restriction sites Eag1 (bold) and Sac1(underlined) were incorporated to facilitate subcloning.

Similarly, the PCR-amplified VH product of ~400 bp was first treated with T4 DNA polymerase to remove the extra A residues at the PCR product termini, and then digested with Sac1, resulting in a VH DNA fragment with a blunt end-sticky end configuration.

A pBlueScript (Stratagene, La Jolla)-based staging vector (HC1kbpSK) containing a SacII fragment of the human IgG1 genomic sequence was constructed. The genomic SacII fragment contains a partial 5' intron, the human IgG1 CH1 domain, the intronic sequence connecting the CH1 to the hinge, the hinge sequence, the intronic sequence connecting the hinge to the CH2 domain, and part of the CH2 domain. The segment containing the hinge and part of the CH2 domain in HC1kbpSK was removed by PstI/Sac1 digestion, and the cloning site generated was used to co-ligate the VL (PstI/blunt) and VH (blunt/Sac1) PCR products prepared above. The CH1 domain in the resultant construct (CH1-734pSK) is connected to the 734scFv gene sequence via an intron.

Since the genomic SacII fragment for IgG1 only included part of the 5' intron sequence flanking the CH1 domain, the full intronic sequence was restored by inserting the remaining intronic sequence as a BamH1/SacII segment, into the corresponding sites of the CH1-734pSK. The BamH1/Eag1 fragment containing the full 5' intron, CH1 domain, connecting intron, 5 hinge-residues, short GGGS linker, and a 734scFv sequences was then isolated, and used to replace the HindIII/Eag1 segment containing the human genomic IgG1 constant sequence in the hMN14pdHL2 vector. The hMN14pdHL2 vector was described in Leung SO, Losman MJ, Qu Z, Goldenberg DM and Hansen HJ, Enhanced Production of a Humanized Anti-carcinoembryonic Antigen Antibody, *Tumor Targeting* 2:184(#95) (1996). For pdHL2 vector, please see Losman MJ, Qu Z, Krishnan IS, Wang J, Hansen HJ, Goldenberg DM and Leung SO, Generation and Monitoring of cell lines producing humanized antibodies, *Clin. Cancer Res.*, 5:3101s-3105s (1999), and Losman MJ, Hansen HJ, Dworak H, Krishnan IS, Qu Z, Shih LB, Zeng L, Goldenberg DM and Leung SO, Generation of a high-producing clone of a humanized anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody (hLL2), *Cancer (suppl)*, 80:2660-2666

WO 02/08293

PCT/US01/41386

(1997). These references, as well as any cited references in this disclosure, are hereby incorporated by reference.

A HNB linker with a BamH1 overhang on one end and a HindIII overhang on the other was used to facilitate the BamH1/Eag1 fragment ligation into the HindIII/Eag1 site in the hMN14pdHL2 vector. It has the sequence of:

5' AGCTTTCGGCCGC 3'
3' ACGCCGGCGCTAG 5'

The resultant vector is designated as hMN14-734pdHL2.

To insert a 734 scFv to the C-terminal end of the kappa chain for hMN-14 Fab, a similar strategy is used and described as follows:

A Sac1 fragment containing part of the 5' intron flanking the human CK domain, and most of the CK region sequence was co-ligated into the Sac1/BamH1 cloning site of a pBlueScript vector in the presence of a linker, CKSB. The CKSB linker contains two synthetic DNA nucleotide, which, when annealed, will generate a double stranded DNA encoding the last 13 amino acid of the human CK region, fused in-framed to the first 4 residues of the human IgG1 hinge, at the C-terminal of which attached a short flexible linker (GGGS). The CKSB linker has the double-stranded sequence of:

5' CGCCCCGTACAAAGAGCTTCACAGGGAGAGTGAGGCCC AATCTGGTGGCG 3'
3' TCGAAGCGGGCACTGTTCTCGAAAGTGTCCCCCTCACACTCGGGTTAGACCCACCGCTAG 5'
S P V T K S F N R G E C E P K S G G G S

The Sac1 3' overhang of the CKSB linker will ligate to the C-terminal Sac1 of the CK fragment, while the BamH1 end will ligate to the corresponding BamH1 site of the pBlueScript vector. The resultant staging vector is designated as CK(B)SK.

The VL region of 734 was PCR-amplified with the primer set 734VLscFv5'(BgIII) and 734VLscFv3'. The primer 734VLscFv5' (BglII) has the sequence of:

5' TCTAGATCTCAGCTGGTTGTGACTCAG 3'
S Q L V V T Q

It represents the sense-strand sequence encoding the first six residues (QLVVTQ) of 734 VL. A 5' BglII site was incorporated (underlined) to facilitate subsequent ligation to the short flexible linker connecting to the CK domain.

The sequence of the 734VLscFv3' has been previously described.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

The PCR-amplified product for 734 VL was treated with T4 DNA polymerase and BglII, generating a blunt end/BglII sticky end fragment.

PCR-amplification of 734 VH was performed using the primer set 734VHscFv5' and 734VHscFv3'(SalI).

The sequence of 734VHscFv5' has been described previously.

The sequence of 734VHscFv3'(SalI) is basically the same as 734VHscFv3'(Sac1) except that the Sac1 site was replaced by Sal1 (underlined).

5' AACCCTTCTCGACGGCCTGCACTCATGAGGAGACGGTGAACCGT 3'
* S S V T V T

Similarly, the PCR-amplified VH product was first treated with T4 DNA polymerase to generate a blunt end and digested with Sal1 to generate a sticky end.

The staging vector CK(B)pSK was digested with BamH1 and Sal1, and the exposed cloning sites were inserted with the VL and VH PCR product. The BglII overhang of VL is complementary to the BamH1 overhang at the C-terminal end of the CK-fragment in the digested vector, whereas the Sal1 end is ligated to the corresponding site in the downstream end of the vector. The resultant vector, designated as CK-734scFvpSK, carries the genomic CK sequence fused via a short peptide to the 734scFv sequence.

The CK-734scFvpSK vector was first linearized with HincII enzyme which cuts at the Sal1 site to generate a blunt end, and the CK-734scFv fragment was cut out by partial digestion with Sac1. The fragment containing the CK-734scFv gene sequence with size of about 1.3 Kb was isolated and ligated at the Sac1/PflM1 site of the hMN14pdHL2 vector, replacing the original CK sequence. The PflM1 site is located at the 3' non-coding sequence about 50 bp downstream of the CK stop codon, and the 3' overhang generated by PflM1 digestion was filled in with Klenow enzyme before the CK-734scFv fragment was ligated into the hMN14-734pdHL2 vector. The final expression vector, designated as hMN14-Di-734pdHL2, encodes a hMN14 Fab molecule carrying two scFv for 734, one fused to the C-terminal of the kappa chain, the other to the C-terminal end of the Fd sequence.

Example 2: Expression and Purification of a Trivalent Bi-specific Antibody Containing a CEA Specific Fab Linked With Two Anti-DTPA ScFv Derived From the Antibody 734

WO 02/08293

PCT/US01/41386

To construct a trivalent BI-specific antibody containing a CEA specific Fab linked with two anti-DTPA scFv derived from the antibody 734, a 734 scFv is fused to the C-terminal end of the hMN-14 Fd sequence to form a Fd-scFv gene sequence; and the same 734 scFv sequence will be attached to the C-terminal end of the hMN-14 kappa chain sequence, forming a kappa-scFv gene sequence. The Fd-scFv and kappa-scFv sequences will be assembled in the expression vector pdHL2. The resultant expression vector, designated as hMN14-di-scFv734pdHL2, will be used to transfect SP2/0 cells by electroporation using standard procedures. The expression vector contains a DHFR gene and can be used as the selection marker for transfected cells using 0.1 μ M of methotrexate (MTX). ELISA assay can be used for the detection of antibody secreting clones, which are subsequently amplified by step-wise increase in the MTX concentration. The secreted antibody can be purified by protein G affinity column. Further purification can be achieved with ion-exchange chromatography.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A target binding protein, comprising
 - a. a first polypeptide comprising a first single chain Fv molecule (scFv) and a first immunoglobulin-like domain; and
 - b. a second polypeptide comprising a second scFv and a second immunoglobulin-like domain,
wherein said first and second scFv each form two target binding sites independently, or wherein said first scFv associates with said second scFv to form two target binding sites; and wherein said first immunoglobulin-like domain associates with said second immunoglobulin-like domain to form a third target binding site.
2. The target binding protein of claim 1, wherein said first scFv and said first immunoglobulin-like domain are linked via a first extra amino acid sequence, and wherein said second scFv and said second immunoglobulin-like domain are linked via a second extra amino acid sequence.
3. The target binding protein of claim 2, wherein said first extra amino acid sequence associates with said second extra amino acid sequence.
4. The target binding protein of claim 2 or 3, wherein said first extra amino acid sequence associates with said second extra amino acid sequence via at least one disulfide bond.
5. The target binding protein of any one of claims 2 to 4, wherein said first immunoglobulin-like domain comprises an immunoglobulin light chain variable region domain or a derivative thereof, wherein said first extra amino acid sequence comprises an immunoglobulin light chain constant

WO 02/08293

PCT/US01/41386

region domain or a derivative thereof, wherein said second immunoglobulin-like domain comprises an immunoglobulin heavy chain variable region domain or a derivative thereof, and wherein said second extra amino acid sequence comprises an immunoglobulin heavy chain constant region domain or a derivative thereof.

6. The target binding protein of claim 5, wherein said first immunoglobulin-like domain comprises an immunoglobulin light chain variable region domain, wherein said first extra amino acid sequence comprises an immunoglobulin light chain constant region domain, wherein said second immunoglobulin-like domain comprises an immunoglobulin heavy chain variable region domain, and wherein said second extra amino acid sequence comprises an immunoglobulin heavy chain constant region domain.
7. The target binding protein of claims 5 or 6, wherein the first scFv and the immunoglobulin light chain constant region domain are linked via a first peptide linker, and wherein the second scFv and the immunoglobulin heavy chain constant region domain are linked via a second peptide linker.
8. The target binding protein of claim 7, wherein the first peptide linker comprises the amino acid sequence EPKSADKTHTCPCPGGGS, and wherein the second peptide linker comprises the amino acid sequence EPKSCDKTHTCPCPGGGS.
9. The target binding protein of any one of claims 1 to 8, wherein at least two of the three target binding sites have different target binding specificities.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

10. The target binding protein of any one of claims 1 to 8, wherein at least two of the three target binding sites have the same target binding specificity.
11. The target binding protein of any one of claims 1 to 10, wherein the first polypeptide or the second polypeptide is linked to an additional amino acid sequence at either the N- or C-terminus thereof.
12. The target binding protein of claim 11, wherein said additional amino acid sequence comprises a polypeptide selected from the group consisting of a peptide tag, a signal peptide, an enzyme, a cytokine, a toxin, a drug, a cytotoxic protein and other functional proteins.
13. The target binding protein of any one of claims 1 to 12, wherein either the first polypeptide or the second polypeptide further comprises a N-glycosylation recognition sequence.
14. The target binding protein of claim 13, wherein a carbohydrate chain is linked to the N-glycosylation recognition sequence.
15. The target binding protein of claim 14, wherein the carbohydrate chain is linked to an agent selected from the group consisting of a drug, a radioactive compound, a chelate, an enzyme, a toxin, a cytokine, a cytotoxic protein and other functional agents.
16. The target binding protein of one of claims 1 to 15, wherein the target binding protein is conjugated to an agent selected from the group consisting of a drug, a radioactive compound, a chelate, an enzyme, a toxin, a cytokine, a cytotoxic protein and other functional agents.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

17. The target binding protein of any one of claims 1 to 16, wherein one target binding site is capable of binding to a toxin, a drug, a cytokine, a chelate, an enzyme, a radioactive compound, a cytotoxic protein or other functional agents, and wherein the other two target binding sites are capable of binding to tumor antigens.
18. The target binding protein of any one of claims 1 to 16, wherein one target binding site is capable of binding to a tumor antigen, and wherein the other two target binding sites are capable of binding to toxins, drugs, cytokines, chelates, enzymes, radioactive compounds, cytotoxic proteins or other functional agents.
19. The target binding protein of any one of claims 1 to 16, wherein one target binding site is capable of binding to a tumor antigen, and the other two target binding sites are capable of binding to surface proteins of a T cell or another effector cell.
20. The target binding protein of claim 19, wherein said surface proteins of a T cell are CD28 and CD3.
21. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide encoding the first polypeptide of claim 1.
22. A vector comprising the nucleic acid of claim 21.
23. A host cell comprising the vector of claim 22.
24. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide encoding the second polypeptide of claim 1.
25. A vector comprising the nucleic acid of claim 24

WO 02/08293

PCT/US01/41386

26. A host cell comprising the vector of claim 25.
27. A host cell comprising the vector of claim 22 and the vector of claim 25.
28. A method of producing a target binding protein, comprising culturing the host cell of claim 27 in a suitable medium, and separating said target binding protein from said medium.
29. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide encoding the first and second polypeptides of claim 1.
30. A vector comprising the nucleic acid of claim 29.
31. A host cell comprising the vector of claim 30.
32. A method of producing a target binding protein, comprising culturing the host cell of claim 31 in a suitable medium, and separating said target binding protein from said medium.
33. A method of eliciting an immune response against a tumor, comprising administering to a subject an effective amount of the target binding protein of claim 19 or 20.

WO 02/08293

PCT/US01/41386

34. A medicament useful in the treatment of a tumor in a subject comprising the target binding protein of any one of claims 1 to 20.

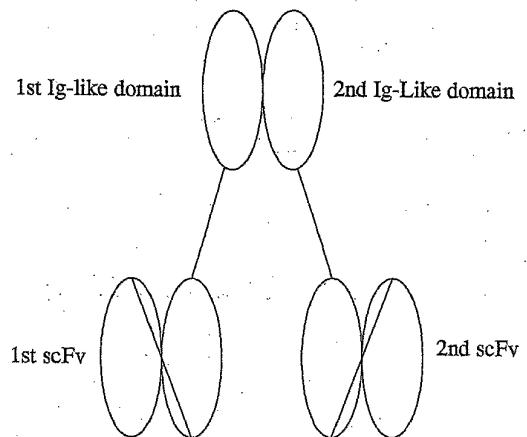


Figure 1

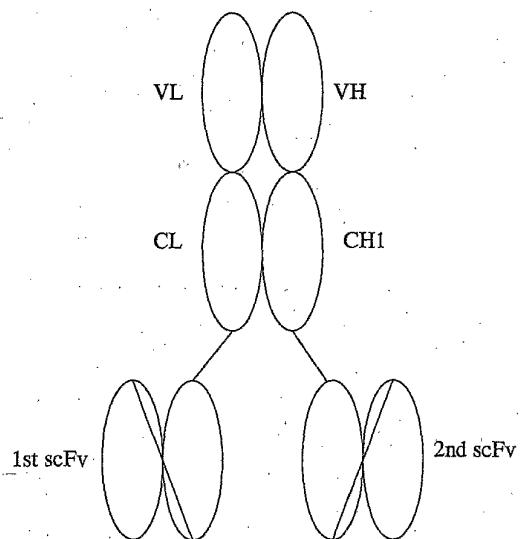


Figure 2

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/008293 A3(51) International Patent Classification*: C12N 15/62,
C07K 16/46, 16/00, C12N 15/85, 5/10, A61P 35/00
// C07K 16/28, 16/30, 16/44

(21) International Application Number: PCT/US01/41386

(22) International Filing Date: 25 July 2001 (25.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/220,782 25 July 2000 (25.07.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOMEDICS INC. [US/US]; 300 American Road,
Morris Plains, NJ 07950 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): LEUNG, Shui-on
[USCN]; Hong Kong Institute of Biotechnology Ltd., 2
Biotechnology Avenue, 12 Miles, Tai Po Road, Shatin,
N.T. (HK).

(74) Agents: SAXE, Bernhard, D. et al.; Foley & Lardner,

Washington Harbour, 3000 K Street, N.W., Suite 500,

Washington, DC 20007-5109 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NO, NZ, PI, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK,
SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CI, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BJ, BJ, CI,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NH, SN, TD,
TG).Published:
with international search report

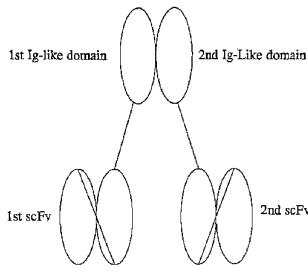
[Continued on next page]

(54) Title: MULTIVALENT TARGET BINDING PROTEIN



A3

WO 02/008293 A3



(57) Abstract: A novel multivalent target binding protein which comprises a first and a second polypeptides and has at least three target binding sites is described. The first polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a first scFv molecule and a first immunoglobulin-like domain which preferably comprises an immunoglobulin light chain variable region domain. The second polypeptide of the multivalent target binding protein comprises a second scFv molecule and a second immunoglobulin-like domain which preferably comprises an immunoglobulin heavy chain variable region domain. The first scFv molecule and the first immunoglobulin-like domain are preferably linked via a first extra amino acid sequence which preferably comprises an immunoglobulin light chain constant region domain. The second scFv molecule and the second immunoglobulin-like domain are preferably linked via a second extra amino acid sequence which preferably comprises an immunoglobulin heavy chain constant region domain. The first and second extra amino acid sequences preferably associate with each other via at least one disulfide bond. The multivalent target binding protein of the present invention is useful for treating and detecting tumors and infectious lesions.

WO 02/008293 A3

(88) Date of publication of the international search report:
23 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【手続補正書】**【提出日】**平成14年6月13日(2002.6.13)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**0 1 2 0**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【0 1 2 0】**

プライマー 7 3 4 V L s c F v 3' は以下の配列を有する：

5' AGCCTCCGCCTCCCTGATCCGCCACCTCCTAAGATCTTCAGTTGGTCC 3'

G G G G S G G G L I K L K T G

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/41386									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/62 C07K16/46 C07K19/00 C07K16/00 C12N15/85 C12N5/10 A61P35/00 //C07K16/28,C07K16/30,C07K16/44											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 99 37791 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ; MERTENS NICOLAS (BE); SCHOONJANS REINH) 29 July 1999 (1999-07-29) page 9 -page 10; example 3 ---</td> <td>1-34</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SCHOONJANS R ET AL: "EFFICIENT HETERODIMERIZATION OF RECOMBINANT BI- AND TRISPECIFIC ANTIBODIES" BIOSEPARATION, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 9, no. 3, 2000, pages 179-183, XP001012944 ISSN: 0923-179X figure 3 ---</td> <td>1-34 -/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 99 37791 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ; MERTENS NICOLAS (BE); SCHOONJANS REINH) 29 July 1999 (1999-07-29) page 9 -page 10; example 3 ---	1-34	X	SCHOONJANS R ET AL: "EFFICIENT HETERODIMERIZATION OF RECOMBINANT BI- AND TRISPECIFIC ANTIBODIES" BIOSEPARATION, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 9, no. 3, 2000, pages 179-183, XP001012944 ISSN: 0923-179X figure 3 ---	1-34 -/-
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 99 37791 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ; MERTENS NICOLAS (BE); SCHOONJANS REINH) 29 July 1999 (1999-07-29) page 9 -page 10; example 3 ---	1-34									
X	SCHOONJANS R ET AL: "EFFICIENT HETERODIMERIZATION OF RECOMBINANT BI- AND TRISPECIFIC ANTIBODIES" BIOSEPARATION, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 9, no. 3, 2000, pages 179-183, XP001012944 ISSN: 0923-179X figure 3 ---	1-34 -/-									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.									
<small>* Special categories of cited documents :</small> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim for a special reason (as specified) *D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <small>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family</small>											
Date of the actual completion of the International search 29 July 2002	Date of mailing of the International search report 22/08/2002										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5810 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-5040, Fax. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Wagner, R										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte...l Application No. PC... 01/41386
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SCHOONJANS R ET AL: "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 15 DEC 2000, vol. 165, no. 12, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 7050-7057, XP002207879 ISSN: 0022-1767 figure 1C	1-34
P,X	SCHOONJANS R ET AL: "A new model for intermediate molecular weight recombinant bispecific and trispecific antibodies by efficient heterodimerization of single chain variable domains through fusion to a Fab-chain." BIOMOLECULAR ENGINEERING. NETHERLANDS JUN 2001, vol. 17, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 193-202, XP002207880 ISSN: 1389-0344 figure 2C	1-34
X	WO 94 09131 A (CARR FRANCIS JOSEPH ;EMERY STEPHEN CHARLES (GB); HARRIS WILLIAM JO) 28 April 1994 (1994-04-28) page 24 -page 27; figure 8	1-6,18
E	WO 02 02781 A (VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INST ;GROOTEN JOHAN (BE); MERTENS NICO (B) 10 January 2002 (2002-01-10) page 16; figures 2C,6B	1-34
A	ZUO Z ET AL: "An efficient route to the production of an IgG-like bispecific antibody." PROTEIN ENGINEERING. ENGLAND MAY 2000, vol. 13, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 361-367, XP002207881 ISSN: 0269-2139 abstract	1-34
A	MÜLLER K ET AL: "The first constant domain (CH1 and CL) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific minibodies" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 422, no. 2, 30 January 1998 (1998-01-30), pages 259-264, XP002135067 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-6 -/-

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte: Application No PC., .. 01/41386
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 06605 A (KUFER PETER ;ZETTL FLORIAN (DE); DREIER TORSTEN (DE); BAUERLE PAT) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document -----	1-34

Form PCT/ISA/010 (continuation of second sheet) (July 1982)

page 3 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/41386
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: <i>Although claim 33 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</i> 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 		
Remark on Protest <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. </div>		

Form PCT/ISA210 (continuation of first sheet (1)) (July 1996)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
relation on patent family members

Inten: Application No
PCT/US 01/41386

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9937791	A	29-07-1999	AU 2719099 A CA 2317727 A1 WO 9937791 A1 EP 1049787 A1	09-08-1999 29-07-1999 29-07-1999 08-11-2000
WO 9409131	A	28-04-1994	AU 5283793 A CA 2146854 A1 WO 9409131 A1 GB 2286189 A JP 8505761 T	09-05-1994 28-04-1994 28-04-1994 09-08-1995 25-06-1996
WO 0202781	A	10-01-2002	AU 7060901 A WO 0202781 A1	14-01-2002 10-01-2002
WO 0006605	A	10-02-2000	AU 5728999 A WO 0006605 A2 EP 1100830 A2	21-02-2000 10-02-2000 23-05-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/46	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 43/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,R,U,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ルン シュイ - オン

香港 エヌ.ティ. シャティン タイ ポ ロード マイルズ 12 バイオテクノロジー ア
ベニュー 2 ホン コン インスティテュート オブ バイオテクノロジー リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA80 CA03 CA07 DA02 EA04 GA14

4B064 AG26 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA26X AA90X AA90Y AA91X AA92X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 AA12 BA44 CA53 DA39 NA14 ZB262

4C085 AA21 AA25 AA27 AA34 BB31 CC23 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 BA41 BA53 DA76 EA28 EA51 FA72 FA74

【要約の続き】

するのに役立つ。