

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

公告本

772310

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97139552

※申請日期：97年10月15日

※IPC分類：

C12N¹⁵/₀₉ (2006.01)

C12N⁵/₁₀ (2006.01)

C12P²¹/₀₀ (2006.01)

一、發明名稱：

(中) 抗體之製造方法
(英)

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 中外製藥股份有限公司
(英) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
代表人：(中) 1. 永山 治
(英) 1. NAGAYAMA, OSAMU
地址：(中) 日本國東京都北區浮間五丁目五番一號
(英) 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543 Japan
國籍：(中英) 日本 JAPAN

三、發明人：(共 5 人)

1. 姓名：(中) 山田 良樹
(英) YAMADA, YOSHIKI
國籍：(中) 日本
(英) JAPAN

2. 姓名：(中) 喜安 達也
(英) KIYASU, TATSUYA
國籍：(中) 日本
(英) JAPAN

3. 姓名：(中) 田畑 和之
(英) TABATA, KAZUYUKI
國籍：(中) 日本
(英) JAPAN

4. 姓名：(中) 葛卷 章浩
(英) KUZUMAKI, AKIHIRO
國籍：(中) 日本

(英) JAPAN

5.姓 名：(中) 山城 舞
(英) YAMASHIRO, MAI
國 籍：(中) 日本
(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本 ; 2007/10/15 ; 2007-267384 ☒ 有主張優先權
2. 日本 ; 2008/04/11 ; 2008-103308 ☒ 有主張優先權

五、中文發明摘要

發明名稱：抗體之製造方法

本發明係提供可效率佳且廉價地生產基因重組抗體之方法。

包含使用令含編碼抗體之 L 鏈（輕鏈）或該片段之外來 DNA 之複製數（copy number）比編碼抗體之 H 鏈（重鏈）或該片段之外來 DNA 多之細胞，使其生產抗體或該片段之抗體或該片段之製造方法。亦提供含 1 個複製之編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA 之重組載體及轉型細胞等。

六、英文發明摘要

發明名稱：

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第 (2) 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗體之製造方法。

【先前技術】

使用基因重組技術，生產醫藥上有效之重組抗體時，使用動物細胞時，因為可進行原核細胞不能進行複雜的轉譯後修飾或折疊，所以多使用動物細胞作為生產重組抗體用之宿主細胞。

近年來，抗體或生理活性蛋白質等之許多生物醫藥品大量出現。尤其，抗體醫藥時，通常 1 次的投予量係 mg 階級，作為具有相當量之活性成份之抗體係必要的。使動物細胞有效率地生產重組抗體之技術係與抗體醫藥品之低成本化相關，約定提供安定的供給於患者。

因此，要求產生效率更高的重組抗體之製造方法。

製作生產重組抗體用之宿主細胞時，通常各導入 1 個複製之編碼該抗體之 H 鏈之 DNA 及 1 個複製之編碼 L 鏈之 DNA 於宿主細胞（非專利文獻 1 及 2）。

非專利文獻 1：Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 1994 Jan 15;83 (2):435-45.

非專利文獻 2：Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of

an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res. 1997 Oct 15; 57 (20):4593-9.

【發明內容】

發明之揭示

發明所欲解決之課題

另一方面，至今仍未知導入 1 個複製之編碼所需重組抗體之 H 鏈之 DNA、2 個複製以上之編碼 L 鏈之 DNA 之轉型穩定表現細胞，是否幫助提升所需重組抗體生產。

本發明係以提供高生產抗體之方法為目的。

課題之解決手段

本發明係為努力解決上述課題，努力的結果係藉由使用含編碼抗體之 L 鏈之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈之外來 DNA 多之細胞，發現可使抗體產生量增加，而完成本發明。

本發明之要旨係如下所述。

(1) 包含使用含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞，使其生產抗體或該片段之抗體或該片段之製造方法。

(2) 如 (1) 記載之方法，其中含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段

之外來 DNA 多之細胞，係已導入含 1 個複製之編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA 之載體之細胞。

(3) 如 (2) 記載之方法，其中細胞為動物細胞。

(4) 如 (3) 記載之方法，其中動物細胞係中國倉鼠卵巢細胞。

(5) 如 (1) 至 (4) 中任一項記載之方法，其中抗體係嵌合體抗體、人源化抗體或人類抗體。

(6) 如 (1) 至 (5) 中任一項記載之方法，其中抗體係選自抗 IL-6 受體抗體、抗 IL-6 抗體、抗 Glypican-3 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 GPII b/III a 抗體、抗 TNF 抗體、抗 CD25 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 Her2/neu 抗體、抗 RSV 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD52 抗體、抗 IgE 抗體、抗 CD11a 抗體、抗 VEGF 抗體及抗 VLA4 抗體所成群。

(7) 製造含有以 (1) 至 (6) 中任一項記載之方法所製造之抗體或該片段之醫藥品之方法。

(8) 含 1 個複製之編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA、2 個複製以上之編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之重組載體。

(9) 導入有 (8) 記載之載體之細胞。

(10) 含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之培養細胞。

(11) 包含使用表現編碼抗體之 L 鏈或該片段比表現編碼抗體之 H 鏈或該片段高之細胞，使其產生抗體或該片段之抗體或該片段之製造方法。

(12) 如 (1) 至 (7)、(11) 中任一項記載之方法，其中細胞係穩定表現 (stable expression) 抗體或該片段之細胞。

(13) 如 (9) 或 (10) 記載之細胞，其係穩定表現抗體或該片段。

發明之功效

依據本發明，將可廉價地產生所需之重組抗體。

本說明書係包含本申請書之優先權基礎之日本專利申請，特願 2008-103308 之說明書及／或圖式所記載之內容。

用以實施發明之最佳型態

以下係更詳細地說明關於本發明之實施型態。

本發明係提供包含使用含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞，使其生產抗體或該片段之抗體或該片段之製造方法。

本發明之方法中，含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞係例如已導入 1 個複製之編碼所需重組抗體之 H

鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼 L 鏈或該片段之 DNA 之轉型細胞，而且可為生產所需重組抗體或該片段之細胞。

本發明之方法中，所需重組抗體並無特別限制，例如可為抗 IL-6 受體抗體、抗 IL-6 抗體、抗 Glypican-3 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 GPIIb/IIIa 抗體、抗 TNF 抗體、抗 CD25 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 Her2/neu 抗體、抗 RSV 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD52 抗體、抗 IgE 抗體、抗 CD11a 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 VLA4 抗體等之對任何抗原之重組抗體。抗體係不僅來自人、小鼠、大鼠、倉鼠、兔子、猴子等動物之單株抗體，亦包含嵌合體抗體、人源化抗體、或 bispecific（雙特異性）抗體等之經人為改變之基因重組型抗體。重組抗體亦可進行使與聚乙二醇等之各種分子鍵結等之化學修飾。另外，抗體之型態亦非特別限定者，抗體之免疫球蛋白型態並非特別限定者，雖可為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等之 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 等之任一種型態，但作為醫藥使用時，以 IgG 及 IgM 為宜。

編碼抗體之 L 鏈之 DNA 及編碼 H 鏈之 DNA 係可如下述調製。自具有表現抗體之基因之融合瘤（hybridoma）、細胞、噬菌體、核糖體等，萃取 mRNA。藉由使用反轉錄酵素之反轉錄反應，依此 mRNA 製作 cDNA。藉由使用具有與 L 鏈基因或 H 鏈基因成互補鹽基序列之引子以及 cDNA 之 PCR，增幅 L 鏈基因或 H 鏈基因，藉由與選

殖用質體鍵結而取得各基因。

本發明之方法中，作為所需重組抗體之片段，可列舉 Fab、F(ab')₂、Fv 等。

編碼抗體之 L 鏈片段之 DNA 及編碼 H 鏈片段之 DNA 係可如下述調製。自具有表現抗體之基因之融合瘤、細胞、噬菌體、核糖體等，萃取 mRNA。藉由使用反轉錄酵素之反轉錄反應，依此 mRNA 製作 cDNA。藉由使用具有與 L 鏈基因片段或 H 鏈基因片段互補鹽基序列之引子以及 cDNA 之 PCR，增幅 L 鏈基因片段或 H 鏈基因片段，藉由與選殖用質體鍵結而取得各基因片段。

本發明者等發現藉由使用已導入 1 個複製之編碼重組抗體之 H 鏈之 DNA、2 個複製以上之編碼 L 鏈之 DNA 之轉型細胞，與通常製造重組抗體所使用之導入 1 個複製之編碼 H 鏈之 DNA、1 個複製之編碼 L 鏈之 DNA 之轉型細胞相比較，所需重組抗體之產生量明顯優異地增加。

構成抗體分子之 H 鏈多胜肽及 L 鏈多胜肽係以 BiP（免疫球蛋白重鏈結合蛋白質，Immunoglobulin heavy chain binding protein）之支架組合，之後，藉由折疊，完成完全的抗體結構。此組合過程係依賴 L 鏈多胜肽（Molecular Biology of the Cell, 1990, 10, 2209）。因此，藉由提高 L 鏈基因數比，提高 L 鏈多胜肽之比率，認為促進 H 鏈多胜肽及 L 鏈多胜肽組合，增加產生量。

然而，於穩定表現系（Stable Expression）表現重組抗體之穩定表現轉型細胞（Stable Transformant）時，因

爲比暫時性表現系 (Transient Expression) 者之 H 鏈表現量低，所以顯示 H 鏈表現量更重要 (Biotechnol. Prog., 2005, 21, 122) 。因此，於穩定表現系時，爲增加抗體之產生量，如何控制 H 鏈與 L 鏈之表現量之比，完全不知。

編碼重組抗體之 L 鏈或該片段之 DNA 數相對於編碼 H 鏈或該片段之 DNA 數之比係只要大於 1 即可，以 1.1 以上，5 以下爲宜，以 2 最好。

作爲含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞，可舉例如已導入含編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA 之載體 (例如 1 個) 與含編碼 L 鏈或該片段之 DNA 比該載體數量多之載體 (例如 2 個以上) 之細胞、已導入 1 個以上於相同載體內含 1 個複製之編碼 H 鏈或該片段之 DNA 與 1 個複製之編碼 L 鏈或該片段之 DNA 之載體以及含 1 個複製之編碼 L 鏈或該片段之 DNA 之載體之細胞、已導入於相同載體內含 1 個複製之編碼 H 鏈或該片段之 DNA 與 2 個複製以上之編碼 L 鏈或該片段之 DNA 之載體之細胞等，以已導入於相同載體內含 1 個複製之編碼 H 鏈或該片段之 DNA 與 2 個複製以上之編碼 L 鏈或該片段之 DNA 之載體之細胞爲宜。

1 個複製之編碼 H 鏈或該片段之 DNA 與 2 個複製以上之編碼 L 鏈或該片段之 DNA 中至少 1 個複製係存在於其他載體時，導入此等載體的順序並無特別的限制，可分

別導入此等載體，亦可同時導入。

本發明中使用於抗體表現的細胞並無特別的限制，可為動物細胞、植物細胞、酵母等之真核細胞、大腸桿菌、枯草菌等之原核細胞等之任何細胞，以 CHO 細胞、COS 細胞、3T3 細胞、骨髓瘤細胞、BHK 細胞、HeLa 細胞、Vero 細胞等之動物細胞為宜，以 CHO 細胞尤佳。另外，為製造所需抗體，以適合導入 CHO dhfr-細胞等所需基因之細胞為宜。例如由基因工程操作，可培養嵌入編碼所需抗體之基因之 COS 細胞或 CHO 細胞。

作為本發明之方法可使用之載體，例如以大腸桿菌為宿主時，為使載體於大腸桿菌（例如 JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）等大量增幅，大量調製時，具有於大腸桿菌所增幅用之「ori」，進而具有經轉型之大腸桿菌之篩選基因（例如，可由某種藥劑（氨比西林或四環黴素、康那黴素、氯黴素）判別之抗藥性基因）為宜。作為載體，可舉例如 M13 系載體、pUC 系載體、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。另外，以 cDNA 之次選殖、切出為目的時，除了上述載體以外，可舉例如 pGEM-T、pDIRECT、pT7 等。生產本發明之抗體或該片段之目的，使用載體時，表現載體尤其有效。作為表現載體，例如於大腸桿菌之表現為目的時，除了具有載體於大腸桿菌增幅之上述特徵以外，以宿主為 JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue 等之大腸桿菌時，於大腸桿菌具有可有效地表現之啟動子，例如 lacZ 啟動子（Ward 等，Nature (1989)

341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、 araB 啓動子 (Better 等 , Science (1988) 240, 1041-1043) 、 或 T7 啓動子等爲宜。作爲如此載體，除了上述載體以外，可列舉 pGEX-5X-1 (Pharmacia 公司製) 、 「 QIAexpress system」 (Qiagen 公司製) 、 pEGFP、或 pET (此時，宿主係以表現 T7RNA 聚合酶之 BL21 爲宜) 等。

另外，對於載體，亦可含分泌多胜肽用之訊號序列。作爲分泌多胜肽用之訊號序列，使大腸桿菌之細胞間質產生時，可使用 pelB 訊號序列 (Lei, S.P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) 。導入載體於宿主細胞係可使用例如氯化鈣法、電穿孔法 (electroporation) 進行。

大腸桿菌爲宿主之外，例如作爲本發明之方法可使用之載體，可列舉來自哺乳動物之表現載體 (例如 pcDNA3 (Invitrogen 公司製) 、或 pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18 (17), p5322) 、 pEF、pCDM8 或 INPEP4 (Biogen-IDEC 公司製)) 、來自昆蟲細胞之表現載體 (例如 「 Bac-to-BAC baculovairus expression system) (GIBCO BRL 公司製) 、 pBacPAK8) 、來自植物之表現載體 (例如 pMH1、pMH2) 、來自動物病毒之表現載體 (例如 pHSV、pMV、pAdexLcw) 、來自腺病毒之表現載體 (例如 pZIpneo) 、來自酵母之表現載體 (例如 「 Pichia Expression Kit) (Invitrogen 公司製) 、 pNV11、SP-Q01) 、來自枯草菌之表現載體 (例如 pPL608、pKTH50) 等。

於 CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等動物細胞之表現為目的時，以具有用以使於細胞內表現必須的啟動子，例如 SV40 啟動子（Mulligan 等，Nature (1979) 277,108）、MMLV-LTR 啟動子、EF1 α 啟動子（Mizushima 等，Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMV 啟動子（Niwa 等，Gene. (1991) 108, 193）、小鼠 β 球蛋白（mBGP）等為宜，若具有用以對細胞進行轉型篩選之基因（例如，可由藥劑（例如新黴素、G418 等）判別之耐藥性基因）尤佳。作為具有如此特性之載體，可舉例如 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 等。已知具有 polyA 之 mRNA 係於細胞內安定，為加成 polyA 於基因所需之 polyA 訊號係以具有例如小鼠 β 球蛋白 polyA 訊號、牛成長激素 polyA 訊號、SV40 polyA 訊號等為宜。

本發明之細胞係可於暫時性表現系（Transient Expression）表現抗體或該片段，亦可於穩定表現系（Stable Expression）表現，但以於穩定表現系表現者為宜。

所謂暫時性表現系係藉由磷酸鈣法、電穿孔法、脂質轉染（lipofection）法等，嵌入環狀質體於細胞內而使表現之方法。環狀質體插入於染色體之效率低，目的基因多存在於染色體外。因此，難以長期間維持來自環狀質體之目的基因之表現。

所謂穩定表現系係藉由磷酸鈣法、電穿孔法、脂質轉染法等，嵌入藉由限制酵素處理等製成之直鏈狀質體於細

胞內而使表現之方法。直鏈狀質體比環狀質體被插入於染色體之效率高，維持目的基因於染色體上之效率亦變高。因此，可長期間維持目的基因之表現。另外，若導入抗藥性基因於質體，將可篩選藥劑，將可有效率地選擇維持目的基因於染色體上之細胞。作為穩定表現系使用之動物細胞，可列舉 CHO 細胞、NSO 細胞、SP2/0 細胞等，以 CHO 細胞為宜。

另外，使基因安定地表現，而且增幅細胞內基因之複製數為目的時，可列舉於欠缺核酸合成途徑之 CHO 細胞中，導入具有與其互補之 DHFR 基因之載體（例如 pCHOI 等），藉由甲基蝶啶胺（MTX）增幅之方法，另外，以基因之暫時性表現為目的時，列舉使用於染色體上具有表現 SV40 T 抗原之基因之 COS 細胞，以具有 SV40 之複製起點之載體（pcD 等）進行轉型之方法。作為複製開始點，另外亦可使用來自多瘤病毒（polyoma virus）、腺病毒（Adenovirus）、牛乳頭狀瘤病毒（BPV）等者。另外，為於宿主細胞系增幅基因複製數，表現載體作為選擇標誌，可含胺基糖苷轉移酶（aminoglycoside transferase）（APH）基因、胸腺嘧啶核苷磷酸酶（Thymidine kinase）（TK）基因、大腸桿菌黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶（xanthine-guanine phosphoribosyltransferase）（Ecogpt）基因、二氫葉酸還原酵素（dhfr）基因等。

本發明亦提供含 1 個複製之編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼抗體之 L 鏈或該片段之

DNA 之載體。

本發明之載體係有效地於宿主細胞內保持編碼重組抗體或該片段之 DNA、或用以使表現重組抗體或該片段。藉由導入 1 個複製之編碼重組抗體之 H 鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼 L 鏈或該片段之 DNA，促進 H 鏈多胜肽組合於抗體分子，可依宿主細胞增加所需之重組抗體或該片段產生。

另外，本發明係提供導入本發明載體之宿主細胞。導入本發明載體之宿主細胞並無限制，例如可使用大腸桿菌或各種動物細胞等。本發明之宿主細胞係可作為例如本發明之抗體或該片段之製造或表現用之生產系使用。作為製造多胜肽用之生產系，有 *in vitro*（體外）及 *in vivo*（體內）之生產系。作為 *in vitro* 生產系，可列舉使用真核細胞之生產系或使用原核細胞之生產系等。

使用真核細胞時，可使用例如動物細胞、植物細胞、真菌細胞作為宿主。已知作為動物細胞，哺乳類動物，例如 CHO（*J. Exp. Med.* (1995) 108, 945）、COS、3T3、骨髓瘤、BHK（baby hamster kidney，幼倉鼠腎臟）、HeLa、Vero、兩棲類細胞，例如非洲爪蟾卵母細胞（Valle, et al., *Nature* (1981) 291, 358-340）、或昆蟲細胞，例如 Sf9、Sf21、Tn5。作為 CHO 細胞，尤其可適合使用欠缺 DHFR 基因之 CHO 細胞之 dhfr-CHO（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, 4216-4220）或 CHO K-1（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1968) 60, 1275）。動物細胞中，以大量

表現爲目的時，以 CHO 細胞尤佳。導入載體於宿主細胞係可以例如磷酸鈣法、DEAE 葡聚糖法、使用 1,2-二油烯氧基-3-三甲氨基丙烷 (cationic liposome DOTAP) (Boehringer Manneheim 社製) 之方法、電穿孔法、脂質轉染法等之方法進行。

作爲植物細胞，已知例如來自煙草 (*Nicotiana tabacum*) 之細胞係作爲多胜肽生產系，可將其進行癒傷組織培養。作爲真菌細胞，已知酵母，例如酵母 (*Saccharomyces*) 屬，如釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，絲狀菌，例如麴菌 (*Aspergillus*) 屬，如黑麴菌 (*Aspergillus niger*)。

使用原核細胞時，有使用細菌細胞之生產系。作爲細菌細胞，可列舉大腸桿菌 (*E. coli*)，例如 JM109、DH5 α 、HB101 等，其他之枯草菌。

將此等細胞，藉由目的基因進行轉型，藉由 *in vitro* (體外) 培養經轉型之細胞，可得到編碼目的基因之多胜肽。培養係可依據已知方法進行。例如，作爲動物細胞之培養液，可使用例如 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。此時，亦可併用牛胎兒血 (FCS) 等之血清補充液，亦可進行無血清培養。培養時之 pH 係以約 6 至 8 爲宜。培養係通常以約 30 至 40℃，進行約 15 至 200 小時，因應需要，加上交換培養基、通氣、攪拌。

藉由培養含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞

，可使此細胞中之抗體或該片段比傳統表現高。培養含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞，可使用通常細胞（以動物細胞為宜）培養所使用之培養基。此等中通常係含胺基酸、維生素類、脂質因子、能量來源、滲透壓調節劑、鐵來源、pH 緩衝劑。此等成份之適當含量範圍，通常胺基酸為 0.05-1500mg/L、維生素類為 0.001-10mg/L、脂質因子為 0-200mg/L、能量來源為 1-20g/L、滲透壓調節劑為 0.1-10000mg/L、鐵來源為 0.1-500mg/L、pH 緩衝劑為 1-10000mg/L、微量金屬元素為 0.00001-200mg/L、界面活性劑為 0-5000mg/L、增殖輔助因子為 0.05-10000 μ g/L 及核苷為 0.001-50 mg/L，但並不局限於此等，可依培養細胞之種類、所需重組抗體或該片斷之種類等適當決定。

上述成份之外，亦可添加例如微量金屬元素、界面活性劑、增殖輔助因子、核苷等。

具體上，可舉例如含左旋－丙胺酸、左旋－精胺酸、左旋－天冬醯胺、左旋－天冬胺酸、左旋－半胱胺酸、左旋－胱胺酸、左旋－麩胺醯胺、左旋－麩胺酸、甘胺酸、左旋－組織胺酸、左旋－異白胺酸、左旋－白胺酸、左旋－賴胺酸、左旋－甲硫胺酸、左旋－鳥胺酸、左旋－苯丙胺酸、左旋－脯胺酸、左旋－絲胺酸、左旋－蘇胺酸、左旋－色胺酸、左旋－酪胺酸、左旋－纈胺酸等，以左旋－丙胺酸、左旋－精胺酸、左旋－天冬醯胺、左旋－天冬胺

酸、左旋－朧胺酸、左旋－麩胺醯胺、左旋－麩胺酸、甘胺酸、左旋－組織胺酸、左旋－異白胺酸、左旋－白胺酸、左旋－賴胺酸、左旋－甲硫胺酸、左旋－苯丙胺酸、左旋－脯胺酸、左旋－絲胺酸、左旋－蘇胺酸、左旋－色胺酸、左旋－酪胺酸、左旋－纈胺酸等為宜之胺基酸類；L-異肌醇、生物素、葉酸、核酸、菸鹼醯胺、菸鹼酸、對胺基苯甲酸、泛酸鈣、吡哆醛鹽酸鹽、吡哆醇鹽酸鹽、核黃素、鹽酸硫胺素、維生素 B12、抗壞血酸等，以生物素、葉酸、核酸、菸鹼醯胺、泛酸鈣、吡哆醛鹽酸鹽、核黃素、鹽酸硫胺素、維生素 B12、抗壞血酸等為宜之維生素類；氯化膽鹼、重酒石酸膽鹼、亞油酸、油酸、膽固醇等，以氯化膽鹼等為宜之脂質因子；葡萄糖、半乳糖、甘露糖、果糖等，以葡萄糖等為宜之能量來源；氯化鈉、氯化鉀、硝酸鉀等，以氯化鈉等為宜之滲透壓調節劑；EDTA 鐵、檸檬酸鐵、氯化亞鐵、氯化鐵、硫酸亞鐵、硫酸鐵、硝酸鐵等，以氯化鐵、EDTA 鐵、檸檬酸鐵等為宜之鐵來源類；碳酸氫鈉、氯化鈣、磷酸二氫鈉、HEPES、MOPS 等，以碳酸氫鈉等為宜之 pH 緩衝劑之培養基。

上述成份以外，亦可添加例如硫酸銅、硫酸錳、硫酸鋅、硫酸鎂、氯化鎳、氯化錫、氯化鎂、亞矽酸鈉等，以硫酸銅、硫酸鋅、硫酸鎂等為宜之微量金屬元素；Tween80、Pluronic F-68 等之界面活性劑；及重組型胰島素、重組型 IGF-1、重組型 EGF、重組型 FGF、重組型 PDGF、重組型 TGF- α 、鹽酸乙醇胺、亞硒酸鈉、A 酸、

鹽酸腐胺等，以亞硒酸鈉、鹽酸乙醇胺、重組型 IGF-1、鹽酸腐胺等為宜之增殖輔助因子；去氧腺嘌呤核苷、去氧胞嘧啶核苷、去氧鳥糞嘌呤核苷、腺嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、鳥糞嘌呤核苷、尿嘧啶核苷等之核苷等。另外，上述培養基之適合例中，亦可含鏈黴素、青黴素 G 鉀及慶大黴素等之抗生素、或酚紅等之 pH 指示劑。

培養基之 pH 係依培養細胞而異，但一般為 pH6.8～7.6，大部份的情況係以 pH7.0～7.4 為適當。

培養基係亦可使用市售之動物細胞培養用培養基，例如 D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle medium)、D-MEM/F-12 1:1 Mixture (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12)、RPMI1640、CHO-S-SFM II (Invitrogen 公司)、CHO-SF (Sigma-Aldrich 公司)、EX-CELL 301 (JRH biosciences 公司)、CD-CHO (Invitrogen 公司)、IS CHO-V (Irvine Scientific 公司)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich 公司) 等之培養基。

另外，培養基係無血清培養基。

細胞為 CHO 細胞時，CHO 細胞之培養係可使用該業者已知之方法進行。例如，通常氣相之 CO₂ 濃度係 0-40%，以 2-10% 之環境下為宜，為 30-39℃，以 37℃ 程度為宜，可進行培養。

為產生所需重組抗體或該片段，適當的細胞培養期間，通常為 1 天至 3 個月，以 1 天至 2 個月為宜，以 1 天至 1 個月尤佳。

另外，作為動物細胞培養用之各種培養裝置，可使用例如發酵槽型桶培養裝置、氣舉式培養裝置、培養瓶（culture flask）式培養裝置、旋轉角瓶（spinner flask）式培養裝置、微載體（microcarrier）式培養裝置、流動層式培養裝置、中空纖維（Hollow-fiber）式培養裝置、滾瓶式培養裝置、填充槽式培養裝置等進行培養。

培養雖可使用批式培養（batch culture）、饋料批式培養（fed-batch culture）、連續培養（continuous culture）等中任一種方法，但以饋料批式培養或連續培養為宜，以饋料批式培養尤佳。

另一方面，作為於 in vivo 生產抗體或該片斷之系統，可舉例如使用動物之產生系或使用植物之產生系。藉由導入目的基因於此等之動物或植物，使動物或植物的體內生產多胜肽，進行回收。本發明中所謂「宿主」係包含此等動物、植物。

使用動物時，有使用哺乳類動物、昆蟲之生產系。作為哺乳類動物，可使用羊、豬、綿羊、小鼠、牛（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。另外，使用哺乳類動物時，可使用基因轉殖動物。

基因轉殖動物之製造方法係已知。例如依據 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384（1980）記載的方法，可得到基因轉殖動物。具體上，導入目的基因於哺乳動物之全能細胞，使個體生產此細胞。所得之個體中，藉由篩選嵌入導入基因於體細胞及生殖細胞中之個體，可製作目

的之基因轉殖動物。作為導入基因之全能細胞，除了受精卵或初期胚胎以外，可舉例如具有多分化能之如 ES 細胞之培養細胞。

例如，調製目的基因（本發明中，編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA 與編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA）與編碼山羊 β 酪蛋白之乳汁中原有所產生之多胜肽之基因作為融合基因。接著，注入含此融合基因之基因片段於山羊胚胎中，移植此胚胎於母山羊。自接受胚胎的山羊所生之基因轉殖羊或該子孫產生的乳汁，可得到目的多胜肽（本發明中之抗體或該片段）。為增加由基因轉殖羊所生產之含多胜肽之乳汁，亦可使用適當的激素於基因轉殖羊（Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702）。

另外，作為昆蟲，例如可使用蠶。使用蠶時，藉由使蠶感染插入編碼目的多胜肽之基因（本發明中，編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA 與編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA）之桿狀病毒（baculovirus），可自此蠶的體液，得到目的多胜肽（Susumu, M. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594）。

另外，使用植物時，可使用例如菸草。使用菸草時，插入編碼目的多胜肽之基因（本發明中，編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA 與編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA）於植物表現用載體，例如 pMON 530，導入此載體於如農桿菌（*Agrobacterium tumefaciens*）之桿菌。使菸草，例

如 (*Nicotiana tabacum*) 感染此桿菌，可由本菸草葉，得到所需多胜肽 (本發明中之抗體或該片段) (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138) 。

本發明亦提供含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之培養細胞。培養細胞係如上所述。

另外，本發明亦提供包含使用表現抗體之 L 鏈或該片段比抗體之 H 鏈或該片段高之細胞，使產生抗體或該片段之抗體或該片段之製造方法。作為表現抗體之 L 鏈或該片段比抗體之 H 鏈或該片段高之細胞，可列舉含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之培養細胞，如此細胞係如上所述。藉由培養表現抗體之 L 鏈或該片段比抗體之 H 鏈或該片段高之細胞，可使此細胞生產抗體或該片段。培養基或培養條件等係如上所述。

作為以本發明之製造方法所生產之抗體，不僅來自人、小鼠、大鼠、倉鼠、兔子、猴子等動物之單株抗體，亦包含嵌合體抗體、人源化抗體、或 bispecific (雙特異性) 抗體等之人為改變之基因重組型抗體。另外，抗體之型態亦非特別限定者，抗體之免疫球蛋白型態並非特別限定者，雖可為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等之 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM 等之任一種型態，但作為醫藥使用時，以 IgG 及 IgM 為宜。另外，作為本發明之抗體，不僅 whole 之抗體，亦可包含 Fv、Fab、F(ab)₂ 等之抗體片段。

將以本發明之方法製造之抗體，進一步作為抗體修飾物，亦可使與聚乙二醇（PEG）等之各種分子鍵結，作為抗體修飾物使用。得到如此之抗體修飾物係可由施以化學修飾於所得抗體而得。此等方法係已於此領域確立。

上述本發明之抗體係可由該業者已知之方法製作。

生產單株抗體之融合瘤係基本上使用已知技術，如下述製作。亦即，使用所需抗原或表現所需抗原之細胞作為敏化抗原，將其依據通常的免疫方法進行免疫，將所得之免疫細胞，由通常之細胞融合法，使與已知親代細胞融合，由通常之篩選法，篩選生產單株抗體之細胞（融合瘤）而可製作。製作融合瘤係可依據例如 Milstein 等之方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73:3-46）等進行。抗原之免疫原性低時，使與白蛋白等之具有免疫原性之巨大分子鍵結，進行免疫即可。

另外，自融合瘤篩選抗體基因，嵌入於適當的載體，將其導入宿主，可使用基因重組技術而使生產之基因重組型抗體（例如參考 Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990）。具體上，使用反轉錄酵素，依融合瘤之 mRNA 合成抗體之可變區（V 區）之 cDNA。若得到編碼目的之抗體之 V 區之 DNA，連接其與所需之編碼抗體恆定區（C 區）之 DNA，嵌入其於表現載體。或亦可嵌入編碼抗體之 V 區之 DNA 於含抗體 C 區之 DNA

之表現載體。表現控制區係嵌入於表現載體，於例如增強子、啟動子之控制下表現。接著，可藉此表現載體，將宿主細胞轉型，使表現抗體。

本發明中，使對人之異種抗原性降低等為目的，可使用人為改變之基因重組型抗體，例如嵌合體（Chimeric）抗體、人源化（Humanized）抗體等。此等改變抗體係可使用已知方法製造。嵌合體抗體係人類以外之哺乳動物，例如小鼠抗體之重鏈、輕鏈之可變區及人抗體之重鏈、輕鏈之恆定區所成之抗體，連接編碼小鼠抗體之可變區之 DNA 與編碼人類抗體之恆定區之 DNA，將其嵌入表現載體，導入宿主，使生產而可得。

人源化抗體亦稱為再構成（reshaped）人類抗體，將人以外之哺乳動物，例如小鼠抗體之互補性決定區（CDR; complementarity determining region），移植於人類抗體之互補性決定區者，亦已知該一般基因重組手法。具體上，將連接小鼠抗體之 CDR 與人類抗體之抗體架構區（framework region; FR）而設計之 DNA 序列，自己製作數個寡聚核苷酸，由 PCR 法合成以使末端部份具有重疊（overlap）部份。連接所得之 DNA 與編碼人類抗體恆定區之 DNA，接著嵌入於表現載體，將其導入於宿主，使生產而可得（參考歐洲專利申請書公開號碼 EP 239400、國際專利申請書公開號碼 WO 96/02576）。介在 CDR 所連接之人類抗體之 FR 係選擇互補性決定區形成良好抗原鍵結部位者。因應需要，亦可取代抗體之可變區之抗體架

構區之胺基酸，以使再構成人抗體之互補性決定區形成適當的抗原鍵結位（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

另外，亦已知人類抗體之取得方法。例如於體外，將淋巴球以所需抗原或表現所需抗原之細胞敏化，使敏化淋巴球與人骨髓瘤細胞，例如 U266 融合，亦可得到對抗原具有鍵結活性之所需人類抗體（參考特公平 1-59878）。另外，將具有人類抗體基因之全部建構之基因轉殖動物，以抗原進行免疫，可取得所需之人類抗體（參考國際專利申請書公開號碼 WO93/12227、WO92/03918、WO94/02602、WO94/25585、WO96/34096、WO96/33735）。另外，亦已知使用人類抗體庫，由盤選（Panning）取得人類抗體之技術。例如，使用人類抗體之可變區作為單鏈抗體（scFv, single-chain antibody fragment），由噬菌體呈現法，使於噬菌體表面表現，可選擇鍵結於抗原之噬菌體。若分析所選擇之噬菌體之基因時，可決定編碼鍵結於抗原之人類抗體之可變區之 DNA 序列。若明白鍵結於抗原之 scFv 之 DNA 序列時，可製作含該序列之適當的表現載體，取得人類抗體。此等方法係已眾所皆知，可參考 WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388。

如上述所得之抗體或該片段係可精製至均勻。抗體或該片段之分離、精製係可使用通常多胜肽所使用之分離、

精製方法。例如適當選擇、組合親和層析等之層析管柱、過濾器、超濾、鹽析、透析、SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳、等電點電泳等，可分離、精製抗體（Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988），但不局限於此等者。上述所得抗體之濃度測定係可由吸光度測定或酵素連結免疫吸附法（Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）等進行。

作為親和層析使用之管柱，可列舉蛋白質 A 管柱、蛋白質 G 管柱。例如作為使用蛋白質 A 管柱之管柱，可列舉 Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等。

作為親和層析以外之層析管柱，可舉例如離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、逆相層析、吸附層析等（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。此等層析係可使用 HPLC、FPLC 等之液相層析進行。

另外，藉由於多胜肽精製前或精製後，使適當的多胜肽修飾酵素作用，亦可任意施以修飾、或除去部份胜肽。作為多胜肽修飾酵素，可使用例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、賴胺醯肽鏈內切酶（lysylendopeptidase）、蛋白激酶（proteinkinase）、葡萄糖苷酶（glucosidase）等。

依據本發明之方法所製造之抗體或該片段，具有可作為醫藥使用之生物學活性時，藉由混合此多胜肽與醫藥上

所容許之載體或添加劑而製劑化，可製造醫藥品。

作為醫藥上所容許之載體或添加劑之例，可舉例如水、醫藥上所容許之有機溶劑、膠原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、羧乙烯基聚合物、羧甲基纖維素鈉、聚丙烯酸鈉、褐藻酸鈉、水溶性葡聚糖、羧甲基澱粉鈉、果膠、甲基纖維素、乙基纖維素、三仙膠、阿拉伯膠、酪蛋白、瓊脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、鏈烷烴、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白（HSA）、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、作為醫藥添加物所容許之界面活性劑等。

實際之添加物係因應本發明治療劑之劑型，自上述中選擇單獨或適當組合，但當然不局限於此等者。例如，作為注射用製劑使用時，可使用溶解經精製之多肽於溶劑，例如生理食鹽水、緩衝溶液、葡萄糖溶液等，於其中加入防吸附劑，例如 Tween80、Tween20、明膠、人血清白蛋白者。或亦可為用以形成於使用前溶解再構成之劑型而冷凍乾燥者，作為冷凍乾燥用之賦形劑，可使用例如甘露糖醇、葡萄糖等之糖醇或糖類。

抗體或該片段之有效投予量係依抗體或該片段之種類、治療或預防對象之疾病之種類、患者之年齡、疾病之嚴重程度等而適當選擇。例如抗體為抗 Glypican-3 抗體，以此作為抗癌劑使用時，抗 Glypican-3 抗體之有效投予量係選自每一次每 1kg 體重為 0.001mg 至 1000mg 之範圍。或可選擇每位患者為 0.01 至 100000mg/body 之投予量。

。然而，此等投予量並非受局限者。

抗體或該片段之投予方法係可為經口、非經口投予中任一種，以非經口投予為宜，具體上可舉例如注射（例如由靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等之全身或局部地投予）、經鼻投予、經肺投予、經皮投予等。

【實施方式】

實施例

以下係由實施例更具體地說明本發明。另外，此等實施例係用以說明本發明者，但並非局限本發明之範圍者。

[實施例 1] 製作人源化抗 Glypican-3 抗體表現質體

首先，如下述調製人源化抗 Glypican-3 抗體之 H 鏈基因。Glypican-3 片段（由 PCR 使與 GST 之融合蛋白質基因表現而取得）對小鼠（MRL/lpr，日本 Charles River）進行免疫。使用此小鼠之脾臟細胞，製作融合瘤。由使用 Glypican-3 作為抗原之 ELISA，篩選融合瘤，選擇生產 Glypican-3 結合抗體之複製體。自融合瘤萃取 mRNA，藉由使用反轉錄酵素之反轉錄反應，製作 cDNA。藉由使用具有與小鼠 H 鏈可變區基因成互補鹽基序列之引子（CAGGGGCCAGTGGATAGACCGATG）（序列號碼 1）以及 cDNA 之 PCR，增幅小鼠抗 Glypican-3H 鏈可變區基因，藉由與 pGEM-T Easy（Promega）結合而取得。由 Kabat

database 搜尋並鑑定具有小鼠抗 Glypican-3H 鏈可變區基因之架構區與同源性 (homology) 之人抗體 H 鏈可變區基因。設計結合經鑑定人抗體 H 鏈可變區基因之各架構區部份與小鼠抗 Glypican-3 抗體 H 鏈可變區基因之各 CDR 部份之人源化抗 Glypican-3H 鏈可變區基因之鹽基序列，由 PCR 合成。結合人源化抗 Glypican-3H 鏈可變區基因與人 IgG1 恆定區基因，由胺基酸取代進行最適化，製作人源化抗 Glypican-3H 鏈基因 (參考 WO06/06693)。藉由 CAG 啟動子之下游結合人源化抗 Glypican-3 抗體之 H 鏈基因，進而於更下游結合連接小鼠 β 球蛋白 polyA 訊號，製作 H 鏈表現單位。可由 H 鏈表現單位上游之 BamHI 及 HindIII，以及下游之 XhoI，切出 H 鏈表現單位。

接著，如下述調製人源化抗 Glypican-3 抗體之 L 鏈基因。Glypican-3 片段對小鼠進行免疫。使用此小鼠之脾臟細胞，製作融合瘤。由使用 Glypican-3 作為抗原之 ELISA，篩選融合瘤，選擇生產 Glypican-3 結合抗體之複製體。自融合瘤萃取 mRNA，藉由使用反轉錄酵素之反轉錄反應，製作 cDNA。藉由使用具有與小鼠 L 鏈可變區基因成互補鹽基序列之引子 (

GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG) (序列號碼 2) 以及 cDNA 之 PCR，增幅小鼠抗 Glypican-3L 鏈可變區基因，藉由與 pGEM-T Easy (Promega) 結合而取得。由 Kabat database 搜尋並鑑定具有小鼠抗 Glypican-3L 鏈可變區基

因之架構區與同源性 (homology) 之人類抗體 L 鏈可變區基因。設計結合經鑑定人類抗體 L 鏈可變區基因之各架構區部份與小鼠抗 Glypican-3 抗體 H 鏈可變區基因之各 CDR 部份之人源化抗 Glypican-3L 鏈可變區基因之鹽基序列，由 PCR 合成。結合人源化抗 Glypican-3L 鏈可變區基因與人類 IgG κ 恆定區基因，由胺基酸取代進行最適化，製作人源化抗 Glypican-3L 鏈基因 (參考 WO06/06693)。

藉由於 CAG 啟動子之下游結合人源化抗 Glypican-3 抗體之 L 鏈基因，進而於下游結合小鼠 β 球蛋白 polyA 訊號，製作 L 鏈表現單位。可以 HindIII，切出 L 鏈表現單位。

結合以 BamHI 及 HoiI 消化之 IDEC 公司製質體 INPEP4 與 H 鏈表現單位，製作 pINP-GC33-H1。結合經 HindIII 消化之 pINGP-GC33-H1 與以 HindIII 切出之 L 鏈表現單位。由上述操作，製作每個質體保持 1 個複製之 L 鏈表現單位及 1 個複製之 H 鏈表現單位之 1 個複製 L 鏈表現質體 pHGC33CAG#1 以及每個質體保持 2 個複製之 L 鏈表現單位及 1 個複製之 H 鏈表現單位之 2 個複製 L 鏈表現質體 pHGC33CAG1 (圖 1)。

[實施例 2] 製作人源化抗 Glypican-3 抗體安定表現細胞株

由電穿孔法導入 pHGC33CAG#1 或 pHGC33CAG1 於 CHO 細胞 DXB11 株。接著，於 400 μ g/mL 之 G418 存在

下培養細胞，篩選經導入表現質體之細胞株。使表現質體基因增幅之目的下，接著，於 10 至 100nM MTX 之存在下實施培養。

取得 4 株之 1 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株及 5 株之 2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株，使用 125mL 燒瓶，進行批次培養，進行比較。培養係以培養液量為 50mL，開始細胞密度為 2×10^5 cells/mL，培養溫度為 37℃，振動速度為 110rpm 之條件實施。培養開始後第 3、5、6、7 天，測定培養液中之抗體濃度，進行比較。4 株之 1 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株之第 7 天之抗體產生量約為 60-260 μ g/mL。另一方面，5 株之 2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株之第 7 天之抗體產生量約為 420-690 μ g/mL。2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株之抗體生產量比 1 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株之抗體產生量，高於 2 倍以上（圖 2）。

由上述確認藉由導入相對於 1 個複製 H 鏈之 2 個複製 L 鏈於宿主細胞，比傳統上藉由導入 1 個複製 L 鏈於宿主細胞，提高產生量。

[實施例 3] 製作人源化抗人 IL-6R 抗體安定表現細胞株

WO92/019759 記載之於人源化抗人 IL-6R 抗體 H 鏈基因及人源化抗人 IL-6R 抗體 L 鏈基因之各個上游，結合 CAG 啟動子，於更下游結合小鼠 β 球蛋白 polyA 訊號，製作 H 鏈表現單位及 L 鏈表現單位。於嵌入新黴素抗藥

性基因及 dhfr 之 pBluescript 上，結合 H 鏈表現單位及 L 鏈表現單位，製作以人源化抗人 IL-6R 抗體基因之 1 個複製 H 鏈及 1 個複製 L 鏈所構成之 1 個複製 L 鏈表現質體以及 1 個複製 H 鏈及 2 個複製 L 鏈所構成之 2 個複製 L 鏈表現質體（圖 3），由電穿孔法導入於 CHO 細胞 DXB11 株。接著，於 $400\ \mu\text{g/mL}$ 之 G418 存在下培養細胞，篩選導入表現質體之細胞株。

取得 176 株之 1 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株及 176 株之 2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株，使用 24 孔培養盤之批次培養，進行比較。培養係以培養液量為 0.7mL ，培養溫度為 37°C ，振動速度為 160rpm 之條件實施。培養開始後第 12 天，測定培養液中之抗體濃度，依抗體產生量重新排列後，進行團體間比較（圖 4）。整體上，結果係 2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞之產生量比 1 個複製 L 鏈表現質體之產生量高。

由上述確認藉由導入相對於 1 個複製 H 鏈之 2 個複製 L 鏈於宿主細胞，比傳統上藉由導入 1 個複製 L 鏈於宿主細胞，提高產生量。

本發明係可應用於所有抗體產生細胞。

本說明書引用之全部出版物、專利及專利申請書，原本本作為參考，為本說明書採用者。

產業上利用性

本發明係可利用於生產抗體。

序列表純文字檔 (free text)

< 序列號碼 1 >

序列號碼 1 係表示具有與小鼠 H 鏈可變區基因成互補鹽基序列之引子之序列。

< 序列號碼 2 >

序列號碼 1 係表示具有與小鼠 L 鏈可變區基因成互補鹽基序列之引子之序列。

【圖式簡單說明】

[圖 1]圖 1 係表示每個質體保持 1 個複製之 L 鏈表現單位及 1 個複製之 H 鏈表現單位之 1 個複製 L 鏈表現質體 pHGC33CAG#1 以及每個質體保持 2 個複製之 L 鏈表現單位及 1 個複製之 H 鏈表現單位之 2 個複製 L 鏈表現質體 pHGC33CAG1。

[圖 2]圖 2 係表示 1 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株及 2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株之抗體（人源化抗人磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3（Glypican-3）抗體）之產生量圖。

[圖 3]表示以人源化抗人類 IL-6R 抗體基因之 1 個複製 H 鏈及 1 個複製 L 鏈所構成之 1 個複製 L 鏈表現質體以及以 1 個複製 H 鏈及 2 個複製 L 鏈所構成之 2 個複製 L 鏈表現質體。

[圖 4]圖 4 係表示 1 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株及 2 個複製 L 鏈表現質體導入細胞株之抗體（人源化抗人類 IL-6R 抗體）之產生量圖。

序列

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120> 抗體之製作方法

<130> FP-122PCT

<150> JP P2008-103308

<151> 2008-04-11

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 1

caggggccag tggatagacc gatg

24

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引子

<400> 2

gctcactgga tggtggaag atg

23

公告本

十、申請專利範圍

1. 一種抗體或該片段之製造方法，其特徵係包含使用含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞，使其生產抗體或該片段，且抗體之免疫球蛋白型態係 IgG1。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多之細胞，係已導入含 1 個複製之編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA 之載體之細胞。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中細胞為動物細胞。

4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中動物細胞係中國倉鼠卵巢細胞。

5. 如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中抗體係嵌合體抗體、人源化抗體（humanized antibody）或人類抗體。

6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中抗體係選自抗 IL-6 受體抗體、抗 IL-6 抗體、抗 Glypican-3 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 GPII b/III a 抗體、抗 TNF 抗體、抗 CD25 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 Her2/neu 抗體、抗 RSV 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD52 抗體、抗 IgE 抗體、抗 CD11a 抗體、抗 VEGF 抗體及抗 VLA4 抗體所成群。

7. 一種方法，其特徵係製造含有以申請專利範圍第 1

項至第 6 項中任一項之方法所製造之抗體或該片段之醫藥品。

8. 一種重組載體，其特徵係含 1 個複製之編碼抗體之 H 鏈或該片段之 DNA、2 個複製以上之編碼抗體之 L 鏈或該片段之 DNA，且抗體之免疫球蛋白型態係 IgG1。

9. 一種細胞，其特徵係導入有申請專利範圍第 8 項之載體。

10. 一種培養細胞，其特徵係含編碼抗體之 L 鏈或該片段之外來 DNA 之複製數比編碼抗體之 H 鏈或該片段之外來 DNA 多，且抗體之免疫球蛋白型態係 IgG1。

11. 一種抗體或該片段之製造方法，其特徵係包含使用表現編碼抗體之 L 鏈或該片段比表現編碼抗體之 H 鏈或該片段高之細胞，使其產生抗體或該片段，且抗體之免疫球蛋白型態係 IgG1。

12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中細胞係穩定表現 (stable expression) 抗體或該片段之細胞。

13. 如申請專利範圍第 9 項或第 10 項之細胞，其係穩定表現抗體或該片段。

圖 1

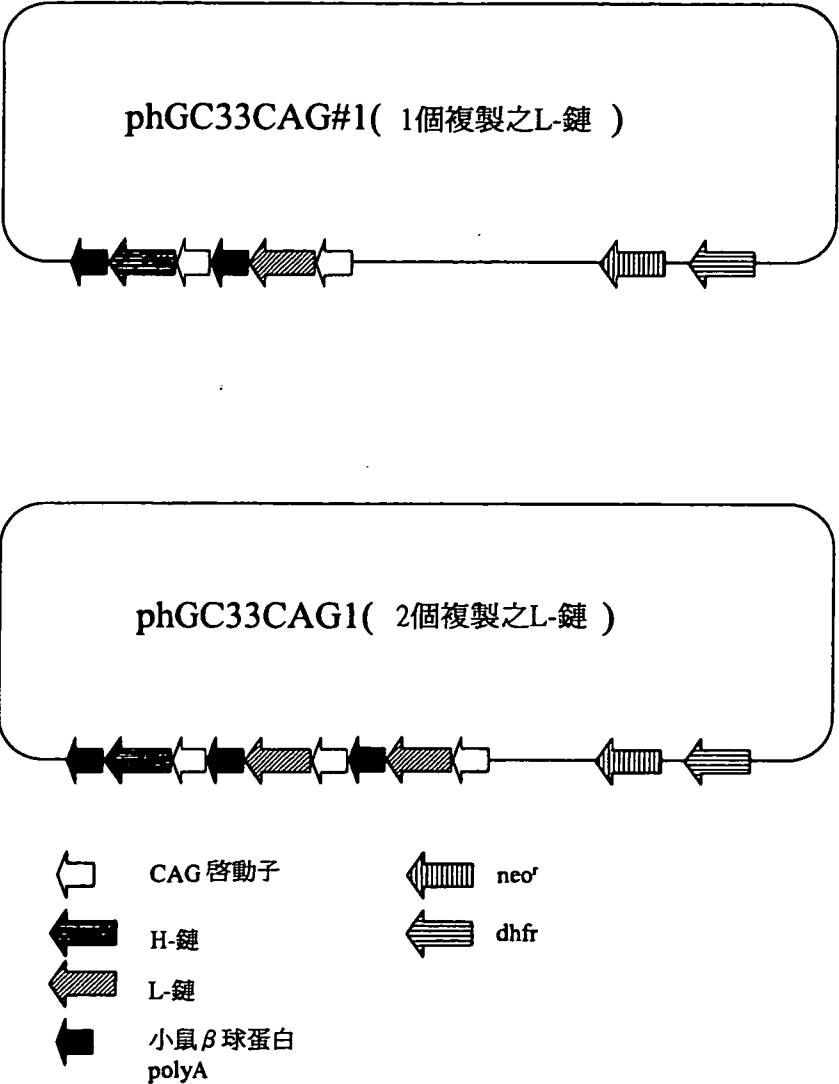


圖2

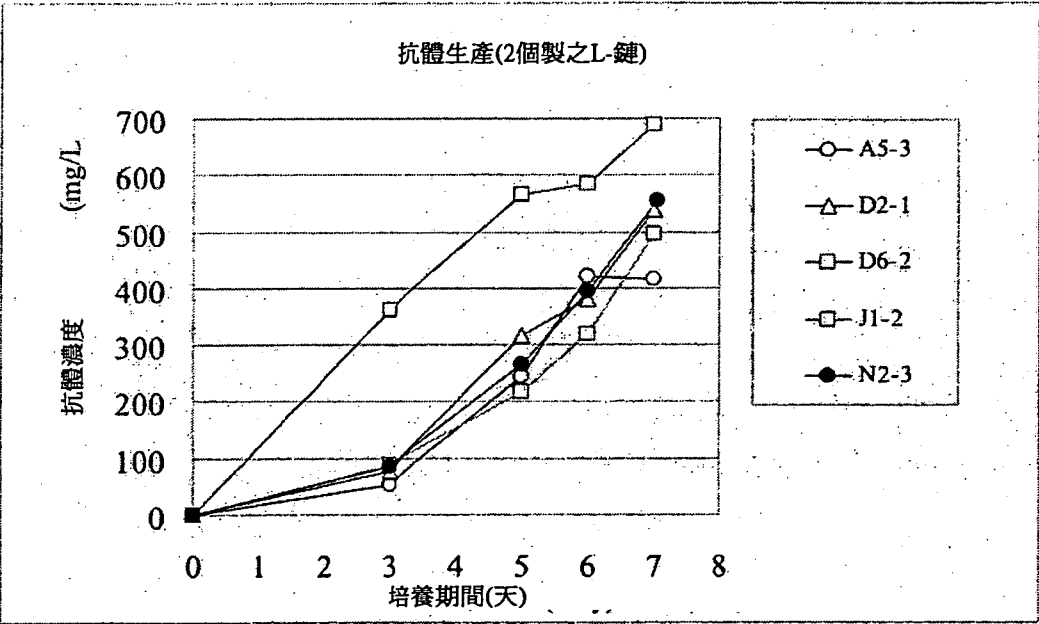
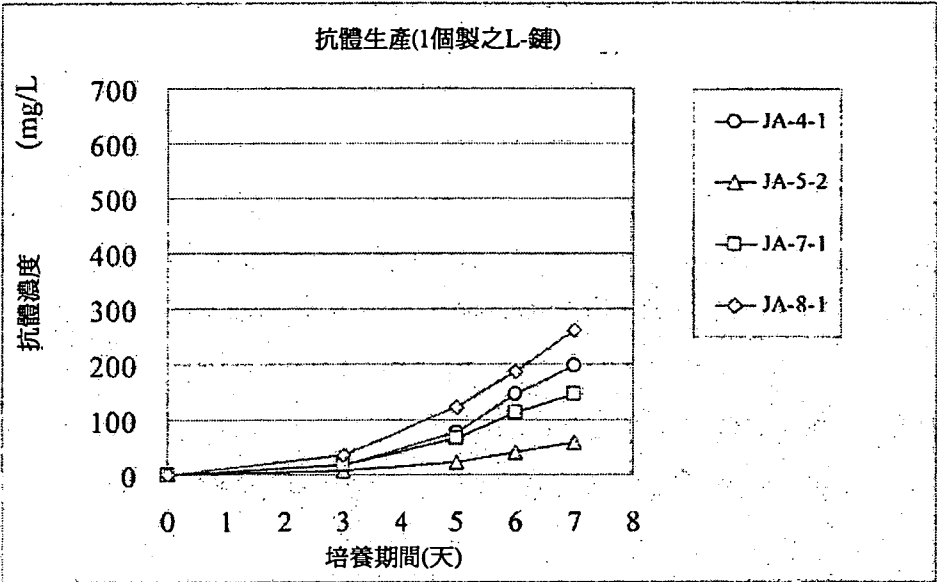
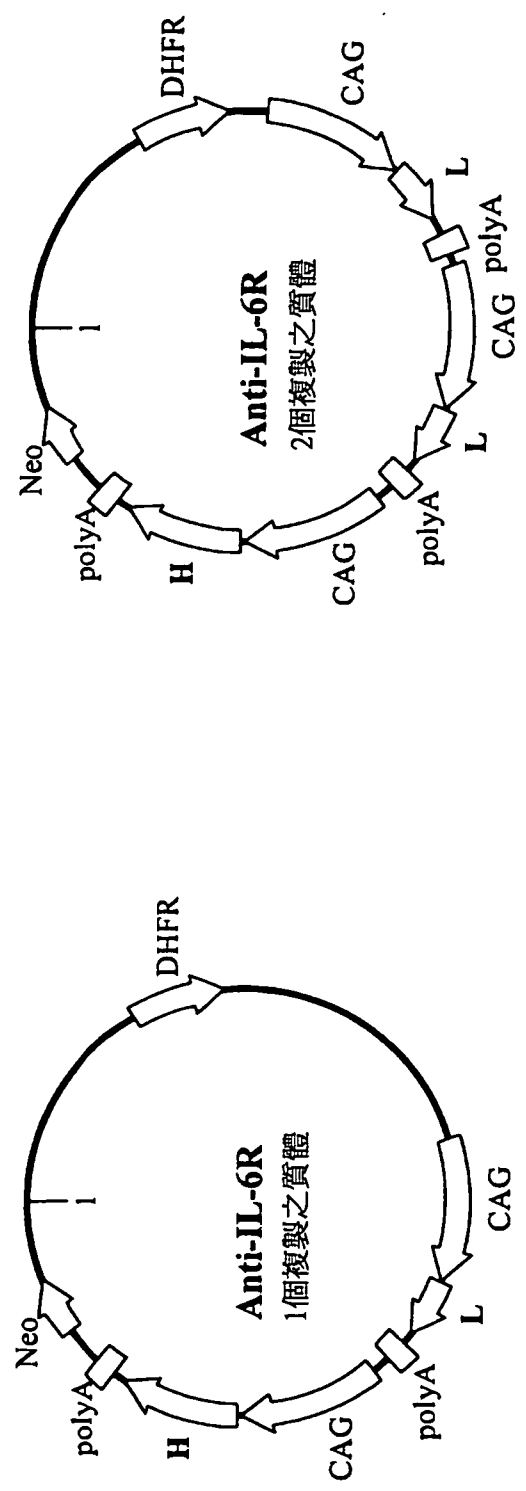


圖3



CAG: CAG 啟動子
L: Anti-IL-6R 抗體L鏈cDNA
H: Anti-IL-6R 抗體H鏈cDNA
polyA: polyA 訊號
Neo: neo^r

圖4

