

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6334166号
(P6334166)

(45) 発行日 平成30年5月30日 (2018. 5. 30)

(24) 登録日 平成30年5月11日 (2018. 5. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
 A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
 C 0 7 K 16/18 (2006. 01)
 C 0 7 K 16/46 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 39/395 W
 A 6 1 K 39/395 Z
 C 0 7 K 16/18
 C 0 7 K 16/46

請求項の数 18 (全 82 頁)

(21) 出願番号 特願2013-523612 (P2013-523612)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月10日 (2011. 8. 10)
 (65) 公表番号 特表2013-535970 (P2013-535970A)
 (43) 公表日 平成25年9月19日 (2013. 9. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/063791
 (87) 国際公開番号 W02012/020065
 (87) 国際公開日 平成24年2月16日 (2012. 2. 16)
 審査請求日 平成26年8月8日 (2014. 8. 8)
 審判番号 不服2016-11431 (P2016-11431/J1)
 審判請求日 平成28年7月29日 (2016. 7. 29)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2010/004878
 (32) 優先日 平成22年8月10日 (2010. 8. 10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 509067887
 グリコトープ ゲーエムベーハー
 ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベ
 ルト-ロスレーシュトラッセ 1 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ゴレッツ, シュテフェン
 ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベ
 ルト-ロスレーシュトラッセ 1 0, グ
 リコトープ ゲーエムベーハー 気付

微生物の受託番号 DSMZ DSMACC3078

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F a b グリコシル化抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を延長するための方法であって、

該抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体を、細胞または細胞系において、該細胞または細胞系が高いシアリル化活性を有する条件下で発現させることにより、該抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を、S P 2 / 0 細胞において発現される抗体または F a b と F c を含む抗体断片もしくはその誘導体と比較して増大させるステップ

を含み、ここで、該グリコシル化部位が、アミノ酸配列 A s n X a a S e r / T h r からなり、X a a が P r o 以外の任意のアミノ酸であり、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 8 0 % が、シアル酸残基を保有せず、そして、該抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期が、S P 2 / 0 細胞において発現される抗体または F a b と F c を含む抗体断片もしくはその誘導体と比較して延長される方法

。

【請求項 2】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖が、複合体型の糖である、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

以下の特徴：

(i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 5 0 % が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を増大させること、および

(i i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖における糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量が、少なくとも 0 . 8 となるように、シアル酸量を増大させること

のうちの 1 またはそれより多くを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体の F c 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部分に付いている糖のうち 1 0 % 未満が、少なくとも 1 つのシアル酸を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

抗原結合アフィニティーを、1 5 % を超えて低下させることがない、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

抗原結合アフィニティーを、1 0 % を超えて低下させることがない、請求項 3 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

抗原結合アフィニティーを、5 % を超えて低下させることがない、請求項 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体が、F c 部分において、少なくとも 1 つのグリコシル化部位を含み、そして

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体が、以下の特徴：

前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも 5 0 % が、前記 F c 部分においてグリコシル化されていること

30

を有する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体が、C H 2 領域において少なくとも 1 つのグリコシル化部位を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体が、アミノ酸 A s n 2 9 7 において少なくとも 1 つのグリコシル化部位を含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記 F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 9 0 % が、シアル酸残基を保有しない、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 2】

前記抗体または F a b と F c を含むその機能的な断片もしくは誘導体が、以下の特徴：

(i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの少なくとも 7 0 % が、少なくとも 1 つのガラクトース残基を保有すること、

(i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、ヒトグリコシル化パターンを有すること、

(i i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、構造 G a l α (

50

1 → 3) Gal β (1 → 4) GlcNAc を有する Gal i l i エピトープを含まないこと、

(i v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、N-グリコシルノイラミン酸 (Ne u G c) 残基を含まないこと、

(v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖中のシアル酸のうちの少なくとも40%が、2, 6結合により連結されていること、

(v i) 前記抗体が、I g G 抗体、I g E 抗体、I g A 抗体、I g D 抗体、またはI g M 抗体であること、

(v i i) 前記抗体が、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ヤギ抗体、霊長動物抗体、またはラクダ抗体であること、および

(v i i i) 前記抗体が、操作された抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であること、

のうちの1またはそれより多くを有する、請求項1から1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記抗体が、I g G 1 抗体またはI g G 2 抗体である、請求項1 2 に記載の方法。

【請求項14】

前記抗体がI g G 1 抗体である、請求項1 2 または1 3 に記載の方法。

【請求項15】

前記抗体が、

(a) キメラまたはヒト化抗 E G F R 抗体であって、

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、

(i i) K a b a t の番号付けによる、該重鎖可変領域のうちのアミノ酸85位の、F a b 部分に存在するグリコシル化部位と、

(i i i) 重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c 部分に存在するグリコシル化部位と

を含む、キメラまたはヒト化抗 E G F R 抗体；および

(b) キメラまたはヒト化抗 T A - M u c 1 抗体であって、

(i) 配列番号7のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号9のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、

(i i) K a b a t の番号付けによる、該重鎖可変領域のうちのアミノ酸54位の、F a b 部分に存在するグリコシル化部位と、

(i i i) 重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c 部分に存在するグリコシル化部位と

を含む、キメラまたはヒト化抗 T A - M u c 1 抗体、

から選択される、請求項1から1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記キメラまたはヒト化抗 E G F R 抗体が、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するCDRL3を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1 5 に記載の方法。

【請求項17】

前記キメラまたはヒト化抗 T A - M u c 1 抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号12のアミノ酸配列を有するCDRL3を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1 5 または1 6 に記載の方法。

【請求項18】

10

20

30

40

50

所望の循環半減期を有する抗体またはF a bとF cを含むその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物を生成するための方法であって、該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を宿主細胞において発現させるステップを含み、ここで、請求項1に記載の抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を延長するための方法が実施される方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、抗体の分野に関する。特に、高度にシアリル化されたグリカンをそれらのF a b部分に結合させた抗体が提供される。さらに、本発明は、それらのF a bシアリル化を介して、抗体の循環半減期を制御する方法も提供する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

今日、抗体は、医療および研究の分野で広く用いられる薬剤である。医療では、抗体が、多くの異なる分野で適用されている。例えば、抗体は、疾患の診断および／もしくは予後診断、または例えば、特定のホルモンの存在もしくは濃度など、特定の体内パラメータの決定を可能とする特定のマーカーを検出するための標識化薬剤として用いられている。

【0003】

さらに、抗体はまた、がん、心血管疾患、炎症性疾患、黄斑変性、移植片拒絶、多発性硬化症、およびウイルス感染など、多様な疾患の処置および予防における治療剤としても用いられている。これらの療法では、抗体が、受容体分子もしくはメッセンジャー分子を遮断し、これによりそれらの疾患関与性機能を阻害することにより、または患者の免疫系の構成要素を動員および活性化することにより、抗体が独自の治療活性を保有しうる。代替的に、抗体を、治療活性を有する別の薬剤に連結することもできる。特に、がんおよび感染症の治療では、前記さらなる薬剤が細胞殺滅活性を有するが、これらは、例えば、放射性同位元素の場合もあり、細胞毒素の場合もある。別の適用では、抗体を用いて、適切な抗体を患者の循環中に移入させることにより、患者を受動的に免疫化することもできる。

20

【0004】

抗体のインビボにおける適用、特に、それらの治療的な使用の重要な側面は、抗体が患者の体内に滞留する時間、すなわち、抗体の循環半減期である。

30

【0005】

タンパク質の循環半減期を延長するための多くの手法は、それらを、半減期を延長する他の分子とコンジュゲートするか、またはそれらを、半減期を延長するタンパク質もしくはペプチドに融合することなど、タンパク質の人工的な修飾を伴う。しかし、これらの手法は、ある不利益を伴う。それらは、通常、複雑な生成工程を伴い、それらの生体適合性または医薬としての承認に関して問題が生じることが多い。さらに、これらの修飾は、抗体の生物学的活性、特に、それらの抗原結合特性、ならびに、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用（ADCC）および補体依存性細胞傷害作用（CDC）など、それらの下流におけるシグナル伝達に対しても有害であることが多い。

40

【0006】

さらに、一部の場合におけるF S Hなどの糖タンパク質については、糖タンパク質の糖鎖（carbohydrate chain）に付いているシアル酸量が、糖タンパク質のクリアランス速度に影響を及ぼし、したがって、糖タンパク質の循環半減期にも影響を及ぼす。しかし、当技術分野の最新技術によれば、この原理を抗体に帰属させることはできない。第1に、I g G抗体のF c領域に付いている糖鎖のシアリル化度が高ければ、抗体の生物学的活性に負の影響が及ぶ。特に、F c領域の各F c受容体へのアフィニティーが低下するために、抗体のADCCが大幅に低下する（例えば、非特許文献1を参照されたい）。さらに、F a b領域におけるグリコシル化部位に付いている糖鎖のシアリル化度

50

は、抗体の循環半減期には影響を及ぼさないと考えられ、むしろ、抗原結合に影響を及ぼす（例えば、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4および非特許文献5を参照されたい）。

【0007】

他方でまた、循環半減期が短い抗体も、適用によっては重要な場合もある。例えば、放射性造影法を用いる診断目的の場合は、放射性核種にコンジュゲートされた抗体を用いる。造影手順は、比較的短時間で実施することができ、抗体にコンジュゲートされた放射性核種は、ある有害な副作用を及ぼすので、患者の循環からのコンジュゲートの迅速なクリアランスが有利である。

【0008】

したがって、当技術分野では、抗体、特に、治療的または診断的に有用な抗体の循環半減期を、化学コンジュゲートまたは融合タンパク質を用いることなしに制御すること、特に、延長または短縮することが必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Scallion, B. J. ら(2006年)、Molecular Immunology、44巻、1524～1534頁

【非特許文献2】Huang, L. ら(2006年)、Analytical Biochemistry、349巻、197～207頁

【非特許文献3】Millward, T. A. ら(2008年)、Biologicals、36巻、41～47頁

【非特許文献4】Jefferys, R. (2009年)、Methods in Molecular Biology、483巻、223～238頁

【非特許文献5】Sola, R. J. ら(2010年)、Biodrugs、24巻、9～21頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、抗体のFab部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖鎖中のシアル酸量が、抗体の循環半減期に大きな影響を及ぼすことを見出した。この原理は、抗体、特に、治療的または診断的に有用な抗体の循環半減期を制御し、したがって、これらのバイオアベイラビリティを制御するのに用いることができる。抗体の循環半減期を個別に調整しうることは、例えば、抗体の治療有効性を最適化し、抗体の治療効果および有害な副作用の可能性を考量するのに有利である。さらに、有害な副作用を回避するためには、抗体の循環半減期を低レベルへと調整することも、診断の目的に有利である。

【0011】

したがって、第一の態様では、本発明が、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を制御するための方法であって、

(a) 循環半減期を延長するために、

(a1) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖(carbohydrate)中のシアル酸量を増大させるステップ、および／あるいは

(a2) 抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に存在する1またはそれより多くのグリコシル化部位を除去するステップ、および／あるいは

(a3) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を減少させるステップ、あるいは

10

20

30

40

50

(b) 循環半減期を短縮するために、

(b 1) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を減少させるステップ、および／あるいは

(b 2) 抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に 1 またはそれより多くのグリコシル化部位を導入するステップ、および／あるいは

(b 3) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を増大させるステップを含む方法を対象とする。

10

【0012】

第二の態様では、本発明が、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物であって、抗体またはその断片もしくは誘導体が、それらの F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位を含むことを特徴とし、組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に付いている糖のうちの少なくとも 65 % が、少なくとも 1 つの末端シアル酸残基を保有し、かつ／あるいは抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に付いている糖のうちの 35 % 未満が、少なくとも 2 つのフリーのガラクトース単位を保有することを特徴とする抗体組成物を提供する。さらに本発明は、特異的な抗体組成物、および医療におけるそれらの使用も提供する。

【0013】

20

第三の態様では、本発明が、所望の循環半減期を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物を生成する方法であって、宿主細胞において前記抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を発現させるステップを含み、本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を制御する方法を、前記方法のステップ (a 1)、ステップ (a 3)、ステップ (b 1)、もしくはステップ (b 3) を用いて実施し、かつ／または宿主細胞が、ステップ (a 2) もしくは (b 2) を用いて本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を制御する方法により得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を発現する方法を提供する。

【0014】

好ましい実施形態では、本発明により提供される抗体が、免疫系の異なる活性、特に、A D C C を誘導する能力をさらに大幅に改善している。これは、抗体のグリコシル化パターンを最適化する結果として、循環半減期の制御のほか、抗体の活性、特に、F c 受容体への結合およびその活性化の改善をもたらすことにより達成される。したがって、さらなる態様における本発明は、循環半減期が延長され、A D C C 活性が改善された抗体を含む抗体組成物のほか、このような抗体を生成する方法も提供する。これらの抗体は、それらのバイオアベイラビリティならびにそれらの生物学的活性が増大しており、これらのいずれもが治療的有効性の増大に寄与するので、治療的使用に特に適する。したがって、本発明の別の利点は、循環半減期が延長されると同時に生物学的活性も増大した抗体を適用する可能性でもある。循環半減期の延長は、本発明の第一の態様に従う方法により達成することが好ましい。加えて、生物学的活性の増大は、特に、個別の F c 受容体に対するより強力な結合から結果として生じる、A D C C 活性の増大でもあることが好ましい。このような A D C C 活性の増大は、特に、抗体のグリコシル化パターンを最適化することにより、例えば、抗体の F c 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のフコース残基量を低減することにより達成することができる。

30

40

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を制御するための方法であって、

(a) 循環半減期を延長することについては、

(a 1) 該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、該抗

50

体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を増大させるステップ、および／あるいは

(a 2) 該抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位を除去するステップ、および／あるいは

(a 3) 該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を減少させるステップ、あるいは

(b) 循環半減期を短縮することについては、

(b 1) 該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を減少させるステップ、および／あるいは

(b 2) 該抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に 1 またはそれより多くのグリコシル化部位を導入するステップ、および／あるいは

(b 3) 該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を増大させるステップを含む方法。

(項目 2)

ステップ (a 1) が、以下の特徴：

(i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 50 % が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を増大させること、

(i i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖における糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量が、少なくとも 0.8 となるように、シアル酸量を増大させること、

(i i i) 前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を増大させる一方で、前記組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の F c 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 20 % 未満、好ましくは 10 % 未満が、少なくとも 1 つのシアル酸を含むこと、および

(i v) シアル酸量を増大させるステップが、前記抗体またはその断片もしくは誘導体を、細胞または細胞系において、該細胞または細胞系が高いシアリル化活性を有する条件下で発現させるステップを包含すること
のうちの 1 またはそれより多くを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

ステップ (a 2) が、以下の特徴：

(i) 前記 1 またはそれより多くのグリコシル化部位を、前記抗体またはその断片もしくは誘導体をコードする核酸配列を変化させることにより除去すること、

(i i) 除去される少なくとも 1 つのグリコシル化部位が、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域内または軽鎖可変領域内、好ましくは重鎖可変領域内、より好ましくはそのフレームワーク領域内に存在すること、

(i i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体の前記 F a b 部分に存在する全てのグリコシル化部位を除去すること、

(i v) 前記 1 またはそれより多くのグリコシル化部位の除去が、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の抗原結合および／または抗原特異性を有意に低減しないかまたは消失させないこと、ならびに

(v) 抗原結合アフィニティーを、20 % を超えて、好ましくは 15 % を超えて、10 % を超えて、または 5 % を超えて低下させることがないこと
のうちの 1 またはそれより多くを含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

ステップ (a 3) が、以下の特徴：

(i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 50 % 未満が、少なくとも 2 つのフリーのガラクトース単位を含むように、フリーのガラクトース単位量を減少させること、および

(i i) フリーのガラクトース単位量を減少させるステップが、前記抗体またはその断片もしくは誘導体を、細胞または細胞系において、前記細胞または細胞系が高いシアリル化活性を有する条件下で発現させるステップを包含すること

のうちの 1 またはそれより多くを含む、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

ステップ (b 1) が、以下の特徴：

(i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 50 % 未満が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を減少させること、

(i i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖における糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量が、0.5 未満となるように、シアル酸量を減少させること、および

(i i) シアル酸量を減少させるステップが、前記抗体またはその断片もしくは誘導体を、細胞または細胞系において、該細胞または細胞系が低いシアリル化活性を有するかまたはシアリル化活性を有さない条件下で発現させるステップを包含すること

のうちの 1 またはそれより多くを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

ステップ (b 2) が、以下の特徴：

(i) 正確に 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つのグリコシル化部位が、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の前記 F a b 部分に導入されること、

(i i) 前記 1 またはそれより多くのグリコシル化部位が、前記抗体またはその断片もしくは誘導体をコードする核酸配列を変化させることにより導入されること、

(i i i) 少なくとも 1 つのグリコシル化部位が、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域内または軽鎖可変領域内、好ましくは重鎖可変領域内、より好ましくはそのフレームワーク領域内に導入されること、

(i v) 少なくとも 1 つのグリコシル化部位が重鎖定常領域 1 または軽鎖定常領域に導入されること、

(v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、前記 1 またはそれより多くのグリコシル化部位を導入する前に、その F a b 部分にグリコシル化部位を含有しないこと、

(v i) 前記 F a b 部分に導入された前記グリコシル化部位のうちの少なくとも 1 つが、配列 A s n X a a S e r / T h r を有し、この場合、X a a が、好ましくは P r o 以外の、任意のアミノ酸であること、

(v i i) 前記 1 もしくはそれより多くの導入されたグリコシル化部位、および／または該グリコシル化部位に付いている糖が、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の抗原結合および／または抗原特異性を有意に低減しないかまたは消失させないこと、ならびに

(v i i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記 1 またはそれより多くの導入されたグリコシル化部位に付いている糖のうちの 50 % 未満が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むこと

のうちの 1 またはそれより多くを含む、項目 1 または 5 に記載の方法。

(項目 7)

ステップ (b 3) が、以下の特徴：

(i) 前記組成物において、前記 F a b 部分に存在する前記少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 50 % が、少なくとも 2 つのフリーのガラクトース単位を含むように、フリーのガラクトース単位量を増大させること、および

(i i) シアル酸量を増大させるステップが、前記抗体またはその断片もしくは誘導体を、細胞または細胞系において、前記細胞または細胞系が低いシアリル化活性を有するか

10

20

30

40

50

、またはシアリル化活性を有さない条件下で発現させるステップを包含すること
のうちの1またはそれより多くを含む、項目1、5、および6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体の前記F a b部分に存在する前記グリコシル化部位のうちの少なくとも1つが、重鎖可変領域内または軽鎖可変領域内、好ましくは重鎖可変領域内、より好ましくは可変領域のフレームワーク領域内に存在する、項目1から7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも50%が、前記F a b部分においてグリコシル化されている、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、F c部分、好ましくはC H 2領域、より好ましくはアミノ酸A s n 2 9 7において、少なくとも1つのグリコシル化部位を含む、項目1から9のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、以下の特徴：

(i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも50%が、前記F c部分においてグリコシル化されていること、

(i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記F c部分に付いている糖のうちの少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%が、フコース残基を保有しないこと、

(i i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記F c部分に付いている糖のうちの少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%が、シアル酸残基を保有しないこと、および

(i v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記F c部分に付いている糖のうちの少なくとも5%が、二分枝状N-アセチルグルコサミン残基を保有すること

のうちの1またはそれより多くを有する、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、以下の特徴：

(i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの少なくとも70%が、少なくとも1つのガラクトース残基を保有すること、

(i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、ヒトグリコシル化パターンを有すること、

(i i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、構造G a l α (1→3) G a l β (1→4) G l c N A cを有するG a l i l iエピトープを含まないこと、

(i v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、N-グリコリルノイラミン酸(N e u G c)残基を含まないこと、

(v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖中のシアル酸のうちの少なくとも40%が、2,6結合により連結されていること、

(v i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの少なくとも23%が、二分枝状N-アセチルグルコサミン(ビスG l c N A c)残基を保有すること、

(v i i) 前記抗体が、I g G抗体、I g E抗体、I g A抗体、I g D抗体、またはI

10

20

30

40

50

g M抗体、好ましくはI g G 1抗体またはI g G 2抗体、より好ましくはI g G 1抗体であること、

(v i i i) 前記抗体が、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ヤギ抗体、霊長動物抗体、またはラクダ抗体であること、および

(i x) 前記抗体が、操作された抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であること

のうちの1またはそれより多くを有する、項目1から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記抗体の前記断片または誘導体が、以下の特徴：

(i) 該抗体の該断片または誘導体が、該抗体のうちの少なくとも重鎖可変領域を含み、場合によって、該抗体の該断片または誘導体が、該抗体の重鎖定常領域1、および／または該抗体の軽鎖可変領域、および／または該抗体の軽鎖定常領域をさらに含むこと、

(i i) 該抗体の該断片または誘導体が、

(a) 重鎖および軽鎖の各々のうちの可変領域および第1の定常ドメインからなる一価断片であるF a b断片、

(b) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのF a b断片を含む二価断片であるF (a b)₂断片、

(c) 重鎖の可変領域および第1の定常ドメインC H 1からなるF d断片、

(d) 抗体の単一のアームの重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなるF v断片、

(e) 単一のポリペプチド鎖からなるF v断片であるs c F v断片、

(f) 共有結合的に連結された2つのF v断片からなる(F v)₂断片、

(g) 重鎖可変ドメイン、および

(h) 重鎖可変領域と軽鎖可変領域との会合が、分子間だけで生じることが可能であり、分子内で生じることが可能でない形で共有結合的に連結された、前記重鎖可変領域および前記軽鎖可変領域からなる多重抗体

からなる群から選択されること、ならびに

(i i i) 該抗体の該断片または誘導体が、該抗体と同じ抗原、好ましくは同じエピートープに結合することが可能であること

のうちの1またはそれより多くを有する、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記組成物において、前記抗体またはその断片もしくは誘導体の前記F a b部分に付いている糖のうちの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%が、ビスG l c N A cを保有する、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記抗体が、

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号2のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、

(i i) 場合によって、配列番号4のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) K a b a tの番号付けによる、該重鎖可変領域のうちのアミノ酸85位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位と、

(i v) 重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c部分に存在するグリコシル化部位と

を含む、キメラまたはヒト化抗E G F R抗体である、項目1から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記抗体が、

10

20

30

40

50

(i) 配列番号7のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号9のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、

(ii) 場合によって、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号12のアミノ酸配列を有するCDRL3を含む軽鎖可変領域と、

(iii) Kabatの番号付けによる、該重鎖可変領域のうちのアミノ酸54位の、Fab部分に存在するグリコシル化部位と、

(iv) 重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、Fc部分に存在するグリコシル化部位と

を含む、キメラまたはヒト化抗TAMUC1抗体である、項目1から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物であって、該抗体またはその断片もしくは誘導体が、それらのFab部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位を含むことを特徴とし、該組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体の該Fab部分に付いている糖のうちの少なくとも65%が、少なくとも1つの末端シアル酸残基を保有し、かつ／あるいは該抗体またはその断片もしくは誘導体の該Fab部分に付いている糖のうちの35%未満が、少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を保有することを特徴とする抗体組成物。

(項目18)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、項目2、4、および8から16のいずれか一項に記載の特徴のうちの1またはそれより多くを有する、項目17に記載の抗体組成物。

(項目19)

前記抗体またはその断片もしくは誘導体が、以下の特徴：

(i) 前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも50%が、前記Fab部分においてグリコシル化されていること、

(ii) 前記組成物において、Fab部分に付いている糖のうちの少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%が、少なくとも1つの末端シアル酸残基を保有すること、

(iii) 該抗体またはその断片もしくは誘導体が、それらのFc部分において、好ましくはCH2領域において、より好ましくはアミノ酸Asn297において、少なくとも1つのグリコシル化部位を含むこと、

(iv) 前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも50%が、前記Fc部分においてグリコシル化されていること、

(v) 前記組成物において、Fc部分に付いている糖のうちの少なくとも80%が、フコース残基を保有しないこと、

(vi) 前記組成物において、Fc部分に付いている糖のうちの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%が、シアル酸残基を保有しないこと、

(vii) 前記組成物において、Fc部分に付いている糖のうちの少なくとも5%が、二分枝状N-アセチルグルコサミン残基を保有すること、

(viii) 前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの少なくとも70%が、少なくとも1つのガラクトース残基を保有すること、

(ix) 該抗体またはその断片もしくは誘導体が、ヒトグリコシル化パターンを有すること、

(x) 該抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、構造Gal α (1 $\rightarrow$ 3)Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAcを有するGaliliエпитープを含まないこと、

(xi) 該抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、N-グリコリルノイラミン酸(NeuGc)残基を含まないこと、

(xii) 前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖

10

20

30

40

50

中のシアル酸のうちの少なくとも40%が、2, 6結合により連結されていること、

(x i i i) 前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの少なくとも23%が、二分枝状のN-アセチルグルコサミン(ビスG l c N A c)残基を保有すること、

(x i v) 前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に付いている糖のうちの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%が、ビスG l c N A cを保有すること、

(x i v) 該抗体が、I g G抗体、I g E抗体、I g A抗体、I g D抗体、またはI g M抗体、好ましくはI g G 1抗体またはI g G 2抗体、より好ましくはI g G 1抗体であること、

(x v) 該抗体が、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ヤギ抗体、霊長動物抗体、またはラクダ抗体であること、

(x v i) 該抗体が、操作された抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であること、

(x v i i) 該抗体の該断片または誘導体が、該抗体のうちの少なくとも重鎖可変領域を含み、F a b部分において前記グリコシル化部位を含むこと、

(x v i i i) 該断片または誘導体が、

(a) 重鎖および軽鎖の各々の可変領域および第1の定常ドメインからなる一価断片であるF a b断片、

(b) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのF a b断片を含む二価断片であるF (a b)₂断片、

(c) 重鎖の可変領域および第1の定常ドメインC H 1からなるF d断片、

(d) 抗体の単一のアームの重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなるF v断片、

(e) 単一のポリペプチド鎖からなるF v断片であるs c F v断片、

(f) 共有結合的に連結された2つのF v断片からなる(F v)₂断片、

(g) 重鎖可変ドメイン、および

(h) 重鎖可変領域と軽鎖可変領域との会合が、分子間だけで生じることが可能であり、分子内で生じることが可能でない形で共有結合的に連結された、該重鎖可変領域および該軽鎖可変領域からなる多重抗体からなる群から選択されること、

(x i x) 該断片または誘導体が、該抗体と同じ抗原、好ましくは同じエピトープに結合することが可能であること、ならびに

(x x) 該抗体が、C e t u x i m a bなどの抗E G F R抗体、K a r o m a bなどの抗T F抗体、P a n k o m a bなどの抗M u c 1抗体、T r a s t u z u m a bなどの抗H E R 2抗体、およびR i t u x i m a bなどの抗C D 2 0抗体からなる群から選択されること

のうちの1またはそれより多くを有する、項目17または18に記載の抗体組成物。

(項目20)

配列番号1のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号2のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、配列番号4のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域とを含むキメラまたはヒト化抗E G F R抗体を含む抗体組成物であって、

(i) 該抗体が、K a b a tの番号付けによる、該重鎖可変領域のうちのアミノ酸85位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位を含み、該組成物において、該F a b部分に存在する該グリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも65%が、少なくとも1つの末端シアル酸残基を保有し、かつ／もしくは該F a b部分に存在する該グリコシル化部位に付いている糖のうちの35%未満が、少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を保有すること、または

(i i) 該抗体が、F a b部分においてグリコシル化部位を含まないこと

10

20

30

40

50

を特徴とする抗体組成物。

(項目 2 1)

前記抗体が、以下の特徴：

(i) 該抗体が、F c 部分に存在するグリコシル化部位を含むこと、

(i i) 前記組成物において、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 8 0 % が、
フコース残基を保有しないこと、

(i i i) 前記組成物において、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 7 0 %、
好ましくは少なくとも 8 0 % が、シアル酸残基を保有しないこと、

(i v) 前記組成物において、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 1 0 % が、
二分枝状 N-アセチルグルコサミン残基を保有すること、

(v) 前記組成物において、該抗体に付いている糖のうちの少なくとも 7 0 % が、少な
くとも 1 つのガラクトース残基を保有すること、

(v i) 該抗体に付いている糖が、構造 $\text{Gal } \alpha (1 \rightarrow 3) \text{ Gal } \beta (1 \rightarrow 4) \text{ Glc}$
 NAc を有する Gal i l i エピトープを含まないこと、および

(v i i) 該抗体に付いている糖が、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) 残基
を含まないこと、

(v i i i) 場合によって、前記組成物において、該抗体またはその断片もしくは誘導
体の F a b 部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも 5 0 %、好ましくは少な
くとも 6 0 %、より好ましくは少なくとも 7 0 % が、ビス GlcNAc を保有すること
の全てを有する、項目 2 0 に記載の抗体組成物。

(項目 2 2)

配列番号 7 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する C
D R H 2、および配列番号 9 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変領域と、
配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する
C D R L 2、および配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変領域
とを含むキメラまたはヒト化抗 M u c 1 抗体を含む抗体組成物であって、該抗体が、K a
b a t の番号付けによる、該重鎖可変領域のうちのアミノ酸 5 4 位の、F a b 部分に存在
するグリコシル化部位を含み、該組成物において、該 F a b 部分に存在する該グリコシル
化部位に付いている糖のうちの少なくとも 6 5 % が、少なくとも 1 つの末端シアル酸残基
を保有し、かつ／または該 F a b 部分に存在する該グリコシル化部位に付いている糖のう
ちの 3 5 % 未満が、少なくとも 2 つのフリーのガラクトース単位を保有することを特徴と
する抗体組成物。

(項目 2 3)

前記抗体が、以下の特徴：

(i) 該抗体が、F c 部分に存在するグリコシル化部位を含むこと、

(i i) 場合によって、前記組成物において、F c 部分に付いている糖のうちの少な
くとも 8 0 % が、フコース残基を保有しないこと、

(i i i) 前記組成物において、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 8 0 % が
、シアル酸残基を保有しないこと、

(i v) 前記組成物において、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも 5 % が、二
分枝状 N-アセチルグルコサミン残基を保有すること、

(v) 前記組成物において、該抗体に付いている糖のうちの少なくとも 7 0 % が、少な
くとも 1 つのガラクトース残基を保有すること、

(v i) 該抗体に付いている糖が、構造 $\text{Gal } \alpha (1 \rightarrow 3) \text{ Gal } \beta (1 \rightarrow 4) \text{ Glc}$
 NAc を有する Gal i l i エピトープを含まないこと、

(v i i) 該抗体に付いている糖が、N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) 残基
を含まないこと、

の全てを有する、項目 2 2 に記載の抗体組成物。

(項目 2 4)

医療、好ましくはがんの処置において使用するための、項目 1 7 から 2 3 のいずれか一

10

20

30

40

50

項に記載の抗体組成物。

(項目 2 5)

医薬組成物である、項目 1 7 から 2 4 のいずれか一項に記載の抗体組成物。

(項目 2 6)

F c γ R I I I a - 1 5 8 F をコードする少なくとも 1 つの対立遺伝子を有する患者におけるがんの処置において使用するための、項目 2 0 から 2 3 のいずれか一項に記載の抗体組成物。

(項目 2 7)

E r b i t u x による処置が不成功であった後のがんの処置において使用するための、項目 2 0 または 2 1 に記載の抗体組成物。

(項目 2 8)

腫瘍細胞が、E G F R によるシグナル伝達経路における少なくとも 1 つの活性化変異を含む、がんの処置において使用するための、項目 2 0 または 2 1 に記載の抗体組成物。

(項目 2 9)

前記活性化変異が、構成的に活性な K - R a s 変異体、構成的に活性な P I 3 キナーゼ変異体、または R a f キナーゼの過剰発現を結果としてもたらす、項目 2 8 に記載の抗体組成物。

(項目 3 0)

所望の循環半減期を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物を生成するための方法であって、該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を宿主細胞において発現させるステップを含み、ここで、項目 1 に記載の抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を制御するための方法が、該方法のステップ (a 1)、ステップ (a 3)、ステップ (b 1)、もしくはステップ (b 3) を用いて実施され、かつ／または該宿主細胞が、ステップ (a 2) もしくは (b 2) を用いる項目 1 に記載の方法により得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を発現する方法。

(項目 3 1)

項目 2 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法が実施されるかまたは実施された、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記抗体組成物が、項目 2 から 2 5 のうちの 1 またはそれより多くに記載の特徴のうちの 1 またはそれより多くを有する、項目 3 0 または 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体であって、該抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも 1 つの C D R のアミノ酸配列が、F a b 部分において少なくとも 1 つのグリコシル化部位を含む基準抗体に由来し、該抗体またはその断片もしくは誘導体が、F a b 部分においてグリコシル化部位を含まず、該抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体が、該基準抗体より長い循環半減期を有する、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体。

(項目 3 4)

以下の特徴：

(i) 前記抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体が、前記基準抗体と同じエピトープに結合すること、

(i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域の 3 つの C D R 全てのアミノ酸配列が、前記基準抗体に由来すること、

(i i i) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体の軽鎖可変領域の 3 つの C D R 全てのアミノ酸配列が、前記基準抗体に由来すること、

(i v) 前記抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域のアミノ酸配列全体、および／または軽鎖可変領域のアミノ酸配列全体が、前記基準抗体に由来すること、

(v) 前記抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の抗原結合アフィニティーが、前記基準抗体の抗原結合アフィニティーと同様であるか、またはこれより高いこと、

10

20

30

40

50

(v i) 前記抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期が、前記基準抗体の循環半減期より少なくとも5%、好ましくは、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、または少なくとも25%長いこと、

(v i i) 前記抗原結合アフィニティーが、20%を超えて、好ましくは15%を超えて、10%を超えて、または5%を超えて低下しないこと、

(v i i i) 前記基準抗体が、C e t u x i m a bまたはC e t u x i m a bと同じエピトープに結合する抗体などの抗E G F R抗体、P a n k o m a bまたはP a n k o m a bと同じエピトープに結合する抗体などの抗M U C 1抗体、S o l a n e z u m a bまたはS o l a n e z u m a bと同じエピトープに結合する抗体などの抗A β 抗体、およびA l e m t u z u m a bまたはA l e m t u z u m a bと同じエピトープに結合する抗体な

10

どの抗C D 5 2抗体からなる群から選択されること、ならびに
(i x) 前記基準抗体のF a b部分におけるグリコシル化部位が、好ましくはアミノ酸配列A s n X a a S e r / T h rを有するN-グリコシル化部位であり、この場合、X a aが、好ましくはP r o以外の任意のアミノ酸であること
のうちの1またはそれより多くを有する、項目33に記載の抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体。

(項目35)

前記基準抗体が、

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号2のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、

20

(i i) 場合によって、配列番号4のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) K a b a tの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸85位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位と、

(i v) 場合によって、重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c部分に存在するグリコシル化部位と
を含む抗E G F R抗体であるか、または
前記基準抗体が、

30

(i) 配列番号7のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号9のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、

(i i) 場合によって、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号11のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) K a b a tの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸54位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位と、

(i v) 場合によって、重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c部分に存在するグリコシル化部位と
を含む抗T A - M u c 1抗体であるか、または
前記基準抗体が、

40

(i) 配列番号15のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号16のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号17のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、

(i i) 場合によって、配列番号18のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号19のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号20のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) 場合によって、K a b a tの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸60位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位と、

50

(i v) 場合によって、重鎖定常領域 2 のうちのアミノ酸 2 9 7 位の、F c 部分に存在するグリコシル化部位と

を含む抗 C D 5 2 抗体であるか、または
前記基準抗体が、

(i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する C D R H 2、および配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む重鎖可変領域と、

(i i) 場合によって、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1 と、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2、および配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) 場合によって、K a b a t の番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸 5 5 位の、F a b 部分に存在するグリコシル化部位と、

(i v) 場合によって、重鎖定常領域 2 のうちのアミノ酸 2 9 7 位の、F c 部分に存在するグリコシル化部位と

を含む抗 A β 抗体である、

項目 3 3 または 3 4 に記載の抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体。

(項目 3 6)

(i) 前記基準抗体の F a b 部分におけるグリコシル化部位が、重鎖可変領域内または軽鎖可変領域内にあり、そして

(i i) 前記抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、該重鎖可変領域内または軽鎖可変領域内のグリコシル化部位が除去されるように、少なくとも 1 つのアミノ酸において、該基準抗体の対応するアミノ酸配列とは異なる、

項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体。

(項目 3 7)

延長された循環半減期を有する、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を生成するための方法であって、

(a) F a b 部分においてグリコシル化部位を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を供給するステップと、

(b) 該コードされた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の該 F a b 部分における該グリコシル化部位が除去されるように、変異を該核酸へと導入するステップとを含む方法。

(項目 3 8)

項目 3 7 に記載の方法により得ることが可能な核酸。

(項目 3 9)

延長された循環半減期を有する、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を生成するための方法であって、

(a) F a b 部分においてグリコシル化部位を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を供給するステップと、

(b) 該コードされた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の該 F a b 部分における該グリコシル化部位が除去されるように、変異を該核酸へと導入するステップと、

(c) ステップ (b) において得られる核酸を発現させて、前記 F a b 部分においてグリコシル化部位を含まず、かつ、F a b 部分においてグリコシル化部位を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体よりも長い循環半減期を有する、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を生成するステップと

を含む方法。

(項目 4 0)

項目 3 9 に記載の方法により得ることが可能な抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体。

(項目 4 1)

10

20

30

40

50

項目33から36のうちの1またはそれより多くに記載の抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物。

(項目42)

前記組成物における前記抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体が、Fc部分において、項目11および／または12に記載のグリコシル化パターンを有する、項目41に記載の抗体組成物。

【0015】

以下の記載および付属の特許請求の範囲により、当業者には、本発明の他の目的、特徴、利点、および態様が明らかとなるであろう。しかし、本出願の好ましい実施形態を示す、以下の記載、付属の特許請求の範囲、および具体例は、例示だけを目的として与えられることを理解されたい。以下を読み取ることにより、当業者には、開示される発明の精神および範囲内にある多様な変更および改変が容易に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、本発明によりグリコシル化された抗EGFR抗体であるCetuximab (Cetuximab (発明)) およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab (Cetuximab SP2/0) の、フローサイトメトリーにより解析される異なる細胞系における結合を示す図である。2連の平均値±SDを示す。

【図2】図2は、GT-5s細胞において発現させたPankomabまたはNM-F9細胞において発現させたPankomabの、ラットにおける薬物動態を示す図である。

【図3】図3は、GT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞において発現させたCetuximabまたはSP2/0細胞において発現させたCetuximabの、カニクイザルにおける薬物動態を示す図である。

【図4】図4は、GT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞において発現させた、Fabのグリコシル化部位およびFcのグリコシル化部位を有するキメラCetuximab、ならびにFcのグリコシル化部位だけを有するヒト化Cetuximabの薬物動態を示す図である。

【図5】図5は、本発明によりグリコシル化されたCetuximab (Cetuximab (発明)) およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab (Cetuximab SP2/0) の、EGF受容体に対する阻害活性を示す図である。A: 異なるCetuximab変異体の存在下における、リガンド結合の阻止によるEGFRリン酸化の阻害を示す図である。市販のキットを用いて、細胞溶解物における全EGFR量およびリン酸化されたEGFR量を決定した。全EGFR中のリン酸化EGFRの百分率が示される。2連の平均値±SDが示される。B: 異なるCetuximab変異体の存在下におけるEGFRへのリガンド結合を阻止することによる、A431細胞の増殖の阻害を示す図である。6ウェルの平均値±SDが示される。

【図6】図6は、本発明によりグリコシル化されたCetuximab (Cetuximab (発明)) およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab (Cetuximab SP2/0) ならびにプロテインGを伴う18時間にわたるインキュベーション後におけるA431細胞を用いる、活性カスパーゼ3アポトーシスアッセイを示す図である。2連の測定値のカスパーゼ3陽性細胞 (アポトーシス細胞) の百分率の平均値±SDが示される。

【図7】図7は、異なる細胞系において発現させたCetuximabを用いるADCCによる標的細胞の溶解を示す図である。

【図8】図8は、GT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞系において発現させたCetuximabまたはSP2/0細胞において発現させたCetuximabを用いる、ホモ接合性FcγRIIIa-158Vドナーから得られるPBMCによる標的細胞の溶解を示す図である。

【図9】図9は、GT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞系において発現させたCetuximabまたはSP2/0細胞において発現させたCetuximabを用いる、ヘテ

10

20

30

40

50

ロ接合性F c γ R I I I a - 1 5 8 F / V ドナーから得られるP B M C による標的細胞の溶解を示す図である。

【図10】図10は、G T - 5 s 細胞に由来するF u c - 細胞系において発現させたC e t u x i m a b またはS P 2 / 0 細胞において発現させたC e t u x i m a b を用いる、ホモ接合性F c γ R I I I a - 1 5 8 F ドナーから得られるP B M C による標的細胞の溶解を示す図である。

【図11】図11は、異なるF c γ R I I I a アロタイプを伴うドナーのヒト初代P B M C による、L S 1 7 4 T 細胞におけるA D C C アッセイ（インキュベーション時間：5 時間、E : T 比を8 0 : 1 とし、全ての解析を、同じ日に平行して実施する）を示す図である。3 連の特異的溶解（s p e c i f i c l y s i s ）（抗体を伴わない特異的溶解（バックグラウンド））の平均値および標準偏差が示される。A : 本発明によりグリコシル化されたC e t u x i m a b を示す図である。B : S P 2 / 0 細胞において発現させたC e t u x i m a b を示す図である。

10

【図12】図12は、異なる細胞において発現させたP a n k o m a b のA D C C 活性についての比較を示す図である。異なる濃度において一晚にわたる、C H O 細胞に由来するP a n k o m a b （P a n k o m a b C H O ）、シアリル化欠損ヒト骨髓細胞に由来するP a n k o m a b （P a n k o m a b シアリル化⁻、シアリル化が低度である）、またはG T - 5 s 細胞に由来するP a n k o m a b （P a n k o m a b シアリル化⁺、シアリル化が高度である）と共にインキュベーションした後において、E : T 比を5 0 : 1 とする、Z R - 7 5 - 1 細胞およびヒトP B M C によるユーロピウム放出アッセイを示す図である。

20

【図13】図13は、G T - 5 s 細胞において発現させたP a n k o m a b またはG T - 5 s 細胞に由来するF u c - 細胞系において発現させたP a n k o m a b を用いる、ホモ接合性F c γ R I I I a - 1 5 8 F ドナーから得たP B M C による標的細胞の溶解を示す図である。

【図14】図14は、本発明によりグリコシル化されたC e t u x i m a b を用いる、ホモ接合性F c γ R I I I a - 1 5 8 F ドナーまたはホモ接合性F c γ R I I I a - 1 5 8 V ドナーから得たP B M C による、構成的に活性なK - R a s 変異を含む標的細胞の溶解を示す図である。

【図15】図15は、帯電の異なるアイソタイプのプールにおけるシアリル化グリカン量を示す図である。（A）等電点電気泳動から得られたプールにおけるF c 部分およびF a b 部分のシアリル化を示す図である（プール1 : p H が高く、プール2 : p H が中程度であり、プール3 : p H が低い）。（B）薬物動態研究に用いられるプールのシアリル化を示す図である（C e t u x i m a b A : プール1 および2、C e t u x i m a b B : プール3）。S 1 とは、グリカンを保有する単一のシアリル酸を意味し、S 2 とは、ジシアリル化グリカンを意味し、S > 0 とは、S 1 とS 2 との和を意味する。

30

【図16】図16は、マウスにおけるC e t u x i m a b の循環半減期の薬物動態を示す図である。C e t u x i m a b A : シアリル化が低度であり、C e t u x i m a b B : シアリル化が高度である。抗体濃度は、対数スケールによる。

【図17】図17は、A 4 3 1 ヒト外陰類表皮がん異種移植細胞を保有するヌードマウスにおける、本発明によりグリコシル化されたC e t u x i m a b （C e t u x i m a b （発明））およびマウスS P 2 / 0 細胞において発現させたC e t u x i m a b （C e t u x i m a b S P 2 / 0 ）の、インビボにおける抗腫瘍活性を示す図である。異種移植されたマウスは、腫瘍が触知可能なサイズに到達したときに、表示の用量レベルで処置した。各記号は、動物8 匹の群の平均値およびS E M を表す。# : 腫瘍サイズが危機的なサイズであるために、対照群の動物は、2 0 日目に屠殺した。

40

【図18】図18は、D U 1 4 5 結腸がん異種移植細胞を保有するヌードマウスにおける、本発明によりグリコシル化されたC e t u x i m a b （C e t u x i m a b （発明））のインビボにおける抗腫瘍活性を示す図である。異種移植されたマウスは、腫瘍が触知可能なサイズに到達した後で、表示の用量レベルでC e t u x i m a b （発明）で処置した

50

。各記号は、動物 7～8 匹の群の平均値および S E M を表す。

【図 19】図 19 は、Z R - 7 5 - 1 細胞を異種移植されたヌードマウスにおける腫瘍成長に対する、G T - 5 s 細胞において発現させたシアリル化 P a n k o m a b の効果を示す図である。8 匹の群のマウス、ヌードマウス、用量：0. 5 m g / k g、静脈内投与。P a n k o m a b シアリル化⁺：シアリル化された P a n k o m a b、P a n d o m a b シアリル化⁻：シアリル化されていない P a n k o m a b；P B S：緩衝液対照。

【図 20】図 20 は、患者から得られた N S C L C および C R C 起源の異種移植細胞を保有するヌードマウスにおける、本発明によりグリコシル化された C e t u x i m a b (C e t u x i m a b (発明)) のインビボにおける抗腫瘍活性を示す図である。異種移植されたヌードマウスは、腫瘍が触知可能なサイズに到達したときに、緩衝液対照または異なる濃度の C e t u x i m a b (発明) で処置した。各記号は、動物 8 匹の群の平均値および S E M を表す。

【図 21-1】図 21 は、(A) I g G 抗体、および (B) コア構造、および (C) 抗体の F a b グリコシル化部位および F c グリコシル化部位に付いている糖鎖の二分枝性 (b i a n t e n n a r y) 複合体型構造についての概略図を示す図である。(A) では、I g G 抗体が、例示的なグリコシル化部位において例示的な糖構造を含む。抗体の 1 つの重鎖のグリコシル化だけを示す。他の重鎖は、概略図には示されていない、対応する糖構造を保有する、対応するグリコシル化部位を含む。(B) および (C) では、黒色四角が、N-アセチルグルコサミン残基 (G l c N A c) を表し、グレーの丸が、マンノース残基 (M a n) を表し、白色丸が、ガラクトース残基 (G a l) を表し、グレーの菱形が、シア

アル酸残基 (S A) を表し、黒色の三角が、フコース残基 (F u c) を表し、グレーの四角が、二分枝状の (b i s e c t i n g) N-アセチルグルコサミン残基 (ビス G l c N A c) を表す。二分枝性複合体型の構造では、糖の分枝中の G l c N A c、G a l、および S A、ビス G l c N A c、ならびに F u c を糖構造内に存在させるのは任意選択であるに過ぎず、存在させなくともよい。

【図 21-2】図 21 は、(A) I g G 抗体、および (B) コア構造、および (C) 抗体の F a b グリコシル化部位および F c グリコシル化部位に付いている糖鎖の二分枝性複合体型構造についての概略図を示す図である。(A) では、I g G 抗体が、例示的なグリコシル化部位において例示的な糖構造を含む。抗体の 1 つの重鎖のグリコシル化だけを示す。他の重鎖は、概略図には示されていない、対応する糖構造を保有する、対応するグリコシル化部位を含む。(B) および (C) では、黒色四角が、N-アセチルグルコサミン残基 (G l c N A c) を表し、グレーの丸が、マンノース残基 (M a n) を表し、白色丸が、ガラクトース残基 (G a l) を表し、グレーの菱形が、シア

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

本明細書で用いられる通り、以下の表現は一般に、それらが用いられる文脈が他の内容を示す場合を除き、以下に示す意味を有することが好ましいことを意図する。

【0018】

本明細書で用いられる「含む」という表現は、その字義通りの意味のほかに、また、「本質的に～からなる」という表現および「～からなる」という表現も包含し、これらの表現を具体的に指す。したがって、「含む」という表現は、具体的に列挙された要素を「含む」対象物が、さらなる要素を含まない実施形態を指すほか、具体的に列挙された要素を「含む」対象物が、さらなる要素を包含する可能性があり、かつ／またはこれらを実際に包含する実施形態も指す。同様に、「有する」という表現も、「含む」という表現と同様に理解されるべきであるが、また、「本質的に～からなる」という表現および「～からな

る」という表現も包含し、これらの表現も具体的に指すものとして理解されるべきである。

【0019】

「抗体」という用語は、特に、ジスルフィド結合により連結された、少なくとも2つの重鎖および2つの軽鎖を含むタンパク質を指す。「抗体」という用語は、天然の抗体のほか、抗体の全ての組換え形態、例えば、原核細胞において発現する抗体、グリコシル化されていない抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体も包含する。各重鎖は、重鎖可変領域（VH）および重鎖定常領域（CH）を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）を含む。重鎖定常領域は、3つまたは（IgM型抗体またはIgE型抗体の場合は）4つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2、CH3、およびCH4）を含み、第1の定常ドメインCH1は、可変領域に隣接し、ヒンジ領域を介して、第2の定常ドメインであるCH2に連結されうる。軽鎖定常領域は、1つの定常ドメインだけからなる。可変領域は、フレームワーク領域（FR）と称する、より保存的な領域を散在させた、相補性決定領域（CDR）と称する超可変性領域へとさらに区分することができ、この場合、各可変領域は、3つのCDRおよび4つのFRを含む。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有する。抗体の定常領域は、多様な免疫系細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的な補体系の第1成分（C1q）を含めた宿主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。しかし、本発明による「抗体」という用語はまた、重鎖抗体、すなわち、1またはそれより多くの、特に、2つの重鎖だけからなる抗体、およびナノボディー、すなわち、単一の単量体可変ドメインだけからなる抗体も包含する。

10

20

【0020】

特に、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、またはIgA2など、任意のサブクラスを含めた、IgA、IgD、IgE、IgG、またはIgMなど、任意のアイソタイプの抗体でありうる。抗体は、IgG1抗体またはIgG2抗体であることが好ましく、IgG1抗体であることがより好ましい。重鎖定常領域は、γ型重鎖、δ型重鎖、α型重鎖、μ型重鎖、またはε型重鎖など、任意の型の重鎖でありうる。さらに、軽鎖定常領域もまた、κ型軽鎖またはλ型軽鎖など、任意の型の軽鎖でありうる。抗体の軽鎖は、κ鎖であることが好ましい。

【0021】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸位置を示すのに、本明細書では、Kabattによる番号受けシステム（Kabatt, E. A. ら（1991年）、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、5版、NIH Publication第91-3242号）を用いる。前記システムによれば、重鎖は、35A、35B、52A～52C、82A～82C、および100A～100Kを含め、0位～113位のアミノ酸位置を含む。Kabattによる番号付けでは、重鎖可変領域のCDRが、31～35B位（CDR1）、50～65位（CDR2）、および95～102位（CDR3）に位置する。残りのアミノ酸位置は、フレームワーク領域であるFR1～FR4を形成する。軽鎖可変領域は、27A～27F位、95A～95F位、および106A位を含めた、0～109位を含む。CDRは、24～34位（CDR1）、50～56位（CDR2）、および89～97位（CDR3）に位置する。抗体の特異的遺伝子の初期形成に応じて、これらの位置のうちの全てが、所与の重鎖可変領域または軽鎖可変領域に必ずしも存在する必要があるわけではない。本明細書で重鎖可変領域または軽鎖可変領域におけるアミノ酸位置に言及する場合、別段に示さない限り、これらのアミノ酸位置は、Kabattによる番号付けに従う位置を指す。

30

40

【0022】

抗体またはその断片もしくは誘導体の「Fab部分」とは、特に、重鎖可変領域および軽鎖可変領域（VHおよびVL）と、第1の重鎖定常領域および軽鎖定常領域（CH1およびCL）とを含む抗体の部分の部分を指す。抗体またはその断片もしくは誘導体が、これらの領域の全てを含むわけではない場合は、「Fab部分」という用語が、VH、VL、CH

50

1、およびC Lという領域のうちで、抗体またはその断片もしくは誘導体に存在する領域だけを指す。「F a b部分」とは、パパインで天然抗体を消化することにより得られる、抗体の抗原結合活性を含有する断片に対応する抗体の部分の部分を指すことが好ましい。特に、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分は、抗原結合部位またはその抗原結合能力を包含する。F a b部分は、抗体のうちの少なくともV H領域を含むことが好ましい。

【0023】

抗体またはその断片もしくは誘導体の「F c部分」とは、特に、重鎖定常領域2、3、および（適合する場合は）4（C H 2、C H 3、およびC H 4）を含む抗体の部分の部分を指す。抗体またはその断片もしくは誘導体が、これらの領域の全てを含まない場合は、「F c部分」という用語が、C H 2、C H 3、およびC H 4という領域のうちで、抗体またはその断片もしくは誘導体に存在する領域だけを指す。「F c部分」とは、パパインで天然抗体を消化することにより得られる、抗体の抗原結合活性を含有しない断片に対応する抗体の部分の部分を指すことが好ましい。特に、抗体またはその断片もしくは誘導体のF c部分は、F c受容体に結合することが可能であり、したがって例えば、F c受容体結合部位またはF c受容体結合能を含む。さらに、F c部分は、A D C Cを誘導することも可能である。F c部分は、抗体のうちの少なくともC H 2領域を含むことが好ましい。

【0024】

F a b部分およびF c部分を含めた、I g Gクラスの抗体についての概略図を、図2 1 Aにおいて見ることができる。

【0025】

本発明によれば、「キメラ抗体」という用語が、特に、定常領域がヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列に由来し、少なくとも1つの可変領域、および好ましくは両方の可変領域が、非ヒト抗体、特に、マウス抗体に由来する抗体を指す。

【0026】

本発明によれば、「ヒト化抗体」という用語は、特に、少なくとも1つのC D Rが、非ヒト抗体に由来し、定常領域と、存在する場合は、可変領域のうちの少なくとも1つのフレームワーク領域とが、ヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列に由来する抗体を指す。重鎖可変領域の全てのC D R、またはより好ましくは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の全てのC D Rが、非ヒト抗体に由来することが好ましい。さらに、重鎖可変領域の全てのフレームワーク領域、または好ましくは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の全てのフレームワーク領域が、ヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列に由来することも好ましい。C D Rは、同じ非ヒト抗体に由来することが好ましい。1つの可変領域のフレームワーク領域のうちの最初の3つまたは全ては、同じヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列に由来するが、重鎖可変領域のフレームワーク領域が、軽鎖可変領域のフレームワーク領域と同じヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列に由来しなくともよい。特に好ましい実施形態では、ヒト化抗体が、同じ抗原、特に、1またはそれより多くのC D Rが由来する非ヒト抗体と同じエピトープに結合することが可能である。

【0027】

非ヒト抗体に由来するヒト化抗体のC D Rは、非ヒト抗体のC D Rと同一であることが好ましい。さらに、ヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列に由来するヒト化抗体のフレームワーク領域は、ヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列のフレームワーク領域と同一でありうる。別の実施形態では、ヒト化抗体のフレームワーク領域が、それらが由来するヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列のフレームワーク領域と比較して、1またはそれより多くのアミノ酸置換を有しうる。置換されたアミノ酸残基は、C D Rのうちの1またはそれより多くが由来する非ヒト抗体の対応するアミノ酸残基（特に、K a b a tの番号付けによれば同じ位置である、対応するアミノ酸残基）により置換されることが好ましい。特に、ヒト化抗体の可変領域のフレームワーク領域（重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域）は、30以下のアミノ酸置換、好ましくは25以下、20以下、15以下、12以下、10以下、または8以下のアミノ酸置換を含むことが好ましい。

【0028】

好ましい実施形態では、ヒト化抗体の重鎖可変領域の全てのフレームワーク領域は、まとめると、それらが由来するヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列の重鎖可変領域のフレームワーク領域と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%の相同性または同一性を共有する。さらに、ヒト化抗体の軽鎖可変領域の全てのフレームワーク領域は、まとめると、それらが由来するヒト抗体またはヒト抗体のコンセンサス配列の軽鎖可変領域のフレームワーク領域と、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%の相同性または同一性を好ましくは共有する。

【0029】

キメラ抗体またはヒト化抗体の定常領域は、任意のヒト抗体またはヒト化抗体のコンセンサス配列に由来する。特に、重鎖定常領域は、 γ 型重鎖、 δ 型重鎖、 α 型重鎖、 μ 型重鎖、または ϵ 型重鎖など、任意の型の重鎖でありうる。したがって、キメラ抗体またはヒト化抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、またはIgA2など、任意のサブクラスを含めた、IgA、IgD、IgE、IgG、またはIgMなど、任意のアイソタイプの抗体でありうる。キメラ抗体またはヒト化抗体は、IgG1抗体またはIgG2抗体であることが好ましく、IgG1抗体であることがより好ましい。さらに、軽鎖定常領域もまた、 κ 型軽鎖または λ 型軽鎖など、任意の型の軽鎖でありうる。キメラ抗体またはヒト化抗体の軽鎖は、 κ 鎖であることが好ましい。

【0030】

標的アミノ酸配列が、その全長にわたり、基準アミノ酸配列の対応する部分と、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも97%の相同性または同一性を共有する場合、標的アミノ酸は、基準アミノ酸配列に「由来」する。例えば、ヒト化抗体のフレームワーク領域が、特定のヒト抗体の可変領域に由来する場合、ヒト化抗体のフレームワーク領域のアミノ酸は、その全長にわたり、ヒト抗体の対応するフレームワーク領域と、少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも97%の相同性または同一性を共有する。「対応する部分」または「対応するフレームワーク領域」とは、例えば、標的抗体の重鎖可変領域のフレームワーク領域1 (FRH1) が、基準抗体の重鎖可変領域のフレームワーク領域1に対応することを意味する。同じことは、例えば、FRH2、FRH3、FRH4、FRL1、FRL2、FRL3、およびFRL4についても当てはまる。具体的な実施形態では、基準アミノ酸配列に「由来」する標的アミノ酸配列は、その全長にわたり、基準アミノ酸配列の対応する部分と100%相同であるか、または特に、100%同一である。

【0031】

抗体の「断片または誘導体」とは、特に、前記抗体に由来するタンパク質または糖タンパク質であり、この抗体と同じ抗原、特に、同じエピトープに結合することが可能である。したがって、本明細書における抗体の断片または誘導体とは、一般に、機能的な断片または誘導体を指す。抗体の機能的な断片または誘導体は、特に、この抗体と同じ抗原、とりわけ、同じエピトープに結合することが可能である。特に好ましい実施形態では、抗体の断片または誘導体が、重鎖可変領域を含む。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片またはそれらの誘導体により実施されることが示されている。抗体の断片または誘導体の例には、(i) 重鎖および軽鎖の各々のうちの変領域および第1の定常ドメインからなる一価断片であるFab断片と、(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab)₂断片と、(iii) 重鎖の可変領域および第1の定常ドメインCH1からなるFd断片と、(iv) 抗体の単一のアームの重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなるFv断片と、(v) 単一のポリペプチド鎖からなるFv断片であるscFv断片と、(vi) 共有結合的に連結された2つのFv断片からなる(Fv)₂断片と、(vii) 重鎖可変ドメインと、(viii) 重鎖可変

10

20

30

40

50

領域と軽鎖可変領域との会合が、分子間だけで生じることが可能であり、分子内で生じることが可能でない形で共有結合的に連結された、重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなる多重抗体とが含まれる。これらの抗体断片および誘導体は、当業者に公知である従来の技法を用いて得られる。

【0032】

「特異的な結合」とは、抗体などの薬剤が、その薬剤が特異的であるエピトープなどの標的に、別の標的に対する結合と比較してより強力に結合することを意味することが好ましい。薬剤は、その薬剤が、第1の標的に、第2の標的に対する解離定数より小さな解離定数 (K_d) で結合する場合、第1の標的に、第2の標的に対する場合と比較してより強力に結合する。薬剤が特異的に結合する標的に対する解離定数は、この薬剤が特異的には結合しない標的に対する解離定数の2分の1未満、好ましくは5分の1未満、より好ましくは10分の1未満、なおより好ましくは20分の1、50分の1、100分の1、200分の1、500分の1、または1000分の1未満であることが好ましい。

10

【0033】

「シアル酸」という用語は、特に、ノイラミン酸の任意のN置換誘導体またはO置換誘導体を指す。シアル酸とは、5-N-アセチルノイラミン酸および5-N-グリコリルノイラミン酸の両方を指すことが好ましく、5-N-アセチルノイラミン酸だけを指すことがより好ましい。シアル酸、特に、5-N-アセチルノイラミン酸は、2, 3結合または2, 6結合を介して、糖タンパク質の糖鎖へと付いていることが好ましい。本明細書で記載される抗体組成物では、2, 3結合したシアル酸ならびに2, 6結合したシアル酸の両方が存在することが好ましい。

20

【0034】

本明細書で言及される「フリーのガラクトース単位」(free galactose unit) という用語は、特に、その還元末端を介して糖構造に付いているガラクトース単位であるが、その6位にシアル酸を保有しないガラクトース単位を指す。特に、フリーのガラクトース単位は、その6位に糖単位を保有しない。特定の実施形態では、フリーのガラクトース単位が、その6位にいかなる化学修飾または置換基も保有しない。特に、ガラクトース単位は、その2位、3位、4位、5位、および6位のうちのいずれの1つにおいても、シアル酸、好ましくはサッカリド(saccharide)、より好ましくはいかなる化学修飾または置換基も保有しない。この点で、ガラクトース単位の水素およびヒドロキシル残基を、化学修飾または置換基としては考えない。

30

【0035】

「グリコシル化部位」という用語は、特に、単糖単位または糖鎖のペプチド鎖への付着を触媒することが可能な酵素により認識されうる任意のアミノ酸配列を指す。グリコシル化部位は、単糖単位または糖鎖が付いているアミノ酸残基を包含することが好ましい。好ましいグリコシル化部位は、N-グリコシル化部位、特に、結合部位としてアスパラギン残基を含むN-グリコシル化部位、およびO-グリコシル化部位、特に、付着部位としてセリン残基またはトレオニン残基を含むO-グリコシル化部位である。好ましいN-グリコシル化部位は、アミノ酸配列Asn Xaa Ser/Thrを含み、この場合、Xaaは、好ましくはPro以外の任意のアミノ酸である。このアミノ酸配列は、3つの連続アミノ酸配列を指し、この場合、第1のアミノ酸残基は、アスパラギン残基であり、第2のアミノ酸残基は、任意のアミノ酸残基、特に、プロリン以外の任意の天然のアミノ酸残基であることが可能であり、第3のアミノ酸残基は、セリンまたはトレオニンである。グリコシル化するとき、糖鎖は、アスパラギン残基に結合する。

40

【0036】

本明細書で示される数、特に、特異的なグリコシル化特性の相対量は、好ましくは概数として理解されるべきである。特に、数は、最大で10%高値および/または低値でありうる、特に、最大で9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%高値および/または低値でありうるものが好ましい。

【0037】

50

「核酸」という用語は、一本鎖および二本鎖の核酸およびリボ核酸ならびにデオキシリボ核酸を包含する。核酸は、天然ならびに合成のヌクレオチドを含む可能性があり、例えば、メチル化、5' キャッピング、および／または3' キャッピングにより天然修飾される場合もあり、合成修飾される場合もある。

【0038】

本発明によれば、「宿主細胞」という用語が、外因性核酸により形質転換またはトランスフェクトされうる任意の細胞を指す。本発明による「宿主細胞」という用語は、原核細胞（例えば、E. coli 細胞）または真核細胞（例えば、哺乳動物細胞、特に、ヒト細胞、酵母細胞、および昆虫細胞）を含む。ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、または霊長動物に由来する細胞など、哺乳動物細胞が特に優先される。細胞は、複数の組織型に由来することが可能であり、一次細胞および一次細胞系を含みうる。宿主細胞は、ヒト細胞、特に、不死化ヒト細胞、好ましくは、不死化ヒト骨髓細胞、または不死化ヒト骨髓性白血病細胞など、不死化ヒト血液細胞であることが好ましい。さらに、宿主細胞はまた、不死化ヒト腫瘍細胞でもありうる。核酸は、宿主細胞において、単一コピーの形態で存在する場合もあり、2つ以上のコピーの形態で存在する場合もあり、一実施形態では、宿主細胞内で発現する。

10

【0039】

本発明による「患者」という用語は、ヒト、非ヒト霊長動物、または別の動物、特に、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはマウスおよびラットなどの齧歯動物などの哺乳動物を意味する。特に好ましい実施形態では、患者が、ヒトである。

20

【0040】

本発明による「がん」という用語は、特に、白血病、精上皮腫、黒色腫、奇形腫、リンパ腫、神経芽腫、神経膠芽腫、直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、副腎がん、甲状腺がん、血液がん、皮膚がん、脳腫瘍、子宮頸がん、腸 (intestinal) がん、肝臓がん、結腸がん、胃がん、腸 (intestine) がん、頭頸部がん、消化器がん、リンパ節がん、食道がん、結腸直腸がん、脾臓がん、耳鼻咽喉 (ENT) がん、乳がん、前立腺がん、子宮がん、卵巣がん、および肺がん、ならびにこれらの転移を含む。これらの例は、肺がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、または上記で記載したがんの種類もしくは腫瘍の転移である。本発明によるがんという用語はまた、がん転移も含む。

【0041】

「腫瘍」とは、制御異常の細胞増殖、特に、がんにより形成される細胞群または組織群を意味する。腫瘍は、構造的秩序および正常組織との機能的協調性の部分的または完全な欠如を示す場合があり、通常は、良性の場合もあり悪性の場合もある、異質の組織塊を形成する。特に、「腫瘍」という用語は、悪性腫瘍を指す。一実施形態によれば、「腫瘍」という用語または「腫瘍細胞」という用語はまた、非充実性腫瘍、および白血病細胞など、非充実性腫瘍細胞も指す。別の実施形態によれば、「腫瘍」という用語および「腫瘍細胞」という用語には、個別の非充実性腫瘍またはそれらの細胞が包含されない。

30

【0042】

「転移」とは、その元の部位から、体内の別の部分へのがん細胞の拡大を意味する。転移の形成は、極めて複雑な過程であり、通常は、がん細胞が原発性腫瘍から離脱し、体内循環へと侵入および定着して、体内の他の場所にある正常組織内で増殖することを伴う。腫瘍細胞が転移する場合、新規の腫瘍を、二次性腫瘍または転移性腫瘍と呼び、その細胞は、通常、元の腫瘍における細胞に類似する。これは、例えば、乳がんが肺へと転移する場合は、二次性腫瘍が、異常な乳腺細胞からなり、異常な肺細胞からなるわけではないことを意味する。よって、肺におけるこの腫瘍は、転移性乳がんと呼ばれ、肺がんとは呼ばれない。

40

【0043】

「医薬組成物」という用語は、特に、ヒトまたは動物への投与に適する組成物、すなわち、薬学的に許容可能な成分を含有する組成物を指す。医薬組成物は、緩衝剤、防腐剤、および等張性修飾剤など、担体、希釈剤、または医薬賦形剤と共に、活性化合物またはそ

50

の塩もしくはプロドラッグを含むことが好ましい。

【0044】

「抗体組成物」という用語は、特に、抗体またはその断片もしくは誘導体を含む任意の組成物を指す。抗体組成物は、流体組成物の場合もあり、固体組成物の場合もあり、また、乾燥凍結させた抗体組成物または再構成した抗体組成物も包含する。流体組成物、より好ましくは水性組成物を用いることが好ましい。抗体組成物は、水などの溶媒、pH値を調整するための緩衝液、および場合によって、抗体を安定化させるか、または抗体の分解を防止するためのさらなる薬剤をさらに含むことが好ましい。抗体組成物は、妥当量の抗体、特に、少なくとも1フェムトモル、好ましくは、少なくとも1ピコモル、少なくとも1ナノモル、または少なくとも1マイクロモルの抗体またはその断片もしくは誘導体を含むことが好ましい。しかし、特定の実施形態ではまた、1つの抗体分子またはその断片もしくは誘導体だけを含む抗体組成物も包含される。特異的な抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物は、加えて、さらなる抗体またはその断片もしくは誘導体も含みうる。しかし、特異的な抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物は、特異的な抗体またはその断片もしくは誘導体とは別に、他の抗体または抗体断片もしくは誘導体を含まないことが好ましい。特に、抗体組成物中の抗体のうちの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、最も好ましくは約100%が、同じ抗原またはエピトープを指向するか、またはこれらに結合する。

【0045】

本発明による「糖鎖1本当たりの平均シアル酸残基量」とは、特に、糖鎖群のうちの1つの糖鎖中に平均で存在するシアル酸残基数を指す。特に、それは、糖鎖群のうちの糖に付いているシアル酸残基の総数を、前記群中の糖鎖の総数で除した数を指す。糖鎖1本当たりの平均シアル酸残基量が1.0であるとは、糖鎖群において、各糖鎖が、平均で1.0のシアル酸残基を含むことを意味する。この点における「糖鎖」という用語は、抗体のポリペプチド鎖に付いている糖を指すことが好ましい。糖鎖群とは、抗体組成物中に存在する全ての抗体の全ての糖鎖、または抗体組成物中の全ての特定の種類の抗体の全ての糖鎖、または抗体組成物中の全ての（特定の種類の）抗体の特定の部分もしくは特定のグリコシル化部位に存在する全ての糖鎖を指すことが好ましい。

【0046】

「循環半減期」という用語は、薬剤を、生体の循環、特に、ヒト体内の循環へと投与した後で、この薬剤の投与量のうち、循環内に存在する量が半分だけとなるまでに経過する時間を指すことが好ましい。治療的に有効な薬剤の場合、循環半減期が長いと、薬剤がより長時間にわたり持続する治療効果を及ぼすので、循環半減期が長いことが一般に望ましい。「クリアランス速度」とは、薬剤が、生体の循環、特に、ヒト体内の循環から除去される速度を指すことが好ましい。したがって、クリアランス速度が大きければ、通常、結果として循環半減期が短くなる。

【0047】

発明の詳細な説明

本発明は、（先行技術の教示とは対照的に）そのFab部分にグリコシル化部位を有する抗体のFab部分に付いている糖鎖中のシアル酸残基量が、前記抗体の循環半減期に対して決定的であり、したがって、前記抗体のバイオアベイラビリティに対して決定的であるという知見に基づく。特に、Fab部分のシアリル化が高度であると、患者の循環内で、抗体の半減期が結果として延長される。同様に、Fab部分のシアリル化が低度であると、循環半減期が短縮される。しかしまた、抗体のFab部分におけるグリコシル化部位を除去し、これにより、Fabのグリコシル化を全て解除すると、抗体の循環半減期が、Fab部分のシアリル化度が中程度である～高い抗体の循環半減期と同等になることも判明した。したがって、シアリル化が低度な抗体の循環半減期は、シアル酸量を増大させることにより延長しうるだけでなく、それぞれのグリコシル化部位が存在する場合、その抗体のFab部分におけるグリコシル化部位を除去することによってもまた延長すること

ができる。さらに、本発明者らは、驚くべきことに、F a b 部分のグリコシル化部位におけるシアル酸含量を調整することが、抗体の抗原結合または抗原特異性に影響を及ぼさないことが多く、さらにまた、そのA D C C 活性およびC D C 活性など、抗体の下流における生物学的活性に対しても負の影響を及ぼさないことも見出した。シアル酸含量の変化が、抗原結合に負の影響を及ぼす場合はまた、F a b 部分におけるグリコシル化部位を除去して、循環半減期を延長することも可能であり、かつ／またはさらなるグリコシル化部位を、F a b 部分における別の位置に導入し、この新規に導入されたF a b のグリコシル化部位のシアル酸含量を、本明細書で教示する通りに調整することもできる。本発明者らにより見出されたさらなる利点は、F a b 部分のグリコシル化部位におけるシアリル化を増大させながら、同時に、F c 部分におけるシアリル化は最小限度に保つ可能性である。したがってまた、抗体のA D C C 活性およびC D C 活性が、F a b 部分のシアリル化を増大させることにより影響を受けることもない。

10

【0048】

抗体の循環半減期を制御する方法

これらの知見に照らして、本発明は、抗体組成物における抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を制御する方法であって、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分において存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を調整するステップ、および／あるいは1またはそれより多くのグリコシル化部位を、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分において除去または導入するステップを含む方法を提供する。したがってまた、抗体の意図される使用との関連で調整される循環半減期をもたらしことも可能である。これにより、化学修飾（P E GまたはH E Sなど）または融合タンパク質を用いる必要なしに、抗体の循環半減期を調整するための柔軟性がもたらされる。

20

【0049】

特に、第一の態様では、本発明が、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を制御するための方法であって、

(a) 循環半減期を延長するために、

(a 1) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を増大させるステップ、および／あるいは

30

(a 2) 抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する1またはそれより多くのグリコシル化部位を除去するステップ、および／あるいは

(a 3) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を減少させるステップ、あるいは

(b) 循環半減期を短縮するために、

(b 1) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を減少させるステップ、および／あるいは

40

(b 2) 抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に1またはそれより多くのグリコシル化部位を導入するステップ、および／あるいは

(b 3) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を増大させるステップを含む方法を提供する。

【0050】

したがって、本発明による方法を用いると、抗体のF a b 部分に既に存在するかまたは人工的に導入されるグリコシル化部位における、シアリル化度および／またはフリーのガラクトース単位の程度を調整することにより、かつ／あるいはF a b 部分におけるグリコ

50

シル化部位を除去するかまたは F a b 部分にグリコシル化部位を導入することにより、所与の抗体の循環半減期を個別に制御することが可能となる。

【0051】

抗体の糖鎖中のシアル酸は、糖構造の非還元末端（複数可）においてガラクトース単位に付いている。したがって、シアル酸量を増大させると、フリーのガラクトース単位量もまた結果として減少し、この逆もまた成り立つ。フリーのガラクトース単位量を増大および減少させることは、例えば、それぞれ、シアル酸量を減少または増大させることにより達成することができる。しかし、フリーのガラクトース単位量はまた、フリーのガラクトース単位に、他の残基、例えば、アセチル残基、グルクロン酸、もしくは硫酸を結合させることにより減少させることもでき、かつ／またはフリーのガラクトース単位を糖から除去することによって減少させることもできる。同様に、フリーのガラクトース単位量の増大は、シアル酸量を減少させることによって達成することもでき、かつ／またはさらなるガラクトース単位を、完全にガラクトシル化されているわけではない糖へと結合させることによって達成することもできる。

10

【0052】

循環半減期の延長

本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の循環半減期を延長するためには、組成物中に含まれる抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を増大させることができる。

【0053】

好ましい実施形態では、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 50 % が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を増大させる。組成物では、F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 65 %、少なくとも 68 %、少なくとも 70 %、または最も好ましくは少なくとも 75 % が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むことが好ましい。特定の実施形態では、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 20 % が、少なくとも 2 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を増大させる。組成物では、F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 25 %、より好ましくは少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、または最も好ましくは少なくとも 45 % が、少なくとも 2 つのシアル酸残基を含むことが好ましい。

20

30

【0054】

組成物では、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の相対量を、少なくとも 5 百分率ポイント、より好ましくは少なくとも 7 百分率ポイント、少なくとも 10 百分率ポイント、少なくとも 15 百分率ポイント、少なくとも 20 百分率ポイント、少なくとも 25 百分率ポイント、少なくとも 30 百分率ポイント、少なくとも 35 百分率ポイント、少なくとも 40 百分率ポイント、少なくとも 45 百分率ポイント、または少なくとも 50 百分率ポイント増大させるようにシアル酸量を増大させることが好ましい。組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の相対量は、組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている全ての糖のうちの、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の百分率である。例えば、10 百分率ポイントの増大とは、組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の相対量の百分率値が、ステップ（a1）において 10 増大する実施形態、すなわち、ステップ（a1）の前では相対量が X % であり、ステップ（a1）の後では相対量が（X + 10）% となる実施形態を指す。

40

【0055】

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む組成物では、抗体またはその断片も

50

しくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を、少なくとも 5 百分率ポイント増大させる。組成物では、F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 65 %、少なくとも 68 %、少なくとも 70 %、または最も好ましくは少なくとも 75 %が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むことが好ましい。

【0056】

F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量の増大はまた、少なくとも 1 つのシアル酸残基を既に含む組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸数を増大させることも包含する。特に、本発明による方法のステップ (a 1) によるシアル酸量の増大とは、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量の増大を指すことが好ましい。糖鎖 1 本当たりの前記平均シアル酸残基量は、少なくとも 0.01、より好ましくは少なくとも 0.05、少なくとも 0.1、少なくとも 0.15、少なくとも 0.2、少なくとも 0.3、または最も好ましくは少なくとも 0.5 増大させることが好ましい。好ましい実施形態では、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量が、少なくとも 0.5、好ましくは少なくとも 0.6、少なくとも 0.7、少なくとも 0.8、少なくとも 0.9、少なくとも 1.0、少なくとも 1.05、または少なくとも 1.1 となるように、シアル酸量を増大させる。

【0057】

F a b 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位を、その循環半減期を延長するステップの前に抗体に存在させている場合もあり、これらのグリコシル化部位のうちの 1 またはそれより多くを、本発明による方法の一部として、抗体の F a b 部分へと導入している場合もある。したがって、特定の実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を増大させるステップが、1 またはそれより多くのグリコシル化部位を、F a b 部分へと導入するステップを包含する。これらの新規に導入されたグリコシル化部位は、グリコシル化されると、糖であって、組成物における前記糖のうちの少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 68 %、少なくとも 70 %、または最も好ましくは少なくとも 75 %が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖を保有することが好ましい。抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分へのグリコシル化部位の導入については、以下でより詳細に記載する。

【0058】

特定の実施形態では、F a b 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を、抗体またはその断片もしくは誘導体の F c 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を有意に増大させることなしに増大させる。

【0059】

組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F c 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量は、本発明による方法を実施した後で、20 %未満、より好ましくは 15 %未満、10 %未満、8 %未満、または最も好ましくは 7 %未満となることが好ましい。特に、抗体の F c 部分におけるグリコシル化部位に付いている糖のうちの 20 %未満、より好ましくは 15 %未満、10 %未満、または 8 %未満、最も好ましくは 7 %未満が、1 またはそれより多くのシアル酸を含む。

【0060】

特定の実施形態では、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 50 %未満が、少なくとも 2 つのフリーのガラクトー

ス単位を含むように、フリーのガラクトース単位量を減少させる。組成物では、F a b 部分に存在する1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、または5%未満が、2つ以上のフリーのガラクトース単位を含むことが好ましい。さらに、組成物では、F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの95%未満が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位を含むことが好ましい。組成物では、F a b 部分に存在する1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%未満、45%未満、または40%未満が、1またはそれより多くのフリーのガラクトース単位を含むことがより好ましい。

10

【0061】

組成物では、F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の相対量を、少なくとも5百分率ポイント、より好ましくは少なくとも7百分率ポイント、少なくとも10百分率ポイント、少なくとも15百分率ポイント、少なくとも20百分率ポイント、少なくとも25百分率ポイント、少なくとも30百分率ポイント、少なくとも35百分率ポイント、少なくとも40百分率ポイント、少なくとも45百分率ポイント、または少なくとも50百分率ポイント減少させるようにフリーのガラクトース単位量を減少させることが好ましい。組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の相対量は、組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている全ての糖のうちの、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の百分率である。例えば、10百分率ポイントの減少とは、組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の相対量の百分率値が、ステップ(a3)において10減少する実施形態、すなわち、ステップ(a3)の前では相対量がX%であり、ステップ(a3)の後では相対量が(X-10)%となる実施形態を指す。

20

30

【0062】

F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量の減少はまた、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、1より多いフリーのガラクトース単位を含む糖中のフリーのガラクトース単位数を減少させることも包含する。特に、本発明による方法のステップ(a3)によるフリーのガラクトース単位量の減少とは、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖1本当たりの平均フリーのガラクトース単位量の減少を指すことが好ましい。糖鎖1本当たりの前記平均フリーのガラクトース単位量は、少なくとも0.01、より好ましくは少なくとも0.05、少なくとも0.1、少なくとも0.15、少なくとも0.2、少なくとも0.3、または最も好ましくは少なくとも0.5減少させることが好ましい。好ましい実施形態では、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖1本当たりの平均フリーのガラクトース単位量が、1.5未満、好ましくは1.4未満、1.3未満、1.2未満、1.1未満、1.0未満、好ましくは0.9未満、0.8未満、0.7未満、0.6未満、または0.5未満となるように、フリーのガラクトース単位量を減少させる。フリーのガラクトース単位量の減少は、シアル酸量を増大させることにより達成することが好ましい。

40

【0063】

シアル酸量を増大および／またはフリーのガラクトース単位量の減少は、シアリル化活

50

性が高い細胞または細胞系において抗体またはその断片もしくは誘導体を発現させるステップを包含する、任意の公知の手段により達成することができる。シアリル化度が高い細胞系は、例えば、細胞系の適切な単一クローンを選択することにより得ることもでき、細胞系を遺伝子操作することにより得ることもできる。シアリル化活性が高い細胞系は、特に、抗体を発現させるのに適する細胞系に対する変異誘発によるスクリーニングであって、シアリル化活性の高い細胞クローンを選択するスクリーニングにより得ることができる。さらに、糖タンパク質のシアリル化の一因となる酵素（複数可）の発現は、例えば、内因性酵素（複数可）の発現を誘導するかもしれないと増大させることにより、細胞もしくは細胞系において誘導もしくは増強することもでき、かつ／または前記酵素（複数可）のための外因性発現カセット（複数可）を導入することにより、細胞もしくは細胞系において誘導もしくは増強することもできる。適切な酵素は、例えば、シアル酸残基の糖鎖への移動の一因となるシアリルトランスフェラーゼ、シアル酸残基もしくはその前駆体の細胞内の関与性の部分もしくは小器官への輸送を制御する輸送体、またはシアル酸の生合成に関与する酵素である。具体例は、 $\alpha 2, 6$ -シアリルトランスフェラーゼおよび $\alpha 2, 3$ -シアリルトランスフェラーゼなどのシアリルトランスフェラーゼ、CMP-シアル酸輸送体などの輸送体、UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼなどのエピメラーゼ、N-アセチルマンノサミンキナーゼおよびN-アセチルグルコサミンキナーゼ、N-アセチルノイラミン酸-9-P-シンセターゼ、N-アセチルノイラミン酸-9-P-ホスファターゼ、およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼなどのキナーゼである。さらに、シアリル化度を結果として高める、発現時の培養条件も用いることができる。当技術分野では、適切な方法が公知であり、例えば、WO 2005/080585において記載されている。代替的に、または加えて、インビトロにおけるシアリル化、特に、シアリルトランスフェラーゼおよび適切な基質を用いる酵素的シアリル化、または適切な化学試薬を用いる化学的シアリル化も用いることができる。シアリル化度を高めることが可能な例示的な細胞系は、ブダペスト条約の要請により受託番号DSM ACC 3078の下、2010年7月28日に、Glycotope GmbH、Robert-Roessler-Str. 10、13125 Berlin (DE)により、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、Inhoffenstrasse 7B、38124 Braunschweig (DE)に寄託されたGT-5s細胞、またはこの細胞に由来する細胞系、もしくはこの細胞系と相同な細胞系である。GT-5s細胞とは、K562細胞に由来する細胞系であり、そのシアリル化活性の高さのために選択されている。K562細胞とは、American Type Culture Collectionに存在するヒト骨髄性白血病細胞系(ATCC CCL-243)である。GT-5s細胞およびこれに由来する細胞系は、K562細胞に適する周知の条件下で培養および維持することができる。

【0064】

GT-5s細胞に由来する細胞系は、例えば、場合によって、それらの変異率を増強するために、GT-5s細胞を処置した後で、GT-5s細胞の培養物に由来する単一クローンまたは細胞群を無作為的または特異的に選択することにより得ることもでき、GT-5s細胞系を遺伝子改変することにより得ることもできる。選択されたクローンまたは細胞群は、上記で記載した通りにさらに処置することもでき、かつ／またはさらなる選択ラウンドを実施することもできる。特に、GT-5s細胞と相同的な細胞系は、不死化ヒト骨髄細胞系である。GT-5s細胞に由来するかまたはこれと相同的な細胞系は、GT-5s細胞から得られる抗体と類似のグリコシル化パターンを有する抗体をもたらすことが可能であることが好ましい。GT-5s細胞に由来するかまたはこれと相同的な細胞系を介して生成する抗体は、本明細書で記載されるグリコシル化特徴のうちの1またはそれより多くを有する、特に、シアリル化度が高く、好ましくはFab部分におけるシアリル化度が高いことが好ましい。好ましい実施形態では、GT-5s細胞に由来するかまたはこれと相同的な細胞系が、本明細書で記載される通り、フコシル化度が低く、特に、Fc部

10

20

30

40

50

分におけるフコシル化度が低い抗体をもたらしことがさらに可能である。G T - 5 s 細胞に由来するかまたはこれと相同的な細胞系を介して生成する抗体の、類似のグリコシル化パターンは、ビス G l c N A c を保有する糖量百分率、シアリル化された糖量百分率、フリーのガラクトース残基を保有する糖量百分率、2, 6 連結されたシアル酸量百分率、およびフコースを保有する糖量百分率からなる群から選択されるグリコシル化特性のうちの、特に、1 またはそれより多く、好ましくは全てにおいて、G T - 5 s 細胞から得られる抗体のグリコシル化パターンと、20%以下、より好ましくは15%以下、10%以下、または5%以下異なることが好ましい。特に好ましい実施形態では、類似のグリコシル化特性が、フコースを保有する糖量百分率を包含しない。

【0065】

10

G T - 5 s 細胞系、ならびにこれに由来する細胞系、およびこれと相同な細胞系は、特に、抗体との関連で、極めて安定的で相同的なタンパク質生成をもたらすので、特に有利である。これらの細胞系は、極めて良好なバッチ間の安定性を有する、すなわち、異なる生成操作から得られる場合、または異なるスケールおよび／もしくは異なる培養手順で生成される場合に、生成するタンパク質およびそれらのグリコシル化パターンが類似する。

【0066】

抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する1またはそれより多くのグリコシル化部位を除去することによって、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸含量の増大および／またはフリーのガラクトース単位含量の減少のほか、抗体またはその断片もしくは誘導体の循環半減期の延長もまたもたらしことができる。前記グリコシル化部位（複数可）を除去することにより、シアリル化度が低く、かつ／またはフリーのガラクトース単位の存在度が高い、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分における糖の存在が防止される。これらのシアリル化の低度な糖は、患者の循環からの抗体のクリアランス速度を高める一因となるので、抗体の F a b 部分における各グリコシル化部位（複数可）を除去すれば、その循環半減期が延長される。

20

【0067】

好ましい実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体をコードする核酸を遺伝子操作することにより、グリコシル化部位の除去を行う。特に、抗体またはその断片もしくは誘導体をコードする核酸配列を変化させることによりグリコシル化部位を除去する。グリコシル化部位における少なくとも1つのアミノ酸の置換、付加、または欠失を達成するように、グリコシル化部位のアミノ酸をコードするコドンのうちの1またはそれより多くを変異させることが好ましい。特に、糖鎖が付いているアミノ酸を欠失させるか、または好ましくは、糖アクセプターとして機能することが可能でないアミノ酸で置換する。代替的にまたは加えてまた、変化させたアミノ酸配列が、酵素的グリコシル化の認識部位として機能しないように、グリコシル化部位のうちの別のアミノ酸を置換するかまたは欠失させることもでき、1またはそれより多くのさらなるアミノ酸をグリコシル化部位に付加することもできる。

30

【0068】

F a b 部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位が除去される抗体またはその断片もしくは誘導体は、F a b 部分におけるただ1つのグリコシル化部位、少なくとも2つのグリコシル化部位、または少なくとも3つのグリコシル化部位など、F a b 部分における任意の数のグリコシル化部位を有することが可能である。本発明による方法では、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分における全てのグリコシル化部位を除去しなくともよい。しかし、循環半減期を最大限に延長するためには、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する全てのグリコシル化部位を除去することが好ましい。

40

【0069】

循環半減期の短縮

本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の循環半減期を短縮するためには、組

50

成物中に存在する抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を減少させることができる。

【0070】

好ましい実施形態では、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 50 % 未満が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を減少させる。組成物では、F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 40 % 未満、30 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、7 % 未満、5 % 未満、3 % 未満、2 % 未満、または 1 % 未満が、1 またはそれより多くのシアル酸残基を含むことが好ましい。一実施形態によれば、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの約 0 % が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸量を減少させる。特定の実施形態では、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 30 % 未満が、少なくとも 2 つのシアル酸残基を含むように、シアル酸残基を減少させる。組成物では、F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 25 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、7 % 未満、5 % 未満、3 % 未満、2 % 未満、または 1 % 未満、より好ましくは約 0 % が、2 つ以上のシアル酸残基を含むことが好ましい。

10

【0071】

組成物では、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の相対量を、少なくとも 5 百分率ポイント、より好ましくは少なくとも 7 百分率ポイント、少なくとも 10 百分率ポイント、少なくとも 15 百分率ポイント、少なくとも 20 百分率ポイント、少なくとも 25 百分率ポイント、少なくとも 30 百分率ポイント、少なくとも 35 百分率ポイント、少なくとも 40 百分率ポイント、少なくとも 45 百分率ポイント、または少なくとも 50 百分率ポイント減少させるようにシアル酸量を減少させることが好ましい。組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の相対量は、組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている全ての糖のうちの、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の百分率である。例えば、10 百分率ポイントの減少とは、組成物における、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む糖の相対量の百分率値が、ステップ (b 1) において 10 減少する実施形態、すなわち、ステップ (b 1) の前では相対量が X % であり、ステップ (b 1) の後では相対量が (X - 10) % となる実施形態を指す。

20

30

【0072】

F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量の減少はまた、1 以上のシアル酸残基を含む組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸数を減少させることも包含する。特に、本発明による方法のステップ (b 1) によるシアル酸量の減少とは、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量の減少を指すことが好ましい。糖鎖 1 本当たりの前記平均シアル酸残基量は、少なくとも 0.01、より好ましくは少なくとも 0.05、少なくとも 0.1、少なくとも 0.15、少なくとも 0.2、少なくとも 0.3、または最も好ましくは少なくとも 0.5 減少させることが好ましい。好ましい実施形態では、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖 1 本当たりの平均シアル酸残基量が、0.8 未満、好ましくは 0.7 未満、0.6 未満、0.5 未満、0.4 未満、0.3 未満、0.2 未満、0.1 未満または 0.05 未満となるように、シアル酸量を減少させる。

40

【0073】

特定の実施形態では、組成物において、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコ

50

シル化部位に付いている糖のうちの少なくとも50%が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含むように、フリーのガラクトース単位量を増大させる。組成物では、F a b部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または最も好ましくは少なくとも98%が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含むことが好ましい。

【0074】

組成物では、F a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の相対量を、少なくとも5百分率ポイント、より好ましくは少なくとも7百分率ポイント、少なくとも10百分率ポイント、少なくとも15百分率ポイント、少なくとも20百分率ポイント、少なくとも25百分率ポイント、少なくとも30百分率ポイント、少なくとも35百分率ポイント、少なくとも40百分率ポイント、少なくとも45百分率ポイント、または少なくとも50百分率ポイント増大させるようにフリーのガラクトース単位量を増大させることが好ましい。組成物における、F a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の相対量は、組成物における、F a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている全ての糖のうちの、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の百分率である。例えば、10百分率ポイントの増大とは、組成物における、F a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖の相対量の百分率値が、ステップ(b3)において10増大する実施形態、すなわち、ステップ(b3)の前では相対量がX%であり、ステップ(b3)の後では相対量が(X+10)%となる実施形態を指す。

【0075】

F a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量の増大はまた、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖であって、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位を既に含む糖中のフリーのガラクトース単位数を増大させることも包含する。特に、本発明による方法のステップ(b3)によるフリーのガラクトース単位量の増大とは、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖1本当たりの平均フリーのガラクトース単位量の増大を指すことが好ましい。糖鎖1本当たりの前記平均フリーのガラクトース単位量は、少なくとも0.01、より好ましくは少なくとも0.05、少なくとも0.1、少なくとも0.15、少なくとも0.2、少なくとも0.3、または最も好ましくは少なくとも0.5増大させることが好ましい。好ましい実施形態では、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中の糖鎖1本当たりの平均フリーのガラクトース単位量が、少なくとも0.5、好ましくは少なくとも0.6、少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.9、少なくとも1.0、少なくとも1.1、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9または少なくとも1.95となるように、フリーのガラクトース単位量を増大させる。

【0076】

F a b部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位を、その循環半減期を延長するステップの前に抗体に存在させている場合もあり、これらのグリコシル化部位のう

10

20

30

40

50

ちの1またはそれより多くを、本発明による方法の一部として、抗体のF a b部分へと導入している場合もある。したがって、特定の実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のフリーのガラクトース単位量を増大させるステップが、1またはそれより多くのグリコシル化部位を、F a b部分へと導入するステップを包含する。これらの新規に導入されたグリコシル化部位は、グリコシル化されると、糖であって、組成物における前記糖のうちの少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または最も好ましくは少なくとも98%が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖を保有することが好ましい。抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分へのグリコシル化部位の導入については、以下でより詳細に記載する。

10

【0077】

シアル酸量の減少および／またはフリーのガラクトース単位量の増大は、シアリル化活性が低いか、またはシアリル化活性を有さない細胞または細胞系において抗体またはその断片もしくは誘導体を発現させるステップを包含する、任意の公知の手段により達成することができる。シアリル化度が低いかまたは見られない細胞系は、例えば、細胞系の適切な単一クローンを選択することにより得ることもでき、細胞系を遺伝子操作すること、例えば、1またはそれより多くの変異を細胞系のゲノム内に導入することにより得ることもでき、細胞系のシアリル化経路に関与する1またはそれより多くの遺伝子に対するノックアウトもしくはノックダウンまたはRNA干渉により得ることもできる。シアリル化経路に関与する適切な遺伝子は、例えば、シアル酸残基の糖鎖への移動の一因となるシアリルトランスフェラーゼ、シアル酸残基もしくはその前駆体の細胞内の関与性の部分もしくは小器官への輸送を制御する輸送体、またはシアル酸の生合成に関与する酵素をコードする。具体例は、 $\alpha 2$, 6-シアリルトランスフェラーゼおよび $\alpha 2$, 3-シアリルトランスフェラーゼなどのシアリルトランスフェラーゼ、CMP-シアル酸輸送体などの輸送体、UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼなどのエピメラーゼ、N-アセチルマンノサミンキナーゼおよびN-アセチルグルコサミンキナーゼ、N-アセチルノイラミン酸-9-P-シンセターゼ、N-アセチルノイラミン酸-9-P-ホスファターゼ、およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼなどのキナーゼである。さらに、シアリル化度を結果として低める、発現時の培養条件も用いることができる。代替的に、または加えて、インビトロにおける脱シアリル化、特に、シアリラーゼを用いる酵素的脱シアリル化、または適切な化学試薬を用いる化学的脱シアリル化も用いることができる。具体的に調整されたシアル酸含量、特に、低含量のシアル酸を有する糖タンパク質をもたらすのに適する細胞系および方法は、例えば、WO 2005/080585において記載されている。

20

30

【0078】

抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に1またはそれより多くのグリコシル化部位を導入することによって、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸含量の減少および／またはフリーのガラクトース単位含量の増大のほか、抗体またはその断片もしくは誘導体の循環半減期の短縮もまたもたらしすることができる。前記グリコシル化部位（複数可）を導入することにより、抗体またはその断片もしくは誘導体におけるシアリル化度が低い糖の存在を増大させることができる。これらの新規に導入されたグリコシル化部位は、グリコシル化されると、糖であって、組成物における前記糖のうちの50%未満、より好ましくは40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、または最も好ましくは5%未満が、1またはそれより多くのシアル酸残基を含む糖を保有することが好ましい。同様に、これらの新規に導入されたグリコシル化部位は、グリコシル化されると、糖であって、組成物における前記糖のうちの少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なく

40

50

とも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または最も好ましくは少なくとも98%が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖を保有することも好ましい。それぞれの低量のシアリル化をどのようにして達成しうるかは、上記に記載されている。

【0079】

少なくとも1つ、より好ましくは少なくとも2つ、または少なくとも3つのグリコシル化部位を、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に導入することが好ましい。特定の実施形態では、1つ、2つ、または3つのグリコシル化部位を導入する。グリコシル化部位（複数可）は、当技術分野において公知である任意の手段により導入することができる。抗体またはその断片もしくは誘導体をコードする核酸を遺伝子操作することにより、グリコシル化部位を導入を行うことが好ましい。特に、抗体またはその断片もしくは誘導体をコードする核酸配列を変化させることによりグリコシル化部位を導入する。コードされたアミノ酸が、グリコシル化部位を形成するように、抗体のコードンのうちの1またはそれより多くを変異させることが好ましい。グリコシル化部位の導入は、1またはそれより多くのさらなるコードンを付加する結果として、1またはそれより多くのさらなるアミノ酸をもたらすことにより達成することもでき、1またはそれより多くのヌクレオチドを置換する結果として、1またはそれより多くのアミノ酸の置換をもたらすことにより達成することもでき、かつ／または1またはそれより多くのコードンを欠失させる結果として、1またはそれより多くのアミノ酸の欠失をもたらすことにより達成することもできる。特に、グリコシル化部位（複数可）は、抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域、好ましくは重鎖可変領域に導入する。グリコシル化部位は、可変領域のフレームワーク領域に導入することがより好ましい。しかし、グリコシル化部位はまた、Fab部分の定常領域、特に、重鎖定常領域1に導入することもできる。

【0080】

1またはそれより多くのグリコシル化部位を、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に導入する場合、抗体またはその断片もしくは誘導体は、そのFab部分において、元はグリコシル化部位を含有しないことが好ましい。しかし、特定の実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体が、1またはそれより多くのグリコシル化部位を、そのFab部分において既に含み、本発明による方法を介して、1またはそれより多くのさらなるグリコシル化部位を導入する。これらの新規に導入されたグリコシル化部位（複数可）は、糖であって、組成物における前記糖のうちの50%未満、より好ましくは40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、または最も好ましくは5%未満が、1またはそれより多くのシアリル酸残基を含む糖を保有することが好ましい。特に、組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に存在する全てのグリコシル化部位に付いている糖のうちの50%未満、より好ましくは40%未満、30%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、または最も好ましくは5%未満が、1またはそれより多くのシアリル酸残基を含むことが好ましい。同様に、これらの新規に導入されたグリコシル化部位は、グリコシル化されると、糖であって、組成物における前記糖のうちの少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または最も好ましくは少なくとも98%が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含む糖を保有することも好ましい。特に、組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に存在する全てのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または最も好ましくは少なくとも98%が、少なくとも1つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を含むことが好ましい。それぞれの低量のシアリル化をどのようにして達成しうるかは、上記に記載されている。

【0081】

F a bにおけるグリコシル化部位

抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に存在するか、またはこのF a b部分に導入されるかもしくはこのF a b部分から除去される、1またはそれより多くのグリコシル化部位は、N-グリコシル化部位および／またはO-グリコシル化部位であり、好ましくはN-グリコシル化部位であり、より好ましくは、アミノ酸配列A s n X a a S e r / T h rを有し、この場合、X a aが、好ましくはP r o以外の任意のアミノ酸である、N-グリコシル化部位である。グリコシル化部位は、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分のいずれに位置させることもできる。しかし、グリコシル化部位は、重鎖可変領域または軽鎖可変領域、好ましくは重鎖可変領域に位置させることが好ましい。特に、グリコシル化部位は、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域のフレームワーク領域および／またはC D R、好ましくはフレームワーク領域に存在させることができる。しかし、1またはそれより多くのグリコシル化部位はまた、F a b部分の定常領域、特に、重鎖定常領域1に位置させることもできる。

10

【0082】

F a b部分におけるグリコシル化部位の導入および除去は、F a b部分のアミノ酸配列を変化させることにより、特に、1またはそれより多くのアミノ酸残基の付加、置換、および／または欠失により達成することができる。これは、アミノ酸またはそれらの断片もしくは誘導体をコードする核酸を遺伝子操作することにより、特に、核酸配列の変異誘発により行いうることが好ましい。グリコシル化部位を除去または導入するのに適する方法は、上記で説明されている。

20

【0083】

抗体またはその断片もしくは誘導体が、2つ以上の重鎖可変領域を含む実施形態では、重鎖可変領域に存在するグリコシル化部位が、抗体またはその断片もしくは誘導体の全ての重鎖可変領域に存在することが好ましい。抗体またはその断片もしくは誘導体が、2つ以上の重鎖定常領域、特に、2つ以上のC H 1領域を含む実施形態では、重鎖定常領域1に存在するグリコシル化部位が、抗体またはその断片もしくは誘導体の全ての重鎖定常領域1に存在することが好ましい。抗体またはその断片もしくは誘導体が、2つ以上の軽鎖可変領域を含む実施形態では、軽鎖可変領域に存在するグリコシル化部位が、抗体またはその断片もしくは誘導体の全ての軽鎖可変領域に存在することが好ましい。抗体またはその断片もしくは誘導体が、2つ以上の軽鎖定常領域を含む実施形態では、軽鎖定常領域に存在するグリコシル化部位が、抗体またはその断片もしくは誘導体の全ての軽鎖定常領域に存在することが好ましい。

30

【0084】

ヒト血清から単離される抗体のうちの約30%は、F a b部分内にグリコシル化部位を有する。抗E G F R抗体、特にC e t u x i m a bについて述べると、これらの抗体のF a b部分における1つのグリコシル化部位は、重鎖可変領域のフレームワーク領域3に位置することが好ましく、より好ましくはK a b a tの番号付けによるアミノ酸の85位に位置する。抗M u c 1抗体、特にP a n k o m a bについて述べると、これらの抗体のF a b部分における1つのグリコシル化部位は、重鎖可変領域のC D R 2に位置することが好ましく、より好ましくはK a b a tの番号付けによるアミノ酸の54位に位置する。

40

【0085】

少なくとも1つのグリコシル化部位が、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b部分に存在する場合、組成物中の少なくとも1つの抗体またはその断片もしくは誘導体は、F a b部分においてグリコシル化されている。組成物中の抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも25%、より好ましくは少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最も好ましくは約100%が、F a b部分においてグリコシル化されていることが好ましい。さらに、組成物中の抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも25%、より好ましくは少なくとも40%、少なくとも50%、少な

50

くとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最も好ましくは約100%が、本明細書で記載されるFab部分における特定のグリコシル化部位、好ましくはFab部分における全てのグリコシル化部位においてグリコシル化されていることが好ましい。また、例えば、精製工程後または精製工程中における、例えば、濃縮法によっても、それぞれにグリコシル化の高度な抗体を得ることができる。

【0086】

好ましい実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位の導入または除去が、抗体またはその断片もしくは誘導体の抗原結合および／または抗原特異性を阻害しない。Fab部分に1もしくは複数のグリコシル化部位を導入するかまたはFab部分における1もしくは複数のグリコシル化部位を除去することによって、抗原結合および／または抗原特異性が有意には低減されないことが好ましい。同様にまた、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量の増加または減少も、抗原結合および／または抗原特異性を阻害しないことが好ましく、抗原結合および／または抗原特異性を有意には低減しないことがより好ましい。特に、本発明による方法を実施した後では、循環半減期を延長または短縮した抗体またはその断片もしくは誘導体の、その特異的抗原に対する結合アフィニティーが、その循環半減期を制御する前における抗体またはその断片もしくは誘導体の結合アフィニティーの少なくとも0.1%、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、好ましくは少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%である。

【0087】

しかし、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分における特定のグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量の増加または減少が、抗原結合または抗原特異性に負の影響を及ぼすかまたは負の影響を及ぼす危険性にある場合は、前記グリコシル化部位を抗体から除去することもでき、かつ／または1もしくは複数の他のグリコシル化部位を、Fab部分の、抗原結合および／もしくは抗原特異性に影響を及ぼさないかもしくはこれに及ぼす影響がより低度である位置に導入することもできる。次いで、循環半減期を所望の通りに制御するために、新規に導入されたグリコシル化部位（複数可）に付いている糖のシアル酸含量を増大させることもでき、減少させることもできる。前記新規に導入されたグリコシル化部位（複数可）は、Fab部分の可変領域のフレームワーク領域、または、より好ましくは、重鎖定常領域1および／もしくは軽鎖定常領域など、Fab部分の定常領域に位置させることが好ましい。

【0088】

抗体またはその断片もしくは誘導体

本発明による方法において用いられる抗体は、天然抗体、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、操作抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体を含め、任意の抗体でありうる。それは、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、ヤギ抗体、霊長動物抗体、またはラクダ抗体でありうる。抗体は、ヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であることが好ましい。抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、またはIgA2など、任意のサブクラスを含めた、IgG、IgE、IgA、IgD、およびIgMなど、任意のクラスの抗体でありうる。抗体は、IgG抗体であることが好ましく、IgG1抗体またはIgG2抗体であることがより好ましく、IgG1抗体であることが最も好ましい。

【0089】

例えば、抗体は、Cetuximabなどの抗EGFR抗体、Karomabなどの抗TF抗体、Pankomabなどの抗Muc1抗体、Trastuzumabなどの抗HER2抗体、Rituximabなどの抗CD20抗体、Solanezumabなどの

抗A β 抗体、A l e m t u z u m a bなどの抗C D 5 2抗体、およびこれらのキメラ形またはヒト化形からなる群から選択することができる。

【0090】

好ましい抗E G F R抗体は、W O 9 6 / 4 0 2 1 0（特に、抗体225のヒト化形およびキメラ形について記載する）およびマウス抗体225について記載するU S 4, 9 4 3, 5 3 3において記載されており、かつ／または配列番号1のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号2のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するC D R H 3、配列番号4のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R L 3からなる群から選択されるC D Rのうちの1またはそれより多くを含む。特に、抗体は、

10

（i）配列番号1のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号2のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、

（i i）場合によって、配列番号4のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域と、

（i i i）K a b a tの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸85位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位と、

（i v）場合によって、重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c部分に存在するグリコシル化部位と

20

を含むキメラまたはヒト化抗E G F R抗体でありうる。

【0091】

前記抗体は、C e t u x i m a bおよび／または抗体225と同じ抗原、特に、これと同じエピトープに結合しうるものが好ましい。

【0092】

好ましい抗M u c 1抗体は、参照により本明細書に組み込まれる特許出願であるW O 0 4 / 0 6 5 4 2 3およびE P 0 9 0 0 9 9 4 2. 5において記載されており、かつ／または配列番号7のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号9のアミノ酸配列を有するC D R H 3、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号11のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R L 3からなる群から選択されるC D Rのうちの1またはそれより多くを含む。特に、抗体は、

30

（i）配列番号7のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号9のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、

（i i）場合によって、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号11のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域と、

（i i i）K a b a tの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸54位の、F a b部分に存在するグリコシル化部位と、

40

（i v）場合によって、重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、F c部分に存在するグリコシル化部位と

を含む、キメラまたはヒト化抗T A - M u c 1抗体でありうる。

【0093】

前記抗体は、P a n k o m a bと同じ抗原、特に、これと同じエピトープに結合しうるものが好ましい。特に、キメラ抗体またはヒト化抗T A - M u c 1抗体は、アミノ酸配列P D T R（配列番号13）、またはより好ましくはP D T R P（配列番号14）を含むエピトープに特異的に結合することが可能である。このエピトープへの結合は、グリコシル化依存性であることが好ましく、この場合、特に、糖部分が配列P D T RまたはP D T R Pのそれぞれのトレオニン残基に付いていると、結合が増大する。エピトープを、トレオ

50

ニン残基において、N-アセチルガラクトサミン (Tn)、シアリル α 2-6 N-アセチルガラクトサミン (sTn)、ガラクトース β 1-3 N-アセチルガラクトサミン (TF)、およびガラクトース β 1-3 (シアリル α 2-6) N-アセチルガラクトサミン (sTF) からなる群から選択される糖部分でグリコシル化する、好ましくはTnまたはTFでグリコシル化すると、結合が増大することが好ましい。糖部分は、 α -O-グリコシド結合により、トレオニン残基に結合していることが好ましい。一部の実施形態では、特に、上記で言及した特定の糖部分によりグリコシル化される場合は、結合のグリコシル化依存性が、エピトープが採用する特定の立体構造に起因する。この場合、抗体は、必ずしも糖部分に結合しなくともよく、エピトープのペプチド部分の結合しさえすればよく、この場合、この結合のアフィニティーは、エピトープの立体構造に依存する。エピトープは、ムチンタンパク質であるMuc1の細胞外タンデム反復配列に含まれることが好ましい。特に、本発明による抗体は、腫瘍関連ムチンエピトープ、特に、エピトープTA-Muc1など、腫瘍関連Muc1エピトープに結合することが可能である (Karsten, U. ら (2004年)、Glycobiology、14巻、681~692頁、およびDanielczyk, A. ら (2006年)、Cancer Immunol. Immunother.、55巻、1337~1347頁を参照されたい)。腫瘍関連ムチン1エピトープであるTA-Muc1とは、腫瘍細胞において存在するが、正常細胞においては存在せず、かつ/または腫瘍細胞に存在する場合に限り宿主の循環中の抗体により接近可能であるが、正常細胞に存在する場合は接近可能でない、Muc1のエピトープを指す。

【0094】

好ましい抗CD52抗体は、配列番号15のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号17のアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号20のアミノ酸配列を有するCDRL3からなる群から選択されるCDRのうちの1またはそれより多くを含む。特に、抗体は、

(i) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号17のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、

(ii) 場合によって、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号20のアミノ酸配列を有するCDRL3を含む軽鎖可変領域と、

(iii) Kabatの番号付けによる重鎖可変領域のうちのアミノ酸60位のFab部分に存在するグリコシル化部位と、

(iv) 場合によって、重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位のFc部分に存在するグリコシル化部位とを含む抗CD52抗体でありうる。

【0095】

前記抗体は、Alemtuzumabと同じ抗原、特に、これと同じエピトープに結合しうるものが好ましい。

【0096】

好ましい抗A β 抗体は、配列番号21のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号22のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号23のアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号24のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号25のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号26のアミノ酸配列を有するCDRL3からなる群から選択されるCDRのうちの1またはそれより多くを含む。特に、抗体は、

(i) 配列番号21のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号22のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号23のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、

(ii) 場合によって、配列番号24のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号2

10

20

30

40

50

5のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号26のアミノ酸配列を有するCDRL3を含む軽鎖可変領域と、

(iii) Kabatの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸55位の、Fab部分に存在するグリコシル化部位と、

(iv) 場合によって、重鎖定常領域2のうちのアミノ酸297位の、Fc部分に存在するグリコシル化部位と

を含む抗Aβ抗体でありうる。

【0097】

前記抗体は、Solanezumabと同じ抗原、特に、これと同じエピトープに結合しうることが好ましい。

【0098】

Fab部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位に加え、抗体はまた、Fc部分における1またはそれより多くのグリコシル化部位も含みうる。抗体は、Fc部分の天然のグリコシル化部位を含むことが好ましい。例えば、抗体は、CH2領域内、特に、IgG抗体の場合にはAsn297にグリコシル化部位を含みうる。これらの実施形態では、組成物における少なくとも1つの抗体またはその断片もしくは誘導体が、Fc部分においてグリコシル化されていることが好ましい。組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも25%、より好ましくは少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最も好ましくは約100%が、Fc部分においてグリコシル化されていることが好ましい。

【0099】

抗体の断片または誘導体は、抗体のうちの少なくとも重鎖可変領域を含むことが好ましい。それは、抗体の重鎖定常領域1、および／または抗体の軽鎖可変領域、および／または抗体の軽鎖定常領域もさらに含むことが好ましい。好ましい実施形態では、抗体の断片または誘導体が、抗体のFab部分全体を含む。

【0100】

特に、抗体の断片または誘導体は、

(i) 重鎖および軽鎖の各々のうちの可変領域および第1の定常ドメインからなる一価断片であるFab断片、

(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab)₂断片、

(iii) 重鎖の可変領域および第1の定常ドメインCH1からなるFd断片、

(iv) 抗体の単一のアームの重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなるFv断片、

(v) 単一のポリペプチド鎖からなるFv断片であるscFv断片、

(vi) 共有結合的に連結された2つのFv断片からなる(Fv)₂断片、

(vii) 重鎖可変ドメイン、および

(viii) 重鎖可変領域と軽鎖可変領域との会合が、分子間だけで生じることが可能であり、分子内で生じることが可能でない形で共有結合的に連結された、重鎖可変領域および軽鎖可変領域からなる多重抗体とからなる群から選択される。

【0101】

断片または誘導体は、抗体と同じ抗原、好ましくは抗体と同じエピトープに結合しうることが好ましい。

【0102】

グリコシル化パターン

好ましい実施形態では、その循環半減期が本発明による方法を介して制御され、それが本発明による抗体組成物中に含まれる、抗体またはその断片もしくは誘導体が、この抗体またはその断片もしくは誘導体に特定の所望の特性をもたらす、さらなるグリコシル化特

10

20

30

40

50

徴を有する。

【0103】

抗体またはその断片もしくは誘導体における糖は、複合体型の糖であることが好ましい。特に、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分および／または F c 部分に付いている糖のうちの、好ましくは少なくとも 50 %、より好ましくは少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、および最も好ましくは約 100 %が、図 21 B（図中、黒色の四角は、N-アセチルグルコサミン残基（G l c N A c）を表し、グレーの丸は、マンノース残基（M a n）を表す）に示されるコア構造を有する。前記コア構造を有する糖は、図 21 C（図中、黒色の四角は、N-アセチルグルコサミン残基（G l c N A c）を表し、グレーの丸は、マンノース残基（M a n）を表し、白色の丸は、ガラクトース残基（G a l）を表し、グレーの菱形は、シアル酸残基（S A）を表し、黒色の三角は、フコース残基（F u c）を表し、グレーの四角は、二分枝状の N-アセチルグルコサミン残基（ビス G l c N A c）を表し、この場合、糖の分枝中の G l c N A c、G a l、および S A、ビス G l c N A c、ならびに F u c を糖構造内に存在させるのは任意選択であるに過ぎず、存在させなくともよい）に示される構造を有する二分枝性複合体型糖などの複合体型糖であることがより好ましい。特に、任意選択の残基は、本明細書に記載される量で存在させる。

10

【0104】

特に、抗体組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの少なくとも 50 %が、少なくとも 1つのガラクトース残基を保有する。組成物における前記糖のうちの少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、または少なくとも 80 %は、少なくとも 1つのガラクトース残基を保有することがより好ましい。好ましい実施形態では、抗体組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に付いている糖のうちの少なくとも 70 %が、少なくとも 1つのガラクトース残基を保有する。組成物における前記糖のうちの少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 90 %は、少なくとも 1つのガラクトース残基を保有することがより好ましい。このガラクトース残基は、場合によって、シアル酸残基をさらに保有する、特に、糖鎖のうちの 1またはそれより多くの分枝の末端に位置する、特に、N-アセチルグルコサミン残基に付いている、末端のガラクトース残基であることが好ましい。この点における「末端の」という用語は、糖鎖におけるガラクトース残基の位置、特に、糖鎖の分枝のうちの 1つにおけるその位置だけを指す。この用語は、ガラクトース残基が、糖鎖の非還元末端に最後に残る単糖単位であることを必ずしも意味しない。特に、末端のガラクトース単位は、シアル酸残基をさらに保有しうる。

20

30

【0105】

好ましい実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体が、ヒトグリコシル化パターンまたはヒト様グリコシル化パターンを有する。特に、抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖が、構造 G a l α (1→3) G a l β (1→4) G l c N A c を有する G a l l i l i エピトープを含まないことが好ましい。これらの糖は、構造 G a l α (1→3) G a l を含まないことが好ましい。抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖はまた、N-グリコリルノイラミン酸（N e u G c）残基を含まないことも好ましい。さらに、組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のシアル酸のうちの少なくとも 25 %が、2，6 結合により連結されていることも好ましい。組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のシアル酸のうちの少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、または少なくとも 68 %が、2，6 結合により連結されていることがより好ましい。

40

【0106】

天然のヒトグリコシル化に類似するグリコシル化パターンを用いることにより、抗体またはその断片もしくは誘導体の投与により引き起こされる有害な副作用を軽減する。特に、G a l l i l i エピトープ、N e u G c、または高量の 2，3 結合されたシアル酸などの

50

糖構造は、患者の免疫系による免疫反応を引き起こしうるので、回避すべきである。例えば、ヒト抗マウス抗体（HAMA）反応は、ヒト様グリコシル化パターンを有するキメラ抗体、または好ましくはヒト化抗体を用いることにより回避することができる。特に、Galiliエピトープは、重度の知覚過敏反応を多数引き起こすことが公知である。特に、マウスSP2/0細胞において発現させたキメラ抗EGFR抗体であるCetuximab（Erbix）は、GaliliエピトープおよびNeuGcを保有する糖を含み、したがって、ヒト患者において抗体に対する免疫反応を誘導する。本発明に従う方法により得られる抗体、特に、キメラCetuximab抗体もしくはヒト化Cetuximab抗体、または本発明による方法を介して得られるCetuximabと同じエピトープを有し、本発明による抗体組成物中に含まれる抗体などのEGFR抗体は、これらの不利な糖構造を含まない。

10

【0107】

さらに、本発明による組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも23%、少なくとも25%、少なくとも27%、少なくとも29%、または少なくとも30%が、二分枝状N-アセチルグルコサミン（ビスGlcNAc）残基を保有する。特に、組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、なおまたは少なくとも70%が、ビスGlcNAcを保有する。

20

【0108】

特定の実施形態では、本発明による組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に結合した糖のうちの50%以下、好ましくは40%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、13%以下、または10%以下が、フコース残基を保有する。さらなる実施形態では、本発明による組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に結合した糖のうちの好ましくは少なくとも1%、より好ましくは少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、または少なくとも10%が、フコース残基を保有する。

【0109】

生物学的活性の増強

本発明の好ましい実施形態では、循環半減期を延長した抗体は、生物学的活性も加えて増強されている。この点における抗体の生物学的活性には、例えば、ADCCおよびCDCが含まれる。生物学的活性の増強は、主に、グリコシル化パターンの最適化、特に、抗体のFc部分におけるグリコシル化パターンの最適化により達成される。例えば、IgG型の抗体のADCC活性は、抗体の、そのFc部分によるFcγ受容体、特に、FcγRIIIaへの結合により媒介される。FcγRIIIaは、ナチュラルキラー（NK）細胞およびマクロファージにおいて発現し、抗体により活性化されると、サイトカインおよび細胞傷害性顆粒の放出を誘導し、この結果として、抗体が結合した標的細胞のアポトーシスをもたらす。抗体のFcγ受容体に対する結合アフィニティーは、抗体のFc部分におけるグリコシル化部位に付いている糖による影響を受ける。したがって、抗体のFc部分におけるグリコシル化パターンを最適化すると、結果として、FcγRIIIaへのより強力な結合がもたらされ、このため、ADCC活性の増強がもたらされる。

30

40

【0110】

抗体の治療有効性（それらの循環半減期に加えた）は、多くの場合、抗体が結合した標的細胞に対する細胞傷害性効果、特に、ADCCの誘導に依存する。したがって、抗体のADCC活性を増大させると、その治療価値が高まる。例えば、患者に同量の抗体を投与しても、それらのADCC活性について最適化した抗体を用いる場合は、はるかに大きな治療的利益が達成される。さらに、同じ治療効果を達成するには、はるかに少量のこのような抗体を投与すればよい。本明細書で論じる通り、抗体の循環半減期を延長することによってもまた、治療効果の増強が結果としてもたらされる。したがって、循環半減期の延

50

長および生物学的活性の増大という両方の特徴を組み合わせることにより、治療用抗体の利点が大きくなる。

【0111】

しかし、両方の特性ともに、抗体のグリコシル化パターンを制御することにより最適化することが好ましい。特に、抗体のF a b部分においてシアリル化度を高くすると、それらの循環半減期が延長されるのに対し、抗体のF c部分におけるフコシル化度を低くすると、それらのA D C C活性が増大する。さらに、F c部分におけるシアリル化度を高くすると、A D C C活性が干渉されうる。両方の特徴を1つの抗体組成物中に組み合わせ、これにより、F a b部分におけるグリコシル化パターンを循環半減期の延長について最適化し、F c部分におけるグリコシル化パターンを生物学的活性の増大について最適化した抗体をもたらすことは、本発明の達成である。

10

【0112】

特に、I g G抗体のF c部分に付いている糖中のフコース量の減少、二分枝状のG l c N A c量の増大、および／またはシアル酸量の減少は、抗体のF c γ R I I I aに対するアフィニティーおよび／またはそのA D C C活性を増大させることが判明している。

【0113】

したがって、好ましい実施形態では、本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体が、抗体またはその断片もしくは誘導体のF c部分に付いている糖中のフコース量が少ない。代替的に、またはこのフコース量が少ないことに加えて、抗体またはその断片もしくは誘導体は、F c部分に付いている糖中の二分枝状のG l c N A c量が多い場合もあり、かつ／またはシアル酸量が少ない場合もあることが好ましい。抗体のF c部分におけるこのようなグリコシル化パターンは、結果として、抗体のA D C C活性の増大をもたらす。

20

【0114】

好ましい実施形態では、本発明による組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のF c部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも97%が、フコース残基を保有しない。抗体のF c部分のグリコシル化部位におけるフコース含量を少なくすることは、特に、抗体の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(A D C C)を高めるために重要である。とりわけ、I g G抗体の場合、F cのグリコシル化部位におけるフコース量が多いと、抗体のF c γ受容体、特に、ナチュラルキラー細胞およびマクロファージにより発現され、A D C Cを媒介する、F c γ R I I I aへのアフィニティーが低減される。さらにまた、I g G抗体のF c部分におけるグリコシル化部位に付いている糖中のフコース量が少ないと、ヒトF c γ R I I I aの異なる多形変異体(F c γ R I I I a-158FおよびF c γ R I I I a-158V)に対する抗体の結合アフィニティーの差違も減少する。したがって、F c部分に付いている糖中のフコース量、特に、上記で記載したフコース量が少ないI g G抗体は、F c部分におけるフコース含量が多い同じ抗体を投与した場合には治療効果をもたらさない量の抗体を投与することにより、患者を処置するのに用いることができる。さらに、これらの低フコース抗体を用いると、ホモ接合性F c γ R I I I a-158F患者、ホモ接合性F c γ R I I I a-158V患者、およびヘテロ接合性F c γ R I I I a-158F/V患者など、F c γ R I I I aの異なる多形変異体を有する患者を、同量の抗体で処置し、投与された同量の抗体に対して同様の応答をもたらすことができる。特に、それらのF c部分におけるフコース含量が多い抗体を結合させると、とりわけ、F c γ R I I I a-158Fに対するアフィニティーが低下する。したがって、前記低フコース抗体を用いると、抗体療法の患者対象範囲が広がる。これはまた、本発明による各抗体組成物を用いる例でも裏付けられる。

30

40

【0115】

さらに、本発明による組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体のF c部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも5%、より好ましくは少なくとも7%、少なく

50

とも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、少なくとも18%、少なくとも20%、または少なくとも22%が、ビスGlcNAc残基を保有する。抗体、特に、IgG抗体のFc部分におけるビスGlcNAc量を多くすると、抗体のADCCを結果として増大させることができる。

【0116】

さらに、本発明による組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体のFc部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも97%が、シアル酸残基を保有しない。さらに、本発明による組成物では、抗体またはその断片もしくは誘導体のFc部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、または少なくとも97%が、2つ以上のシアル酸残基を保有しない。抗体のFc部分におけるシアリル化度を高めると、Fc受容体、特にFcγRIIIaへの結合に対して負の影響を及ぼす可能性があり、したがって、抗体のADCCに対して負の影響を及ぼす可能性がある。これらの抗体組成物を生成するのに用いられる細胞および細胞系は、Fab部分におけるシアリル化度が高く、Fc部分におけるシアリル化度が低い抗体をもたらすことが好ましい。適切な細胞系の例は、細胞系GT-5sであり、これに由来する細胞および細胞系、またはこれと相同的な細胞および細胞系である。

【0117】

抗体組成物

第二の態様では、本発明が、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物であって、抗体またはその断片もしくは誘導体が、それらのFab部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位を含むことを特徴とし、組成物において、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に付いている糖のうちの少なくとも65%が、少なくとも1つの末端シアル酸残基を保有し、かつ／あるいは抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に付いている糖のうちの35%未満が、少なくとも2つのフリーのガラクトース単位を保有することを特徴とする抗体組成物を提供する。抗体組成物の好ましい特徴、および、特に、好ましいグリコシル化パターンは、グリコシル化パターンと共に上記で記載されており、下記でも記載される。

【0118】

本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、および最も好ましくは約100%が、同じ抗原、好ましくは同じエピトープを認識し、これに結合し、かつ／またはこれに特異的であることが好ましい。

【0119】

抗体組成物は、本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の循環半減期を制御する方法であって、抗体またはその断片もしくは誘導体のFab部分に存在する1またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量を増大させる方法により得ることが可能であるか、または実際に得られることが好ましい。

【0120】

特に、本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、本発明による循環半減期を制御する方法に関して上記で記載した特徴のうちの1またはそれより多くを有することが好ましい。特に、本発明による循環半減期を制御する方法と共に記載された、抗体またはその断片もしくは誘導体を含む組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体それぞれの特徴、および、特に、グリコシル化パターン、Fabにおけるグリコシル化部位の特徴、ならびに上記で説明したグリコシル化パターンの特徴はまた、本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体にも適用することができる。

【0121】

好ましい実施形態では、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に付いている糖のうちの少なくとも 68 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、または少なくとも 80 %が、少なくとも 1つの末端シアル酸残基を保有する。特に、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1つのグリコシル化部位に付いている糖における糖鎖 1本当たりの平均シアル酸残基量は、少なくとも 0.65、好ましくは少なくとも 0.7、少なくとも 0.75、少なくとも 0.8、少なくとも 0.9、少なくとも 1.0、少なくとも 1.05、または少なくとも 1.1である。さらに、組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に付いている糖のうちの、好ましくは 30 %未満、25 %未満、20 %未満、15 %未満、10 %未満、7 %未満、または 5 %未満が、2つ以上のフリーのガラクトース単位を保有する。特に、組成物における、抗体またはその断片もしくは誘導体の F a b 部分に存在する少なくとも 1つのグリコシル化部位に付いている糖における糖鎖 1本当たりの平均フリーのガラクトース単位量は、1.2 未満、好ましくは 1.1 未満、1.0 未満、0.9 未満、0.85 未満、0.8 未満、0.75 未満、または 0.7 未満である。

10

【0122】

組成物における少なくとも 1つの抗体またはその断片もしくは誘導体は、F a b 部分においてグリコシル化されていることが好ましい。組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも 25 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、または少なくとも 90 %は、F a b 部分においてグリコシル化されていることがより好ましい。さらに、組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの、好ましくは少なくとも 25 %、より好ましくは少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、または最も好ましくは少なくとも 90 %が、本明細書で記載される F a b 部分の特定のグリコシル化部位において、好ましくは F a b 部分に存在する全てのグリコシル化部位においてグリコシル化されている。抗体またはその断片もしくは誘導体は、例えば、精製工程後または精製工程中における各グリコシル化パターンに応じて濃縮することもできる。

20

【0123】

抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、それらの F c 部分において少なくとも 1つのグリコシル化部位をさらに含むことが好ましい。このグリコシル化部位は、糖によりグリコシル化されていることが好ましく、この場合、組成物中の糖であって、フコース残基を保有する糖の量は、50 %未満、より好ましくは 40 %未満、30 %未満、25 %未満、20 %未満、15 %未満、好ましくは 10 %未満、および最も好ましくは 5 %未満であることが好ましい。さらに、組成物では、F c 部分に付いている糖であって、1またはそれより多くのシアル酸残基を保有する糖の量が、50 %未満、より好ましくは 40 %未満、30 %未満、25 %未満、20 %未満、15 %未満、10 %未満、および最も好ましくは 7 %未満、または 5 %未満であることが好ましい。

30

【0124】

組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、以下の表に列挙されるグリコシル化パターンを有することが好ましい。

40

【0125】

【表 9】

実施形態	グリコシル化部位	B	F	S>0	S2	G>0	G2	フリーのG
1	Fab	≥50		≥65		≥70		
2	Fab	≥50				≥70		<35
3	Fab	≥50		≥65		≥70		<35
4	Fab	≥50		≥65	≥25	≥70		
5	Fab	≥50		≥65		≥70	≥70	
6	Fab	≥50		≥65	≥25	≥70	≥70	
7	Fab	≥50		≥70		≥70		
8	Fab	≥50		≥65		≥80		
9	Fab	≥60		≥65		≥70		
10	Fab	≥60		≥70		≥80		
11	Fab	≥50				≥70		<40
12	Fab	≥50		≥65	≥30	≥70		
13	Fab	≥50		≥65		≥80	≥80	
14	Fab	≥60		≥70	≥30	≥80	≥80	
15	Fab	≥60		≥70	≥30	≥80	≥80	<40
16	Fc	≥5	<50	<40				
17	Fc	≥5	<50	<40	<25			
18	Fc	≥5	<50	<40		≥50		
19	Fc	≥5	<50	<40	<25	≥50		
20	Fc	≥12	<50	<40				
21	Fc	≥5	<80	<40				
22	Fc	≥5	<50	<25				
23	Fc	≥12	<80	<25				
24	Fc	≥5	<50	<40	<15			
25	Fc	≥5	<50	<40		≥60		
26	Fc	≥12	<80	<25	<15	≥60		
27	Fc	≥5		<40				
28	Fc	≥5		<40	<25	≥50		
29	Fc	≥12		<25	<15	≥60		

組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体の表示された部分に付いている、以下の特性を有する糖の百分率値を示す：

B:二分枝性 GlcNAc ; F:フコース ; S>0:少なくとも 1 つのシアル酸 ; S2:2 つのシアル酸 ; G>0:少なくとも 1 つのガラクトース ; S2:2 つのガラクトース ; フリーの G:少なくとも 1 つのフリーのガラクトース単位。

【0126】

組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、F a b のグリコシル化パターンについての 1 つの実施形態（実施形態 1 ～ 15）と、F c のグリコシル化パターンについての 1 つの実施形態（実施形態 16 ～ 29）との組合せ、例えば、実施形態 1 と 16 との組合せ、実施形態 6 と 19 との組合せ、実施形態 10 と 23 との組合せ、実施形態 15 と 26 との組合せ、実施形態 1 と 27 との組合せ、実施形態 4 と 28 との組合せ、ならびに実施形態 14 と 29 との組合せを有することが好ましい。

【0127】

好ましい実施形態では、抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体が、G a l l i l i エピトープおよび／または N-グリコシルノイラミン酸（N e u G c）残基を

含む糖を保有しない。

【0128】

本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、適切な細胞系、特に、ヒト細胞系、好ましくは、ヒト血液細胞系、特に、ヒト骨髓細胞系またはヒト骨髓性白血病細胞系など、不死化ヒト細胞系における発現を介して得ることができる。本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、G T-5 s細胞系(D S M A C C 3 0 7 8)、または上記で規定したこれに由来する細胞もしくは細胞系、またはこれと相同な細胞もしくは細胞系、特に、単一クローン選択により、または細胞系の操作により、例えば、遺伝子ノックアウトにより、低フコシル化について選択される細胞系など、フコシル化活性が低いかまたは見られない細胞系における発現を介して得られる。特に、フコシル化活性が低いかまたは見られない細胞系では、フコースの生合成経路、および／またはフコースの輸送系、および／またはフコシル化酵素において1またはそれより多くの欠損が存在しうる。その活性が低いかまたは見られない標的酵素は、F U T 8 遺伝子によりコードされる α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ、G D P-マンノース-4, 6-デヒドラターゼ、G D P-4-ケト-6-デオキシマンノース-3, 5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ、およびG D P-ベーター-L-フコースピロホスホリラーゼからなる群から選択することが好ましい。欠損は、活性が低いかまたは見られないタンパク質の発現を結果としてもたらし場合もあり、遺伝子の発現を低下させるかまたは阻害する場合もある。さらに、低フコース含量はまた、R N A 干渉など、細胞の遺伝子構造を変化させない生物学的方法によっても達成することができる。

【0129】

さらに本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有するC D R H 1、配列番号2のアミノ酸配列を有するC D R H 2、および配列番号3のアミノ酸配列を有するC D R H 3を含む重鎖可変領域と、配列番号4のアミノ酸配列を有するC D R L 1、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R L 2、および配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R L 3を含む軽鎖可変領域とを含むキメラまたはヒト化抗E G F R抗体を含む抗体組成物であって、

(i) 抗体が、K a b a t の番号付けによる重鎖可変領域のうちのアミノ酸85位のF a b 部分に存在するグリコシル化部位を含み、組成物において、F a b 部分に存在する前記グリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%が、少なくとも1つの末端シアル酸残基を保有すること、または

(i i) 抗体が、F a b 部分においてグリコシル化部位を含まないことを特徴とする抗体組成物を提供する。

【0130】

上記で説明した通り、各抗体組成物は、それぞれのグリコシル化パターンを有さない抗体組成物と比較して、半減期の改善を示す。好ましくは、キメラまたはヒト化抗E G F R抗体は、F c 部分に存在するグリコシル化部位を含み、組成物では、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%が、フコース残基を保有しない。さらに、F c 部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%が、シアル酸残基を保有しない。さらに、一実施形態によれば、F c 部分に付いている糖のうちの少なくとも10%が、二分枝状のNアセチルグルコサミン残基を保有し、抗体に付いている糖のうちの少なくとも70%が、少なくとも1つのガラクトース残基(このガラクトース残基は、特に、場合によって、シアル酸残基をさらに保有する糖鎖の1またはそれより多くの分枝の末端に位置する、特に、N-アセチルグルコサミン残基に付いている、末端ガラクトース残基であることが好ましい)を保有し、抗体に付いている糖が、構造G a l α (1 $\rightarrow$ 3) G a l β (1 $\rightarrow$ 4) G l c N A c を有するG a l l i l i エピトープを含まず、抗体に付いている糖が、N-グリコシルノイラミン酸(N e u G c) 残基を含まない。さらに、一実施形態によれば、F a b 部分に付いている

糖のうちの少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、最も好ましくは少なくとも70%が、二分枝状N-アセチルグルコサミン残基を保有する。一実施形態によれば、抗体に付いている糖のうちの少なくとも25%または少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%が、シアル酸を含む。一実施形態によれば、各抗体組成物が、上記で説明した特徴の全てを、好ましい特徴として組み合わせる。抗体は、IgG抗体であることが好ましい。一実施形態によれば、各グリコシル化抗体の機能的な断片または誘導体を含む抗体組成物が提供される。

【0131】

さらに、本発明はまた、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号9のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号11のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号12のアミノ酸配列を有するCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むキメラまたはヒト化抗Muc1抗体を含む抗体組成物であって、抗体が、Kababの番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸54位の、Fab部分に存在するグリコシル化部位を含み、組成物において、Fab部分に存在する前記グリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%が、少なくとも1つの末端シアル酸残基を保有することを特徴とする抗体組成物を提供する。上記で説明した通り、各抗体組成物は、それぞれのグリコシル化パターンを有さない抗体組成物と比較して、半減期の改善を示す。

【0132】

好ましくは、キメラまたはヒト化抗Muc1抗体は、Fc部分に存在するグリコシル化部位を含み、組成物では、Fc部分に付いている糖のうちの少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%が、フコース残基を保有せず、かつ／または、Fc部分に付いている糖のうちの好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%が、シアル酸残基を保有しない。さらに、一実施形態によれば、Fc部分に付いている糖のうちの少なくとも5%が、二分枝状N-アセチルグルコサミン残基を保有し、抗体に付いている糖のうちの少なくとも70%が、少なくとも1つのガラクトース残基（このガラクトース残基は、特に、場合によって、シアル酸残基をさらに保有する糖鎖の1またはそれより多くの分枝の末端に位置する、特に、N-アセチルグルコサミン残基に付いている、末端ガラクトース残基であることが好ましい）を保有し、抗体に付いている糖が、構造Gal α （1 $\rightarrow$ 3）Gal β （1 $\rightarrow$ 4）GlcNAcを有するGaliliエпитープを含まず、抗体に付いている糖が、N-グリコリルノイラミン酸（NeuGc）残基を含まない。一実施形態によれば、各抗体組成物が、上記で説明した特徴の全てを、好ましい特徴として組み合わせる。抗体は、IgG抗体であることが好ましい。一実施形態によれば、各グリコシル化抗体の機能的な断片または誘導体を含む抗体組成物が提供される。

【0133】

さらなる態様では、本発明が、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体であって、抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも1つのCDRのアミノ酸配列が、Fab部分において少なくとも1つのグリコシル化部位を含む基準抗体に由来し、抗体またはその断片もしくは誘導体が、Fab部分においてグリコシル化部位を含まず、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期が、基準抗体より長い、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を提供する。

【0134】

上記で論じた通り、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体のFab部分のグリコシル化部位（複数可）を除去すると、Fab部分にグリコシル化部位を含む基準抗体と比較して、循環半減期の延長を結果としてもたらす。循環半減期の延長は、少なくとも1つの種において見ることができ、霊長動物、好ましくはヒトにおいて見られることが好ましい。本発明による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、基準抗体と同じエピトープに結合することが好ましい。

【0135】

抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域の3つCDR全てのアミノ酸配列は、基準抗体に由来することが好ましい。さらに、抗体またはその断片もしくは誘導体の軽鎖可変領域の3つのCDR全てのアミノ酸配列も、基準抗体に由来することが好ましい。好ましい実施形態では、基準抗体に由来するCDRのアミノ酸配列は、基準抗体の対応するCDRのアミノ酸配列と同一である。

【0136】

好ましい実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域のアミノ酸配列の全体、および／または軽鎖可変領域のアミノ酸配列の全体が、基準抗体に由来する。特定の実施形態では、基準抗体のFab部分におけるグリコシル化部位が、基準抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域に存在し、本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体が、基準抗体に由来する重鎖可変領域または軽鎖可変領域において、少なくとも1つのアミノ酸の変異であって、前記グリコシル化部位を除去する変異を含む。さらなる実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体のアミノ酸配列の全体が、基準抗体に由来するが、この場合、アミノ酸配列の全体は、Fab断片においてグリコシル化部位を含まない。

【0137】

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の抗原結合アフィニティーは、基準抗体の抗原結合アフィニティーと同様であるかまたはこれより大きいことが好ましい。抗原結合アフィニティーは、20%を超えて低下しないか、好ましくは15%を超えて低下しないか、10%を超えて低下しないか、または5%を超えて低下しないことが好ましい。さらに、一実施形態によれば、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期は、基準抗体の循環半減期より少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%長い。上記で論じた通り、循環半減期の延長は、少なくとも1つの種、好ましくは霊長動物、最も好ましくはヒトにおいて観察される。

【0138】

基準抗体が、抗EGFR抗体、特に、上記で記載した抗EGFR抗体、例えば、CetuximabまたはCetuximabと同じエピトープに結合する抗体、抗MUC1抗体、特に、上記で記載した抗MUC1抗体、例えば、PankomabまたはPankomabと同じエピトープに結合する抗体、SolanezumabまたはSolanezumabと同じエピトープに結合する抗体などの抗Aβ抗体、およびAlemtuzumabまたはAlemtuzumabと同じエピトープに結合する抗体などの抗CD52抗体からなる群から選択されることが好ましい。

【0139】

好ましい抗EGFR抗体、および好ましい抗MUC1抗体、ならびにこれらのCDR配列は、上記に記載されている。ここでもまた当てはまる上記の開示が参照される。これらの抗体は、基準抗体として用いられることが好ましい。上記で論じた通り、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、それぞれの抗体のうちの少なくとも1つのCDR、好ましくは全てのCDRを含むことが好ましい。

【0140】

好ましい抗CD52抗体はまた、上記で説明されており、配列番号15のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号17のアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号19のアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号20のアミノ酸配列を有するCDRL3からなる群から選択されるCDRのうちの1またはそれより多くを含む。特に、抗体は、

(i) 配列番号15のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDRH2、および配列番号17のアミノ酸配列を有するCDRH3を含む重鎖可変領域と、

10

20

30

40

50

(i i) 場合によって、配列番号 18 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する C D R L 2、および配列番号 20 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) K a b a t の番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸 60 位の、F a b 部分に存在するグリコシル化部位と、

(i v) 場合によって、重鎖定常領域 2 のうちのアミノ酸 297 位の、F c 部分に存在するグリコシル化部位と

を含む抗 C D 5 2 抗体でありうる。

【 0 1 4 1 】

前記抗体は、A l e m t u z u m a b と同じ抗原、特に、これと同じエピトープに結合
しうることが好ましい。

10

【 0 1 4 2 】

好ましい抗 A β 抗体はまた、上記で説明されており、配列番号 21 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 22 のアミノ酸配列を有する C D R H 2、および配列番号 23 のアミノ酸配列を有する C D R H 3、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する C D R L 2、および配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される C D R のうちの 1 またはそれより多くを含む。特に、抗体は、

(i) 配列番号 21 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 22 のアミノ酸配列を有する C D R H 2、および配列番号 23 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含む重鎖
可変領域と、

20

(i i) 場合によって、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する C D R L 2、および配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 を含む軽鎖可変領域と、

(i i i) K a b a t の番号付けによる、重鎖可変領域のうちのアミノ酸 55 位の、F a b 部分に存在するグリコシル化部位と、

(i v) 場合によって、重鎖定常領域 2 のうちのアミノ酸 297 位の、F c 部分に存在するグリコシル化部位と

を含む抗 A β 抗体でありうる。

【 0 1 4 3 】

30

前記抗体は、S o l a n e z u m a b と同じ抗原、特に、これと同じエピトープに結合しうることが好ましい。

【 0 1 4 4 】

例示的な基準抗体はまた、以下の表にも列挙される。

【 0 1 4 5 】

【表 10】

抗体	商用名	抗原	発現細胞系	治療用途
Cetuximab	Erbix	EGFR	SP2/0 マウス骨髄腫細胞系	がんの処置、例えば、転移性結腸直腸がん、および頭頸部の扁平上皮癌
Pankomab	—	MUC1	NM-F9 (DSM ACC2606)	がんの処置、例えば、卵巣がん、乳がん、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、消化器がん、腎臓がん、および尿路上皮がん
Solanezumab	—	アミロイドベータ (A β)	SP2/0 マウス骨髄腫細胞系	アルツハイマー病の処置
Alemtuzumab	Campath	CD52	CHO 細胞系	慢性リンパ球性白血病 (CLL)、皮膚性 T 細胞リンパ腫 (CTCL)、T 細胞リンパ腫、および多発性硬化症の処置

10

20

【0146】

F a b のグリコシル化部位に関して上記で記載されている詳細については、上記の開示が参照される。基準抗体の F a b 部分におけるグリコシル化部位は、特に、アミノ酸配列 A s n X a a S e r / T h r を有し、この場合、X a a が、好ましくは P r o 以外の任意のアミノ酸である、N-グリコシル化部位であることが好ましい。

【0147】

好ましい実施形態では、基準抗体の F a b 部分におけるグリコシル化部位は、重鎖可変領域または軽鎖可変領域であり、本発明のこの態様による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、重鎖可変領域または軽鎖可変領域におけるグリコシル化部位が除去されるように、少なくとも 1 つのアミノ酸において、基準抗体の対応するアミノ酸配列とは異なる。

30

【0148】

基準抗体におけるグリコシル化部位は、当技術分野において公知である任意の方法により除去することができ、特に、アミノ酸配列を変化させることにより除去することができる。これもまた上記で記載されている任意選択肢については、上記の開示が参照される。基準抗体のアミノ酸配列において、1 またはそれより多くのアミノ酸を付加すること、置換すること、および／または欠失させることにより、グリコシル化部位を除去することが好ましい。特に、糖鎖のアクセプターとして機能するグリコシル化部位のアミノ酸を、糖鎖のアクセプターとしては機能することが可能でない別のアミノ酸により欠失させるかもしくは置換し、かつ／または抗体のグリコシル化の一因となる酵素、特に、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの認識配列を、この酵素が、アミノ酸配列を認識することができず、このため、糖鎖を抗体のポリペプチド鎖へと移送することができなくなるように変化させる。特に、N-グリコシル化部位を除去するには、グリコシル化部位 A s n X a a S e r / T h r であって、X a a が、好ましくは P r o 以外の任意のアミノ酸残基である、グリコシル化部位のアミノ酸配列を、(i) A s n を欠失させるか、もしくは他の任意のアミノ酸に置換し、(i i) S e r または T h r を欠失させるか、もしくは S e r および T h r 以外の任意のアミノ酸で置換し、(i i i) X a a を欠失させるか、もしくは P r o で置換し、かつ／または (i v) A s n と S e r / T h r との間にさらなるアミノ酸を導入するように変化させる。

40

50

【0149】

さらに、本発明は、上記で記載した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物であって、対応する基準抗体と比較して、F a b 部分にグリコシル化部位を含まない抗体組成物を提供する。抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の詳細については上記の開示が参照される。この態様による抗体組成物は、上記で記載した抗体組成物に関して本明細書で開示される特徴のうちのいずれかを有しうる。特に、組成物における抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、上記で規定および記載した F c 部分においてグリコシル化パターンを有しうる。

【0150】

本発明はさらに、循環半減期を延長した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を生成する方法であって、

(a) F a b 部分においてグリコシル化部位を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体（基準抗体）をコードする核酸を供給するステップと、

(b) コードされた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の F a b 部分におけるグリコシル化部位が除去されるように、変異を核酸へと導入するステップとを含む方法を提供する。

【0151】

これにより、元の抗体（本明細書ではまた、基準抗体とも称する）と同じエピトープに結合するが、循環半減期を延長した、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を得られる。上記で論じた通り、循環半減期の延長は、少なくとも1つの種、好ましくは霊長動物、最も好ましくはヒトにおいて観察されることが好ましい。適切な基準抗体および好ましい基準抗体に関して上記で記載されている詳細については、上記の開示が参照される。得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の抗原結合アフィニティーは、基準抗体の抗原結合アフィニティーと同様であるかまたはこれより大きいことが好ましい。抗原結合アフィニティーは、20%を超えて低下しないか、好ましくは15%を超えて低下しないか、10%を超えて低下しないか、または5%を超えて低下しないことが好ましい。さらに、一実施形態によれば、得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期は、基準抗体の循環半減期より少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%長い。上記で論じた通り、循環半減期の延長は、少なくとも1つの種、好ましくは霊長動物、最も好ましくはヒトにおいて観察される。F a b 部分のグリコシル化部位を除去するのに適する、上記で記載されている方法については、それぞれの開示が参照される。

【0152】

本発明はまた、循環半減期を延長した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を生成する方法であって、

(a) F a b 部分においてグリコシル化部位を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体（基準抗体）をコードする核酸を供給するステップと、

(b) コードされた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の F a b 部分におけるグリコシル化部位が除去されるように、変異を核酸へと導入するステップと、

(c) ステップ (b) において得られた核酸を宿主細胞において発現させて、F a b 部分においてグリコシル化部位を含まず、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期が、F a b 部分においてグリコシル化部位を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体より長い、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をもたらすステップと

を含む方法を提供する。

【0153】

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、例えば、宿主細胞を含む培養培地から得ることができる。抗体を発現させるのに適する宿主細胞は、先行技術において公知であり、上記でもまた記載されている。抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、精製

されることが好ましい。基準抗体、および F a b 断片においてグリコシル化部位を含まない、得られた変異抗体に関して上記で記載されている詳細については、上記の開示が参照される。

【0154】

さらに、本発明は、循環半減期を延長した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を生成する方法により得られる核酸、および循環半減期を延長した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を生成する方法により得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体も提供する。

【0155】

さらなる態様では、本発明が、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体であって、抗体またはその断片もしくは誘導体のうちの少なくとも1つのCDRのアミノ酸配列が基準抗体に由来し、抗体またはその断片もしくは誘導体が、F a b 部分における少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位であって、基準抗体には存在しないグリコシル化部位を含む、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を提供する。特定の実施形態では、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期が、基準抗体より短い。これらの実施形態では、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体のF a b 部分におけるシアリル化度が低く、かつ／またはフリーのガラクトース単位の存在度が高いこと、特に、循環半減期を短縮した抗体またはその断片もしくは誘導体、すなわち、本発明による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を制御するための方法のステップ(b1)または(b3)の後に得られる抗体またはその断片もしくは誘導体に関して、F a b 部分に存在する少なくとも1つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量および／またはフリーのガラクトース単位量が上記の通りであることが好ましい。ここでもまた当てはまる上記の開示が参照される。

【0156】

上記で論じた通り、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体のF a b 部分にグリコシル化部位(複数可)を付加すると、F a b 部分にそれぞれのグリコシル化部位を含まない基準抗体と比較して、循環半減期の短縮を結果としてもたすことができる。循環半減期の短縮は、少なくとも1つの種において見ることができ、霊長動物、好ましくはヒトにおいて見られることが好ましい。本発明による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、基準抗体と同じエピトープに結合することが好ましい。

【0157】

基準抗体は、F a b 部分において、グリコシル化部位を含まないことが好ましい。

【0158】

抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域の3つCDR全てのアミノ酸配列は、基準抗体に由来することが好ましい。さらに、抗体またはその断片もしくは誘導体の軽鎖可変領域の3つのCDR全てのアミノ酸配列も、基準抗体に由来することが好ましい。好ましい実施形態では、基準抗体に由来するCDRのアミノ酸配列は、基準抗体の対応するCDRのアミノ酸配列と同一である。

【0159】

好ましい実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体の重鎖可変領域のアミノ酸配列の全体、および／または軽鎖可変領域のアミノ酸配列の全体が、基準抗体に由来する。特定の実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体のF a b 部分におけるグリコシル化部位が、基準抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域に存在し、本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体が、基準抗体に由来する重鎖可変領域または軽鎖可変領域において、少なくとも1つのアミノ酸の変異であって、前記グリコシル化部位(複数可)を導入する変異を含む。さらなる実施形態では、抗体またはその断片もしくは誘導体のアミノ酸配列の全体が、基準抗体に由来するが、この場合、アミノ酸配列の全体は、F a b 断片において少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位を含む。

【0160】

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の抗原結合アフィニティーは、基準抗体の

抗原結合アフィニティーと同様であるかまたはこれより大きいことが好ましい。抗原結合アフィニティーは、20%を超えて低下しないか、好ましくは15%を超えて低下しないか、10%を超えて低下しないか、または5%を超えて低下しないことが好ましい。さらに、一実施形態によれば、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期は、基準抗体の循環半減期より少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%短い。上記で論じた通り、循環半減期の短縮は、少なくとも1つの種、好ましくは霊長動物、最も好ましくはヒトにおいて観察される。

【0161】

F a bのグリコシル化部位に関して上記で記載されている詳細については、上記の開示が参照される。抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体のF a b部分における1またはそれより多くのさらなるグリコシル化部位は、特に、アミノ酸配列A s n X a a S e r / T h rを有し、この場合、X a aが、好ましくはP r o以外の任意のアミノ酸である、N-グリコシル化部位であることが好ましい。

【0162】

好ましい実施形態では、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体のF a b部分におけるさらなるグリコシル化部位（複数可）のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てが、重鎖可変領域または軽鎖可変領域、好ましくは重鎖可変領域に存在し、本発明のこの態様による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、重鎖可変領域または軽鎖可変領域に少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位が導入されるように、少なくとも1つのアミノ酸において、基準抗体の対応するアミノ酸配列とは異なる。さらなる実施形態では、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体のF a b部分におけるさらなるグリコシル化部位のうちの少なくとも1つ、好ましくは全てが、重鎖定常領域または軽鎖定常領域、好ましくは重鎖定常領域に存在し、本発明のこの態様による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の重鎖定常領域または軽鎖定常領域のアミノ酸配列が、重鎖定常領域または軽鎖定常領域に少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位が導入されるように、少なくとも1つのアミノ酸において、基準抗体の対応するアミノ酸配列とは異なる。

【0163】

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体におけるグリコシル化部位は、当技術分野において公知である任意の方法により導入することができ、特に、アミノ酸配列を変化させることにより導入することができる。これもまた上記で記載されている任意選択肢については、上記の開示が参照される。基準抗体のアミノ酸配列において、1またはそれより多くのアミノ酸を付加すること、置換すること、および／または欠失させることにより、グリコシル化部位を導入することが好ましい。特に、アミノ酸を、糖鎖のアクセプターとして機能するアミノ酸を含み、かつ／または抗体のグリコシル化の一因となる酵素、特に、オリゴサッカリルトランスフェラーゼの認識配列を含む、機能的なグリコシル部位を形成するように変化させる。特に、N-グリコシル化部位を導入するには、基準抗体のアミノ酸配列を、アミノ酸の配列モチーフA s n X a a S e r / T h rであって、X a aが、好ましくはP r o以外の任意のアミノ酸残基であるモチーフを有するグリコシル化部位が、本発明による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体に存在するように変化させる。

【0164】

さらに、本発明は、上記で記載した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物であって、対応する基準抗体と比較して、F a b部分に少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位を含む抗体組成物を提供する。抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の詳細については、上記の開示が参照される。この態様による抗体組成物は、上記で記載した抗体組成物に関して本明細書で開示される特徴のうちのいずれかを有しうる。特に、組成物における抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、上記で規定および記載したF c部分および／またはF a b部分においてグリコシル化パターンを有しうる

。

【0165】

特定の実施形態では、抗体組成物における抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期が、基準抗体より短い。これらの実施形態では、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の F a b 部分におけるシアリル化度が低く、かつ／またはフリーのガラクトース単位の存在度が高く、特に、循環半減期を短縮した抗体またはその断片もしくは誘導体、すなわち、本発明による抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期を制御する方法のステップ (b 1) または (b 3) の後に得られる抗体またはその断片もしくは誘導体に関して上記で記載した、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖中のシアル酸量および／またはフリーのガラクトース単位量を有する。ここでもまた当てはまる上記の開示が参照される。特に、組成物では、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 50 % 未満が、少なくとも 1 つのシアル酸残基を含む。組成物では、F a b 部分に存在する 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの 40 % 未満、30 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、7 % 未満、5 % 未満、3 % 未満、2 % 未満、1 % 未満、または約 0 % が、1 またはそれより多くのシアル酸残基を含むことが好ましい。さらに、組成物では、F a b 部分に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 50 % が、少なくとも 1 つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも 2 つのフリーのガラクトース単位を含むことが好ましい。組成物では、F a b 部分における 1 またはそれより多くのグリコシル化部位に付いている糖のうちの少なくとも 60 %、より好ましくは少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、または最も好ましくは少なくとも 98 % が、少なくとも 1 つのフリーのガラクトース単位、好ましくは少なくとも 2 つのフリーのガラクトース単位を含むことが好ましい。

【0166】

本発明は、循環半減期を短縮した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を生成する方法であって、

(a) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体 (基準抗体) をコードする核酸を供給するステップと、

(b) コードされた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の F a b 部分に少なくとも 1 つのさらなるグリコシル化部位が導入されるように、変異を核酸へと導入するステップとを含む方法をさらに提供する。

【0167】

これにより、元の抗体 (本明細書ではまた、基準抗体とも称する) と同じエピトープに結合するが、循環半減期を短縮した、抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を得られる。上記で論じた通り、循環半減期の短縮は、少なくとも 1 つの種、好ましくは霊長動物、最も好ましくはヒトにおいて観察されることが好ましい。適切な基準抗体および好ましい基準抗体、ならびに抗体またはその断片もしくは誘導体の適切なグリコシル化特徴に関して上記で記載されている詳細については、上記の開示が参照される。得られた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の抗原結合アフィニティーは、基準抗体の抗原結合アフィニティーと同様であるかまたはこれより大きいことが好ましい。抗原結合アフィニティーは、20 % を超えて低下しないか、好ましくは 15 % を超えて低下しないか、10 % を超えて低下しないか、または 5 % を超えて低下しないことが好ましい。さらに、一実施形態によれば、得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の循環半減期は、基準抗体の循環半減期より少なくとも 5 %、好ましくは少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 50 % 短い。上記で論じた通り、循環半減期の短縮は、少なくとも 1 つの種、好ましくは霊長動物、最も好ましくはヒトにおいて観察される。F a b 部分にグリコシル化部位を導入するのに適する、上記で記載されている方法については、それぞれの開

示が参照される。

【0168】

本発明はまた、循環半減期を短縮した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を生成する方法であって、

(a) 抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体（基準抗体）をコードする核酸を供給するステップと、

(b) コードされた抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体の F a b 部分に少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位が導入されるように、変異を核酸へと導入するステップと、

(c) ステップ (b) において得られる核酸を宿主細胞において発現させて、F a b 部分において少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位を有し、F a b 部分において前記少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位を有さない抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体より循環半減期が短い抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をもたらすステップと

を含む方法も提供する。

【0169】

抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、例えば、宿主細胞を含む培養培地から得ることができる。抗体を発現させるのに適する宿主細胞は、先行技術において公知であり、上記でもまた記載されている。具体的な好ましい宿主細胞は、シアリル化活性が低いかまたはこれが見られない。抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体は、精製されることが好ましい。基準抗体、および F a b 部分において少なくとも1つのさらなるグリコシル化部位を含む、得られた変異抗体に関して上記で記載されている詳細については、上記の開示が参照される。

【0170】

さらに、本発明は、循環半減期を短縮した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体をコードする核酸を生成する方法により得られる核酸、および循環半減期を短縮した抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を生成する方法により得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体も提供する。

【0171】

抗体および抗体組成物の医療における使用

上記で記載された抗体および抗体組成物、ならびに、特に、上記で記載された抗 E G F R 抗体組成物および抗 M u c 1 抗体組成物は、グリコシル化パターンが最適化されており、これにより、半減期が延長され、A D C C 活性が増大し、ヒト免疫系との適合性が増大しているので、特に有利である。特に、キメラまたはヒト化抗 E G F R 抗体を含む、本発明による抗体組成物における抗 E G F R 抗体は、マウス S P 2 / 0 細胞において発現させた抗 E G F R 抗体である C e t u x i m a b (E r b i t u x) より循環半減期が長く、A D C C 活性が大きい。さらに、特に、G a l l i l i 構造が存在しないため、有害な副作用が軽減されている。このように有利な特徴を組み合わせることにより、有効な処置に必要な抗体用量を低減することがさらに可能となり、これによりまた、有害な副作用の危険性を軽減することも可能となる。さらに、グリコシル化パターンを最適化することにより患者スペクトルが拡張され、これにより、F / F アロタイプおよび F / V アロタイプの患者を含め、全ての F c γ I I I 受容体型の患者の処置が可能となる。したがって、本発明は、治療プロファイルが改善された抗体組成物、および、特に、治療プロファイルが改善された抗 E G F R 抗体組成物を提供する。

【0172】

本発明による抗体組成物は、医療、特に、疾患、特に、がんの処置、予防、診断、予後診断、および／またはモニタリングにおいて用いることができる。したがって、抗体組成物は、医薬組成物であることが好ましい。がんは、任意のがん、特に、上記で記載されたがんでありうる。

【0173】

好ましい実施形態では、抗体組成物が、本明細書で記載される抗EGFR抗体を含み、がん、特に、EGFRを発現するがんの処置、予防、診断、予後診断、および／またはモニタリングにおいて用いられる。この実施形態では、がんが、結腸直腸がん、転移性結腸直腸がん、頭頸部がん、頭頸部の扁平上皮癌、非小細胞肺癌、腎細胞がん、乳癌、およびトリプルネガティブ乳癌からなる群から選択されることが好ましい。抗EGFR抗体を含む抗体組成物は、別の薬剤、特に本明細書で記載される化学療法剤、例えば、イリノテカンと共に、かつ／または放射線療法と組み合わせて用いることができる。さらに、抗体組成物は、イリノテカン療法、白金ベースの療法、または放射線療法など、先行の抗がん療法の後で用いることもできる。

【0174】

10

さらに好ましい実施形態では、抗体組成物が、本明細書で記載される抗MUC1抗体を含み、がん、特に、MUC1、特に、腫瘍抗原であるTA-MUC1を発現するがんの処置、予防、診断、予後診断、および／またはモニタリングにおいて用いられる。この実施形態では、がんが、卵巣がん、乳がん、肺がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、消化器がん、腎臓がん、および尿路上皮がんからなる群から選択されることが好ましい。抗MUC1抗体を含む抗体組成物は、別の薬剤、特に本明細書で記載される化学療法剤と共に、かつ／または放射線療法と組み合わせて用いることができる。さらに、抗体組成物は、化学療法または放射線療法など、先行の抗がん療法の後で用いることもできる。

【0175】

本発明による抗体組成物、特に、組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体のFc部分に結合した糖のうちの少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも95%がフコース残基を含まない抗体組成物は、FcγRIIIa-158Fをコードする少なくとも1つの対立遺伝子を有する患者におけるがんを処置するのに用いることができる。Fcのグリコシル化部位におけるフコース含量が少ないために、特に、FcγRIIIa-158Fをコードする少なくとも1つの対立遺伝子を有する患者における抗体のADCC活性が増大し、とりわけ、FcγRIIIa-158V遺伝子についてホモ接合性である患者における抗体のADCC活性と同様となる。この有利な特徴を、本明細書で記載される通り、Fab部分におけるシアル酸量を増大させることにより、またはFab部分における1つのグリコシル化部位、または好ましくは全てのグリコシル化部位を除去することにより達成される半減期の改善と組み合わせると、臨床プロファイルが改善された抗体がもたらされる。

20

30

【0176】

例えば、がん患者の処置には、腫瘍細胞の縮小、悪性細胞の根絶、転移の防止、播種性がん、特に、播種性腫瘍細胞もしくは転移性がん、特に、循環中の播種性細胞またはアポトーシス回避もしくは浸潤下にある播種性細胞が、退縮、減少、部分死滅、もしくは完全死滅した患者における再発の防止、生存の延長、ならびに／あるいは腫瘍およびがんそれぞれの進行までの時間の延長が含まれる可能性があり、かつ／またはがんの処置によりこれらが結果としてもたらされうる。がんの処置、診断、または予防において使用される、本発明による抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、フリーの抗体または断片もしくは誘導体の形態の場合もあり、さらなる物質、例えば、放射性核種もしくは細胞傷害性薬剤など、治療的に活性な薬剤、または放射性核種もしくは蛍光マーカーなどのマーカーに連結することもできる。さらに、抗体組成物は、化学療法剤など、1またはそれより多くの治療的に活性なさらなる薬剤も含みうる。さらなる薬剤は、細胞傷害性薬剤または放射性核種、特に、シスプラチンなどのアルキル化剤、抗代謝剤、植物アルカロイドおよびテルペノイド、ビンカアルカロイド、ポドフィロトキシン、タキソールなどのタキサン、イリノテカンおよびトポテカンなどのトポイソメラーゼ阻害剤、またはドキシソルビシンなどの抗新生物剤であることが好ましい。疾患の診断、予後診断、および／またはモニタリングに用いる場合は、本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体を、検出可能なシグナルをもたらしことが可能な標識化剤に連結することが好ましい。特に、前記標識化剤は、放射性核種、フルオロフォア、または酵素でありうる。

40

50

【0177】

A D C C 活性を増大させた抗 E G F R 抗体を含む、本発明による抗体組成物に関しては、前記臨床プロファイルの改善が、抗体組成物により処置されうる患者群の拡大もまた包含する。抗 E G F R 抗体、特に、W O 9 6 / 4 0 2 1 0 または U S 4 , 9 4 3 , 5 3 3 において開示される抗 E G F R 抗体を用いるがん患者の一般的な処置は、この抗体が、受容体のリガンド結合部位に結合し、これを遮断することにより、E G F R の細胞内シグナル伝達を阻害する能力に基づく。E G F R による下流のシグナル伝達経路は、結果として細胞増殖をもたらすので、E G F R によるシグナル伝達を遮断すると、細胞増殖が抑制され、このため、腫瘍成長も抑制される。しかし、この作用方式は、前記シグナル伝達経路が E G F R の活性化状態に関わりなく構成的に活性化される腫瘍細胞については作用しない。これは、例えば、シグナル伝達経路の 1 またはそれより多くのメンバーが構成的に活性となる変異、特に、構成的に活性となる K - R a s 変異体の場合に生じうる。さらに、この作用方式はまた、E G F R シグナル伝達経路には依存せずに増殖する腫瘍細胞に対しても作用しない。

10

【0178】

一般的に用いられる抗 E G F R 抗体とは対照的に、循環半減期を改善し、かつ／または A D C C 活性を増大させた抗 E G F R 抗体を含む、本発明による抗体組成物は、E G F R を発現する任意の腫瘍細胞、特に、E G F R の発現が正常組織と比較して増大する腫瘍細胞など、E G F R の発現率が高い腫瘍細胞を死滅させることが可能である。したがって、本発明による前記抗体組成物は、標的腫瘍細胞の増殖を阻害するだけでなく、標的腫瘍細胞を死滅させ、抗 E G F R 抗体が、E G F R シグナル伝達経路の活性化状態に関わりなく、腫瘍細胞に対して有効であるという利点を有する。特に、これらの抗 E G F R 抗体の治療活性は、E G F R シグナル伝達経路の下流における要素、とりわけ、構成的に活性な K - R a s 変異体の活性に対する非依存性がより大きい。したがって、上記で記載した、A D C C 活性を増大させた抗 E G F R 抗体を含む、本発明による抗体組成物を用いると、処置可能な患者群が、E G F R に対するリガンドの結合を遮断することによっては処置することができない腫瘍またはがん細胞を有する患者へと拡張される。特に、これには、構成的に活性な K - R a s 変異体、構成的に活性な P I 3 キナーゼ変異体、または R a f キナーゼの過剰発現など、E G F R シグナル伝達経路における活性化変異または過剰発現を含む腫瘍またはがん細胞が含まれる。各 K - R a s 変異体の例は、K - R a s G 1 2 V 、 K - R a s G 1 2 D 、 K - R a s G 1 2 C 、 K - R a s G 1 2 S 、 K - R a s G 1 2 A 、 および K - R a s G 1 2 R など、アミノ酸番号 1 2 に変異を有する K - R a s 、 K - R a s G 1 3 D および K - R a s G 1 3 R など、アミノ酸番号 1 3 に変異を有する K - R a s 、 ならびに K - R a s Q 6 1 H 、 K - R a s Q 6 1 K 、 および K - R a s Q 6 1 L など、アミノ酸番号 6 1 に変異を有する K - R a s である。各 P I 3 キナーゼ変異体には、特に、クラス I の P I 3 キナーゼ触媒サブユニット p 1 1 0 α において活性化変異を有する P I 3 キナーゼが含まれる。さらにまた、腫瘍細胞が E G F R を発現する限りにおいて、腫瘍が E G F R シグナル伝達経路の異常により引き起こされるわけではない患者も、この抗体組成物により処置することができる。抗 E G F R 抗体を含む、本発明による抗体組成物は、結腸直腸がんまたは頭頸部がん、特に転移性結腸直腸がんまたは転移性頭頸部がんの処置において用いることが好ましい。抗 E G F R 抗体は、上記で説明した抗 E G F R 抗体であることが好ましい。

20

30

40

【0179】

医薬組成物は、所望の処方物に応じて、動物またはヒトへの投与のための医薬組成物を調合するのに一般的に用いられる媒体として規定される、薬学的に許容可能な非毒性の希釈剤による担体を包含しうる。希釈剤は、混合物の生物学的活性に影響を及ぼさないように選択される。このような希釈剤の例は、蒸留水、緩衝処理水、生理食塩液、P B S 、 リンゲル液、デキストロース液、およびハックス液である。加えて、医薬組成物または処方物は、他の担体、追加投与剤、または非毒性で治療剤以外である、非免疫原性の安定化剤、賦形剤なども包含しうる。組成物はまた、p H 調整剤および緩衝剤、毒性調整剤、保湿

50

剤、および洗浄剤など、生理学的条件を近似するためのさらなる物質も包含しうる。

【0180】

組成物はまた、例えば、抗酸化剤など、各種の安定化剤のうちのいずれかも包含しうる。医薬組成物がポリペプチドを包含する場合、ポリペプチドは、ポリペプチドのインビボにおける安定性を増強するか、または他の形でその薬理学的特性を増強する（例えば、ポリペプチドの半減期を延長し、その毒性を軽減し、可溶性または取込みを増強する）多様な周知の化合物と複合体化させることができる。このような修飾剤または複合体化剤の例には、硫酸、グルコン酸、クエン酸、およびリン酸が含まれる。組成物のポリペプチドはまた、それらのインビボにおける属性を増強する分子と複合体化させることもできる。このような分子には、例えば、糖、ポリアミン、アミノ酸、他のペプチド、イオン（例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、マンガン）、および脂質が含まれる。

10

【0181】

各種の投与に適する処方物に関するさらなる指針は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mace Publishing Company、Philadelphia、Pa.、17版（1985年）において見出すことができる。薬物送達のための方法についての簡潔な総説については、Langer、Science、249巻：1527～1533頁（1990年）を参照されたい。

【0182】

本明細書で記載される医薬組成物は、各種の異なる方法で投与することができる。例には、薬学的に許容される担体を含有する組成物を、経口法、鼻腔内法、直腸内法、局所法、腹腔内法、静脈内法、筋肉内法、皮下（subcutaneous）法、皮下（subdermal）法、経皮法、髄腔内法、および頭蓋内法を介して投与する方法が含まれる。

20

【0183】

抗体組成物を生成する方法

さらなる態様では、本発明が、所望の循環半減期を有する抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を含む抗体組成物を生成する方法であって、宿主細胞において抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を発現させるステップを含み、本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を制御する方法を、前記方法のステップ（a1）、ステップ（a3）、ステップ（b1）、もしくはステップ（b3）を用いて実施し、かつ／または宿主細胞が、ステップ（a2）もしくは（b2）を用いて本発明による抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を制御する方法により得られる抗体またはその機能的な断片もしくは誘導体を発現する方法を提供する。

30

【0184】

宿主細胞を培養培地中で培養し、前記培養培地中で抗体組成物を蓄積し、抗体組成物を細胞培養培地から回収することが好ましい。

【0185】

抗体組成物における抗体またはその断片もしくは誘導体は、本明細書で記載される特徴のうちの任意の1またはそれより多くを有しうる。さらに、抗体またはその断片もしくは誘導体は、抗体またはその断片もしくは誘導体の半減期を制御するのに所望され、かつ／または必要なグリコシル化特徴をもたらしうることが可能な細胞系において発現させることが好ましい。特に、本明細書で開示される細胞および細胞系は、抗体またはその断片もしくは誘導体を発現させるのに用いることができる。ヒト細胞またはヒト細胞系、特に、ヒト血液細胞系、好ましくは、ヒト骨髓細胞系またはヒト骨髓性白血病細胞系など、不死化ヒト細胞系を用いることが好ましい。

40

【0186】

循環半減期を延長した抗体を含む抗体組成物を生成するには、抗体を、シアリル化活性が高い細胞系において発現させることが好ましい。このような細胞系の例は、好ましくは上記で規定した通り、ヒト細胞系GT-5s、またはこれに由来する細胞系もしくはこれ

50

と相同な細胞系である。循環半減期を延長し、A D C C 活性を増大させた抗体を含む抗体組成物は、抗体を、シアリル化活性が高く、フコシル化活性が低い細胞または細胞系において発現させることにより得ることができる。例えば、上記で説明した細胞系など、フコシル化活性を低下させた G T - 5 s 細胞に由来する細胞系を用いることができる。

【0187】

本明細書で示される見出し文は、本明細書を全体として参照することによりもたらされる、本発明の多様な態様または実施形態を限定するものではない。

【0188】

特定のグリコシル化特性について本明細書で示される百分率値は、特に、組成物中の全ての糖のうちで、表示される百分率が、記載される特性を有することを意味する。百分率値が、糖のうちの特定の群、例えば、組成物中の抗体の F a b 部分におけるグリコシル化部位に付いている糖だけを指す場合、示される百分率が記載される特性を有する組成物中の抗体の F a b 部分におけるグリコシル化部位に付いている全ての糖を意味する。このようなグリコシル化特性は、例えば、組成物中の抗体をそれらの F a b 部分および F c 部分へと切断し、F a b 部分を F c 部分から分離し、糖を、分離された F a b 部分および F c 部分から切断し、糖の構造および／または特性を決定する（F a b 部分における糖および F c 部分における糖について個別に）ことにより、決定することができる。構造および特性を決定するのに適する測定法は、例えば、H P L C 法および質量分析である。

【実施例】

【0189】

（実施例1）

糖鎖プロファイリング

抗 E G F R 抗体

ヒト不死化血液細胞系である G T - 5 s (F u c ⁺) に由来する F u c ⁻ 細胞系において発現させた抗 E G F R 抗体である C e t u x i m a b、またはマウス細胞系である S P 2 / 0 において発現させた抗 E G F R 抗体である C e t u x i m a b (E r b i t u x) のグリコシル化パターンをより詳細に特徴づけるため、糖鎖プロファイリング研究を実施した。ヒト／マウスキメラ I g G 抗体である C e t u x i m a b は、重鎖可変領域のフレームワーク領域3において1つのN-グリコシル化部位を含み、重鎖定常領域2において1つのN-グリコシル化部位を含む。

【0190】

抗体をパパインで切断した結果として、1つの F c 断片と、2つの F a b 断片がもたらされた。断片の分離は、F c 断片には結合するが、F a b 断片には結合しない、プロテインAによる固相におけるアフィニティークロマトグラフィーを用いて実施した。F c 部分を F a b 部分から分離した後で、各断片のN-グリカン、糖鎖プロファイリングに適用した。

【0191】

糖鎖プロファイリングでは、完全なN-グリカンをタンパク質のコアから放出させ、N-グリカンの還元末端を、蛍光マーカーで標識化した。標識化したN-グリカンの精製試料は、H P L C により分離した。

【0192】

N-グリカン構造の相対モル存在量を計算するには、蛍光定量検出に基づくピーク面積を用いた。両方の抗体について推定されるデータを、表1にまとめる。値は、対象の種類の単糖（例えば、フコース）を含有するN-グリカンの相対モル含量を表す。

【0193】

【表 1】

表 1

試料	相対量[モル%] *									
	F	S0	S>0	S1	S2	G0	G1	G2	B	Galili
Cetuximab										
Fuc⁻ Fc	8	95	4	4	0	20	48	31	23	0
Fuc⁻ Fab	40	15	78	65	13	1	8	85	71	0
SP2/0 Fc	98	100	0	0	0	55	38	6	3	0
SP2/0 Fab	78	43	37	30	7	2	2	75	6	56

*グリカン構造の相対量は、N-グリカンの総量と関連する。全てのグリカン構造の帰属が可能であるわけではないので、シアリル化されたグリカン構造の相対量とシアリル化されていないグリカン構造の相対量との和、またはガラクトシル化されたグリカン構造の相対量とガラクトシル化していないグリカン構造の相対量との和が、全ての場合に 100%を示すわけではない。

F=フコシル化された N-グリカン、S0=シアリル化されていない N-グリカン、S>0=シアリル化された N-グリカン、S1=モノシアリル化された N-グリカン、S2=ジシアリル化された N-グリカン、G0=ガラクトシル化していない N-グリカン、G1=モノガラクトシル化された N-グリカン、および G2=ジガラクトシル化された N-グリカン、B=二分枝性 N-アセチルグルコサミン、Galili=Gal-1, 3-Gal。

【0194】

糖鎖プロファイリングは、マウス SP2/0 細胞において発現させた Cetuximab 抗体と比較して、GT-5s 細胞に由来する Fuc⁻ 細胞において発現させた Cetuximab 抗体の Fc グリコシル化部位における平均フコース含量はるかに少なく、Fab グリコシル化部位における平均シアル酸含量はるかに多く、Fc 部分における平均ビス GlcNAc 含量はるかに多いほか、Fab 部分のグリコシル化はるかに高度であることを示す。さらに、SP2/0 細胞において発現させた Cetuximab 抗体だけが、ヒトにおける有害な副作用の一因となる Galili エピトープを含む。

【0195】

さらに、異なる 2 つの Cetuximab 調製物中の NeuGc および NeuAc の相対量も決定した。免疫原性である 5-N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) は、逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) により、5-N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) から識別することができる。

【0196】

解析のために、シアル酸を、タンパク質から放出させた。フリーのシアル酸をフルオロフォアで標識化し、蛍光定量検出を用いる RP-HPLC により解析した。標識化した NeuAc と、NeuGc とは、RP-HPLC における貯留時間が異なる。これらの化合物を同定するために、市販の基準物質を用いた。

【0197】

表 2 に結果をまとめる。SP2/0 により発現させた Cetuximab では、いずれのシアル酸も同定されたが、5-N-グリコリルノイラミン酸 (96%) が、5-N-ア

セチルノイラミン酸（４％）に対してはるかに卓越した。これに対し、ヒトGT-5sに由来するFuc⁻細胞系において発現させた、本発明によるCetuximabについては、5-N-アセチルノイラミン酸だけが検出可能であった。

【0198】

【表2】

表 2

試料	相対モル量[モル%]	
	NeuAc	NeuGc
Fuc ⁻	100	0
SP2/0	4	96

10

【0199】

以下の実験では、GT-5s細胞において発現させたCetuximab、またはGT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞系において発現させたCetuximabを、グリコシル化パターンを改善した、特にFab部分におけるシアリル化度が高く、Fc部分における二分枝状GlcNAc量が多く、場合によって、Fc部分におけるフコース量が少ない、本発明による抗体の例として用いた。SP2/0により発現させたCetuximab（Erbix）は、はるかに低いFab部分のシアリル化度を示すので、陰性対照として用いた。

20

【0200】

抗MUC1抗体

同様の糖鎖プロファイリングを、GT-5s細胞において発現させたTA-Muc-1抗体であるPankomab、およびGT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞系において発現させたPankomabについても実施した。重鎖可変領域のCDR2にN-グリコシル化部位を有し、重鎖定常領域2にもN-グリコシル化部位を有する、IgG抗体のヒト化形であるPankomab（hPM）を用いた。

30

【0201】

【表3】

表 3

試料	F	S	G	B
hPM (GT-5s)	84	38	81	n.d.
hPM Fab (GT-5s)	78	71	93	n.d.
hPM Fc (GT-5s)	86	3	70	n.d.
hPM (Fuc ⁻)	31	37	82	28

40

F=フコシル化された N-グリカン、S=シアリル化された N-グリカン、
G=ガラクトシル化された N-グリカン、B=二分枝性 N-アセチルグルコサミン、
n. d.=決定なし

【0202】

GT-5s細胞系に由来するFuc⁻細胞系は、同様に高度なシアリル化パターンおよびガラクトシル化パターンを有する一方で、フコース量は顕著に減少したPankomab抗体を産生する。Fuc⁻細胞系により発現させたPankomab抗体の全体における平均フコシル化糖量が少ないことは、Fc部分のフコースを保有するグリコシル化部位

50

の平均量もまた少ないことを示す。G T - 5 s 細胞から得られたヒト化 P a n k o m a b について実施された糖鎖解析では、二分枝状 G l c N A c 残基量が決定されなかった。

【0203】

改善された検出手順および解析手順を用いて、G T - 5 s 細胞において発現させた抗体である P a n k o m a b について、さらなる糖鎖解析を実施した。以下の結果が得られた。

【0204】

【表4】

表 4

試料	相対量[モル%]*									
	F	S0	S>0	S1	S2	G0	G1	G2	B	Galili
Pankomab Fc	83	84	6	5	1	27	44	20	26	0
Pankomab Fab	92	15	79	44	35	2	3	89	65	0

*グリカン構造の相対量は、N-グリカンの総量と関連する。全てのグリカン構造の帰属が可能であるわけではないので、シアリル化されたグリカン構造の相対量とシアリル化されていないグリカン構造の相対量との和、またはガラクトシル化されたグリカン構造の相対量とガラクトシル化されていないグリカン構造の相対量との和が、全ての場合に 100%を示すわけではない。

F=フコシル化された N-グリカン、S0=シアリル化されていない N-グリカン、S>0=シアリル化された N-グリカン、S1=モノシアリル化された N-グリカン、S2=ジシアリル化された N-グリカン、G0=ガラクトシル化されていない N-グリカン、G1=モノガラクトシル化された N-グリカン、および G2=ジガラクトシル化された N-グリカン、B=二分枝性 N-アセチルグルコサミン、Galili=Gal-1, 3-Gal。

【0205】

(実施例 2)

抗原結合研究

抗原 E L I S A

M a x i s o r p 96 ウェルプレート上に固定化された市販抗原の E G F R により、抗 E G F R 抗体である C e t u x i m a b について特異的な抗原 E L I S A (酵素免疫測定アッセイ)を開発した。コーティングされたウェルは、P B S 中 2 % の B S A でブロッキングして、抗体の非特異的な結合を防止した。1 % の B S A / P B S 中で希釈した抗 E G F R 抗体を、固定化された抗原へとインキュベートして結合させ、酵素で標識された抗ヒト I g G 二次抗体により検出した。酵素である P O D により、基質である T M B を色素へと転換し、これを、希硫酸による酸性化の後に、450nmにおける測光法により定量した。

【0206】

マウス S P 2 / 0 細胞において発現させた C e t u x i m a b (E r b i t u x (M e r c k)) を、1 ~ 10ng/ml の範囲の較正に用いた。本発明によりグリコシル化された C e t u x i m a b を含む試料を、4 ~ 8ng/ml へと希釈し、検量線と比較した(二次方程式による近似法)。異なる C e t u x i m a b プローブによる結果は、E L I S A におけるいずれの抗体の結合も同等であることを示す。

【0207】

反応速度およびアフィニティー（表面プラズモン共鳴）

センサーチップであるCM5を、アミン結合を介して、市販されるEGFRの細胞外ドメインにより共有結合的にコーティングした。マウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Erbix、シアリル化度が低い）と、本発明によりグリコシル化されたCetuximabの2つの調製物とを、リガンド密度を異にしてコーティングした2つのフローセル上を同時に流動させた結果、それぞれ、約25RUおよび100RUの R_{max} が得られた。抗EGFR抗体を、広範な濃度（2nM～1μM）にわたり注入して、結合反応速度を計算した。抗体は2つの結合部位を有するので、二価評価モデルを用いた。結果を表5に示す。Biacore製のシミュレーションソフトウェアであるBIASimulation 2.1において示されうる通り、会合定数 k_{a1} および解離定数 k_{d1} が、関与性の定数である。したがって、これらの2つの定数を用いて、アフィニティー定数である K_D を計算した。コーティングが極めて低度であるフローセルおよびコーティングがやや高度なフローセルによる全ての実験結果をまとめると、いずれのCetuximab変化形についての K_D も同等であるが、本発明によるCetuximab変化形の K_D が、なおわずかに良好であった（ K_D 値が低ければ、より強力な抗原結合が示される）。

【0208】

【表5】

表 5

	Cetuximab (発明)	Erbix
k_{a1} [1/M 秒]	3,73e5	3,29e5
k_{d1} [1/秒]	3,35e-3	4,21e-3
k_{a2} [1/RU 秒]	0,527	1,28
k_{d2} [1/秒]	0,298	0,536
$K_D=k_{d1}/k_{a1}$ [nM]	9	13

【0209】

フローサイトメトリーにおける腫瘍細胞への結合

フローサイトメトリーにより複数のEGFR受容体陽性細胞系を解析して、本発明によりグリコシル化された抗EGFR抗体であるCetuximabの結合特性と、シアリル化度が低いCetuximab（マウスSP2/0細胞において発現させた）の結合特性とを探索し、比較した。略述すると、標的細胞を採取し、濃度の異なる抗EGFR抗体と共にインキュベートした。細胞を洗浄し、暗所、4℃で、Cy3をコンジュゲートした抗ヒトIgG二次抗体と共にインキュベートした。細胞を再度洗浄し、フローサイトメーターであるFACS Canto II（Becton Dickinson）により解析した。生細胞を、それらの散乱特性に基づいてゲーティングし、FACS Diva Software（Becton Dickinson）を用いて陽性細胞の百分率を計算した。

【0210】

本発明によりグリコシル化されたCetuximabと、マウスSP0/2細胞において発現させたCetuximabとは、図1において示す通りに調べた全ての腫瘍細胞系において、同等の結合特徴を示す。

【0211】

スキッチャード解析

2つの因子：腫瘍細胞における抗体のアフィニティーおよび結合部位数が、抗体の治療的適切性に特に重要である。

【0212】

受容体ーリガンド間結合のアフィニティーは、それらの相互作用の強度について記載す

る。抗原－抗体間相互作用の場合、相互作用は、フリーの抗体／抗原と、形成される抗体－抗原複合体との化学平衡により定義される。この平衡はまた、会合速度と解離速度との比率でもあり、例えば、水素結合力、静電相互作用力、疎水性相互作用力、およびファンデルワールス力などの異なるパラメータにより影響される。スキッチャード解析は、リガンド－受容体間結合のアフィニティー定数を計算するのに一般的に用いられる。スキッチャードの式は、

【0213】

【数1】

$$\frac{r}{c} = \frac{nK_a}{1 + nK_a + rK_a}$$

10

【0214】

〔式中、rは、結合可能な結合部位の全体に対する結合したリガンドの濃度比であり、cは、フリーのリガンドの濃度であり、nは、タンパク質分子1つ当たりの結合部位数である〕により与えられる。

【0215】

一価の相互作用を仮定して、r／cをrと対比させるこのデータをプロットすると、傾きを－K_aとし、Y切片をnK_aとする、直線のスキッチャードプロットが得られる。細胞結合研究（この場合、細胞とは、抗原を指す）の場合、細胞1個当たりの結合抗体数は、X切片から計算することができる。

20

【0216】

細胞結合研究では、本発明によりグリコシル化された抗EGFR抗体であるCetuximab、およびマウスSP2／0において発現させたCetuximabの、腫瘍細胞系に対する結合を、放射性標識した抗体を用いて評価した。抗体を、p－SCN－ベンジル－DTPAによりキレート化し、担体を含まない¹²⁵Iで放射性標識した。解離定数および抗体結合部位は、スキッチャードプロット解析により推定した。

【0217】

結合実験は、同等の条件下にある両方の抗体により実施した。ヒト腫瘍細胞系であるA431細胞、LS174T細胞、およびDU145細胞を用いて、両方の抗体の結合特性を探索し、比較した。実験では、細胞のアリコート（バイアル1つ当たりに同等数の細胞）を、量を増大させた、¹²⁵Iで放射性標識した異なる抗体調製物と共にインキュベートして平衡化させ、その後、結合しなかった抗体から分離させた。細胞に結合した抗体の量は、放射性の測定により決定し、上記の通りにデータを評価した。

30

【0218】

スキッチャードプロット解析による結果として、同等のアフィニティーおよび結合部位数が推定された。表6に細胞結合実験の結果をまとめる。

【0219】

【表6】

40

表 6

腫瘍細胞系	解離定数 K _D [M]		細胞1個当たりの結合部位数	
	Cetuximab (発明)	Cetuximab SP2/0	Cetuximab (発明)	Cetuximab SP2/0
A431	1.3x10 ⁻⁹	0.8x10 ⁻⁹	6.9x10 ⁵ *	5.1x10 ⁵
LS174T	2.3x10 ⁻¹⁰	2.3x10 ⁻¹⁰	1.1x10 ⁴	5.2x10 ⁴
DU145	0.9x10 ⁻⁹	0.4x10 ⁻⁹	1.7x10 ⁵	1.2x10 ⁵ .

【0220】

値（LS174T、DU145の）は、少なくとも2つの個別の実験セットの平均を表

50

す。細胞1個当たりの結合部位数とは、細胞1個当たりの結合抗体分子数を指すものであり、細胞表面における受容体の結合位置の数を指すものではない。

【0221】

結果は、本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））、およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Cetuximab SP2/0）の、腫瘍細胞に対するアフィニティーおよび結合部位数が同等であることを示す。

【0222】

抗MUC1抗体であるPankomabについても、同様のスクッチャード解析を実施した。各々をプロテインAによるクロマトグラフィーを介して精製した、CHO細胞において発現させたPankomab、およびGT-5s細胞において発現させたPankomabについて、類似の実験を実施した。ヒト腫瘍細胞系であるZR-75-1を用いて、異なる細胞において発現させたPankomab抗体（全て、特異性が同じであるIgG1抗体）の結合特性を探索し、比較した。

【0223】

実験では、細胞のアリコート（バイアル1つ当たり同等数の細胞）を、量を増大させた異なる抗体調製物（ ^{125}I で放射性標識したPankomabを定量に用いた）と共にインキュベートして平衡化させ、その後、結合しなかった抗体から分離させた。細胞に結合した抗体の量は、放射能の測定により決定し、上記の通りにデータを評価した。表7に結果をまとめる。結果として、グリコシル化の異なるPankomab変換形について、同等の結合が測定された。

【0224】

【表7】

表 7

抗体	解離定数 K_D [M]	細胞1個当たりの結合部位数
CHOにおいて発現させた PankoMab	7.8×10^{-9}	8.2×10^5
GT-5sにおいて発現させた PankoMab	3.33×10^{-9}	6.7×10^5

【0225】

まとめ

結論として述べると、上記の実験は、本発明による抗体のグリコシル化パターンの改善、特に、抗体のFab部分におけるシアリル化度の増大が、その抗原結合特性に負の影響を及ぼさないことを裏付ける。

【0226】

（実施例3）

グリコシル化の異なる抗体の循環半減期

グリコシル化の異なる抗体の循環半減期を調べるため、薬物動態アッセイを実施した。

【0227】

このアッセイでは、プロテインAで精製した抗TA-Muc1抗体であるPankomab $15 \mu\text{g}$ をラットに注射し、特定の時点においてラットの血清中の抗体量を決定した。GT-5s細胞において発現させたPankomabを、ヒト不死化血液細胞系であるNM-F9（例えば、WO2005/017130Aにおいて開示されているDSMACC2606: Fuc^+ 、シアリ酸 $^-$ ）において発現させたPankomabと比較した。図2に結果を示す。

【0228】

見ることができる通り、Fab部分におけるシアリル化度が高い抗体（GT-5s細胞による）は、シアリル化度が低い抗体（NM-F9細胞による）より、循環半減期がはるかに長い。

【0229】

さらなる薬物動態アッセイでは、G T-5 s細胞に由来するF u c-細胞系において発現させた抗E G F R抗体であるC e t u x i m a b、およびマウスS P 2 / 0細胞において発現させたC e t u x i m a bを、インビボのカニクイザルアッセイにおいて調べた。図3に結果を示す。ここでもまた、F a b部分におけるシアリル化度が高い抗体（G T-5 s細胞に由来するF u c-細胞系による）は、シアリル化度が低い抗体（S P 2 / 0細胞による）より、循環半減期がはるかに長いことが裏付けられる。

【0230】

【表8】

表 8

	C_{max} [μg/mL]	t_{1/2} [時間]	AUC_{0-∞} [μg・時間/mL]
Cetuximab (発明)	664 ±53	110 ±28	74600 ±18400
Cetuximab (SP2/0)	589 ±58	68 ±7	46400 ±2800

【0231】

したがって、F a b部分のグリコシル化部位におけるシアリル酸量を増大させることにより、循環半減期は大幅に延長された。

【0232】

第3の薬物動態アッセイでは、F a b部分にグリコシル化部位を有し、F c部分にもグリコシル化部位を有するヒト／マウスキメラI g G抗体であるC e t u x i m a bの循環半減期を、F a b部分におけるグリコシル化部位が除去され、F c部分におけるグリコシル化部位だけを含む、この抗体のヒト化形の循環半減期と比較する。いずれの抗体も、G T-5 s細胞に由来するF u c-細胞系において発現させた。

【0233】

マウス1匹当たり10 μgずつの抗体をマウスに注射し、表示時間後において回収された抗体の相対量を検出した。試験は、3連で行った。図4に結果を示す。F a b部分のグリコシル化部位を有さないヒト化抗体が、そのF a b部分のグリコシル化部位に付いているシアリル化度の高い糖を含むキメラ抗体と比較して、循環半減期が同一であることが裏付けられる。これはまた、本明細書で教示される通り、F a b部分のグリコシル化部位を除去すると、結果として半減期が延長されることも裏付ける。

【0234】

結論として述べると、上記の実験は、シアリル酸含量が少ないF a b部分のグリコシル化部位を有する抗体の循環半減期を、F a b部分に付いている糖中のシアリル酸量を増大させることにより延長することもでき、F a b部分に存在するグリコシル化部位を除去することにより延長することもできることを示す。

【0235】

(実施例4)

グリコシル化が異なる抗E G F R抗体によるE G F受容体の阻害

天然リガンド（例えば、E G FまたはT N Fアルファ）によりE G F Rを活性化すると、受容体の二量体化、細胞内キナーゼドメインの刺激およびリン酸化がもたらされる。核内で誘導されるシグナル伝達カスケードは、これにより細胞増殖を活性化させる。抗E G F R抗体であるC e t u x i m a bの1つの作用機構は、E G F Rの細胞内キナーゼドメインのE G Fにより誘導されるリン酸化の防止であり、これにより、核におけるシグナル伝達が途絶する。これらは、結果として、E G F R陽性細胞系がE G Fにより誘導されて増殖することを阻害する。

【0236】

E G F Rリン酸化の阻害

グリコシル化の異なるC e t u x i m a b抗体の、E G F Rリン酸化に対する効果を解

析するために、EGFRリン酸化アッセイを実施した。略述すると、A431細胞（外陰のヒト類表皮がん細胞系）またはLS174T細胞（ヒト結腸上皮がん細胞）を、24時間にわたる血清枯渇によりEGF飢餓させた。細胞を、異なる濃度の異なるCetuximab変形（ $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）と共に、4時間にわたりインキュベートし、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のEGFにより15分間にわたり刺激した。細胞の溶解物を調製し、全EGFRおよびリン酸化EGFR（p-EGFR）の含量を、同じウェル内でEGFRとリン酸化されたEGFRとを同時に検出する市販のp-EGFR/全EGFRキット（Mesoscale discoveries）を製造元のプロトコールに従って用いて決定した。p-EGFR/全EGFRキットでは、プレートを、ウェルの1つのスポットでは、リン酸化EGFRに特異的な抗体（Tyr1173）であらかじめコーティングし、同じウェルの別のスポットでは、リン酸化EGFRおよび非リン酸化EGFR（全EGFR）を認識する抗体であらかじめコーティングする。ブロッキングおよび洗浄の後、プレートを、溶解物と共にインキュベートし、プレートを洗浄し、結合したEGFRを、Sulfolタグで標識した二次抗体により検出した。SectorImager SI6000（Mesoscale discoveries）により、各スポットについて、電気化学発光を個別に測定した。pEGFRスポットにおけるシグナルの百分率を、全EGFRスポット（同じウェルの）におけるシグナルと比較して計算した。

10

【0237】

図5Aは、本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Cetuximab SP2/0）の非存在下および存在下における、EGFR陽性細胞系であるA431細胞のEGFによる刺激後におけるEGFRリン酸化を測定するアッセイの結果を示す。リン酸化EGFRの百分率の濃度依存的な低下が決定された。 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCetuximabでは、見出されたリン酸化EGFRの量が、抗体とのインキュベーションを伴わずに見出されたリン酸化EGFRの量の3分の1に過ぎなかった。EGFRリン酸化の低減は、いずれのCetuximab変形についても同等であった。EGFR陽性細胞系であるLS174Tを用いても、同様の結果が得られた。結果として、本発明によりグリコシル化パターンが改善されたCetuximabは、用いられた条件下において、市販のCetuximab（Erbix）と同じレベルで、細胞内のキナーゼドメインのEGFRリン酸化を阻害する。

20

30

【0238】

増殖の阻害

EGF受容体の細胞外ドメインにCetuximabが結合すると、結果として、リガンド結合が阻害され、これにより、腫瘍細胞のEGF依存的な増殖が低減される。グリコシル化の異なるCetuximab変形についてこの作用機構を解析するため、A431細胞（外陰のヒト類表皮がん細胞系）の増殖を、異なる濃度（ $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）の、本発明によりグリコシル化されたCetuximab、およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Erbix（Merck））によるMTTアッセイにおいて測定した。MTTアッセイとは、生細胞のミトコンドリアにおけるデヒドロゲナーゼによる、可溶性で黄色のテトラゾリウム塩であるMTT（3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド、チアゾリルブルー）の切断に基づく非放射性アッセイである。これは、紫色のホルマザンの形成を結果としてもたらし、これは、 570 nm におけるELISAリーダーにより測定することができる。吸収シグナルは、培養物中の生細胞についての直接的な測定である。

40

【0239】

陽性対照としてはタキソールを添加することにより増殖を完全に阻害し、陰性対照としてはhIgGまたは培地単独を用いた。略述すると、A431細胞を、96ウェルの平底プレートにおいて4日間にわたり増殖させた。Cetuximab変形および対照物質を添加し、プレートを、加湿した CO_2 インキュベーター内、 37°C で、さらに3～5日間にわたりインキュベートした。上清を完全に除去し、MTTを添加した。細胞を、MT

50

Tと共に、加湿したCO₂ インキュベーター内、37℃で、2時間にわたりインキュベートした。上清を除去し、溶解緩衝液を含有するHClおよび2-プロパノールを用いて、暗所において、室温で1時間にわたり細胞を溶解させた。プレートリーダーであるInfinite F200 (Tecan Austria GmbH) により、570nm/630nmにおける吸収を測定した。

【0240】

図5Bは、同じ実験内の異なるプレートにおける、本発明によりグリコシル化されたCetuximab (Cetuximab (発明))、およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab (Cetuximab SP2/0) により実施した実験の結果を示す。各プレートに对照を添加し、Cetuximab (発明) については暗色で示し、Cetuximab SP2/0については明色で示す。Cetuximabとのインキュベーション後、培地对照 (緑色で示される) およびhIgG1对照 (グレーで示される) と比較して少ない生細胞が観察された。培地对照とhIgG1对照とは、同じ増殖を示した。陽性对照であるタキソールは、結果として、最大の増殖阻害をもたらした。本発明によりグリコシル化されたCetuximab、およびマウスSP2/0細胞において発現させたCetuximabは、A431細胞において、濃度依存的な増殖の阻害を誘導した。増殖の阻害は、いずれのCetuximab変化形においても同等であった。

10

【0241】

結論として述べると、本発明による抗体のグリコシル化パターンの改善は、抗EGFR抗体であるCetuximabの受容体阻害活性に負の影響を及ぼさない。

20

【0242】

(実施例5)

グリコシル化の異なる抗体によるアポトーシスおよび標的細胞溶解の誘導

アポトーシスの誘導

アポトーシスの誘導は、抗体が、抗腫瘍活性を媒介しうるさらなる機構である。単量体抗体によるアポトーシスの直接的な誘導がしばしば無効であるのに対し、抗ヒト免疫グロブリンまたはプロテインGによる抗体の架橋形成は、この作用機構を喚起する。インビボでは、抗体の架橋形成が、Fc受容体保有細胞により誘導されうる。

【0243】

30

この潜在的な作用方式を研究するため、本発明者らは、腫瘍細胞系であるLS174TおよびA431におけるプロテインGによる架橋形成後における、グリコシル化の異なるCetuximab変化形によるアポトーシスの誘導を解析した。アポトーシスの誘導についてのマーカーとして、本発明者らは、BD PE Active Caspase-3 Apoptosis Kitを用いて、カスパーゼ3の活性化について解析した。システインプロテアーゼであるカスパーゼ3は、アポトーシスの初期段階で活性化される重要なプロテアーゼである。カスパーゼ3は、アポトーシスを受けつつある細胞においてプロセシングされる、32kDaの不活性のプロ酵素として合成される。プロセシングされた形態は、会合して活性カスパーゼを形成する2つのサブユニット (17kDaのサブユニットおよび12kDaのサブユニット) からなる。活性のカスパーゼ3は、細胞質および核内の他のカスパーゼならびに標的をタンパク質分解的に切断および活性化し、これにより、アポトーシスを促進する。BD PE Active Caspase-3 Apoptosis Kitを用いて、カスパーゼ3の不活性のプロ酵素形態を認識しない、カスパーゼ3の活性形態に特異的な抗体を用いて、アポトーシス細胞を染色する。

40

【0244】

略述すると、腫瘍細胞系を、無血清 (A431細胞) 培地または血清低減 (1%、LS174T細胞) 培地中で、アッセイ前の24時間にわたり培養した。細胞を48ウェルプレートへと播種し、CO₂ インキュベーター内、37℃で24時間にわたりインキュベートした。異なる濃度のCetuximab変化形または陰性对照としてのhIgG1および最終濃度を2μg/mlとするプロテインGを添加した。CO₂ インキュベーター内、

50

37℃で4～48時間にわたり、プレートをインキュベートした。細胞を採取し、透過処理し、固定し、製造元のプロトコールに従い、活性カスパーゼ3について染色した。BD FACSDiva（商標）Softwareを用いて、BD FACS Canto IIフローサイトメーターによるフローサイトメトリーを介して、活性カスパーゼ3陽性（アポトーシス性）細胞を解析した。

【0245】

プロテインGによる架橋形成後、Cetuximab変化形は、A431細胞およびLS174T細胞において、濃度依存的なアポトーシスを強力に誘導した。例として述べると、図6は、A431細胞を用いる活性カスパーゼ3アポトーシスの結果を示す。アポトーシスの誘導は、本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））と、マウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Cetuximab SP2/0）との間で同等であった。

【0246】

ADCCアッセイ

抗体の異なるグリコシル化パターンのADCCに対する影響を決定するため、ユーロピウム放出アッセイを実施した。

【0247】

第1のアッセイでは、異なる細胞系により発現させた、抗EGFR抗体であるCetuximabを用いて、標的細胞の異なる溶解を調べた。特に、マウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Fab部分におけるシアリル化が低度であり、Fc部分におけるフコシル化が高度である）、齧歯動物CHO細胞において発現させたCetuximab（Fab部分におけるシアリル化が低度であり、Fc部分におけるフコシル化が高度である）、GT-5s細胞において発現させたCetuximab（Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が高度である）、およびGT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞において発現させたCetuximab（Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が低度である）を用いるヒトPBMCによるLS174T細胞の溶解を調べた。エフェクター細胞対標的細胞比（E：T比）は50：1とし、インキュベーション時間は4時間とした。図7に結果を示す。

【0248】

このアッセイにより裏付けられる通り、抗体のFab部分におけるシアル酸量は、そのADCC活性に影響を及ぼさない。しかし、Fc部分におけるフコシル化度を低くすると、ADCC活性が増大する。

【0249】

第2のアッセイでは、マウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Fab部分におけるシアリル化が低度であり、Fc部分におけるフコシル化が高度である）またはGT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞において発現させたCetuximab（Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が低度である）を用いる、FcγRIIIa-158Fについてホモ接合性である（F/F）か、もしくはFcγRIIIa-158Vについてホモ接合性である（V/V）か、またはFcγRIIIaについてヘテロ接合性である（F/V）異なるドナーから得られた初代ヒトPBMCによるLS174T細胞の溶解を決定した。エフェクター細胞対標的細胞比（E：T比）は80：1とし、インキュベーション時間は5時間とした。図8～10に結果を示す。

【0250】

同じ日において、異なるドナーのPBMCにより実施されたさらなる実験（図11）では、本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））が、全ての異なるドナー型について同様のADCC活性を示すことが裏付けられる。これとは対照的に、マウスSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Cetuximab SP2/0）を介する特異的な溶解は、VVドナーにおいて、FFドナー

と比較して顕著な細胞傷害作用の増大を示した。

【0251】

見ることができる通り、Fc部分におけるフコシル化度が低く、Fab部分におけるシアリル化度が高い抗体（Fuc⁻細胞による）は、Fc部分におけるフコシル化度が高く、全てのドナーに対してFab部分におけるシアリル化度が低い抗体（SP2/0細胞による）よりはるかに大きなADCC活性を示す。さらに、低フコース/高シアル酸抗体のADCC活性はまた、異なるドナーの各々についても同等であるのに対し、高フコース/低シアル酸抗体は、V/Vドナーに対して大きなADCC活性を示す。

【0252】

第3のアッセイでは、抗MUC-1抗体であるPankomabのシアリル化度が高いことの、そのADCC活性に対する影響を解析した。抗体依存性細胞傷害作用についての比較アッセイでは、ヒト骨髓細胞系において生成した、Pankomabのシアリル化を本質的に欠くグリコシル化の効果、およびGT-5s細胞において生成したPankomab（シアリル化が高度である）のグリコシル化の効果、ならびにCHO細胞において生成されたPankomabのグリコシル化の効果を解析した。全ての物質は、プロテインAカラム上のクロマトグラフィーにより精製した。

【0253】

非シアリル化細胞および高シアリル化細胞において発現させたPankomabが、ZR-75-1腫瘍細胞に対して同等の特異的溶解を示すのに対し、CHO細胞において発現させたPankomabは、大幅に低度の溶解を示す。シアリル化が低度のPankomabのADCC活性と、シアリル化が高度なPankomabのADCC活性とは、同等である（図12を参照されたい）。

【0254】

したがって、GT-5s細胞において発現させたPankomabの完全なヒトグリコシル化は、CHO細胞において発現させたPankomabの約5倍のADCC活性を伴う抗体の生成を結果としてもたらす。

【0255】

さらに、GT-5s細胞において発現させた抗TA-Muc1抗体であるPankomab（Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が高度である）またはGT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞において発現させたPankomab（Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が低度である）を用いる、FcγRIIIa-158Fについてホモ接合性である（F/F）ドナーから得られた初代ヒトPBMCによるZR-75-1細胞の溶解を決定した。エフェクター細胞対標的細胞比（E:T比）は100:1とし、インキュベーション時間は6時間とした。図13に結果を示す。

【0256】

見ることができる通り、Fc部分におけるフコシル化度が高く、Fab部分におけるシアリル化度が高い抗体（GT-5s細胞による）は、妥当な程度に大きなADCC活性を示す。しかし、Fc部分におけるフコース含量が少ない抗体（Fuc⁻細胞による）では、ADCC活性がなお増大する。

【0257】

このADCC活性の増大を、本発明の教示による半減期の改善と組み合わせることにより、臨床プロファイルが改善された抗体が提供される。

【0258】

（実施例6）

構成的に活性なK-Ras変異を有する標的細胞の、本発明による抗EGFR抗体による溶解

本発明によりグリコシル化パターンを最適化した抗EGFR抗体が、ADCCを介して、構成的に活性なK-Ras変異を有する標的細胞の溶解を誘導する能力を裏付けるため、ユーロピウム放出アッセイを実施した。

10

20

30

40

50

【0259】

このアッセイでは、ヒト肺がん上皮細胞系であるA549細胞を標的細胞として用いた。これらの細胞におけるK-Ras遺伝子は、Gly-12-Ser変異を有する構成的に活性なK-Rasタンパク質をもたらす、コドン12における変異を含む。エフェクター細胞としては、FcγRIIIa-158Fについてホモ接合性である(F/F)か、またはFcγRIIIa-158Vについてホモ接合性である(V/V)異なるドナーから得られた初代ヒトPBMCを用いた。ADCCを介する標的細胞の溶解は、本発明によりグリコシル化された抗EGFR抗体であるCetuximab(Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が低度である)により誘導した。エフェクター細胞対標的細胞比(E:T比)は80:1とし、インキュベーション時間は5時間とした。図14に結果を示す。

10

【0260】

このアッセイにより裏付けられる通り、グリコシル化パターンが改善された、特に、Fab部分におけるシアリル化が高度であり、Fc部分におけるフコシル化が低度である、本発明による抗EGFR抗体は、構成的に活性なEGFRシグナル伝達経路を含む、すなわち、EGFRのリガンド結合を遮断することによっては処置することができない標的がん細胞に対してもなお、ADCCを介する標的細胞の溶解を誘導することが可能である。

【0261】

(実施例7)

グリコシル化の異なる抗体変異体の循環半減期

20

IgG抗体のシアリル化に対する半減期の依存性を調べるため、Cetuximabを、GT-5s細胞に由来するFuc⁻細胞において発現させ(Cetuximab(発明))、電荷の異なるアイソタイプに由来する調製物を生成した。マウスにおける薬物動態研究を実施した。

【0262】

プロテインAで精製したIgG抗体を、陰イオン交換装置により等電点電気泳動(CF)処理し、それらのpIの差違に従って分離し、画分化し、プーリングした。異なるpH値で溶出するこれらの調製物の糖鎖プロファイリングは、異なるグリコシル化パターンを示した。加えて、実施例1で記載したFab/Fc特異的な糖鎖プロファイリングを記録したところ、抗体のFc部分にはジシアリル化されたグリカンが基本的に存在しないので、シアリル化が高度なグリカンを濃縮するには、主にFabのグリコシル化だけが関与性であることが示される(図15Aを参照されたい)。しかし、S>0の増大はまた、負に帯電したプールのFcグリカンにおいても達成された。

30

【0263】

薬物動態アッセイでは、2つの異なる試料:(A)プール1とプール2との混合物(CFが高値~中程度値のpH範囲にある)と、(B)プール3(CFが低値のpH範囲にある)とを比較した。マウスに50mg/kgの用量の抗体を注射し、特定の時点で血清試料を採取した。試料を、それらの抗体含量について、hIgG力価についてのELISAにより解析および評価した。この研究では、全シアリル化度を28%とする調製物(A)と、49%とする調製物(B)とを比較した(図15Bを参照されたい)。

40

【0264】

図16が示す通り、調製物Aの循環半減期($T_{1/2} = 161.9$ 時間)は、シアリル化が高度な調製物Bの循環半減期($T_{1/2} = 199.5$ 時間)より著明に短い。Fab部分におけるシアリル化が低度である調製物、とりわけ、Fab部分におけるS2が少ない調製物は、血清から迅速にクリアランスされた。

【0265】

(実施例8)

グリコシル化の異なる抗体の抗腫瘍活性

A431細胞による異種移植モデルにおける抗EGFR抗体

グリコシル化の異なる抗体を比較するために、A431外陰類表皮がん細胞を用いて、

50

マウス異種移植モデルを準備した。この細胞系は、EGFRタンパク質を高度に発現する。

【0266】

本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））およびSP2/0細胞において発現させたCetuximab（Cetuximab SP2/0）を、5mg/kg～50mg/kg（1群当たりN=8（雌））の投与レベルで、毎週2回ずつ3週間にわたり静脈内投与した。適用体積は、いずれの抗体処方物についても、体重1g当たり10μlとした。注射溶液における濃度の調整は、PBSによる希釈を介して行った。

【0267】

処置された動物の平均相対腫瘍体積を図17に示す。いずれの抗体も、PBSで処置された動物と比較して、腫瘍の成長を用量依存的に阻害する（ $p < 0.001$ ）。Cetuximab SP2/0で処置された群の結果は、公表されたデータ（Fichtnerら、2008年、Steinerら、2007年、Goldsteinら、1995年）と一致する。Cetuximab（発明）で処置された群における相対腫瘍体積と、Cetuximab SP2/0で処置された群における相対腫瘍体積との間では、いずれの投与群においても有意差が見出されなかった。マウスでは、Cetuximab（発明）のADCC活性の増大の利点が大きくないので、Cetuximab（発明）およびCetuximab SP2/0で同等の有効性が予測される。

【0268】

全ての動物は、予定された研究が終了するまで生存した。動物の体重には著明な変化が観察されなかったことから、処置された動物では大きな毒性が発生しなかったことが示される。

【0269】

DU145細胞による異種移植モデルにおける抗EGFR抗体

加えて、Cetuximab（発明）のインビボにおける有効性を、DU145ヒト前立腺がん異種移植細胞を保有する無胸腺ヌードマウスにおいて研究した。DU145細胞系は、EGFR陽性であり、DU145細胞による異種移植モデルは、Erbitux（登録商標）による処置に対して感受性であることが報告されている。

【0270】

予備研究により、毎週2回50mg/kgずつのCetuximab（発明）を3週間にわたり投与した結果、対照群と比較して強力な抗腫瘍効果がもたらされたことが示されている。その後、0.5mg/kg～50mg/kgの範囲にある5つの異なる用量レベルを包含する体積範囲発見研究を実施した。Cetuximab（発明）（1群当たりN=7～8（雄））を、毎週2回ずつ4週間にわたり静脈内投与した。注射溶液中の濃度の調整は、処方物緩衝液による希釈を介して行った。適用体積は、体重1g当たり10μlで一定に保った。処置された動物で研究期間中に死亡した動物は見られなかった。動物の体重には著明な変化が観察されなかったことから、大きな毒性が発生しなかったことが示される。

【0271】

動物の平均相対腫瘍体積を図18に示す。Cetuximab（発明）は、媒体で処置された動物と比較して、DU145細胞における腫瘍の成長を強力かつ用量依存的に阻害した（ $p < 0.001$ ）。0.5mg/kg～50mg/kgの用量レベルが、腫瘍成長の阻害に有効であることが示された。高用量は、低用量と比較して、より迅速でより顕著な効果を結果としてもたらした。

【0272】

ZR-75-1細胞による異種移植モデルにおける抗MUC1抗体

さらなる研究では、異なる細胞系における発現により得られる、シアリル化度の異なるPankomabの抗腫瘍有効性について探索した。両方の抗体の治療的可能性を、ZR-75-1細胞による異種移植ヌードマウスにおいて探索した。ZR-75-1腫瘍細胞

10

20

30

40

50

を皮下注射し、約 0.1 cm^3 の平均サイズまで成長させた。GT-5s細胞において発現させたシアリル化Pankomab（Pankomab シアリル化⁺）、またはシアリル化欠損ヒト骨髓腫瘍細胞系において発現させた非シアリル化Pankomab（Pankomab シアリル化⁻）を、毎週2回ずつ4週間にわたりマウス8匹の群に静脈内投与した。各マウスに 0.5 mg/kg ずつの用量を適用し、PBSを対照として用いた。体重および腫瘍成長をモニタリングした。結果として、 0.5 mg/kg という低用量のシアリル化Pankomabが、腫瘍成長を阻害するのに高度に有効であるのに対し、非シアリル化Pankomabは有意に有効ではなかった。図19は、相対腫瘍体積に基づく結果を示す。全ての結果は、平均±平均の標準誤差として表した。処置期間および抗体濃度の影響を調べるために、相対腫瘍体積についての二元配置ANOVAを実施した（GraphPad Prismソフトウェアv5.02、GraphPad Software、USA）。p値を0.05とするボンフェローニによる事後検定を用いて、群の対間における差違の統計学的有意性を評価した。

10

【0273】

まとめると、低用量の、GT-5s細胞において発現させたシアリル化Pankomab（ 0.5 mg/kg ）は、ZR-75-1細胞による異種移植ヌードマウスにおいて有効な腫瘍成長の阻害をもたらした（ $p<0.001$ ）。非シアリル化Pankomabと比較したシアリル化Pankomabの高度な有効性は、循環からのシアリル化抗体のクリアランスが緩徐であること、したがって、バイオアベイラビリティが長期にわたることによりもたらされることが考えられる。

20

【0274】

（実施例9）

異なる患者に由来する腫瘍に対する抗腫瘍活性

この研究では、本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））のインビボにおける有効性を、ヒト患者のNSCLC（非小細胞肺癌）およびCRC（結腸直腸がん）に由来する異種移植がん細胞を保有する免疫不全マウスにおいて評価した。患者に由来する腫瘍細胞の異種移植モデルは、腫瘍細胞系より元の組織への類似性がなおより大きく、したがって、臨床的関与性が大きいと考えられる。腫瘍モデルは、免疫組織化学により評価された、それらの陽性のEGFR発現状態によるほか、それらのK-Ras遺伝子の変異状態によっても選択した。NSCLC #7466モデルおよびCRC #8397モデルのいずれも、高度なEGFR発現を示すが、NSCLC #7466モデルが、野生型のK-Ras遺伝子を含むのに対し、CRC #8397モデルは、発がん性で常に活性な、K-Ras遺伝子のG12D変異体を保有する。

30

【0275】

Cetuximab（発明）（1群当たり $N=8$ （雄））を、 $5\text{ mg/kg} \sim 50\text{ mg/kg}$ の投与レベルで、毎週2回ずつ3週間にわたり静脈内投与した。注射溶液中の濃度の調整は、処方物緩衝液による希釈を介して行った。適用体積は、体重 1 g 当たり $10\text{ }\mu\text{l}$ で一定に保った。動物の平均相対腫瘍体積を図20に示す。示される通り、Cetuximab（発明）は、ヒト患者に由来する腫瘍の成長を、それらのK-Ras遺伝子の変異状態に依存しないで有効に阻害する。

40

【0276】

Cetuximab（発明）により処置された群で研究終了前の早期に死亡した動物は見られなかった。動物の体重には著明な変化が観察されなかったことから、大きな毒性が発生しなかったことが示される。

【0277】

（実施例10）

毒性学的研究

カニクイザルにおける4週間にわたる反復投与毒性研究およびカニクイザルにおける2週間にわたる用量範囲発見研究を実施した。これらの毒性研究に基づく、本発明によりグリコシル化されたCetuximab（Cetuximab（発明））の安全性プロフ

50

ファイルにより、モノクローナル抗体による候補薬物の忍容性が十分であり、したがって、選択された患者集団の処置も安全であることの十分な重みのある証拠がもたらされる。ヒトにおける抗EGFR抗体の使用を押しとどめる、異常であるかまたは警告的な毒性の指標は観察されなかった。

【0278】

マウスの場合とは対照的に、カニクイザルは、インビトロおよびインビボにおいて、コア構造が脱フコシル化されたヒトIgG1によるADCC活性の増大を示し、これは、ヒト被験系におけるそれぞれのADCC活性の増大と同等であることが示された。したがって、市販のCetuximab (Erbix)と比較した、グリコールを最適化したCetuximabのADCC介在性傷害作用増大の理論的可能性があるとすれば、それがカニクイザルモデルで示されたと結論することができる。

10

【0279】

抗MUC1抗体であるPankomabによるさらなる毒性研究を、ドイツ国内のガイドラインおよび国際的ガイドライン (German Chemicals Law 2002、OECD 1997、Directive of the European Parliament and of the Council 2004)に従うGLP条件下で、Aurigona Life Science GmbHにおいて、Wistarラットにより実施した。この研究は、雌ラットに静脈内投与されたGT-5s細胞において発現させたPankomabについての用量範囲発見研究、ならびに14日間にわたる回復期間を後続させる、雄ラットおよび雌ラットにおける4週間にわたる静脈内反復投与による毒性研究を包含した。用量範囲発見研究の結果、および28日間にわたる反復投与毒性研究の生体における観察は、化合物に関連する作用を示さない。

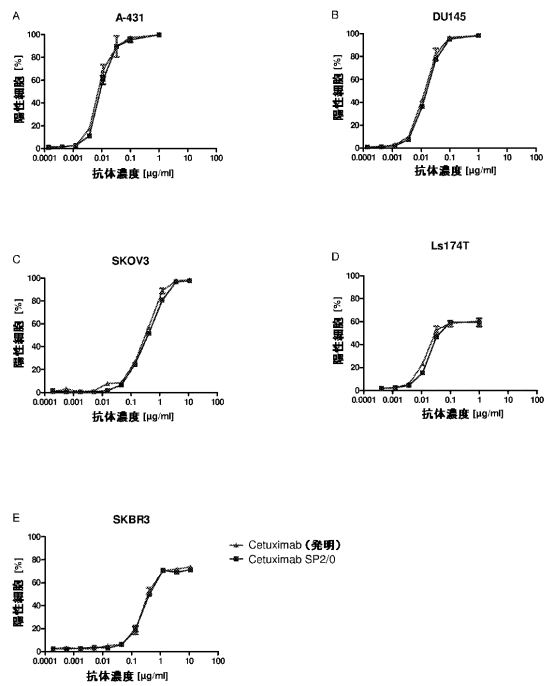
20

【0280】

結果は、本発明による抗体、すなわち、本明細書で記載されるグリコシル化パターンの改善を示す抗体の毒性学的プロファイルが、毒性の増大を示さず、グリコシル化パターンを改善していない最新型の抗体と同等であることの十分な証拠をもたらす。

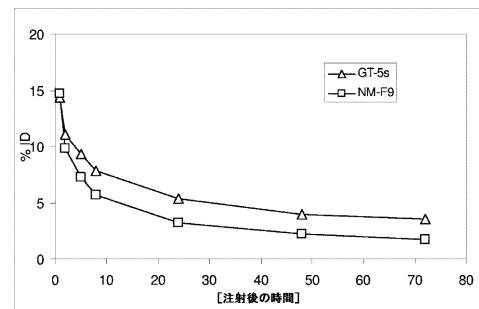
【図 1】

Figure 1



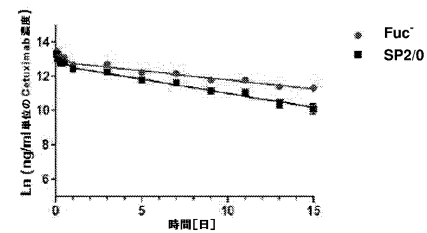
【図 2】

Figure 2



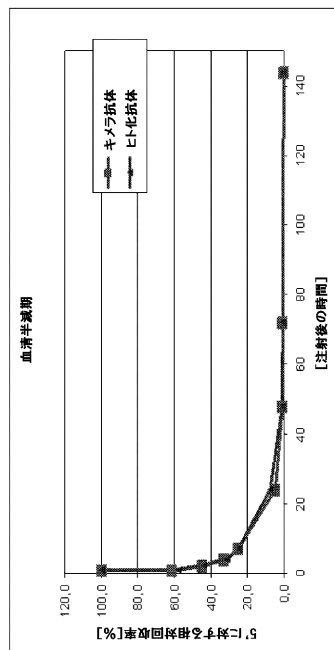
【図 3】

Figure 3



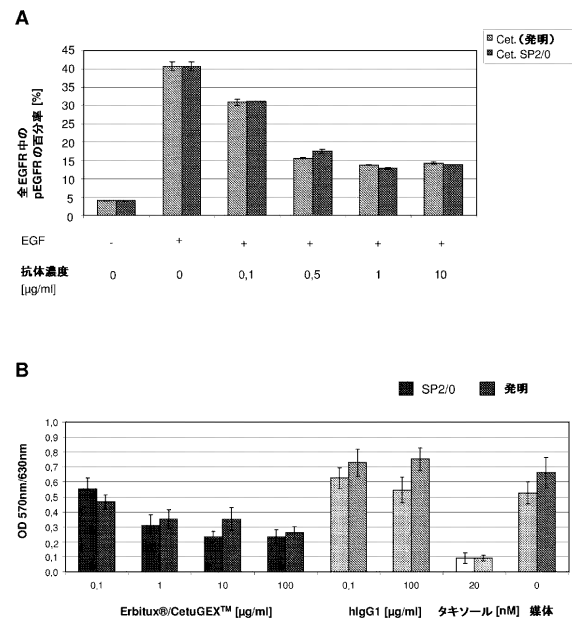
【図 4】

Figure 4



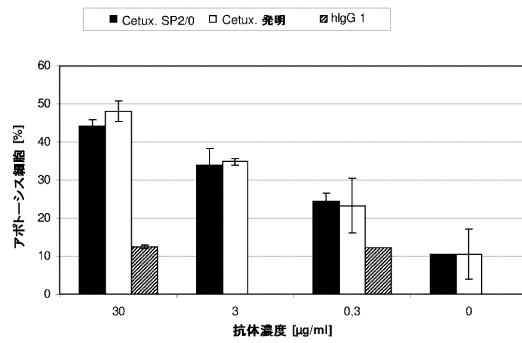
【図 5】

Figure 5



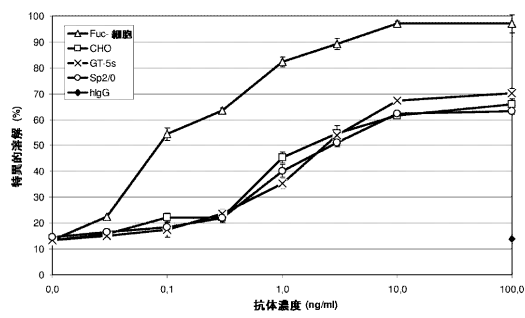
【図 6】

Figure 6



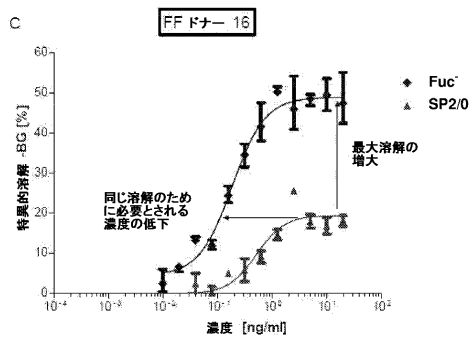
【図 7】

Figure 7



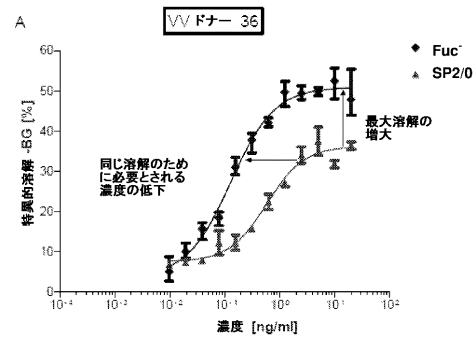
【図 10】

Figure 10



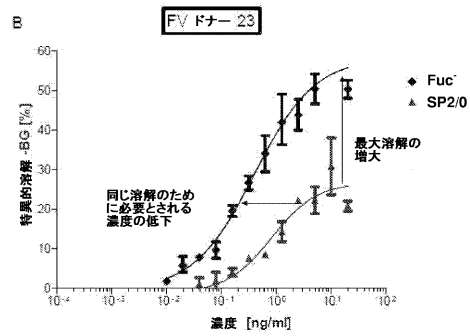
【図 8】

Figure 8



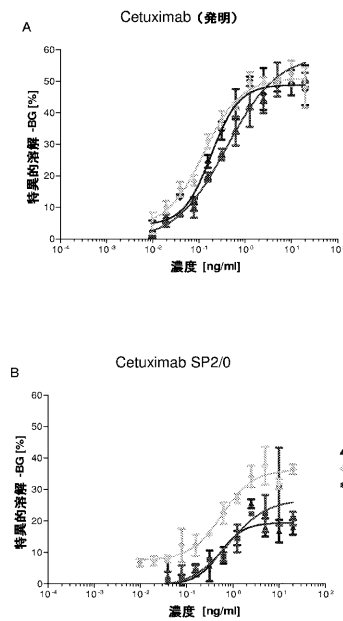
【図 9】

Figure 9



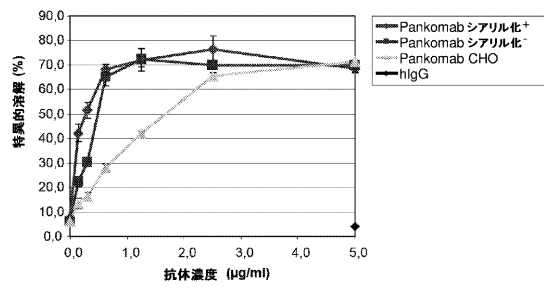
【図 11】

Figure 11



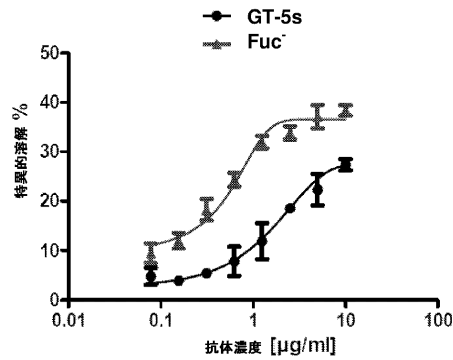
【図 1 2】

Figure 12



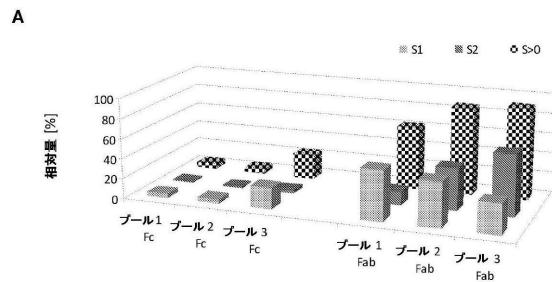
【図 1 3】

Figure 13

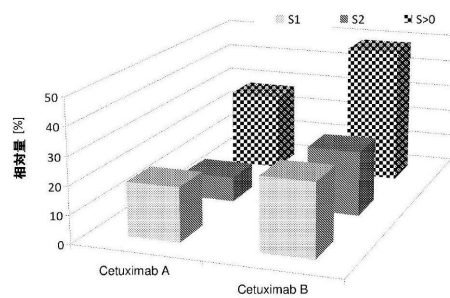


【図 1 5】

Figure 15

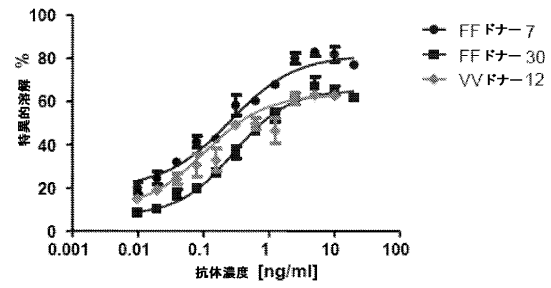


B



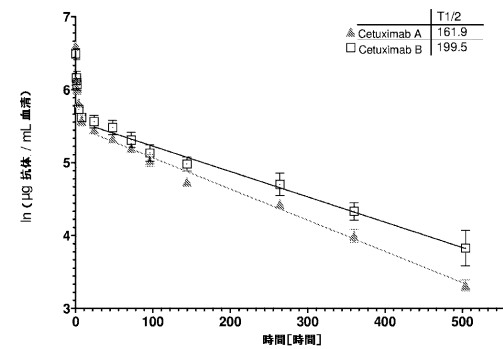
【図 1 4】

Figure 14



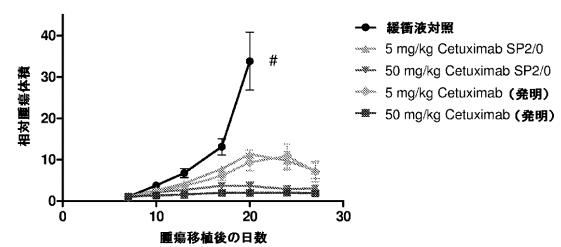
【図 1 6】

Figure 16



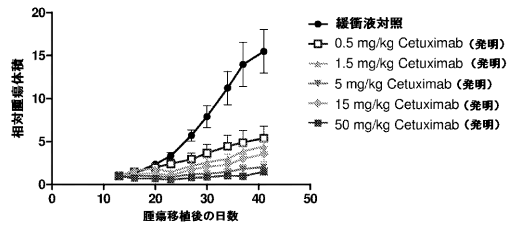
【図 1 7】

Figure 17



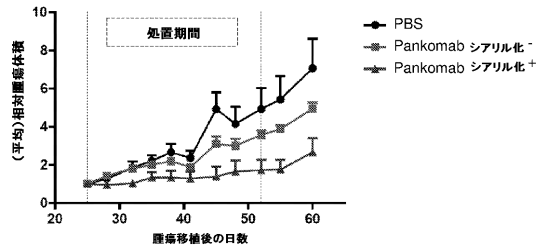
【図 18】

Figure 18



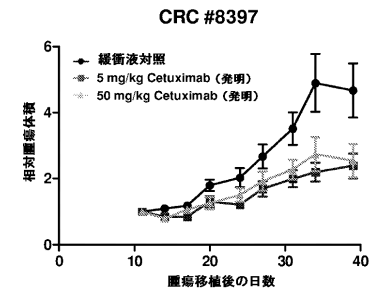
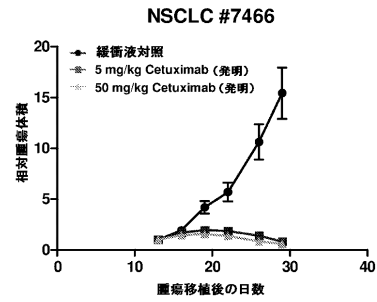
【図 19】

Figure 19



【図 20】

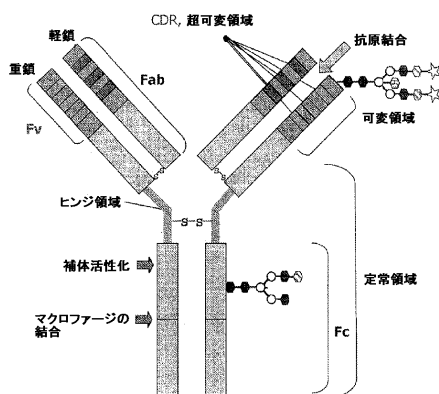
Figure 20



【図 21-1】

Figure 21

A

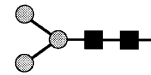


☆	= シアル酸
◻	= ガラクトース
◼	= GlcNAc
○	= マンノース
▽	= フコース
◻	= 二分歧性 GlcNAc

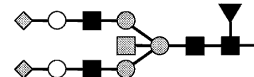
【図 21-2】

Figure 21 (続き)

B



C



【配列表】

0006334166000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ダニエルチク, アンチェ
ドイツ国 13125 ベルリン, ロベルトーロスレーシュトラーセ 10, グリコトープ
ゲーエムベーハー 気付
- (72)発明者 ステックル, ラルス
ドイツ国 13125 ベルリン, ロベルトーロスレーシュトラーセ 10, グリコトープ
ゲーエムベーハー 気付

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 山本 匡子
審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 国際公開第2008/28686 (WO, A2)
国際公開第2005/16455 (WO, A2)
国際公開第2008/101177 (WO, A2)
国際公開第2007/34210 (WO, A2)
国際公開第2003/16466 (WO, A2)
国際公開第2003/74679 (WO, A2)
国際公開第2004/65423 (WO, A2)
国際公開第2006/125207 (WO, A2)
国際公開第2009/126564 (WO, A2)
国際公開第2009/149185 (WO, A2)
国際公開第95/15769 (WO, A1)
特表2010-502204 (JP, A)
特表2009-504569 (JP, A)
特表平07-506339 (JP, A)
BIOCONJUGATE CHEMISTRY、2008. 03. 01、Vol. 19、 No. 3、p. 643-650
DRUG DISCOVERY TODAY、2007. 03. 27、Vol. 12、 No. 7-8、p. 319-326
CANCER BIOTHERAPY & RADIOPHARMACEUTICALS、2000.、Vol. 15、 No. 5、p. 507-515
JOURNAL OF IMMUNOLOGY、1995.、Vol. 154、 No. 11、p. 5919-5926
THE EMBO JOURNAL、英国、1991. 10. 01、Vol. 10 No. 10、p. 2717-2723
MOLECULAR IMMUNOLOGY、1995.、Vol. 32、No. 13、p. 931-940
The Journal of Biological Chemistry、2008.、Vol. 283、No. 12、p. 7804-7812
Clinical Cancer Research、1999.、Vol. 5、3106s-3117s

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
C12N 1/00-5/10
C07K 1/00-19/00
MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/REGISTORY/CA (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)