PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 [4] C07K 15/04, C12N 5/00, 15/00 C12P 21/00 // A61K 39/395 G01N 33/574, 33/577 (C12P 21:00 C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号	WO 88/ 02006
		(43) 国際公開日	1988年3月24日 (24.03.88)

(21) 国際出願番号 PCT/JP87/00690
(22) 国際出願日 1987年9月18日 (18. 09. 87)
(31) 優先権主張番号 特願昭61-221390
(32) 優先日 1986年9月19日 (19. 09. 86)
(33) 優先権主張国 JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)
明治乳業株式会社
(MEIJI MILK PRODUCTS COMPANY LIMITED)〔JP/JP〕
〒104 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人 (米国についてのみ)
多田伸彦 (TADA, Nobuhiko)〔JP/JP〕
〒250 神奈川県小田原市板橋字上ノ山793 Kanagawa, (JP)
中村修治 (NAKAMURA, Shuji)〔JP/JP〕
〒250 神奈川県小田原市南鴨宮2-39-10 Kanagawa, (JP)
池上秀二 (IKEGAMI, Shuji)〔JP/JP〕
〒250-01 神奈川県小田原市栢山1123 清流荘 1-212 Kanagawa,(JP)
(74) 代理人
弁理士 戸田親男 (TODA, Chikao)
〒105 東京都港区虎ノ門一丁目19番14号 邦楽ビル503
戸田特許事務所 Tokyo, (JP)

(81) 指定国
AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許),
DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許),
IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許),
SE (欧州特許), US.
添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO TUMOR CELL SURFACE GANGLIOSIDE AND HYBRIDOMA YIELDING SAME

(54) 発明の名称 抗腫瘍細胞表面ガングリオシド特異的モノクローナル抗体とそれを産生するハイブリドーマ

(57) Abstract

Monoclonal antibody specifically recognizing a ganglioside present on the surface of mouse and human tumor cells and having a cytotoxic activity against the tumor cells, and a hybridoma yielding the same. The monoclonal antibody is yielded by fused cells composed of antibody-yielding cells and myeloma cells of mice sensitized with lymphoid tumor cells of mice. The monoclonal antibody specifically binds with GD2 of a ganglioside present on the cell surface to exert cytotoxicity, thus being useful for diagnosis and treatment of tumor.

(57) 要約

本発明は、マウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞との融合細胞が産生する、マウスおよびヒトの腫瘍細胞の細胞表面のガングリオシドを特異的に認識し、かつ該腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマに関するものである。

本発明のモノクローナル抗体は細胞表面のガングリオシドのＧＤ２に特異的に結合し、細胞傷害を起すことができるので、腫瘍の診断並びに治療に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	FR フランス	MR モーリタニア
AU オーストラリア	GA ガボン	MW マラウイ
BB バルバドス	GB イギリス	NL オランダ
BE ベルギー	HU ハンガリー	NO ノルウエー
BG ブルガリア	IT イタリー	RO ルーマニア
BJ ベナン	JP 日本	SD スーダン
BR ブラジル	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SE スウエーデン
CF 中央アフリカ共和国	KR 大韓民国	SN セネガル
CG コンゴー	LI リヒテンシュタイン	SU ソビエト連邦
CH スイス	LK スリランカ	TD チャード
CM カメルーン	LU ルクセンブルグ	TG トーゴ
DE 西ドイツ	MC モナコ	US 米国
DK デンマーク	MG マダガスカル	
FI フィンランド	ML マリー	

明　細　書

発明の名称

抗腫瘍細胞表面ガングリオシド特異的モノクローナル抗体とそれを産生するハイブリドーマ

産業上の利用分野

本発明は新規なモノクローナル抗体とそれを産生する新規なハイブリドーマに関する。更に詳しくはマウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞との融合細胞からクローン化して得られる、マウスおよびヒトの腫瘍細胞の細胞表面の種間共通の腫瘍関連抗原であるガングリオシド、特にＧＤ２（GalNAcβ1→4(NeuAcα2→8NeuAcα2→3)Galβ1→4Glc→Cer）を特異的に認識し、かつ該腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体を産生することを特徴とする新規なハイブリドーマと該モノクローナル抗体に関する。

なお、ここにおいてガングリオシドの名前（ＧＤ２、ＧＤ３など）はSvennerholmの命名法（Svennerholm, L. J. Lipid Res. 5, 145-155(1964)）による。また、ＧＤ３のシアル酸誘導体は括弧の中に記した。すなわち、ＧＤ３(NeuAc, NeuAc)、ＧＤ３(NeuAc, NeuGc)、ＧＤ３(NeuGc, Ne

uAc)、およびＧＤ３(NeuGc, NeuGc)はそれぞれ、II^3(NeuAc)$_2$-LacCer、II^3(NeuAcα2→8NeuGc)-LacCer、II^3(NeuGcα2→8NeuAc)-LacCer、II^3(NeuGc)$_2$-LacCerを意味する。そのほかの物質の名称はIUPAC-IUB会議（IUPAC-IUB Commission on Biochemiocal Nomenclature, Lipids 12, 455-463(1977)）による。

従来技術

モノクローナル抗体を用いてヒト腫瘍抗原を解析する試みは、ハイブリドーマ法が確立された直後に始まり、1978年にH.Koprowski らによって早くも抗ヒトメラノーマモノクローナル抗体の作製が報告（H Koprowski et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 3405(1978)）された。この抗悪性腫瘍抗体の報告は、腫瘍特異抗原を特異的に認識している可能性から癌の診断、治療という臨床分野で大いに注目され、その後同様な研究が数多くの研究者により精力的に行なわれてきた（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 1438(1979)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 6891(1980)、Br. J. Cancer, 43 696(1981)）。

当初、こうした研究は、腫瘍抗原の抗原決定基

として腫瘍細胞蛋白を対象として研究され、それに対するモノクローナル抗体が作製されていたがそれらの多くは、正常細胞とも反応し腫瘍細胞に対する特異性において満足できるものではなかった。しかし得られたモノクローナル抗体のうち比較的腫瘍細胞に特異性の高い抗体を調べていくうちこれらの抗体の多くが腫瘍細胞表面の糖脂質、糖蛋白質といった複合糖質の糖鎖部分を抗原決定基として担っていることが生化学分析の結果により次第に明かになってきた。なかでも最近、末端にシアル酸を有する糖脂質、即ちガングリオシド(シアル酸を含む糖脂質)を抗原とするモノクローナル抗体の有用性が示されてきている(Cancer Res., 45 2405-2414(1985))。

こうしたガングリオシドで代表される腫瘍細胞糖鎖を認識するモノクローナル抗体の一部は既に癌の血清診断の分野で既に応用され始めている。例えばKoprowskiらによって見いだされたN-19-9抗体(Science, 212 53-54(1981))は、膵癌の診断に有用との評価を得ている。この抗体は、当初シアル酸を含む糖鎖を目的とする抗体として開発

されたものではないが、その後の生化学分析の結果シアル酸を含む糖鎖を認識することがわかってきている。この他に癌の血清診断で有用性を確かめられている抗体は、現在までのところシアル酸を含む糖鎖を特異的に認識するものがほとんどである(神奈木　日本医師会雑誌 95 No2 200-208 (1986)、神奈木　代謝 23 141-154(1986))。このように生化学的分析が進むにつれ腫瘍抗原としてガングリオシドで代表される腫瘍細胞の表面糖鎖の重要性が高まってきている。しかしそれに対するモノクローナル抗体に関していえば、腫瘍組織に長短さまざまな特徴的なガングリオシドが多数存在しているのにもかかわらず、その大部分のガングリオシドに対するモノクローナル抗体が作製されていないのが現状である。

ガングリオシドに対するモノクローナル抗体はGD3に対してはPukel C.S. et al., J. Exp. Med. 155, 1133-1147(1982)やNudelman, E. et al., J. Biol. Chem. 257, 12752-12756(1982)、GD2に対してはCahan, L.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7629-7633(1982)、Cheresh, D.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8

1, 5767-5771(1984)、Cheung, N.K. et al., Cancer Res. 45, 2642-2649、およびSaito M. et al., Biochem. Biophys. Res. Coomun. 127, 1-7(1985)、ＧＭ２に対してはTai, T. et al., Proc. Natil. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)やNatoli, E.J. et al., Cancer Res. 46, 4116-4120(1986)、ＧＭ３に対してはHirabayashi, Y. et al., J. Biol. Chem. 260, 13328-13333(1985)のような研究があり、これらの知見はいずれも抗ガングリオシドモノクローナル抗体が神経外胚葉（Neuroectoderm）由来のメラノーマ、神経芽腫細胞、グリオーマと反応し、正常細胞とは反応しないことを示している。そしてこれらのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの多くはヒト腫瘍細胞で感作させたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞を融合する異種免疫の方法で作られている。ところがこの方法により得られるハイブリドーマのほとんどがヒトの主要組織適応抗原系（Major Histocompatibility Complex）であるＨＬＡを認識するモノクローナル抗体を産生するものであって、目的とする腫瘍細胞表面ガングリオシドに特異的な抗体を産生するものは非常にわずか

であって、クローニングのための作業を極めて煩雑なものにしている。

従って、腫瘍抗原として腫瘍細胞表面ガングリオシドに対して高い特異性をもつ抗体の開発は重要な研究対象でありながら作業の煩雑さもあって進んでおらず、臨床における腫瘍の診断および治療のためにも今後の重要な研究課題となっている。

問題点を 解決するための手段

そこで本発明者らは、腫瘍細胞のガングリオシドに特異的に反応するモノクローナル抗体の作成を目的として研究を行なったところ、マウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞との融合細胞からクローン化して得られるハイブリドーマから、マウスおよびヒトの腫瘍細胞の細胞表面の種間共通の腫瘍関連抗原であるガングリオシド、特にＧＤ２を特異的に認識し、かつ該腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体を見いだし、本発明を完成するに至った。本願発明のハイブリドーマの作成に当たっては、マウスの感作に用いる抗原に同種異系のマウスリンパ系腫瘍細胞を用いたため

に、異種のヒト膵臓細胞を抗原として用いる従来の方法よりも遙かに高い確率で目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることが出来ることも大きな特徴である。

図面の説明

第１図（Ａ）は左からガングリオシド純品の混合物（ＧＭ３＋ＧＭ２＋ＧＭ１＋ＧＤ３＋ＧＤ２）およびM14のガングリオシド分画をＴＬＣにかけ、レゾルシノールで染色したものである。第１図（Ｂ）はM14のＴＬＣにかけた後、ＭｏＡ１、ＭｏＡ２およびＭｏＡ３で酵素免疫染色を行なった結果である。

第２図（Ａ）は４種類のＧＤ３をＴＬＣにかけ、レゾルシノールで染色したものである。左からガングリオシド純品の混合物（ＧＭ３＋ＧＭ１＋ＧＤ３）、レーン番号１はＧＤ３(NeuAc, NeuAc)、レーン番号２はＧＤ３(NeuAc, NeuGc)、レーン番号３はＧＤ３(NeuGc, NeuAc)、レーン番号４はＧＤ３(NeuGc, NeuGc) である。第２図（Ｂ）と（Ｃ）はそれぞれＭｏＡ２とＭｏＡ１によるＴＬＣの酵素免疫染色の結果である。レーン番号とＧＤ３の種類は第２図（Ａ）と同じである。

第３図はＭｏＡ１、ＭｏＡ２およびＭｏＡ３とガングリオシド純品との反応性をＥＬＩＺＡで測定した結果を示したものである。各グラフ中で●－●はＧＤ２、○－○はＧＤ３(NeuAc, NeuAc)、

ＧＤ３(NeuGc, NeuAc)およびＧＴ１ａ、△－△はＧＤ１ｂ、□－□はＧＴ１ｂ、■－■はＧＱ１ｂ、▲－▲はＧＤ３(NeuAc, NeuGc)、ＧＤ３(NeuGc, NeuGc)、ＧＤ１ａ、モノシアロシルガングリオシド、および中性糖脂質を表わす。第３図（Ａ－１）は抗原の各ガングリオシド純品を段階希釈してウエルにコートし、ＭｏＡ１（10μg/ml）と反応させ、酵素で標識された抗マウスIgG抗体と更に反応させたもの。第３図（Ａ－２）は一定量のガングリオシド（0.1μg/ウエル）に対して段階希釈されたＭｏＡ１を加えた後、（Ａ－１）と同様の操作を行なったもの。第３図（Ｂ－１）と（Ｂ－２）はＭｏＡ２についてそれぞれ第３図（Ａ－１）、（Ａ－２）と同様な操作を行なったもの。第３図（Ｃ－１）と（Ｃ－２）はＭｏＡ３についてそれぞれ第３図（Ａ－１）、（Ａ－２）と同様な操作を行なったものである。

発明の構成

本発明のモノクローナル抗体は、発生学的にヒトの神経堤（neural crest）由来の腫瘍細胞に分類される腫瘍細胞表面のガングリオシドを正常細胞と区別し、特異的に認識する。そして認識するガングリオシドを更に詳しく述べると、ＧＤ２に共通してかつ最も強く反応する。

本発明のモノクローナル抗体は、マウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞との融合細胞からクローン化して得られるハイブリドーマを培養して製造される。

本発明のハイブリドーマは、まずマウスリンパ系腫瘍細胞でマウスを感作する。マウスリンパ系腫瘍細胞としては、感作されるマウスと異系でかつライン化されたものであれば用いることが出来るが、その細胞学的性質が比較的良く調べられていることが望ましい。マウスリンパ系腫瘍細胞をマウスに感作するに際しては腹腔内もしくは皮下

に10^6～10^7細胞／マウスで１～２週間毎に数回接種することにより免疫する。

最終免疫後、１～５日後に脾臓を取り出し抗体産生細胞とし親細胞と融合させハイブリドーマを得る。

親細胞としては、適切な選択マーカーを持つマウスミエローマ　　が適当である。

ハイブリドーマ作製には、親細胞であるマウスミエローマ　と抗体産生細胞を適切な割合で用意し、融合剤を用いて行なう通常の方法を使用する。融合剤としてポリエチレングリコール等が、割合としては１：３～１：５が適当である。

こうして得られるハイブリドーマは、公知の方法である限界希釈法でクローニングを繰り返し安定した単一のハイブリドーマを選び出す。ついで目的とする腫瘍細胞に障害性をもつ抗体産生をチェックすることで本発明の抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

こうしたハイブリドーマの抗体産生のスクリーニングは、ハイブリドーマを培養した培養上清にマウスＴ細胞 EL4と良質なウサギ血清補体を用い

た公知の方法である直接法細胞障害性試験または培養上清に神経堤（neural crest）由来のヒト腫瘍細胞と希釈したモルモット血清補体およびヒトO型赤血球の補体受容体を用いた免疫粘着反応試験いずれかにより行なう。

こうして得られる本発明のハイブリドーマでモノクローナル抗体を製造するために、必要に応じて培養容器中（in vitro）または動物の腹腔（in vivo）を利用し培養し、高抗体価のモノクローナル抗体を得ることができる。in vitroの場合、通常の培地にFCSを添加したものでよく、in vivoの場合、ハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に接種し7～14日後に腹水を採取し得る。

本発明の腫瘍細胞表面のガングリオシドを特異的に認識するモノクローナル抗体の精製は、硫安分画、ゲルロ過、アフィニティーカラム等の公知の方法を適宜組み合わせて行なう。

本発明では、このようにして同様の特異性をもつ3つのモノクローナル抗体およびハイブリードーマを得た。

こうして得られる抗体は、ヒトグリオーマ、ヒド神経芽細胞腫、ヒトメラノーマ等で代表される発生学的にヒト神経堤由来の細胞が腫瘍化したものと特異的に反応し正常細胞とは反応しない。この特異性は、ヒト神経堤由来の腫瘍細胞およびマウス由来の腫瘍細胞の一部に対して共通なものである。また抗体は、ヒト神経堤由来の腫瘍細胞に対する抗原決定基として、熱処理した神経堤由来の腫瘍細胞との免疫粘着阻止反応、シアリダーゼ処理した腫瘍細胞との反応性の消失、ガングリオシド分画との免疫粘着阻止反応の結果よりヒトの神経堤由来の腫瘍細胞表面のガングリオシドを特異的に認識しているものである。

更にこれらのモノクローナル抗体が認識している微細構造を決定するために、薄層クロマトグラフィー（以下ＴＬＣと称す）上での酵素免疫染色法、酵素免疫吸着法（以下、ＥＬＩＺＡと称す）、糖脂質純品を用いたＩＡ阻止試験を行なったところ、３つのモノクローナル抗体は認識するガングリオシドに若干の差異があるが、共通してかつ最

も強くガングリオシドＧＤ２を認識していること
が判明した。

このようにして得られたヒト神経堤由来の腫瘍細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体は、血清検査、組織診断、イメージング等による腫瘍の診断等に利用しうるものと期待される。

以下実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例１　ハイブリドーマの作製

Ａ系マウスにC57BLマウス由来のＴ細胞腫瘍EL4、10^7cells／マウスを１回／週、４週間にわたり腹腔内接種し、最終接種後３日目に脾臓を摘出し、細胞浮遊液として調整した。

一方融合の親細胞として BALB／c系マウス由来のミエローマNS.１を10^7cells培養し用意した。

融合は公知の方法（Nature,256 495(1975)）に従い以下の通り行なった。

上記で調整したマウス脾臓細胞とミエローマ細胞を５：１の比率になるように遠心チューブに混

合し、遠心した後上清をすて、RPMI1640(GIBCO社製)で40%に調整したポリエチレングリコール(平均分子量4,000 Merck社製)を0.2mℓ加え2分間よく混合した。その後5mℓの培地を1滴づつ3分間で加えて希釈し、遠心分離(500rpm、5分)し、上清をすてた。次に細胞をHAT培地(RPMI1640培地に10%FCSに終濃度でヒポキサンチン10^{-4}M、アミノプテリン4×10^{-7}M、チミジン1.6×10^{-5}Mを加える)に浮遊させ、96穴マイクロプレートに約100μℓ/wellづつ分配して培養した。

培養3日目と6日目にHAT培地で培地交換を行ない、それ以後は3日毎にHT培地(HAT培地の組成からアミノプリテンのみを除いた培地)で培地交換を行なった。

このようにしてコロニーの形成が十分観察できるようになると(10～14日後)、培養上清中の抗体活性を良質なウサギ血清補体を用いた直接細胞障害試験法にてスクリーニングした。

直接細胞障害試験法は、C57BLマウス由来のT細胞腫瘍EL4浮遊液20μℓ、ウサギ血清補体20μℓ、

培養上清 20μℓを37℃、45分混合し細胞障害性の有無により行なった。

スクリーニングしたハイブリドーマ 486個のうち EL4細胞に対して反応するものが14個得られ、そのうち3個のハイブリドーマについて、96穴プレートを用いて限界希釈を行ない安定なクローンを得るためにクローニングを繰り返し、安定で単一なハイブリドーマA1、A2、A3を得た。

オクタロニー法を用いて各ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の免疫グロブリンクラスを決定したところ、A1、A2、A3の産生するモノクローナル抗体はそれぞれ（IgM、κ）、（IgM、κ）、（IgG3、κ）であった。

実施例2 モノクローナル抗体の精製

BALB／c系のヌードマウス3匹の腹腔に0.5mℓプリステンを各投与し7日後にA1、A2、A3各々約5～10×10^6 cellsを先に用意したヌードマウスにそれぞれ接種し腹水化を行なった。1～2週間後に腹水を採取し、3,000rpm、15分の遠心分離

で上層のプリステン層と細胞塊とを除いた中間層を回収して保存した。

腹水よりの抗体成分の精製は以下の方法により行なった。

硫酸アンモニウムを終濃度50％となるように腹水溶液 10mℓに加えて塩析し、10,000rpm、30分間の遠心分離沈殿物をＰＢＳ（0.01Mリン酸緩衝液、0.15M NaClを含む、pH7.2）緩衝液10mℓに溶解し、同液1ℓに対して透析を３回繰り返し各免疫グロブリン画分とした。

こうして得たＡ１とＡ２の免疫グロブリン画分をＰＢＳ(0.01Mリン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH 7.2）緩衝液にて平衡化したセファデックスG-200カラムに負荷し、最初に溶出する画分（ボイド画分）を回収し精製IgM抗体とし、得られたモノクローナル抗体をMoA１、MoA２とした。

次いでＡ３の免疫グロブリン画分を0.04M リン酸緩衝液（0.03M NaClを含む、pH8.0)に対して十分に透析した後、同緩衝液で平衡化したイオン交換樹脂DE52カラム(ワットマン製)に負荷し、DE52に未吸着画分を回収し、ＰＢＳ緩衝液に透析した

ものを精製 IgG抗体とし、得られたモノクローナル抗体をMoA３とした。

実施例３　モノクローナル抗体の特異性の検討

(a) 精製された MoA１、MoA２、MoA３について種々の腫瘍細胞株に対する反応性を検討した。マウス腫瘍株との反応性試験は、良質のウサギ血清補体を用いた直接法細胞障害性試験をヒト腫瘍株との反応性試験は希釈したモルモット血清補体およびヒトＯ型赤血球の補体受容体を用いた免疫粘着反応試験により行なった。結果を表１および表２に示す。マウス腫瘍株では、MoA１がEL4細胞およびRBL5細胞と反応し、MoA２、MoA３がRBL5細胞および細胞と反応した。ヒト腫瘍株では、60種の細胞株との試験で、MoA１、MoA３がグリオーマ、メラノーマ、肺癌よりの細胞株と反応し、 MoA２がその他に神経芽細胞腫よりの細胞株とも反応した。この結果 MoA１、MoA２、MoA３ともヒトの神経堤由来の腫瘍細胞株およびマウスの腫瘍細胞株の一部と反応することが確認された。

表1 マウス腫瘍細胞株との反応性試験

マウス腫瘍細胞株	由 来	反応性 MoA1	MoA2	MoA3
EL 4	T細胞	+	+	+
RBL 5	T細胞	+	+	+
BPC 4	T細胞	−	+	+
EMG 2	ミエローマ	−	−	−
ERLD	T細胞	−	−	−
70Z/3	B細胞	−	−	−
416 B	幹細胞	−	−	−
8057	巨核芽球白血病	−	−	−
8072	慢性骨髄白血病	−	−	−
RLM 1	T細胞	−	−	−
BALBRV1	T細胞	−	−	−
BALBRVA	T細胞	−	−	−
LSTRA	Moloney 白血病	−	−	−
18-4	B細胞	−	−	−
CMS-4	線維肉腫	−	−	−
CMS17	線維肉腫	−	−	−
C14	肉腫	−	−	−
B6RV1	T細胞	−	−	−
L1210	B細胞	−	−	−
P815	マストサイトーマ	−	−	−

表2　ヒト腫瘍細胞株との反応性試験

ヒト腫瘍細胞株	反応性		
の由来癌組織	MoA1	MoA2	MoA3
グリオーマ	9/14	13/14	5/14
メラノーマ	1/2	2/2	1/2
肺癌			
小細胞	2/9	1/7	1/8
扁平上皮癌	0/4	2/4	0/4
腺癌	0/5	2/5	1/6
その他肺癌	0/2	0/2	0/2
神経芽細胞腫	0/3	2/3	0/3
胃癌	0/6	0/2	0/6
結腸癌	0/2	0/2	0/2
膵癌	0/1	0/1	0/1
肝癌	0/1	0/1	0/1
乳癌	0/2	0/2	0/2
膀胱癌	0/2	0/1	0/2
肉腫	0/2	1/3	0/2
咽頭癌	0/1	0/1	0/1
造血臓器腫瘍	0/6	0/6	0/6
腎癌	n.d.	0/4.	n.d.

(b) 正常細胞に対する反応性の試験も同様に行なった。MoA1、MoA2、MoA3いずれもマウスの正常細胞とは反応しなかった。表3に結果を示す。

表 3

細胞	反応性		
	MoA1	MoA2	MoA3
胸腺細胞	−	−	−
脾臓細胞	−	−	−
リンパ節細胞	−	−	−
骨髄細胞	−	−	−

実施例4 モノクローナル抗体抗原決定基の検討

MoA1、MoA2およびMoA3について認識する抗原構造を決定するためにヒトメラノーマ細胞株UCLASO-M14（以下M14と称す）を標的とした免疫粘着反応（以下IAと称す）、IA阻止試験、IA吸着試験を行なった。

(1) IAの方法

あらかじめ以下の組成のヒトアルブミン含有ベロナール緩衝液（以下HAVBと称す）を調整しておいた。

ヒト血清アルブミン(ミドリ十字)	4mℓ
0.03N $CaCl_2$	2.5mℓ
0.1M $MgCl_2$	2.5mℓ
20mg/mℓ KCL	5mℓ
0.1g/mℓ Glucose	5mℓ
ベロナール緩衝液(×5)	100mℓ

(25mM バルビタール、pH7.5、0.73M NaCl)

1×10^6cells／mℓのM14 25μℓと抗体溶液100μℓを加え、37℃で90分間振とうしながら反応させた。

HAVB 0.8mℓを反応液に加え、1,400rpm、5分間遠心分離を行ない上清をすて、次いでこの操作を3回繰り返し細胞の洗浄を行なった。

次に1／32に希釈したモルモット補体25μℓを加えて37℃、35～40分間振とうさせながら反応を行なった。

続いてヒトO型赤血球8×10^7cells／mℓを25μℓを加え、更に37℃で10分間振とうしながら反応させ、最後の20分間は静置して反応させた。

(2) IA吸着試験による熱安定生抗原の判定

M14、5×10^6cellsを0.1mℓの培地に浮遊させたものを2つ用意し、一方を100℃、5分間加熱処理した。

各々にMoA1抗体溶液を0.1mℓ加えて4℃で1晩吸着反応を実施した。

反応後、2,000rpm、10分間遠心分離を行ない、上清0.1mℓを先のIAの方法に従いIA吸着試験に供した。

同様にMoA2およびMoA3についても反応させた。

その結果どの抗体も反応を示し、結合部位が熱安定抗原、即ち糖質抗原であることが示された。

(3) シアリダーゼ処理腫瘍細胞との反応

M14、1×10^6cells／mℓを1mℓ取り、シアリダーゼ（シグマ社製）を1単位加えて37℃で2時間反応させた後、細胞を培地で洗浄し、これをシアリダーゼ処理細胞として用いた。

シアリダーゼ処理細胞を標的としてMoA1、MoA2およびMoA3の反応性を、先に示したIAの方法により調べたところ、いずれも反応が消失した。

このことよりいずれの抗体も抗原決定基にシアル酸を含むことが確認された。

(4) ガングリオシド分画を用いたIA阻止試験

M14よりSvennerholmらの方法（Biochem. Biophys. Acta. 617 97-107(1980)）に準じて総脂質画分の

抽出、DEAEクロマトグラフィー、アルカリ処理、イアトロビーズカラムクロマトグラフィーにより精製した。

精製ガングリオシド画分を抗体溶液に５nmolまたは10 nmolとなるように加えた後、M14とのIAを行なった。

その結果 MoA１、MoA２およびMoA３ともIA反応が阻止された。

またガングリオシド画分を１％酢酸で100℃、１時間処理してシアル酸の構造を破壊した後、各抗体溶液に加えIA試験を行なったところ、MoA１、MoA２およびMoA３ともIA試験が阻止された。

このことよりいずれの抗体もその抗原決定基にシアル酸が関係しており、腫瘍細胞のガングリオシドであることが確認された。

実施例５　モノクローナル抗体抗原決定基の微細構造の検討

更にこれらのモノクローナル抗体が認識している微細構造を決定するために、薄層クロマトグラフィー（以下ＴＬＣと称す）上での酵素免疫染色法、酵素免疫吸着法（以下、ＥＬＩＺＡと称す）、

糖脂質純品を用いたＩＡ阻止試験を行なった。

（１）ＴＬＣの方法

メルク社製のシリカゲルを塗布済みのＴＬＣプレート「シリカゲル６０」（厚さ200μm）と同じくメルク社製のシリカゲルを塗布済みのＴＬＣプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの展開溶媒はクロロフォルム／メタノール／0.22%CaCl$_2$ 水溶液を容積比55/45/10 としたものを用いた。ＴＬＣプレート上に展開されたガングリオシドの染色にはレゾルシノール（resorcinol）染色を、中性糖脂質の染色にはオルシノール（orcinol）染色を用いた。

（２）ＴＬＣプレート上での酵素免疫染色法

ガングリオシドのＴＬＣ終了後、ＴＬＣプレートをウシ血清アルブミン1%とポリビニールピロリドン（polyvinylpyrolidone）1%とを含有する燐酸緩衝塩溶液に浸した。空気中で乾燥させた後、プレートをモノクローナル抗体溶液(10μg/ml)と２時間25℃で反応させた。次に燐酸緩衝塩溶液（以下PBSと称す）を５回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。そして西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウスＩｇＧおよびＩ

gM抗体をこのクロマトグラムと25℃で2時間反応させた。再びPBSを5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。染色に当たっては400μg/mlのO-フェニレンジアミンと0.12%の過酸化水素を含むクエン酸－燐酸緩衝液（pH5.0、80mM）を用い、15分間反応させた。その後、水に浸して反応を停止させた。

（3）M14のガングリオシド分画と塩脂質純品の調製

M14のガングリオシド分画の調製はTai, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)に従った。

ガングリオシドGM1、GD1a、GD1b、GT1bはウシの脳から調製し、Kanfer, J.N. Methods Enzymol. 14, 660-664(1969)に従って精製した。GQ1bはヤトロン社から購入した。ヒト脳のGM3はスウェーデンのGoteborg大学のL. Svennerholm博士から入手した。GM2とGD2はそれぞれGM2とGD1bから、ウシ睾丸β-ガラクトシダーゼ（アメリカのミシガン大学のJ. W. Jourdian博士から入手）を用いて調製した。ヒトミエリンのGM4とヒト脳のGT1aは東京都臨

床医学総合研究所の有賀博士から入手した。クマ赤血球のＧＤ３(NeuAc, NeuAc)、ＧＤ３(NeuAc, NeuGc)、ＧＤ３(NeuGc, NeuAc)、およびＧＤ３(NeuGc, NeuGc)は東京都臨床医学総合研究所の橋本博士と鈴木明身博士から入手した。LacCer、$Gg0s_3Cer$、および$Gg0s_4Cer$はそれぞれＧＭ３、ＧＭ２、ＧＭ１から弱酸で処理し、イアトロビーズカラムクロマトグラフィーで精製して調製した。GlcCerはTai, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)に従って調製した。$Gb0s_3Cer$と$Gb0s_4Cer$はSupelco社（アメリカ、ペンシルバニア州、ベラフォンテ）から購入した。

（４）M14のガングリオシドとモノクローナル抗体とを反応させたＴＬＣプレート上での酵素免疫染色法の結果

第１図に示すようにＭｏＡ１とＭｏＡ３はM14のＧＤ２とのみ反応し、ＭｏＡ２はＧＤ２とＧＤ３とに反応している。

（５）ガングリオシド純品とモノクローナル抗体とを反応させたＴＬＣプレート上で酵素免疫染色法の結果

純品のジー、トリーおよびテトラーシアロシルーガングリオシドとモノクローナル抗体とのＴＬ

Cプレート上で酵素免疫染色法の結果を表4に示す。

表4

	反応性		
ガングリオシド	MoA1	MoA2	MoA3
GD3	−	++	−
GD2	+++	+++	+++
GD1a	−	−	−
GD1b	−	++	−
GT1a	−	++	++
GT1b	−	+	−
GQ1b	−	++	++
GT3	−	−	−
GT2	−	−	−
GM4	−	−	−
GM3	−	−	−
GM2	−	−	−
GM1	−	−	−
GlcCer	−	−	−
LacCer	−	−	−
$Gg0s_3Cer$	−	−	−
$Gg0s_4Cer$	−	−	−
$Gb0s_3Cer$	−	−	−
$Gb0s_4Cer$	−	−	−

+++：強い、++：中程度、+：弱い、若しくは痕跡程度、−：陰性

表４から分かるように本願発明のモノクローナル抗体はいずれもモノーシアロシルーガングリオシド（ＧＭ４、ＧＭ３、ＧＭ２およびＧＭ１）、および中性糖脂質（GlcCer、LacCer、$Gg0s_3Cer$、$Gg0s_4Cer$、$Gb0s_3Cer$および$Gb0s_4Cer$）とは反応しない。

次に各モノクローナル抗体の反応性の特徴を述べる。

ＭｏＡ１はＧＤ２とのみ反応し、他のガングリオシドとは反応しない。ＧＤ１ｂはＧＤ２の構造に１個のガラクトースが付け加わっているだけであり、またＧＭ２とＧＤ３はＧＤ２の構造からそれぞれ１個のＮ－アセチルノイラミン酸または１個のＮ－アセチルガラクトサミンが欠損しているだけであるにもかかわらず、ＭｏＡ１はこれらを識別してＧＤ２とだけ反応している。

ＭｏＡ２はNeuAcα2→8NeuAcα2→3Galという三糖構造を持つＧＤ３、ＧＤ２、ＧＤ１ｂ、ＧＴ１ａ、ＧＴ１ｂおよびＧＱ１ｂと反応し、他のガングリオシドとは反応しない。最も強く反応するのがＧＤ２であり逆に最も反応が弱いのはＧＴ１ｂである。ＧＤ２にガラクトース１個が付加された

ＧＤ１ｂは反応性が弱くなり、ＧＤ１ｂに更にシアル酸が末端ガラクトース残基に付加されたＧＴ１ｂはもっと反応性が落ちる。この知見からシアル酸が末端のガラクトース残基（ＧＤ１ｂ）や末端のシアル酸残基（ＧＴ１ｂ）に付加することによって、抗原決定基であるNeuAcα2→8NeuAcα2→3Galはマスクされることが示唆される。一方、ＧＴ１ｂの末端シアル酸残基にシアル酸が付加したＧＱ１ｂはＧＤ１ｂのレベルまで反応性が回復する。ＧＴ１ａの反応性はＧＱ１ｂと同程度であるから、ＧＱ１ｂの認識部位は末端の三糖であるはずである。以上から、ＭｏＡ２はガラクトース残基（場所は内部、末端を問わない）に結合したジシアロシル残基「NeuAcα2→8NeuAcα2→3」を認識していることが判明した。

ＭｏＡ３はＧＤ２、ＧＴ１ａ、ＧＱ１ｂとのみ反応している。

次に４種類のＧＤ３（ＧＤ３(NeuAc, NeuAc)、ＧＤ３(NeuAc, NeuGc)、ＧＤ３(NeuGc, NeuAc)、およびＧＤ３(NeuGc, NeuGc)）とモノクローナル抗体のＴＬＣプレート上で酵素免疫染色法の結果は第２図に示されている。ＭｏＡ２のみがこれらの一部と反応しており、ＭｏＡ１とＭｏＡ３は全

く反応しなかった（なおＭｏＡ３は第２図に結果を示していないが結果はＭｏＡ１と同様であった）。ＭｏＡ２と反応したのはＧＤ３(NeuAc, NeuAc)とＧＤ３(NeuGc, NeuAc)である。この結果はＭｏＡ２のガングリオシドの認識には三糖の内部シアル酸が必須であり、かつ該シアル酸はNeuAc残基でなければならないことを示している。内部シアル酸がNeuAcでなく、NeuGcの時は認識されていない。一方、末端シアル酸残基はNeuGc、NeuAcのいずれでもＭｏＡ２に認識されている。するとＭｏＡ２の抗原決定基はSiaα2→8NeuAcα2→3Gal残基となるはずである。

（６）ＥＬＩＺＡの方法

96穴ポリスチレン・マイクロタイター・プレートを使用し、エタノールで段階希釈した糖脂質を各穴に50μlづつ入れた。モノクローナル抗体はヒト血清アルブミン1%を含むPBSで希釈した。第２抗体としてはペルオキシダーゼを結合させた、ヤギ抗マウスＩｇＧおよびＩｇＭ抗体を用いた。

（７）糖脂質純品によるＥＬＩＺＡの結果

結果を第３図に示す。全般的に言ってＴＬＣプレート上で酵素免疫染色法の結果と同様である。

しかしながらＴＬＣプレート上で酵素免疫染色法ではＧＤ３(NeuAc, NeuAc)とＧＤ３(NeuGc, NeuAc)を認識しなかったＭｏＡ３がＥＬＩＺＡでは反応している。またＧＱ１ｂの反応性にも両測定法の間で差がある。これらはＥＬＩＺＡ法の方が感度が高いためであると考えられる。

（８）ＩＡ吸着阻止試験

段階希釈した各種糖脂質抗原50μlと抗体50μlを混合し、該混合液を4℃で一晩反応させた。その後 3.0×10^4 個のM14を含むバルビツール酸緩衝塩溶液25μlを加え、ＩＡ吸着試験を行なった。

（９）ＩＡ吸着阻止試験の結果

13種の酸性糖脂質と６種の中性糖脂質の純品(5nM)の、本願発明のモノクローナル抗体に対する反応性をＩＡ吸着阻止試験の結果で試験した結果を表５に示す。表中の抗原タイターはロゼット形成が50%阻害されたときの希釈倍率の逆数を表わす。

表5

	抗原タイター		
ガングリオシド	MoA1	MoA2	MoA3
GD3(NeuAc, NeuAc)	0	32	0
GD3(NeuAc, NeuGc)	0	16	0
GD3(NeuGc, NeuAc)	0	0	0
GD3(NeuGc, NeuGc)	0	0	0
GD2	64	256	256
GD1a	0	0	0
GD1b	0	16	0
GT1a	0	8	2
GT1b	0	2	0
GQ1b	0	8	8

ＴＬＣ上の酵素免疫法による結果とおおむね同様の結果である。ＭｏＡ１とM14との結合はＧＤ２によってのみ阻止された。ＭｏＡ２の場合は三糖構造を有する７種のガングリオシドにより、様々な程度で阻害された。中でもＧＤ２が最大の、ＧＴ１ｂが最小の阻害を示した。ＭｏＡ３はＧＤ２、ＧＴ１ａおよびＧＱ１ｂの３種のガングリオシドにより阻害された。ＭｏＡ３でもＧＤ２が最大の阻害活性を有している。

以上の結果をまとめると、表６のようになる。

表６

モノクローナル抗体	反応するガングリオシド
ＭｏＡ１	ＧＤ２
ＭｏＡ２	ＧＤ２＞ＧＤ３(NeuAc,NeuAc),ＧＤ３(NeuGc,NeuAc),ＧＤ１ｂ,ＧＴ１ａ,ＧＱ１ｂ＞ＧＴ１ｂ
ＭｏＡ３	ＧＤ２＞ＧＴ１ａ,ＧＱ１ｂ

請求の範囲

(1) マウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞との融合細胞が産生する、マウスおよびヒトの腫瘍細胞の細胞表面のガングリオシドを特異的に認識し、かつ該腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を持つことを特徴とするモノクローナル抗体。

(2) マウスリンパ系腫瘍細胞が T細胞白血病細胞株EL4であることを特徴とする特許請求範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

(3) 感作されたマウスがA系マウスであることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体。

(4) ヒト腫瘍細胞が神経堤（neural crest）由来の腫瘍細胞であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

(5) 細胞表面のガングリオシドがGD2であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

(6) マウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髄腫細胞と

の融合細胞からクローン化して得られる、マウスおよびヒトの腫瘍細胞の細胞表面のガングリオシドを特異的に認識し、かつ該腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ。

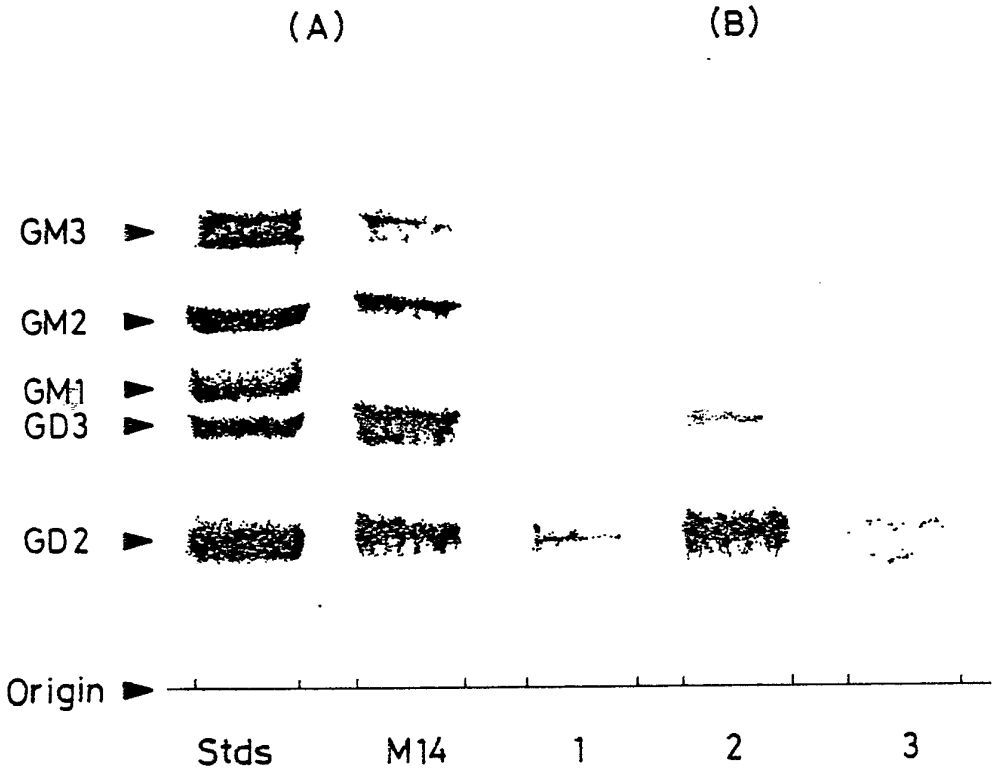
(7) マウスリンパ系腫瘍細胞がT細胞白血病細胞株EL4であることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載のハイブリドーマ。

(8) 感作されたマウスがA系マウスであることを特徴とする特許請求の範囲第6項に記載のハイブリドーマ。

(9) ヒト腫瘍細胞が神経堤(neural crest)由来の腫瘍細胞であることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載のハイブリドーマ。

(10) 細胞表面のガングリオシドがGD2であることを特徴とする特許請求の範囲第6項記載のハイブリドーマ。

FIG. 1



1 = MoA 1
2 = MoA 2
3 = MoA 3

FIG. 2

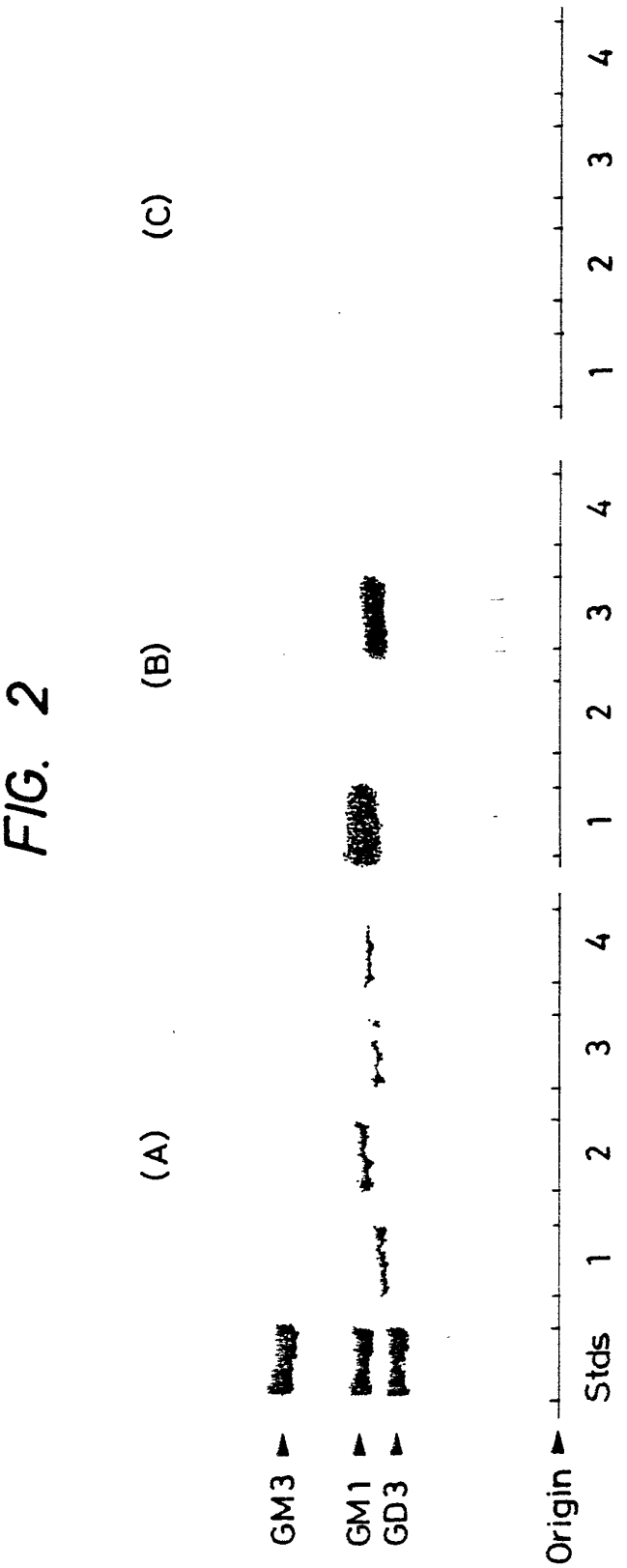
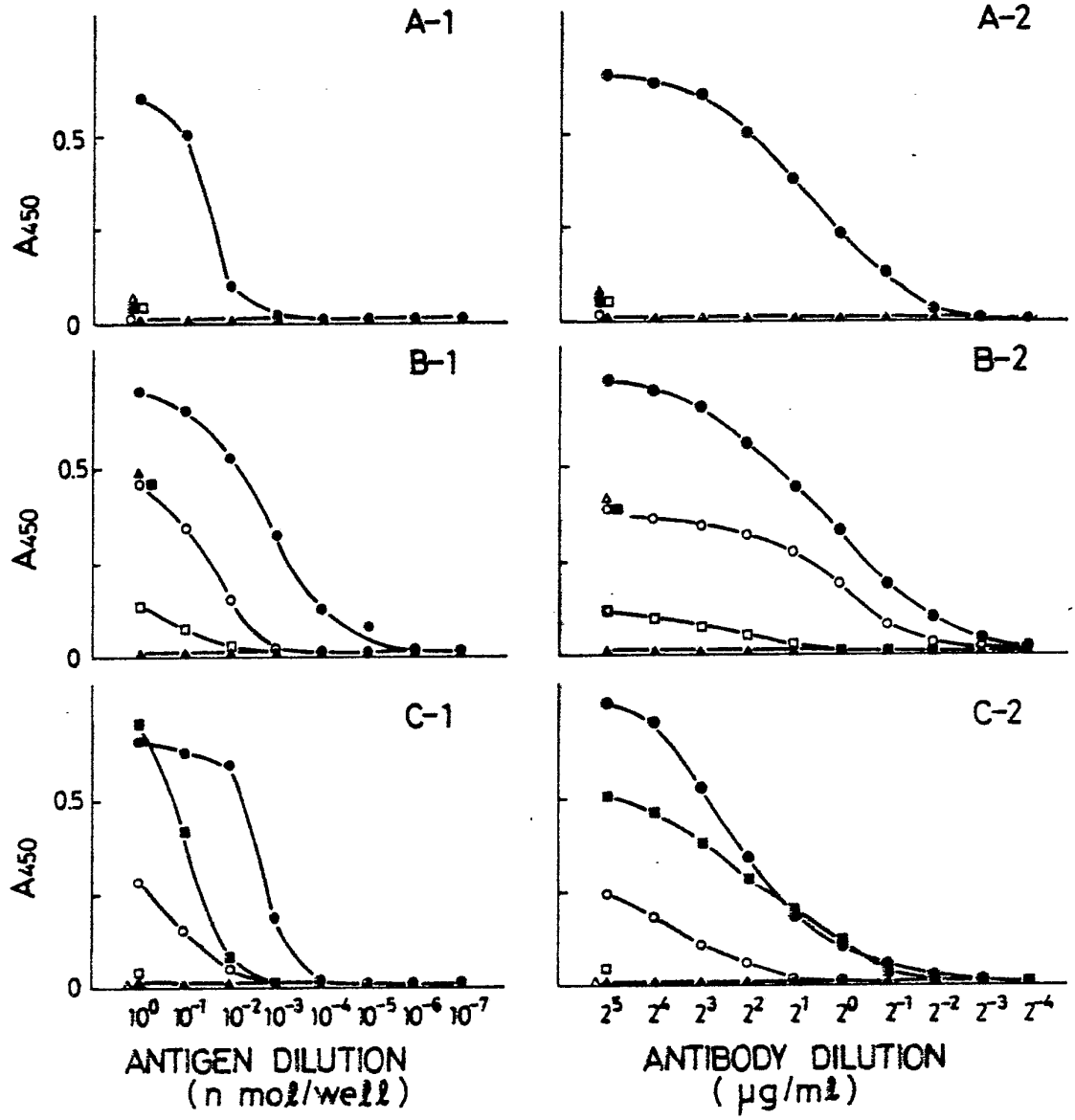


FIG. 3


A-1
A-2
B-1
B-2
C-1
C-2
A450
0.5
0
10^{0} 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7}
ANTIGEN DILUTION
(n mol/well)
2^{5} 2^{4} 2^{3} 2^{2} 2^{1} 2^{0} 2^{-1} 2^{-2} 2^{-3} 2^{-4}
ANTIBODY DILUTION
(μg/ml)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP87/00690

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [3]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl[4] C07K15/04, C12N5/00, 15/00, C12P21/00//A61K39/395, G01N33/574, 33/577, (C12P21/00, C12R1:91)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [4]

Classification System	Classification Symbols
IPC	C07K15/04, C12N5/00, 15/00, C12P21/00, A61K39/395

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [5]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [14]

Category *	Citation of Document, [16] with indication, where appropriate, of the relevant passages [17]	Relevant to Claim No. [18]
A, P	JP, A, 62-190074 (Fred Hatchinson Cancer Research Center) 20 August 1987 (20. 08. 87) (Family: none)	1-10
A	JP, A, 61-88892 (Shionogi & Co., Ltd.) 7 May 1986 (07. 05. 86) (Family: none)	1-10
A	Toyama Sakuji and one other (authors) "Mono-Clone Antibody Handbook" Kodansha Kabushiki Kaisha (1985.07.10) P.169, right column, line 3-170.	1-10

* Special categories of cited documents: [15]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search [2]	Date of Mailing of this International Search Report [2]
December 4, 1987 (04.12.87)	December 14, 1987 (14.12.87)
International Searching Authority [1]	**Signature of Authorized Officer [20]**
Japanese Patent Office	

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 87/ 00690

Ⅰ. 発明の属する分野の分類

国際特許分類（IPC） Int. Cl⁴ C07K15/04, C12N5/00, 15/00, C12P21/00//A61K39/395, G01N33/574, 33/577, (C12P21/00, C12R1:91)

Ⅱ. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

分類体系	分類記号
IPC	C07K15/04, C12N5/00, 15/00, C12P21/00, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

Ⅲ. 関連する技術に関する文献

引用文献のカテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A, P	JP, A, 62-190074 (フレッド・ハッチンソン・キャンサー・リサーチ・センター) 20. 8月. 1987 (20. 08. 87) (ファミリーなし)	1-10
A	JP, A, 61-88892 (塩野義製薬株式会社) 7. 5月. 1986 (07. 05. 86) (ファミリーなし)	1-10
A	富山朔二外1名編「単クローン抗体ハンドブック」株式会社 講談社 (1985. 07. 10) P.169右欄第3行-170.	1-10

※引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリーの文献

Ⅳ. 認証

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
04. 12. 87	14.12.87
国際調査機関	権限のある職員
日本国特許庁 (ISA/JP)	4B 6712 特許庁審査官 小沢 誠次

様式PCT/ISA/210(第2ページ) (1981年10月)