

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6273205号
(P6273205)

(45) 発行日 平成30年1月31日(2018.1.31)

(24) 登録日 平成30年1月12日(2018.1.12)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/46	(2006.01)	C O 7 K 16/46	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 12 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-539855 (P2014-539855)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月4日(2013.10.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/077172
 (87) 国際公開番号 W02014/054804
 (87) 国際公開日 平成26年4月10日(2014.4.10)
 審査請求日 平成28年9月27日(2016.9.27)
 (31) 優先権主張番号 61/710, 221
 (32) 優先日 平成24年10月5日(2012.10.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (74) 代理人 110002000
 特許業務法人栄光特許事務所
 (72) 発明者 丹羽 倫平
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
 (72) 発明者 土屋 摩珠
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内
 (72) 発明者 村上 拓也
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘテロダイマータンパク質組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イムノグロブリン重鎖(以下、H鎖と略記する)定常領域(以下、CHと略記する)を含む第1ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖(以下、L鎖と略記する)定常領域(以下、CLと略記する)とFc領域とが融合した定常領域配列(以降CL-Fcと記載する)を含む第2ポリペプチドからなり、かつ、IgG抗体においてL鎖-H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するCys残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質である、以下の(A)または(B)のヘテロダイマータンパク質。

(A) イムノグロブリンサブクラスがIgG1であって、第1ポリペプチドのCHおよび第2ポリペプチドのCL-FcのサブクラスがともにIgG1であり、かつ以下の(a1)~(a9)のいずれか1であるヘテロダイマータンパク質

(a1) 第1ポリペプチドはEUインデックスC220Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、EUインデックスH435Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(a2) 第1ポリペプチドはアミノ酸置換が無く、第2ポリペプチドは、EUインデックスC214SおよびH435Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(a3) 第1ポリペプチドはEUインデックスC220Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、EUインデックスC214SおよびH435Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(a4) 第1ポリペプチドはEUインデックスC220Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、EUインデックスC220S、C214SおよびH435Rの置換を含むヘテロダイ

10

20

イマータンパク質

(a 5) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 2 2 0 S の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S および H 4 3 5 R の置換並びに E U インドックス 2 1 6 - 2 2 0 の E P K S C の欠損を含むヘテロダイマータンパク質

(a 6) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 2 2 0 S の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(a 7) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 2 2 0 S の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換並びに E U インドックス 2 1 6 - 2 2 0 の E P K S C の欠損を含むヘテロダイマータンパク質

(a 8) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 2 2 0 S、K 3 2 2 A および P 3 3 1 S の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、K 3 2 2 A、P 3 3 1 S、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換並びに E U インドックス 2 1 6 - 2 2 0 の E P K S C の欠損を含むヘテロダイマータンパク質

(a 9) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 2 2 0 S および I 3 3 2 E の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、I 3 3 2 E、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換並びに E U インドックス 2 1 6 - 2 2 0 の E P K S C の欠損を含むヘテロダイマータンパク質

(B) イムノグロブリンサブクラスが I g G 4 であって、第 1 ポリペプチドの C H および第 2 ポリペプチドの C L - F c のサブクラスがともに I g G 4 であり、かつ以下の (b 1) ~ (b 1 0) のいずれか 1 であるヘテロダイマータンパク質。

(b 1) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S および H 4 3 5 R の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 2) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 3) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S および R 4 0 9 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、R 4 0 9 K、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 4) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S、S 2 2 8 P および R 4 0 9 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、S 2 2 8 P、R 4 0 9 K、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 5) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E および R 4 0 9 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、R 4 0 9 K、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 6) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S および R 1 3 3 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S および H 4 3 5 R の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 7) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S および R 1 3 3 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 8) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S、R 1 3 3 K および R 4 0 9 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、R 4 0 9 K、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 9) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S、R 1 3 3 K、S 2 2 8 P および R 4 0 9 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インドックス C 2 1 4 S、S 2 2 8 P、R 4 0 9 K、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

(b 1 0) 第 1 ポリペプチドは E U インドックス C 1 3 1 S、R 1 3 3 K、S 2 2 8 P、

10

20

30

40

50

L 2 3 5 E および R 4 0 9 K の置換を含み、第 2 ポリペプチドは、E U インデックス C 2 1 4 S、S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、R 4 0 9 K、H 4 3 5 R および Y 4 3 6 F の置換を含むヘテロダイマータンパク質

【請求項 2】

前記第 1 ポリペプチドが C H 1 ドメイン、ヒンジドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含むポリペプチドであり、かつ前記第 2 ポリペプチドが C L ドメイン、ヒンジドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含むポリペプチドである、請求項 1 に記載のヘテロダイマータンパク質。

【請求項 3】

ヘテロダイマータンパク質に含まれる F c 領域に結合する全 N - グリコシド結合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖が 20 % 以上である、請求項 1 または 2 に記載のヘテロダイマータンパク質。

10

【請求項 4】

前記第 1 ポリペプチドおよび / または前記第 2 ポリペプチドが、E U インデックス P 2 4 7 I、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、Y 3 0 0 F、P 3 9 6 L、T 3 9 3 A、H 4 3 3 P、S 2 3 9 D、S 2 9 8 A、A 3 3 0 L、I 3 3 2 E、E 3 3 3 A、K 3 3 4 A、L 2 3 5 E、P 2 3 8 A、N 2 9 7 A、K 3 2 2 A、P 3 3 1 S、K 3 2 6 A、S 2 6 7 E、H 2 6 8 F、S 3 2 4 T、K 2 7 4 Q、N 2 7 6 K、Y 2 9 6 F、K 3 2 6 W、K 3 2 6 Y、E 3 3 3 A、E 3 3 3 S、A 3 3 9 T、A 3 3 9 D、D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、T 3 9 4 F、T 3 9 4 Y、V 3 9 7 M および V 4 2 2 I から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸残基置換を含むポリペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のヘテロダイマータンパク質。

20

【請求項 5】

前記第 1 ポリペプチドおよび / または前記第 2 ポリペプチドが、少なくとも 1 つの結合タンパク質が C H および C L - F c の N 末端および / または C 末端に結合したポリペプチドである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のヘテロダイマータンパク質。

【請求項 6】

前記結合タンパク質が、抗体可変領域、single chain Fv (s c Fv)、single variable domain (V H H)、リガンドタンパク質および受容体タンパク質から選ばれるいずれか 1 つのタンパク質である、請求項 5 に記載にヘテロダイマータンパク質。

30

【請求項 7】

(i) 前記第 1 ポリペプチドが、イムノグロブリン重鎖可変領域 (以下、V H と記す) が C H の N 末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第 2 ポリペプチドが、イムノグロブリン軽鎖可変領域 (以下、V L と記す) が C L - F c の N 末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および (i i) 前記第 1 ポリペプチドが、V L が C H の N 末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第 2 ポリペプチドが、V H が C L - F c の N 末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のヘテロダイマータンパク質。

【請求項 8】

40

(i) 前記第 1 ポリペプチドが、V H が C H の C 末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第 2 ポリペプチドが、V L が C L - F c の C 末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および (i i) 前記第 1 ポリペプチドが、V L が C H の C 末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第 2 ポリペプチドが、V H が C L - F c の C 末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のヘテロダイマータンパク質。

【請求項 9】

一価抗体、二価抗体、三価抗体および四価抗体から選ばれる 1 つの抗体である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のヘテロダイマータンパク質。

【請求項 10】

50

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のヘテロダイマータンパク質をコードする DNA。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の DNA を含むタンパク質発現ベクターを含むヘテロダイマータンパク質の発現細胞。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載のヘテロダイマータンパク質の発現細胞を培養し、該培養上清からヘテロダイマータンパク質を精製する工程を含む、ヘテロダイマータンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、効率的かつ安定に分離、精製されるヘテロダイマータンパク質組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体は、抗原に対する高い結合親和性と特異性を有する生体高分子であり、分子標的治療薬として癌または免疫疾患などの治療に応用されている。治療用のモノクローナル抗体として広く用いられているイムノグロブリン G (以下、IgG と略記する) の作用機序は、抗原の中和作用、受容体のアゴニストまたはアンタゴニスト作用、アポトーシス誘導作用、ファゴサイトーシス、補体またはエフェクター細胞依存的傷害活性の誘導、並びに化学療法剤、毒素および放射性同位体の輸送、などが知られている。

【0003】

IgG 抗体は、2 本の抗体重鎖 (以下、H 鎖と略記する) および 2 本の抗体軽鎖 (以下、L 鎖と略記する) からなるテトラマー分子であり、抗原結合部位である可変領域と一定のアミノ酸配列からなる定常領域を構成する (図 1)。

【0004】

抗体の各構造に基いて、様々な機能に関与することが知られている。抗原結合部位は重鎖可変領域 (以下、VH と略記する) と軽鎖可変領域 (以下、VL と略記する) により形成されており、一次配列および高次構造の可変性により多様な抗原特異性と結合親和性をもたらす。

【0005】

IgGH 鎖の定常領域 (以下、CH と略記する) は CH1、ヒンジ、CH2、CH3 の各ドメインからなり、この内 Fc 領域 (以下、単に Fc と記載する) はヒンジ、CH2、CH3 からなる領域を指す。Fc は、白血球細胞上の Fc 受容体 (以下、FcR と略記する) と結合して炎症性メディエーターの放出、貪食作用、抗体依存性細胞傷害活性 (以下、ADCC と略記する) に関与すると共に、補体成分と結合することで補体依存性細胞傷害活性 (以下、CDC と略記する) にも関与する。

【0006】

また、IgG 抗体の Fc は、エンドソームでの低 pH 条件において胎児性 Fc 受容体 (以下、FcRn と略記する) に結合し、リソソームでの分解を回避することで、血中半減期の延長にも関与している。Fc 領域の一次配列はサブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) ごとに異なっており、FcR、FcRn、補体成分に対する結合活性が異なるため、生物学的性質の違いをもたらす (非特許文献 1)。

【0007】

IgG 抗体分子は VH、CH1、VL、L 鎖定常領域 (以下 CL と略記する) からなる Fab と呼ばれる領域を 2 つ有し、この 2 つの Fab により抗原分子に対し 2 価で結合する。この 2 価結合活性は、抗原に対すアビディティを上昇させるだけでなく、細胞膜表面に存在する受容体などの抗原分子に結合する場合、抗原の架橋による細胞内シグナルを誘導する場合がある。

【0008】

このような IgG 抗体の 2 価結合活性を回避するために、抗原結合部位を 1 つ (一価)

10

20

30

40

50

にした一価抗体またはFc R結合活性を無くすアミノ酸残基置換を含むFc variantを有する抗体variantの作製など、抗体工学的な検討がなされている。一方、抗原結合部位を含むFab断片は、抗原に対して一価の結合活性を示すが、Fcが無いために血中半減期が短く、治療薬として有用ではない（非特許文献2）。

【0009】

一方バイスペシフィック抗体は、その二重特異性によって、従来のIgGモノクローナル抗体では発揮することの出来ない作用機序を可能にする。例えば、bispecific T cell engager [BiTE（登録商標）]は、CD3と癌抗原との両方に結合することで、T細胞を動員して癌細胞を効率的に傷害する（非特許文献3）。また、抑制性のFc受容体であるFcRIIbと受容体を架橋することで、活性化した細胞内シグナルを抑制できる可能性がある（非特許文献4、5）。

10

【0010】

バイスペシフィック抗体の最初の作製技術はクアドローマ（quadroma）と呼ばれる、二つのハイブリドーマをさらに融合した細胞による生産法である。二種のH鎖と二種のL鎖からなる4量体は、理論上最大10通りの組み合わせの混合物として生産され、目的のバイスペシフィック活性を有する抗体はそのうちのたった一種であり、類似の物理化学的性質を有する副産物から目的のバイスペシフィック抗体を分離することが困難である（非特許文献6）。

【0011】

バイスペシフィック抗体の副産物の種類を減らすための方法として、異なるH鎖同士”heterologousな会合“を安定化するアミノ酸残基置換をCH3ドメインに導入する方法（非特許文献7、8、9および特許文献4）、およびIgG1抗体およびIgA抗体のキメラ型のCH3ドメインを用いることで、H鎖のヘテロな組合せを安定化させる方法が知られている（特許文献1）。

20

【0012】

これに対して、バイスペシフィック抗体を発現させた場合に生じる、同種のH鎖同士の”homologousな会合“による望まれない副産物を、精製の段階で除去する方法も報告されており、IgG抗体サブクラスのプロテインAへの結合活性の違いを利用した精製方法が知られている。

【0013】

Lindhoferらは、ラットIgG2bはプロテインAに結合せず、マウスIgG2aはプロテインAに結合する特徴を利用して、ラットIgG2bおよびマウスIgG2aから構成されるバイスペシフィック抗体の精製方法を開示している。即ち、ラットIgG2bおよびマウスIgG2aのヘテロダイマーならびにマウスIgG2aホモダイマーは、プロテインAに結合し、溶出時のpHを調節することによりヘテロダイメリックなバイスペシフィック抗体を分離できることが知られている（非特許文献10）。

30

【0014】

さらにSamuelらは、プロテインAへのアフィニティの違いを利用して精製法によってヒトIgG型のバイスペシフィック抗体を特異的に精製する方法を提示している。バイスペシフィック抗体を構成する異なる2本のH鎖のうち、一方のH鎖のCH3ドメインにEUIンデックスの435位のArgおよび436位のPheのアミノ酸残基改変を行うことで、プロテインAに対する結合活性を低下させた結果、溶出時のpHを調節することで、プロテインAに対するアフィニティが異なる3種類の分子から、ヘテロダイメリックなIgG型バイスペシフィック抗体を分離精製できることが開示されている（特許文献2）。

40

【0015】

ヘテロダイマー構造を応用した抗体分子の1つとして、ヒト型軽鎖とヒトIgG1のFcを融合させた融合タンパク質とヒトIgG1抗体H鎖とのヘテロダイマー型一価抗体が報告されている（特許文献3）。

【0016】

50

しかし、このような分子を発現させた場合、H鎖 - H鎖ホモダイマーは分泌されないが、H鎖 - 融合タンパク質ヘテロダイマー、融合タンパク質ホモダイマーおよび多量体も培養上清中に分泌されること、更に、分泌されたタンパク質から特異的なヘテロダイマー型一価抗体を取得するために、H鎖にタグ配列を融合させる必要があり、このタグを用いた精製が必要とされることなどが知られている。このような一価抗体分子を医薬として用いる場合は、予期せぬ生物活性を持つ可能性がある多量体による副作用、および煩雑で高コストなタグ配列を利用したアフィニティ精製が課題である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】国際公開第2007/110205号

【特許文献2】国際公開第2010/151792号

【特許文献3】国際公開第2007/048037号

【特許文献4】国際公開第2009/089004号

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】Cater et al, Nature Review, 2006; 6: 343.

【非特許文献2】Labrjin A F et al, Current Opinion in Immunology, 2008; 20: 1

【非特許文献3】Wolf et al, Drug Discovery Today, 2005; 10: 1237

【非特許文献4】Kufer et al, TRENDS in Biotech., 2004; 22: 238

【非特許文献5】Jackman et al., J. Biol. Chem., 2010; 285: 20850

【非特許文献6】Cater et al. J. Immunol. Methods, 2001; 248: 7

【非特許文献7】Ridway et al. Protein Eng., 1996; 9: 617

【非特許文献8】Merchant et al., Nature Biotech., 1998; 16: 677

【非特許文献9】Gunasekaran et al., J. Biol. Chem., 2010; 285: 19637

【非特許文献10】Lindhofer H et al., J. Immunol., 1995; 155: 219

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

これまでに知られていたヘテロダイマータンパク質は、ヘテロダイマー形成効率が低く、不安定であり、特異的にヘテロダイマータンパク質分子を生成させ、分離および精製することが困難であった。従って、効率的かつ安定に生産できるヘテロダイマータンパク質組成物、該タンパク質組成物の精製方法および製造方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明は、以下の(1)~(24)に関する。

(1) イムノグロブリンCHを含む第1ポリペプチドおよびイムノグロブリンCLとFc領域とが融合したCL - Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ、IgG抗体においてL鎖 - H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するCys残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質。

10

20

30

40

50

(2) イムノグロブリンC Hを含む第1ポリペプチドおよびイムノグロブリンC LとF c領域とが融合したC L - F cを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ、該第2ポリペプチドがC H結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質。

(3) 前記第2ポリペプチドが、K a b a tらによるE Uインデックス(以下、E Uインデックスと記す)214位のアミノ酸残基がS e rに置換されたポリペプチドである、(1)または(2)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(4) 前記第1ポリペプチドがC H1ドメイン、ヒンジドメイン、C H2ドメインおよびC H3ドメインを含むポリペプチドであり、かつ前記第2ポリペプチドがC Lドメイン、ヒンジドメイン、C H2ドメインおよびC H3ドメインを含むポリペプチドである、(1) ~ (3)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

10

(5) 前記C H結合体が、抗C H1ドメイン抗体、抗ヒンジ抗体、抗C H2ドメイン抗体、抗C H3ドメイン抗体、F c受容体タンパク質、プロテインAおよびプロテインGから選ばれるいずれか1つの結合体である、(2) ~ (4)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(6) イムノグロブリンサブクラスがI g G 1、I g G 2およびI g G 4から選ばれるいずれか1つのサブクラスである、(1) ~ (5)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(7) 前記第2ポリペプチドが、E Uインデックス435位のアミノ酸残基がA r gに置換されたポリペプチドである、(1) ~ (6)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

20

(8) イムノグロブリンサブクラスがI g G 4である(1) ~ (7)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(9) 前記第1ポリペプチドが、E Uインデックス131位のアミノ酸残基がS e rに置換されたポリペプチドである、(8)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(10) 前記第1ポリペプチドおよび前記第2ポリペプチドが、E Uインデックス228位のアミノ酸残基がP r oに置換されたポリペプチドである、(9)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(11) 前記第1ポリペプチドおよび前記第2ポリペプチドが、E Uインデックス409位のアミノ酸残基がL y sに置換されたポリペプチドである、(10)に記載のヘテロダイマータンパク質。

30

(12) 前記第1ポリペプチドおよび前記第2ポリペプチドが、E Uインデックス235位のアミノ酸残基がG l uに置換されたポリペプチドである、(11)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(13) イムノグロブリンサブクラスがI g G 1である、(1) ~ (7)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(14) 前記第1ポリペプチドが、E Uインデックスの220位のアミノ酸残基がS e rに置換されたポリペプチドである、(13)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(15) 前記第2ポリペプチドが、E Uインデックスの216 ~ 220位のアミノ酸残基が欠損したヒンジドメインを含むペプチドまたはE Uインデックスの220位のアミノ酸残基がS e rに置換されたポリペプチドである、(14)に記載のヘテロダイマータンパク質。

40

(16) ヘテロダイマータンパク質に含まれるF c領域に結合する全N - グリコシド結合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖が20%以上である、(15)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(17) 前記第1ポリペプチドおよび/または前記第2ポリペプチドが、P 2 4 7 I、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、Y 3 0 0 F、P 3 9 6 L、T 3 9 3 A、H 4 3 3 P、S 2 3 9 D、S 2 9 8 A、A 3 3 0 L、I 3 3 2 E、E 3 3 3 A、K 3 3 4 A、L 2 3 5 E、P 2 3 8 A、N 2 9 7 A、K 3 2 2 A、P 3 3 1 S、K 3 2 6 A、S 2 6 7 E、H 2 6 8 F、S 3 2 4 T、K 2 7 4 Q、N 2 7 6 K、Y 2 9 6 F、K 3 2 6 W、K 3 2 6 Y

50

、 E 3 3 3 A、 E 3 3 3 S、 A 3 3 9 T、 A 3 3 9 D、 D 3 5 6 E、 L 3 5 8 M、 N 3 8 4 S、 K 3 9 2 N、 T 3 9 4 F、 T 3 9 4 Y、 V 3 9 7 M および V 4 2 2 I から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸残基置換を含むポリペプチドである、(15)または(16)に記載のヘテロダイマータンパク質。

(18) 前記第1ポリペプチドおよび/または前記第2ポリペプチドが、少なくとも一つの結合タンパク質がC HおよびC L - F cのN末端および/またはC末端に結合したポリペプチドである、(1)~(17)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(19) 前記結合タンパク質が、抗体可変領域、single chain Fv (sc Fv)、single variable domain (V H H)、リガンドタンパク質および受容体タンパク質から選ばれるいずれか一つのタンパク質である、(18)に記載のヘテロダイマータンパク質。

10

(20) (i) 前記第1ポリペプチドが、イムノグロブリンV HがC HのN末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第2ポリペプチドが、イムノグロブリンV LがC L - F cのN末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および(ii) 前記第1ポリペプチドが、V LがC HのN末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第2ポリペプチドが、V HがC L - F cのN末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、(1)~(19)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(21) (i) 前記第1ポリペプチドが、V HがC HのC末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第2ポリペプチドが、V LがC L - F cのC末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質、および(ii) 前記第1ポリペプチドが、V LがC HのC末端に結合したポリペプチドであり、かつ前記第2ポリペプチドが、V HがC L - F cのC末端に結合したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質から選ばれる、(1)~(20)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

20

(22) 一価抗体、二価抗体、三価抗体および四価抗体から選ばれる一つの抗体である、(1)~(21)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質。

(23) (1)~(22)のいずれか1項に記載のヘテロダイマータンパク質をコードするDNA。

(24) (23)に記載のDNAを含むタンパク質発現ベクターを含むヘテロダイマータンパク質の発現細胞。

30

(25) (24)に記載のヘテロダイマータンパク質の発現細胞を培養し、該培養上清からヘテロダイマータンパク質を精製する工程を含む、ヘテロダイマータンパク質の製造方法。

【発明の効果】

【0021】

本発明のヘテロダイマータンパク質は、イムノグロブリン重鎖定常領域(C H)を含む第1ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖定常領域(C L)とF c領域とが融合したC L - F cを含む第2ポリペプチドからなり、かつI g G抗体においてL鎖-H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するC y s残基が欠損または置換されていることにより、ヘテロダイマータンパク質を生産する際に生じる多量体量、半量体量、並びに多量体/半量体の生成を抑制し、効率的かつ安定に生産することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、I g G抗体の模式図を示す。

【図2A】図2Aは、本発明のヘテロダイマータンパク質の構造の模式図を示す。

【図2B】図2Bは、本発明のヘテロダイマー足場タンパク質構造(H S P)を元に作製され得る典型的な一価から四価抗体構造の模式図を示す。

【図3A】図3Aは、I g G 1型一価抗体を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位(表1)、数字はE Uインデックスで定義された番号を示す。

【図3B】図3Bは、I g G 4型一価抗体のH鎖定常領域のアミノ酸配列(I g G 1 - C

50

H、I g G 4 - C H) を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位(表1)、数字はE U インデックスで定義された番号を示す。

【図4A】図4Aは、I g G 1 型一価抗体を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位(表2)、数字はE U インデックスで定義された番号を示す。

【図4B】図4Bは、I g G 4 型一価抗体のC L - F c のアミノ酸配列(I g G 1 - L、I g G 4 - L)を示す。下線で示したアミノ酸残基はアミノ酸残基置換を導入した部位(表2)、数字はE U インデックスで定義された番号を示す。

【図5】図5は、各種一価抗体の構造を示す。

【図6】図6は、バイスペシフィック抗体の第2ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図7】図7は、バイスペシフィック抗体の構造を示す。

10

【図8A】図8A(a)および(b)は、抗HER2 I g G 4 型一価抗体4 D 5 / m v G 4 - 1 D F および4 D 5 / m v G 4 - 2 D F の、非還元条件でのS D S - P A G E 解析の結果を示す。S D S - P A G E 解析には、プロテインA精製における各p H で溶出された溶出画分1~3を用いた。図中の矢印は多量体のバンドを示す。

【図8B】図8Bは、抗HER2 I g G 4 型一価抗体4 D 5 / m v G 4 - 3 D F および4 D 5 / m v G 4 - 4 D F の、非還元条件でのS D S - P A G E 解析の結果を示す。S D S - P A G E 解析には、プロテインA精製におけるp H 3 . 0 でまとめて溶出した精製タンパク質を用いた。図中の矢印は半量体のバンドを示す。

【図9】図9は、陽イオン交換クロマトグラフィーによる抗HER2 I g G 4 型一価抗体4 D 5 / m v G 4 - 2 D F の分析結果を示す。図中のピーク(1)~(10)は分取した画分を示す。

20

【図10】図10は、陽イオン交換クロマトグラフィーによって分取された抗HER2 I g G 4 型一価抗体4 D 5 / m v G 4 - 2 D F サンプル(図9)のウェスタンブロット解析の結果を示す。L鎖の検出には抗k a p p a 鎖抗体を、H鎖の検出には抗H i s タグ抗体を、I g G の検出には抗ヒトI g G 抗体を用いた。ピーク(2)、(4)、(5)、(6)、(7)および(10)は検出限界以下であった。

【図11】図11は、抗HER2 I g G 4 型一価抗体4 D 5 / m v G 4 - 2 D F のプロテインA精製において、p H 3 . 5 で溶出された画分の1つであるフラクションXおよびp H 5 . 0 で溶出されたフラクションY、およびプロテインAまたはプロテインGで精製した4 D 5 / m v G 4 - 3 D F の、S D S - P A G E、L鎖特異的ウェスタンブロットおよびH鎖特異的ウェスタンブロットの結果を示す。4 D 5 / m v G 4 - 2 D F のフラクションXとYは、表5に示した通りH L 体を主成分とする溶出画分とL L 体を主成分とする溶出画分である。4 D 5 / m v G 4 - 3 D F のプロテインG精製品とプロテインA精製品は、同時に取得した発現細胞培養上清からプロテインGまたはプロテインAで精製を行い、まとめて溶出したサンプルである。

30

【図12】図12は、s a n d w i c h E L I S A によるI g G 4 型一価抗体のH L ヘテロダイマーの量を示す。実験はN = 3で行った。縦軸に、H L ヘテロダイマー結合活性、横軸にH L ヘテロダイマーの濃度(μ g / m L)を示す。

【図13A】図13Aは、s a n d w i c h E L I S A による各プロテインA精製フラクション中のI g G 4 型一価抗体H L ヘテロダイマーの量を示す。実験はN = 3で行った。縦軸に、H L ヘテロダイマー結合活性、横軸にH L ヘテロダイマーの濃度(μ g / m L)を示す。

40

【図13B】図13Bは、s a n d w i c h E L I S A による各プロテインA精製フラクション中のI g G 4 型一価抗体H L ヘテロダイマーの量を示す。実験はN = 3で行った。縦軸に、H L ヘテロダイマー結合活性、横軸にH L ヘテロダイマーの濃度(μ g / m L)を示す。

【図14A】図14Aは、抗HER2ヒト化抗体H e r c e p t i n の結合アッセイ下での、各種一価抗体の競合結合阻害をフローサイトメーターで評価した結果であり、HER2陽性ヒト乳癌細胞株S K - B R - 3 に対する結合活性を示す。図中の相対蛍光強度は、(サンプルの平均蛍光強度) / (h I g G 1 _ A l x の平均蛍光強度)により算出した。

50

実験はN = 2で行った。図はいずれも、縦軸にrelative fluorescence intensity (RFI)、横軸に競合反応させたIgG1抗体および一価抗体の濃度(nM)を示す。

【図14B】図14Bは、抗CD20ヒト化抗体GA101の結合アッセイ下での、各種一価抗体の競合結合阻害をフローサイトメーターで評価した結果であり、CD20陽性ヒトリンパ腫細胞株Rajiに対する結合活性を示す。図中の相対蛍光強度は、(サンプルの平均蛍光強度)/(hIgG1-A1xの平均蛍光強度)により算出した。実験はN = 2で行った。図はいずれも、縦軸にrelative fluorescence intensity (RFI)、横軸に競合反応させたIgG1抗体および一価抗体の濃度(nM)を示す。

10

【図15A】図15A(a)および(b)は、IgG1型およびIgG4型抗HER2一価抗体のヒト乳癌細胞株SK-BR-3に対する抗HER2 IgG1型一価抗体4D5mvG1-1DFのantibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)活性を示す。4D5/mvG1-1DFは、HLヘテロダイマー含量が最も高かったフラクション1(図13)を用いた。実験には、別々のドナーから取得したPBMCを用いた。実験はN = 3で行った。縦軸にADCC活性を、横軸に抗体濃度(nM)を示す。

【図15B】図15B(a)および(b)は、IgG1型およびIgG4型抗HER2一価抗体のヒト乳癌細胞株BT-20に対する抗HER2 IgG4型一価抗体のADCC活性を示す。実験には、別々のドナーから取得したPBMCを用いた。実験はN = 3で行った。縦軸にADCC活性を、横軸に抗体濃度(nM)を示す。

20

【図16】図16(a)~(c)は、抗CD20 IgG1型一価抗体のバーキットリンパ腫細胞株RajiおよびST-486、並びに慢性B細胞白血病細胞株MEC-1に対するADCC活性を示す。縦軸にADCC活性(%）、横軸に抗体濃度(nM)を示した。

【図17】図17は、抗HER2 IgG4型一価抗体4D5/mvG4-4F、抗CD74 IgG4型一価抗体hLL1/mvG4-4F、HER2-CD74バイスペシフィック抗体hLL1-4D5/mvG4-4FおよびCD74-CD20バイスペシフィック抗体hLL1-2F2/mvG4-4Fの非還元および還元条件におけるSDS-PAGE解析結果を示す。

30

【図18】図18(a)および(b)は、ELISA法によるHER2-CD74バイスペシフィック抗体hLL1-4D5/mvG4-4FのリコンビナントHER2タンパク質およびリコンビナントCD74タンパク質に対する結合活性を示す。縦軸に抗原結合活性(OD415-490)。横軸にバイスペシフィック抗体濃度(nM)を示す。各抗原に対するポジティブコントロールIgG1抗体として、抗HER2ヒト化抗体Herc e p t i nおよび抗CD74抗体hLL1抗体を用いた。

【図19】図19は、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2および抗CD20 IgG1抗体GA101/IgG1のバーキットリンパ腫細胞株ST-486に対する補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)を示す。縦軸にCDC活性(%）、横軸に各一価抗体、IgG1抗体のモル濃度(nM)を示す。

40

【図20】図20(a)は、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2および抗CD20 IgG1抗体GA101/IgG1のバーキットリンパ腫細胞株Rajiに対する結合量を示す。図20(b)は、補体因子C1q結合量を示す。いずれも縦軸にRelative Fluorescence Intensity (RFI)値、横軸に各一価抗体、IgG1抗体のモル濃度(nM)を示す。

【図21】図21(a)は、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2および抗CD20 IgG1抗体GA101/IgG1のバーキットリンパ腫細胞株ST-486に対する結合量を示す。図21(b)は補体因子C1q結合量を示す。いずれも縦軸にRelative Fluorescence Intensity (RFI)値、横軸に各一価抗体、IgG1抗体のモル濃度(nM)を示す。

50

【図22A】図22Aは、高CDC活性型定常領域を含むヘテロダイマータンパク質のH鎖定常領域ドメインのアミノ酸配列を示す。アミノ酸番号はKabatraによって定義されたEUインデックスで表し、はIgG1型から高CDC活性型へのアミノ酸置換部位を、はヘテロダイマータンパク質のアミノ酸置換部位を表わしている。

【図22B】図22Bは、高CDC活性型定常領域を含むヘテロダイマータンパク質のCL-Fc鎖のアミノ酸配列を示す。アミノ酸番号はKabatraによって定義されたEUインデックスで表し、はIgG1型から高CDC活性型へのアミノ酸置換部位を、はヘテロダイマータンパク質のアミノ酸置換部位を表わしている。

【図23】図23は、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2および抗CD20高CDC活性型一価抗体GA101/mvComの精製タンパク質を用いたSDS-PAGEの結果を示す。DTT-は、非還元状態、DTT+は還元状態を示す。

10

【図24】図24(a)および(b)は、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2および抗CD20高CDC活性型一価抗体GA101/mvComのパーキットリンバ腫細胞株Rajiまたは慢性B細胞白血病細胞MEC-1に対するCDC活性を示す。縦軸にCDC活性(%）、横軸に各一価抗体、IgG1抗体のモル濃度(nM)を示す。

【図25】図25(a)および(b)は、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2および抗CD20高CDC活性型一価抗体GA101/mvComのパーキットリンバ腫細胞株Rajiまたは慢性B細胞白血病細胞MEC-1に対するADCC活性を示す。縦軸にADCC活性(%）、横軸に各一価抗体、IgG1抗体のモル濃度(nM)を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、イムノグロブリン重鎖定常領域(CH)を含む第1ポリペプチドおよびイムノグロブリン軽鎖定常領域(CL)とFc領域とが融合したCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつIgG抗体においてL鎖-H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するCys残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質、該タンパク質の精製方法、該タンパク質の製造方法、該タンパク質をコードするDNAおよびベクターに関する。

【0024】

30

1. ヘテロダイマータンパク質の構造

本発明のヘテロダイマータンパク質としては、イムノグロブリンCHを含む第1ポリペプチドおよびイムノグロブリンCLと抗体Fcとを融合させたCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ通常のIgG抗体においてL鎖-H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するCys残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

【0025】

以下、特に断りの無い限りアミノ酸番号は、Kabatra [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] によるEUインデックス(以下、単にEUインデックスと記す)に基づいた番号を示す。また、番号の前がアミノ酸残基置換前、番号の後ろが置換後のアミノ酸残基を示す。

40

【0026】

本発明において、CLとCHのジスルフィド結合に関するCys残基としては、通常、抗体のH鎖とL鎖とが分子間ジスルフィド結合を形成するために必要とされるCys残基のことを示す。

【0027】

従って、本発明のヘテロダイマータンパク質は、第1ポリペプチドに含まれるCHおよび/または第2ポリペプチドに含まれるCL-Fcに含まれるCys残基であって、かつIgG抗体においてL鎖-H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するCys残基が欠損また

50

は置換されている。該C y s 残基が欠損または置換されていることで、不要な多重合体の生成を減少させることができる。

【0028】

L鎖中のCLとCH1とのジスルフィド結合に関するC y s 残基としては、例えば、ヒト鎖および鎖のEUインデックス214位のC y s 残基が挙げられる。

【0029】

また、H鎖中のCLとCH1とのジスルフィド結合に関するC y s 残基としては、例えば、ヒトIgG1では220位のC y s 残基、IgG4抗体では131位のC y s 残基が挙げられる。

【0030】

更にアミノ酸残基の欠損または置換することもできるので、上述CLに含まれるC y s 残基の置換または欠損と合わせて、CH1ドメインまたはヒンジドメインのC y s 残基を置換または欠損することもできる。

【0031】

従って、本発明のヘテロダイマータンパク質は、第1ポリペプチドに含まれるCHと第2ポリペプチドに含まれるCL-FcのCHとの間がヒンジドメインのみでジスルフィド結合されている。

【0032】

また本発明のヘテロダイマータンパク質としては、CHを含む第1ポリペプチドおよびCLとFcとが融合したCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ該第2ポリペプチドがCH結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

【0033】

本発明において、CH結合体および/またはFc結合タンパク質への結合活性が低下または欠損した第2ポリペプチドとは、第2ポリペプチドに含まれるCL-Fcのアミノ酸配列に付加、欠失および/または置換を行うことにより、CH結合体および/またはFc結合体に対する結合活性が低下または欠損した第2ポリペプチドをいう。

【0034】

CH結合体とは、抗体H鎖定常領域に結合するものであればタンパク質、化学物質、樹脂など特異的に結合するものであればいかなるものでもよく、例えば、Fc結合タンパク質、抗体H鎖定常領域(CH)に結合する抗体などが挙げられる。

【0035】

Fc結合タンパク質として具体的には、例えば、Staphylococcus Aureus由来Protein A、hemolytic Streptococcus由来Protein G、Fc受容体、該サブクラス(FcRI、IIA、IIB、IIIA、IIIB)および上述タンパク質の結合部分断片などが挙げられる。

【0036】

CHに結合する抗体としては、CH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインから選ばれる少なくとも1つに結合する抗体であればいずれの抗体でもよく、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が挙げられる。

【0037】

本発明のヘテロダイマーを構成する第2ポリペプチドにはCH1ドメインが含まれておらず、第1ポリペプチドにはCH1ドメインが含まれている。従って、CH結合体として抗CH1抗体を用いることにより、本発明のヘテロダイマータンパク質を精製することもできる。

【0038】

本発明において、CH結合体への結合活性が低下または欠損した第2ポリペプチドとは、CH結合体に対するアフィニティが低下することで、実質的に結合活性が低下または欠損することをいう。結合活性が低下または欠損した第2ポリペプチドとは、CH結合体への結合活性を有する第2ポリペプチドにアミノ酸残基付加、欠損または置換を行うことで

10

20

30

40

50

、アミノ酸残基の付加、欠失または置換を行っていない元の第2ポリペプチドと比べてC H結合体への結合活性が低下または欠損した第2ポリペプチドである。C H結合体への結合活性は、後述記載のbinding ELISA、surface plasmon resonance法(SPR)等の測定系を使用することで確認することができる。

【0039】

従って本発明のヘテロダイマータンパク質に含まれるC Hを含む第1ポリペプチドは、上述C H結合体に特異的に結合しC L - F cを含む第2ポリペプチドはC H結合体への結合活性が低下または欠損しているため、第1ポリペプチドと第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質のみがC H結合体に結合し、特異的に分離・精製することができる。

10

【0040】

ここで、本発明のヘテロダイマータンパク質を細胞で発現させた場合、C Hを含む第1ポリペプチドのホモダイマーは細胞外へ分泌されず、またC L - F cを含む第2ポリペプチドのモノマーおよびホモダイマーは、細胞外へ分泌されるが、いずれもC H結合体に対する結合活性が低下または欠損していることから、C H結合体との特異的結合活性に基づいた精製を行えば、第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質を特異的に分離、精製することが可能である。

【0041】

C H結合体を使用せずに本発明のヘテロダイマータンパク質を特異的に発現、分離、精製する方法としては、本発明の第1ポリペプチドのN末端またはC末端に適切なタグを融合させた融合タンパク質を用いることもできる。

20

【0042】

タグとして具体的には、例えば、ヒスチジンタグ(以下、Hisタグとも略記される)、mycタグ、FLAGタグ、ヘマグルチニン(HA)タグおよびグルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)タグなどが挙げられる。上述の方法も本発明のヘテロダイマータンパク質の分離、精製と組み合わせて応用することができる。

【0043】

本発明においてC H結合体への結合活性が低下または欠損した第2ポリペプチドは、第2ポリペプチドに含まれるC L - F cのアミノ酸配列に付加、欠失および置換を行うことで作製される。

30

【0044】

例えば、Protein Aに対する結合活性を低下または欠損させたC L - F cとしては、EUインデックス253位、310位、433位、435位、および436位から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が欠損または置換されたC L - F c、好ましくはEUインデックス435位のアミノ酸残基が置換されたC L - F c、EUインデックス435位および436位のアミノ酸残基が置換されたC L - F c、より好ましくは435位のHisがArgに置換されかつ436位のTyrがPheに置換されたC L - F c、435位のHisがArgに置換されたC L - F cが挙げられる。

【0045】

他のC H結合タンパク質に関しても、該結合タンパク質が結合するC Hのアミノ酸配列に付加、欠失または置換を行うことで、C H結合タンパク質に対する結合活性を低下させることができる。例えば、プロテインGが結合するFc中の結合部位、抗Fc抗体が結合するエピトープおよび抗ヒンジドメイン抗体が結合するエピトープなど、本発明のヘテロダイマータンパク質のC H上に存在するエピトープに含まれる少なくとも1つのアミノ酸残基を置換および/または欠損させることで、各C H結合タンパク質または抗体への結合活性が低下した第2ポリペプチドを作製することができる。

40

【0046】

抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても用いることができ、各抗体によって特定されたエピトープが明らかであればいずれの抗体のエピトープに含まれるアミノ酸残基を置換することもできる。

50

【0047】

また本発明のヘテロダイマータンパク質としては、CHを含む第1ポリペプチドおよびCLとFcとが融合したCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、該第2ポリペプチドがCH結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであり、かつIgG抗体においてL鎖-H鎖の分子間ジスルフィド結合に関するCys残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

【0048】

本発明のヘテロダイマータンパク質としては、CHを含む第1ポリペプチドおよびCLとFcとが融合したCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、該第2ポリペプチドがCH結合体に対する結合活性が低下したポリペプチドであり、かつCHとCL-Fcとの間がヒンジドメインのみでジスルフィド結合されたヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

10

【0049】

本発明のヘテロダイマータンパク質として具体的には、CHを含む第1ポリペプチドと、CL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、第2ポリペプチドが、EUインデックスで示される(i)214位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたポリペプチド、(ii)220位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたポリペプチド、(iii)214位のアミノ酸残基がSerへ置換されたポリペプチド、(iv)220位のアミノ酸残基がSerへ置換されたポリペプチド、(v)435位のアミノ酸残基がArgに置換されたポリペプチド、(vi)214位および435位のアミノ酸残基がSerおよびArgへ置換されたポリペプチド、(vii)220位および435位のアミノ酸残基がSerおよびArgへ置換されたポリペプチド並びに(viii)214位、435位および436位のアミノ酸残基がSer、ArgおよびPheへ置換されたポリペプチドのグループから選ばれるいずれか1つのポリペプチドを含むヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

20

【0050】

また、本発明のヘテロダイマータンパク質としては、CHおよびCL-FcのN末端側およびC末端側から選ばれる少なくとも1つに結合ドメインが結合した第1ポリペプチド並びに第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、第2ポリペプチドがCH結合体に対する結合活性が低下または欠損したポリペプチドであるヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

30

【0051】

本発明において結合ドメインとは、他の分子に結合活性を有するタンパク質であればいずれのタンパク質であってもよく、具体的には抗体断片、抗体可変領域(以下、Vと略記することもある)、single chain Fv(scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂、diabody、disulfide-stabilized Fv(dsFv)およびCDRを含むペプチド、single variable domain(VHH)、リガンドタンパク質および受容体タンパク質等が挙げられる。

【0052】

本発明のヘテロダイマータンパク質の第1ポリペプチドに含まれるCHは、抗体の定常領域であるCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインからなり、いずれのアイソタイプでもよいが、好ましくはIgGアイソタイプが挙げられる。

40

【0053】

IgGサブクラスとしては、IgG1、IgG2およびIgG4のいずれのサブクラスであってもよい。更に、第1ポリペプチドには、各イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインまたは一部アミノ酸配列が付加、欠失または置換されたヒンジドメインが含まれていてもよい。好ましくはFcと同じアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインおよび該アミノ酸残基置換されたヒンジドメインなどが挙げられる。また、ヒンジドメインは本発明のヘテロダイマータンパク質を生産する上で適宜、長くすることも短くすることもできる。

50

【0054】

本発明において第1ポリペプチドに含まれるCHとしては、ヘテロダイマータンパク質が効率的かつ安定に生成されるためのCHであればいずれのアミノ酸配列を有するCHでもよく、好ましくはアミノ酸配列に付加、欠失および置換を含むCHが挙げられる。

【0055】

具体的には、EUインデックスの131番目がS、133番目がK、220番目がS、228番目がPおよび409番目がKになるアミノ酸残基置換から選られる少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含むCHが挙げられる。

【0056】

アミノ酸残基置換の数は、1～15個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～数个、最も好ましくは1～5個のアミノ酸残基置換が挙げられる。IgG1サブクラスの場合は、ヒンジドメインのC220Sの置換を含むCHが挙げられる。

10

【0057】

EUインデックスの220位のアミノ酸残基は、IgG1においてL鎖とのジスルフィド結合に参与することが知られており、本アミノ酸残基置換または欠損は、CL-ヒンジドメインのジスルフィド結合を欠損させることができる。

【0058】

IgG4サブクラスの場合は、CH1ドメインのC131S、R133K、ヒンジドメインのS228P、CH3ドメインのR409K、R409T、R409MおよびR409Lから選られる少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含むCH、好ましくはC131SおよびR409Kのアミノ酸残基置換を含むCH、より好ましくはC131S、R133KおよびR409Kのアミノ酸残基置換を含むCH並びにC131S、R133K、S228PおよびR409Kのアミノ酸残基置換を含むCHが挙げられる。

20

【0059】

EUインデックスの409位のアミノ酸残基は、抗体Fc領域のCH3-CH3ドメイン間の安定的な相互作用に参与していることが知られていることから、R409K、R409T、R409MおよびR409Lのアミノ酸残基改変はFc-Fc相互作用の安定性の増加効果、Fab-arm exchangeの抑制効果、低pH下における凝集体抑制効果が得られる。

【0060】

また、ヘテロダイマータンパク質に含まれるCH3-CH3のヘテロダイマー形成能を増加させる目的で、K409D/K392DおよびD399K/E356Kのアミノ酸残基改変(国際公開第2009/089004号)またはイムノグロブリンサブクラスを利用したSEED技術(国際公開第2007/110205号)も本発明のヘテロダイマーに組み合わせることができる。

30

【0061】

EUインデックスの228位のSer残基は、ヒンジドメイン間のジスルフィド結合の不安定性に参与していることが知られており、S228Pのアミノ酸残基改変はヒンジドメインの安定化に参与する。

【0062】

本発明のヘテロダイマータンパク質の第2ポリペプチドに含まれるCLは、鎖および鎖いずれでもよい。また、第2ポリペプチドに含まれるFcはヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインからなり、いずれのアイソタイプでもよいが、好ましくはIgGアイソタイプが挙げられ、IgGサブクラスとしては、IgG1、IgG2およびIgG4のいずれのサブクラスであってもよい。

40

【0063】

更に、第2ポリペプチドには、各イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインまたは一部アミノ酸配列が付加、欠失または置換されたヒンジドメインが含まれていてもよく、好ましくはFcと同じアイソタイプ、サブクラスのヒンジドメインおよび該アミノ酸残基置換されたヒンジドメインなどが挙げられる。また、ヒンジドメインは本

50

発明のヘテロダイマータンパク質を生産する上で適宜、長くすることも短くすることもできる。

【0064】

本発明において第2ポリペプチドに含まれるCL-Fcとしては、ヘテロダイマータンパク質が効率的かつ安定に生成されるためのCL-Fcであればいずれのアミノ酸配列を有するCL-Fcでもよく、好ましくはアミノ酸配列に付加、欠失および置換を含むCL-Fcが挙げられる。

具体的には、EUインデックスの214番目がS、220番目がS、228番目がP、409番目がK、435番目がRおよび436番目がFになるアミノ酸残基置換から選られる少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含むCL-Fcが挙げられる。

10

【0065】

アミノ酸残基置換の数は、1~15個、好ましくは1~10個、より好ましくは1~数个、最も好ましくは1~5個のアミノ酸残基置換が挙げられる。

【0066】

IgG1サブクラスの場合は、C214S、C220S、H435RおよびY436Fから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、EUインデックス220位のC220Sのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、EUインデックス216-220のEPKSCの欠損を含むCL-Fc、好ましくはC214SおよびH435Rのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、C214S、C220SおよびH435Rのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、より好ましくはC214S、H435RおよびY436Fの

20

【0067】

IgG4サブクラスの場合は、C214S、S228P、L235E、R409K、H435RおよびY436Fから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、好ましくはC214SおよびH435Rのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、C214S、R409KおよびH435Rのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、より好ましくはC214S、R409K、H435RおよびY436Fのアミノ酸残基置換を含むCL-Fc、最も好ましくはC214S、S228P、L235E、R409K、H435RおよびY436Fのアミノ酸残基置換を含むCL-Fcが挙げられる。

30

【0068】

本発明においてモノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ(抗原決定基ともいう)を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列(1次構造)が均一である。

【0069】

エピトープとしては、例えば、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖、アミノ基、カルボキシル基、リン酸、硫酸など修飾残基が結合したアミノ酸配列および該修飾残基が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。立体構造は、天然に存在するタンパク質が有する3次元立体構造であり、細胞内または細胞膜上に発現しているタンパク質が構成する立体構造をいう。

40

【0070】

本発明において抗体分子はイムノグロブリン(以下、Igと表記する)とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相同性が比較的高いIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を総称してIgGともいう。

【0071】

抗体分子は重鎖(heavy chain、以下H鎖と記す)および軽鎖(light chain、以下L鎖と記す)と呼ばれるポリペプチドより構成される。

50

【0072】

また、H鎖はN末端側よりH鎖可変領域（VHとも表記される）、H鎖定常領域（CHとも表記される）、L鎖はN末端側よりL鎖可変領域（VLとも表記される）、L鎖定常領域（CLとも表記される）の各領域により、それぞれ構成される。CHは各サブクラスごとに、
、
、
、
およびμ鎖がそれぞれ知られている。CLは、
および
が知られている。

【0073】

ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、本発明におけるFcおよびFc領域とは、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインから成るH鎖定常領域の部分配列および部分構造を指す。

10

【0074】

CHはさらに、N末端側よりCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの各ドメインにより構成される。本発明におけるCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびFc領域は、EUインデックス [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] により、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。

【0075】

具体的には、CH1はEUインデックス118～215番のアミノ酸配列、ヒンジはEUインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はEUインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はEUインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

20

【0076】

CL-FcはN末端側よりCLドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの各ドメインにより構成される。本発明におけるCL-Fcは、Kabataらの定義 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] により、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定することができる。

30

【0077】

具体的には、CL-FcのCLはKabataらにより定義されたL鎖108～214番目のアミノ酸配列、CL-FcのFcは、ヒンジはEUインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はEUインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はEUインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

【0078】

本発明において抗体としては、ハイブリドーマから取得されるモノクローナル抗体の他に、遺伝子組換え技術により作製された遺伝子組換え抗体も含まれる。遺伝子組換え抗体としては、ヒト抗体定常領域を非ヒト抗体可変領域に結合させたキメラ抗体、非ヒト抗体可変領域のH鎖およびL鎖の相補性決定領域（complementarity determining region、以下、CDRと略記する）をヒト抗体可変領域のフレームワーク領域（以下、FRと略記する）に挿入することで作製されるヒト化抗体（または、CDR移植抗体）、ヒト抗体産生動物など用いて作製されるヒト抗体が包含される。

40

【0079】

キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0080】

ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体

50

のVHおよびVLの対応するCDRに移植した抗体をいう。VHおよびVLのCDR以外の領域はフレームワーク領域(以下、FRと表記する)と称される。

【0081】

ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のVHのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列からなるVHのアミノ酸配列をコードするcDNAと、非ヒト動物抗体のVLのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列からなるVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0082】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリー、不死化ヒト末梢血リンパ球のクローニングまたはヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

【0083】

ヒト抗体は、ヒトイムノグロブリン遺伝子を保持するマウス(Tomizuka K. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 97, 722-7, 2000)に所望の抗原を免疫することにより、取得することができる。また、ヒト由来のB細胞から抗体遺伝子を増幅したphage displayライブラリーを用いることにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を選択することで、免疫を行わずにヒト抗体

【0084】

さらに、EBウイルスを用いてヒトB細胞を不死化することにより、所望の結合活性を有するヒト抗体を生産する細胞を作製し、ヒト抗体を取得することができる(Rosen A. et al., Nature 267, 52-54, 1977)。

【0085】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、EBウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を生産するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

【0086】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより、FabまたはscFv等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

【0087】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が宿主動物の染色体内に組込まれた動物をいう。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。

【0088】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を生産蓄積させることができる。

【0089】

本発明のヘテロダイマータンパク質に結合させるVHおよびVLのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のCDRを、ヒト抗体のフレームワークに移植したヒト化抗体

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列並びにヒト抗体由来のVHおよびVLのアミノ酸配列のいずれでもよい。

【0090】

具体的には、ハイブリドーマまたは抗体産生細胞が産生する非ヒト動物抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列などが挙げられる。

【0091】

本発明のヘテロダイマータンパク質におけるCLのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のCまたはC'のアミノ酸配列が好ましい。

【0092】

本発明のヘテロダイマータンパク質におけるCHとしては、イムノグロブリンに属すればいかなるものでもよいが、好ましくはヒトIgGクラスに属するサブクラス、1 (IgG1)、2 (IgG2)、4 (IgG4)のいずれも用いることができる。

10

【0093】

本発明において抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFv、複数のCDRを含むペプチド、好ましくは抗体の6個のCDRを含むペプチドなどが挙げられる。

【0094】

Fabは、IgG抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち(H鎖の224位のアミノ酸残基で切断される)、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合(S-S結合)で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

20

【0095】

F(ab')₂は、IgGをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち(H鎖の234位のアミノ酸残基で切断される)、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0096】

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0097】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを4個のGlyおよび1個のSer残基からなるリンカー(G4S)を任意の個数つなげたリンカーペプチドなどの適当なペプチドリリンカー(P)を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

30

【0098】

Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対する2特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0099】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のS-S結合を介して結合させたものをいう。

40

【0100】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、CDR同士を直接または適当なペプチドリリンカーを介して結合させることができる。

【0101】

本発明のヘテロダイマータンパク質のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法またはtBoc法などの化学合成

50

法によって製造することもできる。

【0102】

本発明のヘテロダイマータンパク質としては、第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドによって形成される2つの抗体可変領域が、異なる2つのエピトープに結合するヘテロダイマータンパク質であってもよいし、2つの抗体可変領域が、同じエピトープにそれぞれ結合するヘテロダイマータンパク質であっても、いずれでもよい。

【0103】

さらに、上述のCHおよびCL-FcのC末端の少なくともいずれか1つに更に結合タンパク質が結合し、2つ以上のエピトープに結合するヘテロダイマータンパク質も本発明に包含される。

【0104】

2. ヘテロダイマータンパク質の活性の制御

(1) エフェクター活性の制御

本発明のヘテロダイマーは、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインからなるFc領域を有するため、ヘテロダイマータンパク質のFc領域に依存したエフェクター活性を付与することもできる。本発明のヘテロダイマーのエフェクター活性は、種々の方法により制御することができる。

【0105】

エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity activity; ADCC活性)、補体依存性傷害活性(Complement-Dependent Cytotoxicity activity; CDC活性)、またはマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス(Antibody-Dependent Phagocytosis activity; ADP活性)などが知られている。本発明においてADCC活性およびCDC活性は、公知の測定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]を用いて測定することができる。

【0106】

ADCC活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が、抗体のFc領域を介して免疫細胞のFc受容体と結合することで免疫細胞(ナチュラルキラー細胞など)を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

【0107】

Fc受容体(以下、FcRと記すこともある)とは、抗体のFc領域に結合する受容体であり、抗体の結合によりさまざまなエフェクター活性を誘導する。

【0108】

FcRは抗体のサブクラスに対応しており、IgG、IgE、IgA、IgMはそれぞれFcR、FcR、FcR、FcμRに特異的に結合する。更にFcRには、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)のサブタイプが存在し、それぞれFcRIA、FcRIB、FcRIC、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIIA、FcRIIIBのアイソフォームが存在する。これらの異なるFcRは異なる細胞上に存在している[Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492(1991)]。

【0109】

ヒトにおいては、FcRIIIBは好中球に特異的に発現しており、FcRIIAは、単球、Natural Killer細胞(NK細胞)および一部のT細胞に発現している。FcRIIIAを介した抗体の結合は、NK細胞依存的なADCC活性を誘導する。

【0110】

CDC活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タンパク質群からなる一連のカスケード(補体活性化経路)を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

10

20

30

40

50

また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により免疫細胞の遊走、活性化を誘導することができる。

【0111】

CDC活性のカスケードは、抗体のFc領域との結合ドメインを有するC1qが、Fc領域に結合し、2つのセリンプロテアーゼであるC1rおよびC1sと結合することでC1複合体を形成することで開始する。

【0112】

本発明のヘテロダイマータンパク質のエフェクター活性を制御する方法としては以下のような方法が挙げられる。

【0113】

例えば、本発明のヘテロダイマータンパク質のFcとして、IgG1サブクラスのFcのアミノ酸配列を用いて、EUインデックス297位のAsnに結合するN結合複合型糖鎖（以下、単にコンプレックス糖鎖と略記する場合もある）の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に1,6結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号）、または抗体のFc領域のアミノ酸残基を置換することで、ヘテロダイマータンパク質のエフェクター活性を制御することができる。

【0114】

1) 糖鎖改変によるエフェクター活性の制御

ヘテロダイマータンパク質のFc領域に結合しているコンプレックス糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンに付加するフコースの含量を制御することで、ヘテロダイマータンパク質のエフェクター活性を増加または低下させることができる。

【0115】

ヘテロダイマータンパク質のFc領域に結合しているN結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を低下させる方法としては、1,6-フコース転移酵素遺伝子（FUT8）が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していないヘテロダイマータンパク質を取得することができる。フコースが結合していないヘテロダイマータンパク質は高いADCC活性を有する。

【0116】

一方、ヘテロダイマータンパク質のFc領域に結合しているN結合複合型糖鎖に付加するフコースの含量を増加させる方法としては、1,6-フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いてヘテロダイマータンパク質を発現させることで、フコースが結合しているヘテロダイマータンパク質を取得できる。フコースが結合しているヘテロダイマータンパク質は、フコースが結合していないヘテロダイマータンパク質よりも低いADCC活性を有する。

【0117】

本発明のヘテロダイマータンパク質のFc領域には、EUインデックス297位のAsn残基にN結合型糖鎖が結合するが、それ以外のFc領域のAsn残基には糖鎖は結合することは知られていない。従って、通常、ヘテロダイマータンパク質1分子あたり2本のN-グリコシド結合糖鎖が結合している。

【0118】

N結合型糖鎖としてはハイマンノース型、コンプレックス型およびハイブリッド型が知られており、いずれのN結合型糖鎖でもフコースが結合していない糖鎖であれば、フコースが結合している糖鎖と比べて高いADCC活性を得ることができる。

【0119】

本発明のヘテロダイマータンパク質のFc領域に結合するコンプレックス糖鎖としては、コア構造（トリマンノシルコア構造）の非還元末端側のマンノース（Man）に、1つ以上のN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）またはガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）が1-2結合または1-4結

10

20

30

40

50

合している糖鎖が挙げられる。

【0120】

更に Gal - GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N - アセチルグルコサミン（以下、bisecting GlcNAc と記す）などを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖を挙げることができる。

【0121】

本発明において、コアフコース（core-fucose）または 1,6 - フコースとは、N - グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc と記す場合もある）の 6 位とフコース（以下、Fuc と記す場合もある）の 1 位が結合した糖鎖構造をいう。また、N - グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していないことを、単にフコースが無いまたはコアフコースが無い糖鎖という。

10

【0122】

また、本発明において、コア構造またはトリマンノシルコア構造（tri-mannosyl core structure）とは、Man 1 - 6 (Man 1 - 3) Man 1 - 4 GlcNAc 1 - 4 GlcNAc 構造をいう。

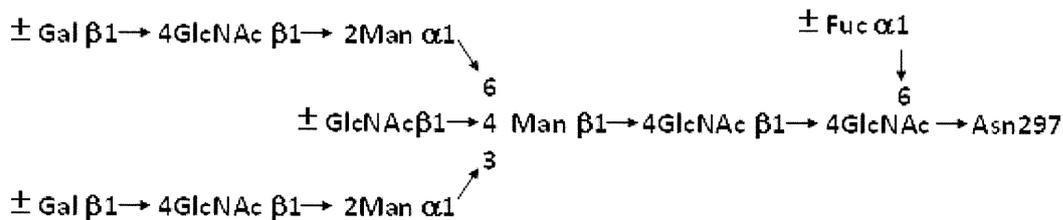
【0123】

本発明のヘテロダイマータンパク質に結合している糖鎖として、2本鎖 N - グリコシド結合コンプレックス糖鎖（バイアンテナリーコンプレックス糖鎖ともいう）は、下記化学式で示される。

20

【0124】

【化1】



30

【0125】

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質分子の 297 位の Asn にコンプレックス型糖鎖が結合した Fc 領域を有するヘテロダイマータンパク質分子であって、上記の糖鎖構造を有していれば、単一の糖鎖構造を有するヘテロダイマータンパク質分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有するヘテロダイマータンパク質分子から構成されていてもよい。

【0126】

すなわち、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物とは、単一または複数の異なる糖鎖構造を有するヘテロダイマータンパク質分子からなる組成物を意味する。具体的には、ヘテロダイマータンパク質に含まれる Fc 領域に結合する全 N - グリコシド結合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖が 20 % 以上であるヘテロダイマータンパク質が挙げられる。

40

【0127】

コアフコースが無い糖鎖の割合としては、ヘテロダイマータンパク質の ADC C 活性が増加すれば、いずれの割合のヘテロダイマータンパク質組成物も含まれるが、好ましくは 20 % 以上、より好ましくは 51 % - 100 %、更に好ましくは 80 % - 100 %、特に好ましくは 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、最も好ましくは 100 % の割合が挙げられる。

【0128】

50

コアフコースが無い糖鎖の割合が50%とは、ヘテロダイマータンパク質分子の第1および第2ポリペプチドに結合しているN-グリコシド結合糖鎖の片方の糖鎖にフコースが結合していない分子が100%含まれるヘテロダイマータンパク質組成物、またはヘテロダイマータンパク質分子の第1および第2ポリペプチドに結合しているN-グリコシド結合糖鎖の両方の糖鎖にフコースが結合していない分子が50%含まれかつヘテロダイマータンパク質分子の第1および第2ポリペプチドに結合しているN-グリコシド結合糖鎖の両方の糖鎖にフコースが結合している分子が50%含まれるヘテロダイマータンパク質組成物いずれも含まれる。

【0129】

本発明において、フコースが無い糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していなければ、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものであってもよい。

10

【0130】

本発明において、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない(コアフコースが無い)とは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していないヘテロダイマータンパク質組成物とは、具体的には、後述に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度のヘテロダイマータンパク質組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の実検出限界以下であることをいう。全ての糖鎖にコアフコースが無いヘテロダイマータンパク質組成物は、最も高いADCC活性を有する。

20

【0131】

N-グリコシド結合複合型糖鎖が結合したFc領域を有するヘテロダイマータンパク質分子からなる組成物中に含まれる、フコースが無い糖鎖を有するヘテロダイマータンパク質分子の割合は、ヘテロダイマータンパク質分子からヒドラジン分解または酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識または同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。

【0132】

また、コンプレックス糖鎖が結合したFcを含むヘテロダイマータンパク質分子からなる組成物中に含まれる、フコースが無い糖鎖が結合したヘテロダイマータンパク質分子の割合は、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法(J. Liq. Chromatogr., 6, 1577, 1983)によって分析することで決定することができる。

30

【0133】

2) アミノ酸残基置換によるエフェクター活性の制御

本発明のヘテロダイマータンパク質は、ヘテロダイマータンパク質を構成するFcの抗体サブクラスの変換またはFcのアミノ酸残基を置換することでADCC活性、ADCP活性およびCDC活性を増加または低下させることができる。

【0134】

例えば、米国特許出願公開第2007/0148165号明細書に記載のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、抗体のCDC活性を増加させることができる。また、米国特許第6,737,056号明細書、米国特許第7,297,775号明細書および米国特許第7,317,091号明細書に記載のアミノ酸残基置換を行うことで、ヘテロダイマータンパク質のADCC活性またはCDC活性を増加させることも低下させることもできる。

40

【0135】

ADCC活性を増強させる具体的なアミノ酸残基置換としては、P247I、A339D、F243L、R292P、Y300L、P396L、T393A、H433P、S239D、S298A、A330L、I332E、E333AおよびK334Aなどが挙げられる。一方、ADCC活性を減少させる具体的なアミノ酸置換残基置換としては、L23

50

5 E、P 2 3 8 A、N 2 9 7 A、K 3 2 2 AおよびP 3 3 1 Sなどが挙げられる。

【0136】

CDC活性を増加させる具体的なアミノ酸残基置換としては、K 3 2 6 A、S 2 6 7 E、H 2 6 8 F、S 3 2 4 T、K 2 7 4 Q、N 2 7 6 K、Y 2 9 6 F、Y 3 0 0 F、K 3 2 6 W、K 3 2 6 Y、E 3 3 3 A、E 3 3 3 S、A 3 3 9 T、D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、K 3 9 2 N、T 3 9 4 F、T 3 9 4 Y、V 3 9 7 MおよびV 4 2 2 Iから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基置換が挙げられる。

【0137】

いずれのアミノ酸残基置換を2つ以上組み合わせてCDC活性を増加させることもでき、目的に応じて置換するアミノ酸残基を増やすことができる。CDC活性を増加させるアミノ酸残基置換として好ましくは、N 2 7 6 K、A 3 3 9 T、T 3 9 4 FおよびT 3 9 4 Yから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基置換、N 2 7 6 KおよびA 3 3 9 Tのアミノ酸残基置換、並びにK 2 7 4 Q、N 2 7 6 K、Y 2 9 6 F、Y 3 0 0 F、A 3 3 9 T、D 3 5 6 E、L 3 5 8 M、N 3 8 4 S、V 3 9 7 MおよびV 4 2 2 Iのアミノ酸残基置換などが挙げられる。一方、CDC活性を減少させる具体的なアミノ酸残基置換としては、L 2 3 5 E、N 2 9 7 A、K 3 2 2 A、P 3 2 9 AおよびP 3 3 1 Sなどが挙げられる。

【0138】

またT 2 5 0 Q、M 4 2 8 L、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 Eなどのアミノ酸変異をヒトIgG1サブクラスのFcに導入することにより血中半減期を延長することができる。またN 2 9 7位にアミノ酸変異を導入することによりN結合型糖鎖を除去したFcまたはヒトIgG2あるいはIgG4サブクラスのFc、IgG2とIgG4のキメラFcなどを用いることにより、ADCC活性、ADCP活性、CDC活性などの細胞傷害活性を低下させることができる。

【0139】

またヒトIgG1にG 2 3 6 D、L 3 2 8 F、S 2 3 9 D、S 2 6 7 Eなどのアミノ酸変異を導入することにより、抑制性Fc受容体であるFcRIIbへの結合活性を上昇させることができる。

【0140】

本発明のヘテロダイマータンパク質としては、上述のエフェクター活性が増加または低下されたヘテロダイマータンパク質いずれのものも包含される。

【0141】

本発明のIgG1型ヘテロダイマータンパク質として具体的には、IgG1抗体のCHを含む第1ポリペプチドおよびIgG1のFcとCLを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質であって、かつ以下(1)~(9)いずれか1つであるIgG1型ヘテロダイマータンパク質などが挙げられる。

(1) 第1ポリペプチドはEUインデックスC 2 2 0 Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、H 4 3 5 Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(2) 第1ポリペプチドはアミノ酸置換が無く、第2ポリペプチドは、C 2 1 4 SおよびH 4 3 5 Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(3) 第1ポリペプチドはEUインデックスC 2 2 0 Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、C 2 1 4 SおよびH 4 3 5 Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(4) 第1ポリペプチドはEUインデックスC 2 2 0 Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、C 2 2 0 S、C 2 1 4 SおよびH 4 3 5 Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(5) 第1ポリペプチドはEUインデックスC 2 2 0 Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、C 2 1 4 SおよびH 4 3 5 Rの置換並びにEUインデックス2 1 6 - 2 2 0のEPKSCの欠損を含むヘテロダイマータンパク質

(6) 第1ポリペプチドはEUインデックスC 2 2 0 Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、C 2 1 4 S、H 4 3 5 RおよびY 4 3 6 Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(7) 該第1ポリペプチドはEUインデックスC 2 2 0 Sの置換を含み、該第2ポリペプチドは、C 2 1 4 S、H 4 3 5 RおよびY 4 3 6 Fの置換並びにEUインデックス2 1 6

10

20

30

40

50

- 220のEPKSCの欠損を含むヘテロダイマータンパク質。

(8) 該第1ポリペプチドはEUインデックスC220S、K322AおよびP331Sの置換を含み、該第2ポリペプチドは、C214S、K322A、P331S、H435RおよびY436Fの置換並びにEUインデックス216-220のEPKSCの欠損を含むヘテロダイマータンパク質。

(9) 該第1ポリペプチドはEUインデックスC220SおよびI332Eの置換を含み、該第2ポリペプチドは、C214S、I332E、H435RおよびY436Fの置換並びにEUインデックス216-220のEPKSCの欠損を含むヘテロダイマータンパク質。

【0142】

また、本発明のIgG4型ヘテロダイマータンパク質として具体的には、IgG4抗体のCHを含む第1ポリペプチドおよびIgG4のFcとCLを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質であって、かつ以下(1)~(10)のいずれか1つであるIgG4型ヘテロダイマータンパク質などが挙げられる。

(1) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214SおよびH435Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(2) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131Sの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(3) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131SおよびR409Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、R409K、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(4) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131S、S228PおよびR409Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、S228P、R409K、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(5) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131S、S228P、L235EおよびR409Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、S228P、L235E、R409K、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質。

(6) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131SおよびR133Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214SおよびH435Rの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(7) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131SおよびR133Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(8) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131S、R133KおよびR409Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、R409K、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(9) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131S、R133K、S228PおよびR409Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、S228P、R409K、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質

(10) 第1ポリペプチドはEUインデックスC131S、R133K、S228P、L235EおよびR409Kの置換を含み、第2ポリペプチドは、C214S、S228P、L235E、R409K、H435RおよびY436Fの置換を含むヘテロダイマータンパク質。

【0143】

(2) ヘテロダイマータンパク質の結合活性の制御

本発明のヘテロダイマータンパク質は、ヘテロダイマー分子を構成するCHおよびCL-Fc(以下、ヘテロダイマー足場構造タンパク質、heterodimer scaffold protein; HSPと記す場合がある)のそれぞれのポリペプチドのN末端およびC末端に分子特異的な結合タンパク質を結合させることで、一価~四価の結合活性を有するヘテロダイマータンパク質を作製することができる。

10

20

30

40

50

【0144】

従って、本発明のヘテロダイマータンパク質としては、CHおよびCL-FcからなるHSPを含むヘテロダイマータンパク質、HSPに少なくとも1つの結合タンパク質が結合したヘテロダイマータンパク質が挙げられる(図2Aおよび図2B)。

【0145】

本発明の一価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質(以下、一価抗体、monovalent antibody、またはmonomeric antibodyと記す場合もある)としては、CHおよびCL-FcのN末端にVHおよびVLをそれぞれ結合させた、第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドからなる一価抗体、CHのN末端にscFvを結合させた第1ポリペプチドとCL-Fcの第2ポリペプチドからなる一価抗体などが挙げられる。

10

【0146】

本発明の2価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質(以下、バイスペシフィック抗体または2価抗体と記す場合もある)としては、CHおよびCL-FcのN末端にそれぞれ、第1scFvおよび第2scFvを結合させた第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体、CHのN末端にVHを結合させ、C末端にscFvを結合させた第1ポリペプチドおよびCL-FcのN末端にVLを結合させた第2ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体などが挙げられる(図2B)。また、上述一価抗体のN末端側にscFvを結合させた2価結合活性を有するヘテロダイマータンパク質も挙げられる。

20

【0147】

本発明の3価または4価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質(以下、3価抗体または4価抗体と記す場合もある)としては、CHおよびCL-FcのN末端およびC末端に、3から4個のscFvを結合結合させた3価抗体または4価抗体などが挙げられる。また、上述一価抗体のN末端側に第1scFv、第2scFvを結合させた3価結合活性を有するヘテロダイマータンパク質も挙げられる。

【0148】

本発明の一価抗体は、1つのエピトープに結合することから、抗原のクロスリンケージ等の影響を引き起こすことが無く、抗原架橋に基く不要な活性を引き起こすことが無い。

【0149】

以下に、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物の製造方法を具体的に説明する。

30

【0150】

3. ヘテロダイマータンパク質組成物の製造方法

本発明のヘテロダイマータンパク質の製造方法は、以下(i)~(iii)の工程を含む製造方法が挙げられる。

(i) CHを含む第1ポリペプチドをコードするDNA含むベクターおよびCH結合体への結合活性が低下したCL-Fcを含む第2ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターを細胞へ導入する工程。

(ii) 該細胞を培養し、培養上清を回収する工程。

(iii) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させて精製する工程。

40

【0151】

より具体的には、例えば、上述(i)のヘテロダイマータンパク質を製造させるための生産細胞を作製する工程において、第1ポリペプチドにEUインデックスC131Sの置換、第2ポリペプチドにEUインデックスC214Sの置換、C220Sの置換、H435RおよびY436Fの置換から選ばれるいずれか1つの置換を加える工程を、ヘテロダイマータンパク質に含まれる抗体定常領域のサブクラスに応じて適宜行うことが挙げられる。

【0152】

より具体的には、例えば、第1ポリペプチドのEUインデックスC131Sの置換および第2ポリペプチドにEUインデックスH435Rの置換、第2ポリペプチドにEUイン

50

デックスC214SおよびH435Rの置換、EUインデックスC220SおよびH435Rの置換、またはEUインデックスC214S、H435RおよびY436Fの置換を加える工程などが挙げられる。

【0153】

また、本発明のヘテロダイマータンパク質の製造方法は、以下(i)~(v)の工程を含む製造方法が挙げられる。

(i) CHを含む第1ポリペプチドおよびCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、第2ポリペプチドのCH結合体への結合活性を低下または欠損させる工程。

(ii) ヘテロダイマータンパク質の、CHとCLとのジスルフィド結合に関するCys残基を欠損または置換させる工程。

(iii) CHを含む第1ポリペプチドをコードするDNA含むベクターおよびCH結合体への結合活性が低下したCL-Fcを含む第2ポリペプチドをコードするDNAを含むベクターを細胞へ導入する工程。

(iv) 該細胞を培養し、培養上清を回収する工程。

(v) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させ精製する工程。

【0154】

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

【0155】

(1) 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現ベクターの構築

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現ベクターとは、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータンパク質分子の第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターである。

【0156】

ヘテロダイマータンパク質組成物発現用ベクターは、動物細胞用発現ベクターにヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータンパク質分子の第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0157】

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータンパク質分子を構成する第1ポリペプチドをコードする遺伝子は、抗体H鎖定常領域(CH)のN末端またはC末端に、所望の結合タンパク質のアミノ酸配列を連結したアミノ酸配列を作製することで作製することができる。

【0158】

同様にして、第2ポリペプチドをコードする遺伝子は、抗体L鎖定常領域(CL)とFcを融合させたCL-FcのN末端またはC末端に、所望の結合タンパク質のアミノ酸配列を連結したアミノ酸配列を作製することで、作製することができる。

【0159】

また、合成DNAを用いて全DNAを合成することもでき、polymerase chain reaction(PCR法)による合成も可能である(モレキュラー・クローニング第2版)。さらに、これらの手法を複数組み合わせることにより、ヘテロダイマータンパク質をコードする遺伝子を作製することもできる。

【0160】

本発明のヘテロダイマータンパク質として、具体的に一価の結合ドメインを有するIgG4型一価抗体を作製する場合は、ヒトIgG4抗体のCHのアミノ酸配列に、C131S/R133K/S228P/L235E/R409Kのアミノ酸置換を加えたアミノ酸配列を設計し、該IgG4-CHアミノ酸配列のN末端にVHのアミノ酸配列を連結した第1ポリペプチドのアミノ酸配列を作成する。

【0161】

一方、ヒトCLのアミノ酸配列とヒトIgG4抗体のヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインのアミノ酸配列を連結したIgG4-CL-Fcに、C214S/S228P/L235E/R409K/H435R/Y436Fのアミノ酸置換を加えたアミノ酸配列を設計し、該アミノ酸配列のN末端にVLのアミノ酸配列を連結した第2ポリペプチドのアミノ酸配列を作成する。作成した第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を作製し、動物細胞発現用ベクターに挿入し、本発明の一価抗体発現ベクターを作製することができる。

10

【0162】

動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、pcDNA1、pCDM8(フナコシ社製)、pAGE107[日本国特開平3-22979号公報; Cytotechnology, 3, 133(1990)]、pAS3-3(日本国特開平2-227075号公報)、pCDM8[Nature, 329, 840(1987)]、pcDNA1/Amp(インビトロジェン社製)、pcDNA3.1(インビトロジェン社製)、pREP4(インビトロジェン社製)、pAGE103[J. Biochemistry, 101, 1307(1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93(国際公開第97/10354号)、N5KG1val(米国特許第6,001,358号明細書)およびTol2トランスポゾンベクター(国際公開第2010/143698号)などが挙げられる。

20

【0163】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のimmediate early(IE)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター、またはモロニー Maus 白血病ウイルスのプロモーターあるいはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

30

【0164】

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現用ベクターは、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ(以下、タンデム型と表記する)のどちらでも用いることができる。

【0165】

(2) 抗体の可変領域をコードするcDNAの取得

40

任意の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

【0166】

任意の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として用い、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製する。

【0167】

前記ライブラリーより、既存の抗体の定常領域または可変領域をコードするDNAをプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよびL鎖可変領域をコードするcDNAを有する組換えファージまたは組換えプ

50

ラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的の抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

【0168】

任意の非ヒト動物抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、抗体が結合する抗原を非ヒト動物に免疫し、周知の方法 [モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996] に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製する。次いでシングルセルクローニングしたハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

10

【0169】

非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスターまたはウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【0170】

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、例えば、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、RNeasy kit (QIAGEN社製)、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] 等が挙げられる。

20

【0171】

また、例えば、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) 等が挙げられる。

30

【0172】

cDNAの合成およびcDNAライブラリー作製法としては、常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)、または市販のキット、例えば、Super Script (登録商標) Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) またはZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) を用いる方法などが挙げられる。

40

【0173】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。

【0174】

例えば、ZAP Express (Strategies, 5, 58, 1992)、pBluescript II SK (+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494, 1989)、ZAP II (Stratagene社製)、gt10、gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach

50

ach, I, 49, 1985)、Lambda BlueMid (Clontech社製)、ExCell, pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pCD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280, 1983) および pUC18 (Gene, 33, 103, 1985) 等を用いることができる。

【0175】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。

【0176】

例えば、XL1-Blue MRF (Strategies, 5, 81, 1992)、C600 (Genetics, 39, 440, 1954)、Y1088、Y1090 (Science, 222, 778, 1983)、NM522 ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol., 166, 1, 1983)、K802 (J. Mol. Biol., 16, 118, 1966) および JM105 (Gene, 38, 275, 1985) 等が用いられる。

10

【0177】

cDNAライブラリーからの非ヒト動物抗体のVHおよびVLをコードするcDNAクローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) に

20

【0178】

また、プライマーを調製し、cDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34) によりVHおよびVLをコードするcDNAを調製することもできる。

【0179】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript II SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、Sangerらのジデオキシ法 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463, 1977) 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該cDNAの塩基配列を決定することができる。

30

【0180】

決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLを完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

40

【0181】

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードするDNAの塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

【0182】

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US De

50

pt. Health and Human Services, 1991)を考慮して該可変領域をコードするDNAの塩基配列を設計し、設計したDNAの塩基配列に基づき、100~150塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うか、完全長のDNAを合成することで、DNAを得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に上述と同様にしてDNAを得ることができる。

【0183】

(3) 抗体の可変領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

10

【0184】

(4) ヒト化抗体の可変領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的の非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRを移植するヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領域(以下、FRと表記する)のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のものであれば、いかなるものでも用いることができる。

20

【0185】

例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)等が挙げられる。

【0186】

その中でも、十分な活性を有するヒト化抗体を作製するためには、目的の非ヒト動物抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが好ましい。

30

【0187】

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的の非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)を考慮してDNAの塩基配列に変換し、ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を設計する。設計したDNAの塩基配列を完全合成する。

40

【0188】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上述3(1)で構築した本発明のヘテロダイマータンパク質組成物発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript IISK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、上述3(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を有するプラスミドを取得する。

【0189】

(5) ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよび

50

V LのF Rに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト動物抗体に比べて低下してしまうことが知られている(B I O / T E C H N O L O G Y , 9 , 2 6 6 , 1 9 9 1)

【 0 1 9 0 】

この原因としては、元の非ヒト動物抗体のV HおよびV Lでは、C D Rのみならず、F Rのいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がC D Rの移植に伴い、ヒト抗体のV HおよびV LのF Rの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。

【 0 1 9 1 】

この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のV HおよびV LのF Rのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基またはC D Rのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元の非ヒト動物抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている(B I O / T E C H N O L O G Y , 9 , 2 6 6 , 1 9 9 1)。

【 0 1 9 2 】

ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるF Rのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析(J . M o l . B i o l . , 1 1 2 , 5 3 5 , 1 9 7 7) 或いはコンピューターモデリング(P r o t e i n E n g i n e e r i n g , 7 , 1 5 0 1 , 1 9 9 4) 等による抗体の立体構造の構築および解析が行われている。

【 0 1 9 3 】

これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来た。しかしながら、あらゆる抗体に適応可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されていない。現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【 0 1 9 4 】

ヒト抗体のV HおよびV LのF Rのアミノ酸残基の改変は、改変用合成D N Aを用いて3 (4) に記載のP C R法を行うことにより、達成できる。P C R後の増幅産物について3 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する

【 0 1 9 5 】

(6) ヘテロダイマータンパク質の発現

上述3 (1) のヘテロダイマータンパク質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することにより一過性または安定的にヘテロダイマータンパク質を生産する形質転換株を得ることができる。

【 0 1 9 6 】

本発明のヘテロダイマータンパク質は、C H含む第1ポリペプチドおよびC L - F cを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつC LとC H 1のジスルフィド結合に関するC y s残基が欠損または置換されたヘテロダイマータンパク質であり、該発現ベクターを導入した宿主細胞では、ヘテロダイマータンパク質の多重合体量が顕著に減少する。従って、本発明のヘテロダイマータンパク質は、C Hを含む第1ポリペプチドおよびC L - F cを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマー構造を効率的に形成する分子である。

【 0 1 9 7 】

また、本発明は、C H含む第1ポリペプチドおよびC L - F cを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、C LとC H 1のジスルフィド結合に関するC y s残基を欠損または置換することにより、ヘテロダイマータンパク質の多重合体を減少させる方法も含む。

【 0 1 9 8 】

10

20

30

40

50

(6-a) ヘテロダイマータンパク質の一過性発現

(3) および(6) で得られるヘテロダイマータンパク質発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いてヘテロダイマータンパク質の一過性発現を行い、作製した多種類のヘテロダイマータンパク質の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

【0199】

発現ベクターを導入する宿主細胞には、ヘテロダイマータンパク質を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばCOS-7細胞[American Type Culture Collection(ATCC)番号:CRL1651]を用いる(Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283, 1991)。

10

【0200】

COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法(Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 1991)、またはリポフェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413, 1987)などを用いる。

発現ベクターの導入後、培養上清中のヘテロダイマータンパク質の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック(1987)]などを用いて測定する。

20

【0201】

(6-b) ヘテロダイマータンパク質の安定発現

(1) で得られたヘテロダイマータンパク質発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヘテロダイマータンパク質を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

【0202】

宿主細胞への発現ベクターの導入には、宿主細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法(Cytotechnology, 3, 133, 1990)、リン酸カルシウム法(日本国特開平2-227075号公報)、リポフェクション法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413, 1987)、インジェクション法[マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(日本国特許第2606856号明細書、日本国特許第2517813号明細書)、DEAE-デキストラン法[バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法(羊土社)横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法(マニピュレイティング・マウス・エンブリオ第2版)等を挙げることができる。

30

【0203】

ヘテロダイマータンパク質発現ベクターを導入する宿主細胞には、ヘテロダイマータンパク質を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。ヒト白血病細胞ナマルバ(Namalwa)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637(日本国特開昭63-299号公報)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等を挙げることができる。

40

【0204】

具体的には、例えば、PER.C6、CHO-K1(ATCC CCL-61)、DUKXB11(ATCC CCL-9096)、Pro-5(ATCC CCL-1781)、CHO-S(Life Technologies, Cat # 11619)、Lec13細胞、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(ATCC番号:CRL1662、またはYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞N

50

S 0、マウスミエローマ細胞 S P 2 / 0 - A g 1 4 (A T C C 番号 : C R L 1 5 8 1)、マウス P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 細胞 (A T C C 番号 : C R L 1 5 8 0)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (D i h y d r o f o r a t e R e d u c t a s e、以下、d h f r と表記する) が欠損した CHO 細胞 (C H O / D G 4 4) [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 7 , 4 2 1 6 (1 9 8 0)]、シリアンハムスター細胞 B H K、H B T 5 6 3 細胞、上述細胞株の亜株細胞および上述細胞株を無血清培養下で馴化した細胞、非接着条件下の培養条件で馴化した細胞などを用いることができる。

【 0 2 0 5 】

本発明においてヘテロダイマータンパク質の生産に用いる細胞としては、F c における E U インデックス 2 9 7 の A s n に結合する糖鎖のコアフコース量を低下または欠損させる細胞を用いることもできる。具体的には、G D P - L - フコースの合成またはゴルジ体への輸送に関与する酵素またはコアフコースの結合に関与する酵素が低下または欠損した細胞を選択するか、または種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

10

【 0 2 0 6 】

具体的には、コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素活性を減少または欠損させる方法、またはコアフコース切断酵素活性を増加させる方法など、コアフコースを制御した細胞を作製することができる。

【 0 2 0 7 】

コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素としては、G D P - L - フコースの合成あるいは輸送に関与する酵素または N - グリコシド結合複合型糖鎖のコアフコースの結合に関与する酵素が挙げられる。

20

【 0 2 0 8 】

G D P - L - フコースの合成またはゴルジ体への輸送に関与する酵素としては、具体的には、G D P - マンノース 4 , 6 - デヒドラターゼ (以下、G M D と表記する)、G D P - 4 - ケト - 6 - デオキシ - D - マンノース - 3 , 5 - エピメラーゼ (以下、F x と表記する)、G D P - ベータ - L - フコース - ピロホスフォリラーゼ (G F P P)、フコキナーゼ、G D P - L - フコーストランスポーターなどが挙げられる。

【 0 2 0 9 】

コアフコースの結合に関与する酵素としては 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ (以下、F U T 8 と表記する) などが挙げられる。

30

【 0 2 1 0 】

本発明のヘテロダイマータンパク質を生産する細胞としては、上述の 1 つの酵素活性を低下または欠損させてもよいし、複数の酵素活性を組み合わせると低下または欠損させてもいずれでもよい。

【 0 2 1 1 】

上述の酵素活性を低下または欠損させる方法としては、
 (a) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法 ;
 (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法 ;
 (c) 酵素についての突然変異を導入する手法 ;
 (d) 酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法 ;
 (e) N - グリコシド結合糖鎖還元末端の N - アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法
 などが挙げられる。

40

【 0 2 1 2 】

レクチンとしては、レンズマメレクチン L C A (L e n s C u l i n a r i s 由来の L e n t i l A g g l u t i n i n) エンドウマメレクチン P S A (P i s u m s a t i v u m 由来の P e a L e c t i n)、ソラマメレクチン V F A (V i c i a f a b a 由来の A g g l u t i n i n)、ヒヨコチャワンタケレクチン A A L (A l e u r i a a u r a n t i a 由来の L e c t i n) などの 1 , 6 フコースに結合するレクチンが挙げ

50

られる。

【0213】

具体的な細胞としては、例えば、FUT8遺伝子が欠損したCHO細胞（国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第2000/061739号）、レクチン耐性を獲得したLec13（Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55, 1986）、GDP-フコーストランスポーター遺伝子が欠損した細胞（国際公開第2003/085102号）、GDP-mannose 4, 6-dehydratase（GMD）遺伝子が欠損した細胞（国際公開第2002/31140号）、WGAレクチン耐性細胞およびLCAレクチン耐性細胞（国際公開第2002/31140号）などを用いることもできる。

10

【0214】

上述の方法以外に、N結合型糖鎖の合成系に関する酵素であるmannosidase I, mannosidase IIなどの酵素を阻害することにより、high mannose型のN結合型糖鎖が結合し、コアフコース量が減少したヘテロダイマータンパク質組成物を発現させることもできる。

【0215】

また、N-acetylglucosamine transferase III（GnTIII）を過剰発現させた宿主細胞を用いることで、bisecting GlcNAcが結合したコンプレックスおよびハイブリッド糖鎖が結合し、かつコアフコース量が減少したテロダイマータンパク質組成物を生産することもできる。

20

【0216】

発現ベクターの導入後、ヘテロダイマータンパク質を安定に発現する形質転換株は、G418硫酸塩（以下、G418と表記する）、シクロヘキシミド（以下、CHXと略記する）、メトトレキサート（以下、MTXと略記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平2-257891号公報）。

【0217】

動物細胞培養用培地には、RPMI1640培地（インビトロジェン社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL301培地、EX-CELL302、EX-CELL325培地（JRH社製）、IMDM培地（インビトロジェン社製）、Hybridoma-SFM培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にウシ胎児血清（以下、FBSと略記する）などの各種添加物を添加した培地などを用いることができる。

30

【0218】

得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヘテロダイマータンパク質を発現蓄積させる。培養上清中のヘテロダイマータンパク質の発現量および抗原結合活性はELISA法などにより測定できる。また、dhfr遺伝子増幅系（日本国特開平2-257891号公報）などを利用して、形質転換株の産生するヘテロダイマータンパク質の発現量を向上させることができる。

【0219】

以上、動物細胞を宿主としたヘテロダイマータンパク質組成物の発現方法を示したが、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても、公知技術に基づいて動物細胞と同様の方法によりヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

40

【0220】

酵母を宿主細胞とする場合は、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリユイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomycetes alluvius等を挙げることもできる。

【0221】

50

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182, 1990)、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 1929, 1978)、酢酸リチウム法 (J. Bacteriology, 153, 163, 1983)、(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929, 1978) に記載の方法等を挙げるができる。

【0222】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー-Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992)、Bio/Technology, 6, 47, 1988等に記載された方法によって、ヘテロダイマータンパク質を発現することができる。

10

【0223】

したがって、宿主細胞がヘテロダイマータンパク質分子を発現する能力を有する場合には、以下に示す宿主細胞にヘテロダイマータンパク質遺伝子を導入した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とするヘテロダイマータンパク質組成物を精製することにより、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

【0224】

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体 (トランスジェニック非ヒト動物) または植物個体 (トランスジェニック植物) を造成し、これらの個体を用いてヘテロダイマータンパク質組成物を製造することもできる。

20

【0225】

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、ヘテロダイマータンパク質組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ヘテロダイマータンパク質組成物を採取することにより、該ヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

【0226】

動物個体を用いてヘテロダイマータンパク質組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S, 1996; American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S, 1996; Bio/Technology, 9, 830, 1991] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とするヘテロダイマータンパク質組成物を生産させる方法が挙げられる。

30

【0227】

動物個体の場合は、例えば、ヘテロダイマータンパク質分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、ヘテロダイマータンパク質組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中よりヘテロダイマータンパク質組成物を採取することにより、ヘテロダイマータンパク質組成物を製造することができる。

40

【0228】

前記動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク (日本国特開昭63-309192号公報) または卵等を挙げるができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができる。例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるカゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーターおよびホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0229】

植物個体を用いてヘテロダイマータンパク質組成物を製造する方法としては、例えばへ

50

テロダイマータンパク質分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、ヘテロダイマータンパク質組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ヘテロダイマータンパク質組成物を採取することにより、ヘテロダイマータンパク質組成物を生産する方法が挙げられる。

【 0 2 3 0 】

(7) ヘテロダイマータンパク質の精製

ヘテロダイマータンパク質発現ベクターを導入した宿主細胞を培養した場合、2本の第2ポリペプチドからなるホモダイマータンパク質と、第1ポリペプチドと第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質を産生する。本発明のヘテロダイマータンパク質は、CHを含む第1ポリペプチドおよびCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるタンパク質であって、かつ該第2ポリペプチドがCH結合体に対する結合活性が低下または欠損したポリペプチドであるため、CH結合体に結合する第1ポリペプチドを含むヘテロダイマータンパク質のみが、特異的に分離、精製される。

10

【 0 2 3 1 】

従って本発明で用いる精製方法としては、CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程とヘテロダイマータンパク質を溶出する工程を含む。すなわち本発明のヘテロダイマータンパク質の精製方法は、以下 (i) ~ (i i i) の工程を含む精製方法が挙げられる。

20

(i) CHを含む第1ポリペプチドおよびCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、第2ポリペプチドのCH結合体への結合活性を低下または欠損させる工程。

(i i) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

(i i i) ヘテロダイマータンパク質を溶出する工程。

【 0 2 3 2 】

より具体的には、例えば、上述 (i) のヘテロダイマータンパク質を製造させるための生産細胞を作製する工程において、第2ポリペプチドにEUインデックスC214Sの置換、C220Sの置換、H435RおよびY436Fの置換から選ばれるいずれか1つの置換を加える工程を、ヘテロダイマータンパク質に含まれる抗体定常領域のサブクラスに

30

【 0 2 3 3 】

より具体的には、例えば、第2ポリペプチドにEUインデックスC214SおよびH435Rの置換、EUインデックスC220SおよびH435Rの置換またはEUインデックスC214S、H435RおよびY436Fの置換を加える工程などが挙げられる。

【 0 2 3 4 】

また、本発明のヘテロダイマータンパク質の精製方法は、以下 (i) ~ (i v) の工程を含む精製方法が挙げられる。

(i) CHを含む第1ポリペプチドおよびCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、第2ポリペプチドのCH結合体への結合活性を低下または欠損させる工程。

40

(i i) ヘテロダイマータンパク質の、CHとCLとのジスルフィド結合に関するCys残基を欠損または置換させる工程。

(i i i) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

(i v) ヘテロダイマータンパク質を溶出する工程。

【 0 2 3 5 】

更に本発明では、上述の製造工程 (i) において、CHとCLとのジスルフィド結合に関するCys残基を欠損または置換させることにより、本発明のヘテロダイマータンパク質の半量体形成および/または多量体形成を低下させることもできる。

【 0 2 3 6 】

50

本発明のヘテロダイマータンパク質の半量体形成を低下させる方法は、以下(i)~(iii)の工程を含むヘテロダイマータンパク質の半量体形成を低下させる方法が挙げられる。

(i) CHを含む第1ポリペプチドおよびFLを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質において、EUインデックスR409Kの置換を導入する工程。

(ii) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

(iii) ヘテロダイマータンパク質を精製する工程。

【0237】

本発明は、以下(i)~(iii)の工程を含むヘテロダイマータンパク質の多量体形成を低下させる方法が挙げられる。

(i) CHを含む第1ポリペプチドおよびFLを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、CHとCLとのジスルフィド結合に関するCys残基を欠損または置換させる工程。

(ii) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

(iii) ヘテロダイマータンパク質を精製する工程。

【0238】

本発明のヘテロダイマータンパク質の半量体形成および多量体形成を低下させる方法は、以下(i)~(iv)の工程を含むヘテロダイマータンパク質の半量体形成を低下させる方法が挙げられる。

(i) CHを含む第1ポリペプチドおよびFLを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質の、CHとCLとのジスルフィド結合に関するCys残基を欠損または置換させる工程。

(ii) EUインデックスR409Kの置換を導入する工程。

(iii) CH結合体にヘテロダイマータンパク質を結合させる工程。

(iv) ヘテロダイマータンパク質を精製する工程。

【0239】

より具体的には、例えば、上述(i)または(ii)のヘテロダイマータンパク質を製造させるための生産細胞を作製する工程において、第2ポリペプチドにEUインデックスC214Sの置換、C220Sの置換、R409Kの置換およびH435Rの置換から選ばれ、いずれか1つの置換を加える工程を、ヘテロダイマータンパク質に含まれる抗体定常領域のサブクラスに応じて適宜行うことが挙げられる。

【0240】

より具体的には、例えば、第2ポリペプチドにEUインデックスC214S、R409KおよびH435Rの置換、EUインデックスC220S、R409KおよびH435Rの置換またはEUインデックスC214S、R409K、H435RおよびY436Fの置換を加える工程などが挙げられる。

【0241】

本発明のヘテロダイマータンパク質は以下のようにして精製することができる。ヘテロダイマータンパク質分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造されたヘテロダイマータンパク質組成物は、例えばヘテロダイマータンパク質分組成物が、細胞内に可溶性タンパク質として発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【0242】

前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75 [三菱化学(株)製]等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

ー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、ヘテロダイマータンパク質組成物の精製標品を得ることができる。

【0243】

本発明においては、アフィニティークロマトグラフィーとして、CH結合体を用いたアフィニティークロマトグラフィーが用いられる(Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

10

【0244】

また、ヘテロダイマータンパク質組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてヘテロダイマータンパク質組成物の不溶体を回収する。回収したヘテロダイマータンパク質組成物の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ヘテロダイマータンパク質組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該ヘテロダイマータンパク質組成物の精製標品を得ることができる。

【0245】

ヘテロダイマータンパク質組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ヘテロダイマータンパク質組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、ヘテロダイマータンパク質組成物の精製標品を得ることができる。

20

【0246】

CH結合体またはFc結合体として具体的には、CHまたはFcに結合するものであればタンパク質、樹脂などいかなるものであってもよく、例えば、Fc結合タンパク質、抗体H鎖定常領域(CH)に結合する抗体などが挙げられる。

【0247】

Fc結合タンパク質として、具体的には、例えば、Staphylococcus Aureus由来Protein A、hemolytic Streptococcus由来Protein G、Fc受容体および該サブクラス(Fc RI、IIA、IIB、IIIA、IIIB)並びにこれらの結合部分断片などが挙げられる。

30

【0248】

CHに結合する抗体としては、例えば、CH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインまたはCH3ドメインに結合する抗体が挙げられる。

【0249】

本発明においてCH結合体としてより好ましくは、Protein A、Protein G、抗CH1抗体および該結合部分断片が挙げられる。

【0250】

本発明のヘテロダイマータンパク質の精製方法として、具体的には、例えば、上述3(6)で作製した形質転換細胞株を用いて培養した培養上清を、Protein AカラムまたはProtein Gカラムのロードした後、該カラムをリン酸バッファー(phosphate buffer saline, 以下PBSと略記する)を用いて洗浄する。

40

【0251】

その後、低pH(pH2.0 - 6.0)のクエン酸バッファー等でカラムからヘテロダイマータンパク質を溶出させ、溶出液をアルカリ性のTrisバッファー等で中和する。中和された溶出液は十分量のPBS等で透析を行い、精製されたヘテロダイマータンパク質を取得することができる。

【0252】

50

精製したヘテロダイマータンパク質分子の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [Nature, 227, 680 (1970)]、またはウェスタンブロッティング法 [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] など用いて測定することができる。

【0253】

4. ヘテロダイマータンパク質組成物の活性評価

精製したヘテロダイマータンパク質組成物のタンパク量、FcR結合活性、C1q結合活性、抗原結合活性、またはADCC活性若しくはCDC活性等の細胞傷害活性を測定する方法としては、例えば、Molecular Cloning 2nd Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996等に記載の公知の方法が挙げられる。

【0254】

具体的な例としては、ヘテロダイマータンパク質組成物の、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法および蛍光抗体法 (Cancer Immunol. Immunother, 36, 373, 1993) 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる [Cancer Immunol. Immunother, 36, 373, 1993、米国特許出願公開第2004/0259150号明細書]。

【0255】

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物がFcRへの結合活性を有することは、遺伝子組み換えFcRIIIAタンパク質または遺伝子組換え胎児FcR (neonatal Fc receptor, FcRn) タンパク質を作製して、結合活性を測定することで確認することができる (米国特許出願公開2004/0259150号明細書)。

【0256】

ADCC活性を測定する方法としては、例えば、放射性同位体、蛍光物質または色素等で標識された標的細胞、ヘテロダイマータンパク質およびエフェクター細胞を接触させた後、傷害された標的細胞から遊離される標識物質の活性または遊離する酵素の生理活性等を測定する方法など挙げられる。

【0257】

CDC活性を測定する方法としては、例えば、放射性同位体、蛍光物質または色素等で標識された標的細胞、ヘテロダイマータンパク質および補体成分を含む血清等の生体試料を接触させた後、傷害された標的細胞から遊離される標識物質の活性または遊離する酵素の生理活性を測定する方法など挙げられる。

【0258】

5. ヘテロダイマータンパク質組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させたヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造は、通常の糖タンパク質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース (Gal)、マンノース (Man) 若しくはフコース (Fuc) などの中性糖、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) などのアミノ糖またはシアル酸 (Sial) などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

10

20

30

40

50

【0259】

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

ヘテロダイマータンパク質組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

【0260】

具体的な方法として、例えば、Dionex社製糖組成分析装置を用いる方法が挙げられる。BioLCはHPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 (J. Liq. Chromatogr., 6, 1577, 1983) によって糖組成を分析する装置である。

10

【0261】

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [Agric. Biol. Chem., 55(1), 283-284, 1991] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

【0262】

(2) 糖鎖構造解析

ヘテロダイマータンパク質組成物の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [Anal. Biochem., 171, 73, 1988、生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

20

【0263】

具体的には、ヘテロダイマータンパク質をヒドラジン分解して、ヘテロダイマータンパク質から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PAと略記する) による糖鎖の蛍光標識 (J. Biochem., 95, 197, 1984) を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (Takara社製)、文献 (Anal. Biochem., 171, 73, 1988) とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

30

【0264】

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

【0265】

ヘテロダイマータンパク質のFc領域のいずれの部分に糖鎖が結合しているのかは、還元アルキル化処理したヘテロダイマータンパク質をトリプシン、ペプシン、Lys-C、Asp-Nなどのエンドプロテアーゼで処理したものを、逆相クロマトグラフィー (LC) で分離した後に、質量分析計 (MS) などで分析することにより確認できる。

40

【0266】

即ち、目的とするヘテロダイマータンパク質のFc領域のアミノ酸配列に基き、プロテアーゼ処理により生成しうるペプチドの分子量および糖鎖が結合したペプチドの分子量と、MSの分析値が一致するか否かにより、実際に糖鎖が結合しているか否かを確認することができる。

【0267】

6. ヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造の識別方法

ヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質Fcの297位のAs

50

nに結合する糖鎖構造が異なったヘテロダイマータンパク質分子から構成されている。本発明のヘテロダイマータンパク質組成物のFcに結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、コアフコースの無い糖鎖の割合が20%以上であるヘテロダイマータンパク質組成物は、高いADCC活性を示す。このようなヘテロダイマータンパク質組成物は、上記5.に記載のヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

【0268】

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いたヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造の識別は、文献[モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院(1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画(1985)]等に記載のウエスタン染色、RIA(Radioimmunoassay)、VIA(Viroimmunoassay)、EIA(Enzymoimmunoassay)、FIA(Fluoroimmunoassay)、MIA(Metalloimmunoassay)などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

10

【0269】

ヘテロダイマータンパク質組成物に含まれるヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料であるヘテロダイマータンパク質組成物を反応させる。次に、標識したレクチンとヘテロダイマータンパク質分子の複合体の量を測定する。

20

【0270】

ヘテロダイマータンパク質分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA(T. vulgaris由来のwheat-germ agglutinin)、ConA(C. ensiformis由来のconcanavalin A)、RIC(R. communis由来の毒素)、L-PHA(P. vulgaris由来のleukoagglutinin)、LCA(L. culinaris由来のlentil agglutinin)、PSA(P. sativum由来のPea lectin)、AAL(Aleuria aurantia Lectin)、ACL(Amaranthus caudatus Lectin)、BPL(Bauhinia purpurea Lectin)、DSL(Datura stramonium Lectin)、DBA(Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL(Elderberry Balk Lectin)、ECL(Erythrina cristagalli Lectin)、EEL(Euonymus europaeus Lectin)、GNL(Galanthus nivalis Lectin)、GSL(Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA(Helix pomatia Agglutinin)、HHL(Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL(Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL(Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL(Maackia amurensis Lectin)、MPL(Maclura pomifera Lectin)、NPL(Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA(Peanut Agglutinin)、E-PHA(Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL(Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA(Ricinus communis Agglutinin)、STL(Solanum tuberosum Lectin)、SJA(Sophora japonica Agglutinin)、SBA(Soybean Agglutinin)、UEA(Ulex europaeus Agglu

30

40

50

tinin)、VVL(Vicia villosa Lectin)、WFA(Wisteria floribunda Agglutinin)が挙げられる。

【0271】

コアフコースを特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、具体的には、例えば、レンズマメレクチンLCA(Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)エンドウマメレクチンPSA(Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA(Vicia faba由来のAgglutinin)およびヒヨロチャワントケレクチンAAL(Aleuria aurantia由来のLectin)を挙げることができる。

【0272】

7. 本発明のヘテロダイマータンパク質組成物の使用

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質分子を構成するCHおよびCL-Fc(heterodimer scaffold protein; HSP)のN末端およびC末端に分子特異的な結合タンパク質を結合させることで、一価から四価の結合活性を有するヘテロダイマータンパク質を作製することができる。

【0273】

従って、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、標的とする抗原に合わせた分子形体を用いることができるため、ヘテロダイマータンパク質医薬品になる。

【0274】

例えば、本発明のヘテロダイマータンパク質が一価の結合ドメインを有する一価抗体の場合には、標的のエピトープに対して1:1で結合するため、抗原のクロスリンケージをすること無く、抗原を活性化また抗原の活性を阻害することができる。

【0275】

また本発明のヘテロダイマータンパク質が2価の結合活性を有する2価抗体(バイスペシフィック抗体ともいう)の場合には、2個のエピトープに結合することで、2抗原のクロスリンケージを引き起こしたり、別々の細胞上に発現する2抗原に結合することで、細胞-細胞のクロスリンケージを引き起こすことができる。

【0276】

また、本発明のヘテロダイマータンパク質が、細胞-細胞間のクロスリンケージする場合は、標的細胞上の抗原と、細胞傷害性T細胞(CTL)、B細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球および肥満細胞などの細胞表面上の抗原をクロスリンケージすることにより、標的細胞付近へ種々の免疫担当細胞を集積、活性化させることができる。

【0277】

本発明のヘテロダイマータンパク質が結合する抗原としては、いずれの抗原であってもよく、好ましくは癌、免疫疾患、アレルギー疾患または循環器疾患等に関する抗原分子が挙げられる。例えば、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子および該受容体並びにCD抗原などが挙げられる。

【0278】

サイトカインあるいは増殖因子としては、例えば、インターフェロン(以下、INFと記す)- α 、INF- β 、INF- γ 、インターロイキン(以下、ILと記す)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、またはマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)および該受容体などが挙げられる。

【0279】

ケモカインとしては、例えば、SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、MIP-3、CTACKおよび該ケモカインの受容体が挙げられる。

【0280】

10

20

30

40

50

増殖因子としては、例えば、Epidermal Growth Factor (EGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、angiopoietin、fibroblast growth factor (FGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、platelet-derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF、Iephrin、angiopoietin、Frizzled ligand、SDF-1および該受容体などが挙げられる。

【0281】

Cluster of differentiation (以下、CDと記載する) 抗原としては、例えば、CD2、CD3、CD4、CD7、CD10、CD14、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD28、CD32、CD37、CD40、CD44、CD52、CD64、CD53、CD56、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7.2)、CD98、human leukocyte antigen (HLA) - Class IIおよびHLA - Iなど挙げられる。

【0282】

更に、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、ガングリオシドGM1、GM2、GD2、GD3、Lewis X、Lewis Y、CD3、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリ分子 (例えば、CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、またはB7-H4)、B7ファミリ分子のリガンド (例えば、CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、またはBTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリ分子 (例えば、DR3、DR4、DR5、TNFR1、またはTNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL) ファミリ分子、TRAILファミリ分子の受容体ファミリ (例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、またはTRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体、Mesothelin、サイトカイン [例えば、IL-1、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor (TGF)、またはTNF など]、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン (例えば、SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、またはCTACKなど)、またはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

【0283】

一価抗体の適した標的分子として二量体化または凝集などで活性化される抗原が挙げられる。そのような性質を有する分子として、例えば、酵素連結型受容体および細胞接着分子などが挙げられる。酵素連結型受容体には受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼ会合型受容体、受容体セリン/トレオニンキナーゼ、受容体グアニル酸環化酵素が含まれる。

【0284】

受容体チロシンキナーゼとしては、例えば、EGF受容体、インスリン受容体、IGF-1受容体、NGF受容体、PDGF受容体、M-CSF受容体、FGF受容体、VEGF受容体およびEph受容体などが挙げられる。チロシンキナーゼ会合型受容体としては、例えば、サイトカイン受容体およびFc受容体などが挙げられる。また、細胞接着分子としては、例えば、カドヘリンおよびインテグリンなどが挙げられる。

【0285】

具体的には、例えば、interleukin-1 receptor 1 (IL-1

10

20

30

40

50

R1)、interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAP)、hepatocyte growth factor receptor (c-Met)、macrophage stimulating 1 receptor (RON)、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)、junctional adhesion molecule-like (JAML)、nectin-like protein 5 (Nectin-5)、tumor necrosis factor receptor 1 (TNF-R1)、tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2)、death receptor 3 (DR3)、death receptor 6 (DR6)、receptor activator of NF- κ B (RANK)、nerve growth factor receptor (NGFR)、lymphotoxin-beta receptor (LT β R)、OX40 (TNFRSF4)、Fas (TNFRSF6)、4-1BB (TNFRSF9)、Fn14 (TNFRSF12A)、TACI (TNFRSF13B)、BAFF-R (TNFRSF13C)、HVEM (TNFRSF14)、BCMA (TNFRSF17)、GITR (TNFRSF18)、TROY (TNFRSF19)、ectodysplasin A1 receptor (EDAR)、ectodysplasin A2 receptor (XEDAR)、receptor expressed in lymphoid tissues (RELT)、CD3、CD27、CD30、CD40、FcRI、FcRIIIおよびFcRI、などが挙げられる。

【0286】

本発明のヘテロダイマータンパク質組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理的に許容される一つまたはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。

【0287】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましい。例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与を挙げることができ、ヘテロダイマータンパク質製剤の場合、好ましくは静脈内投与を挙げることができる。

【0288】

投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等が挙げられる。

【0289】

経口投与に適切な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等が挙げられる。

【0290】

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコール等のグリコール類、ごま油若しくはオリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0291】

カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトール等の賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、またはグリセリン等

の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0292】

非経口投与に適切な製剤としては、例えば、注射剤、座剤、噴霧剤等が挙げられる。

【0293】

注射剤は、塩溶液若しくはブドウ糖溶液または両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、ヘテロダイマータンパク質組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

【0294】

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

【0295】

また、噴霧剤は該ヘテロダイマータンパク質組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該ヘテロダイマータンパク質組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

【0296】

担体として、具体的には、乳糖、グリセリン等が例示される。該ヘテロダイマータンパク質組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0297】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 20\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0298】

また、ヘテロダイマータンパク質組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等が挙げられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等が挙げられる。

【実施例】

【0299】

[実施例1] ヘテロダイマータンパク質発現ベクターの作製

(1) H鎖定常領域へのアミノ酸改変の導入

ヒトIgG1CH (Mol. Immunol., 2000; 37: 1035) およびヒトIgG4CH (J. Immunol. Methods, 2005; 306: 151) のアミノ酸配列 (配列番号2、4) (DNAの塩基配列: 配列番号1、3) のC末端にヒスタジン6残基 (以下、Hisタグと記す) を結合させたアミノ酸配列IgG1-CHおよびIgG4-CH (図3A、図3B) をデザインし (配列番号6、8)、アミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を作製した (配列番号5、7)。該DNAの塩基配列の5'末端および3'末端に制限酵素ApaIと制限酵素BamHIの認識配列を挿入しIgG1-CHおよびIgG4-CHのDNA断片を作製した。

【0300】

作製したIgG1-CH断片、IgG4-CH断片およびプラスミドpBluescript SK-(Stratagene社製) を制限酵素ApaIおよび制限酵素BamHIで酵素処理を行った後、それぞれライゲーション反応を行ない、pBluescript SK-ベクターに各断片を挿入して、IgG1-CHベクターおよびIgG4-CHベクターを作製した。

【0301】

アミノ酸残基置換を含むCHは、それぞれ作製したIgG1-CHおよびIgG4-CHベクターを鋳型として、QuickChange (登録商標) II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社) を用いて表1に示すアミノ酸残基置換を含むIgG1-CHベクターおよびアミノ酸残基置換を含

10

20

30

40

50

む I g G 4 - C H ベクターを作製した。I g G 1 においてヒンジドメインに存在する 2 2 0 位の C y s 残基は、L 鎖中の C y s 残基と分子間ジスルフィド結合を形成することが知られているため、S e r に置換することでジスルフィド結合の除去を行った。

【 0 3 0 2 】

一方、I g G 4 においては C H 1 ドメインに存在する 1 3 1 位の C y s 残基は、L 鎖中の C y s 残基と分子間ジスルフィド結合を形成することが知られている。I g G 1 の 1 3 1 位および 1 3 3 位は S e r 残基および L y s であることから、ジスルフィド結合の除去と抗原性を低下させるために、C H 1 - C L 間のジスルフィド結合に参与する C y s 残基を含む部分配列 C 1 3 1 / R 1 3 3 を、I g G 1 型の配列にするために C 1 3 1 S / R 1 3 3 K のアミノ酸残基置換を I g G 4 型一価抗体へ加えた。

10

【 0 3 0 3 】

また、I g G 4 においてヒンジドメインに存在する 2 2 8 位の S e r 残基と C H 3 ドメインに存在する 4 0 9 位の A r g 残基は、I g G 4 特有の F a b - a r m e x c h a n g e に関与することが知られている。I g G 1 においては 2 2 8 位は P r o 、 4 0 9 位は L y s であるため、F a b - a r m e x c h a n g e を抑制するために、S 2 2 8 P および R 4 0 9 K のアミノ酸残基置換を I g G 4 型一価抗体の H 鎖に加えた。また、I g G 4 における L 2 3 5 E アミノ酸残基置換はエフェクター活性を低下させることができる。

【 0 3 0 4 】

以下、特に断りの無い場合は、アミノ酸配列は、K a b a t らによる E U インデックス [S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , U S D e p t . H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s (1 9 9 1)] に基いて 1 文字で表記した。また、置換する前のアミノ酸残基を数字の前に、置換した後のアミノ酸残基を数字の後に記載した。各 I g G H 鎖の D N A の塩基配列を、それぞれ配列番号 9、11、13、15、17 および 19 に示す。

20

【 0 3 0 5 】

【表 1】

[表 1] CH に導入したアミノ酸置換

配列名	DNA 配列番号	タンパク質 配列番号	サブクラス	CH1	ヒンジ	CH2	CH3
1H0	9	10	IgG1	-	-	-	-
1H1	11	12	IgG1	-	C220S	-	-
4H0	13	14	IgG4	-	-	-	-
4H1	15	16	IgG4	C131S/R133K	-	-	-
4H2	17	18	IgG4	C131S/R133K	S228P	-	R409K
4H3	19	20	IgG4	C131S/R133K	S228P	L235E	R409K

30

【 0 3 0 6 】

(2) ヒト 鎖定常領域 (C L) と I g G 抗体 F c が融合した人工定常領域へのアミノ酸改変の導入

40

ヒト 鎖定常領域 (配列番号 5 7、5 8) の C 末端に、ヒト I g G 1 またはヒト I g G 4 の定常領域のヒンジドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインの順に結合させた C L - F c のアミノ酸配列をデザインし (以下、I g G 1 - L、I g G 4 - L と記す) (配列番号 2 2、配列番号 2 6) (図 4 A、図 4 B)、該アミノ酸配列をコードする D N A の塩基配列 (配列番号 2 1、配列番号 2 5) を作製した。以下、C L - F c を含む第 2 ポリペプチドを L 鎖と記載する場合がある。

【 0 3 0 7 】

尚、I g G 1 - L においては、ヒンジドメインの N 末端から 5 アミノ酸残基に当たる E U インデックス 2 1 6 位から 2 2 0 位のアミノ酸残基 E P K S C を削除したヒンジドメインを用いた (図 4 A)。先に記載したように、I g G 1 のヒンジドメイン中には、L 鎖と

50

の分子間ジスルフィド結合に關与するCys残基が存在するため、これを除去するためにEPKSCを削除した。

【0308】

次に、CL-Fcの3'末端に、pKANTEX93ベクター(J. Immunol. Methods, 2005; 306: 151)に含まれるL鎖の3'-untranslated region(UTR)および制限酵素KpnIの認識配列を結合させ、更に5'末端に、制限酵素BsiWIの認識配列を結合させた遺伝子配列を作製した。

【0309】

作製したBsiWI-KpnI遺伝子断片をTarget Clone-Plus-キット(TOYOBO社製)を用いて、キットに添付されたpTA2ベクター(TOYOBO社製)でクローニングを行い、IgG1-LベクターおよびIgG4-Lベクターを作製した。

【0310】

ヒト鎖の214位のCys残基は、H鎖中のCys残基と分子間ジスルフィド結合を形成することが知られているため、Serに置換することでジスルフィド結合の除去を行った。また、IgG1およびIgG4のCH3ドメインに存在する435位のHis残基および436位のTyr残基は抗体のプロテインA結合に關与していることが知られている。

【0311】

プロテインA結合活性が無いIgG3の435位および436位はArgおよびPheであるため、H435RおよびY436Fのアミノ酸残基置換をL鎖に導入することによって、一価抗体CL-Fc鎖のプロテインA結合活性が低下する。

【0312】

IgG1-LベクターおよびIgG4-Lベクターを鋳型として、表2に記載のアミノ酸置換を含むCL-FcをQuickChange(登録商標)IXL Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene社)を用いて作製した。各CL-FcのDNAの塩基配列を、それぞれ配列番号21、23、25、27、29、31および33に示す。

【0313】

【表2】

[表2] CL-Fcに導入したアミノ酸置換

配列名	DNA 配列番号	タンパク質 配列番号	サブクラス	CH1	ヒンジ	CH2	CH3
1L0	21	22	IgG1	-	欠失 (216-220)	-	-
1L1	23	24	IgG1	C214S	欠失 (216-220)	-	H435R/Y436F
4L0	25	26	IgG4	-	-	-	-
4L1	27	28	IgG4	C214S	-	-	-
4L2	29	30	IgG4	C214S	-	-	H435R/Y436F
4L3	31	32	IgG4	C214S	S228P	-	R409K/H435R/Y436F
4L4	33	34	IgG4	C214S	S228P	L235E	R409K/H435R/Y436F

【0314】

(3) 一価抗体発現ベクターの作製

上述、実施例1(1)および(2)において作製したCHおよびCL-Fcに、IgG抗体のH鎖可変領域(VH)およびL鎖可変領域(VL)を結合させた、一価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質(以下、一価抗体と略記する)を以下のようにして作製した。以下、第1ポリペプチドをH鎖、第2ポリペプチドをL鎖と記載する場合が

ある。

【0315】

CHおよびCL-Fcに結合させる結合タンパク質は、抗CD20抗体ヒト化B-Ly1(B-HH2とB-KV1、以降GA101と記載)(日本国特許第2010-81940号明細書)および抗HER2抗体humAb4D5-8(以降4D5とも記載)(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,1992;89:4285)の可変領域を用いた。DNAの塩基配列およびアミノ酸配列は、GA101-VH(配列番号35、36)、GA101-VL(配列番号37、38)、4D5-VH(配列番号39、40)および4D5-VL(配列番号41、42)を用いた。

【0316】

GA101抗体および4D5抗体のVHのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列の5'末端に、制限酵素NotIの認識配列、また3'末端に制限酵素ApaIの認識配列を結合したDNAの塩基配列を作製し、pKANTEX93ベクター(J.Immunol.Methods,2005;306:151)のNotI-ApaIサイトに挿入した。

【0317】

この結果、抗CD20ヒト化抗体VHを含む発現ベクターpKANTEX93/GA101-VHおよび抗HER2ヒト化抗体VHを含む発現ベクターpKANTEX93/4D5-VHを作製した。

【0318】

次に、GA101抗体および4D5抗体のVLのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列の5'末端に、制限酵素BsiWIの認識配列、また3'末端に制限酵素KpnIの認識配列を結合したDNAの塩基配列を作製し、それぞれpKANTEX93/GA101-VHベクターまたはpKANTEX93/4D5-VHベクターのNotI-ApaIサイトに挿入した。

【0319】

この結果、抗CD20ヒト化抗体GA101発現ベクターpKANTEX93/GA101および抗HER2ヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93/humAb4D5-8を取得した。

【0320】

抗CD20ヒト化抗体GA101発現ベクターpKANTEX93/GA101および抗HER2ヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93/humAb4D5-8のApaI-BamHIサイトに含まれるCHを、上述実施例1(1)で作製した各種IgG1-CHまたはIgG4-CHと置換した。

【0321】

次に、該発現ベクターのBsiWI-KpnIサイトに含まれるCLを、上述実施例1(2)で作製したCLにヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを融合した各種CL-Fcに置換した。

【0322】

その結果、VH-CHを含む第1ポリペプチドおよびVL-CL-Fcを含む第2ポリペプチドからなる、各種一価抗体発現ベクターを作製した(表3)。また、各種一価抗体分子の構造を図5に示す。

【0323】

10

20

30

40

【表 3】

【表 3】 各種一価抗体の可変領域・CH・CL-Fcの組合せ一覧

可変領域	CH	CL-Fc	発現ベクター
humAb4D5-8	1H0	1L0	pKANTEX93/mvG1-1
GA101	1H1	1L1	pKANTEX93/mvG1-2
humAb4D5-8	4H0	4L0	pKANTEX93/mvG4-1
humAb4D5-8	4H1	4L1	pKANTEX93/mvG4-2
humAb4D5-8	4H1	4L2	pKANTEX93/mvG4-3
humAb4D5-8	4H2	4L3	pKANTEX93/mvG4-4
humAb4D5-8	4H3	4L4	pKANTEX93/mvG4-5

10

【0324】

【実施例 2】 バイスペシフィックヘテロダイマータンパク質発現ベクターの作製

2価の結合ドメインを有するヘテロダイマータンパク質（以下、バイスペシフィック抗体と記す）を作製するために、CHのN末端にVHが結合した第1ポリペプチド、並びにCL-FcのN末端にVLが結合しかつC末端にsingle chain Fv (scFv)型可変領域が結合した第2ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体をデザインした（図6、図7）。

20

【0325】

該バイスペシフィック抗体は、VH-VLからなる結合ドメインがCD74特異的に結合し、第2ポリペプチドのC末端に連結したscFvがHer2またはCD20に特異的に結合する2価結合活性を有する。バイスペシフィック抗体は以下のようにして作製した。

【0326】

(1) 抗CD74抗体発現ベクターの作製

抗CD74抗体は、公知の抗CD74ヒト化抗体 hLL1（米国特許第7,312,318号明細書）を用いた（配列番号43-46）。抗CD74ヒト化抗体hLL1のVHおよびVLの、5'末端および3'末端に、上述実施例1(3)と同様にして制限酵素認識配列を結合させ、pKANTEX93ベクターに挿入することで、抗CD74ヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93/hLL1を作製した。

30

【0327】

(2) 抗CD74 IgG4型一価抗体発現ベクターの作製

実施例2(1)と同様に、抗CD74ヒト化抗体hLL1抗体のVHおよびVLのDNA断片を調製し、実施例1(3)で作製したpKANTEX93/mvG4-4ベクターのNotI-ApaIサイトおよびEcoRI-BsiWIサイト挿入を行った。その結果、抗CD74 IgG4型一価抗体発現ベクターpKANTEX93/G4-4/hLL1を作製した。

40

【0328】

(3) CD74-HER2バイスペシフィック抗体およびCD74-CD20バイスペシフィック抗体発現ベクターの作製

上述実施例2(2)において作製した抗CD74 IgG4型一価抗体の第2ポリペプチドのC末端に、抗HER2scFvまたは抗CD20 scFvを融合させたCD74-HER2バイスペシフィック抗体およびCD74-CD20バイスペシフィック抗体を作製するために、CL-FcとscFvとを[Ser-Gly-Gly-Gly-Gl

50

y] × 3、15アミノ酸残基からなるリンカー（以下、GSリンカーと記す）（配列番号47、48）で連結し、CL - Fc - linker - VH - linker - VL（図6、図7）をデザインした。また各scFvを以下のように作製した。

【0329】

抗HER2抗体は、上述実施例1（3）に記載の抗HER2ヒト化抗体4D5 - 8のVHおよびVLの配列を使用し、抗CD20抗体は、抗CD20抗体2F2（米国特許出願公開第2004 / 0167319号明細書）のVHおよびVLの配列（配列番号49 - 52）を使用した。

【0330】

抗CD74 IgG4型一価抗体発現ベクターpKANTEX93 / G4 - 4 / hLL1のCL - Fcの終止コドンに欠損させ、続けて、GSリンカーをコードするDNAの塩基配列、VHをコードするDNA、[Gly - Gly - Gly - Gly - Ser] × 3、15アミノ酸残基からなるリンカーをコードするDNAおよびVLをコードするDNAを結合させたCD74 VL - CL - Fc - 2F2 scFvおよびCD74 VL - CL - Fc - 4D5 scFvのDNAの塩基配列を設計した（配列番号53 - 56）。

【0331】

次に、抗HER2 4D5 - 8 scFvまたは抗CD20 2F2 scFvを、それぞれ抗CD74 IgG4型一価抗体発現ベクターpKANTEX93 / G4 - 4 / hLL1挿入して、pKANTEX93 / G4 - 4 / hLL1 - 4D5 - 8 scFvおよびpKANTEX93 / G4 - 4 / hLL1 - 2F2 scFvを作製した。

【0332】

[実施例3] ヘテロダイマータンパク質の生産

(1) ヘテロダイマータンパク質の発現

細胞の培養は37 °Cの5%CO₂インキュベーターで行った。各種一価抗体およびバイスペシフィック抗体を発現させるために、以下の方法で発現ベクターの導入を行った。

【0333】

4 × 10⁶個のチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO / DG44細胞（Somatic Cell Mol. Genet., 12, 555, 1986）または1, 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子（FUT8）をノックアウトしたCHO / DG44細胞（以下、CHO / FUT8 KO細胞と略記する）（米国特許第6, 946, 292号明細書）に、8 μgの各種一価抗体発現ベクターまたはバイスペシフィック抗体発現ベクターを加え、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]により遺伝子導入を行った。宿主細胞、発現ベクターおよび生産されるヘテロダイマータンパク質の名称は表4にまとめた。

【0334】

CHO細胞で作製されたヘテロダイマータンパク質組成物は、Fcに結合するN - グリコシド糖鎖の還元末端に含まれるN - アセチルグルコサミンにフコースが結合しているが、CHO / FUT8 KO細胞で作製されたヘテロダイマータンパク質組成物は、該糖鎖にフコースが結合していない。以下、それぞれの細胞で作製したヘテロダイマータンパク質組成物をF (fucosylated) およびDF (defucosylated) をサンプル名の後ろに付記する。

【0335】

遺伝子導入後、各細胞は、10%透析牛血清（以下、dFBSと略記する）を含むIMDM培地（GIBCO社）[以下、IMDM - (10)と略記する]で2日間培養後、培地を0.5 mg / mL G418硫酸塩（ナカライテスク社）を含むIMDM - (10) [以下、IMDM - (10G)と略記する]に交換して培養を続け、G418耐性株を取得した。

【0336】

3 × 10⁵個細胞 / mL G418耐性株をIMDM - (10G)に懸濁して3日間培養した後、Excel 1302 (SAFC Biosciences社)に培地を交換し

10

20

30

40

50

て、7～11日間培養後、培養上清を回収した。

【0337】

【表4】

[表4] ベクター・宿主細胞の組合せとサンプル名一覧

発現ベクター	宿主細胞	
	CHO/DG44	CHO/FUT8KO
pKANTEX93/humAb4D5-8	-	4D5/IgG1 DF
pKANTEX93/GA101	GA101/IgG1 F	GA101/IgG1 DF
pKANTEX93/mvG1-1	-	4D5/mvG1-1 DF
pKANTEX93/mvG1-2	GA101/mvG1-2 F	GA101/mvG1-2 DF
pKANTEX93/mvG4-1	-	4D5/mvG4-1 DF
pKANTEX93/mvG4-2	-	4D5/mvG4-2 DF
pKANTEX93/mvG4-3	-	4D5/mvG4-3 DF
pKANTEX93/mvG4-4	4D5/mvG4-4 F	4D5/mvG4-4 DF
pKANTEX93/mvG4-5	4D5/mvG4-5 F	-
pKANTEX93/hLL1	hLL1/IgG1 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1	hLL1/mvG4-4 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1-4D5-8scFv	hLL1-4D5/mvG4-4 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1-2F2scFv	hLL1-2F2/mvG4-4 F	-

10

20

【0338】

(2) ヘテロダイマータンパク質の精製

上述実施例3(1)で取得した各種一価抗体、バイスペシフィック抗体の培養上清を、ProSep-vA High Capacity (MILLIPORE社)担体を充填したカラムに、流速0.5～1.0 mL/minで通過させた。カラムを phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、pH 5.0～pH 3.0の0.1 Mクエン酸緩衝液を用いてタンパク質を溶出し、2 Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) により直ちに中和した。

30

【0339】

4D5/mvG4-3 DFと4D5/mvG4-4 DFはプロテインG担体を用いた精製も実施した。ProSep-G (MILLIPORE社)担体を充填したカラムに、培養上清を流速0.5～1.0 mL/minで通過させた。カラムをPBSで洗浄後、pH 5.0～pH 2.5の0.1 Mクエン酸緩衝液を用いてタンパク質を溶出し、2 Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) により直ちに中和した。

【0340】

タンパク質濃度が高かった溶出画分を、水酸化ナトリウムでpH 6.0に調整した10 mMクエン酸、および150 mM塩化ナトリウムを含むバッファー(以下、クエン酸緩衝液と略記する)で透析した。サンプルを回収後、低濃度のサンプルは限外ろ過フィルター (MILLIPORE社) によって濃縮を行い、0.22 μmフィルター (MILLIPORE社) による滅菌後に、280 nmにおける吸光度 (OD₂₈₀) からタンパク質濃度を算出した。

40

【0341】

in vitro 活性評価には、ゲルろ過クロマトグラフィーでさらに精製したサンプルを用いた。高速液体クロマトグラフィーシステム AKTA explore 10S (GEヘルスケア) に、Superdex 200 10/300 GLカラム (GEヘルスケア) を接続し、クエン酸緩衝液をランニング緩衝液に使用して、サンプルを0.5 mL/minの流速でカラムに通過させた。25～30分付近にピークとして検出される画分を回収して各種解析に用いた。

50

【0342】

(3) ヘテロダイマータンパク質のSDS-PAGE解析

プロテインAで精製した各種一価抗体のSDS-PAGE解析を行った。0 mM dithiothreitol (DTT) (非還元条件) または10 mM DTT (還元条件) を含有する0.3 M トリス塩酸 (pH 6.8)、10% ドデシル硫酸ナトリウムおよび50% グリセロールを含むバッファー (以下、サンプルバッファーと略記する) で調整したサンプルを、100 で5分間処理し、ポリアクリルアミドゲル (ATTOカタログ番号E-T520L) に1 μg/レーンで電気泳動を行った。分子量マーカには、Precision plus protein all blue standards (BIO-RAD社) を用い、5 μL/レーンで添加した。ゲルを回収後、Quick CB

10

【0343】

その結果、一価抗体のH鎖およびL鎖はいずれも分子量が約50 kDaであることから、非還元条件のSDS-PAGEにおいて多量体と予測される250 kDa以上の複数のバンド、2本のポリペプチド鎖からなる単量体と予測される約100 kDa付近のバンドおよび一本のポリペプチド鎖からなる半量体と予測される約50 kDa付近のバンドが認められた [図8A (a) および (b)、図8B]。

【0344】

抗HER2 IgG4型一価抗体4D5/mvG4-1 DFでは、250 kDa以上の多量体と予測されるバンドが多数確認され、複数の多量体が形成されていることが示された。しかしながら、C131S/R133K置換を含むH鎖およびC214S置換を含むL鎖からなる4D5/mvG4-2 DFでは、多量体は殆ど検出されなかった (図8A)。

20

【0345】

従って、IgG4-CHを含む第1ポリペプチドおよびIgG4-Lを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質において、IgG4-CHとCとのジスルフィド結合に関与するCys残基を欠損させるH鎖C131S/R133Kの置換、L鎖C214Sの置換、並びにH鎖C131S/R133KおよびL鎖C214Sの置換は、分子間ジスルフィド結合によって形成される多量体の形成を抑制できることが示された。

【0346】

同様にH鎖C131S/R133KおよびL鎖C214S置換を有する4D5/mvG4-3 DF、4D5/mvG4-4 DF、4D5/mvG4-4 F、4D5/mvG4-5 Fにおいても多量体のバンドは認められなかった。また、4D5/mvG1-1 DFでは多量体が顕著に観察されたが、H鎖C220SおよびL鎖C214S置換を含むGA101/mvG1-2 DFおよびGA101/mvG1-2 Fでは多量体は検出されなかった。

30

【0347】

従って、IgG1-CHを含む第1ポリペプチドおよびIgG1-Lを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質において、IgG1-CHとCとのジスルフィド結合に関与するCys残基を欠損させるH鎖C220Sの置換、L鎖C214Sの置換、並びにH鎖C220Sの置換およびL鎖C214S置換により多量体の形成を抑制できることが示された。

40

【0348】

一方、4D5/mvG4-1 DF、4D5/mvG4-2 DFおよび4D5/mvG4-3 DFでは半量体と予測される約50 kDa付近のバンドが認められたが、H鎖およびL鎖の両方にS228P/R409K置換を含む4D5/mvG4-4 DF、4D5/mvG4-4 Fおよび4D5/mvG4-5 Fでは、半量体のバンドは殆ど認められなかったことから、H鎖およびL鎖におけるS228P置換、R409K置換およびS228P/R409K置換は、半量体の形成を抑制できることが示された (図8B)。

50

【0349】

以上の結果から、本発明のヘテロダイマータンパク質組成物は、ヘテロダイマータンパク質を生産する際に生じる多量体量、半量体量、並びに多量体/半量体が低下した組成物であることが示された。

【0350】

[実施例4] 一価抗体の成分分析

(1) 陽イオン交換クロマトグラフィーによる成分の分離

上述、実施例3においてプロテインAカラムを用いたアフィニティ精製を行った抗HER2 IgG4型一価抗体4D5/mvG4-2 DFの詳細な成分分析を行うために、陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。4D5/mvG4-2 DFは、CLにC214SとCH1にC131S/R133Kのアミノ酸残基置換が加えられ、Fcに結合するN-グリコシド糖鎖の還元末端に含まれるN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないIgG4型一価抗体である。

10

【0351】

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 分析装置 (LC-10Avpシリーズ、島津製作所社) にWCX-10 (DIONE X社製) カラムを接続し、10mMリン酸ナトリウム、pH6.2のバッファー(以下、Aバッファーと略記する)を開始バッファーに、10mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH6.2のバッファー(以下、Bバッファーと略記する)を溶出バッファーに用いた。

20

【0352】

サンプルを流した後、流速1mL/minでAバッファーを流し始め、1分間に1%ずつBバッファーの比率を増加させ、30分間分析を行った。その後、Bバッファーにランニング緩衝液を変更し、10分間分析を行った。

【0353】

4D5/mvG4-2 DFを陽イオン交換クロマトグラフィーで分析した結果、図9に示すようにピーク(1)、(2)~(6)および(7)~(10)の3つのピーク群に分離されたことから、Protein A精製タンパク質には複数の成分が含まれていることが示された。従って、更にピーク(1)~(10)を分取して、各ピーク成分の解析を行った。

30

【0354】

(2) ウェスタンブロット解析による成分の同定

上述、実施例3(3)と同様の方法で、非還元条件で1レーンあたり40ngを添加してSDS-PAGE電気泳動を行い、0.1Mトリス、0.2Mグリシンおよび20%メタノールを含むトランスファーバッファーに浸した濾紙でPVDF膜とゲルを挟み、タンパク質をPVDFメンブレンにブロッティングした(2.5mA/cm²、40分間)。その後、1% bovine serum albumin (BSA)を含むPBS(以下、BSA-PBSと略記する)を用いてタンパク質をトランスファーしたPVDFメンブレンをブロッキングした。

【0355】

検出抗体には、H鎖検出用として1000倍希釈したペルオキシダーゼ(以下、HRPと略記する)標識抗Hisタグ抗体(ナカライテスク社、Cat.No.04546-34)、L鎖検出用として5000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト鎖抗体(SIGMA社、カタログ番号A7164)、IgG検出用として、5000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(American Qualex社、Cat.No.A110PD)を用いて、室温で1時間反応させた。

40

【0356】

その後、PVDFメンブレンは0.1% Tween20を含むPBS(以下、Tween-PBSと略記する)で洗浄を行い、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(Thermo Scie

50

n t i f i c 社製) を反応させてイメージアナライザー (富士フイルム社製) で検出した。

【 0 3 5 7 】

4 D 5 / m v G 4 - 2 D F の陽イオン交換クロマトグラフィー (図 9) で見られたピーク (1) ~ (1 0) のウェスタンブロット解析を行った結果 (図 1 0) 、ピーク (1) および (3) は、2本のポリペプチド鎖からなる単量体と予測される 1 0 0 k D a 付近にバンドが検出され、抗ヒト 鎖抗体および抗 h I g G 抗体の両方と反応し、抗 H i s タグ抗体には反応しなかったことから、H i s タグを含む H 鎖は含まれていない L 鎖のみを成分とする L 鎖 - L 鎖ホモダイマー単量体 (以下、L L 体と略記する) であることが示された。

10

【 0 3 5 8 】

また、ピーク (8) および (9) は、単量体と予測される 1 0 0 k D a 付近にバンドが検出され、抗ヒト 鎖抗体、抗 H i s タグ抗体および抗 h I g G 抗体のすべての検出抗体と反応したことから、H i s タグを含む H 鎖と L 鎖を成分とする H L ヘテロダイマー単量体 (以下、H L 体と略記する) であることが示された (図 1 0) 。

【 0 3 5 9 】

また、ペルオキシダーゼ標識抗 h I g G 抗体による検出結果から、ピーク (1) 、 (3) とピーク (8) 、 (9) の成分は分子量の異なる成分であり、S D S - P A G E により分離可能であることが示された。また、その他のピーク (2) 、 (4) ~ (7) および (1 0) のサンプルはウェスタンブロット解析の検出限界以下であったため、その成分を同定することができなかった。

20

【 0 3 6 0 】

(3) ヘテロダイマーおよびホモダイマーの混合物からの分離

前項から、プロテイン A で精製した 4 D 5 / m v G 4 - 2 D F において、H L 体と L L 体が含まれていることが示唆された。続いて、H L 体と L L 体の標準品を取得するため、プロテイン A 精製時に溶出 p H を変えて得られた各画分を、陽イオン交換クロマトグラフィーで分析した結果、プロテイン A 精製において p H 3 . 5 で溶出された画分の 1 つであるフラクション X はピーク (8) および (9) を主成分とし、プロテイン A 精製において p H 5 . 0 で溶出されたフラクション Y はピーク (1) を主成分とすることを同定した。

30

【 0 3 6 1 】

表 5 に示すように、フラクション X は H L 体含量が 7 4 . 9 % 以上、フラクション Y は L L 体含量が 9 3 . 8 % 以上であることが示された。以降の解析では、H L 体を主成分とするサンプルのコントロールにフラクション X を用い、L L 体を主成分とするサンプルのコントロールにフラクション Y を用いた。なお、表 5 中の数値は面積比 (%) を、「 n . d . 」は未解析であることを表す。

【 0 3 6 2 】

【表5】

【表5】 mvG4-2 DF各画分の陽性交換カラムグラフによる成分分析

ピーク番号	成分	mvG4-2 DF	
		フラクションX	フラクションY
(1)	LL	1	88.6
(2)	未同定	<i>n. d.</i>	1.5
(3)	LL	<i>n. d.</i>	5.2
(4)	未同定	<i>n. d.</i>	1.3
(5)	未同定	<i>n. d.</i>	2.1
(6)	未同定	5.7	1.3
(7)	未同定	10.3	<i>n. d.</i>
(8)	HL	24.2	<i>n. d.</i>
(9)	HL	49.9	<i>n. d.</i>
(10)	未同定	8.8	<i>n. d.</i>
合計(%)	LL	1	93.8
	HL	74.1	<i>n. d.</i>
	未同定	24.9	6.2

【0363】

(4) ヘテロダイマータンパク質の特異的精製

CH結合体への結合活性が低下したCL-Fcを含む第2ポリペプチドを含むヘテロダイマータンパク質が、特異的に分離、精製されることを確認するため、プロテインGおよびプロテインAを用いた精製を行い、精製タンパク質の比較を行った。

【0364】

プロテインGはヒトIgGの何れのサブクラスも結合することが知られており、プロテインA結合活性の無いヒトIgG3はプロテインGには結合することができる。従って、プロテインGを用いた精製では、プロテインA結合部位の本実施例のアミノ酸残基置換の有無に関わらず、全ての抗体分子を精製することが出来ると考えられる。

【0365】

本実施例では、プロテインAへの結合に関与していることが知られているIgG1のEインデックス435位のHisおよび436位のTyrを、プロテインA結合活性の無いヒトIgG3のアミノ酸残基であるArgおよびPheへ置換することで、プロテインA結合活性が低下したCL-Fcを含むヘテロダイマータンパク質(4D5/mvG4-3 DF)を作製して解析を行った。

【0366】

上述の実施例3(3)および実施例4(2)と同様の方法で非還元条件でのSDS-PAGE解析およびウエスタンブロッティングを実施した。

【0367】

非還元条件下のSDS-PAGEにおいて長時間の電気泳動を行った結果、主にHL体

10

20

30

40

50

を含む4D5/mvG4-2のXフラクションは、主にLL対を含む4D5/mvG4-2 DFのYフラクションと比べて、バンドが高分子側に確認された。従って、高分子量側のバンドがHL体、低分子量側のバンドがLL体であることが示唆された。また、泳動時間を長くすることでHLヘテロ単量体およびLLホモ単量体を分離可能であることが示された(図11)。

【0368】

同様に、抗鎖抗体を用いたウェスタンブロットの結果でも、4D5/mvG4-2のXフラクションのバンドは、4D5/mvG4-2のYフラクションのバンドと比べて高分子側に確認された(図11)。

また、プロテインGまたはプロテインAを用いて精製した4D5/mvG4-3 DFにおいて、それぞれの精製品をSDS-PAGEを行い比較を行った。

10

【0369】

初めに、各担体を用いた4D5/mvG4-3 DFの精製条件を検討した結果、プロテインGではpH2.5で、プロテインAではpH3.0で全てのタンパク質が溶出されることを確認した。

【0370】

プロテインGを用いてpH2.5で溶出して得られた4D5/mvG4-3 DF(プロテインG精製品)では、HL体とLL体の両方のバンドが観察されたことから、プロテインGで精製された4D5/mvG4-3 DFには、4D5/mvG4-2 DFと同様にHL体とLL体との両方が含まれていることが明らかになった(図11、SDS-PAGE)。従って、4D5/mvG4-2にH435RおよびY436Fのアミノ酸残基置換を加えた4D5/mvG4-3 DFは、HLおよびLLの両分子が発現していることが示された。

20

【0371】

一方、プロテインG精製に用いた培養上清と同じ培養上清から、プロテインAを用いて、pH3.0で溶出して得られた4D5/mvG4-3 DF(プロテインA精製品)のSDS-PAGEの結果では、HLのバンドは観察されたがLLのバンドは殆ど観察されず、また抗鎖抗体によるウェスタンブロット解析の結果でも、高分子量側のHLのバンドのみが確認された(図11)。

【0372】

従って、4D5/mvG4-3 DFを発現する細胞は、培養上清中にHLヘテロダイマーおよびLLホモダイマーを発現しているが、プロテインAを用いた精製によって、4D5/mvG4-3 DFのHLヘテロダイマータンパク質を選択的に精製できることが示された(図11)。

30

【0373】

一方、L鎖にH435RおよびY436Fのアミノ酸置換を加えていない4D5/mvG4-2 DFは、HL体だけでなくLL体もプロテインAにより精製されることから、H435RおよびY436Fのアミノ酸置換をL鎖へ加えることによって、プロテインA結合活性の無いLL体とプロテインA結合活性のあるHL体から、HL体のみが特異的に精製できるようになった。

40

【0374】

[実施例5]ヘテロダイマータンパク質の検出ELISA

(1)IgG4型一価抗体のサンドイッチELISA

HL体を検出するために、sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)系の構築を検討した。本実施例において作製した一価抗体は図5に示す構造のようにCHのC末端にHisタグが結合したH鎖とFcとC鎖とが融合したL鎖からなるヘテロダイマータンパク質であることから、H鎖特異的に結合する抗体として抗Hisタグ抗体を、L鎖特異的に結合する抗体として抗H鎖抗体を用いることができる。

【0375】

50

抗Hisタグ抗体(QIAGEN社、Cat.No.34670)をELISAプレートに固相化(2µg/mL、50µL/ウェル、4、16時間)し、PBSで洗浄した後、BSA-PBSによってブロッキングを行った(100µL/ウェル、室温、1時間)。

【0376】

ブロッキング液を廃棄した後、各種濃度の一価抗体4D5/mvG4-2 DFフラクションX、4D5/mvG4-2 DFフラクションY、プロテインAを用いて精製した4D5/mvG4-3 DF、4D5/mvG4-4 Fおよび4D5/mvG4-5 Fを反応させた(50µL/ウェル、室温、2時間)。

【0377】

続いて0.05% Tween20を含むPBS(以下、Tween-PBSと略記する)で洗浄した後、5000倍希釈したhorseradish peroxidase(以下、HRPと略記する)標識抗ヒト鎖抗体(SIGMA社、Cat.No.A7164)を反応させた(50µL/ウェル、2時間)。

【0378】

次に、Tween-PBSで洗浄した後、ABTS発色基質〔2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム〕基質液〔1mmol/L ABTS/0.1mol/L クエン酸バッファー(pH4.2)、0.1% H₂O₂〕を50µL/ウェルを加え、室温15分間発色反応を行ない、5% SDS水溶液を50µL/ウェル添加して、発色反応を停止した。プレートリーダーで490nmをリファレンスとし、415nmの吸光度を測定した。データの解析にはSoftMax Pro(Molecular Devices社)を用いた。実験は繰り返し回数3で行った。

【0379】

Binding ELISA系の陽性対照として4D5/mvG4-2 DFのHLヘテロダイマーからなるフラクションX、陰性対照として4D5/mvG4-2 DFのLLホモダイマーからなるフラクションYを用いた。

【0380】

その結果、プロテインA精製により取得した4D5/mvG4-3 DF、4D5/mvG4-4 Fおよび4D5/mvG4-5 Fは、4D5/mvG4-2 DFフラクションXと同等に結合したが、4D5/mvG4-2 DFフラクションYは殆ど結合しなかった(図12)。

【0381】

従って、IgG4型一価抗体4D5/mvG4-3 DF、4D5/mvG4-4 Fおよび4D5/mvG4-5 Fは、いずれもCH-Hisタグを含む第1ポリペプチドおよびCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるHLヘテロダイマータンパク質であることが示された(図12)。

【0382】

また、IgG4型一価抗体4D5/mvG4-2 DFのHLヘテロダイマータンパク質に、更にL鎖にH435YおよびR436Fのアミノ酸置換を加えたIgG4型一価抗体4D5/mvG4-3 DF、更にS228P/R409Kのアミノ酸置換を加えた4D5/mvG4-4 F、4D5/mvG4-4 Fに更にL235Eのアミノ酸置換を加えた4D5/mvG4-5 Fは、いずれもプロテインAを用いた精製によって、HLヘテロダイマーを特異的に精製できることが示された(図12)。

【0383】

従って、L鎖にH435YおよびR436Fのアミノ酸置換を加えることでHLヘテロダイマー体をプロテインAによって特異的に精製できる効果は、S228P/R409KおよびL235Eのアミノ酸置換が存在しても変化しないことが示された。

【0384】

(2) IgG1型一価抗体のサンドイッチELISA

上述実施例5(1)と同様な方法に従いIgG1型一価抗体4D5/mvG1-1 D

10

20

30

40

50

FのプロテインA精製フラクションのsandwich ELISAを行った。

【0385】

その結果、プロテインA精製における各pHの溶出フラクション1~4は、sandwich ELISAの反応性が異なっていた。従って各フラクションに含まれるHLヘテロダイマー含量が異なることが示された(図13A)。

【0386】

従って、最もタンパク質含量の多かったフラクション2は、HL体とLL体の両方を含んでいることが示唆された。また、最も反応性の高かったフラクション1を、以降のin vitro活性評価では4D5/mvG1-1 DFとして用いた。

【0387】

一方、H435RおよびY436 Fのアミノ酸残基置換を含むIgG1型一価抗体GA101/mvG1-2 FおよびGA101/mvG1-2 DFでは、HLヘテロダイマーが主成分である4D5/mvG4-2 DFフラクションXと同等の反応性であった(図13B)。

【0388】

従って、プロテインAを用いて精製されたIgG1型一価抗体GA101/mvG1-2 FおよびGA101/mvG1-2 DFは、HLヘテロダイマーが特異的に精製されていることが示された(図13B)。

【0389】

以上の結果から、IgG4型一価抗体だけでなくIgG1型一価抗体においても、L鎖のH435R/Y436 Fアミノ酸残基置換を含むヘテロダイマータンパク質は、プロテインAによる特異的精製が可能であることが示された。

【0390】

[実施例6]ヘテロダイマータンパク質の癌細胞への結合活性

IgG1型およびIgG4型一価抗体の癌細胞に対する結合活性は、各IgG1抗体の結合阻害実験で確認した。初めに、コントロール抗体として、Alexa488標識キット(インビトロジェン社、A20181)を用いて抗CD20 IgG1抗体GA101/IgG1F、抗HER2 IgG1抗体Herceptin(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992; 89: 4285)およびhuman IgG1(ミリポア社製、AG502)をAlexa488で標識して、GA101_Alx、Herceptin_AlxおよびhIgG1_Alxを作製した。

【0391】

CD20陽性ヒトリンパ腫細胞株Raji(JCRB9012)およびHER2陽性ヒト乳癌細胞株SK-BR-3(ATCC:HTB-30)を用いてフローサイトメーターによる解析を行った。実験は繰り返し回数2で行った。1% BSA、0.02% ethylene diamine tetracetate(EDTA)、および0.05%アジ化ナトリウムを含むPBSバッファー(以下、FACSバッファーと略記する)を用いて 1×10^5 個細胞を懸濁し、該懸濁液に $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ Alexa標識抗体および同時に $210 \text{ nM} \sim 1.68 \text{ nM}$ の非標識IgG1抗体または各種一価抗体を添加し、4、遮光条件下で1.5時間反応させた。

【0392】

また、陰性対照としてhIgG1_Alx用いた。FACSバッファーで洗浄後、フローサイトメーターCytomics FC 500 MPL(Beckman Coulter社)で測定を行った。

【0393】

その結果、ネガティブコントロールhIgG1抗体は、抗HER2抗体Herceptin_AlxのSK-BR-3細胞への結合を阻害しなかったが、抗HER2 IgG1抗体Herceptin、抗HER2 IgG1 デフコース化抗体4D5/IgG1 DF、抗HER2 IgG1型一価抗体4D5/mvG1-1 DF、抗HER2 IgG4型一価抗体4D5/mvG4-4 Fおよび4D5/mvG4-5 Fは、Herceptin_AlxのSK-BR-3細胞への結合を阻害した。

10

20

30

40

50

e p t i n _ A l x の S K - B R - 3 への結合を抗体濃度依存的に阻害した (図 1 4 A)
。

【 0 3 9 4 】

従って、抗 H E R 2 一価抗体は H E R 2 特異的に結合することが示された。即ち、C H および C L - F c からなる h e t e r o d i m e r s c a f f o l d p r o t e i n (H S P) を元に作製されたヘテロダイマータンパク質は、一価の結合活性を有するヘテロダイマータンパク質であることが示された。

【 0 3 9 5 】

しかし、一価抗体の単位モル濃度あたりの結合阻害効果は、抗 H E R 2 I g G 1 抗体 H e r c e p t i n および 4 D 5 / I g G 1 D F に比べて低かった (図 1 4 A) 。

10

【 0 3 9 6 】

一方、C D 2 0 陽性リンパ腫細胞株 R a j i にしても同様に、ネガティブコントロール h I g G 1 抗体は G A 1 0 1 _ A l x の R a j i 細胞への結合を阻害しなかったが、抗 C D 2 0 I g G 1 抗体 G A 1 0 1 、抗 C D 2 0 I g G 1 デフコース化抗体 G A 1 0 1 / I g G 1 D F 、抗 C D 2 0 I g G 1 型一価抗体 G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 F および G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 D F は、G A 1 0 1 _ A l x の R a j i 細胞への結合を抗体濃度依存的に阻害した (図 1 4 B) 。

【 0 3 9 7 】

従って、抗 C D 2 0 一価抗体が C D 2 0 特異的に結合することが示された。また、H E R 2 抗体と同様に、一価抗体の単位モル濃度あたりの結合阻害効果は、抗 C D 2 0 I g G 1 抗体 G A 1 0 1 / I g G 1 F および G A 1 0 1 / I g G 1 D F と比べて弱かった (図 1 4 B) 。

20

【 0 3 9 8 】

[実施例 7] ヘテロダイマータンパク質の抗体依存性細胞傷害活性

(1) 抗 H E R 2 一価抗体の抗体依存性細胞傷害活性

抗体の A D C C 活性は、国際公開第 2 0 0 7 / 0 1 1 0 4 1 号に記載の方法で測定し、3 回繰り返して行った。

【 0 3 9 9 】

標的細胞として H E R 2 陽性ヒト乳癌細胞 S K - B R - 3 (A T C C : H T B - 3 0) 、ヒト乳癌 B T - 2 0 (A T C C : H T B - 1 9) 、C D 2 0 陽性ヒトリンパ腫細胞 R a j i (J C R B 9 0 1 2) 、パーキットリンパ腫細胞 S T - 4 8 6 (A T C C : C R L - 1 6 4 7) および慢性 B 細胞白血病細胞 M E C - 1 (D S M Z : A C C - 4 9 7) を用い、エフェクター細胞には健常人ドナーより調製した末梢血単核球 (P B M C) を用いた。

30

【 0 4 0 0 】

ターゲット細胞に対するエフェクター細胞の比は 1 : 2 5 で実験を行い、細胞傷害活性 (%) は以下の式より算出した。

細胞傷害活性 (%) = 1 0 0 × (S - A b) / (M a x - T)

S = サンプル反応ウェル吸光度 - 培地ウェル吸光度

A b = 抗体無添加ウェル吸光度 - 培地ウェル吸光度

T = 標的ウェル吸光度 - 培地ウェル吸光度

M a x = 1 0 0 % 反応ウェル吸光度 - 1 0 0 % 反応対照ウェル吸光度

40

【 0 4 0 1 】

陰性対照には h I g G 1 、陽性対照には抗 H E R 2 I g G 1 抗体 H e r c e p t i n と抗 H E R 2 I g G 1 デフコース抗体 4 D 5 / I g G 1 D F を用い、エフェクター細胞は、別々のボランティアドナーから調製された P B M C を用いた。T r i t o n X - 1 0 0 によって標的細胞を溶解したウェルを、1 0 0 % 反応ウェルとした。

【 0 4 0 2 】

その結果、抗 H E R 2 一価抗体 4 D 5 / m v G 1 - 1 D F (プロテイン A 精製フラクション 1) は、抗 H E R 2 I g G 1 抗体 4 D 5 / I g G 1 D F と同等の抗体濃度依存的

50

な高いADCC活性を示した(図15A)。一方、抗HER2 IgG4型一価抗体mvG4-4 FおよびmvG4-5 Fは何れもADCC活性を示さなかった(図15B)。

【0403】

従って、IgG1-CHを含む第1ポリペプチドおよびIgG1-Fcが融合したCL(IgG1-L)を含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質は、ADCC活性を付与することができ、IgG4-CHを含む第1ポリペプチドおよびIgG4-Fcが融合したCL(IgG4-L)を含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質は、ADCC活性を除くことができることが示された。

【0404】

更に、IgG1型一価抗体は、IgG1抗体と比べて抗原結合部位が二価から一価へ減少するにもかかわらず、同一条件においてIgG1抗体と同等の効果を得ることができることから、不要な二価結合活性を低下させかつADCC活性を維持した一価抗体が作製され得ることが示された。

【0405】

(2) 抗CD20一価抗体の抗体依存性細胞傷害活性

上述実施例7(1)と同様にして、陰性対照にはhIgG1、陽性対照には抗CD20 IgG1抗体GA101/IgG1 Fと抗CD20 IgG1デフコース抗体GA101/IgG1 DFを用い、全ての実験は健常人ドナー1名から調製したPBMCを用いて行った。

【0406】

その結果、抗CD20 IgG1型デフコース一価抗体GA101/mvG1-2 DFは、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2 Fと比べてADCC活性が顕著に増加した[図16(a)~(c)]。

【0407】

ヒトIgGにおいては、コアフコースの除去によりADCC活性が増強されていることが知られているが、CHを含む第1ポリペプチドおよびCL-Fcを含む第2ポリペプチドからなるIgG1型一価抗体においても同様に、Fcに結合するコアフコースを除去することで、ADCC活性が増加することが示された。即ち、CHを含む第1ポリペプチドおよびCH-Fcを含む第2ポリペプチドからなるヘテロダイマータンパク質のADCC活性は、Fcに結合するコアフコース含量を変化させることで増加または低下させることができることが示された。

【0408】

また、抗CD20 IgG1型デフコース一価抗体GA101/mvG1-2 DFは、抗CD20 IgG1デフコース抗体GA101/IgG1 DFと比較すると、単位モル濃度あたりで誘導できるADCC活性の有効性(potency)は減少したが、最大活性(efficacy)はほぼ同等であった。即ち、抗CD20 IgG1型一価抗体は、抗CD20 IgG1抗体と比べて、抗原結合部位が二価から一価へ減少するにもかかわらず、同一条件において一価抗体分子数を増やすことで、IgG1抗体と同等の効果を得ることができることを示している。

【0409】

[実施例8] 二価ヘテロダイマータンパク質の作製

(1) バイスペシフィック抗体の作製

二価ヘテロダイマータンパク質として、CD74抗体H鎖を含む第1ポリペプチドおよびCD74抗体VL-FcのC末端に抗CD20 scFv抗体または抗HER2 scFv抗体を結合させた第2ポリペプチドからなるバイスペシフィック抗体並びに抗CD74 IgG4型一価抗体hLL1/mvG4-4 Fを作製した。

【0410】

実施例2(3)のバイスペシフィック抗体発現ベクターを用いて、実施例3と同様にしてバイスペシフィック抗体を発現、精製することで、CD74-HER2バイスペシフィ

10

20

30

40

50

ック抗体、CD74 - CD20バイスペシフィック抗体および抗CD74 IgG4型一価抗体hLL1 / mvG4 - 4 Fを取得した。

【0411】

SDS - PAGEの結果、hLL1 / mvG4 - 4 F、hLL1 - 4D5 / mvG4 - 4 FおよびhLL1 - 2F2 / mvG4 - 4 F組成物の精製度は高く、交雑物、分解物および会合体などはほとんど含まれていなかった(図17)。

【0412】

(2) ELISA法によるリコンビナントヒトHER2およびCD74への結合活性評価アッセイには96ウェルのELISA用プレート(グライナー社)を用いた。2 μg / mLリコンビナントヒトHER2 - Fc(R&D Systems社)または2 μg / mL CD74(Santa Cruz Biotechnology社)を50 μL / ウェルで分注し、4 で一晩静置して吸着させた。プレートをPBSで洗浄後、BSA - PBSを100 μL / ウェル加え、室温で1時間静置して残っている活性基をブロックした。

10

【0413】

その後、BSA - PBSを捨て、該プレートに一次抗体として各濃度の抗HER2 IgG1抗体Herceptin F、抗CD74 IgG1抗体hLL1 FまたはCD74 - HER2バイスペシフィック抗体hLL1 - 4D5 / mvG4 - 4 Fを50 μL / ウェル分注し、1時間室温で静置した。

20

【0414】

該プレートをTween - PBSで洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト鎖抗体(Southern Biotech社)を50 μL / ウェル加えて1時間室温で静置した。該プレートをTween - PBSで洗浄し、ABTS発色基質[2,2 - アジノビス(3 - エチルベンゾチアゾール - 6 - スルホン酸)アンモニウム]基質液[1 mmol / L ABTS / 0.1 mol / L クエン酸バッファー(pH 4.2)、0.1% H₂O₂]を50 μL / ウェルを添加して発色させた。

【0415】

5% sodium dodecyl sulfate(SDS)溶液を50 μL / ウェル添加して反応を止め、サンプル波長415 nm、リファレンス波長490 nmにおける吸光度(OD415 - 490)をプレートリーダー(SPECTRA Max 340 PC、Molecular Devices社)を用いて測定した。

30

【0416】

その結果、CD74 - HER2バイスペシフィック抗体hLL1 - 4D5 / mvG4 - 4 Fは、抗HER2 IgG1抗体Herceptin Fと同様にHER2タンパク質に結合した。また、hLL1 - 4D5 / mvG4 - 4 Fは、抗CD74 IgG1抗体hLL1 Fと同様にCD74タンパク質に結合した[図18(a) ~ (c)]。

【0417】

従って、CHおよびCH - Fcからなるheterodimer scaffold protein(HSP)を元に作製されたCD74 - HER2バイスペシフィック抗体hLL1 - 4D5 / mvG4 - 4 Fは、二価結合活性を有するヘテロダイマータンパク質であることが示された。

40

【0418】

[実施例9]ヘテロダイマータンパク質の補体依存性細胞傷害活性(CDC活性)

実施例3で作製したH鎖およびCL - Fc鎖の2つのポリペプチドからなる一価抗体のCDC活性を、国際公開第2011/108502号に記載の方法により測定した。実験は繰り返し回数3回で行った。標的細胞としてCD20陽性パーキットリンパ腫細胞株ST - 486(ATCC: CRL - 1647)を用いた。

【0419】

96ウェル平底プレート(住友ベークライト社)の各ウェルに、10% FBS(JRH社)を含むRPMI 1640(和光純薬工業社)を用いて1.0 × 10⁶個/mLに希釈

50

した標的細胞 50 μ L、終濃度の3倍に調整した抗体溶液 50 μ L および2倍に希釈したヒト補体 (SIGMA社) 50 μ L を分注した。陰性対照には h I g G 1、陽性対照には抗 C D 2 0 抗体 G A 1 0 1 / I g G 1 F と抗 C D 2 0 デフコース化抗体 G A 1 0 1 / I g G 1 D F を用いた。

【0420】

また、抗体を含まないウェルを0%反応ウェル、標的細胞を含まないウェルを100%反応ウェルとして用意した。37 (5% CO₂) で2時間培養後、各反応ウェルに W S T - 1 (R O C H E 社) を 1 5 μ L ずつ添加し 3 7 (5 % C O ₂) で 3 時間培養した。

【0421】

反応終了後、各ウェルの O D 4 5 0 を測定し、下式を用いて細胞傷害活性 (%) を算出した。

細胞傷害活性 (%) = 1 0 0 × { 1 - (反応ウェル吸光度 / 1 0 0 % 反応ウェル吸光度) / (0 % 反応ウェル吸光度 - 1 0 0 % 反応ウェル吸光度) }

【0422】

抗 C D 2 0 I g G 1 型一価抗体のモル濃度あたりの C D C 活性を図 1 9 に示す。その結果、抗 C D 2 0 I g G 1 型一価抗体 G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 F および抗 C D 2 0 I g G 1 型デフコース化一価抗体 G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 D F は、抗 C D 2 0 抗体 G A 1 0 1 / I g G 1 F および G A 1 0 1 / I g G 1 D F と比べて、C D C 活性が増加した。

【0423】

[実施例 10] ヘテロダイマータンパク質の C 1 q 結合活性

細胞表面上への I g G 抗体、一価抗体の結合および C 1 q の結合をフローサイトメーターで測定した。標的細胞には C D 2 0 陽性腫瘍細胞株 R a j i (J C R B 9 0 1 2) および S T - 4 8 6 (A T C C : C R L - 1 6 4 7) を用いた。標的細胞を B S A - P B S (ナカライテスク社) で 4 × 1 0 ⁶ 個 / m L に調製し、更に 1 / 2 0 希釈マウス血清 (C E D A R L A N E 社) をを加え、室温で5分間静置した。

【0424】

この細胞懸濁液を 9 6 ウェル U 字プレート (F A L C O N 社) の各ウェルに 5 0 μ L ずつ分注し、B S A - P B S で 3 倍濃度に希釈した抗体溶液 (G A 1 0 1 / I g G 1 F , G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 F , h I g G 1)、3 倍濃度の精製 C 1 q (S I G M A 社、C 1 7 4 0) をそれぞれ 5 0 μ L ずつ添加した。陰性対象として、バッファーを加えた。

【0425】

各ウェルを懸濁し、氷上で1時間静置後、遠心分離により上清だけを除去した。B S A - P B S を 1 8 0 μ L ずつ各ウェルに加え、再び遠心分離により上清を除去した。この操作を2回繰り返すことで洗浄を行った。

【0426】

その後、1 0 μ g / m L F I T C 標識抗ヒト I g G - F c 抗体 (A b c a m 社、a b 9 9 7 6 3) または F I T C 標識抗 C 1 q 抗体 (D a k o 社、F 0 2 5 4) を各ウェルに 3 0 μ L ずつ添加し、氷上で30分間遮光して静置した。その後、上述の洗浄操作を2回繰り返して、1 8 0 μ L の B S A - P B S に懸濁して測定サンプルとした。

【0427】

フローサイトメーターにより、各測定サンプルの Mean Fluorescent Intensity (M F I) を測定した。陰性対照ウェルの M F I 値に対するサンプルウェルの M F I 値の比を計算して Relative Fluorescent Intensity (R F I) とした。抗体濃度と R F I 値の関係を R a j i 細胞への抗体結合量、C 1 q 結合量をそれぞれ図 2 0 (a) および図 2 0 (b) に、S T - 4 8 6 細胞への抗体結合量および C 1 q 結合量を図 2 1 A および図 2 1 B にそれぞれ示す。

【0428】

R a j i [図 2 0 (a) および (b)] および S T - 4 8 6 [図 2 1 (a) および (b)]

10

20

30

40

50

)]のいずれにおいても、抗IgG-Fc抗体の結合量は、一価抗体GA101/mvG1-2 FはIgG1抗体GA101/IgG1 Fと比べて増加したのに対し[図20(a)および図21(a)]、抗C1q抗体の結合量はIgG1抗体GA101/IgG1 Fと比べて一価抗体GA101/mvG1-2 Fで増加した[図20(b)および図21(b)]。

【0429】

尚、本試験で使用した抗IgG-Fc抗体のGA101/IgG1 FおよびGA101/mvG1-2 Fに対するアフィニティは同等であることを事前に確認している(data not shown)。この結果から、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2 Fの抗原結合活性は、抗CD20 IgG抗体GA101/IgG1 Fと比べて低下しているものの、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2 FのC1q結合活性は、抗CD20 IgG抗体GA101/IgG1 Fと比べて増加していることが明らかになった。

10

【0430】

[実施例11]高CDC活性型ヘテロダイマータンパク質の作製

高CDC活性型ヘテロダイマータンパク質として、高CDC活性型一価抗体を作製するために、高CDC活性型Fc領域(国際公開第2011/108502号)を含む一価抗体発現ベクターを以下のようにして作製した。

【0431】

(1)H鎖ベクターの作製

20

実施例1に記載のH鎖定常領域1H1のFc領域のアミノ酸配列を、国際公開第2011/108502号に記載の配列番号3で示される高CDC型定常領域のFc領域のアミノ酸配列に置換した。IgG1-CHベクター1H1のCH2およびCH3領域の断片を、制限酵素BmgBIおよびEcoT22Iを用いて切り出した。

【0432】

同様にして、高CDC活性型Fc領域を含むpKTX93/113F-N392Kベクター(国際公開第2011/108502号)を制限酵素BmgBIおよびEcoT22Iを用いて酵素処理し、切り出されたBmgBI-EcoT22I断片をIgG1-CHベクター1H1に挿入した。その結果、高CDC活性型Fcを含む一価抗体H鎖ベクター(以下、HCVcomと略記する)を取得した。

30

【0433】

(2)L鎖ベクターの作製

(1)と同様の操作により、実施例1に記載のCL-Fc(1L1)のFc領域のアミノ酸配列を、国際公開第2011/108502号に記載の配列番号3で示される高CDC型定常領域のFc領域のアミノ酸配列に置換して、高CDC活性型Fcを含む一価抗体L鎖ベクター(以下、LCVcomと略記する)を取得した。

【0434】

(3)高CDC活性型一価抗体発現ベクターの作製

上述(1)および(2)より取得されたHCVcomおよびLCVcomを、実施例1表3に記載のpKANTEX93/mvG1-2のCH領域およびCL領域に以下の操作に従って導入した。HCVcomのCH1領域の5'末端に存在するApaIサイトとCH3領域の3'末端に存在するBamHIサイトを各制限酵素で切断し、pKANTEX93/mvG1-2の同サイトに挿入し、続いて、LCVcomのC領域の5'末端に存在するBsiWIサイトとCH3領域の3'末端に存在するPmaCIサイトを各制限酵素で切断して、同サイトに挿入した。

40

【0435】

その結果、高CDC活性型Fcを含む一価抗体発現ベクター(以下、pKANTEX93/mvComと記載する)を取得した。作製したpKANTEX93/mvComのH鎖およびL鎖の定常領域アミノ酸配列を図22Aおよび図22Bに示す。

【0436】

50

また、高CDC活性型の抗CD20抗体GA101を作製するために、GA101-VHおよびVLのアミノ酸配列（配列番号36、38）をコードするDNAをpKTX93/113F-N392Kベクター（国際公開第2011/108502号）の適切な部位に挿入して、抗CD20高CDC活性型二価抗体GA101/IgG1-Com発現ベクターを作製した。

【0437】

（4）高CDC活性型一価抗体の生産

高CDC活性型一価抗体および二価抗体の生産は、実施例3に記載の方法と同様にして行い、抗CD20一価抗体発現ベクターpKANTEX93/mvG1-2および抗CD20高CDC活性型一価抗体発現ベクターpKANTEX93/mvComを、それぞれCHO/FUT8KO細胞へ導入し、N結合型糖鎖に1,6-フコースが結合していない一価抗体、GA101/mvG1-2 DFおよびGA101/mvCom DFまたは二価抗体GA101/IgG1-Com DFを発現させた。

【0438】

一価抗体の精製は、MabSelectSure（GE Healthcare社）担体を用いたProteinA精製を実施し、溶出バッファーをpH3.9の0.1Mクエン酸緩衝液を用いた以外は、実施例2（2）と同様の方法に従って実施した。精製タンパク質を実施例2（3）と同様の方法でSDS-PAGE解析を行った。

【0439】

その結果、図23に示す通り一価抗体のCL-Fc鎖およびH鎖は共に分子量が約50kDaであり、還元条件では50kDa付近の単一バンドが、非還元条件ではH鎖とCL-Fc鎖との2本のポリペプチド鎖で構成されたヘテロダイマーと予想される100kDa付近の単一バンドが認められた。従って、均一な一価抗体GA101/mvG1-2 DFおよびGA101/mvCom DFが精製された。

【0440】

以上の結果は、IgG1およびIgG4型一価抗体だけでなく、抗体定常領域に複数のアミノ酸残基置換を含む高CDC活性型一価抗体もまた、H435R/Y436Fアミノ酸残基置換がCL-Fc鎖へ加えられることで、プロテインAによるヘテロダイマータンパク質特異的な精製が可能であることが示された。

【0441】

即ち、第1ポリペプチドおよび/または第2ポリペプチドに、複数のアミノ酸残基置換が含まれているヘテロダイマータンパク質が、製造可能であることが明らかになった。

【0442】

[実施例12] 高CDC活性型ヘテロダイマータンパク質のCDC活性

実施例11で作製したH鎖およびCL-Fc鎖の2つのポリペプチドからなる一価抗体のCDC活性は、国際公開第2011/108502号に記載の方法により測定した。実験は繰り返し回数3回で行った。標的細胞としてCD20陽性ヒトリンパ腫細胞Raji（JCRB9012）および慢性B細胞白血病細胞MEC-1（DSMZ:ACC-497）を用いた。以下は、実施例9と同様にしてCDC活性を測定した。

【0443】

その結果を図24（a）および（b）に示す。抗CD20高CDC活性型一価抗体GA101/mvCom DFは、抗CD20 IgG1型一価抗体GA101/mvG1-2 DFと比べて高いCDC活性を示した。また、抗CD20高CDC活性型一価抗体GA101/mvCom DFは、二価の抗CD20高CDC活性型抗体GA101/IgG1-Com DFと高濃度域において同等のCDC活性を示すことが明らかになった。

【0444】

従って、H鎖とCL-Fcからなるヘテロダイマータンパク質である一価抗体においても、二価のIgG抗体と同様に体定常領域の複数のアミノ酸残基置換によって、一価抗体のCDC活性が増加すること明らかになった。

【0445】

[実施例 13] ヘテロダイマータンパク質の A D C C 活性

実施例 11 で作製した高 C D C 活性型ヘテロダイマータンパク質である、抗 C D 20 高 C D C 活性型一価抗体 G A 1 0 1 / m v C o m D F の A D C C 活性の測定を、実施例 7 (2) と同様にして行った。標的細胞は C D 20 陽性ヒトリンパ腫細胞 R a j i (J C R B 9 0 1 2) および慢性 B 細胞白血病細胞 M E C - 1 (D S M Z : A C C - 4 9 7) を用いて実施した。

【 0 4 4 6 】

陰性対照には h I g G 1 (M i l l i p o r e 社 , A G - 5 0 2) 、陽性対照には抗 C D 20 I g G 1 型デフコース化一価抗体 G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 D F 、比較対照として抗 C D 20 I g G 1 型フコース化一価抗体 G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 F を用いた。

10

【 0 4 4 7 】

その結果を図 25 (a) および (b) に示す。抗 C D 20 高 C D C 活性型デフコース化一価抗体 G A 1 0 1 / m v C o m D F は、抗 C D 20 I g G 1 型デフコース化一価抗体 G A 1 0 1 / m v G 1 - 2 D F と同等の高い A D C C 活性を有していることが示された。

【 0 4 4 8 】

本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2012年10月5日付けで出願された米国仮出願(61/710,221号)に基づいており、その全体が引用により援用される。

20

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 4 4 9 】

配列番号 1 : ヒト I g G 1 C H の D N A の 塩基配列

配列番号 2 : ヒト I g G 1 C H の アミノ酸配列

配列番号 3 : ヒト I g G 4 C H の D N A の 塩基配列

配列番号 4 : ヒト I g G 4 C H の アミノ酸配列

配列番号 5 : ヒト I g G 1 C H - H i s の D N A の 塩基配列

配列番号 6 : ヒト I g G 1 C H - H i s の アミノ酸配列

配列番号 7 : ヒト I g G 4 C H - H i s の D N A の 塩基配列

30

配列番号 8 : ヒト I g G 4 C H - H i s の アミノ酸配列

配列番号 9 : 1 H 0 の D N A の 塩基配列

配列番号 10 : 1 H 0 の アミノ酸配列

配列番号 11 : 1 H 1 の D N A の 塩基配列

配列番号 12 : 1 H 1 の アミノ酸配列

配列番号 13 : 4 H 0 の D N A の 塩基配列

配列番号 14 : 4 H 0 の アミノ酸配列

配列番号 15 : 4 H 1 の D N A の 塩基配列

配列番号 16 : 4 H 1 の アミノ酸配列

配列番号 17 : 4 H 2 の D N A の 塩基配列

40

配列番号 18 : 4 H 2 の アミノ酸配列

配列番号 19 : 4 H 3 の D N A の 塩基配列

配列番号 20 : 4 H 3 の アミノ酸配列

配列番号 21 : 1 L 0 の D N A の 塩基配列

配列番号 22 : 1 L 0 の アミノ酸配列

配列番号 23 : 1 L 1 の D N A の 塩基配列

配列番号 24 : 1 L 1 の アミノ酸配列

配列番号 25 : 4 L 0 の D N A の 塩基配列

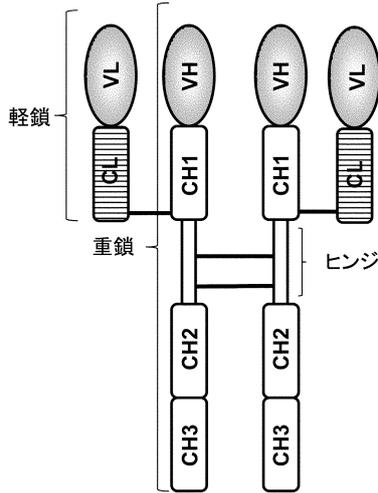
配列番号 26 : 4 L 0 の アミノ酸配列

配列番号 27 : 4 L 1 の D N A の 塩基配列

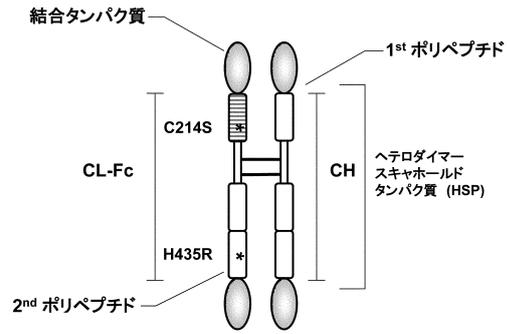
50

配列番号 28 : 4 L 1 のアミノ酸配列	
配列番号 29 : 4 L 2 の DNA の塩基配列	
配列番号 30 : 4 L 2 のアミノ酸配列	
配列番号 31 : 4 L 3 の DNA の塩基配列	
配列番号 32 : 4 L 3 のアミノ酸配列	
配列番号 33 : 4 L 4 の DNA の塩基配列	
配列番号 34 : 4 L 4 のアミノ酸配列	
配列番号 35 : GA101 VH の DNA の塩基配列	
配列番号 36 : GA101 VH のアミノ酸配列	
配列番号 37 : GA101 VL の DNA の塩基配列	10
配列番号 38 : GA101 VL のアミノ酸配列	
配列番号 39 : 4 D 5 VH の DNA の塩基配列	
配列番号 40 : 4 D 5 VH のアミノ酸配列	
配列番号 41 : 4 D 5 VL の DNA の塩基配列	
配列番号 42 : 4 D 5 VL のアミノ酸配列	
配列番号 43 : CD74 VH の DNA の塩基配列	
配列番号 44 : CD74 VH のアミノ酸配列	
配列番号 45 : CD74 VL の DNA の塩基配列	
配列番号 46 : CD74 VL のアミノ酸配列	
配列番号 47 : GS リンカー の DNA の塩基配列	20
配列番号 48 : GS リンカー のアミノ酸配列	
配列番号 49 : 2 F 2 VH の DNA の塩基配列	
配列番号 50 : 2 F 2 VH のアミノ酸配列	
配列番号 51 : 2 F 2 VL の DNA の塩基配列	
配列番号 52 : 2 F 2 VL のアミノ酸配列	
配列番号 53 : CD74 VL - CL - Fc - 2 F 2 sc Fv の DNA の塩基配列	
配列番号 54 : CD74 VL - CL - Fc - 2 F 2 sc Fv のアミノ酸配列	
配列番号 55 : CD74 VL - CL - Fc - 4 D 5 sc Fv の DNA の塩基配列	
配列番号 56 : CD74 VL - CL - Fc - 4 D 5 sc Fv のアミノ酸配列	
配列番号 57 : ヒト C の DNA の塩基配列	30
配列番号 58 : ヒト C のアミノ酸配列	

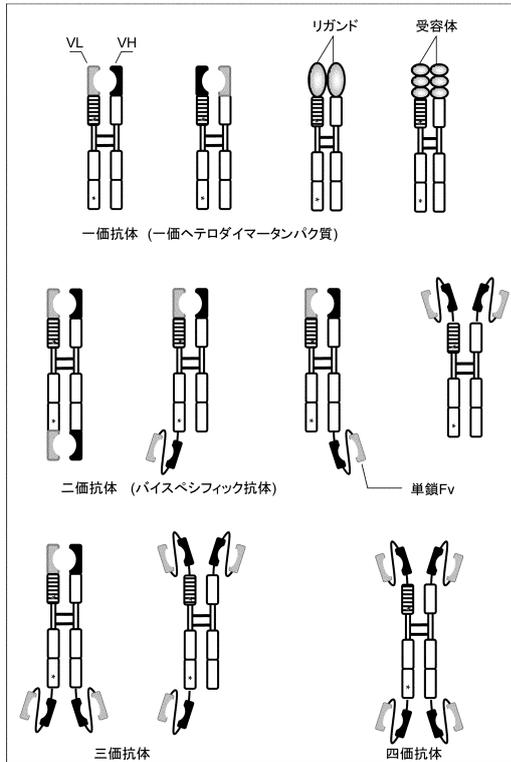
【図1】



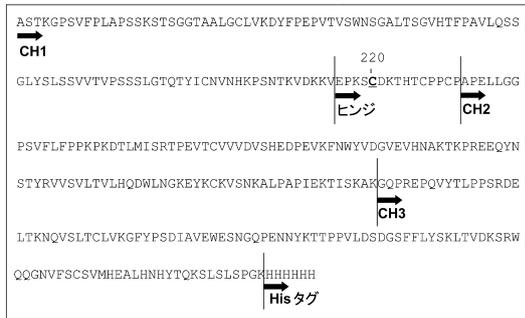
【図2A】



【図2B】



【図3A】



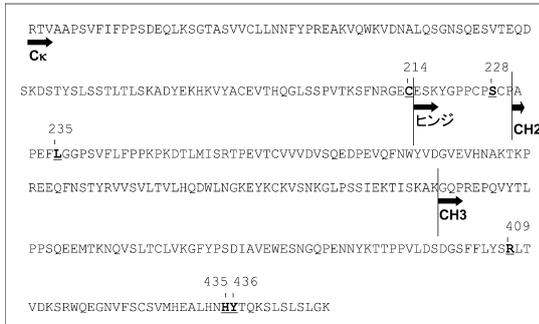
【図3B】



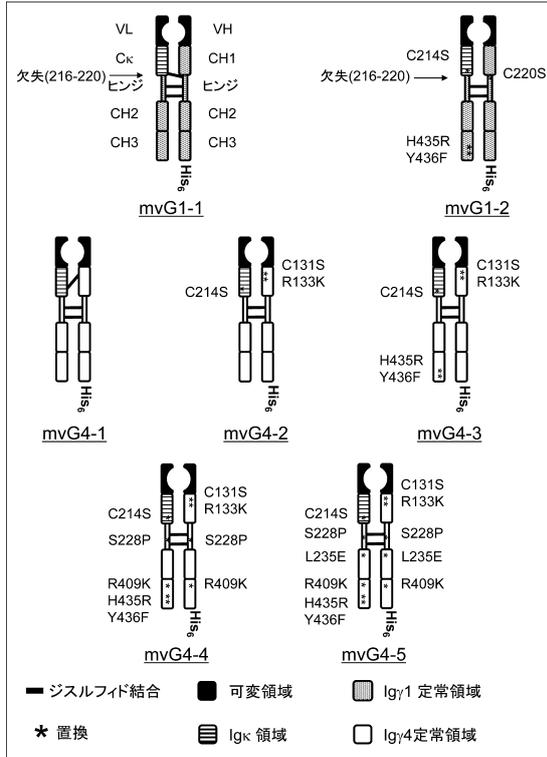
【 図 4 A 】



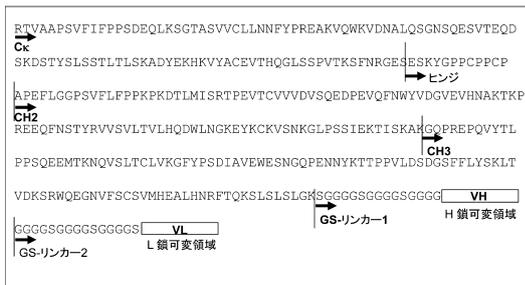
【 図 4 B 】



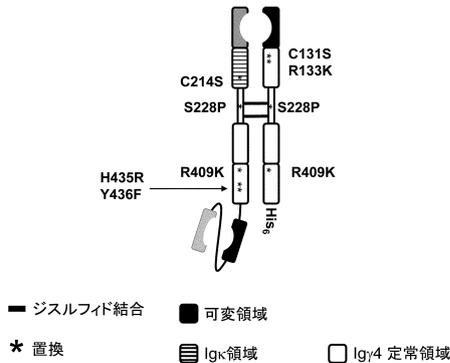
【 図 5 】



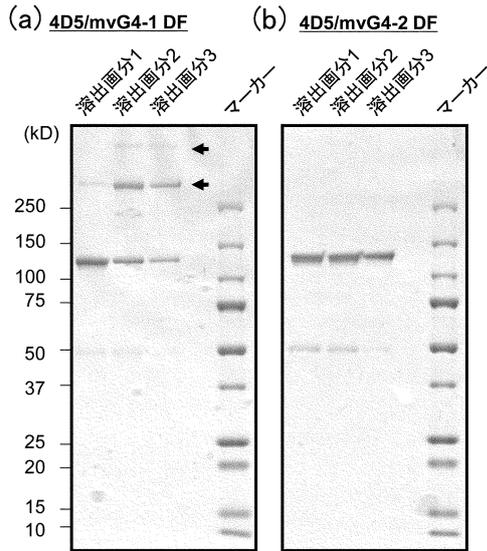
【 図 6 】



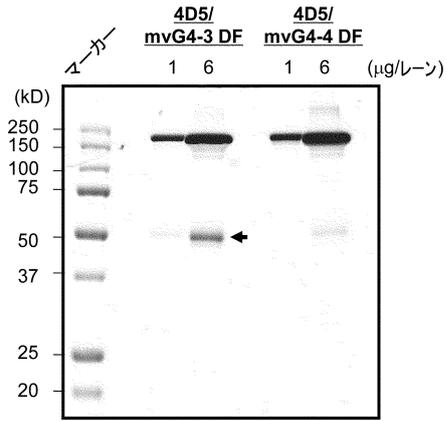
【 図 7 】



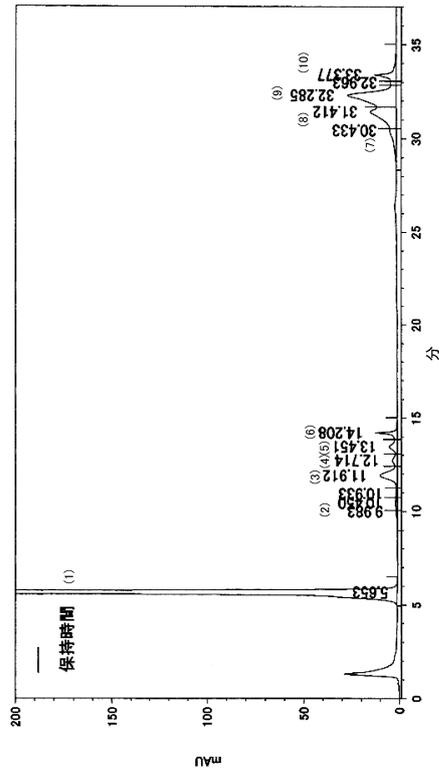
【 図 8 A 】



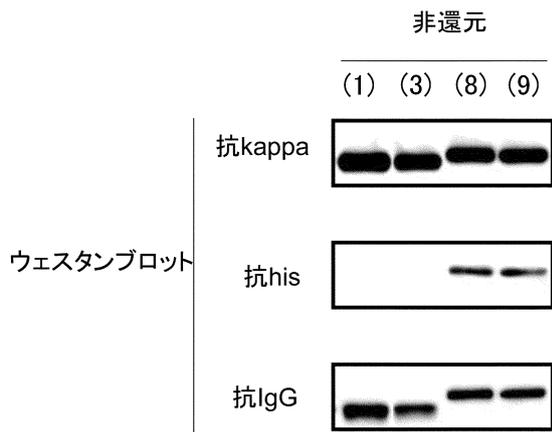
【 図 8 B 】



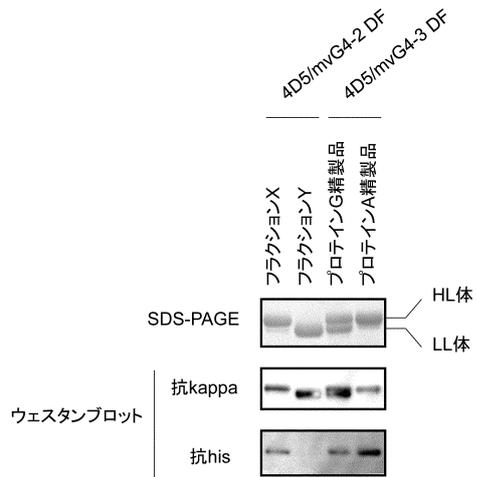
【 図 9 】



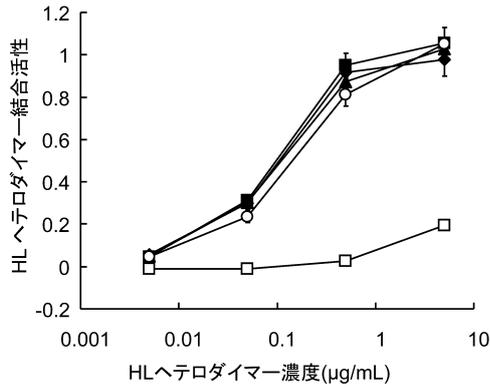
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

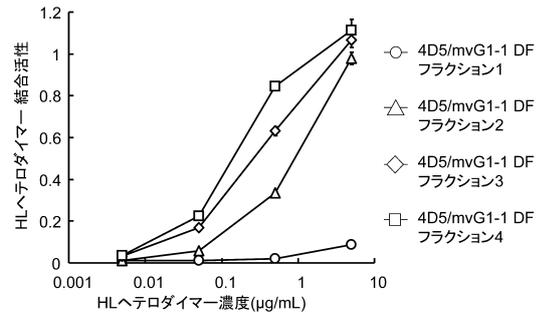


【 図 1 2 】

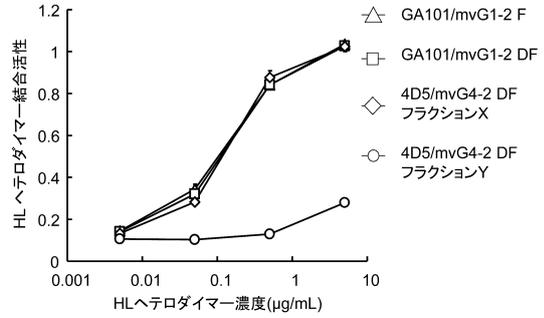


- 4D5/mvG4-3 DF
- ◆ 4D5/mvG4-4 F
- ▲ 4D5/mvG4-5 F
- 4D5/mvG4-2 DF フラクシオンX
- 4D5/mvG4-2 DF フラクシオンY

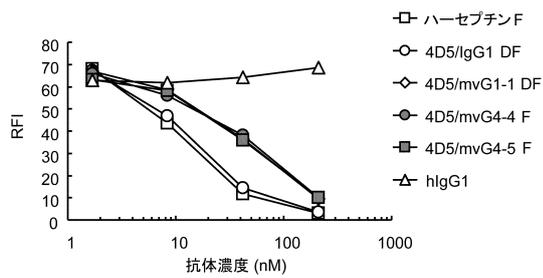
【 図 1 3 A 】



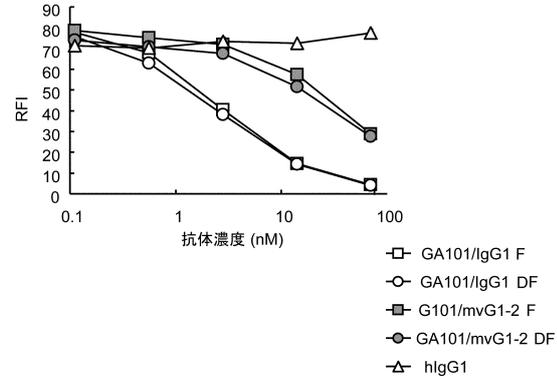
【 図 1 3 B 】



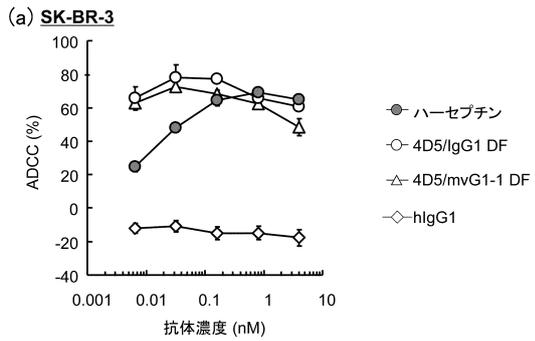
【 図 1 4 A 】



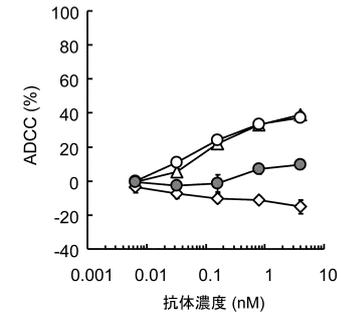
【 図 1 4 B 】



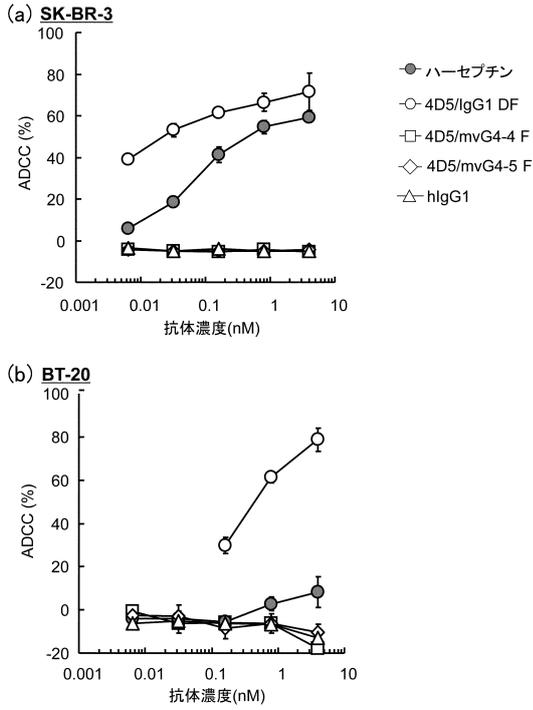
【 図 1 5 A 】



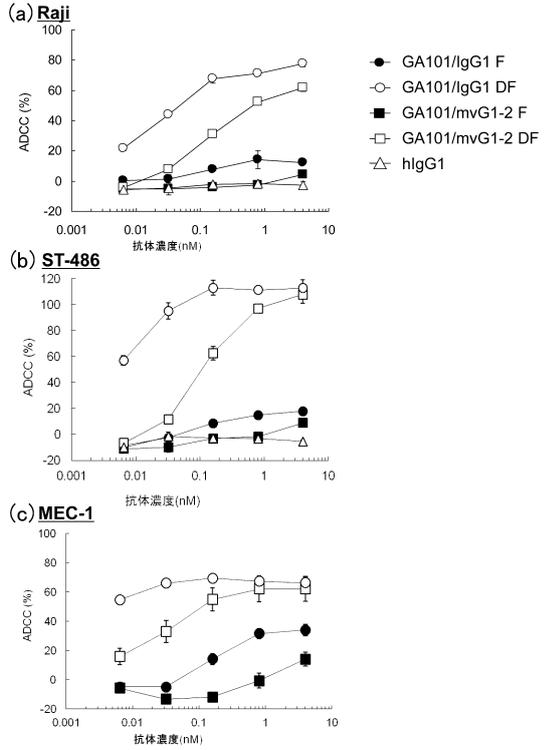
(b) BT-20



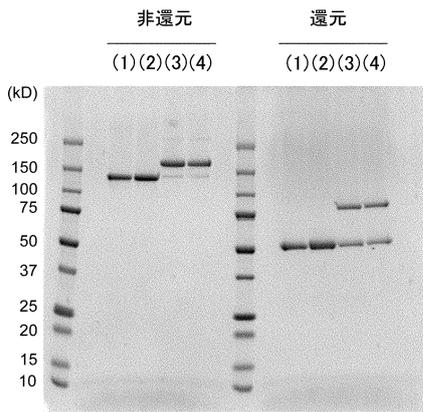
【 図 1 5 B 】



【 図 1 6 】

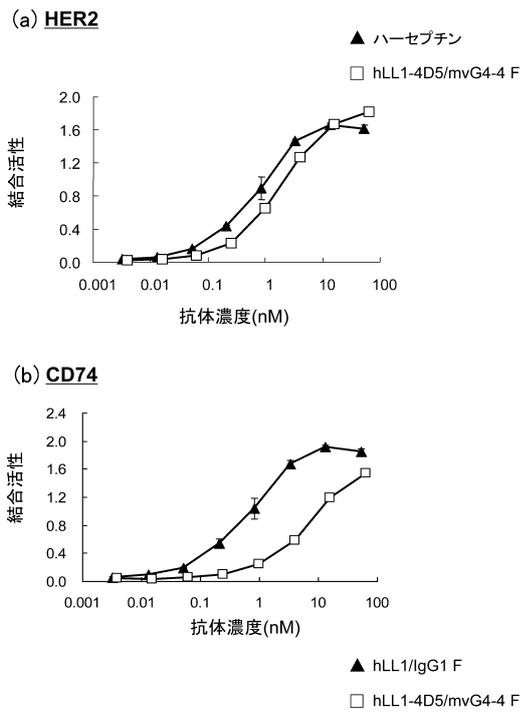


【 図 1 7 】

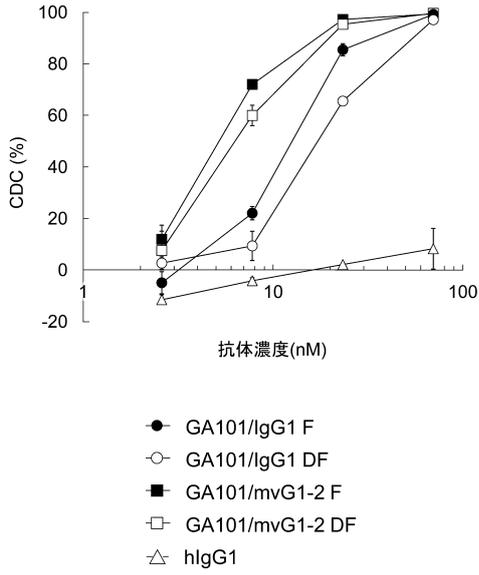


(1) 4D5/mvG4-4 F
(2) hLL1/mvG4-4 F
(3) hLL1-4D5/mvG4-4 F
(4) hLL1-2F2/mvG4-4 F

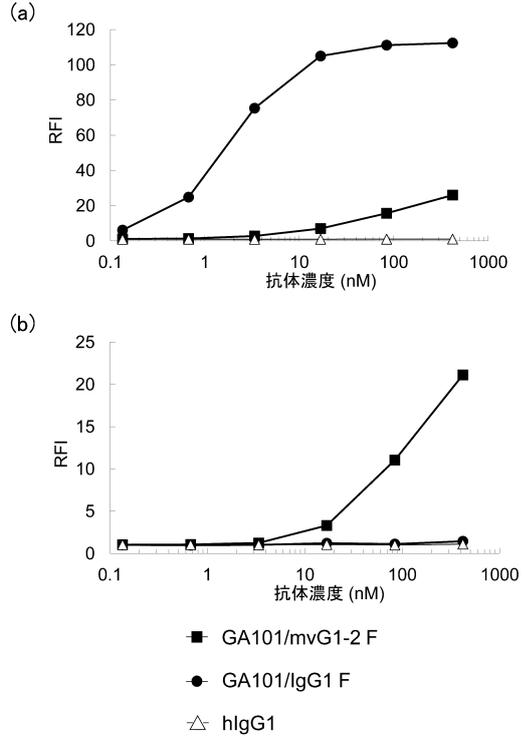
【 図 1 8 】



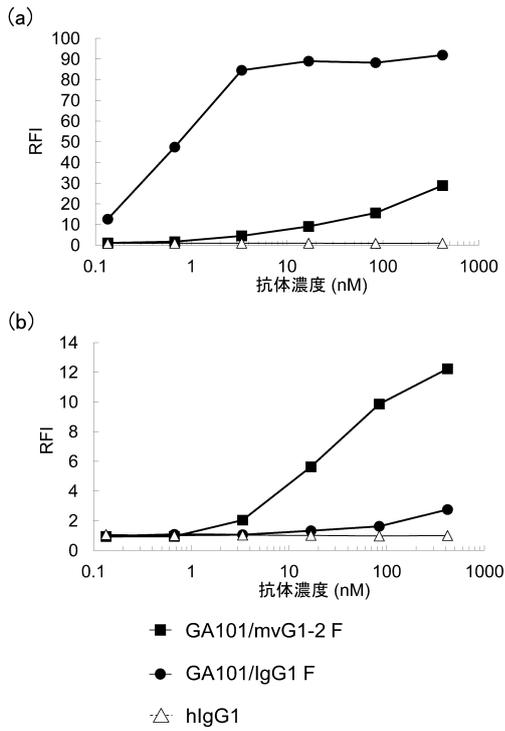
【 図 19 】



【 図 20 】



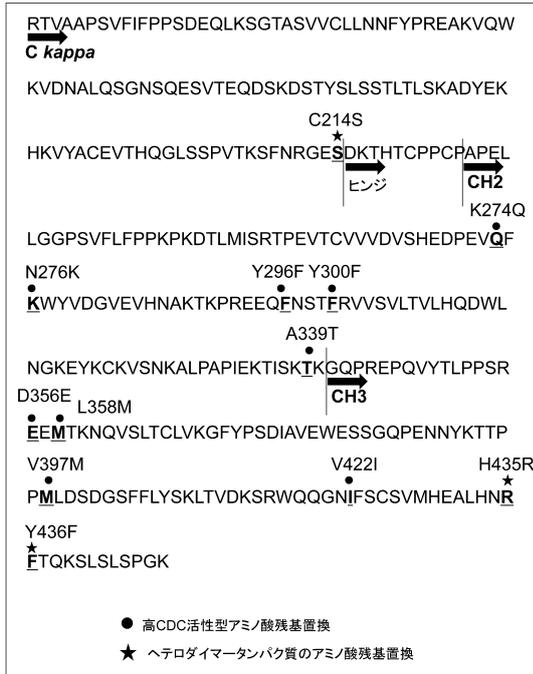
【 図 21 】



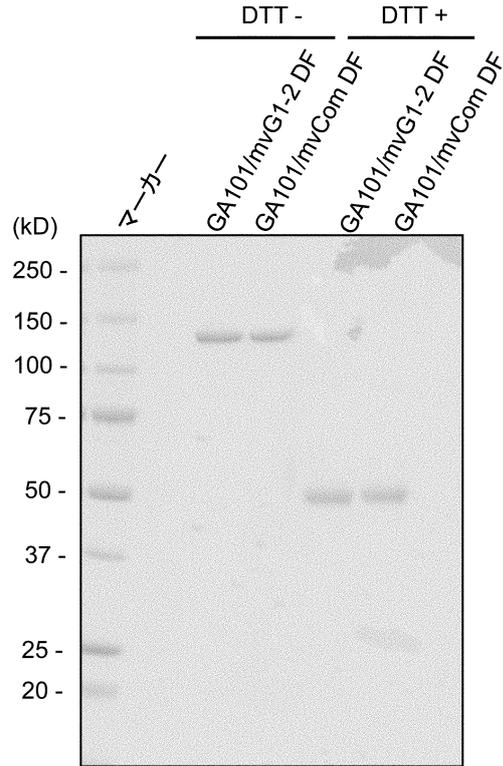
【 図 22 A 】



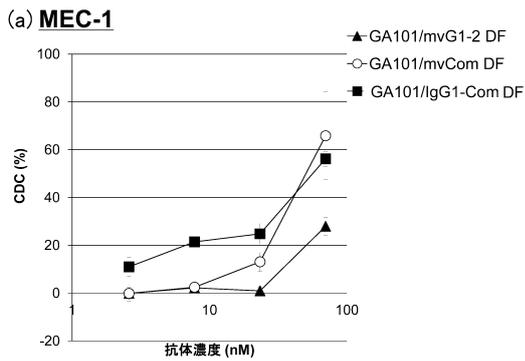
【 図 2 2 B 】



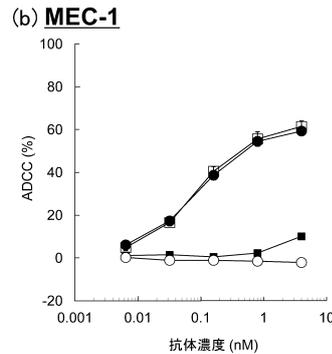
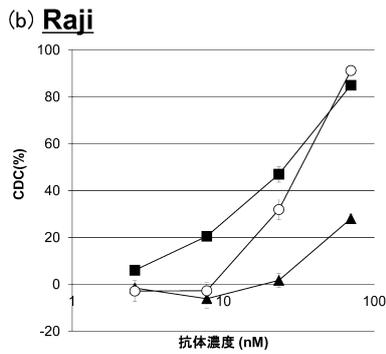
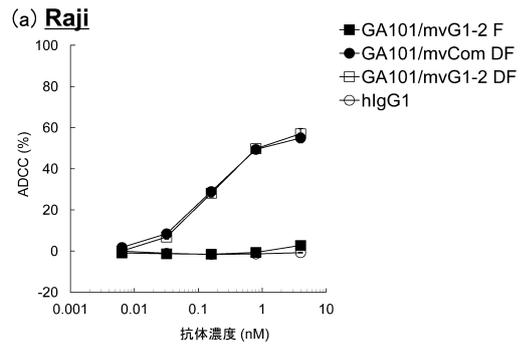
【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【配列表】

0006273205000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/02 (2006.01) C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 手塚 雄太
東京都千代田区大手町1丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社 本社内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2011/090762(WO,A1)
国際公開第2011/078332(WO,A1)
国際公開第2004/029207(WO,A2)
特表2010-538651(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
C 1 2 N 15/00 - 15/90
C 0 7 K 16/00 - 16/46
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed