

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6454547号  
(P6454547)

(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)

(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/63 (2006. 01)

C 1 2 N 15/63 Z N A Z

C 1 2 P 21/08 (2006. 01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 H

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 10 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2014-517838 (P2014-517838)	(73) 特許権者	507316398
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日 (2012. 7. 6)		ゲンマブ エー/エス
(65) 公表番号	特表2014-526884 (P2014-526884A)		デンマーク ディーケー-1560 コペ
(43) 公表日	平成26年10月9日 (2014. 10. 9)		ンハーゲン ブイ カルヴェボー ブリッ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/063338		ゲ 43
(87) 国際公開番号	W02013/004841	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成25年1月10日 (2013. 1. 10)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成27年7月6日 (2015. 7. 6)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/504, 987		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011. 7. 6)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	PA201100518	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011. 7. 6)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100142929
前置審査			弁理士 井上 隆一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体重鎖のC末端の修飾による補体依存性細胞傷害の調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、抗体を宿主細胞において産生する方法であって、該抗体は、少なくとも重鎖および軽鎖を含む、IgG1アイソタイプの抗体であり、さらにここで、該抗体はCD Cを誘導する機能を有し、かつ、CDC媒介能が変化したバリエーションである、方法：

(a) 該重鎖をコードするヌクレオチド構築物を提供する段階であって、該構築物が該重鎖のC末端においてリジン残基をコードせず、該構築物のC末端コドンがPro残基をコードする、段階、

(b) 宿主細胞において該ヌクレオチド構築物を発現させる段階であって、ただし該宿主細胞がCHO細胞または蘇精細胞ではない、段階、および

(c) 該宿主細胞の細胞培養物から該抗体を回収する段階。

【請求項 2】

前記宿主細胞が、タンパク質のAsn結合型グリコシル化の能力を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記宿主細胞が、ヒト様グリコシル化またはヒトグリコシル化されている糖タンパク質を産生するように遺伝子操作されている非ヒト細胞である、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

前記宿主細胞が以下からなる群より選択される、請求項1～3のいずれか一項記載の方法：

- (a) 酵母細胞、
- (b) 糸状菌細胞、
- (c) 植物細胞、
- (d) NS0細胞、Sp2/0細胞、およびPER.C6細胞。

**【請求項 5】**

前記酵母細胞が、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)またはサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)およびオガタエ・ミニュータ(*Ogataea minuta*)からなる群より選択される、請求項4記載の方法。

**【請求項 6】**

前記糸状菌細胞が、アスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesi*)からなる群より選択される、請求項4記載の方法。

**【請求項 7】**

前記植物細胞が、シロイヌナズナ(*Arabidopsis*)細胞、コウキクサ(*Lemna minor*)、ニコチアナ・ベンサミアナ(*Nicotiana benthamiana*) (タバコ)、油料種子作物(ブラシカ・ナプス(*Brassica napus*))、大豆、米、トウモロコシ(ズイー・メイス(*Zea mays*))またはニンジン細胞からなる群より選択される、請求項4記載の方法。

**【請求項 8】**

前記段階(a)において提供される前記ヌクレオチド構築物が、C末端リジン残基に対するコドン有する本来の重鎖配列に由来するか、またはそれに基づいてデザインされる、請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 9】**

前記ヌクレオチド構築物が、該本来の重鎖配列と比べてC末端リジン残基に対するコードンの欠失または置換を含む、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

前記重鎖をコードする構築物が該重鎖のC末端においてリジンまたはアルギニンをコードせず、該重鎖をコードする構築物が該重鎖のC末端において荷電アミノ酸残基をコードしない、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****発明の分野**

本発明は、補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導するための抗体およびその能力に関する。重鎖のC末端の修飾によってCDC媒介能が変化した抗体バリエーションを提供する。さらに、本発明は、そのような抗体を作出する方法、ならびに該抗体の産生に適したヌクレオチド構築物および宿主細胞を提供する。

**【背景技術】****【0002】****発明の背景**

モノクローナル抗体は近年、特にがんおよび自己免疫疾患の治療に対して成果を挙げた治療用分子になっている。抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)のような、抗体のFc領域によって媒介されるエフェクタ機能は、モノクローナル抗体の臨床的有効性にとって重要な機構であることが多い。

**【0003】**

抗体誘導性CDCは、古典的補体カスケードのタンパク質を通じて媒介される。このカスケードは、補体タンパク質C1qの抗体への結合によって誘発される。C1qは、球状頭部およびコラーゲン様尾部を有する6つのヘテロ三量体サブユニットの束から構成される。抗体のFc領域へのC1qの結合には、抗体のCH2領域が必要になることが知られている(Duncan an

10

20

30

40

50

d Winter (1988) Nature 332:738 (非特許文献1))。さらに、Fc領域の糖部分は、C1qの結合に影響を与えることが知られている(Raju (2008) Curr Opin Immunol 20:471 (非特許文献2))。

【0004】

モノクローナル抗体は、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、糖化、N末端グルタミン環化、C末端リジンプロセッシング(除去)、脱アミド、異性化、酸化およびペプチド結合切断を含めて、多くのタイプの酵素的および非酵素的な翻訳後修飾を受けうる複雑な分子である(これらの修飾の概説については、Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426 (非特許文献3)を参照のこと)。

【0005】

カルボキシペプチダーゼによる重鎖からのC末端リジンの除去は、哺乳動物細胞における抗体の組み換え発現でも、ヒト血清中インビボでもともに、よく見られる抗体修飾である(Cai et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. Sep 9 (非特許文献4))。除去は部分的であることが多く、その結果、0個(K0)、1個(K1)または2個(K2)のC末端リジン(すなわち、K2の場合には、抗体の各重鎖中に1個のC末端リジン)を有する抗体の混合集団をもたらす。具体的には、B細胞ハイブリドーマはK0、K1およびK2分子の混合物を産生する(Dick et al. (2008) Biotech. Bioeng. 100: 1132 (非特許文献5))。

【0006】

WO 2009027471 (特許文献1)には、抗体の重鎖のC末端リジンに対するコドンの欠失がチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞での発現によって、いっそう高い抗体力価をもたらすことが記述されている。

【0007】

WO 2008006554 (特許文献2)には、xyl-t/ fuc-t蘇類細胞において産生された抗体調製物が、フコースおよびキシロースのないN-グリカン構造を含み、C末端リジン残基を欠くことが記述されている。この調製物のADCC媒介能は、マウスSp2/0細胞において産生された同抗体の調製物よりも血清によって阻害されなかった。他方で、補体を介した溶解活性は低減された。C末端リジン残基の除去はADCCを増強することが提唱されているが、この修飾のみの効果は試験されていない。

【0008】

当技術分野における考えは、C末端リジンが抗体の機能にほとんどまたは全く影響を与えないというものであり、例えば、活性がC末端リジンに起因するものではなかったと結論付けた、Cai et al. (2010) 前記、または重鎖Lys残基の有無は抗原結合に影響を及ぼさず、Fcエフェクタ機能、クリアランスもしくは他のいずれかの生物学的特性に影響を与える可能性が高いと述べた、Harris (2005) Dev Biol (Basel) 122: 127 (非特許文献6)による文献概説を参照されたい。

【0009】

Antes et al. (2007) J Chromatogr. B 852: 250 (非特許文献7)は、C末端リジンがCD Cに及ぼす効果の試験について記述している。C末端リジンを含む抗体分子の著しい垂集団を含有するSp2/0細胞において抗体調製物が作出された。タンパク質分解によるC末端リジンの除去は、これらの抗体調製物のCDC媒介能に影響を及ぼさなかった。著者らは、例えば、切取型および非切取型のどちらの抗体バリエーションも補体依存性細胞傷害(CDC)アッセイ法において同じ効力を引き起こし、IGN311のリジンの切取りがFcを介したエフェクタ機能を損なわないことを実証すると結論付けた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】WO 2009027471

【特許文献2】WO 2008006554

【非特許文献】

【0011】

10

20

30

40

50

- 【非特許文献1】Duncan and Winter (1988) Nature 332:738  
【非特許文献2】Raju (2008) Curr Opin Immunol 20:471  
【非特許文献3】Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426  
【非特許文献4】Cai et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. Sep 9  
【非特許文献5】Dick et al. (2008) Biotech. Bioeng. 100: 1132  
【非特許文献6】Harris (2005) Dev Biol (Basel) 122: 127  
【非特許文献7】Antes et al. (2007) J Chromatogr. B 852: 250

【発明の概要】

【0012】

今回、驚いたことに、抗体の重鎖のC末端のリジンおよび他の荷電アミノ酸残基が、そのCDC媒介能に実際に大きな影響を及ぼすことが分かった。

10

【0013】

任意の特定の理論によって束縛されるわけではないが、これは、K0、K1およびK2形態の純粋な調製物が比較されていなかったため、以前には検出されなかったものと仮定される。

【0014】

本明細書の実施例において記述される、C末端荷電残基の存在とCDCを媒介する効力との間の関係の知見は、CDC特性が変化した新規の抗体産物、および新規の抗体産生方法の基礎を提供する。

【0015】

20

第1の局面において、本発明は、CDCが増強された抗体などの抗体を宿主細胞において産生する方法であって、該抗体は少なくとも重鎖を含み、以下の段階：

(a) 該重鎖をコードするヌクレオチド構築物を提供する段階であって、該構築物が該重鎖のC末端においてリジン残基をコードしない、段階、

(b) 該ヌクレオチド構築物を宿主細胞において発現させる段階であって、ただし該宿主細胞はCHO細胞または蘇精細胞ではない、段階、  
および

(c) 該宿主細胞の細胞培養物から該抗体を回収する段階  
を含む該方法を提供する。

【0016】

30

別の局面において、本発明は、抗体のCDC媒介能を増強するための方法であって、抗体の重鎖からC末端リジン残基を除去する段階を含む該方法に関する。

【0017】

上記の方法の産物は、C末端リジン残基を含む対応する抗体分子と比べてCDC媒介能が増強されている抗体分子の集団である。そのような抗体は、標的細胞の死滅が望まれるようないくつかの目的（例えば治療目的）に有用である。これは、例えば、がんの治療において望まれうる。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、タンパク質分解による除去を受けにくい荷電アミノ酸残基をC末端領域に少なくとも1つ含む重鎖を含む抗体バリエーションを提供する。

40

【0019】

この抗体バリエーションは、一方または両方のC末端リジン残基がない対応する抗体分子と比べてCDC媒介能が低下している。そのような抗体は、標的のサイレンシングだけが望まれる用途（例えば治療用途）に有用である。これは、例えば、自己免疫疾患または炎症の治療において好都合でありうる。

【0020】

さらなる局面において、本発明は、タンパク質分解による除去を受けにくい荷電アミノ酸残基を重鎖のC末端領域に少なくとも1つ有する抗体バリエーションを産生する方法、ヌクレオチド構築物および宿主細胞に関する。

【0021】

50

さらなる局面において、本発明は、重鎖からC末端リジンを除去できるカルボキシペプチダーゼの活性を取り除くように遺伝子組み換えされた哺乳動物細胞に関する。

【0022】

なおさらなる局面において、本発明は、CDCのようなエフェクタ機能を媒介する能力を強化するために抗体分子の間での分子間相互作用を強化するように修飾された抗体の組成物を提供する。1つのそのような局面において、本発明は、C末端領域において少なくとも1つの正荷電アミノ酸残基を有する重鎖を含む抗体バリエーション分子の亜集団、およびC末端領域において少なくとも1つの負荷電アミノ酸残基を有する重鎖を含む抗体バリエーション分子の亜集団を含む抗体混合物に関し、ここで、該正荷電アミノ酸残基および該負荷電アミノ酸残基はタンパク質分解による除去を受けにくい。

10

【0023】

別のそのような局面において、本発明は、抗体分子の間での分子間C末端相互作用に有利に働く1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む変異C末端領域を有する重鎖を含む抗体を提供する。

[本発明1001]

以下の段階を含む、少なくとも重鎖を含む抗体を宿主細胞において産生する方法：

(a) 該重鎖をコードするヌクレオチド構築物を提供する段階であって、該構築物が該重鎖のC末端においてリジン残基をコードしない、段階、

(b) 宿主細胞において該ヌクレオチド構築物を発現させる段階であって、ただし該宿主細胞がCHO細胞または蘇精細胞ではない、段階、および

(c) 該宿主細胞の細胞培養物から該抗体を回収する段階。

20

[本発明1002]

前記宿主細胞が、軽鎖をコードする構築物をさらに発現する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記宿主細胞が、タンパク質のAsn結合型グリコシル化の能力を有する、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

前記宿主細胞が、ヒト様グリコシル化またはヒトグリコシル化されている糖タンパク質を産生するように遺伝子操作されている非ヒト細胞である、前記本発明1001～1003のいずれかの方法。

30

[本発明1005]

前記宿主細胞が、抗体重鎖からC末端リジン残基を効率的に除去できない宿主細胞である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1006]

前記宿主細胞が、C末端リジンを含む構築物を発現する場合に抗体分子の10%超、例えば30%超がK2アイソフォームである抗体調製物を産生する、宿主細胞である、本発明1005の方法。

[本発明1007]

前記宿主細胞が以下からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法：

(a) 酵母細胞、例えばピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)またはサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセンラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)およびオガタエ・ミニュータ(*Ogataea minuta*)、

40

(b) 糸状菌細胞、例えばアスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)、

(c) 植物細胞、例えばシロイヌナズナ(*Arabidopsis*)細胞、コウキクサ(*Lemna minor*)、ニコチアナ・ベンサミアナ(*Nicotiana benthamiana*) (タバコ)、油料種子作物(ブラシカ・ナプス(*Brassica napus*))、大豆、米、トウモロコシ(ズイー・メイス(*Zea mays*))またはニンジン細胞、

(d) NS0細胞、Sp2/0細胞、およびPER.C6細胞。

50

[本発明1008]

前記段階(a)において提供される前記ヌクレオチド構築物が、C末端リジン残基に対するコドンを含む本発明の重鎖配列に由来するか、またはそれに基づいてデザインされ、例えば、該ヌクレオチド構築物が、該本発明の重鎖配列と比べてC末端リジン残基に対するコードンの欠失または置換を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]

前記重鎖をコードする構築物が該重鎖のC末端においてリジンまたはアルギニンをコードせず、好ましくは、該重鎖をコードする構築物が該重鎖のC末端において荷電アミノ酸残基をコードしない、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1010]

前記ヌクレオチド構築物が、C末端修飾以外は、IgG1またはIgG2アイソタイプの重鎖をコードする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記ヌクレオチド構築物のC末端コドンが、ProまたはGly残基をコードする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記本発明のいずれかの方法によって入手されるまたは入手可能な単離された抗体。

[本発明1013]

抗体重鎖からC末端リジン残基を効率的に除去できない宿主細胞であって、C末端リジンを欠く重鎖をコードするヌクレオチド構築物を含む、前記宿主細胞。

[本発明1014]

本発明1007で指定されたタイプのうちの1つである、本発明1013の宿主細胞。

[本発明1015]

補体依存性細胞傷害を媒介する抗体の能力を増強する方法であって、抗体の重鎖からC末端リジン残基を除去する段階を含む、前記方法。

[本発明1016]

前記リジン残基が酵素的切断によって、例えばカルボキシペプチダーゼを用いて切断される、本発明1015の方法。

[本発明1017]

前記抗体がC末端リジン残基の除去の前に精製される、本発明1015または1016の方法。

[本発明1018]

前記抗体がIgG1またはIgG2アイソタイプである、本発明1015～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

複数の抗体産生細胞培養物、例えばハイブリドーマ細胞培養物を、所望の特性について試験する方法であって、該ハイブリドーマの培養物のサンプルを本発明1015～1018のいずれかの方法で処理する段階、および処理したサンプルを所望の特性について試験する段階を含む、前記方法。

[本発明1020]

前記所望の特性が細胞溶解または細胞致死である、本発明1019の方法。

[本発明1021]

タンパク質分解による除去を受けにくい少なくとも1つの荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖を含む、単離された抗体バリエーション。

[本発明1022]

軽鎖をさらに含む、本発明1021の抗体バリエーション。

[本発明1023]

前記荷電アミノ酸残基のない抗体と比べて補体依存性細胞傷害を媒介する能力が低下している、前記本発明1021～1022のいずれかの抗体バリエーション。

[本発明1024]

前記荷電アミノ酸残基が、哺乳動物由来のプロテアーゼによる除去を受けにくく、好ましくはCHO、HEK-293、PER.C6、NS0またはSp2/0由来のプロテアーゼによる除去を受けにく

10

20

30

40

50

く、より好ましくはCHO、HEK-293、PER.C6、NS0またはSp2/0細胞の分泌経路において活性なプロテアーゼによる除去を受けにくい、前記本発明1021～1023のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1025]

前記荷電アミノ酸残基が、ヒトプロテアーゼによる除去を受けにくく、好ましくは循環中のタンパク質に作用しうるヒトプロテアーゼによる除去を受けにくい、前記本発明1021～1024のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1026]

前記荷電アミノ酸が、最もC末端側の6つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の5つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の4つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の3つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の2つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記荷電アミノ酸が前記重鎖の最もC末端側のアミノ酸残基である、前記本発明1021～1025のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1027]

前記重鎖が、SEQ ID NO:1、2、3または5に記載されたCH3配列を含み、かつ前記荷電アミノ酸が、それぞれ325位～330位、321位～326位、372位～377位および325位～330位の間に位置する、前記本発明1021～1026のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1028]

前記重鎖が、SEQ ID NO:1、2、3または5に記載された定常領域配列全体を含み、かつ前記荷電アミノ酸が、それぞれ325位～330位、321位～326位、372位～377位および325位～330位の間に位置する、前記本発明1021～1027のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1029]

前記荷電アミノ酸が、正荷電アミノ酸残基、好ましくはリジン残基である、前記本発明1021～1028のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1030]

前記荷電アミノ酸が、負荷電アミノ酸残基、好ましくはグルタミン酸残基である、前記本発明1021～1028のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1031]

前記荷電アミノ酸残基が、該荷電アミノ酸残基のC末端側にある位置でのアミノ酸修飾によってタンパク質分解による除去を受けにくい、前記本発明1021～1030のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1032]

前記荷電アミノ酸残基が、該荷電アミノ酸残基のC末端側にあるプロリン残基の存在によってタンパク質分解による除去を受けにくく、好ましくは、該プロリン残基が該荷電アミノ酸残基のすぐC末端側に位置し、より好ましくは、該荷電アミノ酸残基および該プロリン残基が前記重鎖の最もC末端側の2つのアミノ酸残基である、前記本発明1021～1031のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1033]

前記重鎖が、2つまたはそれより多い荷電アミノ酸残基、例えば2つ、3つ、4つまたは5つの荷電アミノ酸残基をC末端領域に含み、該荷電アミノ酸残基が、好ましくは全て正電荷または全て負電荷のいずれかを有する、前記本発明1021～1032のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1034]

指定されたアミノ酸修飾が、アミノ酸置換の結果である、前記本発明1021～1033のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1035]

指定されたアミノ酸修飾が、C末端アミノ酸付加の結果である、前記本発明1021～1034のいずれかの抗体バリエーショント。

[本発明1036]

10

20

30

40

50

前記抗体が、ヒト抗体、好ましくはヒトIgG1抗体またはヒトIgG3抗体である、前記本発明1021～1035のいずれかの抗体バリエーション。

[本発明1037]

前記抗体重鎖が、C末端にプロリン残基が付加されている、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4重鎖である、前記本発明1021～1036のいずれかの抗体バリエーション。

[本発明1038]

前記抗体がC末端で結合されていない、前記本発明1021～1037のいずれかの抗体バリエーション。

[本発明1039]

医薬として用いるための、本発明1021～1038のいずれかの抗体。

10

[本発明1040]

タンパク質分解による除去を受けにくい荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖をコードする、ヌクレオチド構築物。

[本発明1041]

本発明1022～1038のいずれかのさらなる特徴を有する、本発明1040のヌクレオチド構築物。

[本発明1042]

本発明1021～1038のいずれかの抗体バリエーションを産生できる、宿主細胞。

[本発明1043]

重鎖からC末端リジンを除去できるカルボキシペプチダーゼの活性を取り除くように遺伝子組み換えされた、宿主細胞。

20

[本発明1044]

CHO、HEK-293、PER.C6、NS0またはSp2/0細胞である、本発明1043の宿主細胞。

[本発明1045]

本発明1021～1038のいずれかの抗体バリエーションを産生する方法であって、本発明1042～1044のいずれかの宿主細胞を培養する段階、および該細胞の培養物から該抗体を回収する段階を含む、前記方法。

[本発明1046]

前記宿主細胞が、C末端に負荷電アミノ酸残基を有するかまたはC末端において正荷電アミノ酸残基の後にプロリン残基を有する重鎖をコードするヌクレオチド構築物を含むCHOまたはHEK細胞である、本発明1045の方法。

30

[本発明1047]

少なくとも1つの正荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖を含む抗体バリエーション分子の亜集団と、少なくとも1つの負荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖を含む抗体バリエーション分子の亜集団とを含む抗体混合物であって、該正荷電アミノ酸残基および該負荷電アミノ酸残基がタンパク質分解による除去を受けにくい、前記抗体混合物。

[本発明1048]

前記亜集団の各々が前記混合物の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば前記混合物の少なくとも30%を構成する、本発明1047の抗体混合物。

40

[本発明1049]

前記抗体分子が本発明1022～1038のいずれか一つまたは複数において指定された特性を有する、本発明1047または1048の抗体混合物。

[本発明1050]

2つの亜集団の各々における抗体分子が、2本の同一の重鎖を含む、前記本発明1047～1049のいずれかの抗体混合物。

[本発明1051]

医薬として用いるための、好ましくはがんの治療において用いるための前記本発明1047～1050のいずれかの抗体混合物。

[本発明1052]

抗体分子の間での分子間C末端相互作用に有利に働く1つまたは複数のアミノ酸修飾を含

50

む変異C末端領域を有する重鎖を含む、単離された抗体。

[本発明1053]

前記アミノ酸修飾のない抗体と比べて補体依存性細胞傷害を媒介する能力が増強されている、本発明1052の抗体。

[本発明1054]

2本の同一ではない重鎖を含む、本発明1052の抗体。

[本発明1055]

一方の重鎖がC末端領域に負荷電アミノ酸残基を含み、かつ他方の重鎖がC末端領域に正荷電アミノ酸残基を含み、該荷電アミノ酸残基がタンパク質分解による除去を受けにくい、本発明1052の抗体。

[本発明1056]

単一特異性抗体である、前記本発明1052～1055のいずれかの抗体。

[本発明1057]

二重特異性抗体である、前記本発明1052～1055のいずれかの抗体。

[本発明1058]

医薬として用いるための前記本発明1052～1057のいずれかの抗体。

[本発明1059]

本発明1052～1057のいずれかの抗体を産生する方法であって、前記重鎖をコードするヌクレオチド構築物を含む宿主細胞を培養する段階、および該宿主細胞の細胞培養物から該抗体を回収する段階を含む、前記方法。

[本発明1060]

前記宿主細胞がCHOまたはHEK細胞である、本発明1059の方法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】抗CD20抗体および抗CD38抗体の複数のC末端リジンアイソフォームのCIEXプロファイル、cIEFおよびSDS-PAGE分析。抗CD20抗体(a)および抗CD38抗体(b)のCIEXプロファイル。抗CD20抗体(c)および抗CD38抗体(d)の未分画抗体(未分画)および1個のIgG分子あたり0個、1個または2個のC末端リジンを含む回収されたアイソフォーム(K0、K1およびK2)のcIEFプロファイル。抗CD20抗体(e)および抗CD38抗体(f)の未分画抗体および回収されたアイソフォームのSDS PAGE分析。サンプルを未処理(-)でまたはカルボキシペプチダーゼB処理(+ )後に分析した(c～f)。

【図2】抗CD20抗体および抗CD38抗体の複数のC末端リジンアイソフォームによる結合曲線およびCDC誘導。FACS分析によって決定された、カルボキシペプチダーゼB (CPB)処理有りおよび無しの抗CD20抗体および抗CD38抗体の未分画抗体(未分画)および回収されたK2アイソフォームのDaudi細胞への結合(上パネル)。示したデータは平均蛍光強度(MFI)である。ヨウ化プロピジウム染色法を用いて測定された、カルボキシペプチダーゼB処理有りおよび無しの抗CD20抗体および抗CD38抗体の未分画抗体および回収されたK2アイソフォームによるDaudi細胞のCDC誘導(下パネル)。示したデータは溶解の百分率である。

【図3】抗CD38抗体の複数のC末端リジンアイソフォームによるC1q利用の効力。ヨウ化プロピジウム染色法を用いて測定された、カルボキシペプチダーゼB (CPB)処理有りおよび無しの抗CD38抗体の未分画抗体および回収されたK2アイソフォームによるDaudi細胞のCDC誘導。細胞を、固定した抗体濃度(10 μg/mL)とともにインキュベートした。用量設定した量のC1qを補体源としてアッセイに加えた。示したデータは、3回の実験の平均溶解率±S.E.Mである。

【図4】抗CD38抗体および変異体によるcIEF分析、結合およびCDC誘導。抗CD38抗体および変異体のcIEF分析(a)。FACS分析によって分析されたDaudi細胞への抗CD38抗体および変異体の結合(b)。示したデータは平均蛍光強度(MFI)である。PI染色法によって測定された抗CD38抗体および変異体によるDaudi細胞のCDC誘導(c)。示したデータは溶解の百分率である。

【図5】抗CD38抗体変異体の混合物によるCDC誘導。K0およびK4 (a)またはK0およびE2 (b)

10

20

30

40

50

)変異体を、表示のように異なる比率で混合し、Daudi細胞のCDC誘導をヨウ化プロピジウム染色法によって測定した。総IgG濃度は10  $\mu\text{g/mL}$ であった。K4変異体、E2変異体または両方の1:1混合物によるCDC誘導(c)。総IgG濃度を10  $\mu\text{g/mL}$ から0.016  $\mu\text{g/mL}$ に用量設定した。K0は陽性対照として示されている。異なる比率、2つの総IgG濃度(10  $\mu\text{g/mL}$ および0.25  $\mu\text{g/mL}$ )でのE2:K4変異体混合物によるCDC誘導(d)。示したデータ(a~d)は、(最大)溶解の百分率である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

定義

「免疫グロブリン」という用語は、2対のポリペプチド鎖、すなわち1対の低分子量軽(L)鎖および1対の重(H)鎖からなる構造的に関連した糖タンパク質のクラスをいい、これら4つは全てジスルフィド結合によって相互に結合している。免疫グロブリンの構造は十分に特徴付けられている。例えば、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。簡潔に説明すると、各重鎖は典型的に、重鎖可変領域(本明細書ではVHと略す)および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は典型的に、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3から構成される。重鎖はいわゆる「ヒンジ領域」におけるジスルフィド結合によって相互に結合している。各軽鎖は典型的に、軽鎖可変領域(本明細書ではVLと略す)および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は典型的に、1つのドメイン、CLから構成される。典型的に、定常領域におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記述されているようにEUインデックスにしたがって行われる。VH領域およびVL領域はさらに、相補性決定領域(CDR)とも称される超可変性の領域(または配列および/もしくは構造的に規定されたループの形態において超可変性でありうる超可変領域)と、そこに介在するフレームワーク領域(FR)と称されるより保存された領域に細分化されうる。各VHおよびVLは典型的に、アミノ末端からカルボキシ末端へとFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置された、3つのCDRおよび4つのFRから構成される(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)も参照されたい)。

【0026】

本発明との関連における「抗体」(Ab)という用語は、少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間(h)、約24時間もしくはそれより長い、約48時間もしくはそれより長い、約3、4、5、6、7日もしくはそれより長いなどといったかなりの期間の、または任意の他の関連する機能的に規定された期間(抗原に対する抗体結合に付随する生理反応を誘導、促進、増強、および/もしくは調節するのに十分な時間、ならびに/または抗体がエフェクタ活性を動員するのに十分な時間など)の半減期を有し、典型的な生理的条件下で抗原に特異的に結合する能力を有する、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそれらいずれかの誘導体をいう。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系のさまざまな細胞(エフェクタ細胞など)、および補体活性化の古典的経路の第1成分であるC1qなどの補体系の成分を含む、宿主の組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介しうる。抗体はまた、二重特異性抗体、二特異性抗体、または類似の分子でもよい。「二重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる、典型的には非重複性の、エピトープに対する特異性を有する抗体をいう。上記のように、本明細書における抗体という用語は、特に明記しない限りまたは文脈上明らかに矛盾しない限り、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を含む。そのような断片は酵素的切断、ペプチド合成および組み換え発現技法のような、任意の公知の技法によって提供することができる。抗体の抗原結合機能は全長抗体の断片によって行われうることを示されている。抗体という用語は、特に明記しない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ならびにキメラ抗体およびヒ

10

20

30

40

50

ト化抗体などの抗体様ポリペプチドを含むこともまた、理解されるべきである。このようにして作出された抗体は、任意のアイソタイプを有しうる。本発明の1つの態様において、抗体は単離および/または精製される。

【0027】

本明細書において用いられる場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM)をいう。

【0028】

特に指定のない限り、「C末端リジン残基」という用語は、重鎖のC末端(すなわちCH3領域のC末端)のリジン残基をいう。

【0029】

特に指定のない限り、「C末端領域」という用語は、重鎖ポリペプチドの最もC末端側の6つのアミノ酸からなる、抗体の重鎖のC末端領域をいう。

【0030】

本明細書において用いられる「全長抗体」という用語は、そのアイソタイプの抗体に通常見られる全ての重鎖および軽鎖の定常ドメインおよび可変ドメインを含む抗体をいう。

【0031】

本明細書において用いられる「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インピトロでのランダムな、もしくは部位特異的な突然変異誘発によって、またはインピボでの体細胞突然変異によって導入された変異)を含みうる。しかしながら、本明細書において用いられる「ヒト抗体」という用語は、マウスのような別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含まないことが意図される。

【0032】

本明細書において用いられる場合、「重鎖抗体」という用語は、2つの重鎖だけからなり、抗体において通常見られる2つの軽鎖を欠く抗体をいう。例えばラクダ科の動物において天然に存在する重鎖抗体は、VHドメインしか持たないにもかかわらず抗原に結合することが可能であり、例えばHamers-Casterman (1993) Nature 363:446を参照されたい。

【0033】

本明細書において用いられる場合、所定の抗原に対する抗体の結合との関連における「結合」という用語は典型的に、例えば、抗原をリガンドとしておよび抗体を分析物として用いて、BIAcore 3000装置において表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって決定した場合の、約 $10^{-6}$  Mもしくはそれ未満、例えば $10^{-7}$  Mもしくはそれ未満、例えば約 $10^{-8}$  Mもしくはそれ未満、例えば約 $10^{-9}$  Mもしくはそれ未満、約 $10^{-10}$  Mもしくはそれ未満、または約 $10^{-11}$  Mもしくはさらにそれ未満の $K_D$ に対応する親和性での結合であり、所定の抗原または近縁の抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)に対する結合の親和性よりも、少なくとも10倍低い、例えば少なくとも100倍低い、例えば少なくとも1000倍低い、例えば少なくとも10,000倍低い、例えば少なくとも100,000倍低い $K_D$ に対応する親和性で、所定の抗原に結合する。親和性がより低い量は抗体の $K_D$ に依存し、それゆえ抗体の $K_D$ が非常に低い(すなわち、抗体が高度に特異的である)場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも低い量は少なくとも10,000倍でありうる。本明細書において用いられる「 $K_D$ 」(M)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいう。

【0034】

本明細書において用いられる「単離された抗体」は、当該物質がその本来の環境(例えば、天然に存在している場合は天然の環境、または組み換えにより発現される場合は宿主細胞)から取り除かれていることを意味する。抗体が精製された形態であることも好都合である。「精製された」という用語は、絶対的な純度を要するのではなく、むしろ、出発材料と比較した場合の、組成物中の夾雑物の濃度に対する抗体濃度の増加を示す、相対的

10

20

30

40

50

な定義と意図される。

【 0 0 3 5 】

本明細書において用いられる「宿主細胞」という用語は、組み換えヌクレオチド構築物または発現ベクター、例えば本発明の抗体をコードするヌクレオチド構築物または発現ベクターが導入された細胞をいうように意図される。組み換え宿主細胞は、例えば、トランスフェクトマ、例えばCHO細胞、HEK293細胞、NS0細胞もしくはリンパ球細胞、または植物細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞もしくは原核細胞を含む。

【 0 0 3 6 】

本発明のさらなる局面および態様

上記のように、第1の局面において、本発明は、重鎖のC末端領域中の荷電アミノ酸残基の数を減らすことによって抗体のCDC媒介能を増強するための方法に関する。CDC媒介能が増強されている抗体産物は、重鎖からの荷電残基の翻訳後タンパク質分解による除去により、またはC末端をコードする領域中の、リジンなどの荷電アミノ酸のコドンに欠くヌクレオチド構築物からの抗体の組み換え産生により入手可能である。

【 0 0 3 7 】

したがって、第1の局面において、本発明は、宿主細胞において抗体を産生する方法であって、該抗体は少なくとも重鎖を含み、以下の段階：

(a) 該重鎖をコードするヌクレオチド構築物であって、該重鎖のC末端のリジン残基をコードしない該構築物を提供する段階、

(b) 該ヌクレオチド構築物を宿主細胞において発現させる段階であって、ただし該宿主細胞はCHO細胞または蘚類細胞ではない、段階  
および

(c) 該宿主細胞の細胞培養物から該抗体を回収する段階を含む該方法を提供する。

【 0 0 3 8 】

典型的には、重鎖は、少なくともCH3ドメイン、少なくともCH2およびCH3ドメイン、またはCH1、CH2およびCH3ドメインの全てを含んだ定常領域を含む。1つの態様において、重鎖は少なくともCH2およびCH3ドメインを含む。

【 0 0 3 9 】

いくつかの態様において、抗体は重鎖抗体である。しかしながら、ほとんどの態様において、抗体は同様に軽鎖を含み、したがって宿主細胞は、同じまたは異なるベクター上のいずれかで、軽鎖をコードする構築物をさらに発現する。

【 0 0 4 0 】

抗体の組み換え発現に適した宿主細胞は、当技術分野において周知である。1つの態様において、前記宿主細胞は、タンパク質のAsn結合型グリコシル化の能力がある細胞、例えば真核細胞、例えば哺乳動物細胞、例えばヒト細胞である。さらなる態様において、前記宿主細胞は、ヒト様グリコシル化またはヒトグリコシル化されている糖タンパク質を産生するように遺伝子操作されている非ヒト細胞である。そのような細胞の例は、遺伝子組み換えピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) [Hamilton et al., *Science* 301 (2003) 1244-1246; Potgieter et al., *J. Biotechnology* 139 (2009) 318-325]および遺伝子組み換えコウキクサ(*Lemna minor*) [Cox et al., *Nature Biotechnology* 12 (2006) 1591-1597]である。

【 0 0 4 1 】

1つの態様において、前記宿主細胞は、抗体重鎖からC末端リジン残基を効率的に除去することができない。例えば、Liu et al. (2008) *J Pharm Sci* 97: 2426 (参照により本明細書に組み入れられる)中の表2には、C末端リジンの部分的除去だけが達成されている、いくつかのそのような抗体産生系、例えばSp2/0、NS0または遺伝子導入乳腺(ヤギ)が記載されている。

【 0 0 4 2 】

より具体的には、そのような宿主細胞は、C末端リジンを含む構築物を発現する場合に

抗体分子の10%超、例えば30%超がK2アイソフォームである抗体調製物を産生する、細胞であってもよい。表1は、C末端切断に応じて予想されるK0、K1およびK2の量を示す。したがって、別の形で言い表せば、好ましい宿主細胞は、重鎖の30%超がC末端で未切断のままの、例えば重鎖の60%超が重鎖のC末端で未切断のままの、宿主細胞である。

【0043】

表1

% 未切断	% バッチ中K0	% バッチ中K1	% バッチ中K2
10	81	18	1
20	64	32	4
30	49	42	9
40	36	48	16
50	25	50	25
60	16	48	36
70	9	42	49
80	4	32	64
90	1	18	81
100	0	0	100

【0044】

本発明のさらなる態様において、前記宿主細胞は以下からなる群より選択される：

(i) 酵母細胞、例えばピキア・パストリスまたはサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセンラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)およびオガタエ・ミニュータ(*Ogataea minuta*)、ならびに

(ii) 糸状菌細胞、例えばアスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)、ならびに

(iii) 植物細胞、例えばシロイヌナズナ(*Arabidopsis*)細胞、コウキクサ、ニコチアナ・ベンサミアナ(*Nicotiana benthamiana*) (タバコ)、油料種子作物(ブラシカ・ナプス(*Brassica napus*))、大豆、米、トウモロコシ(ズイー・メイス(*Zea mays*))またはニンジン細胞、ならびに

(iv) NS0細胞、Sp2/0細胞またはPER.C6細胞。

【0045】

酵母および糸状菌における抗体の組み換え産生は、例えば、Joosten et al. (2003) *Microbial Cell Factories* 2:1およびGasser and Mattanovich (2007) *Biotech Lett* 29: 201により記述および概説されている。植物細胞における抗体の産生の場合、例えばCox et al. (2006) *Nat Biotechnol* 24: 1591, Decker and Reski (2007) *Curr Opin Biotechnol* 18: 393, Giritch et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14701またはHood et al. (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13: 630を参照されたい。NS0細胞株における抗体の発現は、例えば、Dempsey et al. (2003) *Biotechnol. Prog.* 19: 175により記述されている。とりわけ、Jones et al. (2003) *Biotechnol Prog* 19: 163には、ヒトPER.C6細胞における抗体の産生が記述されている。Sp2/0細胞における抗体産生の場合、例えば、Yang et al. (2007) *Biotechnol Bioeng.* 98: 141を参照されたい。

## 【0046】

さらなる態様において、前記重鎖をコードする構築物が該重鎖のC末端の位置にリジンまたはアルギニンをコードせず、好ましくは、該重鎖をコードする構築物が該重鎖のC末端の位置に荷電アミノ酸残基をコードしない。より好ましくは、重鎖をコードする構築物は、最もC末端側の6つのアミノ酸をコードするコドンの中に荷電アミノ酸残基に対するいずれのコドンも含まない。

## 【0047】

1つの態様において、抗体は、ヒト重鎖を含むヒト抗体である。抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、およびIgMを含むが、これらに限定されない、任意のアイソタイプであってよい。1つの態様において、抗体は、IgGアイソタイプ、例えばIgG1、IgG2、IgG3、および任意でIgG4より選択されるアイソタイプである。具体的な野生型重鎖定常配列は以下、SEQ ID NO:1~5に提供されている。しかしながら、各アイソタイプの異なるアロタイプが当技術分野において公知であり、全体が参照により本明細書に組み入れられるJefferies and Lefranc (2009), mAbs 1:4, 1-7に記述されている。

## 【0048】

本発明の上記の方法のさらなる態様において、段階(a)において提供されるヌクレオチド構築物は、C末端リジン残基に対するコドンを有する本来の重鎖配列に由来するか、またはそれに基づいてデザインされる。例えば、本来の重鎖配列は、下記のように、SEQ ID NO:1 (IgG1m(az)アロタイプ)もしくはSEQ ID NO:5 (IgG1m(f)アロタイプ)の残基番号325~330、またはSEQ ID NO:4の残基番号321~326であるC末端配列を含みうる。かくして、前記ヌクレオチド構築物は、前記本来の重鎖配列と比べてC末端リジン(k)残基に対するコドンの欠失または置換を含みうる。したがって、1つの態様において、ヌクレオチド構築物は、SEQ ID NO:1もしくは5の残基番号325~329を含むかまたはそれからなるC末端配列を含む。1つの態様において、ヌクレオチド構築物は、SEQ ID NO:4の残基番号321~325を含むかまたはそれからなるC末端配列を含む。

## 【0049】

1つの態様において、前記ヌクレオチド構築物は、C末端修飾以外は、IgG1アイソタイプ、任意でIgG1m(f)アロタイプの少なくともCH3ドメイン、少なくともCH2およびCH3ドメイン、またはCH1、CH2およびCH3ドメインを含む、定常領域配列を含んだ重鎖をコードする。1つの態様において、前記ヌクレオチド構築物は、C末端修飾以外は、IgG2アイソタイプの少なくともCH3ドメイン、少なくともCH2およびCH3ドメイン、またはCH1、CH2およびCH3ドメインを含む、定常領域配列を含んだ重鎖をコードする。1つの態様において、前記ヌクレオチド構築物は、C末端修飾以外は、IgG3アイソタイプの少なくともCH3ドメイン、少なくともCH2およびCH3ドメイン、またはCH1、CH2およびCH3ドメインを含む、定常領域配列を含んだ重鎖をコードする。1つの態様において、前記ヌクレオチド構築物は、C末端修飾以外は、IgG4アイソタイプの少なくともCH3ドメイン、少なくともCH2およびCH3ドメイン、またはCH1、CH2およびCH3ドメインを含む、定常領域配列を含んだ重鎖をコードする。1つの態様において、重鎖は、C末端リジン残基を除いてSEQ ID NO:1~5より選択される配列を含む。

## 【0050】

なおさらなる態様において、前記ヌクレオチド構築物は、C末端修飾以外はIgG1またはIgG2アイソタイプの重鎖をコードする、すなわち、C末端修飾を除いて配列がIgG1またはIgG2定常領域と同一である定常領域配列を有する。1つの態様において、前記ヌクレオチド構築物は、C末端修飾以外はIgG1またはIgG3アイソタイプの重鎖をコードする、すなわち、C末端修飾を除いて配列がIgG1またはIgG3定常領域と同一である定常領域配列を有する。さらなる態様において、前記ヌクレオチド構築物のC末端コドンは、ProまたはGly残基をコードし、例えばIgG1またはIgG2重鎖のC末端の-Pro-Gly-Lys配列は、-Pro-Glyまたは-Proのみに切断されよう。

## 【0051】

さらなる局面において、本発明は、上記の本発明の方法によって入手されるまたは入手

10

20

30

40

50

可能な抗体に関する。

【0052】

なおさらなる局面において、本発明は、抗体重鎖からC末端リジン残基を効率的に除去できない前記宿主細胞であって、C末端リジンを欠く重鎖をコードするヌクレオチド構築物を含む該宿主細胞に関する。好ましくは、宿主細胞は蘇類またはCHOではない。より好ましくは、前記宿主細胞は、(i)~(iv)の下、上記で指定されたタイプのうちの1つである。

【0053】

なおもさらなる局面において、本発明は、抗体のCDC媒介能を増強するための方法であって、抗体の重鎖からC末端リジン残基を除去する段階を含む該方法に関する。好ましい態様において、リジン残基は酵素的切断によって、例えばカルボキシペプチダーゼBまたはカルボキシペプチダーゼNなどのカルボキシペプチダーゼを用いて切断される(Cia et al. (2010) 前記)。1つの態様において、前記抗体はC末端リジン残基の除去の前に精製される。

10

【0054】

上記のように、ある細胞型、例えばハイブリドーマは、1つまたは2つのC末端リジンを含む分子もあれば含まない分子もある不均一な抗体分子集団を産生する。C末端リジンが抗体のCDC媒介能に影響を与えるという本研究から明らかであるように、そのようなC末端不均一性は、複数サンプル由来の異なる抗体を比較したい場合に望ましくない可能性がある。というのは、異なるハイブリドーマの間にはC末端プロセッシングの程度に関して差異が存在するかもしれないからである。抗体の結合特性に関連した特性をより良好に比較できるように、そのような差異を取り除くため、比較試験の前に抗体サンプルからC末端リジンを除去することが好都合でありうる。

20

【0055】

したがって、さらなる局面において、本発明は、複数の抗体産生細胞培養物、例えばハイブリドーマ細胞培養物を、所望の特性について試験するための方法であって、該培養物のサンプルを処理して上記のようにC末端リジンを除去する段階、および処理したサンプルを所望の特性について試験する段階を含む、該方法に関する。いくつかの態様において、C末端リジンを除去する前に細胞を取り除くこと、および/または抗体を培養サンプルから精製することが好都合でありうる。好ましい態様において、試験される所望の特性は細胞溶解または細胞致死である。

30

【0056】

上記で説明されるように、さらなる局面において、本発明は、タンパク質分解による除去を受けにくい荷電アミノ酸残基をC末端領域に少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれより多く）有する重鎖を含む抗体バリエーションに関する。

【0057】

荷電アミノ酸残基の例としては、リジン(KまたはLys)、アルギニン(RまたはArg)およびヒスチジン(HまたはHis)のような、正電荷を有するもの、ならびにグルタミン酸(EまたはGlu)およびアスパラギン酸(DまたはAsp)のような、負電荷を有するものが挙げられる。1つの態様において、荷電アミノ酸残基は、リジン、アルギニンおよびヒスチジンから、例えばリジンおよびアルギニンから、例えばリジンから選択される。1つの態様において、荷電アミノ酸残基はグルタミン酸およびアスパラギン酸から、例えばグルタミンから選択される。

40

【0058】

そのようなバリエーションは、典型的には、荷電残基のない対応する抗体と比べてCDC媒介能が低減されている。そのようなバリエーションは、例えばCDCの低減が望まれる治療的使用、例えば標的細胞を死滅させずに標的抗原をサイレンシングすることが望まれる使用に有用でありうる。

【0059】

いくつかの態様において、抗体は重鎖抗体である。しかしながら、ほとんどの態様にお

50

いて、抗体は軽鎖をさらに含む。

【 0 0 6 0 】

1つの態様において、前記荷電アミノ酸残基は、哺乳動物由来のプロテアーゼによる除去を受けにくい、好ましくはCHO、HEK-293、PER.C6、NS0またはSp2/0由来のプロテアーゼによる除去を受けにくい、より好ましくはCHO、HEK-293、PER.C6、NS0またはSp2/0細胞の分泌経路において活性なプロテアーゼ（例えばカルボキシペプチダーゼ）による除去を受けにくい。

【 0 0 6 1 】

さらなる態様において、前記荷電アミノ酸残基は、ヒトプロテアーゼによる除去を受けにくい、好ましくは循環中（例えば血中）のタンパク質に作用しうるヒトプロテアーゼによる除去を受けにくい。

10

【 0 0 6 2 】

1つの態様において、前記荷電アミノ酸は、最もC末端側の6つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の5つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の4つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の3つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記重鎖の最もC末端側の2つのアミノ酸残基の中にあり、例えば前記荷電アミノ酸は前記重鎖の最もC末端側のアミノ酸残基である。

【 0 0 6 3 】

さらなる態様において、前記重鎖は、本明細書において下記のSEQ ID NO:1、2、3、4または5に記載されているCH3配列であって、最もC末端側の最多6つのアミノ酸残基の中に、すなわち、それぞれ325位～330位、321位～326位、372位～377位、321位～326位または325位～330位に前記荷電アミノ酸が位置付けられるように修飾された、該配列を含む。

20

SEQ ID NO:1 : IgG1定常領域のアミノ酸配列(アクセッション番号P01857; IgGm (za) アロタイプ) (CH3配列に下線が引かれている)

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv  
51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep  
101 kscdkthtct pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs  
151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk  
201 eykckvsnka lpapiektis kakggprepq vytlppsrde ltknqvsltc  
251 lvkgfypsdi avewesngqp ennykttpv ldsdgsffly skltvdksrw  
301 qqgnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

30

SEQ ID NO:2 : IgG2定常領域のアミノ酸配列(アクセッション番号P01859) (CH3配列に下線が引かれている)

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv  
51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssnfgtgt ytcnvdhkps ntkvdktver  
101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvdvshedp  
151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vvsvlvtvvhq dwlngkeykc  
201 kvsnkglpap iektisktkg qprepqvtyl ppsreemtkn qvsltclvkg  
251 fypsdiavew esnqgpenny kttpmldsd gsfflysklt vdkswqqgn  
301 vfscsvmhea lhnhytqksl slspgk

40

SEQ ID NO:3 : IgG3定常領域のアミノ酸配列(アクセッション番号P1860) (CH3配列に下線が引かれている)

1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv  
 51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel  
 101 ktplgdttt ht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc  
 151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed  
 201 pevqfkwvyvd gvevhnakt preeqynstf rvvsvltvlh qdwlngkeyk  
 251 ckvsnkalka piektisktk ggprepgvyt lppsreemtk ngvsltclvk  
 301 gfypsdiave wessqgpenn ynttpmlds dgsfflyskl tvdkswggg  
 351 nifscsvmhe alhnrtqks lslspgk

SEQ ID NO:4 : IgG4定常領域のアミノ酸配列(CH3配列に下線が引かれている)

10

astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv  
 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtkt ytcnvdhkps ntkvdkrves  
 kygppcpcsp afeilggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvsqed  
 pevqfnwyvd gvevhnakt preeqfnsty rvvsvltvlh qdwlngkeyk  
 ckvsnkgpls siektiskak ggprepgvyt lppsgeemtk ngvsltclvk  
gfypsdiave wesnqgpenn ykttppvlds dgsfflyskl tvdkswggg  
nvfscsvmhe alhnhytqks lslslgk

SEQ ID NO:5 : IgG1m(f)アロタイプ定常領域のアミノ酸配列(CH3配列に下線が引かれている)

20

1 astkgpsvfp lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv  
 51 htfpavqlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvep  
 101 kscdkthtctp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtpevt cvvvdvs  
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvvsvlt vlhqdwlngk  
 201 eykckvsnka lpapiektis kakggprepg vytlppsree mtkngvsltc  
 251 lvkgfypsdi avewesnqgp ennykttppv ldsdgsffly skltvdksw  
 301 qqqnvfscsv mhealhnhyt qkslslspgk

#### 【 0 0 6 4 】

30

さらなる態様において、前記重鎖は、SEQ ID NO:1、2、3、4または5に記載されている定常領域配列全体を含み、前記荷電アミノ酸は、最もC末端側の6つのアミノ酸残基の中に、すなわち、それぞれ325位～330位、321位～326位または372位～377位に位置付けられている。

#### 【 0 0 6 5 】

1つの態様において、前記荷電アミノ酸は、正荷電アミノ酸残基、好ましくはリジン残基である。C末端リジンは、通常、タンパク質分解による除去を受けやすいので、前記バリエーションは、該リジンのC末端側の位置において、付加または置換などのアミノ酸修飾を1つまたは複数含む。例えば、1つの態様において、前記荷電アミノ酸残基は、該荷電アミノ酸残基のC末端側にあるプロリン残基の存在によってタンパク質分解による除去を受けにくく、ここで該プロリン残基は該荷電アミノ酸残基のすぐC末端側に位置することが好ましく、より好ましくは、ここで該荷電アミノ酸残基および該プロリン残基は重鎖の最もC末端側の2つのアミノ酸残基である。例えば、抗体重鎖は、C末端にプロリン残基が付加されている、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4重鎖でありうる。

40

#### 【 0 0 6 6 】

別の態様において、前記荷電アミノ酸は、負荷電アミノ酸残基、好ましくはグルタミン酸残基である。負電荷を持つC末端残基は、通常、哺乳動物細胞における発現時にタンパク質分解による除去を受けにくく、かくして、いくつかの態様において、そのようなバリエーションは、さらなるアミノ酸修飾を含まない。

#### 【 0 0 6 7 】

50

さらなる態様において、前記重鎖は、C末端領域において、2つまたはそれより多い荷電アミノ酸残基、例えば2つ、3つ、4つまたは5つの荷電アミノ酸残基を含み、該荷電アミノ酸残基は、好ましくは全て正電荷または全て負電荷のいずれかを有し、任意で、該荷電残基のC末端側にさらなるアミノ酸修飾を含んでもよく、例えば該荷電残基のC末端側にプロリン残基を含んでもよい。

【0068】

いくつかの態様において、指定されたアミノ酸修飾は、アミノ酸置換の結果である。他の態様において、指定されたアミノ酸修飾は、C末端アミノ酸付加の結果である。

【0069】

1つの態様において、前記重鎖は、  
pro-gly-glu (PGE), pro-gly-lys-pro (PGKP; SEQ ID NO:6), pro-gly-lys-lys-pro (PGKKP; SEQ ID NO:7), および pro-gly-lys-lys-lys-pro (PGKKKP; SEQ ID NO:8)

より選択されるC末端配列を含む。

【0070】

1つの態様において、前記抗体はヒト抗体、好ましくはヒトIgG1抗体またはヒトIgG3抗体である。

【0071】

別の態様において、前記抗体はC末端の位置で結合されない、例えば毒素または標識などの別の分子に結合されない。さらなる態様において、前記抗体は、C末端の位置で結合されるのではなく、分子の別の位置で結合され、例えば該抗体は、他の部位で、毒素(放射性同位体を含む)、プロドラッグまたは薬物からなる群より選択される化合物に連結されうる。そのような化合物は、例えばがん治療において、標的細胞の死滅をいっそう効果的にしうる。入手される抗体はかくして、免疫結合体である。

【0072】

さらなる局面において、本発明は、医薬として用いるための上記の本発明の抗体に関し、特に、標的細胞を死滅させずに標的抗原をサイレンシング(すなわち阻害)することが望ましい疾患または障害の治療用の医薬として用いるための上記の本発明の抗体に関する。そのような疾患および障害の例としては、自己免疫疾患および炎症が挙げられる。

【0073】

さらなる局面において、本発明は、タンパク質分解による除去を受けにくい荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖をコードするヌクレオチド構築物に関する。さらなる態様において、前記ヌクレオチド構築物は、本発明の抗体について上述したさらなる特徴のいずれか1つまたは複数を有する。

【0074】

さらなる局面において、本発明は、本発明の抗体バリエーションを産生できる宿主細胞に関する。そのような宿主細胞は、本発明のヌクレオチド構築物で形質転換もしくは遺伝子導入された細胞、または重鎖からC末端リジンを除去できるカルボキシペプチダーゼの活性を取り除くように遺伝子組み換えされた宿主細胞でありうる。宿主細胞の例としては、CHO、HEK-293、PER.C6、NS0およびSp2/0が挙げられる。

【0075】

なおもさらなる局面において、本発明は、本発明による宿主細胞を培養する段階および細胞培養物から前記抗体を回収する段階を含む、本発明による抗体バリエーションを産生する方法に関する。1つの態様において、前記宿主細胞は、C末端に負荷電アミノ酸残基を有するか、またはC末端において正荷電アミノ酸残基の後にプロリン残基を有する重鎖をコードするヌクレオチド構築物を含むCHOまたはHEK細胞である。

【0076】

1つの局面において、本発明は、補体依存性細胞傷害を媒介する抗体の能力を低下させるための方法であって、少なくとも1つの荷電アミノ酸残基、プロリン残基、またはその両方を、抗体の重鎖のC末端領域に付加する段階を含む該方法に関する。1つの態様におい

10

20

30

40

50

て、正荷電アミノ酸は、C末端領域に既に存在するプロリン残基のN末端側に挿入される。1つの態様において、プロリン残基は、C末端領域に既に存在するリジン残基のC末端側に付加される。1つの態様において、正荷電アミノ酸およびプロリンがC末端に付加され、ここで正荷電アミノ酸がプロリン残基のN末端側に付加される。そのような態様において、正荷電アミノ酸は、リジン、アルギニンおよびヒスチジン、例えばリジンまたはアルギニン、例えばリジンより選択されうる。

【0077】

1つの態様において、正荷電アミノ酸がC末端領域に付加される。そのような態様において、正荷電アミノ酸は、グルタミン酸およびアスパラギン酸より選択されうる。

【0078】

1つの態様において、本方法は、C末端領域に1つまたは複数のさらなる荷電アミノ酸を付加する段階を含む。

【0079】

上記で説明されたように、さらなる局面において、本発明は、正荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖を含む抗体バリエーション分子の亜集団と、負荷電アミノ酸残基をC末端領域に有する重鎖を含む抗体バリエーション分子の亜集団とを含む抗体混合物であって、該正荷電アミノ酸残基および該負荷電アミノ酸残基がタンパク質分解による除去を受けにくい、該抗体混合物に関する。

【0080】

任意の特定の理論によって束縛されるわけではないが、逆の電荷を有する残基間の静電相互作用によって分子間抗体相互作用が強化され、かくして、補体系の活性化を促進するものと仮定される。

【0081】

1つの態様において、前記亜集団の各々が前記混合物の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば前記混合物の少なくとも30%を構成する。

【0082】

別の態様において、2つの亜集団の各々における抗体分子は、2本の同一の重鎖を含む。さらなる局面において、本発明は、医薬として用いるための、好ましくはがんの治療において用いるための本発明による抗体混合物に関する。

【0083】

上記で説明されるように、さらなる局面において、本発明は、抗体分子の間での分子間C末端相互作用に有利に働く1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む変異C末端領域を有する重鎖を含む抗体に関する。任意の特定の理論によって束縛されるわけではないが、抗体分子の間での分子間相互作用の強化は、補体系の活性化を促進し、かくして、アミノ酸修飾のない抗体産物と比べてCDC媒介能の増強をもたらすものと考えられる。

【0084】

1つの態様において、抗体は、同一ではない2本の重鎖を含む。この特に興味深い態様において、抗体の一方の重鎖はC末端領域において負荷電アミノ酸残基を含み、かつ同じ抗体の他方の重鎖はC末端領域において正荷電アミノ酸残基を含み、ここで該荷電アミノ酸残基はタンパク質分解による除去を受けにくい。そのような抗体は、正電荷を持つ重鎖および負電荷を持つ重鎖を含み、かくして、抗体分子の間での逆の電荷を有する重鎖のアライメントを通じ、CDC活性化に有利に働く強力な抗体-抗体分子間の相互作用を含む多量体を形成するであろう。

【0085】

1つの態様において、そのような抗体は単一特異性抗体である。別の態様において、それは二重特異性抗体である。

【0086】

さらなる局面において、本発明は、医薬として用いるための、好ましくはがんの治療において用いるための本発明の上記の抗体に関する。

【0087】

10

20

30

40

50

なおもさらなる局面において、本発明は、2本の異なる重鎖をコードするヌクレオチド構築物を含む宿主細胞を培養する段階、および該宿主細胞の細胞培養物から抗体を回収する段階を含む、そのような抗体を産生する方法に関する。そのような宿主細胞は、例えばCHOまたはHEK細胞でありうる。

#### 【0088】

上記のように、本発明は、とりわけ、重鎖のC末端の荷電アミノ酸残基を除去するための、または付加および/もしくは保護するための抗体の修飾に関する。修飾前の本発明の出発材料として用いられる抗体は、例えばKohler et al., Nature 256, 495 (1975)によって最初に記述されたハイブリドーマ法によって産生されてもよく、または組み換えDNA法によって産生されてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えば、Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)において記述される技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。モノクローナル抗体は、任意の適当な供給源から得てもよい。このように、例えば、モノクローナル抗体は、関心対象の抗原によって免疫したマウスから入手されたマウス脾臓B細胞から調製されたハイブリドーマから、例えば、表面上に抗原を発現する細胞の形で、または関心対象の抗原をコードする核酸の形で得てもよい。モノクローナル抗体はまた、免疫したヒト、またはラット、イヌ、霊長類などの非ヒト哺乳動物の抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得てもよい。

#### 【0089】

本発明の出発材料として用いられる抗体は、例えばキメラ抗体またはヒト化抗体であってもよい。別の態様において、抗体はヒト抗体である。ヒトモノクローナル抗体は、マウス免疫系ではなくヒト免疫系の部分を保有している、遺伝子導入マウスまたは染色体導入マウス、例えばHuMAbマウスを用いて作出することができる。HuMAbマウスは、内因性の $\mu$ および $\kappa$ 鎖座を不活化する標的化変異とともに、再配列されていないヒト重鎖( $\mu$ および $\kappa$ )ならびに軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニローカスを含む(Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994))。したがって、該マウスはマウスIgMまたは $\kappa$ 鎖の発現の低減を示し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性のヒトIgG、モノクローナル抗体を作出する(Lonberg, N. et al. (1994)、前記: Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)、およびHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N. Y. Acad. Sci. 764 536-546 (1995)において論評)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)、Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)において詳細に記述されている。同様にUS 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,789,650、US 5,877,397、US 5,661,016、US 5,814,318、US 5,874,299、US 5,770,429、US 5,545,807、WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/22645、WO 92/03918、およびWO 01/09187を参照されたい。これらの遺伝子導入マウス由来の脾細胞を用いて、周知の技法によりヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作出することができる。

#### 【0090】

さらに、本発明のヒト抗体または他の種由来の本発明の抗体は、当技術分野において周知の技法を用いて、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、哺乳動物ディスプレイ、およびその他の技法を含むがこれらに限定されないディスプレイ型の技術によって特定することができ、結果として入手された分子は、成熟の技法が当技術分野において周知であるので、親和性成熟などの、さらなる成熟に供することができる。

#### 【0091】

標的疾患および抗原

C末端リジンまたは他の荷電アミノ酸残基のない、本発明の抗体は、CDCを介した細胞致死の増強が望まれる目的のような、多くの異なる目的に用いられうる。適当な疾患の例としては、非限定的に、さまざまな形態のがんが挙げられる。そのような抗体に適した抗原標的の例としては、非限定的に、腫瘍erbB1 (EGFR)、erbB2 (HER2)、erbB3、erbB4、MUC-1、CD4、CD19、CD20、CD25、CD32、CD37、CD38、CD74、CD138、CXCR5、c-Met、HERV-外被タンパク質、ペリオスチン、Bigh3、SPARC、BCR、CD79、EGFrvIII、IGFr、L1-CAM、AXL、組織因子(TF)、EpCAMおよびMRP3が挙げられる。好ましい抗原には、CD20、HER2、EGFR、CD38、IGFR、CD25およびCD32が含まれる。例示的な抗体には、HuMAb 7D8、HuMAb 2F2 (WO 004035607に記述されている)およびHuMAb 005 (WO 2006099875に記述されている)が含まれる。

10

#### 【0092】

C末端リジンまたは他の荷電アミノ酸残基を含む本発明の抗体は、例えば自己免疫疾患または炎症の治療において、作用機序としてCDCが好まれない用途において用いられうる。適当な抗原標的の例としては非限定的にTNF- $\alpha$ 、IL-1、VEGF、IL-6およびIL-8が挙げられる。

#### 【0093】

##### 組成物および使用

さらなる主な局面において、本発明は、本明細書において記述の本発明による抗体および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物に関する。

#### 【0094】

薬学的組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されているものなどの、従来技術にしたがって製剤化することができる。本発明の薬学的組成物は、例えば、希釈剤、増量剤、塩、緩衝液、界面活性剤(例えば、非イオン性界面活性剤、例えばTween-20もしくはTween-80)、安定剤(例えば、糖またはタンパク質を含まないアミノ酸)、保存剤、等張剤、抗酸化物質、組織固定剤、可溶化剤、および/または薬学的組成物の中に含めるのに適した他の材料を含むことができる。本発明の薬学的組成物において利用されうる適当な水性および非水性担体の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)が挙げられる。

20

30

#### 【0095】

薬学的組成物は任意の適当な経路および様式によって投与することができる。1つの態様において、本発明の薬学的組成物は非経口的に投与される。本明細書において用いられる「非経口的に投与される」は、経腸および局所投与以外の、普通は注射による投与様式を意味し、これは表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内注射および点滴を含む。

#### 【0096】

抗体に効率的な投与量および投与レジメンは、治療される疾患または状態に依り、当業者によって決定されうる。本発明の抗体の治療的有効量の例示的な、限定するものではない範囲は、約0.1~100 mg/kg、例えば約0.1~50 mg/kg、例えば約0.1~20 mg/kg、例えば約0.1~10 mg/kg、例えば約0.5 mg/kg、例えば約0.3 mg/kg、約1 mg/kg、約3 mg/kg、約5 mg/kg、または約8 mg/kgである。

40

#### 【0097】

本発明の抗体はまた、併用療法において投与することもでき、すなわち、治療される疾患または状態に適している他の治療剤と組み合わせることもできる。したがって、1つの態様において、抗体を含有する医薬は、細胞毒性剤、化学療法剤または血管新生阻害剤のような、1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせるためのものである。そのような併用投与は同時、別々または逐次であってもよい。さらなる態様において、本発明は、がんなどの疾患を治療または予防するための方法であって、放射線治療および/または外科

50

手術と組み合わせて、本発明の抗体の治療的有効量の、それを必要としている対象への投与を含む該方法を提供する。

#### 【実施例】

#### 【0098】

実施例1: 抗CD20 C末端リジンバリエーションおよび抗CD38 C末端リジンバリエーションの陽イオン交換クロマトグラフィー(CIEX)プロファイル、キャピラリー等電点分画(cIEF)およびドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析

抗CD20抗体(2F2, WO 2004035607 (Genmab)に記述されている)および抗CD38抗体(005, WO 2006099875 (Genmab)に記述されている)をハイブリドーマ上清から単離し、分取陽イオン交換クロマトグラフィー(CIEX)に供した。CIEXは、ProPac (登録商標) WCX 10 (9 mm × 250 mm)分取カラムを用いAKTA Purifierシステムにて行った。移動相AおよびBは、10 mM リン酸ナトリウム(pH 7.2)および10 mMリン酸ナトリウム(pH 7.0)中25 mM塩化ナトリウムであった。注入の前に抗体を終夜透析した。60分で0%から12% Bへの直線勾配(抗CD20)および25分で8%から13% Bへの直線勾配(抗CD38)を用いた。どちらの抗体分離の場合にも流速を4 mL/分とし、280 nmでの吸光度によって濃度を決定した。各抗体ごとに、6回の連続注入を行い、個別にK0、K1およびK2アイソフォーム(1抗体あたり0個、1個または2個の重鎖C末端リジンを含む)をプールし、濃縮し(Sartorius, Vivaspin, 10,000 Da MWCO)、分離用緩衝液をPBS緩衝液に交換した。プールした画分を、処理なしでまたはカルボキシペプチダーゼB (CPB)処理(20 mMリン酸ナトリウム[pH 7.2]中の抗体500 μL [450 μg/mL]を0.05 IU/μL CPB [Calbiochem] 10 μLとともに混合し、4時間37 °Cでインキュベートした)後にcIEFおよびSDS PAGEによって生化学的に分析した。さらに使用するまで-80 °Cでサンプルを貯蔵した。cIEF分析の場合、抗体サンプルを5 μg/mLに希釈し、20 μLを高pI KitならびにpH 7.65および10.0マーカー(Amersham, Piscataway, USA)とともにプレキャストcIEF FocusGel 6-11 24S (ETC, Kirchentellinsfurt, Germany)に負荷した。ゲルを500 V、30 mAおよび10 Wで30分間プレフォーカスし、引き続き1500 V、18 mAおよび20 Wで90分間、ならびに2000 V、15 mAおよび25 Wで30分間フォーカスした。ゲルを20% (w/v)トリフルオロ酢酸中にて30 °Cで45分間固定した。バンドの検出は、FocusGel供給業者によって推奨されるアンモニア銀染色手順を用いて行った。cIEFゲルは、GeneGenius Imaging System (Synoptics, Cambridge, UK)を用いてデジタル画像化した。cIEFに用いたその他全ての試薬および装置は、GE Healthcare (Uppsala, Sweden)から入手した。非還元SDS-PAGEは、4~12%のNuPAGE Bis-Tris SDS-PAGEゲル(Invitrogen, Breda, The Netherlands)にて行った。SDS-PAGEゲルは、GeneGenius Imaging System (Synoptics, Cambridge, UK)を用いてデジタル画像化した。

#### 【0099】

図1は、抗CD20 (a)抗体および抗CD38 (b)抗体に対するCIEXプロファイルを示す。cIEF分析(図1cおよび1d)は、未分画の抗CD20および抗CD38抗体調製物の中に、1個のIgG分子あたり0個、1個または2個のC末端リジンを含む3種のIgG荷電バリエーション(K0、K1およびK2)が存在することを明示している。バリエーションは、回収されたアイソフォームのcIEFプロファイルにおいて示されるように、CIEXによって分離することが可能であった。SDS PAGE分析(図1eおよび1f)は、CIEX分画後に構造的完全性が維持されていたことを示す。未分画の抗CD20および抗CD38調製物ならびに回収されたアイソフォームをカルボキシペプチダーゼB (CPB)で処理した後は、K0アイソフォームしか存在していなかった(図1cおよび1d)。

#### 【0100】

実施例2: 抗CD20抗体および抗CD38抗体のC末端リジンアイソフォームによる結合能および補体媒介性細胞傷害(CDC)の誘導

カルボキシペプチダーゼB (CPB)処理の有無にかかわらず、抗体調製物および回収されたアイソフォームは、前記のように分取CIEXによって得た。CD20およびCD38の両方を発現するDaudi細胞への抗体サンプルの結合は、FACS分析によって分析した。ポリスチレン96ウェル丸底プレート(Greiner bio-one 650101)中50 μLの細胞 $10^5$ 個を、RPMI1640/0.2% BSA中、0.04 μg/mLから10 μg/mLに及ぶ抗体調製物の連続希釈液とともに、4 °Cで30分間

インキュベートした。RPMI/0.2% BSA中で2回洗浄した後に、細胞をフルオレセインイソチオシアネート(FITC)結合ウサギ抗ヒトIgG (F0056, Dako, Glostrup, Denmark)とともに4で30分間インキュベートした。細胞をRPMI/0.2% BSA中で2回洗浄し、RPMI/0.2% BSA中で再懸濁し、FACS Calibur (BD Biosciences)にて分析した。GraphPad Prism V5.01ソフトウェア(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて非直線回帰(傾きを可変量としたS字型用量応答曲線)により結合曲線を分析した。CDCの誘導を調べるため、Daudi細胞(細胞 $2 \times 10^6$ 個/mL)を抗体調製物の連続希釈液とともにRTで15分間インキュベートした。補体源として正常ヒト血清(NHS; M0008, Sanquin, Amsterdam, The Netherlands)を加えた(終濃度20% [v/v])。丸底96ウェルプレート(Nunc, Rochester, NY)中にて37で45分間インキュベートした後、サンプルを氷上に置くことによって反応を停止させた。ヨウ化プロピジウム(PI, Sigma Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)染色法を用いてFACS分析により、細胞溶解を決定した。溶解の百分率を次のように決定した: 溶解の百分率= (PI陽性細胞の数/細胞の総数)  $\times$  100%。

【 0 1 0 1 】

【表 1】

	未分画	未分画 + CPB	K2	K2 + CPB
抗CD20	0.84	0.82	1.8	1.0
抗CD38	0.12	0.13	0.20	0.16

表1 - 抗CD20抗体および抗CD38抗体によるCDCの誘導。

示したデータは、抗CD20抗体および抗CD38抗体の、カルボキシペプチダーゼB (CPB)処理有りおよび無しでの、未分画および回収K2アイソフォームによるDaudi細胞のCDCの誘導に対するEC<sub>50</sub>値[ $\mu$ g/mL]である。

【 0 1 0 2 】

図2左上パネルは、カルボキシペプチダーゼB処理有りおよび無しでの抗CD20抗体の未分画および回収K2アイソフォームのDaudi細胞への結合が同等であることを示す。右上パネルは、同じことが抗CD38に当てはまることを示す。左下パネルおよび表1から、CDCの誘導は抗CD20抗体の回収K2アイソフォームの場合には効率が低い(およそ2倍低い)ことが示される。CDCの誘導能は、抗CD20の回収K2アイソフォームのカルボキシペプチダーゼB処理後に回復した。右下パネルおよび表1は、同じことが抗CD38抗体に当てはまることを示す。カルボキシペプチダーゼB処理は、K2アイソフォームのCDC誘導能を部分的に回復させた。これらのデータから、C末端リジンの存在が抗体のCDC誘導能に負の影響を与えることが示唆される。

【 0 1 0 3 】

カルボキシペプチダーゼB処理は、未分画の抗CD20抗体または抗CD38抗体のCDC誘導能に影響を与えなかった。未分画の抗体調製物は、図1に示されるように、C末端リジンアイソフォーム(K1およびK2)を含む。しかしながら、未分画の抗体調製物中のC末端リジンを含むアイソフォームの画分は、おそらく、小さすぎてCDC誘導能に影響を与えることができない。

【 0 1 0 4 】

実施例3: 抗CD38抗体の未分画および回収K2アイソフォームによるC1q利用の効力

カルボキシペプチダーゼB (CPB)処理の有無にかかわらず、抗体調製物および回収されたK2アイソフォームは、前記のように得た。C1q利用の効力を調べるため、Daudi細胞(細胞 $2 \times 10^6$ 個/mL)を、固定濃度(10  $\mu$ g/mL)の抗体調製物とともに、10%ウシ胎仔血清を補充したRPMI1640培地中で室温で15分間インキュベートした。1 mM MgCl<sub>2</sub>および1 mM CaCl<sub>2</sub>を補充したC1q枯渇血清(Quidel, San Diego, CA)ならびに低濃度のC1q (Complement Technologies, Tyler, TX)を補体源として加えた(終濃度50% [v/v])。前記のようにCDCアッセイ法を行った。

【 0 1 0 5 】

【表 2】

	未分画	未分画 + CPB	K2	K2 + CPB
抗 CD38	1.3	0.8	4.8	0.7

表2 - 抗CD38抗体の未分画および回収K2アイソフォームによるC1q利用の効力。

示したデータは、抗CD38抗体の、CPB処理有りおよび無しでの、未分画および回収K2アイソフォームによるDaudi細胞のCDCの誘導に対するC1q必要量のEC<sub>50</sub>値[μg/mL]である。

【 0 1 0 6 】

図3および表2は、Daudi細胞のCDCを誘導するために必要とされるC1qの量が抗CD38の回収K2アイソフォームの場合にはかなり増強された(3.5倍超)ことを示す。C1q使用の効力はカルボキシペプチダーゼB処理によって完全に回復された。未分画の抗CD38抗体のカルボキシペプチダーゼB処理では、C1q利用の効力がわずかに(2倍未満)改善されただけであった。

【 0 1 0 7 】

実施例4: HEKにより産生された、抗CD38抗体および1本の重鎖あたり1個、2個または3個のC末端リジンまたはC末端グルタミン酸を含む変異体による結合およびCDC誘導

回収されたK2アイソフォームによるCDC誘導の効力が未分画の抗体調製物と比べて低下していたことについて、C末端リジンの存在が実際に関与していたことをさらに検証するため、各重鎖の中に0個、1個、2個または3個のC末端リジンを含む変異体を構築した。さらに、C末端の位置に負電荷(グルタミン酸; E)を有する変異体を構築した。変異体を下記表に記述する。EUナンバリングでのアミノ酸P445はSEQ ID NO:1および5 (それぞれ、IgG1 m (za)およびIgG1m(f)アロタイプFc配列)において328位のプロリンに相当する。

【 0 1 0 8 】

【表 3】

C末端配列 (EUナンバリングを使用)	略語	電荷	変異タンパク質 のpI値
445-PGE-447	E2	-	8.2
445-PG-446	K0	0	8.5
445-PGKP-448	K2	+	8.8
445-PGKKP-449	K4	++	9.0
445-PGKKKP-450	K6	+++	9.1

表3 - 抗CD38抗体の変異体。

pI値はcIEF分析によって決定した(図4a)。

【 0 1 0 9 】

抗CD38抗体005 (WO 2006099875 (Genmab)に記述されている)の発現用の哺乳動物発現ベクターは、抗体のヒトIgG1 (アロタイプf)重鎖および軽鎖のコード領域をpcDNA3.3 (Invitrogen)にクローニングすることによって構築された。PCRを用いて、C末端の重鎖伸長部-KP、-KKP、-KKKPおよび-Eを重鎖発現ベクターに導入した。プロリンを導入して、付加されたC末端リジンの切断を防いだ。全ての抗CD38抗体変異体は、関連する重鎖および軽鎖発現ベクターをHEK293F細胞(Invitrogen)に、293fectin (Invitrogen)を用いて製造元の使用説明書にしたがって一過的に同時遺伝子導入することで、Freestyle培地(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて無血清条件下で産生された。抗体は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー(MabSelect SuRe, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)により精製され、PBSで終夜透析され、0.2 μMのデッドエンドフィルタにて濾過滅菌された。精製されたC末端IgG1バリエーションの濃度を280 nmでの吸光度によって決定した。抗CD38抗体および抗CD38抗体変異体をcIEFによって分析し、Daudi細胞への結合をFACS分析によって分析し、Daudi細胞を用いたCDCアッセイ法においてCDCの誘導を試験した。全てのアッセイ法

は前記のように行った。

【 0 1 1 0 】

【表 4】

	抗CD38	K0	K2	K4	K6	E2
EC <sub>50</sub>	0.21	0.21	0.29	N.D. <sup>a</sup>	0.28	0.26
最大溶解	97	95	65	9	25	26

a) 決定することができなかった。

表4 - 抗CD38抗体および変異体によるCDC誘導。

示したデータは、EC<sub>50</sub>値(μg/mL)および最大濃度(4 μg/mL)の試験抗体で誘導された溶解の百分率である。

【 0 1 1 1 】

図4aは、全ての抗体変異体が、導入されたアミノ酸に基づいて計算されたpIで移動したことを示し、変異体が安定であること、およびC末端の付加アミノ酸が切断されなかったことを示唆している。図4bは、Daudi細胞への抗CD38抗体の結合がC末端リジンまたはグルタミン酸の導入によって影響されなかったこと、および全ての変異体に対して同等であったことを示す。図4cおよび表4は、Daudi細胞のCDC誘導が抗CD38抗体およびPG変異体に対して同様であったことを示す。1本の重鎖あたり、正電荷を有する1つのC末端リジンの導入がCDCの誘導能を低下させたが、これは、誘導された最大溶解率が低いこと(およそ30%の低下)に反映されていた。1本の重鎖あたり2つのC末端リジン(KK)の導入がCDCの誘導能を完全に消失させた。1本の重鎖あたり3つのC末端リジンを含む変異体は、2つのC末端リジンを含む変異体よりもCDCの誘導においてわずかに効率的であった。C末端グルタミン酸を含む変異体も同様に、CDCの誘導において非効率的であった。

【 0 1 1 2 】

実施例5: 抗CD38抗体変異体の混合物によるCDC誘導

IgG分子間の電荷斥力が、C末端の位置にリジンまたはグルタミン酸を保有する抗CD38変異体のCDC活性の低減に関わるかどうかを調べるため、C末端の位置に異なる電荷を有する変異体を混合した。CDCアッセイ法を前記のように行った。

【 0 1 1 3 】

図5aは、総IgG濃度を一定に保ちながら、K4変異体をK0に加えることで、CDC誘導の効力がK0のみでの効力と比べて低下されたことを示す。図5bは、E2変異体の添加の場合にも同じ効果が認められたことを示す。これらの実験は、本発明者らの先の所見と十分一致しており、C末端の位置に荷電残基を有する抗CD38の変異体が、強力に低減されたCDC活性を有することを裏付けている。図5cは、負電荷を持つE2変異体と、正電荷を持つK4変異体とを混合することで、CDC誘導効力を、K0によって誘導されるCDCのレベルにまでほぼ完全に回復させたことを示す。E2変異体およびK2変異体の混合物の場合にも同様の結果が得られた(データは示されていない)。図5dは、最大溶解がおよそ7:3のE2:K4比で得られたことを示す。

【 0 1 1 4 】

このデータから、異なるIgG分子間の相互作用、より具体的には、Fc-Fc相互作用がCDCの誘導において重要な役割を果たすことが示唆される。

【 0 1 1 5 】

実施例6: CDCアッセイ法によって検出された、IgG1変異刺激性Fc:Fc相互作用を介した抗体オリゴマー化の特定

CH3ドメインのC末端の位置に焦点を合わせた変異を含めて、変異のライブラリを作成した。Quikchange部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene, US)を用いて抗CD38抗体005のIgG1 Fc領域の中に変異を導入した。手短に言えば、所望の変異位置ごとに、所望の位置で縮重コドンをコードするフォワードおよびリバースプライマーを用いて、全長プラスミドDNA鋳型を複製した。得られたDNA混合物をDpnIにより消化してソースプラスミドDNA

10

20

30

40

50

を除去し、これを用いて大腸菌(E. coli)を形質転換した。得られたコロニーをプールし、培養し、プラスミドDNAをこれらのプールから単離し、大腸菌へ再び形質転換して、クローン性コロニーを得た。得られたコロニーから単離された変異体プラスミドDNAを、DNA配列決定(LGC genomics, Berlin, Germany)によって調べた。発現カセットをPCRによってプラスミドDNAから増幅し、抗CD38抗体005の変異体重鎖および野生型軽鎖の両方を含むDNA混合物を、本質的には製造元によって記述されているように293fectin (Invitrogen, US)を用いてFreestyle HEK293F細胞(Invitrogen, US)に一過的に遺伝子導入した。抗体変異体を含む遺伝子導入細胞の上清を集めた。

#### 【 0 1 1 6 】

CDCアッセイ法を次のように行った。Daudi細胞またはWien 133細胞 $0.1 \times 10^6$ 個を総量100  $\mu$ L中1.0  $\mu$ g/mLの未精製抗体とともに丸底96ウェルプレート中で、RTにて振盪機上で15分間プレインキュベートした。次に、正常ヒト血清30  $\mu$ Lを補体源として加え(終濃度30%)、インキュベータ内にて37℃で45分間インキュベートした。プレートを氷上に置くことによって反応を停止させた。ヨウ化プロピジウム10  $\mu$ Lを加え、FACSにより細胞溶解を決定した。

#### 【 0 1 1 7 】

抗CD38抗体に組み入れられたCH3 C末端領域における変異を、Daudi細胞のCDCを誘導するその能力について試験した。変異型抗体の溶解効果を野生型抗体のそれと比較したが、野生型抗体の溶解を100%に設定した。阻害のカットオフを66%以下の溶解に設定した。この結果を表5に示す。

#### 【 0 1 1 8 】

抗CD38抗体005に組み入れられた変異を、Wien 133細胞に対するCDCによって決定した場合のオリゴマー化を増強するその能力について試験した。野生型抗体はWien 133細胞に対してCDCを誘導することができない。10%以上の細胞溶解を示す変異体を、増強としてスコア化した。この結果を表6に示す。

#### 【 0 1 1 9 】

表5は、変異P445DおよびP445Eに係るC末端の位置での負電荷の導入が、予想通りにIgG1野生型と比べてCDCを低下させることを示す。同様に、正電荷の導入、すなわちP445HおよびP445Kは予想通りCDCを低下させる。しかし、変異K447IはCDCを明白に低下させ、その一方で、C末端の位置における正電荷を持つKの除去は、CDCにプラスの影響を及ぼすことを予想させるものであった。さらに、G446およびK447の、アルギニンとの交換は、予想に反して、CDCに及ぼすプラスの影響が小さいように思われる。しかし、これは、C末端アルギニンが、実際、変異体に存在することを仮定したものである。どちらの場合も、アルギニン変異体は実際、C末端の位置で切断され、C末端において電荷のない変異体をもたらした(K447R変異体の理論的C末端配列はPGRであり、これはPGに切断されうる、およびG446R変異体の理論的C末端配列はPRKであり、これはPに切断されうる)。

#### 【 0 1 2 0 】

#### 【表 5】

残基	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
P445	75	94	25	22	95	60	41		43	77							65	84		
G446					72				56	63	83				84			57	88	
K447						92		28		70			71		80			77	96	

表5 - 変異体によるCDC誘導 - Daudi 細胞。

1.0  $\mu$ g/mlの抗CD38抗体の点突然変異体の存在下でのDaudi細胞の溶解の百分率。野生型抗体はこれらの条件の下で66%の細胞を溶解させた。

#### 【 0 1 2 1 】

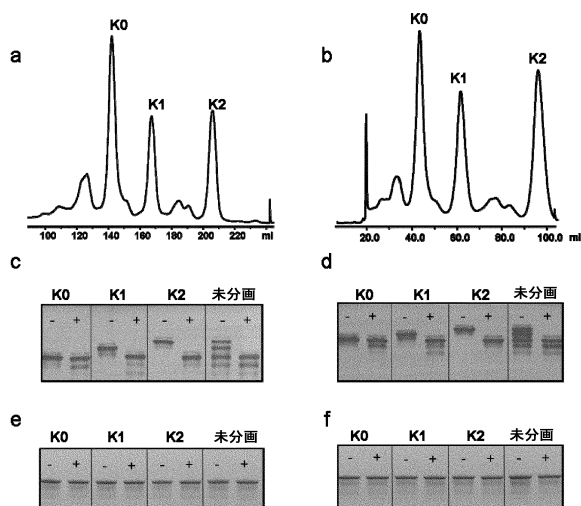
【表 6】

残基	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
P445	3	5	2	2	4	2	4		4	3							2	3		
G446					3				4	5	4				7			3	7	
K447						3		4		3			3		2			2	6	

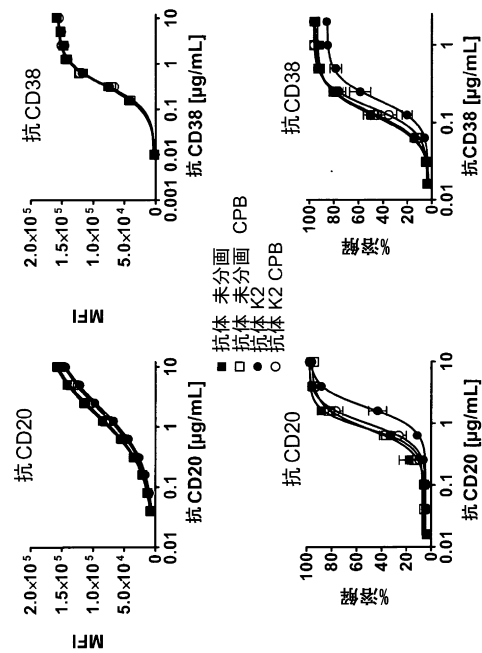
表6 - 変異体によるCDC誘導 - Wien 133細胞。

1.0 ug/mlの抗CD38抗体の点突然変異体の存在下でのWien 133細胞の溶解の百分率。野生型抗体はこれらの条件の下で3%の細胞を溶解させた。

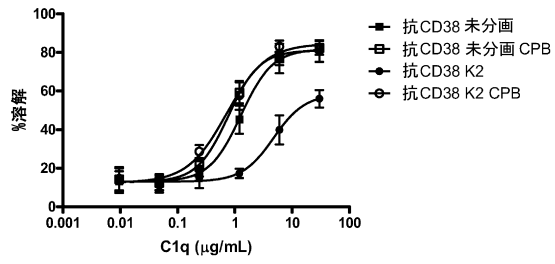
【図 1】



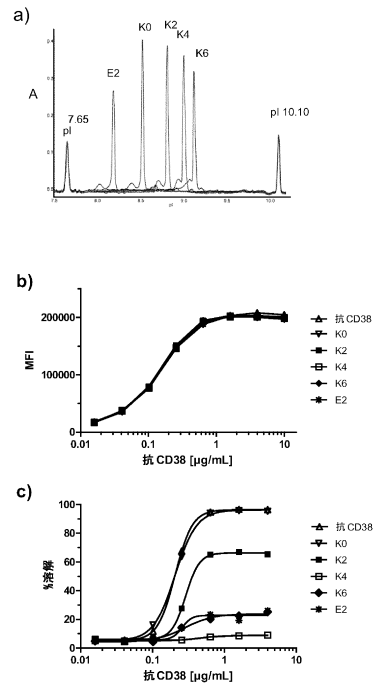
【図 2】



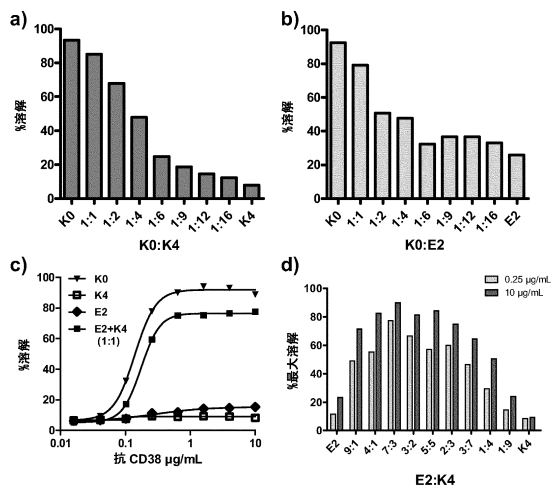
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006454547000001.app

---

 フロントページの続き

- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 パルレン パウル  
オランダ王国 ユトレヒト イアレラン 60 ゲンマブ ビー・ブイ・内
- (72)発明者 ヴァン ベルケル パトリック  
オランダ王国 ユトレヒト デルデ ウェスターパークラン 321
- (72)発明者 ヴァン デン プレメール エワルド  
オランダ王国 ユトレヒト イアレラン 60 ゲンマブ ビー・ブイ・内

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特表2010-536396(JP,A)  
国際公開第2005/090405(WO,A1)  
特表2009-542750(JP,A)  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000年, vol.276, p.965-969  
Journal of Biotechnology, 2009年, vol.139, p.318-325  
Plant Biotechnology Journal, 2007年, vol.5, p.657-663  
PNAS, 2003年, vol.100, no.9, p.5022-5027  
Journal of Pharmaceutical sciences, 2008年, vol.97, no.7, p.2426-2447  
nature biotechnology, 2006年, vol.24, no.12, p.1591-1597

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
C12P 21/08  
C07K 16/00 - 16/46  
A61K 39/395  
A61P 35/00  
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
PubMed