

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514030

(P2005-514030A)

(43) 公表日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 L	4 C O 7 6
A 6 1 K 38/22	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 47/42	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-558131 (P2003-558131)	(71) 出願人	504149971 イミューノメディクス、インコーポレイテッド IMMUNOMEDICS, INC. アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、プレインズ、アメリカン、ロード、300
(86) (22) 出願日	平成14年12月26日 (2002.12.26)	(71) 出願人	504149982 アイピーシー、ファーマシューティカルズ IBC PHARMACEUTICALS アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、プレインズ、アメリカン、ロード、300
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月27日 (2004.8.27)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/038985		
(87) 国際公開番号	W02003/057829		
(87) 国際公開日	平成15年7月17日 (2003.7.17)		
(31) 優先権主張番号	60/342, 103		
(32) 優先日	平成13年12月26日 (2001.12.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 V_HおよびV_Lドメインから多重特異性多価薬剤を製造する方法

(57) 【要約】

本発明は、多重特異性を有する多価結合タンパク質、ならびにこれらの薬剤をV_HおよびV_Lドメインから製造する方法に関する。結合タンパク質は3つ以上の結合部位を有するものであり、少なくとも1つの結合部位はハプテン部分と結合し、かつ、少なくとも2つの部位は標的抗原と結合する。本発明はさらに、ヒスタミン-スクシニル-グリシル(HSG)部分を含む分子への親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および癌胎児性抗原(CEA)への親和性を有する少なくとも2つの結合部位を有する二重特異性三価ヘテロダイマー、ならびにHSG部分を含む分子への親和性を有する少なくとも1つの結合部位、CEAへの親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および金属キレート錯体インジウム-DTPAへの親和性を有する少なくとも1つの結合部位を有する三重特異性三価ヘテロダイマーに関する。さらに、本発明は、適切な宿主におけるこれら機能的ヘテロダイマーの発現に有用な組換えベクターに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

診断薬、治療薬、またはその組合せを標的に送達するためのキットであって、

a . 3 つ以上の結合部位を含んでなり、少なくとも 1 つの結合部位がハプテン部分に対する親和性を有するものであり、かつ、少なくとも 2 つの結合部位が標的抗原に対する親和性を有するものである、多価多重特異性結合タンパク質、および

b . 診断薬、治療薬もしくはその組合せ、結合分子、および 2 つの前記結合タンパク質との同時結合が可能となる位置に配置された少なくとも 2 つのハプテン部分を含んでなる担体分子

を含んでなる、キット。

10

【請求項 2】

ハプテン部分に対する親和性を有する第一の結合部位、ならびに各々が同一または異なる標的抗原であってもよい標的抗原に対する親和性を有する第二および第三の結合部位を含んでなる、多価多重特異性結合タンパク質。

【請求項 3】

標的抗原がヒト疾患に関連する結合部位である、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

ヒト疾患に関連する結合部位が、癌結合部位、自己免疫疾患結合部位、感染症結合部位、循環器疾患結合部位、および炎症性疾患結合部位からなる群から選択されるものである、請求項 3 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 5】

第一の結合部位がヒスタミン - スクシニル - グリシル (H S G) 部分を含む分子に対する親和性を有するものであり、かつ、第二および第三の結合部位がそれぞれ癌胎児性抗原 (C E A) に対する親和性を有するものである、請求項 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

マウス、ヒト化、もしくはヒト配列またはその組合せを含んでなる、請求項 5 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7】

第一の結合部位が、互いに結合して H S G 抗原結合部位を形成する第一および第二のポリペプチドを含んでなるものである、請求項 5 に記載の結合タンパク質。

30

【請求項 8】

第一のポリペプチドが 6 7 9 M A b の V_H ポリペプチド (図 4 、 配列) を含んでなるものであり、かつ、第二のポリペプチドが 6 7 9 M A b の V_K ポリペプチド (図 4 、 配列) を含んでなるものである、請求項 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9】

第一のポリペプチドが h 6 7 9 M A b の V_H ポリペプチド (図 5 、 配列) を含んでなるものであり、かつ、第二のポリペプチドが h 6 7 9 M A b の V_K ポリペプチド (図 5 、 配列) を含んでなるものである、請求項 7 に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

第二の結合部位が、互いに結合して第一の C E A 抗原結合部位を形成する第三および第四のポリペプチドを含んでなるものである、請求項 8 に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 11】

第三のポリペプチドが h M N 1 4 M A b の V_H ポリペプチド (図 6 、 配列) を含んでなるものであり、かつ、第四のポリペプチドが h M N 1 4 M A b の V_K ポリペプチド (図 6 、 配列) を含んでなるものである、請求項 10 に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

第三の結合部位が、互いに結合して第二の C E A 抗原結合部位を形成する第五および第六のポリペプチドを含んでなるものである、請求項 8 に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

第五のポリペプチドが h M N 1 4 M A b の V_H ポリペプチド (図 6 、 配列) を含んで

50

なるものであり、かつ、第六のポリペプチドが h M N 1 4 M A b の V_K ポリペプチド (図 6、配列) を含んでなるものである、請求項 1 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 4】

第一および第四のポリペプチドが第一のリンカーによって連結され、第四および第五のポリペプチドが第二のリンカーによって連結され、第二および第三のポリペプチドが第三のリンカーによって連結され、かつ、第三および第六のポリペプチドが第四のリンカーによって連結された、請求項 1 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 5】

第一のリンカーおよび第三のリンカーがそれぞれ 1 6 アミノ酸残基を含んでなり、かつ、第二のリンカーおよび第四のリンカーがそれぞれ 5 アミノ酸残基を含んでなる、請求項 1 4 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 1 6】

第一および第三のポリペプチドが第一のリンカーによって連結され、第三および第五のポリペプチドが第二のリンカーによって連結され、第二および第四のポリペプチドが第三のリンカーによって連結され、かつ、第四および第六のポリペプチドが第四のリンカーによって連結された、請求項 1 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 7】

第一のリンカーおよび第三のリンカーがそれぞれ 1 6 アミノ酸残基を含んでなり、かつ、第二のリンカーおよび第四のリンカーがそれぞれ 5 アミノ酸残基を含んでなる、請求項 1 6 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 1 8】

ヘテロダイマーである、請求項 5 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 9】

第一、第二、第三、第四、第五および第六のポリペプチドが、それぞれ第一、第二、第三、第四、第五および第六の c D N A によってコードされる、請求項 1 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 0】

第一、第二、第三、第四、第五および第六の c D N A が図 4 および 6 (配列) に示すヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項 1 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の結合タンパク質をコードする第一、第四、および第五の c D N A を含んでなる、核酸分子。

30

【請求項 2 2】

請求項 2 0 に記載の結合タンパク質をコードする第二、第三、および第六の c D N A を含んでなる、核酸分子。

【請求項 2 3】

請求項 2 0 に記載の結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、発現カセット。

【請求項 2 4】

プラスミドである、請求項 2 3 に記載の発現カセット。

40

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載のプラスミドを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 2 6】

結合タンパク質を製造する方法であって、請求項 2 5 に記載の宿主細胞を適切な培地で培養すること、および前記培地から結合タンパク質を分離することを含んでなる、方法。

【請求項 2 7】

第一、第二、第三、第四、第五および第六のポリペプチドが、それぞれ第一、第二、第三、第四、第五および第六の c D N A によってコードされる、請求項 1 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 8】

50

第一、第二、第三、第四、第五および第六の c D N A が図 4 および 6 (配列) に示すヌクレオチド配列を含んでなるものである、請求項 27 に記載の結合タンパク質。

【請求項 29】

第一、第三、および第五の c D N A が第一の単一核酸分子上に存在する、請求項 27 に記載の結合タンパク質。

【請求項 30】

第二、第四、および第六の c D N A が第二の単一核酸分子上に存在する、請求項 29 に記載の結合タンパク質。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の結合タンパク質をコードする核酸分子を含んでなる、発現カセット 10

【請求項 32】

プラスミドである、請求項 31 に記載の発現カセット。

【請求項 33】

請求項 32 に記載のプラスミドを含んでなる、宿主細胞。

【請求項 34】

結合タンパク質を製造する方法であって、請求項 33 に記載の宿主細胞を適切な培地で培養すること、および前記培地から結合タンパク質を分離することを含んでなる、方法。

【請求項 35】

診断薬、治療薬もしくはその組合せ、結合部分、および 1 以上の結合タンパク質の結合 20
部位との同時結合が可能となる位置に配置された 2 以上のハプテン部分を含んでなる、担体分子。

【請求項 36】

担体分子に対するハプテンのモル置換比率を決定するためのスクリーニング方法であって、ハプテン結合反応後に担体分子の混合物を精製すること、および精製した混合物を金属結合アッセイに付して前記モル置換比率を決定することを含んでなる、方法。

【請求項 37】

診断薬、治療薬、またはその組合せを標的に送達する方法であって、

a . それを必要とする被験体に、請求項 5 に記載の結合タンパク質を投与すること、

b . ある量の非結合タンパク質が被験体の血流から除去されるのに十分な時間待つこと 30
、および

c . 前記被験体に、結合タンパク質の結合部位と結合する、診断薬、治療薬、またはその組合せを含んでなる担体分子を投与すること
を含んでなる、方法。

【請求項 38】

担体分子が、第一の結合タンパク質の 1 つの結合部位および第二の結合タンパク質の第二の結合部位と結合するものである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

診断薬または治療薬が、同位元素、薬剤、毒素、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、複合体、放射性核種、および金属からなる群から選択されるものである、請求項 37 に記載の方法。 40

【請求項 40】

同位元素が、 $^{90}_{47}\text{Y}$ 、 $^{111}_{49}\text{In}$ 、 $^{131}_{53}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}_{43}\text{Tc}$ 、 $^{186}_{78}\text{Re}$ 、 $^{188}_{78}\text{Re}$ 、 $^{177}_{79}\text{Lu}$ 、 $^{67}_{29}\text{Cu}$ 、 $^{212}_{83}\text{Bi}$ 、 $^{213}_{83}\text{Bi}$ 、および $^{211}_{85}\text{At}$ からなる群から選択されるものである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

薬剤が担体分子と結合する医薬である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

金属が、ガドリニウムおよび造影剤からなる群から選択されるものである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】

造影剤が、MRI造影剤、CT造影剤、および超音波造影剤からなる群から選択されるものである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

ヒト疾患を検出または治療する方法であって、

a. それを必要とする被験体に、請求項 2 に記載の結合タンパク質を投与すること、

b. ある量の結合していない結合タンパク質が被験体の血流から除去されるのに十分な時間待つこと、および

c. 前記被験体に、結合タンパク質の結合部位と結合する、診断薬、治療薬、またはその組合せを含んでなる担体分子を投与すること

を含んでなる、方法。

10

【請求項 45】

ヒト疾患が、癌、自己免疫疾患、感染症、循環器疾患、および炎症性疾患からなる群から選択されるものである、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 46】

ヒスタミン - スクシニル - グリシル (HSG) 部分を含む分子に対する親和性を有する HSG 結合部位、金属キレート錯体 インジウム - DTPA に対する親和性を有する金属キレート錯体 インジウム - DTPA 結合部位、および各々が癌胎児性抗原 (CEA) に対する親和性を有する CEA 結合部位を含んでなる、多価多重特異性結合タンパク質。

【請求項 47】

マウス、ヒト化、またはヒト配列を含んでなる、請求項 42 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 48】

図 8 および 9 のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 42 に記載の結合タンパク質。

【請求項 49】

図 8 および 9 のヌクレオチド配列を含んでなる、核酸分子

【請求項 50】

請求項 49 に記載の核酸分子を含んでなる、発現カセット。

【請求項 51】

プラスミドである、請求項 50 に記載の発現カセット。

30

【請求項 52】

請求項 24 に記載のプラスミドを含んでなる、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明は、多重特異性を有する多価結合タンパク質、ならびにこれらの薬剤を V_H および V_L ドメインから製造する方法に関する。結合タンパク質は 3 つ以上の結合部位を有するものであり、少なくとも 1 つの結合部位はハプテン部分と結合し、かつ、少なくとも 2 つの部位は標的抗原と結合する。本発明はさらに、ヒスタミン - スクシニル - グリシル (HSG) 部分を含む分子への親和性を有する少なくとも 1 つの結合部位、および癌胎児性抗原 (CEA) への親和性を有する少なくとも 2 つの結合部位を有する二重特異性三価ヘテロダイマー、ならびに HSG 部分を含む分子への親和性を有する少なくとも 1 つの結合部位、CEA への親和性を有する少なくとも 1 つの結合部位、および金属キレート錯体 インジウム - DTPA への親和性を有する少なくとも 1 つの結合部位を有する三重特異性三価ヘテロダイマーに関する。さらに、本発明は、宿主細胞におけるこれら機能的組換えタンパク質の発現に有用な組換えベクターに関する。

40

【発明の背景】

【0002】

人工の結合タンパク質、特に、モノクローナル抗体および人工抗体または抗体断片は幅広く試験されており、これらは、癌、自己免疫疾患、感染症、炎症性疾患、および循環器

50

疾患をはじめとする種々のヒト疾患の検出および治療において重要なものであることがわかってきた[Filpula and McGuire, Exp. Opin. Ther. Patents (1999) 9: 231-245頁]。例えば、放射性同位元素で標識した抗体は、患者への注入後に、当技術分野において利用可能な検出器を用いて腫瘍を可視化する目的で分析されている。抗体または抗体由来医薬品の臨床的有用性は、主として、特定の標的抗原とのその結合能に依存している。選択性は、とりわけ、診断薬または治療薬が体内の正常組織に対して毒性がある場合に、ヒト疾患の検出および治療段階において診断薬または治療薬、例えば、同位元素、薬剤、毒素、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、複合体、放射性核種、または金属を標的位置に送達するのに有用である。

【0003】

抗体系の主要な制限については、Goldenberg, The American Journal of Medicine (1993) 94: 298-299頁に記載されている。検出および治療技術において好ましいパラメータは、標的細胞が存在する部位に厳密に限局された注入投与の量、および摂取率、すなわち、正常組織周辺の放射能濃度に対する特異的に結合した抗体の濃度の比率である。抗体を血流に注入すると、それは代謝を受けて排出されるため、数多くのコンパートメントを通過する。抗体は、標的細胞抗原の位置を突きとめ、これと結合することが可能でなければならないが、その一方で体の他の部分を通す必要がある。抗原ターゲティングを制御する因子としては、位置、大きさ、抗原密度、抗原接近可能性、病理組織の細胞組成、およびターゲティングする抗体の薬物動態学的特性が挙げられる。抗体による腫瘍ターゲティングに特異的に影響を与えるその他の因子としては、腫瘍およびその他の組織の両方における標的抗原の発現、および放射性標識した抗体の血液クリアランスの遅延による骨髄毒性が挙げられる。

【0004】

標的腫瘍細胞と一体化させる、ターゲティングする抗体の量は、腫瘍の血管形成および抗体浸透を妨げる障害、ならびに腫瘍内圧力によって影響を受ける。非標的器官、例えば、肝臓、腎臓または骨髄による非特異的摂取が、特に骨髄照射によって用量制限毒性を引き起こすことが多い放射免疫治療において、この技術のもう1つの可能性ある制限である。

【0005】

提案された一つの解決法が、「親和性増強系(Affinity Enhancement System)」(AES)と呼ばれる、特に、診断用または治療用放射性同位元素を有する抗体による腫瘍ターゲティングの欠陥を克服するよう設計された技術である[米国特許第5,256,395号(1993), Barbet et al., Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals (1999) 14: 153-166頁]。AESは、放射性標識した二価ハプテン、ならびに標的腫瘍および放射性ハプテンの両方を認識する抗腫瘍/抗ハプテン二重特異性抗体を必要とする。この技術では、二重特異性抗体を患者に注入すること、および二重特異性抗体を標的腫瘍に局在させることを必要とする。結合していない抗体が血流から除去されるのに十分な時間の後、放射性標識したハプテンを投与する。ハプテンは標的細胞の部位に位置する抗体-抗原複合体と結合し、診断上または治療上の効用をもたらす。結合していないハプテンは体内から除去される。Barbetは、二重特異性抗体が腫瘍表面と結合すると、二価ハプテンが二重特異性抗体と架橋するという可能性を記述している。結果として、放射性標識した複合体は、より安定化され、より長い時間腫瘍に留まる。

【0006】

さらに、二重特異性または三重特異性トリアポディ(triobody)を作製する従来の方法には問題がある。これらの方法は、その各々が V_L ドメインと直接連結された V_H ドメインからなる3つの異なるポリペプチドの合成を教示するものである。 V_{H1}/V_{L1} の特異性に対しては二価であり、 V_{H2}/V_{L2} の特異性に対しては一価である二重特異性トリアポディの場合、3つのポリペプチドは $V_{H1}-V_{L2}$ 、 $V_{H2}-V_{L1}$ 、および $V_{H1}-V_{L1}$ である。3つの特異性(V_{H1}/V_{L1} 、 V_{H2}/V_{L2} 、および V_{H3}/V_{L3})の各々に対して一価である三重特異性トリアポディでは、3つのポリペプチドは V_{H1}

10

20

30

40

50

- V_{L2} 、 $V_{H2} - V_{L3}$ 、および $V_{H3} - V_{L1}$ である。いずれの設計の各ポリペプチドも、それ自身と結合するか、または2つの他のポリペプチドと結合することによってトリアボディを形成する可能性があるため、最大10の異なるトリアボディを作製し得るが、正しい構造は1つだけである。テトラボディ (tetrabody) 概念に基づく多重特異性四量体を作製するための同様のアプローチでは、第四のポリペプチドを加えることによって起こり得る副生物の数が拡大されるだけである。

【0007】

さらに、タンデムダイアボディ (diabody) などの多重特異性の多価設計もまた、欠点を有することがある。一般に好まれるその他の抗体では、2つの異なる抗体の V_H および V_L ドメインの両方からなるポリペプチドがそれ自身の上に折り重なって、各々の特異性に対して一価性の二重特異性単鎖が生じる可能性がある場合には、恐らく、ホモダイマーは容易には形成し得ない。実際には、いずれの場合にも、タンデムダイアボディの代わりに二重特異性単鎖構造をもたらすタンデムダイアボディ設計をもとにして、いくつかの構築物が作製された (Rossi and Chang、未発表の結果)。よって、同じポリペプチドに両方のタイプが存在する場合、特に、同種の V_H および V_L ドメイン間の距離が十分に長く、フレキシブルである場合には、 V_H および V_L ドメインの鎖内対合が明らかに起こり得る。

10

【0008】

2つの異なる Fab' フラグメントの化学的架橋によって作製した二重特異性多価抗体を、適用可能な二価ハプテンとともに使用することが成功に終わっており、動物モデルおよびヒト患者の両方における腫瘍ターゲティングの改善のための A E S の有用性が確認されている。しかしながら、当技術分野では A E S において有用である組換え DNA 技術による二重特異性抗体の作製の必要性が残されている。具体的には、標的抗原での抗体摂取の増大、血中の抗体の減少、毒性医薬からの正常組織および正常細胞の最適な防御を示す抗体の必要性が残されている。さらに、多価性および多重特異性の s c F v ベースの薬剤の製造に関連する問題を克服する結合タンパク質の必要性が残されている。

20

【発明の概要】

【0009】

本発明は、多重特異性を有する多価結合タンパク質、ならびにこれらの薬剤を V_H および V_L ドメインから製造する方法に関する。結合タンパク質は3つ以上の結合部位を有するものであり、少なくとも1つの結合部位はハプテン部分と結合し、かつ、少なくとも2つの部位は標的抗原と結合する。本発明はさらに、ヒスタミン - スクシニル - グリシル (H S G) 部分を含む分子への親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および癌胎児性抗原 (C E A) への親和性を有する少なくとも2つの結合部位を有する二重特異性三価タンパク質、ならびに H S G 部分を含む分子への親和性を有する少なくとも1つの結合部位、C E A への親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および金属キレート錯体 インジウム - D T P A への親和性を有する少なくとも1つの結合部位を有する三重特異性三価結合タンパク質に関する。さらに、本発明は、宿主 (好ましくは微生物宿主) におけるこれら機能的結合タンパク質の発現に有用な組換えベクターに関する。

30

【0010】

本発明の一つの態様は、ハプテン部分および標的抗原と結合する二重特異性三価ヘテロダイマー、ならびに宿主 (好ましくは微生物宿主) におけるこれら機能的組換えタンパク質の発現に有用な組換えベクターに関する。

40

【0011】

第二の態様によれば、H S G 部分を含む分子に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および C E A に対する親和性を有する少なくとも2つの結合部位を有する二重特異性三価ヘテロダイマー、ならびに宿主 (好ましくは微生物宿主) におけるこれら機能的ヘテロダイマーの発現に有用な組換えベクターが提供される。これらのヘテロダイマーは組換え DNA 技術によって作製され、これにより H S G および C E A に対して特異的な親和性を示す新規 A E S が提供される。

【0012】

50

第三の態様によれば、H S G 部分を含む分子に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位、C E A に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および金属キレート錯体 インジウム - D T P A に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位を有する三重特異性三価ヘテロダイマーが提供される。この態様には、微生物宿主におけるこれら機能的ヘテロダイマーの発現に有用な組換えベクターが含まれる。これらのヘテロダイマーは組換え D N A 技術によって作製され、これにより新規 A E S が提供される。

【0013】

本発明の第四の態様は、診断薬、治療薬、またはその組合せを標的に送達する方法に関する。この方法は、薬剤を必要とする被験体に前記結合タンパク質を投与すること、ある量の非結合タンパク質が被験体の血流から除去されるのに十分な時間待つこと、および前記担体分子を投与することを含む。本発明のさらなる態様によれば、上述の薬剤の標的への送達方法を用いて、ヒト疾患を検出または治療する方法が提供される。

10

【0014】

本発明の一つの目的は、ハプテン部分および抗原と結合することが可能な結合タンパク質を作製することである。本発明の他の目的は、多重特異性抗体をコードする D N A の配列を含み、かつ、微生物宿主細胞において容易に発現されるベクターを作製することである。さらに、本発明は、組換え D N A 技術によってヘテロダイマーを作製する方法を包含する。この方法は、前記宿主細胞を適切な培地で培養すること、および培地からヘテロダイマーを分離することを含む。さらに、本発明は、図4~7(配列)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる c D N A クローン群から選択される核酸分子に関する。679 - s c F v - L 5 および h M N 1 4 - s c F v - L 5 についての核酸の D N A コード配列およびコードされる対応アミノ酸は、それぞれ図4および6(配列)に記載されている。m 7 3 4 V_H および V_L をコードする D N A は図7に記載されている。

20

【好ましい実施形態の詳細な説明】

【0015】

特に断りのない限り、可算名詞("a"または"an")は1つ以上のものを意味する。

【0016】

本発明の一つの実施態様は、多重特異性を有する多価結合タンパク質、ならびにこれらの薬剤を V_H および V_L ドメインから製造する方法に関する。結合タンパク質は3つ以上の結合部位を有するものであり、少なくとも1つの結合部位はハプテン部分と結合し、かつ、少なくとも2つの部位は標的抗原と結合する。本発明はさらに、ヒスタミン - スクシニル - グリシル (H S G) 部分を含む分子に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および癌胎児性抗原 (C E A) に対する親和性を有する少なくとも2つの結合部位を有する二重特異性三価ヘテロダイマー、ならびに H S G 部分を含む分子に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位、C E A に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位、および金属キレート錯体 インジウム - D T P A に対する親和性を有する少なくとも1つの結合部位を有する三重特異性三価ヘテロダイマーに関する。さらに、本発明は、微生物宿主におけるこれら機能的ヘテロダイマーの発現に有用な組換えベクターに関する。

30

【0017】

構造的に、完全抗体は4つのポリペプチド鎖を含む Y 形ユニットの1以上のコピーからなる。2つの鎖は重鎖と呼ばれる1つのポリペプチドの同一コピーであり、2つの鎖は軽鎖と呼ばれる1つのポリペプチドの同一コピーである。各ポリペプチドは個々の D N A によって、または連結された D N A 配列によってコードされる。2つの重鎖は1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結されており、各軽鎖は1つのジスルフィド結合によって一方の重鎖と連結されている。各鎖には、重鎖および軽鎖のそれぞれについて、V_H および V_L と呼ばれる N 末端可変領域があり、F v 断片と呼ばれる1対の V_H および V_L の非共有結合が1つの抗原結合部位を形成している。

40

【0018】

個々の F v 断片は低タンパク質濃度および生理学的条件下にて解離する傾向があり [Glo

50

ckshuber et al., *Biochemistry* (1990) 29: 1362-1367頁]、その用途は限られている。安定性を向上させ、潜在的有用性を高めるために、 V_H ドメイン (または V_L) の C 末端が、長さを変えることが可能なペプチドリンカーを介して V_L ドメイン (または V_H) の N 末端と連結されている組換え単鎖 $scFv$ ($scFv$) 断片が作製され、広範囲にわたって調査されている。[最近の総説に関しては、Hudson and Kortt, *J. Immunological methods* (1999) 231: 177-189頁を参照]。 $scFv$ は、米国特許第 4, 946, 778号(1990) および米国特許第 5, 132, 405号(1992) に開示されている方法によって作製可能である。

【0019】

12 アミノ酸残基長を超えるリンカー (例えば、15 または 18 残基リンカー) を有する $scFv$ は、同一鎖の V_H および V_L ドメイン間の相互作用を可能にし、一般に、モノマー、ヘテロダイマーおよび少量の高分子量マルチマーの混合物を形成する [米国特許第 4, 642, 334号(1987); Kortt et al., *Eur. J. Biochem.* (1994) 221: 151-157頁]。しかしながら、5 個以下のアミノ酸残基のリンカーを有する $scFv$ は、同一鎖の V_H および V_L ドメインの分子内対合を妨げ、異なる鎖の V_H および V_L ドメインの対合を促進する。3 ~ 12 残基間のリンカーは、主にダイマーを形成する [Atwell et al., *Protein Engineering* (1999) 12: 597-604頁]。0 ~ 2 残基間のリンカーでは、 $scFv$ のトリマー構造 (トリアポディと呼ばれる)、テトラマー構造 (テトラポディと呼ばれる) またはより高度なオリゴマー構造が有用である。しかしながら、オリゴマー化の正確なパターンは、リンカーの長さに加えて、組成、ならびに V ドメインの方向性によって異なると考えられる。例えば、抗ノイラミニダーゼ抗体 NC10 の $scFv$ は、0 残基リンカーによって、主にトリマー (V_H から V_L へ方向) またはテトラマー (V_L から V_H へ方向) を形成した [Dolezal et al., *Protein Engineering* (2000) 13: 565-574頁]。1 および 2 残基リンカーを用いて NC10 から構築した $scFv$ に関しては、 V_H から V_L へ方向では主にヘテロダイマーを形成し [Atwell et al., *Protein Engineering* (1999) 12: 597-604頁]、これに対して、 V_L から V_H へ方向ではテトラマー、トリマー、ダイマー、および高分子量マルチマーの混合物を形成した [Dolezal et al., *Protein Engineering* (2000) 13: 565-574頁]。 V_H から V_L へ方向に抗 CD19 抗体 HD37 から構築した $scFv$ に関しては、0 残基リンカーでは専らトリマーを形成し、1 残基リンカーでは専らテトラマーを形成した [Le Gall et al., *FEBS Letters* (1999) 453: 164-168 頁]。

【0020】

2 つ以上の $scFv$ 分子の非共有結合によって、多価であるが単一特異的な機能的ダイアポディ、トリアポディおよびテトラポディが形成され得るため、2 つ以上の異なる $scFv$ 分子の同様の結合によっては、適切に構築されれば、機能的多重特異性 $scFv$ マルチマーが形成される可能性がある。多価性を有する単一特異性ダイアポディ、トリアポディ、およびテトラポディは、5 個以下のアミノ酸残基からなるペプチドリンカーを用いて得られている。二重特異性ダイアポディは、一般に、2 つの異なる $scFv$ のヘテロダイマーであり、各 $scFv$ はショートリンカーによって別の抗体の V_L ドメインと連結された 1 つの抗体由来の V_H ドメインを含んでなる。数種類の二重特異性ダイアポディは、一方のシストロンに V_{H1} - リンカー - V_{L2} を含んでなる組換え遺伝子構築物、およびもう一方のシストロンに V_{H2} - リンカー - V_{L1} を含んでなる第二の組換え遺伝子構築物を含む 2 シストロン性発現ベクターを用いて作製されている [Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90: 6444-6448頁; Atwell et al., *Molecular Immunology* (1996) 33: 1301-1302頁; Holliger et al., *Nature Biotechnology* (1997) 15: 632-631頁; Helfrich et al., *Int. J. Cancer* (1998) 76: 232-239頁; Kipriyanov et al., *Int. J. Cancer* (1998) 77: 763-772頁; Holliger et al., *Cancer Research* (1999) 59: 2909-2916頁を参照]。 $scFv$ を構築する方法は、米国特許第 4, 946, 778号(1990) および米国特許第 5, 132, 405号(1992) に開示されている。 $scFv$ に基づく多価多重特異性結合タンパク質を製造する方法は、二重特異性ダイアポディについては米国特

10

20

30

40

50

許第 5, 837, 242 号(1998)、米国特許第 5, 844, 094 号(1998)および WO - 98 / 44001 (1998)に、タンデムダイアボディについては PCT / DE 99 / 01350 に開示されている。二重特異性抗体は、組み換え工学、化学結合、およびクアドローマ技術(quadroma technology)などの方法によって作製することができる。多価性および多重特異性を有する s c F v ベースの薬剤を、一方の鎖が少なくとも 2 つの抗体に由来する V_H ドメインからなり、もう一方の鎖が対応する V_L ドメインからなる 2 つのポリペプチド鎖を構築することにより製造する方法は、米国特許第 5, 989, 830 号(1999)および米国特許第 6, 239, 259 号(2001)に開示されている。

【0021】

多重特異性および多価抗原結合タンパク質を V_H および V_L ドメインから製造する他の方法が、米国特許第 5, 989, 830 号および同第 6, 239, 259 号に開示されている。このような多価および多重特異性抗原結合タンパク質は、一方のポリペプチド鎖がペプチドリンカーによって直列につながれた 2 つ以上の V_H ドメイン(同じまたは異なる抗体に由来するもの)からなり、もう一方のポリペプチド鎖がペプチドリンカーによって直列につながれた相補的 V_L ドメインからなる 2 つのポリペプチド鎖をコードする 2 シストロン性ベクターを発現させることによって得られる。

【0022】

つい最近、二元的な特異性を有する四価タンデムダイアボディ(tandab と呼ばれる)についても報告された[Cochlovius et al., Cancer Research (2000) 60: 4336-4341 頁]。二重特異性 tandab は 2 つの同じポリペプチドのダイマーであり、その各々のポリペプチドは、自己会合の際に 2 つの異なる特異性それぞれについての 2 つの可能性ある結合部位の形成を容易にする方向に連結された 2 つの異なる抗体の 4 つの可変領域(V_{H1}、V_{L1}、V_{H2}、V_{L2})を含む。

【0023】

本発明の一つの実施態様によれば、非共有結合により 3 つの結合部位を形成する 2 つの異種ポリペプチド鎖を含んでなる二重特異性三価ターゲッティングタンパク質が提供され、前記 3 つの結合部位のうち、2 つの部位は 1 つの標的に対する親和性を有し、第三の部位は、診断薬および/または治療薬用の担体と結合し得るハプテンに対する親和性を有する。好ましい実施態様によれば、結合タンパク質は 2 つの C E A 結合部位と 1 つの H S G 結合部位を有する。二重特異性三価ターゲッティング剤は 2 つの異なる s c F v を有し、1 つの s c F v は、ショートリンカーによってもう 1 つの抗体の V_L ドメインと連結された 1 つの抗体に由来する 2 つの V_H ドメインを含み、第二の s c F v は、ショートリンカーによって他の抗体の V_H ドメインと連結された第一の抗体由来の 2 つの V_L ドメインを含む。多価多重特異性薬剤を V_H および V_L ドメインから製造する方法によると、宿主生物において DNA プラスミドから合成される各鎖は、多価性および多重特異性を有する薬剤を 1 つの V_H 鎖の 1 つの V_L 鎖との非共有結合によって作製することができるように、全て V_H ドメイン(V_H 鎖)で構成されるか、または全て V_L ドメイン(V_L 鎖)で構成される。例えば、三価の三重特異性薬剤を形成する場合、V_H 鎖は、各々が、長さを変えることが可能なペプチドリンカーによって連結される異なる特異性の抗体由来の 3 つの V_H ドメインのアミノ酸配列からなり、V_L 鎖は、V_H 鎖に用いられるものと同様のペプチドリンカーによって連結される相補的 V_L ドメインからなる。抗体の V_H および V_L ドメインは逆平行に結合するため、本発明において好ましい方法は、以下のダイアグラムに示すように、V_H 鎖の V_H ドメインとは逆の順序に配置された V_L 鎖の V_L ドメインを有する。

【0024】

V_H 鎖 : NH₂ - - - - V_{H1} - L a - V_{H2} - L b - V_{H3} - - - - COOH
 V_L 鎖 : NH₂ - - - - V_{L3} - L b - V_{L2} - L a - V_{L1} - - - - COOH

【0025】

ペプチドリンカー L a および L b は同じであってもよいし、または異なってもよい。

10

20

30

40

50

【0026】

価数または特異性の数を増やすように、より多くの可変領域を含めることができる。例えば、以下に示す2つのポリペプチドは、2つの特異性の各々に対して二価である四価二重特異性ダイマーを形成し得る。

【0027】

V_H鎖：NH₂ - - - V_{H1} - L a - V_{H1} - L b - V_{H2} - L c - V_{H2} - - COO
H

V_L鎖：NH₂ - - - V_{L2} - L c - V_{L2} - L b - V_{L1} - L a - V_{L1} - - COO
H

【0028】

ペプチドリンカーL a、L b、およびL cは同じであってもよいし、または異なってもよい。各鎖の可変領域の順序が各特異性の機能活性の保持に重要であるか否かはまだ決定されていない。

【0029】

本発明のさらなる実施態様では、抗原特異的ヘテロダイマーを構築するためのV_HおよびV_Lドメインを作製するために、3つのモノクローナル抗体、679、hMN14、および734が用いられる。hMN14および734を作製し、これらを使用する方法は、全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる米国出願第09/337,756号、第09/823,746号および第10/150,654号に記載されている。679と呼ばれるマウスモノクローナル抗体(IgG1、K)は高い親和性でトリペプチド部分ヒスタミンスクシニルグリシル(HSG)を含む分子と結合する(Morel et al, Molecular immunology, 27, 995-1000頁, 1990)。679の可変領域(V_HおよびV_K)についてのヌクレオチド配列は決定されている(Qu et al, 未発表の結果)。V_Kは、抗体軽鎖、V_Lの2つのイソタイプのうちの1つである。2つのイソタイプの機能は同じである。図1に示すように、679ヘテロダイマーを発現させるための遺伝子構築物(679-s c F v - L 5)の設計は次の特徴を有している：1) V_Hのカルボキシル末端はペプチドリンカーG l y - G l y - G l y - G l y - S e r (G₄S)によってV_Kのアミノ末端と連結されている。G₄Sペプチドリンカーを使用することによって分泌されたポリペプチドのヘテロダイマーへの二量化を可能にし、HSGの2つの結合部位を形成する。2) p e l BリーダースIGNALペプチド配列はV_H遺伝子の前に配置し、大腸菌(E. coli)のペリプラスム空間でのポリペプチドの合成を容易にする。3) 6ヒスチジン(His)残基をカルボキシル末端に付加してIMACによる精製を可能にする。679-s c F v - L 5の核酸のDNAコード配列および対応するコードされるアミノ酸を図4(配列)に示す。図1では、p e l BリーダースIGNALペプチドのタンパク質分解除去後の成熟ポリペプチドの棒線画およびHSG結合部位を含む679ヘテロダイマーの棒線画も示している。679はマウス抗体に対する有害反応を回避するために、ヒト化することができるし、または完全にヒトであってもよい。

【0030】

hMN14はCEAと特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体(M a b)である(Shevitz et al, J. Nucl. Med., suppl., 34, 217頁, 1993; 米国特許第6,254,868号(2001))。元々のM a bはマウスであり、ヒト化抗体試薬は現在、ヒト抗マウス抗体応答を減少させるのに用いられている。この抗体の可変領域を発現構築物(hMN14-s c F v - L 5)へと組み込んだ。図2に示すように、hMN14ヘテロダイマーを発現させるための遺伝子構築物(hMN14-s c F v - L 5)の設計は次の特徴を有している：1) V_Hのカルボキシル末端はペプチドリンカーG l y - G l y - G l y - G l y - S e r (G₄S)によってV_Kのアミノ末端と連結されている。G₄Sペプチドリンカーを使用することによって分泌されたポリペプチドのヘテロダイマーへの二量化を可能にし、CEAの2つの結合部位を形成する。2) p e l BリーダースIGNAL配列はV_H遺伝子の前に配置し、大腸菌のペリプラスム空間でのポリペプチドの合成を容易にする。3) 6ヒスチジン(His)残基をカルボキシル末端に付加してIMACによる精製を可能にする。hM

10

20

30

40

50

N 1 4 - s c F v - L 5 の核酸の D N A コード配列および対応するコードされるアミノ酸を図 6 (配列) に示す。図 2 では、p e l B リーダーペプチドのタンパク質分解除去後の成熟ポリペプチドの棒線画および C E A 結合部位を含む h M N 1 4 ヘテロダイマーの棒線画も示している。

【 0 0 3 1 】

7 3 4 は高い親和性で金属キレート錯体 インジウム - D T P A (ジエチレントリアミン五酢酸) と結合する、指定されたマウスモノクローナル抗体である。図 2 に示すように、7 3 4 ヘテロダイマーを発現させるための遺伝子構築物 (7 3 4 - s c F v - L 5) の設計は次の特徴を有している：1) V_H のカルボキシル末端はペプチドリンカー G l y - G l y - G l y - S e r (G₄S) によって V_K のアミノ末端と連結されている。G₄S ペプチドリンカーを使用することによって分泌されたポリペプチドのヘテロダイマーへの二量化を可能にし、H S G の 2 つの結合部位を形成する。2) p e l B リーダーシグナルペプチド配列は V_H 遺伝子の前に配置し、大腸菌のペリプラスム空間でのポリペプチドの合成を容易にする。3) 6 ヒスチジン (H i s) 残基をカルボキシル末端に付加して I M A C による精製を可能にする。7 3 4 - s c F v - L 5 の核酸の D N A コード配列および対応するコードされるアミノ酸を図 7 (配列) に示す。図 3 では、p e l B リーダーペプチドのタンパク質分解除去後の成熟ポリペプチドの棒線画および I n - D T P A 結合部位を含む 7 3 4 ヘテロダイマーの棒線画も示している。7 3 4 は、マウス抗体に対する有害反応を回避するために、ヒト化することができるし、または完全にヒトであってもよい。

10

20

【 0 0 3 2 】

2 シストロン性発現ベクターを一連のサブクローニング手順によって構築した。三価二重特異性 6 7 9 x h M N 1 4 x h M N 1 4 の 2 シストロン性発現カセットを、宿主細胞において染色体外自己複製遺伝因子を形成する小型の二本鎖 D N A であるプラスミド内に含めてもよい。クローニングベクターは微生物宿主細胞において自己複製可能な D N A 分子である。本発明はさらに、二重特異性三価ヘテロダイマーを発現するベクターを包含する。宿主細胞は増殖を目的としてベクターを受け入れ、宿主細胞が分裂するたびにベクターは複製する。一般的に用いられる宿主細胞は大腸菌 (*Escherichia Coli* (E. Coli)) であるが、その他の宿主細胞も利用可能である。宿主細胞の増殖を通じて可能となる組換え抗体断片の大量生産により、これらの抗体は有望な送達系となる。

30

【 0 0 3 3 】

2 シストロン性カセットが大腸菌において発現すると、いくつかのポリペプチドが折り畳まれ、自然発生的に可溶性の二重特異性三価ヘテロダイマーが形成される。例示した二重特異性三価ヘテロダイマーは、互いに相互作用して H S G に対して高い親和性を有する H S G 結合部位を形成する 2 つのポリペプチド、および結合して C E A 抗原に対して高い親和性を有する 2 つの C E A 結合部位を形成する 4 つのポリペプチドを有する。抗原は特異的な抗体によって捕捉され、架橋している抗原および抗体分子の非共有相互作用によって結合される抗原 - 抗体複合体を形成する。三重特異性三価ヘテロダイマーは、互いに相互作用して H S G に対して高い親和性を有する H S G 結合部位を形成する 2 つのポリペプチド、結合して C E A 抗原に対して高い親和性を有する C E A 結合部位を形成する 2 つのポリペプチド、および結合して金属キレート錯体 インジウム - D T P A に対して高い親和性を有する金属キレート錯体 インジウム - D T P A 結合部位を形成する 2 つのポリペプチドを有する。

40

【 0 0 3 4 】

6 7 9 x h M N 1 4 x h M N 1 4 二重特異性ヘテロダイマーの発現用の 2 つの構築物が設計され、構築され、調査されている。B S 6 または B S 8 (~ 8 0 k D) は C E A の 2 つの結合部位および H S G の 1 つの結合部位を含む。B S 6 は、2 つのポリペプチド上における各 V ドメインの配置が B S 8 とは異なっている。B S 6 を構成するポリペプチドは h M N 1 4 V_H - (L a) - h M N 1 4 V_K - (L b) - 6 7 9 V_H - 6 H i s および 6 7 9 V_K - (L b) - h M N 1 4 V_H - (L a) - h M N 1 4 V_K - 6 H i s である。B

50

S 8を含んでなるポリペプチドはhMN14V_H - (L5) - hMN14V_H - (Lb) - 679V_H - 6Hisおよび679V_K - (Lb) - hMN14V_K - (La) - hMN14V_K - 6Hisである。BS6の場合、hMN14MAbのV_Hポリペプチドは、オリゴペプチドリンカーによって679MAbのV_Hポリペプチドと連結されているhMN14MAbのV_Kポリペプチドと、オリゴペプチドリンカーによって連結されており、679MAbのV_Kポリペプチドは、オリゴペプチドリンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されているhMN14MAbのV_Hポリペプチドと、オリゴペプチドリンカーによって連結されている。各鎖が679xhMN14xhMN14二重特異性三価ヘテロダイマーの半分を形成する。BS8は、オリゴペプチドリンカーによって679MAbのV_Hポリペプチドと連結されているhMN14MAbのV_Hポリペプチドと、オリゴペプチドリンカーによって連結されているhMN14MAbのV_Hポリペプチド、ならびにオリゴペプチドリンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されているhMN14MAbのV_Kポリペプチドと、オリゴペプチドリンカーによって連結されている679MAbのV_Kポリペプチドからなる。各鎖が679xhMN14xhMN14ヘテロダイマーの半分を形成する。BS6およびBS8のオリゴペプチドリンカーは同じであってもよいし、または異なってもよい。BS6の第一および第二のポリペプチド配列についての核酸のDNAコード配列および対応するコードされるアミノ酸は、hMN14V_H - (La) - hMN14V_K - (Lb) - 679V_H - 6Hisおよび679V_K - (Lb) - hMN14V_H - (La) - hMN14V_K - 6Hisであり、BS8の場合では、hMN14V_H - (La) - hMN14V_H - (Lb) - 679V_H - 6Hisおよび679V_K - (Lb) - hMN14V_K - (La) - hMN14V_K - 6Hisであり、ここで、hMN14V_HおよびV_K、ならびに679V_HおよびV_Kは各々、図6および4(配列)に示している。

【0035】

三重特異性三価結合タンパク質、TS1は、CEAの1つの結合部位、HSGの1つの結合部位、および金属キレートインジウム-DTPAの1つの結合部位を有する。TS1を構成するポリペプチドは、hMN14V_H - (La) - 734V_H - (Lb) - 679V_Hおよび679V_K - (Lb) - 734V_K - (La) - hMN14V_Kである。TS1では、hMN14MAbのV_Hポリペプチドが、オリゴペプチドリンカーによって679MAbのV_Hポリペプチドと連結されている734MAbのV_Hポリペプチドと、オリゴペプチドリンカーによって連結されており、679MAbのV_Kポリペプチドが、オリゴペプチドリンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されている734MAbのV_Kポリペプチドと、オリゴペプチドリンカーによって連結されている。各鎖がhMN14x734x679三重特異性三価ヘテロダイマーの半分を形成する。リンカーは同じであってもよいし、または異なってもよい。m734V_HおよびV_Kは図7(配列)に示している。

【0036】

これらの二重特異性三価結合タンパク質の最終的な用途は、HSG含有ペプチドによって運ばれる診断薬または治療薬のその後の特異的な送達を目的としたCEA陽性腫瘍のプレターゲットングに向けたものである。これらのヘテロダイマーは、親和性の増強および所望の位置での滞留時間の延長を考慮して、2つの標的抗原と選択的に結合する。BS6およびBS8は、二価CEA結合および循環時間の延長により高レベルの腫瘍摂取を達成する能力を有するため、魅力的なプレターゲットング剤である。さらに、非抗原結合ヘテロダイマーを迅速に体内から除去し、正常組織の曝露を最小限に抑える。診断薬および治療薬としては、同位元素、薬剤、毒素、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、複合体、放射性核種、および金属を挙げることができる。例えば、ガドリニウム金属は磁気共鳴画像診断(magnet resonance imaging)に用いられ、MRI造影剤、CT造影剤、および超音波造影剤もまた利用される。放射性核種の例は、例えば、⁹⁰Y、¹¹¹In、¹³¹I、^{99m}Tc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁷⁷Lu、⁶⁷Cu、²¹²Bi、²¹³Bi、および²¹¹Atである。その他の放射性核種も診断薬および治療薬として利用可

能である。これらの薬剤へと設計される特異性に応じて、免疫応答の誘導によって、または放射性ハプテンまたは薬剤 - ハプテン複合体を用いる A E S 技術と組み合わせて達成し得る、癌、自己免疫疾患および感染症の治療に用いることが可能である。三重特異性および四重特異性薬剤は、血液サンプル中の特異的な標的細胞の検出および区別に有用であり得る。

【0037】

さらに、本発明は、組み合わせて機能的構造を形成するのに2つの相補的ポリペプチドを必要とするだけであり、同一のポリペプチドが結合することは決してないため、多数の副生物を形成するという問題が回避される。そのため、ポリペプチド鎖の不適切な対合によって不活性な混入物質が形成されることはない。本発明は、各ポリペプチド鎖がV_HまたはV_Lドメインしか含んでいないことから、他方のポリペプチド鎖と結合する場合にのみ機能的構造を形成することができるため、分子内対合の問題が回避される。本発明は、各ポリペプチド鎖がV_HまたはV_Lドメインしか含んでいない(BS8およびTS1)ことから、またはそれらが奇数のV_HおよびV_Lドメインからなる(BS6)ことから、相補鎖と結合する場合に機能的構造だけを形成することができるため、分子内対合の問題が回避される。Davis et al.は、一方が少なくとも2つの抗体由来のV_Hドメインからなり、もう一方が対応するV_Lドメインからなる2つのポリペプチド鎖の対合に基づく多価多重特異性タンパク質の構築の同様のアプローチを開示している(米国特許第5,989,830号(1999)および米国特許第6,239,259号(2001))が、多価多重特異性分子各々の分子的同一性を確立する証拠はほとんど掲載されていない。

10

20

【0038】

本発明によれば、診断または治療を目的とする診断薬または治療薬の標的への送達には、患者に前記結合タンパク質を投与すること、ある量の結合していないタンパク質が患者の血流から除去されるのに十分な時間待つこと、および結合タンパク質の結合部位と結合する診断薬または治療薬を投与することが含まれる。診断にはさらに、公知の技術による結合タンパク質の検出工程が必要である。診断用または治療用担体分子は、診断上または治療上有効な薬剤、結合部分、および1以上のハプテン部分を含んでなる。このハプテン部分は、該ハプテン部分の結合タンパク質との同時結合が可能となる位置に配置される。

【0039】

本発明による結合タンパク質および診断薬または治療薬の哺乳動物への投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸腔内、くも膜下、局所カテーテルを通じた灌流によって、または直接病変内局注によってもよい。注入により結合成分を投与する場合、投与は持続注入または単一回もしくは複数回ボラスによってもよい。

30

【0040】

混合されていない診断薬または治療薬および二重特異性抗体は、医薬上許容される注入ビヒクル、好ましくは生理学的pHおよび濃度のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中において、ヒト治療用および診断用キットとして提供することができる。調製物は、特に、ヒトでの使用を目的とする場合には、好ましくは無菌である。このようなキットの任意の成分としては、安定剤、バッファー、標識試薬、放射性同位元素、常磁性化合物、クリアランスを高めるための第二の抗体、および従来のシリンジ、カラム、バイアルなどが挙げられる。

40

【0041】

前記多価多重特異性結合タンパク質は、癌、自己免疫疾患、感染症、循環器疾患および炎症性疾患をはじめとする種々のヒト疾患の診断および治療に有用である。この実施態様では、標的抗原は、癌結合部位、自己免疫疾患結合部位、感染症結合部位、循環器疾患結合部位、および炎症性疾患結合部位など、ヒト疾患に関連する結合部位である。

【0042】

本発明の範囲において有用な抗体および抗原としては、上記のような特性を有するmAbが挙げられ、限定されるものではないが、癌においては、次のmAbの使用が考えられる：LL1(抗CD74)、LL2(抗CD22)、RS7(抗上皮糖タンパク質-1)

50

EGP - 1))、PAM - 4 および KC 4 (ともに抗 MUC 1)、MN - 1 4 (抗癌胎児性抗原 (CEA))、Mu - 9 (抗結腸特異的抗原 - p)、Immu 3 1 (抗 - フェトプロテイン)、TAG - 7 2 (例えば、CC 4 9)、Tn、J 5 9 1 (抗 PSMA) および G 2 5 0 (抗炭酸脱水酵素 IXmAb)。これらの複合体を用いてターゲティングし得るその他の有用な抗原としては、HER - 2 / neu、BrE 3、CD 1 9、CD 2 0 (例えば、C 2 B 8、hA 2 0、1 F 5 Mab) CD 2 1、CD 2 3、CD 8 0、フェトプロテイン (AFP)、VEGF、EGF 受容体、P 1 GF、MUC 1、MUC 2、MUC 3、PSMA、ガングリオシド、HCG、EGF - 2 (例えば、1 7 - 1 A)、CD 3 7、HLD - DR、CD 3 0、Ia、A 3、A 3 3、Ep - CAM、KS - 1、Le (y)、S 1 0 0、PSA、テネイシン、葉酸受容体、Thomas Friedenreich 抗原、腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、Ga 7 3 3、IL - 2、T 1 0 1、MAGE、L 2 4 3 またはその組合せが挙げられる。数多くの上記の抗体および抗原、ならびに本発明の範囲において有用なさらなる抗体および抗原 (例えば、抗 CSAP、MN - 3 および抗顆粒球抗体) は、引用することにより全開示内容が本明細書の一部とされる、2 0 0 2 年 1 1 月 1 5 日出願の "Use of Multi-specific, Non-covalent Complexes for Targeted Delivery of Therapeutics," と題する米国仮出願第 6 0 / 4 2 6 , 3 7 9 号、2 0 0 2 年 3 月 1 日出願の "RS7 Antibodies," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 6 0 , 2 2 9 号、2 0 0 2 年 2 月 1 4 日出願の "Anti-CD20 Antibodies and Fusion Proteins Thereof and Methods of Use," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 5 6 , 1 3 2 号、2 0 0 1 年 1 1 月 2 8 日出願の "Anti-DOTA Antibody," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 3 3 , 4 7 9 号、2 0 0 1 年 7 月 3 1 日出願の "Polymeric Delivery Systems," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 0 8 , 6 0 5 号、2 0 0 2 年 3 月 1 日出願の "Antibody point mutations for enhancing rate of clearance," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 6 1 , 0 3 7 号、2 0 0 2 年 3 月 1 日出願の "Internalizing Anti-CD-74 Antibodies and Methods of Use," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 6 0 , 2 5 9 号、2 0 0 1 年 1 0 月 1 日出願の "Immunotherapy of B-cell malignancies using anti-CD22 antibodies," と題する米国出願第 0 9 / 9 6 5 , 7 9 6 号、2 0 0 1 年 1 2 月 2 6 日出願の "Labeling Targeting Agents With Gallium-68 and Gallium-67," と題する米国仮出願第 6 0 / 6 0 / 3 4 2 , 1 0 4 号、2 0 0 2 年 4 月 5 日出願の "Labeling Targeting Agents With Gallium-68 and Gallium-67," と題する米国出願第 1 0 / 1 1 6 , 1 1 6 号、2 0 0 2 年 8 月 1 日出願の "Alpha-Fetoprotein Immu3 1 Antibodies and Fusion Proteins and Methods of Use Thereof," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 9 9 , 7 0 7 号、2 0 0 2 年 6 月 1 4 日出願の "Monoclonal Antibody hPAM4," と題する米国仮出願第 6 0 / 3 8 8 , 3 1 4 号、および 2 0 0 2 年 9 月 3 0 日出願の "Chimeric, Human and Humanized Anti-granulocyte Antibodies and Methods of Use," と題する米国仮出願第 6 0 / 4 1 4 , 3 4 1 号に開示されている。

【 0 0 4 3 】

本発明の他の好ましい実施態様によれば、迅速に内在化した後、再び発現され、プロセシングされ、細胞表面に提示されて、細胞による循環免疫複合体の連続摂取および付着を可能にする抗体が用いられる。最も好ましい抗体 / 抗原対の例は、LL 1 抗 CD 7 4 mAb (不変鎖、クラス II 特異的シャペロン、Ii) である。CD 7 4 抗原は、B 細胞リンパ腫、特定の T 細胞リンパ腫、黒色腫および特定のその他の癌 (Ong et al., Immunology 98: 296-302 頁 (1999))、ならびに特定の自己免疫疾患において高度に発現される。

【 0 0 4 4 】

抗 CD 7 4 抗体により好適に治療される疾患としては、限定されるものではないが、非ホジキンリンパ腫、黒色腫および多発性骨髄腫が挙げられる。標的細胞の表面での短期間の CD 7 4 抗原の連続発現後に、抗原の内在化、および抗原の再発現を受けて、標的 LL 1 抗体が、それが「ペイロード」として運ぶ化学療法成分とともに内在化されることを可能にする。このことによって、このような細胞の内部に蓄積される LL 1 - 化学療法薬免疫複合体の高い治療上の濃度が実現可能となる。内在化された LL 1 - 化学療法薬免疫複合体は、リソソームおよびエンドソームを通じて循環され、標的細胞内において化学療法

成分が活性型で放出される。

【0045】

他の態様では、本発明は、被験体を治療する方法であって、治療上有効な量の本発明の好ましい実施態様による治療用複合体を被験体に投与することを含んでなる方法に関する。本発明の好ましい実施態様による治療用複合体によって治療し得る疾患としては、限定されるものではないが、B細胞悪性腫瘍（例えば、非ホジキンリンパ腫および慢性リンパ性白血病、例えば、LL2 mAbを用いる；米国特許第6,183,744号を参照）、内胚葉由来の消化器系上皮の腺癌、乳癌および非小細胞肺癌などの癌、ならびにその他の癌腫、肉腫、神経膠腫、骨髄性白血病などが挙げられる。特に、悪性固形腫瘍または造血器新生物、例えば、胃腸、肺、乳房、前立腺、卵巣、精巣、脳またはリンパ腺の腫瘍、肉腫または黒色腫によって産生されるか、またはそれと関連した抗原、例えば、腫瘍胎児抗原に対する抗体を使用することが有利である。

10

【実施例】

【0046】

以下の実施例は本発明の具体例の例示であり、特許請求の範囲を限定するものとして使用するべきではない。

【0047】

実施例1 - 大腸菌内でBS8を発現するためのプラスミドの構築

本発明により導入された概念を用いて、CEAに対して二価、HSGに対しては一価である二重特異性三価分子（BS8）を以下の2つのポリペプチドの二量化によって得た：

20

V_H鎖：hMN14V_H - GGGGS GGGGS GGGGS M - hMN14V_H - GGGGS - 679V_H

V_L鎖：679V_K - GGGGS - hMN14V_K - LEGGGGS GGGGS GGGGS - hMN14V_K

【0048】

2つのポリペプチドのDNA配列を標準分子生物学技術を用いてpET-ERベクター、2シストロン性細菌発現プラスミドへと設計した。発現の際には、各ポリペプチドは大腸菌のペリプラスム空間での合成に向けるアミノ末端のpelBリーダー配列およびIMACによる精製に関連するカルボキシル末端の6Hisアフィニティータグを有する。我々は、二重特異性薬剤、その後続いてCEAまたはWI2（hMN14に対するラット抗i dモノクローナル抗体）の連続注入時の応答単位のさらなる増大を測定することによるHSG結合センサーチップを用いるBIACoreによって2つのポリペプチドが実際に、CEAとは二価で結合し、HSGとは一価で結合する二重特異性ヘテロダイマーを形成することを示した。

30

【0049】

この具体例では、hMN14 MA bのV_Hポリペプチドは、16アミノ酸残基リンカーによって679 MA bのV_Hポリペプチドと連結されている5アミノ酸残基リンカーによってhMN14 MA bのV_Kポリペプチドと連結されており、679 MA bのV_Kポリペプチドは、5アミノ酸残基リンカーによってhMN14 MA bのV_Kポリペプチドと連結されている16アミノ酸残基リンカーによってhMN14 MA bのV_Hポリペプチドと連結されている。各鎖が679 x hMN14 x hMN14二重特異性、三価ヘテロダイマーの半分を形成する。

40

【0050】

あるいは、V_HおよびV_Lドメインの両方からなる各鎖が対合の際に多価多重特異性結合部位を形成するよう作製されていてもよい。このような例は以下に記載するようにBS6によって提供される。

【0051】

実施例2 - 大腸菌内でBS6を発現するためのプラスミドの構築

本発明により導入された概念の改変を用いて、CEAに対して二価、HSGに対しては一価であるさらなる二重特異性三価分子（BS6）を以下の2つのポリペプチドの二量化

50

によって得た：

hMN14V_H - GGGGS - hMN14V_K - LEGGGGS GGGGS GGGGS -
679V_H
679V_K - GGGGS GGGGS GGGGS M - hMN14V_H - GGGGS - hM
N14V_K

【0052】

BS6は特異的なポリペプチド鎖のドメインの配置がBS8とは異なっている。BS8の各鎖は全てV_Hドメインで構成されるか、または全てV_Lドメインで構成される。BS6のポリペプチド鎖は、その代わりに2つのV_Hと1つのV_Lまたは1つのV_Hと2つのV_Lで構成される。BS6では、hMN14V_HおよびhMN14V_K間のリンカーがたった5個のアミノ酸残基であり、それがそれらの鎖内結合を妨げる。

【0053】

BS6の2つのポリペプチドのDNA配列を標準分子生物学技術を用いてpET-ERベクターへと設計した。発現の際には、各ポリペプチドはアミノ末端のpelBリーダー配列およびカルボキシル末端の6Hisアフィニティータグを有する。我々はBIACoreによって2つのポリペプチドが実際に、CEAとは二価で結合し、HSGとは一価で結合する二重特異性ヘテロダイマーを形成することを示した。

【0054】

この具体例では、BS6は16アミノ酸残基リンカーによって679MAbのV_Hポリペプチドと連結されている5アミノ酸残基リンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されているhMN14MAbのV_Hポリペプチドおよび5アミノ酸残基リンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されている16アミノ酸残基リンカーによってhMN14MAbのV_Hポリペプチドと連結されている679MAbのV_Kポリペプチドからなる。各鎖が679xhMN14xhMN14二重特異性、三価ヘテロダイマーの半分を形成する。

【0055】

実施例3 - 大腸菌内でTS1を発現するためのプラスミドの構築

本発明により導入された概念を用いて、CEA、HSGおよびIn-DTPAの結合部分を有する三重特異性三価分子(TS1)を以下の2つのポリペプチドの二量化によって得た：

V_H鎖：hMN14V_H - (L15) - 734V_H - (L15) - 679V_H
V_L鎖：679V_K - (L15) - 734V_K - (L15) - hMN14V_K

【0056】

2つのポリペプチドのDNA配列を標準分子生物学技術を用いてpET-ERベクターへと設計した。(図8および9を参照)。発現の際には各ポリペプチドは大腸菌のペリプラスム空間での合成に向けるアミノ末端のpelBリーダー配列およびIMACによる精製に関連するカルボキシル末端の6Hisアフィニティータグを有する。我々はBIACoreおよびELISAによって2つのポリペプチドが実際に、CEA、HSGおよびIn-DTPAに対する結合能を有する二重特異性ヘテロダイマーを形成することを示した。

【0057】

この具体例では、hMN14MAbのV_Hポリペプチドは、15アミノ酸残基リンカーによって679MAbのV_Hポリペプチドと連結されている15アミノ酸残基リンカーによって734MAbのV_Hポリペプチドと連結されており、679MAbのV_Kポリペプチドは、15アミノ酸残基リンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されている15アミノ酸残基リンカーによってhMN14MAbのV_Kポリペプチドと連結されている。TS1では、各々の15個のアミノ酸残基リンカーが配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Serを有している。各鎖がhMN14x734x679三重特異性、三価ヘテロダイマーの半分を形成する。

10

20

30

40

50

【0058】

実施例4 - 多重特異性を有する多価薬剤の使用

本発明は、三価二重特異性、三価三重特異性、四価二重特異性、四価三重特異性、または四価四重特異性であってよい *in vivo* ターゲティング剤の製造に最も有効に用いられる。三価二重特異性 (3 - 2 S) 薬剤は2つの異なる抗体 (V_{H1} / V_{L1} および V_{H2} / V_{L2}) の可変領域から誘導され、2つの抗体によって認識される抗原またはエピトープとの結合が可能である。結合は1つの特異性に対して二価、もう1つの特異性に対しては一価である。3 - 2 S 薬剤はダイアグラム1に示す2つの異種ポリペプチド鎖の二量化によって作製される。

【0059】

ダイアグラム1 . 三価二重特異性薬剤

V_H 鎖 : $V_{H1} - L a - V_{H1} - L b - V_{H2}$

V_L 鎖 : $V_{L2} - L c - V_{L1} - L d - V_{L1}$

【0060】

3つの V_H または V_L ドメインの特定の順序を変更してもよく、ペプチドリンカー (L a、L b、L c、L d) は同じであってもよいし、または異なってもよい。

【0061】

三価三重特異性 (3 - 3 S) 薬剤は3つの異なる抗体 (V_{H1} / V_{L1} 、 V_{H2} / V_{L2} 、および V_{H3} / V_{L3}) の可変領域から誘導され、3つの抗体によって認識される抗原またはエピトープとの結合が可能である。結合は3つの異なる特異性の各々に対して一価である。3 - 3 S 薬剤はダイアグラム2に示す2つの異種ポリペプチド鎖の二量化によって作製される。

【0062】

ダイアグラム2 . 三価三重特異性薬剤

V_H 鎖 : $V_{H1} - L a - V_{H2} - L b - V_{H3}$

V_L 鎖 : $V_{L3} - L c - V_{L2} - L d - V_{L1}$

【0063】

3つの V_H または V_L ドメインの特定の順序を変更してもよく、ペプチドリンカー (L a、L b、L c、L d) は同じであってもよいし、または異なってもよい。

【0064】

四価二重特異性 (4 - 2 S) 薬剤は2つの異なる抗体 (V_{H1} / V_{L1} および V_{H2} / V_{L2}) の可変領域から誘導され、2つの抗体によって認識される抗原またはエピトープとの結合が可能である。結合は2つの異なる特異性の各々に対して二価である。4 - 2 S 薬剤はダイアグラム3に示す2つの異種ポリペプチド鎖の二量化によって作製される。

【0065】

ダイアグラム3 . 四価二重特異性薬剤

V_H 鎖 : $V_{H1} - L a - V_{H1} - L b - V_{H2} - L c - V_{H2}$

V_L 鎖 : $V_{L2} - L d - V_{L2} - L e - V_{L1} - L f - V_{L1}$

【0066】

4つの V_H または V_L ドメインの特定の順序を変更してもよく、ペプチドリンカー (L a、L b、L c、L d、L e および L f) は同じであってもよいし、または異なってもよい。

【0067】

四価三重特異性 (4 - 3 S) 薬剤は3つの異なる抗体 (V_{H1} / V_{L1} 、 V_{H2} / V_{L2} 、および V_{H3} / V_{L3}) の可変領域から誘導され、3つの抗体によって認識される抗原またはエピトープとの結合が可能である。結合は3つの特異性のうちの1つに対して二価、別の2つの特異性の各々に対しては一価である。4 - 3 S 薬剤はダイアグラム4に示す2つの異種ポリペプチド鎖の二量化によって作製される。

【0068】

ダイアグラム4 . 四価三重特異性薬剤

10

20

30

40

50

V_H鎖：V_{H1} - L a - V_{H1} - L b - V_{H2} - L c - V_{H3}

V_L鎖：V_{L3} - L d - V_{L2} - L e - V_{L1} - L f - V_{L1}

【0069】

4つのV_HまたはV_Lドメインの特定の順序を変更してもよく、ペプチドリンカー（L a、L b、L c、L d、L eおよびL f）は同じであってもよいし、または異なってもよい。

【0070】

四価四重特異性（4 - 4 S）薬剤は4つの異なる抗体（V_{H1} / V_{L1}、V_{H2} / V_{L2}、V_{H3} / V_{L3}、およびV_{H4} / V_{L4}）の可変領域から誘導され、4つの抗体によって認識される抗原またはエピトープとの結合が可能である。結合は4つの特異性の各々に対して一価である。4 - 4 S薬剤はダイアグラム5に示す2つの異種ポリペプチド鎖の二量化によって作製される。

【0071】

ダイアグラム5 . 四価四重特異性薬剤

V_H鎖：V_{H1} - L a - V_{H2} - L b - V_{H3} - L c - V_{H4}

V_L鎖：V_{L4} - L d - V_{L3} - L e - V_{L2} - L f - V_{L1}

【0072】

4つのV_HまたはV_Lドメインの特定の順序を変更してもよく、ペプチドリンカー（L a、L b、L c、L d、L eおよびL f）は同じであってもよいし、または異なってもよい。

【0073】

これらの多価多重特異性薬剤を作製するための注目すべき抗体としては、CEAおよびMUC1などの腫瘍関連抗原に対して高い親和性を示す抗体、インジウム - DTPA、イットリウム - DOTAなどの金属キレートに対して高い親和性を示す抗体、ヒスタミン - スクシニル - グリシンなどの特定のペプチドに対して高い親和性を示す抗体、CD20、CD22、CD74などの細胞分化抗原に対して高い親和性を示す抗体、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素に対して高い親和性を示す抗体、HLA - DRなどの臨床的に有用である可能性のある細胞表面マーカーに対して高い親和性を示す抗体が挙げられる。

【0074】

本発明による組成物および方法に対して種々の修飾および変形をなし得ることは当業者ならば分かるであろう。よって、このような修飾および変形が添付する特許請求の範囲およびそれらの等価物の範囲にあるならば、本発明はそれらを包含することを表す。

【0075】

以上に引用した全ての刊行物の開示内容は、各々が個別に引用することにより本明細書の一部とされるのと同じ程度に、明示的にその全てが引用することにより本明細書の一部とされる。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】大腸菌において679 - s c F v - L5発現プラスミドから合成され、679ヘテロダイマーを形成する679単鎖Fv（s c F v）ポリペプチドの略図。プロセッシングを受けていないポリペプチドの遺伝子構築物は、pe1Bシグナルペプチド、5アミノ酸リンカーであるGly - Gly - Gly - Gly - Ser（G₄S）によって連結された679V_Hコード配列およびV_Kコード配列、ならびにカルボキシル末端の6ヒスチジン（His）アフィニティータグを含む。この図では、pe1Bリーダーペプチドのタンパク質分解除去後の成熟ポリペプチドの棒線画およびHSG結合部位を含む679ヘテロダイマーの棒線画も示している。

【図2】大腸菌においてhMN14 - s c F v - L5発現プラスミドから合成され、hMN14ヘテロダイマーを形成するhMN14 s c F vポリペプチドの略図。プロセッシングを受けていないポリペプチドの遺伝子構築物は、pe1Bシグナルペプチド、5アミノ酸リンカーによって連結されたhMN14V_Hコード配列およびV_Kコード配列、ならびに

10

20

30

40

50

カルボキシル末端の6ヒスチジンアフィニティータグを含む。この図では、pe1Bリーダーペプチドのタンパク質分解除去後の成熟ポリペプチドの棒線画、およびCEA結合部位を含むhMN14ヘテロダイマーの棒線画も示している。

【図3】大腸菌において734-scFv-L5発現プラスミドから合成され、734ヘテロダイマーを形成し得るm734-scFvポリペプチドの略図。プロセッシングを受けていないポリペプチドの遺伝子構築物は、pe1Bシグナルペプチド、5アミノ酸リンカーによって連結された734V_Hコード配列およびV_Kコード配列、ならびにカルボキシル末端の6ヒスチジンアフィニティータグを含む。この図では、pe1Bリーダーペプチドのタンパク質分解除去後の成熟ポリペプチドの棒線画、および金属キレート錯体インジウム-DTPA結合部位を含む734ヘテロダイマーの棒線画も示している。

10

【図4】679-scFv-L5についての核酸のコード配列およびコードされるアミノ酸。1~66はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。70~426は679V_Hのコード配列である。427~441はリンカーペプチド(GGGGS)のコード配列である。442~780は679V_Kのコード配列である。787~804は6ヒスチジンアフィニティータグのコード配列である。

【図5】h679-scFv-L5についての核酸のコード配列およびコードされるアミノ酸。1~66はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。70~426はh679V_Hのコード配列である。427~441はリンカーペプチド(GGGGS)のコード配列である。442~780はh679V_Kのコード配列である。787~804は6ヒスチジンアフィニティータグのコード配列である。

20

【図6】hMN14-scFv-L5についての核酸のコード配列およびコードされるアミノ酸。1~66はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。70~423はhMN14V_Hのコード配列である。424~438はリンカーペプチド(GGGGS)のコード配列である。439~759はhMN14V_Kのコード配列である。766~783は6ヒスチジンアフィニティータグのコード配列である。

【図7】m734V_HおよびV_Lについての核酸のコード配列およびコードされるアミノ酸。

【図8A】TS1のV_H鎖についてのDNAコード配列および推定アミノ酸配列。1~63はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。90~405はhMN14V_Hのコード配列である。469~819はm734V_Hのコード配列である。866~1222はm679V_Hのコード配列である。

30

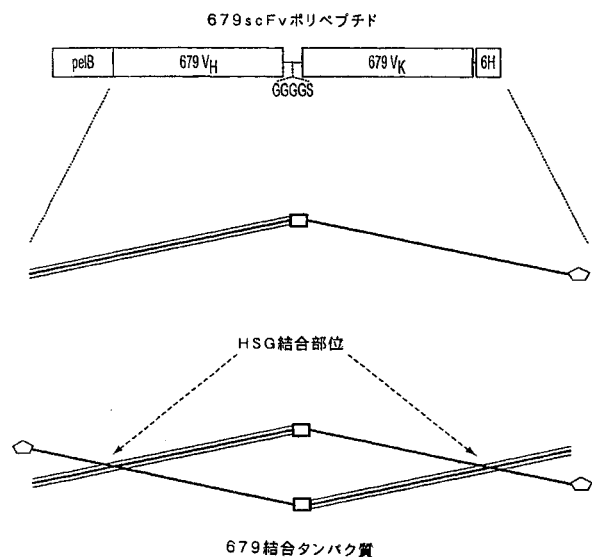
【図8B】TS1のV_H鎖についてのDNAコード配列および推定アミノ酸配列。1~63はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。90~405はhMN14V_Hのコード配列である。469~819はm734V_Hのコード配列である。866~1222はm679V_Hのコード配列である。

【図9A】TS1のV_L鎖についてのDNAコード配列および推定アミノ酸配列。1~63はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。70~408はm679V_Kのコード配列である。452~768はm734V_Lのコード配列である。829~1149はhMN14V_Kのコード配列である。

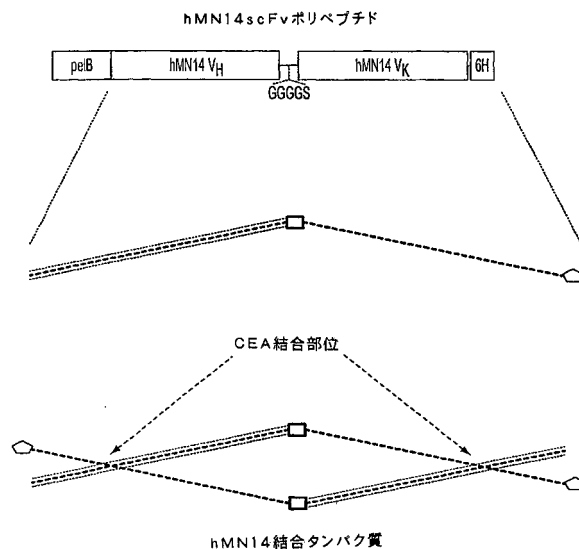
【図9B】TS1のV_L鎖についてのDNAコード配列および推定アミノ酸配列。1~63はpe1Bリーダーペプチドのコード配列である。70~408はm679V_Kのコード配列である。452~768はm734V_Lのコード配列である。829~1149はhMN14V_Kのコード配列である。

40

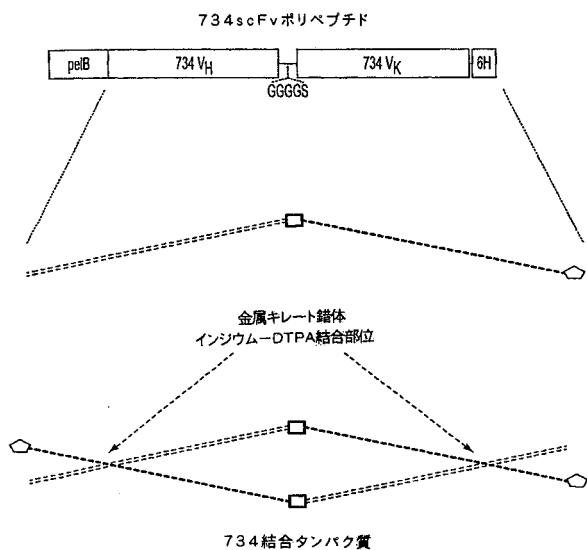
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

49 GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GAA GTG ATC CTG GTG GAG TCA GGG GGA
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly

97 GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT
Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

145 GGA TTC ACT TTC AGT ATT TAC ACC ATG TCT TGG CTT CGC CAG ACT CCG
Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Thr Met Ser Trp Leu Arg Gln Thr Pro

193 GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC CTG AGT GGT GAT GGT GAT GAC
Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Leu Ser Gly Asp Gly Asp Asp

241 ATC TAC TAT CCA GAC AGT CTG AAG GGT CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC
Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

289 AAT GCC AAG AAC AAC CTA TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTA AGG TCT GCG
Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Ala

337 GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AGG GTG CGA CTT GGG GAC TGG GAC
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gly Lys Asp Trp Asp

385 TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC TCC GTC TCC TCA GGA GGT
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ser Val Ser Ser Gly Gly

433 GGC GGA TCC GAC ATT GTG ATG TCA CAA TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG
Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val

481 TCA CCA GGA GAG AAG GTC ACT ATG ACC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu

529 TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC TTG GGT TGG TAC CAG CAG AAA
Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys

577 CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTT CTG ATC TAC TGG GCA TCT ACT CGG GAA
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

625 TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

673 ACT CTC ACC ATC AAC AGT GTG CAG TCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr

721 TGC ACT CAA GTT TAT TAT CTG TGC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG
Cys Thr Gln Val Tyr Tyr Leu Cys Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu

769 GAG CTG AAA CGG CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA
Glu Leu Lys Arg Leu Glu His His His His His His His ---

679-scFv-L5の核酸およびコードされるアミノ酸

【 図 5 】

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

49 GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCA GGG GGA
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

97 GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT
Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

145 GGA TTC ACT TTC AGT ATT TAC ACC ATG TCT TGG CTT CGC CAG ACT CCG
Gly Phe Thr Phe Ser Val Lys Met Ser Trp Leu Arg Gln Thr Pro

193 GGA AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC CTG AGT GGT GAT GGT GAT GAC
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Leu Ser Gly Asp Gly Asp Asp

241 ATC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGT CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC
Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

289 AAT GCC AAG AAC AGC CTA TAT CTG CAG ATG AAC AGT CTA AGG GCT GAG
Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

337 GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AGG GTG CGA CTT GGG GAC TGG GAC
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Arg Leu Gly Asp Trp Asp

385 TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG CTC TCC CTC TCC TCA GGA GGT
Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Val Ser Val Ser Ser Gly Gly

433 GGC GGA TCC GAC ATT GTG ATG ACA CAA TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG
Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val

481 TCA CCC GGG GAG AGG GTC ACT CTG ACC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG
Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Cys Lys Ser Ser Ser Gln Ser Leu

529 TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC TTG GGT TGG TAC CAG CAG AAA
Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys

577 CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTT CTG ATC TAC TGG GCA TCT ACT CGG GAA
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

625 TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC TCA GGC AGT GGA TCC GGA ACA GAT TTC
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

673 ACT CTC ACC ATC AAC AGT CTG CAG GCT GAA GAC GTG GCA GTT TAT TAC
Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Thr

721 TGC ACT CAA GTT TAT TAT CTG TGC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG
Cys Thr Gln Val Tyr Tyr Leu Cys Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu

769 GAG CTG AAA CGC CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA
Glu Leu Lys Arg Leu Glu His His His His His ---

h679-scFv-L5の核酸およびコードされるアミノ酸

【 図 6 】

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

49 GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GAG GTG CAA CTG GTG GAG AGC GGT GGA
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

97 GGT GTT GTG CAA CCT GGC CGG TCC CTG CGC CTG TCC TGC TCC GCA TCT
Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser

145 GGC TTC GAT TTC ACC ACA TAT TGG ATG AGT TGG GTG AGA CAG GCA CCT
Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro

193 GGA AAA GGT CTT GAG TGG ATT GSA GAA ATT CAT CCA GAT AGC AGT ACG
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr

241 ATT AAC TAT GCG CCG TCT CTA AAG GAT AGA TTT ACA ATA TCG CGA GAC
Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

289 AAC GCC AAG AAC ACA TTG TTC CTG CAA ATG GAC AGC CTG AGA CCC GAA
Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu

337 GAC ACC GGG GTC TAT TTT TGT GCA AGC CTT TAC TTC GGC TTC CCC TGG
Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp

385 TTT GCT TAT TGG GGC CAA GGG ACC CCG GTC ACC GTC TCC GGA GGC GGT
Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Gly Gly Gly

433 GGA TCC GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC
Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

481 GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT CAG GAT GTG GGT
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly

529 ACT TCT GTA GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG
Thr Ser Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

577 CTG ATC TAC TGG ACA TCC ACC CGG CAC ACT GGT GTG CCA AGC AGA TTC
Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Val Gly

625 AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu

673 CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAC CAA TAT AGC CTC TAT
Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr

721 CGG TCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA GGT CTC GAG CAC
Arg Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Leu Glu His

769 CAC CAC CAC CAC CAC TGA
His His His His His ---

hMN14-scFv-L5の核酸およびコードされるアミノ酸

【 図 7 】

m734V_hのDNAコード配列および推定アミノ酸配列

1 GAT GTG AAA CTG CTG GAG TCT GGG GGA GGT TTT GTG CAG CCT GGA GGG
D V K L V E S G G G F V Q P G G

49 TCC CTG AAA CTC TCC TGT ATA GCC TCC GGA TTC ACC TTC AGT CAC TAT
S L K L S C I R S G F T P S H Y

97 ACC ATG TCT TGG GTC CGC CAG ACA CCA GAG AAG AGA CTG GAG TGG GTC
T M S W V R Q T P E K R L E W V

145 ACA TAC ATT ACA AAT GGT GGT GTT TCC TCC TAC CAT CCC GAC ACT GTG
T Y I T N G T S S Y H P D T A I Y F C

193 AAG GGC CGA TTC ACC GTC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTA TAC
K G R F T V S R D N A K N T L Y

241 CTG CAA ATG AAC AGT CTG ACG TCT GAG GAC ACG GCC ATC TAC TTT TGT
L Q M N S L T S C I R S A P S L K D R F T I S R D

289 ACA AGA CAT GCT GTC TAC GCC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG ACT CAG
T R H A V Y A F A Y W G Q G T Q

337 GTC ACT GTC TCT TCG
V T V S S

m734V_hのDNAコード配列および推定アミノ酸配列

1 CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA
Q T V V T Q E S A L T T S P G E

49 ACA GTC ACA TTC ACT TGT CGC TCA AGT GCT GGG GCT GTT ACA ACT AGT
T V T F T C R S C I R S A P S L K D R F T I S

97 AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC TCT GGT
N Y A N W V Q E K P D H L F S G

145 CTA ATA GGT GGT ACC ACC AAC CGA GCT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC
L I G G T T C I R S A P S L K D R F T I S

193 TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA
S G S L I G D K A A L T I T G A

241 CAG ACT GAG GAT GAG CCA ATA TAT TTC TGT GTT CTA TGG TAC AGC GAC
Q T E G T C I R S A P S L K D R F T I S

289 CGC TGG GTG TTC GGT GGA GGA GCC AAA CTG ACT
R W V F G G G A K L T

m734V_hおよびV_hの核酸およびコードされるアミノ酸

【 図 8 A 】

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT
M K Y L L P T A A A G L L L L A

49 GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GAG GTC CAA CTG GTG GAG AGC GGT GGA
A Q P A M A M E V Q L V E S G G

97 GGT GTT GTG CAA CCT GGC CGG TCC CTG CGC CTG TCC TGC TCC GCA TCT
G V V Q P G R S L R C T C S C A S

145 GGC TTC GAT TTC ACC ACA TAT TGG ATG AGT TGG GTG AGA CAG GCA CCT
G F D F T P Y W M S W V R Q A P

193 GGA AAA GGT CTT GAG TGG ATT GGA GAA ATT CAT CCA GAT AGC AGT ACG
G K G L E W I G E I H P G A T S T

241 ATT AAC TAT GCG CCG TCT CTA AAG GAT AGA TTT ACA ATA TCG CGA GAC
I N Y A P S L K D R F T I S R D

289 AAC GCC AAG AAC ACA TTG TTC CTG CAA ATG GAC ACT GCA ACC GAA
N A K N T L F L Q M D S L R P E

337 GAC ACC GGG GTC TAT TTT TGT GCA AGC CTT TAC TTC GGC TTC CCC TGG
D T G V Y F C A S L Y F G F P W

385 TTT GCT TAT TGG GGC CAA GGG ACC CCG GTC ACC GTC TCC GGA GGC GGT
F A Y W G Q G T P V T V S G G G

433 GGA TCT GGC GGC GGT GGA TCT GGT GGA GGC GGC AGT GAT GTG AAA CTG
G S G G G G S G G G S D V K L

481 GTG GAG TCT GGG GGA GGT TTT GTG CAG CTT GGA GGG TCC CTG AAA CTC
V E S G G G F V Q P G G S L K L

529 TCC TGT ATA GCC TCC GGA TTC ACC TTC AGT CAC TAT ACC ATC TCT TGG
S C I A S G F T F S H Y T M S W

577 GTC CGC CAG ACA CCA GAG AAG AGA CTG GAG TGG GTC ACA TAC ATT ACA
V R Q T P E K R L E W V T Y I T

625 AAT GGT GGT GTT TCC TCC TAC CAT CCC GAC ACT GTC ARG GGC CGA TTC
N G G V S S Y H P D T V K G R F

673 ACC GTC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTA TAC CTG CAA ATG AAC
T V S R D N A K N T L Y L Q M N

721 AGT CTG ACG TCT GAG GAC ACG GCC ATT TAC TTT TGT ACA AGA CAT GCT
S L T S E D T A I Y F C T R H A

769 GTC TAC GCC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG ACT CAG GTC ACT GTC TCT
V Y A F A Y W G Q G T V T V S

TS1のV_h鎖のDNAコード配列および推定アミノ酸配列

【 図 8 B 】

817 TCG GGT GGC GGA GGT TCA GGC GGA GGC GGT FCC GGC GGT GGC GGA TCC
 S G G G G G S S G G G G S G G G G G S

865 GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCA GGG GGA GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG
 E V Q L V E S S G D L V K P G G

913 TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT ATT TAC
 S L K L S C A A S G F T F S I Y

961 ACC ATG TCT TGG CTT CGC CAG ACT CCG GAA AAG AGG CTG GAG TGG GTC
 T M S W L R Q T P E K R L E W V

1009 GCA ACC CTG AGT GGT GAT GAC ATC TAC TAT CCA GAC AGT GTG
 A T L S G D G D D I Y Y P D S V

1057 AAG GGT CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC AAC CTA TAT
 K G R F T I S R D N A K N N L Y

1105 CTG CAA ATG AAC AGT ACT AGG TCT GCG GAC AGC GCC TTG TAT TAC TGT
 L Q M N S L R S A D T A L Y Y C

1153 GCA AGG GTG CGA CTT GGG GAC TGG GAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG
 A R V R L G D W D F D V W G Q G

1201 ACC ACG GTC TCC GTC TCC TCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC
 T T V S V S S L E H H H H H H H

TS1のV-鎖のDNAコード配列および推定アミノ酸配列

【 図 9 A 】

1 ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC GCT GCT
 M K Y L L P T A A A G L L L L L A

49 GCC CAG CCG CGC ATG GCC ATG GAC ATT GTG ATG TCA CAA TCT CCA TCC
 A Q P A M A M D I V M S Q S P S

97 TCC CTG GCT GTG TCA CCA GGA GAG AAG GTC ACT ATG ACC TGC AAA TCC
 S L A V S P G E K V T M T C K S

145 AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC TTG GGT TGG
 S Q S L F N S R T R K N Y L G W

193 TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTT CTG ATC TAC TGG GCA
 Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A

241 TCT ACT CCG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT
 S T R E S G V P D R F T G S G S

289 GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AAC AGT GTG CAG TCT GAA GAC CTG
 G T D F T L T I N S V Q S E D L

337 GCA GTT TAT TAC TGC ACT CAA GTT TAT TAT CTG TGC ACG TTC GGT GCT
 A V Y Y C T Q V Y Y L C T F G A

385 GGG ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GGA GGT GGC GGA TCC GGC GGC GGT
 G T K L E L K R G G G G S G G G

433 GGA AGC GGA GGT GGC GGT TCC CAG ACT GTG GTG ACT CAG GAA TCT GCA
 G S G G G G S Q T V V T Q E S A

481 CTC ACC ACA TCA CCT GGT GAA ACA GTC ACA TTC ACT TGT CGC TCA AGT
 L T T S P G E T V T F T C R S S

529 GCT GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA GAA AAA
 A G A V T T S N Y A N W V Q E K

577 CCA GAT CAT TTA TTC TCT GGT CTA ATA GGT GGT ACC ACC AAC CGA GCT
 P D H L F S G L I G G T T N R A

625 CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT
 P G V P A R F S G S L I G D K A

673 GCC CTC ACC ATC ACA GGG GCA CAG ACT CAG GAT GAG GCA ATA TAT TTC
 A L T I T G A Q T E D E A I Y F

721 TGT GTT CTA TGG TAC AGC GAC CGC TGG GTG TTC GGT GGA GGA GCC AAA
 C V L W Y S D R W V F G G G A K

TS1のV-鎖のDNAコード配列および推定アミノ酸配列

【 図 9 B 】

769 CTG ACT GTC CTA GGC GGT GGA GGC GGC AGC GGA GGC GGT GGT TCT GGC
 L T V L G G G G S G G G G S G

817 GGA GGT GGA TCC GAC ATC CAG CTG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC
 G G G S D I Q L T Q S P S S L S

865 GCC AGC GTG GGT CAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AAG GCC AGT CAG GAT
 A S V G D R V T I T C K A S Q D

913 GTG GGT ACT TCT GTA GCT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA
 V G T S V A W Y Q Q K P G K A P

961 AAG CTG CTG ATC TAC TGG ACA TCC ACC CCG CAC ACT GGT GTG CCA AGC
 K L L I Y W T S T R H T G V P S

1009 AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC
 R F S G S G S G T D F T F T I S

1057 AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCC ACC TAC TAC TGC CAG CAA TAT AGC
 S L Q P E D I A T Y Y C Q Q Y S

1105 CTC TAT CGG TCG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT CTC
 L Y R S F G Q G T K V E I K R L

1153 GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC
 E H H H H H H H

TS1のV-鎖のDNAコード配列および推定アミノ酸配列

【配列表】

2005514030000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/38985
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12N 15/85, 5/12, 15/63; A61K 39/395; C07K 16/00		
US CL : 530/387.3, 388.1, 388.85, 391.7; 435/320.1, 325; 424/133.1, 135.1, 156.1		
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) U.S. : 530/387.3, 388.1, 388.85, 391.7; 435/320.1, 325; 424/133.1, 135.1, 156.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,837,242 A (HOLLIGER et al.) 17 November 1998 (17.11.1998), see entire document, especially figure 1, column 8, 16, 22, 23, 26.	1-7, 18, 35-47
Y	US 6,121,424 A (WHITLOW et al.) 19 September 2000 (19.09.2000), see entire document, especially Figure 4B, 6A, 6B.	1-7, 18, 35-47
Y	US 6,096,289 A (GOLDENBERG) 01 August 2000 (01.08.2000), see entire document, especially column 15, lines 25-35, column 16, 18, 19, 22.	1-7, 18, 35-47
Y	PLUCKTHUN et al. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. Immunotechnology. 1997, Vol.3, pages 83-105, especially Figure 3.	1-7, 18, 35-47
Y	US 5,693,762 A (QUEEN et al.) 02 December 1997 (02.12.1997), see entire document, especially abstract.	6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"c"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 11 September 2003 (11.09.2003)		Date of mailing of the international search report 14 OCT 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Larry R. Helms Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/38985

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.: 8-17, 19-34 and 48-52
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 8-17, 19-34, 48-52 were not searched because the claims recite SEQ ID in figures but there is no correspondence between the SEQ ID Nos and the figures.

3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/38985

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
CAPLUS, WEST, MEDLINE CANCERLIT BIOSIS USPATFUL
SEARCH TERMS: inventor name, scfv, diabody, tumor, triabody, CEA, label, MRI, hMN-14

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 7
A 6 1 K 47/42	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 49/00	C
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 49/04	A
A 6 1 K 49/04	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 37/24	

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

(74) 代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74) 代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74) 代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(72) 発明者 エドムンド、ロッシー

アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、ブレインズ、アメリカン、ロード、300、ケアオブ、イミュノメディクス、インコーポレイテッド

(72) 発明者 チェーン シン、ケン、チャン

アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、ブレインズ、アメリカン、ロード、300、ケアオブ、イミュノメディクス、インコーポレイテッド

(72) 発明者 デイビッド、ゴールデンバーグ

アメリカ合衆国ニュージャージー州、メンドハム、プレザント、バリー、ロード、330

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA02 CA10 DA06 HA17

4B065 AA26X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44

4C076 AA95 CC04 CC07 CC11 CC27 CC29 CC30 CC31 CC41 EE41

EE59 FF68

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA44 CA53 DA01 DB01 DB52

NA05 ZA36 ZB08 ZB11 ZB26 ZB31

4C085 AA14 AA25 AA26 BB01 BB02 BB07 BB11 BB17 BB24 CC02

CC07 CC08 CC21 CC31 DD23 DD62 DD63 EE01 EE05 HH05

HH07 HH09 KA03 KA04 KA05 KA08 KA11 KA28 KA29 KA36

	KB02	KB07	KB09	KB10	KB11	KB12	KB15	KB18	KB82	KB92
	KB95	LL01	LL03	LL07	LL15	LL18				
4C087	AA01	AA02	BB65	BC83	CA12	NA05	ZA36	ZB08	ZB11	ZB26
	ZB31									
4H045	AA11	CA40	DA76	EA20	EA50	FA74				