

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4943144号
(P4943144)

(45) 発行日 平成24年5月30日(2012.5.30)

(24) 登録日 平成24年3月9日(2012.3.9)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C07K	19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00
C07K	14/21	(2006.01)	C O 7 K 14/21
A61K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A61K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/00

請求項の数 12 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-512665 (P2006-512665)	(73) 特許権者	304020144
(86) (22) 出願日	平成17年4月25日(2005.4.25)		松山 隆美
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/008372		鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 免疫病態制御分野
(87) 国際公開番号	W02005/103250	(73) 特許権者	505426532
(87) 国際公開日	平成17年11月3日(2005.11.3)		イノバティスファーマ株式会社
審査請求日	平成20年4月11日(2008.4.11)		東京都港区高輪3丁目5番25号
(31) 優先権主張番号	特願2004-129134 (P2004-129134)	(74) 代理人	100075812
(32) 優先日	平成16年4月26日(2004.4.26)		弁理士 吉武 賢次
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 葉酸リセプターベータ (FR-β) に対する単クローン抗体を含有する治療薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

葉酸リセプターベータ(FR-)に対する単クローン抗体であって、
配列番号1に示される重鎖可変領域および配列番号2に示される軽鎖可変領域を含んで
なり、

マクロファージ上に発現する葉酸リセプターベータ(FR-)と反応し、K B 癌細胞上に
発現する葉酸リセプターアルファ(FR-)と反応しない、単クローン抗体。

【請求項2】

IgG型である請求項1に記載のFR- 単クローン抗体。

【請求項3】

請求項1または請求項2に記載のFR- 単クローン抗体とトキシンとを結合したFR- 抗体イムノトキシン。

【請求項4】

前記トキシンが、リシンA鎖(ricin A chain)、脱糖鎖リシンA鎖(deglycosylated ricin A chain)、リボソーム不活化蛋白(a ribosome inactivating protein)、アルファサルシン(alpha-sarcin)、ゲロニン(gelonin)、アスペルギリン(aspergillin)、リストリクトシン(restrictocin)、リボヌクレース(ribonuclease)、エピポドフィロトキシン(epi podophyllotoxin)、ジフテリア トキシン(diphtheria toxin)およびシュドモナス エクトトキシン(Pseudomonas exotoxin)からなる群から選択された、請求項3に記載のFR- 抗体イムノトキシン。

【請求項 5】

酵素、サイトカイン、アイソトープ、化学療法剤からなる群から選ばれた少なくとも 1 つの生物学的または化学的に活性のある分子と、請求項 1 または請求項 2 に記載の FR-単クローン抗体との結合物。

【請求項 6】

請求項 1 または請求項 2 に記載の FR- 単クローン抗体と化学療法剤とを含むリポソーム。

【請求項 7】

請求項 3 または 4 に記載の FR- 抗体イムノトキシン、請求項 5 に記載の結合物、請求項 6 に記載のリポソームからなる群から選ばれた少なくとも 1 つを有効成分とする、医薬組成物。 10

【請求項 8】

請求項 3 または 4 に記載の FR- 抗体イムノトキシン、請求項 5 に記載の結合物、請求項 6 に記載のリポソームからなる群から選ばれた少なくとも 1 つを有効成分とする、マクロファージが病態の中心となる疾患の治療剤。

【請求項 9】

前記マクロファージが病態の中心となる疾患が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、マクロファージ活性化症候群、敗血症ショックからなる群から選ばれた疾患である、請求項 8 に記載の治療剤。

【請求項 10】

請求項 8 または請求項 9 に記載の治療剤の投与形態が関節注入剤である、関節リウマチまたは若年性関節リウマチの治療剤。 20

【請求項 11】

請求項 3 または 4 に記載の FR- 抗体イムノトキシン、請求項 5 に記載の結合物、請求項 6 に記載のリポソームから選ばれた少なくとも 1 つを有効成分とする、白血病の治療剤。

【請求項 12】

前記白血病が急性骨髄性白血病である、請求項 11 に記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は葉酸リセプターベータ (FR-) 発現細胞に対して特異的なイムノトキシンのマクロファージ活性化を病態の中心とする疾患や FR- 発現白血病の治療用組成物および治療方法に関する。より詳しくは FR- 抗原に対する単クローン抗体にトキシンを結合させたイムノトキシンの関節リウマチ、若年性関節リウマチ、マクロファージ活性化症候群、敗血症性ショック、急性骨髄性白血病の治療開発に関するものである。 30

【背景技術】

単クローン抗体について：

単クローン抗体は、ケラー (Kohler) とマイルステイン (Milstein) の方法またはその変形方法を用いて製造される。(kohler et al. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7; 256 (5517): 495-7) (非特許文献 1) 40

トキシンについて：

細菌由来のトキシンであるシュドモナス エクソトキシン (Pseudomonas exotoxin) (PE) はアミノ酸配列 279 と 280 が切断されることにより活性型となる。(Ogata et al. Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. J Biol Chem. 1992; 267 (35): 253-96 50

- 401) (非特許文献1)

遺伝子改変PEは細胞表面に結合するIaドメインが欠損し、アミノ酸配列280から始まる。また、C末端部位に細胞障害能を増加させるため、KDEL, REDLKが付加されている。(Kreitman. Chimeric fusion proteins - Pseudomonas exotoxin-based. Curr Opin Invest Drugs. 2001 2(9):1282-93) (非特許文献3)

また、PEの他様々な異なる1型リボソームを含むイムノトキシン(モモルデイン(momordin)、ゲロニン(gelonin)、サポリン、ブリオデイン(bryodin)、及びボウガニン)を使用した前臨床研究の報告がある。(Pastan I Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history. Cancer Immunol Immunother. 2003; 52(5):338-41) (非特許文献4)、(Trail et al. Monoclonal antibody drug immunoc onjugates for targeted treatment of cancer. Cancer Immunol Immunother. 2003 May; 52(5):328-37) (非特許文献5)、Milenic DE. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. Curr Pharm Des. 2002; 8(19):1749-64) (非特許文献6)

イムノトキシンについて:

これまでリコンビナントPEを使用した多数のイムノトキシンが開示されている。

米国特許第6,703,488(特許文献1)の請求項6にIL-13リセプター抗体とトキシンの結合物作成について、実施例1にIL-13リセプター抗体の遺伝子改変PE40とのリコンビナントトキシンの作成の記載がある。

米国特許第6,703,020(特許文献2)の請求項16にVEGFリセプター抗体とPEの結合物作成の記載がある。

米国特許第6,696,064(特許文献3)の請求項6にトランスフェリンリセプター抗体と遺伝子改変PE38の結合物作成の記載がある。

米国特許第6,689,869(特許文献4)の請求項2にCD18抗体と酵素抑制物との結合物作成について、明細書にCD18抗体とPEの結合物作成の記載がある。

米国特許第6,417,337(特許文献5)の請求項5にCEA抗体のトキシンの結合物作成について、明細書においてトキシンにはPEが含まれる記載がある。

米国特許第6,395,276(特許文献6)の請求項1にCD22抗体とトキシンの結合物作成について、実施例5において、CD22抗体遺伝子改変PEのダウデー(Daudi)細胞移植SCIDマウスの生存延長効果についての記載がある。

米国特許第6,348,581(特許文献7)の請求項4にTAG-72抗体とトキシンの結合物作成について、記述においてトキシンにPEが含まれる記載がある。

米国特許第6,346,248(特許文献8)の請求項1にCD86抗体とトキシンの結合物について、記述においてトキシンにPEが含まれる記載がある。

米国特許第6,319,891(特許文献9)の請求項7にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(Glutathion-S-transferase)抗体とPEの結合物作成の記載がある。

米国特許第6,312,694(特許文献10)の請求項31にアミノフォスホリピッド(Aminophospholipid)抗体とPEの結合物作成についての記載がある。

米国特許第6,287,562(特許文献11)の請求項4にルイスY(Lewis Y)抗体とPEの結合物作成について、実施例7にルイスY(Lewis Y)抗体と遺伝子改変PE38の結合物あるいはその単鎖リコンビナントイムノトキシンが細胞株の増殖を抑制した記載がある。

米国特許第6,267,960(特許文献12)の請求項4にプロスタータ幹細胞抗原

10

20

30

40

50

(Prostate Stem Cell Antigen) 抗体とPE、あるいは遺伝子改変PE40の結合物作成の記載がある。

米国特許第6.074.644(特許文献13)の請求項1に遺伝子改変PE(1-279アミノ酸残基、ドメインIbの大半を欠く)と抗体成分VHあるいはVLからなる蛋白と抗体成分VLあるいはVHからなる蛋白のS-S結合による2重鎖リコンビナントイムノトキシンの作成に関して、請求項3にこれらの抗体成分はPEとB1, B3, B5, e23, BR96, Tac, RFB4, HB21抗体成分からなる記載がある。

米国特許第6.033.876(特許文献14)の請求項4にCD30抗体とトキシンの結合物作成について、記述でトキシんにPE38、PE40が含む記載がある。

米国特許第5980895(特許文献15)の請求項1に抗体成分VHと遺伝子改変PE(1-279アミノ酸残基、ドメインIbの大半を欠く)の結合物と抗体成分VLの結合物をS-Sで結合させた2重鎖リコンビナントイムノトキシンの作成について、請求項3においてこのリコンビナントイムノトキシンのVH, VLはB1, B3, B5, e23, BR96, Tac, RFB4, HB21抗体由来である記載がある。

米国特許第5.840.854(特許文献16)の請求項21にGA733-1抗体とトキシンの結合物作成について、記述でトキシんにPEが含まれる記載がある。

米国特許第5.817.313(特許文献17)の請求項3にK1(CA125)抗体とトキシンの結合物作成について、表7においてK1(CA125)抗体PEのOVCA R-3細胞への結合活性についての記載がある。

米国特許第5.776.427(特許文献18)の請求項18にCD5, CD8, CD11/CD18, CD15, CD32, CD44, CD45, CD64, CD25, CD30, CD54, CD71, HMFG-2, SM-3, B72.3, PR5c5, RR402, 27, OV-TL3, Mov18, P185(HER2)抗体とPEの結合物作成についての記載がある。

米国特許第5.759.546(特許文献19)の請求項11にCD4抗体とトキシンの結合物の記述において、トキシんにPEが含まれることの記載がある。

米国特許第5.506.343(特許文献20)の請求項12に脱糖鎖(Unglycosylated)DF3抗体とトキシンの結合物作成について、記述においてトキシんにPEが含まれる記載がある。

米国特許第5.045.451(特許文献21)の請求項1にCD2, CD3, CD5, CD7, CD8, グリコフォリン(Glycophorin), Thy1.1, CD22抗体とトキシンの結合物作成について、記述においてトキシんにPEが含まれる記載がある。

米国特許第4.806.494(特許文献22)の請求項2に卵巣癌(OVB-3)抗体とPEの結合物作成の記載がある。

米国特許第4.545.985(特許文献23)の請求項3にTAC、トランスフェリンリセプター抗体とPEとの結合物作成の記載がある。

ヨーロッパ特許WO9964073(特許文献24)の請求項2にHIVGP120抗体と遺伝子改変PEの結合物作成の記載がある。

ヨーロッパ特許NZ336576(特許文献25)の要約にEGP2, MUC1, MUC2, MUC3抗体とPEの結合物作成の記載がある。

ヨーロッパ特許CN1330081(特許文献26)の要約にHIV抗体とリコンビナントPEの結合物作成の記載がある。

ヨーロッパ特許WO9713529(特許文献27)の請求項1にPE(1-279のアミノ酸残基を欠損)遺伝子と抗体VH遺伝子から生成された蛋白と抗体VH蛋白をS-S結合させた2重鎖リコンビナントトキシンの作成について、請求項に抗体はB1, B3, B5, e23, BR96, Tac, HB21抗体である記載がある。

ヨーロッパ特許WO9841641(特許文献28)の請求項37にCD22抗体VHとPE38遺伝子から作成された蛋白とCD22抗体VL蛋白をS-S結合させた2重鎖リコンビナントイムノトキシンの作成法と実施例8にCD22発現ヒトB細胞腫を移植

10

20

30

40

50

したマウスにおけるそのリコンビナントイムノトキシンの抗腫瘍効果の記載がある。

ヨーロッパ特許第WO9413316(特許文献29)の請求項21に細胞への結合を弱くするためドメイン1に変異を導入、抗体との結合のためドメイン2,3にチスチン(cysteine)残基を付加した遺伝子改変PEと抗体の結合物作成の記載がある。

ヨーロッパ特許第EP0583794(特許文献30)の請求項6にドメイン1Aの細胞結合部位に変異を導入し、ドメインIIのほとんどあるいは1部を欠損させた遺伝子改変PEと抗体の結合物作成の記載がある。

遺伝子改変抗体について：

さらに、抗体のH鎖、L鎖の抗原結合部位とトキシンのDNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌内で蛋白を産生させることにより、単鎖リコンビナントイムノトキシンを作成することができる。(Haasan R et al. Antitumor activity of SS(dsFv)PE38 and SS1(dsFv)PE38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro. Clin Cancer Res. 2002 Nov; 8(11): 3520-6)(非特許文献7)

10

通常、単鎖リコンビナントイムノトキシンはH鎖とL鎖の間にアミノ酸15程度を翻訳する介在配列を含む。(Reiter et al. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. Trends Biotechnol. 1998 Dec; 16(12): 513-20)(非特許文献8)

20

さらに、H鎖あるいはL鎖抗原結合部位DNAとトキシンDNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌内で蛋白を作成し、別にL鎖あるいはH鎖抗原結合部位DNAから蛋白を作成し、これらの蛋白をS-S結合にて結合させた2重鎖リコンビナントイムノトキシンの作製がある。(Brinkmann et al. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(16): 7538-42)(非特許文献9)

キメラ化抗体、ヒト化抗体について：

30

マウス免疫グロブリンの抗原結合部位(Fab部分)DNAとヒト由来の免疫グロブリンFc部分DNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌に産生させたキメラ抗体はヒトにおいて、マウス抗体部分に対する抗体の産生が少なく、臨床投与に有用である記載がある。(Smith et al. Rituximab(monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. Oncogene. 2003; 22(47): 7359-68)(非特許文献10)

さらに、マウスFab部分のCDR1,2,3でヒト免疫グロブリンのCDR1,2,3をおきかえたヒト化抗体はマウス抗体部分に対する抗体の産生が少なく、臨床投与に有用である記載がある。(Kipriyanov. Generation and production of engineered antibodies. Mol Biotechnol. 2004; 26(1): 39-60)(非特許文献11)

40

リポソームについて：

薬剤の輸送システムとして、脂質膜で薬剤を包むリポソームの投与が試みられている。さらに、薬剤の特異的な細胞輸送のために、リポソーム内に薬剤に加えて細胞に特異的に結合する抗体も含まれる。(Gabizon et al. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies. Bioconj Chem. 1999; 10(2): 289-98)(非特許文献12)

50

葉酸リセプターベータ (FR -) を介したドラッグデリバリーシステムは葉酸リセプターアルファ (FR -) の場合と同様に有用であることが推測され、葉酸リポソームにモモルデン、サポリン等の毒素や抗癌剤をもちいたインビトロ (in vitro) の研究がある。(Pan XQ et al. Antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal doxorubicin in a KB oral carcinoma murine xenograft model. Pharm Res. 2003 Mar; 20(3): 417-22) (非特許文献13)、(Sudimack et al. Targeted drug delivery via the folate receptor. Adv Drug Deliv Rev. 2000 Mar 30; 41(2): 147-62) (非特許文献14)

10

関節リウマチについて:

本発明者らは活性化されたマクロファージや関節リウマチ滑膜マクロファージにおいて葉酸リセプターベータ (FR -) の発現増強を報告した。(Nakashima-Matsushita et al. Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999; 42(8): 1609-16) (非特許文献15)

20

RA滑膜炎の治療に効果的な薬剤である金剤やメソトレキサートの作用機序として、単球、マクロファージの遊走・活性化を抑制する作用の報告がある。

(Yamashita et al. Effects of chrisotherapeutic gold compounds on prostaglandin E2 production. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2003 Sep; 2(3): 216-23.) (非特許文献16)、(Bondeson J. The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. Gen Pharmacol. 1997 Aug; 29(2): 127-50) (非特許文献17)

30

最近、抗TNF - 抗体療法がRAに著効を示す報告があるが、その作用機構としてマクロファージ細胞膜表面のTNF - を介した抗体依存性細胞傷害機構が推測される。(Maini RN et al. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? Arthritis Res. 2002; 4 Suppl 2: S22-8. Epub 2002 Mar 27) (非特許文献18)

また、ラット実験的関節炎において、関節炎局所の葉酸の取り込みが増加しており、この取り込みは葉酸リセプターベータ (FR -) 発現細胞によることが推測されている。(Turk et al. Folate-target imaging of activated macrophages in rats with adjuvant-induced arthritis. Arthritis Rheum 2002 Jul. 46(7): 1947-55) (非特許文献19)、(Paulos CM et al. Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. Adv Drug Deliv Rev 2004 Apr: 56(8): 1205-17) (非特許文献20)

40

本発明者らは、葉酸リセプターベータ (FR -) に特異性のある葉酸拮抗剤

50

Ly309887がマウス実験的関節炎を抑制することを報告した。(Nagayoshi et al. Ly309887, antifolate via the folate receptor suppresses murine type II collagen induced arthritis. Clin Exp Rheumatol 2003 Nov-Dec; 21(6): 719-25) (非特許文献21)

RAの治療を目的としたイムノトキシンとして、すでにヒトへの投与がなされたものに、IL-2デニリューキンチフトクスがある。(denileukin diftixox), (Strand V et al. Differential patterns of response in patients with rheumatoid arthritis following administration of an anti-CD5 immun conjugate. Clin Exp Rheumatol. 1993 Suppl 8: S161-3) (非特許文献22)

抗CD5抗体リシンA(ricinA)(Fishwild et al. Administration of an anti-CD5 immun conjugate to patients with rheumatoid arthritis: effect on peripheral blood mononuclear cells and in vitro immune function. J Rheumatol. 1994; 21(4): 596-604) (非特許文献23)

また関節腔内に存在するマクロファージ傷害を目的に抗CD64抗体リシンA(ricin A)(van Roon JA et al. Selective elimination of synovial inflammatory macrophages in rheumatoid arthritis by an Fc gamma receptor I-directed immunotoxin. Arthritis Rheum. 2003; 48(5): 1229-38) (非特許文献24)の報告がある。

その他、開示として、米国特許第6,645,495(特許文献31)の請求項7にCD40L抗体ボウガニン(bouganin)作成について、実施例4において活性化T細胞の増殖抑制効果が記載されている。

米国特許第6,346,248(特許文献32)の請求項2にCD80抗体ゲロニン(gelonin)、CD86抗体(gelonin)の自己免疫疾患への適用が記載されている。

マクロファージ活性化症候群について:

マクロファージ活性化症候群では、マクロファージが異常に活性化されたことが病態の中心と考えられる。(Ravelli et al. Macrophage activation syndrome. Curr Opin Rheumatol. 2002 S; 14(5): 548-52) (非特許文献25)

敗血症性ショックについて:

敗血症性ショックは一般的にグラム陰性バクテリア感染の結果として認識されているが、グラム陽性微生物からおそらく真菌、ウイルス及び寄生虫によっても結果として生じ得ることが現在明らかである。微生物自体、その構成物又は産物は宿主細胞、特にマクロファージを誘発し、TNF- α のような炎症性媒介物を放出し、それにより悪液質及び敗血症性ショックを導く出来事のカスケードを開始する。(Evans et al. The role of macrophages in septic shock. Immunobiology. 1996 Oct; 195(4-5): 655-9) (非特許文献26)

急性骨髄性白血病について:

葉酸リセプターベータ(FR- β)の発現は正常な細胞ではほとんどなく、急性骨髄性白血病の一部でFR- β の発現が亢進していることが報告された。(Reddy et al. Expression and functional characterization of the beta-isoform of the folate

10

20

30

40

50

receptor on CD34 (+) cells. Blood. 1999 Jun 1; 93 (11): 3940 - 8) (非特許文献27)

ヨーロッパ特許第WO03072091(特許文献33)の請求項1に、骨髄性白血病細胞のFR- 発現をレチノイン酸で亢進させ、葉酸、薬剤を含むリポソームについて、明細書に急性骨髄性白血病の70%においてFR- の発現がみられ、インビボ(in vitro)において葉酸リポソームに薬剤を加えた組成物は骨髄性白血病細胞の増殖を抑制したことが記載されている。急性骨髄性白血病の治療のためのイムノトキシンとしては2000年にヒト型抗CD33抗体カルケアマイシン(calicheamicin)がFDAで承認され、良い治療効果をあげている。(Giles et al. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. Cancer. 2003 Nov 15; 98 (10): 2095 - 104) (非特許文献28)

10

その他、抗CD30抗体ヂアンチン(dianthin)が報告されている。(Bolognesi et al. Anti-CD30 immunotoxins with native and recombinant dianthin 30. Cancer Immunol Immunother. 1995; 40 (2): 109 - 14) (非特許文献29)

抗CD33抗体ゲロニン(gelonin)が報告されている。(Xu et al. Antileukemic activity of recombinant humanized M195-gelonin immunotoxin in nude mice. Leukemia. 1996; 10 (2): 321 - 6)。(非特許文献30)

20

抗CD33リシン(ricin)が報告されている。(Russa et al. Effects of anti-CD33 blocked ricin immunotoxin on the capacity of CD34+ human marrow cells to establish in vitro hematopoiesis in long-term marrow cultures. Exp Hematol. 1992; 20 (4): 442 - 8) (非特許文献31)

抗CD64抗体PEが報告されている。(Tur. Et al. Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. Cancer Res. 2003; 63 (23): 8414 - 9) (非特許文献32)

30

抗CD64抗体リシン(ricin)が報告されている。(Zhong et al. Cytotoxicity of anti-CD64-ricin a chain immunotoxin against human acute myeloid leukemia cells in vitro and in SCID mice. J Hematother Stem Cell Res. 2001; 10 (1): 95 - 105) (非特許文献33)

抗HIM6抗体シトシン アラビノシドが報告されている(cytosine arabinoside) (Wang et al. [Studies of two conjugates of monoclonal antibody (HIM6) and cytosine arabinoside] Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 1993; 15 (4): 286 - 90) (非特許文献34)。

40

GM-CSF PEが報告されている。(O'Brien et al. A recombinant GM-CSF-PE40 ligand toxin is functionally active but not cytotoxic to cells. Immunol Cell Biol. 1997; 75 (3): 289 - 94) (非特許文献35)

50

GM-CSFジフテリアトキシンが報告されている。(Diphtheria toxin)(Hall et al. DT388-GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1999; 13(4): 629-33) (非特許文献36)

IL-3ジフテリアトキシンが報告されている。(Diphtheria toxin)(Black et al. Diphtheria toxin-interleukin-3 fusion protein(DT(388)IL3)prolongs disease-free survival of leukemic immunocompromised mice. *Leukemia*. 2003; 17(1): 155-9) (非特許文献37)

IL-9 PEが報告されている。(Klimka et al. A deletion mutant of Pseudomonas exotoxin-A fused to recombinant human interleukin-9(rhIL-9-ETA') shows specific cytotoxicity against IL-9-receptor-expressing cell lines. *Cytokines Mol Ther*. 1996; 2(3): 139-46) (非特許文献38)のインビトロ(in vitro),エクソビボ(exo vivo)での効果が報告されている。

文献リスト:

- 【特許文献1】米国特許第6,703,488号公報
- 【特許文献2】米国特許第6,703,020号公報
- 【特許文献3】米国特許第6,696,064号公報
- 【特許文献4】米国特許第6,689,869号公報
- 【特許文献5】米国特許第6,417,337号公報
- 【特許文献6】米国特許第6,395,276号公報
- 【特許文献7】米国特許第6,348,581号公報
- 【特許文献8】米国特許第6,346,248号公報
- 【特許文献9】米国特許第6,319,891号公報
- 【特許文献10】米国特許第6,312,694号公報
- 【特許文献11】米国特許第6,287,562号公報
- 【特許文献12】米国特許第6,267,960号公報
- 【特許文献13】米国特許第6,074,644号公報
- 【特許文献14】米国特許第6,033,876号公報
- 【特許文献15】米国特許第5,980,895号公報
- 【特許文献16】米国特許第5,840,854号公報
- 【特許文献17】米国特許第5,817,313号公報
- 【特許文献18】米国特許第5,776,427号公報
- 【特許文献19】米国特許第5,759,546号公報
- 【特許文献20】米国特許第5,506,343号公報
- 【特許文献21】米国特許第5,045,451号公報
- 【特許文献22】米国特許第4,806,494号公報
- 【特許文献23】米国特許第4,545,985号公報
- 【特許文献24】ヨーロッパ特許第WO9964073号公報
- 【特許文献25】ヨーロッパ特許第NZ336576号公報
- 【特許文献26】ヨーロッパ特許第CN1330081号公報
- 【特許文献27】ヨーロッパ特許第WO9713529号公報

10

20

30

40

50

- 【特許文献28】ヨーロッパ特許第WO9841641号公報
- 【特許文献29】ヨーロッパ特許第WO9413316号公報
- 【特許文献30】ヨーロッパ特許第EP0583794号公報
- 【特許文献31】米国特許第6,645,495号公報
- 【特許文献32】米国特許第6,346,248号公報
- 【特許文献33】ヨーロッパ特許第WO03072091号公報
- 【非特許文献1】Kohler et al. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7; 256(5517): 495-7. 10
- 【非特許文献2】(35) Ogata et al. Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. *J Biol Chem*. 1992; 267(35): 25396-401.
- 【非特許文献3】Kreitman. Chimeric fusion proteins - Pseudomonas exotoxin-based. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 2(9): 1282-93. 20
- 【非特許文献4】Pastan I. Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52(5): 338-41.
- 【非特許文献5】Trail et al. Monoclonal antibody drug immunconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 May; 52(5): 328-37.
- 【非特許文献6】Milenic DE. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr Pharm Des*. 2002; 8(19): 1749-64. 30
- 【非特許文献7】Haasan R et al. Antitumor activity of SS(dsFv)PE38 and SS1(dsFv)PE38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro. *Clin Cancer Res*. 2002 Nov; 8(11): 3520-6.
- 【非特許文献8】Reiter et al. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol*. 1998 Dec; 16(12): 513-20. 40
- 【非特許文献9】Brinkmann et al. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(16): 7538-42.
- 【非特許文献10】Smith et al. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47): 7359-68.
- 【非特許文献11】Kipriyanov. Generation and produ 50

ction of engineered antibodies. *Mol Biotechnol*. 2004; 26(1): 39-60.

【非特許文献12】 Gabizon et al. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies. *Bioconjug Chem*. 1999; 10(2): 289-98.

【非特許文献13】 Pan XQ et al. Antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal doxorubicin in a KB oral carcinoma murine xenograft model. *Pharm Res*. 2003 Mar; 20(3): 417-22.

10

【非特許文献14】 Sudimack et al. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Mar 30; 41(2): 147-62.

【非特許文献15】 Nakashima-Matsushita et al. Selective expression of folate receptor beta and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(8): 1609-16.

20

【非特許文献16】 Yamashita et al. Effects of chrysotherapeutic gold compounds on prostaglandin E2 production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003 Sep; 2(3): 216-23.

【非特許文献17】 Bondeson J. The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. *Gen Pharmacol*. 1997 Aug; 29(2): 127-50.

30

【非特許文献18】 Maini RN et al. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res*. 2002; 4 Suppl 2: S22-8.

【非特許文献19】 Turk et al. Folate-targeted imaging of activated macrophages in rats with adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2002 Jul. 46(7): 1947-55.

【非特許文献20】 Paulos CM et al. Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 Apr: 56(8): 1205-17.

40

【非特許文献21】 Nagayoshi et al. Ly309887, antifolate via the folate receptor suppresses murine type II collagen induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003 Nov-Dec: 21(6): 719-25.

【非特許文献22】 Strand V et al. Differential patterns of response in patients with rheum

50

atoid arthritis following administration of an anti-CD 5 immun conjugate. Clin Exp Rheumatol. 1993 Suppl 8: S161-3

【非特許文献23】Fishwild et al. Administration of an anti-CD5 immun conjugate to patients with rheumatoid arthritis: effect on peripheral blood mononuclear cells and in vitro immune function. J Rheumatol. 1994; 21(4): 596-604.

【非特許文献24】van Roon JA et al. Selective elimination of synovial inflammatory macrophages in rheumatoid arthritis by an Fc gamma receptor I-directed immunotoxin. Arthritis Rheum. 2003; 48(5): 1229-3.

10

【非特許文献25】Ravelli et al. Macrophage activation syndrome. Curr Opin Rheumatol. 2002 S; 14(5): 548-52.

【非特許文献26】Evans. The role of macrophages in septic shock. Immunobiology. 1996 Oct; 195(4-5): 655-9.

20

【非特許文献27】Reddy et al. Expression and functional characterization of the beta-isof orm of the folate receptor on CD34(+) cells. Blood. 1999 Jun 1; 93(11): 3940-8.

【非特許文献28】Giles et al. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. Cancer. 2003 Nov 15; 98(10): 2095-104.

【非特許文献29】Bolognesi et al. Anti-CD30 immunotoxins with native and recombinant dithin 30. Cancer Immunol Immunother. 1995; 40(2): 109-14.

30

【非特許文献30】Xu et al. Antileukemic activity of recombinant humanized M195-gelolin immunotoxin in nude mice. Leukemia. 1996; 10(2): 321-6.

【非特許文献31】Russa et al. Effects of anti-CD33 blocked ricin immunotoxin on the capacity of CD34+ human marrow cells to establish in vitro hematopoiesis in long-term marrow cultures. Exp Hematol. 1992; 20(4): 442-8.

40

【非特許文献32】Tur. Et al. Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. Cancer Res. 2003; 63(23): 8414-9.

【非特許文献33】Zhong et al. Cytotoxicity of anti-CD64-ricin a chain immunotoxin against human acute myeloid leukemia cells in v

50

itro and in SCID mice. J Hematother Stem Cell Res. 2001; 10(1): 95-105.

【非特許文献34】Wang et al. [Studies of two conjugates of monoclonal antibody (HIM6) and cytosine arabinoside] Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 1993; 15(4) 1286-90.

【非特許文献35】O'Brien et al. A recombinant GM-CSF-PE40 ligand toxin is functionally active but not cytotoxic to cells. Immunol Cell Biol. 1997; 75(3): 289-94.

【非特許文献36】Hall et al. GM-CSF Diphtheria toxin (DT388-GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia. Leukemia. 1999; 13(4): 629-33.

【非特許文献37】Black et al. Diphtheria toxin-interleukin-3 fusion protein (DT(388)IL3) prolongs disease-free survival of leukemic immunocompromised mice. Leukemia. 2003; 17(1): 155-9.

【非特許文献38】Klimka et al. A deletion mutant of Pseudomonas exotoxin-A fused to recombinant human interleukin-9 (rhIL-9-ETA') shows specific cytotoxicity against IL-9-receptor-expressing cell lines. Cytokines Mol Ther. 1996; 2(3): 139-46.

【発明の開示】

しかしながら、非特許文献1を有効活用してIgG型FR-単クローン抗体を作成した報告はない。さらに、非特許文献2、非特許文献3を有効に活用して遺伝子改変PEとFR-単クローン抗体の結合物であるイムノトキシン作成の報告はなく、本発明はFR-単クローン抗体PEの作成を課題とする。

また、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6を有効に活用してPE以外のトキシンとFR-単クローン抗体の結合物であるイムノトキシン作成の報告はなく、本発明はFR-単クローン抗体イムノトキシンの作成を課題とする。

これまでリコンビナントPEを使用した多数のイムノトキシンが開示され、インビボ(in vitro)、インビトロ(in vivo)において種々の疾患での有効性が示されている。しかしながら、特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5、特許文献6、特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11、特許文献12、特許文献13、特許文献14、特許文献15、特許文献16、特許文献17、特許文献18、特許文献19、特許文献20、特許文献21、特許文献22、特許文献23、特許文献24、特許文献25、特許文献26、特許文献27、特許文献28、特許文献29、特許文献30は活性化マクロファージのみを標的としたイムノトキシンではなく、活性化マクロファージが病態の中心である疾患においては効果が得られない問題点があり、本発明は活性化マクロファージが病態の中心である疾患において、有効な効果を示すFR-単クローン抗体イムノトキシンの作成を課題とする。

抗体のH鎖、L鎖の抗原結合部位とトキシンのDNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌内で蛋白を産生させることにより、単鎖リコンビナントイムノトキシン、2重鎖リコン

10

20

30

40

50

ピナントイムノトキシンを作成することができる。リコンビナントイムノトキシンは分子量が小さいため細胞内に入りやすく、しかも化学的に抗体とトキシンの結合物を作成するのに比べて、大量な精製が可能であるという利点を有する。

これまで、F R - 単クローン抗体のH鎖、L鎖の遺伝子配列が明らかでないため、非特許文献7、非特許文献8を有効に活用してF R - 単クローン抗体単鎖リコンビナントイムノトキシンの作成や非特許文献9を有効に活用してF R - 抗体2重鎖リコンビナントイムノトキシン作成の報告はなく、本発明はF R - 単クローン抗体単鎖リコンビナントイムノトキシン、F R - 抗体2重鎖リコンビナントイムノトキシン作成のためのF R - 単クローン抗体のH鎖、L鎖の遺伝子配列を決定することを課題とする。

キメラ抗体はヒトにおいて、マウス抗体部分に対する抗体の産生が少なく、臨床投与に有用であることが記載されている。これまで、F R - 単クローン抗体のH鎖、L鎖の遺伝子配列が明らかでないため、非特許文献10を有効に活用したキメラ抗体作成の報告はなく、本発明はF R - 単クローン抗体のキメラ抗体作成のために、F R - 単クローン抗体のH鎖、L鎖の遺伝子配列を決定することを課題とする。

さらに、マウスF a b部分のC D R 1、2、3でヒト免疫グロブリンのC D R 1、2、3をおきかえたヒト化抗体はマウス抗体部分に対する抗体の産生が少なく、臨床投与に有用であることが記載されている。

これまで、F R - 単クローン抗体のH鎖、L鎖の遺伝子配列が明らかでないため、非特許文献11を有効に活用してヒト化抗体作成の報告はなく、本発明はF R - 単クローン抗体のヒト化抗体作成のために、F R - 単クローン抗体のH鎖、L鎖の遺伝子配列を決定することを課題とする。

薬剤の特異的な細胞輸送のために、リポソーム内に薬剤に加えて細胞に特異的に結合する抗体の利用は治療法として有用であるが、これまで、非特許文献12、非特許文献13、非特許文献14を有効に活用してリポソーム作成にF R - 単クローン抗体を利用した報告はなく、本発明はF R - 単クローン抗体を含むリポソーム作成のための、F R - 単クローン抗体の作成を課題とする。

関節リウマチの病態に活性化マクロファージの役割が知られ、マクロファージ活性化制御を目的とした治療の有効性を示す非特許文献15、非特許文献16、非特許文献17、非特許文献18の報告があるが、これらの治療はイムノトキシンではなく、細胞の死滅や除去能において問題点がある。

また、非特許文献19、非特許文献20は葉酸とアイソトープの結合物の使用であり、しかもこの結合物の治療効果が示されていない点に問題があり、本発明はF R - 単クローン抗体結合物による関節リウマチの活性化マクロファージ活性化制御を課題とする。また、本発明者らによる非特許文献21は葉酸リセプターベータ(F R -)に結合する薬剤が関節炎マウスに有効を示す報告であるが、F R - 単クローン抗体結合物を使用した報告でなく、本発明はF R - 単クローン抗体結合物による関節リウマチの活性化マクロファージ活性化制御を課題とする。

これまで、関節リウマチの治療を目的としたイムノトキシンとして非特許文献22、非特許文献23、非特許文献24、特許文献31、特許文献32が報告されているが、それらの作用の標的には、リンパ球や活性化されていないマクロファージも含まれており、活性化マクロファージ活性化のみの制御ではないため、種々の副作用の問題点がある。さらに、トキシンとしてP E以外のトキシンが使用されており、トキシンとしてのP Eの作用が明らかでない。本発明はF R - 単クローン抗体イムノトキシン、特にF R - 単クローン抗体P Eによる関節リウマチの活性化マクロファージ活性化制御を課題とする。

マクロファージ活性化症候群では、非特許文献25においてマクロファージが異常に活性化されたことが病態の中心と報告され、活性化マクロファージの死滅あるいは除去が望ましいが、非特許文献25ではその治療法としてイムノトキシンに言及していない問題点がある。本発明はF R - 単クローン抗体トキシンによる敗血症性ショックの治療を課題とする。

敗血症ショックでは、非特許文献26においてマクロファージが異常に活性化されたこ

10

20

30

40

50

とが病態の中心と報告され、活性化マクロファージの死滅あるいは除去が望ましいが、非特許文献 26 ではその治療法としてイムノトキシンに言及していない問題点がある。本発明は F R - 単クローン抗体イムノトキシンによる敗血症性ショックの治療を課題とする。

急性骨髄性白血病の一部で葉酸リセプターベータ (F R -) の発現が亢進していることが報告され、非特許文献 27、特許文献 33 において、葉酸、薬剤を含むリポソームが急性骨髄性白血病の増殖抑制した報告があるが、葉酸のリセプターには F R - もあり、このリポソームは F R - 発現細胞に特異的な作用する治療ではなく、種々の副作用の問題点がある。また、白血病細胞においては薬剤耐性がおこることが知られており、薬剤の併用が望ましい。本発明は F R - 単クローン抗体をふくむリポソームによる F R - 発現急性骨髄性白血病細胞に特異的な急性骨髄性白血病の治療を課題とする。急性骨髄性白血病の治療のためのイムノトキシンとしては非特許文献 28、非特許文献 29、非特許文献 30、非特許文献 31、非特許文献 32、非特許文献 33、非特許文献 34、非特許文献 35、非特許文献 36、非特許文献 37、非特許文献 38 の効果が報告されているが、リガンドとして使用された単クローン抗体やサイトカインは急性骨髄性白血病特異的に結合するものではないため、いずれも F R - 単クローン抗体の使用ではなく、種々の副作用の問題点がある。また白血病細胞においては、表面抗原の消失や薬剤耐性がおこることが知られており、また、薬剤の併用が望ましい。

本発明は、急性骨髄性白血病の治療のための F R - 単クローン抗体、とくに I g G 型 F R - 単クローン抗体を提供する。

本発明は、F R - 単クローン抗体イムノトキシンによる F R - 発現急性骨髄性白血病細胞に特異的な急性骨髄性白血病の治療を課題とする。

本発明は、マクロファージの前駆細胞である単球や活性化されていないマクロファージには作用せず、活性化マクロファージ細胞や急性骨髄性白血病細胞を傷害する新規物質を見出し、この物質の新しい作用機序によって、従来の治療薬では充分治療効果が得られなかった疾患の治療や、従来の治療薬との併用により、さらに治療効果が高まるような治療剤を提供しようとするものである。

本発明の一つの目的は、活性化マクロファージや白血病細胞表面に存在するヒト F R - 抗原に対して結合能を有し、F R - 発現細胞への結合により細胞死を誘導する単クローナル抗体と、毒性分子とを有するイムノトキシンを提供することにある。

本発明のほかの目的は、F R - 抗原に対する前記イムノトキシンの結合により、F R - 発現細胞を除去し、局所的な炎症応答を抑制することにより、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、マクロファージ活性化症候群、敗血症ショックのようなマクロファージ活性化が病態の中心である疾患を治療する方法を提供することである。この方法は、治療を必要とする患者に対して、活性化マクロファージ細胞表面上のヒト F R - 抗原に対して結合能を有するイムノトキシンを、製剤学的に適合性のある賦型剤とともに、治療上の有効量を投与することを含む。

本発明の他の目的は、F R - 抗原に対する前記イムノトキシンの結合により、F R - 発現腫瘍細胞が除去されることにより、白血病を治療する方法を提供することである。この方法は、治療の必要な患者に対して、骨髄球由来の腫瘍細胞表面上の F R - に対して結合能を有するイムノトキシンを、製剤学的に適合性のある賦型剤とともに、治療上の有効量を投与することを含む。

本発明の他の目的は、F R - 単クローン抗体のリコンビナントイムノトキシン、キメラ抗体、ヒト化抗体の作成のために、F R - 単クローン抗体の遺伝子の配列に関する知見を提供することである。

葉酸リセプターベータ (F R -) は骨髄系細胞以外に発現せず、しかも健常人の細胞での発現は低い。そこで、F R - 抗原に対する抗体を利用した治療法は有用と考えられるが、F R - 抗原に対する高親和性の I g G 型抗 F R - 単クローン抗体作成の報告はみられない。現在までのところ、F R - 発現活性化マクロファージをマクロファージ活性化が病態の中心である疾患において除去するために F R - 単クローン抗体を使用する

10

20

30

40

50

ことは提案されていない。また、F R - 発現白血病細胞を白血病において除去するためにF R - 単クローン抗体を使用することは提案されていない。

本発明者は、葉酸リセプターベータ (F R -) はマクロファージの前駆細胞である単球や活性化されていないマクロファージには発現しておらず、活性化マクロファージや急性骨髄性白血病細胞のみに発現しており、F R - 発現細胞が病態に關与している疾患において、F R - 単クローン抗体を利用した活性化マクロファージや急性骨髄性白血病細胞の死滅や除去を目的とした治療法は有効と考えて、鋭意研究の結果、活性化マクロファージに特異的な葉酸リセプターベータ (F R -) に対する単クローナル抗体を新たに作成し、次いでこの抗体にトキシンを結合させたイムノトキシンを作成したことにより発明を完成し、上記課題を解決した。

10

すなわち本発明は、F R - 抗原に対する抗体とトキシンとの結合体 (イムノトキシン) が、効果的に、F R - 分子を発現する細胞を死滅させるという検討結果に基づいている。これらのF R - 単クローン抗体イムノトキシンは、葉酸リセプターベータ (F R -) を発現する細胞によって仲介される疾患や症状を予防しあるいは治療するために用いられると考えて、F R - 単クローン抗体イムノトキシンを有効成分とする、とくにI g G型単クローナル抗体と遺伝子改変緑膿菌毒素との結合物であるイムノトキシンが低濃度で活性化マクロファージ細胞を傷害することや葉酸リセプターベータ発現骨髄性白血病細胞の増殖を阻害する作用機構によって、マクロファージが病態の中心となる疾患または白血病の新規な治療剤を実現したものである。

本明細書において使用する「抗体」の語は、多クローン抗体、単クローン抗体、人体に適合させた抗体、単鎖抗体、及び、F a bフラグメントや、F (a b) ' 2フラグメント、F vフラグメント等のこれらの抗体のフラグメントや、親抗体の抗原結合能を維持しているその他のフラグメントを意味する。

20

本明細書において用いる「単クローン抗体」の語は、単一の抗体集団を構成する抗体群を意味する。この語は、その抗体の種や起源に関して限定されないし、抗体の製造方法によっても限定されることを意図するものでもない。この語は、完全なイムノグロブリンの他、F a bフラグメントやF (a b) ₂フラグメント、F vフラグメント及び、抗体の抗原結合能を維持するその他のフラグメントを包含するものである。哺乳類、鳥類の単クローン抗体も、この発明において使用できる。

この明細書において使用する単鎖抗体の語は、結合性のある抗体の結合領域 (H鎖及びL鎖の双方) を決定し、結合性が維持されるような結合部位を付与することによって調製される抗体をいうものとする。これにより、本質的に抗原に結合するための必要な可変領域部位のみを有する、徹底的に簡略化された抗体が形成される。この明細書において使用する「2重鎖抗体」の語は、結合性のある抗体の結合領域 (H鎖及びL鎖の双方) を決定し、H鎖あるいはL鎖とL鎖あるいはH鎖をs - s結合することによって調製される抗体をいうものとする。これにより、本質的に抗原に結合するための必要な可変領域部位のみを有する、徹底的に簡略化された抗体が形成される。

30

本発明にいうイムノトキシン (I T) とは、細胞に結合するリガンドが、トキシンあるいはそのサブユニットに結合されたキメラ分子をいうものとする。イムノトキシンのトキシン部分は、植物や細菌等の各種起源に由来するが、ヒト起源のトキシンや合成トキシン (薬剤) も同様に用いることができる。

40

好ましくは、トキシン部分は、1型や2型のリボソーム不活性化タンパク質 (R I P) のような植物毒素由来である。2型のリボソーム不活性化タンパク質は、例えば、リシンを含んでいる。1型のR I Pは、特に、この発明によってイムノトキシンを構築するのに都合がよい。1型のR I Pとしては、細菌性毒素の例としては、シュドモナス エクソトキシン (P E) 、ジフテリアトキシンがある。その他、ブリオディン (b r y o d i n) 、モモルジン (m o m o r d i n) 、ゲロニン (g e l o n i n) 、サポリン (s a p o r i n) 、ボウガニン (b o u g a n i n) がある。

I Tのリガント部分は、通常、選択された標的細胞に結合する単クローン抗体をいう。本発明で使用するI Tの部分は、細菌由来のトキシン シュドモナス イムノトキシンP

50

*seudomonas exotoxin (PE)*である。具体的にはADPリボシル化活性および細胞膜を介してトランスロケーションする能力を具備する。さらに具体的にはPEはアミノ酸配列279と280が切断されることにより活性型となり、天然の毒素の受容体結合ドメインIaを欠いたPEをコードするDNAを含有する発現プラスミドを大腸菌に遺伝子導入することにより作成できる。

本発明にいうPE結合リコンビナントイムノトキシンは細胞表面に結合するIaドメインが欠損し、アミノ酸配列280から始まり、C末端部位に細胞障害能を増加させるため、KDEL、REDLKが付加されている。具体的にはトキシンが細胞に対して結合活性のないことは、非特異的な毒性を顕著に低下させる。さらに具体的には遺伝子改変されたPEは、改変されていないPEに比較して、インビトロ(*in vitro*)でヒトまたは動物細胞に対してより低い毒性を示し、かつ、インビトロ(*in vivo*)で投与した場合に肝臓に対してより低い毒性を具備する。

10

さらに、本発明でいう単鎖リコンビナントイムノトキシンとは抗体のH鎖、L鎖の抗原結合部位とトキシンのDNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌内で蛋白を産生させることにより作成される蛋白をいう。具体的には通常、単鎖リコンビナントイムノトキシンはH鎖とL鎖の間にアミノ酸15程度を翻訳する介在配列を含むものをいう。(Reiter et al. Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. Trends Biotechnol. 1998 Dec; 16(12): 513-20)

20

本発明でいう2重鎖リコンビナントイムノトキシンとは、H鎖あるいはL鎖抗原結合部位DNAとトキシンDNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌内で蛋白を作成し、別にL鎖あるいはH鎖抗原結合部位DNAから蛋白を作成し、これらの蛋白をS-S結合にて結合させたものをいう。(Brinkmann et al. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(16): 7538-42)

本発明でいうキメラ化抗体とは、マウス免疫グロブリンの抗原結合部位(Fab部分)DNAとヒト由来の免疫グロブリンFc部分DNAを遺伝子操作にて結合させ、大腸菌に産生させたものをいう。(Smith et al. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. Oncogene. 2003; 22(47): 7359-68)

30

本発明でいうヒト化抗体とはマウスFab部分のCDR1、2、3でヒト免疫グロブリンのCDR1、2、3をおきかえたものをいう。(Kipriyanov. Generation and production of engineered antibodies. Mol Biotechnol. 2004; 26(1): 39-60)

本発明でいうリポソームとは薬剤の輸送システムとして、脂質膜で薬剤を包むものをいう。具体的には、薬剤の特異的な細胞輸送のために、リポソーム内に薬剤に加えて細胞に特異的に結合する抗体が含まれるものをいう。(Gabizon et al. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: *in vitro* studies. Bioconj Chem. 1999; 10(2): 289-98)

40

本発明でいう生物学的、化学的に活性のある酵素とは凝固系に作用するウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノゲン、スタフィロキナーゼ、トロンピンや蛋白分解酵素であるメタロプロテアーゼ、コラゲナーゼ、グラチナーゼ、ストロメラysinが挙げられる。

本発明でいうサイトカインとは抗腫瘍作用のあるインターフェロン、TGF-、TNF-や血管新生抑制作用のあるエンドスタチンや抗炎症作用やあるIL-1リセプターアンタゴニスト、IL-4、IL-10、IL-19、IL-20、IL-22、IL-2

50

4、IL-26、IL-28、IL-29が挙げられる。

本発明でいうアイソトープとはガリウム67、ガリウム68、インジウム111、インジウム113、イオデイン123、イオデイン125、イオデイン131、テクネシウム99、イットリウム90、ルビジウム97、ルビジウム103が挙げられる。

本発明でいう化学療法剤とは細胞障害能のある分子をいう。具体的には代謝拮抗剤であるシトシンアラビノシド(cytosine arbinoside)、フルオロウラシル(fluorouracil)、メソトレキサート(methotrexate)、アミノプテリン(aminopterin)、アンスラサイクリン(anthracycline)、マイトマイシン(mitomycin)、デメコルシン(demecolcine)、エトポシド(etoposide)、ミスラマイシン(mithramycin)、アルキル化剤であるクロラムブチル(chlorambucil)、メルファラン(melpharan)、エンドキサン(endoxan)、DNA合成阻害剤であるダウノルビシン(daunorubicin)、ドキシソルビシン(doxorubicin)、アドリアマイシン(adriamycin)、チュブリン(tubulin)阻害薬剤であるコルヒチン(colchicine)、タキサン(taxane)、ビンブラスチン(vinblastine)、ビンブラスチン(vincristine)のようなビンカアルカロイド(vinca alkaloid)が挙げられる。

本発明でいう葉酸リセプターベータ(FR-)は、活性化マクロファージや急性骨髄性白血病に発現する表面抗原であり、葉酸の細胞内輸送に関与する分子をいう。本発明でいう関節リウマチ(RA)とは多発性の関節の腫脹、疼痛を症状とする慢性の炎症性疾患であり、RA滑膜に存在するマクロファージ様細胞がIL-1B、IL-6、IL-8、IL-10、IL-15、MCP-1、MIP-1A、TNF-A、M-CSF、GM-CSF、TGF-B、VEGF、PDGFなどのサイトカインやIL-1と拮抗するIL-1リセプターアンタゴスト、NO、活性酸素、各種カテプシン、各種メタロプロテアーゼなどを産生し、関節の骨破壊を特徴とする疾病をいう。

本発明でいう若年性関節リウマチ(JRA)は、16才未満に発症した慢性関節炎を主体として多彩な関節外症状を伴う原因不明の疾患である。具体的にはJRAは全身型、多関節型および少関節型の3つの型に分類されており、全身型は、40~平熱までの弛張熱、発疹、全身性のリンパ節腫脹、肝脾腫、心膜炎や胸膜炎などを示し、多関節型は、皮下結節を伴うことも多く、発熱、倦怠感などの全身症状、成長障害や体重減少も見られ、少関節炎においては虹彩炎が起こり、視力低下や失明することがある。

本発明でいうマクロファージ活性化症候群とは発熱、汎血球減少、肝機能障害、播種性血管内凝固、骨髄における血球貪食像を示す病態である。具体的には、高サイトカイン血症特に、TNF-の高値を示し、マクロファージ活性化が病態の中心である。(Ravelli et al. Macrophage activation syndrome. Curr Opin Rheumatol. 2002 S; 14(5): 548-52)

本発明でいう敗血症性ショックとは一般的にグラム陰性バクテリア感染の結果として認識されているが、グラム陽性微生物からもおそらく真菌、ウイルス及び寄生虫によっても結果として生じ得ることが現在明らかである。

本発明でいう急性骨髄性白血病とは骨髄球の異常増殖であり、治療抵抗なものは感染、出血で死亡する。具体的にはFR-を発現している急性骨髄性白血病である。(Russet al. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. Cancer. 1999 Jan 15; 85(2): 348-57)

本発明は、FR-単クローン抗体である。IgG型であるものも本発明に含まれる。本発明のFR-単クローン抗体には、マウスをFR-発現B300-19細胞で免疫した後、そのマウスの脾細胞と、マウスミエロマ細胞とを融合させて得られたクローン36(clone 36)細胞から産生されたものも含まれる。本発明のFR-単クロ

10

20

30

40

50

ーン抗体には、マウスをFR - 発現B300 - 19細胞で免疫した後、そのマウスの脾細胞と、マウスミエローマ細胞とを融合させて得られたクローン94b (clone 94b) 細胞から産生されたものも含まれる。

本発明は、FR - 単クローン抗体産生クローン36 (clone 36) 細胞のH鎖とL鎖の遺伝子、およびその遺伝子によりコードされる蛋白質である。なおその遺伝子または蛋白質と実質的に同等の生物学的活性を有するバリエーションも本発明に含まれる。このクローン36 (clone 36) 細胞のH鎖の遺伝子、およびL鎖の遺伝子をキメラ化することにより得られた、ヒト化したFR - 単クローン抗体も本発明に含まれる。

本発明は、FR - 単クローン抗体産生クローン94b (clone 94b) 細胞のH鎖とL鎖の遺伝子、およびその遺伝子によりコードされる蛋白質である。なおその遺伝子または蛋白質と実質的に同等の生物学的活性を有するバリエーションも本発明に含まれる。このクローン94b (clone 94b) 細胞のH鎖の遺伝子、およびL鎖の遺伝子をキメラ化することにより得られた、ヒト化したFR - 単クローン抗体も本発明に含まれる。

本発明のFR - 抗体イムノトキシンは、FR - 単クローン抗体とトキシンとを結合したものである。ここで該トキシンは、リシンA鎖 (ricin A chain)、脱糖鎖リシンA鎖 (deglycosylated ricin A chain)、リボソーム不活化蛋白 (aribosome inactivating protein)、アルファサルシン (alpha-sarcin)、ゲロニン (gelonin)、アスペルギリン (aspergillin)、リストリクトシン (restrictocin)、リボヌクレース (ribonuclease)、エピポドフィロトキシン (epipodophyllotoxin)、ジフテリアトキシン (diphtheria toxin)、シュドモナス エクソトキシン (Pseudomonas exotoxin) などであるが、それらに限定されるものではない。

本発明にはclone 36のH鎖の遺伝子と、clone 36のL鎖の遺伝子とを用いたリコンビナントFR - 抗体イムノトキシンも含まれる。

本発明にはクローン94bのH鎖の遺伝子と、クローン94bのL鎖の遺伝子とを用いたリコンビナントFR - 抗体イムノトキシンも含まれる。

本発明には酵素、サイトカイン、アイソトープ、化学療法剤からなる群から選ばれた少なくとも一つの生物学的または化学的に活性のある分子と、FR - 単クローン抗体との結合物も含まれる。

本発明にはFR - 単クローン抗体と化学療法剤とを含むリボソームも含まれる。

本発明には該FR - 抗体イムノトキシン、該結合物、該リボソームから選ばれた少なくとも一つを有効成分とする医薬組成物も含まれる。

本発明には該FR - 抗体イムノトキシン、該結合物、該リボソームから選ばれた少なくとも一つを有効成分とするマクロファージが病態の中心となる疾患の治療剤も含まれる。

本発明にはマクロファージが病態の中心となる疾患が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、マクロファージ活性化症候群、敗血症ショックからなる群から選ばれた疾患である上記の治療剤も含まれる。

本発明には上記の治療剤の投与形態が関節注入剤である関節リウマチまたは若年性関節リウマチの治療剤も含まれる。

本発明には該FR - 抗体イムノトキシン、該結合物、該リボソームからなる群から選ばれた少なくとも一つを有効成分とする白血病の治療剤も含まれる。

本発明には白血病が急性骨髄性白血病である上記の治療剤も含まれる。

本発明のFR - 抗体イムノトキシンは、FR - 発現マクロファージにプログラム化細胞死の一形態であるアポトーシスを発現させる。また、本発明のFR - 抗体イムノトキシンは、FR - 発現B300 - 19細胞に反応し、FR - 発現B300 - 19細胞にプログラム化細胞死の一形態であるアポトーシスを発現させる。

以上説明したように本発明により、マクロファージの前駆細胞である単球や活性化され

10

20

30

40

50

ないていないマクロファージには反応せず、活性化マクロファージや急性骨髄性白血病細胞に反応するFR - 単クローン抗体が作成されたことにより、従来の治療薬では充分治療効果が得られなかった疾患の治療や、従来の治療薬との併用により、さらに治療効果が高まるような治療剤が提供される。

FR - 抗原に高親和性で低分子量のIgG型FR - 単クローン抗体が作成されたことにより、活性化マクロファージや急性骨髄性白血病細胞に対する特異的な治療効果をもつ治療薬が提供される。

IgG型FR - 単クローン抗体クローン36およびクローン94bのH鎖、L鎖の可変領域の遺伝子配列が明らかにされたことにより、キメラ抗体、ヒト化抗体、リコンビナントイムノトキシンの提供が可能になり、これらの結合物は大量生産可能な、また、マウス蛋白に対するアレルギーが少ない治療薬を提供する。

クローン36 (clone 36) 細胞のH鎖の遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号1に示す。なお該塩基配列の下に、それがコートする蛋白質のアミノ酸配列を付記する。クローン36 (clone 36) 細胞のL鎖の遺伝子の塩基配列を、それがコートする蛋白質のアミノ酸配列と共に配列表の配列番号2に示す。クローン94b (clone 94b) 細胞のH鎖の遺伝子配列を、それがコートする蛋白質のアミノ酸配列と共に配列表の配列番号3に示す。クローン94b (clone 94b) 細胞のL鎖の遺伝子配列を、それがコートする蛋白質のアミノ酸配列と共に配列表の配列番号4に示す。

本願明細書において、配列番号1に示す塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号1に示す塩基配列において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換された遺伝子である。また、その様な遺伝子の塩基配列と配列番号1に示す塩基配列とは、90%以上、好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。またその様な遺伝子と配列番号1に示す塩基配列の遺伝子とは、ストリンジユエントな条件下でハイブリッドを形成する。配列番号2ないし配列番号4に示す塩基配列が改変された塩基配列についても同様である。その様な遺伝子も、クローン36 (clone 36) 細胞のH鎖またはL鎖、若しくはクローン94b (clone 94b) 細胞のH鎖またはL鎖と実質的に同等の生物学的活性を有する蛋白質をコードする限り、本発明の範囲内である。

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

また本願明細書において、配列番号1で示される塩基配列によりコードされるアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加された蛋白質とは、配列番号1に示した塩基配列によりコードされるアミノ酸配列 (配列番号1に付記したアミノ酸配列) において、20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下のアミノ酸が置換された蛋白質である。また、その様な蛋白質のアミノ酸配列と配列番号1で示される塩基配列によりコードされるアミノ酸配列とは、95%以上、好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有する。配列番号2ないし配列番号4に示す塩基配列によりコードされるアミノ酸配列が改変されたものについても同様である。その様な蛋白質も、クローン36 (clone 36) 細胞のH鎖またはL鎖、若しくはクローン94b (clone 94b) 細胞のH鎖またはL鎖と実質的に同等の生物学的活性を有する限り、本発明の範囲内である。

本願明細書において「実質的に同等」とは、蛋白質の活性、例えばFR - 抗原に対して特異的に結合するなどの生理学的な活性、生物学的な活性が実質的に同一であることを意味する。その用語の意味の中には実質的に同質の活性を有する場合を含んでもよく、その実質的に同質の活性とは、例えばFR - 抗原に対して特異的に結合するなど、それらの活性の性質が同質であることを意味し、例えば生理的に、薬理的に、あるいは生物学的

10

20

30

40

50

に同質であることを意味する。なお活性の量的な程度も同一であることが好ましいが、定量的な要素については異なってもよい。

本願明細書において「ストリンジエント」なハイブリダイゼーションの条件については当業者が適宜選択をすることができるが、具体的には、一例として、以下の操作によってハイブリダイゼーションを行うことができる。試験すべきDNAまたはRNA分子を転写した膜と標識したプローブを、適用なハイブリダイゼーションバッファー中でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は、例えば、5×SSC、0.1重量% N-ラウロイルサルコシン、0.02重量%のSDS、2重量%の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬及び50%フォルムアミドから成る。核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬としては、一例として、0.1Mマレイン酸と0.15M塩化ナトリウムからなる緩衝液(pH7.5)に市販の核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬を10%になるように溶解したものを使用することができる。20×SSCは、3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸溶液であり、SSCは、より好ましくは、3~6×SSC、更に好ましくは4~5×SSCの濃度で使用する。

ハイブリダイゼーションの温度は、40~80、より好ましくは50~70、更に好ましくは55~65の範囲であり、数時間から一晩のインキュベーションを行った後、洗浄バッファーで洗浄する。洗浄の温度は、好ましくは室温、より好ましくはハイブリダイゼーション時の温度である。洗浄バッファーの組成は6×SSC+0.1重量%SDS溶液、より好ましくは4×SSC+0.1重量%SDS溶液、更に好ましくは2×SSC+0.1重量%SDS溶液、更に好ましくは1×SSC+0.1重量%SDS溶液、最も好ましくは0.1×SSC+0.1重量%SDS溶液である。このような洗浄バッファーで膜を洗浄し、プローブがハイブリダイズしたDNA分子またはRNA分子をプローブに用いた標識を利用して識別することができる。

これまでイムノトキシンは活性化マクロファージのみを標的としたものではなく、活性化マクロファージが病態の中心である疾患においては、副作用や効果が得られない問題点があり、本発明は活性化マクロファージが病態の中心である疾患において、有効な効果を示すイムノトキシンを提供する。

本発明により、活性化マクロファージが病態の中心である疾患の活性化マクロファージに特異的な細胞死や除去能を示す、酵素、サイトカイン、アイソトープ、化学療法薬から選ばれた少なくとも一つとFR-単クローン抗体との結合物が作成され、これらの結合物は新たな治療薬を提供する。

薬剤の特異的な細胞輸送のために、リポソーム内に薬剤に加えて細胞に特異的に結合する抗体の利用は治療法として有用であるが、これまでFR-単クローン抗体を含むものはなく本発明は活性化マクロファージが病態の中心である疾患において、副作用の少ない、新たな作用機構をもったリポソームを提供する。

本発明により、活性化マクロファージが病態の中心である関節リウマチ、若年性関節リウマチ、マクロファージ活性化症候群、敗血症ショックの活性化マクロファージに特異的な細胞死や除去能を示す、トキシン、酵素、サイトカイン、アイソトープ、化学療法薬から選ばれたいずれか一つとFR-単クローン抗体との結合物やFR-単クローン抗体を含むリポソームは副作用の少ない、新たな作用機構をもった治療薬を提供する。

本発明により得られたトキシン、酵素、サイトカイン、アイソトープ、化学療法薬から選ばれたいずれか一つとFR-単クローン抗体との結合物やFR-単クローン抗体を含むリポソームは関節リウマチ、若年性関節リウマチの関節局所への注入が可能であり、関節局所の炎症除去のための新たな治療薬を提供する。

白血病の治療のための治療薬の多くは正常細胞にも作用するため、種々の副作用がある。また、白血病細胞においては表面抗原の消失や薬剤耐性がおこることが知られており、新たな作用機構をもった治療薬が望まれている。本発明により得られたトキシン、酵素、サイトカイン、アイソトープ、化学療法薬から選ばれたいずれか一つとFR-単クローン抗体との結合物やFR-単クローン抗体を含むリポソームはFR-発現白血病細胞に特異的な細胞死や除去能を示すことより、副作用の少ない新たな作用機構をもつ新たな

10

20

30

40

50

治療薬を提供する。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明のFR-抗体の反応性を示す図である。

図2は、本発明のFR-抗体イムノトキシンとトキシンの分離およびそれらの分子のADPリボシル化能を示す図である。ITはイムノトキシンを示す。PEはシウドモナスエキソトキシンを示す。

図3は、本発明のFR-抗体イムノトキシンがトキシンを含むことを示す図である。ITはイムノトキシンを示す。mABはFR-単クローン抗体を示す。PEはシウドモナスエキソトキシンを示す。

図4は、本発明のFR-抗体イムノトキシンによるB300-19細胞の細胞死を示す図である。なお24h、36h、48hはそれぞれ、24時間後、36時間後、48時間後の細胞死を示す。

図5は、マクロファージにアデノベクターによりFR-を発現させた図である。

図6は、本発明のFR-抗体イムノトキシンによるFR-発現マクロファージの細胞死を示す図である。

図7は、関節リウマチ滑膜細胞にFR-が発現していることを示す図である。

図8は、本発明のFR-抗体イムノトキシンによる関節リウマチ滑膜細胞の細胞死を示す図である。

図9は、リコンビナント二重鎖Fv抗FR-PEキメラ抗体のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の図である。

図10は、種々の濃度のリコンビナント二重鎖Fv抗FR-PE抗体によるFR-発現B300-19細胞の細胞死を示す図である。

図11は、種々の濃度のリコンビナント二重鎖Fv抗FR-PE抗体によるFR-発現HL-60の細胞死を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

[FR-発現細胞の作成]

本発明者は以下の方法にてFR-発現B300-19細胞を作成する。まず、pEF-BOSベクターにFR-遺伝子を組み込む。ベクターはpEF-BOSベクターに限らず、哺乳類の発現ベクターのいずれでもよい。次に、FR-遺伝子をリポフェクタミン法にてマウスB300-19細胞に遺伝子導入する。導入法はエレクトロポレーション法でもよい。また、細胞株はマウスBalb/C由来の細胞株であればいずれでもよい。

本発明はこの細胞を免疫することにより、細胞融合法にてFR-抗原に高親和性で低分子量のIgG型FR-単クローン抗体を作成する。抗体と毒素分子とは、各種周知の化学的方法のいずれか、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等の、異なる2価の結合性基を有するクロスリンカーの使用等によって、互いに化学的に結合される。各種イムノトキシンの製造は、当該分野において周知であり、例えば、Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet, Thorpe et al. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190 (1982) 及びWaldman, Science, 252: 11657 (1991) に記載されている。これらの二つの文献は、引用により本明細書の一部とされる。

[FR-抗体イムノトキシンの作成]

本発明者はこの抗体と遺伝子改変緑膿菌毒素(PE)をHaasanらの方法に準じ(Haasan et al. Anti-tumor activity of K1-LysPE38QQR, an immunotoxin targeting mesothelin, a cell-surface antigen overexpressed in ovarian cancer and malignant mesothelioma. J Immunother. 2000 J; 23(4): 473-9)、サクシニミチルトランス-4-マレイミチルメチシクロヘキサン1-カルボキシレート

10

20

30

40

50

(Succinimidyltrans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate)(SMCC)にて結合させ、イムノトキシンを作成する。本発明が使用するトキシンは、PEの他リシンA鎖(ricin A chain)、脱糖鎖リシンA鎖(deglycosylated ricin A chain)、リボソーム不活化蛋白(ribosome inactivating protein)、アルファ-サルシン(alpha-sarcin)、ゲロニン(gelonin)、アスペルギリン(aspergillin)、リストラクトシン(restrictocin)、リボヌクレース(ribonuclease)、エピポドフィロトキシン(epipodophyllotoxin)、ジフテリアトキシン(diphtheria toxin)、シュドモナスエクソトキシン(Pseudomonas exotoxin)のいずれでもよい。

10

抗体は、単鎖抗体-トキシン融合タンパク質の作製工程と同様にして組換え手法によりトキシシンに融合されることもできる。リガンドをコードする遺伝子とトキシシンとを周知のクローニング法を用いてcDNA中にクローニングし、これらは小さいペプチドリンカーによって直接あるいは離れた状態で結合される。例えば、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)が参照される。

本発明者は、このイムノトキシンが遺伝子導入マクロファージ、関節リウマチ滑膜細胞、FR- 遺伝子導入細胞株へ細胞死(アポトーシス)を誘導することをプロピジウムイオジウム(Propidium Iodide)の取り込みにて示す。このイムノトキシンの効果の証明に用いる細胞はFR- 発現細胞であればいずれでもよい。また、細胞死(アポトーシス)の証明はアネキシン-V(Annexin-V)染色でもよい。さらに、作用効果はトリチウムウリジン([³H]Uridine)の細胞内取り込みの低下による蛋白合成阻害あるいはTNF-、IL-1、IL-6、IL-8などのサイトカイン産生の低下によっても示すことができる。

20

[FR- 抗体のH鎖、L鎖の遺伝子の塩基配列]

本発明者はFR- 単クローン抗体(クローン36またはクローン94b)のH鎖、L鎖の遺伝子をIg-Prime Kit(Novagen)のプライマー使用にて増幅する。本発明者はTaqポリメラーゼをもちいたRT-PCR法にて増幅されたH鎖、L鎖の遺伝子をTAクローニング法にて、pCR(r)2-TOPO(r)ベクターに組み込む。このベクターを大腸菌に遺伝子導入する。本発明者は大腸菌から、ベクターインサートを精製しベクターに存在するM13あるいはT7プライマーを用いて、遺伝子配列を決定する。ベクターは5'末端のTをもち、M13あるいはT7プライマーを含むベクターのいずれでもよい。

30

[FR- 抗体イムノトキシンの作用効果]

本発明のイムノトキシンは、活性化マクロファージ活性化が病態の中心である種々の疾患やFR- 発現腫瘍細胞からなる白血病に適用される。マクロファージはFR- 発現がみられないので、アデノウイルスベクターを用いたFR- 発現マクロファージを用いて作用効果をみる。

40

また、ほとんどの細胞株ではFR- 発現が見られないので通常の哺乳類発現ベクターによりFR- 発現細胞株を作成し、作用効果をみる。

関節リウマチ活膜から得られたマクロファージはFR- 発現がみられるので、作用効果をみるのに適当な細胞である。

[FR- 抗体イムノトキシンの投与量、投与方法]

関節リウマチ、若年性関節リウマチ、マクロファージ活性化症候群、敗血症ショック、急性骨髄性白血病を治療するのに有効である濃度で投与される。この目的を達成するために、イムノトキシンは、当該技術分野で知られている許容される種々の賦形剤を用いて処方される。典型的には、イムノトキシンは、注射によって、静脈内または関節腔内投与される。本発明組成物は、医薬的に許容される非経口賦形剤と混合して、溶液剤、懸濁液剤

50

または乳剤などの単位投与注射用形態で処方される。かかる賦形剤は、本質的に、無毒性であり、非治療的である。かかる賦形剤の例は、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、およびハックス溶液である。固定油およびオレイン酸エチルなどの非水性賦形剤を用いてもよい。好ましい賦形剤は、生理食塩水中5%のデキストロースである。賦形剤は、バッファーおよび保存剤を含む、等張性および化学的安定性を増強する物質などの少量の添加剤を含有してよい。

投与量および投与形態は、個体に左右されるであろう。一般に、該組成物は、イムノトキシシンが、最も好ましくは $0.1 \sim 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与されるように投与される。好ましくは、ボーラス投薬として投与される。連続輸液を用いてもよい。特定の場合によると、必要とされる本発明のイムノトキシシンの「治療有効量」は、かかる処置を必要とする患者を治療するのにまたは少なくとも該当疾患およびその合併症を一部休止させるのに十分な量であるとして決定されるべきである。かかる使用のために有効な量は、疾患の重篤度および患者の全身健康状態に左右されるであろう。単投与または多重投与は、患者によって必要とされ耐えられる投与量および投与回数に依存して要求される。

以下において本発明の特に好ましい具体例を、実施例として記載する。

【実施例】

実施例 1

関節リウマチ滑膜細胞 1×10^7 から、トリゾール(Gibco BRL)にて使用説明書にしたがって全RNAを $200 \mu\text{g}$ 抽出した。全RNA($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $5 \mu\text{l}$ と 10 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) $1 \mu\text{l}$ 、オリゴ(dT) $12 - 18$ プライマー($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$ をくわえて 65°C で5分反応させ、その後水中に1分おいた。

さらに、 $10 \times \text{RT}$ 緩衝液 $2 \mu\text{l}$ 、 25 mM MgCl_2 $24 \mu\text{l}$ 、 0.1 M DTT $2 \mu\text{l}$ 、RNase OUT $2 \mu\text{l}$ を加え、2分反応させた。さらに、トランスクリプターゼ(SuperscriptTM Reverse Transcriptase)(Invitrogen) $1 \mu\text{l}$ を加え、 70°C で15分反応させ、水中に2分おいた。さらに、RNase H $1 \mu\text{l}$ をくわえ、 37°C で20分反応させ、cDNA合成を終了した。

cDNAを得た後、 $4.5 \mu\text{l}$ の反応物とセンス(AGAAAGACATGGTCTGGAAATGGATG)、アンチセンス(GACTGAACTCAGCCAAGGAGCCAGAGTT)プライマーをそれぞれ 40 pM 、dNTPを 0.6 mM 、TaqDNAポリメラーゼ(1.5 unit Boehringer Mannheim Corp) $50 \mu\text{l}$ をもちいて、 94°C で5分、 94°C で45秒、 60°C で60秒、 72°C で90秒で23サイクルPCRをおこない、その後、 72°C で10分反応させることにより葉酸リセプターベータ(FR-)を増幅した。

得られたPCR産物は3'端にAを含むので、5'末端にTをもつPCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen)とライゲーションをおこなった。すなわち、PCR産物 $2.5 \mu\text{l}$ にソルト溶液(Solt solution)、 $1 \mu\text{l}$ 、滅菌蒸留水 $1.5 \mu\text{l}$ 、pCR(r)2-TOPO(r)ベクター $1 \mu\text{l}$ を加え 22°C で5分間インキュベートし、その内 $2 \mu\text{l}$ をワンショット大腸菌(One Shot E. coli)(TOP10F')に加え、水中で30分反応後、 42°C で30秒の熱ショック、水中で2-5分静置、その後 37°C に温めたS.O.Cメジウム $250 \mu\text{l}$ を加え、シェーカー内で 37°C で1時間反応させた。その間にLBプレートを 37°C に温めた。サンプルにX-gal($100 \text{ mg}/\text{ml}$) $40 \mu\text{l}$ 、IPTG($20 \text{ mg}/\text{ml}$) $40 \mu\text{l}$ を加え、それを 3.5 ml LB寒天培地に混ぜて、LBプレートの上に撒き、 37°C で1晩培養した。

大腸菌培養のため、プレート上より採取した白いコロニーをアンピシリン($50 \text{ mg}/\text{ml}$) $1 \mu\text{l}$ を含むLB培地 2 ml に加え、 37°C で1晩シェーカー内で培養した。

DNA精製はQiagenプラスミド精製キット(Qiagen)にておこなった。インサートの確認はEcoRI制限酵素処理後 783 bp のバンドを電気泳動ゲルに確認し

10

20

30

40

50

た。インサートを含むベクターをEcoRI処理し、アガーローズにて電気泳動した。インサート部分を切り取り、あらかじめ、EcoRI、アルカリホスファターゼ処理したpEF-BOSベクター(Mizushima et al. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. Nucleic Acids Res. 1990; 18(17): 5322.)とT4リガーゼをもちいてライゲーションをおこなった。ライゲーション産物を熱ショック法にてワンショット大腸菌(One shot E. coli)(TOP10F')に遺伝子導入をおこなった。遺伝子導入された大腸菌はアンピシリン耐性となるので、アンピシリンを含む1%アガーにて一晩にて培養し、得られたコロニーをさらにアンピシリンを含むLB培地で一晩培養した。培養した大腸菌を集め、上記のDNA精製法にてベクターインサートを精製

10

した。インサートの確認はEcoRI制限酵素処理後783bpのバンドを電気泳動ゲルにて確認した。

リポフェクタミン(GibcoBRL)20 μ lと精製したPEFベクターインサート1 μ g、ハンクスバランストサルト液1mlを混ぜ、あらかじめ24ウエルに 1×10^5 に調整したB300-19細胞にFR- 遺伝子を導入した。遺伝子導入された細胞を、G418(1000 μ g/ml)を含むDMEM液にて培養し、増殖したB300-19細胞のFR- の発現をIgM型抗FR- 抗体にて確かめた。すなわち、B300-19細胞 5×10^5 を0.1ml(1mg/ml)のFR- 抗体と4 で30分反応させた。0.1%NaN₃、1%胎児血清入りPBSで3回細胞を洗った後、蛍光標識ヤギ抗マウスIg抗体(BIOSOURCE)と4 で30分反応させた。その後、0.1%NaN₃、1%牛胎児血清入りPBSで2回細胞を洗浄したのち、エピクスエリート(EPICSElite)(Coulter)にて細胞の蛍光を解析した。恒常的に葉酸リセプターベータ(FR-)を発現するB300-19細胞が得られた。

20

実施例 2

FR- 発現B300-19細胞 1×10^7 をフロインド完全アジュバンドと混合し、7Ba1b/Cマウスの背部3箇所、腹腔内に免疫した。さらに2週間後、B300-19細胞 1×10^7 をフロインド不完全アジュバンドと混合し、腹腔内に免疫した。この免疫をさらに2-4回繰り返した。

単クローン抗体は、(KohlerおよびMilstein, Nature(1975)256:495-96)の方法またはその変形方法をもちいた。脾臓(および所望によりいくつかの大きなリンパ節)を取り出し、単一細胞に解離した。全ての解離した脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマを形成し、HAT選択中で培養した。培養上清のなかで、免疫原と反応するものを選んだ。

30

得られたハイブリドーマを限定希釈により平板培養し、所望の免疫化細胞-表面抗原に特異的に結合する(無関係の抗原には結合しない)抗体の生産についてアッセイした。次いで、選択された単クローン抗体分泌ハイブリドーマをインビトロ(in vitro)(例えば、組織培養ボトルまたは中空繊維反応容器中)またはインビボ(in vivo)(マウスの腹水として)で培養した。さらに、培養上清を用い、抗マウス免疫グロブリンG(IgG)サブクラス抗体、抗マウスアイソクラスタイプ抗体をもちいたマウスイムノグロブリン アイソタイプングELISAキット(Pharmingen)で単クローン抗体のアイソタイプ、サブクラスを決定した。

40

その結果クローン36はIgG_{2a}であり、クローン94bはIgG₁であった。抗体の反応性は実施例1に示したようにフローサイトメトリーにて解析した。図1は得られた抗体がKB細胞には反応せず、FR- 遺伝子導入細胞に反応することを示す。フローサイトメーターによる解析(明細書参照)でX軸は細胞数を、Y軸は細胞の蛍光強度を示す。IgG型FR- 抗体(クローン36)はFR- 遺伝子導入B300-19細胞に反応(a)したが、FR- を発現しないB300-19細胞には反応しなかった(b)。さらに、FR- を発現しているがFR- を発現していないKB細胞(c)には反応しなかった(d)。

実施例 3

50

2週間前にプリスチン0.5ccを腹腔内に注射したマウスの腹腔内にハイブリドーマ細胞 1×10^7 を注射し、2-3週後に腹水を得た。腹水0.5mlをプロテインGカラムに結合させ、10倍量の燐酸バッファーで洗った後、2.5pHグリシンバッファーで溶出した。トリスバッファーでpHを8.0に調整したのち、PBSで24時間透析、その後溶液を濃縮した。腹水0.5mlから1-2mgのIgGをえた。

実施例 4

[大腸菌からのシュドモナス エクソトキシンの調整]

シュドモナス エクソトキシン(PE)を発現させるプラスミドpMS8-38-402(Onda et al. *In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. Cancer Res.* 2004; 64(4): 1419-24)とその宿主大腸菌BL21(DE3)(Stratagene)を、0.1mg/mlアンピシリンと0.1mg/mlクロラムフェニコールを含む5mlのLB培地で、37℃で12-15時間培養した。12-15時間後、5mlの培地に2LのLB培地を加え、波長600nmで吸光度が0.5に達するまで培養した。波長600nmで吸光度が0.5に達した時点で、IPTGを濃度1mMになるようにLB培地に加え、90分間さらに培養した。

培養終了後、細胞を回収して50mlの30mM トリス緩衝液(pH7.4 20% sucrose, 1mM EDTAを含む)で細胞を懸濁し、氷中で15分間放置した。その後、2,000gで15分遠心分離を行い、細胞を回収し、50mlの滅菌蒸留水で懸濁し、氷中で15分間放置した。その後、15,000gで15分遠心分離をして上澄みを集め、これを精製出発物質とした。

実施例 5

PEの精製は、ビジョン ワークステーション(Vision Workstation)液体クロマトグラフィーシステム(日本パーセプティブ社)を用いて行った。最初に20mM トリス緩衝液(pH7.4, 1mM EDTAを含む)で予め平衡化した強陰イオン交換樹脂カラム(POROS HQ Poros社製)に流速10ml/分でPE精製出発物質を吸着させ、過剰量の同緩衝液でカラムを洗浄した。次に、1MのNaClを含んだ20mM トリス緩衝液(pH7.4, 1mM EDTAを含む)を用い、NaCl濃度が0%から100%への到達が10分となるように設定し、流速10ml/分、2mlずつカラムからの溶出液を分取してPEを精製した。

分取サンプルの精製度の確認は、後述のラムリ(Laemmli)法のSDS電気泳動とADPリボシル化活性の検定により行った。精製後のPEサンプルは、さらに分子サイズ排除クロマトグラフィー(TSK 3000 SW、東ソー)を用いて100mMのリン酸緩衝液(pH8.0, 0.15M NaCl, 1mM EDTAを含む)を流速0.35ml/分、1mlずつカラムからの溶出液を分取し、高純度のPEを精製した。

実施例 6

[SDS-PAGE]

SDS電気泳動はラムリ(Laemmli法)(Laemmli-UK, *Nature* (1970) 227: 6680-685)に準じて行った。すなわち、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む10%ポリアクリルアミドの平板ゲルを用い、移動層には終濃度0.1%、130mMのグリシンを含む25mM トリス緩衝液を用いた。各サンプルは等量の0.2%のSDSを含む100mM トリス緩衝液pH6.5で調整し、5分間の煮沸処理を行った。煮沸後、平板ゲルにサンプルを投与し、30mAの定電流で電気泳動を展開させた。展開終了後、0.05%のクマシーブリリアントブルーR(ナカライテスク社)溶液でゲルを染色し、7%の酢酸を含む10%エタノールで脱色し、タンパク質を検出した。

実施例 7

[ADPリボシル化活性検定]

10

20

30

40

50

キャロル (Carroll) らの方法に準じた。(Carroll et al. Active site of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Glutamic acid 553 is photolabeled by NAD and shows functional homology with glutamic acid 148 of diphtheria toxin. J Biol Chem. 1987; 262(18): 8707-11) ADP リボシル化活性検定は、45 μ l の 50 mM のトリス緩衝液 (pH 8.5、4 μ l の小麦胚芽エキス (プロメガ社製)、37 pM の 14 C NAD (0.06 μ Ci)、40 mM の DDT、1 mM の EDTA に、5 μ l の PE 溶液 (約 0.1 - 1.25 μ g) を加え、37 で 10 分間反応させた。反応終了後、10 μ l のトリクロロ酢酸 (ナカライテスク) を混和し、15,000 g で 3 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿物は 5% のトリクロロ酢酸溶液の添加と遠心分離によってさらに洗浄した。洗浄後、液体シンチレーションカウンターで沈殿物の 14 C 放射能を測定し、ADP リボシル化活性の指標とした。

10

実施例 8

[イムノトキシンの作製]

概ねハッサン (Haasan) らの方法に準じた。(Haasan et al. Anti-tumor activity of K1-LysPE38QQR, an immunotoxin targeting mesothelin, a cell-surface antigen overexpressed in ovarian cancer and malignant mesothelioma. J Immunother. 2000 J; 23(4): 473-9)

20

ヒト FR- 抗原に対する IgG 単クローン-抗体 (クローン 36) とサクシニミチルトランス-4-マレイミチルメチシクロヘキサノ-1-カルボキシレート (Succinimidyltrans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate、シグマアルドリッチ) (SMCC) のカップリングを行った。100 mM リン酸緩衝液を用いたタンパク質濃度 3.0 mg/ml に調整した 36 抗体溶液 1 ml に対して 100 μ g の SMCC を添加し、室温で 1 時間反応させた。

反応終了後、脱塩クロマトグラフィーカラム PD-10 (アマシャム・ファルマシア) と 100 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA を含む) を用いて剰余の SMCC を除去した。クローン 36 抗体と SMCC のカップリング効率は DTNB (dithiobis、シグマアルドリッチ) 試薬を用い、412 nm の波長における吸光度を測定し、得られた値を 1 モルあたりの DTNB の分子吸光係数 13,600 で換算した。クローン 36 抗体 1 分子に対し、2.8 - 3.1 分子の SMCC がカップリングされた。

30

次に、PE とサクシニミチル 3-2-ピリジルジチオプロピオナート (succinimidyl 3-(2-pyridyl)dithioproprionate、シグマアルドリッチ) (SPDP) のカップリングを行った。100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA を含む) を用いたタンパク質濃度を 10 mg/ml に調整した PE 溶液 1 ml に対して 400 μ g の SPDP を添加し、4 で 12 - 15 時間反応させた。

40

反応終了後、脱塩クロマトグラフィーカラム PD-10 (アマシャム・ファルマシア) と 100 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.5、0.15 M NaCl、1 mM EDTA を含む) を用いて剰余の SPDP を除去した。PE と SPDP のカップリング効率は 2-メルカプトエタノール (シグマアルドリッチ) を用い、343 nm の波長における吸光度を測定し、得られた値を 1 モルあたりの SPDP の分子吸光係数 8,080 で換算した。PE 1 分子に対し、1.2 - 1.5 分子の SPDP がカップリングされた。

クローン 36 抗体-SMCC と PE-SPDP のカップリングは、3 mg の 36-SMCC と 6 mg の PE-SPDP を用いて行った。

まず、6 mg 相当の PE-SPDP (100 mM のリン酸緩衝液、pH 6.5、150

50

mM NaCl、1mM EDTAを含む)に100 μ gのトリス2-カルボキシエチル
 フォスフィン(tris-2-carboxyethylphosphine、Molecular probes社)(TCEP)を加え、室温で20分間反応させてPE-S
 PDPを活性化させた。

反応終了後、3mg相当のクローン36抗体-SMCC(100mMのリン酸緩衝液(pH6.5、150mM NaCl、1mM EDTAを含む)を、分子量10,000
 カットの遠心濃縮器(セントリコン10、Amicon社製)中で混和し、最終タンパク
 質濃度が5-7mg/mlとなるように4,800gで遠心分離を行った。遠心分離
 後、タンパク質溶液を4で15-18時間反応させた。

反応終了後、脱塩クロマトグラフィーカラムPD-10(アマシャム・ファルマシア)と20mMトリス緩衝液(pH7.4、1mM EDTAを含む)を用いてタンパク質溶
 液の置換を行い、イムノトキシンの精製出発物質を調製した。

イムノトキシンの精製は、前述のPE精製に準じて行った。まず、予め20mMトリス
 緩衝液(pH7.4、1mM EDTAを含む)平衡化した強陰イオン交換樹脂カラム(
 POROS HQ Poros社製)に流速10ml/分でイムノトキシン精製出発物質
 を吸着させ、過剰量の同緩衝液でカラムを洗浄した。次に、1MのNaClを含んだ20
 mMトリス緩衝液(pH7.4、1mM EDTAを含む)を用い、NaCl濃度が0%
 から100%への到達が10分となるように設定し、流速10ml/分、2mlずつカ
 ラムからの溶出液を分取してイムノトキシンを精製した。

分取サンプルの精製の確認は、前述のラムリ(Laemmli)法のSDS電気泳動と
 ADPリボシル化活性の検定により行った。精製後のイムノトキシンは、さらに分子サイ
 ズ排除クロマトグラフィー(TSK 3000SW、東ソー)を用いて50mMのリン酸
 緩衝液(pH7.3、150mM NaClを含む)で展開し、高純度のイムノトキシ
 ンを精製した。高純度のイムノトキシンは、さらに滅菌濾過器で処理した後、-80度で保
 存した(最終濃度0.1-0.2mg/ml)。

図2はTSK-SW3000による抗FR-抗体イムノトキシンのゲルろ過クロマト
 グラフィーであり、X軸は溶出量、Y軸の-はOD280による蛋白濃度、-は
 シュドモナス エクソトキシンのADPリボシル化活性である。蛋白濃度の最初のピーク
 は分子量が大きく、抗体あるいはトキシンの結合した抗体と考えられる。次のピークは分
 子量がより小さく、トキシンと考えられる。いずれのピークにもADPリボシル化活性が
 みられた。

図3はFR-抗体イムノトキシン(IT)、FR-抗体(mAb)、シュドモナス
 エクソトキシン(PE)をSDS-PAGEにて電気泳動し、それぞれ抗PE抗体、抗
 マウスIgG抗体でウエスタンブロットを行った結果である。ITにおいてのみ、66k
 Daから200kDaに両抗体に反応するバンドがみられた。

実施例9

実施例1にてB300-19細胞にFR-を恒常的に発現させた細胞をもちいた。イ
 ムノトキシンの傷害能はプロピジウムイオジウム(propidium iodide)とDNAの結合をフローサイトメーターにて測定した。(Nicolletti et
 al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide
 staining and flow cytometry. J Immunol Methods. 1991; 139(2): 271-9)具体的には種々な時間、B3
 00-19細胞(2×10^5 /ml)と種々な濃度のFR-抗体イムノトキシンにて培
 養した。B300-19細胞をPBSにて1回洗浄し、細胞ペレットにプロピジウムイオ
 ジウム(Propidium Iodide)(40 μ g/ml)0.5mlを加え、室
 温にて1晩反応させ後、細胞の蛍光強度をフローサイトメーターにて測定した。プロピジ
 ウムイオジウム(Propidium Iodide)に低染色性の細胞を死細胞とし
 、蛍光強度をフローサイトメーターにて測定した。測定結果を図4に示した。

図4はB300-19細胞と種々の濃度のFR-抗体イムノトキシン(X軸に示す)

を混ぜ、24時間、36時間、48時間後の細胞死の割合（Y軸に示す）を示したものである。図4は4回の実験の平均値で、バーはSDを示す。

実施例10

FR- のcDNAをpEF-BOSベクターに組み込み、熱ショック法にて大腸菌に遺伝子導入し、一晩でコロニーを増殖させ、アンピシリン耐性のインサート陽性クローンを選んだ。陽性クローンをLB培地2mlで増殖させ、Qiagenプラスミド精製キット(Qiagen)にてcDNAを精製した。

プラスミドから制限酵素XbaI処理にてFR- 遺伝子を分離、エタノール沈殿後、DNAブランディングキット(DNA Blunting Kit)(TAKARA)をもちいてFR- 遺伝子を平滑末端化し、電気泳動後、QIAEXII(TAKARA)を用いてゲルから抽出した。フェノール/クロロホルム抽出後エタノール沈殿し、沈殿を水に溶かした。

インサートとコスミドベクターpAxCawtをライゲーションし、エタノール沈殿させた。この混合物をSwaIで切断した。切断したものをギガパック3ゴールドパッキングエクストラクト(Gigapack3Gold Packing Extract)(STRATAGENE)をもちいて大腸菌DH5 に感染させた。この大腸菌をアンピシリン含有寒天プレートに巻き、コロニーをピックアップし、アンピシリン含有LB培地10mlで培養し、アルカリ溶解法にてプラスミドを回収しPEG沈殿をおこなった。

沈殿を水に溶かし、制限酵素XbaIとBamHIをもちいて電気泳動によりインサートの向きと構造を確認した。順向き、逆向きのインサート入りコスミドをアンピシリン含有LB培養液21にて培養し、ラージコンストラクションキットLarge Construction Kit(Qiagen)にて多量精製した。

アデノウイルス エクプレション ベクター キット(Adenovirus Expression Vector Kit)(TAKARA)に準じ、生成物をカルシウム燐酸法セルフェクト トランスフェクション キット(Cellfect Transfection Kit)(Amersham Pharmacia Biotech)にて制限酵素処理済みDNA-TPとコトランスフェクションした。簡単にはpAxCawt 9μl(8.1μg)とDNA-TPC 10μl(7μg)を1011のD.W.を混ぜ、カルシウム燐酸法にて、3,5mlファルコンデッシュに80%コンフルエントに培養したL293細胞に遺伝子導入した。

24時間後にL293細胞をそのままの細胞濃度、10倍希釈細胞濃度、100倍希釈濃度に調製し、96ウェルに移し、約20日間培養した。死細胞の培養上中に、細胞内で組換えが起こった組換えアデノウイルスがえられた。10倍希釈、100倍希釈のウェルの組換えコスミドの確認は細胞を%SDSで処理し、フェノール/クロロホルム処理後、XbaI, BamHI制限酵素でコスミドを切断し、1%アガーゲルにてそれぞれ、768bp、1703bpのインサートの存在を確認した。

インサートの確認できた培養上清を凍結融解を5回行ない、3000rpmで10分遠心後、上清を得た。その上清をL293細胞を80%コンフルエントに培養した200mlフラスコにくわえ、4日後に死細胞ウェルから上清を得た。同様の操作を繰り返し、高力価のウイルスを得た。

ウイルスの力価の測定は50%テッシュカルチャーインフェクシャス ドーズ(Tissue Culture Infectious Dose)測定法によった(Precious, Band Russell W.C.(1985) in Virology: A Practical Approach, ed. Mahy, B.W.J.(IRL Oxford), pp.193-205)。

実施例11

健常人をヘパリン入り注射器50ml(200)にて静脈から採血し、血液をPBSにて3倍に希釈した。15mlのファイコール/ハイパーク入り50mlチューブに希釈血液を重層し、室温、3000g15分に有核細胞を分離した。

上層をあつめ、PBSを加え、2000gにて5分遠心し、上清を捨て、ペレットをほ

10

20

30

40

50

ぐし、PBSを加え、 $1000g$ にて5分遠心した。ペレットをほぐし、 $1 \times 10^6 / ml$ に調整し、ファルコンデッシュにて30分培養、PBSで10回培養後、リバーポリスマンにて付着細胞をはがした。遠心後、DMEMに 1×10^6 に調整し、再びデッシュに付着させ、同様に付着細胞をえた。付着細胞はM-CSFにて24時間培養後、MOI100の濃度にてアデノウイルスベクター葉酸リセプターベータ、アデノウイルス逆相の葉酸リセプターベータを感染させた。

感染実験はウイルス上清を加え、 $37^\circ C$ 1時間 $3000g$ にておこなった。 $5 \times 10^6 / ml$ に調整し72時間培養した。また、感染細胞にFR-抗体、FITC標識抗マウス免疫グロブリン抗体を順次加え、陽性細胞をフローサイトメーターにて測定した。

10

図5にセンスFR-アデノベクター導入によるマクロファージのFR-発現を示した。

図5(a)はセンスFR-遺伝子を導入し、FR-抗体、FITC標識抗マウスIg抗体を反応させ、図5(b)はアンチセンスFR-遺伝子を導入し、FR-抗体、FITC標識抗マウスIg抗体と反応させた。蛍光強度はフローサイトメーターにて測定した。X軸は蛍光強度、Y軸は細胞数である。

実施例12

$1 \times 10^6 / ml$ に調整したマクロファージを1ウエル1mlにて24ウルデッシュで培養、加えたFR-抗体イムノトキシンの濃度と、細胞死の測定は実施例6と同様におこなった。図6にFR-抗体イムノトキシンによるFR-発現マクロファージの細胞死を示した。

20

図はセンスFR-遺伝子を導入したマクロファージと種々の濃度のFR-抗体イムノトキシン(X軸)を混ぜ、72時間後の細胞死の割合から、アンチセンスFR-遺伝子を導入したマクロファージと種々の濃度のFR-抗体イムノトキシンを混ぜ、72時間後の細胞死の割合の差(Y軸)を示したものである。プロピジウムイオジウム(Propidium Iodide)に低染色性の細胞を死細胞とし、蛍光強度をフローサイトメーターにて測定した。図の値は4名の健常人のマクロファージからえられた実験の平均値で、バーはSDを示す。

実施例13

関節リウマチ患者の膝関節置換術時得られた滑膜から、滑膜細胞を精製した。先ず滑膜を5mmほど細切し、30mlの1mg/mlのコラゲナーゼタイプ5を含むDMEMで $37^\circ C$ 30分処理した。ステンレスメッシュでデブリスをのぞいたのち、等量のDMEMを追加し、ファイコール/ハイペーク比重遠心法にて室温、15分 $2000g$ にて遠心分離し、上層を集め、2倍量のDMEMを加え、 $1500g$ 、 $1000g$ 遠心し滑膜有核細胞をえた。

30

1×10^7 の細胞をファルコンデッシュに加え、 $37^\circ C$ 30分培養し、PBSにて10回洗浄し、付着胞を得た。付着細胞をデッシュから、ラバーポリスマンにてはがし、50mlチューブに集めた。上記の細の付着を繰り返した後、50mlチューブを $1000g$ で遠心した。 $1 \times 10^6 / ml$ の細胞濃度に調整し、10%ヒト血清、10%牛胎児血清入りDMEMにて培養した。イムノトキシンを加えたもののコントロールとして抗体とトキシンを等量加えたものを用いた。72時間後の細胞のアポトーシスを上記の方法にて測定した。

40

図7に関節滑膜細胞がFR-を発現していることを示した。関節リウマチ滑膜細胞をFR-抗体(a)、CD14抗体(b)、DR抗体と反応させ、その後、FITC標識抗マウスIg抗体と反応させた。蛍光強度はフローサイトメーターにて測定した。X軸は細胞数、Y軸は蛍光強度を示す。40%以上の関節リウマチ滑膜細胞にFR-の発現がみられた。

図8にFR-抗体イムノトキシンによる関節リウマチ滑膜細胞の細胞死を示した。図8は関節リウマチ滑膜細胞と種々の濃度のFR-抗体イムノトキシン(X軸)を混ぜ、72時間後に生じた細胞死の割合から、関節リウマチ滑膜細胞とFR-抗体、トキシ

50

の等分子量混合物 (X軸) を混ぜ、72時間後に生じた細胞死の割合の差 (Y軸) を示したものである。プロピジウムイオジウム (Propidium Iodide) に低染色性の細胞を死細胞とし、蛍光強度をフローサイトメーターにて測定した。図8の値は関節リウマチ6症例から得られた実験の平均値で、バーはSDを示す。

実施例14

ハイブリドーマ細胞 5×10^6 に TRIzol (r) LS 反応液 0.75 ml を加え 15 から 30 で 5 分間置いた。さらに、トリゾール LS 反応液 0.75 ml あたり 0.2 ml クロロホルムを加え、攪拌後 15 から 30 で 2 から 15 分間置いた。12000g、4 で 15 分間遠心分離し、最上部の透明層のみを別チューブに移した。

その溶液にトリゾール (r) LS 反応液 0.75 ml あたり 0.5 ml のイソプロピルアルコール液を加え、15 から 30 で 10 分間置いた。12000g、4 で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、トリゾール (r) LS 反応液 0.75 ml あたり 1 ml の 75% エタノールを加え、7500g、4 で 5 分間遠心分離し、上清を捨てた。この過程を繰り返し、その後サンプルを乾燥させた。完全に乾燥する前に 10 μ l の DNase, RNase なしの滅菌蒸留水を加えた。Total RNA 1 μ g / μ l となるように DNase, RNase なしの滅菌蒸留水を加え、その内 5 μ l に 10 mM dNTP mix 1 μ l と Oligo (dT) 12-18 プライマー (0.5 μ g / μ l) 1 μ l を加えて 65 5 分インキュベートし、その後氷中に 1 分間静置、それに 10 \times RT 緩衝液 2 μ l、25 mM MgCl₂ 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l、RNase OUTM 2 μ l を加え、42 2 分間インキュベートし、トランスクリプターゼ (SuperScript™ 2 RT) μ l を加え 70 15 分間インキュベートし、氷中に 2 分、最後に RNase H 1 μ l を加え 37 20 分間インキュベートし、cDNA を得た。

Ig-プライムキット (Novagen) と、Taq DNA ポリメラーゼ (Taq DNA polymerase) 1 unit、dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 50 μ M、トリス塩酸 (pH 9.0) 40 mM MgCl₂ 21.5 mM を含むリアクション チューブ 13 本にそれぞれ cDNA 1 μ l を入れ、H鎖、L鎖の遺伝子 5' プライマー 0.5 μ l と 3' プライマー 0.5 μ l づつ加えた。

PCR は 1: 94 1 分、2: 50 1 分、3: 72 2 分を 27 サイクル行い、72 6 分のファイナル エクステンション (final extension) をおこなった。クローン 36、クローン 94b の H鎖の塩基配列決定のための 5' プライマーは MuIgVH 5' - B、3' プライマーは MuIgVH 3' - 2 を、L鎖の塩基配列決定のための 5' プライマーは MuIgVL 5' - A、3' プライマーは MuIgVL 3' - 1 を使用した。PCR 産物 2.5 μ l にソルト溶液 (T4 DNA リガーゼ 0.5 unit) 滅菌蒸留水 1 μ l、1.5 μ l、pCR (r) 2-TOPO (r) ベクター 1 μ l を加え 22 5 分間インキュベートし、その内 2 μ l を One shot E. coli (TOP 10 F') に加え、氷中 30 分、熱ショック 42 30 秒後氷中 2-5 分、37 に温めた S.O.C メジウム 250 μ l を加え、シェーカーで 37 1 時間インキュベートした。その間に LB プレート を 37 に温め、サンプルに X-gal (100 mg/ml) 40 μ l、IPGT (20 mg/ml) 40 μ l を加え、それを 3.5 ml LB 寒天培地に混ぜて LB プレートの上に撒き、37 1 晩培養した。

LB 培地 2 ml にアンピシリン (50 mg/ml) 1 μ l を加え、そこにプレート上より採取した白いコロニーを入れ、37 で 1 晩培養した。DNA 精製は Qiagen プラスミド精製キット (Qiagen) にておこなった。

塩基配列はビッグダイターミネーター V3.1 サイクルシーケンシング キット (Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit) (Applied Biosystem) にておこなった。すなわち、精製した DNA 溶液 (25 μ l) より 5.3 μ l とり、レーダー反応ミックス (Ready Reaction Mix) 4 μ l を加え、さらに M13R プライマーまたは T7 プライマー 0.7 μ l を加えた。

10

20

30

40

50

PCRは1:96 10秒, 2:50 5秒, 3:60 4分で25サイクル行い、最後に4 において。PCR産物10 μ lに3M酢酸Na 1 μ lと100%エタノール10 μ lを加え、-20 で20分間置き、15000g 4 10分間で遠心分離した後、上清を捨て、70%エタノール180 μ lを加え攪拌し、15000g 5分間4 で遠心分離した後、上清を捨てDNAを乾燥させた。DNAにテンプレート抑制溶液(Template Suppression Reagent) 15 μ lを加え攪拌し、遠心フラッシュ、攪拌、再度遠心フラッシュし、99 5分間インキュベートし、水中におき、ABI310シーケンサーにて塩基配列を解析した。

実施例15

[免疫グロブリン重鎖遺伝子可変領域にシステイン変異を導入]

10

クローン94bの免疫グロブリン重鎖遺伝子可変領域(VH)の63番目のアミノ酸グリシン(塩基配列ggc)をシステイン(塩基配列tgt)に変異させるようにデザインしたプライマー(cagaggcctgaacagtgtctggagtggattggaag,cttccaatccactccagacactgttcaggcctctg)を用い、クイックチェンジサイトデレクテッド変異誘発キット(Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE))を使って、実施例14で得たクローン94bのVHを含むプラスミドpCR2.1-TOPO/94bVHに変異誘発処理を施した。

このPCR反応は、反応液を95 で30秒処理した後、95 30秒、55 1分、68 4分のサイクルを12回おこなった。

20

次に、反応後のDNAを大腸菌(XL1-Blue supercompetent cell)に導入し、100 μ g/mlのアンプシリンを含むLB培地で形質転換体を選択した。選択した形質転換体のプラスミドをDNA精製キット(QIAprep spin Miniprep Kit)(QIAGEN)により抽出した。さらに、M13リバースプライマー(caggaaacagctatgac)と塩基配列決定キット(Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)(Applied Biosystems)をもちい、ABI310シーケンサーにて塩基配列を決定し、63番目のグリシン(塩基配列ggc)がシステイン(塩基配列tgt)に変異したことを確認した。

実施例16

30

[pRK79/PE38ベクターに変異を導入した免疫グロブリン重鎖遺伝子可変領域を挿入]

次に、PE38遺伝子を含むpRK79ベクター(PRK79/PE38)に、クローン94bの変異を導入したVHの挿入を以下の方法にておこなった。

変異を導入したクローン94bのVHの5'末端(FR1)と3'末端(JK)のアニーリングプライマーとして、taagaaggagatatacatatggagggttcagctgcagcagctcとgccctcgggacctccggaagcttttgaggagactgtgagagtggをそれぞれデザインした。FR1アニーリングプライマーには制限酵素NdeI部位があり、この部位でのクローニングにより、同部位中のatgを開始コドンとしたタンパク質の発現が可能である。JKアニーリングプライマーでは、JKアニーリング配列の次にaを配置し、続いて制限酵素HindIII部位がくるようにデザインしてあり、制限酵素HindIII部位でクローニングすると、クローンVHとpRK79ベクター上のPE38が一致したフレームで連結することを可能である。

40

これらのプライマーの組み合わせとDNAポリメラーゼ(Pfu DNA polymerase)(STRATAGENE)を使って、変異を導入したpCR2.1-TOPO/94bVHプラスミドにPCRを行った。

このPCR反応は、95 4分を1サイクルした後、95 1分、54 1分、72 1分のサイクルを30回、次に72 10分を1サイクルおこなった。

次に、PCR産物を電気泳動し、DNA精製キット(QIAquick Gel Ex

50

traction Kit) (QIAGEN)を用いて、ゲルから目的の大きさのDNAを回収し、さらに、回収産物を制限酵素HindIII (New England Biolabs)とNdeI (New England Biolabs)で切断した。制限酵素処理した変異導入VHと同じ制限酵素で処理したpRK79/PE38を混ぜ、ライゲーションハイ (Ligation high) (TOYOBO)を用いて16で一晚ライゲーション反応を行った。

次に、ライゲーション産物を大腸菌 (TOP10F') (Invitrogen)に遺伝子導入し、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地で形質転換体を選択した。

形質形質転換体のDNAをDNA精製キット (QIAprep spin Miniprep Kit) (QIAGEN)により抽出し、プラスミドの塩基配列を、T7プロモータープライマー (taatacgaactcactatagg)と塩基配列決定キット (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) (Applied Biosystems)をもちい、ABI310シーケンサーにて塩基配列を決定し、変異導入VHの塩基配列がpRK79ベクター上のT7プロモーター下流領域とPE38塩基配列に連結していることを確認した。

実施例17

[免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域にシステイン変異を導入]

クローン94bの免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域 (VL)の125番目のアミノ酸グリシンをシステインに変異させ、変異導入VLをpRK79ベクターに挿入することを目的に以下のことをおこなった。5'末端のアニーリングプライマーとして、taagaaaggagatatacatatggacattgtgatgtcacaatcをデザインした。このプライマーは制限酵素NdeI部位を含むため、この部位でクローニングすることにより、atgを開始コドンとしたタンパク質の発現が可能である。

3'末端 (JK)のアニーリングプライマーとして、

gctttgttagcagccgaattcctattttgatttccagcttggtgccacaaccgaacgtをデザインした。このプライマーは125番目のグリシン (gga)をシステイン (tgt)に変異させ、終始コドンtagに続いて制限酵素EcoRI部位がくるようにデザインしてある。これらのプライマーとDNAポリメラーゼ (Pfu DNA polymerase) (STRATAGENE)を使って、実施例14で得たクローン94bのVLを含むプラスミドpCR2.1-TOPO/94b VLにPCRを行った。

このPCR反応は、95 4分を1サイクルした後、95 1分、54 1分、72 1分のサイクルを30回、次に72 10分を1サイクルである。

実施例18

[pRK79ベクターに変異免疫グロブリン軽鎖遺伝子可変領域を挿入]

PCR産物を電気泳動し、DNA精製キット (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN)を用いて、ゲルから目的の大きさのDNAを回収した。

回収PCR産物を制限酵素EcoRI (New England Biolabs)と制限酵素NdeI (New England Biolabs)で切断し、同じ酵素で切断したpRK79プラスミドと混ぜ、ライゲーションLigation high (TOYOBO)を用いて16で一晚ライゲーション反応を行った。次に、ライゲーション産物を大腸菌TOP10F' (Invitrogen)に導入し、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地で形質転換体を選択した。

形質転換体から、DNA精製キット (QIAprep spin Miniprep Kit) (QIAGEN)によりプラスミドを抽出し、T7プロモーター (taatacgaactcactatagg)と塩基配列決定キット (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) (Applied Biosystems)をもちい、ABI310シーケンサーにて塩基配列を決定し、変異導入VLの125番目のグリシン (gga)がシステイン (tgt)に変異しているこ

とや p R K 7 9 ベクター上の T 7 プロモーター下流領域に連結していること、J K 配列の次に終始コドン t a g が配置されていることを確認した。

実施例 1 9

[リコンビナント蛋白封入体の調製]

上記の変異導入 V H を組み込んだプラスミド p R K 7 9 / P E 3 8、変異導入 V L を組み込んだプラスミド p R K 7 9 を 5 0 n g 用い、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) に遺伝子導入した。

遺伝子が導入された大腸菌の選抜は、アンピシリン (1 0 0 μ g / m l) とクロラムフェニコール (2 0 μ g / m l) を含む L B 培地で 3 7 °C、1 5 - 1 8 時間の培養で行った。

選択培養終了後の大腸菌は、アンピシリン (1 0 0 μ g / m l) とクロラムフェニコール (2 0 μ g / m l) を含む 5 0 0 m l のスーパーブローチ (S u p e r B r o t h) 培地で 3 7 °C で、波長 6 0 0 n m で吸光度が 0 . 6 に到達するまで培養した。

さらに、I P T G (i s o p r o p y l b e t a - D - t h i o - g a l a c t o p y r a r i o s i d e) 1 m M を加え、3 7 °C で 9 0 分間培養した。培養終了後の大腸菌は、遠心分離で回収した後、5 0 m M トリス緩衝液 (p H 7 . 4、2 0 m M E D T A を含む) を用いて懸濁し、同緩衝液で最終容量 2 0 m l に調整し、ホモゲナイザーに移した。ホモゲナイザーに移した大腸菌懸濁液 2 0 m l に、最終濃度 0 . 2 m g / m l となるように卵白リゾチームを添加し、室温で 1 時間反応させて大腸菌体成分を破壊した。破壊後、2 . 5 m l の 5 M N a C l 溶液と 2 5 % T r i t o n - X 溶液をそれぞれ加え、ホモゲナイズした後、室温で 6 0 分反応させた。反応終了後、2 0 , 0 0 0 × g、4 分で遠心分離を行って沈殿物を回収した。

回収した沈殿物は、2 0 m l の同トリス緩衝液で再懸濁し、2 . 5 m l の 5 M N a C l 溶液と 2 5 % T r i t o n - X 溶液をそれぞれ加えてホモゲナイズ後、2 0 , 0 0 0 × g、4 分で遠心分離を行い、沈殿物を回収した。この作業を 8 回繰り返した後、2 0 m l の同トリス緩衝液で再懸濁し、ホモゲナイズ後、2 0 , 0 0 0 × g、4 分で遠心分離し、沈殿物を回収した。この作業を 5 回繰り返した後の沈殿物をリコンビナントイムノトキシン封入体とし、さらに、0 . 1 M トリス緩衝液 (p H 8 . 0、1 0 m M E D T A、6 M グアニジン塩酸塩を含む) で溶解させ、最終濃度 1 0 m g / m l となるように同緩衝液で調節し、- 8 0 °C で保存した。

実施例 2 0

[リコンビナント二重鎖 F v 抗 F R - P E 抗体の作成]

- 8 0 °C で保存したリコンビナント蛋白封入体溶液を、室温にて融解後、0 . 5 m l の V H、0 . 2 5 m l の V L を、それぞれ別個の 1 . 5 m l チューブに移した。次にジチオスレイトール (D T T) を最終濃度 1 0 m g / m l となるように添加し、室温で 4 時間の還元処理を行った。還元処理後、0 . 5 m l の V H と 0 . 2 5 m l の V L を混和し、7 5 m l の 0 . 1 M トリス緩衝液 (p H 8 . 0、0 . 5 M アルギニン、0 . 9 m M 酸化型グルタチオン、2 m M E D T A を含む) に溶解させた。この溶液を 1 0 °C で 4 0 時間放置する事によって V H と V L を結合させた。結合終了後の溶液は、分子量 1 0 , 0 0 0 カットの遠心濃縮器 (セントリコン 1 0、A m i c o n 社) を用いて 5 m l まで濃縮し、さらに 5 0 m l の蒸留水で希釈した。この希釈液をリコンビナントイムノトキシン精製の出発物質とした。

実施例 2 1

[リコンビナント二重鎖 F v 抗 F R - P E 抗体の精製]

最初に、2 0 m M トリス緩衝液 (p H 7 . 4、1 m M E D T A を含む) で予め平衡化した強陰イオン交換樹脂カラム (H i - t r a p Q アマシャム・ファルマシア社) に、3 0 m l / 時間の流速で上記精製出発物質を吸着させ、2 0 m M トリス緩衝液 (p H 7 . 4、1 m M E D T A を含む) で吸光度 2 8 0 n m で 0 . 0 0 5 以下になるまで洗浄した。次に、0 . 3 M の N a C l を含む 2 0 m M トリス緩衝液 (p H 7 . 4、1 m M E D T A を含む) で溶出させた。溶出後、2 0 m M トリス緩衝液 (p H 7 . 4、1 m M

EDTAを含む)中で透析/脱塩を行った。

次に、パーヒュージョンクロマトグラフィーシステム(アブライドバイオシステム)、と強陰イオン交換樹脂カラム(POROS HQ Poros社製)を用い、さらに精製した。20mM トリス緩衝液(pH7.4、1mM EDTAを含む)で予め平衡化したカラムに、透析した精製物質を10ml/分の流速で吸着させた。吸着後、同緩衝液でカラムを洗浄後、リコンビナントイムノトキシンをNaClの濃度勾配(0Mから1Mへの到達が10分となるように設定)によって精製した。カラムからの溶出液を2mlずつ分取し、精製度の高い画分を精製リコンビナントイムノトキシンとした。精製度の確認は、後述のLaemmli法のSDS電気泳動により行った。

実施例 2 2

[エンドトキシン除去]

精製後のリコンビナントイムノトキシンのエンドトキシン除去は、パーヒュージョンクロマトグラフィーシステム(アブライドバイオシステム)と分子サイズ排除クロマトグラフィー(TSK 3000 SW、東ソー社)を用いて行った。まず、クロマトグラフィーシステムおよび分子サイズ排除クロマトグラフィーカラムの洗浄75%の消毒用エタノールで48時間行い、その後、日本薬局方注射用蒸留水(大塚製薬)でさらに洗浄した。蒸留水で洗浄後、日本薬局方生理食塩液(大塚製薬)で分子サイズ排除クロマトグラフィーの平衡化を行った。平衡化終了後、精製後のリコンビナントイムノトキシンを分子サイズ排除クロマトグラフィーに投与し、流速0.25ml/分でカラムからの溶出液を分取した。精製後の高純度リコンビナントイムノトキシンは、さらに滅菌濾過器で処理し、一部をタンパク質濃度の定量に用い、残りを-80℃で保存した。この方法で7.5mgのリコンビナントイムノトキシン封入体より0.15mgのエンドトキシンを除去した高純度リコンビナントイムノトキシンが得られた。

実施例 2 3

[SDS - PAGE]

SDS電気泳動はラムリー(Laemmli)法に準じて行った。すなわち、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む10%ポリアクリルアミドの平板ゲルを用い、移動層には終濃度0.1%、130mMのグリシンを含む25mM トリス緩衝液を用いた。各サンプルは等量の0.2%のSDSを含む100mM トリス緩衝液pH6.5で調整し、5分間の煮沸処理を行った。煮沸後、平板ゲルにサンプルを投与し、30mAの電流で電気泳動を展開させた。展開終了後、0.05%のクマシーブリリアントブルーR溶液でゲルを染色し、7%の酢酸を含む10%エタノールで脱色し、タンパク質を検出した。

図9はリコンビナント2重鎖Fv抗FR-PE抗体のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動像を示したものである。リコンビナント二重鎖Fv抗FR-PEキメラ抗体(分子量60kDa)は還元することにより、V_H PE(50kDa)とV_L(10kDa)にそれぞれ分解した。レーンの左から順に、VLタンパク質、リコンビナント二重鎖Fv抗FR-PE抗体(IT)、VH PE融合タンパク質を還元条件で電気泳動した図、分子量マーカー(Mr)、非還元条件でのリコンビナント二重鎖Fv抗FR-PE抗体(IT)を示す。

実施例 2 4

[FR - 発現HL-60細胞の作成]

実施例1で得られたPCR2.1-TOPO/FR-を制限酵素EcoR1で処理、同じ制限酵素処理したベクターpcDNA3(Invitrogen)と混ぜ、ライゲーション反応をおこなった。また、ヒト急性骨髄性白血病細胞株HL-60細胞に実施例1と同様な方法で遺伝子導入をおこない、FR-発現HL-60細胞株を得た。

実施例 2 5

[リコンビナント2重鎖Fv抗FR-PE抗体の作用]

リコンビナント2重鎖Fv抗FR-PE抗体がFR-発現B300-19細胞株、FR-発現HL-60細胞株に細胞傷害を誘導するか否かについて、実施例8と同様

10

20

30

40

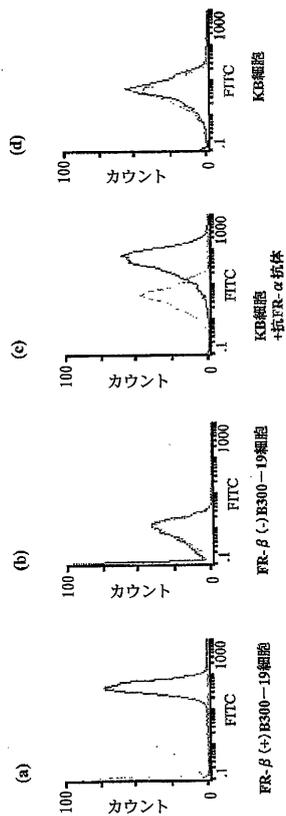
50

な測定を行った。図10は、FR-発現B300-19細胞と種々の濃度のリコンビナント2重鎖Fv抗FR-PEキメラ抗体を混ぜ、24時間、36時間、48時間後の細胞死の割合（Y軸に示す）を示したものである。図10は3回に実験の平均値でバーはSDを示す。

図11は、FR-発現HL-60細胞株と種々の濃度のリコンビナント2重鎖Fv抗FR-PE抗体を混ぜ、24時間、48時間、72時間後の細胞死の割合（Y軸に示す）を示したものである。図11は3回に実験の平均値でバーはSDを示す。

【図1】

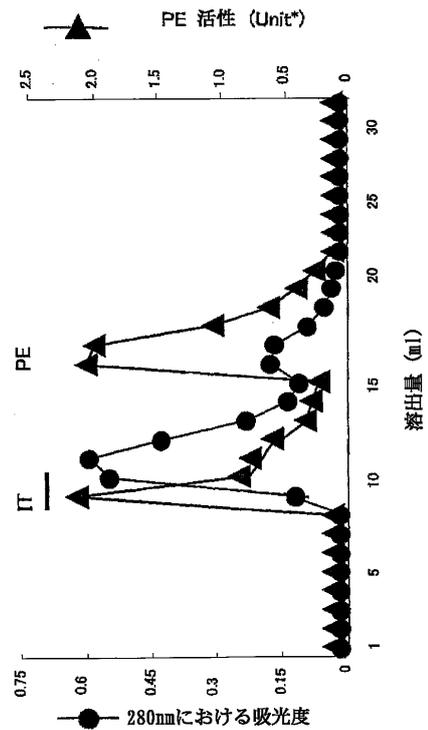
FIG. 1



【図2】

FIG. 2

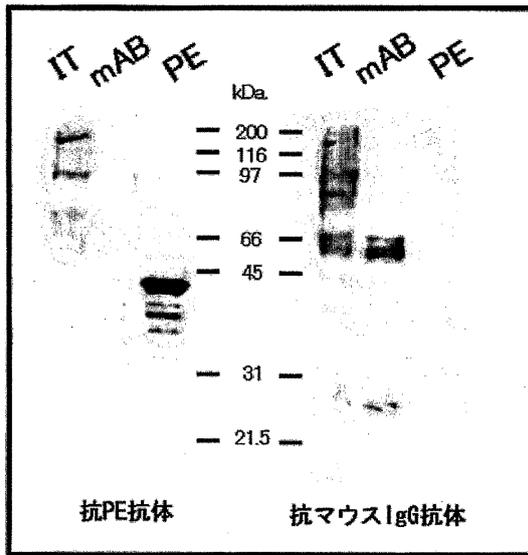
TSK-SW3000ケルろ過クロマトグラフィー



【 図 3 】

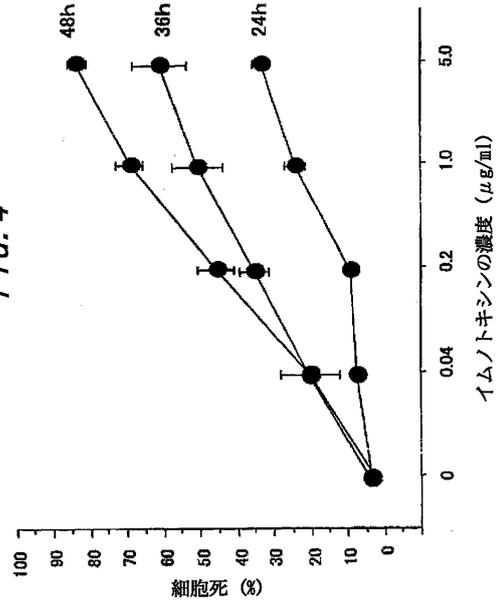
FIG. 3

ウェスタンブロッティング



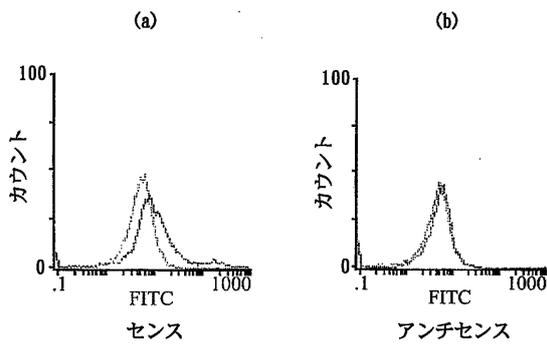
【 図 4 】

FIG. 4



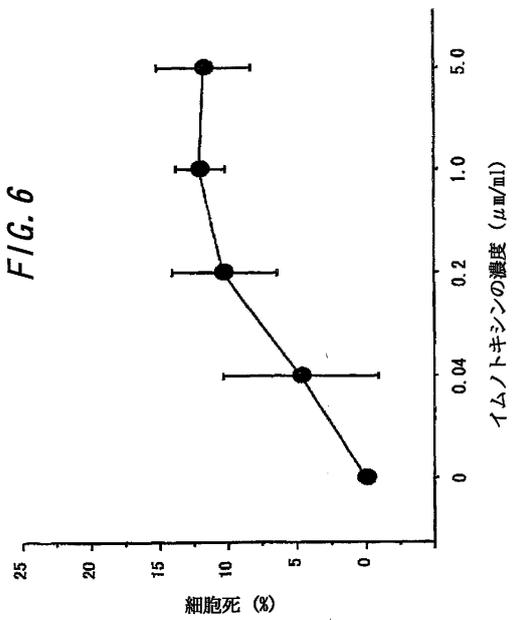
【 図 5 】

FIG. 5



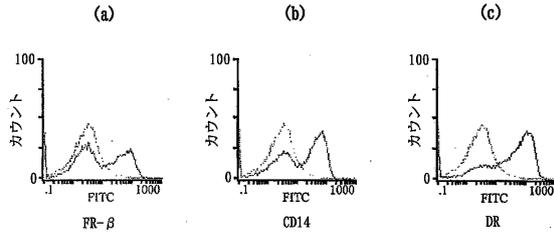
【 図 6 】

FIG. 6



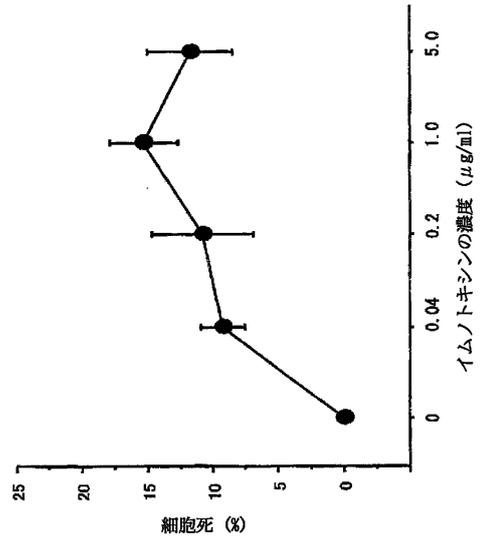
【 図 7 】

FIG. 7



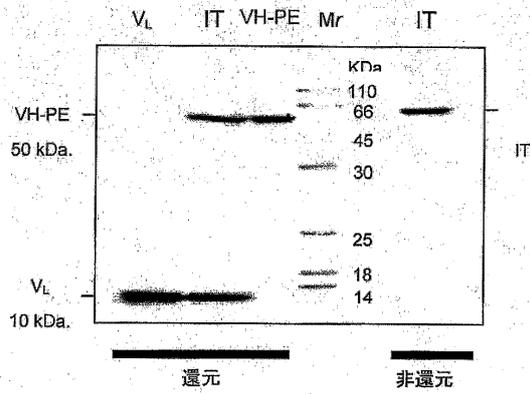
【 図 8 】

FIG. 8



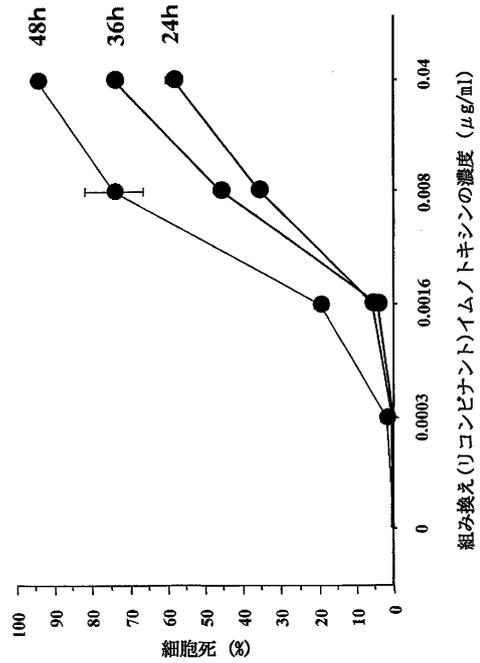
【 図 9 】

FIG. 9

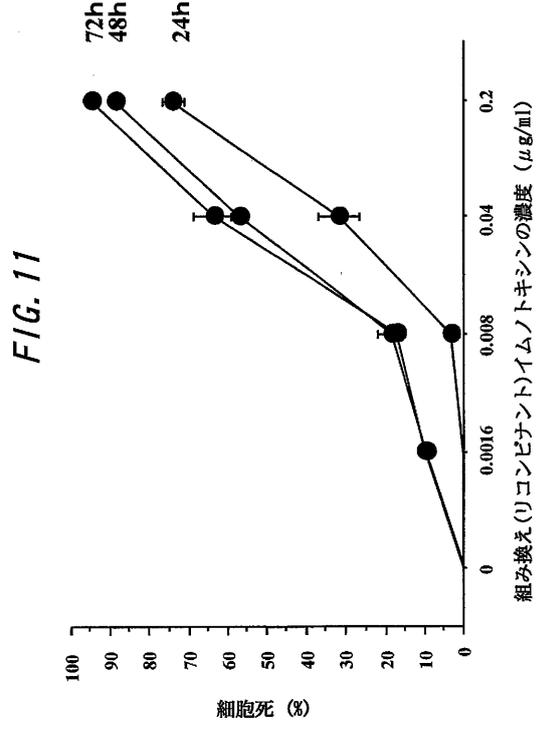


【 図 10 】

FIG. 10



【 図 1 1 】



【 配列表 】

[0004943144000001.xml](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 松 山 隆 美

鹿児島県鹿児島市桜が丘 8 - 3 5 - 1 鹿児島大学内

(72)発明者 永 吉 隆 作

鹿児島県鹿児島市桜が丘 8 - 3 5 - 1 鹿児島大学内

(72)発明者 恒 吉 康 弘

鹿児島県鹿児島市桜が丘 8 - 3 5 - 1 鹿児島大学内

(72)発明者 永 井 拓

鹿児島県鹿児島市桜が丘 8 - 3 5 - 1 鹿児島大学内

(72)発明者 松 下 格

鹿児島県鹿児島市桜が丘 8 - 3 5 - 1 鹿児島大学内

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 国際公開第 0 2 / 0 8 7 4 2 4 (WO, A 1)

国際公開第 0 3 / 0 7 2 0 9 1 (WO, A 1)

Cancer, 1 9 9 9 年, Vol.85, No.2, p.348-357

Biochemistry, 1 9 8 9 年, Vol.28, p.8249-8254

Adv Drug Deliv Rev, 2 0 0 0 年, Vol.41, No.2, p.147-162

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 16/28

C07K 19/00

A61K 38/00

A61K 39/395

A61P 19/02

A61P 29/00

A61P 37/02

A61P 35/02

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

UniProt/GeneSeq