

(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2013-502913

(P2013-502913A)

(43) 公表日 平成25年1月31日(2013.1.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/30 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/30	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-526072 (P2012-526072)  
 (86) (22) 出願日 平成22年8月27日 (2010. 8. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/062527  
 (87) 国際公開番号 W02011/023787  
 (87) 国際公開日 平成23年3月3日 (2011. 3. 3)  
 (31) 優先権主張番号 61/238, 505  
 (32) 優先日 平成21年8月31日 (2009. 8. 31)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512036384  
 ロシュ グリクアート アーゲー  
 スイス国 ツェーハー 8952 シュリ  
 ーレン, ヴァーギシュトラッセ 18  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 ホーファー, トーマス ウー,  
 スイス国 ツェーハー 8052 チュー  
 リッヒ, ブーンライン 8  
 (72) 発明者 ホッセ, ラルフ  
 スイス国 ツェーハー 6330 シャム  
 , シュミートシュトラッセ 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 親和性成熟ヒト化抗CEAモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗原結合分子 ( A B M ) に関する。特定の実施態様において、本発明は、ヒト癌胎児性抗原に特異的であるキメラ抗体、霊長類化抗体、又はヒト化抗体を含む、組換えモノクローナル抗体に関する。更に、本発明は、このような A B M をコードする核酸分子、及びにこのような核酸分子を含むベクター及び宿主細胞に関する。本発明は更に、本発明の A B M を製造するための方法及び疾患の治療において、これらの A B M を使用方法に関する。更に、本発明は、 F c レセプター結合が増加し及びエフェクター機能が増加した抗体を含む、改善された治療特性を有し修飾されたグリコシル化を持つ A B M に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む、ヒト化、親和性成熟抗原結合ドメインを含む抗原結合分子(ABM)であって、前記抗原結合ドメインは、膜結合ヒト癌胎児性抗原(CEA)に特異的に結合し、前記抗原結合ドメインはマウスモノクローナル抗体PR1A3と同じエピトープに結合するか、又はマウスモノクローナル抗体PR1A3と結合を競合することが可能である抗原結合分子。

## 【請求項 2】

前記ABMは、親和性成熟されていない親ABMより、CEAに対して少なくとも約2倍から約10倍高い親和性を有する、請求項1に記載のABM。

10

## 【請求項 3】

前記ABMは約1 $\mu$ Mから約0.001nMよりも低い $K_D$ 値でヒトCEAに結合する、請求項1又は請求項2に記載のABM。

## 【請求項 4】

前記親和性成熟抗原結合分子は約100nMより低い $K_D$ 値で結合する、請求項3に記載のABM。

## 【請求項 5】

前記ABMは可溶性CEAに対して実質的に交差反応性を持たない、請求項1から4の何れか一項に記載のABM。

## 【請求項 6】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、及び配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、及び配列番号56、又はその組合わせからなる群から選択される、少なくとも一つの重鎖又は軽鎖CDRを含む、請求項1から5の何れか一項に記載のABM。

20

30

## 【請求項 7】

前記少なくとも一つのCDRは重鎖CDRである、請求項6に記載のABM。

## 【請求項 8】

前記抗原結合ドメインが、

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、及び配列番号12からなる群から選択される重鎖CDR1、及び

配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、及び配列番号24からなる群から選択される重鎖CDR2、及び

40

配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35からなる群から選択される重鎖CDR3を含む、重鎖可変領域を含む、請求項1から7の何れか一項に記載のABM。

## 【請求項 9】

前記抗原結合ドメインが、

配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、及び配列番号45、からなる群から選択される軽鎖CDR1、及び

50

配列番号 46、及び配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、及び配列番号 55 からなる群から選択される軽鎖 CDR2、及び

配列番号 56 の軽鎖 CDR3 を含む、

軽鎖可変領域を含む、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の A B M。

【請求項 10】

前記重鎖可変領域が、

配列番号 9、

配列番号 15、及び

配列番号 25、

を含み、及び

前記軽鎖可変領域が、

配列番号 45、

配列番号 55、及び

配列番号 56

を含む、請求項 9 に記載の A B M。

10

【請求項 11】

前記抗原結合ドメインが、

Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E X<sup>1</sup> X<sup>2</sup> M X<sup>3</sup> W V  
R Q A P G Q G L E W M G X<sup>4</sup> I N T K X<sup>5</sup> G E A X<sup>6</sup> Y X<sup>7</sup> E E F K G R F V F S L D  
T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D X<sup>8</sup> X<sup>9</sup> X<sup>10</sup> Y X<sup>11</sup> X<sup>12</sup>  
X<sup>13</sup> X<sup>14</sup> D Y W G Q G T T V T V S S

20

の配列を含む重鎖可変領域を含み、

ここで、X<sup>1</sup> は Y 又は F ; X<sup>2</sup> は S 又は G ; X<sup>3</sup> は N 又は S ; X<sup>4</sup> は W 又は Y ; X<sup>5</sup> は N、T 又は S ; X<sup>6</sup> は T 又は N ; X<sup>7</sup> は V 又は I ; X<sup>8</sup> は F 又は A ; X<sup>9</sup> は Y、A、V、F 又は S ; X<sup>10</sup> は D、H、W、E、又は Y ; X<sup>11</sup> は V、L 又は F ; X<sup>12</sup> は E、K 又は Q ; X<sup>13</sup> は A 又は T ; 及び X<sup>14</sup> は M 又は L

である、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の A B M。

【請求項 12】

前記重鎖可変領域が配列番号 107 の配列を含む、請求項 11 に記載の A B M。

30

【請求項 13】

前記抗原結合ドメインが、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S X<sup>15</sup> X<sup>16</sup> X<sup>17</sup> X<sup>18</sup> X<sup>19</sup>  
X<sup>20</sup> V A W Y Q Q K P G K A P K X<sup>21</sup> L I Y X<sup>22</sup> A S X<sup>23</sup> X<sup>24</sup> X<sup>25</sup> X<sup>26</sup>  
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C H Q Y Y T Y P L  
F T F G Q G T K L E I K

の配列を含む軽鎖可変領域を含み、

ここで、X<sup>15</sup> は Q、A、K、又は H ; X<sup>16</sup> は N、A、Y、I、K、T、又は F ; X<sup>17</sup> は V、A、G、又は M ; X<sup>18</sup> は G、S、T、又は L ; X<sup>19</sup> は T、N、P、又は A ; X<sup>20</sup> は N 又は Y ; X<sup>21</sup> は P 又は L ; X<sup>22</sup> は S、L、又は W ; X<sup>23</sup> は Y、N、又は H ; X<sup>24</sup> は R、L、P、又は H ; X<sup>25</sup> は Y、S、Q、K、E、F、又は P ; 及び X<sup>26</sup> は S、G、I、又は R

である、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の A B M。

40

【請求項 14】

前記軽鎖可変領域が配列番号 108 の配列を含む、請求項 13 に記載の A B M。

【請求項 15】

前記抗原結合ドメインが配列番号 107 の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 108 の配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 1 から 14 の何れか一項に記載の A B M。

【請求項 16】

前記 A B M がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子に由来する少なくとも一つのフレーム

50

ワーク領域を含む、請求項 1 - 15 の何れか一項に記載の A B M。

【請求項 17】

前記 A B M が配列番号 102 の重鎖フレームワーク領域 F R 1 - 3、及び配列番号 106 の軽鎖フレームワーク領域 F R 1 - 3 を含む、請求項 16 に記載の A B M。

【請求項 18】

一以上の相補性決定領域 ( C D R ) を含む抗原結合ドメインを含む変異体抗原結合分子 ( A B M ) であって、前記抗原結合ドメインは膜結合ヒト癌胎児性抗原 ( C E A ) に特異的に結合し、前記変異体 A B M は、親 A B M と比べて変異体 A B M の結合親和性の増加に寄与する少なくとも一つの C D R において、少なくとも一つのアミノ酸置換を含み、親 A B M はマウス P R 1 A 3 抗体の少なくとも一つの C D R を含み、前記変異体 A B M は P R 1 A 3 抗体と同じエピトープに結合するか、又は膜結合 C E A への結合のために P R 1 A 3 抗体と競合することが可能であり、前記変異体 A B M は配列番号 1 から 4 の何れか一つの配列を含まない、変異体抗原結合分子。

10

【請求項 19】

前記変異体 A B M は可溶性 C E A に対して実質的な交差反応性を持たない、請求項 18 に記載の変異体 A B M。

【請求項 20】

前記変異体 A B M は前記親 A B M より少なくとも約 2 倍から約 10 倍強い、C E A に対する結合親和性を有する、請求項 18 又は請求項 19 に記載の変異体 A B M。

【請求項 21】

前記変異体 A B M は、約 1  $\mu$  M から約 0.001 n M より低い  $K_D$  の結合親和性でヒト C E A に結合する、請求項 18 から 20 の何れか一項に記載の変異体 A B M。

20

【請求項 22】

前記変異体 A B M は、約 100 n M より低い  $K_D$  を持つ、請求項 18 から 20 の何れか一項に記載の変異体 A B M。

【請求項 23】

前記親 A B M はマウス P R 1 A 3 抗体の 6 つの C D R 全てを含み、及び前記変異体 A B M は前記少なくとも 2 つの C D R において一以上のアミノ酸置換を含む、請求項 18 から 22 の何れか一項に記載の変異体 A B M。

【請求項 24】

前記変異体 A B M は、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 55、及び配列番号 56、又はその組合わせからなる群から選択される少なくとも一つの C D R を含む、請求項 18 から 23 の何れか一項に記載の変異体 A B M。

30

【請求項 25】

前記少なくとも一つの C D R は重鎖 C D R である、請求項 24 に記載の変異体 A B M。

【請求項 26】

前記の抗原結合ドメインが、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、及び配列番号 12、からなる群から選択される重鎖 C D R 1、及び

40

配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号

50

18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、及び配列番号24、からなる群から選択される重鎖CDR2、及び

配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35からなる群から選択される重鎖CDR3

を含む重鎖可変領域を含む、請求項24又は請求項25に記載の変異体ABM。

【請求項27】

前記抗原結合ドメインが配列番号107の配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項24から26の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項28】

前記の抗原結合ドメインが、

配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、及び配列番号45からなる群から選択される軽鎖CDR1及び

配列番号46、及び配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、及び配列番号55からなる群から選択される軽鎖CDR2及び

配列番号56の軽鎖CDR3

を含む軽鎖可変領域を含む、請求項18から27の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項29】

前記抗原結合ドメインが配列番号108の配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項28に記載の変異体ABM。

【請求項30】

前記抗原結合ドメインが

配列番号9、

配列番号15、及び

配列番号25

を含み、及び

前記軽鎖可変領域が、

配列番号45、

配列番号55、及び

配列番号56

を含む、請求項24から29の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項31】

前記抗原結合ドメインが配列番号107の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号108の配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項30に記載の変異体ABM。

【請求項32】

前記変異体ABMがヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子に由来する少なくとも一つのフレームワーク領域を含む、請求項18から24の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項33】

前記変異体ABMが配列番号102の重鎖フレームワーク領域FR1-3、及び配列番号106に由来する軽鎖フレームワーク領域FR1-3を含む、請求項32に記載の変異体ABM。

【請求項34】

前記ABM又は前記変異体ABMがFc領域を含む、請求項1から17の何れか一項に記載のABM、又は請求項18から33の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項35】

前記Fc領域がヒトIgGのFc領域である、請求項34に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項36】

10

20

30

40

50

Fc領域が糖鎖を操作されたFc領域である、請求項34又は請求項35に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項37】

前記Fc領域中のN結合オリゴ糖の少なくとも約20%から約100%がフコシル化されてない、請求項36に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項38】

前記Fc領域中のN結合オリゴ糖の少なくとも約20%から約100%が二分されている、請求項36に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項39】

前記Fc領域中のN結合オリゴ糖の少なくとも約20%から約50%が二分され、フコシル化されてない、請求項36に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項40】

前記ABM又は変異体ABMが少なくとも一つの増加したエフェクター機能を有する、請求項36から39の何れか一項に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項41】

前記少なくとも一つの増加したエフェクター機能は、Fcレセプター結合親和性の増加、抗体依存性細胞傷害(ADCC)の増加、NK細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシス、樹状細胞の成熟の増加、及びT細胞プライミングの増加からなる群から選択される、請求項40に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項42】

前記増加したエフェクター機能はADCCの増加、又はNK細胞への結合の増加である、請求項41に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項43】

前記ABM又は変異体ABMが、前記親抗原結合分子に比較して少なくとも約40%から約100%のADCCの増加を有する、請求項34から42の何れか一項に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項44】

前記ABM又は前記変異体ABMが、全抗体、scFv断片、Fv断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、ミニボディ(minibodies)、ダイアボディ(diabodies)、トリアボディ(triabodies)、及びテトラボディ(tetrabodies)からなる群から選択される、請求項1から17の何れか一項に記載のABM、又は請求項18から33の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項45】

前記ABM又は前記変異体ABMが、疾患の動物モデルにおいて最大生存時間を前記親ABMと比較して、少なくとも約10日から約120日増加させる、請求項1から17、又は34から44の何れか一項に記載のABM、又は請求項18から44の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項46】

疾患の前記動物モデルが、LS174Tヒト大腸癌細胞を用いたマウス腫瘍異種移植片モデルである、請求項45に記載のABM又は変異体ABM。

【請求項47】

前記ABM又は前記変異体ABMが、インビトロ細胞毒性試験において、少なくとも約10%から約100%、ADCCを増加させる、請求項1から17又は34から46の何れか一項に記載のABM、又は請求項18から43の何れか一項に記載の変異体ABM。

【請求項48】

前記ABM又は前記変異体ABMが、マウスPR1A3抗体と比較して、与えられた濃度でADCCを誘導するときに、少なくとも約10倍から約1000倍強力である、請求項1から17、又は34から47の何れか一項に記載のABM、又は請求項18から43の何れか一項に記載の変異体ABM。

10

20

30

40

50

## 【請求項 49】

A D C C がインビトロの細胞毒性試験により測定される、請求項 48 に記載の A B M 又は変異体 A B M。

## 【請求項 50】

膜結合 C E A に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む単離されたポリペプチドであって、前記抗原結合ドメインは、

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 55、及び配列番号 56、又はその組合せを含む群から選択される一以上の C D R 配列を含む、ポリペプチド。

10

## 【請求項 51】

第一配列及び第二配列を含む単離されたポリペプチドであって、前記第一配列は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、and 配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 からなる群から選択される一以上の C D R 配列を含み、及び

20

前記第二配列は

配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 55、及び配列番号 56 からなる群から選択される一以上の C D R 配列を含み、及び

30

前記ポリペプチドは膜結合 C E A に特異的に結合する、ポリペプチド。

## 【請求項 52】

配列番号 101、105、107、108、及び 188 - 216 からなる群から選択される配列に少なくとも約 80% から約 100% 同一である配列を含む単離されたポリペプチドであって、前記ポリペプチドが膜結合 C E A に特異的に結合するポリペプチド。

## 【請求項 53】

膜結合 C E A に特異的なヒト化抗原結合分子が請求項 45 から 52 の何れか一項に記載のポリペプチドを含む。

40

## 【請求項 54】

前記ヒト化抗原結合分子が可溶性 C E A に対して実質的に交差反応性を持たない、請求項 53 に記載のヒト化抗原結合分子。

## 【請求項 55】

膜結合 C E A に特異的に結合する抗体であって、前記抗体が配列番号 107 の重鎖可変領域及び配列番号 108 の軽鎖可変領域を含み、前記抗体がマウス P R 1 A 3 抗体と比較して増加した A D C C を有する、抗体。

## 【請求項 56】

前記抗体が糖鎖を操作された F c 領域を含む、請求項 55 に記載の抗体。

## 【請求項 57】

50

前記抗体が可溶性 C E A に対して実質的に交差反応性を持たない、請求項 5 5 又は 5 6 に記載の抗体。

【請求項 5 8】

前記抗体がマウス P R 1 A 3 抗体と比較して、疾患の動物モデルにおける最大生存時間を少なくとも約 1 0 日から 1 2 0 日増加させる、請求項 5 5 から 5 7 に記載の抗体。

【請求項 5 9】

前記抗体がインビトロ細胞毒性試験において、A D C C を少なくとも約 1 0 % から約 1 0 0 % 増加させる、請求項 5 5 から 5 8 に記載の抗体。

【請求項 6 0】

請求項 4 5 から 5 2 の何れか一項に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。 10

【請求項 6 1】

第一の単離されたポリヌクレオチド配列及び第二の単離されたポリヌクレオチド配列を含む組成物であって、前記第一の単離されたポリヌクレオチド配列が配列番号 1 1 3、1 1 9、及び 1 5 9 - 1 7 7 からなる群から選択される配列と少なくとも約 8 0 % から約 1 0 0 % 同一であり、前記第二の単離されたポリヌクレオチド配列が配列番号 1 1 7、1 2 0、及び 1 7 8 - 1 8 からなる群から選択される配列と少なくとも約 8 0 % から約 1 0 0 % 同一であり、前記ポリヌクレオチドが膜結合 C E A に特異的に結合するポリペプチドをコードする、組成物。

【請求項 6 2】 20

前記第一の単離されたポリヌクレオチドが配列番号 1 1 9 であり、及び前記第二の単離されたポリヌクレオチドが配列番号 1 2 0 である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 3】

前記第一の単離されたポリヌクレオチドが配列番号 1 0 7 のポリペプチドをコードし、及び前記第二の単離されたポリヌクレオチドが配列番号 1 0 8 のポリペプチドをコードする、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

膜結合 C E A に特異的なポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドが配列番号 5 7 - 7 7 からなる群から選択される一以上の重鎖 C D R をコードする配列を含む、ポリヌクレオチド。 30

【請求項 6 5】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 1 1 9 と少なくとも約 8 0 % から約 1 0 0 % 同一である配列を含む、請求項 6 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6 6】

膜結合 C E A に特異的なポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドは配列番号 7 8 - 9 8 からなる群から選択される一以上の軽鎖 C D R をコードする配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 6 7】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 1 2 0 と少なくとも約 8 0 % から約 1 0 0 % 同一である配列を含む、請求項 6 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 40

【請求項 6 8】

請求項 6 0 から 6 7 の何れか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 6 9】

前記ベクターがクローニングベクター又は発現ベクターである、請求項 6 8 に記載のベクター。

【請求項 7 0】

前記ベクターがファージディスプレイライブラリーの作成に適しているベクターである、請求項 6 8 に記載のベクター。

【請求項 7 1】

請求項 6 8 から 7 0 の何れか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。 50

**【請求項 7 2】**

第一の単離されたポリヌクレオチド及び第二の単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、前記第一の単離されたポリヌクレオチドが配列番号 1 1 3、1 1 9、及び 1 5 9 - 1 7 7 からなる群から選択される配列を含み、前記第二の単離されたポリヌクレオチドが配列番号 8、及び配列番号 1 1 7、1 2 0、及び 1 7 8 - 1 8 7 からなる群から選択される配列を含む、宿主細胞。

**【請求項 7 3】**

膜結合ヒト C E A に特異的に結合する A B M を産生する方法であって、前記方法が、  
( a ) 前記ポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下で、培地中で請求項 7 1 又は請求項 7 2 の宿主細胞を培養し、前記ポリヌクレオチドが前記 A B M の一部を形成するポリペプチドをコードし、

( b ) 前記 A B M を回復することを含む、

前記 A B M 又はその一部分がマウスモノクローナル抗体 P R 1 A 3 と同じエピトープに結合するか、又はマウスモノクローナル抗体 P R 1 A 3 と結合を競合することが可能である、方法。

**【請求項 7 4】**

請求項 1 から 1 7 又は 3 4 から 4 9 の何れか一項に記載の A B M、請求項 1 8 から 4 9 の何れか一項に記載の変異体 A B M、又は請求項 5 5 から 5 9 の何れか一項に記載の抗体、及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

**【請求項 7 5】**

腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、前記方法が前記腫瘍細胞を、請求項 1 から 1 7 又は 3 4 から 4 9 の何れか一項に記載の A B M、請求項 1 8 から 4 9 の何れか一項に記載の変異体 A B M、又は請求項 5 5 から 5 9 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 7 4 に記載の組成物に接触させることを含む、方法。

**【請求項 7 6】**

前記腫瘍細胞が、大腸癌細胞、N S C L C ( 非小細胞肺癌 )、胃癌細胞、膵臓癌細胞及び乳癌細胞からなる群から選択される、請求項 7 5 に記載の方法。

**【請求項 7 7】**

前記細胞溶解が前記 A B M、変異体 A B M の抗体依存性細胞傷害により誘導される、請求項 7 5 に記載の方法。

**【請求項 7 8】**

前記方法が、前記被検体に診断薬の有効量を投与することを含み、前記診断薬が請求項 1 から 1 7、又は 3 4 から 4 9 の何れか一項に記載の A B M、請求項 1 8 から 4 9 の何れか一項に記載の変異体 A B M、又は請求項 5 5 から 5 9 の何れか一項に記載の抗体、及び前記診断薬及び C E A の複合体の検出を可能にする標識を含む方法。

**【請求項 7 9】**

前記標識が造影剤である、請求項 7 8 に記載の方法。

**【請求項 8 0】**

異常に C E A を発現する癌を有する被検体を治療する方法であって、前記方法が前記被検体に、請求項 1 から 1 7、又は 3 4 から 4 9 の何れか一項に記載の A B M、請求項 1 8 から 4 9 の何れか一項に記載の変異体 A B M、又は請求項 5 5 から 5 9 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 7 4 に記載の組成物の治療に有効量を投与することを含む、方法。

**【請求項 8 1】**

異常に C E A を発現する癌を有する被検体において生存時間を増加させる方法であって、前記方法が前記被検体に、請求項 1 から 1 7、又は 3 4 から 4 9 の何れか一項に記載の A B M、請求項 1 8 から 4 9 の何れか一項に記載の変異体 A B M、又は請求項 5 5 から 5 9 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 7 4 に記載の組成物の治療に有効量を投与することを含む、方法。

**【請求項 8 2】**

10

20

30

40

50

前記癌が、大腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌及び乳癌からなる群から選択される、請求項 80 又は 81 に記載の方法。

【請求項 83】

異常に CEA を発現する腫瘍の退縮を被検体において誘導する方法であって、前記方法が前記被検体に、請求項 1 から 17、又は 34 から 49 の何れか一項に記載の ABM、請求項 18 から 49 の何れか一項に記載の変異体 ABM、又は請求項 55 から 59 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 74 に記載の組成物の治療に有効量を投与することを含む、方法。

【請求項 84】

前記腫瘍が、大腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌及び乳癌からなる群から選択される癌である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記 ABM 又は前記変異体 ABM が化学療法又は放射線療法と併用して投与される、請求項 80 から 84 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 86】

前記 ABM 又は前記変異体 ABM が化学療法剤と併用して投与される、請求項 80 から 85 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 87】

前記被検体がヒトである、請求項 78 から 86 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 88】

異常に CEA を発現する腫瘍細胞の CEA 媒介性細胞接着を阻害する方法であって、前記方法が前記腫瘍細胞を、請求項 1 から 17、又は 34 から 49 の何れか一項に記載の ABM、請求項 18 から 49 の何れか一項に記載の変異体 ABM、又は請求項 55 から 59 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 74 に記載の組成物の有効量と接触させることを含む、方法。

【請求項 89】

請求項 1 から 17、又は 34 から 49 の何れか一項に記載の ABM、請求項 18 から 49 の何れか一項に記載の変異体 ABM、又は請求項 55 から 59 の何れか一項に記載の抗体、又は請求項 74 に記載の組成物の、異常に CEA を発現する癌を有する被検体の治療のための医薬の製造における使用。

【請求項 90】

前記癌が、大腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌及び乳癌からなる群から選択される、請求項 89 に記載の使用。

【請求項 91】

前記ポリヌクレオチドが、

a) 配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 61 からなる群から選択される配列、及び

b) 配列番号 62、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66 からなる群から選択される配列、及び

c) 配列番号 67、配列番号 68、配列番号 69、配列番号 70、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、配列番号 74、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77 からなる群から選択される配列

を含む、請求項 64 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 92】

前記ポリヌクレオチドが

配列番号 58、

配列番号 64、及び

配列番号 67

を含む、請求項 91 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 93】

10

20

30

40

50

前記ポリヌクレオチドが配列番号 119 の配列を含む、請求項 91 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 94】

前記ポリヌクレオチドが

a) 配列番号 78、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83、配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87 からなる群から選択される配列、及び

b) 配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 94、配列番号 95、配列番号 96、配列番号 97 からなる群から選択される配列、及び

c) 配列番号 98 の配列

を含む、請求項 66 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 95】

前記ポリヌクレオチドが

配列番号 87、

配列番号 97、及び

配列番号 98

を含む、請求項 94 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 96】

前記ポリヌクレオチドが配列番号 120 の配列を含む、請求項 94 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 97】

明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原結合分子 (ABM) に関する。特定の実施態様において、本発明は、ヒト癌胎児性抗原に特異的であるキメラ抗体、霊長類化抗体、又はヒト化抗体を含む、組換えモノクローナル抗体に関する。更に、本発明は、このような ABM をコードする核酸分子、及びにこのような核酸分子を含むベクター及び宿主細胞に関する。本発明は更に、本発明の ABM を製造するための方法及び疾患の治療において、これらの ABM を使用方法に関する。更に、本発明は、ADCC 等の、Fc レセプター結合が増加し及びエフェクター機能が増加した抗体を含む、改善された治療特性を有し修飾されたグリコシル化を持つ ABM に関する。

【背景技術】

【0002】

癌胎児性抗原 (CEA) 及び抗 CEA 抗体

癌胎児性抗原 (CEA、CEACAM-5 又は CD66e としても知られている) は約 180 kDa の分子量を有する糖タンパク質である。CEA は免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーを介して細胞膜にリンクされている 7 つのドメインを含む (Thompson J.A., J Clin Lab Anal. 5:344-366, 1991)。7 つのドメインは、単一の N 末端 Ig 可変ドメイン及び Ig 定常領域に相同な 6 つのドメイン (A1-B1-A2-B2-A3-B3) を含む (Hefta L J,ら、Cancer Res. 52:5647-5655, 1992)。

【0003】

ヒト CEA ファミリーは、29 の遺伝子を含んでおり、そのうち 18 個が発現される：7 つは CEA サブグループに、11 個は妊娠特異的糖タンパク質のサブグループに属している。いくつかの CEA サブグループのメンバーは、細胞接着特性を有すると考えられている。CEA は、自然免疫の役割を持っていると考えられている (Hammarstrom S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999))。CEA に密接に関連するタンパク質の存在のため、

10

20

30

40

50

他の密接に関連したタンパク質に対する最小限の交差反応性を持つ C E A に特異的な抗 C E A 抗体を産生することは挑戦的であり得る。

【 0 0 0 4 】

C E A は、腫瘍関連抗原として長らく同定されてきた (Gold 及び Freedman, *J Exp Med*, 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., *J Clin Oncol.*, 20:2197-2207, 2002)。胎児の組織においてのみに発現されるタンパク質としてもともと分類されたが、現在 C E A は複数の正常成人組織で同定されている。これらの組織は元々は主に上皮性であり、消化管、呼吸器系の細胞、泌尿生殖器管、及び大腸、子宮頸部、汗腺、前立腺の細胞を含む (Napら、*Tumour Biol.*, 9(2-3):145-53, 1988; Napら、*Cancer Res.*, 52(8):2329-23339, 1992)。

10

【 0 0 0 5 】

上皮由来の腫瘍、ならびにそれらの転移は、腫瘍関連抗原としての C E A を含む。C E A 自体の存在は、癌細胞への転換を示すものではないが、C E A の分布は指標となる。正常組織では、C E A は、一般的に細胞の頂端膜側に発現しており (Hammarstrom S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999))、血液中で抗体に近づきにくくしている。正常組織とは対照的に、C E A は、癌細胞の表面全体に発現する傾向がある (Hammarstrom S., *Semin Cancer Biol.* 9(2):67-81 (1999))。発現パターンのこの変化は、癌細胞中で抗体の結合に C E A が到達できるようにしている。加えて、C E A の発現は癌細胞で増加する。更に、増加した C E A の発現は、細胞間接着の増加を促進し、転移につながる可能性がある (Marshall J., *Semin Oncol.*, 30(付録8):30-6, 2003)。

20

【 0 0 0 6 】

C E A は、容易に細胞表面から切断されて、直接又はリンパ管を介して、腫瘍からの血流に流される。この特性のため、血清 C E A のレベルは、癌の診断、及び癌、特に大腸癌の再発スクリーニングのための臨床マーカーとして使用されている (Goldenberg D M., *The International Journal of Biological Markers*, 7:183-188, 1992; Chau I.,ら、*J Clin Oncol.*, 22:1420-1429, 2004; Flaminiら、*Clin Cancer Res*; 12(23):6985-6988, 2006)。血清 C E A は現在入手可能な抗 C E A 抗体の大部分に結合し、細胞表面上のそれらの標的への到達を妨げ、潜在的な臨床効果を制限するため、この特性は標的として C E A を使用するための課題の一つを提示している。

30

【 0 0 0 7 】

複数のモノクローナル抗体が、診断ツールとして研究目的用に、及び治療目的用に、C E A に対して産生されている (例えば、Napら、*Cancer Res.*, 52(8):2329-23339, 1992; Sheahanら、*Am. J. Clin. Path.* 94:157-164, 1990; Sakuraiら、*J. Surg. Oncol.*, 42:39-46, 1989; Goldenberg D M., *The International Journal of Biological Markers*, 7:183-188, 1992; Ledermann J A, *Br. J. Cancer*, 58:654, 1988; Ledermann J A, *Br. J. Cancer*, 68:69-73, 1993; Pedley R B,ら、*Br. J. Cancer*, 68:69-73, 1993; Boxer GM,ら、*Br. J. Cancer*, 65:825-831, 1992)。チェスターらは、放射免疫検出及び放射免疫療法に使用されるファージディスプレイライブラリーから単鎖抗 C E A 抗体を単離し (米国特許第 5 8 7 6 6 9 1 号)、続いて抗体はヒト化された (米国特許第 7 2 3 2 8 8 8 号)。抗 C E A 抗体はまた、ヒトファージディスプレイライブラリーからも単離されている (米国特許第 5 8 7 2 2 1 5 号)。

40

【 0 0 0 8 】

マウスモノクローナル抗体 P R 1 A 3 は、通常の大腸上皮で免疫したマウス由来の脾臓細胞と N S 1 ( P 3 / N S 1 / I - A g - 4 - 1 ) 骨髄腫細胞の融合により産生された (Richman P. I. 及び Bodmer W. F., *Int. J. Cancer*, 39:317-328, 1987)。P R 1 A 3 は高分化型及び低分化型大腸癌の双方に強く反応し、その抗原は、腫瘍に固定されるように現れ、リンパ管若しくは腫瘍を排出する通常のリンパ節には現れないため、他の大腸上皮反応性抗体に勝る利点を有している (Granowska M.ら、*Eur. J. Nucl. Med.*, 20:690-698, 1989)。例えば、P R 1 A 3 は、60分の59の大腸腫瘍と反応したが、一方 C E A 反応性抗体 B 7 2 . 3 は、大腸腫瘍の75%のみと反応した (Mansi L.,ら、*Int J Rad App*

50

I Instrum B., 16(2):127-35, 1989)。

【 0 0 0 9 】

P R 1 A 3 のエピトープマッピングでは、抗体が B 3 ドメイン及び C E A 分子の G P I アンカーをターゲットにすることを示している (Durbin H.ら、 Proc. Natl. Scad. Sci. USA, 91:4313-4317, 1994)。その結果、P R 1 A 3 抗体は膜結合 C E A に対してのみ結合し、癌患者の血流で見つけられる可溶性 C E A 型には結合しない。この結合特性のため、P R 1 A 3 抗体は血清 C E A によって隔絶されることはほとんどなく、その代わりに、癌細胞に発現している C E A をターゲットにすることができる。P R 1 A 3 に結合されるエピトープは立体構造エピトープではなく、可溶性 C E A に対する P R 1 A 3 の結合の損失に寄与すると考えられている直線状エピトープである (Stewartら、 Cancer Immunol Immunother, 47:299-06, 1999)。

10

【 0 0 1 0 】

P R 1 A 3 抗体は、以前に、マウス親抗体の C D R を、ヒト抗体 R F - T S 3 ' C L ( P R 1 A 3 のマウスフレームワーク 4 を保持する ) の重鎖フレームワーク領域 1 - 3、及び R E I 抗体の軽鎖のフレームワーク領域へ移植することでヒト化された (Stewartら、 Cancer Immunol Immunother, 47:299-06, 1999)。P R 1 A 3 のこのヒト化バージョンは特異性を保持しており、表面に発現した C E A に対してマウス抗体のそれと似た親和性を有する (Stewartら、 Cancer Immunol Immunother, 47:299-06, 1999; U.S. Pat. No. 5,965,710)。ヒト P R 1 A 3 ( h P R 1 A 3 ) 抗体は大腸癌細胞系の標的化された死滅を誘導することが示された (Conaghan P. J.,ら、 Br. J. Cancer, 98(7):1217-1225)。しかしながら、C E A に対する h P R 1 A 3 の親和性は比較的低い。

20

【 0 0 1 1 】

放射標識された抗 C E A 抗体は大腸癌患者での臨床試験で使用されている。例えば、<sup>123</sup>I 標識キメラミニボディ T 8 4 . 6 6 ( c T 8 4 . 6 6 ) は、大腸癌患者のパイロット臨床試験で使用されている。放射標識されたミニボディは癌細胞を標的とすることができた (Wong J. Y.ら、 Clin Cancer Res. 10(15):5014-21, (2004))。別の例では、(<sup>131</sup>I) イラベツズマブ、放射性標識化ヒト化抗 C E A 抗体が、大腸癌の肝転移患者におけるアジュバント免疫療法で試験され、有望な生存の優位性を与えることが判明した (Liersch T.,ら、 Ann. Surg. Oncol. 14(9):2577-90, (2007))。

30

【 0 0 1 2 】

抗体グリコシル化

オリゴ糖成分は、物理的安定性、プロテアーゼ攻撃に対する抵抗性、免疫系との相互作用、薬物動態学、及び特異的生物学的活性を含む、治療用糖タンパク質の効力に関連する特性に有意に影響を与える。このような特性は、オリゴ糖の存在又は非存在に依存するのみならず、オリゴ糖の特異的構造にもまた依存する可能性がある。オリゴ糖構造と糖タンパク質機能との間のある程度の一般化がなされ得る。例えば、特定のオリゴ糖構造は、特異的炭水化物結合タンパク質との相互作用を通して血流からの糖タンパク質の急速なクリアランスを媒介するが、他の構造は、抗体によって結合され得、そして望ましくない免疫反応を誘発し得る (Jenkinsら、 Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996)。

40

【 0 0 1 3 】

哺乳動物細胞は、ヒト適用のための大部分の適合性の型においてタンパク質をグリコシル化するそれらの能力に起因して、治療用糖タンパク質の産生のための好ましい宿主である (Cummingら、 Glycobiology 1:115-30, 1991; Jenkinsら、 Nature Biotechnol. 14:975-981, 1996)。細菌は非常にまれに、タンパク質、ならびに酵母、糸状菌、昆虫、及び植物細胞などの一般的な宿主の同様の他の型をグリコシル化し、血流からの迅速なクリアランス、望ましくない免疫相互作用、及びある特定の場においては、減少した生物学的活性と関連したグリコシレーションパターンを生じる。哺乳動物細胞の間で、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞は、過去 2 0 年間の間に最も一般的に使用されてきた。適切なグリコシル化パターンを与えることに加えて、これらの細胞は、遺伝的に安定な、高度に生産的なクローン性細胞系の一貫した生成を可能にする。これらは、無血清培地を使

50

用する単純なバイオリクター中で高密度で培養され得、安全かつ再生可能なバイオプロセスの開発を可能にする。他の一般的に使用される動物細胞には、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、NS0-及びSP2/0-マウス骨髄腫細胞が含まれる。より最近では、トランスジェニック動物からの産生もまた試験されてきた(Jenkinsら、Nature Biotechnol. 14:975-81, 1996)。

#### 【0014】

全ての抗体は、重鎖定常領域の保存性位置に糖質構造を含み、各アイソタイプがN連結糖質構造の独特のアレイを有し、これはタンパク質のアセンブリー、分泌又は機能的な活性に様々に影響を与える(Wright A. 及び Morrison S. L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997)。結合したN連結糖質の構造は、プロセシングの程度に依存して顕著に変化し、高マンノース、多分枝ならびに二分岐複合体オリゴ糖を含み得る(Wright, A., 及び Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32, 1997)。典型的には、特定のグリコシル化部位に結合されたコアオリゴ糖構造の均質でないプロセシングが存在し、その結果、モノクローナル抗体さえもが複数の糖型で存在する。同様に、抗体のグリコシル化における主要な違いは細胞系間で起こり、そしてマイナーな違いさえも異なる培養条件下で増殖された所定の細胞系について見られることが示されてきた(Lifely, M. R.ら、Glycobiology 5(8):813-22, 1995)。

#### 【0015】

単純な製造プロセスを維持しながら、かつ有意な、望ましくない副作用を回避しながら、効力の大きな増加を得るための1つの方法は、Umana, P.等、Nature Biotechnol. 17:176-180(1999)及び米国特許第6602684号(これらの内容はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)において記載されるような、それらのオリゴ糖を操作することによってモノクローナル抗体の天然の、細胞媒介性エフェクター機能を増強することである。癌免疫治療において最も一般的に使用される抗体であるIgG1型抗体は、各CH2ドメイン中のAsn297において保存性N連結型グリコシル化部位を有する糖タンパク質である。Asn297に結合された2つの複合体二分岐状オリゴ糖は、CH2ドメイン間に包埋されて、ポリペプチドバックボーンとの広範な接触を形成しており、それらの存在は、抗体が、抗体依存的細胞傷害性(ADCC)などのエフェクター機能を媒介するために必須である(Lifely, M. R.,ら、Glycobiology 5:813-822 (1995); Jefferis, R.,ら、Immunol Rev. 163:59-76 (1998); Wright, A. 及び Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15:26-32 (1997))。

#### 【0016】

Umanaらは以前に、チャイニーズハムスター卵巣細胞における、二分岐オリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII(「GnTII」)の過剰発現が、操作されたCHO細胞によって産生される抗神経芽細胞腫キメラモノクローナル抗体(chCE7)のインビトロADCC活性を増加させることを示した(Umana, P.ら、Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999); 及び国際公開番号WO 99/54342を参照のこと、これらの内容は参照により本明細書に組み込まれる)。抗体chCE7は、結合体化されていないmAbの大きなクラスに属し、これは、高い腫瘍親和性及び特異性を有するが、GnTII酵素を欠く標準的な工業用細胞系において産生される場合には、効力が小さすぎて臨床的には有用でない(Umana, P.,ら、Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999))。この研究は、ADCC活性の大きな増加が、GnTIIを発現するために抗体産生細胞を操作することによって得られ得、これはまた、二分岐でフコシル化されていないオリゴ糖を含む、定常領域(Fc)結合した二分岐性オリゴ糖の割合の増加を、天然に存在する抗体において見いだされるレベルよりも上に導くことを最初に示した。

#### 【0017】

ヒトを含むがこれに限定されない霊長類における癌の治療のために、CEA、特に膜結合CEAを標的化する、増強された治療アプローチについての必要性が残っている。

#### 【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 8 】

P R 1 A 3 抗体の結合特異性を有し、かつ F c レセプター結合親和性及び / 又はエフェクター機能を増強するように親和性が成熟し及び / 又は糖鎖を操作された抗原結合分子 ( A B M ) の驚異的な治療的潜在能力を認識したので、本発明者らは、このような A B M を提供した。一態様において、本発明は、抗原結合において P R 1 A 3 と競合することができる変異型 A B M 及び / 又は親和性成熟 A B M に関する。これらの A B M の効力は、抗体 F c 領域のグリコシル化プロフィールを操作することによってさらに増強される。

## 【 0 0 1 9 】

一態様において、本発明はまた、一以上の相補性決定領域 ( C D R ) を含む、ヒト化、親和性成熟した抗原結合ドメインを含む抗原結合分子 ( A B M ) に向けられており、該抗原結合ドメインは、膜結合ヒト癌胎児性抗原 ( C E A ) に特異的に結合し、及び該抗原結合ドメインは、同じエピトープに結合するか、若しくはマウスモノクローナル抗体 P R 1 A 3 との結合に競合することが可能である。本発明はさらに、本発明の A B M に関連し、該 A B M は修飾されたオリゴ糖を有する。一実施態様では、非修飾オリゴ糖と比較して、修飾されたオリゴ糖は、フコシル化を低減させた。他の実施態様では、修飾されたオリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体である。別の態様において、本発明はまた、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、宿主細胞、及び A B M S に関連した発現ベクターに向けられる。更なる態様において、本発明は A B M S の製造方法に向けられる。更なる態様において、本発明は、特に癌などの C E A の異常発現に関連する疾患の治療のため、A B M S を使用する方法に向けられている。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 図 1 は、C E A ( C E A C A M - 5 、 C D 6 6 e ) 抗原の模式図を示す。P R 1 A 3 抗体は、細胞膜に結合している場合、抗原の B 3 ドメインに特異的に結合する。

【 図 2 】 図 2 は、エフェクターとしてヒト P B M C による糖鎖を操作されたキメラ P R 1 A 3 抗体の強化された A D C C 活性を示す。

【 図 3 】 図 3 は、重鎖可変領域コンストラクト、C H 7 A 、及び軽鎖可変領域コンストラクト、C L 1 A を含むヒト化 P R 1 A 3 抗体の抗原結合活性を示す。

【 図 4 】 図 4 は、ヒト化 P R 1 A 3 抗体軽鎖の親和性成熟のために抗体ライブラリーを生成するためのランダム化部位を示す。X が付いている位置が無作為に割り付けられた。

【 図 5 】 図 5 は、ヒト化 P R 1 A 3 抗体重鎖の親和性成熟のために抗体ライブラリーを生成するためのランダム化部位を示す。X が付いている位置が無作為に割り付けられた。

【 図 6 】 図 6 は、重鎖可変領域コンストラクト C H 7 A r F 9 及び軽鎖可変領域コンストラクト C L 1 A r H 1 1 を含む、ヒト化 P R 1 A 3 抗体由来の親和性成熟抗 C E A 抗体の結合活性を示す。

【 図 7 】 図 7 は、同所腫瘍モデルを持つために L S 1 7 4 T ヒト大腸癌細胞を脾臓内投与された S C I D / b g マウスにおける有効性試験の結果を示す。抗体療法は、25 mg / k g 体重の用量で抗体の注射により 7 日後に開始され、その後 2 回追加の毎週の注射が続いた。「C H 7 A 」は本明細書に記載されるように P R 1 A 3 の C D R を含むヒト化抗体を表している。「S M 3 E 」は、以前に生成された抗 C E A 抗体を指す。「G A 2 0 1 」はポジティブコントロールとして使用されたヒト化抗 E G F 抗体を表している。「P B S 」はネガティブコントロールとして使用されたリン酸緩衝生理食塩水を指す。生存はスイスの規制当局によって定義された終了基準に従って測定された。

【 図 8 】 図 8 は、A 5 4 9 肺癌細胞を静脈内注射された S C I D / b g マウスにおける有効性試験の結果を示しており、腫瘍は動物の肺に生着する。抗体療法は、25 mg / k g 体重の用量で抗体の注射により 7 日後に開始され、その後 2 回追加の毎週の注射が続いた。「C H 7 A 」、「S M 3 E 」、及び「G A 2 0 1 」は上記のように、図 7 に記載されている。「C H 7 A r F 9 C L 1 A r H 1 1 」なる記号は、親和性成熟重鎖及び軽鎖を持つ C H 7 A 抗体変異体を表している。「g e 」なる記号は、抗体が糖鎖を操作されて、その F c 領域にフコシル化オリゴ糖の還元数を有していることを示している。「ピークル」

10

20

30

40

50

はネガティブコントロールを指す。A549肺癌細胞ではEGFR発現に対して強陽性であり、CEA発現に対して弱陽性である。

【図9】図9は、MKN45胃癌細胞を脾臓内に投与されたSCID/bgマウスにおける有効性試験の結果を示しており、動物の肝臓に腫瘍の転移を生成する。「CH7ArF9CL1ArH11」、「SM3E」、「ge」、及び「PBS」は、上記のように、図7及び8に記載されている。

【図10】図10は、親和性成熟したクローンの動態解析を示している。(a)は、非成熟軽鎖CL1A(配列番号105)とともに、親和性成熟重鎖のCH7AH4E9(配列番号199)；非成熟重鎖CH7A(配列番号105)と組み合わせた、親和性成熟軽鎖のCL1ApAC18(配列番号209)；及びその組み合わせの、CH7AH4E9及びCL1ApAC18(配列番号：199及び209)による抗CEAFabのセンサーグラムを示す。(b)親和性成熟クローンの動態解析の概要。

【図11】図11は、ヒト化CH7A抗CEA抗体重鎖のCDR1及びCDR2無作為化の図式的概観を示している。

【図12】図12は、ヒト化CL1A抗CEA抗体軽鎖のCDR1及びCDR2無作為化の図式的概観を示している。

【図13】図13は、ヒト化CH7A抗CEA抗体重鎖のCDR3無作為化の図式的概観を示している。

【図14】図14は、ヒト化CL1A抗CEA抗体軽鎖のCDR3無作為化の図式的概観を示している。

【図15】図15は、MKN45標的細胞上の膜結合CEAに対する抗CEA抗体の結合親和性を示している。IgGへ変換された親和性成熟軽鎖(パネルA、CH7A、CL1ArH7、又はCH7A、CL1ArH11)又は親和性成熟重鎖及び軽鎖(パネルB、CH7ArB9、CL1ArH11G2(1))の何れかを持つヒト化抗CEA抗体はコントロール抗体(CH7A、CL1A)と比べて結合の向上を示している。

【図16】図16は、コントロール抗体(CH7A、CL1AG2(R2))に比べた、親和性成熟抗体(CH7ArB9、CL1ArH11G2(1)、CH7Arf9、CL1ArH11G2(1)、及びCH7A、CL1ArH11G2(1))による抗体依存性細胞傷害(ADCC)を試験するアッセイの結果を示す。

#### 【0021】

発明の詳細な記述

#### 定義

本明細書において用いられる用語は、下記に別に定義されていなければ、一般的に当該技術分野で用いられている。

#### 【0022】

本明細書で使用される場合、用語、抗原結合分子とは、その最も広い意味において、抗原決定基を特異的に結合する分子をいう。抗原結合分子の非限定的な例では、抗原特異的な結合を保持する抗体又はその断片である。より具体的には、膜結合ヒト癌胎児性抗原(CEA)を結合する抗原結合分子は、CEAに対して、より具体的には細胞表面から切断された可溶性CEAではなく、細胞表面又は膜結合CEAに対して特異的に結合するABMである。「特異的に結合する」によって、結合が抗原について選択的であり、かつ望ましくない又は非特異的な相互作用から区別され得ることが意味される。

#### 【0023】

本明細書で使用される場合、用語、「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体及び多特異性(例えば、二特異性)抗体を含む全体の抗体分子、ならびにFc領域を有しかつ結合特異性を保持している抗体断片、及び免疫グロブリンのFc領域に等価である領域を含みかつ結合特異性を保持している融合タンパク質を含むことが意図される。また包含されるのは、限定されないが、VH断片、VL断片、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、scFv断片、Fv断片、ミニボディ(minibodies)、ダイアボディ(diabodies)、トリアボディ(triabodies)、及びテトラボディ(tetrabodies)を特に含む、結合特

10

20

30

40

50

異性を保持した抗体断片である(例えば、Hudson 及び Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)を参照)。

【0024】

本明細書で使用される場合、用語、「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し、かつ相補的である領域を含む抗原結合分子の一部を指す。抗原が大きい場合には、抗原結合分子は、エピトープと呼ばれる抗原の特定の部分に結合することができる。抗原結合ドメインは、例えば、1つ又は複数の抗体の可変ドメインにより与えられ得る。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体の軽鎖可変領域(VL)及び抗体の重鎖可変領域(VH)を含む。

【0025】

本明細書で使用される場合、用語、「親和性成熟」は、抗原結合分子(例えば抗体)との関連で、例えば突然変異により参照抗原結合分子から由来し、参照抗体と同じ抗原に結合し、好ましくは同じエピトープに結合し、参照抗原結合分子のそれよりも抗原に対して高い親和性を有する抗原結合分子を指す。親和性成熟は一般的に抗原結合分子の1以上のCDRの1つ又は複数のアミノ酸残基の修飾が含まれる。典型的には、親和性成熟抗原結合分子は、初期の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合する。

【0026】

本明細書で使用される場合、用語、「結合親和性」は、一般的に会合平衡又は解離定数を単位として表わされ(それぞれ $K_a$ 又は $K_d$ )、それらは順に解離速度定数及び会合速度定数(それぞれ $k_d$ 及び $k_a$ )の逆比である。従って、等価な親和性は速度定数の比が同じままである限り、異なる速度定数を含み得る。

【0027】

本明細書で使用される場合、用語、「Fc領域」は、IgG重鎖のC末端領域を指す。IgG重鎖のFc領域の境界はわずかに異なる可能性があるが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226位のアミノ酸残基からカルボキシル末端までに広がると通常定義される。

【0028】

本明細書で使用される場合、用語、「免疫グロブリンのFc領域に等価である領域」は、免疫グロブリンのFc領域の天然に存在する対立遺伝子変異体、ならびに置換、付加、又は欠失を生じるが、免疫グロブリンがエフェクター機能を媒介する能力(抗体依存的な細胞傷害性)を実質的に減少しない変化を有する変異体を含むことが意図される。例えば、1つ以上のアミノ酸が、免疫グロブリンのFc領域のN末端又はC末端から、生物学的機能の実質的な損失を伴うことなく、欠失され得る。このような変異体は、活性に対して最小限の効果を有するように、当分野において公知である一般的規則に従って選択される(例えば、Bowie, J. U.ら、Science 247:1306-10 (1990)を参照のこと)。

【0029】

本明細書で使用される場合、用語、「膜結合ヒトCEA」は、細胞の膜の部分に、又は細胞の表面、特に腫瘍細胞の表面に結合するヒト癌胎児性抗原(CEA)を指す。用語、「膜結合ヒトCEA」は、所定の状況において、細胞の膜に結合しないが、PR1A3抗体が結合するエピトープを保持するように構築されたCEAを指す場合がある。「可溶性CEA」は、細胞膜又は細胞表面(例えば、腫瘍細胞表面)に結合していないか又は切断され、及び/又はPR1A3抗体に結合されたコンフォメーションエピトープを保持しないヒト癌胎児性抗原を指す。可溶性CEAは、例えば、癌患者の血流又はリンパ管に見いだされる。

【0030】

本明細書で使用される場合、用語、「可溶性CEAに対する交差反応性が実質的に無い」とは、分子(例えば、抗原結合分子)が、特に膜結合CEAと比較した場合に、可溶性CEAを認識しないか又は特異的に結合しないことを意味する。例えば、抗原結合分子が約10%未満から約5%未満の可溶性CEAに結合する場合があります、又は約10%、9%、8%7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、又は0.1%

10

20

30

40

50

未満、好ましくは約2%、1%又は0.5%未満の可溶性CEAに、及び最も好ましくは約0.2%又は0.1%未満の可溶性CEAから成る群から選択される量において可溶性CEAに結合しうる。

#### 【0031】

本明細書で使用される場合、用語、「融合物」又は「キメラ」は、ABMなどのポリペプチドに関連して使用される場合、異なる種からの抗体の部分などの2つ以上の異種ポリペプチドに由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。キメラABMについては、例えば、非抗原結合成分が、チンパンジー及びヒトなどの霊長類を含む広範な種々の種に由来されてもよい。キメラABMの定常領域は、一般的に、天然のヒト抗体の定常領域と実質的に同一であり；キメラ抗体の可変領域は、一般的に、マウスPR1A3可変領域の

10

#### 【0032】

本明細書で使用される場合、用語、「ヒト化」は、親の分子の抗原結合特性を保持するか又は実質的に保持するが、ヒトにおいて免疫原性が低い非ヒト抗原結合分子、例えば、マウス抗体の一部が由来する抗原結合分子をいうために使用される。これは、(a)キメラ抗体を生成するためにヒト定常領域に全体の非ヒト可変ドメインを移植すること、(b)決定的なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体機能を保持するために重要であるもの）の保持を伴うかもしくは伴わない、ヒト（例えば、レシピエント抗原結合分子）フレームワーク及び定常領域に非ヒト（例えば、ドナー抗原結合分子）CDRのみを移植すること、又は(c)全体の非ヒト可変ドメインを移植するが、表面残基の置換によってヒト様部分でそれらを「覆う」ことを含む種々の方法によって達成され得る。このような方法は、Jonesら、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855 (1984); Morrison及びOi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994)において開示されており、これらの全ては、それらの全体が本明細書に参照として組み込まれる。一般的に、3つの相補性決定領域、すなわちCDR(CDR1、CDR2及びCDR3)が、抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインの各々に存在し、これらは、抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインの各々において4つのフレームワークサブ領域（すなわち、FR1、FR2、FR3、及びFR4）によって隣接されている。FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。ヒト化抗体の議論は、とりわけ、米国特許第6,632,927号及び米国出願公開第2003/0175269号に見いだされ得、これらの両方は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。ヒト化は、また選択したフレームワーク上に与えられたCDRに対する特異性決定アミノ酸残基をのみを含む切断されたCDRを移植することによって達成することができる。「特異性を決定する残基」は、抗原との特異的相互作用に直接関与するか、及び/又は抗原特異的結合に必要な残基を意味する。一般的に、所定のCDRにおける残基の約5分の1から3分の1のみが抗原への結合に関与する。特定のCDRにおける特異性決定残基は、例えば、三次元モデリングからの原子間接触の計算及びPadlanら、FASEB J. 9(1):133-139 (1995)（この内容はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に

20

30

40

#### 【0033】

いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。更に、ヒト化抗原結合分子は、レシピエント抗体又はドナー抗体にも見出されない残基を含み得る。これらの改変は、更に抗原結合分子の性能を洗練するために作られている。一般的に、ヒト化抗原結合分子は、可変ドメインの少なくとも一つ、及び典型的には2つの全てを実質的に含むことができ、そのうち可変領域の少なくとも一つ、又は実質的に全て、又は全ては非ヒト免疫グロブリンのそれらに対応し、かつFRの全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のそれらである。ヒト抗原結合分子はまた、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト

50

免疫グロブリンのそのの少なくとも一部を含んでなる。例えば、Jonesら、Nature 321:522-525 (1986); Reichmannら、Nature 332:323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照。

**【0034】**

同様に、本明細書で使用される場合、用語、「霊長類化」は、親の分子の抗原結合特性を保持するか又は実質的に保持するが、霊長類において免疫原性が低い非霊長類抗原結合分子、例えば、マウス抗体に由来する抗原結合分子をいうために使用される。

**【0035】**

本明細書で使用される場合、用語、「変異体」(又はアナログ)とは、例えば、組換えDNA技術を使用して作製された、挿入、欠失、及び置換によって、本発明の特に列挙されるポリヌクレオチド又はポリペプチドとは異なるポリヌクレオチド又はポリペプチドをいう。具体的には、これらの同一又は類似のポリペプチドをコードする組換え変異体は、遺伝子コードの「冗長性」を利用することにより、合成又は選択することができる。種々の制限部位を生成するサイレント変化などの様々なコドン置換が、特定の原核生物又は真核生物システムのプラスミド又はウイルスベクターへのクローニング又は発現を最適化するために導入することができる。ポリヌクレオチド配列の変異は、リガンド結合親和性、鎖間親和性、又は分解/代謝回転速度などの特性を変更するために、ポリペプチドの任意の部分の特性を改変するためにポリペプチドに追加された他のペプチドのポリペプチド又はドメインに反映され得る。

**【0036】**

本明細書で使用される場合、用語、「変異体抗CEA抗原結合分子」とは、親抗体配列において、1つ又は複数のアミノ酸残基の付加、欠失及び/又は置換のために「親」抗CEA抗原結合分子のアミノ酸配列とはアミノ酸配列が異なる分子を意味する。特定の実態様において、変異体は、1つ又は複数の超可変領域又は親の抗原結合分子の重鎖及び/又は軽鎖のCDRの1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。例えば、変異体は、親抗原結合分子の1つ又は複数の超可変領域又はCDR(すなわち、1、2、3、4、5、又は6の超可変領域又はCDR)において、少なくとも一つ、例えば約1から約10(すなわち、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10)、及び好ましくは約2から約5つの置換を含み得る。変異体抗CEA抗原結合分子はまた、重鎖又は軽鎖のいずれかの1つ又は複数のフレームワーク領域内に、1つ又は複数の付加、欠失及び/又は置換を含み得る。通常、変異体は、親の抗原結合分子重鎖又は軽鎖可変ドメイン配列と、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を持ち、典型的には少なくとも約80%、90%、95%又は99%である。本明細書では配列に関する同一性は、最大パーセントの配列同一性を達成するために、必要に応じてギャップを導入し、配列をアラインした後、親抗体残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。抗体配列のN末端、C末端、又は内部伸張、欠失、又は挿入は、配列同一性又は相同性に影響を及ぼすものと解釈してはならない。変異体抗原結合分子は膜結合ヒトCEAに結合する能力を保持し、例えば、親の抗原結合分子のそれと同じエピトープに結合し、好ましくは、親の抗原結合分子のものよりも優れている特性を有する。例えば、変異体は、インビトロ及びイン

ビボでの抗体媒介性細胞傷害を誘導するために、より強力な結合親和性、強化された能力を持ち得る。このような特性を分析するためには、一般的に変異抗原結合分子と親の抗原結合分子を同じ形式で比較する必要がある。例えば、親の抗原結合分子のFab形態に対する変異体抗原結合分子のFab形態、又は親の抗原結合分子の全長形態に対する変異体抗原結合分子の全長形態。本明細書中で特に重要な変異体抗原結合分子は、親の抗原結合分子と比較した場合に、生物学的活性において、少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍又は20倍の増強を有する1つである。

**【0037】**

用語「親」抗原結合分子は、変異体の調製のための開始点又は基礎として使用されるA

10

20

30

40

50

B Mを指す。特定の実施態様では、親の抗原結合分子は、ヒトフレームワーク領域及びび、存在する場合には、ヒト抗体定常領域を持つ。例えば、親抗体は、ヒト化又はヒト抗体であり得る。

【0038】

アミノ酸「置換」は、1つのアミノ酸を、類似の構造及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸で置換すること、すなわち、保存性アミノ酸置換の結果である。「保存性」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性の性質に基づいて行われ得る。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンが含まれ;極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれ;正電荷を有する(塩基性)アミノ酸には、アルギニン、リジン、及びヒスチジンが含まれ;ならびに負電荷を有するアミノ酸には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。「挿入」又は「欠失」は、一般的には、約1から約20アミノ酸、より明確には約1から約10アミノ酸、更により明確には約2から約5アミノ酸の範囲である。非保存的置換は、別のクラスのためにこれらのクラスのいずれかのメンバーを交換することを伴う。例えば、アミノ酸置換はまた、一つのアミノ酸を、異なる構造及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸で置き換える結果となる可能性があり、例えば、一つのグループ(例えば極性)由来のアミノ酸を異なるグループ(例えば、塩基性)由来の別のアミノ酸で置換する。許容されるバリエーションは、組換えDNA技術を使用して、及び活性について得られる組換え変異体をアッセイして、ポリペプチド分子中のアミノ酸の挿入、欠失、又は置換を体系的に作製することによって、実験的に決定され得る。

10

20

【0039】

本明細書で使用される場合、用語、「単鎖Fv」又は「scFv」とは、単一のポリペプチド鎖としてVHドメイン及びVLドメインを含む抗体断片を指す。典型的には、VH及びVLドメインはリンカー配列によって結合されている。Pluckthun, in: The PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg 及び Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語、「ミニボディ」とは、二量体化領域として、定常領域、典型的には免疫グロブリン、好ましくはIgG、より好ましくはIgG1のCH3領域を含む二価のホモ二量体scFv誘導体を意味する。一般的には、定常領域はヒンジ領域及び/又はリンカー領域を介してscFvに連結されている。ミニボディタンパク質の例はHu et al. (1996), Cancer Res. 56: 3055-61に見いだすことができる。

30

【0041】

本明細書で使用される場合、用語、「ダイアボディ」とは、二つの抗原結合部位を持つ小さな抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖(VH-VL)の軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは別の鎖の相補ドメインと対を成すよう強制され、2つの抗原結合部位を作成する。ダイアボディは例えば、欧州特許第404097号;国際公開第93/11161号;Hollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)により詳細が記載されている。トリアボディは3つのscFvの3価のトリマーの形成から生じ、3つの結合部位を与え、テトラボディは4つのscFvの4価のテトラマーであり、4つの結合部位をもたらす。

40

【0042】

当分野において使用され、及び/又は受容される1つの用語の2つ以上の定義が存在する場合には、本明細書で使用される用語の定義は、明白に反対のことが言及されない限り、全てのこのような意味を含むことが意図される。特定の例は、重鎖と軽鎖の両方のポリペプチドの可変領域中に見いだされる不連続抗原組み合わせ部位(抗原結合部位としても知られる)を説明するための用語「相補性決定領域」(「CDR」)の使用である。CD

50

R はまた、「超可変領域」としても言及され、その用語は本明細書では抗原結合領域を形成する可変領域の部分を参照する用語「CDR」と同義的に使用される。この特定の領域は、Kabatら、U.S. Dept. of Health 及び Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 及び Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) によって記載されており、これらは参照により本明細書に援用され、ここでこの定義は、互いに対して比較した場合に、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それにも関わらず、抗体又はその変異体の CDR をいうためのいずれの定義の適用も、本明細書で定義され、及び使用される用語の範囲内にあることが意図される。上記に引用した参考文献の各々によって定義された CDR を含む適切なアミノ酸残基は、比較として表 1 において以下に記載される。特定の CDR を含む正確な残基の番号は、CDR の配列及びサイズに依存して変化する。当業者は、抗体の可変領域のアミノ酸配列が与えられると、どの残基が特定の CDR を含むかを慣用的に決定することができる。

10

表 1. CDR 定義<sup>1</sup>

CDR	Kabat	Chothia	AbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-34
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

20

<sup>1</sup>表1の全てのCDR定義の番号付けは、Kabatらにより明記された規約による。

<sup>2</sup>表1で用いられる小文字の「b」を持つ「AbM」は、OxfordMolecularの「AbM」抗体モデリングソフトウェアにより定義されるCDRを指す。

## 【0043】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能である可変ドメイン配列についての番号付けを定義した。当業者は、配列それ自体を超えたいかなる実験データにも頼ることなく、任意の可変ドメインに「Kabat番号付け」のこのシステムを明白に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「Kabat番号付け」とは、Kabatら、U.S. Dept. of Health 及び Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983) によって示される番号付けシステムをいう。他に特定されない限り、ABM中の特定のアミノ酸残基の位置の番号付けはKabat番号付けシステムに従う。配列表の配列（すなわち、配列番号1から配列番号216）は、Kabat番号付けシステムに従って番号付けされていない。しかし、当業者は、配列表の配列をKabatの番号付けに変換する方法に精通している。

30

## 【0044】

本発明の参照ヌクレオチド配列に対して、少なくとも、例えば、95%「同一である」ヌクレオチド配列を有する核酸又はヌクレオチドによって、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5個までの点変異を含んでもよいこと以外は、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は参照配列と同一であることが意図される。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中の5%までのヌクレオチドが欠失されるかもしくは別のヌクレオチドで置換されてもよく、または参照配列中の全ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドが参照ヌクレオチドに挿入されてもよい。

40

## 【0045】

実際問題として、任意の特定の核酸分子又はポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列又はポリペプチド配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラムを使用して慣用的に決定され得る。グローバル配列アラインメントとも呼ばれる、問い合わせ

50

配列（本発明の配列）と対象配列との間の最良の全体の一致を決定するための好ましい方法は、Brutlagら、Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列アラインメントにおいては、問い合わせ配列及び対象配列は両方ともDNA配列である。RNA配列は、UをTに変換することによって比較され得る。前記グローバル配列アラインメントの結果は同一性パーセントである。同一性パーセントを計算するためにDNA配列のFASTDBアラインメントにおいて使用される好ましいパラメータは以下である。マトリックス=単一、k-タプル=4、ミスマッチペナルティ=1、結合ペナルティ=30、ランダム化グループ長=0、カットオフスコア=1、ギャップペナルティ=5、ギャップサイズペナルティ=0.05、ウィンドウサイズ=500又は対象ヌクレオチド配列の長さのどちらが短い方。

10

#### 【0046】

内部の欠失のためではなく、5'欠失又は3'欠失のために対象配列が問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が結果に対して行わなければならない。これは、FASTDBプログラムが、同一性パーセントを計算する場合に、対象配列の5'及び3'短縮を計算に入れないからである。5'末端又は3'末端で短縮されている対象配列については、問い合わせ配列と比較して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の全体の塩基のパーセントとして一致/アラインしない、対象配列の5'及び3'である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致/アラインされるか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。次いで、このパーセンテージが、同一性パーセントから減算され、特定のパラメータを使用して上記のFASTDBプログラムによって計算されて、最終的な同一性パーセントスコアに到達する。この補正されたスコアは、本発明の目的のために使用されるものである。問い合わせ配列と一致/アラインしない、FASTDBアラインメントによって示されるような、対象配列の5'塩基及び3'塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントスコアを手動で調整する目的のために計算される。

20

#### 【0047】

例えば、90塩基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100塩基の問い合わせ配列とアラインされる。欠失は対象配列の5'末端で起こり、それゆえに、FASTDBアラインメントは、5'末端における最初の10塩基の一致/アラインメントを示さない。この10個の対合しない塩基は配列の10%を表し（一致しない5'末端及び3'末端の数/問い合わせ配列における塩基の総数）、従って、10%が、FASTDBプログラムによって計算されたパーセント同一性スコアから減算される。残りの90塩基が完全に一致するならば、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例において、90塩基の対象配列が100塩基の問い合わせ配列と比較される。今回は欠失が内部欠失であり、その結果、問い合わせと一致/アラインしない、対象の5'末端又は3'末端上の塩基は存在しない。この場合、FASTDBによって計算された同一性パーセントは手動で補正されない。再度、問い合わせ配列と一致/アラインしない対象配列の塩基の5'及び3'のみが、手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためには行われない。

30

40

#### 【0048】

本発明の問い合わせアミノ酸配列に対して、少なくとも、例えば、95%「同一である」アミノ酸配列を有するポリペプチドによって、対象のポリペプチドのアミノ酸配列が、対象のポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列の各100アミノ酸あたりに5個までのアミノ酸の変化を含んでもよいこと以外は、問い合わせ配列と同一であることが意図される。換言すれば、問い合わせヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列中の5%までのアミノ酸残基が挿入、欠失、又は別のアミノ酸で置換されてもよい。参照配列のこれらの変化は、参照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端の位置で、又は参照配列中の残基間に個々に、もしくは参照配列中の1つ以上の連続する基においてのいずれかで散在して、これ

50

らの末端間の任意の位置に存在してもよい。

#### 【0049】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、参照ポリペプチドに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラムを使用して慣用的に決定され得る。グローバル配列アラインメントとも呼ばれる、問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最良の全体の一致を決定するための好ましい方法は、Brutlagら、Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列アラインメントにおいては、問い合わせ配列及び対象配列は両方ともヌクレオチド配列であるか、又は両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。このグローバル配列アラインメントの結果は同一性パーセントである。FASTDBアミノ酸アラインメントにおいて使用される好ましいパラメーターは以下である。マトリックス = PAM 0、k-タプル = 2、ミスマッチペナルティー = 1、結合ペナルティー = 20、ランダム化グループ長 = 0、カットオフスコア = 1、ウィンドウサイズ = 配列長、ギャップペナルティー = 5、ギャップサイズペナルティー = 0.05、ウィンドウサイズ = 500 又は対象アミノ酸配列の長さのどちらか短い方。

10

#### 【0050】

内部の欠失のためではなく、N末端欠失又はC末端欠失のために対象配列が問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が結果に対して行わなければならない。これは、FASTDBプログラムが、全体同一性パーセントを計算する場合に、対象配列のN末端及びC末端短縮を計算に入れれないからである。N末端又はC末端で短縮されている対象配列については、問い合わせ配列と比較して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の全体の塩基のパーセントとして、対応する対象の残基と一致/アラインしない、対象配列のN末端及びC末端である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。残基が一致/アラインされるか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。次いで、このパーセンテージが、同一性パーセントから減算され、特定のパラメーターを使用して上記のFASTDBプログラムによって計算されて、最終的な同一性パーセントスコアに到達する。この最終的な同一性パーセントスコアが、本発明の目的のために使用されるものである。問い合わせ配列と一致/アラインしない、対象配列のN末端及びC末端への残基のみが、同一性パーセントスコアを手動で調整する目的のためのものと見なされる。すなわち、対象配列の最も遠いN末端及びC末端の残基の外側の位置の問い合わせ残基のみである。

20

30

#### 【0051】

例えば、90アミノ酸残基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100残基の問い合わせ配列とアラインされる。欠失は対象配列のN末端で起こり、それゆえに、FASTDBアラインメントは、N末端における最初の10残基の一致/アラインメントを示さない。この10個の対合しない残基は配列の10%を表し（一致しないN末端及びC末端の数/問い合わせ配列における残基の総数）、従って、10%が、FASTDBプログラムによって計算されたパーセント同一性スコアから減算される。残りの90残基が完全に一致するならば、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例において、90残基の対象配列が100残基の問い合わせ配列と比較される。今回は欠失が内部欠失であり、その結果、問い合わせと一致/アラインしない、対象配列のN末端又はC末端上の残基は存在しない。この場合、FASTDBによって計算された同一性パーセントは手動で補正されない。再度、FASTDBによって示されるような、問い合わせ配列と一致/アラインしない、対象配列の残基のN末端及びC末端のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためには行われない。

40

#### 【0052】

ポリヌクレオチド及び/又はポリペプチドの同一性パーセントは、プログラムに示されているデフォルトのパラメータで、全米バイオテクノロジー情報センター（NCBI）を通じて利用BLASTプログラムを用いて決定することができる。

50

## 【0053】

本明細書で使用される場合、本発明の核酸配列に「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」核酸とは、50%ホルムアミド、5×SSC(750mM NaCl、75mM クエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×Denhardt's 溶液、10% 硫酸デキストラン、及び20µg/ml 変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中、42℃での一晚インキュベーション、続いて0.1×SSC中、約65℃でフィルター洗浄が続く、指定された条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドをいう。

## 【0054】

本明細書で使用される場合、「GnTIII活性」を有するポリペプチドとは、N連結オリゴ糖のトリマンノシルコアの 連結マンノシドへの -1-4 結合におけるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の付加を触媒することができるポリペプチドをいう。これは、特定の生物学的アッセイにおいて測定した場合に、用量依存性を伴って又は伴わずに、国際生化学分子生物学連合の命名委員会(NC-IUBMB)に従う -1,4-マンノシル-糖タンパク質4- N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.144)としても知られている、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIの活性に類似しているが、同一である必要はない酵素活性を示す融合ポリペプチドを含む。用量依存性が存在する場合において、これは、GnTIIIのそれと同一である必要はないが、むしろ、GnTIIIと比較して、所定の活性における用量依存性に実質的に類似する(すなわち、候補ポリペプチドは、GnTIIIと比較して、より高い活性又は約25分の1以下、及び好ましくは、約10分の1以下の活性、及び最も好ましくは、約3分の1以下の活性を示す)。

## 【0055】

本明細書で使用される場合、用語、「ゴルジ局在化ドメイン」とは、ゴルジ複合体中の部位へポリペプチドを固定することに関与する、ゴルジ存在性ポリペプチドのアミノ酸配列をいう。一般的に、局在化ドメインは、酵素のアミノ末端「テール」を含む。

## 【0056】

本明細書で使用される場合、用語、「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(ネイティブ配列のFc領域又はアミノ酸配列変異体のFc領域)に起因し得る生物学的活性をいう。抗体エフェクター機能の例には、Fcレセプター結合親和性、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込み、細胞表面レセプターのダウンレギュレーションなどが含まれるがこれらに限定されない。

## 【0057】

本明細書で使用される場合、用語、「操作する」、「操作された」、「操作すること」、とりわけ、接頭辞の「glyco-」が付いた用語、ならびに「グリコシル化操作」は、天然に存在するポリペプチド又は組換えポリペプチド又はその断片のグリコシル化パターンの任意の操作を含むと見なされる。グリコシル化操作には、細胞中で発現される糖タンパク質のグリコシル化の変化を達成するためのオリゴ糖合成経路の遺伝子操作を含む、細胞のグリコシル化機構の代謝的操作を含む。さらに、グリコシル化操作は、グリコシル化に対する変異及び細胞環境の影響を含む。一実施態様において、グリコシル化操作は、糖転移酵素活性の変化である。特定の実施態様では、操作が変更されたグルコサミニルトランスフェラーゼ活性及び/又はフコース転移酵素活性をもたらす。

## 【0058】

本明細書で使用される場合、用語、「宿主細胞」は、本発明のポリペプチド及び抗原結合分子を生成するために操作され得る任意の種の細胞系を網羅する。1つの実施態様において、宿主細胞は、修飾されたグリコフォームを有する抗原結合分子の産生を可能にするように操作される。好ましい実施態様において、抗原結合分子は、抗体、抗体断片、又は融合タンパク質である。所定の実施態様において、宿主細胞は、GnTIII活性を有する1つ以上のポリペプチドのレベルの増加を発現するようにさらに操作されている。宿主

10

20

30

40

50

細胞には、培養細胞、例えば、哺乳動物培養細胞、ほんの少し例を挙げれば、例えば、C H O細胞、B H K細胞、N S O細胞、S P 2 / 0細胞、Y O骨髓腫細胞、P 3 X 6 3マウス骨髓腫細胞、P E R細胞、P E R . C 6細胞、又はハイブリドーマ細胞など、酵母細胞、昆虫細胞、及び植物細胞が含まれるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物、又は培養した植物もしくは動物の組織中に含まれる細胞もまた含まれる。

【0059】

本明細書で使用される場合、用語、「F c媒介性細胞傷害性」は、抗体依存性細胞毒性、及びヒトF c領域を含む可溶性F c融合タンパク質により媒介される細胞障害を含む。それは「ヒト免疫エフェクター細胞」による「標的化細胞」の溶解につながる免疫機構である。

10

【0060】

本明細書で使用される場合、用語、「ヒト免疫エフェクター細胞」は、それらが抗原結合分子又はF c融合タンパク質のF c領域にそれを通して結合する、それらの表面上のF cレセプターを表示し、及びエフェクター機能を実行する白血球の集団である。このような集団には、末梢血単球細胞(P B M C)及び/又はナチュラルキラー(N K)細胞が含まれ得るがこれらに限定されない。

【0061】

本明細書で使用される場合、用語、「標的化細胞」は、F c領域を含む抗原結合分子(例えば、F c領域を含む抗体又はその断片)又はF c融合タンパク質によって特異的に結合される細胞である。抗原結合分子又はF c融合タンパク質は、F c領域に対してN末端であるタンパク質部分を通して標的細胞に結合する。

20

【0062】

本明細書で使用される場合、用語、「F c媒介性細胞傷害性の増加」は、標的細胞を取り囲む培地中で、上に定義されたF c媒介性細胞傷害性のメカニズムによって、所定の時間内に、所定の抗原結合分子もしくはF c融合タンパク質の濃度で溶解される「標的化細胞」の数の増加、及び/又はF c媒介性細胞傷害性のメカニズムによって、所定の時間内に、所定の数の「標的化細胞」の溶解を達成するために必要とされる、標的細胞を取り囲む培地中の抗原結合分子もしくはF c融合タンパク質の濃度の減少のいずれかとして定義される。F c媒介性細胞傷害性の増加は、同じ標準的な産生、精製、製剤、及び保存の方法(当業者に公知である)を使用して、同じ抗原結合分子、又は同じ型の宿主細胞によって生産されるF c融合タンパク質により媒介される細胞障害性に比例するが、これは、本明細書に記載される方法によって、改変されたグリコシル化型を有するように(例えば、グリコシルトランスフェラーゼG n T I I I又は他のグリコシルトランスフェラーゼを発現するように)操作された宿主細胞によって産生されなかった。

30

【0063】

「抗体依存性細胞傷害性(A D C C)を有する抗体」によって、その用語が本明細書で定義される通り、当業者に公知である任意の適切な方法によって決定される、A D C Cの増加を有する抗原結合分子が意味される。1つの受容されるインビトロA D C Cアッセイは以下の通りである。

1) このアッセイは、抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが知られている標的細胞を使用する；

40

2) このアッセイは、エフェクター細胞として、ランダムに選択された健常ドナーの血液から単離されたヒト末梢血単球細胞(P B M C)を使用する；

3) このアッセイは以下のプロトコールに従って使用される。

i) P B M Cを、標準的な密度遠心分離手順を使用して単離し、R P M I細胞培養培地中、 $5 \times 10^6$ 細胞/mlで懸濁する；

i i) 標的細胞を、標準的な培養方法によって増殖させ、90%よりも高い生存度を有する指数増殖期から収集し、R P M I細胞培養培地中で洗浄し、100マイクロキュリーの51C rで標識し、細胞培養培地で2回洗浄し、そして105細胞/mlの密度で細胞培養培地中に再懸濁する；

50

i i i ) 100 マイクロリットルの上記の最終的な標的細胞懸濁物を、96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移す；

i v ) 抗体を、細胞培養培地中で4000 ng/ml から0.04 ng/ml まで段階希釈し、得られる抗体溶液の50 マイクロリットルを96 ウェルマイクロタイタープレート中の標的細胞に加えて、上記の全体の濃度範囲を網羅する種々な抗体濃度を3通りで試験する；

v ) 最大放出 (MR) コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルは、抗体溶液 (上記の要点 i v ) の代わりに、50 マイクロリットルの2% (V/V) 非イオン性界面活性剤 (Nonidet, Sigma, St. Louis) の水溶液を受容する；

v i ) 自発性放出 (SR) コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルに、抗体溶液 (上記の要点 i v ) の代わりに、50 マイクロリットルのRPMI細胞培養培地を受容する；

v i i ) 次いで、96 ウェルマイクロタイタープレートを、50 × g で1分間遠心分離し、そして1時間4℃でインキュベートする；

v i i i ) 50 マイクロリットルのPBMC懸濁液 (上記の要点 i ) を各ウェルに加えて25:1のエフェクター:標的細胞比を生じ、そしてプレートをインキュベーター中、5% CO<sub>2</sub>大気、37℃下に4時間配置する；

i x ) 各ウェルからの無細胞上清を収集し、実験的に放出された放射能をガンマカウンターを使用して定量する；

x ) 特異的溶解のパーセンテージを、計算式  $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$  に従って各抗体について計算し、ここで、ERは抗体濃度について定量された平均放射能 (上記の要点 i x を参照のこと) であり、MRはMRコントロール (上記の要点 v を参照のこと) についての定量された平均放射能 (上記の要点 i x を参照のこと) であり、そしてSRはSRコントロール (上記の要点 v i を参照のこと) についての定量された平均放射能 (上記の要点 i x を参照のこと) である；

4) 「ADCCの増加」は、上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの増加、及び/又は上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの半分を達成するために必要とされる抗体の濃度の減少のいずれかとして定義される。ADCCの増加は、上記のアッセイを用いて測定される、当業者に公知である同じ標準的な産生、精製、製剤、及び保存の方法を使用して、同じ型の宿主細胞によって産生される、同じ型の抗体によって媒介されるADCCに比例するが、これは、GnTIIを過剰発現するように操作された宿主細胞によって産生されなかった。

#### 【0064】

##### 抗CEA抗原結合分子

CEAは、長い間診断目的のために癌マーカーとして使用されている。それは同一の細胞型の非腫瘍組織に比べて多くの腫瘍組織内において異常に発現される (例えば、細胞内で異なるパターンで過剰発現されるか及び/又は分布している)。しかしながら、CEAは、一般的に腫瘍細胞表面から切断され、使用可能な抗CEA抗体のほとんどはまた、可溶性CEAに結合されているので、CEAに対する非抱合型抗体は一般に、治療目的のために使用されてはいない。たとえば、現在パイロット試験にある抗CEA抗体は放射抱合体として投与される (Wongら、2004; Lierschら、2007)。

#### 【0065】

いくつかのメカニズムは、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 及び補体依存性細胞傷害 (CDC) を含む抗CEA抗体の治療効果に参与している。CEAの発現の増大は癌細胞の転移につながる細胞間接着の増加を促進する (Marshall J., Semin Oncol. 30(3) 補足 8: 30-36)。したがって、抗CEA抗原結合分子はまた、CEA介在細胞接着及び癌細胞の転移の阻害に重要な役割を果たす可能性がある。

#### 【0066】

10

20

30

40

50

一態様において、本発明は、1つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、又は6）のマウスPR1A3抗体のCDRを含む抗原結合分子（例えば、抗体又はその断片）に向けられており、そのCDRの少なくとも一つにはPR1A3の対応するCDRに比べて少なくとも一つのアミノ酸残基の置換があり、かつ親PR1A3抗原結合分子に比べて、CEA、好ましくは膜結合CEAに対して向上した親和性を有する。このような1以上のCDRは、切断型CDRとなることができ、所与のCDRに対して、その用語が本明細書で定義されるように、最低限、特異性決定残基（SDR）を含み得る。一実施態様では、抗原結合分子は、特異的な結合を保持するCDRの残基を含み、以下の表2に記載されたCDRの少なくとも一つ（例えば、1、2、3、4、5又は6）を含む抗原結合分子を含む。別の実施態様では、抗原結合分子は、少なくとも前記CDRに対する特異性決定残基を含み、かつ異種ポリペプチド由来の配列を含む、以下の表2に記載されたCDRの少なくとも一つ（例えば、1、2、3、4、5又は6）、又は変異体又はその切断型を含む。抗原結合分子がPR1A3の重鎖CDR1変異体を含む特定の実施態様において、HCDR1はKababの位置31にバリンと置換されたグルタミン酸を有する。一実施態様では、抗原結合分子は表2にある3つの重鎖CDR（例えば、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）、及び/又は3つの軽鎖（例えば、LCDR1、LCDR2及びLCDR3）、又は前記3つのCDRの各々に対する少なくとも特異性決定残基を含む変異体又はその切断型を含む。より具体的な実施態様では、抗原結合分子は表2にある3つの重鎖CDR（例えば、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）、及び3つの軽鎖（例えば、LCDR1、LCDR2及びLCDR3）を含む。別の実施態様では、抗原結合分子は、抗体軽鎖及び/又は重鎖、好ましくは、重鎖及び軽鎖可変領域の両方の可変領域を含む。より特定の実施態様においては、重鎖及び/又は軽鎖可変領域は、表4の重鎖及び/又は軽鎖可変領域又はそれらの組み合わせから選択され、ここでは重鎖及び軽鎖可変領域は配列番号99及び配列番号103、又は配列番号100及び配列番号104の組み合わせではない。一実施態様では、抗原結合分子は、キメラ抗体、より具体的にはヒト化抗体である。別の実施態様では、抗原結合分子は、Fc領域を含む。別の実施態様では、抗原結合分子は親和性成熟である。別の実施態様では、抗原結合分子はPR1A3に比べ増加したADCC活性を有する。一実施態様では、抗原結合分子の増加したADCCは、例えば親和性成熟又は親和性を向上させる他の方法により、膜結合CEAに対する抗原結合分子の親和性の増加による（Tangら、J. Immunol. 2007, 179:2815-2823を参照、その全体の内容は参照により本明細書に援用される）。別の実施態様では、抗原結合分子は糖鎖を操作されたFc領域を含む。別の態様において、本発明はまた、同じ細胞型の正常組織と比べて、CEAが発現され、特にCEAが異常に発現される（例えば、細胞内で過剰発現されるかもしくは別のパターンで発現される）疾患、特に細胞増殖障害の治療における、こうした抗原結合分子の製造方法及びその使用方法に向けられる。そのような障害は、限定されないが、大腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌及び乳癌を含む。CEAの発現レベルは当該技術分野で公知の方法及び本明細書に記載された方法で決定され得る（例えば、免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光アッセイ、免疫酵素法、ELISA、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、リガンド結合、キナーゼ活性、など）。

#### 【0067】

別の態様において、本発明はまた、一つ以上（例えば、1、2、3、4、5、又は6）のマウスPR1A3抗体の相補性決定領域を含むポリペプチドをコードする配列又は前記相補性決定領域に対する少なくとも特異性決定残基を含む変異体又はその切断型を含む単離されたポリヌクレオチドに向けられている。典型的にはこのような単離されたポリヌクレオチドは、抗原結合分子を形成する1つ又は複数の融合ポリペプチドをコードする。一実施態様において、ポリヌクレオチドは、特異的な結合を保持するであろうCDRの残基を含む、以下の表2に記載のCDRの1以上（例えば、1、2、3、4、5又は6）をコードする配列を含む。一実施態様において、ポリヌクレオチドは、表2の少なくとも3つの重鎖CDR（例えば、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）及び/又は3つの軽

10

20

30

40

50

鎖 C D R (例えば L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3)、又は前記 3 つの相補性決定領域の各々に対する少なくとも特異性決定残基 (S D R) を含む、変異体又はその切断型をコードする配列を含む。より具体的な実施態様では、ポリヌクレオチドは、表 2 にある 3 つの重鎖 C D R (例えば、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3) 及び 3 つの軽鎖 C D R (例えば L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3) をコードする。別の実施態様において、ポリヌクレオチドは、抗体軽鎖及び / 又は重鎖の可変領域を含むポリペプチドをコードする。重鎖可変領域のポリペプチド及び軽鎖可変領域のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、1 つ又は複数の発現ベクターで発現させることができる。より特定の実施態様において、重鎖及び / 又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、表 5 に示されるポリヌクレオチド又はそれらの組み合わせからなる群から選択され、ここでは重鎖及び軽鎖可変領域は配列番号 1 1 及び配列番号 1 1 5、又は配列番号 1 1 2 及び配列番号 1 1 6 の組み合わせによりコード化されない。一実施態様において、ポリヌクレオチドによってコードされた重鎖可変領域のポリペプチド及び軽鎖可変領域のポリペプチドは結合し、キメラ抗体、より具体的にはヒト化抗体を形成する。ポリヌクレオチドが P R 1 A 3 の重鎖 C D R 1 又はその変異体をコードする配列を含む特定の実施態様において、前記ポリヌクレオチドは、K a b a t の位置 3 1 においてバリンに対して置換されたグルタミン酸をコード化している。別の実施態様において、ポリヌクレオチドは、F c 領域をコードする配列を含む。本発明は更に、そのようなポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに向けられている。一実施態様では、前述のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、F c 領域を含む。より具体的な実施態様において、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、糖鎖が操作されて、F c 領域におけるグリコシル化に変化したパターンを有する。特定の実施態様において、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの膜結合 C E A に対する親和性は、親 P R 1 A 3 抗体に比べて増加している。別の実施態様において、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは A D C C 活性を増加させている。一実施態様において、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの増加した A D C C は、例えば親和性成熟もしくは親和性を向上させる他の方法による、膜結合 C E A に対するポリペプチドの親和性の増加に起因する。別の態様において、本発明はまた、C E A が発現され、特に同じ細胞タイプの正常組織に比べて C E A が異常に発現される (例えば、細胞内で過剰発現されるか又は別のパターンで発現される) 疾患、特に細胞増殖性疾患の治療において、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド (例えば、抗原結合分子) を使用することに向けられている。このような疾患としては、限定されないが、大腸癌、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌、膵臓癌及び乳癌を含む。C E A の発現レベルは、当該技術分野で公知であって本明細書に記載された方法 (例えば、免疫アッセイ、免疫アッセイ、免疫酵素法、E L I S A、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、リガンド結合、キナーゼ活性などを介して) により決定することができる。特定の実施態様において、本発明は、配列番号 1 0 1、1 0 7、又は 1 1 8 - 2 0 6 の何れか一の配列を含む重鎖可変領域を含む膜結合 C E A に対して特異的なヒト化抗原結合分子又はその一部分又は断片に向けられている。別の実施態様において、本発明は、配列番号 1 0 5、1 0 8、又は 2 0 7 - 2 1 6 の何れか一の配列を含む軽鎖可変領域を膜結合 C E A に対して特異的なヒト化抗原結合分子又はその一部分又はその断片に向けられている。特定の実施態様では、膜結合 C E A に対して特異的なヒト化抗原結合分子又はその一部分又はその断片は配列番号 1 0 1、1 0 7、又は 1 8 8 - 2 0 6 の何れか一の配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 0 5、1 0 8、又は 2 0 7 - 2 1 6 の何れか一の配列を含む軽鎖可変領域を含む。一実施態様では、ヒト化抗原結合分子は更に、ヒト重鎖定常領域及び / 又はヒト軽鎖定常領域を含む。このような定常領域は、本明細書に記載されており、当該分野で知られている。より特定の実施態様においては、ヒト化抗原結合分子は、F c 領域、より具体的には、糖鎖を操作された F c 領域を含む。

#### 【 0 0 6 8 】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は当該分野で知られている。例えば、本発明による

ヒト化 A B M は W i n t e r に対する米国特許第 5 2 2 5 5 3 9 号、Q u e e n らに対する米国特許第 6 1 8 0 3 7 0 号、又は A d a i r らに対する米国特許第 5 2 2 5 5 3 9 号に記載の方法に従って調製することができ、それらの各々の全内容は参照によって本明細書に援用される。好ましくは、ヒト化抗体は非ヒトである供給源からそれに導入された一又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから取り込まれる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的に W i n t e r 及び共同研究者 (J o n e s ら、Nature, 321:522-525 (1986); R i e c h m a n n ら、Nature, 332:323-327 (1988); V e r h o e y e n ら、Science, 239:1534-1536 (1988)) による方法に従い、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列と置換することによって、実行することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体 (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号) であり、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に小さい配列が非ヒト種由来の対応する配列で置換される。典型的には、ヒト化抗体は、いくつかの超可変領域残基及び恐らくは幾つかの F R 残基が、非ヒト (例えば、げっ歯類) 抗体の類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。対象ヒト化抗 C E A 抗体は必要に応じて、ヒト免疫グロブリンの定常領域を含む。

#### 【0069】

ヒト化抗体を作製するにおいて、軽鎖及び重鎖ヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減するために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法によれば、ドナー (例えば、げっ歯類) 抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングされる。ドナー (例えば、げっ歯類) のそれに最も近いヒト配列は、その後ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域 (F R) として受け入れられる (S i m s ら、J. Immunol., 151:2296 (1993); C h o t h i a ら、J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。ヒトフレームワーク配列を選択する別の方法は、フレームワークサブ領域 (例えば、K a b a t の番号付けにより決定される) に対応する既知のヒト可変領域配列のライブラリーに対して、完全なドナー (例えば、げっ歯類) フレームワーク (つまり、F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4) の個々のサブ領域の配列、又は個々のサブ領域 (例えば F R 1 及び F R 2) のいくつかの組み合わせを比較し、げっ歯類のそれに最も近い各サブ領域又は組み合わせに対するヒトの配列を選択することである (L e u n g 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 4 0 6 0 6 A 1 号、2 0 0 3 年 2 月 2 7 日 公 開)。もう一つの方法は、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する (C a r t e r ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); P r e s t a ら、J. Immunol., 151:2623 (1993))。一実施態様では、ヒトフレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系列のコレクションから選択される。ヒト生殖細胞系列のそのようなコレクションは、I M G T 又は V b a s e 等のデータベースで見つけることができる。フレームワーク領域は、個別に選択でき (例えば、ヒト化抗 C E A A B M の重鎖及び / 又は軽鎖可変領域のアクセプター用に選択された F R 1 - 3 は異なる生殖細胞系列遺伝子によってコード化することができる)、又は同一の生殖細胞系列遺伝子の一部として選択できる。より具体的な実施態様では、重鎖 F R 1 - 3 は I G H V 7 \_ 4 \_ 1 \* 0 2 ヒト免疫グロブリン生殖細胞系列遺伝子配列 (受入番号 X 6 2 1 1 0、配列番号 1 1 4) によってコード化されている。別の特定の実施態様において、軽鎖 F R 1 - 3 は I M G T \_ h V K \_ 1 \_ 3 9 ヒト免疫グロブリン生殖細胞系列遺伝子配列 (受入番号 X 5 9 3 1 5、配列番号 1 1 8) によってコード化されている。別の特定の実施態様において、重鎖 F R 4 は J H 6 生殖細胞系列遺伝子配列によってコード化されている (G e n B a n k 受入番号 M 6 3 0 3 0 を参照)。別の特定の実施態様では、軽鎖 F R 4 は J K 2 生殖細胞系列遺伝子配列によってコード化されている (G e n B a n k 受入番号 X 6 1 5 8 4 を参照)。

#### 【0070】

抗体及びその断片などの抗原結合分子は、抗原及び他の好ましい生物学的性質に対する高親和性を保持してヒト化されることが一般に望ましい。したがって、一実施態様では、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物を分析することによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入

10

20

30

40

50

手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を例示かつ表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらのディスプレイの分析は、例えば、その抗原に結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を及ぼす残基の解析など、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割を解明するのに役立つ。このようにして、標的抗原に対する増加した親和性などの所望の抗体特性が達成されるように、レシピエント及び移入配列からFR残基が選択され、組み合わせることができる。一般的には、超可変領域残基は、直接的に、最も実質的に抗原結合に影響を与えることに関与している。

#### 【0071】

一態様において、本発明は、ヒト化、親和性成熟し、及び/又はバリエーション型の、望ましい特性及び特徴を持つ抗CEA抗原結合分子に向けられており、限定されないが、CEAに対する強い結合親和性 - 特に膜結合CEA - 、実質的に可溶性CEAに対して交差反応性を有しない；インビトロ及びエクスピボでのCEA発現細胞の溶解を誘導する能力、好ましくは用量依存的に；インビトロでのCEA媒介細胞接着を阻害する能力；腫瘍組織増殖の阻害及び/又は腫瘍組織退縮を誘導する能力（例えば、腫瘍モデル（例えば、異種移植片マウス）で実証される）を含む。

10

#### 【0072】

本明細書に記載するように、いくつかの実施態様において、本発明の抗原結合分子はPR1A3抗体の1つ又は複数のCDRを含む親抗体の親和性成熟のために、例えば結合親和性が増加している。本発明の抗原結合分子の親和性は、当技術分野において公知であり、本明細書に記載の方法によって決定することができる。特定の実施態様では、本発明のヒト化又は変異体抗CEA抗原結合分子は、ヒト化CEA、好ましくは膜結合CEAに、一価親和性定数 ( $K_D$ ) 値が約1  $\mu$ Mから約0.001 nMを超えない、より具体的には約800 nMから約1 nMを超えない、更により具体的には約550 nMから10 nMを超えない値で、結合する。特定の実施態様では、変異体抗CEA抗原結合分子は、約10 nmから約100 nMを超えないの一価の親和性定数 ( $K_D$ ) の値で膜結合CEAに結合する親和性成熟抗体又はその断片である。

20

#### 【0073】

一つの実施態様において、本発明の抗原結合分子は、典型的には、マウス抗体PR1A3によって認識されるのと同じエピトープに結合する、又は膜結合CEAへの結合においてPR1A抗体と競合することが可能である。目的の抗体が結合したヒトCEA上のエピトープに結合する抗体（例えば、ヒトCEAへのPR1A3抗体の結合を阻止するもの）をスクリーニングするために、ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 及びLane編集。(1988)に記載されたように、所定の交差ブロッキングアッセイが実施可能である。あるいは、Champeら、J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)に記載された通りに、エピトープマッピングが、抗体が目的のエピトープに結合するかどうかを判断するために実行することができる。

30

#### 【0074】

一実施態様では、ヒトCEAに特異的な変異体抗原分子は、モノクローナル抗体PR1A3の少なくとも一つのCDRを含む親抗CEA抗原結合分子から作られ、親抗CEA抗体はPR1A3抗体と同じエピトープに結合し、抗原結合に対してPR1A3と競合することが可能である。一実施態様では、親抗原結合分子は、少なくとも1つ、2つ、又は典型的には3つのPR1A3抗体の重鎖CDRを含む；別の実施態様では、親抗原結合分子は、少なくとも1つ、2つ、又は典型的には3つのPR1A3抗体の軽鎖CDRを含む；別の実施態様では、親抗原結合分子はPR1A3抗体の3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む。好ましくは、抗原結合分子はPR1A3のHCDR1を含む場合、HCDR1は、Kababの位置31でバリンに対するグルタミン酸への置換を含む。変異体ABMは、通常、親よりもCEAに対する親和性を有する。一実施態様では、変異体ABMは、Fc領域を含む。一実施態様では、変異体ABMは、糖鎖を操作されている。一実施態様では、変異体ABMは、親ABMに比べてADCC活性を増加させている。特定の実

40

50

施態様では、増加したA D C Cは、親和性の増加の結果であり、例えば、親A B Mの親和性成熟によって達成され変異体A B Mを生成する。より特定の実施形態では、A D C Cの増加は、前記親抗原結合分子と比較して少なくとも約40%から約100%程度である。別の特定の実施態様では、変異体A B Mは、インビトロ細胞毒性アッセイにおいて少なくとも約10%から約100%A D C Cを増加させる。より特定の実施態様において、変異体A B Mは、マウスP R 1 A 3抗体に比べて所定の濃度でA D C Cを誘導することで少なくとも約10倍から約1000倍より強力である。より特定の実施態様では、変異体A B Mは、マウスP R 1 A 3抗体に比べて所定の濃度でA D C Cを誘導することで少なくとも約10倍から約1000倍より強力である。別の特定の実施態様では、増加したA D C C活性はF c領域の糖鎖操作の結果である。

10

**【0075】**

一実施態様では、本発明の変異抗原結合分子は、少なくとも一つのC D Rの1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。アミノ酸置換の数は、好ましくは、1から10の範囲（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10）、好ましくは2から5まで（例えば、2、3、4、又は5）、変動し得る。一実施態様では、少なくとも1つの重鎖C D Rは、1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。一実施態様では、少なくとも1つの軽鎖C D Rは、1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。別の実施態様では、少なくとも1つの重鎖C D Rは、1つ又は複数の置換を含み、かつ少なくとも1つの軽鎖C D Rは、1つ又は複数の置換を含む。好ましくは、抗原結合分子はP R 1 A 3のH C D R 1を含む場合、H C D R 1は、K a b a tの位置31におけるパリンに対するグルタミン酸への置換を含む。抗原結合分子の生物学的特性の実質的な修飾は、(a)例えば、シート又はらせん構造として、置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖のかさ、の維持するうえで、その効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される。アミノ酸置換を有する変異体抗原結合分子は、親の抗原結合分子と比較して生物学的活性、例えば、改良された抗原結合親和性及び強化されたA D C Cを改善し得る。アミノ酸置換は、限定されないが、部位特異的突然変異誘発及び/又はファージディスプレイによる親の抗原結合分子等の親和性成熟を含む、当該分野で公知の様々な技術によって導入することができる。

20

**【0076】**

修飾のための候補部位、例えば超可変残基、を同定するために、アラニンスキャン突然変異誘発が、抗原結合に有意に寄与する残基を見つけるために実行され得る。あるいは、又は加えて、抗体及びヒトC E Aとの間の接触点を同定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することは有益であり得る。そのような接触残基と隣接する残基は、当該技術分野で既知の方法か、及び/又は本明細書に記載の方法に従って置換の候補である。ひとたび、そのような変異体が生産され、変異体のパネルは、当該分野で既知の方法、及び/又は本明細書に記載の方法によりスクリーニングすることができ、1つ又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体が、更なる開発のために選択することができる。

30

**【0077】**

ファージディスプレイは、ランダムなアミノ酸変異を含む親の抗原結合分子から超可変領域配列のレパートリーを生成するために使用することができる。例えば、幾つかの超可変領域部位（例えば6-7部位）は各部位で全ての可能なアミノ酸置換を生成させるために変異している。あるいは、ランダム突然変異誘発は、重鎖及び/又は軽鎖可変領域で実行することができる。突然変異は、当該技術分野で公知の技術によって生成することができる。限定されないが、突然変異誘発プライマーを用い、サイクル数を制御し、及びP C R増幅の間に変異原性ヌクレオチド類似体の8-オキソ-d G T P及びd P T Pを使用する。こうして生成された抗体変異体は、各粒子内のM 1 3のパッケージの遺伝子I I I産物への融合体として繊維状ファージ粒子から一価の様式で表示される。本明細書に開示されたように、ファージ表示された変異体は、その後、その生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされ、1つ又は複数の改良された活性を有する候補が更な

40

50

る開発のために使用される。ファージディスプレイライブラリーを作製するための方法は、Huseら、Science, 246:1275-1281 (1989); Proc. Nat'l Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991)に見いだすことができ、その各々の内容全体が本明細書中で参照により援用される。親和性成熟した抗原結合分子を同定するための代替方法は、例えば、Balintらに対する米国特許第7432063号に見いだすことができ、その内容全体が本明細書中で参照により援用される。

【0078】

幾つかの実施態様において、本発明の抗原結合分子は、Fc領域、好ましくはヒトFc領域を含む。Fc領域の配列及び構造は、当技術分野で知られており特徴づけられている。特定の実施態様では、ヒト定常領域は、配列番号121及び122に記載されたIgG1であり、以下に記載される：

IgG1ヌクレオチド配列(配列番号121)

A C C A A G G G C C C A T C G G T C T T C C C C C T G G C A C C C T C C T C C A  
 A G A G C A C C T C T G G G G G C A C A G C G G C C C T G G G C T G C C T G G T  
 C A A G G A C T A C T T C C C C G A A C C G G T G A C G G T G T C G T G G A A C  
 T C A G G C G C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T T C C C G G C T G  
 T C C T A C A G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C G T G G T  
 G A C C G T G C C C T C C A G C A G C T T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C  
 T G C A A C G T G A A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T G G A C A  
 A G A A A G C A G A G C C C A A A T C T T G T G A C A A A A C T C A C A C A T G  
 C C C A C C G T G C C C A G C A C C T G A A C T C C T G G G G G G A C C G T C A  
 G T C T T C C T C T T C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A  
 T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T G G T G G A C G T  
 G A G C C A C G A A G A C C C T G A G G T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G  
 G A C G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G C G G G  
 A G G A G C A G T A C A A C A G C A C G T A C C G T G T G G T C A G C G T C C T  
 C A C C G T C C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A A G G A G T A C  
 A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G C C C T C C C A G C C C C C A T C G  
 A G A A A A C C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C A G C C C C G A G A A C C  
 A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A T G A G C T G A C C  
 A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T  
 A T C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A T G G G C A  
 G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C G C C T C C C G T G C T G G A C  
 T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T G G  
 A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C  
 C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G  
 A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T A A A T G A

IgG1アミノ酸配列(配列番号122)

T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N  
 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I  
 C N V N H K P S N T K V D K K A E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S  
 V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V  
 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y  
 K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T  
 K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D  
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K  
 S L S L S P G K

【0079】

しかしながら、ヒトFc領域の変異体及びアイソフォームもまた、本発明に包含される。例えば、本発明における使用に適した変異体Fc領域は、Prestaに対する米国特

10

20

30

40

50

許第6737056号で教示された方法に従って産生することができる。(1つ又は複数のアミノ酸修飾のために変更されたエフェクター機能を有するFc領域変異体);又は米国特許出願第60/439498号、同第60/456041号;同第60/514549号;又は国際公開第2004/063351号(アミノ酸修飾により増加した結合親和性を有する変異体Fc領域);又は米国特許出願第10/672280号又は国際公開第2004/099249号(アミノ酸修飾によるFc Rへの改変された結合をするFc変異体)、その各々の内容は本明細書においてその全体が参照により援用される。特定の実施態様では、抗CEA ABM及び変異体ABMは(例えば、フコシル化を減少させ、Fcレセプター結合親和性を向上させ、ADCCを増加させる、など)ABMのエフェクター機能活性を変更するための糖鎖操作されたFc領域を含んでいる。使用することができる糖鎖操作の方法は、本明細書中以下に詳細に記載されており、及び当該技術分野で知られている。

#### 【0080】

一実施態様において、本発明の抗原結合分子は、放射標識又は毒素などの追加部分に結合している。そのような抱合された抗原結合分子は、当技術分野でよく知られている多数の方法によって作成することができる。本発明の抗CEA ABMコンジュゲートは、本明細書中の以下に「抗CEA抗原結合分子コンジュゲート」と題する節で詳細に記載されている。

#### 【0081】

抗CEA ABMのポリペプチド及びポリヌクレオチド

一態様において、本発明は、抗原結合分子及びマウスPR1A3抗体と同じ結合特異性(例えば、膜結合CEAの同じエピトープに結合する)を有し、及び相当するか又は改良された生物学的活性(例えば、膜結合CEAに対する改善された親和性及び/又は強化されたADCC)を有するポリペプチドに関する。一実施態様では、抗原結合分子は、下記の表2に記載のCDRの一つ又は複数を含む。より具体的な実施態様では、抗原結合分子は、下記表2の3つの重鎖CDRを含む。別の具体的な実施態様では、抗原結合分子は、下記表2の3つの軽鎖CDRを含む。別の特定の実施態様において、本発明は、(a)配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、及び配列番号12からなる群から選択される重鎖CDR1配列:(b)配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、及び配列番号24からなる群から選択される重鎖CDR2配列:(c)配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、及び配列番号35からなる群から選択される重鎖CDR3配列:を含む膜結合ヒトCEAに対して特異的な抗原結合分子に向けられている。別の具体的な実施態様において、本発明は、(a)配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44及び配列番号45からなる群から選択される軽鎖CDR1配列:(b)配列番号46、及び配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、及び配列番号55からなる群から選択される軽鎖CDR配列:及び(c)配列番号56の軽鎖CDR3:を含む膜結合ヒトCEAに対して特異的な抗原結合分子に向けられている。特定の実施態様では、抗原結合分子は可溶性ヒトCEAに対して実質的な交差反応性を有していない。別の実施態様では、抗原結合分子は、ヒト重鎖及び/又は軽鎖の定常領域を含む。例えば、一実施態様では、抗原結合分子は、Fc領域を含む。より具体的な実施態様では、抗原結合分子は糖鎖を操作されたFc領域を含む。本発明はまた、膜結合ヒトCEAに特異的な本発明の抗原結合分子のいずれか一をコードするポリヌクレオチドに向けられている。

#### 【0082】

一態様において、本発明は、重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域を含む膜結合ヒトC

10

20

30

40

50

E A に特異的な抗原結合分子に向けられている。一実施態様では、重鎖可変領域は、配列番号 101 の配列を有するポリペプチドを含む。別の実施態様では、重鎖可変領域は、配列番号 101 の配列に少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の同一性を有するポリペプチドを含む。一実施態様では、軽鎖可変領域は、配列番号 101 の配列を有するポリペプチドを含む。別の実施態様では、重鎖可変領域は、配列番号 105 の配列に少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% の同一性を有するポリペプチドを含む。

#### 【0083】

一実施態様では、膜結合ヒト C E A に特異的な抗原結合分子は重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。具体的な実施態様では、重鎖可変領域は、以下の通りの配列番号 4 の配列を有するポリペプチドを含む：

Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T E X<sup>1</sup> X<sup>2</sup> M X<sup>3</sup> W V  
R Q A P G Q G L E W M G X<sup>4</sup> I N T K X<sup>5</sup> G E A X<sup>6</sup> Y X<sup>7</sup> E E F K G R F V F S L D  
T S V S T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A R W D X<sup>8</sup> X<sup>9</sup> X<sup>10</sup> Y X<sup>11</sup> X<sup>12</sup>  
X<sup>13</sup> X<sup>14</sup> D Y W G Q G T T V T V S S

ここで、X<sup>1</sup> は Y 又は F ; X<sup>2</sup> は S 又は G ; X<sup>3</sup> は N 又は S ; X<sup>4</sup> は W 又は Y ; X<sup>5</sup> は N , T 又は S ; X<sup>6</sup> は T 又は N ; X<sup>7</sup> は V 又は I ; X<sup>8</sup> は F 又は A ; X<sup>9</sup> は Y、A、V、F 又は S ; X<sup>10</sup> は D、H、W、E、又は Y ; X<sup>11</sup> は V、L 又は F ; X<sup>12</sup> は E、K 又は Q ; X<sup>13</sup> は A 又は T ; 及び X<sup>14</sup> は M 又は L である。

具体的な実施態様では、軽鎖可変領域は、以下の通りの配列番号 11 の配列を有するポリペプチドを含む：

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S X<sup>15</sup> X<sup>16</sup> X<sup>17</sup> X<sup>18</sup> X<sup>19</sup>  
X<sup>20</sup> V A W Y Q Q K P G K A P K X<sup>21</sup> L I Y X<sup>22</sup> A S X<sup>23</sup> X<sup>24</sup> X<sup>25</sup> X<sup>26</sup>  
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C H Q Y Y T Y P L  
F T F G Q G T K L E I K

ここで、X<sup>15</sup> は Q、A、K、又は H ; X<sup>16</sup> は N、A、Y、I、K、T、又は F ; X<sup>17</sup> は V、A、G、又は M ; X<sup>18</sup> は G、S、T、又は L ; X<sup>19</sup> は T、N、P、又は A ; X<sup>20</sup> は N 又は Y ; X<sup>21</sup> は P 又は L ; X<sup>22</sup> は S、L、又は W ; X<sup>23</sup> は Y、N、又は H ; X<sup>24</sup> は R、L、P、又は H ; X<sup>25</sup> は Y、S、Q、K、E、F、又は P ; 及び X<sup>26</sup> は S、G、I、又は R である。

#### 【0084】

別の特定の実施態様において、重鎖可変領域は、配列番号 107 の配列を有するポリペプチドを含む。別の特定の実施態様において、重鎖可変領域は配列番号 107 の配列に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% は同一である配列を有するポリペプチドを含む。別の特定の実施態様では、抗原軽鎖可変領域は、配列番号 108 の配列を有するポリペプチドを含む。別の特定の実施態様では、軽鎖可変領域は、配列番号 108 の配列に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% 同一である配列を含む。一実施態様では、抗原結合分子は、配列番号 101、107、及び 188 から 206 からなる群から選択される配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一である重鎖ポリペプチド、及び配列番号 105、108、及び 207 から 216 からなる群から選択される配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一である軽鎖ポリペプチドを含む。抗原結合分子は、C E A、特に膜結合 C E A に特異的である重鎖及び / 又は軽鎖可変領域を含む。一実施態様では、重鎖及び / 又は軽鎖可変領域を含む抗原結合分子は、水溶性の C E A に対する実質的な交差反応性を持たない。別の実施態様では、重鎖は更に F c 領域を含む。特定の実施態様では、F c 領域は、以下で詳細に説明するように糖鎖が操作され、N - 結合型オリゴ糖鎖のフコシル化を低下させている。

#### 【0085】

一態様において、本発明はまた、表 2 に記載された、一以上の C D R を含む単離された

10

20

30

40

50

ポリペプチドに向けられている。一実施態様において、単離されたポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 からなる群から選択される重鎖 CDR1 配列；(b) 配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、及び配列番号 24 からなる群から選択される重鎖 CDR2 配列；及び (c) 配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 からなる群から選択される重鎖 CDR3 配列を含む。一実施態様において、単離されたポリペプチドは、配列番号 107 の配列に少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一である配列を含む。別の実施態様において、本発明は、(a) 配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、及び配列番号 45 からなる群から選択される軽鎖 CDR1 配列；(b) 配列番号 46、及び配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、及び配列番号 55 からなる群から選択される軽鎖 CDR 配列；(c) 配列番号 56 の軽鎖 CDR3 を含むポリペプチドに向けられている。別の実施態様において、本発明は、(a) 配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、及び配列番号 45 からなる群から選択される軽鎖 CDR1 配列；(b) 配列番号 46、及び配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 53、配列番号 54、及び配列番号 55 からなる群から選択される軽鎖 CDR 配列；及び (c) 配列番号 56 の軽鎖 CDR3 を含むポリペプチドに向けられている。一実施態様において、単離されたポリペプチドは、配列番号 108 の配列と、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一である配列を含む。別の態様において、本発明はまた、これらのポリペプチドの何れか一をコードするポリヌクレオチド及びこれらのポリペプチドの何れか一を含む抗原結合分子に向けられている。ポリペプチドを含む抗原結合分子は、CEA、特に膜結合 CEA に対して特異的である。一実施態様では、抗原結合分子は可溶性ヒト CEA に対して実質的な交差反応性を持たない。一実施態様において、ポリペプチドは更に、ヒト重鎖及び / 又は軽鎖の定常領域を含む。別の実施態様において、ポリペプチドは、Fc 領域、より具体的には糖鎖を操作された Fc 領域を含む。特定の実施形態では、Fc 領域は本明細書で詳細に説明したように糖鎖が操作されて、N-結合型オリゴ糖鎖のフコシル化を低下させている。

#### 【0086】

別の態様において、本発明はさらに、膜結合ヒト CEA に特異的な抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドに向けられている。一実施態様において、単離されたポリヌクレオチドは、以下の表 3 に示すように 1 つ又は複数の CDR 配列、又はそれらの組み合わせを含み、ポリヌクレオチドは、抗原結合分子の一部として、特異的に CEA に結合、特に膜結合 CEA に結合するポリペプチドをコードする。一実施態様において、単離されたポリヌクレオチドは、表 5 に示された 1 つ又は複数の可変領域の配列に対し、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 同一である配列を含む。一実施態様において、本発明は、配列番号 113、119、及び 159 から 177 からなる群から選択される配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一である配列を含む第一の単離されたポリヌクレオチド、及び配列番号 117、120、及び 178 から 187 からなる群から選択される配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一である配列を含む第二の単離されたポリヌクレオチドを含む組成物に向けられている。一実施態様において、ポリヌクレオチドは、可変領域及び定常領域 (例えば、IgG 定常領域又はその断片、特に Fc 領域を含む IgG

定常領域)を含む重鎖をコードしている。一実施態様において、ポリヌクレオチドは、可変領域及び定常領域(例えば、又は定常領域)を含む軽鎖をコードしている。一実施態様では、これらの単離されたポリヌクレオチドによってコードされる抗原結合分子は可溶性ヒトCEAに対して交差反応性を実質的に有しない。

【0087】

別の実施態様において、本発明はまた、保存的アミノ酸置換を持つ配列番号101、105、107、108、及び188から216からなる群から選択される配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である配列を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドを包含し、ポリペプチド(例えば、配列番号101、107、及び188-206からなる群から選択される配列と少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチド、及び配列番号105、108、及び207-216からなる群から選択される配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるポリペプチドを含む抗原結合分子)を含む抗原結合分子は、CEA、特に膜結合CEAに特異的に結合する。一実施態様において、ポリペプチドは更に、ヒト定常領域を含む。特定の実施態様では、ポリペプチドは、ヒトFc領域を含む。より特定の実施形態では、Fc領域は糖鎖を操作されたIgGのFc領域である。

【0088】

一実施態様において、本発明は、(a)配列番号57-59及び61からなる群から選択される重鎖CDR1配列をコードする配列、(b)配列番号62-66からなる群から選択される重鎖CDR2配列、及び(c)配列番号67-77からなる群から選択される重鎖CDR3配列を含むポリヌクレオチドに向けられている。その他の実施態様において、本発明は、(a)配列番号78-88からなる群から選択される軽鎖CDR1配列をコードする配列、(b)配列番号89-97からなる群から選択される軽鎖CDR2配列、及び(c)配列番号98の軽鎖CDR3配列の配列を含むポリヌクレオチドに向けられている。

10

20

表 2

CDR		アミノ酸配列	配列番号
重鎖 CDR1	Kabat	EFGMN	1
		EYGMN	2
		EYSMN	3
		EFGMS	5
	Chothia	GYTFTEF	6
		GYTFTEY	7
	AbM	GYTFTEFGMN	8
		GYTFTEYGMN	9
		GYTFTEYSMN	10
		GYTFTEFGMS	12
重鎖 CDR2	Kabat	WINTKTGEATYVEEFKG	13
		WINTKTGEATYIEEFKG	14
		WINTKSGEATYVEEFKG	15
		YINTKNGEANYVEEFKG	16
		WINTKNGEATYIEEFKG	17
	Chothia	NTKTGEAT	18
		NTKSGEAT	19
		NTKNGEAN	20
	AbM	WINTKTGEAT	21
		WINTKSGEAT	22
		YINTKNGEAN	23
		WINTKNGEAT	24
重鎖 CDR3	Kabat Chothia and AbM	WDFYDYVEAMDY	25
		WDFYHYVEAMDY	26
		WDFVDYVEAMDY	27
		WDFYWYVEAMDY	28
		WDAFEYVKALDY	29
		WDFFEYFKTMDY	30
		WDFFYVQTMDY	31
		WDFSYYVEAMDY	32
		WDFAHYFQTMDY	33
		WDFAYYFQTMDY	34
		WDFAYYLEAMDY	35
軽鎖		KASQNVGTNVA	36

10

20

30

CDR	アミノ酸配列	配列番号
CDR1	KASANVGNNVA	37
	KASKNVGTNVA	38
	KASAAVGTYYVA	39
	KASQYASTNVA	40
	KASHNVGTNVA	41
	KASQIMGNVA	42
	KASQIVGTNVA	43
	KASQKVLNVA	44
	KASQTVSANVA	45
軽鎖 CDR2	SASYRYS	46
	YLASNLSG	47
	YLASYPQI	48
	YSASYRKR	49
	YWASYRYS	50
	YSASHRYS	51
	YLASYHES	52
	YSASHRPS	53
	YLASYRYS	54
	YLASYRYR	55
軽鎖 CDR3	HQYYTYPLFT	56

10

20

表 3

CDR	ヌクレオチド配列	配列番号
重鎖 CDR1	GGATACACCTTCACTGAGTTTGGAAATGAAC	57
	GGATACACCTTCACTGAGTATGGTATGAAC	58
	GGATACACCTTCACTGAGTATTCTATGAAC	59
	GGATACACCTTCACTGAGTTTGGAAATGAGC	61
重鎖 CDR2	TGGATAAACACCAAAACTGGAGAGGCAACATATGT TGAAGAGTTTAAGGGA	62
	TGGATAAACACCAAAACTGGAGAGGCAACATATAT TGAAGAGTTTAAGGGA	63
	TGGATAAACACCAAAAGTGGAGAGGCAACATATG TTGAAGAGTTTAAGGGA	64
	TATATAAACACCAAAAATGGAGAGGCAAACTATG TTGAAGAGTTTAAGGGA	65
	TGGATAAACACCAAAAATGGAGAGGCAACATATA TTGAAGAGTTTAAGGGA	66
重鎖 CDR3	TGGGACTTCTATGATTACGTGGAGGCTATGGACTA C	67
	TGGGACTTCTATCATTACGTGGAGGCTATGGACTA C	68
	TGGGACTTCGTGGATTACGTGGAGGCTATGGACTA C	69
	TGGGACTTCTATTGGTACGTGGAGGCTATGGACTA C	70
	TGGGACGCCTTTGAGTACGTGAAGGCGCTGGACT AC	71

30

40

CDR	ヌクレオチド配列	配列番号	
	TGGGATTTCTTTGAGTATTTAAGACTATGGACTA C	72	
	TGGGACTTTTTTTTATTACGTGCAGACTATGGACTA C	73	
	TGGGATTTTCTTATTACGTTGAGGCGATGGACTA C	74	
	TGGGACTTTGCTCATTACTTTCAGACTATGGACTA C	75	
	TGGGACTTCGCTTATTACTTTCAGACTATGGACTA C	76	10
	TGGGATTTGCGGTATTACCTTGAGGCTATGGACTA C	77	
軽鎖 CDR1	AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTTGCC	78	
	AAGGCCAGTGCCAATGTGGGTAATAATGTTGCC	79	
	AAGGCCAGTAAGAATGTGGGGACTAATGTTGCC	80	
	AAGGCCAGTGCGGCTGTGGGTACGTATGTTGCC	81	
	AAGGCCAGTCAGATAGCGAGTACTAATGTTGCC	82	
	AAGGCCAGTCACAATGTGGGTACCAACGTTGCG	83	
	AAGGCCAGTCAGATTATGGGTCCCTAATGTTGCC	84	
	AAGGCCAGTCAAATTGTGGGTACTAATGTTGCC	85	20
	AAGGCCAGTCAGAAGGTGCTTACTAATGTTGCC	86	
	AAGGCCAGTCAGACTGTGAGTGCTAATGTTGCC	87	
軽鎖 CDR2	TATTCGGCATCCTACCGCTACAGT	88	
	TATTTGGCCTCCAACCTCTCCGGT	89	
	TACCTGGCATCCTACCCCAAGATT	90	
	TATTCGGCATCCTACCGCAAAGG	91	
	TATTGGGCATCCTACCGCTATAGT	92	
	TATTCGGCATCCCACCGGTACAGT	93	
	TATTTGGCATCCTACCACGAAAGT	94	
	TATTCGGCATCCCACCGTCCAGT	95	30
	TATTTGGCATCCTACCGCTACAGT	96	
	TATTTGGCATCCTACCGCTACAGA	97	
軽鎖 CDR3	CACCAATATTACACCTATCCTCTATTACG	98	

表 4

コンストラクト	ペプチド配列	配列番号	
PR1A3 VH	QVKLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTEFGMNW VKQAPGKGLKWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFAFS LETSATTAYLQINNLKNEDTAKYFCARWDFYDYVE AMDYWGQGTITVTVSS	99	40
pEM1496 huPR1A3 VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTITVTVSS	100	
CH7A	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTITVTVSS	101	

コンストラクト	ペプチド配列	配列番号
IGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMN WVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFV FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR	102
PR1A3 VL	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAW YQQKPGQSPKALIYSASYRYSVDPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFCHQYYTYPLFTFGSGTKLEMKR T	103
pEM1495 huPR1A3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTF TISSLQPEDATYYCHQYYTYPLFSFGQGTKVEIKR	104
CL1A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK	105
IMGT_hVK_1_39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQSYSTP	106
CH7 rF9	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKSGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTITVTVSS	107
CLA1 rH11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQTVSANVAWY QQKPGKAPKLLIYLASYRYRGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT	108
PMS22	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTITVTVSS	188
1C8	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYHYVE AMDYWGQGTITVTVSS	189
3E1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFVDYVE AMDYWGQGTITVTVSS	190
2D7	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYWYVE AMDYWGQGTITVTVSS	191
親和性 成熟 重鎖	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFAHYFQ TMDYWGQGTITVTVSS	192
親和性 成熟 重鎖	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFAYYFQ TMDYWGQGTITVTVSS	193
親和性 成熟 重鎖	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFAYYLE AMDYWGQGTITVTVSS	194

10

20

30

40

コンストラクト	ペプチド配列	配列番号
H3 完全 (5) 19	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMS WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDAFEYVK ALDYWGQGTTVTVSS	195
H3 完全 (5) 8	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFFEYFK TMDYWGQGTTVTVSS	196
H3 完全 (5) 28	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFFYVQ TMDYWGQGTTVTVSS	197
H3 完全 (5) 27	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFSYYVE AMDYWGQGTTVTVSS	198
H4E9 重鎖	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYIEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	199
pAC14 (B9)	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKSGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	200
pAC15 (F9)	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKSGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	201
H1/H2 (5) 2	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEYSMN WVRQAPGQGLEWMGYINTKNGEANYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	202
H1/H2 (5) 11	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEYGMN WVRQAPGQGLEWMGWINTKNGEATYIEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	203
H1/H2 (5) 13	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTKNGEANYVEEFKGRFVF SLDASVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	204
H1/H2 (5) 14	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEYGMN WVRQAPGQGLEWMGYINTKNGEANYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDFYDYVE AMDYWGQGTTVTVSS	205
H3 Full (5) 19	QVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTEFGMS WVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRFVF SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARWDAFEYVK ALDYWGQGTTVTVSS	206
pAC21 (3A1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASANVGNNVAWY QKPKGKAPKLLIYLASNRSGGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRT	207

10

20

30

40

コンストラクト	ペプチド配列	配列番号
pAC19 (2C6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASKNVGTNVAWY QQKPGKAPKPLIYLASYPQIGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	208
pAC18 (2F1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	209
pAC23 (2F11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIASTNVAWYQ QKPGKAPKLLIYWASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	210
H4E9 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWY QQKPGKAPKPLIYSASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	211
L2D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASHNVGTNVAWY QQKPGKAPKLLIYSASHRYSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	212
pAC6 (C1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIMGPNVAWY QQKPGKAPKLLIYLASYHESVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	213
pAC7 (E10)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQIVGTNVAWY QQKPGKAPKLLIYSASHRPSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	214
pAC12 (H7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQKVLTNVAWY QQKPGKAPKLLIYLASYRYSVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	215
pAC13 (H11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQTVSANVAWY QQKPGKAPKLLIYLASYRYRGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGGTKLEIKRT	216

10

20

表 5

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
PR1A3 VH	CAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAGTTGA AGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAA GGCTTCTGGATATACCTTCACAGAATTCGGAATGA ACTGGGTGAAGCAGGCTCCTGGAAAGGGTTTAAA GTGGATGGGCTGGATAAACACCAAACTGGAGAG GCAACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGC CTTCTCTTTGGAGACCTCTGCCACCACTGCCTATTT GCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCT AAATATTTCTGTGCTCGATGGGATTTCTATGACTAT GTTGAAGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CCGTGACCGTCTCCTCA	111

30

40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
pEM1496	CAGGTGCAGCTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTGGAATGAACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG GATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGCA ACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTT CTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGC AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGACGACACTGCCGT GTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTACG TGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA	112
CH7A	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGAATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	113
IGHV7-4- 1*02	CAGGTGCAGCTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGCTATGAATT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG GATGGGATGGATCAACACCAACTGGGAACCCA ACGTATGCCAGGGCTTACAGGACGGTTTGTCTT CTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGC AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGT GTATTACTGTGCGAGA	114
PR1A3 VL	GATATCGTGATGACCCAGTCTCAAAGATTCATGTC CACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGC AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTTGCCTG GTATCAACAGAAACCAGGACAATCCCCTAAAGCA CTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGT CCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTACAGTCTGAA GACTTGGCGGAGTATTTCTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTCCGGCTCGGGACAAAGT TGGAATGAAACGTACG	115
pEM1495	GACATCCAGATGACTCAGAGCCCAAGCAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGT AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTTGCCTG GTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTG CTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGTGT GCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACC GACTTCACCTTACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGA GGACATCGCCACCTACTACTGCCACCAATATTACA CCTATCCTCTATTACGTTCCGGCCAAGGGACCAAG GTGGAAATCAAACGT	116

10

20

30

40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
CLIA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATGTTGCCTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTTCGGCATCCTACCGCTACAGTGGAGTC CCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTTGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAG	117
IMGT_hVK_1_39	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAG TACCCCT	118
CH7 rF9	CAGGTGCAATTGGTGAATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTATGGTATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACGAAATCTGGAGAGGC AACCTATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC	119
CLA1 rH11	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGACTGTGAGTGCTAATGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTACTTGGCATCCTACCGCTACAGAGGAGTC CCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTTGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	120
PMS22	CAGGTGCAATTGGTGAATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGGAAATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	159

10

20

30

40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号	
1C8	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGGAATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATCATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	160	10
3E1	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGGAATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCGTGGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	161	20
2D7	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGGAATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATTGGTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	162	30
親和性 成熟 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGGAATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTTGCTCATTAC TTTCAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA	163	40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号	
親和性 成熟 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG AATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA ACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCGCTTATTAC TTTCAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA	164	10
親和性 成熟 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG AATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA ACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGATTCGCGTATTAC CTTGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGATCACCGTCTCCTCA	165	20
H3 完全(5) 19	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG AATGAGC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA ACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCTG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACGCCTTTGAGTAC GTGAAGGCGCTGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	166	30
H3 完全(5) 8	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG AATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA ACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGATTTCTTTGAGTATT TTAAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA	167	40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号	
H3 完全 (5) 28	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG AATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA ACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTTTTTTATTACG TGCAGACTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA	168	10
H3 完全 (5) 27	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG AATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA ACTGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGATTTTCTTATTACG TTGAGGCGATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC AGTCACCGTCTCCTCA	169	20
H4E9 重鎖	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG TATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAATAACCAAAA ACTGGAGAGGC AACTTATATTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	170	30
pAC14 (B9)	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGG TATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAA AGTGGAGAGGC AACCTATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	171	40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
pAC15 (F9)	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTATGGTATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACGAAATCTGGAGAGGC AACCTATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	172
H1/H2 (5) 2	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTATTCTATGAACT GGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG GATGGGATACATAAACACCAAAAATGGAGAGGCA AACTATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCTT CTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTGC AGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCGT GTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTACG TGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA	173
H1/H2 (5) 11	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTATGGTATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAAATGGAGAGGC AACCTATATTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	174
H1/H2 (5) 13	CAGGTGCAATTGGTGC AATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGGTATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATATATAAACACCAAAAATGGAGAGGC AACTATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACGCCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	175

10

20

30

40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
H1/H2 (5) 14	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTATGGTATGAAC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATATATAAACACCAAAAATGGAGAGGC AAACTATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCCG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACTTCTATGATTAC GTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	176
H3 完全(5) 19	CAGGTGCAATTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACTGAGTTTGAATGAGC TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATAAACACCAAAAATGGAGAGGC AACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGGTTTGTCT TCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTG CAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAAGACACTGCTG TGTATTACTGTGCGAGATGGGACGCCTTTGAGTAC GTGAAGGCGCTGGACTACTGGGGCCAAGGGACCA CGGTCACCGTCTCCTCA	177
pAC21 (3A1)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTGCCAATGTGGGTAATAATGTTGCCTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTTGGCCTCCAACCGCTCCGGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	178
pAC19 (2C6)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTAAGAATGTGGGGACTAATGTTGCGTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCCC CTGATCTACCTGGCATCCTACCCCCAGATTGGAGT CCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCCCTATTCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	179
pAC18 (2F1)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTGCGGCTGTGGGTACGTATGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTCGGCATCCTACCGCAAAGGGGAGTC CCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	180

10

20

30

40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
pAC23 (2F11)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGATAGCGAGTACTAATGTTGCCTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTGGGCATCCTACCGCTATAGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	181
H4E9 軽鎖	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTTGCCTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCCCC TGATCTATTTCGGCATCCTACCGCTACAGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	182
L2D2	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCACAATGTGGGTACCAACGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTTCGGCATCCCACCGGTACAGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	183
pAC6 (C1)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGATTATGGGTCCCTAATGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTTGGCATCCTACCACGAAAGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	184
pAC7 (E10)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAAATTGTGGGTACTAATGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTTCGGCATCCCACCGTCCCAGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	185

10

20

30

40

コンストラクト	ヌクレオチド配列	配列番号
pAC12 (H7)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGAAGGTGCTTACTAATGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTATTTGGCATCCTACCGCTACAGTGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	186
pAC13 (H11)	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGACTGTGAGTGCTAATGTTGCGTGG TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAGCTCC TGATCTACTTGGCATCCTACCGCTACAGAGGAGTC CCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA GATTCGCAACTTACTACTGTCACCAATATTACAC CTATCCTCTATTCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGC TCGAGATCAAGCGTACG	187

10

20

## 【 0 0 8 9 】

## 発現ベクター及び宿主細胞

一態様において、本発明は、発現ベクター及び/又は本発明の1つ又は複数の単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞に向けられている。例えば、宿主細胞又は発現ベクターは、上記「抗CEA抗原結合分子」及び「抗CEA A B Mのポリペプチド及びポリヌクレオチド」なる表題の付いた節に記載されたA B M及び/又は変異体A B Mのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドの何れか一つ又は複数を含む。別の態様において、本発明は、特異的に膜結合ヒトCEAに結合するA B Mを産生する方法に向けられており、該方法は、前記一又は複数のポリヌクレオチドの発現を可能にする条件下の培地中で、本発明の一つ又は複数の単離されたポリヌクレオチド、又は本発明の一つ又は複数の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む宿主細胞を培養することを含み、前記一つ又は複数のポリヌクレオチドはA B Mの一部を形成する一又は複数のポリペプチドをコードし、前記A B Mを回復し、前記A B M又はその一部が同じエпитープに結合し、又はマウスモノクローナル抗体P R 1 A 3との結合に対して競合することが可能である。

30

## 【 0 0 9 0 】

一般的に、任意の型の培養細胞系が本発明のA B Mを発現するために使用され得る。好ましい実施態様において、C H O細胞、B H K細胞、N S 0細胞、S P 2 / 0細胞、Y O骨髄腫細胞、P 3 X 6 3マウス骨髄腫細胞、P E R細胞、P E R . C 6細胞又はハイブリドーマ細胞、他の哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は植物細胞が、本発明の操作された宿主細胞を生成するためにバックグラウンド細胞系として使用される。

40

## 【 0 0 9 1 】

具体的な実施態様において、宿主細胞又は発現ベクターは、マウスP R 1 A 3抗体の結合特異性を有する変異体抗体又はその断片であるA B Mをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含み、例えば、該A B MはP R 1 A 3のそれと同じエпитープに結合し、又は抗原への結合においてP R 1 A 3抗体と競合することが可能である。好ましい実施態様において、抗体は親和性が成熟している。親和性成熟抗体は、一般的に親和性成熟抗体が由来する参照抗体のそれよりも結合親和性を向上させている。別の好ましい実施態様において、抗体は、限定されないが、可溶性CEAに対して実質的に交差反応性を有さず、C

50

E A 抗原、特に膜結合 C E A に対する強い結合親和性；好ましくは用量依存的に、インビトロ及びエキソピボでの C E A 発現細胞の細胞溶解を誘導する能力；インビトロでの C E A 媒介細胞接着を阻害する能力；腫瘍組織の増殖を阻害する能力及び / 又はマウス（例えば、異種移植片マウス）の腫瘍モデルにおいて腫瘍組織の退縮を誘導する能力、を含む望ましい治療特性を持っている。別の好ましい実施態様では、変異体抗体又はその断片はヒト F c を含む。

#### 【 0 0 9 2 】

1 つの実施態様において、本発明の A B M をコードする 1 個又は数個のポリヌクレオチドが、構成的プロモーター、又は調節された発現系の制御下で発現されてもよい。適切な調節された発現系には、テトラサイクリンで調節される発現系、エクジソン誘導性発現系、lac スイッチ発現系、糖質コルチコイド誘導性発現系、温度誘導性発現系、及びメタロチオネイン金属誘導性発現系が含まれるがこれらに限定されない。本発明の A B M をコードするいくつかの異なる核酸が宿主細胞系中に含まれる場合、それらのいくつかは構成的プロモーターの制御下で発現され得るのに対して、その他は調節プロモーターの制御下で発現される。最大発現レベルは、細胞増殖速度に顕著な有害な効果をおよぼさない安定なポリペプチド発現の最高の可能なレベルであると見なされ、日常的な実験を使用して決定される。発現レベルは、A B M に特異的である抗体又は A B M に融合されたペプチドタグに特異的である抗体を使用するウェスタンブロット分析；及びノーザンブロット分析を含む、当分野において一般的に公知である方法によって決定される。さらなる代替において、このポリヌクレオチドは、レポーター遺伝子に作動可能に連結され得；本明細書に開示される A B M の発現レベルは、レポーター遺伝子の発現レベルと相関するシグナルを測定することによって決定される。このレポーター遺伝子は、単一の m R N A 分子として前記 A B M をコードする核酸と一緒に転写され得；それらのそれぞれのコード配列は、内部リボソームエンタリー部位（I R E S）によって、又はキャップ非依存性翻訳エンハンサー（C I T E）によってのいずれかで連結され得る。このレポーター遺伝子は、単一のポリペプチド鎖が形成されるように、本明細書に開示される A B M をコードする少なくとも 1 つの核酸と一緒に翻訳され得る。本発明の A B M をコードする核酸は、単一のプロモーターの制御下でレポーター遺伝子に作動可能に連結され得、その結果、A B M をコードする核酸及びレポーター遺伝子が、2 つの別々のメッセンジャー R N A（m R N A）分子に選択的スプライシングされる R N A 分子に転写される；得られる m R N A の 1 つは前記レポータータンパク質に翻訳され、そして他方が A B M に翻訳される。

#### 【 0 0 9 3 】

当業者に周知である方法が、適切な転写 / 翻訳制御シグナルとともに、マウス P R 1 A 3 抗体のそれと同じエピトープに結合する A B M のコード配列含む発現ベクターを構築するために使用され得る。これらの方法には、インビトロ組換え D N A 技術、合成技術及びインピボ組換え / 遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatis ら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) 及び Ausubel ら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates 及び Wiley Interscience, N.Y (1989) に記載される技術を参照のこと。

#### 【 0 0 9 4 】

種々の宿主発現ベクター系が本発明の A B M のコード配列を発現するために利用されてもよい。好ましくは、哺乳動物細胞が、目的のタンパク質のコード配列及び融合ポリペプチドのコード配列を含む組換えプラスミド D N A 又はコスミド D N A 発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞系として使用される。最も好ましくは、C H O 細胞、B H K 細胞、N S 0 細胞、S P 2 / 0 細胞、Y O 骨髄腫細胞、P 3 X 6 3 マウス骨髄腫細胞、P E R 細胞、P E R . C 6 細胞又はハイブリドーマ細胞、他の哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は植物細胞が、宿主細胞系として使用される。発現系及び選択方法のいくつかの例が、以下の参考文献及びその中の引用文献に記載されている。Borth ら、Biotechnol. Bioen. 71(4):266-73 (2000-2001)、Werner ら、Arzneimittelforschung/Drug Res. 48 (8):870-80 (1998)、Andersen 及び Kruppen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123 (2002

10

20

30

40

50

)、Chadd 及び Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), 及び Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001)。

【0095】

代替的な実施態様において、以下を含む、他の真核生物宿主細胞系が使用され得る。本発明の A B M のコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母細胞、例えば、米国特許出願第 60 / 344169 及び国際公開第 03 / 056914 号に教示された発現系など（ヒト以外の真核生物宿主細胞におけるヒト型様糖タンパク質の製造方法）（その各々の内容はその全体が参考として援用される）；マウス P R 1 A 3 抗体のそれと同じか、又は P R 1 A 3 と抗原結合に関して競合することができるエピトープに結合する A B M のコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；本発明の A B M のコード配列を含む、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）で感染されるか、もしくはこの配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ti プラスミド）で形質転換された植物細胞系であって、限定されないが、米国特許出願第 6815184 号（遺伝子操作されたウキクサからの生物学的に活性なポリペプチドの発現及び分泌のための方法）、国際公開第 2004 / 057002 号（糖転移酵素遺伝子の導入によるコケ植物細胞における糖タンパク質の生産）及び国際公開第 2004 / 024927 号（コケ原形質体における細胞外異種非植物タンパク質を生成する方法）、及び米国特許出願第 60 / 365,769 号、同第 60 / 368047 号及び国際公開第 2003 / 078614 号（機能的哺乳類 GnTII を酵素を含むトランスジェニック植物中の糖タンパク質プロセッシング）（各々の内容はその全体が本明細書において参考として援用される）に教授された発現系を含む；又は安定に増幅されたか（CHO / dhfr）もしくは二重微小染色体（例えば、マウス細胞系）中で不安定に増幅されたかのいずれかである、マウス P R 1 A 3 抗体のそれと同じエピトープに結合するキメラ A B M をコードする DNA の複数のコピーを含むように操作された細胞株を含む、組換えウイルス発現ベクター（例えば、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）で感染された動物細胞系。1 つの実施態様において、本発明の A B M をコードするポリヌクレオチドを含むベクターはポリシストロン性である。また、1 つの実施態様において、上記で議論した A B M は、抗体又はその断片である。好ましい実施態様において、この A B M は親和性成熟抗体である。

【0096】

本発明の方法のために、安定な発現が一過性の発現よりも好まれる。なぜなら、これは、典型的には、より再現性のある結果を達成し、及びまた、大規模な産生に対してより受け入れ可能であるからであるが、しかし、それは一過性の発現が特定の状況のためのより良いかどうかを判断する当業者の技術の範囲内にある。ウイルス起源の複製を含む発現ベクターを使用するよりはむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）によって制御されるそれぞれのコード核酸、及び選択マーカーで形質転換され得る。外来性 DNA の導入後に、操作された細胞は、富化培地中で 1 - 2 日間増殖され得、次いで、選択培地に交換される。組換えプラスミド中の選択マーカーは選択に対する耐性を付与し、それらの染色体にプラスミドを安定に組み込んだ細胞の選択を可能にし、増殖して増殖巣を形成し、これは次にはクローニングされ得、そして細胞系に拡大され得る。

【0097】

多数の選択系が使用されてもよく、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (Wigler ら、*Cell* 11:223 (1977))、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962))、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (Lowy ら、*Cell* 22:817 (1980))、これらは、 $t k^{-}$  細胞、 $h g p r t^{-}$  細胞、又は  $a p r t^{-}$  細胞中でそれぞれ利用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、メトトレキサートに対する耐性を付与する  $d h f r$  遺伝子 (Wigler ら、*Natl. Acad. Sci. U*

10

20

30

40

50

SA 77:3567 (1989); O'Hareら、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); ミコフェノール酸に対する耐性を付与する *g p t* 遺伝子(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); アミノグリコシド G - 4 1 8 に対する耐性を付与する *n e o* 遺伝子(Colberre-Garapinら、 J. Mol. Biol. 150:1 (1981)); 及びハイグロマイシンに対する耐性を付与する *h y g r o* 遺伝子(Santerreら、 Gene 30:147 (1984)についての選択の基礎として使用され得る。最近、さらなる選択遺伝子、すなわち、細胞がトリプトファン代わりにインドールを利用することを可能にする *t r p B* ; 細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする *h i s D* (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); グルタミン合成系; 及びオルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである 2 - (ジフルオロメチル) - D L - オルニチン、 D F M O に対する耐性を付与する O D C (オルニチンデカルボキシラーゼ) (McConlogue, : Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)) が記載されている。

10

【 0 0 9 8 】

本発明は更に、宿主細胞によって産生される本発明の A B M のグリコシル化のプロファイルを修飾するための方法に向けられており、前記宿主細胞中で本発明の A B M をコードする核酸、グリコシルトランスフェラーゼ活性を持つポリペプチドをコードする核酸、又はそのような核酸を含むベクターを発現することを含む。グリコシルトランスフェラーゼ活性を持つ遺伝子は、 ( 1 , 4 ) - N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼ I I ( G n T I I I )、 - マンノシダーゼ I I ( M a n I I )、 ( 1 , 4 ) - ガラクトシルトランスフェラーゼ ( G A L T )、 ( 1 , 2 ) - N - アセチルグルコサミン転移酵素 I ( G n T I )、 ( 1 , 2 ) - N - アセチルグルコサミン転移酵素 I I ( G n T I I ) を含む。一実施態様では、グリコシルトランスフェラーゼ活性を持つ遺伝子の組み合わせは、宿主細胞 (例えば、 G n T I I I 及び M a n I I ) で発現される。同様に、この方法はまた、糖転移酵素遺伝子が破壊され、あるいは不活性化されている (例えば、 1 - 6 コアフコース転移酵素をコードする遺伝子の活性がロックアウトされた宿主細胞) 宿主細胞内で A B M をコードする 1 つ又は複数のポリヌクレオチドの発現を包含する。別の実施態様において、本発明の A B M は、グリコシル化パターンを修飾する G n T I I I 活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に発現する宿主細胞内で産生することができる。特定の実施態様において、 G n T I I I 活性を有するポリペプチドは、ゴルジ常在性のポリペプチドのゴルジ体局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである。別の好ましい実施態様において、 G n T I I I 活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現する宿主細胞における本発明の A B M の発現は、増加した F c レセプター結合親和性及び、増加したエフェクター機能を持つ A B M をもたらす。したがって、一実施態様では、本発明は、 ( a ) G n T I I I 活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離された核酸; 及び ( b ) 例えば、ヒト C E A に結合し、キメラ、霊長類又はヒト化抗体等、本発明の A B M をコードする単離されたポリヌクレオチドを含有する宿主細胞に向けられている。好ましい実施態様において、 G n T I I I 活性を有するポリペプチドは、 G n T I I I の触媒ドメインを含む融合ポリペプチドであり、及びゴルジ体局在化ドメインはマンノシダーゼ I I の局在化ドメインである。このような融合ポリペプチドを生成し、増加したエフェクター機能を有する抗体を産生するためにそれらを使用するための方法は、米国仮特許出願第 6 0 / 4 9 5 1 4 2 号及び米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 4 1 8 1 7 号に開示されており、その全体の内容が参照により本明細書に明示的に援用される。特定の実施態様では、宿主細胞によって生成された修飾された A B M は、 I g G 定常領域又は F c 領域を含むその断片を有する。別の特定の実施形態では A B M は、ヒト化抗体又はその F c 領域を含む断片である。

20

30

40

【 0 0 9 9 】

本発明の宿主細胞によって産生される改変されたグリコシル化を持つ A B M は、典型的には、宿主細胞の修飾の結果として (例えば、糖転移酵素遺伝子の発現により)、増加した F c レセプター結合親和性及び / 又は増加したエフェクター機能を示す。好ましくは、

50

増加したFcレセプター結合親和性は、FcRIIIaレセプター等のFc活性化レセプターへの結合が増加している。増加したエフェクター機能は、好ましくは、以下の1つ以上の増加である：増加した抗体依存性細胞傷害、増加した抗体依存性細胞貪食(ADCP)、増加したサイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体介在性抗原取り込みの増加、Fc依存性細胞傷害の増加、NK細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、多形核白血球(多形核白血球)への結合の増加、単球への結合の増加、標的に結合した抗体の架橋の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、樹状細胞の成熟の増加、及びT細胞プライミングの増加。

#### 【0100】

抗体依存性細胞傷害を含む増加したエフェクター機能を有するABMSの生成及び使用一態様において、本発明は、マウスPR1A3抗体と同じエピトープを結合し、抗体依存性細胞傷害性を含めて、増加したエフェクター機能を有するABMのグリコフォーム(例えば、変異体ABM)を提供する。抗体のグリコシル化の操作は、以前に記載されている。例えば、米国特許第6602684号を参照、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。グリコシル化に關与する遺伝子の活性を改変した宿主細胞由来のABMの産生方法も詳細に本明細書中に記載される。(例えば、「発現ベクター及び宿主細胞」なる題名の次の節を参照)。本発明のABMSのADCCの増加はまた、親和性成熟又は親和性を向上させる他の方法で、膜結合CEAに対する抗原結合分子の親和性を増加させることによって達成される(Tangら、J. Immunol. 2007, 179:2815-2823を参照)。これらのアプローチの組み合わせも本発明に包含される。

10

20

#### 【0101】

いくつかの型の癌の治療のための非結合体化モノクローナル抗体(mAb)の臨床試験が、最近、有望な結果を生じてきている。Dillman、Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25(1997); Deoら、Immunology Today 18:127(1997)。キメラの非結合体化IgG1は、軽度又は濾胞性のB細胞非ホジキンリンパ腫のために認可されており(Dillman、Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25(1997))、一方別の非結合体化mAbである、ヒト化IgG1標的化固形胸部腫瘍はまた、フェーズIII臨床試験において有望な結果を示している。Deoら、Immunology Today 18:127(1997)。これらの2つのmAbの抗原は、それぞれの腫瘍細胞中で高度に発現され、そして抗体は、インビトロ及びインビボにおいてエフェクター細胞による潜在的な腫瘍破壊を媒介する。対照的に、微細な腫瘍特異性を有する多くの他の非結合mAbは、臨床的に有用であるために十分な効力のエフェクター機能を誘発することができない。Frostら、Cancer 80:317-33(1997); Surfusら、J. Immunother. 19:184-91(1996)。これらのより弱いmAbのいくつかについて、補助サイトカイン治療が現在試験されている。サイトカインの付加は、循環しているリンパ球の活性及び数を増加させることによって、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を刺激し得る。Frostら、Cancer 80:317-33(1997); Surfusら、J. Immunother. 19:184-91(1996)。ADCC、抗体標的化細胞に対する溶解性攻撃は、抗体の定常領域(Fc)への白血球レセプターの結合の際に誘発される。Deoら、Immunology Today 18:127(1997)。

30

#### 【0102】

非結合体化IgG1sのADCC活性を増加させるための、異なるが補完的なアプローチは、抗体のFc領域を操作することである。タンパク質操作研究は、FcRがIgGC<sub>H</sub>2ドメインのより下位のヒンジ領域と相互作用することを示してきた。Lundら、J. Immunol. 157:4963-69(1996)。しかし、FcR結合はまた、C<sub>H</sub>2領域における保存性Asn297に共有結合されたオリゴ糖の存在を必要とする。Lundら、J. Immunol. 157:4963-69(1996); Wright及びMorrison、Trends Biotech. 15:26-31(1997)、いずれかオリゴ糖及びポリペプチドの両方が相互作用部位に直接的に寄与すること、又はオリゴ糖が、活性なC<sub>H</sub>2ポリペプチドコンホメーションを維持するために必要とされることを示唆する。それゆえに、オリゴ糖構造の修飾は、相互作用の親和性を増加するための手段として探求され得る。

40

#### 【0103】

50

I g G分子は、そのF c領域中に2つのN連結オリゴ糖を有し、これは各重鎖に1つである。いかなる糖タンパク質とも同様に、抗体は、同じポリペプチドバックボーンを共有するが、グリコシル化部位に結合された異なるオリゴ糖を有する糖型の集団として産生される。血清I g GのF c領域中に通常見出されるオリゴ糖は、複合体二分岐型(Wormaldら、*Biochemistry* 36:130-38(1997))であり、低レベルの末端シアル酸及び二分枝N - アセチルグルコサミン(G l c N A c)、ならびに変動する程度の末端ガラクトシル化及びコアフコシル化を有する。いくつかの研究は、F c R結合のために必要とされる最小の炭水化物構造はオリゴ糖コア中に存在することを示唆する。Lundら、*J. Immunol.* 157:4963-69(1996)。

#### 【0104】

非結合体化治療用m A bの産生のために産業界及び学術研究において使用されるマウス又はハムスター由来の細胞系は、通常、必要とされるオリゴ糖決定基をF c部位に結合する。しかし、これらの細胞系において発現されるI g Gは、血清I g Gにおいて少量見出される二分枝G l c N A cを欠いている。Lifelyら、*Glycobiology* 318:813-22(1995)。対照的に、ラット骨髄腫により産生されるヒト化I g G 1 (C A M P A T H - 1 H) が、いくつかのその糖型で二分枝G l c N A cを有したことが最近観察された。Lifelyら、*Glycobiology* 318:813-22(1995)。ラット細胞由来の抗体は、C A M P A T H - 1 H抗体が標準的な細胞系において産生されるにつれて、同様の最大インビトロA D C C活性に到達したが、有意に低い抗体濃度であった。

#### 【0105】

C A M P A T H抗原は、通常、リンパ腫細胞上で高レベルで存在し、このキメラm A bは、二分枝G l c N A cの非存在下で高いA D C C活性を有する。Lifelyら、*Glycobiology* 318:813-22(1995)。N連結グリコシル化経路において、二分枝G l c N A cはG n T I I Iによって加えられる。Schachter、*Biochem. Cell Biol.* 64:163-81(1986)。

#### 【0106】

以前の研究は、異なるレベルのクローニングしたG n T I I I遺伝子酵素を、外部から調節される様式で発現するように以前に操作された単一の抗体産生C H O細胞系を使用した。(Umana, P.ら、*Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999))。このアプローチは、グリコシルトランスフェラーゼ(例えばG n T I I I)の発現と、修飾抗体のA D C C活性との間の厳格な相関を最初に確立した。従って、本発明は、F c領域又はA B M産生宿主細胞においてグリコシルトランスフェラーゼの発現レベルを変化させることに由来する改変されたグリコシル化を有するF c領域に等価な領域を含む、マウスP R 1 A 3抗体のそれと同じエピトープに結合する変異体A B M(例えば親和性成熟A B M)を熟考する。特定の実施態様にて、遺伝子発現レベルの変化はG n T I I I活性の増加である。G n T I I I活性の増加は、二分枝オリゴ糖のパーセンテージの増加、ならびにA B MのF c領域中のフコース残基のパーセンテージの減少を生じる。この抗体又はその断片は、F cレセプター結合親和性の増加及びエフェクター機能の増加を有する。

#### 【0107】

本発明はまた、宿主細胞中に修飾オリゴ糖を有する、本発明のA B Mを産生するための方法に向けられ、この方法は、(a)本発明に従うA B Mの産生を可能にする条件下でグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸を発現するように操作された宿主細胞を培養し、ここで、このグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、この宿主細胞によって産生されるこのA B MのF c領域においてオリゴ糖を修飾するために十分な量で発現され；及び(b)このA B Mを単離することを含む。一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、G n T I I Iである。その他の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する2つのポリペプチドがある。特定の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する2つのペプチドは、G n T I I I及びM a n I I Iである。別の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドはG n T I I Iの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドである。より具体的な実施態様におい

10

20

30

40

50

て、融合ポリペプチドはさらに、ゴルジ常在ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む。好ましくは、このゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼ I 又は G n T I の局在化ドメインである。代替的には、このゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼ I の局在化ドメイン、G n T I I の局在化ドメイン、及び 1 - 6 コアフコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群より選択される。本発明の方法によって産生される A B M は、F c レセプター結合親和性の増加及び / 又はエフェクター機能の増加を有する。一般的に、エフェクター機能の増加は、以下の 1 つ以上である。F c 媒介性細胞傷害性の増加（抗体依存性細胞傷害性の増加を含む）、抗体依存性細胞食作用（A D C P）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、N K 細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、標的結合抗体の架橋の増加、樹状細胞成熟の増加、又は T 細胞プライミングの増加。F c レセプター結合親和性の増加は、好ましくは、F c R I I I a などの F c 活性化レセプターへの結合の増加である。特に好ましい実施態様において、A B M はヒト化抗体又はその断片である。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 0 8 】

1 つの実施態様において、A B M の F c 領域における二分枝 N 結合オリゴ糖のパーセンテージは、全体のオリゴ糖の、少なくとも約 1 0 % から約 1 0 0 %、特に少なくとも約 5 0 %、より具体的には、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、又は少なくとも約 9 0 - 9 5 % である。さらに別の実施態様において、本発明の方法により産生された抗原結合分子は、本発明の方法により、その糖鎖の修飾の結果として、F c 領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。一実施態様において、非フコシル化オリゴ糖のパーセンテージは、少なくとも約 2 0 % から約 1 0 0 %、具体的には少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 % から約 7 0 %、及びより具体的には、少なくとも約 7 5 % である。非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド型又は複合型であり得る。更に別の実施態様において、本発明の方法により産生された抗原結合分子は、本発明の方法により、その糖鎖の修飾の結果として、F c 領域で二分枝オリゴ糖の割合が増加している。一実施態様において、二分枝糖鎖のパーセンテージは少なくとも約 2 0 % から約 1 0 0 %、具体的には少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 % から約 7 0 %、及びより具体的には、少なくとも約 7 5 % である。特に好ましい実施態様において、本発明の宿主細胞及び方法により産生された A B M は、F c 領域内の二分枝の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。二分枝の、非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体であり得る。具体的には、本発明の方法は、抗原結合分子を産生するために使用され得、抗原結合分子の F c 領域のオリゴ糖の少なくとも約 1 0 % から約 1 0 0 %、具体的には少なくとも約 1 5 %、より具体的には少なくとも約 2 0 % から約 5 0 %、より具体的には少なくとも約 2 0 % から約 2 5 %、及びより具体的には少なくとも約 3 0 % から約 3 5 % が二分枝され、非フコシル化されている。本発明の A B M S はまた、A B M の F c 領域のオリゴ糖の少なくとも約 1 0 % から約 1 0 0 %、具体的には少なくとも約 1 5 %、より具体的には少なくとも約 2 0 % から約 2 5 %、及びより具体的には少なくとも約 3 0 % から約 3 5 % が二分枝され、非フコシル化されている F c 領域を含み得る。

#### 【 0 1 0 9 】

別の実施態様において、本発明は、本発明の方法によって産生される、エフェクター機能の増加及び / 又は F c レセプター結合親和性の増加を有するように操作された膜結合ヒト C E A に対する P R 1 A 3 抗体と競合できる抗原結合分子（例えば、変異体 A B M）に向けられる。エフェクター機能の増加は、限定されないが、以下の一つ又は複数を含み得る：F c 媒介性細胞傷害性の増加（抗体依存性細胞傷害性の増加を含む）、抗体依存性細胞食作用（A D C P）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、N K 細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、標的結合抗体の架橋の増加、樹状細胞成熟の増加、又は T 細胞プライミングの増加。好ましい実施態様において、F c レセプター結合親和性の増加は、F c 活性化レ

セプター、最も好ましくはFc R I I I aへの結合の増加である。1つの実施態様において、抗原結合分子は抗体、Fc領域を含む抗体断片、又は免疫グロブリンのFc領域に対して等価である領域を含む融合タンパク質である。特に好ましい実施態様において、抗原結合分子はヒト化親和性成熟抗体である。

#### 【0110】

本発明はさらに、抗体依存性細胞傷害を含み、Fcレセプター結合親和性を増加させ、好ましくは、Fc活性化レセプターへの結合を増加させ、及び/又はエフェクター機能を増加させた、本発明のABMのグリコフォームの生産のための宿主細胞系の生成及び使用のための方法を提供する。本発明にABMで使用される糖鎖操作の方法論は、米国特許第6602684号、米国特許出願公開第2004/0241817(A1)号、米国特許出願公開第2003/0175884(A1)号、米国仮特許出願第60/441307号、及び国際公開第2004/065540号により詳細が記載されており、その各々の内容全体が参照によりその全体が本明細書に援用される。本発明のABMは、別の方法として米国特許出願公開第2003/0157108号(ジェネンテック)、又は欧州特許第1176195(A1)号、国際公開第03/084570号、同第03/085119号、及び米国特許出願公開第2003/0115614号、同2004/093621号、同2004/110282号、同2004/110704号、同2004/132140号(Kyowa)に開示された技術に従って、Fc領域にフコース残基を減少させるように糖鎖を操作することができる。これらの文書の各々の内容は、参考により本明細書にその全体が援用される。本発明の糖鎖を操作されたABMは、また、米国特許出願公開第60/344169号、及び国際公開第03/056914号(GlycoFi, Inc.)又は国際公開第2004/057002号及び国際公開第2004/024927号(Greenovation)に教示されたように、修飾された糖タンパク質を生産する発現系において生成することができ、その各々の内容はここにその全体が参考により援用される。

10

20

#### 【0111】

グリコシル化パターンの変化を有するタンパク質の産生のための細胞系の生成

一態様にて、本発明は、グリコシル化パターンの修飾を有する本発明のABMの生成のための宿主発現系を提供する。特に、本発明は、改善された治療的価値を有する本発明のABMの糖型の生成のための宿主細胞系を提供する。それゆえに、本発明は、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを発現するように選択又は操作された宿主細胞発現系を提供する。一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性はGnT I I I活性である。一実施態様において、GnT I I I活性を有するポリペプチドは、異種ゴルジ存在性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである。詳細には、このような宿主細胞発現系は、構成的又は調節されるプロモーター系に作動可能に連結された、GnT I I Iを有するポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含むように操作され得る。

30

#### 【0112】

1つの特定の実施態様において、本発明は、GnT I I I活性を有し、かつ異種ゴルジ存在性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸を発現するように操作されている宿主細胞を提供する。1つの態様において、宿主細胞は、GnT I I I活性を有し、かつ異種ゴルジ存在性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする少なくとも1つの遺伝子を含む核酸分子で操作されている。

40

#### 【0113】

一般的に、上記に議論される細胞系を含む任意の型の培養細胞系が、本発明の宿主細胞株を操作するためにバックグラウンドとして使用され得る。好ましい実施態様において、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞又はハイブリドーマ細胞、他の哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は植物細胞が、本発明の操作された宿主細胞を生成するためにバックグラウンド細胞系として使用される。

50

## 【0114】

本発明は、本明細書に定義されるような異種ゴルジ存在性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドを含む、G n T I I I 活性などのグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを発現する任意の操作された宿主細胞を含むことを意図する。

## 【0115】

グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばG n T I I I 活性を有するポリペプチドをコードする1つ又はいくつかの核酸が、構成的プロモーター又は代替的には、調節された発現系の制御下で発現され得る。このような系は当該技術分野において周知であり、これは上記に議論した系を含む。グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばG n T I I I 活性を有し、かつ異種ゴルジ存在性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドをコードするいくつかの異なる核酸が宿主細胞系中に含まれる場合、それらのいくつかは構成的プロモーターの制御下で発現され得るのに対して、その他は調節されるプロモーターの制御下で発現される。グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばG n T I I I 活性を有する融合ポリペプチドの発現レベルは、ウェスタンブロット分析、ノーザンブロット分析、レポーター遺伝子発現分析、又はグリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばG n T I I I 活性の測定を含む、当該技術分野において一般的に公知である方法によって決定される。代替的には、G n T I I I の生合成産物に結合するレクチン、例えば、E<sub>4</sub>-PHAレクチンが利用されてもよい。代替的には、グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばG n T I I I 活性を有するポリペプチドをコードする核酸で操作された細胞によって産生される抗体によって媒介される、Fcレセプター結合の増加又はエフェクター機能の増加を測定する機能的アッセイが使用されてもよい。

10

20

## 【0116】

グリコシル化パターンの修飾を有するタンパク質を発現するトランスフェクト体又は形質転換体の同定

P R 1 A 3 抗体と抗原結合に対して競合する能力を有する変異体A B M (例えばヒト化、親和性成熟A B M)のコード配列を含み、かつ生物学的に活性な遺伝子産物を発現する宿主細胞は、少なくとも4つの一般的アプローチ：(a)DNA-DNA又はDNA-RNAのハイブリダイゼーション；(b)「マーカー」遺伝子機能の存在又は非存在；(c)宿主細胞中のそれぞれのmRNA転写物の発現によって測定されるような転写物のレベルを評価すること；及び(d)免疫アッセイによって、又はその生物学的活性によって測定されるような遺伝子産物の検出によって同定されてもよい。

30

## 【0117】

第1のアプローチにおいて、P R 1 A 3 抗体と競合できる変異体A B Mのコード配列及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えばG n T I I I)活性を有するポリペプチドのコード配列の存在は、それぞれのコード配列、又はその部分もしくは誘導体それぞれに相同であるヌクレオチド配列を含むプローブを使用するDNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーションによって検出され得る。

## 【0118】

第2のアプローチにおいて、組換え発現ベクター/宿主系は、特定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、メトトレキサートに対する耐性、形質転換表現型、パキユロウイルスにおける顆粒体形成など)の存在又は欠如に基づいて同定及び選択され得る。例えば、本発明のA B Mのコード配列又はその断片、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えばG n T I I I)活性を有するポリペプチドのコード配列がベクターのマーカー遺伝子配列中に挿入される場合、それぞれのコード配列を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の欠如によって同定され得る。代替的には、マーカー遺伝子は、コード配列の発現を制御するために使用される同じか又は異なるプロモーターの制御下でコード配列とともにタンデムに配置され得る。誘導又は選択に回答したマーカーの発現は、本発明のA B Mのコード配列及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えばG n T I I I)活性を有するポリペプチドのコード配列の発現を示す。

40

50

## 【0119】

第3のアプローチにおいて、本発明のABMのコード領域、又はその断片、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えばGnTII)活性を有するポリペプチドのコード配列についての転写活性は、ハイブリダイゼーションアッセイによって評価され得る。例えば、RNAは、本発明のABMのコード配列又はその断片、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えばGnTII)活性を有するポリペプチドのコード配列又はその特定の部分に相同であるプローブを使用するノーザンブロットによって単離及び分析され得る。代替的には、宿主細胞の全体の核酸は、抽出され得、及びこのようなプローブへのハイブリダイゼーションについてアッセイされ得る。

## 【0120】

第4のアプローチにおいて、タンパク質産物の発現が、例えば、ウェスタンブロット、放射性免疫沈降、酵素結合免疫アッセイなどの免疫アッセイによって、免疫学的に評価され得る。しかし、発現系の成功の究極的な試験は、生物学的に活性な遺伝子産物の検出を含む。

## 【0121】

抗原結合分子の抗CEAを使用する治療への応用と方法

本発明はまた、CEAを発現する細胞をインビボ又はインビトロで標的とするための方法に向けられている。CEAを発現する細胞を治療目的のために標的とすることができる(例えば、免疫系による破壊のためCEA発現細胞を標的とすることで疾患を治療するために)。一実施態様において、本発明は、被験体に、本発明のABMを含む組成物を投与することを含み、CEAを発現する細胞を標的とするための方法に向けられている。CEAを発現する細胞また、診断目的のために標的とされ得る(例えば、それらがCEAを正常又は異常に発現しているかどうかを決定することなど)。従って、本発明はまた、CEAの存在又はCEAを発現する細胞を検出するための方法に向けられている。本発明によればCEAの発現を検出する方法は、ABM及びCEAとの複合体の形成を可能にする条件下で、テストする試料を必要に応じてコントロール試料と、本発明のABMと、接触させることを含む。複合体形成は、その後(例えば、ELISA又は当技術分野で公知の他の方法により)検出される。試験試料とともにコントロール試料を用い、試験試料及びコントロール試料を比較する場合、ABM-CEA複合体の形成における任意の統計的な有意差は、被験試料中のCEAの存在を示している。

## 【0122】

一態様において、本発明のABMは、CEAを発現する標的細胞をインビボ又はインビトロで使用することができる。CEAを発現する細胞は、診断又は治療目的のために標的とすることができる。一態様において、本発明のABMは、試料中のCEAの存在を検出するために使用することができる。CEAは同一細胞型の非腫瘍組織に比べて多くのヒト腫瘍で異常に発現される(例えば、過剰発現される)。従って、本発明のABMは、腫瘍形成の予防、腫瘍の根絶及び腫瘍増殖又は転移の阻害に特に有用である。本発明のABMはまた、細胞周期を停止し、標的細胞(例えば、腫瘍細胞)のアポトーシスを引き起こし、血管新生及び/又は標的細胞の分化を阻害することに作用する。本発明のABMは、CEAを発現する任意の腫瘍を治療するために使用することができる。本発明のABMで治療することができる特定の悪性腫瘍としては、限定されないが、大腸癌、非小細胞肺癌、胃癌、膵臓癌及び乳癌を含む。

## 【0123】

本明細書に開示された抗CEA ABMは、腫瘍増殖を阻害又は腫瘍細胞を殺すために単独で使用することができる。例えば、抗CEA ABMsは、癌細胞の細胞膜又は細胞表面上にあるCEAに結合することができ、癌細胞の、例えば、ADCC又は他のエフェクターが媒介する死滅を誘発する。抗CEA ABMsは、ヒト化することができ、具体的には、親和性成熟し、より具体的には、糖鎖が操作され、親和性が成熟され得る。

## 【0124】

ABMは、代わりに、特に物理的に別の化合物の結合を妨害することにより、CEA抗

10

20

30

40

50

原の活性をブロックするために単独で使うことができる。例えば、抗原結合分子は、C E A が介在する細胞接着をブロックするために使うことができる。

【0125】

本発明の抗 C E A A B M S は、例えば以下に説明する薬学的に許容される剤形で、一定期間のボラス投与として又は連続注入としてヒト静脈内に投与することができるものを含み、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、又は吸入経路により、哺乳動物、好ましくはヒトに投与される。A B M も局所的並びに、全身の治療効果を発揮するために、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、又は病変部周囲の経路により適切に投与される。腹腔内経路は、例えば、大腸腫瘍の治療に特に有用であることが期待されている。

10

【0126】

病気の治療のために、A B M の適切な用量は、治療する疾患の種類、疾患の重篤度及び経過、以前の治療、患者の病歴及び抗体に対する応答、及び主治医の裁量に依存する。A B M は、一回、又は一連の治療にわたって患者に適切に投与される。

【0127】

本発明は、C E A を発現する腫瘍細胞を選択的に死滅させるための方法を提供する。この方法は、本発明の抗原結合分子又は複合体（例えば、免疫毒素）を前記腫瘍細胞と反応させることを含む。これらの腫瘍細胞は、大腸癌、非小細胞肺癌（N S C L C）、胃癌、膵臓癌、及び乳癌を含むヒト癌に由来し得る。

20

【0128】

一実施態様において、本発明は、腫瘍細胞の C E A 介在細胞接着を阻害する方法を提供する。この方法は、前記腫瘍細胞を本発明の抗原結合分子又はコンジュゲートと接触させることを含む。これらの腫瘍細胞は、大腸癌細胞、非小細胞肺癌細胞（N S C L C）、胃癌細胞、膵臓癌細胞及び乳癌細胞を含むヒト細胞に由来しうる。

【0129】

さらに、本発明は、インビボで癌（例えば、ヒト癌）を治療する方法を提供する。この方法は、被験体に本発明の抗原結合分子又は免疫複合体（例えば、免疫毒素）の少なくとも 1 つを含有する組成物の薬学的有効量を投与することを包含する。

【0130】

さらなる態様において、本発明は、限定されないが、大腸癌細胞、N S C L C（非小細胞肺癌）、胃癌細胞、膵臓癌細胞及び乳癌細胞を含む、C E A の過剰発現によって特徴付けられた癌を、本明細書に開示されたヒト化及び親和性成熟した抗原結合分子又はその変異体抗原結合分子の治療有効量を投与することにより、治療するための方法に向けられている。

30

【0131】

さらなる実施態様において、本発明は、本明細書に開示された、ヒト化及び親和性成熟した抗原結合分子又は変異体抗原結合分子を使用して、被検体に腫瘍組織の退縮を誘導するための方法に向けられている。非限定的な腫瘍組織の例としては、大腸腫瘍、非小細胞肺癌の腫瘍、胃腫瘍、膵腫瘍及び乳腺腫瘍が含まれる。特定の実施態様では、腫瘍組織は大腸腫瘍である。

40

【0132】

本発明の実施に応じて、被験体は、ヒト、ウマ、ブタ、ウシ、ネズミ、イヌ、ネコ、鳥の被験体であり得る。他の温血動物もまた本発明に含まれる。

【0133】

本発明はさらに、腫瘍細胞の増殖を阻害し、被験体の腫瘍を治療し、被検体の増殖型の疾患を治療するための方法を提供する。これらの方法は、被検体に本発明の組成物の有効量を投与することを含む。

【0134】

別の態様において、本発明は、異常な C E A の発現に関連した疾患を治療するための医薬の製造のために、本明細書に開示されるヒト化及び親和性成熟抗原結合分子又は変異体

50

抗原結合分子の使用に向けられている。特定の実施態様では、疾患は、限定されないが、大腸腫瘍、非小細胞肺腫瘍、胃腫瘍、膵腫瘍及び乳腺腫瘍を含む、C E Aを過剰発現する癌である。特定の実施態様では、腫瘍は大腸腫瘍である。

【0135】

組成物、製剤、投与量、及び投与経路

一態様において、本発明は、本発明のA B M Sを含む薬学的組成物及び薬学的に許容される担体に向けられている。本発明は更に、癌などの疾患の治療法、及び癌などの疾患の治療のための医薬の製造における、そうした薬学的組成物の使用に向けられている。具体的には、本発明は、疾患の治療のための方法、より具体的には、癌の治療のための方法に向けられており、該方法は本発明の薬学的組成物の治療有効量を投与することを含む。

10

【0136】

一態様において、本発明は、薬学的組成物、組み合わせ、ヒト癌、例えば、大腸癌を治療するための方法を包含する。例えば、本発明は、本発明の抗体の薬学的有効量、及び薬学的に許容される担体を含むヒト癌の治療に使用するための薬学的組成物を含む。

【0137】

本発明のA B M組成物は、限定されないが、静脈内、腹腔内、経口、リンパ内を含む従来の投与形式、又は直接腫瘍への投与を用いて投与される。静脈内投与が好ましい。

【0138】

本発明の一態様において、本発明のA B Mを含む治療用製剤は、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、任意の薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤(RemingtonのPharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と所望の純度を有する抗体を混合することにより、貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、用いる投与量及び濃度でレシピエントに非毒性である。

20

【0139】

インピボ投与に使用されるべき製剤は無菌でなければならない。これは滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。

【0140】

本発明の薬学的組成物の投与及び投薬レジメンの最も効果的な機序は、疾患の重症度及び経過、患者の健康及び治療への応答、及び治療にあたる医師の判断に依存する。従って、組成物の投与量は、個々の患者に対して滴定する必要がある。にも関わらず、この発明の組成物の有効用量は通常、約0.01mg/kgから約2000mg/kgの範囲になり得る。

30

【0141】

本明細書に記載の分子は、様々な剤形であり得、限定されないが、液体溶液又は懸濁液、錠剤、丸剤、散剤、坐剤、高分子マイクロカプセル又は微小胞、リポソーム、及び注射可能溶液又は注入可能溶液を含む。好ましい形態は、投与方法及び治療への適用に依存する。

【0142】

本発明のA B Mを含む組成物は、処方され、服用され、良好な医療行為の一貫した方法で投与される。この文脈において検討するための要因は、治療される特定の疾患又は障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の病態、疾患又は障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、管理のスケジューリング、及び開業医に知られているその他の要因を含む。投与されるべきアンタゴニストの治療的有效量は、そうした考慮に左右される。

40

【0143】

以下の例は、本発明をより詳細に説明する。以下の調製及び実施例は、当業者が本発明をより明確に理解し、実施することができるように与えられる。本発明は、しかしながら、例示の実施態様による範囲に限定されるものではなく、本発明の単一側面の実例として意図されており、及び機能的に同等な方法は、本発明の範囲内である。実際に、本明細書に記載されたものに加えて、本発明の様々な変更が前述の説明及び添付図面から当業者に明確になるであろう。そのような修飾は、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図され

50

ている。

【実施例】

【0144】

特に指定されない限り、以下の実施例の特定のアミノ酸残基の位置の番号への参照は、K a b a tの番号付けシステムに従っている。

実施例 1

親和性成熟ライブラリの生成

H 1 / H 2 ライブラリー

H C D R 1 及び H C D R 2 領域における無作為化された親和性成熟ライブラリの生成のために、C D R 1 中の位置 F 3 2 G 3 3、C D R 2 中の位置 W 5 0 N 5 2 T 5 2 a K 5 2 b T 5 4 E 5 6 T 5 8 をコード化するトリプレットが無作為に選ばれた。最初の工程で、D N A 断片 (断片 1) は、テンプレートとして p M S 2 2 及び無作為化 C D R 1 の位置を含むプライマー M S - 4 3 と E A B - 6 7 9 (図 1 1 及び表 6) を用いて増幅された。同じテンプレートを使用して、プライマー M S - 5 6 及び M S - 5 2 は、断片 1 の 3' 末端との重複領域を有する第二断片 (断片 2) を増幅した。増幅条件は、最初の 5 分間 9 4 でのインキュベーション工程が含まれ、その後、断片 1 及び断片 2 のそれぞれにおいて、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング、及び 2 0 秒間及び 5 0 秒間の 7 2 伸長工程を含む各サイクルが 2 5 サイクル続いた。最後に、最終の 1 0 分間 7 2 のインキュベーション工程が実施された。両断片はアガロースゲル上で精製された。プライマー M S - 4 3 と E A B - 6 8 0 を使用して、断片 1 と 2 による重複伸長 P C R は、C D R 2 の無作為化位置を含み、無作為化された両方の C D R を持つ断片を生成した (断片 3)。断片 1 及び 2 のアセンブリに対して、断片 1 及び断片 2 の等モル量を使用した。増幅条件は、最初の 5 分間 9 4 のインキュベーション工程を含み、その後プライマー無しで、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング、及び 4 0 秒間 7 2 の伸長工程の各サイクルが 5 サイクル続いた。外側のプライマーを添加した後、さらに 2 0 サイクルが同じパラメータを用いて実施された。断片 3 の 3' 領域と重なった第 4 断片 (断片 4) が、テンプレートとして再び p M S 2 2、及びプライマー M S - 5 5 及び M S - 5 2 を用いた P C R 増幅された。ゲル精製した後、最終的なオーバーラップ伸長 P C R は、テンプレートとして断片 3 及び 4、及びプライマー M S - 4 3 及び M S - 5 2 を使用して、C L 及び V H の一部分を含む断片を生成した。このために、断片 3 及び断片 4 の等モル量を用いた。増幅条件は最初の 5 分間 9 4 インキュベーション工程を含み、その後プライマー無しで、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング、及び 8 0 秒間 7 2 の伸長工程を含む各サイクルが 5 サイクル続いた。外側のプライマーを添加した後、更に 2 0 サイクルが同じパラメータを用いて実施された。得られた断片は次いでゲル精製及び N c o I / N h e I 消化後に p M S 2 2 と連結された。

【0145】

10

20

30

表 6

プライマー	配列番号	H1/H2 ライブラリープライマーヌクレオチド配列
MS-43	123	CCAGCCGGCCATGGCCGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATC
MS-52	124	GAAGACCGATGGGCCTTTGGTGCTAG
MS-55	125	GCAACATATGTTGAAGAGTTTAAGGGACGG
MS-56	126	ATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTG
EAB-679	127	CAGGGGCCTGTCGCACCCAGTTCATMNNAWACTCAGTGAAG GTGTATCCAGAAGCC
EAB-680	128	CCGTCCCTTAAACTCTTCAACATAGGTTGCCTCTCCAGTTTTG GTGTTTATCCATCCCATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGG

10

プライマーEAB-679及びEAB-680の無作為化:

下線:60%がオリジナルな塩基で40%がNとして無作為化

## 【 0 1 4 6 】

## L 1 / L 2 ライブラリー

LCDR 1 及びLCDR 2 領域における無作為化された親和性成熟ライブラリーの生成のために、CDR 1 中の位置 Q 2 7、N 2 8、V 2 9、G 3 0 T 3 1 N 3 2、CDR 2 中の位置 Y 4 9 S 5 0 Y 5 3 R 5 4 Y 5 5 S 5 6 をコード化するトリプレットが無作為に選ばれた。最初の工程で、DNA 断片 (断片 1) は、テンプレートとして pMS 2 2 及び無作為化 CDR 1 の位置を含むプライマー EAB - 6 8 5 及び EAB - 6 8 1 (図 1 2 及び表 6) を用いて増幅された。同じテンプレートを使用して、プライマー EAB - 6 8 6 及び EAB - 6 8 7 は、断片 1 の 3' 末端との重複領域を有する第二断片 (断片 2) を増幅した。増幅条件は、最初の 5 分間 9 4 でのインキュベーション工程が含まれ、その後、断片 1 及び断片 2 のそれぞれにおいて、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング、及び 6 0 秒間 7 2 の伸長工程を含む各サイクルが 2 5 サイクル続いた。最後に、最終の 1 0 分間 7 2 のインキュベーション工程が実施された。両断片はアガロースゲル上で精製された。プライマー EAB - 6 8 5 及び EAB - 6 8 2 を使用して、断片 1 と 2 による重複伸長 PCR は、CDR 2 の無作為化位置を含み、無作為化された両方の CDR を持つ断片を生成した (断片 3)。断片 1 及び 2 のアセンブリに対して、断片 1 及び断片 2 の等モル量を使用された。増幅条件は、最初の 5 分間 9 4 のインキュベーション工程を含み、その後プライマー無しで、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング、及び 6 0 秒間 7 2 の伸長工程の各サイクルが 5 サイクル続いた。外側のプライマーを添加した後、さらに 2 0 サイクルが同じパラメータを用いて実施された。断片 3 の 3' 領域と重なった第 4 断片 (断片 4) が、テンプレートとして再び pMS 2 2、及びプライマー EAB - 6 8 8 及び EAB - 6 8 7 を用いた PCR 増幅された。ゲル精製した後、最終的なオーバーラップ伸長 PCR は、テンプレートとして断片 3 及び 4、及びプライマー EAB - 6 8 5 及び EAB - 6 8 7 を使用して、VL 及び CH の一部分を含む断片を生成した。このために、断片 3 及び断片 4 の等モル量を用いた。増幅条件は最初の 5 分間 9 4 インキュベーション工程を含み、その後プライマー無しで、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング、及び 8 0 秒間 7 2 の伸長工程を含む各サイクルが 5 サイクル続いた。外側のプライマーを添加した後、更に 2 0 サイクルが同じパラメータを用いて実施された。得られた断片は次いでゲル精製及び Hind III / Sac I 消化後に pMS 2 2 と連結された。

20

30

40

## 【 0 1 4 7 】

表 7

プライマー	配列番号	L1/L2 ライブラリープライマースクレオチド配列
EAB-685	129	CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAAATTC TATTTCAAGG
EAB-686	130	GTTGCGTGGTATCAGCAGAAACCAGGG
EAB-687	131	GCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGG
EAB-688	132	GGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGG
EAB-681	133	CCTGGTTTCTGCTGATACCACGCAACATTAGTACCCACAT <u>TCTGACTGGCCTTGCAAGTGATGGTGACTC</u>
EAB-682	134	CTGCCACTGAACCTTGATGGGACTCCACTGTAGCGGTAG GATGCCGAATAGATCAGGAGCTTAGGTGCTTCCCTGG

プライマーEAB-681及びEAB-682の無作為化:

下線:60%がオリジナルな塩基で40%がNとして無作為化

10

### 【 0 1 4 8 】

#### H 3 ライブラリー

20

H C D R 3 領域内の無作為化された親和性成熟ライブラリーを生成するために、位置 W 9 5、D 9 6、F 9 7、Y 9 8、D 9 9、Y 1 0 0、V 1 0 0 a、E 1 0 0 b、A 1 0 0 c、及び M 1 0 0 d をコードするトリプレットは、2つの異なるアプローチに無作為化された。:( 1 ) セグメント全体 ( H 3 完全ライブラリー ) の無作為化、又は ( 2 ) 各位置の個々の無作為化は 1 0 個のサブライブラリーを与えた。個別に無作為化された位置を持つクローンを含むサブライブラリーは、細菌 ( H 3 プールライブラリー ) への形質転換の後にプールされた。H C D R 3 領域の無作為化のために、断片は、C L の 3 ' 末端でアニールされたプライマー及び H C D R 3 の無作為化配列 ( 図 1 3 ) を含むプライマーを用いて P C R 増幅された。次いで重複伸長 P C R が、断片 1 の 3 ' 末端と重なり、V H の終端及び C H 1 の 5 ' 領域を含む第二の断片を用いて行われた。集合断片は S a c I / N h e I 消化後 p M S 2 2 へ連結された。H 3 プールライブラリーを生成するために、10個の D N A 断片は、プライマー E A B - 7 4 9 と組み合わせてプライマー A C 7 - A C 1 6 の各々を用いて別個に P C R 増幅された。L 3 完全ライブラリーを生成するために、プライマー A C 1 7 及び E A B - 7 4 9 が使用された。プラスミド p M S 2 2 が、テンプレートとして使用された。増幅条件は最初の 5 分間 9 4 インキュベーション工程を含み、その後、1分間 9 4 の変性、1分間 5 5 のアニーリング、及び 3 6 秒間 7 2 の伸長工程を含む各サイクルが 2 5 サイクル続き、その後最終の 1 0 分間 7 2 のインキュベーション工程が続いた。これによりアガロースゲル上で精製した約 5 8 0 b p 長の断片を得た。重複伸長 P C R のために、第二の断片は E A B - 7 5 2 と組み合わせて、E A B - 7 5 0 又は E A B - 7 5 1 の何れかのプライマーを用いて増幅された。プライマー E A B - 7 5 0 は、無作為化プライマー A C 7 - 1 1 と重複配列を有し、一方 E A B - 7 5 1 は無作為化プライマー A C 1 2 - 1 7 と配列相同性を共有していた。増幅条件は最初の 5 分間 9 4 インキュベーション工程を含み、その後、1分間 9 4 の変性、1分間 5 5 のアニーリング、及び 1 2 秒間 7 2 の伸長工程を含む各サイクルが 2 5 サイクル続き、その後最終の 1 0 分間 7 2 のインキュベーション工程が続いた。得られた断片はおよそ 1 8 0 b p 長であった。両方の断片の集合に対して、断片 1 及びそれに対応する断片 2 の等モル量が使用された。増幅条件は最初の 5 分間 9 4 インキュベーション工程を含み、その後、1分間 9 4 の変性、1分間 5 5 のアニーリング、及び 6 0 秒間 7 2 の伸長工程を含む各サイクルが 5 サイクル続いた。外側のプライマー E A B - 7 4 9 及び E A B - 7 5 2 を添加した後、更に 2 0 サイクルが同じパラメータを用いて実施された。最後に、最後の 1 0 分

30

40

50

間 7 2 でのインキュベーション工程が実施された。ゲル精製断片は次いで S a c I / N h e I 消化後に p M S 2 2 へ連結され、精製されたライゲーションが電気穿孔法により T G 1 細菌に形質転換された。

【 0 1 4 9 】

表 8

プライマー	配列番号	H3 ライブラリープライマーヌクレオチド配列
AC7	135	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAGAAGTCMNNCTCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC8	136	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAGAAMNNCCATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC9	137	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAMNNGTCCCATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC10	138	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCMNNGAAGTCCCATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC11	139	CCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAMNNATAGAAGTCCCATCTCGCACAGTAATACACGGCAGTG
AC12	140	CGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTCCATAGCCTCCACMNNATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC13	141	CGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTCCATAGCCTCMNNGTAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC14	142	CGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTCCATAGCMNNCACGTAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC15	143	CGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTCCATMNNCTCCACGTAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC16	144	CGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTCMNNAGCCTCCACGTAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAG
AC17	145	CGTGGTCCCTTGGCCCCAGTAGTCCATAGCCTCCACGTAATCATAGAAGTCCCATCTCGCACAGTAATACACGGCAG
EAB-749	146	CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
EAB-750	147	CGTGGAGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGG
EAB-751	148	GACTACTGGGGCCAAGGACCACGGTCAC
EAB-752	149	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCACG

プライマーAC17の無作為化:

太字及びイタリック:60%がオリジナルな塩基で40%がMとして無作為化

下線:60%がオリジナルな塩基で40%がNとして無作為化

【 0 1 5 0 】

L 3 ライブラリー

軽鎖の C D R 3 領域内の無作為化された親和性成熟ライブラリーを生成するために、位置 Y 9 1、Y 9 2、T 9 3、Y 9 4、及び L 9 5 a をコードするトリプレットは、セグメント全体 (L 3 完全ライブラリー) 又は各々の何れかで無作為化され、5 個のサブライブラリーを得た。個別に無作為化された位置を持つクローンを含むサブライブラリーは、細菌 (L 3 プールライブラリー) への形質転換の後にプールされた。5 個のサブライブラリーの生成のために、5 個の DNA 断片が、プライマー M S 4 3 との組み合わせでプライマー A C 1 - A C 5 のそれぞれを用いて P C R 増幅された。L 3 完全ライブラリーを生成するために、A C 6 及び M S 4 3 のプライマーの組み合わせが使用された (図 1 4)。プラスミド p M S 2 2 が、テンプレートとして使用された。増幅条件は最初の 5 分間 9 4 インキュベーション工程を含み、その後、1 分間 9 4 の変性、1 分間 5 5 のアニーリング

、及び25秒間72 の伸長工程を含む各サイクルが25サイクル続き、その後最終の10分間72 のインキュベーション工程が続いた。V Lドメインの位置1から104までを包含する得られた断片はアガロースゲル上で精製され、追加のPCR増幅のテンプレートとして使用された。全ての反応は上記と同じ条件を用いて無作為化プライマー及びMS43との重複配列を有するプライマーEAB-746で実施された。精製断片並びにpMS22はNcoI/XhoIで消化された。全5個のサブライブラリについて、0.5µgの挿入は、0.5µgのpAC16と連結された。L3完全ライブラリについて、ライゲーションは9.8µgの挿入及び9.8µgのpMS22により実施された。精製されたライゲーションは電気穿孔法によってTG1細菌に形質転換された。

【0151】

10

表 9

プライマー	配列番号	L3ライブラリープライマーヌクレオチド配列
AC1	150	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAGGTGTA MNNTTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC2	151	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAGGTMNN ATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC3	152	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAMNNGTA ATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC4	153	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGMNNGGTGTA ATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC5	154	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAAMNNAGGATAGGTGTA ATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC
AC6	155	GGTGCCCTGGCCAAACGTGAATAGAGGATAGGTGTA <u>ATATTGGTGACAGTAGTAAGTTGC</u>
EAB-746	156	CGCTTGATCTCGAGCTTGGTGCCCTGGCCAAACGTG
MS-43	123	CCAGCCGGCCATGGCCGATATCCAGATGACCCAGTCT CCATC

プライマーAC6の無作為化:

太字及びイタリック:60%がオリジナルな塩基で40%がMとして無作為化

下線:60%がオリジナルな塩基で40%がNとして無作為化

20

30

【0152】

抗体の産生

マウス及びヒト化PR1A3抗体の両方が膜結合CEAのみを認識するが、可溶性ヒトCEAを与えないので、PR1A3のエピトープを含む組換えキメラタンパク質はヒト化PR1A3のインビトロ親和性成熟のために生成された(配列番号7及び8)。このハイブリッドタンパク質の生成はStewardら(1999)に記載の通り行われた。簡潔には、ヒトの胆汁糖タンパク質(BGP)のBドメインのDNA配列が、PR1A3のエピトープを含むヒトCEA-B3ドメインの配列に置き換えられた。その結果、配列は、BGPのN及びA1ドメイン、CEAのB3ドメイン及びBGPのA2ドメインを含むハイブリッドタンパク質をコードしている(N-A1-B3-A2、huNABA)。この融合産物は、次いでヒトIgG1のFc部分にリンクされるか(huNABA-Fc)(Stewardら、Cancer Immunol Immunother, 47:299-306, 1999)、又は正確なプロテアーゼ切断部位、aviタグ及び(His)6タグをコードする配列に融合するか(huNABA-avi-his)(配列番号158)の何れかであった。huNABA-Fcは、プロテインAカラムを用いて安定的にトランスフェクトしたCHO細胞株の培養上清から精製された。huNABA-avi-hisは、安定してEBV由来タンパク質EBNAを発現するHEK293細胞に一時的にトランスフェクトした。同時にビオチンリガーゼをコードする同時形質移入されたプラスミドは、インビトロでaviタグ固有のビオチン化を可能とした

40

50

。タンパク質は、その後、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー ( I M A C )、続いてゲル濾過により精製された。

【 0 1 5 3 】

配列番号 1 5 8 ( h u N A B A - a v i - h i s ) p E T R 6 5 9 2

Q L T T E S M P F N V A E G K E V L L L V H N L P Q Q L F G Y S W Y K G E R V D  
G N R Q I V G Y A I G T Q Q A T P G P A N S G R E T I Y P N A S L L I Q N V T Q  
N D T G F Y T L Q V I K S D L V N E E A T G Q F H V Y P E L P K P S I S S N N S  
N P V E D K D A M A F T C E P E T Q D T T Y L W W I N N Q S L P V S P R L Q L S  
N G N R T L T L L S V T R N D T G P Y E C E I Q N P V S A N R S D P V T L N V T  
Y G P D T P T I S P P D S S Y L S G A N L N L S C H S A S N P S P Q Y S W R I N  
G I P Q Q H T Q V L F I A K I T P N N G T Y A C F V S N L A T G R N N S I V K  
S I T V S A L S P V V A K P Q I K A S K T T V T G D K D S V N L T C S T N D T G  
I S I R W F F K N Q S L P S S E R M K L S Q G N I T L S I N P V K R E D A G T Y  
W C E V F N P I S K N Q S D P I M L N V N Y N A L P Q E N L I N V D L E V L F Q  
G P G S G L N D I F E A Q K I E W H E A R A H H H H H H

10

【 0 1 5 4 】

ヒト化 P R 1 A 3 の親和性成熟

親和性成熟ヒト化 P R 1 A 3 F a b の生成は、標準プロトコルを使用して、ファージディスプレイによって行われた (Silacci ら、Proteomics, 5(9):2340-2350, 2005)。親和性成熟ライブラリーによる選択は以下の手順に従って溶液中で実施された：[1] . 各親和性成熟ライブラリーのおよそ 1 0 1 2 ファージミド粒子を 1 0 0 n M のビオチン化 h u N A B A - a v i - h i s に 1 ミリリットルの総体積で 0 . 5 時間結合させ、[2] . ビオチン化 h u N A B A - a v i - h i s 及び特異的に結合したファージ粒子を、 $5 \cdot 4 \times 10^7$  のストレプトアビジン被覆磁気ビーズの 3 分間の添加により、捕獲し、[3] . ビーズを  $5 - 10 \times 1 \text{ ml PBS / Tween 20}$  及び  $5 - 10 \times 1 \text{ ml PBS}$  を用いて洗浄し、[4] .  $1 \text{ ml}$  の  $100 \text{ mM}$  の T E A ( トリエチルアミン ) を 10 分間の添加によりファージ粒子を溶出し、及び  $500 \text{ ul}$  の  $1 \text{ M}$  トリス / H C l p H 7 . 4 を加えることによる中和し、及び、[5] . 指数関数的に増殖する大腸菌 T G 1 細菌を再感染させ、ヘルパーファージ V C S M 1 3 により感染させ、続いて、その後の選択のラウンドで使用されるファージミド粒子を P E G / N a C l 沈殿させる。選択は一定又は減少する抗原濃度 (  $10^{-7} \text{ M}$  から  $2 \times 10^{-9} \text{ M}$  ) のいずれかを使用して、3 から 5 回のラウンドで行われた。ラウンド 2 において、抗原：ファージ複合体の捕捉が、ストレプトアビジンビーズの代わりにニュートラアビジンプレートを用いて行われた。特異的バインダーは、次のように E L I S A により同定した：ウエルあたり  $10 \text{ nM}$  のビオチン化 h u N A B A - a v i - h i s の  $100 \mu \text{ l}$  はニュートラアビジンプレート上に被覆された。F a b を含む細菌の上清が添加され、結合した F a b は抗フラグ / H R P 二次抗体を使用して、フラグ-タグを介して検出された。E L I S A 陽性クローンを 96 穴フォーマットに可溶性 F a b 断片として細菌に発現させ、B I A C O R E T 100 を使用して、S P R 分析により、上清は動力学的スクリーニング実験にかけられた。最も高い親和性定数を持つ F a b を発現するクローンを同定し、対応するファージミドが配列決定された。

20

30

40

【 0 1 5 5 】

F a b の精製及び動力学的パラメータの測定

動力学パラメータの正確な分析のために、F a b を細菌培養から精製した。500 ml の培養は播種され、O D 600 が 0 . 9 にて 1 mM の I P T G で誘導した。細菌は 25 で一晩インキュベートし、遠心分離によって回収した。再懸濁したペレットを 25 ml の P P B 緩衝液 (  $30 \text{ mM}$  トリス - H C l p H 8、 $1 \text{ mM}$  の E D T A、 $20\%$  ショ糖 ) で 20 分間のインキュベーションした後、細菌は再び遠心分離し、上清を回収した。このインキュベーション工程は、 $5 \text{ mM}$  の M g S O <sub>4</sub> 溶液 25 ml で一回繰り返した。両方のインキュベーション工程の上清をプールし、ろ過し、I M A C カラム ( His gravitrap、GE Healthcare ) にロードされた。その後、カラムを 40 体積で洗浄した。溶出した後に ( 5

50

00 mMのNaCl、500 mMのImidazole、20 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4)、溶出液はPD10カラム(GE Healthcare)を使用して再バッファリングされた。精製されたFabの速度論的パラメータは、200 nMから6.25 nMの範囲にあった希釈列にてSPR分析により調べられた。

【0156】

#### 実施例 2

PR1A3抗体は、ヒトIgG1/kappa定常領域を持たせるようにキメラ化され、及びFcにおいて高度にフコシル化された糖を持たせるためにGlycoMab技術を用いて発現された。糖鎖を操作された抗体及び糖鎖は操作されていない抗体は、エフェクターとターゲットの比率が25:1で比較された。抗体依存性標的細胞死滅の最大量は、Fc領域の糖鎖操作により倍増した(図2)。細胞死滅の更なる増加はエフェクターとターゲットの比を増加させることにより達成された(図2)。

10

【0157】

PR1A3は、ヒト生殖細胞配列と同一のフレームワークを使用してヒト化された。IMGT配列IGHV7-4-1\*02(受入番号X62110)は、ヒト化VHに対するアクセプターであり、IMGT\_hVK\_1\_39(受入番号X59315)はヒト化VLに対するアクセプターであった。重鎖可変領域コンストラクトCH7Aを含むヒト化PR1A3抗体、及び軽鎖可変領域CL7Aは、フローサイトメトリーによって測定され、ヒト結腸癌細胞への十分な結合を示した(図3)。

【0158】

ファージディスプレイによるPR1A3の親和性成熟は、本明細書に、実施例1で詳細に説明されるように標準プロトコルを用いて行われた。親和性成熟のために使用された親ヒトPR1A3抗体は、重鎖可変領域コンストラクトCH7A、及び軽鎖可変領域コンストラクトCL1Aを含む。以下の表3-6は、親和性成熟のために使用されるライブラリを示している。L1/L2ライブラリについては、CDR内に位するバリン29、アラニン50、又はセリン51は一定に保たれた。H1/H2ライブラリについては、CDR内に位置するイソロイシン51、グリシン55、又はアラニン57は一定に保たれた(図4及び図5)。

20

【0159】

親和性成熟重鎖可変領域コンストラクトCH7A rF9、及び親和性成熟軽鎖可変領域コンストラクトCL1A rH11は、お互いにそれぞれ親の軽鎖可変領域コンストラクト及び重鎖可変領域の構造とペアをなした。すべての抗体は、ヒトIgG1/kappaに変換され、CEA陽性細胞株MKN45への結合は、フローサイトメトリーで測定された。親和性成熟した重鎖又は軽鎖可変領域の何れか一つ、又は親和性成熟した重鎖又は軽鎖可変領域の両方を含む抗体は、ヒト化親抗体と比べて改善された結合特性を示した(図6)。図6、図10及び図15は、成熟軽鎖及び重鎖が独立して親和性増加に寄与するいくつかの例を示している。親抗体CH7A CL1Aは、図6と図15において最低シグナル強度、並びに最高のEC50値を有する。成熟軽鎖は、EC50値を低い数字にシフトさせ、成熟した重鎖(図6のrF9、及び図15のrB9)はフローサイトメトリー測定における総蛍光シグナル強度をシフトさせる。図10は、ピアコア方法で測定した重鎖及び軽鎖の個々の寄与を示す。これら2つの鎖の組み合わせは、さらに親和性を向上させる。親和性成熟重鎖及び軽鎖のCDRの結合親和性はピアコアによって決定され、以下の表10にリストされた。

30

40

【0160】

表 10

配列番号	CDR-H3 (無作為化された残基は下線が引かれ、 選択された残基は太字)	親和性 (ピアコアにより 決定された)	コンストラクト
25	<u>WDFYDYVEAMDY</u>	3681 nM	PMS22
26	WDFY <b>H</b> YVEAMDY	586 nM	1C8
27	WDFV <b>D</b> YVEAMDY	1893 nM	3E1
28	WDFY <b>W</b> YVEAMDY	746 nM	2D7
33	WDF <b>A</b> H <b>Y</b> F <b>Q</b> TMD	59 nM	親和性成熟 CDRH-3
34	WDF <b>A</b> Y <b>Y</b> F <b>Q</b> TMD	44 nM	親和性成熟 CDRH-3
35	WDF <b>A</b> Y <b>Y</b> L <b>E</b> AMD	69 nM	親和性成熟 CDRH-3
29	W <b>D</b> A <b>F</b> E <b>Y</b> V <b>K</b> A <b>L</b> D <b>Y</b>	26 nM	H3 完全 (5) 19
30	W <b>D</b> F <b>F</b> E <b>Y</b> F <b>K</b> T <b>M</b> D <b>Y</b>	51 nM	H3 完全 (5) 8
31	W <b>D</b> F <b>F</b> Y <b>Y</b> V <b>Q</b> T <b>M</b> D <b>Y</b>	81 nM	H3 完全 (5) 28
33	W <b>D</b> F <b>S</b> Y <b>Y</b> V <b>E</b> AMD <b>Y</b>	132 nM	H3 完全 (5) 27
	<b>CDR-H1 及び CDR-H2</b> 無作為化された残基は下線が引かれ、 選択された残基は太字		
1 及び 13	<u>EFGMN</u> 及び <u>W<b>I</b>N<b>T</b>K<b>T</b>G<b>E</b>A<b>T</b>Y<b>V</b>E<b>E</b>F<b>K</b>G</u>	3681 nM	pMS22
1 及び 14	EFGMN 及び W <b>I</b> N <b>T</b> K <b>T</b> G <b>E</b> A <b>T</b> Y <b>I</b> E <b>E</b> F <b>K</b> G	402 nM	H4E9
1 及び 15	EFGMN 及び W <b>I</b> N <b>T</b> K <b>S</b> G <b>E</b> A <b>T</b> Y <b>V</b> E <b>E</b> F <b>K</b> G		pAC14 (B9)
2 及び 15	E <b>Y</b> G <b>M</b> N 及び W <b>I</b> N <b>T</b> K <b>S</b> G <b>E</b> A <b>T</b> Y <b>V</b> E <b>E</b> F <b>K</b> G		pAC15 (F9)
3 及び 16	E <b>Y</b> S <b>M</b> N 及び <b>Y</b> I <b>N</b> T <b>K</b> N <b>G</b> E <b>A</b> N <b>Y</b> V <b>E</b> E <b>F</b> K <b>G</b>		H1/H2 (5) 2
2 及び 17	E <b>Y</b> G <b>M</b> N 及び W <b>I</b> N <b>T</b> K <b>N</b> G <b>E</b> A <b>T</b> Y <b>I</b> E <b>E</b> F <b>K</b> G		H1/H2 (5) 11
1 及び 16	E <b>F</b> G <b>M</b> N 及び <b>Y</b> I <b>N</b> T <b>K</b> N <b>G</b> E <b>A</b> N <b>Y</b> V <b>E</b> E <b>F</b> K <b>G</b>		H1/H2 (5) 13
2 及び 16	E <b>Y</b> G <b>M</b> N 及び <b>Y</b> I <b>N</b> T <b>K</b> N <b>G</b> E <b>A</b> N <b>Y</b> V <b>E</b> E <b>F</b> K <b>G</b>		H1/H2 (5) 14
5 及び 13	E <b>F</b> G <b>M</b> S 及び <u>W<b>I</b>N<b>T</b>K<b>T</b>G<b>E</b>A<b>T</b>Y<b>V</b>E<b>E</b>F<b>K</b>G</u>	26 nM	H3 完全 (5) 19
	<b>CDR-L1 及び CDR-L2</b> 無作為化された残基は下線が引かれ、 選択された残基は太字		
36 及び 46	<u>Q<b>N</b>V<b>G</b>T<b>N</b></u> 及び <u>Y<b>S</b>A<b>S</b>Y<b>R</b>Y<b>S</b></u>	3681 nM	pMS22

10

20

30

40

37 及び 47	ANVGNN 及び YLASNLSG	250 nM	pAC21 (3A1)
38 及び 48	KNVGTN 及び YLASYPQI	700 nM	pAC19 (2C6)
39 及び 49	AAVGTY 及び YSASYRKR	220 nM	pAC18 (2F1)
40 及び 50	QYASTN 及び YWASYRYS	290 nM	pAC23 (2F11)
36 及び __	QNVGTN 及び PLI-YSASYRYS	402 nM	H4E9
41 及び 51	HNVTGN 及び YSASHRYS	2255 nM	L2D2
42 及び 52	QIMGPN 及び YLASYHES		pAC6 (C1)
43 及び 53	QIVGTN 及び YSASHRPS		pAC7 (E10)
44 及び 54	QKVLTN 及び YLASYRYS		pAC12 (H7)
45 及び 55	QTVSAN 及び YLASRYR		pAC13 (H11)
	<b>CDR-L3</b> 無作為化残基は下線が引かれ、 選択された残基は太字		
56	H Q Y Y <u>T</u> Y P <b>L</b> F T		pMS22

10

20

## 【 0 1 6 1 】

下の表 1 1 は、様々な親和性成熟抗体配列の親和性定数をまとめている。親抗体 P R 1 A 3 は、成熟、及び非成熟配列のいくつかの軽鎖及び重鎖の組み合わせとともに、記載されている。全ての値は、ピアコア技術により、抗原として固定化 N A B A - a v i - h i s 試薬（配列番号 1 5 8）により、ピアコアチップ上の F a b 形態での様々な可溶性抗体コンストラクトの会合速度定数（ $k_{on}$ ）及び解離速度定数（ $k_{off}$ ）を測定することにより、得られた。親和性定数は K D のラベルが付される。

## 【 0 1 6 2 】

30

表 11: 親和性成熟クローンの動態解析

クローン名	鎖	一価親和性	二価親和性
PR1A3	wt/wt	$k_{on}: 6.74 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.48 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $3681 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 2.82 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 5.52 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $2 \times 10^{-9} \text{ M}$
1C8	hc/wt	$k_{on}: 12.9 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.76 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $586 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 4.67 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 3.24 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.693 \times 10^{-9} \text{ M}$
H4E9	hc/wt	$k_{on}: 5.22 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.21 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $402 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 2.92 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.04 \times 10^{-3} \text{ 1/s};$ KD: $0.7 \times 10^{-9} \text{ M}$
H3 完全 (5) 19	hc/wt	$k_{on}: 54.2 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.13 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $24 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 9.02 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.75 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.19 \times 10^{-9} \text{ M}$
H3 完全 (5) 8	hc/wt	$k_{on}: 27.3 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.14 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $51 \times 10^{-9} \text{ M}$	N/D
3A1	wt/lc	$k_{on}: 46.8 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.17 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $250 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 2.42 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 3.64 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$
2F1	wt/lc	$k_{on}: 95.7 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.07 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $220 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 4.23 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 4.10 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.952 \times 10^{-9} \text{ M}$
5L1A10	hc/wt	$k_{on}: 15.6 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.09 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $59 \times 10^{-9} \text{ M}$	N/D
5HFF12	hc/wt	$k_{on}: 20.8 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.09 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $44 \times 10^{-9} \text{ M}$	N/D
M4F1	hc/wt	$k_{on}: 25.7 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.17 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $69 \times 10^{-9} \text{ M}$	N/D
H4E9 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 36.4 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.35 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $96 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 4.23 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.91 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.452 \times 10^{-9} \text{ M}$
H4E9 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2.46 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 1.36 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.55 \times 10^{-9} \text{ M}$
1C8 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 68.1 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.87 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD $128 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 9.68 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 6.36 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.66 \times 10^{-9} \text{ M}$
1C8 x 3A1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 2.89 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.57 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.888 \times 10^{-9} \text{ M}$
H3 完全 (5) 19 x 2F1	hc/lc	$k_{on}: 206 \times 10^3 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 0.25 \times 10^{-2} \text{ 1/s};$ KD: $12.2 \times 10^{-9} \text{ M}$	$k_{on}: 1.76 \times 10^6 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.84 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.16 \times 10^{-9} \text{ M}$
H3 完全 (5) 8 x 2F1	hc/lc	N/D	$k_{on}: 9.93 \times 10^5 \text{ 1/Ms}; k_{off}: 2.71 \times 10^{-4} \text{ 1/s};$ KD: $0.28 \times 10^{-9} \text{ M}$

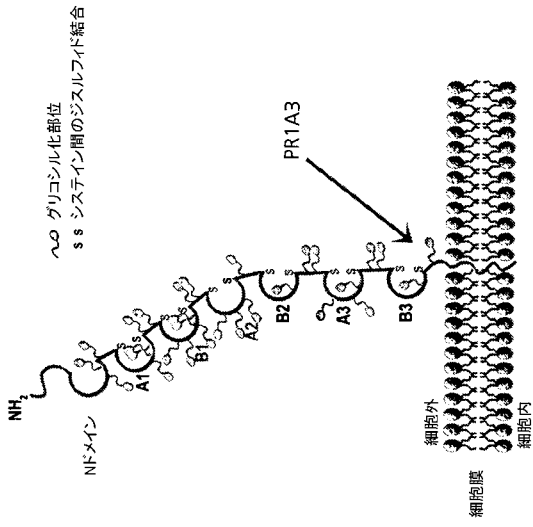
10

20

30

40

【 図 1 】



【 図 3 】

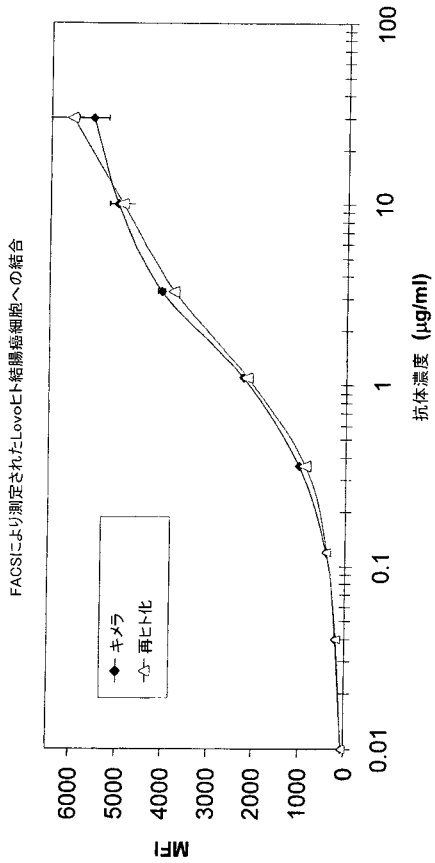


Fig. 3

【 図 2 】

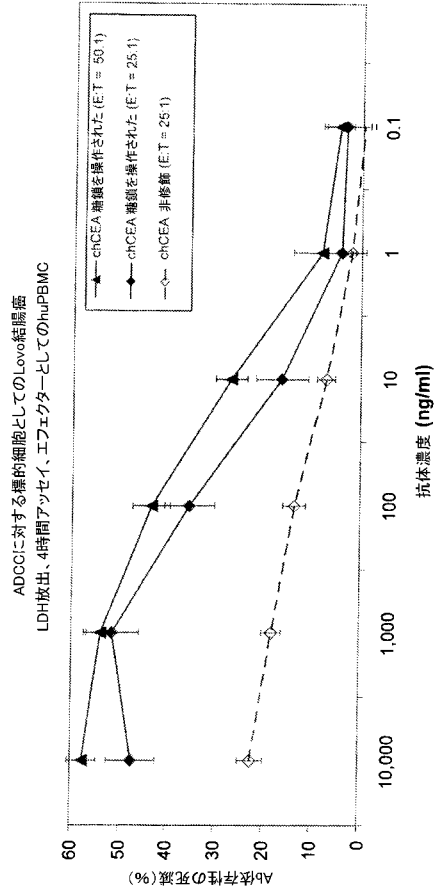


Fig. 2

【 図 4 】

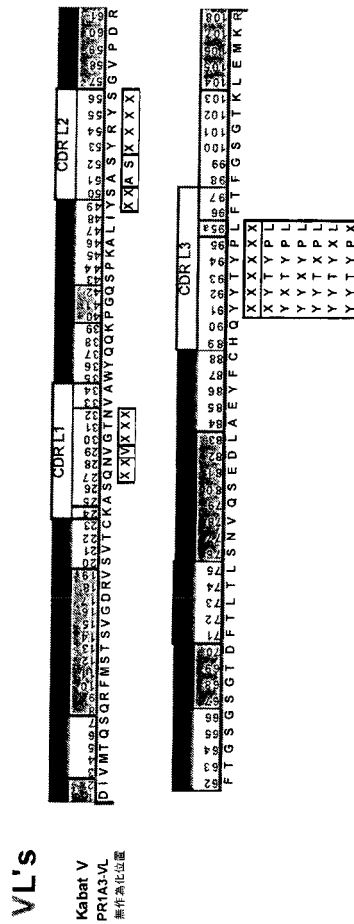
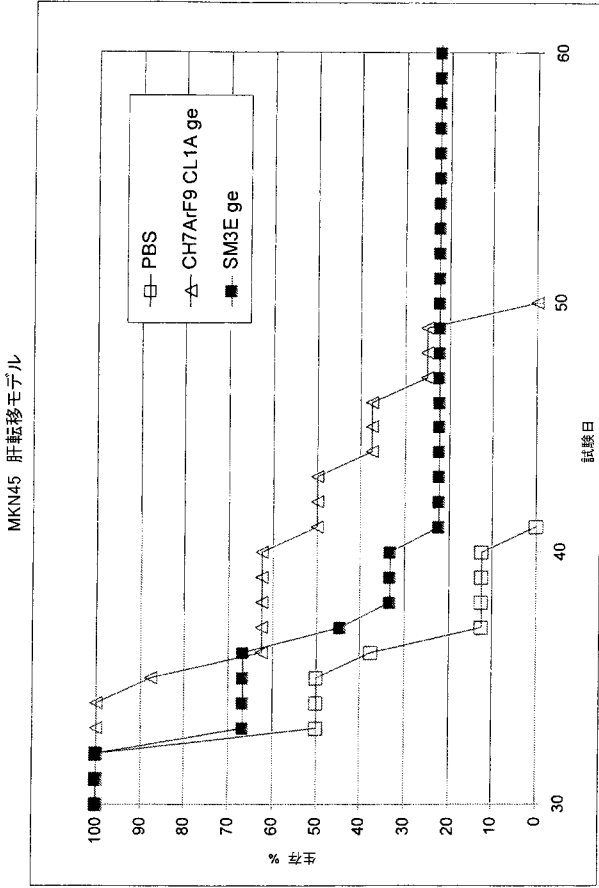


Fig. 4



【 図 9 】



【 図 1 1 】

CDR1及びCDR2 VH(CH7A)の無作為化

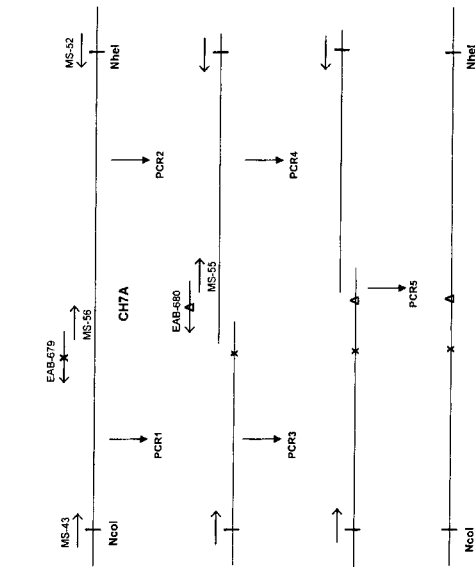


Fig. 11

【 図 1 2 】

CDR1及びCDR2 VL(CL1A)の無作為化

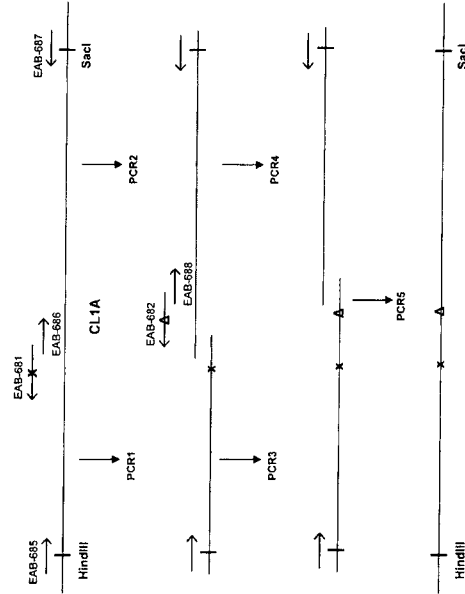
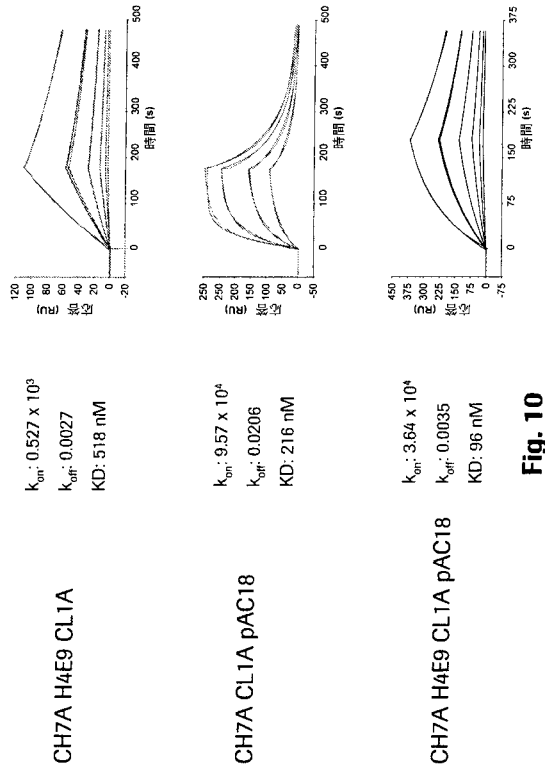


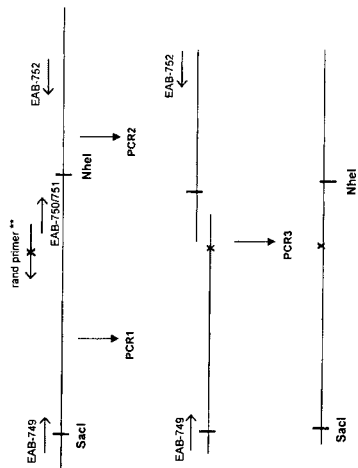
Fig. 12

【 図 1 0 】



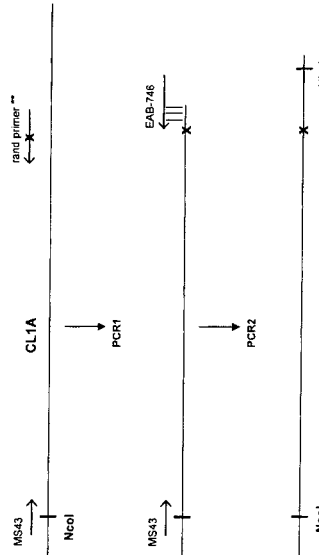
【 図 1 3 】

CDR3\_VH(CH7A)の無作為化



【 図 1 4 】

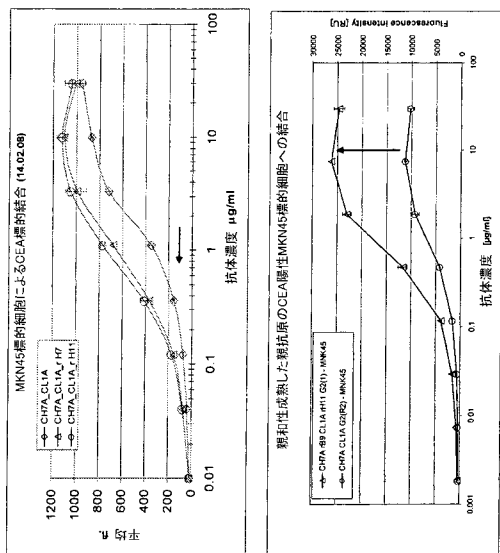
CDR3\_VL(CL1A)の無作為化



【 図 1 5 】

IgGに変換された場合に、  
軽鎖ライブラリー由来の  
親和性成熟クローンは、  
因子3の親和性増強を有する。

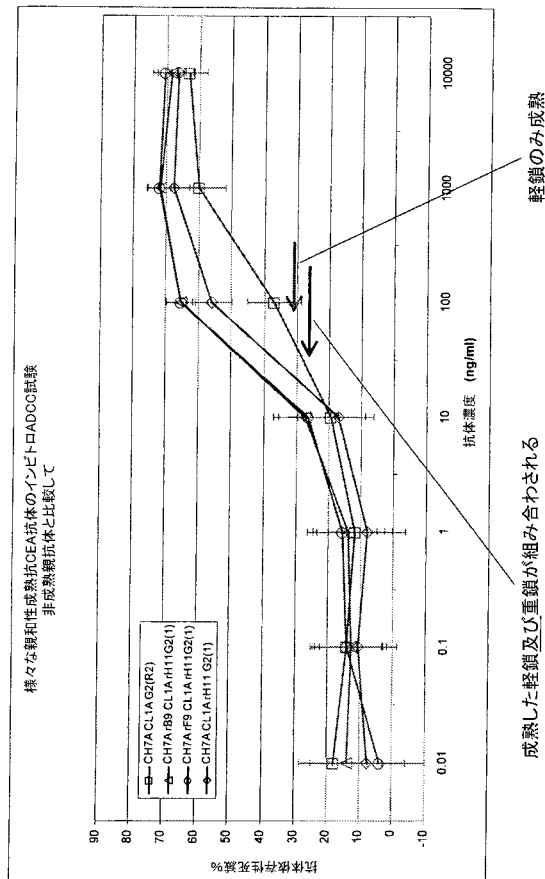
IgGに変換された場合に、  
重鎖ライブラリー由来の  
親和性成熟クローンは、  
強く増大したシグナルを示す。



→ 抗体の重鎖及び軽鎖は両方とも全抗体の親和性に寄与する。  
(膜結合型への結合は、親和性成熟後維持される。)

Fig. 15

【 図 1 6 】



→ 成熟した軽鎖及び重鎖が組み合わされる  
親和性の向上はADCCの向上をもたらし

Fig. 16

Fig. 13

Fig. 14

軽鎖のみ成熟

【配列表】

2013502913000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2010/062527
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/30 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CONAGHAN PJ ET AL: "Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen.", BRITISH JOURNAL OF CANCER 8 APR 2008 LNKD-PUBMED:18349843, vol. 98, no. 7, 8 April 2008 (2008-04-08), pages 1217-1225, XP002609357, ISSN: 0007-0920 page 1218, left-hand column - right-hand column page 1224, left-hand column	1-96
X	WO 95/06067 A1 (IMP CANCER RES TECH [GB]; BODMER WALTER FRED [GB]; DURBIN HELGA [GB];) 2 March 1995 (1995-03-02) page 5, line 8 - line 14; examples 6-8	1-96
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"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 when the document is taken alone "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		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 November 2010		26/11/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Le Flao, Kateil

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2010/062527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YANG W-P ET AL: "CDR WALKING MUTAGENESIS FOR THE AFFINITY MATURATION OF A POTENT HUMAN ANTI-HIV-1 ANTIBODY INTO THE PICOMOLAR RANGE", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 254, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 392-403, XP000199739, ISSN: 0022-2836, DOI: DOI:10.1006/JMBI.1995.0626 * abstract</p>	1-96
A	<p>STEIDL S ET AL: "In vitro affinity maturation of human GM-CSF antibodies by targeted CDR-diversification", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 46, no. 1, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 135-144, XP025472134, ISSN: 0161-5890, DOI: DOI:10.1016/J.MOLIMM.2008.07.013 [retrieved on 2008-08-21] * abstract</p>	1-96
A	<p>ZBAR A P ET AL: "Immune responses in advanced colorectal cancer following repeated intradermal vaccination with the anti-CEA murine monoclonal antibody, PRIA3: results of a phase I study.", INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE SEP 2005 LNKD- PUBMED:15864608, vol. 20, no. 5, September 2005 (2005-09), pages 403-414, XP002609358, ISSN: 0179-1958 the whole document</p>	1-96
A	<p>DURBIN H ET AL: "An epitope on carcinoembryonic antigen defined by the clinically relevant antibody PRIA3.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 10 MAY 1994 LNKD- PUBMED:7514303, vol. 91, no. 10, 10 May 1994 (1994-05-10), pages 4313-4317, XP002609359, ISSN: 0027-8424 * abstract</p>	1-96

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2010/062527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KIM JIN C ET AL: "Enhancement of colorectal tumor targeting using a novel biparatopic monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen in experimental radioimmunoguided surgery.", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER 1 FEB 2002 LNKD-PUBMED:11802220, vol. 97, no. 4, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 542-547, XP002609360, ISSN: 0020-7136 * abstract</p>	1-96
A	<p>WO 2004/101790 A1 (DOMANTIS LTD [GB]; JESPERS LAURENT S [GB]; JONES PHILIP C [GB]; FARM K) 25 November 2004 (2004-11-25) sequence 6</p>	17
T	<p>ASHRAF S Q ET AL: "Humanised IgG1 antibody variants targeting membrane-bound carcinoembryonic antigen by antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis.", BRITISH JOURNAL OF CANCER 17 NOV 2009 LNKD- PUBMED:19904275, vol. 101, no. 10, 17 November 2009 (2009-11-17), pages 1758-1768, XP002609361, ISSN: 1532-1827 * abstract</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2010/062527**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 97  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2010/062527

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 97

Present claim 97 relates to "the invention as described hereinabove". Based upon the fact that no technical feature is defined in this claim, the claim is not fulfilling the requirements of Art. 6 PCT and does not define a scope that can be searched. As a consequence no search has been performed for claim 97.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/062527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9506067	A1	02-03-1995	AT 226596 T 15-11-2002
			AU 7390694 A 21-03-1995
			CA 2168440 A1 02-03-1995
			DE 69431602 D1 28-11-2002
			DE 69431602 T2 26-06-2003
			DK 721470 T3 24-02-2003
			EP 0721470 A1 17-07-1996
			ES 2187529 T3 16-06-2003
			JP 3492373 B2 03-02-2004
			JP 9501571 T 18-02-1997
			PT 721470 E 31-03-2003
			US 5965710 A 12-10-1999
			WO 2004101790
CA 2525120 A1 25-11-2004			
EP 1627062 A1 22-02-2006			
JP 2007535484 T 06-12-2007			
US 2009005257 A1 01-01-2009			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	
<b>A 6 1 K 41/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 41/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/53 N	
	G 0 1 N 33/574 E	

(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, S E, 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, ID, I L, 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 メスナー, エッケハルト

スイス国 ツェーハー - 8 2 8 0 クロイツリンゲン, フェルゼンブルクヴェク 5

(72)発明者 ウマーニャ, パプロ

スイス国 ツェーハー - 8 8 3 2 ヴォルララウ, フェルゼンラインシュトラッセ 2 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA02 DA06 EA03 EA04 FA20 GA11 GA19

GA25 GA27 HA01

4B064 AG27 BJ12 CA02 CA19 CC24 CE12 DA05

4B065 AA26X AB01 BA02 BA24 BD14 CA25 CA44 CA46

4C084 AA11 AA19 MA02 NA14 ZB261

4C085 AA14 BB01 CC23 EE01 EE03

4H045 AA11 BA09 CA42 DA76 EA29 EA51 FA74 GA26

专利名称(译)	亲和力成熟人源化抗CEA单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013502913A</a>	公开(公告)日	2013-01-31
申请号	JP2012526072	申请日	2010-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	罗切格利卡特公司		
申请(专利权)人(译)	罗氏Gurikato AG		
[标]发明人	ホーフアートーマスウー ホッセラルフ メスナーエツケハルト ウマーニャパプロ		
发明人	ホーフアー, トーマス ウー. ホッセ, ラルフ メスナー, エツケハルト ウマーニャ, パプロ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61K45/00 A61K41/00 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 A61P43/00 C07K16/3007 C07K2317/24 C07K2317/55 A61K39/395 C07K2317/14 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61K39/395. N A61K39/395.T A61K45/00 A61K41/00 A61P35/00 A61P43/00.105 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/574.E		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024 /FA20 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/GA25 4B024/GA27 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065 /BA02 4B065/BA24 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA11 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085 /EE03 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	61/238505 2009-08-31 US		
其他公开文献	JP5744872B2 JP2013502913A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

抗原结合分子 ( ABM ) 本发明涉及抗原结合分子 ( ABM ) 。在一个具体实施方案中, 本发明涉及重组单克隆抗体, 其包含嵌合抗体, 灵长类抗体或对人癌胚抗原特异的人源化抗体。此外, 本发明涉及编码此类ABM的核酸分子以及包含此类核酸分子的载体和宿主细胞。本发明还涉及使用ABM治疗产生本发明ABM的方法和疾病的方法。本发明进一步涉及具有改进的治疗特性的经修饰的糖基化的ABM, 包括具有增加的Fc受体结合和增加的效应子功能的抗体。

CDR	Kabat	Chothia	AbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-34
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup>表中の全てのCDR定義の番号付けは Kabat に 1-11 対応させた相対的トス