(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6329061号
(P6329061)

(45)発行日　平成30年5月23日(2018.5.23)　(24)登録日　平成30年4月27日(2018.4.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
A61K 35/14	(2015.01)	A61K	35/14	Z
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	E
A61P 1/04	(2006.01)	A61K	39/395	T
A61P 11/00	(2006.01)	A61P	1/04	

請求項の数 19　(全 46 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-237465(P2014-237465)
(22)出願日　平成26年11月25日(2014.11.25)
(62)分割の表示　特願2012-74560(P2012-74560)の分割
原出願日　平成11年4月20日(1999.4.20)
(65)公開番号　特開2015-51017(P2015-51017A)
(43)公開日　平成27年3月19日(2015.3.19)
審査請求日　平成26年11月25日(2014.11.25)
審判番号　不服2017-1368(P2017-1368/J1)
審判請求日　平成29年1月31日(2017.1.31)
(31)優先権主張番号　60/082,581
(32)優先日　平成10年4月20日(1998.4.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　506153815
ロシュ　グリクアート　アクチェンゲゼルシャフト
スイス国、ツェーハー－８９５２　シュリーレン、ヴァギシュトラーセ　１８
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺　陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体依存性細胞傷害性を改善するための抗体のグリコシル化操作

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｎ結合型オリゴ糖を含むＦｃ領域を含む組換え抗体を産生する糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞であって、該チャイニーズハムスター卵巣細胞は、グリコシルトランスフェラーゼＧｎＴＩＩＩおよび抗体をコードする遺伝子を有し、調節性発現系の制御下にグリコシルトランスフェラーゼＧｎＴＩＩＩを調節可能に発現する、糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項２】
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される、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項３】
前記抗体がキメラ抗体である、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項４】
前記抗体がヒト化抗体である、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項５】
前記抗体が、免疫グロブリンのＦｃ領域を含む、特異的結合部位を含有する抗体フラグメントである、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項６】

前記抗体が、免疫グロブリンのＦｃ領域を含む融合タンパク質である、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項７】
前記Ｆｃ領域中の優勢なＮ結合型オリゴ糖が、少なくとも５つのマンノースを含有する高マンノース構造ではない、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項８】
前記抗体が、糖操作されていない同一のチャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生された対応する抗体と比較して、Ｆｃ領域において、フコース残基の割合に対して割合の増加したＧｌｃＮＡｃ残基を有し、前記ＧｌｃＮＡｃ残基が二分岐である、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項９】
前記抗体が、糖操作されていない同一のチャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生された対応する抗体と比較して、Ｆｃ領域において、フコース残基の割合に対して割合の増加したＧｌｃＮＡｃ残基を有し、前記ＧｌｃＮＡｃ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１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１０】
前記抗体が、糖操作されていない同一のチャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生された対応する抗体と比較して、Ｆｃ領域において、フコース残基の割合に対して割合の増加したＧｌｃＮＡｃ残基を有し、前記ＧｌｃＮＡｃ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１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１１】
前記抗体が治療抗体である、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１２】
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１１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１３】
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１２に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１４】
前記抗体がＩｇＧである、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１５】
前記抗体が、糖操作されていない同一のチャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生された対応する抗体と比較して、該抗体のＦｃ領域中に、割合の増加した二分岐のＧｌｃＮＡｃ残基を含む、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１６】
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る、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１７】
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１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。
【請求項１８】

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チャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生された同一の抗体と比較して、最大ＡＤＣＣ活性の少なくとも８０％の増加を示す、請求項１に記載の糖操作されたチャイニーズハムスター卵巣細胞。

【請求項１９】

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１～１８のいずれか１項に記載のチャイニーズハムスター卵巣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。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（Ｉ．他の出願との関連）

本出願は、１９９８年４月２０日に出願された米国仮特許出願第６０／０８２，５８１号（これは、本明細書中にその全体が参考として援用される）の優先権を主張する。

【０００２】

（ＩＩ．発明の分野）

本発明は、タンパク質のグリコシル化操作の分野に関する。さらに詳細には、本発明は、改善された治療特性を有するタンパク質（増強された抗体依存性細胞傷害性を有する抗体を含む）を生成するグリコシル化操作に関する。

【背景技術】

【０００３】

（ＩＩＩ．発明の背景）

糖タンパク質は、ヒト、他の真核生物、およびいくつかの原核生物における多くの必須の機能（触媒、シグナル伝達、細胞間コミュニケーション、および分子認識および分子会合を含む）を媒介する。それらは、真核生物において非細胞質ゾルタンパク質の大部分を構成している。非特許文献１。治療目的のために多くの糖タンパク質が探索されており、そして最近２０年の間には、天然に存在する分泌糖タンパク質の組換えバージョンが生物工学産業の主要な産物になった。例としては、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、治療的モノクローナル抗体（治療的ｍＡｂ）、組織プラスミノーゲンアクチベーター（ｔＰＡ）、インターフェロン－β（ＩＦＮ－β）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、およびヒト絨毛性ゴナドトロピン（ｈＣＨ）が挙げられる。非特許文献２。

【０００４】

オリゴ糖成分は、治療的糖タンパク質の有効性（物理学的安定性、プロテアーゼの攻撃に対する耐性、免疫系との相互作用、薬物動態、および特異的生物学的活性を含む）に関する特性に、有意に影響を及ぼし得る。このような特性は、オリゴ糖の存在または非存在に依存し得るだけでなく、その特異的構造にも依存し得る。オリゴ糖構造と糖タンパク質機能との間のいくつかの一般化がなされ得る。例えば、特定のオリゴ糖構造は、特定の糖質結合タンパク質との相互作用を介した血流からのこの糖タンパク質の迅速なクリアランスを媒介する一方、他のオリゴ糖構造は、抗体に結合し、所望されない免疫応答を誘発し得る。非特許文献３。

【０００５】

哺乳動物細胞は、ヒト適用のために最も適合した形態でタンパク質をグリコシル化する能力のために、治療的糖タンパク質の生成のために好ましい宿主である。非特許文献２；非特許文献３。細菌はタンパク質をほとんどグリコシル化しない。そして同様に他の型の一般的な宿主（例えば、酵母、糸状菌、昆虫細胞および植物細胞）は、血流からの迅速なクリアランス、所望されない免疫応答、およびいくつかの特定の場合では、減少した生物学的活性と関連したグリコシル化パターンを生じる。哺乳動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞が、最近２０年の間に最も一般的に使用された。適切な

グリコシル化パターンを与えることに加えて、これらの細胞は、遺伝的に安定な、高度に生産的なクローン性細胞株の一貫した生成を可能にする。それらは、無血清培地を使用して単純なバイオリアクター中で高密度に培養され得、そして安全かつ再現可能な生物プロセスの開発を可能にする。他の一般的に使用された動物細胞としては、新生仔ハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、ＮＳ０マウスミエローマ細胞およびＳＰ２／０マウスミエローマ細胞が挙げられる。さらに最近、トランスジェニック動物からの生成もまた、試験されている。非特許文献３。

【０００６】

動物細胞で生成した組換え治療的タンパク質のグリコシル化は、宿主細胞中のグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の過剰発現によって操作され得る。非特許文献４。しかし、この分野の以前の研究では、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の構成性発現が使用されてきたに過ぎず、発現レベルについては、ほとんど注意が払われてこなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】ＬｉｓおよびＳｈａｒｏｎ、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．（１９９３）２１８：１－２７

【非特許文献２】Ｃｕｍｍｉｎｇら、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９９１）１：１１５－１３０

【非特許文献３】Ｊｅｎｋｉｎｓら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎ．（１９９６）１４：９７５－９８１

【非特許文献４】Ｂａｉｌｅｙ、Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９１）２５２：１６６８－１６７５

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

（ＩＶ．発明の要旨）

本発明は、一般に、改善された治療価値を生じる改変されたグリコシル化パターンを有するタンパク質の生成のための宿主細胞および方法に関する。１つの特定の実施態様において、本発明は、バイセクティングＧｌｃＮＡｃを有するＮ結合型複合型オリゴ糖を増加する、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ活性の好ましい範囲を発現し得るように操作された宿主細胞に関する。他の実施態様において、本発明は、糖タンパク質、例えば、抗体（抗体分子全体、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む融合タンパク質を含み、増強されたＦｃ媒介細胞傷害性を有する）の改変された糖形態を生成するための方法、およびそのように生成された糖タンパク質に関する。本発明は、バイセクティングＧｌｃＮＡｃを有するＮ結合型複合型オリゴ糖の最大化のための糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ発現の最適な範囲が存在するという本発明者らの発見に一部基づく。

【０００９】

より詳細には、本発明は、改善した治療的価値を有する改変された糖形態のタンパク質、例えば、増強された抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する抗体を宿主細胞において生成する方法に関する。本発明は、目的のタンパク質（例えば、抗体）をコードする核酸、および糖タンパク質改変グリコシル化トランスフェラーゼをコードする少なくとも１つの核酸を有する宿主細胞を提供する。さらに、本発明は、上記の目的のタンパク質（例えば、抗体依存性細胞傷害性を増強した抗体）の発現を可能にする条件下でこのような宿主細胞を培養する方法およびプロトコルを提供する。さらに、このように生成された、改変されたグリコシル化パターンを有するタンパク質（例えば、増強された抗体依存性細胞傷害性を有する抗体）を単離する方法が記載される。

【００１０】

さらに、本発明は、改善した治療特性を有するタンパク質の別の糖形態を提供する。本発明のタンパク質は、増強された抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する抗体を含み、これは、開示された方法および宿主細胞を使用して生成される。

【００１１】

（ＶＩ．定義）

用語は、以下に定義されなければ、当該分野で一般に使用されるように本明細書中で使用される。

【００１２】

本明細書中で使用される用語「抗体」は、抗体分子全体、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域と等価な領域を含む融合タンパク質を含むことが意図される。

【００１３】

本明細書中で使用される用語「糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ」とは、糖タンパク質のグリコシル化パターンの改変をもたらす酵素をいう。糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの例としては、例えば、ＧｎＴ　ＩＩＩ、ＧｎＴ　Ｖ、ＧａｌＴ、およびＭａｎＩＩのようなグリコシルトランスフェラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【００１４】

本明細書中で使用される用語「グリコシル化操作」は、天然に存在するポリペプチドまたはそのフラグメントのグリコシル化パターンに対して任意の種類の変化を含むとみなされる。グリコシル化操作としては、細胞のグリコシル化機構の代謝的操作（細胞中で発現された糖タンパク質の改変されたグリコシル化を達成する、オリゴ糖合成経路の遺伝子操作を含む）が挙げられる。さらに、グリコシル化操作としては、グリコシル化に対する変異および細胞環境の効果が挙げられる。

【００１５】

本明細書中で使用される用語「宿主細胞」は、タンパク質、タンパク質フラグメント、または目的のペプチド（抗体または抗体フラグメントを含む）の改変された糖形態を生成するように操作され得る任意の種類の細胞系を含む。代表的には、宿主細胞は、少なくとも１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最適化されたレベルを発現するように操作されており、これらのグリコシルトランスフェラーゼとしては、ＧｎＴ　ＩＩＩ、ＧｎＴ　Ｖ、ＧａｌＴ、およびＭａｎＩＩ、ならびに／または少なくとも１つのグリコシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、哺乳動物培養細胞（例えば、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞またはハイブリドーマ細胞）、酵母細胞および昆虫細胞が挙げられ、トランスジェニック動物または培養組織内に含まれる細胞もまた挙げられる。

【００１６】

本明細書中で使用される用語「Ｆｃ媒介細胞傷害性」は、抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、および免疫グロブリンＧのＦｃ領域またはそれに等価な領域をその細胞表面で発現するように操作された細胞に対する細胞傷害性、ならびに免疫グロブリンＧのＦｃ領域またはそれに等価な領域のＮ末端に融合された標的タンパク質ドメインからなる可溶性融合タンパク質により媒介される細胞傷害性を含むことが意図される。

したがって本発明は、以下の項目を提供する

（項目１）　調節されたレベルにおいて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１つの核酸を発現するために操作された、宿主細胞。

（項目２）　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１つの遺伝子を含む核酸分子が、上記宿主細胞に導入されている、項目１に記載の宿主細胞。

（項目３）　内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、上記宿主細胞が操作されている、項目１に記載の宿主細胞。

（項目４）　上記宿主細胞が、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞、またはハイブリドーマ細胞である、項目２または３に記載の宿主細胞。

（項目５） 上記内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、調節性プロモーターエレメントを上記宿主細胞染色体へ挿入することによって活性化されている、項目３に記載の宿主細胞。

（項目６） 上記糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、ＧｎＴ ＩＩＩ、ＧｎＴ Ｖ、Ｍａｎ ＩＩ、またはＧａｌ Ｔである、項目２または３に記載の宿主細胞。

（項目７） 上記宿主細胞が、ＧｎＴ ＩＩＩ、ＧｎＴ Ｖ、Ｍａｎ ＩＩ、およびＧａｌ Ｔからなる群から選択される少なくとも２つの異なる、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼを発現するために操作された、項目２または３に記載の宿主細胞。

（項目８） 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１つの遺伝子が、構成性プロモーターエレメントに作動可能に連結されている、項目７に記載の宿主細胞。

（項目９） 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１つの遺伝子が、調節性プロモーターエレメントに作動可能に連結されている、項目２に記載の宿主細胞。

（項目１０） 上記調節性プロモーターエレメントが、テトラサイクリンに調節性プロモーター系、エクジソン誘導性プロモーター系、ｌａｃスイッチプロモーター系、グルココルチコイド誘導性プロモーター系、温度誘導性プロモーター系、またはメタロチオネイン金属誘導性プロモーター系である、項目５または９に記載の宿主細胞。

（項目１１） 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１つの核酸分子を発現するために操作された宿主細胞であって、ここでその宿主細胞が、増強したＦｃ媒介細胞傷害性を有するタンパク質を産生し得る、宿主細胞。

（項目１２） 上記タンパク質が、抗体分子全体、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む融合タンパク質である、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目１３） 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１つの遺伝子を含む核酸分子が、上記宿主細胞染色体へ導入されている、項目１２に記載の宿主細胞。

（項目１４） 上記宿主細胞が、内因性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異誘発発現を保有するために選択されている、項目１２に記載の宿主細胞。

（項目１５） 上記宿主細胞が、変異ｌｅｃ１０である、項目１４に記載の宿主細胞。

（項目１６） 内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、上記宿主細胞が操作されている、項目１２に記載の宿主細胞。

（項目１７） 上記内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、調節性プロモーターエレメントを上記宿主細胞染色体へ挿入することによって活性化されている、項目１６に記載の宿主細胞。

（項目１８） 上記内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、構成性プロモーターエレメント、トランスポゾン、またはレトロウイルスエレメントを上記宿主細胞染色体へ挿入することによって活性化されている、項目１６に記載の宿主細胞。

（項目１９） 抗体分子、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む融合タンパク質をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸をさらに含む、項目１１または１３に記載の宿主細胞。

（項目２０） 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１つの遺伝子が、構成性プロモーターエレメントに作動可能に連結される、項目１３に記載の宿主細胞。

（項目２１） 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１つの遺伝子が、調節性プロモーターエレメントに作動可能に連結される、項目１３に記載の宿主細胞。

（項目２２）　上記調節性プロモーターエレメントが、テトラサイクリンに調節性プロモーター系、エクジソン誘導性プロモーター系、ｌａｃスイッチプロモーター系、グルココルチコイド誘導性プロモーター系、温度誘導性プロモーター系、またはメタロチオネイン金属誘導性プロモーター系である、項目２１に記載の宿主細胞。

（項目２３）　上記宿主細胞がハイブリドーマ細胞である、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目２４）　上記操作された宿主細胞が、操作されたＣＨＯ細胞、操作されたＢＨＫ細胞、操作されたＮＳ０細胞、または操作されたＳＰ２／０細胞である、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目２５）　上記宿主細胞が、キメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（Ｃ２Ｂ８）をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸を含む、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目２６）　上記宿主細胞が、キメラ抗ヒト神経芽腫モノクローナル抗体（ｃｈＣＥ７）をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸を含む、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目２７）　上記宿主細胞が、キメラ抗ヒト腎細胞癌モノクローナル抗体（ｃｈ－Ｇ２５０）、ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、キメラ抗ヒト結腸癌、肺癌、および乳癌モノクローナル抗体（ＩＮＧ－１）、ヒト化抗ヒト１７－１Ａ抗原モノクローナル抗体（３６２２Ｗ９４）、ヒト化抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体（Ａ３３）、ＧＤ３ガングリオシドに対する抗ヒト黒色腫抗体（Ｒ２４）、またはキメラ抗ヒト扁平上皮癌モノクローナル抗体（ＳＦ－２５）をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸を含む、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目２８）　少なくとも１つの核酸分子が、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴ　ＩＩＩ）をコードする、項目１１に記載の宿主細胞。

（項目２９）　β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）をコードする少なくとも１つの核酸をさらに含む、項目２８に記載の宿主細胞。

（項目３０）　マンノシダーゼＩＩ（Ｍａｎ　ＩＩ）をコードする少なくとも１つの核酸をさらに含む、項目２８に記載の宿主細胞。

（項目３１）　β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）をコードする少なくとも１つの核酸およびマンノシダーゼＩＩ（Ｍａｎ　ＩＩ）をコードする少なくとも１つの核酸をさらに含む、項目２８に記載の宿主細胞。

（項目３２）　宿主細胞において、増強したＦｃ媒介細胞傷害性を有するタンパク質化合物を産生するための方法であって、以下の工程：

（ａ）調節されたレベルにおいて、目的のタンパク質化合物のグリコシル化を改善するように選択された、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼを発現するために操作された宿主細胞を提供する工程であって、ここで、その宿主細胞が、抗体、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む融合タンパク質をコードする少なくとも１つの核酸を発現する、工程；

（ｂ）増強したＦｃ媒介性依存性細胞傷害性を有するそのタンパク質化合物の産生を可能にする条件下で、その宿主細胞を培養する工程；および

（ｃ）増強したＦｃ媒介細胞傷害性を有するそのタンパク質化合物を単離する工程、

を包含する、方法。

（項目３３）　工程（ａ）において、上記宿主細胞が、抗体全体をコードする少なくとも１つの核酸を含む、項目３２に記載の方法。

（項目３４）　工程（ａ）において、上記宿主細胞が、抗体フラグメントをコードする少なくとも１つの核酸を含む、項目３２に記載の方法。

（項目３５）　工程（ａ）において、上記宿主細胞が、免疫グロブリンのグルコシル化Ｆｃ領域に類似の領域を含む融合タンパク質をコードする少なくとも１つの核酸を含む、項目３２に記載の方法。

（項目３６）　上記宿主細胞が、キメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（Ｃ２Ｂ８）をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸を含む、項目３２に記載の方法。

（項目３７）　上記宿主細胞が、キメラ抗ヒト神経芽腫モノクローナル抗体（ｃｈＣＥ７）をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸を含む、項目３２に記載の方法。

（項目３８）　上記宿主細胞が、キメラ抗ヒト腎細胞癌モノクローナル抗体（ｃｈ－Ｇ２５０）、ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、キメラ抗ヒト結腸癌、肺癌、および乳癌モノクローナル抗体（ＩＮＧ－１）、ヒト化抗ヒト１７－１Ａ抗原モノクローナル抗体（３６２２Ｗ９４）、ヒト化抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体（Ａ３３）、ＧＤ３ガングリオシドに対する抗ヒト黒色腫抗体（Ｒ２４）、またはキメラ抗ヒト扁平上皮癌モノクローナル抗体（ＳＦ－２５）をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸を含む、項目３２に記載の方法。

（項目３９）　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１つの遺伝子が、上記宿主細胞に導入されている、項目３２に記載の方法。

（項目４０）　上記宿主細胞が、内因性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異誘発発現を保有するために選択されている、項目３２に記載の宿主細胞。

（項目４１）　上記宿主細胞が、変異ｌｅｃ１０である、項目４０に記載の宿主細胞。

（項目４２）　内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、上記宿主細胞が操作されている、項目３２に記載の宿主細胞。

（項目４３）　上記グリコシルトランスフェラーゼが、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴ　ＩＩＩ）である、項目３２に記載の方法。

（項目４４）　上記ＧｎＴ　ＩＩＩが、構成性プロモーター系を使用して発現される、項目４３に記載の方法。

（項目４５）　上記ＧｎＴ　ＩＩＩが、調節性プロモーター系を使用して発現される、項目４３に記載の方法。

（項目４６）　上記調節性プロモーター系が、テトラサイクリンに調節性プロモーター系、エクジソン誘導性プロモーター系、ｌａｃスイッチプロモーター系、グルココルチコイド誘導性プロモーター系、温度誘導性プロモーター系、またはメタロチオネイン金属誘導性プロモーター系である、項目４５に記載の方法。

（項目４７）　上記グリコシルトランスフェラーゼが、β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）である、項目３２に記載の方法。

（項目４８）　上記ＧａｌＴが、構成性プロモーター系を使用して発現される、項目４７に記載の方法。

（項目４９）　上記ＧａｌＴが、調節性プロモーター系を使用して発現される、項目４７に記載の方法。

（項目５０）　上記調節性プロモーター系が、テトラサイクリンに調節性プロモーター系、エクジソン誘導性プロモーター系、ｌａｃスイッチプロモーター系、グルココルチコイド誘導性プロモーター系、温度誘導性プロモーター系、またはメタロチオネイン金属誘導性プロモーター系である、項目４９に記載の方法。

（項目５１）　上記宿主細胞が、調節されたレベルにおいて、目的のタンパク質化合物のグリコシル化を改善するように選択された、グリコシルトランスフェラーゼをコードする複数の核酸を発現するために操作され、ここで、少なくとも１つの核酸がＧｎＴ　ＩＩをコードし、そして少なくとも１つの核酸がβ（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）をコードする、項目３２に記載の方法。

（項目５２）　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１つの遺伝子を含む核酸分子が、上記宿主細胞に導入されている、項目５１に記載の宿主細胞。

（項目５３）　上記宿主細胞が、少なくとも１つの、内因性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異誘発発現を保有するために選択されている、項目５１に記載の宿主細胞。

（項目５４）　内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、上記宿主細胞が操作されている、項目５１、５２、または５３に記載の宿主細胞。

（項目５５）　上記宿主細胞が、調節されたレベルにおいて、目的のタンパク質化合物のグリコシル化を改善するように選択された、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複数の核酸を含み、ここで、少なくとも１つの核酸がＧｎＴ　ＩＩＩをコードし、そして少なくとも１つの核酸がマンノシダーゼＩＩ（Ｍａｎ　ＩＩ）をコードする、項目３２に記載の方法。

（項目５６）　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１つの遺伝子を含む核酸分子が、上記宿主細胞に導入されている、項目５５に記載の宿主細胞。

（項目５７）　上記宿主細胞が、少なくとも１つの、内因性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異誘発発現を保有するために選択されている、項目５５に記載の宿主細胞。

（項目５８）　内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、上記宿主細胞が操作されている、項目５５、５６、または５７に記載の宿主細胞。

（項目５９）　上記宿主細胞が、調節されたレベルにおいて、目的のタンパク質のグリコシル化を改善するように選択された、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複数の核酸を含み、ここで、少なくとも１つの核酸がＧｎＴ　ＩＩＩをコードし、少なくとも１つの核酸がβ（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）をコードし、そして少なくとも１つの核酸がマンノシダーゼＩＩ（Ｍａｎ　ＩＩ）をコードする、項目３２に記載の方法。

（項目６０）　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１つの遺伝子を含む核酸分子が、上記宿主細胞に導入されている、項目５９に記載の宿主細胞。

（項目６１）　上記宿主細胞が、少なくとも１つの、内因性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異誘発発現を保有するために選択されている、項目５９に記載の宿主細胞。

（項目６２）　内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、上記宿主細胞が操作されている、項目５９、６０、または６１に記載の宿主細胞。

（項目６３）　少なくとも１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発現レベルが、抗体分子、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む融合タンパク質を産生するように選択され、その糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが、異なる発現レベルの同一のグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子から得られるＦｃ媒介細胞傷害性よりも、より高いレベルにおいて増強したＦｃ媒介細胞傷害性を有する、項目３２に記載の方法。

（項目６４）　上記発現レベルが、グリコシルトランスフェラーゼ特異的抗体を使用するウエスタンブロット分析によって決定される、項目６３に記載の方法。

（項目６５）　上記発現レベルが、グリコシルトランスフェラーゼ特異的プローブを使用するノーザンブロット分析によって決定される、項目６３に記載の方法。

（項目６６）　上記発現レベルが、グリコシルトランスフェラーゼの酵素活性を測定することによって決定される、項目６３に記載の方法。

（項目６７）　上記発現レベルが、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの生合成産物に結合するレクチンを使用して決定される、項目６３に記載の方法。

（項目６８）　上記レクチンがE_4－ＰＨＡレクチンである、項目６７に記載の方法

。

（項目６９）　上記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上記核酸が、レポーター遺伝子に作動可能に連結され、そしてここで、そのグリコシルトランスフェラーゼの上記発現レベルが、そのレポーター遺伝子の発現レベルと相関するシグナルを測定することによって決定される、項目６３に記載の方法。

（項目７０）　上記レポーター遺伝子が、単一のＲＮＡ分子として、上記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１つの核酸とともに転写され、そしてそれらの各コード配列が、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）またはキャップ独立性翻訳エンハンサー（ＣＩＴＥ）のいずれかによって連結される、項目６９に記載の方法。

（項目７１）　単一のポリペプチド鎖が形成されるように、上記レポーター遺伝子が、上記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１つの核酸とともに翻訳される、項目６９に記載の方法。

（項目７２）　上記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上記核酸が、単一のプロモーターの制御下でレポーター遺伝子に作動可能に連結され、ここでそ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その核酸およびそのレポーター遺伝子が、２つの別個のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子に選択的スプライスされるＲＮＡ分子へ転写され、ここで得られたｍＲＮＡの一方がそのレポータータンパク質に翻訳され、そして他方がその糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼに翻訳される、項目６３に記載の方法。

（項目７３）　上記宿主細胞が、グリコシダーゼをコードする核酸をさらに含む、項目３２に記載の方法。

（項目７４）　項目１１に記載の宿主細胞によって産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、抗体。

（項目７５）　項目２５に記載の宿主細胞によって産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、キメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（Ｃ２Ｄ８）。

（項目７６）　項目２６に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、キメラ抗ヒト神経芽腫モノクローナル抗体（ｃｈＣＥ７）。

（項目７７）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、キメラ抗ヒト腎細胞癌モノクローナル抗体（ｃｈ－Ｇ２５０）。

（項目７８）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、ヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体。

（項目７９）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、キメラ抗ヒト結腸癌、肺癌、および乳癌モノクローナル抗体（ＩＮＧ－１）。

（項目８０）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、ヒト化抗ヒト１７－１Ａ抗原モノクローナル抗体（３６２２Ｗ９４）。

（項目８１）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、キメラ抗ヒト扁平上皮癌モノクローナル抗体（ＳＦ－２５）。

（項目８２）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、ヒト化抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体（Ａ３３）。

（項目８３）　項目２７に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強した抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を有する、ＧＤ３ガングリオシドに対する抗ヒト黒色腫抗体（Ｒ２４）。

（項目８４）　項目１１に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強したＦｃ媒介細胞傷害性を有する、免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む、抗体フラグメント

。

（項目８５）　項目１１に記載の宿主細胞を使用して産生された、増強したＦｃ媒介細胞傷害性を有する、免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む、融合タンパク質。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】図１は、典型的なＦｃ関連オリゴ糖構造の代表を記載する。

【図２】図２は、２つの異なるｔＴＡ生成ＣＨＯクローンにおけるＧｎＴ　ＩＩＩのテトラサイクリン調節性発現のウェスタンブロット分析を示す。ＣＨＯｔ２細胞（レーンＡおよびＢ）およびＣＨＯｔ１７細胞（レーンＣおよびＤ）は、ｐＵＤＨ１０－３ＧｎＴＩＩＩｍ発現ベクターでトランスフェクトされ、そしてテトラサイクリンの非存在下（レーンＡおよびＣ）または４００ｎｇ／ｍｌの濃度の存在下（レーンＢおよびＤ）で３６時間培養した。次いで、細胞溶解物を、抗体（９Ｅ１０）でプローブするウェスタンブロット分析のために調製した。この抗体は、そのカルボキシ末端でＧｎＴ　ＩＩＩに付加されたｃ－ｍｙｃタグを特異的に認識する。

【図３】図３は、ｍｙｃタグ化ＧｎＴ　ＩＩＩ発現が制御され得るテトラサイクリン濃度の範囲の決定を示す。ＣＨＯｔ１７細胞を、ｐＵＤＨ１０－３－ＧｎＴＩＩＩｍ発現ベクターでトランスフェクトし、次いで、示された濃度のテトラサイクリンの存在下で４８時間培養した。これらの培養物の細胞溶解物のＧｎＴ　ＩＩＩレベルは、ウェスタンブロット分析を使用して比較した。ＧｎＴ　ＩＩＩを、９Ｅ１０抗体を使用するｃ－ｍｙｃタグを介して検出した。

【図４】図４Ａ～４Ｂは、ＧｎＴ　Ｖ（図４Ａ）またはｍｙｃタグ化ＧｎＴ　ＩＩＩ（図４Ｂ）グリコシルトランスフェラーゼの安定な、テトラサイクリン調節性発現についてのＣＨＯクローンのウェスタンブロット分析によるスクリーニングを示す。ＣＨＯｔ１７細胞は、プロマイシン耐性（ｐＰＵＲ）の発現のためのベクターと、ｐＵＨＤ１０－３ＧｎＴＶ（図４Ａ）またはｐＵＤＨ１０－３ＧｎＴＩＩＩｍ（図４Ｂ）のいずれかとで同時トランスフェクトされ、そして安定なＣＨＯクローンを、テトラサイクリンの存在下（２μｇ／ｍｌ）で、プロマイシン（７．５μｇ／ｍｌ）に対する耐性について選択した。各グリコシルトランスフェラーゼについての８つのクローン（１～８）を、テトラサイクリンの非存在下または存在下（＋）（２μｇ／ｍｌ）で４８時間培養し、そして抗ＧｎＴ　Ｖ抗体（図４Ａ）または抗ｍｙｃ抗体（９Ｅ１０）抗体（図４Ｂ）のいずれかを用いてウェスタンブロットによって分析した。

【図５】図５Ａおよび５Ｂは、レクチンブロット分析によるインビボでの異種ＧｎＴ　Ｖ（図５Ａ）およびＧｎＴ　ＩＩＩ（図５Ｂ）のグリコシルトランスフェラーゼの活性の検証を示す。テトラサイクリン（２μｇ／ｍｌ）の非存在下または存在下（＋）で培養した種々の安定なクローンからの細胞糖タンパク質（図４と同様に番号付けした）をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、膜にブロットし、そしてＬ－ＰＨＡレクチン（図５Ａ）およびＥ－ＰＨＡレクチン（図５Ｂ）のいずれかでプローブした。これらのレクチンは、それぞれ、ＧｎＴ　ＶおよびＧｎＴ　ＩＩＩによって触媒された反応のオリゴ糖生成物に対して、これらの反応物のオリゴ糖基質に対するより、より高い親和性で結合する。分子量マーカー（ＭＷＭ）を、並行して泳動した。図５Ａおよび５Ｂのレクチンブロットの比較によって、内因性ＣＨＯ細胞糖タンパク質の中で、ＧｎＴ　Ｖ（図５Ａ）についてより、ＧｎＴ　ＩＩＩ（図５Ｂ）についてより広範囲の基質が示される。

【図６】図６Ａ～６Ｄは、グリコシルトランスフェラーゼの過剰発現の際の細胞増殖の阻害を示す、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ細胞を、５～１０％コンフルエントで播種し、そしてテトラサイクリンの非存在下（図６Ａおよび６Ｂ）または存在下（図６Ｃおよび６Ｄ）で培養した。培養物を播種して４５時間後（図６Ａおよび６Ｃ）ならびに８５時間後（図６Ｂおよび６Ｄ）に写真を撮った。

【図７】図７は、ｃｈＣＥ７重鎖遺伝子の構築のためにＰＣＲで使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列を示す。正方向および逆方向プライマーは、それぞれ、「．ｆｗｄ」および「．ｒｅｖ」を接尾辞としてつけることによって同定する。テンプレートとして

最初のＰＣＲ工程の産物を使用して、第２のＰＣＲ工程を行うために必要な、異なるプライマー間の重複を示す。導入された制限部位、ＣＥ７キメラゲノムＤＮＡにアニーリングする配列、および導入された合成リーダー配列もまた示す。

【図８】図８は、ｃｈＣＥ７軽鎖遺伝子の構築のためにＰＣＲで使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列を示す。正方向プライマーおよび逆方向プライマーは、それぞれ、「．ｆｗｄ」および「．ｒｅｖ」を接尾辞としてつけることによって同定する。テンプレートとして最初のＰＣＲ工程の産物を使用して、第２のＰＣＲ工程を行うために必要な、異なるプライマー間の重複を示す。導入された制限部位、ＣＥ７キメラゲノムＤＮＡにアニーリングする配列、および導入されたリーダー配列もまた示す。

【図９Ａ】図９は、ＳＰ２／０マウスミエローマ細胞（図９Ａ、５０μｇのＣＥ７－ＳＰ２／０からのオリゴ糖）、または培地に添加したテトラサイクリンの濃度が異なるため、ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子を異なるレベルで発現するＣＨＯ－ｔｅｔＧｎＴＩＩＩ－ｃｈＣＥ７細胞培養物のいずれかにより生成されたｃｈＣＥ７サンプルからの中性オリゴ糖混合物のＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを示す。テトラサイクリン濃度の大きさを低減する、すなわち、ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子発現のレベルを増加させることにおいて、後者のサンプルは、ＣＥ７－２０００ｔ（図９Ｂ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－６０ｔ（図９Ｃ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－３０ｔ（図９Ｄ、２５μｇの抗体からのオリゴ糖）およびＣＥ７－１５ｔ（図９Ｅ、１０μｇの抗体からのオリゴ糖）である。

【図９Ｂ】図９は、ＳＰ２／０マウスミエローマ細胞（図９Ａ、５０μｇのＣＥ７－ＳＰ２／０からのオリゴ糖）、または培地に添加したテトラサイクリンの濃度が異なるため、ＧｎＴＩＩＩ遺伝子を異なるレベルで発現するＣＨＯ－ｔｅｔＧｎＴＩＩＩ－ｃｈＣＥ７細胞培養物のいずれかにより生成されたｃｈＣＥ７サンプルからの中性オリゴ糖混合物のＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを示す。テトラサイクリン濃度の大きさを低減する、すなわち、ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子発現のレベルを増加させることにおいて、後者のサンプルは、ＣＥ７－２０００ｔ（図９Ｂ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－６０ｔ（図９Ｃ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－３０ｔ（図９Ｄ、２５μｇの抗体からのオリゴ糖）およびＣＥ７－１５ｔ（図９Ｅ、１０μｇの抗体からのオリゴ糖）である。

【図９Ｃ】図９は、ＳＰ２／０マウスミエローマ細胞（図９Ａ、５０μｇのＣＥ７－ＳＰ２／０からのオリゴ糖）、または培地に添加したテトラサイクリンの濃度が異なるため、ＧｎＴＩＩＩ遺伝子を異なるレベルで発現するＣＨＯ－ｔｅｔＧｎＴＩＩＩ－ｃｈＣＥ７細胞培養物のいずれかにより生成されたｃｈＣＥ７サンプルからの中性オリゴ糖混合物のＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを示す。テトラサイクリン濃度の大きさを低減する、すなわち、ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子発現のレベルを増加させることにおいて、後者のサンプルは、ＣＥ７－２０００ｔ（図９Ｂ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－６０ｔ（図９Ｃ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－３０ｔ（図９Ｄ、２５μｇの抗体からのオリゴ糖）およびＣＥ７－１５ｔ（図９Ｅ、１０μｇの抗体からのオリゴ糖）である。

【図９Ｄ】図９は、ＳＰ２／０マウスミエローマ細胞（図９Ａ、５０μｇのＣＥ７－ＳＰ２／０からのオリゴ糖）、または培地に添加したテトラサイクリンの濃度が異なるため、ＧｎＴＩＩＩ遺伝子を異なるレベルで発現するＣＨＯ－ｔｅｔＧｎＴＩＩＩ－ｃｈＣＥ７細胞培養物のいずれかにより生成されたｃｈＣＥ７サンプルからの中性オリゴ糖混合物のＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを示す。テトラサイクリン濃度の大きさを低減する、すなわち、ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子発現のレベルを増加させることにおいて、後者のサンプルは、ＣＥ７－２０００ｔ（図９Ｂ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－６０ｔ（図９Ｃ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－３０ｔ（図９Ｄ、２５μｇの抗体からのオリゴ糖）およびＣＥ７－１５ｔ（図９Ｅ、１０μｇの抗体からのオリゴ糖）である。

【図９Ｅ】図９は、ＳＰ２／０マウスミエローマ細胞（図９Ａ、５０μｇのＣＥ７－ＳＰ

２／０からのオリゴ糖）、または培地に添加したテトラサイクリンの濃度が異なるため、ＧｎＴＩＩＩ遺伝子を異なるレベルで発現するＣＨＯ－ｔｅｔＧｎＴＩＩＩ－ｃｈＣＥ７細胞培養物のいずれかにより生成されたｃｈＣＥ７サンプルからの中性オリゴ糖混合物のＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳスペクトルを示す。テトラサイクリン濃度の大きさを低減する、すなわち、ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子発現のレベルを増加させることにおいて、後者のサンプルは、ＣＥ７－２０００ｔ（図９Ｂ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－６０ｔ（図９Ｃ、３７．５μｇの抗体からのオリゴ糖）、ＣＥ７－３０ｔ（図９Ｄ、２５μｇの抗体からのオリゴ糖）およびＣＥ７－１５ｔ（図９Ｅ、１０μｇの抗体からのオリゴ糖）である。

【図１０】図１０は、ＧｎＴ　ＩＩＩ触媒された反応を介する、複合型バイセクト型オリゴ糖を導く、Ｎ結合型オリゴ糖生合成経路を記載する。Ｍはマンノース；ＧｎはＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）；Ｇはガラクトース；Gn^{b}はバイセクティングＧｌｃＮＡｃ；ｆはフコースを示す。オリゴ糖命名法は、コアオリゴ糖に結合されたＭ、ＧｎおよびＧ残基を数えること、およびGn^{b}を含めることによってバイセクティングＧｌｃＮＡｃの存在を示すことからなる。オリゴ糖コアは、それ自体が２つのＧｎ残基から構成され、そしてフコースを含んでも、含まなくてもよい。オリゴ糖の主要なクラスは、破線で囲んだ枠の中に示す。Ｍａｎ　Ｉはゴルジマンノシダーゼ；ＧｎＴはＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ；およびＧａｌＴはガラクトシルトランスフェラーゼを表す。ＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳ分析で観察される、主要なナトリウムと会合したオリゴ糖イオンに関連する質量は、各オリゴ糖の隣に示す。潜在的にコアがフコシル化され得るオリゴ糖については、フコシル化形態（＋ｆ）および非フコシル化形態（－ｆ）の両方に関連する質量を示す。

【図１１】図１１は、ＧｎＴ　ＩＩＩ触媒反応を介して、複合型バイセクト型オリゴ糖および混成型バイセクト型オリゴ糖を導くＮ結合型オリゴ糖生合成経路を示す。Ｍはマンノース；ＧｎはＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）；Ｇはガラクトース；Gn^{b}はバイセクティングＧｌｃＮＡｃ；ｆはフコースを示す。オリゴ糖命名法は、共通のオリゴ糖に結合されたＭ、ＧｎおよびＧ残基を数えること、およびGn^{b}を含めることによってバイセクティングＧｌｃＮＡｃの存在を示すことからなる。オリゴ糖コアは、それ自体が２つのＧｎ残基から構成され、そしてフコースを含んでも、含まなくてもよい。オリゴ糖の主要なクラスは、破線で囲んだ枠の中に示す。Ｍａｎ　Ｉはゴルジマンノシダーゼ；ＧｎＴはＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼ；およびＧａｌＴはガラクトシルトランスフェラーゼを表す。ＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳ分析で観察される、主要なナトリウムと会合したオリゴ糖イオンと関連する質量は、各オリゴ糖の隣に示す。潜在的にコアがフコシル化され得るオリゴ糖については、フコシル化形態（＋ｆ）および非フコシル化形態（－ｆ）の両方に関連する質量を示す。

【図１２】図１２は、異なるｃｈＣＥ７サンプルのＡＤＣＣ活性を示す。ヒトリンパ節によるＩＭＲ－３２神経芽腫細胞の溶解（標的：エフェクター比は１：１９、３７℃で１６時間のインキュベーション）を、ｃｈＣＥ７サンプルの異なる濃度で媒介し、蛍光色素の保持によって測定した。細胞傷害性の割合は、抗体の非存在下でのシグナルを差し引いた後に、総溶解コントロール（界面活性剤による）に対して算出した。

【図１３】図１３は、異なるテトラサイクリン濃度で増殖させた、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ　ＩＩＩの異なる培養物のＧｎＴ　ＩＩＩ発現を使用して、異なるＣ２Ｂ８抗体サンプルを生成したことを記載する。２０００ｎｇ／ｍｌ（レーンＣ）および２５ｎｇ／ｍｌ（レーンＤ）のテトラサイクリン濃度で増殖させた各培養物からの細胞溶解物をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し、メンブラン上にブロットし、そして１次抗体および２次抗体として、それぞれ、９Ｅ１０（前出を参照のこと）および抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼを用いてプローブした。レーンＡは、陰性コントロールを示す。

【図１４】図１４は、懸濁物中での細胞を用いた間接免疫蛍光アッセイを使用するＣ２Ｂ８抗ＣＤ２０モノクローナル抗体の抗原結合の特異性を示す。ＣＤ２０陽性細胞（ＳＢ細胞；ＡＴＣＣ受託番号ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１２０）およびＣＤ２０陰性細胞（ＨＳＢ細胞；

ＡＴＣＣ受託番号ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１２０．１）（それぞれ、図１４Ａおよび１４Ｂ）を使用した。各型の細胞を、１次抗体として２５ｎｇ／ｍｌテトラサイクリンで生成したＣ２Ｂ８抗体とともにインキュベートした。陰性コントロールは、１次抗体の代わりに、ＨＢＳＳＢを含めた。抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異的ポリクローナルＦＩＴＣ結合体化抗体を２次抗体として全てのサンプルで使用した。

【図１５】図１５は、異なる抗体濃度（０．０４～５μｇ／ｍｌ）での異なるＣ２Ｂ８抗体サンプルのＡＤＣＣ活性を示す。サンプルＣ２Ｂ８－ｎｔは、ＧｎＴ　ＩＩＩ発現なしの細胞株で生成されたＣ２Ｂ８抗体のＡＤＣＣ活性を表す。サンプルＣ２Ｂ８－２０００ｔ、Ｃ２Ｂ８－５０ｔおよびＣ２Ｂ８－２５ｔは、漸減テトラサイクリン濃度（すなわち、漸増ＧｎＴ　ＩＩＩ発現）で生成した３つの抗体サンプルのＡＤＣＣ活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

（ＶＩＩ．発明の詳細な説明）

（Ａ．一般的な概要）

本発明の目的は、タンパク質（特に抗体（抗体分子全体、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を含む融合タンパク質を含む））の糖形態を提供して、治療的タンパク質の新たな改変体を生成することである。本発明は、細胞のグリコシル化反応ネットワークが、その集団内での特定の糖形態の割合を最大化するように操作され得、そして特定の糖形態が改善された治療特性を有するという本発明者らの発見に一部基づく。本発明はさらに、改善された治療価値を有するタンパク質の糖形態を同定する方法、およびそれらを再現可能に生成する方法の発見に一部基づく。本発明はさらに、バイセクティングＧｌｃＮＡｃを保有するＮ結合型複合型オリゴ糖を増加させるために、抗体生成細胞での糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ発現の好ましい範囲が存在するという発見に一部基づく。

【００１９】

そのように、本発明は、一般に、治療特性を改変し、そして改善するようにタンパク質をグリコシル化操作するための方法に関する。より詳細には、本発明は、改変されたグリコシル化パターンを有し、その結果、増強された抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を生じる抗体を宿主細胞において生成するための方法を記載する。方法の実施のために、本発明は、抗体をコードする核酸および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１つの核酸を有する宿主細胞を提供する。さらに、本発明は、改変されたグリコシル化パターンを有し、その結果、増強された抗体依存性細胞傷害性を生じる所望の抗体の発現を可能にする条件下でこのような宿主細胞を培養する方法およびプロトコルを提供する。さらに、増強された抗体依存性細胞傷害性を有する、そのように生成された抗体を単離する方法を記載する。

【００２０】

本発明のさらに特定の実施態様において、２つのモノクローナル抗体（すなわち、抗神経芽腫抗体ｃｈＣＥ７および抗ＣＤ２０抗体Ｃ２Ｂ８）はモデル治療糖タンパク質として使用され、そして標的糖形態は、特定のクラスの糖質（すなわち、バイセクティングＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）で改変されたＮ結合型複合型バイアンテナリーオリゴ糖）を有する糖形態である。本発明によって提供されるモデル系においては、ＣＨＯ細胞が宿主細胞として使用されるが、多くの他の細胞系が宿主細胞系として企図され得る。種々の型のＮ結合型オリゴ糖にバイセクティングＧｌｃＮＡｃを付加するグリコシルトランスフェラーゼであるＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴ　ＩＩＩ）は、通常は、ＣＨＯ細胞によって生成されない。ＳｔａｎｌｅｙおよびＣａｍｐｅｌｌ、１９８４、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６１：１３３７０－１３３７８。

【００２１】

ＧｎＴ　ＩＩＩ過剰発現の効果を実験的に調査するために、ラットＧｎＴ　ＩＩＩ　ｃＤＮＡのテトラサイクリン調節性過剰発現を有するＣＨＯ細胞株が樹立された。この実験系を使用して、本発明者らは、高レベルへのＧｎＴ　ＩＩＩの過剰発現が増殖阻害を導き

、そして細胞に対して毒性であることを発見した。ＧｎＴ　Ｖ（これは、異なるグリコシルトランスフェラーゼである）のテトラサイクリン調節性過剰発現を有する別のＣＨＯ細胞株は、同じ阻害効果を示した。このことは、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの過剰発現の一般的特徴であり得ることを示す。細胞増殖に対する酵素発現の効果は、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現のレベルに上限を設定し、従って、接近しにくいグリコシル化部位が、非調節性発現ベクターを使用するグリコシル化経路およびグリコシル化パターンの操作によって改変され得る程度もまた制限し得る。

【００２２】

基本レベルと毒性レベルとの間の範囲でＧｎＴ　ＩＩＩ発現を制御することによって糖形態分布が異なるｃｈＣＥ７　ｍＡｂおよびＣ２Ｂ８サンプルのセットの生成が開示される。ｃｈＣＥ７　ｍＡｂサンプルのＡＤＣＣ活性の測定によって、インビトロでの最大ｃｈＣＥ７生物学的活性についてのＧｎＴ　ＩＩＩ発現の最適範囲が示された。この活性は、Ｆｃと関連する複合型バイセクト型オリゴ糖のレベルと相関した。実際の範囲内（すなわち、有意な増殖阻害も毒性も見られない）でのＧｎＴ　ＩＩＩの発現は、ｃｈＣＥ７サンプルのこのセットについて標的の複合型バイセクト型構造の増加を導いた。高レベルのＧｎＴ　ＩＩＩで産生されたｃｈＣＥ７サンプルのＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ質量分析におけるオリゴ糖ピークのパターンは、潜在的なＧｎＴ　ＩＩＩ基質の有意な割合が混成型バイセクト型オリゴ糖副生成物に転換されることを示す。従って、経路のさらなる操作による、これらの副生成物の最小化は、有益であり得る。

【００２３】

（Ｂ．グリコシル化パターンの改変を指向するタンパク質をコードする核酸の同定および生成）

本発明は、グリコシル化パターンの変化が指向される、目的の任意のタンパク質、タンパク質フラグメントまたはペプチドの変化した糖形態の生成に適切な宿主細胞系を、提供する。そのような目的のタンパク質、タンパク質フラグメントまたはペプチドをコードする核酸は、一般に当該分野において公知の方法によって得られ得る。例えば、核酸は、ｃＤＮＡライブラリーまたはゲノムライブラリーから単離され得る。使用され得るクローニング戦略のための総説について、例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ、１９８９、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇｓ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．；およびＡｕｓｕｂｅｌら、１９８９、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、（Ｇｒｅｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、Ｎ．Ｙ．）を参照のこと。

【００２４】

本発明の別の実施態様において、目的のタンパク質、タンパク質フラグメントまたはペプチドのコード配列は、当該分野において周知の化学的方法を使用して、全体的にか、または部分的に、合成され得る。例えば、Ｃａｒｕｔｈｅｒｓら、１９８０、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．７：２１５～２３３；ＣｒｅａおよびＨｏｒｎ、１９８０、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．ＵＳＡ　９：２３３１；ＭａｔｔｅｕｃｃｉおよびＣａｒｕｔｈｅｒｓ、１９８０、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　２１：７１９；ＣｈｏｗおよびＫｅｍｐｅ、１９８１、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．９：２８０７～２８１７を参照のこと。あるいは、そのタンパク質自体が、そのアミノ酸配列の全体または部分を合成する化学的方法を使用して生成され得る。例えば、ペプチドは、固相技術によって合成され、樹脂から切断され、そして調製用高速液体クロマトグラフィーによって精製され得る。例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、１９８３、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　Ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．、Ｎ．Ｙ．，５０～６０頁を参照のこと。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはアミノ酸配列決定（例えば、エドマン分解手順；Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、１９８３、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．、Ｎ．Ｙ．３４～４

９頁を参照のこと）によって確認され得る。

【００２５】

好ましい実施態様において、本発明は、抗体または抗体フラグメントあるいは増強した抗体依存性細胞傷害性を有する抗体フラグメントを含有する融合タンパク質の糖形態の産生のための宿主細胞系の生成および使用のための方法を提供する。標的エピトープの同定、およびグリコシル化パターンの改変が所望される、可能性のある治療的価値を有する抗体の生成、ならびにその対応するコード核酸配列の単離は、本発明の範囲内である。

【００２６】

当該分野において公知の種々の手順が、目的の標的エピトープに対する抗体の産生のために使用され得る。そのような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Ｆａｂフラグメント、およびＦａｂ発現ライブラリーによって産生されたフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。そのような抗体は、例えば、診断剤および治療剤として有用であり得る。治療剤として、中和抗体（すなわち、リガンド、基質またはアダプター分子との結合に競合する抗体）が、特に好ましく興味深い。

【００２７】

抗体の産生のために、種々の宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない）が、目的の標的タンパク質を用いて、注射によって免疫される。種々のアジュバント（宿主の種に依存して、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性剤、プルロニックポリオール（ｐｌｕｒｏｎｉｃ ｐｏｌｙｏｌｓ）、ポリアニオン、ペプチド、懸濁オイル、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびＢＣＧ（ｂａｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍのような可能性のある有用なヒトアジュバントが挙げられるが、これらに限定されない）を使用して、免疫応答を増加し得る。

【００２８】

目的の標的に対するモノクローナル抗体が、培養物中の連続的細胞株による抗体分子産生のために提供される任意の技術を使用して、調製され得る。この技術には、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５、Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５～４９７）によって最初に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｓｂｏｒら、１９８３、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ、４：７２；Ｃｏｔｅら、１９８３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２０２６～２０３０）およびＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅら、１９８５、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ、Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ、Ｉｎｃ．７７～９６頁）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子とともに、スプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、１９８４、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：６８５１～６８５５；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、１９８４、Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４～６０８；Ｔａｋｅｄａら、１９８５、Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２～４５４）が、使用され得る。あるいは、単鎖抗体の産生について記載される技術（米国特許第４，９４６，７７８号）が、所望の特異性を有する単鎖抗体の産生に適用され得る。

【００２９】

目的の標的タンパク質の特異的結合部位を含有する抗体フラグメントが、公知の技術によって生成され得る。例えば、そのようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化によって生成され得るＦ（ａｂ’）$_2$フラグメント、およびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントのジスルフィド架橋の還元によって生成され得るＦａｂフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、Ｆａｂ発現ライブラリーが、構築され得（Ｈｕｓｅら、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５～１２８１）、目的の標的タンパク質に対する所望の特異性を有するモノクローナルＦａｂフラグメントの迅速かつ容易な同定を可

能にする。

【００３０】

一旦、グリコシル化パターンにおける改変が所望される抗体または抗体フラグメントが同定されると、コード核酸配列が、当該分野において周知の技術を用いて、同定および単離される。上記を参照のこと。

【００３１】

（Ｃ．変化したグリコシル化パターンを有するタンパク質の産生のための細胞株の生成）

本発明は、改変されたグリコシル化パターンを有するタンパク質の生成のための宿主細胞発現系を提供する。具体的には、本発明は、改善された治療的価値を有するタンパク質の糖形態を生成するための宿主細胞系を提供する。従って、本発明は、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を増加するように選択されるか、または操作された宿主細胞発現系を提供する。具体的には、そのような宿主細胞発現系を操作して、構成性プロモーター系または調節性プロモーター系と作動可能に連結された、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組換え核酸分子を含有し得る。あるいは、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼを、天然に産生する、産生するように誘導される、および／または産生するように選択される、宿主発現系が、使用され得る。

【００３２】

１つの特定の実施態様において、本発明は、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１つの核酸を発現するように操作された宿主細胞を提供する。１つの局面において、宿主細胞は、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１つの遺伝子を含有する核酸分子で、形質転換されるか、またはトランスフェクションされる。代替的な局面において、この宿主細胞は、内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように、操作および／または選択される。例えば、宿主細胞は、内因性の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を誘発するような変異を含有するように選択され得る。この局面は、宿主細胞がＣＨＯ　ｌｅｃ１０変異株である１つの特定の実施態様において例示される。あるいは、宿主細胞は、内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが活性化されるように操作され得る。再度別の代替物において、宿主細胞は、内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが宿主細胞染色体中に調節性プロモーターエレメントを挿入することによって活性化されるように操作される。さらなる代替物において、宿主細胞は、内因性の糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼが宿主細胞染色体中に構成性プロモーターエレメント、トランスポゾン、またはレトロウイルスエレメントを挿入することによって活性化されるように操作される。

【００３３】

一般に、任意のタイプの培養細胞株を、本発明の宿主細胞株を操作するバックグラウンドとして使用し得る。好ましい実施態様において、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞またはハイブリドーマ細胞株を、本発明の操作された宿主細胞を生成するための、バックグラウンド細胞株として使用する。

【００３４】

本発明は、本明細書において規定される糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの任意のタイプを発現する操作された宿主細胞を包含することが意図される。しかし、好ましい実施態様において、本発明の宿主細胞によって発現される少なくとも１つの糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼは、ＧｎＴ　ＩＩＩであるか、あるいは、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＶ（β（１，４）－Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｙｌｔｒａｓｆｅｒａｓｅ　Ｖ）（ＧｎＴ　Ｖ）である。しかし、代表的にＧｎＴ　ＩＩＩまたはＧｎＴ　Ｖに加えて、β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）、およびマンノシダーゼＩＩ（ＭａｎＩＩ）を含む、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの別のタイプもまた、宿主系において発現され得る。本発明の１つの実施態様において、ＧｎＴ　ＩＩＩは、ＧａｌＴと同時に

発現される。本発明の別の実施態様において、ＧｎＴ　ＩＩＩは、ＭａｎＩＩと同時に発現される。本発明のさらなる実施態様において、ＧｎＴ　ＩＩＩは、ＧａｌＴおよびＭａｎＩＩと同時に発現される。しかし、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの任意の他の変更は、本発明の範囲内である。さらに、宿主細胞系内でのグリコシダーゼの発現が所望され得る。

【００３５】

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核酸の１つまたはいくつかは、構成性プロモーターの制御下、あるいは調節性発現系の制御下において発現され得る。適切な調節性発現系としては、テトラサイクリン－調節性発現系、エクジソン誘導性発現系、ｌａｃスイッチ発現系、グルココルチコイド誘導性発現系、温度誘導性プロモーター系、およびメタロチオネイン金属誘導性発現系が挙げられるが、これらに限定されない。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いくつかの異なる核酸が、宿主細胞系内に含有される場合、それらのいくつかは、構成性プロモーターの制御下において発現され得るが、一方、その他は、調節性プロモーターの制御下で発現される。最適な発現レベルは、目的の各タンパク質について異なり、そして慣用的な実験を使用して決定される。発現レベルは、当該分野において一般に公知の方法（グリコシルトランスフェラーゼ特異的抗体を使用するウエスタンブロット分析、グリコシルトランスフェラーゼ特異的核酸プローブを使用するノザンブロット分析、または酵素活性の測定を含む）によって決定される。あるいは、グリコシルトランスフェラーゼの生合成産物と結合するレクチン（例えば、E_4－ＰＨＡレクチン）を使用し得る。さらなる代替物において、核酸は、レポーター遺伝子と作動可能に連結され得る；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レベルは、レポーター遺伝子の発現レベルと相関するシグナルを測定することによって決定される。このレポーター遺伝子は、こ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核酸とともに、単一のｍＲＮＡ分子として転写され得る；その対応するコード配列は、内部リボゾーム進入部位（ＩＲＥＳ）またはキャップ非依存性翻訳エンハンサー（ＣＩＴＥ）のいずれかと連結され得る。このレポーター遺伝子は、こ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１つの核酸とともに翻訳され得、その結果単一のポリペプチド鎖が形成される。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核酸は、単一のプロモーターの制御下のレポーター遺伝子に作動可能に連結され得、その結果糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼおよびレポーター遺伝子をコードする核酸は、２つの別のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子に選択的スプライシングされるＲＮＡ分子に転写される；生じるＲＮＡの一方は、そのレポータータンパク質に翻訳され、そして他方は糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼに翻訳される。

【００３６】

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いくつかの異なる核酸が発現する場合、これらの核酸は、１つかまたはいくつかのｍＲＮＡ分子として転写されるように配列され得る。これらの核酸が、単一のｍＲＮＡ分子として転写される場合、その対応するコード配列は、内部リボゾーム進入部位（ＩＲＥＳ）またはキャップ非依存性翻訳エンハンサー（ＣＩＴＥ）のいずれかと連結され得る。これらの核酸は、単一のプロモーターから１つのＲＮＡ分子に転写され、いくつかの別々のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子に選択的スプライシングされ得る。次いで、これらｍＲＮＡの各々は、対応するコードされた糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼに翻訳される。

【００３７】

他の実施態様において、本発明は、治療的タンパク質（例えば、増強された抗体依存性細胞傷害性を有する抗体、およびＦｃ媒介細胞傷害性を促進する表面にＩｇＧ　Ｆｃ領域を提示する細胞）の生成のための宿主細胞発現系を提供する。一般に、宿主細胞発現系は、操作および／または選択され、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１つの核酸ともに、改変された糖形態の生成が所望されるタンパク質をコードする核酸を発現する。１つの実施態様において、宿主細胞系は、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１つの遺伝子でトランスフェクトされる。代表的には、トランスフェクトされた細胞を選択して、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼを安定に発現するクローンを同定および単離する。別の実施態様において、この宿主細胞は、内因性グリコシルトランスフェラーゼの発現について選択された。例えば、そうでなければサイレントな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を誘発する変異を有する細胞が、選択され得る。例えば、ＣＨＯ細胞は、特定の変異体において（例えば、変異体Ｌｅｃ１０において）活性な、サイレントなＧｎＴ ＩＩＩ遺伝子を保有することが公知である。さらに、サイレントな糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を活性化するために、当該分野において公知の方法（調節性プロモーターまたは構成性プロモーターの挿入、あるいはトランスポゾン、レトロウイルスエレメントの使用などを含む）が使用され得る。遺伝子ノックアウト技術の使用、またはリボザイム方法の使用を用いて、宿主細胞のグリコシルトランスフェラーゼおよび／またはグリコシダーゼ発現レベルを適応させ得る。この使用も本発明の範囲内である。

【００３８】

培養細胞株の任意のタイプが、本発明の宿主細胞株を操作するためのバックグラウンドとして使用され得る。好ましい実施態様において、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞である。代表的には、そのような細胞株は操作され、抗体分子全体、抗体フラグメント、または免疫グロブリンのＦｃ領域と等価の領域を含む融合タンパク質をコードする少なくとも１つのトランスフェクトされた核酸をさらに含む。別の実施態様において、目的の特定の抗体を発現するハイブリドーマ細胞株を、本発明の操作された宿主細胞を生成するためのバックグラウンド細胞株として使用する。

【００３９】

代表的には、宿主細胞系内の少なくとも１つの核酸は、ＧｎＴ ＩＩＩ、あるいはＧｎＴ Ｖをコードする。しかし、他のタイプの糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ（代表的にはＧｎＴ ＩＩＩまたはＧｎＴ Ｖに加え、ＧａｌＴおよびＭａｎＩＩを含む）が、宿主系内で発現され得る。本発明の１つの実施態様において、ＧｎＴ ＩＩＩは、ＧａｌＴと同時に発現される。本発明の別の実施態様において、ＧｎＴ ＩＩＩは、ＭａｎＩＩと同時に発現される。本発明のさらなる実施態様において、ＧｎＴ ＩＩＩは、ＧａｌＴおよびＭａｎＩＩと同時に発現される。しかし、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼの任意の他の変更は、本発明の範囲内である。さらに、宿主細胞系内でのグリコシダーゼの発現が所望され得る。

【００４０】

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核酸の１つまたはいくつかは、構成性プロモーターの制御下、あるいは調節性発現系の制御下において発現され得る。適切な調節性発現系としては、テトラサイクリン－調節性発現系、エクジソン誘導性発現系、ｌａｃスイッチ発現系、グルココルチコイド誘導性発現系、温度誘導性プロモーター系、およびメタロチオネイン金属誘導性発現系が挙げられるがこれらに限定されない。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いくつかの異なる核酸が、宿主細胞系内に含有される場合、それらのいくつかは、構成性プロモーターの制御下において発現され得るが、一方、その他は、調節性プロモーターの制御下で発現される。最適な発現レベルは、目的の各タンパク質について異なり、そして慣用的な実験を使用して決定される。発現レベルは、当該分野において一般に公知の方法（グリコシルトランスフェラーゼ特異的抗体を使用するウエスタンブロット分析、グリコシルトランスフェラーゼ特異的核酸プローブを使用するノザンブロット分析、または酵素活性の測定を含む）によって決定される。あるいは、グリコシルトランスフェラーゼの生合成産物と結合するレクチン（例えば、E_4－ＰＨＡレクチン）を使用し得る。さらなる代替物において、核酸は、レポーター遺伝子と作動可能に連結され得る；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レベルは、レポーター遺伝子の発現レベルと相関するシグナルを測定することによって決定される。このレポーター遺伝子は、こ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核酸とともに、単一のｍＲＮＡ分子として転写され得る；

その対応するコード配列は、内部リボゾーム進入部位（ＩＲＥＳ）またはキャップ非依存性翻訳エンハンサー（ＣＩＴＥ）のいずれかと連結され得る。このレポーター遺伝子は、こ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１つの核酸とともに翻訳され得、その結果単一のポリペプチド鎖が形成される。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核酸は、単一のプロモーターの制御下のレポーター遺伝子に作動可能に連結され得、その結果糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼおよびレポーター遺伝子をコードする核酸は、２つの別々のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子に選択的スプライシングされるＲＮＡ分子に転写される；生じるＲＮＡの１つは、そのレポータータンパク質に翻訳され、そして他方は糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼに翻訳される。

【００４１】

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いくつかの異なる核酸が発現する場合、これらの核酸は、１つかまたはいくつかのｍＲＮＡ分子として転写されるように配列され得る。これらの核酸が、単一のｍＲＮＡ分子として転写される場合、その対応するコード配列は、内部リボゾーム進入部位（ＩＲＥＳ）またはキャップ非依存性翻訳エンハンサー（ＣＩＴＥ）のいずれかと連結され得る。これらの核酸は、単一のプロモーターから１つのＲＮＡ分子に転写され、いくつかの別々のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子に選択的スプライシングされ得る。次いで、これらｍＲＮＡの各々は、対応するコードされた糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼに翻訳される。

【００４２】

（１．発現系）

当業者に周知の方法を使用して、目的のタンパク質のコード配列および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列、および適切な転写／翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築し得る。これらの方法としては、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術およびインビボ組換え／遺伝子組換えが挙げられる。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓら、１９８９、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｎ．Ｙ．およびＡｕｓｕｂｅｌら、１９８９、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ、Ｎ．Ｙ．に記載される技術を参照のこと。

【００４３】

種々の宿主－発現ベクター系を使用して、目的のタンパク質のコード配列、および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列を発現し得る。好ましくは、哺乳動物細胞を、目的のタンパク質のコード配列、および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列を含有する、組換えプラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞系として使用する。最も好ましくは、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、またはＳＰ２／０細胞あるいはハイブリドーマ細胞株を、宿主細胞系として使用する。代替的な実施態様において、他の真核生物宿主細胞系（目的のタンパク質のコード配列、および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母細胞；目的のタンパク質のコード配列、および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；目的のタンパク質のコード配列、および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列を含む、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）で感染されたか、または組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは目的のタンパク質をコードするＤＮＡ、および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列の複数のコピー（安定に増幅された（ＣＨＯ／ｄｈｆｒ）か、もしくは二重微小染色体中で不安定に増幅された（例えば、マウス細胞株））を含有するよ

うに操作された細胞株を含む、組換えウイルス発現ベクター（例えば、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）で感染された動物細胞系を含む）が意図され得る。

【００４４】

本発明の方法のために、安定な発現が、一般には一過性の発現よりも好ましい。なぜなら、安定な発現は、代表的により再現性のある結果を達成し、そしてまた、大スケール産生により適合しやすいからである。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使用するよりむしろ、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）によって制御されるそれぞれのコード核酸、および選択マーカーで形質転換し得る。外来ＤＮＡの導入後、操作された細胞を、富化された培地中で１～２日間増殖させ得、次に、選択培地に変更する。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、そしてプラスミドをその染色体中に安定に組み込み、そして増殖してコロニーを形成し、その結果クローン化され、細胞株に拡大される細胞の選択を可能にする。

【００４５】

それぞれ、ｔｋ⁻、ｈｇｐｒｔ⁻、またはａｐｒｔ⁻細胞において使用され得る、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒら、１９７７、Ｃｅｌｌ　１１：２２３）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＳｚｙｂａｌｓｋａおよびＳｚｙｂａｌｓｋｉ、１９６２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　４８：２０２６）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙら、１９８０、Ｃｅｌｌ　２２：８１７）遺伝子を含むが、これらに限定されない多数の選択系が使用され得る。抗代謝産物耐性が、メトトレキサートに対する耐性を付与するｄｈｆｒ（Ｗｉｇｌｅｒら、１９８０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：３５６７；Ｏ’Ｈａｒｅら、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１５２７）、ミコフェノール酸に対する耐性を付与するｇｐｔ（ＭｕｌｌｉｇａｎおよびＢｅｒｇ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：２０７２）；アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を付与するｎｅｏ（Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎら、１９８１、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１）；およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するｈｙｇｒｏ（Ｓａｎｔｅｒｒｅら、１９８４、Ｇｅｎｅ　３０：１４７）遺伝子についての選択の基礎として使用され得る。近年、細胞にトリプトファンの代わりにインドールを利用させ得るｔｒｐＢ；細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用させ得るｈｉｓＤ（ＨａｒｔｍｅｎおよびＭｕｌｌｉｇａｎ、１９８８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：８０４７）；グルタミンシンターゼ系；およびオルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである２－（ジフルオロメチル）－ＤＬ－オルニチン、ＤＦＭＯに対する耐性を付与するＯＤＣ（オルニチンデカルボキシラーゼ）（ＭｃＣｏｎｌｏｇｕｅ、１９８７、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ編）と称するさらなる選択遺伝子が記載されている。

【００４６】

（２．改変グリコシル化パターンを有するタンパク質を発現するトランスフェクト体および形質転換体の同定）

コード配列を含む宿主細胞および生物学的に活性な遺伝子産物を発現する宿主細胞は、少なくとも４つの一般的なアプローチにより同定され得る；（ａ）ＤＮＡ－ＤＮＡハイブリダイゼーションまたはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーション；（ｂ）「マーカー」遺伝子機能の存在または非存在；（ｃ）宿主細胞におけるそれぞれのｍＲＮＡ転写物の発現により測定されるような、転写レベルの評価；および（ｄ）イムノアッセイまたはその生物学的活性により測定されるような、遺伝子産物の検出。

【００４７】

第１のアプローチにおいて、発現ベクター中に挿入された目的のタンパク質のコード配列および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列の存在は、それぞ

れのコード配列、またはそれらのそれぞれの部分もしくは誘導体に相同であるヌクレオチド配列を含むプローブを用いて、ＤＮＡ－ＤＮＡハイブリダイゼーションまたはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションにより検出され得る。

【００４８】

第２のアプローチにおいて、組換え発現ベクター／宿主系は同定され、そして特定の「マーカー」遺伝子機能（例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、メトトレキサートに対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルス中の封入体形成など）の存在または非存在に基づき、選択され得る。例えば、目的のタンパク質のコード配列および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列が、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入されている場合、それぞれのコード配列を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の非存在により同定され得る。あるいは、マーカー遺伝子は、コード配列の発現を制御するために使用される同じプロモーターまたは異なるプロモーターの制御下で、コード配列と縦列して配置され得る。誘導または選択に応じたマーカーの発現は、目的のタンパク質のコード配列および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列の発現を示す。

【００４９】

第３のアプローチにおいて、目的のタンパク質のコード領域および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列の転写活性は、ハイブリダイゼーションアッセイにより評価され得る。例えば、ＲＮＡは、単離されそして目的のタンパク質のコード配列および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列またはそれらの特定部分に相同なプローブを用いたノーザンブロットにより分析され得る。あるいは、宿主細胞の全核酸が抽出され、そしてこのようなプローブへのハイブリダイゼーションについて評価され得る。

【００５０】

第４のアプローチにおいて、目的のタンパク質のタンパク質産物および糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼのコード配列の発現は、免疫学的に、例えば、ウェスタンブロット、イムノアッセイ（例えば、ラジオイムノ沈降、酵素結合イムノアッセイなど）により評価され得る。しかし、発現系の最終的な試験の成功は、生物学的に活性化な遺伝子産物の検出を含む。

【００５１】

（Ｄ．変化したグリコシル化パターンを有するタンパク質およびタンパク質フラグメントの生成および使用）

（１．増強した抗体依存性細胞傷害性を有する抗体の生成および使用）

好ましい実施態様において、本発明は、増強した抗体依存性細胞傷害性を有する抗体および抗体フラグメントの糖形態を提供する。

【００５２】

いくつかの型の癌の処置のための非結合体化モノクローナル抗体（ｍＡｂ）の臨床的試行は、近年進んだ結果を生じた。Ｄｉｌｌｍａｎ、１９９７、Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｔｈｅｒ．＆Ｒａｄｉｏｐｈａｒｍ．１２：２２３－２２５；Ｄｅｏら、１９９７、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ １８：１２７。キメラの非結合体化ＩｇＧ１が、低級なまたは小胞性のＢ細胞非ホジキンリンパ腫について認可されている（Ｄｉｌｌｍａｎ、１９９７、前出）が、一方別の非結合体化ｍＡｂである、ヒト化ＩｇＧ１標的固形乳腫瘍もまた、第ＩＩＩ相臨床試験において有望な結果を示しつつあった。Ｄｅｏら、１９９７、前出。これらの２つのｍＡｂの抗原は、それらの各々の腫瘍細胞において高度に発現され、そしてそれらの抗体は、インビトロおよびインビボでエフェクター細胞により強力な腫瘍破壊を媒介する。対照的に、良好な腫瘍特異性を有する多くの他の非結合体化ｍＡｂは、臨床的に有用である程十分な効力のエフェクター機能を引き起こし得ない。Ｆｒｏｓｔら、１９９７、Ｃａｎｃｅｒ ８０：３１７－３３３；Ｓｕｒｆｕｓら、１９９６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．１９：１８４－１９１。これらのより弱いｍＡｂのいくつかについて、補助的なサイトカイン治療が、現在も試験されている。サイトカインの添加は、その活

性および循環リンパ球の数を増加することによって抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を刺激し得る。Ｆｒｏｓｔら、１９９７、前出；Ｓｕｒｆｕｓら、１９９６、前出。溶解物が抗体標的化細胞に対して攻撃するＡＤＣＣは、リンパ球レセプターの、抗体の定常境域（Ｆｃ）への結合の際、引き起こされる。Ｄｅｏら、１９９７、前出。

【００５３】

非結合体化ＩｇＧ１のＡＤＣＣ活性を増大させる、異なるが相補的であるアプローチは、抗体のＦｃ領域を、リンパ球レセプターに対する親和性（ＦｃγＲ）を増大させるように操作することである。タンパク質工学研究は、ＦｃγＲが、ＩｇＧ　ＣＨ２ドメインのより低いヒンジ領域と相互作用することを示した。Ｌｕｎｄら、１９９６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４９６３－４９６９。しかし、ＦｃγＲ結合はまた、ＣＨ２領域における保存されたＡｓｎ２９７で共有結合的に付着したオリゴ糖の存在を必要とする。Ｌｕｎｄら、１９９６、前出；ＷｒｉｇｈｔおよびＭｏｒｒｉｓｏｎ、１９９７、Ｔｉｂｔｅｃｈ　１５：２６－３１は、オリゴ糖およびポリペプチドの両方が直接相互作用部位に寄与するか、またはオリゴ糖が活性なＣＨ２ポリペプチドコンフォメーションを維持するために必要とされるかのいずれかであることを示唆している。従って、オリゴ糖の構造の改変は、相互作用の親和性を増大させるための手段として、探索され得る。

【００５４】

ＩｇＧ分子は、そのＦｃ領域中に２つのＮ結合オリゴ糖を保有し、一つは、各重鎖にある。任意の糖タンパク質と同様に、抗体は、糖形態の集団として産生される。この糖形態は、同じポリペプチド骨格を共有するが、グリコシル化部位に付着した異なるオリゴ糖を有する。血清ＩｇＧのＦｃ領域中に通常見出されるオリゴ糖は、低いレベルの末端シアル酸およびバイセクティングＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ならびに程度が可変し得る末端ガラクトシル化およびコアフルコシル化を有する、バイアンテナリー複合型オリゴ糖である（Ｗｏｒｍａｌｄら、１９９７、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３６：１３０－１３８０）(図１）。いくつかの研究は、ＦｃγＲ結合を必要とする最小の糖質構造は、オリゴ糖コア内にあることを示唆する。Ｌｕｎｄら、１９９６、前出。末端ガラクトースの除去は、ＡＤＣＣ活性において約２倍の減少をもたらす。このことは、ＦｃγＲレセプター結合におけるこれらの残基についての役割を示す。Ｌｕｎｄら、１９９６、前出。

【００５５】

非結合体化治療用ｍＡｂの生成のために産業および教育において使用される　マウスまたはハムスター誘導細胞株は、通常、必要とされるオリゴ糖決定因子をＦｃ部位に付着させる。しかし、これらの細胞株において発現されるＩｇＧは、血清ＩｇＧにおいて低量で見出されるバイセクティングＧｌｃＮＡｃを欠く。Ｌｉｆｅｌｙら、１９９５、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ　３１８：８１３－８２２。対照的には、ラット骨髄腫産生ヒト化ＩｇＧ１（ＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈ）が、その糖形態のいくつかにおいてバイセクティングＧｌｃＮＡｃを保有することが、最近観察された。Ｌｉｆｅｌｙら、１９９５、前出。ラット細胞誘導化抗体は、標準的な細胞株において産生されるＣＡＭＰＡＴＨ－１Ｈ抗体と類似したインビトロのＡＤＣＣ活性に、しかし有意により低い抗体濃度で、達した。

【００５６】

ＣＡＭＰＡＴＨ抗原は、通常、リンパ腫細胞に高いレベルで存在し、そしてこのキメラｍＡｂは、バイセクティングＧｌｃＮＡｃの非存在下で高いＡＤＣＣ活性を有する。Ｌｉｆｅｌｙら、１９９５、前出。Ｌｉｆｅｌｙら、１９９５、前出の研究において、たとえ最大のインビトロＡＤＣＣ活性が、グリコシル化パターンの変化により増大しなかったとしても、この活性レベルが、バイセクト型オリゴ糖を保有する抗体の比較的低い抗体濃度で得られたという事実は、バイセクト型オリゴ糖の重要な役割を示唆する。Ｆｃ領域においてバイセクト型オリゴ糖を保有するこれらの抗体の糖形態を生成することによって、低い基底活性レベルを有するＩｇＧ１のＡＤＣＣ活性を増大するようなアプローチが発達した。

【００５７】

Ｎ結合グリコシル化経路において、バイセクティングＧｌｃＮＡｃは、酵素β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴ　ＩＩＩ）により添加される。Ｓｃｈａｃｈｔｅｒ、１９８６、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．６４：１６３－１８１。Ｌｉｆｅｌｙら、１９９５、前出は、内因的な一定のレベルでＧｎＴ　ＩＩＩを発現するラット骨髄腫細胞株を含む、異なるが非操作のグリコシル化機構を有する異なる細胞株において抗体を産生することによって、同じ抗体の異なるグリコシル化パターンを得た。対照的に、本発明者らは、単一の抗体産生ＣＨＯ細胞株を使用した。これは、外部調節した様式で、異なるレベルのクローン化ＧｎＴ　ＩＩＩ遺伝子を発現するようにあらかじめ操作されていた。このアプローチにより、本発明者らは、ＧｎＴ　ＩＩＩの発現と改変した抗体のＡＤＣＣ活性との間の厳密な相関を初めて確立し得た。

【００５８】

本明細書中に実証されるように（実施例４（後述）を参照のこと）、開示される方法に従って改変されたＣ２Ｂ８抗体は、同一の細胞培養および精製条件下で産生された、標準的な非改変Ｃ２Ｂ８抗体よりも約１６倍高いＡＤＣＣ活性を有した。簡単に言うと、ＧｎＴ　ＩＩＩ発現を有さないＣＨＯ－ｔＴＡ－Ｃ２Ｂ８細胞において発現されたＣ２Ｂ８抗体サンプルは、ヒトリンパ球によりＳＢ細胞（ＣＤ２０＋）のインビトロ溶解として測定された、約３１％の細胞傷害性活性を示した（１μｇ／ｍｌ抗体濃度で）。対照的に、基底の主な抑制レベルでＧｎＴ　ＩＩＩを発現するＣＨＯ細胞培養物由来のＣ２Ｂ８抗体は、１μｇ／ｍｌ抗体濃度で、同じ抗体濃度でのコントロールに対してＡＤＣＣ活性の３３％増大を示した。さらに、ＧｎＴ　ＩＩＩの発現の増大は、同じ抗体濃度でのコントロールと比較して、最大のＡＤＣＣ活性においてほぼ８０％の大きな増加を生じた（１μｇ／ｍｌ抗体濃度で）。実施例４（後述）を参照のこと。

【００５９】

増強した抗体依存性細胞傷害性を有する本発明のさらなる抗体は、以下を含むが、これらに限定されない：本発明の方法により産生される抗ヒト神経芽腫モノクローナル抗体（ｃｈＣＥ７）、本発明の方法により産生されるキメラ抗ヒト腎細胞癌腫モノクローナル抗体（ｃｈ－Ｇ２５０）、本発明の方法により産生されるヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体、本発明の方法により産生されるキメラ抗ヒト結腸、肺および乳癌腫モノクローナル抗体（ＩＮＧ－１）、本発明の方法により産生されるヒト化抗ヒト１７－１Ａ抗原モノクローナル抗体（３６２２Ｗ９４）、本発明の方法により産生されるヒト化抗ヒト結腸直腸腫瘍抗体（Ａ３３）、本発明の方法により産生されるＧＤ３ガングリオシドに対する抗ヒト骨髄腫抗体（Ｒ２４）、ならびに本発明の方法により産生されるキメラ抗ヒト扁平上皮細胞癌モノクローナル抗体（ＳＦ－２５）。さらに、本発明は、抗体フラグメント、および免疫グロブリンのＦｃ領域と等価である領域を含む融合タンパク質に対して指向される。後述を参照のこと。

【００６０】

（２．Ｆｃ媒介細胞傷害性を促進する免疫グロブリンのＦｃ領域と等価な領域を含む融合タンパク質の生成および使用）

上記で議論されるように、本発明は、治療用抗体のＡＤＣＣ活性を増強するための方法に関する。これは、このような抗体のＦｃ領域のグリコシル化パターンを操作することによって、特に、それらのＦｃ領域で変換されたグリコシル化部位にＮ結合した複合型バイセクト型オリゴ糖を保有する抗体分子の割合を最大にすることによって達成される。この戦略は、治療用抗体によるのみならず、免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域を保有する任意の分子により媒介される、望ましくない細胞に対するＦｃ媒介性細胞細胞傷害を、増大させるために適用され得る。なぜならば、グリコシル化の操作により導入された変化は、Ｆｃ領域のみに影響を与え、従って、エフェクター細胞の表面上のＦｃレセプターとのその相互作用は、ＡＤＣＣ機構に関与したからである。現在開示される方法で適用され得るＦｃ含有分子としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：（ａ）Ｆｃ領域のＮ末端に融合された標的タンパク質ドメインで作製された可溶性融合タンパク質（ＣｈａｍｏｖおよびＡｓｈｋｅｎａｚｉ、１９９６、ＴＩＢＴＥＣＨ　１４：５２）、および

（ｂ）Ｆｃ領域のＮ末端に融合された原形質膜に局在するＩＩ型膜貫通ドメインで作製された原形質膜固定化融合タンパク質（Ｓｔａｂｉｌａ，Ｐ．Ｅ．、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．１６：１３５７）。

【００６１】

可溶性融合タンパク質（ａ）の場合、標的ドメインは、融合タンパク質の望ましくない細胞（例えば、癌細胞）への結合、すなわち治療用抗体と類似した様式で、指向させる。従って、これらの分子によって媒介されるＦｃ媒介細胞傷害性活性を増強するための、近年開示された方法の適用は、治療用抗体に適用される方法と同一である。米国特許仮出願番号第６０／０８２，５８１号（本明細書中で参考として援用される）の実施例２を参照のこと。

【００６２】

膜固定化融合タンパク質（ｂ）の場合、身体中の望ましくない細胞が、融合タンパク質をコードする遺伝子を発現する必要がある。これは、遺伝子治療アプローチ、すなわち、融合タンパク質コード遺伝子の発現を望ましくない細胞に指向させるプラスミドベクターもしくはウイルスベクターを用いて、インビボで細胞をトランスフェクトすることによるか、または細胞表面上に融合タンパク質を発現するように遺伝子的に操作された細胞の身体中への移植によるかのいずれかで達成され得る。後者の細胞は、通常、それらの細胞が、Ｆｃ媒介細胞傷害性機構によって破壊され得ないポリマーカプセルに内包されて身体内へ移植される（カプセル化細胞治療）。しかし、カプセル送達が失敗し、そして逸脱細胞が望ましくないようになれば、それらはＦｃ媒介細胞傷害性により除去され得る。Ｓｔａｂｉｌａら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ、Ｂｉｏｔｅｃｈ．１６：１３５７。この場合、現在開示される方法は、遺伝子治療用ベクターに、十分なもしくは最適なＧｎＴ　ＩＩＩの発現レベルを指向するさらなる遺伝子発現カセットを組込むことによってか、または十分なもしくは最適なレベルのＧｎＴ　ＩＩＩを発現するように、移植されるべき細胞を操作することによってかのいずれかで適用され得る。両方の場合において、開示される方法の目的は、複合型バイセクト型オリゴ糖を保有する表面提示Ｆｃ領域の割合を増大または最大にすることである。

【００６３】

以下の実施例は、本発明をより詳細に説明する。以下の調製物および実施例は、当業者が本発明をより明瞭に理解し、そして実施することを可能にするために、与えられる。しかし、本発明は、例示される実施態様および本発明の範囲内にある機能的に等価である方法によって範囲を限定されることなく、本発明の単なる単一の局面の例証として意図される。実際、本明細書中に記載されるものに加え、本発明の種々の改変は、前述の説明および添付している図面より当業者に明らかである。このような改変は、添付された特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

【実施例】

【００６４】

（ＶＩＩＩ．実施例）

（Ａ．実施例１：チャイニーズハムスター卵巣細胞におけるグリコシルトランスフェラーゼのテトラサイクリン調節過剰発現）

ＧｎＴ　ＩＩＩの発現が外部制御され得る細胞株を確立するために、テトラサイクリン調節発現系を使用した。Ｇｏｓｓｅｎ，Ｍ．およびＢｕｊａｒｄ，Ｈ．、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：５５４７－５５５１。これらの細胞中のＧｎＴ　ＩＩＩの量は、培養培地中のテトラサイクリン濃度を単に操作することによって制御され得る。この系を用いて、高いレベルまでのＧｎＴ　ＩＩＩの過剰発現が増殖阻害を導き、そして細胞に対して毒性であることを見出した。ＧｎＴ　Ｖ（異なる糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ）のテトラサイクリン調節過剰発現を有する別のＣＨＯ細胞株は、同様の阻害効果を示した。このことは、これが、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現の一般的特徴であり得ることを示す。この現象は、以前に報告されておらず、おそらく発明者は、一般的には、関連実験については構成的なプ

ロモーターを使用したという事実に起因する。増殖効果は、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現のレベルの上方制限を設定し、それによってまた貧弱な到達可能な糖タンパク質部位の改変の最大範囲を制限し得る。

【００６５】

（１．材料および方法）

グリコシルトランスフェラーゼのテトラサイクリン調節発現を有するＣＨＯ細胞の樹立。第１の工程において、テトラサイクリン制御トランスアクチベーター（ｔＴＡ）を、調節系に十分なレベルで、構成的に発現する中間のＣＨＯ細胞株（ＣＨＯ－ｔＴＡ）をまず生成した。リポフェクタミン試薬（Ｇｉｂｃｏ，Ｅｇｇｅｎｆｅｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、ＣＨＯ（ＤＵＫＸ）細胞を、ｔＴＡ遺伝子の構成的発現のためのベクターであるｐＵＨＤ１５－１（ＧｏｓｓｅｎおよびＢｕｊａｒｄ、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：５５４７－５５５１）およびネオマイシン耐性遺伝子の構成的発現のためのベクターであるｐＳＶ２Ｎｅｏ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）とともに同時トランスフェクトした。安定した薬物耐性クローンを選択し、そしてテトラサイクリン調節β－ガラクトシダーゼ発現ベクターであるｐＵＨＧ１６－３を用いた一過性トランスフェクションによる十分なレベルのｔＴＡ発現についてスクリーニングした。ｃ－ｍｙｃエピトープコードＤＮＡを、ＰＣＲ増幅によってラットＧｎＴ　ＩＩＩ　ｃＤＮＡ（Ｎｉｓｈｉｋａｗａら、１９９２、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：１８１９９－１８２０４）の３’末端に付加した。Ｎｉｌｓｓｏｎら、１９９３、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１２０：５－１３。この産物を配列決定し、そしてテトラサイクリン調節発現のためのベクターであるｐＵＨＤ１０－３（ＧｏｓｓｅｎおよびＢｕｊａｒｄ、前出）にサブクローニングし、ベクターｐＵＨＤ１０－３－ＧｎＴ　ＩＩＩｍを生成した。ヒトＧｎＴ　Ｖ　ｃＤＮＡ（Ｓａｉｔｏら、１９９５、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２３３：１８－２６）を、ｐＵＨＤ１０－３に直接サブクローニングし、プラスミドベクターｐＵＨＤ１０－３－ＧｎＴ　Ｖを生成した。ＣＨＯ－ｔＴＡ細胞を、リン酸カルシウムトランスフェクション法（ＪｏｒｄａｎおよびＷｕｒｍ．１９９６、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２４：５９６－６０１）を用いて、ピューロマイシン耐性の構成的発現のためのベクターであるｐＰｕｒ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ、ＣＡ）、およびベクターｐＵＨＤ１０－３－ＧｎＴ　ＩＩＩｍまたはベクターｐＵＨＤ１０－３－ＧｎＴ　Ｖのいずれかで、同時トランスフェクトした。ピューロマイシン耐性クローンをテトラサイクリンの存在下で選択し、単離し、次いでウェスタンブロット分析によりＧｎＴ　ＩＩＩまたはＧｎＴ　Ｖのテトラサイクリン調節発現について分析した。後述を参照のこと。

【００６６】

ウェスタンブロッティングおよびレクチンブロッティング。ＧｎＴ　ＩＩＩまたはＧｎＴ　Ｖのウェスタンブロット分析のために、細胞溶解物を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、そしてＰＶＤＦ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ）に電気ブロットした。抗ｃ－ｍｙｃモノクローナル抗体９Ｅ１０（Ｎｉｌｓｓｏｎら、１９９３、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１２０：５－１３）を用いてＧｎＴ　ＩＩＩを検出し、そして抗ＧｎＴ　Ｖウサギポリクローナル抗体（Ｃｈｅｎら、１９９５、Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｊ．１２：８１３－８２３）を用いてＧｎＴ　Ｖを検出した。二次抗体として、抗マウスまたは抗ウサギＩｇＧ西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ、ＩＬ）を使用した。結合した二次抗体を、増強化学発光キット（ＥＣＬキット、Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ、ＩＬ）を使用して検出した。

【００６７】

ＧｎＴ　ＩＩＩ触媒反応またはＧｎＴ　Ｖ触媒反応のいずれかにより改変される糖タンパク質のレクチンブロット分析について、ビオチン化Ｅ－ＰＨＡ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｌｙｃｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）またはＬ－ＰＨＡ－ジゴキシゲニン（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｍａｎｎｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）をそれぞれ使用した。ＭｅｒｋｌｅおよびＣｕｍｍｉｎｇｓ、１９８７、

Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１３８：２３２－２５９。

【００６８】

（２．結果および考察）

グリコシルトランスフェラーゼのテトラサイクリン調節過剰発現を有するＣＨＯ細胞株の樹立。グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現細胞株の樹立のために使用される戦略は、最初に、この系が働くのに十分なレベルで、テトラサイクリン制御トランスアクチベーター（ｔＴＡ）を構成的に発現する中間体ＣＨＯ細胞株をまず生成することからなった。Ｙｉｎら、１９９６、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２３５：１９５－２０１。このレベルは、テトラサイクリン非存在下で、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の上流の最小プロモータからの転写の高いレベルを活性化するのに十分高くなくてはいけなかった。ＣＨＯ細胞を、ｔＴＡの構成的発現のためのベクター（これは、ヒトサイトメガロウイルス（ｈＣＭＶ）プロモーター／エンハンサーによって駆動される）、およびネオマイシン耐性（Ｎｅｏ^{R}）遺伝子の発現のためのベクターとともに同時トランスフェクトした。過剰なｔＴＡ発現ベクターを使用し、そしてネオマイシン耐性クローンを単離した。

【００６９】

哺乳動物細胞において、同時トランスフェクトされたＤＮＡは、染色体内のランダムな位置で隣接して組込まれ、そして発現は、組込み部位に大部分依存し、そしてインタクトな発現カセットのコピー数にもまた依存する。トランスフェクトされた遺伝子の異なる発現レベルを有するクローンの混合集団が生成される。Ｙｉｎら、１９９６、前出。ネオマイシン耐性についての選択は、単に、インタクトなＮｅｏ^{R}発現カセットの組込みについて選択し、一方過剰なｔＴＡ発現ベクターの使用は、ｔＴＡの良好な発現を有するクローンを見出す確率を増大させる。クローンの混合集団は、ｔＴＡ発現についての機能的アッセイを用いてスクリーニングされなければならない。ＧｏｓｓｅｎおよびＢｕｊａｒｄ、１９９２、前出；Ｙｉｎら、１９９６、前出。これは、ｔｅｔプロモーターの制御下でレポーター遺伝子ｌａｃＺを保有する第２のベクターによる各クローンのトランスフェクション、およびβ－ガラクトシダーゼ活性の、テトラサイクリン調節（ｔｅｔ調節）一過的発現（すなわち、トランスフェクション後１～３日後）についてのスクリーニングによりなされた。ＣＨＯｔ１７（これは、２０のスクリーニングされたクローンの間で最も高いレベルのｔｅｔ調節β－ガラクトシダーゼ活性を示した）を、さらなる研究のために選択した。

【００７０】

ＣＨＯｔ１７細胞を、ベクターｐＵＨＤＩＯ－３－ＧｎＴ　ＩＩＩｍで細胞をトランスフェクトし、そしてテトラサイクリンの存在下または非存在下での３６時間、細胞をインキュベートした後のＧｎＴ　ＩＩＩの相対レベルを比較することにより、Ｇｎｔ　ＩＩＩのｔｅｔ調節発現について試験した。ＧｎＴ　ＩＩＩレベルを、ＧｎＴ　ＩＩＩのカルボキシ末端でｃ－ｍｙｃペプチドエピトープタグを認識するモノクローナル抗体（９Ｅ１０）を用いて、ウェスタンブロット分析により比較した。このタグを、ＰＣＲ増幅を用いたグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の改変により導入した。種々の報告は、局在または活性を崩壊することなく、同じトポロジーを共有する酵素群であるグリコシルトランスフェラーゼのカルボキシ末端へペプチドエピトープの付加することを実証した。Ｎｉｌｓｓｏｎら、１９９３、前出；Ｒａｂｏｕｉｌｌｅら、１９９５、Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　１０８：１６１７－１６２７。図２は、クローンＣＨＯｔ１７において、ＧｎＴ　ＩＩＩ蓄積が、テトラサイクリンの存在下よりも非存在においての方が、有意に高いことを示す。β－ガラクトシダーゼ活性のアッセイにおいてより弱い転写活性化を与えるさらなるクローン、ＣＨＯｔ２を、並行して試験した（図２）。ＧｎＴ　ＩＩＩおよびβ－ガラクトシダーゼの発現レベルは、これらの両方のクローンについて同じパターンのテトラサイクリン調節を伴う。ＧｎＴ　ＩＩＩ発現が量的に制御され得るテトラサイクリン濃度の範囲は、０～１００ｎｇ／ｍｌと見出された（図３）。この結果は、異なる細胞株と遺伝子を用いた前述の研究に一致する（Ｙｉｎら、１９９６、前出）。

【００７１】

ＧｎＴ　ＩＩＩのｔｅｔ調節発現を有する安定な細胞株を生成するために、ＣＨＯｔ１７細胞を、ベクターｐＵＨＤＩＯ－３－ＧｎＴ　ＩＩＩmおよびプロマイシン耐性遺伝子の発現のためのベクターｐＰＵＲで同時トランスフェクトした。並行して、ＣＨＯｔ１７細胞を、ｐＵＨＤＩＯ－３－ＧｎＴ　Ｖベクターおよびｐ ＰＵＲベクターで同時トランスフェクトし、この他のグリコシルトランスフェラーゼについて類似の細胞株を生成した。高度に効率的なリン酸カルシウムトランスフェクション方法を使用して、そして真核生物発現カセットの外側の唯一の制限部位でＤＮＡを線状化し、組込みの際にこれらを崩壊する確率を減少させた。発現したｔＴＡのレベルが最初に十分であると証明されている宿主を用いることによって、テトラサイクリン非存在下でグリコシルトランスフェラーゼの高度な発現を有するクローンを見出す確率が増大する。

【００７２】

安定な組込み体を、ピューロマイシン耐性により選択し、クローン選択を行った培地中にテトラサイクリンを保ち、基底レベルでのグリコシルトランスフェラーゼの発現を維持した。各グリコシルトランスフェラーゼについて、１６のピューロマイシン耐性クローンをテトラサイクリンの存在および非存在下で増殖し、それぞれの８つをウェスタンブロット分析により分析した（図４）。大多数のクローンは、グリコシルトランスフェラーゼ発現の良好な調節を示した。ＧｎＴ　ＩＩＩ発現クローンのうちの１つは、テトラサイクリンの存在下で比較的高い基底レベルを示した（図４Ｂ、クローン３）。このことは、発現カセットの組込みが内因性ＣＨＯ細胞エンハンサーに近接することを示唆する；一方、２つのピューロマイシン耐性クローンは、テトラサイクリンの非存在下でＧｎＴ　ＩＩＩの発現を示さなかった（図４Ｂ、クローン６および８）。発現の良好な調節を示すクローンの間で、異なる最大レベルのグリコシルトランスフェラーゼが観察された。これは、組込み部位または組込まれたコピー数におけるバリエーションに起因し得る。グリコシルトランスフェラーゼの活性を、テトラサイクリンの存在および非存在において増殖させた種々のクローン由来の内因性細胞糖タンパク質へのＥ－ＰＨＡおよびＬ－ＰＨＡレクチン結合により確認した（図５）。レクチンは、特異的なオリゴ糖構造に結合するタンパク質である。Ｅ－ＰＨＡレクチンは、ＧｎＴ　ＩＩＩ触媒反応の産物であるバイセクト型オリゴ糖に結合し、そしてＬ－ＰＨＡは、ＧｎＴ　Ｖ触媒化反応により産生されるトリアンテナリー型オリゴ糖およびテトラアンテナリー型オリゴ糖に結合する（ＭｅｒｋｌｅおよびＣｕｍｍｉｎｇｓ、１９８７、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１３８：２３２－２５９）。各グリコシルトランスフェラーゼについて、テトラサイクリンの非存在において高度に発現し、しかしテトラサイクリン存在下では検出不可能であるクローン（クローン６、図４Ａ、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ　Ｖおよびクローン４、図４Ｂ、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ　ＩＩＩm）を、さらなる研究のために選択した。

【００７３】

（Ｂ．実施例２：グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現によってもたらされる細胞増殖の阻害）

テトラサイクリンの非存在下でのＧｎＴ　ＩＩＩを発現するクローンおよびＧｎＴ　Ｖを発現するクローンのスクリーニングの間（上記の実施例１を参照のこと）、クローンの各セットのおよそ半分が増殖の強力な阻害を示した。増殖阻害の程度は、クローンにより変動し、そしてウェスタンブロット分析から見積もった発現レベルとの比較（図４）は、増殖阻害の程度と、グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現との間の相関を示唆した。この相関は、最後のクローンＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ　ＩＩＩmおよびＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ　Ｖを、種々の濃度のテトラサイクリンにおいて増殖させることによって強固に確立された。増殖の強力な阻害は、低レベルのテトラサイクリンでの培養の２日後に明確になった（図６）。増殖阻害した細胞は、接着性ＣＨＯ細胞の代表的な細長い形状の代わりに小さく丸い形態を提示した。数日後、有意な細胞死が、増殖阻害された細胞の形態から明らかであった。

【００７４】

グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現に起因する増殖阻害は、これまで、文献には報

告されていない。これはおそらく、構成性のプロモーターの広汎な使用に起因する。増殖阻害レベルでのグリコシルトランスフェラーゼの構成性発現を与えるこれらのクローンは、選択手順の間に消失する。これは、選択の間に、培地中のテトラサイクリン（すなわち、基底発現レベル）を維持することによってここで回避された。選択前に、構成性ｈＣＭＶプロモーター／エンハンサーに基づく伝統的な哺乳動物ベクターを用いて増殖阻害レベルにまでグリコシルトランスフェラーゼを発現し得るクローンの頻度は、より低いと予測される。これは、任意の所定の遺伝子について、高度の構成性レベルのｔＴＡについて選択されたＣＨＯ細胞株におけるｐＵＨＤＩＯ－３ベクターが、他者らによって観察されるような、構成性のｈＣＭＶプロモーター／エンハンサーに基づくベクターよりも有意に高い発現レベルを与えるという事実に起因する。Ｙｉｎら、１９９６、前出。

【００７５】

細胞増殖の阻害は、それらのインビボでの触媒活性には非依存性の、膜結合型の、ゴルジ体内在性グリコシルトランスフェラーゼの過剰発現の直接の効果（例えば、小胞体（ＥＲ）における折り畳みの誤りを介し、ＥＲにおけるタンパク質折り畳みを補助するエレメントの飽和を生じる）に起因し得る。これは、おそらく、他の必須の細胞タンパク質の折り畳みおよび分泌に影響を与え得る。あるいは、増殖阻害は、グリコシルトランスフェラーゼのインビボ活性の増加に関連し得る。この活性増加は、機能を破壊する様式で、標準的なインビトロ培養条件下での増殖にとって必要な１セットの内因性糖タンパク質のグリコシル化パターンの変化をもたらす。

【００７６】

根底をなす機構とは独立して、この増殖阻害効果は、動物細胞のグリコシル化を操作することについて２つの結果を有する。第一に、この効果は、標的となる糖タンパク質産物のためのベクターとともに構成性グリコシルトランスフェラーゼ発現ベクターを同時トランスフェクトすることは、貧弱な戦略であることを示唆する。これらの２つのクラスのタンパク質の連結した発現の他の方法（例えば、類似の強度の複数の構成性プロモーターの使用または複数シストロン性の構成性発現ベクターの使用による）もまた、回避されるはずである。これらの場合、経済的なバイオプロセスにとって必要である、標的糖タンパク質の非常に高度で構成性の発現を有するクローンもまた、グリコシルトランスフェラーゼの高度な発現を有し、そしてこの選択プロセスにおいて排除され得る。連結された誘導性の発現もまた、産業的バイオプロセスについて問題であり得る。なぜなら、増殖停止した細胞の生存性は、グリコシルトランスフェラーゼの過剰発現によって減弱化されるからである。

【００７７】

第二の結果は、これが、グリコシル化操作のアプローチについてグリコシルトランスフェラーゼ過剰発現に上限を課すことである。明らかに、細胞において、グリコシルトランスフェラーゼの内因性レベルでの、多くのグリコシルトランスフェラーゼ触媒性の反応の変換は、いくつかのグリコシル化部位について非常に高い。しかし、そのオリゴ糖がいくらかアクセス不能であるか、または特定のグリコシルトランスフェラーゼについて有利でないコンホメーションにおいて安定化されている、グリコシル化部位もまた存在する。例えば、バイセクティングＧｌｃＮＡｃの添加は、ヒトＩｇＧ抗体の可変領域に配置されるオリゴ糖よりもそのＦｃ領域に付着するオリゴ糖に、より制限されることが観察されている。Ｓａｖｖｉｄｏｕら、１９８４、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２３：３７３６－３７４０。これらの制限された部位のグリコシル化操作は、グリコシルトランスフェラーゼ発現におけるそのような限定によって影響を受け得る。これは、糖形態の「非天然の」分布について目的化することを示唆するが、これらは、糖タンパク質の特定の治療適用について利益があり得る。

【００７８】

（Ｃ．実施例３：チャイニーズハムスター卵巣細胞の抗ヒト神経芽腫抗体のグリコシル化の操作）

そのグリコシル化パターンを改変することによって治療抗体を操作する概念を確認する

ために、キメラ抗ヒト神経芽腫ＩｇＧ１（ｃｈＣＥ７）を選択した。このＩｇＧ１は、ＳＰ２／０組換えマウスミエローマ細胞によって産生される場合有意ではないＡＤＣＣ活性を有する。ｃｈＣＥ７は、腫瘍に会合する１９０ｋＤａの膜糖タンパク質を認識し、そしてこれまでに試験されている神経芽腫腫瘍のすべてと強力に反応する。ｃｈＣＥ７は、その抗原について高度の親和性（$10^{10}M^{-1}$のK_d）を有し、そしてその高度の腫瘍特異性のために、ｃｈＣＥ７は、臨床病理において診断ツールとして慣用される。Ａｍｓｔｕｔｚら、１９９３．Ｉｎｔ．Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ５３：１４７－１５２。近年の研究において、放射標識されたｃｈＣＥ７は、ヒト患者において良好な腫瘍局在を示している。Ｄｕｒｒ、１９９３、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．２０：８５８。抗神経芽腫治療モノクローナル抗体（ｍＡｂ）であるｃｈＣＥ７のグリコシル化パターンをＣＨＯ細胞において、ＧｎＴ ＩＩＩのテトラサイクリン調節発現を用いて操作した。その糖形態分布において異なる１セットのｍＡｂサンプルを、基底レベルと毒性レベルとの間の範囲においてＧｎＴ ＩＩＩ発現を制御することによって産生した。そして、そのグリコシル化プロフィールを中性オリゴ糖のＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳによって分析した。これらのサンプルのＡＤＣＣ活性の測定によって、インビトロ生物学的活性における最大のｃｈＣＥ７についてのＧｎＴ ＩＩＩ発現の最適範囲が示された。そして、この活性は、Ｆｃに関連し、複合型バイセクト型オリゴ糖のレベルと相関していた。

【００７９】

（１．材料および方法）

ｃｈＣＥ７発現ベクターの構築。抗ヒト神経芽腫キメラ抗体ｃｈＣＥ７の、重鎖（ＩｇＧ１）および軽鎖（κ）の発現のための、それぞれ、プラスミドベクター１０ＣＥ７ＶＨおよび９８ＣＥ７ＶＬ（これらは、マウス免疫グロブリンプロモーター／エンハンサー、マウス抗体可変領域、およびヒト抗体定常領域を含むキメラゲノムＤＮＡを含む）（Ａｍｓｔｕｔｚら、１９９３、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ５３：１４７－１５２）を、最終の発現ベクターｐｃｈＣＥ７ＨおよびｐｃｈＣＥ７Ｌの構築のための出発材料として使用した。キメラ重鎖および軽鎖ｃｈＣＥ７の遺伝子を、再アセンブリし、そしてｐｃＤＮＡ３．１（＋）ベクター中にサブクローニングした。再アセンブリの間、全てのイントロンを除去し、リーダー配列を、合成したものに置き換えた（Ｒｅｆｆら、１９９４、Ｂｌｏｏｄ ８３：４３５－４４５）。そして、可変領域および定常領域の配列を接合する独特な制限部位を導入した。重鎖の定常領域からイントロンを、重複伸長ＰＣＲを用いてスプライシングすることによって除去した（Ｃｌａｃｋｓｏｎら、１９９１、Ｇｅｎｅｒａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ ＰＣＲ ｔｏ Ｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ、ｐ．１８７－２１４、ｉｎ：ＭｃＰｈｅｒｓｏｎら（編）、ＰＣＲ ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ）。

【００８０】

異なるレベルのＧｎＴ ＩＩＩを発現するｃｈＣＥ７のＣＨＯ細胞における産生。ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ ＩＩＩｍ（前出を参照のこと）細胞を、リン酸カルシウムトランスフェクション方法を使用して、ベクターｐｃｈＣＥ７Ｈ、ｐｃｈＣＥ７Ｌ、およびｐＺｅｏＳＶ２（Ｚｅｏｃｉｎ耐性のため、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ、Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を用いて同時トランスフェクトした。Ｚｅｏｃｉｎ耐性クローンを、９６ウェル細胞培養プレートに移した。そして、ヒトＩｇＧ定常領域について特異的なＥＬＩＳＡアッセイを用いてキメラ抗体発現についてアッセイした。Ｌｉｆｅｌｙら、１９９５、前出。４つのｃｈＣＥ７抗体サンプルは、１０％ ＦＣＳを補充したＦＭＸ－８細胞培養培地中で増殖させた選択したクローン（ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ ＩＩＩｍ－ｃｈＣＥ７）の並行培養物に由来した；各培養物は、異なるレベルのテトラサイクリンを含み、従って、異なるレベルのＧｎＴ ＩＩＩを発現した。ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ ＩＩＩｍ－ｃｈＣＥ７細胞を増大させ、そして７日間、異なる濃度のテトラサイクリンに予備適合させた。テトラサイクリンのレベルは、２０００ｎｇ／ｍｌ、６０ｎｇ／ｍｌ、３０ｎｇ／ｍｌ、および１５ｎｇ／ｍｌであった。

【００８１】
ｃｈＣＥ７抗体サンプルの精製。抗体を、２０ｍＭリン酸ナトリウム、２０ｍＭクエン酸ナトリウム、５００ｍＭ塩化ナトリウム、０．０１％　Ｔｗｅｅｎ２０、１Ｍ尿素、ｐＨ　７．５（緩衝液Ａ）から緩衝液Ｂ（リン酸ナトリウムのない緩衝液Ａ、ｐＨ　２．５）へのｐＨ線形勾配溶出を用いて、１ｍｌのＨｉＴｒａｐプロテインＡカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）におけるプロテインＡアフィニティークロマトグラフィーによって培養培地から精製した。アフィニティー精製したｃｈＣＥ７サンプルを、１ｍｌのＲｅｓｏｕｒｃｅＳカチオン交換カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）においてＰＢＳへと緩衝液交換した。最終純度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクーマシーブルー染色から９５％より高いと判断した。各サンプルの濃度を、２８０ｎｍでの吸光度から見積もった。

【００８２】
抗体の神経芽腫細胞への結合。ヒト神経芽腫細胞への結合親和性を、ＣＨＯ産生したサンプルによる^{125}Ｉ標識したｃｈＣＥ７の変位量から見積もった。Ａｍｓｔｕｔｚら、１９９３、前出。

【００８３】
ＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳによるオリゴ糖分析。ＣＥ７－２０００ｔ，ＣＥ７－６０ｔ，ＣＥ７－３０ｔ、およびＣＥ７－１５ｔのサンプルを、Ａ．ｕｒｅｆａｃｉｅｎｓシアリダーゼ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｌｙｃｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｏｘｆｏｒｄ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）を、製造業者の指示に従って用いて処理して、任意のシアル酸モノサッカリド残基を除いた。次いで、シアリダーゼ消化物を、ペプチドＮ－グリコシダーゼＦ（ＰＮＧａｓｅＦ、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｇｌｙｃｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）を製造業者の指示に従って用いて処理して、Ｎ結合型オリゴ糖を放出させた。タンパク質、界面活性剤および塩を、その消化物を上部から底部まで、２０ｍｌのＳａｐＰａｋ　Ｃ１８逆相マトリクス（Ｗａｔｅｒｓ，Ｍｉｌｆｏｒｄ、ＭＡ）を含むマイクロカラム、２０ｍｌのＤｏｗｅｘ　ＡＧ　５０Ｗ　Ｘ８カチオン交換マトリクス（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）を含むマイクロカラム、および２０ｍｌのＡＧ　４Ｘ４アニオン交換マトリクス（ＢｉｏＲａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）を含むマイクロカラムに通すことによって除去した。これらのマイクロカラムを、これらのマトリクスを、エタノールを満たしたＧｅｌ　Ｌｏａｄｅｒチップ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ，Ｂａｓｅｌ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）中に充填すること、続いて水を用いて平衡化することによって作製した。Ｋｕｓｔｅｒら、１９９７、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２５０：８２－１０１。フロースルーの液体および３００ｍｌの水での洗浄物をプールし、濾過し、エバポレートして、室温で乾燥させ、そして２ｍｌの脱イオン水中に再懸濁した。１μｌをＭＡＬＤＩ－ＭＳサンプルプレート（Ｐｅｒｓｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆａｒｍｉｎｇｈａｍ、ＭＡ）に適用し、そしてアセトニトリル中の１ｍｌの１０ｍｇ／ｍｌデヒドロ安息香酸（ＤＨＢ、Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｍｉｌｗａｋｅｅ、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）溶液と混合した。これらのサンプルを風乾し、そして得られた結晶を０．２ｍｌのエタノール中に溶解し、そして風乾により再結晶させた。Ｈａｒｖｅｙ、１９９３、Ｒａｐｉｄ　Ｍａｓｓ、Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．７：６１４－６１９。次いで、このオリゴ糖サンプルを、陽イオンおよび反射様式で、２０ｋＶの加速電圧を用いて、遅延イオン抽出ＭＡＬＤＩイオン供給源を装着したＥｌｉｔｅ　Ｖｏｙａｇｅｒ４００分光器（Ｐｅｒｓｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆａｒｍｉｎｇｈａｍ，ＭＡ）を用いるマトリクス支持レーザー脱離イオン化／飛行時間重量スペクトル測定（ＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳ）によって分析した。１２８の走査を平均化した。バイアンテナリー複合型バイセクト型オリゴ糖構造を、５つのＨｅｘＮＡｃに関連するピークに割り当てた。代替の５つのＨｅｘＮＡｃを含むアイソマーであるＮ結合型トリアンテナリー非バイセクト型オリゴ糖は、ＩｇＧのＦｃ領域においては決して見出されず、そしてそれらの合成は、ＧｎＴ　ＩＩＩとは別のグリコシルトランスフェラーゼによって触媒された。

【００８４】

ＡＤＣＣ活性アッセイ。異なる濃度のｃｈＣＥ７サンプルの存在下で、１：１９での標的：エフェクター比にて、３７℃１６時間のインキュベーションの間のＩＭＲ－３２ヒト神経芽腫細胞（標的）のヒトリンパ球（エフェクター）による溶解を、蛍光色素の保持を介して測定した。Ｋｏｌｂｅｒら、１９８８、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １０８：２５５－２６４。ＩＭＲ－３２細胞を、蛍光色素Ｃａｌｃｅｉｎ ＡＭを用いて２０分間標識した（最終濃度３．３μＭ）。標識した細胞（８０，０００細胞／ウェル）を、１時間、異なる濃度のＣＥ７抗体とインキュベートした。次いで、単球を涸渇した単核細胞を添加した（１，５００，０００細胞／ウェル）。そして、細胞混合物を、５％CO_2雰囲気中で３７℃で１６時間インキュベートした。この上清を捨て、そしてその細胞をＨＢＳＳで一回洗浄し、そしてＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００ （０．１％）中で溶解した。ＩＭＲ－３２細胞における蛍光色素の保持を、蛍光測定器（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｌｕｍｉｎｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｅｒ ＬＳ ５０Ｂ、（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ））を用いて測定し、そして特定の溶解物を、その標的を抗体への曝露の代わりに界面活性剤に対する曝露から得られた総溶解物コントロールに対して相対的に算出した。抗体の非存在下でのシグナルを、０％の細胞傷害性に設定した。各抗体濃度を、三連にて分析し、そしてそのアッセイを、３回の別個の回数反復した。

【００８５】

（２．結果および考察）

異なるレベルのＧｎＴ ＩＩＩを発現するＣＨＯ細胞におけるｃｈＣＥ７の産生。ＣｈＣＥ７の重鎖および軽鎖の発現ベクターを、ヒトサイトメガロウイルス（ｈＣＭＶ）プロモーター、ウシ成長ホルモン終結配列およびポリアデニル化配列を組み込み、そして全ての重鎖および軽鎖のイントロンを除去して構築した。このベクター設計は、ＣＨＯ細胞における組換えＩｇＧ遺伝子の再現性の良い高レベル発現の報告に基づいた。Ｒｅｆｆら、１９９４、前出；Ｔｒｉｌｌら、１９９５、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：５５３－５６０。さらに、独特な制限部位を、可変領域と定常領域との間の接合部にて各鎖に導入した。これらの部位は、リーディングフレームを保存し、そしてアミノ酸配列を変化させない。これらは、他のマウス－ヒトキメラ抗体の産生のための、マウス可変領域の単純な交換を可能にするはずである。Ｒｅｆｆら，１９９４、前出。ＤＮＡ配列決定によって、所望の遺伝子が適切にアセンブルされているかを確認した。そして、トランスフェクトされたＣＨＯ細胞におけるキメラ抗体の産生を、ヒトＦｃ－ＥＬＩＳＡアッセイを用いて確認した。

【００８６】

ＧｎＴ ＩＩＩの安定なテトラサイクリン制御された発現およびｃｈＣＥ７の安定な構成的発現を伴うＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴ ＩＩＩｍ－ｃｈＣＥ７細胞を確立し、そして１セットのｃｈＣＥ７サンプルの産生のために規模拡大した。規模拡大の間、同じＣＨＯクローンに由来する４つの並行培養物を、各々、異なるレベルのテトラサイクリンおよびすなわちＧｎＴ ＩＩＩ遺伝子の発現レベルのみにおいて異なるように増殖させた。この手順は、Ｎ結合型糖形態の生合成に影響を与える他の可変物からの任意のクローン性効果を除去し、ＧｎＴ ＩＩＩ遺伝子発現とグリコシル化抗体の生物学的活性との間の厳格な相関付けの確立を可能にする。テトラサイクリンの濃度は、２０００ｎｇ／ｍｌ（すなわち、ＧｎＴ ＩＩＩ発現の基底レベル）から１５ｎｇ／ｍｌ（この濃度において、グリコシルトランスフェラーゼの過剰発現に起因する有意な増殖阻害および毒性が観察された（前出を参照のこと））までに及んだ。実際、ほんのわずかの量の抗体が後者の培養物から回収され得た。テトラサイクリンを３０ｎｇ／ｍｌの濃度で用いた第二の最高レベルのＧｎＴ ＩＩＩ発現は、緩和な増殖阻害のみをもたらした。この培養物から精製した抗体の収率は、ＧｎＴ ＩＩＩ遺伝子過剰発現の残りの２つのより低いレベル由来のものの約７０％であった。

【００８７】

４つの抗体サンプルＣＥ７－２０００ｔ、ＣＥ７－６０ｔ、ＣＥ７－３０ｔ、ＣＥ７－１５ｔ（数字は、テトラサイクリンの会合濃度を示す）を、プロテインＡ上でアフィニテ

ィークロマトグラフィーにより精製し、そしてカチオン交換カラムを用いてＰＢＳへと緩衝液交換した。純度は、クーマシーブルー染色を用いたＳＤＳ－ＰＡＧＥから判断した場合９５％を超えた。ヒト神経芽腫細胞に対する結合アッセイは、細胞に対する高度の親和性および異なるサンプル間で抗原結合が有意に相違しないことを示した（２．０Ｍと２．７×１０$^{-10}$Ｍとの間で変動させた推定平衡解離定数）。このことは予測どおりであった。なぜならＣＥ７可変領域には、推定Ｎ結合型グリコシル化部位が存在しないからである。

【００８８】

異なるｃｈＣＥ７サンプルの複合型バイセクト型オリゴ糖の分布およびレベル。オリゴ糖プロフィールを、飛行時間におけるマトリクス支持レーザ脱離／イオン化質量測定（ＭＡＬＤＩ／ＴＯＦ－ＭＳ）によって得た。４つのＣＨＯ産生した抗体サンプルの各々およびＳＰ２／０マウスミエローマ由来のｃｈＣＥ７（ＣＥ７－ＳＰ２／０）サンプルに由来する中性のＮ結合型オリゴ糖の混合物を、２，５－デヒドロ安息香酸（２，５－ＤＨＢ）を用いてマトリクスとして分析した（図９）。これらの条件下で、中性のオリゴ糖は、本質的に単一の［Ｍ＋　Ｎａ$^{+}$］イオンであるようであり、これは、ときに、そのマトリクスのカリウム含有量に依存してより小さな［Ｍ＋　Ｋ$^{+}$］イオンを伴う。Ｂｅｒｇｗｅｆｆら、１９９５、Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｊ．１２：３１８－３３０。

【００８９】

この型の分析は、異なる質量の中性オリゴ糖の相対比（これは、相対ピーク高さに反映される）、および各ピークのモノサッカリドの荷電組成の両方を得た。Ｋｕｓｔｅｒら、１９９７、前出；ＮａｖｅｎおよびＨａｒｖｅｙ、１９９６、Ｒａｐｉｄ　Ｃｏｍｍｕｎ．Ｍａｓｓ　Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．１０：１３６１－１３６６。一時的な構造を、そのモノサッカリドの組成、生合成経路の知識および同じ宿主によって産生された同じ糖タンパク質由来のオリゴ糖についてのこれまでの構造データに基づくピークにより割り当てる。なぜなら、タンパク質バックボーンおよび細胞型は、オリゴ糖分布に対して強力な影響を有し得るからである。Ｆｉｅｌｄら、１９９６、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２３９：９２－９８。Ｆｃが会合するオリゴ糖の場合、バイアンテナリー複合型オリゴ糖のみがヒト血清に存在するＩｇＧにおいて検出されるか、または正常条件下での哺乳動物細胞培養物によって産生された。Ｗｏｒｍａｌｄら、１９９７、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３６：１３７０－１３８０；ＷｒｉｇｈｔおよびＭｏｒｒｉｓｏｎ、１９９７，Ｔｉｂｔｅｃｈ　１５：２６－３１。これらの化合物へ導く経路を、各オリゴ糖に対応する［Ｍ＋　Ｎａ$^{+}$］イオンの質量を含めて図１０に示す。高マンノースオリゴ糖もまた、バッチ細胞培養物の安定期および死期において産生された抗体において検出された。Ｙｕ　Ｉｐら、１９９４、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ　３０８：３８７－３９９。

【００９０】

ＣＥ７－ＳＰ２／０サンプルにおける２つの主要なピーク（図９Ａ）は、４つのＮ－アセチルヘキソサミン（ＨｅｘＮＡｃ）を伴うフコシル化オリゴ糖の質量に対応する（これらは、３つ（ｍ／ｚ１４８６）または４つ（ｍ／ｚ１６４８）のいずれかのヘキソースを含む）。図１０を参照のこと。しかし、この図におけるオリゴ糖についてまとめた注記は、コアの２つのＧｌｃＮＡｃを計数していないことに注意されたい。この組成は、それぞれ、０個または１個のガラクトース残基を有する、コアがフコシル化バイアンテナリー複合型オリゴ糖構造（これは、Ｆｃが会合したオリゴ糖に代表的であり、そしてＳＰ２／０細胞において発現されたキメラＩｇＧ１に由来するＦｃオリゴ糖のＮＭＲ分析においてこれまでに観察されている通りである）と一致する。Ｂｅｒｇｗｅｆｆら、１９９５、前出。

【００９１】

ＧｎＴ　ＩＩＩに触媒される、バイセクティングＧｌｃＮＡｃのこれらのバイアンテナリー化合物（この化合物は、好ましいＧｎＴ　ＩＩＩアクセプターである）への移入は、５つのＨｅｘＮＡｃを伴うオリゴ糖をもたらす（ｍ／ｚ１６８９および１８５１、それぞれ、非ガラクトシル化およびモノガラクトシル化、図１０）。これらのオリゴ糖は、ＣＥ

７－ＳＰ２／０サンプルにおいては明らかに存在しなかった。後者のピークは、ｃｈＣＥ７がＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ細胞において発現される場合に現れる。ＣＨＯが発現する抗体において、４つのＨｅｘＮＡｃを含有するピークもまた、主にフコシル化されている。しかし、少量のフコシル化されていない構造も、ｍ／ｚ１３３９でのピークから明らかである（図１０を参照のこと）。ガラクトシル化のレベルはまた、ＣＨＯ由来材料とＳＰ２／０由来材料との間であまり異ならない。ＧｎＴ　ＩＩＩ発現の基底レベルでは（ＣＥ７－２０００ｔサンプル．図９Ｂ）、５つのＨｅｘＮＡｃを伴う分子は、４つのＨｅｘＮＡｃを伴うものよりも低い割合で存在する。より高いレベルのＧｎＴ　ＩＩＩ発現（ＣＥ７－６０ｔサンプル、図９Ｃ）は、５つのＨｅｘＮＡｃを伴うオリゴ糖に有利に比の逆転をもたらした。この傾向に基づいて、バイアンテナリー複合型バイセクト型オリゴ糖構造は、これらのサンプルにおいて５つのＨｅｘＮＡｃを伴う化合物であると割り当てられた。三アンテナ性Ｎ結合型オリゴ糖である別の５ＨｅｘＮＡｃ含有アイソマーは、ＩｇＧのＦｃ領域においては決して見出されず、そしてその合成は、ＧｎＴ　ＩＩＩとは異なるＧｌｃＮＡｃトランスフェラーゼによって触媒される。

【００９２】

ＧｎＴ　ＩＩＩ発現におけるさらなる増加（ＣＥ７－３０ｔサンプル、図９Ｄ）は、複合型バイセクト型オリゴ糖のレベルにおいてなんらの有意な変化をももたらさなかった。５つのＨｅｘＮＡｃを含む別のピーク（ｍ／ｚ１５４３）は、ＣＨＯ－ＧｎＴＩＩＩサンプルにおいて低いが比較的安定なレベルで現れ、そして質量において非フコシル化複合型バイセクト型オリゴ糖質量に対応する（図１０）。ｍ／ｚ１７０５およびｍ／ｚ１８６７での小さなピークもまた、５つのＨｅｘＮＡｃ含有バイアンテナリー複合型オリゴ糖に対応する。それらは、ｍ／ｚ１６８９およびｍ／ｚ１８５１でのピークのカリウム付加物（ナトリウム付加物に関する１６Ｄａの質量の相違）（Ｋｕｓｔｅｒら、１９９７、前出）か、またはフコースを伴わないモノガラクトシル化および二ガラクトシル化複合型バイセクト型オリゴ糖のいずれかに割り当てられ得る（図１０）。まとめると、複合型バイセクト型オリゴ糖は、サンプルＣＥ７－２０００ｔにおける合計の約２５％の量であり、そしてサンプルＣＥ７－６０ｔおよびＣＥ７－３０ｔにおいて約４５％～５０％に達する。

【００９３】

ｃｈＣＥ７サンプルのオリゴ糖プロフィールからのさらなる情報。複合型バイセクト型オリゴ糖のレベルは、サンプルＣＥ７３０ｔにおいてより高くなかったが、ＧｎＴ　ＩＩＩの過剰発現の増加は、少量ではあるが、バイアンテナリー複合型オリゴ糖基質の基質比を継続して減少させた。このことは、２つの異なる４つのＨｅｘＮＡｃ含有ピーク（ｍ／ｚ１６６４およびｍ／ｚ１８１０）において中程度の増加を伴った。後者の２つのピークは、ガラクトシル化バイアンテナリー複合型オリゴ糖、または混成型バイセクト型化合物のいずれかに対応し得る（図１１）。両方のクラスの構造の組合せもまた、可能である。これらのピークにおける相対的な増加は、ＧｎＴ　ＩＩＩ過剰発現の混成型バイセクト型の副産物の蓄積と一致する。実際、ＧｎＴ　ＩＩＩ過剰発現の最高レベルで産生されたサンプルであるＣＥ７－１５ｔは、ｍ／ｚ１６６４におけるピークの大きな増加、ｍ／ｚ１８１０におけるピークの減少、およびバイセクト型複合オリゴ糖の約２５％のレベルへの同時減少を示した。図９Ｅにおけるｍ／ｚ１６８９およびｍ／ｚ１８５１のピークならびに図１１における対応する構造を参照のこと。フコシル化されたもの（ｍ／ｚ１８１０）に代わる、非フコシル化（ｍ／ｚ１６６４）の混成型バイセクト型副産物のより高度な蓄積は、ＧｎＴ　ＩＩＩによってまず改変されているオリゴ糖がもはや、コアのα１，６－フコシルトランスフェラーゼについての生合成基質ではあり得ないという事実に一致する。Ｓｃｈａｃｈｔｅｒ、１９８６、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．６４：１６３－１８１。

【００９４】

ｍ／ｚ１２５７でのピークは、ＣＨＯに由来するサンプルにおける合計の１０～１５％のレベルで、およびＣＥ７－ＳＰ２／０よりも低いレベルで存在する（図９）。これは、５つのヘキソースおよび２つのＨｅｘＮＡｃに対応する。この組成を有する唯一公知であ

るＮ結合型オリゴ糖構造は、高マンノース型の５つのマンノースを含有する化合物である。別の高マンノースオリゴ糖である６マンノースのもの（ｍ／ｚ１４２０）もまた、はるかに低いレベルで存在する。上記のように、このようなオリゴ糖は、バッチ細胞培養物の後期において発現されるＩｇＧのＦｃにおいて検出されている。Ｙｕ　Ｉｐら、１９９４、前出。

【００９５】

ｃｈＣＥ７サンプルの抗体依存性細胞傷害性。ｃｈＣＥ７は、最小レベルのＧｎＴＩＩＩ過剰発現をとともにＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ細胞中で発現されるとき、ヒトリンパ球による神経芽腫細胞のインビトロ溶解として測定される、ある程度のＡＤＣＣ活性を示す（図１２、サンプルＣＥ７－２０００ｔ）。ＧｎＴＩＩＩのレベルが上昇すると、ＡＤＣＣ活性における大きな増加が生じた（図１２、サンプルＣＥ７－６０ｔ）。ＧｎＴＩＩＩのさらなる過剰発現は、活性のさらなる増加をともなわず（図１２，サンプルＣＥ７－３０ｔ）、そして最高レベルの発現は、実際に、減少したＡＤＣＣに至った（図１２、サンプルＣＥ７－１５ｔ）。最高のＡＤＣＣ活性を示すことに加えて、ＣＥ７－６０ｔおよびＣＥ７－３０ｔの両方のサンプルの両方は、非常に低い抗体濃度で、有意なレベルの細胞傷害性を示す。これらの結果は、ＡＤＣＣ活性についてＣＨＯ細胞における最適範囲のＧｎＴＩＩＩ過剰発現があることを示し、そしてオリゴ糖プロフィールとの比較は、活性が、Ｆｃに結合した複合型バイセクト型オリゴ糖のレベルと相関することを示す。

【００９６】

ＡＤＣＣ活性についての複合型バイセクト型オリゴ糖の重要性を考慮すると、これら化合物の比率をさらに増加させるために、この経路を操作することが有用である。ＧｎＴＩＩの、サンプルＣＥ７－３０ｔについて用いられたレベルに接近するレベルまでの過剰発現は、有意な傷害性および増殖阻害が観察されない生物工学的に実施可能な範囲内にある。このレベルの発現では、非ガラクトシル化された、バイアンテナリー複合型非バイセクト型オリゴ糖、すなわち、好適な潜在的ＧｎＴＩＩＩ基質は、全体の１０％より少なくなるまで減少する。ｍ／ｚ　１４８６のピーク、図９Ｄを参照のこと。しかし、わずか５０％が、所望のバイアンテナリー複合型バイセクト型構造に転換されるだけである。残りは、混成型バイセクト型オリゴ糖副産物に転用されるか、または競合酵素β１，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ、ＧａｌＴにより消費されるかのいずれかである（図１１）。

【００９７】

相補的構造分析による、混成型バイセクト型およびガラクトシル化複合型非バイセクト型オリゴ糖ピークの分離は、各々の潜在的な所望されない経路がいくら消費されるかを決定する。高いＧｎＴＩＩＩ過剰発現レベルにおけるｍ／ｚ　１６６４および１８１０ピークの増大は、これらピークの少なくとも一部分は、混成型バイセクト型オリゴ糖に対応することを示唆する（図１１）。理論的には、混成型バイセクト型化合物に行くフラックスは、ＧｎＴＩＩＩと一緒のマンノシダーゼＩＩのような経路中のより先の酵素の同時過剰発現により低減され得る。その一方、ＧｎＴＩＩＩとＧａｌＴとの間の複合型バイセクト型オリゴ糖基質に対する競合は、ＧｎＴＩＩＩを過剰発現する間に、ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃのゴルジ体内濃度を増加させることにより、ＧｎＴＩＩＩ触媒反応に向かって潜在的に片寄り得る。ＧｎＴＩＩＩは、ＧｌｃＮＡｃを、同時基質（ｃｏ－ｓｕｂｔｒａｔｅ）ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃから異なるオリゴ糖に転移させる。ＵＤＰ－ＧｌｃＮＡｃ同時基質のゴルジ体内濃度が、ＧｎＴＩＩＩに対して準飽和である場合、それを、培養培地組成の操作によるか、またはゴルジ体中への糖－ヌクレオチド輸送の遺伝的操作により増加させて、オリゴ糖についてＧａｌＴとの競合でＧｎＴＩＩＩに有利にし得る。

【００９８】

ＡＤＣＣ活性における増加が、ガラクトシル化および非ガラクトシル化の両方の複合型バイセクト型オリゴ糖における増加から生じるか、またはこれらの形態の１つのみにおける増加から生じるか否かは決定されるべきままである。図９におけるｍ／ｚ　１６８９および１８５１のピークを参照のこと。ガラクトシル化バイアンテナリー複合型バイセクト

型オリゴ糖が、増加したＡＤＣＣ活性について最適構造であることが見出される場合、Ｆｃ領域におけるこれら化合物の画分を最大にすることは、ＧｎＴＩＩＩおよびＧａｌＴの両方の過剰発現を必要とする。先に論議された競合シナリオを考慮すると、両方の遺伝子の発現レベルは、注意深く調節されなければならない。さらに、可能な限り、トランス－ゴルジ体嚢の代わりにＴＧＮに向かって、過剰発現ＧａｌＴを再分配する試みは、価値がある。後者の戦略は、ＧａｌＴの膜貫通領域コード配列を、α２，６－シアリルトランスフェラーゼの膜貫通領域（ＣｈｅｇｅおよびＰｆｅｆｆｅｒ、１９９０、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１１１：８９３～８９９）と交換することにより実現され得る。

【００９９】

（Ｄ．実施例４：抗ＣＤ２０モノクローナル抗体Ｃ２Ｂ８のグリコシル化の操作）

Ｃ２Ｂ８は、抗ヒトＣＤ２０キメラ抗体である。Ｒｅｆｆ、Ｍ．Ｅ．ら、１９９４、前述。Ｃ２Ｂ８は、１９９７年にＦＤＡ認可を受け、そして現在、合衆国において、非ホジキンリンパ腫の処置のために、ＲｉｔｕｘａｎＴＭの商品名の下で用いられている。Ｃ２Ｂ８は、ＣＨＯ細胞培養物に由来し、そしてそれ故、バイセクト型オリゴ糖を保持しないはずである。前述を参照のこと。この抗体の改良型を生成するために、ｃｈＣＥ７抗神経芽腫抗体について先に示された方法が適用された。前述を参照のこと。開示された方法に従って改変されたＣ２Ｂ８抗体は、同じ細胞培養物および精製条件の下で生成された、標準的な非改変Ｃ２Ｂ８抗体よりも高いＡＤＣＣ活性を有していた。

【０１００】

（１．材料および方法）

キメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（Ｃ２Ｂ８）の可変軽鎖領域および可変重鎖領域の合成。Ｃ２Ｂ８抗体のＶＨ遺伝子およびＶＬ遺伝子を、ＰＣＲを用いる１工程プロセス（Ｋｏｂａｙａｓｈｉら、１９９７、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２３：５００～５０３）で、1セットの重複する一本鎖オリゴヌクレオチド（プライマー）を用いて合成的にアセンブルした。抗ＣＤ２０抗体のマウス免疫グロブリンの軽鎖および重鎖の可変領域（それぞれＶＬおよびＶＨ）をコードする配列データを、公開された国際特許出願（国際公開番号：ＷＯ　９４／１１０２６）から得た。アセンブルされたＤＮＡフラグメントを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩＫＳ（＋）中にサブクローン化し、そしてＤＮＡサイクルシークエンシングにより配列決定し、変異が導入されなかったことを確認した。

【０１０１】

キメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（Ｃ２Ｂ８）の発現のためのベクターの構築。Ｃ２Ｂ８モノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬのコード領域を、ｐｃｈＣＥ７ＨおよびｐｃｈＣＥ７Ｌ中にそれぞれサブクローン化した。このサブクローニングでは、抗神経芽腫ＣＥ７の可変重鎖および可変軽鎖をコードする配列（前述）を、Ｃ２Ｂ８の合成的にアセンブルされた可変重鎖領域および可変軽鎖領域と交換した。

【０１０２】

Ｃ２Ｂ８抗体を発現するＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ細胞の生成。Ｃ２Ｂ８抗体を発現するＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ細胞株の生成のための方法は、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ－ＣＥ７に対するのと正確に同じであった。前述を参照のこと。さらなる作業のために選択されたクローンを、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ－Ｃ２Ｂ８と名づけた。

【０１０３】

Ｃ２Ｂ８抗体を発現するＣＨＯ－ｔＴＡの生成。ＣＨＯ－ｔＴＡは、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍの親細胞株である。前述を参照のこと。ＧｎＴＩＩＩを発現せず、Ｃ２Ｂ８抗体を発現するＣＨＯ－ｔＴＡ細胞株の生成のための方法は、ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ－Ｃ２Ｂ８およびＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ－ｃｈＣＥ７に対するのと正確に同じであった。前述を参照のこと。さらなる作業のために選択されたクローンを、ＣＨＯ－ｔＴＡ－Ｃ２Ｂ８と名づけた。

【０１０４】

Ｃ２Ｂ８抗体サンプルの生成。２つのＣ２Ｂ８抗体サンプルは、平行なＣＨＯ－ｔｅｔ

－ＧｎＴＩＩＩｍ－Ｃ２Ｂ８培養物に由来した；各培養物は、種々のレベルのテトラサイクリンを含み、そしてそれ故ＧｎＴＩＩＩを種々のレベルで発現すると予想される。テトラサイクリンのレベルは、２０００ｎｇ／ｍｌ、５０ｎｇ／ｍｌ、および２５ｎｇ／ｍｌであった。これらの培養に由来するＣ２Ｂ８抗体サンプルを、Ｃ２Ｂ８－２０００ｔ、Ｃ２Ｂ８－５０ｔ、およびＣ２Ｂ８－２５ｔとそれぞれ称した。平行して、１つの抗体サンプル（Ｃ２Ｂ８－ｎｔ）を、ＣＨＯ－ｔＴＡ－Ｃ２Ｂ８培養から作成した。この細胞株は、ＧｎＴＩＩＩを発現しない。ＣＨＯ－ｔＴＡ－Ｃ２Ｂ８細胞を、テトラサイクリンなしで培養した。

【０１０５】

ＧｎＴＩＩＩ発現の分析。ＧｎＴＩＩＩのウェスタンブロット分析については、生産培養物の各々の細胞溶解産物を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、そしてポリビニリデンジフルオライド膜に電気ブロットした。抗ｃ－ｍｙｃモノクローナル抗体９Ｅ１０および抗マウスＩｇＧ－西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ、ＩＬ）を、一次抗体および二次抗体としてそれぞれ用いた。結合抗体を、増感化学発光キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ、ＩＬ）を用いて検出した。

【０１０６】

Ｃ２Ｂ８抗体サンプルの精製。抗体サンプルを、ｃｈＣＥ７抗体サンプルについてと同じ手順を用いて精製した。前述を参照のこと。濃度を、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ（Ｌｅｉｄｅｎ、Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）からの蛍光に基づくキットを用いて測定した。

【０１０７】

特異的Ｃ２Ｂ８抗原結合の確認。Ｃ２Ｂ８抗ＣＤ２０モノクローナル抗体の抗原結合の特異性を、懸濁液中の細胞について間接免疫蛍光アッセイを用いて確認した。この研究には、ＣＤ２０陽性細胞（ＳＢ細胞；ＡＴＣＣ寄託番号ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１２０）およびＣＤ陰性細胞（ＨＳＢ細胞；ＡＴＣＣ寄託番号ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１２０．１）を利用した。各タイプの細胞を、一次抗体としての、２５ｎｇ／ｍｌテトラサイクリンで生成したＣ２Ｂ８抗体とともにインキュベートした。陰性のコントロールは、一次抗体の代わりにＨＢＳＳＢを含んだ。抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異的なポリクローナルＦＩＴＣ結合体化抗体を、すべてのサンプルについて二次抗体として用いた（ＳＩＧＭＡ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）。細胞を、Ｌｅｉｃａ（Ｂｅｎｓｈｅｉｍ、Ｇｅｒｍａｎｙ）蛍光顕微鏡を用いて調べた。

【０１０８】

ＡＤＣＣ活性アッセイ。異なる濃度のＣ２Ｂ８サンプルの存在下の、ヒト単球枯渇末梢血単核細胞（エフェクター細胞）によるＳＢ細胞（ＣＤ２０＋標的細胞；ＡＴＣＣ寄託番号ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１２０）の溶解を、Ｂｒｕｎｎｅｒら、１９６８、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１４：１８１－１８９に記載されるのと同じ手順に基本的に従って実施した。エフェクター細胞の標的細胞に対する比率は、１００：１であった。

【０１０９】

（２．結果および考察）

ＧｎＴＩＩＩは、種々の細胞株および培養物において種々のレベルで発現される。平行したＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩｍ－Ｃ２Ｂ８培養物（各培養物は種々のレベルのテトラサイクリン（２０００、５０、および２５ｎｇ／ｍｌ）を含み、そしてそれ故、種々のレベルでＧｎＴＩＩＩを発現すると期待される）の細胞を溶解し、そして細胞溶解産物をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離し、そしてウェスタンブロッティングにより検出した。２５ｎｇ／ｍｌテトラサイクリンで増殖させた培養物の溶解産物は、ＧｎＴＩＩＩの対応する分子量に強いバンドを示し、その一方、５０および２０００ｎｇ／ｍｌで増殖させた培養物は、図１３に示されるように、ＧｎＴＩＩＩのかなりより少ない発現を有していた。

【０１１０】

特異的Ｃ２Ｂ８抗原結合の確認。種々のレベルのＧｎＴＩＩＩを発現する細胞の平行培養物から産生されたＣ２Ｂ８サンプルを、アフィニティークロマトグラフィーにより培養

上清から精製し、そしてカチオン交換カラム上でＰＢＳに緩衝液交換した。純度は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥのクマシーブルー染色から９５％より高いと推定された。これらの抗体サンプルは、可変領域がＰＣＲアセンブリ法により合成された抗体遺伝子の発現に由来した。この合成ｃＤＮＡフラグメントの配列決定は、先に公開された国際特許出願（国際公開番号ＷＯ９４／１１０２６）中の元のＣ２Ｂ８可変領域配列とは差異を示さなかった。このサンプルのヒトＣＤ２０（Ｃ２Ｂ８の標的抗原である）への特異的結合は、その表面上にＣＤ２０を発現するヒトリンパ芽球様細胞株ＳＢ、およびこの抗原を欠くＨＳＢリンパ芽球様細胞株を用いる、間接免疫蛍光により証明された。抗体サンプルＣ２Ｂ８－２５ｔは、ＳＢ細胞の陽性染色を与えたが（図１４Ａ）、同一の実験条件下でＨＳＢ細胞の陽性染色は与えなかった（図１４Ｂを参照のこと）。ＳＢ細胞からなるさらなる陰性コントロールを、Ｃ２Ｂ８－２５ｔ抗体の代わりにＰＢＳ緩衝液とともにインキュベートした。それは、染色が全くないことを示した。

【０１１１】

Ｃ２Ｂ８サンプルのインビトロＡＤＣＣ活性。ＧｎＴＩＩＩ発現を有さないＣＨＯ－ｔＴＡ－Ｃ２Ｂ８細胞（前述を参照のこと）中で発現した抗体サンプルＣ２Ｂ８－ｎｔは、ヒトリンパ球によるＳＢ細胞（ＣＤ２０＋）のインビトロ溶解で測定したとき、（１μｇ／ｍｌの抗体濃度で）３１％の細胞傷害性活性を示した（図１５、サンプルＣ２Ｂ８－ｎｔ）。２０００ｎｇ／ｍｌのテトラサイクリンで増殖したＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩ培養物（すなわち、クローン化したＧｎＴＩＩＩ発現の基底レベル）由来のＣ２Ｂ８－２０００ｔ抗体は、同じ抗体濃度におけるＣ２Ｂ８－ｎｔサンプルに関してＡＤＣＣ活性において、１μｇ／ｍｌの抗体濃度で３３％の増加を示した。テトラサイクリンの濃度を２５ｎｇ／ｍｌまで低減させると（サンプルＣ２Ｂ８－２５ｔ）、これはＧｎＴＩＩＩ発現を有意に増大させ、同じ抗体濃度におけるＣ２Ｂ８－ｎｔ抗体サンプルに関して最大ＡＤＣＣ活性において（１μｇ／ｍｌの抗体濃度で）ほぼ８０％の大きな増加を生じた（図１５、サンプルＣ２Ｂ８－２５ｔ）。

【０１１２】

最も高いＡＤＣＣ活性を示すことに加えて、Ｃ２Ｂ８－２５ｔは、非常に低抗体濃度で、有意なレベルの細胞傷害性を示した。０．０６μｇ／ｍｌにおけるＣ２Ｂ８－２５ｔサンプルは、１μｇ／ｍｌにおけるＣ２Ｂ８－ｎｔの最大ＡＤＣＣ活性に類似のＡＤＣＣ活性を示した。この結果は、サンプルＣ２Ｂ８－２５ｔが、Ｃ２Ｂ８－ｎｔより１６倍低い抗体濃度で、Ｃ２Ｂ８－ｎｔと同じＡＤＣＣ活性に到達したことを示した。この結果は、ＧｎＴＩＩＩを活性に発現する細胞株で生産されたキメラ抗ＣＤ２０抗体Ｃ２Ｂ８が、ＧｎＴＩＩＩを発現しなかった細胞株で生産された同じ抗体より有意に活性であったことを示す。

【０１１３】

本発明の方法を用いるこの抗体の１つの利点は、（１）同じ治療効果に到達するために注入されなければならない抗体のより低い用量が、抗体産生の経済学で有利なインパクトを有すること、または（２）同じ用量の抗体を用いてより良い治療効果が得られることである。

【０１１４】

（Ｅ．実施例５：最大ＡＤＣＣ活性に至る最適レベルでグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の構成的発現を有するＣＨＯ細胞株の確立）

ＡＤＣＣを増大するための方法のいくつかの適用では、それ自体で、または他のクローン化されたグリコシルトランスフェラーゼおよび／またはグリコシダーゼとともに、ＧｎＴＩＩＩの調節された発現よりも構成的発現を用いることが所望され得る。しかし、本発明者らは、改変された抗体のＡＤＣＣ活性が、ＧｎＴＩＩＩの発現レベルに依存することを証明した。前述を参照のこと。従って、ＧｎＴＩＩＩ単独の、またはその他のグリコシルトランスフェラーゼおよび／またはグリコシダーゼ遺伝子とともに、最適レベルまたは最適レベル近傍でその構成的発現を有するクローンを選択することが重要である。単独またはβ（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ（ＧａｌＴ）のような他のグリコシ

ルトランスフェラーゼとともにのいずれかで、ＧｎＴＩＩＩ発現の最適レベルは、グリコシルトランスフェラーゼの調節性発現を有する細胞株を用いて最初に決定される。次いで、ＧｎＴＩＩＩおよび任意のその他のクローン化されたグリコシルトランスフェラーゼの構成的発現を有する安定クローンを、最適近傍の発現レベルについてスクリーニングする。

【０１１５】

（１．調節されたＧｎＴＩＩＩのためのベクターの最適近傍発現レベル構成の決定）

ＧＦＰ発現に連鎖する発現。各グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、ＩＲＥＳ配列を経由して、細胞中に保持されるタンパク質、例えば、グリーン蛍光タンパク質（ＧＦＰ）または利用可能な抗体により認識され得るペプチドでタグ化される原形質膜タンパク質をコードするレポーター遺伝子に連結される。１つより多くのグリコシルトランスフェラーゼが試験されている場合、種々のマーカーが各々のグリコシルトランスフェラーゼと連結される。例えば、ＧｎＴＩＩＩがＧＦＰに連結され得、そしてＧａｌＴがブルー蛍光タンパク質（ＢＦＰ）に連結され得る。ＧＦＰ　ｃＤＮＡの上流のＩＲＥＳエレメントの上流のＧｎＴＩＩＩ　ｃＤＮＡからなる真核生物発現カセットは、まず、標準的なサブクローニングおよび／またはＰＣＲ工程によりアセンブルされる。次いでこのカセットを、テトラサイクリン調節発現ベクターｐＵＨＤ１０－３（前述を参照のこと）中、ｔｅｔ－プロモーターの下流でかつ終止配列およびポリアデニル化配列の上流にサブクローン化し、ベクターｐＵＨＤ１０－３－ＧｎＴＩＩＩ－ＧＦＰを得る。

【０１１６】

ＧＦＰ発現に連鎖した調節されたＧｎＴＩＩＩ発現を持つＣＨＯ細胞の確立、および構成的ｃｈＣＥ７抗体発現。テトラサイクリン応答性トランスアクチベーターを発現するＣＨＯ－ｔＴＡ細胞（前述を参照のこと）を、ベクターｐＵＨＤ１０－３－ＧｎＴＩＩＩ－ＧＦＰおよびピューロマイシン耐性遺伝子の発現のためのベクターｐＰｕｒで同時トランスフェクトする。前述を参照のこと。ピューロマイシン耐性クローンを、テトラサイクリンの存在下で選択する。個々のクローンを、テトラサイクリンの存在下（２μｇ／ｍｌ）または非存在下で２連で培養する。グリコシルトランスフェラーゼ過剰発現に起因して（前述を参照のこと）、テトラサイクリンの非存在下で増殖の阻害を示す６つのクローンを選択し、そしてＧＦＰ関連シグナルの検出のために、蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）により分析する。最高の誘導比（テトラサイクリンの存在下の蛍光に対するテトラサイクリンの非存在下の蛍光の比として規定される）を与えるクローンを、さらなる作業のために選択し、そしてＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩ－ＧＦＰと称する。ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩ－ＧＦＰを、抗体ｃｈＣＥ７についての発現ベクターでトランスフェクトし、そしてこの抗体の高い構成的発現を有するクローンは、選択されたＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩ－ＧＦＰ－ｃｈＣＥ７である。前述を参照のこと。

【０１１７】

ｃｈＣＥ７サンプルの生産、ＡＤＣＣ活性の測定および最適ＧｎＴＩＩＩ発現レベルの決定。ＣＨＯ－ｔｅｔ－ＧｎＴＩＩＩ－ＧＦＰ－ｃｈＣＥ７の平行培養物を、種々のレベルのテトラサイクリン、そしてそれ故、ＧＦＰとともにＧｎＴＩＩＩを種々のレベルで発現して増殖させる。ｃｈＣＥ７抗体サンプルを、アフィニティークロマトグラフィーにより培養上清から精製する。平行して、各培養物からの細胞をＦＡＣＳにより分析して、各培養物の、ＧｎＴＩＩＩの発現レベルに相関する、ＧＦＰ関連蛍光の平均レベルを決定する。各ｃｈＣＥ７抗体サンプルのインビトロＡＤＣＣ活性を決定し（前述を参照のこと）、そして各サンプルの最大インビトロＡＤＣＣ活性を、それを生成するために用いた細胞の平均蛍光に対してプロットする。

【０１１８】

（２．最適近傍レベルで構成的ＧｎＴＩＩＩ発現を持つＣＨＯ細胞株の確立）

ＧｎＴＩＩＩ－ＩＲＥＳ－ＧＦＰカセット（前述を参照のこと）を、構成的発現ベクター中にサブクローン化する。ＣＨＯ細胞を、このベクターおよびピューロマイシン耐性のためのベクターで安定に同時トランスフェクトする。ピューロマイシン耐性細胞を選択す

る。次いで、この安定にトランスフェクトされた細胞の集団を、ＦＡＣＳによりソートし、そして最適または最適近傍のＡＤＣＣ活性が達成される範囲内近傍のレポーターＧＦＰ遺伝子レベルを発現するクローンを選択する。前述を参照のこと。この最終のトランスフェクション工程は、すでに治療抗体を安定に発現するＣＨＯ細胞、または空のＣＨＯ細胞（例えば、ＤＵＫＸまたはＤＧ４４　ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞）のいずれかに対してなされ得る。後者の場合には、上記の手順から得られたクローンは、最終の抗体産生細胞株を作製するために、治療抗体発現ベクターでトランスフェクトされる。

【０１１９】

（Ｆ．実施例６：最適化されたグリコシル化を有するヒトＩｇＧ　Ｆｃキメラの細胞表面発現）

現在、カプセル化細胞治療が多くの疾患に対して試験されている。カプセル化細胞インプラントを、身体内に外科的に配置されるように設計し、所望の治療物質をそれが必要である場所に直接送達する。しかし、移植されたカプセル化デバイスが、一旦機械的破壊を有する場合、細胞は、逃れそして所望でなくなり得る。身体内で、逃れた、所望でない細胞を破壊する１つの方法は、Ｆｃ媒介細胞傷害性メカニズムを経由することである。この目的のために、カプセル化されるべき細胞を先に操作して、Ｆｃ領域のＮ末端に融合した原形質膜に局在化するＩＩ型膜貫通ドメインからなる原形質膜係留融合タンパク質を発現し得る。Ｓｔａｂｉｌａ、Ｐ．Ｆ．、１９９８、前述。カプセル内側の細胞は、Ｆｃ媒介細胞傷害性に対してカプセルによって保護され、その一方、逃れた細胞は、表面に提示されたＦｃ領域を認識するリンパ球による破壊、すなわち、Ｆｃ媒介細胞傷害性メカニズムによる破壊に接近可能である。この実施例は、このＦｃ媒介細胞傷害性活性が、提示されたＦｃ領域のグリコシル化操作によってどのように増大するかを説明する。

【０１２０】

（１．Ｆｃキメラをその表面上に発現し、およびＧｎＴＩＩＩを発現する細胞の確立）

特定の治療のために移植されるべき細胞、例えば、表面に提示されたＦｃキメラおよび分泌性治療タンパク質を既に生産する、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞を、まず、ＩＲＥＳエレメントを経由してＧＦＰの発現に連鎖したＧｎＴＩＩＩの構成的発現のためのベクターで安定にトランスフェクトする。前述を参照のこと。安定なトランスフェクタントを、ベクター中に取り込んだマーカーにより、例えば、薬物耐性マーカーにより選択し、そしてその薬物の存在下の生存について選択する。

【０１２１】

（２．種々のレベルのＧｎＴＩＩＩを発現する細胞のスクリーニングおよび測定）

安定なトランスフェクタントを、蛍光活性化細胞ソーティング（ＦＡＣＳ）により分析し、そして種々の平均蛍光レベルを有する一連のクローンを、さらなる研究のために選択する。各選択されたクローンを増殖させ、そしてＦＡＣＳにより再分析し、ＧＦＰの安定性、そしてそれ故、関連したＧｎＴＩＩＩ発現を確実にする。

【０１２２】

（３．提示されたＦｃ領域上の複合型バイセクト型オリゴ糖の種々のレベルの確認）

種々のレベルのＧＦＰ関連蛍光を有する３つのクローンから、およびＧｎＴＩＩＩ－ＩＲＥＳ－ＧＦＰベクターでトランスフェクトしていない元のＢＨＫ細胞からのＦｃ領域を、界面活性剤により膜から可溶化し、次いでアフィニティクロマトグラフィーにより精製する。次いで、オリゴ糖を取り出し、精製し、そしてＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ／ＭＳにより分析する。前述を参照のこと。得られるＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ／ＭＳプロフィールは、改変された、蛍光クローンのＦｃ領域が、種々の比率の複合型バイセクト型オリゴ糖を保持することを示す。改変されていない細胞からのＭＡＬＤＩプロフィールは、バイセクト型オリゴ糖にともなう任意のピークを示さない。提示されたＦｃ領域上で最高レベルの複合型バイセクト型オリゴ糖を保持するクローンを、さらなる作業のために選択する。

【０１２３】

（４．インビトロのＦｃに媒介される細胞の細胞傷害性活性アッセイ）

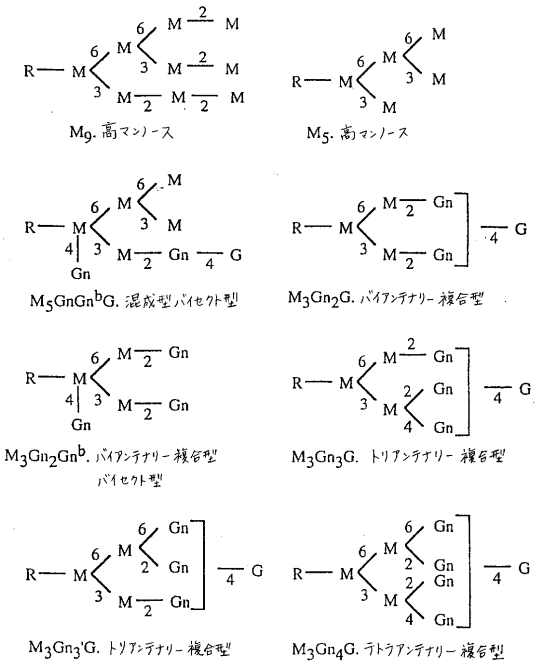
次いで、Ｆｃに媒介される細胞の細胞傷害性活性アッセイを２つ、平行して実施する。

１つのアッセイでは、標的細胞は、上記で選択されたクローンに由来する。平行するアッセイでは、標的細胞は、カプセル化され、そしてＧｎＴＩＩＩを発現するように改変されていない元の細胞である。このアッセイを、先に記載された手順を用いるが（前述を参照のこと）、任意のさらなる抗体の非存在下で実施する。なぜなら、標的細胞は、既にＦｃ領域を提示しているからである。この実験は、ＧｎＴＩＩＩを発現する細胞に対するＦｃ媒介細胞傷害性活性が、このグリコシルトランスフェラーゼを発現しない細胞に対するＦｃ媒介細胞傷害性活性よりも高いことを示す。

【０１２４】

本明細書の本体内で引用されるすべての参考文献は、その全体が参考として本明細書に援用される。

【図１】



【図２】

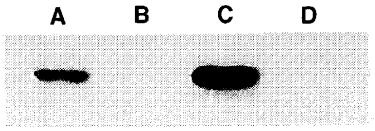
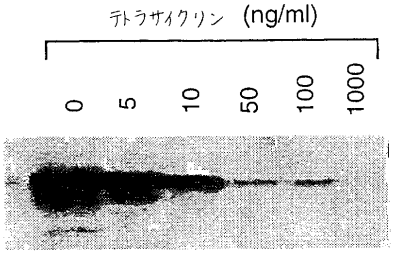


FIG.2

【図３】



【図４】

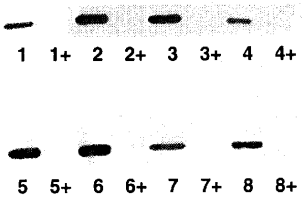


FIG.4A

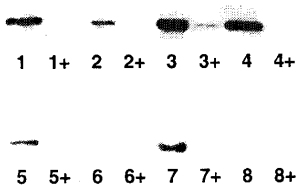


FIG.4B

【図５】

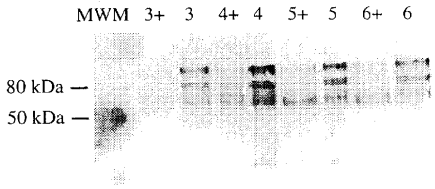


FIG.5A

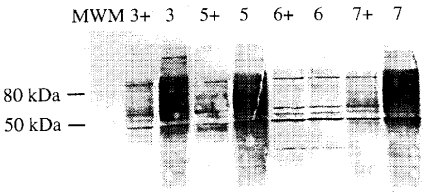


FIG.5B

【図６】



FIG.6A

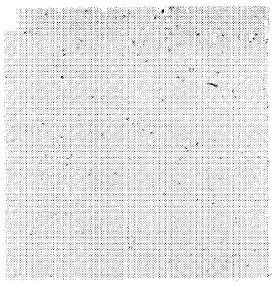


FIG.6B

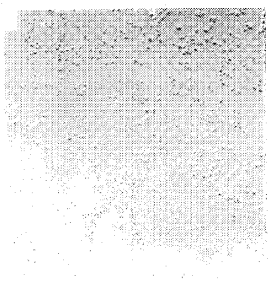


FIG.6C

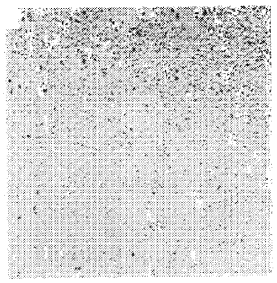
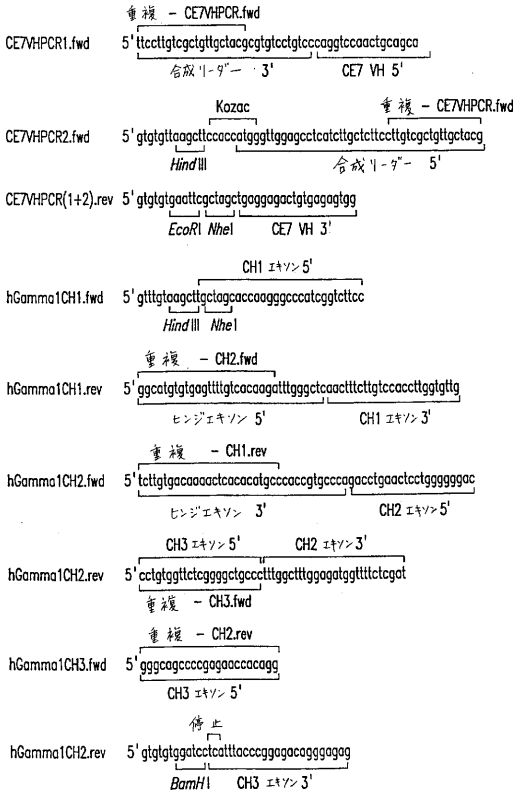
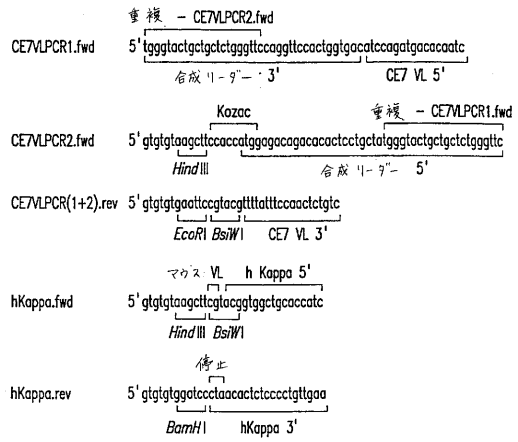


FIG.6D

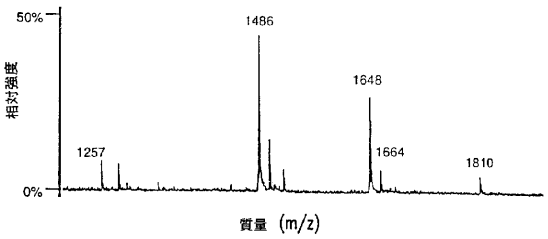
【図７】



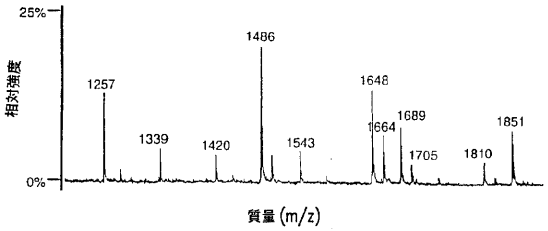
【図８】



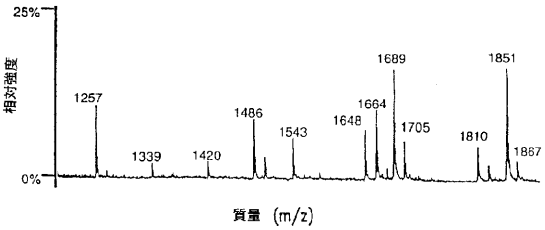
【図９Ａ】



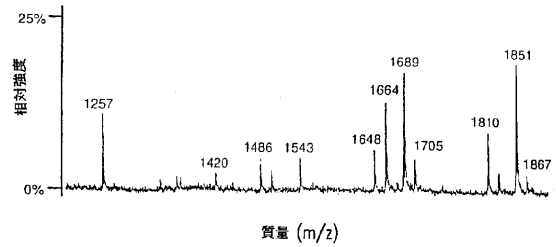
【図９Ｂ】



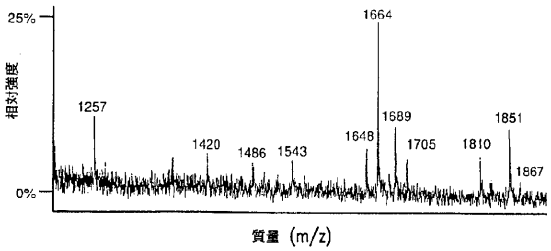
【図９Ｃ】



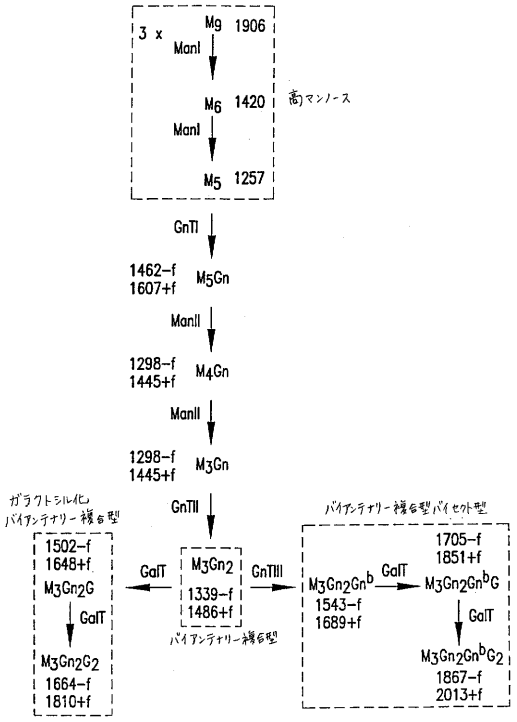
【図９Ｄ】



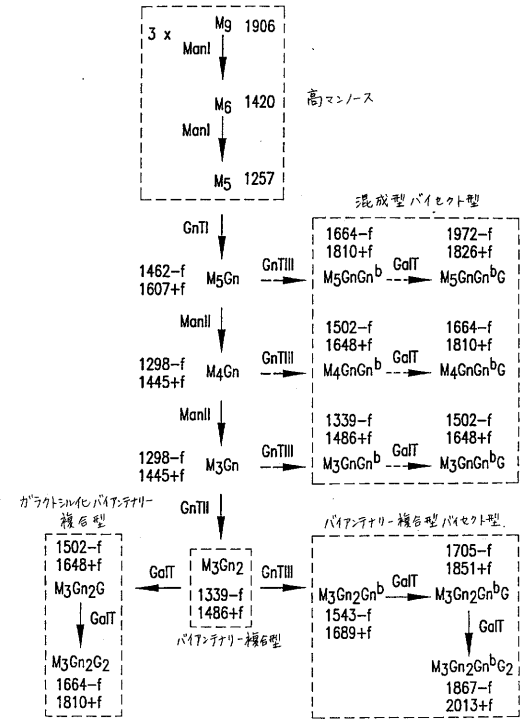
【図９Ｅ】



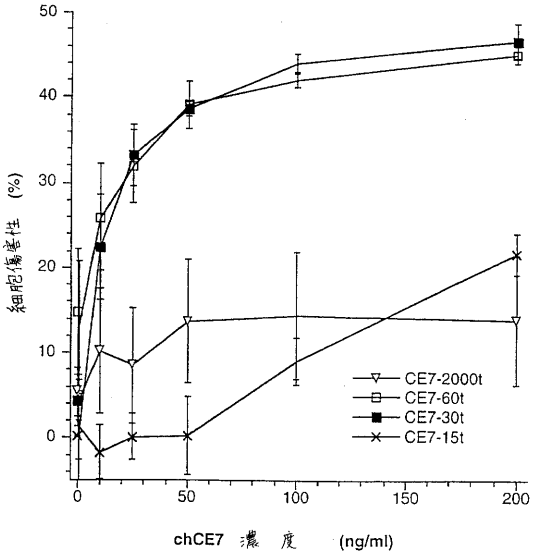
【図１０】



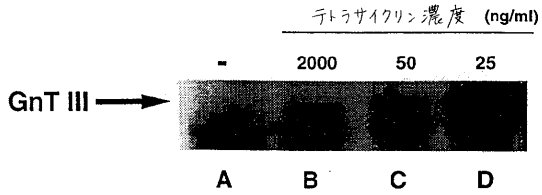
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【図１４】

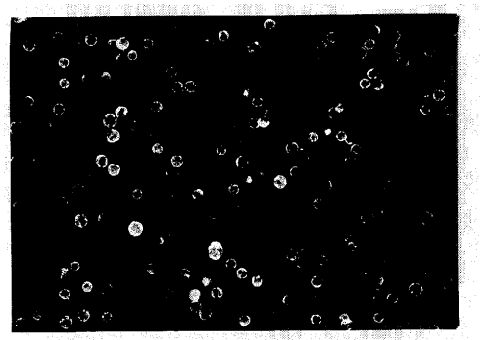


FIG.14A

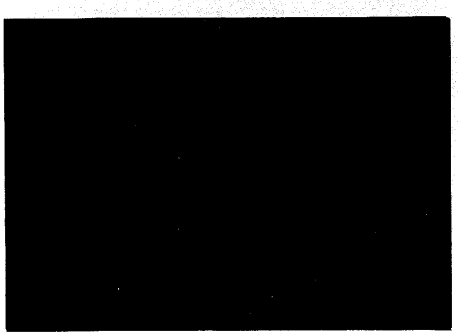
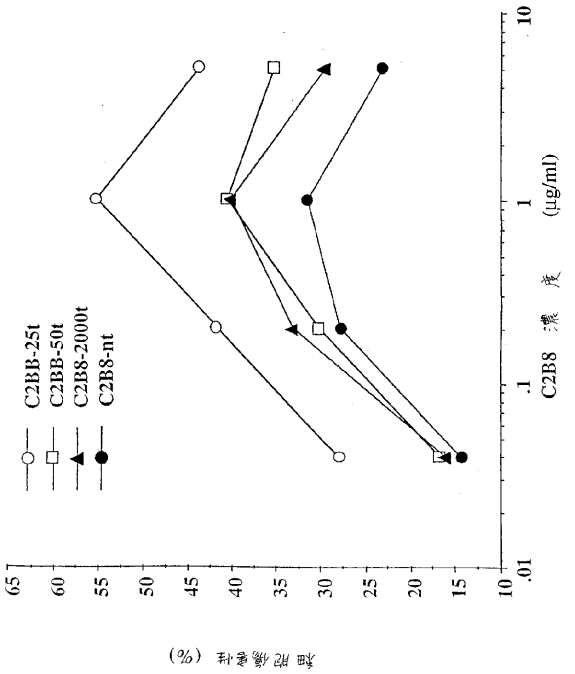


FIG.14B

【図１５】



【配列表】
0006329061000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61P 13/12	*(2006.01)*	A61P	11/00	
A61P 15/00	*(2006.01)*	A61P	13/12	
A61P 17/00	*(2006.01)*	A61P	15/00	
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	17/00	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	25/00	
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P	35/00	
C07K 16/18	*(2006.01)*	A61P	35/02	
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/18	ZNA
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	16/46	
C12N 15/09	*(2006.01)*	C07K	19/00	
		C12N	15/00	A

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則
(72)発明者 パブロ ウマナ
スイス国 シーエイチ－８０５７ チューリッヒ, ミルチバックシュトラーセ 3
(72)発明者 ジョエル ジーン－マイレット
スイス国 シーエイチ－８０５７ チューリッヒ, バーチシュトラーセ ５９
(72)発明者 ジェイムズ イー. バイレイ
スイス国 シーエイチ－８００１ チューリッヒ, ウィンケルウィーズ 6

合議体
審判長 福井 悟
審判官 中島 庸子
審判官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第９７／３００８７（WO, A1）
ＴＩＢＴＥＣＨ, １９９７年, Ｖｏｌ. １５. ｐ. ２６－３２
Ｉｎｔ. Ｊ. Ｃａｎｃｅｒ, １９９７年, Ｖｏｌ. ７３, Ｎｏ. ６, ｐ. ８５０－８５８
Ｇｌｙｃｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｊｏｕｒｎａｌ, １９９７年, Ｖｏｌ. １４, Ｎｏ. ６. ｐ. ７８１
Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ, １９９７年, Ｖｏｌ. ２９, ｐ. ８９１－８９２
Ｂｌｏｏｄ, １９９４年, Ｖｏｌ. ８４, ｐ. ２４５７－２４６６
Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ., １９９５年, Ｖｏｌ. ５５, ｐ. ４６－５０

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
IPC C12N 15/00-15/90
ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＣＡＰｌｕｓ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）