

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 18 年 1 月 19 日 (2006.1.19)

【公表番号】特表 2002-512014 (P2002-512014A)

【公表日】平成 14 年 4 月 23 日 (2002.4.23)

【出願番号】特願 2000-544680 (P2000-544680)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**A 6 1 K 39/395 (2006.01)**

**A 6 1 P 35/00 (2006.01)**

**C 0 7 H 21/04 (2006.01)**

**C 0 7 K 16/00 (2006.01)**

**C 1 2 N 1/15 (2006.01)**

**C 1 2 N 1/19 (2006.01)**

**C 1 2 N 1/21 (2006.01)**

**C 1 2 P 21/08 (2006.01)**

**C 1 2 N 5/10 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00

C 0 7 H 21/04

C 0 7 K 16/00

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 11 月 15 日 (2005.11.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N 結合型オリゴ糖を含む F c 領域を含む組換え抗体を産生する糖操作された宿主細胞であって、該抗体が、糖操作されていない同一の宿主細胞によって産生された対応する抗体と比較して、該 F c 領域において割合の増加した非フコシル化オリゴ糖を有し、そして該抗体が、該非フコシル化オリゴ糖の割合の増加の結果として、増加した F c 媒介性細胞傷害性を有する、糖操作された宿主細胞。

【請求項 2】 N 結合型オリゴ糖を含む F c 領域を含む組換え抗体を産生する糖操作された宿主細胞であって、該抗体が、糖操作されていない同一の宿主細胞によって産生された対応する抗体と比較して、該 F c 領域において割合の増加した非フコシル化オリゴ糖を有し、そして該抗体が、該非フコシル化オリゴ糖の割合の増加の結果として、増加した F c レセプター結合を有する、糖操作された宿主細胞。

【請求項 3】 前記宿主細胞が、少なくとも一つの糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの変化した活性を有するように操作された、請求項 1 または 2 に記載の

糖操作された宿主細胞。

【請求項 4】 前記宿主細胞が、少なくとも一つの糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの変化した発現を有するように操作された、請求項 3 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 5】 前記宿主細胞が、少なくとも一つの糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも一つの外来核酸分子で形質転換またはトランスフェクトされた、請求項 4 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 6】 前記少なくとも一つの糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、G n T I I I、G n T V、G a l T、M a n I I および F u c T からなる群より選択される、請求項 3 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 7】 前記糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの発現が増加する、請求項 4 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 8】 前記糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの発現が減少する、請求項 4 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 9】 前記糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、G n T I I I、M a n I I または G a l T である、請求項 7 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 10】 前記糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、- 1, 6 - コアフコシルトランスフェラーゼである、請求項 8 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 11】 前記宿主細胞が、C H O 細胞、B H K 細胞、N S 0 細胞、S P 2 / 0 細胞、酵母細胞および植物細胞からなる群より選択される、請求項 1 または 2 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 12】 前記宿主細胞が、C H O 細胞である、請求項 11 に記載の糖操作された宿主細胞。

【請求項 13】 請求項 1 または請求項 2 に記載の糖操作された宿主細胞により産生された抗体。

【請求項 14】 前記抗体の F c 領域中の優勢な N 結合型オリゴ糖が、フコシル化されていない、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】 前記抗体がキメラ抗体である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 16】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 17】 前記抗体が、免疫グロブリンの F c 領域を含む抗体フラグメントである、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 18】 前記抗体が、免疫グロブリンの F c 領域を含む融合タンパク質である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 19】 前記 F c 領域中の優勢な N 結合型オリゴ糖が、高マンノース構造ではない、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 20】 前記 N 結合型オリゴ糖を含む F c 領域が、糖操作されていない同一の宿主細胞によって産生された対応する抗体と比較して、割合の増加した G l c N A c 残基をさらに含む、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 21】 前記抗体が、糖操作されていない同一の宿主細胞によって産生された対応する抗体と比較して、フコース残基の割合に対して F c 領域中に割合の増加した G l c N A c 残基を有する抗体であって、該抗体が、前記糖操作の結果として増加した F c 媒介性細胞傷害性を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 22】 前記 G l c N A c 残基が二分岐である、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 23】 前記 G l c N A c 残基が、二分岐であり、該二分岐オリゴ糖が複合型のオリゴ糖である、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 24】 前記 G l c N A c 残基が、二分岐であり、該二分岐オリゴ糖が、ハイブリッド型のオリゴ糖である、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 25】 前記抗体が治療抗体である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 26】 前記抗体が、癌細胞によって差示的に発現された抗原に選択的に結合する、請求項 25 に記載の抗体。

【請求項 27】 前記抗体が、抗 CD20 抗体、抗ヒト神経芽細胞腫抗体、抗ヒト腎細胞癌抗体、抗 HER2 抗体、抗ヒト結腸癌抗体、抗ヒト肺癌抗体、抗ヒト乳癌抗体、抗ヒト 17-1A 抗原抗体、ヒト化抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体、抗ヒト黒色腫抗体、および抗ヒト扁平上皮癌抗体からなる群より選択される、請求項 26 に記載の抗体。

【請求項 28】 前記抗体が IgG である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 29】 前記抗体の Fc 領域中の N 結合型オリゴ糖の大部分が二分岐である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 30】 前記抗体の Fc 領域中の N 結合型オリゴ糖の大部分がフコシル化されていない、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 31】 前記抗体の Fc 領域中の N 結合型オリゴ糖の大部分が、二分岐であり、フコシル化されていない、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 32】 前記抗体が、ヒト Fc 領域を有する治療モノクローナル抗体であり、かつ癌細胞によって発現された抗原に選択的に結合する抗体であり、ここで、該抗体の Fc 領域におけるオリゴ糖の大部分がフコシル化されていない、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 33】 前記 Fc 領域におけるオリゴ糖の少なくとも 45% が複合構造である、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 34】 前記抗体が、同一の培養条件および精製条件下で、同一であるが、糖操作されていない宿主細胞によって産生された同一の抗体と比較して、最大 ADC 活性の少なくとも 80% の増加を示す、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 35】 糖操作された組換え抗体を作製するための方法であって、以下：

(a) 該糖操作された組換え抗体の作製を可能にする条件下で、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を培養する工程；および

(b) 培養培地から該糖操作された組換え抗体を回収する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 36】 標的細胞を死滅させるための方法であって、該細胞を請求項 13 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の抗体と接触させる工程であって、該抗体が該細胞によって発現された抗原を選択的に標的する、工程を包含する、方法。

【請求項 37】 前記標的細胞が、リンパ球の存在下で前記抗体と接触する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】 前記リンパ球が、ナチュラルキラー (NK) 細胞を含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】 前記標的細胞が、前記接触工程の結果として溶解する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】 前記標的細胞が、前記接触工程の結果としてアポトーシスする、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】 前記標的細胞がヒト癌細胞である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】 前記癌細胞が、ヒト神経芽細胞腫細胞、ヒト腎臓癌細胞、ヒト結腸癌細胞、ヒト肺癌細胞、ヒト乳癌細胞、ヒト結腸直腸腫瘍細胞、ヒト黒色腫細胞、ヒトリンパ腫細胞およびヒト扁平上皮癌細胞からなる群より選択される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】 前記抗体が、癌細胞で差示的に発現された抗原を選択的に標的する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 44】 前記抗体が、ヒト CD20 抗原に選択的に結合する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 45】 請求項 1 または 2 に記載の糖操作された宿主細胞であって、前記増加した Fc 媒介性細胞傷害性が、以下の標準的インビトロアッセイにおいて測定した場

合、抗体依存性細胞傷害性の増加によって決定される、宿主細胞であって、該標準的インビトロアッセイは、該抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが公知である生存能力のある標的細胞を使用し、かつヒト末梢血単核細胞（P B M C）をエフェクター細胞として使用し、以下の工程：

（i）該標的細胞を、細胞統合性に対するマーカーとして蛍光色素Calcein A Mを用いて標識する工程；

（i i）該標識された標的細胞の第一の部分入手し、その後該第一の部分、該標識された標的細胞の複数の等しい下位部分に分割する工程；

（i i i）該複数の等しい下位部分と同数の標識された標的細胞を有する該標識された標的細胞の第二の部分および第三の部分入手する工程；

（i v）該標識された標的細胞のそれぞれの該複数の等しい下位部分を、複数ウェルアッセイプレート中の種々の濃度の抗体と混合する工程であって、各濃度が三連で試験され、該種々の濃度の抗体が、種々のパーセントの固有の溶解を生じるように選択される、工程；

（v）全溶解制御部分を提供するために、該標識された標的細胞の第二の部分、該複数ウェルアッセイプレート中の該標識された標的細胞を溶解する洗浄剤と混合する工程；

（v i）自発的放出制御部分を提供するために、該標識された標的細胞の第三の部分、該複数ウェルアッセイプレート中の抗体を含まない培養培地と混合する工程；

（v i i）該複数の等しい下位部分、全溶解制御部分および自発的放出制御部分を含む該複数ウェルアッセイプレートを1時間インキュベートする工程；

（v i i i）エフェクター細胞を、該複数ウェルアッセイプレート中の該複数の等しい下位部分、全溶解制御部分、および自発的放出制御部分の各々に添加し、19：1のエフェクター細胞：標的細胞の比を生じさせ、そして、混合する工程；

（i x）該複数ウェルアッセイプレートを、5 % C O<sub>2</sub> 雰囲気下で、インキュベーター内で37 で16時間インキュベートする工程；

（x）該複数ウェルアッセイプレートの各ウェルから無細胞上清を廃棄する工程；

（x i）該複数ウェルアッセイプレート中の該標識された標的細胞を、緩衝化した生理食塩水溶液で洗浄する工程；

（x i i）該標識された標的細胞を、0 . 1 %（v / v）の最終濃度の非イオン性洗浄剤t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール中に溶解する工程；

（x i i i）該標的細胞の、実験的に保持された蛍光（E F）を蛍光光度計により測定する工程であって；

ここで、各抗体濃度に対する特異的な細胞溶解の百分率が、式 $(S R - E F) / (S R - M R) \times 100$ に従って計算され、E Fは、所定の抗体濃度に対して測定された平均蛍光であり、M Rは、該全溶解制御部分に対して測定された平均蛍光であり、S Rは、該自発的放出制御部分に対して測定された平均蛍光であり、ここで、抗体依存性細胞傷害性における増加が、試験した抗体濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大百分率における増加、および／または、試験した抗体濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大百分率の二分の一を達成するのに必要な抗体の濃度における減少として測定される、工程を包含するアッセイである、宿主細胞。

【請求項46】 請求項35に記載の方法であって、前記増加したF c媒介性細胞傷害性が、以下の標準的インビトロアッセイにおいて測定した場合、抗体依存性細胞傷害性の増加によって決定される、宿主細胞であって、該標準的インビトロアッセイは、該抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが公知である生存能力のある標的細胞を使用し、かつヒト末梢血単核細胞（P B M C）をエフェクター細胞として使用し、以下の工程：

（i）該標的細胞を、細胞統合性に対するマーカーとして蛍光色素Calcein A Mを用いて標識する工程；

（i i）該標識された標的細胞の第一の部分入手し、その後該第一の部分、該標識された標的細胞の複数の等しい下位部分に分割する工程；

( i i i ) 該複数の等しい下位部分と同数の標識された標的細胞を有する該標識された標的細胞の第二の部分および第三の部分を入力する工程；

( i v ) 該標識された標的細胞のそれぞれの該複数の等しい下位部分を、複数ウェルアッセイプレート中の種々の濃度の抗体と混合する工程であって、各濃度が三連で試験され、該種々の濃度の抗体が、種々のパーセントの固有の溶解を生じるように選択される、工程；

( v ) 全溶解制御部分を提供するために、該標識された標的細胞の第二の部分、を、該複数ウェルアッセイプレート中の該標識された標的細胞を溶解する洗浄剤と混合する工程；

( v i ) 自発的放出制御部分を提供するために、該標識された標的細胞の第三の部分、を、該複数ウェルアッセイプレート中の抗体を含まない培養培地と混合する工程；

( v i i ) 該複数の等しい下位部分、全溶解制御部分および自発的放出制御部分を含む該複数ウェルアッセイプレートを1時間インキュベートする工程；

( v i i i ) エフェクター細胞を、該複数ウェルアッセイプレート中の該複数の等しい下位部分、全溶解制御部分、および自発的放出制御部分の各々に添加し、19：1のエフェクター細胞：標的細胞の比を生じさせ、そして、混合する工程；

( i x ) 該複数ウェルアッセイプレートを、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下で、インキュベーター内で37℃で16時間インキュベートする工程；

( x ) 該複数ウェルアッセイプレートの各ウェルから無細胞上清を廃棄する工程；

( x i ) 該複数ウェルアッセイプレート中の該標識された標的細胞を、緩衝化した生理食塩水溶液で洗浄する工程；

( x i i ) 該標識された標的細胞を、0.1%(v/v)の最終濃度の非イオン性洗浄剤t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール中に溶解する工程；

( x i i i ) 該標的細胞の、実験的に保持された蛍光(EF)を蛍光光度計により測定する工程であって；

ここで、各抗体濃度に対する特異的な細胞溶解の百分率が、式 $(SR - EF) / (SR - MR) \times 100$ に従って計算され、EFは、所定の抗体濃度に対して測定された平均蛍光であり、MRは、該全溶解制御部分に対して測定された平均蛍光であり、SRは、該自発的放出制御部分に対して測定された平均蛍光であり、ここで、抗体依存性細胞傷害性における増加が、試験した抗体濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大百分率における増加、および/または、試験した抗体濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大百分率の二分の一を達成するのに必要な抗体の濃度における減少として測定される、工程を包含するアッセイである、方法。