(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5767779号
(P5767779)

(45)発行日　平成27年8月19日(2015.8.19)　(24)登録日　平成27年6月26日(2015.6.26)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18	
C12N 5/078	(2010.01)	C12N	5/00	202J

請求項の数 22　(全 126 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2009-527066 (P2009-527066)
(86)(22)出願日	平成19年9月10日 (2007.9.10)
(65)公表番号	特表2010-502204 (P2010-502204A)
(43)公表日	平成22年1月28日 (2010.1.28)
(86)国際出願番号	PCT/EP2007/007877
(87)国際公開番号	WO2008/028686
(87)国際公開日	平成20年3月13日 (2008.3.13)
審査請求日	平成22年9月1日 (2010.9.1)
(31)優先権主張番号	06090162.6
(32)優先日	平成18年9月10日 (2006.9.10)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号	06090171.7
(32)優先日	平成18年9月18日 (2006.9.18)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73)特許権者　509067887
グリコトープ　ゲーエムベーハー
ドイツ国　１３１２５　ベルリン，　ロベルト－ロスレ－シュトラーセ　１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ゴレツ，　シュテファン
ドイツ国　１６５４８　グリーニケ－ノルトバン，　アイヒホルンシュトラーセ　２４
(72)発明者　ダニエルチク，　アンチェ
ドイツ国　１６３４１　パンケタル，　ゴンタルトシュトラーセ　１１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体の発現のための骨髄白血病起源のヒト細胞の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

タンパク質分子組成物を産生させる方法であって、

（ａ）不死化ヒト血液細胞である宿主細胞内に、前記タンパク質の少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；

（ｂ）前記宿主細胞を前記タンパク質分子組成物の産生を許容する条件下で培養すること；ならびに

（ｃ）前記タンパク質分子組成物を単離すること

を含み、

ここで、前記宿主細胞は、以下の特徴的グリコシル化：

（ｉ）ＮｅｕＧｃを含まない；

（ｉｉ）α２－６結合ＮｅｕＮＡｃを含む；

（ｉｉｉ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された前記少なくとも１つの核酸によってコードされる同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも１５％多い量のＮｅｕＮＡｃによる、増大したシアリル化度を有する；

を有するタンパク質分子組成物を産生するように選択され、

ここで、前記宿主細胞が、ＮＭ-Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］、ＮＭ-Ｈ９Ｄ８

－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、および、これらに由来する細胞または細胞株からなる群から選択される、方法。

【請求項２】

前記宿主細胞が、以下の特徴：

（ｉ）末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌを含まない；

（ｉｉ）前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも２％の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する；

（ｉｉｉ）前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも５％の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する；

ならびに／あるいは

（ｉｖ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％多い量のＮｅｕＮＡｃによる、増大したシアリル化度を有する；ならびに／あるいは

（ｖ）前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも５０％の糖鎖構造を含み、フコースがない；ならびに／あるいは

（ｖｉ）ＮＭ－Ｆ９細胞またはＮＭ－Ｄ４細胞で達成されるものより高いシアリル化度を有し、ここで、前記ＮＭ－Ｆ９細胞または前記ＮＭ－Ｄ４細胞において、前記宿主細胞で得られるシアリル化度の５０％～６０％しか達成されない；

のうちの少なくとも１つを有するタンパク質分子組成物を産生するように選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記宿主細胞は、以下の特徴的グリコシル化：

（ｉ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて増大したガラクトシル化度を有する；および／または

（ｉｉ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％多いＧ２構造量を有する；および／または

（ｉｉｉ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないＧ０構造量を有する；および／または

（ｉｖ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質

分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないフコース量を含む；および／または

（ｖ）前記細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物のシアリル化パターンと比べて改変されたシアリル化パターンを有する、

の少なくとも１つを有するタンパク質組成物が産生されるように選択され、かつここで、前記タンパク質分子は特徴的グリコシル化（ｉ）～（ｖ）の少なくとも１つを有する、タンパク質分子組成物を産生させるための請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

前記シアリル化パターンが、以下の特徴：

－前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％多い量のＮｅｕＮＡｃによる、増大したシアリル化度を有する、および／または

－前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％多く含まれる、

の少なくとも１つを特徴とする、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

前記宿主細胞が、

－前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも１０％の糖鎖構造を含み、フコースがない、および／または

－前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも５％の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する糖鎖構造を含む、および／または

－前記タンパク質分子組成物中の糖鎖構造全体またはそのうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、３５％より多くのＧ２構造を含む；および／または

－前記タンパク質分子組成物中の糖鎖構造全体またはそのうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、２２％未満のＧ０構造を含む

糖タンパク質が産生されるように選択される、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項６】

産生される前記タンパク質分子組成物が、以下の特徴：

－特に細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて増大した活性および／または増大した収率を有する；

－特に細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて改善された均一性を有する；

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％高い平均または最大収率の増大を有する；および／または

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて改善されたグリコシル化の均一性である改善された均一性を有する；
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて増大した活性を有する；
－前記タンパク質分子が抗体分子である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する；および／または
－前記タンパク質分子が抗体分子である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の結合よりも少なくとも１５％大きい抗原媒介性またはＦｃ媒介性結合の増大を有する
の少なくとも１つを有する、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記宿主細胞が、以下の特徴的なグリコシル化の組合せ：
（ａ）
－ＮｅｕＧｃが含まれない
－Ｇａｌα１－３Ｇａｌが含まれない
－請求項３に記載のガラクトシル化パターンが含まれる
－請求項３に記載のフコース含量を有する
－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子のタンパク質組成物と比べて、または、前記シアリル化のない細胞株であるＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］もしくはＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］と比べて増加した量のシアル酸が含まれる；
（ｂ）
－ＮｅｕＧｃが含まれない
－Ｇａｌα１－３Ｇａｌが含まれない
－請求項３に記載のガラクトシル化パターンが含まれる
－請求項３に記載のフコース含量を有する
－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる
－２－６　ＮｅｕＮＡｃが含まれる
を有するタンパク質分子を含むタンパク質組成物が産生されるように選択される、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸が前記宿主細胞内に導入され、かつ前記宿主細胞が前記葉酸代謝拮抗薬とともに培養され、ここで、前記葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸が、配列番号１～９からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記葉酸代謝拮抗薬がメトトレキサートである、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記タンパク質が、サイトカインおよびその受容体の群；レニン；ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；α－１－抗トリプシン；インスリンＡ－鎖およびＢ－鎖；ゴナドトロピン；カルシトニン；グルカゴン；凝固因子；抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；プラスミノゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血増殖因子

；エンケファリナーゼ；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質；血清アルブミン；ミュラー阻害物質；レラキシンＡ－鎖およびＢ－鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；血管内皮増殖因子；ホルモンまたは増殖因子の受容体；インテグリン；プロテインＡおよびＤ；リウマチ因子；神経栄養因子；血小板由来増殖因子；線維芽細胞増殖因子；上皮増殖因子；トランスホーミング増殖因子；インスリン様増殖因子－Ｉおよび－ＩＩ；インスリン様増殖因子結合タンパク質；ＣＤタンパク質；エリトロポイエチン（ＥＰＯ）；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形成タンパク質；インターフェロン；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）；インターロイキン（ＩＬ）；スーパーオキシドジスムターゼ；Ｔ細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；抗体およびイムノアドヘシン；グリコホリンＡ；ＭＵＣ１からなる群より選択される、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】

前記タンパク質が、腫瘍壊死因子ＴＮＦ－αおよびＴＮＦ－β、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、サイロトロピン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈＣＧ）、第ＶＩＩＩＣ因子、第ＩＸ因子、第ＶＩＩ因子、組織因子、フォン・ビルブラント因子、プロテインＣ、ウロキナーゼ、ヒト尿および組織型プラスミノゲン活性化因子、ヒト血清アルブミン、骨由来神経栄養因子、ニューロトロフィン－３、ニューロトロフィン－４、ニューロトロフィン－５、ニューロトロフィン－６、神経成長因子－β、ＴＧＦ－α、ＴＧＦ－β、ＣＤ－３、ＣＤ－４、ＣＤ－８、ＣＤ－１９、インターフェロン－α、インターフェロン－β、インターフェロン－γ、Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ならびに、ＩＬ－１～ＩＬ－１２からなる群より選択される、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

前記タンパク質が抗体またはその断片である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３】

前記抗体が、ガングリオシドＧＤ３に対する抗体、ヒトインターロイキン－５受容体α鎖に対する抗体、ＨＥＲ２に対する抗体、ＣＣケモカイン受容体４に対する抗体、ＣＤ２０に対する抗体、ＣＤ２２に対する抗体、神経芽腫に対する抗体、ＭＵＣ１に対する抗体、および、上皮増殖因子受容体に対する抗体からなる群より選択される抗体である、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記抗体が、ＰａｎｋｏＭａｂ、ムロモナブ、ダクリズマブ、バシリキシマブ、アブシキシマブ、リツキシマブ、ハーセプチン、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、イブリツモマブ、セツキシマブ、ベバシズマブ、トシツモマブ、パブリズマブ、インフリキシマブ、エクリズマブ、エプラツズマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、アダリムマブ、カンパス－１Ｈ、Ｃ２Ｂ８、パノレックス、ブレバレックス、シムレクト、アントバ、ＯＫＴ３、ゼナパックス、レオプロ、シナジス、オスタビル、プロトビル、オバレックス、ビタキシン、抗ＣＣケモカイン受容体４抗体ＫＭ２１６０、および抗神経芽腫抗体ｃｈＣＥ７からなる群より選択される抗体である、請求項１２に記載の方法。

【請求項１５】

前記抗体が、ＭＵＣ１に対する抗体；ＨＥＲ２に対する抗体；および、ＥＧＦＲに対する抗体からなる群より選択される、請求項１２～１４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１６】

前記抗体が、ＰａｎｋｏＭａｂ、Ｐａｎｋｏ　１、Ｐａｎｋｏ　２、ハーセプチン、および、セツキシマブからなる群より選択される、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

（ｉ）前記タンパク質を、別のペプチドまたはポリペプチド配列に融合させるか；あるいは

（ｉｉ）前記タンパク質が、別のタンパク質配列に融合した抗体断片であるか；あるいは

（ｉｉｉ）前記タンパク質が、治療効果を媒介するエフェクター分子にカップリングさ

せた抗体または抗体断片である、
請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
（ｉ）前記タンパク質を、リンカー、活性化分子、および、毒素からなる群より選択される別のペプチドまたはポリペプチド配列に融合させるか；あるいは
（ｉｉ）前記タンパク質が、サイトカイン、共起刺激因子、毒素、他の抗体由来の抗体断片、多量体化配列、および、検出、精製、分泌または安定化のための配列からなる群より選択される別のタンパク質配列に融合した抗体断片であるか；あるいは
（ｉｉｉ）前記タンパク質が、免疫エフェクター分子、毒素、および、放射性同位体からなる群より選択される、治療効果を媒介するエフェクター分子にカップリングさせた抗体または抗体断片である、
請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
宿主細胞を、以下の特徴的グリコシル化：
（ｉ）ＮｅｕＧｃが含まれない；
（ｉｉ）末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌを含まない；
（ｉｉｉ）前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも２％の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する；
（ｉｖ）α２－６結合ＮｅｕＮＡｃを含む；かつ
（ｖ）前記細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも１５％多い量のＮｅｕＮＡｃによる、増大したシアリル化度を有する；
を有するタンパク質組成物の産生に関して、
以下の工程
（ａ）相違するグリコシル化パターンをもたらす少なくとも２種類の異なる宿主細胞内に、タンパク質またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；ここで、前記宿主細胞の少なくとも１種類は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、および、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］からなる群より選択される不死化ヒト血液細胞である、
（ｂ）前記少なくとも２種類の異なる宿主細胞を培養すること、ここで、異なる各宿主細胞は、その他の宿主細胞によってもたらされるグリコシル化パターンと相違するグリコシル化パターンを有するタンパク質組成物を産生する；
（ｃ）前記少なくとも２種類の異なる宿主細胞と異なるグリコシル化パターンを有する前記発現されたタンパク質組成物を単離すること；および
（ｄ）（ｉ）～（ｖ）に規定した特徴的グリコシル化を有するタンパク質組成物を産生する前記宿主細胞を選択すること
によって選択するための方法。
【請求項２０】
ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、および、それらに由来する細胞もしくは細胞株からなる群より選択される、不死化ヒト血液細胞。
【請求項２１】
タンパク質分子または少なくともその一部分をコードする少なくとも１つの核酸を含む、請求項２０に記載の不死化ヒト血液細胞の、前記タンパク質または前記その一部分を産生

するための、使用。
【請求項２２】
タンパク質分子組成物を産生させるための方法であって、
（ａ）不死化ヒト血液細胞である宿主細胞内に、前記タンパク質の少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；
（ｂ）前記宿主細胞を前記タンパク質分子組成物の産生を許容する条件下で培養すること；ならびに
（ｃ）前記タンパク質分子組成物を単離すること；
を含み、
ここで、前記宿主細胞が、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８５６］またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株からなる群より選択される、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
概要
本発明は、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有するタンパク質分子組成物、特に抗体分子組成物の産生のための生物工学的に有利な方法、ならびにヒトグリコシル化を提供する。さらに、本発明は、新規な宿主細胞、核酸、およびタンパク質分子組成物を提供する。
【背景技術】
【０００２】
序
当業界の重要な主要点および努力目標は組換えタンパク質の作製であり、生産性、コスト、均一性、およびタンパク質活性は、最適化の余地がある重要な課題である。また、グリコシル化も、均一な組換え糖タンパク質の高収率作製における重要な課題であるが、かかるタンパク質の作製に一連の大きな問題点を課す。現在使用されている各産生細胞株は、異なる一連の努力目標および問題点（これは、主として、グリコシル化の複雑性ならびに種、組織および部位特異性による）をもたらす。したがって、グリコシル化に関する産生系の最適化は、最適化の余地がある重要な側面の１つである。これは、特に、多くの場合、グリコシル化パターンの違いが、そのタンパク質分子の活性、免疫原性、バイオアベイラビリティおよび半減期に相当な影響を及ぼすためである。種々の種に由来する種々の細胞株および非哺乳動物産生系のグリコシル化の性質の概要の詳細は、Ｊｅｎｋｉｎｓら（Ｇｅｔｔｉｎｇ　ｔｈｅ　ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｒｉｇｈｔ：ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｉｎｄｕｓｔｒｙ，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９６，１４：９７５－９８１）に示されている。
【０００３】
抗体は、診断および研究用の主要なツールであり、おそらく、治療剤のうちで最も大きな群となっている。１０種類を超える組換え抗体治療剤が市販されており、数百種類が臨床開発中である。当業界の重要な主要点および努力目標は、組換え抗体（「ｒＭＡｂ」）の作製であり、生産性、コスト、均一性および抗体活性は、最適化の余地がある重要な課題である。市販のほぼすべての治療用ｒＭＡｂは、ハムスター（ＣＨＯ）およびマウス（ＮＳ０またはＳｐ２／０）由来の齧歯類細胞株において産生させたものである。開発においてｒＭＡＢの圧倒的大多数は齧歯類細胞で産生させており、一部は開発中であるが、いずれも、生産性、コスト、均一性および抗体活性の最適化に充分でない。
【０００４】
また、グリコシル化も均一で効力のあるｒＭＡｂの高収率作製における重要な課題であるが、ｒＭＡｂの作製に一連の大きな問題点を課す。現在使用されている各産生細胞株は、異なる一連の努力目標および問題点（これは、主として、グリコシル化の複雑性ならび

に種、組織および部位特異性による）をもたらす［概説：非特許文献１］。
【０００５】
したがって、グリコシル化に関するタンパク質産生系の最適化、特に抗体産生系の最適化は、最適化の余地がある重要な側面の１つである。
【０００６】
本発明は、不死化ヒト血液細胞系、特に、骨髄性白血病起源の細胞系の新たな発現系を提供する。このような細胞では、驚くべきことに、活性、収率および／または均一性に関して、グリコシル化されたタンパク質、特に抗体の産生が改善される。
【０００７】
背景技術
タンパク質は、その機能および存在度が互いに大きく異なる多様性のある一群である。潜在的に治療用のタンパク質のうち、ほとんどのタンパク質はグリコシル化されたものであり、例えば、多くのホルモン（例えば、成長ホルモン、グリカゴン、ＦＳＨおよびＬＨ）、増殖因子（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＶＥＧＦおよびエリトロポイエチン）、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－７、インターフェロン－αおよび－β、ＴＮＦ－α）、抗凝血剤（ｃｏａｇｕｌａｎｔｉａ）（例えば、Ｌｅｐｉｒｕｄｉｎ、Ｄｅｓｉｒｕｄｉｎ）、血液凝固因子（例えば、第ＶＩＩ因子、第ＶＩＩＩ因子および第ＩＸ因子）、ワクチン（例えば、Ｂ型肝炎抗原）ならびに抗体などである。確立された細胞産生系は、元々のヒトグリコシル化を有するタンパク質を産生することができない。原核生物（例えば、細菌）ならびにほとんどの真核生物の細胞系（例えば、酵母、昆虫および植物細胞）は、グリコシル化がないタンパク質、またはヒト糖鎖と大きく異なるグリカンを有するタンパク質を合成する。チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞は、一般的に使用されている産生系であり、ヒト細胞と同様の様式でタンパク質をグリコシル化することができる。しかしながら、依然として、例えばガラクトシル化、フコシル化、Ｎ－アセチルグルコサミンによる具体的なグリコシル化、および特にシアリル化の種々の側面に重要な違いがある。このような違いは、活性、バイオアベイラビリティ、免疫原性および半減期に影響を及ぼす。
【０００８】
このような産生系が確立された当時は、少なくともある程度活性な治療用タンパク質を産生するのに充分であった。しかしながら、現在では、（ｉ）治療用タンパク質の適用投与の回数および濃度を低減する、（ｉｉ）治療コストを削減する、および（ｉｉｉ）副作用を低減する目的で、治療用タンパク質の活性の改善に多大な労力が注がれている。
【０００９】
タンパク質の生物活性を改善するための主なストラテジーは、血清半減期を長くし、したがってバイオアベイラビリティを長期化することである。これは、例えば、産生されたタンパク質に特定のある形態のポリエチレングリコールを化学的に付加／連結させるペグ化と称するプロセスによって行なわれ得る。ＰＥＧによって分子量が増大し、したがって血清半減期が増大する。しかしながら、このプロセスは、いくつかの問題点を伴う。例えば、ほぼすべての場合で、ペグ化により、その細胞エフェクター機能によってタンパク質の活性が低下し、ヒトにおける反復投与では多くの場合、有害な免疫応答が生じ、そのため、中和抗体および／または該産生プロセスにはさらなる化学修飾が必要とされ、多工程プロセスとなり、追加コスト、時間のロスを伴う。同様の担体系（例えば、ＨＥＳ化またはアルブミンの結合）が存在するが、類似の欠点を有する
また、糖鎖の修飾、したがってタンパク質のグリコシル化は、組換え発現タンパク質の血清半減期を改善するためである。そのため、当該技術は、組換え糖タンパク質のシアリル化度の最大化に焦点をあてたものである。シアル酸は、真核生物細胞の表面上で最もよく見られる末端単糖であり、一般的に、糖タンパク質が多くシアリル化されているほど、その循環中の血清半減期が長くなると考えられている。これは、循環中の非シアリル化タンパク質に結合し、これを細胞に指向して分解させる肝臓内のアシアロタンパク質受容体としてのある種の受容体の存在に基づく。

【００１０】
ヒトおよびほとんどの哺乳動物には、種々のクラスの抗体、すなわち、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤが存在している。すべての抗体クラスの分子が診断確定において、または研究ツールとして使用されるが、市販および開発中の抗体系治療剤の大部分は、ＩｇＧと、程度は低いがＩｇＭである。ヒトＩｇＧクラスは、４つのサブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４にさらに分類される。ＩｇＧ分子の基本構造は、２つのＦａｂ領域（それぞれ、抗原結合部位を含む１つの可変ドメインを含む）と１つの定常ドメインとを含む２つの軽鎖と２つの重鎖からなり、１つのＦｃ領域はさらに、定常ドメインとリガンドに対する相互作用部位とを含み、フレキシブルヒンジ領域によりＦａｂ領域とＦｃ領域が連結されている。抗体は、完全体の分子として存在していてもよく、ＦａｂまたはＦａｂ断片またはリンカーによって連結された重鎖と軽鎖の２つの可変領域を含む単鎖Ｆｖなどの抗体断片として存在していてもよい。図１８はＩｇＧ抗体を示す。

【００１１】
治療的使用のための組換え抗体は、免疫原性を低減するために、たいていキメラ、ヒト化またはいわゆる完全ヒトタンパク質配列である。しかしながら、真に完全ヒト分子は容易に得られていない。それは、齧歯類またはＣＨＯ細胞内での産生により特にグリコシル化などの翻訳後修飾がヒト由来でなく、したがってヒト血清中のヒト抗体において見られる修飾とは異なり得るためである。修飾、特にグリコシル化パターンの違いは、それぞれに産生される抗体の活性および免疫原性に深刻な影響を及ぼし得る。

【００１２】
抗体の活性は、複数の効果の組合せによるものであり得、該組合せによって影響され得る。一方において、抗体は、Ｆａｂ領域に存在するその抗体の可変領域（「Ｖ領域」）の特定の配列ＣＤＲ領域によって媒介される一定の特異性を有する。これは、抗体の具体的な特異性および親和性の決定において重要な役割を果たす。したがって、Ｖ領域は、エピトープ結合特性に決定的であり、抗体ごとに異なる。抗体の親和性は、抗体の単一の結合領域のそのエピトープに対する結合の強度および反応速度論を示す。種々のクラスおよびサブクラスの抗体は、１つの抗体分子内に２～１０個の同一の可変領域を有するため、抗体の結合の強度および反応速度論は、標的抗原または細胞上のエピトープに対する結合に利用可能な結合部位の数および該エピトープの到達可能性に影響され、そのアビディティで示される。

【００１３】
診断、特に治療における使用のための抗体の特質の別の重要な要素は、その標的構造または細胞上の抗体結合部位の数ならびにそのインターナリゼーション速度である。このような特質は、特に治療における使用に対する抗体の効果と適性に影響する。

【００１４】
他方において、抗体の治療的使用に関連するエフェクター機構は数種類あり、そのため、一部の抗体は１つの機構によってのみ作用し、別の抗体は種々のエフェクター機構の組合せによって作用する。ストラテジーの一例は、抗体または抗体断片を、治療効果を媒介するエフェクター分子にカップリングさせること、例えば、免疫系を漸増させるための免疫エフェクター分子、例えばインターロイキン２へのカップリング、または例えば抗腫瘍治療のために標的細胞を死滅させるための毒素もしくは放射性同位体へのカップリングなどである。放射性標識抗体または抗体断片もまた、インビボ診断に有益である。

【００１５】
他のストラテジーは、毒性学的性質が低い、複雑なロジスティックが少ない、天然免疫エフェクターアームの使用、またはさらなるエフェクター分子の必要性なく治療効果が誘発されるなどの重要な利点を有し得る非標識の、いわゆる「裸の」抗体を使用することである。抗体の活性機構および作用様式を解明するため、ならびにこのような活性を利用する抗体を開発するために、多くの研究が行なわれている。中でも、最も重要な活性および効果は、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（本明細書において「ＡＤＣＣ活性」という）、補体依存性細胞傷害活性（本明細書において「ＣＤＣ活性」という）、食作用媒介型細胞

傷害活性（本明細書において「食作用活性」という）、異なる効果と活性の組全体を含む受容体媒介型活性（本明細書において「受容体媒介型活性」という）である。

【００１６】

受容体媒介型活性は、主に、標的細胞上の分子もしくは受容体への抗体の結合に基づくもの、または特定のある分子が標的細胞に結合するのを抑制し、この場合、この細胞に対して特定のある効果、例えば、アンタゴニスト活性もしくはアゴニスト活性を誘導または阻害することによるもの、または抗体の受容体ブロックにより、例えば、標的細胞のアポトーシスもしくは増殖の誘導もしくは阻害をもたらすことによるもの、または標的細胞における特定のある分子の分泌もしくは分泌の阻害をもたらすことによるもの、または特定のある他の受容体媒介性事象（分子と細胞もしくは細胞間の相互作用など）をブロックまたは誘発することによるものである。ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性および食作用活性は、抗体のＦｃ領域によって媒介される細胞傷害活性（本明細書において「Ｆｃ部分媒介型活性」という）であるが、抗体の受容体媒介型の活性、親和性、アビディティおよび特異性は、主に、抗体のＦａｂ領域に含まれる結合領域によって媒介される。

【００１７】

Ｆｃ部分媒介型活性は、免疫学的エフェクター細胞、例えば、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞および活性化マクロファージ、または種々の補体成分などにより、エフェクターリガンド、例えば、Ｆｃ－γＲＩ、Ｆｃ－γＲＩＩ、Ｆｃ－γＲＩＩＩ、補体のＣ１ｑ成分、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）などに結合することによって媒介される。ヒトＩｇＧ１サブクラスは、ヒトＩｇＧクラス分子の中で、最も高いＡＤＣＣおよびＣＤＣ活性を有することが報告されている。ＩｇＭでは、ＣＤＣ活性が優勢的なエフェクター機構である。ＡＤＣＣ活性およびＣＤＣ活性は、抗体のＦｃ領域、定常領域の、エフェクター細胞のＦｃ－受容体（Ｆｃ－γＲＩ、Ｆｃ－γＲＩＩ、Ｆｃ－γＲＩＩＩなど）またはＣ１ｑなどの補体成分への結合を伴う。重要なアミノ酸残基はヒンジ領域内、特に、定常領域の第２のドメイン（「Ｃγ２ドメイン」）内に存在する。Ｃγ２ドメインへの糖鎖結合は、該活性に重要である。糖鎖は、Ｃγ２のアミノ酸アスパラギン２９７（Ａｓｎ－２９７）に結合される（Ｎ－グリコシド結合糖鎖）。アスパラギンに結合する糖鎖末端は還元末端と称し、反対側の末端は非還元末端と称する。ＩｇＧ抗体のＦｃ領域は２つの糖鎖結合部位を有する。図１８は、ＩｇＧ分子の構造を示し、典型的には糖鎖構造が見られ得る位置を示す。さらに、このような糖鎖構造の化学構造および組成を説明する。

【００１８】

Ｆｃ部分媒介型活性より、２つのことが、抗体のグリコシル化によって影響されると想定される。抗体のＦｃ部分の糖鎖の除去により、ＣＤＣおよびＡＤＣＣ活性の消失がもたらされ、また、このようなＮ－グリカンのガラクトースの還元により、ＣＤＣ活性の低下が引き起こされることが示されている［Ｂｏｙｄら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，３２，１３１１，（１９９５）；ＵＳ６９４６２９２］。さらに、ラット細胞における抗体の発現では、該細胞内で発現させた特定のある抗体のＡＤＣＣ活性が、ハムスター細胞およびラット細胞において発現させた同じ抗体と比べて増大することが報告されている［Ｌｉｆｅｌｙら、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９９５　Ｄｅｃ；５（８）：８１３－２２；ＷＯ００／６１７３９］。両報告では、グリコシル化の変化によって、このような抗体のＡＤＣＣ活性の違いがもたらされたと想定されているが、これは明らかではない。Ｌｉｆｅｌｙら　１９９５では、バイセクトＮ－アセチルグルコサミン（「ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃ」）が抗体の増大したＡＤＣＣ活性の原因であると想定されており、一方、ＷＯ００／６１７３９では、Ｎ－グリカンの還元末端のＮ－アセチルグルコサミンに結合するフコースα１－６（「コア－フコース」）の劇的な減少が、増大したＡＤＣＣ活性の原因であると想定されている。さらに、ＣＨＯ細胞において、Ｎ－グリカンへの糖ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃの結合を担う酵素ＧｎＴＩＩＩの組換え発現により、この細胞で発現させたとき、ＧｎＴＩＩＩで組換えトランスフェクトされていないＣＨＯ細胞において発現させた同じ抗体と比べて、特定のある抗体の増大したＡＤＣＣ活性がもたらされることが報告されている［特許文献１、非特許文献１］。さらに、ＣＨＯ細胞において、コア－

フコースの欠損をもたらす遺伝子ＦＵＴ８のノックアウトにより、かかるＦＵＴ８　ＫＯＣＨＯ細胞において発現させた場合、特定のある抗体のＡＤＣＣ活性が増大され得ることが報告された［特許文献２］。この結果はまた、抗体の活性に対するグリコシル化パターンの重要性および複雑性を示す。

【００１９】

しかしながら、「外来の」、したがって最適化されていないグリコシル化パターンは、該活性に有害であり得るだけでなく、免疫原性でもあり得る。現在使用されているタンパク質、特に抗体の発現／産生系は、主に、齧歯類由来の細胞株であり、ハムスター、マウス、またはラット由来の細胞株系、例えば、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＮＳ０、Ｓｐ２／０およびＹＢ２／０などである。齧歯類細胞は、非至適条件下で、効力がないか、または免疫原性であるいくつかの異常にグリコシル化されたタンパク質産物を産生することがあり得ることが知られている。また、齧歯類細胞は、ヒト細胞において発現されるものと重要な違い（例えば、非ヒト糖鎖の存在、およびタンパク質をヒト細胞において発現可能にする特定のあるヒト糖鎖部分の欠如）を有し、例えば、免疫原性である、有効性が低い、収率が低いまたは構造的要件もしくはフォールディングが最適状態に及ばない糖鎖構造を発現することが知られている。ほとんどの齧歯類細胞は、例えば、ヒトには存在せず、ヒトにおいて免疫原性であるＮ－アセチルノイラミン酸（「ＮｅｕＮＡｃ」）および／または免疫原性ガラクトースα（１－３）ガラクトース修飾体（「Ｇａｌα１－３Ｇａｌ」）の代わりに、Ｎ－グリコリルノイラミン酸（「ＮｅｕＧｃ」）を発現する、および／または重要なα２－６結合ＮｅｕＮＡｃなどの重要な糖鎖が欠損しているか、あるいはｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが欠損している。また、他にも既知および未知の違いがある。さらに、齧歯類での産生から、グリコフォームプロフィールはたいてい不均一であり、また、クローン特異的グリコフォームプロフィール（これは、ＣＨＯ、ＮＳ０またはＳｐ２／０細胞においてクローンごとに大きく異なり得る）は、産生様式と培養条件に依存性であることがわかっている。

【００２０】

さらに、ヒト細胞、例えば、Ｈｅｋ　２９３細胞（これは、ヒト胚性腎臓細胞由来のものである）、または細胞系ＰｅｒＣ６（登録商標）（これは、単一のヒト網膜由来細胞由来のものであり、組換えＤＮＡ手法を用いて故意に不死化したものである）などが組み込まれた、タンパク質産生用の発現系が存在している。しかしながら、これらの細胞株は、多くの場合で非ヒト細胞系よりも好ましいが、それでもなお、いくつかの欠点を有する。これらは、それぞれの細胞のグリコシル化機構に起因する特有のグリコシル化パターンを有する。しかしながら、これらの細胞では、産生されるタンパク質によっては、例えば該タンパク質の活性および／または血清半減期に関して、最適化されたグリコシル化プロフィールがもたらされないことがあり得る。特に、これらの細胞では、一定のシアリル化度およびシアリル化パターンを得ることは困難である。例えば、当該分野の技術水準において既知の細胞系は、多くの場合、検出可能なα２－６結合シアリル化を提供できるものではないが、該シアリル化は血清半減期に重要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２１】

【特許文献１】米国特許第６，６０２，６８４号明細書
【特許文献２】米国特許第６，９４６，２９２号明細書

【非特許文献】

【００２２】

【非特許文献１】Ｒｏｙｓｔｏｎ　Ｊｅｆｆｅｒｉｓ，ＣＣＥ　ＩＸ：ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ；Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．２００５、２１，１１－１６
【非特許文献２】Ｕｍａｎａら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎ　１７：１７６－１８０（１９９９）

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２３】
このような実状から、依然として、代替型および／または改善された発現系を提供することにより、産生能、均一性および／または抗体活性がさらに最適化され得る発現／産生系の必要性が存在することが明らかになる。さらに、このような実状から、どの糖鎖構造、特にどのヒト糖鎖構造がタンパク質、特に抗体の活性または均一性を改善するのに最適であるか、およびタンパク質、特に抗体の活性を最適化するために細胞株、特にヒト細胞株がどのような種類のグリコシル化パターンをもたらすべきか言えないことも明らかになる。したがって、当該分野の技術水準において既知の発現系で得られる産物と比べると相違するグリコシル化パターンを有する産物が提供される発現系の必要性が存在する。
【課題を解決するための手段】
【００２４】
本発明は、ヒト不死化血液細胞株系、特に、骨髄性白血病起源の細胞系の新たな発現系を提供することにより、このような問題点に対する解決手段を提供する。不死化ヒト血液細胞の使用は、このような細胞により、異なる組織（例えば、腎臓または網膜）に由来する他の既知のヒト細胞系とは異なるグリコシル化プロフィールがもたらされるため、従来技術において知られた系と比べて好都合である。このような違いは、活性、均一性および産生物の収率に関して好都合であり得る。さらに、このような細胞は、無血清条件下でトランスフェクトおよび浮遊培養され得る。
【００２５】
したがって、第１の実施形態によれば、以下の工程：
（ａ）不死化ヒト血液細胞である宿主細胞内に、前記タンパク質の少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；
（ｂ）前記宿主細胞を前記タンパク質分子組成物の産生を許容する条件下で培養すること；および
（ｃ）前記タンパク質組成物を単離すること
を含む、タンパク質組成物を産生させる方法が提供される。
【００２６】
不死化ヒト血液細胞を利用するこの方法では、活性、収率および／または均一性に関してタンパク質、特に抗体の産生が改善される。このことは、これまで、不死化ヒト血液細胞、特に骨髄性白血病細胞がタンパク質の産生に適していること、特にそれぞれに性質が改善された抗体がもたらされることが示されていなかったため、驚くべきことである。ある種のラット白血病細胞が抗体の発現に使用されたが、ヒトとラットでは、グリコシル化機構が決定的に異なり、そのため、後者では、ヒトにおいて免疫原性であり得るＮｅｕＧｃおよびＧａｌα１－３Ｇａｌなどの糖鎖部分が発現されることがあり得る。ラットＹＢ２／０白血病細胞では、ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃの高存在度のため、またはコアーフコースの劇的な下方調節のため、高ＡＤＣＣ活性を有する抗体が生成されることが報告された。
【００２７】
該問題点が、不死化ヒト血液細胞、特に骨髄性細胞を使用する本発明によって解決され得たことは、骨髄性白血病細胞である細胞株Ｋ５６２がｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃに対する酵素を発現しない（ＧｎＴＩＩＩの遺伝子ハイブリダイゼーションによって報告され示された所見）ことが以前に報告されていた［Ｙｏｓｈｉｍｕｒａ　Ｍら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６（２）：４１２－８（１９９６）］が、コアーフコースの付加をもたらすフコシルトランスフェラーゼを発現する遺伝子ＦＵＴ８を発現する（ＲＴ－ＰＣＲによって示される）［実施例１］ため、さらにより驚くべきことであった。このことは、Ｋ５６２がレクチンＬＣＡに強く結合されるため（細胞がコアーフコシル化に対して陰性であるか、またはコアーフコシル化が強く下方調節されている根拠）レクチン処理に対して抵抗性でないことから、驚くべきことであった。Ｋ５６２細胞のグリコシル化プロフィールに関す

るこの情報のため、有利な活性パターンに必要なグリコシル化機構は存在しないと想定されたため、該細胞では、該細胞内で発現させた抗体の活性が改善され得ることは期待され得なかった。また、本発明の産生方法により、現在使用されている発現系の細胞と比べて、増大した結合活性、改善された均一性および／または高収率を有するタンパク質、特に抗体が生成および取得され得ることは驚くべきことであった。

【００２８】

本発明のストラテジーは、ヒト系にできるだけ近い翻訳後修飾の組全体を有し、したがってヒト系において免疫原性がないか低い、および／または活性が改善されたタンパク質産物がもたらされ得る系を得るために、適当なヒト細胞株を作製することである。その目的は、発現させる各タンパク質／抗体に対してオーダーメードのグリコシル化パターンを提供することである。

【００２９】

糖鎖構造が非常に複雑であり、細胞のグリコシル化機構は、その合成に関与する数百種の酵素で構成され、該酵素は、主に、種特異的および組織特異的に発現されるという実状のため、ヒトグリコシル化を達成するための本発明者らの主要なストラテジーは、最適化されたグリコシル化パターンを有するタンパク質、特に抗体を発現させるための生物工学的に好適なヒト発現系を提供することである。最適化されたグリコシル化パターンは、タンパク質ごと、および抗体ごとに異なり得るため、本発明は、異なるグリコシル化パターンをもたらす細胞株を提供し、この場合、産生に関してそれぞれのタンパク質／抗体生成物に対して最適化されたグリコシル化パターンをもたらす細胞株を選択することが可能になる。

【００３０】

したがって、本発明は、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性ならびに完全ヒトグリコシル化を有するタンパク質組成物、特に抗体分子組成物の産生のための生物工学的に有利な方法を提供する。さらに、本発明は、新規な宿主細胞、核酸および分子組成物を提供する。

【００３１】

したがって、以下の工程：

（ａ）宿主細胞としての不死化ヒト血液細胞内に、タンパク質またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；

（ｂ）前記宿主細胞を前記タンパク質組成物の産生を許容する条件下で培養すること；および

（ｃ）目的の特徴的グリコシル化を有する前記タンパク質組成物を単離すること

を含む、規定のグリコシル化パターンを有するタンパク質組成物、好ましくは抗体分子組成物を産生させる方法が提供される。

【００３２】

本発明による改善された性質を有するタンパク質組成物、特に抗体組成物を得るため、宿主細胞は、以下の特徴的グリコシル化の少なくとも１つを有するタンパク質／抗体組成物が産生されるように選択される。

【００３３】

（ｉ）検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない。

【００３４】

上記に概説したように、ＮｅｕＧｃグリコシル化はヒトにおいて免疫原性を有し得る。したがって、それぞれの（ｒｅｓｐｅｃｔｉｖｅ）グリコシル化は、できるだけ回避されることが望ましい。それぞれのグリコシル化は、不死化ヒト血液細胞を使用すること、特にヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞を使用することにより回避される。

【００３５】

（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－

９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて増大したガラクトシル化度を有する。

【００３６】

ガラクトース残基は、主に、抗体のコンプレックス型Ｎ－グリカンのアンテナ上のＧｌｃＮＡｃ残基に対してβ１－４結合した状態で見られるが、β－１，３結合もまた見出されている。しかしながら、これらは、通常、トリアンテナ型構造で存在している。該活性に対するガラクトシル化度の影響は、特に抗体に関して顕著である。ガラクトースの枯渇によってＣＤＣ活性の低下がもたらされることが示されている。したがって、高いガラクトシル化度を有することが好ましかろう。また、ガラクトシル化は、他のタンパク質に対しても重要な役割を果たしている可能性がある。

【００３７】

タンパク質分子の糖鎖構造全体に言及する場合、該タンパク質分子のすべてのグリコシル化が考慮される。タンパク質分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造が解析される場合、特定の糖鎖構造（１つまたは複数）、例えば、抗体分子のＦｃ部分のＡｓｎ２９７に結合された糖鎖構造（１つまたは複数）などに着目する（図１８もまた参照されたい）。それぞれの特定の構造が評価される場合、この特定の構造の内容／組成が決定される。また、前記特性を規定するために糖鎖単位全体と特定の糖鎖に言及されていることがあり得る（これらは同義である）。

【００３８】

（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％多いＧ２構造の量を有する。

【００３９】

特に、抗体を本発明の方法に従って生成させる場合、高量のＧ２構造が有益なである。「Ｇ２構造」は、ガラクトースが、抗体の場合ではＦｃ領域に結合されたバイアンテナ型構造の両端に見られるグリコシル化パターンと規定する（図１８もまた参照されたい）。ガラクトースが１分子見られる場合はＧ１構造と称し、ガラクトースがない場合はＧ０構造と称する。Ｇ２グリコシル化パターンは、多くの場合で抗体のＣＤＣの改善がみとめられた。したがって、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８５％、９５％またさらには１００％を超える多くもの多い量のＧ２構造が、産生されるタンパク質／抗体組成物中に存在することが好ましい。それぞれ高いＧ２グリコシル化パターンが得られる好適な細胞株は、本明細書に記載している。

【００４０】

全体的に高いガラクトシル化度は、多くの場合、抗体のＣＤＣに有益であるため、多くの場合、タンパク質、特に、抗体分子の糖鎖構造全体または特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％またさらには９５％を超えるＧ２および／またはＧ１構造を得ることが好ましい。

【００４１】

さらなる実施形態によれば、３５％より多く（４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％または７０％より多く）のＧ２構造が、前記タンパク質組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造に存在する。

【００４２】

（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成

物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ない量のＧ０構造を有する。
【００４３】
上記に概説したように、通常、高いガラクトシル化度が好都合である。したがって、細胞株は、好ましくは、Ｇ０構造が回避されるように選択される。Ｇ０構造の量は、好ましくは、１０％未満、１５％未満、２０％未満、２５％未満、３０％未満、３５％未満、４０％未満、５０％未満、５５％未満、６０％未満、６５％未満、７０％未満、７５％未満、８０％未満、８５％未満、９０％未満、またはさらに少ない量である。
【００４４】
さらなる実施形態によれば、２２％未満（２０％、１８％、１５％、１２％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％未満）のＧ０構造が、前記タンパク質組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造に存在する。
【００４５】
（ｖ）検出可能な末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌが含まれない。
【００４６】
上記に概説したように、Ｇａｌα１－３Ｇａｌグリコシル化は、ヒトにおいて免疫原性であり得る。このグリコシル化は、第２のガラクトース残基が第１のガラクトース残基に対してα１，３位に結合されて、高度に免疫原性のＧａｌα１－３Ｇａｌ二糖がもたらされたパターンを特徴とする。不死化ヒト血液細胞、特にヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞を使用することにより、それぞれ不好都合なグリコシル化が回避される。
【００４７】
（ｖｉ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないフコース量を含む。
【００４８】
フコース残基は、Ｎ－グリカン鎖（ｔｒｅｅ）内の種々の部位、
－該アミノ酸種（ｓｔｒａｉｎ）に近位のＧｌｃＮＡｃ残基に対してα１，６結合；
－アンテナ型で存在するＧｌｃＮＡｃ残基に対してα１，３およびα１，４結合；
－アンテナ型で存在するＧａｌ残基に対してα１，２結合
で非常に特別に見られる。
【００４９】
抗体結合Ｎ－グリカン上には、フコース残基の圧倒的多数が、近位ＧｌｃＮＡｃ残基に対して１，６結合された状態で見られる（いわゆる「コアフコース」）。抗体に結合しているＮ－グリカンの還元末端上にコアフコースが存在しないと、抗体のＡＤＣＣ活性が２５～１００倍増強されることがわかった。ＡＤＣＣに対するこの有益な効果のため、フコース量は、該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、４００％、５００％、１０００％、１５００％または２０００％超少ないことが好ましい。本発明はまた、それぞれ全体的に低フコシル化が達成される特別に操作された細胞株を提供する。
【００５０】
さらなる実施形態によれば、前記宿主細胞は、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の特定の少なくとも１つの糖鎖構造の少なくとも１０％（１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％または８０％より多くの）糖鎖を含み、フコースがない糖タンパク質が産

生されるように選択される。抗体に関しては、Ｆｃ領域に結合しているＮ－グリコシド結合糖鎖が、ＧｌｃＮＡｃを含む還元末端を含み、該糖鎖は、その還元末端においてＧｌｃＮＡｃの６位に結合されたフコースを含まないことが特に好ましい。

【００５１】

（ｖｉｉ）バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する少なくとも１つの糖鎖構造を含む

バイセクトＮ－アセチルグルコサミン（ｂｉｓＧｌｃＮＡｃ）は、多くの場合、抗体中に見られるＮ－グリカンのトリ－マンノシルコア構造の中央のマンノース残基にβ１，４結合した状態で見られる。抗体Ｆｃ－Ｎ－グリカンの中央のマンノース残基におけるバイセクトＧｌｃＮＡｃの存在により、抗体のＡＤＣＣ活性が増大する。

【００５２】

さらなる実施形態によれば、前記宿主細胞は、産生される前記タンパク質が、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の、フコースもバイセクトＧｌｃＮＡｃも含まない糖鎖単位全体（またはそのうちの１つのタンパク質分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖）に、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含むがフコースは含まないそれぞれの糖鎖構造よりも多くの糖鎖構造を含むように選択される。

【００５３】

さらなる実施形態によれば、前記宿主細胞は、産生される前記タンパク質が、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の、より多くのバイセクトＧｌｃＮＡｃおよびフコースを含む糖鎖単位全体（またはそのうちの１つのタンパク質分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖）に、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含むがフコースは含まないそれぞれの糖鎖構造よりも多くの糖鎖構造を含むように選択される。

【００５４】

（ｖｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物のシアリル化パターンと比べて改変されたシアリル化パターンを有する

活性、半減期およびバイオアベイラビリティに対するシアリル化度／パターンの影響は、種々のタンパク質／抗体間で異なる。したがって、各タンパク質／抗体分子について、最適化シアリル化パターンを事前に本発明によるスクリーニング方法を用いることによって調べた後、所望のグリコシル化パターンをもたらす最も適当な宿主細胞で産生の確立を行なうことは有益である。例えば、下流の効果、すなわちＣＤＣおよびＡＤＣＣに対する、抗体のＦｃグリカン上に存在するシアル酸残基の負の影響を報告する刊行物がいくつか存在している。しかしながら、高度なシアリル化により、そのシアリル化分子の半減期が長くなることがわかった。したがって、産生されるタンパク質／抗体にもよるが、種々のシアリル化パターンが好都合であり得、本発明は、種々のシアリル化活性を有し、この場合、最適化されたグリコシル化パターンを示すタンパク質／抗体を得ることが可能な不死化ヒト血液細胞株を提供する。

【００５５】

一実施形態によれば、宿主細胞は、該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子よりも少なくとも１０％（好ましくは、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、＞９５％）少ない量のシアル酸による、減少したシアリル化度を有するタンパク質が産生されるように選択される。一実施形態によれば、産生物には、検出可能なＮｅｕＮＡｃが含まれないことすらある。産生されるタンパク質／抗体によっては、シアル酸、特にＮｅｕＮＡｃの存在が、タンパク質／抗体の活性に寄与しない場合があり得る。このような場合、産生物をより均一にするため、シアル酸のグリコシル化を回避することが有利であり得る。また、このことにより、ＮｅｕＮＡｃグリコシル化パターンとして、さまざまな組成のタンパク質が得られ得

る。これは、産生物が種々のＮｅｕＮＡｃ含有量を有し、均一性が低いため、産生物の調節の許容（ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　ａｐｐｒｏｖａｌ）が困難となり得る。

【００５６】

活性がＮｅｕＮＡｃグリコシル化の存在に依存しないタンパク質／抗体では、均一性を増大させるために、ＮｅｕＮＡｃグリコシル化の回避が有益であり得る。しかしながら、「検出可能なＮｅｕＮＡｃがない」とは、必ずしも、存在しているＮｅｕＮＡｃが全くないことを意味するのではない。逆に、やや低い程度のＮｅｕＮＡｃ（例えば、１～１０％）を有する実施形態も想定される。

【００５７】

一実施形態によれば、産生物は、該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の同じ量のタンパク質分子よりも少なくとも１５％（２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、３５０％、４００％、４５０％、＞５００％）少ない量のＮｅｕＮＡｃによる、減少したシアリル化度を有する。この実施形態は、シアリル化がタンパク質／抗体の活性に対して負の効果を有するタンパク質／抗体が発現されると推測される場合に有益である。

【００５８】

それぞれのグリコシル化（シアル酸または特にＮｅｕＮＡｃが非存在または程度が非常に低い）は、無血清培地中でＮＭ－Ｆ９およびＮＭ－Ｄ４などのシアリル化のない細胞を用いることにより達成され得る。

【００５９】

さらなる実施形態によれば、産生物は、該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも１５％（２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、３５０％、４００％、４５０％または５００％超）多い量のＮｅｕＮＡｃによる、増大したシアリル化度を有する。

【００６０】

上記に概説したように、それぞれに増大したシアリル化度により、タンパク質の血清半減期に対し、該半減期が長くなることによって正の効果がもたらされ得る。このような場合、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］で得られるものより高いシアリル化度をもたらし、かつシアリル化のない細胞（例えば、ＮＭ－Ｆ９およびＮＭ－Ｄ４など）で得られるものより高いシアリル化度をもたらす細胞株を使用することが好ましく、このとき、シアリル化が起こるように前駆物質を添加する必要がある。しかしながら、このようなシアリル化のない細胞を培養する際にそれぞれ前駆物質を添加した場合であっても、このような細胞では、通常、シアリル化に必要なグリコシル化機構において遺伝子変異／遺伝的欠陥をもたない不死化ヒト血液細胞で得られるシアリル化度の約５０～６０％しか達成されない。したがって、高度なシアリル化度が目標とされる実施形態では、それぞれ高いシアリル化度がもたらされ得る細胞株を使用し、ＮＭ－Ｆ９およびＮＭ－Ｄ４を使用しないことが好ましい。

【００６１】

さらなる実施形態によれば、産生物にはα２－６結合ＮｅｕＮＡｃが含まれる。さらに、α２－３結合ＮｅｕＮＡｃが、ある程度存在することがあり得る。一部のタンパク質／抗体に関して、ＮｅｕＮＡｃグリコシル化の存在は、特にタンパク質／抗体の半減期に関して有益である。α２－６結合ＮｅｕＮＡｃを得ることは、このグリコシル化パターンが

ヒトグリコシル化パターンと類似しているため、有益である。齧歯類細胞では、通常、α２－３結合ＮｅｕＮＡｃが得られる。また、他の既存のヒト細胞株は、充分なα２－６結合ＮｅｕＮＡｃグリコシル化がもたらされ得ない。

【００６２】

それぞれのグリコシル化パターンが得られる好適な細胞株は、例えば、ＮＭ-Ｈ９Ｄ８およびＮＭ-Ｈ９Ｄ８－Ｅ６である。

【００６３】

さらなる実施形態によれば、細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％多く含まれるタンパク質を産生する宿主細胞が使用される。

【００６４】

また、糖鎖の荷電プロフィールは、その性質に影響することがあり得、したがって、考慮されるべきである。糖鎖に電荷を与える化学基は、例えば、イオウ基またはシアル酸である。

【００６５】

別の実施形態によれば、前記産生物には、細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％少なく含まれる。

【００６６】

さらなる実施形態によれば、前記宿主細胞は、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも２％（５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、または４５％超）の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含む糖タンパク質が産生されるように選択される。

【００６７】

一実施形態によれば、以下の性質を示すタンパク質：

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて増大した活性、増大した収率および／または改善された均一性を有する；および／または

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％高い平均または最大収率の増大を有する；および／または

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたとき、改善されたグリコシル化の均一性である改善された均一性を有し、ここで前記抗体分子組成物が、同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のシアリル化度よりも小さいシアリル化度を有する；および／または

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたとき、前記タンパク質分子が抗体分子である場合、同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する；および／または

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたとき、前記タンパク質分子が抗体分子である場合、同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の結合より少なくとも５０％高い抗原媒介性またはＦｃ媒介性結合の増大を有する、

の産生のための宿主細胞が使用される。

【００６８】

上記に概説したように、それぞれの性質は、本明細書に記載のタンパク質のグリコシル化を最適化することにより得られ得る。また、グリコシル化プロフィールに基づき、一部の抗体で結合プロフィールが改変および改善され得るのが見られることは驚くべきことであった。好適な宿主細胞も本明細書に記載している。

【００６９】

さらなる実施形態によれば、前記タンパク質分子組成物の改善された均一性は、以下の特徴：

－検出可能なＮｅｕＧｃがない；

－検出可能なＮｅｕＮＡｃがない；

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子のタンパク質分子組成物よりもＮｅｕＮＡｃが多い；

－検出可能なα２－６結合ＮｅｕＮＡｃ

の少なくとも１つを含む前記タンパク質分子組成物の改善されたグリコシル化の均一性である。

【００７０】

さらなる実施形態によれば、前記宿主細胞は、以下の特徴的なグリコシル化パターン：

（ａ）

－検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない

－検出可能なＧａｌα１－３Ｇａｌが含まれない

－請求項２に記載のガラクトシル化パターンが含まれる

－請求項２に記載のフコース含量を有する

－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子のタンパク質組成物と比べて、またはＮＭ－Ｆ９およびＮＭ－Ｄ４などのシアリル化のない細胞株と比べて増加した量のシアル酸が含まれる

（ｂ）

－検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない

－検出可能なＧａｌα１－３Ｇａｌが含まれない

－請求項２に記載のガラクトシル化パターンが含まれる

－請求項２に記載のフコース含量を有する

－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる

－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子のタンパク質組成物と比べて減少した量のシアル酸が含まれる

（ｃ）

－検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない

－検出可能なＧａｌα１－３Ｇａｌが含まれない

－請求項２に記載のガラクトシル化パターンが含まれる

－請求項２に記載のフコース含量を有する

－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる

－２－６　ＮｅｕＮＡｃが含まれる

の１つを有するタンパク質分子を含むタンパク質組成物が産生されるように選択される。

【００７１】

改善された特性がもたらされるさらなる適当な特徴的な組合せを、表９に示す。

【００７２】

本発明によれば、用語「タンパク質分子」は、目的のタンパク質あるいはその活性な断片および／または変異型を意味し、ここで、任意のタンパク質が使用され得、好ましくは、ヒト起源の任意の糖タンパク質が使用され得る。タンパク質分子という用語は、任意のポリペプチド分子またはその一部分を意味する。これは、１つまたはいくつかの核酸にコ

ードされ得る。これは、分泌様式で、またはその画分で、または融合パートナーとの融合タンパク質で産生され得る。好ましくは、該タンパク質は上清み中に分泌される。この実施形態は、例えば、流出（ｓｈｅｄｄｉｎｇ）工程（例えば、ホルボールエステルによる）が回避され得るため、産生プロセス全体に関して特に有益である。

【００７３】

哺乳動物の糖タンパク質の例としては、サイトカインおよびその受容体、例えば、腫瘍壊死因子ＴＮＦ－αおよびＴＮＦ－β；レニン；ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；α－１－抗トリプシン；インスリンＡ－鎖およびＢ－鎖；ゴナドトロピン、例えば、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、サイロトロピン、およびヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈＣＧ）；カルシトニン；グルカゴン；凝固因子（第ＶＩＩＩＣ因子、第ＩＸ因子、第ＶＩＩ因子など）、組織因子およびフォン・ビルブラント因子；プロテインＣなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；プラスミノゲン活性化因子（ウロキナーゼ、ヒト尿および組織型プラスミノゲン活性化因子など）；ボンベシン；トロンビン；造血増殖因子；エンケファリナーゼ；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミュラー阻害物質；レラキシンＡ－鎖およびＢ－鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；血管内皮増殖因子；ホルモンまたは増殖因子の受容体；インテグリン；プロテインＡおよびＤ；リウマチ因子；神経栄養因子（骨由来神経栄養因子、ニューロトロフィン－３、－４、－５、－６および神経成長因子－βなど）；血小板由来増殖因子；線維芽細胞増殖因子；上皮増殖因子；トランスホーミング増殖因子（ＴＧＦ－αおよびＴＧＦ－βなど）；インスリン様増殖因子－Ｉおよび－ＩＩ；インスリン様増殖因子結合タンパク質；ＣＤタンパク質（ＣＤ－３、ＣＤ－４、ＣＤ－８およびＣＤ－１９など）；エリトロポイエチン（ＥＰＯ）；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形成タンパク質；インターフェロン（インターフェロン－α、－β、および-γ）；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えば、Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦ；インターロイキン（ＩＬ）、例えば、ＩＬ－１～ＩＬ－１２；スーパーオキシドジスムターゼ；Ｔ細胞受容体；表面膜タンパク質；崩壊促進因子；抗体およびイムノアドヘシン；グリコホリンＡ；ＭＵＣ１などの分子が挙げられる。

【００７４】

前述の糖タンパク質の多くは、サイトカイン（本明細書では、免疫系の細胞内に存在している一般的なクラスのホルモン（リンホカインおよびモノカインンならびにその他）に言及している）に属する。その定義は、限定されないが、局所で作用し、血中に循環せず、本発明に従って使用すると個体の免疫応答の改変がもたらされるホルモンを包含することを意図する。さらなる適当な免疫調節サイトカインの例としては、限定されないが、インターフェロン（例えば、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－βおよびＩＦＮ－γ）、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０およびＩＬ－１２）、腫瘍壊死因子（例えば、ＴＮＦ－αおよびＴＮＦ－β）、エリトロポイエチン（ＥＰＯ）、ＦＬＴ－３リガンド、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＣＤ２およびＩＣＡＭが挙げられる。エリトロポイエチンを見ると、この分子は、前駆細胞を赤血球に成熟させると考えられており、一方、トロンボポエチンは、前駆細胞を血小板系（ｔｈｒｏｍｂｏｃｙｔｉｃ）経路に沿って誘導すると考えられている。ＣＳＦは、骨髄中に見られる前駆細胞が特定の型の成熟血液細胞に分化するように誘導するリンホイシン（ｌｙｍｐｈｏｉｃｉｎｅ）のファミリーをいう。前駆細胞から生じる成熟血液細胞の具体的な型は、存在するＣＳＦの型に依存する。同様に、顆粒球マクロファージコロニー形成は、ＧＭ－ＣＳＦの存在に依存性である。さらに、ＩＬ－２、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－αなどのヒト形態に実質的な相同性を有する他の哺乳動物のサイトカインは、免疫系に対して同様の活性を示すことが実証された場合、本発明において有用である。接着分子もしくはアクセサリー分子またはその組合せが、単独またはサイトカインとの組合せで使用され得る。

【００７５】
同様に、任意の特定のタンパク質に実質的に類似するが、タンパク質配列に比較的軽微な変化を有するタンパク質も、本発明において有用性が見出される。タンパク質の配列のアミノ酸配列内のいくつかの小さな改変は、多くの場合、そのタンパク質分子の機能性能力を阻害することなく存在し得ることはよく知られており、したがって、本発明における親タンパク質としての機能を果たすが、現在既知の配列とわずかに異なるタンパク質が作製され得る。したがって、生物学的機能を維持しているそれぞれのバリアントも包含される。

【００７６】
好ましい糖タンパク質は、グリコホリンＡ、ＥＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＳＨ、ｈＣＧ、ＬＨ、インターフェロン、インターロイキン、抗体および／またはその断片を含む群から選択される。

【００７７】
上記のタンパク質分子はすべて、他のペプチドまたはポリペプチド配列、例えば限定されないが、リンカー、活性化分子または毒素などに融合させてもよい。

本発明はまた、以下の項目を提供する。

（項目１）
タンパク質分子組成物を産生させる方法であって、
（ａ）不死化ヒト血液細胞である宿主細胞内に、上記タンパク質の少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；
（ｂ）上記宿主細胞を上記タンパク質分子組成物の産生を許容する条件下で培養すること；ならびに
（ｃ）上記タンパク質分子組成物を単離すること
を含む、方法。

（項目２）
以下の工程：
（ａ）不死化ヒト血液細胞である宿主細胞内に、タンパク質またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；ここで、上記宿主細胞は、以下の特徴的グリコシル化：
（ｉ）検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない；および／または
（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて増大したガラクトシル化度を有する；および／または
（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％多いＧ２構造量を有する；および／または
（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないＧ０構造量を有する；および／または
（ｖ）検出可能な末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌを含まない；および／または
（ｖｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タン

パク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないフコース量を含む；および／または

（ｖｉｉ）バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する少なくとも１つの糖鎖構造を含む；および／または

（ｖｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物のシアリル化パターンと比べて改変されたシアリル化パターンを有する、

の少なくとも１つを有するタンパク質組成物が産生されるように選択される、

（ｂ）上記宿主細胞を上記タンパク質分子組成物の産生を許容する条件下で培養すること；ならびに

（ｃ）上記タンパク質分子組成物を単離すること、ここで、該タンパク質分子は特徴的グリコシル化（ｉ）～（ｖｉｉｉ）の少なくとも１つを有する、

を含む、タンパク質分子組成物、好ましくは抗体分子組成物を産生させるための項目１に記載の方法。

（項目３）

上記シアリル化パターンが、以下の特徴：

－α２－６結合ＮｅｕＮＡｃを含む；および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも１５％多い量のＮｅｕＮＡｃによる、増大したシアリル化度を有する、および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の同じ量のタンパク質分子よりも少なくとも１５％少ない量のＮｅｕＮＡｃによる、減少したシアリル化度を有する、および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％多く含まれる、および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％少なく含まれる、

の少なくとも１つを特徴とする、項目１または２に記載の方法。

（項目４）

上記宿主細胞が、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも１０％の糖鎖構造を含み、フコースがない糖タンパク質が産生されるように選択される、項目１～３の少なくとも１項に記載の方法。

（項目５）
上記宿主細胞が、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも２％の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する糖鎖構造を含む糖タンパク質が産生されるように選択される、項目１～４の少なくとも１項に記載の方法。
（項目６）
上記宿主細胞が、
－上記タンパク質分子組成物中の糖鎖構造全体またはそのうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、３５％より多くのＧ２構造を含む；および／または
－上記タンパク質分子組成物中の糖鎖構造全体またはそのうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、２２％未満のＧ０構造を含む
糖タンパク質が産生されるように選択される、項目１～５の少なくとも１項に記載の方法。
（項目７）
産生される上記タンパク質分子組成物が、以下の特徴：
－特に細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて増大した活性および／または増大した収率を有する；
－特に細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて改善された均一性を有する；
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％高い平均または最大収率の増大を有する；および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて改善されたグリコシル化の均一性である改善された均一性を有する；
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて増大した活性を有する；
－上記タンパク質分子が抗体分子である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する；および／または
－上記タンパク質分子が抗体分子である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の結合よりも少なくとも１５％、好ましくは２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、好ましくは５０％大きい抗原媒介性またはＦｃ媒介性結合の増大を有する
の少なくとも１つを有する、項目１～６の少なくとも１項に記載の方法。
（項目８）
宿主細胞を無血清条件下で培養して該タンパク質分子組成物を産生させる、項目１～７の少なくとも１項に記載の方法。
（項目９）
宿主細胞が、以下の特徴的なグリコシル化の組合せ：
（ａ）
－検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない
－検出可能なＧａｌα１－３Ｇａｌが含まれない

－項目２に記載のガラクトシル化パターンが含まれる
－項目２に記載のフコース含量を有する
－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子のタンパク質組成物と比べて、またはＮＭ－Ｆ９およびＮＭ－Ｄ４などのシアリル化のない細胞株と比べて増加した量のシアル酸が含まれる；
（ｂ）
－検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない
－検出可能なＧａｌα１－３Ｇａｌが含まれない
－項目２に記載のガラクトシル化パターンが含まれる
－項目２に記載のフコース含量を有する
－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子のタンパク質組成物と比べて減少した量のシアル酸が含まれる；
（ｃ）
－検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない
－検出可能なＧａｌα１－３Ｇａｌが含まれない
－項目２に記載のガラクトシル化パターンが含まれる
－項目２に記載のフコース含量を有する
－ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる
－２－６　ＮｅｕＮＡｃが含まれる
を有するタンパク質分子を含むタンパク質組成物が産生されるように選択される、項目１～８の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１０）
以下のグループ１～４：
（ａ）Ｋ５６２などの高いシアリル化活性を有する宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ１；
（ｂ）遺伝子欠失または発現抑制系のためシアリル化活性が低いか、または該活性がないＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］およびＧＴ－２Ｘと同等の宿主細胞およびこれらを含む宿主細胞、またはその誘導細胞株を含むグループ２；
（ｃ）ＮＭ－Ｈ９およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８などのＫ５６２よりも高いシアリル化度を有する宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ３；
（ｄ）ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２などのフコシル化活性が低いか、または該活性がない宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ４
から選択される宿主細胞が使用される、項目１～９の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１１）
宿主細胞が、ヒト骨髄性白血病起源のものであり、好ましくは、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＧＴ-２Ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ　　］、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株からなる群より選択される、項目１～１０の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１２）
葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸が宿主細胞内に導入される、項目１～１１の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１３）
上記葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸が、発現対象の上記タンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸を含むベクターとは別の別個のベクターによって導入されるか、または発現対象の上記タンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸

と、該葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸とを少なくとも含むベクターが使用される、項目１２に記載の方法。
（項目１４）
宿主細胞が上記葉酸代謝拮抗薬とともに培養される、項目１２または１３に記載の方法。
（項目１５）
発現対象の上記タンパク質分子の少なくとも一部分をコードする核酸配列を、培養液中の葉酸代謝拮抗薬濃度を段階的に上げることにより増幅する、項目１２～１４の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１６）
以下の特徴：
（ａ）葉酸代謝拮抗薬がメトトレキサートである
（ｂ）上記葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸が、配列番号１～９の群、好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードする
の少なくとも１つを満足す、項目１２～１５の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１７）
上記タンパク質が抗体である、項目１～１６の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１８）
（ａ）ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内に、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸を導入すること；
（ｂ）上記宿主細胞をメトトレキサートとともに培養することにより、上記抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列を増幅させること；
（ｃ）上記抗体分子組成物の産生を許容する条件下で上記宿主細胞を培養すること；ならびに
（ｄ）上記抗体分子組成物を単離すること
を含む、抗体分子組成物を産生させるための項目１～１７の少なくとも１項に記載の方法。
（項目１９）
（ａ）ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内に、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；
（ｂ）上記抗体分子組成物の産生を許容する条件下で上記宿主細胞を培養すること；ならびに
（ｃ）増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有する上記抗体分子組成物を単離すること
を含む、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有する抗体分子組成物を産生させるための項目１～１８の少なくとも１項に記載の方法。
（項目２０）
（ａ）ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内に、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸を導入すること；
（ｂ）上記宿主細胞をメトトレキサートとともに培養することにより、上記抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列を増幅させること；
（ｃ）上記抗体分子組成物の産生を許容する条件下で上記宿主細胞を培養すること；ならびに
（ｄ）増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有する上記抗体分子組成物を単離すること
を含む、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有する抗体分子組成物を産生させるための項目１～１９の少なくとも１項に記載の方法。

（項目２１）
宿主細胞を、以下の特徴的グリコシル化：
（ｉ）検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない；および／または
（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造においてＧｌｃＮＡｃ結合ガラクトースのガラクトシル化度が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて増大している；および／または
（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％多いＧ２構造量を有する；および／または
（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないＧ０構造量を有する；および／または
（ｖ）検出可能な末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌを含まない；および／または
（ｖｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないフコース量を含む；および／または
（ｖｉｉ）バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する少なくとも１つの糖鎖構造を含む；および／または
（ｖｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物のシアリル化パターンと比べて改変されたシアリル化パターンを有する
の少なくとも１つを有するタンパク質組成物の産生に関して、
以下の工程
（ａ）相違するグリコシル化パターンをもたらす少なくとも２種類の異なる宿主細胞内に、タンパク質またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；ここで、上記宿主細胞の少なくとも１種類は不死化ヒト血液細胞である、
（ｂ）上記少なくとも２種類の異なる宿主細胞を培養すること、ここで、異なる各宿主細胞は、その他の宿主細胞によってもたらされるグリコシル化パターンと相違するグリコシル化パターンを有するタンパク質組成物を産生する；
（ｃ）該少なくとも２種類の異なる宿主細胞と異なるグリコシル化パターンを有する上記発現されたタンパク質組成物を単離すること；および
（ｄ）（ｉ）～（ｖｉｉｉ）に規定した特徴的グリコシル化の少なくとも１つを有するタンパク質組成物を産生する上記宿主細胞を選択すること
によって選択するための方法。
（項目２２）
上記タンパク質組成物が、以下の特徴：
－抗体分子組成物である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦ

ｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する；
および／または
－抗体分子組成物である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の結合より少なくとも５０％高い抗原媒介性またはＦｃ媒介性結合の増大を有する；
および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％高い平均または最大収率の増大を有する、
の少なくとも１つを示す、項目２１記載の方法。
（項目２３）
ヒト骨髄性白血病起源の上記少なくとも２種類の異なる宿主細胞の少なくとも一方が、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＧＴ-２Ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ　　］、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株である、項目２１または２２に記載の方法。
（項目２４）
該少なくとも２種類の異なる宿主細胞が、以下のグループ１～４：
（ａ）Ｋ５６２などの高いシアリル化活性を有する宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ１；
（ｂ）遺伝子欠失のためシアリル化が低いか、またはシアリル化がないＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］およびＧＴ－２Ｘなどの宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ２；
（ｃ）ＮＭ－Ｈ９およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８などのＫ５６２よりも高いシアリル化度を有する宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ３；
（ｄ）ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２などのフコシル化活性が低いか、または該活性がない宿主細胞またはその誘導細胞株を含むグループ４
から選択される、項目２１または２２に記載の方法。
（項目２５）
項目２～９に規定されたグリコシル化パターンを示すタンパク質組成物、好ましくは抗体組成物を産生する少なくとも１種類の宿主細胞が選択される、項目２１～２４の少なくとも１項に記載の方法。
（項目２６）
項目１～２０の少なくとも１項に記載の産生方法によって得られ得るタンパク質またはタンパク質分子組成物。
（項目２７）
上記組成物が、以下の特徴：
（ｉ）検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない；および／または
（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて増大したＧｌｃＮＡｃ結合ガラクトースのガラクトシル化度を有する；および／または
（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質

分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％多いＧ２構造量を有する；および／または

（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないＧ０構造量を有する；および／または

（ｖ）検出可能な末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌを含まない；および／または

（ｖｉ）該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の上記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないフコース量を含む；および／または

（ｖｉｉ）バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する少なくとも１つの糖鎖構造を含む；および／または

（ｖｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物のシアリル化パターンと比べて改変されたシアリル化パターンを有する

の少なくとも１つを有する、項目２６に記載のタンパク質またはタンパク質分子組成物。

（項目２８）

該タンパク質分子組成物が、以下の特徴：

－α２－６結合ＮｅｕＮＡｃを含む、および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも１５％多い量のＮｅｕＮＡｃによる増大したシアリル化度を有する、および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の同じ量のタンパク質分子よりも少なくとも１５％少ない量のＮｅｕＮＡｃによる、減少したシアリル化度を有するおよび／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％多く含まれる、および／または

－該細胞において発現させたとき、上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖に荷電Ｎ－グリコシド結合糖鎖が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも２０％少なく含まれる；および／または

－上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖

鎖の少なくとも１０％糖鎖構造が含まれ、フコースがない；および／または
－上記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖単位全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定のグリコシル化部位の少なくとも１つの特定の糖鎖の少なくとも２％の糖鎖構造を含み、バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する；および／または
－上記タンパク質組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、３５％より多くのＧ２構造が含まれる；および／または
－上記タンパク質組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、２２％未満のＧ０構造が含まれる；および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて増大した活性および／または増大した収率を有する；および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物と比べて改善された均一性を有する；および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％高い平均または最大収率の増大を有する；および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％大きく増大した活性を有する；および／または
－細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたとき、改善されたグリコシル化の均一性である改善された均一性を有し、ここで上記抗体分子組成物が、同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のシアリル化度よりも小さいシアリル化度を有する；および／または
－上記タンパク質分子が抗体分子である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する；および／または
－上記タンパク質分子が抗体分子である場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の結合より少なくとも２０％、好ましくは３０％または５０％高い抗原媒介性またはＦｃ媒介性結合の増大を有する、
の少なくとも１つを有する、項目２７に記載のタンパク質またはタンパク質分子組成物。
（項目２９）
上記組成物が、ＭＵＣ１エピトープに結合し、細胞外タンデム反復領域のアミノ酸配列ＤＴＲを含む少なくとも１つの抗体分子を含む、項目２６～２８の少なくとも１項に記載のタンパク質またはタンパク質分子組成物。
（項目３０）
上記抗体が、Ｔがグリコシル化されているアミノ酸配列ＤＴＲを含むＴＡ－ＭＵＣ１エピトープに結合する、項目２９に記載のタンパク質またはタンパク質分子組成物。
（項目３１）
上記抗体が該グリコシル化エピトープに、非グリコシル化エピトープよりも高い親和性で結合する、項目３０に記載の抗体または抗体分子組成物。
（項目３２）
上記抗体が、
－ＰａｎｋｏＭａｂと同じＴＡ－ＭＵＣ　１エピトープに競合的に結合する抗体ＰａｎｋｏＭａｂまたはそのバリアント；

－Ｐａｎｋｏ１と同じＴＡ－ＭＵＣ　１エピトープに競合的に結合する抗体Ｐａｎｋｏ１またはそのバリアント；
－Ｐａｎｋｏ２と同じＴＡ－ＭＵＣ　１エピトープに競合的に結合する抗体Ｐａｎｋｏ２またはそのバリアント
から選択される、項目３０または３１に記載の抗体または抗体分子組成物。
（項目３３）
上記抗体が、以下の特徴的グリコシル化：
（ａ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子よりも少なくとも１５％多い量のＮ－アセチルノイラミン酸による増大したシアリル化度を有する；
（ｂ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子よりも少なくとも５％多い量のＧ２構造による高いガラクトシル化度を有する；
（ｃ）ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃが含まれる、
の少なくとも１つを有する、項目２６～３２のうちの１項、特に項目３２に記載の抗体または抗体分子組成物。
（項目３４）
グリコシル化パターンにより、以下の活性パターン：
（ａ）ＣＨＯ細胞において発現させた同じ抗体の活性よりも１５％超高いＣＤＣ活性；
（ｂ）検出可能なシアリル化がないか、または低い程度で有する抗体と比べて２倍長くなった血清半減期；
（ｃ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する、
がもたらされる、項目２６～３３のうちの１項、特に項目３３に記載の抗体または抗体分子組成物。
（項目３５）
上記抗体が、以下の：
（ａ）
（ｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも２～４倍高く増大したＡＤＣＣ活性；および／または
（ｉｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも２倍高く増大したＣＤＣ活性；および／または
（ｉｉｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも２０％、好ましくは３０％または４０％高い高抗原結合活性；および／または
（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも５０％多い、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造におけるＧ２構造の量；および／または
（ｖ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単

離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも２０％多いバイセクトＧｌｃＮＡｃ構造の量
を有するＰａｎｋｏＭａｂ抗体またはそのバリアント、
ここで、該細胞において発現させたとき、上記ＰａｎｋｏＭａｂ分子組成物は、宿主細胞ＮＭ－Ｆ９において産生させることにより、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離されたＰａｎｋｏＭａｂ分子組成物と比べて高収率で得られ得る；
（ｂ）
（ｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも３倍高く増大したＡＤＣＣ活性；および／または
（ｉｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも２０％、好ましくは３０％または４０％高く増大したＣＤＣ活性；および／または
（ｉｉｉ）検出可能な２－６　ＮｅｕＮＡｃおよび／または
（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、ＮＭ－Ｆ９から単離された同じ抗体分子の抗体分子組成物と比べて少なくとも１．５倍長くなった血清半減期；および／または
（ｖ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその上記諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造における、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも５０％多いＧ２構造の量；および／または
（ｖｉ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも２０％多いバイセクトＧｌｃＮＡｃ構造の量；
を有するＰａｎｋｏＭａｂ抗体またはそのバリアント、
ここで、該細胞において発現させたとき、上記ＰａｎｋｏＭａｂ分子組成物は、宿主細胞ＮＭ－Ｈ９Ｄ８において産生させることにより、該細胞において発現させたときＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離されたＰａｎｋｏＭａｂ分子組成物と比べて高収率で得られ得る；
（ｃ）
（ｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも４倍高く増大したＡＤＣＣ活性；および／または
（ｉｉ）検出可能な２－６　ＮｅｕＮＡｃおよび／または
（ｉｉｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも３０％、好ましくは４０％または５０％高い高抗原結合活性
を有するＰａｎｋｏ２抗体またはそのバリアント、
ここで、上記Ｐａｎｋｏ２分子組成物は、宿主細胞ＮＭ－Ｈ９Ｄ８において産生させることにより得られ得る；
（ｄ）
（ｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも４倍高く増大したＡＤＣＣ活性；および／または
（ｉｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも３０％、好ましくは４０％または５０％高い高抗原結合活性

を有するＰａｎｋｏ２抗体またはそのバリアント、
　ここで、上記Ｐａｎｋｏ２分子組成物は、宿主細胞ＧＴ－２ｘにおいて産生させることにより得られ得る；
（ｅ）
　（ｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも８倍高く増大したＡＤＣＣ活性；および／または
　（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造における、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも５０％多いＧ２構造の量；および／または
　（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造における、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも７０％多い高量の非フコシル化構造
を有するＰａｎｋｏ１抗体またはそのバリアント、
　ここで、上記Ｐａｎｋｏ１分子組成物は、宿主細胞ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６において産生させることにより得られ得る；
（ｆ）
　（ｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも５０％高く増大したＡＤＣＣ活性；および／または
　（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造における、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも５０％多いＧ２構造の量；および／または
　（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、上記抗体分子組成物の上記諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造における、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子と比べて少なくとも５０％多い高量の非フコシル化構造
を有するＰａｎｋｏ１抗体またはそのバリアント、
　ここで、上記Ｐａｎｋｏ１分子組成物は、宿主細胞ＮＭ－Ｈ９Ｄ８において産生させることにより得られ得る、
からなる群より選択される、項目２９～３４の少なくとも１項に記載の抗体または抗体分子組成物。
（項目３６）
抗体セツキシマブまたはセツキシマブと同じエピトープに結合するそのバリアントである、項目２６～３４の少なくとも１項に記載の抗体。
（項目３７）
上記タンパク質がＦＳＨである、項目２６～３０の少なくとも１項に記載のタンパク質。
（項目３８）
上記ＦＳＨが、検出可能な２－６結合ＮｅｕＮＡｃを含む、項目３７に記載のタンパク質。
（項目３９）
適切な発現ベクター内にタンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を含む、項目２６～３８の少なくとも１項に記載のタンパク質、特に抗体

組成物を産生させるための不死化ヒト血液細胞、好ましくはヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞。
（項目４０）
タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸を含む、項目３９に記載の宿主細胞。
（項目４１）
宿主細胞が、タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸を含む、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｈ９、Ｈ９、ＮＭ－Ｈ１０、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、または上記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株である、項目３９または３６に記載の宿主細胞。
（項目４２）
項目４１または４２の少なくとも１つの核酸（を含む、項目３９～４１の少なくとも１項に記載の宿主細胞。
（項目４３）
コードされた抗体分子が、項目３１～３６に記載の抗体である、項目３９～４２いずれかに記載の宿主細胞。
（項目４４）
コードされた抗体分子がキメラまたはヒト化抗体、特に、ＰａｎｋｏＭａｂ、Ｐａｎｋｏ１、Ｐａｎｋｏ２もしくはセツキシマブ、または同じエピトープに結合するそのバリアントである、項目３９～４３いずれかに記載の宿主細胞。
（項目４５）
無血清条件下で培養して該抗体分子組成物を産生させる、項目３９～４４いずれかに記載の宿主細胞。
（項目４６）
（ａ）タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする配列、および
（ｂ）配列番号１～配列番号９の群の配列をコードする少なくとも１つの配列
を含む核酸。
（項目４７）
（ａ）タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする配列、および
（ｂ）配列番号１の群の配列をコードする少なくとも１つの配列
を含む核酸。
【図面の簡単な説明】
【００７８】
【図１】図１は、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］細胞のｆｕｔ８　ｍＲＮＡ発現の図である。対照としてＨｅｐＧ２細胞を使用した。
【図２】図２は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞またはＳＰ２／０細胞から単離した、標的細胞としてのＬＳ１７４Ｔ細胞に対するセツキシマブを用いたユウロピウム放出アッセイの図である。アッセイ物は、標的細胞に対するエフェクター比５０：１、抗体濃度０～１００ｎｇ／ｍｌで、４時間インキュベートした。
【図３】図３は、ＮＭ－Ｆ９から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂのＡＤＣＣ活性が、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂよりも約５倍高い図である。
【図４】図４：ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から単離した、標的細胞としてのＺＲ－７５－１細胞に対するキメラＰａｎｋｏ１を用いたユウロピウム放出アッセイの図である。アッセイ物は、標的細胞に対するエフェクター比８０：１、抗体濃度０～１μｇ／ｍｌで、４時間インキュベートした。
【図５】図５：ユーロピウム放出アッセイにおいて、標的細胞に対するエフェクター比５

０：１および５０００標的細胞／ウェルで一晩（ｏ．ｎ．）インキュベーション後のＺＲ－７５－１細胞に対するキメラＰａｎｋｏ２のＡＤＣＣ活性の図である。試料は３連でインキュベートした。

【図６】図６は、ユーロピウム放出アッセイにおいて、標的細胞に対するエフェクター比５０：１および１０，０００標的細胞／ウェルで一晩インキュベーション後のＺＲ－７５－１細胞に対するキメラＰａｎｋｏ２のＡＤＣＣ活性の図である。試料は３連でインキュベートした。

【図７】図７は、ＺＲ－７５－１に対するキメラＰａｎｋｏＭａｂを用いたＣＤＣアッセイの図である。

【図８】図８は、ＮＭ－Ｆ９から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂの合成３０量体グリコシル化ＭＵＣ１ペプチドに対する結合活性が、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂの結合活性よりも約５０％高い図である。

【図９】図９は、ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８から単離したキメラＰａｎｋｏ２の合成３０量体グリコシル化ＭＵＣ１ペプチドに対する結合活性が、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏ２の結合活性よりも約５０％高い図である。

【図１０】図１０は、ウエスタンブロット解析を行ない、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］において発現させた抗体分子組成物の種々にシアリル化された重鎖が同定された図である。タンパク質をニトロセルロースに移し、抗ヒトＩｇＧ二次抗体（図１０Ａ）または２－６シアリル化を検出するＳＮＡ（図１０Ｂ）のいずれかによって可視化した。

【図１１】図１１は、ウエスタンブロット解析を行ない、ＣＨＯｄｈｆｒ－またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８において発現させた抗体分子組成物の種々にシアリル化された重鎖が同定された図である。タンパク質をニトロセルロースに移し、２－６シアリル化を検出するＳＮＡによって可視化した。

【図１２】図１２は、ＥＬＩＳＡ解析を行ない、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＧＴ－２ｘ、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６において発現させた種々にシアリル化された抗体分子組成物が同定された図である。

【図１３ａ】図１３は、ＥＬＩＳＡ解析を行ない、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８において発現させたセツキシマブの種々にシアリル化された抗体分子組成物が同定された図である。シアリル化は、（Ａ）α２－６シアリル化を検出するＳＮＡ、ノイラミニダーゼ処理あり、またはなし、および（Ｂ）α２－３　シアリル化を検出するＭＡＬ　Ｉで解析した。

【図１３ｂ】図１３は、ＥＬＩＳＡ解析を行ない、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８において発現させたセツキシマブの種々にシアリル化された抗体分子組成物が同定された図である。シアリル化は、（Ａ）α２－６シアリル化を検出するＳＮＡ、ノイラミニダーゼ処理あり、またはなし、および（Ｂ）α２－３　シアリル化を検出するＭＡＬ　Ｉで解析した。

【図１４】図１４は、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞から単離したキメラ抗体Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏ２のＳＮＡで染色したドットブロットの図である。

【図１５】図１５は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂが、ヌードマウスの血清中において、ＮＭ－Ｆ９から単離したものよりも長いアベイラビリティを有する図である。

【図１６】図１６は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８（レーン１）およびＧＴ－２ｘ（レーン２）において産生されたｈＦＳＨのＳＤＳ－Ｐａｇｅ解析の図である。還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって１レーンあたり５μｇの精製ｈＦＳＨが分離され、クマシーブリリアントブルーで染色した。マーカー部は２１～１０８ｋＤの範囲を示す。

【図１７】図１７は、ウエスタンブロット解析を行ない、差示的にシアリル化されたｈＦＳＨ分子組成物が同定された図である。ＣＨＯ（レーン１）、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８（レーン２）およびＧＴ－２ｘ（レーン３）から、還元条件下での１０％アクリルアミドゲルにおけ

るＳＤＳ－Ｐａｇｅによって、１μｇのｈＦＳＨ分子組成物を分離した。タンパク質をニトロセルロースに移し、２－６シアリル化を検出するＳＮＡで可視化した。

【図１８】図１８は、Ｎ－グリカンが、ＦｃのＣ$_{H}$２ドメイン内の保存Ａｓｎ　２９７残基に共有結合されたＩｇＧ抗体を示す図である。図示のように、Ｆａｂドメイン内に、さらにＮ－結合オリゴ糖が存在していてもよく、これは、その抗体の結合活性に影響を及ぼすことがあり得る。抗体上の片方のみのグリカン構造を図示している。Ｆｃの糖鎖は、バイセクト型の鎖構造であり、主として２つのＣ$_{H}$２ドメイン内に位置し、各オリゴ糖の１つのアーム／アンテナがＣ$_{H}$２ドメインの疎水性領域と相互作用する。ポリクローナル骨髄腫ヒトＩｇＧの構造解析により、Ｆｃは、図１８に示したような種々の量の基本バイアンテナ型コア構造を含むことが示された。記号の意味は、表中に対応させて示している。前記コア構造は、近位のＧｌｃＮＡｃにゼロ（Ｇ０）、１（Ｇ１）または２（Ｇ２）個の末端ガラクトース残基および／またはバイセクトＧｌｃＮＡｃおよび／またはフコース残基を含むものであり得る。また、他方のＧｌｃＮＡｃ残基またはガラクトース残基に、さらにフコース分子が存在していてもよい。シアル酸は、ＡＤＣＣに対して負の影響を有することが報告されていることから、抗体の性質に応じて末端シアル酸が存在する場合と存在しない場合があり得るため、この多様性は、さらに大きい。

【発明を実施するための形態】

【００７９】

本発明の好ましい実施形態において、核酸は、該タンパク質またはその断片の分泌型をコードしたものである。好ましい実施形態において、分泌型は、膜貫通ドメインがないものである。

【００８０】

本発明によれば、用語「タンパク質分子組成物」は、本発明の方法に従って、特に本発明の宿主細胞において発現させた任意のタンパク質分子の分子群であって、単離され得るものを意味する。前記タンパク質分子組成物は、少なくとも１つのタンパク質分子を含むものである。前記タンパク質組成物は、タンパク質分子の少なくとも１つのグリコフォームを含むものである。タンパク質分子の前記グリコフォームは、特定のグリコシル化、または少なくとも１つの糖構成ブロック（例えば、限定されないが、さらなるガラクトース、シアル酸、ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃ、フコース）が異なる糖鎖、または別の糖修飾（限定されないが、同じタンパク質分子の別のグリコフォームのアセチル化もしくは硫酸化（ｓｕｌｆａｔａｔｉｏｎ）など）を有するタンパク質分子を意味する。本発明の別の実施形態において、タンパク質分子組成物は、宿主細胞内で発現させた１つより多くのタンパク質分子の分子群を含むものであり得る。好ましい実施形態において、本発明のタンパク質分子組成物は、細胞において発現させたとき、高活性を媒介するタンパク質分子のかかるグリコフォーム（１つまたは複数）の分子を、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマの少なくとも１種類、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から得られる同じタンパク質分子のタンパク質分子組成物よりも、パーセントにおいて多く含むものである。さらに好ましい実施形態において、本発明のタンパク質分子組成物は、細胞において発現させたとき、高活性を媒介するタンパク質分子のかかるグリコフォーム（１つまたは複数）の分子を、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマ、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から得られる同じタンパク質分子のタンパク質分子組成物よりもパーセントにおいてより多く含むものである。

【００８１】

本発明によれば、用語「抗体分子」は、任意の完全体の抗体もしくは抗体断片または抗体断片を含む分子を意味する。前記完全体の抗体は、任意のクラスもしくはサブクラスの任意の抗体もしくは免疫グロブリン分子、または当業者に周知の少なくとも１つの免疫グロブリンドメイン（限定されないが、動物起源、例えば限定されないが、ヒト、サル、齧

歯類、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、トリ、ニワトリもしくはサメ起源のＩｇＧ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ）を含む任意の分子であり得、また、種々の動物由来の抗体、例えば、キメラもしくはヒト化抗体（これは、当業者には周知のように、種々の割合の例えばマウス配列とヒト配列が結合して完全体の抗体となっている、および／または変異されて例えば免疫原性が低減もしくは親和性が増大したものなど）のタンパク質配列を含む分子であり得る。本発明の別の実施形態において、前記完全体の抗体はまた、少なくとも１つのさらなるアミノ酸またはポリペプチド配列を有する前述の完全体の抗体であり得る。

【００８２】

好ましい実施形態において、前記完全体の抗体は、ヒト、ヒト化またはヒトＦｃ領域を含むキメラＩｇＧ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４もしくはＩｇＭである。なおさらに好ましい本発明の実施形態において、前記完全体の抗体は、ヒト、ヒト化またはヒトＦｃ領域を有するキメラＩｇＧ１、ＩｇＧ４もしくはＩｇＭである。前記ヒトＦｃ領域は、ヒト抗体のＦｃ領域の定常ドメインの少なくとも１つの２０アミノ酸の配列、より好ましくは少なくとも１００アミノ酸で構成され、好ましくは、ヒト抗体の少なくとも１つのＦｃドメインを含み、より好ましくはヒトＣγ２ドメインを含み、より好ましくは、特定のあるクラスまたはサブクラスのヒト抗体のＦｃ領域のすべての定常ドメインを含む。また、前記ヒトＦｃ領域は、少なくとも１つのアミノ酸が変異されたヒト配列を含むものであり得る。

【００８３】

本発明の最も好ましい実施形態において、完全体の抗体分子は、（ｉ）例えば、ヒト抗体産生血液細胞（１種類もしくは複数種）またはマウス抗体遺伝子座が少なくとも一部ヒト抗体配列で交換されたトランスジェニックマウスから生成される完全ヒト抗体、または（ｉｉ）マウスもしくはラット抗体の可変領域（フレームワーク領域など）の少なくとも一部分またはフレームワークの少なくとも１つのアミノ酸がヒト配列に交換または変異され、ヒトにおいて低免疫原性であり、ヒト定常ドメインを含む完全体のヒト化抗体、または（ｉｉｉ）可変領域がマウスまたはラットのものであり、ヒト定常ドメインを含む完全体のキメラ抗体のいずれかである。

【００８４】

前記完全ヒト抗体、完全体のヒト化抗体、および完全体のキメラ抗体またはその一部分、ならびに適当なさらなる配列を有する、または有しないこのような抗体分子を構築、同定、試験、最適化および選択する方法、ならびにこのような抗体分子をコードする最も適当な核酸を構築、同定、試験および選択する方法は、当業者にはわかるであろう。

【００８５】

前記抗体断片は、前記完全体の抗体の少なくとも２０アミノ酸、好ましくは少なくとも１００アミノ酸を含む抗体の任意の断片である。好ましい実施形態において、該抗体断片は、抗体の結合領域を含むもの（Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ）２など）、多数の結合ドメインを含むマルチボディ（ダイアボディ、トリアボディもしくはテトラボディなど）、単一ドメイン抗体またはアフィボディ（ａｆｆｉｂｏｄｙ）である。別の好ましい実施形態では、該抗体断片は、その定常ドメインの全部または一部を有する、好ましくは第２のドメイン（Ｃγ２ドメイン）を含むＦｃ領域を含むものである。別の実施形態では、該抗体断片は、少なくとも１つのアミノ酸、ポリペプチドストレッチまたはドメイン完体が欠失した切断型の完全体の抗体である。該分子は、安定化またはリンカーなどの分子の結合の改善のためのさらなる配列と結合されたものであってもよい。

【００８６】

抗体断片を含む前記分子は、前記抗体断片または少なくとも２０アミノ酸の他の免疫グロブリンドメインのいずれかを含む任意の分子である。好ましい実施形態において、抗体断片を含む前記分子は、多重結合特異性を有する分子（二重もしくは三重特異的抗体）を作製するため、または結合ドメインの多量体化をもたらすためのＭＢＰ（マンナン結合タンパク質）ドメインなどの多量体化配列を有する分子を作製するため、または検出、精製

、分泌または安定化のための配列（タグ、局在シグナルもしくはリンカーなど）を有する分子を作製するために、抗体断片が他のタンパク質配列（エフェクター配列など、例えば、サイトカイン、共起刺激因子、毒素、または他の抗体由来の抗体断片）と融合された融合分子である。別の好ましい実施形態では、抗体断片を含む前記分子は、完全体の抗体またはその一部分のＦｃ領域を含む、好ましくは、第２の定常ドメイン（Ｃγ２ドメイン）を含む融合分子である。前記融合分子は遺伝学的手段によって融合され、ここで、該分子は、１つの核酸にコードされたもの、または少なくとも２つの核酸の共発現によって融合されたもの（該融合は、非共有結合性または共有結合性タンパク質相互作用によって引き起こされる）、または両者の組合せによって融合されたものである。抗体断片と別のポリペプチド配列またはタンパク質分子間の遺伝子融合は遺伝子操作によってなされ得、ここで、両方の部分は、間にさらなるアミノ酸を有する、または有しない単一の核酸にコードされている。さらに好ましい実施形態において、前記融合分子は、抗体断片（単一ドメイン抗体など）由来の少なくとも１つの結合領域、またはＦａｂもしくは抗体由来でない結合配列（レクチンドメインなど）、および第２のドメイン（Ｃγドメイン）を含むＦｃ領域またはその一部分を含むものである。別の好ましい実施形態において、融合分子は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＧＭ－ＣＳＦ、ペプチド毒素、またはその一部分を含む。該分子は、例えば遺伝学的手段によって融合されたものであり、ここで、該分子は、１つの核酸にコードされたもの、または少なくとも２つの核酸の共発現によって融合されたもの（該融合は、非共有結合性または共有結合性タンパク質相互作用によって引き起こされる）、または抗体断片（ＭＢＰの多量体化配列に連結された単一ドメイン抗体、ＦａｂもしくはＦａｂなど）由来のコミオン（ｃｏｍｉｏｎ）によって融合されたものである。

【００８７】

該抗体分子またはその一部分、ならびに適当なさらなる配列を有する、または有しないこのような抗体分子を構築、同定、試験および選択する方法、ならびにこのような抗体分子をコードする最も適当な核酸を構築、同定、試験および選択する方法はすべて、当業者にはわかるであろう。

【００８８】

本発明によれば、用語「抗体分子組成物」は、本発明の宿主細胞において発現させた任意の抗体分子の分子群であって、単離され得るものを意味する。前記抗体分子組成物は、少なくとも１つの抗体分子を含むものである。前記抗体組成物は、抗体分子の少なくとも１つのグリコフォームを含むものである。抗体分子の前記グリコフォームは、特定のグリコシル化、または少なくとも１つの糖構成ブロック（例えば、限定されないが、さらなるガラクトース、シアル酸、ｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃ、フコース）が異なる糖鎖、または別の糖修飾（限定されないが、同じ抗体分子の別のグリコフォームのアセチル化もしくは硫酸化など）を有する抗体分子を意味する。本発明の別の実施形態において、抗体分子組成物は、宿主細胞内で発現させた１つより多くの抗体分子の分子群を含むものであり得る。好ましい実施形態において、本発明の抗体分子組成物は、細胞において発現させたとき、高Ｆｃ媒介性細胞性細胞傷害および／または改善された結合を媒介する抗体分子のかかるグリコフォーム（１つまたは複数）の分子を、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマの少なくとも１種類、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から得られる同じ抗体分子の抗体分子組成物よりも、パーセントにおいて多く含むものである。さらに好ましい実施形態において、本発明の抗体分子組成物は、細胞において発現させたとき、高Ｆｃ媒介性細胞性細胞傷害および／または改善された結合を媒介する抗体分子のかかるグリコフォーム（１つまたは複数）の分子を、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマ、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から得られる同じ抗体分子の抗体分子組成物よりもパーセントにおいてより多く含むものである。

【００８９】
本発明によれば、用語「ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞」または同等の系統的論述は、ヒト骨髄性白血病起源の任意の細胞もしくは細胞株、または白血病患者から得られ得る任意のヒト骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、またはヒトドナーから得られ得る任意の骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、または前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株、または前述の細胞の少なくとも１種類を含む細胞もしくは細胞株の混合物を意味する。
【００９０】
本発明の別の実施形態において、本発明の前記ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞または前記不死化ヒト血液細胞はまた、前述の宿主細胞の少なくとも１種類、特に骨髄性白血病起源のものを、ヒトまたは動物起源の別の細胞（限定されないが、Ｂ細胞、ＣＨＯ細胞など）と融合させることにより得られたかかる細胞または細胞株を包含する。当業者は、適当なヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞のためのヒト由来の適当な細胞および細胞株を取得、作製および／または不死化するのに適当な供給源および方法を特定し、使用することができよう。
【００９１】
前記宿主細胞由来の細胞または細胞株という用語は、前記骨髄性白血病起源の宿主細胞の事前の変異または遺伝子操作を伴う、または伴わない任意の培養およびクローニング手段によって得られ得る任意の細胞または細胞株を意味し、所望の性質を有する前記宿主細胞由来の細胞または細胞株の選択を含む。前記培養およびクローニングは、好ましくは、単一細胞クローニング法、例えば、限界希釈またはフローサイトメトリー系細胞分取などを使用し、細胞の多数回の継代培養およびクローニングによって、異なる性質を有する細胞クローンが初代細胞培養物、細胞培養物から、および細胞クローンの培養物からも得られ得ることに基づく。好ましい実施形態において、前記宿主細胞由来の前記細胞または細胞株は、レクチンまたは糖鎖結合抗体に結合させることにより選択される。前記変異は、物理的、化学的または生物学的変異原、例えば限定されないが、放射線、アルキル化剤またはＥＭＳ（メタンスルホン酸エチル）、レクチンなどのタンパク質、またはウイルス粒子などを用いた当業者に周知の処理によって行なわれ得る。前記遺伝子操作は、当業者に周知の方法、例えば、部位特異的相同組換えによる遺伝子のノックアウト、トランスポゾンの使用、部位特異的変異誘発、特定のある核酸のトランスフェクション、または遺伝子もしくは遺伝子産物のサイレンシングなどによって行なわれ得る。前記培養およびクローニングの方法、前記変異および変異原ならびに前記遺伝子操作は当業者には周知であり、一例は、ＷＯ２００５／０１７１３０　Ａ２、ＵＳ　２００３／０１１５６１４　Ａ１に詳細に示されており、あるいは本明細書に記載している。当業者は、本発明の適当な前記宿主細胞由来の細胞または細胞株の作製のための適当な方法または方法の組合せを選択および／または採用および／または改良することができよう。
【００９２】
前記宿主細胞由来の前記細胞または細胞株は、その親細胞または細胞株と比べて好都合な細胞の性質、例えば限定されないが、倍加時間が短い、成長が速い、高密度下で増殖する可能性、より多く産生され得る、無血清条件下および／またはタンパク質無含有培地中で培養される、クローニング効率が高い、ＤＮＡのトランスフェクション効率が高い、抗体分子組成物の発現速度が速い、発現される抗体分子組成物の活性が高い、発現される抗体分子組成物の均一性が高いおよび／または規模拡大のロバストネスが高いなどにより選択される。好都合な性質を有する細胞の選択方法は、当業者に周知であるか、または本明細書に記載されている。本発明は、（ａ）ヒト骨髄性白血病細胞を、レクチンまたは脱シアリル化エピトープもしくはシアル酸のないエピトープを認識し、シアリル化形態のエピトープに結合しないか、または有意に低度に結合する抗体とともにインキュベートすること、（ｂ）前記レクチンまたは抗体に結合された細胞を単離すること、（ｃ）該単離された細胞を適当な時間培養すること、および（ｄ）シアル酸を有するエピトープに結合するレクチンまたは抗体に強く結合する細胞（１つもしくは複数）または細胞クローンを選択

することを含む、本発明の宿主細胞の作製方法を提供する。

【００９３】

前記レクチンまたは脱シアリル化エピトープもしくはシアル酸のないエピトープを認識する前記抗体がＮｅｍｏｄ－ＴＦ１、Ｎｅｍｏｄ－ＴＦ２、Ａ７８－Ｇ／Ａ７またはＰＮＡであり、前記ヒト骨髄性白血病細胞が細胞株Ｋ５６２、ＫＧ－１、ＭＵＴＺ－３、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｈ９、Ｈ９、ＮＭ－Ｈ１０である上記の方法がより好ましい。

【００９４】

高いシアリル化および有利な生物工学的性質（急速な細胞増殖など）を有する本発明の宿主細胞の作製方法は、（ｉ）起源細胞としての本発明のヒト骨髄性白血病細胞（好ましくは、Ｋ５６２）をレクチンまたは好ましくは、脱シアリル化エピトープもしくはシアル酸のないエピトープを認識し、シアリル化形態のエピトープに結合しないか、または低度に結合する抗体（限定されないが、Ｎｅｍｏｄ－ＴＦ１、Ｎｅｍｏｄ－ＴＦ２、Ａ７８－Ｇ／Ａ７、またはＰＮＡ（落花生（Ａｒａｃｈｉｓ　ｈｙｐｏｇａｅａ）、ピーナッツ凝集素由来のレクチン）など）（好ましくは、磁気ビーズに結合させたもの）とともにインキュベートすること、（ｉｉ）前記レクチンまたは抗体に結合された細胞を単離すること、（ｉｉｉ）該単離された細胞を適当な時間培養すること、および（ｉｖ）好ましくは単一細胞クローニング後、シアル酸を有するエピトープに結合するレクチンまたは抗体（ＳＮＡ　（セイヨウニワトコ凝集素）もしくはＭＡＬ（イヌエンジュ（Ｍａａｃｋｉａ　ａｍｕｒｅｎｓｉｓ）レクチン）、ＭＡＬ　Ｉ（イヌエンジュレクチンＩ）、好ましくはＳＮＡなど）に強く結合する細胞（１つもしくは複数）または細胞クローンを選択することを含む。

【００９５】

好ましい実施形態において、本発明は、（ｉ）Ｋ５６２を、磁気ビーズに結合させたＮｅｍｏｄ－ＴＦ１、Ｎｅｍｏｄ－ＴＦ２、Ａ７８－Ｇ／Ａ７、またはＰＮＡとともにインキュベートすること、（ｉｉ）前記レクチンまたは抗体に結合された細胞を単離すること、（ｉｉｉ）該単離された細胞を約１～６週間の適当な時間培養すること、および（ｉｖ）単一細胞クローニング後、ＳＮＡに強く結合する細胞クローンを選択することを含む、高いシアリル化および有利な生物工学的性質（急速な細胞増殖など）を有する本発明の宿主細胞の作製方法を提供する。好ましい実施形態において、該細胞は、起源細胞よりも強くＳＮＡに結合し、別の好ましい実施形態では、該細胞は起源細胞よりも速く増殖する。

【００９６】

本発明の好ましい実施形態では、起源細胞を、工程（ｉ）の前にメタンスルホン酸エチルで処理する。

【００９７】

当業者は、本発明の意味において、このような宿主細胞を作製するために、適当な条件および方法を選択し、これらを最適化することができよう。一部の工程のさらなる詳細は、ＷＯ２００５／０１７１３０　Ａ２およびＷＯ２００５／０８０５８５　Ａ１を見るとよい。

【００９８】

一実施形態によれば、以下のグループ１～４：

（ａ）Ｋ５６２などの高いシアリル化活性を有する宿主細胞を含むグループ１；

（ｂ）遺伝子欠失または発現阻害手段（例えば、ＲＮＡｉ）のためシアリル化が低いか、またはシアリル化がなく、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］およびＧＴＸ－２と同等の活性を有する宿主細胞ならびにＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］およびＧＴＸ－２を含むグループ２；

（ｃ）ＮＭ－Ｈ９およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８などのＫ５６２よりも高いシアリル化度を有する宿主細胞を含むグループ３；

（ｄ）ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６およびＮＭ　Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２などのフコシル化活性

が低いか、または該活性がない宿主細胞を含むグループ４
から選択される不死化ヒト血液細胞が宿主細胞として使用される。
【００９９】
好ましい実施形態において、作製される前記細胞株はＮＭ－Ｈ９Ｄ８である。上記の方法によって作製される最も好ましい細胞クローンとして、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８を選択し、２００６年9月１５日に、Ｇｌｙｃｏｔｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｒｏｂｅｒｔ－Ｒｏｅｓｓｌｅ－Ｓｔｒ．１０，１３１２５　ベルリン（ドイツ）が、ブラウンシュヴァイク（ドイツ）の「ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ」にＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６で寄託した。他の細胞クローン、例えば、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６（ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０７）などは、親細胞と１種類以上のレクチンとのインキュベーション、およびフローサイトメトリー細胞分取を用いたその後の単一細胞クローニング（これは、陽性選択手順または陰性選択と陽性選択の組合せによって行なった）によって選択した。安定な特性を有する細胞クローンを得るため、得られた細胞クローンを、上記の限界希釈によって少なくとも１回再クローニングした。
【０１００】
本発明の好ましい実施形態において、好ましくは宿主骨髄性白血病起源の細胞である前記不死化ヒト血液細胞は、無血清条件下で培養され、本発明のタンパク質／抗体分子組成物を産生する。なおさらに好ましい実施形態において、好ましくは宿主骨髄性白血病起源の細胞である前記不死化ヒト血液細胞は、無血清条件下で培養される。さらに、該タンパク質／抗体分子をコードする核酸をこのような細胞内に導入してもよく、また、該タンパク質／抗体分子組成物は、無血清条件下で単離され得る。無血清条件下で作業できることは、血清夾雑物が規制プロセスにおいて許容され得ないため、治療用タンパク質を作製する場合に特に重要である。
【０１０１】
本発明の好ましい実施形態において、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、細胞もしくは細胞株Ｋ５６２、ＫＧ１、ＭＵＴＺ－３、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］または前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株、または前述の細胞の少なくとも１種類を含む細胞もしくは細胞株の混合物である。宿主細胞は、好ましくは、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０６］、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６ ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８０７、もしくはＮＭ　Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２（ＤＳＭ　ＡＣＣ　２８５６）、ＧＴ－２Ｘ（２００７年9月7日に、Ｇｌｙｃｏｔｏｐｅ　ＧｍｂＨ、Ｒｏｂｅｒｔ－Ｒｏｅｓｓｌｅ－Ｓｔｒ．１０，１３１２５　ベルリン（ドイツ）が、ブラウンシュヴァイク（ドイツ）の「ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ」に、ＤＳＭ　ＡＣＣ　　で寄託）またはこれらの任意の細胞株由来の細胞もしくは細胞株からなる群より選択される。
【０１０２】
細胞ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］およびＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］は、Ｎｅｍｏｄ　Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ　＆　Ｃｏ．ＫＧ、Ｒｏｂｅｒｔ－Ｒｏｅｓｓｌｅ－Ｓｔｒ．１０，１３１２５　ベルリン、ドイツ（本出願人が本明細書に該寄託生物学的材料を記載することを許可した）により寄託された。
【０１０３】
本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、細胞もしくは細胞株Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、または前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株である。
【０１０４】

本発明の好ましい実施形態において、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、細胞もしくは細胞株Ｋ５６２（Ｋ５６２［ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２４３］など）、または前記宿主細胞由来の細胞もしくは細胞株である。

【０１０５】

本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、細胞もしくは細胞株Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ　２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、もしくはＧＴ－２Ｘ、もしくはＮＭ　Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２または前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株である。

【０１０６】

本発明のさらにより好ましい実施形態において、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、無血清条件下で培養され、本発明の抗体分子組成物を産生する細胞（１種類もしくは複数種）または細胞株Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、またはＧＴ－２Ｘ、またはＮＭ　Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２であり、最も好ましくは、無血清条件下で培養される本記載の細胞（１種類もしくは複数種）または細胞株であり、該抗体分子をコードする核酸をこのような細胞に導入してもよく、抗体分子組成物は、無血清条件下で単離される。

【０１０７】

本発明の最も好ましい実施形態において、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、無血清条件下で培養され、本発明の抗体分子組成物を産生する細胞（１種類もしくは複数種）または細胞株ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、ＧＴ－２Ｘ、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、またはＮＭ　Ｍ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２であり、最も好ましくは、無血清条件下で培養される本記載の細胞（１種類もしくは複数種）または細胞株であり、該抗体分子をコードする核酸をこのような細胞に導入してもよく、抗体分子組成物は、無血清条件下で単離される。

【０１０８】

一実施形態によれば、不死化ヒト血液細胞およびヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、シアリル化のない細胞株ＮＭ－Ｆ９およびＮＭ－Ｄ４または前記宿主細胞のいずれかに由来する同じ性質を有する細胞もしくは細胞株のうちの１種ではない。この実施形態は、高いシアリル化度が目標とされる場合に有益である。このような実施形態では、宿主細胞は、好ましくは、Ｋ５６２、ＮＭ　Ｈ９Ｄ８、ＮＭ　Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ　Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２およびこれらの任意の宿主細胞由来の宿主細胞からなる群より選択される。

【０１０９】

本発明との関連で記載した細胞株は１４～２４時間の倍加時間を有し、これは、本発明の細胞株にもよるが、他の哺乳動物発現系と比べて非常に速い。

【０１１０】

さらに、ヒト細胞は通常、ＤＨＦＲ遺伝子が欠失しておらず、したがってｄｈｆｒ／メトトレキサート増幅系の使用が可能でないため、ヒト細胞株における高収率の抗体発現に適した一般的な高発現ベクター系は知られていない。したがって、本発明のさらなる実施形態によれば、産生物の収率の増大を可能にする実施形態が提供される。

【０１１１】

この実施形態によれば、さらに、葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸が宿主細胞内に導入される。ジヒドロ葉酸還元酵素またはＤＨＦＲは、ＮＡＤＰＨを電子供与体として使用し、ジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元し、これらは、１－炭素転移化学反応に使用されるテトラヒドロ葉酸補因子種に変換され得る。葉酸代謝拮抗薬はＤＨＦＲ酵素を阻害し、細胞死をもたらす。葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸を得るため、該核酸でトランスフェクトされた細胞を選択するためのツールであって、さらに、宿主細胞内で発現される核酸の増幅を可能にするツールを提供する

。

【０１１２】

前記葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸は、例えば、宿主細胞内で発現させるタンパク質／抗体をコードする核酸とは別個のベクターによって導入され得る。葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードするベクターは、該タンパク質／抗体をコードする核酸を含むベクターと基本的に同時にトランスフェクトすることが好ましい。この実施形態では、前記発現対象のタンパク質／抗体をコードする核酸を宿主細胞のゲノム内において、該葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸と同じ遺伝子部位に組み込むことが推奨され、これは、前記タンパク質／抗体をコードする核酸の増幅が所望される場合に有益である。

【０１１３】

あるいはまた、発現対象の前記タンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸、ならびに該葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸を含むベクター系が使用され得る。

【０１１４】

次いで、宿主細胞を前記葉酸代謝拮抗薬とともに培養する。これは、前記葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする核酸で成功裡にトランスフェクトされた宿主細胞が、葉酸代謝拮抗薬の存在にもかかわらず培養され得るという効果を有する。そのため、成功裡にトランスフェクトされた細胞が選択され得る。

【０１１５】

さらなる実施形態によれば、前記タンパク質／抗体の少なくとも一部分をコードする核酸配列を、培養液中の葉酸代謝拮抗薬濃度を段階的に上げることにより増幅する。増殖培地中での葉酸代謝拮抗薬濃度の上昇により、ゲノム内の葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントコピーの増加がもたらされる。これは、細胞内での組換え事象によって達成されていると想定される。そのため、同様に、発現対象のタンパク質の少なくとも一部分をコードする核酸のコピー数もまた、前記タンパク質をコードする核酸がゲノム内で葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントの近傍に存在している場合、増加し、これは、個々のベクターを同時にトランスフェクトすること、または両方の核酸配列を含む１つのベクターを使用することのいずれかによって促進され得る。この機構によって、該タンパク質／抗体を高収率で発現する宿主細胞が得られる。

【０１１６】

好ましくは、葉酸代謝拮抗薬はメトトレキサートである。

【０１１７】

前記タンパク質、好ましくは抗体分子またはその一部分をコードする核酸配列は、好ましくは、前記宿主細胞を葉酸代謝拮抗薬、好ましくはメトトレキサーとともに、連続して少なくとも２回培養することにより増幅され、このとき、前記葉酸代謝拮抗薬、好ましくはメトトレキサートの濃度は、連続する各回において少なくとも１００％増加する。

【０１１８】

前記葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントを得るための適当な核酸は、配列番号１～９の群、好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードするものである。

【０１１９】

この増幅系に関するさらなる詳細および実施形態は、以下にも詳細に記載している。

【０１２０】

また、本発明は、

（ａ）ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内に、タンパク質、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および配列番号１～配列番号９の群のポリペプチドの少なくとも１つ、好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸を導入すること；

（ｂ）前記タンパク質、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列を、前記宿主細胞をメトトレキサートとともに培養することにより、好ましく

は、前記宿主細胞をメトトレキサートとともに連続して少なくとも２回培養することにより増幅させること、このとき、メトトレキサートの濃度は、連続する各回において、好ましくは少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約１００％増加する；

（ｃ）前記宿主細胞を前記タンパク質、好ましくは抗体分子組成物の産生を許容する条件下で培養すること、および

（ｄ）好ましくは抗体分子組成物である前記タンパク質を単離すること

を含む、タンパク質、好ましくは抗体分子組成物を産生させる方法を提供する。

【０１２１】

また、本発明は、

（ａ）ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内に、タンパク質、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸導入すること；

（ｂ）前記宿主細胞を、好ましくは抗体分子組成物である前記タンパク質組成物の産生を許容する条件下で培養すること；および

（ｃ）増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有する好ましくは抗体分子組成物である前記タンパク質組成物を単離すること

を含む、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有するタンパク質組成物、好ましくは抗体分子組成物を産生させる方法を提供する。

【０１２２】

さらに、本発明は、

（ａ）ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内に、タンパク質、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および配列番号１～配列番号９の群のポリペプチドの少なくとも１つ、好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸を導入すること；

（ｂ）前記宿主細胞をメトトレキサートとともに培養することにより、好ましくは、前記宿主細胞をメトトレキサートとともに連続して少なくとも２回培養することにより、前記抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列を増幅させること、このとき、メトトレキサートの濃度は、連続する各回において、好ましくは少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約１００％増加する；

（ｃ）前記宿主細胞を、好ましくは抗体分子組成物である前記タンパク質組成物の産生を許容する条件下で培養すること；および

（ｄ）増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有する好ましくは抗体分子組成物である前記タンパク質組成物を単離すること

を含む、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性を有するタンパク質組成物、好ましくは抗体分子組成物を産生させる方法を提供する。

【０１２３】

抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする前記核酸、および配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む前記核酸は、１つの核酸または２つの個々の核酸であり得る。

【０１２４】

最適化されたたグリコシル化プロフィールを有するタンパク質を得るための適当な宿主細胞を選択するためには、本発明によるスクリーニング／選択方法を行なうことが好都合である。本発明による選択方法によって適当な宿主細胞が決定されたら、次いで、前記宿主細胞を、請求項１～２０に記載のタンパク質の産生に使用する。

【０１２５】

したがって、本発明はまた、宿主細胞を、以下の特徴的グリコシル化：

（ｉ）検出可能なＮｅｕＧｃが含まれない；および／または

（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組

成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて増大したガラクトシル化度を有する；および／または

（ｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％多いＧ２構造量を有する；および／または

（ｉｖ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないＧ０構造量を有する；および／または

（ｖ）検出可能な末端Ｇａｌα１－３Ｇａｌを含まない；および／または

（ｖｉ）該細胞において発現させたとき、前記タンパク質分子組成物中の前記諸タンパク質分子の糖鎖構造全体またはその諸タンパク質分子のうちのタンパク質１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物中の同じ量のタンパク質分子と比べて少なくとも５％少ないフコース量を含む；および／または

（ｖｉｉ）バイセクトＧｌｃＮＡｃを含有する少なくとも１つの糖鎖構造を含む；および／または

（ｖｉｉｉ）該細胞において発現させたとき、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物のシアリル化パターンと比べて改変されたシアリル化パターンを有する、

の少なくとも１つを有するタンパク質の産生に関して、

以下の工程：

（ａ）宿主細胞として少なくとも２種類の異なる不死化ヒト血液細胞内に、タンパク質またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を導入すること；

（ｂ）前記少なくとも２種類の異なる宿主細胞を培養すること、ここで、異なる各宿主細胞は、その他の宿主細胞によってもたらされるグリコシル化パターンと相違するグリコシル化パターンを有するタンパク質組成物を産生する；

（ｃ）該少なくとも２種類の異なる宿主細胞と異なるグリコシル化パターンを有する前記発現されたタンパク質組成物を単離すること；および

（ｄ）（ｉ）～（ｖｉｉｉ）に規定した特徴的グリコシル化の少なくとも１つを有するタンパク質組成物を産生する前記宿主細胞を選択すること

によって選択するための方法を提供する。

【０１２６】

グリコシル化パターンおよび前記パターンを得るための適当な細胞株に関する詳細は、先に記載しており、また、本発明による適当な宿主細胞を選択するためのスクリーニング方法に適用可能であり、該方法に適している。

【０１２７】

請求項１～２０に記載の産生方法を確立する前にそれぞれスクリーニング工程を行なうことは、この実施形態により、最適化されたグリコシル化パターンを有するタンパク質／抗体分子組成物の産生に最も適当な宿主細胞の選択が可能になるため、好都合である。このスクリーニング系の基本的概念に従い、目的のタンパク質を、相違するグリコシル化パターンを有する少なくとも２種類の異なる細胞株において発現させる。例えば、一方の細胞株は高いシアリル化度を示すものであり得、他方は、低いシアリル化度（またはフコシル化および／またはガラクトシル化）を示すものであり得るか、あるいは未知の特徴的グ

リコシル化を示すものであってもよい。したがって、この異なる細胞株から得られた産生物は、それぞれの細胞株でグリコシル化パターン特性を有する。

【０１２８】

次いで、例えばその活性（例えば、抗体のＡＤＣＣおよびＣＤＣ）、親和性、血清半減期ならびに他の重要な特性に関して異なる細胞株において産生されたタンパク質の特性が決定され得る。その結果により、グリコシル化パターンに関して最適化されたタンパク質を得るための最良のグリコシル化機構を有する細胞株の選択が可能になる。決定的な特性（例えば、親和性、血清半減期など）は種々であるため、この方法は特に好都合である。

【０１２９】

好ましくは、産生される前記タンパク質は、以下の特徴：

（ａ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたとき、抗体分子組成物である場合、同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する；

および／または

（ｂ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたとき、抗体分子組成物である場合、同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の結合より少なくとも５０％高い抗原媒介性またはＦｃ媒介性結合の増大を有する；

および／または

（ｃ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の収率よりも少なくとも１０％高い平均または最大収率の増大を有する、

の少なくとも１つを示す。

【０１３０】

一実施形態によれば、前記宿主細胞の少なくとも一方は、不死化ヒト血液細胞、好ましくはヒト骨髄性白血病起源の細胞、例えば、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘなどまたはその誘導細胞もしくは誘導細胞株である。

【０１３１】

前記少なくとも一方のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞は、以下のグループ１～４：

（ａ）Ｋ５６２などの高いシアリル化活性を有する宿主細胞またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株を含むグループ１、

（ｂ）ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］およびＧＴＸ－２などの、遺伝子欠失または発現抑制手段（例えば、ＲＮＡｉ）のためシアリル化が低いか、またはシアリル化がない宿主細胞またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株を含むグループ２、

（ｃ）ＮＭ－Ｈ９およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８などのＫ５６２よりも高いシアリル化度を有する宿主細胞またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株を含むグループ３、

（ｄ）ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６などのフコシル化活性が低いか、または該活性がない宿主細胞またはその誘導細胞もしくは誘導細胞株を含むグループ４

のうちの１つから選択され得る。

【０１３２】

好ましくは、スクリーニングプロセスに使用される宿主細胞の少なくとも２種類または３種類が上記のグループから選択される。しかしながら、解析される異なるグリコシル化パターンをさらに広げるため、別の起源由来の他の宿主細胞（例えば、Ｈｅｋ　２９３細胞）を、本発明によるスクリーニング系に含めることも可能である。

【０１３３】

得られた宿主細胞は、好ましくは、表９に示したグリコシル化パターンの少なくとも１つを示すタンパク質、特に抗体を産生するものである。

【０１３４】
本発明によれば、核酸を導入するという用語は、限定されないが、エレクトロポレーション、カチオン性脂質を用いたトランスフェクション、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、またはウイルス粒子（アデノウイルスもしくはレトロウイルスなど）による感染、またはその組合せなどの方法によって、哺乳動物宿主細胞（１種類または複数種）内に１つの核酸、または２つ以上の核酸を導入する当業者に周知の任意の方法を意味する。当業者は、本発明の１つ以上の核酸の導入のための適当な方法を選択および最適化することができよう。
【０１３５】
本発明によれば、抗体分子をコードする核酸は、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする任意の核酸である。この場合、本発明の抗体分子は、単一または多数の核酸分子にコードされたものであり得る。
【０１３６】
前記核酸にコードされる前記抗体分子の一部分は、少なくとも１つの２０アミノ酸の配列、より好ましくは少なくとも１００アミノ酸の抗体分子あるいは抗体分子の定常および／または可変ドメインで構成される。抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする合併（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）配列は、少なくとも１つの他の配列（例えば、イントロンなど）で分離されていてもよい。ドメインの配列は、少なくとも１つのアミノ酸変異を含むものであってもよい。
【０１３７】
本発明によれば、タンパク質分子をコードする核酸は、タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする任意の核酸である。この場合、本発明のタンパク質分子は、単一または多数の核酸分子にコードされたものであり得る。タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする配列は、少なくとも１つの他の配列（例えば、イントロンなど）で分離されていてもよい。タンパク質分子の配列は、少なくとも１つのアミノ酸変異を含むものであってもよい。
【０１３８】
好ましい実施形態において、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸は、抗体分子の少なくとも１つの可変および／または少なくとも１つの定常ドメイン、より好ましくは両方を含み、より好ましくは、少なくとも定常ドメイン（１つまたは複数）の部分にヒト配列を含むようなものであり、さらにより好ましくは、ヒトＣγ２ドメインを含むようなものであり、最も好ましくは、特定のあるクラスまたはサブクラスのヒト抗体のＦｃ領域のすべての定常ドメインと可変ドメインとを含むものである。
【０１３９】
一実施形態によれば、該タンパク質、特に抗体分子は、単一の核酸にコードされたものである。別の好ましい実施形態では、該タンパク質、特に、抗体分子は、２つの核酸または３つの核酸にコードされたものである。
【０１４０】
さらに好ましい実施形態において、核酸の１つは、抗体分子の一部分をコードするものであり、その軽鎖の可変および／または定常ドメインをコードしており、別の核酸は、該抗体分子の別の部分をコードするものであり、重鎖の可変ドメインおよび／または少なくとも１つの定常ドメインをコードしている。
【０１４１】
本発明によれば、配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む核酸は、前記核酸が、配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードしていることを意味する。本発明の宿主細胞内に成功裡に導入され得る限り、任意の数のこのような配列が適当である。好ましい実施形態において、前記核酸は、配列番号１～配列番号９の群の１つ、２つまたは３つのポリペプチド、より好ましくは１つのポリペプチド、最も好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードするものである。本発明の意味において、前記核酸は

また、少なくとも１つのアミノ酸変異を有する配列番号１～配列番号９の群から選択される、好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードするものであり得る（この変異が、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸の、本明細書の他の箇所に記載したメトトレキサートによる増幅を可能にするものである限り）。

【０１４２】

配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする核酸配列は、本明細書の他の箇所に記載した抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸と同じ核酸分子の一部分であり得るか、または個々の核酸分子上に存在するものであり得る。

【０１４３】

本発明の別の好ましい実施形態において、配列番号１～配列番号９の群から選択される、最も好ましくは配列番号１の配列をコードする核酸配列を含む個々の核酸は、本発明の宿主細胞内に、本発明の抗体分子またはその一部分をコードする前記核酸（１つまたは複数）とは別々に導入され得る。これは、配列番号１～配列番号９の群から選択される配列をコードする核酸配列を含む前記個々の核酸を、本発明の抗体分子またはその一部分をコードする前記核酸（１つまたは複数）の導入と一緒、該導入の前または後のいずれかで導入することによって行なわれ得る。好ましい実施形態では、これは並行して行なわれ、別の好ましい実施形態では、本発明の宿主細胞は、配列番号１～配列番号９の群から選択される、最も好ましくは配列番号１の配列をコードする核酸配列を含む前記個々の核酸を既に含むものである。

【０１４４】

さらに好ましい実施形態は、本実施例に記載している。

【０１４５】

好ましくは抗体分子またはその一部分であるタンパク質をコードする安定に導入された前記核酸または数コピーの前記核酸の増幅は、メトトレキサートを使用し、本明細書の他の箇所および本実施例に記載のようにして行なわれ得る。

【０１４６】

好ましい実施形態において、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする核酸は、該核酸が成功裡に導入された細胞の選択を可能にする少なくとも１つの他の遺伝因子、例えば限定されないが、抗生物質耐性遺伝子（例えば、限定されないが、プロマイシンまたはネオマイシン耐性をコードする遺伝因子）などを含む。さらに、このような核酸は、本発明の宿主細胞での抗体分子の発現のための１つまたはいくつかの遺伝因子（プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化部位および／またはイントロンなど）、ならびに細菌の複製起点、プロモーターおよびトランスフェクトされた細菌の選択のためのエレメント（細菌内での核酸の増幅用の抗生物質耐性遺伝子など）などの遺伝因子を含む。

【０１４７】

好適なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のＩＥ（極初期）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、熱ショックプロモーター、ＳＲαプロモーター、ＥＦ－１αプロモーターなどが挙げられる。ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーは、そのプロモーターと組合せて使用され得る。

【０１４８】

該遺伝因子およびさらなる遺伝因子は当業者には周知であり、当業者は、選択し、結合し、最適化し、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸内に導入することができる。好ましくは抗体分子もしくはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸または核酸の組合せの好ましい実施形態、ならびに使用される好ましい遺伝因子および組合せは、本明細書および本実施例に記載しているが、本発明は、かかる使用に限定されず、当業者によって組み合わされ、またはさらに最適化され得る。

【０１４９】
当業者は、適当な遺伝因子を選択および／または結合し、それに応じた核酸ベクターまたはエレメントを構築し、本発明の１つ以上の核酸を本発明による細胞株に導入することができよう。
【０１５０】
好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸または核酸の組合せ、ならびに前記さらなる遺伝因子、ならびにこれを抗体分子組成物の発現のために本発明の宿主細胞内に、または増幅のために細菌内に導入（例えば、トランスフェクト）するための方法は、当業者には周知であり、同様に、このような核酸（１つまたは複数）を構築、同定、試験、最適化、選択および結合するための方法、および該核酸を、成功裡にトランスフェクトされた細胞の選択のための適当なさらなる配列と結合するための方法、ならびにこのような抗体分子をコードする最も適当な核酸を構築、同定、試験および選択するための方法は当業者に周知である。
【０１５１】
本発明の好ましい実施形態は、本実施例に詳細に記載している。
【０１５２】
本発明の好ましい実施形態において、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする核酸は、該核酸が成功裡に導入された本発明の宿主細胞の選択のための遺伝因子、例えば限定されないが、ネオマイシンまたはプロマイシンなどを含み、より好ましくは、ＥＦ－１αまたはＣＭＶプロモーターなどのプロモーターをさらに含み、より好ましくはＣＭＶエンハンサーをさらに含み、より好ましくは、該核酸と複製のための遺伝因子（細菌内での前記核酸の増幅のためのＣｏｌＥ１複製起点など）でトランスフェクトされた細菌の選択を可能にする遺伝因子をさらに含み、さらにより好ましくは、ＣＯＳ細胞での前記核酸の増幅のための遺伝因子（ＳＶ４０起点など）をさらに含む。このようなエレメントは当業者には周知であり、当業者は、選択、結合、最適化および使用することができる。
【０１５３】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、先に記載したタンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする前記核酸は１つの核酸配列を含むものである。好ましくは、タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする前記核酸は、さらに、プロマイシン耐性もしくはネオマイシン耐性をコードする遺伝因子、または配列番号１～配列番号９の群、最も好ましくは配列番号１から選択される少なくとも１つの配列をコードする核酸配列をコードしている。
【０１５４】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、先に記載した抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする前記核酸は、該抗体分子の重鎖および／または軽鎖の可変ドメインと少なくとも１つの定常ドメインをコードする少なくとも１つの配列を含む。
【０１５５】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、先に記載した抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする前記核酸は、該抗体分子の軽鎖の可変ドメインと定常ドメイン、または完全体の該抗体分子の重鎖の可変ドメインとすべての定常ドメインをコードする少なくとも１つの配列を含む。
【０１５６】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、先に記載した前記核酸の１つは、該抗体分子の軽鎖の可変ドメインと定常ドメインをコードする少なくとも１つの配列を含む該抗体分子の少なくとも一部分をコードしており、先に記載した前記核酸の第２のものは、該抗体分子の重鎖の可変ドメインと少なくとも１つの定常ドメイン、好ましくはすべての定常ドメインをコードする少なくとも１つの配列を含む該抗体分子の他の少なくとも一部分をコードしており、両方の核酸を本発明の同じ宿主細胞内に導入する。好ましくは、前記核酸の一方は、さらに、プロマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしており、前

記核酸の他方は、さらに、ネオマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしている。
【０１５７】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする先に記載した前記核酸は、該タンパク質分子またはその少なくとも一部分の２つのアミノ酸配列をコードする少なくとも２つの核酸配列を含む。
【０１５８】
好ましくは、前記核酸の１つは、さらに、プロマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしており、前記核酸の他の１つは、さらに、ネオマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしている。より好ましくは、前記核酸の１つは、さらに、プロマイシンまたはネオマイシン耐性、好ましくはプロマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしており、前記核酸の他の１つは、さらに、配列番号１～配列番号９の群、最も好ましくは配列番号１から選択される少なくとも１つの配列をコードする核酸配列を含む。
【０１５９】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、タンパク質分子またはその少なくとも一部分をコードする先に記載した前記核酸は、該タンパク質分子またはその少なくとも一部分の３つのアミノ酸配列をコードする３つの核酸配列を含む。
【０１６０】
好ましくは、前記核酸の１つは、さらに、プロマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしており、前記核酸の他の１つは、さらに、ネオマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしており、前記核酸の他の１つは、さらに、配列番号１～配列番号９の群、最も好ましくは配列番号１から選択される少なくとも１つの配列をコードする核酸配列を含む。
【０１６１】
さらにより好ましい実施形態において、前記核酸の１つは、さらに、プロマイシンまたはネオマイシン耐性をコードする遺伝因子をコードしており、前記核酸の他方は、さらに、配列番号１～配列番号９の群、最も好ましくは配列番号１から選択される少なくとも１つの配列をコードする核酸配列を含む。さらにより好ましい実施形態において、軽鎖の可変ドメインと定常ドメインをコードする配列を含む前記核酸の１つは、さらに、配列番号１～配列番号９の群、最も好ましくは配列番号１から選択される少なくとも１つの配列をコードする核酸配列を含み、前記核酸の他方は、該抗体分子の重鎖の可変ドメインと少なくとも１つの定常ドメイン、好ましくはすべての定常ドメインをコードする配列を含み、さらに、プロマイシンまたはネオマイシン耐性、好ましくはプロマイシン耐性をコードする核酸配列を含む。
【０１６２】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする前記核酸は、該抗体分子の軽鎖の可変ドメインと定常ドメインをコードする少なくとも１つの配列と、該抗体分子の重鎖の可変ドメインと少なくとも１つの定常ドメイン、好ましくはすべての定常ドメインをコードする少なくとも１つの配列を含む。
【０１６３】
本発明の好ましい実施形態において、上記および他の箇所に記載の本発明の核酸にコードされる定常ドメインは、ＩｇＧもしくはＩｇＭ、好ましくはヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ４もしくはＩｇＭのヒト定常ドメイン、または１つのドメインもしくはそのドメインの組合せであり、このとき、好ましくは、少なくとも１つのイントロンを含むゲノム配列またはゲノム配列由来の配列が使用され、これは、当業者が選択、構築および最適化することができる。
【０１６４】
本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明の好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸は、さらに、ＥＦ－１αプロモーター／ＣＭＶエンハンサーまたはＣＭＶプロモーター由来のプロモーター、好ましくは、ＣＭＶ－Ｅを含む。

【０１６５】
本発明のさらに好ましい実施形態において、好ましくは本発明の抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸は、さらに、分泌シグナルペプチド、好ましくはＴ細胞受容体分泌シグナルを含む。
【０１６６】
本発明のなおさらに好ましい実施形態において、本発明の好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸は、さらに、分泌シグナルペプチド、好ましくは配列番号１０を含む。
【０１６７】
好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分であるタンパク質をコードする前記核酸または核酸の組合せ、ならびに前記さらなる遺伝因子、ならびにこれらを導入するための方法は当業者に周知であり、同様に、このような核酸（１つまたは複数）を構築、同定、試験、最適化、選択および結合するための方法、および該核酸を、成功裡にトランスフェクトされた細胞の選択のための適当なさらなる配列と結合するための方法、ならびにこのような抗体分子をコードする最も適当な核酸を構築、同定、試験および選択するための方法は当業者に周知である。
【０１６８】
本発明の好ましい実施形態は、本実施例に詳細に記載している。
【０１６９】
該核酸の導入は、一過的または安定的のいずれかであり得る。
【０１７０】
本発明によれば、タンパク質もしくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列を、前記宿主細胞を葉酸代謝拮抗薬、特にメトトレキサートとともに培養することにより増幅させるという用語は、発現対象のタンパク質（例えば、抗体分子など）またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸、および葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアント、好ましくは配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸が導入された本明細書の他の箇所に記載した本発明の宿主細胞が、少なくとも１種類の葉酸代謝拮抗薬、好ましくはメトトレキサート濃度によって培養されることを意味する。典型的な培養期間は、各回で１～２週間、典型的な濃度は、約２０ｎＭから３０００ｎＭ、好ましくは約５０ｎＭ～２０００ｎＭ、より好ましくは約１００ｎＭ～２０００ｎＭである。葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサート増幅処理の持続期間、ならびに本発明の核酸の濃度およびそれに応じたベクターは、当業者によって最適化され得、また、本実施例の好ましい実施形態に記載している。至適増幅条件は、種々のコードタンパク質／抗体分子間、および上記の種々の核酸もしくは核酸構築物またはその組合せの使用間で異なり得る。当業者は、本発明の最も適当な条件および核酸を選択および最適化することができよう。前記増幅により、葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサート培養なしよりも、または少なくとも１種類の葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアントをコードする該核酸配列の導入なしよりも多くのコピー数の該タンパク質／抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸が、宿主細胞のゲノム内に組込まれることになり、特に、配列番号１～配列番号９の群のポリペプチドおよび／または前記増幅により、該タンパク質／抗体分子組成物の産生の増加がもたらされる。
【０１７１】
本発明の好ましい実施形態において、タンパク質／抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸（１つまたは複数）が導入された前記宿主細胞において該核酸を増幅のための前記宿主細胞は、配列番号１～配列番号９の群のポリペプチドの少なくとも１つ、好ましくは配列番号１のポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む少なくとも１つの核酸が導入されたものであり（本明細書の他の箇所（例えば、好ましい実施形態）に記載）、ヒト骨髄性白血病起源、好ましくは、細胞もしくは細胞株ＫＧ１、ＭＵＴＺ－３、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ

ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株、より好ましくは、細胞もしくは細胞株Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株、さらにより好ましくは、細胞もしくは細胞株ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株である。

【０１７２】

本発明の好ましい実施形態では、前記宿主細胞を葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサートとともに、連続して少なくとも２回培養し、このとき、葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサートの濃度は、連続する各回で、好ましくは少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約１００％増大する。本発明のなおさらに好ましい実施形態では、前記宿主細胞を葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサートとともに、少なくとも３回、より好ましくは４回、より好ましくは５回、さらにより好ましくは６回連続して培養し、このとき、葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサートの濃度は、連続する各回で、好ましくは少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約１００％増大する。約２０ｎＭ～３０００ｎＭの葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサートの濃度が、さらにより好ましく、より好ましくは約５０ｎＭ～２０００ｎＭ、より好ましくは約１００ｎＭ～２０００ｎＭであり、さらにより好ましい約１００ｎＭ、２００ｎＭ、５００ｎＭ、１０００ｎＭ、２０００ｎＭは、好ましい実施形態であり、１００ｎＭから開始して連続する回で使用される。

【０１７３】

葉酸代謝拮抗薬耐性ＤＨＦＲバリアント、好ましくは配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする核酸配列の導入により、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞、特に、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株において、葉酸代謝拮抗薬／メトトレキサートとともに培養することによって、前記タンパク質／抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列の増幅が可能になることは驚くべきことである。

【０１７４】

配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする核酸配列の導入により、本発明の宿主細胞、特に、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株において、メトトレキサートとともに培養することによって、前記抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列の増幅が可能になることは、特に驚くべきことである。

【０１７５】

配列番号１～配列番号９の群の少なくとも１つのポリペプチドをコードする核酸配列の導入により、本発明の宿主細胞、特に、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株において、前記宿主細胞をメトトレキサートとともに連続して少なくとも２回培養することによって、前記抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列のなおさらなる増幅が可能になり、このとき、メトトレキサートの濃度が、連続する各回で少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約１００％増大することは、さらにより驚くべきことである。

【０１７６】
配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする核酸配列の導入により、本発明の宿主細胞、特に、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株において、前記宿主細胞をメトトレキサートとともに連続して少なくとも２回培養することによって、前記抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする核酸配列のなおさらなる増幅が可能になり、このとき、メトトレキサートの濃度が、連続する各回で少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約１００％増大することは、さらにより驚くべきことである。
【０１７７】
好ましい実施形態において、増幅が安定であるという用語は、宿主細胞分裂サイクルの少なくとも３５世代において、抗体分子組成物の高収率生成がもたらされることを意味する。該タンパク質／抗体分子またはその一部分をコードする安定に導入された前記核酸（１つまたは複数）の増幅は、メトトレキサートを使用し、上記および本実施例に記載のようにして行なわれ得る。
【０１７８】
さらに好ましい実施形態は、本実施例に記載している。
【０１７９】
本発明の好ましい実施形態において、本発明の核酸が導入された本発明の宿主細胞は、好ましくは、少なくとも１回の単一細胞クローニング／適当な発現を有する細胞クローンの選択／前記タンパク質／抗体組成物の分泌後に使用される。好ましくは、前記単一細胞クローニング／適当な発現を有する細胞クローンの選択／前記タンパク質／抗体組成物の分泌は、本明細書の他の箇所に記載した少なくとも１回のメトトレキサート増幅後に行なう。さらに好ましい実施形態において、前記細胞クローンは、メトトレキサート（好ましくは増大濃度のメトトレキサート、好ましくは少なくとも約２倍濃度のメトトレキサート）によるさらに少なくとも１回の増幅によってさらに増幅させ、さらにより好ましくは、その後、さらなる回の単一細胞クローニング／適当な発現を有する細胞クローンの選択／前記タンパク質／抗体組成物の分泌を行なう。このような好ましい実施形態では、特に高発現収率を有する細胞クローンが選択され得る。
【０１８０】
本発明によれば、前記抗体分子組成物またはタンパク質のそれぞれの配合物の産生を許容する条件下で前記宿主細胞を培養するという用語は、一般に、タンパク質／抗体分子をコードする少なくとも１つの核酸、好ましくは、本明細書の他の箇所に記載した本発明の前記核酸の好ましい実施形態を含む本発明の宿主細胞を、該タンパク質／抗体分子がタンパク質／抗体分子組成物の形態で、好ましくは、培地中に分泌され、好ましくは、本明細書の他の箇所に記載したような高収率および／または高い活性および／または高い均一性を有するように発現されることを可能にする培養条件下で培養することを意味する。当業者は、適当な培地ならびに培養条件（限定されないが、適当な時間、温度、ｐＨ、ガス供給（ｇａｓｉｎｇ）、供給量、培地、培地補給物質、容器または反応器のサイズおよび当業者に周知の原理など）を使用することにより、最も適当な培養条件を選択することができよう。当業者は、最も適当な条件を選択および最適化することができよう。好ましい実施形態を本実施例に記載するが、これらに限定されない。
【０１８１】
本発明の細胞の培養は、所望の抗体分子組成物が効率的に産生され得る任意の一般的な動物細胞培養法、例えば、バッチ培養、反復バッチ培養、流加培養および灌流培養によって行なわれ得る。好ましくは、所望のポリペプチドの生産性を挙げるために、流加培養または灌流培養が使用される。
【０１８２】
本発明のさらに好ましい実施形態において、前記培養は無血清条件下で行なわれ、なお

さらに好ましくは、タンパク質無含有培地または動物成分無含有培地で行なわれる。

【０１８３】

本発明による無血清培地への本発明の宿主細胞の適応は、驚くほど速く、ロバスト（ｒｏｂｕｓｔ）である。該適応は、例えば、血清含有培地中で継代培養した細胞を、市販の無血清培地に直接適応させることによって、または連続適応によって行なわれ得、ここで、無血清培地への直接適応が好ましく、好都合である。無血清培地への適応プロセス中、細胞のバイアビリティは一時的に低下し、場合によっては、細胞の死滅が引き起こされる。したがって、細胞のバイアビリティを回復させるため、またはこれを高い状態で維持するため、細胞を、適応用培地中の無血清培地に、１×１０^{5}～５×１０^{5}細胞／ｍｌ、好ましくは２×１０^{5}細胞／ｍｌの細胞密度で播種することが好ましい。４～７日間の培養後、密度が５×１０^{5}～１０×１０^{5}細胞／ｍｌに達した細胞を、無血清培地に適応された細胞として選択する。また、無血清培地への適応は、無血清培地組成物によるＦＣＳ補給培地の連続希釈によって行なわれ得る（連続適応）。当業者は、最も適当な条件を選択および最適化することができよう。好ましい実施形態を本実施例に記載するが、これらに限定されない。

【０１８４】

本発明の細胞を無血清培地に適応させた後、９６ウェルプレートでの限界希釈法、コロニー形成法などを使用することにより細胞株のクローニングが準備され得、細胞の性質により、その親細胞または細胞株と比べて好都合な、例えば限定されないが、倍加時間が短い、成長が速い、高密度下で増殖する可能性、より多く産生され得る、クローニング効率が高い、ＤＮＡのトランスフェクション効率が高い、抗体分子組成物の発現速度が速い、発現される抗体分子組成物の活性が高い、発現される抗体分子組成物の均一性が高いおよび／または規模拡大のロバストネスが高いなどの細胞または細胞株が選択される。好都合な性質を有する細胞の選択方法は、当業者に周知であるか、または本明細書に記載されている。

【０１８５】

本発明によれば、前記抗体分子組成物またはタンパク質の対応する配合物を単離するという用語は、一般に、本明細書の他の箇所に記載した前記該タンパク質／抗体分子またはその一部分をコードする核酸の少なくとも１つを含む前記宿主細胞によって発現されるタンパク質／抗体分子組成物が、当業者には周知の方法によってタンパク質／抗体分子組成物または前記タンパク質／抗体分子組成物のその一部を培養またはさらに富化もしくは精製した後、該増殖培地を使用することにより得られることを意味する。また、本発明の意味における前記タンパク質／抗体分子組成物は、本明細書の他の箇所に記載した特定のあるタンパク質／抗体分子が富化された前記タンパク質／抗体分子組成物の一部を意味する。

【０１８６】

好ましい一実施形態において、タンパク質／抗体分子組成物は、培養後に、例えば遠心分離手法によって培地を細胞および／または細胞残屑から分離することにより単離される。

【０１８７】

本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明のタンパク質／抗体分子組成物は、限外濾過、沈降法または当業者には周知の他の濃縮方法によって単離またはさらに富化される。

【０１８８】

本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明のタンパク質／抗体分子組成物は、当業者に周知のクロマトグラフィー法、例えば限定されないが、親和性クロマトグラフィー（相応する親和性物質、例えば限定されないが、プロテインＡ、プロテインＧ、抗抗体アイソタイプ抗体、レクチンクロマトグラフィー、抗体分子内に導入される特定のあるタグ（ＨＩＳ－タグもしくはｍｙｃ－ｔａｇなど）に対する抗体あるいは抗原などを使用）、またはイオン交換クロマトグラフィーなどによるタンパク質／抗体分子組成物の精製に

よって単離される。

【０１８９】

タンパク質またはタンパク質の特定のあるグリコフォームのさらなる精製または富化方法は、当業者には周知であり、当業者は、選択、採用、最適化し、単独でまたは上記の方法と組合せて使用し、本発明のタンパク質分子組成物またはその画分を単離またはさらに精製、分画もしくは富化することができる。

【０１９０】

本発明の好ましい実施形態において、本発明の主にＩｇＧの抗体分子組成物は、事前の超遠心分離を伴って、または伴わずに、プロテインＡクロマトグラフィーによって単離される。

【０１９１】

本発明の別の好ましい実施形態では、本発明の主にＩｇＭの抗体分子組成物が、事前の超遠心分離を伴って、または伴わずに、抗ＩｇＭ抗体クロマトグラフィーによって単離される。

【０１９２】

本発明の別の好ましい実施形態では、抗体分子の特定のあるグリコフォームが富化された本発明の抗体分子組成物が、事前の超遠心分離を伴って、または伴わずに、レクチン親和性クロマトグラフィーによって単離される。タンパク質またはタンパク質の特定のあるグリコフォームのさらなる精製または富化方法は、当業者には周知であり、当業者は、選択、採用、最適化し、単独でまたは上記の方法と組合せて使用し、本発明の抗体分子組成物またはその画分を単離またはさらに精製、分画もしくは富化することができる。

【０１９３】

好ましい実施形態において、抗体分子組成物は、プロテインＡカラムを用いて単離される。別の好ましい実施形態では、抗体分子組成物は、抗ＩｇＭカラムを用いて単離される。

【０１９４】

本発明によれば、用語「増大した活性」は、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質および／または抗体分子組成物の活性が、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマのうちの少なくとも１種類において発現させたときの同じタンパク質／抗体分子の少なくとも１種類のタンパク質／抗体分子組成物の活性よりも高いことを意味する。本発明の好ましい実施形態において、これは、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質／抗体分子組成物の活性が、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質／抗体分子のタンパク質／抗体分子組成物の活性よりも高いことを意味する。抗体では、前記増大した活性は、増大したＦｃ媒介性細胞性細胞傷害または増大した結合活性である。

【０１９５】

本発明の意味において、「活性」はまた、生物学的状況でタンパク質分子が発揮する機能または一組の機能である。本発明の意味において、用語「増大した活性」、その内容に相当する語句および文法的に対応する語句は、選択された適用に関して改善された、または最適な活性と理解されたく、このとき、該活性は、限界値に対して近似（例えば、極小化もしくは極大化）したもの、または先行技術によって産生された対応するタンパク質分子と比べて高い活性もしくは低い活性を示す中央値に設定したもののいずれかであり得る。また、本発明の意味における改善された、または増大した活性は、生物学的意味および／または製薬的意味において、改善された血清半減期、薬物動態、安定性、生物学的活性、結合、抗原性および／または免疫原性として有利な活性を意味する。例えば、タンパク質分子組成物の生物学的活性は、有害な生物学的効果を低減することにより、例えば、有害な免疫効果の刺激の低減または免疫原性の低減によって、ある程度増大され得る。

【０１９６】

本発明によるタンパク質分子組成物の活性は、該タンパク質の活性の測定が可能な適当なバイオアッセイにおいて測定され得る。当業者は、適当なバイオアッセイを特定、または適当なバイオアッセイを構築することができよう。本発明によれば、かかるバイオアッセイとしては、例えば、生物学的インビトロアッセイ、例えば、細胞系もしくは分子系または混合型アッセイ、例えば増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、細胞接着アッセイ、シグナル伝達アッセイ、泳動アッセイ、細胞細胞傷害アッセイ、食作用アッセイ、溶解アッセイ、および結合アッセイが挙げられる。また、かかるバイオアッセイとして、動物モデルまたはヒトを用いたインビボアッセイ、例えば、生体分布、薬物動態、薬力学の試験など、血清半減期試験、バイオアベイラビリティの試験、有効性試験、局在試験、臨床試験などの疾患の処置および予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｅ）の試験も挙げられる。また、かかるバイオアッセイとして、化学的、物理的、物理化学的、生物物理的および生化学的試験（温度、剪断応力、圧力、ｐＨ、コンジュゲーションなどに対する安定性など）も挙げられる。また、かかるバイオアッセイとして、臨床使用に関してタンパク質分子組成物の性質を改善するため、免疫原性および／または抗原性に関する試験も挙げられる。当業者は、タンパク質分子組成物の活性または記載の活性の組合せを測定することができよう。

【０１９７】

好ましい実施形態において、高活性のタンパク質分子組成物は、少なくとも１種類のバイオアッセイで測定したときの、少なくとも１種類のインビトロモデルにおける高活性および／または少なくとも１種類のインビボモデルにおける高活性および／または高安定性および／または長い血清半減期および／または長いバイオアベイラビリティおよび／または改善された免疫原性および／または改善された抗原性を特徴とする。活性全体における改善もまた、本明細書では高活性と称し、これは、例えば、ヒトまたは相当する生物体において使用した場合、該産生物の低投薬量、長い投与間隔、低副作用および無毒性または低毒性などの改善をもたらし得、医薬品の大きな改善がもたらされる。

【０１９８】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質分子組成物の活性は、先行技術によって産生された同じタンパク質分子の少なくとも１種類のタンパク質分子組成物の活性よりも高い。

【０１９９】

前記増大したＦｃ媒介性細胞性細胞傷害は、増大した抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ活性）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ活性）および／または食作用によって引き起こされる細胞傷害（食作用活性）である。増大したＦｃ媒介性細胞性細胞傷害、例えば、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性または食作用活性は、当業者に周知の種々の方法によって測定され得、一部を本実施例に詳細に記載しているが、それらの方法に限定されない。ここで、本実施例に記載の方法は、本発明の好ましい実施形態である。

【０２００】

前記増大した結合活性は、抗体分子のエピトープ（エピトープ、抗原、エピトープを含む別のポリペプチドもしくは抗体分子のエピトープを含む細胞など）に対する増大した結合、または少なくとも１種類のＦｃ受容体もしくは別のエフェクターリガンド（Ｆｃ－γＲＩ、Ｆｃ－γＲＩＩ、Ｆｃ－γＲＩＩＩ、およびそのサブクラス、例えば、Ｆｃ－γＲＩＩａ、Ｆｃ－γＲＩＩＩａ、Ｆｃ－γＲＩＩＩｂ、もしくは補体のＣ１ｑ成分、もしくはＦｃＲｎあるいは任意のかかるＦｃ受容体もしくはエフェクターリガンドを含む分子もしくは細胞など）に対する増大した結合である。増大した結合活性は、高くなった親和性、高くなったアビディティおよび／または結合部位の数の増加またはその組合せであり得る。増大した結合活性により、種々の効果および活性、例えば限定されないが、背景技術の項目で記載したような形態の受容体媒介型活性などがもたらされ得る。増大した結合親和性、アビディティおよび受容体媒介型活性は、当業者に周知の種々の方法の少なくとも１つ、例えば限定されないが、Ｂｉａｃｏｒｅ測定、Ｓｃａｔｃｈａｒｄ解析、ＥＬＩＳＡまたはＲＩＡ系の測定、フローサイトメトリー測定、適当な標的細胞におけるアポトーシス誘導を調べるための試験、適当な標的細胞の増殖を調べるための試験、抗体分子組成

物のアンタゴニスト、アゴニストおよび／または受容体ブロックについての試験（限定されないが、細胞－細胞媒介型結合の阻害、細胞内部の分子事象の誘発など）などによって測定され得る。当業者は、結合親和性、アビディティ、結合部位の数および／または受容体媒介型活性の試験のための適当な方法または方法の組合せを選択および／または採用および／または改良することができよう。

【０２０１】

本発明の方法を用いて、抗体分子の食作用および／またはエピトープ（好ましくは、少なくとも１種類のＦｃ受容体または別のエフェクターリガンド）に対する増大した結合活性によってもたらされる増大したＦｃ媒介性細胞性細胞傷害、好ましくは、ＡＤＣＣ活性、ＣＤＣ活性および／または細胞傷害が得られ得る抗体の能力が、一般におよび／または特に本発明の宿主細胞で試験され得、その好ましい実施形態は本明細書の他の箇所に記載している。

【０２０２】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質／抗体分子組成物の活性は、該細胞において発現させたとき、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマ、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］少なくとも１種類由来の同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の活性よりも高い。

【０２０３】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質／抗体分子組成物の活性は、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも２倍、より好ましくは少なくとも３倍、より好ましくは少なくとも４倍、より好ましくは少なくとも５倍、より好ましくは少なくとも７倍、より好ましくは少なくとも１０倍、より好ましくは少なくとも１５倍、より好ましくは少なくとも２３倍、より好ましくは少なくとも３０倍、より好ましくは少なくとも５０倍、より好ましくは少なくとも７５倍、より好ましくは少なくとも１００倍、より好ましくは少なくとも１５０倍、より好ましくは少なくとも１５０倍、より好ましくは少なくとも２３０倍、より好ましくは少なくとも３００倍、より好ましくは少なくとも５００倍、より好ましくは少なくとも７５０倍、最も好ましくは１０００倍超高い。

【０２０４】

そのため、各バイオアッセイで高活性が示される必要はなく、具体的なタンパク質分子組成物の使用および特質に応じて、一部の有利な生物学的効果によってあまり有利でない他のものが補償され得、やはり、全体として本発明の意味におけるタンパク質分子組成物の高い活性がもたらされる。例えば、特定のあるタンパク質分子組成物では、細胞の受容体に対する結合によってずっと高い活性がもたらされ得、それにより、副次効果（増殖の誘導など）が誘発され得るが、やや血清半減期の低下が示されることがあり得る。組合せにおいて、より多くの受容体を誘発する高活性により、次いで、全体的な生物活性においてより短いバイオアベイラビリティが補償される。別の例では、半減期の短縮および受容体に対する高活性の誘発が、ともに好都合である。また別の例では、インビボ活性は改善されないが、インビトロでの安定性により、タンパク質分子組成物の産生と保存が改善される。また別の例では、半減期は長いが活性は低いことが必要とされる。

【０２０５】

本発明の好ましい実施形態において、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＡＤＣＣ活性である。別の好ましい実施形態では、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＣＤＣである。別の好ましい実施形態では、抗体分子組成物の増大した活性は、食作用によって引き起こされる増大した細胞傷害である。別の好ましい実施形態では、抗体分子組成物の増大した活性は、エピトープに対する増大した結合活性である。別の好ましい実施形態では、抗体分子組成物の増大した活性は、少なくとも１種類のＦｃ受容体、好まし

くはＦｃγＲＩＩＩＡに対する増大した結合活性である。さらに好ましい実施形態において、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＦｃ媒介性細胞性細胞傷害とエピトープに対する増大した結合活性である。さらに好ましい実施形態において、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＡＤＣＣ活性とエピトープに対する増大した結合活性である。さらに好ましい実施形態において、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＡＤＣＣ活性、増大したＣＤＣ活性、エピトープに対する増大した結合活性、および少なくとも１種類のＦｃ受容体に対する増大した結合活性である。さらに好ましい実施形態において、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＡＤＣＣ活性、食作用によって引き起こされる増大した細胞傷害、エピトープに対する増大した結合活性および少なくとも１種類のＦｃ受容体に対する増大した結合活性である。最も好ましい実施形態において、抗体分子組成物の増大した活性は、増大したＡＤＣＣ、食作用によって引き起こされる増大した細胞傷害、増大したＣＤＣ活性、およびエピトープに対する増大した結合活性、および少なくとも１種類のＦｃ受容体に対する増大した結合活性である。

【０２０６】

本発明によれば、用語「改善された均一性」は、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質／抗体分子組成物が、該細胞において発現させたとき、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマの少なくとも１種類から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物よりも少ない異なるグリコフォーム、または多くの有利なグリコフォーム（１種類もしくは複数種）、または少ない抗体分子の少なくとも１つのグリコフォーム（好ましくは、それ自体において、抗体分子組成物全体の少なくとも１％であるグリコフォーム）を含むことを意味する。本発明の好ましい実施形態において、これは、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明の抗体分子組成物が、該細胞において発現させたとき、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の抗体分子組成物よりも少ない異なるグリコフォーム、または多くの有利なグリコフォーム（１種類もしくは複数種）、または少ない抗体分子の少なくとも１つのグリコフォームを含むことを意味する。

【０２０７】

ヒトにおける産生および使用に特に問題となる不均一性の一例は、シアリル化である。好ましい実施形態において、本発明のタンパク質／抗体分子組成物は、シアル酸Ｎ－グリコリルノイラミン酸（ＮｅｕＧｃ）を有するグリコフォームを含まないことにより、改善された均一性を有し、ここで、この場合、グリコフォームを含まないとは、グリコフォームが、精製抗体分子組成物から得られ得る全糖鎖の１％より多く存在しないこと、より好ましくは、当業者に周知の方法によって検出可能である検出可能な糖鎖が全くないことを意味する。ＮｅｕＧｃは、ヒトにおいて免疫原性となり得ることがわかっているため、このことは、ＣＨＯ、ＮＳＯ、ＳＰ２／０などの他の産生系と比べて、本発明の宿主細胞の大きな利点である。

【０２０８】

好ましい実施形態において、本発明のタンパク質／抗体分子組成物は、含まれるグリコフォームが５％未満、より好ましくは３％未満、さらにより好ましくは１％未満であること、最も好ましくは、実施例に記載のような検出可能なシアル酸を有するタンパク質／抗体分子組成物のグリコフォームが含まれないことにより、シアリル化に関して改善された均一性を有する。さらに好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物は、糖ヌクレオチド前駆物質経路に欠陥を有し、したがって、ＣＭＰ－シアル酸が欠損または低減された本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞を使用することにより得られ、これにより、該細胞を無血清培地中で培養したとき、タンパク質／抗体分子の糖鎖構造の糖鎖のシアリル化が全くないか、または大きな低減がもたらされる。なおさらに好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有するかかるタンパク質／抗体分子組成物は、無血清培地中で培養する本発明

の宿主細胞として、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］またはＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］を使用することにより得られ得、本実施例でより詳細に記載する。

【０２０９】

別のさらに好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物は、ＧＭＰ－シアル酸の糖ヌクレオチド輸送体または少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼに欠陥を有する本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞を使用することにより得られ、これにより、該細胞を無血清培地中で培養したとき、タンパク質／抗体分子の糖鎖構造の糖鎖のシアリル化が全くないか、または低減がもたらされる。例は、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４およびＧＴ－２Ｘである。

【０２１０】

本発明の別の好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物は、増大したシアリル化度を有する本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞を使用することにより得られる。前記シアリル化度は、抗体分子組成物中のタンパク質／抗体分子上のシアル酸Ｎ－アセチルノイラミン（ＮｅｕＮｃまたはＮｅｕＮＡｃ）の量が、該細胞において発現させたとき、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマ、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］少なくとも１種類から単離された同じタンパク質／抗体分子のタンパク質／抗体分子組成物の同じ量のタンパク質／抗体分子と比べて、タンパク質／抗体分子の糖鎖単位全体または特定のあるグリコシル化部位の特定の糖鎖のシアル酸Ｎ－アセチルノイラミン（ＮｅｕＮｃまたはＮｅｕＮＡｃ）の量よりも、少なくとも５％、より好ましくは少なくとも１５％、より好ましくは少なくとも２０％、より好ましくは少なくとも２５％、より好ましくは少なくとも３０％、より好ましくは少なくとも３５％、より好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも１００％、より好ましくは少なくとも３倍、より好ましくは少なくとも５倍、より好ましくは少なくとも１０倍、より好ましくは少なくとも２５倍、より好ましくは少なくとも５０倍、最も好ましくは１００倍超多いことを意味する。シアリル化度は、当業者に周知の方法、例えば限定されないが、結合が糖鎖構造（ＳＮＡ、ＭＡＬ、ＭＡＬ　ＩもしくはＰＮＡ）のシアリル化に依存するレクチンを用いたイムノブロット解析またはＥＬＩＳＡ、化学的検出法（チオバルビツール酸法など）、ＨＰＬＣもしくは質量分析など、またはその組合せによって検出され得る。当業者は、最も適当な方法を選択し、採用し、その目的に最適化することができよう。さらなる詳細は、本実施例に記載している。ＳＮＡを用いたイムノブロット解析が好ましい。

【０２１１】

別のさらに好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物は、本発明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞、好ましくは、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘおよびその誘導細胞または誘導細胞株、最も好ましくは、増大したシアリル化度を有し、例えばＳＮＡ結合によって検出可能なα２－６結合シアル酸を含むタンパク質／抗体分子組成物が、より好ましくは、α２－６およびα２－３結合シアル酸を含むタンパク質／抗体分子組成物の型でもたらされるＫ５６２、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘを使用することにより得られる。

【０２１２】

別の好ましい実施形態では、シアリル化に関して改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物は、ＮｅｕＮＡｃをα２－３で結合させ得る少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼと、ＮｅｕＮＡｃをα２－６結合で糖鎖基に結合させ得る少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼを含むヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞、例えば

限定されないが、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘおよびその誘導細胞または誘導細胞株などを使用することにより得られ、それにより、タンパク質／抗体分子組成物においてタンパク質／抗体分子に、より好ましい組成のグリコフォームがもたらされる。

【０２１３】

本発明のなおさらに（好ましい）実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有する本発明の前記抗体分子組成物は、少なくとも１つの糖鎖が、Ｆｃ領域の第２のドメイン（Ｃγ２ドメイン）内のアミノ酸Ａｓｎ－２９７とは別の該抗体分子のグリコシル化部位に結合された抗体分子の少なくとも１つのグリコフォームを含む。

【０２１４】

なおさらに好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有する先の抗体分子組成物は、増大したシアリル化度を有する、および／またはシアル酸をα２－３で結合させ得る少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼと、シアル酸をα２－６結合で糖鎖基に結合させ得る少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼを含むヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞において、例えば、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘおよびその誘導細胞または誘導細胞株などにおいて発現させる。

【０２１５】

なおさらに好ましい実施形態において、先の抗体分子は、Ｆａｂ領域の配列内に、少なくとも１つのＮ－グリコシル化部位（Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、式中、Ｘは、Ｐｒｏ以外の任意のアミノ酸であり得る）および／または少なくとも１つのＯ－グリコシル化部位を有する。

【０２１６】

さらに好ましい実施形態において、Ｆｃ部分の第２のドメイン（Ｃγ２ドメイン）内のアミノ酸Ａｓｎ－２９７とは別の該抗体分子のグリコシル化部位に結合された少なくとも１つの糖鎖を含む抗体分子を含むシアリル化に関して改善された均一性を有する本発明の抗体分子組成物は、該細胞において発現させたとき、少なくとも１種類の哺乳動物（マウス、ラットなど）、または好ましくはヒトにおいて測定した場合、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマ、好ましくは、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］の少なくとも１種類から単離された同じ抗体分子の抗体分子組成物よりも増大した血清半減期および／またはバイオアベイラビリティを有する。

【０２１７】

抗体のバイオアベイラビリティは、本発明を用いて最適化され得る。特に、高い、さらには非常に高いシアリル化を有する細胞（上記のグループ１～３）における抗体分子の発現により、バイオアベイラビリティが増大した抗体組成物がもたらされ得るが、グループ２の細胞における抗体分子の発現では、比較的低減したバイオアベイラビリティを有する抗体組成物がもたらされ得る。バイオアベイラビリティは、当業者には周知のようにして、および本実施例に記載のようにして、動物または好ましくはヒトを用いて試験され得る。動物としては、マウス、ラット、モルモット、イヌ、またはサルが挙げられるが、かかる種に限定されない。ヒトの性質をもつため、ヒトに近いグリコシル化および最も重要なシアリル化を有する動物が好ましく、ヒトが最も好ましい。

【０２１８】

さらにより好ましい実施形態において、シアリル化に関して改善された均一性を有する抗体分子組成物は、増大したシアリル化度を有する、および／またはシアル酸をα２－３で結合させ得る少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼと、シアル酸をα２－６結合で糖鎖基に結合させ得る少なくとも１種類のシアリルトランスフェラーゼを含む本発

明のヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で、例えば、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、およびその誘導細胞または誘導細胞株などで発現させたものであり、抗体分子Ｆａｂ領域の配列内の少なくとも１つのＮ－グリコシル化部位および／または少なくとも１つのＯ－グリコシル化部位に結合された少なくとも１つの糖鎖を含み、該細胞において発現させたとき、少なくとも１種類の哺乳動物（マウス、ラットなど）、または好ましくはヒトにおいて測定した場合、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマの少なくとも１種類、好ましくは、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の抗体分子組成物よりも増大した血清半減期および／またはバイオアベイラビリティを有する。さらに好ましい実施形態において、発現される抗体分子は、エルビタックス（セツキシマブ）である。

【０２１９】

本発明によれば、用語「増大した収率」は、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で産生された本発明のタンパク質／抗体分子組成物の平均または最大収率が、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマのうちの少なくとも１種類において発現させたときの同じタンパク質／抗体分子の少なくとも１種類のタンパク質／抗体分子組成物のそれぞれの平均または最大収率よりも高いことを意味する。本発明の好ましい実施形態において、これは、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で発現させた本発明のタンパク質／抗体分子組成物の平均または最大収率が、マウスｄｈｆｒ遺伝子およびＣＨＯｄｈｆｒ－における増幅のためのメトトレキサートを使用し、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じタンパク質／抗体分子のタンパク質／抗体分子組成物のそれぞれの平均または最大収率よりも高いことを意味する。平均および最大収率は、細胞の産生能を反映するＳＰＲにおいて測定され、細胞混合物または細胞株は、当業者によって決定され得、その好ましい実施形態を本実施例に記載している。

【０２２０】

本発明のさらに好ましい実施形態において、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞内で、好ましくは、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたはその誘導細胞もしくは誘導細胞株で発現させた本発明のタンパク質／抗体分子組成物の少なくとも平均または最大収率は、マウスｄｈｆｒ遺伝子およびＣＨＯｄｈｆｒ－における増幅のためのメトトレキサートを用いて細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じタンパク質／抗体分子の相当するタンパク質／抗体分子組成物よりも少なくとも１０％、より好ましくは少なくとも１５％、より好ましくは少なくとも２０％、より好ましくは少なくとも２５％、より好ましくは少なくとも３０％、より好ましくは少なくとも３５％、より好ましくは少なくとも４５％、より好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも５５％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも１００％、より好ましくは少なくとも３倍、より好ましくは少なくとも４倍、最も好ましくは５倍超高い。

【０２２１】

本発明は、さらに、

（ａ）本明細書の他の箇所に記載したタンパク質、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする配列、および

（ｂ）配列番号１～配列番号９の群の配列をコードする少なくとも１つの配列

を含む核酸を提供する。

【０２２２】

本発明の好ましい実施形態において、本発明の核酸は、
（ａ）本明細書の他の箇所に記載したタンパク質、好ましくは抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする配列、および
（ｂ）配列番号１をコードする配列
を含む。

【０２２３】

本発明のさらに好ましい実施形態において、上記の本発明の核酸は、さらに、選択マーカーをコードする配列、好ましくは、前記核酸が導入された宿主細胞の抗生物質（限定されないが、ネオマイシンまたはプロマイシンなど）への耐性を誘導するポリペプチドをコードする配列を含む。

【０２２４】

本発明のさらに好ましい実施形態において、上記の本発明の核酸は、さらに、本明細書の他の箇所に記載した少なくとも１種類の遺伝因子の少なくとも１つの配列を含む。

【０２２５】

本発明は、さらに、ヒト骨髄性白血病起源の宿主細胞、または白血病患者から得られ得る任意のヒト骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、またはヒトドナーから得られ得る任意の骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、またはヒト骨髄性白血病起源の少なくとも１種類の細胞を含む細胞もしくは細胞株の混合物、ヒト骨髄性白血病起源の少なくとも１つの細胞、複数の細胞もしくは細胞株または白血病患者から得られ得る任意のヒト骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、またはヒトドナーから得られ得る任意の骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株を、ヒトまたは動物起源の別の細胞（限定されないが、Ｂ細胞、ＣＨＯ細胞など）と融合させることによりにより得られた細胞（１種類もしくは複数種）あるいは細胞株であって、タンパク質／抗体分子またはその一部分をコードする少なくとも１つの核酸が細胞内に導入された細胞（１種類もしくは複数種）あるいは細胞株を提供する。

【０２２６】

本発明は、タンパク質／抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする少なくとも１つの核酸を含む、上記の本発明の宿主細胞を提供する。

【０２２７】

好ましい実施形態において、本発明は、宿主細胞Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株を提供し、好ましくは、無血清条件下で培養され、該タンパク質／抗体分子組成物が無血清条件下で単離されるもの、さらにより好ましくは、無血清条件下で該抗体分子をコードする核酸が導入されており、タンパク質／抗体分子またはその一部分をコードする少なくとも１つの核酸、好ましくは、本明細書の他の箇所に記載したタンパク質／抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする配列を含む核酸を含むものを提供する。

【０２２８】

本発明は、配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸を含む上記の本発明の宿主細胞を提供する。

【０２２９】

本発明は、抗体分子またはその一部分をコードする少なくとも１つの核酸と、配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸を含む上記の本発明の宿主細胞を提供する。

【０２３０】

好ましい実施形態において、本発明は、宿主細胞Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２

、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株を提供し、好ましくは、無血清条件下で培養され、該タンパク質／抗体分子組成物が無血清条件下で単離されるもの、さらにより好ましくは、無血清条件下で該タンパク質／抗体分子をコードする核酸が導入されており、タンパク質／抗体分子またはその一部分をコードする少なくとも１つの核酸、好ましくは、本明細書の他の箇所に記載したタンパク質／抗体分子またはその少なくとも一部分をコードする配列を含む核酸と、配列番号１～配列番号９の群、好ましくは配列番号１の配列をコードする少なくとも１つの配列を含むものを提供する。

【０２３１】

さらに好ましい実施形態において、本発明は、コードされた抗体分子がＷＯ２００４／０６５４２３の抗体である上記の宿主細胞を提供する。

【０２３２】

なおさらに好ましい実施形態において、本発明は、コードされた抗体分子が、抗体ＰａｎｋｏＭａｂ［Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６ Ｎｏｖ；５５（１１）：１３３７－４７．Ｅｐｕｂ ２００６ Ｆｅｂ．ＰａｎｋｏＭａｂ：ａ ｐｏｔｅｎｔ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｕｒ ＭＵＣ１ ａｎｔｉｂｏｄｙ．Ｄａｎｉｅｌｃｚｙｋら］、好ましくは、ＰａｎｋｏＭａｂとすべてのヒト定常ドメインとのキメラ形態、より好ましくはヒト化ＰａｎｋｏＭａｂである上記の宿主細胞を提供する。

【０２３３】

本発明は、さらに、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性および本明細書のどこかに記載した本発明の任意の方法によってもたらされる完全ヒトグリコシル化を有するタンパク質／抗体分子組成物を提供する。

【０２３４】

好ましい実施形態において、本発明は、本発明の任意の方法によって生成され、該細胞において発現させたとき、細胞株ＣＨＯ、またはＣＨＯｄｈｆｒ－、またはＢＨＫ、またはＮＳ０、またはＳＰ２／０、またはＰｅｒＣ．６またはマウスハイブリドーマ、好ましくは、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］少なくとも１種類から単離された同じタンパク質／抗体分子のタンパク質／抗体分子組成物と比べて、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性および本発明の任意の方法によってもたらされる完全ヒトグリコシル化を有するタンパク質／抗体分子組成物を提供する。

【０２３５】

発現されるタンパク質分子またはその一部分は、任意のタンパク質またはタンパク質の一部分またはタンパク質断片であり得る。発現される抗体分子またはその一部分は、任意の抗体または抗体の一部分または抗体断片であり得る。

【０２３６】

本発明のタンパク質分子組成物は、白血病、好中球減少症、血球減少症、癌、骨髄移植、造血系の疾患、不妊症および自己免疫疾患などの疾患の予防的および／または治療的処置に使用され得る。当業者には周知のタンパク質分子組成物の治療適用用途の範囲は、非常に広い。例えば、Ｇ－ＣＳＦは、白血病性癌患者の化学療法の結果として好中球が減少する命にかかわる疾患である好中球減少症を処置するための重要な治療剤である。ＧＭ－ＣＳＦは、特に、化学療法後に好中球減少症からの速やかな回復を得るため、比較的高齢のＡＭＬ患者の処置に使用される。さらに、ＧＭ－ＣＳＦは、骨髄移植におけるいくつかの適用用途のため、および末梢血幹細胞の可動性のための治療剤として承認されている。また、現在研究中のＧＭ－ＣＳＦには、ＨＩＶおよび癌の処置用などのいくつかの臨床適用用途がある。造血系のある種の疾患は、ＥＰＯで処置され、ＩＦＮ－βは、現在、自己免疫疾患である多発性硬化症の処置のための重要な治療剤である。別の例はＦＳＨであり、これは、男性および女性の不妊症の処置に広く使用されている。また、ｈＣＧも不妊症の処置に適用されているが、女性の無排卵に焦点をあてたものである。ｈＧＨは、体脂肪低減および筋肉組織増加などの臨床的に証明された利点を有する。

【０２３７】
また、本発明のタンパク質分子組成物は、白血病、好中球減少症、血球減少症、癌、骨髄移植、造血系の疾患、不妊症および自己免疫疾患を含む群から選択される疾患の予防的および／または治療的処置のための医薬の製造に使用され得る。
【０２３８】
本発明の好ましい実施形態において、発現される抗体分子は、乾癬、慢性関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、自己免疫疾患、ＳＬＥ、多発性硬化症、自己免疫性の血液障害、喘息、アレルギー、対宿主性移植片病、同種移植拒絶反応、緑内障手術、心筋梗塞、ウイルス（ＲＳＶ、ＨＩＶ、Ｈｅｐ　Ｂ、もしくはＣＭＶなど）、癌、肉腫、ＣＬＬ、ＡＭＬ、またはＮＨＬを認識する抗体分子である。
【０２３９】
本発明のさらに好ましい実施形態において、発現される抗体分子は、少なくとも１人のヒトの、好ましくは、耳－鼻－喉領域、肺、縦隔、胃腸管、泌尿生殖器系、婦人科系、乳房、内分泌系、皮膚の癌性疾患または腫瘍疾患、骨および軟組織の肉腫、中皮腫、黒色腫、中枢神経系の新生物、新生児期の癌性疾患または腫瘍疾患、リンパ腫、白血病、新生物随伴症候群、原発不明腫瘍による転移（ＣＵＰ症候群）、腹膜癌腫症、免疫抑制関連悪性疾患および／または腫瘍転移の群から選択される癌、腫瘍または転移、少なくとも１つの癌細胞または腫瘍細胞を認識する抗体分子である。
【０２４０】
本発明の好ましい実施形態において、発現される抗体またはその一部分は、抗ＭＵＣ１抗体である。
【０２４１】
本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、抗体リツキシマブ、ハーセプチン、エルビタックス、カンパス１Ｈまたはその誘導抗体である。
【０２４２】
本発明のさらにより好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０５０７０７の抗体であり、さらにより好ましくはＷＯ２００４／０６５４２３のものであり、さらにより好ましくはＰａｎｋｏＭａｂ［Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６　Ｎｏｖ；５５（１１）：１３３７－４７．Ｅｐｕｂ　２００６　Ｆｅｂ．ＰａｎｋｏＭａｂ：ａ　ｐｏｔｅｎｔ　ｎｅｗ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｕｒ　ＭＵＣ１　ａｎｔｉｂｏｄｙ．Ｄａｎｉｅｌｃｚｙｋら］であり、さらにより好ましくは、すべてのヒト定常ドメインを含むそのキメラ型であり、さらにより好ましくはそのヒト化抗体である。
【０２４３】
本発明のさらにより好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、本発明の任意の完全体の抗体、好ましくは、リツキシマブ、ハーセプチン、エルビタックス、より好ましくはＷＯ２００４／０６５４２３のもの、最も好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、ここで、本発明の任意の宿主細胞、好ましくは、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株から単離された抗体分子組成物は、検出可能なＮｅｕＧｃを含まない。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。
【０２４４】
本発明のさらにより好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、任意の完全体の抗体分子または本発明のＣγ２ドメインを含む抗体分子、好ましくは、リツキシマブ、ハーセプチン、エルビタックス、より好ましくはＷＯ２００４／０６５４２３のもの、最も好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、ここで、本発明の宿主細胞、好ましくは、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ

－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株から単離された抗体分子組成物は、α２－６シアル酸を有する少なくとも１つのグリコフォームを含む。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。

【０２４５】

本発明のさらにより好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、任意の完全体の抗体分子または本発明のＣγ２ドメインを含む抗体分子、好ましくは、リツキシマブ、ハーセプチン、エルビタックス、カンパス１Ｈ、より好ましくはＷＯ２００４／０６５４２３のもの、最も好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、ここで、宿主細胞ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株から単離された抗体分子組成物は、本実施例に記載のレクチンＳＮＡを用いた免疫ブロット解析によって検出可能なα２－６シアル酸を含む。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。

【０２４６】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、任意の抗体分子、好ましくは、リツキシマブ、ハーセプチン、エルビタックス、カンパス１Ｈ、より好ましくはＷＯ２００４／０６５４２３のもの、最も好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、無血清培地中、より好ましくはタンパク質無含有培地中で培養後に本発明の宿主細胞ＮＭ－Ｆ９またはＮＭ－Ｄ４から単離された抗体分子組成物は、検出可能なシアル酸のない改善された均一性を有する。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。

【０２４７】

本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、抗体リツキシマブ、ハーセプチン、カンパス１Ｈ、またはその誘導抗体であり、本発明の宿主細胞から単離された抗体分子組成物は、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも４倍高く増大したＡＤＣＣ活性を有する。

【０２４８】

本発明のさらにより好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、本発明の宿主細胞から単離された抗体分子組成物は、細胞Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株の少なくとも１種類において産生させた場合、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも４倍高く増大したＡＤＣＣ活性を有する。

【０２４９】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、本発明の宿主細胞Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株から単離された抗体分子組成物は、そのエピトープに対し、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも５０％高く、好ましくは２倍高く増大した結合活性を有する。

【０２５０】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、無血清培地中、より好ましくはタンパク質無含有培地中で培養後に本発明の宿主細胞ＮＭ－Ｆ９またはＮＭ－Ｄ４から単離された抗体分子組成物は、検出可能なシアル酸のない改善された均一性を有する。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。

【０２５１】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、宿主細胞Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは前記宿主細胞のいずれかに由来する細胞もしくは細胞株から単離された抗体分子組成物は、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物よりも少なくとも１０％多くのシアル酸を含む改善された均一性を有する。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。

【０２５２】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、本発明の宿主細胞から単離された抗体分子組成物は、ＮＭ－Ｆ９またはＮＭ－Ｄ４において発現させたとき、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物と比べて検出可能なシアル酸がない程度が高い改善された均一性を有する。同じことが、タンパク質に一般的にあてはまる。

【０２５３】

本発明の別の好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂであり、本発明の宿主細胞から単離された抗体分子組成物は、上記のような改善された均一性を有し、細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させた同じ抗体分子の抗体分子組成物の活性よりも少なくとも４倍高く増大したＡＤＣＣ活性を有する。

【０２５４】

本発明の最も好ましい実施形態において、本発明の核酸（１つまたは複数）にコードされた抗体分子は、ＷＯ２００４／０６５４２３の抗体、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂである。

【０２５５】

本発明は、さらに、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性、および本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における完全ヒトグリコシル化を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための宿主細胞を提供し、ここで、該宿主細胞は、ヒト骨髄性白血病起源の任意の細胞（１つもしくは複数）または細胞株、または白血病患者から得られ得る任意のヒト骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、またはヒトドナーから得られ得る任意の骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株、またはヒト骨髄性白血病起源の少なくとも１種類の細胞を含む細胞もしくは細胞株、あるいは本明細書の他の箇所に記載した細胞またはその誘導細胞株の混合物、または前述の細胞の少なくとも１種類を含む細胞もしくは細胞株の混合物である。

【０２５６】

また、本発明は、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性、および本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における完全ヒトグリコシル化を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための宿主細胞を提供し、ここで、該宿主細胞は、ヒト骨髄性白血病起源の少なくとも細胞（１つもしくは複数）もしくは細胞株、または白血病患者から得られ得る任意のヒト骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしく

は細胞株、またはヒトドナーから得られ得る任意の骨髄性もしくは骨髄性前駆細胞もしくは細胞株を、ヒトまたは動物起源の別の細胞（限定されないが、Ｂ細胞、ＣＨＯ細胞など）と融合させることにより得られた任意の細胞（１つもしくは複数）または細胞株である。

【０２５７】

好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、細胞もしくは細胞株ＫＧ１、ＭＵＴＺ－３、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたはその誘導細胞もしくは誘導細胞株、または前述の細胞の少なくとも１種類を含む細胞もしくは細胞株の混合物である。

【０２５８】

さらに好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、細胞もしくは細胞株Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたはその誘導細胞もしくは誘導細胞株である。

【０２５９】

さらに好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、細胞もしくは細胞株ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたはその誘導細胞もしくは誘導細胞株、または本明細書の他の箇所に記載したその誘導細胞もしくは誘導細胞株である。

【０２６０】

なおさらに好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、ＫＧ１、ＭＵＴＺ－３、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘ由来の細胞もしくは細胞株、または本明細書の他の箇所に記載したその誘導細胞もしくは誘導細胞株であって、無血清条件下で培養されるものであり、好ましくは、該タンパク質／抗体分子をコードする核酸が導入され得、抗体分子組成物が無血清条件下で単離されるものである。

【０２６１】

なおさらに好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘ由来の細胞もしくは細胞株、または本明細書の他の箇所に記載したその誘導細胞もしくは誘導細胞株であって、無血清条件下で培養されるものである。

【０２６２】

なおさらに好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率およ

び／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘ由来の細胞もしくは細胞株、または本明細書の他の箇所に記載したその誘導細胞もしくは誘導細胞株であって、無血清条件下で培養され、該タンパク質／抗体分子をコードする核酸が導入され得、該タンパク質／抗体分子組成物が無血清条件下で単離されるものである。

【０２６３】

最も好ましい実施形態において、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有するタンパク質／抗体分子組成物を産生させるための本発明が提供する前記宿主細胞は、細胞もしくは細胞株ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、もしくはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、ＧＴ－２Ｘまたは本明細書の他の箇所に記載したその誘導細胞もしくは誘導細胞株であって、無血清条件下で培養されるものであり、好ましくは、該タンパク質／抗体分子をコードする核酸が導入され得、該タンパク質／抗体分子組成物が無血清条件下で単離されるものである。

【０２６４】

本発明は、さらに、本明細書の他の箇所に記載した本発明の任意の方法によって単離されるタンパク質／タンパク質組成物を提供する。

【０２６５】

本発明は、さらに、本明細書の他の箇所に記載した本発明の任意の方法によって単離される、増大した活性および／または増大した収率および／または改善された均一性、および本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における完全ヒトグリコシル化を有するタンパク質分子組成物を提供する。

【０２６６】

本発明のさらに好ましい実施形態において、該タンパク質分子またはその一部分は、少なくとも１０ｋＤａの大きさ、好ましくは少なくとも１５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも２０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも２５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも３０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも３５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも４０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも４５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも５０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも５５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも６０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも６５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも７０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも７５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも８０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも８５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも９０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも９５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１００ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１０５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１１０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１１５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１２０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１２５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１３０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１３５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１４０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１４５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１５０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１５５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１６０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１６５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１７０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１７５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１８０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１８５ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１９０ｋＤａの大きさ、より好ましくは少なくとも１９５ｋＤａの大きさ、最も好ましくは少なくとも２００ｋＤａの大きさを有する。

【０２６７】
本発明の好ましい実施形態において、前記タンパク質分子組成物は、サイトカインおよびその受容体、例えば、腫瘍壊死因子ＴＮＦ－αおよびＴＮＦ－β；レニン；ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；α－１－抗トリプシン；インスリンＡ－鎖およびＢ－鎖；ゴナドトロピン、例えば、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、サイロトロピン、およびヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈＣＧ）；カルシトニン；グルカゴン；凝固因子（第ＶＩＩＩＣ因子、第ＩＸ因子、第ＶＩＩ因子など）、組織因子およびフォン・ビルブラント因子；プロテインＣなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；プラスミノゲン活性化因子（ウロキナーゼ、ヒト尿および組織型プラスミノゲン活性化因子など）；ボンベシン；トロンビン；造血増殖因子；エンケファリナーゼ；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミュラー阻害物質；レラキシンＡ－鎖およびＢ－鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；血管内皮増殖因子；ホルモンまたは増殖因子の受容体；インテグリン；プロテインＡおよびＤ；リウマチ因子；神経栄養因子（骨由来神経栄養因子、ニューロトロフィン－３、－４、－５、－６および神経成長因子－βなど）；血小板由来増殖因子；線維芽細胞増殖因子；上皮増殖因子；トランスホーミング増殖因子（ＴＧＦ－αおよびＴＧＦ－βなど）；インスリン様増殖因子－Ｉおよび－ＩＩ；インスリン様増殖因子結合タンパク質；ＣＤタンパク質（ＣＤ－３、ＣＤ－４、ＣＤ－８およびＣＤ－１９など）；エリトロポイエチン（ＥＰＯ）；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形成タンパク質；インターフェロン（インターフェロン－α、－β、および-γ）；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えば、Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＧ－ＣＳＦ；インターロイキン（ＩＬ）、例えば、ＩＬ－１～ＩＬ－１２；スーパーオキシドジスムターゼ；Ｔ細胞受容体；表面膜タンパク質；分解促進因子；抗体およびイムノアドヘシン；グリコホリンＡ；ＭＵＣ１の群の任意のタンパク質分子に由来するものである。

【０２６８】
本発明のより好ましい実施形態において、前記タンパク質分子組成物は、グリコホリンＡ、ＥＰＯ、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＳＨ、ｈＣＧ、ＬＨ、インターフェロン、インターロイキン、抗体および／またはその断片の群の任意のタンパク質分子に由来するものである。

【０２６９】
また、本発明による産生方法によって得られ得るグリコールタンパク質またはタンパク質組成物が提供される。前記タンパク質好ましくは、請求項２７に記載の特徴的グリコシル化を有する。

【０２７０】
好ましくは、前記タンパク質組成物は抗体分子組成物である。本発明は、さらに、本明細書の他の箇所に記載した本発明の任意の方法によって単離される、増大した活性および／または増大した収率および／または本明細書の他の箇所に記載した本発明の意味における改善された均一性を有する抗体分子組成物を提供する。

【０２７１】
かかる抗体の例としては、ガングリオシドＧＤ３、ヒトインターロイキン－５受容体α鎖、ＨＥＲ２、ＣＣケモカイン受容体４、ＣＤ２０、ＣＤ２２、神経芽腫、ＭＵＣ１、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）に対する抗体が挙げられる。

【０２７２】
本発明の好ましい実施形態において、前記抗体分子組成物は、ムロモナブ（Ｍｕｒｏｍｏｍａｂ）、ダクリズマブ、バシリキシマブ、アブシキシマブ、リツキシマブ、ハーセプチン、ゲムツズマブ、アレムツズマブ、イブリツモマブ、セツキシマブ（エルビタックス）、ベバシズマブ、トシツモマブ、パブリズマブ（Ｐａｖｌｉｚｕｍａｂ）、インフリキシマブ、エクリズマブ、エプラツズマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、アダリムマブ、カンパス－１Ｈ、Ｃ２Ｂ８、パノレックス、ブレバレックス（ＢｒｅｖａＲｅｘ）、シ

ムレクト、アントバ（Ａｎｔｏｖａ）、ＯＫＴ３、ゼナパックス、レオプロ、シナジス、オスタビル（Ｏｓｔａｖｉｒ）、プロトビル（Ｐｒｏｔｏｖｉｒ）、オバレックス、ビタキシンの群の任意の抗体分子に由来するものである。

【０２７３】

本発明のより好ましい実施形態において、前記抗体分子組成物は、リツキシマブ、ハーセプチン、抗ＣＣケモカイン受容体４抗体ＫＭ２１６０、カンパス－１Ｈ、Ｃ２Ｂ８、エルビタックス、抗神経芽腫抗体ｃｈＣＥ７の群の任意の抗体分子に由来するものである。本発明のさらにより好ましい実施形態において、前記抗体分子組成物は、ＷＯ２００４／０６５４２３の群の抗体分子に由来するものであり、より好ましくはＰａｎｋｏＭａｂ、より好ましくはそのキメラ、さらにより好ましくはそのヒト化形態である。

【０２７４】

また、本発明の産生方法によって得られ得る、ＭＵＣ１エピトープに結合し、アミノ酸配列ＤＴＲを含む抗体であるタンパク質またはタンパク質組成物が提供される。

【０２７５】

ＭＵＣ－１は、さまざまな上皮腫瘍において発現される確立された腫瘍マーカーであり、潜在腫瘍標的である。ＭＵＣ－１は、大分子の高度にＯ－グリコシル化された膜貫通糖タンパク質である。その細胞外部分は、各々が潜在的なＯ－グリコシル化された５つの側鎖を有する２０アミノ酸からなる可変数の２０～１２０個のタンデム反復配列（ＴＲ）からなる。ＭＵＣ　１は、上皮組織上だけでなく、造血細胞上にも発現される。ＭＵＣ　１のＤＴＲモチーフに結合するいくつかの抗体が知られており、これらもまた、本発明との関連において適当なタンパク質／抗体である（概説については、Ｋａｒｓｔｅｎら，１９９８を参照）。また、Ｋａｒｓｔｅｎにより、ＭＵＣ　１上のエピトープのコンホメーション（ＴＡ　ＭＵＣ）内に含まれるＰＤＴ＊ＲＰ（式中、Ｔ＊は、Ｏ　グリコシル化されている）の構造の新規な糖鎖が報告された。この部位に存在するグリカンは、それ自体が腫瘍特異的糖鎖構造である。

【０２７６】

したがって、ＴＡ　ＭＵＣ腫瘍エピトープと非グリコシル化エピトープを識別することができるＭＵＣ抗体を使用することが望ましい。グリコシル化されたＴＡ　ＭＵＣエピトープを特異的に認識し得る適当な抗体の一例は、ＰａｎｋｏＭａｂ抗体である、この作製は、Ｄａｎｉｅｌｃｚｙｋら２００６（ＰａｎｋｏＭａｂ：ａ　ｐｏｔｅｎｔ　ｎｅｗ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｕｒ　ＭＵＣ１　ａｎｔｉｂｏｄｙ）（引用により全体が本明細書に組み込まれる）に詳細に記載されている。親ＰａｎｋｏＭａｂ抗体と同じＴＡ－ＭＵＣ　１エピトープに競合的に結合する抗体ＰａｎｋｏＭａｂまたはそのバリアントが好ましく使用される。かかる抗体バリアントは、以下の特徴：

－少なくともアミノ酸配列ＰＤＴＲＰを含むエピトープに結合する；

－Ｇａｌ－ＮａｃαでＰＤＴＲＰ配列がグリコシル化されている場合、１，５ＴＲを含む３０アミノ酸の短鎖ＭＵＣペプチドに結合するが、同ペプチドがグリコシル化されていない場合は、結合しない；

－２５超、好ましくは２８（最も好ましくは、２９，５の比）の長さ付加効果を示す；

－造血系細胞に対して低結合性を示すか、または示さないことすらある（検出法に関しては、Ｄａｎｉｅｌｃｚｙｋら２００６（引用により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）；

－Ｓｃａｔｃｈａｒｄプロット解析で測定したときほぼ少なくともＫ$_{ａｓｓ}$＝０．２～１×１０^{9}Ｍ$^{-1}$の範囲の腫瘍細胞に対して高親和性を有する

の少なくとも１つを有する。

【０２７７】

それぞれのバリアントの好適な例は、本実施例に示している。該抗体は、マウス起源のもの、キメラまたはヒト化されたものであり得る。

【０２７８】

本明細書に記載のＴＡ－ＭＵＣ　１エピトープに結合する抗体、好ましくは、Ｐａｎｋ

ｏＭａｂ抗体または抗体Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏ２は、以下：
（ｉ）該細胞において発現させたとき、前記抗体分子組成物の諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子よりも少なくとも１５％多い量のＮ－アセチルノイラミン酸による増大したシアリル化度を有する；
（ｉｉ）該細胞において発現させたとき、前記抗体分子組成物の諸抗体分子の糖鎖構造全体またはその諸抗体分子のうちの抗体１分子の特定の１つのグリコシル化部位の糖鎖構造において、ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］から単離された同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物の同じ量の抗体分子よりも少なくとも５％多い量のＧ２構造による高ガラクトシル化度を有する；
（ｉｉｉ）検出可能な量のｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃを含む；
（ｉｖ）ハイブリッド型または高次マンノース構造を含まないか、または２％未満で有する
の少なくとも１つの特徴的グリコシル化を有する。

【０２７９】
それぞれのグリコシル化パターンにより、以下：
（ｉ）ＣＨＯ細胞において発現させた同じ抗体の活性よりも１５％超高いＣＤＣ活性；
（ｉｉ）検出可能なシアリル化のない抗体と比べて２倍（１．５倍超）長くなった血清半減期；
（ｉｉｉ）細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させたときの同じ抗体分子の少なくとも１種類の抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害より少なくとも２倍大きいＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の増大を有する、
の驚くべき有益な活性パターンがもたらされる。

【０２８０】
それぞれの抗体は、高いシアリル化およびガラクトシル化度をもたらすが、好ましくは、フコシル化が少なくなる本発明による細胞株において産生させることにより得られ得る。好適な例は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８-Ｅ６である。

【０２８１】
以下の表および図に、本発明が例証される。

【０２８２】
以下の表１および８ならびに図１から１７に、本発明が例証される。

【０２８３】
表１：ＦＣＳを補給した培地中で培養したＣＨＯｄｈｆｒ－およびＮＭ－Ｆ９において発現させたキメラＰａｎｋｏＭａｂの収率。

【０２８４】
表２：無血清培地中で培養したＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］において発現させたキメラＰａｎｋｏＭａｂの収率。

【０２８５】
表３：ＰａｎｋｏＭａｂおよびＣｅｔｕｘｉＭａｂのシアル酸含有量の定量：抗体は、表示した細胞株によって産生させ、ＤＭＢ標識シアル酸バリアントの逆相クロマトグラフィーによって得られたピーク面積を積分することにより定量した。ＮｅｕＧｃとＮｅｕＡｃは、シアル酸標品を使用することにより区別した。

【０２８６】
表４：Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏＭａｂの種々の負荷構造の定量：２－ＡＢ標識Ｎ－グリカンをアニオン交換クロマトグラフィー（Ａｓａｈｉ－ＰＡＫ－カラム）に供し、その種々の負荷構造に対応するピークを積分によって定量した。

【０２８７】
表５：抗体Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏＭａｂのガラクトシル化度を、２－ＡＢ標識

グリカンのａｍｉｎｏｐｈａｓｅ　ＨＰＬＣ（Ｌｕｎａ－ＮＨ２－カラム）によって測定した。ピークを積分によって定量し、基礎となるグリカン構造を質量分析によって解析した。

【０２８８】

表６：Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏＭａｂにおけるトリアンテナ型およびバイアンテナ型＋バイセクト型構造の定量。おそらく分岐しているＧｌｃＮＡｃを含む画分をａｍｉｎｏｐｈａｓｅ－ＨＰＬＣから回収し、逆相クロマトグラフィー（ＲＰ１８－カラム）に供した。これにより、トリアンテナ型およびバイアンテナ型＋バイセクト型構造が識別され得る。該抗体のフコシル化度を、２－ＡＢ標識グリカンのａｍｉｎｏｐｈａｓｅ　ＨＰＬＣ（Ｌｕｎａ－ＮＨ２－カラム）によって調べた。ピークを積分によって定量し、基礎となるグリカン構造を質量分析によって解析した。フコシル化構造および非フコシル化構造を調べ、積分ピーク面積を定量した。

【０２８９】

表７：ＦＣＳを補給した培地（ＣＨＯｄｈｆｒ－）または無血清培地中で培養したＣＨＯｄｈｆｒ－およびＧＴ－２ｘにおいて発現させたｈＦＳＨの収率。

【０２９０】

表８：無血清培地中で培養したＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］において発現させたｈＦＳＨの収率。

【０２９１】

表９：本発明による方法で得られ得る好適なグリコシル化および活性の組合せ。

【０２９２】

表１０：種々の細胞株におけるｂｉｓｅｃＧｌｃＮＡｃとフコースの得られた値。

【実施例】

【０２９３】

（実施例１）

細胞内でのｆｕｔ８発現の解析

ＲＮＡを、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｈ９、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］、ＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］およびＨｅｐＧ２（対照）細胞から、標準的な手順（ＲＮｅａｓｙ－Ｍｉｎｉ－Ｋｉｔ、Ｑｉａｇｅｎ）に従って抽出した。ｍＲＮＡを、磁気ビーズ手法を使用し、製造業者の使用説明書（ＨＤｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標）Ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）２５Ｈ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に従って単離した。第１鎖Ｐ^{P}ｃＤＮＡ合成には、各試料の５０μｌのビーズ懸濁液とＯｍｎｉｓｃｒｉｐｔ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（Ｑｉａｇｅｎ）を製造業者の使用説明書に従って使用した。その後のＰ^{P}ＲＴ-ＰＣＲ反応には、５μｌのｃＤＮＡ生成物Ｐ^{P}と特異的ｆｕｔ８プライマーを使用し、２１２ｂｐ断片を得た。対照として、アクチン特異的プライマーを使用すると、２４０ｂｐ断片が得られた。得られたＰＣＲ産物（１つまたは複数）Ｐ^{P}を１．５％ゲル上で解析した。

【０２９４】

ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４、ＮＭ－Ｈ９、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８およびＧＴ－２ｘは、ｆｕｔ８のｍＲＮＡを発現する。

【０２９５】

図１は、一例として、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８のｆｕｔ８　ｍＲＮＡ発現を示す。

【０２９６】

（実施例２）

Ｋ５６２細胞の糖鎖操作

Ｋ５６２細胞の糖鎖操作ならびにＮＭ－Ｄ４およびＮＭ－Ｆ９細胞株の作製は、ＥＰ１６５４３５３に記載されている。

【０２９７】

高いシアリル化潜在能を有するＮＭ－Ｈ９細胞、およびその誘導細胞または誘導細胞株は、以下のようにして作製した。Ｋ５６２細胞をアルキル化剤メタンスルホン酸エチルで処理することにより、ランダム変異誘発を行なった。試料ごとにＫ５６２細胞をＰＢＳ中で洗浄し、ＥＭＳ（０．１ｍｇ／ｍｌ、メタンスルホン酸エチル、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を補給した細胞増殖培地１ｍｌあたり１０Ｐ^{6}細胞で一晩、３７℃および５％ＣＯＢ$_{2}$にて播種した。細胞を洗浄し、新鮮培地を供給した。２日ごとに、トリパンブルー染色によって細胞生存能力を調べ、免疫細胞化学的染色によって細胞を解析した。

【０２９８】

続いて、ＴＦ高発現の新規な表現型を示す細胞を、ＴＦ特異的抗体によって選択した。Ｋ５６２細胞をＢ－ＰＢＳ（ＰＢＳ中０．５％ＢＳＡ）中で洗浄し、モノクローナル抗体Ａ７８－Ｇ／Ａ７またはＰａｎｋｏＭａｂのハイブリドーマ培養物の５０μｌの上清みおよび９５０μｌのＢ－ＰＢＳとともに、４℃で３０分間インキュベートした。洗浄後、この手順を、ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，ケルン，ドイツ）とコンジュゲートさせた５０μｌのラット－抗マウス－ＩｇＭ－抗体またはラット－抗マウス－ＩｇＧ－抗体で繰り返した。洗浄後、磁気標識ＴＦ陽性Ｋ５６２細胞を、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ製（ケルン，ドイツ）の２つの連続カラムによって、製造業者のマニュアルに記載のようにして分離した。９日間の培養後、単離手順を合計３回繰り返した。ＦＡＣＳ解析（フローサイトメトリー）を抗体染色から開始した。約３×１０^{5}細胞を、４℃で１．５時間、モノクローナル一次抗体（Ａ７８－Ｇ／Ａ７（ＩｇＭ）、ＰａｎｋｏＭａｂ（ＩｇＧ１）（すべて細胞増殖培地中１：２希釈）のハイブリドーマ培養上清み）とともに、続いて、Ｃｙ３コンジュゲートヤギ抗マウスＩｇＭまたはＩｇＧ二次抗体（ＰＢＳ中１：２００希釈）とともに４℃で３０分間インキュベートし、再度洗浄した。再懸濁細胞（２００μｌのＰＢＳ）を、フローサイトメトリー（フローサイトメーター：Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｅｐｉｃｓ，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｋｒｅｆｅｌｄ，Ｇｅｒ）によって調べた。以下の抗体標識細胞のパラメータ：前方散乱（ＦＳ）：２６Ｖ、ゲイン１、側方散乱（ＳＳ）：８０７Ｖ、ゲイン５、ＦＬ２：７４０Ｖ、ゲイン１、および以下のレクチン標識細胞のパラメータ：ＦＳ：２６Ｖ、ゲイン１、ＳＳ：８０７Ｖ、ゲイン５、ＦＬ１：７４０Ｖ、ゲイン１）とともにＥｘｐｏ３２ソフトウェア（Ｂｅｃｔｏｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用し、定量的解析を行なった。

【０２９９】

３回の単離後、９３％がＴＦ陽性細胞のＫ５６２細胞集団が得られた。しかしながら、ＴＦ陽性Ｋ５６２細胞の割合は、経時的に減少し、単離手順後の１４日間で、底値の約２０％ＴＦ陽性細胞に達した。ＴＦ陽性表現型の安定な発現では、Ｋ５６２細胞が４分の１の期間（ａ ｆｏｒｔｈ ｔｉｍｅ）で単離され、最後に、単離したＴＦ陽性Ｋ５６２細胞をクローニングした後、９６ウェルプレートにおいて限界希釈した（１細胞／１００μｌ）。得られた３０個のＫ５６２細胞クローンのうち、１７個の細胞クローンは、ＴＦ抗原を低量で発現したか、またはＴＦ抗原を発現しなかった。これらの細胞クローンを、ＳＮＡ結合についてフローサイトメトリーにおいて、および増殖速度（倍加時間の解析、下記参照）について解析した。高ＳＮＡ結合および高増殖速度を示す細胞クローンを選択した。単一細胞クローニングによるさらなるクローンの生成のため、および無血清条件下での培養を最適化するために、安定なＮＭ－Ｈ９クローンを選択した。最も好ましい細胞クローンとして、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ ＡＣＣ２８０６］を選択し、２００６年９月１５日に、Ｇｌｙｃｏｔｏｐｅ ＧｍｂＨ、Ｒｏｂｅｒｔ－Ｒｏｅｓｓｌｅ－Ｓｔｒ．１０，１３１２５ ベルリン（ドイツ）が、ブラウンシュヴァイク（ドイツ）の「ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ」にＤＳＭ ＡＣＣ ２８０６で寄託した。

【０３００】

（実施例３）

Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、およびＧＴ－

２ｘ細胞株とＣＨＯｄｈｆｒ－細胞の培養ならびに無血清細胞株の作製
Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、またはＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］を、１０％ＦＣＳおよび２ｍＭのグルタミンを補給したＲＰＭＩ　１６４０中または無血清のＸ－Ｖｉｖｏ　２０培地で培養し、８％の加湿雰囲気中、３７℃で増殖させた。

【０３０１】
ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６）を、１０％ＦＣＳ、２ｍＭのグルタミンおよび２％ＨＴ補給物を補給したＤＭＥＭ中、または無血清のＣＨＯ－Ｓ－ＳＦＭ　ＩＩ培地で培養し、８％の加湿雰囲気中、３７℃で増殖させた。

【０３０２】
Ｋ５６２、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、またはＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］および前記宿主細胞由来の細胞または細胞株は、細胞増殖培地を完全に交換することによって、無血清条件に容易に適応される。本発明による細胞および細胞株は、無血清培地としてのＸ－Ｖｉｖｏ　２０中に、１×１０^{5}～５×１０^{5}細胞／ｍｌ、好ましくは２×１０^{5}細胞／ｍｌの密度で播種され、通常の動物細胞培養法によって培養される。４～７日間の培養後、密度が５×１０^{5}～１０×１０^{5}細胞／ｍｌに達した細胞を、無血清培地に適応された細胞として選択する。また、無血清培地への適応は、無血清培地組成物によるＦＣＳ補給培地の連続希釈によって行なわれ得る（連続適応）。抗体組成物を産生する本発明の宿主細胞の変換ＦＣＳ産生クローンの無血清条件に対する産生能は、たいてい保存される。

【０３０３】
無血清条件へのＣＨＯｄｈｆｒ－（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６）の適応は、段階的に行なわなければならず、数週間かかり、このとき、少なくとも半数の産生能が低下することが通常である。

【０３０４】
（実施例４）
真核生物細胞においてキメラ抗体ＰａｎｋｏＭａｂ、Ｐａｎｋｏ１、Ｐａｎｋｏ２、またはセツキシマブを発現させるためのベクターのクローニング
ＰａｎｋｏＭａｂの可変配列を、ＰａｎｋｏＭａｂ［ＨＣａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．Ｈ　２００６　Ｎｏｖ；５５（１１）：１３３７－４７．Ｅｐｕｂ　２００６　Ｆｅｂ．ＰａｎｋｏＭａｂ：ａ　ｐｏｔｅｎｔ　ｎｅｗ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ　ＭＵＣ１　ａｎｔｉｂｏｄｙ．Ｄａｎｉｅｌｃｚｙｋら］を産生するマウスハイブリドーマ細胞由来の特異的プライマーを用いてＰＣＲ増幅した。

【０３０５】
Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏ２の可変配列ＶＨおよびＶＬは、は、ＷＯ２００４／０６５４２３（引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０３０６】
Ｐａｎｋｏ１の可変重鎖：
ＥＶＫＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＭＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＤＡＷＭＤＷＶＲＱＳＰＥＫＧＬＥＷＶＡＥＩＲＳＫＡＮＮＨＡＴＹＹＡＥＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＶＳＫＳＳＶＹＬＱＭＮＮＬＲＡＥＤＴＧＩＹＹＣＴＲＧＧＹＧＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳ
Ｐａｎｋｏ１の可変軽鎖：
ＤＩＶＬＴＱＴＰＬＳＬＰＶＳＬＧＤＱＡＳＩＳＣＲＳＳＱＳＩＶＨＳＮＧＮＴＹＬＥＷＹＬＱＫＰＧＱＳＰＫＬＬＩＹＫＶＳＮＲＦＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＫＩＳＲＶＥＡＥＤＬＧＶＹＹＣＦＱＧＳＨＶＰＬＴＦＧＤＧＴＫＬＥＬＫＲ

Ｐａｎｋｏ２の可変重鎖：
ＥＶＫＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＭＫＬＳＣＶＡＳＧＦＴＦＳＮＹＷＭＮＷＶＲＱＳ
ＰＥＫＧＬＥＷＶＡＥＩＲＬＫＳＮＮＹＴＴＨＹＡＥＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＤＳＫＳＳ
ＶＳＬＱＭＮＮＬＲＶＥＤＴＧＩＹＹＣＴＲＨＹＹＦＤＹＷＧＱＧＴＴＬＴＶＳ
Ｐａｎｋｏ２の可変軽鎖：
ＤＩＶＭＴＱＡＡＦＳＮＰＶＴＬＧＴＳＡＳＩＳＣＲＳＳＫＳＬＬＨＳＮＧＩＴＹＦＦＷ
ＹＬＱＫＰＧＬＳＰＱＬＬＩＹＱＭＳＮＬＡＳＧＶＰＤＲＦＳＳＳＧＳＧＴＤＦＴＬＲＩ
ＳＲＶＥＡＥＤＶＧＶＹＹＣＡＱＮＬＥＬＰＰＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲ
セツキシマブのＶＨおよびＶＬの可変アミノ酸配列を、ｈｔｔｐ：／／ｒｅｄｐｏｌｌ．ｐｈａｒｍａｃｙ．ｕａｌｂｅｒｔａ．ｃａ／ｄｒｕｇｂａｎｋ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｇｅｔＣａｒｄ．ｃｇｉ？ＣＡＲＤ＝ＢＴＤ００００７１．ｔｘｔから入手し、ＶｅｃｔｏｒＮＴＩを使用することにより、ｃＤＮＡコード配列に逆翻訳した。

【０３０７】

セツキシマブの可変重鎖：
ＱＶＱＬＫＱＳＧＰＧＬＶＱＰＳＱＳＬＳＩＴＣＴＶＳＧＦＳＬＴＮＹＧＶＨＷＶＲＱＳ
ＰＧＫＧＬＥＷＬＧＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮ
ＴＰＦＴＳＲＬＳＩＮＫＤＮＳＫＳＱＶＦＦＫＭＮＳＬＱＳＮＤＴＡＩＹＹＣＡＲＡＬＴ
ＹＹＤＹＥＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ
セツキシマブの可変軽鎖：
ＤＩＬＬＴＱＳＰＶＩＬＳＶＳＰＧＥＲＶＳＦＳＣＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨＷＹＱＱＲＴ
ＮＧＳＰＲＬＬＩＫＹＡＳＥＳＩＳＧＩＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＳＩＮＳＶＥＳＥＤＩＡＤＹＹＣＱＱＮＮＮＷＰＴＴＦＧＡ
ＧＴＫＬＥＬＫＲ
該ｃＤＮＡ配列を、ＶＬの場合はＮｃｏＩ／ＮｈｅＩによって、ＶＨの場合はＮｃｏＩ／ＳａｌＩによって伸張してｃＤＮＡを作製した。ＮｃｏＩ／ＸｈｏＩ切断可変重鎖断片ＶＨを、ＷＯ２００４／０６５４２３に記載のＮｃｏＩ／ＳａｌＩ切断ＢＳ－リーダーベクター内にクローニングした。ＢＳ－リーダーベクターは、Ｔ細胞受容体シグナルペプチド配列を該可変ドメインの５’末端に、およびスプライスドナー配列を３’末端に導入するためのクローニングカセットを含む。対応する抗体の可変軽鎖ＶＬは、３’末端にさらにスプライスドナー部位をコードする特異的プライマーを用いて増幅し、ＮｃｏＩ／ＮｈｅＩにより、同様の消化ＢＳ－リーダーベクター内にクローニングした。その後、ＢＳ－リーダーベクターの各ＨｉｎｄＩＩＩ／ＢａｍＨＩ断片を、対応する真核生物の発現ベクター内にクローニングした。このようなベクター（ｐＥＦｐｕｒｏＣγ１ＶＢ$_{ＨＢ}$、ｐＥＦｄｈｆｒＣκＶＢ$_{ＬＢ}$、ｐＥＦｄｈｆｒＢ$_{ｍｕｔＢ}$ＣκＶＢ$_{ＬＢ}$）は、ＥＦ－１αプロモーターとＨＣＭＶエンハンサー、ＳＶ４０起点、ポリアデニル化シグナル、プロマイシン耐性遺伝子を重鎖用のベクター内に、ＣＨＯ細胞発現のためのマウスジヒドロホラーゼ（ｄｉｈｙｄｒｏｆｏｌａｓｅ）遺伝子（ｄｈｆｒ）、またはＫ５６２、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、もしくはＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］発現のための配列番号１（配列１＃）を、選択と遺伝子増幅のために軽鎖用ベクター内に、ならびに重鎖用ではヒト定常γ１領域のゲノム配列、または軽鎖用ではヒト定常κ領域を含む（ヒトゲノムＤＮＡからの増幅のためのプライマーおよびベクターマップはＷＯ２００４／０６５４２３を参照のこと）。

【０３０８】

（実施例５）

キメラ抗体ＰａｎｋｏＭａｂ、Ｐａｎｋｏ１、Ｐａｎｋｏ２、またはセツキシマブを発現させるための真核生物細胞のトランスフェクション、ならびに血清の存在下で高産生の細胞クローンを作製するための遺伝子増幅手順

該キメラ抗体をＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］またはＣＨＯｄｈｆｒ－［ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６］において発現させるため、細胞を、重鎖および軽鎖用の上記のベクター（１：１～１：３）の混合物で、ＤＭＲＩＥ－Ｃを用いたリポフェクションによって、またはＮＭ－Ｆ９とリポフェクタミンの懸濁細胞ではエレクトロポレーション、または付着細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－ではエレクトロポレーションによってコトランスフェクトした。トランスフェクションの２日後、増殖培地を選択培地（ＮＭ－Ｆ９は、ＲＰＭＩ　１６４０＋１０％ＦＣＳ＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン＋０．７５μｇ／ｍｌプロマイシン＋５０ｎＭメトトレキサート中；ＣＨＯｄｈｆｒ－は、ＤＭＥＭ＋１０％透析ＦＣＳ＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン＋５μｇ／ｍｌプロマイシン＋５０ｍＭメトトレキサート）に１週間交換した。最初の増幅は、メトトレキサート濃度を１００ｎＭに上げることにより、さらに２週間行なった。増幅細胞集団の一部を、プロマイシンおよびメトトレキサート無添加の培地中で単一細胞クローニングし、残りの細胞は、メトトレキサート濃度を上げることにより新たな回の遺伝子増幅に供した。このようにして、４～６回の遺伝子増幅（１００、２００、５００、１０００、２０００、３０００ｎＭメトトレキサート）を行なった。さらに、クローンスクリーニングおよび解析によって特定された最良の産生クローンを、同様にしてさらに増幅した。

【０３０９】

限界希釈（０．５細胞／ウェル）を用いた９６ウェルプレート内での単一細胞クローニング後、プレートを２～３週間培養し、増殖中の細胞クローンを顕微鏡により解析し、クローニング効率を％で（増殖中の細胞クローンの入ったウェルの数×１００／播種細胞の理論数）を調べた。付着性のＣＨＯｄｈｆｒ－細胞またはＮＭ－Ｆ９懸濁細胞で異なる手順を使用し、増殖中のクローンを産生能に関してスクリーニングした。

【０３１０】

ＣＨＯｄｈｆｒ－：増殖中のクローンの細胞をＰＢＳで洗浄し、Ａｃｃｕｔａｓｅ処理によって回収した。再懸濁した細胞の半数を９６ウェル試験プレート内に播種し、他の半数は、２４ウェルプレート内に播種してさらに培養した。試験プレーを２０～２４時間培養した。各ウェルの上清みを抗体力価について、比産生速度（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｖｉｔｙ　ｒａｔｅ）（ＳＰＲ）および倍加時間（ｇ）の測定の項目（下記参照）に記載のようにして解析した。相対細胞密度を、ＭＴＴアッセイを用いて測定した。詳細には、細胞をＭＴＴ溶液とともに２時間インキュベートし、溶液を廃棄し、細胞を２－プロパノール中０．０４Ｍ　ＨＣｌ溶液で溶解させた。２時間後、プレートを静かに混ぜ、デュアルモードの５７０ｎｍフィルターと６３０ｎｍ参照フィルターを備えたマイクロタイタープレート光度計を用いて測定を行なった。

【０３１１】

ＮＭ－Ｆ９：９６ウェルプレートを遠心分離し、上清みを廃棄した。細胞を２００μｌの新鮮培地中に再懸濁した。再懸濁した細胞の半数を９６ウェル試験プレート内に播種し、１００μｌの培地で希釈し、他の半数はクローニングプレート内でそのままさらに培養した。２日間の培養後、試験プレートを遠心分離し、２０μｌの上清みを抗体力価について、比産生速度（ＳＰＲ）および倍加時間（ｇ）の測定の項目（下記参照）に記載のようにして解析した。相対細胞密度を、ＷＳＴ－１アッセイを使用し、各ウェル内への１０μｌのＷＳＴ－１溶液（Ｒｏｃｈｅ）の添加によって測定した。１～３時間のインキュベーション後、デュアルモードの４５０ｎｍフィルターと６３０ｎｍの参照フィルターを備えたマイクロタイタープレート光度計を用いて測定を行なった。

【０３１２】

細胞密度に対する抗体力価の比率が高い細胞クローンを選択し、さらに培養および解析した。

【０３１３】

Ｋ５６２、ＮＭ－Ｄ４およびＮＭ－Ｈ９に対する条件は同じにした。

比産生速度（ＳＰＲ）および倍加時間（ｇ）の測定

各クローンについて、２×１０Ｐ^{4} ^{P}細胞／ウェルを２４ウェル組織培養プレートの５

００μｌの増殖培地中に播種した。細胞を３日間培養し、ならし培地を回収して解析し、必要に応じてＡｃｃｕｔａｓｅによって細胞を取り出し、計数した。特異的抗体価を培地試料からＥＬＩＳＡによって定量的に測定した。アッセイプレートをヒトκ鎖特異的抗体（ＢＤ）でコートした。結合された組換え抗体を、抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）により検出した。定量では、精製組換えキメラ抗体を標品として使用した。

【０３１４】

特定タンパク質のピコグラム／細胞／日（ｐｃｄ）で測定されるＳＰＲは、増殖速度と産生能の両方の関数であり、以下の等式：

【０３１５】

【数１】

$$SPR = \frac{\text{全タンパク質質量}}{\text{積分細胞面積 (ICA)}}$$

【０３１６】

【数２】

$$ICA = \frac{(\text{最終細胞数} - \text{最初の細胞数}) \times \text{培養日数}}{\log B_{eB}\,(\text{最終細胞数} / \text{最初の細胞数})}$$

によって計算した。

【０３１７】

倍加時間は、以下の等式：

ｇ＝ｌｏｇ２×（培養時間）／ｌｏｇ（最終細胞数／最初の細胞数）

によって計算した。

細胞株の平均収率および最大収率の測定

上記の限界希釈（０．５細胞／ウェル）を用いた９６ウェルプレート内での単一細胞クローニング後、理論的に２００個の平板培養単一クローンから、増殖中の細胞クローンのＳＰＲを測定し、種々の細胞株および種々の条件での平均および偏差ならびに最大収率を求めた。表１では、血清含有条件下で生成されたＣＨＯｄｈｆｒ－とＮＭ－Ｆ９のキメラＰａｎｋｏＭａｂ産生細胞クローンのデータを比較している。

【０３１８】

（実施例６）

抗体分子組成物を産生する無血清高収率細胞クローンの作製

無血清培地Ｘ－Ｖｉｖｏ　２０に適応させたＮＭ－Ｈ９Ｄ８、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２、またはＧＴ－２ｘのトランスフェクションを、無血清条件下、ＤＭＲＩＥ－Ｃまたはエレクトロポレーション（Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ，Ａｍａｘａ）を用いて行なった。トランスフェクションの２日後、増殖培地を選択培地（Ｘ－Ｖｉｖｏ　２０＋０．７５μｇ／ｍｌプロマイシン＋５０ｎＭメトトレキサート）に１週間交換した。最初の増幅は、メトトレキサート濃度を１００ｎＭに上げることにより、さらに２週間行なった。増幅細胞集団の一部を、プロマイシンおよびメトトレキサート無添加のＸ－Ｖｉｖｏ中で単一細胞クローニングし、残りの細胞は、メトトレキサート濃度を上げることにより新たな回の遺伝子増幅に供した。このようにして、４～６回の遺伝子増幅（１００、２００、５００、１０００、２０００、３０００ｎＭメトトレキサート）を行なった。さらに、クローンスクリーニングおよび解析によって特定された最良の産生クローンを、同様にしてさらに増幅した。限界希釈（０．５細胞／ウェル）を用いた９６ウェルプレート内での単一細胞クローニング後、プレートを２～３週間培養し、増殖中の細胞クローンを顕微鏡により解析し、クローニング効率を％で（増殖中の細胞クローンの入っ

たウェルの数×１００／播種細胞の理論数）調べた。血清の存在下でのＮＭ－Ｆ９懸濁細胞と同じ手順（上記参照）を使用し、増殖中のクローンを産生能に関してスクリーニングした。

細胞クローンの平均収率および最大収率の測定

上記の限界希釈（０．５細胞／ウェル）を用いた９６ウェルプレート内での単一細胞クローニング後、理論的に２００個の平板培養単一クローンから、増殖中の細胞クローンのＳＰＲを測定し、異なる条件での平均および偏差ならびに最大収率を求めた。表２は、完全に無血清条件下で生成されたＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］のキメラＰａｎｋｏＭａｂ産生細胞クローンのデータを示す。

【０３１９】

本発明による細胞株における増幅後の比産生速度（ＳＰＲ）は、ＣＨＯｄｈｆｒ－のものよりも高く、無血清条件下で生成されたキメラＰａｎｋｏＭａｂ産生ＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］細胞でのものが最大である。

【０３２０】

大部分のクローンの産生速度は、少なくとも６週間にわたって淘汰圧なく非常に安定である。最良のクローンは、ＳＰＲが３０ｐｃｄで６週間にわたって安定であり、倍化速度は２４時間であった。

【０３２１】

データは、実験室内小規模でのクローンの産生能を反映し、プロセスの開発、培地最適化および発酵によって、産生能が増大するさらなる可能性がある。

【０３２２】

無血清条件下で生成された産生クローンの高い産生能と収率は好都合なものであり、条件は、他のすべての抗体、および無血清条件に適応させたＫ５６２、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｄ４、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｅ－２Ｆ９、ＮＭ－Ｃ－２Ｆ５、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、またはＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］のすべての細胞株で同じである。

【０３２３】

（実施例７）

抗体分子組成物の単離

本発明による抗体分子組成物の産生および単離のため、キメラ抗体ＰａｎｋｏＭａｂ、Ｐａｎｋｏ１、Ｐａｎｋｏ２、またはセツキシマブを分泌する安定にトランスフェクトされた細胞を、細胞密度が約１～２×１０Ｐ^{6}Ｐ細胞／ｍｌに達するまで無血清培地中で培養した。遠心分離（４００×ｇ、１５分間）によって細胞培養上清みから細胞を除去した後、キメラ抗体を、プロテインＡカラム（ＨｉＴｒａｐ　ｒ－ｐｒｏｔｅｉｎ　ＡＦＦ、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて精製した。急速ｐＨ変化によって溶出された精製抗体画分をＰＢＳ中で再緩衝化し、Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ遠心チューブ（５０ｋＤａ排除、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて濃縮した。

【０３２４】

（実施例８）

本発明による抗体分子組成物のＦｃ媒介性細胞性細胞傷害の測定

エフェクター細胞としての献血者からのＰＢＭＣの単離

ＰＢＭＣを健常ドナーの血液から、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ）を用いた密度遠心分離によって単離した。細胞を、５％ＦＣＳ補給ＲＰＭＩ　１６４０で３回洗浄し、５×１０^{7}細胞の個々のバッチで低温保存した。ＰＢＭＣを解凍し、フローサイトメトリーにおいて、または細胞傷害アッセイのエフェクター細胞として直接使用するか、または使用前に１０％ＦＣＳを補給したＲＰＭＩ　１６４０（ＲＰＭＩ／ＦＣＳ）中に一晩維持した。

インビトロモデルでの抗体依存性細胞性細胞傷害の検出

本発明による組換え抗体の抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を、ユーロピウム放出アッセイにおいて調べた。標的細胞（ＺＲ－７５－１、５×１０^{6}）を６分間氷上にて

、８００μｌのユーロピウムバッファー（５０mMのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、９３mM ＮａＣｌ、５mM ＫＣｌ、２mM $MgCl_2$、１０mMジエチレントリアミン五酢酸、２mM酢酸ユーロピウム（ＩＩＩ））中でインキュベートし、Ｍｕｌｔｉｐｏｒａｔｏｒ（ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ）においてエレクトロポレーションし（７１０Ｖ、１パルス、３０μｓ）、続いて、氷上でさらに６分間インキュベートした。その後、細胞をＲＰＭＩ １６４０／５％ＦＣＳ中で５回洗浄し、９６ウェル丸底プレート内に播種した（Ｎｕｎｃ；１００μｌ中1×10^4細胞／ウェル）。種々の濃度（２００μｌのインキュベーション容量中０．５～２５μｇ／ｍｌ終濃度）の２０μｌの組換え抗体または対応する対照（培地、アイソタイプ対照ヒトＩｇＧ）の添加後、ヒト末梢血細胞（８０μｌ／ウェル）を、エフェクター細胞としてエフェクター／標的細胞比５０：１を用いて添加した。エフェクター細胞を含まない８０μｌのＲＰＭＩ／ＦＣＳを添加し、自発放出を測定した。標的細胞をエタノールで完全に溶解させた後、最大放出を測定した。インキュベータ内で３７℃にて４時間インキュベーション後、プレートを５００×ｇで５分間遠心分離し、２５μｌの各試料を２００μｌの増強溶液（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｗａｌｌａｃ）／ウェルにピペッティングした。室温で１５分間のインキュベーション後、蛍光を測定した（ＶｉｃｔｏｒＰ^{2P} Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒ、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｗａｌｌａｃ）。特異的細胞傷害は、等式（実験溶解-自発溶解）／（最大溶解-自発溶解）＊１００から得られる。

【０３２５】

あるいはまた、標的細胞（ＬＳ１７４ＴまたはＺＲ－７５－１、3×10^6細胞）を６分間氷上で、１００μｌのユーロピウムバッファー（５０mMのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、９３mM ＮａＣｌ、５mM ＫＣｌ、２mM $MgCl_2$、１０mMジエチレントリアミン五酢酸、２mM酢酸ユーロピウム（ＩＩＩ））中でインキュベートし、プログラムＡ－０１１を用いたＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ ＩＩ（Ａｍａｘａ）においてエレクトロポレーションし、続いて、氷上でさらに６分間インキュベートした。その後、細胞をＲＰＭＩ １６４０／５％ＦＣＳ中で４回洗浄し、９６ウェル丸底プレート内に播種した（Ｎｕｎｃ；１００μｌ中５～10×10^3細胞／ウェル）。種々の濃度（セツキシマブでは、２００μｌのインキュベーション容量中０．００１～１００ｎｇ／ｍｌ終濃度；キメラＰａｎｋｏＭａｂ、Ｐａｎｋｏ１、またはＰａｎｋｏ２では、０．１６～５μｇ／ｍｌ）の２０μｌの組換え抗体または対応する対照（培地、アイソタイプ対照ヒトＩｇＧ）の添加後、ヒト末梢血細胞（８０μｌ／ウェル）を、エフェクター細胞としてエフェクター／標的細胞比１００：１～５０：１を用いて添加した。エフェクター細胞を含まない８０μｌのＲＰＭＩ／ＦＣＳを添加し、自発放出を測定した。標的細胞を％Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で完全に溶解させた後、最大放出を測定した。インキュベータ内で３７℃にて４時間または一晩インキュベーション後、プレートを５００×ｇで５分間遠心分離し、２５μｌの各試料を２００μｌの増強溶液（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｗａｌｌａｃ）／ウェルにピペッティングした。室温で１０分間のインキュベーション後、蛍光を測定した（Ｖｉｃｔｏｒ^2 Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒ、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｗａｌｌａｃ）。特異的細胞傷害は、等式（実験溶解-自発溶解）／（最大溶解-自発溶解）＊１００から得られる。

【０３２６】

ｆｕｔ８$^-$細胞株ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６から単離したセツキシマブのＡＤＣＣ活性は、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞またはＳＰ２／０細胞から単離したセツキシマブのＡＤＣＣ活性よりも有意に高い。図２に示されるように、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６から単離したセツキシマブは、ＣＨＯｄｈｆｒ－またはＳＰ２／０細胞から単離したセツキシマブ（エルビタックス、Ｍｅｒｃｋ製）より約３０倍低い抗体濃度で、ＬＳ１７４Ｔ細胞に対して同じ特異的溶解を誘導する。これは、この市販品と比べて３０倍高いＡＤＣＣ活性を示す。この結果は、本発明の産生方法を使用することにより得られ、最適化されたグリコシル化パターンがもたらされる。

【０３２７】

また、ＮＭ－Ｆ９［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６］、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｄ４［ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５６］、ＧＴ－Ｘ２［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂのＡＤＣＣ活性は、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂのＡＤＣＣ活性よりも約５倍高い。キメラＰａｎｋｏＭａｂは約５分の１の濃度で、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させたキメラＰａｎｋｏＭａｂと同じＡＤＣＣ活性をもたらす。図３は、比較の目的でＮＭ－Ｆ９細胞株を用いたそれぞれの結果を示す。

【０３２８】

ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２から単離したキメラＰａｎｋｏ１のＡＤＣＣ活性は、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏ１のＡＤＣＣ活性よりも約８倍高い。キメラＰａｎｋｏ１は約８分の１の濃度で、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させたキメラＰａｎｋｏ１と同じＡＤＣＣ活性をもたらす。それぞれの結果を図４に示す。

【０３２９】

ＮＭ－Ｈ９Ｄ８またはＧＴ－２ｘから単離したキメラＰａｎｋｏ２のＡＤＣＣ活性は、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏ２のＡＤＣＣ活性よりも約６倍高い。キメラＰａｎｋｏ２は約６分の１の濃度で、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させたキメラＰａｎｋｏ２と同じＡＤＣＣ活性をもたらす。それぞれの結果を図５に示す。

【０３３０】

ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６から単離したキメラＰａｎｋｏ２のＡＤＣＣ活性は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から単離したキメラＰａｎｋｏ２のＡＤＣＣ活性よりも低い。それぞれの結果を図６に示す。

インビトロモデルでの補体依存性細胞性細胞傷害の検出

抗体の補体依存性細胞性細胞傷害（ＣＤＣ）を、ユーロピウム放出アッセイにおいて調べた。Eu^{3+}負荷標的細胞（ＺＲ－７５－１、3×10^{6}）は、上記のようにして作製した。

【０３３１】

その後、細胞を９６ウェル丸底プレート内に播種した（Ｎｕｎｃ；１００μｌ／ウェル中5×10^{3}細胞）。種々の濃度（２００μｌのインキュベーション容量中０．５～５０μｇ／ｍｌ終濃度）の２０μｌの抗体または対応する対照（培地、アイソタイプ対照ヒトＩｇＧ）の添加後、細胞を室温で半時間インキュベートした。その後、１０μｌ／ウェルの乳児ウサギ補体（Ｃｅｄａｒｌｉｎｅ、１：５～１：１０希釈）を添加した。補体を含まない１０μｌのＲＰＭＩ／ＦＣＳを添加し、自発放出を測定した。標的細胞をエタノールまたは１％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で完全に溶解させた後、最大放出を測定した。インキュベータ内で３７℃にて３～３．５時間インキュベーション後、プレートを５００×ｇで５分間遠心分離し、２５μｌの各試料を２００μｌの増強溶液（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｗａｌｌａｃ）／ウェルにピペッティングした。室温で１０分間のインキュベーション後、蛍光を測定した（ＶｉｃｔｏｒＰ^{2P}　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒ、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｗａｌｌａｃ）。特異的細胞傷害は、等式（実験溶解－自発溶解）／（最大溶解－自発溶解）＊１００から得られる。

【０３３２】

ＮＭ－Ｆ９細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂのＣＤＣ活性は、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離されたキメラＰａｎｋｏＭａｂのＣＤＣ活性よりも８倍高い。ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂと比べ、ＮＭ－Ｆ９から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂでは、同じ特異的溶解が、８倍低い濃度で誘導される。それぞれの結果を図７に示す。

抗体分子組成物の食作用活性を解析するためのコンジュゲート形成アッセイ（ＣＦＡ）

ＰＫＨ２６での腫瘍細胞の染色：

$1\times10P^{7P}$～$2\times10P^{7P}$の腫瘍細胞をＰＢＳ中で２回洗浄し、１ｍｌの希釈剤

Ｃ中に再懸濁し、１ｍｌのＰＫＨ２６を濃度１２×１０Ｐ－６Ｐで、ＺＲ－７４－１、ＺＲ－７４－１ＴＦ、ＭＣＦ－７およびＭＴ－３に対して添加した。

【０３３３】

室温で３分間インキュベーション後、２ｍｌのＦＣＳを室温で１分間添加することにより染色を終了した。培地（４ｍｌ、１％Ｌ－グルタミン、１０％ＦＣＳを補給したＲＰＭＩ）を添加し、細胞を遠沈させ、培地で４回洗浄した。過剰のＰＫＨ－２６放出が可能となるように、腫瘍細胞を３７℃および５％ＣＯＢ２Ｂで一晩インキュベートした。

【０３３４】

ＰＫＨ－２６染色の最適化を、半分の細胞数および容量で行なった。

ＣＦＡ：

ＰＫＨ－２６標識腫瘍細胞をトリプシン／ＥＤＴＡにより回収し、ＰＢＳで１回洗浄し、組換え抗体分子組成物の存在下または非存在下のＭＡＫ細胞培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に、０．８×１０Ｐ６Ｐ細胞／ｍｌで再懸濁させた。腫瘍細胞（２５０μｌ、０．２×１０Ｐ６Ｐ細胞）を、非付着性ポリプロピレンチューブ内に播種した。

【０３３５】

ＭＡＫ細胞を、Ｂｏｙｅｒら、Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２７、７５１－７６１（１９９９）に従って作製し、洗浄し、１．６×１０Ｐ６Ｐ細胞／ｍｌで再懸濁した。２５０μｌのＭＡＫ細胞（０．２×１０Ｐ６Ｐ細胞）をＰＫＨ－２６標識腫瘍細胞（Ｅ：Ｔ比２：１）に添加した。個々の試料を２連で、４℃および３７℃／５％ＣＯＢ２Ｂにて３時間または一晩（１８～２０時間）インキュベートした。

【０３３６】

３時間または一晩インキュベーション後、細胞をＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ／１０％ＦＣＳ中ＣＤ１１ｃ－ＦＩＴＣ（１：１８．５）＋７－ＡＡＤ（１：５００）で染色した。細胞をＰＢＳで洗浄し、４００μｌのＰＢＳ中に再懸濁させた。取得は、Ｅｐｉｃｓ　ＸＬ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）において１０，０００細胞に対して行なった。共局在ＭＡＫ細胞の割合を、全バイアブルＣＤ１１ｃ－ＦＩＴＣ陽性細胞に対する同期（ｇａｔｅ）した細胞集団内のＰＫＨ－２６陽性細胞の割合として求めた。

【０３３７】

（実施例９）

ＥＬＩＳＡでの抗体分子組成物結合活性の解析

種々の細胞株で発現させた抗体分子組成物の抗原結合を解析するため、キメラＰａｎｋｏＭａｂとＰａｎｋｏ２の精製抗体分子組成物を、ＥＬＩＳＡで、配列ＡＰＰＡＨＧＶＴＳＡＰＤＴ［ＧａｌＮＡｃα］ＲＰＡＰＧＳＴＡＰＰＡＨＧＶＴＳＡを有する合成３０量体グリコシル化ＭＵＣ１ペプチドにおいて測定した。非グリコシル化ＭＵＣ１ペプチドを対照として使用した。

【０３３８】

分割して－２０℃で保存しておいたストック溶液（１ｍｌの蒸留（ｂｉｄｅｓｔ）ＨＢ２ＢＯ中１ｍｇ）を使用し、ＰＢＳ中１μｇ／ｍｌの希釈液を作製した。５０μｌ／ウェルをＮＵＮＣ　Ｉｍｍｕｎｏ　ｐｌａｔｅ　Ｆ９６　最大ｉＳｏｒｐ内にピペッティングし、この試験プレートを４℃で一晩インキュベートした。翌日、試験プレートをＰＢＳ／０．２％Ｔｗｅｅｎ－２０で３回洗浄した。続いて、非特異的結合部位をＰＢＳ中２％ＢＳＡでブロックし、室温で少なくとも１時間インキュベートし、５０μｌの組換えＰａｎｋｏＭａｂを適用した（１～４００ｎｇ／ｍｌ　ＰＢＳ／１％ＢＳＡ）。ＰＢＳ／０．２％Ｔｗｅｅｎ－２０で３回の洗浄工程後、ペルオキシダーゼ結合抗ヒトＦｃγ１二次抗体を用いて特異的結合抗体を検出した。結合二次抗体を検出するため、ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン）による発色反応を行なった。１５分後、２．５ＮＨＢ２ＢＳＯＢ４Ｂを添加することにより、反応をクエンチした。デュアルモードの４５０ｎｍフィルターと６３０ｎｍの参照フィルターを備えたマイクロタイタープレート光度計を使用し、測定を行なった。

【０３３９】

ＮＭ－Ｆ９から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂの結合活性は、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂの結合活性よりも約５０％高い（図８）。

【０３４０】

高シアリル化クローンＮＭ－Ｈ９Ｄ８で発現させ、該クローンから単離したキメラＰａｎｋｏ２の結合活性は、ＥＬＩＳＡにおいて、ＧＴ－２ｘのものと同等であり、ＣＨＯｄｈｆｒ－細胞でのものと比べると高い（図９）。

【０３４１】

（実施例１０）

ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－およびＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させた抗体分子組成物のグリカン解析

少なくとも１００μｇの精製抗体のグリカンを酸加水分解によって切断した。シアル酸を、蛍光色素ＤＭＢとのコンジュゲーションによって特異的に標識した。解析は、ＨＰＬＣによって例えばＡｓａｈｉｐａｋ－ＮＨ２カラムにおいて、個々の糖鎖に対して行なった。シアル酸の同定および計算は、適切なシアル酸標準物質によって行なった。

【０３４２】

ＣＨＯｄｈｆｒ－またはＮＭ－Ｆ９細胞において発現させたキメラＰａｎｋｏＭａｂ抗体分子組成物の解析により、ＣＨＯｄｈｆｒ－産生物ではモノシアリル化が＜１０％、およびＮＭ－Ｆ９またはＧＴ－２ｘ産生物ではシアリル化がほぼないことが示された。後者は、非荷電グリカンのみを含んでいた。

【０３４３】

より詳細には、少なくとも１００μｇの精製抗体のグリカンを酸加水分解によって切断した。シアル酸を、ＤＭＢなどの蛍光色素とのコンジュゲーションによって特異的に標識した。解析は、ＨＰＬＣによって、例えばＲＰ－１８カラムでの逆相クロマトグラフィーによって行なった。シアル酸の同定および計算は、適切なシアル酸標準物質によって行なった。

【０３４４】

荷電グリカン構造およびガラクトシル化状態の測定のため、１００μｇ抗体をトリプシンで消化し、ＰＮＧａｓｅＦ処理によってＮ－グリカン（Ｇｌｙｋａｎ）を得た。精製グリカンを２－アミノベンズアミド（２－ＡＢ）で標識し、アニオン交換クロマトグラフィーＨＰＬＣ（Ａｓａｈｉ－ＰＡＫ－カラム）に供し、荷電Ｎ－グリカン構造を調べた。ガラクトシル化状態の測定のため、Ｎ－グリカンを、シアル酸含有量を枯渇させるノイラミニダーゼで処理した。Ａｍｉｎｏｐｈａｓｅ　ＨＰＬＣ（Ｌｕｎａ－ＮＨ２－カラム）によって分離し、ピークを質量分析によって解析した。

【０３４５】

おそらく分岐しているＧｌｃＮＡｃを有するグリカンを含むピークを、第２の工程で逆相クロマトグラフィー（ＲＰ１８－カラム）によって分離した。これにより、トリアンテナ型およびバイアンテナ型＋バイセクト型構造が識別され得る。該抗体のフコシル化度を、２－ＡＢ標識グリカンのａｍｉｎｏｐｈａｓｅ　ＨＰＬＣ（Ｌｕｎａ－ＮＨ２－カラム）によって調べた。ピークを積分によって定量し、基礎となるグリカン構造を質量分析によって解析した。フコシル化構造および非フコシル化構造を調べ、積分ピーク面積を定量した。

【０３４６】

ＮＭ－Ｆ９、ＧＴ－２ｘ、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６、またはＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させたセツキシマブ、ＰａｎｋｏＭａｂおよびＰａｎｋｏ１の種々の抗体分子組成物を解析し、結果を表３～４にまとめる。

【０３４７】

α２－６（ＳＮＡ）またはα２－３（ＭＡＬ－Ｉ）結合シアル酸に優先的に結合するレクチンを使用し、ＥＬＩＳＡまたはウエスタンブロット解析によって抗体シアリル化を特性化した。

【０３４８】

ウエスタンブロット解析を行なうと、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］において発現させた抗体分子組成物の種々にシアリル化された重鎖が確認された。５μｇの各抗体分子組成物を、還元条件下での１０％アクリルアミドゲルにおけるＳＤＳ－Ｐａｇｅによって分離した。タンパク質をニトロセルロースに移し、レクチンおよび／または抗ヒトＩｇＧ二次抗体によって可視化した。図１０は、抗ヒトＩｇＧ二次抗体（図１０Ａ）または２－６シアリル化を検出するＳＮＡ（図１０Ｂ）のいずれかでの、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］において発現させたキメラＰａｎｋｏＭａｂの抗体分子組成物の種々にシアリル化された重鎖を示す。図１１は、ＳＮＡ結合によって可視化した、ＣＨＯｄｈｆｒ－またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８において発現させたセツキシマブ抗体分子組成物の種々にシアリル化された重鎖を示す。

【０３４９】

ＥＬＩＳＡ実験は、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞の上清みから単離した抗体のシアリル化を解析するために使用した。ＰＢＳ中２μｇ／ｍｌの精製抗体を５０μｌ／ウェルで、９６ウェルマイクロタイタープレート（最大ｉｓｏｒｐ）に４℃で一晩コートし、ブロックし（ＰＢＳ／ＢＳＡ）、洗浄し、ビオチン化ＳＮＡ（２μｇ／ｍｌ、ＰＢＳ／１％ＢＳＡ）とともに１時間インキュベートし、再度洗浄した。次いで、ウェルをＰＯＤ－ストレプトアビジンとともにインキュベートし、洗浄し、ＴＭＢで発色させた。２．５Ｎ　H_2SO_4の添加によって反応を停止させ、参照として６３０ｎｍに対して４５０ｎｍで光学濃度を測定した。図１２は、ＳＮＡの結合は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞において発現させた抗体に対して生じるが、ＣＨＯｄｈｆｒ－またはＧＴ－２ｘ細胞において発現させた抗体には生じないことを示す。結合強度は個々の抗体で異なり、これは、個々の抗体の微細構造または使用した条件下での糖鎖のアベイラビリティによってもたらされたシアリル化度が種々であることを示す。

【０３５０】

ＥＬＩＳＡ実験は、種々の細胞株で発現させた精製抗体を、マイクロタイタープレートのウェルにコートし（２μｇ／ｍｌ、５０μｌ／ウェル）、適切なビオチン化レクチンＳＮＡおよびＭＡＬ　Ｉによって検出することにより行なった。シアリル化によるレクチン結合の依存性は、ノイラミニダーゼ処理（０．１Ｕ／ｍｌおよび室温で１時間のインキュベーション）によって確認した。セツキシマブの結果を図１３Ａおよび１３Ｂに示す。

【０３５１】

ドットブロット解析を行なうと、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞において発現させた抗体のシアリル化の差が確認された。３μｇの精製抗体を各々、ニトロセスロースにスポットし、ＰＢＳ／ＢＳＡでブロックし、洗浄し、２，６－シアリル化を検出するＳＮＡによって可視化した。図１４は、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞から単離したキメラ抗体Ｐａｎｋｏ１およびＰａｎｋｏ２のブロットを示す。２，６－シアリル化は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６細胞から単離した抗体でのみ検出可能である。

【０３５２】

（実施例１１）

ＮＭ－Ｆ９、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８およびＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させた抗体分子組成物のバイオアベイラビリティの検出

ＮＭ－Ｈ９Ｄ８において発現させたシアリル化抗体ＰａｎｋｏＭａｂでは、ＮＭ－Ｆ９細胞において発現させた非シアリル化抗体ＰａｎｋｏＭａｂと比べて長いバイオアベイラビリティが、ヌードマウスにおいて測定された。マウス１匹あたり５μｇの精製抗体を、１群あたり少なくとも３匹のマウスにｉ．ｖ．注射した。血液試料を注射後の種々の時点（注射の５分後、２、５、８、２４、４８、７２および１４４時間後）で採取し、血清を単離し、解析まで試料を－８０℃で保存した。これらの試料の抗体価をＥＬＩＳＡによって測定した。図１５は、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から単離したキメラＰａｎｋｏＭａｂが、Ｎ

Ｍ－Ｆ９から単離したものよりも細胞よりもバイオアベイラビリティが長いことを示し、これは、おそらく抗体の種々のシアリル化によって引き起こされる。

【０３５３】

（実施例１２）

真核生物細胞内でｈＦＳＨを発現させるためのベクターのクローニング

ＦＳＨαおよびＦＳＨβ鎖のコード配列を、特異的プライマーにより、ＢＡＣクローンＲＺＰＤＢ７３７Ｂ１２２０５３Ｄ（ＦＳＨαゲノム）、ＩＲＡＵｐ９６９Ｅ０７５２Ｄ（ＦＳＨα　ｃＤＮＡ）およびＲＺＰＤＢ７３７Ｈ０６１９Ｄ６（ＦＳＨβゲノム）（ＲＺＰＤ、ドイツ製）を用いてＰＣＲ増幅した。

ＦＳＨα鎖のプライマー：

ＦＳＨａ－ｗｔ－ｆ－ＫｐｎＩ：ＡＡＡＧＧＴＡＣＣＡＴＧＧＡＴＴＡＣＴＡＣＡＧＡＡＡＡＴＡＴＧ／

ＦＳＨａ－ｂ－ＢａｍＨＩ：ＡＡＡＧＧＡＴＣＣＴＴＡＡＧＡＴＴＴＧＴＧＡＴＡＡＴＡＡＣ；

ＦＳＨβ鎖のプライマー：

ＦＳＨｂ－ｗｔ－ｆ－ＨｉｎｄＩＩＩ：ＴＴＴＡＡＧＣＴＴＡＴＧＡＡＧＡＣＡＣＴＣＣＡＧＴＴＴＴＴＣ／

ＦＳＨｂ－ｂ－ＢａｍＨＩ：ＴＴＴＧＧＡＴＣＣＴＴＡＴＴＣＴＴＴＣＡＴＴＴＣＡＣＣ

増幅後、産生物を、ＨｉｎｄＩＩＩ／ＢａｍＨＩ（ＦＳＨゲノムβ）およびＫｐｎＩ／ＢａｍＨＩ（ＦＳＨゲノムαまたはＦＳＨｃＤＮＡα）により、対応する真核生物の発現ベクター内にクローニングした。ｃＤＮＡ配列を、ＴＣＲ－リーダー配列に融合されたＦＳＨβ鎖をコードするＧｅｎｅｓｙｎｔｈｅｓｉｓによって作製し、真核生物の発現ベクター（ＦＳＨｃＤＮＡβ）内にクローニングした。

配列ＦＳＨｃＤＮＡβ（ＴＣＲ－リーダー配列に下線）：

【０３５４】

【化１】

atggcctgccccggcttcctgtgggccctggtgatcagcacctgcctggaattctccatggctaacagctgcgagctgacc
aacatcaccatcgccatcgagaaagaggaatgccggttctgcatcagcatcaacaccacctggtgcgccggctactgc
tacacccgggacctggtgtacaaggaccccgccaggcccaagatccagaaaacctgcaccttcaaagaactggtgta
cgagaccgtgcgggtgcccggctgcgcccaccacgccgacagcctgtacacctaccccgtggccacccagtgccact
gcggcaagtgcgacagcgacagcaccgactgcaccgtgaggggcctgggccccagctactgcagcttcggcgagat
gaaagagtga

発現ベクター（ｐＥＦｐｕｒｏおよびｐＥＦｄｈｆｒＢ$_{mutB}$）は、ＥＦ－１αプロモーターとＨＣＭＶエンハンサー、ＳＶ４０起点、ポリアデニル化シグナル、プロマイシン耐性遺伝子をα鎖ベクター内に、およびＣＨＯ細胞発現のためのマウスジヒドロホラーゼ遺伝子（ｄｈｆｒ）、またはＮＭ－Ｆ９、ＧＴ－２ｘ、Ｋ５６２、ＮＭ－Ｈ９、ＮＭ－Ｄ４、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８発現のための配列番号１（配列１＃）を、選択と遺伝子増幅のためにβ鎖用ベクター内に含む。

【０３５５】

（実施例１３）

ヒト組換えｈＦＳＨを発現させるための真核生物細胞のトランスフェクション、ならびに無血清条件下で高産生の細胞クローン（ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８）または血清含有条件下で高産生の細胞クローン（ＣＨＯｄｈｆｒ－）を作製するための遺伝子増幅手順

ｈＦＳＨをＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］、ＮＭ－Ｈ９Ｄ８（ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６）、およびＣＨＯｄｈｆｒ－（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－９０９６）において発現させるため、細胞を、αおよびβ鎖用の上記のベクター（１：１～１：３）の混合物で、ＤＭＲＩＥ－Ｃを用いたリポフェクションによって、またはＧＴ－２ｘ（ＦＳＨｃＤＮＡα／ＦＳＨゲノムβ）およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８（ＦＳＨｃＤＮＡα／ＦＳＨｃＤＮＡβ）とリポフェクタミンの懸濁細胞ではエレクトロポレーション（Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ；

Ａｍａｘａ）、または付着細胞株ＣＨＯｄｈｆｒ－（ＦＳＨゲノムα／ＦＳＨゲノムβ）ではエレクトロポレーションによってコトランスフェクトした。これらは、このような設定で使用される例示的な組合せである。他の組合せのｈＦＳＨαとｈＦＳＨβ鎖発現プラスミドでも、各々、同等の結果がもたらされる。

【０３５６】

トランスフェクションの２日後、増殖培地を選択培地（ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８では、Ｘ－Ｖｉｖｏ２０培地＋０．７５μｇ／ｍｌプロマイシン＋５０ｎＭメトトレキサート；ＣＨＯｄｈｆｒ－では、ＤＭＥＭ＋１０％透析ＦＣＳ＋２ｍＭ　Ｌ－グルタミン＋５μｇ／ｍｌプロマイシン＋５０ｍＭメトトレキサート）に１週間交換した。最初の増幅は、メトトレキサート濃度を１００ｎＭに上げることによりさらに２週間、および２００ｎＭメトトレキサートでさらに２週間行なった。増幅細胞集団の一部を、プロマイシンおよびメトトレキサート無添加の培地中で単一細胞クローニングした。残りの細胞は、メトトレキサート濃度を上げることにより新たな回の遺伝子増幅に供した。このようにして、２～３回の遺伝子増幅（１００、２００、５００ｎＭ　メトトレキサート）を行なった。さらに、クローンスクリーニングおよび解析によって特定された最良の産生クローンを、同様にしてさらに増幅した。

【０３５７】

ＣＨＯｄｈｆｒ－：増殖中のクローンの細胞をＰＢＳで洗浄し、Ａｃｃｕｔａｓｅ処理によって回収した。再懸濁した細胞の半数を９６ウェル試験プレート内に播種し、他の半数は、２４ウェルプレート内に播種してさらに培養した。試験プレーを２０～２４時間培養した。各ウェルの上清みを抗体価について、比産生速度（ＳＰＲ）および倍加時間（ｇ）の測定の項目（下記参照）に記載のようにして解析した。相対細胞密度を、ＭＴＴアッセイを用いて測定した。詳細には、細胞をＭＴＴ溶液とともに２時間インキュベートし、溶液を廃棄し、細胞を２－プロパノール中０．０４Ｍ　ＨＣｌ溶液で溶解させた。２時間後、プレートを静かに混ぜ、デュアルモードの５７０ｎｍフィルターと６３０ｎｍ参照フィルターを備えたマイクロタイタープレート光度計を用いて測定を行なった。

【０３５８】

ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８：９６ウェルプレートを遠心分離し、上清みを廃棄した。細胞を２００μｌの新鮮培地中に再懸濁した。再懸濁した細胞の半数を９６ウェル試験プレート内に播種し、１００μｌの培地で希釈し、他の半数はクローニングプレート内でそのままさらに培養した。２日間の培養後、試験プレートを遠心分離し、２０μｌの上清みを抗体価について、比産生速度（ＳＰＲ）および倍加時間（ｇ）の測定の項目（下記参照）に記載のようにして解析した。相対細胞密度を、ＷＳＴ－１アッセイを使用し、各ウェル内への１０μｌのＷＳＴ－１溶液（Ｒｏｃｈｅ）の添加によって測定した。１～３時間のインキュベーション後、デュアルモードの４５０ｎｍフィルターと６３０ｎｍの参照フィルターを備えたマイクロタイタープレート光度計を用いて測定を行なった。

比産生速度（ＳＰＲ）および倍加時間（ｇ）の測定

各クローンについて、２×１０Ｐ$^{4\ P}$細胞／ウェルを２４ウェル組織培養プレートの５００μｌの増殖培地中に播種した。細胞を３日間培養し、ならし培地を回収して解析し、必要に応じてＡｃｃｕｔａｓｅによって細胞を取り出し、計数した。特異的抗体価を培地試料からＥＬＩＳＡによって定量的に測定した。アッセイプレートをｈＦＳＨβに特異的なマウスｍＡＢ（ａｂ２２４７３）でコートした。結合された組換えｈＦＳＨをｈＣＧαに特異的なヤギポリクローナル抗体（ａｂ２０７１２）とともにインキュベートし、ロバ抗ヤギＩｇＧ　Ｈ＋Ｌ－ＰＯＤ（ＪａｃｋｓｏｎＩｍｍｕｎｏカタログ番号３０５－０３５－００３）により検出した。定量では、精製組換えｈＦＳＨを標品として使用した。

【０３５９】

特定タンパク質のピコグラム／細胞／日（ｐｃｄ）で測定されるＳＰＲは、増殖速度と産生能の両方の関数であり、以下の等式：

【０３６０】

【数３】

$$SPR = \frac{\text{全タンパク質質量}}{\text{積分細胞面積(ICA)}}$$

【０３６１】
【数４】

$$ICA = \frac{(\text{最終細胞数}-\text{最初の細胞数})\times\text{培養日数}}{\log_{eB}(\text{最終細胞数}/\text{最初の細胞数})}$$

によって計算した。
【０３６２】
倍加時間は、以下の等式：
ｇ＝ｌｏｇ２×（培養時間）／ｌｏｇ（最終細胞数／最初の細胞数）
によって計算した。
細胞株の平均収率および最大収率の測定
上記の限界希釈（０．５細胞／ウェル）を用いた９６ウェルプレート内での単一細胞クローニング後、理論的に２００個の平板培養単一クローンから、増殖中の細胞クローンのＳＰＲを測定し、種々の細胞株および種々の条件での平均および偏差ならびに最大収率を求めた。表７および表８では、血清含有条件下（ＣＨＯｄｈｆｒ－）ならびに無血清条件（ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８）で生成されたｈＦＳＨを産生するＣＨＯｄｈｆｒ－、ＧＴ－２ｘ、およびＮＭ－Ｈ９Ｄ８の細胞クローンのデータを比較している。
【０３６３】
（実施例１４）
ｈＦＳＨ分子組成物の単離
本発明によるｈＦＳＨ分子組成物産生および単離のため、ｈＦＳＨを分泌する安定にトランスフェクトされた細胞を、細胞密度が約１～２×１０Ｐ^{6}Ｐ細胞／ｍｌに達するまで無血清培地中で培養した。遠心分離（４００×ｇ、１５分間）によって細胞培養上清みから細胞を除去した後、キメラ抗体を、ＮＨＳ活性化カラム（ＨｉＴｒａｐ　ＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ＨＰ；ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に結合させたｈＣＧαに対するポリクローナル抗体を使用する親和性クロマトグラフィーを用いて精製した。急速ｐＨ変化によって溶出された精製ＦＳＨ画分をＰＢＳ中で再緩衝化し、Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ遠心チューブ（１０ｋＤａ排除、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて濃縮し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって解析した（図１６参照）。
【０３６４】
（実施例１５）
本発明によるＦＳＨ分子組成物の活性の測定
異なるグリコシル化パターンを有するＦＳＨ分子の活性は、以下に記載する方法に従って測定され得る。最適化されたグリコシル化をもたらす本発明によるスクリーニング方法により適当な細胞株を選択するため、ＦＳＨ分子を種々の細胞株で発現させ、それにより、例えばシアリル化度、ガラクトシル化および／またはフコシル化度に関して相違するグリコシル化パターンを示す個々の細胞株からＦＳＨ組成物を得る。最も有利な活性、したがってグリコシル化パターンを有するＦＳＨ分子／組成物は、以下の方法の少なくとも１つによって決定され得る。
ラット顆粒膜細胞アッセイ：
顆粒膜細胞を、ＤＥＳ処理した脳下垂体摘出ラットから採取した。該細胞の調製方法は、ＪｉａおよびＨｓｕｅｈ　１９８５に詳細に記載されている。
【０３６５】
得られた細胞を、２４ウェル規模で約１６００００細胞／ウェルにて、１００ｎＭ　Ｄ

ＥＳ、０．１２５　Ｍ　１－メチル－３－イソブチルキサンチン、２mMグルタミン、１μMアンドロステンジオン、１００Ｕ／ｍｌペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、１μｇ／ｍｌウシインスリンならびにＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞由来の漸増濃度のｒＦＳＨ調製物（０～１μｇ／ｍｌ）を含むマッコイ５Ａ培地中で、７２時間まで培養した。インキュベーションの７２時間後に培地を回収し、ＥＬＩＳＡ（Ｃａｌｂｉｏｔｅｃｈ　＃　ＥＳ０７１Ｓ）によるエストラジオールの定量まで－２０℃で保存した。

２９３ＨＥＫ　アッセイ：

ｈＦＳＨ－受容体（２×１０^{5}細胞／３５mm培養皿）で安定にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞を、ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から得られた漸増用量の各ＦＳＨタンパク質分子組成物（０～１μｇ／ｍｌ　ＦＳＨの範囲）に、０．１２５mMの１－メチル－３－イソブチルキサンチンの存在下、３７℃で２４時間から７２時間までで曝露した。インキュベーション後、全（細胞内および細胞外）ｃＡＭＰ濃度を、ｃＡＭＰ　Ｄｉｒｅｃｔ　Ｂｉｏｔｒａｋ^{TM}　ＥＩＡ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号：ＲＰＮ２２５）によって製造業者の使用説明書に従って測定した。

ＧＦＳＨＲ－１７細胞アッセイ：

細胞を、５％ウシ胎仔血清（Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＫＧ，ベルリン，ドイツ）を含むダルベッコ改変イーグル培地Ｈａｍ　Ｆ１２（１：１　ｖ：ｖ；Ｂｉｏｃｈｒｏｍ　ＫＧ，ベルリン，ドイツ）で培養した。細胞を２×１０^{5}細胞／２４ウェルプレートで平板培養し、ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から得られたＦＳＨタンパク質分子組成物とともに２４時間、０～１μｇ／ｍｌの範囲で１～２４時間インキュベートした。インキュベーション後に培地を回収し、プロゲステロンＥＬＩＳＡアッセイ（Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｉｍｍｕｎｏｓｙｓｔｅｍｓ，フライブルク，ドイツ）を製造業者の使用説明書に従って使用することによるプロゲステロンの定量まで－２０℃で保存した。

ヒト顆粒膜細胞アッセイ

ミュンスター大学で体外受精プログラムに参加している女性から得た卵胞採取による顆粒膜－黄体細胞を、Ｋｈａｎら，１９９０に記載のようにして富化し、６ウェルプレート内に播種した（１～１．５×１０^{5}バイアブル細胞／ウェル）。１０％熱不活化ウシ胎仔血清（ＦＣＳ；Ｇｉｂｃｏ，エッゲンシュタイン，ドイツ）、ペニシリン（５０単位／ｍｌ）、ストレプトマイシン（５０ｐｇ／ｍｌ）、ゲンタマイシン（１００ｐｇ／ｒｎｌ）およびアンホテリシン（０．６ｐｇ／ｍｌ）を補給したハムＦ１２／ダルベッコ改変必須培地（ＤＭＥＭ）（１：１；ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，メッケンハイム，ドイツ）中で、５％CO_2雰囲気下３７℃にて細胞をインキュベートした。細胞を、ＧＴ－２ｘおよびＮＭ－Ｈ９Ｄ８細胞から得られた漸増用量の各ＦＳＨタンパク質分子組成物（０～１μｇ／ｍｌ　ＦＳＨの範囲）に、０．１２５mMの１－メチル－３－イソブチルキサンチンの存在下、３７℃で２４時間から７２時間までで曝露した。インキュベーション後、全（細胞内および細胞外）ｃＡＭＰ濃度を、ｃＡＭＰ　Ｄｉｒｅｃｔ　Ｂｉｏｔｒａｋ^{TM}　ＥＩＡ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号：ＲＰＮ２２５）によって製造業者の使用説明書に従って測定した。

【０３６６】

（実施例１６）

ＧＴ－２ｘ　およびＣＨＯｄｈｆｒ－細胞において発現させたＦＳＨ組成物のグリカン解析

ウエスタンブロット解析を行なうと、ＣＨＯｄｈｆｒ－、ＧＴ－２ｘ［ＤＳＭ　ＡＣＣ＿＿＿］、またはＮＭ－Ｈ９Ｄ８［ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６］において発現させた種々にシアリル化されたＦＳＨ分子組成物が確認された。５μｇの各抗体分子組成物を、還元条件下での１０％アクリルアミドゲルにおけるＳＤＳ－Ｐａｇｅによって分離した。タンパク質をニトロセルロースに移し、２－６シアリル化を検出するＳＮＡによって可視化した（図１７）。

【０３６７】

シアル酸含有量、電荷分布、フコース含量、ガラクトシル化状態およびバイセクトＧｌｃＮＡｃ含有量の測定に関する詳細なグリカン解析は、実施例１０に従って行なわれ得る。

ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢＭＢ推奨（１９９６）による定義：
Ｎｅｕ５Ｇｃ：５－Ｎ－グリコリル－α－ノイラミン酸
Ｎｅｕ５ＡｃおよびＮｅｕＮＡｃ：５－Ｎ－アセチル－α－ノイラミン酸
Ｇａｌａ１，３Ｇａｌ：α－Ｄ－ガラクトピラノシル－（１→３）ガラクトピラノシル－隣接糖
２，３結合ノイラミン酸：５－Ｎ－アセチル－α－ノイラミニル－（２→３）－隣接糖
２，６結合ノイラミン酸：５－Ｎ－アセチル－α－ノイラミニル－（２→６）－隣接糖

本発明は、本明細書に記載した具体的な方法論、プロトコルおよび／または試薬が種々であり得るため、これらに限定されないことは理解されよう。また、本明細書で使用した専門用語は、具体的な実施形態を示す目的にすぎず、特許請求の範囲によってのみ制限される本発明の範囲を制限することは意図しないことも理解されよう。

配列番号
配列＃１
配列番号１
【０３６８】
【化２】

MVRPLNCIVAVSQDMGIGKNGDLPWPPLRNEWKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKKD

配列＃２
配列番号２
【０３６９】
【化３】

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNESRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

配列＃３
配列番号３
【０３７０】
【化４】

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEARYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

配列＃４
配列番号４
【０３７１】

【化５】

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

配列＃５
配列番号４
【０３７２】
【化６】

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

配列＃６
配列番号６
【０３７３】
【化７－１】

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV

【化７－２】

GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

配列＃７
配列番号７
【０３７４】
【化８】

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDFPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
KKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY
KFEVYEKND

配列＃８
配列番号８
【０３７５】
【化９】

MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDRPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKKD

配列＃９
配列番号９
【０３７６】

【化１０】

MVRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDYPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMG
RKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVG
GSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYK
FEVYEKKD

配列＃１０

配列番号１０

ＭＷＬＧＳＬＬＬＬＧＴＶＡＣＳＩＳＡ

【０３７７】

【表１】

表1

	CHOdhfr-	NM-F9
産生速度 (clgG1) 第1回～第4回の遺伝子増幅(メトトレキサート)および単一細胞クローニング(限界希釈)後に測定された理論的に200個の播種クローンのpcd	第1回(100nM MTX) 平均:2＋／－1pcd;最大:3pcd 第2回(200nM MTX) 平均:5＋／－1pcd;最大:7pcd 第3回(500nM MTX) 平均:9＋／－5pcd;最大:17pcd 第4回(1000nM MTX) 平均:13＋／－5pcd;最大22pcd	第1回(100nM MTX) 平均:5＋／－1．5pcd;最大:13pcd 第2回(200nM MTX) 平均:7．5＋／－4．5pcd;最大:19pcd 第3回(500nM MTX) 平均:12．5＋／－4．5pcd;最大:19pcd 第4回(1000nM MTX) 平均:16．5＋／－6pcd;最大:27pcd

【０３７８】

【表２】

表2

	NM-H9D8
産生速度(clgG1) 第1回～第5回の遺伝子増幅(メトトレキサート)および単一細胞クローニング(限界希釈)後に測定された理論的に200個の播種クローンのpcd	第1回(100nM MTX) 平均:7＋／－4pcd;最大:14pcd 第2回(200nM MTX) 平均:14＋／－4pcd;最大:23pcd 第3回(500nM MTX) 平均:13＋／－6pcd;最大:31pcd 第4回(1000nM MTX) 平均:23＋／－8pcd;最大:34pcd 第5回(2000nM MTX) 平均:23＋／－9pcd;最大:38pcd

【０３７９】

【表３－１】

表3

	pmol Neu5Gc	pmol Neu5Ac	pmol Neu5Gc / μg タンパク質	pmol Neu5Ac / μg タンパク質
エルビタックス(Merck;SP2／0)	0,149	0,000	**1,784**	0,000
セツキシマブGT－2x	0,000	0,278	0,000	**3,335**
セツキシマブNM-H9D8	0,000	1,156	0,000	**12,003**
cPankoMab CHOdhfr－	0,000	0,477	0,000	**4,921**

【０３８０】

【表３－２】

cPankoMab GT-2x	0,000	0,248	0,000	**2,990**
cPankoMab NM-H9D8	0,000	0,776	0,000	**13,856**

【０３８１】

【表４】

表4

	A0	A1	A2	A3	A4
Panko1 CHOdhfr－	75	9	11	4	1
Panko1 NM-H9D8	43	14	32	10	1
Panko1 NM-H9D8-E6	40	16	33	10	1
cPankoMab CHOdhfr-	93	7	0	0	0
cPankoMab NM-F9	99	1	0	0	0
cPankoMab NM-H9D8	62	26	11	1	0

【０３８２】

【表５】

表5

	G0[%]	G1[%]	G2[%]	G3[%]
Panko1 CHOdhfr－	22	45	33	0
Panko1 NM-H9D8	7	8	66	14
Panko1 NM-H9D8-E6	5	18	58	19
cPankoMab CHOdhfr-	28	36	35	1
cPankoMab NM-F9	7	26	65	2
cPankoMab NM-H9D8	7	32	59	0

【０３８３】

【表６】

表6

	フコシル化	非フコシル化	バイアンテナ型＋分岐GlcNAc
Panko1 CHOdhfr−	100	0	0
Panko1 NM-H9D8	45	55	5
Panko1 NM-H9D8-E6	21	79	2

	バイアンテナ型	バイアンテナ型＋分岐GlcNAc	非フコシル化
cPankoMab-CHO	99	0	0
cPankoMab-NM-F9	68	29	6
cPankoMab-NM-H9D8	59	39	1

【０３８４】

【表７－１】

表7

	CHOdhfr-	GT-2X
産生速度(FSH)	第3回(500nM MTX)	第2回(200nM MTX)

【０３８５】

【表７－２】

第3回の遺伝子増幅(メトトレキサート)および単一細胞クローニング(限界希釈)後に測定された理論的に200個の播種クローンのpcd	平均:＜1pcd;最大:0.05pcd	平均:2.5＋／－2.0pcd;最大:6pcd 第3回(500nm MTX) 平均:2.5＋／－1.3pcd;最大:12pcd

【０３８６】

【表８】

表8

	NM-H9D8
産生速度(FSH) 第2回の遺伝子増幅(メトトレキサート)および単一細胞クローニング(限界希釈)後に測定された理論的に200個の播種クローンのpcd	第2回(200nM MTX) 平均:2.2＋／－1.2pcd;最大:4pcd

【０３８７】

【表９－１】

表9

- NeuGcなし - 検出可能な末端Galα１－３Galなし - 請求項2および従属項に記載の高ガラクトース - 請求項2および従属項に記載の低フコース - bisecGlcNAc - 高い活性、特にFc活性 - 高親和性 - 高収率 - ２－６ NeuNAc - ２－３ NeuNAc - 請求項2および従属項に記載の高シアル酸	- NeuGcなし - 検出可能な末端Galα１－３Galなし - 請求項2および従属項に記載の高ガラクトース - 請求項2および従属項に記載の低フコース - bisecGlcNAc - 高い活性、特にFc活性 - 高親和性 - 高収率 - 請求項2および従属項に記載の低シアル酸	- NeuGcなし - 検出可能な末端Galα１－３Galなし - 請求項2および従属項に記載の高ガラクトース - 請求項2および従属項に記載の低フコース - bisecGlcNAc - 高い活性、特にFc活性 - 高親和性 - 高収率 - ２－６ NeuNAc

【０３８８】

【表９－２】

－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース

【０３８９】

【表９－３】

－請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc

【０３９０】

【表９－４】

－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －bisecGlcNAc －高収率 －６NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －高い活性、特にFc活性 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の高ガラクトース －高収率 －２－６ NeuNAc

【０３９１】

【表９－５】

－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高親和性 －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高親和性 －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高親和性 －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc

【０３９２】

【表９－６】

－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －請求項2および従属項に記載の低フコース －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc

【０３９３】

【表９－７】

－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －bisecGlcNAc －高収率 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －高い活性、特にFc活性 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －高い活性、特にFc活性 －２－６ NeuNAc
－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －高収率 －２－６ NeuNAc －２－３ NeuNAc －請求項2および従属項に記載の高シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －高収率 －請求項2および従属項に記載の低シアル酸	－NeuGcなし －検出可能な末端Galα１－３Galなし －高収率 －２－６ NeuNAc

【０３９４】

【表１０】

表10

Panko1

フコースなし＋BisGlcNAcなし	H9D8＝54% H9D8－E6＝79%
フコース含有＋BisGlcNAc含有	H9D8＝5% H9D8－E6＝2%
フコースなし＋BisGlcNAc含有	H9D8＝0% H9D8－E6＝0%

Panko2

フコースなし＋BisGlcNAcなし	H9D8＝約0% F9およびGT－2X＝約5～6%
フコース含有＋BisGlcNAc含有	H9D8＝36% F9およびGT－2X＝29%
フコースなし＋BisGlcNAc含有	H9D8＝0% F9およびGT－2X＝0%

【０３９５】

【数５】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

２３　頁、　１　行、

Ｂ．寄託物の表示　その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ×

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2003年8月14日	DSM ACC2606

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ×

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
× この用紙は国際出願とともに受理された	□ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官
ポールズ，リチャード	

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

整理番号：４８　３７７　Ｋ

受託番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０６についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デン

マーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。

【０３９６】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。

【０３９７】

【数６】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国　際　様　式

原寄託についての受託証

ﾈﾓﾄﾞ ﾊﾞｲｵｾﾗﾋﾟｭｰﾃｨｸｽ GmbH & Co.KG
ロベルトーロスレーシュトラーセ　１０
１３１２５　ベルリン

この頁の下部に記載されている
国際寄託当局が規則7.1に従って発行した

Ⅰ．微生物の表示	
寄託者による識別のための表示： ＮＭ－Ｆ９	国際寄託当局により与えられた受託番号： DSM ACC2606
II．科学的性質および／または提示された分類学上の位置：	
Ⅰで表示された微生物は以下を伴っていた。 （×）科学的性質 （　）提示された分類学上の位置 （該当するところに×印を付ける）	
III．受託および受理	
この国際寄託当局は、上記Ⅰで表示される微生物を2003年8月14日（原寄託の日付）[1]に受け付けて受理している。	
IV．変更の申請の受託	
Ⅰで表示された微生物は（原寄託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられ、原寄託からブタペスト条約に基づく寄託への変更申請は（変更申請の受託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられている。	
V．国際寄託当局	
名称：ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン　ＧｍｂＨ 住所：ドイツ国 ３８１２４　ブラウンシュウェイク マッチェローダー　ヴェーク　１ベー	国際寄託当局の代表者または事務局長の署名 （署名） 日付：2003年10月16日

[1]規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる；

ＤＳＭＺ－ＢＰ／４様式（単一頁）１２／２００１

【０３９８】

【数７】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

２３　頁、　１　行、

Ｂ．寄託物の表示　その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ×

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2003年8月14日	DSM ACC2605

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ×

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
× この用紙は国際出願とともに受理された	□ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官
ポールズ，リチャード	

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

受託番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２６０５についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デンマーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒ

ｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。
【０３９９】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。
【０４００】

【数８】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国　際　様　式

原寄託についての受託証

ﾈﾓﾄﾞ ﾊﾞｲｵｾﾗﾋﾟｭｰﾃｨｸｽ GmbH & Co.KG
ロベルトーロスレーシュトラーセ　１０
１３１２５　ベルリン

この頁の下部に記載されている
国際寄託当局が規則7.1に従って発行した

Ⅰ．微生物の表示	
寄託者による識別のための表示： ＮＭ－Ｄ４	国際寄託当局により与えられた受託番号： DSM ACC2605
II．科学的性質および／または提示された分類学上の位置：	
Ⅰで表示された微生物は以下を伴っていた。 （×）科学的性質 （　）提示された分類学上の位置 （該当するところに×印を付ける）	
III．受託および受理	
この国際寄託当局は、上記Ⅰで表示される微生物を2003年8月14日（原寄託の日付）[1]に受け付けて受理している。	
IV．変更の申請の受託	
Ⅰで表示された微生物は（原寄託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられ、原寄託からブタペスト条約に基づく寄託への変更申請は（変更申請の受託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられている。	
V．国際寄託当局	
名称：ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン　ＧｍｂＨ 住所：ドイツ国 ３８１２４　ブラウンシュウェイク マッチェローダー　ヴェーク　１ベー	国際寄託当局の代表者または事務局長の署名 （署名） 日付：2003年10月16日

[1]規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる；

ＤＳＭＺ－ＢＰ／４様式（単一頁）１２／２００１

【０４０１】

【数９】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

６１　頁、　２１　行、

Ｂ．寄託物の表示　その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ×

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2006年9月15日	DSM ACC2806

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ×

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
×この用紙は国際出願とともに受理された	□この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官
ポールズ，リチャード	

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

受託番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０６についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デン

マーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。

【０４０２】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。

【０４０３】

【数１０】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国　際　様　式

原寄託についての受託証

ﾈﾓﾄﾞ ﾊﾞｲｵｾﾗﾋﾟｭｰﾃｨｸｽ GmbH & Co.KG
ロベルトーロスレーシュトラーセ　１０
１３１２５　ベルリン

この頁の下部に記載されている
国際寄託当局が規則7.1に従って発行した

Ⅰ．微生物の表示	
寄託者による識別のための表示： ＮＭ－Ｈ９Ｄ８	国際寄託当局により与えられた受託番号： DSM ACC2806
II．科学的性質および／または提示された分類学上の位置：	
Ⅰで表示された微生物は以下を伴っていた。 （　）科学的性質 （　）提示された分類学上の位置 （該当するところに×印を付ける）	
III．受託および受理	
この国際寄託当局は、上記Ⅰで表示される微生物を2006年9月15日（原寄託の日付）[1]に受け付けて受理している。	
IV．変更の申請の受託	
Ⅰで表示された微生物は（原寄託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられ、原寄託からブタペスト条約に基づく寄託への変更申請は（変更申請の受託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられている。	
V．国際寄託当局	
名称：ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン　ＧｍｂＨ 住所：ドイツ国 Ｄ－３８１２４　ブラウンシュウェイク インホフェンシュトラーセ　７Ｂ	国際寄託当局の代表者または事務局長の署名 （署名） 日付：2006年10月9日

[1]規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる；

ＤＳＭＺ－ＢＰ／４様式（単一頁）０８／２００６

【０４０４】

【数１１】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

２２　頁、　１６　行、

Ｂ．寄託物の表示　その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ×

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2006年10月5日	DSM ACC2807

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ×

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
×この用紙は国際出願とともに受理された	□この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官
ポールズ，リチャード	

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

受託番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デンマーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、

スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。
【０４０５】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。
【０４０６】

【数１２】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国　際　様　式

原寄託についての受託証

ﾈﾓﾄﾞ ﾊﾞｲｵｾﾗﾋﾟｭｰﾃｨｸｽ GmbH & Co.KG
ロベルト－ロスレーシュトラーセ　１０
１３１２５　ベルリン

この頁の下部に記載されている
国際寄託当局が規則7.1に従って発行した

Ⅰ．微生物の表示	
寄託者による識別のための表示： ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６	国際寄託当局により与えられた受託番号： DSM ACC2807
II．科学的性質および／または提示された分類学上の位置：	
Ⅰで表示された微生物は以下を伴っていた。 （　）科学的性質 （　）提示された分類学上の位置 （該当するところに×印を付ける）	
III．受託および受理	
この国際寄託当局は、上記Ⅰで表示される微生物を2006年10月15日（原寄託の日付）[1]に受け付けて受理している。	
IV．変更の申請の受託	
Ⅰで表示された微生物は（原寄託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられ、原寄託からブタペスト条約に基づく寄託への変更申請は（変更申請の受託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられている。	
V．国際寄託当局	
名称：ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン　ＧｍｂＨ 住所：ドイツ国 Ｄ－３８１２４　ブラウンシュウェイク インホフェンシュトラーセ　７Ｂ	国際寄託当局の代表者または事務局長の署名 （署名） 日付：2006年10月18日

[1]規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる；

ＤＳＭＺ－ＢＰ／４様式（単一頁）０８／２００６

【０４０７】

【数１３】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

６１　頁、　２８　行、

Ｂ．寄託物の表示　その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 □

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2007年8月8日	DSM ACC2856

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ×

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
×この用紙は国際出願とともに受理された	□この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官
ポールズ，リチャード	

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

受託番号ＤＳＭ　ＡＣＣ２８０７についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デンマーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、

スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。
【０４０８】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。
【０４０９】

【数１４】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国　際　様　式

原寄託についての受託証

ﾈﾓﾄﾞ ﾊﾞｲｵｾﾗﾋﾟｭｰﾃｨｸｽ GmbH & Co.KG
ロベルト－ロスレーシュトラーセ　１０
１３１２５　ベルリン

この頁の下部に記載されている
国際寄託当局が規則7.1に従って発行した

Ⅰ．微生物の表示	
寄託者による識別のための表示： ＮＭ－Ｈ９Ｄ８－Ｅ６Ｑ１２	国際寄託当局により与えられた受託番号： DSM ACC2856
II．科学的性質および／または提示された分類学上の位置：	
Ⅰで表示された微生物は以下を伴っていた。 （　）科学的性質 （　）提示された分類学上の位置 （該当するところに×印を付ける）	
III．受託および受理	
この国際寄託当局は、上記Ⅰで表示される微生物を2007年８月８日（原寄託の日付）[1]に受け付けて受理している。	
IV．変更の申請の受託	
Ⅰで表示された微生物は（原寄託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられ、原寄託からブタペスト条約に基づく寄託への変更申請は（変更申請の受託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられている。	
V．国際寄託当局	
名称：ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン　ＧｍｂＨ 住所：ドイツ国 Ｄ－３８１２４　ブラウンシュウェイク インホフェンシュトラーセ　７Ｂ	国際寄託当局の代表者または事務局長の署名 （署名） 日付：2007年8月23日

[1]規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる；

ＤＳＭＺ－ＢＰ／４様式（単一頁）１２／２００１

【０４１０】

【数１５】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

＿＿＿＿頁、 ＿＿＿＿行、

Ｂ．寄託物の表示 その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2007年7月7日	未決定

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☒

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

ＧＴ－２Ｘの受託番号は追って知らせる。

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官
ポールズ，リチャード	

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

ＧＴ－２Ｘ－受託番号決定－についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デン

マーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。

【０４１１】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。

【０４１２】

【数１６】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

９４　頁、　　３３　行、

Ｂ．寄託物の表示　　その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐

寄託機関の名称

ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン（ＤＳＭＺ）

寄託機関の住所（郵便番号および国を含む）

ドイツ国

３８１２４　ブラウンシュウェイク

マッチェローダー　ヴェーク　１ベー

寄託日	受託番号
2007年9月7日	DSM ACC2858

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　　この情報は追付の用紙に続く ☒

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☐この用紙は国際出願とともに受理された	☒この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
	２００７年１１月１９日
認定官	認定官
	カリ　ヒュンーコン

PCT/RO/134様式（1998年７月；2004年1月再印刷）

ＤＳＭ　ＡＣＣ２８５８についての、ＰＣＴ／ＲＯ／１３４様式に基づくさらなる表示

出願人はここにおいて、個々の規定を有する国に対して、本願において言及されている寄託された生物学的材料の試料の供与は、無関係の、指名された専門家に対してのみなさ得ることを要求する（適用可能な場合、特にオーストラリア、カナダ、クロアチア、デンマーク、フィンランド、ドイツ、アイスランド、ノルウェー、シンガポール、スペイン、スウェーデン、英国、ヨーロッパにおいて、「エキスパートソリューション（ｅｘｐｅｒ

ｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）」の要求）。
【０４１３】

したがって、ヨーロッパに関しては、出願人は、寄託された生物学的材料が、ＥＰＣ規則２８（３）において規定されるように、特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる場合には出願の日から２０年間、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能となされる（ＥＰＣ規則２８（４））ことを要求する。
【０４１４】

【数１７】

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国　際　様　式

原寄託についての受託証

ﾈﾓﾄﾞ ﾊﾞｲｵｾﾗﾋﾟｭｰﾃｨｸｽ GmbH & Co.KG
ロベルト－ロスレーシュトラーセ　１０
１３１２５　ベルリン

この頁の下部に記載されている
国際寄託当局が規則7.1に従って発行した

Ⅰ．微生物の表示	
寄託者による識別のための表示： ＧＴ－２Ｘ	国際寄託当局により与えられた受託番号： DSM ACC2858
II．科学的性質および／または提示された分類学上の位置：	
Ⅰで表示された微生物は以下を伴っていた。 （×）科学的性質 （　）提示された分類学上の位置 （該当するところに×印を付ける）	
III．受託および受理	
この国際寄託当局は、上記Ⅰで表示される微生物を2007年9月7日（原寄託の日付）[1]に受け付けて受理している。	
IV．変更の申請の受託	
Ⅰで表示された微生物は（原寄託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられ、原寄託からブタペスト条約に基づく寄託への変更申請は（変更申請の受託の日付--該当せず）にこの国際寄託当局により受け付けられている。	
V．国際寄託当局	
名称：ドイチェ　サムルング　フォン　ミクロオルガニズメン　ウント　ゼルクルトゥーレン　ＧｍｂＨ 住所：ドイツ国 Ｄ－３８１２４　ブラウンシュウェイク インホフェンシュトラーセ　７Ｂ	国際寄託当局の代表者または事務局長の署名 （署名） 日付：2007年9月20日

[1]規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる；

ＤＳＭＺ－ＢＰ／４様式（単一頁）８／２００６

【図１】

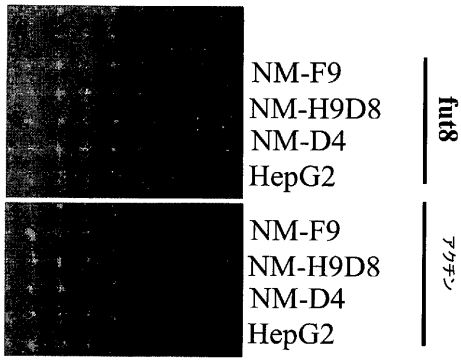


図１

【図２】

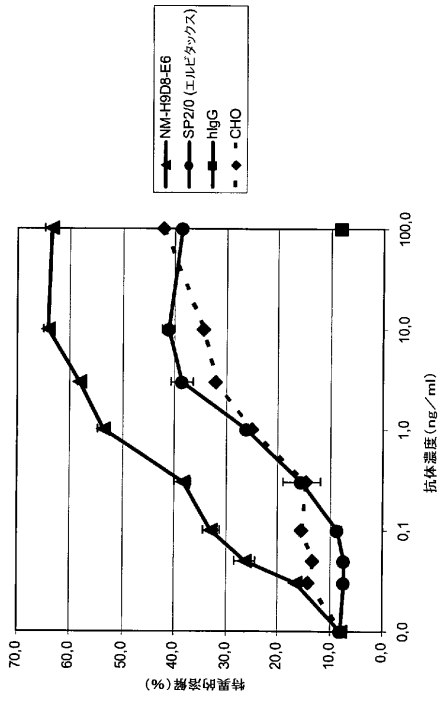


図２

【図３】

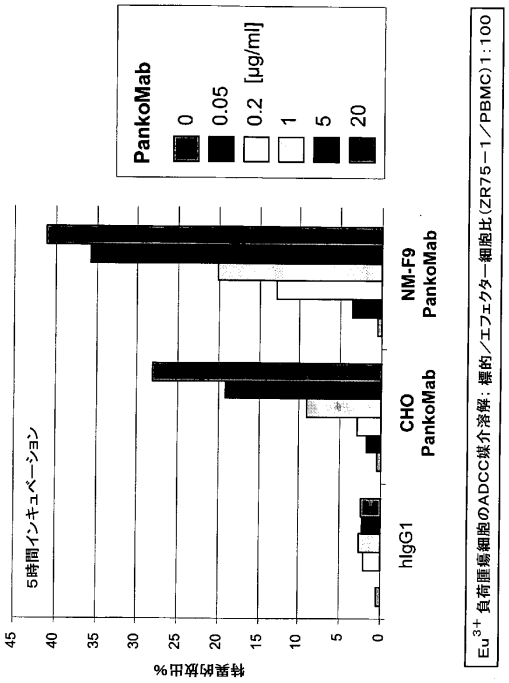


図３

【図４】

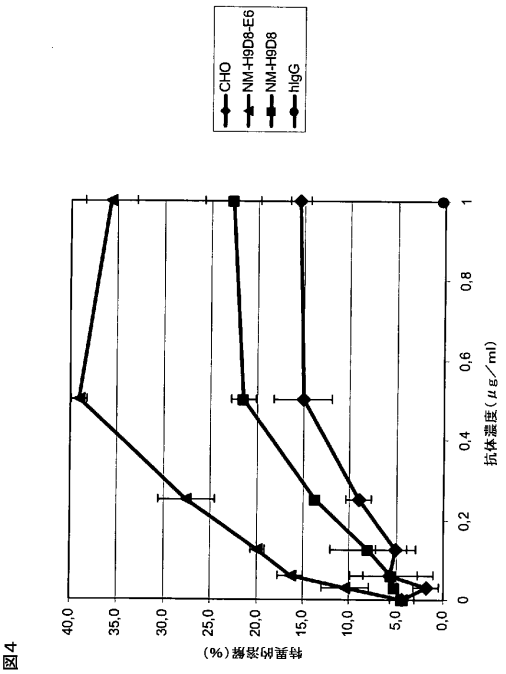


図４

【図５】

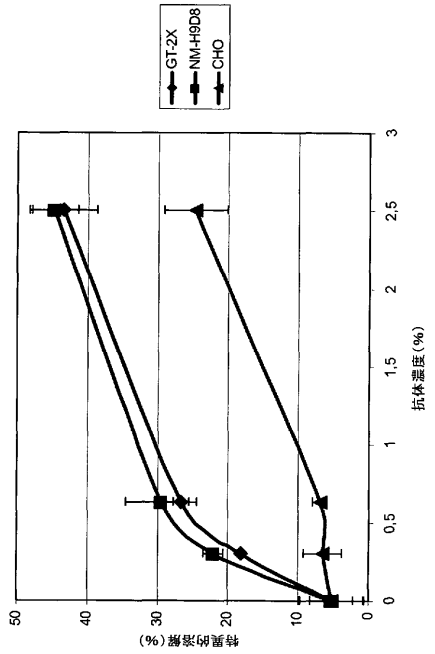


図5

【図６】

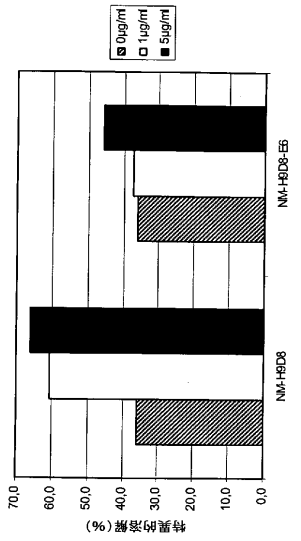


図6

【図７】

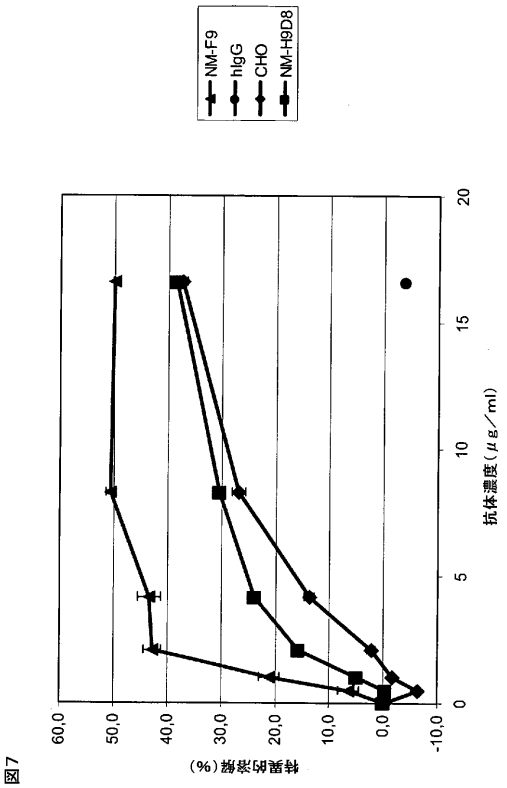


図7

【図８】

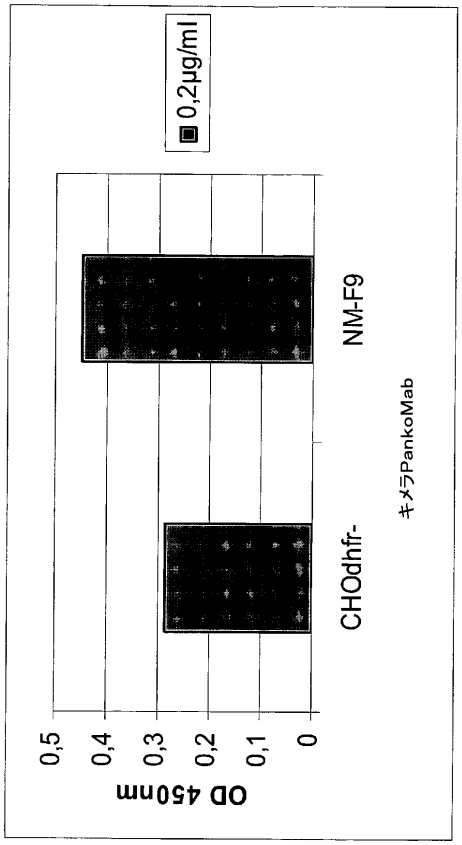


図8

【図９】

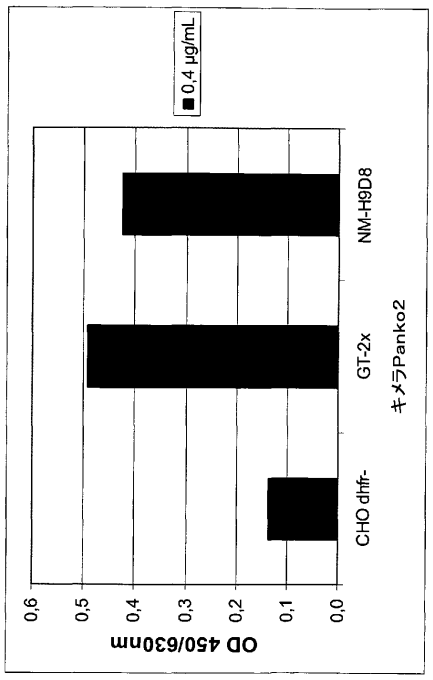


図9

【図１０】

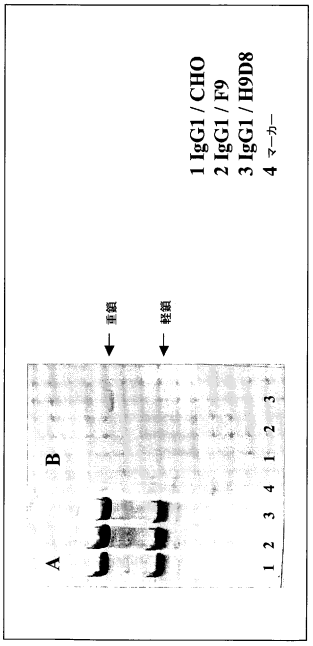


図10

【図１１】

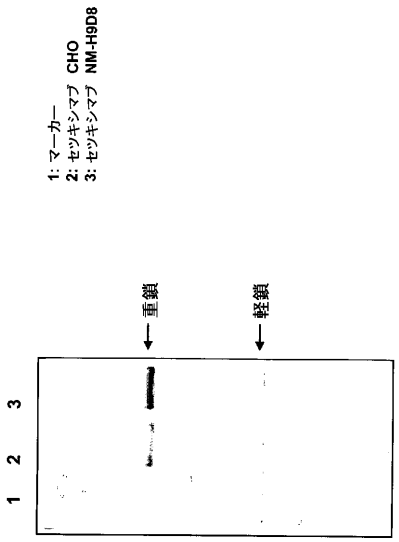


図11

【図１２】

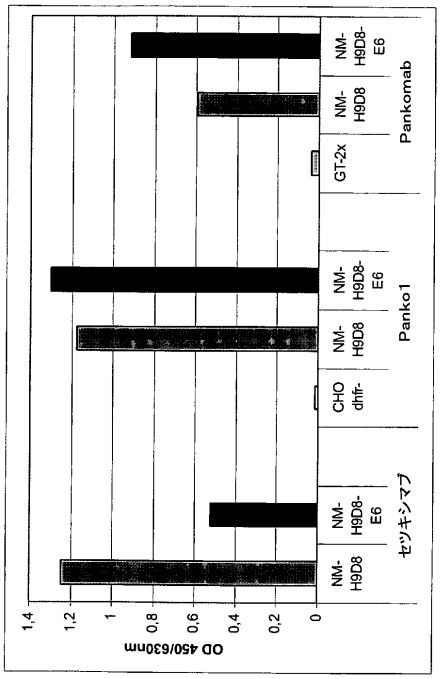


図12

【図１３ａ】

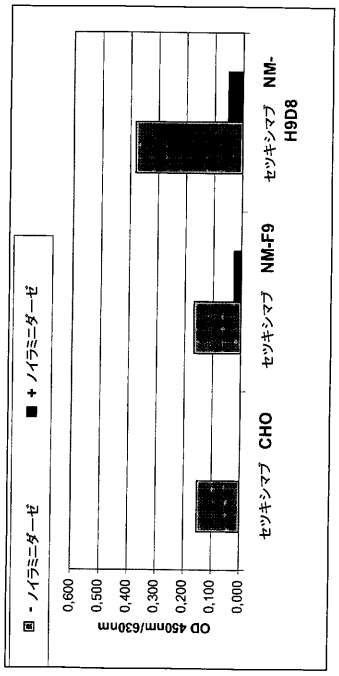


図13a

【図１３ｂ】

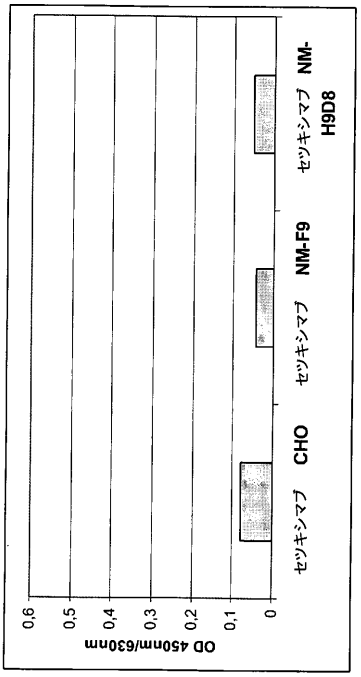


図13b

【図１４】

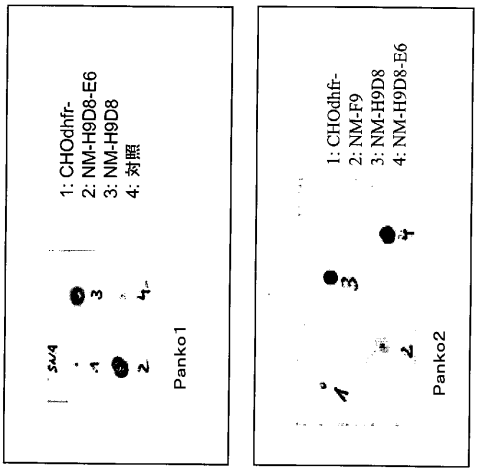


図14

【図１５】

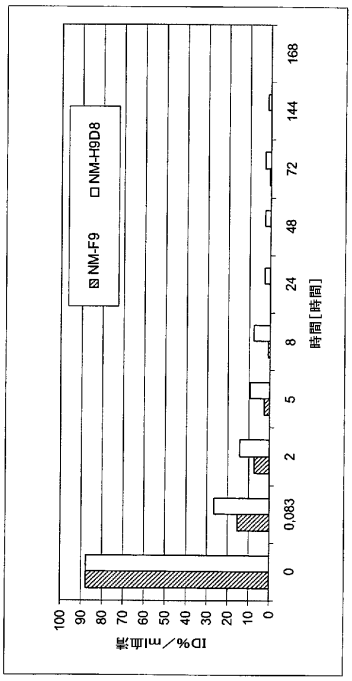


図15

【図１６】

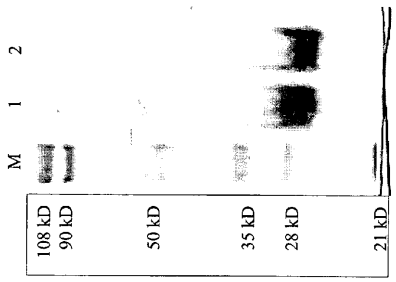


図16

【図１７】

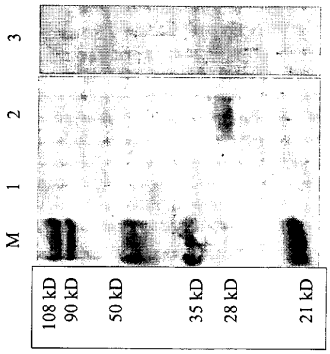
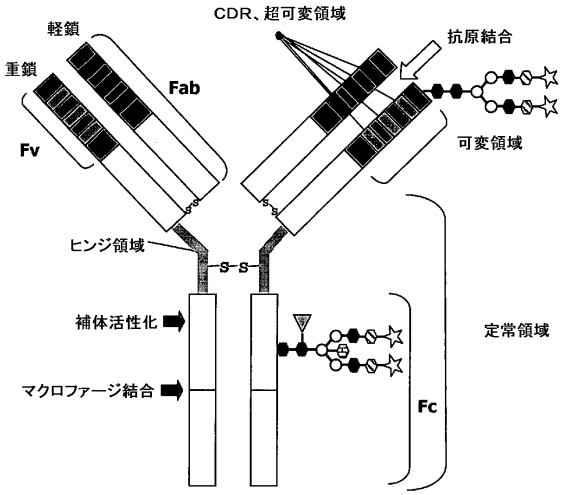


図17

【図１８】

図18



☆	= シアル酸
▨	= ガラクトース
⬢	= GlcNAc
○	= マンノース
▽	= フコース
⬡	= バイセクト GlcNAc

【配列表】
0005767779000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/46

(31)優先権主張番号 06090190.7
(32)優先日 平成18年10月13日(2006.10.13)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 07090094.9
(32)優先日 平成19年5月4日(2007.5.4)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2606
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2605
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2806
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2807
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2856
微生物の受託番号 DSMZ DSM ACC2858

前置審査

(72)発明者 バウマイスター, ハンス
ドイツ国 １４１６９ ベルリン, ホホシツヴェーク １５９
(72)発明者 シュタン, レナテ
ドイツ国 １３１２５ ベルリン, オイペナー シュトラーセ １１アー
(72)発明者 ロフラー, アニャ
ドイツ国 １６２４４ アイヒホルスト, シュルシュトラーセ ２１
(72)発明者 シュトクル, ラルス
ドイツ国 １２２０３ ベルリン, マムリンガーシュトラーセ ８

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 国際公開第２００５／０８０５８５（WO, Ａ１）
米国特許出願公開第２００５／０２０３０１０（ＵＳ, Ａ１）
国際公開第２００５／０４０２２１（WO, Ａ１）
欧州特許出願公開第００１１７０６０（ＥＰ, Ａ１）
欧州特許出願公開第０１１６７５３７（ＥＰ, Ａ１）
GOLETZ S, TURNING GLYCOMICS INTO HEALTH, BIO 2006 ANNUAL CONVENTION [ONLINE], ２００６年 ４月 ９日, ＵＲＬ, http://www.invest-in-germany.de/upload_files/20060425091024_Praesentation_GLYCOTOPE_German_Country_Presentation.pdf
DORAI H, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 米国, １９８７年１２月１５日, V139 N12, P4232-4241
Science, 313(AUG 2006) p.670-673

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／０９
Ｃ０７Ｋ １６／１８
Ｃ０７Ｋ １６／４６
Ｃ１２Ｎ ５／０７８
Ｃ１２Ｐ ２１／０８

C12Q 1/04
CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)
JSTPlus(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq