

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6205363号
(P6205363)

(45) 発行日 平成29年9月27日(2017.9.27)

(24) 登録日 平成29年9月8日(2017.9.8)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/46	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 14/71	(2006.01)
C07K	16/46
C07K	19/00
C07K	16/00
C07K	16/28
C07K	14/71

請求項の数 19 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-532118 (P2014-532118)
(86) (22) 出願日	平成24年9月26日 (2012.9.26)
(65) 公表番号	特表2015-501291 (P2015-501291A)
(43) 公表日	平成27年1月15日 (2015.1.15)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/057393
(87) 国際公開番号	W02013/049254
(87) 国際公開日	平成25年4月4日 (2013.4.4)
審査請求日	平成27年9月25日 (2015.9.25)
(31) 優先権主張番号	61/539,416
(32) 優先日	平成23年9月26日 (2011.9.26)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	512257473 ジェイエヌ バイオサイエンシーズ エル エルシー
	アメリカ合衆国 94043 カリフォル ニア州, マウンテン ビュー, ロード アベニュー 320
(74) 代理人	110001139 S K 特許業務法人
(74) 代理人	100130328 弁理士 奥野 彰彦
(74) 代理人	100130672 弁理士 伊藤 寛之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ハイブリッド定常領域

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

各々が Ig G アイソタイプもしくは Ig A アイソタイプである CH 2 領域および CH 3 領域、ならびに、C μ 3 領域および C μ 4 領域を、N 末端から C 末端に向かって順に含む免疫グロブリン重鎖定常領域を含むことを特徴とする抗体または融合タンパクであって、前記抗体または融合タンパクは、表面結合標的タンパク質に対するものであり、前記標的タンパク質の凝集が受容体を通じてのシグナル伝達を誘導することを特徴とする抗体または融合タンパク。

【請求項 2】

腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーのメンバーに結合することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体または融合タンパク。

【請求項 3】

前記免疫グロブリン重鎖は、さらに、前記 CH 2 領域の N 末端にヒンジ領域および/または前記ヒンジ領域の N 末端に CH 1 領域を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体または融合タンパク。

【請求項 4】

前記重鎖定常領域が重鎖可変領域に融合した抗体であって、さらに、軽鎖可変領域および定常領域を含む軽鎖を含む抗体であることを特徴とする請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

異なる重鎖可変領域、および、随意的に、異なる軽鎖可変領域を有する請求項 4 に規定

10

20

の複数の抗体を含む多重特異性抗体であって、前記複数の抗体は、前記多重特異性抗体において前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化している多重特異性抗体の構成要素であることを特徴とする請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 1 領域である、または、
 前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 2 領域である、または、
 前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 3 領域である、または、
 前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 4 領域である、または、
 前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g A 領域であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体または融合タンパク。 10

【請求項 7】

前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、ヒトの C H 2 領域および C H 3 領域であり、前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域は、ヒトの C μ 3 領域および C μ 4 領域であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または融合タンパク。

【請求項 8】

前記重鎖定常領域に連結した単鎖 F v を含む単鎖抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

請求項 8 に規定の複数の単鎖抗体を含む多重特異性抗体であって、前記複数の前記 s c F v は異なる V H 領域を有し、前記複数の単鎖抗体は、前記多重特異性抗体において前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化している多重特異性抗体の構成要素であることを特徴とする請求項 8 に記載の抗体。 20

【請求項 10】

前記抗体の少なくとも 5 つまたは 6 つの複製を含む多量体であって、前記複製は、前記多量体において前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化している多量体の形態であることを特徴とする請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 11】

異種ポリペプチドに連結した免疫グロブリン重鎖を含む融合タンパクであることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク。

【請求項 12】

前記異種ポリペプチドは、受容体細胞外ドメインまたは受容体細胞外ドメインに特異的に結合するタンパクであることを特徴とする請求項 11 に記載の融合タンパク。 30

【請求項 13】

異なる異種ポリペプチドを含有する複数の融合タンパクを含む多重特異性複合体の構成要素であることを特徴とする請求項 11 に記載の融合タンパク。

【請求項 14】

前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化した抗体および融合タンパクを含む多重特異性複合体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体または融合タンパク。

【請求項 15】

前記抗体は、ヒト化した、キメラの、張り合わせ (v e n e e r e d) の、または、ヒトの抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体または融合タンパク。 40

【請求項 16】

C D 7 9 a , C D 3 0 または D R 5 に特異的に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 17】

T N F アルファ受容体、L F A - 3 受容体、または I L - 1 受容体の細胞外ドメインを含むことを特徴とする、または、

T R A I L タンパクを含む融合タンパクであることを特徴とする請求項 1 に記載の融合タンパク。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

癌を有するまたは癌の危険性のある患者を治療するために使用する、請求項 1 に規定の抗体または融合タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項 1 9】

免疫学的疾患を治療するために使用する、請求項 1 に規定の抗体または融合タンパク質を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

関連出願の参照

本出願は 2011 年 9 月 26 日に出願された米国特許出願第 61/539,416 号の 10 非仮出願である。

【0 0 0 2】

抗体は、免疫系において重要な役割を果たす B 細胞によって産生される糖タンパクである (Schroeder et al., J. Allergy Clin. Immunol. 125: S41-S52, 2010)。5 つのクラスの抗体、すなわち、IgM, IgD, IgG, IgA および IgE が、動物において産生される。ヒトにおいては、IgG 抗体の 4 つのサブクラス (IgG1, IgG2, IgG3 および IgG4) ならびに IgA 抗体の 2 つのサブクラス (IgA1 および IgA2) が産生される。各抗体は、単量体型の 2 つの同一の軽鎖および 2 つの同一の重鎖から成る。これら 4 つの鎖は、共有結合および非共有結合の組み合わせによって相互に接続されて、Y 字状の分子を形成する。哺乳類には、2 種類の軽鎖、カッパおよびラムダ、がある。抗体のクラスを決定する数種類の重鎖が存在する。ヒトでは、μ 重鎖が IgM に、デルタ重鎖が IgD に、ガンマ - 1 重鎖が IgG1 に、ガンマ - 2 重鎖が IgG2 に、ガンマ - 3 重鎖が IgG3 に、ガンマ - 4 重鎖が IgG4 に、アルファ - 1 重鎖が IgA1 に、アルファ - 2 重鎖が IgA2 に、イプシロン重鎖が IgE に組み込まれている。これらの抗体の単量体型は、2 つの抗原結合部位を有しており、したがって、抗原結合について 2 倍である。IgG, IgD および IgE は、もっぱら単量体として産生されるが、IgM は六量体として産生され、したがって、J 鎖が存在しない場合は、抗原結合について 12 倍であり、J 鎖が存在するときは、10 倍の五量体である (Gilmour et al., Trans. Med. 18: 167-174, 2008)。IgA は J 鎖を有する 4 倍の二量体を形成し、一方、J 鎖が存在しないとき、IgA は単量体であるが、J 鎖を有しない二量体 IgA の同時形成も報告されている (Johansen et al., Scand. J. Immunol. 52: 240-248, 2000)。

【0 0 0 3】

米国食品医薬品局は、2010 年末までに、ヒトの治療法として、28 のモノクローナル抗体を承認している。これらの治療抗体はすべて、IgG 抗体またはその誘導体である。IgG 抗体は、特異的な抗原結合に加えて、Fc 領域によって媒介される様々な生物学的機能を引き起こす (前記 Schroeder et al.; Desjarlais et al., Exp. Cell Res. 317: 1278-1285, 2011)。ヒトにおいて、細胞結合 IgG1 および IgG3 抗体は、NK 細胞上に発現される Fc 受容体タイプ III (CD16) の Fc 領域に結合することによって、抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (ADCC) を媒介する (Hulett et al., Adv. Immunol. 57: 1-127, 1994)。同様に、細胞結合 IgG1 および IgG3 抗体は、Fc 領域と補体成分との相互作用によって、補体依存性細胞毒性 (CDC) を効率よくトリガーやし得る (Bindon et al., J. Exp. Med. 168: 127-142, 1988)。

【0 0 0 4】

ヒト IgG 抗体の 4 つのすべてのサブクラスの Fc 領域は、膜貫通鎖および 2-マイクログルブリンから成るヘテロダイマーである新生児型 Fc 受容体 (FcRn) に、pH 依存性の態様で結合して、ピノサイトーシスによって内在化した IgG 抗体を、リソソ

10

20

30

40

50

ーム中の異化分解から救済して、血液循環へのそれらの再循環を可能にする (Ghetie et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18: 739-766, 2000)。IgG抗体は、したがって、血液循環からの遅いクリアランスを呈して、ヒトにおいて、通常23日という、長い血清半減期という結果となる (Kindt et al., Chapter 4, *Kuby Immunology*, Sixth Edition, W.H. Freeman & Co., 2006)。さらに、IgG抗体のFc領域は、プロテインA (IgG3を除く) およびプロテインGに結合するので、プロテインAまたはプロテインGアフィニティクロマトグラフィーによるIgG抗体の精製が可能である (Andrew et al., Unit 2.7, Chapter III, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc. 1997)。 10

【0005】

細胞表面の特異性分子の2量化は、1つ以上の生物学的応答をしばしばトリガーし得る。細胞表面のPSMA (前立腺特異膜抗原)タンパクへのモノクローナルIgG抗体の結合は、PSMA内在化の比率を高める (Liu et al., *Cancer Res.* 58: 4055-4060, 1998)。タイプI膜貫通タンパクUC1の内在化および下方制御は、マウスIgG1抗体への結合によってトリガーされる (Hisatsune et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 677-382, 2009)。c-Metタンパクに対するモノクローナル抗体は細胞表面のc-Metを二量化し、細胞内シグナル伝達を開始させて、細胞増殖をもたらす (Prat et al., *J. Cell Sci.* 111: 237-247, 1998)。同様に、モノクローナル抗EPO受容体抗体は、表面のEPO受容体のホモ二量化により、細胞成長のアゴニストとして機能し得る (Schneider et al., *Blood* 89: 473-482, 1997)。しかし、細胞表面の、腫瘍壞死因子受容体 (TNFR)スупーファミリーのメンバーである細胞死受容体5 (DR5)の抗体媒介二量化は、必ずしもシグナル伝達をトリガーせず、一方、マウスモノクローナル抗DR5抗体とヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体との混合物によるDR5タンパクの多量化は、たとえば、細胞質におけるシグナル伝達を誘導し、アポトーシスをトリガーする (Griffith et al., *J. Immunol.* 162: 2597-2605, 1999)。 20

【0006】

IgM抗体は、J鎖を有する五量体およびJ鎖を有しない六量体として存在する (前記Gilmour et al.)。抗原を二量化することのみが可能であるIgG抗体と対照的に、IgMは、その10価または12価の抗原結合能力によって、細胞表面タンパクを多量化することが可能である。TNFRスупーファミリーのメンバー (Cosman, Stem Cells 12: 440-455, 1994)であるFasに対する特異性を有するモノクローナルIgM抗体は、表面のFasタンパクの多量化によって、Fas発現細胞のアポトーシスを効率よく誘導することができ (Yonehara et al., *J. Exp. Med.* 169: 1747-1756, 1989)、一方、抗Fas IgG抗体は、架橋していなければ、誘導しない (Matsuno et al., *J. Rheumatol.* 29: 1609-1614, 2002)。IgGと比較して、IgMは、FcRnに結合する能力を欠いているため、ヒトにおいて通常5日という、はるかに短い血液循環半減期を呈する (前記Kindt et al.)。IgM抗体は、また、CD16への結合を欠くため、ADCCを媒介し得ない。さらに、IgMがプロテインAおよびプロテインGへの結合を欠くことが、プロテインAおよびプロテインGアフィニティクロマトグラフィーそれぞれによるIgMの精製を不可能としている (Gautam et al., *Biotechnol. Adv. - publication*, July 2011)。 40

【0007】

新規形態の多価抗体を生成する試みにおいて、種々の構造形式が利用されてきた。多価抗体の技術における近年の進歩が、Cuestaらの総説 (Trends Biotech 50

h . , 2 8 : 3 5 5 - 3 6 2 , 2 0 1 0) にまとめられている。好ましい多価 Ig G 抗体は、細胞表面の抗原を効率よく多量化し得る。ADC C , CDC 、オプソニン化、pH 依存性 Fc Rn 結合、ならびに、プロテイン A およびプロテイン G への結合能などの、ガンマ重鎖の Fc 領域によって媒介される特性が、そのような多価 Ig G 抗体において保持されていることも重要である。

【0008】

多価 Ig G 抗体を生成するために、Caronら (J. Exp. Med. , 176 : 1191 - 1195 , 1992) は、ヒト化抗 CD33 Ig G1 / カップ抗体、Hu G1 - M195において、ヒトガンマ - 1 重鎖のカルボキシル末端からの 4 位に、セリンからシスティンへの置換を導入した。Hd - Ig G と呼ばれるこのような変更 Hu G1 - M195 は、精製されて、架橋するために、および、次いで過剰のスルフヒドリル位をブロックするために、エルマン試薬 (Pierce Chemical Co. , Rockford , IL) で処理された。単量体の Hu G1 - M195 は、フェニルセファロースカラムクロマトグラフィーによって、Hd - Ig G から除去された。得られた Hd - Ig G は、CD33 分子を内在化する能力の劇的な向上を示し、ADC C およびCDCにおいて、Hu G1 - M195 よりも強力であった。10

【0009】

Millerら (J. Immunol. , 170 : 4854 - 4861 , 2003) は、ヒト化抗 HER2 Ig G1 モノクローナル抗体、hu4D5 の重鎖の VH - CH1 領域を複製することで、4 倍の Ig G 抗体を構築した。この変更ガンマ重鎖は、N 末端から C 末端に向かって、VH , CH1 , VH , CH1 , ヒンジ , CH2 および CH3 の領域で構成された。変更 Ig G 中の 4 つの VH - CH1 領域の各々には 1 つの軽鎖が結合して、4 倍の hu4D5 抗体 (TA - HER2) を形成した。TA - HER2 は、HER2 発現細胞上の親の 2 倍 hu4D5 よりも、速やかに内在化された。Millerら (前記) は、また、TA - HER2 と同じ重鎖形式の、TA - DR5 と呼ばれる 4 倍の抗 DR5 Ig G 抗体を構築した。TA - DR5 は、親の 2 倍抗 DR5 Ig G モノクローナル抗体よりも約 100 倍低い濃度で、アポトーシスをトリガーした。20

【0010】

Rossiら (Cancer Res. , 68 : 8384 - 8392 , 2008) は、Hex - hA20 と名付けられた 6 倍の抗 CD20 Ig G 抗体の、ドック - ロック法 (Dock-and-Lock method) を用いた構築を報告した。6 つの Fab 領域および 2 つの Fc 領域から成る Hex - hA20 を生成するために、2 つの構成要素が、構築され、哺乳類細胞において別個に生産された。第 1 に、A キナーゼアンカータンパクのアンカードメイン (AD) が、ヒト化抗 CD20 Ig G1 抗体、hA20 の重鎖のカルボキシル末端に、遺伝子的に融合された。この構造物は、CH3 - AD2 - Ig G - hA20 と名付けられた。第 2 に、サイクリック AMP 依存性のタンパクキナーゼのドッキングドメイン (DDD) が、h20 の Fab フラグメントのカルボキシル末端に、遺伝子的に融合された。この構造物は、CH1 - DDD2 - Fab - hA20 と名付けられた。CH3 - AD2 - Ig G - hA20 および CH1 - DDD2 - Fab - hA20 は、プロテイン A およびプロテイン L アフィニティクロマトグラフィーによってそれぞれ精製された。Hex - hA20 は、精製した CH3 - AD2 - Ig G - hA20 および CH1 - DDD2 - Fab - hA20 を酸化還元条件下で混合し、次いで、プロテイン A で精製することによって得られた。Hex - h20 は、架橋抗体を必要とすることなく、CD20 発現 B リンパ腫細胞株の増殖を阻害した。Hex - h20 は、hA20 の ADC C 活性を保持したが、CDC 活性は失った。3040

【0011】

Yooら (J. Biol. Chem. , 47 : 33771 - 33777 , 1999) は、ガンマ - 2 重鎖の一部がヒトアルファ - 1 重鎖の対応する部分で置き換えられた、変異型ヒト抗 DNS Ig G2 抗体を構築した。 - tp と呼ばれる構造物において、ヒトアルファ - 1 重鎖の C 末端に存在し、 tp と呼ばれる 18 個のアミノ酸ポリペプチ50

ド(アルファ尾部とも呼ばれる)が、ヒトガンマ-2重鎖のC末端にて付加された。

- t pにおいては、次の3つの変異型IgG2抗体を生成するために、さらに変更された。
 - t pにおいては、ガンマ-2重鎖のCH1領域が、ヒトアルファ-1重鎖の相手方で置き換えられた。
 - t pにおいては、CH1領域、ヒンジ領域およびCH2領域が、ヒトアルファ-1重鎖の相手方で置き換えられた。
 - t pにおいては、ヒンジ領域およびCH2領域が、ヒトアルファ-1重鎖の相手方で置き換えられた。これらの構造物は、J鎖を產生するマウス骨髄腫細胞株Sp2/0において安定して発現された。
 精製された - t p抗体、- t p抗体、- t p抗体および
 - t p抗体の各々は、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体および六量体の混合物であった。混合物における六量体と五量体とを合わせた割合は、- t pについて
 10 は20%、- t pについては25%、- t pについては45%、
 - t pについては32%であった。

【0012】

Sorensenら(J. Immunol. 156: 2858-2865, 1996)は、第1、第2および第3のヒンジ領域が削除された、ヒトモノクローナル抗NIP(3-ニトロ-4-ヒドロキシ-5-ヨードフェニル酢酸)IgG3抗体変異型に基づき、多価抗体を生成した。この変異型IgG3抗体のガンマ-3重鎖遺伝子は、2つの位置において変更された。第1に、ヒトμ重鎖のC末端に存在し、μ t pと呼ばれる18個のアミノ酸ポリペプチド(ミュー尾部とも呼ばれる)が、重鎖のC末端にて付加された。第2に、CH2領域の309位のロイシン残基が、システイン残基に変更された。IgGL309Cμ t pと呼ばれる、このような変更モノクローナルIgG3抗体は、J鎖を產生するマウス骨髄腫細胞株J558Lにおいて発現され、NIP-セファロースカラムを用いて精製された。IgGL309Cμ t pの分泌レベルは、親のIgG3抗体よりも低いと報告され、IgGL309Cμ t pの大部分が、細胞内に保持された。サイズ分析は、五量体および六量体が、精製IgGL309Cμ t pの81%を構成することを示した。

【0013】

Sorensenら(Int. Immunol., 12: 19-27, 2000)も、ガンマ-3重鎖のCH2領域およびCH3領域を、ヒトμ重鎖の、μ t pを含むCH3領域およびCH4領域で置換することによって、上記と同じヒト抗NIP IgG3抗体変異体を変更した。このような変更IgG3/IgMハイブリッド分子の重鎖は、IgG-Cμ3-Cμ4と呼ばれ、N末端から、ヒトガンマ-3重鎖の抗NIP VH領域、CH1および第4ヒンジ領域、ならびに、ヒトμ重鎖の、μ t pを含むCH3領域およびCH4領域から成る。IgG-Cμ3-Cμ4は、J鎖を產生するJ558細胞において発現され、NIP-セファロースカラムを用いて精製された。精製IgG-Cμ3-Cμ4において、六量体および五量体は、それぞれ、14.0%および66.7%を構成した。IgG-Cμ3-Cμ4は、ヒトガンマ-3重鎖のCH2領域およびCH3領域を有しないので、ADC C、pH依存性FcRn結合、ならびに、プロテインAおよびプロテインGへの結合能などの、Fc 媒介特性を欠くであろう。

【0014】

発明の概要

本発明は、各々がIgGアイソタイプもしくはIgAアイソタイプであるCH2領域およびCH3領域、ならびに、Cμ3領域およびCμ4領域を、N末端からC末端に向かって順に含む免疫グロブリン重鎖定常領域を含む抗体または融合タンパクを提供する。随意的に、前記免疫グロブリン重鎖は、さらに、前記CH2領域のN末端にヒンジ領域を含む。随意的に、前記免疫グロブリン重鎖は、さらに、前記ヒンジ領域のN末端にCH1領域を含む。

【0015】

随意的に、前記抗体または融合タンパクは、前記重鎖定常領域が重鎖可変領域に融合した抗体であって、さらに、軽鎖可変領域および定常領域を含む軽鎖を含む抗体である。随意的に、前記抗体は、異なる重鎖可変領域、および、随意的に、異なる軽鎖可変領域を有

10

20

30

30

40

50

する複数の抗体を含む多重特異性抗体であって、前記複数の抗体は、前記多重特異性抗体において前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化している多重特異性抗体の構成要素である。

【 0 0 1 6 】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクにおいて、本発明の抗体または融合タンパクにおける、前記 C H 1 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 1 領域である。随意的に、前記抗体または融合タンパクにおける、前記 C H 1 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 2 領域である。随意的に、前記抗体または融合タンパクにおける、前記 C H 1 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 3 領域である。随意的に、前記抗体または融合タンパクにおける、前記 C H 1 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G 4 領域である。随意的に、前記 C H 1 領域（存在する場合）、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g A 領域である。随意的に、前記 C H 1 領域および前記ヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、ヒトの C H 1 領域、ヒンジ領域、C H 2 領域およびC H 3 領域であり、前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域は、ヒトの C μ 3 領域および C μ 4 領域である。10

【 0 0 1 7 】

随意的に、前記抗体または融合タンパクは、前記重鎖定常領域に連結した単鎖 F v を含む単鎖抗体である。随意的に、前記単鎖抗体は、複数の単鎖抗体を含む多重特異性抗体であって、前記複数の前記 s c F v は異なる V H 領域を有し、前記複数の単鎖抗体は、前記多重特異性抗体において前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化している多重特異性抗体の構成要素である。随意的に、前記 s c F v は同じ V L 領域を有する。20

【 0 0 1 8 】

随意的に、抗体または融合タンパクは、2つの前記重鎖および2つの前記軽鎖を含むユニットの少なくとも5つもしくは6つの複製を含む多量体であって、前記複製は、前記多量体において前記 C μ 3 領域および前記 C μ 4 領域を介して複合化している多量体の形態である。

【 0 0 1 9 】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクにおいて、前記 C H 1 領域（存在する場合）、前記ヒンジ領域、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、I g G であり、前記抗体または融合タンパクは、p H 依存性 F c R n 結合を示し、プロテイン G に特異的に結合し、プロテイン A に特異的に結合し、A D C C , C D C および / またはオプソニン化を呈する。30

【 0 0 2 0 】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクにおいて、前記 C H 1 領域（存在する場合）、ならびに、前記ヒンジ領域、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、ヒト I g G 1 領域であり、前記抗体は、p H 依存性 F c R n 結合を示し、プロテイン G に特異的に結合し、プロテイン A に特異的に結合する。随意的に、このような抗体または融合タンパクは、A D C C , C D C およびオプソニン化を呈する。40

【 0 0 2 1 】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクにおいて、前記 C H 1 領域（存在する場合）、ならびに、前記ヒンジ領域、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、ヒトの I g G 2 領域または I g G 4 領域であり、前記抗体または融合タンパクは、p H 依存性 F c R n 結合を示し、プロテイン G に特異的に結合し、プロテイン A に特異的に結合する。

【 0 0 2 2 】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクにおいて、前記 C H 1 領域（存在する場合）、ならびに、前記ヒンジ領域、ならびに、前記 C H 2 領域および前記 C H 3 領域は、ヒト I g G 3 であり、前記抗体は、p H 依存性 F c R n 結合を示し、プロテイン G に特異的に50

結合する。随意的に、ADC, CDC およびオプソニン化を呈する請求項 20 に記載の抗体または融合タンパク。

【0023】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクにおいて、前記CH1領域(存在する場合)、ならびに、前記CH2領域および前記CH3領域は、ヒトIgAであり、前記抗体は、Fcアルファ受容体に結合する。

【0024】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、異種ポリペプチドに連結した免疫グロブリン重鎖を含む融合タンパクである。随意的に、前記異種タンパクは、Gly-Gly-Ala-Alaなどの可撓性リンカーを介して、前記定常領域の前記ヒンジに連結している。随意的に、前記異種ポリペプチドは、受容体細胞外ドメインまたは受容体細胞外ドメインに特異的に結合するポリペプチドである。随意的に、前記融合タンパクは、異なる異種ポリペプチドを含有する複数の融合タンパクを含む多重特異性複合体の構成要素である。

【0025】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、前記C_μ3領域および前記C_μ4領域を介して複合化した抗体および融合タンパクを含む多重特異性複合体である。

【0026】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、ヒト化した、キメラの、張り合わせ(venerered)の、または、ヒトの抗体である。

【0027】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、受容体の細胞外ドメインに特異的に結合する。

【0028】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、CD79a, CD30 または DR5 に特異的に結合する。

【0029】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、TNFアルファ受容体、LFA-3受容体、もしくはIL-1受容体の細胞外ドメインを含む融合タンパク、または、TRAILタンパクを含む融合タンパクである。

【0030】

随意的に、上記の抗体または融合タンパクは、有毒部分に、随意的に、細胞毒性を有する部分に抱合している。

【0031】

本発明は、さらに、上記の抗体または融合タンパクを含む医薬組成物を提供する。

【0032】

本発明は、さらに、癌を有するまたは癌の危険性のある患者に、上記の抗体または融合タンパクの有効な投与計画を実施することを含む癌を治療する方法を提供する。

【0033】

本発明は、さらに、免疫学的疾患を治療する方法であって、前記疾患を有するまたは前記疾患の危険性のある患者に、上記の抗体または融合タンパクの有効な投与計画を実施することを含む方法を提供する。

【0034】

本発明は、さらに、抗体および/または融合タンパクの多重特異性複合体を生成する方法を提供し、この方法は、a. 異なる特異性を有する複数の請求項 1 に規定の抗体および/または融合タンパクをコードするベクターまたは複数のベクターを細胞に導入すること、ならびに、b. 前記多重特異性複合体を細胞培養物から単離することを含む。そして、前記抗体および/または融合タンパクは、発現すると、前記C_μ3領域および前記C_μ4領域を介して前記多重特異性複合体に組み立てられる。随意的に、前記複数の抗体または融合タンパクの各々は、異なるベクターによってコードされる。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明は、さらに、N末端IgG定常領域区分およびC末端IgM定常領域区分を含むハイブリッド定常領域を含む抗体または融合タンパクであって、前記抗体は、pH依存性FcRn結合を呈し、プロテインGに特異的に結合し、前記IgM定常領域を介して多量化して少なくとも五量化または六量化する抗体または融合タンパクを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1：抗体発現ベクターの模式的構造を示す図である。

【0037】

【図2】図2：単量体型の組み換え抗体の模式的構造を示す図である。

10

【0038】

【図3】図3A-E：Superose 6ゲルろ過カラムからの、抗CD79a IgG 1抗体の溶出パターンを示す図である。

【0039】

【図4】図4：多価抗CD79a IgG 1抗体によるラモス細胞(Ramos cell)のアポトーシスの誘導を示す図である。

【0040】

【図5】図5：多価IgG 1抗体のFcRnへのpH依存性結合を示す図である。

【0041】

【図6】図6A-I：多価IgG 1抗体のCD16への結合を示す図である。

20

【0042】

【図7】図7A-D：Superose 6ゲルろ過カラムからの、抗CD30 IgG 1抗体の溶出パターンを示す図である。

【0043】

【図8】図8：多価抗CD30 IgG 1抗体によるKarpas 299細胞の細胞分裂停止を示す図である。

【0044】

【図9】図9：Superose 6ゲルろ過カラムからの、HEK293細胞に発現した多価抗CD30 IgG 1抗体の溶出パターンを示す図である。

【0045】

30

【図10】図10A-D：Superose 6ゲルろ過カラムからの、抗DR5 IgG 1抗体の溶出パターンを示す図である。

【0046】

【図11】図11：多価抗DR5 IgG 1抗体により誘導されるJurkat細胞のアポトーシスを示す図である。

【0047】

【図12】図12A-C：Superose 6ゲルろ過カラムからの、多価抗CD79a IgG 4抗体の溶出パターンを示す図である。

【0048】

【図13】図13A-E：Superose 6ゲルろ過カラムからの、抗CD79a IgG 3抗体の溶出パターンを示す図である。

40

【0049】

【図14】図14：多価IgG 3抗体のFcRnへのpH依存性結合を示す図である。

【0050】

【図15】図15A-G：多価IgG 3抗体のCD16への結合を示す図である。

【0051】

【図16A】ガンマ-1(配列番号15~18)、ガンマ-2(配列番号19~22)、および、ガンマ-3(配列番号23~26)の重鎖定常領域の配列を示す図である。

【図16B】ガンマ-4(配列番号27~30)、アルファ-1(配列番号31~33)、および、アルファ-2(配列番号34~36)の重鎖定常領域の配列を示す図である。

50

【図16C】ミュー重鎖定常領域（配列番号51～54）、および、J鎖（配列番号55）の配列を示す図である。Cミュー配列において、18個のアミノ酸ミュー尾部に下線を付してある。J鎖に示した最初の22個のアミノ酸は、開裂シグナルペプチドである。

【0052】

【図17】六量体コンフォメーションの、ハイブリッド定常領域を有する例示的抗体を示す図である。鎖間ジスルフィド結合は直線で示してある。各単量体ユニットは、各々が重鎖可変領域および軽鎖可変領域から形成された2つの結合部位を有する。6つの単量体ユニットは、異なる単量体ユニットのC μ 3領域とC μ 4領域との間のジスルフィド結合を介して、互いに結合している。結合価およびジスルフィド結合パターンを含めて示した抗体は、例示のための本発明の1つの実施形態にすぎない。

10

【0053】

【図18】HuYON007-MV1gG1またはHuYON007-IgG1で処理したラモス担持CB17SCIDマウスの生存データを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0054】

定義

抗体または融合タンパクは、一般に、単離型で提供される。これは、抗体または融合タンパクが、一般に、その產生または精製で生じる干渉タンパクおよび他の汚染物質から、少なくとも50%w/w純粋であるが、モノクローナル抗体が、その使用を容易にするための、医薬的に許容される過剰の担体または他の媒体と、組み合わされる可能性を排除するものではない。いくつかの抗体または融合タンパクは、產生または精製由来の干渉タンパクおよび他の汚染物質から、少なくとも60, 70, 80, 90, 95または99%w/w純粋である。抗体または融合タンパクは、その精製後に残存する主たる高分子種であることが多い。

20

【0055】

抗体または融合タンパクのその標的抗原への特異的結合とは、少なくとも10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, または10¹⁰M⁻¹の親和性を意味する。特異的結合は、少なくとも1つの関連のない標的に対して生じる非特異的結合よりも、結合程度が検出可能に高く、非特異的結合から区別される。非特異的結合は、通常、ファンデルワールス力の結果であるが、特異的結合は、特定の官能基間の結合または特定の空間的合致（たとえば、鍵と鍵穴型）の形成の結果であり得る。ただし、特異的結合は、抗体または融合タンパクが1つの標的のみに結合することを必ずしも意味しない。

30

【0056】

基本的な抗体構造ユニットは、サブユニットの四量体である。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対を含み、各対は1つの「軽」（約25kDa）鎖および「重」（約50～70kDa）鎖を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識に主要な関与をする、約100～110個またはそれより多数のアミノ酸の可変領域を含む。この可変領域は、最初、開裂可能なシグナルペプチドに連結して発現される。シグナルペプチドを有しない可変領域は、成熟可変領域と呼ばれることもある。したがって、たとえば、軽鎖成熟可変領域は、軽鎖シグナルペプチドを有しない軽鎖可変領域を意味する。ただし、可変領域と呼ぶことは、シグナル配列が必ず存在することを意味せず、実際のところ、本発明の抗体または融合タンパクは、発現され分泌されると、シグナル配列が開裂する。重鎖可変領域と軽鎖可変領域との対は、抗体の結合領域を規定する。軽鎖および重鎖のカルボキシ末端部分は、それぞれ、軽鎖定常領域および重鎖定常領域を規定する。重鎖定常領域は、エフェクター機能に主要な関与をする。IgG抗体において、重鎖定常領域は、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域に区分される。IgAにおいて、重鎖定常領域は、CH1領域、CH2領域およびCH3領域に区分される。CH1領域は、ジスルフィド結合および非共有結合によって、軽鎖定常領域に結合する。ヒンジ領域は、抗体の結合領域とエフェクター領域との間に可撓性をもたらし、また、四量体において、2つの重鎖定常領域の間に分子内ジスルフィド結合のための部位を提供する。CH2領域およびCH

40

50

3領域は、エフェクター機能およびFcRn結合の主要な部位である。IgM抗体において、 μ 重鎖定常領域(C μ)は、4つの領域、C μ 1, C μ 2, C μ 3およびC μ 4にさらに区分される。C μ 3領域およびC μ 4領域は、1つ以上のJ鎖と協働して、天然IgM抗体および本発明の抗体または融合タンパクにおいて、多量化機能を提供することがある。ミュール尾部は、IgM重鎖定常領域のC末端に位置する18アミノ酸長のポリペプチドである。IgMは多量化して、J鎖が存在するときは五量体構造を、J鎖が存在しないときは六量体構造を、形成する。

【0057】

軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンに分類され、それぞれ、抗体アイソタイプをIgG, IgM, IgA, IgDまたはIgEと規定する。軽鎖および重鎖において、可変領域および定常領域は、約12個またはそれより多数のアミノ酸の「J」区分によって結合されており、重鎖は、約10個またはそれより多数のアミノ酸の「D」区分も含む（概して、Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7を参照）（あらゆる目的のために、参照によってその全体が組み込まれる）。

【0058】

軽鎖/重鎖の各対の成熟可変領域は、抗体結合部位を形成する。したがって、抗体全体は、2つの結合部位を有し、すなわち2価である。天然の抗体において、これらの結合部位は同じである。ただし、2つの結合部位が異なる二重特異性抗体を作製することが可能である（たとえば、Songsivilai and Lachmann, Clin. Expt. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelnik et al., J. Immunol., 148: 1547-53 (1992)を参照）。可変領域はすべて、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって連結され、比較的保存されている同じ一般構造のフレームワーク領域（FR）を示す。各対の2つの鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整合され、これにより特異的エピトープへの結合が可能になっている。N末端からC末端に向かって、軽鎖および重鎖の両者は、FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3およびFR4のドメインを含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、カバトの定義、Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), または、Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989)に従う。カバトはまた、異なる重鎖可変領域間または異なる軽鎖可変領域間の対応する残基が、同じ番号を割り当てられる、広く使用されている番号付け規則（カバト番号付け）を提供している。カバト番号付けは抗体定常領域に使用することが可能であるが、EUインデックスがより一般に使用されており、本出願においてもそのようにしている。

【0059】

多量化ユニットは、そのIgM部分によって多量化される本発明のハイブリッド定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクの、単量体ユニットである。多量化ユニットは、それ自体1価または2価であり得る。単一特異性2価抗体ユニットにおいて、2つの重鎖および2つの軽鎖は同じである。二重特異性2価抗体ユニットにおいては、異なる結合特異性を有する、重鎖および軽鎖の2つの異なる対が存在する。抗体ユニットは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が分子内で対を成す単鎖抗体の場合のように、重鎖および軽鎖の単一の組み合わせを含んで、1価でもあり得る。融合タンパクユニットは、単量体型、融合タンパクの2つの複製を含むホモ二量体型、または、2つの異なる融合タンパクを含むヘテロ二量体型であり得る。

【0060】

多量化とは、ハイブリッド定常領域のC μ 部分を介する、少なくとも2つの多量化ユニ

10

20

30

40

50

ット、より一般には、5つまたは6つのそのようなユニットの、会合を意味する。ハイブリッド定常領域を有する抗体または融合タンパクの多量化は、通常のIgMの五量体または六量体の構造よりも、高次または低次の構造を形成することもあり得る。このようなことは、多量化によって形成された複合体を、少なくとも約5つまたは6つのユニットを有すると特徴付けることによって示されることがある。

【0061】

結合価とは、結合領域の数を指し、換言すれば、抗体または融合タンパクが結合し得る標的抗原の最大分子数を指す。通常のホモ二量体型IgG抗体は、2の結合価を有する。通常のIgM抗体は、五量体型または六量体型のどちらの構造(つまり、各々が2つの結合部位を有する四量体である5つまたは6つのIgMユニット)が形成されるかに応じて、10または12の結合価を有する。単量体ユニットが2価である本発明の抗体または融合タンパクは、10または12の結合価を有することが可能であり、一方、単量体ユニットが1価である抗体または融合タンパクは、5または6の結合価を有し得る。ハイブリッド定常領域が、通常のIgMの五量体型または六量体型の構造よりも高次または低次の構造を形成することがあり、上記の抗体または融合タンパクにおいて、結合価は上記の値から変化するかも知れない。これらの結合価は、理論的最大値である。実際には、結合する抗原の複製の数は、立体障害のため、理論的最大値よりも少なくなるかも知れない。

【0062】

本発明の抗体または融合タンパクは、そのすべての抗原(またはリガンド)結合領域が同じ特異性を有する場合、单一特異性である。抗体または融合タンパクは、その抗原結合領域が少なくとも2つの異なる特異性を有する場合は、多重特異性である。多重特異性の抗体または融合タンパクにおける異なる特異性の数は、2から抗体または融合タンパクの最大結合価(たとえば、10または12)にわたる。同じ細胞培養で產生される抗体または融合タンパクの集団において、異なる特異性の数は、集団の異なる要素間で変動し得る。

【0063】

「抗体」の用語は、少なくとも1つの結合領域を有するあらゆる形の抗体を包含し、1価フラグメント、2つの重鎖および軽鎖の2価四量体ユニット、ならびに、より高次の複合体、特に、1価または2価のユニットの五量体および六量体、を包含する。抗体は、すべての結合領域が同じ特異性を有する单一特異性、または、結合部位が少なくとも2つの特異性を有する多重特異性であり得る。抗体フラグメントは、一般に、重鎖可変領域およびハイブリッド重鎖定常領域を含み、軽鎖可変領域も含んでよい。たとえば、抗体フラグメントは、N末端からC末端に向かって、軽鎖可変領域、ペプチドスペーサー、重鎖可変領域、および、本発明のハイブリッド重鎖定常領域を含み得る。他のフラグメントは、重鎖可変領域(結合領域)およびハイブリッド重鎖定常領域を含み、軽鎖を含まない(つまり、Dabまたはナノボディ)。同様に、融合タンパクは、単量体型または二量体型の融合タンパクユニット、または、より高次の複合体、特に、五量体または六量体を含む。

【0064】

「エピトープ」の用語は、抗体または融合タンパクが結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、連続アミノ酸、または、1つ以上のタンパクの三次折り畳みによって並置された不連続アミノ酸で形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープ(直線状エピトープとしても知られる)は、一般に、変性溶媒に曝されても維持され、一方、三次折り畳みで形成されるエピトープ(コンフォメーションエピトープとしても知られる)は、一般に、変性溶媒での処理で失われる。いくつかの抗体は、末端特異的エピトープに結合し、このことは、抗体が、自由端を有するポリペプチドに対して、他のポリペプチドと融合して自由端を失った同じポリペプチドに対するよりも、優先的に結合することを意味する。エピトープは、一般に、少なくとも3個、より普通には、少なくとも5個または8~10個の、独特の立体コンフォメーションのアミノ酸を含む。エピトープの立体コンフォメーションを決定する方法には、たとえば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴が含まれる。たとえば、Epitope Mapping Protocols, in Metho

10

20

30

40

50

ds in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996) を参照。

【0065】

「抗原」または「標的抗原」の用語は、抗体または融合タンパクが結合する標的分子を指す。抗原は、あらゆる長さのタンパク（天然、合成、または組み換え発現）、核酸、炭水化物、その他の分子であってよい。抗原には、受容体、リガンド、カウンターレセプター、および外皮タンパクが含まれる。

【0066】

融合タンパクにおける異種ポリペプチドは、天然には免疫グロブリン定常領域に連結していないポリペプチドである。このようなポリペプチドは、完全長タンパクであるか、または、完全長タンパクが結合する抗原への特異的結合を維持するに足る長さの、完全長タンパクのあらゆるフラグメントであり得る。たとえば、異種ポリペプチドは、受容体細胞外ドメインまたはそれに対するリガンドであり得る。

10

【0067】

同じまたは重複するエピトープを認識する抗体は、標的抗原への他の抗体の結合に競合する1つの抗体の能力を示す、単純な免疫アッセイで同定され得る。抗体のエピトープは、抗原に結合した抗体の接触残基を同定するための、X線結晶学によつても同定され得る。これに代えて、2つの抗体は、一方の抗体の結合を低減または消去する、抗原におけるすべてのアミノ酸変異が、他方の結合を低減または消去する場合、同じエピトープを有する。2つの抗体は、一方の抗体の結合を低減または消去するいくつかのアミノ酸変異が、他方の結合を低減または消去する場合、重複するエピトープを有する。

20

【0068】

抗体間の競合は、試験中の抗体が共通の抗原への対照抗体の特異的結合を阻害するアッセイにおいて決定される（たとえば、Jung hans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990を参照）。過剰の試験抗体（たとえば、少なくとも2x, 5x, 10x, 20xまたは100x）が、競合結合アッセイで測定して、対照抗体の結合を少なくとも50%、ただし好ましくは75%, 90%または99%阻害する場合、試験抗体は対照抗体と競合する。競合アッセイで規定される抗体（競合抗体）には、対照抗体と同じエピトープに結合する抗体、および、立体障害が生じるに足るほど、対照抗体が結合するエピトープに近い隣接エピトープに結合する抗体が含まれる。

30

【0069】

「患者」の用語は、予防処置または治療処置を受けるヒトおよび他の哺乳類対象を包含する。

【0070】

アミノ酸置換を保存的または非保存的と分類する目的で、アミノ酸は次のようにグループ分けされる：グループI（疏水性側鎖）：met, ala, val, leu, ile；グループII（中性親水性側鎖）：cys, ser, thr；グループIII（酸性側鎖）：asp, glu；グループIV（塩基性側鎖）：asn, gln, his, lys, arg；グループV（鎖配向に影響する残基）：gly, pro；および、グループVI（芳香族側鎖）：trp, tyr, phe。保存的置換には、同じクラスのアミノ酸間での置換が含まれる。非保存的置換は、いずれか1つのクラスの要素を、他のクラスの要素と交換することから成る。

40

【0071】

配列同一性割合は、可変領域についてのカバト番号付け規則、または定常領域についてのEU番号付けによって、最大に整合される抗体配列で決定される。整合化の後、対象抗体領域（たとえば、重鎖または軽鎖の成熟可変領域全体）が対照抗体の同じ領域と比較される場合、対象抗体領域と対照抗体領域との配列同一性割合は、対象抗体領域と対照抗体領域の双方において同じアミノ酸が占める位置の数を、両領域の整合させた位置のギャップを除外した総数で割り、百分率に変換するために、100を乗じたものである。

【0072】

50

1つ以上の明記した要素を「含む」組成物または方法は、明記していない他の要素を含んでよい。たとえば、抗体を含む組成物は、その抗体を、単独で、または他の含有物と組み合わせて、有してよい。

【0073】

「抗体依存性細胞毒性」の用語、またはADCは、抗体被覆標的細胞（つまり、抗体が結合した細胞）と溶解作用を行う免疫細胞（エフェクター細胞とも呼ばれる）との相互作用に依存した、細胞死を誘導するメカニズムである。このような、エフェクター細胞には、ナチュラルキラー細胞、単球/マクロファージ、および好中球が含まれる。ADCは、細胞に結合した抗体のFc領域と、好中球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞などの免疫エフェクター細胞上のFc受容体、特に、FcRIおよびFcRIII、との相互作用によってトリガーされる。標的細胞は、媒介するエフェクター細胞のタイプに依存して、食作用または溶解によって除去される。抗体被覆標的細胞の死が、エフェクター細胞活性の結果として生じる。

【0074】

「抗体依存性細胞食作用」またはADCPとしても知られるオプソニン化の用語は、抗体被覆細胞が、免疫グロブリンFc領域に結合する食免疫細胞（たとえば、マクロファージ、好中球、および樹状細胞）によって、全体的にまたは部分的に、内在化される処理を指す。

【0075】

「補体依存性細胞毒性」の用語またはCDCは、標的結合抗体のFcエフェクタードメインが一連の酵素反応を活性化し、結果として標的細胞膜に穴を形成する細胞死を誘導するメカニズムを指す。一般に、抗体被覆細胞上のものなどの抗原-抗体複合体は、補体成分C1qに結合して活性化し、これが補体力スケードを活性化して、標的細胞の死をもたらす。補体の活性化は、また、白血球上の補体受容体（たとえば、CR3）に結合することによってADCを促進する標的細胞表面への、補体成分の沈着という結果になるかも知れない。

【0076】

FcRn受容体への抗体のpH依存性結合とは、抗体がそのような受容体に、pH6.0において、pH7.5におけるよりも強く結合することを意味する。飲作用による内在化後のエンドソームにおける低いpHでのFcRnの結合は、IgG抗体をリソソームにおける異化作用分解から救済する。救済されたIgG抗体は、次いで、中性pHにてFcRnから解放され、血液循環に再利用される。このようなpH依存性FcRn結合が、IgG抗体（および、本発明のハイブリッド定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパク）の長い血清半減期の分子機構の基礎となる（Ghetie et al., Ann. Rev. Immunol. 18: 739-766, 2000）。たとえば、ヒトIgG抗体は、pH6.0にて、ヒト新生児型Fc受容体（FcRn）に結合し、一方、pH7.5においては、それらはFcRnに弱く結合するにすぎない。IgG抗体におけるFcRn結合部位は、CH2ドメインとCH3ドメインとの連結部に存在する。μ重鎖は、pH6.0またはpH7.5においてFcRnに結合しないので、天然IgMは、FcRn媒介経路を利用して、白血球における分解から抗体を救済することができず、したがって、一般に、天然IgG抗体よりも短い半減期を有する。

【0077】

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体からのCDRがヒト「アクセプター」抗体配列に移植されている、遺伝子操作された抗体である（たとえば、US 5,530,101および5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 4,07,213, Adair, US 5,859,205,6,881,557, Foote, US 6,881,557を参照）。アクセプター抗体配列は、たとえば、成熟ヒト抗体配列、そのような配列の複合体、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、または、生殖細胞系領域配列であり得る。したがって、ヒト化抗体は、完全にまたは実質的にドナー抗体に由来するCDRのいくつかまたはすべて、ならびに、完全にまたは実質的にヒ

10

20

30

40

50

ト抗体配列に由来する、可変領域フレームワーク配列および定常領域（存在する場合）を有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全にまたは実質的にドナー抗体重鎖に由来する、少なくとも1つ、2つ、通常は3つすべてのCDR、ならびに、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワーク配列および定常領域配列に由来する、重鎖可変領域フレームワーク配列及び重鎖定常領域（存在する場合）を有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全にまたは実質的にドナー抗体軽鎖に由来する、少なくとも1つ、2つ、通常は3つすべてのCDR、ならびに、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワーク配列および定常領域配列に由来する、軽鎖可変領域フレームワーク配列および軽鎖定常領域（存在する場合）を有する。ナノボディおよびdAbを除き、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖およびヒト化軽鎖を含む。ヒト化抗体におけるCDRは、対応するCDR間で、対応残基（カバトの規定による）の少なくとも85%，90%，95%または100%が同一であるときは、非ヒト抗体における対応するCDRに実質的に由来する。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列または抗体鎖の定常領域は、カバトの規定による対応残基の少なくとも85%，90%，95%または100%が同一であるときは、それぞれ、ヒト可変領域フレームワーク配列またはヒト定常領域に、実質的に由来する。

【0078】

ヒト化抗体は、しばしば、マウス抗体由来の6つすべてのCDR（好ましくは、カバトの規定による）を取り込んでいるが、ヒト化抗体は、すべてよりも少ないCDR（たとえば、マウス抗体由来の少なくとも3つ、4つまたは5つのCDR）で作製することもできる（たとえば、Pascalis et al., J. Immunol. 169: 3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36: 1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164: 1432-1441, 2000）。

【0079】

キメラ抗体は、非ヒト抗体（たとえば、マウス）の軽鎖および重鎖の成熟可変領域が、ヒトの軽鎖定常領域および重鎖定常領域と組み合わされた抗体である。このような抗体は、マウス抗体の結合特異性を実質的にまたは完全に保持し、ヒト配列の約2/3である。

【0080】

張り合わせ（veneered）抗体は、非ヒト抗体のいくつかの、通常はすべてのCDR、および、非ヒト可変領域フレームワーク残基を保持するが、B細胞エピトープまたはT細胞エピトープに寄与するかも知れない他の可変領域フレームワーク残基、たとえば、露出残基（Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991）が、ヒト抗体配列の対応位置由来の残基で置き換えられた、1種のヒト化抗体である。その結果、CDRが、非ヒト抗体に完全にまたは実質的に由来し、非ヒト抗体の可変領域フレームワークが、置換によって、ヒト様とされた抗体となる。

【0081】

ヒト抗体は、ヒトから単離することができるが、他に、ヒト免疫グロブリン遺伝子の発現からも生じる（たとえば、インビトロでのまたはファージ提示による、遺伝子組み換えマウス）。ヒト抗体を产生する方法には、Oestbergらのトリオーマ法（Hybridoma 2: 361-367 (1983); Oestberg, U.S. Patent No. 4,634,664; およびEngleman et al., US Patent 4,634,666）、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む遺伝子組み換えマウスの使用（たとえば、Lonberg et al., WO 93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 50

91/10741(1991)を参照)、および、ファージ提示法(たとえば、Dower et al., WO 91/17271、ならびに、McCafferty et al., WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743およびUS 5,565,332を参照)が含まれる。

【0082】

プロテインAは、もともと黄色ブドウ球菌の細胞壁において発見された、40~60kDaの表面タンパクである。プロテインAは、マウスIgG2aおよびIgG2bのほか、ヒトIgG1, IgG2およびIgG4に、高い親和性で特異的に結合する。プロテインAは、ヒトIgG3, IgAまたはIgMには結合しない。プロテインAは、抗体のアフィニティ精製に使用される。

【0083】

プロテインGは、65kDa(G148プロテインG)および58kDa(C40プロテインG)の連鎖球菌細胞表面タンパクである。プロテインGは、血清アルブミン結合ドメインを含むが、IgG結合には必要とされず、削除されていることが多い。プロテインGは、ヒトIgGのすべてのアイソタイプに特異的に結合するが、IgAおよびIgMには結合しない。プロテインGも、抗体精製に使用される。

【0084】

詳細な説明

I. 概説

20

本発明は、ハイブリッド定常領域、および、ハイブリッド定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクを提供する。ハイブリッド定常領域は、少なくとも、IgGまたはIgAの定常領域のCH2領域およびCH3領域、ならびに、C μ 定常領域のC μ 3領域およびC μ 4領域を含む。ハイブリッドは、両構成要素の定常領域特性を保持している。ハイブリッドは、多価複合体、たとえば、五量体型構造または六量体型構造(図17に示す)、を形成するC μ 定常領域の能力を保持している。IgGハイブリッドは、また、比較的長いインビオ半減期に関連するpH依存性FcRn結合、および、精製を容易にするプロテインGへの特異的な結合を含む、IgG特性を保持している。アイソタイプおよびサブタイプ、抗原の性質、ならびに、追加のIgG CH1ドメインおよびヒンジドメインの存在に応じて、IgGハイブリッドは、また、プロテインAへの特異的結合、エフェクター機能、ADCC, CDCおよびオプソニン化の特性も、保持するかも知れない。IgAハイブリッドは、ヒトにおいてFcアルファ受容体CD89に結合するIgAの特性を保持している(Swiss Prot P24071)。

【0085】

IgGエフェクター機能、比較的長い半減期、および、精製の容易さと、多量化するIgMの能力との組み合わせは、新規な組み合わせの特性を有する抗体または融合タンパクをもたらす。たとえば、いくつかのこののような抗体または融合タンパクは、ADCC, CDC、オプソニン化、pH依存性FcRn結合、ならびに、IgGアイソタイプを有する抗体と比較した、プロテインAおよびプロテインGに結合する能力などの、Fc媒介特性を維持しながら、または、さらには増強しながら、細胞表面の受容体または結合リガンドを効率よく多量化することができる。異なるアイソタイプ由来の特性の組み合わせは、癌および他の疾患の治療について、従来のIgG, IgMまたはIgA抗体よりも強力である可能性をもたらす。

30

【0086】

多量化するIgMの能力は、また、異なる特異性を有するユニットがIgM定常領域によって共に保持されている、多重特異性の抗体または融合タンパクの複合体を作製する形式を提供する。

40

【0087】

上述の長所は、ハイブリッド抗体または融合タンパクの発現のための核酸構造物の作製に関与する操作以外にインビトロでの操作なしで、達成することができる。

50

【0088】

I I . ハイブリッド定常領域の構成要素

ハイブリッド定常領域は、I g G部分またはI g A部分およびC μ 部分を含む。I g G部分またはI g A部分は、少なくとも、I g GまたはI g AのC H 2領域およびC H 3領域を含む。C H 2領域およびC H 3領域は、F c R n結合、プロテインAおよびプロテインGへの結合、A D C C, C D Cおよびオプソニン化に、少なくとも部分的に関与する。I g G部分は、また、好ましくは、ヒンジ領域および/またはC H 1領域を含む。ヒンジ領域は、抗体または融合タンパクの結合領域とエフェクター領域との間に可撓性をもたらし、A D C C、オプソニン化およびC D Cなどのエフェクター機能に寄与する。ヒンジ領域は、また、一対のI g G重鎖を互いに連結するジスルフィド結合の部位でもある。C H 1領域は、軽鎖定常領域と結合し、一般に、軽鎖定常領域を有する軽鎖が存在する形式で含まれるが、融合タンパク、または軽鎖定常領域が存在しない単鎖抗体形式においては、省略可能である。I g Aは、カバトの領域描写によれば、ヒンジ領域を有しない。ただし、I g Aにおいてこれらの領域間の境界に隣接するC H 1およびC H 2における残基が、ヒンジ領域の役割を効果的に果たす可撓性を提供する。C H 1領域は、好ましくは、抗体軽鎖定常領域を含むI g A融合に含まれ、好ましくは、他所では省略される。

【0089】

C μ 部分は、C μ 定常領域のC μ 3およびC μ 4を含む。C μ 部分は、複数の1価または2価の結合ユニットを多量化して、多価複合体とする。本発明を実施するためにメカニズムの理解は必要ではないが、ハイブリッド抗体または融合タンパクの多量化は、異なる単量体のC μ 3領域間の、および異なる単量体のミュー尾部間の、鎖間ジスルフィド結合を通じて、天然のI g M抗体における態様と類似の態様で生じると考えられる。I g Mのいくつかの多量体は、また、ミュー尾部に結合した1つ以上のJ鎖も含む。I g Mは、1つ以上のJ鎖が存在すると、五量体型構造を形成することができ、J鎖が存在しなければ、六量体型構造を形成することができる。六量体型I g Mは、五量体型よりも強いC D Cを有すると報告されている。本発明の抗体または融合タンパクは、I g Mと同様に、五量体型または六量体型の複合体を形成すると考えられるが、より大きいまたはより小さい他の多量体も、同様に、または五量体型または六量体型に代えて、形成されるかも知れない。

【0090】

上述の構成要素は、N末端からC末端に向かって、I g GまたはI g AのC H 1領域(存在する場合)、I g Gヒンジ領域(存在する場合)、I g GまたはI g AのC H 2領域、I g GまたはI g AのC H 3領域、C μ 3領域、および、C μ 4領域の順序で、配置される。

【0091】

通常I g G領域またはI g A領域のすべては、同じアイソタイプおよびサブタイプである。すなわち、すべてのI g G領域は、I g G 1, I g G 2, I g G 3またはI g G 4のいずれかに由来し、すべてのI g A領域は、I g A 1またはI g A 2のいずれかに由来する。

【0092】

好ましくは、I g G領域またはI g A領域は、ヒトのI g G領域またはI g A領域である。同様に、C μ 3領域およびC μ 4領域は、好ましくは、ヒトのものである。ヒトのI g G 1, I g G 2, I g G 3, I g G 4, I g A 1, I g A 2, I g Mの重鎖定常領域の例示的配列を、構成要素(C H 1, ヒンジ, C H 2, C H 3, C μ 1, C μ 2, C μ 3およびC μ 4ならびにJ鎖)に区分する説明と共に、図16A、図16B、図16Cに示す。ただし、非ヒト靈長類、ラクダ科、軟骨魚類、マウスまたはラットを含む他の種に由来する領域も、また、使用することが可能である。

【0093】

ヒトのI g G領域、I g A領域もしくはI g M領域(つまり、C H 1, ヒンジ, C H 2, C H 3, C μ 3およびC μ 4)またはJ鎖に言及することは、例示的配列、またはその

10

20

30

40

50

アロタイプもしくは同型アロタイプ、または、例示的配列と少なくとも 90, 95, 98 もしくは 99 % の配列同一性を有し、かつ / あるいは、CH1, CH2, CH3, C μ 3 および C μ 4 ならびに J 鎖の場合には、1, 2, 3, 4, 5, 10 もしくは 15 個までのアミノ酸削除、置換もしくは内部挿入によって、および、IgG1, IgG2 もしくは IgG4 のヒンジ領域については、1, 2 もしくは 3 個の削除、置換もしくは内部挿入によって、IgG3 ヒンジについては、1, 2, 3, 4, 5 もしくは 6 個までの削除によって、例示的配列とは異なる他の変異配列に、言及することである。置換（存在する場合）は、好ましくは保存的である。ヒト定常領域は、異なる個体間で、アロタイプ変異および同型アロタイプ変異を示し、つまり、定常領域は、異なる個体において、1 つ以上の多型位置にて異なり得る。同型アロタイプは、同型アロタイプを認識する血清が、1 つ以上の他のアイソタイプの非多型領域に結合する点で、アロタイプと相違する。ヒト定常領域への言及は、あらゆる天然アロタイプ（同型アロタイプを含む）を有する定常領域、または、天然アロタイプの多型位置を占める残基のあらゆる並べ替えを含む。非ヒト定常領域の配列は、たとえば、Swiss-Prot データベースまたは Genbank データベースによって、提供される。非ヒト定常領域への言及は、同様に、アロタイプ変異もしくは同型アロタイプ変異、およびその並び替え、または、天然配列とは異なる他の変異配列を含む。変異の範囲は、配列同一性、および / または、非ヒト定常領域の天然配列に関する置換の数によって、上述のヒト定常領域に関する変異の説明と類似の態様で、規定される。アイソタイプまたは他の種内の対応する位置を規定すること、または、突然変異位置を定義することにおいては、EU 番号付け規則が使用される。

10

20

【0094】

重鎖の C 末端リジンなどの、軽鎖および / または重鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端の 1 個または数個のアミノ酸は、分子の一部または全体において、欠落してまたは誘導体化されてもよい。補体媒介細胞毒性または ADC C などのエフェクター効果を、低下させもしくは上昇させるために（たとえば、Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; および Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006 を参照）、または、ヒトにおける半減期を引き延ばすために（たとえば、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004 を参照）、定常領域において置換を行うことができる。例示的な置換には、抗体の半減期を増すための、位置 250 の Gln、および / または位置 428 の Leu が含まれる（EU 番号付け）。位置 234, 235, 236 および / または 237 のいずれかにおける置換は、Fc 受容体、特に Fc RI、に対する親和性を低下させる（たとえば、US 6,624,821 を参照）。随意的に、ヒト IgG2 の位置 234, 236 および / または 237 はアラニンで置換され、位置 235 はグルタミンで置換される（たとえば、US 5,624,821 を参照）。

30

【0095】

ヒンジ領域が使用される場合、ヒンジの一部分は、合成リンカー分子で置き換えることが可能である。このようなことは、融合タンパクの結合領域が、たとえば、10 個までの N 末端残基が合成の可撓性リンカーで置き換えられたヒンジ領域を介して、CH2 および CH3 IgG または IgA 定常領域に結合された融合タンパクにおいて行われることが多い。Gly-Gly-Ala-Ala, Gly-Gly-Gly-Ser, Leu-Ala-Ala-Ala およびこれらの多量体が、そのようなリンカーの例である。このヒンジ領域は、全体を合成リンカーで置き換えること、または、置換なしで省略することが可能である。

40

【0096】

ヒンジ領域の一部または全体を置き換える合成リンカー、ならびに、エフェクター機能もしくは以下にさらに説明する FcRn 結合、および N 末端での結合領域の付加を増強または抑制するための、1 つまたはいくつかのアミノ酸置換を可能な例外として、ハイブリッド定常領域は、上述の CH1 領域、ヒンジ領域、CH2 領域、CH3 領域、C μ 3 領域

50

および $C\mu 4$ 領域以外の配列を含まないことが好ましい。それでも、たとえばヘキサヒスチジンタグなどの、他の配列を加えることが可能であるが、必要ではない。

【0097】

I I I . 融合の特性

上述のハイブリッド重鎖定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクの特性は、アイソタイプ、ならびに、 $CH1$ 領域、ヒンジ領域（存在する場合）、 $CH2$ 領域および $CH3$ 領域のサブタイプ、 $CH1$ 領域および / またはヒンジ領域が存在するか否か、ならびに、抗体または融合タンパクが結合する抗原の性質に部分的に依存する。

【0098】

ハイブリッド定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、少なくとも、1 倍または 10 2 倍のユニットを多量化してより多価にする $C\mu 3$ および $C\mu 4$ の能力、ならびに、 IgG 抗体または IgA 抗体の少なくとも 1 つの特性を保持する。 $CH1$ 、ヒンジ（存在する場合）、 $CH2$ および $CH3$ が IgG 起源であるとき、抗体は、少なくとも、プロテイン G への結合および pH 依存性 FcRn 結合という IgG 様の特性とともに、標的抗原に特異的に結合する能力を保持する。

【0099】

アイソタイプまたはサブタイプの選択は、所望の特性に依存する。非ハイブリッド抗体に関して、強いエフェクター機能が望まれる場合（癌細胞、病原体に対する場合が多い）は、 $IgG1$ または $IgG3$ が選択され、必要とされる CDC, ADC C およびオプソニン化がより弱い場合、またはこれらが必要とされない場合（メカニズムが受容体 - リガンド相互作用の阻害の場合にあるかも知れない）は、 $IgG2$ または $IgG4$ が選択される。
20

【0100】

$CH1$ 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、 $CH2$ 領域および $CH3$ 領域がヒト $IgG1$ であるときには、ハイブリッド定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、pH 依存性 FcRn 結合、プロテイン A およびプロテイン G への特異的結合を有し、結合した抗原に応じて、ADC C, CDC, オプソニン化などのエフェクター機能を有するかも知れない。このようなエフェクター機能は、通常、結合した抗原が表面受容体（たとえば、細胞またはウイルス上のもの）である場合に存在する。抗原が通常は可溶な形態である場合、エフェクター機能は、通常、可溶な抗原に対しては発現しないが、（たとえば、細胞表面上の）結合型の抗原を発現させることによって、証明することができる。
30

【0101】

$CH1$ 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、 $CH2$ 領域および $CH3$ 領域がヒト $IgG2$, $IgG4$ であるときには、ハイブリッド重鎖定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、少なくとも、pH 依存性 FcRn 結合、ならびに、プロテイン A およびプロテイン G への特異的結合を示す。ヒトの $IgG2$ アイソタイプおよび $IgG4$ アイソタイプは、一般に、CDC を欠く。 $IgG4$ は、結合抗原に対していくらかの ADC C およびオプソニン化を有するが、 $IgG1$ または $IgG3$ よりも弱い。
40

【0102】

$CH1$ 領域およびヒンジ領域（存在する場合）、ならびに、 $CH2$ 領域および $CH3$ 領域がヒト $IgG3$ であるときには、ハイブリッド重鎖定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、少なくとも、pH 依存性 FcRn 結合およびプロテイン G への特異的結合を示す。このような抗体または融合タンパクは、 $IgG1$ の場合と同様に、結合抗原が表面抗原であるか可溶であるかに応じて、ADC C, CDC、オプソニン化などのエフェクター機能も示すかも知れない。

【0103】

ADC C, CDC またはオプソニン化が存在するハイブリッド定常領域を有する抗体または融合タンパクにおいて、ADC C, CDC またはオプソニン化のレベルは、従来の IgG 定常領域を有し他の点では同等の抗体または融合タンパクのレベルと、（実験誤差の
50

範囲内で)同じであることもあり、それよりも高いこともある。

【0104】

I V . 抗体および融合タンパクの形式

ハイブリッド定常領域は、単一特異性抗体、融合タンパク、および多重特異性複合体に、組み込むことができる。単一特異性抗体の発現について、ハイブリッド重鎖定常領域は、重鎖可変領域に連結して、可変領域および定常領域を含む軽鎖で発現させることが可能である。重鎖および軽鎖は、重鎖および軽鎖の定常領域の C H 1 領域を介して互いに結合して、ヘテロ二量体を形成する。2つのヘテロ二量体は、次いで、従来の抗体の場合と同様に、重鎖の I g G 部分または I g A 部分のヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域の会合によって、対を成して、四量体ユニットを形成する。四量体ユニットは、それらの重鎖定常領域の C μ 部分の会合によって、さらに多量化することができる。重鎖定常領域は、異なる鎖の C μ 3 領域間のジスルフィド結合によって、および/または、異なる鎖のミニュー尾部間のジスルフィド結合によって、会合し得る。

10

【0105】

単一特異性单鎖抗体について、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、ペプチドスペーサーによって隔てられた同一鎖の一部として発現する(たとえば、U S 5, 2 6 0, 2 0 3, U S 5 8 6 9 2 0 3, U S 6, 2 9 1, 1 5 9 を参照)。ペプチドスペーサーの長さは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域が分子内で会合して、1つの重鎖可変領域と分子内で対を成した1つの軽鎖可変領域を含むユニットを形成するか、あるいは、分子間で会合して、各軽鎖可変領域が重鎖可変領域に分子間で結合した、2つの軽鎖可変領域および2つの重鎖可変領域の四量体型ユニットを形成するかを、決定する。どちらの場合も、ユニットは、重鎖可変領域に連結しているハイブリッド定常領域の C μ 部分を介して、多量化し得る。C μ 部分のジスルフィド結合を介する多量化は、少なくとも5つまたは6つのユニットを含む複合体を生じ得る。

20

【0106】

ハイブリッド定常領域は、キメラ抗体、ヒト化抗体、張り合わせ(veneer ed)抗体またはヒト抗体を含む、あらゆるタイプの改变抗体と共に使用することが可能である。その抗体は、モノクローナル抗体または遺伝子操作されたポリクローナル抗体調製物であり得る(U S 6, 9 8 6, 9 8 6 を参照)。

30

【0107】

融合タンパクについて、ハイブリッド定常領域は、異種ポリペプチドに連結して発現される。異種ポリペプチドは、定常領域のN末端において結合領域を提供し、単に結合領域と呼ばれることもある。I g G または I g A の C H 1 領域は、一般に、融合タンパクについては、定常領域に含まれない。I g G ヒンジ領域は、含まれても、含まれなくてもよい。いくつかの融合タンパクにおいて、ヒンジ領域の一部分および全部は、合成リンカーペプチドで置き換えられて、融合タンパクの結合部分とハイブリッド定常領域との間に可撓性をもたらす。

【0108】

融合タンパクの結合領域は、(とりわけ)今日までに生成されている他の融合タンパクで使用される結合部分の、いずれかのタイプである。結合領域の例は、細胞受容体の細胞外ドメインもしくはそれらのリガンド、またはカウンターレセプター(たとえば、T N F アルファ受容体、L F A 3 または I L - 1 受容体または T r a i l)である。

40

【0109】

抗体および融合タンパクの双方は、多重特異性形式で、つまり、異なる標的特異性内で抗体ユニットまたは融合タンパクユニットを含む複合体として、発現することが可能である。個々の特異性は、定常領域の C μ 部分の多量化を介して会合する。複合体中での異なる特異性の数は、たとえば、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 または 12 であり得る。異なる特異性のユニットの組み合わせは、2つのレベルで生じ得る。第1のレベルにおいては、二重特異性抗体またはヘテロ二量化融合タンパクにおけるように、2価の多量化ユニットが2つの結合特性を含み得る。組み合わせの第2のレベルにおいては、

50

異なる特異性の多量化ユニットが、C μ 媒介多量化を介して、互いに組み合わされ得る。このような多量化は、少なくとも、約5つまたは6つのユニットの複合体を生成する。

【0110】

特異性の組み合わせの2つのレベルが集合するとき、この方法は、同じ複合体内に、約10(五量体)または12(六量体)の特異性を組み合わせることを可能にする。多くの適用において、特異性のこの数は必要とされる数を超えるが、本発明は、より少ない数(たとえば、わずか2)の特異性が必要とされる適用において、利点をもたらす。特異性が組み合わされる第2のレベルのおかげで、形成される複合体が各所望の特異性のユニットを少なくとも1つ含むことが、統計的にはるかに確実になる。対照的に、二重特異性抗体を従来の方法で発現させると、多重特異性ユニットの形成は、単一特異性ユニットの形成と競合して、いくつかは二重特異性であるが、かなりの数が単一特異性である、不均一な抗体集団を生じることになる。

10

【0111】

多重特異性形式の抗体において、ユニットは、一般に、異なる重鎖可変領域を含む。軽鎖可変領域も、同様に異なり得る。しかし、異なる結合特異性を有し、同じ軽鎖可変領域を有する抗体を、(たとえば、ファージ提示を使用して)選択することも可能である。そのような抗体は、ユニットが、異なる重鎖可変領域を有しながら、同じ軽鎖可変領域を有する、多重特異性の形式で組み合わせることができる。

【0112】

多重特異性の抗体または融合タンパクは、標的(たとえば、癌細胞または病原体)上の抗原に対する結合特異性と、エフェクター細胞上の抗原(たとえば、T細胞上のCD3)に対する結合特異性とを含むことができる。そのような多重特異性複合体は、標的細胞とエフェクター細胞との間に架橋を形成して、エフェクター細胞の細胞毒性活性またはオプソニン化活性を、促進する。多重特異性の抗体または融合タンパクは、さらに、または代替的に、同一標的(たとえば、癌細胞または病原体)上の2つの異なる抗原に対する結合特異性を含むことができる。そのような抗体または融合タンパクは、標的細胞に対して、单一の抗原に対して特異性を有する抗体または融合タンパクよりも、大きな選択毒性を有し得る。他の多重特異性抗体または融合タンパクは、受容体およびそのリガンドまたはカウンターレセプターの双方に対する結合領域を含む。そのような抗体または融合タンパクは、受容体またはリガンド/カウンターレセプターのみに結合する抗体または融合タンパクよりも、大きい阻害を発揮し得る。これらのいずれ特異性も、同じ多重特異性複合体において他の特性と組み合わせることが可能である。

20

【0113】

V. 遺伝子操作および発現

ハイブリッド重鎖定常領域を含む抗体または融合タンパクは、組み換え発現によって產生される。ハイブリッド定常領域は、IgG部分またはIgA部分をコードするDNA区分を、C μ 部分をコードするDNA区分と融合させることによってなされる。好ましくは、IgG部分またはIgA部分のCH3エクソンの最後のアミノ酸が、C μ 3エクソンの最初のアミノ酸に、インフレームで融合される。ハイブリッド定常領域をコードする区分のN末端は、抗体の場合は重鎖可変領域、または、融合タンパクの場合は他の結合領域(たとえば、細胞表面受容体の細胞外領域)、であり得る結合領域をコードするDNA区分に、融合することができる。単一鎖抗体において、少なくとも軽鎖可変領域をコードするDNA構造物は、重鎖をコードする区分に、インフレームで融合することができる。これに代えて、軽鎖は、重鎖と同じベクター上の、または別のベクター上の、いずれかの異なる発現ユニットとして、別個に発現することができる。従来の抗体產生の場合と同様に、抗体鎖または融合タンパクをコードするDNA区分は、一般に、分泌を可能にするべく、シグナルペプチドをコードするDNA区分に、N末端にて機能可能に連結される。

30

【0114】

いくつかの構成要素をコードする構造物を構築する際の遺伝因子の融合を行う順序は、重要ではない。たとえば、重鎖可変領域をコードするDNA区分を、ハイブリッド定常領

40

50

域の Ig G 部分をコードする DNA に連結することが可能であり、その後、この Ig G 部分をコードする DNA を、 Ig M 部分をコードする DNA に連結することが可能であり、または、ハイブリッド定常領域をコードする区分を、まず、互いに連結することが可能である。これらの区分は、それぞれの区分をコードする重複するオリゴヌクレオチドを重複 PCR 型反応において結合することによって、同時に連結することもできる。実際には、ハイブリッド定常領域をコードする発現ベクターが一旦生成されると、そのハイブリッド定常領域をコードする DNA 区分を再生成することなく、重鎖可変領域または融合タンパクの場合は他の結合領域（および軽鎖可変領域）を挿入するために、同じベクターを使用することができる。

【 0115 】

10

哺乳類細胞が、本発明の抗体または融合タンパクをコードするヌクレオチド区分を発現するための、好ましいホストである (Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987) を参照)。無損傷の異種タンパクを分泌するいくつかの好適なホスト細胞株が、当技術分野で開発されており、それには、 CHO 細胞株、種々の COS 細胞株、ヒーラ細胞、 HEK293 細胞、 L 細胞、ならびに、 Sp2/0 および NS0 を含む抗体非產生骨髄腫が、含まれる。好ましくは、細胞は非ヒト細胞である。抗体を産生するために使用される細胞は、内生的に J 鎖を発現してもよいし、しなくてもよい。内生的 J 鎖が発現されない場合、または不十分なレベルで発現される場合、ホスト細胞は、遺伝子的に変更して J 鎖を発現させることが可能である（つまり、それをコードする構造物を導入することによる）。しかし、 J 鎖を発現しないホスト細胞を使用することも可能である。 J 鎖を有するまたは有しない細胞の選択は、生成される抗体または融合タンパクが有する結合価に影響する（たとえば、 J 鎖を有する五量体および有しない六量体）。好ましくは、本発明の抗体または融合タンパクは、モノクローナル細胞株から発現される。

20

【 0116 】

これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの、発現制御配列 (Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49 (1986))、リボソーム結合部位、 RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位などの、必要な処理情報部位、および、転写終結因子配列を含み得る。好ましい発現制御配列は、内在性遺伝子、サイトメガロウイルス、 SV40 、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスなどに由来するプロモーターである。 Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992) を参照。

30

【 0117 】

細胞には、発現すべき抗体または融合タンパクをコードする 1 つ以上のベクターが導入される。多重鎖抗体については、重鎖および軽鎖は、同じまたは別個のベクター上で発現され得る。多重特異性複合体の発現については、その複合体の構成要素（つまり、異なる抗体または融合タンパク）をコードする DNA は、同じまたは別個のベクター上に存在し得る。

【 0118 】

40

抗体または融合タンパク鎖は、発現され、処理されてシグナルペプチドを除かれ、組み立てられて、ホスト細胞から分泌される。多量化および J 鎖との会合は、少なくとも大部分、細胞内で生じ、したがって、抗体または融合タンパクは、そもそも、多量体として、特に、 5 つまたは 6 つのユニットがハイブリッド定常領域の C μ 部分を介して会合した多量体として、分泌されると考えられる。

【 0119 】

抗体または融合タンパクは、細胞培養物上清から、従来の抗体精製法によって、精製することができる。ハイブリッド定常領域が Ig G 部分を含む場合、精製は、親和性試薬としてプロテイン A またはプロテイン G を用いるクロマトグラフィー工程を含み得る。ハイブリッド定常領域が Ig A 部分を含む場合、ジャカリンレクチンアフィニティクロマトグラフィーを、代わりに使用することができる。イオン交換、ヒドロキシアパタイトクロマ

50

トグラフィー、またはHPLCなどの従来の抗体精製処理もまた、使用することが可能である（概して、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982) を参照）。

【0120】

V I . 標的

ハイブリッド定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、あらゆる標的に対して作製することが可能である。抗体または融合タンパクは、標的タンパクの凝集が所望の応答を誘導する表面結合標的タンパク（たとえば、細胞上またはウイルス上のもの）に、特に有用である。所望の応答は、たとえば、標的を担持する細胞またはウイルスの除去、受容体を通じてのシグナル伝達であり得、たとえば、アポトーシス、リガンドまたはカウンターレセプターへの受容体の結合の阻害、または、毒物に抱合した抗体または融合タンパクの内在化を含む。抗体または融合タンパクは、市販の抗体または融合タンパクと同じ標的に対して、作製することができ、または、市販の抗体または融合タンパクを誘導体化して、既存の定常領域が本発明のハイブリッド定常領域で置き換えられたものとすることができる。抗体または融合タンパクは、表面結合抗原に結合した標的リガンドに結合することによって、間接的に、表面結合抗原を凝集させることもできる。

【0121】

1つの可能な作用メカニズムを説明するために、本発明のハイブリッド重鎖定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーのメンバーに対して特異性を有するように生成される。このような受容体は、シグナル伝達のために三量化を必要とする。抗体は、多価（たとえば、五量体または六量体）であるので、腫瘍細胞の表面の抗原を多量化して、アポトーシスおよび/または腫瘍細胞の増殖停止を誘導することができる。癌を処理するこのような多価抗体の有効性は、マウス異種移植モデル、または、他の適当な癌の動物モデルにおいて検討することができる。

【0122】

他のメカニズムを説明するために、ハイブリッド重鎖定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、免疫細胞、たとえば、B細胞、T細胞、単球、好中球または樹状細胞、の表面に発現された抗原に対して特異性を有するように生成される。このような抗体は、免疫細胞の表面の抗原を多量化して、正常または異常のシグナル伝達をトリガーすることができる。これに代えて、このような抗体は、細胞表面抗原の内在化をトリガーすることができる。このような免疫細胞の機能は、抗原、細胞のタイプ、および、結合したエピトープに応じて増強または抑制され、免疫系の調節をもたらす。免疫不全を処理するこのような抗体の有効性は、免疫不全の適当なインビトロ系または動物モデルにおいて、検討することができる。

【0123】

他のメカニズムを説明するために、ハイブリッド重鎖定常領域を組み込んだ抗体または融合タンパクは、感染性細菌、イースト、真菌またはウイルスなどの、病原体によって発現される抗原に対して特異性を有するように生成される。抗体は、感染性微生物またはウイルスを無力化する（たとえば、ADCC、CDC、オプソニン化により、または、病原体と細胞受容体との相互作用を阻害することにより、または、抗体に付加した有毒部分の作用による）。感染性疾患を処理するこのような抗体の有効性は、感染のインビトロ系または動物モデルにおいて、検討することができる。

【0124】

興味深い標的には、癌細胞上の受容体、およびそのリガンドまたはカウンターレセプター（たとえば、CD3, CD20, CD22, CD30, CD34, CD40, CD44, CD52, CD70, CD79a, DR4, DR5, EGFR, CA-125/Muc-16, C1受容体, PEM抗原, gp72, EpCAM, Her-2, VEGFまたはVEGFR, ガングリオシド GD3, CEA, AFP, CTLA-4, アルファベータ3, HLA-DR10ベータ, SK-1）が含まれる。興味深い他の標的は、自己抗体または自己免疫疾患を媒介するT細胞サブセットである。興味深い他の標的は、

10

20

30

40

50

成長因子受容体（たとえば、FGFR, HGFR, PDGFR, EGFR, NGFR, およびVEGFR）ならびにそれらのリガンドである。他の標的は、Gタンパク受容体であり、これには、サブスタンスK受容体、アンジオテンシン受容体、およびアドレナリン受容体、セロトニン受容体、およびPAF受容体が含まれる。たとえば、Gilmann, Ann. Rev. Biochem. 56: 625-649 (1987) を参照。他の標的には、イオンチャンネル（たとえば、カルシウムチャンネル、ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル）、ムスカリン受容体、アセチルコリン受容体、GABA受容体、グルタミン酸受容体、および、ドーパミン受容体が含まれる（Harpold, U.S. Patent. No. 5,401,629 および U.S. Patent. No. 5,436,128 を参照）。他の標的は、インテグリン、セレクチン、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーなどの接着タンパクである（Springer, Nature 346: 425-433 (1990); Osborn, Cell 62: 3 (1990); Hynes, Cell 169: 11 (1992)）。他の標的は、インターロイキン IL-1 ないし今日までの約 IL-37、腫瘍壞死因子、インターフェロン、ならびに、腫瘍成長因子ベータ、コロニー刺激因子（CSF）、および、顆粒球单球コロニー刺激因子（GM-CSF）などの、サイトカインである。Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Aggrawal et al. eds., Blackwell Scientific, Boston, Mass. 1991) を参照。他の標的は、アミロイドベータ、アルファ-シヌクレインまたはプリオンペプチドなどのアミロイド生成性ペプチドである。他の標的は、ホルモン、酵素、ならびに、アデニルシクラーゼ、グアニルシクラーゼ、およびホスホリパーゼCなどの細胞内および細胞間の伝達物質である。標的分子は、ヒトの、哺乳類の、または細菌のものであり得る。他の標的は、タンパク、糖タンパク、ウイルスおよび細菌の両方の微生物病原体由来の炭水化物、ならびに腫瘍などの、抗原である。

【0125】

市販の抗体およびそれらの標的の例には、アレムツズマブ、CD52、リツキシマブ、CD20、トラスツズマブ Her/neu、ニモツズマブ、セツキシマブ、EGFR、ベバシズマブ、VEGF、パリビズマブ、RSV、アブシキシマブ、GpI Ig/I Ig a、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブ、ゴリムマブ TNF-アルファ、バシリキシマブ(baciliximab)、ダクリズマブ、IL-2、オマリズマブ、IgE、ゲムツズマブ、CD33、ナタリズマブ、VLA-4、ベドリズマブ、アルファ4ベータ7、ベリムマブ、BAFF、オテリキシズマブ(otelixizumab)、テプリズマブ CD3、オファツムマブ、オクレリズマブ CD20、エプラツズマブ CD22、アレムツズマブ(alemtuzumab) CD52、エクリズマブ C5、カナキヌマブ(canakinumab) IL-1ベータ、メポリズマブ IL-5、レスリズマブ、トリリズマブ IL-6R、ウステキヌマブ、ブリアキヌマブ IL-12、23 が含まれる。市販の融合タンパクの例には、TNF-アルファに結合するエタネルセプト、アレファセプト (CD2に結合するLFA3-Fc融合物)、BAFF および APRIL に結合するTACI-Fc融合物、アバタセプト (CD80 および CD86 に結合するCTLA-4-Fc)、および、ロミプロスチム (Fcに融合したトロンボポイエチンのペプチドアナログ) が含まれる。市販の抗体または融合タンパクのいずれも、変更して、既存の重鎖定常領域を、本発明のハイブリッド定常領域で置き換えることが可能である。これに代えて、ハイブリッド定常領域を、上記の市販の抗体または融合タンパクのいずれかと同じ標的特異性（たとえば、競合アッセイによって決定される）を有する他の抗体に、連結することもできる。

【0126】

VII. 免疫抱合体

抗体または融合タンパクは毒物と抱合することができる。毒物は、細胞毒性または細胞増殖抑制性であり得る。毒物のいくつかの例には、抗チューブリン剤、オーリスタチン、DNA小溝結合剤、DNA複製阻害剤、アルキル化剤（たとえば、シスプラチン、モノ（白金）、ビス（白金）および三核白金錯体、ならびに、カルボプラチンなどの白金錯体）

、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸拮抗剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、カンプトテシン、エトポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソウレア、プラチノール、プリフォーム化合物、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ビンカアルカロイドなどが含まれる。放射性コンジュゲート(radioconjugated)抗体の生成のための、種々の放射性核種が入手可能である。例には、²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹I-⁹⁰Yおよび¹⁸⁶Reが含まれる。抗体と毒物との抱合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPD_P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジブイミド酸ジメチルHClなど)、活性エステル(スペリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(2,6-ジイソシアネートなど)、および、ビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)などの、二官能性タンパクカップリング剤を用いて作製することができる。毒物は、リンカーを介して抗体に連結することも可能であり、そのリンカーは細胞内条件で開裂してもよい(US 2003-0083263, 2005-0238649および2005-0009751)。上記の毒物の多くは、細胞内に内在化されたとき、単に有効であるか、または最も有効である。本発明の抗体または融合タンパクは、細胞性受容体に結合することによって内在化することができる、たとえば、細胞性受容体の架橋は、内在化を促進し得る。

〔 0 1 2 7 〕

V III. 治療方法および医薬組成物

本発明の抗体または融合タンパクは、上述の市販の抗体が使用されてきた癌を含む癌の治療に使用することが可能である。この方法は、 固形腫瘍を治療するのに使用することができ、また、特に、白血病（たとえば、T細胞大顆粒リンパ球性白血病）、リンパ腫（ホジキンスもしくは非ホジキンス）、または、多発性骨髄腫などの、血液悪性疾患に使用することができる。 固形腫瘍には、皮膚（たとえば、黒色腫）、卵巣、子宮内膜、膀胱、乳房、直腸、結腸、胃、脾臓、肺、胸腺、腎臓および脳のものが含まれる。

【 0 1 2 8 】

本発明の抗体または融合タンパクは、上述の市販の抗体が使用されてきた免疫応答を含む、様々な好ましくない免疫応答を抑制するのにも使用することが可能である。

【 0 1 2 9 】

本発明の抗体または融合タンパクによって治療することが可能な免疫不全の1つの範疇は、移植拒絶反応である。同種異系細胞または器官（たとえば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、肺、脾臓、および骨髄）がホストに移植されたとき（すなわち、寄贈者と受贈者が、同じ種の異なる個体である）、ホストの免疫系は、移植中の外来抗原に対して免疫反応（移植片対宿主病）を起こし、移植された組織の破壊に至る。本発明の抗体は、とりわけ、受贈者におけるアロ抗原誘導免疫応答を阻止するのに有用である。

【 0 1 3 0 】

本発明の抗体または融合タンパクについての関連する使用は、「移植片対宿主」病（GVHD）に含まれる免疫応答を調節することにある。GVHDは、免疫適格細胞が、同種レシピエント(recipient)に移転されたときに生じる、致死の可能性のある疾患である。この状況において、ドナーの免疫担当細胞は、レシピエントの組織を攻撃するかも知れない。皮膚、腸上皮および肝臓の組織が、しばしば標的となり、GVHDの過程において破壊されるかも知れない。この疾患は、骨髄移植の場合など、免疫組織が移植されるときに、特に深刻な問題を示すが、心臓および肝臓の移植を含む他の場合には、より軽度のGVHDも報告されている。

【 0 1 3 1 】

免疫抑制が望まれるさらなる状況は、タイプ1糖尿病、クローム病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、スティフマン症候群、リウマチ性関節炎、重症筋無力症、およびエリテマト

ーデスなどの、自己免疫疾患の治療においてである。これらの疾患において、身体は、それ自体の抗原に対して細胞性および／またはホルモン性の免疫応答を示し、その抗原の破壊、および、可能性としては、深刻なおよび／または致死的な結果に至る。自己免疫疾患は、本発明の抗体または融合タンパクの1つを投与することで治療される。

【0132】

本発明の抗体または融合タンパクで治療可能な他の免疫疾患には、喘息、アレルギー、セリック病、乾癬、およびブドウ膜炎が含まれる。セリック病、乾癬およびブドウ膜炎は、自己免疫疾患である。

【0133】

抗体または融合タンパクは、また、ウイルス性、細菌性、原生動物性、または真菌性感染などの病原性感染症にも使用することができる。ウイルス性感染症のいくつかの例には、HIV、肝炎(A, BまたはC)、ヘルペスウイルス(たとえば、VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, CMV、およびエプスタイン・バール・ウイルス)、アデノウイルス、XMRV、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ムンブスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、MLV関連ウイルス、パピローマウイルス、伝染性軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルス、および、アルボウイルス脳炎ウイルスが含まれる。細菌性感染症のいくつかの例には、クラミジア、リケッチャ細菌、マイコバクテリウム、ブドウ球菌、連鎖球菌、ニウモノコッカス、髄膜炎菌、および、コノコッカス、クレブシエラ菌、プロテウス菌、セラチア菌、緑膿菌、レジオネラ菌、ジフテリア菌、サルモネラ菌、桿菌、コレラ菌、破傷風菌、ボツリヌス菌、炭疽菌、ペスト菌、レプトスピラ菌、ライム病原因菌、連鎖球菌、または、ナイセリア菌が含まれる。病原性真菌のいくつかの例には、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、ニューモシスティス、およびスタキボトリスが含まれる。原生動物の例には、クリプトスパリジウム、ランブル鞭毛虫、およびマラリア原虫が含まれる。

【0134】

抗体または融合タンパクは、発症を遅延し、重度を軽減し、さらなる悪化を阻止し、および／または、疾患の少なくとも1つの兆候または症状を改善する用量、投与経路、投与頻度を意味する有効な投与計画で実施される。患者が既に疾患を患っている場合、投与計画は、治療上有効な投与計画を指し得る。患者が、一般住民と比較して高い疾患の可能性を有するが、未だ症状を経験していない場合、投与計画は、予防上有効な投与計画を指し得る。いくつかの例において、治療上または予防上の有効性は、歴史的対照または同じ患者における過去の経験と比較して、個々の患者において観察され得る。他の例において、治療上または予防上の有効性は、非処理の対照集団と比較して、処理患者の集団での前臨床試験または臨床試験において実証することができる。

【0135】

抗体または融合タンパクの例示的用量は、固定用量として、0.01～20, 0.5～5, 0.01～1, 0.01～0.5もしくは0.05～0.5mg/体重kg(たとえば、0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4もしくは5mg/kg)、または、10～1500mgである。用量は、患者の状態、および、先の処理に対する応答(いくらかでもある場合)、処理が予防的であるか治療的であるか、疾患が急性であるか慢性であるか、その他の因子に依存する。

【0136】

投与は、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所的、鼻腔内、または筋肉内の経路であり得る。静脈内または皮下投与による、体循環への投与が好ましい。静脈内投与は、たとえば、30～90分の時間にわたる点滴で行うことができる。

【0137】

10

20

30

40

50

投与頻度は、血液循環における抗体または融合タンパクの半減期、患者の状態、投与経路、その他の因子に依存する。頻度は、患者の状態の変化または治療中の疾患の進行に応じて、毎日、毎週、毎月、毎四半期、または、不規則な間隔であり得る。静脈内投与の例示的な頻度は、治療理由が継続する期間にわたって毎週ないし毎四半期であるが、より高いまたは低い頻度も可能である。皮下投与については、例示的な頻度は、毎日から毎月であるが、より高いまたは低い頻度も可能である。

【0138】

投与される用量の数は、疾患が急性であるか慢性であるか、および、治療に対する疾患の反応に依存する。急性疾患、または、慢性疾患の急性憎悪については、1～10の用量で十分なことが多い。急性疾患または慢性疾患の急性憎悪については、随意的に分割した態様での単回ボーラス投与で、十分なこともある。急性疾患または急性憎悪の反復に対しては、治療を繰り返すことができる。慢性疾患については、抗体は、少なくとも1年、5年もしくは10年または患者の生涯にわたって、毎週、隔週、毎月、毎四半期、毎半年などの規則的な間隔で投与することができる。

10

【0139】

非経口投与の医薬組成物は、このましくは、無菌で実質的に等張であり、GMP条件で製造される。医薬組成物は、単位用量(つまり、単回投与のための用量)の形態で提供することができる。医薬組成物は、生理的に許容される媒体、希釈剤、賦形剤または助剤を用いて、製剤とすることが可能である。製剤は、選択される投与経路に依存する。たとえば、抗体は、水溶液で、好ましくは、ハンクス液、リンゲル液、生理食塩水、または酢酸緩衝液などの生理的に許容される緩衝液中で(注射部位の不快感低減のため)、製剤することができる。溶液は、懸濁剤、安定剤および/または分散剤などの製剤化剤を含有することができる。これに代えて、抗体は、滅菌した発熱性物質非含有水などの好適な媒体で使用前に調製するために、凍結乾燥の形態とすることもできる。

20

【0140】

本発明の抗体での治療は、治療中の疾患に対して有効な他の治療と組み合わせることが可能である。免疫異常の治療について、従来の治療には、肥満細胞脱顆粒阻害剤、副腎皮質ステロイド、非ステロイド性抗炎症剤、ならびに、アザチオプリン、シクロホスファミド、ロイケラン、FK506、および、シクロスボリンなどの、より強力な抗炎症剤が含まれる。Tysabri(登録商標)(ナタリズマブ)またはHumira(登録商標)(アダリムマブ)などの生物学的抗炎症剤も、使用することができる。癌の治療に使用するとき、本発明の抗体は、化学療法、放射線、幹細胞治療、手術、もしくは、HER2抗原に対するHerceptin(登録商標)(トラスツズマブ)、VEGFに対するAvastin(登録商標)(ベバシズマブ)、もしくは、Erbitux(登録商標)(セツキシマブ)およびVectibix(登録商標)(パニツムマブ)などのEGF受容体への抗体などの、生物製剤での治療と組み合わせることができる。化学療法剤には、クロランプシル、シクロホスファミド、または、メルファン、カルボプラチニン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、および、ミトキサントロン、メソトレキセート、フルダラビン、および、シタラビン、エトポシド、または、トポテカン、ビンクリスチン、および、ビンブラスチンが含まれる。感染について、治療は、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、または、抗原虫剤など、と組み合わせることができる。

30

【0141】

I X . 他の適用

抗体または融合タンパクは、臨床診断もしくは治療において、または研究において、それらの標的分子を検出するために使用することができる。たとえば、抗体は、治療に適する免疫媒介疾患を患者が患っていることの目安として、癌関連抗原を検出するために使用することができる。抗体は、また、標的および種々の刺激に対するそれらの応答の検出における研究室用の研究試薬として、販売することも可能である。そのような用途では、抗体または融合タンパクは、蛍光分子、スピナベル分子、酵素またはラジオアイソトープで標識することが可能であり、アッセイを行うために必要なすべての試薬を有するキット

40

50

の形態で、提供することができる。抗体または融合タンパクは、それらの標的抗原を、たとえば、アフィニティクロマトグラフィーによって、精製するために使用することができる。

【0142】

上記または下記で引用するすべての特許出願、ウェブサイト、他の出版物、受託番号などは、個々の各項目が、あらゆる目的のために参照によって全体が取り込まれると、具体的かつ個別に示されているのと同様に、あらゆる目的のために参照によって全体が取り込まれる。配列の異なるバージョンが異なる時点で受託番号に関連付けられている場合、本出願の有効出願日の受託番号に関連付けられたバージョンを意味する。有効出願日は、実際の出願日、または、該当する場合、受託番号に言及する優先出願の出願日の、早い方を意味する。同様に、出版、ウェブサイトなどの異なるバージョンが異なる時点で公開されている場合、そうでないと示されない限り、本出願の出願日における最新公開のバージョンを意味する。本発明の、あらゆる特徴、ステップ、要素、実施形態、または側面は、具体的にそうでないと示されない限り、他のいずれとも組み合わせて使用することが可能である。本発明を、明瞭化および理解のために、図面および例を用いてある程度詳しく説明したが、添付の特許請求の範囲内で、ある程度の変更および修正を実施してもよいことが、明らかであろう。

10

【実施例】

【0143】

実施例1：発現ベクター

20

本研究における遺伝子クローニング、突然変異生成、およびプラスミド構築は、標準的な生物学的手法を用いて行った。Sambrook and Russell (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), Kostelny et al. (Int. J. Cancer 93: 556-565, 2001), および Cole et al. (J. Immunol. 159: 3613-3621, 1997)を参照。これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0144】

マウス抗ヒトCD79aモノクローナル抗体9G6 (Ch9G6-IgG1) からキメラIgG1を生成するための哺乳類発現ベクターpCh9G6-IgG1 (図1)を、次の遺伝要素を含むように構築した。図1のpCh9G6-IgG1のSalI部位から時計回りに進んで、プラスミドは、抗体重鎖遺伝子の転写を開始する、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)主要最初期プロモーターおよびエンハンサー(図におけるCMV-P)で始まる重鎖転写ユニットを含む。CMVプロモーターに続いて、SpeI部位および HindIII部位が隣接するマウス抗ヒトCD79aモノクローナル抗体9G6の重鎖可変領域エクソン(9G6 VH)、介在するイントロン共に、CH1エクソン(CH1(1))、ヒンジエクソン(h(1))、CH2エクソン(CH2(1))およびCH3エクソン(CH3(1))を含むヒト-1重鎖定常領域を含むゲノム配列、ならびに、ヒト-1重鎖遺伝子のポリアデニル化部位が存在する。重鎖遺伝子配列の後には、CMVプロモーター(CMV-P)で始まる軽鎖転写ユニットがあり、これに続いて、NheI部位およびEcoRI部位が隣接するマウス抗ヒトCD79aモノクローナル抗体9G6の軽鎖可変領域エクソン(9G6 VL)、イントロンの一部が先行するヒトカッパー鎖定常領域エクソン(CL)を含むゲノム配列、ならびに、CLエクソンに続くヒトカッパー鎖遺伝子のポリアデニル化部位が存在する。その後、軽鎖遺伝子には、SV40早期プロモーター(SV40-P)、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシル転移遺伝子(gpt)、および、SV40ポリアデニル化部位(SV40-A)を含む区分が続く。最後に、プラスミドは、細菌起原の複製(pUC ori)およびラクタマーゼ遺伝子(lactamase)を含むプラスミドの一部pUC19を含む。図における矢印は、転写の方向を示す。

30

40

マウス抗ヒトCD79aモノクローナル抗体9G6 (Ch9G6-IgG1) からキメラIgG1を生成するための哺乳類発現ベクターpCh9G6-IgG1 (図1)を、次の遺伝要素を含むように構築した。図1のpCh9G6-IgG1のSalI部位から時計回りに進んで、プラスミドは、抗体重鎖遺伝子の転写を開始する、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)主要最初期プロモーターおよびエンハンサー(図におけるCMV-P)で始まる重鎖転写ユニットを含む。CMVプロモーターに続いて、SpeI部位および HindIII部位が隣接するマウス抗ヒトCD79aモノクローナル抗体9G6の重鎖可変領域エクソン(9G6 VH)、介在するイントロン共に、CH1エクソン(CH1(1))、ヒンジエクソン(h(1))、CH2エクソン(CH2(1))およびCH3エクソン(CH3(1))を含むヒト-1重鎖定常領域を含むゲノム配列、ならびに、ヒト-1重鎖遺伝子のポリアデニル化部位が存在する。重鎖遺伝子配列の後には、CMVプロモーター(CMV-P)で始まる軽鎖転写ユニットがあり、これに続いて、NheI部位およびEcoRI部位が隣接するマウス抗ヒトCD79aモノクローナル抗体9G6の軽鎖可変領域エクソン(9G6 VL)、イントロンの一部が先行するヒトカッパー鎖定常領域エクソン(CL)を含むゲノム配列、ならびに、CLエクソンに続くヒトカッパー鎖遺伝子のポリアデニル化部位が存在する。その後、軽鎖遺伝子には、SV40早期プロモーター(SV40-P)、大腸菌キサンチングアミニホスホリボシル転移遺伝子(gpt)、および、SV40ポリアデニル化部位(SV40-A)を含む区分が続く。最後に、プラスミドは、細菌起原の複製(pUC ori)およびラクタマーゼ遺伝子(lactamase)を含むプラスミドの一部pUC19を含む。図における矢印は、転写の方向を示す。

40

50

【0145】

抗ヒトCD79aモノクローナルIgG抗体9G6を産生するマウスハイブリドーマは、JN Biosciences (Mountain View, CA)にて、免疫原としての組み換えCD79aタンパク、およびそれに続く標準的なハイブリドーマ技術を用いて生成された。VH配列およびVL配列は、Tsurushita et al. (Methods 36: 69 - 83, 2005)に記載されているものなどの、標準的な実験手順で決定した。SpeI~HindIIIフラグメントにおける9G6 VH遺伝子は、コード化領域の3'端にスプライスドナーシグナルを含むエクソンとして、設計した。このシグナルペプチドを含み、pCh9G6-IgG1のVHエクソンによってコードされる9G6 VHのアミノ酸配列を、以下に示す。成熟9G6 VH配列は、配列番号1の位置20に始まる。 10

【0146】

9G6 VHのアミノ酸配列(配列番号1)：

MGWSRIFLFLLSITAGVHCQVQLQQSGPELVKPGASVKIS
CKASGYTFSTSWMNWVKQRPQGQGLEWIGRIYPGDDTNYN
GKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSVDSAVYFCERFYY
GNTFAMDYWGQGTSVTVSS。

【0147】

NheI-EcoRIフラグメントの9G6 VL遺伝子も、コード化領域の3'端にスプライスドナーシグナルを含むエクソンとして、設計した。このシグナルペプチドを含み、pCh9G6-IgG1のVLエクソンによってコードされる9G6 VLのアミノ酸配列を以下に示す。成熟9G6 VL配列は、配列番号2の位置20に始まる。 20

【0148】

9G6 VLのアミノ酸配列(配列番号2)：

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVLMTQIPLSLPVSLGDQASI
SCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLYQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPF
TFGSGTAKLEIKR。

【0149】

pCh9G6-IgG1にコードされる免疫グロブリン重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。 30

【0150】

pCh9G6-IgG1にコードされる重鎖定常領域(配列番号3)：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。 40

【0151】

pCh9G6-IgG1にコードされる免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

【0152】

pCh9G6-IgG1にコードされる軽鎖定常領域(配列番号4)：

TVAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSDKDSTYSLSSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C。 50

【0153】

発現ベクター pCh9G6 - IgG1 を変更して、ヒト μ 重鎖の CH3 領域および CH4 領域（それぞれ $C\mu 3$ および $C\mu 4$ ）をコードする cDNA 由来のフラグメントが、pCh9G6 - IgG1 のヒンジ領域の最後のアミノ酸にインフレームで融合するように、新たな発現ベクター pCh9G6 - IgG1 / M を構築した。 $C\mu 3$ および $C\mu 4$ のアミノ酸配列を以下に示す。

【0154】

ヒト μ 重鎖の $C\mu 3$ および $C\mu 4$ （配列番号 5）：

D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T K L T C L V T D L T T Y D S V T
I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A T F S A V G E A S I C E D D W N 10
S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R P K G V A L H R P D V Y L L P P
A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V Q W M Q R G Q P L S P E K
Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E E W N T G E T Y T C V V A
H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L V M S D T A G T C Y.

【0155】

ヒト - 1 重鎖の CH2 エクソンおよび CH3 エクソンは、pCh9G6 - IgG1 / M において削除した。pCh9G6 - IgG1 の軽鎖配列は、pCh9G6 - IgG1 / M において変更しなかった。pCh9G6 - IgG1 / M の模式的な構造を図 1 に示す。pCh9G6 - IgG1 / M にコードされる重鎖定常領域には、N 末端から C 末端に向かって、ヒトガンマ - 1 重鎖の CH1 領域およびヒンジ領域、ならびに、 $C\mu 3$ 領域および $C\mu 4$ 領域が含まれる。pCh9G6 - IgG1 / M にコードされる重鎖定常領域のアミノ酸配列を、以下に示す。

【0156】

pCh9G6 - IgG1 / M にコードされる重鎖定常領域（配列番号 6）：

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P D Q D T A I R 30
V F A I P P S F A S I F L T K S T K L T C L V T D L T T Y D S V T I S W T R Q N
G E A V K T H T N I S E S H P N A T F S A V G E A S I C E D D W N S G E R F T C
T V T H T D L P S P L K Q T I S R P K G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L
R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M
P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E E W N T G E T Y T C V V A H E A L P N R
V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L V M S D T A G T C Y.

【0157】

発現ベクター pCh9G6 - IgG1 もまた、 $C\mu 3$ および $C\mu 4$ のコード化領域が、pCh9G6 - IgG1 の CH3 エクソンの最後のアミノ酸にインフレームで融合するように、変更した。軽鎖配列は変更しなかった。得られたプラスミド pCh9G6 - MVIgG1 の模式的な構造を図 1 に示す。pCh9G6 - MVIgG1 にコードされる重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

【0158】

pCh9G6 - MVIgG1 にコードされる重鎖定常領域（配列番号 7）：

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T K L T C L V 50

T D L T T Y D S V T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A T F S A V G
 E A S I C E D D W N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R P K G V A L
 H R P D V Y L L P P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V Q W M
 Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E E W N
 T G E T Y T C V V A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L V M S
 D T A G T C Y。

【0159】

p C h 9 G 6 - I g G 1 , p C h 9 G 6 - I g G 1 / M および p C h 9 G 6 - M V I g
 G 1 から產生される单量体型の抗体（それぞれ、 C h 9 G 6 - I g G 1 , C h 9 G 6 - I
 g G 1 / M および C h 9 G 6 - M V I g G 1 ）の模式的な構造を、図2に示す。図中の記
 号「 C H 1 」、「ヒンジ」、「 C H 2 」および「 C H 3 」は、ヒトガンマ重鎖の C H 1 領
 域、ヒンジ領域、 C H 2 領域および C H 3 領域をそれぞれ示す。記号「 C μ 3 」および「
 C μ 4 」は、ヒト μ 重鎖の C H 3 領域および C H 4 領域をそれぞれ示す。記号「 C L 」は
 、ヒトカッパー定常領域を示す。

【0160】

実施例2：多価抗 C D 7 9 a I g G 1 抗体の発現、精製および特徴付け

発現ベクター p C h 9 G 6 - I g G 1 , p C h 9 G 6 - I g G 1 / M および p C h 9 G
 6 - M V I g G 1 を、マウス骨髄腫細胞株 N S 0 (European Collection
 of Animal Cell Cultures , Salisbury , Wiltshire , UK) に導入して、それぞれ C h 9 G 6 - I g G 1 抗体 , C h 9 G 6 - I g G
 1 / M 抗体および C h 9 G 6 - M V I g G 1 抗体を安定的に產生する細胞株を得た。 N S
 0 細胞を、 7 . 5 % C O₂ インキュベータにおいて、 37 にて、 10 % ウシ胎仔血清 (F B S ; H y C l o n e , Logan , UT) を含有する D M E 培地で培養した。 N S 0
 への安定導入を、 B e b b i n g t o n et al . (B i o / T e c h n o l o g y
 10 : 169 - 175 , 1992) に記載されているように、エレクトロポレーションによ
 って行った。導入に先立ち、各発現ベクターを、 F s p I を用いて直線化した。一般的
 な実験において、約 10⁷ 個の細胞に、 20 μ g の直線化プラスミドを形質移入し、 10
 % F B S を含有する D M E 培地に懸濁し、 96 ウエルプレートに播いた。 48 時間後、選
 択培地 (10 % F B S 、 H T 培地添加物 (S i g m a , S t . L o u i s , M O) 、 0 .
 25 m g / m l キサンチングルおよび 1 μ g / m l ミコフェノール酸を含有する D M E 培
 地) を適用した。選択開始の約 10 日後、形質転換体の培養上清を、抗体產生についてア
 ッセイした。

【0161】

抗体の発現を、サンドイッチ E L I S A によって測定した。一般的な実験において、 E
 L I S A プレートを、 100 μ l / ウエルの P B S (リン酸緩衝生理食塩水、 p H 7 . 4
) 中 1 / 2 , 000 希釈の、ヤギ抗ヒト I g G F c 鎖特異性ポリクローナル抗体 (C
 h 9 G 6 - I g G 1 および C h 9 G 6 - M V I g G 1 について) 、または、抗ヒト I g M
 F c μ 鎖特異性ポリクローナル抗体 (C h 9 G 6 - I g G 1 / M について) で、 4 にて一晩被覆し、洗浄緩衝液 (0 . 05 % T w e e n 20 含有 P B S) で洗浄し、ブロッ
 ク緩衝液 (2 % S k i m M i l k および 0 . 05 % T w e e n 20 含有 P B S) で、室
 温にて 0 . 5 時間ブロックした。洗浄緩衝液で洗浄後、 E L I S A 緩衝液 (1 % S k i m
 M i l k および 0 . 025 % T w e e n 20 含有 P B S) で適当に希釈した 100 μ l
 / ウエルの試験試料を、 E L I S A プレートに施した。適当なヒト I g G / 抗体または
 I g M / を標準として用いた。 E L I S A プレートを室温にて 1 時間インキュベートし
 、洗浄緩衝液で洗浄した後、結合した抗体を、 100 μ l / ウエルの E L I S A 緩衝液中 1
 / 2 , 000 希釈の H R P 抱合ヤギ抗ヒトカッパー鎖ポリクローナル抗体を用いて、検出
 した。室温にて 1 時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、 100 μ l / ウエル
 の A B T S 基質を添加することにより、発色現像を行った。 100 μ l / ウエルの 2 % シ
 ュウ酸を添加することにより、発色現像を停止した。 405 n m にて吸光度を測定した。

【0162】

10

20

30

40

50

Ch9G6-IgG1抗体、Ch9G6-IgG1/M抗体およびCh9G6-MV IgG1抗体の各々を産生するNS0安定形質転換体を、Hybridoma SFM (Invitrogen)を用いる無血清培地中の培養に付し、ローラーボトル中で約10⁶/mlの濃度まで培養し、1/10倍体積の60mg/mlの、SFM4MAb培地(HyClone)に溶解したUltrafiltered Soy Hydrolysate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)を与え、細胞生存率が50%未満になるまで、さらに培養した。遠心分離およびろ過の後、培養液上清を、Ch9G6-IgG1およびCh9G6-MV IgG1のために、プロテインAカラム(HiTrap MAB Select Sure, GE Healthcare, Piscataway, NJ)に載せた。カラムをPBSで洗浄した後、0.1Mグリシン-HCl (pH 3.0)で抗体を溶出した。Ch9G6-IgG1/Mは、ヒトガンマ-1重鎖のCH2領域およびCH3領域を欠いており、プロテインAに結合しないので、Ch9G6-IgG1/Mを産生するNS0安定形質転換体の培養液上清は、ヤギ抗ヒトIgMアガロースカラム(Sigma)に載せた。抗ヒトIgMアガロースカラムをPBSで洗浄した後、0.1Mグリシン-HCl (pH 2.5)で抗体を溶出した。溶出したすべての抗体の緩衝液を、1M Tris-HCl (pH 8)で中和し、次いで透析によってPBSに変えた。280nmでの吸光度を測定することによって、抗体濃度を決定した(1mg/ml = 1.4OD)。Ch9G6-IgG1, Ch9G6-IgG1/MおよびCh9G6-MV IgG1がヒトCD79aに特異的に結合することが確認された。

【0163】

精製したCh9G6-IgG1抗体、Ch9G6-IgG1/M抗体およびCh9G6-MV IgG1抗体の特徴を、SDS-PAGEにより、標準的な手順に従って明らかにした。還元条件下での分析は、各抗体が2つの鎖を含むことを示唆した。各鎖の分子量を、ゲル上で移動度を分子量マーカーの移動度と比較することによって、見積もった。Ch9G6-IgG1, Ch9G6-IgG1/MおよびCh9G6-MV IgG1に共通である軽鎖は、約26kDaの分子量を有すると見積もられた。重鎖は、Ch9G6-IgG1については54kDa、Ch9G6-IgG1/Mについては58kDa、Ch9G6-MV IgG1については76kDaであると見積もられた。軽鎖および重鎖の各々の見積もった分子量は、対応するアミノ酸配列に基づく予想分子量と一致した。

【0164】

Ch9G6-IgG1, Ch9G6-IgG1/MおよびCh9G6-MV IgG1の天然型での分子サイズを、球状タンパクの分離範囲が5kDa~5,000kDaであるSuperose 6 10/300 GLカラムを有する、AKTA Basic FPLCシステム(GE Healthcare, Indianapolis, IN)を用いるゲルろ過により分析した。溶出緩衝液にはPBSを使用した。図3C~図3Eに、Ch9G6-IgG1(図3C)、Ch9G6-IgG1/M(図3D)およびCh9G6-MV IgG1(図3E)の溶出パターンを示す。Ch9G6-IgG1およびCh9G6-MV IgG1については、それぞれ、溶出量16.7mlおよび9.9mlに、1つの主要なピークのみが観察され、一方、Ch9G6-IgG1/Mについては、2つの主要なピークと、いくつかの小さなピークが存在した。骨髄腫細胞株から精製したヒトモノクローナルIgM抗体(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)は、10.4mlに溶出した(図3B)。分子量標準物質(Gel Filtration Standard, BioRad, Hercules, CA)の溶出パターン(図3A)と比較することにより、溶出量11.7mlおよび14.8mlの2つの大きなピークにおけるCh9G6-IgG1/Mの分子量は、それぞれ、約800kDaおよび220kDaと見積もられた。主要なピークにおけるCh9G6-IgG1の分子量は、154kDaと見積もられ、これは、SDS-PAGE上でのその重鎖および軽鎖のサイズに基づく、Ch9G6-IgG1単量体の予測分子量(160kDa)に対応する。ヒトIgMが10.4mlに溶出したのに対して、Ch9G6-MV IgG1は9.9mlに溶出しており、これは、Ch9G6-MV IgG1がヒトIgMよりも僅かに大

10

20

30

40

50

きいことを示唆している。SDS-PAGE分析は、Ch9G6-MV IgG1の重鎖および軽鎖の分子量が、それぞれ、76kDaおよび26kDaであることを示唆しているので、Ch9G6-MV IgG1の単量体の分子量は約200kDaであると計算され、これは、ヒトIgMの単量体（概略180kDa）よりも僅かに大きい。骨髄腫細胞から精製したヒトIgMは、五量体として（または、おそらく六量体として）存在し易いので、したがって、NS0細胞から精製したCh9G6-MV IgG1もまた、天然型では五量体または六量体として存在すると結論付けられた。

【0165】

実施例3：多価抗CD79a IgG1抗体によるアポトーシス

ヒトバーキットリンパ腫細胞株ラモスは、膜結合IgM/ラムダ、CD79aおよびCD79bタンパクから成るB細胞受容体細胞表面に発現する（Ollila et al., Mol. Immunol. 44: 3537-3551, 2007; Reth, Annu. Rev. Immunol. 10: 97-121, 1992）。架橋によるB細胞受容体の多量化は、ラモス細胞のアポトーシスを誘導する（前記Ollila et al.）。

【0166】

ラモス細胞は、10%FBSを含有するDME媒質中で培養される。CD79aタンパクへの結合を介して細胞表面上のB細胞受容体を多量化して、アポトーシスを誘導するCh9G6-IgG1抗体およびCh9G6-MV IgG1抗体の能力を評価するために、各抗体を、1μg/mlの最終濃度で、3倍のラモス細胞とインキュベートした。Ch9G6-IgG1には、1μg/mlの濃度で、架橋のために、10μg/mlのヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体も加えた。アポトーシスの陽性対照として、1μg/mlヤギ抗ヒトラムダ軽鎖ポリクローナル抗体を、ラモス細胞とインキュベートした。7.5%CO₂インキュベータ中で3日間培養した後、細胞生存率を、alamarBlue（Invitrogen）で、製造者のプロトコルに従って測定した。

【0167】

試験抗体の存在下における吸光度値を試験抗体の非存在下における吸光度値に対して規格化することによって、パーセント細胞生存率を計算した。細胞なしでの吸光度値を背景として使用した。生存率は、ヤギ抗ヒトラムダ軽鎖ポリクローナル抗体について69%（図中「抗ラムダpAB」）、Ch9G6-IgG1について107%、Ch9G6-IgG1とヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体の混合物（図中「Ch9G6-IgG1+抗ヒトIgG」）について42%、Ch9G6-MV IgG1について53%であった。2価Ch9G6-IgG1は、ラモス細胞のアポトーシスを誘導しなかったが、架橋Ch9G6-IgG1は、アポトーシスを誘導することができた。Ch9G6-MV IgG1は、架橋Ch9G6-IgG1が誘導したのとほぼ同じ効率で、ラモス細胞のアポトーシスを誘導した。多価抗CD79a抗体として機能するCh9G6-MV IgG1は、細胞表面のB細胞受容体を多量化し、ラモス細胞のアポトーシスを誘導することができる（図4）。

【0168】

実施例4：新生児Fc受容体への多価IgG1抗体の結合

pH依存性の態様でFcRnに結合するCh9G6-IgG1抗体、Ch9G6-IgG1/M抗体およびCh9G6-MV IgG1抗体の能力を、細胞表面にヒトFcRnを発現するNS0細胞（NS0/FcRn細胞）を用いるフローサイトメトリーによって分析した。FcRn鎖および2-マイクログルブリンから成るヘテロ二量体である、ヒトFcRnを細胞表面に安定的に発現するNS0/FcRn形質転換体を、Hinton et al. (J. Biol. Chem. 279: 6213-6216 2004)に記載されている一般的手順に従って生成した。この文献は参照によって本明細書に組み込まれる。1次染色工程において、1μg/mlのCh9G6-IgG1, Ch9G6-IgG1/MおよびCh9G6-MV IgG1を、Hinton et al. (上記)に記載の手順に従って、個別に、pH6.0および7.5で、NS0/FcRn細胞とインキュベートした。2次染色工程において、PE標識ヤギポリクローナル抗ヒトガンマ鎖抗体

10

20

30

40

50

(Ch9G6-IgG1について、抗体対照なし)、または、PE標識ヤギポリクローナル抗ヒト μ 鎖抗体(Ch9G6-IgG1/M, Ch9G6-MV IgG1について、抗体対照なし)を用いて、FcRnに結合する抗体を検出した。図5に示すように、Ch9G6-IgG1およびCh9G6-MV IgG1は両方とも、pH6.0にて、FcRnに強く結合した。それらのFcRn結合は、pH7.5においてはpH6.0よりも有意に弱く、FcRnへのpH依存性結合を表し、これらの抗体が長い血清半減期を有することを示唆した。Ch9G6-IgG1/Mは、pH6.0および7.5の両方においてFcRnにほとんど結合せず、Ch9G6-IgG1/Mの血清半減期が短いことを示唆した。このことは、Ch9G6-IgG1/MがFcRnへの結合部位を欠くことと、合致している。

10

【0169】

実施例5：CD16への多価IgG1抗体の結合

細胞結合したIgG1抗体およびIgG3抗体のFc領域と、NK細胞の表面に発現したCD16分子(Fc受容体タイプIIとも呼ばれる)との相互作用は、ヒトにおける抗体結合した細胞に対するNK細胞による、抗体依存性細胞媒介細胞毒性(ADCC)をトリガーする(Hulett et al., Adv. Immunol. 57: 1-127, 1994)。CD16結合部位は、ヒトガンマ-1鎖およびヒトガンマ-3鎖のCH2領域にコードされる下ヒンジに存在する(Sarmay et al., Mol. Immunol. 29: 633-639, 1992)。

【0170】

ヒトCD16への多価IgG1抗体の結合を、フローサイトメトリーによって分析した。1次抗体結合工程にて、表面にヒトCD16を一時的に発現するHEK293細胞を、FACS緩衝液(0.5%ウシ血清アルブミンおよび0.025%ナトリウムアジド含有PBS)中の、1 μ g/mlのCh9G6-IgG1, Ch9G6-IgG1/M, Ch9G6-MV IgG1またはマウスモノクローナル抗ヒトCD16 IgG抗体3G8(BioLegend, San Diego, CA)と、氷上で30分インキュベートした。対照として、ヒトCD16を発現するHEK293細胞も、試験抗体なしでインキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、2次染色工程にて、細胞を、FACS緩衝液中の、フィコエリトリン(PE)標識ヤギポリクローナル抗ヒトガンマ重鎖抗体(Ch9G6-IgG1, Ch9G6-MV IgG1について、抗体対照なし)、PE標識ヤギポリクローナル抗ヒト μ 重鎖抗体(Ch9G6-IgG1/M, Ch9G6-MV IgG1について、抗体対照なし)、または、PE標識ヤギポリクローナル抗マウスガンマ重鎖抗体と、氷上で15分インキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、染色した細胞を、FACS緩衝液に懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

20

【0171】

マウス抗CD16抗体は、ヒトCD16を一次的に発現するHEK293細胞に、強く結合した(図6I)。Ch9G6-IgG1も、ヒトCD16への強い結合を示した(図6D)。Ch9G6-MV IgG1は、Ch9G6-IgG1よりもさらに強いヒトCD16への結合を示し(図6F)、ADCCを発揮する能力を示唆した。一方、Ch9G6-IgG1/Mは、PE標識ヤギ抗 μ 重鎖抗体で染色しただけの細胞と比べたとき(図6C)、ヒトCD16への僅かな結合を示すのみであった(図6E)。CD16へのCh9G6-IgG1/Mの見かけ上の弱い結合は、PE標識ヤギ抗 μ 重鎖抗体によるものではない。なぜならば、2次染色工程でPE標識ヤギ抗 μ 重鎖抗体を使用したときに、CD16へのCh9G6-MV IgG1の強い結合が観察された(図6G)からである。Ch9G6-IgG1/MがCD16に結合し得ないということは、ADCC活性がないということになり、Ch9G6-IgG1/Mがヒトガンマ-1重鎖のCH2領域およびCH3領域を欠いていることと、合致している。

30

【0172】

実施例6：多価抗CD30 IgG1抗体の生成、発現、精製および特徴付け

抗ヒトCD30モノクローナル抗体San11を產生するマウスハイブリドーマは、J

40

50

N Bioscienceにて、組み換えヒトCD30タンパクを免疫原として用い、標準的なハイブリドーマ手法に従って、単離された。San11 VH配列およびVL配列を、Tsurushita et al. (前記)に記載された方法などの標準的な実験手順で決定した。San11 VH配列を、シグナルペプチドを含めて、以下に示す。成熟天然San11 VHアミノ酸配列は、配列番号8の位置20に始まる。

【0173】

San11 VH(配列番号8) :

M K C S W V I F F L M A V V T G V N S E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S
C T A S G F N I K D T Y M H W V K Q R P E Q G L E W I G R I D P A N G D T I Y D
P N F Q G K A T I T A Y T S S N T A Y L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A R G Y Y 10
G S S Y W Y F D V W G A G T T V T V S S.

【0174】

San11 VLアミノ酸配列を、シグナルペプチドを含めて、以下に示す。成熟天然San11 VL配列は、配列番号9の位置21に始まる。

【0175】

San11 VL(配列番号9) :

M E S D T L L L W V L L L W V P G S T G D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
I S C R A S E S V E Y Y G T G L M Q W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y S A S N V E S
G V P A R F T G S G S G T D F S L N I H P V E E D D I A M Y F C Q Q S R K V P W
T F G G G T K L E I K R. 20

【0176】

哺乳類発現ベクターpChSan11-IgG1およびpChSan11-MVIgG1を、次の手順で構築した。まず、コード化領域の3'端のスプライスドナーシグナルを含み、SpeI部位およびHindIII部位に隣接するエクソンとして、San11 VH遺伝子を構築した。同様に、スプライスドナーシグナルを含み、NheI部位およびEcoRI部位に隣接するエクソンとして、San11 VL遺伝子を構築した。San11 VHエクソンを担持するSpeI~HindIIIフラグメント、および、San11 VLエクソンを担持するNheI~EcoRIフラグメントを、pCh9G6-IgG1の対応する部位に導入して、pChSan11-IgG1を生成した。同様に、San11 VHエクソンを担持するSpeI~HindIIIフラグメント、および、San11 VLエクソンを担持するNheI~EcoRIフラグメントを、pCh9G6-MVIgG1の対応する部位に導入して、pChSan11-MVIgG1を生成した。pChSan11-IgG1およびpChSan11-MVIgG1の全体構造は、pCh9G6-IgG1およびpCh9G6-MVIgG1の全体構造(図1)と、それぞれ同一であった。pChSan11-IgG1およびpChSan11-MVIgG1から産生される抗体(それぞれ、ChSan11-IgG1およびChSan11-MVIgG1)の模式的構造を図2に示す。

【0177】

ChSan11-IgG1およびChSan11-MVIgG1を産生するNS0安定形質転換体の生成を、実施例2に記載のように行った。プロテインAアフィニティクロマトグラフィーによるChSan11-IgG1およびChSan11-MVIgG1の精製を、実施例2に記載のように行った。還元条件下でのChSan11-IgG1およびChSan11-MVIgG1のSDS-PAGE分析は、各抗体が2つの鎖を含むことを示した。分子量マーカーと比較することによって、軽鎖の分子量は、ChSan11-IgG1およびChSan11-MVIgG1の双方について、25kDaであると見積もられた。重鎖の分子量は、ChSan11-IgG1について53kDa、ChSan11-MVIgG1について79kDaであると見積もられた。SDS-PAGEで観察された軽鎖および重鎖それぞれのサイズは、対応するアミノ酸配列に基づく予想サイズに合致していた。

【0178】

天然の Ch San 11 - Ig G 1 抗体および Ch San 11 - MV Ig G 1 抗体の分子サイズを、実施例 2 に記載のように、Superose 6 10 / 300 GL を用いるゲルろ過によって分析した。Ch San 11 - Ig G 1 抗体および Ch San 11 - MV Ig G 1 抗体の溶出パターンを図 7 に示す。Ch San 11 - Ig G 1 は、単一の主要なピークを、溶出量 15.7 ml に示した(図 7 C)。検量線を分子量標準物質(Gel 10 Filtration Standard, BioRad)の溶出パターン(図 7 A)と比較することにより、主要なピークにおける Ch San 11 - Ig G 1 の分子量は、約 150 kDa であると見積もられた。これは、SDS-PAGE での軽鎖および重鎖のサイズに基づく Ch San 11 - Ig G 1 単量体の予測分子量(156 kDa)に対応する。Ch San 11 - MV Ig G 1 は、単一の主要なピークを、溶出量 9.9 ml に示した(図 7 D)。ヒトモノクローナル Ig M 抗体(Jackson ImmunoResearch)は、同じ条件下で、10.4 ml に溶出した(図 7 B)。SDS-PAGE の結果に基づき概略 208 kDa という分子量を有している Ch San 11 - MV Ig G 1 が、ヒト Ig M の単量体(約 180 kDa)よりも僅かに大きいことを考慮すると、NS0 細胞から精製した Ch San 11 - MV Ig G 1 は、天然型において、五量体または六量体として存在すると結論付けられた。

【0179】

モノクローナル抗 CD30 Ig G 抗体とポリクローナル抗 Ig G 抗体との混合物での処理による、細胞表面の CD30 タンパクの架橋は、ヒト T 細胞リンパ腫細胞株 Karpas 299 (Wahl et al., Cancer Res. 62: 3736 - 3742, 2002) の細胞分裂停止を引き起こした。CD30 タンパクを架橋させる Ch San 11 - MV Ig G 1 の能力を調べるために、 2×10^5 個の Karpas 299 細胞を、96 ウェルプレートにおいて、(a) 2 μ g / ml の Ch San 11 - Ig G 1、(b) 2 μ g / ml の Ch San 11 - Ig G 1 と 10 μ g / ml のヤギ抗ヒト Ig G ポリクローナル抗体との混合物、または、(c) 2 μ g / ml の Ch San 11 - MV Ig G 1、の存在下で、10% FBS 含有の 0.2 ml の RPMI-1640 媒体中でインキュベートした(図 8)。5 日間のインキュベーションの後、Karpas 299 細胞を、テトラゾリウム塩 WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD) とインキュベートし、デヒドロゲナーゼ活性、したがつて細胞生存率の指標となる 450 nm での吸光度を測定した。試験抗体の存在下における吸光度値を、Karpas 299 細胞に結合しない対照 Ig G 抗体の存在下における吸光度値に対して規格化することによって、パーセント細胞生存率を計算した。細胞なしでの吸光度値を背景として使用した。Karpas 299 細胞の生存率は、Ch San 11 - Ig G 1 の存在下では 95%、Ch San 11 - Ig G 1 とヤギ抗ヒト Ig G ポリクローナル抗体との混合物(図中、「Ch San 11 - Ig G 1 (架橋)」)の存在下では 44%、Ch San 11 - MV Ig G 1 の存在下では 48% であった(図 8)。Ch San 11 - MV Ig G 1 は、ヤギ抗ヒト Ig G ポリクローナル抗体で架橋した Ch San 11 - Ig G 1 と同程度の効率で、Karpas 299 細胞の細胞分裂停止を誘導した。Ch San 11 - MV Ig G 1 は、したがって、多価抗体として機能し、細胞表面の CD 30 分子を架橋させて、Karpas 299 細胞の増殖停止を誘導する。

【0180】

実施例 7 : HEK 293 細胞における Ch San 11 - MV Ig G 1 の発現

Ig M は、たとえば、マウス骨髄腫細胞株 NS0 におけるように、J鎖が存在するとき五量体を形成し、一方、たとえば、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO におけるように、J鎖が存在しないときには、Ig M は六量体を形成する(Gilmour et al. Transfus. Med. 18: 167 - 174 2008)。J鎖がないときの構造を調べるために、Ch San 11 - MV Ig G 1 を、ヒト胚性腎臓細胞株 HEK 293 において発現させた。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、提供者のプロトコルに従って、pCh San 11 - MV Ig G 1 ベクターを HEK 293 細胞に一時的に導入した。一時的に導入された HEK 293 細胞の培養上清を

10

20

30

40

50

、実施例2に記載の手順に従って、Superose 6 ゲルろ過を用いて分画した。各0.5ml画分中のChSan11-MV IgG1の存在を、実施例2に記載のように、ELISAで監視した。図9に、各画分のChSan11-MV IgG1のレベルを示す。ChSan11-MV IgG1の最も高いELISAシグナルが、溶出量9.0mlに観察された。単量体型ChSan11-IgG1抗体が溶出する(図7C)、溶出量1.6ml付近の画分では、顕著なELISAシグナルは検出されなかった。ヒトモノクローナルIgM抗体は、同じ条件下で10.4mlに溶出したので、天然ChSan11-MV IgG1は、IgMよりも大きい。したがって、ChSan11-MV IgG1は、J鎖が存在しないとき、五量体または六量体で、あるいはおそらく六量体よりも大きく、產生されると結論付けられた。

10

【0181】

実施例8：多価キメラ抗DR5 IgG1抗体の生成、発現、精製および特徴付け

マウス抗ヒトDR5モノクローナル抗体のVH遺伝子のコード化領域を、シグナルペプチドコード化配列、スプライスドナーシグナル、ならびに、隣接SpeI部位およびHindIII部位を含むエクソンに変換した。同様に、マウス抗DR5モノクローナル抗体のVL遺伝子を、シグナルペプチドコード化配列、スプライスドナーシグナル、ならびに、隣接NheI部位およびEcoRI部位を含むエクソンに変換した。マウス抗DR5モノクローナル抗体の、VHエクソンを担持するSpeI～HindIIIフラグメントおよびVLエクソンを担持するNheI～EcoRIフラグメントを、pCh9G6-IgG1の対応する部位に導入して、pChADR5-IgG1を生成した。同様に、SpeI～HindIII VHフラグメントおよびNheI～EcoRI VLフラグメントをpCh9G6-MV IgG1に導入して、pChADR5-MV IgG1を生成した。pChADR5-IgG1およびpChADR5-MV IgG1の全体構造は、VH遺伝子およびVL遺伝子が異なることを除いて、pCh9G6-IgG1およびpCh9G6-MV IgG1の全体構造(図1)と、それぞれ同一である。pChADR5-IgG1およびpChADR5-MV IgG1から生成された抗体(それぞれ、ChADR5-IgG1およびChADR5-MV IgG1)の模式的構造を、図2に示す。

20

【0182】

ChADR5-IgG1およびChADR5-MV IgG1の各々を產生するNS0安定形質転換体の生成を、実施例2に記載のように行つた。プロテインAアフィニティクロマトグラフィーによるChADR5-IgG1およびChADR5-MV IgG1の精製を、実施例2に記載の方法で行つた。還元条件下でのChADR5-IgG1およびChADR5-MV IgG1のSDS-PAGE分析は、各抗体が、2つの鎖：2つの抗体に共通のサイズの軽鎖、および、抗体ごとに異なるサイズを有する重鎖、を含むことを示した。ゲル上での分子量マーカーの位置を比べることによって、共通軽鎖の分子量は、26kDaであると見積もられた。重鎖の分子量は、ChADR5-IgG1について51kDa、ChADR5-MV IgG1について75kDaであると見積もられた。

30

【0183】

天然のChADR5-IgG1抗体およびChADR5-MV IgG1抗体のサイズを、実施例2に記載のよう、Superose 6 10/300 GLカラムを用いるゲルろ過で分析した。それらの溶出パターンを図10A～図10Dに示す。ChADR5-IgG1は、単一の主要なピークを、溶出量15.9mlに示した(図10C)。分子量標準物質(Gel Filtration Standard, Bioread)の溶出パターン(図10A)と比較することにより、主要なピークにおけるChADR5-IgG1の分子量は、約150kDaと見積もられた。これは、ChADR5-IgG1の単量体の予測分子量に対応する。ChADR5-MV IgG1は、単一の主要なピークを、溶出量9.2mlに示した(図10D)。ヒト骨髄腫細胞(Jackson ImmunoResearch)から精製したヒトIgMモノクローナル抗体は、10.4mlに溶出したので(図10B)、ChADR5-MV IgG1の分子サイズは、ヒトIgMの分子サイズよりも僅かに大きい。ChADR5-MV IgG1の単量体が概略200kDaで

40

50

あり、ヒト IgM の単量体が約 180 kDa であることを考慮すると、ChADR5-MV IgG1 は、天然型において、五量体または六量体で存在すると結論付けられる。

【0184】

表面の DR5 分子の架橋は、ヒト T 細胞白血病細胞株 Jurkat のアポトーシスを誘導する (Guo et al., J. Biol. Chem. 280: 41940 - 41952, 2005)。アポトーシスを誘導する ChADR5-IgG1 および ChADR5-MV IgG1 の能力を、Jurkat 細胞とのインキュベーションにより見積もった。3 セットの試験抗体、(i) ChADR5-IgG1、(ii) 架橋用の 10 倍過剰のヤギ抗ヒトガンマ重鎖ポリクローナル抗体と混合した ChADR5-IgG1、および、(iii) ChADR5-MV IgG1、を 333 ng / ml を最終濃度として始まる 3 倍段階希釈の様々な濃度で加えた。細胞を、7.5% CO₂ インキュベータ中で、37° にて 1 日、96 ウエルプレートで培養した。WST-8 試薬 (Dojindo) を用いて、細胞生存率を測定した。試験抗体なしの Jurkat 細胞の吸光度値を 100% 生存率に用い、細胞なしの値を背景に用いた。結果を図 11 に示す。ChADR5-IgG1 は、アポトーシスを誘導する能力を示さなかった。10 倍過剰のヤギ抗ヒトガンマ重鎖ポリクローナル抗体で架橋した ChADR5-IgG1 (図中、「ChADR5-IgG1 (架橋)」) は、111 ng / ml にて 70% の細胞死を、4 ng / ml にて 20% の細胞死を示した。ChADR5-MV IgG1 は、より強いアポトーシス誘導能、333 ng / ml ~ 1.4 ng / ml での 90% 以上の細胞死を示した。ChADR5-MV IgG1 は、0.15 ng / ml にて 40% 近い細胞死を示した。このように、ChADR5-MV IgG1 は、多価抗体として機能し、細胞表面の DR5 分子を効率よく架橋させた。

【0185】

実施例 9：多価抗 CD79a IgG4 抗体の生成

pCh9G6-IgG1 におけるヒトガンマ-1 重鎖のゲノム CH1 領域、ヒンジ領域、CH2 領域および CH3 領域の配列を、ヒトガンマ-4 重鎖の CH1 領域、ヒンジ領域、CH2 領域および CH3 領域 (図中、それぞれ CH1 (4), h (4), CH2 (4) および CH3 (4)) (図 1) をコードする cDNA 由来フラグメントで置き換えることによって、キメラ抗 CD79a IgG4 モノクローナル抗体を発現するための pCh9G6-IgG4 ベクターを構築した。pCh9G6-IgG4 にコードされるガンマ-4 重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

【0186】

pCh9G6-IgG4 にコードされる重鎖定常領域 (配列番号 10) :

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
L S L S L G K.

【0187】

C μ 3 領域および C μ 4 領域 (配列番号 5) を、pCh9G6-IgG4 (図 1) の CH3 領域の最後のアミノ酸にインフレームで融合することによって、多価キメラ抗 CD79a IgG4 モノクローナル抗体を発現するための pCh9G6-MV IgG4 ベクターを構築した。pCh9G6-MV IgG4 にコードされる重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

【0188】

pCh9G6-MV IgG4 にコードされる重鎖定常領域 (配列番号 11) :

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S

10

20

30

40

50

WNSGALTSGVHTFP A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
 YTCNV D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V
 F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
 G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
 C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 L S L S L G K D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T K L T C L V T D L
 T T Y D S V T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A T F S A V G E A S
 I C E D D W N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R P K G V A L H R P 10
 D V Y L L P P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V Q W M Q R G
 Q P L S P E K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E E W N T G E
 T Y T C V V A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L V M S D T A
 G T C Y.

【0189】

Ch9G6 - MV IgG4を産生するNS0安定形質転換体の生成を、実施例2に記載のように行なった。プロテインAアフィニティクロマトグラフィーによるCh9G6 - MV IgG4の精製を、実施例2に記載の方法で行なった。還元条件下でのSDS-PAGE分析は、Ch9G6 - MV IgG4が約25kDaの軽鎖および約78kDaの重鎖を含むことを示した。 20

【0190】

天然Ch9G6 - MV IgG4の分子サイズを、実施例2に記載のように、Superose 6 10 / 300 GLカラムを用いるゲルろ過によって分析した。1つの大きいピーク(溶出量10.1ml)および1つの小さいピーク(溶出量14.1ml)が、Ch9G6 - MV IgG4の溶出パターンに観察された(図12)。BioRadの分子量標準物質(図12A)およびヒトIgM(10.4mlに溶出;図12B)と比較し、単量体型のCh9G6 - MV IgG4(~208kDa)およびIgM(~180kDa)の予想サイズを考慮することによって、10.1mlに溶出するCh9G6 - MV IgG4は、五量体または六量体であると結論付けられた。このような多量体型Ch9G6 - MV IgG4が、全精製抗体の83%を成した。 30

【0191】

実施例10：多価IgG3抗体の発現、精製および特徴付け

キメラ抗CD79a IgG3モノクローナル抗体およびその2つの誘導体を発現するために、3つのベクターを構築した。pCh9G6 - IgG1におけるヒトガンマ-1重鎖のゲノムCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域を担持するdIII~EagIフラグメントを、ヒトガンマ-3重鎖のゲノムCH1領域、第4ヒンジ領域、CH2領域およびCH3(~3) (図1)を担持する HindIII~EagIフラグメントで置き換えることによって、pCh9G6 - IgG3Dベクターを構築した。pCh9G6 - IgG3Dにおいて、第1、第2および第3のヒンジ領域のコード化配列は除外した。pCh9G6 - IgG3Dにコードされる重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。 40

【0192】

pCh9G6 - IgG3Dにコードされる重鎖定常領域(配列番号12)：
 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G G
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M 50

L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L H N R F T
Q K S L S L S P G K。

【0193】

ヒト μ 重鎖のC μ 3領域およびC μ 4領域(配列番号5)を、pCh9G6-IgG3D(図1)のヒンジ領域の最後のアミノ酸にインフレームで融合することによって、pCh9G6-IgG3D/Mを構築した。pCh9G6-IgG3D/Mにおいて、ヒトガンマ-3重鎖のCH2エクソンおよびCH3エクソンは除いた。N末端からC末端に向かって、ヒトガンマ-3重鎖のCH1領域および第4ヒンジ領域、ならびに、ヒト μ 重鎖のCH3領域およびCH4領域から成る、pCh9G6-IgG3D/Mにコードされる得られた重鎖定常領域は、Sorensen et al. (Int. Immunol. 12: 19-27 2000)により報告されているIgG-C μ 3-C μ 4重鎖定常領域と同一であった。pCh9G6-IgG3D/Mにコードされる重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

【0194】

pCh9G6-IgG3D/Mにコードされる重鎖定常領域(配列番号13):
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D T P P P C P R C P D Q D T A I R
V F A I P P S F A S I F L T K S T K L T C L V T D L T T Y D S V T I S W T R Q N
G E A V K T H T N I S E S H P N A T F S A V G E A S I C E D D W N S G E R F T C
T V T H T D L P S P L K Q T I S R P K G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L
R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M
P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E E W N T G E T Y T C V V A H E A L P N R
V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L V M S D T A G T C Y。

【0195】

ヒト μ 重鎖のC μ 3領域およびC μ 4領域(配列番号5)を、pCh9G6-IgG3D(図1)のヒトガンマ-3重鎖のCH3エクソンの最後のアミノ酸に、インフレームで融合することによって、pCh9G6-MV IgG3Dベクターを構築した。pCh9G6-MV IgG3Dにコードされる得られた重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

【0196】

pCh9G6-MV IgG3Dにコードされる重鎖定常領域(配列番号14):
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E A L H N R F T
Q K S L S L S P G K D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T K L T C L V
T D L T T Y D S V T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A T F S A V G
E A S I C E D D W N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R P K G V A L
H R P D V Y L L P P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D V F V Q W M
Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V S E E E W N
T G E T Y T C V V A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V S L V M S
D T A G T C Y。

【0197】

pCh9G6-IgG3D, pCh9G6-IgG3D/MおよびpCh9G6-MV IgG3Dから產生される抗体の单量体型の模式的構造(それぞれ、Ch9G6-IgG3D, Ch9G6-IgG3D/MおよびCh9G6-MV IgG3D)を図2に示す。

10

20

30

40

50

【0198】

C h 9 G 6 - I g G 3 D 抗体、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* 抗体および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* 抗体の各々を産生する*N S 0* 安定形質転換体の生成を、実施例 2 に概説したように行った。*C h 9 G 6 - I g G 3 D* 抗体、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* 抗体および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* 抗体を産生する*N S 0* 安定形質転換体を、*Hy b r i d o m a S F M* を用いる無血清媒体での増殖に適用し、実施例 2 に記載のようにローラーボトルに展開した。遠心分離およびろ過の後、*C h 9 G 6 - I g G 3 D* および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* について、培養上清をプロテイン G セファロースカラム (*G E H e a l t h c a r e*) に載せた。プロテイン G セファロースカラムを *P B S* で洗浄し、その後、0.1 M グリシン - *H C l* (pH 2.5) で抗体を溶出した。1 M *T r i s - H C l* (pH 8) で中和した後、溶出した抗体の緩衝液を透析によって *P B S* に変えた。 10

【0199】

C h 9 G 6 - I g G 3 D / M は、ヒトガンマ - 3 重鎖の *C H 2* 領域および *C H 3* 領域を欠いており、プロテイン G に結合しないので、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* を産生する*N S 0* 安定形質転換体の培養上清は、ヤギ抗ヒト *I g M* アガロースカラム (*S i g m a*) に載せた。抗ヒト *I g M* アガロースカラムを *P B S* で洗浄し、その後、0.1 M グリシン - *H C l* (pH 2.5) で抗体を溶出した。1 M *T r i s - H C l* (pH 8) で中和した後、溶出した抗体の緩衝液を透析によって *P B S* に変えた。

【0200】

精製した抗体を、*S D S - P A G E* により、標準的な手順に従って特徴付けた。還元条件下での分析は、*C h 9 G 6 - I g G 3 D* 抗体、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* 抗体および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* 抗体の各々が、2 つの鎖を含むことを示唆した。ゲル上で移動度を分子量マーカーの移動度と比較することによって、各鎖の分子量を見積もった。*C h 9 G 6 - I g G 3 D*、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* に共通の軽鎖は、約 25 kDa の分子量を有していた。重鎖の分子量は、*C h 9 G 6 - I g G 3 D* について 53 kD、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* について 60 kDa、*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* について 81 kDa であると見積もられた。軽鎖および重鎖の各々の見積もられたサイズは、対応するアミノ酸配列に基づいて予想されるサイズに合っていた。 20

【0201】

天然型の*C h 9 G 6 - I g G 3 D* 抗体、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* 抗体および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* 抗体のサイズを、実施例 2 に記載のように、*S u p e r o s e 6 10 / 300 G L* を有する *A K T A B a s i c F P L C* システムを用いるゲルろ過によって分析した。図 13 に、*C h 9 G 6 - I g G 3 D* (図 13 C)、*C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* (図 13 D) および*C h 9 G 6 - M V I g G 3 D* (図 13 E) の溶出パターンを示す。*C h 9 G 6 - I g G 3 D* について、単一の主要なピークが、溶出量 15.6 ml に観察された。*G e l F i l t r a t i o n S t a n d a r d* (*B i o R a d*) の溶出パターン (図 13 A) と比較することによって、主要なピークにおける *C h 9 G 6 - I g G 3 D* の分子量は、150 kDa と見積もられ、これは、*S D S - P A G E* 結果からの *C h 9 G 6 - I g G 3 D* の単量体の予測分子量に対応する。 30

【0202】

C h 9 G 6 - I g G 3 D / M では、4 つの大きなピークが観察された (図 13 D)。12.3 ml、15.0 ml および 16.1 ml に溶出した *C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* の分子量は、それぞれ、650 kDa、180 kDa および 90 kDa であると見積もられた。20.8 ml に溶出した第 4 の大きなピークのタンパクは、概略 2 kDa の分子量を有しており、抗 *I g M* アガロースカラムに結合しそれから溶出した *C h 9 G 6 - I g G 3 D / M* の分解物のようである。 40

【0203】

C h 9 G 6 - M V I g G 3 D では、単一の主要なピークが、溶出量 10.4 ml に観察された (図 13 E)。ヒト *I g M* も 10.4 ml に溶出した (図 13 B)。*S D S - P A* 50

G E の結果から見積もられた C h 9 G 6 - M V I g G 3 D (~ 2 0 0 k D a) および I g M (~ 1 8 0 k D a) の単量体のサイズを考慮して、 C h 9 G 6 - M V I g G 3 D は、天然型では五量体または六量体で產生されると結論付けられた。

【 0 2 0 4 】

実施例 1 1 : F c R n への多価 I g G 3 抗体の結合

p H 依存性の態様で F c R n に結合する C h 9 G 6 - I g G 3 D 抗体、 C h 9 G 6 - I g G 3 D / M 抗体および C h 9 G 6 - M V I g G 3 D 抗体の能力を、細胞表面にヒト F c R n を発現する N S 0 細胞 (N S 0 / F c R n 細胞) を用いるフローサイトメトリーによって分析した。1 次染色工程において、 1 μ g / m l での C h 9 G 6 - I g G 3 D , C h 9 G 6 - I g G 3 D / M および C h 9 G 6 - M V I g G 3 D を、個別に、実施例 4 に記載のように、 p H 6 . 0 および 7 . 5 にて、 N S 0 / F c R n 細胞とインキュベートした。2 次染色工程において、 P E 標識ヤギポリクローナル抗ヒトガンマ鎖抗体 (C h 9 G 6 - I g G 3 D について、抗体対照なし) 、または、 P E 標識ヤギポリクローナル抗ヒト μ 鎖抗体 (C h 9 G 6 - I g G 3 D / M , C h 9 G 6 - M V I g G 3 D について、抗体対照なし) を用いて、 F c R n に結合する抗体を検出した。図 1 4 に示すように、 C h 9 G 6 - I g G 3 D は、 p H 6 . 0 においては F c R n に強く結合し、 p H 7 . 5 では弱く結合しただけであった。同様に、 C h 9 G 6 - M V I g G 3 D は、 p H 6 . 0 にて F c R n に強く結合した。 C h 9 G 6 - M V I g G 1 の F c R n 結合は、 p H 6 . 0 では p H 7 . 5 よりもはるかに強かった。したがって、 C h 9 G 6 - I g G 3 D および C h 9 G 6 - M V I g G 3 D の両者は、 p H 依存性の態様で F c R n に結合し、これらの抗体が長い血清半減期を有することを示唆している。 C h 9 G 6 - I g G 3 D / M は、 p H 6 . 0 または 7 . 5 において、 F c R n への顕著な結合を示さず、 C h 9 G 6 - I g G 3 D / M の短い血清半減期を示唆している。このことは、 C h 9 G 6 - I g G 3 D / M が F C R n への結合部位を欠いていることと合致している。
10 20

【 0 2 0 5 】

実施例 1 2 : C D 1 6 への多価 I g G 3 抗体の結合

ヒト C D 1 6 への多価 I g G 3 抗体の結合を、フローサイトメトリーによって分析した。表面にヒト C D 1 6 を一時的に発現する H E K 2 9 3 細胞を、 F A C S 緩衝液 (0 . 5 % ウシ血清アルブミンおよび 0 . 0 2 5 % ナトリウムアジドを含有する P B S) 中で、 1 μ g / m l の C h 9 G 6 - I g G 3 D , C h 9 G 6 - I g G 3 D / M または C h 9 G 6 - M V I g G 3 D と、氷上で 3 0 分インキュベートした。対照として、ヒト C D 1 6 を発現する H E K 2 9 3 細胞も、試験抗体なしでインキュベートした。 F A C S 緩衝液で洗浄した後、2 次染色工程において、細胞を、 P E 標識ヤギポリクローナル抗ヒトガンマ重鎖抗体 (C h 9 G 6 - I g G 3 D , C h 9 G 6 - M V I g G 3 D について、抗体対照なし) 、または、 P E 標識ヤギポリクローナル抗ヒト μ 重鎖抗体 (C h 9 G 6 - I g G 3 D / M , C h 9 G 6 - M V I g G 3 D について、抗体対照なし) と、氷上で 1 5 分インキュベートした。 F A C S 緩衝液で洗浄した後、染色細胞をフローサイトメトリーにより分析した。
30

【 0 2 0 6 】

C h 9 G 6 - I g G 3 D は、 C D 1 6 に強い結合を示した (図 1 5 D) 。 C h 9 G 6 - M V I g G 1 は、 C h 9 G 6 - I g G 3 D よりもさらに強い C D 1 6 結合を示し (図 1 5 F) 、 A D C C を発揮する能力を示唆している。一方、 C h 9 G 6 - I g G 1 / M は、 P E 標識ヤギ抗 μ 重鎖抗体のみで染色した細胞に比べて (図 1 5 C) 、ヒト C D 1 6 への非常に弱い結合を示し (図 1 5 E) 、 C h 9 G 6 - I g G 1 / M が A D C C 活性を有しないことを示唆している。 P E 標識ヤギ抗 μ 重鎖抗体を 2 次染色工程で使用したときに、 C h 9 G 6 - M V I g G 3 D の強い C D 1 6 結合が観察されたので (図 1 5 G) 、 C D 1 6 への C h 9 G 6 - I g G 3 D / M の顕著な結合は、 P E 標識 2 次抗体の違いによるものではない。 C h 9 G 6 - I g G 3 D / M が C D 1 6 に結合し得ないことは、 C h 9 G 6 - I g G 3 D / M が、ヒトガンマ - 3 重鎖の C H 2 領域および C H 3 領域を欠くことと合致している。
40

【 0 2 0 7 】

多価 Ig G 2 抗体を生成するために、ヒトガンマ - 2 重鎖の CH 3 エクソンの最後のアミノ酸を、ヒト μ 重鎖の CH 3 領域および CH 4 領域に、インフレームで融合した。得られた重鎖は、N 末端から C 末端に向かって、(i) ヒトガンマ - 2 重鎖の CH 1 領域、ヒンジ領域、CH 2 領域および CH 3 領域、ならびに、その後の (ii) ヒト μ 重鎖の CH 3 領域および CH 4 領域、から成る。得られた多価 Ig G 2 抗体を、NS0 細胞、CHO 細胞または HEK 293 細胞などの哺乳類細胞で発現させ、プロテイン A アフィニティカラムを使用して使用済培養上清から精製し、ゲルろ過および SDS - PAGE で特徴付けた。

【0208】

実施例 13：多価 Ig G 2 抗体

10

多価 Ig G 2 抗体を生成するために、ヒトガンマ - 2 重鎖の CH 3 エクソンの最後のアミノ酸を、ヒト μ 重鎖の C μ 3 領域および C μ 4 領域に、インフレームで融合した。得られた重鎖は、N 末端から C 末端に向かって、(i) ヒトガンマ - 2 重鎖の CH 1 領域、ヒンジ領域、CH 2 領域および CH 3 領域、ならびに、その後の (ii) ヒト μ 重鎖の C μ 3 領域および C μ 4 領域、から成る。得られた多価 Ig G 2 抗体を、NS0 細胞、CHO 細胞または HEK 293 細胞などの哺乳類細胞で発現させ、プロテイン A アフィニティカラムを使用して使用済培養上清から精製し、ゲルろ過および SDS - PAGE で特徴付けた。

【0209】

実施例 14：多価 Ig A 抗体

20

多価 Ig A 抗体を生成するために、ヒトアルファ - 1 またはアルファ - 2 重鎖の CH 3 エクソンの最後のアミノ酸を、ヒト μ 重鎖の CH 3 領域および CH 4 領域に、インフレームで融合した。得られた重鎖は、N 末端から C 末端に向かって、(i) ヒトアルファ - 1 またはアルファ - 2 重鎖の CH 1 領域、CH 2 領域および CH 3 領域、ならびに、その後の (ii) ヒト μ 重鎖の C μ 3 領域および C μ 4 領域、から成る。得られた多価 Ig A 抗体を、NS0 細胞、CHO 細胞または HEK 293 細胞などの哺乳類細胞で発現させ、J acalin レクチンカラムまたは他の標準的な手順を使用して培養上清から精製し、ゲルろ過および SDS - PAGE で特徴付けた。

【0210】

実施例 15：多価 Fc 融合タンパク

30

本研究において多価 Ig G 抗体を生成するために発明された技術は、また、多価 Fc 融合タンパクを生成することにも適用可能である。たとえば、pCh9G6 - MV Ig G 1 ベクターを、(i) VH エクソンおよび CH 1 エクソンを除去し、(ii) シグナルペプチドおよびヒト TRAIL の細胞外領域 (TRAIL EC) をコードする cDNA 由来フラグメントを、ヒンジエクソンの最初のアミノ酸にインフレームで融合し、(iii) 軽鎖転写ユニットを除去する、などの方法で変更した。Thr - Gly - Gly - Gly などの可撓性のポリペプチドリンカーを、TRAIL とヒンジ領域との間に入れてもよい。得られた Fc 融合タンパク (TRAIL - MVFc) は、N 末端から C 末端に向かって、(i) TRAIL EC、(ii) ヒトガンマ - 1 重鎖のヒンジ領域、CH 2 領域および CH 3 領域、ならびに、その後の (iii) ヒト μ 重鎖の C μ 3 領域および C μ 4 領域、から成る。このような Fc 融合タンパクは、哺乳類細胞において五量体または六量体として産生される。DR 4 または DR 5 を発現する細胞のアポトーシスを誘導するこのような多量体型 Fc 融合タンパクの生物活性は、標準的な手順で分析される。

40

【0211】

実施例 16：多重特異性 Fc 融合タンパク

多価 Fc 融合タンパクを生産するための技術は、さらに、多重特異性 Fc 融合タンパクの生成にも適用可能である。たとえば、3 つの異なる Fc 融合タンパクを発現させるために、3 つのベクターを構築する。最初の発現ベクターは、ヒトガンマ - 1 重鎖のヒンジ領域、CH 2 領域および CH 3 領域に融合したヒト TNF 受容体タイプ II の細胞外領域 (TNFR - II EC) をコードし、これを、さらに、ヒト μ 重鎖の C μ 3 領域および C

50

μ 4 領域に融合する (TNFR-II-MVFc)。第2のベクターは、ヒトガンマ-1重鎖のヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域に融合したヒトLFA-3の細胞外領域をコードし、これを、さらに、ヒト μ 重鎖のC μ 3領域およびC μ 4領域に融合する (LFA-3-MVFc)。第3のベクターは、ヒトガンマ-1重鎖のヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域に融合したヒトIL-1受容体の細胞外領域をコードし、これを、さらに、ヒト μ 重鎖のC μ 3領域およびC μ 4領域に融合する (IL-1R-MVFc)。TNFR-II-MVFc, LFA-3-MVFc および IL-1R-MVFc を、同時に発現させて、TNF、CD2 (LFA-3の受容体) および IL-3 に結合することが可能な、多価Fc融合タンパクを生成する。炎症性疾患を治療するためのこのような多重特異性多価Fc融合タンパクの有効性は、標準的な方法を用いて研究される。

10

【0212】

実施例17：IgG抗体およびFc融合タンパクから成る多価タンパク

多価IgG抗体およびFc融合タンパクを生産するための技術は、また、IgG抗体およびFc融合タンパクの双方から成る多価タンパクの生成にも適用可能である。たとえば、2つの発現ベクター：(i) 多価抗DR5 IgG抗体の産生のための発現ベクター、および、(ii) 多価TRA1L-Fc融合タンパクの産生のための発現ベクター、を哺乳類細胞に同時導入する。発現した多量化タンパクは、抗DR5 IgG抗体およびTRA1L-Fc融合タンパクの双方から成る。DR4媒介およびDR5媒介のアポトーシスを誘導するこのようなタンパクの生物活性は、標準的な手順によって分析される。

【0213】

20

実施例18：二重特異性多価抗体

それぞれヒトCD79aおよびCD30に結合する多価IgG1抗体を発現するベクター、pCh9G6-MV IgG1およびpChSan11-MV IgG1を、個別にまたは共に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、提供者のプロトコルに従って、HEK293細胞に導入した。次いで、HEK293細胞を、7.5%CO₂インキュベータにおいて、10%FBS含有DME培地で、37にて4日間インキュベートした。培養上清に一時的に発現した抗体の抗原結合を、次の2つの形式のELISAで試験した。

【0214】

30

第1の形式のELISAでは、マイクロタイタープレートのウェルを、C末端にてヒト1鎖のFc領域 (CD30-Fc；配列番号37) に融合した組み換えヒトCD30細胞外領域で被覆した。ウェルをプロック緩衝液でプロックした後、適当に希釈したHEK293細胞の培養上清をウェルに加え、4にて一夜インキュベートした。ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した後、ELISA緩衝液中の、C末端にてヒト2定常領域に融合した組み換えヒトCD79a細胞外領域 (CD79a-C；配列番号38) を、ウェルに加えた。CD79a-Cにおいては、ヒト2定常領域におけるカルボキシル末端から2番目の位置のシステイン残基を、セリン残基に変更した。ELISAプレートを室温にて1時間インキュベートし、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した後、結合したCD79a-Cを、HRP抱合ヤギ抗ヒト鎖ポリクローナル抗体によって検出した。ABTS基質を加えることによって発色現像を開始し、2%シュウ酸で停止した。405nmにて吸光度を測定した。

40

【0215】

pCh9G6-MV IgG1またはpChSan11-MV IgG1のいずれかを導入したHEK293細胞の培養上清は、非導入HEK293細胞の培養上清と比べたとき、この第1の形式のELISAにおいて、シグナルを示さなかった。pCh9G6-MV IgG1およびpChSan11-MV IgG1をHEK293細胞に導入したとき、培養上清は、この形式のELISAにおいて強いシグナルを示し、溶液中のCD79a-CおよびELISAプレート上に被覆したCD30-Fcの双方に結合し得る、二重特異性抗体の存在を示唆している。

【0216】

50

第2の形式のELISAでは、マイクロタイプレートのウェルを、C末端にてヒト1鎖のFc領域に融合した組み換えヒトCD79a細胞外領域(CD79a-Fc;配列番号39)で被覆した。ウェルをブロック緩衝液でブロックした後、適当に希釈したHEK293細胞の培養上清をウェルに加え、4にて一夜インキュベートした。ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した後、ELISA緩衝液中の、C末端にてヒト2定常領域に融合した組み換えヒトCD30細胞外領域(CD30-C;配列番号40)を、ウェルに加えた。CD30-Cにおいては、ヒト2定常領域におけるカルボキシル末端から2番目の位置のシステイン残基を、セリン残基に変更した。ELISAプレートを室温にて1時間インキュベートし、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄した後、結合したCD30-Cを、HRP抱合ヤギ抗ヒト鎖ポリクローナル抗体によって検出した。ABTS基質を加えることによって発色現像を開始し、2%シュウ酸で停止した。405nmにて吸光度を測定した。
10

【0217】

pCh9G6-MV IgG1またはpChSan11-MV IgG1のいずれかを導入したHEK293細胞の培養上清は、非導入HEK293細胞の培養上清と比べたとき、この第2の形式のELISAにおいて、シグナルを示さなかった。一方、pCh9G6-MV IgG1およびpChSan11-MV IgG1を導入したHEK293細胞の培養上清は、第2の形式のELISAにおいて強いシグナルを示し、CD79aおよびCD30の双方に結合し得る、二重特異性抗体の存在を裏付けている。
20

【0218】

C末端にてヒトガンマ-1鎖のFc領域に融合した組み換えヒトCD30細胞外領域(CD30-Fc)のアミノ酸配列は、次のとおりである：

F P Q D R P F E D T C H G N P S H Y Y D K A V R R C C Y R C P M G L F P T Q Q C
P Q R P T D C R K Q C E P D Y Y L D E A D R C T A C V T C S R D D L V E K T P C
A W N S S R V C E C R P G M F C S T S A V N S C A R C F F H S V C P A G M I V K
F P G T A Q K N T V C E P A S P G V S P A C A S P E N C K E P S S G T I P Q A K
P T P V S P A T S S A S T M P V R G G T R L A Q E A A S K L T R A P D S P S S V
G R P S S D P G L S P T Q P C P E G S G D C R K Q C E P D Y Y L D E A G R C T A
C V S C S R D D L V E K T P C A W N S S R T C E C R P G M I C A T S A T N S C A
R C V P Y P I C A A E T V T K P Q D M A E K D T T F E A P P L G T Q P D C N P T
P E N G E A P A S T S P T Q S L L V D S Q A S K T L P I P T S A P V A L S S T G
K P V L D T G G G E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L L G G P S V F L F P P K
P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N
A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K
A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L
Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
K(配列番号37)。
30

【0219】

C末端にてヒト2定常領域に融合した組み換えCD79a細胞外領域(CD79a-C)のアミノ酸配列は、次のとおりである：

A L W M H K V P A S L M V S L G E D A H F Q C P H N S S N N A N V T W W R V L H
G N Y T W P P E F L G P G E D P N G T L I I Q N V N K S H G G I Y V C R V Q E G
N E S Y Q Q S C G T Y L R V R Q P P P R P F L D M G E G T K N R T G G G G Q P K
A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A
D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S
Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E S S(配列番号38)。
40

【0220】

C末端にてヒトガンマ-1鎖のFc領域に融合した組み換えヒトCD79a細胞外領域(CD79a-Fc)のアミノ酸配列は、次のとおりである：

10

20

30

40

50

A L W M H K V P A S L M V S L G E D A H F Q C P H N S S N N A N V T W W R V L H
 G N Y T W P P E F L G P G E D P N G T L I I Q N V N K S H G G I Y V C R V Q E G
 N E S Y Q Q S C G T Y L R V R Q P P P R P F L D M G E G T K N R T G G G E P K S
 C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V
 T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 39)。

【0221】

10

C末端にてヒト 2 定常領域に融合した組み換えヒトCD30細胞外領域 (CD30-C) のアミノ酸配列は、次のとおりである：

F P Q D R P F E D T C H G N P S H Y Y D K A V R R C C Y R C P M G L F P T Q Q C
 P Q R P T D C R K Q C E P D Y Y L D E A D R C T A C V T C S R D D L V E K T P C
 A W N S S R V C E C R P G M F C S T S A V N S C A R C F F H S V C P A G M I V K
 F P G T A Q K N T V C E P A S P G V S P A C A S P E N C K E P S S G T I P Q A K
 P T P V S P A T S S A S T M P V R G G T R L A Q E A A S K L T R A P D S P S S V
 G R P S S D P G L S P T Q P C P E G S G D C R K Q C E P D Y Y L D E A G R C T A
 C V S C S R D D L V E K T P C A W N S S R T C E C R P G M I C A T S A T N S C A
 R C V P Y P I C A A E T V T K P Q D M A E K D T T F E A P P L G T Q P D C N P T
 P E N G E A P A S T S P T Q S L L V D S Q A S K T L P I P T S A P V A L S S T G
 K P V L D T G G G G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S
 D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y
 L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E S S (配列番号 40)。

20

【0222】

実施例 19：ラモス細胞でのマウス全身性異種移植モデルにおける多量体型抗DR4 IgG抗体の治療効果

抗ヒト細胞死受容体 4 (DR4; Apo2、TRAIL受容体 1 および TNFRSF10A とも呼ばれる) モノクローナル IgG1 / ラムダ抗体 YON007 を産生するマウスハイブリドーマは、JN Biosciences (Mountain View, CA) にて、ヒトガンマ-1 重鎖の Fc 領域に融合したヒト DR4 の細胞外領域 (DR4-Fc) (配列番号 41) を免疫原とし、続く標準的なハイブリドーマ技法を用いて生成された。

30

【0223】

YON007 VH および VL のアミノ酸配列は、Tsurushita et al. (前記) に記載の方法などの標準的実験手順によって決定した。YON007 VH のアミノ酸配列は、シグナルペプチド配列を含めて、次のとおりである：

M N R L T S S L L L I V P A Y V L S Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T
 C S F S G F S L S T S G M G V S W I R Q P S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y
 N P S L K S R L K I S K D T S S N Q V F L K I T S V D T A D T A T Y Y C T R R G
 E Y G N F D Y W G Q G T T L T V S S (配列番号 42) (US 61/679,045)。

40

成熟 YON007 VH は、配列番号 42 の位置 20 に始まる。YON007 VL のアミノ酸配列は、シグナルペプチド配列を含めて、次のとおりである：

M A W I S L I L S L L A L S S G A I S Q A V V T Q E S A L T T S P G E T V T L T
 C R S S S G A V T T S N F A N W V Q E K P D H L F T G L I G G T N N R A P G V P
 A R F S G S L I G D K A A L T I T G A Q T E D E A I Y F C A L W Y S N H W V F G
 G G T K L T V L (配列番号 43) (US 61/679,045)。

成熟 YON007 VL は、配列番号 43 の位置 20 に始まる。

50

【0224】

YON007 VHおよびVLのヒト化を、Tsurushita et al. (前記)に記載の手順により行った。ヒト化YON007 (HuYON007) VHのアミノ酸配列は、シグナルペプチドを含めて、次のとおりである：

MNRLTSSL L L I V P A Y V L S Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T
C T F S G F S L S T S G M G V S W I R Q P P G K A L E W L A H I Y W D D D K R Y
N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C T R R G
E Y G N F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号44) (US 61/679, 045)。

成熟YON007 VH配列は、配列番号44の位置20に始まる。

10

【0225】

ヒト化YON007 (HuYON007) VLのアミノ酸配列は、次のとおりである：
M A W I S L I L S L L A L S S G A I S Q T V V T Q E P S F S V S P G G T V T L T
C R S S S G A V T T S N F A N W V Q Q T P G Q A P R G L I G G T N N R A P G V P
D R F S G S L L G N K A A L T I T G A Q A D D E S D Y Y C A L W Y S N H W V F G
G G T K L T V L (配列番号45) (US 61/679, 045)。

成熟YON007 VL配列は、配列番号45の位置20に始まる。

【0226】

HuYON007 VH (配列番号46) をコードする遺伝子を、コード化領域の3'端のスライスドナーシグナル、フラグメントの5'端のSpeI部位、およびフラグメントの3'端のHindIII部位を含むエクソンとして、合成した。HuYON007 VL (配列番号47) をコードする遺伝子を、コード化領域の3'端のスライスドナーシグナル、フラグメントの5'端のNheI部位、およびフラグメントの3'端のEcoRI部位を含むエクソンとして、合成した。

20

【0227】

ヒト化抗ヒトDR4モノクローナルIgG1/ラムダ抗体HuYON007-IgG1 產生のための哺乳類発現ベクターpHuYON007の構造は、(1) 9G6 VH遺伝子が、SpeI部位とHindIII部位との間のHuYON007 VH遺伝子 (配列番号46) で置き換えられ、(2) 9G6 VL遺伝子が、NheI部位とEcoRI部位との間のHuYON007 VL遺伝子 (配列番号46) で置き換えられ、(3) Cコード化エクソンが、ヒトラムダ-2定常領域をコードするエクソンで置き換えられ、(4) gpt遺伝子が、ピューロマイシンNアセチル転移遺伝子で置き換えられていることを除いて、pCh9G6-IgG1 (図1) の構造と本質的に同一である。

30

【0228】

pHuYON007にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列は、次のとおりである：
Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V S W I R
Q P P G K A L E W L A H I Y W D D D K R Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C T R R G E Y G N F D Y W G Q G T L V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
K S L S L S P G K (配列番号48)。

40

【0229】

pHuYON007にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列は、次のとおりである：

Q T V V T Q E P S F S V S P G G T V T L T C R S S S G A V T T S N F A N W V Q Q

50

TPGQAPRGLIGGTNNRAPGVPDFSGSILGNKAALTITGA
 QADDES DYYCALWYSNHWVFGGGTLKLTVLGQPKAAPSVTL
 FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
 GVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH
 EGSTVEKTVAPTECS (配列番号49)。

【0230】

多量体型 HuYON007 IgG 抗体の発現のために、C μ 3 および C μ 4 のコード化領域を、pHuYON007 における CH3 エクソンの最後のアミノ酸に、インフレームで融合した。軽鎖配列は変更しなかった。プラスミド pHuYON007-MV IgG 1 にコードされる結果の成熟重鎖のアミノ酸配列は、つぎのとおりである：

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIR
 QPPGKALEWL AHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSKNQV
 VLTMTNMDPVDTATYYCTR RGEYGNFDYWGQGT LVTVSSA
 STKGPSVFP LAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
 ICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEEVKFNWY
 VDGVEVHN A KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTT P PVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGKDQDTAIRVFAI PPSFASIFLT KSTKLTCLVT
 DLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTH TNISESHPNATFSAGE
 ASICEDDWNSGERFTCTVTH TDLPSP LKQTISRPKGVALH
 RPDVYLLPPAREQ LNLRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQ
 RGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNT
 GETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSD
 TAGTCY (配列番号50)。

【0231】

発現ベクター pHuYON007 および pHuYON007-MV IgG 1 を、チャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO - S (*In vitro*) の染色体に、個別に導入して、ヒト化 IgG1 / ラムダ抗体 HuYON007 - IgG1 および HuYON007 - MV IgG 1 を、それぞれ得た。CHO - S 細胞は、7.5% CO₂ インキュベータにおいて、37 °C にて SFM4 CHO 媒体 (HyClone) 中で増殖させた。エレクトロポレーションによって、CHO - S 細胞への安定導入を行った。導入に先立ち、FspI を用いて各発現ベクターを直線化した。一般的な実験において、約 10⁷ 個の細胞に、SFM4 CHO に懸濁した 20 μ g の直線化プラスミドを導入し、細胞の適当な希釈の後、いくつかの 96 ウエルプレートに塗布した。48 時間後、安定形質転換体の選択のために、ピューロマイシンを加えた。選択の開始後約 2 週間に、形質転換体の培養上清を抗体産生についてアッセイした。抗体の発現は、被覆に、ヤギ抗ヒトガンマ重鎖ポリクローナル抗体を用い、結合した HuYON007 - IgG1 抗体または HuYON007 - MV IgG1 抗体の検出に、HRP 抱合ヤギ抗ヒトラムダ鎖抗体を用いるサンドイッチ E L I S A によって測定した。HuYON007 - IgG1 および HuYON007 - MV IgG1 の各々を産生する CHO - S 安定形質転換体を、SFM4 CHO に展開した。

【0232】

遠心分離およびろ過の後、培養上清をプロテイン A カラム (HiTrap MAB Select Sure, GE Healthcare, Piscataway, NJ) に載せた。カラムを PBS で洗浄した後、0.1M グリシン - HCl (pH 3.0) で抗体を溶出した。溶出したすべての抗体の緩衝液を、1M Tris - HCl (pH 8) で中和し、次いで、透析によって PBS に変えた。前述のように、Superose 6 10 / 3

10

20

20

30

40

50

00 GLを用いるゲルろ過分析において、約150kDaに対応する単一の主要なピークが、HuYON007-IgG1について観察された。約1,000kDaに対応する単一の主要なピークが、ゲルろ過分析において、HuYON007-MV IgG1について観察された。

【0233】

ヒトバーキットリンパ腫細胞株ラモスは、細胞表面にDR4を発現する (Daniel et al. Blood. 110: 4037-4046, 2007)。細胞表面での架橋によるDR4の多量化が、細胞のアポトーシスを誘導することが知られている (Griffith et al. J. Immunol. 162: 2597-2605, 1999)。10 10% FBS含有 RPMI-1640培地において、200ng/mlのHuYON007-MV IgG1またはHuYON007-IgG1の存在下で、ラモス細胞をインキュベートした。24時間インキュベーション後のラモス細胞の生存率は、HuYON007-MV IgG1の存在下では5%未満であったが、HuYON007-IgG1の存在下では生存率は75%を超える。HuYON007-MV IgG1が、ラモス細胞のアポトーシスを効率よく誘導することを示唆している。

【0234】

HuYON007-MV IgG1の治療上の有効性を、ラモス細胞での全身性マウス異種移植モデルを用いて見積もった。CB17 SCID雌マウスに、第0日に、腫瘍成長のために、尾静脈への静脈内投与で 5×10^6 個のラモス細胞を接種した。第7, 10, 14, 17, 21, 24, 28および31日に、HuYON007-IgG1 (0.5mg/kg), HuYON007-MV IgG1 (0.5mg/kg)またはPBSを、担癌マウスに静脈内投与した。マウスを、病状および生死について、毎日監視した。後肢麻痺が発生した時、または20%超の体重減少があった時に、マウスを安楽死させた。20

【0235】

マウスの生存を、Kaplan-Meier法を用いてプロットし(図18)、Mantel-Cox試験を用いて、有意性について分析した。平均生存時間は、PBS処理群については27.5日、HuYON007-IgG1で処理した群については31.5日、HuYON007-MV IgG1で処理した群については37.5日であった。PBS処理群とHuYON007-MV IgG1処理群との間のP値は、0.0019であった。HuYON007-IgG1処理群とHuYON007-MV IgG1処理群との間のP値は0.0128であった。HuYON007-MV IgG1は、ラモス細胞でのマウス全身性異種移植モデルにおける治療薬として、HuYON007-IgG1よりも、有意に有効であった。30

【0236】

ヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合したヒトDR4(DR4-Fc)の細胞外領域のアミノ酸配列、配列番号41は、次のとおりである：

ASGTEAAAATPSKVWGSSAGRIEPRGGGRGALPTSMGQHGP
PSARARAGRAPGPRPAREASPRLRVHKTFKFVVGVLQLQV
VPSSAATIKLHDQSIGTQQWEHSPPLGELCPPGSHRSEHPG
ACNRCTEGVGYTNASNLLFACLPCTACKSDEEERSPCTTT
RNTACQCKPGTFRNDNSAEMCRKCSTGCPRGMVVKVDCTP
WSDIECVHKESGNNGHNTGGGEPKSCDKTHTCPGPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNN
YTQKSLSLSPGK.40

【0237】

HuYON007 VHをコードするエクソンのヌクレオチド配列、配列番号46は、次のとおりである：

ACTAGTACCAACCATGAACAGGGCTTACTTCCCTCATTTGCTGC
 TGCTGATTGTCCTGCAATATGTCCTGTCAGGTCACCTT
 GAGGGAGTCTGGTCCTGCCCTGGTGAAACCCACACAGACC
 CTCACACTGACCTGCACCTCTCTGGGTTCTCACTCAGCA
 CTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATCAGACAGCCCCAGG
 GAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTACTGGGATGAT
 GACAAGCGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCAGGCTCACCA
 TCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAAGTGGTCTTACAAT 10
 GACCAACATGGACCCCTGTCACACAGCCACCTATTACTGT
 ACTCGGAGAGGGAGTATGGTAACCTCGACTACTGGGGCC
 AGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCAGGTGAGTCTGCTGT
 ACTGAAGCTT。

【0238】

HuYON007 VLをコードするエクソンのヌクレオチド配列、配列番号47は、次のとおりである：

GCTAGCACCAACCATGGCCTGGATTTCACTTATCCTCTCTC
 TCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAGACTGTCGT
 GACCCAGGAGCCATCCTCTCAGTGTCCCCCTGGAGGGACA 20
 GTCAACACTCACTTGTGCTCAAGTTCTGGGCTGTTACAA
 CCAGTAACCTTGCCAACCTGGGTCCAGCAGACCCAGGCCA
 GGCTCCACGCCCTCATCGCGGTACCAACAAACCGAGCT
 CCAGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCATCCTTGGGA
 ACAAAAGCTGCCCTCACCATCACCGGGGCCAGGCAGATGA
 TGAATCTGATTATTACTGTGCTATGGTACAGCAACCAAC
 TGGGTGTTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTG
 AGTCTCTTCTCCCCGAATTG。

【図1】

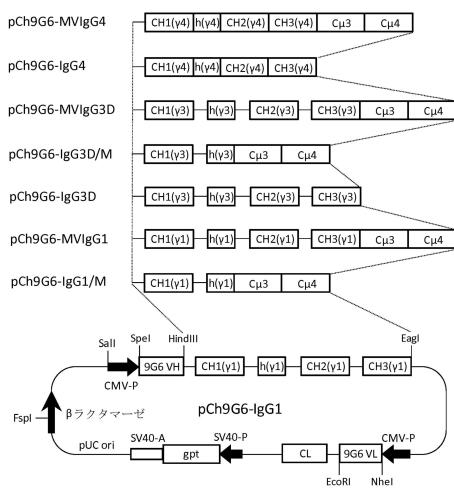


Figure 1

【図2】

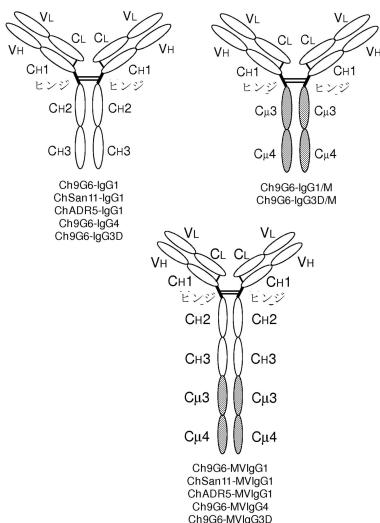
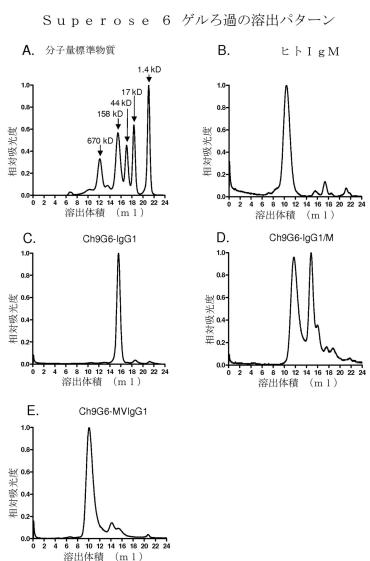


Figure 2

【図3】



Figures 3A-E

【図4】

多価 IgGによるラモス細胞のアポトーシス誘導

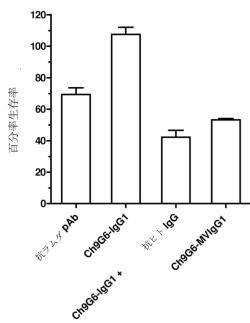


Figure 4

【図5】

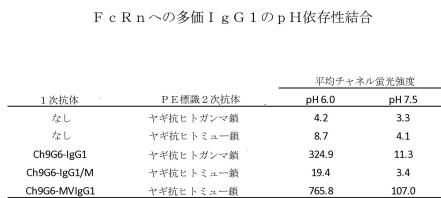
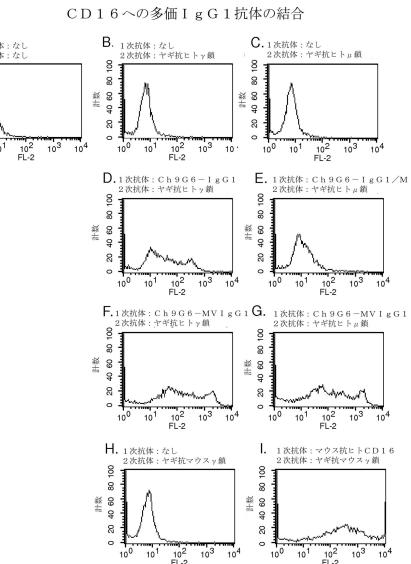


Figure 5

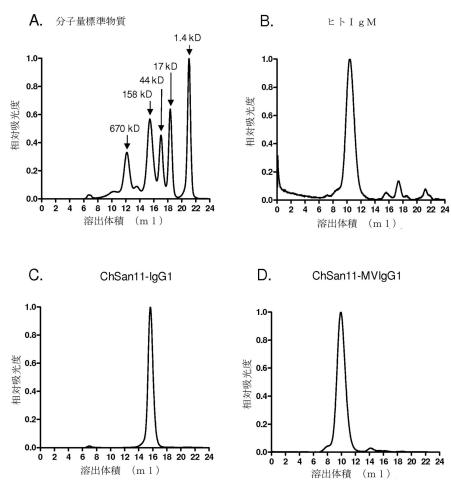
【図6】



Figures 6A-1

【図7】

Superox 6 ゲルろ過の溶出パターン



Figures 7A-D

【図8】

多価IgGによるKarpas 299細胞の細胞分裂停止

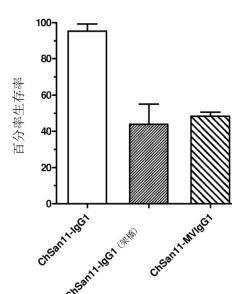


Figure 8

【図9】

Superose 6 画分におけるChSant11-MV IgG1の存在

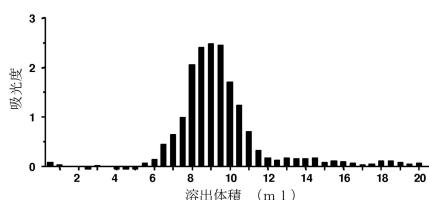
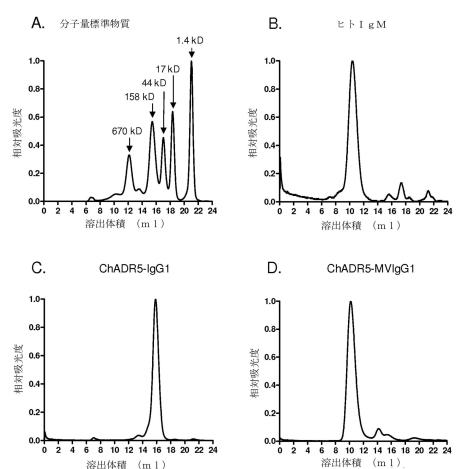


Figure 9

【図10】

Superose 6 ゲルろ過の溶出パターン



Figures 10A-D

【図11】

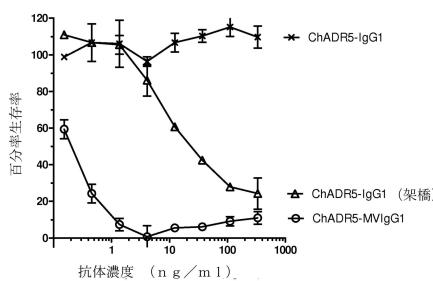
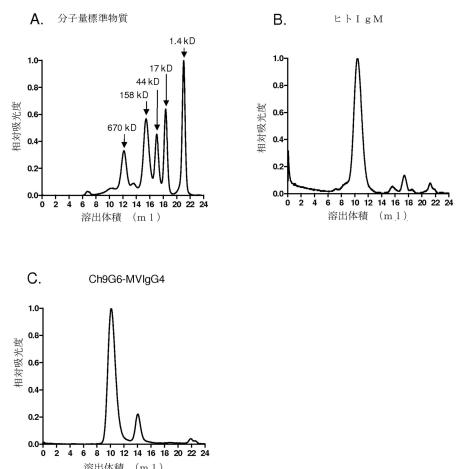
多価 IgG により誘導された
Jurkat 細胞のアボトーシス

Figure 11

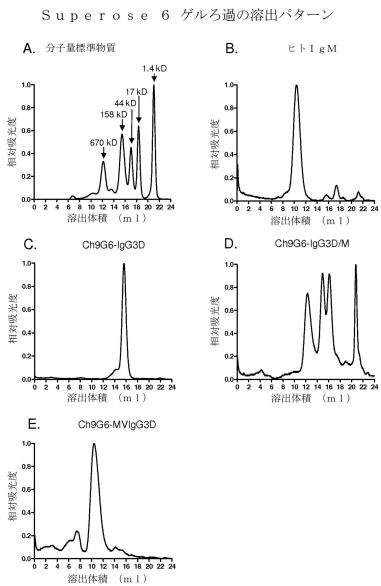
【図12】

Superose 6 ゲルろ過の溶出パターン



Figures 12A-C

【図13】



Figures 13A-E

【図14】

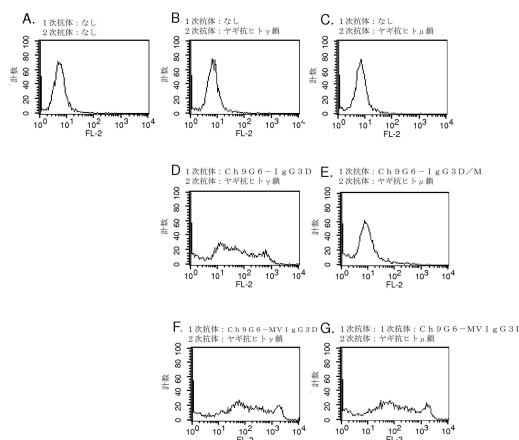
FcRnへの多価 IgG3 の pH 依存性結合

1次抗体	PE標識2次抗体	平均チャネル蛍光強度	
		pH 6.0	pH 7.5
なし	ヤギ抗ヒト gamma 鎮	4.2	3.3
なし	ヤギ抗ヒト myo 鎮	8.7	4.1
Ch9G6-IgG3D	ヤギ抗ヒト gamma 鎮	447.4	20.6
Ch9G6-IgG3D/M	ヤギ抗ヒト myo 鎮	11.4	3.2
Ch9G6-MV IgG3D	ヤギ抗ヒト myo 鎮	962.1	146.5

Figure 14

【図15】

CD16への多価 IgG3 抗体の結合



Figures 15A-G

【図16A】

Figure 16A

ヒト gamma-m 1 重鎖定常領域

CH1: ASTKGPSVPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKV (配列番号 1 5)

Hinge: EPKSCDKTHTCPPCP (配列番号 1 6)

CH2: APELLGGPSVFLFPPPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTK
FREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK (配列番号 1 7)

CH3: GQPREPQVYTLPPSRDELTQNQVSLTCLVKGYFYSIDIAVEWESNGQFENNYKTTPPVLDSS
DGSFFLYSKLTVQSKRNRQGQNVFSCSVMVHEALNNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 8)

ヒト gamma-m 2 重鎖定常領域

CH1: ASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKTV (配列番号 1 9)

Hinge: ERKCCVCECPPCP (配列番号 2 0)

CH2: APPVAGPSVFLFPPPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
REEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTK (配列番号 2 1)

CH3: GQPREPQVYTLPPSRDEMTKQVSLTCLVKGYFYSIDIAVEWESNGQFENNYKTTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVQSKRNRQGQNVFSCSVMVHEALNNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 2 2)

ヒト gamma-m 3 重鎖定常領域

CH1: ASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKRV (配列番号 2 3)

Hinge: ELKTPLCGDTTHTCPPCPCEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC
PRCP (配列番号 2 4)

CH2: APELLGGPSVFLFPPPKDTLMSRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK
FREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKTK (配列番号 2 5)

CH3: GQPREPQVYTLPPSRDEMTKQVSLTCLVKGYFYSIDIAVEWESNGQFENNYKTTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVQSKRNRQGQNVFSCSVMVHEALNNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 2 6)

【図16B】

Figure 16B

ヒトガンマ-4重鎖定常領域

CH1:ASTKGPSVFPLAPCSRSITSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVSNWSALTSVGVHTFPALQSS

GLYSLSSVVTVPPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRV (配列番号 2 7)

ヒンジ:ESKYVGPPCSCP (配列番号 2 8)

CH2:AEPEFLGGPSVFLFPPPKDITLMSIRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTK
PREEQFNSTYRVSLSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISAK (配列番号 2 9)CH3:GQPREPQVTYLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPNENYKTTTPVLD
DGSFFLYSLRTVDKSRWQEGNVEFSCSVMVHEALINHNTQKSLSLGK (配列番号 3 0)

ヒトアルファ-1重鎖定常領域

CH1:ASPTSPKVFPPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFFQEPPLSVWESQGQVTAARNFPPSQDAS
GDLYTTSQSLTLPATQCLAGKSVTCHVHYTNPQDVTPCP (配列番号 3 4)CH2:VPSTPTPSPSPTPTPSPSCCHPRLSLHRAPELDLILGSEANLTCLTGLRDAVGTVFTW
TPSSGKSAVQGGPPERDLCCGCVSVSVPGLGCAEPWNHGTFTCTAAYPESKTPTLATLSKS
(配列番号 3 2)CH3:GNTRPEVHLLPPPSEELALNEVLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASR
QEFSQGTTTFAVTSILRVAEAEDWKKGDTFSCMVGVHEALPLAFTQKTIIDRLLAGKPTHVNVSVM
EVDTGTY (配列番号 3 3)

ヒトアルファ-2重鎖定常領域

CH1:ASPTSPKVFPPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFFQEPPLSVWESQGQVTAARNFPPSQDAS
GDLYTTSQSLTLPATQCPDGKSVTCHVHYTNPQDVTPCP (配列番号 3 4)CH2:VFPFFFFCCHPRLSLHRAPELDLILGSEANLTCLTGLRDAVGATFTWIPSSGKSAVQGPP
ERDLCCGCVSVSVPGLGCAQFWNHGETFTCTAAPELKTPTANIKS (配列番号 3 5)CH3:GNTRPEVHLLPPPSEELALNEVLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTWASR
QEFSQGTTTFAVTSILRVAEAEDWKKGDTFSCMVGVHEALPLAFTQKTIIDRLLAGKPTHVNVSVM
EVDTGTY (配列番号 3 6)

【図16C】

Figure 16C

ヒトミュー重鎖定常領域

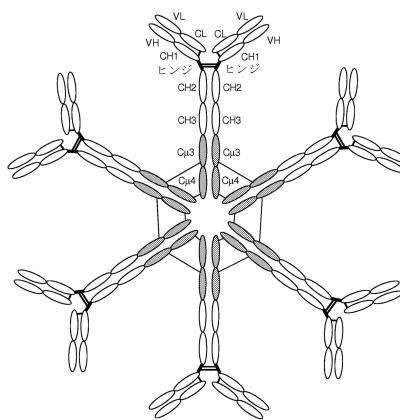
Cμ1:GSASAPTLPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITFSWVKYKNNNSDISSTRGFPSPV
RGKGKYAATSVVLLPSKDVMQGTDDEHVVKVQHFNNGNEKVNPLP (配列番号 5 1)Cμ2:VIAELPPKVSVFVPPROGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQLQVSLRKGQVGSVTTDQV
QAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRLTFQQNASSMCV (配列番号 5 2)Cμ3:DQDTAIRVAIIPPSFASIPLTKSTKLTCVLTDLTTYDSVTISWTRQNQEAVKHTHNISES
HPNATFSAVGEASICEDDNNGSERFTCTVHTHDLPSPLKQTISRK (配列番号 5 3)Cμ4:GVALIRPDPYLLPAREQLNLRESATITCLVGTGSPADVFVQWQMRQGQLSPPEKYVTSAP
MPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMS
DTAGTCY (配列番号 5 4)

J鎖 (アミノ酸 1 ~ 22 = シグナルペプチド)

MKNHLLFWGVLAVFIRAVHVKQAEDEIRVLVIDNCKCARITSRLIRSSSEDPNEDIVERNI
RILIVPLNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKCDCPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSAT
ETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMWETALTLPDCAYPD (配列番号 5 5)

【図17】

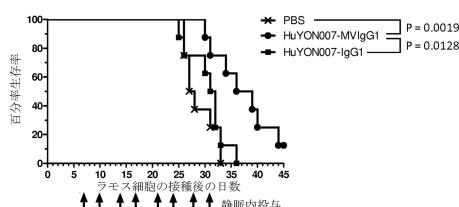
Figure 17



【図18】

Figure 18

ラモス全身性異種移植モデル



【配列表】

0006205363000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 7 K	14/715	(2006.01) C 0 7 K 14/715
C 0 7 K	14/725	(2006.01) C 0 7 K 14/725
C 1 2 N	15/09	(2006.01) C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 P	21/02	(2006.01) C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K	39/395	(2006.01) A 6 1 K 39/395 Y
A 6 1 P	35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01) A 6 1 P 37/02

(72)発明者 ソウ， ジェイ.， ユン

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州， マウンテン ビュー， ロード アベニュー
3 2 0

(72)発明者 ツルシタ， ナオヤ

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州， マウンテン ビュー， ロード アベニュー
3 2 0

審査官 植原 克典

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 7 5 7 8 6 (U S , A 1)

特表2 0 0 4 - 5 2 5 6 2 0 (J P , A)

International Immunology, 2 0 0 0 年, vol.12, no.1, p.19-27

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 4 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

B I O S I S / M E D L I N E / C A p l u s (S T N)