

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6850351号
(P6850351)

(45) 発行日 令和3年3月31日(2021.3.31)

(24) 登録日 令和3年3月9日(2021.3.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08
C 07 K 1/113	(2006.01)	C 07 K 1/113 Z N A
C 07 K 1/22	(2006.01)	C 07 K 1/22
C 07 K 16/00	(2006.01)	C 07 K 16/00
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395 J

請求項の数 15 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-533340 (P2019-533340)
 (86) (22) 出願日 平成29年12月19日 (2017.12.19)
 (65) 公表番号 特表2020-501577 (P2020-501577A)
 (43) 公表日 令和2年1月23日 (2020.1.23)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2017/083429
 (87) 國際公開番号 WO2018/114877
 (87) 國際公開日 平成30年6月28日 (2018.6.28)
 審査請求日 令和1年8月13日 (2019.8.13)
 (31) 優先権主張番号 16205587.5
 (32) 優先日 平成28年12月21日 (2016.12.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 歐州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 17157002.1
 (32) 優先日 平成29年2月20日 (2017.2.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCHE
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体のインビトロ糖鎖工学

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の順序で、

・N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体を含む溶液を、固相に結合された抗体軽鎖アフィニティーリガンドに適用し、それによって、抗体がリガンドに結合され、その結果、リガンドに結合された抗体が生じる、工程、

・任意で、固相を、抗体を脱離させること/リガンド抗体複合体を破壊することなく、緩衝溶液で洗浄する工程、

・抗体のN-グリコシル化部位におけるグリコシル化を、

- 第1グリコシル化修飾用酵素を含む第1溶液を、リガンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄し、第2グリコシル化修飾用酵素を含む第2溶液を、リガンドに結合された修飾抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素を含む第1溶液を、リガンドに結合された抗体の少なくとも部分的な酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、所定の期間後に、第2グリコシル化修飾用酵素を含む第2溶液を、リガンドに結合された修飾抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素および第2グリコシル化修飾用酵素を含む溶液を、リガ

10

20

ンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄することのいずれかによって、酵素的に修飾する工程、

・抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから遊離させる工程

を含み、それによって、抗体が生産される、抗体を生産するための方法であって、前記溶液がクロマトグラフィーで精製された抗体を含み、前記第2グリコシル化修飾用酵素がST6であり、かつ前記第2グリコシル化修飾用酵素の適用が37または室温で24時間行われ、かつ前記抗体がモノクローナル抗体である、前記方法。

【請求項2】

以下の順序で、

10

・N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体を含む溶液を、固相に結合された抗体軽鎖アフィニティーリガンドに適用し、それによって、抗体がリガンドに結合され、その結果、リガンドに結合された抗体が生じる、工程、

・任意で、固相を、抗体を脱離させること/リガンド抗体複合体を破壊することなく、緩衝溶液で洗浄する工程、

・抗体のN-グリコシル化部位におけるグリコシル化を、

- 第1グリコシル化修飾用酵素および第1活性化糖残基を含む第1溶液を、リガンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄し、第2グリコシル化修飾用酵素および第2活性化糖を含む第2溶液を、リガンドに結合された修飾抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

20

- 第1グリコシル化修飾用酵素および第1活性化糖を含む第1溶液を、リガンドに結合された抗体の少なくとも部分的な酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、所定の期間後に、第2グリコシル化修飾用酵素および第2活性化糖を含む第2溶液を、リガンドに結合された修飾抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素および第2グリコシル化修飾用酵素ならびに第1活性化糖および第2活性化糖を含む溶液を、リガンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄すること

30

のいずれかによって、酵素的に修飾する工程、

・抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから遊離させる工程

を含み、それによって、グリコシル化修飾抗体が生産される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

抗体を含む溶液、第1溶液、第2溶液、および/または第1グリコシル化修飾用酵素および第2グリコシル化修飾用酵素を含む溶液が、緩衝溶液である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

前記遊離させる工程後に、

40

・修飾抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから回収する工程

を含む、請求項1~3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

抗体が、完全長抗体、二価单一特異性抗体、二重特異性抗体、二価二重特異性抗体、三価二重特異性抗体、四価二重特異性抗体、三価三重特異性抗体、抗体Fabフラグメント、および四価四重特異性抗体からなる抗体の群より選択される、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

抗体が、二価または三価または四価の二重特異性抗体またはFabフラグメントである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 7】

抗体が、キメラ抗体またはヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

第1グリコシル化修飾用酵素がガラクトシルトランスフェラーゼである、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

第1グリコシル化修飾用酵素がGalt1であり、かつ第1グリコシル化修飾用酵素の適用が37または室温で24時間行われる、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

溶液が抗体を含む緩衝無細胞培養上清であり、第1グリコシル化修飾用酵素がGalt1であり、第2グリコシル化修飾用酵素がST6であり、ST6が第1グリコシル化修飾用酵素の6～24時間後、好ましくは24時間後に添加され、総インキュベーション時間が37または室温で24時間～48時間、好ましくは30時間である、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

(a) 抗体またはFabフラグメントを、前記抗体またはFabフラグメントをコードする核酸を含む細胞中で組換え生産して、N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体またはFabフラグメントを得る工程、

(b) N-グリコシル化部位における不均一なグリコシル化を伴う工程(a)で生産された抗体またはFabフラグメントを単離する工程、

(c) N-グリコシル化部位における不均一なグリコシル化を伴う抗体またはFabフラグメントを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよび/またはシリルトランスフェラーゼで酵素的に修飾して、修飾抗体を得た後、修飾抗体またはFabフラグメントを酵素から分離する工程、

(d) 任意で、修飾抗体またはFabフラグメントを、1つまたは複数のクロマトグラフィー工程によって精製する工程

を含み、生産された抗体またはFabフラグメントが、N-グリコシル化部位に、相対量が少なくとも70%の二ガラクトシル化抗体またはFabフラグメント(G2グリコフォーム)を含む(ここで100%はG0、G1およびG2グリコフォームの量に相当する)、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

工程(a)に記載の抗体が、IgG1アイソタイプの抗体である、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

細胞が、哺乳類細胞またはCHO細胞である、請求項11記載の方法。

【請求項 14】

工程(b)が、工程(a)で生産された抗体またはFabフラグメントを回収および精製することを含む、請求項11記載の方法。

【請求項 15】

N-グリコシル化部位がFab領域N-グリコシル化部位またはアスパラギン残基297(ナンバリングはKabatに従う)のFc領域N-グリコシル化部位である、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗体工学の分野に属する。より具体的に述べると、本明細書には、抗体のFc領域におけるグリコシル化のインピトロ糖鎖工学のための方法が記載される。

【背景技術】

【0002】

【発明の背景】

IgGは最も豊富に存在する抗体アイソタイプであり、IgG1抗体は最も重要な一連のエフ

10

20

30

40

50

エクター機能を呈するサブクラスである。IgG抗体は、ADCCおよびCDCが重要とみなされることが多い免疫治療において、最もよく使用される抗体である。抗体の構造内では、CH2ドメインならびにIgGヒンジ領域が、Fcによって媒介される抗体エフェクター機能に大きな役割を果たす。各CH2ドメインは、約297番目（ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う）に位置するアスパラギンに、保存されたグリコシル化部位を含み、グリカン部分はそこに共有結合される（Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32 (非特許文献1)）。成熟IgG分子では、グリカンがCH2ドメインの間に埋もれて、IgG分子の三次構造に影響を及ぼしている。

【0003】

抗体のFc領域のグリカンは、主として、高度に不均一な複合型バイアンテナ構造である。抗体のFab領域内には保存されていないさらなるグリコシル化部位も存在しうるが、抗体のグリコシル化がそのエフェクター機能に及ぼす影響は、Fc領域のグリコシル化に起因すると考えられている。

【0004】

抗体のFc領域に存在するN結合型グリカンが、ADCCなどのエフェクター機能を媒介するために、抗体にとって不可欠であることは公知である（Lively, M.R. et al. Glycobiol. 8 (1995) 813-822 (非特許文献2)、Jefferis R. et al. Immunol Rev. 163 (1998) 59-76 (非特許文献3)）。N結合型グリカンの組成は、IgG分子のFc領域の構造に影響を及ぼし、それによって、Fc受容体結合、ADCC活性およびCDC活性などの抗体エフェクター機能を変化させることができ（Presta, L., Curr. Opin. Struct. Biol. 13 (2003) 519-525 (非特許文献4)）。

【0005】

組換え発現系において発現させた、例えば原核宿主細胞または真核宿主細胞における発現などによって発現させた、IgG抗体では、N結合型グリカン構造が個々の抗体分子間で異なる。それゆえに、組換え発現系で生産された抗体は「抗体の集団」（本明細書においてこれ以降も使用する用語）とみなすことができ、抗体はそれらのアミノ酸配列こそ同一であるものの、Fc領域のN結合型グリカンパターンについては不均一性を呈する。

【0006】

組換え抗体の発現に使用する宿主細胞の種が異なると、Fc領域グリカンの組成が異なることは公知である。抗体の組換え発現によく使用される宿主細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）とマウス骨髄腫細胞（例えばsp2/0、P3X63Ag8.653、NS0）の二つである。CHO細胞は、末端シアル酸残基が実質的に欠けていて、グリカンパターンの大部分がフコシル化されている組換え抗体を、発現する。対照的に、マウス骨髄腫細胞は、最大50%（相対頻度）のシアル酸残基を有するがフコース残基は少ない抗体集団を生じる。

【0007】

グリカン構造の末端残基のいくつかがIgGエフェクター機能に影響を及ぼすことは公知である。末端フコース残基の存在がFcガンマRIIIa結合の低減およびADCCの低減の一因になることは公知である。したがって、フコース残基を欠く抗体（「フコース欠損（afucosylated）」抗体）は、その抗体集団が媒介するADCCの増加に関連する。ADCC媒介の改良に対するフコース欠損（afucosylation）の影響は、当技術分野では広く受け入れられているが、ADCC媒介におけるFc領域ガラクトシル化の役割については議論の余地を残す記載がなされている。いくつかの研究が、ガラクトシル化はADCCに影響しないことを示しているのに対し（Boyd, P.N., et al. Mol Immunol. 32 (1995) 1311-1318 (非特許文献5)、Hodniczky, J., et al. Biotechnol. Prog. 21 (2005) 1644-1652 (非特許文献6)、Raju, T.S., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 471-478 (非特許文献7)）、IgGのガラクトシル化がFcガンマRIIIa結合を増加させると記載している研究もある（Houde, D., et al, Mol. Cell. Proteom. 9 (2010) 1716-1728 (非特許文献8)、Kumpel, B.M., et al, Hum. Antibod. Hybridom. 6 (1995) 82-88 (非特許文献9)、Thomann, M., et al, Mol. Immunol. 73 (2016) 69-75 (非特許文献10)）。

10

20

30

40

50

【0008】

現在、抗体が媒介するADCCを改良するために行われるIgG分子の工学的改変は、IgG分子のフコシル化を調節することに集中している。組換え発現IgGのフコース欠損は、遺伝子改変宿主細胞、例えばタンパク質フコシル化に欠陥を有するLec13 CHO細胞、またはアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子がノックアウトされているCHO細胞などのノックアウト細胞株において抗体を発現させることによって達成しうる。

【0009】

しかし、CHO細胞などの現行の発現系によって生成する抗体は不均一なグリカンパターンを呈し、それが、生成した抗体の異なるバッチ間での異なるグリカン種の分布のばらつきにつながる。

10

【0010】

それゆえに、組換えIgG抗体のエフェクター機能のテラリングは、とりわけ治療用抗体によって媒介されるADCCを改良する手段を提供するために、依然として必要とされている。

【0011】

WO 2011/012297 (特許文献1) では、所定の糖鎖構造を伴う免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメントを生産するための方法であって、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメントを含有するアフィニティークロマトグラフィーカラム溶出液を用意する工程、アフィニティークロマトグラフィーカラム溶出液を植物起源の、例えばコーヒー生豆由来の、(a1,3)ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22)と共にインキュベーションする工程、インキュベーションしたアフィニティークロマトグラフィーカラム溶出液をプロテインAクロマトグラフィー材料に適用する工程、およびプロテインAクロマトグラフィー材料から免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメントを回収する工程を含み、それによって、所定の糖鎖構造を伴う免疫グロブリンまたは免疫グロブリンフラグメントを生産する方法が記載されている。

20

【0012】

WO 2015/123754 (特許文献2) では、アフィニティーリガンドに結合された不均一グリコフォーム抗体試料を、治療的用途のための実質的に均質な所望の单一グリコフォーム抗体試料に再構築するための酵素法と、それらの方法を実施するためのキットが提供されている。アフィニティーリガンドに結合された抗体のFc領域を不均一なグリコフォームから実質的に均質な单一グリコフォームへと酵素的に変化させるための方法は、アフィニティーリガンドに結合された不均一グリコフォーム抗体を、Fc領域のグリコフォームを実質的に均一な单一型へと修飾するために、十分な時間および条件下で、特定グリコフォーム修飾のために設計された反応緩衝液と接触させる工程、任意で、1つまたは複数のスクレオチド糖および/またはコファクターを加える工程、および実質的に均一な单一グリコフォーム抗体試料を該アフィニティーリガンドから遊離させる工程を含む。この発明は、がんおよび免疫障害を処置するための、酵素的に生産された单一グリコフォームのmAbおよびポリクローナル抗体を含む生物製剤、ならびに生物製剤としての单一グリコフォーム抗体を含む組成物も包含する。

30

【0013】

WO 2016/037947 (特許文献3) では、IgG1アイソタイプのガラクトース改変型 (galacto engineered) 組換え抗体、該抗体の生産方法およびそれらの用途が記載されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】WO 2011/012297

【特許文献2】WO 2015/123754

【特許文献3】WO 2016/037947

【非特許文献】

【0015】

50

- 【非特許文献 1】Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32
 【非特許文献 2】Lively, M.R. et al. Glycobiol. 8 (1995) 813-822
 【非特許文献 3】Jefferis R. et al. Immunol Rev. 163 (1998) 59-76
 【非特許文献 4】Presta, L., Curr. Opin. Struct. Biol. 13 (2003) 519-525
 【非特許文献 5】Boyd, P.N., et al. Mol Immunol. 32 (1995) 1311-1318
 【非特許文献 6】Hodoniczky, J., et al. Biotechnol. Prog. 21 (2005) 1644-1652
 【非特許文献 7】Raju, T.S., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 471-478
 【非特許文献 8】Houde, D., et al. Mol. Cell. Proteom. 9 (2010) 1716-1728
 【非特許文献 9】Kumpel, B.M., et al. Hum. Antibod. Hybridom. 6 (1995) 82-88
 【非特許文献 10】Thomann, M., et al. Mol. Immunol. 73 (2016) 69-75

10

【発明の概要】

【0016】

本明細書には、抗体のインビトロ糖鎖工学のための方法であって、組換え生産されたモノクローナル抗体の一態様では、抗体軽鎖アフィニティーリガンドを含む固相に抗体が結合している間にグリコシル化の修飾が行われる方法を記載する。本明細書に記載する方法は、なかんずく、固定化された抗体を修飾するための改良された方法である。

【0017】

本明細書に記載する方法では、酵素的修飾のためにモノクローナル抗体をアフィニティーリガンド、とりわけ抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合させ、その後に、修飾された糖鎖構造を伴うモノクローナル抗体調製物として遊離させる。この修飾は、Fabフラグメント中またはFc領域中のN-グリコシル化部位において行うことができる。驚いたことに、抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合された抗体は、あたかも抗体が溶液状態にあるかのように効果的に、酵素的に修飾されうることがわかった。本明細書に記載する方法は任意の抗体精製プロセスに容易に組み込むことができ、それにより、効率がよく対費用効果の高い新規なインビトロ抗体グリカン修飾プロセスを与える。

20

【0018】

本明細書に記載する方法は、任意のモノクローナル抗体の修飾に役立ち、先行する上流生産プロセス工程に変更を加える必要はない。本明細書に記載する方法は、単一のインビトロ修飾および精製工程として、既存のプロセスに組み込むことができる。本質的に、既存の抗体生産細胞株に大きな変更を加える必要はない。糖鎖構造修飾は、本明細書に記載する方法では、下流プロセシング中になされるからである。

30

【0019】

本明細書に記載する方法により、抗体のグリコシル化の修飾に使用した酵素を抗体調製物から取り除くことができ、その結果、改良された調製物が得られる。

【0020】

本明細書に記載する一局面は、N-グリコシル化部位における修飾された（実質的に均一な）グリコシル化を伴う抗体の酵素的調製/生産方法であって、酵素的修飾中は抗体が抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合している方法である。

【0021】

本明細書に記載する一局面は、抗体のN-グリコシル化部位のグリコシル化の（実質的に均一なグリコシル化への）酵素的修飾のための方法であって、酵素的修飾中は抗体が抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合している方法である。

40

【0022】

すべての局面の一態様において、本方法は以下の工程を含む：

- ・抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合された、N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴うモノクローナル抗体を、N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を所定の（実質的に均一な）形態（均一なグリコシル化）へと修飾するために、十分な時間および適切な条件下で、1つまたは複数の酵素と共にインキュベーションする工程。

【0023】

すべての局面の一態様において、本方法は、前記インキュベーション工程に先だって

50

・N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴うモノクローナル抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合させる工程
を含み、前記インキュベーション工程後に、

・N-グリコシル化部位における所定の（実質的に均一な）グリコシル化を伴う抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから遊離させる工程
を含む。

【0024】

すべての局面の一態様において、本方法は、以下の工程を以下の順序で含む：

・N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体を含む（緩衝）溶液を、固相に結合された抗体軽鎖アフィニティーリガンド（抗体軽鎖アフィニティーリガンドクロマトグラフィー材料）に適用し、それによって、抗体がリガンドに結合される（その結果、リガンドに結合された抗体が生じる）工程、

・任意で、固相を緩衝溶液で洗浄する工程、

・抗体のN-グリコシル化部位におけるグリコシル化を、

- 第1グリコシル化修飾用酵素（および第1活性化糖残基）を含む第1（緩衝）溶液を、酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で、リガンドに結合された抗体に適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄し、第2グリコシル化修飾用酵素（および第2活性化糖）を含む第2（緩衝）溶液を、酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で、リガンドに結合された修飾抗体に適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素（および第1活性化糖）を含む第1（緩衝）溶液を、少なくとも部分的な酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で、リガンドに結合された抗体に適用し、所定の期間後に、第2グリコシル化修飾用酵素（および第2活性化糖）を含む第2（緩衝）溶液を、酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で、リガンドに結合された修飾抗体に適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素および第2グリコシル化修飾用酵素（ならびに第1活性化糖および第2活性化糖）を含む（緩衝）溶液を、リガンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄すること

のいずれかによって、酵素的に修飾する工程、

・N-グリコシル化部位における所定のグリコシル化を伴う抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから遊離させる工程。

【0025】

本明細書に記載する方法において使用される抗体は、それがN-グリコシル化部位を含有する限り、任意の抗体または抗体フラグメント、例えばFabフラグメント、一本鎖抗体、多重特異性抗体および抗体融合物であることができる。

【0026】

すべての局面の一態様において、N-グリコシル化部位はFab領域またはFc領域にある。

【0027】

したがって、本明細書に記載するすべての局面の一態様において、抗体は、抗体Fabフラグメント、完全長抗体、二価単一特異性抗体、二重特異性抗体、二価二重特異性抗体、三価二重特異性抗体、四価二重特異性抗体、三価三重特異性抗体および四価四重特異性抗体からなる抗体の群より選択される。

【0028】

一態様において、抗体は二価単一特異性抗体である。

【0029】

一態様において、抗体は二価または三価または四価の二重特異性抗体である。

【0030】

一態様において、抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体またはヒト抗体である。

10

20

30

40

50

【0031】

一態様において、抗体はポリクローナル抗体調製物である。

【0032】

一態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0033】

本明細書に記載するすべての局面の一態様において、抗体（調製物）は、ヒトIgGクラスの抗体（調製物）である。一態様において、抗体はヒトIgG1またはIgG4サブクラスの抗体である。

【0034】

本明細書に記載するすべての局面の一態様において、所定のグリコシル化は、G2グリコフォーム、G0グリコフォーム、M3グリコフォーム、S2グリコフォーム、A2Bグリコフォーム、A2BG2グリコフォームおよびS1グリコフォームからなる群より選択されるグリコシル化である。 10

【0035】

本明細書に記載するすべての局面の一態様において、所定のグリコシル化は、末端糖としてのガラクトース、末端糖としてのGlcNAc、末端糖としてのマンノースおよび末端糖としてのシアル酸からなる群より選択されるグリコシル化である。

【0036】

一態様において、抗体は組換え生産された抗体である。

【0037】

本明細書に記載する一局面は、本明細書に記載する方法により生産された抗体である。 20

【0038】

本明細書に記載する一局面は、本明細書に記載する方法によって生産される所定のグリコシル化を伴う抗体を含む薬学的製剤である。

【0039】

本発明の別の一局面は、

(a) (IgG1アイソタイプの)抗体を、前記抗体をコードする核酸を含む（哺乳類またはCHO）細胞中で組換え生産して、N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体を得る工程、

(b) N-グリコシル化部位における不均一なグリコシル化を伴う抗体を単離する（回収し、任意で精製する）工程、 30

(c) N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体を、ガラクトシルトランスフェラーゼおよび/またはシアリルトランスフェラーゼで酵素的に修飾して、N-グリコシル化部位に、相対量が少なくとも70%の二ガラクトシル化 (bi-galactosylated) 抗体 (G2Fグリコフォーム) を含む（ここで100%はG0F、G1FおよびG2Fグリコフォームの量に相当する）、N-グリコシル化部位における所定のグリコシル化を伴う抗体を得た後、修飾抗体を酵素から分離する工程、

(d) 任意で、修飾抗体を、1つまたは複数のクロマトグラフィー工程によって精製する工程

を含み、それによって、N-グリコシル化部位における所定のグリコシル化を伴う抗体が生産される、N-グリコシル化部位における所定のグリコシル化を伴う抗体の組換え生産方法である。 40

【0040】

本明細書に記載するすべての局面の一態様において、第1グリコシル化修飾用酵素はガラクトシルトランスフェラーゼである。

【0041】

本明細書に記載するすべての局面の一態様において、第1グリコシル化修飾用酵素はガラクトシルトランスフェラーゼであり、かつ第2グリコシル化修飾用酵素はシアリルトランスフェラーゼである。

【0042】

一態様において、ガラクトシルトランスフェラーゼは 4GalT1である。

【0043】

一態様において、シアリルトランスフェラーゼはST6である。

【0044】

一態様において、シアリルトランスフェラーゼはST6Gal1またはST6Gal2である。

【0045】

一態様において、(第1)緩衝溶液はUDP-Galを含む。

【0046】

一態様において、(第2)緩衝溶液はCMP-NANAを含む。

【0047】

一態様において、インキュベーションは室温(20~25、好ましくは約22)で行われる。

10

【0048】

一態様において、インキュベーションは25で行われる。

【0049】

一態様において、インキュベーションは37で行われる。

【0050】

一態様において、インキュベーションは7~48時間行われる。

【0051】

本明細書に記載するすべての局面の一態様において、溶液はクロマトグラフィーで精製された抗体を含み、(第1)グリコシル化修飾用酵素はGalT1であり、かつ(第1)グリコシル化修飾用酵素とのインキュベーションは、20~27または37で24時間行われる。一態様において、インキュベーションは室温(約22)で行われる。

20

【0052】

一態様において、溶液はクロマトグラフィーで精製された抗体を含み、(第2)グリコシル化修飾用酵素はST6であり、かつ(第2)グリコシル化修飾用酵素とのインキュベーションは、20~27または37で24時間行われる。一態様において、インキュベーションは室温(約22)で行われる。

【0053】

一態様において、溶液は抗体を含む緩衝無細胞培養上清であり、第1グリコシル化修飾用酵素はGalT1であり、第2グリコシル化修飾用酵素はST6であり、ST6は第1グリコシル化修飾用酵素の6~24時間後、好ましくは24時間後に添加され、総インキュベーション時間は20~27または37で24時間~48時間、好ましくは30時間である。一態様において、インキュベーションは室温(約22)で行われる。

30

【0054】

本明細書に記載する一局面は、以下の工程を以下の順序で含み、それによって、抗体が生産される、抗体またはそのフラグメントの生産方法である：

- 抗体または少なくとも抗体軽鎖を含むそのフラグメントをコードする核酸を含む細胞を用意する工程、

- N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体またはそのフラグメントの発現に適した条件下で細胞を培養する工程(フラグメントは、次の工程の一つにおいて使用される抗体軽鎖アフィニティークロマトグラフィー材料によって特異的に結合されうる軽鎖を少なくとも1つ含む)、

40

- 抗体またはそのフラグメントを細胞または培養培地から回収する工程、

- 抗体またはそのフラグメントを含む溶液を、抗体軽鎖アフィニティークロマトグラフィーカラムに、前記抗体またはそのフラグメントの前記アフィニティークロマトグラフィー材料への結合に適した条件下で適用する工程、

- N-グリコシル化部位における抗体またはそのフラグメントのグリコシル化を、本明細書に記載する方法で修飾する工程、ならびに

- N-グリコシル化部位における所定のグリコシル化を伴う修飾された抗体またはそのフ

50

ラグメントをアフィニティーコロマトグラフィー材料から回収する工程。

[0055]

一態様において、本方法は最終工程として以下の工程を含む：

・修飾された抗体またはそのフラグメントを1~3つのクロマトグラフィー工程で精製する工程。

[0056]

すべての局面の一態様において、N-グリコシル化部位はFab領域またはFc領域にある。

[本発明1001]

・抗体を含む溶液を、固定化された抗体軽鎖アフィニティーリガンドに適用することによって、抗体軽鎖アフィニティーリガンドが固相上に固定化されている抗体-抗体軽鎖アフィニティーリガンド複合体を形成させる工程、

・先の工程において形成された複合体を、抗体のグリコシル化を修飾するために1つまたは複数の酵素（および1つまたは複数の活性化糖残基）と共にインキュベーションする工程

を含み、それによって、（グリコシル化修飾）抗体が生産される、（グリコシル化修飾）抗体を生産するための方法。

[本発明1002]

前記インキュベーション工程後に、

・修飾抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから回収する工程
を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

以下の順序で、

・N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体を含む（緩衝）溶液を、固相に結合された抗体軽鎖アフィニティーリガンドに適用し、それによって、抗体がリガンドに結合される（その結果、リガンドに結合された抗体が生じる）工程、

・任意で、固相を（抗体を脱離させること/リガンド抗体複合体を破壊することなく）緩衝溶液で洗浄する工程、

・抗体のN-グリコシル化部位におけるグリコシル化を、

- 第1グリコシル化修飾用酵素（および第1活性化糖残基）を含む第1（緩衝）溶液を、リガンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄し、第2グリコシル化修飾用酵素（および第2活性化糖）を含む第2（緩衝）溶液を、リガンドに結合された修飾抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素（および第1活性化糖）を含む第1（緩衝）溶液を、リガンドに結合された抗体の少なくとも部分的な酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、所定の期間後に、第2グリコシル化修飾用酵素（および第2活性化糖）を含む第2（緩衝）溶液を、リガンドに結合された修飾抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された2回修飾された抗体を洗浄すること、または

- 第1グリコシル化修飾用酵素および第2グリコシル化修飾用酵素（ならびに第1活性化糖および第2活性化糖）を含む（緩衝）溶液を、リガンドに結合された抗体の酵素的修飾のために十分な時間および適切な条件下で適用し、任意で、リガンドに結合された修飾抗体を洗浄すること

のいずれかによって、酵素的に修飾する工程、

・抗体を抗体軽鎖アフィニティーリガンドから遊離させる工程
を含み、それによって、（グリコシル化修飾）抗体が生産される、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

抗体が、完全長抗体、二価单一特異性抗体、二重特異性抗体、二価二重特異性抗体、三

10

20

30

40

50

価二重特異性抗体、四価二重特異性抗体、三価三重特異性抗体、抗体Fabフラグメント、および四価四重特異性抗体からなる抗体の群より選択される、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

抗体が、二価または三価または四価の二重特異性抗体またはFabフラグメントである、本発明1001～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

抗体が、キメラ抗体またはヒト化抗体またはヒト抗体である、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

第1グリコシル化修飾用酵素がガラクトシルトランスフェラーゼであり、かつ第2グリコシル化修飾用酵素がシアリルトランスフェラーゼである、本発明1003～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

溶液がクロマトグラフィーで精製された抗体を含み、(第1)グリコシル化修飾用酵素がGalT1であり、かつ(第1)グリコシル化修飾用酵素とのインキュベーションが37または室温で24時間行われる、本発明1001～1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

溶液がクロマトグラフィーで精製された抗体を含み、(第2)グリコシル化修飾用酵素がST6であり、かつ(第2)グリコシル化修飾用酵素とのインキュベーションが37または室温で24時間行われる、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

溶液が抗体を含む緩衝無細胞培養上清であり、第1グリコシル化修飾用酵素がGalT1であり、第2グリコシル化修飾用酵素がST6であり、ST6が第1グリコシル化修飾用酵素の6～24時間後、好ましくは24時間後に添加され、総インキュベーション時間が37または室温で24時間～48時間、好ましくは30時間である、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

(a) (IgG1アイソタイプの)抗体またはFabフラグメントを、前記抗体またはFabフラグメントをコードする核酸を含む(哺乳類またはCHO)細胞中で組換え生産して、N-グリコシル化部位におけるグリコシル化を伴う抗体またはFabフラグメントを得る工程、

(b) N-グリコシル化部位における不均一なグリコシル化を伴う工程(a)で生産された抗体またはFabフラグメントを単離する(回収し、任意で精製する)工程、

(c) N-グリコシル化部位における不均一なグリコシル化を伴う抗体またはFabフラグメントを、ガラクトシルトランスフェラーゼおよび/またはシアリルトランスフェラーゼで酵素的に修飾して、修飾抗体を得た後、修飾抗体またはFabフラグメントを酵素から分離する工程、

(d) 任意で、修飾抗体またはFabフラグメントを、1つまたは複数のクロマトグラフィー工程によって精製する工程

を含み、生産された抗体またはFabフラグメントが、N-グリコシル化部位に、相対量が少なくとも70%の二ガラクトシル化抗体またはFabフラグメント(G2グリコフォーム)を含む(ここで100%はG0、G1およびG2グリコフォームの量に相当する)、本発明1001～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

N-グリコシル化部位がFab領域N-グリコシル化部位またはアスパラギン残基297(ナンバリングはKabatに従う)のFc領域N-グリコシル化部位である、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

本発明1001～1012のいずれかの方法により生産された抗体。

[本発明1014]

本発明1013の抗体と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的製剤。

10

20

30

40

50

[本発明1015]

医薬として使用するための本発明1013の抗体。

【発明を実施するための形態】**【0057】****発明の詳細な説明****定義**

本明細書において、重鎖および軽鎖のすべての定常領域および定常ドメインのアミノ酸位置は、Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に記載のKabatナンバリングシステムに従ってナンバリングされ、これを本明細書では「ナンバリングはKabatに従う」という。具体的に述べると、カッパアイソタイプおよびラムダアイソタイプの軽鎖定常ドメインCLには、Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) のKabatナンバリングシステム (647~660頁参照) を使用する。具体的に述べると、定常重鎖ドメイン (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3) には、Kabat EUインデックスナンバリングシステム (661~723頁参照) を使用する (この場合、本明細書では、「ナンバリングはKabat EUインデックスに従う」ということによって、これをさらに明確にする)。

【0058】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、複数の指示対象を包含することに留意しなければならない。したがって例えば、「1つの細胞(a cell)」と記載している場合、それは、複数のそのような細胞および当業者に公知のそれらの等価物を包含する、などとなる。同様に、「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、「1つまたは複数の(one or more)」、および「少なくとも1つの(at least one)」という用語は、本明細書では、相互可換的に使用されうる。「含む(comprising)」、「包含する(including)」、および「有する(having)」という用語が、相互可換的に使用されうることにも留意されたい。

【0059】

アミノ酸配列、例えばポリペプチドのアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列をコードする対応核酸配列に変換するための手順および方法は、当業者には周知である。したがって核酸は、個々のヌクレオチドからなるその核酸配列によって特徴づけられ、それがコードするポリペプチドのアミノ酸配列によっても同様に特徴づけられる。

【0060】

用語「約」は、その後ろに続く数値の±20%の範囲を表す。一態様において、約という用語は、その後ろに続く数値の±10%の範囲を表す。一態様において、約という用語は、その後ろに続く数値の±5%の範囲を表す。

【0061】

本明細書において「抗体」という用語は、最も広義に使用され、さまざまな抗体構造、例えば限定するわけではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、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、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、包含する。

【0062】

「抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC)」という用語は、Fc受容体結合によって媒介される機能であり、エフェクター細胞の存在下での本明細書に記載の抗体による標的細胞の溶解を指す。ADCCは、一態様では、新鮮単離PBMC (末梢血単核球) などのエフェクター細胞の存在下または単球もしくはNK (ナチュラルキラー) 細胞のようなバフィーコートからの精製エフェクター細胞の存在下で、CD19を発現する赤血球系細胞 (例えば組換えヒトCD19を発現するK562細胞) の調製物を、本明細書に記載する抗体で処理することによって測定される。標的細胞をCr-51で標識してから、抗体と共にインキュベーションする。標識細

10

20

30

40

50

胞をエフェクター細胞と共にインキュベーションし、放出されたCr-51について上清を分析する。対照には、標的内皮細胞をエフェクター細胞と共に、ただし抗体なしで、インキュベーションすることを含める。ADCCを媒介する初期段階を誘導する抗体の能力は、Fc RIおよび/またはFc RIIAを組換え発現する細胞または(本質的にFc RIIIAを発現する)NK細胞などといったFc 受容体発現細胞へのそれらの結合を測定することによって調べられる。好ましい一態様では、NK細胞上のFc Rへの結合が測定される。

【0063】

「抗体フラグメント」とは、インタクト抗体以外の分子であって、インタクト抗体のうち、インタクト抗体が結合する抗原に結合する部分を含む分子を表す。抗体フラグメントの例として、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子(例えばscFv)、および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0064】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および/または軽鎖の一部分が特定の供給源または種に由来し、重鎖および/または軽鎖の残りの部分は異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【0065】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。抗体には5つの主要クラス、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらのうちのいくつかは、さらにサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2に分類することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ 、 、 、 および μ と呼ばれる。

20

【0066】

「補体依存性細胞傷害(CDC)」という用語は、補体の存在下で、本明細書に記載する抗体によって誘導される細胞の溶解を指す。CDCは、一態様では、CD19を発現するヒト内皮細胞を、補体の存在下で、本明細書に記載の抗体で処理することによって測定される。一態様では、細胞をカルセインで標識する。抗体が30 μ g/mlの濃度で20%以上の標的細胞の溶解を誘導すれば、CDCが見いだされる。補体因子C1qへの結合はELISAにおいて測定することができる。そのようなアッセイでは、原則として、ある濃度範囲の抗体でELISAプレートをコーティングし、そこに精製ヒトC1qまたはヒト血清を加える。C1q結合は、C1qに対する抗体とそれに続くペルオキシダーゼ標識コンジュゲートとによって検出される。結合の検出(最大結合B_{max})は、ペルオキシダーゼ基質ABTS(登録商標)(2,2'-アジノジ-[3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホネート])の場合は、405nmにおける光学密度(OD405)として測定される。

30

【0067】

「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指し、抗体クラスによってさまざまである。抗体エフェクター機能の例として、C1q結合および補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、貪食、細胞表面受容体(例えばB細胞受容体)のダウンリギュレーション、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

40

【0068】

Fc受容体結合依存的エフェクター機能は、抗体のFc領域と、造血細胞上の特殊化した細胞表面受容体であるFc受容体(FcR)との相互作用によって媒介されうる。Fc受容体は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、免疫複合体の貪食による抗体被覆病原体の除去と、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)による、対応する抗体で覆われた赤血球および他のさまざまな細胞標的(例えば腫瘍細胞)の溶解とを、どちらも媒介することが示されている(例えばVan de Winkel, J.G. and Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524参照)。FcRは、免疫グロブリンアイソタイプに対するそれぞれの特異性によって規定され、IgG抗体に対するFc受容体はFc Rと呼ばれる。Fc受容体結合は、例えばRavetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492, Capel, P.J.,

50

et al, Immunomethods 4 (1994) 25-34、de Haas, M., et al, J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341およびGessner, J.E., et al, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248に記載されている。

【 0 0 6 9 】

IgG抗体のFc領域に対する受容体 (Fc R) の架橋は、貪食、抗体依存性細胞性細胞傷害、および炎症性メディエーターの放出、ならびに免疫複合体クリアランスおよび抗体生産の調節を含む、多種多様なエフェクター機能の引き金を引く。ヒトでは、3つのFc Rクラスが特徴づけられており、それらは以下のとおりである。

・Fc RI (CD64) は、単量体型IgGに高いアフィニティーで結合し、マクロファージ、单球、好中球および好酸球上に発現する。アミノ酸残基E233～G236、P238、D265、N297、A327およびP329 (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) のうちの少なくとも1つにおけるIgGのFc領域中の修飾は、Fc RIへの結合を低減する。IgG2の233～236番目の残基でIgG1中およびIgG4中の残基を置換すると、Fc RIへの結合は10³分の1に低減し、抗体感作赤血球細胞に対するヒト单球応答は排除された (Armour, K.L., et al, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624)。

・Fc RII (CD32) は、複合体化したIgGに、中～低アフィニティーで結合し、広く発現している。この受容体は2つのサブタイプFc RIIAおよびFc RIIBに分類することができる。Fc RIIAは、キリング (killing) に関する多くの細胞 (例えばマクロファージ、单球、好中球) に見いだされ、キリングプロセスを活性化することができるようである。Fc RIIBは、阻害プロセスにおいて役割を果たすと思われ、B細胞、マクロファージならびに肥満細胞および好酸球上に見いだされる。これは、B細胞上では、さらなる免疫グロブリン生産および例えばIgEクラスへのアイソタイプスイッチングを抑制する機能を果たすようである。Fc RIIBは、マクロファージ上では、Fc RIIAによって媒介される貪食を阻害するように作用する。好酸球および肥満細胞上では、IgEがその別個の受容体に結合することによって起こるこれらの細胞の活性化を抑制するのに、このB型が役立つ。Fc RIIAに対する結合の低減は、例えばアミノ酸残基E233～G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292およびK414 (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) のうちの少なくとも1つに突然変異を有するIgG Fc領域を含む抗体に見いだされる。

・Fc RIII (CD16) は中～低アフィニティーでIgGに結合し、2つのタイプとして存在する。Fc RIIIAはNK細胞、マクロファージ、好中球ならびに一部の单球およびT細胞上に見いだされ、ADCCを媒介する。Fc RIIIBは好中球に高発現している。Fc RIIIAへの結合の減少は、例えばアミノ酸残基E233～G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338およびD376 (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) のうちの少なくとも1つに突然変異を有するIgG Fc領域を含む抗体に見いだされる。

【 0 0 7 0 】

Fc受容体に対するヒトIgG1上の結合部位のマッピング、上述の突然変異部位ならびにFc RIおよびFc RIIAへの結合を測定するための方法は、Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604に記載されている。

【 0 0 7 1 】

本明細書において使用する用語「Fc受容体」は、受容体に付随する細胞質ITAM配列の存在を特徴とする活性化受容体を指す (例えばRavetch, J.V. and Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19 (2001) 275-290参照)。そのような受容体はFc RI、Fc RIIAおよびFc RIIIAである。「Fc Rの結合がない」という用語は、10 μg/mlの抗体濃度において、NK細胞への本明細書に記載の抗体の結合が、WO 2006/029879に記載されている抗OX40L抗体LC. 001について見いだされる結合の10%以下であることを表す。

【 0 0 7 2 】

IgG4は低減したFcR結合を示すが、他のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。ただし、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297 (Fc糖質の喪失) 、Pro329ならびに234、235、236お

10

20

30

40

50

および237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434およびHis435は、改変されると、やはり低減したFcR結合を与える残基である (Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604、Lund, J., et al, FASEB J. 9 (1995) 115-119、Morgan, A., et al, Immunology 86 (1995) 319-324およびEP0307434)。

【0073】

「Fc領域」という用語は、本明細書では、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するために使用される。この用語は、ネイティブ配列Fc領域および変異型Fc領域を包含する。一態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、重鎖のCys226から、またはPro230から、またはAla231から、カルボキシル末端までにわたる。ただし、Fc領域のC末端リジン (Lys447) は存在しても存在しなくてもよい。

10

【0074】

本明細書に記載する抗体はFc領域を含み、一態様ではヒト由来のFc領域を含む。一態様において、Fc領域は、ヒト定常領域のすべてのパートを含む。抗体のFc領域は、補体活性化、C1q結合、C3活性化およびFc受容体結合に直接関与する。補体系に対する抗体の影響は一定の条件に依存するが、C1qへの結合は、Fc領域中の所定の結合部位が引き起こす。そのような結合部位は、現在の技術水準では公知であり、例えばLukas, T.J., et al, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560、Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917、Burton, D.R., et al, Nature 288 (1980) 338-344、Thommesen, J.E., et al, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004、Idusogie, E.E., et al, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184、Hezareh, M., et al, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168、Morgan, A., et al, Immunology 86 (1995) 319-324およびEP0307434に記載されている。そのような結合部位は、例えばL234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331およびP329 (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) である。サブクラスIgG1、IgG2およびIgG3の抗体が、通常、補体活性化、C1q結合およびC3活性化を示すのに対し、IgG4は補体系を活性化せず、C1qに結合せず、C3を活性化しない。「抗体のFc領域」は、当業者には周知の用語であり、抗体のパパイン切断に基づいて規定される。一態様において、Fc領域はヒトFc領域である。一態様において、Fc領域は、突然変異S228Pおよび/またはL235Eおよび/またはP329G (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) を含むヒトIgG4サブクラスのものである。一態様において、Fc領域は、突然変異L234AおよびL235Aを含み、任意でP329Gを含む (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う) 、ヒトIgG1サブクラスのものである。

20

【0075】

「野生型Fc領域」という用語は、自然に見いだされるFc領域のアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を表す。野生型ヒトFc領域としては、ネイティブヒトIgG1 Fc領域 (非AおよびAアロタイプ)、ネイティブヒトIgG2 Fc領域、ネイティブヒトIgG3 Fc領域およびネイティブヒトIgG4 Fc領域、ならびにそれらの天然変異体が挙げられる。野生型Fc領域を、SEQ ID NO:01 (IgG1、コーカサス人アロタイプ)、SEQ ID NO:02 (IgG1、アフリカ系アメリカ人アロタイプ)、SEQ ID NO:03 (IgG2)、SEQ ID NO:04 (IgG3) およびSEQ ID NO:05 (IgG4) に示す。

30

【0076】

変異型 (ヒト) Fc領域は、含まれているアミノ酸突然変異によって規定される。したがって、例えばP329Gという用語は、親 (野生型) Fc領域との比較でアミノ酸位置329にプロリンからグリシンへの突然変異を有する変異型Fc領域を表す (ナンバリングはKabatのEUインデックスに従う)。野生型アミノ酸の実体は明記されていなくてもよく、その場合、上述の変異体は329Gと呼ばれる。

40

【0077】

IgG1サブクラスの野生型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、227番目のシステイン残基で始まり446番目のグリシン残基で終わる以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDEPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPR PQVYTLPPSR (E/D) E (M/L) TKNQVSL
 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 06).

【 0 0 7 8 】

突然変異T366S、L368AおよびY407Vを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDEPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPR PQVYTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 07).

10

【 0 0 7 9 】

突然変異T366Wを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDEPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPR PQVYTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 08).

20

【 0 0 8 0 】

突然変異L234AおよびL235Aを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDEPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPR PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 09).

30

【 0 0 8 1 】

突然変異L234A、L235A、T366S、L368AおよびY407Vを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDEPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPR PQVYTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 10).

40

【 0 0 8 2 】

突然変異L234A、L235AおよびT366Wを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 11).

【 0 0 8 3 】

突然変異L234A、L235AおよびP329Gを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 12).

10

【 0 0 8 4 】

突然変異L234A、L235A、P329G、T366S、L368AおよびY407Vを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 13).

20

【 0 0 8 5 】

突然変異L234A、L235A、P329GおよびT366Wを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 14).

30

【 0 0 8 6 】

突然変異L234A、L235A、P329G、Y349C、T366S、L368AおよびY407Vを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 15).

40

【 0 0 8 7 】

突然変異L234A、L235A、P329G、S354CおよびT366Wを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPCR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 16).

【 0 0 8 8 】

突然変異L234A、L235A、P329G、S354C、T366S、L368AおよびY407Vを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPCR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 17).

【 0 0 8 9 】

突然変異L234A、L235A、P329G、Y349CおよびT366Wを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALGAPIEKT ISKAKGQPREG PQVCTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 18).

【 0 0 9 0 】

突然変異I253A、H310AおよびH435Aを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMASR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLAQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 19).

【 0 0 9 1 】

突然変異H310A、H433AおよびY436Aを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLAQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALANH ATQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 20).

【 0 0 9 2 】

突然変異M252Y、S254TおよびT256Eを有するIgG1サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KALPAPIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 21).

【 0 0 9 3 】

IgG4サブクラスの野生型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPSCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G (SEQ ID NO: 22).

10

【 0 0 9 4 】

突然変異S228PおよびL235Eを有するIgG4サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEFE GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G (SEQ ID NO: 23).

20

【 0 0 9 5 】

突然変異S228P、L235EおよびP329Gを有するIgG4サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

CPPCPAPEFE GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KGLGSSIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G (SEQ ID NO: 24).

30

【 0 0 9 6 】

突然変異S228P、L235E、P329G、T366S、L368AおよびY407Vを有するIgG4サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
 EDPEVQFNWY VDGVEVHNKA TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
 YKCKVSNKGL GSSIEKTISK AKGQPREGQV YTLPSSQEEM TKNQVSLSCA
 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVLS DSDGSFFLVS RLTVDKSRWQ
 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 25).

40

【 0 0 9 7 】

突然変異S228P、L235E、P329GおよびT366Wを有するIgG4サブクラスの変異型ヒトFc領域のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を有する：

ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
 YKCKVSNKGL GSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVLL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 26).

【0098】

「完全長抗体」、「インタクト抗体」および「全抗体」という用語は、本明細書では相互可換的に使用され、ネイティブ抗体構造と実質的に類似する構造を有する抗体または本明細書に規定するFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

10

【0099】

「グリカン」という用語は多糖またはオリゴ糖を表す。グリカンは、本明細書では、糖タンパク質、糖脂質、糖ペプチド、グリコプロテオーム、ペプチドグリカン、リポ多糖またはプロテオグリカンなどの複合糖質の糖質部分を指すためにも使用される。グリカンは、通常、単糖間の-グリコシド結合だけからなる。グリカンは、単糖残基のホモポリマーまたはヘテロポリマーであることができ、線状または分岐状であることができる。

【0100】

「グリコシルトランスフェラーゼ」という用語は、ヌクレオチド糖からオリゴ糖中の糖分子などのアクセプター分子に単糖部分を転移させる能力を有する酵素を表す。そのようなグリコシルトランスフェラーゼの例として、ガラクトシルトランスフェラーゼおよびシリルトランスフェラーゼが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0101】

「ヒンジ領域」という用語は、抗体重鎖ポリペプチドのうち、野生型抗体重鎖中でCH1ドメインとCH2ドメインとを接合している部分、例えばKabatのEUナンバーシステム (number system) で約216番目から約230番目まで、またはKabatのEUナンバーシステムで約226番目から約230番目までを表す。他のIgGサブクラスのヒンジ領域は、IgG1サブクラス配列のヒンジ領域システイン残基との整列によって決定することができる。

【0102】

ヒンジ領域は、通常、同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチドからなる二量体型分子である。ヒンジ領域は一般的には約25個のアミノ酸残基を含み、フレキシブルであって、付随する標的結合部位が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域は3つのドメイン、すなわち上部 (upper)、中央 (middle) および下部 (lower) ヒンジドメインに細分することができる (例えばRoux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083参照)。

30

【0103】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRからのアミノ酸残基とヒトFRからのアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。一定の態様において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質上すべてを含み、その可変ドメインでは、HVR (例えばCDR) のすべてまたは実質上すべてが非ヒト抗体のものに対応し、FRのすべてまたは実質上すべてがヒト抗体のものに対応するであろう。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含みうる。抗体の、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化型」とは、ヒト化を受けた抗体を指す。

40

【0104】

本明細書において使用する用語「超可変領域」または「HVR」は、抗体可変ドメインのうち、配列が超可変であり (「相補性決定領域」または「CDR」) かつ/または構造上明確なループ (「超可変ループ」) を形成しかつ/または抗原接觸残基 (「抗原接觸部 (antigen contacts)」) を含有するアミノ酸残基区間 (amino acid residue stretch) を含む領域のそれぞれを指す。一般に、抗体は6つのHVRを含んでいて、3つはVHにあり (H1、H2、H3)、3つはVLにある (L1、L2、L3)。

【0105】

HVRは、

50

(a) アミノ酸残基26～32(L1)、50～52(L2)、91～96(L3)、26～32(H1)、53～55(H2)および96～101(H3)に存在する超可変ループ(Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917)、

(b) アミノ酸残基24～34(L1)、50～56(L2)、89～97(L3)、31～35b(H1)、50～65(H2)および95～102(H3)に存在するCDR(Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242)、

(c) アミノ酸残基27c～36(L1)、46～55(L2)、89～96(L3)、30～35b(H1)、47～58(H2)および93～101(H3)に存在する抗原接触部(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996))、ならびに

(d) アミノ酸残基46～56(L2)、47～56(L2)、48～56(L2)、49～56(L2)、26～35(H1)、26～35b(H1)、49～65(H2)、93～102(H3)および94～102(H3)を含む(a)、(b)および/または(c)の組み合わせを含む。

【0106】

別段の表示がある場合を除き、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基(例えばFR残基)は、本明細書では、前掲のKabatらに従ってナンバリングされる。

【0107】

「単離された」抗体とは、その自然環境の構成要素から分離された抗体である。いくつかの態様において、抗体は、例えば電気泳動(例えばSDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)、キャピラリー電気泳動)またはクロマトグラフィー(例えばイオン交換または逆相HPLC)による決定で純度95%超または99%超まで精製される。抗体純度の評価方法を概観するには、例えばFlatman, S. et al, J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87を参照されたい。

【0108】

「単離された」核酸とは、その自然環境の構成要素から分離された核酸分子を指す。単離された核酸には、その核酸分子を通常含有する細胞に含まれている核酸分子であるが、染色体外に存在するか、その自然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する核酸分子が含まれる。

【0109】

「軽鎖」という用語は、ネイティブIgG抗体の短い方のポリペプチド鎖を表す。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2タイプのうちの一方に割り当てることができる。ヒトカッパ軽鎖定常ドメインについてはSEQ ID NO:27を、またヒトラムダ軽鎖定常ドメインについてはSEQ ID NO:28を参照されたい。

【0110】

本明細書において使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、例えば天然の突然変異を含有する変異型抗体、またはモノクローナル抗体調製物の生産中に生じる変異型抗体(そのような変異体の存在量は一般に少量である)などといった考えうる変異型抗体を除けば、前記集団を構成する個々の抗体は同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。典型的には異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、1つの抗原上の単一の決定基を指向する。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示しており、何か特定の方法による抗体の生産を必要とするところではない。例えば本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定するわけではないがハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法などといった、さまざまな技法によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法および他の例示的方法は、本明細書において説明する。

【0111】

10

20

30

40

50

「ネイティブ抗体」とは、さまざまな構造を伴う天然の免疫グロブリン分子を指す。例えばネイティブIgG抗体は、ジスルフィド結合された2本の同一軽鎖および2本の同一重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体型糖タンパク質である。各重鎖は、N末端からC末端に向かって、可変領域(VH)（可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインともいう）と、それに続く3つの定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3)とを有し、第1定常ドメインと第2定常ドメインとの間にヒンジ領域が位置する。同様に、各軽鎖は、N末端からC末端に向かって、可変領域(VL)（可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインともいう）と、それに続く定常軽鎖(CL)ドメインとを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(α)およびラムダ(β)と呼ばれる2タイプのうちの一方に割り当てることができる。

10

【0112】

「N結合型オリゴ糖」という用語は、アスパラギンアミノ酸残基においてアスパラギン-N-アセチルグルコサミン結合によってペプチドバックボーンに連結されるオリゴ糖を表す。N結合型オリゴ糖は「N-グリカン」とも呼ばれる。N結合型オリゴ糖はすべて、Man3GlcNAc2の共通五糖コアを有する。これらは、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、フコースおよびシアル酸などの周辺糖(peripheral sugar)の有無ならびに周辺糖の分岐の数(アンテナともいう)が相違する。任意で、この構造は、コアフコース分子および/またはキシロース分子も含有しうる。

【0113】

「O結合型オリゴ糖」という用語は、スレオニンアミノ酸残基またはセリンアミノ酸残基においてペプチドバックボーンに連結されるオリゴ糖を表す。

20

【0114】

「シアル酸」という用語は、九炭カルボキシル化糖のファミリーの任意のメンバーを表す。シアル酸ファミリーの最も一般的なメンバーはN-アセチル-ノイラミン酸(2-ケト-5-アセトアミド-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクト-ノヌロピラノース-1-オニ酸)である(Neu5Ac、NeuAcまたはNANAと略記されることが多い)。このファミリーの第2のメンバーは、NeuAcのN-アセチル基がヒドロキシル化されているN-グリコリルノイラミン酸(Neu5GcまたはNeuGc)である。第3のシアル酸ファミリーメンバーは、2-ケト-3-デオキシ-ノヌロソン酸(KDN)である(Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:11550-11557、Kanamori et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:21811-21819)。また、9-O-ラクチル-Neu5Acまたは9-O-アセチル-Neu5Acのような9-O-C1~C6アシル-Neu5Ac、9-デオキシ-9-フルオロ-Neu5Acおよび9-アジド-9-デオキシNeu5Acなどの9-置換シアル酸も挙げられる。シアル酸ファミリーについて概観するには、例えばVarki, Glycobiol. 2 (1992) 25-40、Sialic Acids:Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992))を参照されたい。シアリル化手順におけるシアル酸化合物の合成および使用はWO 92/16640に記載されており、その開示は参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。

30

【0115】

抗体に関して「実質的に」という用語は、各生成物(抗体)が、単一のグリコシル化状態を有することを意味し、その状態が单一部位または複数部位でのグリコシル化を含むかどうかは問わない。通例、抗体は、それが調製物中の抗体の少なくとも60重量%を構成するのであれば、実質的に純粋である。例えば調製物中の抗体は、重量で、少なくとも約75%、一定の態様では少なくとも約80%、一定の態様では約85%、一定の態様では少なくとも約90%、一定の態様では少なくとも約95%、96%、97%、98%、最も好ましくは少なくとも約99%が、所望の抗体である。

40

【0116】

「グリコシル化状態」という用語は、抗体の具体的なまたは所望のグリコシル化パターンを表す。「グリコフォーム」とは、ある特定のグリコシル化状態を含む抗体である。そのようなグリコシル化パターンとして、例えば、天然に生産されたまたは組換え的、合成的もしくは半合成的に生産された1つまたは複数の糖の、抗体のFc領域の位置N-297における

50

る付加が挙げられる（ナンバリングはKabatに従う）。グリコシル化パターンは、当技術分野において公知の数多くの方法によって決定することができる。例えば、タンパク質上の糖質を分析する方法はUS 2006/0057638およびUS 2006/0127950に記載されている（これらの文献の開示は、ここに、参照によりそのまま本明細書に組み入れられる）。

【0117】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体重鎖または抗体軽鎖のうち、抗原への抗体の結合に関するドメインを指す。ネイティブ抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は一般に類似する構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域（FR）と3つの超可変領域（HVR）とを含んでいる。（例えばKindt, T.J. et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007) 91頁参照）。抗原結合特異性を付与するには単一のVHドメインまたはVLドメインで十分でありうる。さらにまた、特定の抗原に結合する抗体は、その抗原に結合する抗体からのVHドメインまたはVLドメインを使ってそれぞれ相補的なVLドメインまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることによって、単離しうる。例えばPortolano, S., et al, *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887、Clackson, T., et al, *Nature* 352 (1991) 624-628を参考されたい。

【0118】

「N-グリコシル化部位」という用語は、N-グリコシル化部位コンセンサス配列内のアミノ酸残基であって、グリカンが付加されている残基、またはグリカンを付加することができる残基を表す。一般にN結合型グリカンは、アスパラギンアミノ酸（Asn、N）側鎖のアミド窒素原子に付加される。N-グリコシル化部位コンセンサス配列はAsn-X-Ser/Thrであり、ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸残基であることができる。「N結合型グリコシル化」という用語は、例えばアスパラギンのアミド窒素原子に糖分子オリゴ糖（グリカンという）が付加された結果を表す。

【0119】

抗体グリコシル化

ヒト抗体は主に、重鎖CH2ドメインの約297番目にあるアスパラギン残基（Asn297）またはFab領域中のアスパラギン残基において、多かれ少なかれフコシル化されたバイアンテナ型複合型オリゴ糖でグリコシル化される（抗体アミノ酸残基のナンバリングは前掲のKabatに従う）。バイアンテナ型糖鎖構造は、各アームの末端に最大2つの連続ガラクトース（Gal）残基を有することができる。アームは、中心マンノース残基へのグリコシド結合に応じて、(1,6)および(1,3)と表される。G0と表される糖鎖構造はガラクトース残基を含まない。G1と表される糖鎖構造は一方のアーム中に1つまたは複数のガラクトース残基を含有する。G2と表される糖鎖構造は各アーム中に1つまたは複数のガラクトース残基を含有する（Raju, T.S., *Bioprocess Int.* 1 (2003) 44-53）。ヒト定常重鎖領域はKabatの前掲書およびBrueggemann, M., et al, *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361、Love, T.W., et al, *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527に詳述されている。抗体Fc領域のCHO型グリコシル化は例えばRoutier, F.H., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207に記載されている。

【0120】

「抗体」という用語は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはT細胞抗原枯渇抗体（T-cell antigen depleted antibody）などといった、さまざまな形態の抗体を表し、包含する（例えばWO 98/33523、WO 98/52976およびWO 00/34317参照）。一態様において、本明細書に記載する方法における抗体はヒト抗体またはヒト化抗体である。抗体の遺伝子工学は、例えばMorrison, S.L., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855、US 5,202,238およびUS 5,204,244、Riechmann, L., et al, *Nature* 332 (1988) 323-327、Neuberger, M.S., et al, *Nature* 314 (1985) 268-270、Lonberg, N., *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1117-1125に記載されている。

【0121】

抗体は、一般に、2つのいわゆる完全長軽鎖ポリペプチド（軽鎖）と2つのいわゆる完全

10

20

30

40

50

長重鎖ポリペプチド（重鎖）とを含む。完全長重鎖および軽鎖ポリペプチドのそれぞれは、抗原と相互作用する結合領域を含む可変ドメイン（可変領域）（一般に完全長ポリペプチド鎖のアミノ末端部分）を含有している。完全長重鎖および軽鎖ポリペプチドのそれぞれは定常領域（一般にカルボキシル末端部分）を含む。完全長重鎖の定常領域は、i) Fc ガンマ受容体（Fc R）を有する細胞、例えば食細胞への、またはii) ブランベル（Brambell）受容体とも呼ばれる新生児型Fc受容体（FcRn）を有する細胞への、抗体の結合を媒介する。これは、古典的補体系の因子、例えば成分（C1q）などといったいくつかの因子への結合も媒介する。そしてまた、完全長抗体の軽鎖または重鎖の可変ドメインは、異なるセグメント、すなわち4つのフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（CDR）を含む。「完全長抗体重鎖」は、サブクラスIgEの抗体の場合、N末端からC末端に向かって、抗体重鎖可変ドメイン（VH）、抗体定常ドメイン1（CH1）、抗体ヒンジ領域、抗体定常ドメイン2（CH2）、抗体定常ドメイン3（CH3）および任意で抗体定常ドメイン4（CH4）からなるポリペプチドである。「完全長抗体軽鎖」は、N末端からC末端に向かって、抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および抗体軽鎖定常ドメイン（CL）からなるポリペプチドである。完全長抗体鎖は、CLドメインとCH1ドメインの間および完全長抗体重鎖のヒンジ領域間で、ポリペプチド間ジスルフィド結合によって一つに連結されている。10

【0122】

近年、抗体のグリコシリ化パターン、すなわち付加された糖鎖構造の糖組成および数の多さは、生物学的特性に強い影響を有することが報告されている（例えばJefferis, R., Biotechnol. Prog. 21 (2005) 11-16参照）。哺乳動物細胞が生産する抗体は質量で2~3%のオリゴ糖を含有する（Taniguchi, T., et al, Biochem. 24 (1985) 5551-5557）。これは、例えばクラスGの抗体（IgG）の場合、マウス由来のIgGで2.3個のオリゴ糖残基（Mizuochi, T., et al, Arch. Biochem. Biophys. 257 (1987) 387-394）およびヒト由来のIgGで2.8個のオリゴ糖残基（Parekh, R.B., et al, Nature 316 (1985) 452-457）に相当し、一般的にはそのうちの2個はFc領域中のAsn297に位置し、残りは可変領域に位置する（Saba, J.A., et al., Anal. Biochem. 305 (2002) 16-31）。

【0123】

本願において使用する「糖鎖構造」という用語は、指定されたアミノ酸残基における单一の所定のN結合型またはO結合型オリゴ糖を表す。したがって、「G1糖鎖構造を伴う抗体」という用語は、Kabatナンバリングスキームでおよそ297のアミノ酸位置にあるアスパラギンアミノ酸残基に、またはFAB領域に、オリゴ糖の非還元末端に末端ガラクトース残基を1つだけ含んでいるバイアンテナ型オリゴ糖を含む抗体を表す。本願において使用する用語「オリゴ糖」は、共有結合された单糖単位を2つ以上含む多糖を表す。30

【0124】

本発明では、さまざまなN結合型オリゴ糖またはO結合型オリゴ糖を表記するために、個々の糖残基を、オリゴ糖分子の非還元末端から還元末端に向かって列挙する。最も長い糖鎖を表記のための基本鎖として選ぶ。N結合型またはO結合型オリゴ糖の還元末端は、抗体のアミノ酸バックボーンのアミノ酸に直接結合している单糖残基であり、一方、基本鎖の還元末端とは反対の末端に位置するN結合型またはO結合型オリゴ糖の末端を、非還元末端と呼ぶ。40

【0125】

すべてのオリゴ糖は、本明細書では、非還元糖の名称または略号（すなわちGal）、それに続いてグリコシド結合の立体配置（または）、環結合（1または2）、結合に関与する還元糖の環位置（2、3、4、6または8）、次に還元糖の名称または略号（すなわちGlcNAc）で記載される。各糖は好ましくはピラノースである。標準的な糖鎖生物学の命名法を概観するには、Essentials of Glycobiology Varki et al. eds., 1999, CSHL Pressを参照されたい。

【0126】

「所定の糖鎖構造」という用語は、本願では、糖鎖構造の非還元末端にある单糖残基がある特定種類のものである糖鎖構造を表す。「所定の糖鎖構造」という用語は、本願では50

、糖鎖構造の非還元末端にある単糖残基が規定されていて、ある特定種類のものである糖鎖構造を表す。

【0127】

抗体精製

本願において使用する用語「アフィニティークロマトグラフィー」は、「アフィニティークロマトグラフィー材料」を使用するクロマトグラフィー法を表す。アフィニティークロマトグラフィーにおいて、抗体は、それらの生物学的活性または化学構造に基づき、クロマトグラフィー材料のクロマトグラフィー官能基への静電相互作用、疎水結合および/または水素結合の形成に応じて分離される。特異的に結合された抗体をアフィニティークロマトグラフィー材料から回収するには、競合リガンドを加えるか、緩衝液のpH値、極性またはイオン強度などのクロマトグラフィー条件を変化させることができる。例示的な「アフィニティークロマトグラフィー材料」は、Ni (II) -NTAもしくはCu (II) -NTAなどの金属キレートクロマトグラフィー材料、またはプロテインAもしくはプロテインGが共有結合で連結されているクロマトグラフィー材料などの抗体アフィニティークロマトグラフィー材料、またはクロマトグラフィー官能基として酵素基質類似体、酵素コファクターもしくは酵素阻害剤が共有結合されているクロマトグラフィー材料などの酵素結合アフィニティークロマトグラフィー材料、またはクロマトグラフィー官能基として多糖、細胞表面受容体、糖タンパク質もしくはインタクトな細胞が共有結合で連結されているクロマトグラフィー材料などのレクチン結合クロマトグラフィー材料である。
10

【0128】

一態様において、抗体軽鎖アフィニティーリガンドは、例えば、抗体にカッパ軽鎖が含まれているかラムダ軽鎖が含まれているかに応じてカッパ定常軽鎖またはラムダ定常軽鎖に特異的な、軽鎖定常ドメイン特異的捕捉試薬を使用する。そのような軽鎖定常ドメイン特異的捕捉試薬の例は、例えば大スケールでの高い流速と低い背圧を可能にする剛性の高いアガロースベースマトリックスに基づくKappaSelect (商標) およびLambdaFabSelect (商標) (GE Healthcare/BACから入手可能) である。これらの材料は、それぞれカッパ軽鎖またはラムダ軽鎖の定常領域に結合する(軽鎖の定常領域を欠く抗体またはそのフラグメントは結合しない)リガンドを含有する。それゆえに、どちらも、軽鎖の定常領域を含有する他の標的分子、例えばIgG、IgAおよびIgMを結合する能力を有する。リガンドは、それらを標的分子への結合に容易に利用できるようにするために、長い親水性スペーサーアームを介してマトリックスに取り付けられる。それらは、ヒトIgカッパまたはヒトIgラムダのどちらかに対してスクリーニングされた一本鎖抗体フラグメントに基づく。
20

【0129】

「軽鎖」という用語は、ネイティブIgG抗体の短い方のポリペプチド鎖を表す。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()およびラムダ()と呼ばれる2タイプのうちの一方に割り当てることができる。ヒトカッパ軽鎖定常ドメインについてはSEQ ID NO:27を、またヒトラムダ軽鎖定常ドメインについてはSEQ ID NO:28を参照されたい。
30

【0130】

本願において使用される「に適用する」という用語および文法上それと等価な用語は、関心対象の物質を含有する溶液を固定相と接触させる、精製方法の部分工程を表す。精製しようとする関心対象の物質を含有する溶液は、固定相を通過して、固定相と溶液状態にある物質との間の相互作用をもたらす。例えばpH、伝導率、塩濃度、温度および/または流量などの条件に応じて、溶液の一部の物質が固定相に結合し、それと共に溶液から除去される。他の物質は溶液状態のままである。溶液状態のままの物質は素通り画分に見いだすことができる。「素通り画分」とは、クロマトグラフィー装置の通過後に得られる溶液を表し、これは、関心対象の物質を含有する適用された溶液であるか、カラムをフラッシュするため使用される緩衝液または固定相に結合している1つもしくは複数の物質の溶出を引き起こすために使用される緩衝液でありうる。関心対象の物質は、その物質が実質的に均一な形態で得られるように、例えば沈殿、塩析、限外濾過、ダイアフィルトレーシ
40

ヨン、凍結乾燥、アフィニティークロマトグラフィーまたは溶媒体積低減など、当業者にはよく知られる方法によって、精製工程後に溶液から回収することができる。

【0131】

本明細書に記載する方法において修飾することができる糖鎖構造を伴う抗体または抗体フラグメントは、組換え手段によって生産することができる。組換え生産のための方法は、当技術分野の水準では広く公知であり、真核細胞におけるタンパク質発現と、それに続く抗体または抗体フラグメントの単離および薬学的に許容される純度への精製を含む。抗体または抗体フラグメントの発現には、抗体または抗体フラグメントをコードする1つまたは複数の核酸が導入されたハイブリドーマ細胞または真核細胞のどちらかが使用される。一態様において、真核細胞は、CHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、BHK細胞、ウサギ細胞またはヒツジ細胞から選択される。別の一態様において、真核細胞は、CHO細胞、HEK細胞またはウサギ細胞から選択される。発現後に、抗体または抗体フラグメントは、細胞から（上清からまたは溶解後の細胞から）回収される。抗体の組換え生産のための一般的な方法は、当技術分野の水準では周知であり、例えばMakrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202、Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282、Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160、Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880の総説に記載されている。10

【0132】

抗体の精製は、細胞構成要素または他の夾雑物、例えば他の細胞核酸または細胞タンパク質を除去するために、アルカリ/SDS処理、CsClバンドィング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、その他当技術分野において周知の方法などといった、標準的な技法によって行うことができる（例えばAusubel, F.M., et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (2005)）。タンパク質精製には、例えば微生物タンパク質を使ったアフィニティークロマトグラフィー（例えばプロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー（例えば陽イオン交換（カルボキシメチルレジン）、陰イオン交換（アミノエチルレジン）および混合モード交換）、チオフィリック吸着（例えばベータ-メルカプトエタノールおよび他のSHリガンドによるもの）、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー（例えばフェニル-セファロース、アザ-アレノフィリック (aza-arenophilic) レジンまたはm-アミノフェニルボロン酸）、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー（例えばNi (II) およびCu (II) -アフィニティー材料）、サイズ排除クロマトグラフィーおよび電気泳動法（ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動など）ならびにそれらの組み合わせ、例えば微生物タンパク質によるアフィニティークロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーなど、異なる方法も確立され、広く使用されている（例えばVijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102参照）。一般的なクロマトグラフィー法およびそれらの使用は当業者には公知である。例えばHeftmann, E. (ed.), Chromatography, 5th edition, Part A:Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, New York (1992)、Deyl, Z. (ed.), Advanced Chromatography and Electromigration Methods in Biosciences, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands (1998)、Poole, C.F., and Poole, S.K., Chromatography Today, Elsevier Science Publishing Company, New York (1991)、Scopes, Protein Purification:Principles and Practice (1982)、Sambrook, J., et al. (eds.), Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) またはAusubel, F.M., et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (2005) を参照されたい。203040

【0133】

細胞培養法などによって生産された抗体または抗体フラグメントの精製には、一般に、異なるクロマトグラフィー工程の組み合わせを使用することができる。通常は（プロテインA）アフィニティークロマトグラフィーの後に、1つまたは2つの追加分離工程を行う。50

一態様において、追加クロマトグラフィー工程は、陽イオン交換クロマトグラフィー工程および陰イオン交換クロマトグラフィー工程またはその逆である。最終精製工程は、凝集した免疫グロブリン、残存HCP(宿主細胞タンパク質)、DNA(宿主細胞核酸)、ウイルスまたはエンドトキシンのような微量の不純物および夾雜物を除去するためのいわゆる「ポリッシング工程(polishing step)」である。一態様において、最終精製工程は、フロースルーモードの陰イオン交換クロマトグラフィーである。

【0134】

本明細書に記載する方法

組換え生産された抗体または抗体フラグメントの糖鎖構造は、使用した細胞株および使用した培養条件によって決まることになる。従来の下流処理技法では、特定糖鎖構造の選択的除去は不可能である。 10

【0135】

詳述すると、組換え生産されたモノクローナル抗体は、一般に、それぞれのグリコシル化部位にグリコフォームの不均一な混合物を含んでいる。このグリコシル化プロファイルは、宿主細胞中および培養培地中に存在する酵素活性ならびに培養条件などといった、組換え生産中のさまざまな因子による影響を受ける。

【0136】

優勢なグリコシル化、さらには予め決定されたグリコシル化を伴う抗体、例えばなかんずく治療効果を有する抗体を、生産する必要がある。

【0137】

本明細書に記載する方法は、抗体を培養物から収穫した後にN-グリコシル化部位のグリカンを酵素的に修飾することによって、N-グリコシル化部位、例えばFab領域中またはFc領域中のN-グリコシル化部位において、所定のグリコシル化を伴う抗体、すなわち、グルコシル化部位において付加された、例えばFc領域中のAsn297に付加された、本質的に単一のグリコフォームを含有する抗体を提供する。抗体は抗体軽鎖アフィニティーリガンドに強固に結合されるので、そのグリコシル化は所望の方法で修飾することができる。したがって、本明細書に記載する方法には、培養上清からの抗体精製に使用される標準的な作業手順に容易に組み込むことができるという利点がある。抗体は抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合され、そしてその抗体軽鎖アフィニティーリガンドはさらに固相上に固定化することができるので、なかんずく、修飾に使用される酵素の量を、修飾を溶液状態で行った場合に必要になるであろう量と比較して低減することができ、その上、修飾全体を一工程で達成することができる。 30

【0138】

「所定のグリコシル化を伴う抗体」または「所定の糖鎖構造を伴う抗体」という用語は、限られた数の異なるグリカンが(予め決定された)N-グリコシル化部位に、例えばFc領域中のAsn297において、付加されている抗体分子の集団を表す(ナンバリングはKabatのEUIインデックスに従う)。一態様では、グリカンの1つが、G0F、G1FおよびG2Fグリコフォームのうちの50%以上、またはG0F、G1F、G2F、G1S1F、G2S1FおよびG2S2Fグリコフォームのうちの30%以上を占める。

【0139】

本明細書において使用する「実質的に」という用語は、化合物のうちの40%以上、一態様では50%以上が、同じグリコシル化を有すること、すなわちN-グリコシル化部位に、例えばFc領域中のAsn297(ナンバリングはKabatに従う)に同じグリカンを含むことを表す。

【0140】

本明細書に記載する方法により、抗体は、そのタイプおよびサイズにかかわりなく、所定のグリコフォームを含むように修飾することができる。より具体的には、N-グリコシル化部位の、例えばFc領域中のN-グリコシル化部位の、グリコシル化は、例えば抗体の意図した治療的応用のために、テーラーメイドすることができる。例えば、抗体のFc領域のガラクトシル化はがんの処置に有用である。さらに例えば、抗体のFc領域の、所定のグリコ 50

フォームへのシアリル化は、自己免疫障害の処置において有用である。異なる応用例では、Fc領域の脱ガラクトシル化および/または脱シアリル化が望ましい場合もある。さらに別の態様では、N-アセチルグルコサミンGlcNAc、またはマンノース-N-アセチルグルコサミン-N-アセチルグルコサミンMan-GlcNAc-GlcNAcなど、GlcNAc残基とマンノース残基のコアを有するハイブリッド型構造の生産を達成しうる。前記はいずれも、本明細書に記載する方法を使って生産しうる。というのも、所望する所定のグリコフォーム抗体を生産するために、本明細書に記載する方法を異なるグリコシリ化酵素を使って逐次繰り返すことにより、任意の抗体および該抗体の任意の糖構造を段階的に修飾することができるからである。

【0141】

10

例えば、本明細書に記載する方法を使って、モノクローナル抗体の不均一な集団から、G2グリコフォームを伴う抗体を生産することができる。同じ方法を使って、糖鎖工学的方法によって生産することができる不均一な非フコシル化 (non-fucosylated) 抗体を、均一なG2グリコフォームに変換することができる。加えて、本明細書に記載する方法を使ってガラクトシル化を所望のレベルに調整することによって、抗体のガラクトシル化のバッチ間のばらつきにも対処することができる。

【0142】

簡単に述べると、本明細書に記載する方法は、N-グリコシリ化部位において、例えばFc領域中のN-グリコシリ化部位において、グリコシリ化を伴う抗体を含む溶液を、固相/支持体に固定化された抗体軽鎖アフィニティーリガンドに適用する工程を含む。支持体はカラムを構成し、そのカラムは洗浄緩衝液で洗浄された後、対応する所望の酵素的オンカラム糖鎖構造修飾に適した反応緩衝溶液で洗浄される。反応緩衝液は、選択された二次的酵素、任意でコファクターおよび任意でヌクレオチド糖の添加によって、さらに最適化することができる。次に、カラムを室温で、または約37℃の高温でインキュベーションする。その後、カラムを洗浄緩衝液で洗浄し、所定のグリコフォームを伴う修飾されたモノクローナル抗体を、溶出緩衝液を使って固形支持体から溶出させる。溶出した抗体は、次に、中和緩衝液を使って中和させうる。

20

【0143】

反応緩衝液において使用されるヌクレオチド糖は、UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GalNAc、UDP-GlcNAc、UDP-GlcUA、UDP-Xyl、GDP-Man、GDP-Fuc、CMP-NeuSAc、CMP-NeuSGcおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される。反応緩衝液において使用される濃度は約0.5mM～約5mMの範囲、諸局面では約1mM～約1.5mMの範囲にある。反応緩衝液において使用されるコファクターは、Mn²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺、-ラクトアルブミンおよびそれらの組み合わせからなる群より選択されうる。反応緩衝液において使用されるコファクターの濃度は、約2mM～約10mMの範囲にありうる。

30

【0144】

抗体軽鎖アフィニティーリガンドは固相上に固定化され、精製および修飾プロセス中、その固相はカラム内に保持される。固相としては、非標的タンパク質および修飾酵素の非特異的吸着が無視できる程度でしかないアガロース、セファロース (sepharose)、ポリアクリル系、ポリスチレンおよび他の合成ポリマーが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。アフィニティーリガンドは、例えばN-ヒドロキシスルシンイミド (NHS) エステル、エポキシド、アルデヒドまたは臭化シアンなど、固相に対するさまざまな化学のいずれかによって、固相に共有結合される。そのようなコンジュゲーション化学は、Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press (Amsterdam, the Netherlands, Ed. 2008) およびWong, S., Chemistry of Protein Conjugation and CrossLinking, CRC Press (Boca Raton, Fla, 1991) に例示されているように、当技術分野では周知である。

40

【0145】

洗浄緩衝液は、洗浄工程中に抗体とアフィニティーリガンドの間の高いアフィニティーが維持されることを保証する。例えば、約7.2のpHを有するリン酸緩衝食塩水溶液 (PBS)

50

を洗浄緩衝液として使用することができる。ただし、pHがある程度異なってもよいことは、当業者には理解される。洗浄緩衝液および反応緩衝液は、抗体とアフィニティーリガンドの間の高いアフィニティーが維持されると同時に、各酵素の活性も維持されることを保証する。洗浄緩衝液および反応緩衝液は約25 ~ 約40 の温度およびその間の任意の温度で使用される。約37 の温度が使用されることが多い。軽鎖アフィニティーリガンドに対する抗体の高いアフィニティーにとって、至適pH範囲は約6.0 ~ 約8.0である。このpH範囲内で、緩衝液は、本明細書に記載する方法において使用することができるアフィニティーリガンドの至適pH範囲とオーバーラップする。それらには、TRIS緩衝液、BIS-TRIS緩衝液、MES緩衝液、BES緩衝液、MOPS緩衝液およびHEPES緩衝液などがあるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0146】

アフィニティーカラムの洗浄条件は、非特異的結合を最小限に抑え、よって酵素反応に、よって抗体修飾に、影響を及ぼす。洗浄条件は、抗体軽鎖アフィニティーリガンドと標的モノクローナル抗体の間の結合を破壊しないような条件である。

【0147】

本明細書に記載する方法における使用に適した酵素は、修飾に応じて、マンノシル-グルコサミントランスフェラーゼ (MGAT1、MGAT2およびMGAT3)、ガラクトシルトランスフェラーゼ (4GalT1、4GalT2、4GalT3、4GalT4、4GalT5、4GalT6、4GalT7)、シアリルトランスフェラーゼ (ST6Gal1、ST6Gal2)、マンノシダーゼ (マンノシダーゼ-I、マンノシダーゼ-II、(1-2)マンノシダーゼ、(1-6)マンノシダーゼ、(1-2,3)マンノシダーゼ、(1-2,3,6)マンノシダーゼ)、ヘキソサミニダーゼ (-N-アセチルヘキソサミニダーゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼ、-N-アセチルグルコサミニダーゼ)、ガラクトシダーゼ (-ガラクトシダーゼ、(1-4)ガラクトシダーゼ、(1-3,6)ガラクトシダーゼ)、シアリダーゼ ((2-3,6,8)シアリダーゼ、(2-3)シアリダーゼ)、フコシダーゼ (-L-フコシダーゼ、(1-6)フコシダーゼ、(1-2)フコシダーゼ、(1-3,4)フコシダーゼ、(1-2,3,4)フコシダーゼ)およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択することができる。

20

【0148】

本明細書に記載する方法は、例えばFc領域中に、均一なG2糖鎖構造を伴う抗体を生成させるべく、ガラクトースから末端シアル酸を除去し、またはガラクトースに末端シアル酸を付加するために、使用することができる。したがって例えば、あらゆる結合からシアル酸を除去する非特異的ノイラミニダーゼ酵素、またはそれぞれのシアル酸を付加する特異的シアリダーゼを利用することができる。ガラクトシル化とシアル酸の除去または付加とを同時に達成するために、この酵素をガラクトシルトランスフェラーゼと併用することができる。これにより、少なくともグリコフォームG0、G1、G2、G1S1およびG2S2を含む、Fc領域などにグリコシル化を伴う抗体から、Fc領域などに所定のG2グリコフォームを伴う抗体を得ることができる。

30

【0149】

本明細書に記載する方法による抗体のグリコシル化の修飾は、個々の酵素との逐次的インキュベーションを使って行うか、第1酵素を加え、一定期間後に第1酵素を除去せずに第2酵素を加える半逐次的インキュベーションを使って行うか、または両酵素が一緒に存在する状態での同時インキュベーションを使って行うことができる。これらのプロトコールはいずれも、完全に溶液反応での修飾と比較して、または抗体をプロテインA上に固定化しての修飾と比較して、改良された修飾をもたらす。

40

【0150】

対応するトランスフェラーゼ酵素を利用してFc領域中に所定のガラクトシル化およびシアリル化を伴う抗体を得る例を以下に挙げて、本明細書に記載する方法を説明する。

【0151】

オンカラムでのガラクトシル化

IgG1サブクラスの精製ヒト化抗体をプロテインAアフィニティーコロマトグラフィー材

50

料および抗体軽鎖アフィニティーリガンドクロマトグラフィー材料 (GE HealthcareのKappa select) に適用した。結合した抗体を、オンカラムで、ガラクトシルトランスフェラーゼ (GALT1) とUDP-GALとを含む緩衝溶液と共に、インキュベーションした。結果を以下の表に提示する。抗体軽鎖アフィニティーリガンドを含むカラムに抗体を結合させた場合の方が、達成されるガラクトシル化の量は多いことがわかる。

時間 [h]	抗体Fc領域アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (プロテインA) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			抗体軽鎖アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (Kappa select) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			10
	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	
0	50	35	15	50	35	15	
2	33	50	17	19	58	23	
7	25	50	25	5	49	46	
24	17	42	41	0	22	78	

G0F = 2つの末端N-アセチルグルコサミン残基とフコースとを有する複合型N-グリカン
G1F = 1つの末端N-アセチルグルコサミン残基と1つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

G2F = 2つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン
20
【0152】

Fc領域中に均一なグリコシル化を有するIgG1サブクラスの精製ヒト化抗体 (均一なG2Fグリコフォーム) を、プロテインAアフィニティーリガンドクロマトグラフィー材料および抗体軽鎖アフィニティーリガンドクロマトグラフィー材料 (GE HealthcareのKappa select) に適用した。結合した抗体を、オンカラムで、シアリルトランスフェラーゼ (ST6) とCMP-NANAとを含む緩衝溶液と共に、インキュベーションした。結果を以下の表に提示する。抗体軽鎖アフィニティーリガンドを含むカラムに抗体を結合させた場合の方が、達成されるシアリル化の量は多いことがわかる。

37°C	抗体Fc領域アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (プロテインA) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			抗体軽鎖アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (Kappa select) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			30
	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	
0	100	0	0	100	0	0	
2	17	66	17	0	74	26	
7	11	59	30	0	44	56	
24	10	58	32	0	45	55	
48	12	58	30				40

RT	抗体Fc領域アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (プロテインA) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			抗体軽鎖アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (Kappa select) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			50
	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	
0	100	0	0	100	0	0	
24	-	-	-	0	38	62	
48	15	54	31	-	-	-	

【 0 1 5 3 】

アルカリホスファターゼの有無はプロテインAカラムでの収率を変化させなかった (19 %G2F、56%G2S1F、25%G2S2F)。溶液状態では、以下の結果を得ることができる：

37°C		溶液状態			10
時間 [h]		G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	
0		100	0	0	
48		0	40~30	60~70	

G2F = 2つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

G2S1F = 1つがシアル化されている2つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

G2S2F = どちらもシアル化されている2つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

【 0 1 5 4 】

IgG4サブクラスのヒト抗体をプロテインAアフィニティークロマトグラフィー材料および抗体軽鎖アフィニティーリガンドクロマトグラフィー材料 (GE HealthcareのKappa select) に適用した。結合した抗体を、オンカラムで、ガラクトシルトランスフェラーゼ (G aIT1) とUDP-GALとを含む緩衝溶液と共に、インキュベーションした。結果を以下の表に提示する。抗体軽鎖アフィニティーリガンドを含むカラムに抗体を結合させた場合の方が、達成されるガラクトシル化の量が多いことがわかる。

時間 [h]	抗体Fc領域アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (プロテインA) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			抗体軽鎖アフィニティーリガンド クロマトグラフィー材料 (Kappa select) 上で行った Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾			30
	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	
0	91	9	0	91	9	0	
2	49	36	15	13	49	38	
7	26	33	41	0	14	86	
24	13	22	65	0	0	100	

G0F = 2つの末端N-アセチルグルコサミン残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

G1F = 1つの末端N-アセチルグルコサミン残基と1つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

G2F = 2つの末端ガラクトース残基とフコースとを有する複合型N-グリカン

【 0 1 5 5 】

Fc領域中に均一なグリコシル化を有するIgG4サブクラスのヒト抗体 (均一なG2Fグリコフォーム) をプロテインAアフィニティークロマトグラフィー材料および抗体軽鎖アフィニティーリガンドクロマトグラフィー材料 (GE HealthcareのKappa select) に適用した。結合した抗体を、オンカラムで、シアリルトランスフェラーゼ (ST6) とCMP-NANAとを含む緩衝溶液と共に、インキュベーションした。結果を以下の表に提示する。抗体軽鎖アフィニティーリガンドを含むカラムに抗体を結合させた場合の方が、達成されるシアリル化の量が多いことがわかる。

抗体Fc領域アフィニティーリガンド
クロマトグラフィー材料
(プロテインA) 上で行った
Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾

抗体軽鎖アフィニティーリガンド
クロマトグラフィー材料
(Kappa select) 上で行った
Fc領域N-グリコシル化の酵素的修飾

時間 [h]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
0	100	0	0	100	0	0
7	n.d.	n.d.	n.d.	0	6	94
24	0	22	78	0	0	100

n.d. = 未決定

10

【 0 1 5 6 】

Fab中に追加のグリコシル化部位を有する IgG1サブクラスのヒト化抗体を、プロテインAアフィニティーコロマトグラフィー材料および抗体軽鎖アフィニティーリガンドコロマトグラフィー材料 (GE HealthcareのKappa select) に適用した。結合した抗体を、オンカラムで、シアリルトランスフェラーゼ (ST6) とCMP-NANAとを含む緩衝溶液と共に、インキュベーションした。結果を以下の表に提示する。この例では、Fab中のN-グリコシル化部位のグリコシル化が修飾された。抗体軽鎖アフィニティーリガンドを含むカラムに抗体を結合させた場合の方が、反応速度は向上することがわかる。

抗体Fc領域アフィニティーリガンド
クロマトグラフィー材料
(プロテインA) 上で行った
Fab N-グリコシル化の酵素的修飾

抗体軽鎖アフィニティーリガンド
クロマトグラフィー材料
(Kappa select) 上で行った
Fab領域N-グリコシル化の酵素的修飾

時間 [h]	G2 [%]	G2S1 [%]	G2S2 [%]	G2 [%]	G2S1 [%]	G2S2 [%]
0	0	52	48	0	51	49
2	0	20	80	0	8	92
7	0	5	95	0	6	94
24	0	5	95	0	8	92

G2 = 2つの末端ガラクトース残基を有する複合型N-グリカン

30

G2S1 = 1つがシアル化されている2つの末端ガラクトース残基を有する複合型N-グリカン

G2S2 = どちらもシアル化されている2つの末端ガラクトース残基を有する複合型N-グリカン

【 0 1 5 7 】

IgG1サブクラスのヒト化抗体を含む無細胞培養上清をプロテインAアフィニティーコロマトグラフィー材料および抗体軽鎖アフィニティーリガンドコロマトグラフィー材料 (GE HealthcareのKappa select) に適用した。結合した抗体を、オンカラムで逐次的に、まず、ガラクトシルトランスフェラーゼ (GalT1) とUDP-GALとを含む緩衝溶液と共にインキュベーションし、次にシアリルトランスフェラーゼ (ST6) とCMP-NANAとを含む緩衝溶液と共にインキュベーションした。結果を以下の表に提示する。シアリルトランスフェラーゼは6時間のインキュベーション時間後に加えた。

40

プロテインA

時間 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
0	50	38	12	0	0	0
6	26	47	27	0	0	0
8	25	36	9	9	14	6
24	26	31	7	15	13	9
48	26	32	7	14	13	9

Kappa select

10

時間 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
0	50	38	12	0	0	0
6	3	42	55	0	0	0
8	3	32	8	10	39	8
24	0	24	6	19	30	21
48	0	24	6	19	30	21

【 0 1 5 8 】

同じ実験を精製バルク材料で繰り返した。

20

プロテインA

時間 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
0	52	40	8	0	0	0
6	26	48	26	0	0	0
8	25	38	8	10	14	5
24	27	34	7	8	14	10
48	25	33	6	14	13	9

Kappa select

30

時間 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
0	52	40	8	0	0	0
6	4	46	50	0	0	0
8	4	36	6	10	36	8
24	0	28	4	20	29	19
48	0	28	3	21	29	19

【 0 1 5 9 】

24時間後にシリルトランスフェラーゼを添加する改良型kappa select法

40

時間 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
0	52	40	8	0	0	0
24	0	22	78	0	0	0
30	0	12	0	6	53	29

【 0 1 6 0 】

本明細書に記載する方法において使用される抗体

キメラ抗体およびヒト化抗体

一定の態様において、本明細書に記載する方法において修飾される抗体はキメラ抗体である。

50

【0161】

例えばUS 4,816,567およびMorrison, S.L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855には一定のキメラ抗体が記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト靈長類に由来する可変領域）とヒト定常領域とを含む。さらなる一例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変更された「クラススイッチ（class switched）」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合性フラグメントも、それらが本明細書に記載する方法において使用される抗体軽鎖アフィニティーアンドに結合する限り、包含される。

【0162】

一定の態様において、キメラ抗体はヒト化抗体である。通常、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性およびアフィニティーを保ちつつヒトに対する免疫原性を低減するために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR（またはその一部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（またはその一部分）がヒト抗体配列に由来する、1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意でヒト定常領域の少なくとも一部分も含むであろう。いくつかの態様において、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば抗体の特異性またはアフィニティーを回復または改良するために、非ヒト抗体（例えばHVR残基が由来する抗体）からの対応する残基で置換される。

【0163】

ヒト化抗体およびそれらの作製方法については、例えばAlmagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633に総説があり、例えばRiechmann, I. et al, Nature 332 (1988) 323-329、Queen, C. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033、US 5,821,337、US 7,527,791、US 6,982,321およびUS 7,087,409、Kashmiri, S.V. et al, Methods 36 (2005) 25-34（特異性決定領域（SDR）移植に関する記載がある）、Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498（「リサーフェイシング（resurfacing）」に関する記載がある）、Dall'Acqua, W.F. et al, Methods 36 (2005) 43-60（「FRシャフリング」に関する記載がある）ならびにOsbourne, J. et al, Methods 36 (2005) 61-68およびKlimka, A. et al, Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260（FRシャフリングへの「誘導選択（guided selection）」アプローチに関する記載がある）にも、さらに記載されている。

【0164】

ヒト化に使用しうるヒトフレームワーク領域としては、「ベストフィット」法を使って選択されるフレームワーク領域（例えばSims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308参照）、軽鎖可変領域または重鎖可変領域が特定サブグループであるヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えばCarter, P. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289およびPresta, L.G. et al, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632参照）、ヒト成熟（体細胞突然変異した）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えばAlmagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633参照）およびFRライブラリーのスクリーニングによって得られるフレームワーク領域（例えばBaca, M. et al, J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684およびRosok, M.J. et al, J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618参照）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0165】

ヒト抗体

一定の態様において、本明細書に記載する方法において修飾される抗体はヒト抗体である。

【0166】

ヒト抗体は、当技術分野において公知のさまざまな技法を使って生産することができる。ヒト抗体はvan Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374およびLonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459に概説されて

10

20

30

40

50

いる。

【0167】

ヒト抗体は、抗原チャンレンジに応答してインタクトヒト抗体またはヒト可変領域を有するインタクト抗体を生産するように変更が加えられたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製しうる。そのような動物は、典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部分を含有しており、それらは内在性免疫グロブリン遺伝子座と置き換わっているか、染色体外に存在するか、またはその動物の染色体にランダムに組み込まれている。そのようなトランスジェニックマウスでは、内在性免疫グロブリン遺伝子座は一般に不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法を概観するには、Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125を参照されたい。例えればXENOMOUSE（商標）技術が記載されているUS 6,075,181およびUS 6,150,584、HUMAB（登録商標）技術が記載されているUS 5,770,429、K-M MOUSE（登録商標）技術が記載されているUS 7,041,870、VELOCIMOUSE（登録商標）技術が記載されているUS 2007/0061900、および免疫再構築マウスが記載されているWO 2007/131676も参照されたい。そのような動物が生成させるインタクト抗体のヒト可変領域は、例えば異なるヒト定常領域と組み合わせることなどによって、さらに修飾しうる。

【0168】

ヒト抗体はハイブリドーマに基づく方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体を生産するためのヒト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株は、既に記載されている（例えはKozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005、Brodeur, B.R. et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) , pp.51-63およびBoerner, P. et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95参照）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成させたヒト抗体も、Li, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562に記載されている。さらなる方法として、例えはUS 7,189,826（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の生産に関する記載がある）およびNi, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268（ヒト-ヒトハイブリドーマに関する記載がある）に記載されているものが挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）は、Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937およびVollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191にも記載されている。

【0169】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成させることもできる。そのような可変ドメイン配列は、次に、所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技法を以下に説明する。

【0170】

ライブラリー由来抗体

本明細書に記載する方法において修飾される抗体は、1つまたは複数の所望の活性を有する抗体について、コンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離しうる。例えは当技術分野では、ファージディスプレイライブラリーを作成し、所望の結合特徴を有する抗体についてそのようなライブラリーをスクリーニングするために、さまざまな方法が公知である。そのような方法については、例えはHoogenboom, H.R. et al, Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37に概説されており、例えはMcCafferty, J. et al, Nature 348 (1990) 552-554、Clackson, T. et al, Nature 352 (1991) 624-628、Marks, J.D. et al, J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597、Marks, J.D. and Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175、Sidhu, S.S. et al, J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310、Lee, C.V. et al, J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093、Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472およびLee, C.V. et al, J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132には、さらに詳しく記載されてい

る。

【0171】

一定のファージディスプレイ法では、Winter, G. et al., *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455に記載されているように、VH遺伝子とVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって個別にクローニングし、それらをファージライブラリーでランダムに組み換えた後、そのライブラリーを抗原結合性ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的には、抗体フラグメントを、一本鎖Fv (scFv) フラグメントとして、またはFabフラグメントとして、ディスプレイする。免疫化された供給源からのライブラリーは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、免疫原に対する高アフィニティー抗体を与える。あるいは、Griffiths, A.D. et al, *EMBO J.* 12 (1993) 725-734に記載されているように、免疫化を一切行わずに、ナイーブレパートリーを(例えばヒトから)クローニングすることで、広範な非自己抗原に対する抗体、そしてまた自己抗原に対する抗体の、単一の供給源とすることもできる。最後に、Hoogenboom, H.R. and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388に記載されているように、幹細胞から非再編成V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使って高度に可変なCDR3領域をコードすると共に、インビトロで再編成を行うことにより、ナイーブライブラリーを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーが記載されている特許公報として、例えばUS 5,750,373、ならびにUS 2005/0079574、US 2005/0119455、US 2005/0266000、US 2007/0117126、US 2007/0160598、US 2007/0237764、US 2007/0292936およびUS 2009/0002360が挙げられる。

10

20

【0172】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体フラグメントは、本明細書では、ヒト抗体またはヒト抗体フラグメントとみなされる。

【0173】

多重特異性抗体

一定の態様において、本明細書に記載する方法において修飾される抗体は多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。二重特異性抗体は完全長抗体または抗体フラグメントとして調製することができる。多重特異性(二重特異性)抗体のフラグメントは、それらが本明細書に記載する方法において使用される抗体軽鎖アフィニティーリガンドに結合する限り、包含される。

30

【0174】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組換え共発現 (Milstein, C. and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540、WO 93/08829およびTraunecker, A. et al, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659参照) および「ノブ・イン・ホール (knob-in-hole)」工学(例えばUS 5,731,168参照)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。多重特異性抗体は、抗体Fcヘテロ二量体型分子を作製するために静電ステアリング効果を工作すること(WO 2009/089004)、2つ以上の抗体またはフラグメントを架橋すること(例えばUS 4,676,980およびBrennan, M. et al, *Science* 229 (1985) 81-83参照)、ロイシンジッパーを使って二重特異性抗体を生産すること(例えばKostelnik, S.A. et al, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553参照)、二重特異性抗体フラグメントを作製するための「ダイアボディ」技術を使用すること(例えばHolliger, P. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448参照)、および一本鎖Fv (sFv) 二量体を使用すること(例えばGruber, M et al, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374参照)、および例えばTutt, A. et al, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69に記載されているように三重特異性抗体を調製することによって作製してもよい。

40

【0175】

「オクトパス (Octopus) 抗体」など、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する工学的に改変された抗体も、ここに包含される(例えばUS 2006/0025576参照)。

【0176】

50

本明細書に記載する方法において修飾される抗体またはフラグメントには、「二重作用性Fab (Dual Acting Fab)」、すなわち「DAF」も包含される（例えばUS 2008/0069820参照）。

【0177】

本明細書における抗体またはフラグメントには、WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792およびWO 2010/145793に記載の多重特異性抗体も包含される。

【0178】

組換え法および組成物

抗体は、例えばUS 4,816,567に記載されている組換え法および組成物を使って生産され 10 うる。これらの方法のために、抗体をコードする1つまたは複数の単離された核酸が提供される。

【0179】

ネイティブ抗体またはネイティブ抗体フラグメントの場合、2つの核酸、すなわち軽鎖またはそのフラグメント用に1つと、重鎖またはそのフラグメント用に1つとが必要である。そのような核酸は抗体のVLを含むアミノ酸配列および/または抗体のVHを含むアミノ酸配列（例えば抗体の軽鎖および/または重鎖）をコードする。これらの核酸は同じ発現ベクター上または異なる発現ベクター上に存在することができる。

【0180】

ヘテロ二量体型重鎖を有する二重特異性抗体の場合、4つの核酸、すなわち第1軽鎖用に1つ、第1ヘテロ单量体Fc領域ポリペプチドを含む第2軽鎖用に1つ、第2軽鎖用に1つ、および第2ヘテロ单量体Fc領域ポリペプチドを含む第2重鎖用に1つが必要になる。例えば、ヘテロ二量体型重鎖の一方は、いわゆる「ノブ突然変異」（T366Wおよび任意でS354CまたはY349Cのうちの一つ）を含み、他方はいわゆる「ホール突然変異」（T366S、L368AおよびY407Vならびに任意でY349CまたはS354C）を含む（例えばCarter, P. et al., Immunotechnol. 2 (1996) 73参照）。そのような核酸は、抗体の第1VLを含むアミノ酸配列および/または抗体の第1ヘテロ单量体Fc領域を含んでいる第1VHを含むアミノ酸配列および/または抗体の第2VLを含むアミノ酸配列および/または抗体の第2ヘテロ单量体Fc領域を含んでいる第2VHを含むアミノ酸配列（例えば抗体の第1および/もしくは第2軽鎖ならびに/または第1および/もしくは第2重鎖）をコードする。これらの核酸は同じ発現ベクター上または異なる発現ベクター上に存在することができ、通常これらの核酸は2つまたは3つの発現ベクター上に位置する。すなわち、1つのベクターがこれらの核酸のうちの2つ以上を含みうる。これらの二重特異性抗体の例はCrossMabおよびT細胞二重特異性抗体である（例えばSchaefer, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 (2011) 11187-11191参照）。

【0181】

一態様では、本明細書に記載する方法において使用される抗体をコードする単離された核酸が提供される。

【0182】

さらなる一態様では、（1つまたは複数の）そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば発現ベクター）が提供される。

【0183】

さらなる一態様では、（1つまたは複数の）そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。

【0184】

そのような一態様において、宿主細胞は以下を含む（例えば以下で形質転換されている）：

- ・ネイティブ抗体またはネイティブ抗体フラグメントの場合：
- (1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または
- (2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクターおよび抗体のVH

を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2ベクター、

・ヘテロ二量体型重鎖を有する二重特異性抗体の場合：

(1) 一方は抗体の第1VLを含み他方は抗体の第1VHを含むアミノ酸配列をコードする核酸の第1ペアを含む第1ベクターと、一方は抗体の第2VLを含み他方は抗体の第2VHを含むアミノ酸配列をコードする核酸の第2ペアを含む第2ベクター、または

(2) 可変ドメインのうちの1つ（好ましくは軽鎖可変ドメイン）を含むアミノ酸配列をコードする第1核酸を含む第1ベクター、一方は軽鎖可変ドメインを含み他方は第1重鎖可変ドメインを含むアミノ酸配列をコードする核酸のペアを含む第2ベクター、および一方は、第2ベクターの場合と同様に、それぞれ他の軽鎖可変ドメインを含み他方は第2重鎖可変ドメインを含むアミノ酸配列をコードする核酸のペアを含む第3ベクター、または

(3) 抗体の第1VLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクター、抗体の第1VHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2ベクター、抗体の第2VLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第3ベクター、および抗体の第2VHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第4ベクター。

【0185】

一態様において、宿主細胞は真核生物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ球系細胞（例えばY0、NS0、Sp20細胞）である。一態様では、抗体を作製する方法であって、上で用意された抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適した条件下で培養する工程、任意で抗体を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収する工程、および本明細書に記載する方法で抗体のグリコシル化を修飾する工程を含む方法が提供される。

【0186】

抗体を組換え生産するには、抗体をコードする核酸、例えば上述のものを単離し、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のために、1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を使って（例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離し、配列決定すること、または組換え法によって生産すること、または化学合成によって得ることができる。

【0187】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現のための適切な宿主細胞としては、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞が挙げられる。例えば抗体は、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要でない場合は特に、細菌中で生産しうる。細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現については、例えばUS 5,648,237、US 5,789,199およびUS 5,840,523を参照されたい。（大腸菌における抗体フラグメントの発現が記載されているCharlton, K.A., In:Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp.245-254も参照されたい）。発現後に、抗体を細菌細胞ペーストから可溶性画分に単離して、さらに精製することができる。

【0188】

原核生物だけでなく、糸状菌または酵母などの真核微生物も、グリコシル化経路が「ヒト化」されていて部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体の生産をもたらす真菌株および酵母株を含めて、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング宿主または発現宿主である。Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414およびLi, H. et al, Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215参照。

【0189】

グリコシル化された抗体を発現させるための適切な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎生物および脊椎動物）にも由来する。無脊椎生物細胞の例として、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と一緒に使用しうる（特にスプドブテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションに使用することができる）バキュロウイルス株は、数多く同定されている。

【0190】

10

20

30

40

50

植物細胞培養も宿主として利用することができる。例えばUS 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978およびUS 6,417,429（トランスジェニック植物における抗体生産のためのPLANTIBODIES（商標）技術が記載されている）を参照されたい。

【0191】

脊椎動物細胞も宿主として使用しうる。例えば、懸濁状態での成長に適応した哺乳動物細胞株は役立ちうる。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）、ヒト胎児腎臓株（Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74などに記載の293または293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252などに記載のTM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸癌細胞（HELA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝臓細胞（BRL3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、マウス乳房腫瘍（MMT060562）、Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68などに記載のTRI細胞、MRC5細胞およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株として、DHFR-CHO細胞（Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220）を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ならびにY0、NS0およびSp2/0などの骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体生産に適した一定の哺乳動物宿主細胞株を概観するには、例えばYazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004) pp.255-268を参照されたい。

【0192】

薬学的製剤

本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体の薬学的製剤は、所望の純度を有するそのような抗体を1種または複数種の随意の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)）と混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度において受容者にとって一般に無毒性であり、これには、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝剤；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベンまたはブロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリ（ビニルピロリドン）；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン；单糖、二糖および他の糖質、例えばグルコース、マンノースまたはデキストリン；キレート剤、例えばEDTA；糖類、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および/または非イオン界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）などがあるが、それらに限定されるわけではない。本明細書における、例示的な薬学的に許容される担体としては、間質薬物分散剤、例えば可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrhuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）が、さらに挙げられる。rhuPH20を含む一定の例示的sHASEGPおよびその使用方法は、US 2005/0260186およびUS 2006/0104968に記載されている。一局面では、sHASEGPが、1種または複数種の追加グリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと併用される。

【0193】

例示的な凍結乾燥抗体製剤はUS 6,267,958に記載されている。水性抗体製剤としてはUS 6,171,586およびWO 2006/044908に記載されているものが挙げられ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0194】

10

20

30

40

50

本明細書における製剤は、処置される特定適応症の必要に応じて、2種以上の活性成分、好ましくは互いに有害な影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含有しうる。そのような活性成分は、適宜、意図した目的に有効な量で組み合わされて存在する。

【0195】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ- (メチルメタクリレート)マイクロカプセルに封入するか、コロイド薬物送達系 (例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル) に封入するか、またはマクロエマルジョンに封入することができる。そのような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th, Osol, A. (ed.) (1980) に開示されている。10

【0196】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、マトリックスがフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態にあるものが挙げられる。

【0197】

インビオ投与に使用される製剤は一般に無菌状態にある。無菌性は例えば無菌濾過膜による濾過などによって容易に達成することができる。

【0198】

治療方法および組成物

20

本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体はいずれも、治療方法に使用しうる。

【0199】

一局面では、医薬として使用するための、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体が提供される。さらなる局面では、疾患の処置において使用するための、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体が提供される。一定の態様では、処置方法において使用するための、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体が提供される。一定の態様において、本発明は、有効量の、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体を個体に投与する工程を含む、疾患を有する個体を処置する方法において使用するための、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体を提供する。そのような一態様において、本方法は、有効量の少なくとも1つの追加治療剤を個体に投与する工程を、さらに含む。一定の態様において、本発明は、有効量の、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体を個体に投与する工程を含む、個体における処置方法において使用するための、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体を提供する。上記の態様のいずれにおいても「個体」は好ましくはヒトである。30

【0200】

さらなる一局面において、本発明は、医薬の製造または調製における、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体の使用を提供する。一態様において、医薬は疾患を処置するための医薬である。さらなる一態様において、医薬は、疾患を有する個体に有効量の医薬を投与する工程を含む疾患の処置方法において使用するための医薬である。そのような一態様において、本方法は、有効量の少なくとも1つの追加治療剤を個体に投与する工程を、さらに含む。さらなる一態様において、医薬は、個体に有効量の医薬を投与する工程を含む個体における処置方法において使用するための医薬である。上記の態様のいずれにおいても「個体」はヒトでありうる。40

【0201】

さらなる一局面において、本発明は、疾患を処置するための方法を提供する。一態様において、本方法は、有効量の、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体を、そのような疾患を有する個体に投与する工程を含む。そのような一態様において、本方法は、有効量の少なくとも1つの追加治療剤を個体に投与する工程を、さらに含む。上記の態様のいずれにおいても「個体」はヒトでありうる。50

【0202】

さらなる一局面において、本方法は、例えば上記の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体のいずれかを含む薬学的製剤を提供する。一態様において、薬学的製剤は、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体のいずれかと薬学的に許容される担体とを含む。もう一つの態様において、薬学的製剤は、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体のいずれかと、少なくとも1つの追加治療剤とを含む。

【0203】

本発明の抗体は、単独で、または他の作用物質と組み合わせて、治療に使用することができる。例えば本発明の抗体は、少なくとも1つの追加治療剤と共に投与しうる。

10

【0204】

上記のそのような併用療法は、併用投与（この場合は2つ以上の治療剤が同じ製剤または別個の製剤に含まれている）を包含すると共に、個別投与も包含し、その場合は、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体の投与を、1種または複数種の追加治療剤の投与の前に、1種または複数種の追加治療剤の投与と同時に、および/または1種または複数種の追加治療剤の投与の後に、行うことができる。一態様において、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体の投与と追加治療剤の投与は、互いに約1ヶ月以内、または約1、2もしくは3週間以内、または約1、2、3、4、5もしくは6日以内に行われる。本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体は、放射線治療と組み合わせて使用することもできる。

20

【0205】

本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体（および任意の追加治療剤）は、非経口投与、肺内投与および鼻腔内投与、そして局所処置にとって望ましい場合は、病巣内投与を含む、任意の適切な手段によって投与することができる。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内または皮下投与が挙げられる。投薬は、投与が短期間であるか慢性的であるかにも一部依存して、任意の適切な経路で、例えば静脈内注射または皮下注射などの注射によって、行うことができる。限定するわけではないが、単回投与、またはさまざまな時点にわたる複数回投与、ボーラス投与およびパルス注入を含む、さまざまな投薬スケジュールが、ここでは考えられる。

30

【0206】

本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体は、優良医療規範（good medical practice）に合致する方法で処方され、調合され、投与されるであろう。この文脈において考慮すべき因子としては、処置される特定障害、処置される特定哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、作用物質の送達部位、投与の方法、投与のスケジューリング、および医療従事者に公知の他の因子が挙げられる。抗体は、問題の障害を防止または処置するために現在使用されている1種または複数種の作用物質と共に製剤化する必要があるわけではないが、任意でそのようにしてもよい。そのような他の作用物質の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または処置のタイプ、および上で述べた他の因子に依存する。これらは、一般に、上述したものと同じ投薬量および投与経路で使用されるか、本明細書に記載する投薬量の約1~99%で、または実験的/臨床的に適当であると決定された任意の投薬量および任意の経路で使用される。

40

【0207】

疾患の防止または処置に関して、本明細書に記載する方法のいずれかで修飾された抗体の適当な投薬量（単独で使用する場合、または1つもしくは複数の他の追加治療剤と併用する場合）は、処置すべき疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体を防止のために投与するのか治療のために投与するのか、治療歴、患者の病歴および抗体に対する応答、ならびに担当医の裁量に依存することになる。抗体は、患者に1回で、または一連の処置で、適切に投与される。疾患のタイプおよび重症度に応じて、例えば1回または複数回の独立した投与によるか、または持続注入によるかを問わず、約1 μ g/kg ~ 15mg/kg（例えば0.5mg/kg ~ 10mg/kg）の抗体を、患者に投与するための初回候補投薬量と

50

することができる。典型的な1日量は、上述の因子に依存して約1 μ g/kgから100mg/kgまたはそれ以上に及びうる。数日またはそれ以上にわたる反復投与の場合、状態に依存して、処置は一般に、疾患症状の所望の抑制が起こるまで、継続されるであろう。抗体の例示的投薬量の一つは約0.05mg/kg～約10mg/kgの範囲にあるだろう。したがって約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kgもしくは10mg/kg（またはそれらの任意の組み合わせ）の1つまたは複数の用量を患者に投与することができる。そのような用量は（例えば患者が抗体の投与を約2回～約20回、または例えば約6回受けることになるように）間欠的に、例えば毎週または3週ごとに投与することができる。高用量の初回負荷量を投与した後に、それより低い用量を1回または複数回投与してもよい。ただし他の投薬レジメンも役立つ。この治療の進行は、従来の技法およびアッセイによって容易にモニタリングされる。

10

【0208】

本明細書において言及した特許、特許出願および刊行物の開示はいずれも皆、ここに、参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。

【0209】

以下の実施例は本発明の理解を助けるために提供されるものであり、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載される。記載した手順には、本発明の要旨から逸脱することなく、変更を加えることができると理解される。

【実施例】

【0210】

材料

20

GaIT反応溶液 (5mM MnCl₂、10mM UDP-Gal、100mM MES、0.05mg/ml GaIT、pH6.5) :

153mgのUDP-Gal (MW = 610.27g/mol)

32mgのMnCl₂ (MW = 125.84g/mol)

460 μ LのGaIT (c = 5.43mg/mL; 10 μ g/2mg抗体 300 μ L中に10 μ g = 0.033mg/ml)

100mM MES緩衝液pH6.5中

【0211】

ST6反応溶液 (0.1mM ZnCl₂、200nM AP、50mM MES、1.7mg/ml CMP-NANA、0.7mg/ml ST6、pH6.5) :

50 μ LのZnCl (100mM溶液: 1mLの50mM MES中に13.6mg)

28 μ Lのアルカリホスファターゼ (AP) (c = 20mg/mL、MW = 56,000g/mol)

30

167mgのCMP-NANA (1000 μ g/2mg抗体 300 μ Lあたり1000 μ g = 3.34mg/mL)

6mLのST6 (c = 5.45mg/mL、目標: 300 μ L (2mg AK) 中に200 μ g = 0.67mg/mL)

50mM MES緩衝液pH6.5中

【0212】

緩衝液:

再生緩衝液1 (0.1Mリン酸)

再生緩衝液2 (3Mグアニジン-HCl)

平衡化緩衝液 (25mM Tris、25mM NaCl、5mM EDTA、pH7.1)

洗浄緩衝液1 (100mM MES、pH6.5) : 1000mLのH₂O中に21.3mgのMES、pH6.5 (50% (w/v))

NaOHで調節)

40

洗浄緩衝液2 (1M Tris、pH7.2)

洗浄緩衝液3 (50mM MES、pH6.5) : 洗浄緩衝液100mM MESを蒸留H₂Oと1:1

溶出緩衝液Kappa select (0.1Mグリシン、pH2.7) : 100mLのH₂O中に750mgのグリシン、pH2.7 (25% (w/v) HClで調節)

溶出緩衝液プロテインA (25mM Na-クエン酸、pH2.8)

【0213】

実施例1

オンカラムでのバルク材料のガラクトシル化

・2カラム体積の再生緩衝液1、10カラム体積の平衡化緩衝液および4カラム体積の洗浄緩衝液1を適用することによって、プロテインAカラムまたはKappa selectカラムを再生し

50

、平衡化し、洗浄する。

- ・2mgのIgG(バルク材料)をカラムに適用する。
- ・10カラム体積の洗浄緩衝液1で洗浄する。
- ・2mLのガラクトシル化反応溶液(0.033mg/ml GALTを含有)を適用し、0.8mLを流す。
- ・それぞれ25でインキュベーションする(2、7または24時間)。
- ・8カラム体積の洗浄緩衝液1で洗浄する。
- ・各溶出緩衝液(プロテインAの場合は2カラム体積、kappa selectの場合は8カラム体積)で溶出させ、pH調節には1M Tris緩衝液(pH9.0)を使用する。

【0214】

実施例2

10

オンカラム(プロテインA)でのIgG1バルク材料のシアリル化

- ・2カラム体積の再生緩衝液1、10カラム体積の平衡化緩衝液および10カラム体積の洗浄緩衝液3を適用することによって、プロテインAカラムを再生し、平衡化し、洗浄する。
- ・2mgのIgG(バルク材料)をカラムに適用する。
- ・2mLのシアリル化反応溶液(3.3mg/mlのCMP-NANA、±AP)を適用し、0.8mLを流す。
- ・37(2、7、24または48時間)および25(48時間)でそれぞれインキュベーションする。
- ・4カラム体積の洗浄緩衝液3で洗浄する。

・2カラム体積の溶出緩衝液プロテインA(クエン酸ナトリウム)で溶出させ、pH調節には1M Tris緩衝液(pH9.0)を使用する。

20

【0215】

オンカラム(Kappa select)でのIgG1バルク材料のシアリル化

- ・2カラム体積の平衡化緩衝液、3カラム体積の再生緩衝液2、4カラム体積の平衡化緩衝液および2カラム体積の洗浄緩衝液3を適用することによって、Kappa Selectカラムを再生し、平衡化し、洗浄する。

- ・2mgのIgG(バルク材料)をカラムに適用する。
- ・3カラム体積の洗浄緩衝液3で洗浄する。
- ・2mLのシアリル化反応溶液(3.3mg/mlのCMP-NANA、±AP)を適用し、0.8mLを流す。
- ・37(2、7および24時間)および25(24時間)でそれぞれインキュベーションする。
- ・3カラム体積の洗浄緩衝液3で洗浄する。
- ・8カラム体積の溶出緩衝液Kappa selectで溶出させ、pH調節には1M Tris緩衝液(pH9.0)を使用する。

30

【0216】

実施例3

細胞培養上清の逐次的なガラクトシル化およびシアリル化

- ・2カラム体積の再生緩衝液1および10カラム体積の平衡化緩衝液を適用することによって、プロテインAカラムまたはKappa selectカラムを再生し、平衡化する。

- ・1mgのIgG(上清中)をカラムに適用する。
- ・10カラム体積の平衡化緩衝液、次に2カラム体積の洗浄緩衝液2および6カラム体積の洗浄緩衝液1で洗浄する。
- ・2mLのガラクトシル化反応溶液を適用し、0.8mLを流す。
- ・25で(十分なガラクトシル化が可能なように)約6~24時間インキュベーションする。

40

- ・8カラム体積の洗浄緩衝液1、10カラム体積の平衡化緩衝液、2カラム体積の洗浄緩衝液2および6カラム体積の洗浄緩衝液3で洗浄する。
- ・2mLのシアリル化反応溶液を適用し、0.8mLを流す。
- ・インキュベーションする(例えば25でそれぞれ2、7もしくは24時間またはそれ以上)。
- ・8カラム体積の洗浄緩衝液1で洗浄する。

50

- 各溶出緩衝液（プロテインAの場合は2カラム体積、Kappa selectの場合は8カラム体積）で溶出させ、pH調節には1M Tris緩衝液（pH9.0）を使用する。

【0217】

実施例4

バルク材料の逐次的なガラクトシル化およびシアリル化

- 2カラム体積の再生緩衝液1、10カラム体積の平衡化緩衝液および4カラム体積の洗浄緩衝液1を適用することによって、プロテインAカラムまたはKappa Selectカラムを再生し、平衡化し、洗浄する。

- 1mgのIgG（バルク材料）をカラムに適用する。
- 10カラム体積の洗浄緩衝液1で洗浄する。
- 2mLのガラクトシル化反応溶液を適用し、0.8mLを流す。
- 25で（十分なガラクトシル化が可能なように）約6～24時間インキュベーションする。
- 8カラム体積の洗浄緩衝液1、10カラム体積の平衡化緩衝液、2カラム体積の洗浄緩衝液2および6カラム体積の洗浄緩衝液3で洗浄する。
- 2mLのシアリル化反応溶液を適用し、0.8mLを流す。
- インキュベーションする（例えば25でそれぞれ2、7もしくは24時間またはそれ以上）。
- 8カラム体積の洗浄緩衝液1で洗浄する。
- 各溶出緩衝液（プロテインAの場合は2カラム体積、Kappa selectの場合は8カラム体積）で溶出させ、pH調節には1M Tris緩衝液（pH9.0）を使用する。

【配列表】

0006850351000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 12 N 15/13 (2006.01) C 12 N 15/13

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 ファルケンシュタイン ローベルト
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 ヴァルフ ハイコ
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 マリク ゼバストイアン
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 トマン マルコ
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 フライヘル フォン ロマン マティアス
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 グリューナート イングリッド
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 ドルン ローラント
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー
 (72)発明者 ヒンガー ミヒヤエル
 ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク ノンネンヴァルト 2 ケア オブ ロシュ ダ
 イアグノスティックス ゲーエムベーハー

審査官 西垣 歩美

(56)参考文献 国際公開第2015/123754 (WO, A1)
 特表2013-500002 (JP, A)

特表2006-520187 (JP, A)

Chin-Wei Lin, A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions, PNAS, 2015年, vol.112,no.34, p.10611-10616

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 P	2 1 / 0 8
C 12 N	1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
A 61 K	3 9 / 3 9 5
C 07 K	1 / 1 1 3
C 07 K	1 / 2 2
C 07 K	1 6 / 0 0