

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-534406

(P2013-534406A)

(43) 公表日 平成25年9月5日(2013.9.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C07K 16/32 (2006.01)	C07K 16/32	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	4C076
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 T	4C084
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-508358 (P2013-508358)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月16日 (2011.3.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月28日 (2012.12.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2011/071840
 (87) 国際公開番号 WO2011/137687
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日 (2011.11.10)
 (31) 優先権主張番号 201010163052.2
 (32) 優先日 平成22年5月5日 (2010.5.5)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 512285258
 シャンハイ ハイカン ファーマシューテ
 イカル テクノロジー アンド デヴェロ
 ップメント カンパニー リミテッド
 中華人民共和国, 上海, ジョジュ ロ
 ード, ナンバー 337, ビルディン
 グ ナンバー6, ルーム 2218
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100148596
 弁理士 山口 和弘
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌胎児性抗原に対する抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、癌胎児性抗原 (CEA) に対するヒト化キメラモノクローナル抗体、該抗体をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び該発現ベクターを含有する宿主細胞を開示する。本発明は、該抗体、ポリヌクレオチド、ベクター及び宿主細胞の、腫瘍の診断及び/又は治療のための医薬を製造するための使用も開示する。

【選択図】 図15

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 7 ~ 9 に示す C D R 領域を含む重鎖と、配列番号 10 ~ 12 に示す C D R 領域を含む軽鎖とを含む、ヒト化キメラモノクローナル抗体又はその機能的変異体。

【請求項 2】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項 1 に記載の抗体又はその機能的変異体。

【請求項 3】

請求項 1 若しくは 2 に記載のヒト化キメラ抗体又はその機能的変異体の C D R 領域と同一である C D R 領域を含み、請求項 1 に記載の前記ヒト化キメラ抗体の生物活性と同等又はそれより高い生物活性を有するポリペプチド。

10

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト化キメラ抗体若しくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその相補配列を含む核酸。

【請求項 5】

D N A 又は R N A である、請求項 4 に記載の核酸。

【請求項 6】

好ましくは、真核細胞において、特にチャイニーズハムスター卵巣細胞において高発現される、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

20

【請求項 7】

図 4 に示す p S R N C - C - C E A 又は図 5 に示す p S R D C - C 1 - C E A である、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 4 若しくは 5 に記載の核酸を含む、又は請求項 6 若しくは 7 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 9】

チャイニーズハムスター卵巣細胞、特に寄託番号第 C G M C C 3 8 0 3 号を有する細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

30

治療有効量の請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体若しくはポリペプチドの、又は請求項 4 若しくは 5 に記載のポリヌクレオチド若しくはその相補配列の、又は請求項 6 若しくは 7 に記載のベクターの、又は請求項 8 若しくは 9 に記載の宿主細胞の、抗腫瘍医薬の調製における使用。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体又はポリペプチドの、腫瘍診断剤の調製における使用。

【請求項 12】

前記腫瘍が、結腸直腸がん、結腸直腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、膀胱がん、胆嚢がん及び食道がんからなる群から選択され、好ましくは結腸直腸である、請求項 10 又は 11 に記載の使用。

40

【請求項 13】

前記抗腫瘍医薬が、活性成分として放射性免疫治療剤とカップリングした請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の前記抗体又はポリペプチドを含み、好ましくは、前記放射性免疫治療剤が ^{131}I である、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 14】

前記腫瘍診断剤が、活性成分として放射性免疫イメージング剤とカップリングした請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の前記抗体又はポリペプチドを含み、好ましくは、前記放射性免疫イメージング剤が ^{188}Re である、請求項 11 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌胎児性抗原（CEA）に対するヒト化キメラ抗体、該抗体をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び前記発現ベクターを含む宿主細胞並びに腫瘍を診断及び/若しくは治療するための薬剤又は医薬の調製におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

1965年に、カナダのGold及びFredmanは、ヒト結腸がんからの抽出物を用いてウサギを免疫し、得られた血清を用いて様々なヒト組織を調べた。このときに、ヒト内胚葉を起源とする消化管腫瘍の染色が強陽性であることが見出され、2～6カ月齢の胎児の消化管組織も陽性であることも見出され、よって、消化管腫瘍において発現が陽性であるこのような抗原分子が癌胎児性抗原（CEA）と命名された。後に、内胚葉細胞から分化した腫瘍細胞におけるCEA抗原の発現が、正常細胞のものより100倍高く、よって、これは様々なヒト悪性腫瘍についての重要な抗原及びマーカーであることが見出された。CEAは、約180～200kDの分子量を有する糖鎖及びペプチド鎖で構成される糖タンパク質である。糖鎖の組成及び起源の違いにより、CEAの生化学的特性及び免疫原性は非常に異質性、多様性及び不均質性を示し、よって巨大分子の比較的大きいファミリーを形成する。CEA分子は、多くの異なる抗原エピトープを有し、これらの異なるエピトープは、成体、胎児器官の異なる正常組織及び様々な悪性腫瘍組織において異なって発現され、その特異性も異なる。Hammarstromらは、1989年に、CEA抗原エピトープを5つの群、すなわちGold1～5（Gold分類）に分割できることを提案した。Gold1～5群の抗原エピトープがそれぞれCEA分子のドメインA3、B2、B3、A1及びNにあり、A3及びB3ドメインは他のCEA関連分子との相同性が低く、これらは、CEA分子の比較的ユニークなドメインであることが研究において示されている。

10

20

【0003】

CEAは、細胞の細胞膜上及び細胞質中で主に発現され、8週齢の胚の様々な胚葉組織においても発現される。3カ月を超える胚の組織では、CEAは、胃腸上皮組織において主に発現されるが、成体組織におけるCEAの発現は著しく低減又は減じられ、結腸上皮細胞の表面上で痕跡量が発現されるのみである。しかし、CEAは、結腸直腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、膀胱がん、胆嚢がん及び食道がんを含む多くの悪性腫瘍において50～90%までの陽性率で高発現される。CEAは、これらの悪性腫瘍の転移巣においても高発現され、発現レベルは原発巣よりも高い。これらの腫瘍のうち、結腸直腸がんにおけるCEA発現は、陽性率（95%より高い）及び強度の両方の点で最も高い。CEAは、結腸直腸がん組織のほぼ全てで高発現され、肝臓転移巣のような転移巣におけるCEAの発現レベル及び陽性率は、原発巣よりも著しく高い。悪性腫瘍におけるCEAの発現は、腫瘍の量、段階、転移及び予後と密接に関係することも多くの研究において証明されている。よって、CEAは、悪性腫瘍についての特異的分子マーカーとして広く認識され、このことにより、腫瘍の標的治療及び診断についての最良の標的の1つとなっている。

30

40

【0004】

CEA陽性悪性腫瘍は高い罹患率を有し、非常に多数の患者に影響を与え、世界中の人々の健康について最も驚異となる疾患の1つになっている。例えば、CEAを高発現する結腸がんは、最も一般的に見られる悪性腫瘍の1つである。欧州及びアメリカの先進国における結腸直腸がんの罹患率は、全ての悪性腫瘍のうちで第3位であり、死亡率は第2位である。新しく発生した事例は世界中で毎年100万件を超え、529,000名を超える患者が結腸直腸がんによって死亡する。毎年、中国において400,000名近くの結腸直腸がん患者が新しく発生し、結腸直腸がん患者の200,000名近くが、治療に不応性であることにより死亡する。現在までに、FDAは、結腸がんについての4つの一般的に用

50

いられる化学療法医薬：フルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチン及びカペシタピンのみを承認している。これらの現在利用可能な術後の補助的治療としての化学療法医薬及び化学療法レジメンは、結腸直腸がんの再発率を約15%にまで低減でき、5年生存率を約10～13%にまで改善及び増加できる。抗体標的医薬は、悪性腫瘍を治療するために最近10年間の間に開発されている別の型の新しい医薬である。非ホジキンリンパ腫などのいくつかの血液系腫瘍の臨床的治療において、これは著しい治療効果を示し、患者の5年生存率を増加できる。CEA抗原を標的として用いる放射活性抗体標的治療剤として、CEA抗体医薬は現在のところ臨床的使用について承認されていない。しかし、2つのCEA抗体放射性免疫治療剤が、第I相、第II相の臨床試験について承認されている。1つは¹³¹I-hMN-14抗体医薬、すなわち¹³¹Iとカップリングした組換えヒト化抗CEA抗体hMN-14であり、これは、1999年に米国のImmunomedics Corp.により開発され、現在、進行結腸直腸がんにおける薬物耐性転移を治療するための第II相臨床試験がほぼ終了し、第III相臨床試験に入っている。別の抗ヒトCEA抗体医薬は、放射活性核種⁹⁰YとカップリングしたcT84.66ヒト/マウスキメラ抗体であり、これは米国のCity of Hope National Medical CenterによりFDAの承認のもとで開発されている。現在、進行悪性腫瘍を治療するための第I相臨床試験が終了した。しかし、これらの2つのCEA抗体医薬は、特異性をさらに改良する必要がある、毒性及び副作用をさらに低減する必要がある、抗体の親和性が過剰に高く、このことにより、標的放射性免疫治療中に親和性バリアの発生を引き起こす傾向があり、それにより治療効果に著しく影響するなどのいくつかの問題をまだ有している。従来技術の抗CEA抗体の問題を克服するための新しい抗CEA抗体に対する必要性が存在する。

【0005】

抗体の結合特異性及び親和性はともに、軽鎖及び重鎖の超可変領域（相補性決定領域、略してCDRともよばれる）のアミノ酸配列により主に決定されることが多くの従来の研究において結論付けられている。米国食品医薬品局（FDA）は、その教育的原理の中で、同じ相補性決定領域を有する同じ型の全ての抗体は1つの抗体に属すると断言している。よって、臨床的な治療価値を有する1つの抗体のCDRを得た後に、その非CDR領域のアミノ酸配列は、様々な確立された知られている技術により容易に変化させて、同じ又はよりよい生物活性を有する変異体を得ることができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、顕著なCEA結合特異性及び適度な親和性を有する親の抗CEAマウスモノクローナル抗体に基づく。

【課題を解決するための手段】

【0007】

該抗体のCDR領域の配列は、クローニング、同定及び遺伝子構造分析により決定されている。対応するヒト化キメラ抗体及びその真核細胞発現ベクターが構築され、抗CEAヒト化キメラ抗体を発現して分泌する細胞株が得られた。

本発明は、元のマウスモノクローナル抗体のものと同様である適度な親和性に加えて、前記ヒト化キメラ抗体が、優れたCEA結合特異性及びin vivo腫瘍標的特性も有し、結腸がんの増殖を多くの動物モデルにおいてin vivoで著しく阻害できることをさらに実証する。該抗体はヒト化されているので、抗体の毒性及び副作用は、ヒトに用いた場合に低減できる。本発明は、動物モデル及び放射性免疫イメージングのような実験をさらに採用して、前記ヒト化キメラ抗体が、CEA陽性腫瘍についての優れた標的特性を有し、よって、CEA陽性腫瘍についてのin vivo診断剤を調製するために用いることができることをin vivoにおいて十分に証明する。さらに、本発明は、放射性免疫治療などの実験も採用して、いくつかの動物モデルの体内において、前記ヒト化キメラ抗体がCEA陽性腫瘍の増殖を阻害するための優れた能力を有し、よって、CEA陽

性腫瘍のための治療用医薬の調製において用いることができることを実証する。

【0008】

よって、本発明は、以下の態様に主に関する。

第1の態様では、本発明は、モノクローナル抗体の重鎖が、配列番号7～9に示すCDR領域を含み、モノクローナル抗体の軽鎖が、配列番号10～12に示すCDR領域を含む、癌胎児性抗原に対するヒト化キメラモノクローナル抗体又はその機能的変異体に関する。

【0009】

第2の態様では、本発明は、抗CEAヒト化キメラモノクローナル抗体の軽鎖のアミノ酸配列が、配列番号1であり、重鎖のアミノ酸配列が、配列番号2である、抗CEAヒト化キメラモノクローナル抗体又はその機能的変異体に関する。

10

【0010】

第3の態様では、本発明は、前記ヒト化キメラ抗体のCDR領域と同一であるCDR領域を有するポリペプチドに関し、該ポリペプチドは、前記ヒト化キメラ抗体の生物活性と同等又はそれより高い生物活性を有する。抗体の結合特異性及び親和性がともに、CDR領域により主に決定されることが当技術分野において知られている。様々な確立された知られている従来技術に基づいて、非CDR領域のアミノ酸配列を容易に変化させて、同等又はそれより高い生物活性を有する変異体を得ることができる。

【0011】

第4の態様では、本発明は、第1若しくは第2の態様によるモノクローナル抗体又はその変異体をコードするか又は第3の態様によるポリペプチドをコードする核酸に関する。核酸の配列が変化しても、トリプレットコドンの遺伝子ドグマに従って配列番号1のアミノ酸配列及び配列番号2のアミノ酸配列を含む抗体タンパク質に最終的に翻訳できる限りは、それはやはり前記抗CEAヒト化キメラ抗体をコードするポリヌクレオチドであることが当技術分野において知られている。前記核酸は、DNA又はRNAであり得る。

20

【0012】

第5の態様では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列及び配列番号2のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関し、好ましくは、該発現ベクターは、真核細胞において高発現される。好ましくは、前記真核細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞である。好ましい実施形態では、前記発現ベクターは、図4に示すpSRNC-C-CEA又は図5に示すpSRDC-C-1-CEAである。

30

【0013】

第6の態様では、本発明は、第5の態様による発現ベクターを含む宿主細胞に関する。好ましい実施形態では、本発明の宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、特に寄託番号第CGMCC3803号の細胞である。

【0014】

第7の態様では、本発明は、治療有効量の態様1～3の1つによる前記抗体若しくはポリペプチド又はその機能的変異体(例えば複合体、融合タンパク質)の、或いは第4の態様による前記核酸の、或いは第5の態様による前記ベクターの、或いは第6の態様による前記宿主細胞の、抗腫瘍医薬の調製における使用に関する。前記腫瘍は、結腸直腸がん、胃がん、肺がん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、膀胱がん、胆嚢がん及び食道がん、好ましくは結腸直腸がんからなる群から選択される。好ましい実施形態では、前記抗腫瘍医薬は、活性成分として放射性物質とカップリングした態様1～3のいずれか1つによる前記抗体又はポリペプチドを含み、好ましくは、前記放射性物質は、¹³¹Iである。

40

【0015】

第8の態様では、本発明は、態様1～3の1つによる前記抗体若しくはポリペプチド又はその機能的変異体(例えば複合体、融合タンパク質)の、或いは第4の態様による前記核酸の、或いは第5の態様による前記ベクターの、或いは第6の態様による前記宿主細胞の、腫瘍診断剤の調製における使用に関する。前記腫瘍は、結腸直腸がん、胃がん、肺が

50

ん、乳がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、前立腺がん、膀胱がん、胆嚢がん及び食道がん、好ましくは結腸直腸がんからなる群から選択される。好ましい実施形態では、前記腫瘍診断医薬は、活性成分として放射性免疫イメージング剤とカップリングした態様1～3のいずれか1つによる前記抗体又はポリペプチドを含み、好ましくは、前記放射性免疫イメージング剤は、¹⁸⁸Reである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】親のマウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞の抽出した全RNAについてのアガロースゲル電気泳動を用いた分析を示す。レーン1．分子量マーカー、DNA/HindIII。レーン2．親のマウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞の全RNA。

10

【図2】親のマウスモノクローナル抗体VL、VH遺伝子のPCR産物についてのアガロースゲル電気泳動を用いた分析を示す。レーン1．分子量マーカー、DNA/HindIII。レーン2．親のマウスモノクローナル抗体VL遺伝子のPCR産物。レーン3．親のマウスモノクローナル抗体VH遺伝子のPCR産物。

【図3】増幅により得られた親のマウスモノクローナル抗体VL、VH遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号7）及びそのアミノ酸配列（配列番号8）並びにCDR配列を示す。

【図4】抗CEAヒト化キメラ抗体軽鎖真核発現ベクターpSRNC-C-CEAの構造についての概略図を示す。Pw、減弱化真核プロモーター；Neo、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（neo）遺伝子；PhCMV-IE、ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター及びエンハンサー；VL遺伝子、リーダーペプチド配列及び5'端イントロンスプライシング部位配列を有する軽鎖可変領域の遺伝子断片；C遺伝子、ヒト抗体軽鎖の鎖定常領域遺伝子断片；BGHPolA、ウシ成長ホルモンポリAテイル付加部位；Ap、アンピシリン耐性遺伝子。

20

【図5】抗CEAヒト化キメラ抗体重鎖真核発現ベクターpSRDC-C1-CEAの構造についての概略図を示す。Pw、減弱化真核プロモーター；dhfr、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子；PhCMV-IE、ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター及びエンハンサー；VH遺伝子、リーダーペプチド配列及び5'端イントロンスプライシング部位配列を有する重鎖可変領域の遺伝子断片；C1遺伝子、ヒト抗体重鎖の鎖定常領域遺伝子断片；BGHPolA、ウシ成長ホルモンポリAテイル付加部位；Ap、アンピシリン耐性遺伝子。

30

【図6】抗CEAヒト化キメラ抗体を高レベルで発現及び分泌する細胞株についての構築及びスクリーニングプロセスを示す。

【図7】ELISA法を用いて測定した、抗CEAヒト化キメラ抗体を発現及び分泌するCHO細胞株の上清中のキメラ抗体含量を示す。ここで、CHO上清（1：1000）、OD490 = 1.520は、0.08 µg/ml、上清ストック溶液の濃度：0.08 × 1000 = 80 µg/mlに相当する。

【図8】RT-PCRを用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体の抗原特異性を示す。レーン1．DNA/HindIII。レーン2．320bpマーカー。レーン3．抗CEAヒト化キメラ抗体VL遺伝子のPCR増幅産物。レーン4．抗CEAヒト化キメラ抗体VH遺伝子のPCR増幅産物。レーン5、6．陰性対照。

40

【図9】免疫蛍光を用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体の抗原特異性を示す。

【図10】抗CEAヒト化キメラ抗体が、いくつかのCEA発現がん細胞上のCEA抗原を認識できることを示す。

【図11】ウェスタンブロッティングを用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体のヒト化特性を示す。レーン1．分子量マーカー。レーン2．キメラ抗体、2次抗体として抗ヒトIgG Fc-HRP。レーン3．マウスモノクローナル抗体、2次抗体として抗ヒトIgG Fc-HRP。レーン4．キメラ抗体、1次抗体として抗ヒト鎖。レーン5．マウスモノクローナル抗体、1次抗体として抗ヒト鎖。

【図12】抗CEAヒト化キメラ抗体の組織1グラムあたりのパーセント（ID%/g）

50

として表した、放射活性線量取り込み分析の結果を示す。

【図13】腫瘍組織と正常組織との間(T/NT)の抗CEAヒト化キメラ抗体の放射線比率の結果を示す。

【図14】抗CEAヒト化キメラ抗体によるCEA陽性結腸がんの腫瘍の*in vivo*放射性免疫イメージングを示す。

【図15】抗CEAヒト化キメラ抗体とI-13との複合体の単回投与によるヒト結腸がんを有するヌードマウス移植腫瘍モデルの治療の結果を示す(増殖曲線)。

【図16】抗CEAヒト化キメラ抗体とI-13との複合体の複数回投与によるヒト結腸がんを有するヌードマウス移植腫瘍モデルの治療の結果を示す(増殖曲線)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の抗CEAヒト化キメラ抗体の抗体可変領域は、抗マウスモノクローナル抗体C24由来であり、これは、本発明者らがCEAを用いてマウスを免疫することにより以前に調製及び取得し、2010年5月4日に寄託番号第CGMCC3802号の下で寄託されたハイブリドーマ細胞から得ることができる。いくつかの以前の研究(Lu, Baolan, Cheng, Ming, Qiang, Laiying. 「The study for the preparation and immunological characteristics of carcinoembryonic antigen monoclonal antibody」 Chinese Journal of Biotechnology, 1986, 15(2):37頁)は、このマウスモノクローナル抗体が、特に高い特異性及び適度な親和性を含む、標的治療に適切ないくつかの優れた生物学的特性を有することを示す。該モノクローナル抗体は、CEA抗原と高い特異性で結合し、胃がん、肺がん、結腸がん、直腸がん、乳がん、卵巣がん、膀胱がんなどを含むいくつかのヒト腫瘍と*in vitro*で特異的に結合できるが、正常ヒト組織細胞と高い特異性ではほとんど結合しない。数千の試料の免疫組織化学的分析は、抗体が、上記のいくつかの腫瘍組織と、60%~90%までの陽性率で結合するが、正常組織との結合についての陽性率は5%~10%の間のみであることを実証する。さらに、高い特異性に加えて、標的治療についての別の利点は、モノクローナル抗体が適度な親和性を有することである。抗原-抗体結合力学によると、標的治療に用いる場合、過剰に高い親和性を有する抗体は、標的抗体が腫瘍表面に吸着し、腫瘍の内部にさらに浸透してよりよい治療効果を奏することが妨げられる結果となる。よって、適度な親和性を有する抗体が、腫瘍の標的治療のためにより適切である。本発明の抗CEAマウスモノクローナル抗体は、適度な親和性を有し、親和性定数は約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ である。そのヒト化抗体は、腫瘍の臨床治療においてよりよい治療効果及び展望を有すると期待できる。

【0018】

定義

モノクローナル抗体

本明細書で用いる場合、用語「モノクローナル抗体」は、本質的に相同な抗体の群から得られる抗体のことをいい、すなわち、この群に含まれる抗体のそれぞれが、いくつかの自発的突然変異体が非常に少量で存在し得ることを除いて同一である。モノクローナル抗体は、単独標的部位に対して高度に特異的な抗体である。さらに、従来の(ポリクローナル)抗体調製(これは、異なる決定因子(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含有する)とは対照的に、各モノクローナル抗体は、標的上の1つの単独決定因子に対する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体の利点は、ハイブリドーマ培養により合成でき、他の免疫グロブリンが混入しないことである。修飾語「モノクローナル」は、抗体が、本質的に均質な抗体集団から得られるという特徴のことをいうが、何らかの特別なプロセスにより抗体を生成する必要があることを意味しない。例えば、本発明で用いるモノクローナル抗体は、従来の技術によりファージ抗体ライブラリーから単離できる。本発明に従って用いる親のモノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, Nature 256, 495頁(1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法により生

10

20

30

40

50

成できるか、又は組換え法により生成できる。

【0019】

相補性決定領域 (CDR)

本明細書で用いる場合、用語「相補性決定領域」は、免疫グロブリンのような結合分子の可変領域中の配列のことをいう。典型的に、相補性決定領域は、抗原上の認識されるエピトープに相補的（形状及び電荷分布の点で）な抗原結合部位を主にもたらず。CDR領域は、タンパク質若しくはタンパク質断片の直鎖状エピトープ、不連続エピトープ又は立体構造エピトープに特異的であり得る。これらのエピトープは、それらの天然の立体構造でタンパク質上に存在するか、又は変性形（例えばSDS中での可溶化により）でタンパク質上に存在する場合もある。エピトープは、翻訳後修飾タンパク質で構成されることもできる。

10

【0020】

ポリヌクレオチド

本明細書で用いる場合、「ポリヌクレオチド」は、ストリンジェントな条件下で本質的に同一のヌクレオチド配列とハイブリダイズでき（天然ヌクレオチドと全く同じように）、及び/又は天然ヌクレオチドと全く同じように同一アミノ酸に翻訳できる限り、デオキシリボ-ポリヌクレオチド、リボ-ポリヌクレオチド又は天然のリボヌクレオチドの本質的な特性を有するそれらの類似体を含む。ポリヌクレオチドは、天然若しくは異種構造又は調節遺伝子の全長配列若しくはサブシーケンスであり得る。そうでないと明記しない限り、この用語は、特定の配列及びその相補配列を含む。よって、用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書で用いる場合、安定性又は他の理由のために改変された原則的な鎖DNA又はRNAを含む。

20

【0021】

ポリペプチド

本明細書で用いる場合、用語「ポリペプチド」は、アミノ酸残基のポリマーのことをいう「ペプチド」及び「タンパク質」と交換可能に用いることができる。この用語は、1若しくは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的類似体であるアミノ酸ポリマーのために用いられ、天然アミノ酸ポリマーのために用いられる。天然アミノ酸のこのような類似体の本質的な特性は、該類似体をタンパク質に組み込んだ場合に、タンパク質が、同一であるが完全に天然のアミノ酸で構成されるタンパク質により刺激される抗体と特異的に反応できることである。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、それらに限定されないがリン酸化、グリコシル化、脂質付加、硫化、グルタミン酸残基の γ -カルボキシル化、ヒドロキシル化及びADP-リボシル化を含む改変も含む。

30

【0022】

特異的結合

本明細書で用いる場合、抗体と抗原のようなその結合パートナーとの間の相互作用に関して言及する用語「特異的結合」は、上記の相互作用が、抗原決定因子又はエピトープの存在のような結合パートナー上の特定の構造の存在に依存することを意味する。言い換えると、上記の結合パートナーが他の分子又は生物の混合物中に存在しても、上記の抗体が、上記の結合パートナーとまだ優先的に結合又は認識する。上記の結合は、共有相互作用若しくは非共有相互作用又は2つの相互作用の両方により媒介できる。つまり、用語「特異的結合」は、抗原又はその断片との免疫特異的結合及び他の抗原との非免疫特異的結合のことをいう。免疫特異的結合の結合分子は、放射性免疫分析(RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、BIACORE又は当技術分野において既知のアッセイにより決定されるより低い親和性で他のペプチド又はポリペプチドと結合できる。結合分子又は抗原と免疫特異的に結合するその断片は、関連抗原と交差反応できる。好ましくは、結合分子又は抗原と免疫特異的に結合するその断片は、他の抗原と交差反応しない。

40

【0023】

機能的変異体

本明細書で用いる場合、用語「機能的変異体」は、親の結合分子のヌクレオチド及び/

50

又はアミノ酸配列と比較した場合に1若しくは複数のヌクレオチド及び/又はアミノ酸を
 改変するヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列を含むが、親の結合分子の結合パートナー
 (例えばCEA)とまだ競合的に結合できる結合分子のことをいう。言い換えると、親の
 結合分子のヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列における改変が、上記のヌクレオチド配
 列によりコードされるか又は上記のアミノ酸配列を含む結合分子の結合特異性に著しく影
 響しないか又はそれを変化させない、すなわち上記の結合分子が、その標的部位をまだ認
 識し、それと結合できる。上記の機能的変異体は、ヌクレオチド又はアミノ酸の置換、付
 加及び欠失を含む保存配列改変を有することができる。これらの改変は、部位特異的突然
 変異誘発及びランダムPCR媒介突然変異誘発のような当技術分野において既知の標準的
 な技術により導入でき、天然及び非天然のヌクレオチド並びにアミノ酸を含むことができ

10

【0024】

保存アミノ酸置換は、同様の構造又は化学的特異性を有するアミノ酸残基によるアミノ
 酸残基の置き換えを含む。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーが決定されている
 。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性
 側鎖(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えばグリシン、アス
 パラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)
 、非極性側鎖(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニル
 アラニン、メチオニン)、 β -分岐側鎖(例えばトレオニン、バリン、イソロイシン)及
 び芳香族側鎖(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有
 するアミノ酸を含む。当業者は、上記以外のアミノ酸残基ファミリー分類も用いることが
 できることを理解している。さらに、変異体は、異なる構造又は化学的特性を有するアミ
 ノ酸残基によるアミノ酸残基の置き換えのような非保存アミノ酸置換も有することができ
 る。同様の小さい変化は、アミノ酸の欠失若しくは挿入又は両方も含み得る。アミノ酸残
 基を、その免疫学的活性を消去することなく置換、挿入又は欠失できることを決定するた
 めの指示は、当技術分野において既知のコンピュータプログラムを用いて見出すことができ

20

【0025】

ヌクレオチド配列中の変異は、トランジション変異若しくはトランスバージョン変異の
 ような遺伝子座において生じる単独変異(部位変異)であり得るか、又は単独の座におけ
 る複数のヌクレオチドの挿入、欠失若しくは変化であり得る。さらに、1又は複数の変化
 を、ヌクレオチド配列内の任意の数の座において作製できる。変異は、当技術分野におい
 て既知の適当な方法により行うことができる。

30

【0026】

キメラ抗体

キメラ抗体を生成するための方法は、当業者により得ることができる。例えば、軽鎖及
 び重鎖はそれぞれ、例えば免疫グロブリン軽鎖及び免疫グロブリン重鎖を用いて別々のプ
 ラスミドにおいて発現できる。次いで、これらを精製し、*in vitro*にて完全抗体
 としてアセンブリする。このようなアセンブリを遂行するための方法は、記載されている
 。例えばScharff, M., Harvey Lectures 69: 125頁(1
 974)を参照されたい。Oira, Bio Techniques 4(4): 214~
 221頁(1986);及びSunら, Hybridoma 5(1986) Suppl
 1: 517~20頁も参照されたい。

40

【0027】

回収した単離軽鎖及び重鎖からIgG抗体を形成するための*in vitro*反応パラ
 メータも記載されている。例えばBeychok, S., Cells of Immun
 oglobulin Synthesis, Academic Press, New Y
 ork, 69頁、1979を参照されたい。軽鎖と重鎖との細胞内会合を遂行するよう
 同じ細胞内で軽鎖と重鎖とを同時発現させ、次いでそれらを連結して完全H₂L₂IgG
 抗体を形成することも可能である。このような同時発現は、同じ宿主細胞内で同じ又は異

50

なるプラスミドを用いて達成できる。

【0028】

ヒト化抗体

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又は非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するその断片（例えば抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂断片又は標的と結合する他の配列）である。一般的に、ヒト化抗体は、全て又は本質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、全て又は本質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域のものである、ほぼ完全な可変領域の少なくとも1つ、及び通常2つである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含有でき、これは、通常、選択されたヒト免疫グロブリン鑄型の免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分である。

10

【0029】

ベクター

用語「ベクター」は、別の核酸を宿主細胞に導入して複製し、あるいはいくつかの場合には発現させるために別の核酸を挿入できる核酸分子のことをいう。言い換えると、ベクターは、連結された核酸分子を移動させることができる。クローニングベクター及び発現ベクターはともに、本発明で用いる用語「ベクター」に包含される。ベクターは、それらに限定されないが、プラスミド、コスミド、細菌人工染色体（BAC）及び酵母人工染色体（YAC）並びに植物若しくは動物（ヒトを含む）のファージ又はウイルスに由来するベクターを含む。ベクターは、所定の宿主により認識される複製起点を含有する。発現ベクターの場合、ベクターは、プロモーター及び宿主により認識される他の調節領域も含有する。別の核酸分子を含有するベクターは、形質転換、トランスフェクションにより又はウイルス侵入機構を用いることにより細胞に導入できる。いくつかのベクターは、宿主細胞内で自律複製できる（例えば細菌複製起点を有するベクターは、細菌内で複製できる）。他のベクターは、宿主に導入された場合に宿主のゲノムに組み込まれ、そのことにより宿主のゲノムと一緒に複製できる。

20

【0030】

作動可能に連結した

用語「作動可能に連結した」とは、2つ以上の核酸要素が物理的に通常連結され、互いに機能的関係を有することを意味する。例えば、プロモーターが、コード配列の転写若しくは発現を開始又は調節できるならば、プロモーター及び上記のコード配列は、作動可能に連結しており、この場合、コード配列は、プロモーターの「制御」下であると解釈される。

30

【0031】

宿主

本明細書で用いる場合、用語「宿主」は、発現ベクターのようなベクターが導入された生物又は細胞のことをいう。上記の生物又は細胞は、原核若しくは真核の生物又は細胞であり得る。この用語は、ある対象の生物又は細胞のみに言及するのではなく、この生物又は細胞の子孫にも言及すると理解される。変異又は環境の影響により、いくつかの改変が後続の世代に生じ、よって、このような子孫は、親の生物又は細胞と実際上異なるが、これらは、本明細書で用いる場合の用語「宿主」の範囲内にまだ含まれる。

40

【0032】

薬学的に許容される賦形剤

「薬学的に許容される賦形剤」は、医薬、活性剤又は結合分子のような活性分子と組み合わせる適度な又は簡便な剤形を調製する任意の不活性な薬剤のことをいう。「薬学的に許容される賦形剤」は、用いられる投与量及び濃度にて宿主にとって非毒性であり、医薬、薬又は結合分子を含有する調製物の他の成分と適合できる賦形剤である。

【0033】

治療有効量

50

用語「治療有効量」は、がんを効果的に予防、改善及び/又は治療できる本発明の抗体の量を意味する。

【0034】

治療

用語「治療」は、疾患を治癒又は疾患を予防若しくは疾患の進行を少なくとも遅らせるために用いる治療的治療或いは予防的措置のことをいう。治療される対象は、がん罹患者である対象及びがんの予防を必要とする対象を含む。がんから部分的又は完全に回復した対象も治療を必要とする。予防は、がんの進行を阻害若しくは遅くすること或いはがんに関連する1若しくは複数の症状の発症、発生又は進行を阻害又は低減することを含む。

【0035】

本記載では、用語「含む」は、言及した要素、整数若しくはステップ又は要素、整数若しくはステップの群を含むが、他の要素、整数若しくはステップ又は要素、整数若しくはステップの群を排除しないことを意味する。

【0036】

一態様では、本発明は、モノクローナル抗体の重鎖が、配列番号7～9に示すCDR領域を含み、モノクローナル抗体の軽鎖が、配列番号10～12に示すCDR領域を含む、癌胎児性抗原に対するヒト化キメラモノクローナル抗体又はその機能的変異体を提供する。

【0037】

一態様では、本発明は、抗体の軽鎖タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号1を含むか又は配列番号1からなり、重鎖タンパク質のアミノ酸配列が、配列番号2を含むか又は配列番号2からなる抗CEA抗体又はその機能的変異体を提供する。本発明の好ましい実施形態では、抗CEA抗体は、組換え又はモノクローナル抗体である。別の好ましい実施形態では、前記抗体は、キメラ又はヒト化抗体である。

【0038】

本出願では、用語「本発明の抗体」は、モノクローナル抗体の重鎖が、配列番号7～9に示すCDR領域を含み、モノクローナル抗体の軽鎖が、配列番号10～12に示すCDR領域を含む、本発明による抗CEAヒト化キメラモノクローナル抗体又はその機能的変異体であることをいう。具体的に、抗CEAヒト化キメラ抗体の軽鎖タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1を含むか又は配列番号1からなり、重鎖タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号2を含むか又は配列番号2からなる。

【0039】

本発明は、前記ヒト化キメラ抗体のものと同一であるCDR配列を有するポリペプチドにも関し、これは、本発明による前記ヒト化キメラ抗体の生物活性と同等又はそれより高い生物活性を有する。用語「本発明のポリペプチド」は、前記ヒト化キメラ抗体のものと同一であるCDR配列を有するポリペプチドのことをいい、前記ポリペプチドは、本発明による前記ヒト化キメラ抗体の生物活性と同等又はそれより高い生物活性を有する。

【0040】

別の態様では、本発明は、本発明の抗体若しくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその相補配列を含む本発明の抗体をコードする核酸に関する。前記核酸は、DNA又はRNAであり得る。ヌクレオチド配列が変化しても、トリプレットコドンの遺伝子ドグマに従って配列番号1のアミノ酸配列及び配列番号2のアミノ酸配列を含む抗体タンパク質に最終的に翻訳できる限りは、それはやはり前記抗CEAヒト化キメラ抗体をコードするポリヌクレオチドであることが当技術分野において知られている。

【0041】

別の態様では、本発明は、前記抗CEAヒト化キメラ抗体を調製するために用いることができる組換え発現ベクターを提供する、前記ベクターは、本発明の抗体をコードする核酸を含む。ベクターは、F、R1、RP1、Col、pBR322、TOL、Tiなどのプラスミド；コスミド；ラムドイド、M13、Mu、P1、P22、Q、T-even、T-odd、T2、T4、T7などのファージ；植物ウイルス；又は動物ウイルスに

10

20

30

40

50

由来できる。ベクターは、クローニング及び/又は発現の目的のため及び遺伝子治療の目的のために用いることができる。1若しくは複数の発現調節核酸分子と作動可能に連結した本発明の抗体をコードする1又は複数の核酸分子を含むベクターも、本発明に含まれる。ベクターの選択は、組換え手順及び用いる宿主に依存する。ベクターを宿主細胞に導入することは、リン酸カルシウムトランスフェクション、ウイルス感染、D E A E - グルカン媒介トランスフェクション、リポフェクタミントランスフェクション又はエレクトロポレーションにより達成できる。ベクターは、自律複製できるか又はベクターが組み込まれた染色体と一緒に複製できる。好ましくは、前記ベクターは、1又は複数の選択マーカーを含有する。前記マーカーの選択は、選択される宿主細胞に依存でき、本発明にとって重要でなく、当業者に知られている。前記マーカーは、それらに限定されないが、カナマイシン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン、ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK)、マウスジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)を含む。具体的に、本発明では、抗CEAヒト化キメラ抗体の軽鎖及び重鎖をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ真核プロモーターを有する2つのベクターに組換えによりクローニングされる。得られる発現ベクターを、真核宿主細胞に導入する。抗体を高い収率で発現する真核宿主細胞をスクリーニングにより得て、前記宿主細胞の培養物の上清は、細胞により分泌された抗CEAヒト化キメラ抗体タンパク質を多量に含有する。抗CEAヒト化キメラ抗体タンパク質は、当技術分野において既知の技術的方法に従って簡便に抽出及び調製できる。好ましい実施形態では、前記発現ベクターは、それぞれpSRNC-C-CEA及びpSRDC-C-1-CEAであり、これらは、前記抗CEAヒト化キメラ抗体の遺伝子と、メトトレキセートストレス増幅発現選択マーカー遺伝子(dhfr)とを含有し、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において発現できる。好ましい実施形態では、前記宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOである。

【0042】

本発明は、前記ベクターの1又は複数のコピーを含有する宿主も提供する。好ましくは、前記宿主は、宿主細胞である。宿主細胞は、それらに限定されないが、哺乳動物、植物、昆虫、真菌又は細菌を起源とする細胞を含む。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のような哺乳動物細胞を用いる発現系は、本発明において好ましい。好ましい実施形態では、本発明は、pSRNC-C-CEA及びpSRDC-C-1-CEAを含有するチャイニーズハムスター卵巣細胞である組換え宿主細胞(Rcc24)を提供する。前記組換え宿主細胞は、段階的メトトレキセートストレス増幅発現、発現収率によりスクリーニングした高発現株のサブクローニング及び血清フリー培養における最終的な馴化により得られる。前記宿主細胞は、China General Microbiological Culture Collection Centerに、2010年5月4日に寄託番号第CGMCC3803号で寄託された。

【0043】

本発明の一態様によると、抗CEAヒト化キメラ抗体タンパク質は、ヒトCEA陽性腫瘍を診断及び/又は治療するための医薬の調製において用いることができる。追跡分子を本発明の抗CEAヒト化キメラ抗体とカップリングさせることにより、ヒトCEA陽性腫瘍を診断するための医薬を調製できる。前記追跡分子は、放射活性核種(例えば¹²⁵I、¹¹¹In、⁹⁹Tcなど)であり得る。代わりに、ナノ蛍光物質又は遠赤外物質などの臨床的に許容される技術的手段により検出できる他の型の分子を用いることもできる。本発明の好ましい実施形態では、追跡分子は、放射活性核種レニウム-188である。追跡分子を抗CEAヒト化キメラ抗体とカップリングさせた後に、CEA陽性腫瘍は、カメラ又はイメージャーによる放射性免疫イメージングにより、比較的良好なシグナルノイズ比、標的特性及びイメージング品質で正確に診断できる。

【0044】

本発明の抗体は、腫瘍の治療のための医薬組成物の調製において用いることもできる。さらに、放射活性核種などのある治療剤を、抗CEAヒト化キメラ抗体とカップリングさ

10

20

30

40

50

せて、ヒトCEA陽性腫瘍の治療のための医薬組成物を調製できる。本明細書で記載する場合、「抗体複合体 (antibody conjugate)」は、放射活性核種のような治療用物質を本発明の抗体と、当業者に既知の様々なカップリング法によりカップリングさせることにより得られる複合体のことをいう。前記放射活性核種は、 ^{131}I 及び ^{90}Y を含む。本発明の好ましい実施形態では、前記治療用物質は、放射活性核種ヨウ素-131である。治療用物質を抗CEAヒト化キメラ抗体とカップリングさせた後に、放射性免疫治療をCEA陽性腫瘍について行うことができ、これは、腫瘍の増殖を著しく阻害でき、優れた治療効果を有し、明らかな毒性及び副作用を本質的に有さない。好ましい実施形態では、抗体又は抗体複合体は、卵巣がん、乳がん、肺がん及び他のCEA陽性腫瘍を含むCEAを発現する腫瘍の診断又は治療のために用いることができる。好ましい具体的な実施形態では、CEAを発現する前記腫瘍は、結腸直腸がんである。現存する臨床的診断技術に基づいて、当業者は、患者の血清中のCEA含量を検出でき、患者の腫瘍がCEA陽性であるかを決定でき、治療すべき適度な腫瘍の型を容易に選択できる。当業者は、前記医薬組成物が、薬学的に許容される賦形剤も含み得ることも理解している。

10

【0045】

前記抗CEAヒト化キメラ抗体は、それらに限定されないが、非経口投与、例えば経静脈、注入、局部投与などを含む従来の投与経路により、患者に医薬として投与できる。適度な用量は、投与の方法並びに治療される対象及び耐容能レベルを含むいくつかのパラメータに依存する。 ^{131}I 標識抗CEAヒト化キメラ抗体が、用量依存的にヒト結腸直腸がんの増殖を著しく阻害できることが明確である。好ましい用量は、 12.5mCi/kg であり、治療は、10日間隔で2回行った。

20

【0046】

本発明を、以下の実施例によりさらに説明するが、いずれの実施例又はそれらの組み合わせも、本発明の範囲又は実施形態を限定すると解釈されない。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲により定義される。当技術分野における常識と組み合わせた本明細書の記載に基づいて、当業者は、特許請求の範囲により定義される範囲を明確に理解できる。

【0047】

生物材料の寄託情報

親のマウスモノクローナル抗体を生成するマウスハイブリドーマ細胞株C24は、China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC, Datun Road in Chaoyang District of Beijing, the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences) に、2010年5月4日に寄託番号第CGMCC3802号で寄託した。

30

【0048】

ヒト化キメラモノクローナル抗体を生成するCHO細胞株Rcc24は、China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC, Datun Road in Chaoyang District of Beijing, the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences) に、2010年5月4日に寄託番号第CGMCC3803号で寄託した。

40

【実施例】

【0049】

実施例1：キメラ抗体についての遺伝子のクローニング及び配列決定

遺伝子クローニング法を用いて、親の抗CEAマウスのモノクローナル抗体中の軽鎖及び重鎖可変領域についての遺伝子をクローニングし、ヌクレオチド配列分析を行った。

【0050】

親の抗CEAマウスモノクローナル抗体の可変領域についての遺伝子を増幅するための方法：マウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞C24からの全RNAの抽出を、トリゾール (Trizol) 試薬 (Gibco) の使用説明に従って次のようにして行った

50

。 1×10^7 マウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞を回収し、 10000 rpm にて1分間遠心分離した。ピペット操作で上清を捨てた後に、 1 ml のトリゾールを加えて細胞を十分に溶解させた。室温にて $3 \sim 5$ 分間静置した後に、 0.2 ml のクロロホルムを加えた。転倒させて混和した後に、試料を 4 、 12000 rpm にて10分間遠心分離し、次いで 0.6 ml の上清を新しい遠心分離チューブに移し、 0.5 ml のイソプロパノールを加えた。転倒させて混和した後に、試料を室温にて $5 \sim 10$ 分間静置し、次いで 4 、 12000 rpm にて10分間遠心分離した。上清を捨てた後に、試料を 75% エタノールで1回洗浄し、風乾し、次いで $50 \mu\text{l}$ の ddH_2O を加えて沈殿物を溶解した。マウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞 cDNA の第1鎖の合成を、製造業者により提供される使用説明に従って MMLV 逆転写酵素 (Gibco) を用いて行った。 $4 \mu\text{l}$ の $5 \times$ 緩衝液、 10 mM の DDT (Promega)、 $10 \mu\text{g}$ の全 RNA、 0.5 mM の最終濃度の dNTP (Promega)、 $10 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度のオリゴ d(T)15 (Promega)、 40 u の RNasin (Promega)、 200 u (U) の MMLV 逆転写酵素 (Gibco) を $20 \mu\text{l}$ の系に加え、これらを次いで混和した。試料を 37 にて1時間、次いで沸騰した水で5分間インキュベートして逆転写酵素を不活性化させた。マウスモノクローナル抗体軽鎖及び重鎖可変領域遺伝子の増幅を、高正確性 DNA ポリメラーゼ Taq (Promega) + Pfu DNA ポリメラーゼ (Promega) を用いて、 $10 \times$ 緩衝液 $10 \mu\text{l}$ 、 10 mM dNTP $2 \mu\text{l}$ 、 cDNA $20 \mu\text{l}$ 、各増幅プライマー 50 pmol を含有する $100 \mu\text{l}$ の反応系において行った。反応系の表面を、混和の後にパラフィン油で覆った。 95 の水浴中で5分間インキュベートした後に、 $1 \sim 2 \text{ u}$ の Taq + Pfu DNA ポリメラーゼを、パラフィン油を通して加え、以下のサイクルを開始した： 94 で1分間、 55 で1分間及び 72 で1分間を 30 サイクル、並びに最後のサイクルにおいて 72 で10分間。PCR プライマー：軽鎖可変領域の増幅用プライマー： PVL5 : $5' - \text{GACAT TCAGC TGACC CAGTC TCCA} - 3'$ (配列番号3) ; PVL3 : $5' - \text{GTTA G ATCTC CAGCT TGGTC CC} - 3'$ (配列番号4)。重鎖可変領域の増幅用プライマー： PVH5 : $5' - \text{AGGTS MARCT GCAGS AGTCW GG} - 3'$ (S = C / G、M = A / C、R = A / G、W = A / T) (配列番号5) ; PVH3 : $5' - \text{TGAGG AGACG GTGAC CGTGG TCCCT TGG CC CCAG} - 3'$ (配列番号6)。

【0051】

0.7% 非変性アガロースゲル電気泳動を行って、全 RNA を分析した。 18 S RNA 及び 28 S RNA のサイズは正しく、明度比率は約 $1 : 2$ であり、バンドは明確であり、これらのことは、抽出した全 RNA が比較的完全であったことを示した (図1)。オリゴ d(T)15 をプライマーとして用いて、cDNA の第1鎖を合成し、この cDNA を鋳型として用いて PCR を行った。軽鎖プライマー PVL5 及び PVL3 を用いることにより、約 320 bp の軽鎖可変領域の遺伝子断片を増幅し、重鎖プライマー PVH5 及び PVH3 を用いることにより、約 360 bp の重鎖可変領域の遺伝子断片を増幅した。鋳型を含まないブランク対照は、増幅バンドを示さなかった (図2)。増幅された可変領域遺伝子断片のサイズは、通常の抗体の可変領域遺伝子のサイズと一致した。

【0052】

親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体軽鎖、重鎖可変領域の遺伝子のクローニング、配列決定及び遺伝子構造分析：親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体軽鎖可変領域の遺伝子断片を、大量に増幅した。グラスミルク吸着法を用いて単離及び回収した後に、断片を、PvuII 及び BglII 二重消化に供し、次いで、クローニングベクター pRGWL の対応する部位にクローニングした。 153 個全ての形質転換クローンのうち、 24 個のクローンをスクリーニングのためにランダムに採取し、 6 個の組換えクローンを得た。 3 個の VL 遺伝子組換えクローンをヌクレオチド配列分析のために選択した。ヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列を図3に示した。 3 個のクローンの配列は同一であり、クローニングされた抗体軽鎖可変領域遺伝子が、実際に親の抗 CEA マウスモノクローナル抗

体軽鎖可変領域遺伝子であったことを示した。1個のクローンを3個のクローンからランダムに採取し、pRGWL-C502と命名した。Kabataのデータとの比較から、親の抗CEAマウスモノクローナル抗体のVL(配列番号2)がマウス軽鎖VIサブグループに属することがわかる。軽鎖CDR1~3配列(配列番号10~12)を図3に示した。親の抗CEAマウスモノクローナル抗体重鎖可変領域の遺伝子断片を、大量に増幅した。グラスミルク吸着法を用いて単離及び回収した後に、断片を、PstI及びBstEII二重消化に供し、次いで、クローニングベクターpRGWHの対応する部位にクローニングした。364個全ての形質転換クローンのうち、24個のクローンをスクリーニングのためにランダムに採取し、18個の組換えクローンを得た。3個のVH遺伝子組換えクローンをヌクレオチド配列分析のために選択した。ヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列を図3に示した。3個のクローンの配列は同一であり、クローニングされた抗体重鎖可変領域遺伝子が、実際に親の抗CEAマウスモノクローナル抗体重鎖可変領域遺伝子であったことを示した。1個のクローンを3個のクローンからランダムに採取し、pRGWH-C504と命名した。Kabataのデータとの比較から、親の抗CEAマウスモノクローナル抗体のVH(配列番号1)が、マウス重鎖II(B)サブグループに属することがわかる。重鎖CDR1~3配列(配列番号7~9)を図3に示した。具体的に、配列番号7~12の配列は、次のとおりである：

配列番号7 - His Tyr Tyr Met His
 配列番号8 - Trp Ile Asn Pro Glu Asn Val Asp Thr
 r Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly
 配列番号9 - Tyr Arg Tyr Ala Gly Gly Gly Ala Leu
 u Asp Tyr
 配列番号10 - Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 le His
 配列番号11 - Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 配列番号12 - Gln Gln Trp Asn Asn Asn Pro Tyr Ser

【0053】

実施例2：抗CEAヒト化キメラ抗体についての遺伝子及び発現ベクターの構築

遺伝子クローニング及びDNA組換え法を用いて、親の抗CEAマウスモノクローナル抗体の可変領域遺伝子を、調節配列及びヒト抗体定常領域遺伝子を含むベクターに組み換えて、抗CEAヒト化キメラ抗体の遺伝子及び前記遺伝子を含む真核発現ベクターを構築した。

【0054】

調節配列を有する可変遺伝子断片のPCR増幅：PCR増幅を、高正確性DNAポリメラーゼ、すなわちTaq+Pfu DNAポリメラーゼを、10×緩衝液10µl、10mM dNTP 2µl、プラスミド1µg、50pmolの各増幅プライマーを含む100µl反応系において行った。混和の後に、反応系の表面をパラフィン油で覆った。95℃の水浴中で5分間インキュベートした後に、1~2uのTaq+Pfu DNAポリメラーゼを、パラフィン油を通して加え、以下のサイクルを開始した：94℃で1分間、55℃で1分間及び72℃で1分間を20サイクル、並びに最後のサイクルにおいて72℃で10分間。

【0055】

抗CEAヒト化キメラ抗体の真核発現ベクターの構築及び同定：実施例1において取得及び同定した組換えクローニングプラスミドpRGWL-C502及びpRGWH-C504を鋳型として用いて、クローニングの目的のためにBamHI及びNotI制限部位を有するプライマーPVL5及びPVNP(軽鎖について)並びにPVHS及びPVNP(重鎖について)をPCR増幅のために用いて、リーダーペプチド配列と5'端スプライシング部位とを有する親の抗CEAマウスモノクローナル抗体のVL及びVH配列を増幅した。PCR増幅により、リーダーペプチド配列と5'端スプライシング部位とを有する

親の抗CEAマウスモノクローナル抗体のVL断片を、軽鎖についての組換えプラスミドから増幅し、VL断片のサイズは約500bpであった。リーダーペプチド配列と5'端スプライシング部位とを有する親の抗CEAマウスモノクローナル抗体のVH断片を、重鎖についての組換えプラスミドから増幅し、サイズは約700bpであった。PCR産物を、グラスミルク法を用いて単離及び回収し、次いで、BamHI及びNotIを用いて消化した。「Molecular Cloning」に記載される従来のDNA組換え手順に従って、抗CEAヒト化キメラ抗体遺伝子の完全真核発現ベクターを得るように、VL断片をpSRNC-Cの対応する部位にクローニングし、VH断片をpSRDC-C1の対応する部位にクローニングした。VL及びVH断片をそれぞれ発現ベクターpSRNC-C及びpSRDC-C1に連結した後に、12個のクローンをそれぞれスクリーニングのために採取した。酵素消化により、9個の軽鎖及び7個の重鎖組換えクローンを得た。BamHI及びNotIによる酵素消化の後に、対応するVL及びVH断片を同定し、このことにより、完全抗癌胎児性抗原モノクローナル抗体遺伝子及びその真核発現ベクターの構築が成功したことが実証された。2回のヌクレオチド配列決定により、抗癌胎児性抗原モノクローナル抗体真核発現ベクターpSRNC-C-CEA及びpSRDC-C1-CEA中の可変領域遺伝子配列が、それぞれpRGWL-C502及びpRGWH-C504中に含まれる可変領域遺伝子配列と完全に同一であることが証明された。

10

【0056】

抗CEAヒト化キメラ抗体真核発現ベクターの構造：抗CEAヒト化キメラ抗体真核発現ベクター系は、2つの別々の発現ベクター、すなわち軽鎖真核発現ベクターpSRNC-C-CEAと重鎖真核発現ベクターpSRDC-C1-CEAとを含有するが、これらの構造の概略図を図4及び5に示した。

20

【0057】

実施例3：抗CEAヒト化キメラ抗体の発現ベクターをトランスフェクトしたCHO細胞による発現

CHO-dhfr⁻細胞（本発明者らの実験室にて保管）を、10%FBS、0.03mmol/Lヒポキサンチン(H)、0.003mmol/Lチミジンデオキシヌクレオシド(T)、0.1mmol/Lプロリン(Pro)、0.1mmol/Lグリシン(Gly)、100u/mlペニシリン/ストレプトマイシン、2mmol/Lグルタミンを含むDMEM完全成長培地中で、5%CO₂、37℃の条件下で培養した。継代を、1:10の比率で3~4日毎に常法通り行った。上記の細胞培養試薬は、Gibco社から購入した。遺伝子トランスフェクション法を用いて、リポフェクタミン(LipofectAMINE)試薬(Gibco)をトランスフェクションのために用いた。細胞に抗CEAヒト化キメラ抗体の発現ベクターをトランスフェクトし、次いで、H、T、Glyを含まない培地で培養することによりスクリーニングした。クローンが形成された後に、200µg/mlのG418(Gibco)を含有する選択培地を培養のために用いて、スクリーニングを行った。その結果、4µgの軽鎖及び重鎖キメラ抗体遺伝子発現ベクターのそれぞれを用いて、CHO-dhfr⁻細胞をトランスフェクトした。クローンの形成は、約10日後に観察され、全て一緒に約350個のクローンが計数された。プールした耐性クローンの培養物の上清は、間接ELISA法を用いることによりOD₄₉₀ = 1.622として測定され(陰性対照CHO-dhfr⁻上清のOD₄₉₀は0.063のみであった)、このことは、トランスフェクトした細胞の上清中に抗CEAヒト化キメラ抗体発現が存在したことを示した。

30

40

【0058】

【表 1】

表 1. トランスフェクション後の細胞培養物中の ELISA による抗 CEA ヒト化キメラ抗体の検出

試料	OD ₄₉₀ ^a	OD ₄₉₀ ^b	OD ₄₉₀ ^c
感染の 60 時間後の上清	0.900±0.005	0.900±0.005	1.848±0.021
クローンのプールした上清(1:10)	0.643±0.004	0.637±0.003	1.622±0.011
クローン 1C5 の上清(1:10)	0.916±0.017	0.913±0.006	1.880±0.010
PBS(0ng/ml ヒト IgG1)	0.076±0.003	0.070±0.001	-
20 ng/ml ヒト IgG1	0.480±0.007	0.452±0.004	-
40 ng/ml ヒト IgG1	0.895±0.005	0.874±0.002	-
60 ng/ml ヒト IgG1	1.130±0.014	1.050±0.009	-
CHO-dhfr ^r の上清	0.081±0.003	0.075±0.002	0.063±0.002

a、ヤギ-抗ヒト IgG ポリクローナル抗体でコーティング;

b、ヤギ-抗ヒト κ 鎖ポリクローナル抗体でコーティング;

c、ヒト CEA 抗原でコーティング。

【 0 0 5 9 】

実施例 4 : ストレス下での発現増幅により抗 C E A ヒト化キメラ抗体を高発現できる株のスクリーニング

形質転換 CHO 細胞を、10% FBS、100 u/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、2 mmol/L グルタミンを含む DMEM 完全成長培地 (Gibco) 中で、5% CO₂、37 °C の条件下で培養した。継代を、1:10 の比率で 3~4 日毎に常法通り行った。メトトレキセート (MTX) のストレス下での発現増幅のスクリーニング法を用いて、高発現株をスクリーニングした。上清中の抗 C E A ヒト化キメラ抗体を発現する細胞クローンを、ストレス下で発現を増幅するために、 3×10^{-8} M 及び 10^{-7} M のメトトレキセート (MTX) (Sigma) をそれぞれ含有する完全培地中で逐次的に培養した。各回の増幅発現の後に、サブクローニングを限界希釈により行って、最高の収率を有するクローンを選択した (図 6)。

【 0 0 6 0 】

抗 C E A ヒト化キメラ抗体発現ベクターを CHO - dhfr^r 細胞にトランスフェクトした後の 1 回目のスクリーニングで得られ、抗 C E A ヒト化キメラ抗体を高効率で発現できるクローン 1 C 5 ($0.41 \mu\text{g/ml}$ までのキメラ抗体の収率) を、 3×10^{-8} M のメトトレキセート (MTX) (Sigma) を含有する培地中で培養した。約 30 日間の連続した培養の後に、細胞モダリティ及び成長速度は通常に回復したことが観察され、細胞は、 3×10^{-8} M の MTX に適応した。キメラ抗体の発現収率は、 $10.4 \mu\text{g/ml}$ であった。サブクローニングの後に、最高のキメラ抗体収率を有するクローン 2 B 2 を選択し、キメラ抗体の収率は、 $16 \mu\text{g/ml}$ であった。1:5 の比率での継代の後に、クローン 2 B 2 を、 10^{-7} M の MTX を含有する完全培地中で次いで培養した。細胞が適応した後に、キメラ抗体の収率は、 $32 \mu\text{g/ml}$ であった。サブクローニングの後に、最高のキメラ抗体収率を有するクローン 3 B 2 を選択し、予備的検出により、キメラ抗体収率は、 $80 \mu\text{g/ml}$ ほどの高さであった (図 7)。

【 0 0 6 1 】

実施例 5 : 血清フリー懸濁培養に適応し、抗 C E A ヒト化キメラ抗体を生成できる細胞株の馴化及び調製

血清を減少させる方法を用いて細胞株 (血清フリー懸濁培養に適応されている) を馴化

10

20

30

40

50

して、抗CEAヒト化キメラ抗体を高レベルで発現及び分泌できる細胞株（血清フリー懸濁培養に適応されている）を得た。

【0062】

血清を含有する培地で培養した場合に接着して成長し、抗CEAヒト化キメラ抗体を高効率で発現及び分泌するrCHO RCC-24細胞（すなわちクローン3B2）を、まず、5%血清を含有するDMEM完全成長培地（Gibco）中で培養フラスコにおいて培養した。細胞が適応し、安定な成長を示した後に、培地を、2%、1%、0.5%、0.25%の血清をそれぞれ同じように含有する完全成長培地に逐次的に置き換えた。細胞が適応し、安定な成長を示した後に、培地を、血清フリー培地、すなわちCHO-S-SFM II成長培地（Gibco）に最終的に置き換えた。このときに、細胞のほとんどは接着成長の特性を喪失し、培養物は本質的に半懸濁になった。細胞が適応し、安定な成長を示した後に、細胞を、次いで、80~100rpmにて振とうフラスコ中で培養し、細胞を強制的に懸濁で成長させた。細胞が適応し、安定な成長を示した後に、血清フリー懸濁培養で成長でき、抗CEAヒト化キメラ抗体を効果的に発現及び分泌する、得られた新しい細胞を、rCHO RCC-24(SF)細胞株と命名した。

10

【0063】

実施例6：抗CEAヒト化キメラ抗体の特異性、ヒト化特性及びin vivo標的特性の同定

1. 抗CEAヒト化キメラ抗体の特異性の同定：

RT-PCR法を行い、ここでは、トリゾール試薬の使用説明に従って、具体的には実施例1に記載したようにして細胞の全RNAの抽出を行った。cDNAの第1鎖の合成を、製造業者の使用説明に従って、具体的には実施例1に記載するようにしてMMLV逆転写酵素（Promega）を用いて行った。PCR増幅実験において、細胞のcDNAからの可変領域遺伝子を増幅する方法は、実施例に記載したとおりであった。結果は、配列決定の後に、rCHO RCC-24(SF)細胞株から増幅された軽鎖及び重鎖可変領域遺伝子（図8）が、元の親の抗CEAマウスモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖可変領域遺伝子と同一であり、よって、抗癌胎児性抗原モノクローナル抗体が、親の抗CEAマウスモノクローナル抗体の特異性を維持し、CEAと特異的に結合できることを示した。

20

【0064】

ELISA法を行い、ここでは、1µg/mlのCEAを用いてELISAプレートをコーティングした。試料を反応のために加えた後に、ヤギ-抗ヒトIgG Fc断片-HRPELISA抗体（Sigma）（マウスIgと交差反応しない）又はヤギ-抗マウスIgG Fc断片-HRP ELISA抗体（Sigma）（ヒトIgと交差反応しない）を加えた。インキュベーション及び発色の後に、OD490値を測定した。その後、ヒトCEA抗原を用いてELISAプレートをコーティングし、次いで、ヤギ-抗ヒトIgG Fc断片-HRPを2次抗体として用いて直接ELISAを行った。形質転換細胞の上清中の抗CEAヒト化キメラ抗体及びプロテインA親和性クロマトグラフィーカラムにより精製された抗CEAヒト化キメラ抗体はともに、コーティングのために用いたCEA抗原と結合でき、ヤギ-抗ヒトIgG Fc断片ポリクローナル抗体により認識でき、強い陽性反応を示した。非形質転換CHO-dhfr⁻細胞培養上清及び親のマウスモノクローナル抗体は、陰性の反応を示した。ヤギ-抗マウスIgG Fc断片-HRPを2次抗体として用いた場合、非形質転換CHO-dhfr⁻細胞培養上清及び精製抗CEAヒト化キメラ抗体はともに陰性の反応を示したが、親のマウスモノクローナル抗体は陽性の反応を示した。無関係の抗体ヒトIgG1は、両方の場合について陰性であった。発現された抗CEAヒト化キメラ抗体がCEA抗原と特異的に結合でき、親のマウスモノクローナル抗体と同じ抗原結合特異性を有したことが実証された。

30

40

【0065】

【表 2】

表 2. 抗 CEA ヒト化キメラ抗体の抗原結合特異性を分析するための直接 ELISA

試料	OD ₄₉₀ ^a	OD ₄₉₀ ^b
抗 CEA ヒト化キメラ抗体(精製、100ng/ml)	2.571±0.032	0.072±0.000
ヒト IgG1(100ng/ml)	0.079±0.007	0.077±0.005
親のマウスモノクローナル抗体(100ng/ml)	0.072±0.003	2.636±0.043
PBS 対照	0.070±0.001	0.072±0.001
CHO-dhfr ⁻ 細胞上清	0.076±0.002	0.073±0.002

a、ヤギ-抗ヒト IgG Fc 断片-HRP を 2 次抗体として用いた；b、ヤギ-抗マウス IgG Fc 断片-HRP を 2 次抗体として用いた。

10

【0066】

競合阻害実験を行い、ここでは、1 μg/ml の CEA 抗原を用いて ELISA プレート (BioDesign) をコーティングした。2.5 ng/ウェルの無関係のマウスモノクローナル抗体 (本発明者らで調製した) 又は 2.5 ng/ウェルの親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 C50 (本発明者らで調製した) 及び異なる濃度の抗 CEA ヒト化キメラ抗体を加えた。37 °C でのインキュベーションの後に、次いで、ヤギ-抗マウス IgG-HRP ELISA 抗体 (Sigma) を加えた。OD₄₉₀ 値を反応の後に測定し、その競合阻害率を計算した。競合阻害率は、以下の式に従って計算し、無関係の抗体ヒト IgG1 対照も用いた。

20

【数 1】

$$\text{競合阻害率} = \frac{\text{マウスモノクローナル抗体単独の OD}_{490} - \text{キメラ抗体を加えた後の OD}_{490}}{\text{マウスモノクローナル抗体単独の OD}_{490}} \times 100\%$$

【0067】

競合阻害実験の結果を以下の表に示し、陰性対照である無関係の抗体ヒト IgG1 及び親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体の反応は、競合阻害効果を示さなかった (競合阻害率は -12.80% であった)。抗 CEA ヒト化キメラ抗体と親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体との間の比率が 2 : 1 である場合、親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体と抗原との間の結合について著しい競合阻害が起こり得る。キメラ抗体の濃度が増加すると、親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体と抗原との間の結合産物の量が減少し、その OD₄₉₀ が徐々に減少し、競合阻害率が増加した。比率が 32 : 1 の場合、競合阻害率は 40.85% まで到達できる。このことは、抗 CEA ヒト化キメラ抗体及び親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体がともに、CEA 抗原の同じエピトープと結合できることを示し、このことにより、抗 CEA ヒト化キメラ抗体及び親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体が同じ抗原結合特異性を有することが証明された。

30

【0068】

【表 3】

表 3. 競合阻害 ELISA を用いて、抗 CEA ヒト化キメラ抗体の特異性を調べる

試料	OD ₄₉₀	阻害率 (%)	
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体	1.394±0.044	-	
CHO-dhfr ⁻ 細胞上清	0.000±0.003	0	
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +80ng ヒト IgG1	1.573±0.010	-12.8	
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +2.5ng 抗 CEA ヒト化キメラ抗体	1.359±0.024	2.5	10
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +5ng 抗 CEA ヒト化キメラ抗体	1.166±0.006	16.36	
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +10ng 抗 CEA ヒト化キメラ抗体	0.997±0.008	28.52	
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +20ng 抗 CEA ヒト化キメラ抗体	0.903±0.041	35.22	
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +40ng 抗 CEA ヒト化キメラ抗体	0.884±0.009	36.59	20
2.5ng 親の抗 CEA マウスモノクローナル抗体 +80ng 抗 CEA ヒト化キメラ抗体	0.825±0.047	40.85	

【0069】

免疫蛍光試験を行い、ここでは、CEAを高レベルで発現できる結腸がん細胞LS180 (ATCCから購入)を標的細胞として用い、抗CEAヒト化キメラ抗体を加えた。37でのインキュベーションの後に、ヤギ-抗ヒトIgG-FITC蛍光2次抗体(Sigma)を次いで加え、蛍光顕微鏡を用いて、反応後の観察を行い、無関係の抗体対照を対照として用いた。図9における結果は、抗CEAヒト化キメラ抗体が、CEAを高レベルで発現できる結腸がん細胞LS180上のCEA抗原を認識できることを示した。

免疫蛍光試験を行い、ここでは、いくつかのCEA発現がん細胞SW1116、LVOO(ATCCから購入)を標的細胞として用い、抗CEAヒト化キメラ抗体を加えた。37でのインキュベーションの後に、ヤギ-抗ヒトIgG-Cy5蛍光2次抗体(Sigma)を次いで加えた。蛍光顕微鏡を用いて反応後の観察を行い、無関係の抗体対照を対照として用いた。結果(図10)は、癌胎児性抗原に対するモノクローナル抗体が、CEA発現がん細胞上のCEA抗原を認識できることを示した。

【0070】

2. 抗CEAヒト化キメラ抗体のヒト化特性の同定:

ELISA実験において、CEA、ヤギ-抗ヒト鎖(Sigma)又はヤギ-抗ヒトIgGポリクローナル抗体(Sigma)を用いてELISAプレートをコーティングし、ヤギ-抗ヒトIgG Fc断片-HRP(Sigma)をELISA抗体として用いた。ELISAの結果(表4)は、精製抗CEAヒト化キメラ抗体が強い陽性反応を示したが、抗CEAヒト化キメラ抗体モノクローナル抗体の親のマウスモノクローナル抗体は陰性の反応を示したことを示した。このことは、精製抗CEAヒト化キメラ抗体が、ヒトIgGの軽鎖及び重鎖定常領域を含有することを実証した。

【0071】

【表 4】

表 4. ELISA を用いて抗 CEA ヒト化キメラ抗体のヒト化特性を調べる

試料(100ng/ml)	OD ₄₉₀ ^a	OD ₄₉₀ ^b	OD ₄₉₀ ^c
抗 CEA ヒト化キメラ抗体	2.361±0.127	2.870±0.204	2.570±0.169
親のマウスモノクローナル抗体	0.074±0.000	0.072±0.008	0.074±0.005
ヒト IgG1	0.072±0.007	2.887±0.186	2.565±0.198
PBS	0.072±0.005	0.070±0.007	0.070±0.007

a、CEA をコーティングのために用いた； b、ヤギ-抗ヒト IgG をコーティングのために用いた； c、ヤギ-抗ヒトκ鎖をコーティングのために用いた。

10

【0072】

ウェスタンブロッティング実験を行い、ここでは、抗 C E A ヒト化キメラ抗体についての還元 SDS - P A G E を行った。抗体をメンブレンに移した後に、ヤギ - 抗ヒト I g G F c 断片 - H R P 又はヤギ - 抗ヒト κ鎖ポリクローナル抗体をそれぞれ用いてウェスタンブロッティングを行った。結果 (図 1 1) は、55 k D でのタンパク質バンドが、ヤギ - 抗ヒト I g G F c 断片 - H R P により認識され、染色された単独の特異的バンドを形成し、バンドが示すサイズが、抗体の重鎖に相当したことを示した。対照マウスモノクローナル抗体は、その位置にバンドを示さず、このことは、発現された抗 C E A ヒト化キメラ抗体重鎖がヒト定常領域を含有することを実証した。25 k D でのタンパク質バンドがヤギ - 抗ヒト κ鎖ポリクローナル抗体により認識され、染色された単独の特異的バンドを表し、このバンドが示すサイズは、抗体の軽鎖に相当した。対照マウスモノクローナル抗体はここでは陰性の反応を示し、このことは、抗 C E A ヒト化キメラ抗体がヒト κ鎖定常領域を含むことを示した。

20

【0073】

ヤギ - 抗ヒト I g G、ヤギ - 抗ヒト I g M 及びヤギ - 抗ヒト I g A を用いて血清を免疫し、二重免疫拡散試験を、検査のために行った。結果は、抗 C E A ヒト化キメラ抗体が、ヒト I g G 型の免疫グロブリンに属することを示した。マウス - 抗ヒト I g G 1、マウス - 抗ヒト I g G 2、マウス - 抗ヒト I g G 3 及びマウス - 抗ヒト I g G 4 モノクローナル抗体を用いて E L I S A 試験を行い、結果は、抗 C E A ヒト化キメラ抗体がヒト I g G 1 であったことを示した。

30

【0074】

3. 抗 C E A ヒト化キメラ抗体の *i n v i v o* 標的特性の同定：

i n v i v o 放射性免疫取り込み実験、*i n v i v o* 放射性免疫生体分布実験を含むいくつかの *i n v i v o* 放射性免疫実験を行って、腫瘍を *i n v i v o* で特異的に標的にする特性について抗 C E A ヒト化キメラ抗体を調べた (C E A 陽性腫瘍結腸がん細胞 L S 1 7 4 T の腫瘍を有するマウスをモデルとして用いた)。結果は、核種 ¹²⁵I 標識抗 C E A ヒト化キメラ抗体の注射の後に、腫瘍が、全ての組織のうちで最も多く標識抗体を取り込み、他の正常組織よりもかなり高く、これは、最大で 33% まで達し、26% が 7 d 後まで残ることができることを示した。標識抗体は、腫瘍によく蓄積し、長期間残ることができる。正常組織における取り込み量は低く、これらは残らず、全て時間経過とともに迅速に減少した (図 1 2)。T / N 比率研究の結果は、標識抗体が、注射の 24 時間後に腫瘍に主に分布し、血液プールにはそれらのわずかが分布したことを示した。しかし、96 時間後に、標識抗体は、腫瘍にのみ優勢的に分布し、このことは、核種標識抗 C E A ヒト化キメラ抗体が腫瘍に特異的に分布できるが、正常組織には分布しないことを示した (図 1 3)。上記の結果は、抗 C E A ヒト化キメラ抗体が、優れた *i n v i v o* 腫瘍標的特性を有し、動物において C E A 陽性腫瘍細胞と特異的に結合でき、腫瘍中に特異的に蓄積されて残るが、血液プール以外の正常組織には分布せず残らなかったことを示した。

40

【0075】

実施例 7：抗 C E A ヒト化キメラ抗体を用いる *i n v i v o* 放射性免疫イメージング診

50

断のための診断用医薬の調製

In vivo放射性免疫イメージング実験を採用して、in vivo放射性免疫イメージング診断についての診断用医薬（本発明の抗CEAヒト化キメラ抗体を用いて調製した）の効力を評価した。図14に示す結果は、本発明の核種¹⁸⁸Re標識抗CEAヒト化キメラ抗体の注射の24時間後に、腫瘍を明確に画像化できることを示した。腫瘍は、5～7日後にさらにより明確になり、画像化できる最小の腫瘍のサイズは、0.5cmであった。結果は、in vivo診断への非常に良好な応用の可能性を示す。

【0076】

実施例8：抗CEAヒト化キメラ抗体を用いるCEA陽性腫瘍のin vivo放射性免疫治療のための治療用医薬の調製

核種I-131を用いて抗CEAヒト化キメラ抗体を標識した（rch24と略す、約20mCi/mgタンパク質）。結腸がん腫瘍を死滅させるin vivo放射性免疫治療の有効性を、ヒトCEA陽性結腸がん細胞LS180（ATCC、USAから購入）の移植腫瘍を有するマウスにおいて研究し、ここでは、100万個のLS180を前記マウスの右側の背中にs.c.注射し、腫瘍のサイズが適度になった後に治療を行った。結果は、形成された腫瘍について（腫瘍のサイズが0.5cm³を超えた後に治療を行った）、250μCi/用量の高い免疫活性及び特異的放射活性を有する標識抗体を用いる単回治療が、形成された腫瘍について81.1%の腫瘍阻害率を示した（表5、図15）が、125μCi/マウスを1週間隔で3回投与した治療群について（腫瘍のサイズが約0.1cm³になったときに治療を行った）、腫瘍阻害率は93%であり（表6、図16）、腫瘍の増殖はほぼ停止したことを示した。両方の場合において、ヒト結腸がんの増殖は、著しく阻害できる。末梢血液像分析及び体重変動についての予備的毒性研究は、¹³¹I標識抗CEAヒト化キメラ抗体をヒト結腸がんのin vivo放射性免疫治療のために用いる場合、末梢血液像及びマウスの体重の各成分は、治療群と対照群との間で著しく異ならず、このことは、明らかな毒性がないことを示した。

【0077】

【表5】

表5. 形成された腫瘍に対して250μCi/用量を用いる単回治療の腫瘍阻害率は、81.1%であった。

群	数	平均腫瘍重量 (X±SD, g)	阻害率(%)	P値
PBS	6	4.048±2.428	-	
hIgG	6	3.859±1.928	-	
rch24	6	0.765±0.442	81.1	<0.038

【0078】

【表6】

表6. 125μCi/用量の標識抗体を用いる3用量治療の腫瘍阻害率は、93%であった。

群	用量	腫瘍重量 (X±SD, g)	阻害率(%)	P値
hIgG	150 μCi/マウス × 3	8.18 ± 6.13	-	
rch24	150 μCi/マウス × 3	0.57 ± 0.47	93.04	<0.05

【0079】

ヒト大腸がんを有するヌードマウスモデルにおいて、試験試料（すなわち131I標識抗CEAキメラ抗体rch24）のin vivo抗腫瘍活性を観察した。方法：ヒト大腸がん細胞LS180、LS174T及びSW1116をそれぞれBABL/c nu/nuヌードマウスにs.c.接種した8～10日後に、異なる群にそれぞれ投与した。腫瘍のサイズによる均衡の原則に基づいて、群を、対照群；「ヌード」抗CEAヒト化キメ

ラ抗体rch24群(156.2μg/kg群及び625.0μg/kg群)；同一の特異的放射活性で標識した無関係のヒトIgG群(3.1mCi/kg群及び12.5mCi/kg群)；131I標識抗CEAヒト化キメラ抗体rch24群(3.1mCi/kg群、6.25mCi/kg群及び12.5mCi/kg群)；並びに陽性化学療法医薬対照群に分割した。試験試料及び適切な対照試料を尾静脈中の注射により10日毎に1回、合計で2回投与した。規則的に、動物の全身の状態を観察し、体重を測定し、腫瘍のサイズを測定し、血清CEAレベル及び末梢血指標を測定し、腫瘍組織及び非腫瘍組織中の同位体の分布を決定した。腫瘍を有するヌードマウスを実験の最後に屠殺し、腫瘍の重量を測定した。結果：高用量の試験試料群(131I標識抗CEAキメラ抗体rch24)の1匹のヌードマウスが死亡し、同一の特異的放射活性で標識した無関係のヒトIgGの高用量群の1匹のヌードマウスが死亡した。投与後に、試験試料の全ての群において、腫瘍のサイズは対照群のものよりも小さく、相対的腫瘍増殖率は、対照群のものよりも低かった。3つの腫瘍株LS180、LS174、SW1116についての腫瘍阻害率は、低用量群において47.8~71.4%であり、中程度用量群において52.2~75.0%であり、高用量群において65.2~86.2%であった。試験試料の全ての群においてヌードマウスの血清CEAレベルは、対照群のものよりも明確に低かった。「ヌード」抗CEAヒト化キメラ抗体及び131I標識無関係ヒトIgGの異なる用量群を比較した場合に、腫瘍阻害効果は、試験試料の対応する群より著しかった。3つの腫瘍株についての腫瘍阻害効果について、試験試料131I標識抗CEAキメラ抗体rch24は、LS180腫瘍の増殖の阻害について最も効力があつた。1回目の投与の48時間及び96時間後に、腫瘍組織中の同位体の分布は、非腫瘍組織におけるものよりも明確に高かつた。投与の30日後に、投与群のヌードマウスにおける末梢血白血球総数などの指標は、対照群のものとは著しくは異ならなかつた。結論：試験試料131I標識抗CEAキメラ抗体rch24は、マウスが有するヒト大腸がんの増殖を投与量依存的に著しく阻害でき、腫瘍を有するヌードマウスにおける血清CEAレベルを同時に減少でき、腫瘍組織におけるその標的分布は著しかった。投与は10日間隔で2回行い、投与群における腫瘍を有するヌードマウスの造血機能は明確には変化しなかつた。

10
20

【0080】

【表7】

表7 腫瘍を有するヌードマウスにおける腫瘍重量及び腫瘍阻害率に対する¹³¹I標識抗CEAキメラ抗体の影響(LS180、バッチ1)

30

群	腫瘍重量(g)	腫瘍阻害率(%)
対照群	2.8±0.8	—
rch24 低用量群	1.7±0.5*	39.3
rch24 高用量群	1.4±0.3**	50.0
ヒトIgG 低用量群	1.1±0.2***	60.7
ヒトIgG 高用量群	1.9±0.2***	67.9
3.1 mCi/kg 群	0.8±0.2***	71.4
6.25 mCi/kg 群	0.7±0.2***###&&	75.0
12.5 mCi/kg 群	0.4±0.1***\$\$\$@!!	85.7
陽性対照群	1.6±0.3**	42.9

40

注：対照群と比較して*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001；rch24 低用量群と比較して#p<0.05、##p<0.01；rch24 高用量群と比較して\$\$\$p<0.001；IgG 低用量群と比較して&p<0.01；IgG 高用量群と比較して@@@p<0.001；6.25mCi/kg 群と比較して!!p<0.01。

【0081】

【表 8】

表 8 腫瘍を有するヌードマウスにおける腫瘍重量及び腫瘍阻害率に対する ^{131}I 標識抗 CEA キメラ抗体の影響 (LS180、バッチ 2)

群	腫瘍重量 (g)	腫瘍阻害率 (%)
モデル対照群	2.9±0.6	—
rch24 低用量群	1.8±0.2***	37.9
rch24 高用量群	1.5±0.1***	48.3
ヒト IgG 低用量群	1.2±0.1***	58.6
ヒト IgG 高用量群	1.0±0.2***	65.5
3.1 mCi/kg 群	0.9±0.3***	69.0
6.25 mCi/kg 群	0.8±0.1***###&&&	72.4
12.5 mCi/kg 群	0.4±0.1***\$\$\$\$@@@!!!	86.2
陽性対照群	1.7±0.2***	41.4

注:モデル対照群と比較して***p<0.001;rch24 低用量群と比較して###p<0.001;rch24 高用量群と比較して\$\$\$\$p<0.001;IgG 低用量群と比較して&&&p<0.001;IgG 高用量群と比較して@@@p<0.001;6.25mCi/kg 群と比較して!!!p<0.001。

【0082】

【表 9】

表 9 腫瘍を有するヌードマウスにおける腫瘍重量及び腫瘍阻害率に対する ^{131}I 標識抗 CEA キメラ抗体の影響 (LS174T、バッチ 1)

群	腫瘍重量 (g)	腫瘍阻害率 (%)
モデル対照群	2.5±0.2	—
rch24 低用量群	1.6±0.3***	36.0
rch24 高用量群	1.3±0.2***	48.0
ヒト IgG 低用量群	1.1±0.2***	56.0
ヒト IgG 高用量群	1.0±0.2***	60.0
3.1 mCi/kg 群	0.9±0.1***	64.0
6.25 mCi/kg 群	0.7±0.1***###&&&%	72.0
12.5 mCi/kg 群	0.5±0.1***\$\$\$\$@@@	80.0
陽性対照群	1.4±0.2***	44.0

注:モデル対照群と比較して***p<0.001;rch24 低用量群と比較して###p<0.001;rch24 高用量群と比較して\$\$\$\$p<0.001;IgG 低用量群と比較して&&&p<0.001;3.1mCi/kg 群と比較して%p<0.05;IgG 高用量群と比較して@@@p<0.001。

【0083】

【表 10】

表 10 腫瘍を有するヌードマウスにおける腫瘍重量及び腫瘍阻害率に対する ^{131}I 標識抗 CEA キメラ抗体の影響 (LS174T、バッチ 2)

群	腫瘍重量 (g)	腫瘍阻害率 (%)
モデル対照群	2.6±0.2	—
rch24 低用量群	1.7±0.2***	34.6
rch24 高用量群	1.5±0.1***	42.3
ヒト IgG 低用量群	1.3±0.1***	50.0
ヒト IgG 高用量群	1.1±0.1***###	57.7
3.1 mCi/kg 群	1.0±0.1***###	61.5
6.25 mCi/kg 群	0.8±0.1***###&&&%	69.2
12.5 mCi/kg 群	0.7±0.1***\$\$\$\$@@@!	73.1
陽性対照群	1.4±0.2***	46.2

注:モデル対照群と比較して***p<0.001;rch24 低用量群と比較して###p<0.001;rch24 高用量群と比較して\$\$\$\$p<0.001;IgG 低用量群と比較して&&&p<0.001;3.1mCi/kg 群と比較して%p<0.05;IgG 高用量群と比較して@@@p<0.001;6.25mCi/kg 群と比較して!p<0.05。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 4 】

【 表 1 1 】

表 11 腫瘍を有するヌードマウスにおける腫瘍重量及び腫瘍阻害率に対する ¹³¹I 標識抗 CEA キメラ抗体の影響 (SW1116、バッチ 1)

群	腫瘍重量 (g)	腫瘍阻害率 (%)
モデル対照群	2.2±0.1	—
rch24 低用量群	1.6±0.2***	27.3
rch24 高用量群	1.4±0.2***	36.4
ヒト IgG 低用量群	1.2±0.2***	45.5
ヒト IgG 高用量群	1.0±0.1***	54.5
3.1 mCi/kg 群	0.9±0.2***	59.1
6.25 mCi/kg 群	0.8±0.2***###&&	63.6
12.5 mCi/kg 群	0.7±0.1***\$\$\$@@@	68.2
陽性対照群	1.5±0.2***	31.8

注:モデル対照群と比較して***p<0.001;rch24 低用量群と比較して###p<0.001;rch24 高用量群と比較して\$\$\$p<0.001;IgG 低用量群と比較して&&p<0.01;IgG 高用量群と比較して@@@p<0.001。

【 0 0 8 5 】

【 表 1 2 】

表 12 腫瘍を有するヌードマウスにおける腫瘍重量及び腫瘍阻害率に対する ¹³¹I 標識抗 CEA キメラ抗体の影響 (SW1116、バッチ 2)

群	腫瘍重量 (g)	腫瘍阻害率 (%)
モデル対照群	2.3±0.1	—
rch24 低用量群	1.7±0.2***	26.1
rch24 高用量群	1.5±0.2***	34.8
ヒト IgG 低用量群	1.4±0.1***	39.1
ヒト IgG 高用量群	1.3±0.3***	43.5
3.1 mCi/kg 群	1.2±0.1***	47.8
6.25 mCi/kg 群	1.1±0.1***###&&&	52.2
12.5 mCi/kg 群	0.8±0.1***\$\$\$@@@!!	65.2
陽性対照群	1.5±0.2***	34.8

注:モデル対照群と比較して***p<0.001;rch24 低用量群と比較して###p<0.001;rch24 高用量群と比較して\$\$\$p<0.001;IgG 低用量群と比較して&&&p<0.001;IgG 高用量群と比較して@@@p<0.001;6.25mCi/kg 群と比較して!!p<0.01。

10

20

30

【 図 1 】

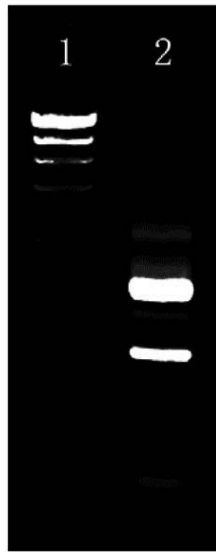


図 1 : 親のマウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞の抽出した全RNA
についてのアガロースゲル電気泳動を用いた分析。

【 図 2 】



図 2 : 親のマウスモノクローナル抗体 VL、VH 遺伝子の PCR 産物についてのアガロースゲル電気泳動を用いた分析。

【 図 3 】

VL:

```

          9           18           27           36           45           54
GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
          63           72           81           90           99           108
GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATA CAC TGG TAT CAG
Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln
----- CDR1 -----
          117           126           135           144           153           162
CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG GTT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT
Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Val Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
----- CDR2 -----
          171           180           189           198           207           216
TCT GGA GTC CCT GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
-----
          225           234           243           252           261           270
ACA ATC AGC ACC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG
Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
-----
          279           288           297           306           315
AAT AAT AAC CCA TAC TCG TTC GGA GGG GGG ACC AAG GTG GAG ATC
Asn Asn Asn Pro Tyr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
- CDR3 -----

```

VH:

```

          9           18           27           36           45           54
CAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAA CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA ATC
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala Ser Ile
          63           72           81           90           99           108
AAG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA CAC TAC TAT ATG CAC TGG
Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Tyr Tyr Met His Trp
----- CDR1 -----
          117           126           135           144           153           162
GTG AAA CAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TGG ATT AAT CCT GAG
Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asn Pro Glu
-----
          171           180           189           198           207           216
AAT GTT GAT ACT GAA TAT GCC CCC AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATG ACT GCA
Asn Val Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala
----- CDR2 -----
          225           234           243           252           261           270
GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC
Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
          279           288           297           306           315           324
ACT GCC GTC TAT TAC TGT AAT CAC TAT AGG TAC GCC GGA GGG GGT GCT TTG GAC
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn His Tyr Arg Tyr Ala Gly Gly Gly Ala Leu Asp
----- CDR3 -----
          333           342           351           360
TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 3'
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
-----

```

図3：増幅により得られた親のマウスモノクローナル抗体VL、VH遺伝子のヌクレオチド配列及びそのアミノ酸配列並びにCDR配列(CDRに下線を付す)。

【 図 4 】

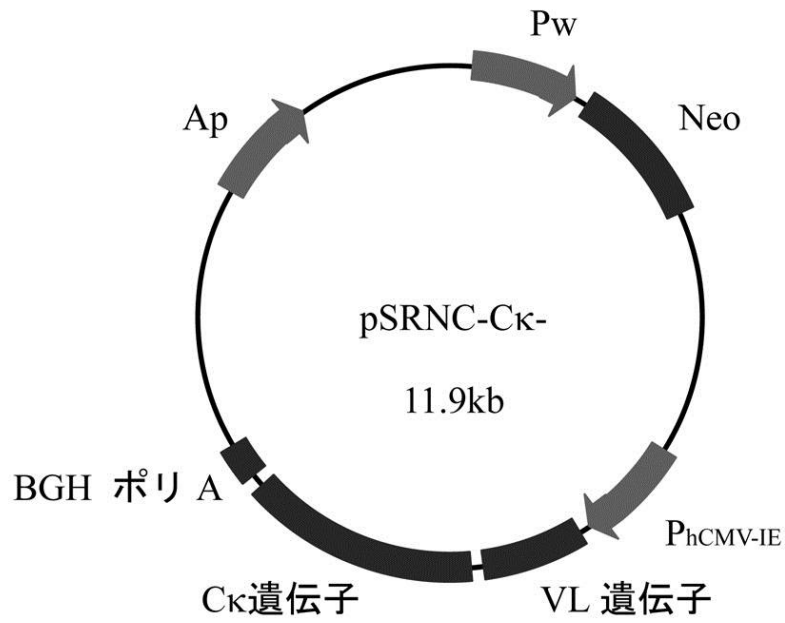


図 4 : 抗 C E A ヒト化キメラ抗体軽鎖真核発現ベクター p S R N C - C κ - C
E A の構造についての概略図。

【 図 5 】

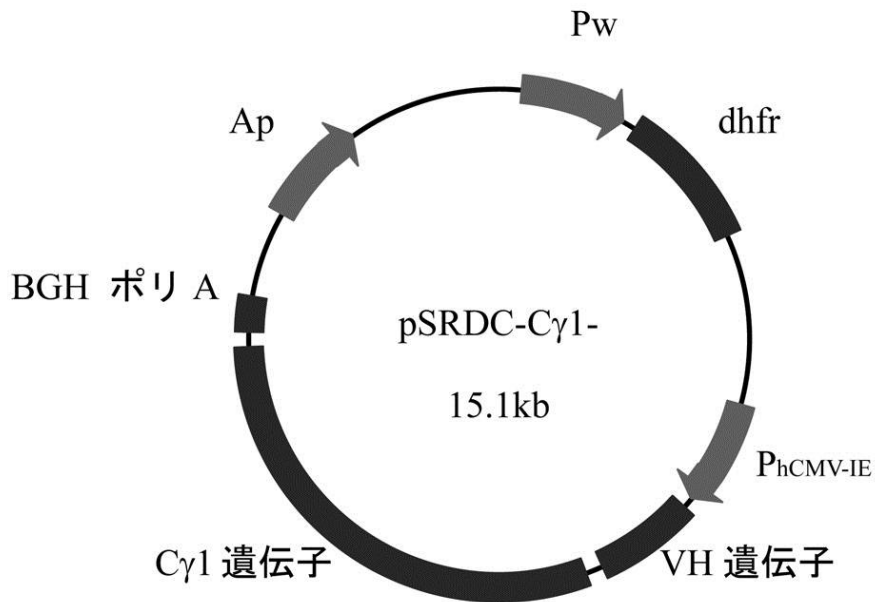


図5 : 抗CEAヒト化キメラ抗体重鎖真核発現ベクター pSRDC-Cγ1-
CEAの構造についての概略図。

【 図 6 】

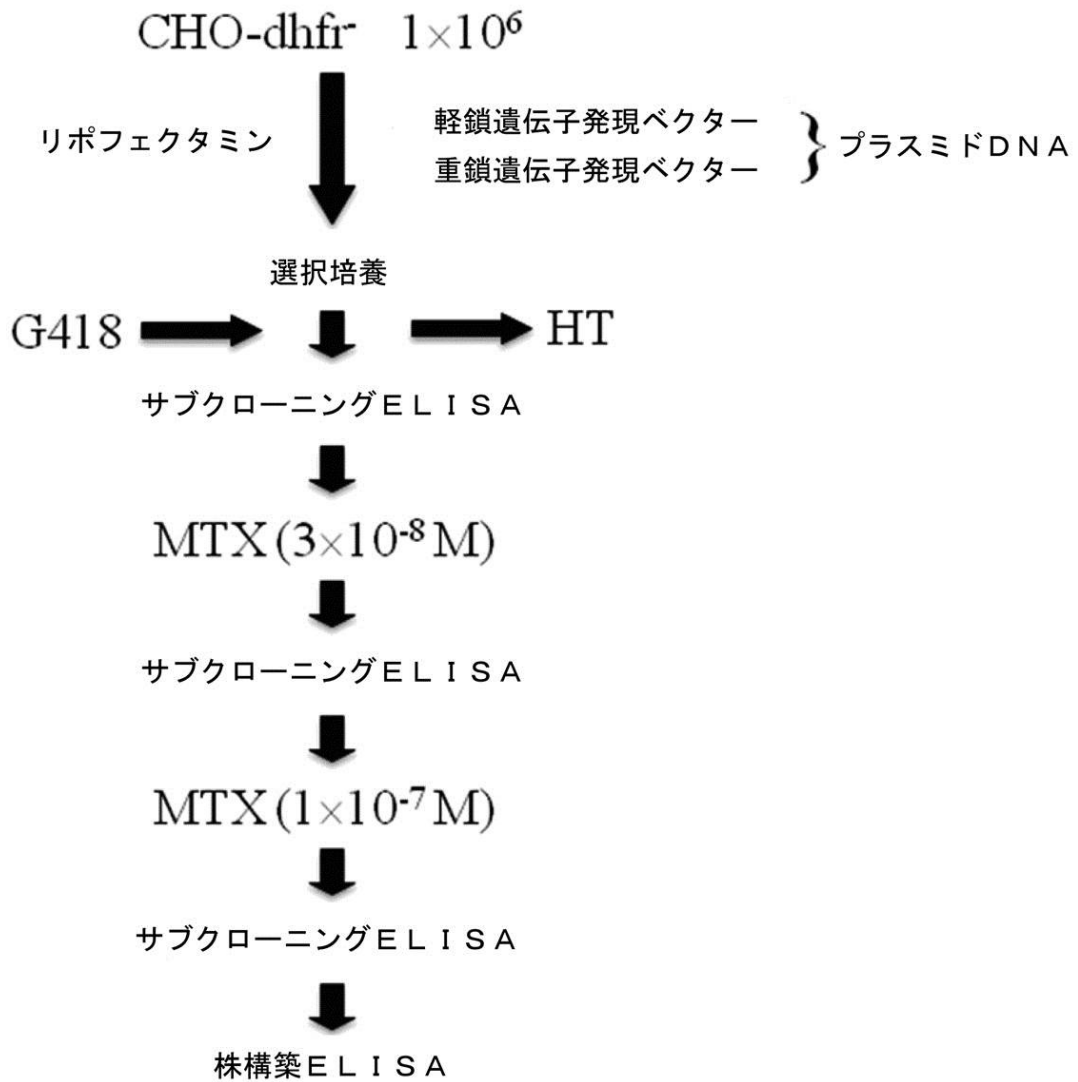


図6 : 抗CEAヒト化キメラ抗体を高レベルで発現及び分泌する細胞株についての構築及びスクリーニングプロセス。

【 図 7 】

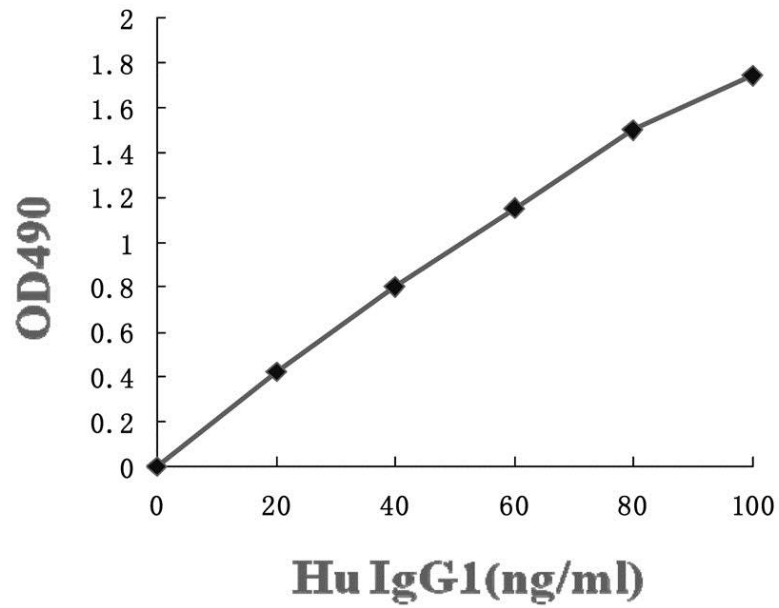


図 7 : E L I S A法を用いて測定した、抗CEAヒト化キメラ抗体を発現及び分泌するCHO細胞株の上清中のキメラ抗体含量。

【 図 8 】

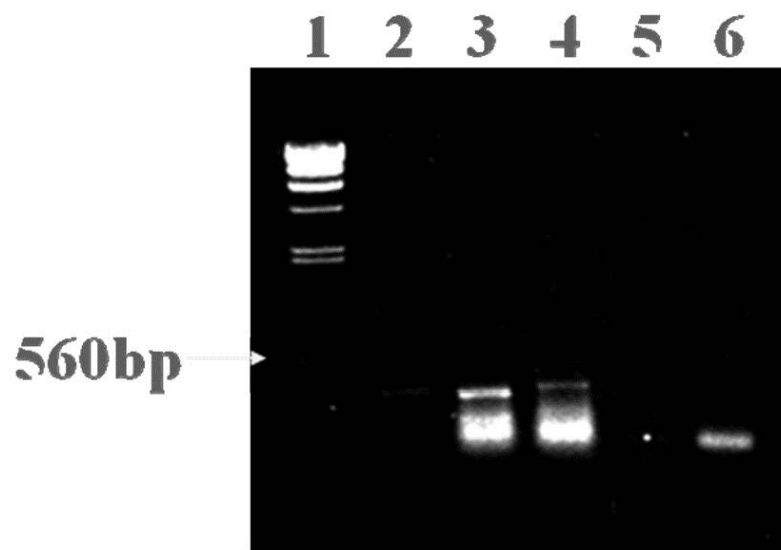
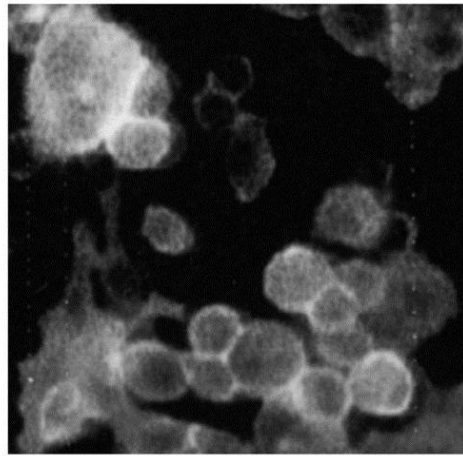


図8：RT-PCRを用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体の抗原特異性。

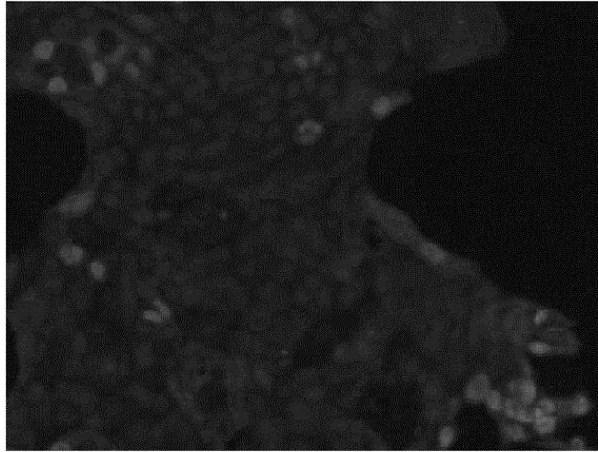
【 図 9 】



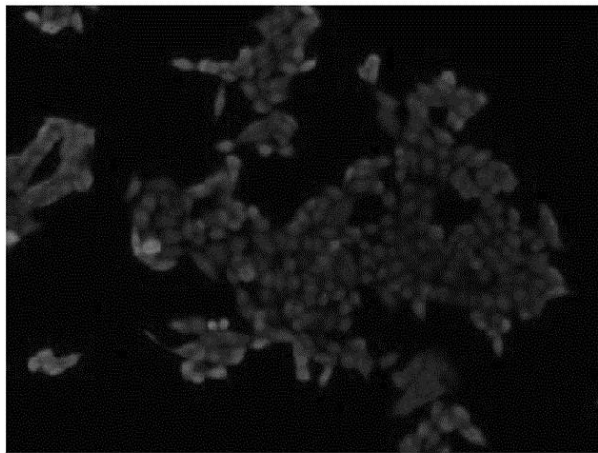
LS180 細胞

図 9 : 免疫蛍光を用いて分析した、抗 C E A ヒト化キメラ抗体の抗原特異性。

【 図 1 0 】



SW1116



LOVO

図 1 0 : 抗 C E A ヒト化キメラ抗体は、いくつかの C E A 発現がん細胞上の C E A 抗原を認識できる。

【 図 1 1 】

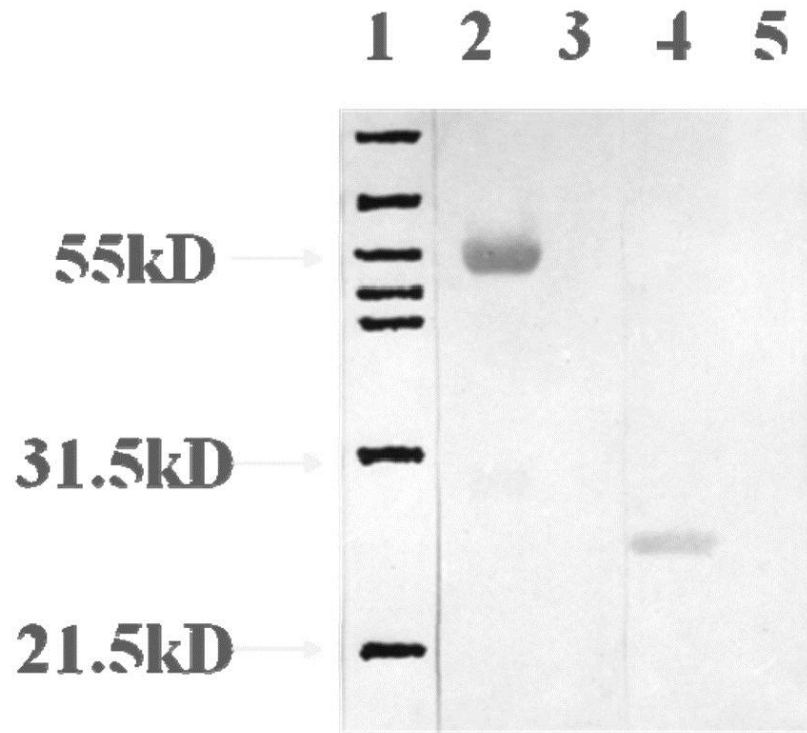


図 1 1 : ウェスタンブロッティングを用いて分析した、抗 C E A ヒト化キメラ抗体のヒト化特性。

【 図 1 2 】

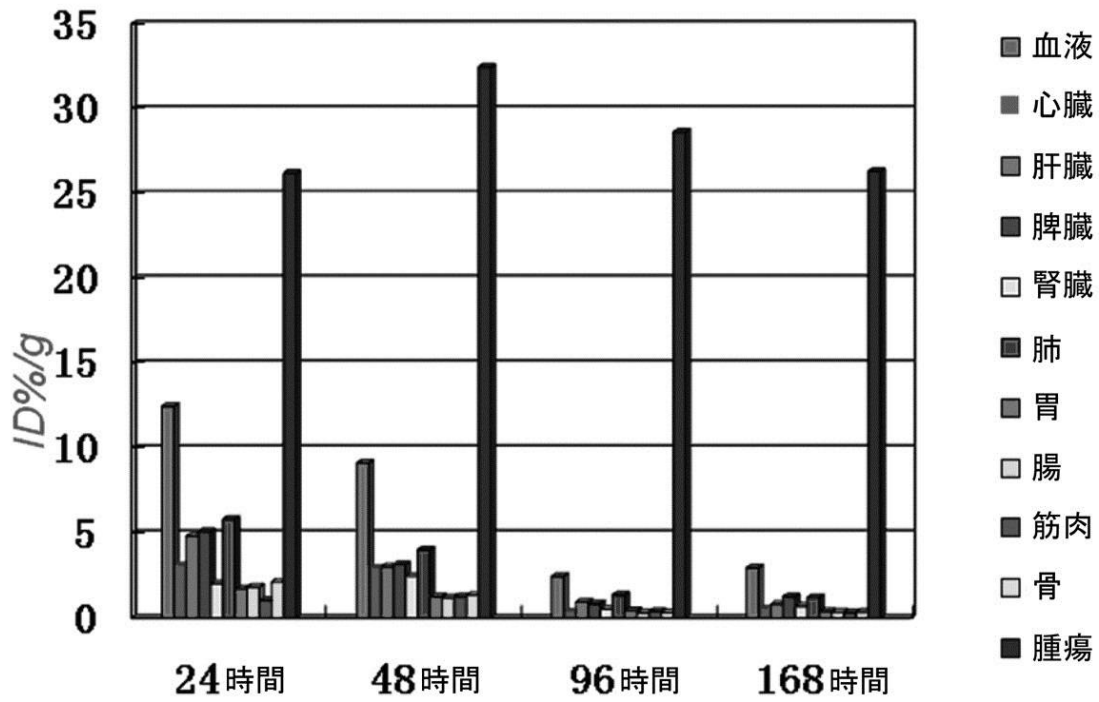


図 1 2 : 抗 C E A ヒト化キメラ抗体の組織 1 グラムあたりのパーセント (I D % / g) として表した、放射活性線量取り込み分析の結果。

【 図 1 3 】

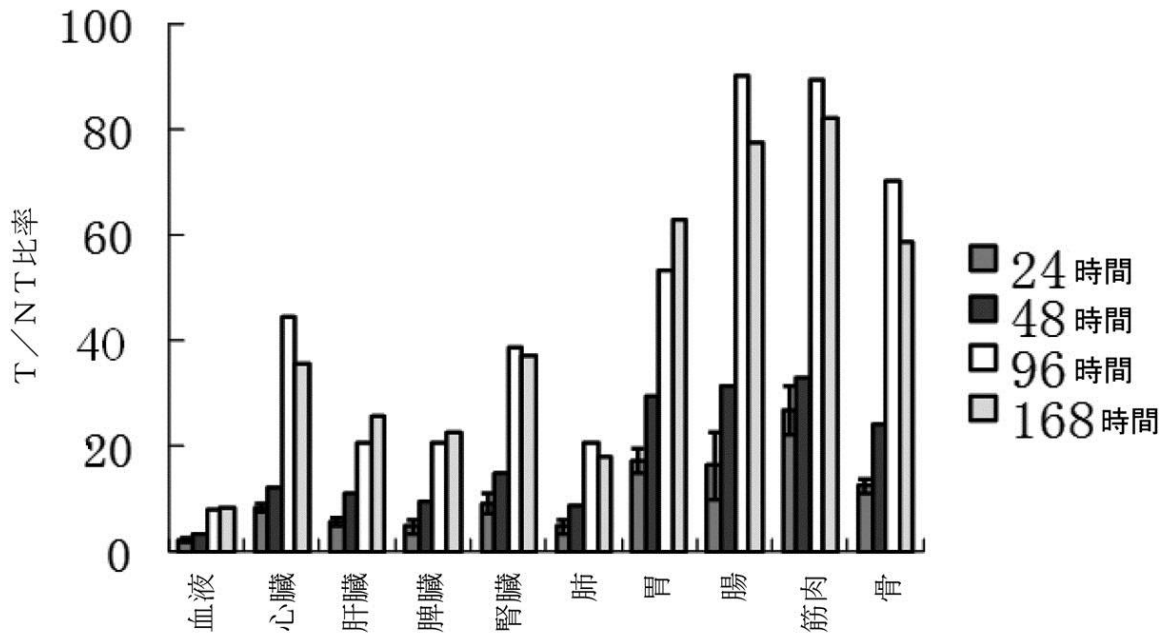


図 1 3 : 腫瘍組織と正常組織との間 (T/N T) の抗 C E A ヒト化キメラ抗体の放射線比率の結果。

【 図 1 4 】

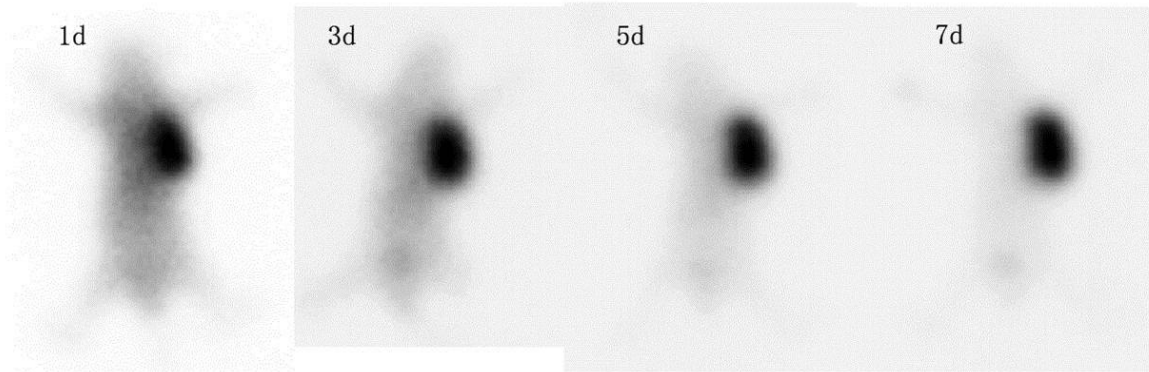


図 1 4 : 抗 C E A ヒト化キメラ抗体による C E A 陽性結腸がんの腫瘍の i n v i v o 放射性免疫イメージング。

【図 15】

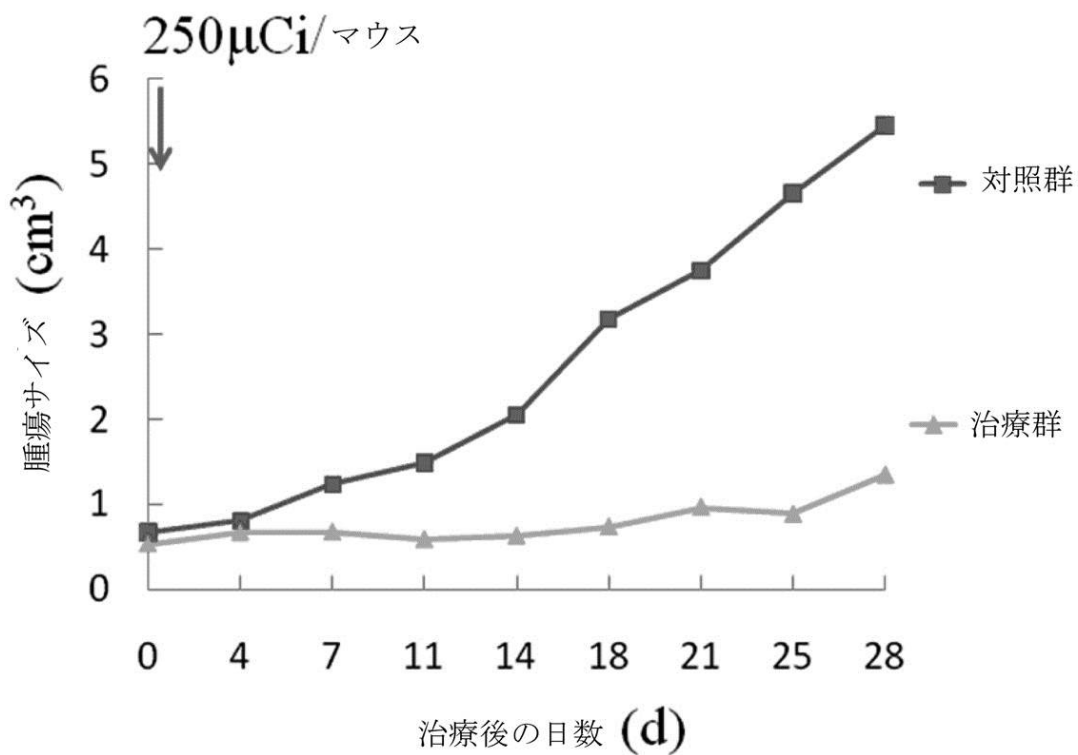


図 15 : 抗 CEA ヒト化キメラ抗体と I-131 との複合体の単回投与によるヒト結腸がんを有するヌードマウス移植腫瘍モデルの治療の結果 (増殖曲線)。

【 図 1 6 】

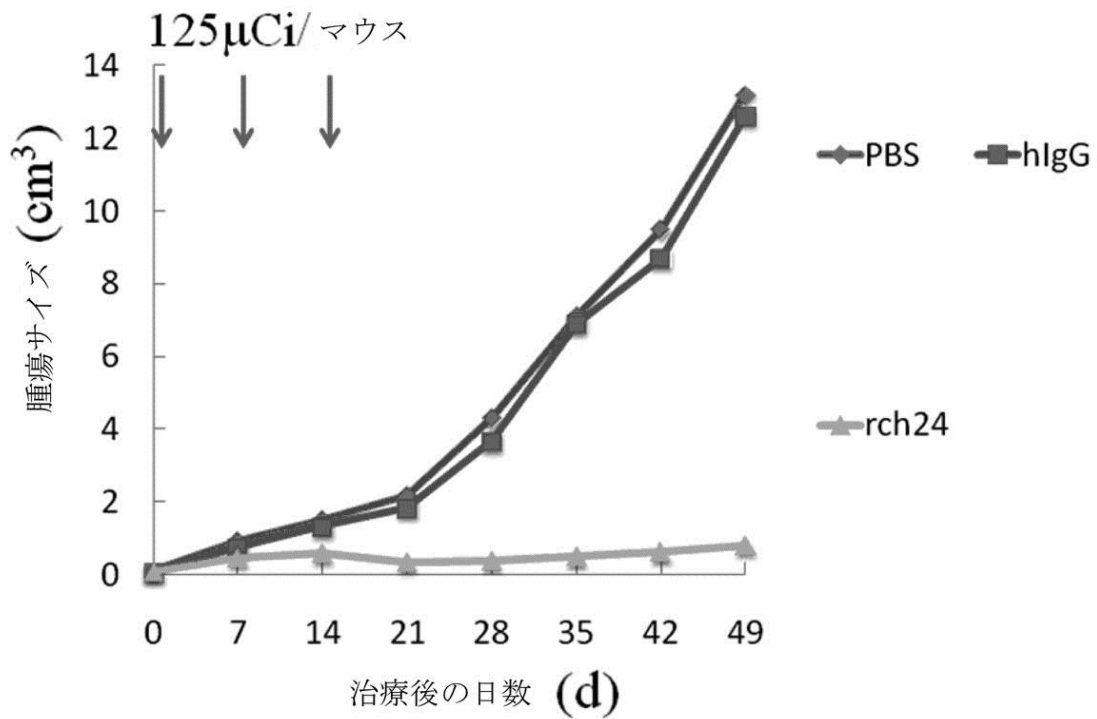


図 1 6 : 抗 C E A ヒト化キメラ抗体と I - 1 3 との複合体の複数回投与によるヒト結腸がんを有するヌードマウス移植腫瘍モデルの治療の結果 (増殖曲線)。

【 配 列 表 】

2013534406000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年2月8日(2013.2.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

【図1】親のマウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞の抽出した全RNAについてのアガロースゲル電気泳動を用いた分析を示す。レーン1．分子量マーカー、DNA/HindIII。レーン2．親のマウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞の全RNA。

【図2】親のマウスモノクローナル抗体VL、VH遺伝子のPCR産物についてのアガロースゲル電気泳動を用いた分析を示す。レーン1．分子量マーカー、DNA/HindIII。レーン2．親のマウスモノクローナル抗体VL遺伝子のPCR産物。レーン3．親のマウスモノクローナル抗体VH遺伝子のPCR産物。

【図3】増幅により得られた親のマウスモノクローナル抗体VL、VH遺伝子のヌクレオチド配列及びそのアミノ酸配列並びにCDR配列を示す。

【図4】抗CEAヒト化キメラ抗体軽鎖真核発現ベクターpSRNC-C₁-CEAの構造についての概略図を示す。Pw、減弱化真核プロモーター；Neo、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子；PhCMV-IE、ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター及びエンハンサー；VL遺伝子、リーダーペプチド配列及び5'端イントロンスプライシング部位配列を有する軽鎖可変領域の遺伝子断片；C₁遺伝子、ヒト抗体軽鎖の鎖定常領域遺伝子断片；BGHポリA、ウシ成長ホルモンポリAテイル付加部位；Ap、アンピシリン耐性遺伝子。

【図5】抗CEAヒト化キメラ抗体重鎖真核発現ベクターpSRDC-C₁-CEAの構造についての概略図を示す。Pw、減弱化真核プロモーター；dhfr、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子；PhCMV-IE、ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター及びエンハンサー；VH遺伝子、リーダーペプチド配列及び5'端イントロンスプライシング部位配列を有する重鎖可変領域の遺伝子断片；C₁遺伝子、ヒト抗体重鎖の鎖定常領域遺伝子断片；BGHポリA、ウシ成長ホルモンポリAテイル付加部位；Ap、アンピシリン耐性遺伝子。

【図6】抗CEAヒト化キメラ抗体を高レベルで発現及び分泌する細胞株についての構築及びスクリーニングプロセスを示す。

【図7】ELISA法を用いて測定した、抗CEAヒト化キメラ抗体を発現及び分泌するCHO細胞株の上清中のキメラ抗体含量を示す。ここで、CHO上清(1:1000)、OD₄₉₀ = 1.520は、0.08 µg/ml、上清ストック溶液の濃度：0.08 × 1000 = 80 µg/mlに相当する。

【図8】RT-PCRを用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体の抗原特異性を示す。レーン1．DNA/HindIII。レーン2．320bpマーカー。レーン3．抗CEAヒト化キメラ抗体VL遺伝子のPCR増幅産物。レーン4．抗CEAヒト化キメラ抗体VH遺伝子のPCR増幅産物。レーン5、6．陰性対照。

【図9】免疫蛍光を用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体の抗原特異性を示す。

【図10】抗CEAヒト化キメラ抗体が、いくつかのCEA発現がん細胞上のCEA抗原を認識できることを示す。

【図11】ウェスタンブロッティングを用いて分析した、抗CEAヒト化キメラ抗体のヒト化特性を示す。レーン1．分子量マーカー。レーン2．キメラ抗体、2次抗体として抗ヒトIgG Fc-HRP。レーン3．マウスモノクローナル抗体、2次抗体として抗ヒトIgG Fc-HRP。レーン4．キメラ抗体、1次抗体として抗ヒト鎖。レーン5

・マウスモノクローナル抗体、1次抗体として抗ヒト鎖。

【図12】抗CEAヒト化キメラ抗体の組織1グラムあたりのパーセント（ID%/g）として表した、放射活性線量取り込み分析の結果を示す。

【図13】腫瘍組織と正常組織との間（T/NT）の抗CEAヒト化キメラ抗体の放射線比率の結果を示す。

【図14】抗CEAヒト化キメラ抗体によるCEA陽性結腸がんの腫瘍のin vivo放射性免疫イメージングを示す。

【図15】抗CEAヒト化キメラ抗体とI-131との複合体の単回投与によるヒト結腸がんを有するヌードマウス移植腫瘍モデルの治療の結果を示す（増殖曲線）。

【図16】抗CEAヒト化キメラ抗体とI-131との複合体の複数回投与によるヒト結腸がんを有するヌードマウス移植腫瘍モデルの治療の結果を示す（増殖曲線）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

生物材料の寄託情報

親のマウスモノクローナル抗体を生成するマウスハイブリドーマ細胞株C24は、China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC, Beichenxi Road 1-3 in Chaoyang District of Beijing, the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences) に、2010年5月4日に寄託番号第CGMCC3802号で寄託した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

ヒト化キメラモノクローナル抗体を生成するCHO細胞株Rcc24は、China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC, Beichenxi Road 1-3 in Chaoyang District of Beijing, the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences) に、2010年5月4日に寄託番号第CGMCC3803号で寄託した。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2011/071840
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
DWPI, CNABS, CPRSABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, GenBank, CAS Registry: carcinoembryonic antigen, CEA, antibody, humanize, chimeric, CDR, sequence search based on SEQ ID NOs: 1-2, 7-12.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN101928347A (SHANGHAI HAIKANG TRADITIONAL MEDICAL SC) 29 Dec. 2010 (29.12.2010) See claims 1-14.	1-14
X	Ran YL et al., Cloning of variable regions genes of a anti-CEA monoclonal antibody and expression of human-mouse chimeric antibody, Journal of Practical Oncology, 2001, Vol.16, No.2, pages 82-85.	1-14
X	Zhang MY et al., Construction and screening of the anti-CEA single chain antibody gene, Progress in Biochemistry and Biophysics, 1996, Vol.23, No.5, pages 470-474.	1-6, 8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 Jun. 2011 (10.06.2011)		Date of mailing of the international search report 23 Jun. 2011 (23.06.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer TIAN, Tian Telephone No. (86-10)62411042

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/071840

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US2005147614A1 (BEGENT R J H) 7 Jul. 2005 (07.07.2005) See claims 1-43.	1-14
A	US2009226111A1 (TOSHIBA KK) 10 Sep. 2009 (10.09.2009) See claims 1-33.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/071840

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101928347A	29.12.2010	None	
US2005147614A1	07.07.2005	US7232888B2	19.06.2007
		US2008003646A1	03.01.2008
		US7626011B2	01.12.2009
US2009226111A1	10.09.2009	JP2009211626A	17.09.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/071840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/30 (2006.01) i

C12N15/13 (2006.01) i

C12N15/63 (2006.01) i

C12N5/10 (2006.01) i

A61K39/395 (2006.01) i

A61K48/00 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2011/071840
A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K, C12N, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
DWPI, CNABS, CPRSABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, GenBank, CAS Registry: 癌胚抗原、抗体、人源化、嵌合、carcinoembryonic antigen、CEA、antibody、humanize、chimeric、CDR、基于 SEQ ID NO:1-2、7-12 的序列检索。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN101928347A (上海海抗中医药科技发展有限公司) 29.12 月 2010 (29.12.2010) 参见权利要求 1-14	1-14
X	冉宇靓等, 抗 CEA 抗体可变区基因的克隆及其嵌合抗体的表达, 实用肿瘤杂志, 2001 年, 第 16 卷第 2 期, 第 82-85 页。	1-14
X	章美云等, 人癌胚抗原单链抗体基因的构建和筛选, 生物化学与生物物理进展, 1996 年, 第 23 卷第 5 期, 第 470-474 页。	1-6、8
A	US2005147614A1 (BEGENT R J H) 7.7 月 2005 (07.07.2005) 参见权利要求 1-43。	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 10.6 月 2011 (10.06.2011)		国际检索报告邮寄日期 23.6 月 2011 (23.06.2011)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 田甜 电话号码: (86-10) 62411042

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/071840

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US2009226111A1 (TOSHIBA KK) 10.9 月 2009 (10.09.2009) 参见权利要求 1-33。	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/071840

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101928347A	29.12.2010	无	
US2005147614A1	07.07.2005	US7232888B2	19.06.2007
		US2008003646A1	03.01.2008
		US7626011B2	01.12.2009
US2009226111A1	10.09.2009	JP2009211626A	17.09.2009

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2011/071840

A. 主题的分类

C07K16/30 (2006.01) i

C12N15/13 (2006.01) i

C12N15/63 (2006.01) i

C12N5/10 (2006.01) i

A61K39/395 (2006.01) i

A61K48/00 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 43/00	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/534 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	E
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/534	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72) 発明者 ヤン, ジファ

中華人民共和国北京市朝陽区潘家園南里17号院中国医学科学院 腫 瘤研究所科研楼国
家抗体工程 実 験 室 1 2 - 0 5

(72) 発明者 ラン, ユリヤン

中華人民共和国北京市朝陽区潘家園南里17号院中国医学科学院 腫 瘤研究所科研楼国
家抗体工程 実 験 室 1 2 - 0 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA04 DA02 EA02 FA02 GA11 HA03 HA11
HA15
4B064 AG27 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA90X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4C076 CC27 EE41 EE59
4C084 AA12 NA13 ZB26
4C085 AA14 AA16 AA25 EE01 HH03 KA05 KA29 KB07 LL18
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA41 DA76 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	抗癌胚抗原的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2013534406A	公开(公告)日	2013-09-05
申请号	JP2013508358	申请日	2011-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海海康PHARML TECH & DEVE		
申请(专利权)人(译)	上海管道制药技术和德韦下降仪器有限公司		
[标]发明人	ヤンジファ ランユリヤン		
发明人	ヤン, ジファ ラン, ユリヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C07K16/32 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61K47/48 A61K47/42 A61K51/00 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/534 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/3007 C07K2317/14 C07K2317/24 C07K2317/73 A61K51/1093		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/46 C07K16/32 C12N5/00.102 A61K39/395.T A61P35/00 A61K47/48 A61K47/42 A61K43/00 A61K49/02.A G01N33/577.B G01N33/574.E G01N33/534 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA12 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA25 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/KA05 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	池田 成人 山口和弘		
优先权	201010163052.2 2010-05-05 CN		
其他公开文献	JP5987822B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了针对癌胚抗原 (CEA) 的人源化嵌合单克隆抗体, 编码该抗体的多核苷酸, 含有该多核苷酸的表达载体和含有该表达载体的宿主细胞。本发明还公开了所述抗体, 多核苷酸, 载体和宿主细胞在制备用于诊断和/或治疗肿瘤的药物中的用途。[选择图]图15

表2. 抗CEAヒト化キメラ抗体の抗原結合特異性を分析するための直接ELISA

試料	OD_{490}^a	OD_{490}^b
抗CEAヒト化キメラ抗体(精製、100ng/ml)	2.571±0.032	0.072±0.000
ヒトIgG1(100ng/ml)	0.079±0.007	0.077±0.005
親のマウスモノクローナル抗体(100ng/ml)	0.072±0.003	2.636±0.043
PBS 対照	0.070±0.001	0.072±0.001
CHO-dhfr 細胞上清	0.076±0.002	0.073±0.002

a、ヤギ-抗ヒトIgG Fc断片-HRPを2次抗体として用いた;b、ヤギ-抗マウスIgG Fc断片-HRP