

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5513114号  
(P5513114)

(45) 発行日 平成26年6月4日 (2014.6.4)

(24) 登録日 平成26年4月4日 (2014.4.4)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 19 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-527737 (P2009-527737)  
 (86) (22) 出願日 平成19年9月12日 (2007.9.12)  
 (65) 公表番号 特表2010-503386 (P2010-503386A)  
 (43) 公表日 平成22年2月4日 (2010.2.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/007944  
 (87) 国際公開番号 W02008/031577  
 (87) 国際公開日 平成20年3月20日 (2008.3.20)  
 審査請求日 平成22年8月20日 (2010.8.20)  
 (31) 優先権主張番号 06019399.2  
 (32) 優先日 平成18年9月15日 (2006.9.15)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

微生物の受託番号 CNCM CNCM 1-3586

(73) 特許権者 506102293  
 ドムベ・ファ. ル. マ・ソチエタ・ベル・  
 アツィオーニ  
 イタリア国イー-67100 ラクイラ,  
 ヴィア・カンボ・ディ・ピレ  
 (73) 特許権者 505024774  
 イスティトゥート・ナツィオナーレ・ベ  
 ル・ロ・ストゥーディオ・エ・ラ・クーラ  
 ・デイ・ツモリ  
 ISTITUTO NAZIONALE  
 PER LO STUDIO E LA  
 CURA DEI TUMORI  
 イタリア国、イー-20133 ミラノ、ヴ  
 イア・ヴェネツィアン 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵巣癌の放射免疫療法のためのヒト抗-葉酸受容体アルファ抗体および抗体フラグメント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

葉酸受容体アルファ (F R ) に特異的に結合する、単離された若しくは精製された抗体  
 またはそのフラグメントであって、

該抗体またはそのフラグメントが、軽鎖と重鎖を含む F a b フラグメントであり、軽鎖  
 が可変領域 (V<sub>L</sub>) 及び定常領域 (C<sub>L</sub>) を有し、重鎖が可変領域 (V<sub>H</sub>) 及び第 1 定常  
 領域 (C<sub>H1</sub>) を有し、

ここで、可変領域 (V<sub>L</sub>) が下記のアミノ酸配列：

C D R 1 : R A S E S V S F L G I N L I H ( S E Q I D N O : 3 ) 、

C D R 2 : Q A S N K D T ( S E Q I D N O : 4 ) 、

C D R 3 : L Q S K N F P P Y T ( S E Q I D N O : 5 )

を含み、

定常領域 (C<sub>L</sub>) がカッパ定常部であり、

可変領域 (V<sub>H</sub>) がアミノ酸配列 ( S E Q I D N O : 2 ) を有し、

第 1 定常領域 (C<sub>H1</sub>) が I g G 重鎖である、

抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

図 1 のアミノ酸配列 ( S E Q I D N O : 1 ) を有する軽鎖を含む、請求項 1 に記載の  
 抗体またはそのフラグメント。

【請求項 3】

完全ヒト型である、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

重鎖がさらに第 2 抗体フラグメントへの共有結合に適したヒンジ部を含む、F a b ' フラグメントである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体フラグメント。

【請求項 6】

細胞毒性物質またはマーキング剤から選択されるエフェクター部分にコンジュゲーションしている、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはフラグメント。

10

【請求項 7】

エフェクター部分が放射性核種である、請求項 6 に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 8】

放射性核種が<sup>131</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>188</sup>Re 及び<sup>99</sup>Tc よりなる群から選択される、請求項 7 に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の 2 つの共有結合した F a b ' フラグメントにより形成される二量体。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントをコードする配列を含む核酸分子。

20

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸を含み、その核酸が作動可能な状態で転写調節シグナルに結合している発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項 13】

大腸菌 (*Escherichia coli*) である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントを含む、医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 6 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントを含む、葉酸受容体アルファ (F R ) の過剰発現が関与する障害を治療、予防または診断するための医薬。

30

【請求項 16】

障害がヒトにおける卵巣癌である、請求項 15 に記載の医薬。

【請求項 17】

請求項 6 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、および他の療法薬を含む、療法に同時、個別または逐次使用するための組み合わせ製剤としての製品。

【請求項 18】

他の療法薬が、化学療法薬および放射線療法薬よりなる群から選択される、請求項 17 に記載の製品。

40

【請求項 19】

卵巣癌の療法に同時、個別または逐次使用するための組み合わせ製剤としての、請求項 17 または 18 に記載の製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト葉酸受容体アルファに特異的な高アフィニティーヒト抗体および抗体フラグメント、特に F a b フラグメントに関する。本発明は、そのような抗体およびフラグメントの調製方法、ならびに療法および診断の場における、たとえば特に卵巣癌の放射免疫療法におけるそれらの使用に関する。本発明はさらに、これらの抗体およびフラグメン

50

トを含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

上皮卵巣癌（EOC）は、工業国および欧州における婦人科悪性疾患のうち最も致死性の高いものである。EOCは発病率が比較的低い（毎年約1/100,000の新症例）にもかかわらず高い致死率を示し、総5年生存率は約44%にとどまっている<sup>（1）</sup>、<sup>（2）</sup>。臓器限定腫瘍を伴う女性の予後はきわめて良好であるが、大部分の早期癌は無症候性であり、2/3を超える患者が進行疾患の状態と診断される。早期EOCは一般に無症候性であり、大部分の女性（70～75%）が進行疾患を呈し、これはしばしば散在性の小容積腫瘍沈着物として拡散している。卵巣癌の疑いがある場合の管理には、組織学的確

10

【0003】

卵巣癌の効果的な処置に際して化学療法が重要な役割を果たすようになってきた<sup>（3）</sup>、<sup>（4）</sup>。EOCは化学物質感受性腫瘍であると考えられ、事実、高活性の最先端化学療法を受けたEOC患者の70～80%が臨床緩解期に入る。しかし、新たな療法が開発されて中央総生存率が改善されたにもかかわらず、進行期患者の大部分において初期処置に完全応答した後に再発が起き、これらの患者のうち少なくとも70～90%が最終的に薬物（療法）抵抗性癌で死亡し、10～30%が長期生存を示すにすぎない。

20

【0004】

したがって、卵巣癌の代替処置法の要望が大きい。これらの代替処置法のひとつは、放射免疫療法である。卵巣癌は、化学療法抵抗性である転移を根除するために合併放射免疫療法で処置できる。放射免疫療法は、癌エピトープ特異的なモノクローナル抗体を放射性成分で標識することにある。次いでこの放射性標識モノクローナル抗体をインビ注射すると、その特異性により癌塊に蓄積するであろう。この手法は療法薬（この場合は放射性成分）を癌細胞に濃縮することができ、部位特異的ではない化学療法と異なり毒性および副作用が少ない；これは、その選択的ターゲティング、およびおそらく作用機序の相異

30

【0005】

卵巣癌については幾つかの異なるマーカーがこれまでに同定され、多数の異なる抗体が作成された。それらのうち最も良く解明されているものは、抗-CA125抗体<sup>（5）</sup>、<sup>（6）</sup>および抗MUC-1抗体、ならびに抗-葉酸受容体抗体、たとえばMOV18<sup>（7）</sup>である。後者は幾つかの重要な利点をもたらす。

【0006】

葉酸受容体アルファ（FR）は、葉酸ならびにある還元葉酸、たとえば5-メチルテトラヒドロ葉酸およびテトラヒドロ葉酸に対する高いアフィニティーをもつ、グリコシルホスファチジルイノシトール結合タンパク質である。それは限られた数の上皮細胞、特に腎臓、胎盤および脈絡膜叢にも存在するが、それらの頂端側表面に発現し、抗体が到達できないようになっている。FRが卵巣癌細胞に過剰発現し、かつ正常組織におけるその分布が限られていることは、放射免疫療法のための抗FR抗体を開発する好機となる。MOV18はアルファ葉酸受容体に特異的なモノクローナル抗体であり、この受容体は卵巣癌の90%で過剰発現しているため放射免疫療法の理想的な標的である。<sup>131I</sup>で放射性標識したMOV18は既にI/I I相臨床試験に導入され、ある程度の成果が得られている。FRに対して形成された他のネズミモノクローナル抗体にはMOV19が含まれる。

40

【0007】

MOV18を含めた多数の他のモノクローナル抗体が種々の臨床試験で有効性を示して

50

いるが、それらはネズミ由来であることによりそれらの臨床開発は限られている。それらの免疫原性を回避するために、臨床開発前または開発中に幾つかの抗体を工学的に処理してキメラ抗体またはヒト化抗体が形成され、最終世代は完全ヒト型であって臨床開発中である。

#### 【 0 0 0 8 】

放射免疫療法がしばしば遭遇する制約は、抗体の半減期が長く、数日間に及ぶ可能性があることである。一方ではこの特性は利点であって、抗体が腫瘍をターゲティングするのに適切な長さの時間を得ることができる。しかし他方では、これは患者にとって、標識によっては放射性成分が全身の静脈内で崩壊するのに数日間かかる場合があることも意味する。この場合、抗体は患者の身体から低速でクリアランスされるので、腫瘍 - 対 - 血液または臓器比は、最も好ましい状態でもほとんど 1 o g を超えないであろう。この観点からみて、抗体の半減期を短縮させると、健常組織における非特異的な放射線蓄積による副作用が低下することによって処置毒性が減少するであろう。

#### 【 0 0 0 9 】

考慮すべき他の点は、腫瘍への侵入である。モノクローナル抗体分子の立体障害は、標的が血流中に単離した細胞である限り影響をもたないが、卵巣癌の場合のように固形腫瘍を考慮する際には重大となる<sup>( 8 )</sup>、<sup>( 9 )</sup>。固形腫瘍への侵入はリガントに対する抗体のアフィニティーによっても影響を受ける；アフィニティーが低すぎると腫瘍局在化が妨げられ、これに対しアフィニティーが高すぎると腫瘍周辺への抗体結合が制限されることがこれまでに証明されており<sup>( 1 0 )</sup>、後者の現象は抗原バリアーとして記載されている。

#### 【 0 0 1 0 】

前記の点（由来、サイズ、半減期およびアフィニティー）を考慮して、卵巣癌の放射免疫療法にヒト抗体フラグメント（F a b）を用いることが提唱された。実際に、腫瘍への侵入のためには完全抗体より小さな分子の方が好ましいと思われ、それがヒト由来であることは免疫原反応を排除するはずである。さらに、半減期は短縮されるであろう。そのような分子のアフィニティーは、選択した抗体フラグメントの機能として具体的に対処する必要がある。F a b フォーマットの他の利点は、このタイプの分子が機能性であるために何らかのグリコシル化を必要としないことである。これは、微生物による製造およびそれに伴う利点と適合する。

#### 【 0 0 1 1 】

そのような抗体フラグメントはこれまでに、M O V 1 8 を作成したのと同じ融合体から選択されたモノクローナル抗体（M a b）である M O v 1 9 から出発してガイド付き選択（g u i d e d s e l e c t i o n）により作成され、同一標的抗原、すなわち F R 上の非交差反応性エピトープを認識する。C 4 と命名されたこの選択された F a b フラグメント<sup>( 1 1 )</sup>は、インビトロアッセイにより F R を特異的に結合しうると記載されている。C 4 は、全 E O C 細胞について実施した S c a t c h a r d 分析により 2 0 0 n M の推定  $K_{a f f}$  を示した。

#### 【 0 0 1 2 】

したがって、インビボ臨床用として卵巣癌の療法および診断に適切な C 4 - F a b フラグメントの開発が想定された。しかし本発明者らは、C 4 抗体 F a b フラグメントの比較的低いアフィニティーおよびそのインビボ半減期は臨床開発の要求に適合しないことを見いだした。実際に、本発明者らが C 4 F a b フラグメントについて実施したインビボ実験により下記のことが示された：

- C 4 F a b フラグメントのアフィニティーは効果的な腫瘍局在化のためには低すぎた；

- C 4 F a b のインビボ半減期はきわめて短く、これはそのアフィニティーが低いことと合わせていずれの腫瘍への局在化も妨げた；静脈内投与のわずか 1 時間後ですら、動物の血液中に F a b フラグメントを検出するのはほとんど不可能であった。この急速すぎるクリアランスは、固形腫瘍における抗体フラグメントの蓄積を妨げ、このため一貫し

10

20

30

40

50

ない生体内分布結果を生じた。

【 0 0 1 3 】

さらに本発明者らは、大腸菌 ( E . c o l i ) における組換え C 4 F a b の産生、およびその後のその精製は、非機能性 L 鎖ホモ二量体混在物 ( L <sub>2</sub> ) が同時に産生し、それを精製工程中に除去するのが困難なことによって著しく妨げられることを見いだした。

【 0 0 1 4 】

したがって本発明者らは、卵巣癌の放射免疫療法に適切な二量体 F a b フラグメントの作成の可能性を調べることを決定した。F a b から F ( a b ' ) <sub>2</sub> フォーマットに移行すると、幾つかの利点が得られる；たとえば二価性が得られ、これはフラグメントのアビディティを高め、したがってその全体的アフィニティを高める；対応する F a b フラグメントと比較して分子量が倍増し、これにより尿中への排出が減少して腎臓が保護され、結果的にそのインビボ半減期が延長する ( <sup>1 2</sup> ) 。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 非特許文献 1 】 Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55: 10-30.

【 非特許文献 2 】 Cannistra SA. Cancer of the ovary. N Engl J Med 2004; 351: 2519-29.

【 非特許文献 3 】 Harries M, Gore M. Part I: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment at first diagnosis. Lancet Oncol 2002; 3: 529-36.

【 非特許文献 4 】 Vasey PA. Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. Br J Cancer 2003; 89 Suppl 3: S23-S28.

【 非特許文献 5 】 Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. N Engl J Med. 1983 Oct 13; 309(15): 883-7.

【 非特許文献 6 】 Lavin PT, Knapp RC, Malkasian G, Whitney CW, Berek JC, Bast RC Jr. CA 125 for the monitoring of ovarian carcinoma during primary therapy. Obstet Gynecol. 1987 Feb; 69(2): 223-7.

【 非特許文献 7 】 Miotti S, Canevari S, Menard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, Regazzoni M, Tagliabue E, Colnaghi MI. Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. Int J Cancer. 1987 Mar 15; 39(3): 297-303.

【 非特許文献 8 】 Netti PA, Baxter LT, Boucher Y, Skalak R, Jain RK Time-dependent behavior of interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. Cancer Res. 1995 Nov 15; 55(22): 5451-58.

【 非特許文献 9 】 Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. Cancer Res. 1990 Feb 1; 50(3 Suppl): 814s-819s.

【 非特許文献 1 0 】 Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh R K, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. Cancer Res. 2001 Jun 15; 61(12): 4750-5.

【 非特許文献 1 1 】 Figini M et al., Cancer Res. 1998, Mar 1; 58 (5): 991-6.

【 非特許文献 1 2 】 King DJ, Turner A, Farnsworth AP, Adair JR, Owens RJ, Pedley R B, Baldock D, Proudfoot KA, Lawson AD, Beeley NR, et al Improved tumor targeting with chemically cross-linked recombinant antibody fragments. Cancer Res. 1994 Dec 1; 54(23): 6176-85.

【 発明の概要 】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0016】

ところが本発明者らは、意外にもC4 Fabフラグメントを効率的に二量体化するのは不可能であることを見いだした。自然二量体化法または化学的二量体化法のいずれでも、許容できる収率のC4二量体は生成しなかった；適正な少量の二量体生成物には不適正な別の二量体種が多量に混在しており、これをゲル濾過クロマトグラフィー精製により除去することはできなかった。本発明者らは、Fab二量体の作成には、C4ラムダ鎖をカッパ鎖で置換することを含めて、元のC4 Fabフラグメントを広範に修飾する必要があることを見いだした。これはガイド付き選択法により行なわれた。こうして選択したカッパ鎖を含む新規なFabフラグメントをAFRAと命名し、改善された結合アフィニティーをもつFabが生成した。この新規なカッパ鎖によりL鎖ホモ二量体形成の問題も回避され、かつ安定性が改善され、これは放射免疫療法に有利である<sup>(13)</sup>。他の有益性は、カッパ鎖は大腸菌においてより容易に発現するという事実であり<sup>(14)</sup>、これは、工業用の場合に特に有利である。本発明のAFRAカッパ鎖のアミノ酸配列を図1および7に示す(SEQ ID NO: 1)。比較のために、C4 L鎖のアミノ酸配列も図1に示す(SEQ ID NO: 12)。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0017】

したがって本発明は、葉酸受容体アルファに特異的に結合する抗体、好ましくはモノクローナル抗体、または抗体のフラグメントに関するものであり、その際、抗体またはフラグメントは、図1および7に示すAFRAアミノ酸配列(SEQ ID NO: 1)を含むかもしくはそれからなるL鎖、またはこのL鎖の誘導体であって図1および7に示すもの(SEQ ID NO: 1)と機能的に均等であるアミノ酸配列をもつものを含む。機能均等物は後記に定めるものである。

20

## 【0018】

本発明に関して、下記の述語を用いる：

- 用語 "本発明の抗体およびフラグメント" または "AFRA抗体" または "AFRA抗体フラグメント" は、別途記載しない限り、図1および7に示すもの(SEQ ID NO: 1)と同一のアミノ酸配列または図1および7に示すもの(SEQ ID NO: 1)と機能的に均等であるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなるL鎖を含む、抗体またはフラグメントを表わす；

30

- 用語 "AFRA由来の抗体" または "AFRA由来の抗体フラグメント" は、図1および7に示すもの(SEQ ID NO: 1)と機能的に均等であるアミノ酸配列をもつL鎖を含む抗体またはフラグメントを表わすために用いられる；

- 用語 "AFRA L鎖" は、図1 (AFRA) および図7に示すL鎖(SEQ ID NO: 1)を表わす。用語 "AFRA由来のL鎖" は、図1 (AFRA) および図7に示すもの(SEQ ID NO: 1)と機能的に均等であるアミノ酸配列をもつL鎖を意味する；

- 用語 "抗体" は、用語 "免疫グロブリン" (または 'Ig') と同義に用いられる。別途明記しない限り、用語 "抗体" または用語 "免疫グロブリン" は無傷の(または全)抗体分子を表わす。フラグメントはそのように表示される；

40

- 抗体分子内のアミノ酸位置のナンバリングは、別途記載しない限り、Kabata E. (Kabata, H. A., et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. (U.S. Dept. Health and Human Services, Bethesda, Md., 1991)を用いて行なう。

## 【0019】

自然界では、抗体はBリンパ球が産生する糖タンパク質分子である。本発明の抗体は、Bリンパ球により、ハイブリドーマにより、原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞における組換え抗体の発現により、または合成法、たとえば既存の抗体から抗体の工学的処理により作成できる。それらはグリコシル化されていてもよく、されていなくてもよい。一般的

50

に、抗体は抗原を高度の特異性で結合し、物理的および機能的特性に基づいて I g G、I g M、I g A、I g D および I g E と表示される 5 クラス（またはイソ型）に小分類することができる。これらの異なるタイプの抗体は、約 150,000 ダルトン（150 kDa）の分子量をもつ共通の基本構造単位を共有し、システイン残基間の鎖間ジスルフィド（S-S）結合により共有結合した 2 つの同一ポリペプチド重（H）鎖および 2 つの同一軽（L）鎖からなる。本発明の無傷の抗体もこの構造をもつ。好ましくはそれらは I g G タイプのものである。

#### 【0020】

本発明に関して、'抗体フラグメント' は抗体のいずれかの部分、好ましくは抗原結合部分を意味し、そのような部分の変異型を含む。本発明による抗原結合フラグメントの例は F a b フラグメント；F a b ' フラグメント；F（a b '）<sub>2</sub> フラグメント；およびミニボディー（mini body）である。そのようなフラグメントの変異型には、天然ヒンジ配列、合成ヒンジ配列、ペプチドリinkerを用いて得ることができる、それらのフラグメントの二量体および三量体およびフラグメント間融合体、または化学的コンジュゲートが含まれる。本発明のフラグメントは、一価（たとえば F a b フラグメント）、二価（たとえば F（a b '）<sub>2</sub> フラグメント）または多価（たとえば三量体 F a b フラグメントを含む化学的コンジュゲート）であってもよい。

#### 【0021】

本発明の A F R A 抗体およびフラグメントが特異的に結合する抗原は、ヒト葉酸受容体アルファ（F R）である。葉酸受容体は 3 つのイソ型、アルファ、ベータおよびガンマをもち、それらはアミノ酸配列において約 70% の同一性を示す。これらの異なるイソ型は、葉酸に対するそれらの相対アフィニティーにおいて著しい差を示し、組織特異性が異なり、幾つかの悪性疾患における増加度が異なる。アルファイソ型は、普通はグリコシル-ホスファチジルイノシトール膜アンカーにより細胞表面に結合している<sup>15</sup>。それは葉酸に対して高いアフィニティーをもち、受容体に結合した葉酸化合物および葉酸コンジュゲートの内部移行を仲介する。葉酸受容体アルファは正常組織ではきわめて限られた分布をもち（すなわち、限られた数の正常上皮細胞に存在する）が、婦人科組織の癌、たとえば卵巣癌では過剰発現する。本発明によれば、用語"葉酸受容体アルファ" は下記の用語と同義である：F R - アルファ；F R ；葉酸受容体 1；成体葉酸受容体；成体葉酸結合タンパク質；F B P；卵巣腫瘍関連抗原 M O v 18。本発明に関して、この用語には細胞の表面に発現した受容体およびその可溶性形態も含まれる。ヒト葉酸受容体アルファの一次アミノ酸配列を図 10 A に、可溶性形態を図 10 B に示す。

#### 【0022】

本発明の抗体およびフラグメントの重要な特徴は、葉酸受容体アルファに対するそれらの結合が特異的なことである。本発明の抗体およびフラグメントは C 4 および M o v 19 のものに重ね合わせることができる反応性をもつので、それらはベータおよびガンマイソ型の葉酸受容体には結合しない。用語"特異的に結合する" は、本発明の抗体およびフラグメントは高いアフィニティー（好ましくは少なくとも 100 nM の K<sub>D</sub>、最も好ましくは少なくとも 20 nM の K<sub>D</sub>）で哺乳動物細胞の表面に発現した F R に結合し、同一エピトープ領域において 90% 未満の同一性、好ましくは 95% 未満の同一性、最も好ましくは 98% 未満の同一性をもつタンパク質には結合しないことを意味する。本発明のモノクローナル抗体が認識するエピトープは、ヒト細胞の表面、好ましくはヒト卵巣癌細胞の表面で受容体がその天然立体配置をとった際に受容体により形成される連続エピトープであってもよく、不連続（コンホメーション）エピトープであってもよい。たとえば、本発明の抗体およびフラグメントは、90% 未満の全同一性、好ましくは 95% 未満の全同一性、最も好ましくは 98% 未満の全同一性をもつタンパク質には結合しない。したがって、本発明の抗体およびフラグメントは、図 10 A および B に示すヒト葉酸受容体アルファに対してきわめて高度の同一性をもつタンパク質、たとえば図 10 の配列に対してアミノ酸 1 ~ 5 個の差をもち本発明の抗体が認識するエピトープ領域（1 以上）に関しては図 10 の配列と実質的に同一である対立遺伝子変異型に結合することができる。

## 【 0 0 2 3 】

前記のように、F R は卵巣癌細胞に過剰発現するが、あるタイプの正常上皮細胞にも発現する。ただし、正常細胞における発現は頂端側表面においてであり、このため受容体はインビボ状況では本発明の抗体に到達できない。その結果、インビボでは、本発明の抗体およびフラグメントは卵巣癌細胞（ここではトランスフォーメーションの結果として細胞がそれらの極性を喪失し、次いで葉酸受容体が細胞表面全体に発現する）（または他の癌）に発現したF R に特異的に結合し、正常なヒト上皮細胞の表面に発現している受容体には結合できない。これに対し、本発明の抗体およびフラグメントをインビトロアッセイにより、単離された正常なヒト上皮細胞もしくは組織（たとえば、脳下垂体、子宮内膜、甲状腺または膵臓の上皮細胞）、または低レベルのF R を発現している細胞系について試験した場合には、特異的な結合を検出できる。

10

## 【 0 0 2 4 】

本発明のA F R A抗体およびA F R A抗体フラグメントは特異的なL鎖を特徴とし、そのアミノ酸配列は図1に示されている（SEQ ID NO：1）。図示したA F R A L鎖は、免疫グロブリンL鎖（L）に典型的な構造をもつ。実際に、一般的にL鎖（L）はアミノ酸約220個の長さであり、1つの可変ドメイン（"V<sub>L</sub>"）をL鎖のアミノ末端にもち（約110個のアミノ酸）、L鎖の残りのカルボキシル側半分からなる1つの定常ドメイン（"C<sub>L</sub>"）をもつ。本発明のA F R A L鎖（L）は218個のアミノ酸を含み、N末端の113個のアミノ酸が可変部（"V<sub>L</sub>"）を構成し、カルボキシル末端の残り105個のアミノ酸が定常ドメイン（"C<sub>L</sub>"）を構成する。このL鎖可変部のアミノ酸配列は、本発明のA F R A抗体に独特である。これは、付随するH鎖の可変部と共に抗体の抗原結合部位を形成する。A F R A L鎖の定常部は典型的なカップL鎖である。

20

## 【 0 0 2 5 】

本発明のA F R A抗体およびフラグメントのL鎖は通常は図1および7に示したものと同一であるけれども、本発明から逸脱することなくある変化をこの配列に生じさせることができる。実際に本発明は、図1および7に示したものの（SEQ ID NO：1）と機能均等なL鎖を含む"A F R A由来抗体"または"A F R A由来抗体フラグメント"にも関連する。そのような機能均等なL鎖は下記のアミノ酸配列である：

- その可変部に図1および7に示したA F R A L鎖の葉酸受容体アルファに対する特異性を決定する領域のうち少なくとも1つが含まれ、かつカップ定常部を含む、L鎖を含む。特異性を決定する領域は、V<sub>L</sub>鎖の"超可変"部に相当し、これは"相補性決定領域"（CDR）とも呼ばれる。これらのCDRは、CDR1、CDR2およびCDR3、またはL1、L2およびL3と表示される。A F R A配列（SEQ ID NO：1）のF a b結晶構造により確認した相補性決定領域は下記のものである：

30

R A S E S V S F L G I N L I H（SEQ ID NO：3）、

Q A S N K D T（SEQ ID NO：4）、

L Q S K N F P P Y T（SEQ ID NO：5）。

## 【 0 0 2 6 】

これらの領域を図7に下線を施した太字で示す。したがって本発明のこの変異型によれば、A F R A由来抗体またはA F R A由来抗体フラグメントは葉酸受容体アルファ（F R）に特異的に結合し、その可変部は下記のアミノ酸配列のうち少なくとも1つ、好ましくは2つ、最も好ましくは3つ全部を含むL鎖を含む：

40

CDR1： R A S E S V S F L G I N L I H（SEQ ID NO：3）、

CDR2： Q A S N K D T（SEQ ID NO：4）、

CDR3： L Q S K N F P P Y T（SEQ ID NO：5）。

## 【 0 0 2 7 】

上記のCDR配列は、好ましくはA F R A由来L鎖中に、元のA F R A L鎖中のものと同じ位置に存在する；すなわちCDR1：24-38；CDR2：54-60；CDR3：93-102（K a b a tナンバリング方式を採用）。A F R A由来L鎖の可変部の残りの配列は、いずれかの枠組み（framework）配列であってよい；たとえば図1および7

50

の配列 (SEQ ID NO: 1) とはアミノ酸 10 または 20 個までの、たとえばアミノ酸 1、2、3、4 または 5 個の置換、欠失または挿入により異なる枠組み配列であって、図 1 に示す AFRA L 鎖枠組み配列と置き換えて AFRA CDR を含む抗体または抗体フラグメント中に用いた場合にヒト葉酸受容体アルファに対する抗体またはそのフラグメントの特異性を質的に変化させないもの。1 態様において、AFRA 由来 L 鎖の可変部は、図 1 および 7 の配列 (SEQ ID NO: 1) とはアミノ酸 10 または 20 個までの、たとえばアミノ酸 1、2、3、4 または 5 個の置換、欠失または挿入により異なり、この置換、欠失または挿入は CDR 内または外で行なうことができる。AFRA 由来 L 鎖の定常部は、古典的なカップ定常部、たとえば図 7 の AFRA 配列のアミノ酸 114 ~ 219 (二重下線) と同一である。好ましくは、これらの AFRA 由来抗体または AFRA 由来抗体フラグメントは、葉酸受容体アルファ (FR) に 50 nM, 未満、好ましくは 20 nM 未満のアフィニティー ( $K_D$ ) で結合する。

#### 【0028】

葉酸受容体アルファに対する前記に定めた AFRA 由来抗体または AFRA 由来抗体フラグメントの特異性は、インビトロおよび/またはインビボで、FR との反応性を示し、かつ 90 % 未満の配列同一性、好ましくは 95 % 未満の配列同一性をもつ受容体タンパク質との交差反応性がないことを示すための一般的実験手段を用いて試験することができる。

#### 【0029】

L 鎖 (L) が SEQ ID NO: 1 の変更していない AFRA 配列であるかまたは前記のようなそれらの誘導体であるかに関係なく、本発明による抗体またはフラグメントは、好ましくはさらに抗体 H 鎖の少なくとも一部、たとえば少なくとも可変部 ( $V_H$ ) を含み、一般に  $C_{H1}$  と表示される第 1 定常部を含むかまたは含まない。本発明の L 鎖と会合していてもよい H 鎖の他の部分は、可変部 ( $V_H$ )、第 1 定常部 ( $C_{H1}$ )、およびヒンジ部の全部または一部を含む、H 鎖フラグメントである。あるいは、H 鎖は無傷であって、順に  $V_H$ 、 $C_{H1}$ 、ヒンジ部、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 、および場合により  $C_{H4}$  を含むこともできる。H 鎖と L 鎖の間の会合は、普通は L 鎖のカルボキシ末端にあるシステインが関与するジスルフィド結合による共有結合である。

#### 【0030】

本発明に関して、AFRA L 鎖と会合していてもよい種々の H 鎖セグメントは、無傷の免疫グロブリン H 鎖 (H) が通常はアミノ酸約 440 個の長さであることを留意して、下記のように定められる：可変ドメイン ( $V_H$ ) は H 鎖のアミノ末端範囲である (通常は約 110 個のアミノ酸)。H 鎖の残りの部分は、そのクラス内で高い (少なくとも 30 %) 配列相同性をもつアミノ酸約 110 個の反復配列を 3 または 4 つ (H 鎖のクラスによる) 含む。これらの領域は H 鎖の定常部であり、 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$  および  $C_{H4}$  と表示される。H 鎖は  $C_{H1}$  ドメインと  $C_{H2}$  ドメインの間に位置するヒンジ部をも含み、これは分子に柔軟性および鎖間ジスルフィド結合形成能を付与する。ヒンジ部は、各抗体分子の 2 つの抗原結合領域が抗原を結合するために独立して動くのを可能にする。

#### 【0031】

H 鎖の可変部は、この場合も "相補性決定領域" (CDR) と呼ばれる 3 つの超可変部を含み、これらは H1、H2 および H3、あるいは CDR1、CDR2 および CDR3 と表示される。H 鎖の CDR はアミノ酸約 3 ~ 25 個の長さをもち、抗体特異性において重要な役割を果たす。

#### 【0032】

自然界には 5 つの異なる H 鎖、アルファ ( )、ガンマ ( )、デルタ ( )、イプシロン ( ) およびミュー (  $\mu$  ) が存在し、これらは互いにアミノ酸配列が異なる。ある抗体のイソ型 (すなわち、それが IgA、IgG、IgD、IgE または IgM のいずれのクラスに属するか) は、その抗体の H 鎖により決定される：アルファ H 鎖は IgA イソ型を決定し、ガンマ H 鎖は IgG イソ型を決定する、など。IgG クラス内には、IgG1 ~ IgG4 と表示される 4 つのサブクラスがある。本発明によれば、AFRA 抗体または

10

20

30

40

50

そのフラグメントもしくは誘導体のH鎖はこれらのイソ型のいずれであってもよいが、I g G イソ型、たとえばI g G 1 が特に好ましい。

【0033】

A F R A L 鎖と共に存在するH鎖の具体的なサブ領域に応じて、さらに会合しているサブユニットの個数に応じて、本発明の抗体および抗体フラグメントは無傷の抗体の形態をとることができ、あるいはその抗原結合フラグメント、たとえばF a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F ( a b )<sub>2</sub> などであってもよい。

【0034】

本発明の特に好ましい態様によれば、A F R A 抗体もしくはA F R A 由来抗体またはフラグメントは、下記のものを含むかまたはそれらからなるF a b フラグメントである：

i ) A F R A L 鎖 ( 可変部 ( V<sub>L</sub> ) と定常部 ( C<sub>L</sub> ) の両方 ) : 図 1 もしくは 7 に示すもの ( S E Q I D N O : 1 ) または前記に定めたその誘導体、ならびに

i i ) H 鎖の可変部 ( V<sub>H</sub> ) および第 1 定常部 ( C<sub>H1</sub> ) 。

【0035】

好ましくは、L 鎖とH鎖はL鎖のカルボキシ末端システインが関与するジスルフィド結合により互いに共有結合している。本発明のF a b フラグメントは、一般に約 55 k D a のサイズをもつ。

【0036】

本発明のこの態様の特に好ましい例は、H鎖の可変部 ( V<sub>H</sub> ) が図 8 のアミノ酸配列 ( S E Q I D N O : 2 ) をもつF a b フラグメントである。あるいは、H鎖の可変部 ( V<sub>H</sub> ) は、図示した配列のC D R 領域のうち少なくとも1つ、好ましくは2または3つを、図 8 に示したものと異なる枠組み配列内に含むアミノ酸配列をもつことができる。図 8 のC D R 領域は下記のものである：

C D R 1 : D Y A M I ( S E Q I D N O : 6 )

C D R 2 : S I S S S S S Y I Y Y A D S V K G ( S E Q I D N O : 7 )

C D R 3 : E R Y D F W S G M D V ( S E Q I D N O : 8 )

本発明のこの態様の他の特に好ましい例は、H鎖 ( C<sub>H1</sub> ) 領域の定常部がガンマH鎖の、特にガンマ 1 H 鎖のC<sub>H1</sub> 領域であるF a b フラグメントである。代表的なC<sub>H1</sub> H 鎖の例を図 9 ( S E Q I D N O : 9 ) に示す。

【0037】

したがって、本発明の好ましいF a b フラグメントは下記の配列要素を含むか、またはそれらからなる：

i ) S E Q n ° 1 のアミノ酸配列をもつL 鎖

i i ) 可変部が図 8 に示すアミノ酸配列 ( S E Q I D N O : 2 ) をもつH鎖であって、その第 1 定常部 ( C<sub>H1</sub> ) が図 9 に示すアミノ酸配列 ( S E Q I D N O : 9 ) をもつもの。

【0038】

本発明の他の観点によれば、抗体フラグメントはF a b ' フラグメントであってもよい。本発明に関して、F a b ' フラグメントは、F a b フラグメントのH鎖がさらにそのカルボキシ末端に第 2 抗体フラグメントへの共有結合に適した天然ヒンジ部を含むものである。ヒンジ部は、共有結合の形成に適した 1 個以上のアミノ酸残基または化学基、たとえば遊離システインを含み、これによりF a b ' フラグメントの二量体化が可能になる。ヒンジ部は抗体の天然ヒンジ部、たとえば自然界でアルファ ( )、ガンマ ( )、デルタ ( )、イプシロン ( ) およびミュー ( μ ) H 鎖のいずれかに存在するヒンジ部の少なくとも一部であってもよい。特に好ましいものは、ガンマサブクラス、特にガンマ 1 の天然配列に相当するヒンジ部またはその一部、たとえばペントペプチド D K T S C、またはヘキサペプチド D K T H T C である。F a b ' フラグメントの作成に用いるヒンジ部の一部は、一般に少なくとも 1 つの遊離システイン残基をたとえばカルボキシ末端に含むが、2 または 3 つの遊離システイン残基を含むように工学処理されてもよい。

【0039】

10

20

30

40

50

あるいは、たとえばインビボ環境での加水分解に対する抵抗性を付与する化学リンカーなどの非タンパク質部分により、F a b ' フラグメントを人工的に二量体化してもよい。そのような人工リンカーの一例はビスマレイミドエタン ( B M O E ) であるが、他の幾つかのリンカーが文献に報告されている ( 1 6 ) , ( 1 7 ) 。

#### 【 0 0 4 0 】

F a b ' フラグメントを使用する利点は、それらを二量体化して2つの抗原結合ドメインをもつ F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメントを形成しうることである。したがって、F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメントは二価であり、F a b 単量体と対比して結合のアビディティーが高くなる。二量体を構成する2つの F a b ' フラグメントは、F a b ' H鎖の2つのヒンジ部それぞれの間で結合することにより互いに結合している。F a b ' 単量体は、H鎖のC末端にある遊離システインの自然酸化により二量体化することができる。F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメントは一般に約 1 0 0 ~ 1 1 0 k D a のサイズをもつ。

10

#### 【 0 0 4 1 】

非タンパク質人工リンカーにより二量体化する場合、F ( a b ' ) <sub>2</sub> 二量体を構成する2つの F a b ' 単量体は、この化学リンカーにより互いに共有結合する。たとえばビスマレイミドエタン ( B M O E ) は非加水分解性のマレイミド結合を生成し、したがって二量体にインビボ環境での安定性を付与する。

#### 【 0 0 4 2 】

本発明のこの観点によれば、F ( a b ' ) <sub>2</sub> 二量体の2つの抗原結合ドメインは同一の特異性をもつことができ、両方とも葉酸受容体アルファの特定のエピトープに特異的に結合する。あるいは、F ( a b ' ) <sub>2</sub> 二量体は二重特異性であって、抗原結合ドメインのうち一方は葉酸受容体アルファの第1エピトープに特異的であり、他方は葉酸受容体アルファの第2エピトープに特異的であってもよい。他の可能性は、第2抗原結合ドメインが葉酸受容体アルファとは全く異なる抗原、たとえば第2の癌抗原に、またはエフェクター細胞のナチュラルキラーマーカーに結合することである。

20

#### 【 0 0 4 3 】

本発明の抗体およびフラグメントは、好ましくは完全ヒト型である。本発明の A F R A L 鎖はヒト由来である。したがって、このL鎖をヒト由来のH鎖と組み合わせることが有利である。あるいは、A F R A L 鎖をまずヒト以外、たとえばネズミに由来するH鎖と組み合わせ、次いで抗体工学的手法を用いてH鎖をヒト化することができる。

30

#### 【 0 0 4 4 】

本発明の抗体およびフラグメントは、ヒト葉酸受容体アルファに対する高い結合アフィニティーおよびアビディティーを特徴とする。結合アフィニティーは、抗体またはそのフラグメント上にある1つの抗原結合部位とそれに特異的なエピトープとの間の相互作用の強さである。アフィニティーが高いほど、抗原と抗体またはフラグメントの間の会合はより緊密になり、抗原が結合部位にとどまる可能性はより大きくなる。用語 " アビディティー " は、抗体またはフラグメント間の相互作用の全体的な強さを記述するために用いられ、相互作用のアフィニティーおよび結合価の両方に依存する。個々の抗体分子がより多数の結合部位をもつほど、抗原に対する抗体のアビディティーはより高くなる。

#### 【 0 0 4 5 】

40

アフィニティーはアフィニティー定数  $K_A$  で表わすことができ、これは抗体と抗原の会合速度定数 (  $k_{a s s}$  ) と解離速度定数 (  $k_{d i s s}$  ) の比である。 $K_A$  は  $M^{-1}$  で測定され、アフィニティーが高いほど  $K_A$  はより高い。あるいは、アフィニティーは解離定数  $K_D$  で表わすことができ、ここで  $K_D = 1 / K_A$  である。 $K_D$  の単位はMであり、アフィニティーが高いほど  $K_D$  はより低い。本発明に関して、アフィニティーは普通は  $K_D$  で表わされる。大部分のアフィニティー測定方法は抗体またはフラグメントの結合部位の数を考慮に入れるので、 $K_A$  および  $K_D$  アフィニティー値は実際には一価の抗体またはフラグメントに関するアフィニティーを反映し、アビディティーは多価の抗体またはフラグメントに関するものであるとみなすことができる。

#### 【 0 0 4 6 】

50

本発明のAFRA抗体およびフラグメントは、好ましくは葉酸受容体アルファ（FR）に100nM～1pMのアフィニティー（ $K_D$ ）で結合する。より好ましくは、それらは75nM未満、好ましくは50nM未満、より好ましくは30nM未満、最も好ましくは5nM未満のアフテニティー（ $K_D$ ）をもつ。たとえば本発明の一価フラグメント、たとえばFabフラグメントは、一般に50nM未満の $K_D$ を示す。このアフィニティーは、既知の単量体C4 Fabフラグメントよりかなりの改善である。本発明の二価フラグメント、たとえばF(ab')<sub>2</sub>またはジFabマレイミド（DFM）は、一般に30nM未満、たとえば5nM未満の $K_D$ を示す。これらの数値は、可溶性受容体または細胞表面発現受容体のいずれかを抗原として用いて得ることができる。

#### 【0047】

本発明によれば、結合アフィニティーは多数の一般的方法、たとえば平衡透析により、データのScatchard分析を用いて測定できる。これによれば：

$$r/c = K(n - r)$$

であり、ここで：

- ・ r = 平衡状態における結合したリガンドのモル数 / 抗体のモル数；
- ・ c = 平衡状態における遊離リガンド濃度；
- ・ K = 平衡会合定数；および
- ・ n = 抗体分子当たりの抗原結合部位の数（結合価）。

#### 【0048】

ELISA競合結合アッセイも $K_A$ の測定のために使用でき、この場合もScatchard分析を使用する。あるいは、相対 $K_D$ をELISAプラトー信号の半分が得られる濃度として判定することもできる。

#### 【0049】

結合アフィニティーを測定するために使用できる他の方法は、たとえばBiacore法（Pharmacia）を用いる表面プラズモン共鳴（SPR）である。この方法を用いると、アフィニティー定数のほか結合速度も測定できる。この方法によれば、 $K_D = k_{diss} / k_{ass}$ である；ここで $k_{diss}$ は解離速度定数（ $k_{off}$ とも表示される）であり、 $k_{ass}$ は会合速度定数（ $k_{on}$ とも表示される）である。

#### 【0050】

本発明によれば、アフィニティー分析に用いる抗原は、全細胞（whole cell）、特にヒト細胞、たとえばヒト卵巣癌細胞、たとえばOVCA3（ATCC）、IGROVI（Dr J. Benardにより寄贈、Institut Gustave Roussy, Villejuif, フランス）、またはヒト葉酸受容体アルファでトランスフェクションした細胞、たとえばA431-Fr細胞<sup>(18)</sup>の表面に発現する葉酸受容体アルファであってもよい。あるいは、抗原は可溶性受容体の形態、たとえば図10に示す組換えFRであってもよい。可溶性受容体の使用は表面プラズモン共鳴（SPR）分析に特に有利であり、ヒトにおけるインビボ結合を推定するのに使用できる。

#### 【0051】

本発明のAFRA抗体およびフラグメントは、多くの療法、診断およびイメージング用途に使用できる。したがって本発明は、葉酸受容体アルファ（FR）の過剰発現が関与する障害を処置するための、本発明によるAFRA抗体またはフラグメントに関する。特に、本発明のAFRA抗体およびフラグメントは、葉酸受容体アルファ（FR）の過剰発現が関与する障害、たとえば癌の処置のための医薬の製造に使用できる。したがって本発明の1観点は、葉酸受容体アルファ（FR）の過剰発現が関与する障害を処置するための方法であって、その処置を必要とする対象に有効量の本発明によるAFRA抗体またはフラグメントを投与することを含む方法に関する。

#### 【0052】

多くの療法、診断およびイメージング用途のために、抗体またはフラグメントをエフェクター部分、たとえば細胞毒性物質またはマーカーにコンジュゲーションさせる。これは、癌、たとえば婦人科癌などの障害の処置の場合に行なわれる。

10

20

30

40

50

## 【0053】

A F R A 抗体およびフラグメントの特に好ましい療法用途は、ヒトにおける卵巣癌の放射免疫療法における用途である。そのような用途のために、抗体およびフラグメントを細胞毒性放射性核種、たとえば $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{188}\text{Re}$ にコンジュゲーションさせる。最も好ましい放射性核種は $^{131}\text{I}$ である。さらに、他の放射性核種、たとえば $^{99}\text{Tc}$ は、たとえば診断またはイメージングのセッティングに使用できる。

## 【0054】

A F R A 抗体およびフラグメントは、葉酸受容体アルファに対するそれらの $K_D$ 値が低く、既知のC4 Fabより著しく改善されているため、放射免疫療法に特に好適である。C4のアフィニティーと対比してA F R A 抗体およびフラグメントのアフィニティーがより高いことは、放射免疫療法にとって実質的な利点である；これは、腫瘍への局在化および抗体用量に直接影響を及ぼすからである。この場合、A F R A 抗体およびフラグメントのアフィニティーがより高いことは、腫瘍結合抗体の量を直接反映する。すなわち、A F R A 抗体およびフラグメントはC4よりはるかに低い $K_D$ 値をもつので、A F R A 分子は同じ希釈度においてC4の場合より高い濃度で腫瘍組織に到達するであろう。これによりバックグラウンドが低下し、主に抗体の非特異的結合によるものである処置副作用も結果的に低減する。放射免疫療法の効果は腫瘍における特異的な放射能蓄積に基づいており、A F R A 抗体およびフラグメントを用いて得られる腫瘍/健常組織比がより高いことは、療法効果の改善を明瞭に示すものとなる。

## 【0055】

本発明の抗体またはフラグメントへの放射性核種のコンジュゲーションは、いずれかの一般的方法を用いて、たとえば抗体と放射性同位体の間にリンカーを用いて行なうことができる。好ましくは、放射免疫コンジュゲートは放射性核種に応じて約0.5～約15 mCi/mgの比放射能をもち、静脈内その他の経路で投与できる。目的とする処置の期間および有効性に応じて、本発明の放射性核種-抗体コンジュゲートを1回または数回、他の療法薬または放射線増感剤と組み合わせて投与することができる。放射免疫コンジュゲートの適用量は、その癌の厳密な性質に依存する。投与当たりの放射エネルギーは有効であるのに十分なほど高くなければならないが、線量限界毒性(DLT)より低くなければならない。1回投与が好ましい；多数回投与も可能である。一般に、投与当たりの放射エネルギーは、20～80 mCi/m<sup>2</sup>体表面積(BSA)であろう。

## 【0056】

本発明の好ましい態様によれば、放射免疫療法に用いるA F R A 抗体フラグメントは二量体フラグメント、たとえばF(ab')<sub>2</sub>または化学的Fab二量体、たとえばFab'-DFMである。放射免疫療法用の代表的なA F R A Fab二量体は、A F R A L鎖をIgGH鎖と共に含み、これはたとえば図8に示す可変部、または図8の配列のCDR類を異なる枠組み配列中に含む可変部をもつ。

## 【0057】

本発明の抗体およびフラグメントを単一の療法薬として、障害、たとえば癌、特に卵巣癌の処置に使用できる。あるいは、それらを他の療法薬と共に、複数の薬物および/または処置方法を伴う併用療法に使用できる。たとえば本発明の抗体またはフラグメントを化学療法、放射線療法、ホルモン療法または生物学的療法と併用できる。

## 【0058】

したがって本発明のこの態様は、療法に同時、個別または逐次使用するための組合わせ製剤としての、本発明による抗体またはフラグメントおよび少なくとも1種類の他の療法薬を含有する製剤に関する。他の療法薬は、一般に化学療法薬および放射線療法薬よりなる群から選択される。併用療法のためのそのような製剤は、ヒトの癌、たとえば卵巣癌の処置に特に適切である。

## 【0059】

そのような併用療法に関しては、本発明の抗体またはフラグメントを一次処置として、適切な二次処置と共に使用でき、二次処置はA F R A 抗体またはフラグメントと同時に、

10

20

30

40

50

またはそれに続いて施すことができる。あるいは、本発明の抗体またはフラグメントを二次処置として、化学療法などの一次処置を補助するために使用してもよい。したがって本発明のこの観点には、葉酸受容体アルファ（F R ）の過剰発現が関与する障害を処置するための方法であって、その処置を必要とする対象に有効量の第1療法薬および有効量の第2療法薬を投与することを含む方法が含まれ、その際、第1および第2療法薬は対象に同時、逐次または個別に投与され、第1または第2療法薬は本発明によるA F R A抗体またはフラグメントを含む。

#### 【0060】

したがって本発明の抗体またはフラグメントは、ヒトの癌、特に卵巣癌の処置のために他の療法薬、たとえば化学療法薬との補助療法または合併療法を実施するために使用できる。

10

#### 【0061】

本発明の他の観点によれば、A F R A抗体またはフラグメントは他の抗体またはフラグメントと共に、カクテルまたは混合物の形で存在してもよい。これらの他の抗体またはフラグメントは、葉酸受容体アルファに特異的な他のA F R A抗体またはフラグメントであってもよく、あるいは異なる抗原に対する特異性をもつ抗体またはフラグメントであってもよい。本発明のカクテルまたは混合物は、異なるA F R A抗体フォーマットを含むA F R A抗体またはフラグメントの混合物、たとえば図1もしくは図7に示すA F R Aアミノ酸配列（S E Q I D N O : 1）をもつ少なくとも1つのL鎖またはこのL鎖の機能均等物を含む単量体および二量体A F R Aフラグメント（1以上）の混合物をも含有することができる。

20

#### 【0062】

したがって本発明にはA F R A抗体またはフラグメントの混合物が含まれ、この混合物には下記のものを含むかまたはそれらからなる抗体フラグメントの不均一組成物が含まれる：

i) ヒト葉酸アルファ受容体に特異的に結合する二価抗体フラグメント；この二価フラグメントは、図1もしくは図7に示すA F R Aアミノ酸配列（S E Q I D N O : 1）をもつL鎖またはこのL鎖の機能均等物をそれぞれが含む2つの共有結合したF a b 'フラグメントを含む、および

i i) 図1もしくは図7に示すA F R Aアミノ酸配列（S E Q I D N O : 1）をもつ少なくとも1つのL鎖またはこのL鎖の機能均等物を含む、他の抗体フラグメント；二価抗体フラグメント（i）は、組成物の少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも70%を構成する。好ましくは、フラグメント（i i）は、組成物の20%未満、最も好ましくは10%未満を占める。

30

#### 【0063】

二価の種は、F a b 'フラグメントのヒンジ部間のジスルフィド結合により結合した天然二量体であってもよく、あるいは化学的二量体、たとえばD F M - A F R Aであってもよい。

#### 【0064】

たとえば、自然二量体化の条件では、精製後に約80%のA F R A二量体化生成物がF（a b'）<sub>2</sub>であることが認められる。本発明のA F R Aフラグメントが形成する抗原結合性二量体の割合が高いことは、既知のC4 F a bと比較したさらに他の利点となる。本発明者らは、二量体化に際して偽二量体が形成されることを観察した。この偽二量体は、2つのL鎖が1つのH鎖に共有結合し、第2のH鎖が疎水性相互作用によりこの構造体内に保持されたものからなる。この偽二量体はS D S - P A G Eにおいて2つの種、すなわち75 k D aをもつもの（L<sub>2</sub>H）および25 k D aをもつ他のもの（H鎖）に分離できるので、簡略化のためにL<sub>2</sub>Hと呼ばれた。C4 F a b'の'自然'二量体化に際しては、適正な二量体L<sub>2</sub>H<sub>2</sub>は反応生成物の約30%であるにすぎないのに対し、残り70%の物質はL<sub>2</sub>H二量体に相当する。C4二量体をその代替物からクロマトグラフィーにより精製するのは不可能であり、偽二量体の割合が適正な二量体の割合よりはるかに

40

50

高いので、C4分子を放射免疫療法用として開発することは実現不可能である。

#### 【0065】

化学的二量体化により得られる二量体について、AFRAフラグメントは少なくとも50%のF(ab')<sub>2</sub>を含む二量体化生成物混合物を生成する。組成物の20%未満、最も好ましくは10%未満を占めるL<sub>2</sub>H種は存在してもよく、これら2形態をクロマトグラフィー法で分離できない場合でも、不均一組成物は精製された形で存在する。L<sub>2</sub>H種が存在するにもかかわらず、この不均一なAFRA-DFM混合物は、ヒト葉酸アルファ受容体に対して、たとえば50nM未満、好ましくは30nM未満、最も好ましくは5nM未満のKDで高い結合アフィニティーをもつことが示された。

#### 【0066】

「自然」二量体形成に際してC4 L鎖が反応する強い傾向は、化学的二量体合成(DFM)に際してはさらに顕著であり、幾つかのpHおよび温度条件を試験してもいかなる二量体組立でもほとんど阻止される。C4の化学的二量体化反応により得られる収率は5%未満であり、そのうちわずかに約30%が適正な二量体である。したがって、反応終了時に得られる二量体の総%はAFRAの場合より10倍低い。C4 Fabのこの特有の特性は、単量体として使用できない低いアフィニティーと共に、放射免疫療法のためのC4抗体フラグメントの開発を妨げている。

#### 【0067】

本発明の他の観点は、葉酸受容体アルファ(FR)に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントのL鎖をコードする配列を含む核酸分子に関するものであり、その際、そのL鎖はSEQ ID NO: 1の配列またはその機能均等物を含む。核酸はDNAまたはRNAのいずれであってもよく、二本鎖または一本鎖のいずれであってもよい。

#### 【0068】

本発明は、上記の核酸配列を含む発現ベクターに関するものでもあり、その際、その核酸コード配列は作動可能な状態で転写調節シグナルに結合しており、これによりAFRAL鎖を適切な宿主細胞において発現させることができる。この核酸はさらに、抗体H鎖またはそのフラグメントをコードする配列を例えばビストロニック配置(bicistronic arrangement)で含むことができ、これにより宿主細胞におけるL鎖とH鎖の自然会合が促進される。

#### 【0069】

本発明は、AFRAL鎖をコードする核酸を含む宿主細胞、たとえば本発明の発現ベクターで形質転換した宿主細胞にも及ぶ。宿主細胞は原核細胞または真核細胞のいずれであってもよい。原核宿主細胞の例としては、大腸菌(*Escherichia coli*)が特に好ましい。適切な真核細胞の例には、ヒト、霊長類、ネズミまたは酵母の細胞が含まれる。

#### 【0070】

特に好ましい細胞は、ブダペスト条約の条項のもとに、CNCMに2006年3月15日に寄託番号CNCM I-3586で寄託された大腸菌株である。この微生物(大腸菌株BW25113 PyrC::kan(lacI<sup>q</sup>, rrnB<sub>T14</sub>, lacZ<sub>WJ16</sub>, hsdR514, araBA-D<sub>AH33</sub>, rhaBAD<sub>LD78</sub>))は、プラスミドDoB0134を含み、本発明のAFRA Fabを産生する。この寄託菌株から得ることができるAFRA Fabフラグメントも本発明の範囲に含まれる。

#### 【0071】

本発明はまた、葉酸受容体アルファ(FR)に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントである高アフィニティーのヒト抗体またはそのフラグメントを調製するための、下記の工程を含む方法に関する：

- 前記の発現ベクターを適切な宿主にトランスフェクションし；
- 発現したAFRA抗体またはそのフラグメントを回収し；
- 回収した抗体またはそのフラグメントを場合により変異形成及び/または二量体化する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 2 】

こうして発現した抗体またはフラグメントの変異形成を行なってヒンジ部またはシステイン残基を付加することができ、あるいは変異形成を利用して抗体／フラグメントのアフィニティーおよび特異性を微調整または改変することができる。

## 【 0 0 7 3 】

1 態様においては、前記の発現ベクターを、細胞において、抗体 H 鎖またはそのフラグメントをコードする核酸配列を含みその核酸が作動可能な状態で転写調節シグナルに結合している第 2 発現ベクターと共発現させる。

## 【 0 0 7 4 】

本発明の抗体を作成するための別法は、下記の工程を含む：

- ヒト  $V_H C_H$  レパトアの構築；ヒトのレパトアは、卵巣癌患者であったけれども好ましくはレパトア構築時点ではその疾患を伴わない者、または健常なドナーに由来する、骨髓、リンパ節、脾臓または末梢血から得たヒト B 細胞から構築することが好ましい。レパトアは合成により作成することもできる；

- 葉酸受容体アルファ (F R ) に特異的に結合する能力をもつヒト抗体 H 鎖の選択；この選択はガイド付き選択により実施され、ヒト  $V_H C_H$  レパトア上のガイド鑄型として S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列の L 鎖を含む抗体フラグメントを用い、続いて F R または可溶性 F R タンパク質を過剰発現しているヒト細胞を選択する；

- 選択したヒト抗体 H 鎖をコードする遺伝子を、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列をもつ L 鎖をコードする遺伝子と共に、適切な宿主細胞において、これらの L 鎖および H 鎖の組み立てが可能な条件で発現させる。

1 態様において、選択したヒト抗体 H 鎖をコードする遺伝子および S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列をもつ L 鎖をコードする遺伝子は、選択したヒト抗体 H 鎖および S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列をコードする核酸配列が転写調節シグナルに作動可能な状態で結合したものを含む発現ベクターにより、細胞において発現される。

## 【 0 0 7 5 】

別法では、選択したヒト抗体 H 鎖をコードする核酸配列が転写調節シグナルに作動可能な状態で結合したものを含む第 1 発現ベクターにより、選択したヒト抗体 H 鎖をコードする遺伝子を細胞において発現させ、そして A F R A L 鎖をコードする核酸配列が転写調節シグナルに作動可能な状態で結合したものを含む第 2 発現ベクターにより、S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列をもつ L 鎖をコードする遺伝子を細胞において発現させる。

## 【 0 0 7 6 】

この方法により、A F R A L 鎖と結合した際に葉酸受容体アルファに特異的な結合ドメインを形成する種々の H 鎖の選択が可能になる。このタイプの方法の具体的な詳細を後記の実施例に示す。

## 【 0 0 7 7 】

本発明の他の観点は、本発明の抗体またはフラグメントを医薬的に許容できるキャリアーと共に含む医薬組成物に関する。そのような組成物においては、抗体またはそのフラグメントを、一般に抗体に結合させて用いるエフェクター部分、たとえば  $^{131}I$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{188}Re$ 、または毒素もしくは化学療法薬もしくはプロドラッグもしくは酵素にコンジュゲートさせることができる。 $^{99}Tc$  は診断用に使用できる。

## 【 0 0 7 8 】

本発明は、卵巣癌またはその転移の診断またはイメージングのための方法であって、たとえば対象の組織またはその試料を本発明による抗体またはそのフラグメントと接触させることを含む方法を提供し、その抗体またはフラグメントは放射性核種などの適切な標識に結合している。この診断法またはイメージング法はインビボで実施でき、その際、組織への有意の抗体結合が検出されたことは、葉酸受容体アルファの過剰発現があることの指標であり、これは細胞の悪性トランスフォーメーションを示唆する。あるいは、この診断法またはイメージング法は体外で、たとえばインビトロで、対象から得た生物試料、たとえば組織試料について実施できる。後者の場合、そのような組織のトランスフォーメーシ

10

20

30

40

50

ョンしていない正常な細胞において頂端側に発現している葉酸受容体アルファの検出を考慮するために、本発明の抗体またはフラグメントの結合レベルを正常組織試料について観察された結合レベルと比較することを推奨する。

【0079】

本発明の多様な観点を図面で説明する。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】C4 (SEQ ID NO: 12) と AFRA (SEQ ID NO: 1) の L 鎖アミノ酸配列のアラインメント。AFRA L 鎖は 218 個のアミノ酸を含み、そのうち最初の 113 個のアミノ酸はカップパ可変部を構成し、残りの 105 個のアミノ酸はカップパ定常部である。C4 抗体と AFRA 抗体の主な相異は CDR にある。

10

【図2】AFRA Fab を大腸菌において発現させるのに適したピシストロン発現ベクター DoB0134 の模式図。図1に示す AFRA L 鎖 (SEQ ID NO: 1) および AFRA H 鎖 (Q1N 変異を含む) をコードする核酸配列を含むこのベクターを大腸菌に導入したものは、CNCM に 2006 年 3 月 15 日に寄託番号 CNCM I-3586 で寄託された。BW25113 PyrC::Kan (lacI<sup>q</sup>, rrnB<sub>T14</sub>, lacZ<sub>WJ16</sub>, hsdR514, araBA-D<sub>AH33</sub>, rhaBAD<sub>L78</sub>)。

【図3】(BIAcore 結合): アルファ葉酸受容体における抗体フラグメント結合パラメーターの測定。このために、数種類の濃度 (3 ~ 200 nM) の Fab 単量体を、予め組換え受容体でコーティングしたセンサーチップセルに流し、結合を 30 分間記録した。この期間の後、さらに 20 分間、洗液をモニターした。AFRA については 1.85 の Chi<sup>2</sup> で K<sub>D</sub> が 43.9 nM と判定された (パネル A) のに対し、C4 については 2.19 の Chi<sup>2</sup> で K<sub>D</sub> が 168 nM と判定された (パネル B)。

20

【図4】(自然二量体化): Fab AFRA および C4 を緩和に還元し、そして穏やかに酸化して、自然二量体を得た。反応生成物を SDS-PAGE により分析し、結果を上側のパネル A に AFRA についてその相対濃度測定分析と共に報告し、一方、パネル B は C4 に対応する。L<sub>2</sub>H 種の生成を C パネル画像に報告する。

【図5】(免疫組織化学): 抗 CA125 モノクローナル抗体を内部陽性対照として卵巣癌に対応するヒト生検試料において調べた (A パネル)。同じ方法で、AFRA-DFM (0.5 μg/ml) を同一組織において評価した (B パネル)。両抗体とも FITC 処理し、バックグラウンドを C スライドで推定した。

30

【図6】(AFRA-DFM-<sup>131</sup>I の生体内分布): <sup>131</sup>I で放射性標識したジ-Fab-マレイミドを腫瘍保有マウスに静脈内注射した。動物を注射後 1、3、6、15、24 および 48 時間目に屠殺した。腫瘍、血液および予め定めた臓器を摘出、秤量および計数して、AFRA-DFM の濃度を判定した。生体内分布の結果をこの図にグラム当たりの注射量 (ID) に対するパーセントとして報告する。

【図7】AFRA カップ L 鎖アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1): 下記を示す:  
- アミノ酸 1 ~ 113 にわたる可変部 (V); - 結晶構造から確認した超可変部: CDR1 (アミノ酸 24 ~ 38)、CDR2 (アミノ酸 54 ~ 60) および CDR3 (アミノ酸 93 ~ 102) (太字、下線); - アミノ酸 114 ~ 219 にわたるカップパ定常部 (C) (二重下線)。

40

【図8】AFRA H 鎖 (可変部) アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2): - アミノ酸 1 ~ 120 にわたる可変部 (V); - 超可変部: CDR1 (アミノ酸 31 ~ 35)、CDR2 (アミノ酸 50 ~ 66) および CDR3 (アミノ酸 99 ~ 110) (太字、下線)。

【図9】AFRA H 鎖 (定常部: IgG1 CH1) (SEQ ID NO: 8)。

【図10】(アルファ葉酸受容体): A: 葉酸受容体アルファのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 10): - シグナル配列: アミノ酸 1 ~ 24 - 成熟受容体配列: アミノ酸 25 ~ 234 - プロペプチド配列: アミノ酸 235 ~ 237、成熟形においては除

50

去される - グリコシル化部位：アミノ酸 69、161 および 201 B：精製用 His 6 タグ付きの組換え可溶性アルファ葉酸受容体 (SEQ ID NO：11)。

【図 11】マウスに異種移植した腫瘍における、平均線量 1 mCi / マウスの放射性標識 A F R A - D F M のインビボ有効性。黒色棒：ヒト葉酸受容体アルファでトランスフェクションした A 4 3 1 細胞 (A 4 3 1 F R) の腫瘍。斜線を施した棒：ヒト葉酸受容体アルファでトランスフェクションしていない A 4 3 1 細胞 (A 4 3 1) の腫瘍。白い棒：対照。

【図 12】腹腔内投与後のインビボ局在化。腹腔内増殖した I G R O V 1 腫瘍細胞を保有するマウスに、 $^{131}\text{I}$  で放射性標識した A F R A - D F M を腹腔内注射した (平均線量 = 0.074 mCi / マウス)。動物を、注射後 1、3、6、15 および 24 時間目に屠殺した。腹水、腹腔内固形腫瘍塊、血液および予め定めた臓器を摘出、秤量および計数して、A F R A - D F M の濃度を判定した。生体内分布の結果をグラム当たりの注射量に対するパーセントとして報告する。

【図 13】マウスに異種移植した卵巣癌細胞における、放射性標識 A F R A - D F M のインビボ有効性。A：ヒト葉酸受容体アルファを自然に過剰発現する I G R O V 1 細胞を腹腔内注射し、+ 2 日目に 1 mCi / マウスの  $^{131}\text{I}$  - D F M - A F R A または生理食塩水 (対照) で腹腔内処理したマウスの総生存率。B：ヒト葉酸受容体アルファを自然に過剰発現する O V C A R 3 細胞を腹腔内注射し、+ 2 日または + 4 日目に 1 mCi / マウスの  $^{131}\text{I}$  - D F M - A F R A または生理食塩水 (対照) で腹腔内処理したマウスの総生存率。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0081】

1. アルファ葉酸受容体に特異的な高アフィニティーヒト F a b フラグメントの作成

結合アフィニティーの増大を含む改善された結合特性をもつヒト F a b フラグメントを得るために、C 4 F a b フラグメントを有意に改変した。これらの改変を以下に記載する：

a) 鎖シャフリング：アルファ葉酸受容体に特異的なカップ L 鎖の選択

まず C 4 ラムダ L 鎖をカップ L 鎖で置換することを決定した。この F a b L 鎖置換は、C 4 フラグメントについて先に記載されたファージディスプレイガイド付き選択により実施された ( $^{11}$ )。

【0082】

具体的には、抗体カップ L 鎖 (V C) ライブラリーをヒト B 細胞から作成した。

このライブラリーは、以前に卵巣癌に罹患していたが採血時点では疾患を伴わない 4 人の女性から得た末梢血リンパ球からプールした m R N A に由来していた。これらの女性は採血前の数年間、疾患を伴わない状態にあった。3 人の女性は以前に I I I または I V 期の疾患と診断された重篤な組織学的タイプの癌に罹患していた。4 人目の患者は以前に、I I I 期と診断された子宮内膜様の組織学的タイプの卵巣癌を伴っていた。ライブラリー作成のために、各患者から  $2.0 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$  の P B M C を採集した。プライマーアニーリング温度に従った P C R 比効率を補償するために、適切なプライマー対によりそれぞれの鎖ファミリーを個別に増幅させた。

【0083】

患者は以前に葉酸受容体アルファ抗原の過剰発現に曝露されていたので、こうして得たユニーク V C レパトアはナイーブレパトアではなかった。それは特定の腫瘍に対して、おそらくその疾患を伴う女性に発現したアルファ葉酸受容体に対して形成された抗体の遺伝子を含んでいた可能性がある。

【0084】

こうして得たライブラリーを用いて C 4 H 鎖と適合する新規な L 鎖を選択した。本発明者らはアルファ葉酸受容体に対して C 4 分子と同じ特異性を共有する抗体フラグメントを探求していたので、ガイド付き選択プロトコルを適用した。新規なカップ L 鎖を選択す

10

20

30

40

50

るためのガイド鋳型としてC4 H鎖を用い、卵巣癌細胞(OVCA R - 3細胞)について3回のパンニングを行なった後、幾つかのファージをランダムに採取し、それらがこれらの細胞に結合する能力を評価した。最良結合体を同定し、AFRA (Anti Folate Receptor Alpha、抗-葉酸受容体アルファ)と命名し、そのL鎖配列を決定した。

#### 【0085】

選択したカップL鎖アミノ酸配列を図1に報告する。AFRAとC4フラグメントは、実施例1cに報告するように、AFRA H鎖の第1アミノ酸にQ1N変異が導入されていること以外は同一のH鎖をもつ。

#### 【0086】

##### b) 大腸菌におけるFabの発現：

次いで、AFRA FabフラグメントおよびC4 Fabフラグメントを大腸菌において発現させるのに適切な発現構築体を作成した：フラグメント合成を大腸菌周辺細胞質コンパートメントで行なわせるために、AFRAまたはC4のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子をリーダー配列(大腸菌の耐熱性エンテロトキシンII由来のStIIリーダー配列)と読み枠を一致させてクローニングした。この発現ベクターは、L鎖とH鎖の両方をコードするピシストロン構築体を、アラビノースaraPプロモーターの制御下に、ジヒドロオロターゼをコードするpyrC選択マーカーと一緒に含むように、発酵用として特別に設計された(基本の発現カセットは下記に記載されている：欧州特許出願EP 0 510 927 4.0、Dompe S.p.A.の名で2005年10月6日出願、本明細書に援用する；およびWO 2007/039632)。ピシストロンベクターは、第2(H)鎖の発現と比較して第1(L)鎖をわずかに過剰に発現するように設計された。この場合、H鎖は単独で発現すると大腸菌に対して有毒となる可能性があるからである。

#### 【0087】

AFRAを発現するベクターはDOB0134と表示され(図2を参照)、CNCMに寄託番号CNCM I - 3586で寄託された(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15、2006年3月15日、大腸菌株BW25113内、PyrC::Kan(lacI<sup>q</sup>, rrnB<sub>T14</sub>, lacZ<sub>WJ16</sub>, hsdR514, araBA-D<sub>AH3</sub>, rhaBAD<sub>L78</sub>)。この菌株は、AFRA L鎖、実施例1cに記載するN末端修飾、および天然ヒンジ部を含むH鎖を発現する。

#### 【0088】

発現ベクターDOB0134を大腸菌内へ形質転換し、AFRA抗体フラグメントを発現させ、精製した。比較のために、既知のC4 Fabを発現する対応する構築体を用いて同様な実験を行なった。

#### 【0089】

C4の産生に際しては、著しいホモL鎖二量体(L<sub>2</sub>)蓄積が観察され、これは組換えタンパク質合成の50%に達した。これは一部は、第2鎖の発現と比較してわずかに過剰の第1鎖を発現する発現ベクターの設計による可能性がある。しかし、この発現ベクターは幾つかの異なるFabの産生に用いられており、これまで他の配列についてはホモ二量体L鎖の産生は観察されていない。このL<sub>2</sub>ホモ二量体は無用な微生物副産物であり、生産プロセスにおいてかなりの欠点となる。実際、それは宿主代謝に著しい負荷をかけ、有用なFab'から分離するのが困難であり、標的結合能をもたず、目的フラグメントの代わりに産生される。

#### 【0090】

これに対し本発明のAFRA Fabは、同じ発現ベクターおよび同じ大腸菌株から、検出可能なホモ二量体L鎖を産生しない。したがって全生産収率が人為的に高められ、樹脂結合に対する目的Fab'フラグメントとホモL鎖二量体の間の競合がないのでクロマトグラフィーカラム容量が著しく縮小する。

#### 【0091】

10

20

30

40

50

A F R A F a bの特異性をF A C Sにより評価した。ヒトアルファ葉酸受容体を発現する細胞についてのみ蛍光シフトが記録された。

c) N末端Q1N変異A F R Aの修飾:

C 4 H鎖をガイド鋳型として用いる最初のガイド付き選択プロトコルの結果、A F R AフラグメントとC 4フラグメントは最初は同一H鎖をもち、その第1アミノ酸はグルタミンであった。しかし、この位置のグルタミンはピログルタミン酸への変換を受ける可能性のあることが知られており<sup>(19)</sup>、これは生成物の不均一性を生じる。したがってN末端グルタミンを部位特異的変異誘発によりアスパラギンで置換した。そのような置換によりアミノ酸側鎖長さが炭素1個分短くなり、その環化が阻止される。部位特異的変異誘発は、A F R A H鎖の第1アミノ酸に対応するDNAトリプレットコドンを変更して、それを目的とするアスパラギン残基に変更するように行なわれた。

10

【0092】

P C R増幅中にこの変異以外の他の予定外の変異が導入されていないことを証明するために、全遺伝子の配列を決定することにより部位特異的変異を確認した。対応するタンパク質を産生させ、均一になるまで精製した。その際、d i - P h e n y lカラム上での逆相H P L C分析により、いずれのp Hにおいてもユニーク種に対応する単一ピークが示された。これは、エレクトロスプレー質量分析により確認され、その際、A F R A分子量はその一次構造から計算したものと一致した。

【0093】

2. ヒト葉酸受容体アルファに対するA F R A F a bフラグメントの結合特性:

20

新規なA F R AヒトF a bフラグメントがヒト葉酸受容体アルファを結合する能力を評価し、その結合をC 4の結合と比較した。B I A c o r e装置(P h a r m a c i a)を用いるプラズモン共鳴により、可溶性組換えヒトアルファ葉酸受容体を標的タンパク質として用いて反応速度分析を実施した(図8を参照)。

【0094】

a) 可溶性アルファイソ型葉酸受容体(F R)の精製

アルファイソ型葉酸受容体(F R)を発現するチャイニーズハムスター卵巢(C H O - K 1)細胞系を構築した。精製を容易にするために、可溶性 F R遺伝子をp I R E S n e o発現ベクターにサブクローニングして、H i s タグ付きの可溶性アルファイソ型葉酸受容体糖タンパク質を発現させた。

30

【0095】

可溶性タンパク質を生成させるために、適切なプライマー対を用いるP C R法により、アミノ酸位置234で終わる短縮形の F Rを工学的に作成して、細胞膜へのタンパク質の固着を仲介する受容体カルボキシ末端部分(G P I - アンカー)を除去した。

【0096】

P C Rプライマーは、p I R E S - n e oベクター多重クローニング制限部位と適合する制限部位をもつように設計された: 半E c o R Vをフォワードプライマー中に、E c o R Iをリバースプライマー中に。P C R生成物をQ u i a e xゲル抽出キット(Q u i a g e n)により精製し、E c o R Iで消化した。消化生成物を精製し、E c o R IおよびE c o R Vで消化し、かつ脱リン酸したp I R E S - n e oベクターに、T 4ライゲーションシステム(B i o l a b s)により一夜ライゲートさせた。ライゲートした試料を大腸菌D H 5 内へ形質転換し、L B - 寒天アンピシリンプレートに播種した。

40

【0097】

幾つかのアンピシリン耐性コロニーを採取し、P C R法により検査した。適正なパターンを示した1クローンをDNA抽出および発現試験のために選択した。発現ベクターのDNA配列を自動配列決定法により確認した。

【0098】

次いでこの発現ベクターをC H O細胞内へトランスフェクションし、安定なクローンをネオマイシン耐性により選択した。それらのうち最良の生産を示すクローンを培養上清のウェスタンブロット分析により確認し、生産規模を1リットルに拡大した。10000x

50

gで15分間の遠心により培養上清を澄清にして上清を細胞から分離し、 $0.22\mu\text{m}$ で濾過し、4で精製を行なった；その際、すべての緩衝液はTween-20を0.05%含有していた。

#### 【0099】

葉酸受容体タンパク質を上清から下記に従って精製した。第1工程では、 $\text{Ni}^{++}$ -Charged Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) を記載に従って用いる固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (immobilized metal affinity chromatography) (IMAC) により、His-タグ付き糖タンパク質を濃縮した。CHO細胞培養上清を、予め20mMリン酸塩、0.15M NaCl pH7.0で平衡化したこのカラムに5ml/分の流速で付与した。すべての上清をカラムに付与した後、これを溶出液の $A_{280\text{nm}}$ がベースラインに戻るまで出発緩衝液で洗浄した。0.5Mのイミダゾールを含有する同じ緩衝液で上記タンパク質を溶離した。 $A_{280\text{nm}}$ ピークを次の工程のために採集した。この時点で、1M HClの滴加によりpHを3.0に低下させ、氷浴内で1時間攪拌することによって、内因性葉酸分子をFRから解離させた。次いで試料をG-25 Sephadexカラム (HiPrep 26/10 脱塩、Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 上で20mMリン酸塩、0.15M NaCl pH7.0と緩衝液交換した。最後に、試料を低速で(0.5ml/分)、5カラム容積の20mMリン酸塩、0.15M NaCl pH7.0で平衡化した葉酸-Sepharose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) の2mlカラムに通した。流出液を分析のために採集した。カラムを平衡化用緩衝液で洗浄した後、FRをアフィニティー樹脂から0.1Mグリシン、0.5M NaCl pH2.8で溶離した。

#### 【0100】

50mLの1Mリン酸ナトリウム、pH7.0を入れたポリプロピレン試験管に画分を採集して、溶出液のpHを7.0に高めた。この調製物中のFRの純度を、SDS (15%) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により非還元条件下でLaemmli (13) の方法に従って測定し、ゲルをクーマシーブリリアントブルーでタンパク質につき染色した。純度100%と思われる画分をブールし、DCタンパク質アッセイキット (Bio-Rad Richmond, CA) により標準としてBSAを用いてタンパク質濃度を測定した (14)。精製したFRを小分けして-25に保存した。

#### 【0101】

##### b) アフィニティー測定

標的タンパク質をC5 BIAcoreセンサーチップ上にコーティングし、数種類の濃度の両抗体フラグメントを用いて結合速度を測定した。具体的には、CM5センサーチップにアミン結合キット (Pharmacia) により、組換えFRを10mM酢酸ナトリウム、pH4.8中において抗原濃度 $0.6\mu\text{g/ml}$ で共有結合させ、280RUの表面を得た。残存する活性基を $35\mu\text{l}$ のエタノールアミン (1.0M pH8.5) の注入によりブロックした。見掛け解離速度定数 ( $K_{off}$ ) を、抗体200~3.125nM、緩衝液流速 $50\mu\text{l/分}$ の飽和条件下で、wizardプログラムを用いて計算した。少なくとも30分間、評価を行なった。続いて、100mMグリシン緩衝液、pH2.7によりセンサーチップに結合した残存抗体の脱着を行なった。

#### 【0102】

それぞれのアフィニティーを結合曲線から演繹した。C4およびAFRAの両方とも固定化抗原に結合することができた。しかし、AFRAにつき計算した $K_D$  (43, 9nM) はC4のもの (168nM) より3倍以上低く、これは、アフィニティーがより高いことを示す。結果を図3に報告する。AFRA単量体の結合速度は、会合速度がきわめて高いが、解離定数も高いことを示す；これは、放射免疫療法に用いる抗体にとって時には欠点となる可能性がある；効果的な腫瘍照射のためには、抗体がいったん腫瘍に結合するとその持続効果が必須だからである。

## 【 0 1 0 3 】

3. 自然二量体  $F(a b')_2$  の調製および  $F(a b')_2$  のインビトロ結合特性：

## a) 自然二量体化

A F R A F a b の解離速度を低下させるために、かつフラグメントのアビディティをさらに高めるために、F a b フラグメントを二量体化することを決定した。このために、ガンマ1ヒトファミリーの天然ヒンジ配列に対応するペントペプチド D K T S C を A F R A および C 4 両方の H 鎖のカルボキシ末端に付加して、F a b' と表示されるフラグメント（すなわち、カルボキシ末端にヒンジ部に属する余分な遊離システインをもつ F a b）を形成した。次いでこの F a b' フォーマットから、抗体 H 鎖のカルボキシ末端に意図的に付加した、天然全長抗体ヒンジ部の第 1 システインに対応するこの遊離システイン残基（<sup>20</sup>）の自然酸化により、 $F(a b')_2$  二量体を得ることができた。

10

## 【 0 1 0 4 】

A F R A および C 4 両フラグメントを T C E P（トリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩）と共に緩やかな条件下で保温して、カルボキシ末端 H 鎖システインを還元し、緩衝液を交換して還元剤を除去し、pH を 8 に調整した；これは、ジスルフィド結合の形成に化学的に好ましいことが知られている。

## 【 0 1 0 5 】

ゲル濾過クロマトグラフィーにより二量体を反応混合物から分離すると、それらは単一ピークとして分離した。S D S - P A G E 分析により、二量体調製物は予想したように均一ではなく、それらのピークはゲル上では数個のバンドを生じることが明らかになった：

20

- A F R A フラグメントについて、材料の 8 0 % を占める主バンドは予想どおり 1 0 0 k D a の範囲に移動し、A F R A 二量体と特定された。全材料の 1 6 % を占め、見掛け分子量 7 5 k D a をもつもうひとつのバンドを検出でき、これは普通の単量体が他の F a b

L 鎖に共有結合したものからなる " 二量体 "（ $L_2 H$ ）と特定された。この " 二量体 " は、第 1 単量体からのカルボキシ末端システインが第 2 の F a b 単量体の L 鎖のカルボキシ末端システインを異例に攻撃した結果、生成した。この L 鎖システインは普通は H 鎖とのジスルフィド結合に関与しているものであり、したがって他のいずれのジスルフィド結合形成にも利用される可能性はない。得られたこの二量体において、F a b H 鎖はもはや分子の残部に共有結合しておらず、ファン - デル - ワールス力および疎水性相互作用により L 鎖と相互作用しているにすぎないので、この物質は自然条件で実施するゲル濾過精製に際しては普通の二量体として溶出するが、S D S - P A G E 分析に際しては界面活性剤（S D S）濃度が分子を分解するのに十分なものであれば、2 つのバンドとして分離する（図 4）。実際にこの列には、 $L_2 H$  と共に、代替二量体からもぎ取られた共有結合していない H 鎖に対応するもうひとつのバンドをゲル底部に検出でき、これは全材料の 4 % を占める；

30

- C 4 F a b の場合、意外にも状況はさらに悪かった；この場合、S D S - P A G E において  $L_2 H$  化合物、すなわち A F R A 反応の不純物に対応する主バンド（全材料の 4 3 %）が今回は C 4 二量体化反応の最多量の生成物となったからである。共有結合した二量体は全材料の 2 9 % を占めるにすぎず、S D S 分離した H 鎖は混合物の 2 5 % であった；

40

この分析をさらに L C - 質量分析により確認して、ゲル濾過精製後に得られた材料中に存在するすべての種を明瞭に同定することができた。

## 【 0 1 0 6 】

自然の水性条件では、適正な二量体と、共有結合していない H 鎖を含む " 二量体 " に対応する不純物とのクロマトグラフィー挙動には、これらの 2 種を分離するために利用できる差がない。本発明者らは、純粋な二量体を得るためにイオン交換または疎水性相互作用クロマトグラフィーにより両種の分離を試みたが成功しなかった。本発明者らは、選択的熱変性により不純物を二量体から除去することも試みたが成功しなかった。

## 【 0 1 0 7 】

b) E L I S A :  $F(a b')_2$  のアルファ葉酸受容体直接結合

50

次いで2種類のF(ab')<sub>2</sub>二量体を、ヒトアルファ葉酸受容体でトランスフェクションしたA431細胞系において、ならびにヒト卵巣癌細胞系OVCAR3およびIGROVIにおいて、ELISA方式で結合を直接に試験した。

#### 【0108】

細胞4×10<sup>4</sup>個(ヒト卵巣癌細胞系OVCAR3(ATCC)およびIGROVI(Dr J.Benardからの寄贈, Institut Gustave Roussy, Villejuif, フランス)、ならびに葉酸受容体アルファでトランスフェクションしたヒト類表皮癌細胞であるA431-FR<sup>(17)</sup>細胞)を、96ウェルフォーマットプレートの各ウェルに播種し、集密単層が得られるまで増殖させた。細胞を室温で5分間、PBS中の0.1%グルタルアルデヒドで固定した。プレートをPBSで2回、次いでPBS+0.02% NaN<sub>3</sub>中の0.1Mグリシンで1回(5分間)、PBSで連続5回、最後に1%のBSAおよび0.02%のNaN<sub>3</sub>を含有するPBSで洗浄した。

#### 【0109】

抗体フラグメント(C4またはAFRA)の系列希釈液を室温でPBS+0.03% BSA中において1時間結合させ、PBSで3回洗浄した。

PBS+0.03% BSA中に1:1000希釈したペルオキシダーゼ結合-抗ヒトIgG(Fab特異的, Sigma)を用いて、抗体フラグメント結合を解明した。100μlのTMB溶液(Sigma)を室温で30分間添加することによりELISAプレートを呈示させ、50μlのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(1M)の添加により停止し、450nmで読みとった。

#### 【0110】

空のベクターでトランスフェクションしたA431 mock細胞にはFR-アルファでトランスフェクションした細胞と比較して信号を検出できなかったため、AFRAおよびC4抗体の両方ともアルファ葉酸受容体に特異的であると判定された。両フラグメントとも低いナノモル濃度範囲でほぼ同じ総アフィニティを示し、効力は放射免疫療法用に適合していた(ただし、C4のF(ab')<sub>2</sub>は偽二量体L<sub>2</sub>Hで著しく汚染されていたので、実際の使用、特に放射免疫療法における実用には適さないことを留意されたい)。表Iに、C4およびAFRA抗体フラグメントのF(ab')<sub>2</sub>のK<sub>D</sub>のELISA測定値を報告する。K<sub>D</sub>は、ELISAプラトー信号の半分が得られる濃度として判定された。

#### 【0111】

#### 【表1】

表I

F(ab') <sub>2</sub>	K <sub>D</sub> (nM)		
	OVCAR3	A431-FR	IGROV1
C4	11±2	1,2±0,1	118±64
AFRA	26±10	2,5±0,7	57±21

#### 【0112】

#### 4. Fab'の化学的二量体化およびインビボ結合特性:

腫瘍特異性および局在化を証明するために、インビボアッセイを実施した。ただしインビボでは、F(ab')<sub>2</sub>分子の2半分を互いに保持するジスルフィド橋が急速に加水分解されてF(ab')<sub>2</sub>は速やかにFabフラグメントに再変換され、血流から排除される。したがって、インビボでF(ab')<sub>2</sub>フォーマットを保持するために、以下に記載する化学的二量体化を行なう。

## 【0113】

## a) ビスマレイミド (BMOE) による Fab' フラグメントの二量体化

インビボで  $F(ab')_2$  フォーマットを保存するために、2つの Fab' を結合して  $F(ab')_2$  を形成する非加水分解性リンカーを用いた<sup>(21)</sup>。より具体的には、Fab' フラグメントを二量体化してジ Fab マレイミド (DFM) にするためにビスマレイミドエタンリンカー (BMOE) を同定した<sup>(22)</sup>。臨床開発のための最良の候補を同定するために AFRA および C4 Fab の両フラグメントにこの処理を施し、インビボ生体内分布実験で検査した。

## 【0114】

Fab' を化学的に二量体化して DFM にすることは、既に文献に報告されている。この化学反応は、システイン残基がマレイミド複素環と特異的に反応するという独特の能力に基づく。この化学反応により、システイン残基とマレイミドの間に化学結合が形成される。本発明の場合、Fab' タンパク質上の独自の遊離システインが Fab' H 鎖のカルボキシ末端にあった。したがって、マレイミドの攻撃は部位特異的であり、葉酸受容体結合部位の反対側に対して行なわれた。

## 【0115】

タンパク質を Fab' のモル当たり 70 モルの TCEP (トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩) と共に室温で 5 時間保温して、H 鎖カルボキシ末端システイン残基を還元した。MES 40 mM pH 6.0 中で予め平衡化した HiPrep 脱塩クロマトグラフィー 26/10 (General Electric) により TCEP を除去した。タンパク質を 8 mg/ml まで濃縮し、室温で 2.5 時間、穏やかに攪拌して、Fab 鎖間に存在するジスルフィド結合を再酸化した。反応速度を RP-HPLC 分析によりモニターした。BMOE リンカー (Sigma) をタンパク質溶液 (1 mg/ml, DMSO 中) にモル比 0.35 のリンカー/タンパク質で添加し、室温で 16 時間、穏やかに攪拌しながら保温した。

## 【0116】

自然  $F(ab')_2$  を除去するために、反応混合物を Fab' のモル当たり 70 モルの TCEP により室温で 3.5 時間、再還元した。MES 40 mM pH 6.0 で予め平衡化した HiPrep Sephacryl S-100 HR カラムで二量体を精製した。タンパク質を SDS-PAGE 分析し、Bradford により定量した。

## 【0117】

この方法で AFRA-DFM がほぼ同量の  $L_2H$  不純物と共に得られた。しかし意外にも適正な C4-DFM を得ることは実際上不可能であった。ジスルフィド還元後に行なった "自然" 二量体を除去するためのゲル濾過により、リンカーと反応して DFM を形成するのはわずか 4% の C4 分子であると推定された。C4 Fab' についてこのプロトコルを数回繰り返し、種々の条件を採用したが、本発明者らはこれより高い二量体濃度を得るのに決して成功しなかった。この反応を工程毎に質量分析により追跡して、この反応は BMOE 分子が Fab' に付加した以後は進行しなかったことが示された。おそらく、AFRA と C4 の Fab フラグメント間の唯一の相異をなす C4 のラムダ L 鎖のため、リンカーは予想外の様式で反応したのであろう。これに対し、AFRA 部分については同一条件で常に二量体化が観察された (表 II)。

## 【0118】

10

20

30

40

【表 2】

表 II

抗体 フラグメント	総二量体化 率 %	SDS-PAGE により分析した 二量体ピーク生成物の%					
		高 分子量	二量体 L <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	L <sub>2</sub> H	60 kDa	Fab'	遊離 H 鎖
F(ab') <sub>2</sub> -C4	65	-	29	43	-	-	25
F(ab') <sub>2</sub> -AFRA	61	-	80	16	-	-	4
DFM-C4	4	3	34	17	17	14	15
DFM-AFRA	44	10	48	17	-	17	8

## 【 0 1 1 9 】

この表から、C4 については 60 kDa に予想外の生成物があることを解明できるが、残りの二量体化反応ではほぼ同じ生成物が同量で得られることが分かる。AFRA と C4 には、反応終了時に得られた二量体の % に関してこれら 2 分子間に 10 倍を超える有意差があり、AFRA が優位である。

## 【 0 1 2 0 】

## b) 生検試料における免疫組織化学的アッセイ

前記で報告したアッセイ法は、トランスフェクションした細胞または卵巢癌細胞系においてインビトロで実施された。しかし、異なる細胞系はそれぞれ異なる量および異なるグリコシル化変異型の受容体を発現する可能性がある。したがって、Fab 二量体をインビボ状態で試験することが重要である。免疫組織化学的アッセイにおいて、卵巢癌から発現したアルファ葉酸受容体を AFRA がインサイチューで認識する能力を試験した。

## 【 0 1 2 1 】

AFRA - DFM 二量体をインビトロで FITC 標識し、染色用の生検試料を調製した。具体的には、厚さ 5 mm の生検試料凍結切片を切り取り、乾燥させ、冷アセトン中で 5 分間固定した。スライドを PBS (pH 7.4) 中で洗浄することにより、過剰のアセトン除去し、次いで風乾した。凍結固定切片を 3% BSA、10% ヒト血清 (3% スキムミルク中) により室温で 60 分間ブロックした。FITC - DFM - AFRA 標識抗体フラグメントを、まず 4 で一夜、3 種類の異なる希釈度で保温した。

## 【 0 1 2 2 】

autostainer 緩衝液洗浄を行なった。抗 FITC mAb (ウサギ、希釈度 1:200) を室温で 30 分間添加した。スライドを autostainer 緩衝液で連続洗浄した。次いで、ブタ - 抗ウサギ Ig - アルカリホスファターゼ結合 mAb (希釈度 1:80) を室温で 30 分間添加した。スライドを autostainer 緩衝液で洗浄した。続いて Red Buffer (Vector により供給) を添加し、洗浄し、最終洗浄を蒸留水中で実施した。ヘマトキシリンを室温で 15 秒間添加した。スライドを水道水中で洗浄し、脱水し、清浄にし、顕微鏡観察のためにマウントした。

## 【 0 1 2 3 】

AFRA - DFM は、この場合も腫瘍領域に局在化することができ、周囲の健常組織を染色せず (図 5)、これによりインビボ状況での AFRA - DFM 二量体の特異性が確認された。

## 【 0 1 2 4 】

## c) インビボ生体内分布

AFRA - DFM の特異性が証明されたので、生体内分布実験を行なった。このために

、前記の高分子を、Iodogenプレコートドヨウ素化試験管によりChizzonite法を用いて $I^{131}$ で放射性標識した；本質的に製造業者(Pierce)の記載に従い、発熱物質を含まない臨床用試薬を使用した( $^{17}$ )。Chizzonite法は、分子の統合性および機能性をより良好に保存することができる；事実、5mCi/mgの比放射能で放射性標識した最終生成物は、少なくとも65%の平均免疫反応性を示した。この $I^{131}$ 標識AFRA-DFMを動物の血中に注射した。

#### 【0125】

注射後、予め定めた幾つかの時点で動物を屠殺し、臓器を摘出、秤量および計数して、それらのそれぞれにおける放射能の蓄積および排出の速度を判定した。予め動物の皮下に移植した腫瘍に対する標準として正常組織を用いた。

#### 【0126】

より具体的には、5～6週令の雌CD1 nu/nuマウス(無胸腺)をCharles River Laboratories(Calco, イタリア)から入手した。1週間の順化の後、ヒト葉酸受容体アルファでトランスフェクションしたA431細胞またはA431tMock細胞 $3.5 \times 10^6$ 個を、0.1mLの0.9% NaCl中においてマウスの皮下に異種移植した。腫瘍細胞を注射した2～3週間後、マウスをランダムにグループ分けし、放射性標識抗体フラグメント( $I^{131}$ -DFM-AFRA 5.3)を尾の側脈に静脈内注射した。この放射性同位体について実験を行ない、詳細を下記の表IIIに報告する：

#### 【0127】

#### 【表3】

表 III

試験した異種移植腫瘍	A431FR
1回当たりのグループサイズ	4
比放射能 (mCi/mg)	5.0
全注射線量 (μCi)/動物	30.0
全注射量 (μg)/動物	6.0
生体内分布につき評価した中間時点(h)	1, 3, 6, 15, 24, 48
薬物動態につき評価した中間時点(h)	10分, 30分, 1, 3, 6, 15, 24, 48

#### 【0128】

##### d) 放射能局在化

解剖後、腫瘍および他の組織/臓器(脾臓、腎臓、肝臓、尿を含む膀胱、胸骨、心臓および筋肉)を採取し、湿潤重量を測定した。各組織に付随する放射能を、ガンマ計数計で内部標準を用いて評価した(5および10μlの注射液)。

#### 【0129】

結果を図6に示す；これは組織グラム当たりの注射量に対するパーセント(%ID/g)として表わし、放射能減衰に対して補償したものである。この方法で正規化することにより臓器または動物の直接比較が可能になる。放射免疫療法に理想的な分子は、腫瘍に高度に蓄積し、長い持続時間を持ち、健常組織におけるバックグラウンドは可能な限り最低であろう。

#### 【0130】

この生体内分布実験の結果は、AFRA-DFMが腫瘍に特異的に蓄積することを証明する。膀胱および尿に対応する高い数値は、予想したDFM排出と良好に一致し、解毒経路の確証となる。予想どおりDFMは腫瘍に蓄積し、ここでは注射の6時間後に他の臓器で測定された濃度より濃度が高くなり始めた。

#### 【0131】

### 5. 放射性標識 A F R A - D F M のインビボ有効性の原理の証明

放射性標識抗体フラグメント  $^{131}\text{I}$  - D F M - A F R A は F R を異所性発現している腫瘍 ( A 4 3 1 F R ) に特異的に蓄積することが証明されたので、それが腫瘍の増殖を抑制する能力を評価した。全注射量を薬物動態に従って決定した。この高分子を  $^{131}\text{I}$  で放射性標識し、皮下移植した腫瘍細胞を保有する動物の血流中に注射した。

#### 【 0 1 3 2 】

より具体的には、7週令の雌 C D 1  $\nu/\nu$  マウス ( 無胸腺 ) を C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s ( C a l c o , イタリア ) から入手した。1週間の順化の後、ヒト葉酸受容体アルファでトランスフェクションした A 4 3 1 細胞 ( A 4 3 1 F R ) または A 4 3 1 t M o c k 細胞  $3.5 \times 10^6$  個を、0.1 mL の 0.9 % N a C l ( 生理食塩水 ) 中においてマウスの皮下に異種移植した。腫瘍細胞を注射した1週間後、マウスをランダムにグループ分けし、生理食塩水中の放射性標識抗体 A F R A - D F M または対照としての生理食塩水のみ 0.3 mL を尾の側脈に静脈内注射した。腫瘍の増殖を2~3日毎にモニターし、カリパスで測定した；腫瘍容積を下記に従って判定した： $D \times d^2 \times 1/6 \times$ ；ここで、D = 主直径、d = 副直径。独立した3回の実験を行ない、詳細を下記の表 I V に報告する：

#### 【 0 1 3 3 】

#### 【 表 4 】

表 IV

試験した異種移植腫瘍	A431FR および A431mock
独立した実験の回数	3
処理当たりのグループサイズ	6-7
平均比放射能(mCi/mg)	$4.87 \pm 0.57$
全注射放射線量( $\mu\text{Ci}$ )/動物	$1002 \pm 80$
全注射タンパク質量( $\mu\text{g}$ )/動物	$211 \pm 35$

#### 【 0 1 3 4 】

結果を図 1 1 に示し、生理食塩水のみで処理した対照に対比した腫瘍増殖率パーセントとして表わす。 $^{131}\text{I}$  で標識した A F R A - D F M を腫瘍保有マウスに平均線量 1 m C i / マウスで注射した。注射後、2~3 毎に腫瘍の増殖をモニターした。独立した3回の実験で記録された腫瘍増殖遅延の結果を、各対照に対比した平均腫瘍増殖率パーセントとして図 1 1 に報告する。各実験において、各処理グループ、すなわち A 4 3 1 F R または A 4 3 1 m o c k の平均容積を各対照グループの平均容積と比較した。これらの有効性実験の結果は、放射性標識 A F R A - D F M は目的とする標的抗原を発現している腫瘍 ( A 4 3 1 F R ) の増殖を特異的に遅延させたが、無関係な腫瘍の抗原を発現している腫瘍 ( A 4 3 1 m o c k ) の増殖は遅延させず、腫瘍縮小率パーセントは処理後 1 1 および 1 6 日目の両方とも有意であったことを証明する ( それぞれ  $p = 0.006$  および  $p = 0.05$  )。

#### 【 0 1 3 5 】

6. 腹腔内腫瘍として増殖している卵巣癌細胞への放射性標識 A F R A - D F M の局在化

放射性標識抗体フラグメント  $^{131}\text{I}$  - D F M - A F R A は静脈内注射後に F R ( A 4 3 1 F R ) を異所性発現している腫瘍に特異的に蓄積して増殖を抑制しうることが証明されたので、葉酸受容体を自然に過剰発現している卵巣癌細胞にそれが局在化する能力を評価した。卵巣癌細胞を腹腔内移植した動物、すなわちヒト上皮卵巣癌の自然増殖と内転移を模倣したモデルの腹腔内に  $^{131}\text{I}$  - D F M - A F R A を注射した。

#### 【 0 1 3 6 】

より具体的には、7週令の雌CD1 nu/nuマウス（無胸腺）をCharles River Laboratories（Calco, イタリア）から入手した。1週間の順化の後、ヒト葉酸受容体アルファを過剰発現しているIGROV1細胞 $8 \sim 10 \times 10^6$ 個を、0.3 mLの0.9% NaCl（生理食塩水）中においてマウスの腹腔内に異種移植した。腹水生成が顕性になった時点で（腫瘍細胞注射の14～20日後）、生理食塩水0.3 mL中の放射性標識抗体AFRA-DFMを腹腔内注射し、マウスをランダムにグループ分けし、種々の時点で腹水、腹膜に付着して増殖している固形腫瘍塊、および他の組織/臓器（血液、腎臓、肝臓および筋肉）を採集し、湿潤重量を測定した。腹水を遠心し、ペレット化した腹水腫瘍細胞を体液から分離し、個別に計数した。各組織に付随する放射能を、ガンマ計数計で内部標準を用いて評価した（5および10  $\mu$ lの注射液）。独立した3回の実験を行ない、詳細を下記の表Vに報告する：

【0137】

【表5】

表V

試験した異種移植腫瘍	IGROV1
独立した実験の回数	3
1回当たりのグループサイズ	3-4
比放射能範囲(mCi/mg)	3.9-9.7
全注射放射線量 $\mu$ Ci/動物 (範囲)	30-158
全注射タンパク質量 $\mu$ g/動物 (範囲)	3.6-40
生体内分布につき評価した時点 (h)	1, 3, 6, 15, 24

【0138】

結果を図12に示す；これは組織グラム当たりの注射量に対するパーセント（%ID/g）として表わし、放射能減衰に対して補償したものである。この方法で正規化することにより臓器または動物の直接比較が可能になる。これらの実験の結果は、放射性標識抗体AFRA-DFMは腹水中に存在する卵巢癌細胞（IGROV1）の表面に特異的に結合し、放射性標識抗体AFRA-DFMはこれらの細胞表面および固形腫瘍塊に最高15時間存続することを証明する。

【0139】

7. 腹腔内腫瘍として増殖している卵巢癌細胞に対する放射性標識抗体AFRA-DFMの有効性

$^{131}\text{I}$ -DFM-AFRAは腹腔内注射後にFRを自然発現している腫瘍（IGROV1）に特異的に蓄積しうることが証明されたので、それが卵巢癌の腹腔内腫瘍の内転移を抑制する能力を評価した。抗体フラグメント投与の2～4日前に移植した腹腔内卵巢癌細胞を保有する動物の腹腔内に $^{131}\text{I}$ -DFM-AFRAを注射した。

【0140】

より具体的には、7週令の雌CD1 nu/nuマウス（無胸腺）をCharles River Laboratories（Calco, イタリア）から入手した。1週間の順化の後、ヒト葉酸受容体アルファを過剰発現している卵巢癌細胞（IGROV1またはOVCA3） $8 \sim 10 \times 10^6$ 個を、0.3 mLの0.9% NaCl（生理食塩水）中においてマウスに腹腔内異種移植した。腫瘍細胞注射の2または4日後、マウスをランダムにグループ分けし、生理食塩水中の放射性標識抗体AFRA-DFMまたは対照としての生理食塩水のみ0.3 mLを腹腔内注射した。2～3日毎に腫瘍の増殖をモニターし、秤量し、腹水生成または腹腔内固形腫瘍塊の発達をモニターした。動物の生存を記録した。独立した2回の実験を行ない、詳細を下記の表VIに報告する：

【0141】

【表 6】

表 VI

試験した異種移植腫瘍	IGROV1 または OVCAR3
独立した実験の回数	2
処理当たりのグループサイズ	8-9
平均比放射能 (mCi/mg)	4.3
全注射放射線量 (μCi)/動物	1.004
全注射タンパク質量 (μg)/動物	250

10

## 【0142】

結果を図13に示し、生存曲線として表わす。生存率の上昇を記録順位検定 (log-rank assay) により評価した。これらの実験の結果は、腹腔に腫瘍を移植した後4日目までに放射性標識 AFR A - DFM を注射すると、両方の同所性腫瘍モデルにおいて腫瘍の増殖を有意に遅延させ、したがって動物の生存を延長しうることを証明する (IGROV1 および OVCAR3 モデルにおいてそれぞれ  $p = 0.0014$  および  $p < 0.001$ )。

## 【0143】

20

本願発明の他の態様は、以下の通りである；

【態様1】 葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントであって、その可変部に下記のアミノ酸配列のうち少なくとも1つが含まれるL鎖：

- R A S E S V S F L G I N L I H (SEQ ID NO: 3)、
- Q A S N K D T (SEQ ID NO: 4)、
- L Q S K N F P P Y T (SEQ ID NO: 5)

を含み、かつそのL鎖の定常部がカップ定常部である、抗体またはそのフラグメント。

【態様2】 図1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1) をもつL鎖を含む、態様1に記載の抗体またはそのフラグメント。

30

【態様3】 さらに、抗体H鎖の少なくとも一部を含む、態様1または2に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様4】 L鎖をH鎖の可変部 ( $V_H$ ) および第1定常部 ( $C_{H1}$ ) と共に含む Fab フラグメントである、態様3に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様5】 H鎖の可変部 ( $V_H$ ) が図8のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) をもつ、態様4に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様6】  $C_{H1}$  領域のH鎖がIgGのH鎖、特にIgG1のH鎖である、態様4に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様7】 Fab' フラグメントであり、H鎖がさらに第2抗体フラグメントへの共有結合に適したヒンジ部を含む、態様4に記載の抗体フラグメント。

40

【態様8】 ヒンジ部が、遊離システインを含む抗体ヒンジ部の少なくとも一部を含む、態様7に記載の抗体フラグメント。

【態様9】 2つの Fab' フラグメントを含む  $F(ab')_2$  二量体である、態様7に記載の抗体フラグメント。

【態様10】 2つの Fab' 単量体がジスルフィド結合により互いに共有結合している、態様9に記載の抗体フラグメント。

【態様11】 2つの Fab' 単量体が、マレイミドなど非加水分解性の化学的リンカーにより互いに共有結合している、態様9に記載の抗体フラグメント。

【態様12】 二重特異性二量体である、態様9に記載の抗体フラグメント。

【態様13】 完全ヒト型である、態様1または2に記載の抗体またはそのフラグメン

50

ト。

【態様 14】 葉酸受容体アルファ ( F R ) に 5 0 n M 未満のアフィニティー ( K<sub>D</sub> ) で結合する、態様 1 または 2 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様 15】 細胞毒性物質またはマーキング剤などのエフェクター部分にコンジュゲーションしている、態様 1 または 2 に記載の抗体またはフラグメント。

【態様 16】 細胞毒性物質が放射性核種である、態様 15 に記載の抗体またはフラグメント。

【態様 17】 放射性核種が <sup>131</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>188</sup>Re よりなる群から選択される、態様 16 に記載の抗体またはフラグメント。

【態様 18】 エフェクター部分が <sup>99</sup>Tc などのマーキング剤である、態様 15 に記載の抗体またはフラグメント。

【態様 19】 葉酸受容体アルファ ( F R ) に特異的に結合する抗体フラグメントであって、大腸菌 ( E . c o l i ) C N C M I - 3 5 8 6 から得られる抗体フラグメント。

【態様 20】 モノクローナル抗体である、態様 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【態様 21】 抗体または抗体フラグメントのカクテルであって、態様 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗体フラグメントを含むカクテル。

【態様 22】 葉酸受容体アルファ ( F R ) に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントをコードする配列を含む核酸分子であって、抗体またはそのフラグメントはその可変部に下記のアミノ酸配列のうち少なくとも 1 つが含まれる L 鎖：

- R A S E S V S F L G I N L I H ( S E Q I D N O : 3 )、
- Q A S N K D T ( S E Q I D N O : 4 )、
- L Q S K N F P P Y T ( S E Q I D N O : 5 )

を含みかつその L 鎖の定常部はカップ定常部である、核酸分子。

【態様 23】 S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列を含む抗体またはそのフラグメントをコードする、態様 22 に記載の核酸分子。

【態様 24】 態様 22 または 23 に記載の核酸を含み、その核酸が作動可能な状態で転写調節シグナルに結合している発現ベクター。

【態様 25】 核酸がさらに、抗体 H 鎖またはそのフラグメントをコードする配列を含む、態様 24 に記載の発現ベクター。

【態様 26】 態様 24 または 25 のいずれか 1 項に記載のベクターで形質転換した宿主細胞。

【態様 27】 原核細胞である、態様 26 に記載の宿主細胞。

【態様 28】 大腸菌 ( E s c h e r i c h i a c o l i ) である、態様 27 に記載の宿主細胞。

【態様 29】 態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントを医薬的に許容できるキャリアーと共に含む、医薬組成物。

【態様 30】 抗体またはそのフラグメントが細胞毒性物質またはマーキング剤などのエフェクター部分にコンジュゲーションしている、態様 29 に記載の医薬組成物。

【態様 31】 細胞毒性物質が放射性核種である、態様 30 に記載の医薬組成物。

【態様 32】 放射性核種が <sup>131</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>188</sup>Re から選択される、態様 31 に記載の医薬組成物。

【態様 33】 エフェクター部分が <sup>99</sup>Tc などのマーキング剤である、態様 32 に記載の医薬組成物。

【態様 34】 療法に使用するための、態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様 35】 放射免疫療法に使用するための、態様 16 または 20 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【態様 36】 葉酸受容体アルファ ( F R ) の過剰発現を伴う障害を治療または予防

10

20

30

40

50

するための医薬の製造における、態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントの使用。

【態様 37】 抗体またはそのフラグメントが放射性核種に結合しており、医薬が放射免疫療法に適切である、態様 36 に記載の使用。

【態様 38】 障害がヒトにおける卵巣癌である、態様 37 に記載の使用。

【態様 39】 卵巣癌またはその転移の診断またはイメージングのための方法であって、対象の組織または組織試料を態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントと接触させることを含み、抗体またはそのフラグメントは放射性核種など適切な標識に結合している方法。

【態様 40】 態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメント、および他の療法薬を含む、療法に同時、個別または逐次使用するための組み合わせ製剤としての製品。 10

【態様 41】 他の療法薬が、化学療法薬および放射線療法薬よりなる群から選択される、態様 40 に記載の製品。

【態様 42】 ヒトの癌、たとえば卵巣癌の療法に同時、個別または逐次使用するための組み合わせ製剤としての、態様 40 または 41 に記載の製品。

【態様 43】 癌の処置に用いる組み合わせ医薬製剤を製造するために、抗体またはそのフラグメントおよび他の療法薬を同時、個別または逐次投与する、態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントおよび他の療法薬の使用。

【態様 44】 他の療法薬が、化学療法薬および放射線療法薬よりなる群から選択される、態様 43 に記載の使用。 20

【態様 45】 ヒトの癌、たとえば卵巣癌の処置のための他の療法薬との補助療法または合併療法を実施するのに用いる医薬を製造するための、態様 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体またはそのフラグメントの使用。

【態様 46】 葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントである高アフィニティーのヒト抗体またはそのフラグメントを調製するための、下記の工程を含む方法：

i) 葉酸受容体アルファ (FR) に特異的に結合する能力をもつヒト抗体 H 鎖を選択し、その選択はガイド付き選択により実施され、ヒト V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>レパトア上のガイド鑄型として、その可変部に下記のアミノ酸配列のうち少なくとも 1 つが含まれ： 30

- R A S E S V S F L G I N L I H (SEQ ID NO : 3)

- Q A S N K D T (SEQ ID NO : 4)

- L Q S K N F P P Y T (SEQ ID NO : 5)

かつその定常部がカッパ定常部である A F R A L 鎖と表示される L 鎖を含む抗体フラグメントを用い、続いて FR を過剰発現しているヒト細胞上の H 鎖を選択し、

ii) 選択したヒト抗体 H 鎖をコードする遺伝子を、A F R A L 鎖をコードする遺伝子と共に、適切な宿主細胞において、これらの L 鎖および H 鎖の組み立てが可能な条件で発現させる。

【態様 47】 A F R A L 鎖が SEQ ID NO : 1 のアミノ酸配列を含む、態様 46 に記載の方法。 40

【態様 48】 ヒト V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>レパトアは、卵巣癌に罹患していたがレパトア構築時点ではその疾患を伴わない患者に由来するヒト B 細胞から構築される、態様 46 に記載の方法。

【態様 49】 宿主細胞における工程 (ii) で、選択したヒト抗体 H 鎖をコードする遺伝子および A F R A L 鎖をコードする遺伝子を、選択したヒト抗体 H 鎖および A F R A L 鎖をコードする核酸配列が作動可能な状態で転写調節シグナルに結合したものを含む発現ベクターにより発現させる、態様 46 に記載の方法。

【態様 50】 宿主細胞における工程 (ii) で、選択したヒト抗体 H 鎖をコードする遺伝子を、選択したヒト抗体 H 鎖をコードする核酸配列が作動可能な状態で転写調節シグナルに結合したものを含む第 1 発現ベクターにより発現させ、そして A F R A L 鎖をコ 50

ードする遺伝子を、A F R A L 鎖をコードする核酸配列が作動可能な状態で転写調節シグナルに結合したものを含む第2発現ベクターにより発現させる、態様46に記載の方法。

【態様51】 葉酸受容体アルファ（F R ）に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントである高アフィニティーのヒト抗体またはそのフラグメントを調製するための、下記の工程を含む方法：

- 態様24または25に記載の発現ベクターを適切な宿主細胞において発現させ；
- 発現した抗体またはそのフラグメントを回収し；
- 回収した抗体またはそのフラグメントを場合により二量体化する。

【態様52】 発現ベクターが態様24に記載の発現ベクターであり、細胞において、抗体H鎖またはそのフラグメントをコードする核酸配列を含む第2発現ベクターと共発現させ、その核酸は作動可能な状態で転写調節シグナルに結合している、態様51に記載の方法。

10

#### 参考文献一覧

【0144】

## 【 数 1 】

<sup>1</sup> Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.

<sup>2</sup> Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;351:2519-29.

<sup>3</sup> Harries M, Gore M. Part I: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment at first diagnosis. *Lancet Oncol* 2002;3:529-36.

<sup>4</sup> Vasey PA. Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. *Br J Cancer* 2003;89 Suppl 3:S23-S28.

10

<sup>5</sup> Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1983 Oct 13;309(15):883-7.

<sup>6</sup> Lavin PT, Knapp RC, Malkasian G, Whitney CW, Berek JC, Bast RC Jr. CA 125 for the monitoring of ovarian carcinoma during primary therapy. *Obstet Gynecol*. 1987 Feb;69(2):223-7.

<sup>7</sup> Miotti S, Canevari S, Menard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, Regazzoni M, Tagliabue E, Colnaghi MI. Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. *Int J Cancer*. 1987 Mar 15;39(3):297-303.

20

<sup>8</sup> Netti PA, Baxter LT, Boucher Y, Skalak R, Jain RK Time-dependent behavior of interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. *Cancer Res*. 1995 Nov 15;55(22):5451-58.

<sup>9</sup> Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res*. 1990 Feb 1;50(3 Suppl):814s-819s.

<sup>10</sup> Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4750-5.

30

<sup>11</sup> Figini M et al., *Cancer Res*. 1998, Mar 1; 58 (5): 991-6.

<sup>12</sup> King DJ, Turner A, Farnsworth AP, Adair JR, Owens RJ, Pedley RB, Baldock D, Proudfoot KA, Lawson AD, Beeley NR, et al Improved tumor targeting with chemically cross-linked recombinant antibody fragments. *Cancer Res*. 1994 Dec 1;54(23):6176-85.

<sup>13</sup> Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Plückthun, A.. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: Engineering of a

40

## 【 0 1 4 5 】

## 【 数 2 】

humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. (1999) *Cancer Res.* 59, 5758-5767.

<sup>14</sup> Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., and Plückthun, A.. Biophysical properties of human antibody variable domains *J. Mol. Biol.* 3(2003) 5, 531-553.

<sup>15</sup> Tomassetti et al., *J. Cellular Biochemistry*, 1999 72:111-118.

<sup>16</sup> Stalteri MA, Mather SJ. A cross-linked monoclonal antibody fragment for improved tumor targeting. *Bioconjug Chem.* 1995 Mar-Apr;6(2):179-86.

<sup>17</sup> Sharkey RM, McBride WJ, Karacay H, Chang K, Griffiths GL, Hansen HJ, Goldenberg DM. A universal pretargeting system for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res.* 2003 Jan 15;63(2):354-63.

<sup>18</sup> Coliva A et al., *Cancer Immunol. Immunotherap.* 2005, Dec; 54 (12): 1200-13.

<sup>19</sup> Adamczyk M, Gebler JC, Wu J, Yu Z. Complete sequencing of anti-vancomycin Fab fragment by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry with a combination of database searching and manual interpretation of the MS/MS spectra. *J Immunol Methods.* 2002 Feb 1;260(1-2):235-49.

<sup>20</sup> Humphreys DP, Vetterlein OM, Chapman AP, King DJ, Antoniw P, Smiters AJ, Reeks DG, Parton TA, King LM, Smith BJ, Lang V, Stephens PE. F(ab')<sub>2</sub> molecules made from *Escherichia coli* produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model. *J Immunol Methods.* 1998 Aug 1;217(1-2):1-10.

<sup>21</sup> Casey JL, Napier MP, King DJ, Pedley RB, Chaplin LC, Weir N, Skelton L, Green AJ, Hope-Stone LD, Yarranton GT, Begent RH. Tumor targeting of humanised cross-linked divalent-Fab' antibody fragments: a clinical phase I/II study. *Br J Cancer.* 2002 May 6;86(9):1401-10.

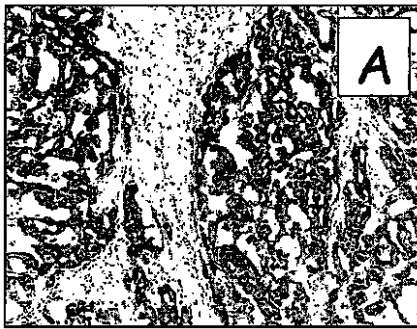
<sup>22</sup> DeSilva BS, Wilson GS. Synthesis of bifunctional antibodies for immunoassays. *Methods.* 2000 Sep;22(1):33-43.

10

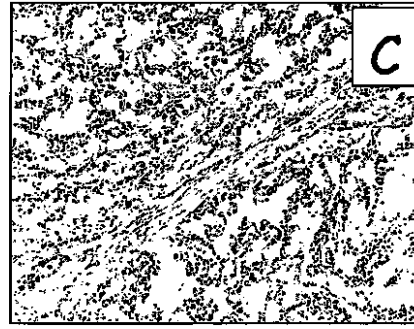
20

30

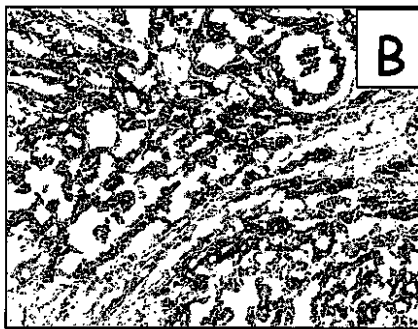
【図 5 A】



【図 5 C】



【図 5 B】

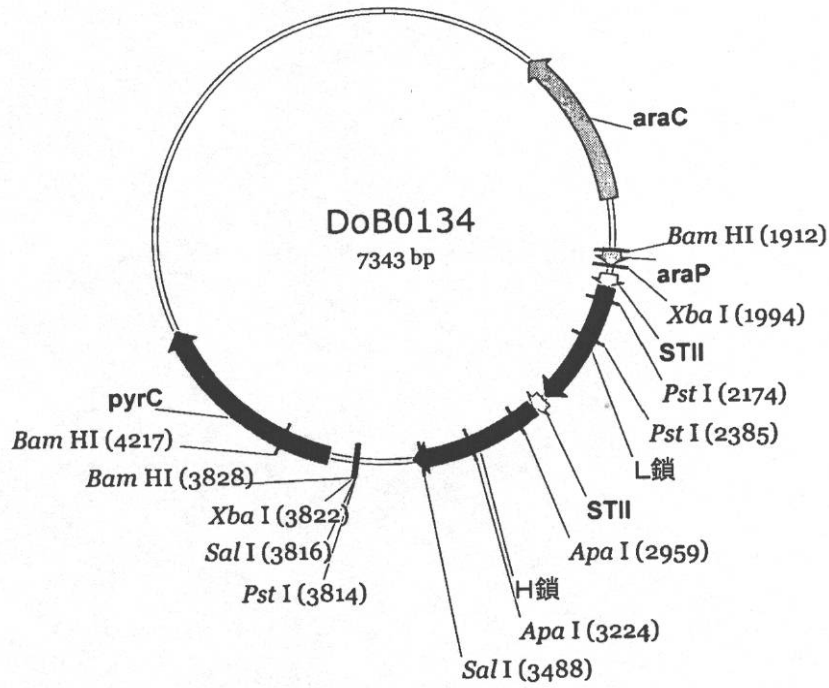


【 図 1 】

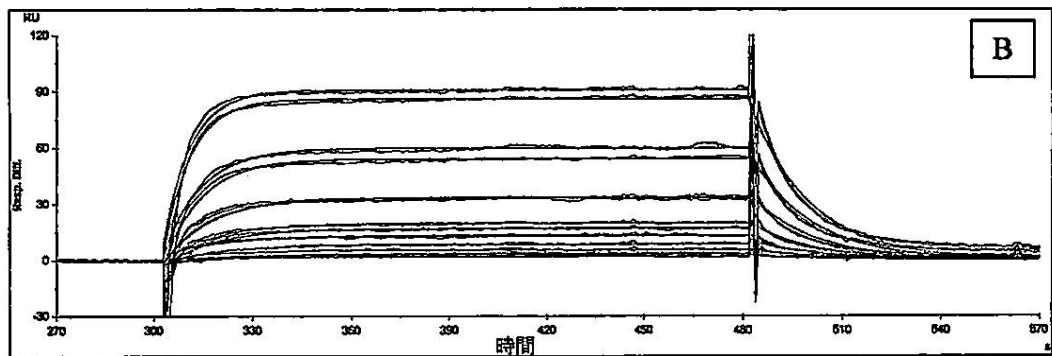
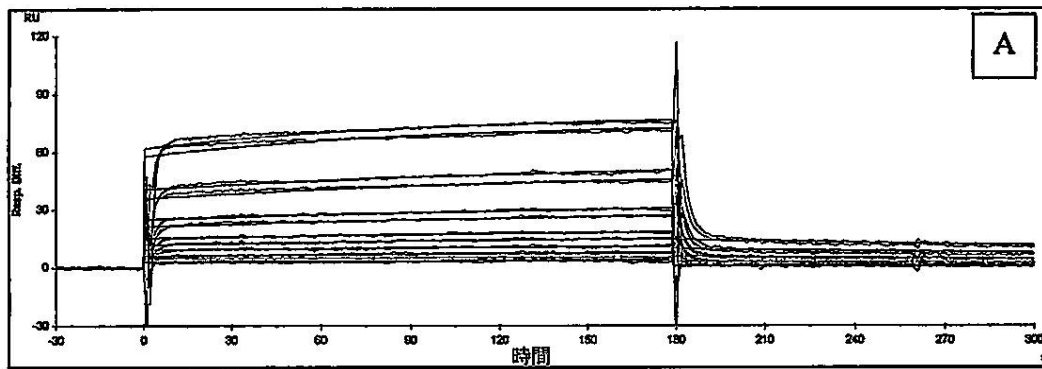
## C4 および AFRA L鎖アミノ酸配列のアラインメント

C4	(1)	-QSALTQPASVSGSPGQSI	TISCTG-TSSDVGSYNLVSWYQQHPGKAPKL
AFRA	(1)	EIVLTQSPASLAVSPGQRATIT	CRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKL
C4	(49)	MIYEGSKRPSGVSNRFS	GSKGNAASLTISGLQAEDEADYYCQSYDSSLS
AFRA	(51)	LIYQASNKDTGVPARFS	GSGTDFTLINPVEANDTANYCYCLQSKNFPP
C4	(99)	VVFGGGTKLTVLGQPKA	PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV
AFRA	(101)	YTFGQGTKLEIKR-TVA	APSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
C4	(149)	TVAWKADSSPVKAG-VET	TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRGYSC
AFRA	(150)	KVQWKVDNALQSGNSQ	ESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC
C4	(198)	QVTHEGSTVEKTVAPT	--ECS--
AFRA	(200)	EVTHQGLSSPVTKSF	NRGEC-

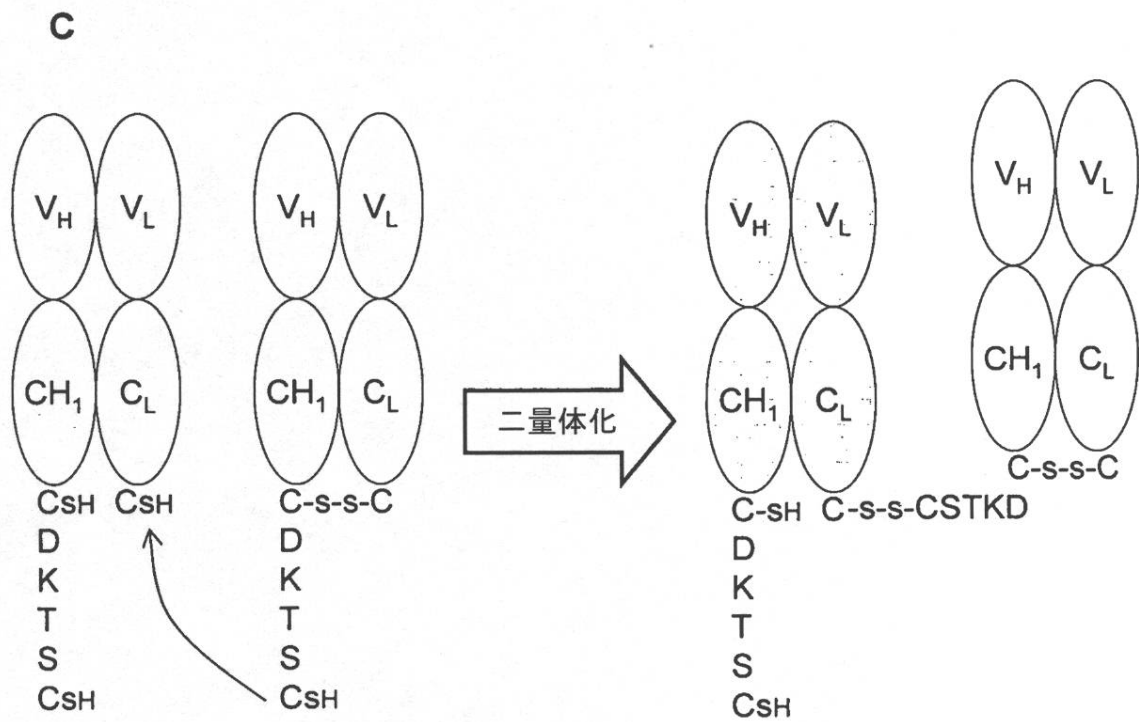
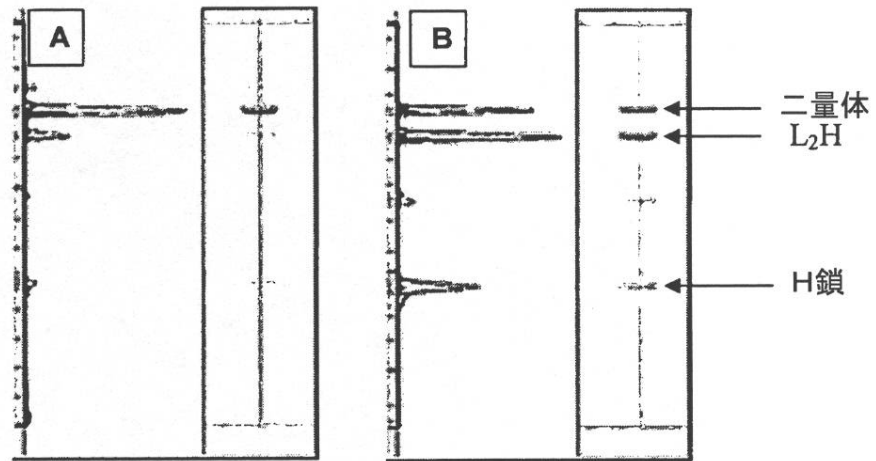
【 図 2 】



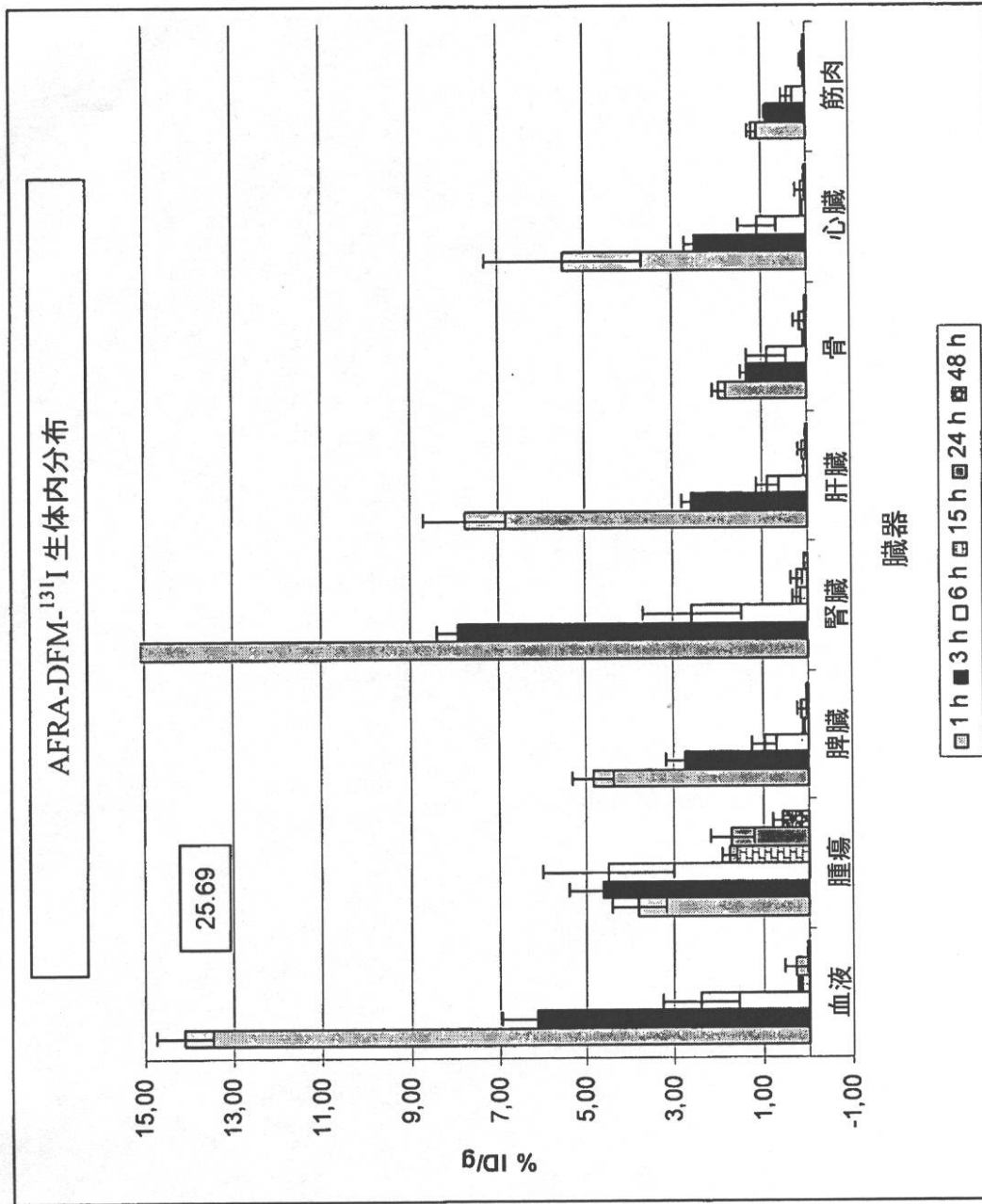
【 図 3 】



【図4】



【図 6】



## 【図 7】

AFRA カップル鎖 (Vk Cκ) アミノ酸配列:

AFRA (1) EIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSFLGINLIHWYQQKPGQPPKL

AFRA (51) LIYQASNKDTGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDTANYYCLQSKNFPP

AFRA (101) YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

AFRA (150) KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC

AFRA (200) EVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

AFRA0V<sub>H</sub>

【 8 】

NVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTTSGFTFGDYAMIWARQAPGKGLEWVSSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS

RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYDFWSGMDVWGKGTTTVSS

AFRAのC<sub>H</sub>1の例

【 9 】

```
1  ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
61 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHHKPS NTKVDKK
```

## 【図 10】

## A:葉酸受容体アルファ

```

MAQRMTTQLL LLLVWVAVVG EAQTRIAWAR TELLNVCMA KHHKEKPGPE 50
DKLHEQCRPW RKNACCSTNT SQEAHKDVS YRFRNWNHCG EMAPACKRHF 100
IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV DQSWRKERV NVPLCKEDCE QWWEDCRTSY 150
TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS 200
NYSRSGSRCI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAMSGAGPWA AWPFLSLAL 250
MLLWLLS 257

```

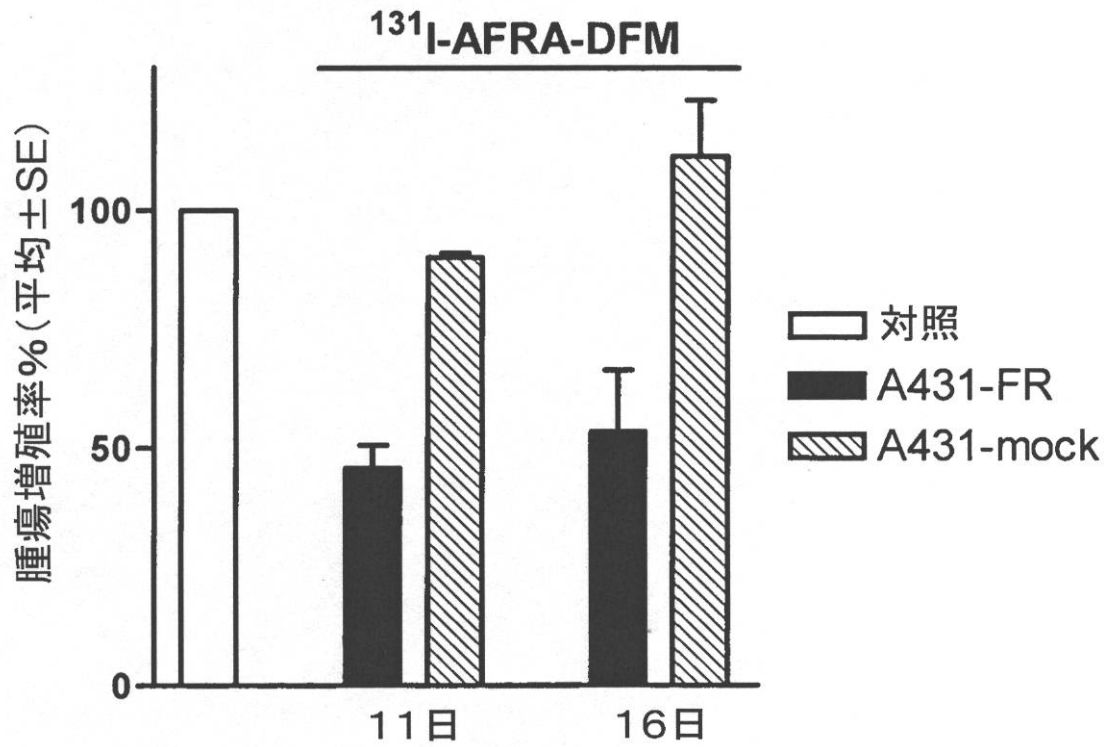
## B:精製用His6タグ付きの組換え可溶性アルファ葉酸受容体

```

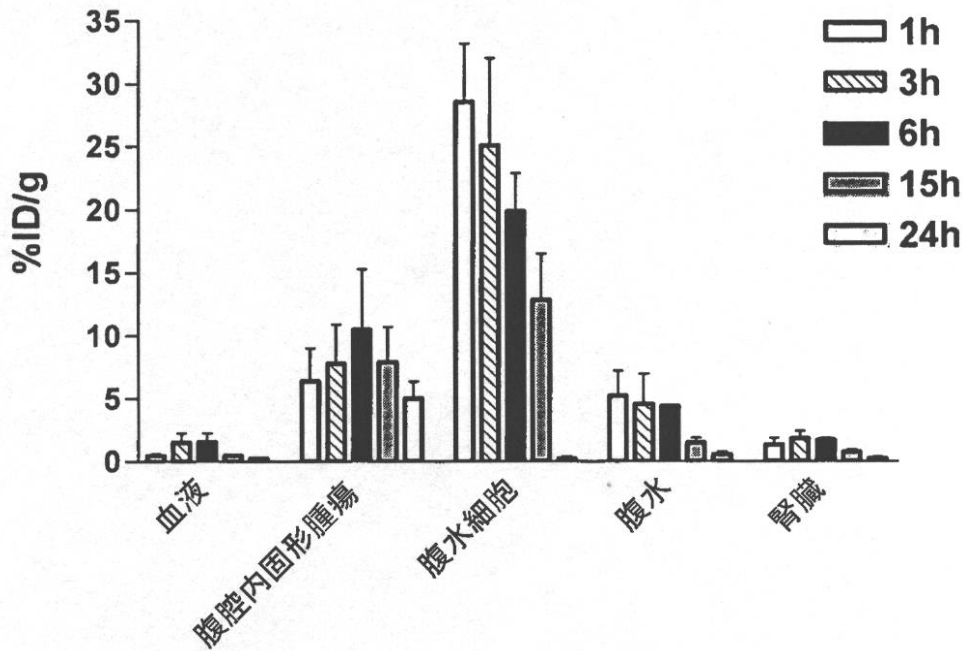
          RIAWAR TELLNVCMA KHHKEKPGPE 26
DKLHEQCRPW RKNACCSTNT SQEAHKDVS YRFRNWNHCG EMAPACKRHF 76
IQDTCLYECS PNLGPWIIQQV DQSWRKERV NVPLCKEDCE QWWEDCRTSY 126
TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS 176
NYSRSGSRCI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAHHHHHH 214

```

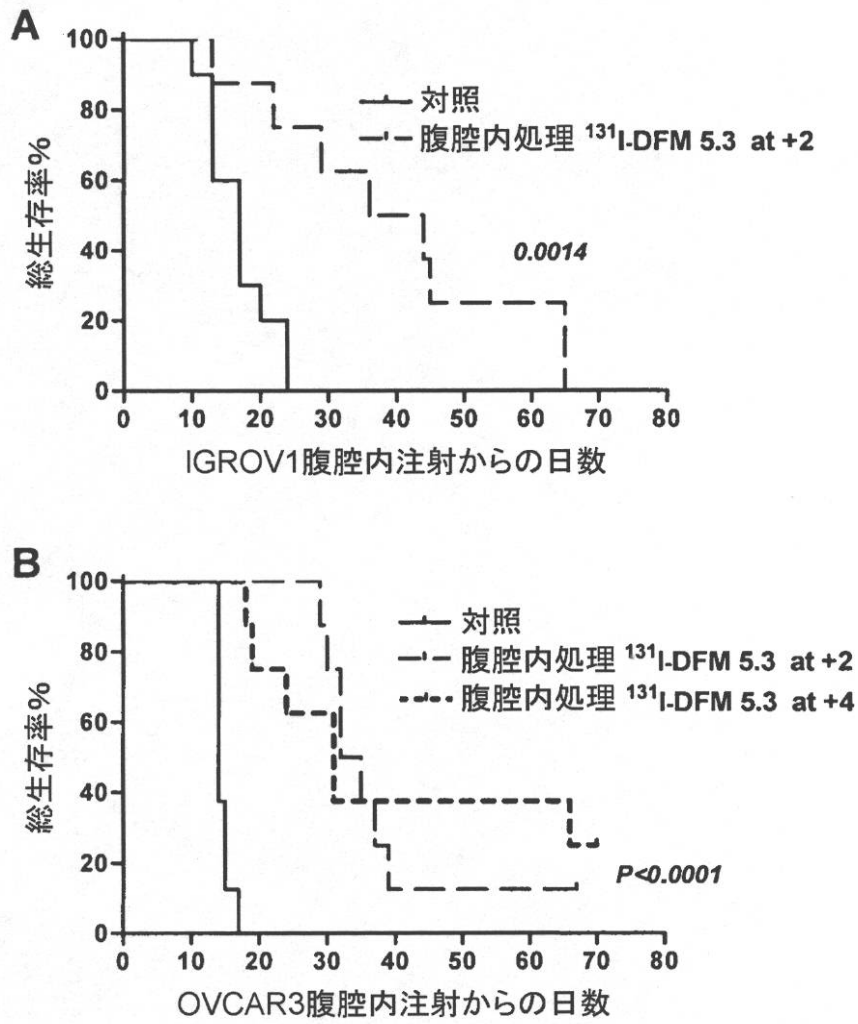
【図 1 1】



【図 1 2】



【図13】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 2
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 35/00	

(74)代理人 100140109  
弁理士 小野 新次郎

(74)代理人 100089705  
弁理士 社本 一夫

(74)代理人 100075270  
弁理士 小林 泰

(74)代理人 100080137  
弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100106080  
弁理士 山口 晶子

(72)発明者 マルタン, フランク  
イタリア国 6 7 1 0 0 ラクイラ, ヴィア・カンボ・ディ・ピレ・エッセエヌチー, ドムペ・ファ・ル・マ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ

(72)発明者 カトツゾ, マルゲリータ  
イタリア国 6 7 1 0 0 ラクイラ, ヴィア・カンボ・ディ・ピレ・エッセエヌチー, ドムペ・ファ・ル・マ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ

(72)発明者 マウリジ, ジョヴァンニ  
イタリア国 6 7 1 0 0 ラクイラ, ヴィア・カンボ・ディ・ピレ・エッセエヌチー, ドムペ・ファ・ル・マ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ

(72)発明者 ディ・チオッチョ, ヴィト  
イタリア国 6 7 1 0 0 ラクイラ, ヴィア・カンボ・ディ・ピレ・エッセエヌチー, ドムペ・ファ・ル・マ・ソチエタ・ペル・アツィオーニ

(72)発明者 フィジニ, マリアンゲラ  
イタリア国 2 0 1 3 3 ミラノ, ヴィア・ジャコモ・ヴェネツィアン 1, イスティトゥート・ナツィオナーレ・ペル・ロ・ストゥーディオ・エ・ラ・クーラ・ディ・ツモリ

(72)発明者 カネヴァーリ, シルヴァーナ  
イタリア国 2 0 1 3 3 ミラノ, ヴィア・ジャコモ・ヴェネツィアン 1, イスティトゥート・ナツィオナーレ・ペル・ロ・ストゥーディオ・エ・ラ・クーラ・ディ・ツモリ

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 5 / 0 8 0 4 3 1 (WO, A 1)  
Cancer Research, 1 9 9 8 年, Vol.58, pp.991-996  
Cancer Immunology Immunotherapy, 2 0 0 5 年, Vol.54, No.12, pp.1200-1213

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C07K 1/00-19/00

C12P 1/00-41/00

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq