

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-512216

(P2016-512216A)

(43) 公表日 **平成28年4月25日(2016.4.25)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 M	4 C 0 8 5
C 0 7 K 1/16 (2006.01)	C 0 7 K 1/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Q	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-562236 (P2015-562236)	(71) 出願人	506129544
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014. 3. 14)		ラボラトワール・フランセ・デュ・フラク
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月13日 (2015. 11. 13)		シオンマン・エ・デ・ビヨテクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055179		LABORATOIRE FRANCAI
(87) 国際公開番号	W02014/140322		S DU FRACTIONNEMENT
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)		ET DES BIOTECHNOLO
(31) 優先権主張番号	1352360		G I E S
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)		フランス国、91940レ・ユリ、アブニ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ュー・デ・トロピク、3、ゾーン・ダクテ
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 主要電荷アイソフォームに富んだ抗体組成物を含む新規な薬剤

(57) 【要約】

本発明は、ADCCによる標的細胞破壊のメカニズムを伴う抗体療法の技術分野にある。本発明は、薬剤として用いるための、抗体組成物内に天然に存在する様々な電荷アイソフォームのクロマトグラフィー分画、及びクロマトグラムの主要ピークに対応する1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせることによって得られた、精製された抗体組成物に関するものであり、得られたモノクローナル抗体組成物は前記主要ピークに富んでおり、前記ピークは、得られた組成物のクロマトグラムの少なくとも85%に相当する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

薬剤として用いるための、

- a) 細胞クローンから、非ヒトトランスジェニック動物から、又はトランスジェニック植物からモノクローナル抗体組成物を生産する工程、
 b) 工程a)において得られた組成物をクロマトグラフィーによって分画する工程、及び
 c) クロマトグラム上の主要ピークに対応する、工程b)において得られた1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせる工程
- を含む方法によって得られ得るモノクローナル抗体組成物であって、こうして得られたモノクローナル抗体組成物が前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークが、工程c)において得られた組成物のクロマトグラムの少なくとも85%に相当する、モノクローナル抗体組成物。

10

【請求項2】

工程b)の分画が、イオン交換クロマトグラフィーによって、クロマトフォーカシングによって、又は疎水性相互作用クロマトグラフィーによって達成されることを特徴とする、請求項1に記載の薬剤として用いるための、請求項1に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項3】

イオン交換クロマトグラフィーが、以下の溶離手段：

- イオン力勾配、及び/又は
- pH勾配、又は
- 置換分子

20

の1つを用いることを特徴とする、請求項2に記載の薬剤として用いるための、請求項2に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項4】

組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%がC末端リシン残基をまったく含まないことを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から3のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項5】

薬剤として用いるための、組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%がC末端リシン残基をまったく含まない、モノクローナル抗体組成物。

30

【請求項6】

抗体が、健康なドナー細胞上に存在する非遍在的な抗原、癌細胞の抗原、病原体に感染した細胞の抗原、又は免疫細胞の抗原に対するものであることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から5のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項7】

抗体が抗Rhesus D抗体であり、組成物がRhマイナスの個体における同種免疫化を予防するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項8】

抗体が癌細胞の抗原に対するものであり、組成物が癌を治療するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

40

【請求項9】

抗体が病原体に感染した細胞の抗原に対するものであり、組成物が前記病原体による感染を治療するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項10】

抗体が免疫細胞の抗原に対するものであり、組成物が自己免疫疾患を治療するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から6

50

のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項 1 1】

抗体が、Fc RIII受容体へのその結合及びFc RIII受容体を介するそのエフェクター特性を増大させる、Fc断片の修飾を含むことを特徴とする、請求項1から10のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から10のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項 1 2】

抗体が、Fc断片の特定のアミノ酸残基で少なくとも1つの変異を含むことを特徴とする、請求項11に記載の薬剤として用いるための、請求項11に記載のモノクローナル抗体組成物。

10

【請求項 1 3】

65%以下のフコース含有量を含むことを特徴とする、請求項11又は12に記載の薬剤として用いるための、請求項11又は12に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項 1 4】

抗体が、タンパク質C1qへの結合及び補体を介するそのエフェクター特性を増大させる、Fc断片の修飾を含むことを特徴とする、請求項1から10のいずれか一項に記載の薬剤として用いるための、請求項1から10のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項 1 5】

所与の抗体に対するモノクローナル抗体組成物の、Fc RIII(CD16)受容体を発現する免疫系のエフェクター細胞による、前記抗原を発現する標的細胞の抗体依存性の細胞傷害性(ADCC)を誘発する能力を増大させるための、クロマトグラフィー分画工程の使用。

20

【請求項 1 6】

所与の抗体に対するモノクローナル抗体組成物の、補体による、前記抗原を発現する標的細胞の補体依存性の細胞傷害性(CDC)を誘発する能力を増大させるための、クロマトグラフィー分画工程の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ADCCを介して標的細胞を破壊するメカニズムを伴う抗体療法の技術分野にある。本発明は、薬剤として用いるための、抗体組成物内に天然に存在する異なる電荷アイソフォームをクロマトグラフィーによって分画すること、及びクロマトグラムの主要ピークに対応する1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせることによって得られた、精製された抗体組成物に関するものであり、こうして得られたモノクローナル抗体組成物は前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークは、得られた組成物のクロマトグラムの少なくとも85%に相当する。

30

【背景技術】

【0002】

ここ10年間、様々な治療分野、すなわち、癌、Rhマイナスの妊婦における同種免疫化の予防、感染性疾患、炎症性疾患、特に自己免疫疾患において、抗体、多くの場合モノクローナル抗体による受動免疫療法治療が大きく開発されている。

40

【0003】

抗体による受動免疫療法治療は今日、治療上の利益があることが示されているが、観察される臨床的応答レベルは依然として不十分であり、したがって、二次的影響を制限するために臨床応答の増大及びより低用量の投与を可能にする、更に効率的な抗体組成物が求められている。

【0004】

あらゆる生物学的産物と同様に、抗体の組成物は元々異種である。実際、治療法において用いられる抗体組成物は、生物学的系(細胞、トランスジェニック動物又は植物)において生産され、この場合、通常はタンパク質、したがって特に抗体が多く翻訳後修飾(酵素的修飾又は分解)を受け、この翻訳後修飾は抗体分子ごとに異なり、それによって、生

50

産された抗体組成物内で微小不均一性を生じさせる。

【0005】

抗体は、様々な数のジスルフィド架橋及び非共有結合的相互作用を伴う、4つのポリペプチド鎖、すなわち2つの通常同一な重鎖(「重(heavy)」鎖を表すいわゆる「H」鎖)及び2つの通常同一な軽鎖(「軽(light)」鎖を表すいわゆる「L」鎖)からなる糖タンパク質である。これらの鎖はY型の構造を形成し、重鎖はYの幹部分及びYの各腕の半分を構成し、軽鎖はYの各腕の半分を構成する。各軽鎖は定常ドメイン(C_L)及び可変ドメイン(V_L)からなり、重鎖は、可変断片(V_H)と、抗体のアイソタイプ(IgGは3つの定常断片 C_{H1} から C_{H3} を含む)に応じて3つ又は4つの定常断片(C_{H1} から C_{H3} 又は C_{H4})とからなる。軽鎖(V_L+C_L)の会合、並びに重鎖の V_H ドメイン及び C_{H1} ドメインの会合は、断片Fabを形成し、会合したドメインVL及びVHは、抗原の認識に寄与する。両重鎖の定常ドメイン(C_{H2} 及び C_{H3})又は(C_{H2} から C_{H4})は定常Fc断片を形成する。

10

【0006】

抗体は、翻訳後修飾、すなわち、重鎖又は軽鎖の末端修飾、Fc部分(及び場合によってFab)のグリコシル化、脱アミド化、異性化、酸化、フラグメンテーション、及び凝集を受けることが知られている(Vlasakら、2008年を参照されたい)。

【0007】

ほとんどの翻訳後修飾は、荷電基の数を変更することによって直接的に、又は、それ自体が荷電残基の局所的分布を変更するか若しくはそれらのpKaを変化させる構造的修飾を導入することによって間接的に、抗体の表面電荷特性の改変をもたらす。全てのこれらの修飾はまた、したがって、微小不均一性、すなわち、異なる等電点(pI)を伴う同一の抗体の異なる電荷を有する多くのアイソフォームがこうして抗体組成物において共存する状態を生じさせる(Vlasakら、2008年を参照されたい)。

20

【0008】

翻訳後修飾の間で、抗体の定常部分Fcのグリコシル化は、今日、抗体の多くの生物学的特性、すなわち、インビボでの半減期(Wrightら、1994年を参照されたい)、ADCC応答を誘発する能力(抗体依存性の細胞傷害性細胞応答、Satohら、2006年、Prestaら、2006年を参照されたい)、CDC応答(補体依存性の細胞傷害性応答、Wrightら、1994年、Prestaら、2006年)等に強力に影響することが周知である。特に、フコシル化されたグリカン形態の抗体組成物の含有量が、今日、組成物の、ADCC応答をインビボで誘発する能力に非常に強力に影響することが知られている。

30

【0009】

逆に、多くの論文が、市販のモノクローナル抗体バッチの再現性及び質の正当性を証明するために抗体組成物内に存在する電荷アイソフォームを特徴付けることを目的としているが、抗体組成物内で同一の抗体の多くの異なる電荷アイソフォームの存在をもたらす他の翻訳後修飾は、現在まで、インビボでの抗体の生物学的特性にほとんど影響しないか又は全く影響しないと考えられている。したがって、先行技術においては、電荷アイソフォームに関して、市販の抗体バッチの質を追跡することが不可欠であると通常考えられているが、この追跡は、製品の質の純粋な追跡であると考えられ、治療目的で特定の電荷アイソフォームに非常に富んでいる抗体組成物の精製画分を使用することについては全く提案されていない。実際、抗体組成物の少なくとも特定の生物学的特性に対する有意な影響が実証されていない状況で、組成物全体を使用しない理由、調製方法を複雑にする理由、及び収量を低減させる理由はない。現在、上記に指摘したように、グリコシル化を除いて、抗体組成物内で抗体の多くの異なる電荷アイソフォームの存在をもたらす他の翻訳後修飾は、現在まで、抗体の生物学的特性を改変させないと考えられていた。

40

【0010】

いくつかの電荷アイソフォームを生じさせる修飾の1つは、抗体の重鎖におけるC末端リシンの酵素的切断である。このような切断は、カルボキシペプチダーゼを発現する細胞において抗体が生産されるとすぐに、抗体分子に応じて異なるレベルで生じる。C末端リシンの存在によって、リシンの側鎖に起因して、非常に塩基性の性質がもたらされる。重鎖

50

の片方又は両方でのその切断は、したがって、より酸性のアイソフォームを生じさせる。通常、重鎖上に0、1つ、又は2つのC末端リシンを有するアイソフォームが存在し、したがって、わずかに異なるpIを有する3つのアイソフォームが生じる(Vlasakら、2008年を参照されたい)。この特定の修飾について、Antesら、2007年は、血清の存在下又は不存在下で生産された、癌の受動免疫療法において用いられるヒト化モノクローナル抗Lewis-Y IG311抗体の、バッチの等電点電気泳動(IEF)による分析を記載している。著者は、血清の存在下又は不存在下で生産された抗体組成物の電荷アイソフォームのプロファイルが異なり、血清の不存在下で生産された組成物は血清の存在下で生産された組成物よりも抗体の重鎖のC末端リシンの酵素的切断による影響が少ないことを示している。両組成物の、CDC応答(補体を介する)を誘発するそれぞれの能力に対する、この修飾の影響の分析は、この修飾に関するいかなる有意な影響も示していない。

10

【0011】

抗体組成物内でいくつかの電荷アイソフォームを存在させる別のタイプの修飾は、N末端グルタミン又はグルタミン酸残基の環化であり、これは、ピログルタミン酸(pE)基の形成、したがって、より酸性のアイソフォームをもたらす。この修飾は、系統的に、異なるレベルで、抗体組成物全体において生じるが、抗体の機能的特性に影響し得るとは考えられていない(Vlasakら、2008年を参照されたい)。

【0012】

抗体組成物内でいくつかの電荷アイソフォームを存在させる更に別のタイプの修飾は、より酸性のアイソフォームを生じさせる、特にリシン残基上での、共有結合付加体の形成、特に糖化現象(非酵素的な糖の付加)である。このタイプの修飾もまた、抗体の機能的特性に影響し得ないと考えられている(Vlasakら、2008年を参照されたい)。

20

【0013】

抗体組成物内にいくつかの電荷アイソフォームを存在させる別の通常のタイプの修飾は、より酸性のアイソフォームを生じさせる、アスパラギン残基の脱アミド化及びアスパラギン酸残基の異性化である。抗体の定常部分において、脱アミド化現象に感受性のアスパラギン残基は、FcRn受容体及びFcR受容体への結合部位から離れたCH3ドメイン内に位置する。これらの修飾は、したがって、通常、抗体の機能的特性に影響し得ないと考えられる(Vlasakら、2008年を参照されたい)。

【0014】

Khawliら、2010年、及びGandhiら、2011年は、受動免疫療法において用いられるモノクローナル抗体組成物の主要アイソフォーム、酸性アイソフォーム、及び塩基性アイソフォームの、陽イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィー技術での分離;いくつかのアイソフォームの存在をもたらす翻訳後修飾の分析;並びに、3つの精製画分(酸性画分、主要画分、及び塩基性画分)の薬物動態学的特性及び特定の機能的特性の研究を記載している。両ケースにおいて、非変性組成物のクロマトグラムは常に、酸性アイソフォームを含むピーク及び塩基性アイソフォームを含むピークに囲まれた、主要ピークを示す。同定された翻訳後修飾には、特に、特定のジスルフィド架橋の還元(Khawliら、2010年)、糖化(Khawliら、2010年、Gandhiら、2011年)、脱アミド化(Khawliら、2010年、Gandhiら、2011年)、重鎖のC末端リシンの切断(Khawliら、2010年、Gandhiら、2011年)、凝集体の存在(Gandhiら、2011年)、酸化現象(Gandhiら、2011年)が含まれる。薬物動態学的特性の分析(Khawliら、2010年における、インビボでのFcRn結合及び試験)は、3つの試験した精製画分での挙動における有意差を全く実証しなかった。両論文において、3つの精製画分の、エフェクター細胞の不存在下で、それに対して抗体が特異的である抗原を発現する細胞系の増殖をインビトロで阻害する能力もまた試験された。このような試験は、抗原に結合する能力及びアポトーシスを誘発する能力を実証することを可能にする。両論文における酸性画分は、ごくわずかに低い能力を有していたが、結果は有意ではなく、したがって、有意差は3つの精製画分の間で観察されなかった。更に、主要アイソフォームに富んでいる画分は、3つの画分を分離する前の抗体組成物全体と比較して、能力は増強していなかった。

30

40

【0015】

50

更に、他の文献は、抗体の特定の電荷アイソフォームをいかに分析及び/又は分離するかを記載しているが、異なるアイソフォームのエフェクター特性の比較は記載していない。したがって、EP1308456及びWO2004/024866は、精製の前後に組成物のエフェクター特性を試験することなく、モノクローナル抗体組成物の酸性変異体を除去することを目的としたクロマトグラフィー法を記載している。同様に、WO2011/009623は、精製の前後に組成物のエフェクター特性を試験することなく、モノクローナル抗体組成物の酸性変異体又は塩基性変異体を抑制することを目的としたクロマトグラフィー法を記載している。更に、この文献において記載されている方法は、単一のタイプの変異体の抑制のみを可能にし、酸性変異体の除去のみが実際に適用されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】EP1308456

【特許文献2】WO2004/024866

【特許文献3】WO2011/009623

【特許文献4】WO00/42072

【特許文献5】WO2004/029207

【特許文献6】WO/2004063351

【特許文献7】WO2004/074455

【特許文献8】WO02/060919A2

【特許文献9】WO2010/045193

【特許文献10】WO2010/106180A2

【特許文献11】WO99/51642

【特許文献12】WO2004074455A2

【特許文献13】米国特許第5,591,669号

【特許文献14】米国特許第5,598,369号

【特許文献15】米国特許第5,545,806号

【特許文献16】米国特許第5,545,807号

【特許文献17】米国特許第6,150,584号

【特許文献18】WO2012/041768

【特許文献19】WO0026357A2

【特許文献20】WO9004036A1

【特許文献21】WO9517085A1

【特許文献22】WO0126455A1

【特許文献23】WO2004050847A2

【特許文献24】WO2005033281A2

【特許文献25】WO2007048077A2

【特許文献26】WO2007106078A2

【特許文献27】EP1176195A1

【特許文献28】WO01/77181

【特許文献29】WO2004/024768

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994年)

【非特許文献2】Gene Targeting, A Practical Approach、IRL Press at Oxford University Press(1993年)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

10

20

30

40

50

したがって、抗体の機能的特性に対する影響を有することが知られているグリコシル化を除いて、(主要アイソフォームにもたらされた異なる修飾から)いくつかの電荷アイソフォームを生じさせる他の翻訳後修飾に関連する、先行技術において利用可能な要素は、これらの修飾が抗体の機能的特性に対していかなる影響も有さないことを示唆する。

【0019】

しかし、本発明者らは、驚くべきことに、抗体組成物の主要電荷アイソフォームに富んだ、クロマトグラフィーによって精製された画分が、CD16受容体を発現するエフェクター細胞によるこの受容体を介するエフェクター応答を誘発する有意に優れた能力を有することを見出した。したがって、抗体組成物の主要電荷アイソフォームに富んだ精製画分は、インビボでのより強力なADCC応答及びより強力なCDC応答を誘発することを可能にし、したがって、臨床応答を増大させ且つ/又は投与用量を低減させて、それによって二次的影響を制限することを可能にする。

10

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明は、したがって、薬剤として用いるための、

- a)細胞クローンから、非ヒトトランスジェニック動物から、又はトランスジェニック植物からモノクローナル抗体組成物を生産する工程、
- b)工程a)において得られた組成物をクロマトグラフィーによって分画する工程、及び
- c)クロマトグラム上の主要ピークに対応する、工程b)において得られた1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせる工程

20

を含む方法によって得られ得るモノクローナル抗体組成物に関するものであり、こうして得られたモノクローナル抗体組成物は前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークは、工程c)において得られた組成物のクロマトグラム上の少なくとも85%、有利には少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、より有利には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、又は更には少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%に相当する。

【0021】

有利には、工程b)は、標準的なイオン交換クロマトグラフィーによって、クロマトフォーカシングによって、又は疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、工程a)において得られた組成物を分画することによって達成される。

30

【0022】

有利には、イオン交換クロマトグラフィーは、以下の溶離手段:

- イオン力勾配、及び/又は
- pH勾配、又は
- 置換分子

の1つを用いる。

【0023】

有利には、薬剤として用いるためのこのような組成物において、組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%、有利には少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%は、C末端リシン残基をまったく含まない。

40

【0024】

本発明はまた、薬剤として用いるための、組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%、有利には少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%がC末端リシン残基をまったく含まない、モノクローナル抗体組成物にも関する。

【0025】

本発明に従った薬剤として用いるための組成物において、抗体は、有利には、健康なドナー細胞上に存在する非遍在的な抗原、癌細胞の抗原、又は病原体に感染した細胞の抗原

50

に対するものである。

【0026】

特に、以下の実施形態が好ましい：

- 抗体は抗Rhesus (D)抗体であり、組成物はRhマイナスの個体における同種免疫化を予防するためのものである。
- 抗体は癌細胞の抗原に対するものであり、組成物は癌を治療するためのものである。
- 抗体は病原体に感染した細胞の抗原に対するものであり、組成物は前記病原性生物による感染を治療するためのものである。
- 抗体は免疫細胞の抗原に対するものであり、組成物は自己免疫疾患を治療するためのものである。

10

【0027】

本発明に従った薬剤として用いるための組成物における、有利な実施形態において、抗体は、Fc RIII受容体へのその結合及びFc RIII受容体を介するそのエフェクター特性を増大させる、Fc断片の修飾を含む。本発明に従った薬剤として用いるための組成物は、Fc RIII受容体へのその結合及び/又は低いフコース含有量を増大させる、Fc断片における変異を特に含み得る。特に、有利には、組成物内に存在する抗体は、Fc断片のN-グリコシル化部位上に、フコース含有量が65%未満の、二分岐型のグリカン構造を有する。

【0028】

本発明に従った薬剤として用いるための組成物における、有利な実施形態において、抗体は、タンパク質C1qへのその結合及び補体を介するそのエフェクター特性を増大させる、Fc断片の修飾を含む。

20

【0029】

本発明はまた、所与の抗体に対するモノクローナル抗体組成物の、Fc RIII受容体(CD16)を発現する免疫系のエフェクター細胞による、前記抗原を発現する標的細胞の抗体依存性の細胞傷害性(ADCC)を誘発する能力を増大させるための、クロマトグラフィー分画工程の使用に関する。

【0030】

本発明はまた、所与の抗体に対するモノクローナル抗体組成物の、補体による、前記抗原を発現する標的細胞の補体依存性の細胞傷害性(CDC)を誘発する能力を増大させるための、クロマトグラフィー分画工程の使用に関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】低下pH勾配(2つの緩衝液、すなわち緩衝液A(ジエタノールアミン、25mM)、緩衝液B(polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5)を用いることによって9.5から8.0)による溶離を伴う、抗CD20抗体組成物のクロマトフォーカシング(陰イオン交換樹脂(GE Life Sciences社によって販売されているカラムMono(商標)P)による3回の分離について得られたクロマトグラムを示す図である。抗体組成物を脱塩し、20mgをカラム上に注入した。2mLの画分を回収した。画分33から50を分析のために回収した。

【図2】陽イオン交換クロマトグラフィー(Aと同一のカラム及び溶離)による11の分離に対応する11のクロマトグラムの重ね合わせを示す図である。画分F1からF20を回収し、ピーク:P1(酸性、F1からF3)、P2(酸性、F4及びF5)、P3(酸性、F6)、P4(主要ピーク、F7からF10)、P5(塩基性、F11)、P6(塩基性、F12からF14)、P7(塩基性、F15からF17)、及びP8(塩基性、F18からF20)にごとにグループ分けした。

40

【図3】CEXによって精製された抗CD20抗体組成物のクロマトグラムを示す図である。A. 精製前の抗CD20抗体組成物のクロマトグラム。B. 分離前のクロマトグラム(A)の主要ピークに対応する画分1から20を組み合わせることによって形成された組成物のクロマトグラム。様々なピークのパーセンテージが示されている。

【図4】陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製された画分の、CD16(Biacore)への結合を示す図である。各試料のCD16への結合は、参照試料のCD16への結合に対するパーセンテージとして表される。

50

【図5】クロマトフォーカシング(A)によって又は陽イオン交換クロマトグラフィー(B)によって精製された画分のCD16活性を示す図である。各試料のCD16活性(CD16 Jurkat細胞によるIL-2の分泌)は、参照試料のCD16活性に対するパーセンテージとして表される。

【図6】陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製された画分の補体依存性の細胞傷害性(CDC)を示す図である。各試料のCDC応答は、参照試料のCDC応答に対するパーセンテージとして表される。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明は、したがって、薬剤として用いるための、

a)細胞クローンから、非ヒトトランスジェニック動物から、又はトランスジェニック植物からモノクローナル抗体組成物を生産する工程、

b)工程a)において得られた組成物をクロマトグラフィーによって分画する工程、及び

c)クロマトグラム上の主要ピークに対応する、工程b)において得られた1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせる工程

を含む方法によって得られ得るモノクローナル抗体組成物に関するものであり、こうして得られたモノクローナル抗体組成物は前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークは、工程c)において得られた組成物のクロマトグラム上の少なくとも85%、有利には少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、より有利には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、又は更には少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%に相当する。

【0033】

工程a)において、モノクローナル抗体組成物は、細胞クローンから、トランスジェニック動物から、又はトランスジェニック植物から生産される。

【0034】

「抗体」又は「免疫グロブリン」は、所与の抗原に結合するための少なくとも1つのドメインと、FcR受容体に結合し得るFc断片を含む定常ドメインとを含む分子を意味する。ヒト及びマウス等のほとんどの哺乳動物において、抗体は、4つのポリペプチド鎖、すなわち、分子に対する柔軟性を確実にする様々な数のジスルフィド架橋を介して共に連結された2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる。各軽鎖は、定常ドメイン(CL)及び可変ドメイン(VL)からなり、重鎖は、1つの可変ドメイン(VH)及び抗体のアイソタイプに従って3つ又は4つの定常ドメイン(CH1からCH3又はCH1からCH4)からなる。ラクダ及びラマ等のわずかな稀な哺乳動物において、抗体は2つの重鎖のみからなり、各重鎖は、1つの可変ドメイン(VH)及び1つの定常領域を含む。

【0035】

可変ドメインは抗原の認識に関与し、一方、定常ドメインは、抗体の生物学的特性、薬物動態学的特性、及びエフェクター特性に関与する。

【0036】

配列が抗体ごとに大きく変化する可変ドメインとは異なり、定常ドメインは、種及びアイソタイプに特有の、抗体同士で非常に近いアミノ酸配列を特徴とし、場合によってわずかな体細胞変異を伴う。Fc断片は、天然に、ドメインCH1を除く重鎖の定常領域、すなわち、下方境界領域と、定常ドメインCH2及びCH3又はCH2からCH4(アイソタイプに応じて)とからなる。ヒトIgG1において、完全Fc断片は、226位のシステイン残基(C226)から開始する重鎖のC末端部分からなり、Fc断片におけるアミノ酸残基の番号付けは、本明細書全体において、Edelmanら、1969年、及びKabatら、1991年において記載されているEUインデックスの番号付けである。他のタイプの免疫グロブリンの対応するFc断片は、配列のアラインメントによって当業者によって容易に同定され得る。

【0037】

Fc断片は、2つの重鎖のそれぞれの上に、297位のアスパラギン残基(Asn 297)に結合しているN-グリカンが存在することで、CH2ドメインにおいてグリコシル化される。

【0038】

Fc内に位置する以下の結合ドメインは、抗体の生物学的特性に重要である：

- 抗体の薬物動態学的特性(インビボでの半減期)に関与する、FcRn受容体に結合するためのドメイン：

異なるデータが、CH2及びCH3ドメインの界面に位置する特定の残基がFcRn受容体への結合に関与することを示唆している。

- CH2ドメイン内に位置する、CDC応答(「補体依存性の細胞傷害性」)に関与する、補体C1qがタンパク質に結合するためのドメイン、

- CH2ドメイン内に位置する、食作用又はADCC(「抗体依存性の細胞傷害性」)型の応答に関与する、FcR受容体に結合するためのドメイン。

10

【0039】

本発明の意味では、抗体のFc断片は上記に定義したように天然であり得るか、又は様々な方法で修飾されていてよいが、それは、それがFcR受容体(IgGではFc R受容体)に結合するための機能的ドメイン、好ましくは受容体FcRnに結合するための機能的ドメインを含む限りにおいてである。修飾には、Fc断片の特定の部分の欠失が含まれ得るが、それは、前記Fc断片が、受容体FcR(IgGでは受容体Fc R)に結合するための機能的ドメイン、好ましくは受容体FcRnに結合するための機能的ドメインを含有する限りにおいてである。この修飾にはまた、抗体の生物学的特性に影響し得るアミノ酸の様々な置換が含まれ得るが、それは、前記アミノ酸が、受容体FcRに結合するための機能的ドメイン、好ましくは受容体FcRnに結合するための機能的ドメインを含有する限りにおいてである。特に、抗体がIgGである場合、抗体は、WO00/42072、Shieldsら、2001年、Lazarら、2006年、WO2004/029207、WO/2004063351、WO2004/074455において記載されているような受容体Fc RIII(CD16)への結合を増強することを意図した変異を含み得る。例えばShieldsら、2001年、Dall'Acquaら、2002年、Hintonら、2004年、Dall'Acquaら、2006年(a)、WO00/42072、WO02/060919A2、WO2010/045193、又はWO2010/106180A2において記載されているような、受容体FcRnへの結合、したがってインビボでの半減期を増強することを可能にする変異も存在し得る。他の変異、例えば、タンパク質への補体の結合、したがってCDC応答を低減又は増大させることを可能にする変異が存在していてもしていなくてもよい(WO99/51642、WO2004074455A2、Idusogieら、2001年、Dall'Acquaら、2006年(b)、及びMooreら、2010年を参照されたい)。

20

30

【0040】

「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、同一で固有の抗原特異性を有する抗体分子を含む組成物を意味する。組成物内に存在する抗体分子は、それらの翻訳後修飾に関して、特にそれらのグリコシル化構造又はそれらの等電点に関して変化し得るが、全て同一の重鎖及び軽鎖配列によってコードされており、したがって、あらゆる翻訳後修飾の前には、同一のタンパク質配列を有する。翻訳後修飾(例えば、重鎖のC末端リシンの切断、アスパラギン残基の脱アミド化、及び/又はアスパラギン酸残基の異性化等)に関連する、タンパク質配列における特定の差異は、それでも、組成内に存在する様々な抗体分子の間で存在し得る。

【0041】

本発明の範囲内で薬剤として用いられる組成物内に存在するモノクローナル抗体は、有利には、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体であり得る。実際、これによって、投与された抗体に対する患者の免疫反応を避けることが可能になる。

40

【0042】

「キメラ」抗体は、所与の種に対して異種の種の抗体の軽鎖及び重鎖の定常領域と会合した、前記所与の種の抗体に由来する天然可変領域(軽鎖及び重鎖)を含有する抗体を指すものである。有利には、本発明に従った薬剤として用いるためのモノクローナル抗体組成物がキメラモノクローナル抗体を含む場合、前記キメラモノクローナル抗体はヒト定常領域を含む。非ヒト抗体から開始して、キメラ抗体は、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて調製され得る。例えば、キメラ抗体は、重鎖及び軽鎖について、プロモーターと、

50

非ヒト抗体の可変領域をコードする配列と、ヒト抗体の定常領域をコードする配列とを含む組換えDNAをクローニングすることによって、生産され得る。キメラ抗体を調製するための方法については、例えば、文献Verhoeynら、1988年を参照することができる。

【0043】

「ヒト化」抗体は、非ヒト由来の抗体に由来するCDR領域を含有し、抗体分子の他の部分は1つの(又は複数の)ヒト抗体に由来する、抗体を指すものである。更に、骨格セグメント(FRと呼ばれる)の特定の残基は、結合親和性を保持するために修飾され得る(Jonesら、1986年、Verhoeyenら、1988年、Riechmannら、1988年)。本発明に従ったヒト化抗体は、Almagroら、2008年の総説においてまとめられているような、当業者に知られている技術、例えば「CDRグラフィティング」技術、「リサーフェシング(resurfacing)」技術、超ヒト化(SuperHumanization)技術、「ヒトストリングコンテンツ(Human string content)」技術、「FRライブラリー」技術、「ガイド選択(Guided selection)」技術、「FRシャッフリング」技術、及び「ヒューマニアリング(Humaneering)」技術によって調製され得る。

10

【0044】

「ヒト」抗体は、全配列がヒト由来である抗体、すなわち、コード配列が抗体をコードするヒト遺伝子の組換えによって生産されている抗体を意味する。実際、今や、免疫化されると内因性免疫グロブリンの生産の不存在下で全種類のヒト抗体を生産し得る、トランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが可能である(Jakobovitsら、1993年(a)及び(b)、Bruggermannら、1993年、並びにDuchosalら、1992年、米国特許第5,591,669号、米国特許第5,598,369号、米国特許第5,545,806号、米国特許第5,545,807号、米国特許第6,150,584号を参照されたい)。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイバンクからも得られ得る(Hoogenboomら、1991年、Marksら、1991年、Vaughanら、1996年)。

20

【0045】

抗体は、それらの定常領域の性質に応じていくつかのアイソタイプのものであり得、すなわち、定常領域、 μ 、及び δ はそれぞれ、IgG、IgA、IgM、IgE、及びIgD免疫グロブリンに対応する。有利には、本発明の範囲内で薬剤として用いられる組成物内に存在するモノクローナル抗体は、IgGアイソタイプのものである。実際、このアイソタイプは、最大数の個体(ヒト)においてADCC(「抗体依存性の細胞傷害性」)活性を生じさせる能力を示す。定常領域はいくつかのサブタイプ、すなわち 1、2、3を含み、これらの3つのタイプの定常領域は、ヒト補体を結合する特殊性を有し、4は、それによって、サブアイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を生じさせる。有利には、本発明の範囲内で薬剤として用いられる組成物内に存在するモノクローナル抗体は、アイソタイプIgG1又はIgG3、好ましくはIgG1のものである。

30

【0046】

モノクローナル抗体の組成物は、当業者に周知の技術によって、細胞クローン、非ヒトトランスジェニック動物、又はトランスジェニック植物によって生産され得る。

【0047】

特に、組成物を生産する細胞クローンは、3つの主な技術によって得ることができる：

- 1) 目的の抗体を生産するBリンパ球と不死化系との融合によってハイブリドーマを得ること、
- 2) エプスタイン・バーウイルス(EBV)によって、目的の抗体を生産するBリンパ球を不死化すること、
- 3) 目的の抗体をコードする配列を単離し(通常はハイブリドーマ又は不死化Bリンパ球から)、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列を発現する1つ又は複数のベクターをクローニングし、発現ベクターによって細胞系を形質転換し、そして、異なる得られた細胞クローンを分離すること。抗体の重鎖及び軽鎖の発現ベクターは、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列を発現させるために必要なエレメント、特にプロモーター、転写を開始するためのコドン、終結配列、及び転写を調節するための適切な配列を含む。これらのエレメントは、発現に用いられる宿主に応じて変化し、当業者の一般的な知識を考慮して当業者によって容易に選択される。ベクターは、特に、プラスミド又はウイルスであり得る。形質転換

40

50

技術もまた、当業者に周知である。

【 0 0 4 8 】

抗体の重鎖及び軽鎖をコードする配列の1つ又は複数の発現ベクターによる細胞系の形質転換が、特にキメラ抗体又はヒト化抗体を得るために、最も一般的に用いられる。

【 0 0 4 9 】

形質転換された細胞系は、好ましくは真核生物由来のものであり、特に、昆虫、植物、酵母、又は哺乳動物の細胞から選択され得る。抗体組成物は、次いで、適切な条件下で宿主細胞を培養することによって生産され得る。抗体を生産するための適切な細胞系には、SP2/0、YB2/0、IR983F、ヒト骨髄腫Namalwa、PERC6、CHO系、特にCHO-K-1、CHO-Lec10、CHO-Lec1、CHO-Lec13、CHO Pro-5、CHO dhfr-、又は、遺伝子FUT8及び/若しくは遺伝子GMDをコードする2つの対立遺伝子が欠失しているCHO系、WIL-2、Jurkat、Vero、Molt-4、COS-7、293-HEK、BHK、K6H6、NSO、SP2/0-Ag 14、P3X63Ag8.653、アヒル胚細胞系EB66(登録商標)(Vivalis社)、並びにラット肝臓癌系H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)から選択される細胞系が特に含まれる(WO2012/041768を参照されたい)。好ましい実施形態において、抗体は、以下の系の1つにおいて生産される:YB2/0、遺伝子FUT8及び/又は遺伝子GMDをコードする2つの対立遺伝子が欠失しているCHO系、胚性アヒル細胞系EB66(登録商標)(Vivalis社)、並びにラット肝臓癌系H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)。好ましい実施形態において、抗体はYB2/0(ATCC CRL-1662)において生産される。

10

【 0 0 5 0 】

或いは、抗体組成物は、非ヒトトランスジェニック動物において生産され得る。

20

【 0 0 5 1 】

非ヒトトランスジェニック動物は、受精卵内に目的の遺伝子(ここでは、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする再編成遺伝子)を直接注入することによって得られ得る(Gordonら、1980年)。非ヒトトランスジェニック動物はまた、胚性幹細胞内に目的の遺伝子(ここでは、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする再編成遺伝子)を導入すること、及びキメラ凝集法又はキメラ注入法によって動物を調製することによって得られ得る(Manipulating the Mouse Embryo、A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994年); Gene Targeting、A Practical Approach、IRL Press at Oxford University Press(1993年)を参照されたい)。非ヒトトランスジェニック動物はまた、目的の遺伝子(ここでは、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする再編成遺伝子)が導入されている核を除核卵内に移植する、クローニング技術によって得られ得る(Ryanら、1997年、Cibelliら、1998年、WO0026357A2)。目的の抗体を生産する非ヒトトランスジェニック動物は、上記の方法によって調製され得る。抗体は次いで、トランスジェニック動物内に蓄積され、特に動物の乳又は卵から採取され得る。非ヒトトランスジェニック動物の乳内に抗体を生産するために、調製方法は特に、WO9004036A1、WO9517085A1、WO0126455A1、WO2004050847A2、WO2005033281A2、WO2007048077A2において記載されている。乳から目的のタンパク質を精製するための方法もまた知られている(WO0126455A1、WO2007106078A2を参照されたい)。目的の非ヒトトランスジェニック動物には、特に、マウス、ウサギ、ラット、ヤギ、ウシ(特に乳牛)、及び家禽(特にニワトリ)が含まれる。

30

【 0 0 5 2 】

抗体組成物は、トランスジェニック植物において生産され得る。多くの抗体はトランスジェニック植物において既に生産されており、目的の抗体を発現するトランスジェニック植物を得るため及び抗体を回収するために必要な技術は、当業者に周知である(Stogerら、2002年、Fisherら、2003年、Maら、2003年、Schillbergら、2005年を参照されたい)。更にわずかなフコシル化を伴う、天然ヒト抗体(キシロースを有さない)のグリコシル化に近いグリコシル化を得るために、例えば低分子干渉RNAによって、植物において得られたグリコシル化に影響することも可能である(Forthalら、2010年)。

40

【 0 0 5 3 】

本発明に従った薬剤として用いるためのモノクローナル抗体組成物を得ることが可能な方法の工程b)において、工程a)において得られた組成物内に存在する抗体の異なる電荷ア

50

イソフォームは、工程a)において得られた組成物をクロマトグラフィーによって分画することによって分離される。

【0054】

導入部分において説明したように、細胞クローン、非ヒトトランスジェニック動物、又はトランスジェニック植物によって生産されるあらゆるモノクローナル抗体組成物は、同一のモノクローナル抗体の特定の数の電荷イソフォーム又は変異体の存在を特徴とする。これらの異なる電荷イソフォーム又は変異体の存在は、荷電基の数を修飾することによって直接的に、又は、それ自体が荷電残基の局所的分布を修飾するか若しくはそれらのpKaを変化させる構造的修飾を導入することによって間接的に、抗体の表面電荷特性の改変をもたらす、翻訳後修飾の存在に関連する。各電荷イソフォーム又は変異体は、この分子の全体的電荷がゼロであるpH(水素ポテンシャル(hydrogen potential))、又は、言い換えると、分子が電氣的に中性である(両性イオン性形態又は混合型イオン)pHに対応する、その等電点(pI、水素等電ポテンシャル(isoelectric hydrogen potential)(pHI)とも呼ばれる)を特徴とする。したがって、所与のpHで、モノクローナル抗体の異なる電荷イソフォーム又は変異体は、可変の正味電荷、すなわち、pIが負の電荷を有するpHよりも低い(分子は、そのプロトン塩基性培地に渡す傾向がある)正味電荷、pIが中性pHに等しい正味電荷、及びpIが正の電荷を有するpHよりも高い(分子は、そのプロトンを保持するか又はそのプロトンの一部を酸性培地から捕捉する傾向にある)正味電荷を有する。モノクローナル抗体の異なる電荷イソフォーム又は変異体は、各変異体上に存在する翻訳後修飾の頻度に応じて、可変の割合で存在する。モノクローナル抗体組成物は、通常、主要な変異体又はイソフォームを含み、これは、それらのpIが主要イソフォームのpIよりも低いか高いかに応じて、複数のいわゆる酸性又は塩基性の変異体又はイソフォームを伴う。抗体、その生産態様、及びそれが既に受けている精製工程に応じて、酸性イソフォーム、主要ピーク、及び塩基性イソフォームの割合(イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムから計算される)は、通常、以下の値の辺りで変化する:酸性イソフォームは10から30%、主要ピークは50から75%、及び塩基性イソフォームは8から20%(Farnanら、2009年、Reaら、2011年、Reaら、2012年、Khawliら、2010年、Zhangら、2011年、W02011/009623、及びEP1308456を参照されたい)。

10

20

【0055】

所与のpHでのそれらのpI及び正味電荷が異なるため、所与の抗体組成物内に存在する抗体の電荷イソフォームは、異なるクロマトグラフィー技術によって分離され得る。

30

【0056】

クロマトグラフィーは、ランニング移動相と静止相(又は固定相)との間のふるまいの差異に基づく、化学物質(液体又は気体の均質な混合物)を分離するための技術である。クロマトグラフィー法は、使用される相の性質又は分離において適用される現象の性質に従って分類され得る。

【0057】

本発明の1つの実施形態において、工程b)の分画は、イオン交換クロマトグラフィーによって達成される。実際、これによって、同一タンパク質の電荷イソフォームの分離が可能になる。イオン(陰イオン又は陽イオン)交換クロマトグラフィーにおいて、異なる成分の分離を可能にするパラメータは、それらの正味電荷である。

40

【0058】

抗体組成物は、まず、イオン交換樹脂上にロードされる。これには、正に(陰イオン交換クロマトグラフィー)又は負に(陽イオン交換クロマトグラフィー)荷電した樹脂(固定相又は静止相)が用いられる。樹脂のイオンの電荷と逆の電荷を有する分子が樹脂上に保持/固定される。

【0059】

当業者に知られており、目的の抗体組成物の分離に適切な、強い又は弱いあらゆるタイプの陽イオン又は陰イオン交換樹脂が用いられ得る。そのタンパク質配列に応じて、抗体組成物の平均等電点(pI)は、通常、5と9との間で変化する、最も多くは7と9との間で変化する

50

る。8を超えるpIでは、陽イオン交換樹脂が用いられる。逆に、6未満のpIでは、陰イオン交換樹脂が用いられる。6と8との間に含まれるpIでは、両タイプのイオン(陽イオン又は陰イオン)交換樹脂が試験され得る。したがって、イオン力勾配での溶離が後に続く陽イオン交換クロマトグラフィー(負に荷電した樹脂)が最も多く用いられても、特定のケースにおいては陰イオン交換クロマトグラフィー(正に荷電した樹脂)を用いることも可能である。

【0060】

イオン交換樹脂は、通常、正に荷電した基(陰イオン交換樹脂)又は負に荷電した基(陽イオン交換樹脂)がグラフトされた、架橋したポリマー又はゲルからなる。架橋したポリマー又はゲルは、デキストラン(例えばSephadex(登録商標))、アガロース(例えばSepharose(登録商標))、セルロース、メタクリレートポリマー(例えばFratogel(登録商標))、ビニルポリマー(例えばFractoprep(登録商標))、例えばポリ(スチレンジビニルベンゼン)(例えばMonobeads(商標)、Source(商標)、Bio Mab NP-5又はNP-10、Sepax Antibodix(商標)NP1.7、NP3、NP5、及びNP10)から特に選択され得る。

10

【0061】

ゲルは、有利には、平均直径が10と200 μm との間に含まれるビーズの形であり得る。

【0062】

陽イオン交換樹脂では、負に荷電した基、例えば、スルホプロピル(SP)、メチルスルホネート(S)、又はカルボキシメチル(CM)型の基が、架橋したポリマー上にグラフトされる。

20

【0063】

陰イオン交換樹脂では、正に荷電した基、例えば、アンモニウム型(Q)の基、特に第四級アミノエチル(QAE)、ジエチルアミノエチル(DEAE)、ジメチルアミノエチル(DMAE)、トリエチルアミノエチル(TMAE)、又はジメチルアミノプロピル(ANX)が、架橋したポリマー上にグラフトされる。

【0064】

本発明の範囲内で用いられ得る陽イオン交換樹脂には、樹脂Source(商標)15S又は30S、Mono-S(GE Life Sciences社によって販売されている);ProPac(登録商標)WCX(特に、ProPac(登録商標)WCX-10)、ProPac(登録商標)SCX(特に、ProPac(登録商標)SCX-10又はSCX-20)、ProSwift WCX、MAbPac(登録商標)SCX(特に、MAbPac(登録商標)SCX-10)(Dionex社によって販売されている);Bio Mab(特に、Agilentによって販売されているBio Mab NP-5又はNP-10)、PL-SCX(Agilentによって販売されている);Sepax Antibodix(商標)(特に、Sepax Antibodix(商標)NP1.7、NP3、NP5、及びNP10)(Sepaxによって販売されている)が含まれる(Farnanら、2009年、Khawliら、2010年、Gandhiら、2011年、Zhangら、2011年、Reaら、2011年、及びMcAtteeら、2012年を参照されたい)。また、本発明の範囲内において用いられ得る陰イオン交換樹脂には、樹脂Source(商標)15Q又は30Q、Mono(商標)-Q(GE Life Sciences社によって販売されている);ProPac(登録商標)WAX(特に、ProPac(登録商標)WAX-10)、ProPac(登録商標)SAX(特に、ProPac(登録商標)SAX-10)(Dionex社によって販売されている)が含まれる。

30

【0065】

抗体組成物がイオン交換樹脂上にロードされると、電荷アイソフォームを分離するために異なる溶離方法が用いられ得る。

40

【0066】

固定された分子の溶離は、樹脂のイオンの電荷と逆の電荷を有するイオンを含有する溶離緩衝液(移動相)を用いることによって特に達成され得、これは、樹脂が有する電荷との相互作用について、固定された分子と競合するようになる。強力なイオン濃度を含有する緩衝液を直接用いること(全ての分子を一度に溶離するために)、又は逆に、イオン濃度を徐々に増大させて(これはイオン力勾配と呼ばれる)、異なる分子を樹脂とのそれらの静電的相互作用の力に応じて連続的に切り離すことを可能にすることができる。実際、この最後のシナリオでは、2つの緩衝溶液が用いられ、その一方は低いイオン濃度のものであ

50

り、他方は強力なイオン濃度のものである。2つの駆動ポンプがこれらの溶液を吸い上げ、経時的に変化する比率に従って(強力なイオン濃度の溶液の割合が徐々に増大する)両者を混合する。この混合の産物はカラムにおいて用いられる。この技術を用いる、抗体組成物の電荷アイソフォームを分離するための具体的な方法の例は、Gandhiら、2011年において記載されている。Reaら、2012年にはまた、この技術の原理、並びに、抗体の電荷アイソフォーム又は変異体を分離するためのカラム、緩衝液、及び作動パラメータをいかにして適切に選択するかが記載されている(第7節、447~451頁を参照されたい)。

【0067】

別のイオン交換クロマトグラフィーにおいて、溶離は、イオン力勾配を用いてではなく、pH勾配を用いて達成される。実際、多くのイオン化可能な基はpH感受性である。上昇pH勾配では(すなわち、pHを増大させることによって)、酸性基(負に荷電した)のイオン化が好ましく、塩基性基(正に荷電した)のイオン化は好ましくない。したがって、pHを上昇させることによって、正味の負の電荷の発生が、pH感受性のイオン化可能な基を有する分子にとって好ましい。上昇pH勾配は、したがって、負に荷電した樹脂(陽イオン交換器)上に固定された抗体組成物の電荷アイソフォームの分離も可能にする。低下pH勾配では(すなわち、pHを低下させることによって)、塩基性基(正に荷電した)のイオン化が好ましく、酸性基(負に荷電した)のイオン化は好ましくない。pHを低下させることによって、pH感受性のイオン化可能な基を有する分子にとっての正味の正の電荷の発生が好ましい。低下pH勾配は、したがって、正に荷電した樹脂(陰イオン交換器)上に固定された抗体組成物の電荷アイソフォームの分離も可能にする。pH勾配による溶離を用いる、イオン交換クロマトグラフィーによる抗体の電荷アイソフォームを分離するための具体的な方法の例は、Farnanら、2009年、及びReaら、2011年において記載されている。Reaら、2012年にはまた、この技術の原理、並びに、抗体の電荷アイソフォーム又は変異体を分離するためのカラム、緩衝液、及び作動パラメータをいかにして適切に選択するかが記載されている(第8節、451~452頁を参照されたい)。実施例1はまた、陽イオン交換クロマトグラフィー及び上昇pH勾配での溶離による抗体組成物の電荷アイソフォームの分離を記載する。

【0068】

イオン交換クロマトグラフィーの別の選択肢において、溶離はまた、Reaら、2012年(第9節、453頁を参照されたい)において記載されているように、イオン力勾配及びpH勾配を組み合わせることによって(いわゆる「ハイブリッド」溶離)が達成され得る。

【0069】

本明細書において「置換イオン交換クロマトグラフィー(displacement ion exchange chromatography)」と呼ばれ、抗体組成物の電荷アイソフォームの分離を同様に可能にする、イオン交換クロマトグラフィーの更に別の選択肢において、イオン(陰イオン又は陽イオン)交換器の樹脂はまた、固定相又は静止相として用いられるが、溶離は、イオン力及び/又はpH勾配によってではなく、置換分子によって、すなわち、樹脂上への結合について樹脂上に事前に固定された抗体分子と競合することになり、そして、樹脂への親和性が置換分子よりも低い抗体分子を置換させる、クロマトグラフィー樹脂に対して強力な親和性を有する分子によって達成される。抗体分子は、こうして、置換分子の波によってカラムに沿って移動させられる。前記波がカラムを横断するにつれて、新たな平衡が設定され、この平衡において、抗体分子は、利用可能な状態のままである樹脂への結合部位について互いに競合するようになる。この動的なバランスプロセスの間に、抗体の異なる電荷変異体又はアイソフォームは、イオン交換樹脂へのそれらの親和性の大きさに従って分離される。このクロマトグラフィーの分離方法の原理、並びに、抗体組成物の電荷アイソフォームを分離するためのその適用に必要な樹脂、緩衝液、及び材料は、特に、Khawliら、2010年、Zhangら、2011年、及びMcAteeら、2012年において記載されている。

【0070】

イオン交換クロマトグラフィーのこれらの異なる溶離態様において、選択されたカラムに応じて、あらゆる適切な溶離(pH又はイオン力勾配)又は置換緩衝液が用いられ得る。樹脂及び関連する緩衝液の例は、Farnanら、2009年、Khawliら、2010年、Gandhiら、2011年

、Zhangら、2011年、Reaら、2011年、及びMcAteeら、2012年において記載されている。

【0071】

抗体組成物の電荷アイソフォームの分離を可能にする別のクロマトグラフィー技術は、クロマトフォーカシングである。この技術において、タンパク質は、それらの等電点(pI)に従って分離される。この技術は、特定の樹脂(固定相又は静止相)及び特定の両性緩衝液の会合の使用に基づく。特に、線形のpH勾配を得るためには、分離に用いられるpHの全範囲にわたって等しい緩衝液能力が必要であり、したがって、本願のために特異的に設計された緩衝液、及び荷電した緩衝液アミンで置換された樹脂が必要である。

【0072】

分離の原理は以下の通りである:クロマトフォーカシング樹脂を、最も高い所要のpHよりもわずかに高いpHの最初の緩衝液でバランスする。溶離緩衝液(最も低い所要のpHに調整された)をカラムに通し、樹脂及びタンパク質のアミンの滴定を開始する。溶離緩衝液がカラムを通るにつれて、pHは徐々に低減し、下向きのpH勾配が生じる。第1の容積の溶離緩衝液がカラムに通した後、試料をカラムにアプライする。試料のタンパク質を、それをカラム内に導入した後すぐに滴定する(pHの調整)。それらのpIよりも高いpHを有するタンパク質は負に荷電し、カラムの頂部近くで保持される(正に荷電したアミン基への結合によって)。それらのpIよりも低いpHを有するタンパク質は、緩衝液の流れでカラムに沿って移動し始め、pHがそれらのpIよりも高い区域に達するまでカラムに結合しない。これが分離プロセスの最初である。

10

【0073】

pHがカラムの頂部で低下し続けるにつれて(pH勾配の時間依存性の変化)、pIが新たなpHよりも高いあらゆるタンパク質は徐々に正に荷電し始め、正に荷電したアミン基によって反発され、そして溶離緩衝液でカラムに沿って移動し始め、その移動は、pH勾配の移動よりも速い。このタンパク質がカラムに沿って移動するにつれて、pHは徐々に上昇する。タンパク質が、pHがそのpIよりも高い区域に達すると、タンパク質は再び負に荷電し、再びカラムに結合する。タンパク質は、可動pH勾配が局所的なpHをそのpIよりも低く低減させるまで、すなわち、タンパク質が再び正に荷電し、再び移動し始める時点まで、結合したままである。このプロセスは、タンパク質がそのpIに近いpHでカラムから溶離されるまで反復される。

20

【0074】

この技術の名称は、この技術のフォーカシング効果に由来している。実際、pH低下勾配では、タンパク質は3つの荷電状態、すなわち、正、負、又は中性で存在し得る。更に、クロマトフォーカシングにおいて、タンパク質の荷電の状態は、pH勾配が変化するにつれて、且つタンパク質がカラムの異なるpH区域を移動するにつれて、連続的に変化する。一区域の後部にある分子は、この同一の区域の前部にある分子よりも速く移動して、各バンドが同一pIを有する1つ又は複数のタンパク質に対応する、次第に狭くなるタンパク質バンドを形成する。

30

【0075】

したがって、クロマトフォーカシングにおいて、異なるpIを有するタンパク質は、pH勾配が変化するにつれて、異なる速度でカラムを徐々に移動し、正に荷電した緩衝液アミン基を有する樹脂を継続的に結合し、及びそれから解離するが、狭いバンドに徐々にフォーカシングされ、最終的に溶離される。最も高いpIを有するタンパク質がまず溶離され、一方、最も低いpIを有するタンパク質は最後に溶離される。

40

【0076】

クロマトフォーカシングによる分離に用いられる樹脂は、特にポリ(スチレンジビニルベンゼン)又は架橋したアガロース型の、標準的な樹脂(好ましくは上記のようなビーズとしての、上記のような架橋したポリマー又はゲル)に基づくものであり、前記樹脂は、正に荷電した緩衝液アミン基のグラフティングを特徴とする。これらの正に荷電した緩衝液アミン基は、特に、第二級、第三級、及び/又は第四級アミン基である。クロマトフォーカシングにおいて有用な樹脂の例には、Mono(商標)-Pカラム(第二級、第三級、及び/又は

50

第四級アミン基でグラフトされた、架橋したポリ(スチレンジビニルベンゼン)、GE Life Sciences社又はGE Healthcare社によって販売されている、PBE 94及びPBE 118(エーテル結合を介して単糖に結合した、第二級、第三級、及び/又は第四級アミン基でグラフトされた、架橋した6%アガロース樹脂)が含まれる。Mono(商標)-P及びPBE 94カラムはpH9とpH4との間の分離に適しており、一方、カラムPBE 118は、pH9を超えて開始するpH勾配での分離に適している。Mono(商標)-P及びPBE 94カラム、特にカラムMono(商標)-Pが好ましい。

【0077】

用いられる最初の緩衝液は、特に、異なるpHの(HCl型の酸、酢酸、又はイミノ二酢酸の添加)ジエタノールアミン溶液、トリス溶液、トリエタノールアミン溶液、ビス-トリス溶液、トリエチルアミン溶液、エタノールアミン溶液、イミダゾール溶液、ヒスチジン溶液、又はピペラジンに基づき得る。

【0078】

用いられる溶離両性緩衝液には、特に、緩衝液Polybuffer 74(pH範囲:7~4、Mono(商標)-P及びPBE 94カラムで)、Polybuffer 96(pH範囲:9~6、Mono(商標)-P及びPBE 94カラムで)、及びPharmalyte pH8-10.5(pH範囲:11~8、PBE 118カラムで)が含まれる。

【0079】

これらの緩衝液の使用及び選択の具体的な指示は、これらのカラムの製造者から入手可能である。

【0080】

抗体組成物の電荷アイソフォームの分離を可能にする更に別のクロマトグラフィー技術は、疎水性相互作用クロマトグラフィーである。

【0081】

したがって、有利には、本発明に従った薬剤として用いるためのモノクローナル抗体組成物を得ることを可能にする本方法の工程b)において、工程a)の分画は、以下のクロマトグラフィー技術の1つによって達成される：

- イオン力勾配による溶離を伴う、イオン(陰イオン又は陽イオン)交換クロマトグラフィー(イオン力勾配を伴うイオン交換クロマトグラフィー)、
- pH勾配(陽イオン交換のケースでは上昇し、陰イオン交換のケースでは低下する)による溶離を伴う、イオン(陰イオン又は陽イオン)交換クロマトグラフィー(pH勾配を伴うイオン交換クロマトグラフィー)、
- イオン力及びpH勾配による溶離を伴う、イオン(陰イオン又は陽イオン)交換クロマトグラフィー(ハイブリッドイオン交換クロマトグラフィー)、
- 置換分子による溶離を伴う、イオン(陰イオン又は陽イオン)交換クロマトグラフィー(置換イオン交換クロマトグラフィー)、
- クロマトフォーカシング、及び
- 疎水性相互作用クロマトグラフィー。

【0082】

有利には、本発明に従った薬剤として用いるためのモノクローナル抗体組成物を得ることを可能にする本方法の工程b)において、工程a)の分画は、以下のクロマトグラフィー技術の1つによって達成される：

- イオン交換クロマトグラフィー(溶離態様に関わらず)、特に、pH勾配を伴うイオン交換クロマトグラフィー、及び
- クロマトフォーカシング。

【0083】

特に、本発明者らは、本発明の範囲内で用いられ得る以下の2つの異なる技術を用いて、モノクローナル抗体組成物の電荷アイソフォーム又は変異体を分離し得た：

- クロマトフォーカシング:低下pH勾配(緩衝液A(ジエタノールアミン、25mM)、緩衝液B(polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5)の2つの緩衝液を用いることによって9.5から8.0)による溶離を伴う、カラムMono(商標)-P(GE Life Sciences社)、

- 上昇pH勾配(緩衝液A:20mMの NaH_2PO_4 、60mMの NaCl (pH6)、緩衝液B:20mMの Na_2HPO_4 、60mMの NaCl (pH10)、勾配:60分以内に緩衝液Bの10%から60%)による溶離を伴う、陽イオン交換クロマトグラフィー(カラムSCX、MabPac、Dionex社)。

【0084】

電荷アイソフォームの分離を可能にするクロマトグラフィー技術によって得られる抗体組成物のクロマトグラムは、一方ではそのpIが主要アイソフォームと比較して低いいわゆる「酸性」アイソフォームを、他方ではそのpIが主要アイソフォームと比較して高いいわゆる「塩基性」アイソフォームを含むマイナーピーク(minority peaks)に囲まれている、主要電荷アイソフォーム及び主要アイソフォームに近い他のアイソフォーム(すなわち、主要アイソフォームと比較して多くの修飾を有さず、したがって、所与のpHでのpI及び正味電荷が主要アイソフォームのそれに非常に近い)を含む、主要ピークを常に含む(図1~図2を参照されたい)。

10

【0085】

用いられるクロマトグラフィー技術に応じて、異なるアイソフォームがクロマトグラム上に現れ、以下の順で溶離される:

- 溶離態様(イオン力勾配、pH勾配、pH及びイオン力勾配、又は置換分子による溶離)に関わらず、陽イオン交換クロマトグラフィー(負に荷電した樹脂)の使用:酸性アイソフォーム(主要アイソフォームほどには正に荷電していない)がまず溶離され、その後、主要アイソフォーム、次いで塩基性アイソフォーム(主要アイソフォームよりも正に荷電している)が溶離される(Khawliら、2010年の図1、Reaら、2012年の図3、Farnanら、2009年の図1、及びReaら、2011年の図1、Zhangら、2011年の図1、及びMcAteeら、2012年の図8.10.2、及び本明細書の図2を参照されたい)、

20

- 溶離態様(イオン力勾配、pH勾配、pH及びイオン力勾配、又は置換分子による溶離)に関わらず、陰イオン交換クロマトグラフィー(正に荷電した樹脂)の使用:塩基性アイソフォーム(主要アイソフォームほどには負に荷電していない)がまず溶離され、その後、主要アイソフォーム、次いで酸性アイソフォーム(主要アイソフォームよりも負に荷電している)が溶離される、

- クロマトフォーカシング:塩基性アイソフォームがまず溶離され、その後、主要アイソフォーム、次いで酸性アイソフォームが溶離される(本明細書の図1を参照されたい)。

【0086】

細胞クローン、非ヒトトランスジェニック動物、又はトランスジェニック植物によって生産された抗体組成物内に存在する抗体の電荷アイソフォーム又は変異体はまた、クロマトグラフィー以外の技術を用いて分離され得る。しかし、これらの技術が電荷アイソフォーム又は変異体の分析又は特徴付けの目的で非常に有用である場合、それらはこれらのアイソフォームを許容可能な収量で分離することを可能にするものではなく、したがって、調製目的ではあまり用いられていない。

30

【0087】

このような他の技術のうち、特に、等電点電気泳動(「等電点電気泳動」の略で「IEF」と呼ばれ、またエレクトロフォーカシングとも呼ばれる)に言及することができる。

【0088】

等電点電気泳動(IEF)の基本的原理は、ゲル(場合によってキャピラリーに含まれている)において、電界にかけられたタンパク質が移動し得るpH勾配を生じさせることである。タンパク質はこの電界内を移動する。それらのpIに対応するpHに達すると、タンパク質は、それらの正味電荷がゼロになるため、固定される。この方法で、調製物のタンパク質をそれらのpIに従って分離することが可能である。このようなpH勾配は、特定の数の正又は負にイオン化可能な基(アミン、カルボキシル、又はスルフェート)を有し、特定の緩衝能力を有する、高分子電解質を用いて生じさせることが可能である。これらの分子は、両性電解質と呼ばれる。これらの両性電解質が、陽極では強酸の溶液によって、及び陰極では強塩基の溶液によって制限される電界にかけられると、それらは移動し、それらのpIに従って分布する。それらの緩衝能力によって、それらのpIに等しい小さなpH区域がそれらの

40

50

周りに維持される。特定のpH範囲を網羅するpIをそれぞれ有する一連の両性電解質は、したがって、連続的なpH勾配を生じさせる。その形成の後又は最中に、この系内の少量のタンパク質の移動が生じる場合、それらも移動し、それらのpIで固定される。

【0089】

ゲルのための不活性マトリクスとして、アガロース、アクリルアミド、又はより稀にはデキストランを用いることが可能であり、その中でpH勾配が形成される。ポリアクリルアミドゲルは最も多く用いられる。pIのみが移動に影響するため、多孔率が低分子タンパク質よりも高分子タンパク質を減速させる濃度ではないが、扱いが容易になるように十分に固体である、アクリルアミド濃度が用いられる必要がある。5~6%のゲルが通常適切である。

10

【0090】

陽極の緩衝液は強酸性であり、通常、リン酸である。陰極では強塩基が置かれ、トリエタノールアミンであることが多い。

【0091】

両性電解質が、ゲルのポリマー化の前にゲルを調製するための混合物に含まれる。高分子電解質であるこれらの分子は、電界内を移動し、それら自体のpIの順で並んで位置する。多くの企業が、非常に狭い又は非常に広いpH範囲を網羅する多くの両性電解質混合物を製造している:Ampholine(登録商標)(特に、Sigma Aldrich社によって販売されているAmpholine(登録商標)pH6/8及びAmpholine(登録商標)pH 7/9)、Pharmalyte(登録商標)(特に、Sigma Aldrich社、及びGE Healthcare, Life Sciences社によって特に販売されているPharmalyte(登録商標)pH 8/10.5)、BioLite(登録商標)(特に、Bio-Rad社によって販売されているBioLite(登録商標)pH 6/8、BioLite(登録商標)pH 7/9、及びBioLite(登録商標)pH 8/10)、Zoom(登録商標)(特に、Life Technologies/Invitrogen社によって販売されているZoom(登録商標)pH 6/9)、Servalyt(商標)(特に、Serva社によって販売されているServalyt(商標)pH 6/8、Servalyt(商標)pH 6/9、Servalyt(商標)pH 7/9)、SinuLyte(商標)(特に、Sinus社によって販売されているSinuLyte(商標)pH 6/8、SinuLyte(商標)pH 6/9、SinuLyte(商標)pH 7/9、SinuLyte(商標)pH 8/10)等。電圧が両電極の間かけられると、各両性電解質はその等電点の限り遠くに移動し、そこで固定される。様々なpH振幅を有する勾配が、様々な両性電解質を組み合わせることによって生じ得る。特に、抗体組成物内の電荷アイソフォームの分析では、勾配は、各両性電解質の間で、抗体の平均pIに集中した狭いpH範囲の、且つ異なるアイソフォームのpI範囲に対応する、非常に狭い間隔(例えば、0.1pH単位)を伴ってもたらされ得(例えば、pH6とpH8との間又はpH7とpH9との間)、異なる電荷アイソフォームの非常に細かい分離が可能になる。

20

30

【0092】

分析対象の抗体組成物は、ゲルのポリマー化の後に添加され得るか、又はポリマー化の前に混合物内に直接添加され得る。抗体は両性電解質よりも大きいため、抗体ははるかに遅く移動し、両性電解質はしたがって、抗体の実質的な移動のかなり前にそれらのpIで安定化し得る。

【0093】

移動時間は重要ではない。実際、抗体は、それらのpIに達するであろう点で固定されると、ゲルを離れる危険はない。移動のみが十分に長い時間にわたり続き、その結果、両性電解質は適切に移動する時間を有し、抗体はそれらのpIに達するための時間を有する。2mAでは、所要の時間は約1時間であると推定される。

40

【0094】

移動の後、ゲルは、抗体組成物内に存在する異なる電荷アイソフォームを分析するために着色され得る。着色は、標準的な電気泳動において用いられるあらゆる通常の方法によって達成され得る。しかし、両性電解質は、それらが着色され得てからゲルから除去されなくてはならない。したがって、通常、着色は、5又は10%のトリクロロ酢酸浴に漬けることによって、又は抗体をその場で固定しながらトリクロロ酢酸浴をゲルから拡散させることによって行われる。

50

【0095】

所与のpIを有するマーカーの使用によって、異なる電荷アイソフォームのpIを非常に具体的に決定することが可能になる。

【0096】

着色の後、アイソフォーム全体に対する、IEFで分離された各電荷アイソフォームの、分析された組成物における割合は、例えばBio-Rad社によって販売されているソフトウェアパッケージQuantity One(登録商標)等の、画像分析ソフトウェアパッケージによって定量され得る。

【0097】

抗体組成物内に存在する電荷アイソフォームを分離するためには非常に正確で感度が高いが、等電点電気泳動技術は、分離されたアイソフォームを容易に採取することを可能にするものではなく、したがって、異なるアイソフォームを分取する目的よりも分析及び定量の目的で通常は用いられる。

10

【0098】

本方法の工程c)において、薬剤として用いるための本発明に従った目的の組成物は、クロマトグラムの主要ピークに対応する、工程b)において得られた1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせることによって得られ、こうして得られたモノクローナル抗体組成物は前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークは、工程c)において得られた組成物のクロマトグラムの少なくとも85%、有利には少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、より有利には少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、又は更には少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%に相当する。

20

【0099】

有利には、本発明に従った薬剤として用いるための組成物において、組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%、有利には少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%は、C末端リシン残基をまったく含まない。

【0100】

本発明はまた、薬剤として用いるための組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%、有利には少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも98.5%、少なくとも99%、又は少なくとも99.5%がC末端リシン残基をまったく含まない、モノクローナル抗体組成物に関するものである。実際、組成物内に存在する抗体の塩基性アイソフォームは、C末端リシン残基を有する少なくとも1つの重鎖を有する。このような組成物は、したがって、主要アイソフォーム及び酸性アイソフォームを排他的に含む。塩基性アイソフォームはFc RIIIを介する及び補体を介するエフェクター機能についてそれほど活性ではなく(実施例を参照されたい)、精製の前に約8から20%に相当する(クロマトグラフィーによって測定される)ため、このような組成物は、塩基性アイソフォームを排除する前の組成物全体よりも強い、Fc RIIIを介するADCC応答及び応答CDCを誘発し得る。このような組成物は、上記のようなクロマトグラフィー分離によって得られ得るが、回収された画分は、このケースでは、酸性アイソフォーム及び主要アイソフォームの画分に対応する。

30

40

【0101】

上記の方法によって得られ得る、且つ薬剤として用いるための、抗体組成物は、特にADCCによる又はCDCによる標的細胞の破壊が治療に有用である場合、モノクローナル抗体で治療され得るあらゆる病理において用いられ得る。

【0102】

今日、ADCCが、癌を治療するため(Wallaceら、1994年、Veldersら、1998年、Cartronら、2002年、Ianelloら、2005年、Weinerら、2010年)、Rhマイナスの妊婦における同種免疫化を防ぐため(Beliardら、2008年)の抗体による受動免疫療法治療の臨床的効率に必須の

50

メカニズムであることが知られている。更に、ADCC応答はまた、ウイルス(Ahmadら、1996年、Miaoら、2009年)、細菌(Albrechtら、2007年、Casadevallら、2002年)、及び寄生体(Zeitlinら、2000年)に対する抗感染性応答において重要な役割を有することが知られている。更に、自己免疫疾患の背景では、新たな治療法は、攻撃の原因となる免疫細胞、例えばBリンパ球又はTリンパ球等を除去することを目的とし、ADCCはそこで、非常に重要な役割を有する(Edwardsら、2006年、Chanら、2010年)。

【 0 1 0 3 】

CDC応答はまた、様々な病理において、特に癌の治療において重要であることが知られている。

【 0 1 0 4 】

したがって、本発明に従った薬剤として用いるための組成物において、抗体は、有利には、健康なドナー細胞上に存在する非遍在的抗原、癌細胞の抗原、病原体に感染した細胞の抗原、又は免疫細胞の抗原に対するものである。

【 0 1 0 5 】

特に、以下の実施形態が好ましい:

- 抗体は抗Rhesus (D)抗体(特に、ロレズマブ(Roledumab)、アトロリムマブ(Atorolimab)、又はモロリムマブ(Morolimumab)、特にロレズマブ(Roledumab))であり、組成物はRhマイナスの個体における同種免疫化を予防するためのものである、
- 抗体は癌細胞の抗原に対するものであり、組成物は癌を治療するためのものである、
- 抗体は病原体に感染した細胞の抗原に対するものであり、組成物は前記病原性生物による感染の治療のためのものである、
- 抗体は免疫細胞の抗原に対するものであり、組成物は自己免疫疾患を治療するためのものである。

【 0 1 0 6 】

癌の治療の背景において、抗体は、特に、以下の抗原に対するものであり得る:CD20、Her2/neu、CD52、EGFR、EPCAM、CCR4、CTLA-4(CD152)、CD19、CD22、CD3、CD30、CD33、CD4、CD40、CD51(インテグリンアルファ-V)、CD80、CEA、FR-アルファ、GD2、GD3、HLA-DR、IGF1R(CD221)、ホスファチジルセリン、SLAMF7(CD319)、TRAIL-R1、TRAIL-R2。

【 0 1 0 7 】

更に具体的には、それらの治療的利益が知られている特異的(抗原/癌)対(この抗原特異性の抗体は言及された癌の治療について少なくとも1つの国で認可されているか、又は臨床試験が行われている)を以下のTable 1(表1)に示す。

【 0 1 0 8 】

10

20

30

【表 1 A】

Table 1.目的の特異的(抗原/癌)対

抗原	この抗原に対する抗体の例	この抗原特異性の抗体で治療され得る癌
CD20	リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、トシツモマブ、ベルツズマブ、ウブリツキシマブ (Ublituximab)	血液癌、特に、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、慢性リンパ球白血病、濾胞性リンパ腫
Her2/neu	トラスツズマブ、ペルツズマブ	固形癌、特に、乳癌、小細胞を伴わない肺癌、膵臓癌、前立腺癌、卵巣癌
CD52	アレムツズマブ	血液癌、特に、慢性リンパ球白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚又は末梢のT細胞リンパ腫
EGFR	セツキシマブ、パニツムマブ、フツキシマブ (Futuximab)、イムガツズマブ (Imgatuzumab)、マツズマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ザルツムマブ	固形腫瘍、特に、結腸直腸癌、頭頸部癌、肺癌、食道癌、胃癌、神経膠腫、退形成性星細胞腫、膠芽腫
EPCAM	エドレコロマブ、アデカツムマブ、ソリトマブ (Solitomab)	固形癌、特に、結腸直腸癌、前立腺癌、乳癌
CCR4	モガムリズマブ	血液癌、特に、成人T細胞白血病/リンパ腫
CTLA-4 (CD152 という名でも知られている)	イピリムマブ、トレメリムマブ (Tremelimumab)	固形腫瘍、特に、黒色腫、前立腺癌、膀胱癌
CD19	ブリナツモマブ (Blinatumomab)(CD19 及び CD3 の両方を標的化する)	血液癌、特に、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病、肺癌、消化管癌
CD22	エプラツズマブ	血液癌、特に、B細胞癌
CD3	オテリキシズマブ、テプリズマブ、ビジリズマブ	血液癌、特に、多発性骨髄腫
CD30	イラツムマブ	血液癌、特に、非ホジキンリンパ腫
CD33	リンツズマブ	血液癌、特に、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群
CD4	セデリズマブ、クレノリキシマブ、プリリキシマブ、ザノリムマブ	黒色腫、皮膚又は末梢のT細胞リンパ腫
CD40	ダセツズマブ、ルカツムマブ (Lucatumumab)、テネリキシマブ (Teneliximab)	血液癌、特に、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫
CD51 (インテグリン アルファ-V)	インテツムマブ (Intetumumab)	固形腫瘍

10

20

30

40

【表 1 B】

CD80	ガリキシマブ	血液癌、特に、B細胞リンパ腫
CEA	ラベツズマブ	固形腫瘍、特に、結腸直腸癌
FR-アルファ	ファーレツズマブ	卵巣癌
ガングリオシド GD2	3F8、TRBS07	神経芽細胞腫、黒色腫
ガングリオシド GD3	エクロメキシマブ (Ecomeximab)、ミツモマ ブ(Mitumomab)	黒色腫、小細胞を伴う肺癌
HLA-DR	アポリズマブ	血液癌
IGF1R (CD221)	シクスツムマブ (Cixutumumab)、フィギツ ムマブ、ロバツムマブ (Robatumumab)、ガニツマ ブ(Ganitumab)	固形腫瘍、特に、小細胞を伴わない肺 癌、副腎皮質癌腫、膵臓癌
ホスファチジル セリン	バビツキシマブ (Bavituximab)	固形腫瘍、特に、乳癌、小細胞を伴わ ない肺癌
SLAMF7 (CD319)	エロツズマブ	多発性骨髄腫
TRAIL-R1	マバツムマブ	固形腫瘍、特に、小細胞を伴わない肺 癌、結腸直腸癌、非ホジキンリンパ腫
TRAIL-R2	コナツムマブ (Conatumumab)、レクサツ ムマブ、ティガツズマブ	固形腫瘍、特に、乳癌、膵臓癌、結腸 直腸癌、小細胞を伴わない肺癌、卵巣 癌

10

20

【0110】

病原性生物による感染の治療の背景において、抗体は、特に、以下の抗原に対するものであり得る：クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)の抗原、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の抗原(特に、ClfA及びリポテイコ酸)、サイトメガロウイルスの抗原(特に、糖タンパク質B)、大腸菌(*Escherichia coli*)の抗原(特に、単位IIB下の志賀様毒素)、呼吸器合胞体ウイルスの抗原(特に、タンパク質F)、B型肝炎ウイルスの抗原、インフルエンザウイルスAの抗原(特に、血球凝集素)、血清型IATS O11の緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の抗原、狂犬病ウイルスの抗原(特に、糖タンパク質)、ホスファチジルセリン。

30

【0111】

更に具体的には、それらの治療的利益が知られている特異的(抗原/感染性疾患)対(この抗原特異性の抗体は言及された感染性疾患の治療について少なくとも1つの国で認可されているか、又は臨床試験が行われている)を以下のTable 2(表2)に示す。

【0112】

【表 2】

Table 2.目的の特異的(抗原/感染性疾患)対

抗原	この抗原に対する抗体の例	この抗原特異性の抗体で治療され得る感染性疾患
クロストリジウム・ディフィシルの抗原	アクトクスマブ、ベズロトクスマブ (Bezlotoxumab)	クロストリジウム・ディフィシル感染
黄色ブドウ球菌の CifA 抗原	テフィバズマブ (Tefibazumab)	黄色ブドウ球菌感染
サイトメガロウイルスの抗原	セビルマブ(Sevirumab)	サイトメガロウイルスによる感染
サイトメガロウイルスの糖タンパク質 B	レガビルマブ	サイトメガロウイルスによる感染
大腸菌の志賀様毒素、サブユニット IIB	ウルトキサズマブ	大腸菌、血清型 O121 による感染
呼吸器合胞体ウイルスのタンパク質 F	パリビズマブ、モタビズマブ	呼吸器合胞体ウイルスによる感染
B 型肝炎ウイルスの表面抗原	エクスピビルマブ (Exbivirumab)、リビビルマブ(Libivirumab)	B 型肝炎ウイルスによる感染
B 型肝炎ウイルスの抗原	ツビルマブ(Tuvirumab)	B 型肝炎ウイルスによる感染
インフルエンザ A ウイルスの血球凝集素	CR6261	インフルエンザ、特にスペイン風邪、及び H5N1
黄色ブドウ球菌のリポテイコ酸	パギバキシマブ	黄色ブドウ球菌感染、黄色ブドウ球菌による敗血症性ショック
ホスファチジルセリン	バビツキシマブ	C 型肝炎ウイルス、インフルエンザ A 及び B ウイルス、HIV 1 及び 2、風疹、呼吸器合胞体ウイルス、ピキンデウイルスによる感染
緑膿菌血清型 IATS O11 の抗原	パノバクマブ (Panobacumab)	緑膿菌による感染
狂犬病ウイルスの糖タンパク質	フォラビルマブ (Foravirumab)、ラフィビルマブ(Rafivirumab)	狂犬病ウイルスによる感染

10

20

30

【 0 1 1 3 】

自己免疫疾患の治療の背景において、抗体は、特に、以下の抗原に対するものであり得る：CD20、CD52、CD25、CD2、CD22、CD3、及びCD4。

【 0 1 1 4 】

更に具体的には、それらの治療的利益が知られている特異的(抗原/自己免疫疾患)対(この抗原特異性の抗体は言及された自己免疫疾患の治療について少なくとも1つの国で認可されているか、又は臨床試験が行われている)を以下のTable 3(表3)に示す。

40

【 0 1 1 5 】

【表 3】

Table 3.目的の特異的(抗原/自己免疫疾患)対

抗原	この抗原に対する抗体の例	この抗原特異性の抗体で治療され得る自己免疫疾患
CD20	リツキシマブ、オフアツムマブ、オクレリズマブ、トシツモマブ、ベルツズマブ、ウブリツキシマブ	関節リウマチ、血小板減少性紫斑病、エリテマトーデス、多発性硬化症
CD52	アレムツズマブ	多発性硬化症
CD25	ダクリズマブ、バシリキシマブ、イノリモマブ(Inolimomab)	ブドウ膜炎、多発性硬化症、乾癬、1型糖尿病、潰瘍性大腸炎
CD2	シプリズマブ	乾癬
CD22	エプラツズマブ	エリテマトーデス
CD3	オテリキシズマブ、テブリズマブ、ビジリズマブ	1型糖尿病、潰瘍性大腸炎、クローン病
CD4	セデリズマブ、クレノリキシマブ、プリリキシマブ、ザノリムマブ	関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、乾癬

10

【0116】

本発明に従った薬剤として用いるための抗体組成物は、特に、上記に詳述した多くのシナリオを含む、ADCC応答を用いる治療法のためのものである。したがって、これらの抗体がまたFc RIII受容体を介するインビボでのADCC応答を可能な限り強く誘発するための他の手段によって最適化されていることが有利である。したがって、本発明に従った薬剤として用いるための組成物における有利な実施形態において、抗体は、Fc RIII受容体へのその結合及びFc RIII受容体を介するそのエフェクター特性を増強させるFc断片の修飾を含む。

20

【0117】

Fc RIII受容体を介するADCC活性を最適化するための2つの主な手段が、今のところ記載されている：

- WO00/42072、Shieldsら、2001年、Lazarら、2006年、WO2004/029207、WO/2004063351、WO2004/074455において特に記載されているような、Fc断片の特定のアミノ酸残基での少なくとも1つの変異の挿入。
- Fc断片における各重鎖のAsn297残基に付着したN-グリカンの性質の最適化。

30

【0118】

したがって、有利な実施形態において、本発明に従った薬剤として用いるための組成物は、その残基が、WO00/42072、Shieldsら、2001年、Lazarら、2006年、WO2004/029207、WO/2004063351、WO2004/074455において記載されているように、Fc RIII受容体への結合を増強させるためのFc断片の少なくとも1つのアミノ酸残基で修飾されている、モノクローナル抗体を含む。

【0119】

特に、Fc RIII受容体への親和性及びこの受容体を介するADCCを誘発する能力の増大を可能にするものとして、Fcの以下の位置での変異が記載された：219、222、224、239、247、256、267、270、283、280、286、290、294、295、296、298、300、320、326、330、332、333、334、335、339、360、377、396。

40

【0120】

更に具体的には、Fc RIII受容体への親和性及びこの受容体を介するADCCを誘発する能力の増大を可能にするものとして、以下の置換が記載された：S219Y、K222N、H224L、L234E、L234Y、L234V、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239D、S239T、V240I、V240M、P247L、T256A、T256N、V264I、V264T、V266I、S267A、D270E、D280A、D280K、D280H、D280N、D280T、D280Q、D280Y、V282M、E283Q、N286S、K290A、K290Q、K290S、K290E、K290G、K290D

50

、K290P、K290N、K290T、K290S、K290V、K290T、K290Y、E294N、Q295K、Y296W、S298A、S298N、S298V、S298D、S298E、Y300I、Y300L、K320M、K320Q、K320E、N325T、K326S、K326N、K326Q、K326D、K326E、A330K、A330L、A330Y、A330I、I332E、I332D、E333A、E333Q、E333D、K334A、K334N、K334Q、K334S、K334E、K334D、K334M、K334Y、K334H、K334V、K334L、K334I、T335E、T335K、A339T、K360A、F372Y、I377F、V379M、P396H、P396L、D401V

【 0 1 2 1 】

目的の変異の組み合わせには、E333A/K334A、T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K334A、S298A/E333A/K334A、S267A/D280A(WO00/42072)、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L(Lazarら、2006年)、V264I/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239N/I332E、S239Q/I332D、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、S239E/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E(WO2004/029207)が含まれる。

10

【 0 1 2 2 】

或いは、又は更に、本発明に従った薬剤として用いるためのモノクローナル抗体組成物は、低フコース含有量を含む。「フコース含有量」は、各抗体の各重鎖のFc断片のAsn297残基に付着したN-グリカン内のフコシル化形態のパーセンテージを意味する。「低フコース含有量」は、65%以下のフコース含有量を意味する。実際、今日では、抗体組成物のフコース含有量が、この組成物の、FcRIII受容体を介する強力なADCC応答を誘発する能力において重要な役割を有することが知られている。有利には、フコース含有量は、65%以下、好ましくは60%、55%、若しくは50%以下、又は更には45%、40%、35%、30%、25%、若しくは20%以下である。しかし、フコース含有量がゼロである必要はなく、フコース含有量は、例えば、5%、10%、15%、又は20%以上であり得る。フコース含有量は、例えば、5と65%との間、5と60%との間、5と55%との間、5と50%との間、5と45%との間、5と40%との間、5と35%との間、5と30%との間、5と25%との間、5と20%との間、10と65%との間、10と60%との間、10と55%との間、10と50%との間、10と45%との間、10と40%との間、10と35%との間、10と30%との間、10と25%との間、10と20%との間、15と65%との間、15と60%との間、15と55%との間、15と50%との間、15と45%との間、15と40%との間、15と35%との間、15と30%との間、15と25%との間、15と20%との間、20と65%との間、20と60%との間、20と55%との間、20と50%との間、20と45%との間、20と40%との間、20と35%との間、20と30%との間、20と25%との間に含まれ得る。

20

30

【 0 1 2 3 】

抗体組成物は、更に、異なるタイプのグリコシル化(オリゴマンノース型又は二分岐複合型のN-グリカンであり、二分岐複合型のN-グリカンのケースでは、様々な割合のバイセクティングN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基又はガラクトース残基を伴う)を有し得るが、それは、それらが低フコース含有量を有する限りにおいてである。したがって、オリゴマンノース型のN-グリカンは、異なるグリコシル化阻害剤、例えば1,2-マンノシダーゼIの阻害剤(デオキシマンノジリマイシン又は「DMM」のような)若しくはβ-グルコシダーゼ(カスタノスペルミン又は「Cs」のような)の存在下で培養することによって、又はCHO Lec 1系において抗体を生産することによって、得られ得る。トランスジェニックヤギの乳における生産によってもまた、主要なN-グリカンがオリゴマンノース型のものであり、少数が、1つ又は2つのガラクトースを伴いかなるバイセクティングGlcMAcもシアリル化(G1F又はG2F)も伴わない、フコシル化された二分岐複合形態を形成する、抗体が得られる(WO2007048077A2を参照されたい)。二分岐複合型のN-グリカンは、ほとんどの哺乳動物細胞において得られ得るが、グリコシル化機構が修飾されている細菌、酵母、又は植物においても得られ得る。フコース含有量を制限するために、Fc断片に結合したGlcNAcへのフコースの付加をもたらす酵素FUT8(1,6-フコシルトランスフェラーゼ)の活性が元々低い細胞系、例えば細胞系YB2/O、アヒル胚細胞系EB66(登録商標)、又はラット肝臓癌細胞系H

40

50

4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)が用いられ得る。GDP-フコースの合成が低減しているCHO細胞系の変異体であるCHO Lec13細胞系のような、他の遺伝子の変異しておりその低発現又は過剰発現が低フコース含有量をもたらす細胞系もまた用いられ得る。目的の細胞系を選択すること、及びN-グリカンのフコシル化経路に關与するタンパク質(特にFUT8(Yamane-Ohnukiら、2004年を参照されたい)であるが、GDP-フコースの輸送に關与する遺伝子であるGMDもある(Kandaら、2007年を参照されたい))の発現を低下させるか又は無効にする(特に、干渉RNAを用いることによって、又は目的のタンパク質を発現する遺伝子の変異若しくは欠失によって)ことも可能である。目的の細胞系の選択、及び、タンパク質GnTIII((1,4)-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII)のような、N-グリカンのフコシル化に何らかの形で干渉するタンパク質の過剰発現には、別の選択肢が存在する。特に、わずかにフコシル化されたN-グリカンを有する抗体が、

- YB2/0(EP1176195A1、WO01/77181、Shinkawaら、2003年を参照されたい)、CHO Lec13(Shieldsら、2002年を参照されたい)、EB66(登録商標)(Olivierら、2010年を参照されたい)、又はラット肝臓癌系H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)(WO2012/041768を参照されたい)における生産、

- FUT8(Moriら、2004年、Suzukiら、2007年、Cardarelliら、2009年、Cardarelliら、2010年、Herbstら、2010年)、又はGMD(ゴルジ装置におけるGDPフコースの輸送体をコードする遺伝子、Imai-Nishiyaraら、2007年を参照されたい)に対する低分子干渉RNAの存在下での野生型CHO細胞系の生産、

- 1,6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子FUT8の2つの対立遺伝子が欠失している(Yamane-Ohnukiら、2004年)か、又はゴルジ装置におけるGDP-フコースの輸送体をコードするGMD遺伝子の両対立遺伝子が欠失している(Kandaら、2007年)、CHO細胞系における生産。

- 酵素GnTIII((1,4)-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII)をコードする遺伝子が遺伝子導入によって過剰発現したCHO細胞系における生産(Umanaら、1999年)。低フコシル化に加えて、得られたN-グリカンは、高い含有量のバイセクティングGlcMAcを特徴とする。

- 低分子干渉RNAの使用によって 1,2-キシロース残基及び 1,3-フコース残基の含有量が大きく低減したトランスジェニック植物(ベンサムアナタバコ(N. benthamiana))における生産(Forthalら、2010年)、

【0124】

オリゴマンノース型のN-グリカンは、二分岐複合型のN-グリカンと比較してインビボでの半減期が低減している。その結果、有利には、組成物内に存在する抗体は、Fc断片のN-グリコシル化部位上に、上記に定義した低フコース含有量の二分岐複合型のグリカン構造を有する。

【0125】

特に、モノクローナル抗体組成物は、60%を超えるG0+G1+G0F+G1F形態の含有量、及び上記に定義した低フコース含有量を有し得る。モノクローナル抗体組成物はまた、65%を超えるG0+G1+G0F+G1Fの含有量、及び上記に定義した低フコース含有量を有し得る。モノクローナル抗体組成物はまた、70%を超えるG0+G1+G0F+G1Fの含有量、及び上記に定義した低フコース含有量を有し得る。モノクローナル抗体組成物はまた、75%を超えるG0+G1+G0F+G1Fの含有量、及び上記に定義した低フコース含有量を有し得る。モノクローナル抗体組成物はまた、80%を超えるG0+G1+G0F+G1Fの含有量、及び上記に定義した低フコース含有量を有し得る。モノクローナル抗体組成物はまた、60%、65%、70%、75%、又は80%を超えるG0+G1+G0F+G1Fの含有量、及び50%未満のG0F+G1F形態の含有量を有し得る。形態G0、G1、G0F、及びG1Fは、以下に定義する。

【0126】

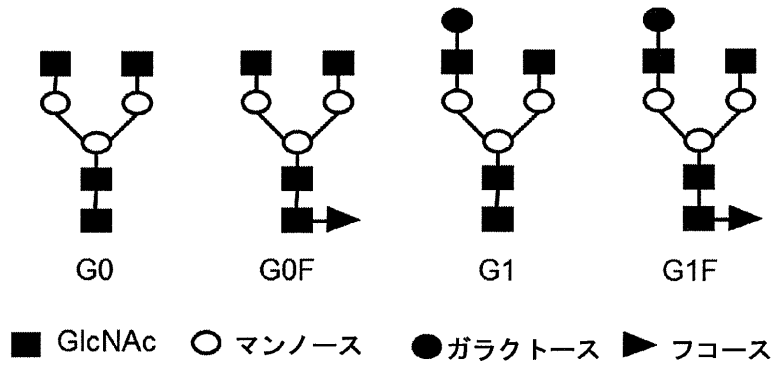
10

20

30

40

【化1】



10

【0127】

このような抗体組成物は、特に、YB2/0における生産、CHO Lec13における生産、FUT8又はGMDに対する低分子干渉RNAの存在下で培養された野生型CHO細胞系における生産、1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子FUT8の両対立遺伝子又はゴルジ装置におけるGDP-フコースの輸送体をコードする遺伝子GMDの両対立遺伝子が欠失しているCHO細胞系における生産によって得られ得る。

【0128】

本発明に従った薬剤として用いるための抗体組成物はまた、CDC応答を伴う治療法のためのものである。したがって、Fc RIIIを介する活性を増大させる修飾に加えて、又はそれに代えて、これらの抗体がまたタンパク質C1qを介するインビボでのCDC応答を可能な限り強く誘発するための他の手段によって最適化されていることが有利であり得る。したがって、本発明に従った薬剤として用いるための組成物における有利な実施形態において、抗体は、タンパク質C1qへのその結合、及び補体を介するそのエフェクター特性を増強させるFc断片の修飾を含む。

20

【0129】

このような変異は、特に、文献WO2004074455A2、Idusogieら、2001年、Dall'Acquaら、2006年(b)、及びMooreら、2010年において記載されている。

【0130】

本発明はまた、所与の抗体に対するモノクローナル抗体組成物の、Fc RIII(CD16)受容体を発現する免疫系のエフェクター細胞による、前記抗原を発現する標的細胞の抗体依存性の細胞傷害性(ADCC)を誘発する能力を増大させるための、クロマトグラフィー分画工程の使用に関する。

30

【0131】

このようにして得られた組成物は、Fc RIII(CD16)受容体を発現する免疫系のエフェクター細胞、特にナチュラルキラー細胞(又はNK細胞)による、目的の抗原を発現する標的細胞のADCCを誘発する能力が向上している。好ましくは、以下の式によって定義される、主要ピークのアイソフォームに富んだ組成物及び分画前の組成物で得られるADCCレベルの比率Rは、少なくとも1.15(少なくとも15%のADCCレベルの増大に対応する)、有利には少なくとも1.16、少なくとも1.17、少なくとも1.18、少なくとも1.19、より有利には少なくとも1.20、少なくとも1.25、少なくとも1.30、少なくとも1.35、少なくとも1.40、少なくとも1.45、又は更には少なくとも1.50(少なくとも50%のADCCレベルの増大に対応する)である。

40

【0132】

【数1】

$$R = \frac{\text{主要ピークのアイソフォームに富んだ組成物で得られた ADCC レベル}}{\text{分画前の組成物で得られた ADCC レベル}}$$

50

【0133】

本発明はまた、所与の抗体に対するモノクローナル抗体組成物の、補体による、前記抗原を発現する標的細胞の補体依存性の細胞傷害性(CDC)を誘発する能力を増大させるための、クロマトグラフィー分画工程の使用に関する。

【0134】

このようにして得られた組成物は、目的の抗原を発現する標的細胞の補体による溶解を誘発する能力が向上している。好ましくは、以下の式によって定義される、主要ピークのアイソフォームに富んだ組成物及び分画前の組成物で得られるCDCレベルの比率Rは、少なくとも1.15(少なくとも15%のCDCレベルの増大に対応する)、有利には少なくとも1.16、少なくとも1.17、少なくとも1.18、少なくとも1.19、より有利には少なくとも1.20、少なくとも1.25、少なくとも1.30、少なくとも1.35、少なくとも1.40、少なくとも1.45、又は更には少なくとも1.50(少なくとも50%のCDCレベルの増大に対応する)である。

10

【0135】

【数2】

$$R = \frac{\text{主要ピークのアイソフォームに富んだ組成物で得られた CDC レベル}}{\text{分画前の組成物で得られた CDC レベル}}$$

【0136】

上記の両使用において、クロマトグラフィー分画工程は、本発明に従った薬剤として用いるための主要アイソフォームに富んだ抗体組成物を得るための、上記のあらゆる方法で行われ得る。特に、分画は、以下のクロマトグラフィー技術の1つによって行われ得る：

20

- 溶離態様(イオン力勾配、pH勾配、pH及びイオン力勾配、置換分子)に関わらず、イオン交換クロマトグラフィー、
- クロマトフォーカシング、
- 疎水性相互作用クロマトグラフィー。

【0137】

CD16を発現するエフェクター細胞を介するADCC又はCDC応答の能力を増大させることを目的としてこのようなクロマトグラフィー分画工程が行われるモノクローナル抗体組成物は、上記のあらゆるモノクローナル抗体組成物であり得る。特に、組成物内に存在するモノクローナル抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体であり得る。

30

【0138】

これはまた、あらゆるタイプの抗原、特に上記の抗原に対するものであり得る。特に、標的細胞が癌細胞である場合、抗体は、癌細胞抗原に対するもの、特に、癌治療の背景で上記に記載された抗原の1つに対するものであり得る。標的細胞が病原体に感染した細胞である場合、抗体は、感染細胞の抗原に対するもの、特に、感染性疾患の治療の背景で上記に記載された抗原の1つに対するものであり得る。標的細胞が自己免疫疾患の発症に關与する免疫細胞である場合、抗体は、これらの免疫細胞の抗原に対するもの、特に、自己免疫疾患の治療の背景で上記に記載された抗原の1つに対するものであり得る。

【0139】

40

クロマトグラフィー分画工程(工程a)の後、好ましくは、クロマトグラム主要ピークに対応する得られたクロマトグラフィー画分を組み合わせる工程(工程b)が行われ、こうして得られたモノクローナル抗体組成物は前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークは、工程b)において得られた組成物のクロマトグラムの少なくとも85%に相当する(分画及び目的のクロマトグラフィー画分の組み合わせの後)。

【0140】

以下の実施例は、本発明の実例に対応する。

【実施例】

【0141】

(実施例1)

50

抗CD20抗体組成物の電荷アイソフォームの精製画分の調製、アイソフォーム及びそれらのエフェクター特性の特徴付け

設備及び方法

抗CD20抗体組成物

分離及び分析の全ては、クローンYB2/0によって生産された抗CD20抗体組成物のバッチに対して行った。

【0142】

クロマトフォーカシングによる電荷アイソフォームの分離

同一の抗体組成物の電荷アイソフォーム3回の分取を、クロマトフォーカシングによって行った。

【0143】

陰イオン交換樹脂Mono P 5/200 GLを用いた。20mgの塩析されたタンパク質を各分離で注入した。溶離を、2つの以下の緩衝液を用いることによって、低下pH勾配(pH9.5から8.0)によって行った。

- 緩衝液A:ジエタノールアミン25mM、
- 緩衝液B:polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5。

【0144】

分離の溶離液を2mLの画分内に回収した。目的の画分は、画分33から50である。

【0145】

3回の分離の画分を、分析のために濃縮した。

【0146】

分離1(S1)を、画分が濾過によって無菌となり得るように、特定の濃縮にかけた。

- 1mLの容積を得るための、Amicon Ultra 10kDaでの画分の濃縮
- 滅菌濾過
- 濃度を測定するためのアリコート及び活性を測定するためのアリコートの試料採取

【0147】

陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)による電荷アイソフォームの分離

電荷アイソフォームの11回の分離を、上昇pH勾配による溶離を伴う陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)によって行った。

【0148】

陽イオン交換樹脂SCX(MabPac SCX 10.4 x 250mm、Dionex社)を30 で用いた。溶離を、以下の緩衝液の両方を用いることによって、上昇pH勾配(pH6から10)によって行った:

- 緩衝液A:20mMのNaH₂PO₄、60mMのNaCl(pH6)、
- 緩衝液B:20mMのNaH₂PO₄、60mMのNaCl(pH10)。

【0149】

勾配は、60分以内に10%から60%の緩衝液B、という方法で得た。

【0150】

分離の溶離液を画分内に回収した。目的の画分は、画分1から20である。

【0151】

BIACOREによるCD16受容体への結合の分析

Biacore T100系(GE Healthcare社)でSPR(「表面プラズモン共鳴」)技術を用いることによって、抗体組成物の受容体CD16aへの結合能力を測定するための方法が開発された。可溶性受容体CD16aを、アミンカップリングを用いることによって検出チップ上に固定した。1つのフローセルを抗体に使用し、他のフローセルはバックグラウンドノイズを差し引くために空のままとする。抗体を3つの濃度で注入し、動態パラメータを、会合相と解離相との両方への結合率を各濃度について得ることによって推定する。共鳴単位(RU)で表されるSPRシグナルは、受容体での抗体の会合及び解離に相当する。

【0152】

CD16を介するエフェクター細胞の活性化(CD16 Jurkat試験)

異なる電荷アイソフォームを含む、クロマトフォーカシング及び陽イオン交換クロマト

10

20

30

40

50

グラフィー (CEX) によって分離された様々な画分の、CD16受容体 (Fc RIII) を介するエフェクター細胞の応答を誘発する能力を試験した。

【 0 1 5 3 】

用いた試験は以下のものである：

抗体をWIL-2-S細胞 (正のCD20標的細胞) 及びCD16 Jurkat細胞 (エフェクター細胞) (遺伝子型CD16FF) と共にインキュベートする。CD16 Jurkat細胞によって分泌されたサイトカイン (IL-2) の量をELISAによって測定した。

【 0 1 5 4 】

更に具体的には、96ウェルプレート内で、以下のものを混合する：

- 抗体: 50 μ l の、IMDM 5% FCS内で0.156から10ng/mlの範囲の希釈物
- PMA: 50 μ l の、IMDM 5% FCS内で40ng/mlの希釈物 (すなわち、2ng PMA/50 μ l)
- WIL-2-S細胞: IMDM 5% FCS内で 6×10^5 /mlで50 μ l (すなわち、 30×10^3 細胞/50 μ l)
- CD16 Jurkat: IMDM 5% FCS内で 10×10^6 /mlで50 μ l (すなわち、 500×10^3 細胞/50 μ l)

10

【 0 1 5 5 】

2つの対照を用いる：いかなる標的細胞も有さない陰性対照、及び最大活性を有する陽性対照：

いかなる細胞も有さない陰性対照は、ウェル当たり以下のように添加する：

- 50 μ l のCD16 Jurkat細胞を 10×10^6 細胞/mlで (すなわち、 500×10^3 細胞/50 μ l)
- 50 μ l のPMAを40ng/mlで (すなわち、2ng PMA/50 μ l)
- 50 μ l の抗体を最大濃度で
- 50 μ l のIMDM培地+5%FCS

20

最大活性陽性対照を、ウェル当たり以下のように添加する：

- 50 μ l のCD16 Jurkat細胞を 10×10^6 細胞/mlで (すなわち、 500×10^3 細胞/50 μ l)
- 50 μ l のPMAを40ng/mlで (すなわち、2ng PMA/50 μ l)
- 50 μ l のイオノマイシンを5 μ g/mlで
- 50 μ l のIMDM培地+5%SVF

【 0 1 5 6 】

穏やかに攪拌し、 37 ± 0.5 で一晩インキュベートする

細胞を1分、125gでデカントする

160 μ l の上清を丸底の96ウェルプレート内に移す

再び、細胞を1分、125gでデカントする

上清内のIL-2を定量する。450nmで読み取る。

各試料のCD16活性 (IL-2の分泌) を参照試料のCD16活性に対するパーセンテージで表す。

30

【 0 1 5 7 】

補体依存性の細胞傷害性 (CDC)

標的細胞Wil2-Sを、10%のFCSを有する補体除去されたIMDM培地 (培地I10) 内で培養する。これらを、週に2回、フラスコF175内に、 0.2×10^6 細胞/mlで、100mlの培地内に移植する。試験を24から72時間まで、移植された細胞に対して行い、補体除去された培地IMDM+5%FCS (培地I5) 内で 1×10^6 細胞/mlで再開する。

【 0 1 5 8 】

ヒト血清 (全血の凝固によって得られたヒト血清AB) を、それを用いる日に解凍する。解凍は+4で行う。解凍後、血清を培地I5内で1/2に希釈する。

40

【 0 1 5 9 】

CellTiter-Blue (登録商標) (Promega社) を-20 で保存し、使用前に室温で解凍させておく。

【 0 1 6 0 】

研究対象の抗体の濃度は、15培地内で1 μ g/mlに調整する。

【 0 1 6 1 】

U型の底の96ウェルプレート内に、以下のものを添加する：

- 50 μ l の標的細胞 (1×10^6 細胞/mlのWil2S)

50

- 50 μ l の試験対象の抗体
- 50 μ l の1/2希釈されたヒト血清。

【0162】

細胞は 1×10^6 細胞/mlに調整した後にプレート内に直接置き、37 に置く。

【0163】

細胞を5分インキュベートし、試料を、血清を入れる前に37 で攪拌する。

【0164】

いかなる細胞も有さない(C-)及び抗体を有する(AC-)、2つの対照を作製する。不在の要素を15培地で置き換える。

【0165】

それらを、37 で2時間、攪拌しながらインキュベートする。次いで、30 μ lのCellTiter-Blue(登録商標)を各ウェルに添加し、添加の際にリバースピペティングすることによってホモジナイズを行い、インキュベーションを、攪拌しながら、37 で3時間30分行う。

【0166】

インキュベーションの最後に、25 μ lの3%SDSを添加して反応を停止及び安定化させることによって、読み取りを翌日まで延期することができる。次いで、プレートを室温で維持する。

【0167】

インキュベーションの最後又は翌日、プレートを125gで2分遠心分離する。100 μ lの各ウェルを試料採取し、次いで、透明な底を有する黒色のオプティカルプレート内に、プレートを平らに保ちながら分配する。

【0168】

プレートの読み取りは、以下のパラメータを用いて、蛍光リーダーで行う：

- 励起:530/25nm
- 発光:590/20nm
- プレートの底を介する読み取り(FOND)
- 組み込み時間:20 μ 秒
- フラッシュ数:25
- ゲイン:いかなる抗体も含有しない対照ウェル(細胞+血清+15培地)において採取されたウェルから計算される
- 軌道モードで強度2で15秒の攪拌

【0169】

質量分析によるアイソフォームの特徴付け

クロマトフォーカシング又は陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)によって分離された様々な画分内に存在する様々な電荷アイソフォームを、Chevreux、2011年において記載されているような質量分析によって分析した。

【0170】

この方法は、細菌プロテアーゼシステイン(IdeS、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)の免疫グロブリンを分解する酵素)の使用を含み、これは、IgGをそれらの結合メインの元で特異的に切断し、重鎖をVH-CH1ドメイン及びCH2-CH3ドメインからそれぞれなる25kDaの2つの断片に切断する。断片を、アセトニトリル勾配を用いる液体クロマトグラフィーによって分離し、以下の手順によって、質量分析において分析する。

【0171】

クロマトフォーカシング又はCEXによって精製された100 μ gの画分を凍結乾燥し、20 μ l消化緩衝液(50mMの NaH_2PO_2 及び150mMのNaCl、pH6.30)内で再溶解し、そして、100IUのIdeS酵素を酵素キット(FabRICATORキット、Genovis社、ルンド、スウェーデン)の指示に従って添加した。調製物を、加水分解を向上させるために、50Wの出力のマイクロ波アシストを用いて(CEM Discover System、CEM社、マッシュューズ、ノースカロライナ州、アメリカ合衆国)、37 で1時間インキュベートした。次に、25 μ lの変性緩衝液(8Mの尿素及び0.4Mの

10

20

30

40

50

NH₄HCO₃、pH8.0)を添加し、その後、5 μlの250mMジチオスレイトール(DTT)溶液を添加した。試料を、タンパク質を確実に完全に還元するために、50Wの出力のマイクロ波アシストを用いて、50 で20分インキュベートし、それを次いで、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)によって分析した。

【 0 1 7 2 】

20 μgの量に対応する反応混合物のアリコート、70 に平衡化された逆相ProSphere C 4カラム(150×2.1mm、5 μm、Alltech社)に、350 μl/分の流量で注入した。逆相クロマトグラフィーを、超高性能液体クロマトグラフィー系(UPLC、Acquity UPLC、Waters社、ミルフォード、マサチューセッツ州、アメリカ合衆国)を用いて行った。勾配を、0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を移動相Aとして、及び0.1%のTFAを含むアセトニトリルを移動相Bとして用いて生じさせた。10%のBで5分の定組成溶離の後、Bを5分間で27%まで増大させ、次いで、更に10分間で40%まで増大させた。カラムを次いで90%のBで3分洗浄し、10%のBで2分再平衡化し、25分の全所要時間となった。

10

【 0 1 7 3 】

溶離された種を、次いで、500から3000m/zの陽イオンモードで操作する質量分析計QSTAR R(QSTAR XL、Applied Biosystems社、トロント、カナダ)で分析し、製造者によって記載された手順に従って、レニンについて校正した。

【 0 1 7 4 】

結果

クロマトフォーカシングによる電荷アイソフォームの分離

20

3回の分離のクロマトグラムを図1に示し、これは、これらが完全に重ね合わされ得ることを示し、したがって、クロマトフォーカシングによる分離方法の再現性を実証している。陰イオン交換樹脂及び低下pH勾配の使用によって、塩基性アイソフォームがまず溶離され、その後、主要アイソフォームが、次いで酸性アイソフォームが溶離される。

【 0 1 7 5 】

33から50の画分を、それらの生化学的特性及びエフェクター特性についてのその後の分析のために回収した。

【 0 1 7 6 】

陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)による電荷アイソフォームの分離

電荷アイソフォームの陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)による11の分離のクロマトグラムを図2に示す。陽イオン交換樹脂の使用によって、酸性アイソフォームがまず溶離され、その後、主要アイソフォームが、次いで塩基性アイソフォームが溶離される。

30

【 0 1 7 7 】

精製の効率を調べるために、ピーク4(P4、主要ピーク)をCEXにおいて再分析した。CEXでの分離の前後に得られた酸性アイソフォーム、主要アイソフォーム、及び塩基性アイソフォームのパーセンテージを図3及び以下のTable 4(表4)に示し、これらのパーセンテージは、主要ピークの精製の効率を明らかに示す。

【 0 1 7 8 】

【表 4】

Table 4.CEXでの分離の前後に得られた酸性アイソフォーム、主要アイソフォーム、及び塩基性アイソフォームのパーセンテージ

40

試料	酸性形態	主要ピーク	塩基性形態
分離前	12.6 %	58.7 %	28.7 %
分離後	3.5 %	93.4 %	3.1 %

【 0 1 7 9 】

BIACOREによるCD16受容体への結合の分析

異なる電荷アイソフォームを含む、陽イオン交換クロマトグラフィーによって分離された様々な画分の、受容体CD16への結合能力を試験した。

50

【 0 1 8 0 】

結果を図4に示し、この結果は、酸性形態(P1からP3)及びピーク7(P7)では親和性が失われたが、他の塩基性形態(P6、P8)では失われなかったことを示す。

【 0 1 8 1 】

CD16を介するエフェクター細胞の活性化(CD16 Jurkat 試験)

異なる電荷アイソフォームを含む、クロマトフォーカシング及び陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)によって分離された様々な画分の、CD16受容体(Fc RIII)を介するエフェクター細胞の応答を誘発する能力を試験した。

【 0 1 8 2 】

結果を図5(CEX)、及び以下のTable 5(表5)(クロマトフォーカシングによる分離)に示す。

10

【 0 1 8 3 】

各ケースにおいて、主要アイソフォームに対応する画分がCD16 Jurkat細胞の活性化を誘発し、それが酸性アイソフォーム又は塩基性アイソフォームを含む画分の活性化よりも有意に大きいことが観察される。

【 0 1 8 4 】

したがって、様々な電荷アイソフォームの、CD16を介してエフェクター細胞を活性化する能力は大きく変化し、主要アイソフォームは、他のアイソフォームと比較して有意に向上した、CD16を発現するエフェクター細胞を活性化する能力を有する。

【 0 1 8 5 】

抗体組成物の存在下で受容体CD16をトランスフェクトされたJurkat細胞による分泌されたIL-2の量を測定する上記の試験は、この抗体組成物の、CD16を発現するエフェクター細胞によってADCCを誘発する能力を代表するものであることが示された(WO2004/024768)。したがって、以下のTable 4(表4)からTable 6(表6)に示す結果は、精製前のクロマトフォーカシング又はCEXの主要ピークに対応する精製画分が、他のアイソフォームと比較して、また全てのアイソフォームを含む組成物全体と比較して、CD16を発現するエフェクター細胞を介してADCCを誘発する能力が有意に向上していることを示す。

20

【 0 1 8 6 】

【表 5】

Table 5.参照組成物と、分離前の組成物全体と、クロマトフォーカシングによる分離から得られた画分F36(塩基性アイソフォーム)、F39(主要アイソフォーム)、並びにF43、F44、F48、F49、及びF50(次第に強くなる酸性アイソフォーム)とによる、CD16 Jurkat細胞の活性化。

30

試料	CD16 Jurkat の活性 (参照組成物に対する%)
参照組成物	100%
分離前の組成物全体	80%
F36 (塩基性アイソフォーム)	62%
F39 (主要アイソフォーム)	96%
F43 (酸性アイソフォーム)	59%
F44 (酸性アイソフォーム)	71%
F48 (酸性アイソフォーム)	27%
F49 (酸性アイソフォーム)	38%
F50 (酸性アイソフォーム)	17%

40

【 0 1 8 7 】

補体依存性の細胞傷害性(CDC)

異なる電荷アイソフォームを含む、陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)によって分離された様々な画分の、補体依存性の細胞傷害性応答(CDC)を誘発する能力を測定した。

【 0 1 8 8 】

結果をTable 6(表6)に示し、これは、酸性形態(P1:37%、P2:52%、及びP3:69%)及び塩基

50

性形態 (P5:45%、P6=K1:64%、P7:35%、及びP8=K2:49%)で、主要ピーク (P4)と比較して、活性が大きく失われていることを示す。主要アイソフォーム (P4)に対応するピークは、したがって、酸性アイソフォーム又は塩基性アイソフォームを含む画分よりも有意に大きいCD C応答を誘発する。

【0189】

質量分析によるアイソフォームの特徴付け

クロマトフォーカシングによって精製された画分及びCEXによって精製された画分をLC-MSによって分析して、N末端リシンを有する又は有さない重鎖のパーセンテージを特徴付けした。

【0190】

分離前の主要ピークに対応する、クロマトフォーカシングによって精製された画分及びCEXによって精製された画分では、分析は、重鎖の95%超がC末端リシンをまったく含まないことを示した。

【0191】

結論

上記に示された結果は、イオン交換クロマトグラフィー (CEX)又はクロマトフォーカシングによる分離の主要ピークに対応する抗体組成物の電荷アイソフォームが、同一の抗体組成物の酸性アイソフォーム又は塩基性アイソフォームよりも、受容体Fc RIII (CD16)を介して、また補体を介してエフェクター細胞を活性化する能力が有意に大きいことを示す。

【0192】

この主要ピークに対応する精製画分の使用は、したがって、ADCC又はCDC応答が重要な役割を有する、モノクローナル抗体によって治療される病理の範囲内で、例えば特に、同種免疫化の予防、又は癌、感染性疾患、及び自己免疫疾患の治療の範囲内で、CD16 (ADCC、サイトカインの分泌)を介するエフェクター特性のさらなる増大を可能にする。

(参考文献)

10

20

- Ahmad et al. *FASEB J.* 1996. 10:258–266.
- Albrecht MT, et al. *INFECTION AND IMMUNITY*, Nov. 2007, p. 5425–5433.
- Almagro et al. *Frontiers in Bioscience* 13, 1619–1633, January 1, 2008.
- Antes B, et al. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 1;852(1–2):250–6.
- Beliard R et al. *Br J Haematol.* 2008 Apr;141(1):109–19.
- Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993);
- Cardarelli et al. *Clin Cancer Res* 2009 April 28;15:3376–3383, 10
- Cardarelli et al. *Cancer Immunol Immunother.* 2010. 59. 257–265,
- Cartron G, et al. *Blood.* 2002 Feb 1;99(3):754–8.
- Casadevall A. et al. *Emerg Infect Dis.* 2002 Aug;8(8):833–41;
- Chan AC, et al. *Nat Rev Immunol.* 2010 May;10(5):301–16.
- Chevreux G et al. *Anal Biochem.* 2011 Aug 15;415(2):212–4;
- Cibelli et al., 1998 *Science*, 280: 1256–1258
- Dall'Acqua et al. 2002, *J Immunol.*;169:5171–80.
- Dall'Acqua et al. 2006, *J. Biol. Chem.*;281:23514–24. (a)
- Dall'Acqua et al. *J Immunol* 2006; 177:1129–1138. (b) 20
- Duchosal et al. *Nature* 355:258 (1992)
- Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78–85 (1969).
- Edwards JC, et al. *Nat Rev Immunol.* 2006 May;6(5):394–403.
- EP 1 176 195 A1,
- EP 1 308 456,
- EP 1 829 961,
- Farnan D, Moreno GT. *Anal Chem.* 2009 Nov 1;81(21):8846–57.
- Fisher R, et al. *Vaccine* 21 (2003) 820–825.
- Forthal et al., *J Immunol* 2010;185:6876–6882, 30
- Gandhi S, et al. *Pharm Res.* 2012 Jan;29(1):209–24.
- Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)
- Gordon et al., 1980 *Proc Natl Acad Sci U S A.*;77:7380–4
- Herbst R. et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct;335(1):213–22,
- Hinton et al. 2004, *J Biol Chem.*;279:6213–6.
- Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991);
- Ianello A, et al. *Cancer and Metastasis Reviews* 24: 487–499, 2005.
- Idusogie EE et al. *J Immunol.* 2001; 166:2571–5. 40

- Imai-Nishiya et al., *BMC Biotechnology* 2007, 7:84;
- Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:2551 (1993) (a);
- Jakobovits et al., *Nature*, 362:255–258 (1993) (b);
- Jones et al. *Nature*, 321: 522–525, 1986;
- Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).
- Kanda Y et al., *Journal of Biotechnology* 130 (2007) 300–310,
- Khawli LA, et al. *MAbs*. 2010 Nov–Dec;2(6):613–24.
- Lazar, G. A., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11): 4005–10. 10
- Ma JK, et al. *Nat Rev Genet.* 2003 Oct;4(10):794–805.
- Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994);
- Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581–5 597 (1991);
- McAtee CP et al. *Curr Protoc Protein Sci.* 2012 Aug;Chapter 8:Unit 8.10,
- Miao C, et al. *Journal of General Virology* (2009), 90, 1119–1123.
- Moore GL. et al. *mAbs* 2:2, 181–189; March/April, 2010;
- Mori K, et al. *Biotechnol Bioeng.* 2004 Dec 30;88(7):901–8,
- Olivier S. et al. *MAbs*. 2010 Jul–Aug; 2(4): 405–415,
- Presta LG. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Aug 7;58(5–6):640–56. 20
- Rea JC, et al. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Jan 25;54(2):317–23.
- Rea Jennifer C. *Innovations in Biotechnology.* InTech. February 17, 2012. Chapter 19.
- Riechmann et al. *Nature*, 332: 323–327, 1988,
- Ryan et al., 1997 *Science*; 278: 873 - 876;
- Satoh M, et al. *Expert Opin Biol Ther.* 2006 Nov;6(11):1161–73.
- Schillberg S, et al. *Vaccine* 23 (2005) 1764–1769.
- Shields RL, et al. *J Biol Chem.* 2001 Mar 2;276(9):6591–604.
- Stoger E, et al. *Molecular Breeding* 9: 149–158, 2002.
- Suzuki et al. *Clin Cancer Res* 2007 March 15;13:1875–1882,
- Umana et al. *Nat Biotechnol.* 1999 Feb;17(2):176–80, 30
- US 5,591,669,
- US 5,598,369,
- US 5,545,806,
- US 5,545,807,
- US 6,150,584
- Vaughan et al. *Nature Biotech* 14:309 (1996)
- Velders MP et al., *Br J Cancer.* 1998 Aug;78(4):478–83.

- Verhoeyn et al. *BioEssays*, 8: 74, 1988,
Verhoeyn et al. *Science*, 239: 1534–1536, 1988;
Vlasak J, Ionescu R. *Curr Pharm Biotechnol*. 2008 Dec;9(6):468–81.
Wallace PK et al., *J Leukoc Biol*. 1994 Jun;55(6):816–26.
Weiner LM, et al. *Nat Rev Immunol*. 2010 May;10(5):317–27.
WO9004036A1,
WO9517085A1,
WO9951642,
WO0026357A2, 10
WO00/42072,
WO01/77181,
WO01/26455A1,
WO02/060919A2,
WO2004/024768,
WO2004/024866,
WO2004/029207,
WO2004/050847A2,
WO2004/063351
WO2004/074455 20
WO2005/033281A2,
WO2007/048077A2
WO2007/106078A2,
WO2010/045193,
WO2010/106180A2,
WO2011/009623,
WO2012/041768A1
Wright A, Morrison SL. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1087–96,
Yamane–Ohnuki N. et al. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Sep 5;87(5):614–22,
Zeitlin L. et al. *Microbes Infect*. 2000 May;2(6):701–8, 30
Zhang T. et al. *J Chromatogr A*. 2011 Aug 5;1218(31):5079–86.

【 図 1 】

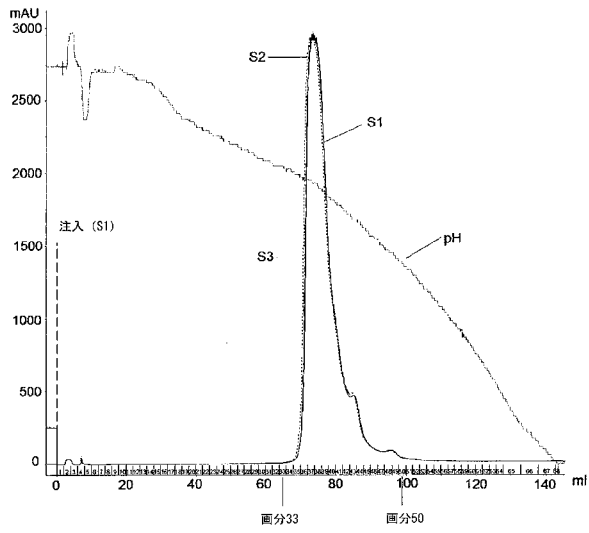


Figure 1

【 図 2 】

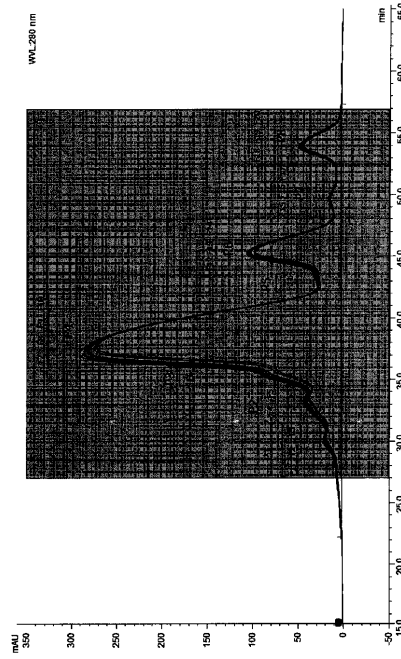


Figure 2

【 図 3 】

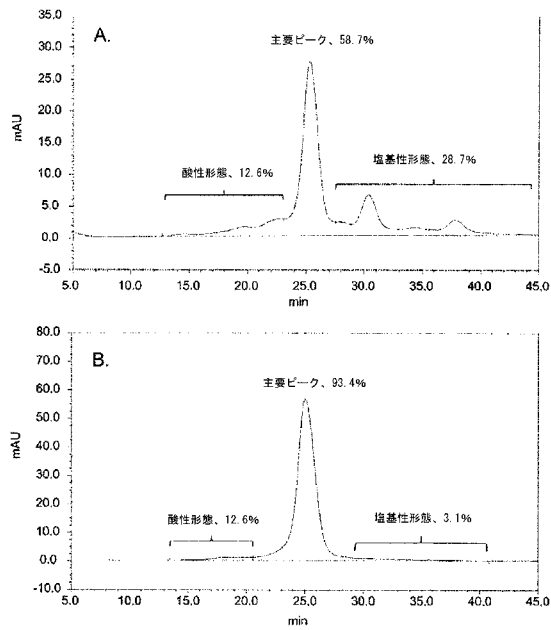


Figure 3

【 図 4 】

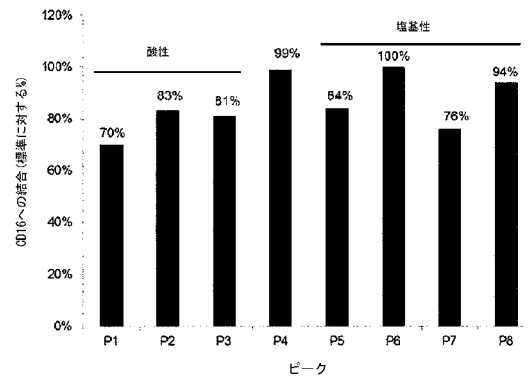


Figure 4

【 図 5 】

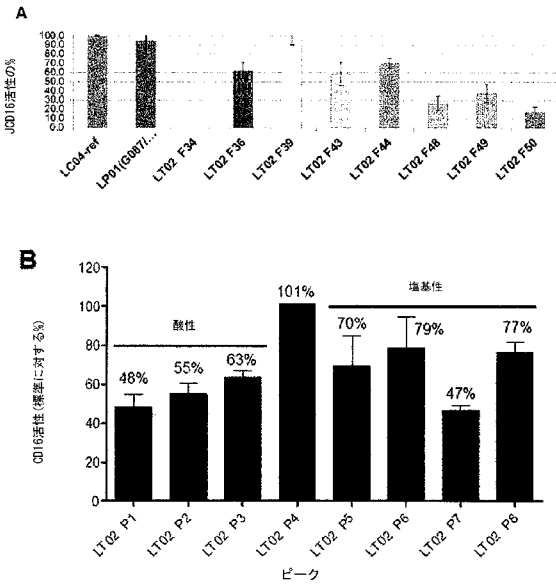


Figure 5

【 図 6 】

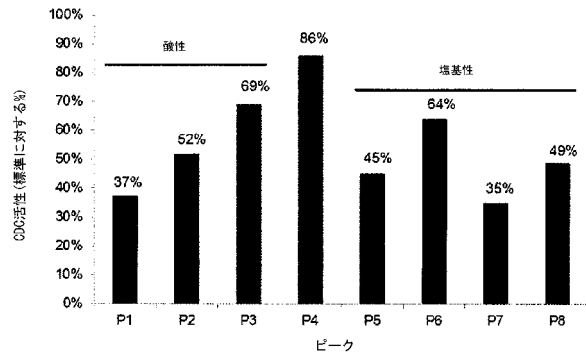


Figure 6

【 手続 補正 書 】

【 提出 日 】 平成 27 年 12 月 21 日 (2015.12.21)

【 手続 補正 1 】

【 補正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補正 方 法 】 変 更

【 補正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

薬 剤 と し て 用 い る た め の、

a) 細胞クローンから、非ヒトトランスジェニック動物から、又はトランスジェニック植物からモノクローナル抗体組成物を生産する工程、

b) 工程a)において得られた組成物をクロマトグラフィーによって分画する工程、及び

c) クロマトグラムの主要ピークに対応する、工程b)において得られた1つ又は複数のクロマトグラフィー画分を組み合わせる工程

を含む方法によって得られ得るモノクローナル抗体組成物であって、こうして得られたモノクローナル抗体組成物が前記主要ピークに富んでおり、前記主要ピークが、工程c)において得られた組成物のクロマトグラムの少なくとも85%に相当する、モノクローナル抗体組成物。

【 請 求 項 2 】

工程b)の分画が、イオン交換クロマトグラフィーによって、クロマトフォーカシングによって、又は疎水性相互作用クロマトグラフィーによって達成されることを特徴とする、請 求 項 1 に 記 載 の モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 組 成 物。

【 請 求 項 3 】

イオン交換クロマトグラフィーが、以下の溶離手段：

- イオン力勾配、及び/又は
- pH勾配、又は
- 置換分子

の1つを用いることを特徴とする、請求項2に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項4】

組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%がC末端リシン残基をまったく含まないことを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項5】

薬剤として用いるための、組成物内に存在する抗体の重鎖の少なくとも95%がC末端リシン残基をまったく含まない、モノクローナル抗体組成物。

【請求項6】

抗体が、健康なドナー細胞上に存在する非遍在的な抗原、癌細胞の抗原、病原体に感染した細胞の抗原、又は免疫細胞の抗原に対するものであることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項7】

抗体が抗Rhesus D抗体であり、組成物がRhマイナスの個体における同種免疫化を予防するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項8】

抗体が癌細胞の抗原に対するものであり、組成物が癌を治療するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項9】

抗体が病原体に感染した細胞の抗原に対するものであり、組成物が前記病原体による感染を治療するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項10】

抗体が免疫細胞の抗原に対するものであり、組成物が自己免疫疾患を治療するためのものである、請求項1から6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項11】

抗体が、Fc RIII受容体へのその結合及びFc RIII受容体を介するそのエフェクター特性を増大させる、Fc断片の修飾を含むことを特徴とする、請求項1から10のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項12】

抗体が、Fc断片の特定のアミノ酸残基で少なくとも1つの変異を含むことを特徴とする、請求項11に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項13】

65%以下のフコース含有量を含むことを特徴とする、請求項11又は12に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項14】

抗体が、タンパク質C1qへの結合及び補体を介するそのエフェクター特性を増大させる、Fc断片の修飾を含むことを特徴とする、請求項1から10のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体組成物。

【請求項15】

所与の抗原に対するモノクローナル抗体組成物が、Fc RIII(CD16)受容体を発現する免疫系のエフェクター細胞による、前記抗原を発現する標的細胞の抗体依存性の細胞傷害性(ADCC)を誘発する能力を増大させるための方法であって、クロマトグラフィー分画工程を実施することを含む、方法。

【請求項16】

所与の抗原に対するモノクローナル抗体組成物が、補体による、前記抗原を発現する標的細胞の補体依存性の細胞傷害性(CDC)を誘発する能力を増大させるための方法であって、クロマトグラフィー分画工程を実施することを含む、方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/055179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 C07K1/16 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/004841 A1 (GENMAB AS [DK]; PARREN PAUL [NL]; VAN BERKEL PATRICK [NL]; VAN DEN BRE) 10 January 2013 (2013-01-10) example 4	1-16
A	----- WO 2006/099875 A1 (GENMAB AS [DK]; WEERS MICHEL DE [NL]; GRAUS YVO [NL]; OPRINS JUDITH [N]) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 6 May 2014		Date of mailing of the international search report 13/05/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, René

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055179

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>YI DU ET AL: "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies", MABS, vol. 4, no. 5, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 578-585, XP055077895, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21328 page 582</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16
A	<p>TAYLOR ZHANG ET AL: "Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1218, no. 31, 17 May 2011 (2011-05-17), pages 5079-5086, XP028236720, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2011.05.061 [retrieved on 2011-05-27] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013004841 A1	10-01-2013	EP 2729496 A1 WO 2013004841 A1	14-05-2014 10-01-2013
WO 2006099875 A1	28-09-2006	AU 2006226733 A1 BR P10608927 A2 CA 2602375 A1 CN 101218256 A EA 200702053 A1 EA 201100694 A1 EP 1866338 A1 EP 2535355 A2 EP 2551282 A2 EP 2567976 A2 JP 5225069 B2 JP 2008533977 A JP 2012070737 A KR 20070116137 A NZ 561883 A NZ 586780 A US 2009148449 A1 US 2011099647 A1 WO 2006099875 A1 ZA 200709003 A	28-09-2006 09-11-2010 28-09-2006 09-07-2008 28-02-2008 28-02-2012 19-12-2007 19-12-2012 30-01-2013 13-03-2013 03-07-2013 28-08-2008 12-04-2012 06-12-2007 26-11-2010 24-02-2012 11-06-2009 28-04-2011 28-09-2006 27-05-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2014/055179

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>YI DU ET AL: "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies", MABS, vol. 4, no. 5, 1 septembre 2012 (2012-09-01), pages 578-585, XP055077895, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21328 page 582</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	15,16
A	<p>TAYLOR ZHANG ET AL: "Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, NL, vol. 1218, no. 31, 17 mai 2011 (2011-05-17), pages 5079-5086, XP028236720, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2011.05.061 [extrait le 2011-05-27] le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2014/055179

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013004841 A1	10-01-2013	EP 2729496 A1	14-05-2014
		WO 2013004841 A1	10-01-2013
WO 2006099875 A1	28-09-2006	AU 2006226733 A1	28-09-2006
		BR P10608927 A2	09-11-2010
		CA 2602375 A1	28-09-2006
		CN 101218256 A	09-07-2008
		EA 200702053 A1	28-02-2008
		EA 201100694 A1	28-02-2012
		EP 1866338 A1	19-12-2007
		EP 2535355 A2	19-12-2012
		EP 2551282 A2	30-01-2013
		EP 2567976 A2	13-03-2013
		JP 5225069 B2	03-07-2013
		JP 2008533977 A	28-08-2008
		JP 2012070737 A	12-04-2012
		KR 20070116137 A	06-12-2007
		NZ 561883 A	26-11-2010
		NZ 586780 A	24-02-2012
		US 2009148449 A1	11-06-2009
		US 2011099647 A1	28-04-2011
		WO 2006099875 A1	28-09-2006
		ZA 200709003 A	27-05-2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 31/04	
	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 K 39/395	J
	A 6 1 K 39/395	K

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72) 発明者 ギヨーム・シュヴルー

フランス・7 5 0 0 9・パリ・リュ・デ・マルティル・6 6

(72) 発明者 ニコラ・ピオロー

フランス・9 1 4 0 0・オルセー・アヴニュ・パラ・3 6

Fターム(参考) 4C085 AA14 BA02 BA07 BA49 BA51 BB01 BB42 CC02 CC23 DD32

DD34 EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 CA40 DA75 DA76 EA20 GA21 GA23