

(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2005-508628

(P2005-508628A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 0 7 K 16/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

F I

C 1 2 N 15/00

C 0 7 K 16/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 5

4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-528863 (P2003-528863)

(86) (22) 出願日 平成14年9月13日 (2002.9.13)

(85) 翻訳文提出日 平成16年3月12日 (2004.3.12)

(86) 国際出願番号 PCT/EP2002/010307

(87) 国際公開番号 W02003/025018

(87) 国際公開日 平成15年3月27日 (2003.3.27)

(31) 優先権主張番号 01122104.1

(32) 優先日 平成13年9月14日 (2001.9.14)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 504099171

アフィメート テラポイティクス アーゲー

ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク 69
120 イム ノイエンハイマー フェルト
582, テヒノロジーパーク

(74) 代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(72) 発明者 ル ガル, ファブリセ

ドイツ連邦共和国 エディンゲン-ネッカー
ールハウゼン 68535 ハウプツシュ
トラーセ 118

(72) 発明者 キブリヤノフ, セルゲイ

ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク 69
126 ライブルヴェーク 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原結合ダイマーおよびマルチマー構造

(57) 【要約】

本発明は、抗原結合ダイマーおよびマルチマー構造、該構造をコードする発現ベクター、該構造の診断および治療での使用に関する。この抗原結合構造は、好ましくは、Fv抗体構築物の形態である。

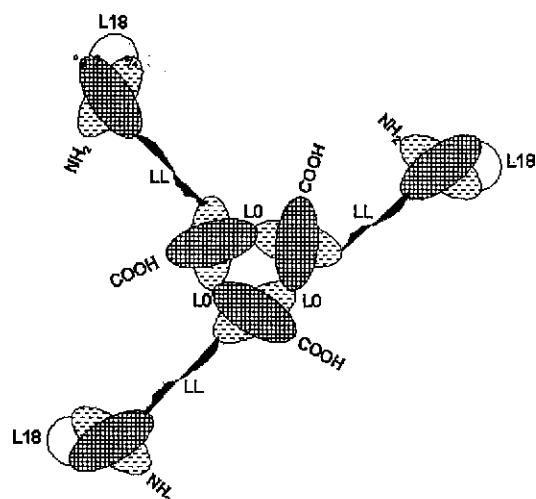


FIGURE 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

4つの抗体可変ドメインを含有する単鎖分子を含有してなるダイマーまたはマルチマー構造であって、

(a) 該4つの可変ドメインの最初の2つまたは最後の2つのいずれか一方が、 V_H/V_L または V_L/V_H の向きに抗原結合scFvを形成することにより同じ鎖内で互いに分子内結合している、および

(b) 他方の2つのドメインが、別の鎖の対応する V_H または V_L ドメインと分子間結合して抗原結合 V_H/V_L 対を形成している、
ダイマーまたはマルチマー構造。

10

【請求項 2】

以下の特徴：

(a) マルチマーFv-抗体のモノマーが少なくとも4つの可変ドメインを含有し、このうち、1つのモノマーの2つの隣接するドメインが抗原結合 V_H-V_L または V_L-V_H scFv単位を形成し、これらの2つの可変ドメインは、scFvの分子内形成を妨げない、少なくとも5個のアミノ酸残基のペプチドリンカーにより連結されている、

(b) 該モノマーの少なくとも2つの可変ドメインが別のモノマーの2つの可変ドメインと非共有結合により結合されており、これにより、少なくとも2つのさらなる抗原結合部位の形成がもたらされてマルチマー化モチーフが形成され、各モノマーのこれらの2つの可変ドメインは最大12のペプチドリンカーにより連結されている、
を有する、マルチマーFv-抗体の形態の請求項1記載のマルチマー構造。

20

【請求項 3】

さらなる特徴は、1つのモノマーの2つの隣接するドメインにより形成された抗原結合 V_H-V_L または V_L-V_H scFv単位が、マルチマー化モチーフの他方の可変ドメインに、少なくとも5個のアミノ酸残基のペプチドリンカーにより連結されていることである、請求項2記載のマルチマーFv-抗体。

【請求項 4】

該モノマーが4つの可変ドメインを含有し、ここで、該モノマーの第3および第4可変ドメインが12個以下のアミノ酸残基のペプチドリンカーにより連結されている、請求項2または3記載のマルチマー構造。

30

【請求項 5】

該モノマーが4つの可変ドメインを含有し、ここで、該モノマーの第1および第2可変ドメインが12個以下のアミノ酸残基のペプチドリンカーにより連結されている、請求項2または3記載のマルチマー構造。

【請求項 6】

該モノマーの第1および第2ドメインまたは第3および第4ドメインのいずれか一方が介在アミノ酸残基なしで直接連結されている、請求項4または5記載のマルチマー構造。

【請求項 7】

該モノマーの第2および第3可変ドメインが、少なくとも5個のアミノ酸残基からなるペプチドリンカーにより連結されている、請求項2～6いずれか記載のマルチマー構造。

40

【請求項 8】

該モノマーのいずれかの可変ドメインが、Nおよび/またはC末端において少なくとも1つのアミノ酸残基だけ短縮されている、請求項1～7いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項 9】

モノマーのドメインの順序が、 $V_H-V_L-V_H-V_L$ 、 $V_L-V_H-V_H-V_L$ 、 $V_H-V_L-V_L-V_H$ または $V_L-V_H-V_L-V_H$ である、請求項1～7いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 10】

少なくとも1つの可変ドメイン対の非共有結合が、少なくとも1つのジスルフィド結合により強化されている、請求項1～9いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 11】

50

四価ダイマー、六価トリマーまたは八価テトラマーである、請求項 1 ~ 10 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 12】

二重特異性または三重特異性または四重特異性抗体である、請求項 1 ~ 11 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 13】

少なくとも 1 つのモノマーが生物学的に活性な物質、化学薬品、ペプチド、タンパク質または薬物に結合されている、請求項 1 ~ 12 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 14】

B リンパ球の CD19 抗原または CEA 抗原に特異的に結合することができる単一特異性抗体である、請求項 1 ~ 11 いずれかまたは 13 記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 15】

(a) CD19 および T 細胞受容体の CD3 複合体；
(b) CD19 および T 細胞受容体の CD5 複合体；
(c) CD19 および T リンパ球上の CD28 抗原；
(d) CD19 ならびにナチュラルキラー細胞、マクロファージおよび活性化された単球上の CD16；

(e) CEA および CD3；

(f) CEA および CD28；または

(g) CEA および CD16

に特異的に結合することができる二重特異性抗体である、請求項 1 ~ 13 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造。

【請求項 16】

(a) ペプチドリinker をコードする DNA 配列を、可変ドメインをコードする DNA 配列と、該ペプチドリinker が可変ドメインを連結して多価マルチマー構造のモノマーをコードする DNA 配列の形成がもたらされるようにライゲートし、(b) 種々のモノマーをコードする DNA 配列を適当な発現系において発現させる、請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造の調製方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造をコードする DNA 配列。

【請求項 18】

請求項 17 記載の DNA 配列を含有する発現ベクター。

【請求項 19】

pSKK2-scFv_{L18} 抗 CD3-LL-scFv_{L10} 抗 CD19 (pSKK2-scFv3LLDb19) (DSM 14470) または pSKK2-scFv_{L18} 抗 CD19-LL-scFv_{L10} 抗 CD3 (pSKK2-scFv19LLDb3) (DSM 14471) である、請求項 18 記載の発現ベクター。

【請求項 20】

請求項 18 または 19 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造、請求項 17 記載の DNA 配列または請求項 18 もしくは 19 記載の発現ベクターを含有する医薬組成物。

【請求項 22】

診断のための請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造の使用。

【請求項 23】

(a) ウイルス、細菌、腫瘍もしくはプリオン関連疾患の治療、(b) 赤血球の凝集、(c) 免疫系の細胞障害性細胞の腫瘍細胞への結合、または (d) 活性なサイトカイン、細胞障害性物質もしくはプロテアーゼの標的細胞への結合のための医薬組成物の調製のための請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造、請求項 17 記載の DNA 配列または請求項 18 もしくは 19 記載の発現ベクターの使用。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造を含有する診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、抗原結合ダイマーおよびマルチマー構造、該構造をコードする発現ベクター、該構造の診断および治療での使用に関する。この抗原結合構造は、好ましくは、Fv抗体構築物の形態である。

【0002】

天然の抗体はそれ自身がダイマーであり、したがって二価である。異なる抗体を産生する2つのハイブリドーマ細胞を人工的に融合させると、該ハイブリッドハイブリドーマにより産生される抗体のいくつかは、異なる特異性を有する2つのモノマーから構成される。かかる二重特異性抗体は、2つの抗体を化学的にコンジュゲートさせることによって産生され得る。天然の抗体およびその二重特異性誘導体は、比較的大きく、産生させるのに高価である。また、マウス抗体の定常ドメインはヒト抗マウス(HAMA)応答の主な原因であり、治療剤としての広範な使用を妨げる。これらはまた、そのFc受容体の結合による所望されない効果を生じる。これらの理由のため、分子免疫学者らは、微生物において、よりずっと小さいFab-およびFv-断片の産生に焦点をあてている。これらの小断片は産生がずっと容易であるだけでなく、より免疫原性が低く、エフェクター機能をもたず、比較的大きさが小さいために組織および腫瘍をより良好に透過し得る。Fab断片の場合、可変ドメインに隣接する定常ドメインは、重鎖および軽鎖ダイマーの安定化において主要な役割をはたす。

【0003】

Fv断片は、より安定性が低く、したがって、安定性を増大させるため、ペプチドリンカーが重鎖および軽鎖可変ドメイン間に導入された。この構築物は、単鎖Fv(scFv)断片として知られている。さらなる安定性のため、2つのドメイン間にジスルフィド結合が時々導入される。これまでに、四価のscFv系抗体が、テトラマーを形成するストレプトアビジンモノマーなどのさらなる重合ドメインへの融合、および両親媒性 α ヘリックスへの融合により作製された。しかしながら、これらのさらなるドメインは、該四価分子の免疫原性を増加させ得る。

【0004】

二価および二重特異性抗体は、抗体可変ドメインのみを用いて構築され得る。かなり効率的で比較的簡単な方法は、 V_H および V_L ドメイン間に、該ドメインがフォールディングし得ず、互いに結合し得ないような短いリンカー配列を作製することである。リンカーの長さを3~12残基に短縮することは、scFv分子のモノマーコンフィギュレーションを抑制し、60kDaの非共有結合性scFvダイマー「二量体(diabody)」の形成を伴う分子間 V_H - V_L 対合に有利である(Holligerら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448)。二量体形式は、組換え二重特異性抗体の作製にも使用され得、組換え二重特異性抗体は、ある1つの抗体由来の V_H ドメインが別の抗体の V_L ドメインと短いリンカーにより連結されてなる、2つの単鎖融合産物の非共有結合性会合により得られる。リンカーの長さをさらにさらに3残基未満に短縮すると、トリマー(「三量体(triabody)」、約90kDa)またはテトラマー(「四量体(tetrabody)」、約120kDa)(LeGallら, 1999, FEBS Letters 453, 164-168)の形成がもたらされ得る。しかしながら、小さなサイズの二重特異性二量体(50~60kDa)は、腎臓による血流からの迅速なクリアランスをもたらし、したがって、治療のためには比較的高用量の適用が必要とされる。さらに、二重特異性二量体は、各特異性に対して結合ドメインを1つしかもたない。しかしながら、二価結合は、機能性アフィニティを増

10

20

30

40

50

大させ、おそらく、高密度にクラスター化した抗原を保有する特定の細胞型に対する選択性を増大させる重要な手段である。

【0005】

したがって、本発明の基礎をなす技術的課題は、従来技術のFv-抗体の不都合点を解決する、新規な抗体結合性ダイマーおよびマルチマー構造を提供すること、および単一特異的または多重特異的である、少なくとも4つの結合性ドメインを有する構造を形成するための一般的な方法を提供することである。

【0006】

該技術的課題の解決は、特許請求の範囲において特徴付けられる態様を提供することにより達成され得る。

10

【0007】

本発明は、分子のN末端またはC末端部分に位置するscFv-ダイマー、-トリマーおよび-テトラマーを、マルチマーFv-分子の構築のための多量体化モチーフとして使用し得るという観察に基づくものである。したがって、本発明は、単一特異的または多重特異的である、少なくとも4つの結合性ドメインを有するマルチマーFv分子を形成するための一般的な方法を提供する。本発明のFv分子の各モノマーは、 V_H/V_L 抗原結合単位、および他のモノマーの可変ドメイン（多量体化モチーフ）に非共有結合により結合した後、 V_H/V_L 抗原結合単位を形成する2つの抗体の可変ドメインを特徴とする。ダイマー、トリマーまたはテトラマーは、可変ドメイン、および多量体化モチーフを含有する可変ドメイン間のペプチドリinkerの長さに応じて形成される（図1、2、3、14、21を参照）。

20

【0008】

好ましくはマルチマーFv-抗体の形態である、本発明の抗原結合ダイマーまたはマルチマー構造は、非常に安定であり、かつより高い結合能力を有することが期待される。また、これまでに使用されたダイマー二量体は、小さく、腎臓により血流からかなり急速に除去されるため、本発明の構造は、治療目的に特に有用であるべきである。さらに、本発明のマルチマーFv-抗体の単鎖形式は、細菌内のみでなく、真核微生物内において作製可能となる。

【0009】

したがって、本発明は、4つの抗体可変ドメインを含有する単鎖分子を含有してなるダイマーまたはマルチマー構造であって、

30

(a) 該4つの可変ドメインの最初の2つ、または最後の2つの一方が、 V_H/V_L または V_L/V_H の向きに抗体結合性scFvを形成することにより同じ鎖内で互いに分子内結合している、および

(b) 他方の2つのドメインが、別の鎖の対応する V_H または V_L ドメインと分子間結合して抗体結合性 V_H/V_L 対を形成している、

ダイマーまたはマルチマー構造に関する。

【0010】

特に好ましい態様において、本発明は、以下の特徴：

(a) 該Fv-抗体のモノマーが少なくとも4つの可変ドメインを含有し、このうち、1つのモノマーの2つの隣接するドメインが抗原結合 V_H-V_L または V_L-V_H scFv単位を形成し；これらの2つの可変ドメインは、scFvの分子内形成を妨げない、少なくとも5個のアミノ酸残基の、好ましくは少なくとも6、7、8、9、10、11または12個のアミノ酸のペプチドリinkerにより連結されている、

40

(b) 該モノマーの少なくとも2つの可変ドメインが別のモノマーの2つの可変ドメインと非共有結合により結合されており、これが、少なくとも2つのさらなる抗原結合部位の形成をもたらす、マルチマー化モチーフを形成しており；各モノマーのこれらの2つの可変ドメインは最大12、好ましくは最大10個のアミノ酸残基のペプチドリinkerにより連結されている、

を特徴とする、マルチマーFv-抗体に関する。

【0011】

50

さらに好ましい特徴は、1つのモノマーの2つの隣接するドメインにより形成される抗原結合 V_H - V_L または V_L - V_H scFv単位が、多量体化モチーフの他方の可変ドメインと、少なくとも5個のアミノ酸残基の、好ましくは少なくとも6、7、8、9、10、11または12個のアミノ酸のペプチドリinkerにより連結しているということである。

【0012】

用語「Fv-抗体」は、可変ドメインを含有するが、定常ドメインは含有しない抗体に関する。

【0013】

用語「ペプチドリinker」は、2つの可変ドメインを連結させることができ、その長さが連結する可変ドメインの種類に依存する任意のペプチドに関する。ペプチドリinkerは、任意のアミノ酸残基を含み得、第2および第3可変ドメインを連結するペプチドリinkerとしては、アミノ酸残基グリシン、セリンおよびプロリンが好ましい。

【0014】

用語「分子内」は、機能的抗原結合部位の形成を伴う、同じペプチド鎖（モノマー）に属する V_H および V_L ドメイン間の相互作用を意味する。

【0015】

用語「分子間」は、異なるモノマーに属する V_H および V_L ドメイン間の相互作用を意味する。

【0016】

本発明の抗原結合ダイマーまたはマルチマー構築物、例えば、マルチマーFv-抗体は、標準的な方法に従って調製され得る。好ましくは、該Fv-抗体は、以下の実施例に記載するように、ペプチドリinkerをコードするDNA配列を、可変ドメインをコードするDNA配列と、該ペプチドリinkerが可変ドメインを連結してマルチマーFv-抗体のモノマーをコードするDNA配列の形成がもたらされるようにライゲートし、種々のモノマーをコードするDNA配列を適当な発現系において発現させることにより調製される。

【0017】

本発明の抗原結合構造、特にFv-抗体は、当該技術分野において公知の慣用技術、例えば、アミノ酸欠失、挿入、置換、付加および/または組換えおよび/または当該技術分野において公知の他の修飾のいずれかを単独で、または組み合わせて用いることにより、さらに修飾し得る。可変ドメインまたはペプチドリinkerのアミノ酸配列の下地となるDNA配列内にかかる修飾を導入するための方法は当業者に周知であり、例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.を参照のこと。

【0018】

本発明の抗原結合構造は、少なくとも1つのさらなるタンパク質ドメインを含有し得、該タンパク質ドメインは、共有結合または非共有結合により連結されている。連結は、当該技術分野において公知の、および上記の方法に従う遺伝子融合に基づき得、例えば、WO 94/04686などに記載のような化学架橋により行なわれ得る。本発明にしたがって使用される構造を含有する融合タンパク質内に存在するさらなるドメインは、好ましくは、フレキシブルリンカー、有利にはペプチドリinkerにより連結され得、ここで、ペプチドリinkerは、該さらなるタンパク質ドメインのC末端とFv-抗体のN末端（またはその逆）との間隔にまたがるのに十分な長さの複数の親水性ペプチド結合アミノ酸を含有する。上述の融合タンパク質は、プロテイナーゼのための切断可能なリンカーまたは切断可能な部位をさらに含有し得る。また、融合タンパク質は、ヒスチジン-タグ、例えば(His)₆などのタグを含有し得る。

【0019】

本発明の好ましい態様において、抗原結合構造のモノマーは、4つの可変ドメインを含有し、該モノマーの第1および第2または第3および第4可変ドメインのいずれかが、12、11、10個またはそれ未満のアミノ酸残基、好ましくは5個未満のアミノ酸残基のペプチドリinkerにより連結されている。さらにより好ましい態様において、第1および第2ま

10

20

30

40

50

たは第3および第4ドメインのいずれかは、介在アミノ酸残基なしで直接連結されている。

【0020】

本発明の別の好ましい態様において、該モノマーの第2および第3可変ドメインが、少なくとも5個、好ましくは少なくとも6、7、8、9、10、11または12個のアミノ酸残基からなるペプチドリinkerにより連結されている。好ましくは、アミノ酸残基の最大数は30である。

【0021】

本発明の別の好ましい態様において、いずれかの可変ドメインは、N末端および/またはC末端で少なくとも1つのアミノ酸残基だけ短縮されている。ある状況において、この短縮型形態は、独国特許出願100 63 048.0に記載のように、より良好な安定性の分子を与える。

【0022】

本発明の特に好ましい態様において、モノマーのドメインの順序は、 $V_H-V_L-V_H-V_L$ 、 $V_L-V_H-V_H-V_L$ 、 $V_H-V_L-V_L-V_H$ または $V_L-V_H-V_L-V_H$ である。

【0023】

ある場合において、2つの可変ドメインの会合を強化することが望ましいことがある。したがって、本発明のマルチマーFv-抗体のさらに好ましい態様において、可変ドメインの少なくとも1つの対の結合は、少なくとも1つの分子間ジスルフィド結合により強化されている。これは、可変ドメインをコードするDNA配列を相応に修飾することにより、すなわち、システインコドンを導入することにより達成され得る。ジスルフィド結合を導入するための2つの最も有望な部位は、重鎖のフレームワーク2を軽鎖のフレームワーク4に連結する V_H44-V_L100 および重鎖のフレームワーク4を軽鎖のフレームワーク2に連結する V_H105-V_L43 のようであった。

【0024】

本発明のさらに好ましい態様において、マルチマーFv-抗体は、四価ダイマー、六価トリマーまたは八価テトラマーである。かかる形態の形成は、好ましくは、多量体化モチーフを含有する特定の V_H および V_L ドメインにより、およびリンカーの長さにより決定される。

【0025】

本発明の別の好ましい態様において、マルチマーFv-抗体は、二重特異性、三重特異性、四重特異性・・・などの抗体である。

【0026】

モノマーサブユニットの多量体化は、第4可変ドメインのC末端における二量体化モチーフの存在により促進され得、これは、好ましくは、ペプチド結合により直接連結された(ポリ)ペプチドである。かかる二量体化モチーフの例は当業者に公知であり、ストレプトアビジン、両親媒性 α ヘリックスが挙げられる。したがって、さらに好ましい態様において、二量体化モチーフは、本発明のマルチマーFv-抗体の少なくとも2つのモノマーの最後のドメインに融合される。

【0027】

特定の治療用途には、本発明のマルチマー抗体の少なくとも1つのモノマーを、非共有結合または共有結合より、生物学的に活性な物質(例えば、サイトカインまたは成長ホルモン)、化学薬品(例えば、ドキソルビシン、シクロスポリン)、ペプチド(例えば、 α -アマニチン)、タンパク質(例えば、グランザイムAおよびB)と結合させ得る。

【0028】

さらに好ましい態様において、本発明のマルチマーFv-抗体は、(I)Bリンパ球のCD19抗原または癌胎児抗原(CEA)に特異的に結合することができる単一特異性抗体;または(II)(a)CD19およびT細胞受容体のCD3複合体;(b)CD19およびT細胞受容体のCD5複合体;(c)CD19およびTリンパ球のCD28抗原;(d)CD19ならびにナチュラルキラー細胞、マクロファージおよび活性化された単球上のCD16;(e)CEAおよびCD3;(

10

20

30

40

50

f) CEAおよびCD28;または(g) CEAおよびCD16に特異的に結合することができる二重特異性抗体である。可変ドメインのヌクレオチド配列は、すでに得られており、抗体抗CD19 (Kipriyanovら, 1996, J. Immunol. Methods 200, 51-62)、抗CD3 (Kipriyanovら, 1997, Protein Engineer. 10, 445-453)、抗CD28 (Takemuraら, 2000, EFBS Lett. 476, 266-271)、抗CD16(独国特許出願DE 199 37 264 A1)、抗CEA (Griffithsら, 1993, EMBO J. 12, 725-734)および抗CD5(Betterら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 457-461)の場合について記載されている。

【0029】

驚いたことに、特異性抗CD3および抗CD19を有する請求項1記載の四価構造は、対応する二価(scFv)x2構造、および4つのドメインすべてが別の鎖の対応するドメインと対を形成した四価構造よりもインビトロでずっと高い有効性を示した。 10

【0030】

本発明の別の目的は、(a)ペプチドリinkerをコードするDNA配列を、可変ドメインをコードするDNA配列と、該ペプチドリinkerが可変ドメインを連結してマルチマーFv-抗体のモノマーをコードするDNA配列の形成がもたらされるようにライゲートし、(b)種々のモノマーをコードするDNA配列を適当な発現系において発現させる、本発明のマルチマーFv-抗体の調製方法である。この方法の種々の工程は、標準的な方法、例えば、Sambrookら,に記載の、または以下の実施例に記載の方法により行なわれ得る。

【0031】

本発明はまた、本発明のマルチマーFv-抗体をコードするDNA配列およびベクター、好ましくは該DNA配列を含有する発現ベクターに関する。 20

【0032】

マルチマーFv-抗体をコードする配列を含めるため、および発現させるために種々の発現ベクターおよび/または宿主系を用い得る。これらとしては、組換えバクテリオファージ、プラスミドもしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物;酵母発現ベクターで形質転換された酵母;ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)で感染させた昆虫細胞系;ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiもしくはpBR322プラスミド)で形質転換した植物細胞系;または動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。本発明は使用する宿主細胞により制限されない。 30

【0033】

「対照エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を行なうために、宿主の細胞性タンパク質と相互作用する、ベクター-エンハンサーの非翻訳領域、プロモーター、5'および3'非翻訳領域である。かかるエレメントは、その強度および特異性において異なり得る。使用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導性プロモーターを含む、任意の数の適切な転写および翻訳エレメントを使用し得る。例えば、細菌系においてクローニングする場合、Bluescript.RTM.ファージミド(Stratagene, LaJolla, Calif.)またはpSport1.TM.プラスミド(Gibco BRL)のハイブリッドLacZプロモーターなどの誘導性プロモーターを使用し得る。昆虫細胞においてはバキュロウイルスポリヘドリンプロモーターを使用し得る。植物細胞のゲノム由来(例えば、熱ショックRUBISCO;および保存タンパク質遺伝子)または植物ウイルス由来(例えば、ウイルスプロモーターもしくはリーダー配列)のプロモーターまたはエンハンサーをベクターにクローニングし得る。哺乳動物細胞系において、哺乳動物遺伝子由来または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。マルチマーFv-抗体をコードする配列の多数のコピーを含む細胞株を作製することが必要である場合、SV40またはEBVに基づくベクターを、適切な選択マーカーとともに使用し得る。 40

【0034】

細菌系において、マルチマーFv-抗体について意図される用途に応じていくつかの発現ベクターを選択し得る。本発明での使用に好適なベクターとしては、細菌における発現用のpSKK発現ベクターが挙げられるが、これに限定されない。 50

【0035】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、 α 因子、アルコールオキシダーゼおよび PGH などの構成的または誘導性プロモーターを含有するいくつかのベクターを使用し得る。概説は、Grant ら, (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544 を参照のこと。

【0036】

植物発現ベクターを使用する場合、マルチマー Fv-抗体をコードする配列の発現は、いくつかのプロモーターのいずれかにより誘導され得る。例えば、CaMV の 35S および 19S プロモーターなどのウイルスプロモーターを単独で、または TMV 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用し得る (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311)。あるいはまた、RUBISCO または熱ショックプロモーターの小サブユニットなどの植物プロモーターを使用し得る (Coruzzi, G ら, (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Brogli e, R. ら (1984) *Science* 224:838-843; および Winter, J. ら, (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105)。これらの構築物は、直接 DNA 形質転換または病原体媒介性トランスフェクションにより植物細胞内に導入され得る。かかる技術は、一般的に入手可能な概説のいくつかに記載されている (例えば、McGrawHill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; 第 191 ~ 196 頁の Hobbs, S. または Murry, L. E. 参照のこと)。

【0037】

マルチマー Fv-抗体を発現させるために、昆虫系も使用し得る。例えば、かかる系の 1 つでは、*Spodoptera frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* 幼虫において外来遺伝子を発現させるために、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) をベクターとして使用する。マルチマー Fv-抗体をコードする配列は、ポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非必須領域内にクローニングし得、ポリヘドリンプロモーターの制御下に配置し得る。マルチマー Fv-抗体の良好な挿入は、ポリヘドリン遺伝子を不活性とし、被覆タンパク質を欠く組換えウイルスを生じる。

【0038】

次いで、この組換えウイルスを、APOB が発現され得る、例えば *S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* 幼虫を感染させるために使用し得る (Engelhard, E. K. ら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3224-3227)。

【0039】

哺乳動物宿主細胞においては、いくつかのウイルス系発現系を使用し得る。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、マルチマー Fv-抗体をコードする配列を、後期プロモーターおよび三部分リーダー配列からなるアデノウイルス転写 / 翻訳複合体にライゲートし得る。感染した宿主細胞においてマルチマー Fv-抗体を発現することができる生存可能なウイルスを得るために、ウイルスゲノムの非必須 E1 または E3 領域の挿入を使用し得る (Logan, J. および Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659)。また、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させるため、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーなどの転写エンハンサーを使用し得る。

【0040】

また、プラスミド内に含有され、発現され得るよりも大きな DNA のフラグメントを送達するために、ヒト人工染色体 (HAC) を用い得る。6 ~ 10 Mb の HAC を構築し、治療目的のために従来の送達方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマーまたは小胞) により送達される。

【0041】

また、マルチマー Fv-抗体をコードする配列のより効率的な翻訳を達成するために、特定の開始シグナルを使用し得る。かかるシグナルとしては、ATG 開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。マルチマー Fv-抗体をコードする配列の場合、その開始コドンおよび上流配列を適切な発現ベクターに挿入し、さらなる転写または翻訳制御シグナルは必要とない。しかしながら、コード配列のみが挿入される場合は、ATG 開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを提供すべきである。さらに、開始コドンは、挿入物全体の翻訳を

確実にするため、正しいリーディングフレーム内に挿入されるべきである。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは、天然および合成両方の種々の起源のものであり得る。発現の効率は、文献 (Scharf, D.ら (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162) に記載されているものなどの、使用される具体的な細胞系に適切であるエンハンサーを含めることにより向上され得る。

【0042】

また、宿主細胞株は、その挿入された配列の発現を調節する能力または発現されたタンパク質を所望の様式でプロセッシングする能力で選択され得る。また、タンパク質の「ブレプロ」型を切断する翻訳後プロセッシングは、正しい挿入、フォールディングおよび/または機能を促進するために使用され得る。特定の細胞機構および翻訳後活性のための特徴的な機構を有する異なる宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、HEK293およびW138) は、American Type Culture Collection(ATCC; Bethesda, Md.)から入手可能であり、外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするために選択し得る。

【0043】

長期の高収率での組換えタンパク質の産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、マルチマーFv-抗体を安定的に発現する細胞株を、ウイルスの複製起点および/または内因性発現エレメントならびに選択可能なマーカー遺伝子を同じまたは別個のベクター上を含み得る発現ベクターを用いて形質転換し得る。ベクターの導入後、富化培地内において細胞を1~2日間増殖させた後、選択培地に交換し得る。選択マーカーの目的は、選択のための耐性を付与することであり、その存在により、導入された配列を良好に発現する細胞の成長および回収を可能にする。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞型に適切な組織培養技術を用いて増殖させ得る。

【0044】

形質転換細胞株を回収するため、任意の数の選択系を使用し得る。これらとしては、それぞれ、tk.sup.細胞またはaprt.sup.細胞において使用し得る、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler, M.ら (1977) *Cell* 11:223-32)遺伝子およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy, I.ら (1980) *Cell* 22:817-23)遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また、抗代謝剤、抗生物質または除草剤耐性、例えば、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr(Wigler, M.ら (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70);アミノグリコシドネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与するnpt(Colbere -Garapin, F.ら (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14)ならびに、それぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与するalsおよびpat(Murry, 上記)も選択の根拠として使用し得る。さらなる選択可能な遺伝子、例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用可能にするtrpBまたは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用可能にするhisDが記載されている (Hartman, S. C.およびR. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51)。最近、アントシアニン、βグルクロニダーゼおよびその基質GUSならびにルシフェラーゼおよびその基質ルシフェリンなどの可視マーカーの使用の人气が高まっており、特定のベクター系による形質転換体を同定するためだけでなく、一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために広く使用されている (Rhodes, C.A.ら, (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131)。

【0045】

特定の発現ベクターは、pSKK2-scFv_{L18}抗CD3-LL-scFv_{L10}抗CD19(pSKK2-scFv3LLDb19)(2001年8月22日にDSM 14470でブダペスト条約にしたがってDSMZに寄託)またはpSKK2-scFv_{L18}抗CD19-LL-scFv_{L10}抗CD3(pSKK2-scFv19LLDb3)(2001年8月22日にDSM 14471でブダペスト条約にしたがってDSMZに寄託)である。

【0046】

本発明はまた、好ましくは適切な医薬用担体と組み合わされた、本発明のマルチマーFv-抗体、DNA配列または発現ベクターを含有する医薬組成物に関する。適切な医薬用担体の例は、当該技術分野において周知であり、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油/水エマル

10

20

30

40

50

ジョンなどのエマルジョン、種々のタイプの湿潤剤、滅菌溶液などが挙げられる。かかる担体は、従来法により製剤化され得、適切な投薬量で被験体に投与され得る。適切な組成物の投与は、種々の方法により、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与により行なわれ得る。投与経路は、もちろん、疾患、例えば腫瘍の性質、および医薬組成物に含有される化合物の種類に依存する。投薬計画は、担当医師および他の臨床的因子により決定される。医学分野では周知のように、任意の一患者に対する用量は、患者の体格、体表面積、年齢、性別、投与される具体的な化合物、投与の時間および経路、障害の種類、一般健康状態ならびに同時に投与されている他の薬物を含む多くの因子に依存する。

【0047】

10

本発明の化合物の好ましい薬学的用途は、(a) ウイルス、細菌、腫瘍もしくはプリオン関連疾患の治療、(b) 赤血球の凝集、(c) 免疫系の細胞障害性細胞、例えば、T細胞もしくはナチュラルキラー細胞の腫瘍細胞への結合、または(d) 活性なサイトカイン、好ましくはIL-1、IL-2、IFN γ 、TNF α もしくはGM-CSF、細胞障害性物質(例えば、ドキソルビシン、シクロスポリン、 α -アマニチンもしくはプロテアーゼ、好ましくはグランザイムBの標的細胞への結合である。

【0048】

本発明のさらなる目的は、診断のための本発明のマルチマーFv-抗体の使用である。診断用試験において使用するため、本発明によりキットも提供され、該キットは本発明のマルチマーFv-抗体を含有する。Fv-抗体は検出可能に標識され得る。好ましい態様において、該キットはELISAによる診断を可能にし、公知の技術を用いて固体支持体、例えばポリスチレンマイクロタイターディッシュまたはニトロセルロース紙に結合させたFv-抗体を含有する。あるいはまた、該キットは、RIAに基づくものであり、放射性同位体でマーキングしたFv-抗体を含有する。本発明のキットの好ましい態様では、抗体は、酵素、蛍光性化合物、発光性化合物、強磁性プローブまたは放射性化合物で標識されている。

20

【0049】

本発明を図面に関してさらに説明する。

【0050】

以下の実施例は、本発明を説明する。

【0051】

30

実施例1：細菌におけるマルチマーFv分子の発現のためのプラスミドpSKK2scFvL₁₈抗CD3-LL-scFvL₁₀抗CD19(scFv3-Db19)およびpSKK2 scFvL₁₈抗CD19-LL-scFvL₁₀抗CD3(scFv19-Db3)の構築

マルチマーFv構築物の作製のために、ヒトCD19に特異的なハイブリドーマHD37(Kipriyanovら、1996、J. Immunol. Meth. 196, 51-62; Le Gallら、1999, FEBS Lett., 453, 164-168)またはヒトCD3に特異的なハイブリドーマOKT3(Kipriyanovら、1997, Protein Eng. 10, 445-453)のいずれかに由来する抗体断片をコードするプラスミドpHOG_HD37、pHOG_Dia_HD37、pHOG_mOKT3+NotIおよびpHOG_Dia_mOKT3を使用した。

【0052】

c-mycエピトープおよびヘキサヒスチジンルテールをコードするセグメントに続く抗CD19scFvL₁₀遺伝子をPvuII/XbaIを用いてプラスミドpHOG_Dia_HD37から切断し、PvuII/XbaI線状ベクターpDISC-1LLに再度クローン化した(Kipriyanovら、1999, J. Mol. Biol. 293, 41-56)(図4)。このハイブリッドプラスミドを、NcoI/NotIにより線状し、プラスミドpHOGmOKT3+NotIからNcoI/NotIにより切断したscFvL₁₀をコードする遺伝子を、このプラスミドにライゲートした。得られたプラスミドは、pHOGscFvL₁₈ α CD3-LL-scFvL₁₀ α CD19(scFv3-Db19)である(図4)。

40

【0053】

線状ハイブリッドプラスミドNcoI/NotIをまた、プラスミドpHOGHD37に由来するscFvL₁₈ α CD19をコードする遺伝子のライゲーションに使用した。得られたプラスミドは、pHOG scFvL₁₈ α CD19-LL-scFvL₁₀ α CD19(scFv19 $\times$ Db19)である(図4)。このプラスミドを、Pvu

50

II/XbaIにより線状し、c-mycエピトープおよびヘキサヒスチジンテールをコードするセグメントに続くscFv_{L10}遺伝子を、PvuII/XbaIを用いてプラスミドpHOGDia mOKT3から切断した。得られたプラスミドは、pHOG scFv_{L18} α CD19-LL-scFv_{L10} α CD3(scFv19-Db3)である(図5)。

【0054】

細菌ペリプラズムにおける機能的抗体断片の収率を増加するために、最適化発現ベクター-pSKKを作製した。このベクターを、hok/sokプラスミド無含有細胞自殺系(plasmid-free cell suicidesystem)(Thistedら、1994, EMBO J., 13, 1950-1956)を含有するプラスミドpHKK(Horn, 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol., 46, 524-532)に基づいて構築した。最初に、プライマー5-NDE、5'-GATATACATATGAAATACCTATTGCCTACGGCおよび3-AFL、5'-CGAA TTCTTAAGTTAGCACAGGCCTCTAGAGACACACAGATCTTTAGを用いて、プラスミドpHOG3-19(Kipriyanovら、1998, Int. J. Cancer 77, 763-772)からPCRにより、ハイブリッドscFv V_H3-V_L19をコードする遺伝子を増幅した。得られた921bpのPCR断片をNdeIおよびAflIIIを用いて消化し、NdeI/AflIII線状プラスミドpHKKにクローン化し、ベクターpHKK3-19を作製した。余分のXbaI部位を削除するために、lacI遺伝子(lacレプレッサーをコードする)の3'末端部分を含有するpHKKプラスミドの断片、強い転写ターミネーター_{t_{HP}}および野生型lacプロモーター/オペレーターを、プライマー5-NAR、5'-CACCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCおよび3-NDE、5'-GGTATTTTCATATGTATATCTCTTCTCAGAAATTCGTAATCATGGを用いてPCRにより増幅した。得られた329bpDNA断片を、NarIおよびNdeIで消化し、NarI/NdeI線状プラスミドpHKK3-19にクローン化し、ベクター

pHKK□Xba

を作製した。より高い組換え抗体産生のためにSkp/OmpHペリプラズム因子をコードする遺伝子を導入するために(BothmannおよびPlueckthun, 1988, Nat. Biotechnol., 16, 376-380)、鋳型としてプラスミドpGAH317(HolckおよびKleppe, 1988, Gene, 67, 117-124)を使用してプライマーskp-3、5'-CGAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGTGGTTATTAGCTGCAGGおよびskp-4、5'-CGAATTCTCGAGCATTATTTAACCTGTTTCAGTACGTCGGを用いるPCRにより、skp遺伝子を増幅した。得られた528bpPCR断片をAflIIIおよびXhoIを用いて消化し、発現プラスミドpSKK2を生じるAflIII/XhoI消化プラスミド

pHKK□Xba

にクローン化した。

【0055】

プラスミドpHOG scFv_{L18} α CD3-LL-scFv_{L10} α CD19(scFv3-Db19)およびpHOGscFv_{L18} α CD19-LL-scFv_{L10} α CD3(scFv19-Db3)を、NcoI/XbaIにより切断し、NcoI/XbaI線状プラスミドpSKK2にライゲートした。得られたプラスミドは、pSKK2scFv_{L18} α CD3-LL-scFv_{L10} α CD19およびpSKK2 scFv_{L18} α CD19-LL-scFv_{L10} α CD3である。完全なヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、それぞれ図6および図7に示す。

【0056】

実施例2：細菌におけるマルチマーFv分子の発現および精製

発現プラスミドpSKK2scFv_{L18} α CD3-LL-scFv_{L10} α CD19およびpSKK2 scFv_{L18} α CD19-LL-scFv_{L10} α CD3を用いて形質転換した大腸菌K12株RV308(Maurerら、1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161)を、50 μg/mlアンピシリンおよび100mMグルコースを有する2xYT培地(2xYT_{GA})中で28℃にて一晚増殖させた。2xYT_{GA}における一晚培養物の希釈物(1:50)を、200rpmで振盪しながら28℃にてフラスコ培養物として増殖させた。培養物がOD₆₀₀ = 0.8に達した時、細菌を20℃で10分間の5,000 × gでの遠心分離によりペレット化し、50 μg/mlアンピシリンを含有する同容量の新しいYTBS培地(1Mソルビトールおよび2.5mMグリシンベタインを含有する2xYT; Blacwell & Horgan, 1991, FEBS Letters. 295, 10-12)に再懸濁した。IPTGを最終濃度0.2mMまで添加し、20℃で18~20時間増殖を続けた。4℃にて20分間9,000 × gでの遠心分離により細胞を採取した。可溶性ペリプラズムタンパク質を単離するために、ペレ

ット化細菌を開始容量の5%の氷冷50mMTris-HCl、20%スクロース、1mM EDTA、pH 8.0に再懸濁した。時々攪拌しながら氷上での1時間のインキュベーション後、スフェロプラストを4 にて30分間30,000×gで遠心分離し、可溶性ペリプラスム抽出物を上清とし、スフェロプラスト+不溶性ペリプラスム材料をペレットとして取り出した。ペリプラスム画分を4 で開始緩衝液(50mMTris-HCl、1M NaCl、50mMイミダゾール、pH7.0)に対して透析した。組換え産物を含む透析溶液を、4 にて30分間30,000×gにて遠心分離した。組換え産物を硫酸アンモニウム沈殿により濃縮した(最終濃度は飽和の70%)。タンパク質沈殿物を遠心分離(10,000×g、4 、40分間)により回収し、開始容量の10%の50mMTris-HCl、1M NaCl、pH7.0に溶解した。固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)を、Cu²⁺で荷電し、かつ50mMTris-HCl、1M NaCl、pH7.0(開始緩衝液)で平衡化したキレートセファロース(Pharmacia)の5mlのカラムを用いて4 で行った。試料をカラムに通過させることにより、試料を負荷した。次に、溶出物の吸光度(280nm)が最小になるまで、20カラム容積の開始緩衝液、続いて50mMイミダゾールを含有する開始緩衝液で洗浄した(約30カラム容量)。吸収物質を、50mMTris-HCl、1M NaCl、250mMイミダゾール、pH7.0で溶出した。マルチマーFv分子を含む溶出画分を、scFv3-Db19について図8AおよびscFv19-Db3について図8Bに示されるように、以前記載された(Kipriyanovら、1994、Mol.Immunol. 31, 1047-1058)ように機能する抗c-myc Mab 9E10を用いるウエスタンブロット解析により同定した。

【0057】

陽性画分を回収し、Ultrafree-15遠心分離フィルターデバイス(MilliporeCorporation, Eschborn, Germany)で0.5mlまで濃縮した。

【0058】

PBSI(15mMリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、50mMイミダゾール、pH7.0)中でSuperdex200 HR10/30カラム(Pharmacia)を通すサイズ排除FPLCにより、マルチマーFv分子のさらなる精製を行った。それぞれ、調製用クロマトグラフィーのための試料容積は500μlであり、流速は0.5ml/分であった。高および低分子量ゲル濾過検定用キット(Pharmacia)を用いてカラムを検定した。マルチマーFv分子を含む溶出画分を、以前記載された(Kipriyanovら、1994、Mol.Immunol. 31, 1047-1058)ように機能する抗c-myc Mab 9E10を用いるウエスタンブロット解析により同定し、scFv3-Db19およびscFv19-Db3分子についてそれぞれ図9Aおよび9Bに結果を示す。画分を回収し、氷上に個々に保管した。

【0059】

作製したFv分子を、同じ条件で作製および精製した2つのscFv-scFvタンデム、scFv3-scFv19およびscFv19-scFv3(図10)と比較した。図10は、scFv3×scFv19およびscFv19×scFv3と比較して、scFv3×Db19およびscFv19×Db3に対してより高い分子形態が得られることをはっきりと示している。scFv3-scFv19およびscFv19-scFv3分子の主なピークは分子量約67kDaに相当し、scFv3-Db19およびscFv19-Db3に対しては約232kDaに相当する。分子のC末端におけるダイマー化モチーフの存在は、分子のマルチマー化について陽性効果を有する。

【0060】

実施例3：フローサイトメトリーによるマルチマーFv分子の特徴づけ

ヒトCD3⁺/CD19⁻急性T細胞白血病株ジャーカットおよびCD19⁺/CD3⁻B細胞株JOK-1をフローサイトメトリーに使用した。簡単には、10%FCSおよび0.1%アジ化ナトリウムを補充した50μlのRPMI1640培地(GIBCO BRL, Eggenstein, Germany)(完全培地とも言う)中5×10⁵細胞を、氷上で45分間100μlのマルチマーFv分子調製物と共にインキュベートした。完全培地を用いて洗浄した後、細胞を、氷上で45分間同じ緩衝液中で10μg/mlの抗c-mycMab 9E10(IC Chemikalien, Ismaning, Germany)100mlと共にインキュベートした。第2の洗浄サイクルの後、100μlのFITC標識ヤギ抗マウスIgG(GIBCOBRL)と共に前と同じ条件下で細胞をインキュベートした。次いで、細胞を再び洗浄し、完全培地に1μg/mlのヨウ化プロピジウム(propidiumiodide)(Sigma, Deisenhofen, Germany)を含有する溶液100μlに再懸濁し、死滅細胞を排除した。染色細胞の相対蛍光を、FACScanフローサイトメーター(BecktonDickinson, Mountain View, CA)またはEpics XLフローサイトメーターシステム(Beck

man Coulter, Miami, FL)を用いて測定した。

【 0 0 6 1 】

フローサイトメトリー実験は、全てのマルチマーFv-分子に対してCD3⁺ ジャーカットおよびCD19⁺ JOK-1細胞の両方と特異的な相互作用を示した(図11)。

【 0 0 6 2 】

CD19およびCD3結合親和性について、scFv3×scFv19およびscFv19-scFv3に対してモノマー、ならびにscFv3×Db19およびscFv19×Db3に対してマルチマーに対応する画分を使用することを決定した。

【 0 0 6 3 】

実施例 4：マルチマーFv分子のインビトロ細胞表面保持アッセイ

細胞表面保持アッセイを、保持された抗体断片の検出を抗c-myc MAb9E10、続いてFITC-標識抗マウスIgGを用いて行った他は、37℃で本質的に(Adamsら、1998, Cancer Res. 58, 485-490)に記載のように行なった。マルチマーFv-分子の解離の速度論的解離定数(K_{off})および半減期($t_{1/2}$)を、「GraphPad」Prism(GraphPadSoftware, San Diego, CA)を用いる実験データの1段階指数減衰フィット(one-phase exponential decay fit)から推論した。対照のために、以前記載されたように(Kipriyanovら、1998, Int.J. Cancer 77, 763-777; Cochloviusら、2000, J. Immunol. 165, 888-895)二重特異性二量体CD19×CD3(BsDb19×3)を使用した。実験の結果を図12に示し、表1に要約する。

【 0 0 6 4 】

scFv3-scFv19は、CD19⁺ JOK-1細胞について相対的に短い保持半減期($t_{1/2}$)を有し、BsDb19×3の $t_{1/2}$ よりほぼ2倍少ない(表1)。対照的に、scFv3-Db19は、JOK-1細胞の表面上により長く保持された。scFv19-scFv3について、 $t_{1/2}$ はBsDb19×3の $t_{1/2}$ と同じ範囲である。scFv3-Db19の保持は、他の分子と比較してかなり高く、 $t_{1/2}$ = 65.71分である(表1)。CD3⁺ ジャーカット細胞の表面上の全ての多特異的Fv-分子の半減期は、相対的に短かった。リンカーの長さは、抗原結合にいくつか影響を有するようであった。なぜなら、scFv3-Db19およびscFv19-Db3は、BsDb19×3、scFv3×scFv19およびscFv19-scFv3よりもかなり遅いCD19-陽性細胞からの K_{off} 値を示したからである。

【 0 0 6 5 】

【 表 1 】

組換え二重特異性分子の結合速度論

抗体	k_{off} ($s^{-1}/10^{-3}$)	$t_{1/2}$ (分)	抗体	k_{off} ($s^{-1}/10^{-3}$)	$t_{1/2}$ (分)
A. JOK-1 細胞 (CD3⁺/CD19⁺)			B. JOK-1 細胞 (CD3⁺/CD19⁺)		
BsDb 19x3	0.9945	11.62	BsDb 19x3	0.1512	10.68
scFv3-scFv19	1.814	6.368	scFv19-scFv3	0.05547	8.622
scFv3-Db19	0.6563	17.6	scFv19-Db3	0.01171	65.71
C. ジャーカット細胞 (CD3⁺/CD19⁺)			D. ジャーカット細胞 (CD3⁺/CD19⁺)		
BsDb 19x3	4.268	2.707	BsDb 19x3	4.268	2.707
scFv3-scFv19	2.912	3.967	scFv19-scFv3	6.91	1.672
scFv3-Db19	3.161	3.655	scFv19-Db3	3.4	3.394

【 0 0 6 6 】

実施例 5：組換え多価分子の抗腫瘍活性のインビトロ解析

慢性リンパ性白血病(CLL)を罹患している患者から新しく単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、12ウエルプレート(Invitrogen, Breda, The Netherlands)の個々のウエルの2mlのRPMI培地/10%FCSに 2×10^6 細胞/mlの密度で播種した。組換え抗体scFv3-scFv19およびscFv3-Db19を5μg/mlの濃度で添加した。5日間のインキュベーション後、細胞を採取し、計数し、フローサイトメトリー解析のために抗CD3MAb OKT3(DKFZ, Heidelberg, Germany)、抗CD4 MAb Edu-2(Chemicon, Hofheim, Germany)、抗CD8MAb UCH-T4(Chemicon, Hofheim

10

20

30

40

50

, Germany)および抗CD19 MAb HD37(DKFZ, Heidelberg, Germany)を用いて染色した。10⁴生存細胞を、Beckman-Coulterフローサイトメーターを用いて解析し、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺およびCD19⁺細胞の相対量および絶対量をプロットした。

【0067】

図13に示される結果は、四価scFv3-Db19分子が自己T細胞の活発な増殖およびC19⁺腫瘍細胞の死滅を生じたことを示す。対照的に、二価scFv3-scFv19分子は、ほとんど影響しなかった。

【0068】

実施例6：細菌におけるマルチマーFv-抗体(Db19-SL-scFv3)の発現に対するプラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-SL-scFv_{L18}抗CD3の構築

マルチマーFv構築物の作製のために、ヒトCD19に特異的なハイブリドーマHD37(Kipriyanovら、1996、J. Immunol. Meth. 196, 51-62; Le Gallら、1999, FEBS Lett., 453, 164-168)またはヒトCD3に特異的なハイブリドーマOKT3(Kipriyanovら、1997, Protein Eng. 10, 445-453)のいずれかに由来する抗体断片をコードするプラスミドpHOG_HD37、pHOG_Dia_HD37、pHOG_mOKT3+NotIおよびpHOG_Dia_mOKT3を使用した。

【0069】

V_L-V_Hの向きを有する抗CD19scFv_{L7}をコードする遺伝子を作製するために、鋳型としてプラスミドDNA pHOG_HD37(Kipriyanovら、1996、J. Immunol. Meth. 196, 51-62)およびプライマーVL_Nco、5'-CAGCCGGCCATGGCGGATATCTTGCTCACCCAACTCCAGCおよび3Ck、5'-AGACGGTGCAGCAACAGTACGTTTGATTTCCAGCを用いるPCRにより、V_L-HD37遺伝子を増幅した。得られた371bpPCR断片は、抗CD19 VLドメイン、続いて7アミノ酸Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Serリンカーをコードする。順番に、鋳型としてプラスミドDNA pHOG_HD37(Kipriyanovら、1996、J. Immunol. Meth. 196, 51-62)およびプライマー5_Ck、5'-CGTACTGTTGCTGCACCGTCTCAGGTGCAACTGCAGCAGTCおよびVHNot、5'-GAAGATGGATCCAGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCCを用いるPCRにより、V_L-HD37遺伝子を増幅した。得られた416bpPCR断片は、7アミノ酸Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Serリンカーの前に抗CD19 VHドメインをコードする。プライマーVL_NcoおよびVHNotを用いる371bpおよび416bp DNA断片からのPCRにより、抗CD19 scFv_{L7}に対する全体の遺伝子を合成した。得られた764bpのPCR断片をNcoIおよびNotIを用いて消化し、NcoI/NotI線状プラスミドpDISC2/SL(Kipriyanovら、1999, J. Mol. Biol. 293, 41-56)にクローン化し、したがってプラスミドpDISC-scFv_{L7}抗CD19-SL-scFv_{L10}抗CD3を作製した。

【0070】

細菌ペリプラズム(periplasm)における機能的scFv抗体の収率を増加するために、最適化発現ベクターpSKK3を作製した(図15)。このベクターを、hok/sokプラスミド無含有細胞自殺系(Thistedら、1994, EMBO J. 13, 1960-1968)を含有するプラスミドpHKK(Hornら、1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532)に基づいて構築した。最初に、プライマー5-NDE、5'-GATATACATATGAAATACCTATTGCCTACGGCおよび3-AFL、5'-CGAATTCTTAAGTTAGCAGGCCTCTAGAGACACACAGATCTTTAGを用いて、プラスミドpHOG3-19(Kipriyanovら、1998, Int. J. Cancer 77, 763-772)からPCRにより、ハイブリッドscFv V_H3-V_L19をコードする遺伝子を増幅した。得られた921bpのPCR断片をNdeIおよびAflIIを用いて消化し、NdeI/AflII線状プラスミドpHKKにクローン化し、ベクターpHKK3-19を作製した。余分のXbaI部位を削除するために、IacI遺伝子(lacレプレッサーをコードする)の3'末端部分を含有するpHKKプラスミドの断片、強い転写ターミネーターtHPおよび野生型lacプロモーター/オペレーターを、プライマー5-NAR、5'-CACCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCおよび3-NDE、5'-GGTATTTCATATGTATATCTCCTTCTTCAGAAATTCGTAATCATGGを用いるPCRにより増幅した。得られた329bpDNA断片を、NarIおよびNdeIで消化し、NarI/NdeI線状プラスミドpHKK3-19にクローン化し、ベクターpHKKΔXbaを作製した。より高い組換え抗体産生のためにSkp/OmpHペリプラズム因子をコードする遺伝子を導入するために(BothmannおよびPlueckthun, 1998, Nat. Biotechnol. 16, 376-380)、鋳型としてプラスミドpGAH317(HolckおよびKleppe, 1988, Gene 67, 117-124)を使用してプライマーskp-3、5'-CGAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGTGGTT

10

20

30

40

50

ATTAGCTGCAGGおよびskp-4、5'-CGAATTCTCGAGCATTATTTAACCTGTTTCAGTACGTCGGを用いるPCRにより、skp遺伝子を増幅した。得られた528bpPCR断片をAflIIIおよびXhoIを用いて消化し、AflIII/XhoI消化プラスミド

pHKKXba

にクローン化し、発現プラスミドpSKK2を生じた。

【0071】

潜在的に免疫原性であるc-mycエピトープをコードする配列を除去するために、NcoI/XbaI線状プラスミドpSKK2を、scFvph0x31E(Marksら、1997, BioTechnology 10, 779-783)をコードするNcoI/XbaI-消化902bp PCR断片をクローニングするために使用し、プライマーD P1およびHis-Xba、5'-CAGGCCTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGGGを用いて増幅した。得られたプラスミドpSKK3をNcoIおよびNotIを用いて消化し、抗CD3scFv₁₈をコードする遺伝子をクローニングするためのベクターとして使用し、NcoIおよびNotIを用いたプラスミドpHOG 21_dmOKT3+ NotI(Kipriyanovら、1997, Protein Eng. 10, 445-453)の消化後751bp DNA断片として単離した。得られたプラスミドpSKK3_scFv₁₈抗CD3を、プライマーBi3h、5'-CCG GCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGおよびP-skp、5'-GCTGCCCATGTTGACGATTGCを用いる抗CD3scFv₁₈をコードする遺伝子のPCR増幅のための鋳型として使用した。作製した919bpのPCR断片をPvuIIおよびXbaIを用いて消化し、PvuII/XbaI切断プラスミドpDISC-scFv₁₇抗CD19-SL-scFv₁₀抗CD3にクローン化した。得られたプラスミドpDISC-scFv₁₇抗CD19-SL-scFv₁₀抗CD3をNcoIおよびXbaIで消化し、1536bpDNA断片を単離し、NcoI/XbaI-線状ベクターpSK 20 K3にクローン化した。

【0072】

作製したプラスミドpSKK3-scFv₁₇抗CD19-SL-scFv₁₀抗CD3(図15)は、プラスミド挙動を改善し、振盪フラスコ培養および高細胞密度発酵の両方の条件下で大腸菌ペリプラズムにおいて機能的二価産物の増加した蓄積をもたらす数個の特徴を含む。これらは、プラスミドの損失を妨げるhok/sok分離後死滅系、強タンデムリボソーム結合部位および細菌における抗体断片の機能的収率を増加するペリプラズム因子Skp/OmpHをコードする遺伝子である。発現カセットは、wtlacプロモーター/オペレーター系の転写制御下にあり、大腸菌LacZ遺伝子に由来する第1 rbsを有するβガラクトシダーゼ(lacZ')のN末端ペプチドをコードする短い配列、続いてファージT7の遺伝子10(T7g10)に由来する強いrbsの翻訳制御 30 下にscFv抗体およびSkp/OmpHペリプラズム因子をコードする遺伝子を含む。その上、scFv抗体の遺伝子は、免疫検出および固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)による組換え産物の精製の両方のための6個のヒスチジン残基をコードするヌクレオチド配列に続く。

【0073】

実施例7：細菌における発現およびマルチマーFv-抗体の精製

大腸菌K12株RV308(ΔlacX 74galISII::OP308strA)(Maurerら、1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161)(ATCC31608)をscFv抗体の機能的発現のために使用した。発現プラスミドpSKK 3-scFv₁₇抗CD19-SL-scFv₁₀抗CD3を用いて形質転換した細菌を、100μg/mlアンピシリンおよび100mMグルコースを有する2xYT培地(2xYT_{GA})中で28℃にて一晩増殖させた。一晩培養物を新しい2xYT_{GA}培地中で600nm(OD₆₀₀)が0.1である最適密度まで希釈し、フラスコ培養物として28℃で激しく振盪しながら(180-220rpm)OD₆₀₀が0.8に達するまで増殖を続けた。細菌を20℃で15分間の5,000gでの遠心分離により集め、同容量の新しいYTBS培地(1Mソルビトール、2.5mMグリシンベタインおよび100μg/mlアンピシリンを含有する2xYT)に再懸濁した。イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度0.2mMまで添加し、21℃で18~20時間増殖を続けた。4℃にて20分間9,000gでの遠心分離により細胞を採取した。可溶性ペリプラズムタンパク質を単離するために、ペレット化細菌を開始容量の5%の氷冷200mMTris-HCl、20%スクロース、1mM EDTA、pH 8.0に再懸濁した。時々攪拌しながら氷上での1時間のインキュベーション後、スフェロプラストを4℃にて30分間30,000gで遠心分離し、可溶性ペリプラズム抽出物を上清とし、スフェロプラスト+不溶性ペリ 40 50

プラズマ材料をペレットとして取り出した。ペリプラズマ画分を50mMTris-HCl、1M NaCl、pH7.0に対して入念に透析し、scFv抗体を単離するための出発物質として使用した。組換え産物を硫酸アンモニウム沈殿により濃縮した(最終濃度は飽和の70%)。タンパク質沈殿物を遠心分離(10,000g、4、40分間)により回収し、開始容量の2.5%の50mMTris-HCl、1M NaCl、pH7.0に溶解し、続いて同じ緩衝液に対して透析した。固定化金属親和性クロマトグラフィー(IMAC)を、 Cu^{2+} で荷電し、かつ50mMTris-HCl、1M NaCl、pH7.0(開始緩衝液)で平衡化したキレートセファロース(Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany)の5mlのカラムを用いて4で行った。重力流により試料をカラムに通過させることにより、試料を負荷した。次に、溶出物の吸光度(280nm)が最小になるまで、20カラム容積の開始緩衝液、続いて50mMイミダゾールを含有する開始緩衝液でカラムを洗浄した(約30カラム容量)。吸収物質を、50mMTris-HCl、1M NaCl、300mMイミダゾール、pH7.0で1mlの画分として溶出した。組換えタンパク質を含む溶出画分を、以前記載されたように(Kipriyanovら、1994、Mol. Immunol. 31, 1047-1058)機能する抗ペンタ-His mAb(QIAGEN, Hilden, Germany)およびヤギ抗マウスIgGHRP-コンジュゲート抗体(Dianova, Hamburg, Germany)を用いるウエスタンブロット解析により同定した。陽性画分をプールし、予め充填したPD-10カラム(Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)を用いて50mMイミダゾール-HCl、50mM NaCl(pH6.0)に対して緩衝液交換を行った。タンパク質溶液の濁りを遠心分離により除去した(30,000g、1時間、4)。

10

【0074】

最終精製を、50mMイミダゾール-HCl、50mM NaCl、pH6.0中で線形0.05-1MNaCl勾配を用いるMono S HR 5/5カラム(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)を通すイオン交換クロマトグラフィーにより達成した。マルチマーFv抗体を含む画分を、Ultrafree-15遠心分離フィルターデバイス(Millipore Eschborn, Germany)を用いて、50mMイミダゾール、pH7.0を含むPBS(PBS緩衝液)に対して同時に緩衝液交換しながら濃縮した。Bio-Rad(Munich, Germany)タンパク質アッセイキットを使用するBradford染料結合アッセイ(Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254)によりタンパク質濃度を決定した。SDS-PAGE解析は、Db19-SL-scFv3が分子量(M_r)約56kDaを有する単一バンドとして移動することを示した(図17)。検定用Superdex200 HR 10/30カラム(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)を通すサイズ排除クロマトグラフィーは、Db19-SL-scFv3が主に約150kDaの M_r を有するダイマー形態であることを示した(図18)。

20

30

【0075】

実施例8：細胞結合測定

ヒトCD3⁺T細胞白血病細胞株ジャーカットおよびヒトCD19⁺B細胞細胞株JOK-1を、フローサイトメトリー実験に使用した。10%熱不活性化ウシ胎仔血清(FCS)、2mM-グルタミン、100U/mLペニシリンGナトリウムおよび100μg/ml硫酸ストレプトマイシン(全てInvitrogen, Groningen, The Netherlands)を補充したRPMI 1640培地中で5%CO₂を有する加湿雰囲気下に37にて細胞を培養した。希釈したDb19-SL-scFv3を含み、2%熱不活性化ウシ胎仔血清(FCS, Invitrogen, Groningen, The Netherlands)および0.1%アジ化ナトリウム(Roth, Karlsruhe, Germany)を補充した0.1mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS, Invitrogen, Groningen, The Netherlands)(FACS緩衝液とも言う)と共に、氷上で45分間 1×10^6 細胞をインキュベートした。FACS緩衝液を用いて洗浄した後、0.01mg/mlの抗-(His)₆マウスmAb13/45/31-2(Dianova, Hamburg, Germany)を含有する同じ緩衝液0.1mlと共に氷上で45分間細胞をインキュベートした。第2洗浄サイクルの後、0.015mg/mlのFITC-コンジュゲートヤギ抗マウスIgG(Dianova, Hamburg, Germany)0.1mlと共に前と同じ条件下に細胞をインキュベートした。次に細胞を再び洗浄し、2μg/mlのヨウ化プロピジウム(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)を含むFACS緩衝液0.5mlに再懸濁し、死滅細胞を排除した。 1×10^4 染色細胞の蛍光を、Beckman-Coulter Epics XLフローサイトメーター(Beckman-Coulter, Krefeld, Germany)を用いて測定した。System-IIおよびExpo32ソフトウェア(Beckman-Coulter, Krefeld, Germany)を使用して平均蛍光(F)を計算し、バックグラウンド蛍光を差し引いた。ソフトウェアプログラムPRISM(GraphPad Software, San Diego, CA)を使用してラインウィ

40

50

ーバー-バーク等式： $1/F = 1/F_{\max} + (K_d/F_{\max})(1/[Ab])$ に実験値を適合させることにより平衡解離定数(K_d)を決定した。

【0076】

フローサイトメトリー実験は、表面上にCD3を発現するジャーカット細胞、および表面上にCD19を発現するJOK-1細胞に対するDb19-SL-scFv3分子の特異的相互作用を示した(図19、AおよびB)。測定したアフィニティー定数は、分子のCD-3およびCD-19結合部分の両方にみごとに匹敵することを証明した(表2)。

【0077】

【表2】

**CD3⁺ジャーカット細胞および CD19⁺ JOK-1細胞に結合する
Db19-SL-scFv3 マルチマー抗体の親和性**

細胞株	K_d (nM)
ジャーカット (CD3 ⁺)	14.67
JOK-1 (CD19 ⁺)	10.02

解離定数(K_d)を 図19に示される ラインウィーバー-バークプロットから推測した。

10

20

【0078】

実施例9：組換え多価分子の抗腫瘍活性のインビトロ解析

慢性リンパ性白血病(CLL)を罹患している患者から新しく単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、12ウエルプレート(Invitrogen, Breda, The Netherlands)の個々のウエルの2mlのRPMI培地/10%FCSに 2×10^6 細胞/mlの密度で播種した。組換え抗体Db19-SL-scFv3を5、1、0.1 μ g/mlの濃度で添加した。6日間のインキュベーション後、細胞を採取し、計数し、フローサイトメトリー解析のために抗CD3MAb OKT3(DKFZ, Heidelberg, Germany)、抗CD4 MAb Edu-2(Chemicon, Hofheim, Germany)、抗CD8MAb UCH-T4(Chemicon, Hofheim, Germany)および抗CD19 MAb HD37(DKFZ, Heidelberg, Germany)を用いて染色した。10⁴生存細胞を、Beckman-Coulterフローサイトメーターを用いて解析し、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺およびCD19⁺細胞の相対量をプロットした。

30

【0079】

図20に示される結果は、四価Db19-SL-scFv3分子が自己T細胞の活発な増殖およびC19⁺腫瘍細胞の死滅を生じることを示した。観察されたT細胞増殖および死滅CLL細胞は、以前記載したCD19 $\times$ CD3タンデム二量体で観察されたものよりも高くさえあった(Tandab; Kipriyanovら、1999, J. Mol. Biol. 293, 41-56; Cochloviusら、2000, Cancer Res. 60, 4336-4341)。

【0080】

実施例10：細菌におけるマルチマーFv-抗体(Db19-L6-scFv3)の発現に対するプラスミドpS KK3-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3の構築

40

抗CD3 scFv_{L10}をコードする遺伝子を構築するために、抗ヒトCD3scFv₁₈に対する遺伝子を含むプラスミドpHOG21-dmOKT3(Kipriyanovら、1997, Protein Engineering10, 445-453)を使用した。クローニング手順を容易にするために、プライマーBi3sk、5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAGおよびBi9sk、5'-GAAGATGGATCCAGCGGCCGAGTATCAGCCCGGTTを用いるscFv₁₈遺伝子のPCR増幅によりNotI制限部位をプラスミドpHOG21-dmOKT3に導入した。得られた776bpPCR断片をNcoIおよびNotIを用いて消化し、NcoI/NotI線状ベクターpHOG21-CD19(Kipriyanovら、1996, J. Immunol. Methods 196, 51-62)にクローン化し、したがってプラスミドpHOG21-dmOKT3+Notを作製した。プライマーDP1、5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACCおよびDP2、5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGCを用い

50

るPCRにより、Kabatナンバリングスキーム(Kipriyanovら、1997,Protein Engineering 10, 445-453)に従う100A位のCys-Ser置換を有するOKT3 V_Hドメインをコードする遺伝子を増幅し、抗CD3V_H、続く10アミノ酸のリンカーSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Lys-Leu-Gly-Glyに対する遺伝子を作製した。得られた507bpのPCR断片をNcoIおよびEcoRVを用いて消化し、NcoI/EcoRV線状プラスミドpHOG21-dmOKT3+Notにクローン化し、したがってプラスミドpHOG21-scFv10/抗CD3を生じた。

【0081】

V_L-V_H配向、続いて6アミノ酸リンカーペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Proを有する抗CD19scFv_{L7}をコードする遺伝子を作製するために、鋳型としてプラスミドDNA pHOG_HD37(Kipriyanovら、1996、J. Immunol. Meth. 196, 51-62)およびプライマーVL_Nco、5'-CAGCCGGC CATGGCGGATATCTTGCTCACCCAACTCCAGCおよび3ck、5'-AGACGGTGCAGCAACAGTACGTTTGATTTCAGCを用いるPCRにより、V_L-HD37遺伝子を増幅した。得られた371bpPCR断片は、抗CD19 VLドメイン、続いて7アミノ酸Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Serリンカーをコードする。順番に、鋳型としてプラスミドDNApHOG_HD37(Kipriyanovら、1996、J. Immunol. Meth. 196, 51-62)およびプライマー5_Ck、5'-CGTACTGTTGCTGCACCGTCTCAGGTGCAACTGCAGCAGTCおよびVH-L6Pvu、5'-CTGCTGCAGCTGCACCTGGGGTGTGTTTTGGCTGAGGAGを用いるPCRにより、V_H-HD37遺伝子を増幅した。得られた428bpPCR断片は、抗CD19 VHドメイン、その前に7アミノ酸Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Serリンカー、後に6アミノ酸リンカーペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Proをコードする。プライマーVLNcoおよびVH-L6_Pvuを用いて371bpおよび428bp DNA断片からPCRにより抗CD19 scFv_{L7}-L₆の全体の遺伝子を合成した。得られた790bpのPCR断片をNcoIおよびPvuIIを用いて消化し、NcoI/PvuII線状プラスミドpHOG21-scFv10/抗CD3にクローン化し、したがって、プラスミドpDISC-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3を作製した。

【0082】

細菌ペリプラズムにおける機能的scFv抗体の収率を増加するために、プラスミドpDISC-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3を、NcoIおよびXbaIを用いて消化し、1503bpDNA断片を単離し、NcoI/XbaI線状ベクターpSKK3にクローン化した(実施例6参照)。作製したプラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3(図22)は、振盪フラスコ培養および高細胞密度発酵の両条件下にて大腸菌ペリプラズムにおける機能的二価産物の発現に適切である。

【0083】

実施例11: Db19-L6-scFv3抗体の特徴づけ

プラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3で形質転換した大腸菌RV308細胞中で組換えscFv抗体Db19-L6-scFv3を発現させ、本質的に実施例7に記載のように可溶性ペリプラズム画分から精製した。SDS-PAGE解析は、Db19-L6-scFv3が分子量(M_r)約56kDaを有する単一バンドとして移動することを示した(図24)。検定用Superdex200 HR 10/30カラム(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)を通すサイズ排除クロマトグラフィーは、Db19-L6-scFv3が主に約150kDaのM_rを有するダイマー形態であることを示した(図25)。

【0084】

ヒトCD3⁺T細胞白血病細胞株ジャーカットおよびヒトCD19⁺B細胞細胞株JOK-1を、フローサイトメトリー実験に使用した。10%熱不活性化ウシ胎仔血清(FCS)、2mM-グルタミン、100U/mLペニシリンGナトリウムおよび100μg/ml硫酸ストレプトマイシン(全てInvitrogen, Groningen, The Netherlands)を補充したRPMI 1640培地中で5%CO₂を有する加湿雰囲気下に37℃にて細胞を培養した。希釈したDb19-SL-scFv3を含み、2%熱不活性化ウシ胎仔血清(FCS, Invitrogen, Groningen, The Netherlands)および0.1%アジ化ナトリウム(Roth, Karlsruhe, Germany)を補充した0.1mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS, Invitrogen, Groningen, The Netherlands)(FACS緩衝液とも言う)と共に、氷上で45分間1×10⁶細胞をインキュベートした。FACS緩衝液を用いて洗浄した後、同じ緩衝液中0.01mg/mlの抗-(His)₆マウスmAb13/45/31-2(Dianova, Hamburg, Germany)0.1mlと共に氷上で45分間細胞をインキュベートした。第2洗浄サイクルの後、0.015mg/mlのFITC-コンジュゲートヤギ抗マウスIgG(Dianova, Hamburg, Germany)0.1mlと共に前と同じ条件下に細胞をインキュベートした。次に細胞を再び洗浄し、2μg/mlのヨウ化プロピジウム(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, G

10

20

30

40

50

ermay)を含むFACS緩衝液0.5mlに再懸濁し、死滅細胞を排除した。 1×10^4 染色細胞の蛍光を、Beckman-CoulterEpics XLフローサイトメーター(Beckman-Coulter, Krefeld, Germany)を用いて測定した。System-IIおよびExpo32ソフトウェア(Beckman-Coulter, Krefeld, Germany)を使用して平均蛍光(F)を計算し、バックグラウンド蛍光を差し引いた。ソフトウェアプログラムPRISM(GraphPadSoftware, San Diego, CA)を使用してラインウィーバー-バーク等式： $1/F = 1/F_{max} + (K_d / F_{max})(1/[Ab])$ に実験値を適合させることにより平衡解離定数(K_d)を決定した。

【0085】

フローサイトメトリー実験は、表面上にCD3を発現するジャーカット細胞、および表面上にCD19を発現するJOK-1細胞に対するDb19-L6-scFv3分子の特異的相互作用を示した(図26、AおよびB)。測定したアフィニティー定数は、分子のCD-3およびCD-19結合部分にみごとに匹敵することを証明した(表3)。

【0086】

【表3】

**CD3⁺ジャーカット細胞および CD19⁺ JOK-1 細胞に結合する
Db19-L6-scFv3 マルチマー抗体の親和性**

細胞株	K_d (nM)
ジャーカット (CD3 ⁺)	4.42
JOK-1 (CD19 ⁺)	8.49

解離定数(K_d)を 図26に示されるラインウィーバー-バークプロットから推測した。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】図1は、特定の抗体ドメインとマルチマー化モチーフを含有する可変ドメインの間のペプチドリinker-LLの長さ上に依存するマルチマー-F_v分子の略図を示す。略語L0: V_HおよびV_Lドメインは、介在するリンカーペプチド無く直接連結される; L1: Ser残基をコードするリンカー配列; L10: V_HおよびV_Lドメインを連結するSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyポリペプチドをコードするリンカー配列; LL: ハイブリッドscFv断片を連結する(Gly₄Ser)₄ポリペプチドをコードするリンカー配列; L18: V_HおよびV_Lドメインを連結するSerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgValポリペプチドをコードするリンカー配列。

【図2】図2は、特定の抗体ドメインとマルチマー化モチーフを含有する可変ドメインの間のペプチドリinker-LLの長さ上に依存するマルチマー-F_v分子の略図を示す。

【図3】図3は、特定の抗体ドメインとマルチマー化モチーフを含有する可変ドメインの間のペプチドリinker-LLの長さ上に依存するマルチマー-F_v分子の略図を示す。

【図4】図4は、プラスミドpHOG scFv₁₈ α CD3-LL-scFv₁₀ α CD19およびpHOGscFv₁₈ α CD19-LL-scFv₁₀ α CD3を構築する略図を示す。略語c-myc: mAb 9E10により認識されるエピトープをコードする配列; His: 6個のC末端ヒスチジン残基をコードする配列; PelB: 細菌ペクチン酸リアーゼ(PelBリーダー)のシグナルペプチド配列; rbs: リボソーム結合部位; Stop: 終止コドン(TAA); V_HおよびV_L: 重鎖および軽鎖の可変領域; L10: V_HおよびV_Lドメインを連結するSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyポリペプチドをコードするリンカー配列; LL: ハイブリッドscFv断片を連結する(Gly₄Ser)₄ポリペプチドをコードするリンカー配列; L18: V_HおよびV_Lドメインを連結するSerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgValポリペプチドをコードするリンカー配列; B: BamHI, Ea: EagI, E: EcoRI, Nc: NcoI, N: NotI, P: PvuII, X: XbaI。

【図5】図5は、プラスミドpHOG scFv₁₈ α CD3-LL-scFv₁₀ α CD19およびpHOGscFv₁₈ α CD19

-LL-scFv₁₀ α CD3を構築する略図を示す。

【図 6】図 6 は、プラスミド pSKK2 scFv3-LL-Db19 のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。略語 His6 tail : 6 個の C 末端ヒスチジン残基をコードする配列 ; β ラクタマーゼ : アンピシリン耐性に対する耐性を与える β ラクタマーゼをコードする遺伝子 ; bp : 塩基対 ; c-myc エピトープ : mAb9E10 により認識されるエピトープをコードする配列 ; Lac P / 0 : wt lac オペロンプロモーター / オペレーター ; Pel B リーダー : 細菌ペクチン酸リアーゼのシグナルペプチド配列 ; V_H および V_L : 重鎖および軽鎖の可変領域 ; L10 : V_H および V_L ドメインを連結する SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly ポリペプチドをコードするリンカー配列 ; LL : ハイブリッド scFv-断片を連結する (Gly₄Ser)₄ ポリペプチドをコードするリンカー配列 ; L18 : V_H および V_L ドメインを連結する SerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal ポリペプチドをコードするリンカー配列 ; rbs : リボソーム結合部位 ; V_H および V_L : 重鎖および軽鎖の可変領域 ; hok-sok : プラスミド安定化 DNA 座 ; lacI : lac-レプレッサーをコードする遺伝子 ; lacP / 0 : wt lac オペロンプロモーター / オペレーター ; lacZ' : β ガラクトシダーゼの α ペプチドをコードする遺伝子 ; skip 遺伝子 : 細菌ペリプラズム因子 Skp / OmpH をコードする遺伝子 ; tLPP : リポ蛋白質ターミネーターのヌクレオチド配列 ; M13ori : DNA 複製起点 ; pBR322ori : DNA 複製起点 ; tHP : 転写の強いターミネーター ; SD1 : 大腸菌 lacZ 遺伝子 (lacZ) に由来するリボソーム結合部位 (シャイン・ダルガルノ) ; SD2 および SD3 : 強く発現した T7 遺伝子 10 タンパク質 (T7g10) に対するシャイン・ダルガルノ配列。

【図 7】図 7 は、プラスミド pSKK2 scFv19-LL-Db3 のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。略語 His6 tail : 6 個の C 末端ヒスチジン残基をコードする配列 ; β ラクタマーゼ : アンピシリン耐性に対する耐性を与える β ラクタマーゼをコードする遺伝子 ; bp : 塩基対 ; c-myc エピトープ : mAb9E10 により認識されるエピトープをコードする配列 ; Lac P / 0 : wt lac オペロンプロモーター / オペレーター ; Pel B リーダー : 細菌ペクチン酸リアーゼのシグナルペプチド配列 ; V_H および V_L : 重鎖および軽鎖の可変領域 ; L10 : V_H および V_L ドメインを連結する SerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGly ポリペプチドをコードするリンカー配列 ; LL : ハイブリッド scFv-断片を連結する (Gly₄Ser)₄ ポリペプチドをコードするリンカー配列 ; L18 : V_H および V_L ドメインを連結する SerAlaLysThrThrProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgVal ポリペプチドをコードするリンカー配列 ; rbs : リボソーム結合部位 ; hok-sok : プラスミド安定化 DNA 座 ; lacI : lac-レプレッサーをコードする遺伝子 ; lacP / 0 : wt lac オペロンプロモーター / オペレーター ; lacZ' : β ガラクトシダーゼの α ペプチドをコードする遺伝子 ; skip 遺伝子 : 細菌ペリプラズム因子 Skp / OmpH をコードする遺伝子 ; tLPP : リポ蛋白質ターミネーターのヌクレオチド配列 ; M13ori : DNA 複製起点 ; pBR322ori : DNA 複製起点 ; tHP : 転写の強いターミネーター ; SD1 : 大腸菌 lacZ 遺伝子 (lacZ) に由来するリボソーム結合部位 (シャイン・ダルガルノ) ; SD2 および SD3 : 強く発現した T7 遺伝子 10 タンパク質 (T7g10) に対するシャイン・ダルガルノ配列。

【図 8】図 8 は、IMAC 後ピークのタンパク質含量の解析を示す。還元条件下で電気泳動を行った ; scFv3-Db19 (図 8A) および scFv19 × Db3 (図 8B) 分子の場合の抗 c-myc モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットを示す。

【図 9】図 9 は、サイズ排除 FPLC クロマトグラフィー溶出プロファイルを示す。検定用 (calibrated) Superdex200 HR10/30 カラムを使用し、ウエスタンブロットによるピークのタンパク質含量の解析を、scFv3-Db19 (図 9A) および scFv19-Db3 (図 9B) 分子の場合について抗 c-myc モノクローナル抗体を用いて行なった。

【図 10】図 10 は、サイズ排除 FPLC クロマトグラフィー溶出プロファイルを示す。scFv3-Db19、scFv19-Db3、scFv19-scFv3 および scFv3-scFv19 分子に対する検定用 Superdex200 HR10/30 カラムを使用した。

【図 11】図 11 は、CD3⁺ ジャーカット および CD19⁺ JOK-1 細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。

【図 12】図 12 は、scFv3-scFv19 および scFv3-Db19 分子 (A, C) ならびに scFv19-scFv3 および scFv19 × Db3 分子 (B, D) に関する CD19⁺ JOK-1 細胞 (A, B) および CD3⁺ ジャーカット細胞 (

C, D)の細胞表面保持の解析を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、CD19×CD3二重特異性分子を介する自己Tリンパ球の漸増による一次悪性CD19⁺ CLL-細胞の減少を示す。慢性リンパ性白血病(CLL)を罹患している患者から新しく単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、12ウエルプレートの個々のウエルの2mlのRPMI 101 培地 / 10% FCSに 2×10^6 細胞 / mlの密度で播種した。組換え抗体scFv3-scFv19およびscFv3-Db19を5 μ g / mlの濃度で添加した。5日間のインキュベーション後、細胞を採取し、計数し、フローサイトメトリー解析のために抗CD3MAb OKT3、抗CD4 MAb Edu-2、抗CD8 MAb UC H-T4および抗CD19 MAb HD37を用いて染色した。10⁴生存細胞を、Beckman-Coulterフローサイトメーターを用いて解析し、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ およびCD19⁺ 細胞の相対量をプロットした。

【図 1 4】図 1 4 は、N末端「二量体(diabody)」モチーフを介するダイマー化により形成されるマルチマーFv抗体構築物の概略図を示す。L7：ダイマー化「二量体」モチーフにおいてV_LおよびV_Hドメインを連結する7アミノ酸リンカーペプチドArg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser；SL：ダイマー化モチーフおよびscFvの間の8アミノ酸リンカーペプチドAla-Ala-Ala-Gly-Gly-Pro-Gly-Ser；L18：scFvにおいてV_HおよびV_Lドメインを連結する18アミノ酸リンカーペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Lys-Leu-Glu-Glu-Gly-Glu-Phe-Ser-Glu-Ala-Arg-Val。

【図 1 5】図 1 5 は、発現プラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-SL-scFv_{L18}抗CD3の図を示す。bla：アンピシリン耐性を担う β ラクタマーゼの遺伝子；bp：塩基対；CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3：重鎖の相補性決定領域(CDR)1~3をコードする配列；CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3：軽鎖の相補性決定領域(CDR)1~3をコードする配列；His6タグ：6個のC末端ヒスチジン残基をコードする配列；hok-sok：プラスミド安定化DNA座；L7リンカー：抗CD19のV_LおよびV_Hドメインを連結する7アミノ酸ペプチドArg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Serをコードする配列；L18リンカー：抗CD-3のV_HおよびV_Lドメインを連結する18アミノ酸ペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Lys-Leu-Glu-Glu-Gly-Glu-Phe-Ser-Glu-Ala-Arg-Valをコードする配列；lacI：lac-レプレッサーをコードする遺伝子；lacP/O：野生型lacオペロンプロモーター / オペレーター；M13ori：バクテリオファージM13の遺伝子間領域；pBR322ori：DNA複製起点；PelBリーダー：細菌ペクチン酸リアーゼのシグナルペプチド配列；SD1：大腸菌lacZ遺伝子(lacZ)に由来するリボソーム結合部位；SD2およびSD3：強く発現したバクテリオファージT7の遺伝子10(T7g10)に由来するリボソーム結合部位；skp遺伝子：細菌ペリプラズム因子Skp/OmpHをコードする遺伝子；SLリンカー：抗CD19および抗CD3のV_Hドメインを連結する9アミノ酸ペプチドSer-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Pro-Gly-Serをコードする配列；tHP：強い転写ターミネーター；tLPP：転写のリボ蛋白質ターミネーター；V_HおよびV_L：それぞれ免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変領域をコードする配列。特有の制限部位が示される。

【図 1 6】図 1 6 は、プラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-SL-scFv_{L18}抗CD3のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、還元条件下での12%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による精製Db19-SL-scFv3分子の解析を示す。レーン 1：M_r マーカー(kDa、数千のM_r) レーン 2：Db19-SL-scFv3。ゲルをクーマシーブルーを用いて染色した。

【図 1 8】図 1 8 は、検定用Superdex200カラムを通すサイズ排除クロマトグラフィーによる精製Db19-SL-scFv3分子の解析を示す。分子質量標準の溶出位置を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、フローサイトメトリーにより決定される抗体濃度の蛍光依存のラインウィーバー-バーク解析を示す。CD3⁺ ジャーカット細胞(A)およびCD19⁺ JOK-1細胞(B)へのDb19-SL-scFv3の結合を測定した。

【図 2 0】図 2 0 は、Db19-SL-scFv3を介する自己Tリンパ球の漸増による一次悪性CD19⁺ CLL-細胞の減少を示す。慢性リンパ性白血病(CLL)を罹患している患者から新しく単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、2mlのRPMI培地 / 10% FCSにおける12ウエルプレートの個々のウエルに 2×10^6 細胞 / mlの密度で播種した。組換えscFv-抗体Db19-SL-scFv3またはCD19

10

20

30

40

50

× CD3タンデム二量体 (Tandab; Kipriyanovら、1999、J. Mol. Biol. 293, 41-56; Cochloviusら、2000、Cancer Res. 60, 4336-4341) を、 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ および $0.1\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した。5日間のインキュベーション後、細胞を採取し、計数し、フローサイトメトリー解析のために抗CD3MAb OKT3、抗CD4 MAb Edu-2、抗CD8 MAb UCH-T4および抗CD19 MAb HD37を用いて染色した。 10^4 生存細胞を、Beckman-Coulterフローサイトメーターを用いて解析し、 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ および CD19^+ 細胞の相対量をプロットした。n.d.: CD19の被覆および/またはモジュレーションのために決定しなかった。

【図21】図21は、N末端「二量体」モチーフを介するダイマー化により形成されたマルチマー-scFv₇-L₆-scFv₁₀Fv抗体構築物の概略図を示す。L7: ダイマー化「二量体」モチーフにおけるV_LおよびV_Hドメインを連結する7アミノ酸リンカーペプチドArg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser; L6: ダイマー化モチーフおよびscFvsの間の6アミノ酸リンカーペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro; L10: scFvsにおけるV_HおよびV_Lドメインを連結する10アミノ酸リンカーペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Lys-Leu-Gly-Gly。

【図22】図22は、発現プラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3の図を示す。bla: アンピシリン耐性を担うβラクタマーゼの遺伝子; bp: 塩基対; CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3: 重鎖の相補性決定領域(CDR)1~3をコードする配列; CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3: 軽鎖の相補性決定領域(CDR)1~3をコードする配列; His6タグ: 6個のC末端ヒスチジン残基をコードする配列; hok-sok: プラスミド安定化DNA座; L6: 抗CD19および抗CD3のV_Hドメインを連結する6アミノ酸ペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Proをコードする配列; L7リンカー: 抗CD19のV_LおよびV_Hドメインを連結する7アミノ酸ペプチドArg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Serをコードする配列; L10リンカー: 抗CD3のV_HおよびV_Lドメインを連結する10アミノ酸ペプチドSer-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro-Lys-Leu-Gly-Glyをコードする配列; lacI: lac-レプレッサーをコードする遺伝子; lacP/O: 野生型lacオペロンプロモーター/オペレーター; M13ori: バクテリオファージM13の遺伝子間領域; pBR322ori: DNA複製起点; PelBリーダー: 細菌ペクチン酸リアーゼのシグナルペプチド配列; SD1: 大腸菌lacZ遺伝子(lacZ)に由来するリボソーム結合部位; SD2およびSD3: 強く発現したバクテリオファージT7の遺伝子10(T7g10)に由来するリボソーム結合部位; skip遺伝子: 細菌ペリプラスム因子skip/ompHをコードする遺伝子; tHP: 強い転写ターミネーター; tLPP: 転写のリボ蛋白質ターミネーター; V_HおよびV_L: それぞれ免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変領域をコードする配列。特有の制限部位が示される。

【図23】図23は、プラスミドpSKK3-scFv_{L7}抗CD19-L6-scFv_{L10}抗CD3のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。

【図24】図24は、還元条件下での12%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による精製Db19-L6-scFv3の分子の解析を示す。レーン1: M_rマーカー(kDa、数千のM_r) レーン2: Db19-L6-scFv3。ゲルをクーマシーブルーを用いて染色した。

【図25】図25は、検定用Superdex200カラムでのサイズ排除クロマトグラフィーによる精製Db19-L6-scFv3分子の解析を示す。分子質量標準の溶出位置を示す。

【図26】図26は、フローサイトメトリーにより決定されるDb19-L6-scFv3の濃度に対する蛍光依存のラインウィーバー-バーク解析を示す。CD3⁺ ジャーカット細胞(A)およびCD19⁺ JOK-1細胞(B)へのDb19-L6-scFv3の結合を測定した。

【 図 1 】

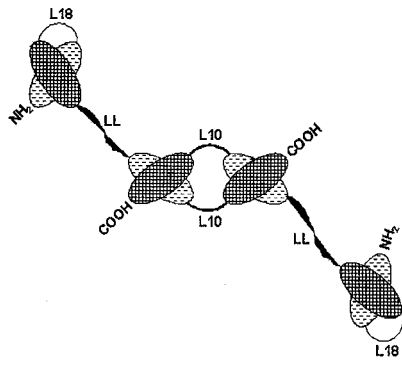


FIGURE 1

【 図 2 】

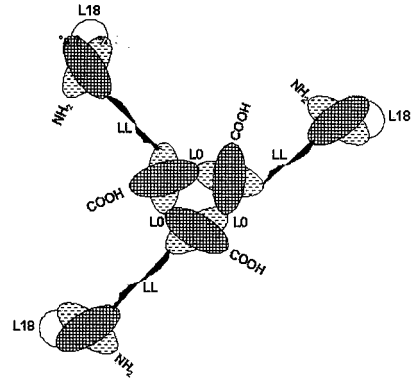


FIGURE 2

【 図 3 】

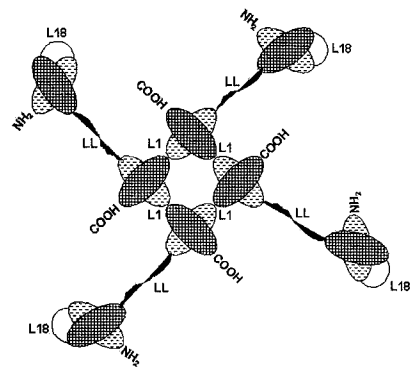


FIGURE 3

【 図 4 】

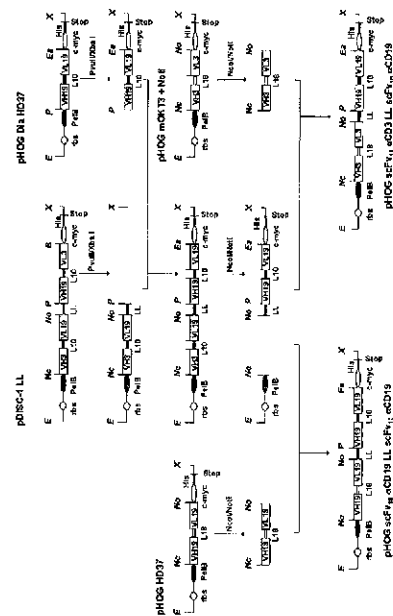


FIGURE 4

【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 3 】

FIGURE 6A

FIGURE 6B

【 図 7 - 1 】

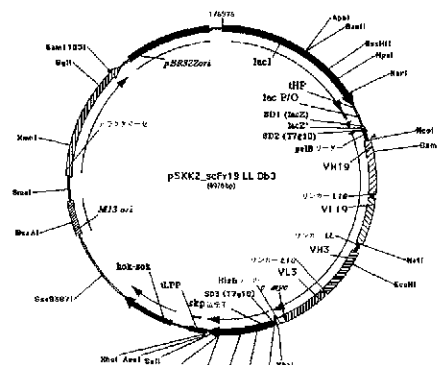


FIGURE 7

【 図 7 - 2 】

[illegible]

FIGURE 7A

【 図 7 - 3 】

CDR-13

1292 GCATCTCGACGTATTACTGTCCAGATATATGATGATACCTGACTACTGGCGGCAAGGCACACT
> DSAVYFACCAARYDDHYSLDYMGGQGT

CDR-11

1368 CTCACGCTCTTCAGCCAAACACCAACCACTCCGGCTGATATGTCTGACTACTCTCCAGACATCTG
> LTVSSAATCTYKLGDDIVLTQSPATIM

CDR-11

1444 CTCGATCTCCGCGGCAAGGTCACATGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTGATGATGATGACCTGACCA
> ASAPGKCTTCTCSA SSVSYVMWYQY

CDR-10

1520 GAATGCACTGACCTCCCAAAAGATGATTATGACATCCAAATCTCTCTGGACCTCTGCTCATGAGC
> KSGTSTPCKRWIYDITSLKSLAGVPAHFH

CDR-10

1596 GCGATGCTGCTGCGACCTTCTTCTCTCAATCAAGGCTACGGCTGCAAGCTGCCACATATTACTGCG
> GSGSGTSTYSLTSLTGGGCAAGCAATGCAATCTG

CDR-13

1672 AGCATGCTGATCTAGCCATGACATCTGGCTCGGGCAAACTGCAATTAACCGGCTGACGACCAAC
> QKMSNNFVFGSGTKLIFNRADAPT

e-myc

R167

1748 TGCATCGTCAAAAGAGTCTCTCAGAAAGATCATCTGACATGACCATCATCATCATATGATATAGA
> GSEQKLISEEDLNSSHHHHH

FIGURE 78

【 図 8 】

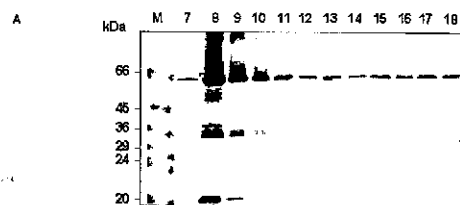


FIGURE 8A

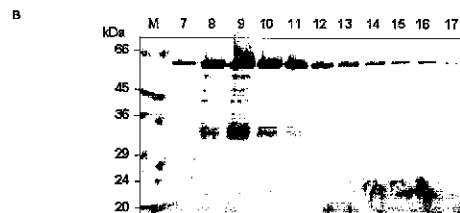


FIGURE 8B

【図 9】

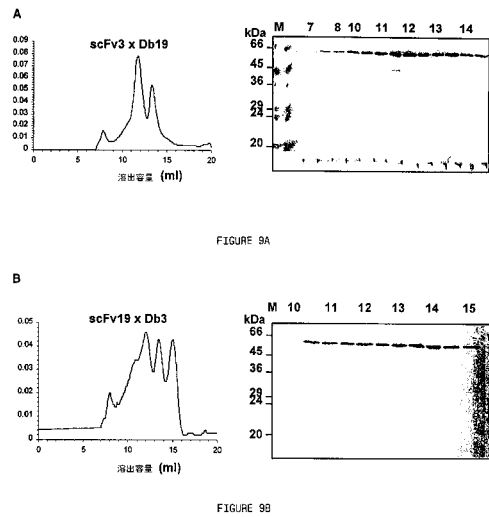


FIGURE 9A

FIGURE 9B

【図 10】

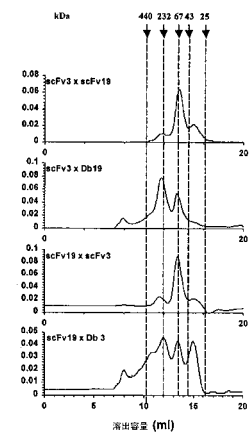


FIGURE 10

【図 11】

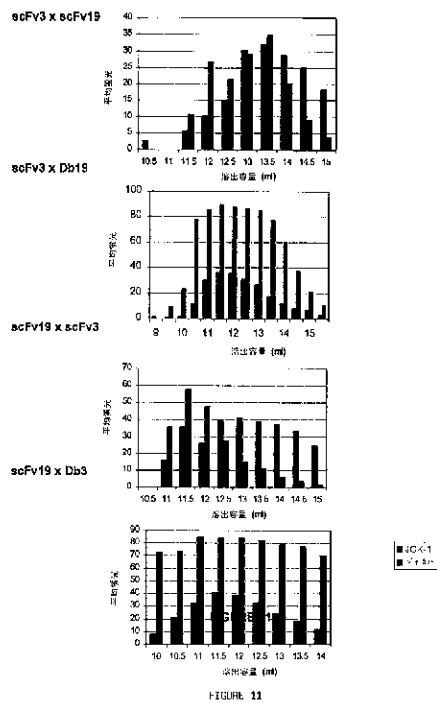


FIGURE 11

【図 12】

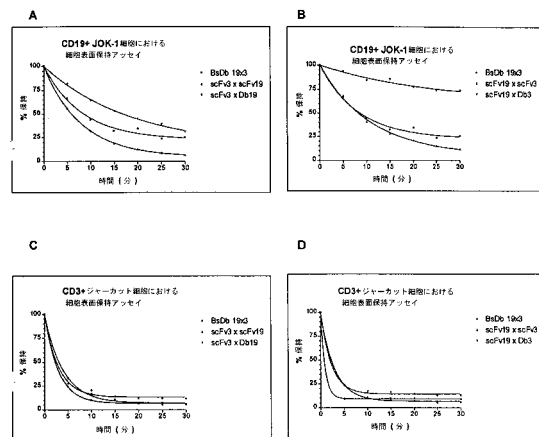


FIGURE 12

【 図 1 3 】

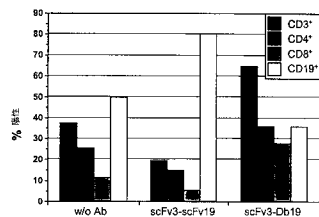


FIGURE 13

【 図 1 4 】

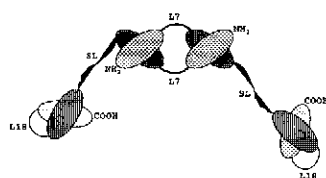


FIGURE 3.4

【 図 1 5 】

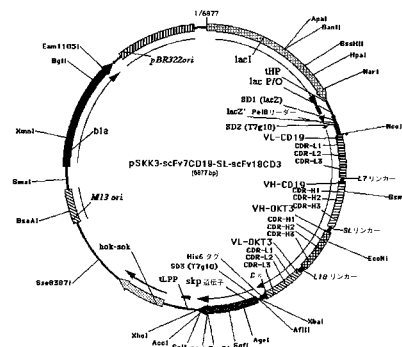


Figure 15

【 図 1 6 - 1 】

<110> Affimed Therapeutics AG	
<120> Title : Dimeric and multimeric Antigen Binding Structure	
<130>	
<140> EP 01122104.1	
<141>	
<160>2	
Figure 1a:	
<210> 1	
<211> 6844	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<221> Description of the Artificial Sequence: pSK3 scFv1 anti-CD19-L6-scFv10	
anti-CD3	
<400.1>	
acgaacacac atcgaatgac gcaaaacott tccggatgat gcatgataga gccggcgaaga	60
gagtcacatc agggtagtga atgtgaaacg agtaacgtta taagatgtcg caagatgatcg	120
cgggttgtct tatcaacagc ttccocggct ggtgaacccg gcaacgacgc ttctccgaa	180
aaacgggaaa aaagtgaagc cggcgatgag ggaatgaaat taacttccca accggatgac	240
acgaacatgc cggggcaaac agtcgttgct gatggcgtt gccactccca cgttcggcct	300
gcacggcgcc tcgaacaatt tcggcggcat taactctcgc gcgcgtcaac tgggtgcacg	360
ggtgtggttc togatgtgac aaacgaacgg cgtcgaacgc tgaataaggc cgttcgaaca	420
ttcttcgcgc acgacgcgtca gtggcgtgat catcaacat ccgttgatga accaagatgc	480
caatgcctgc gaagctgctt gcaataatgt tcggcgatta ttcttgatgt tctcgaaca	540
gacacacatc aacagatata tttcttcaca gttgaacggc accgcgcgtc cgttgagaga	600
tcgtctgcga tcgggtccac accaatacgc gclgtatga ggcacattaa gtctctcttc	660
cggtgcgtcg cgtctgctgt gctgtcctaa aaatctcaat cgcatacaaa ttccgcgat	720
agcgcaagcg gaagcgacat ggaagtgcac gtcccgcttt aaacaaacaa tcgaanaagt	780
gaaatggggc atcgttccca ctgcgatgct ggttcgcaac gatcagatgc cgtctggcgc	840
atcagcgccg attacagagt ccggctgcgc cgttgctgac gatattccgc taatgggata	900
gcgcgttacc gaagacagat catgttatat cncgcgcgtta accacacataa aacagagatt	960
tcgtcgtgtc ggcgaacaaa ccgttgacgc cgtctgcga ctctctcagc gcgcgcggct	1020
gaacggccat cagctctcttc cgtctcactc gttgaacaga aaacacacac ttcggcgcgc	1080

【 図 1 6 - 2 】

[illegible]

【 図 16 - 3 】

```

ctagagggct ctgctacgct aagaagggga tatataatg aaaaaggggt ccttagcggt 3000
aggctctggc ctgagctgga ccaattctgc tcaaggcggt gaaaaaatg aatagatgaa 3060
cctggggcgt cctgctcagg aggttaggga gaaaacgggt gttctctaga cgttaggaaa 3120
tgagtttcaa gctcgtgcta gctgaactga gctataggaa acatctctgc aggtcctaac 3180
gaaaagcttg cagctaatga aagcggcgag cgtctcgact aagctggaaa aagagcggac 3240
ggctcagcgc cagacttttg ctgaagaaat ggaagctttt gaggagggat gggcagcttg 3300
ttccacggaa gaaacgggga aactggttaa tcatatcrag actcggcgga aactcggctg 3360
caaaagcttg gctctcgggc cgtctcttga tgaataagaa gttgctttaa aagcggcgga 3420
tgcaaaagac atcaactcgg aatgactgaa acaggtttaa taactgctga ggaacggctg 3480
aaacatctga agagagctgt taaagctgag tctgataag cttgactcgt gaaagctaaa 3540
atgagaaata ttgtaggaaa tttctctctg ctgctgttta aagctatgag gctcgggact 3600
cgttcgaaaa aacttaggaa ggcagctgta tggcgtaaaa atcagcggga tttctctgta 3660
agcgtctgaa tgaagcgatt atctctaggt aagcgtgagt cgtctcgggt gaaagctaaa 3720
gagctatgag gtcgctcggc ctgagggctt tctcgtctaa aagctgagag cgtctctctg 3780
cagctcttga tgaagagag aagctagctc cgtctcgaat taattcttaa taaagctaaa 3840
gaggtctctc tctgctcagt ccaaaagagt atagctctt accgctgttt gagaagagag 3900
aagagagaaa tgaactaac aagagctaa cgtctctgtt gctgctgagt cgtctctctc 3960
aaactctgaa taattcttaa tctgagagaa aagctgagt ggaagcttg tgaagagag 4020
ggaacagggg aggtcgagc tttctctgtt taagactcgt gtaagctgaa aactagagag 4080
gagagagaaa tgcctcttga agagctgagt atgctctgaa taagagagag cttctctaaa 4140
gggtctctct gctcggaggt aagagcttga tctctctgaa tctctctgaa atctgagag 4200
agagctctct cgtctctgaa gctctctgaa tctctctgaa tctctctgaa atctgagag 4260
agctctctct gctctctgaa atctctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4320
aagagagaaa tgcctcttga agagctgagt atgctctgaa taagagagag cttctctaaa 4380
cgtctctgaa gctctctgaa atctctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4440
gtagagagag cagctctgaa gctctctgaa atctctctga atctctctga atctctctga 4500
tttctctgaa cagctctgaa gctctctgaa atctctctga atctctctga atctctctga 4560
tgcgctctga agagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4620
taactctgaa agagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4680
gtctctctga ttcctctgaa agagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga 4740
tgcctctgaa cagctctgaa aagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga 4800

```

【 図 16 - 4 】

```

atagcctgaa cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4860
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4920
agagagagag cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 4980
agagagagag cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5040
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5100
atagcctgaa cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5160
gagagagag cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5220
gagagagag cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5280
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5340
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5400
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5460
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5520
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5580
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5640
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5700
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5760
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5820
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5880
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 5940
atctctctga cagagagag tgcgctctga atctctctga atctctctga atctctctga 6000

```

【 図 16 - 5 】

```

agagagagag agagagagag cagagagagag cgtctctgaa cttctctgaa cgtctctgaa 6720
tgcgctctga tgcgctctga gctctctgaa tgcgctctga tgcgctctga gctctctgaa 6780
gaaaagagag agagagagag cgtctctgaa gctctctgaa tgcgctctga cttctctgaa 6840
cagc
Figure 16b:
<210>2
<211>496
<212> PRT
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>Description of the Artificial Sequence:Db19-L6-scFv3
<400>2
DILLVTPAS LAVSLQGRAT ISCKASQSDV YGDSEYNNY QDIPQDFKL LIYDASNLVS 60
GIPPRFSGS SGTDFYKIH PVKVDARTY HCQSTEDPW TFGGSKLEI KRTVAAPGV 120
QLQSGAELV RFGSSVKLSC KASGYAFSSY WHNVMKRGF GLEWIGQIN FGGGTYNYG 180
KFKGKATLA DESSSTAYM LSLASLSDSA VFCAARSTT TVGRVYVAD YWQGTSTVY 240
SSAKTTPQV LQSGAELAR PGASVMSCK ASGYTFTYR HWVMKRGFQ GLEWIGYINP 300
SGGYTVMQR FDKATLITD KSSSTAYMQL SSLTSDSDAV YICARYDDH YSLDYGQGT 360
TLTVSSARTI PKLGGDIVL QSPAINASRP GKVMYTCSA SSVSYNNY QKSGTSEKR 420
WIVDTSKLAS GVFAFRSGS SGTSISLIS GMEADARTY YCQKSSNP7 TFGGSKLEI 480
NRADTAAGS HHHHHH 496

```

【 図 18 】

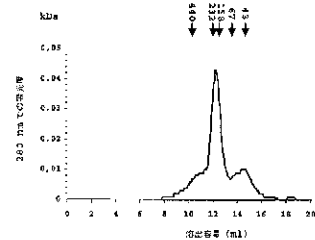


FIGURE 18

【 図 17 】

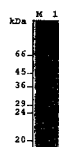
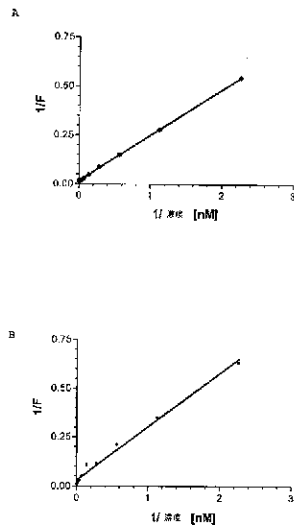


Figure 17

【図 19】



FIGURES 19 A and B

【図 20】

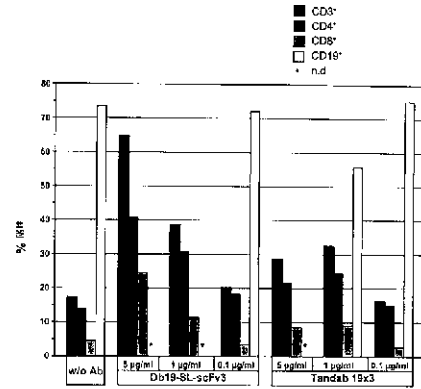


FIGURE 20

【図 21】

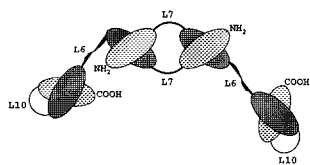


FIGURE 21

【図 23 - 1】

FIGURE 23

<110> Affimed Therapeutics AG
 <120> Dimeric and multimeric Antigen Binding Structure
 <130>
 <140> EP 01122104.1
 <41>
 <160>2
 Figure23a
 <210>1
 <211>6844
 <212>DNA
 <213> Artificial Sequence

```

<400>1 :
accgacac atcgatgg gccaacct tcgggtat gcatgtag gccggaga      60
ggtcaatc aggtgtga atgtgaac agtaagta kacatgtg cagatgtg     120
cgtgtctt tatcagac ttcccggt ggtgaacc gccagcag ttctcgaa     180
aacgaggaa aagtggaag cggcgatg ggaagtga taattcca accggatgc     240
aaccaacty ggggnaac agtctgtg gttggcgt gccactcca gtctggcc     300
gcaugcgcg tcgcaattg tcggcgat taattctg gccagcac tgggtgca     360
cgtgtgtgt tcgatgtg aacgaagg cgtcgaag tgaagcgg cgttgcaaa     420
ttctctgg caacgtgc gttgggtg cattaact coctggatg accagatgc     480
cattgctg gaaagtgc gaaactat tcgggtga ttcttgatg tctctgaa     540
gacacncc aacattta ttcttcca tgaagcgt aagcagtg gttgagaa     600
ttgtgtgc ttgggtcac acaaatgc gctgttag ggcactaa gtctcttc     660
ggcggtcg cgtctggt gttgcaaa atatctac gcaatcaa ttcagcgt     720
agcgaagg gaagcgac gaaatgat gttcggtt caacaaca tgcaaatgt     780
gaatgaagg atcttcca ctgagatg gttgcaac gatcatag cgtgggag     840
aatgcgag attacgag cgggtgct cgtgtgtg gatatctg tagtggaa     900
cgacgata gaagcagat catgttat ccgggtga accacncc aacagatt     960
tcgctgct gggcaaca cgtggagc cttgtgaa ctctctag gaaagggt     1020
gaaggcaat cagctgtg cgtctcat gttgaaga aaacncc ttggcgcaa     1080
taagaacac gctctccc gctgttgc cgttctta atgcagtg cagcaggt     1140
ttctcgatg gaagcggc agtgcggt accgataa agcggttc tgcagagg     1200
cgttttgt ttgagcca cctcaagca ataatgta gttagctac tcttagca     1260

```

【図 22】

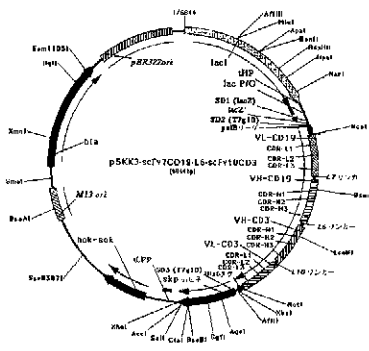


FIGURE 22

【 図 2 3 - 2 】

ccccaggett taocattat gctccgggt cgtatgttgt gtggaattgt gagggatata 1320
caatttcaaa caggaaacag ctatgacat gatcaaat tictgaaga ggaatataat 1380
atatgaata cctattgct acggcgccg cgttgctgt gtgtgtgca gctacggcg 1440
ccatggcgga tatcttgct acnaaaact cagctcttt gctgtgtct ctaggcgaa 1500
ggcccaaat ctctgcag gcccgaaca gcttgatta tgaatgtgt agttattga 1560
actgttaca acagattca ggaagacac ccaactcat catatgat gatcaaat 1620
tagttttgt gctcccaac aggtttagt gtagtggtc tggagacag ttaacotta 1680
acatcaatc tgtgagaag gtggtgtgt caactatca ctgtacga agtactgag 1740
atcgtggac gctgggtga ggcacacag tgaatatca actactgtt gctgcacct 1800
ctcaggtga actgcagag tctgggtgt agtgggtgt gctgtgttc ctatgaaga 1860
ttctgtcaa gctttctgt tatgactaa gtatgactg gatgaactg gtagaaga 1920
ggctggaca ggtttctgt tggattgac agatttgcc tggagctgt gatacaat 1980
acaatgaaa gttcaaggt aaagcaatc tgaatgaa cgaatctcc agcacagct 2040
acatgaact cagcagctt gactgtgag actctgggt ctattctgt gcaagcggg 2100
agactcag cgttgagctt tattctatg ctatggaca ctgggtcaa ggaactcag 2160
tcaactctc ctacgcaaa acacacagg aggtcagct cagcagctt ggggtgac 2220
tggcaagac tgggtctca gtagaggtt cctgcagag tctgtctac actttacta 2280
ggtacagat gactgtgtt aaacagagg ctggcaggg tctgagtg attgataa 2340
ttaactag cgtgtgttt actaacta atcagaagt caagacag gcaactga 2400
ctacagaaa atctccagc acagcttca tgaactgag cagctgaa tctgagact 2460
ctgacttca tctgttga agatattat atgactaa cagctgtac tactgggac 2520
aagcacaac tctcagct tctcagca aaacacac cagctgtg gtagatag 2580
tgcactca ctctcagca atcattctg catctccag gtagaagtc acctgaat 2640
cagctgac ctagatga agtactga actgataa gtagagta ggaactccc 2700
cnaaagct gattatga acatcaaac tggctctgt agtctgtct caattcagg 2760
gacggggtc tgggacctt tactcttca caatcagc ctaggggt gaagtgtg 2820
caacttata ctgcagag tggagtga accatcac gttgtctgt ggaacagt 2880
tggaaataa cgggtgtat actgaggg ctgagatca taactaac caactaat 2940
ctagaggtt gctcaact aaagagaaga tatataatt aaagtggt tatagctg 3000
aggtctgt tttagaat ctactctg ctacggctg gcaaatgt caatctca 3060
cctgggac ctgtcagc aggtagcga gaaacaggt gtttcaaa cgtggaaa 3120

【 図 2 3 - 3 】

tgaattcaaa ggccttgaca ggaactgaa gctctgaaa accatctaa aggttaaat 3180
gaaatgct cagctcagaa aagcgggag gtagctcct aggttgaaa aagatgat 3240
gctcagct cagctcctc ctacgaaag gaaatgttt gtagcagaa gtagcagct 3300
ctcagcga gaaatgct cagctcctc gtagcagaa gtagcagct aggttgctg 3360
caacagcag gtagcagct cgtgtctga tgaatgct gtagcagaa gtagcagct 3420
tgaatgct cagctcctc gtagcagaa gtagcagaa gtagcagct gtagcagct 3480
aaacatctga aggtctgct taaatgct gtagcagaa gtagcagct gtagcagct 3540
atgctgca cgtctgca tttttgt cgtctgca cgtctgca gtagcagct 3600
gtagcagaa cgtctgca gtagcagaa gtagcagaa gtagcagaa gtagcagct 3660
gtagcagaa gtagcagct cgtctgca gtagcagaa gtagcagct gtagcagct 3720
gtagcagct gtagcagct cgtctgca cgtctgca cgtctgca gtagcagct 3780
cgtctgct gtagcagaa gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct 3840
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 3900
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 3960
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4020
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4080
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4140
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4200
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4260
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4320
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4380
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4440
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4500
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4560
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4620
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4680
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4740
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4800
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4860
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4920
gtagcagct gtagcagct cgtctgca gtagcagct gtagcagct gtagcagct 4980

【 図 2 3 - 4 】

cgtcaattt caaaaattt caactttt caactttt caactttt caactttt 5040
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5100
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5160
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5220
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5280
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5340
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5400
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5460
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5520
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5580
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5640
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5700
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5760
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5820
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5880
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 5940
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6000
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6060
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6120
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6180
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6240
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6300
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6360
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6420
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6480
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6540
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6600
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6660
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6720
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6780
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6840
caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt 6900

【 図 2 3 - 5 】

FIGURE 23b:
<210>2
<211>496
<212>PRT
<213>Artificial Sequence
<400>2
DILLTQTPAS LAVALQAT ISCHASQSDV YGGSYLHW QTPQPPKL ILYDANLVS 60
GTPPRFGSG SDOTLWIR PVKVDATY HQQSDTDPW TFGGQKLEI KRVAAPGV 120
QLQSGAELV RGSVSRIC KASCTAFSS MNHNVKRGQ GLENTQIWI RGGDTNMG 180
KTKKATLA DESSYAYM LSLAEDSA VYFCARBTI TVRVYXMD YWQGSITV 240
SSATYPPVD LQSGAELV RGSVSRIC ASGTYFTYI MNHNVKRGQ GLENTQIWI 300
RSGYVYVNR KOKATLTD KSSSTAYMD SLSLSDSAV YVCARYDOR YSLVWGGT 360
TLVSSAKTY PKLQDQVLT QSPALMSAP GKVYNTCSA SSVSYHMYI QKSGSPXR 420
WYDTSLAS GVFAHFGSG SGTYSLSIS GMEADATY YCOGSSNPF TFGGQKLEI 480
NRADTAAGS HHHHHH 496

【 図 2 4 】

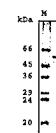


Figure 24

【図 25】

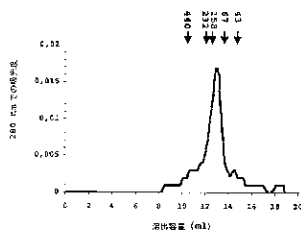


FIGURE 25

【図 26】

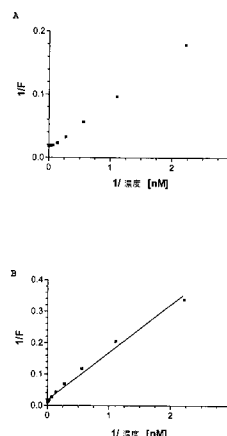


FIGURE 26

【手続補正書】

【提出日】平成15年12月3日(2003.12.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

2つ以上の同一のタンパク質モノマーを含有してなるマルチマー構造であって、

(a) 該構造のモノマーが少なくとも4つの可変ドメインを含有し、このうち、最初または最後の2つの可変ドメインが抗原結合VH-VLまたはVL-VH scFv単位を形成し、ここで、2つの可変ドメインは、scFvの分子内形成を妨げない、少なくとも5個のアミノ酸残基のペプチドリinkerにより連結されている、

(b) モノマーの他方の2つの隣接する可変ドメインが、別のモノマーの相補ドメインと非共有結合により結合され、少なくとも2つのさらなる抗原結合部位の形成がもたらされてマルチマー化モチーフが形成される

ことを特徴とするマルチマー構造。

【請求項2】

以下の特徴：

(a) 該Fv-抗体のモノマーが少なくとも4つの可変ドメインを含有し、このうち、最初または最後の2つの可変ドメインが、scFvの分子内形成を妨げない、5～30個のアミノ酸残基のペプチドリinkerにより連結されている、

(b) モノマーの他方の2つの隣接する可変ドメインが、別のモノマーの2つの相補可変ドメインと非共有結合により結合され、少なくとも2つのさらなる抗原結合部位の形成

がもたらされてマルチマー化モチーフが形成され、該2つの可変ドメインは最大12個のアミノ酸残基のペプチドリinkerにより連結されている、
を有する、マルチマー-Fv-抗体の形態の請求項1記載のマルチマー構造。

【請求項3】

さらなる特徴は、1つのモノマーの2つの隣接するドメインにより形成された抗原結合 V_H-V_L または V_L-V_H scFv単位が、マルチマー化モチーフの他方の可変ドメインに、5～30個のアミノ酸残基のペプチドリinkerにより連結されていることである、請求項2記載のマルチマー-Fv-抗体。

【請求項4】

該モノマーが4つの可変ドメインを含有し、ここで、該モノマーの一端の第3および第4可変ドメインが12個以下のアミノ酸残基を有するリンカーにより連結されている、請求項1、2または3記載のマルチマー構造。

【請求項5】

該モノマーが4つの可変ドメインを含有し、ここで、該モノマーの一端の第1および第2可変ドメインが12個以下のアミノ酸残基を有するペプチドリinkerにより連結されている、請求項1、2または3記載のマルチマー構造。

【請求項6】

該モノマーの第2および第3可変ドメインが、5～30個のアミノ酸残基からなるペプチドリinkerにより連結されている、請求項2～5いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項7】

該モノマーのいずれかの可変ドメインが、Nおよび/またはC末端において少なくとも1つのアミノ酸残基だけ短縮されている、請求項1～6いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項8】

モノマーのドメインの順序が、 $V_H-V_L-V_H-V_L$ 、 $V_L-V_H-V_H-V_L$ 、 $V_H-V_L-V_L-V_H$ または $V_L-V_H-V_L-V_H$ である、請求項1～6いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項9】

少なくとも1つの可変ドメイン対の非共有結合が、少なくとも1つのジスルフィド結合により強化されている、請求項1～8いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項10】

四価ダイマー、六価トリマーまたは八価テトラマーである、請求項1～10いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項11】

二重特異性または三重特異性または四重特異性抗体である、請求項1～10いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項12】

少なくとも1つのモノマーが生物学的に活性な物質、化学薬品、ペプチド、タンパク質または薬物に結合されている、請求項1～11いずれか記載のマルチマー構造。

【請求項13】

Bリンパ球のCD19抗原またはCEA抗原に特異的に結合することができる単一特異性抗体である、請求項1～10いずれかまたは12記載のマルチマー構造。

【請求項14】

- (a) CD19およびT細胞受容体のCD3複合体；
 - (b) CD19およびT細胞受容体のCD5複合体；
 - (c) CD19およびTリンパ球上のCD28抗原；
 - (d) CD19ならびにナチュラルキラー細胞、マクロファージおよび活性化された単球上のCD16；
 - (e) CEAおよびCD3；
 - (f) CEAおよびCD28；または
 - (g) CEAおよびCD16
- に特異的に結合することができる二重特異性抗体である、請求項1～12いずれか記載の

マルチマー構造。

【請求項 15】

(a) ペプチドリinkerをコードするDNA配列を、可変ドメインをコードするDNA配列と、該ペプチドリinkerが可変ドメインを連結して多価マルチマー構造のモノマーをコードするDNA配列の形成がもたらされるようにライゲートし、(b) 種々のモノマーをコードするDNA配列を適切な発現系において発現させる、請求項 1 ~ 14 いずれか記載のマルチマー構造の調製方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 14 いずれか記載のマルチマー構造をコードするDNA配列。

【請求項 17】

請求項 16 記載のDNA配列を含有する発現ベクター。

【請求項 18】

pSKK2-scFv_{L18}抗CD3-LL-scFv_{L10}抗CD19(pSKK2-scFv3LLDb19)(DSM 14470)またはpSKK2-scFv_{L18}抗CD19-LL-scFv_{L10}抗CD3(pSKK2-scFv19LLDb3)(DSM 14471)である、請求項 17 記載の発現ベクター。

【請求項 19】

請求項 17 または 18 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 14 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造、請求項 17 記載のDNA配列または請求項 18 もしくは 19 記載の発現ベクターを含有する医薬組成物。

【請求項 21】

診断のための請求項 1 ~ 15 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造の使用。

【請求項 22】

(a) ウイルス、細菌、腫瘍もしくはプリオン関連疾患の治療、(b) 赤血球の凝集、(c) 免疫系の細胞障害性細胞の腫瘍細胞への結合、または(d) 活性なサイトカイン、細胞障害性物質もしくはプロテアーゼの標的細胞への結合のための医薬組成物の調製のための請求項 1 ~ 14 いずれか記載のダイマーまたはマルチマー構造、請求項 16 記載のDNA配列または請求項 17 もしくは 18 記載の発現ベクターの使用。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 14 いずれか記載のマルチマー構造を含有する診断用キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/10307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/00 C07K16/28 C07K16/30 C07K19/00 C12N15/13 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/10 A61P31/00		
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) IPC 7 C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CANCERLIT, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERESFORD GUY W ET AL: "Binding characteristics and tumor targeting of a covalently linked divalent CC49 single-chain antibody." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 81, no. 6, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 911-917, XP002238722 ISSN: 0020-7136	1,8-24
Y	page 912 --- -/--	2-7
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 document 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		Date of mailing of the international search report
17 April 2003		08/05/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, R

International Application No
PCT/EP 02/10307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOEL A ET AL: "Divalent forms of CC49 single-chain antibody constructs in <i>Pichia pastoris</i> : expression, and characterization" JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, JAPANESE BIOCHEMICAL SOCIETY, TOKYO, JP, vol. 127, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 829-836, XP001063231 ISSN: 0021-924X page 831	1,8-24
X	COLCHER D ET AL: "single-chain antibodies in pancreatic cancer" ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, NEW YORK, NY, US, vol. 880, 30 June 1999 (1999-06-30), pages 263-280, XP000995150 ISSN: 0077-8923 page 269	1,8-24
X	EP 0 506 124 A (TANOX BIOSYSTEMS INC) 30 September 1992 (1992-09-30) page 4, column 17 -column 18	1,8-24
Y	HUDSON P J ET AL: "High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 231, no. 1-2, 10 December 1999 (1999-12-10), pages 177-189, XP004186084 ISSN: 0022-1759 abstract	2-7
A	DE 198 16 141 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 14 October 1999 (1999-10-14) page 3, line 45-52	1-24
A	US 6 025 165 A (BIRD ROBERT E ET AL) 15 February 2000 (2000-02-15) column 23; figure 16	1-24
A	DE 199 30 433 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 11 January 2001 (2001-01-11) the whole document	1-24
A	WO 99 57150 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ; KIPRIYANOV SERGEJ (DE); LITTLE MELVYN (DE)) 11 November 1999 (1999-11-11) page 7 -page 8	1-24

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/10307

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIPRIYANOV ET AL: "Bispecific tandem diabody for tumour therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics" J.MOL.BIOL., vol. 293, 1999, pages 41-56, XP002185480 page 42 -page 43; figure 1	1-24
A	COCHLOVIUS B ET AL: "CURE OF BURKITT'S LYMPHOMA IN SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY MICE BY T CELLS, TETRAVALENT CD3 X CD19 TANDEM DIABODY, AND CD28 COSTIMULATION" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 60, no. 16, 15 August 2000 (2000-08-15), pages 4336-4341, XP001026130 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-24
P,A	VÖLKEL: "Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain antibodies" PROTEIN ENGINEERING, vol. 14, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 815-823, XP002185481 the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/10307**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

Although claim 22 is directed to a diagnostic method possibly practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
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:
3. ☐ Claims 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

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP102/10307

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0506124	A	30-09-1992	AU 640863 B2	02-09-1993
			AU 1299292 A	15-10-1992
			CA 2062582 A1	28-09-1992
			EP 0506124 A1	30-09-1992
			JP 5117164 A	14-05-1993
			ZA 9202017 A	31-03-1993
DE 19816141	A	14-10-1999	DE 19816141 A1	14-10-1999
			AU 2365699 A	28-10-1999
			BR 9902039 A	02-05-2000
			CN 1234406 A	10-11-1999
			CZ 9901215 A3	13-10-1999
			EP 0952218 A2	27-10-1999
			HU 9900956 A2	29-04-2002
			JP 2000201678 A	25-07-2000
US 6025165	A	15-02-2000	US 5869620 A	09-02-1999
			US 6027725 A	22-02-2000
			US 6121424 A	19-09-2000
			US 6103889 A	15-08-2000
			US 6515110 B1	04-02-2003
			AT 207080 T	15-11-2001
			AU 3178993 A	28-06-1993
			CA 2122732 A1	10-06-1993
			DE 69232137 D1	22-11-2001
			DE 69232137 T2	29-05-2002
			DK 617706 T3	12-11-2001
			EP 1136556 A1	26-09-2001
			EP 0617706 A1	05-10-1994
			ES 2165851 T3	01-04-2002
			JP 7501451 T	16-02-1995
			WO 9311161 A1	10-06-1993
DE 19930433	A	11-01-2001	DE 19930433 A1	11-01-2001
WO 9957150	A	11-11-1999	DE 19819846 A1	11-11-1999
			AU 4896099 A	23-11-1999
			CA 2331641 A1	11-11-1999
			WO 9957150 A2	11-11-1999
			EP 1078004 A2	28-02-2001
			JP 2002513805 T	14-05-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/531	C 1 2 N 5/00	A

(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,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ロイシュ, ウーヴェ

ドイツ連邦共和国 マイカマー 6 7 4 8 7 ディーターヴィーゼンシュトラッセ 1 3

(72)発明者 モルデンハウアー, ゲルハルト

ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク 6 9 1 2 0 ケプラーシュトラッセ 2 2

(72)発明者 リトル, メルヴィン

ドイツ連邦共和国 ネッカーゲミュント 6 9 1 5 1 フリッツ フォン プリーゼン 1 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA11 CA20 DA02 DA05 DA11 EA04

GA11 HA11

4B065 AA26X AA93X AB01 AC14 BA01 CA44 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

GA05 GA21

专利名称(译)	抗原结合二聚体和多聚体结构		
公开(公告)号	JP2005508628A	公开(公告)日	2005-04-07
申请号	JP2003528863	申请日	2002-09-13
申请(专利权)人(译)	Afimeto兵马俑POI遗传学AG		
[标]发明人	ルガルファブリセ キプリヤノフセルゲイ ロイシュウーヴェ モルデンハウアーゲルハルト リトルメルヴィン		
发明人	ル ガル,ファブリセ キプリヤノフ,セルゲイ ロイシュ,ウーヴェ モルデンハウアー,ゲルハルト リトル,メルヴィン		
IPC分类号	G01N33/531 A61P31/00 C07K16/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/13		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/00 A61P35/02 C07K16/00 C07K16/28 C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/531.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B065/AA26X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA05 4H045/GA21		
优先权	2001122104 2001-09-14 EP		
其他公开文献	JP4373782B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了多聚体Fv-抗体构建体，编码所述Fv-抗体构建体的表达载体和诊断用途以及所述多聚体Fv-抗体构建体的治疗用途。

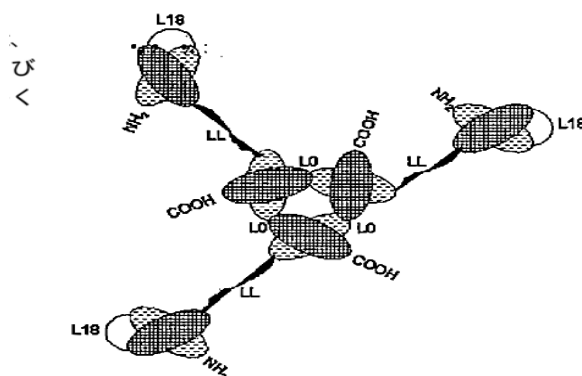


FIGURE 2