

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4263485号
(P4263485)

(45) 発行日 平成21年5月13日(2009.5.13)

(24) 登録日 平成21年2月20日(2009.2.20)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A C
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T

請求項の数 18 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-563309 (P2002-563309)	(73) 特許権者	501022343
(86) (22) 出願日	平成14年2月7日(2002.2.7)		ヴィレックス アクチエンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2004-522447 (P2004-522447A)		W i l e x A G
(43) 公表日	平成16年7月29日(2004.7.29)		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン グリルパ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/001282		ルツァー シュトラーセ 10
(87) 国際公開番号	W02002/062972		G r i l l p a r z e r S t r a s s e
(87) 国際公開日	平成14年8月15日(2002.8.15)		10, D-81675 Muench
審査請求日	平成16年9月17日(2004.9.17)		e n, G e r m a n y
(31) 優先権主張番号	60/266,853	(74) 代理人	100061815
(32) 優先日	平成13年2月7日(2001.2.7)		弁理士 矢野 敏雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100094798
(31) 優先権主張番号	60/327,008		弁理士 山崎 利臣
(32) 優先日	平成13年10月5日(2001.10.5)	(74) 代理人	100099483
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 久野 琢也
微生物の受託番号	DSM ACC2526		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリドーマ細胞系 G 2 5 0 およびモノクローナル抗体を製造するためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体 G 2 5 0 を製造するハイブリドーマ細胞 G 2 5 0 (受託番号: D S M A C C 2 5 2 6)。

【請求項 2】

モノクローナル抗体 G 2 5 0 を製造する細胞を製造するための、請求項 1 に記載のハイブリドーマ細胞 G 2 5 0 (受託番号: D S M A C C 2 5 2 6) の使用。

【請求項 3】

前記細胞が、G 2 5 0 抗体または少なくとも G 2 5 0 抗体の抗原結合部位をコードする遺伝物質を細胞にトランスファーすることによって得られる、請求項 2 に記載の使用。 10

【請求項 4】

前記細胞が、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体、二重特異性抗体、一本鎖抗体、または F (a b ') ₂、F a b ' または F a b 抗体フラグメントを製造する、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 5】

前記細胞が、原核細胞である、請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

前記細胞が、E. C o l i 細胞である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記細胞が、真核細胞である、請求項 2 から 4 までのいずれか 1 項に記載の使用。 20

【請求項 8】

前記細胞が、酵母細胞、骨髓腫細胞またはCHO細胞である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

G 2 5 0 抗体を製造するための方法において、適した条件下で、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の細胞を培養し、抗体が製造され、かつ細胞および／または培地から抗体を得ることを特徴とする、G 2 5 0 抗体を製造するための方法。

【請求項 10】

癌治療において、遅延した免疫応答を惹起する活性物質としてG 2 5 0 抗体を含有する医薬品を製造するために使用される請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

医薬品がキメラG 2 5 0 抗体を含有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

医薬品が、放射性ラベルされた形でのキメラG 2 5 0 抗体を含有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

医薬品が、サイトカインと結合したキメラG 2 5 0 抗体を含有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

サイトカインが、IL-2、TNFおよび／またはGM-CSFである、請求項 13 に記載の方法。

20

【請求項 15】

G 2 5 0 抗体を製造するための、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の細胞の使用。

【請求項 16】

癌治療において、遅延した免疫応答を惹起する薬剤を製造するための、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の細胞により製造されたG 2 5 0 抗体の使用。

【請求項 17】

腎細胞腫の治療のための、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

腫瘍の手術後の転移を治療するための、請求項 16 または 17 に記載の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ハイブリドーマ細胞G 2 5 0 またはG 2 5 0 抗体を製造する能力を有するそれらの子孫細胞に関する。

【0002】

マウス骨髓腫細胞と免疫化マウスからの脾臓細胞との融合は、K o h l e r およびM i l s t e i n ら、Nature, 256, 495-997 (1975) によって最初に記載され、この場合、この方法は、モノクローナル抗体 (mAb) と呼称される均一な抗体を製造する連続的な細胞系を得ることを可能にするものである。

40

【0003】

ハイブリッド細胞またはハイブリドーマを示す多くの例が記載されている。これらのハイブリドーマは、種々の科学研究に使用可能な抗体を製造するために使用される (Current Topics in Microbiology and Immunology, Volume 81- "Lymphocyte Hybridomas", F.Melchers et al., Springer-Verlag (1978) and references therein; C.J. Barnstable et al., Cell, (1978), 14, 9-20; P. Parham, W.F. Bodmer, Nature (1978), 276, 397-399; Handbook of Experimental Immunology, 3rd edition, Vol. 2, D.M. Wier, editor, Blackwell, 1978, Chapter 25, Chem. Eng. News, 15-17 (1979); Kennett, R.H., McKearn, J.T., and Bechtol, K.B. (1980) Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New

50

Dimension in Biological Analysis (Plenum, New York))。これらは、ハイブリドーマによるモノクローナル抗体製造のための重要な技術を報告するものである。

【0004】

モノクローナル抗体G250、サブクラスIgG1は、選択的に、腎細胞腫細胞(RCC)膜上で発現するが、正常な基部管状上皮(proximal tubular epithelium)中で発現しない抗原を認識する。抗体G250は、マウスを、種々の患者から得られた原発性RCC病変からの細胞ホモジェネートで免疫することによって得られた(Oosterwijk et al., Int. J. Cancer 38 (1986), 489-494)。

【0005】

モノクローナル抗体G250ならびにそのキメラ誘導体は、臨床試験において使用されている(Steffens et al., J. Clin. Oncol. 15 (1997), 1529-1537)。G250の抗原結合部位をコードする核酸配列は、本明細書中において参考のためにのみ引用される、係争中のUS-出願US60/266853の対象である。

10

【0006】

G250抗体を発現するハイブリドーマ細胞の製造は、一般には、国際特許出願WO88/08854およびOosterwijkら(前記参照)中で記載されている。前記に示したように、原発性RCC病変からの細胞ホモジェネートが種々の患者から得られ、このように非特異的材料が、免疫抗原として使用された。さらに、ハイブリドーマ細胞系は、ブタベスト条約による、認定受託機関には寄託されていない。したがって、入手可能な先行技術文献から、G250ハイブリドーマ細胞系を正確に再現することは可能でないように思われる。

20

【0007】

同時に、G250抗体が、WO93/18152で示された、いわゆるMN抗原と結合することが見出された。しかしながら、MN抗原上のG250結合部位は、現在においても知られていない。さらに、最近の結果によって、G250結合部位が、G250ハイブリドーマ細胞系を再現するための負担を増加させる、立体配座エピトープであることが示され、それというのも、G250と結合するMN抗原上の特異的なエピトープ配列が提供されないためである。

【0008】

したがって、本発明は、G250モノクローナル抗体を製造する能力を有するハイブリドーマ細胞に関する。このハイブリドーマ細胞は、微生物の寄託に関するブタベスト条約にしたがって、2001年9月11日、Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)、Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germanyで、寄託番号DSM ACC 2526で寄託された。この寄託によって、G250抗体を製造するハイブリドーマ細胞系が、初めて開示された。

30

【0009】

本発明の他の対象は、G250抗体を製造する前記ハイブリドーマDSM ACC 2526から誘導された子孫細胞である。

【0010】

好ましい実施態様において、本発明は、G250抗体を製造する寄託されたハイブリドーマ細胞の子孫細胞に関し、その際、子孫細胞は、組換えDNA法、たとえば、G250抗体をコードするかまたは少なくともその抗原結合部位をコードする遺伝物質を、レセプター細胞中にトランスファーすることによって得られる。遺伝物質は、直接的にかまたは間接的に、寄託されたハイブリドーマ細胞G250から得ることができる。“直接的に得られる”とは、G250遺伝物質が寄託されたハイブリドーマ細胞から誘導されることを意味する。“間接的に得られる”とは、G250遺伝物質が、すでに存在するG250子孫細胞から誘導されるか、あるいは化学合成を含む他の源から誘導されることを意味する。

40

【0011】

50

好ましくは、G 2 5 0 遺伝物質は、少なくともG 2 5 0 抗原結合部位をコードするヌクレオチド配列、特に、図 1 に示したようなH鎖抗原-結合部位の相補性決定部CDR 3、CDR 2および/またはCDR 1 (H 1 -H 3 を示す) をコードするヌクレオチド配列、および/または、図 1 に示したようなL鎖抗原-結合部位の相補性決定部CDR 3、CDR 2および/またはCDR 1 (L 1 -L 3 を示す) をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0012】

本発明によれば、用語“G 2 5 0 抗体”は、多重特異性抗体（たとえば二重特異性抗体）を含む任意の抗体を包含し、かつ、これらが好ましい活性を示す限りは抗体フラグメント、すなわち、少なくとも一つのG 2 5 0 抗原-結合部位をも包含する。抗体は、IgM、IgG（たとえば、IgG₁、IgG₂、IgG₃またはIgG₄）、IgD、IgAまたはIgE、特にIgG抗体、タンパク質分解法によってかまたは組換えDNA法によって得ることができる、組換え抗体または抗体フラグメントであってもよい。

10

【0013】

本明細書中で使用される用語“モノクローナル抗体”は、ほぼ均一な抗体の細胞群から得られる抗体、すなわち、細胞群を有する独立した抗体が、わずかな量で存在していてもよい天然に生じうる突然変異を除き同一であることを意味する。

【0014】

本明細書中で使用される用語“抗体”は、少なくとも一つのG 2 5 0 抗原-結合部位、すなわち、G 2 5 0 H鎖の少なくともCDR 3ドメインおよび/またはG 2 5 0 L鎖のCDR 3ドメインを含有する任意のポリペプチドか、あるいは本来のG 2 5 0 CDR 3ドメインに対して、アミノ酸レベルで少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%の同一性を有する変異体G 2 5 0 CDR 3ドメインを含有する任意のポリペプチドに関するが、但し、この場合、変異体CDR 3領域は、本来のCDR 3領域と同等の抗原-結合特性、特にアフィニティおよび特異性を有する。

20

【0015】

好ましくは、本明細書の範囲内で“抗体”の用語は、キメラ抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト化抗体（fully humanized antibodies）、一本鎖抗体、たとえば、sFv抗体フラグメント、Diabodyフラグメント、タンパク分解性または組み換え抗体フラグメント、たとえば、Fv-、Fab-、Fab'-またはF(ab')₂-フラグメントまたは抗体の他の抗原-結合配列を含む。さらに抗体は、他の独立体との融合体または結合体であってもよい。

30

【0016】

本明細書中において、抗体は、特にキメラ抗体を含み、その際、抗体は、抗原-結合部位を有するH鎖および/またはL鎖の部分が、本来のハイブリドーマ細胞系G 2 5 0 から誘導された相当する配列と同一であるかまたは相同であり、その一方で鎖の残余部分は、他の種から誘導された相当する配列または他の抗体クラスまたはサブクラスに属する配列、さらには、好ましい生物学的活性を示すこのような抗体のフラグメントと同一かまたは相同である。より好ましくは、キメラ抗体は、可変領域、たとえば、相補性決定部（CDRs）および本来のG 2 5 0 モノクローナル抗体のH鎖またはL鎖からの枠組み領域およびヒト定常配列、特に、ヒトκ-L鎖およびγ-H鎖配列を含む。キメラ抗体の製造方法は、Morrisonら（Proc.Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 6851-6855）に記載されており、この場合、この文献は、本明細書中において参考のためにのみ引用されているものである。

40

【0017】

さらに、本明細書中に示された抗体は、ヒト化抗体または完全ヒト化抗体を含む。ヒト化抗体は、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはこれらのフラグメントであり、この場合、これらは非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小限の配列を含む。特に、ヒト化抗体は、得られたヒト抗体のCDRからの残基が、G 2 5 0 CDR、特にH鎖および/またはL鎖のCDR 1、CDR 2および/またはCDR 3からの残基によって置換された

50

、ヒト免疫グロブリンである。さらに、ヒト化抗体は、レシピエントヒト抗体かまたは移入されたG 2 5 0 C D R配列中に見出されることのない残基を含有していてもよい。これらの改変によってさらに精製され、抗体性能を最適化することができる。一般に、ヒト化抗体または完全ヒト化抗体は、ほぼすべてが、少なくとも1個、典型的には2個の変領域を含有していてもよく、その際、すべてかまたはほぼすべてのC D Rドメインが、本来のG 2 5 0免疫グロブリンのドメインに相当し、かつ、すべてかまたはほぼすべての枠組み領域および定常領域は、ヒト免疫グロブリン配列に相当するものである。ヒト化抗体の製造は、たとえばJ o n e s ら (Nature 321(1986),522-525)、R i e c h m a n n ら (Nature 332 (1988), 323-329)、およびP r e s t a ら (Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992), 332-339) で記載されており、この場合、この文献は、本明細書中において参考のためにのみ引用されているものである。

10

【0018】

さらに、特に抗体は、一本鎖抗体、たとえば抗体のV HおよびV L領域を有する一本鎖F v抗体フラグメントを含み、その際、これらの領域は、一本鎖のポリペプチド中に存在する。一般に、F vポリペプチドはさらにs F vによって抗原結合の好ましい構造を形成させる、V HおよびV L領域間のポリペプチドリンカーを含む。s F V抗体の製造は、たとえば、P l u e c k t h u n ら (The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore, Eds., Springer Verlag, NY, pp. 269-315 (1994), Barbas III (Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119)) およびH o o g e n b o o m ら (Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68) で記載されており、この場合、この文献は、本明細書中において参考のためにのみ引用されているものである。

20

【0019】

さらに、特に抗体は、d i a b o d y、すなわち、2個の抗原結合部位を有する小さい抗体を含み、この場合、これらのフラグメントは、同一のポリペプチド鎖上で、L鎖可変部と連結されたH鎖可変部を有する。あまりにも短く、同一鎖上で2個の領域間で対にならないリンカーを用いて、ドメインは、他の鎖の相補的領域と強制的に対になり、かつ2個の抗原結合部位を形成する。d i a b o d yの製造は、たとえば、H o l l i n g e r ら (Proc. Natl. Sci. USA 90 (1993), 6444-6448) によって記載されているが、この場合、この文献は、参考のためにのみ引用されているものである。

【0020】

さらに、特に抗体は、多重特異性抗体、たとえば、少なくとも1個のG 2 5 0抗原結合部位および異なる抗体、たとえば抗C D - 3抗体からの抗原結合部位を有するヘテロ二重特異性抗体を含む。

30

【0021】

G 2 5 0ハイブリドーマ細胞またはこれらの子孫細胞によって製造された抗体は、マーカー成分または作用成分と融合するかまたは結合されてもよい。たとえば、G 2 5 0抗体は、組換え的に改変され、したがって、サイトカイン、たとえばインターロイキン-2 (I L - 2)、腫瘍壊死因子(T N F) および／または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F) と結合していてもよい。

【0022】

さらに、G 2 5 0抗体は、たとえば、適したマーカー群、たとえば蛍光群、放射性マーカー群等か、あるいは放射性同位体、たとえば、I、Y、P r、T m、I n、たとえば、¹²³I、¹²⁵I、¹³⁵I、^{99m}T mまたは¹¹¹I nを含む細胞毒、化学療法剤および細菌、ファージ、植物または動物由来の酵素的に活性の毒、またはこれらのフラグメントと、共有結合させるかまたは融合させることによって結合されていてもよい。

40

【0023】

本来のG 2 5 0ハイブリドーマ細胞またはこれらの任意の後代からのG 2 5 0特異的遺伝物質であるか、あるいは合成由来のG 2 5 0遺伝物質がトランスファーされた、レセプター細胞は、抗体を発現する能力を有する任意の適したホスト細胞であってもよい。たとえば、ホスト細胞は、原核細胞、好ましくはE. C o l i細胞または真核細胞であっても

50

よい。好ましい真核細胞は、たとえば昆虫、酵母および哺乳類細胞である。最も好ましいホスト細胞は哺乳類細胞、たとえば、ヒトまたはマウス骨髓腫細胞またはCHO細胞である。

【0024】

さらに、本発明は、G250抗体またはこれらの誘導体を製造する方法を含み、この場合、この方法は：G250ハイブリドーマ細胞またはこれらの子孫細胞を、適した条件下で培養し、その際、G250抗体が製造され、かつ、細胞および／または細胞培地から抗体および／またはその誘導体を得る。

【0025】

この方法によって得られる抗体は、特に、活性物質としての抗体、さらに製薬学的に認容性のキャリアー、希釈剤および／またはアジュバントを含む医薬品組成物を製造するのに有用である。

10

【0026】

特に好ましい実施態様において、活性物質は、キメラG250抗体であり、この場合、これらは、それ自体でかまたは放射性群、たとえば ^{125}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tm}$ または ^{111}In との結合体として存在していてもよい。

【0027】

さらに、本発明は、前記に示されたG250抗体、たとえばモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト化抗体、二重特異性抗体および、たとえば、(Fab')₂、Fab'-、Fab-およびFv-フラグメントのようなこれらのフラグメントを製造するための、寄託されたハイブリドーマ細胞およびそれらの子孫細胞の使用に関する。

20

【0028】

キメラG250抗体は、術後の腎細胞腫の治療のための臨床的研究において良好に使用された。研究はいまだ完了していないものの、治療された患者はすでに、メディアン生存時間において、未治療の患者（3ヶ月）または標準的処置で治療された患者（10～12ヶ月）と比較して著しい増加（15ヶ月以上）を示した。

【0029】

驚くべきことに、いくつかの場合において、治療開始後6ヶ月以上（more than 6 months）に亘って、腫瘍の退行（regression）が生じた。このようにして、キメラG250抗体および他のG250抗体は、ガン治療、好ましくは腎細胞腫の治療、より好ましくは、腫瘍手術後の転移の治療のために、遅延した免疫応答を導く能力を有する。

30

【0030】

例1

G250ハイブリドーマ細胞系の寄託

G250ハイブリドーマ細胞系は、WO88/08854の例1に記載のようにして製造した。その文献には、一般的な免疫化プロトコールが示されていた。他の情報、たとえば、G250抗体およびG250ハイブリドーマ細胞の分子学的特徴については示されていないかった。

【0031】

G250ハイブリドーマ細胞系は、ブタペスト条約にしたがって、DSMZで、寄託番号DSMAACC2526として、2001年9月11日に寄託された。

40

【0032】

例2

モノクローナル抗体G250によって認識されたエピトープのマッピング

まとめられた実験的証拠によれば、モノクローナル抗体G250（MabG250）によって認識されたG250タンパク質エピトープは、立体配座であり、どちらかといえば非線状の種類である。この仮説は、以下の観察に基づくものである：

MabG250は、ウェスタンブロット分析において抗原G250と反応しなかった。

MABG250アフィニティクロマトグラフィーによるG250抗原の精製は、非効率的

50

であり、その際、効率、精製の実施に要する時間が増加するにつれて減少し、タンパク質分解を回避するための最適の条件にもかかわらず、G250エピトープの急速な分解／変性が示唆された。一般的にデタージェントの添加は、ELISA中で減少したG250検出レベルを導いた。

【0033】

G250抗原をコードするcDNAを切断(truncation)し、引き続いてG250－ネガティブ細胞へ一時的にトランスフェクションをおこない、その後に、以下に示された免疫組織学的分析をおこなった：

【0034】

【表1】

cDNA コンストラクト	G250- 反応性
nt 1-1500 (aa 1-459), 完全タンパク質	+
nt 1-1218 (aa 1-406), G250 膜貫通領域を含まない	+/-
nt 1-1074 (aa 1-358)	-
nt 1-843 (aa 1-281)	-
nt 1-672 (aa 1-224)	-
nt 1-450 (aa 1-150)	-

【0035】

これによって、長いcDNAコンストラクトが使用された場合においても、G250－反応性が失われることが見出された。

【0036】

さらに、G250エピトープを明確に示すために、NovaTope system (Novagen Inc.) が使用され、この場合、この系は、このベクター中にライゲートされたすべてのコンストラクトの発現を確実にする系であり、すなわち、リーディングフレームに関係なく、可能なすべてのフラグメントが発現する。これは、タンパク質の中間部分において存在するエピトープの同定を可能にする。

【0037】

MN (G250) 抗原をコードするcDNAは、DNAse Iで2時間に亘って処理し、約15～70個のアミノ酸の長さを有するポリペプチドをコードする約50～200個のヌクレオチドのフラグメントが生じる。dAテーリングの後に、フラグメントをpScreen Tベクター中に挿入し、かつ、ライゲーション混合物を、トランスフォーメーションのためにコンピテントE. Coli DE3細菌に添加した。細菌を選択プレート上にプレーティングした。細菌コロニーをニトロセルロースフィルター上にブロットイングし、かつG250抗体でスクリーニングした。全部で7個のコロニーをMAb G250で同定した。G250反応性は弱かった。さらに再度スクリーニングした後に、一つのコロニーのみが極めて弱いにもかかわらずMb G250と反応したが、おそらくはバックグラウンドによる染色であった。クローンのシーケンス分析は、任意のG250配列を示さ

なかったが、しかしながら、切断されたベクターの存在を示した。したがって、ニトロセルロースプロットの染色は、おそらくは非特異的バックグラウンドによるものである。

【0038】

他の試験において、MN (G250) 抗原をコードする cDNA は、DNase I で処理されるが、しかしながら、約 65～200 個のアミノ酸のポリペプチドをコードする 200～600 個のヌクレオチドのフラグメントが単離され、かつ発現ベクター中にクローニングされ、かつ細菌中で発現させた。別個の細菌コロニーを G250 抗体に関してスクリーニングした。

【0039】

G250 での反応性は示されなかった。プロットは、延長された時間に亘って染色されたが、その後に、わずかな染色が 6 個の細菌単離物で観察された。細菌単離物は、切断ベクターおよび関連のない配列のみを含有していた。

【0040】

したがって、MAb G250 との強い反応性を有する MN 抗原の配列は全く同定されなかった。

【0041】

これらの結果は、G250 エピトープが立体配座エピトープであることを強く示している。さらに、MN 抗原上の G250 エピトープは、種々試みたが通常の方法によって特徴付けることはできなかった。

【0042】

例 3

キメラ G250 IgG 生産細胞系の製造
一般的なストラテジー

マウス G250 抗体のマウス/ヒト キメラ型の抗体を構築するために、抗体の結合特異性を決定する H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子は、G250 マウスハイブリドーマからクローニングされ、かつ *in vitro* で、ヒト定常部遺伝子と一緒に構築され、マウス/ヒトキメラキメラ遺伝子を製造した。適切な細胞系中でのこれらのキメラ遺伝子の発現は、本来のマウス抗体と同様の結合特性を有するキメラ抗体の製造を生じるが、しかしながら約 75% の分子はヒト配列を有している。

【0043】

G250 ハイブリドーマからの H 鎖および L 鎖遺伝子の可変部をクローニングするためのストラテジーは、機能的に再構築された（および発現された）免疫グロブリン遺伝子のための、ゲノム中の可変部と相当する J（ジョイント）鎖との架橋に基づく。J 鎖 DNA プローブは、J 鎖と結合する DNA を単離するための遺伝子ライブラリーのスクリーニングのために使用することができ；さらに生殖細胞系組織（再構築なし）中の DNA も J プローブとハイブリダイズするが、しかしながら可変部配列とは結合せず、単離されたクローンの制限酵素分析によって同定することができる。

【0044】

したがって、クローニングストラテジーは、JH および JK プローブを用いて、再構築された H 鎖および L 鎖遺伝子から可変領域を単離した。さらに、正確な遺伝子クローンの同定および特徴付けを補助するために、H 鎖および L 鎖の可変領域に相当する cDNA クローンが、G250 ハイブリドーマ中で製造された mRNA から得られた。G250 cDNA 配列とマッチングするこれらのゲノミッククローンは、ヒト定常部を含む発現ベクター中でクローニングされ、かつマウス骨髓腫細胞中にトランスファーすることで抗体が製造されるかどうかを調べた。生産細胞からの抗体については、その後に、マウス G250 抗体と比較しての結合特異性を試験した。

【0045】

G250 VH cDNA および VL cDNA のクローニング

全 RNA を、G250 ハイブリドーマ細胞から単離し、特異的 VH および VL cDNA クローンを製造するために使用した。第 1 ストランドの cDNA 合成を、マウス κ 鎖お

10

20

30

40

50

よび I g G 定常部に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いておこなった。dG テーリングの後に、第2ストランド合成を、C-末端 (tailed) オリゴヌクレオチドプライマーを用いておこなった。H鎖およびL鎖の可変部は、特異的 5'-および 3'-プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応によって増幅させ、かつ増幅産物を、プラスミドベクター pUC19 中にクローニングした。VH および VL クローンについて DNA シークエンス分析をおこない、推定される G250H 鎖および L 鎖可変部の塩基配列を確立した。シークエンシングの結果は、図1に示した。

【0046】

G250 可変部の遺伝子のクローニング

可変部遺伝子をクローニングするために、高分子量ゲノミック DNA を、単離された核を SDS および プロテアーゼ K で処理し、引き続いてフェノール抽出を2回、その後にエタノール沈殿を1回おこなうことによって、G250 ハイブリドーマ細胞から単離した。

【0047】

H鎖遺伝子座に関して J 領域プローブを用いてのサザンブロッティングは、G250H 鎖が、2.3 kb の EcoRI DNA フラグメントを含むことを示唆した。したがって、ハイブリドーマ DNA 細胞からの EcoRI フラグメントを、0.8% アガロースゲル上に分画し、約 2~3 kb フラグメントのサイズの範囲をゲルから溶離し、かつ λ バクテリオファージ Zap II (Stratagene, La Jolla California, USA) のベクターアームにライゲートした。ライゲーションを、in vitro で、Gidapack Gold (Stratagene) を用いてファージ粒子中にパッケージングし、かつ、150 mm プレート当たり約 20,000 プラークの密度で、E. Coli LE392 上にプレーティングした。プラークを、ニトロセルロースフィルター上にトランスファーし、かつ、³²P-ラベルされた DNA プローブ (マウス J3 および J4 エキソンを含有する 2.0 Kb の EcoRI-BamHI フラグメント) で試験した。

【0048】

L鎖 G250 可変領域の遺伝子に関して、κ-遺伝子座からのマウス J 鎖プローブを用いてのサザンブロッティング分析は、正確な遺伝子が、5.5 Kb の HindIII フラグメント上に位置することを示した。したがって、G250 ハイブリドーマ DNA は、HindIII で切断され、かつ 5~6 Kb の DNA フラグメントを、0.8% アガロースゲルから単離し、かつ、バクテリオファージ λ ベクター Charon 27 のアームにライゲートした。ライゲートされた DNA を in vitro で、Gigapack Gold (Stratagene) を用いて、ファージ粒子中にパッケージングし、かつ、E. Coli LE392 細胞上に、150 mm プレート当たり約 20,000 プラークの密度でプレーティングした。プラークをニトロセルロースフィルターにトランスファーし、かつ、³²P-ラベル DNA プローブで試験した (全部で5個の Jκ エキソンを含む、2.7 Kb の HindIII フラグメント)。

【0049】

H鎖およびL鎖遺伝子に関する推定されるクローンを、J鎖プローブを用いて、少なくとも3回のプラーク精製の後に単離し、それぞれの精製段階において、ファージ DNA に対するハイブリダイゼーションを試験した。H鎖およびL鎖遺伝子のための単離されたファージクローンから精製された DNA を、EcoRI (H鎖) および HindIII (L鎖) で切断し、かつアガロースゲル上に分画した。適切なサイズのフラグメント (H鎖に関しては 2.3 kb および L鎖に関しては 5.5 kb) を、ゲルから単離し、かつプラスミドベクター pUC19 中にサブクローニングした。これらのサブクローニングされた DNA フラグメントは、制限エンドヌクレアーゼマッピングおよび DNA 配列分析によって、本来の G250 ハイブリドーマから得られる cDNA クローンの構造に適合する可変領域抗体遺伝子を含有することが示された。

【0050】

発現プラスミド

2.3 kb の EcoRI H鎖可変領域フラグメントを、ヒト G1 定常領域および哺乳

10

20

30

40

50

類細胞中で選択可能なマーカーに対する耐性を付与する遺伝子を含む、適した発現ベクター中にクローニングした。5.5 kbのHindIII-L鎖フラグメントを、ヒトκ定常領域および哺乳類細胞中で選択可能なマーカーに対する耐性を付与する遺伝子を含む、適した発現ベクター中にクローニングした。クローニングしたフラグメントの存在および発現ベクター中でのその配置を、制限酵素マッピングによって試験した。基礎となるベクターは、従来よりキメラ抗体の構築のために使用されていたものである (Sun, L. et al., (1987) PNAS 84, p. 214; Knight et al., (1993), Molecular Immunology 30, p. 1443-1453)。キメラ抗体遺伝子の発現は、クローニングされた可変領域の上流に存在する天然の免疫グロブリンプロモーターを用いて達成され；下流の調節シグナルは、定常領域遺伝子と関連する要素によって提供された。

10

【0051】

G250キメラ抗体の発現

H鎖およびL鎖発現ベクターは、エレクトロポレーション技術を用いて、非一生産性マウス骨髓腫細胞系の同時トランスフェクトのために使用された。ELISAアッセイを、ヒトFc領域を有する抗体のスクリーニングのためのクローンをスクリーニングするために使用し、かつ、最も高い生産物 (producer) (cG250) を、他の特徴付けのために選択した。

【0052】

キメラ抗体は、タンパク質A-セファロース上でクロマトグラフィーによって精製し、かつ、抗体が正確な特異性を有することを証明するための競合アッセイ中で分析した。cG250抗体は、A704腎細胞腫細胞 (この場合、これは、G250抗体を発現する) との結合に関しての¹²⁵I-ラベルマウスG250との競合において、非ラベルマウスG250とほぼ等しく効果的であることが見出された。したがって、キメラG250抗体は、その結合特性に関して、本来のマウスG250抗体と類似している。

20

【0053】

例4

臨床試験におけるキメラG250抗体の使用

投与プロトコール

術後の転移を有する腎細胞腫の患者は、12週間に亘って、1週間当たり1回の輸液で、30分に亘ってキメラG250抗体 50 mgを投与することによって処理した。

30

有効性の判断：

この試験において、6ヶ月以上に亘って、疾病の継続的な安定化が、患者32人のうち8人 (25%) で達成された。すべての患者に関する進行に対してのメディアン時間は、4～70週間の範囲で16週間であった (平均26、27週間)。試験を中断した日時である2001年12月において、5人の患者についてはなおも進行がみられなかった (51+、56+、60+、64+および70+週間)。

【0054】

これらの発見の重要性は、これらの患者の多くが、記録された進行性疾病を有することによって支持されるが、他の2人の患者については、試験への参加時において進行していたと考えられる。さらに、これらの患者のうち3人は、以前のサイトカイン療法および化学療法に対して治療抵抗性であるか、あるいは、サイトカイン治療後の数年間で再発していた。4人の患者については治療歴がなく、転移の診断の後すぐに試験薬剤で治療した。試験への参加時において、これらの患者のうち3人は、80%のKarnofsky performance status (KPS) を有し、2人が90%のKPSを有していた。ヘモグロビン (Hgb) は、5人の患者において10 g/dLを下廻った。90%のperformance status 中央値 (平均91%) は、非応答性の患者群と同一であった。さらに、9.8 g/dL (平均10.97 g/dL) のメディアンHgbは相対的に低かった。

40

【0055】

1人の患者において、完全に目的とする緩解が達成された。目的とする応答は、遅延して生じ、治療の開始後6ヶ月を上廻って生じた。他の患者では、その標的病変の大きさの

50

59%相当する減少を生じた。双方の患者の応答は、それぞれ64週、および70週で、2001年12月での評価と同様に継続していた。腫瘍の退行は、試験開始後6ヶ月を上廻って遅くに生じた。遅発性応答は、キメラ抗体の静脈内注射（iv injection）による治療の継続期間が相対的に短く、かつ、ADCCとは無関係の遅延した免疫応答が生じたものと解釈されてもよい。

【0056】

応答は、1年以上に亘って継続可能であり、かつ2001年12月においてなおも継続していた。総合的な臨床効果率（clinical benefit）（少なくとも6ヶ月を上廻るか、または目的の応答）は25%であった。さらに、試験的治療参加後6ヶ月で、患者の87.5%（28/32）が依然として生存していたことは強調されるべきである。

10

【0057】

2001年11月の末において、メディアン生存時間の推定が、少なくとも13.5ヶ月であると算定された。

【0058】

2002年1月の末において、メディアン生存時間の推定が、少なくとも15ヶ月であると算定された。これは、未治療の患者（3ヶ月）のメディアン生存時間よりもかなり高く、かつ、FDA承認の標準的治療、すなわち、高用量インターロイキン2の投与（10～12ヶ月）で治療した患者のメディアン生存時間よりもかなり高いものである。

【0059】

このようにして、キメラ抗体G250が、腎細胞腫の治療に関しての適した治療薬であることが明らかになった。好ましい実施態様において、治療は、体中に分散した転移を取り除くために、主な腫瘍の外科的手術による除去、および引き続いてのG250の投与を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】本発明によるVHG250およびVLG250のシーケンシングの結果を示す図

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 K 38/22	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 K 37/24
		C 1 2 P 21/08

前置審査

(74)代理人 100110593
弁理士 杉本 博司

(74)代理人 100128679
弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 エグベルト オースターウィーク
オランダ国 ビューニンゲン クライドンク 1

(72)発明者 スヴェン ワーナー
オランダ国 ライデン ヴァン ビューニンゲンラーン 2 0

(72)発明者 シュテファン ウルリヒ
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン ヴォルフオルシュトラーセ 1 5

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第 8 8 / 0 0 8 8 5 4 (WO, A 1)
Journal of clinical oncology. 1997, Vol.15, No.4, p.1529-1537
Journal of clinical oncology. 1993, Vol.11, No.4, p.738-750
International journal of cancer. 1986, Vol.38, No.4, p.489-494, デンマーク

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-19/00
PubMed