

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/198731

発行日 令和3年4月22日(2021.4.22)

(43) 国際公開日 令和1年10月17日(2019.10.17)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------------|---------------------|------------|
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 Z N A | 4 B O 6 5 |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 Z | 4 C O 8 5 |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | 4 H O 4 5 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

| | |
|---|--|
| 出願番号 特願2020-513417 (P2020-513417) | (71) 出願人 504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2019/015528 | |
| (22) 国際出願日 平成31年4月9日(2019.4.9) | |
| (31) 優先権主張番号 特願2018-75339 (P2018-75339) | (71) 出願人 504145308 国立大学法人 琉球大学 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 |
| (32) 優先日 平成30年4月10日(2018.4.10) | |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP) | (74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所 |
| | (72) 発明者 梅津 光央 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 |
| | (72) 発明者 杉山 在生人 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体断片及び該抗体断片を含む二重特異性抗体

(57) 【要約】

ヒトHER2に特異的に結合する抗体断片は、下記式(1)の構造を有する単一ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を有する。

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 ... (1)

(式中、FR1、FR2、FR3、及びFR4はフレームワーク領域であり、CDR1、CDR2、及びCDR3は相補性決定領域であり、以下の(I)~(III)の少なくとも一つを満たす：

(I) CDR1は、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(II) CDR2は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(III) CDR3は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。)

10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトHER2に特異的に結合する抗体断片であって、下記式(1)の構造を有する単一ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を有する抗体断片。

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 ... (1)

(式中、

FR1、FR2、FR3、及びFR4はフレームワーク領域であり、

CDR1、CDR2、及びCDR3は相補性決定領域であり、以下の(I)~(III)の少なくとも一つを満たす：

(I) CDR1は、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

10

(II) CDR2は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(III) CDR3は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。)

20

【請求項 2】

前記CDR1は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有し、前記CDR2は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有し、前記CDR3は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する請求項1に記載の抗体断片。

【請求項 3】

下記(i)~(xii)のCDR1、CDR2及び/又はCDR3を有する請求項1又は2に記載の抗体断片。

30

- (i) CDR1:配列番号5、CDR2:配列番号12、及びCDR3:配列番号19
- (ii) CDR1:配列番号6、CDR2:配列番号13、及びCDR3:配列番号20
- (iii) CDR1:配列番号7、CDR2:配列番号14、及びCDR3:配列番号21
- (iv) CDR1:配列番号8、CDR2:配列番号15、及びCDR3:配列番号22
- (v) CDR1:配列番号9、CDR2:配列番号16、及びCDR3:配列番号23
- (vi) CDR1:配列番号10、CDR2:配列番号17、及びCDR3:配列番号24
- (vii) CDR1:配列番号11、CDR2:配列番号18、及びCDR3:配列番号25
- (viii) CDR1:配列番号53
- (ix) CDR1:配列番号53、及びCDR3:配列番号57
- (x) CDR1:配列番号54
- (xi) CDR1:配列番号55
- (xii) CDR3:配列番号58

40

【請求項 4】

FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4で表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号1~4で表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号1~4で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する請求項1~3のいずれか一項に記載の抗体断片。

【請求項 5】

配列番号26~32のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する請求項1~4のいずれか一項に記載の抗体断片。

50

【請求項6】

請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体断片からなる第1的可変領域と、HER2とは異なる抗原に特異的に結合する第2的可変領域とを備え、前記第1的可変領域と前記第2的可変領域が単一のポリペプチド鎖上に含まれる、二重特異性抗体。

【請求項7】

前記第2的可変領域が、T細胞上の抗原に特異的に結合する、請求項6に記載の二重特異性抗体。

【請求項8】

前記第2的可変領域が、抗CD3抗体の重鎖の可変領域と、抗CD3抗体の軽鎖の可変領域とを含む請求項7に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項9】

単量体、二量体、三量体、四量体、五量体又はそれらのFc領域融合体である請求項6~8のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項10】

請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体断片又は請求項6~9のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、蛍光物質、発光物質、低分子化合物、核酸、放射性物質、薬剤、毒素、サイトカイン、アルブミン、酵素、及び非ペプチド性ポリマーからなる群の少なくとも1種の化合物とが結合されたコンジュゲート抗体。

【請求項11】

請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体断片又は請求項6~9のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする塩基配列を含む核酸分子。

20

【請求項12】

請求項11に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項13】

請求項12に記載の発現ベクターにより形質転換した宿主細胞。

【請求項14】

請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体断片又は請求項6~9のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含有する医薬組成物。

【請求項15】

請求項1~5のいずれか一項に記載の抗体断片又は請求項6~9のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を備えたキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体断片、該抗体断片を含む二重特異性抗体、該抗体断片又は該二重特異性抗体をコードする塩基配列を含む核酸分子、該抗体断片又は該二重特異性抗体を含む医薬組成物、及び該抗体断片又は該二重特異性抗体を含むキットに関する。

【背景技術】

【0002】

がん（悪性腫瘍）に対する安全な治療薬として、免疫療法が用いられている。がんに対する免疫療法では、がんに対して特異的に細胞傷害活性を示す抗体が使用されている。

40

【0003】

Human epidermal growth factor Receptor 2 (HER2)は細胞表面に存在する糖蛋白質の受容体型チロシンキナーゼ（分子量 約 185kDa）であり、EGFR2, ErbB2, CD340, あるいはNEUとも呼ばれる。HER2はその変異型や欠損型も含めて乳癌をはじめとする複数のがん で過剰発現しており、治療標的として注目されている。HER2を標的とした抗体は、標的化による治療効果が期待されるがん細胞表面抗原の一つである。

【0004】

抗体の基本構造は、重鎖と軽鎖がジスルフィド結合によりヘテロテトラマーを形成したものであるが、このようなIgG型の抗体は高分子量であるため、腫瘍深部まで浸透するこ

50

とができない。このため、抗体の可変領域断片を含む低分子量の抗体の開発が進んでいる。

【0005】

近年、Hamers-Casterman らはヒトコブラクダやラマなどのラマ科の動物において、CH1ドメインを含まず重鎖のみからなる抗体が存在することを報告した（非特許文献1）。ラクダ由来抗体の可変領域断片(single Variable domain of the Heavy chain of a Heavy-chain camel antibody : VHH)は、単量体ドメインにもかかわらず、高親和性・高特異性を有している。そこで、ラマ科の動物の免疫化により取得した抗体群をライブラリーとしてファージ提示法等の生体外選択操作を行うことで種々の標的に特異的に結合するVHHが取得されている（非特許文献2, 3）。

10

【0006】

一方で、抗原に対する親和性を高めるために、抗体を多量体化又は多価化する技術も知られている。例えばHarwood らは三量体形成ドメインとして知られる collagen XVIII trimerization domain を抗CD3 scFv1 分子及び抗EGFR VHH 抗体3 分子と融合させることで、EGFR に対して三価の組換え抗体を設計し、かかる組換え抗体が同一ドメインから構成される一重一価の組換え抗体よりも高い傷害活性を発揮することを報告している（非特許文献4）。

【0007】

従来のIgG型の抗体では、ナチュラルキラー細胞よりも活性の高いT細胞を利用することができず、T細胞を利用することができる低分子量の抗体は開発されているが、低分子であるため、細胞へ結合する価数が1であり、抗原との結合親和性が低い。

20

【0008】

抗体と抗原の結合親和性増大は抗体の多価設計により傷害活性向上をもたらすため、有効なアプローチであるといえるが、重鎖と軽鎖間のリンカー配列の短縮化・除去による多価化設計は多価な会合体形成にある程度有効であるものの（非特許文献5, 6）、単一の多価会合体のみが形成されるような設計には至っていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】EMBO J 2000, 19, 921-930

30

【非特許文献2】Structure 2013, 21, 1214-1224

【非特許文献3】Protein Eng Des Sel 2008, 21, 1-10.

【非特許文献4】Oncoimmunology 2018, 7, e1377874

【非特許文献5】J Immunol Methods 1999, 231, 177-189

【非特許文献6】Protein Sci 2003, 12, 734-747

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、ヒトHER2に特異的に結合する抗体断片、かかる抗体断片からなる可変領域を備えた高いがん細胞傷害性を有する二重特異性抗体、該抗体断片又は該二重特異性抗体を含む医薬組成物、及び該抗体断片又は該二重特異性抗体を含むキットを提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、本発明者らにより開発されたシングルドメインであるラクダ抗体VHH及びscFv（単鎖抗体断片）から構成される二重二価抗体をフォーマットとして採用して作製された、ヒトHER2に特異的に結合する抗体が、高い細胞傷害活性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち本発明は、以下の項に記載の主題を包含する。

50

[1] ヒトHER2に特異的に結合する抗体断片であって、下記式(1)の構造を有する単一ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を有する抗体断片。

【 0 0 1 3 】

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 ... (1)

(式中、

FR1、FR2、FR3、及びFR4はフレームワーク領域であり、

CDR1、CDR2、及びCDR3は相補性決定領域であり、以下の(Ⅰ)～(Ⅲ)の少なくとも一つを満たす：

(Ⅰ) CDR1は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

10

(Ⅱ) CDR2は配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(Ⅲ) CDR3は配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。)

20

[2] 前記CDR1は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有し、前記CDR2は配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有し、前記CDR3は配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する [1] に記載の抗体断片。

[3] 下記(i)～(xii)のCDR1、CDR2及び/又はCDR3を有する [1] 又は [2] に記載の抗体断片。

(i) CDR1: 配列番号5、CDR2: 配列番号12、CDR3: 配列番号19

(ii) CDR1: 配列番号6、CDR2: 配列番号13、CDR3: 配列番号20

(iii) CDR1: 配列番号7、CDR2: 配列番号14、CDR3: 配列番号21

(iv) CDR1: 配列番号8、CDR2: 配列番号15、CDR3: 配列番号22

(v) CDR1: 配列番号9、CDR2: 配列番号16、CDR3: 配列番号23

(vi) CDR1: 配列番号10、CDR2: 配列番号17、CDR3: 配列番号24

(vii) CDR1: 配列番号11、CDR2: 配列番号18、CDR3: 配列番号25

(viii) CDR1: 配列番号53

(ix) CDR1: 配列番号53、及び配列番号CDR3: 配列番号57

(x) CDR1: 配列番号54

(xi) CDR1: 配列番号55

(xii) CDR3: 配列番号58

30

40

[4] FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1～4で表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号1～4で表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号1～4で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する [1] ～ [3] のいずれか一項に記載の抗体断片。

[5] 配列番号26～32のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する [1] ～ [4] のいずれか一項に記載の抗体断片。

[6] [1] ～ [5] のいずれか一項に記載の抗体断片からなる第1の変領域と、HER2とは異なる抗原に特異的に結合する第2の変領域とを備え、前記第1の変領域と前記第2の変領域が単一のポリペプチド鎖上に含まれる、二重特異性抗体。

[7] 前記第2の変領域が、T細胞上の抗原に特異的に結合する、 [6] に記載の二重特

50

異性抗体。

[8] 前記第2の可変領域が、抗CD3抗体の重鎖の可変領域と、抗CD3抗体の軽鎖の可変領域とを含む [7] に記載の二重特異性抗体。

[9] 単量体、二量体、三量体、四量体、五量体又はそれらのFc領域融合体である [6] ~ [8] のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

[10] [1] ~ [5] のいずれか一項に記載の抗体断片又は [6] ~ [9] のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、蛍光物質、発光物質、低分子化合物、核酸、放射性物質、薬剤、毒素、サイトカイン、アルブミン、酵素、及び非ペプチド性ポリマーからなる群の少なくとも1種の化合物とが結合されたコンジュゲート抗体。

[11] [1] ~ [5] のいずれか一項に記載の抗体断片又は [6] ~ [9] のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする塩基配列を含む核酸分子。

[12] [11] に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

[13] [12] に記載の発現ベクターにより形質転換した宿主細胞。

[14] [1] ~ [5] のいずれか一項に記載の抗体断片又は [6] ~ [9] のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含有する医薬組成物。

[15] [1] ~ [5] のいずれか一項に記載の抗体断片又は [6] ~ [9] のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を備えたキット。

【発明の効果】

【0014】

本発明の抗体断片は、ヒトHER2を細胞表面に有する腫瘍細胞を標的とすることができる。また、かかる抗体断片を可変領域として備えた二重特異性抗体は、腫瘍細胞を標的として特異的に結合できると共に低濃度でも非常に高い細胞傷害性を有するため、臨床やがん細胞を用いた研究に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】フォーマットとなるT細胞リクルート抗体BiBianを示す略図。

【図2】(A)ベクター、(B)インサート、(C)BiBian 発現ベクターの略図。

【図3】HER2の細胞外領域構造(左)及び二量体化時に相互作用する領域(右)を示す分子モデル。

【図4】Dimer Armを調製するためのベクターのインサートの塩基配列及びアミノ酸配列

【図5】Domain II-Hisを調製するためのベクターのインサートの塩基配列及びアミノ酸配列。

【図6】Domain II-Fcを調製するためのベクターのインサートの塩基配列及びアミノ酸配列。

【図7】pcDNA3.1(+)-HER2 DomainII-HumanFc ベクターのベクターマップ。

【図8】(A) Dimer ArmのSDS-PAGE。レーン1: Precolumn、レーン2: F.T.、レーン3: 20 mM imidazole溶出、レーン4: 50mM imidazole溶出、レーン5: 300mM imidazole溶出、レーン6: 1M imidazole溶出、レーン7: 20mM imidazole溶出、レーン8: 50mM imidazole溶出、レーン9: 300mM imidazole溶出、レーン10: 1M imidazole溶出。レーン3-6はカラム1で行い、レーン7-10はカラム2で行った。抗体: 3 µL His-prob-HRP、条件: increment, standard。(B) FT画分を再度IMACしたSDS-PAGE。レーン1: 20mM imidazole溶出、レーン2: 1M imidazole溶出、レーン3: 20mM imidazole溶出、レーン4: 1M imidazole溶出。レーン1,2はカラム1で行い、レーン3,4はカラム2で行った。

【図9】(A) IMAC後のDomain II HisのSDS-PAGE及び(B) Western Blotting。レーン1: Precolumn、レーン2: F.T.1st、レーン3: F.T.2nd、レーン4: PBS、レーン5: 20m imidazole溶出M、レーン6: 50mM imidazole溶出、レーン7: 300mM imidazole溶出、レーン8: 1M imidazole溶出、レーン9: マーカー、レーン10: PBS、レーン11: 20mM imidazole溶出、レーン12: 50mM imidazole溶出、レーン13: 300mM imidazole溶出、レーン14: 1M imidazole溶出。レーン4-8はF.T.1回目、レーン10-14はF.T.2回目である。抗体: 3 µL His-prob-HRP、条件: increment, standard。(C) 300mM Imidazole溶出画分を用いたサイズ排除ク

10

20

30

40

50

ロマトグラフィー (SEC)。 (D) 1M Imidazole 溶出画分を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)。

【図 10】 (A) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 溶出ピークの新還元 SDS-PAGE 及び (B) Western Blotting。 レーン 1-14 は図 9 A と同じ。 抗体: 3 μ L His-prob-HRP、条件: increment, standard。

【図 11】 (A) Domain II-Fc 安定発現細胞株の限界希釈法による単クローン化と ELISA による発現量評価。 横軸はそれぞれの株に対応し、各株の番号は省略した。 (B) 選抜された 12 クローン 拡大培養後の ELISA による発現量評価。 (C) 2G4, 3E10, 及び 4D10 クローンのプロテイン A 精製後の SDS-PAGE, (D) Western Blotting 結果。 矢印で示すタンパク質の Number of amino acids: 383, Molecular weight: 42047.65, theoretical pI: 6.52、Ext. coefficient 44485。 3 μ L 抗ヒト IgG-Fc HRP で検出。 アクリルアミド濃度 12.5%。

10

【図 12】 実施例 3 ~ 5 で調製した HER2 断片蛋白質に対するバイオパニングの結果。 3 種のパニングデザイン (A) ver.1, (B) ver.2, (C) ver.3。

【図 13】 (A) - (F) 図 12 (A) - (C) の各ラウンドの phage の output/input 比 (-)。 (A) 及び (D) ver.1, (B) 及び (E) ver.2, (C) 及び (F) ver.3。

【図 14】 (A) - (C) 図 12 (A) - (C) の各ラウンドの溶出ファージを用いた HER2 断片蛋白質 4 種に対する結合活性評価。

【図 15】 (A) - (F) 精製した二重特異性抗体による細胞傷害性評価を示すグラフ。

【図 16】 標準的手法による T 細胞リクルート抗体の創出プロセス (左) 及びファージのモノクローナル化を経ない新規創出プロセス (右) を説明する略図。

20

【図 17】 抗体を発現していない大腸菌培養上清の細胞傷害性評価を示すグラフ。

【図 18】 (A) 抗体 BiBian の検出の作用機構を示す模式図、 (B) 精製 BiBian による検量線、 (C) Tag-sandwich ELISA による培地上清に含まれる BiBian の濃度定量、 (D) 図 18 (C) の Y 軸を拡大したグラフ。

【図 19】 (A) ~ (R) モノクローナル化された BiBian が発現している培地上清を用いた細胞傷害活性評価。

【図 20】 (A) ~ (E) 直接的 BiBian 化手法により選抜されてきた BiBian の精製サンプルによる細胞傷害活性評価。

【図 21】 (A) 標準的手法と (B) 直接的 BiBian 化手法でスクリーニングされたクローンの K_d 及び IC₅₀、 (C) 取得されたクローンの IC₅₀ 値の箱ひげ図による傾向分析。 エラーバーは最大値, 最小値を与えたプロット、箱内には全体の 50% のサンプルが含まれる。 箱内の横線は中央値を示す。

30

【図 22】 BiBian 6x3 を調製するためのベクターのインサートの塩基配列及びアミノ酸配列。 Z3 が可変領域断片 (VHH) を示す。

【図 23】 直接的 BiBian 化手法でスクリーニングされたクローン並びにその変異体の K_d 及び IC₅₀。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の第 1 の態様によれば、ヒト HER2 に特異的に結合する抗体断片であって、下記式 (1) の構造を有する単一ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を有する抗体断片が提供される。

40

【0017】

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 ... (1)

式中、

FR1、FR2、FR3、及び FR4 はフレームワーク領域であり、

CDR1、CDR2、及び CDR3 は相補性決定領域であり、

以下の (I) ~ (III) の少なくとも一つを満たす:

(I) CDR1 は、配列番号 5 ~ 11、53 ~ 55、及び 59 ~ 64 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号 5 ~ 11、53 ~ 55、及び 59 ~ 64 のいずれかで表されるアミノ酸配列において 1 から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号 5 ~ 11、53 ~ 55、及び 59 ~ 64 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 80% 以上の同一性を有

50

するアミノ酸配列を有する

(II) CDR2は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(III) CDR3は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0018】

後述するように、配列番号5はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンH44の可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号6はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンH48の可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号7はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンd8Dの可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号8はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンh11Eの可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号9はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf8Cの可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号10はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf10Dの可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号11はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf11Eの可変領域断片のアミノ酸配列26~35番目のアミノ酸配列に対応する。

【0019】

配列番号12はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンH44の可変領域断片のアミノ酸配列50~56番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号13はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンH48の可変領域断片のアミノ酸配列50~57番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号14はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンd8Dの可変領域断片のアミノ酸配列50~59番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号15はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンh11Eの可変領域断片のアミノ酸配列50~59番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号16はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf8Cの可変領域断片のアミノ酸配列50~59番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号17はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf10Dの可変領域断片のアミノ酸配列50~59番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号18はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf11Eの可変領域断片のアミノ酸配列50~59番目のアミノ酸配列に対応する。

【0020】

配列番号19はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンH44の可変領域断片のアミノ酸配列96~114番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号20はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンH48の可変領域断片のアミノ酸配列98~107番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号21はHER2 抗原に対する結合活性を有するクローンd8Dの可変領域断片のアミノ酸配列99~110番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号22はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンh11Eの可変領域断片のアミノ酸配列99~110番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号23はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf8Cの可変領域断片のアミノ酸配列99~105番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号24はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf10Dの可変領域断片のアミノ酸配列99~104番目のアミノ酸配列に対応し、配列番号25はHER2 抗原に対して高い結合を有するクローンf11Eの可変領域断片のアミノ酸配列99~113番目のアミノ酸配列に対応する。

【0021】

配列番号53は、HER2に対して高い結合親和性を有する改変BiBianクローン6×3のCDR1のアミノ酸配列(配列番号52のアミノ酸配列の54~59番目)に対応し、配列番号54~55及び59~64はかかるクローン6×3のCDR1の変異型である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

配列番号56は、HER2に対して高い結合親和性を有する改変BiBianクローン6×3のCDR3のアミノ酸配列（配列番号52のアミノ酸配列の118～122番目）に対応し、配列番号65～71はかかるクローン6×3のCDR3の変異型である。

【 0 0 2 3 】

配列番号57は、HER2に対して高い結合親和性を有する改変BiBianクローン6×3のCDR3のアミノ酸配列（配列番号52のアミノ酸配列の123～128目）に対応し、配列番号58及び配列番号72～84はかかるクローン6×3のCDR3の変異型である。

【 0 0 2 4 】

本明細書におけるアミノ酸配列又は塩基配列における配列同一性に関し、2つのアミノ酸配列又は塩基配列における配列同一性を決定するために、配列は比較に最適な状態に前処理される。例えば、一方の配列にギャップを入れることにより、他方の配列とのアラインメントの最適化を行なう。その後、各部位におけるアミノ酸残基又は塩基が比較される。第一の配列におけるある部位に、第二の配列の相当する部位と同じアミノ酸残基又は塩基が存在する場合、それらの配列は、その部位において同一である。2つの配列における同一性は、配列間での同一である部位数の全部位（全アミノ酸又は全塩基）数に対する百分率で示される。アミノ酸配列及び塩基配列の同一性は、例えば、Lipman-Pearson法（Science, 227,1435, 1985）等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較することにより決定することができる。

10

【 0 0 2 5 】

抗体断片の標的抗原は、ヒトHER2である。腫瘍としては、乳がん、胃がん、卵巣がん、子宮がん、膵臓がん、結腸がん、直腸がん、前立腺がん、唾液腺がん、腎臓がん、及び肺がんが含まれるがこれらに限定されない。

20

【 0 0 2 6 】

FR1、FR2、FR3、及びFR4は特に限定されないが、好ましくはそれぞれ配列番号1～4で表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号1～4で表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号1～4で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 7 】

配列番号1～4のアミノ酸配列は以下の通りである。

30

$X_1X_2QLVESGGX_3LVQX_4GGSLRLSX_5CAS$ （配列番号1）

$WX_1RQAPGKX_2REX_3VA$ （配列番号2）

$YX_1DSVKGRFTISRDNAX_2TVYLQMNSLKPEDTAVYYCX_3X_4$ （配列番号3）

$X_1GX_2GTX_3VX_4VSS$ （配列番号4）

配列番号1において、 X_1 はQ又はE、 X_2 はV又はL、 X_3 はT又はG、 X_4 はA又はP、 X_5 はF、Y又はVである。

【 0 0 2 8 】

配列番号2において、 X_1 はE、Q又はG、 X_2 はF、L又はW、 X_3 はS、A又はTである。

【 0 0 2 9 】

配列番号3において、 X_1 はN、K又はS、 X_2 はA、K、N、又はR、 X_3 はA、T、K又はV、 X_4 はR又はQ、

40

配列番号4において、 X_1 はW又はR、 X_2 はR又はQ、 X_3 はR又はQ、 X_4 はT又はIである。

【 0 0 3 0 】

FR1、FR2、FR3、及びFR4が配列番号1～4で表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0～3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。

【 0 0 3 1 】

FR1、FR2、FR3、及びFR4が配列番号1～4で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は80%以上であることが好ましく、90%以上で

50

あることがさらに好ましい。

【0032】

一実施形態において、上記抗体断片のFR1、FR2、FR3、及びFR4は、配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと少なくとも90%の配列同一性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと95%の配列同一性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと少なくとも98%の配列同一性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと100%の配列同一性を有する。

【0033】

一実施形態において、CDR1は、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。CDR1が配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR1が配列番号5~11、53~55、及び59~64で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

【0034】

別の実施形態において、CDR2は、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。CDR2が配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR2が12~18で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

【0035】

別の実施形態において、CDR3は、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。CDR3が配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR2が19~25、56~58、及び65~84で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

【0036】

別の実施形態において、CDR3は、配列番号56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を、又は配列番号56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

別の実施形態において、CDR3は、配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

【 0 0 3 8 】

CDR3が配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0～3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR2が19～25、56～58、及び65～84で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

【 0 0 3 9 】

別の実施形態において、上記抗体断片は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR3のうちの少なくとも一つを有する。

【 0 0 4 0 】

別の実施形態において、上記抗体断片は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

【 0 0 4 1 】

別の実施形態において、上記抗体断片は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

【 0 0 4 2 】

別の実施形態において、上記抗体断片は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配

10

20

30

40

50

列、又は配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

【0043】

別の実施形態において、上記抗体断片は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR3のうちの少なくとも一つを有する。

【0044】

別の実施形態において、上記抗体断片は、下記(i)～(xii)のCDR1、CDR2及び/又はCDR3を有する。

- (i) CDR1:配列番号5、CDR2:配列番号12、及びCDR3:配列番号19
- (ii) CDR1:配列番号6、CDR2:配列番号13、及びCDR3:配列番号20
- (iii) CDR1:配列番号7、CDR2:配列番号14、及びCDR3:配列番号21
- (iv) CDR1:配列番号8、CDR2:配列番号15、及びCDR3:配列番号22
- (v) CDR1:配列番号9、CDR2:配列番号16、及びCDR3:配列番号23
- (vi) CDR1:配列番号10、CDR2:配列番号17、及びCDR3:配列番号24
- (vii) CDR1:配列番号11、CDR2:配列番号18、及びCDR3:配列番号25
- (viii) CDR1:配列番号53
- (ix) CDR1:配列番号53、及びCDR3:配列番号57
- (x) CDR1:配列番号54
- (xi) CDR1:配列番号55
- (xii) CDR3:配列番号58

配列番号5～25、53～55、57～58のアミノ酸配列は以下の通りである。

- GRTFSSYAMG (配列番号5)
- GNIFSLNAMA (配列番号6)
- GRSLSSYAMG (配列番号7)
- GLSFSTFTMG (配列番号8)
- GGTFWRYAMG (配列番号9)
- GRTFITNAMG (配列番号10)
- GSTFSRNVMS (配列番号11)
- AIRLKTD (配列番号12)
- RITTTGGSPR (配列番号13)
- AISWGGSTY (配列番号14)
- AIGRTGGPAA (配列番号15)
- HANWSSGRIY (配列番号16)
- AIRWNGASTY (配列番号17)
- TISSGGGTTS (配列番号18)
- WLRRGYGASWYLTGADPRY (配列番号19)
- VKFSPNIREY (配列番号20)
- GSVWDDTQGPYW (配列番号21)
- GSSWYRGDEYDY (配列番号22)
- LSGGRQY (配列番号23)
- ARANIA (配列番号24)
- IVVTGKLMNLQVGEY (配列番号25)
- YAMGWY (配列番号53)
- RRVYWA (配列番号54)
- RSFRWY (配列番号55)
- RSFYWG (配列番号57)
- FNGLQY (配列番号57)
- RLRERG (配列番号58)

10

20

30

40

50

さらなる実施形態において、上記抗体断片は、配列番号26～32のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する。

QVQLVESGGTLVQAGGSLRRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAAI RLKTDYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMN
NSLKPEDTAVYYCAAWLRRGYGASWYLTGADPRYWGRGTRVTVSS (配列番号26)

QLQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCVASGNIFSLNAMAWYRQAPGKQRELVARITTTGGSPRYADSVKGRFTISRDNAKKTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCKTVKFSPNIREYWGQGTQVIVSS (配列番号27)

QLQLVESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGRSLSSYAMGWFRQAPGKERELVAAISWGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTV
YLQMNSLKPEDTAVYYCNAAGSVWDDTQGPYWGQGTQVTVSS (配列番号28)

EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASGLSFSTFTMGWFRQAPGKEREVFAAIGRTGGPAAYADSVKGRFTISRDNASTLY
LQMNSLKSEDTAVYYCAKGSWYRGDEYDYWGQGTQVTVSS (配列番号29)

ELQLVESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGGTFWRYAMGWFRQAPGKEREVFAHANWSGGRITYTDSVKGRFTISRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCRVLSGGRQYWGQGTQVTVSS (配列番号30)

QLQLVESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGRFTITNAMGWFRQAPGKEREVFAAIRWNGASTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAVYYCKTARANIRAGQGTQVTVSS (配列番号31)

QLQLVESGGGLVQPGGSLLLSCAASGSTFSRNVMSWVRQAPGKLEWVSTISSGGTTSYADSVKGRFTISRDNAKNVVY
LQMNSLKPEDTAVYYCNAIVVTGKLMNLQVGEYWDQGTQVTVSS (配列番号32)

本発明の第2の態様によれば、第1の態様の抗体断片からなる第1の可変領域と、HER2とは異なる抗原に特異的に結合する第2の可変領域とを備え、第1の可変領域と第2の可変領域が単一のポリペプチド鎖上に含まれる、二重特異性抗体が提供される。

【0045】

二重特異性抗体の第1の可変領域は、がん細胞結合ラクダ抗体中のシングルドメインである可変領域(以下、ラクダ抗体VHH)に基づいて設計することができる。

【0046】

T細胞上の抗原は、エフェクターT細胞上に位置する抗原であることが好ましく、そのような抗原としては、ヒトCD2抗原、ヒトCD3抗原、ヒトCD5抗原、ヒトCD16抗原、ヒトCD25抗原、ヒトCD28抗原、ヒトNKG2D抗原、T細胞受容体(TCR)等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0047】

一実施形態において、二重特異性抗体の第1の可変領域は、上記式(1)の構造を有する単一ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を有する。

【0048】

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 ... (1)

式中、

FR1、FR2、FR3、及びFR4はフレームワーク領域であり、

CDR1、CDR2、及びCDR3は相補性決定領域であり、以下の(I)～(III)の少なくとも一つを満たす：

(I) CDR1は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(II) CDR2は配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する

(III) CDR3は配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0049】

二重特異性抗体の第1の可変領域のFR1、FR2、FR3、及びFR4は特に限定されない。

【0050】

一実施形態において、二重特異性抗体の第1の可変領域のFR1、FR2、FR3、及びFR4は、配列番号1~4で表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号1~4で表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号1~4で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0051】

FR1、FR2、FR3、及びFR4が配列番号1~4で表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。

10

【0052】

FR1、FR2、FR3、及びFR4が配列番号1~4で表されるアミノ酸配列と70%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は80%以上であることが好ましく、90%以上であることがさらに好ましい。

【0053】

一実施形態において、二重特異性抗体の第1の可変領域のFR1、FR2、FR3、及びFR4は、配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと少なくとも90%の配列同一性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと95%の配列同一性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと少なくとも98%の配列同一性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、FR1、FR2、FR3、及びFR4は配列番号1~4のアミノ酸配列のそれぞれと100%の配列同一性を有する。

20

【0054】

一実施形態において、第1の可変領域のCDR1は、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。CDR1が配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR1が配列番号5~11、53~55、及び59~64で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

30

【0055】

別の実施形態において、第1の可変領域のCDR2は、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。CDR2が配列番号12~18のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR2が12~18で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

40

【0056】

別の実施形態において、第1の可変領域のCDR3は、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するか、配列番号19~25、56~58、及び65~84

50

のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有するか、又は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。CDR3が配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR2が19~25、56~58、及び65~84で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

【0057】

別の実施形態において、CDR3は、配列番号56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を、又は配列番号56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0058】

別の実施形態において、CDR3は、配列番号56、65~71のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号56、65~71のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号56、65~71のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号57~58及び72~84のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号57~58及び72~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号57~58及び72~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

【0059】

CDR3が配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列を有する場合、欠失、置換若しくは付加の数は、0~3個であることが好ましく、0個、1個、又は2個であることがより好ましく、0個又は1個であることがさらに好ましい。CDR2が19~25、56~58、及び65~84で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合、同一性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがさらに好ましい。

【0060】

別の実施形態において、上記第1の可変領域は、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号19~25、56~58、及び65~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

【0061】

別の実施形態において、上記第1の可変領域は、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号5~11、53~55、及び59~64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号57~58及び72~84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号57~58及び72~84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

別の実施形態において、上記第1の可変領域は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列、配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号56、65～71のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列と、配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列において1から数個の欠失、置換若しくは付加を含むアミノ酸配列、又は配列番号57～58及び72～84のいずれかで表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列とを有する。

10

【 0 0 6 3 】

別の実施形態において、第1の可変領域は、配列番号5～11、53～55、及び59～64のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号12～18のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR2、及び配列番号19～25、56～58、及び65～84のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するCDR3のうちの少なくとも一つを有する。

【 0 0 6 4 】

別の実施形態において、第1の可変領域は、下記(i)～(xii)のCDR1、CDR2及び / 又はCDR3を有する。

20

- (i) CDR1:配列番号5、CDR2:配列番号12、及びCDR3:配列番号19
- (ii) CDR1:配列番号6、CDR2:配列番号13、及びCDR3:配列番号20
- (iii) CDR1:配列番号7、CDR2:配列番号14、及びCDR3:配列番号21
- (iv) CDR1:配列番号8、CDR2:配列番号15、及びCDR3:配列番号22
- (v) CDR1:配列番号9、CDR2:配列番号16、及びCDR3:配列番号23
- (vi) CDR1:配列番号10、CDR2:配列番号17、及びCDR3:配列番号24
- (vii) CDR1:配列番号11、CDR2:配列番号18、及びCDR3:配列番号25
- (viii) CDR1:配列番号53
- (ix) CDR1:配列番号53、及び配列番号CDR3:57
- (x) CDR1:配列番号54
- (xi) CDR1:配列番号55
- (xii) CDR3:配列番号58

30

さらなる実施形態において、本発明の二重特異性抗体の第1の可変領域が配列番号26～32のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 6 5 】

二重特異性抗体の第2の可変領域は、HER2とは異なる抗原に特異的に結合する限り特に限定されず、例えばFab、dAb、scFv、ダイアボディ(diabody)、ユニボディ(unibody)、SMIPs、TandAbs、BiTEs、Fc融合タンパク質及びこれらの組合せ物等の、CDR領域を有する抗体断片であってもよい。

【 0 0 6 6 】

好ましくは二重特異性抗体の第2の可変領域は、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とを含み、より好ましくは同じ親抗体由来の重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とを含むダイアボディである。これらの一組の可変領域によりscFvを構成し、HER2とは異なる抗原に結合する。HER2とは異なる抗原としては、T細胞上の抗原が挙げられるがこれに限定されない。二重特異性抗体の第2の可変領域が特異的に結合する抗原がT細胞上の抗原である場合、第2の可変領域はT細胞上の抗原に対する公知の抗体の一部から構成することができる。例えばヒトCD2抗原に対する抗体、ヒトCD3抗原に対する抗体、ヒトCD5抗原に対する抗体、ヒトCD16抗原に対する抗体、ヒトCD25抗原に対する抗体、ヒトCD28抗原に対する抗体、ヒトNKG2D抗原に対する抗体、及びT細胞受容体(TCR)に対する抗体は各種のものが公知であり、当業者にはかかる抗体の構造を元に本発明の二重特異性抗体の第2の可変領域を作製

40

50

することができる。例えば、第2の可変領域をヒトCD3抗原に対する抗体から作製する場合、重鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号46、軽鎖の可変領域のアミノ酸配列は配列番号47とすることができる。

【0067】

重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域は、重鎖の可変領域が二重特異性抗体のN末端側にあってもよい（VH-VL型）し、軽鎖の可変領域が二重特異性抗体のN末端側にあってもよい（VL-VH型）。重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域の間には複数のアミノ酸からなるペプチドリンカーが含まれてもよいし、含まなくてもよい。ペプチドリンカーが含まれる場合、ペプチドリンカーのアミノ酸の長さは通常1~30個、好ましくは1~15個である。

【0068】

ペプチドリンカーを含まない場合、二つの可変領域が直接結合していても良い。このような場合には、各第2の可変領域の一本鎖抗体の三次元的自由度を高めて多量体化を促進させるために、各一本鎖抗体においてN末端側にあるヒト型化可変領域のC末端の1ないし数個のアミノ酸、又は、C末端側にあるヒト型化可変領域のN末端の1ないし数個のアミノ酸が除去されていることが好ましい。このような型の一本鎖抗体の一例として、VH-VL型において重鎖の可変領域のC末端のアミノ酸が1つ又は2つ除去された一本鎖抗体を挙げることができる。

【0069】

本発明の二重特異性抗体は、第1の可変領域及び第2の可変領域に加えて、任意選択で、重鎖の定常領域（CH1，CH2，CH3）、軽鎖の定常領域（CL）、ヒンジ領域等を含んでもよい。

【0070】

また、本発明の二重特異性抗体は、単量体に加えて、会合して二量体、三量体、四量体、五量体、又はそれらの単量体又は多量体にIgGのFc領域を融合させたFc領域融合体を形成することが可能である。IgGのFc領域の構造は周知であり、当業者には適宜選択することができる。

【0071】

本発明の抗体断片又は二重特異性抗体のIC₅₀は好ましくは50nM以下であり、より好ましくは10nM以下であり、より好ましくは1nM以下であり、より好ましくは0.5nM以下であり、より好ましくは0.3nM以下であり、より好ましくは0.2nM以下である。

【0072】

本発明の抗体断片又は二重特異性抗体の解離定数Kdは好ましくは 1×10^5 nM以下であり、より好ましくは 1×10^4 nM以下であり、より好ましくは 5×10^3 nM以下であり、より好ましくは 1×10^3 nM以下である。

【0073】

図1は、BiBian(Bispecific Bivalent antibody)とも称する、本発明の二重特異性抗体を作製するためのフォーマットとなるT細胞リクルート抗体の例を示す。T細胞リクルート抗体は、単一のポリペプチド鎖からなり、がん細胞上の標的抗原に特異的に結合する第1の可変領域と、標的抗原とは異なるT細胞上の抗原に特異的に結合する第2の可変領域とを備えている。第1の可変領域は、がん細胞結合ラクダ抗体のシングルドメインである可変領域VHHからなる。第2の可変領域は、T細胞上の抗原に特異的に結合する抗体（T細胞結合抗体）の重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域からなり、該重鎖の可変領域と該軽鎖の可変領域はペプチドリンカー（GGGGG）₁ ~ （GGGGG）₃で結合されている。第1の可変領域と第2の可変領域は、IgAヒンジ領域を介して連結されている。第1の可変領域の5'末端にはPeIBシグナル配列が付加されている。

【0074】

このBiBianは3つのドメインからなる単一遺伝子であり、T細胞標的Fv断片から設計されたホモ二量体の自発的会合により多価化を達成しているため、ダイアボディにみられる非機能的な会合体形成の懸念がない。また、BiBianは微生物発現系による調製が可能であ

10

20

30

40

50

る。そのため、BiBianに基づいて作製された3つのドメインからなる本発明の二重特異性抗体も、ダイアボディにみられる非機能的な会合体形成の懸念がなく、微生物発現系による調製が可能である。

【0075】

本発明の二重特異性抗体は、このようなT細胞リクルート抗体をフォーマットとして、ヒトHER2に結合性のドメインのドメインライブラリーを送出し、そこから多種多様なT細胞リクルート抗体遺伝子群を創出し、傷害活性スクリーニングにより選別、単離して得ることができる。

【0076】

本発明の第3の態様によれば、第1の態様の抗体断片又は第2の態様の抗体と、抗体以外の機能分子とが結合されたコンジュゲート抗体が提供される。抗体以外の機能分子としては、蛍光物質、発光物質、低分子化合物、核酸、放射性物質、薬剤、毒素、サイトカイン、アルブミン、酵素、及び非ペプチド性ポリマーからなる群の少なくとも1種の化合物が挙げられる。蛍光物質は、光のエネルギーが励起に用いられて発光する物質を指す。発光物質は、高い励起状態からより低い励起状態又は基底状態に遷移することにより光を発する物質であり、本明細書では化学反応により生じるエネルギーが励起源として用いられて発光する物質を指す。化学反応により生じるエネルギーが励起源として用いられて発光する物質を化学発光物質、化学反応の中でも特に生体内の化学反応により発光する物質を生物発光物質と呼ぶ。非ペプチド性ポリマーとしてはポリエチレングリコール(PEG)、ヒアルロン酸等が挙げられる。薬剤としては治療薬が挙げられる。治療薬としては、免疫調節薬、抗血管新生薬、抗増殖薬、アポトーシス促進剤、化学療法剤等が挙げられる。抗体以外の機能分子は、第1の態様の抗体断片又は第2の態様の抗体に対し、当該技術分野で確立された手法により化学的又は遺伝子工学的に結合される。

10

20

【0077】

好ましい抗体以外の機能分子は、蛍光物質、薬剤、又は核酸である。

【0078】

本発明の第4の態様によれば、上記の第1の態様の抗体断片又は第2の態様の二重特異性抗体をコードする塩基配列を含む核酸分子が提供される。なお「核酸」は、一本鎖ポリペプチドをコードする分子であれば、その化学構造及び取得経路に特に制限はなく、例えば、gDNA、cDNA、化学合成DNA及びmRNA等を含むものとする。

30

【0079】

第1の態様の抗体断片、第2の態様の二重特異性抗体、又は該二重特異性抗体の一部(例えば第1の可変領域、第2の可変領域)をコードする塩基配列、若しくは第2の態様の二重特異性抗体の可変領域をコードする核酸を作製する場合、予め設計されたアミノ酸配列に基づきオーバーラップPCR法により合成することができる。

【0080】

具体的には、cDNAライブラリーから、文献記載の配列に基づいてハイブリダイゼーションにより、あるいはポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)技術により単離されうる。一旦単離されれば、DNAは発現ベクター中に配置され、次いでこれを、大腸菌(E. coli)細胞、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、又はイムノグロブリンを産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞にトランスフェクションさせ、該組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成させることができる。PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えば R. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487,88; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990)); M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに

40

50

記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。またPCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

【0081】

DNAなど核酸の配列決定は、例えばSanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977)などを参考にすることができる。また一般的な組換えDNA技術は、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (ed.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)及びD. M. Glover et al. (ed.), "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)などを

10

【0082】

こうして取得された本発明の二重特異性抗体を構成する一本鎖ポリペプチド又はそれに含まれる各領域をコードする核酸は、目的に応じて、当業者に公知の手段により適宜所望のペプチド又はアミノ酸をコードするように改変することができる。この様にDNAを遺伝子的に改変又は修飾する技術は、Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. Mcpherson (Ed.), (IRL Press, Oxford, UK(1991)における総説において示されており、例えば、位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)、カセット変異誘発法及びポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)変異生成法を挙げることができる。

20

【0083】

ここで、核酸の「改変」とは、得られたオリジナルの核酸において、アミノ酸残基をコードする少なくとも一つのコドンにおける、塩基の挿入、欠失又は置換を意味する。例えば、オリジナルのアミノ酸残基をコードするコドンを、別のアミノ酸残基をコードするコドンにより置換することにより一本鎖ポリペプチドを構成するアミノ酸配列自体を改変する方法がある。

【0084】

又は、アミノ酸自体は変更せずに、CHO細胞等の宿主細胞にあったコドン(至適コドン)を使用するように、一本鎖ポリペプチドをコードする核酸を改変することも出来る。このように至適コドンに改変することによって、宿主細胞内における一本鎖ポリペプチドの発現効率等の向上を図ることが出来る。

30

【0085】

本発明の第5の態様によれば、第4の態様の核酸分子を含む発現ベクターが提供される。

【0086】

本発明の第1の態様の抗体断片及び第2の態様の二重特異性抗体は、当業者に公知の方法、例えば、遺伝子工学的的手法又は化学合成等の各種手段を用いて製造することが出来る。遺伝子工学的的手法としては、例えば、該抗体断片又は二重特異性抗体を構成するポリペプチドをコードする核酸を含有する複製可能な発現ベクターを作製し、このベクターで宿主細胞を形質転換せしめ、該形質転換された宿主細胞を培養して一本鎖ポリペプチドを発現させ、該ポリペプチドを回収・精製し、それらの一本鎖ポリペプチドを会合させ、形成された抗体分子を分離・回収することによって製造することが出来る。

40

【0087】

ここで、「複製可能な発現ベクター(replicable expression vector)」及び「発現ベクター(expression vector)」は、DNA(通常は二本鎖である)の断片(piece)をいい、該DNAは、その中に外来のDNAの断片を挿入せしめることができる。外来のDNAは、異種DNA(heterologous DNA)として定義され、このものは、対象宿主細胞においては天然では見出されないDNAである。ベクターは、外来DNA又は異種DNAを適切な宿主細胞に運ぶために使用される。一旦、宿主細胞中に入ると、ベクターは、宿主染色体DNAとは独立に複製することが可能であり、そしてベクター及びその挿入された(外来)DNAのいくつかのコピーが生成され得る。さらに、ベクターは外来DNAのポリペプチドへの翻訳を可能にするのに不可欠なエレメントを含む。従って、外来DNAによってコードされるポリペプチドの多く

50

の分子が迅速に合成されることができる。

【0088】

このようなベクターは、適切な宿主中で DNA配列を発現するように、適切な制御配列(control sequence)とそれが機能するように(operably) (即ち、外来DNAが発現できるように) 連結せしめられたDNA配列を含有する DNA構築物(DNA construct) を意味している。そうした制御配列としては、転写(transcription) させるためのプロモーター、そうした転写を制御するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードしている配列、エンハンサー、リアデニル化配列、及び転写や翻訳(translation) の終了を制御する配列等が挙げられる。更にベクターは、当業者に公知の各種の配列、例えば、制限酵素切断部位、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子(選択遺伝子)、シグナル配列、リーダー配列等を必要に応じて適宜含むことが出来る。これらの各種配列又は要素は、外来DNAの種類、使用する宿主細胞、培養培地等の条件に応じて、当業者が適宜選択して使用することが出来る。更に、製造した一本鎖ポリペプチドの検出及び精製等を容易にする目的のために、当業者に公知の各種のペプチドタグ(例えば、c-mycタグ及びHis-tag) をコードする配列を一本鎖ポリペプチドに対応する配列の末端等に含ませることが出来る。

10

【0089】

該ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、あるいは単純にゲノムの挿入体(genomic insert)等の任意の形態が可能である。一旦、適切な宿主の中に形質転換で導入せしめられると、該ベクターは宿主のゲノムとは独立して複製したり機能するものであり得る。又は、該ベクターはゲノムの中に組み込まれるものであってもよい。

20

【0090】

本発明の抗体断片又は二重特異性抗体を構成する一本鎖ポリペプチドを製造する為に使用する各種の発現ベクターは、当業者であれば、当該技術分野における公知技術を用いて容易に作製することが出来る。

【0091】

本発明の第6の態様によれば、第5の態様の発現ベクターにより形質転換した宿主細胞が提供される。

【0092】

宿主細胞としては当業者に公知の任意の細胞を使用することが出来るが、例えば、代表的な宿主細胞としては、大腸菌(E. coli)等の原核細胞、及び、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、ヒト由来細胞などの哺乳動物細胞、酵母、昆虫細胞等の真核細胞が挙げることができる。形質転換菌は当業者に公知の任意の抵当な条件・方法で培養することができる。宿主として、例えば、BL21 star(DE3)株、培地として2xYT培地、培養温度28前後、0.5 mM 程度のIPTGで発現を誘導することによって、培養上清又は可溶性画分における本発明の二重特異性抗体の収量を大幅に向上させることができ、製造効率を高めることが可能となる。

30

【0093】

このような宿主細胞における発現等により得られた一本鎖ポリペプチドは一般に分泌されたポリペプチドとして培養培地から回収されるが、それが分泌シグナルを持たずに直接に産生された場合には宿主細胞溶解物から回収することが出来る。一本鎖ポリペプチドが膜結合性である場合には、適当な洗浄剤(例えば、トライトン-X100)を使用して膜から遊離せしめることができる。精製操作は当業者に公知の任の方法を適宜組み合わせる事が出来る。例えば、必用に応じてPEG化等の化学修飾を行った後、遠心分離、硫酸アンモニウム沈殿、クロスフロー濃縮、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースでのクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン樹脂クロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム等)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及びアフィニティークロマトグラフィーによって好適に精製される。アフィニティークロマトグラフィーは、一本鎖ポリペプチドが有するペプチドタグとの親和力を利用した効率が高い好ましい精製技術の一つである。

40

50

【0094】

回収された一本鎖ポリペプチドは不溶性画分に含まれている場合には、精製操作は、一本鎖ポリペプチドを可溶化し変性状態にした上で行うことが好ましい。この可溶化処理は、エタノールなどのアルコール類、各種試薬類、グアニジン塩酸塩、尿素などの解離剤として当業者に公知の任意の薬剤を使用して行うことが出来る。更に、こうして精製された同一種類又は2種類の一本鎖ポリペプチドを会合（巻き戻し）せしめ、形成された抗体を分離して回収することによって、本発明の二重特異性抗体を製造することが出来る。

【0095】

会合処理は、単独の一本鎖ポリペプチドを適切な空間的配置に戻すことによって、所望の生物活性を有する状態に戻すことを意味する。従って、会合処理は、ポリペプチド同志あるいはドメイン同志を会合した状態に戻すという意味も有しているので「再会合」ともいうことができるし、所望の生物活性を有するものにするという意味で、再構成ということもでき、或いは、リフォールディング (refolding) と呼ぶことが出来る。会合処理は当業者に公知の任意の方法で行うことが出来るが、例えば、透析操作により、一本鎖ポリペプチドを含むバッファ溶液中の変性剤（例えば、塩酸グアニジン）の濃度を段階的に下げる方法が好ましい。この過程で、凝集抑制剤、及び酸化剤を反応系に適宜添加することによって、酸化反応の促進を図ることも可能である。形成された多量体化低分子抗体の分離及び回収も当業者に公知の任意の方法で行うことが出来る。

10

【0096】

以上に示したように、本発明の抗体断片又は二重特異性抗体は、例えば、培養宿主細胞の培養培地上清、ペリプラズマ画分、菌体内可溶性画分、又は、菌体内不溶性画分から調製することが可能である。

20

【0097】

本発明の第7の態様によれば、第1の態様の抗体断片又は第2の態様の二重特異性抗体を含有する医薬組成物が提供される。

【0098】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗体断片又は二重特異性抗体、核酸、ベクター、及び形質転換された宿主細胞から成る群から選ばれたものを有効成分として含有することを特徴とする。かかる有効成分は、以下の実施例に示されているように、インビトロ及びインビボで上皮細胞成長因子受容体を発現する（陽性）腫瘍細胞を有意に排除・殺傷・傷害する作用を有しているので、本発明の医薬組成物はこのような腫瘍細胞に対する抗腫瘍剤として使用することが出来る。

30

【0099】

本発明の有効成分の有効量は、例えば治療目的、腫瘍の種類、部位及び大きさ等の投与対象における病状、患者の諸条件、及び投与経路等によって当業者が適宜決めることが出来る。典型的な1回の投与量又は日用量は、上記の条件に応じ、可能ならば、例えば当分野で既知の腫瘍細胞の生存又は生長についての検定法を使用して、まずインビトロで、そして次に、人間の患者のための用量範囲を外挿し得る適切な動物モデルで、適当な用量範囲を決定することもできる。

【0100】

本発明の医薬組成物には、有効成分の種類、薬剤形態、投与方法・目的、投与対象の病態等の各種条件に応じて、有効成分に加えて当業者に周知の薬学上許容し得る各種成分（例えば、担体、賦形剤、緩衝剤、安定化剤、等）を適宜添加することが出来る。

40

【0101】

本発明の医薬組成物は、上記各種条件に応じて、錠剤、液剤、粉末、ゲル、及び、噴霧剤、或いは、マイクロカプセル、コロイド状分配系（リポソーム、マイクロエマルジョン等）、及びマクロエマルジョン等の種々薬剤形態をとり得る。

【0102】

投与方法としては、静脈内、腹腔内、脳内、脊髄内、筋肉内、眼内、動脈内、特に胆管内、又は病変内経路による注入又は注射、及び持続放出型システム製剤による方法が挙

50

げられる。本発明の活性物質は、輸液により連続的に、又は大量注射により投与されることができ。尚、本発明の医薬組成物を投与する場合には、食作用又は細胞傷害活性を有する細胞と共に投与することが好ましい。或いは、投与前に本発明の二重特異性抗体のような有効成分と上記細胞とを混合することによって、投与前に該抗体を予め該細胞に結合させておくことが好ましい。

【0103】

持続放出製剤は、一般的には、そこから本発明の活性物質をある程度の時間放出することができる形態のものであり、持続放出調製物の好適な例は、蛋白質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性担体を含み、該担体は、例えばフィルム又はマイクロカプセル等の成型物の形態のものである。

10

【0104】

本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十三改正 日本薬局方解説書、平成8年7月10日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して製造することができる。

【0105】

本発明の第8の態様によれば、第1の態様の抗体断片又は第2の態様の二重特異性抗体を備えたキットが提供される。キットは、本発明の二重特異性抗体の他に、二重特異性抗体を収容するための容器、注射針、薬学的に許容される媒体、アルコール綿布、絆創膏、又は使用方法を記載した指示書等を備えることもできる。

20

【0106】

本発明の第9の態様によれば、腫瘍細胞上の標的抗原に特異的に結合する第1の可変領域と、前記標的抗原とは異なる抗原に特異的に結合する第2の可変領域とを備え、前記第1の可変領域と前記第2の可変領域が単一のポリペプチド鎖上に含まれる、二重特異性抗体をスクリーニングする方法が提供される。腫瘍細胞上の標的抗原は好ましくはHER2であり、より好ましくはヒトHER2である。前記標的抗原とは異なる抗原は、好ましくは標的抗原とは異なるT細胞上の抗原である。

【0107】

一実施形態において、上記二重特異性抗体をスクリーニングする方法は、ラマ由来ナイーブVHHライブラリー遺伝子を含む第1のベクターをパニングし、標的抗原へ結合陽性を示す種々のVHHを有するポリクローナルなファージミドベクターを調製すること、前記VHHを含む第1のベクターにより形質転換された宿主細胞をモノクローナル化すること、モノクローナル化したベクターから標的抗原との結合活性に基づいてクローンを選択すること、選択クローンから腫瘍細胞上の標的抗原に特異的に結合する第1の可変領域を切断し、標的抗原とは異なる抗原に特異的に結合する第2の可変領域を有する第2のベクターに、第1の可変領域と第2の可変領域とが単一のポリペプチド鎖上に含まれるように挿入すること、前記第2のベクターにより形質転換された宿主細胞をクローニングすること、及び細胞傷害活性に基づいて宿主細胞のクローンを選択することを含む（第1のスクリーニング方法）。

30

【0108】

このような構成によれば、腫瘍細胞に特異的に結合し、細胞傷害活性を有する二重特異性抗体を短時間で高精度にスクリーニングすることができる。

40

【0109】

標的抗原は好ましくはHER2であり、より好ましくはヒトHER2である。

【0110】

前記細胞傷害活性に基づくクローンの選択は通常、基準値よりも細胞傷害活性が高いか否かで判定し、基準値よりも細胞傷害活性が高いクローンを選択する。基準値は、標的抗原に対するT細胞の公知の細胞傷害活性の値、又はその分数倍、もしくはその整数倍であってもよく、当業者には適宜決定することができる。

【0111】

別の実施形態において、上記二重特異性抗体をスクリーニングする方法は、ラマ由来ナ

50

イーブVHHライブラリー遺伝子を含む第1のベクターをパニングし、標的抗原へ結合陽性を示す種々のVHHを有するポリクローナルなファージミドベクターを調製すること、前記VHHを切断し、標的抗原とは異なる抗原に特異的に結合する第2の可変領域を有する第2のベクターに、上記切断したVHHからなる第1の可変領域と第2の可変領域とが単一のポリペプチド鎖上に含まれるように挿入すること、前記第2のベクターにより形質転換された宿主細胞をモノクローナル化すること、及び細胞傷害活性に基づいてクローンを選択することを含む（第2のスクリーニング方法）。

【0112】

このような構成によれば、腫瘍細胞に特異的に結合し、細胞傷害活性を有する二重特異性抗体を、上記第1のスクリーニング方法よりもさらに短時間で高精度にスクリーニングすることができる。

10

【0113】

上記二重特異性抗体をスクリーニングする方法における標的抗原は好ましくはHER2であり、より好ましくはヒトのHER2である。

【0114】

前記細胞傷害活性に基づくクローンの選択は通常、基準値よりも細胞傷害活性が高いか否かで判定し、基準値よりも細胞傷害活性が高いクローンを選択する。基準値は、標的抗原に対するT細胞の公知の細胞傷害活性の値、又はその分数倍、もしくはその整数倍であってもよく、当業者には適宜決定することができる。

20

【0115】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【実施例】

【0116】

実施例1 フォーマット抗体BiBian遺伝子の構築

PCRによりベクター（図2A）とインサート（図2B）の両断片に Sfi I サイトを付加した。ベクター側は pRA1-1a1 VHH-HL 型 OKT3 scFv（配列番号33）を鋳型として利用し（図2A）、inverse PCRにより調製した。ベクターとインサートいずれも Sfi I によって 50、3 hr の反応で制限酵素処理した。ベクター側はセルフライゲーションを防ぐために Dpn I 処理後にライゲーションし、形質転換、ミニプレップ、シーケンシングにより目的 VHH 配列が導入されていることを確認することで BiBian 発現ベクターを構築した（図2C）。

30

【0117】

実施例2 標的抗原HER2断片の調製

本実施例では、VHH断片が標的とする抗原として、乳癌をはじめとして複数のがんでの過剰発現が報告されているHER2を選択した。

【0118】

HER2分子には対応するリガンドはいまだ見つかっておらず、現在のところ対応するリガンドは存在しないと言われている。HER2分子自身は、リガンドがなくてもシグナル伝達を行うことができる。HER2分子自身は、リガンドに結合しなくてもHER2ホモ二量体を形成することができ、また、リガンドと結合して構造変化した他のErbB分子とも二量体を形成でき、リガンドと相互作用していない状態で増殖シグナルを伝達できる。このため、HER2を介した増殖シグナルの遮断には二量体化阻害デザインが有効と考える研究があり、Matthewらが報告しているHER2二量体化時に相互作用する領域（Dimerization Arm）（Matthew. C.F., et al., Cancer Cell, 2004, 5, 317-328）（図3）が二量体化阻害によるがん細胞の増殖抑制というアプローチにおいて有効な標的部位になり得る。

40

【0119】

そこで、本発明者らはHER2のなかでも二量体形成に関与しているDomain IIに対するVHH抗体の取得を目指した。Domain IIはジスルフィドリッチなドメインであるため、機能的な構造を維持したDomain II調製が困難となる可能性がある。そこで、(1) Domai

50

n II の中でも二量体化時に相互作用領域として同定されている Dimerization Arm に His タグを融合させた HER2 断片蛋白質(Dimer Arm)及び(2)Domain II に His タグを融合させた HER2 断片蛋白質(Domain II-His)の 2 種を大腸菌発現系により調製した。また(3)Domain II にFc タグを融合させた HER2 断片蛋白質 (Domain II-Fc)を哺乳細胞発現系により調製することで、合計 3 種の HER2 断片蛋白質の調製を試みた。

【 0 1 2 0 】

HER2 断片蛋白質Dimer Armを調製するためのベクターのインサートの塩基配列 (配列番号34) 及びアミノ酸配列 (配列番号35) を図4に示す。

【 0 1 2 1 】

pRA-OKT3 ベクター (Scientific Reports, 7, 2862 (2017). DOI:10.1038/s41598-017-03101-4参照) を Nco I, Spe I 消化したものに、pKHI-HER2 ベクターから下記プライマーで増幅し Nco I, Spe I 消化した断片を挿入することで作成した。

Fw プライマー ; NcoI-DimerArm

NNNCCATGGCCGGATCCCTGCACTGCCAGCC (配列番号36)

Rv プライマー ; DimerArm-His-SpeI

NNNACTAGTGCTATTAATGGTGGTGATGATGGTGCGCCGCGACGAGGGTGCAGGATCCCA (配列番号37)

HER2 断片蛋白質Domain II-Hisを調製するためのベクターのインサートの塩基配列 (配列番号38) 及びアミノ酸配列 (配列番号39) を図5に示す。

【 0 1 2 2 】

pRA-OKT3 ベクターを Nco I, Spe I 消化したものに、pKHI-HER2 ベクターから下記プライマーで増幅しNco I, Spe I消化した断片を挿入することで作成した。

Fw プライマー ; NcoI-her2 DomainII

NNNCCATGGCCGGATCCACGCGCACTGTCTGTGC (配列番号40)

Rv プライマー ; her2 DomainII-His-SpeI

NNNACTAGTGCTATTAATGGTGGTGATGATGGTGCGCCGCGATTGGCACTGGTAACTGCCCT (配列番号41)

HER2 断片蛋白質Domain II-Fcを調製するためのベクターのインサートの塩基配列 (配列番号42) 及びアミノ酸配列 (配列番号43) を図6に示す。

【 0 1 2 3 】

pcDNA-3.1(+)ベクターを Sfi I 消化したものに、pKHI-HER2 ベクターから下記プライマーで増幅・Sfi I 消化した断片を挿入することで作成した。

Fw プライマー ; SfiI-her2 DomainII

NNNGGCCAGCCGGCCACGCGCACTGTCTGTGC (配列番号44)

Rv プライマー ; her2 DomainII-SfiI

NNNGGCCGAGAGGCCGCGATTGGCACTGGTAACTGCCCT (配列番号45)

Domain II-Fc を調製するために構築した pcDNA3.1(+)-Her2 DomainII-HumanFc ベクターのベクターマップを図7に示す。

【 0 1 2 4 】

実施例 3 Dimer Armの調製

表1に示した条件で大腸菌 BL21(DE3)株を培養し、菌体分離後の培地上清画分から Dimer Armを精製した。具体的には、Dimer Armの遺伝子断片を含むpET系ベクターで形質転換した大腸菌BL21(DE3)を100 µg/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地にプレーティングし、28℃で20~24時間培養した。そして、プレート培地に形成された5コロニーを100 µg/mLのアンピシリンを含む50 mLのLB液体培地に植菌し、28℃で一晩振盪培養した。次に、その培養液から5 mL分を500 mLの2×YT液体培地に植え継ぎ、28℃で振盪培養した。培養液のO.D.600が0.8となった時点で振盪培養を停止し、フラスコを氷中に10分間静置した後、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を終濃度1 mMとなるように添加した。IPTG添加後の誘導培養温度は28℃として、引き続き16時間振盪培養した。その後遠心分離により培地上清画分を回収し、Ni-sepharoseカラムを用いた固定化金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)により粗精製した。粗精製したDimer Armは、1mM EDTAを含むPBS緩衝液を展開液としたサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製することで、

10

20

30

40

50

最終精製物とした。

【 0 1 2 5 】

IMAC 精製後の溶出画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により確認したところ、300 mM 及び 1 M imidazole 濃度の溶出画分に目的とされる分子量をもつ蛋白質が確認された (図8A)。またカラム非吸着画分 (FT)を用いて再度 IMAC 精製し、1 M imidazole/PBS で溶出したところ、こちらでも目的分子量付近にバンドを確認できた (図8B)。各溶出画分のうち最も精製度が高かった 1 M imidazole/PBS での溶出画分 (図8Aのレーン10) を用いて後述のバイオパニングを行った。

【 0 1 2 6 】

【表 1】

10

表 1. Dimer Arm-His の各画分への最適発現条件

| 大腸菌画分 | 発現条件 |
|-------|---------------------------|
| 培地上清 | IPTG 0.1 mM, 28 °C, 16 hr |
| 可溶性画分 | 発現条件なし |
| 不溶性画分 | IPTG 1 mM, 28 °C, 16 hr |

【 0 1 2 7 】

20

実施例 4 Domain II-His の調製

表2に示した条件で大腸菌 BL21(DE3)株を培養し、菌体分離後の培地上清画分から Dimer Arm II-Hisを精製した。具体的には、Dimer Armの遺伝子断片を含むpET系ベクターで形質転換した大腸菌BL21(DE3)を100 µg/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地にプレティングし、28 °Cで20~24時間培養した。そして、プレート培地に形成された5コロニーを100 µg/mLのアンピシリンを含む50 mLのLB液体培地に植菌し、28 °Cで一晩振盪培養した。次に、その培養液から5 mL分を500 mLの2×YT液体培地に植え継ぎ、28 °Cで振盪培養した。培養液のO.D.600が0.8となった時点で振盪培養を停止し、フラスコを氷中に10分間静置した後、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1 mMとなるように添加した。IPTG添加後の誘導培養温度は15 °Cとして、引き続き16時間以上振盪培養した。その後、遠心分離により沈殿画分を回収し、沈殿した菌体を超音波破碎した後、再び遠心分離を行い、上清画分を回収した。そして、その溶液をNi-sepharoseカラムを用いた固定化金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC)により粗精製した。粗精製したDimer Armは、1mM EDTAを含むPBS緩衝液を展開液としたサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製することで、最終精製物とした。

30

【 0 1 2 8 】

IMAC 精製後の溶出画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 及びWestern Blottingにより確認したところ、300 mM及び 1 M Imidazole 濃度の溶出画分に目的分子量のバンドが確認できた (図9A,B)。そこで、両溶出画分を用いて SEC による更なる精製を行ったところ、複数の溶出ピークが得られた (図9C,D)。

40

【 0 1 2 9 】

Domain II は 11 対のジスルフィド結合を有するため、分子間架橋による複数分子複合体が形成されている可能性がある。そこで、非還元 SDS-PAGE を用いてジスルフィド結合を維持させた状態で評価したところ、溶出位置の違いによって様々なサイズの会合体がジスルフィド結合を介して形成されていることが分かった (図10)。そのうち、最も精製度が高かった画分 (図9 (D) の B3 画分)をパニングに用いることにした。

【 0 1 3 0 】

【表 2】

表 2 Domain II His の各画分への最適発現条件

| 大腸菌画分 | 発現条件 |
|-------|-----------------------------------|
| 培地上清 | IPTG 0.1 mM, 15 °C, 16 hr |
| 可溶性画分 | IPTG 0.1 mM, 15 °C, 16 hr |
| 不溶性画分 | IPTG 0.1 mM or 1 mM, 28 °C, 16 hr |

10

【 0 1 3 1 】

実施例 5 Domain II-Fc の調製

HER2 の Domain II 領域には 11 対ものジスルフィド結合があることが知られており、大腸菌を宿主とした際に難発現性になることが予見された。そこで、哺乳細胞を用いた発現系も大腸菌発現系と同時に構築した。哺乳細胞を用いた発現にあたり、種々の蛋白質への融合で発現量の向上、安定性向上が報告されているヒト IgG1 抗体由来の Fc ドメインを C 末端に融合させた Domain II-Fc を設計した (塩基配列及びアミノ酸配列は実施例 2 に記載済)。

【 0 1 3 2 】

まず、CHO 細胞及び HEK293T 細胞を用いた一過性発現を試みた。培養上清を用いたドットプロットングにより Domain II-Fc の発現は確認されたものの期待された収量は得られなかった。そこで、CHO 細胞を用いた安定発現株の樹立を目指した。

20

【 0 1 3 3 】

リポフェクション法により pcDNA3.1(+)-Domain II-Fc プラスミドを CHO 細胞に形質導入後、G418 含有 RPMI 培地で拡大培養した後、限界希釈法により 96-well プレート 4 枚に 1 cell/well になるように形質導入後 CHO 細胞を播種した。播種 15 日後に培養上清を用いて ELISA による発現量評価を行い(図11A)、高発現な 12 クローン(1B6、1A9、2G4、2A5、2B8、3B5、3E8、3E10、3H10、4A6、4B7、4D10)を単離し、24-well プレートを用いた拡大培養を行った。ELISA による発現量評価を再度行い、その結果から 2G4、3E10、4D10の3つのクローンを大量培養クローン候補に決定した(図11B)。

30

【 0 1 3 4 】

大量培養後の培養上清を Abcapture Extra(プロテノバ、Japan)を用いて Protein A 精製を行い、その溶出液を SDS-PAGE、Western Blotting により収量比較した結果、2G4 をベストクローンとして決定した(図11C,D)。クローン 2G4 により発現させた Domain II-Fc は Protein A カラムにて精製した後、1 mM EDTA/PBS に透析することで精製した。

【 0 1 3 5 】

実施例 6 M13ファージを用いたバイオパニング

前述したとおり、本章にて標的としている HER2 Domain II は 11 対のジスルフィド結合を有する複雑な構造であり、いずれの HER2 断片蛋白質も機能的な構造を維持していない可能性がある。そこで、実施例 3 ~ 5 にて調製した HER2 断片蛋白質三種 (Dimer Arm、Domain II-His、Domain II-Fc)に加え、既に上市されている HER2 特異的抗体が結合することが分かっている whole HER2 (ACROBiosystems、DE、USA)を購入し、これら四種の抗原を組み合わせたパニングを行うことにした。

40

【 0 1 3 6 】

本研究では、3 種のパニング方法 (ver.1、ver.2、ver.3) を用いて生体外選択法を行った (図12A-C)。3 種のパニング法は、いずれも 1st ラウンドにおいて HER2 の二量体化阻害が期待できる領域に対する配列認識型の結合性ファージを選択し、2nd ラウンドにおいて配列認識型ファージ群の中から正しい構造に対しても結合可能な配列・構造認識型のファージが濃縮されるようデザインした。

50

【 0 1 3 7 】

本実施例で行ったパニング法の詳細について説明する。琉球大学 岸本英博教授と村上明一助教より提供を受けたラマ由来ナイーブ VHH ライブラリー遺伝子(ライブラリー規模: 1.0×10^{10} cfu)を用いて、エレクトロポレーション法により大腸菌TG-1 株を形質転換し、プレティング後 37℃、一晩インキュベートした。その後、スプレッターによりコロニーをこそぎとり、O.D.600 が 0.1 になるように 1 mg/ml アンピシリンを含む 50 ml 培地に添加し、O.D. 600 が約 0.5 となるまで培養した。ヘルパーファージ M13K07 (1×10^{11} cfu/ml $\times 20 \mu\text{L}$)を感染させ、30℃、45 min~1 hr 静置後、終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ になるようにカナマイシンを添加し一晩培養(100 rpm、30℃)した。大腸菌を集菌後、終濃度 5% PEG 6000 / 0.5 M NaCl 溶液になるように 40 ml の培地上清に対して、25% PEG 6000 / 2.5 M NaCl 溶液を 10 ml 加え水中にて 1 hr 静置した。遠心分離後(60 min、10000 rpm、0℃)、ファージ沈殿物を 10% glycerol / PBS 溶液 1.5 mL に懸濁しファージライブラリーを調製した。

10

【 0 1 3 8 】

MAXISORP immune-tube (444202; thermo scientific、USA)に 0.05% アジ化ナトリウム/PBS 2 mL、各 HER2 抗原蛋白質 (終濃度; Dimer Arm: 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Domain II-His: 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Domain II-Fc: 10 $\mu\text{g/ml}$ 、Whole HER2: 2 $\mu\text{g/ml}$)を添加し 4℃、一晩又は 25℃、1~2 hr 静置して固相化させた。PBS で洗浄後、3% Skim milk/PBS 溶液で immune tube 全体をブロッキング(25℃、30 min)させ、PBS で 5 回洗浄した。3 ml の 5%BSA / 5%HSA / 3%Skim milk/ PBS を添加し、Diversity が確保できる量(50~100 μL)のファージライブラリー溶液を加えてボルテックスした後、30 min 間室温静置させてからゆるやかに回転攪拌(30 min~1 hr、6 rpm、室温)し、再び 30 min~1 hr 室温静置したのちに0.05% Tween 20/ PBS で 10 回洗浄した。1 ml の 100 mM トリエチルアミン水溶液にて結合しているファージを溶出後、1 mL の 0.5 M Tris-HCl 溶液と混合して中和させた。再度1 ml の100mM トリエチルアミン水溶液を添加し、ゆるやかに回転攪拌(10 min、6 rpm、室温)後に先ほどの中和液に回収した。溶出ファージは 1.5 ml 分をグリセロールストック、残り 1.5 mL 分を O.D.600が約 0.5 となるまで培養した TG-1 に感染させた。30℃、45 min~1 hr 静置後、遠心操作により上清を除去し、2 \times YT/ 1% glucose/ Amp+プレート2 枚にプレティングすることでファージミドベクターを保持した TG-1 をコロニー化させた。これらパニング操作をラウンド毎に抗原を変更しながら 2 ラウンド繰り返し返した。

20

30

【 0 1 3 9 】

パニングの結果、ver.1, 2, 3 における 2nd ラウンドでの output phage / input phage(O/I)はそれぞれ 0.54×10^{-5} 、 0.89×10^{-5} 、 2.4×10^{-5} であり、1st ラウンドからの enrichment factor(2nd(O/I) / 1st(O/I))は 109、36、52 倍であった(図13A-C)。これより結合性ファージの濃縮が示唆されたため、ポリクローナルな状態で initial library、1st round eluted phage、2nd round eluted phage を用いた ELISAによる結合活性評価を行った(図14A-C)。

【 0 1 4 0 】

本実施例で行ったELISAの詳細について説明する。96-wellプレートに1~2 $\mu\text{g/ml}$ になるようにPBSにて希釈調製した各種HER2断片蛋白質を50 μL 添加し、25℃で1時間穏やかにプレートを振盪させて固相化した。その後、溶液を除き150 μL のPBSで1回洗浄した。続いてPBS/ 0.1% Tween20/ 3% skim milkを150 μL 添加し、25℃で1時間ブロッキングした。反応溶液を除き150 μL のPBSで1回洗浄後、精製ファージ又はファージ含有培地上清を50 μL 添加し、室温で30分間反応させてから反応溶液を除き、PBS/ 0.1% Tween 20で3回洗浄を行った。続いて、PBS/0.1% Tween20/ 0.5% BSAで5000倍希釈したAnti-M13-HRP (GE healthcare, CT, USA)を50 μL 添加して25℃で40分間抗体反応を行った後、反応溶液を除きPBS/ 0.1% Tween 20で3回洗浄した。その後、TMB溶液 (1-Step (登録商標) Ultra TMB-ELISA Substrate Solution; Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を50 μL 添加することで呈色反応を行い、2M H_2SO_4 溶液を50 μL 添加することで反応を停止させた。450 nmの

40

50

吸光度はプレートリーダー (Synergy (登録商標) H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader; BioTek, VT, USA)にて測定した。

【0141】

その結果、ver.1, 2, 3全てで結合性ファージの濃縮傾向がみられた。ver.2, 3では、1st ラウンドに用いた HER2 抗原 (ver.2: Domain II-His、ver.3: Domain II-Fc) に対する結合活性が 2nd ラウンド後にも向上していることがわかった。一方 ver.1 では、1st ラウンドに用いた Dimer Arm に対する 2nd round eluted phage の結合活性は微減したものの、whole HER2 に対する結合活性は 2 倍向上し、かつ Domain II-His、Domain II-Fc に対する結合活性も向上がみられた。以上の結果より Her2 Domain II に対する結合性ファージは濃縮されていると判断し、2nd round eluted phage pool からファージのモノクローナル化による二重特異性抗体の構築(実施例7)及びポリクローナル 改変 BiBian 遺伝子の構築(実施例8)を試みた。

10

【0142】

実施例7 ファージのモノクローナル化を経る標準手法によるBiBianをフォーマットとする二重特異性抗体の構築

1. ELISAによるモノクローナルファージの結合活性評価

2nd パニング後のファージが感染した TG-1 株を LB/amp プレートにプレーティングし、37 12 hr インキュベートしたのち、1 コロニーずつ Deep well plate(P-2ML-SQ-C; Axxygen, Japan)に播種することでファージをモノクローナル化した。パニング version 毎に 96 クローン、合計で 288クローンを単離し 96-well プレートにおけるファージ調製プロトコールに基づいてモノクローナルファージを調製した。

20

【0143】

次に、ELISA による結合活性評価を行うことで有望クローンの特定を試みた。まず、HER2 陽性細胞 DG44 (HER2+)を用いた phage-cell ELISA により細胞表面へと発現している HER2 分子への結合活性を評価した(データ非図示)。その結果、パニング ver.2(Domain II-His x whole HER2)より単離した2つのクローンと、パニング ver.3(Domain II-Fc x whole HER2)より単離した1つのクローンとの3クローンにおいて高い結合活性(abs. at 450 nm > 1.5)が観測され(データ非図示)、中程度の結合活性(1.5 > abs. at 450 nm > 0.4)が3つの別のクローンにおいて観測された(データ非図示)。

30

【0144】

また、細胞表面 HER2 に対する選択的結合を評価するため、DG44-HER2 細胞に対する結合活性を CHO(-)細胞に対する結合活性で割った値を S/N ratio としてクローン毎に算出した(データ非図示)。DG44-HER2 細胞に対する選択的な結合(S/N 1.0)がみられたのは 88 クローン中 version 1、2、3 でそれぞれ 34、41、24 クローンであった。

【0145】

次に、パニングに用いた各 HER2 断片蛋白質に対する結合活性を phage ELISA により評価した。その結果、パニングデザイン ver.1(Dimer Arm x whole HER2)に由来するクローン及び ver.2(Domain II-His x whole HER2)に由来するクローンにおいて、3種の HER2 抗原いずれに対しても高い結合活性が(abs. at 450 nm > 1.5)が観測され、これら3クローンは His タグ、Fc タグではなく、HER2 部分を認識していることが示唆された。また、パニングデザイン ver.3(Domain II-Fc x whole HER2)に由来するクローンは、そのほとんどが negative control である IgG 抗体、及び Hippap-Fc に対して結合活性を示した(データ非図示)。これは、単離されたクローンが Domain II-Fc、及び IgG、Hippap-Fc における共通部分である Fc 領域に結合していることを示唆しており、ver.3 の 1st ラウンドにおいて Fc 結合性ファージの濃縮が起こった可能性が高い。

40

【0146】

以上から、phage-cell ELISA、phage ELISA のいずれにおいても高い結合活性が確認された1つのクローン(H44クローン)、phage-cell ELISA にて高い結合活性が観測された2つのクローン(H48クローン、Fc59クローン)、ELISAにて高い結合活性が観測された2つのクローン(A63クローン、A96クローン)、ELISAにてさらに phage-cell ELISA におい

50

て中程度の結合活性が観測された 3 つのクローンのうち DG44-HER2 細胞に対して最も選択的な結合 (S/N ratio = 1.97) が確認された 1 クローン (A64 クローン) の合計 6 クローンを BiBian 化させることにした。

【 0 1 4 7 】

選定したクローンは、ファージミドベクターを取得後に DNA シークエンサーによる塩基配列解析によってアミノ酸配列を決定した。6 クローンのアミノ酸配列を clustal omega を用いて比較したところ、いずれもユニーク配列であることがわかったため、6 クローンからそれぞれ VHH 遺伝子に BiBian の scFv 領域の遺伝子を連結した二重特異性抗体の遺伝子 (改変 BiBian 遺伝子) を構築することにした。

【 0 1 4 8 】

2. 有望クローンを用いた遺伝子の構築

前項にて選出した有望 VHH クローン遺伝子は、culture PCR にて VHH 遺伝子部分を増幅後アガロースゲル電気泳動にて非特異的な増幅部分を分離、ゲル抽出操作によって VHH 遺伝子を抽出した。Sfi I にて制限酵素処理後、PCI, エタノール沈殿によりインサート遺伝子断片を調製した。ベクター側は、pRA1-pelB-Ia1 VHH-OKT3 scFv-His-cmyc プラスミドを鋳型とした。インバース PCR によって Ia1 VHH を抜け落とし、かつ pelB の下流及び OKT3 scFv の上流にプライマーにより Sfi I サイトを付加させた (表3)。調製はインサートと同様の手順で行った。ライゲーション後はプロトコールに基づいて遺伝子を調製し、シークエンサーによって VHH クローンが BiBian のフォーマットに正しく挿入されていることを確認した。

【 0 1 4 9 】

【表 3】

表3 BiBian の構築に用いたプライマー配列

| name | 注文配列 5'----3' | Tm値 | GC% | bp数 | 備考 |
|----------------|--|-----|-----|-----|--|
| R_pelB-inv | CCATGGCCGGCTGGG (配列番号43) | 59 | 80 | 15 | pRA5-BiBianからVHHを抜いて、SfiIサイトを付加 |
| F_IgA-inv_SfiI | NNNGGCCCTCTGCGGGCGCGCCGCGCCAGCC (配列番号44) | 59 | 92 | 29 | ※有望VHHをSfiI DDにて入れることが目的、上流のPelB内には既にSfiIサイトあり |

【 0 1 5 0 】

3. 有望クローンから構築した二重特異性抗体の構築

構築した pRA1-BiBian 発現ベクターを用いて、BiBian をフォーマットとする各種二重特異性抗体 (以下、「改変 BiBian」と記す場合がある) の調製を試みた。

【 0 1 5 1 】

二重特性抗体の遺伝子断片を含む pET 系ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) を 100 µg/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地にプレーティングし、28 °C で 20 ~ 24 時間培養した。そして、プレート培地に形成された 5 コロニーを 100 µg/mL のアンピシリンを含む 50 mL の LB 液体培地に植菌し、28 °C で一晩振盪培養した。次に、その培養液から 5 mL 分を 500 mL の 2xYT 液体培地に植え継ぎ、28 °C で振盪培養した。培養液の O.D.600 が 0.8 となった時点で振盪培養を停止し、フラスコを氷中に 10 分間静置した後、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度 1 mM となるように添加した。IPTG 添加後の誘導培養温度は 15 °C として、引き続き 16 時間以上振盪培養した。その後、遠心分離により沈殿画分を回収し、沈殿した菌体を超音波破碎した後、再び遠心分離を行い、上清画分を回収した。そして、その溶液を Ni-sepharose カラムを用いた固定化金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) により粗精製した。粗精製した Dimer Arm は、1 mM EDTA を含む PBS 緩衝液を展開液としたサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製することで、最終精製物とした。

【 0 1 5 2 】

IMAC 精製を行ったところ、6 種全てにおいて 300 mM Imidazole 濃度の PBS 溶出画分

10

20

30

40

50

に目的分子量をもつ蛋白質の溶出が最も多く観測された(データ非図示)。そこで次に、300 mM Imidazole/PBS の溶出画分を用いて SEC による精製を行い、VHH 融合 scFv の Dimer 画分(BiBianフォーマット)、及び Monomer 画分が溶出されうる 170~210 mL 付近に現れた溶出ピークを SDSPAGE と Western Blotting により評価した。その結果、6クローンの改変BiBianのDimer 画分はクローンによって差があるものの、174 mL~195 mL の間に溶出することがわかった(データ非図示)。

【0153】

4. 新規二重特異性抗体を用いた細胞傷害活性試験

前項の新たな二重特異性抗体である改変BiBianを用いて細胞傷害活性を MTS assay により評価した(図15A-F)。本アッセイでは、がん細胞として HER2 陽性であり乳癌由来の SK-BR3 細胞 (1×10^4 cells/well)、T 細胞として T-LAK (5×10^4 cells/well)を用いた。その結果、改変BiBian 6種で傷害活性が確認された。また、BiBi-H44とBiBi-H48の2クローンは終濃度 2 nM においても 50%を超える高い傷害活性を有することがわかった。H44クローン(配列番号26)及びH48クローン(配列番号27)はパニング条件 ver. 2(Domain I-His x whole HER2)から単離されたクローンであり、パニング条件 ver.2 は高い傷害活性を発現するクローンが取得されやすい可能性が示唆された。

【0154】

実施例 8 ファージのモノクローナル化を経ないT細胞リクルート抗体の新規創出プロセス

実施例 6 のパニングで取得されたクローンは BiBian 化することで HER2 陽性細胞に対して傷害活性を発現できることが 実施例 7 の結果より示された。そこで、抗体断片を単位とした複数の抗体断片集団から最適な細胞傷害活性をもつドメインの組み合わせをもつ T細胞リクルート抗体をスクリーニングするDolag ArT 法(Domain library approach for generating antibody recruiting T-cell)に適合した、T細胞リクルート 抗体ライブラリーの創出プロセスの構築を試みた。

【0155】

実施例 7 で行ったのは、バイオパニングを出発点とした結合性分子の取得、及び T細胞リクルート 抗体化とその傷害活性を評価するまでの標準的な手法である。しかし、この標準手法では BiBian 化して傷害活性を評価できるクローンは 6種程度が限界であった。傷害活性を評価できるクローン数が少なくなってしまうのはBiBian 化する際に各クローンから個別に、VHH遺伝子にBiBianのscFv領域の遺伝子を連結した二重特異性抗体である改変BiBian遺伝子を構築する必要がある点、そして改変BiBianを十分量調製・精製する際にクローンごとに 1L 三角フラスコ 2~6 本での培養が必要である点に原因がある。

【0156】

そこで、本実施例ではファージのモノクローナル化、及び各クローンの個別遺伝子構築を経ずにポリクローナルファージミドベクターから直接ポリクローナル改変BiBian遺伝子を構築することでパニングプロセスと Dolag ArT 法を有機的に連結させる新規手法を着想し(図16)、その有効性を検証した。

【0157】

1. ポリクローナルの改変BiBian 遺伝子の構築と改変BiBian のモノクローナル化

まず、パニング後の精製ファージを大腸菌 TG-1 株に感染させ、LB/Amp+ プレートにプレティング、37 °C で一晩インキュベートした。形成されたコロニーを確認した後、スプレッターでこそぎとりミニプレップキットを用いてポリクローナルなファージミドベクターを調製した。

【0158】

調製したプラスミドが実際に種々の VHH 配列を含んでいるかを Hha I 消化による評価を試みた。Hha I は GCGC 配列を認識する制限酵素であり、理論的には 256 bp に 1 回の確率で GCGC配列が出現する。このため配列多様性をHha I消化後のバンドパターンから評価できると考え、2nd ラウンド後の 3 種のポリクローナルファージミドベクター、及び前項にて単離した H44、H48 クローンをコントロールとして 37 °C , 3 hr の反応条件

10

20

30

40

50

にて消化した。その結果、H44、H48クローンは単一遺伝子であるため、特定のバンドパターンが確認されたのに対し、3種のポリクローナルファージミドベクターはいずれもスメアバンドが確認された(データ非図示)。これより、ポリクローナルファージミドには多様性がある状態で調製できたことが示唆された。その後 Sfi I 処理により、VHH の上流、下流域に位置する Sfi I サイトをカットし電気泳動、及びゲル抽出により調製した。ライゲーション反応には、0.20 pmol 分のインサート、及び実施例 7 と同様の手法で調製したベクターを 0.04 pmol 分用いた。その後、蛋白質発現に適した BL21(DE3) 株にエレクトロポレーション法により形質転換をしたところ、パニング ver.1, 2, 3 から調製した形質転換体が 3200, 2912, 4000 コロニーずつ得られた。また、インサートの代わりに ddH₂O をライゲーションに用いたコントロールサンプルで形成されたコロニーは 3 であつた。これよりコロニーはそのほとんどがパニングに由来する VHH を保持した改変 BiBian 発現ベクターであると判断し、コロニーピッキングにより各プレートから 88 クローンのモノクローナル化を行った。

10

20

30

40

50

【0159】

2. 培地上清を用いたモノクローナル化改変BiBianの傷害活性評価

培地上清を用いた傷害活性評価を行うにあたり、まず、評価対象とする SK-BR3 細胞に対する培地上清の毒性を評価した(図17)。pRA5-vacant ベクター(Scientific Reports, 7, 2862 (2017). DOI:10.1038/s41598-017-03101-4参照)で形質転換された大腸菌 BL21(DE3)株の IPTG 誘導後 36 hr 培養した培地上清を、動物細胞用培地 (RPMI1640, 10%FBS、1 × Antibiotic-Antimycotic solution)を用いて希釈調製した。そして、その溶液を SK-BR3 細胞に対して添加し、72 hr 後に検出したところ、TFK-1 細胞の場合と同様に 10 倍以上に希釈することで培地上清に由来する毒性の影響がなくなることがわかった。

【0160】

決定した培養条件に基づいて、BiBian 発現ベクターで形質転換された大腸菌を 96-deep wellプレートにより培養し、IPTG 誘導後 36 hr 培養した培地上清をスウィングローターによる遠心操作(3000 rpm, 60 min, 4)によって回収し、培地上清を用いた MTS assay によって細胞傷害活性を評価した。本アッセイでは、がん細胞として HER2 陽性であり乳癌由来の SKBR3 細胞 (1×10^4 cells/well)、T 細胞として T-LAK (5×10^4 cells/well)を用いた。まず、動物細胞用培地にて 10 倍希釈した培地上清を用いて活性を評価したところ、264 クローン中 83 クローンで 70%以上の高い傷害活性が確認された。そこで、培地上清を PBS で 100 倍希釈した条件で再度傷害活性を評価したところ、18 クローンで 70%以上の高い傷害活性が確認された。18 クローンのうち、11 クローンが ver.1 由来、4 クローンが ver.2 由来、3 クローンが ver.3 由来であった。また、ver.2 の n.o.10, 74, 75 といったクローンでは希釈倍率依存的な細胞増殖亢進作用がみられた。

【0161】

3. 選抜されたクローンをを用いた定量的傷害活性評価

前項にて選出された 18 クローンを再度同条件にて培養し、tag-sandwich ELISA (Journal of Bioscience and Bioengineering Available online 13 March 2018 doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.007参照)を用いて培地上清中のBiBian 濃度を定量した。検量線には Ia1 VHH-OKT3 scFv BiBianを用いた(図18A,B)。また、培地上清の 50 倍及び 100 倍希釈条件で算出された濃度の平均値を濃度と定義した。

【0162】

Tag-sandwich ELISA による濃度定量的結果、最も高発現だったのは d5Bクローンで定量された濃度は 2436 nM であつた。一方、最も低発現量だったのが 19 nM の d8Dであり、クローン間で発現量には大きな差異があることがわかった(図18C,D)。

【0163】

次に定量結果をもとに濃度調製した溶液を用いて定量的な細胞傷害活性評価を行った(図19A-R)。本アッセイでは、がん細胞として HER2 陽性であり乳癌由来の SK-BR3 細胞 (1×10^4 cells/well)、T 細胞として T-LAK (5×10^4 cells/well)を用いた。アッセイの結果、2 nM でも 50%以上の傷害活性を有する 6 クローン(d8D, d11C, f8C, f10D, f11E,

h11E) の同定に成功した。

【 0 1 6 4 】

DNA シークエンサーにより配列を解析したところ、d8D, d11C クローンは配列が一致し、同一クローンであることがわかった。残り 4 クローンはいずれもユニーク配列であり、5.3.3 での標準的手法によりスクリーニングされてきた VHH 配列と比較してもユニークなクローンであり、かつクローン d8D、f8C、及び h11E は 実施例 6 で同定されたクローンよりも高い細胞傷害性をもつ可能性がある。クローンd8D、クローンh11E、クローンf8C、クローン f10D及びクローン f11Eのアミノ酸配列はそれぞれ配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31及び配列番号32である。

【 0 1 6 5 】

4 . 精製した選抜クローンを用いた細胞傷害活性評価

次に培地上清への発現条件 (IPTG 濃度 0.1 mM / 誘導後温度 20 / 誘導後培養時間 36 hr) に基づいて、前項にて高活性候補クローンとして同定された 5 クローン (d8D (d11C は同一配列), f8C, f10D, f11E, h11E) を対象として、各サンプル 1.5 L ずつ培養・精製を行った。クローン h11E, f8C, f10D は培地上清を回収し、IMAC により精製した。一方で、クローン d8D, f11E は培地上清への発現がほとんど確認できなかったため、菌体内可溶性画分を回収し IMAC により精製した。IMAC 精製後サンプルは、ゲルろ過クロマトグラフィーによりさらに精製し、これを用いて再度 MTS assay による細胞傷害活性を評価した(図20A-E)。

【 0 1 6 6 】

その結果、5サンプルとも精製した状態でも傷害活性を示し、 IC_{50} はそれぞれ、d8D: 0.16 nM, f8C: 0.05 nM, f10D: 0.13 nM, f11E: 0.47 nM, h11E: 32.5 nM であった。実施例 7 で取得したクローンで最も高い傷害活性であったのは BiBi-H48の $IC_{50}=0.30$ nM であったため、本手法により高い傷害活性を有する新規改変 BiBian の取得に成功したといえる。

【 0 1 6 7 】

5 . フローサイトメトリーを用いた解離定数(Kd)の測定

HER2を提示する動物細胞を 2×10^6 個含む培地をマイクロチューブに分注し、遠心分離後上清を除去し、細胞を500 μ LのPBS/0.01%BSAで懸濁する。再度遠心分離操作を行い、培地成分を除去する洗浄操作を行った後、C-mycタグ付きのHER2標的VHHを様々な濃度で調整したPBS緩衝液 100 μ Lで細胞を懸濁し1時間緩やかに振とうした。遠心分離により上清を除去した後、PBS/0.01%BSAで洗浄操作を行い、一次抗体(Myc-Tag (9B11) Mouse mAb #2276)をPBS/0.01%BSAで1000倍希釈した溶液 50 μ Lで細胞を懸濁し、30分間緩やかに振とうした。そして、500 μ LのPBS/0.01%BSAで懸濁後、遠心分離し上清を除去し、洗浄操作を行った。次に、PBS/0.01%BSAで100倍希釈した二次検出抗体(Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, DyLight 650 #84545 Thermo Fisher Scientific) 50 μ Lで細胞を懸濁し、30分間緩やかに振とうした。500 μ LのPBS/0.01%BSAで懸濁後、遠心分離し上清を除去し、PBS/0.01%BSA 300 μ Lで懸濁した後メッシュフィルターを行い、フローサイトメトリー(FACS Accuri)測定用試験管へ入れた。そして、FACS Accuriにて、各サンプル中の各細胞の蛍光強度を測定する。各サンプルでのVHH濃度に対する蛍光強度をプロットすることでKd値を算出した。

【 0 1 6 8 】

その結果、5つのサンプルのうちKd値を測定したd8D, f8C, f10DのクローンではBiBi-H48($Kd=6.1 \times 10^4$)よりもKd値が低かったため(図21A,B)、HER2を提示する標的細胞に対する結合親和性が高い。このため、本手法により高い結合親和性を有する新規改変 BiBian の取得に成功したといえる。

【 0 1 6 9 】

6 . 新規プロセスと標準的手法の比較

実施例 7 及び実施例 8 により、結合活性による標準的手法ではなく最終目標機能である「傷害活性」によるスクリーニングが可能となった。実施例 7 の標準的手法において実際

10

20

30

40

50

に傷害活性を評価できたのは 10 クローンのみであったが、本実施例の手法では約 300 のクローンの傷害活性を評価し、その中から有望クローンを選抜することができた。また、300 のクローンの中にはがん細胞の増殖を促進しているようなクローンが複数見受けられた。このように必ずしも強い結合活性イコール強い傷害活性のようにはならないからこそ、最終機能での評価が肝要となる。

【 0 1 7 0 】

図21A及び図21Bに標準的手法、及び直接的 BiBia 化手法のそれぞれにより得られたクローンの IC₅₀ を示す。これをもとに手法の有効性の箱ひげ図による評価を試みた (図21C)。その結果、集団の分布、中央値ともに本実施例の直接的 BiBian 化手法のほうが実施例 7 の標準的手法と比較して IC₅₀ の優れたクローンが取得されやすい傾向があることが示された。

10

【 0 1 7 1 】

また、実施例 7 の従来標準的手法を用いるとファージのモノクローナル化～精製した T-細胞リクルート抗体を用いた傷害活性評価まで 5 週間ほどかかる。一方、本実施例の手法はポリクローナルファージミド調製～配列のシーケンシングまで 2 週間(14 日間)で完了するため、新規プロセスは時間の面でもスループット性向上に寄与する。これより、取得可能なクローンの質及び時間的な観点からも本実施例の手法の重要性・有効性を示せたといえる。

【 0 1 7 2 】

実施例 9 改変BiBianのHER2に対する結合親和性の向上

20

実施例 8 において、低い解離定数Kd値を有する 1 つのクローンが同定されたため、これをクローン 6×3 と名付けた。クローン 6×3 は CDR1 付近に YAMGWY (配列番号 53)、CDR3 付近に FNLQY (配列番号 57) のアミノ酸配列を有する (表 4)。

【 0 1 7 3 】

CDR1-2 はクローン 6×3 の BiBian タンパク質 (配列番号 52) のアミノ酸配列の 32～37 番目に対応し、CDR3-1 はクローン 6×3 の BiBian タンパク質 (配列番号 52) のアミノ酸配列の 96～100 番目に対応し、CDR3-2 はクローン 6×3 の BiBian タンパク質 (配列番号 52) のアミノ酸配列の 101～106 番目に対応する。

【 0 1 7 4 】

図 2 2 に示したインサート (塩基配列を配列番号 51、アミノ酸配列を配列番号 52 で表す) を備えた改変 BiBian 6×3 ベクターを作製し、実施例 8 の「1. ポリクローナルの改変 BiBian 遺伝子の構築と改変 BiBian のモノクローナル化」の手順に基づき、数十の変異型のクローンのモノクローナル化を行った (データ非図示)。

30

【 0 1 7 5 】

同定されたクローン 6×3 の変異体のうち、CDR1-2 に YAMGWY (配列番号 53)、RRVYWA (配列番号 54)、又は RSFRWY (配列番号 55) のアミノ酸配列を有する場合と、CDR3-2 に FNLQY (配列番号 57) 又は RLRERG (配列番号 58) のアミノ酸配列を有する場合に、Kd 値が低い傾向にあることが判明した (データ非図示)。

【 0 1 7 6 】

このため、実施例 8 の手順に従って、表 4 に示すような CDR1-2、CDR3-1、及び / 又は CDR3-2 を備えたクローン 6×3 の変異体として、variant 1、variant 2、variant 3、及び variant 4 と称する HER2 標的 VHH を作製し、variant 1 及び variant 2 に関しては Kd を測定した。その結果、図 2 3 に示すように、variant 1 及び variant 2 ではクローン 6×3 よりも Kd 値がさらに低く、HER2 に対する結合親和性が向上していることが確認された。

40

【 0 1 7 7 】

なお、クローン 6×3 の CDR1 及び CDR3 の変異型としては、表 4 に示した配列をもつもの、表 5 に示した配列をもつもの、及びその組み合わせ配列をもつものも使用し得る。より詳しくは、クローン 6×3 の CDR1 及び CDR3 の変異型は以下のものであってもよい。表 4 又は 5 の CDR1-2 を有する変異型

表 4 又は 5 の CDR3-1 を有する変異型

50

表 4 又は 5 の CDR3-2 を有する変異型表 4 又は 5 の CDR1-2、CDR3-1 を有する変異型

表 4 又は 5 の CDR1-2、CD3-2 を有する変異型

表 4 又は 5 の CDR1-2、CDR3-1、CD3-2 を有する変異型

表 4 の CDR1-2 を有する変異型と、表 5 の CDR3-1 を有する変異型との組み合わせ

表 4 の CDR1-2 を有する変異型と、表 5 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 4 の CDR1-2 を有する変異型と、表 4 の CDR3-1 を有する変異型と、表 5 の 5 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 4 の CDR1-2 を有する変異型と、表 5 の CDR3-1 を有する変異型と、表 4 の 5 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 4 の CDR1-2 を有する変異型と、表 5 の CDR3-1 を有する変異型と、表 5 の 5 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 5 の CDR1-2 を有する変異型と、表 4 の CDR3-1 を有する変異型との組み合わせ

表 5 の CDR1-2 を有する変異型と、表 4 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 5 の CDR1-2 を有する変異型と、表 5 の CDR3-1 を有する変異型と、表 4 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 5 の CDR1-2 を有する変異型と、表 4 の CDR3-1 を有する変異型と、表 5 の 5 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

表 5 の CDR1-2 を有する変異型と、表 4 の CDR3-1 を有する変異型と、表 4 の 5 の CDR3-2 を有する変異型との組み合わせ

【 0 1 7 8 】

【 表 4 】

表 4 クローン 6x3 変異体の配列

| | CDR1-2 | CDR3-1 | CDR3-2 |
|-----------|------------------|-----------------|------------------|
| 6x3 | YAMGWY (配列番号 53) | RSYNV (配列番号 56) | FNGLQY (配列番号 57) |
| variant 1 | RRVYWA (配列番号 54) | — | — |
| variant 2 | — | — | RLRERG (配列番号 58) |
| variant 3 | RSFRWY (配列番号 55) | — | — |
| variant 4 | RRVYWA (配列番号 54) | — | RLRERG (配列番号 58) |

—は変異がないことを示す。

【 0 1 7 9 】

10

20

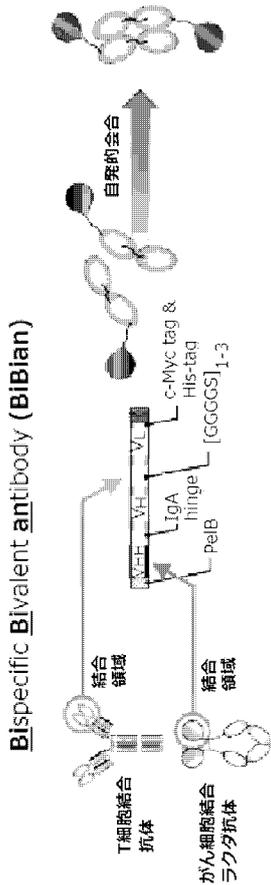
30

【表 5】

表 5 クローン 6×3 変異体のさらなる配列

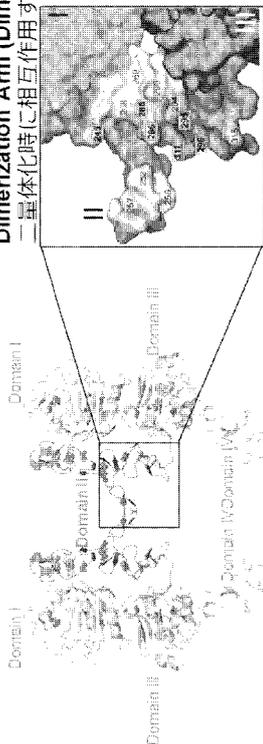
| CDR1-2 | | |
|--------|-----------|----|
| RSFYWG | (配列番号 59) | |
| RTFLWY | (配列番号 60) | |
| RSFRWF | (配列番号 61) | |
| RSFKWF | (配列番号 62) | |
| RSSPKN | (配列番号 63) | 10 |
| WRFTWD | (配列番号 64) | |
| CDR3-1 | | |
| RGRAI | (配列番号 65) | |
| GSGFR | (配列番号 66) | |
| FPFRR | (配列番号 67) | |
| LVRSR | (配列番号 68) | |
| MFRSS | (配列番号 69) | 20 |
| FRSRR | (配列番号 70) | |
| GSSYR | (配列番号 71) | |
| CDR3-2 | | |
| RRHNLP | (配列番号 72) | |
| KAPSRR | (配列番号 73) | |
| RTTLKL | (配列番号 74) | 30 |
| RRSSVL | (配列番号 75) | |
| VRAQRH | (配列番号 76) | |
| RRTYTQ | (配列番号 77) | |
| RLHGRP | (配列番号 78) | |
| RPFLRS | (配列番号 79) | |
| VTNVTL | (配列番号 80) | |
| RTKVSS | (配列番号 81) | |
| LTRLSS | (配列番号 82) | 40 |
| SLSHRQ | (配列番号 83) | |
| RLGNSV | (配列番号 84) | |

【 図 1 】



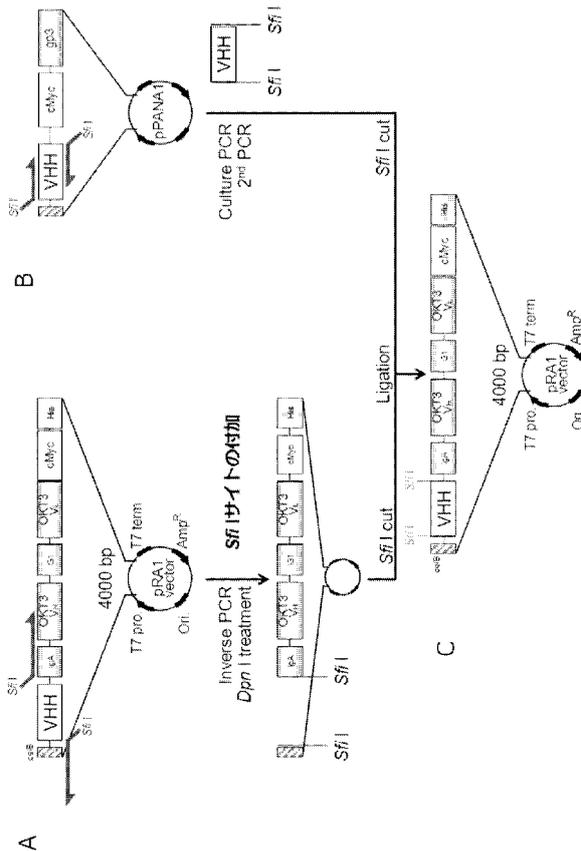
【 図 3 】

Dimerization Arm (Dimer Arm)
二量体化時に相互作用する領域



Matthew. C.F., et al., Cancer Cell, 2004, 5, 317-328

【 図 2 】



【 図 4 】

pRA5-Her2 DimerArm-His

T7pro — **CD** — **PelB** — **DimerArm** — His tag — T7 term.

塩基配列 (配列番号3.4)

```

TAATACGACTCATATAGGGAGACCCAAAGTTTATTTTCAGCGACAGCTGATATATGGAAATACCTATGGCTTAGGGGAG
CCGCTGGATTGTTATNTCTCGGCGCCAGCCGCGAAGGCGCGCACTGCGCCAGCCGCTGTCACCTACACACA
CAGACACCTTTGAGTCCATGCCCAATCCGAGGCGGGTATACATTCGGCGCCAGCTGTGACGTCCGCTCCCTACA
ACTACCTTTCACGGACGTGGATCTCTCCACCCGCTCZGRCGACCATATCACCACCATTAATAGCAATTAATTTAA
GCTCTTAGA)BCCCTGCTAAAGAACCCGAAAGGAAAGTGAATTTGGCTGCGTCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAGCC
CTTGGGGCCCTAAACACGGGCTTTGAGGGGTTTTTGGCTGAAAGGAGAACTATATCCCGTBAATTC

```

アミノ酸配列 (配列番号3.5)

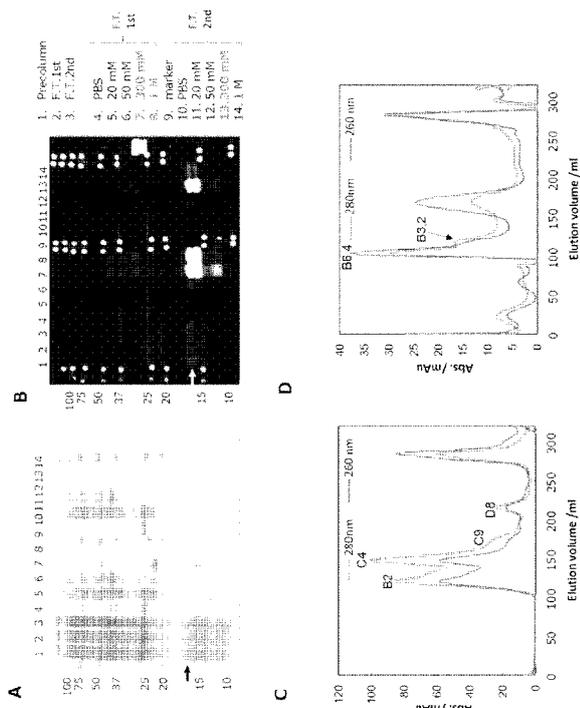
```

MKLPTFAAGLLEKAPPAKLSLHCPALVYTYNTDIFESMPNPEGRYTFGAGSVTAGPYNVLETDVGGCTLVAAHHHHHHH-

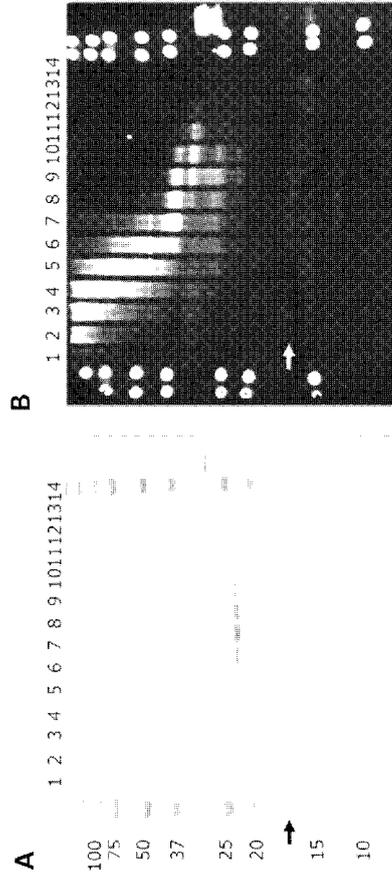
```

Number of amino acids: 59
Molecular weight: 6420.08
Theoretical pI: 6.11
Ext. coefficient: 6210 (ジスルフィド結合考慮)

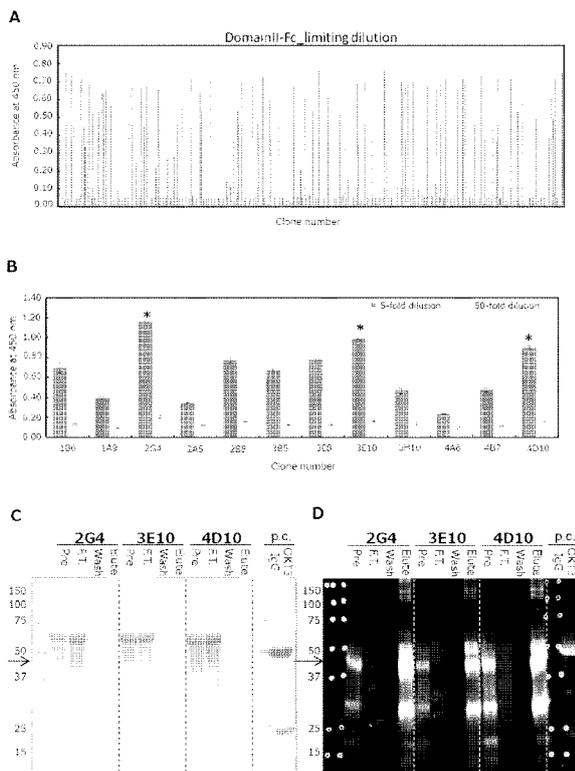
【 9 】



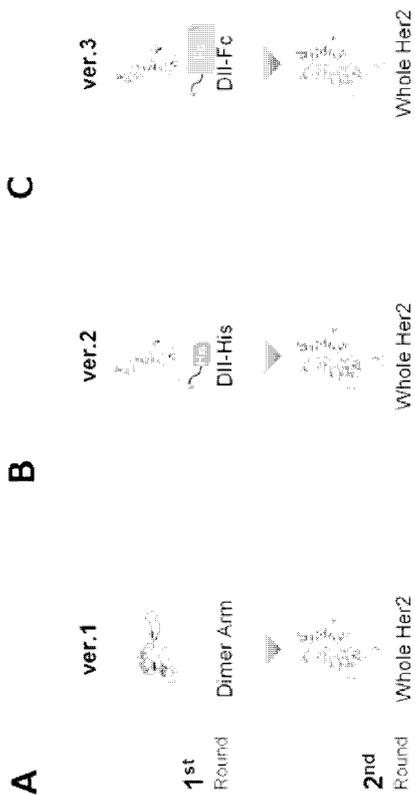
【 1 0 】



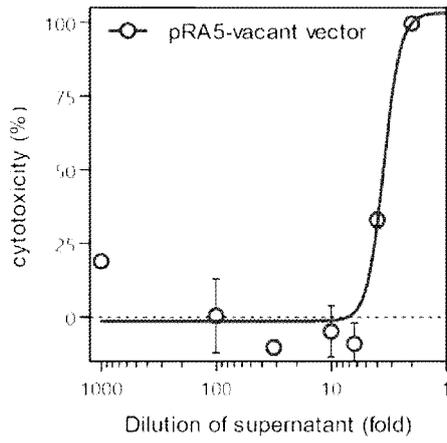
【 1 1 】



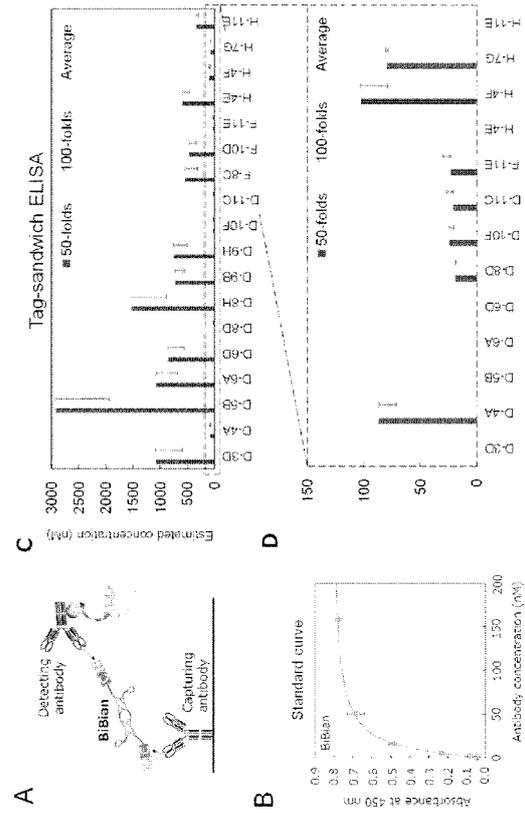
【 1 2 】



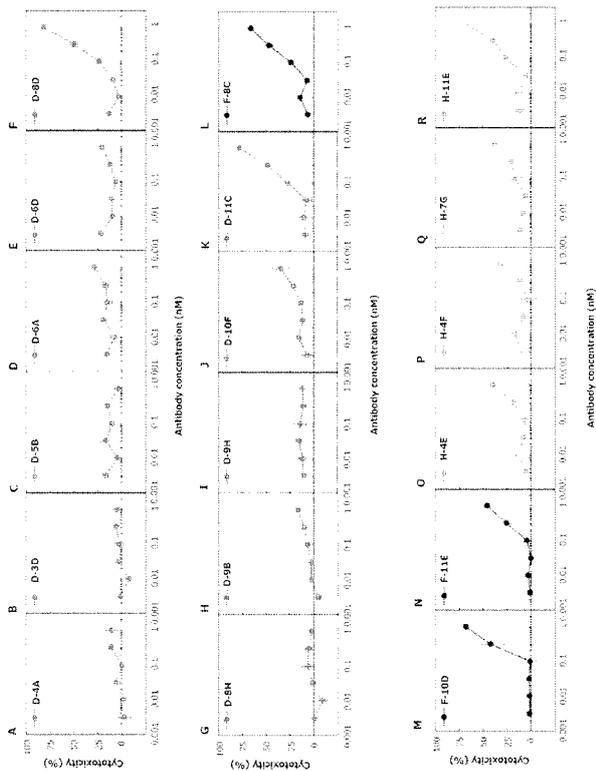
【 17 】



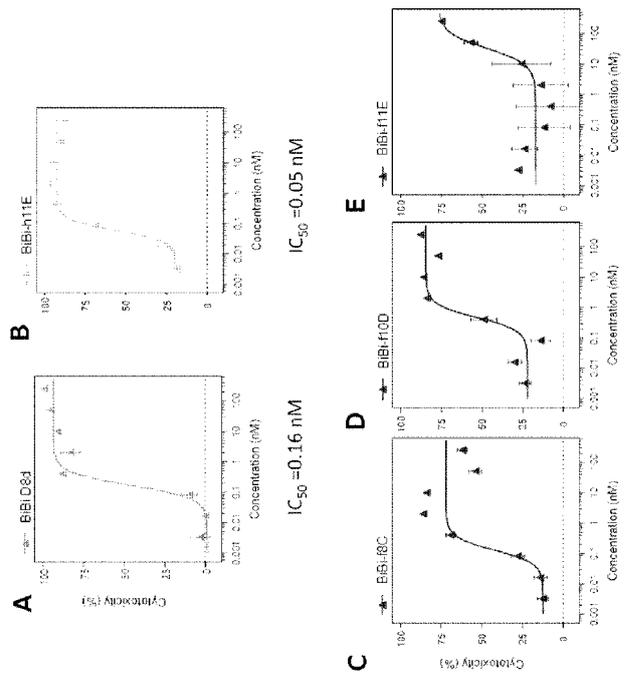
【 18 】



【 19 】



【 20 】



【配列表】

2019198731000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2019/015528 |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12N15/13(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/62(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N15/13, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C07K16/30, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/62, C12N15/63 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X Y | US 2011/0059090 A1 (REVETS, H. A. P.) 10 May 2011, paragraphs [0010], [0098]-[0100], [0854], [0895], [0896], [0932]-[0940], [1046], page 151, examples 3-6, 9 & WO 2009/068625 A2 | <u>1, 4, 6, 9-15</u> 1-15 |
| Y | 村上明一, ほか, 標的抗原特異的 CDR3 と天然アルパカ CDR1-2 領域を使用した VHH 抗体の迅速試験管内進化法, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会要旨集, 1P-1359, entire text, (MURAKAMI, Akikazu et al., Rapid in vitro evolution system of VHH antibodies by using target antigen specific CDR3 and natural alpaca CDR1-2 regions), non-official translation (Abstract of Consortium of Biological Sciences 2017) | 1-15 |
| <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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 04.07.2019 | | Date of mailing of the international search report 16.07.2019 |
| Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan | | Authorized officer Telephone No. |

| | | | |
|--|---|--|---------|
| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 1 5 2 8 | |
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/13(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/62(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/13, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/28, C07K16/30, C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/62, C12N15/63 | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019年 | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 | |
| X Y | US 2011/0059090 A1 (REVETS, Hilde Adi Pierrette) 2011.05.10, 段落[0010], [0098]-[0100], [0854], [0895]-[0896], [0932]-[0940], [1046], 第151頁, 実施例3-6, 9 & WO 2009/068625 A2 | 1, 4, 6, 9-15 1-15 | |
| Y | 村上明一, ほか, 標的抗原特異的 CDR3と天然アルパカ CDR1-2領域を使用したVHH抗体の迅速試験管内進化法, 2017年度 生命科学系学会合同年次大会要旨集, 1P-1359, 全文 | 1-15 | |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | |
| 国際調査を完了した日 04.07.2019 | | 国際調査報告の発送日 16.07.2019 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 市島 洋介 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4B 5804 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------|--------|------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | |
| C 0 7 K 16/30 (2006.01) | C 0 7 K | 16/30 | |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | C 0 7 K | 16/46 | |
| C 1 2 N 15/62 (2006.01) | C 1 2 N | 15/62 | Z |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | N |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 1 1 |
| | A 6 1 P | 43/00 | 1 0 5 |

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. トライトン
2. T W E E N

- (72) 発明者 中澤 光
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
- (72) 発明者 二井手 哲平
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
- (72) 発明者 岸本 英博
沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学内
- (72) 発明者 村上 明一
沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学内

Fターム(参考) 4B065 AA26X AA98X AB01 AC14 BA02 CA46
4C085 AA14 AA16 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA42 DA76 EA28 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。