

(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2015-502138

(P2015-502138A)

(43) 公表日 平成27年1月22日 (2015.1.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	4 B 0 6 4
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-535228 (P2014-535228)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月10日 (2012.10.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月4日 (2014.6.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2012/050402
 (87) 国際公開番号 W02013/054331
 (87) 国際公開日 平成25年4月18日 (2013.4.18)
 (31) 優先権主張番号 PCT/IL2011/000808
 (32) 優先日 平成23年10月11日 (2011.10.11)
 (33) 優先権主張国 イスラエル (IL)

(71) 出願人 511255421
 テル ハシヨメール メディカル リサーチ インフラストラクチャー アンド サービスズ リミテッド
 イスラエル国, 5 2 6 2 1 ラマットーガン, テル ハシヨメール, ザ チャイム シェバ メディカル センター
 (71) 出願人 514087865
 シーシーエーエム バイオセラピューティクス リミテッド
 イスラエル国, 2 0 1 7 4 0 0 ミスガーヴ, ミスガーヴ インダストリアル パーク ピーオー ボックス 7 9

最終頁に続く

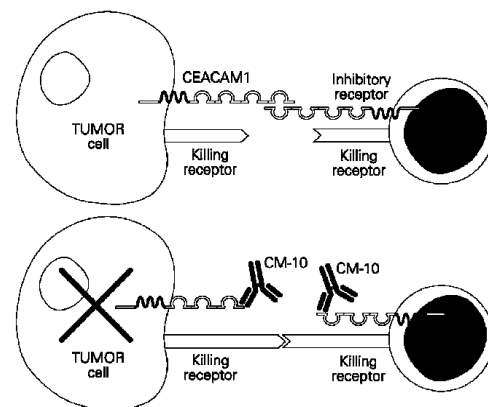
(54) 【発明の名称】 癌胎児抗原関連細胞接着分子 (CEACAM) に対する抗体

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質 CEACAM1 の特異的エピトープを認識し、場合により CEACAM タンパク質ファミリーの他のサブタイプにも結合する、抗体ならびに少なくとも抗体の抗原結合部分を有する分子を提供する。開示する抗体および抗体フラグメントは、特異的 CDR 配列を特徴とする。前記抗体および抗体フラグメントの製造法ならびに治療および診断への使用も提供する。

【選択図】 図 9

Figure 9



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 に示す配列を含む重鎖 C D R 1、配列番号 2 に示す配列を含む重鎖 C D R 2、配列番号 3 に示す配列を含む重鎖 C D R 3、配列番号 4 に示す配列を含む軽鎖 C D R 1、配列番号 5 に示す配列を含む軽鎖 C D R 2 および配列番号 6 に示す配列を含む軽鎖 C D R 3、ならびにその類似体および誘導体を有する、ヒト C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体またはその抗体フラグメント。

【請求項 2】

配列番号 7 に示す配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号 8 に示す配列を有する重鎖 C D R 2 および配列番号 9 に示す配列を有する重鎖 C D R 3 を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項 3】

配列番号 13 に示す配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号 14 に示す配列を有する重鎖 C D R 2 および配列番号 15 に示す配列を有する重鎖 C D R 3 を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 4】

配列番号 10 に示す配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号 11 に示す配列を有する軽鎖 C D R 2 および配列番号 12 に示す配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

配列番号 16 に示す配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号 17 に示す配列を有する軽鎖 C D R 2 および配列番号 18 に示す配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

20

【請求項 6】

配列番号 13、14、15、16、17 および 18 に示す C D R 配列を有する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 7】

配列番号 7、8、9、10、11 および 12 に示す C D R 配列を有する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体の抗原結合部分と少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントの類似体または誘導体。

30

【請求項 9】

配列番号 26 に示す配列を有する重鎖可変ドメイン配列、または前記重鎖配列と少なくとも 97% の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 10】

配列番号 28 に示す配列を有する軽鎖可変ドメイン配列、または前記軽鎖配列と少なくとも 97% の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

40

【請求項 11】

配列番号 26 に示す配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号 28 に示す配列を有する軽鎖可変ドメイン、あるいは前記抗体またはフラグメント配列と少なくとも 97% の配列同一性を有するその類似体または誘導体を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 12】

i . マウス I g G 2 a、マウス I g G 2 b、マウス I g G 3、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3 からなる群から選択されるフレームワーク配列と、

i i . 配列番号 13、14、15、16、17 および 18 に示す配列を有する 6 つの C

50

D R ; または配列番号 7、8、9、10、11 および 12 に示す配列を有する 6 つの C D R ; ならびに前記 C D R 配列と少なくとも 97 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体と

を含み、少なくとも約 5×10^{-7} M のアフィニティで少なくとも 2 種の C E A C A M サブタイプに結合する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 13】

少なくとも約 10^{-8} M のアフィニティで C E A C A M 1 に結合することができる、請求項 12 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 14】

少なくとも約 5×10^{-7} M のアフィニティで C E A C A M 3 および C E A C A M 5 の少なくとも 1 つに結合することができる、請求項 13 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項 15】

キメラモノクローナル抗体である、請求項 12 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 16】

ヒト I g G 1、ヒト I g G 2 およびヒト I g G 3 からなる群から選択されるヒト由来定常領域を含む、請求項 15 に記載のキメラモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 17】

配列番号 13、14、15、16、17 および 18 に示す配列を有する 6 つの C D R ; または配列番号 7、8、9、10、11 および 12 に示す配列を有する 6 つの C D R ; ならびに前記 C D R 配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体を含む、請求項 16 に記載のキメラモノクローナル抗体またはそのフラグメントであって、少なくとも約 10^{-8} M のアフィニティで C E A C A M 1 に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

20

【請求項 18】

ヒト I g G 1 サブタイプの定常領域サブクラスを含む、請求項 17 に記載のキメラモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 30 で示される重鎖配列を含む、請求項 17 に記載のキメラモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

30

【請求項 20】

配列番号 31 で示される軽鎖配列を含む、請求項 17 に記載のキメラモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 21】

配列番号 30 で示される重鎖配列および配列番号 31 で示される軽鎖配列を含む、請求項 17 に記載のキメラモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 22】

A T C C 寄託番号 P T A - 12130 として 2011 年 9 月 28 日に寄託されたプラスミドに含有される重鎖および軽鎖の D N A 配列から産生された C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体。

40

【請求項 23】

配列番号 7、8、9、10、11 および 12 で示される 6 つの C D R 配列または配列番号 13、14、15、16、17 および 18 で示される 6 つの C D R 配列を有するモノクローナル抗体が結合する C E A C A M 1 分子上の同一エピトープに結合することができる、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメント。

【請求項 24】

それぞれ配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) および P N A S L L I Q N V T (配列番号 33) を有するヒト C E A C A M 1 の残基 17 ~ 29 および 68 ~ 79 中

50

のエピトープと反応性である、請求項 23 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 25】

モノクローナル抗体が結合する C E A C A M 1 分子上のエピトープが、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) および P N A S L L I Q N V T (配列番号 33) 中のアミノ酸残基を含むエピトープである、請求項 23 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 26】

モノクローナル抗体が結合する C E A C A M 1 分子上のエピトープが、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) の少なくとも 4 個のアミノ酸を含む、請求項 23 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項 27】

モノクローナル抗体が結合する C E A C A M 1 分子上のエピトープが、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) および P N A S L L I (配列番号 34) 中のエピトープである、請求項 23 に記載のモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 28】

配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) の少なくとも 3 個のアミノ酸および配列 P N A S L L I Q N V T (配列番号 33) の少なくとも 3 個のアミノ酸を含む 6 ~ 20 個のアミノ酸の単離ペプチド配列、あるいは前記親配列と少なくとも 85 % の相同性を有する類似体または誘導体。

20

【請求項 29】

配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) の少なくとも 6 個のアミノ酸を含む、請求項 28 に記載の単離ペプチド。

【請求項 30】

配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 32) および P N A S L L I (配列番号 34) のアミノ酸を含む、請求項 28 に記載の単離ペプチド。

【請求項 31】

C E A C A M 1 を認識する抗体を産生するための請求項 28 に記載の単離ペプチドの使用。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗体フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド。

30

【請求項 33】

配列番号 25 もしくは配列番号 27 に示す D N A 配列または前記配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するその類似体を含む、請求項 32 に記載の単離ポリヌクレオチド配列。

【請求項 34】

請求項 32 に記載の少なくとも 1 種の単離ポリヌクレオチド配列を含むプラスミド。

【請求項 35】

A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 1 3 0 として 2 0 1 1 年 9 月 2 8 日に寄託された、請求項 34 に記載のプラスミド。

40

【請求項 36】

治療有効量の請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはフラグメントと、薬学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 37】

C E A C A M 1、C E A C A M 3 または C E A C A M 5 の発現、活性化または機能に関連する疾患または障害を処置するための請求項 36 に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

前記疾患または障害が細胞増殖性疾患または障害である、請求項 37 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 39】

前記細胞増殖性疾患または障害が、胃腸、結腸直腸（CRC）、膵臓、非小細胞肺（NSCL）、乳房、甲状腺、胃、卵巣および子宮からなる群から選択されるがんである、請求項 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

前記細胞増殖性疾患または障害が、黒色腫、膵がん、肺がんおよび骨髄腫からなる群から選択されるがんである、請求項 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 41】

少なくとも 1 種の請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗体フラグメントと、任意の担体または賦形剤とを含む診断用組成物。

10

【請求項 42】

治療有効量の請求項 36 に記載の医薬組成物を含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、CEACAM の発現、活性化または機能に関連する疾患または障害を予防、弱化または処置する方法。

【請求項 43】

前記疾患または障害ががんである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記疾患または障害がウイルス感染症である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

前記医薬組成物に含有される前記単離抗体または抗体フラグメントが細胞傷害性部分に付着しており、前記疾患ががんである、請求項 42 に記載の方法。

20

【請求項 46】

CEACAM1 発現リンパ球を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 47】

前記リンパ球が T 細胞、NK 細胞または腫瘍浸潤リンパ球を含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

CEACAM 発現リンパ球を請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントと接触させるステップを含む、免疫調節法。

30

【請求項 49】

CEACAM 発現腫瘍細胞を請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントと接触させ、それによって CEACAM 発現腫瘍細胞の移動を阻害するステップを含む、CEACAM 発現腫瘍細胞の移動を阻害する方法。

【請求項 50】

CEACAM1 発現リンパ球を請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントと接触させ、それによって CEACAM1 ホモタイプまたはヘテロタイプタンパク質 - タンパク質相互作用を阻害するステップを含む、CEACAM1 ホモタイプまたはヘテロタイプタンパク質 - タンパク質相互作用を阻害する方法。

【請求項 51】

有効量の請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントを含む組成物および抗新生物組成物を対象に投与するステップを含む、がんを有する対象の応答または生存の持続時間または進行を増加させる方法であって、前記抗新生物組成物は少なくとも 1 種の化学療法剤を含み、それによって前記抗体および前記抗新生物組成物の同時投与により生存の持続時間または進行が有効に増加する方法。

40

【請求項 52】

対象由来の生体試料を請求項 41 に記載の診断用組成物と接触させるステップを含む、それを必要とする対象のがんを診断する方法であって、所定の閾値を超える複合体形成は対象のがんを示す方法。

【請求項 53】

50

i . 生体試料を請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗体フラグメントと共にインキュベートするステップと、

ii . 検出可能プローブを使用して結合した C E A C A M を検出するステップと、

iii . (ii) の量を既知の量の C E A C A M を含有する基準試料から得た標準曲線と比較するステップと、

iv . 標準曲線から前記生体試料中の C E A C A M の量を計算するステップと

v . (iv) の量を正常な C E A C A M 量と比較するステップと

を含む、C E A C A M 発現に関連する疾患または障害を診断する方法が提供される。

【請求項 54】

細胞増殖性もしくは血管新生関連疾患または障害あるいはウイルス感染症の診断または処置のための、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗体フラグメントの使用。

【請求項 55】

C E A C A M の発現または活性化に関連する障害または疾患を処置するための医薬品を調製するための、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗体フラグメントの使用。

【請求項 56】

細胞増殖性もしくは血管新生関連疾患または障害あるいはウイルス感染症を診断するための診断用組成物を調製するための、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体または抗体フラグメントの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌胎児抗原関連細胞接着分子 (C E A C A M) の発現、活性化または機能が関与する疾患に有用な治療用および診断用抗体に関する。詳細には、本発明は、特異的相補性決定領域 (C D R) および C E A C A M 1 を認識する他の抗体に対して改善した特性を有する抗体を提供する。

【背景技術】

【0002】

膜貫通タンパク質である癌胎児抗原関連細胞接着分子 1 (C E A C A M 1 、胆汁糖タンパク質 (B G P) 、 C D 6 6 a および C - C A M 1 としても知られる) は、免疫グロブリンスーパーファミリーにも属する癌胎児抗原ファミリー (C E A) のメンバーである。C E A C A M 1 は、C D 6 6 a (C E A C A M 1) 、 C D 6 6 e (C E A C A M 6) および C D 6 6 e (C E A C A M 5 、 C E A) タンパク質を含む他の既知の C E A C A M タンパク質と相互作用する。これは、上皮細胞から造血性起源のもの (例えば、免疫細胞) にまで及ぶ広範囲の細胞で発現している。

【0003】

多くの異なる機能が C E A C A M 1 タンパク質に属するものとされてきた。C E A C A M 1 タンパク質は、結腸、前立腺の一部の癌ならびに他の型のがんで過剰発現している。追加のデータにより、血管新生および転移における C E A C A M 1 の中心的な関与が裏付けられている。C E A C A M 1 はまた、自然および適応免疫応答の調節における役割も有する。例えば、C E A C A M 1 は、ヒト腸上皮中に含まれる活性化 T 細胞にとっての阻害性受容体であることが示された (国際公開第 99 / 52552 号および M o r a l e s ら J . I m m u n o l . 1999、163、1363 ~ 1370)。追加の報告により、モノクローナル抗体 (m A b) と架橋した T 細胞受容体または淋菌 O p a タンパク質のいずれかによる C E A C A M 1 会合により、T 細胞活性化および増殖が阻害されることが示された。

【0004】

黒色腫は、色素産生細胞 (メラニン形成細胞) の悪性腫瘍であり、主として広範な転移のため、世界の皮膚がん関連死亡率の 75% の原因となっている。転移性黒色腫 (M M)

10

20

30

40

50

は、ほとんどの抗がんレジメンにごくわずかしかなるべき、MMの患者の平均全生存期間平均は8.5か月である。CEACAM1の過剰発現が不良な予後と相関し、転移性黒色腫の症例の多数で検出されているという証拠が存在する。CEACAM1は、正常なメラニン形成細胞ではめったに発現していないが、黒色腫細胞では頻繁に見られる。原発性皮膚黒色腫病変でのCEACAM1発現は、予後不良の転移性疾患の発症を強く予測する。さらに、健常なドナーと比べて、CEACAM1発現の増加が何人かの転移性黒色腫の患者に由来するNK細胞で観察された。

【0005】

CEACAM1がウイルス感染症において重要な役割を有し得ることが、証拠により示されている。例えば、Markelら(J. Clinical Investigation 2002、110、943~953)は、CMV感染患者の脱落膜から単離したリンパ球がCEACAM1タンパク質を増加したレベルで発現していることを証明した。脱落膜リンパ球でのCEACAM1発現増加は、局所免疫応答を減少させ、主に活性化脱落膜リンパ球による認識および排除を回避するためのウイルスにより開発された別の機構として作用し得る。子宮頸がんおよびヒトパピローマウイルス(HPV)感染上の前駆領域におけるCEACAM1のタンパク質発現パターンを研究したAlbarran-Somozara(Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2006、54、1393)は、CEACAM1免疫染色が、低悪性度扁平上皮内病変(SIL)および正常な子宮頸部組織と比べて高度SILで有意に増加していることを示した。著者らは、CEACAM1発現上昇が高度SILにおけるHPV DNAの組み込みと関連し得ることならびにCEACAM1がSILおよび子宮頸がん進行の重要な生物学的マーカーとなり得ることを示唆した。要するに、この証拠は、CEACAM1が種々のウイルス感染症で重要な役割を果たすことを示している。さらに、CEACAM1過剰発現は、種々のウイルス感染症のマーカーとして役立ち得る。

【0006】

国際公開第2007/063424号および米国特許公開出願第20070110668号は、免疫系を制御する方法、特に、リンパ球活性の制御を含む特異的免疫応答を制御する方法を開示している。これらの方法は、CEACAM1タンパク質機能の負と正の両方の調節を含む。

【0007】

米国特許公開出願第20070071758号は、例えば、CEACAM1に特異的な免疫グロブリンを使用するなど、CEACAM1タンパク質の活性を負に調節することにより、がんの処置において腫瘍浸潤リンパ球(TIL)療法の効果を高めるための方法および組成物を教示している。

【0008】

米国特許公開出願第20080108140号は、自己免疫疾患および組織の移植を必要とする疾患の処置で防御免疫を生み出す特異的免疫応答を調節する方法を開示している。特に、この文献は、標的組織中のCEACAM1タンパク質の機能的濃度を増加させることにより、標的化様式で免疫応答を抑制することに関する。

【0009】

米国特許公開出願第20040047858号は、CEACAM1を介してT細胞活性を調節することができる特異的抗体および免疫応答関連疾患(例えば、移植片対宿主病、自己免疫疾患、がん等)の処置へのその使用を開示している。

【0010】

米国特許公開出願第20020028203号、第20050169922号および第20080102071号は、胆汁糖タンパク質結合剤などの、T細胞阻害性受容体分子に結合し、T細胞活性(例えば、細胞傷害性および増殖)を調節する(すなわち、増強もしくは抑制する)組成物、および疾患(例えば、自己免疫疾患、免疫不全、がん等)の処置などのために前記組成物を使用する方法を開示している。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明者らの国際公開第2010/125571号は、特異的ハイブリドーマ細胞により産生されるマウスモノクローナル抗体を開示している。mAbは、CEACAM1に高度に選択性であり、CEACAMファミリーの他のメンバーと交差反応しない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

CEACAM1を認識する既知の抗体のいずれも、本発明のモノクローナル抗体の結合特異性の範囲を有さない。したがって、CEACAM発現または活性化が関与する疾患に診断的および治療的に使用可能なCEACAMタンパク質の特異的サブセットを認識する抗体を提供するという要求が満たされていない。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、CEACAMサブタイプの特異的セットを認識するモノクローナル抗体を開示する。有利なことに、本発明の抗体は、CEACAM1ならびにCEACAM5およびCEACAM3から選択される少なくとも1種の追加のサブタイプへの結合を示す。本発明の抗体は、特有のCDR配列およびフレームワーク組み合わせを有すること、ならびにCEACAM1分子内の新たに同定されたエピトープに結合することを特徴とする。本発明のモノクローナル抗体の特有の特異性は、追加の型の悪性腫瘍およびウイルス感染症の処置および診断のための治療上の有用性を広げた。また、本発明は、前記抗体を同定および単離する方法、その製造法、ならびにその治療的および診断的使用を提供する。

20

【0014】

本発明に係るモノクローナル抗体は、CDRの特異的組み合わせを有し、特有の特性ならびに既知の抗CEACAM1抗体に対して改善した特異性および能力を有する。

【0015】

一態様によれば、本発明は、配列番号1、2および3に示す配列を含む重鎖CDRと配列番号4、5および6に示す配列を含む軽鎖CDR、ならびにその類似体および誘導体を含む、CEACAM1を認識するモノクローナル抗体または少なくともその抗原結合部分を含むその抗体フラグメントを提供する。

【0016】

一部の実施形態によれば、配列番号1に示す配列を含む重鎖CDR1、配列番号2に示す配列を含む重鎖CDR2、配列番号3に示す配列を含む重鎖CDR3、配列番号4に示す配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5に示す配列を含む軽鎖CDR2および配列番号6に示す配列を含む軽鎖CDR3、ならびにその類似体および誘導体を有する、CEACAM1を認識するモノクローナル抗体または抗体フラグメントが提供される。

30

【0017】

一部の実施形態によれば、配列番号7、8および9に示す配列を有する重鎖CDRを含む、CEACAM1を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【0018】

一部の実施形態によれば、配列番号13、14および15に示す配列を有する重鎖CDRを含む、CEACAM1を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

40

【0019】

一部の実施形態によれば、配列番号10、11および12に示す配列を有する軽鎖CDRを含む、CEACAM1を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【0020】

一部の実施形態によれば、配列番号16、17および18に示す配列を有する軽鎖CDRを含む、CEACAM1を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

50

【 0 0 2 1 】

他の実施形態によれば、配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7 および 1 8 に示す C D R 配列を有するモノクローナル抗体が提供される。

【 0 0 2 2 】

さらに他の実施形態によれば、配列番号 7、8、9、1 0、1 1 および 1 2 に示す C D R 配列を有するモノクローナル抗体が提供される。

【 0 0 2 3 】

参照配列の抗原結合部分と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するモノクローナル抗体またはそのフラグメントも本発明の範囲内にある。

【 0 0 2 4 】

一部の実施形態によれば、参照配列の抗原結合部分と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するモノクローナル抗体またはそのフラグメントの類似体および誘導体が提供される。特定の実施形態によれば、抗体は、配列番号 2 6 :

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNNLI EWVKQRPQGLEWIGVINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAY
MQLSSLTSDDSAVYFCARGDYYGGFAVDYWGQGTSVTVSS

の配列番号 2 6 に示す配列を有する重鎖可変ドメイン配列、または重鎖配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。

【 0 0 2 5 】

さらに別の実施形態によれば、抗体は、

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQKQPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ
EDIATYFCQQGKSLPRTFGGGTKLEIK

の配列番号 2 8 に示す配列を有する軽鎖可変ドメイン配列、または軽鎖配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体を含む。

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 2 6 に示す配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号 2 8 に示す配列を有する軽鎖可変ドメイン、あるいは抗体またはフラグメント配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体または誘導体を含む。

【 0 0 2 7 】

本発明は、ハイブリドーマ細胞または他の生物系から単離したモノクローナル抗体、ならびに組換え的または合成的に産生されたモノクローナル抗体を包含する。本発明に係るモノクローナル抗体は、限定するものではないが、マウス、ラットおよびヒトを含む、任意の哺乳動物種の定常領域を含有し得る。本発明に係るモノクローナル抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、異種抗体、および抗体の少なくとも抗原結合部分を含む抗体フラグメントを含む。具体的な実施形態によれば、抗体フラグメントは、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F d'、F v、d A b、単離 C D R 領域、単鎖抗体、「ダイアボディ」および「線状抗体」からなる群から選択される。

【 0 0 2 8 】

一部の特定の実施形態によれば、本発明は、

i . マウス I g G 2 a、マウス I g G 2 b、マウス I g G 3、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3 からなる群から選択されるフレームワーク配列と、

i i . 配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7 および 1 8 に示す配列を有する 6 つの C D R のセット ; または配列番号 7、8、9、1 0、1 1 および 1 2 に示す配列を有する 6 つの C D R のセット ; ならびに前記 C D R 配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体と

を含むモノクローナル抗体または抗体フラグメントであって、

少なくとも約 5×10^{-7} M のアフィニティで少なくとも 2 種の C E A C A M サブタイプに結合するモノクローナル抗体または抗体フラグメントを提供する。

【 0 0 2 9 】

一部の実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、少なくとも

10

20

30

40

50

約 5×10^{-7} M のアフィニティで少なくとも 2 種の C E A C A M サブタイプに結合する。

【0030】

他の実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、少なくとも約 10^{-8} M のアフィニティで C E A C A M 1 に結合する。

【0031】

一部の具体的な実施形態によれば、モノクローナル抗体はキメラモノクローナル抗体である。

【0032】

一部の実施形態によれば、キメラ抗体はヒト由来定常領域を含む。

10

【0033】

一部の実施形態によれば、キメラ抗体のヒト定常領域は、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2 およびヒト I g G 3 からなる群から選択される。

【0034】

特定の実施形態によれば、配列番号 13、14、15、16、17 および 18 に示す配列を有する 6 つの C D R ; または配列番号 7、8、9、10、11 および 12 に示す配列を有する 6 つの C D R ; ならびに前記 C D R 配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体と、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2 およびヒト I g G 3 から選択される定常領域サブクラスとを含む、C E A C A M 1 を認識するキメラまたはヒト化モノクローナル抗体であって、少なくとも約 5×10^{-7} M のアフィニティで少なくとも 2 種の C E A C A M サブタイプに結合するモノクローナル抗体が提供される。

20

【0035】

具体的な実施形態によれば、キメラもしくはヒト化モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、ヒト I g G 1 サブタイプの定常領域サブクラスを含む。

【0036】

別の特定の実施形態によれば、配列番号 30 で示される重鎖配列を含むキメラモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【0037】

さらに別の特定の実施形態によれば、配列番号 31 で示される軽鎖配列を含むキメラモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

30

【0038】

さらに別の特定の実施形態によれば、配列番号 30 で示される重鎖配列および配列番号 31 で示される軽鎖配列を有するキメラモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【0039】

特定の実施形態によれば、A T C C 寄託番号 P T A - 12130 として 2011 年 9 月 28 日に寄託されたプラスミドに含有される重鎖および軽鎖の D N A 配列から産生された C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体が提供される。

【0040】

本発明のモノクローナル抗体は、一部の実施形態によれば、2 種以上の C E A C A M サブタイプへの特異的結合を示す。一部の実施形態によれば、モノクローナル抗体は、少なくとも 2 種の異なる C E A C A M サブタイプに結合する。一部の具体的な実施形態によれば、モノクローナル抗体は、C E A C A M 1 ならびに C E A C A M 3 および C E A C A M 5 の少なくとも 1 つに結合する。特定の実施形態によれば、モノクローナル抗体は、C E A C A M 1 および C E A C A M 5 に結合する。別の特定の実施形態によれば、モノクローナル抗体は、C E A C A M 1 および C E A C A M 3 に結合する。さらに他の実施形態によれば、本発明に係るモノクローナル抗体は、C E A C A M サブタイプ 1、3 および 5 に結合する。

40

【0041】

特定の実施形態によれば、本発明に係るモノクローナル抗体は、C E A C A M 4 および

50

C E A C A M 6 に結合しない。

【 0 0 4 2 】

さらに別の態様によれば、本発明は、配列番号 2 6 または配列番号 3 0 で示される重鎖配列と配列番号 2 8 または配列番号 3 1 で示される軽鎖配列とを有する C E A C A M 1 に対するモノクローナル抗体が結合する C E A C A M 1 分子上の同一エピトープに結合することができる、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントを提供する。

【 0 0 4 3 】

一部の実施形態によれば、モノクローナル抗体は、それぞれ配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) および P N A S L L I Q N V T (配列番号 3 3) を有するヒト C E A C A M 1 の残基 1 7 ~ 2 9 および 6 8 ~ 7 9 中のエピトープと反応性である。

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態によれば、モノクローナル抗体が結合する C E A C A M 1 分子上のエピトープは、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) および P N A S L L I Q N V T (配列番号 3 3) 中のアミノ酸残基を含むエピトープである。

【 0 0 4 5 】

他の実施形態によれば、本発明に係るモノクローナル抗体は、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) の少なくとも 4 個のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

【 0 0 4 6 】

さらに他の実施形態によれば、本発明に係るモノクローナル抗体は、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) および P N A S L L I (配列番号 3 4) 中のエピトープに結合する。

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、配列番号 7、8、9、10、11 および 12 で示される 6 つの C D R 配列を有する抗体が結合するのと同じエピトープに結合する。

【 0 0 4 8 】

さらに他の実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、配列番号 13、14、15、16、17 および 18 を有する抗体が結合するのと同じエピトープに結合する。

【 0 0 4 9 】

特定の実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 1 3 0 として 2 0 1 1 年 9 月 2 8 日に寄託された D N A 配列から産生された抗体が結合する同一エピトープに結合する。

【 0 0 5 0 】

本発明は、さらに別の態様によれば、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) の少なくとも 3 個のアミノ酸および配列 P N A S L L I Q N V T (配列番号 3 3) の少なくとも 3 個のアミノ酸を含む 6 ~ 2 0 個のアミノ酸の単離ペプチド配列を提供する。親配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 % または 9 8 % の相同性を有する、前記ペプチドの類似体および誘導体も本発明の範囲内にある。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態によれば、単離ペプチドは、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) の少なくとも 6 個のアミノ酸を含む。

【 0 0 5 2 】

さらに他の実施形態によれば、単離ペプチドは、配列 V L L L V H N L P Q Q L F (配列番号 3 2) および P N A S L L I (配列番号 3 4) のアミノ酸を含む。

【 0 0 5 3 】

モノクローナルまたはポリクローナル抗体を産生するための単離ペプチドの使用、ならびに診断または処置へのその使用も本発明の範囲内にある。

【 0 0 5 4 】

C E A C A M 1 に対するアフィニティおよび特異性を有する、本発明に係る抗体または抗体フラグメントをコードする核酸分子も本発明の範囲内にある。

【 0 0 5 5 】

この態様によれば、C E A C A M 1 を認識する抗体またはその抗体フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列も開示される。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態によれば、単離ポリヌクレオチド配列は、配列番号 2 5 に示す D N A 配列または前記 D N A 配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体を含む。他の実施形態によれば、単離ポリヌクレオチド配列は、配列番号 2 7 に示す D N A 配列または前記 D N A 配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体を含む。

10

【 0 0 5 7 】

本発明に係るモノクローナル抗体またはそのフラグメントをコートする少なくとも 1 種のポリヌクレオチド配列を含むプラスミド、ならびにこれらのプラスミドを含む宿主細胞も開示される。

【 0 0 5 8 】

特定の実施形態によれば、A T C C 寄託番号 P T A - 1 2 1 3 0 として 2 0 1 1 年 9 月 2 8 日に寄託された配列番号 2 5 および 2 7 で示されるポリヌクレオチド配列を含むプラスミドが開示される。

【 0 0 5 9 】

別の態様では、本発明は、C E A C A M 1、C E A C A M 3 または C E A C A M 5 の発現、活性化または機能に関連する疾患または障害を予防、弱化または処置するのに有用な医薬組成物に関する。本発明に係る医薬組成物は、治療有効量の、C E A C A M 1、C E A C A M 3 または C E A C A M 5 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントと、薬学的に許容可能な担体とを含む。

20

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態によれば、医薬組成物は、少なくとも 10^{-8} k D の結合アフィニティで C E A C A M 1 に結合することができるモノクローナル抗体を含む。

【 0 0 6 1 】

追加の実施形態によれば、医薬組成物は、少なくとも約 10^{-8} k D のアフィニティで C E A C A M 1 に結合するならびに少なくとも約 5×10^{-7} M のアフィニティで C E A C A M 3 および C E A C A M 5 の少なくとも 1 つに結合することができるモノクローナル抗体を含む。

30

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態によれば、医薬組成物は、少なくとも約 5×10^{-7} M のアフィニティで C E A C A M 1、C E A C A M 3 および C E A C A M 5 に結合することができるモノクローナル抗体を含む。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態によれば、C E A C A M 1、C E A C A M 3 および / または C E A C A M 5 の発現、活性化または機能に関連する疾患または障害は、細胞増殖性疾患または障害である。一部の実施形態によれば、細胞増殖性疾患または障害はがんである。

40

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態によれば、C E A C A M 5 の過剰発現に関連するがんは、胃腸、結腸直腸 (C R C)、膵臓、非小細胞肺癌 (N S C L)、乳房、甲状腺、胃、卵巣および子宮からなる群から選択される。

【 0 0 6 5 】

具体的な実施形態によれば、C E A C A M 1 の過剰発現に関連するがんは、黒色腫、膵がん、全ての型の肺癌および骨髄腫である。

【 0 0 6 6 】

本発明に係る医薬組成物は、単独処置として、または任意の他の治療剤を用いた処置に加えて投与され得る。具体的な実施形態によれば、本発明に係る抗体は、少なくとも 1 種

50

の抗がん剤と併せて処置レジメンの一部としてそれを必要とする対象に投与される。本発明に係る医薬組成物は、他の薬剤と共にまたは別々に投与され得る。

【0067】

別の態様では、本発明は、対象のCEACAM1、CEACAM3およびCEACAM5からなる群から選択される少なくとも1種のCEACAMサブタイプを検出するのに有用な診断用組成物を提供する。本発明に係る診断用組成物は、治療有効量の、CEACAM1、CEACAM3もしくはCEACAM5に対する少なくとも約 5×10^{-7} Mのアフィニティを有するモノクローナル抗体、または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントと、任意の担体または賦形剤とを含む。

【0068】

さらに別の態様では、本発明は、治療有効量のCEACAMに対する抗体と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、CEACAMの発現、活性化または機能に関連する疾患または障害を予防、弱化または処置する方法に関する。

【0069】

一部の実施形態によれば、疾患または障害は細胞増殖性疾患または障害である。特定の実施形態によれば、細胞増殖性疾患または障害はがんである。具体的な実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、CEACAM1に対する少なくとも約 10^{-8} Mのアフィニティを有し、がんは黒色腫である。

【0070】

他の実施形態によれば、モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、CEACAM5に対する少なくとも約 5×10^{-7} Mのアフィニティを有し、がんは、胃腸、結腸直腸(CRC)、膵臓、非小細胞肺癌(NSCL)、乳房、甲状腺、胃、卵巣および子宮からなる群から選択される。

【0071】

追加の実施形態によれば、CEACAM1の過剰発現に関連する疾患または障害はウイルス感染症である。

【0072】

一部の実施形態によれば、ウイルス感染症は、限定するものではないが、サイトメガロウイルス(CMV)、アデノウイルス、肝炎ウイルスおよびヒトパピローマウイルス(HPV)などのDNAウイルス；ならびに限定するものではないが、インフルエンザウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス(HIV)などのRNAウイルスからなる群から選択されるウイルスにより引き起こされる。

【0073】

本発明の態様によれば、CEACAM発現リンパ球を抗体または抗体フラグメントと接触させるステップを含む、免疫調節法が提供される。

【0074】

本発明の態様によれば、CEACAM発現腫瘍細胞を抗体または抗体フラグメントと接触させ、それによってCEACAM発現腫瘍細胞の移動を阻害するステップを含む、CEACAM発現腫瘍細胞の移動を阻害する方法が提供される。

【0075】

一部の実施形態によれば、腫瘍細胞は、黒色腫腫瘍細胞を含む。

【0076】

本発明の態様によれば、治療有効量の抗体または抗体フラグメントを、それを必要とする対象に投与し、それによって対象のがんを処置するステップを含む、がんを処置する方法が提供される。

【0077】

本発明の態様によれば、CEACAM1発現リンパ球を抗体または抗体フラグメントと接触させ、それによってCEACAM1ホモタイプまたはヘテロタイプタンパク質-タンパク質相互作用を阻害するステップを含む、CEACAMホモタイプまたはヘテロタイプ

10

20

30

40

50

タンパク質 - タンパク質相互作用を阻害する方法が提供される。

【0078】

一部の実施形態によれば、単離抗体または抗体フラグメントは、細胞傷害性部分に付着している。

【0079】

一部の実施形態によれば、細胞傷害性部分は、細胞毒、ケモカイン、化学療法組成物、アポトーシス促進性物質 (pro-apoptotic)、インターフェロン、放射性部分、またはこれらの組み合わせを含む。

【0080】

一部の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、同定可能部分に付着している。

【0081】

一部の実施形態によれば、がんの細胞は、非罹患細胞に比べてCEACAM1の過剰発現を特徴とする。

【0082】

一部の実施形態によれば、がんを処置する方法は、リンパ球を対象に投与するステップをさらに含む。

【0083】

一部の実施形態によれば、リンパ球は、T細胞およびNK細胞を含む。一部の実施形態によれば、リンパ球は、CEACAM1を発現している。他の実施形態によれば、CEACAM1発現リンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)である。他の実施形態によれば、CEACAM1発現リンパ球は、細胞傷害性T細胞である。

【0084】

本発明の抗体を使用して免疫エフェクター細胞(CEACAM発現リンパ球、例えば、腫瘍浸潤細胞、T細胞もしくはNK細胞)および標的細胞(例えば、がん細胞などのCEACAM発現病理細胞)のいずれかまたは両方のCEACAMを遮断することができる。この治療にとっての候補であるがん細胞の例としては、限定するものではないが、黒色腫、肺、甲状腺、乳房、結腸、前立腺、肝臓、膀胱、腎臓、子宮頸部、膵臓、白血病、リンパ腫、骨髄、卵巣、子宮、肉腫、胆汁、または子宮内膜細胞が挙げられる。

【0085】

本発明のさらなる態様によれば、CEACAM発現腫瘍細胞を免疫調節に感受性にする方法が提供される。この方法は、CEACAM発現腫瘍細胞(例えば、黒色腫、肺、甲状腺、乳房、結腸、前立腺、肝臓、膀胱、腎臓、子宮頸部、膵臓、白血病、リンパ腫、骨髄、卵巣、子宮、肉腫、胆汁、または子宮内膜細胞)を上記抗体または抗体フラグメントと接触させ、それによってCEACAM発現腫瘍細胞を免疫調節に感受性にするステップを含む。

【0086】

上記に加えてまたは上記に代えて、本発明は、CEACAM1発現リンパ球を本明細書に記載する抗体または抗体フラグメントと接触させることによる、免疫調節(例えば、CEACAM1ホモタイプまたはヘテロタイプタンパク質 - タンパク質相互作用を阻害する)方法も想起する。

【0087】

本教示の治療または予防法は、生体外で(例えば、T細胞系養子免疫療法で使用する)または生体内で行うことができる。

【0088】

本発明の一部の実施形態の抗体は、上記免疫調節活性から独立した抗がん活性を有することができる。

【0089】

別の態様では、本発明は、有効量の、CEACAMを認識する抗体を含む組成物および抗新生物組成物を対象に投与するステップを含む、がんを有する対象の応答または生存の

10

20

30

40

50

持続時間または進行を増加させる方法であって、前記抗新生物組成物は少なくとも１種の化学療法剤を含み、それによって抗体および抗新生物組成物の同時投与により応答または生存の持続時間または進行が有効に増加する方法を提供する。

【００９０】

さらに、本発明は、有効量の、ＣＥＡＣＡＭに対する抗体を含む組成物および抗新生物組成物を対象に投与し、それによってＣＥＡＣＡＭに対する抗体および抗新生物組成物の同時投与により対象の群で応答発生率が有効に増加するステップを含む、がんを有する対象を処置する方法を提供する。

【００９１】

治療的用途とは別に、本発明の抗体を診断的用途に使用することもできる。

10

【００９２】

したがって、さらなる態様によれば、対象由来の生体試料（生体内、試験管内または生体外）を本明細書に記載する抗体または抗体フラグメントと接触させるステップを含む、それを必要とする対象のがんを診断する方法であって、所定の閾値を超える複合体形成は対象のがんを示す方法が提供される。一部の実施形態によれば、がんの細胞は、非罹患細胞に比べてＣＥＡＣＡＭの過剰発現を特徴とする。

【００９３】

特定の実施形態によれば、診断されるがんは、黒色腫、膵がん、肺がんおよび骨髄腫からなる群から選択される。

【００９４】

別の特定の実施形態によれば、測定されるタンパク質はＣＥＡＣＡＭ５であり、診断されるがんは胃腸、結腸直腸（ＣＲＣ）、膵臓、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬ）、乳房、甲状腺、胃、卵巣および子宮からなる群から選択される。

20

【００９５】

上記のように、本発明の方法は、免疫複合体を形成するのに十分な条件下で行われる。前記条件（例えば、適当な濃度、緩衝液、温度、反応時間）ならびに前記条件を最適化する方法は、当業者に知られており、例は本明細書に開示される。本明細書で使用する場合、「免疫複合体」という句は、本発明の抗体およびＣＥＡＣＡＭを含む複合体を指す。本発明の免疫複合体の存在またはレベルを決定することは直接的であっても抗体に付着し得る同定可能（検出可能）部分を検出することによってもよい。

30

【００９６】

試験細胞（例えば、それを必要とする対象の細胞）中の免疫複合体のレベルを所定の閾値と比較する。本発明の抗体を使用して血清可溶性ＣＥＡＣＡＭの量を測定することもできることが認識されるであろう。とにかく、閾値は既知の基準レベルおよび／または対照細胞もしくは血清中のレベルに基づいて決定され得る。対照細胞は、対照の健常対象（例えば、がんを患っていない対象）または疾患発症前もしくは処置後の同じ対象から得ることができる。本発明の一部の実施形態によれば、対照対象は、同じ種、例えば、好ましくはそれを必要とする対象と同じ年齢、体重、性別等に一致したヒトである。

【００９７】

診断を容易にするために、上記教示を、限定するものではないが、画像法、分子検査および外科生検を含む、当業界で公知の他のがん診断法と組み合わせることができる。

40

【００９８】

本発明の別の態様によれば、ＣＥＡＣＡＭの存在を検出または定量化する方法が提供される。したがって、また、本発明は、ＣＥＡＣＡＭを認識する抗体を使用して、ＣＥＡＣＡＭ発現に関連する状態を診断する方法も提供する。本発明に係る診断法は、試験管内または生体外で、具体的な実施形態に従って行うことができる。本発明に係る抗体を使用してスクリーニング法を構成することもできる。例えば、当業界で公知の標準的方法により、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して、ポリペプチドの分泌または細胞結合レベルを測定するために、ＥＬＩＳＡアッセイを構築することができる。

【００９９】

50

一実施形態によれば、

i . 生体試料を C E A C A M に対する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントと共にインキュベートするステップと、

i i . 検出可能プローブを使用して結合した C E A C A M を検出するステップと、

i i i . (i i) の量を既知の量の C E A C A M を含有する基準試料から得た標準曲線と比較するステップと、

i v . 標準曲線から試料中の C E A C A M の量を計算するステップと
を含む、C E A C A M の存在を検出または定量化する方法が提供される。

【0100】

別の実施形態によれば、

i . 生体試料を C E A C A M に対する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントと共にインキュベートするステップと、

i i . 検出可能プローブを使用して結合した C E A C A M を検出するステップと、

i i i . (i i) の量を既知の量の C E A C A M を含有する基準試料から得た標準曲線と比較するステップと、

i v . 標準曲線から試料中の C E A C A M の量を計算するステップと、

v . (i v) の量を正常な C E A C A M 量と比較するステップと

を含む、C E A C A M 発現に関連する疾患または障害を診断する方法が提供される。

【0101】

一の実施形態によれば、生体試料は、哺乳動物対象の体液である。特定の実施形態によれば、哺乳動物対象はヒトである。

【0102】

本発明の抗体を、患者の C E A C A M レベルを評価し、処置の有効性を予測するためのスクリーニングアッセイに使用することもできる。本発明の抗体を用いたスクリーニングアッセイにより、C E A C A M のレベルを決定すること、それゆえ処置成績の予測および適当な処置レジメンの計画が可能となり得る。

【0103】

他の実施形態によれば、C E A C A M 1、C E A C A M 3 および C E A C A M 5 の少なくとも1つのレベルを評価する。特定の実施形態によれば、C E A C A M 1 のレベルを評価する。

【0104】

本発明の一部の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは同定可能部分に付着している。

【0105】

抗体またはそのフラグメントと同定可能部分の前記付着は、当業界で公知の方法による化学的接合または組換え D N A 技術により行うことができることが認識されるであろう。

【0106】

同定可能部分は、結合対の追加のメンバーと直接可視化される標識の相互作用を通して同定可能な結合対のメンバーおよびであり得る。一例では、結合対のメンバーは、対応する標識抗体により同定される抗原である。一例では、標識は蛍光タンパク質または比色反応を引き起こす酵素である。

【0107】

本発明の別の態様は、細胞増殖性もしくは血管新生関連疾患または障害あるいはウイルス感染症の診断または処置のための、C E A C A M に対する抗体またはその抗体フラグメントの使用に関する。

【0108】

一実施形態によれば、細胞増殖性疾患は黒色腫である。

【0109】

他の実施形態によれば、細胞増殖性疾患または障害は、胃腸、結腸直腸 (C R C)、膵臓、非小細胞肺癌 (N S C L)、乳房、甲状腺、胃、卵巣および子宮からなる群から選

10

20

30

40

50

扱われるがんである。

【0110】

一実施形態によれば、本発明は、限定するものではないが、がんおよびウイルス感染症を含む発現または活性化に関連する障害または疾患を処置するための医薬品を調製するための、CEACAMに対する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントの使用を提供する。

【0111】

また、本発明は、細胞増殖性もしくは血管新生関連疾患または障害あるいはウイルス感染症を診断するための診断用組成物を製造するための、CEACAMに対する抗体またはその抗体フラグメントの使用に関する。

10

【0112】

CEACAM1、CEACAM3およびCEACAM5抗体についての既知のまたは従来技術で想起される本質的に全ての使用を、これらのタンパク質に対する改善したアフィニティならびにCEACAM1保有細胞に対する優れた阻害および間接的免疫調節効果を有することが示されている本発明の抗体により達成することができる。これらの使用には、診断、予防および治療技術が含まれる。

【0113】

本発明のさらなる実施形態およびその利用可能性の完全な範囲は、以下に示す詳細な説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0114】

【図1】キメラ抗体CM10の軽鎖および重鎖を示すSDS-PAGE像を示す図である。

【図2】精製hCEACAM1へのCM10の特異的結合曲線を示す図である。

【図3】フローサイトメトリ分析により検出される、CEACAM1へのCM10の特異的結合を示す図である。

【図4】CM10が細胞間のCEACAM1-CEACAM1相互作用を遮断することを確認する図である。種々のCM10濃度の存在下でインキュベートしたエフェクター細胞(CEACAM1を発現しているBW/221細胞)のマウスIL-2分泌をELISAにより測定した。

30

【図5】CEACAM1-陽性黒色腫細胞の特異的死滅活性のCM10増強を示す図である。

【図6】CM10が腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の死滅活性を刺激することを示す図である。

【図7】CM10がCEACAM1陽性黒色腫細胞系に対するNK細胞の死滅活性を増強することを示す図である。

【図8】CM10免疫調節効果が生体内で腫瘍成長を阻害することを示す図である。矢印は投与の時間を示す(CM10 円、TIL 三角形、CM10およびTIL 白抜き正方形)。

【図9】CM10免疫調節作用様式の概略図である。

40

【図10】抗CEACAM1抗体により決定される腫瘍中のCEACAM1結合強度レベルを表す図である。

【図11】1細胞あたりに結合しているCM10分子の定量化を示す図である。

【図12】CM10がPBMc増殖に効果を有さないことを確認する図である。結果は、各処理について3人のドナーからの平均増殖速度を表す。

【図13-1】CM10とCEACAMファミリータンパク質間の結合のFACS分析を示す図である。CEACAM1、および5を721.221細胞で発現させた。

【図13-2】CM10とCEACAMファミリータンパク質間の結合のFACS分析を示す図である。CEACAM6および8を721.221細胞で発現させた。

【図13-3】CM10とCEACAMファミリータンパク質間の結合のFACS分析を

50

示す図である。C E A C A M 3 および 4 を H E K 2 9 3 T 細胞で発現させた。

【図 1 4】黒色腫細胞系での補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイの結果を表す図である。

【図 1 5】C M 1 0 が C E A C A M 1 および H L A - A 2 陽性黒色腫細胞の存在下で T I L のグランザイム B 分泌を増強することを示す図である。

【図 1 6】C M 1 0 が C E A C A M 1 - C E A C A M 5 相互作用を遮断することを示す図である。

【図 1 7】H L A 拘束性 T 細胞死滅の C M 1 0 増強を表す図である。

【図 1 8】C M 1 0 の免疫調節活性が生体内で腫瘍成長を阻害することを示す図である。

【図 1 9】C M 1 0 が C E A C A M 1 陽性膵がん細胞系 C O L O - 3 5 7 および B X P C 3 に対する N K 細胞の死滅活性を増強することを示す図である。

【図 2 0 - 1】C M 1 0 が C E A C A M 1 陽性膵がん細胞系の存在下で N K 細胞のグランザイム B 分泌を増強することを示す図である。

【図 2 0 - 2】C M 1 0 が C E A C A M 1 陽性膵がん細胞系の存在下で N K 細胞のグランザイム B 分泌を増強することを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 1 1 5】

本発明は、改善した特有の特異性、選択性、アフィニティおよび / または活性を有する C D R 配列の特異的セットを含む C E A C A M 1 を認識する抗体を提供する。

【0 1 1 6】

本発明に係る抗体は、他の抗 C E A C A M 1 抗体よりも高いアフィニティで C E A C A M 1 に結合し、全ての抗 C E A C A M 抗体がそうであるわけではないが、ポリクローナル抗 C E A C A M 抗体よりも効率的に C E A C A M 1 の機能を遮断する。さらに、本発明に係る抗体は、がん細胞、特に黒色腫細胞に対して有効である。この抗体は、黒色腫細胞をリンパ球により感受性にし、生体内で黒色腫細胞成長速度を阻害し、抗体を生体内で養子 T 細胞移入と組み合わせるとその効果が増強する。

【0 1 1 7】

本発明に係る抗 C E A C A M 1 抗体の生体内抗黒色腫効果は、直接的抗腫瘍効果ならびに細胞を反応性リンパ球により感受性にする免疫調節効果の組み合わせであることがここで初めて示されている。

【0 1 1 8】

本発明に係る抗体、フラグメントおよび誘導体は、診断、免疫調節およびがん処置のための有効なツールとして使用することができる。

【0 1 1 9】

抗体は、免疫エフェクター細胞および C E A C A M 1 を発現している標的細胞の共インキュベーション、ならびに I L - 2 分泌の評価、ならびに試験管内致死アッセイにより決定されるように、C E A C A M 1 同種アフィニティ相互作用を阻害する。

【0 1 2 0】

本発明の抗体は、特異的標的細胞の存在下で、H L A 拘束性 T 細胞死滅を増強する C M 1 0 を増強し、エフェクター N K および T 細胞からのグランザイム B (セリンプロテアーゼが標的細胞の媒介アポトーシスに関与する) 分泌を増強することが示されており、したがって、抗体による標的細胞の観察される死滅の増強を可能にする。この抗体はまた、用量依存的様式で C E A C A M 1 と C E A C A M 5 の間の結合を阻害するので、これを使用して高レベルの C E A C A M 5 を発現し、免疫細胞を抑制するために C E A C A M 1 - C E A C A M 5 軸を利用している悪性腫瘍を処置することができる。

【0 1 2 1】

さらに、本明細書では、本発明に係る抗体が黒色腫細胞浸潤を阻害するのに有効であることが示されている。さらに、単独でまたは反応性リンパ球と組み合わせる本発明に係る抗体の生体内投与が、黒色腫腫瘍の成長を阻害するのに有効であることが示された。養子ヒト T 細胞移入とモノクローナル抗体注入の組み合わせにより、アイソタイプ対照群と

10

20

30

40

50

比べて有意な相乗作用が示され、異種移植片成長が強力に阻害された。

【 0 1 2 2 】

本発明のさらなる態様によれば、上記特異的 C D R セグメントを有する抗原認識ドメインを含む本明細書に定義する抗体と同じ結合特異性および選択性を有する単離抗体または抗体フラグメントが提供される。この態様によれば、単離抗体または抗体フラグメントは、その特異的 C D R セグメント配列により上記抗体が結合するのと同じ C E A C A M 1 タンパク質のエピトープ決定基に結合することができる。

【 0 1 2 3 】

本発明に係るモノクローナル抗体が結合するエピトープの提案される配列が、追加のモノクローナル抗体の産生させるために使用可能なこのエピトープ由来の提案される単離ペプチドと共に、同時に本明細書に開示される。

10

【 0 1 2 4 】

モノクローナル抗体 (m A b) は、腫瘍細胞を選択的に標的化し、いったん結合したら種々の応答を誘発するよう設計することができる。これらの薬剤は、腫瘍細胞増殖を遮断するか、または免疫系を活性化などの異なる方法で腫瘍細胞を破壊することができる。本発明に係るキメラモノクローナル抗体を、C E A C A M 1 タンパク質および他の C E A C A M サブタイプタンパク質に特異的に結合し、その種々の機能を無効にする、および腫瘍細胞の特異的死を誘発するよう設計した。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、本発明に係るモノクローナル抗体は、がん性細胞に対する免疫系の活性化を通して作用することが示唆される。

20

【 0 1 2 5 】

臨床的および生物学的証拠の両方が、標的化免疫療法を開発するための有望な標的として C E A C A M 1 に脚光を当てている。C E A C A M 1 は、正常なメラニン形成細胞には見られないが、転移性黒色腫標本の大部分で新たな発現 (n e o - e x p r e s s i o n) を受け、広範に発現している。C E A C A M 1 が N K 細胞および T 細胞のエフェクター機能を阻害することにより黒色腫細胞を保護することが以前に機構的に示されている。

【 0 1 2 6 】

C M 1 0 が高いアフィニティでヒト C E A C A M 1 に結合するキメラモノクローナル抗体であることが本明細書で初めて示されている。試験管内で、C M 1 0 は用量依存的様式で C E A C A M 1 同種アフィニティ相互作用を効率的に遮断し、T 細胞および N K 細胞による C E A C A M 1 陽性黒色腫細胞死滅を改善する。さらに、C M 1 0 は、黒色腫反応性ヒト T リンパ球 (腫瘍浸潤リンパ球、T I L) と共に全身投与すると、黒色腫異種移植片の生体内成長を有意に阻害した。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、このことは、示唆された作用機構 ; 活性化リンパ球による腫瘍細胞の免疫防御相互作用の抑止と一致する。

30

【 0 1 2 7 】

いくつかの証拠により、C E A C A M 1 が結腸、前立腺、乳房、腎臓等を含む多種多様な上皮細胞で発現していることが報告された。I H C による正常なおよび悪性の組織についての C E A C A M 1 発現プロファイルの幅広い調査が行われた。発現分析により、正常なヒト組織で試験した組織の大部分で染色がなかったのに対し、黒色腫細胞では強い染色が示された。それにもかかわらず、いくつかの臓器の限られた部位でいくつかの選択的染色が観察された。より定量的な方法を使用して、悪性のおよび正常な一次細胞に結合した C M 1 0 m A b 分子の数を定量化すると、正常な細胞では極めて低い C M 1 0 分子が検出され、このことは C M 1 0 がほとんど患者の腫瘍細胞に結合することを示していると思われる。さらに、C M 1 0 は、一次細胞増殖に効果を有さず、完全にまたはほとんど完全に C D C も A D C C も誘発することができないことが示され、このことはヒト対象におけるこのモノクローナル抗体の潜在的安全性を示している。

40

【 0 1 2 8 】

C M 1 0 は免疫調節活性を有するので、考えられる免疫関連の副作用を評価する。P B M C 活性化後、C E A C A M 1 を活性化リンパ球で上方制御する (G r a y - O w e n お

50

よび Blumberg 2006、Nat Rev Immunol 6、433～46)。
生体外ヒトPBM C増殖アッセイにより、CM10がナイーブおよび活性化PBM C増殖応答に効果を有さないことが明らかになった。

【0129】

一般的阻害機構の抑止に対するCEACAM1遮断の主な利点は、腫瘍の近傍に対する予測される選択性、それゆえ他の一般的免疫毒性剤と比べて有害事象が少ないことである。

【0130】

本発明で示されるように、CM10は、力強い活性および安全性プロファイルを示し、がん免疫療法のための有望な候補であり、これを戦略として使用して黒色腫および非小細胞肺がんなどの数種の悪性腫瘍における内因性免疫応答の抗腫瘍特性を選択的に増強することができる。

10

【0131】

追加のCEACAMサブタイプへの結合により、抗体の治療プロファイルが増加するので、これを、CEACAM1を広範には発現していないが、例えば、CEACAM5を発現している他の型の悪性腫瘍の診断および処置に使用することができる。

【0132】

CEACAM5は、胃腸、結腸直腸(CRC)および膵がんの90%、非小細胞肺がんの70%、ならびに乳がんの50%を含む、多くのヒト腫瘍の高い割合で過剰発現していることが分かっている。また、CEACAM5は、甲状腺、胃、卵巣および子宮がんでも過剰発現している(Thompson、Grunertら 1991、J Clin Lab Anal 5、344～66)。CEACAM5は、CRCの肝臓転移および結腸がんの術後監視のための臨床マーカーとして有用でさえある(Duffy 2001、Clin Chem 47、624～30)。CM10がCEACAM5に結合することができるという証拠は極めて重要であり、4～5種の悪性腫瘍から10種超までCM10により処置することができる可能な適応症を広げることができる。臨床試験に入った抗CEACAM5剤には、種々の悪性腫瘍の診断目的と処置目的の両方のための放射性物質などの毒性物質と接合した抗CEACAM5抗体が含まれる。これらの毒性接合型でさえ安全性の課題を示さないように思われ、このことはCEACAM5が安全な標的であることを示し得る。

20

30

【0133】

マウスIgGサブクラスのヒト対応物は、生物および機能活性の類似性に基づく。マウスIgG2aおよびIgG2bならびにヒトIgG1およびIgG3は、補体を固定し、タンパク質抗原に結合する能力を共有している(Hussainら、1995、Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 726～732)。マウスIgG1およびヒトIgG4は、肥満細胞への結合の特性のために類似しているとみなされる。ヒトIgG4は、補体を活性化しない唯一のヒトIgGサブクラスであり、サブクラスIgG1および3は、補体を活性化するのに最も有効である。マウスについては、IgG1と共に活性であるサブクラスはIgG2aおよびIgG2bであり、おそらくIgG3は不活性である(Clark MR、Chem Immunol 1997; 65: 88～110)。

40

【0134】

CEACAM1を認識する数種の既知のモノクローナル抗体は、サブタイプマウスIgG1のものである。マウスIgG1のヒト同等物はIgG4であるので、ヒトIgG4定常フレームワークを含むキメラ抗体を作成することが予想されるであろう。本発明の一部の実施形態によりキメラモノクローナル抗体がヒトIgG1定常フレームワークを含むことは予想外である。

【0135】

一態様によれば、本発明は、配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択される配列を含む少なくとも1つの重鎖CDRと配列番号4、配列番号5および配列

50

番号 6 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 1 つの軽鎖 C D R、ならびにその類似体および誘導体を含む、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくともその抗原結合部分を含む抗体フラグメントを提供する。

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態によれば、参照配列の配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントの類似体および誘導体が開示される。

【 0 1 3 7 】

他の実施形態によれば、参照配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントの類似体および誘導体が開示される。

【 0 1 3 8 】

さらに他の実施形態によれば、参照抗体の C D R 配列と少なくとも 9 8 % の配列同一性を有するモノクローナル抗体もしくはそのフラグメントの類似体および誘導体が開示される。

【 0 1 3 9 】

一実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 2 つの重鎖 C D R と配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 1 つの軽鎖 C D R、ならびにモノクローナル抗体またはそのフラグメントの配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体を含む。

【 0 1 4 0 】

他の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 1 つの重鎖 C D R と配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 2 つの軽鎖 C D R、ならびにモノクローナル抗体またはそのフラグメントの配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体を含む。

【 0 1 4 1 】

さらに他の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 2 つの重鎖 C D R と配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 からなる群から選択される配列を含む少なくとも 2 つの軽鎖 C D R、ならびにモノクローナル抗体またはそのフラグメントの配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体を含む。

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列番号 1 9、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 からなる群から選択される配列に由来する少なくとも 5 個のアミノ酸の少なくとも 1 つの重鎖 C D R と配列番号 2 2、配列番号 2 3 および配列番号 2 4 からなる群から選択される配列に由来する少なくとも 5 個のアミノ酸の少なくとも 1 つの軽鎖 C D R、ならびにモノクローナル抗体またはそのフラグメントの配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体を含む。

【 0 1 4 3 】

他の実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントの抗体結合部位は、配列番号 7、8、9、1 3、1 4 および 1 5 からなる群から選択される 3 つの重鎖 C D R と配列番号 1 0、1 1、1 2、1 6、1 7、1 8 からなる群から選択される 3 つの軽鎖 C D R、ならびに抗体結合部位と少なくとも 9 7 % の配列同一性を有するその類似体および誘導体からなる。

【 0 1 4 4 】

さらに他の実施形態によれば、抗体結合部位は、配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7 および 1 8 の 6 つの C D R からなる。

【 0 1 4 5 】

他の実施形態によれば、抗体結合部位は、配列番号 7、8、9、1 0、1 1 および 1 2 の 6 つの C D R からなる。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

本発明に係る C D R 配列は、2つの異なるアルゴリズム法：I M G T アルゴリズム (L e f r a n c ら、1999、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h、27、209～212)；および K A B A T アルゴリズム (W u T T および K a b a t E . A .、1970、J . E x p . M e d . 132、211～250) を使用して同定した。両方法により明らかになった配列を開示する。

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態によれば、本発明に係る抗体またはそのフラグメントの重鎖 C D R 1 は、N N L I E (配列番号 7) および G Y A F T N N L (配列番号 1 3) から選択される。

【 0 1 4 8 】

一部の実施形態によれば、本発明に係る抗体またはそのフラグメントの重鎖 C D R 2 は、I N P G S G D T V I N P G S G D T N Y N E K F K G (配列番号 8) および I N P G S G D T (配列番号 1 4) から選択される。

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態によれば、本発明に係る抗体またはそのフラグメントの重鎖 C D R 3 は、G D Y Y G G F A V D Y (配列番号 9) および A R G D Y Y G G F A V D Y (配列番号 1 5) から選択される。

【 0 1 5 0 】

一部の実施形態によれば、本発明に係る抗体またはそのフラグメントの軽鎖 C D R 1 は、Q D I G N Y R T S Q D I G N Y L N (配列番号 1 0) および Q D I G N Y (配列番号 1 6) から選択される。

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態によれば、本発明に係る抗体またはそのフラグメントの軽鎖 C D R 2 は、Y T S R L H S (配列番号 1 1) および Y T S (配列番号 1 7) から選択される。

【 0 1 5 2 】

一部の実施形態によれば、本発明に係る抗体またはそのフラグメントの軽鎖 C D R 3 は、Q Q G K S L P (配列番号 1 2) および Q Q G K S L P R T (配列番号 1 8) から選択される。

【 0 1 5 3 】

一部の実施形態によれば、重鎖 C D R が配列番号 7、8 および 9 の配列からなる、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【 0 1 5 4 】

一部の実施形態によれば、重鎖 C D R が配列番号 1 3、1 4 および 1 5 の配列からなる、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態によれば、軽鎖 C D R が配列番号 1 0、1 1 および 1 2 の配列からなる、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【 0 1 5 6 】

一部の実施形態によれば、軽鎖 C D R が配列番号 1 6、1 7 および 1 8 の配列からなる、C E A C A M 1 を認識するモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【 0 1 5 7 】

具体的な実施形態によれば、抗体は、重鎖可変ドメイン配列を含む。

【 0 1 5 8 】

具体的な実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 2 6 からなる重鎖可変ドメイン配列および配列番号 2 8 からなる軽鎖可変ドメイン、あるいは抗体またはフラグメント配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体または誘導体を含

10

20

30

40

50

む。

【0159】

一部の特定の実施形態によれば、本発明は、i . 配列番号13、14、15、16、17および18とii . 配列番号7、8、9、10、11および12から選択される6つのCDRのセット；ならびに前記CDR配列と少なくとも97%の配列同一性を有するその類似体および誘導体と、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3から選択されるフレームワーク配列とを含むモノクローナル抗体または抗体フラグメントであって、少なくとも約 5×10^{-7} Mのアフィニティで少なくとも2種のCEACAMサブタイプに結合するモノクローナル抗体または抗体フラグメントを提供する。

10

【0160】

特定の実施形態によれば、配列番号7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17および18からなる群から選択される少なくとも1つのCDR配列；ならびに前記CDR配列と少なくとも97%の配列同一性を有するその類似体および誘導体と、ヒトIgG1、ヒトIgG2およびヒトIgG3から選択される定常領域配列とを含む、CEACAM1を認識するキメラモノクローナル抗体であって、少なくとも約 5×10^{-7} Mのアフィニティで少なくとも2種のCEACAMサブタイプに結合するキメラモノクローナル抗体が提供される。

【0161】

特定の実施形態によれば、i . 配列番号13、14、15、16、17および18とii . 配列番号7、8、9、10、11および12から選択される6つのCDRのセット；ならびに前記CDR配列と少なくとも97%の配列同一性を有するその類似体および誘導体と、ヒトIgG1、ヒトIgG2およびヒトIgG3から選択される定常領域配列とを含む、CEACAM1を認識するキメラまたはヒト化モノクローナル抗体であって少なくとも約 5×10^{-7} Mのアフィニティで少なくとも2種のCEACAMサブタイプに結合するモノクローナル抗体が提供される。

20

【0162】

さらに別の特定の実施形態によれば、配列番号30による重鎖配列を含む、キメラモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【0163】

さらに別の特定の実施形態によれば、配列番号31による軽鎖配列を含む、キメラモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

30

【0164】

さらに別の特定の実施形態によれば、配列番号30によるヒトIgG1重鎖配列および配列番号31によるヒトIgG1軽鎖配列を含む、キメラモノクローナル抗体または少なくとも抗原結合部分を含むそのフラグメントが提供される。

【0165】

定義

「CEACAM1」という用語は、CEACAM1遺伝子のタンパク質産物、例えば、NP__001020083.1、NP__001703.2を指すために使用される。ヒトでは、11種の異なるCEACAM1スプライスバリエントが今までに検出されている。個々のCEACAM1アイソフォームは、細胞外免疫グロブリン様ドメインの数（例えば、4つの細胞外免疫グロブリン様ドメインを有するCEACAM1は、CEACAM1-4として知られる）、膜固定および/またはその細胞質側末端の長さ（例えば、長い細胞質側末端を有するCEACAM1-4はCEACAM1-4Lとして知られ、短い細胞質側末端を有するCEACAM1-4はCEACAM1-4Sとして知られる）に関して異なる。CEACAM1のN末端ドメインはシグナルペプチドの直後に始まり、その構造はIgV型とみなされる。例えば、CEACAM1アノテーションP13688では、N末端IgV型ドメインは、アミノ酸35から142までの108個のアミノ酸で構成されている。このドメインは、同種アフィニティ結合活性を担うものとして同定された（Wat

40

50

tら、2001、Blood. 98、1469~79)。これらのスプライスバリエントを含む全てのバリエントが「CEACAM1」という用語に含まれる。

【0166】

「抗CEACAM1抗体」、「CEACAM1を認識する抗体」、「CEACAM1に対する抗体」または「CEACAM1に対する抗体」は、十分なアフィニティおよび特異性でCEACAM1タンパク質に結合する抗体である。典型的には、本教示による抗体は、約 10^{-8} または 10^{-9} Mの最小アフィニティでCEACAM1に結合することができる。本発明のモノクローナル抗体のいくつかは、約 5×10^{-7} Mの最小アフィニティでCEACAM3、5および/または8に結合することができる。

【0167】

好ましくは、本発明の抗CEACAM1抗体を、CEACAM1発現または活性が関与する疾患または状態の標的化および妨害に診断または治療剤として使用することができる。

【0168】

「抗原」は、抗体形成を誘発し、抗体に結合され得る分子または分子の一部である。抗原は、1つまたは2つ以上のエピトープを有し得る。上記の特異的反応は、抗原が高度に選択的様式で、その対応する抗体と反応するが、他の抗原により誘起され得る他の抗体の多数とは反応しないことを示すものとされる。本発明に係る抗原は、CEACAM1タンパク質またはそのフラグメントである。

【0169】

本発明に係る「抗原決定基」または「エピトープ」という用語は、特定の抗体と特異的に反応する抗原分子の領域を指す。エピトープ由来のペプチド配列を、当業界で公知の方法を適用して単独でまたは担体部分と併せて使用して、動物を免疫化する、および追加のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体を産生することができる。エピトープ由来の単離ペプチドを、抗体を検出するために診断法に、および前記抗体の阻害が必要な場合に治療剤として使用することができる。

【0170】

抗体または免疫グロブリンは、「Y字型形状」のジスルフィド結合により互いに連結した2本の重鎖と、各軽鎖がジスルフィド結合によりそれぞれの重鎖と連結している2本の軽鎖とを含む。抗体のタンパク質分解により、Fv（フラグメント可変）およびFc（フラグメント結晶）ドメインが得られる。抗原結合ドメイン、Fabは、ポリペプチド配列が変化する領域を含む。F(ab')₂という用語は、ジスルフィド結合により連結した2本のFab'アームを表す。抗体の中心軸は、Fcフラグメントと呼ばれる。各重鎖は、一端に、いくつかの定常ドメイン(C_H)が続く可変ドメイン(V_H)を有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)、および他端に定常ドメイン(C_L)を有し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと一直線に並び、軽鎖定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)と一直線に並んでいる。軽鎖および重鎖の各対の可変ドメインは、抗原結合部位を形成する。軽鎖および重鎖上のドメインは同じ一般構造を有し、各ドメインはその配列が比較的保存されており、相補性決定領域(CDR1~3)として知られる3つの超可変ドメインにより結合した4つのフレームワーク領域を含む。これらのドメインは、抗原結合部位の特異性およびアフィニティに寄与する。重鎖のアイソタイプ(γ、α、δ、εまたはμ)が、免疫グロブリンクラス(それぞれ、IgG、IgA、IgD、IgEまたはIgM)を決定する。軽鎖は、全抗体クラスで見られる2つのアイソタイプ(カッパ、κまたはラムダ、λ)のいずれかである。

【0171】

「抗体」という用語は、広義に使用され、所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体(全長抗体もしくは完全抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)および抗体フラグメントを含む。

【0172】

本発明に係る抗体は、少なくとも抗体の抗原結合部分を含む分子である。本発明に係る

10

20

30

40

50

抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体 (mAb) などの完全抗体ならびに Fab または F(ab')₂ フラグメントなどのそのタンパク質分解フラグメントを含む。キメラ抗体；ヒトおよびヒト化抗体；組換えおよび操作された抗体、ならびにこれらのフラグメントが本発明の範囲にさらに含まれる。さらに、抗体の可変領域をコードする DNA を、他の抗体をコードする DNA に挿入してキメラ抗体を産生することができる。鎖抗体も本発明の範囲に入る。

【0173】

「抗体フラグメント」は、一般的に完全抗体の抗原結合部位を含み、したがって抗原に結合する能力を保持している、完全抗体の一部のみを含む。本定義に包含される抗体フラグメントの例としては、(i) VL、CL、VH および CH1 ドメインを有する Fab フラグメント；(ii) CH1 ドメインの C 末端に 1 個または複数のシステイン残基を有する Fab' フラグメント；(iii) VH および CH1 ドメインを有する Fd フラグメント；(iv) VH および CH1 ドメインならびに CH1 ドメインの C 末端に 1 個または複数のシステイン残基を有する Fd' フラグメント；(v) 抗体の単一アームの VL および VH ドメインを有する Fv フラグメント；(vi) VH ドメインからなる dAb フラグメント (Ward ら、Nature 1989、341、544 ~ 546)；(vii) 単離 CDR 領域；(viii) 二価フラグメントがヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結した 2 つの Fab' フラグメントを含む F(ab')₂ フラグメント；(ix) 単鎖抗体分子 (例えば、単鎖 Fv；scFv) (Bird ら、Science 1988、242、423 ~ 426；および Huston ら、PNAS (USA) 1988、85、5879 ~ 5883)；(x) 同じペプチド鎖中の軽鎖可変ドメイン (VL) と接続した重鎖可変ドメイン (VH) を含む、2 個の抗原結合部位を有する「ダイアボディ」(例えば、欧州特許第 404097 号；国際公開第 93/11161 号；および Hollinger ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1993、90、6444 ~ 6448 参照)；(xi) 相補的軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域の対を形成するタンデム Fd セグメントの対 (VH - CH1 - VH - CH1) を含む「線状抗体」(Zapata ら Protein Eng.、1995、8、1057 ~ 1062；および米国特許第 5641870 号) が挙げられる。

【0174】

単鎖抗体は、抗原結合能力を有し、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の可変領域、すなわち、連結した V_H - V_L または単鎖 Fv (scFv) と相同または類似のアミノ酸配列を含む単鎖複合ポリペプチドであり得る。

【0175】

本明細書で使用する「中和抗体」とは、明細書通り、生体内または試験管内アッセイにより決定される、活性を低下もしくは阻害 (遮断) するか、または受容体を通してシグナル伝達することができる特異的受容体またはリガンド標的に対する抗原結合部位を有する分子を指す。

【0176】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、集団を含む個々の抗体が微量に存在し得る考えられる自然発生突然変異を除いて同一である抗体を指す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一抗原を標的とする。さらに、典型的には異なる決定基 (エピトープ) を標的とする異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基を標的とする。「モノクローナル」という修飾語句は、任意の特定の方法による抗体の産生を要するものと解釈されるべきではない。mAb は、当業者に既知の方法により得ることができる。例えば、本発明により使用されるモノクローナル抗体は、Kohler ら、Nature 1975、256、495 に初めて記載されているハイブリドーマ法により作成することができる、または組換え DNA 法 (例えば、米国特許第 4816567 号参照) により作成することができる。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson ら、Nature 1991、352、624 ~ 628 または

Marksら、J. Mol. Biol.、1991、222:581~597に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0177】

本発明のmAbは、IgG、IgM、IgE、IgAを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであり得る。mAbを産生するハイブリドーマは、試験管内でも生体内でも培養することができる。高力価のmAbは、個々のハイブリドーマ由来の細胞を、初回抗原刺激した(pristine-primed) Balb/cマウスに腹腔内注射して高濃度の所望のmAbを含有する腹水を得る生体内産生により得ることができる。アイソタイプIgMまたはIgGのmAbは、当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を使用して、前記腹水または培養液上清から精製することができる。

10

【0178】

本明細書のモノクローナル抗体は、具体的には、所望の生物活性を示す限り、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種由来のまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りは別の種由来のまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびに前記抗体のフラグメントの対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体を含む(米国特許第4816567号; およびMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851~6855(1984))。さらに、相補性決定領域(CDR)グラフトを行い、アフィニティまたは特異性を含む抗体分子の特定の特性を変えることができる。CDRグラフトの非限定的例は、米国特許第5225539号に開示されている。

20

【0179】

キメラ抗体は、マウスmAb由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどの、その異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。実質的にヒト抗体(アクセプター抗体と呼ばれる)由来の可変領域フレームワーク残基および実質的にマウス抗体(ドナー抗体と呼ばれる)由来の相補性決定領域を有する抗体は、ヒト化抗体とも呼ばれる。適用での免疫原性を低下させ、産生における収率を増加させるために、キメラ抗体が主に使用され、ここではマウスmAbはハイブリドーマよりも高い収率を有するが、ヒトにおける免疫原性が高いので、ヒト/マウスキメラmAbが使用される。キメラ抗体およびその製造法は、当業界で公知である(例えば、国際公開第86/01533号、第97/02671号、第90/07861号、第92/22653号ならびに米国特許第5693762号、第5693761号、第5585089号、第5530101号および第5225539号)。

30

【0180】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分は、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域の残基が、所望の特異性、アフィニティおよび能力を有するマウス、ラット、ウサギまたはヒト以外の霊長動物などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。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り置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含むことができる。これらの修飾を行って抗体性能をさらに精密化する。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループの全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FRの全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体は、任意選択により免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含む。さらなる詳細については、Jonesら、Nature 1986、321、522~525; Riechmannら、Nature 1988、332、323~329; およびPresta Curr. Op. Struct. Biol.、1992、2、593~596を参照されたい。

40

【0181】

50

「ヒト抗体」は、ヒトにより産生された抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するおよび/または本明細書に開示するヒト抗体を製造する技術のいずれかを使用して作成されたものである。ヒト抗体のこの定義では、特に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体は除外される。ヒト抗体は、当業界で公知の種々の技術を使用して製造することができる。一実施形態では、ヒト抗体は、ファージライブラリーから選択され、そのファージライブラリーがヒト抗体を発現する (Vaughanら Nature Biotechnology 1996 14、309~314; Sheetsら PNAS (USA)、1998、95、6157~6162); HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、1991、227、381; Marksら、J. Mol. Biol.、1991、222、581)。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたマウスに導入することにより作成することもできる。抗原攻撃により、遺伝子再構成、アセンブリおよび抗体レパートリーを含む全ての点で、ヒトで見られるのと酷似したヒト抗体産生が観察される。この手法は、例えば、米国特許第5545807号; 第5545806号; 第5569825号; 第5625126号; 第5633425号; 第5661016号および以下の科学刊行物; Marksら、Bio/Technology 10:779~783 (1992); Longbergら、Nature 368:856~859 (1994); Morrison、Nature 368:812~813 (1994); Fishwildら、Nature Biotechnology 14:845~51 (1996); Neuberger、Nature Biotechnology 14:826 (1996); LongbergおよびHuszar、Intern. Rev. Immunol. 13:65~93 (1995)に記載されている。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原を標的とする抗体を産生するヒトBリンパ球の不活化を通して調製することができる (前記Bリンパ球は個体から回収されても、試験管内で免疫化されていてもよい)。例えば、Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁 (1985); Boernerら、J. Immunol.、147 (1): 86~95 (1991); および米国特許第5750373号を参照されたい。

【0182】

「単鎖可変フラグメント (scFv)」という用語は、短い (通常はセリン、グリシン) リンカーと連結で連結した、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の融合体を意味する。単鎖抗体は、抗原結合能力を有し、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の可変領域と相同または類似のアミノ酸配列を含む単鎖複合ポリペプチド (連結 $V_H - V_L$ または単鎖 $Fv (scFv)$) であり得る。 V_H および V_L の両者が天然モノクローナル抗体配列をコピーし得る、または鎖の一方もしくは両方が、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5091513号に記載されている型のCDR-FR構築物を含み得る。軽鎖および重鎖の可変領域と類似の個々のポリペプチドが、ポリペプチドリンカーにより結合される。特に、 V_H および V_L 鎖のポリペプチド構造をコードするDNAが知られている、前記単鎖抗体を製造する方法は、例えば、その各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4946778号、第5091513号および第5096815号に記載されている方法により達成され得る。

【0183】

本明細書で使用する「抗体の抗原結合部分を有する分子」は、任意のアイソタイプおよび任意の動物細胞系もしくは微生物により産生される完全免疫グロブリン分子だけでなく、限定するものではないが、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、これらの重鎖および/または軽鎖の可変部分、Fabミニ抗体 (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第93/15210号、米国特許公開出願第08/256790号、国際公開第96/13583号、米国特許公開出願第08/817788号、国際公開第96/37621号、米国特許公開出願第08/999554号参照)、二量体二重特異性ミニ抗体 (Mullerら、1998参照) および前

10

20

30

40

50

記反応性分画を組み込むキメラもしくは単鎖抗体、ならびに前記抗体反応性分画が物理的に挿入された任意の他の型の分子もしくは細胞、例えば、キメラT細胞受容体もしくは前記受容体を有するT細胞、または前記反応性分画を含有する分子の一部によって治療用部分を送達するよう開発された分子を含むその抗原結合反応性分画も含むことが意図されている。前記分子は、限定するものではないが、酵素切断、ペプチド合成または組換え技術を含む任意の既知の技術により提供され得る。

【0184】

本発明に係る抗体は、通常使用するプロトコルを使用して、CEACAM1、もしくはエピトープ保持フラグメント、類似体、または発現細胞を動物、好ましくは非ヒトに投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製するために、連続細胞系培養により産生される抗体を提供する当業界で公知の任意の技術を使用することができる。例としては、Kohler, G. および Milstein, C., Nature 256 : 495 ~ 497 (1975); Kozborら、Immunology Today 4 : 72 (1983); Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPYの77 ~ 96頁、Alan R. Liss, Inc. (1985)のものなどの種々の技術が挙げられる。

10

【0185】

生体内で抗体を産生する従来法に加えて、ファージディスプレイ技術を使用して試験管内で抗体を産生することができる。組換え抗体の前記産生は、従来の抗体産生と比べてはるかに速く、多数の抗原に対して産生することができる。さらに、従来法を使用すると、多くの抗原は、非免疫原性または極めて毒性であることが分かり、それゆえ動物で抗体を産生するために使用することができない。さらに、組換え抗体のアフィニティ成熟（すなわち、アフィニティおよび特異性を高めること）は極めて単純で、比較的速い。最後に、特異的抗原に対する多数の異なる抗体を一選択手順で産生することができる。組換えモノクローナル抗体を産生するために、全てディスプレイライブラリーに基づく種々の方法を使用して異なる抗原認識部位を有する抗体の巨大なプールを産生することができる。前記ライブラリーは、いくつかの方法で作成することができる：重鎖生殖細胞系遺伝子のプールで合成CDR3領域をクローニングすることにより合成レパートリーを産生することができるので、巨大な抗体レパートリーを産生することができ、そこから種々の特異性を有する組換え抗体フラグメントを選択することができる。抗体ライブラリーを構築するための出発材料としてヒトのリンパ球プールを使用することができる。ヒトIgM抗体のナイーブレパートリーを構築し、したがって多様性が大きなヒトライブラリーを作成することが可能である。この方法は、異なる抗原に対する多数の抗体を首尾よく選択するために広く使用されてきた。組換え抗体のバクテリオファージライブラリー構築および選択のためのプロトコルは、周知の参考文献テキストCurrent Protocols in Immunology、Colliganら（編）、John Wiley & Sons, Inc. (1992 ~ 2000)、第17章、第17.1節に提供されている。

20

30

【0186】

非ヒト抗体を当業界で公知の任意の方法によりヒト化することができる。1つの方法では、非ヒト相補性決定領域(CDR)をヒト抗体またはコンセンサス抗体フレームワーク配列に挿入する。次いで、さらなる変更を抗体フレームワークに導入してアフィニティまたは免疫原性を調節することができる。

40

【0187】

例えば、Queenらの米国特許第5585089号は、ヒト化免疫グロブリンおよび同グロブリンを調製する方法を開示しており、ヒト化免疫グロブリンはドナー免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)とヒトアクセプター免疫グロブリン重鎖および軽鎖からの重鎖および軽鎖可変領域フレームワークとを含み、前記ヒト化免疫グロブリンはKabattおよびChothia CDRの外側にドナー免疫グロブリンフレームワークからのアミノ酸を含み、ドナーアミノ酸はアクセプター免疫グロブリン重鎖または軽鎖フレームワーク中の対応するアミノ酸に置き換わっている。

50

【0188】

Winterの米国特許第5225539号も、変化抗体もしくはその抗原結合フラグメントおよび同抗体もしくはフラグメントを調製する方法を開示しており、抗体もしくは抗原結合フラグメントの可変ドメインは第1の免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域と、第2の免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインの相補性決定領域とを有し、前記第2の免疫グロブリン重鎖または軽鎖ドメインは、前記第1の免疫グロブリン重鎖または軽鎖ドメインと抗原結合特異性、抗原結合アフィニティ、種、クラスまたはサブクラスが異なる。

【0189】

本発明の抗体と特異的に免疫反応性の抗イディオタイプ抗体も包含される。

10

【0190】

単鎖抗体を産生するための技術（米国特許第4946778号）を適合させて本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する単鎖抗体を産生することができる。また、トランスジェニックマウス、または他の哺乳動物などの他の生物を使用して本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに免疫特異性のヒト化抗体を発現することができる。

【0191】

あるいは、ファージディスプレイ技術を利用して、抗CEACAM1を有するかスクリーニングしたヒトのリンパ球のPCR増幅v遺伝子のレパトリーまたはライブラリーのいずれかから本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する抗体遺伝子を選択することができる（McCaffertyら、1990、Nature 348、552～554；Marksら、1992、Biotechnology 10、779～783）。これらの抗体のアフィニティを、例えば、チェーンシャッフリング（Clacksonら、1991、Nature 352：628）により改善することもできる。

20

【0192】

上記抗体を使用してポリペプチドを発現するクローンを単離または同定して、例えば、アフィニティークロマトグラフィーによりポリペプチドを精製することができる。

【0193】

また、本発明は、本発明に係る抗体分子の保存的アミノ酸変異型も提供する。コードされるタンパク質の全体的分子構造を保存する、本発明に係る変異型も製造され得る。開示されるタンパク質産物を含む個々のアミノ酸の特性が示されれば、いくつかの合理的置換当業者は認めるであろう。アミノ酸置換、すなわち、「保存的置換」は、例えば、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性の性質の類似性に基いて行われ得る。

30

【0194】

「障害」は、抗体による処置からの利益を得る任意の状態である。これには、哺乳動物を当の障害に罹らせる病理学的状態を含む、慢性および急性の障害または疾患が含まれる。本明細書で処置される障害の非限定的例としては、良性および悪性腫瘍；白血病およびリンパ系腫瘍；ニューロン、グリア、星状細胞、視床下部および他の腺、マクロファージ、上皮、間質および割腔障害；ならびに炎症、血管新生、免疫障害または透過性亢進状態が挙げられる。

40

【0195】

「治療有効量」という用語は、哺乳動物の疾患または障害を処置するのに有効な薬物の量を指す。がんの場合、治療有効量の薬物は、がん細胞の数を減少させる；腫瘍サイズを減少させる；末梢器官へのがん細胞の浸潤を阻害する（すなわち、ある程度遅らせる、好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度遅らせる、好ましくは停止させる）；ある程度、腫瘍成長を阻害する；および/またはある程度障害に関連する症状の1つもしくは複数を軽減することができる。薬物が既存のがん細胞の成長を防ぐおよび/または死滅させることができる限り、この薬物は細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性となり得る。がん治療については、生体内での有効性は、例えば、生存期間、疾患進行までの時間（TTP）、奏功率（RR）、奏功期間、および/または生活の質を評

50

価することにより測定することができる。

【0196】

「処置」は、治療的処置および予防的もしくは防止的手段の両方を指す。処置を必要とする者には、既に障害を有する者ならびに障害を防ぐべき者が含まれる。

【0197】

「がん」および「がん性」という用語は、典型的には無秩序な細胞成長を特徴とする哺乳動物の病理学的状態を指すまたは説明する。がんの例としては、限定するものではないが、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫および白血病が挙げられる。前記がんのより具体的な例としては、黒色腫、肺、甲状腺、乳房、結腸、前立腺、肝臓、膀胱、腎臓、子宮頸部、膵臓、白血病、リンパ腫、骨髄、卵巣、子宮、肉腫、胆汁または子宮内膜がんが挙げられる。

10

【0198】

一部の実施形態によれば、本発明の抗体は、細胞傷害性または治療部分に付着している。細胞傷害性または治療部分は、例えば、その例が以下に提供される、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、二重特異性抗体部分、細胞毒、ケモカイン、化学療法、アポトーシス促進性物質、インターフェロン、放射性部分またはこれらの組み合わせであり得る。

【0199】

「抗新生物組成物」という用語は、腫瘍成長もしくは機能を阻害または防止する、ならびに／あるいは腫瘍細胞の破壊を引き起こすことができる少なくとも1種の活性治療剤を含む、がんを処置するのに有用な組成物を指す。がんを処置するための抗新生物組成物に適切な治療剤には、限定するものではないが、化学療法剤、放射性同位元素、毒素、インターフェロンなどのサイトカイン、およびサイトカイン、サイトカイン受容体もしくは腫瘍細胞に関連する抗原を標的化する拮抗剤が含まれる。好ましくは、治療剤は化学療法剤である。

20

【0200】

本明細書で使用する場合、「診断する」という用語は、病態の存在または非存在を決定する、病態または症状を分類する、病態の重症度を決定する、病態進行を監視する、病態の結果および／または回復の見込みを予測することを指す。

【0201】

薬理学

30

また、本発明は、本明細書に多様に記載する状態を処置、診断または予防するための治療用または診断用組成物を製造するための、活性剤としてCEACAM1を認識する少なくとも1種の抗体を含む、ヒトの医療用の医薬製剤も熟慮する。

【0202】

前記医薬および薬剤製剤では、活性剤は、好ましくは1種または複数の薬学的に許容可能な担体ならびに任意選択により他の治療成分と共に利用される。担体は、薬剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに過度に有害ではないという意味で薬学的に許容可能でなければならない。活性剤は、上記のように所望の薬理学的効果を達成するのに有効な量で、および所望の1日量を達成するのに適当な量で提供される。

40

【0203】

典型的には、抗体の抗原結合部分を含むかまたはペプチド模倣物を含む別のポリペプチドを含む本発明の分子は、治療用途のために滅菌生理食塩水溶液に懸濁される。あるいは、医薬組成物は、有効成分（抗体の抗原結合部分を含む分子）の放出を制御するか、または患者の系中でのその存在を延長するよう製剤化され得る。多数の適当な薬物送達システムが知られており、これには、例えば、植込み型薬物放出システム、ヒドロゲル、ヒドロキシメチルセルロース、マイクロカプセル、リポソーム、マイクロエマルジョン、マイクロスフェアなどが含まれる。制御放出製剤は、本発明に係る分子を複合体化または吸着するためにポリマーを使用して調製することができる。例えば、生体適合性ポリマーには、ポリ（エチレン - コ - 酢酸ビニル）のマトリックスおよびステアリン酸二量体とセバシン

50

酸のポリ酸無水物共重合体のマトリックスが含まれる。前記マトリックスからの本発明による、すなわち、抗体または抗体フラグメントの分子の放出速度は、分子の分子量、マトリックス中の分子の量、および分散した粒子のサイズに依存する。

【0204】

本発明の医薬組成物は、経口、局所、鼻腔内、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、関節内、病変内または非経口などの任意の適当な手段により投与することができる。通常は、静脈内（i.v.）、関節内、局所または非経口投与が好ましい。

【0205】

本発明に係る分子の治療有効量は、特に、投与計画、投与する分子の単位用量、分子を他の治療剤と組み合わせて投与するかどうか、患者の免疫状態および健康、投与する分子の治療活性ならびに治療する医師の判断に依存する。本明細書で使用する場合、「治療有効量」は、一定期間にわたって処置する障害に関連する1つまたは複数の症状を緩和するのに必要な分子の量を指す。

10

【0206】

本発明の分子の適当な用量は、投与経路、分子の型（ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機分子等）、患者の年齢、体重、性別または状態に応じて変化し、最終的に医師により決定される必要があるが、経口投与の場合、1日量は、体重1kg当たり、一般的に約0.01mg～約500mg、好ましくは約0.01mg～約50mg、より好ましくは約0.1mg～約10mgの間であり得る。非経口投与の場合、1日量は、体重1kg当たり、一般的に約0.001mg～約100mg、好ましくは約0.001mg～約10mg、より好ましくは約0.01mg～約1mgの間であり得る。1日量は、例えば、1日に1～4回の個々の投与という典型的なレジメンで投与することができる。投与の他の好ましい方法には、体重1kg当たり、約0.01mg～約100mgの関節内投与が含まれる。有効量に達するための種々の留意点は、例えば、GoodmanおよびGilmanの：The Pharmacological Bases of Therapeutics、第8版、Pergamon Press、1990；ならびにRemington's Pharmaceutical Sciences、第17版、Mack Publishing Co.、Easton、Pa.、1990に記載されている。

20

【0207】

併用化学療法に適当な投与レジメンは当業界で公知であり、例えば、SaltzらProc ASCO 1999、18、233aおよびDouillardら、Lancet 2000、355、1041～7に記載されている。

30

【0208】

有効成分としての本発明の分子は、周知のように、薬学的に許容可能であり、有効成分と適合性の賦形剤に溶解、分散または混和される。適当な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水（PBS）、ブドウ糖、グリセリン、エタノールなどおよびこれらの組み合わせである。他の適当な担体は当業者に周知である。さらに、所望であれば、組成物は、微量の湿潤または乳化剤、pH緩衝剤などの補助剤を含有することができる。

【0209】

本発明に係る医薬組成物は、抗新生物組成物と共に投与され得る。具体的な実施形態によれば、抗新生物組成物は、少なくとも1種の化学療法剤を含む。本発明に係る抗体と共にまたは別々に投与され得る化学療法剤は、限定するものではないが、ミトキサントロン、トポイソメラーゼ阻害剤、紡錘体毒ピンカ：ピンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン（タキソール）、パクリタキセル、ドセタキセル；アルキル化剤：メクロレタミン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド；メトトレキサート；6-メルカプトプリン；5-フルオロウラシル、シタラビン、ゲムシタビン；ボドフィロトキシン：エトポシド、イリノテカン、トポテカン、デカルバジン；抗生物質：ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ブレオマイシン、ミトマイシン；ニトロソウレア：カルムスチン（BCNU）、ロムスチン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン；無機イオン：シスプラチン、カルボプラチン；インターフェロン、アスパラギナーゼ；

40

50

ホルモン：タモキシフェン、リュープロリド、フルタミドおよび酢酸メゲストロールを含む、抗がん活性を示す当業界で公知の任意のこのような薬剤を含むことができる。

【0210】

具体的な実施形態によれば、化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体および関連する阻害剤、ビンカアルカロイド、エポドフィロトキシン、抗生物質、L-アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼ阻害剤、インターフェロン、白金配位錯体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、副腎皮質ステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン薬、アンドロゲン、抗アンドロゲン薬および性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体からなる群から選択される。別の実施形態によれば、化学療法剤は、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン(LV)、イリノテカン、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセルおよびドセタキセルからなる群から選択される。2種以上の化学療法剤をカクテルで使用して抗CEACAM1抗体の投与と組み合わせて投与することができる。

10

【0211】

以下の実施例は、本発明の化合物および方法の製造および使用の仕方を説明することを意図したものであり、決して限定するものとして解釈すべきでない。本発明をここでその具体的な実施形態と併せて記載するが、多くの修正および変形が当業者に明らかであることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨および広範な範囲に入る全てのこのような修正および変形を包含することが意図されている。

20

【実施例】

【0212】

抗体を調製およびキャラクタライゼーションする手段は当業界で公知である。本発明に係る抗CEACAM1抗体を製造、キャラクタライゼーションおよび使用するための技術を例示する説明を以下に記載する。

【0213】

一般的に、本明細書で使用する命名法および本発明で利用する実験室手順には、分子、生化学、微生物学および組換えDNA技術が含まれる。前記技術は、文献に完全に説明されている。例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら、1989；「Current Protocols in Molecular Biology」第I~III巻 Ausubel, R. M. 編 1994；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、Baltimore、Maryland 1989；Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons、New York 1988；Watsonら、「Recombinant DNA」、Scientific American Books、New York；Birrenら(編)「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」、第1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York 1998；米国特許第466828号；第4683202号；第4801531号；第5192659号および第5272057号に示されている方法論；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」第I~III巻 Cellis, J. E. 編 1994；「Current Protocols in Immunology」第I~III巻 Coligan J. E. 編 1994；Stitesら(編)、「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、Norwalk、CT 1994；MishellおよびShiigi(編)、「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、New York 1980を参照されたい。利用可能な免疫測定法は、特許および科学文献に広範に記載されている。例えば、米国特許第3791932号；第3839153号；第3850752号；第38

30

40

50

50578号；第3853987号；第3867517号；第3879262号；第3901654号；第3935074号；第3984533号；第3996345号；第4034074号；第4098876号；第4879219号；第5011771号および第5281521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, N. J. 編 (1984)；「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編 1985；「Transcription and Translation」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編 1984；「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編 1986；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press、(1986)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B.、1984および「Methods in Enzymology」第1～317巻、Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、San Diego、CA 1990；Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press 1996を参照されたい。これらの文献中の手順は当業界で公知であると考えられる。

【0214】

実施例1：CEACAMを認識したモノクローナル抗体の産生およびキャラクタライゼーション

組換えヒトCEACAM1タンパク質を用いてマウスを免疫化することにより、ナノモル濃度で、試験管内でCEACAM1同種アフィニティ相互作用を有効に遮断するモノクローナル抗体を産生した。CEACAM1遮断抗体を産生するハイブリドーマを産生し、数回再クローニングして安定なクローンを得た。

【0215】

CEACAM1を認識する1つの代表的なモノクローナル抗体のDNAおよびアミノ酸配列を、Fusion Antibodies Ltdにより決定した。mRNAをハイブリドーマ細胞ペレットから抽出し、RNA抽出プロトコルを使用して、全RNAをペレットから抽出した。オリゴ(dT)プライマーを用いた逆転写により、RT-PCR-cDNAをRNAから作成した。可変ドメインプライマーを使用したPCR反応を使用してモノクローナル抗体DNAのVHおよびVLの両方を増幅した。

【0216】

VHおよびVL産物をInvitrogen配列決定ベクターpCR2.1にクローニングし、正の形質転換体についての上位10位に形質転換させた。選択されたコロニーを選び、配列決定により分析した。決定され得られたDNAおよびアミノ酸配列を以下に示す。

可変重鎖 (VH)

VHドメインのDNA配列：

ATGGGATGGACCTTGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTCTAGTAAGTGCAGGTGTTCACTCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGG
AGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTAATAACTTGATAG
AGTGGGTAAACAGAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGTGGTGATACTAACTACAAT
GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATC
TGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGATTACTACGGTGGCTTTGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT
CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCCGTTTATCCCTTGCCCCCTGGAAGCTTGGG (配列番号 2
5)。

VHドメインのアミノ酸配列：

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKASGYAFTNNLEWVKQRPQGLEWIGVINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAY
MQLSSLTSDSAVYFCARGDYGGFAVDYWGQTSVTVSS (配列番号 26)。

可変軽鎖 (VL)

10

20

30

40

50

V L ドメインの D N A 配列 :

ATGGTGTCTCAGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGAACCAGATGTGATATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGACAAGTCAGGACATTGGCAATTATTTAA
ACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCA
AGGTTCACTGAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTT
TTGCCAACAGGGTAAAAAGCCTTCCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGTTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
CTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTAC
CCCAGAGA (配列番号 2 7) 。

V L ドメインのアミノ酸配列 :

DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ
EDIATYFCQQKSLPRTFGGGKLEIK (配列番号 2 8) 。

10

N 末端アミノ酸配列決定および質量スペクトル分析を使用して V L および V H 同一性を確認した。

【 0 2 1 7 】

実施例 2 : N 末端アミノ酸配列の検証

エドマン分解法により、軽鎖のアミノ酸配列解析を行ってモノクローナル抗体の 1 つの軽鎖の N 末端配列を検証した。得られた N 末端配列は、DIQMTQTSS (配列番号 2 9) であり、これは D N A 配列に基づいて予想した N 末端と一致している。

【 0 2 1 8 】

実施例 3 : 相補性決定領域 (C D R) 配列

20

C D R セグメントを 2 つの異なるアルゴリズム法を使用して同定した :

- 1 . I M G T アルゴリズム (L e f r a n c ら、1999、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h、27、209 ~ 212) ;
- 2 . K A B A T アルゴリズム (W u T T および K a b a t E . A .、1970、J . E x p . M e d . 132、211 ~ 250) 。

【 0 2 1 9 】

表 1 は、2 つの方法を使用して決定した C D R 配列ならびに両方法を使用して同定した最小コンセンサス配列および結合配列を要約している。

【 表 1 】

表 1 . C D R 配列

30

	VH1	VH2	VH3	VL1	VL2	VL3
IMGT	GYAFTNNL (配列番号 1 3)	INPGSGDT (配 列番号 1 4)	ARGDYYGGFAV DY (配列番号 1 5)	QDIGNY (配 列番号 1 6)	YTSR (配 列番号 1 7)	QQGKSLPRT (配列番号 1 8)
KABAT	NNLIE (配 列番号 7)	VINPGSGDTNY NEKFKG (配 列番号 8)	GDYYGGFAVDY (配列番号 9)	RTSQDIGNYLN (配列番号 1 0)	YTSRLHS (配列番号 1 1)	QQGKSLP (配列番号 1 2)
結合配列	GYAFTNNLIE (配列番号 1 9)	VINPGSGDTNY NEKFKG (配 列番号 2 0)	ARGDYYGGFAV DY (配列番号 2 1)	RTSQDIGNYLN (配列番号 2 2)	YTSRLHS (配列番号 2 3)	QQGKSLPRT (配列番号 2 4)
コンセン サス配列	X ₁ NNLX ₂ * (配 列番号 1)	INPGSGDT (配 列番号 2)	GDYYGGFAVDY (配列番号 3)	QDIGNY (配 列番号 4)	YTSR (配 列番号 5)	QQGKSLP (配列番号 6)

40

*X₁ は存在しないまたは T h r (T) であり、X₂ は存在しないまたは I l e (I) である。

【 0 2 2 0 】

実施例 4 : キメラモノクローナル抗体の設計および産生

可変重鎖および軽鎖の D N A 配列 (配列番号 2 5 および 2 7) を使用して、ヒト I g G 1 アイソタイプ定常ドメインおよび定常軽 (C L) ヒト I g κ ドメインを含むキメラ抗体を構築した。親モノクローナル抗体はマウス I g G 1 であり、そのヒト同等物は I g G 4

50

であるが、ヒトIgG1フレームワークを使用して本発明のキメラ抗体のいくつかを構築した。軽鎖および重鎖についてのDNA配列を合成し、別々のプロモーターの下で発現ベクターpFUSION-DHFR1にクローニングした。

【0221】

CHO細胞の一過性導入

懸濁CHO細胞(invitrogen、UK)を、250および500mlペント型エルレンマイヤーフラスコ(Corning、オランダ)中、Pro CHO 5無血清培地(Lonza、UK)において130rpm、8%CO₂、37℃で培養した。導入日に、細胞を2.0×10⁶個細胞/mlの密度で播種し、2.5g/mlのプラスミドDNA(Geneart、ドイツ)をポリエチレンイミン(Polysciences Inc、PA、US)を使用して細胞に導入した。導入培養液を130rpm、8%CO₂、37℃で9~10日間インキュベートした。培養液の収穫前に、上清を4000rpmで40分間スピンのさせた。

10

【0222】

培養液を収穫し、2つの別々のバッチで精製した。培養液を0.8μm gyrodisscフィルターを通して濾過し、1ml Protein Aカラムを使用して精製した。抗体をFPLCにより精製した。試料320mlを0.2ml/分で一晚充填し、17時間後に0.5ml/分に増加させた。pH3.0のGly/HCL溶出緩衝液で溶出する前に、カラムをPBSにより0.5ml/分で洗浄/平衡化した。良好なピークが観察され、分画1~5をBradfordアッセイにより定量化した。Bradfordアッセイは、PBS1l中(4、120RPM)に一晚プールし、緩衝液交換のために透析した分画1~4中にタンパク質が存在することを示した。1.823mg/mlの濃度が4ml試料で観察されたので、約7.32mgの総収量を精製した。第2のバッチでは、Bradfordアッセイの結果により、プールし、透析した分画1~3中にタンパク質が存在することが示された。馴化培地320mlから、約7.32mgの総収量を精製した(バッチA)。培養液910mlから、約15.74mgの総収量を精製した(バッチB)。全一過性発現により、精製タンパク質約23mgが得られた。濃度決定およびSDS/PAGE分析後、キメラ抗体19.65mgが得られた。精製抗体試料をSDS-PAGEにより分析して純度を評価した。図1は、キメラ抗体の軽鎖および重鎖を示すSDS-PAGEゲル像を示している。MS分析により、CM10重鎖の分子量が48.6kDaであり、軽鎖の分子量が23.3kDaであることが明らかになった。

20

30

【0223】

得られた抗体(CM10と示す)は、重鎖および軽鎖の以下のアミノ酸配列を有する。重鎖アミノ酸配列(シグナルペプチドを含まない)：

【表2】

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNNLIEWVKQRPQGQLEWIGVINPGSGDTNYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARGDYGGFAVDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号30)。

40

可変ドメインは太字とし、IMGTによるCDRに下線を付す。

軽鎖アミノ酸配列(シグナルペプチドを含まない)：

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQGGKSLPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号31)

可変ドメインは太字とし、IMGTによるCDRに下線を付す。

【0224】

CM10と示す代表的なキメラモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖のDNA配列を含むプラスミドを、ATCC寄託番号PTA-12130として2011年9月28日に寄

50

託した。

【0225】

実施例5：キメラモノクローナル抗体CM10のアフィニティキャラクタライゼーション
CM10の精製ヒトCEACAM1への結合

精製ヒトCEACAM1を使用したELISAアッセイで、CM10のヒトCEACAM1への結合特異性を試験した。23の二重希釈のCM10を使用した間接ELISAを使用して、特異的結合曲線を作成した。図2に示す結果は、3つの複製からの平均OD $\pm$ SEを表す。他の10の独立した実験からも同様の結果が得られた。

【0226】

キメラ化プロセスが抗体の結合アフィニティに影響を及ぼすかどうかを試験するために、競合ELISAおよびBIAcore分析により、キメラ抗体CM10のCEACAM1結合について評価した。

10

【0227】

ELISAについては、組換え精製ヒトCEACAM1をプレートに結合させた。化学的ビオチン化CM10を一定濃度でトレーサーとして使用し、増加する濃度の標識されていないCM10と競合させた。インキュベーションおよび洗浄後、プレートをStreptAvidin-HRP複合体で展開し、HRP基質としてのTMBで色反応を発色させた。

【0228】

50 ng/mlのトレーサーを使用して、CM10について検出された見かけのアフィニティ値は1.2~1.6 nMであった。

20

【0229】

BIAcore分析

各抗体をNHSS-EDC結合化学によりBiacore 3000装置のCM5センサーチップの単一チャンネル上に固定した。

【0230】

組換えCEACAM1を種々の濃度(0.19、0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5および25 nM)でチップ上に50 μ l/分で流した。ランニングバッファーはPBS-ET(10 mM p-バッファー pH7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTAおよび0.005% tween 20)とした。BIAEvaluationソフトウェア3.0を使用してデータを分析し、3つの独立した実験から計算したCM10-CEACAM1アフィニティのKD値は、(KD): 4.07~5.05 nM(平均4.56 nM)であった。

30

【0231】

CM10の膜結合内因性CEACAM1に対する結合特異性

CM10の膜結合内因性CEACAM1への結合を試験するために、FACS分析を行った。いくつかのヒト黒色腫細胞系をhCEACAM1発現についてスクリーニングする一方で、526 mel細胞系を正の対照として、また003 melを負の対照系として使用した。526 mel、003 mel、Malme3M、Skme15およびA375細胞系をCM10で染色した。空のヒストグラムはmAb染色を表し、暗いヒストグラムは背景染色を表す。少なくとも5000個の細胞を使用して各ヒストグラムのCEACAM1発現を分析した。

40

【0232】

図3からわかるように、CM10は、膜結合内因性CEACAM1を検出する。Malme3MおよびSkme15細胞系は高いCEACAM1発現を示したが、A375黒色腫細胞系では発現は検出されなかった。

【0233】

結論

キメラ化プロセスは首尾よく行われた。キメラ抗体は、2つの異なる手法により検証されるとおり、1.4 nMのアフィニティでCEACAM1に結合する。CM10の種々の

50

黒色腫細胞系に対する結合特異性を試験する F A C S 分析により、抗体がその生物学的結合能力を保持したことが示されている。

【 0 2 3 4 】

実施例 6 . C M 1 0 の活性の評価

細胞 - 細胞相互作用遮断アッセイ

抗 C E A C A M 1 m A b が C E A C A M 1 細胞 - 細胞相互作用を遮断する能力を決定するアッセイは、マウス z 鎖に融合したヒト C E A C A M 1 の細胞外部分で構成されたキメラ分子 (B W / C E A C A M 1) に安定的にトランスフェクトされたマウス T 細胞 (B W 細胞) を使用する。 B W / C E A C A M 1 細胞と C E A C A M 1 に安定的にトランスフェクトされた B 細胞 (2 2 1 / C E A C A M 1) のコインキュベーションによる C E A C A M 1 の会合により、 z 鎖により媒介されるマウス I L - 2 の分泌がもたらされる。

【 0 2 3 5 】

氷上で 3 0 分間、 C M 1 0 または P B S の存在下で、エフェクター細胞 (B W 、 C E A C A M 1 を発現している) をインキュベートした。インキュベーション後、エフェクター細胞を、 C E A C A M 1 を発現している (2 2 1 +) または C E A C A M 1 を発現していない (2 2 1 -) 標的細胞と共に一晚共培養した。商業的 E L I S A によりマウス I L - 2 分泌を測定した。図 4 に示す結果は、複製ウェルからの平均 I L - 2 分泌を表す。図に示すように、 C M 1 0 を添加すると、 T 細胞と B 細胞との間の C E A C A M 1 媒介細胞 - 細胞相互作用が、 I L - 2 分泌の遮断により、示されるように用量依存的様式で消滅した。

【 0 2 3 6 】

試験管内免疫調節死滅アッセイ

T 細胞死滅アッセイ : 黒色腫反応性 T 細胞 T I L (腫瘍浸潤リンパ球、黒色腫患者由来) は、 H L A が適合した黒色腫細胞を破壊することができる。 T I L は、 S h i b a 医療センターの E L L A I n s t i t u t e から購入し、臨床検査室プロトコルに従って培養した。 C F S E 標識黒色腫細胞 (S K m e l 5) を氷上で 3 0 分間、 C M 1 0 (1 0 μ g / m l) と共にプレインキュベートした。 T I L を添加して 3 7 ° でさらに 1 0 時間インキュベートした。 C F S E 標識黒色腫細胞の P I 染色により死滅の割合を決定した。エフェクター対標識比は 5 : 1 であった。別のアッセイでは、 C F S E 標識黒色腫細胞を氷上で 3 0 分間、 C M 1 0 と共にプレインキュベートした。 T I L を添加して 3 7 ° でさらに 5 時間インキュベートした。 C F S E 標識黒色腫細胞の P I 染色により死滅の割合を決定した。結果は、 1 処理当たりの 3 複製ウェルからの特異的死滅 % の平均 ± S E を表す。エフェクター対標的比は 5 : 1 であった。

【 0 2 3 7 】

図 5 に示す結果は、 T 細胞の死滅活性が抗 C E A C A M 1 m A b 、 C M 1 0 の存在下で増強することを示している。さらに、 T I L が黒色腫細胞を死滅させることができないアッセイ条件 (短いインキュベーションまたは低い T I L 比) 下で、 C M 1 0 を添加すると、 T I L の死滅活性が刺激されたが、 I g G 1 アイソタイプ対照では死滅を検出することはできなかった (図 6) 。

【 0 2 3 8 】

N K 細胞死滅アッセイ

ナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) は、アポトーシスにより標的細胞を死滅させるパーフォリンと呼ばれる小タンパク質およびグランザイムを放出することにより、悪性細胞を破壊することができるタイプの細胞傷害性リンパ球である。 N K 細胞は、いくつかの異なる経路、中でもサイトカイン、 F C 受容体および M H C クラス 1 が標的細胞に存在しない経路を通して活性化され得る。標的細胞上の種々のリガンドに対するいくつかの活性化および阻害受容体は、 N K 細胞の最終的な細胞傷害活性を調節する。 N K 9 2 M I 細胞は、 A T C C から購入した I L - 2 独立 N K 細胞系である。

【 0 2 3 9 】

N K 9 2 M I を C M 1 0 (0 . 2 μ g / m l 、 1 μ g / m l もしくは 5 μ g / m l) ま

たはアイソタイプ一致対照 A b (5 μ g / m l) と共に 37 で 30 分間インキュベートし、C E A C A M 1 を発現している標的細胞をさらに 5 時間添加した。古典的 L D H 放出アッセイにより、死滅の割合を決定した。結果は、1 処理当たり 3 複製ウェルからの細胞傷害 % の平均 $\pm$ S E を表す。エフェクター対標的比は 2 : 5 : 1 であった。

【 0 2 4 0 】

図 7 に示すアッセイは、C M 1 0 が、P B S またはアイソタイプ一致 I g G と比べて、C E A C A M 1 を発現している 2 種の黒色腫細胞系 (S K m e l 5 および G 3 6 1) で N K 細胞の死滅活性を強力に増強したことを示している。2 種の他の C E A C A M 1 + 黒色腫細胞系および種々のエフェクター対標的 (E : T) 比でも同様の結果が示された。

【 0 2 4 1 】

抗体依存性細胞媒介細胞傷害

抗体依存性細胞媒介細胞傷害 (A D C C) は、免疫系のエフェクター細胞 (ほとんど N K 細胞) が、特異的抗体が結合した標的細胞を溶解する細胞媒介免疫の機構である。C M 1 0 の安全性プロファイルを評価するために、本発明者らは、C M 1 0 が A D C C を誘発する能力を 3 種の黒色腫細胞系 (C E A C A M 1 陽性細胞系 : G 3 6 1 および S K m e l 5 ならびに C E A C A M 1 陰性細胞系 : S K m e l 2 8) で調べる予備 A D C C アッセイを行った。

【 0 2 4 2 】

C M 1 0 が A D C C を誘発する能力を、陽性対照抗体 (予備実験で A D C C 活性を示したポリクローナル A b 抗 C E A C A M 1) と比較して調査した。アイソタイプ一致抗体が陰性対照として役立った (h I g G 1 K) 。結果は、C M 1 0 が試験した設定で A D C C を誘因しないことを示している。

【 0 2 4 3 】

補体依存性細胞傷害

補体タンパク質は血液に見られ、その作用は抗体の働きを「補完する」。補体依存性細胞傷害 (C D C) は、標的細胞表面に結合した抗体が補体を固定し、標的細胞膜中に孔を作り出し、最終的に細胞溶解を引き起こす膜攻撃複合体を会合させ、細胞を死滅させる機構である。

【 0 2 4 4 】

C M 1 0 の安全性プロファイルを評価するために、C M 1 0 が C D C を誘発する能力を、C E A C A M 1 を発現している 2 種の黒色腫細胞系 (S K m e l 2 8 および S K m e l 5) で調査した。商業的プールヒト血清を補体タンパク質源として使用した。D a u d i 細胞と共にインキュベートした商業的モノクローナル抗体リツキシマブを C M 1 0 に対するアッセイの陽性対照として、また商業的 I g G 1 K をアイソタイプ一致対照として使用した。黒色腫細胞系 - S K M E L 5 および S K M E L 2 8 または陽性対照 D a u d i 細胞を、それぞれ C M 1 0 またはリツキシマブと共に室温で 1 時間インキュベートし、次に加湿インキュベーター (37 、 5 % C O ₂) 中で 50 % の最終濃度で正常ヒト血清をさらに 2 時間添加した。溶解細胞の割合をヨウ化プロピジウム (P I) 染色により決定した。結果 (図 1 4) は、複製して行った 2 つの独立した実験の平均 $\pm$ S . E . を表しており、C M 1 0 が試験した設定で C D C 溶解を誘発しなかったことを示している。

【 0 2 4 5 】

生体内有効性実験

この実験の目的は、生体内での C M 1 0 の黒色腫細胞への直接効果を試験すること、ならびに異種移植片設定では見つからない免疫調節効果を評価することである。

【 0 2 4 6 】

異種移植片実験の校正

「 A T C C 」から購入した C E A C A M 1 陽性ヒト黒色腫細胞系 (S K m e l 5) および「 H a r l a n l a b o r a t o r i e s 」製の N O D - S C I D 、年齢一致マウスを使用した。腫瘍の成長を監視し、最適な T I L レジメンを見出すために、校正アッセイを行った。S K m e l 5 黒色腫細胞を S C I D - N O D マウスに S C (皮下) 注射し、腫瘍

10

20

30

40

50

体積を物理的測定により監視した。腫瘍体積が 100 mm^3 に達したら、マウスを5つのランダム化群に分けた。TILを2種の異なる濃度でIT（腫瘍内）または1種の濃度（1マウス当たり 20×10^6 ）でIV（静脈内）注射し、1つの群は1回の注射のみ受け、第2の群は2回のTIL注射を受けた。各TIL注射の後、5日間のhIL-2投与を行った。較正実験により、TIL IV注射がIT投与よりも腫瘍サイズに与える影響が大きいことが示された。さらに、反復したTIL管理体制により、T細胞半減期から予測され得るように、単回注射よりも優れた腫瘍成長阻害が引き起こされる。このデータに基づいて、TILを以後の異種移植片実験で、IV注射により10日毎に投与する。

【0247】

CM10の生体内免疫調節性抗がん活性

ヒトCEACAM1陽性SKmel5黒色腫細胞を、SCID-NODマウスにSC注射した。腫瘍が約 100 mm^3 の体積に達したら、マウスを以下の処理群の1つにランダム化した：a) 週1回のPBSのIV注射；b) 週1回のCM10 0.45mgのIV注射；c) 3回の 20×10^6 抗腫瘍反応性ヒトT細胞（TIL）のIV注射および週1回のPBSのIV注射；d) 3回の 20×10^6 抗腫瘍反応性ヒトT細胞（TIL）のIV注射および週1回のCM10 0.45mgのIV注射。実験設定を知らない人が1週間に2～3回腫瘍体積を測定した。図8の結果は、1群当たり6～10匹のマウスからの平均腫瘍体積 $\pm$ SEを表す。矢印は、投与の時間を示している（CM10 円、TIL 三角形、CM10およびTIL 白抜き正方形）。示すように、腫瘍成長の中等度の阻害がCM10単独またはTIL単独で観察されたが、対照処理と比べると、差は統計学的有意性に達しなかった。養子ヒトT細胞移入とCM10注射の組み合わせは、有意な相乗作用を著しく示し、異種移植片成長を強力に阻害した。この所見は、CM10のT細胞死滅への増強効果を示す試験管内データと一致する（図5および図6）。

【0248】

TILの存在下、CM10で処理した群では有意な成長阻害が観察された。これらの結果は、異なる細胞系での抗CEACAM1 mAbの免疫刺激効果を補強し、CM10を有望な免疫調節抗体として使用することができることを示している。この所見は、CM10のT細胞による黒色腫細胞死滅への刺激効果を示す試験管内データと一致する。

【0249】

結論

CEACAM1は、白血球活性化の制御因子であることが知られている。CM10は、2つのCEACAM1分子間の相互作用を遮断する（図4）ので、CEACAM1により媒介される阻害シグナルを除去し、腫瘍細胞に対するより強力な細胞傷害性リンパ球活性化を引き起こす（図6および図7）。生体内異種移植片結果（図8）は、CM10の免疫刺激性の性質を補強し、TILの存在下、CM10で処理したマウスにおいて腫瘍の有意な成長阻害を示している。図9に示すスキームは、免疫系細胞による死滅シグナルの活性化を可能にする、CEACAM1-CEACAM1相互作用を防ぐCM10の作用様式 of 非限定的理論を示している。

【0250】

実施例7：CM10試験管内安全性評価

CM10の正常なヒト細胞への効果

免疫系から逃れるために、がん細胞は、多くの分子の発現を変化させる。いくつかの証拠により、黒色腫細胞の悪性形質転換中にCEACAM1発現が増加していることが示されている。文献によると、CEACAM1は正常な細胞でも発現しているので、体のCM10の可能な結合部位をマッピングし、正常な細胞へのCM10の結合が、何らかの望ましくない結果をもたらすおそれがあるかどうかを確認することが重要である。

【0251】

正常なヒト組織の交差反応性

この試験では、正常なおよび悪性の黒色腫試料を含有するヒト組織マイクロアレイにおける抗CEACAM1 mAbの結合強度を調査した。結合強度は、標準的病理学的点数

10

20

30

40

50

化システムを使用して評価した。標準的 IHC 手順により、悪性黒色腫（原発性、転移）および良性母斑の 100 例を含有する組織マイクロアレイ（TMA）の抗 CEA CAM 1 結合強度を分析した。腫瘍の各コアを 0 から +3 まで類別した。図 10 に示すように、抗 CEA CAM 1 mAb の結合強度は、黒色腫試料の 50% 超および転移性黒色腫試料の 65% に見られた。

【0252】

多くの正常なヒト器官組織マイクロアレイ（TMA）は、各型を 3 人の正常なヒト個体から採取した 33 の型の正常な器官を含んでいた。年齢は 2 ~ 67 歳に及び、43 標本は女性から得て、57 標本は男性から得た。以下の組織は、抗 CEA CAM 1 mAb 結合について陰性であった：大脳、小脳、卵巣、膵臓、副甲状腺、下垂体、甲状腺、扁桃、骨髓、脾臓、胸腺、肺、心筋、胃、骨格筋、皮膚、末梢神経、中皮および網膜。細胞特異的染色がいくつかの器官、主に小腸の刷子縁；いくつかの頂端結腸腺；乳管上皮；肝臓毛細胆管；尿細管の内部表面；わずかな子宮内膜腺；唾液腺の管腔部分などの管腔臓器器官中の管または腺を形成する上皮細胞の管腔側で検出された。さらに、いくらかの低い細胞染色が、副腎皮質、前立腺の頂端膜側、精巣のライディッヒ細胞および膵臓の単一散乱細胞で観察された。陽性と分かった免疫系の唯一の細胞は、毛細血管中の好中球であった。組織およびリンパ器官では、リンパ球の染色は見られなかった。最後に、弱 ~ 中等度の陽性染色が、卵巣、副腎、腎臓を含む選択的部位の小血管の上皮細胞、ならびにまれに膵臓、前立腺、下垂体および子宮内膜で見られた。

【0253】

IHC 分析により、正常なヒト組織で試験した組織の大多数で染色がなかったのに対し、黒色腫細胞の強い抗 CEA CAM 1 染色が示された。それにもかかわらず、いくらかの選択的染色が、管腔臓器の管または腺の上皮細胞の管腔側で観察された。この細胞側は、一般的に末梢血を通して投与された抗体にあまり接近できない。

【0254】

1 細胞あたりに結合した CM10 分子の定量化

各細胞型に結合した CM10 分子の正確な数を定量化するために、Quant i B R I T E キットを使用した。このキットを使用して、MFI（平均蛍光強度）を、1 細胞あたりに結合した分子の数に直接変換した。抗 CEA CAM 1 結合について陽性であることが分かった組織の 3 種のヒト一次細胞を ATCC から購入した。上皮細胞で見られた陽性染色を表すための HUVEC 細胞；前立腺が陽性染色を示したので一次前立腺上皮細胞、および管の内部表面が陽性染色したので一次腎近位尿細管上皮細胞である。より詳細には、SKmel5、G361、Malme3M、NK92MI、HUVEC、腎臓一次細胞および前立腺一次細胞を ATCC プロトコルに従って培養した。CM10 を製造業者のプロトコルに従って PE 分子（RPE LYNX Rapid Conjugation Kits Serotec）に結合し、Quant i B R I T E PE ビーズキット（BD）と共に使用して（1 μ g/ml）フローサイトメトリーにより ABC（1 細胞あたりに結合した抗体）を測定した。黒色腫細胞系と比較して示した一次細胞でフローサイトメトリーを使用して 1 細胞あたりに結合した CM10 分子の数を分析した。少なくとも 1000 個の細胞を各細胞系についてカウントした。

【0255】

定量分析（図 11、結果は 2 ~ 3 の独立した実験の平均 $\pm$ SE を表す）により、CEA CAM 1 陽性黒色腫細胞が、20000 ~ 50000 個の間の CM10 分子に結合する一方で、いくらかの CEA CAM 1 発現をすることが報告された正常な内皮および上皮細胞（例えば、HUVEC、腎臓および前立腺）は最大でも 2000 個の CM10 分子にしか結合しないことが示された。さらに、多数の CM10 抗体が NK 細胞（約 20000）に結合し、これは活性化リンパ球で高い CEA CAM 1 発現を示す発表データと相関する。これらの結果は、活性化リンパ球媒介細胞溶解におけるプレーヤーとしての CM10 の安全性プロファイル（一次細胞で低発現）およびその活性（NK 結果）を補強する。

【0256】

CM10の存在下でのヒト一次細胞の増殖

いくつかの陽性染色が正常な組織で見られたので、CM10の一次細胞成長への効果を調査した。HUVECおよび一次前立腺細胞をATCCプロトコルに従って培養し、XTT標準アッセイを使用して細胞増殖について監視した。細胞増殖への効果は検出されなかった。

【0257】

要約

抗CEACAM1 mAbの正常な組織および黒色腫細胞への結合プロファイルを確認した。CEACAM1は正常なメラニン形成細胞では不在であるが、新たな発現を受け、転移性黒色腫標本の大多数で広く発現し(図10)、他の正常な器官では、CEACAM1の発現はいくつかの組織内の特異的細胞中に限られている。細胞に結合したCM10分子の数を測定する定量分析により、正常なヒト一次細胞上の結合CM10の数が極めて少ないことが明らかになった(図11)。これらの結果は、患者に注射したCM10分子の大部分が、発現の差により、主にがん細胞を標的化し、正常な組織を標的化しないことを暗示している。さらに、CM10は、細胞増殖、CDC活性に効果を及ぼさず、無視できるまたは低いADC活性を有し、このことはCM10の非標的細胞への結合が望ましくない細胞成績をもたらさないことを示唆している。

【0258】

CM10の免疫系への効果

CM10は、2つのCEACAM1分子間の相互作用を遮断する免疫刺激性抗体であり、そうすることにより、悪性細胞に対するリンパ球の刺激を媒介する。抗体が重度の有害事象を引き起こすおそれがある免疫系の抑えられていない刺激を引き起こさないことを検証することが重要である。正常なリンパ球では、細胞膜上でCEACAM1の発現は無視でき、細胞活性化後にのみCEACAM1が膜に動員され、活性化リンパ球上で急速かつ強力に上方制御される(Gray - Owen and Blumberg 2006、Nat Rev Immunol 6、433~46)。上に示すように、正常なリンパ組織(脾臓、胸腺、骨髄)またはリンパ球に対する交差反応性は観察されなかった。それにもかかわらず、種々の試験管内および生体外免疫毒性分析を行い、潜在的副作用を予測するのに役立てた。

【0259】

CM10のヒトリンパ球増殖への効果

試験管内で免疫調節性抗体の安全性を評価するための最も一般的かつ許容される方法の1つは、その増殖への効果および正常なヒトPBMC(末梢血単核細胞)のサイトカイン分泌を調べることである。3人の非血縁者ドナーからのヒトPBMCを単離し、3つの異なる濃度(2 µg/ml、20 µg/mlもしくは200 µg/ml)のCM10または対照mAb IgG1K(200 µg/ml)と共に60分間および8複製ウェルでインキュベートした。PHA(1 µg/ml)をアッセイ複製ウェルの4に添加し、96時間インキュベートした。3H-チミジンの組み込みを使用して細胞増殖を分析した。mock刺激細胞およびPHAのみ刺激細胞をそれぞれアッセイの陰性および陽性対照として使用した。残りのリンパ球ならびに活性化リンパ球(PHA処理)で増殖を評価した。mock刺激細胞およびPHAのみ刺激細胞をそれぞれアッセイの陰性および陽性対照として使用した。結果(図12)は、CM10がナープまたは活性化ヒトリンパ球の増殖に効果を有さないことを明確に示している。PBMC増殖試験に加えて、CM10のヒトPBMCからのサイトカイン分泌への効果を評価する。サイトカイン分泌試験は、CM10の免疫調節効果を規定し、潜在的副作用を予測するのに役立つ。

【0260】

実施例8 . CM10選択性パネル

異なるCEACAMファミリータンパク質を過剰発現している細胞系およびフローサイトメトリー分析を使用して、結合プロファイルのキャラクタライゼーションを行った。ヒトでは、CEAファミリーは、染色体19q13.2上の18の遺伝子および11の偽遺

10

20

30

40

50

伝子によりコードされている。いくつかの密接に関連するメンバーは、CEACAMファミリーに属し(CEACAM1、3、4、5、6、7、8)、種々のヒト細胞型で差次的に発現している。CEACAMタンパク質は、正常な細胞およびがん性細胞の成長ならびに分化を支配する種々の接着媒介効果と関係づけられてきた(Gray-Owen and Blumberg 2006、Nat Rev Immunol 6、433~46)。ファミリーの密接に関連するタンパク質は、特定のメンバー間で45%から最大90%の類似性まで変化する高いアミノ酸類似性を共有する。

【0261】

標準的FACSプロトコルを、ビオチン分子および二次薬剤としてのStrept-Avidin APCと結合したCM10を用いて使用した。CEACAM1、5、6、8を発現している721.221細胞またはCEACAM3、4を一過性発現しているHEK293Tをビオチン化CM10(1μg/ml)および二次薬剤としてのStrept-Avidin APCで染色した。空のヒストグラムはmAb染色を表し、赤色ヒストグラムは背景染色を表す。各ヒストグラムに少なくとも1000個の細胞を使用してCM10結合を分析した。染色細胞のMFIを背景染色のMFIで割ることによりFABを計算した。図13に示す結果は、CM10がCEACAM1を発現している細胞に強く結合することを明確に示している。CEACAM3および5を発現している細胞で、中等度の染色が観察された。CEACAM4、6、8を発現している細胞で、弱いまたは無視できる結合が示された。

【0262】

結論

CM10は、ヒトCEACAM1、がん、一般に、特に黒色腫に関連することが分かったタンパク質を認識するために開発されたmAbである。数種の悪性腫瘍、特に黒色腫、NSCLC、甲状腺がんおよび胃がんがCEACAM1の過剰発現が確認されている。証拠により、CEACAM1の過剰発現が黒色腫およびNSCLC患者の予後不良と相関し得ることが示されている。CEACAM5は、胃腸、結腸直腸(CRC)および膵がんの90%、非小細胞肺癌細胞の70%、ならびに乳がんの50%を含む、多くのヒト腫瘍の高い割合で過剰発現していることが分かった。CEACAM5はまた、甲状腺、胃、卵巣および子宮がんでも過剰発現している(Thompson、Grunertら 1991、J Clin Lab Anal 5、344~66)。CEACAM5は、CRCの肝臓転移および結腸がんの術後監視のための臨床マーカーとして有用でさえある(Duffy 2001、Clin Chem 47、624~30)。CM10がCEACAM5に結合することができるという証拠は極めて重要であり、4~5種の悪性腫瘍から10種超までCM10により処置することができる可能な適応症を広げることができる。臨床試験に入った抗CEACAM5剤には、種々の悪性腫瘍の診断目的と処置目的の両方のための放射性物質などの毒性物質と接合した抗CEACAM5抗体が含まれる。これらの毒性接合型でさえ安全性の課題を示さないように思われ、このことはCEACAM5が安全な標的であることを示し得る(Lierschら、2005、J Clin Oncol 23(27)、6763~70; Ychou Clinら 2008、Cancer Res 14(11)、3487~93)。他方、これらの薬剤のいずれも腫瘍の免疫学的制御を標的化せず、これはCM10などのCEACAM1とCEACAM5の両方に結合することができる抗体により標的化され得る。

【0263】

実施例9: CM10のエピトープマッピング

標的分子の不連続エピトープを再構築するために、構築ペプチドのライブラリーを合成した。標的分子は、以下の配列を有するヒトCEACAM1分子のNドメインであった:

```

1      QLTTESMPFN VAEGKEVLLL VHNLPQQFLG YSWYKGERVD GNRQIVGYAI50
51     GTQQATPGPA NSGRETIYPN ASLLIQNVTVQ NDTGFYTLQV IKSDLVNEEA100
101    TGQFHVYP108 (配列番号35)
```

【0264】

ペプチドを単一ループ、二重ループ、三重ループ、シート状折りたたみおよびこれらの組み合わせに構築することを可能にする *Peps can's Chemically Linked Peptide on Scaffolds (CLIPS)* 技術を使用してライブラリーを合成した (Timmermanら 2007、J. Mol. Recognit. 20: 283~99 および Slootstra 1996、Molecular Diversity 1: 87~96)。CLIPS 鑄型をシステイン残基に結合させる。ペプチド中の多数のシステインの側鎖を1つまたは2つのCLIPS 鑄型に結合させる。例えば、T2 CLIPS の1,3-ビス(プロモメチル)ベンゼン中0.5 mM 溶液を重炭酸アンモニウム(20 mM、pH 7.9) / アセトニトリル(1:1 (v/v)) に溶解する。この溶液をペプチドアレイに添加する。CLIPS 鑄型は、ペプチドアレイ(3 μ l ウェルで455 ウェルプレート)の固相結合ペプチド中に存在する2個のシステインの側鎖に結合する。ペプチドアレイを、溶液に完全に被覆しながら、溶液中で30~60 分間穏やかに振盪する。最後に、ペプチドアレイを過剰のH₂Oで広範に洗浄し、70 でPBS (pH 7.2) 中1% SDS / 0.1% β -メルカプトエタノールを含有する破壊緩衝液中30 分間超音波処理し、次にH₂O中でさらに45 分間超音波処理する。ペプチドを保有するT3 CLIPS を、同様であるが3個のシステインを用いる方法で作成した。

10

【0265】

総数3002個のペプチドを合成した。このペプチドは以下を含む：天然システインがアラニンで置き換えられた全タンパク質の2つの異なる領域を組み合わせたCLIPSマトリックスセット；長さ6、10、15、20、25および33の直鎖ペプチドセット；中央残基がアラニンで置き換えられた長さ15の直鎖ペプチドセット；天然システインがアラニンで置き換えられた長さ15のCLIPS 構造的ループセット；および天然システインがアラニンで置き換えられた、アラニンで置き換えられた中央残基を有する長さ15のCLIPS 構造的ループセット。

20

【0266】

抗体の合成ペプチドの各々への結合を、PEPSCANをベースとするELISAで試験した。ペプチドアレイを一次抗体(CM10)溶液と共にインキュベートした(4で一晩)。洗浄後、ペプチドアレイを抗体ペルオキシダーゼ複合体の1/1000希釈と共に25 で1時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ基質2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸(ABTS)および2 μ l/mlの3% H₂O₂を添加した。1時間後、発色を測定した。発色は、電荷結合素子(CCD)カメラおよび画像処理システムを用いて定量化した。

30

【0267】

CCDから得られる値は、0~3000 mAUに及び、標準的96ウェルプレートELISAリーダーと類似である。結果を定量化し、Peplabデータベースに保存する。二次元マップで変数にとる値を色として表すデータのグラフ表示を使用して、結合値を分析のために抽出する。

【0268】

観察された結合パターンに基づいて、CM10、S91のエピトープのコアは、残基₁₇VLLLVHNLPPQLF₂₉からなる。二次結合領域は、₆₈YPNASLLIQNVT₇₉の周りの配列で観察された。観察された結合パターンを標的タンパク質の利用可能な結晶構造と比較すると、CM1、S91についての不連続エピトープが₆₈PNASLLI₇₅(担体)と共に₁₇VLLLVHNLPPQLF₂₉(コア)からなることが提案される。

40

【0269】

実施例10：CM10の活性を評価する追加の実験

潜在的PDマーカーとしてのエフェクター細胞によるグランザイムB分泌

堅牢な薬力学的(PD)マーカーの開発は、臨床試験における薬物の成功を改善するために重要であり、有効性と毒性の釣り合いを取る最適な薬物用量の選択を補佐する。PDマーカーは通常、分子経路において薬物標的に近位であり、治療効果にかかわらず薬物の

50

効果を測定するために使用される。グランザイム B は、特異的標的を認識すると、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) および NK 細胞の細胞質顆粒を通して放出されるセリンプロテアーゼである。これが、今度は標的細胞のアポトーシスを媒介する。本発明者らは、CM10 が特異的標的細胞の存在下でエフェクター NK および T 細胞からのグランザイム B 分泌を増強し、したがって抗体による標的に死滅の増強が観察されることを可能にするかどうかを決定しようとした。

【0270】

TIL を CM10 ($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ もしくは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) またはアイソタイプ対照 Ab (IPI-イピリムマブ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) と共に 37 で 30 分間インキュベートした。CEACAM1 を発現している標的陽性黒色腫細胞および HLA-A2-SKmel5 を 2.5 : 1 のエフェクター対標的比で一晩のインキュベーションに添加した。グランザイム B 分泌を ELISA により測定した。結果は、1 処理当たり 6 反復からのグランザイム B 放出値の平均 $\pm$ S.E. を表す。別の独立した実験でも同様の結果が見られた。

【0271】

図 15 に示すように、TIL は、CM10 単独の存在下で低いままであった低い初期レベルのグランザイム B を分泌する。標的細胞を TIL に添加した場合にのみ、グランザイム B は劇的に上昇した。しかし、CM10 は、グランザイム B 分泌を高い初期レベル以上に有意に増加させることができた。NK92MI 細胞をエフェクター細胞として使用した場合にも同様の結果が見られ、CM10 が NK 細胞からのグランザイム B 分泌を同様の様式で増強することができることを示している。生体内モデルおよび患者標本を含む補完的セットの実験で、CM10 処理に対する PD マーカーとしてのグランザイム B の使用も調べる。

【0272】

CM10 は CEACAM1 - CEACAM5 相互作用を遮断する

癌胎児性抗原 (CEA、CEACAM5 および CD66e) は、種々の型のがん、特に結腸直腸癌、ならびに胃腸、膵がん、非小細胞肺癌、乳がん、甲状腺、胃および卵巣がんに関連することが分かっている。がん診断および治療のための標的となる分子が開発されてきた。

【0273】

MHC-I 欠損黒色腫細胞系と NK 細胞との間の同種アフィニティ CEACAM1 相互作用は、NK 細胞によるがん細胞の死滅を有意に阻害した (Markelら J Immunol. 2002; 168: 2803 ~ 2810)。同様に、HLA クラス I 欠損 721.221 細胞の強制発現も NK 媒介細胞傷害を抑制し (Sternら J Immunol. 2005; 174: 6692 ~ 6701)、CEACAM5 - CEACAM1 異種アフィニティ相互作用も免疫細胞における阻害性 CEACAM1 シグナル伝達を誘因することができることを示している。

【0274】

CEACAM1 陽性細胞系 (SKmel5) をアイソタイプ対照または種々の濃度の CM10 と共にインキュベートし、結合していない CM10 を 2 回洗浄し、次に可溶性ビオチン化 CEACAM5 を用いてまたは用いずにインキュベートした。ビオチン化 CEACAM5 の細胞への結合は、二次 streptavidin-APC および FACS 分析により検出した。結果は、複製ウェルの平均 $\pm$ SE を表す。2 つの他の独立した実験でも同様の結果が得られた。

【0275】

図 16 の結果は、CM10 が CEACAM1 と CEACAM5 との間の結合を用量依存的様式で阻害することを示している。そのため、CM10 を使用して高レベルの CEACAM5 を発現し、免疫細胞を抑制するために CEACAM1 - CEACAM5 軸を利用している悪性腫瘍を処置することができる。

【0276】

10

20

30

40

50

CM10はHLA拘束性T細胞死滅を増強する

細胞傷害性T細胞は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、移植拒絶にも関与する。これらの細胞は、体のほぼ全細胞の表面上に存在するHLA分子と関連する抗原に結合することによりその標的を認識する。感染細胞または悪性細胞の死滅には、適切な応答を発生させるためにいくつかの経路を採用することを要する。

【0277】

このアッセイのセットは、CM10がHLA拘束性のあるいは免疫系の全体的刺激を引き起こす「天然」CTL活性を増強するかどうかを決定しようとしたものである。

【0278】

TILをCM10(0.2 μg/ml、1 μg/ml、5 μg/mlもしくは10 μg/ml)またはアイソタイプ一致対照抗体と共に37℃で30分間インキュベートした。CEACAM1を発現している標的陽性黒色腫細胞SKmel5およびHLA-A2を、HLA-A2遮断モノクローナル抗体を用いてまたは用いずに1時間プレインキュベートし、2.5:1のエフェクター対標的比で一晩のインキュベーションに添加した。標準的LDH放出アッセイにより死滅を測定した。結果は、1処理当たり3反復からのLDH放出値の平均±S.E.を表す。

【0279】

図17の結果は、HLA-A2遮断抗体の存在下で、CM10がTILによる黒色腫細胞死滅を増大させることができなかったこと、およびCM10の活性がHLA拘束性であることを示している。別の独立した実験でも同様の結果が見られた。そのため、これらの結果によると、CM10が生体内での悪性細胞に対するCTLの活性を改善し、免疫系の非特異的活性化を促進しないことが示唆される。

【0280】

CM10の免疫調節活性が生体内で腫瘍成長を阻害する

新規な抗がん剤の生体内での作用を評価するために最も広く使用されているモデルの1つは、ヒト腫瘍異種移植片モデルである。このモデルでは、ヒト腫瘍細胞を、ヒト細胞を拒絶しない免疫無防備状態のマウスの皮膚下に移植する。注射する細胞の数および細胞の増殖速度に応じて、腫瘍は数週間にわたって成長し、適当な治療レジメンに対する応答を生体内で試験することができる。腫瘍形成の初期段階の処理を伴うモデルの利点は、患者における転移の広がりにより類似し得る設定で薬剤の影響を試験する、および処理の初期腫瘍移植への効果を確認する機会があることである。

【0281】

そのため、生体内でのCM10の免疫調節活性を、予防的処置体制下でヒト黒色腫細胞を移植したSCID-NODマウスで調査した。SCID-NODマウスを図18に示す5つの処置群に従ってランダム化した。6×10⁶個のSKmel5細胞(黒色腫細胞系)を0日にSC注射した。マウスを図に示すように抗体/TILで処理した。矢印は投与時間を示し、薄い矢印は抗体-0.25 mg/マウス/注射(CM10、IgG対照およびイピリムマブ対照)を表し、広い矢印はTIL(1注射当たり1マウス当たり20×10⁶個の細胞)を表す。腫瘍体積を1週間当たり2~3回盲検的に測定した。結果は、1群当たり8~9匹のマウスからの平均腫瘍体積±S.E.を表す。

【0282】

図18は、養子ヒトT細胞移入とCM10の組み合わせが有意な相乗作用を示し、アイソタイプ対照群と比較して強力に異種移植片成長を阻害した(69% TGI)ことを示している。この結果は、CM10が単一薬剤としても効果を有し(32日で45% TGI)、おそらくは増殖、血管新生を阻害することによりまたは他の生物学的経路を通して腫瘍細胞または腫瘍の周囲に直接作用したことを示している。

【0283】

同じ実験セットで、実験終了日に腫瘍の総重量を測定した。得られた結果は体積測定値を支持し、TIL+CM10処理群の腫瘍量の劇的減少およびCM10処理群の腫瘍重量の統計学的に有意な減少も示している。

10

20

30

40

50

【0284】

CM10はNK細胞のCEACAM1陽性膵がん細胞系への免疫調節死滅活性を増強する予備的スクリーニングにより、膵がん細胞系および患者標本が高レベルのCEACAM1を発現していることが示された（膵がん標本の94%がCEACAM1陽性であった）。そのため、CM10が膵がん細胞系に対する免疫細胞の活性を増強することができるかどうかを調べるための実験を行った。異なるCEACAM1陽性標的膵がん細胞系との、種々の濃度のCM10で前処理したNK92MI細胞の共培養により、死滅アッセイを行った。NK92MIをCM10（0.2 μg/ml、1 μg/mlもしくは10 μg/ml）またはアイソタイプ一致対照Ab（10 μg/ml）と共に37℃で30分間インキュベートした。A. CEACAM1を発現している標的細胞を、2.5 : 1のエフェクター対標的比（COLO-357）でさらに5時間または5 : 1のエフェクター対標的比（BXP3）で一晩添加した。結果は、1処理当たり3複製からの古典的LDH放出アッセイにより決定される細胞傷害%の平均±S.E.を表す。

10

【0285】

図19に表す結果は、NK細胞による膵がん細胞の死滅は比較的低かったが、CM10がこの活性をベースラインの細胞傷害（PBSまたは対照Ab）から最大で2倍まで増強したことを示している。追加の2つの系でも同様の結果が見られた。

【0286】

CM10はCEACAM1陽性膵がん細胞系の存在下でNK細胞のグランザイムB分泌を増強する

20

黒色腫細胞と同様に、CM10が膵がん細胞の存在下でNK細胞からのグランザイムBの分泌を増強することができるかどうかを決定するための実験を設計した。死滅アッセイと同様の設定で、NK細胞を種々の濃度のCM10で前処理し、次いで、4種の異なる標的膵がん細胞系と共培養した。特異的ELISAにより上清のグランザイムB含量を分析した。NK92MIをCM10（0.2 μg/ml、1 μg/mlもしくは10 μg/ml）またはアイソタイプ一致対照抗体（10 μg/ml）と共に37℃で30分間インキュベートした。CEACAM1を発現している標的膵臓細胞を、2.5 : 1のエフェクター対標的比A.（COLO-357およびASPC-1）とB.（SU8686）または10 : 1のE : T C.（BXP3）でさらに5時間添加した。グランザイムB分泌をELISAにより測定した。結果は、1処理当たり2～6複製からのグランザイムB放出値の平均±S.E.を表す。

30

【0287】

図20は、CM10が膵がん細胞の存在下でNK細胞からのグランザイムB分泌を増加させることを明確に示している。

【0288】

実施例11：ヒト化およびヒト抗体

ヒト化抗体は、典型的には非ヒトCDRが移植されたヒトフレームワークを有する。したがって、ヒト化抗体は、ヒト以外の源から導入された1個または複数のアミノ酸配列を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は通常、「移入」残基と呼ばれ、これらは典型的には「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、齧歯動物CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより、本質的にはWinterおよび共同研究者の方法に従って行うことができる（Jonesら、Nature、321 : 522～525、1986；Riechmannら、Nature、332 : 323～327、1988；Verhoevenら、Science、239 : 1534～1536、1988）。したがって、前記「ヒト化」抗体は、実質的に完全ヒト可変ドメイン未満がヒト以外の種からの対応する配列により置換されたキメラ抗体である（米国特許第4816567号）。実際、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかのCDR残基およびおそらくはいくつかのFR残基が齧歯動物抗体中の類似部位からの残基により置換されているヒト抗体である。

40

【0289】

ヒト化抗体を作成するために使用される、軽鎖と重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択

50

は、抗原性を低下させるために極めて重要である。いわゆる「最良適合」法によると、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、齧歯動物のものに最も近いヒト配列をヒト化抗体用のヒトフレームワーク (FR) と認める (Simsら、J. Immunol.、151:2296、1993; Chothiaら、J. Mol. Biol.、196:901、1987)。別の方法は、特定のサブグループの軽鎖または重鎖の全ヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用することができる (Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:4285、1992; Prestaら、J. Immunol.、151:2623、1993)。

10

【0290】

抗体を抗原との高いアフィニティおよび他の好ましい生物学的特性を保持しながらヒト化することがさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法によると、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して親配列および種々の概念的ヒト化産物を分析する方法によりヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に利用可能であり、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可能な三次元形態構造を説明し示す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検査により、候補免疫グロブリンの機能における残基のもっともらしい役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。こうして、FR残基をレシピエントから選択し組み合わせ、所望の抗体特性、例えば標的抗原に対するアフィニティ増加が得られるように配列を移入することができる。一般に、CDR残基は抗原結合に影響を及ぼすことに直接的およびほとんど実質的に関与している。

20

【0291】

あるいは、免疫化すると、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物 (例えば、マウス) を製造することがここで可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞系突然変異マウスの抗体重鎖連結領域 (JH) 遺伝子のホモ接合欠損により、内因性抗体産生の完全な阻害がもたらされることが記載されている。前記生殖細胞系突然変異マウスへのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの移入により、抗原攻撃時にヒト抗体の産生がもたらされる (例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:2551、1993; Jakobovitsら、Nature、362:255~258、1993; Bruggermannら、Year in Immunol.、7:33、1993; および Duchosalら Nature 355:258、1992)。ヒト抗体をファージディスプレイライブラリーから得ることもできる (Hoogenboomら、J. Mol. Biol.、227:381、1991; Marks J. Mol. Biol. 222:581 597 1991; Vaughanら Nature Biotech 14:309、1996)。

30

【0292】

実施例12．抗体フラグメント

40

抗体フラグメントを産生するための種々の技術が開発されてきた。伝統的には、これらのフラグメントは、完全抗体のタンパク質分解を通して得られた (例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107~117、1992およびBrennanら、Science、229:81、1985)。しかしながら、これらのフラグメントは現在、組換え宿主細胞により直接産生することができる。例えば、抗体フラグメントを上記抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントを大腸菌から直接回収し、化学的に結合してF(ab')₂フラグメントを形成することができる (Carterら、Bio/Technology 10:163~167、1992)。別の手法によると、F(ab')₂フラグメントを組換え宿主細胞培養液か

50

ら直接単離することができる。抗体フラグメントを産生するための他の技術は当業者に明らかである。他の実施形態では、好まれる抗体は単鎖Fvフラグメント(s c F v)である。

【0293】

実施例13．ウイルス感染症に対する抗CEACAM抗体の能力

以下の実験を使用してウイルス感染症に対するCM10の能力を測定する。実験は異なる標的細胞、種々のウイルスならびにいくつかの生体内および試験管内モデルを含む。

検出／診断：FACS分析、RT-PCRおよび免疫組織化学による、異なるウイルス型に感染した細胞系および一次細胞におけるCEACAM発現レベルの調査。

予防：抗CEACAM抗体との標的細胞のプレインキュベーションならびにウイルス感染後のウイルス負荷またはウイルス複製の測定。

処理：ウイルス感染後、感染細胞を免疫系細胞と共にインキュベートし、エフェクター細胞の死滅能力およびウイルス負荷を調べる。さらに、ウイルス感染および抗CEACAM抗体による処理後にウイルス負荷および複製および全生存を生体内で測定する。

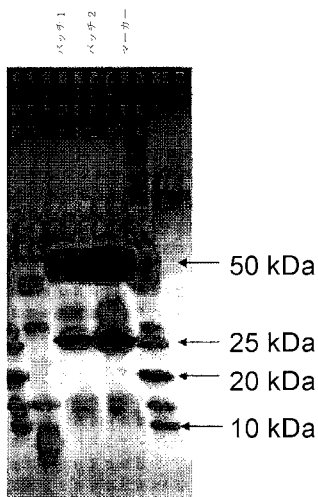
【0294】

上に記載した具体的な実施形態の説明により、本発明の一般的性質が完全に明らかになるので、現在の知識を適用することにより、過度の実験を行うことなくまた一般概念から逸脱することなく具体的な実施形態を容易に修正する、および／または種々の用途に適合させることができる。このため、前記適合および修正は、開示する実施形態の同等物の意味および範囲に包含されるべきであり、そのように意図されている。本明細書で使用する文言および用語は、説明を目的とするものであり、限定を目的としないことを理解すべきである。種々の開示する機能を実施するための手段、材料およびステップは、本発明から逸脱することなく、各種の代替形態をとることができる。

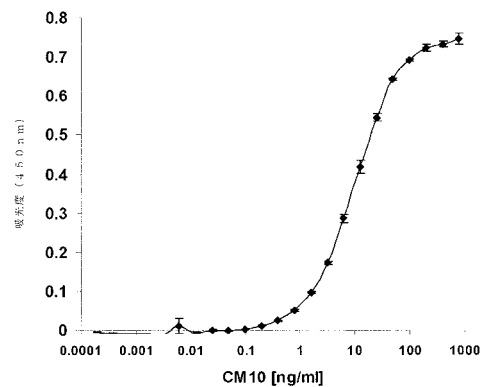
10

20

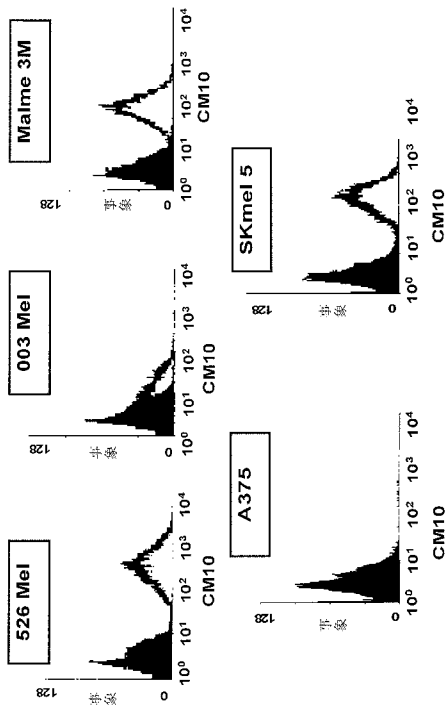
【図1】



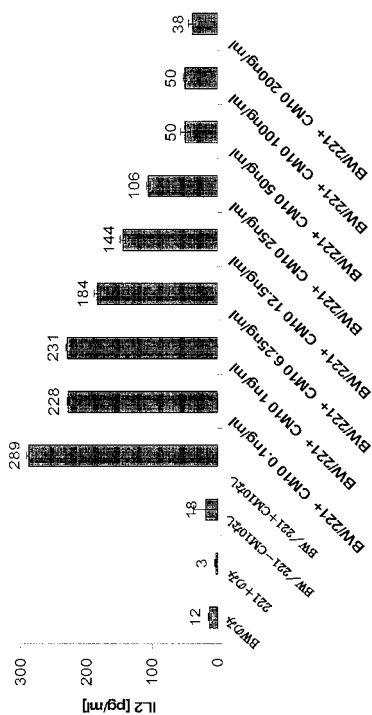
【図2】



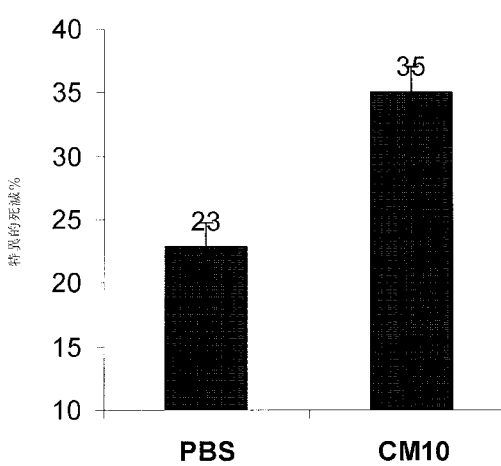
【 図 3 】



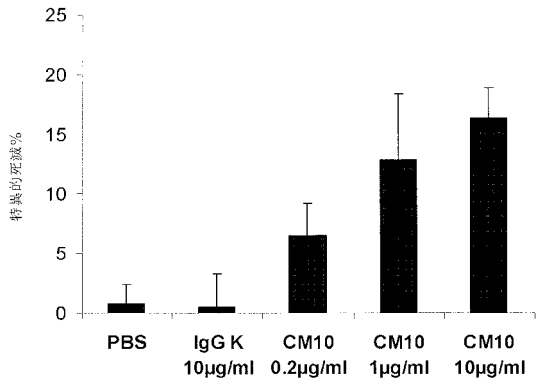
【 図 4 】



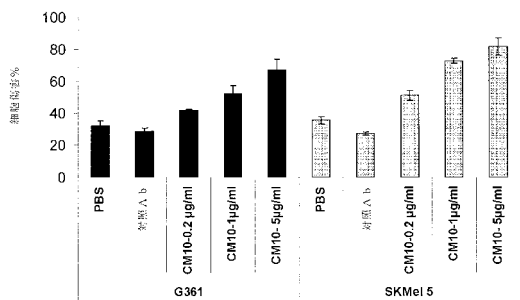
【 図 5 】



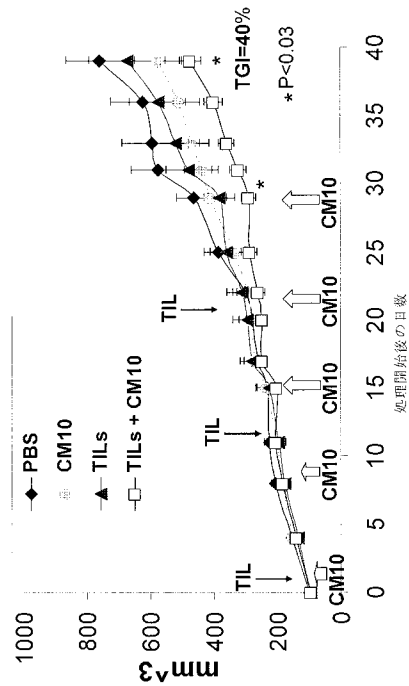
【 図 6 】



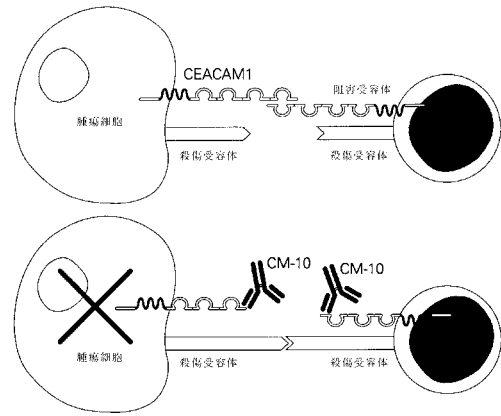
【 図 7 】



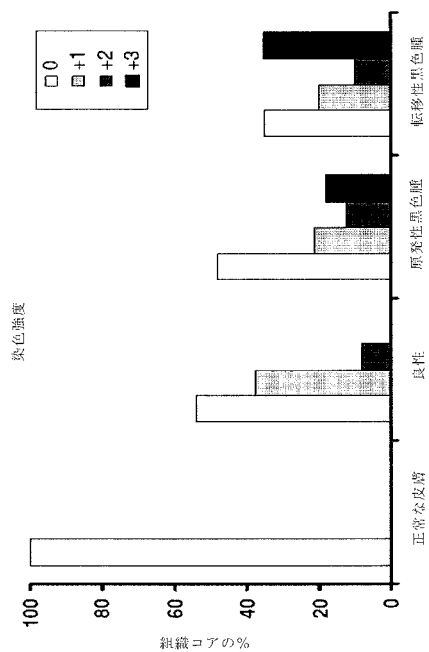
【図 8】



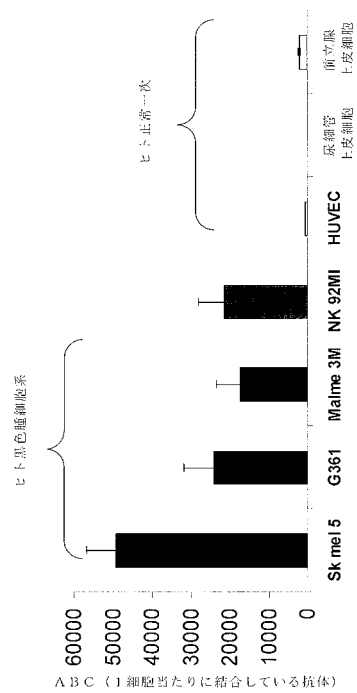
【図 9】



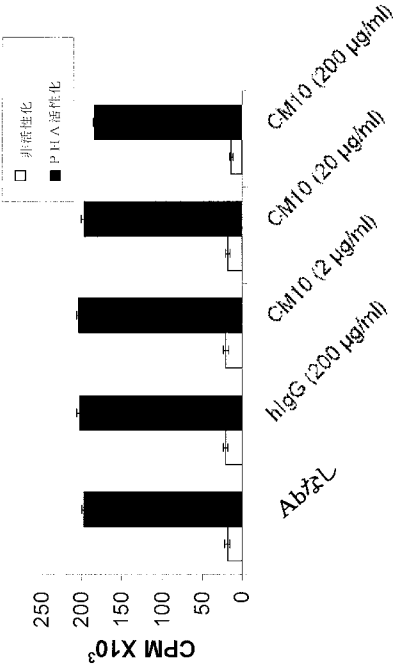
【図 10】



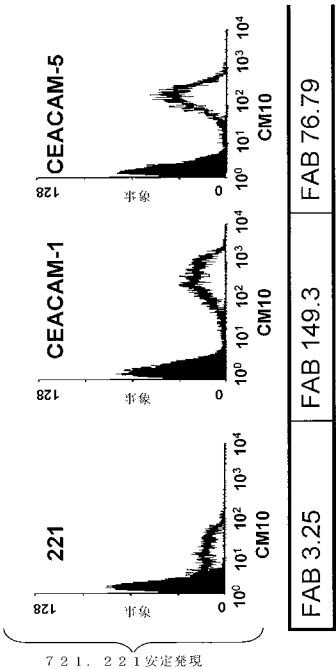
【図 11】



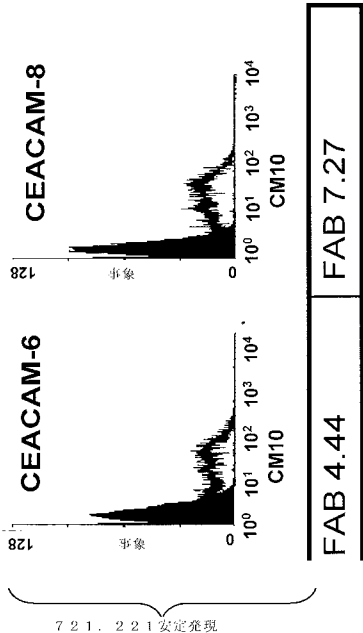
【 図 1 2 】



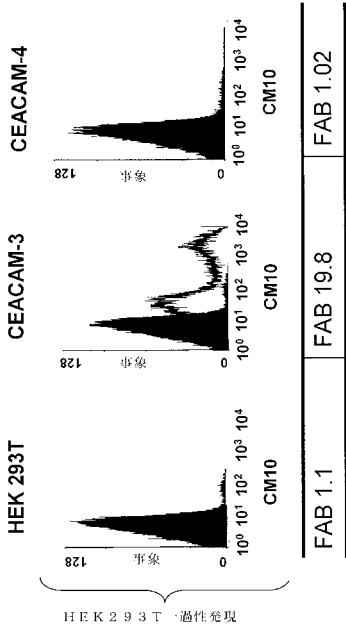
【 図 1 3 - 1 】



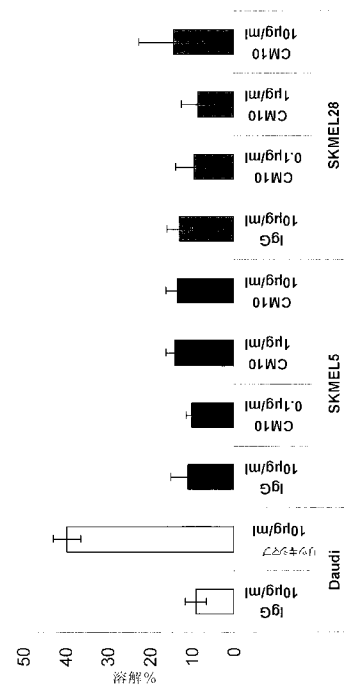
【 図 1 3 - 2 】



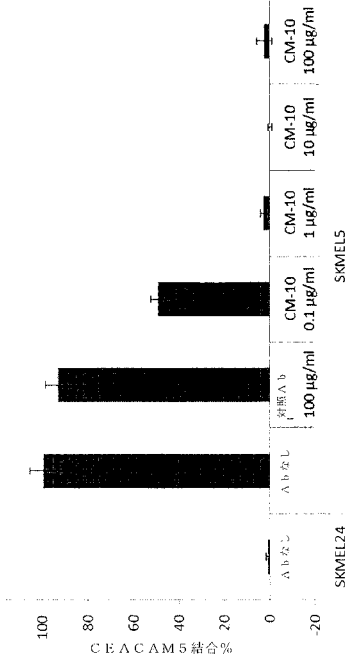
【 図 1 3 - 3 】



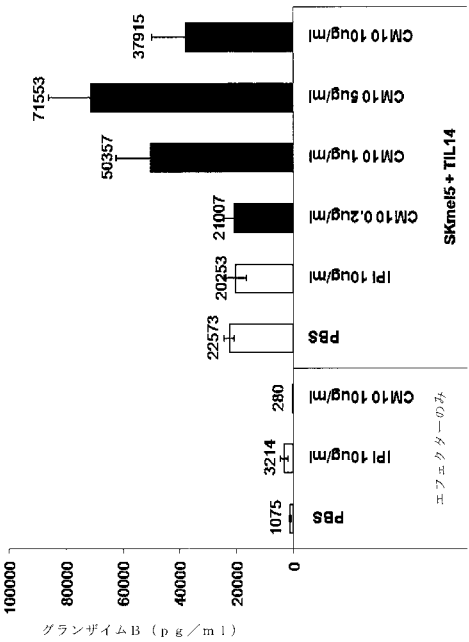
【 図 1 4 】



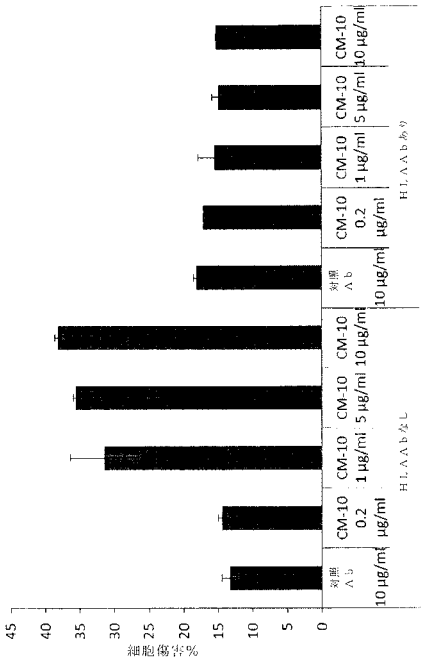
【 図 1 6 】



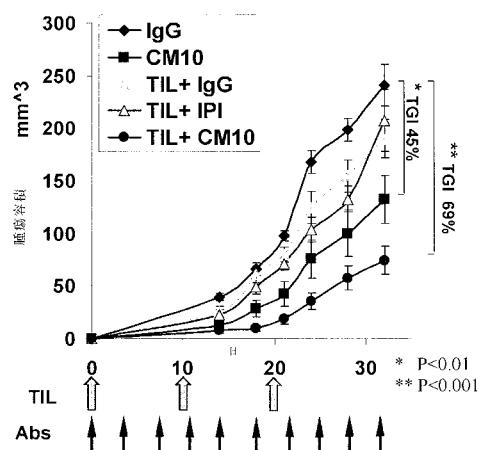
【 図 1 5 】



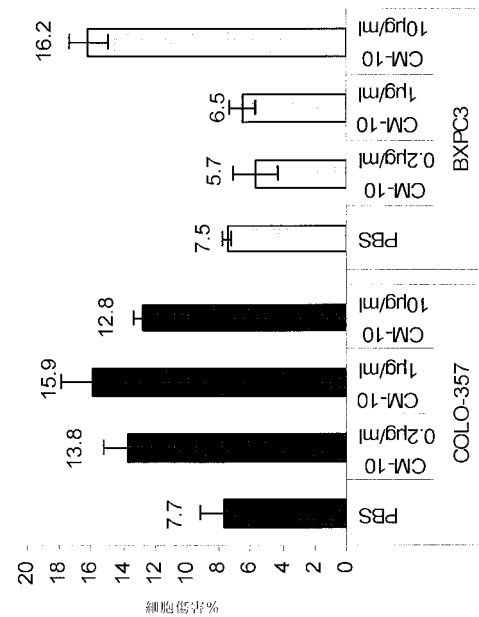
【 図 1 7 】



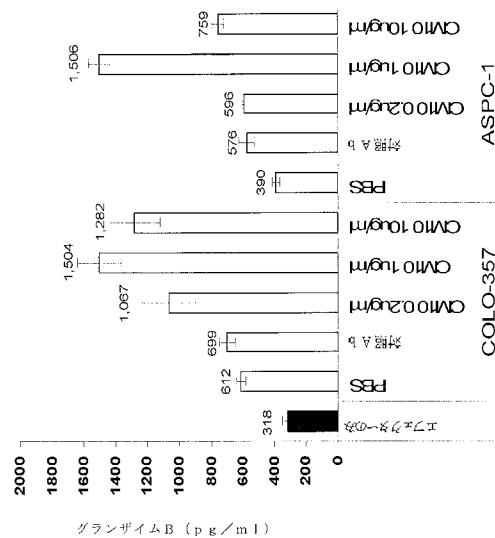
【図 18】



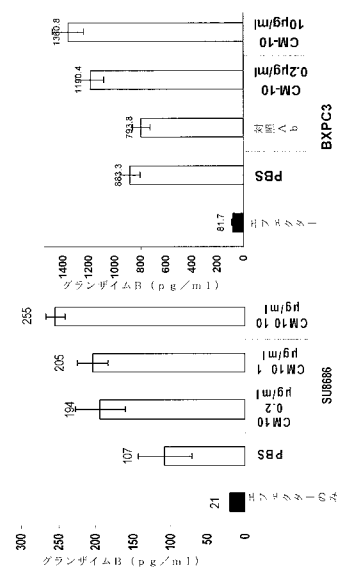
【図 19】



【図 20 - 1】



【図 20 - 2】



【配列表】

2015502138000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL2012/050402
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC (2013.01) C07K 16/28, C07K 16/30, A61K 39/395, G01N 33/53, A61P 35/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2013.01) C07K, A61K, G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases consulted: NCBI, THOMSON INNOVATION, REGISTRY, Google Scholar Search terms used: CEACAM1, BGP, CD66a, C-CAM 1, CEACAM5, CD66e		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pavoni E, et al., Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein (2006). BMC Cancer, 6:41. Retrieved from the Internet <URL: http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/41> <doi:10.1186/1471-2407-6-41>. 24 Feb 2006 (2006/02/24) The whole document	1-14,23-34,36-56
Y		15-22,35
X	Zheng C, et al., A novel anti-CEACAM5 monoclonal antibody, CC4, suppresses colorectal tumor growth and enhances NK cells-mediated tumor immunity (2011). PLoS One. 6(6): e21146. <URL: http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0021146> < doi: 10.1371/journal.pone.0021146>. 22 Jun 2011 (2011/06/22) The whole document	1-14,23-34,36-56
Y		15-22,35
X	WO 0113937 A1 SKUBITZ KEITH M [US]; SKUBITZ AMY P N [US] 01 Mar 2001 (2001/03/01) SEQ ID NOS: 17, 119, 178, 187- Tables I, II, VII, VIII, page 3, paragraphs 1-2	28,29
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 application or patent 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 20 Jan 2013		Date of mailing of the international search report 20 Jan 2013
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office The Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 96951, Israel Facsimile No. 972-2-5651616		Authorized officer RON-COHEN Yael yaelrc@justice.gov.il Telephone No. 972-2-5651737

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2012/050402

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Presta LG, et al., Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders (1997). Cancer Res.57(20):4593-9. <URL: http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/20/4593.long > 15 Oct 1997 (1997/10/15) abstract, p 4594, right column second paragraph, page 4595 right column third paragraph	15-22,35
Y	Kim SJ, et al., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies (2005). Mol Cells. 20(1):17-29., <URL: http://cms.daegu.ac.kr/sgpark/molecular%20biology/antibody%20engineering.pdf > 31 Aug 2005 (2005/08/31) page 19 left column, paragraph 1	15-22,35

International application No.
PCT/IL2012/050402

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 0113937 A1	01 Mar 2001	AU 6940700 A	19 Mar 2001
		CA 2383562 A1	01 Mar 2001
		EP 1212075 A1	12 Jun 2002
		EP 1212075 A4	23 Nov 2005
		WO 0113937 A1	01 Mar 2001
		WO 0113937 A9	06 Sep 2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)		A 6 1 K 49/00	A	4 H 0 4 5
A 6 1 K 49/04 (2006.01)		A 6 1 K 49/04	A	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	M	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P 7/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/18		
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 11/00		
A 6 1 K 35/14 (2015.01)		A 6 1 P 15/00		
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 P 7/00		
A 6 1 P 5/00 (2006.01)		A 6 1 P 31/12		
A 6 1 P 17/00 (2006.01)		A 6 1 K 35/14	Z	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 5/00		
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		A 6 1 P 17/00		
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		A 6 1 P 19/00		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 37/02		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B	
		G 0 1 N 33/574	A	
		G 0 1 N 33/53	D	
		C 1 2 P 21/08		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(71)出願人 507253749

ラモット アット テル アビブ ユニバーシティ, リミテッド

イスラエル国 6 1 3 9 2 テル アビブ, ピー . オー . ボックス 3 9 2 9 6

(74)代理人 100114775

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 マーケル, ガル

イスラエル国, 6 2 2 6 4 テル—アビブ, ブネイ ダン ストリート 5 0 / 6

(72)発明者 ベン モシェ, テヒラ

イスラエル国, 2 0 1 8 1 ミスガブ, コラニット

(72)発明者 サピア, ヤイル

イスラエル国, 4 2 8 6 0 ブルガタ, 1 6 ハデケル
(72)発明者 マンデル, イラナ
イスラエル国, 2 9 0 6 6 キリヤット ヤム, 3 ハテエナ
(72)発明者 シャハテル, ヤコブ
イスラエル国, 5 3 3 2 6 キヴァタイム, デレフ ベン グリオン 2 5 8
(72)発明者 オルテンバーグ, ロナ
イスラエル国, 6 9 4 9 4 テル—アビブ, レカナチ ストリート 1 4, アパートメント 5 0
F ターム(参考) 4B024 AA01 BA45 BA61 CA04 CA09 CA12 CA20 EA04 GA05 GA11
HA01 HA11
4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4C084 AA19 NA05 ZB262
4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04
GG08 GG10 HH01 HH20 KA04 KA05 LL18
4C087 AA01 AA02 BB37 DA20 MA02 NA05 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17

专利名称(译)	针对癌胚抗原相关细胞粘附分子 (CEACAM) 的抗体		
公开(公告)号	JP2015502138A	公开(公告)日	2015-01-22
申请号	JP2014535228	申请日	2012-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	Teruha甘蔗邮件医学研究基础设施和服务有限公司 希凯姆生物治疗有限公司 特拉维夫大学拉莫特有限公司		
申请(专利权)人(译)	电话Hashomeru医学研究基础设施和服务有限公司 CC AMR生物治疗有限公司 拉莫特在特拉维夫大学有限公司		
[标]发明人	マーケルガル ベンモシエテヒラ サビアヤイル マンデルイラナ シャハテルヤコブ オルテンバーグロナ		
发明人	マーケル,ガル ベン モシエ,テヒラ サビア,ヤイル マンデル,イラナ シャハテル,ヤコブ オルテンバーグ,ロナ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 C07K16/46 A61K49/00 A61K49/04 A61K39/395 A61P43/00 A61P35/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P11/00 A61P15/00 A61P7/00 A61P31/12 A61K35/14 A61K45/00 A61P5/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P37/02 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/18 A61P5/00 A61P7/00 A61P11/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/3007 C07K2317/24 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/39566 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/53 G01N33/686 A61K35/17 A61K45/06 C07K16/42		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 C07K16/46 A61K49/00.A A61K49/04.A A61K39/395.T A61K39/395.M A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P35/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P11/00 A61P15/00 A61P7/00 A61P31/12 A61K35/14.Z A61K45/00 A61P5/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P37/02 G01N33/577.B G01N33/574.A G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA45 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB36 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH01 4C085/HH20 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/LL18 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/DA20 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17		
优先权	PCT/IL2011/000808 2011-10-11 WO		
其他公开文献	JP6170926B2 JP2015502138A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了抗体以及至少具有抗体的抗原结合部分的分子，其识别蛋白质CEACAM1的特定表位并任选地结合CEACAM蛋白质家族的其他亚型。公开的抗体和抗体片段以特定的CDR序列为特征。还提供了这些抗体和抗体片段的生产方法和用于治疗 and 诊断的用途。

