

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7651145号
(P7651145)

(45)発行日 令和7年3月26日(2025.3.26)

(24)登録日 令和7年3月17日(2025.3.17)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	Z N A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
請求項の数 20 (全21頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-562971(P2023-562971)	(73)特許権者	510273880
(86)(22)出願日	令和4年4月20日(2022.4.20)		コリア ユニバーシティ リサーチ アンド
(65)公表番号	特表2024-514890(P2024-514890		ビジネス ファウンデーション
	A)		K O R E A U N I V E R S I T Y R E
(43)公表日	令和6年4月3日(2024.4.3)		S E A R C H A N D B U S I N E S S
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/005661		F O U N D A T I O N
(87)国際公開番号	WO2022/225329		大韓民国、0 2 8 4 1 ソウル、ソンプ
(87)国際公開日	令和4年10月27日(2022.10.27)		ク - グ、アナム - ロ 1 4 5
審査請求日	令和5年10月13日(2023.10.13)	(73)特許権者	521302906
(31)優先権主張番号	10-2021-0050921		エスジー メディカル インコーポレイテ
(32)優先日	令和3年4月20日(2021.4.20)		ッド
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		大韓民国、0 5 5 4 8 ソウル、ソンパ
(31)優先権主張番号	10-2022-0048257	(74)代理人	110000338
(32)優先日	令和4年4月19日(2022.4.19)		弁理士法人 H A R A K E N Z O W O R
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 向上した癌細胞死滅効能を有する非対称抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の構成を含む、補体依存性細胞傷害 (C o m p l e m e n t D e p e n d e n t C y t o t o x i c i t y、C D C) が抗 C D 2 0 対称抗体と比較して向上した抗 C D 2 0 非対称抗体:

(a) 配列番号 1 6 の L C D R 1、配列番号 1 8 の L C D R 2、配列番号 2 0 の L C D R 3、配列番号 2 4 の H C D R 1、配列番号 2 6 の H C D R 2 及び配列番号 2 8 の H C D R 3 配列を含む s c F v (S i n g l e - c h a i n v a r i a b l e f r a g m e n t) ; 及び

(b) 配列番号 3 3 の L C D R 1、配列番号 3 5 の L C D R 2、配列番号 3 7 の L C D R 3、配列番号 4 2 の H C D R 1、配列番号 4 4 の H C D R 2 及び配列番号 4 6 の H C D R 3 配列を含む F a b (F r a g m e n t a n t i g e n - b i n d i n g)。 10

【請求項2】

前記 s c F v は、配列番号 5 1 の軽鎖可変領域 (V L) 配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項3】

前記 s c F v は、配列番号 5 2 の重鎖可変領域 (V H) 配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項4】

前記 s c F v は、配列番号 1 5 の L F R 1、配列番号 1 7 の L F R 2、配列番号 1 9 の 20

L F R 3、配列番号 2 1 の L F R 4、配列番号 2 3 の H F R 1、配列番号 2 5 の H F R 2、配列番号 2 7 の H F R 3 及び配列番号 2 9 の H F R 4 で構成された群から選ばれる配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 5】

前記 s c F v は、V L - リンカー - V H の形態であることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 6】

前記リンカーは、G l y 及び S e r の組み合わせであることを特徴とする、請求項 5 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 7】

前記 F a b は、配列番号 5 3 の軽鎖可変領域 (V L) 配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 8】

前記 F a b は、配列番号 5 4 の重鎖可変領域 (V H) 配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 9】

前記 F a b は、配列番号 3 2 の L F R 1、配列番号 3 4 の L F R 2、配列番号 3 6 の L F R 3、配列番号 3 8 の L F R 4、配列番号 4 1 の H F R 1、配列番号 4 3 の H F R 2、配列番号 4 5 の H F R 3 及び配列番号 4 7 の H F R 4 で構成された群から選ばれる配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 1 0】

前記 F a b は、配列番号 3 9 の C (C k a p p a) 配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 1 1】

前記 F a b は、配列番号 4 8 の C H 1 配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 1 2】

前記 F a b は、V L - C - リンカー - V H - C H 1 の形態であることを特徴とする、請求項 1 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 1 3】

前記リンカーは、G l y 及び S e r の組み合わせであることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の抗 C D 2 0 非対称抗体。

【請求項 1 4】

請求項 1 の抗 C D 2 0 非対称抗体をコーディングする核酸分子。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 のベクターで形質転換された単離された宿主細胞。

【請求項 1 7】

請求項 1 の抗 C D 2 0 非対称抗体、前記抗体をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターを有効成分として含む癌の予防又は治療用薬剤学的組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 の抗 C D 2 0 非対称抗体、前記抗体をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターを有効成分として含む癌の診断用組成物。

【請求項 1 9】

下記の段階を含む、補体依存性細胞傷害 (C o m p l e m e n t D e p e n d e n t C y t o t o x i c i t y、C D C) が抗 C D 2 0 対称抗体と比較して向上した抗 C D 2 0 非対称抗体の製造方法：

(a) 配列番号 1 6 の L C D R 1、配列番号 1 8 の L C D R 2、配列番号 2 0 の L C D R 3、配列番号 2 4 の H C D R 1、配列番号 2 6 の H C D R 2 及び配列番号 2 8 の H C D R

10

20

30

40

50

3配列を含むs c F v (S i n g l e - c h a i n v a r i a b l e f r a g m e n t) を製造する段階；及び

(b) 配列番号33のL C D R 1、配列番号35のL C D R 2、配列番号37のL C D R 3、配列番号42のH C D R 1、配列番号44のH C D R 2及び配列番号46のH C D R 3配列を含むF a b (F r a g m e n t a n t i g e n - b i n d i n g) を製造する段階。

【請求項20】

下記の段階を含む、補体依存性細胞傷害 (C o m p l e m e n t D e p e n d e n t C y t o t o x i c i t y、C D C) が抗C D 2 0対称抗体と比較して向上した抗C D 2 0非対称抗体をコーディングする核酸分子の製造方法：

(a) 配列番号16のL C D R 1、配列番号18のL C D R 2、配列番号20のL C D R 3、配列番号24のH C D R 1、配列番号26のH C D R 2及び配列番号28のH C D R 3配列を含むs c F v (S i n g l e - c h a i n v a r i a b l e f r a g m e n t) をコーディングする核酸分子を製造する段階；及び

(b) 配列番号33のL C D R 1、配列番号35のL C D R 2、配列番号37のL C D R 3、配列番号42のH C D R 1、配列番号44のH C D R 2及び配列番号46のH C D R 3配列を含むF a b (F r a g m e n t a n t i g e n - b i n d i n g) をコーディングする核酸分子を製造する段階。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、補体依存性細胞傷害 (C o m p l e m e n t D e p e n d e n t C y t o t o x i c i t y、C D C) が向上した新規の抗C D 2 0非対称抗体又はその抗原結合断片及び/又はこれを用いた癌の予防、治療及び/又は診断用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

全世界の抗癌剤市場は、過去10年間、年平均10%～13%の成長率を示しており、2022年には合計2,000億ドルに達すると予想される。2020年、現在の全世界において、男性は5人のうち1人、女性は6人のうち1人が生涯1回以上の癌発病を経験しており、男性8人のうち1人と女性11人のうち1人が癌で死亡しているほどに、癌の有病率と死亡率は持続的に増加している。

【0003】

全世界の抗癌剤市場においては、1世代化学療法を始めとして、2世代標的抗癌剤と3世代免疫抗癌剤までパラダイム転換がなされている。初期の単純な癌の縮小・抑制を目的としていた治療方法から逸脱し、正常に速く分裂する細胞に対する損傷がなく、癌細胞のみを選択的に攻撃する標的抗癌治療技術が活発に研究されており、このような標的抗癌治療技術の開発は、癌細胞を選択的に標的化できるようにする、癌細胞で特異的に発現される受容体の選別、及び受容体と結合する標的化合物の開発の二つの段階からなる。

【0004】

リツキシマブは、キメラ抗 (c h i m e r i c a n t i) C D 2 0単一クローン抗体であって、腫瘍治療の目的で商用化され、米国のF D Aから最初に承認された単一クローン抗体治療剤である。1980年代初期のC D 2 0抗原の抗体は、マウスから作られた単一クローン抗体であって、抗原との反応性には優れるが、生体半減期が短く、異種抗原による抗原性 (H A M A、h u m a n a n t i - m o u s e a n t i b o d y) が誘発されるといふ短所を有していた。このようなマウス由来抗体の欠点を補完し、生物学的な効果を高めるために、抗原認識が行われる可変領域 (v a r i a b l e r e g i o n) はマウス由来で、抗体の定常領域 (c o n s t a n t r e g i o n) はヒト由来であるキメラ抗体であるリツキシマブが遺伝子組換え技術を通じて合成された。

【0005】

C D 2 0抗原は、B細胞系列が細胞周期 (c e l l - c y c l e e n t r y) に入っ

10

20

30

40

50

たり、B細胞に分化するのに関与するものとして知られている。CD20抗原は、細胞の表面から容易に脱却したり変形或いは陥入しないという特性を有しており、標的分子として活用するのに適当な特徴を有している。CD20抗原の分布は、正常細胞の場合、プレ(pre)B細胞段階で活性化されたB細胞(activated B cell)段階まで広範囲に分布するが、造血母細胞、形質細胞と異なる系列の細胞には分布しておらず、リンパ腫の場合は、B細胞リンパ腫と慢性リンパ性白血病のほとんど及びプレB細胞急性リンパ性白血病の50%においてCD20抗原が発現され、単クローン抗体を用いた腫瘍特異的免疫反応を誘導するのに適切な標的になり得る(Maloney DG et al., IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low grade non-Hodgkin's lymphoma. Blood, 90:2188-2195, 1997; McLaughlin P et al., Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol, 16:2825-2833, 1998)。

10

【0006】

しかし、前記リツキシマブの場合、約半分程度の低悪性度リンパ腫患者及び約60%~70%程度の高悪性度リンパ腫患者において耐性を示し、CD55又はCD59などの発現が多い場合、補体媒介性細胞毒性が減少するという一部の報告があるが、相当数の患者で反応しない理由は確実でない状況である。

20

【0007】

本明細書全体にわたって多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容は、その全体が本明細書に参照として挿入され、本発明の属する技術分野のレベル及び本発明の内容がより明確に説明される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、本発明者等は、リツキシマブに対して反応性を示さないか、これに対して耐性を有する癌細胞を効果的に死滅できる治療剤を開発するために鋭意研究・努力した。その結果、一側はscFvを含み、他の一側はFabを含む抗CD20非対称抗体を用いる場合、著しく向上した補体依存性細胞傷害(Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)を有することを発見することによって、本発明を完成するに至った。

30

【0009】

したがって、本発明の目的は、scFv(Single-chain variable fragment)及びFab(Fragment antigen-binding)を含む、補体依存性細胞傷害(CDC)が向上した抗CD20非対称抗体(asymmetric antibody)又はその抗原結合断片を提供することにある。

40

【0010】

本発明の他の目的は、前記抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子を提供することにある。

【0011】

本発明の更に他の目的は、前記核酸分子を含むベクターを提供することにある。

【0012】

本発明の更に他の目的は、前記ベクターで形質転換された宿主細胞を提供することにある。

【0013】

本発明の更に他の目的は、前記抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片、前記抗体

50

又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターを有効成分として含む癌の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供することにある。

【0014】

本発明の更に他の目的は、前記抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターの薬剤学的有効量を対象体に投与する段階を含む癌の予防又は治療方法を提供することにある。

【0015】

本発明の更に他の目的は、前記抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターの治療用途 (for use in therapy) を提供することにある。

10

【0016】

本発明の更に他の目的は、前記抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターを有効成分として含む癌の診断用組成物を提供することにある。

【0017】

本発明の更に他の目的は、scFvを製造する段階及びFabを製造する段階を含む、補体依存性細胞傷害が向上した抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片の製造方法を提供することにある。

【0018】

本発明の更に他の目的は、scFvをコーディングする核酸分子を製造する段階、及びFabをコーディングする核酸分子を製造する段階を含む、補体依存性細胞傷害が向上した抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子の製造方法を提供することにある。

20

【0019】

本発明の他の目的及び利点は、下記の発明の詳細な説明、特許請求の範囲及び図面によってより明確になる。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明の一様態によると、本発明は、下記の段階を含む、補体依存性細胞傷害 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) が向上した抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子の製造方法を提供する：

30

【0021】

(a) 配列番号16のLCDR1、配列番号18のLCDR2、配列番号20のLCDR3、配列番号24のHCDR1、配列番号26のHCDR2及び配列番号28のHCDR3配列を含むscFv (Single-chain variable fragment) をコーディングする核酸分子を製造する段階；及び

【0022】

(b) 配列番号33のLCDR1、配列番号35のLCDR2、配列番号37のLCDR3、配列番号42のHCDR1、配列番号44のHCDR2及び配列番号46のHCDR3配列を含むFab (Fragment antigen-binding) をコーディングする核酸分子を製造する段階。

40

【0023】

本発明者等は、リツキシマブに対して反応性を示さないか、これに対して耐性を有する癌細胞を効果的に死滅できる治療剤を開発するために鋭意研究・努力した。その結果、一側はscFvを含み、他の一側はFabを含む抗CD20非対称抗体を用いる場合、著しく増加した補体依存性細胞傷害を有することを発見した。

【0024】

本明細書において、「抗体 (antibody)」という用語は、免疫学的に特定の抗

50

原との反応性を有する免疫グロブリン分子を含む、抗原を特異的に認識する受容体としての役割をするタンパク質分子を意味し、多クローン抗体及び単クローン抗体を全て含む。

【0025】

抗体は、完全な全長 (full-length) 抗体形態のみならず、抗体分子の抗原結合断片 (抗体断片) を含む。完全な抗体は、2 個の全長の軽鎖及び 2 個の全長の重鎖を有する構造であって、それぞれの軽鎖は重鎖と二硫化結合で連結されている。重鎖定常領域は、ガンマ ()、ミュー (μ)、アルファ ()、デルタ () 及びエプシロン () タイプを有し、サブクラスとしてガンマ 1 (1)、ガンマ 2 (2)、ガンマ 3 (3)、ガンマ 4 (4)、アルファ 1 (1) 及びアルファ 2 (2) を有する。軽鎖の定常領域は、カッパ (Kappa、) 及びラムダ (lambda、) タイプを有する。

10

【0026】

本明細書において、「抗体の抗原結合断片」という用語は、全体の抗体分子内で抗原を特異的に認識し、抗原-抗体結合機能を保有する断片を意味し、単ドメイン抗体 (sdAb)、単鎖抗体 (scFv)、Fab、F(ab')、F(ab')₂ 及び Fv などを含む。断片の例としては、VL、VH、C (又は CL) 及び CH1 ドメインで構成された 1 価断片 (Fab 断片) ; ヒンジ領域で二硫化物橋によって連結された 2 個の Fab 断片を含む 2 価断片 (F(ab')₂ 断片) ; VH 及び CH1 ドメインで構成された Fd 断片 ; 抗体の一つのアーム (arm) の VL 及び VH ドメイン、及び二硫化物-連結された Fv (sdFv) で構成された Fv 断片 ; VH ドメインで構成された dAb 断片 ; 及び分離された相補性決定領域 (CDR) 又はリンカーによって選択的につながり得る二つ以上の分離された CDR の組み合わせ ; を含む。また、scFv は、VL と VH 領域がペアをなし、1 価分子を形成した単一タンパク質鎖をなすようにリンカーによってつながり得る。このような単鎖抗体も抗体の断片に含まれる。また、前記抗体又は抗体の断片は、2 個の重鎖分子及び 2 個の軽鎖分子を含むテトラマー抗体 ; 抗体軽鎖モノマー ; 抗体重鎖モノマー ; 抗体軽鎖ダイマー、抗体重鎖ダイマー ; イントラボディ ; 1 価抗体 ; ラクダ抗体 ; 及び単ドメイン抗体 (sdAb) を含む。

20

【0027】

Fv は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のみを有している最小の抗体フラグメントであって、Fv 断片を生成する組換え技術は、PCT 国際公開特許出願 WO 88 / 10649、WO 88 / 106630、WO 88 / 07085、WO 88 / 07086 及び WO 88 / 09344 に開示されている。二重鎖 Fv (two-chain Fv) は、非共有結合で重鎖可変領域と軽鎖可変領域が連結されている。また、単鎖 Fv (single-chain Fv) は、一般に、ペプチドリンカーを介して重鎖の可変領域と単鎖の可変領域が共有結合で連結されたり、又は C 末端で直ぐ連結されており、二重鎖 Fv と同様に、ダイマーのような構造をなすことができる。このような抗体断片は、タンパク質加水分解酵素を用いて得ることができ (例えば、全体の抗体をパインで制限・切断すると Fab を得ることができ、ペプシンで切断すると F(ab')₂ 断片を得ることができ)、遺伝子組換え技術を通じて製作することもできる。

30

【0028】

本明細書において、「重鎖」という用語は、抗原に特異性を付与するための十分な可変領域配列を有するアミノ酸配列を含む可変領域ドメイン VH、及び 3 個の定常領域ドメイン CH1、CH2 及び CH3 を含む全長の重鎖及びその断片を全て意味する。また、本明細書において、「軽鎖」という用語は、抗原に特異性を付与するための十分な可変領域配列を有するアミノ酸配列を含む可変領域ドメイン VL 及び定常領域ドメイン C (CL) を含む全長の軽鎖及びその断片を全て意味する。

40

【0029】

本明細書において、「CDR (complementarity determining region)」という用語は、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の超可変領域 (hypervariable region) のアミノ酸配列を意味する (Kabata et al. Sequences of Proteins of Immunological

50

Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)。重鎖 (HCDR1、HCDR2 及び HCDR3) 及び軽鎖 (LCDR1、LCDR2 及び LCDR3) には、それぞれ3個のCDRが含まれており、これらCDRは、抗体が抗原又はエピトープに結合する際に主要な接触残基を提供する。前記CDRは、フレームワーク領域 (FR) と命名された、さらに保存された各領域に散在される。各VH及びVLは、3個のCDR及び4個のFRからなり、これらは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及びFR4の順にアミノ末端からカルボキシ末端に配列される。

【0030】

本発明の抗体又は抗体断片の範囲には、CDR領域に保存的アミノ酸置換を有する変異体が含まれ、CD20を特異的に認識できる範囲内で添付した配列リストに記載のアミノ酸配列に対する変異体を含むことができる。例えば、抗体の結合親和度以外に、半減期、生体適合性及びその他の生物学的特性をより改善するために、抗体のアミノ酸配列に追加的な変化を与えることができる。このような生物学的均等活性を有する変異を考慮した場合、本発明の抗体又はこれをコーディングする核酸分子は、配列リストに記載の配列と実質的な同一性 (substantial identity) を示す配列も含むものとして解釈される。前記実質的な同一性は、前記本発明の配列と任意の他の配列を最大限に対応するようにアラインし、当業界で通常用いられるアルゴリズムを用いてアラインされた配列を分析した場合、最小61%の相同性、特定の一例によると70%の相同性、特定の他の例によると80%の相同性、特定の更に他の例によると90%の相同性を示す配列を意味する。配列を比較するためのアラインメント方法は、当業界に公知となっている。アラインメントに対する多様な方法及びアルゴリズムは、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482 Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. (1970) 48: 443; Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. (1988) 24: 307-31; Higgins and Sharp, Gene (1988) 73: 237-44; Higgins and Sharp, CABIOS (1989) 5: 151-3; Corpet et al. Nuc. Acids Res. (1988) 16: 10881-90; Huang et al. Comp. Appl. Biosci. (1992) 8: 155-65 及び Pearson et al. Meth. Mol. Biol. (1994) 24: 307-31に開示されている。

【0031】

本明細書において、「対称抗体」という用語は、2個の軽鎖及び2個の重鎖を有する抗体の一側及び他側が互に対称構造 (例えば、一側及び他側が同一の軽鎖可変領域及び同一の重鎖可変領域を有する抗体) を有する抗体を意味する。

【0032】

本明細書において、「非対称抗体」という用語は、前記「対称抗体」ではない非対称構造の抗体を意味する。例えば、一側はVL-リンカー-VHを含む断片 (すなわち、scFv) を含み、他の一側はVL-C (又はCL)-リンカー-VH-CH1を含む断片 (すなわち、Fab) を含むことができる。また、一側はFabを含む断片を含み、他の一側はFab及びscFvを含む断片を含むことができる。前記非対称抗体は、さらにFc部位を含むこともできる。例えば、一側はVL-リンカー-VH-CH2-CH3を含む断片を含み、他の一側はVL-C (又はCL)-リンカー-VH-CH1-CH2-CH3を含む断片を含んで非対称構造の抗体を製作することもできる。

【0033】

本明細書において、「親和度 (affinity)」という用語は、抗体又はその抗原結合断片と抗原との間の結合強度を意味し、これは、「結合力」としても表現され得る。

【0034】

本発明の具体的な具現例によると、前記scFvは、配列番号51の軽鎖可変領域 (V

10

20

30

40

50

L) 配列を含む。

【0035】

本発明の具体的な具現例によると、前記 s c F v は、配列番号 52 の重鎖可変領域 (VH) 配列を含む。

【0036】

本発明の具体的な具現例によると、前記 s c F v は、配列番号 15 の L F R 1、配列番号 17 の L F R 2、配列番号 19 の L F R 3、配列番号 21 の L F R 4、配列番号 23 の H F R 1、配列番号 25 の H F R 2、配列番号 27 の H F R 3 及び配列番号 29 の H F R 4 で構成された群から選ばれる配列を含む。

【0037】

本発明の具体的な具現例によると、前記 s c F v は、V L - リンカー - V H の形態である。

【0038】

本発明の具体的な具現例によると、前記リンカーは、G l y 及び S e r の組み合わせであり得る。

【0039】

本発明の具体的な具現例によると、前記 F a b は、配列番号 53 の軽鎖可変領域 (VL) 配列を含む。

【0040】

本発明の具体的な具現例によると、前記 F a b は、配列番号 54 の重鎖可変領域 (VH) 配列を含む。

【0041】

本発明の具体的な具現例によると、前記 F a b は、配列番号 32 の L F R 1、配列番号 34 の L F R 2、配列番号 36 の L F R 3、配列番号 38 の L F R 4、配列番号 41 の H F R 1、配列番号 43 の H F R 2、配列番号 45 の H F R 3 及び配列番号 47 の H F R 4 で構成された群から選ばれる配列を含む。

【0042】

本発明の具体的な具現例によると、前記 F a b は、配列番号 39 の C (C k a p p a) 配列を含む。

【0043】

本発明の具体的な具現例によると、前記 F a b は、配列番号 48 の C H 1 配列を含む。

【0044】

本発明の具体的な具現例によると、前記 F a b は、前記 V L - C - リンカー - V H - C H 1 の形態である。

【0045】

本発明の具体的な具現例によると、前記リンカーは、G l y 及び S e r の組み合わせであり得る。

【0046】

本発明の具体的な具現例によると、本発明の非対称抗体は、重鎖同士の間で所望でないペアの結合を防止するために、10個乃至100個、より具体的には15個乃至60個のG l y 及び S e r で構成されたリンカーを使用することができる。

【0047】

具体的には、本発明の二重特異的抗体は、C D 20 - s c F v - ノブ (V L - l i n k e r 20 - V H - C H 2 - C H 3) と C D 20 - F a b - ホール (V L - C - l i n k e r 40 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3) とが結合された形態であり得る。

【0048】

l i n k e r 20 は、前記 G l y 又は S e r を 20 個含むものであって、その例としては、G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y G l y G l y S e r G l y S e r G l y G l y S e r を含み得るが、これに制限されることはない。

10

20

30

40

50

【0049】

linker40は、前記Gly又はSerを40個含むものであって、その例としては、Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Serを含み得るが、これに制限されることはない。

【0050】

本発明の他の様態によると、本発明は、上述した本発明の抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子を提供する。

10

【0051】

本明細書において、「核酸分子」という用語は、DNA (gDNA及びcDNA)及びRNA分子を包括的に含む意味を有し、核酸分子において基本構成単位であるヌクレオチドは、自然のヌクレオチドのみならず、糖又は塩基部位が変形した類似体 (analogue) も含む (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman及びPeyman, Chemical Reviews, (1990) 90: 543 - 584)。本発明の重鎖及び軽鎖可変領域をコーディングする核酸分子の配列は変形可能である。前記変形は、ヌクレオチドの追加、欠失、非保存的置換又は保存的置換を含む。

【0052】

本発明の核酸分子は、前記ヌクレオチド配列に対して実質的な同一性を示すヌクレオチド配列も含むものとして解釈される。前記実質的な同一性は、前記本発明のヌクレオチド配列と任意の他の配列を最大限に対応するようにアラインし、当業界で通常用いられるアルゴリズムを用いてアラインされた配列を分析した場合、最小80%の相同性、特定の一例では最小90%の相同性、特定の他の例では最小95%の相同性を示すヌクレオチド配列を意味する。

20

【0053】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、上述した本発明の抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子を含むベクターを提供する。

【0054】

本明細書において、「ベクター」という用語は、前記ポリヌクレオチド (核酸) 配列を複製できる細胞への導入のためにポリヌクレオチド配列を挿入できる伝達体を意味する。ポリヌクレオチド配列は、外生 (Exogenous) 又は異種 (Heterologous) であり得る。ベクターとしては、プラスミド、コスミドベクター及びウイルスベクター (レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルスベクターなど) を挙げることができるが、これに制限されない。当業者は、標準的な組換え技術によってベクターを構築することができる (Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 及び Ausubel et al., In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994など)。

30

40

【0055】

本明細書において、「発現ベクター」という用語は、転写される遺伝子産物のうち少なくとも一部分をコーディングするヌクレオチド配列を含むベクターを意味する。一部の場合は、その後、RNA分子がタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドに翻訳される。発現ベクターは、多様な調節配列を含むことができる。転写及び翻訳を調節する調節配列と共に、ベクター及び発現ベクターには、更に他の機能を提供する核酸配列も含まれ得る。

【0056】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、上述したベクターで形質転換された宿主細

50

胞を提供する。

【0057】

本明細書において、「細胞」という用語は、真核細胞及び原核細胞を含み、前記ベクターを複製できるか、ベクターによってコーディングされる遺伝子を発現できる任意の形質転換可能な細胞を意味する。細胞は、前記ベクターによって形質感染(Transfected)、形質導入(Transduced)又は形質転換(Transformed)され得るが、これは、外生のポリヌクレオチド(核酸分子)が宿主細胞内に伝達又は導入される過程を意味する。本明細書において、「形質転換」という用語は、前記形質感染及び形質導入を含む意味で使用される。

【0058】

本発明の(宿主)細胞は、これに制限されないが、好ましくは、昆虫細胞又は哺乳動物細胞、より好ましくは、昆虫細胞の場合はSf9、哺乳動物細胞の場合は、HEK293細胞、HeLa細胞、ARPE-19細胞、RPE-1細胞、HepG2細胞、Hep3B細胞、Huh-7細胞、C8D1a細胞、Neuro2A細胞、CHO細胞、MES13細胞、BHK-21細胞、COS7細胞、COP5細胞、A549細胞、MCF-7細胞、HC70細胞、HCC1428細胞、BT-549細胞、PC3細胞、LNCaP細胞、Capan-1細胞、Panc-1細胞、MIA PaCa-2細胞、SW480細胞、HCT166細胞、LoVo細胞、A172細胞、MKN-45細胞、MKN-74細胞、Kato-III細胞、NCI-N87細胞、HT-144細胞、SK-MEL-2細胞、SH-SY5Y細胞、C6細胞、HT-22細胞、PC-12細胞、NIH3T3細胞などを用いることができる。

【0059】

本発明の宿主細胞は、好ましくは単離された宿主細胞である。

【0060】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、上述した本発明の抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターを有効成分として含む癌の予防又は治療用薬剤学的組成物を提供する。

【0061】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、上述した本発明の抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターの薬剤学的有効量を対象体に投与する段階を含む癌の予防又は治療方法を提供する。

【0062】

本発明の更に他の様態によれば、本発明は、上述した本発明の抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターの治療用途を提供する。

【0063】

本明細書において、「予防」という用語は、疾患又は疾病を保有していると診断されたことはないが、このような疾患又は疾病にかかる可能性のある対象体における疾患又は疾病の発生を抑制することを意味する。

【0064】

本明細書において、「治療」という用語は、(a)疾患、疾病又は症状の発展の抑制；(b)疾患、疾病又は症状の軽減；又は(c)疾患、疾病又は症状を除去することを意味する。本発明の組成物を対象体に投与すると、CD20に対してリツキシマブと同等レベルの結合力を示し、リツキシマブに比べて有意な補体活性及び/又はこれによるCDC効果によって癌細胞の増殖を抑制することによって癌の進行を阻害したり、これによる症状を除去又は軽減させる役割をする。よって、本発明の組成物は、それ自体が癌治療用組成物になることもあり、或いは、他の薬理成分と共に投与され、その治療反応性を向上させる治療補助剤として適用されることもある。そこで、本明細書において、「治療」又は「治療剤」という用語は、「治療補助」又は「治療補助剤」の意味を含む。

10

20

30

40

50

【0065】

本明細書において、「投与」又は「投与する」という用語は、本発明の組成物の治療的有効量を対象体に直接投与することによって、対象体の体内で同一の量が形成されるようにすることを意味する。

【0066】

本発明において、「治療的有効量」という用語は、本発明の薬剤学的組成物を投与しようとする個体に組成物内の薬理成分が治療的又は予防的効果を提供するのに十分な程度に含有された組成物の含量を意味し、これは、「予防的有効量」を含む意味である。

【0067】

本明細書において、「対象体」という用語は、制限なしで、ヒト、マウス、ラット、ギニーピッグ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、サル、チンパンジー、ヒヒ又はアカゲザルを含む。具体的には、本発明の対象体はヒトである。

10

【0068】

本発明の具体的な具現例によると、本発明の組成物で予防又は治療可能な癌は、CD20陽性癌である。

【0069】

CD20陽性癌は、例えば、リンパ腫、白血病などの血液癌、及び黒色腫、肺癌、甲状腺癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、胃癌、肝臓癌、膀胱癌、腎臓癌、子宮頸部癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮頸部癌、子宮内膜細胞癌などの固形癌を含み、好ましくは、B細胞非ホジキンリンパ腫(non-Hodgkin's lymphomas)(NHL)、濾胞性リンパ腫(follicular lymphoma)、びまん性大細胞型B-細胞性リンパ腫(diffuse large B cell lymphoma)、マンテル細胞リンパ腫(mantle cell lymphoma)、慢性リンパ性白血病(chronic lymphocytic leukemia)、小リンパ球性リンパ腫(small lymphocytic lymphoma)(SLL)、辺縁帯リンパ腫(marginal zone lymphoma)(MZL)、リンパ形質細胞性リンパ腫(Lymphoplasmacytic lymphoma)(LPL)、原発性マクログロブリン血症(Waldenstrom macroglobulinemia)(WM)などを含むが、これに制限されることはない。

20

【0070】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、上述した本発明の抗体又はその抗原結合断片、前記抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子、又は前記核酸分子を含むベクターを有効成分として含む癌の診断用組成物を提供する。

30

【0071】

本発明で使用される抗体又はその抗原結合断片と対象になる癌については既に詳細に説明したので、過度な重複を避けるために、それについての記載は省略する。

【0072】

本明細書において、「診断」という用語は、特定の疾患に対する個体の感受性(susceptibility)の判定、特定の疾患を現在の個体が有しているかどうかの判定、及び特定の疾患にかかった一つの客体の予後(prognosis)の判定を含む。

40

【0073】

CD20は、B細胞リンパ腫及び慢性リンパ性白血病などの癌組織において、正常レベルに比べて高い発現レベルを示す典型的な癌診断マーカーであって、CD20に特異的に結合する本発明の抗体は、生物学的試料内の腫瘍の存在を正確に判定することができる。併せて、本発明の抗体は、多様な免疫アッセイ方法を通じて腫瘍内のCD55の発現レベルを正確に測定し、該当の腫瘍のCD55薬物に対する治療感受性を予測することによって、癌の性格に合わせたオーダーメイド型治療戦略を早期に樹立する際に有用に利用可能である。

【0074】

本明細書において、「診断用組成物」という用語は、対象体の癌発病の有無を判断した

50

り、CDC薬物に対する治療感受性を予測するために、CD20タンパク質の発現量測定手段として本発明の抗体を含む統合的な混合物 (mixture) 又は装置 (device) を意味し、これは、「診断用キット」として表現されることもある。

【0075】

本明細書において、「生物学的試料」という用語は、組織、細胞、全血、血清、血漿、唾液、尿、リンパ液、脊髄液、組織剖検試料 (脳、皮膚、リンパ節、脊髄など)、細胞培養上清液、破裂された真核細胞及び細菌発現系を含むが、これに制限されない。

【0076】

生物学的試料において、CD20タンパク質の検出は、比色法 (colorimetric method)、電気化学法 (electrochemical method)、蛍光法 (fluorimetric method)、発光法 (luminescence method)、粒子計数法 (particle counting method)、肉眼測定法 (visual assessment) 又は閃光計数法 (scintillation counting method) を用いた抗原-抗体複合体形成の検出を通じて行うことができる。本明細書において、「検出」という用語は、抗原-抗体複合体の形成有無を判定するための一連の過程を意味する。検出は、酵素、蛍光物、リガンド、発光物、微小粒子又は放射性同位元素を含む多様な標識体を用いて実施することができる。

【0077】

検出標識体として使用される酵素は、例えば、アセチルコリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ及び β -ラクタマーゼを含み、蛍光物としては、フルオレセイン、 Eu^{3+} 、 Eu^{3+} キレート又はクリプテートなどを含み、リガンドとしてはビオチン誘導体などを含み、発光物としては、アクリリジニウムエステル及びイソルミノール誘導体などを含み、微小粒子としては、金コロイド及び着色されたラテックスなどを含み、放射性同位元素としては、 ^{57}Co 、 ^3H 、 ^{125}I 及び ^{125}I -ボルトン (Bolton) ハンター (Hunter) 試薬などを含むことができる。

【0078】

本発明の一具現例によると、抗原-抗体複合体は、酵素免疫吸着法 (ELISA) を用いて検出することができる。本発明の抗体は検出標識を有することができ、検出標識を有さない場合は、本発明の抗体を捕獲することができ、検出標識を有する更に他の抗体を処理して確認することができる。

【0079】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、下記の段階を含む、補体依存性細胞傷害 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) が向上した抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片の製造方法を提供する：

【0080】

(a) 配列番号16のLCDR1、配列番号18のLCDR2、配列番号20のLCDR3、配列番号24のHCDR1、配列番号26のHCDR2及び配列番号28のHCDR3配列を含むscFv (Single-chain variable fragment) を製造する段階；及び

【0081】

(b) 配列番号33のLCDR1、配列番号35のLCDR2、配列番号37のLCDR3、配列番号42のHCDR1、配列番号44のHCDR2及び配列番号46のHCDR3配列を含むFab (Fragment antigen-binding) を製造する段階。

【0082】

本発明の更に他の様態によると、本発明は、下記の段階を含む、補体依存性細胞傷害 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) が向上した抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片をコーディングする核酸分子の製造方法を提供する：

10

20

30

40

50

【0083】

(a) 配列番号16のLCDR1、配列番号18のLCDR2、配列番号20のLCDR3、配列番号24のHCDR1、配列番号26のHCDR2及び配列番号28のHCDR3配列を含むscFv (Single-chain variable fragment) をコーディングする核酸分子を製造する段階；及び

【0084】

(b) 配列番号33のLCDR1、配列番号35のLCDR2、配列番号37のLCDR3、配列番号42のHCDR1、配列番号44のHCDR2及び配列番号46のHCDR3配列を含むFab (Fragment antigen-binding) をコーディングする核酸分子を製造する段階。

10

【0085】

本発明の非対称抗体は、安定的に会合できる第1及び第2サブユニットからなるFc領域を含むことができる。本明細書において、「Fc領域」という用語は、全長抗体の定常領域のうち少なくとも一部分を含有する抗体重鎖のC末端領域を意味し、これは、野生型配列Fc領域と変異体Fc領域を全て含む。IgGのFc領域は、IgG CH2及びIgG CH3ドメインを含む。本発明の非対称抗体のCH3領域は、野生型又は変異体CH3ドメイン（例えば、その一つの鎖に導入された「突出部」（「ノブ」）及びその他の鎖に相応する導入された「空洞（cavity）」（「ホール」）を有するCH3ドメインであり得る。

【0086】

本発明の具体的な具現例によると、本発明の非対称抗体は、重鎖同士の間で所望でないペアの結合を防止するためにノブ-イントゥ-ホール (knob-into-hole) 方法を使用することができる。「ノブ-イントゥ-ホール」方法 [US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9,617-621 (1996); Carter, J Immunol Meth 248,7-15 (2001)] は、異種二量体の生成を促進し、同種二量体の生成を阻害するために、突出部が空洞に位置し得るように第1ポリペプチドの界面に突出部（「ノブ」）を導入し、第2ポリペプチドの界面には相応する空洞（「ホール」）を導入する。突出部は、第1ポリペプチドの界面から小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖（例、チロシン又はトリプトファン）に置換することによって構成される。大きいアミノ酸側鎖をより小さい側鎖（例、アラニン又はトレオニン）に置換することによって、突出部と同一又は類似する大きさの相互補完的の空洞が第2ポリペプチドの界面に生成される。

20

【0087】

本発明の具体的な具現例によると、本発明の非対称抗体は、VL-リンカー-VH-CH2-CH3の形態のscFvと、VL-C-リンカー-VH-CH1-CH2-CH3の形態のFabとが結合された形態であり得る。

【発明の効果】

【0088】

本発明の特徴及び利点を要約すると、次の通りである：

【0089】

(i) 本発明は、一側はscFv (Single-chain variable fragment) を含み、他の一側はFab (Fragment antigen-binding) を含む、補体依存性細胞傷害 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) が向上した抗CD20非対称抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0090】

(ii) 本発明の非対称抗体は、対称構造の抗体と比較して著しく向上した補体依存性細胞傷害 (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) を示すので、リツキシマブなどの抗癌剤に耐性が誘導された多様な疾患において薬物の耐性を根本的に除去し、治療反応性を著しく改善する効率的な治療剤又は治療補助剤と

50

して有用に利用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】IgGと非対称形態の抗体を示す模式図である。

【0092】

【図2】非対称形態の抗CD20抗体のSDS-PAGE分析結果を示す図である。

【0093】

【図3】非対称形態の抗CD20抗体のCD20に対する親和度分析ELISA結果を示す図である。

【0094】

【図4】リツキシマブと非対称形態の抗CD20抗体の補体活性能をC4d濃度測定と比較したELISA結果を示す図である。

【0095】

【図5】リツキシマブに対する耐性を示すRamos-RR細胞においてリツキシマブと非対称形態の抗CD20抗体のCDC効果を比較した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0096】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものに過ぎなく、本発明の要旨に従って、本発明の範囲がこれら実施例によって制限されないことは当業界で通常の知識を有する者にとって自明であろう。

【実施例】

【0097】

実施例1. 動物細胞発現のための非対称形態の抗CD20抗体クローニング

【0098】

非対称形態の抗CD20抗体は、重鎖同士の所望でないペアと結合することを防止するためにノブ-イントゥ-ホール技法を使用し、軽鎖同士の誤った結合を防止するためにはGly及びSerで構成されたリンカーを使用した。CD20-scFv-ノブ(VL-linker20-VH-CH2-CH3)とCD20-Fab-ホール(VL-linker40-VH-CH1-CH2-CH3)の形態でそれぞれクローニングを進行し、CD20-scFv-ノブの場合は、Drug Data Bankに出たリツキシマブシーケンス(Rituximab sequence)に基づいて表1のプライマー組み合わせを用いてPCRを行った。増幅された遺伝体は、BssHIIとXbaI(New England Biolab、イギリス)酵素を用いて処理し、同様に、同一の制限酵素で処理された動物細胞発現用ベクターであるpMAZベクターにライゲーションした。ライゲーションが完了したプラスミドは、DH5 コンピテントセル(competent cell)(New England Biolab、イギリス)に熱衝撃を加えて形質転換し、確保したコロニーを大量培養することによってプラスミドを収得した。

【0099】

CD20-Fab-ホール(VL-linker40-VH-CH1-CH2-CH3)の形態を作るためには、CD20-scFv-ノブと同様に、Drug Data Bankに出たリツキシマブシーケンスに基づいて表2のプライマー組み合わせを用いてPCRを行った。増幅された遺伝体は、BssHIIとXbaI酵素を用いて処理し、同様に、同一の制限酵素で処理された動物細胞発現用ベクターであるpMAZベクターにライゲーションした。ライゲーションが完了したプラスミドは、DH5 コンピテントセル(New England Biolab、イギリス)に熱衝撃を加えて形質転換し、確保したコロニーを大量培養することによってプラスミドを収得することによってシーケンス分析(表3)を完了した。

【0100】

10

20

30

40

50

【表 1】

	プライマー	配列	
V _L	正方向	CGC AGC GAG CGC GCA CTC CCA GAT CGT CCT GAG TCA GAG CC	配列番号 1
	逆方向	AGA GCC GCC AGA TCC ACT GCC TCC TCC ACC GCT ACC GCC ACC ACC ACT CCC GCC TCC GCC CTT AAT CTC CAA TTT AGT TCC CCC GC	配列番号 2
V _H	正方向	GCA GTG GAT CTG GCG GCT CTC AGG TCC AGC TCC AAC AGC CC	配列番号 3
	逆方向	GGT GGG CAT GTG TGA GTT TTG TCT GAG CCG CCA GCA CTC ACC GTC ACA GTG GTA C	配列番号 4
C _H	正方向	GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CC	配列番号 5
	逆方向	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CTA	配列番号 6

10

【 0 1 0 1 】

C D 2 0 - s c F v - ノブのクローニング時に使用されるプライマーリスト

【 0 1 0 2 】

【表 2】

	プライマー	配列	
V _L - C _K	正方向	CGC AGC GAG CGC GCA CTC CCA GAT TGT CCT GTC TCA GTC TCC TGC	配列番号 7
	逆方向	CGG CCG CCG TGC GAG ATC TTT TGA TTT CCA GTT TAG TTC CGC CG	配列番号 8
V _H	正方向	CAA GTC CAA CTG CAA CAA CCG GG	配列番号 9
	逆方向	GGA AGA CCG ATG GGC CCT TGA AGC TAG CGG CGG AAA CCG TTG TGC CAG AG	配列番号 10
C _H	正方向	GCA AGC TTC AAG GGC	配列番号 11
	逆方向	CTC TCC CTG TCC CCG GGT AAA TGA CTA GAA CTA	配列番号 12

20

30

【 0 1 0 3 】

C D 2 0 - F a b - ホールのクローニング時に使用されるプライマーリスト

【 0 1 0 4 】

40

50

【表 3】

	アミノ酸	
CD20-scFv-ノブ	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSP KPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGS QVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSSLSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGGS DKTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 13
CD20-Fab-ホール	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSP KPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRSRTAAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFPYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG SGSSQVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWV KQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSSSLSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS AAFKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 14

10

20

30

【0105】

CD20-scFv-ノブとCD20-Fab-ホールのアミノ酸配列

【0106】

実施例 2 . 動物細胞での発現及び精製

【0107】

非対称形態の抗CD20抗体は、配列番号13及び14の配列を用いてそれぞれのプラスミドをポリエチレンイミン(PEI)(Polysciences、米国)と150mMのNaClを用いてHEK293F細胞(Invitrogen、米国)に形質感染させ、Freestyle 293発現培地(Invitrogen、米国)で37℃の温度、8%のCO₂及び55%の湿度条件下で7日間培養した。発現細胞培養液を4,000rpmで10分間遠心分離した後、上清液を採取してから0.22µmのフィルターを通じてろ過した。ろ過された上清液は、4℃でKappaSelect(GE Healthcare、米国)レジン1mlに結合するように誘導した。結合されたレジン

40

50

0 c v (c o l u m n v o l u m e) の P B S 溶液で洗浄した後、100 mM のグリシン - H C l (p H 2 . 7) 溶液を用いて結合された抗体を溶出した後、1 M のトリス - H C l (p H 9 . 0) で中和した。p H 7 . 2 ~ 7 . 4 の P B S で緩衝液の交換を行った後、S D S - P A G E を通じて精製された抗体の軽鎖と重鎖の大きさ及び純度を確認した結果、理論的計算値と一致する分子量及び高い純度を確認できた (図 2) 。

【 0 1 0 8 】

非対称形態の抗 C D 2 0 抗体は、一側の結合部位が F a b で、他の一側の結合部位が s c F v であるヘテロ形態である。F a b の C カッパ部分を用いて K a p p a S e l e c t で精製すると、二重抗体の精製時に生成可能性が最も高いと知られているノブ - ノブホモダイマー又はノブモノマー (G i e s e , e t a l . , B i s p e c i f i c a n t i b o d y p r o c e s s d e v e l o p m e n t : A s s e m b l y a n d p u r i f i c a t i o n o f k n o b a n d h o l e b i s p e c i f i c a n t i b o d i e s . B i o t e c h n o l P r o g , 3 4 (2) 3 9 7 - 4 0 4) の生成を抑制し、所望の形態であるヘテロダイマーのみを得ることができる。

10

【 0 1 0 9 】

実施例 3 . E L I S A を通じた非対称形態の抗 C D 2 0 抗体の C D 2 0 結合力確認

【 0 1 1 0 】

前記実施例 2 で製作した非対称形態の抗 C D 2 0 抗体がターゲットとする抗原である C D 2 0 に対する親和度を間接 E L I S A で確認した。

【 0 1 1 1 】

間接 E L I S A は、50 μ l の P B S に 1 μ g / m l で C D 2 0 細胞外ドメインループ (e c t o d o m a i n l o o p) 領域抗原を希釈してから 9 6 ウェル免疫プレート (C o r n i n g , 米 国) に入れ、4 で保管して一晩中吸着させた。4 % のスキムミルク (B D , 米 国) が含まれた緩衝溶液を用いて常温で 1 時間反応させた後、0 . 5 % の T w e e n 2 0 (A m r e s c o , 米 国) が含まれた緩衝溶液で 3 回洗浄し、順次的濃度 (0 . 1 , 0 . 3 , 1 , 3 , 1 1 , 3 3 , 1 0 0 n M) で希釈したそれぞれの抗体を 1 ウェル当たり 5 0 μ l ずつ処理した。抗原に抗体が結合できるように常温で 2 時間反応させた後、0 . 5 % の T w e e n 2 0 (A m r e s c o , 米 国) が含まれた緩衝溶液で 3 回洗浄した。抗ヒト免疫グロブリン F c - H R P 抗体 (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h , 米 国) を 1 : 3 , 0 0 0 で 2 % のスキムミルク (B D , 米 国) が含まれた緩衝溶液を用いて希釈してから 1 ウェル当たり 5 0 μ l ずつ処理した後、常温で 1 時間反応させた。反応が終了した後、0 . 5 % の T w e e n 2 0 (A m r e s c o , 米 国) が含まれた緩衝溶液で 3 回洗浄した後、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (T M B) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , 米 国) を 5 0 μ l ずつ入れて 1 0 分間発色させた。分光光度計 (B i o t e k , 米 国) を用いて 4 5 0 n m で吸光度を測定し、その結果を図 3 に示した。その結果、非対称形態の抗 C D 2 0 抗体は、C D 2 0 に対してリツキシマブと同等レベルの結合力を示した。

20

30

【 0 1 1 2 】

実施例 4 . C 4 d E L I S A を通じた非対称形態の抗 C D 2 0 抗体の補体活性能確認

【 0 1 1 3 】

前記実施例 2 で製作した非対称形態の抗 C D 2 0 抗体の補体活性能を C 4 d E L I S A を通じて確認した。C 4 d は、補体古典経路の活性化に対するマーカーであって (C o h e n , e t a l . , P r o s a n d c o n s f o r C 4 d a s a b i o m a r k e r . K i d n e y I n t . , 8 1 (7) 6 2 8 - 3 9) 、C 4 d 濃度の測定で補体活性能の確認が可能である。

40

【 0 1 1 4 】

まず、100 μ g / m l 濃度のリツキシマブ又は非対称形態の抗 C D 2 0 抗体 10 μ l を 1 m g / m l 濃度の補体 (Q u i d e l , 米 国) 9 0 μ l で 1 時間反応させた後で 1 0 倍希釈し、M i c r o V u e 補体 C 4 d フラグメント E I A キット (Q u i d e l , 米 国) を用いて C 4 d 濃度を確認し、その結果を図 4 に示した。その結果、非対称形態の抗 C

50

D20抗体は、補体依存性細胞傷害（Complement Dependent Cytotoxicity、CDC）が主要な治療メカニズムであるリツキシマブに比べてC4d濃度を増加させた。これは、非対称形態の抗CD20抗体の補体活性能がリツキシマブに比べて優れることを意味する。

【0115】

実施例5．リツキシマブ耐性細胞株であるRamos - RRでの非対称形態の抗CD20抗体のCDC効果確認

【0116】

リツキシマブに対する耐性を示すRamos - RRにおいて、リツキシマブと非対称形態の抗CD20抗体のCDC効果を確認した。1サンプル当たり 5×10^5 個のRamos - RR細胞に、リツキシマブ又は非対称形態の抗CD20抗体をそれぞれ $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように20%の補体血清ヒト（complement sera human）（Sigma、米国）が添加されたRPMI培地で希釈し、最終的に $100 \mu\text{l}$ を処理した後、 $37^\circ\text{C}/5\%/\text{CO}_2$ 条件下で2時間にわたって培養した。その後、7-AADとFITCアネキシンVアポトーシス検出キットを用いてFACS分析装置であるAttune NxT（ThermoFisher Scientific、米国）で死滅細胞を確認し、CDCを観察した（図5）。Ramos - RR細胞は、リツキシマブに対するCDC効果が低かったが、非対称形態の抗CD20抗体は、その効果を増加させた。

10

【0117】

このような結果は、IgG抗体に比べて非対称形態の抗体が補体を効果的に活性化し、CDCを効果的に誘導することを示し、CDCが主要な治療メカニズムである癌治療用抗体の場合、非対称形態の抗体が癌治療にさらに有利であることを意味する。

20

【0118】

以上では、本発明の各実施例に対して説明したが、該当の技術分野で通常の知識を有する者であれば、特許請求の範囲に記載された本発明の思想から逸脱しない範囲内で、構成要素の付加、変更、削除又は追加などによって本発明を多様に修正及び変更可能であり、これも本発明の権利範囲内に含まれると言えるだろう。

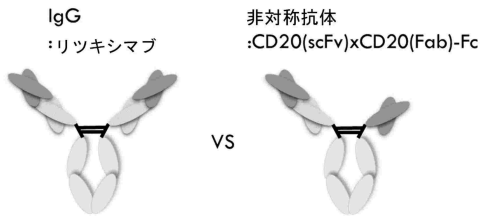
30

40

50

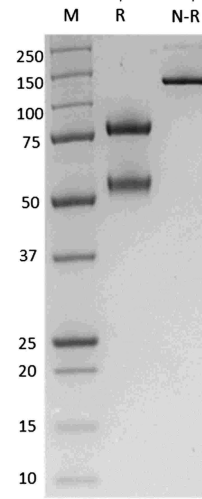
【図面】

【図 1】



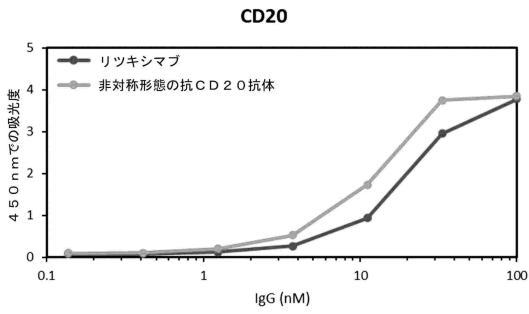
【図 2】

非対称形態の抗CD20抗体

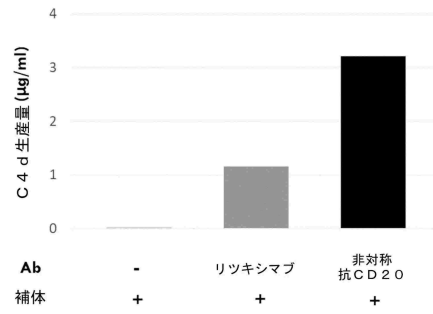


10

【図 3】



【図 4】



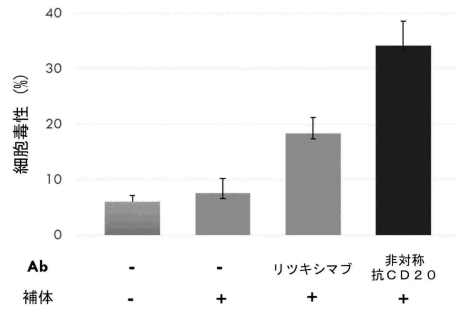
20

30

40

50

【 5】



【配列表】

[0007651145000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
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	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関

韓国(KR)

LD PATENT & TRADEMARK

(72)発明者

ジョン, サン テク

大韓民国, 0 6 2 1 7 ソウル, ガンナム - グ ソンルン - ロ 6 9 - ギル, 2 0 , 1 1 2 ドン 6
エフ 7 0 2 ホ

(72)発明者

イ, ジ チョル

大韓民国, 1 4 2 4 4 キョンギ - ド, クァンミョン - シ クァンドクサン - ロ 2 6 , 1 0 5 - 2
2 0 2

(72)発明者

ミン, ソン ウォン

大韓民国, 0 4 7 0 1 ソウル, ソンドン - グ ワンシムリ - ロ, 4 1 0 , 1 0 6 - 4 0 9

(72)発明者

ベ, ゴン ドウク

大韓民国, 0 5 3 8 1 ソウル, ガンドン - グ チョンホ - デロ 1 7 0 - ギル, 5 0 , 5 0 3

(72)発明者

クォン, ヒョン ソン

大韓民国, 0 2 2 5 3 ソウル, ジュンナン - グ ミョンモク - ロ 3 4 - ギル, 2 8 , 4 0 1

(72)発明者

イ, サン ミン

大韓民国, 1 2 4 5 2 キョンギ - ド, カピョン - グン チョンピョン - ミョン, ジャムゴク - ロ,
7 , 2 0 1

審査官

籠島 福太郎

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 1 4 4 6 3 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 4 8 6 0 3 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 0 4 (W O , A 1)

Frontiers in Immunology , 2020年 , Vol. 11 , Article 762

Methods , 2019年 , Vol. 154 , pp. 38-50

mAb , 2013年 , Vol. 5, No. 6 , pp. 872-881

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 P 2 1 / 0 8

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)

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