

(43) 国際公開日
2006年12月14日 (14.12.2006)

PCT

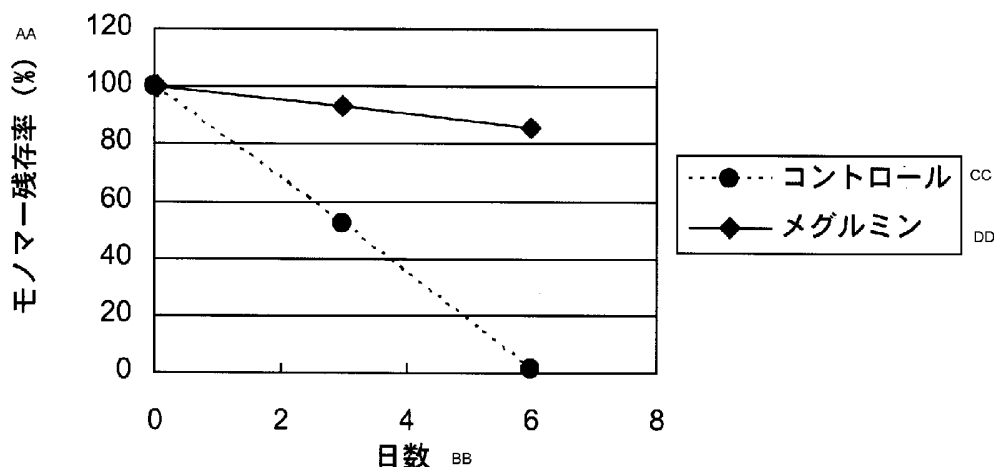
(10) 国際公開番号
WO 2006/132363 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 47/26 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/311625
- (22) 国際出願日: 2006年6月9日 (09.06.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-170794 2005年6月10日 (10.06.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井川 智之
- (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 亀岡 大介 (KAMEOKA, Daisuke) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

[続葉有]

(54) Title: STABILIZER FOR PROTEIN PREPARATION COMPRISING MEGLUMINE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: メグルミンを含有するタンパク質製剤の安定化剤、およびその利用



AA... RATE OF RESIDUAL MONOMERS (%)
 BB... DAYS
 CC... CONTROL
 DD... MEGGLUMINE

(57) Abstract: Disclosed is a method for stabilizing a protein comprising the step of mixing meglumine with the protein or a method for preventing the assembly of proteins. Also disclosed is an agent for stabilizing a protein or agent for preventing the assembly of proteins which comprises meglumine. Further disclosed are a pharmaceutical composition comprising an antibody molecule stabilized with meglumine, a process for producing the pharmaceutical composition and a kit comprising the pharmaceutical composition. A study was made on the antibody-stabilizing effect of meglumine which is an amino sugar. As a result, it is now found that meglumine is useful as a stabilizer for an antibody molecule and that meglumine is also useful as an excipient for a lyophilized preparation.

[続葉有]



WO 2006/132363 A1



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は、メグルミンをタンパク質に添加する工程を含む、タンパク質を安定化させる方法、またはタンパク質の会合化を抑制する方法を提供することを課題とする。また、メグルミンを含有する、タンパク質を安定化する薬剤、またはタンパク質の会合化を抑制する薬剤の提供を課題とする。さらに、メグルミンにより安定化された抗体分子を含有する医薬組成物、該医薬組成物の製造方法、および該医薬組成物を含むキットの提供についても課題とする。本発明者らは、上記の課題を解決するために、アミノ糖の一つであるメグルミンの抗体安定化効果について検討を行った。その結果、メグルミンが抗体分子の安定化剤として有用であること、また凍結乾燥剤の賦形剤としても有用であることを見出した。

明 細 書

メグルミンを含有するタンパク質製剤の安定化剤、およびその利用
技術分野

[0001] 本発明は、アミノ糖の一つであるメグルミンを含有するタンパク質を安定化する薬剤、およびその利用に関する。より具体的には、メグルミンを含有する抗体分子を安定化する薬剤、およびメグルミンを添加する工程を含む、抗体分子を安定化させる方法に関する。また、メグルミンにより安定化された抗体分子を含有する医薬組成物、およびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] バイオ医薬品の製剤化においては、医薬品として使用されるタンパク質を安定に保存することができる製剤が必要である(非特許文献1)。

一般にタンパク質の劣化していく経路としては、可溶性の多量体の形成や沈殿・不溶物の生成等のタンパク質分子の物理的会合に伴う劣化経路(非特許文献2)と、加水分解・脱アミド化反応・メチオニン酸化反応等による化学的修飾による劣化経路(非特許文献3)が知られている。医薬品としてタンパク質を開発するにあたっては、これら両方の劣化経路を最小限に抑え、保存中にそのタンパク質の生物学的活性の低下が起こらない製剤を提供する必要がある。このような劣化経路を最小限に抑制する方法として、溶液pHの最適化、緩衝液・塩の種類と濃度、および、安定化剤の種類と濃度の最適化が行われる。

[0003] 医薬品として使用可能な抗体には、全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体(抗体と他のタンパク質の融合タンパク質および抗体コンジュゲート)等が知られている。IgGの抗体製剤は、一般に非常に高濃度の製剤が要求されるため、非常に困難であることが知られている(非特許文献5)。そのため緩衝液種とpHの最適化以外で、抗体を安定化させる種々の試みがなされている。例えば、WO02/096457(特許文献1)においては、酸性成分を含有する抗体高濃度安定製剤が開示され、抗体の安定化のために MgCl_2 、 CaCl_2 を添加剤として使用している。また、低分子抗体等は会合化しやすく、安定性が非常に低いことが知られており(非特許文献8, 9)、scFv

の単量体は非常に会合化しやすく高濃度条件下では単量体が会合化し2量体を形成することが知られている(非特許文献10)。そのため、これらの抗体を溶液製剤として医薬品開発するに当たっては、抗体分子を溶液中で安定化させること(すなわち会合化を抑制すること)が非常に重要な課題となっている。

[0004] 一般的にタンパク質は凍結乾燥することによって溶液状態よりも安定化する(会合化が抑制される)ことから、上述の抗体製剤が溶液製剤化が困難な場合、凍結乾燥製剤化することが考えられる(非特許文献11, 12, 13)。IgG抗体の凍結乾燥の際はスクロースが賦形剤として有効であることが報告されている(非特許文献14)。

[0005] メグルミンは、これまでX線用造影剤(アミドトリゾ酸メグルミン)、MRI用造影剤(ガドペンテト酸メグルミン)等にご利用されてきたが、これまでタンパク質を安定化させる効果については報告されてこなかった。

非特許文献1:Nat. Rev. Drug Discov. 2005, 4(4), 298-306

非特許文献2:Int. J. Pharm. 2005, 289, 1-30

非特許文献3:Int. J. Pharm. 1999, 185, 129-188

非特許文献4:J. Pharm. Sci. 2004, 93(6), 1390-1402

非特許文献5:Pharmaceutical Research 1994, 11(5), 624-632

非特許文献6:Clin. Chem. Lab. Med. 2000, 38(8):759-764

非特許文献7:Journal of Immunological Methods, 111 (1988), 17-23

非特許文献8:FEBS Letters Volume 360, Issue 3 , 1995, 247-250

非特許文献9:FEBS Letters, 1995, 441, 458-462

非特許文献10:J. Mol. Biol. 2002, 320, 107-127

非特許文献11:Pharm Biotechnol, 2002, 13, 109-33

非特許文献12:Int. J. Pharm. 2000, 203(1-2), 1-60

非特許文献13:Pharm. Res. 1997, 14(8), 969-75

非特許文献14:J. Pharm. Sci. 2001, 90(3), 310-21

特許文献1:WO02/096457

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アミノ糖の一つであるメグルミンをタンパク質に添加する工程を含む、タンパク質を安定化する方法を提供することにある。

より具体的には、メグルミンを抗体分子に添加する工程を含む、抗体分子を安定化させる方法、または抗体分子の会合化を抑制する方法を提供することにある。また、メグルミンを含有する、抗体分子を安定化する薬剤、または抗体分子の会合化を抑制する薬剤を提供することを課題とする。さらに、メグルミンにより安定化された抗体分子を含有する医薬組成物、該医薬組成物の製造方法、および該医薬組成物を含むキットを提供することも課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記の課題を解決するために、アミノ糖の一つであるメグルミンの抗体安定化効果について検討を行った。

まず、本発明者らは、sc(Fv)₂であるhVB22B sc(Fv)₂を用いて、メグルミンによる会合反応の抑制効果の検討を行った。その結果、メグルミンを添加することによって、大幅にモノマー残存率が向上し、hVB22Bの会合化反応は大幅に抑制できることが明らかとなった。本研究により、安定性が低い低分子化抗体に対してメグルミンを添加することで著しく安定性が向上することを見出した。また本研究により、初めてメグルミンがタンパク質の安定化剤として有用であることを明らかにした。

[0008] 次に、メグルミンによる、他のsc(Fv)₂分子、および全長抗体への安定化効果について検討を行った。その結果、メグルミンを添加することによって、sc(Fv)₂のみならず、全長抗体のIgG等、抗体分子全般において会合化を抑制する効果があることが明らかとなった。

[0009] さらに、スクロースに比べてメグルミンのほうが会合体の生成に対する抑制効果が、溶液製剤、凍結乾燥ストレス、凍結乾燥製剤において大きいことが明らかとなった。また、メグルミンは、抗体濃度が100mg/mLという非常に高濃度の製剤に対しても、溶液状態、凍結乾燥状態を問わず高い安定化効果を示すことが明らかとなった。さらに、メグルミンを添加することにより、低温下または常温下の長期保存においても、抗体分子の会合化が抑制されることが明らかとなった。

即ち、本発明者らは、本発明により初めてメグルミンが抗体分子の安定化剤として有用であることを見出し、これにより本発明を完成するに至った。

[0010] 本発明は、より具体的には以下の〔1〕～〔21〕を提供するものである。

〔1〕メグルミンを含有する、タンパク質を長期安定化する薬剤。

〔2〕メグルミンを含有する、タンパク質の会合化を抑制する薬剤。

〔3〕タンパク質が抗体分子である、〔1〕または〔2〕に記載の薬剤。

〔4〕抗体分子が、全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体、または抗体様分子のいずれかである〔3〕または〔4〕に記載の薬剤。

〔5〕剤形が凍結乾燥製剤である、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の薬剤。

〔6〕メグルミンがその塩またはその誘導体である〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の薬剤。

〔7〕タンパク質にメグルミンを添加する工程を含む、タンパク質を長期安定化する方法。

〔8〕タンパク質にメグルミンを添加する工程を含む、タンパク質の会合化を抑制する方法。

〔9〕〔7〕または〔8〕に記載の方法であって、長期低温保存条件において、タンパク質を長期安定化、またはタンパク質の会合化を抑制する方法。

〔10〕〔7〕または〔8〕に記載の方法であって、長期常温保存条件において、タンパク質を長期安定化、またはタンパク質の会合化を抑制する方法。

〔11〕タンパク質が抗体分子である、〔7〕から〔10〕のいずれかに記載の方法。

〔12〕抗体分子が、全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体、または抗体様分子のいずれかである〔11〕に記載の方法。

〔13〕メグルミン添加する工程の後、タンパク質を凍結乾燥する工程を含む、〔7〕から〔12〕のいずれかに記載の方法。

〔14〕メグルミンがその塩またはその誘導体である〔7〕から〔13〕のいずれかに記載の方法。

〔15〕メグルミンを添加した医薬組成物。

〔16〕剤形が凍結乾燥製剤であることを特徴とする、〔15〕に記載の医薬組成物。

[17] メグルミンがその塩またはその誘導体である[15]または[16]に記載の医薬組成物。

[18] 抗体含有組成物にメグルミンを添加する工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法。

[19] 以下の(1)および(2)の工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法。

(1) メグルミンを抗体含有組成物に添加する工程

(2) (1)の混合物を凍結乾燥する工程

[20] 抗体分子が全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体、または抗体様分子のいずれかである[18]または[19]に記載の医薬組成物の製造方法。

[21] メグルミンがその塩またはその誘導体である[18]から[20]のいずれかに記載の製造方法。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]メグルミンによるhVB22Bの安定化効果を示す図である。

[図2]メグルミンによる、sc(Fv)₂分子、および全長抗体への安定化効果を示す図である。図中の数値は溶液加速条件における会合体の含有率(%)を示す。

[図3]IgGの溶液製剤化および凍結乾燥製剤化における、メグルミンによる安定性効果を示す図である。

[図4]single chain diabody型 sc(Fv)₂の長期低温保存(−20℃・6ヶ月)における、メグルミンによる安定性効果を示す図である。

[図5]ヒト化二重特異性抗体の長期常温保存(25℃・2ヶ月)におけるメグルミンによる安定性効果を示す図である。

[図6]一本鎖抗体sc(Fv)₂の作製過程を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

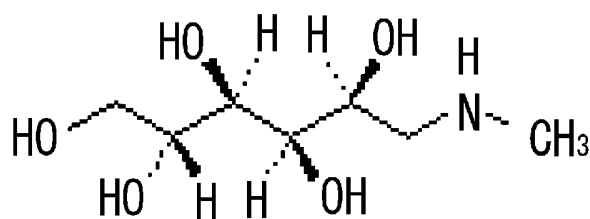
[0012] 本発明者らは、sc(Fv)₂の安定化製剤を検討する過程で、アミノ糖の一つである新規安定化剤メグルミンを見出した。さらに、このメグルミンは低分子抗体であるsc(Fv)₂のみならず、全長抗体も安定化することを見出した。さらに、メグルミンは、蛋白質医薬製剤中の安定化剤として一般的に使われているスクロース等の糖やアミノ糖に比

べ、抗体分子などの蛋白質あるいはペプチドに対して優れた安定化効果を示すことを見出した。本発明は、これら知見に基づくものである。

本発明は、メグルミンをタンパク質に添加する工程を含む、タンパク質を安定化させる方法に関する。本発明の安定化は、長期にわたる安定化であってもよい。本発明において「長期安定化」とは以下のように定義される。低分子化抗体の溶液製剤の場合は、55℃2週間保存後における会合体量が35%以下であること、或いは40℃2週間保存後における会合体量が10%以下、好ましくは7%以下であること、あるいは25℃2ヶ月保存後における会合体量が1%以下であること、あるいは-20℃6ヶ月保存後における会合体量が2%以下、好ましくは1%以下であることを意味する。低分子化抗体を除く全ての抗体或いは一般的な蛋白質の溶液製剤の場合は、60℃3週間保存後における会合体量が20%以下、好ましくは10%以下であること、あるいは-20℃6ヶ月保存後における会合体量が2%以下、好ましくは1%以下であることを意味する。また、IgG、低分子化抗体を含む全ての抗体或いは一般的な蛋白質の凍結乾燥製剤の場合は40℃1ヶ月保存後における会合体量が5%以下、好ましくは1%以下さらに好ましくは0.5%以下であることを意味する。

本発明において、「メグルミン」とは、別名N-メチルグルカミン、化学式1-Deoxy-1-methylamino-D-glucitolおよび、以下の化学式で示される化合物である。

[化1]



1-デオキシ-1-メチルアミノ-D-グルシトール

[0013] 本発明において「メグルミン」には、メグルミン誘導体やメグルミンの塩等が含まれる。メグルミン誘導体やメグルミンの塩としては、アミドドリゾ酸メグルミン、アミドドリゾ酸ナトリウムメグルミン、カドペンテト酸メグルミン、ガドテル酸メグルミン、イオタラム酸メグルミン、イオトロクス酸メグルミン、ガドベン酸メグルミン、ヨードキサム酸メグルミン、フルニキシムメグルミン、ガストログラフィン(メグルミン硫酸塩)等を挙げることが出来

るがこれらに限定されるものではない。また、上記のメグルミンの水酸基、アミノ基等が、化学的に修飾を受けたものも、本発明のメグルミンに含まれる。

[0014] 本発明において安定化の対象となる医薬組成物(タンパク質)は、ペプチドを含むタンパク質またはその他の生体高分子、合成高分子化合物、低分子化合物、またはそれらの誘導体、またはそれらの組み合わせからなる複合体のいずれであってもよい。本発明の好ましい例としては、抗体を挙げることが出来る。

[0015] 本発明において安定化の対象となる抗体は、既に公知の抗体を用いることが可能であり、全長抗体、断片化抗体、修飾抗体または低分子化抗体のいずれであってもよい。

公知の全長抗体としてはIgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgD、IgE、IgM、IgY等を挙げることができるが、その種類は特に限定されるものではない。また全長抗体としては、二重特異性IgG抗体(J Immunol Methods. 2001 Feb 1;248(1-2):7-15)も含まれる。

又、新規の抗原を用いて、当業者に公知の方法により作製された抗体も対象とすることができる。具体的には、例えば、新規抗体の作製は以下のようにして行うことができる。

[0016] 新規抗原タンパク質若しくはその断片を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞(ハイブリドーマ)をスクリーニングする。抗原の調製は公知の方法、例えばバキュロウイルスを用いた方法(WO98/46777など)等に準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。その後、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域(V領域)のcDNAを合成し、得られたcDNAの配列を公知の方法により解読すればよい。

[0017] 新規抗原を認識する抗体は、新規抗原と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。又、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換

え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体なども使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体等であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

[0018] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号E P 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0019] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる(国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現さ

せ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

[0020] 本発明の安定化の対象となる抗体としては、断片化抗体または低分子化抗体を挙げることができる。これらは公知の抗体または新規に作製する抗体のいずれであつてもよい。断片化抗体または低分子化抗体とは、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv(シングルチェーンFv)(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenburt及び Moore編, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994))、VHH (camelid VH、J Biotechnol. 2001 Jun;74(4):277-302.)、またはsc(Fv)₂などを挙げることができるが、好ましくはsc(Fv)₂である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

[0021] 本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体のVHを2つ以上及びVLを2つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非共有結合の両方でもよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VHとVLが非共有結合により結合し

て形成されるVH-VL対を2つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中の一方のVH-VL対と他方のVH-VL対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。

[0022] 本発明において低分子化抗体としては、scFv、Diabody、またはsc(Fv)₂を挙げることが出来る。scFv は可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメントである。

Diabodyは、scFv等(以下、Diabodyを構成するフラグメント)を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む。Diabodyを構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でもよいが、好ましくは非共有結合である。

[0023] Diabodyを構成するフラグメントは、VLとVHを結合したもの、VLとVLを結合したもの、VHとVHを結合したもの等を挙げることができるが、好ましくはVHとVLを結合したものである。Diabodyを構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常2～14アミノ酸、好ましくは3～9アミノ酸、特に好ましくは4～6アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため、同一鎖上のVLとVHの間で非共有結合がおこらず、単鎖V領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、Diabody作製と同じ原理で、Diabodyを構成するフラグメントを3つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

[0024] sc(Fv)₂は、2つの重鎖可変領域([VH])及び2つの軽鎖可変領域([VL])をリンカー等で結合して一本鎖ポリペプチドにした抗体である(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999;231:177-189)。この2つのVHとVLは異なるモノクローナル抗体由来であってもよい。例えば、Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374に開示されるような2種類の抗原、あるいは2種類のエピトープを認識する二重特異性(bispecific) sc(Fv)₂が挙げられる。sc(Fv)₂は、例えば、2つのscFv(シングルチェーンFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883、Plickthun「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」Vol.113, Resenbourg 及び Moore編, Springer Verl

ag, New York, pp.269-315, (1994))をリンカー等で結合することにより作製することが可能である。リンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカー等を用いることができるが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1～100アミノ酸、好ましくは5～30アミノ酸、特に好ましくは12～18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。

- [0025] 結合される2つの重鎖可変領域と2つの軽鎖可変領域の順序は特に限定されず、どのような順序で並べられていてもよく、例えば、以下のような配置を挙げることができる。

[VH]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VL]
 [VL]リンカー[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]
 [VH]リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]
 [VH]リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]
 [VL]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VH]
 [VL]リンカー[VH]リンカー[VL]リンカー[VH]

本発明においては、好ましくは、[VH]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VL]の配置を有するsc(Fv)₂である。

- [0026] 重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。さらに、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を会合させた場合に、抗原結合活性を有する限り、一部を欠損させてもよいし、他のポリペプチドを付加してもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。

- [0027] 本発明において、抗体の可変領域を結合するリンカーは、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー、例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996に開示されるリンカーを用いることができる。

本発明において好ましいリンカーはペプチドリンカーである。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1～100アミノ酸、好ましくは3～50アミノ酸、更に好ましくは5～30アミノ酸、特に好

ましくは12～18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。

[0028] ペプチドリンカーのアミノ酸配列としては、例えば、以下のような配列を挙げることができる。

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:41)

Ser・Gly・Gly・Gly(配列番号:42)

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:43)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:44)

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:45)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:46)

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:47)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:48)

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:43))_n

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:44))_n

[_nは1以上の整数である]

[0029] 合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0030] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。

sc(Fv)2は、当業者に周知の方法で作製することができる。例えば、sc(Fv)2をコードするDNAを挿入したベクターを宿主細胞へ導入し、sc(Fv)2を発現させ、発現産物を回収することで、sc(Fv)2を作製できる。

[0031] 該ベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明のsc(Fv)2を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でsc(Fv)2を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

[0032] 上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。sc(Fv)2を発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞(例:酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞(例:ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

[0033] sc(Fv)2の回収は、本発明のsc(Fv)2が培地に分泌される場合は、培地を回収するこ

とで実施できる。また、sc(Fv)2が細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にsc(Fv)2組成物を回収する。

あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、ポリペプチドに変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、本発明の抗体に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、本発明の抗体のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の抗体に含まれる。

[0034] 変異するアミノ酸数は特に制限されないが、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内(例えば、3アミノ酸以内)であると考えられる。変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US

A (1982) 79, 6409-6413)。また、抗体の定常領域などのアミノ酸配列は当業者に公知である。

[0035] また、本発明に使用する抗体は、修飾抗体であってもよく、修飾抗体としては、ポリエチレングリコール(PEG)、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。

また、修飾抗体は、抗体コンジュゲートのほかに、抗体分子、抗体分子断片、抗体様分子と、他タンパク質・ペプチドとの融合タンパクであってもよい。融合タンパクとしてはTNF α とFcの融合タンパク(Int J Clin Pract. 2005 Jan;59(1):114-8.)やIL2とscFvとの融合タンパク(J Immunol Methods. 2004 Dec;295(1-2):49-56.)等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

また、本発明に使用する抗体は、抗体様分子であってもよい。抗体様分子としてはaffibody(Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 18;100(6):3191-6)やankyrin(Nat Biotechnol. 2004 May;22(5):575-82)等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0036] 上述の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体のDNAを発現ベクターへ組み込む。その際、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。その際には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。

ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。

[0037] 抗体を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター(Wardら, Nature (1989) 341, 544-546;FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター(Betterら, Science (1988)

240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (Pharmacia社製)、「QIAexpress system」(QIAGEN社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0038] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。ポリペプチド分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0039] 大腸菌以外にも、例えば、本発明のポリペプチドを製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター(例えば、pcDNA3 (Invitrogen社製)や、pEGF-BO S (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」(GIBCO BRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(Invitrogen社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

[0040] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター(Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0041] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺

伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcDなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス(BPV)等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。

[0042] 本発明においてメグルミンをタンパク質に「添加する」とは、メグルミンとタンパク質を混合させることも意味する。本発明において、メグルミンとタンパク質を混合させるとは、メグルミンを含有する溶液に、タンパク質を溶解させるものであってもよい。

本発明において、「安定化する」とは、タンパク質が天然の状態または、活性を保つ状態を保持することをいう。

[0043] また、本発明のメグルミンを含有する安定化剤を添加することにより、タンパク質の活性が、天然状態もしくはコントロールよりも上昇した場合、または保存時において会合化による活性の低下がより小さくなった場合にも、タンパク質が安定化されたとみなすことができる。タンパク質の具体例として、抗体分子の活性が上昇したか否かは、同一の条件下で目的の活性を測定することにより確認することができる。安定化の標的となる抗体分子は新たに合成されたものや、生物体から単離されたものでもよい。

[0044] 本発明において活性は、結合活性、中和活性、細胞傷害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性、酵素活性など、いかなる活性でもよく、特に限定されないが、生体、組織、細胞、タンパク質、DNA、RNA等に量的及び／又は質的な変化、影響をもたらす活性であることが好ましく、特にアゴニスト活性が好ましい。

アゴニスト活性とは、受容体などの抗原に抗体が結合することにより、細胞内にシグナルが伝達される等して、何らかの生理的活性の変化を誘導する活性である。生理的活性としては、例えば、増殖活性、生存活性、分化活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、タンパク質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移

活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性、などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

[0045] 本発明において抗原は特に限定されず、どのような抗原でもよい。抗原の例としては、例えば、受容体、癌抗原、MHC抗原、分化抗原、などを挙げることができる。受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては多数の文献が存在し、例えば、Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. *New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II"* pp.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA, Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14., Ullrich A., et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212., Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070., Miyajima A., et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331., Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396., Fantl WJ., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481., Smith CA., et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962., Flower DR. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234., 宮坂昌之監修, 細胞工学別冊ハンドブックシリーズ「接着因子ハンドブック」(1994) (秀潤社, 東京, 日本) 等が挙げられる。

[0046] 上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン(EPO)受容体、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体、ヒト又はマウスロンゴポイエチン(TPO)受容体、ヒト又はマウスインスリン受容体、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子(PDGF)受容体、ヒト又はマウスインターフェロン(IFN)- α 、 β 受容体、ヒト又はマウスレプチン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン(GH)受容体、ヒト又はマウスインターロイキン(IL)-10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子(IGF)-I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子(LIF)受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子(CNTF)受容体等を例示することができる(hEPOR: Simon, S. et al. (1990) *Blood* 76, 31-35.; mEPOR: D'

Andrea, AD. Et al. (1989) Cell 57, 277-285.; hG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8702-8706.; mG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Cell 61, 341-350.; hTPOR: Vigon, I. et al. (1992) 89, 5640-5644.; mTPOR: Skoda, RC. Et al. (1993) 12, 2645-2653.; hInsR: Ullrich, A. et al. (1985) Nature 313, 756-761.; hFlt-3: Small, D. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 459-463.; hPDGFR: Gronwald, RGK. Et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 3435-3439.; hFN α/β R: Uze, G. et al. (1990) Cell 60, 225-234.及びNovick, D. et al. (1994) Cell 77, 391-400.)。

- [0047] 癌抗原は細胞の悪性化に伴って発現する抗原であり、腫瘍特異性抗原とも呼ばれる。又、細胞が癌化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も癌抗原となり、特に癌糖鎖抗原と呼ばれる。癌抗原の例としては、例えば、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA-1(SLX)などを挙げることができる。

MHC抗原には、MHC class I抗原とMHC class II抗原に大別され、MHC class I抗原には、HLA-A,-B,-C,-E,-F,-G,-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR,-DQ,-DPが含まれる。

- [0048] 分化抗原には、
CD1,CD2,CD3,CD4,CD5,CD6,CD7,CD8,CD10,CD11a,CD11b,CD11c,CD13,CD14,CD15s,CD16,CD18,CD19,CD20,CD21,CD23,CD25,CD28,CD29,CD30,CD32,CD33,CD34,CD35,CD38,CD40,CD41a,CD41b,CD42a,CD42b,CD43,CD44,CD45,CD45RO,CD48,CD49a,CD49b,CD49c,CD49d,CD49e,CD49f,CD51,CD54,CD55,CD56,CD57,CD58,CD61,CD62E,CD62L,CD62P,CD64,CD69,CD71,CD73,CD95,CD102,CD106,CD122,CD126,CDw130などが含まれる。

- [0049] 活性の変化を測定する為に用いる検出指標としては、量的及び／又は質的な変化が測定可能である限り使用することができる。例えば、無細胞系(cell free assay)の指標、細胞系(cell-based assay)の指標、組織系の指標、生体系の指標を用いることができる。

無細胞系の指標としては、酵素反応やタンパク質、DNA、RNAの量的及び／又は質的な変化を用いることができる。酵素反応としては、例えば、アミノ酸転移反応、糖

転移反応、脱水反応、脱水素反応、基質切断反応等を用いることができる。また、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化、二量化、多量化、分解、乖離等や、DNA、RNAの増幅、切断、伸長を用いることができる。例えばシグナル伝達経路の下流に存在するタンパク質のリン酸化を検出指標とすることができる。

[0050] 細胞系の指標としては、細胞の表現型の変化、例えば、産生物質の量的及び／又は質的变化、増殖活性の変化、細胞数の変化、形態の変化、特性の変化等を用いることができる。産生物質としては、分泌タンパク質、表面抗原、細胞内タンパク質、mRNA等を用いることができる。形態の変化としては、突起形成及び／又は突起の数の変化、扁平度の変化、伸長度／縦横比の変化、細胞の大きさの変化、内部構造の変化、細胞集団としての異形性／均一性、細胞密度の変化等を用いることができる。これらの形態の変化は検鏡下での観察で確認することができる。特性の変化としては、足場依存性、サイトカイン依存応答性、ホルモン依存性、薬剤耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、拍動性、細胞内物質の変化等を用いることができる。細胞運動性としては、細胞浸潤活性、細胞遊走活性がある。また、細胞内物質の変化としては例えば、酵素活性、mRNA量、 Ca^{2+} やcAMP等の細胞内情報伝達物質、細胞内タンパク質量等を用いることができる。また、細胞膜受容体の場合には、受容体の刺激によって誘導される細胞の増殖活性の変化を指標とすることができる。

[0051] 組織系の指標としては、使用する組織に応じた機能変化を検出指標とすることができる。生体系の指標としては組織重量変化、血液系の変化、例えば血球細胞数の変化、タンパク質量や、酵素活性、電解質量の変化、また、循環器系の変化、例えば、血圧、心拍数の変化等を用いることができる。

[0052] これらの検出指標を測定する方法としては、特に制限はなく、吸光、発光、発色、蛍光、放射活性、蛍光偏光度、表面プラズモン共鳴シグナル、時間分解蛍光度、質量、吸収スペクトル、光散乱、蛍光共鳴エネルギー移動、等を用いることができる。これらの測定方法は当業者にとっては周知であり、目的に応じて、適宜選択することができる。

例えば、吸収スペクトルは一般的に用いられるフォトメータやプレートリーダー等、発光はルミノメータ等、蛍光はフルオロメータ等で測定することができる。質量は質量分

析計を用いて測定することができる。放射活性は、放射線の種類に応じてガンマカウンターなどの測定機器を用いて、蛍光偏光度はBEACON(宝酒造)、表面プラズモン共鳴シグナルはBIACORE、時間分解蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動などはARVOなどにより測定できる。さらに、フローサイトメータなども測定に用いることができる。これらの測定方法は、一つの測定方法で2種以上の検出指標を測定しても良く、簡便であれば、2種以上の測定を同時及び／又は連続して測定することによりさらに多数の検出指標を測定することも可能である。例えば、蛍光と蛍光共鳴エネルギー移動を同時にフルオロメータで測定することができる。

- [0053] 本発明において、アゴニスト活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、実施例に記載のように細胞増殖を指標にアゴニスト活性を測定する方法により判定することが可能である。より具体的には、アゴニスト依存性増殖を示す細胞に、アゴニスト活性を測定したい抗体を添加し、培養する。その後、WST-8のような生細胞数に応じて特定の波長において発色反応を呈する試薬を添加して吸光度を測定し、得られた吸光度を指標にアゴニスト活性を測定することが可能である。
- [0054] アゴニスト依存性増殖を示す細胞も当業者に公知の方法により作製することが可能であり、例えば、抗原が細胞増殖シグナルを発する受容体である場合には、該受容体を発現している細胞を用いればよい。又、抗原が細胞増殖シグナルを出さない受容体である場合には、細胞増殖シグナルを発する受容体の細胞内領域と、細胞増殖シグナルを出さない受容体の細胞外領域からなるキメラ受容体を作製し、該キメラ受容体を細胞で発現させればよい。細胞増殖シグナルを発する受容体の例としては、例えば、G-CSF受容体、mpl、neu、GM-CSF受容体、EPO受容体、c-kit、FLT-3等を挙げることができる。受容体を発現させる細胞としては、例えば、BaF3、NFS60、FDCP-1、FDCP-2、CTLL-2、DA-1、KT-3等を挙げることができる。
- [0055] また、本発明において、タンパク質が「安定化する」とは、タンパク質の会合化反応が抑制された状態であって、保存中に生じるタンパク質の会合体の増加を抑制すること、及び／又は、保存中に生じるタンパク質の不溶性会合体(沈殿物)の増加を抑制すること及び／又は、タンパク質の機能を保持していることをいい、好ましくは、保存中に生じるタンパク質の会合体の増加を抑制することをいう。

[0056] 本発明は、アミノ糖の一つであるメグルミンをタンパク質に添加する工程を含む、タンパク質の会合化を抑制する方法に関する。より具体的には、メグルミンを抗体分子に添加する工程を含む、抗体分子の会合化を抑制する方法に関する。

本発明において、会合とは、タンパク質(抗体分子)が不可逆的あるいは可逆的に会合化し抗体2分子以上の多量体が形成されることを言う。会合が抑制されたか否かについては、当業者に公知の方法、例えば、沈降平衡法(超遠心法)、浸透圧法、光散乱法、低角レーザー光散乱法、X線小角散乱法、中性子小角散乱法、またはゲルろ過法等により抗体分子の会合体含有率を測定することで行うことが出来る。メグルミンを添加することにより、保存時の抗体の会合体含有率が低下した場合に、会合化が抑制されたと解釈することが出来る。

[0057] 抗体の会合体含有率の測定する方法としては、実施例に記載の通り、SEC (Size Exclusion Chromatography: サイズ排除クロマトグラフィー)を用いて行う方法が挙げられるが、これらの方法に限定されるものではない。

本発明において「抗体分子を安定化する」とは、抗体の濃度や状態は問わず、溶液抗体製剤、凍結乾燥抗体製剤、またはスプレードライ製剤に含まれる抗体分子を安定化するものであってもよい。また、低温下または常温下で長期保存された抗体分子を安定化するものであってもよい。本発明において低温保存とは、一例として -80°C ～ 10°C における保存を挙げることが出来、凍結保存も保存形態に含まれる。低温の好ましい例としては、 -20°C または 5°C を挙げることが出来るが、この温度に限定されるものではない。また、本発明において常温保存とは、一例として 15°C ～ 30°C における保存を挙げることが出来る。常温の好ましい例としては、 25°C を挙げることが出来るが、この温度に限定されるものではない。

[0058] 溶液製剤化は、当業者に周知の方法によって実施できる。例えば、非特許文献(J. Pharm.Sc, 2004, 93(6), 1390-1402)に記載されているように、通常TFF膜を利用した膜濃縮法が用いられる。

凍結乾燥は、当業者に周知の方法によって実施できる(Pharm. Biotechnol, 2002, 13, 109-33, Int. J. Pharm. 2000, 203(1-2), 1-60, Pharm. Res. 1997, 14(8), 969-75)。例えば、溶液を凍結乾燥に用いるバイアル等の容器に適当量分注し、凍結庫また

は凍結乾燥庫中にて行なうか、またはアセトン／ドライアイス、液体窒素などの冷媒中に浸漬して行なう。

[0059] また、スプレードライ製剤化は当業者に周知の方法によって実施できる(J. Pharm. Sci. 1998 Nov;87(11):1406-11)。

溶液製剤化および凍結乾燥については、実施例に記載の方法で行うことも出来るが、それらに限定されるものではない。

[0060] 本発明は、アミノ糖の一つであるメグルミンを含有する、タンパク質を安定化させる薬剤、またはタンパク質の会合化を抑制する薬剤に関する。より具体的には、メグルミンを含有する、抗体分子を安定化させる薬剤、または抗体分子の会合化を抑制する薬剤に関する。

また、メグルミンを含有する、抗体分子を安定化させる薬剤、または、凍結乾燥抗体製剤に含まれる抗体分子を安定化させる薬剤に関する。

[0061] 本発明において、薬剤には保存剤や安定剤等の製剤上許容しうる担体が添加されていてもよい。製剤上許容しうるとは、それ自体は上記のタンパク質の安定化作用を有する材料であってもよいし、安定化作用を有さない材料であってもよく、上記の薬剤とともに投与可能な製剤上許容される材料を意味する。また、安定化作用を有さない材料であっても、メグルミンと併用することによって相乗的もしくは相加的な安定化効果を有する材料であってもよい。

[0062] 製剤上許容される材料としては、例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。

本発明において、界面活性剤としては非イオン界面活性剤を挙げることができ、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル;グリセリンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレート等のグリセリン脂肪酸エステル;デカグリセリンモノステアレート、デカグリセリンジステアレート、デカグリセリンモノリノレート等のポリグリセリン脂肪酸エステル;ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチ

レンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル;ポリオキシエチレンソルビットテトラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル;ポリオキシエチレングリセリルモノステアレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル;ポリエチレングリコールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル;ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル;ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンセチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル;ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル;ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(ポリオキシエチレン水素ヒマシ油)等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ油;ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘導体;ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体;ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等のHLB 6~18を有するもの、等を典型的例として挙げることができる。

[0063] また、界面活性剤としては陰イオン界面活性剤も挙げることができ、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数10~18のアルキル基を有するアルキル硫酸塩;ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が2~4でアルキル基の炭素原子数が10~18であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩;ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が8~18のアルキルスルホコハク酸エステル塩;天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質;スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質;炭素原子数12~18の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げるができる。

本発明の製剤には、これらの界面活性剤の1種または2種以上を組み合わせる添加することができる。本発明の製剤で使用する好ましい界面活性剤は、ポリソルベート20, 40, 60又は80などのポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、ポリ

ソルベート20及び80が特に好ましい。また、ポロキサマー（プルロニックF-68（登録商標）など）に代表されるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールも好ましい。

界面活性剤の添加量は使用する界面活性剤の種類により異なるが、ポリソルベート20又はポリソルベート80の場合では、一般には0.001～100mg/mLであり、好ましくは0.003～50mg/mLであり、さらに好ましくは0.005～2mg/mLである。

- [0064] 本発明において緩衝剤としては、リン酸、クエン酸緩衝液、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、コハク酸、乳酸、リン酸カリウム、グルコン酸、カプリル酸、デオキシコール酸、サリチル酸、トリエタノールアミン、フマル酸等 他の有機酸等、あるいは、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、ヒスチジン緩衝液、イミダゾール緩衝液等を挙げることが出来る。
- また溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製してもよい。緩衝液の濃度は一般には1～500mMであり、好ましくは5～100mMであり、さらに好ましくは10～20mMである。

- [0065] また、本発明の薬剤は、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、アミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、糖アルコールを含んでもよい。

本発明においてアミノ酸としては、塩基性アミノ酸、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン等、またはこれらのアミノ酸の無機塩（好ましくは、塩酸塩、リン酸塩の形、すなわちリン酸アミノ酸）を挙げることが出来る。遊離アミノ酸が使用される場合、好ましいpH値は、適当な生理的に許容される緩衝物質、例えば無機酸、特に塩酸、リン酸、硫酸、酢酸、蟻酸又はこれらの塩の添加により調整される。この場合、リン酸塩の使用は、特に安定な凍結乾燥物が得られる点で特に有利である。調製物が有機酸、例えばリンゴ酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸等を実質的に含有しない場合あるいは対応する陰イオン（リンゴ酸イオン、酒石酸イオン、クエン酸イオン、コハク酸イオン、フマル酸イオン等）が存在しない場合に、特に有利である。好ましいアミノ酸はアルギニン、リジン、ヒスチジン、またはオルニチンである。さらに、酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸、及びその塩の形（好ましくはナトリウム塩）あるいは中性アミノ酸、例えばイソロイシン、ロイシン、グリシン、セリン、スレオニン

、バリン、メチオニン、システイン、またはアラニン、あるいは芳香族アミノ酸、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、または誘導体のN-アセチルトリプトファンを使用することもできる。

- [0066] 本発明において、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物としては、例えばデキストラン、グルコース、フラクトース、ラクトース、キシロース、マンノース、マルトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース等を挙げることができる。

本発明において、糖アルコールとしては、例えばマンニトール、ソルビトール、イノシトール等を挙げることができる。

- [0067] 注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

- [0068] 所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、pH調整剤、無痛化剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。

本発明において、含硫還元剤としては、例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1~7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等を挙げることができる。

また、本発明において酸化防止剤としては、例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキソトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤を挙げることが出来る。

- [0069] また、必要に応じ、マイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシス

テム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる(“Remington’s Pharmaceutical Science 16th edition”, Oslo Ed., 1980等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556; EP第133,988号)。

[0070] 本発明は、アミノ糖の一つであるメグルミンにより安定化された抗体分子を含有する医薬組成物に関する。また、本発明はアミノ糖の一つであるメグルミンにより会合化が抑制された抗体分子を含有する医薬組成物に関する。さらに、該医薬組成物、および薬学的に許容される担体を含むキットに関する。

本発明の医薬組成物およびキットには、上記の安定化された抗体分子以外に、製剤上許容される材料が含まれてもよい。製剤上許容される材料としては、上記に記載のものを挙げることが出来る。

本発明の医薬組成物の形態(剤形)としては、注射剤形、凍結乾燥剤形、溶液剤形、またはスプレードライ製剤形などが例示できるが、これらに限定されるものではない。

本発明の製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチック又はガラス製のバイアル、アンプル、注射器のような規定容量の形状の容器、ならびに瓶のような大容量の形状の容器で供給することができる。使用の便宜性の点からはプレフィルドシリンジが好ましい。

[0071] 患者への投与は経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、例えば、注射投与が可能である。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状によって適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、タンパク質、ペプチド、抗体については一回につき体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001~100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明はこれらの投与量および投与方法等に制限されるものではない。低分子化

合物については、成人に対して有効成分量として、一日当たり、0.1～2000mgの範囲である。しかしながら、本発明はこれらの投与量および投与方法等に制限されるものではない。

[0072] 本発明の凍結乾燥製剤またはスプレードライ製剤は、使用前に、溶液製剤とすることができる。従って、本発明は、本発明の凍結乾燥製剤またはスプレードライ製剤、および薬学的に許容される担体を含むキットもまた提供する。薬学的に許容される担体は、本発明の凍結乾燥製剤またはスプレードライ製剤を溶液製剤化できるものであれば、担体の種類、組み合わせの有無等に制限はないが、薬学的に許容される担体として、またその一部として、本発明の安定化剤を用いることで、溶液製剤中での抗体分子の会合化を抑制することができる。

[0073] 本発明は、メグルミンを抗体に添加し、抗体分子を安定化させる工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法に関する。また、メグルミンを抗体に添加し、抗体分子の会合化を抑制する工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法に関する。また、(1)メグルミンを抗体に添加工程、および(2)(1)の混合物を溶液製剤化する工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法に関する。さらに、(1)メグルミンを抗体に添加する工程、および(2)(1)の混合物を凍結乾燥する工程の工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法に関する。

溶液製剤化および、凍結乾燥に関しては上記に記載の方法で行うことが出来る。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0074] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1]メグルミンによるhVB22Bの安定化の検討

高純度に精製したsc(Fv)₂であるhVB22B sc(Fv)₂ u2-wz4 (配列番号:1、以下参考例を参照)を用いて、メグルミンによる会合反応の抑制効果の検討を行った。安定性試験における溶媒の条件、hVB22B濃度は以下の通りである。

[0075] <安定性試験条件>

コントロール: 20mMクエン酸ナトリウム (pH6.5)

メグルミン: 20mMクエン酸ナトリウム、pH6.5、10% メグルミン

hVB22B u2-wz4 : 1.0mg/mL

[0076] 上記条件下において、55°C-3日後および6日後に、SEC (Size Exclusion Chromatography: サイズ排除クロマトグラフィー)を用いて、モノマー残存率を測定した(モノマー残存率は、初期状態のモノマーピークエリアに対する熱加速サンプルのモノマーのピークエリアの%である)。SECの分析条件を下記に示す。

[0077] <SECの分析条件>

カラム : TSKgel Super2000sw (TOSOH)

溶出液 : 50mMリン酸ナトリウム、300mM KCl, pH7.0

Flow rate : 0.2ml/min

検出波長 : 220nm

[0078] SECの分析結果を図1に示す。図1は、上記溶液条件におけるinitial, 55°C-3日後、6日後のモノマー残存率の経時変化である。

以上の結果により、コントロールと比較してメグルミンを添加することによって、大幅にモノマー残存率が向上し、hVB22Bの会合化反応は大幅に抑制できることが明らかとなった。本研究により、安定性が非常に低い低分子化抗体に対してメグルミンを添加することで著しく安定性が向上することを見出した。また本研究により、初めてメグルミンがタンパク質の安定化剤として有用であることを明らかにした。

[0079] [実施例2]メグルミンの及ぼす他のsc(Fv)2分子、および全長抗体への安定化効果の検討

[実施例1]に示したhVB22B以外のsc(Fv)2: 下記に示すmVB22B(配列番号:2、以下参考例を参照)、12E10(配列番号:3、WO02/33072)、2D7(配列番号:4、以下参考例を参照)においてメグルミンの安定化効果を検討した。また、sc(Fv)2ではなく、全長抗体IgG1であるヒト化抗IL-6受容体抗体(H鎖-配列番号:5、L鎖-配列番号:6、WO92/19759)における安定化効果も検討した。安定性試験における溶媒の条件、各抗体濃度は以下の通りである。

[0080] <安定性試験条件>

コントロール: 20mM クエン酸バッファー、pH6.5

メグルミン: 20mMクエン酸バッファー、10%メグルミン、pH6.5

mVB22B: 28ug/mL、40°C-1週間後、2週間後について測定を行った。

2D7: 59ug/mL、40°C-1週間後、2週間後について測定を行った。

12E10: 10ug/mL、55°C-1週間後、2週間後について測定を行った。

IgG: 6.84mg/mL、60°C-1週間後、3週間後について測定を行った。

上記条件において、熱加速試験を実施した。

[0081] <SECの分析条件>

mVB22B, 2D7, 12E10 に関しては、分析は下記の条件で行った。

カラム : TSKgel Super2000SW (TOSOH)

溶出液 : 50mMリン酸ナトリウム、300mM KCl, pH7.0

Flow rate : 0.2ml/min

検出波長 : 220nm

[0082] IgGに関しては、分析は下記の条件で行った。

カラム : TSKgel G3000SWxl (TOSOH)

溶出液 : DPBS(-)

Flow rate : 0.5ml/min

検出波長 : 220nm

[0083] 図2に、上記の各溶液加速条件における会合体(aggregate)の経時変化を示す。安定性試験の結果、sc(Fv)₂、IgGに限らず、いずれの分子形においてもメグルミン添加により、会合体の生成が抑制された。以上の結果よりメグルミンを添加することによって、sc(Fv)₂のみならず、全長抗体のIgG等、抗体分子全般において会合化を抑制する効果があることが明らかとなった。メグルミンはこれまで抗体分子の安定化剤としての報告がなく、本検討により初めてメグルミンが抗体分子の安定化剤として有用であることを明らかにした。

[0084] [実施例3] IgGの溶液安定化剤、凍結乾燥製剤の賦形剤としてのメグルミンの検討

IgGの溶液製剤の安定化剤として、あるいは、凍結乾燥製剤の賦形剤としてメグルミンの安定化効果を検討した。IgGの安定化剤(賦形剤)の比較として、一般的なスクロ

ースを用いた。スクロースは抗体の凍結乾燥製剤として非常に有用であることが報告されている。試験に供した試料及び安定性試験条件は以下の通りである。

[0085] <試験に供した試料>

試料1: IgG 80 mg/vial、スクロース 100 mg/vial、ポリソルベート80 1 mg/vial、リン酸ナトリウム塩 30 μ mol/vial、pH6.0

試料2: IgG 80 mg/vial、スクロース 70 mg/vial、ポリソルベート80 1 mg/vial、リン酸ナトリウム塩 30 μ mol/vial、pH6.0

試料3: IgG 80 mg/vial、スクロース 50 mg/vial、ポリソルベート80 1 mg/vial、リン酸ナトリウム塩 30 μ mol/vial、pH6.0

試料4: IgG 80 mg/vial、メグルミン 55 mg/vial、ポリソルベート80 1 mg/vial、リン酸ナトリウム塩 30 μ mol/vial、pH6.0

試料5: IgG 80 mg/vial、メグルミン 40 mg/vial、ポリソルベート80 1 mg/vial、リン酸ナトリウム塩 30 μ mol/vial、pH6.0

試料6: IgG 80 mg/vial、メグルミン 30 mg/vial、ポリソルベート80 1 mg/vial、リン酸ナトリウム塩 30 μ mol/vial、pH6.0

[0086] 上記試料の凍結乾燥製剤については、IgG濃度が40 mg/mLとなるように調製した凍結乾燥前溶液をバイアルに2mLずつ充填し、棚型凍結乾燥機を用いて以下の条件からなる凍結乾燥を行うことにより調製した。

※ 凍結乾燥条件

工程名	温度
予備凍結	-50°C
一次乾燥	-20°C
二次乾燥	25→30°C

また、上記試料の溶液製剤については、凍結乾燥製剤1バイアル当たり0.6mLの注射用水を添加することにより調製した。このとき、IgG濃度は約120 mg/mLとなる。

[0087] <安定性試験条件>

凍結乾燥前後: 凍結乾燥前溶液及び凍結乾燥製剤について測定を行った。

凍結乾燥製剤: 40°C—1ヵ月保存試料について測定を行った。

溶液製剤:25℃—2週間保存試料について測定を行った。

[0088] <SECの分析条件>

以下の分析条件にて測定を行った。

カラム : TSKgel G3000SWxl (TOSOH)

溶出液 : pH7.0のリン酸緩衝液 (300 mmol/L塩化ナトリウム及び0.05%アジ化ナトリウムを含むpH7.0の50 mmol/Lリン酸緩衝液)

Flow rate : 1ml/min

検出波長 : 280nm

[0089] 図3に、凍結乾燥前後(凍結乾燥前溶液と凍結乾燥製剤)の会合体含有量に及ぼすスクロースとメグルミンの比較、及び、凍結乾燥製剤を作製し40℃-1ヶ月の加速試験後の会合体含有量に及ぼすスクロースとメグルミンの比較、及び、溶液製剤における25℃-2週間の加速試験後の会合体含有量に及ぼすスクロースとメグルミンの比較を示した。

[0090] いずれの比較においても、スクロースと比較してメグルミンのほうが、会合体含有率が低かった。これよりスクロースに比べてメグルミンのほうが会合体の生成に対する安定化作用が大きいことを見出した。また、その安定化作用にはメグルミンの濃度依存性が見られ、メグルミンが高濃度であるほど高い安定化作用が見られた。すなわち、凍結乾燥工程における抗体の乾燥ストレスに対して、メグルミンを添加することによって、メグルミンの濃度依存的に凍結乾燥による会合体の増加を抑制することが出来た。また、凍結乾燥製剤の40℃-1ヶ月保存による会合化も同様に抑制することができた。さらに、濃度約120mg/mLの溶液製剤について、25℃-2週間保存による会合化も同様に抑制することができた。そして、このような100mg/mLを超えるような高濃度溶液製剤に対しても、また溶液状態あるいは凍結乾燥状態のいずれを問わず、メグルミンはスクロースに比べて高い安定化効果があることを見出した。

[0091] [実施例4]hVB22B u2-wz4の-20℃凍結保存時におけるメグルミンの安定化効果

hVB22B u2-wz4を、本発明の参考例1～3、WO2005/056603またはWO2005/056604に示された方法で発現し、single chain diabody型 sc(Fv)2を精製した。精製されたsingle chain diabody型 sc(Fv)2を用いて以下の溶液条件の処方(F1およびF2)を調製

した。

F1 : 10mg/mL single chain diabody型 sc(Fv)₂

20mM ヒスチジン (pH6.8) + 150mM NaCl + 0.5mg/mL Polysorbate80

F2 : 10mg/mL single chain diabody型 sc(Fv)₂ + 150mM メグルミン

20mM ヒスチジン (pH6.8) + 150mM NaCl + 0.5mg/mL Polysorbate80

これらの試料を-20℃において6ヶ月凍結保存した。保存前の試料(initial)の会合体含有率および-20℃・6ヶ月保存後の試料(-20℃-6M)の会合体含有率を、SEC (ゲルろ過クロマトグラフィー)を用いて以下の条件で分析した。

液体クロマトグラフィー

カラム : TSKgel G3000SWXL (東ソー)

移動相 : 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) + 300mM 塩化カリウム

流速 : 0.5 mL/min

検出 : 220 nm

試料注入量 : 10 μ L

カラム温度 : 室温

サンプル温度 : 5℃

[0092] 図4にSECにより解析された保存前の試料と-20℃・6ヶ月後の試料の会合体含有率を示した。-20℃・6カ月の会合体増加率は、メグルミンを含まないF1においては4.8%会合体が増加したのに対して、メグルミンを安定化剤として含むF2においては会合体の増加は0.4%に抑制することができた。本実施例において、メグルミンは凍結状態においてもタンパク質を安定化する作用を有することが示された。

[0093] [実施例5] ヒト化二重特異性抗体hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQにおけるメグルミンの安定化効果

精製されたヒト化二重特異性抗体hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQを用いて以下の溶液条件の処方 (AF1、AF2、AF3) を調製した。hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQ からなるヒト化二重特異性抗体は、IgG4タイプの抗体であり、配列番号：49で示される第1のH鎖の可変領域 (hA69-KQ)、配列番号：50で示される第2のH鎖の可変領域 (hB26-PF)、およびそれぞれのH鎖に共通の配列番号：51で示されるL鎖の可変

領域(hAL-AQ)を含む抗体である。

AF1 : 20mM ヒスチジン-HCl, 50mM NaCl, pH5.8, 120mg/mL hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQ

AF2 : 20mM ヒスチジン-HCl, 50mM NaCl, 200mM メグルミン, pH5.8, 120mg/mL hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQ

AF3 : 20mM ヒスチジン-HCl, 50mM NaCl, 200mM アルギニン-HCl, pH5.8, 120mg/mL hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQ

[0094] これらの試料を25℃において2ヶ月常温保存した。保存前の試料(initial)の会合体含有率および25℃・2ヶ月保存後の試料(25℃-2M)の会合体含有率を、SEC (ゲルろ過クロマトグラフィー)を用いて以下の条件で分析した。測定にあたり、AF1、AF2、AF3をSECの移動相を用いて1mg/mLに希釈し、希釈した試料を用いて分析を行った。

液体クロマトグラフィー

カラム : TSKgel G3000SWXL (東ソー)

移動相 : 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) + 300mM 塩化カリウム

流速 : 0.5 mL/min

検出 : 220 nm

試料注入量 : 10 μ L (120mg/mLの溶液を移動相で1mg/mLに希釈した溶液を注入)

カラム温度 : 室温

サンプル温度 : 5℃

[0095] 図5にSECにより解析された保存前の試料および25℃・2ヶ月後の試料の、会合体含有率を示した。25℃・6カ月の会合体増加分は、安定化剤を含まないAF1においては0.51%会合体が増加したのに対して、メグルミンを安定化剤として含むAF2においては会合体の増加は0.26%に抑制することができ、アルギニンを安定化剤として含むAF3においては会合体の増加は0.27%であったことから、アルギニンと比較してメグルミンは同等以上の安定化効果を有することが示された。また、実施例3と同様において示されたように、120mg/mLからなる高濃度のヒト化二重特異性抗体hA69-KQ / hB26-PF / hAL-AQ溶液においてもメグルミンは安定化効果を有することが示された。また

、メグルミンはIgG、sc(Fv)2のみならず、bispecific IgGにおいても安定化効果を有することが示されたことから、広くタンパク質の安定化剤として使用することが可能である。

以下、本発明のsc(Fv)2抗体(hVB22B、mVB22B、2D7)の作成方法について、参考例を例示するが、本発明はこれら参考例に制限されるものではない。

[0096] [参考例1] 抗ヒトMpl抗体の作製

1.1 Mpl発現BaF3細胞株の樹立

TPO依存増殖性細胞株を得るために、全長Mpl遺伝子を発現するBaF3細胞株の樹立を行った。

全長ヒトMpl cDNA (Palaciosら、Cell 1985;41:727-734) (GenBank#NM_005373)をPCRにより増幅し、pCHOI(Hirataら、FEBS Letter 1994;356:244-248)のDHFR遺伝子発現部位を除去し、HEF-VH-g γ 1(Satoら、Mol Immunol. 1994;31:371-381)のNeomycin耐性遺伝子発現部位を挿入した発現ベクターpCOS2にクローニングし、pCOS2-hMplfullを構築した。

[0097] また、カニクイザル骨髓細胞から抽出したTotal RNAからSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製)を用いて、カニクイザルMpl cDNA(配列番号:7)をクローニングした。得られたカニクイザルcDNAをpCOS2に挿入、pCOS2-monkeyMplfullを構築した。

さらに、全長マウスMpl cDNA(GenBank#NM_010823)をPCRにより増幅し、pCOS2に挿入し、pCOS2-mouseMplfullを構築した。

[0098] 作製した各ベクター(20 μ g)をPBSに懸濁したBaF3細胞(1×10^7 cells/mL)に混合し、Gene Pulserキュベットに加え、Gene Pulser II (Bio-Rad社製)を用いて0.33kV, 950 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したBaF3細胞を1ng/mLマウスインターロイキン3(以下、mIL-3、Peprotech社製)、500 μ g/mL Geneticin(Invitrogen社製)、10% FBS(Invitrogen社製)を含むRPMI1640培地(Invitrogen社製)に加えて選抜し、ヒトMpl発現BaF3細胞株(以下、BaF3-human Mpl)、サルMpl発現BaF3細胞株(以下、BaF3-monkey Mpl)およびマウスMpl発現BaF3細胞株(以下、BaF3-mouse Mpl)を樹立した。選抜後は、1ng/mL rhTPO(R&D社製)、10% FBSを含むRPMI1640培地を用いて培養、維持した。

[0099] 1.2 Mpl発現CHO細胞株の樹立

Flow Cytometryを用いた結合活性評価用の細胞株を得るために、全長Mpl遺伝子を発現するCHO細胞株の樹立を行った。

はじめに、pCXN2(Niwaら、Gene 1991; 108:193-199)のHindIII部位にpCHOIのDHFR遺伝子発現部位を挿入して、発現ベクターpCXND3を作製した。pCOS2-hMplfull、pCOS2-monkeyMplfullおよびpCOS2-mouseMplfullを鋳型にして、His-tag配列を含むプライマーを用いてPCRにより増幅した各Mpl遺伝子をpCXND3にクローニングし、pCXND3-hMpl-His、pCXND3-monkey Mpl-HisおよびpCXND3-mouse Mpl-Hisを構築した。

[0100] 作製した各ベクター(25 μ g)をPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10^7 cells/mL)に混合し、Gene Pulserキューベットに加え、Gene Pulser II (Bio-Rad社製)を用いて1.5kV、25 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したCHO細胞を500 μ g/mL Geneticin、1xHT (Invitrogen社製)を含むCHO-S-SFMII培地(Invitrogen社製)に加えて選抜し、ヒトMpl発現CHO細胞株(以下、CHO-human Mpl) およびサルMpl発現CHO細胞株(以下、CHO-monkey Mpl) およびマウスMpl発現CHO細胞株(以下、CHO-mouse Mpl)を樹立した。

[0101] 1.3 可溶型ヒトMplタンパク質の調製

可溶型ヒトMplタンパク質を調製するため、昆虫細胞Sf9細胞で分泌産生する発現系を以下のように構築した。

ヒトMplの細胞外領域(Gln26からTrp491)の下流にFLAGタグを付加した遺伝子を作製し、pBACSurf-1 Transfer Plasmid (Novagen社製)のPstI-SmaI部位に挿入し、pBACSurf1-hMpl-FLAGを作製した。続いて、Bac-N-Blue Transfection Kit (Invitrogen)を用いて、4 μ gのpBACSurf1-hMpl-FLAGをSf9細胞に導入した。培養3日後に培養上清を回収し、プラークアッセイにより組換えウイルスを単離した。ウイルスストックを調製後にSf9細胞に感染させて培養上清を回収した。

[0102] 得られた培養上清を用いて、以下のように可溶型ヒトMplタンパク質を精製した。培養上清をQ Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、50mM Na-Phosphate Buffer, 0.01%(v/v) Tween20, 500mM NaCl (pH 7.2)を用いて溶

出した。溶出液をFLAG M2 -Agarose (SIGMA-ALDRICH社製)に吸着させた後に、100mM Glycine-HCl, 0.01%(v/v) Tween20 (pH 3.5)を用いて溶出した。溶出後、直ちに1M Tris-Cl (pH8.0)により中和し、PD-10 column (Amersham Biosciences社製)を用いて、PBS(-), 0.01% (v/v) Tween20に置換を行った。精製した可溶型Mplタンパク質をshMpl-FLAGと称する。

[0103] 1.4 ヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質の調製

ヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質遺伝子は、Bennettらの方法(Bennettら、J.Biol.Chem. 1991;266:23060-23067)に従って作製した。ヒトMplの細胞外領域(Gln26からTrp491)をコードする塩基配列をヒトIgG- γ 1のFc領域(Asp216よりの下流の領域)をコードする塩基配列に連結し、連結部にFusion LinkerとしてBstEII配列(アミノ酸Val-Thr)を付加した。シグナル配列は、ヒトIgG H鎖可変領域のシグナルペプチド19アミノ酸を使用した。得られたヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質遺伝子をpCXND3にクローニングし、pCXND3-hMpl-Fcを構築した。

[0104] 作製したベクター(25 μ g)をPBSに懸濁したCHO-DG44細胞(1×10^7 cells/mL)に混合し、Gene Pulserキューベツトに加え、Gene Pulser II (Bio-Rad社製)を用いて1.5kV, 25 μ FDの容量でパルスを加えた。エレクトロポレーション処理により遺伝子導入したCHO細胞を500 μ g/mL Geneticin、1xHTを含むCHO-S-SFMII培地に加えて選抜し、shMPL-Fc発現CHO細胞株(CHO-hMpl-Fc)を樹立した。

得られた培養上清を用いて、以下のようにヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質を精製した。

[0105] 培養上清をQ Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、50mM Na-Phosphate Buffer, 0.01%(v/v) Tween20, 1M NaCl (pH 7.6)を用いて溶出した。溶出液をHiTrap proteinG HPカラム(Amersham Biosciences社製)に吸着させた後に、0.1 M Glycine-HCl, 150 mM NaCl, 0.01%(v/v) Tween20 (pH 2.7)を用いて溶出した。溶出後、直ちに1M Tris-Cl (pH8.0)により中和し、PD-10 column (Amersham Biosciences社製)を用いて、PBS(-), 0.01% (v/v) Tween20に置換を行った。精製した可溶型Mplタンパク質をhMpl-Fcと称する。

[0106] 1.5 shMpl-FLAGまたはBaF3-human Mplの免疫およびハイブリドーマの選抜

MRL/MpJUmmCrj-lpr/lprマウス(以下、MRL/lprマウス、日本チャールス・リバーより購入)を用いて、8週齢より免疫を開始した。初回免疫は100 μ g/匹のshMPL-FLAGにフロイント完全アジュバント(H37 Ra、ベクトン・ディッキンソン社製)を加え、エマルジョン化したものを皮下に投与した。追加免疫は50 μ g/匹のshMPL-FLAGにフロイント不完全アジュバント(ベクトン・ディッキンソン社製)を加え、エマルジョン化したものを皮下に投与した。合計6回免疫を行ったマウス3匹に対し、50 μ g/匹のshMPL-FLAGを尾静脈内投与することにより最終免疫を行った。マウスミエローマ細胞P3-X63Ag8U1(P3U1、ATCCより購入)とマウス脾臓細胞を混合し、Polyethylene Glycol 1500(Roche Diagnostics社製)を加えながら混合することにより細胞融合を行った。翌日よりHAT培地を用いて選抜を行い、培養上清を用いてshMpl-FLAGまたはhMpl-Fcを固相化したイムノプレートを用いたELISAおよびBaF3-human Mplを用いた細胞増殖活性を指標としたスクリーニングを実施した。また、BaF3-human MplをBalb/Cマウスに 1.0×10^7 細胞ずつ1週間から5ヶ月の間隔で腹腔内投与し、合計11回免疫した。同様に細胞融合によりハイブリドーマを作製し、BaF3-human Mplを用いた細胞増殖活性を指標としたスクリーニングを実施した。陽性クローンについて、限界希釈法によりモノクローン化した後に、拡大培養を行い、培養上清を回収した。

[0107] 1.6 抗ヒトMpl抗体の解析

抗体濃度はヤギ抗マウスIgG (gamma) (ZYMED社製)とアルカリフォスファターゼ-ヤギ抗マウス IgG (gamma)(ZYMED社製)を用いたマウスIgGサンドイッチELISAを行い、Isotypeの等しい市販抗体をスタンダードにして、GraphPad Prism (GraphPad Software, USA)を用いて検量線を作成し、抗体濃度の換算を行った。

[0108] 抗体のアイソタイプは、アイソタイプ特異的な二次抗体を用いた抗原依存的ELISAにて決定した。hMpl-Fcを1 μ g/mLとなるようにcoating buffer (0.1mM NaHCO₃ (pH9.6), 0.02%(w/v) NaN₃)で希釈したものを加え、4°Cにて一晩反応し、コーティングした。Diluent buffer (50mM Tris-HCl(pH8.1), 1mM MgCl₂, 150mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20, 0.02%(w/v) NaN₃, 1%(w/v) BSA)にてブロッキング処理を行った後、ハイブリドーマの培養上清を加え、室温で1時間放置した。Rinse buffer (0.05%(v/v) Tween20, PBS)にて洗浄した後、Alkaline phosphatase標識したアイソタイプ特異的な二次抗体を加

え、室温で1時間放置した。発色はSIGMA104(SIGMA-ALDRICH社製)を1mg/mLとなるようにSubstrate Buffer (50mM NaHCO₃ (pH9.8), 10mM MgCl₂)に希釈したものを
用い、405nmの吸光度をBenchmark Plus (Bio-Rad社製)にて測定した。

[0109] shMpl-FLAGおよびhMPL-Fcに対する結合活性は、ELISAにより評価した。精製したshMpl-FLAGおよびhMPL-Fcを1 μ g/mLになるようにコーティングし、Diluent bufferにてブロッキング処理を行った。ハイブリドーマの培養上清を加え、室温で1時間放置した後、Alkaline Phosphatase標識した抗マウスIgG抗体(Zymed社製)を加え、上記方法と同様に発色を行った。室温で1時間発色させた後に405nmの吸光度を測定し、GraphPad Prismを用いてEC₅₀値を算出した。

[0110] CHO-human MplまたはCHO-monkey Mplを回収し、1x10⁶ cells/mLになるようにFACS Buffer (1% FBS/ PBS)に懸濁した。100 μ L/wellとなるようにMultiscreen (Millipore社製)に分注し、遠心操作にて培養上清を除去した。5 μ g/mLになるように希釈した培養上清を加え、氷上にて30分間反応させた。細胞をFACS bufferにて1回洗浄し、FITC標識抗マウスIgG抗体(Beckman Coulter社製)を添加し、氷上にて30分間反応させた。反応後、500rpmで1分間遠心し、上清を除き、FACS Buffer 400 μ Lに懸濁し、EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter)を用いてフローサイトメトリーを行った。前方散乱光(forward scatter)及び側方散乱光(side scatter)のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定した。

[0111] 抗体のアゴニスト活性は、TPO依存性増殖を示すBaF3-human MplまたはBaF3-monkey Mplを用いて評価した。各細胞をそれぞれ4x10⁵ cells/mLとなるように10% Fetal Bovine Serum(Invitrogen社製)を含むRPMI1640(Invitrogen社製)に懸濁し、60 μ L/wellで96well plateに分注した。rhTPO (R&D社製)およびハイブリドーマ培養上清の濃度を振り、各wellに40 μ L加え、37°C、5%CO₂条件下で、24時間培養した。10 μ L/wellでCell Count Reagent SF (ナカライテスク社製)を加え、2時間培養後に、450 nmの吸光度(対照655nm)をBenchmark Plusにて測定し、GraphPad Prismを用いてEC₅₀値を算出した。

これらの解析により、ヒトMplに結合するマウスモノクローナル抗体を合計163個取得した。

以下に記載する抗ヒトMpl抗体の中で、TA136はBaF3-human Mpl免疫マウスより樹立され、それ以外の抗体はshMpl-Flag免疫マウスより樹立した。

[0112] 1.7 抗ヒトMpl抗体の精製

ハイブリドーマの培養上清を用いて、以下のように抗ヒトMpl抗体を精製した。

培養上清をHiTrap proteinG HPカラム (Amersham Biosciences社製) に吸着させた後に、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.7)を用いて溶出した。溶出後、直ちに1M Tris-Cl (pH 9.0)により直ちに中和し、PBSで一昼夜透析を行い、バッファー置換を行った。

[0113] 1.8 抗ヒトMpl抗体VB22Bのエピトープの決定

抗ヒトMpl抗体VB22Bがwestern blottingに使用可能である性質を利用し、ヒトMplの部分配列とGSTの融合蛋白質を構築しVB22Bのエピトープ解析を行った。MG1 (Gln 26からTrp491)、MG2 (Gln26からLeu274) の領域をそれぞれPCR増幅し、GST融合蛋白質として発現されるようにpGEX-4T-3 (Amersham社) ヘクローニングした。プラスミドDNAをDH5 α へ導入し形質転換体を得、対数増殖期にある形質転換体に1mMとなるようにIPTGを加えることによりGST融合蛋白質の発現を誘導し、2時間培養後に菌体を回収した。Sonicationにより破碎後、XL-80 Ultracentrifuge (Beckman, Rotor 7 0.1Ti)を用い35,000rpmで30分遠心後の培養上清を回収し、GST Purification Modules (Amersham社)を用いて精製した。10%-SDS-PAGEにより分離後、PVDF膜にトランスファーし、VB22Bマウス抗体を用いたwestern blottingを行った。VB22BはMG-1、MG-2を認識したことから、VB22BのエピトープはGln26からLeu274の領域にあることが判明した。

[0114] 次に、MG3 (Gln26からAla189)、MG4 (Gln26からPro106)、MG5 (Gln26からGlu259)、MG6 (Gln26からGly245) の領域とGSTの融合蛋白質を作製し同様にwestern blottingを行った結果、VB22BはMG5、MG6を認識したが、MG3、MG4を認識しなかったことから、VB22BのエピトープはAla189からGly245の周辺に存在する事が予想された。さらにMG7 (Gln26からAla231)、MG8 (Gln26からPro217)とGSTの融合蛋白質を作製し評価した結果、VB22BはMG7を認識したが、MG8は認識しなかったことから、VB22BのエピトープはGln217からAla231の周辺に存在することが示された。さらにMG10 (Gln213からAla231)とGSTの融合蛋白質との結合が確認されたことから、VB22Bのエピトープ

はGln213からAla231の19アミノ酸に限定された。

[0115] 1.9 抗ヒトMpl抗体VB22Bの抗原抗体反応の反応速度論的解析

抗ヒトMpl抗体VB22Bが可溶性組換えMplに結合する性質を利用し、実施例1.4で示したヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質とVB22B IgGとの抗原抗体反応における速度論的な解析を行った。Biacore 2000(Biacore社製)にSensor Chip CM5(Biacore社製)をセットし、アミンカップリング法にてヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質を固定化した。次に、HBS-EP Buffer(Biacore社製)を用いて1.25～20 μ g/mLのVB22B IgGを調製し、VB22B IgGを2分間添加し、結合領域を得た後に、HBS-EP Bufferを2分間添加することで解離領域を得た。Sensor Chip上のヒトMpl-IgG Fc融合タンパク質に結合したVB22B IgGは、10mM NaOHを15秒間添加して除去し、Sensor Chipを再生した。ランニングバッファーとしてHBS-EP Bufferを用い、流速は20 μ L/minとした。BIAevaluation ver.3.1ソフトウェア(Biacore社製)を用いて、各濃度で得られたセンサーグラムより反応速度定数を算出した。その結果、VB22B IgGの解離定数(KD)は $1.67 \pm 0.713 \times 10^{-9}$ Mであった。

[0116] [参考例2] 抗ヒトMpl一本鎖抗体の作製

取得した抗ヒトMpl抗体の中で、結合活性およびアゴニスト活性が高かった23種類の抗体について、遺伝子工学的手法により一本鎖抗体の発現系を構築した。以下に抗ヒトMpl抗体VB22Bの一本鎖抗体作製例について示す。

[0117] 2.1 抗ヒトMpl抗体可変領域のクローニング

抗ヒトMpl抗体を産生するハイブリドーマより抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits(QIAGEN社製)を用いて 1×10^7 細胞のハイブリドーマより抽出した。

1 μ gのTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit(CLONTECH社製)を用いて、マウスIgG2b定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMH C-IgG2b(配列番号:8)またはマウス κ 鎖定常領域塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドkappa(配列番号:9)を用いて、5'末端側遺伝子断片を増幅した。逆転写反応は42°Cで1時間30分間反応させた。

[0118] PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10×Advantage 2 PCR Buffer、
 5 μ Lの10×Universal Primer A Mix、
 0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
 1 μ LのAdvantage 2 Polymerase Mix

(以上の成分はいずれもCLONTECH社製)、

2.5 μ Lの逆転写反応産物、

10pmolの合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2bまたはkappa

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間、

94°C/5秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復、

94°C/5秒間、70°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを5回反復、

94°C/5秒間、68°C/10秒間、72°C/3分間のサイクルを25回反復、

最後に反応産物を72°Cで7分間加熱した。

PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。さらに、ABI 3700 DNA Analyzer (Perkin Elmer社製)を用いて塩基配列を決定した。

[0119] クローニングしたVB22B H鎖可変領域(以下、VB22B-VH)の塩基配列を配列番号:10、アミノ酸配列を配列番号:11、およびL鎖可変領域(以下、VB22B-VL)の塩基配列を配列番号:12、アミノ酸配列を配列番号:13に示す。

[0120] 2.2 抗ヒトMpl抗体Diabody発現ベクターの作製

5アミノ酸からなるリンカー配列を用いたVB22B一本鎖Fv (以下、VB22B Diabody)をコードする遺伝子は、VB22B-VHをコードする遺伝子の3'末端およびVB22B-VLをコードする遺伝子の5'末端に(Gly Ser)_{4 1}から成るリンカーをコードする塩基配列を付加させた遺伝子について、それぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより構築した。

[0121] VB22B-VHの前方プライマー70・115HF(配列番号:14)は、EcoRI部位を有するように設計し、VB22B-VHの後方プライマー33・115HR(配列番号:15)は、VB22B-VHのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつ(Gly Ser)_{4 1}から成るリンカーをコー

ドする塩基配列ならびにVB22B-VLのN末端をコードするDNAにハイブリダイズする塩基配列を有するように設計した。VB22B-VLの前方プライマー33・115LF(配列番号:16)は、VB22B-VLのN末端をコードする塩基配列ならびに(Gly₄Ser₁)から成るリンカーをコードする塩基配列、VB22B-VHのC末端をコードする塩基配列を有するように設計した。VB22B-VLの後方プライマー33・115LR(配列番号:17)は、VB22B-VLのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつFLAGタグ(AspTyrLysAspAsp AspAspLys/配列番号:18)をコードする塩基配列を有し、さらにNotI部位を有するように設計した。

- [0122] 第一PCRにおいて、VB22B-VHおよびリンカー配列とVB22B-VLおよびリンカー配列を含む2つのPCR反応物を以下のように合成した。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、

0.4mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq

(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

10ngのVB22B-VHまたはVB22B-VL遺伝子を含むpGEM-T Easyベクター、

10pmolの合成オリゴヌクレオチド70・115HF、33・115HRまたは33・115LF、33・115

LR

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間、

94°C/15秒間、72°C/2分間のサイクルを5回反復、

94°C/15秒間、70°C/2分間のサイクルを5回反復、

94°C/15秒間、68°C/2分間のサイクルを28回反復、

最後に反応産物を72°Cで5分間加熱した。

- [0123] 約400bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、各PCR産物の一部を用いて以下のように第二PCRを行った。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10 $\times$ PCR Buffer、
0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq
(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、
1 μ Lの第一PCR産物 (2種類)、
10pmolの合成オリゴヌクレオチド70・115HF、33・115LR

また反応温度条件は次のとおりである。

94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて30秒間、
94 $^{\circ}$ C/15秒間、72 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを5回反復、
94 $^{\circ}$ C/15秒間、70 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを5回反復、
94 $^{\circ}$ C/15秒間、68 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを28回反復、
最後に反応産物を72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

[0124] 約800bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、pCXND3にクローニングし、pCXND3-VB22B dbを作製した。

[0125] 2.3 抗ヒトMpl抗体sc(Fv)2発現ベクターの作製

VB22B由来の2つのH鎖可変領域および2つのL鎖可変領域を含む改変抗体[sc(Fv)2]を発現するプラスミドを作製するために、前述のpCXND3-VB22B dbを用いて以下のようにPCR法により修飾した。

[0126] はじめに、VB22B-VHをコードする遺伝子の3'末端およびVB22B-VLをコードする遺伝子の5'末端に15アミノ酸から成るリンカー (Gly₄Ser₃) をコードする塩基配列を付加させた遺伝子について、それぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより構築した。この構築過程において、3種類のプライマーを新たに設計した。VB22B-VHの前方プライマーVB22B-fpvu (プライマーA, 配列番号:19) は、5'末端にEcoRI部位を有し、VB22B dbのGln22およびLeu23がPvuII部位に変換するように設計した。VB22B-VHの後方プライマーsc-rL15 (プライマーB, 配列番号:20) は、VB22B-VHのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつ (Gly₄Ser₃) から成るリンカーをコードする

塩基配列ならびにVB22B-VLのN末端をコードするDNAにハイブリダイズする塩基配列を有するように設計した。VB22B-VLの前方プライマーsc-fL15(プライマーC, 配列番号:21)は、VB22B-VLのN末端をコードする塩基配列ならびに(Gly₄Ser₃)から成るリンカーをコードする塩基配列、VB22B-VHのC末端をコードする塩基配列を有するように設計した。

[0127] 第一PCRにおいて、VB22B-VHおよびリンカー配列とVB22B-VLおよびリンカー配列を含む2つのPCR反応物を以下のように合成した。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10 $\times$ PCR Buffer、

0.4mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq

(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

10ngのpCXND3-VB22B db、

10pmolの合成オリゴヌクレオチドVB22B-fpvu、sc-rL15またはsc-fL15、33 $\cdot$ 115LR(プライマーD)

また反応温度条件は次のとおりである。

94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて30秒間、

94 $^{\circ}$ C/15秒間、72 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを5回反復、

94 $^{\circ}$ C/15秒間、70 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを5回反復、

94 $^{\circ}$ C/15秒間、68 $^{\circ}$ C/2分間のサイクルを28回反復、

最後に反応産物を72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

[0128] 約400bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、各PCR産物の一部を用いて以下のように第二PCRを行った。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10 $\times$ PCR Buffer、

0.4mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、

2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq

(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

1 μ Lの第一PCR産物 (2種類)、

10pmolの合成オリゴヌクレオチド70・115HF、33・115LR

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間、

94°C/15秒間、72°C/2分間のサイクルを5回反復、

94°C/15秒間、70°C/2分間のサイクルを5回反復、

94°C/15秒間、68°C/2分間のサイクルを28回反復、

最後に反応産物を72°Cで5分間加熱した。

[0129] 約800bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、制限酵素EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素NotI (宝酒造社製) で消化した後に、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製し、pBacPAK9 (CLONTECH社製)にクローニングし、pBacPAK9-scVB22Bを作製した。

[0130] 次に、pBacPAK9-scVB22BのPvuII部位に挿入する断片を作製した。すなわちN末端が欠けたVB22B-VHとVB22B-VLを $(\text{Gly}_4\text{Ser}_3)$ から成るリンカーで連結したアミノ酸をコードする遺伝子をさらにVB22B-VHのN末端をコードする遺伝子と $(\text{Gly}_4\text{Ser}_3)$ から成るリンカーをコードする塩基配列で連結する断片で、両末端がPvuII認識配列となる断片である。2種類のプライマーを新たに設計し、PCR法を用いて、この断片を作製した。目的断片の前方プライマーFv2-f (プライマーE, 配列番号:22) は、5'末端にPvuII部位を有し、VB22B-VHの5'末端側の配列を持つように設計した。目的断片の後方プライマーFv2-r (プライマーF, 配列番号:23) は、VB22B-VLのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし、かつ $(\text{Gly}_4\text{Ser}_3)$ から成るリンカーをコードする塩基配列ならびにVB22B-VHのN末端をコードするDNAにハイブリダイズする塩基配列、さらにPvuII部位を有するように設計した。pBacPAK9-scVB22Bを鋳型にして、以下のようにPCRを行った。

PCR反応溶液(50 μ L)の組成を次に示す。

5 μ Lの10×PCR Buffer、

0.4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、
2.5ユニットのDNAポリメラーゼTaKaRa Ex Taq
(以上の成分はいずれも宝酒造社製)、

10 μ gのpBacPAK9-scVB22B、
10pmolの合成オリゴヌクレオチドFv2-f、Fv2-r

また反応温度条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間、
94°C/15秒間、72°C/2分間のサイクルを5回反復、
94°C/15秒間、70°C/2分間のサイクルを5回反復、
94°C/15秒間、68°C/2分間のサイクルを28回反復、
最後に反応産物を72°Cで5分間加熱した。

[0131] 約800bpのPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングした。塩基配列の決定後、制限酵素PvuII (宝酒造社製)で消化した後に、目的断片を回収した。pBacPAK9-scVB22Bを制限酵素PvuII (宝酒造社製)で消化した後に、回収した断片を連結し、pBacPAK9-VB22B sc(Fv)2を作製した。作製したベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製)および制限酵素NotI (宝酒造社製)で消化した後に、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、約1600bpの断片をアガロースゲルから精製し、発現ベクターpCXND3にクローニングし、pCXND3-VB22B sc(Fv)2を作製した。

[0132] 2.4 動物細胞を用いた抗ヒトMpl一本鎖抗体の発現

CHO-DG44細胞を用いた一本鎖抗体の安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。Gene PulserII (BioRad社製)を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。発現ベクター (25 μ g)とPBSに懸濁したCHO-DG44細胞 (1×10^7 細胞/mL)の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、500 μ g/mL Geneticin (Invitrogen社製)を含むCHO-S-S FMII培地 (Invitrogen社製)に加えて選抜し、発現CHO細胞株を樹立した。VB22B sc

(Fv)2は、この方法で安定発現細胞株およびその培養上清を調製した。

- [0133] COS7細胞を用いた一本鎖抗体の一過性発現は次のようにして行った。発現ベクター (10 μ g) とPBSに懸濁したCOS7細胞 (1×10^7 細胞/mL) の0.75mLを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10% FBSを含むDMEM培地 (Invitrogen社製) に加え、一晩培養した後に、PBSで洗浄後にCHO-S-SFMII培地を加えて約3日間培養した。VB22B Diabodyは、この方法で培養上清を調製した。

- [0134] 2.5 培養上清中の抗ヒトMpl一本鎖抗体の定量

COS細胞に一過性発現させた抗ヒトMpl一本鎖抗体の培養上清中の濃度は、表面プラズモン共鳴を利用して測定した。すなわちBiacore 2000(Biacore社製)にSensor Chip CM5 (Biacore社製) をセットし、ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (SIGMA-ALDRICH社製) を結合した。流速5mL/secで適濃度のサンプルを流し、50mMジエチルアミンを流して結合した抗体を解離させた。サンプルを流したときの質量変化を測定し、標準品の質量変化に基づいて作成した検量線を用いて、濃度を算出した。Diabodyについての標準品は、db12E10(WO02/33073、WO02/33072参照)を使用し、sc(Fv)2についての標準品は同じ遺伝子構造を持つ12E10 sc(Fv)2を使用した。

- [0135] 2.6 抗ヒトMpl Diabodyおよび一本鎖抗体の精製

VB22B Diabody発現COS7細胞あるいはCHO細胞の培養上清を、50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween20で平衡化したAnti-Flag M2 Affinity Gel (SIGMA-ALDRICH社製) カラムに吸着させ、100 mM Glycine-HCl(pH 3.5)で溶出させた。溶出画分は、直ちに1M Tris-HCl (pH8.0)で中和を行い、HiLoad 26/60 Superdex200pg (Amersham-Bioscience社製) カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーのバッファーは、PBS、0.01% Tween20を使用した。

- [0136] VB22B sc(Fv)2発現COS7細胞あるいはCHO細胞の培養上清を、Diabody精製と同一条件で精製を行った。また、大量に調製する場合には、CHO細胞の培養上清を20 mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で平衡化したMacro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I (Bio-Rad社製) カラムにかけ、250mM リン酸緩衝液 (pH6.8) で段階的に溶出した。溶

出画分は、限外ろ過膜を用いて濃縮後、HiLoad 26/60 Superdex200pgカラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、分子量が約40kD～70kDに相当する画分を分取した。この画分を、50 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween20で平衡化したAnti-Flag M2 Affinity Gelカラムに吸着させ、100 mM Glycine-HCl(pH 3.5)で溶出させた。溶出画分は、直ちに1M Tris-HCl (pH8.0)で中和を行い、HiLoad 26/60 Superdex200pgカラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーのバッファーは、20 mM酢酸緩衝液 (pH6.0), 150 mM NaCl, 0.01% Tween 80を使用した。各精製ステップにおいて、Diabodyおよびsc(Fv)2の確認は、SDS-PAGEおよび抗Flag抗体(SIGMA-ALDRICH社)を用いたWestern Blottingを用いて行なった。それぞれ、分取したピーク画分をLaemliの方法に準じて電気泳動し、クマシーブリリアントブルーで染色した結果、Diabodyでは、見かけ上の分子量約 29kDaに、またsc(Fv)2では、見かけ上の分子量約 55kDaに、それぞれ単一のバンドが検出された。

[0137] 2.7 Flow Cytometryによる抗ヒトMpl一本鎖抗体の結合活性の評価

CHO-human Mpl、CHO-monkey MplおよびCHO-mouse Mplを回収し、 1×10^6 cells/mLになるようにFACS Buffer (1% FBS/ PBS)に懸濁した。100 μ L/wellとなるようにMultiscreen - HV Filter Plates (Millipore社製)に分注し、遠心操作にて上清を除去した。適濃度のDiabodyまたはsc(Fv)2を加え、氷上にて30分間反応させた。細胞を200 μ LのFACS bufferにて1回洗浄し、10 μ g/mLのANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody (SIGMA-ALDRICH社製)を添加し、氷上にて30分間反応させた。次に200 μ LのFACS bufferにて細胞を1回洗浄した後、100倍希釈したFITC標識抗マウスIgG抗体(Beckman Coulter社製)を添加し、氷上にて30分間反応させた。最後に遠心し上清を除き、FACS Buffer 400 μ Lに懸濁し、EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter社)を用いてFlow Cytometryに供した。前方散乱光(forward scatter)及び側方散乱光(side scatter)のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定した。

[0138] 精製したVB22B sc(Fv)2を用いて、各種Mplを発現させたCHO細胞に対する結合活性を評価した。宿主細胞であるCHOおよびCHO-mouse Mplに対しては結合活性を示さず、CHO-human MplおよびCHO-monkey Mplに特異的に結合することが確

認められた。この結合活性の傾向は、VB22B IgGと変わらないことから、低分子化により抗体の結合部位は変化していないことが推測された。

[0139] 2.8 抗ヒトMpl一本鎖抗体のヒト化

VB22B sc(Fv)2のヒト化を実施するために、公開されているKabat Database (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/) より抗体の配列データ入手し、H鎖可変領域、L鎖可変領域に分けてホモロジー検索を行った。その結果、H鎖可変領域はDN13(Smithsonら、Mol Immunol. 1999;36:113-124)と高い相同性を持つことが分かった。また、L鎖可変領域はToP027(Hougsら、J. Immunol. 1999;162:224-237)と高い相同性を持つことが分かった。これらの抗体のフレームワーク領域(以下、FR)に相補性抗原決定領域(以下、CDR)を移植したヒト化抗体を作製した。ヒト化抗体sc(Fv)2をCHO-DG44細胞にて発現させ、BaF3-human Mplを用いたアゴニスト活性を評価した。アゴニスト活性を指標に、FR内にアミノ酸置換を加え、マウス型VB22B sc(Fv)2と同等のアゴニスト活性を有するヒト化VB22B sc(Fv)2を作製した。

[0140] 具体的には、50base程度の合成オリゴDNAを約20base程度ハイブリダイズするように設計し、これらの合成オリゴDNAをPCR法によりアッセンブリさせて各可変領域をコードする遺伝子を作製した。これらの遺伝子を用いて、実施例2.3の方法と同様に、sc(Fv)2を作製し、発現ベクターpCXND3にクローニングし、ヒト化VB22B sc(Fv)2を挿入した各発現ベクターpCXND3-hVB22B p-z sc(Fv)2、pCXND3-hVB22B g-e sc(Fv)2、pCXND3-hVB22B e sc(Fv)2、pCXND3-hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2、pCXND3-hVB22B q-wz5 sc(Fv)2を作製した。本プラスミドに含まれるhVB22B p-z sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:24に、アミノ酸配列を配列番号:25に、hVB22B g-e sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:26に、アミノ酸配列を配列番号:27に、hVB22B e sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:28に、アミノ酸配列を配列番号:29に、hVB22B u2-wz4 sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:30に、アミノ酸配列を配列番号:1に、hVB22B q-wz5 sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:31に、アミノ酸配列を配列番号:32に示す。またマウス型VB22B sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:33に、アミノ酸配列を配列番号:2に示す。実施例2.4の方法と同様にCHO-DG44細胞に発現させ、培養上清を回収した。ヒト化VB22B sc(Fv)2はFlagタグを付加していないことから、培養上清からの精製は、実施例

1.8に記載したVB22Bが認識するエピトープであるMG10(Gln213からAla231)とGST融合蛋白質を利用して行った。MG10とGST融合蛋白質の精製は、Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences社製)を用いて、メーカーのプロトコールに従って精製した。さらに、精製したMG10とGST融合蛋白質をメーカーのプロトコールに従って、HiTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences社製)に固定化し、アフィニティカラムを作製した。ヒト化VB22B sc(Fv)2発現CHO細胞の培養上清を、50mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 0.01% Tween80で平衡化したMG10-GST融合蛋白質固定化カラムに流し、ヒト化VB22B sc(Fv)2を吸着させ、100mM Glycine-HCl(pH3.5), 0.01% Tween80で溶出させた。溶出画分は直ちに1M Tris-HCl(pH7.4)で中和を行い、HiLoad 16/60 Superdex200pg (Amersham Biosciences社製)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの緩衝液は、20mMクエン酸緩衝液(pH7.5), 300mM NaCl, 0.01% Tween 80を使用した。

[0141] [参考例3] 2D7 sc(Fv)2 型DIABODY発現ベクターの作製

WO2004/033499に記載した通り、HLAクラスIに対する抗体2D7モノクローナル抗体を、重鎖および軽鎖可変領域を5merのリンカーで接続した低分子抗体(2D7 diabody)に改変することにより、ミエローマ細胞に対する細胞死誘導活性が劇的に上昇したことを既に示した。そこで、この2D7diabodyを、構造的により安定であると考えられるsc(Fv)2型に改変し、細胞死誘導活性を従来型diabody(HL5)と比較検討した。

[0142] まず、2D7抗体の重鎖可変領域配列(VH)と軽鎖可変領域配列(VL)が、VH-VL-VH-VLの並びになるように、それぞれを15merのリンカー(GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer GlyGlyGlyGlySer)で接続した2D7 sc(Fv)2をコードするDNA発現ベクターを以下の手順で作製した。

[0143] WO2004/033499に記載の方法で作成した、VH-VLを5merのリンカー(GlyGlyGlyGlySer)で連結した2D7diabody(HL5)発現ベクターを鋳型にして、プライマー2D7DBH1(配列番号:34)、プライマー2D7PA2(配列番号:35)でPCR反応を行い、断片Aを増幅した。同様に、プライマー2D7PA3(配列番号:36)、プライマー2D7PA5(配列番号:37)でPCR反応を行い、断片Bを増幅した。ここで得られた断片A及び断片Bを、同一チューブ内で混合し、PCR-recombination反応を行うことで、断片Aと断片Bを連結

させた。これにより、N末にVHのシグナル配列を含み、VH-VLが15merのリンカーで連結したDNA断片 "2D7diabodyHL15-1"を得た。

[0144] 続いて、2D7diabody(HL5)発現ベクターを鋳型にして、プライマー2D7PA6(配列番号:38)、プライマー2D7PA2(配列番号:35)でPCR反応を行い、断片Cを増幅した。同様に、プライマー2D7PA3(配列番号:36)、プライマー2D7DBL2(配列番号:39)でPCR反応を行い、断片Dを増幅した。ここで得られた断片C及び断片Dを同一チューブ内で混合し、PCR-recombination反応により、2つの断片を連結させた。この操作によって、VH-VLが15merのリンカーで連結し、C末にFlag-tag領域を含むDNA断片 "2D7diabodyHL15-2"を得た。

[0145] 上記反応により得られた2つのDNA断片、すなわち "2D7diabodyHL15-1" DNA断片、及び、"2D7diabodyHL15-2" DNA断片を、それぞれEcoRI-BamHI、及び、BamHI-NotIで切断し、両DNA断片をあらかじめEcoRI-NotIで切断し開裂した発現ベクターpCXND3に挿入した。インサートDNAの塩基配列を解析し、目的どおりsignal-VH(15)VL(15)VH(15)VL-FlagをコードするcDNAが、pCXND3のEcoRI-NotI間に挿入されていることを確認し、2D7sc(Fv)2発現ベクター(pCXND3-2D7sc(Fv)2)の構築を終了した。2D7sc(Fv)2の塩基配列を配列番号:40に、アミノ酸配列を配列番号:4に示す。

[0146] [参考例4] 2D7sc(Fv)2産生発現細胞株の樹立

PvuIで切断し直鎖化したpCXND3-2D7sc(Fv)2 20 μ gをCHO細胞(DG44株)に以下のようにelectroporation法により導入した。

CHO-S-SFM-II培地(インビトロジェン)で培養したDG44細胞をice-cold PBSで2回洗浄した後 1×10^7 /mlになるようにPBSに懸濁した。これに20 μ gの上記プラスミドを混合し、電気パルス(1.5KV, 25 μ FD)を与えた。適当な割合で細胞を希釈し96 well plateに細胞を撒きこみ、終濃度500 μ g/mlの G418(インビトロジェン)を添加したCHO-S-SFM-II培地中で培養を行った。生育した単一コロニーを約30クローンほどピックアップし、それら培養上清中の2D7sc(Fv)2の発現量を抗FLAG抗体(シグマ)を用いたウエスタンブロットにより調べた。最も発現の高かったクローンを5nM MTXを含む核酸フリーのCHO-S-SFM II培地(インビトロジェン)で培養を行い、培養スケールを拡大した。その結果得られた株を高産生細胞株とした。

[0147] [参考例5] 2D7sc(Fv)2の大量精製

T-125フラスコでサブコンフルエントの2D7sc(Fv)2高産生CHO細胞株を 1×10^5 /mlになるようにローラーボトル (CHO-S-SFM II培地 250ml/ボトル)に移した。37°Cで培養し、6日後に培養液を回収した。遠心によって死細胞を除去した後、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを通してこれを精製に用いた。

[0148] 2D7sc(Fv)2の精製は以下のとおり行った。

まず、buffer A (20mM Na-phosphate pH6.8) で平衡化したHydroxyapatite カラム (micro prep ceramic Hydroxyapatite type I, Bio-Rad) に回収した培養上清をapplyした。buffer Aでカラムを洗浄した後、buffer C (250mM Na-phosphate pH6.8) で 2D7sc(Fv)2を溶出した。2D7sc(Fv)2を含むフラクションを等量のbuffer Aで希釈した後、これをAnti-Flag M2アガロースアフィニティカラム (Bio-Rad) にapplyした。このカラムをbuffer C (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20)で洗浄した後、buffer D (100mM Glycine H3.5, 0.01% Tween 20)で2D7sc(Fv)2を溶出した。回収したサンプルは直ちに終濃度25mMになるようにTris-HCl pH8.0で中和した。その後、このフラクションを、セントリプレップYM-10 (AMICON) で濃縮し、Superdex200HR (26/60)カラム (アマシャムファルマシア) によるゲルろ過クロマトグラム精製に使用した。

[0149] 0.01% Tween 20を含むPBSでゲルろ過クロマトグラム精製を行った。2D7sc(Fv)2高産生CHO細胞株より産生された低分子化抗体は、そのほとんどが分子量約52Kdの位置に溶出ピークを有し、同じく52Kdで溶出される2D7 diabodyのピークと完全に一致した。

ゲルろ過クロマトグラム精製により分離された52Kdのピークのみを回収し、これを2D7sc(Fv)2蛋白標品とした。回収したサンプルの一部をSDS電気泳動および銀染色を行うことで、目的の蛋白が100%の純度で精製されていることを確認した。回収した精製標品はセントリプレップYM-10 (AMICON) で濃縮した。

産業上の利用可能性

[0150] 本発明のメグルミンを含有する安定化剤を用いることで、抗体分子の会合化反応を抑制し、抗体分子をモノマーの状態で存在させることが可能となった。抗体を医薬品として開発するためには、それぞれの抗体分子を安定に存在させ、製剤保存中の会

合化反応を最小限に抑制することが必要である。本発明の安定化剤は、安定化させる抗体が非常に高濃度な状態であっても、抗体分子を安定化させ会合化反応を抑制することができるため、抗体製剤を製造する際には非常に有用なものとなると考えられる。また、本発明のメグルミンを含有する薬剤は、抗体分子を溶液製剤化、または凍結乾燥剤化する場合にも抗体分子を安定化させる効果を持つ。または凍結乾燥製剤化時の凍結乾燥ストレスに対して、抗体分子を安定化させる効果を持つ。さらに、本発明の安定化剤は、全長抗体、断片化抗体、または低分子化抗体のいずれの抗体に対しても安定化効果を示し、抗体製剤を製造する際には広く有用なものとなる。

- [0151] 本発明のメグルミンにより安定化された抗体分子を含有する医薬組成物は、抗体分子の変性、会合が抑制されているため、従来の抗体製剤よりも、保存状態が良く、保存時における会合化による活性の低下がより小さくなることが期待される。

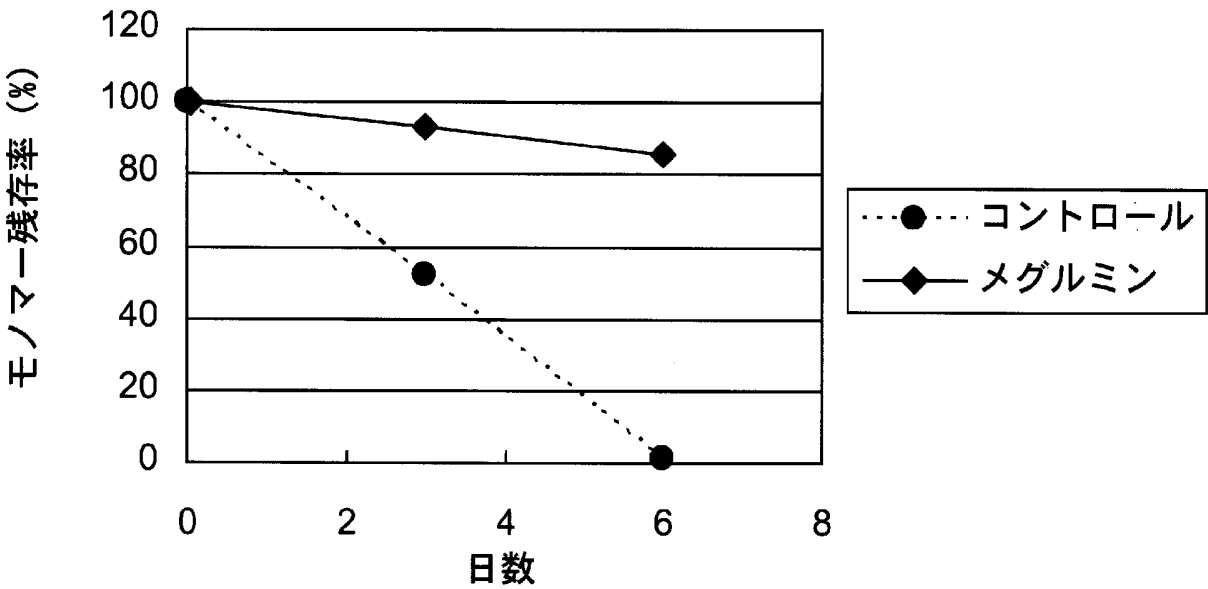
請求の範囲

- [1] メグルミンを含有する、タンパク質を長期安定化する薬剤。
- [2] メグルミンを含有する、タンパク質の会合化を抑制する薬剤。
- [3] タンパク質が抗体分子である、請求項1または2に記載の薬剤。
- [4] 抗体分子が、全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体、または抗体様分子のいずれかである請求項3または4に記載の薬剤。
- [5] 剤形が凍結乾燥製剤である、請求項1から4のいずれかに記載の薬剤。
- [6] メグルミンがその塩またはその誘導体である請求項1から5のいずれかに記載の薬剤。
- [7] タンパク質にメグルミンを添加する工程を含む、タンパク質を長期安定化する方法。
- [8] タンパク質にメグルミンを添加する工程を含む、タンパク質の会合化を抑制する方法。
- [9] 請求項7または8に記載の方法であって、長期低温保存条件において、タンパク質を長期安定化、またはタンパク質の会合化を抑制する方法。
- [10] 請求項7または8に記載の方法であって、長期常温保存条件において、タンパク質を長期安定化、またはタンパク質の会合化を抑制する方法。
- [11] タンパク質が抗体分子である、請求項7から10のいずれかに記載の方法。
- [12] 抗体分子が、全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体、または抗体様分子のいずれかである請求項11に記載の方法。
- [13] メグルミン添加する工程の後、タンパク質を凍結乾燥する工程を含む、請求項7から12のいずれかに記載の方法。
- [14] メグルミンがその塩またはその誘導体である請求項7から13のいずれかに記載の方法。
- [15] メグルミンを添加した医薬組成物。
- [16] 剤形が凍結乾燥製剤であることを特徴とする、請求項15に記載の医薬組成物。
- [17] メグルミンがその塩またはその誘導体である請求項15または16に記載の医薬組成物。
- [18] 抗体含有組成物にメグルミンを添加する工程を含む、抗体分子を含有する医薬組

成物の製造方法。

- [19] 以下の(1)および(2)の工程を含む、抗体分子を含有する医薬組成物の製造方法
- 。
- (1) メグルミンを抗体含有組成物に添加する工程
- (2) (1)の混合物を凍結乾燥する工程
- [20] 抗体分子が全長抗体、断片化抗体、低分子化抗体、修飾抗体、または抗体様分子のいずれかである請求項18または19に記載の医薬組成物の製造方法。
- [21] メグルミンがその塩またはその誘導体である請求項18から20のいずれかに記載の製造方法。

[図1]



[図2]

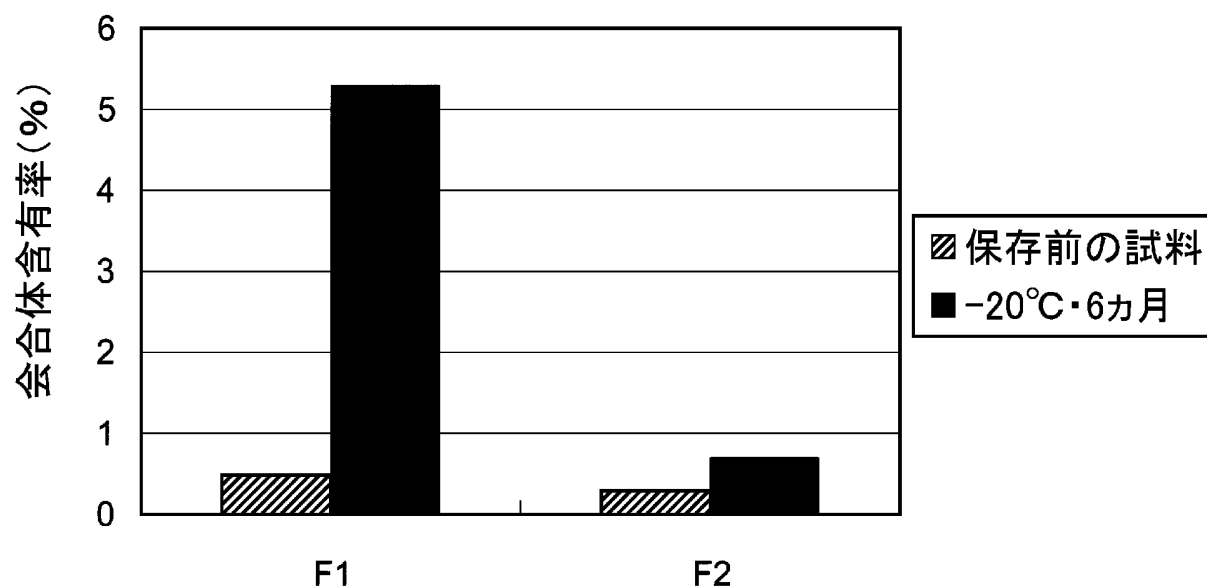
		コントロール メグルミン		
sc(Fv)2	mVB22B	40°C- 1W	13	4
		40°C- 2W	22	7
	2D7	コントロール メグルミン		
		40°C- 1W	1	0
	40°C- 2W	3	0	
	12E10	コントロール メグルミン		
55°C- 1W		62	25	
	55°C- 2W	84	31	
		コントロール メグルミン		
IgG	ヒト化抗IL-6 受容体抗体	60°C- 1W	2	1
		60°C- 3W	12	9

[図3]

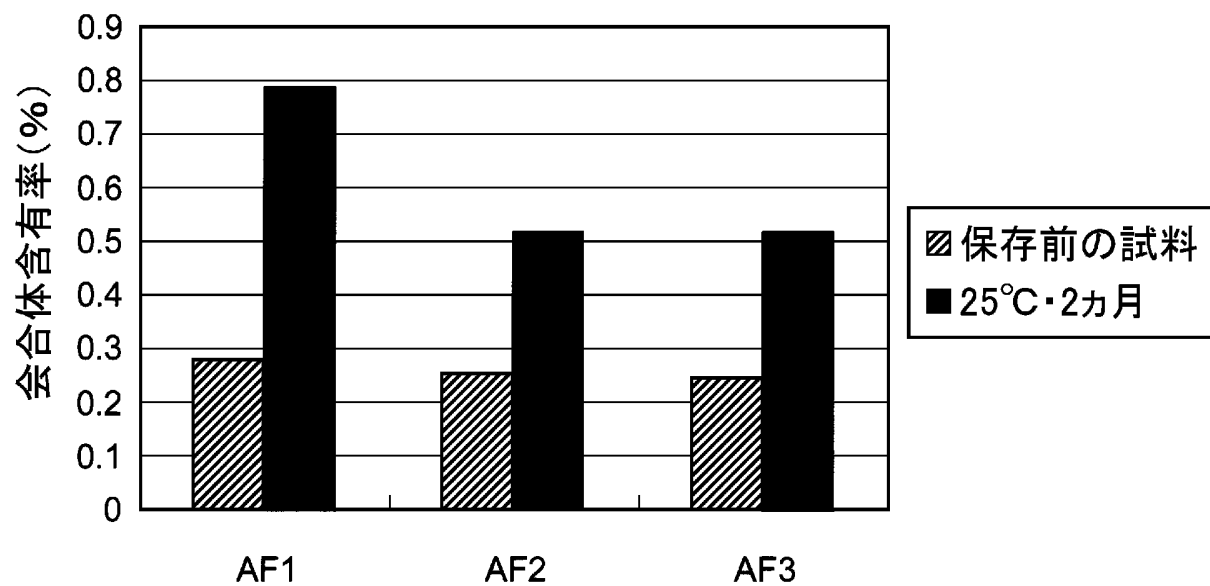
ヒト化抗IL-6受容体抗体 80mg(116mg/mL)

	バルク試薬	会合体含有率(%)	バルク試薬	会合体含有率(%)
凍結乾燥後	100mg	0.03	55mg	0.00
	スクロース 70mg	0.07	メグルミン 40mg	0.03
	50mg	0.16	30mg	0.06
	バルク試薬	会合体含有率(%)	バルク試薬	会合体含有率(%)
凍結乾燥製剤 40℃-1ヶ月の 加速試験後	100mg	0.54	55mg	0.47
	スクロース 70mg	0.99	メグルミン 40mg	0.56
	50mg	1.57	30mg	0.87
	バルク試薬	会合体含有率(%)	バルク試薬	会合体含有率(%)
溶液製剤 25℃-2週間の 加速試験後	100mg	0.23	55mg	0.15
	スクロース 70mg	0.24	メグルミン 40mg	0.19
	50mg	0.40	30mg	0.24

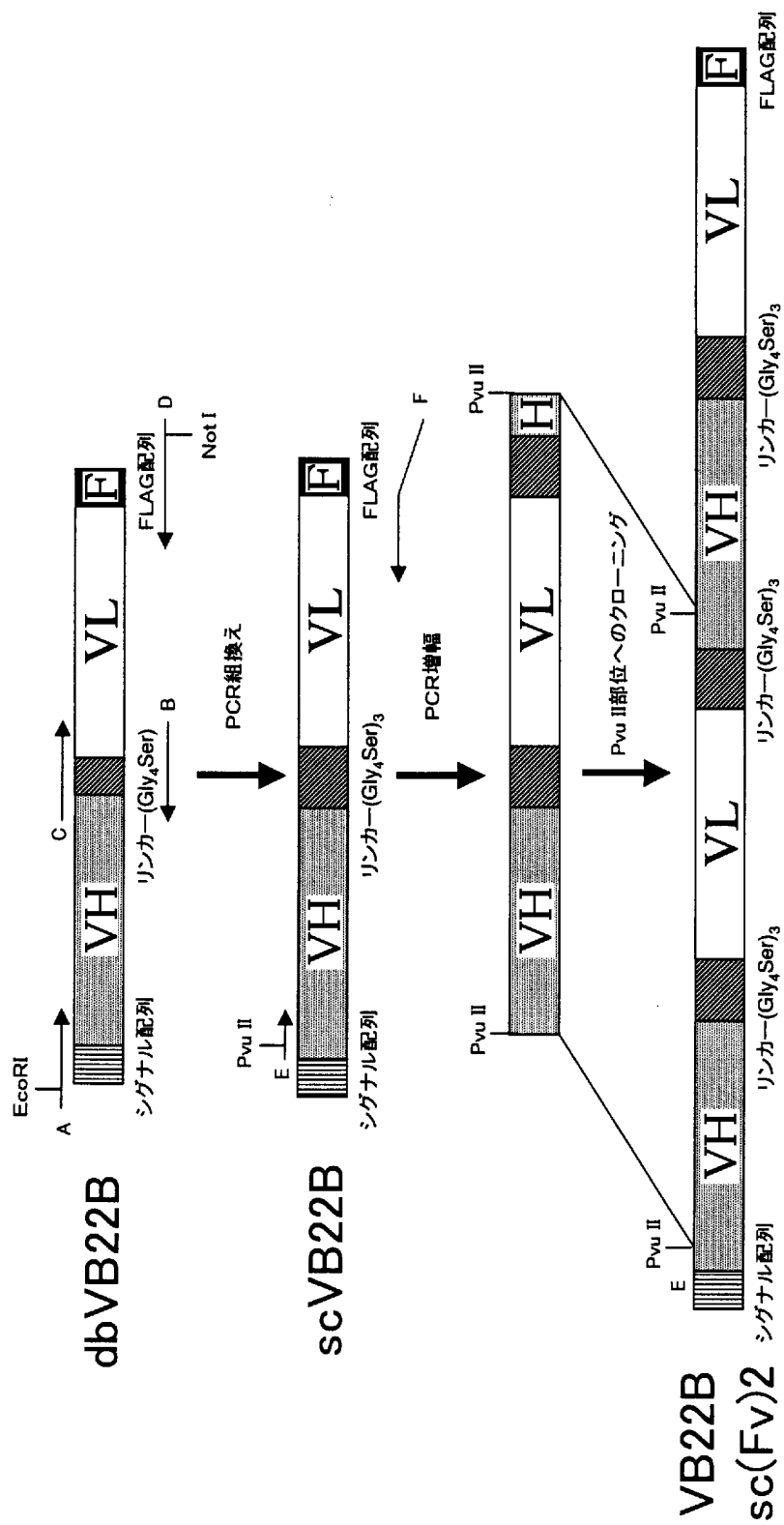
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K47/26(2006.01) i, A61K9/19(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K47/26(2006.01) i, A61K9/19(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 3-41033 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 21 February, 1991 (21.02.91), Full text; particularly, Claim 4 & WO 91/00739 A & EP 437622 A	1-2, 5-10, 13-17 3-4, 11-12, 18-21
Y	JP 2004-292455 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 21 October, 2004 (21.10.04), Full text & WO 2003/068260 A & EP 1475101 A & US 2005/214278 A	3-4, 11-12, 18-21
Y	WO 93/06862 A (Toray Industries, Inc.), 15 April, 1993 (15.04.93), Full text & EP 562125 A	3-4, 11-12, 18-21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 August, 2006 (09.08.06)		Date of mailing of the international search report 22 August, 2006 (22.08.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311625

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004-037293 A (Dainippon Sumitomo Seiyaku Kabushiki Kaisha), 06 May, 2004 (06.05.04), Full text & EP 1559433 A & US 2005/267222 A	15-17
X	WO 2003/086324 A (Allos Therapeutics, Inc.), 23 October, 2003 (23.10.03), Full text & US 2003/232887 A & EP 1496863 A & JP 2005-532288 A	15
A	WO 98/22136 A (Roche Diagnostics GmbH), 28 May, 1998 (28.05.98), Full text & EP 852951 A & EP 941121 B & JP 2001-503781 A	1-21

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K47/26(2006.01)i, A61K9/19(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K47/26(2006.01)i, A61K9/19(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA (STN), MEDLINE (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	J P 3-41033 A（協和醗酵工業株式会社） 1991.02.21, 全文、特に、請求項4参照のこと	1-2, 5-10, 13-17	
Y	&WO 91/00739 A &EP 437622 A	3-4, 11-12, 18-21	
Y	J P 2004-292455 A（中外製薬株式会社） 2004.10.21, 全文 &WO 2003/068260 A &EP 1475101 A &US 2005/214278 A	3-4, 11-12, 18-21	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 09.08.2006		国際調査報告の発送日 22.08.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 八原 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9261

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 93/06862 A (東レ株式会社) 1993.04.15, 全文 &EP 562125 A	3-4, 11-12, 18 -21
X	WO 2004/037293 A (大日本住友製薬株式会社) 2004.05.06, 全文 &EP 1559433 A &US 2005/267222 A	15-17
X	WO 2003/086324 A (アロス・セラピューティクス・ インコーポレーテッド) 2003.10.23, 全文 &US 2003/232887 A &EP 1496863 A &JP 2005-532288 A	15
A	WO 98/22136 A (ロシュ ダイアグノスティクス ゲ ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 1998.05.28, 全文 &EP 852951 A &EP 941121 B &JP 2001-503781 A	1-21

第 I 欄 ニュクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. b の続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 紙形式
☒ 電子形式
- c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの
☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：