

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6894239号
(P6894239)

(45) 発行日 令和3年6月30日 (2021.6.30)

(24) 登録日 令和3年6月7日 (2021.6.7)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 S

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 7/00 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

請求項の数 29 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-569735 (P2016-569735)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月27日 (2015.5.27)
 (65) 公表番号 特表2017-517518 (P2017-517518A)
 (43) 公表日 平成29年6月29日 (2017.6.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/032745
 (87) 国際公開番号 W02015/184009
 (87) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015.12.3)
 審査請求日 平成30年5月18日 (2018.5.18)
 審判番号 不服2019-17368 (P2019-17368/J1)
 審判請求日 令和1年12月23日 (2019.12.23)
 (31) 優先権主張番号 62/003,136
 (32) 優先日 平成26年5月27日 (2014.5.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 596118493
 アカデミア シニカ
 ACADEMIA SINICA
 台湾, タイペイ 11529, ナンカン,
 アカデミア ロード 128, セクション
 2
 128 Sec 2, Academia
 Road, Nankang, Taipei
 11529 TW
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増強された抗体の有効性のための普遍的グリコフォームに関する組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片の均一な集団を含む組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤であって、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片の均一な集団の各分子は、Fc領域上に単一の様なN-グリカンを含み、前記Fc領域上の前記N-グリカンが、親抗体のFc領域に比べてFcRIIAまたはFcRIIAに対する結合親和性の増大を示し、前記N-グリカンは、コアフコースを含まず、かつ、 $\text{Si a}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ の構造を有し、前記N-グリカンは、エフェクター細胞機能を改善するように最適化されている、医薬製剤。

【請求項 2】

前記モノクローナル抗体が、対応する親モノクローナル抗体に比べて改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性を示す、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体がヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択される、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体が、少なくともがん、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患、または感染症に関連する抗原に結合する、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

前記モノクローナル抗体が、がんに関連する抗原に結合する、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 6】

前記抗原が、GD2、GD3、GM2、Globo-H、SSEA-3、SSEA-4、CD16A、CD30、CD32B、CD33、CD52、EpCAM、CEA、gpA33、HER2/neu、A33、CD5、CD11c、CD19、CD20、CD22、CD23、CD27、CD40、CD45、CD79a、CD79b、CD103、CTLA4、ErbB1、ErbB3、ErbB4、VEGF受容体、TNF-受容体、TNF-受容体、またはTNF-受容体、gpA33、ムチン、TAG-72、CAIX、PSMA、葉酸結合性タンパク質、VEGF、VEGFR、インテグリン V 3、インテグリン 5 1、EGFR、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAPおよびテネイシンからなる群より選択される、請求項 5 に記載の医薬製剤。

10

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が、自己免疫疾患または炎症性疾患に関連する抗原に結合する、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

前記抗原が、インターロイキン 5 およびその受容体、腫瘍壊死因子およびその受容体からなる群より選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

20

前記モノクローナル抗体が、ウイルス感染細胞において発現される抗原に結合する、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 10】

前記抗原が、gp120、CXCR4およびペロ毒素からなる群より選択される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

前記組成物が、in vitroにおいて作製される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 12】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性を増強するための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

30

【請求項 13】

疾患、障害、または感染に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるための、請求項 1 に記載の医薬製剤であって、治療有効量の前記組成物がそれを必要とする被験体に投与されることを特徴とする、医薬製剤。

【請求項 14】

前記疾患、前記障害、または前記感染が、がん、自己免疫障害、炎症性障害または伝染性感染症からなる群より選択される、請求項 13 に記載の医薬製剤。

【請求項 15】

前記がんが、脳がん、肺がん、乳がん、口腔がん、食道がん、胃がん、肝がん、胆管がん、膵がん、結腸がん、腎がん、子宮頸部がん、卵巣がんおよび前立腺がんからなる群より選択される、請求項 14 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 16】

前記がんが、B細胞リンパ腫、NHL、前駆Bリンパ芽球性白血病/リンパ腫および成熟B細胞新生物、B細胞性慢性リンパ性白血病(CLL)/小リンパ球性リンパ腫(SLL)、B細胞性前リンパ性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、低悪性度、中悪性度および高悪性度(FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁層B細胞リンパ腫、MALT型辺縁層B細胞リンパ腫、節性辺縁層B細胞リンパ腫、脾臓型辺縁層B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫(

50

A L C L) からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 7】

前記自己免疫疾患または前記炎症性疾患が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (S L E)、ループス腎炎、潰瘍性大腸炎、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、血栓性血小板減少性紫斑病 (T T P)、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、I g A 腎症、I g M 多発ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群および糸球体腎炎からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 8】

前記自己免疫疾患または前記炎症性疾患が関節リウマチである、請求項 1 7 に記載の医薬製剤。

10

【請求項 1 9】

前記疾患が、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、呼吸器合胞体ウイルス (R S V)、サイトメガロウイルス (C M V)、エボラウイルス、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス (H C V)、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス (V Z V)、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス (H S V)、ヒトヘルペスウイルス 6 (H H V - 6)、ヒトヘルペスウイルス 8 (H H V - 8)、ヒトパピローマウイルス、またはパルボウイルス、S A R S ウイルス、麻疹ウイルス；流行性耳下腺炎ウイルス；風疹ウイルス；狂犬病ウイルス；パピローマウイルス；ワクシニアウイルス；水痘帯状疱疹ウイルス；痘瘡ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；P . f a l c i p a r u m ；P . v i v a x ；P . m a l a r i a e ；P . o v a l e ；C o r y n e b a c t e r i u m d i p h t h e r i a e ；C l o s t r i d i u m t e t a n i ；C l o s t r i d i u m b o t u l i n u m ；B o r d e t e l l a p e r t u s s i s ；H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e ；N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s、血清群 A、B、C、W 1 3 5 および / または Y ；S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e ；S t r e p t o c o c c u s a g a l a c t i a e ；S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s ；S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s ；B a c i l l u s a n t h r a c i s ；M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s ；C h l a y m d i a t r a c h o m a t i s ；C h l a m y d i a p n e u m o n i a e ；Y e r s i n i a p e s t i s ；F r a n c i s e l l a t u l a r e n s i s ；S a l m o n e l l a s p e c i e s ；V i b r i o c h o l e r a e ；毒性 E . c o l i ；ヒト内在性レトロウイルス；または他の微生物病原体などの病原体によって引き起こされる、請求項 1 3 に記載の医薬製剤。

20

30

【請求項 2 0】

前記感染症が、H I V、H C V、またはこれらの組み合わせによって引き起こされる、請求項 1 9 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 1】

前記疾患、前記障害、または前記感染に付随する 1 つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるために、F c R によって媒介されるエフェクター細胞機能の有効性の増強が所望される、請求項 1 3 に記載の医薬製剤。

40

【請求項 2 2】

前記疾患、前記障害、または前記感染に付随する 1 つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるために、A D C C 増強が所望される、請求項 1 3 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 3】

前記医薬製剤が、単独で、または、第 2 の抗体、化学療法剤および免疫抑制剤からなる群より選択される第 2 の治療剤と併せて投与されることを特徴とする、請求項 1 3 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 4】

50

ウイルス性疾患の処置を必要とするヒト被験体においてウイルス性疾患を処置するための組み合わせ物であって、(a)NK細胞の抑制性受容体を遮断する第1の化合物と、(b)請求項1に記載の医薬製剤とを含む、組み合わせ物。

【請求項25】

前記ウイルス性疾患が、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)、RSV(呼吸器合胞体ウイルス)、CMV(サイトメガロウイルス)、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス8(HHV-8)、ヒトパピローマウイルス、またはパルボウイルスによって引き起こされ、別々の特定の
10
実施形態では、前記ウイルス性疾患は、HIVまたはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる、請求項24に記載の組み合わせ物。

【請求項26】

前記モノクローナル抗体が、リツキシマブ(Rituxan(登録商標))の軽鎖配列および重鎖配列を含む、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項27】

前記モノクローナル抗体が、トラスツズマブ(Herceptin(登録商標))の軽鎖配列および重鎖配列を含む、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項28】

前記モノクローナル抗体が、アダリムマブ(Humira(登録商標))の軽鎖配列および重鎖配列を含む、請求項1に記載の医薬製剤。
20

【請求項29】

前記モノクローナル抗体がF₁モノクローナル抗体である、請求項1に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2014年5月27日に出願された米国仮出願連続番号第(USSN)62/003,136号、2014年5月27日に出願されたUSSN 62/003,104号、2014年5月28日に出願されたUSSN 62/003,908号、2014年7月2日に出願されたUSSN 62/020,199号および2015年1月30日に出願されたUSSN 62/110,338号への優先権の利益を主張する。これらそれぞれの内容は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。
30

【背景技術】

【0002】

抗体に基づく治療には、炎症性障害、がん、感染症、および固形臓器移植片拒絶反応を含めた多くの疾患に対する有効性に関して証明された記録がある。現在、40種を超える治療用モノクローナル抗体(mAb)が、USA、EUおよびいくつかの他の国において臨床使用について認可を受けている。それらの大部分はがんおよび免疫疾患の治療用である。抗腫瘍活性を有する治療用抗体の例としては、抗CD20、抗Her2、抗EGFR、抗CD40、抗CTLA-4、および抗PD-1抗体が挙げられる。
40

【0003】

治療用抗体の大多数はモノクローナルであり、種の差異に由来する所望されない免疫学的応答を回避するためにマウス/ヒトキメラまたはヒト化抗体を発現するようにトランスジェニックヒト化マウスを組み入れるハイブリドーマ技術によって調製されたものである。最近、完全ヒト抗体の開発が主要な傾向になっており、その印象的な進行には、ファージディスプレイされた抗体ライブラリーまたは単一のB細胞の利用が役立っている。

【0004】

多くの他の哺乳動物タンパク質と同様に、抗体は、不均一にグリコシル化されており、グリカンはFc受容体と相互作用することによって抗体の活性に著しく影響を及ぼし得るので、Fc領域におけるグリコシル化が効果的かつ安全な治療用モノクローナル抗体における重要な問題になっている。したがって、これらの相互作用を理解するため、および薬物適用における安全性および有効性を改善するために、明確に定義されたFc-グリカンを有する均一なモノクローナル抗体の開発が必要とされている。この目標に向かって、コアフコース残基を除去することにより、Fc-グリカンとヒトFcγRIIIa受容体の相互作用が増大することに起因してIgGの抗体依存性細胞傷害(antibody-dependent cellular cytotoxicity)(ADCC)活性が増強されることが報告されている。FDAの認可を受けた、糖鎖工学により操作された(glycoengineered)抗体であるモガムリズマブ(POTELLIGENT(登録商標))およびオビヌツズマブ(obinutuzumab)(GA101)の2種は、脱フコシル化(defucosylated)抗体であり、POTELLIGENT(登録商標)はFUT8ノックアウトCHO細胞株によって産生されたものであり、GA101はGnT-III過剰発現系から産生されたものである。さらに、長期RAの単球においてより多くのFcγRIIIaが発現し、また、RA患者のIgG重鎖においてより多くのフコシル化の傾向も見いだされ、これは、炎症促進性サイトカインを中和するだけでなく、FcγRIIIaについて自己由来の自己抗体と競合もする無フコシル化(afucosylate)医薬抗体を用いたRA処置および寛解の可能性があることを意味する。

10

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

したがって、最適化されたFcグリコフォームを有する治療用モノクローナル抗体を生成することが大変興味深い。

【0006】

本開示は、モノクローナル抗体、特にモノクローナル抗体の均一な集団(「糖操作抗体群(glycoantibodies)」)に対する糖鎖最適化(glyco-optimized)Fcの発見に基づく。最適化グリコフォームは、エフェクター細胞機能(例えば、ADCC)の有効性の増強を示す。

30

【0007】

「糖操作抗体群(glycoantibodies)」という用語は、本発明者、Chih-Huey Wong博士により造り出されたものであり、Fc上に単一の様なN-グリカンを有するモノクローナル抗体(好ましくは、治療用モノクローナル抗体)の均一な集団を指す。均一な集団を構成する個々の糖操作抗体群は実質的に同一であり、同じエピトープに結合し、また、明確に定義されたグリカン構造および配列を有する同じFcグリカンを含む。

【0008】

「実質的に同一」とは、比較される対象が、当業者に理解される通り、基本的に同じという程度に酷似していることを意味する。「実質的に同一」は、「同一」を包含する。

40

【0009】

本明細書で使用される場合、「糖操作抗体群(glycoantibodies)」(「GAb」)という用語は、Fc上に同じN-グリカンを有するIgG分子の均一な集団を指す。「糖操作抗体(glycoantibody)」(「GAb」)という用語は、糖操作抗体群内の個々のIgG分子を指す。

【0010】

したがって、本開示の一態様は、Fc上に、単一の様なN-グリカンであって、構造がエフェクター細胞機能の有効性を増強するための最適化N-グリカン構造であるN-グリカンを含むモノクローナル抗体の均一な集団の組成物に関する。

【0011】

50

好ましい実施形態では、N - グリカン は F c 領域の A s n - 2 9 7 に付着している。

【 0 0 1 2 】

好ましい実施形態では、N - グリカン は、S i a₂ (2 - 6) G a l₂ G l c N A c₂ M a n₃ G l c N A c₂ の構造からなる。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載の糖操作抗体群は、i n v i t r o で作製することができる。糖操作抗体群は、F c 糖鎖工学によって生成することができる。ある特定の実施形態では、糖操作抗体群は、哺乳動物細胞培養によって得られるモノクローナル抗体から酵素的にまたは化学酵素的に工学的に作製される。

【 0 0 1 4 】

10

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体群の F c 領域は、対応するモノクローナル抗体の野生型 F c 領域に比べて F c R I I A または F c R I I I A に対する結合親和性の増大を示す。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体群は、野生型免疫グロブリンに比べて抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (a n t i b o d y - d e p e n d e n t c e l l - m e d i a t e d c y t o t o x i c i t y) (A D C C) 活性の増強を示す。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、糖操作抗体群は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 からなる群より選択される。

20

【 0 0 1 7 】

モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体またはキメラモノクローナル抗体であってよい。

【 0 0 1 8 】

本明細書に記載の糖操作抗体群はがん、自己免疫障害、炎症性障害または感染症に関連する抗原に結合し得る。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作された抗 C D 2 0 である。いくつかの例では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作されたリツキシマブ (R i t u x a n (登録商標)) である。

30

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作された抗 H E R 2 である。いくつかの例では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作されたトラスツズマブ (ハーセプチン (H e r c e p t i n) (登録商標)) である。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作された抗 T N F である。いくつかの例では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作されたアダリムマブ (H u m i r a (登録商標)) である。

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体は、糖鎖工学により操作された F I 6 抗体である。

40

【 0 0 2 3 】

本開示の別の態様は、本明細書に記載の糖操作抗体群の組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。医薬組成物は、腫瘍学、自己免疫障害、炎症性障害および感染症など、治療薬において使用することができる。

【 0 0 2 4 】

一部の実施形態では、医薬組成物を、F c R によって媒介されるエフェクター細胞機能 (例えば、A D C C) の有効性の増強が所望される疾患、障害、または感染、例えばがん、自己免疫疾患、感染症に付随する 1 つまたは複数の症状を防止する、処置する、また

50

は好転させるために、および効果がA D C Cによって媒介される治療用抗体の治療有効性の増強において使用する。

【0025】

本開示には、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）活性を増強するための方法であって、被験体に、ある量の本明細書に記載の糖操作抗体群を投与するステップを含む方法も含まれる。

【0026】

さらに、本開示には、疾患、障害、または感染に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるための方法であって、それを必要とする被験体に、治療有効量の明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が含まれる。疾患、障害、または感染は、がん、自己免疫障害、炎症性障害および伝染性感染症からなる群より選択することができる。

【0027】

本開示の別の態様は、それを必要とするヒト被験体においてウイルス性疾患を処置するための方法であって、（a）被験体にNK細胞の抑制性受容体（inhibitory receptor）を遮断する第1の化合物を投与するステップと、（b）被験体に治療有効量の明細書に記載の医薬組成物を投与するステップとを含む方法の特徴とする。

【0028】

本明細書に記載のこれらの処置方法では、糖操作抗体群の医薬組成物は、単独で、または、第2の抗体、もしくは化学療法剤もしくは免疫抑制剤などの第2の治療剤と併せて投与することができる。

【0029】

本出願は、種々の発行特許、公開特許出願、学术论文、および他の刊行物を参照し、全てが参照により本明細書に組み込まれる。

【0030】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細が以下の説明に記載されている。本発明の他の特徴または利点は、以下の図およびいくつかの実施形態の詳細な説明から、ならびに添付の特許請求の範囲からも明らかになるであろう。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

（項目1）

モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片の均一な集団を含む組成物であって、各糖操作抗体または抗原結合性断片分子は、Fc領域上に単一の様なN-グリカンを含み、前記N-グリカンは、 $\text{Si a}_2(2-6)\text{Ga l}_2\text{G l c N A c}_2\text{M a n}_3\text{G l c N A c}_2$ の構造を有し、前記N-グリカンは、エフェクター細胞機能を改善するように最適化されている、組成物。

（項目2）

前記Fc領域上の前記N-グリカンが、対応するモノクローナル抗体の野生型Fc領域に比べてFcRIIAまたはFcRIIAに対する結合親和性の増大を示す、項目1に記載の組成物。

（項目3）

前記モノクローナル抗体が、対応する野生型モノクローナル抗体に比べて改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）活性を示す、項目1に記載の組成物。

（項目4）

前記モノクローナル抗体がヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択される、項目1に記載の組成物。

（項目5）

前記モノクローナル抗体が、少なくともがん、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患、または感染症に関連する抗原に結合する、項目1に記載の組成物。

（項目6）

前記モノクローナル抗体が、がんに関連する抗原に結合する、項目1に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目7)

前記抗原が、GD2、GD3、GM2、Globo-H、SSEA-3、SSEA-4、CD16A、CD30、CD32B、CD33、CD52、EpCAM、CEA、gpA33、HER2/neu、A33、CD5、CD11c、CD19、CD20、CD22、CD23、CD27、CD40、CD45、CD79a、CD79b、CD103、CTLA4、Erbb1、Erbb3、Erbb4、VEGF受容体、TNF-受容体、TNF-受容体、またはTNF-受容体、gpA33、ムチン、TAG-72、CAIX、PSMA、葉酸結合性タンパク質、VEGF、VEGFR、インテグリンV3、インテグリン51、EGFR、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAPおよびテネイシンからなる群より選択される、項目6に記載の組成物。

10

(項目8)

前記モノクローナル抗体が、自己免疫疾患または炎症性疾患に関連する抗原に結合する、項目1に記載の組成物。

(項目9)

前記抗原が、インターロイキン5およびその受容体、腫瘍壊死因子およびその受容体からなる群より選択される、項目1に記載の組成物。

(項目10)

前記モノクローナル抗体が、ウイルス感染細胞において発現される抗原に結合する、項目1に記載の組成物。

20

(項目11)

前記抗原が、gp120、CXCR4およびペロ毒素からなる群より選択される、項目1に記載の組成物。

(項目12)

in vitroにおいて作製される、項目1に記載の組成物。

(項目13)

項目1に記載の組成物と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤。

(項目14)

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性を増強するための方法であって、それを必要とする被験体に、ある量の項目1に記載の組成物を投与するステップを含む、方法。

30

(項目15)

疾患、障害、または感染に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるための方法であって、それを必要とする被験体に、治療有効量の項目13に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法。

(項目16)

前記疾患、前記障害、または前記感染が、がん、自己免疫障害、炎症性障害または伝染性感染症からなる群より選択される、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記がんが、脳がん、肺がん、乳がん、口腔がん、食道がん、胃がん、肝がん、胆管がん、膵がん、結腸がん、腎がん、子宮頸部がん、卵巣がんおよび前立腺がんからなる群より選択され、一部の実施形態では、前記がんは、脳がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、結腸がん、または膵がんである、項目16に記載の方法。

40

(項目18)

前記がんが、B細胞リンパ腫、NHL、前駆Bリンパ芽球性白血病/リンパ腫および成熟B細胞新生物、B細胞性慢性リンパ性白血病(CLL)/小リンパ球性リンパ腫(SLL)、B細胞性前リンパ性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、低悪性度、中悪性度および高悪性度(FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁層B細胞リンパ腫、MALT型辺縁層B細胞リンパ腫、節性辺縁層B細胞リンパ腫、脾臓型辺縁層B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞

50

型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫（ALCL）からなる群より選択される、項目16に記載の方法。

（項目19）

前記自己免疫疾患または前記炎症性疾患が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、ループス腎炎、潰瘍性大腸炎、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、IgA腎症、IgM多発ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群および糸球体腎炎からなる群より選択される、項目16に記載の方法。

10

（項目20）

前記自己免疫疾患または前記炎症性疾患が関節リウマチである、項目19に記載の方法。

（項目21）

前記感染症が、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、ヒトパピローマウイルス、またはパルボウイルス、SARSウイルス、麻疹ウイルス；流行性耳下腺炎ウイルス；風疹ウイルス；狂犬病ウイルス；パピローマウイルス；ワクシニアウイルス；水痘帯状疱疹ウイルス；痘瘡ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；*P. falciparum*；*P. vivax*；*P. malariae*；*P. ovale*；*Corynebacterium diphtheriae*；*Clostridium tetani*；*Clostridium botulinum*；*Bordetella pertussis*；*Haemophilus influenzae*；*Neisseria meningitidis*、血清群A、B、C、W135および/またはY；*Streptococcus pneumoniae*；*Streptococcus agalactiae*；*Streptococcus pyogenes*；*Staphylococcus aureus*；*Bacillus anthracis*；*Moraxella catarrhalis*；*Chlamydia trachomatis*；*Chlamydia pneumoniae*；*Yersinia pestis*；*Francisella tularensis*；*Salmonella species*；*Vibrio cholerae*；毒性*E. coli*；ヒト内在性レトロウイルス；他の微生物病原体；他の微生物毒素、アレルゲン、腫瘍抗原、自己抗原および同種異系抗原、化学物質または毒素などのヒト病原体によって引き起こされる、項目16に記載の方法。

20

30

（項目22）

前記感染症が、HIV、HCV、またはこれらの組み合わせによって引き起こされる、項目21に記載の方法。

40

（項目23）

前記疾患、前記障害、または前記感染に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるために、FcRによって媒介されるエフェクター細胞機能の有効性の増強が所望される、項目15に記載の方法。

（項目24）

前記疾患、前記障害、または前記感染に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるために、ADCC増強が所望される、項目15に記載の方法。

（項目25）

前記医薬組成物を、単独で、または、第2の抗体、化学療法剤および免疫抑制剤からなる群より選択される第2の治療剤と併せて投与する、項目15に記載の方法。

50

(項目 2 6)

ウイルス性疾患の処置を必要とするヒト被験体においてウイルス性疾患を処置するための方法であって、(a) 前記被験体にNK細胞の抑制性受容体を遮断する第1の化合物を投与するステップと、(b) 前記被験体に治療有効量の項目13に記載の医薬組成物を投与するステップとを含む、方法。

(項目 2 7)

前記ウイルス性疾患が、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)、RSV(呼吸器合胞体ウイルス)、CMV(サイトメガロウイルス)、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス8(HHV-8)、ヒトパピローマウイルス、またはパルボウイルスによって引き起こされ、別々の特定の実施形態では、前記ウイルス性疾患は、HIVまたはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる、項目26に記載の方法。

10

(項目 2 8)

前記モノクローナル抗体が、リツキシマブ(Rituxan(登録商標))の軽鎖配列および重鎖配列を含む、項目1に記載の組成物。

(項目 2 9)

前記モノクローナル抗体が、トラスツズマブ(Herceptin(登録商標))の軽鎖配列および重鎖配列を含む、項目1に記載の組成物。

20

(項目 3 0)

前記モノクローナル抗体が、アダリムマブ(Humira)の軽鎖配列および重鎖配列を含む、項目1に記載の組成物。

(項目 3 1)

前記モノクローナル抗体がF16モノクローナル抗体である、項目1に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】【0031】

【図1a】図1は、IgG1のFc領域のグリカン構造のリモデリング(b)によって均一な抗体を調製するための一般的な戦略(a)を示す。

【図1b】図1は、IgG1のFc領域のグリカン構造のリモデリング(b)によって均一な抗体を調製するための一般的な戦略(a)を示す。

30

【0032】

【図2-1】図2は、種々の、糖鎖工学により操作されたリツキシマブの抗体依存性B細胞枯渇活性を示す。ヒトB細胞の枯渇を、新しく調製したヒトPBMC細胞を使用して行い、FACSでCD19+CD2-B細胞に基づいて分析した。(A)一連の異なる、糖鎖工学により操作されたリツキシマブと比較して、2,6-NSCTリツキシマブによって示される枯渇能力はより高いものであった。(B)10ドナーの全血B細胞枯渇活性では、2,6-シアリル化リツキシマブの活性が無処理のリツキシマブよりも有意に高く、p値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリツキシマブにより最低の活性が示された。(C)調製したラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞は細胞表面上に発現するCD20のレベルがより低い。(D、E)2,6-NSCTリツキシマブにより正常細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても注目すべきADCC有効性が示されたが、無処理の抗体の抵抗性株に対する活性は劇的に失われた。

40

【図2-2】図2は、種々の、糖鎖工学により操作されたリツキシマブの抗体依存性B細胞枯渇活性を示す。ヒトB細胞の枯渇を、新しく調製したヒトPBMC細胞を使用して行い、FACSでCD19+CD2-B細胞に基づいて分析した。(A)一連の異なる、糖鎖工学により操作されたリツキシマブと比較して、2,6-NSCTリツキシマブによって示される枯渇能力はより高いものであった。(B)10ドナーの全血B細胞枯渇活性では、2,6-シアリル化リツキシマブの活性が無処理のリツキシマブよりも有意に高く、p値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリツキシマブにより最低の活性が

50

示された。(C)調製したラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞は細胞表面上に発現するCD20のレベルがより低い。(D、E)2,6-NSCTリツキシマブにより正常細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても注目すべきADCC有効性が示されたが、無処理の抗体の抵抗性株に対する活性は劇的に失われた。

【図2-3】図2は、種々の、糖鎖工学により操作されたリツキシマブの抗体依存性B細胞枯渇活性を示す。ヒトB細胞の枯渇を、新しく調製したヒトPBMC細胞を使用して行い、FACSでCD19+CD2-B細胞に基づいて分析した。(A)一連の異なる、糖鎖工学により操作されたリツキシマブと比較して、2,6-NSCTリツキシマブによって示される枯渇能力はより高いものであった。(B)10ドナーの全血B細胞枯渇活性では、2,6-シアリル化リツキシマブの活性が無処理のリツキシマブよりも有意に高く、p値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリツキシマブにより最低の活性が示された。(C)調製したラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞は細胞表面上に発現するCD20のレベルがより低い。(D、E)2,6-NSCTリツキシマブにより正常細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても注目すべきADCC有効性が示されたが、無処理の抗体の抵抗性株に対する活性は劇的に失われた。

10

【図2-4】図2は、種々の、糖鎖工学により操作されたリツキシマブの抗体依存性B細胞枯渇活性を示す。ヒトB細胞の枯渇を、新しく調製したヒトPBMC細胞を使用して行い、FACSでCD19+CD2-B細胞に基づいて分析した。(A)一連の異なる、糖鎖工学により操作されたリツキシマブと比較して、2,6-NSCTリツキシマブによって示される枯渇能力はより高いものであった。(B)10ドナーの全血B細胞枯渇活性では、2,6-シアリル化リツキシマブの活性が無処理のリツキシマブよりも有意に高く、p値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリツキシマブにより最低の活性が示された。(C)調製したラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞は細胞表面上に発現するCD20のレベルがより低い。(D、E)2,6-NSCTリツキシマブにより正常細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても注目すべきADCC有効性が示されたが、無処理の抗体の抵抗性株に対する活性は劇的に失われた。

20

【図2-5】図2は、種々の、糖鎖工学により操作されたリツキシマブの抗体依存性B細胞枯渇活性を示す。ヒトB細胞の枯渇を、新しく調製したヒトPBMC細胞を使用して行い、FACSでCD19+CD2-B細胞に基づいて分析した。(A)一連の異なる、糖鎖工学により操作されたリツキシマブと比較して、2,6-NSCTリツキシマブによって示される枯渇能力はより高いものであった。(B)10ドナーの全血B細胞枯渇活性では、2,6-シアリル化リツキシマブの活性が無処理のリツキシマブよりも有意に高く、p値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリツキシマブにより最低の活性が示された。(C)調製したラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞は細胞表面上に発現するCD20のレベルがより低い。(D、E)2,6-NSCTリツキシマブにより正常細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても注目すべきADCC有効性が示されたが、無処理の抗体の抵抗性株に対する活性は劇的に失われた。

30

【図2-6】図2は、種々の、糖鎖工学により操作されたリツキシマブの抗体依存性B細胞枯渇活性を示す。ヒトB細胞の枯渇を、新しく調製したヒトPBMC細胞を使用して行い、FACSでCD19+CD2-B細胞に基づいて分析した。(A)一連の異なる、糖鎖工学により操作されたリツキシマブと比較して、2,6-NSCTリツキシマブによって示される枯渇能力はより高いものであった。(B)10ドナーの全血B細胞枯渇活性では、2,6-シアリル化リツキシマブの活性が無処理のリツキシマブよりも有意に高く、p値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリツキシマブにより最低の活性が示された。(C)調製したラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞は細胞表面上に発現するCD20のレベルがより低い。(D、E)2,6-NSCTリツキシマブにより正常細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても注目すべきADCC有効性が示されたが、無処理の抗体の抵抗性株に対する活性は劇的に失われた。

40

【0033】

【図3A】図3は、V158FcRIIIa媒介性ADCCレポーターバイオアッセ

50

イにおける、糖鎖工学により操作されたハーセプチン (Herceptin) の EC50 を示す。標的細胞として SKBR3、およびエフェクター細胞として V158 Fc RIIIa を工学的に作製したジャーカットを用い、E/T 比 6:1 の下で実験を実施した。同じグラフに示されているデータは全て、同じマイクロプレートおよび同じエフェクター細胞のバッチで行った実験であった; 95% 信頼区間の棒がプロットされていた。(A) 無フコシル化ハーセプチン G8 および市販のハーセプチンにより同様の ADCC 効果が示され、これにより、抗 Fc RIIIa の脱フコシル化による利点が無フコシル化ハーセプチン G8 では失われることが例示される。(B) バイセクト型 (bisected) およびその非バイセクト型 (non-bisected) 類似体ハーセプチンである G9 および G4 により同様の EC50 値が示され、これにより、このアッセイではより良好なバイセクト型グリカン媒介性 ADCC 機能は観察されなかったことが示される。(C) ガラクトース末端を 2 つ有する、糖鎖工学により操作されたハーセプチン G1 と比較して、2, 6 - シアリル化抗体では有意な EC50 変化が観察されなかったが、2, 3 - シアリル化ハーセプチンでは見かけの EC50 上昇が示された。結果から、Fc における 2, 3 - シアリル化によりエフェクター細胞活性化が低下するが、2, 6 結合したものではエフェクター細胞活性化は低下しないことが示された。誘導倍率 (fold induction) の曲線は、誘導された発光を、抗体を用いない対照の誘導で割った結果であった。(D) グラフ (A) ~ (C) において EC50 が最低である試料を選択し、市販のハーセプチンと比較した。この ADCC レポーターバイオアッセイにおいて、全ての試料でより良好な活性が実証された。

【図 3 B】図 3 は、V158 Fc RIIIa 媒介性 ADCC レポーターバイオアッセイにおける、糖鎖工学により操作されたハーセプチン (Herceptin) の EC50 を示す。標的細胞として SKBR3、およびエフェクター細胞として V158 Fc RIIIa を工学的に作製したジャーカットを用い、E/T 比 6:1 の下で実験を実施した。同じグラフに示されているデータは全て、同じマイクロプレートおよび同じエフェクター細胞のバッチで行った実験であった; 95% 信頼区間の棒がプロットされていた。(A) 無フコシル化ハーセプチン G8 および市販のハーセプチンにより同様の ADCC 効果が示され、これにより、抗 Fc RIIIa の脱フコシル化による利点が無フコシル化ハーセプチン G8 では失われることが例示される。(B) バイセクト型 (bisected) およびその非バイセクト型 (non-bisected) 類似体ハーセプチンである G9 および G4 により同様の EC50 値が示され、これにより、このアッセイではより良好なバイセクト型グリカン媒介性 ADCC 機能は観察されなかったことが示される。(C) ガラクトース末端を 2 つ有する、糖鎖工学により操作されたハーセプチン G1 と比較して、2, 6 - シアリル化抗体では有意な EC50 変化が観察されなかったが、2, 3 - シアリル化ハーセプチンでは見かけの EC50 上昇が示された。結果から、Fc における 2, 3 - シアリル化によりエフェクター細胞活性化が低下するが、2, 6 結合したものではエフェクター細胞活性化は低下しないことが示された。誘導倍率 (fold induction) の曲線は、誘導された発光を、抗体を用いない対照の誘導で割った結果であった。(D) グラフ (A) ~ (C) において EC50 が最低である試料を選択し、市販のハーセプチンと比較した。この ADCC レポーターバイオアッセイにおいて、全ての試料でより良好な活性が実証された。

【図 3 C】図 3 は、V158 Fc RIIIa 媒介性 ADCC レポーターバイオアッセイにおける、糖鎖工学により操作されたハーセプチン (Herceptin) の EC50 を示す。標的細胞として SKBR3、およびエフェクター細胞として V158 Fc RIIIa を工学的に作製したジャーカットを用い、E/T 比 6:1 の下で実験を実施した。同じグラフに示されているデータは全て、同じマイクロプレートおよび同じエフェクター細胞のバッチで行った実験であった; 95% 信頼区間の棒がプロットされていた。(A) 無フコシル化ハーセプチン G8 および市販のハーセプチンにより同様の ADCC 効果が示され、これにより、抗 Fc RIIIa の脱フコシル化による利点が無フコシル化ハーセプチン G8 では失われることが例示される。(B) バイセクト型 (bisected)

およびその非バイセクト型 (non-bisected) 類似体ハーセプチンである G9 および G4 により同様の EC50 値が示され、これにより、このアッセイではより良好なバイセクト型グリカン媒介性 ADCC 機能は観察されなかったことが示される。(C) ガラクトース末端を 2 つ有する、糖鎖工学により操作されたハーセプチン G1 と比較して、2, 6 - シアリル化抗体では有意な EC50 変化が観察されなかったが、2, 3 - シアリル化ハーセプチンでは見かけの EC50 上昇が示された。結果から、Fc における 2, 3 - シアリル化によりエフェクター細胞活性化が低下するが、2, 6 結合したものではエフェクター細胞活性化は低下しないことが示された。誘導倍率 (fold induction) の曲線は、誘導された発光を、抗体を用いない対照の誘導で割った結果であった。(D) グラフ (A) ~ (C) において EC50 が最低である試料を選択し、市販のハーセ

10

【図 3 D】図 3 は、V158 Fc RIIIIa 媒介性 ADCC レポーターバイオアッセイにおける、糖鎖工学により操作されたハーセプチン (Herceptin) の EC50 を示す。標的細胞として SKBR3、およびエフェクター細胞として V158 Fc RIIIIa を工学的に作製したジャークットを用い、E/T 比 6 : 1 の下で実験を実施した。同じグラフに示されているデータは全て、同じマイクロプレートおよび同じエフェクター細胞のバッチで行った実験であった ; 95 % 信頼区間の棒がプロットされていた。(A) 無フコシル化ハーセプチン G8 および市販のハーセプチンにより同様の ADCC 効果が示され、これにより、抗 Fc RIIIIa の脱フコシル化による利点が無フコシル化ハーセプチン G8 では失われることが例示される。(B) バイセクト型 (bisected) およびその非バイセクト型 (non-bisected) 類似体ハーセプチンである G9 および G4 により同様の EC50 値が示され、これにより、このアッセイではより良好なバイセクト型グリカン媒介性 ADCC 機能は観察されなかったことが示される。(C) ガラクトース末端を 2 つ有する、糖鎖工学により操作されたハーセプチン G1 と比較して、2, 6 - シアリル化抗体では有意な EC50 変化が観察されなかったが、2, 3 - シアリル化ハーセプチンでは見かけの EC50 上昇が示された。結果から、Fc における 2, 3 - シアリル化によりエフェクター細胞活性化が低下するが、2, 6 結合したものではエフェクター細胞活性化は低下しないことが示された。誘導倍率 (fold induction) の曲線は、誘導された発光を、抗体を用いない対照の誘導で割った結果であった。(D) グラフ (A) ~ (C) において EC50 が最低である試料を選択し、市販のハーセ

20

30

【0034】

【図 4 A】図 4 は、修飾された均一な SCT グリカンを Fc Asn297 に付着させた抗インフルエンザ抗体 FI6 (FI6m) では ADCC 活性の増強が有意に示され、マウスが致死用量の H1N1 ウイルス攻撃から予防的に保護されたことを示す。(a) 細胞傷害性が、PBMc (エフェクター細胞) および様々な濃度の抗体と一緒にインキュベートした際にインフルエンザ H1 赤血球凝集素 (HA) (A/California/07/09) を発現した、溶解した HEK293T 細胞 (標的細胞) の百分率として表されている。(b) ADCC 活性を、活性化 T 細胞経路の ADCC シグナル伝達核因子が活性化されるとシグナルを生じるルシフェラーゼレポーターアッセイからの生物発光の増加倍率として示した。HA を発現した HEK293T 細胞 (標的細胞) を、前記ルシフェラーゼレポーター (エフェクター細胞) および種々の量の抗インフルエンザ抗体 FI6 および FI6m を伴う NK 細胞と一緒にインキュベートした。ソフトウェア GraphPad Prism を用いて 4 PL 非線形回帰で曲線あてはめを行った。(c) インフルエンザウイルス A/California/07/09 (H1N1) を致死用量 (10 ML D50) で感染させた時のマウスの生存をモニターした。感染の 2 時間前に、マウスの各群 (N = 9) に、FI6、FI6m または PBS を、それぞれ 2.5 mg/kg で腹腔内に与えた。FI6 群と FI6m 群には有意な生存差異があった ($p < 0.01$)。

40

50

【図4B】図4は、修飾された均一なSCTグリカンにFc Asn297に付着させた抗インフルエンザ抗体FI6 (FI6m)ではADCC活性の増強が有意に示され、マウスが致死用量のH1N1ウイルス攻撃から予防的に保護されたことを示す。(a)細胞傷害性が、PBMC (エフェクター細胞) および様々な濃度の抗体と一緒にインキュベートした際にインフルエンザH1赤血球凝集素(HA) (A/California/07/09)を発現した、溶解したHEK293T細胞 (標的細胞) の百分率として表されている。(b) ADCC活性を、活性化T細胞経路のADCCシグナル伝達核因子が活性化されるとシグナルを生じるルシフェラーゼレポーターアッセイからの生物発光の増加倍率として示した。HAを発現したHEK293T細胞 (標的細胞) を、前記ルシフェラーゼレポーター (エフェクター細胞) および種々の量の抗インフルエンザ抗体FI6およびFI6mを伴うNK細胞と一緒にインキュベートした。ソフトウェアGraphPad Prismを用いて4PL非線形回帰で曲線あてはめを行った。(c) インフルエンザウイルスA/California/07/09 (H1N1) を致死用量 (10MLD50) で感染させた時のマウスの生存をモニターした。感染の2時間前に、マウスの各群 (N=9) に、FI6、FI6mまたはPBSを、それぞれ2.5mg/kgで腹腔内に与えた。FI6群とFI6m群には有意な生存差異があった ($p < 0.01$)。

【図4C】図4は、修飾された均一なSCTグリカンにFc Asn297に付着させた抗インフルエンザ抗体FI6 (FI6m)ではADCC活性の増強が有意に示され、マウスが致死用量のH1N1ウイルス攻撃から予防的に保護されたことを示す。(a)細胞傷害性が、PBMC (エフェクター細胞) および様々な濃度の抗体と一緒にインキュベートした際にインフルエンザH1赤血球凝集素(HA) (A/California/07/09)を発現した、溶解したHEK293T細胞 (標的細胞) の百分率として表されている。(b) ADCC活性を、活性化T細胞経路のADCCシグナル伝達核因子が活性化されるとシグナルを生じるルシフェラーゼレポーターアッセイからの生物発光の増加倍率として示した。HAを発現したHEK293T細胞 (標的細胞) を、前記ルシフェラーゼレポーター (エフェクター細胞) および種々の量の抗インフルエンザ抗体FI6およびFI6mを伴うNK細胞と一緒にインキュベートした。ソフトウェアGraphPad Prismを用いて4PL非線形回帰で曲線あてはめを行った。(c) インフルエンザウイルスA/California/07/09 (H1N1) を致死用量 (10MLD50) で感染させた時のマウスの生存をモニターした。感染の2時間前に、マウスの各群 (N=9) に、FI6、FI6mまたはPBSを、それぞれ2.5mg/kgで腹腔内に与えた。FI6群とFI6m群には有意な生存差異があった ($p < 0.01$)。

【発明を実施するための形態】

【0035】

定義

本発明の実施では、別段の指定のない限り、当技術分野の技術の範囲内に入る分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技法を使用する。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual、第2版、Sambrook、Fritsch およびManiatis編 (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年)；DNA Cloning、I巻およびII巻 (D. N. Glover編、1985年)；Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney、Alan R. Liss, Inc.、1987年)；Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press、1986年)；B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning (1984年)；論文集、Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.、N.Y.)；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. MillerおよびM. P. Calos編、1987年、Cold Spring Harbor Laboratory)；Methods In Enz

ymology、154巻および155巻(Wuら編)、Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(MayerおよびWalker編、Academic Press、London、1987年);Antibodies: A Laboratory Manual、HarlowおよびLanes(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988年);およびHandbook Of Experimental Immunology、I~IV巻(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、1986年)を参照されたい。

【0036】

「糖操作抗体群(glycoantibodies)」という用語は、本発明者、Ch i - Huey Wong博士により造り出されたものであり、単一の様化されたグリコフォームがFc領域に結合したモノクローナル抗体(好ましくは、治療用モノクローナル抗体)の均一な集団を指す。基本的に均一な集団を構成する個々の糖操作抗体群は同一であり、同じエピトープに結合し、また、明確に定義されたグリカン構造および配列を有する同じFcグリカンを含む。

10

【0037】

本明細書で使用される場合、「抗CD20糖操作抗体群」(「抗CD20GAb s」)という用語は、Fc上に同じグリコフォームを有する抗CD20IgG分子の均一な集団を指す。

【0038】

「抗CD20糖操作抗体」(「抗CD20GAb」)という用語は、抗CD20糖操作抗体群内の個々のIgG抗体分子を指す。本明細書で使用される場合、「分子」とは、抗原結合性断片も指し得る。

20

【0039】

本明細書で使用される場合、「グリカン」という用語は、多糖、オリゴ糖または単糖を指す。グリカンは糖残基の単量体であってもポリマーであってもよく、直鎖であっても分枝していてもよい。グリカンとしては、天然の糖残基(例えば、グルコース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルノイラミン酸、ガラクトース、マンノース、フコース、ヘキソース、アラビノース、リボース、キシロースなど)および/または修飾された糖(例えば、2'-フルオロリボース、2'-デオキシリボース、ホスホマンノース、6'スルホN-アセチルグルコサミンなど)が含まれ得る。グリカンとは、本明細書では、糖タンパク質、糖脂質、グリコペプチド、グリコプロテオーム、ペプチドグリカン、リポ多糖またはプロテオグリカンなどの複合糖質の炭水化物部分を指すためにも使用される。グリカンは、通常、単糖間のO-グリコシド結合のみからなる。例えば、セルロースは-1,4結合したD-グルコースで構成されるグリカン(または、より詳細にはグルカン)であり、キチンは-1,4結合したN-アセチル-D-グルコサミンで構成されるグリカンである。グリカンは、単糖残基のホモポリマーであってもヘテロポリマーであってもよく、直鎖であっても分枝していてもよい。グリカンは、糖タンパク質およびプロテオグリカンのようにタンパク質に付着して見いだされ得る。グリカンは、一般に、細胞の外表面に見いだされる。O結合およびN結合グリカンは、真核生物では非常に一般的であるが、原核生物においても、一般的ではないが見いだされ得る。N結合グリカンは、シークオン(sequence)内のアスパラギンのR基窒素(N)に付着して見いだされる。シークオンは、Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr配列であり、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である。

30

40

【0040】

本明細書で使用される場合、「フコース」、「コアフコース」および「コアフコース残基」という用語は、互換的に使用され、N-アセチルグルコサミンと1,6位結合したフコースを指す。

【0041】

本明細書で使用される場合、「N-グリカン」、「N結合グリカン」、「N結合グリコ

50

シル化」、「Fcグリカン」および「Fcグリコシル化」という用語は、互換的に使用され、Fcを含有するポリペプチド内のアスパラギン残基のアミド窒素と結合したN - アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付着したN結合オリゴ糖を指す。「Fcを含有するポリペプチド」という用語は、Fc領域を含む、抗体などのポリペプチドを指す。

【0042】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化パターン」および「グリコシル化プロファイル」という用語は、互換的に使用され、糖タンパク質または抗体から酵素的にまたは化学的に放出され、次いで、それらの炭水化物構造について、例えば、LC - HPLC、またはMALDI - TOF MSなどを使用して分析されたN - グリカン種の特徴的な「指紋」を指す。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Current Analytical Chemistry、1巻、1号(2005年)、28~57頁の総説を参照されたい。

10

【0043】

本明細書で使用される場合、「糖鎖工学により操作されたFc」という用語は、本明細書で使用される場合、Fc領域上のN - グリカンが、酵素的にまたは化学的に変更または工学的に操作されていることを指す。「Fc糖鎖工学」という用語は、本明細書で使用される場合、糖鎖工学により操作されたFcを作出するために使用される酵素的または化学的なプロセスを指す。工学的操作の典型的な方法は、例えば、その内容が本明細書によって参照により組み込まれるWongら、US SN 12 / 959,351に記載されている。

20

【0044】

「均一な(homogeneous)」、「一様な(uniform)」、「一様に(uniformly)」および「均一性(homogeneity)」という用語は、Fc領域のグリコシル化プロファイルに関しては、互換的に使用され、1つの所望のN - グリカン種によって単一のグリコシル化パターンが表され、前駆N - グリカンの痕跡量はほとんどないまたは全くないことを意味するものとする。ある特定の実施形態では、前駆N - グリカンの痕跡量は約2%未満である。

【0045】

「基本的に純粋な」タンパク質とは、組成物の総重量に基づいて、例えば、少なくとも約91重量%、少なくとも約92重量%、少なくとも約93重量%、少なくとも約94重量%、少なくとも約95重量%、少なくとも約96重量%、少なくとも約97重量%、少なくとも約98重量%、または少なくとも約99重量%を含め、少なくとも約90重量%のタンパク質を含む組成物を意味する。

30

【0046】

「基本的に均一な」タンパク質は、組成物の総重量に基づいて、例えば、少なくとも約98.5%、少なくとも約99%を含め、少なくとも約98重量%のタンパク質を含む組成物を意味する。ある特定の実施形態では、タンパク質は、抗体、構造バリエーション、および/またはその抗原結合性断片である。

【0047】

本明細書で使用される場合、「IgG」、「IgG分子」、「モノクローナル抗体」、「免疫グロブリン」、および「免疫グロブリン分子」という用語は、互換的に使用される。本明細書で使用される場合、「分子」とは、抗原結合性断片も指し得る。

40

【0048】

本明細書で使用される場合、「Fc受容体」または「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体について述べるものである。好ましいFcRは、ネイティブな配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRはIgG抗体に結合するもの(ガンマ受容体)であり、これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび代替的にスプライスされた形態を含め、FcRIサブクラスの受容体(CD64)、FcRIIサブクラスの受容体(CD32)、およびFcRIIIサブクラスの受容体(CD16)が挙げられる。FcRII受容体としてはFcRIIA(「活性化受容体」)およびFcRII

50

B(「抑制受容体(inhibiting receptor)」)があり、これらは、同様のアミノ酸配列を有し、主にその細胞質ドメインが異なる。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメイン内に免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含有する。抑制受容体FcRIIBは、その細胞質ドメイン内に免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITIM)を含有する(総説M. in Daeron、Annu. Rev. Immunol. 15巻:203~234頁(1997年)を参照されたい)。FcRは、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol 9巻:457~92頁(1991年);Capelら、Immunomethods 4巻:25~34頁(1994年);およびde Haasら、J. Lab. Clin. Med. 126巻:330~41頁(1995年)に概説されている。今後同定されるものを含めた他のFcRが本明細書における「FcR」という用語に包含される。この用語は、母系IgGの胎児への移行に関与する新生児受容体、FcRnも包含する(Guyerら、J. Immunol. 117巻:587頁(1976年)およびKimら、J. Immunol. 24巻:249頁(1994年))。

【0049】

「エフェクター機能」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体Fc領域のFc受容体またはリガンドとの相互作用によって生じる生化学的事象を指す。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q結合;補体依存性細胞傷害;Fc受容体結合;抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC);食作用;細胞表面受容体(例えばB細胞受容体;BCR)の下方制御などが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、当技術分野で公知の様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0050】

本明細書で使用される場合、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」という用語は、ある特定の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)上に存在するFc受容体(FcR)に結合した、分泌されたIgにより、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、その後、細胞毒により標的細胞を死滅させることが可能になる、細胞傷害性の形態を指す。抗体は、細胞傷害性細胞を「武装」させるものであり、そのような死滅に絶対必要なものである。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞はFcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol 9巻:457~92頁(1991年)の464頁、表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または米国特許第5,821,337号に記載されているものなどのin vitro ADCCアッセイを実施することができる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。その代わりにまたはそれに加えて、目的の分子のADCC活性は、in vivoにおいて、例えば、Clynesら、PNAS(USA)95巻:652~656頁(1998年)に開示されているものなどの動物モデルにおいて評価することができる。

【0051】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」という用語は、本明細書で使用される場合、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的な補体経路の活性化は、同族抗原に結合する抗体(適切なサブクラスのもの)に補体系の第1の構成成分(C1q)が結合することによって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202巻:163頁(1996年)に記載のCDCアッセイを実施することができる。

【0052】

「キメラ」抗体(免疫グロブリン)は、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である重鎖および/または軽鎖の一部を有し、鎖(複数可)の残りは、別の種に由来するまたは別の抗体クラスまた

10

20

30

40

50

はサブクラスに属する抗体、ならびに所望の生物活性を示す限りはそのような抗体の断片、の対応する配列と同一または相同である（米国特許第4,816,567号；および Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻：6851～6855頁（1984年））。ヒト化抗体とは、本明細書で使用される場合、キメラ抗体のサブセットである。

【0053】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの部分に関して、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）由来の超可変領域残基で置き換えられた、ヒト免疫グロブリン（レシピエントまたはアクセプター抗体）である。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基が対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体においては見いだされない残基を含んでよい。これらの改変は、結合親和性などの抗体の性能をさらに磨くために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、一般には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFR領域であるが、FR領域は結合親和性を改善する1つまたは複数のアミノ酸置換を含んでよい。FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は、一般には、H鎖では6以下であり、L鎖では3以下である。ヒト化抗体は、場合により、一般にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含む。さらなる詳細に関しては、Jonesら、Nature 321巻：522～525頁（1986年）；Reichmannら、Nature 332巻：323～329頁（1988年）；および Presta、Curr. Op. Struct. Biol. 2巻：593～596頁（1992年）を参照されたい。以下の総説論文およびそこに引用されている参考文献も参照されたい：Vaswaniおよび Hamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1巻：105～115頁（1998年）；Harris、Biochem. Soc. Transactions 23巻：1035～1038頁（1995年）；Hurlieおよび Gross、Curr. Op. Biotech. 5巻：428～433頁（1994年）。

【0054】

本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、免疫応答を引き出すことができる任意の物質と定義される。本明細書で使用される場合、「抗原特異的」という用語は、特定の抗原または抗原の断片の供給により特異的な細胞増殖がもたらされるような細胞集団の性質を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、「免疫原性」という用語は、免疫応答を刺激する免疫原、抗原、またはワクチンの能力を指す。

【0056】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体またはT細胞受容体の抗原結合部位と接触する、抗原分子の一部と定義される。

【0057】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合すること」という用語は、結合対（例えば、抗体と抗原）間の相互作用を指す。種々の例では、特異的に結合することは、約 10^{-6} モル/リットル、約 10^{-7} モル/リットル、または約 10^{-8} モル/リットル、またはそれ未満の親和性定数によって具体化することができる。

【0058】

「単離された」抗体とは、同定され、その天然の環境の構成成分から分離および/または回収された抗体である。その天然の環境の混入構成成分は、抗体の研究、診断または治

10

20

30

40

50

療的な使用に干渉する材料であり、それらとして、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が挙げられる。

【0059】

「実質的に類似した」、「実質的に同じ」、「等価の」、または「実質的に等価の」という句は、本明細書で使用される場合、2つの数値（例えば、一方が分子に関連し、他方が参照／比較用（comparator）分子に関連する）間の類似性の程度が十分に高く、したがって、当業者により、前記値（例えば、K_d値、抗ウイルス効果など）により測定される生物学的特性の文脈内で、その2つの値の差異の生物学的および／または統計的有意性がほとんどまたは全くないとみなされるだろうことを示す。前記2つの値の差異は、参照／比較用分子についての値の関数として、例えば、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、および／または約10%未満である。

10

【0060】

「実質的に低下した」または「実質的に異なる」という句は、本明細書で使用される場合、2つの数値（一般に、一方が分子に関連し、他方が参照／比較用分子に関連する）の差異の程度が十分に高く、したがって、当業者により、前記値（例えば、K_d値）により測定される生物学的特性の文脈内で、その2つの値の差異が統計的に有意であるとみなされるだろうことを示す。前記2つの値の差異は、参照／比較用分子についての値の関数として、例えば、約10%超、約20%超、約30%超、約40%超、および／または約50%超である。

【0061】

20

「結合親和性」とは、一般に、分子（例えば、抗体）の単一の結合性部位とその結合パートナー（例えば、抗原）の間の非共有結合性の相互作用の総計の強度を指す。別段の指定のない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1：1相互作用を反映する内因性の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（K_d）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載のものを含めた当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般に、抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般に、抗原により速く結合し、より長く結合したままである傾向がある。結合親和性を測定する種々の方法は当技術分野で公知であり、そのいずれも本発明の目的に関して使用することができる。特定の例示的な実施形態は以下に記載されている。

30

【0062】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。これらのドメインは、一般に、抗体の最も可変性の部分であり、抗原結合部位を含有する。

【0063】

「可変性」という用語は、可変ドメインのある特定の部分が、その配列が抗体の間で広範囲にわたって異なり、特定の抗体のそれぞれのその特定の抗原に対する結合および特異性に使用されるという事実を指す。しかし、可変性は抗体の可変ドメイン全体を通して一様に分布しているのではない。可変性は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの両方にある相補性決定領域（CDR）または超可変領域と称される3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク（FR）と称される。ネイティブな重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、大部分がベータ-シート立体配置をとっている4つのFR領域を含み、これは、ベータ-シート構造の一部と接続し、いくつかの場合にはそれを形成するループを形成する3つのCDRと接続している。各鎖のCDRはFR領域の極めて近傍に一緒に保持され、他の鎖由来のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、National Institute of Health、Bethesda、Md（1991年）を参照されたい）。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体

40

50

依存性細胞傷害 (a n t i b o d y - d e p e n d e n t c e l l u l a r t o x i c i t y) への抗体の関与などの、種々のエフェクター機能を示す。

【 0 0 6 4 】

抗体のパパイン消化により、それぞれが単一の抗原結合部位を有する「 F a b 」断片と称される2つの同一の抗原結合性断片と、容易に結晶化できることが名称に反映されている残りの「 F c 」断片とが生じる。ペプシン処理により、抗原結合性部位を2つ有し、なお抗原と架橋結合することが可能な F (a b ') 2断片がもたらされる。

【 0 0 6 5 】

「 F v 」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含有する最小の抗体断片である。二本鎖 F v 種では、この領域は、密接に非共有結合により結びついた重鎖可変ドメイン1つと軽鎖可変ドメイン1つの二量体からなる。単鎖 F v 種では、重鎖可変ドメイン1つと軽鎖可変ドメイン1つが柔軟なペプチドリinkerによって共有結合により連結してよく、したがって、軽鎖および重鎖が二本鎖 F v 種のもものと類似した「二量体」構造で結びついていてよい。この立体配置では、各可変ドメインの3つの C D R が相互作用して V H - V L 二量体の表面上の抗原結合部位が規定される。集散的に、6つの C D R によって抗原結合特異性が抗体に付与される。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な C D R を3つのみ含む F v の半分）でさえ、結合性部位全体よりも親和性は低い、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【 0 0 6 6 】

F a b 断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン (C H 1) も含有する。F a b ' 断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含めた重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシ末端の数残基の付加により、F a b 断片とは異なる。F a b ' - S H とは、本明細書では、定常ドメインのシステイン残基（複数可）に遊離のチオール基を有する F a b ' に対する名称である。F (a b ') 2 抗体断片は、最初は、間にヒンジシステインを有する F a b ' 断片の対として生じた。抗体断片の他の化学的カップリングも公知である。

【 0 0 6 7 】

任意の脊椎動物種に由来する抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ () およびラムダ () と称される、2つの明白に異なる型のうちの一方に割り当てることができる。

【 0 0 6 8 】

抗体（免疫グロブリン）は、重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには主要なクラスが5つ存在する： I g A 、 I g D 、 I g E 、 I g G および I g M 、これらの一部は、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、 I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g A 1 、および I g A 2 にさらに分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 、 、 、 および μ と称される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および3次元立体配置は周知であり、一般に、例えば、 A b b a s ら、 C e l l u l a r a n d M o l . I m m u n o l o g y 、第4版（2000年）に記載されている。抗体は、抗体と1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合による結びつきによって形成されるより大きな融合分子の一部であってよい。

【 0 0 6 9 】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」および「全抗体」という用語は、本明細書では互換的に使用され、下で定義される通り、抗体断片ではなく実質的にインタクトな形態にある抗体を指す。この用語は、特に、F c 領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

【 0 0 7 0 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分のみを含み、その部分は、インタクトな抗体内に存在する場合にその部分に通常付随する機能の少なくとも1つ、できるだけ多く、大多数または全てを保持する。一実施形態では、抗体断片は、インタクトな抗体の抗原結合部位を含み、したがって、抗原に結合する能力を保持する。別の実施形態では、抗体断

10

20

30

40

50

片、例えば、Fc領域を含む断片は、FcRn結合、抗体半減期調節、ADCC機能および補体結合などの、Fc領域がインタクトな抗体内に存在する場合に通常付随する生物学的機能の少なくとも1つを保持する。一実施形態では、抗体断片は、インタクトな抗体と実質的に類似したin vivo半減期を有する一価抗体である。例えば、そのような抗体断片は、断片にin vivoにおける安定性を付与することが可能なFc配列に連結した抗原結合性アームを含んでよい。

【0071】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量に存在し得る、可能性のある天然に存在する変異以外は同一である。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、別個の抗体の混合物ではないという抗体の特性を示す。そのようなモノクローナル抗体は、一般には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、ここで、標的結合性ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合性ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスによって得られたものである。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローンまたは組換えDNAクロンのプールなどの複数のクローンから固有のクローンを選択することであってよい。例えば、標的に対する親和性を改善するため、標的結合配列をヒト化するため、細胞培養物中でのその産生を改善するため、in vivoにおけるその免疫原性を低下させるため、多重特異性抗体を創出するためなどで、選択された標的結合配列をさらに変更できること、および、変更された標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であることが理解されるべきである。一般には異なる決定因子（エピトープ）を対象とする異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子を対象とする。モノクローナル抗体調製物は、それらの特異性に加えて、一般には他の免疫グロブリンが混入していないという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均一な集団から得られるという抗体の特性を示すものであり、任意の特定の方法による抗体の作製が必要であるとは解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohlerら、Nature、256巻：495頁（1975年）；Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988年）；Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563～681頁（Elsevier、N.Y.、1981年））、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clacksonら、Nature、352巻：624～628頁（1991年）；Marksら、J. Mol. Biol. 222巻：581～597頁（1992年）；Sidhuら、J. Mol. Biol. 338巻（2号）：299～310頁（2004年）；Leeら、J. Mol. Biol. 340巻（5号）：1073～1093頁（2004年）；Fellouse、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101巻（34号）：12467～12472頁（2004年）；およびLeeら、J. Immunol. Methods 284巻（1～2号）：119～132頁（2004年）を参照されたい）、およびヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座または遺伝子の一部または全部を有する動物においてヒトまたはヒト様抗体を産生させるための技術（例えば、WO98/24893；WO96/34096；WO96/33735；WO91/10741；Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：2551頁（1993年）；Jakobovitsら、Nature 362巻：255～258頁（1993年）；Bruggemannら、Year in Immunol. 7巻：33頁（1993年）；米国特許第5,545,807号；5,545,806号；5,569,825号；5,625,126号；5,633,425号；5,661,016号；Marksら、Bio.

10

20

30

40

50

Technology 10巻：779～783頁(1992年)；Lonbergら、Nature 368巻：856～859頁(1994年)；Morrison、Nature Biotechnol. 14巻：845～851頁(1996年)；Neuberger、Nature Biotechnol. 14巻：826頁(1996年)およびLonbergおよびHuszar、Intern. Rev. Immunol. 13巻：65～93頁(1995年)を参照されたい)を含めた様々な技法によって作出することができる。

【0072】

本明細書のモノクローナル抗体は、詳細には、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であり、鎖(複数可)の残りは、別の種に由来するまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、ならびに所望の生物活性を示す限りはそのような抗体の断片、の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体を含む(米国特許第4,816,567号；およびMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻：6851～6855頁(1984年))。

【0073】

以下の総説論文およびそこに引用されている参考文献も参照されたい：VaswaniおよびHamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1巻：105～115頁(1998年)；Harris、Biochem. Soc. Transactions 23巻：1035～1038頁(1995年)；HurlerおよびGross、Curr. Op. Biotech. 5巻：428～433頁(1994年)。

【0074】

「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、本明細書で使用される場合、配列内で超可変性であり、および/または構造的に定義されているループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つの超可変領域を含む；VHに3つ(H1、H2、H3)、およびVLに3つ(L1、L2、L3)。いくつもの超可変領域の記述が使用されており、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)は配列の可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991年))。Chothiaは、その代わりに、構造ループの場所に言及する(ChothiaおよびLesk J. Mol. Biol. 196巻：901～917頁(1987年))。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループの折衷を示すものであり、Oxford Molecular's AbM antibody modeling softwareに使用されている。「contact」超可変領域は、入手可能な複合体結晶構造の解析に基づくものである。これらの超可変領域のそれぞれに由来する残基を以下に示す。

ループ	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24 - L34	L24 - L34	L26 - L32	L30 - L36
L2	L50 - L56	L50 - L56	L50 - L52	L46 - L55
L3	L89 - L97	L89 - L97	L91 - L96	L89 - L96
H1	H31 - H35B	H26 - H35B	H26 - H32	H30 - H35B
(Kabat 番号付け)				
H1	H31 - H35	H26 - H35	H26 - H32	H30 - H35
(Chothia 番号付け)				
H2	H50 - H65	H50 - H58	H53 - H55	H47 - H58
H3	H95 - H102	H95 - H102	H96 - H101	H93 - H101

【0075】

超可変領域は、以下の通り「伸長された超可変領域」を含み得る：V Lにおける24 - 36または24 - 34 (L1)、46 - 56または50 - 56または49 - 56 (L2) および89 - 97または89 - 96 (L3)、ならびにV Hにおける26 - 35 (H1)、50 - 65または49 - 65 (H2) および93 - 102、94 - 102、または95 - 102 (H3)。可変ドメイン残基は、これらの定義のそれぞれについて、Kabatら、上記に従って番号付けされる。

【0076】

「フレームワーク」または「FR」残基とは、本明細書において定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

10

【0077】

「Kabatと同様の可変ドメイン残基の番号付け」または「Kabatと同様のアミノ酸位番号付け」という用語およびその変形は、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991年)における抗体の編集物 (compilation) の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインのために使用される番号付け系を指す。この番号付け系を使用して、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはHVRにおける短縮、または挿入に対応して、より少ないまたは追加的なアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後ろに単一のアミノ酸挿入 (Kabatに従って残基52a)、および重鎖FR残基82の後ろに挿入残基 (Kabatに従って例えば残基82a、82b、および82cなど) を含み得る。所与の抗体について、「標準の」Kabat番号付けされた配列を有する抗体の配列の相同性の領域におけるアラインメントによって残基のKabat番号付けを決定することができる。

20

【0078】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のVHドメインおよびVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖内に存在する。一般に、scFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これにより、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成することが可能になる。scFvの概説については、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、269～315頁 (1994年) を参照されたい。

30

【0079】

「ダイアボディ (diabody)」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、断片は、同じポリペプチド鎖内で接続した重鎖可変ドメイン (VH) と軽鎖可変ドメイン (VL) (VH-VL) を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間での対形成が可能になるには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは強制的に別の鎖の相補的なドメインと対形成し、2つの抗原結合部位が創出される。ダイアボディは、例えば、EP404,097; WO93/1161; およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻: 6444～6448頁 (1993年) により詳細に記載されている。

40

【0080】

「ヒト抗体」とは、ヒトによって産生された抗体および/または本明細書に開示されているヒト抗体を作出するための技法のいずれかを使用して作出された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合性残基を含むヒト化抗体を明確に排除する。

【0081】

「親和性成熟した」抗体とは、その1つまたは複数のHVRに1つまたは複数の変更を

50

伴う抗体であり、その変更により、それらの変更（複数可）を有さない親抗体と比較して、抗体の抗原に対する親和性の改善がもたらされる。一実施形態では、親和性成熟した抗体は、標的抗原に対してナノモル濃度またはさらにはピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟した抗体は、当技術分野で公知の手順によって作製される。Marksら、Bio/Technology 10巻：779～783頁（1992年）には、VHドメインおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟が記載されている。CDRおよび/またはフレームワーク残基のランダム変異誘発は、Barbasら、Proc Natl Acad Sci USA 91巻：3809～3813頁（1994年）；Schierら、Gene 169巻：147～155頁（1995年）；Yeltonら、J. Immunol. 155巻：1994～2004頁（1995年）；Jacksonら、J. Immunol. 154巻（7号）：3310～9頁（1995年）；およびHawkinsら、J. Mol. Biol. 226巻：889～896頁（1992年）により説明されている。

10

【0082】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体とは、それが結合する抗原の生物活性を阻害するまたは低下させる抗体である。ある特定の遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。

【0083】

「アゴニスト抗体」とは、本明細書で使用される場合、目的のポリペプチドの機能活性の少なくとも1つを模倣する抗体である。

20

【0084】

「障害」とは、本発明の抗体を用いた処置から利益を得る任意の状態である。障害には、哺乳動物に問題の障害の素因を与える病的状態を含めた慢性および急性の障害または疾患が含まれる。本明細書において処置される障害の非限定的な例としてはがんが挙げられる。

【0085】

「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。一実施形態では、細胞増殖性障害はがんである。

【0086】

「腫瘍」とは、本明細書で使用される場合、悪性であるか良性であるかにかかわらず全ての新生細胞成長および増殖、ならびに全ての前がん性およびがん性細胞および組織を指す。「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」および「腫瘍」という用語は、本明細書で言及される場合、相互排他的なものではない。

30

【0087】

「がん」および「がん性」という用語は、一般に、調節されていない細胞成長/増殖を一般に特徴とする哺乳動物の生理的状态を指すまたは記述する。がんの例としては、これだけに限定されないが、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。そのようながんのより詳細な例としては、扁平上皮細胞がん（squamous cell cancer）、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺癌、肺扁平上皮癌（squamous carcinoma of the lung）、腹膜がん、肝細胞がん、胃腸がん、膵がん（pancreatic cancer）、神経膠芽腫、子宮頸がん（cervical cancer）、卵巣がん（ovarian cancer）、肝がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳がん（breast cancer）、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎がん、肝がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝癌、白血病および他のリンパ球増殖性障害、および種々の型の頭頸部がんが挙げられる。

40

【0088】

本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、免疫応答を引き出すことができる任意の物質と定義される。

【0089】

50

本明細書で使用される場合、「抗原特異的」という用語は、特定の抗原または抗原の断片の供給により特異的な細胞増殖がもたらされるような細胞集団の性質を指す。

【0090】

「CD20発現がん」という用語は、本明細書で使用される場合、がん細胞がCD20抗原の発現を示す全てのがんを指す。CD20発現がんとは、本明細書で使用される場合、リンパ腫（好ましくはB細胞非ホジキンリンパ腫（NHL））およびリンパ性白血病を指すことが好ましい。そのようなリンパ腫およびリンパ性白血病としては、例えば、a）濾胞性リンパ腫、b）小型非切れ込み核細胞性リンパ腫（Small Non-Cleaved Cell Lymphoma）/バーキットリンパ腫（地方病性バーキットリンパ腫、散発性バーキットリンパ腫および非バーキットリンパ腫を含む）、c）辺縁層リンパ腫（節外周辺帯B細胞リンパ腫（粘膜関連リンパ組織リンパ腫、MALTを含む）、節性辺縁層B細胞リンパ腫（nodal marginal zone B cell lymphoma）および脾性辺縁層リンパ腫（splenic marginal zone lymphoma））、d）マンツル細胞リンパ腫（MCL）、e）大細胞型リンパ腫（びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLCL）、びまん性混合細胞型リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、縦隔原発B細胞リンパ腫（Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma）、血管中心性リンパ腫 - 肺B細胞リンパ腫（Angiocentric Lymphoma - Pulmonary B-Cell Lymphoma）を含む）、f）ヘアリー細胞白血病、g）リンパ球性リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、h）急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）/小リンパ球性リンパ腫（SLL）、B細胞前リンパ性白血病、i）形質細胞新生物、形質細胞骨髄腫、多発性骨髄腫、形質細胞腫、j）ホジキン病が挙げられる。CD20発現がんは、B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）であることがより好ましい。特に、CD20発現がんは、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLCL）、バーキットリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、濾胞性リンパ腫、多発性骨髄腫、辺縁層リンパ腫、移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、HIV関連リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、またはCNS原発リンパ腫である。

【0091】

本明細書で使用される場合、「処置（treatment）」とは、処置される個体または細胞の自然経過を変更する試みにおける臨床介入を指し、予防法のためまたは臨床病理の過程中的のいずれかで実施することができる。望ましい処置の効果としては、疾患の出現または再発の防止、症状の緩和、疾患のあらゆる直接または間接的な病理学的影響の減弱、炎症および/または組織/器官損傷の防止または減少、疾患の進行の速度の低下、病態の好転または一時的緩和（palliation）、および寛解または予後の改善が挙げられる。一部の実施形態では、疾患または障害の発生を遅延させるために本発明の抗体を使用する。

【0092】

「個体」または「被験体」は、脊椎動物である。ある特定の実施形態では、脊椎動物は、哺乳動物である。哺乳動物としては、これだけに限定されないが、農場動物（例えば、ウシなど）、競技動物、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌ、およびウマなど）、霊長類、マウスおよびラットが挙げられる。ある特定の実施形態では、脊椎動物は、ヒトである。

【0093】

「哺乳動物」とは、処置の目的に関しては、ヒト、家畜動物および農場動物、ならびに動物園の動物、競技動物、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含めた、哺乳動物に分類される任意の動物を指す。ある特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0094】

「有効量」とは、治療的または予防的結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。

【 0 0 9 5 】

本発明の物質／分子の「治療有効量」は、個体の病態、年齢、性別、および体重、ならびに個体における所望の応答を引き出す物質／分子の能力などの因子に応じて変動し得る。治療有効量は、物質／分子のあらゆる毒性の影響または有害な影響よりも治療的に有益な影響が上回る量でもある。「予防有効量」とは、所望の予防的結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。必ずではないが、一般に、予防用量は、被験体に疾患の前またはより早い段階で使用されるので、予防有効量は治療有効量よりも少なくなる。

【 0 0 9 6 】

「細胞傷害性薬剤」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害するもしくは妨げ、かつ／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば、A t 2 1 1、I 1 3 1、I 1 2 5、Y 9 0、R e 1 8 6、R e 1 8 8、S m 1 5 3、B i 2 1 2、P 3 2、P b 2 1 2およびL uの放射性同位元素）、化学療法剤（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカアルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤）、核酸分解酵素などの酵素およびその断片、抗生物質、ならびに、断片および／もしくはそのバリエーションを含めた、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素もしくは酵素的に活性な毒素などの毒素、ならびに以下に開示されている種々の抗腫瘍剤または抗がん剤を含むものとする。他の細胞傷害性薬剤が下に記載されている。殺腫瘍剤（tumor ic id al agent）は腫瘍細胞の破壊を引き起こすものである。

【 0 0 9 7 】

「化学療法剤」はがんの処置において有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびC Y T O X A N（登録商標）シクロホスファミド（c y c l o s p h o s p h a m i d e）などのアルキル化剤；ブスルファン、インブrosulfanおよびピボスulfanなどのアルキルスルホネート；ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチルオロメラミンを含めた、エチレンイミンおよびメチルアメラミン（m e t h y l a m e l a m i n e）；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；デルタ - 9 - テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、M A R I N O L（登録商標））；ベータ - ラパコン（l a p a c h o n e）；ラパコール（l a p a c h o l）；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（H Y C A M T I N（登録商標））、C P T - 1 1（イリノテカン、C A M P T O S A R（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコボレチン（s c o p o l e c t i n）、および9 - アミノカンプトテシンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；C C - 1 0 6 5（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、K W - 2 1 8 9およびC B 1 - T M 1を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン（p a n c r a t i s t a t i n）；サルコジクチン（s a r c o d i c t y i n）；スポンギスタチン（s p o n g i s t a t i n）；クロラムブシル、クロマファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン（n o v e m b i c h i n）、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン（r a n i m n u s t i n e）などのニトロソ尿素（n i t r o s u r e a）；エンジン抗生物質（例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシガンマ1 IおよびカリチアマイシオメガI 1など（例えば、A g n e w、C h e m . I n t l . E d . E n g l .、3 3巻：1 8 3～1 8 6頁（1 9 9 4年）を参照されたい））；ジネミシン（d y n e m i c i n）Aを含めたジネミシン；エ

10

20

30

40

50

スペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エン
 ジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン（
 a u t h r a m y c i n）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カルピシ
 ン（c a r a b i c i n）、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン（c h
 r o m o m y c i n i s）、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジ
 アゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、A D R I A M Y C I N（登録商標）ドキシソルピシ
 ン（モルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ -
 ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン（
 e s o r u b i c i n）、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマ
 イトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、
 ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニ
 グリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；
 メトトレキサートおよび5 - フルオロウラシル（5 - F U）などの代謝拮抗薬；デノプテ
 リン（d e n o p t e r i n）、メトトレキサート、プテロプテリン（p t e r o p t e
 r i n）、トリメトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6 - メルカプトプリン
 、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6 -
 アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エ
 ノシタピン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ド
 ロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロ
 ゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤（a n t i - a d r
 e n a l）；フォリン酸（f r o l i n i c a c i d）などの葉酸補充剤；アセグラト
 ン；アルドホスファミドグリコシド（a l d o p h o s p h a m i d e g l y c o s i
 d e）；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサント
 レン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルチン；ジアジクオン；エルフロルニ
 チン（e l f o r m i t h i n e）；エリプチニウム（e l l i p t i n i u m）酢酸塩
 ；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイ
 ニン（l o n i d a i n i n e）；マイタンシンおよびアンサマイトシンなどのメイタン
 シノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール（m o p i d a n m o l）；
 ニトラクリン（n i t r a e r i n e）；ベントスタチン；フェナメット（p h e n a m
 e t）；ピラルピシン；ロソキサントロン（l o s o x a n t r o n e）；2 - エチルヒ
 ドラジド；プロカルバジン；P S K（登録商標）多糖複合体（J H S N a t u r a l
 P r o d u c t s、E u g e n e、O r e g）；ラゾキサン；リゾキシシン（r h i z o x
 i n）；シゾフラン（s i z o f u r a n）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリ
 アジクオン；2，2'，2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、T
 - 2 毒素、ベラクリン（v e r r a c u r i n）A、ロリジン（r o r i d i n）Aおよ
 びアングイジン（a n g u i d i n e））；ウレタン；ビンデシン（E L D I S I N E（
 登録商標）、F I L D E S I N（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブ
 ロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン（g a c y t o s i n e）；ア
 ラビノシド（「A r a - C」）；チオテパ；タキソイド、例えば、T A X O L（登録商標）
 パクリタキセル（B r i s t o l - M y e r s S q u i b b O n c o l o g y、P
 r i n c e t o n、N . J .）、パクリタキセルのアルブミンで工学的に操作したナノ粒
 子製剤であるA B R A X A N E（商標）C r e m o p h o r - f r e e（A m e r i c a n
 P h a r m a c e u t i c a l P a r t n e r s、S c h a u m b e r g、I l l
 .）、およびT A X O T E R E（登録商標）ドセタキセル（d o x e t a x e l）（R h
 o n e - P o u l e n c R o r e r、A n t o n y、F r a n c e）；クロラムブシル
 （c h l o r a n b u c i l）；ゲムシタピン（G E M Z A R（登録商標））；6 - チオ
 グアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンな
 どの白金類似体；ピンブラスチン（V E L B A N（登録商標））；白金；エトポシド（V
 P - 1 6）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン（O N C O V I N（登
 録商標））；オキサリプラチン；ロイコボリン（l e u c o v o v i n）；ビノレルピン

10

20

30

40

50

(NAVELBINE (登録商標)) ; ノバントロン (novantrone) ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロネート ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイン酸などのレチノイド ; カペシタピン (XELODA (登録商標)) ; 上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体 ; ならびに、上記の2つまたはそれ超の組み合わせ、例えば、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびブレドニゾロンの併用療法の略語である CHOP、および、オキサリプラチン (ELOXATIN (商標)) と 5-FU および ロイコボリン (leucovorin) の組み合わせの処置レジメンの略語である FOLFEX などが挙げられる。

【0098】

本明細書で使用される場合、「処置」とは、処置される個体または細胞の自然経過を変更する試みにおける臨床介入を指し、予防法のためまたは臨床病理の過程中的のいずれかで実施することができる。望ましい処置の効果としては、疾患の出現または再発の防止、症状の緩和、疾患のあらゆる直接または間接的な病理学的影響の減弱、炎症および/または組織/器官損傷の防止または減少、疾患の進行の速度の低下、病態の好転または一時的緩和、および寛解または予後の改善が挙げられる。一部の実施形態では、疾患または障害の発生を遅延させるために本発明の抗体を使用する。

【0099】

「個体」または「被験体」は、脊椎動物である。ある特定の実施形態では、脊椎動物は、哺乳動物である。哺乳動物としては、これだけに限定されないが、農場動物 (例えば、ウシなど)、競技動物、愛玩動物 (例えば、ネコ、イヌ、およびウマなど)、霊長類、マウスおよびラットが挙げられる。ある特定の実施形態では、脊椎動物は、ヒトである。

【0100】

「哺乳動物」とは、処置の目的に関しては、ヒト、家畜動物および農場動物、ならびに動物園の動物、競技動物、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含めた、哺乳動物に分類される任意の動物を指す。ある特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0101】

「有効量」とは、所望される治療的または予防的結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。

【0102】

本発明の物質/分子の「治療有効量」は、個体の病態、年齢、性別、および体重、ならびに個体における所望の応答を引き出す物質/分子の能力などの因子に応じて変動し得る。治療有効量は、物質/分子のあらゆる毒性の影響または有害な影響よりも治療的に有益な影響が上回る量でもある。「予防有効量」とは、所望の予防的結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。必ずではないが、一般に、予防用量は、被験体に疾患の前またはより早い段階で使用されるので、予防有効量は治療有効量よりも少なくなる。

【0103】

「細胞傷害性薬剤」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害するもしくは妨げ、かつ/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位元素 (例えば、At 211、I 131、I 125、Y 90、Re 186、Re 188、Sm 153、Bi 212、P 32、Pb 212 および Lu の放射性同位元素)、化学療法剤 (例えば、メトトレキサート、アドリマイシン、ビンカルカロイド (ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤)、核酸分解酵素などの酵素およびその断片、抗生物質、ならびに、その断片および/もしくはパリアントを含めた、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素もしくは酵素的に活性な毒素などの毒素、および以下に開示されている種々の抗腫瘍剤または抗がん剤を含むものとする。他の細胞傷害性薬剤が下に記載されている。殺腫瘍剤は腫瘍細胞の破壊を引き起こすものである。

【0104】

「処置すること (treating)」または「処置 (treatment)」または「緩和 (alleviation)」とは、治療的処置および予防または防止措置の両方を指し、ここで、目的は、標的とした病的状態または障害を防止するまたは減速させる (減らす) ことである。処置を必要とするものとしては、すでに障害を有するものならびに障害を有しやすいものまたは障害が防止されるべきものが挙げられる。被験体または哺乳動物は、治療量の抗体を本発明の方法に従って受けた後、患者が以下のうちの1つまたは複数の観察可能かつ/または測定可能な低下または不在を示した場合、感染に対して成功裏に「処置」されている：感染細胞の数の低下または感染細胞の不在；感染した総細胞のパーセントの低下；ならびに/または特定の感染に付随する症状のうちの1つまたは複数のいくつかの程度までの軽減；罹患率および死亡率の低下、ならびに生活の質の問題の改善。疾患における成功裏の処置および改善を評価するための上記のパラメータは医師によく知られている常套的な手順によって容易に測定可能である。

10

【0105】

「治療有効量」という用語は、被験体または哺乳動物における疾患または障害を「処置する」ために有効な抗体または薬物の量を指す。前述の「処置すること」の定義を参照されたい。

【0106】

1種または複数種の別の治療剤「と組み合わせた (in combination with)」投与は、同時 (並行 (concurrent)) 投与および任意の順序での連続した (consecutive) 投与を含む。

20

【0107】

「担体」とは、本明細書で使用される場合、使用される投与量および濃度でそれに暴露される細胞または哺乳動物に対して非毒性である、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含む。多くの場合、生理的に許容される担体は、水性 pH 緩衝溶液である。生理的に許容される担体の例としては、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸を含めた抗酸化剤；低分子量 (約 10 残基未満の) ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTA などのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；ならびに/または TWEEN (商標) ポリエチレングリコール (PEG)、および PLURONICS (商標) などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

30

【0108】

糖操作抗体群

培養物中で哺乳動物細胞から産生された組換えタンパク質のグリコシル化は、治療用抗体の有効な使用を確実にすることにおける重要なプロセスである (Goosheer、1991年；Jenkins および Curling、1994年)。哺乳動物の細胞培養では、全てが同じ性質を有するわけではない、グリコシル化パターンの不均一な混合物が送達される。治療用タンパク質の安全性、有効性および血清中半減期のような性質は、これらのグリコシル化パターンの影響を受ける可能性がある。本発明者らは、「糖操作抗体群 (glycoantibodies)」という名称の新規クラスのモノクローナル抗体を開発することにより、グリコフォーム不均一性問題に成功裏に対処した。

40

【0109】

「糖操作抗体群 (glycoantibodies)」という用語は、本発明者、Chi-Huey Wong 博士により造り出されたものであり、Fc 上に単一の様化されたグリコフォームを有するモノクローナル抗体 (好ましくは、治療用モノクローナル抗体) の均一な集団を指す。均一な集団を構成する個々の糖操作抗体群は同一であり、同じエピトープに結合し、また、明確に定義されたグリカン構造および配列を有する同じ Fc グ

50

リカンを含有する。

【0110】

糖操作抗体群は、市販されているまたは開発中のモノクローナル抗体（好ましくは、治療用モノクローナル抗体）から生成することができる。治療的使用のためのモノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体またはキメラモノクローナル抗体であってよい。

【0111】

「親抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、糖操作抗体を作製するために使用されるモノクローナル抗体を指す。親抗体は、哺乳動物細胞培養物、*Pichia pastoris* または昆虫細胞株などの細胞培養によって得ることができる。親抗体は哺乳動物細胞培養物中で産生されることが好ましい。親抗体はFDAの認可を受けたものであってもよく、開発中のものであってもよい。

【0112】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、およびファージディスプレイ技術、またはこれらの組み合わせの使用を含めた、多種多様な当技術分野で公知の技法を使用して調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であり、例えば、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988年)；Hammerlingら、*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563～681頁(Elsevier、N.Y.、1981年)において教示されているものを含めたハイブリドーマ技法を使用して産生させることができる。「モノクローナル抗体」(「mAb」と省略される)という用語は、本明細書で使用される場合、ハイブリドーマ技術により産生された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含めた単一のクローンに由来する抗体を指し、それが産生される方法を指すものではない。「モノクローナル抗体」は、2つのタンパク質、すなわち重鎖および軽鎖を含む、あるいはそれからなることができる。

【0113】

治療用モノクローナル抗体からFc糖鎖工学によって導出された機能的に活性な糖操作抗体群が本明細書に記載されている。最適化グリコフォームを有する糖操作抗体群は、治療用モノクローナル抗体と比較してより強力な生物活性を示す。最適化グリコフォームを有する糖操作抗体群により、治療的使用のための代替物がもたらされ得ることが意図されている。

【0114】

本発明の糖操作抗体群は、Fc上の単一の様化されたグリコフォーム(N-グリカン)からなる。一部の実施形態では、N-グリカンはFc領域のAsn-297に付着している。

【0115】

本発明によるN-グリカンは、「トリマンノスコア(trimannose core)」または「五糖コア」とも称される $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ という共通の五糖コアを有し、ここで、「Man」はマンノースを指し、「Glc」はグルコースを指し、「NAc」はN-アセチルを指し、 GlcNAc はN-アセチルグルコサミンを指す。

【0116】

一部の実施形態では、N-グリカンは二分岐(biantennary)構造を有する。

【0117】

本明細書に記載のN-グリカンは、「バイセクティング(bisecting)」 GlcNAc を含む鎖内置換を有し得る。グリカンがトリマンノスコア上にバイセクティング GlcNAc を含む場合、構造は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$ と表される。グリカンがト

リマンノースコアに付着したコアフコースを含む場合、構造は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (F) と表される。N - グリカン は、1 つまたは複数の末端シアル酸 (例えば、N - アセチルノイラミン酸) を含んでよい。「Sia」と表される構造は、末端シアル酸を指す。シアリル化は、二分岐構造の 1 - 3 アームまたは 1 - 6 アームのいずれかにおいて起こり得る。

【0118】

一部の実施形態では、本明細書に記載の N - グリカン は、2 - 6 末端シアル酸を少なくとも 1 つ含む。ある特定の実施形態では、N - グリカン は、2 - 6 末端シアル酸を 1 つ含む。好ましい実施形態では、N - グリカン は、2 - 6 末端シアル酸を 2 つ含む。

【0119】

一部の実施形態では、本明細書に記載の N - グリカン は、2 - 3 末端シアル酸を少なくとも 1 つ含む。ある特定の実施形態では、N - グリカン は、2 - 3 末端シアル酸を 1 つ含む。好ましい実施形態では、N - グリカン は、2 - 3 末端シアル酸を 2 つ含む。

【0120】

一部の実施形態では、本明細書に記載の N - グリカン は、ガラクトースを少なくとも 1 つ含む。ある特定の実施形態では、N - グリカン は、ガラクトースを 1 つ含む。好ましい実施形態では、N - グリカン は、ガラクトースを 2 つ含む。

【0121】

本開示による N - グリカン は、コアフコースを含まないことが好ましい。

【0122】

表 1 は、糖操作抗体群における例示的な N - グリカンの一覧である。

10

20

表1.

GAb	グリカン構造	グリカン配列
1-101		$\text{Sia}_2(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-102		$\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-103		$\text{Sia}(\alpha 2-6)\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-104		$\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-105		$\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$
1-106		$\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-107		$\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-108		$\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$
1-109		$\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$
1-110		$\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$

20

30

40

【表 1 - 2】

1-111		Man ₃ GlcNAc ₂
1-112		Sia ₂ (α2-6)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
1-113		Sia(α2-6)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
1-114		Sia(α2-6)GalGlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
1-115		Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
1-116		GalGlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
1-117		Sia ₂ (α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
1-118		Sia(α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
1-119		Sia ₂ (α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
1-120		Sia(α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂

10

20

30

40

ブ (Opdivo)、オビヌツズマブ (Gazyva)、オフアツムマブ (Arzerra、HuMax-CD20)、パニツムマブ (Vectibix)、ペムプロリズマブ (Keytruda)、ペルツズマブ (Perjeta)、ラムシルマブ (Cyramza)、リツキシマブ (Rituxan、Mabthera)、シルツキシマブ (Sylvant)、トシリズマブ、トシツモマブ (Bexxar) およびトラスツズマブ (Herceptin) が挙げられる。

【0125】

抗CD20糖操作抗体群 (抗CD20GAb)

「CD20」抗原は、末梢血またはリンパ系器官に由来するB細胞の90%超の表面に見いだされる、分子量およそ35kDの非グリコシル化膜貫通リンタンパク質である。CD20は、初期プレB細胞発生の間に発現し、形質細胞分化まで残る。CD20は、ヒト幹細胞、リンパ球前駆細胞または正常な形質細胞においては見いだされない。CD20は、正常なB細胞ならびに悪性B細胞のどちらにも存在する。文献におけるCD20に対する他の名称としては、「Bリンパ球制限分化抗原」および「Bp35」が挙げられる。CD20抗原は、例えば、ClarkおよびLedbetter、Adv. Can. Res. 52巻: 81~149頁 (1989年) およびValentineら、J. Biol. Chem. 264巻 (19号): 11282~11287頁 (1989年) に記載されている。

【0126】

本開示は、「抗CD20糖操作抗体群」(「抗CD20GAb」)と称される新規クラスの抗CD20抗体を特徴とする。抗CD20糖操作抗体群は、抗CD20モノクローナル抗体からFc糖鎖工学によって生成することができる。均一な集団を構成する個々の抗CD20糖操作抗体群は同一であり、明確に定義されたグリカン構造および配列を有する同じFcグリカンを含む。本発明による抗CD20GAbは、その親抗体が結合するのと同じ、細胞膜上のヒトCD20抗原のエピトープに特異的に結合する。

【0127】

「親抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、抗CD20糖操作抗体を作製するために使用される抗CD20モノクローナル抗体を指す。

【0128】

親抗体は、哺乳動物細胞培養物、Pichia pastorisまたは昆虫細胞株などの細胞培養によって得ることができる。親抗体は哺乳動物細胞培養物中で産生されることが好ましい。親抗体はFDAの認可を受けたものであってもよく、開発中のものであってもよい。例示的な親抗体としては、これだけに限定されないが、リツキシマブ、オフアツムマブ、トシツモマブ、オクレリズマブ、11B8または7D8 (WO2004/035607に開示されている)、C6などの、WO2005/103081に開示されている抗CD20抗体、IMMU-106 (Immunomedics) などの、WO2003/68821に開示されている抗CD抗体、AME-133 (Applied Molecular Evolution/Lilly) などの、WO2004/103404に開示されている抗CD20抗体、および、TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals Inc) などの、US2003/0118592に開示されている抗CD20抗体、「Y2B8」(ZEVALLIN (登録商標)) (Biogen-Idc, Inc.) と称される90Y標識2B8マウス抗体 (例えば、米国特許第5,736,137号、Andersonら; ATCC寄託物HB11388); マウスおよびキメラ2H7抗体 (例えば、米国特許第5,677,180号、Robinsonら); rhuMAb2H7および他のバージョン (Genentech, Inc.) などのヒト化2H7抗体 (例えば、WO2004/056312、Adamsら、および下に示されている他の参考文献); CD20に対するヒトモノクローナル抗体 (GenMab A/S/Medarex, Inc.) (例えば、WO2004/035607およびWO2005/103081、Teelingら); CD20の細胞外エピトープに結合するキメラ化またはヒト化モノクローナル抗体 (Biomedics Inc.) (例えば、WO

2006/106959、Numazakiら）；ヒト化LL2および同様の抗体（Immunomedics, Inc.）（例えば、米国特許第7,151,164号およびUS2005/0106108、Hansen）；キメラA20（cA20）またはヒト化A20抗体（hA20、IMMUN-106T、ベルツズマブ）などのA20抗体（Immunomedics, Inc.）（例えば、US2003/0219433、Hansenら）；CD20に対する完全ヒト抗体（Amgen/AstraZeneca）（例えば、WO2006/130458、Gazitら）；CD20に対する抗体（Avestha Gengraine Technologies Pvt Ltd.）（例えば、WO2006/126069、Morawala）；および、GA101などの、CD20に対するキメラまたはヒト化B-Ly1抗体（Roche/GlycArt Biotechnology AG）（例えば、WO2005/044859；US2005/0123546；US2004/0072290；およびUS2003/0175884、Umanaら）が挙げられる。

10

【0129】

一部の実施形態では、本明細書に記載の例示的な抗CD20GAbは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。好ましい実施形態では、抗CD20GAbは、リツキシマブの軽鎖配列および重鎖配列を含む。

以下の表2は、リツキシマブの重鎖および軽鎖配列を示す。

【表2】

20

表 2
リツキシマブ 受託番号:DB00073 ソース: http://www.drugbank.ca/drugs/DB00073
>リツキシマブ重鎖 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 2)
>リツキシマブ軽鎖 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVR FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号 1)

30

40

【0130】

一部の実施形態では、N-グリカンがFc領域のAsn-297に付着している。

【0131】

本発明によるN-グリカンは、「トリマンノースコア」または「五糖コア」とも称されるMan₃GlcNAc₂という共通の五糖コアを有し、ここで、「Man」はマンノースを指し、「Glc」はグルコースを指し、「NAc」はN-アセチルを指し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを指す。

50

【0132】

一部の実施形態では、N - グリカンには二分岐構造を有する。

【0133】

本明細書に記載のN - グリカンは、「バイセクティング」GlcNAcを含む鎖内置換を有し得る。グリカンがトリマンノースコア上にバイセクティングGlcNAcを含む場合、構造は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_3$ と表される。グリカンがトリマンノースコアに付着したコアフコースを含む場合、構造は、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{F})$ と表される。N - グリカンは、1つまたは複数の末端シアル酸（例えば、N - アセチルノイラミン酸）を含んでよい。「Sia」と表される構造は、末端シアル酸を指す。シアリル化は、二分岐構造の1 - 3アームまたは1 - 6アームのいずれかにおいて起こり得る。

10

【0134】

一部の実施形態では、本明細書に記載のN - グリカンは、2 - 6末端シアル酸を少なくとも1つ含む。ある特定の実施形態では、N - グリカンは、2 - 6末端シアル酸を1つ含む。好ましい実施形態では、N - グリカンは、2 - 6末端シアル酸を2つ含む。

【0135】

一部の実施形態では、本明細書に記載のN - グリカンは、2 - 3末端シアル酸を少なくとも1つ含む。ある特定の実施形態では、N - グリカンは、2 - 3末端シアル酸を1つ含む。好ましい実施形態では、N - グリカンは、2 - 3末端シアル酸を2つ含む。

【0136】

一部の実施形態では、本明細書に記載のN - グリカンは、ガラクトースを少なくとも1つ含む。ある特定の実施形態では、N - グリカンは、ガラクトースを1つ含む。好ましい実施形態では、N - グリカンは、ガラクトースを2つ含む。

20

【0137】

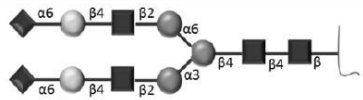
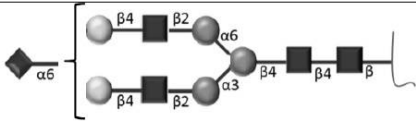
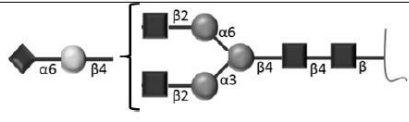

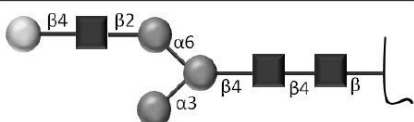
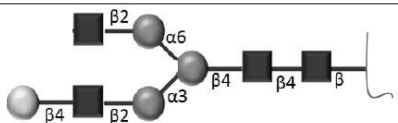

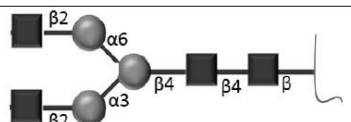
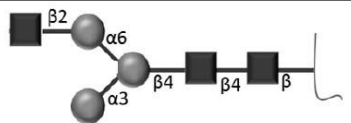
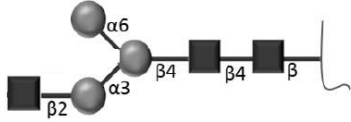
本開示によるN - グリカンは、コアフコースを含まないことが好ましい。

【0138】

表3は、抗CD20糖操作抗体群における例示的なN - グリカンの一覧である。本開示の複数の実施形態は、本明細書において列挙されているN - グリカンのいずれを含んでもよく排除してもよい。

【表 3 - 1】

表3.

GAb	グリカン構造	グリカン配列
2-101		Sia ₂ (α2-6)Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-102		Sia(α2-6)Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-103		Sia(α2-6)GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-104		Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-105		GalGlcNAcMan ₃ GlcNAc ₂
2-106		GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-107		GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-108		GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-109		GlcNAcMan ₃ GlcNAc ₂
2-110		GlcNAcMan ₃ GlcNAc ₂

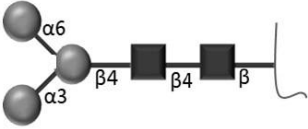
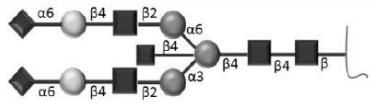
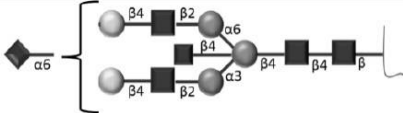
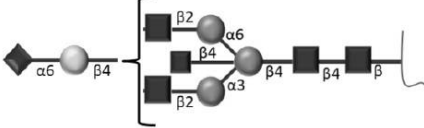
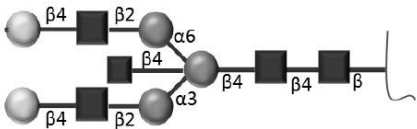
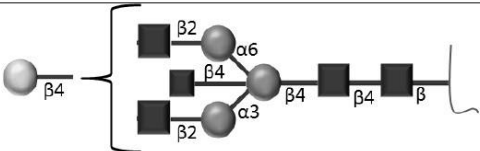
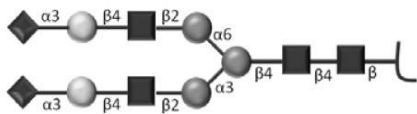
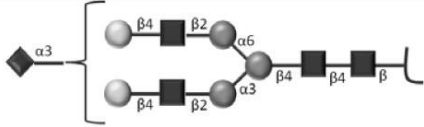
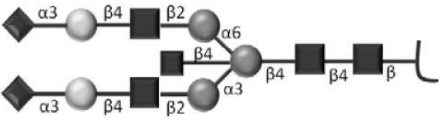
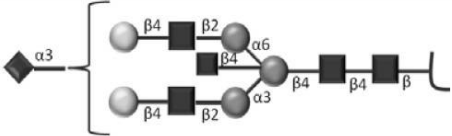
10

20

30

40

【表 3 - 2】

2-111		Man ₃ GlcNAc ₂
2-112		Sia ₂ (α2-6)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-113		Sia(α2-6)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-114		Sia(α2-6)GalGlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-115		Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-116		GalGlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-117		Sia ₂ (α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-118		Sia(α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2-119		Sia ₂ (α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂
2-120		Sia(α2-3)Gal ₂ GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂

10

20

30

40

【表 4】

表 4.

抗 CD20	リツキシマブ	GAb101	GAb104	GAb105	GAb107	GAb108	GAb111
ADCC (倍率)	1	>50	>50	30~50	>50	10~30	5~10

【0142】

本明細書に記載のいくつかの抗CD20GAb's、特にGAb101およびGAb104は、その親抗体であるリツキシマブと比較してADCC活性の増強を示す。本発明の糖操作抗体群は、B細胞媒介性悪性腫瘍およびB細胞またはB細胞によって産生される抗体が関与する免疫学的疾患に対する治療剤として優れた効果を示し得、治療剤の開発における抗CD20GAbの使用は本発明の目的であることが意図されている。

10

【0143】

抗CD20糖操作抗体群のCDC活性

驚いたことに、本明細書に記載の糖操作抗体により、CDCに影響を及ぼすことなく、ADCCの改善をもたらすことができる。例示的なCDCアッセイが実施例に記載されている。例示的な実施形態では、糖操作抗体のADCCは増大するが、補体依存性細胞傷害性(CDC)などの他の免疫グロブリン型エフェクター機能は同様のままである、または有意には影響を受けない。

20

【0144】










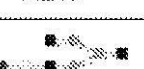
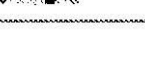
FcRIIIと抗CD20糖操作抗体群の間の結合

表5は、抗CD20GAb'sおよびリツキシマブの例示的なFcRIIIA結合の一覧である。FcRIIIA結合は、当技術分野で公知のアッセイを使用して測定することができる。例示的なアッセイが実施例に記載されている。Fc受容体結合は、抗CD20GAbとリツキシマブの相対比として決定することができる。例示的な実施形態では、Fc受容体結合は、少なくとも1.2倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍または20倍、30倍、40倍、50倍、100倍またはそれを超えて増大する。

30

【表 5】

表5

SPRによる、種々の糖操作抗体群に対するFcRⅢAの結合定数					注記
	曲線	KD (nM)	Rmax (RU)	倍率	
	Rituxan	100~300	49.29		カテゴリーA: 30倍超の増大 カテゴリーB: 15~30倍の増大 カテゴリーC: 5~10倍の増大
	GAb101	1~25	90.48	A	
	GAb104	1~25	93.4	A	
	GAb111	40~130	56.28	C	
	GAb108	40~130	67.01	C	
	GAb107	7~30	76.02	B	
	GAb109	40~130	51.03	C	
	GAb110	40~130	38.43	C	
	GAb105	1~25	72.12	A	
	GAb106	7~30	70.8	B	
	GAb102	1~25	67.52	A	

【0145】

結合データから、リツキシマブと比較して、抗CD20GAb's、特にGAb101およびGAb104が標的分子CD20に対してより強力な結合親和性を示すことが示された。

【0146】

総合すると、抗CD20GAb'sは、リツキシマブと比較して、ADCC活性の増強およびより強力なFcRⅢA結合親和性を示す。本発明の糖操作抗体群により、単独で、またはそのような抗体を2種またはそれ超含む組成物中のいずれかで、および場合によって化学療法などの他の処置と組み合わせて、優れた臨床応答をもたらすことができることが意図されている。ADCCが増強された抗CD20糖操作抗体により、B細胞リンパ腫および他の疾患に対する代替治療薬をもたらすことができることが意図されている。本発明の糖操作抗体群のエフェクター機能の増大は、より低濃度かつ低頻度で投薬することが可能になり、それにより、抗体毒性および/または抗体耐性の発生の潜在性が減少することを意味するので、有利なことに、本発明の糖操作抗体群を使用して、現在の投与経路および現在の治療レジメンを変更することができる。さらに、エフェクター機能の改善により、組換え宿主系で産生された対応する抗CD20モノクローナル抗体を用いた処置には以前に抵抗性または不応性であった臨床的適応症を処置するための新しい手法がもたらされる。

【0147】

抗CD20GAbの調製

本発明の抗CD20糖操作抗体群は、市販されているまたは前臨床または臨床開発中の抗CD20モノクローナル抗体(「親抗体」)からFc糖鎖工学によって作製することができる。モノクローナル抗体は治療用モノクローナル抗体であることが好ましい。Fc糖鎖工学は、酵素的にまたは化学酵素的に行うことができる。好ましい実施形態では、親抗体はリツキシマブである。

【0148】

本発明の糖操作抗体群におけるN-グリカンは、脱フコシル化されていることが好ましい。

【0149】

N-グリカンの脱フコシル化は、FcドメインのN-グリカン内のコアフコースを除去するプロセスである。脱フコシル化は酵素的に使用することができる。N-グリカンは2つのFcドメイン間に埋め込まれているので、酵素的脱フコシル化効率は、立体的な障害、すなわち、フコシダーゼのフコース残基への接近がFcドメインの一部によって遮断されることに起因して、はるかに低い。

【0150】

多くの - フコシダーゼが当技術分野で公知である。例としては、Turbo cornutus、Charonia lampas、Bacillus fulminans、Aspergillus niger、Clostridium perfringens、ウシ腎臓 (Glyko)、ニワトリ肝臓に由来する - フコシダーゼ (Tyagarajanら、1996年、Glycobiology 6巻: 83~93頁) およびXanthomonas manihotisに由来する - フコシダーゼII (Glyko、PROzyme) が挙げられる。同様に多種多様なフコシダーゼが市販されている (とりわけ、Glyko、Novato, Calif.; PROzyme、San Leandro, Calif.; Calbiochem-Novabiochem Corp.、San Diego, Calif.)。しかし、コアフコースをN結合グリカンから効率的に除去することが分かっている - フコシダーゼは存在しない。

【0151】

WO2013/12066では、ウシ腎臓由来の - フコシダーゼによる (Fuc 1, 6) GlcNAc - リツキシマブの脱フコシル化が開示された。WO2013/12066に記載の通り、(Fuc 1, 6) GlcNAc - リツキシマブの反応混合物をウシ腎臓由来の - フコシダーゼ (Prozymeから市販されている) と一緒に37 で20日間インキュベートして、(Fuc 1, 6) GlcNAc - リツキシマブのフコースが完全に除去された。

【0152】

免疫グロブリンの熱不安定性が報告されている (Vermeerら、Biophys J. Jan 78巻: 394~404頁 (2000年))。Fab断片は加熱処理に対する感受性が最も高く、一方、Fc断片は、pHの低下に対する感受性が最も高い。抗体の熱安定性および機能活性を検査するために、WO2013/12066に記載されているものと同じ実験を実施し、37 で3日間熱処理した後に抗体がCD20に対する結合親和性を約10%失ったことを見いだした。さらに、本発明者らは、37 で7日間熱処理した後に抗体がCD20に対する結合親和性を約20%失ったことを見いだした。WO2013/12066に記載の通り、抗体のCD20に対する結合親和性は、37 で20日間などの持続的な熱処理後に有意に失われることが意図されている。

【0153】

治療的価値が改善された糖操作抗体群を合成するための本発明者らの試みにおいて、N結合グリカンからフコース残基を効率的に除去することができるBacteroides fragilis - フコシダーゼ (GenBank受託番号YP_212855.1) が予想外に発見された。効率的な脱フコシル化は、特定の酵素を使用して成功裏に達成されている。重要なことに、本発明の糖操作抗体群の作出効率は、図1において例示されているように、容易なN-グリカンの脱フコシル化をもたらす特定の - フコシダーゼを使用することによって有益に改善されている。

【0154】

したがって、本発明は、 - フコシダーゼの組成物、および、 - フコシダーゼを使用してN-グリカンのコアフコースを除去するための、改善された方法を提供する。 - フコシダーゼは、配列番号5またはそのバリエーションの配列に対して少なくとも80%、85

10

20

30

40

50

% 90%、95%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。脱フコシル化の改善された方法は、抗体を - フコシダーゼと接触させるステップを含み、ここで、 - フコシダーゼは、配列番号5、そのバリエーションまたは断片の配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0155】

抗CD20糖操作抗体を作出するための、改善された方法であって、(a)抗CD20モノクローナル抗体を - フコシダーゼおよび少なくとも1種のエンドグリコシダーゼと接触させ、それにより、単一のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を有する脱フコシル化抗体を得るステップと、(b)適切な条件下でGlcNAcに炭水化物部分を付加するステップと、を含む方法が本明細書の記載に含まれる。

10

【0156】

一部の実施形態では、本発明の方法による抗CD20モノクローナル抗体はリツキシマブである。

【0157】

N-グリカン内のオリゴ糖の可変性部分を切り取るために、エンドグリコシダーゼを使用する。本明細書で使用されるエンドグリコシダーゼの例としては、これだけに限定されないが、EndoA、EndoF、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH、EndoM、EndoS、EndoS2およびそのバリエーションが挙げられる。

20

【0158】

本発明の方法による - フコシダーゼは、配列番号5、その機能的バリエーションの配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0159】

一部の実施形態では、 - フコシダーゼは、配列番号5、そのバリエーションまたは断片の配列に対して少なくとも90%または95%同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0160】

ある特定の実施形態では、 - フコシダーゼは、組換えBacteroides - フコシダーゼである。

【表6】

30

表 6
<p>QQKYQPTEANLKARSEFQDNKFGIFLHWGLYAMLATGEWT MTNNNLNYKEYAKLAGGFYPSKFDADKWVAAIKASGAKYICFTTRHHEGFSMFDTKYS NIVKATPFRDVKELADACAKHGKILHFFYYSHIDWYREDAPQGRGTGRRTGRPNPKGDWK SYYQFMNNQLTELLTNYGPIGAIWFDGWWDQDINPDFDWELPEQYALIHRLQPA HHQTPFAGEDIQIFERDLPGENTAGLSGQSVSHLPLETCETMNGMWGYKITDQNYKSTKT LIHYLVKAAGKDANLLMNIGPQPDGELPEVAVQRLKEVGEWMSKYGETIYGT DWGVTTQKGNKLYVHILNLQDKALFLPIVDKKVKKAVVFADKTPVRF VPTDVDYVVELTID (配列番号 5)</p>

40

【0161】

本発明の方法のステップ(a)により、単一のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を有する脱フコシル化抗体が導かれる。その後、トランスグリコシラーゼを使用した酵素媒介性グリコシル化を実施して、指定の炭水化物部分をGlcNAcに付加し、糖鎖を伸長させる。したがって、糖操作抗体群の均一な集団を作製することができる。本明細書に記載のトランスグリコシラーゼの例としては、これだけに限定されないが、EndoA、EndoF、EndoF1、EndoF2、EndoF3、EndoH、EndoM、EndoS、EndoS2およびそのバリエーションが挙げられる。

50

【0162】

一部の実施形態では、本発明の方法による炭水化物部分は、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3/2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-6/2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3/2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-6/2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ からなる群より選択される。

10

20

【0163】

好ましい実施形態では、炭水化物部分は、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3/2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-6/2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-3/2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}_2(2-6/2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Sia}(2-3)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ からなる群より選択される。

30

【0164】

本発明の方法におけるステップ(b)により、糖鎖の伸長が導かれる。糖鎖を伸長させるための1つの方法は、酵素により触媒されるグリコシル化反応を通じたものである。グリコシル化反応は付加反応であり、いかなる酸、水などの付随的な排除も伴わずに進行するので、酵素により触媒されるグリコシル化反応の中でも、糖ドナーとして糖オキサゾリンを使用するグリコシル化がオリゴ糖の合成に関して有用であることが当技術分野で周知である(Fujitara, Biochim. Biophys. Acta 2001年、1528巻、9~14頁)。

40

【0165】

一部の実施形態では、炭水化物部分は、糖オキサゾリンである。

【0166】

適切な条件は、反応混合物を少なくとも20分、30分、40分、50分、60分、70分、80分、90分または100分、好ましくは60分未満にわたってインキュベート

50

することも含む。インキュベーションは室温で行うことが好ましく、およそ20、25、30、35、40または45で行うことがより好ましく、およそ37で行うことが最も好ましい。

【0167】

本発明の - フコシダーゼのポリペプチドは、それらの単離または精製を補助するために、誘導体化または修飾することができることが理解されよう。したがって、本発明の一実施形態では、本発明において使用するためのポリペプチドを、分離手段に直接かつ特異的に結合することができるリガンドを付加することによって誘導体化または修飾する。あるいは、ポリペプチドを、結合対の一方のメンバーを付加することによって誘導体化または修飾し、分離手段に、結合対の他方のメンバーを付加することによって誘導体化または修飾される試薬を含める。任意の適切な結合対を使用することができる。本発明において使用するためのポリペプチドを、結合対の一方のメンバーを付加することによって誘導体化または修飾する好ましい実施形態では、ポリペプチドにヒスチジン - タグを付けるまたはビオチン - タグを付けることが好ましい。一般には、ヒスチジンまたはビオチンタグのアミノ酸コード配列を遺伝子レベルで含め、E. coliにおいて組換えによりタンパク質を発現させる。ヒスチジンまたはビオチンタグは、一般には、ポリペプチドの一端、N末端またはC末端のいずれかに存在する。ヒスチジンタグは、一般には6つのヒスチジン残基からなるが、これより長くてもよく、一般には、最大7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸または20アミノ酸またはそれ未満、例えば、5アミノ酸、4アミノ酸、3アミノ酸、2アミノ酸または1アミノ酸であってよい。さらに、ヒスチジンタグは、アミノ酸置換、好ましくは上で定義されている保存的置換を1つまたは複数含有してよい。

【0168】

本明細書に記載のバリエーションポリペプチドは、アミノ酸配列が配列番号5のものから変動するものであるが、配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む酵素の同じまたは同様の機能を示す。

【0169】

本明細書で使用される場合、配列に関するパーセント(%)配列同一性は、配列をアラインメントし、必要であれば、最大のパーセント配列同一性を達成するためにギャップを導入した後の、参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である候補ポリペプチド配列内のアミノ酸残基の百分率と定義される。パーセント配列同一性を決定するためのアラインメントは、当技術分野の技術の範囲内である種々のやり方で、例えば、BLAST、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含めた、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

【0170】

本発明のいくつかの好ましい実施形態が実施例において実証されている。

【0171】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は当技術分野で周知である。一般に、ヒト化抗体には、非ヒトである供給源から1つまたは複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、「移入」残基と称され、一般には、「移入」可変ドメインから取得される。ヒト化は、基本的に、Winterおよび共同研究者(Jonesら、Nature、321巻：522~525頁(1986年)；Riechmannら、Nature、332巻：323~327頁(1988年)；Verhoevenら、Science、239巻：1534~1536頁(1988年))の方法に従って、齧歯類CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに使用することによって実施することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体はキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)であり、非ヒト種に由来する対応する配列で置換されているインタクトなヒト可変ドメインが実質的により少ない。実際には、ヒト化抗体は、一般に

は、いくつかのCDR残基および場合によってはいくつかのFR残基が齧歯類抗体における類似部位由来の残基で置換されたヒト抗体である。

【0172】

ヒト化抗体の作出に使用する軽鎖および重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「最良適合」法に従って、齧歯類抗体の可変ドメインの配列を公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として許容する(Simsら、J. Immunol.、151巻:2296頁(1993年); Chothiaら、J. Mol. Biol.、196巻:901頁(1987年))。別の方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用することができる(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻:4285頁(1992年); Presta et al.、J. Immunol.、151巻:2623頁(1993年))。

10

【0173】

さらに、抗体を、抗原に対する高親和性および他の好都合な生物学的性質を保持させながらヒト化することが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の3次元モデルを使用した、親の配列および種々の概念的なヒト化産物の分析のプロセスによって調製される。3次元免疫グロブリンモデルが一般に利用可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性のある3次元コンフォメーション構造を例示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検査により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このように、FR残基をレシピエントから選択し、組み合わせ、配列に移入し得、したがって、標的抗原(複数可)に対する親和性の増大などの所望の抗体特性を達成する。一般に、CDR残基は、抗原結合への影響に直接かつほぼ実質的に関与する。

20

【0174】

あるいは、現在、免疫化すると内在性免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作製することが可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域(JH)遺伝子のホモ接合性欠失により、内在性抗体産生の完全な阻害がもたらされることが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの移行により、抗原による攻撃に際してヒト抗体の産生がもたらされる。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻:2551頁(1993年); Jakobovitsら、Nature、362巻:255~258頁(1993年); Bruggermannら、Year in Immunol.、7巻:33頁(1993年)を参照されたい。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーから導出することもできる(Hoogenboomら、J. Mol. Biol.、227巻:381頁(1991年); Marksら、J. Mol. Biol.、222巻:581~597頁(1991年))。

30

40

【0175】

抗HER2糖操作抗体群(抗HER2GAb)

HER2遺伝子は、乳がんのおよそ30%で過剰発現または増幅される。HER2が過剰発現または増幅している乳がん患者では、無病生存期間および全生存期間が短縮される。HER2タンパク質は、固有であり、HER2遺伝子が過剰発現するがんの抗体療法に対する有用な標的であると考えられている。抗HER2モノクローナル抗体である trastuzumab (Herceptin (登録商標))がこの標的に関する悪性のがんに対する療法において成功裏に使用されており、これは、HER2過剰発現乳がんの処置に関して1

50

998年にFDAによる認可を受けた。これだけに限定されないが、乳がんを含めた、HER2を発現する細胞が関与する様々な疾患の予防および/または処置においてより有効である、HER2に対する改善された治療用抗体がなお必要とされている。

【0176】

本開示は、「抗HER2糖操作抗体群」(「抗HER2GAb」)と称される新規クラスの抗HER2抗体を特徴とする。抗HER2糖操作抗体群は、抗HER2モノクローナル抗体からFc糖鎖工学によって生成することができる。均一な集団を構成する個々の抗HER2糖操作抗体群は同一であり、明確に定義されたグリカン構造および配列を有する同じFcグリカンを含有する。本発明による抗HER2GAbは、その親抗体と同じヒトHER2抗原のエピトープに特異的に結合する。

10

【0177】

「親抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、抗HER2糖操作抗体を作製するために使用される抗HER2モノクローナル抗体を指す。

【0178】

親抗体は、哺乳動物細胞培養物、*Pichia pastoris*または昆虫細胞株などの細胞培養によって得ることができる。親抗体は哺乳動物細胞培養物中で産生されることが好ましい。親抗体はFDAの認可を受けたものであってもよく、開発中のものであってもよい。FDAの認可を受けた抗HER2治療用抗体としては、トラスツズマブ(Herceptin)、ラパチニブ(Tykerb)、ペルツズマブ(Perjeta)、アド-トラスツズマブエムタンシン(Kadcyla、Genentech)が挙げられる。

20

【0179】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗HER2GAbは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。好ましい実施形態では、抗HER2GAbは、トラスツズマブの軽鎖配列および重鎖配列を含む。

以下の表7は、トラスツズマブの重鎖および軽鎖配列を示す。

【表 7】

表 7.

表 7	
トラスツズマブ	
受託番号:DB00072	
ソース: http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072	
<p>>トラスツズマブ軽鎖のアミノ酸配列</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 12)</p>	
<p>>トラスツズマブ重鎖のアミノ酸配列</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVFPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 11)</p>	

10

20

【 0 1 8 0 】

F c におけるグリコシル化は、A D C C、C D C および循環半減期を含めた種々の免疫グロブリンエフェクター媒介性機能に影響を及ぼす可能性がある。A D C C 増強は、治療用抗体の薬効を改善するための重要な戦略である。A D C C 増強には、薬物費用の低減と

という利益のために、有効薬物投与量を低減させる潜在性がある。本明細書に記載の抗 H E R 2 糖操作抗体群は、機能的性質を特徴とし得る。抗 H E R 2 G A b は、ヒト H E R 2 発現細胞に対するアポトーシスを含めた細胞増殖阻害活性を有する。一部の実施形態では、抗 H E R 2 G A b は、その親抗体と比較してより強力な細胞増殖阻害活性を示す。

30

【 0 1 8 1 】

本発明による糖操作抗体の A D C C 活性は、親抗体の A D C C 活性と比較して、少なくとも 3 倍増大した、好ましくは少なくとも 9 倍、より好ましくは少なくとも 10 倍増大した A D C C 活性、好ましくは少なくとも 12 倍増大した A D C C 活性、好ましくは少なくとも 20 倍増大した A D C C 活性、最も好ましくは少なくとも 30 倍増大した A D C C 活性である。

40

【 0 1 8 2 】

本発明の糖操作抗体の A D C C 溶解活性は、S K B R 5、S K B R 3、L o V o、M C F 7、O V C A R 3 および / または K a t o I I I などの標的がん細胞株を使用して、親抗体と比較して測定することができる。

【 0 1 8 3 】

表 8 は、トラスツズマブと比較した、抗 H E R 2 G A b s の例示的な A D C C 活性の増強の一覧である。例示的なアッセイが実施例に記載されている。

【表 8】

表 8.

抗 HER2	トラスツ ズマブ	GAb101	GAb104	GAb105	GAb107	GAb108	GAb111
ADCC (倍率)	1	>30	>30	20~30	>10	5~10	1~5

【 0 1 8 4 】

本明細書に記載のいくつかの抗HER2 GAb s、特にGAb101およびGAb104は、その親抗体であるリツキシマブと比較してADCC活性の増強を示す。本発明の糖操作抗体群は、HER2陽性疾患に対する治療剤として優れた効果を示し得、治療剤の開発における抗HER2 GAbの使用は本発明の目的であることが意図されている。

10

【 0 1 8 5 】

驚いたことに、本明細書に記載の糖操作抗体により、CDCに影響を及ぼすことなく、ADCCの改善をもたらすことができる。例示的なCDCアッセイが実施例に記載されている。例示的な実施形態では、糖操作抗体のADCCは増大するが、補体依存性細胞傷害性(CDC)などの他の免疫グロブリン型エフェクター機能は同様のままである、または有意には影響を受けない。

【 0 1 8 6 】

表9は、抗HER2 GAb sおよびハーセプチンの例示的なFc RIIIA結合の一覧である。

20

【表 9】

表 9.

試料	KD (M)	Rmax (RU)	倍率
ハーセプチン	80~200	30.01	1 倍
101	1~25	44.98	>10X
104	1~25	55.68	>10X
111	35~100	41.54	1~5X
108	25~100	53.98	1~5X
107	20~90	39.88	3~10X
109	25~80	48.19	2~10X
110	70~150	18.15	1~5X
106	25~80	52.82	1~10X
103	15~70	59.89	4~10X
117	1~50	26.95	1~5X

【 0 1 8 7 】

F c R I I I A 結合は、当技術分野で公知のアッセイを使用して測定することができる。例示的なアッセイが実施例に記載されている。F c 受容体結合は、抗 H E R 2 G A b

対 トラスツズマブの相対比として決定することができる。例示的な実施形態では、F c 受容体結合は、少なくとも 2 . 5 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、1 5 倍または 2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍またはそれを超えて増大する。

【 0 1 8 8 】

結合データから、トラスツズマブと比較して、抗 H E R 2 G A b s、特に G A b 1 0 1 および G A b 1 0 4 が標的分子 H E R 2 に対してより強力な結合親和性を示すことが示された。

【 0 1 8 9 】

総合すると、抗 H E R 2 G A b s、特に G A b 1 0 1 および G A b 1 0 4 は、トラスツズマブと比較して、A D C C 活性の増強およびより強力な F c R I I I A 結合親和性を示す。本発明の糖操作抗体群により、単独で、または、好ましくは、そのような抗体を 2 種またはそれ超含む組成物中のいずれかで、および場合によって化学療法などの他の処置と組み合わせて優れた臨床応答をもたらすことができることが意図されている。A D C C が増強された抗 H E R 2 糖操作抗体により、H E R 2 陽性疾患に対する代替治療薬をもたらすことができることが意図されている。本発明の糖操作抗体群のエフェクター機能の増

大は、より低濃度かつ低頻度で投薬することが可能になり、それにより、抗体毒性および／または抗体耐性の発生の潜在性が減少することを意味するので、有利なことに、本発明の糖操作抗体群を使用して、現在の投与経路および現在の治療レジメンを変更することができる。さらに、それらのエフェクター機能の改善により、組換え宿主系において産生された対応する抗HER2モノクローナル抗体を用いた処置には以前に抵抗性または不応性であった臨床的適応症を処置するための新しい手法がもたらされる。

【0190】

本発明の抗HER2糖操作抗体群は、市販されているまたは前臨床または臨床開発中の抗HER2モノクローナル抗体（「親抗体」）からFc糖鎖工学によって作製することができる。モノクローナル抗体は治療用モノクローナル抗体であることが好ましい。Fc糖鎖工学は、酵素的にまたは化学酵素的に実施することができる。好ましい実施形態では、親抗体はトラスツズマブである。

10

【0191】

本発明の糖操作抗体群におけるN-グリカンには、脱フコシル化されていることが好ましい。

【0192】

抗HER2糖操作抗体を作出するための方法は、抗CD20糖操作抗体を作出するための、本明細書に記載の方法と同様である。簡単に述べると、方法は、(a)抗HER2モノクローナル抗体を - フコシダーゼおよび少なくとも1種のエンドグリコシダーゼと接触させ、それにより、単一のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を有する脱フコシル化抗体を得るステップと、(b)適切な条件下でGlcNAcに所望の炭水化物部分を付加するステップとを含む。

20

【0193】

好ましい実施形態では、炭水化物部分は、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ である。

【0194】

(II)自己免疫および／または炎症に対する糖操作抗体群

本明細書に記載の糖操作抗体群は、自己免疫および／または炎症を処置するために有用であり得る。自己免疫および炎症に対する例示的なモノクローナル抗体としては、これだけに限定されないが、ナタリズマブ(Tysabri; Biogen Idec/Elan)、ベドリズマブ(MLN2; Millennium Pharmaceuticals/Takeda)、ベリムマブ(Benlysta; Human Genome Sciences/GlaxoSmithKline)、アタシセプト(TACI-Ig; Merck/Serono)、アレファセプト(Amevive; Astellas)、オテリキシズマブ(TRX4; Tolerx/GlaxoSmithKline)、テプリズマブ(MGA031; MacroGenics/Eli Lilly)、リツキシマブ(Rituxan/Mabthera; Genentech/Roche/Biogen Idec)、オフアツムマブ(Arzerra; Genmab/GlaxoSmithKline)、オクレリズマブ(2H7; Genentech/Roche/Biogen Idec)、エプラツズマブ(hLL2; Immunomedics/UCB)、アレムツズマブ(CamPATH/MabCamPATH; Genzyme/Bayer)、アバタセプト(Orencia; Bristol-Myers Squibb)、エクリズマブ(Soliris; Alexion pharmaceuticals)、オマリズマブ(Xolair; Genentech/Roche/Novartis)、カナキヌマブ(Ilaris; Novartis)、メボリズマブ(Bosatريا; GlaxoSmithKline)、レスリズマブ(SCH55700; Ception Therapeutics)、トシリズマブ(Actemra/RoActemra; Chugai/Roche)、ウステキヌマブ(Stelara; Centocor)、プリアキヌマブ(ABT-874; Abbott)、エタネルセプト(Enbrel; Amgen/Pfizer)、インフリキシマブ(Remicade; Centocor/Me

30

40

50

rack)、アダリムマブ(Humira/Trudexa; Abbott)、セルトリズマブペゴル(Cimzia; UCB)、およびゴリムマブ(Simponi; Centocor)が挙げられる。

【0195】

抗TNF 糖操作抗体群(抗TNF GAb)

単球およびマクロファージは、内毒素または他の刺激に応答して、腫瘍壊死因子-(TNF)および腫瘍壊死因子-(TNF)として公知のサイトカインを分泌する。TNFは、17kDタンパク質サブユニットの可溶性ホモ三量体である(Smithら、J. Biol. Chem. 262巻:6951~6954頁(1987年))。膜に結合した26kDの前駆形態のTNFも存在する(Krieglerら、Cell 53巻:45~53頁(1988年))。TNF-は、先天免疫の重要な調節因子である炎症反応の強力な誘導因子であり、細胞内細菌およびある特定のウイルスの感染に対するTh1免疫応答の調節において重要な役割を果たす。しかし、調節不全TNFは、多数の病理学的状況の一因となる可能性もある。これらの病理学的状況としては、関節リウマチ、クローン病、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、潰瘍性大腸炎および重症慢性尋常性乾癬を含めた免疫媒介性炎症性疾患(IMID)が挙げられる。

10

【0196】

本開示は、「抗TNF 糖操作抗体群」(「抗TNF GAbs」)と称される新規クラスの抗TNF モノクローナル抗体を特徴とする。抗TNF 糖操作抗体群は、抗TNF モノクローナル抗体(「親抗体」)からFc糖鎖工学によって生成することができる。「親抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、抗TNF 糖操作抗体群を作製するために使用される抗TNF モノクローナル抗体を指す。均一な集団を構成する個々の抗TNF 糖操作抗体群は同一であり、明確に定義されたグリカン構造および配列を有する同じFcグリカンを含む。本発明の抗TNF 糖操作抗体群は、その親抗体が結合するのと同じヒトTNF 抗原のエピトープに結合し得る。

20

【0197】

親抗体は、哺乳動物細胞、Pichia pastorisまたは昆虫細胞などの細胞において産生させることができる。親抗体は哺乳動物細胞において産生させることが好ましい。親抗体はFDAの認可を受けたものであってもよく、開発中のものであってもよい。認可を受けたまたは開発中の抗TNF モノクローナル抗体としては、インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、CDP870(セルトリズマブ)、TNF-TeAbおよびCDP571が挙げられる。

30

【0198】

本発明の抗TNF 糖操作抗体は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖を含み得る。本発明の抗TNF 糖操作抗体は、アダリムマブ(Humira(登録商標))の軽鎖配列および重鎖配列を含み得る。

以下の表10は、アダリムマブの重鎖および軽鎖配列を示す。

【表 10】

表 10.

表 10	
アダリムマブ	
受託番号:DB00051	
ソース: http://www.drugbank.ca/drugs/DB00051	
>軽鎖:	10
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 22)	
>重鎖:	20
EVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSATWNSGHIDY ADSVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号 21)	

【0199】

本発明の抗TNF 糖操作抗体は、抗TNF モノクローナル抗体（「親抗体」）からFc糖鎖工学によって作製することができる。一部の実施形態では、親抗体はアダリムマブ（Humira（登録商標））である。

【0200】

抗TNF 糖操作抗体を作出するための方法は、抗CD20糖操作抗体を作出するための、本明細書に記載の方法と同様である。簡単に述べると、方法は、（a）抗TNF モノクローナル抗体を - フコシダーゼおよび少なくとも1種のエンドグリコシダーゼと接触させ、それにより、単一のN - アセチルグルコサミン（GlcNAc）を有する脱フコシル化抗体を得るステップと、（b）適切な条件下でGlcNAcに所望の炭水化物部分を付加するステップとを含む。

【0201】

好ましい実施形態では、炭水化物部分は、 $\text{Sia}_2(2-6)\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ である。

【0202】

（III）感染症に対する糖操作抗体群

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体群は、感染症を処置するために有用である。

【0203】

感染症に対する例示的なモノクローナル抗体としては、これだけに限定されないが、MB-003（c13C6、h13F6およびc6D8）、ZMab（m1H3、m2G4およびm4G7）およびZMapp（c13C6、c2G4、c4G7）などの抗エボラ抗体、VRC01、VRC02、VRC03、VRC06、b12、HJ16、8ANC131、8ANC134、CH103、NIH45、NIH46、NIH45G54W、NIH46G54W、3BNC117、3BNC60、VRC-PG04、1NC9、12A12、12A21、VRC23、PG9、PGT145、PGDM1400、PG16、2G12、PGT121、PGT128、PGT135、4E10、10E8、Z1

3および2F5などの抗HIV抗体、ならびにC179、CR6261、F10、FI6、CR8020、CH65、C05、TCN-032、D005、CR9114およびS139/1などの抗インフルエンザ抗体が挙げられる。

【0204】

抗ウイルス糖操作抗体群

一部の実施形態では、本開示は、新規クラスの、糖鎖工学により操作されたFI6モノクローナル抗体を特徴とする。FI6モノクローナル抗体は、中和抗A型インフルエンザウイルス抗体である。中和抗体は、A型インフルエンザウイルスに対して応答する。抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列は、PCT公開WO2013011347に記載されているものと同様である。

10

【0205】

FI6糖操作抗体を作出するための方法は、抗CD20糖操作抗体を作出するための、本明細書に記載の方法と同様である。簡単に述べると、方法は(a)FI6モノクローナル抗体を - フコシダーゼおよび少なくとも1種のエンドグリコシダーゼと接触させ、それにより、単一のN - アセチルグルコサミン (GlcNAc) を有する脱フコシル化抗体を得るステップと、(b)適切な条件下でGlcNAcに所望の炭水化物部分を付加するステップとを含む。

【0206】

好ましい実施形態では、炭水化物部分は、 $\text{Si a}_2 (2 - 6) \text{Gal}_2 \text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3 \text{GlcNAc}$ である。

20

【0207】

医薬組成物

本開示による医薬組成物は、治療薬に使用することができる。例えば、医薬組成物は、FcRによって媒介されるエフェクター細胞機能(例えば、ADCC)の有効性の増強が所望される疾患、障害、または感染、例えばがん、自己免疫疾患、感染症に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるために、および効果がADCCによって媒介される治療用抗体の治療有効性の増強において使用することができる。

【0208】

抗体を本明細書に記載の通り調製した後、「凍結乾燥前製剤」を作製することができる。製剤を調製するための抗体は、基本的に純粋であることが好ましく、基本的に均一であることが望ましい(すなわち、混入タンパク質などを含まない)。「基本的に純粋な」タンパク質とは、組成物の総重量に基づいて、少なくとも約90重量%、好ましくは少なくとも約95重量%のタンパク質を含む組成物を意味する。「基本的に均一な」タンパク質とは、組成物の総重量に基づいて、少なくとも約99重量%のタンパク質を含む組成物を意味する。ある特定の実施形態では、タンパク質は抗体である。

30

【0209】

凍結乾燥前製剤中の抗体の量は、所望の用量体積、投与の様式(複数可)などを考慮に入れて決定する。選択されたタンパク質がインタクトな抗体(全長抗体)である場合、例示的な出発タンパク質濃度は、約2mg/mLから約50mg/mLまで、好ましくは約5mg/mLから約40mg/mLまで、最も好ましくは約20mg/mLから30mg/mLまでである。タンパク質は、一般に、溶液中に存在する。例えば、タンパク質は、pH緩衝溶液中に約4~8、好ましくは約5~7のpHで存在し得る。例示的な緩衝液としては、ヒスチジン、リン酸、トリス、クエン酸、コハク酸および他の有機酸が挙げられる。緩衝液の濃度は、例えば、緩衝液および製剤(例えば、再構成製剤)の所望の等張性に応じて、約1mMから約20mMまで、または約3mMから約15mMまでであり得る。以下で実証される通り、凍結保護性を有し得るという点で、ヒスチジンが好ましい緩衝液である。コハク酸が別の有用な緩衝液であることが示された。

40

【0210】

凍結保護剤を凍結乾燥前製剤に添加する。好ましい実施形態では、凍結保護剤は、スクロースまたはトレハロースなどの非還元糖である。凍結乾燥前製剤中の凍結保護剤の量は

50

、一般に、再構成した時に得られる製剤が等張性になるような量である。しかし、高張性の再構成製剤も適切であり得る。さらに、凍結保護剤の量は、凍結乾燥した時に許容されない量のタンパク質の分解／凝集が起こるほど少ないものであってはならない。凍結保護剤が糖（例えば、スクロースまたはトレハロースなど）であり、タンパク質が抗体である場合、凍結乾燥前製剤中の例示的な凍結保護剤濃度は、約 10 mM から約 400 mM まで、好ましくは約 30 mM から約 300 mM まで、最も好ましくは約 50 mM から約 100 mM までである。

【0211】

タンパク質と凍結保護剤の比は、各々のタンパク質と凍結保護剤の組み合わせに対して選択する。タンパク質濃度が高い等張性の再構成製剤を生成するためにタンパク質としての選択された抗体と、凍結保護剤としての糖（例えば、スクロースまたはトレハロース）との場合、抗体に対する凍結保護剤のモル比は、1モルの抗体に対して約100モルから約1500モルまでの凍結保護剤、好ましくは1モルの抗体に対して約200モルから約1000モルまでの凍結保護剤、例えば、1モルの抗体に対して約200モルから約600モルまでの凍結保護剤であり得る。

【0212】

本発明の好ましい実施形態では、凍結乾燥前製剤に界面活性剤を添加することが望ましいことが見いだされた。その代わりに、またはそれに加えて、凍結乾燥製剤および／または再構成製剤に界面活性剤を添加することができる。例示的な界面活性剤としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20または80）；ポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）；トリトン；ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）；ラウリル硫酸ナトリウム（sodium lauryl sulfate）；オクチルグリコシドナトリウム（sodium octyl glycoside）；ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、またはステアリルスルホベタイン；ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシンまたはステアリルサルコシン；リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、またはセチルベタイン；ラウロアミドプロピルベタイン、ココアミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルニドプロピルベタイン、またはイソステアラミドプロピルベタイン（例えばラウロアミドプロピル）；ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、またはイソステアラミドプロピルジメチルアミン；ナトリウムメチルココイルタウレート、または二ナトリウムメチルオレイルタウレート；およびMONAQUATTMシリーズ（Mona Industries, Inc.、Paterson, N. J.）、ポリエチルグリコール（polyethyl glycol）、ポリプロピルグリコール（polypropyl glycol）、およびエチレンとプロピレングリコールの共重合体（例えば、Pluronic、PF68など）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。添加する界面活性剤の量は、再構成されたタンパク質の凝集が減少し、再構成後の微粒子物の形成が最小限になるような量にする。例えば、界面活性剤は、凍結乾燥前製剤中に、約0.001～0.5%、好ましくは約0.005～0.05%の量で存在してよい。

【0213】

本発明のある特定の実施形態では、凍結乾燥前製剤の調製において、凍結保護剤（例えば、スクロースまたはトレハロースなど）と増量剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）の混合物を使用する。増量剤により、中に過剰なポケットを伴わない様な凍結乾燥ケーキなどの作製が可能になり得る。

【0214】

製剤の所望の特性に悪影響を及ぼさないのであれば、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A. 編（1980年）に記載されているものなどの、他の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤を凍結乾燥前製剤（および／または凍結乾燥製剤および／または再構成製剤）に含めることができる。許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される投与量および濃度でレシ

ピエントに対して非毒性のものであり、それらとして、追加的な緩衝剤；防腐剤；共溶媒；アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤；EDTAなどのキレート剤；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ポリエステルなどの生分解性ポリマー；ならびに／またはナトリウムなどの塩形成性対イオンが挙げられる。

【0215】

本明細書に記載の医薬組成物および製剤は、安定であることが好ましい。「安定な」製剤／組成物とは、保管に際してその中の抗体の物理的安定性および化学的安定性および完全性が基本的に保持される製剤／組成物である。タンパク質安定性を測定するための種々の分析技法が当技術分野において利用可能であり、Peptide and Protein Drug Delivery、247～301頁、Vincent Lee編、Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs (1991年)およびJones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10巻：29～90頁(1993年)に概説されている。安定性は、選択された温度で選択された期間にわたって測定することができる。

【0216】

in vivo投与に使用する製剤は、無菌であるべきである。これは、凍結乾燥および再構成の前またはその後に滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。あるいは、混合物全体の無菌性は、タンパク質以外の成分を、例えば約120で約30分にわたってオートクレーブすることによって達成することができる。

【0217】

タンパク質、凍結保護剤および他の任意選択の構成成分を混合した後、製剤を凍結乾燥する。この目的のために、Hull 50（登録商標）（Hull, USA）またはGT20（登録商標）（Leybold-Heraeus, Germany）フリーズドライヤーなどの多くの異なるフリーズドライヤーが利用可能である。フリーズドライは、製剤を凍結させ、その後、一次乾燥に適した温度で凍結した内容物から氷を昇華させることによって達成される。この条件の下で、産物の温度は製剤の共融点または崩壊温度を下回る。一般には、一次乾燥の棚温度は、一般には約50～250 mTorrにわたる適切な圧力で、約-30～25にわたる（産物が一次乾燥の間凍結したままであることを条件とする）。乾燥に必要な時間は、主に、製剤、試料を保持する容器のサイズおよび型（例えば、ガラスバイアル）ならびに液体の体積により規定され、これは、数時間から数日（例えば、40～60時間）までにわたる。二次乾燥段階は、主に、使用する容器の型およびサイズならびにタンパク質の型に応じて、約0～40で行うことができる。しかし、本明細書では、二次乾燥ステップは必要でない場合があることが見いだされた。例えば、凍結乾燥の水除去相全体を通した棚温度は、約15～30（例えば、約20）であり得る。二次乾燥に必要な時間および圧力は、例えば温度および他のパラメータに応じて、適切な凍結乾燥ケーキが生じる時間および圧力である。二次乾燥時間は、産物中の所望の残留水分レベルにより規定され、一般には、少なくとも約5時間（例えば、10～15時間）かかる。圧力は、一次乾燥ステップの間に使用する圧力と同じであってよい。フリーズドライ条件は、製剤およびバイアルサイズに応じて変動し得る。

【0218】

いくつかの場合には、移行ステップを回避するために、タンパク質の再構成を行う容器中でタンパク質製剤を凍結乾燥することが望ましい。この場合、容器は、例えば、3cc、5cc、10cc、20cc、50ccまたは100ccのバイアルであってよい。一般命題として、凍結乾燥により、水分含量が約5%未満、および好ましくは約3%未満である凍結乾燥製剤がもたらされる。

【0219】

所望の段階、一般には、タンパク質を患者に投与する時に、希釈剤を用いて凍結乾燥製剤を再構成し、したがって、再構成製剤中のタンパク質の濃度を少なくとも50 mg/mL、例えば、約50 mg/mLから約400 mg/mLまで、より好ましくは約80 mg/mLから約300 mg/mLまで、最も好ましくは約90 mg/mLから約150 mg/mL

/mLまでにすることができる。そのような再構成製剤中の高タンパク質濃度は、再構成製剤の皮下送達で意図されている場合に特に有用であると考えられる。しかし、静脈内投与などの他の投与経路に関しては、再構成製剤中のタンパク質の濃度はより低いことが所望される場合がある（例えば、再構成製剤中、約5～50mg/mL、または約10～40mg/mLのタンパク質）。ある特定の実施形態では、再構成製剤中のタンパク質の濃度は、凍結乾燥前製剤中のタンパク質の濃度よりも有意に高い。例えば、再構成製剤中のタンパク質の濃度は、凍結乾燥前製剤中のタンパク質の濃度の約2～40倍、好ましくは3～10倍、最も好ましくは3～6倍（例えば、少なくとも3倍または少なくとも4倍）であり得る。

【0220】

一般には、再構成は、完全な湿潤化（hydration）を確実にするために約25の温度で行うが、所望であれば他の温度を使用することができる。再構成に必要な時間は、例えば、希釈剤の型、賦形剤（複数可）およびタンパク質の量に依存する。例示的な希釈剤としては、滅菌水、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）、滅菌食塩溶液、リンゲル液またはデキストロス溶液が挙げられる。希釈剤は、場合によって防腐剤を含有する。例示的な防腐剤が上に記載されており、好ましい防腐剤はベンジルまたはフェノールアルコールなどの芳香族アルコールである。使用する防腐剤の量は、異なる防腐剤濃度をタンパク質との適合性について評価すること、および防腐剤有効性試験によって決定する。例えば、防腐剤が芳香族アルコール（例えば、ベンジルアルコールなど）である場合、約0.1～2.0%、好ましくは約0.5～1.5%、しかし最も好ましくは約1.0～1.2%の量で存在してよい。再構成製剤は、サイズが10μm超の粒子をバイアル当たり6000個未満有する。

【0221】

治療適用

本開示には、疾患、障害、または感染に付随する1つまたは複数の症状を防止する、処置する、または好転させるための方法であって、それを必要とする被験体に、治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が含まれる。疾患、障害、または感染としては、これだけに限定されないが、がん、自己免疫障害、炎症性障害および伝染性感染症が挙げられる。

【0222】

（I）がんの処置

本開示による医薬組成物は、がんを使用することができる。本開示には、患者においてがんを処置するための方法であって、患者に、有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が含まれる。

【0223】

がんの例としては、これだけに限定されないが、聴神経腫、腺癌、副腎がん、肛門がん、血管肉腫（angiosarcoma）（例えば、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（lymphangioma）、血管肉腫（hemangiosarcoma））、虫垂がん、良性単クローン性高ガンマグロブリン血症、胆道がん（例えば、胆管細胞癌）、膀胱がん、乳がん（breast cancer）（例えば、乳腺癌、乳房の乳頭癌、乳がん（mammary cancer）、乳腺腫瘍）、脳がん（例えば、髄膜腫；神経膠腫、例えば、星状細胞腫、乏枝神経膠腫；髄芽腫）、気管支がん、カルチノイド腫瘍、子宮頸がん（例えば、子宮頸部の腺癌）、絨毛癌、脊索腫、頭蓋咽頭腫、結腸直腸がん（例えば、結腸がん、直腸がん、結腸直腸腺癌）、上皮癌、上衣腫、内皮肉腫（endotheliosarcoma）（例えば、カボジ肉腫、多発性特発性出血性肉腫）、子宮体がん（例えば、子宮がん、子宮肉腫）、食道がん（esophageal cancer）（例えば、食道腺癌、パレット腺癌）、ユーイング肉腫、眼がん（例えば、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫）、家族性過好酸球増加症、胆嚢がん、胃がん（gastric cancer）（例えば、胃腺癌）、消化管間質腫瘍（GIST）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌、口腔がん（例えば、口腔扁平上皮癌（OSC

C)、のどのがん(例えば、喉頭がん、咽頭がん、鼻咽頭がん、中咽頭がん))、造血系のがん(例えば、急性リンパ性白血病(ALL)(例えば、B細胞ALL、T細胞ALL)、急性骨髄球性白血病(AML)(例えば、B細胞AML、T細胞AML)、慢性骨髄球性白血病(CML)(例えば、B細胞CML、T細胞CML)、および慢性リンパ性白血病(CLL)(例えば、B細胞CLL、T細胞CLL)などの白血病;ホジキンリンパ腫(HL)(例えば、B細胞HL、T細胞HL)および非ホジキンリンパ腫(NHL)(例えば、びまん性大細胞型リンパ腫(DLCL)(例えば、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)などのB細胞NHL)、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病/小リンパ球性リンパ腫(CLL/SLL)、マンツル細胞リンパ腫(MCL)、辺縁層B細胞リンパ腫(例えば、粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫、結節性辺縁層B細胞リンパ腫、脾臓辺縁層B細胞リンパ腫)、縦隔原発B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫(すなわち、「ワルデンシュトレームマクログロブリン血症」、ヘアリー細胞白血病(HCL)、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫および中枢神経系(CNS)原発リンパ腫などのリンパ腫;および前駆Tリンパ芽球性リンパ腫/白血病、末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)(例えば、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)(例えば、菌状息肉症、セザリー症候群)、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラーT細胞リンパ腫、腸疾患型T細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫)などのT細胞NHL;上記の1つまたは複数の白血病/リンパ腫の混合型;ならびに多発性骨髄腫(MM)、重鎖病(例えば、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、ミュー鎖病)、血管芽細胞腫、炎症性筋線維芽細胞腫瘍(inflammatory myofibroblastic tumor)、免疫細胞アミロイドーシス、腎がん(例えば、腎芽腫、別名ウィルムス腫瘍、腎細胞癌)、肝がん(例えば、肝細胞がん(HCC)、悪性ヘパトーマ)、肺がん(例えば、気管支原性肺癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌)、平滑筋肉腫(LMS)、肥満細胞症(例えば、全身性肥満細胞症)、骨髄異形成症候群(MDS)、中皮腫、骨髄増殖性疾患(MPD)(例えば、真性赤血球増加症(PV)、本態性血小板増加症(ET)、原因不明骨髄様化生(AMM)、別名骨髄線維症(MF)、慢性特発性骨髄線維症、慢性骨髄球性白血病(CML)、慢性好中球性白血病(CNL)、好酸球増加症候群(HES))、神経芽細胞腫、神経線維腫(例えば、神経線維腫症(NF)1型または2型、神経鞘腫症)、神経内分泌がん(例えば、胃腸膵神経内分泌腫瘍(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor)(GEP-NET)、カルチノイド腫瘍)、骨肉腫、卵巣がん(ovarian cancer)(例えば、嚢胞腺癌、卵巣胎児性癌、卵巣腺癌)、乳頭状腺癌、膵がん(pancreatic cancer)(例えば、膵腺癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、膵島細胞腫瘍)、陰茎がん(例えば、陰茎および陰嚢のパジェット病)、松果体腫、未分化神経外胚葉性腫瘍(PNT)、前立腺がん(例えば、前立腺腺癌)、直腸がん、横紋筋肉腫、唾液腺がん、皮膚がん(例えば、扁平上皮癌(SCC)、角化棘細胞腫(KA)、黒色腫、基底細胞癌(BCC))、小腸がん(例えば、虫垂がん)、軟部肉腫(例えば、悪性線維性組織球腫(MFH)、脂肪肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)、軟骨肉腫、線維肉腫、粘液肉腫)、脂腺癌、汗腺癌、滑膜腫、精巣がん(例えば、セミノーマ、精巣胎児性癌)、甲状腺がん(例えば、甲状腺の乳頭癌(papillary carcinoma of the thyroid)、甲状腺乳頭癌(papillary thyroid carcinoma)(PTC)、甲状腺髄様がん)、尿道がん、膣がんおよび外陰がん(例えば、外陰部のパジェット病)が挙げられる。

【0224】

一部の実施形態では、提供される糖操作抗体群は、肺がんの処置において有用である。一部の実施形態では、提供される化合物は小細胞肺がん(small lung cancer)の処置において有用である。一部の実施形態では、提供される化合物は、非小細胞肺がん(non-small lung cancer)の処置において有用である。一部の実施形態では、提供される化合物は、大腸がんの処置において有用である。一部の

10

20

30

40

50

実施形態では、提供される化合物は、膵がん (pancreas cancer) の処置において有用である。一部の実施形態では、提供される化合物は、胆道がん (biliary tract cancer) または子宮体がんの処置において有用である。

【0225】

抗CD20糖操作抗体群を使用した処置

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とするヒト被験体においてがんを処置するための方法であって、被験体に治療有効量の抗CD20糖操作抗体群および薬学的に許容される担体を投与するステップを含む方法の特徴とする。

【0226】

がんの例としては、これだけに限定されないが、B細胞リンパ腫、NHL、前駆Bリンパ芽球性白血病/リンパ腫および成熟B細胞新生物、B細胞性慢性リンパ性白血病 (CLL) / 小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、B細胞性前リンパ性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫 (MCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、低悪性度、中悪性度および高悪性度 (FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫 (cutaneous follicle center lymphoma)、辺縁層B細胞リンパ腫、MALT型辺縁層B細胞リンパ腫、節性辺縁層B細胞リンパ腫、脾臓型辺縁層B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髓腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) が挙げられる。

【0227】

ある特定の実施形態では、がんは、非ホジキンリンパ腫などのB細胞リンパ腫である。

【0228】

抗HER2糖操作抗体群を使用した処置

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とするヒト被験体においてがんを処置するための方法であって、被験体に治療有効量の抗HER2糖操作抗体群および薬学的に許容される担体を投与するステップを含む方法の特徴とする。

【0229】

がんの例としては、これだけに限定されないが、乳がん (breast cancer)、脳がん、肺がん、口腔がん、食道がん (esophagus cancer)、胃がん (stomach cancer)、肝がん、胆管がん、膵がん (pancreas cancer)、結腸がん、腎がん、子宮頸部がん、卵巣がん (ovary cancer) および前立腺がんが挙げられる。一部の実施形態では、がんは、脳がん、肺がん、乳がん (breast cancer)、卵巣がん (ovarian cancer)、前立腺がん、結腸がん、または膵がん (pancreas cancer) である。

【0230】

本明細書に記載のこれらの処置方法では、糖操作抗体群の医薬組成物は、単独で、または、第2の抗体、もしくは化学療法剤もしくは免疫抑制剤などの第2の治療剤と併せて投与することができる。

【0231】

ある特定の実施形態では、第2の治療剤は、抗がん剤である。抗がん剤は、生物療法抗がん剤ならびに化学療法剤を含む。例示的な生物療法抗がん剤としては、これだけに限定されないが、インターフェロン、サイトカイン (例えば、腫瘍壊死因子、インターフェロン、インターフェロン)、ワクチン、造血成長因子、モノクローナル血清療法、免疫賦活薬および/または免疫調節剤 (例えば、IL-1、2、4、6、または12)、免疫細胞増殖因子 (例えば、GM-CSF) および抗体 (例えば、HERCEPTIN (トラスツズマブ)、T-DM1、AVASTIN (ペバシズマブ)、ERBITUX (セツキシマブ)、VECTIBIX (パニツムマブ)、RITUXAN (リツキシマブ)、BEXXAR (トシツモマブ)) が挙げられる。例示的な化学療法剤としては、これだけに限定されないが、抗エストロゲン剤 (例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、およびメゲストロール)、LHRHアゴニスト (例えば、ゴセレリン (goserelin) およ

ビロイプロリド)、抗アンドロゲン薬(例えば、フルタミドおよびビカルタミド)、光ダイナミック療法(例えば、ベルテポルフィン(vertoporfin)(BPD-MA)、フタロシアニン、光増感剤Pc4、およびデメトキシ-ヒポクレリンA(2BA-2-DMHA))、ナイトロジェンマスタード(例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、トロホスファミド、クロラムブシル、エストラムスチン、およびメルファラン)、ニトロソウレア(例えば、カルムスチン(BCNU)およびロムスチン(CCNU))、アルキルスルホネート(例えば、ブスルファンおよびトレオスルファン)、トリアゼン(例えば、ダカルバジン、テモゾロミド)、白金含有化合物(例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン)、ピンカアルカロイド(例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシン、およびビノレルビン)、タキソイド(例えば、パクリタキセル、または、ナノ粒子アルブミン結合型パクリタキセル(ABRAXANE)、ドコサヘキサエン酸が結合したパクリタキセル(DHA-パクリタキセル、Taxoprexin)、ポリグルタミン酸が結合したパクリタキセル(PG-パクリタキセル、パクリタキセルポリグルメクス、CT-2103、XYOTAX)、腫瘍により活性化されるプロドラッグ(TAP)ANG1005(3分子のパクリタキセルと結合したAngiopep-2)、パクリタキセル-EC-1(erbB2認識ペプチドEC-1が結合したパクリタキセル)、およびグルコース-コンジュゲートしたパクリタキセル、例えば、2'-パクリタキセルメチル2-グルコピラノシルスクシネート;ドセタキセル、タキソールなどのパクリタキセル等価物)、エピボドフィリン(例えば、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、トポテカン、9-アミノカンプトテシン、カンプトイリノテカン、イリノテカン、クリスナトール、マイトマイシンC)、代謝拮抗薬、DHFR阻害剤(例えば、メトトレキサート、ジクロロメトトレキサート、トリメトトレキサート、エダトレキサート)、IMPデヒドロゲナーゼ阻害剤(例えば、ミコフェノール酸、チアゾプリン、リバピリン、およびEICAR)、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤(例えば、ヒドロキシウレアおよびデフェロキサミン)、ウラシル類似体(例えば、5-フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン、ドキシフルリジン、ラルチトレキセド(ratitrexed)、テガフル-ウラシル、カペシタピン)、シトシン類似体(例えば、シタラビン(arac)、シトシンアラビノシド、およびフルダラビン)、プリン類似体(例えば、メルカプトプリンおよびチオグアニン)、ビタミンD3類似体(例えば、EB1089、CB1093、およびKH1060)、イソプレニル化阻害剤(例えば、ロバスタチン)、ドーパミン作動性神経毒(例えば、1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン)、細胞周期阻害剤(例えば、スタウロスポリン)、アクチノマイシン(例えば、アクチノマイシンD、ダクチノマイシン)、ブレオマイシン(例えば、ブレオマイシンA2、ブレオマイシンB2、ペプロマイシン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン、ドキシルビシン、ペグ化リポソーム性ドキシルビシン、イダルビシン、エビルビシン、ピラルビシン、ゾルビシン、ミトキサントロン)、MDR阻害剤(例えば、ベラパミル)、Ca²⁺ATPアーゼ阻害剤(例えば、タプシガルジン)、イマチニブ、サリドマイド、レナリドマイド、チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、アキシチニブ(AG013736)、ボスチニブ(SKI-606)、セジラニブ(RECENTIN(商標)、AZD2171)、ダサチニブ(SPRYCEL(登録商標)、BMS-354825)、エルロチニブ(TARCEVA(登録商標))、ゲフィチニブ(IRESSA(登録商標))、イマチニブ(Gleevec(登録商標)、CGP57148B、STI-571)、ラパチニブ(TYKERB(登録商標)、TYVERB(登録商標))、レスタウルチニブ(CEP-701)、ネラチニブ(HKI-272)、ニロチニブ(TASIGNA(登録商標))、セマクサニブ(セマキシニブ、SU5416)、スニチニブ(SUTENT(登録商標)、SU11248)、トセラニブ(PALLADIA(登録商標))、バンデタニブ(ZACTIMA(登録商標)、ZD6474)、パタラニブ(PTK787、PTK/ZK)、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))、ベバシズマブ(AVAS-TIN(登録商標))、リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))、セツキシマブ(ERBITUX(登録商標))、パニツムマブ(VECTIBIX(登録商標))、ラニ

10

20

30

40

50

ビズマブ (Lucentis (登録商標))、ニロチニブ (TASIGNA (登録商標))、ソラフェニブ (NEXAVAR (登録商標))、エペロリムス (AFINITOR (登録商標))、アレムツズマブ (CAMPATH (登録商標))、ゲムツズマブオゾガマイシン (MYLOTARG (登録商標))、テムシロリムス (TORISEL (登録商標))、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、乳酸ドビチニブ (dovitinib lactate) (TKI258、CHIR-258)、BIBW2992 (TOVOK (商標))、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF1120 (VARGATEF (登録商標))、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、ティボザニブ (AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647、および/またはXL228)、プロテアソーム阻害剤 (例えば、ボルテゾミブ (VELCADE))、mTOR阻害剤 (例えば、ラパマイシン、テムシロリムス (CCI-779)、エペロリムス (RAD-001)、リダフォロリムス、AP23573 (Ariad)、AZD8055 (AstraZeneca)、BEZ235 (Novartis)、BGT226 (Novartis)、XL765 (Sanofi Aventis)、PF-4691502 (Pfizer)、GDC0980 (Genetech)、SF1126 (Semafoe) および OSI-027 (OSI))、オブリメルセン、ゲムシタピン、カルミノマイシン (carminomycin)、ロイコボリン、ペメトレキセド、シクロホスファミド、ダカルバジン、プロカルバジン (procabizine)、プレドニゾロン、デキサメタゾン、カンプトテシン (campathecin)、プリカマイシン、アスパラギナーゼ、アミノプテリン、メトプテリン (methopterin)、ポルフィロマイシン、メルファラン、レウロシジン (leurosidine)、レウロシン (leurosine)、クロラムブシル、トラベクテジン、プロカルバジン、ディスコデルモリド、カルミノマイシン、アミノプテリン、およびヘキサメチルメラミンが挙げられる。

【0232】

(II) 自己免疫疾患および/または炎症性疾患の処置

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体群は、自己免疫疾患および/または炎症性疾患を処置するために有用である。

【0233】

抗CD20糖操作抗体群を使用した処置

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とするヒト被験体において自己免疫疾患または炎症性疾患を処置するための方法であって、被験体に治療有効量の抗CD20糖操作抗体群および薬学的に許容される担体を投与するステップを含む方法の特徴とする。

【0234】

自己免疫疾患または炎症性疾患の例としては、これだけに限定されないが、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE)、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、IgA腎症、IgM多発ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、糖尿病、レイノー症候群 (Reynaud's syndrome)、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、C型肝炎関連クリオグロブリン血症性血管炎、慢性限局性脳炎 (chronic focal encephalitis)、水疱性類天疱瘡、血友病A、膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis)、成人皮膚筋炎および若年性皮膚筋炎、成人多発性筋炎、慢性蕁麻疹、原発性胆汁性肝硬変、視神経脊髄炎、グレーブス甲状腺異常症、水疱性類天疱瘡、膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis)、チャージ・ストラウス症候群、喘息、乾癬性関節炎、皮膚炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎 (encephalitis)、ぶどう膜炎、湿疹、アテローム性動脈硬化症、白血球接着

10

20

30

40

50

不全症、若年発症糖尿病、ライター病、ベーチェット病、溶血性貧血、アトピー性皮膚炎、ウェゲナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性伝染性単核球症、HIVおよびヘルペス関連疾患、全身性硬化症、シェーグレン症候群（Sjorgren's syndrome）および糸球体腎炎、皮膚筋炎、ANCA、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、第VII因子欠損症、血友病A、自己免疫性好中球減少症、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、固形臓器移植片拒絶反応、移植片対宿主病（GVHD）、自己免疫性肝炎、リンパ性間質性肺炎（HIV）、閉塞性細気管支炎（非移植）、ギラン・バレー症候群、大型血管炎（large vessel vasculitis）、巨細胞（高安）動脈炎、中型血管炎（medium vessel vasculitis）、川崎病、および結節性多発性動脈炎が挙げられる。ある特定の実施形態では、自己免疫疾患または炎症性疾患は関節リウマチである。

10

【0235】

抗TNF 糖操作抗体群を使用した処置

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とするヒト被験体において自己免疫疾患または炎症性疾患を処置するための方法であって、被験体に治療有効量の抗TNF 糖操作抗体群および薬学的に許容される担体を投与するステップを含む方法の特徴とする。

【0236】

（III）感染症の処置

一部の実施形態では、本明細書に記載の糖操作抗体群は、細菌またはウイルス感染によって引き起こされる感染症を処置するために有用である。

20

【0237】

感染症の例としては、これだけに限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、ヒトパピローマウイルス、またはパルボウイルス、SARSウイルス、麻疹ウイルス；流行性耳下腺炎ウイルス；風疹ウイルス；狂犬病ウイルス；パピローマウイルス；ワクシニアウイルス；水痘帯状疱疹ウイルス；痘瘡ウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；*P. falciparum*；*P. vivax*；*P. malariae*；*P. ovale*；*Corynebacterium diphtheriae*；*Clostridium tetani*；*Clostridium botulinum*；*Bordetella pertussis*；*Haemophilus influenzae*；*Neisseria meningitidis*、血清群A、B、C、W135および/またはY；*Streptococcus pneumoniae*；*Streptococcus agalactiae*；*Streptococcus pyogenes*；*Staphylococcus aureus*；*Bacillus anthracis*；*Moraxella catarrhalis*；*Chlamydia trachomatis*；*Chlamydia pneumoniae*；*Yersinia pestis*；*Francisella tularensis*；*Salmonella species*；*Vibrio cholerae*；毒性*E. coli*；ヒト内在性レトロウイルス；他の微生物病原体；他の微生物毒素、アレルゲン、腫瘍抗原、自己抗原および同種異系抗原、化学物質または毒素が挙げられる。ある特定の実施形態では、感染症は、HIV、HCV、またはこれらの組み合わせによって引き起こされる。

30

40

【0238】

FI6糖操作抗体群を使用した処置

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とするヒト被験体においてウイルス性疾患を処置するための方法であって、被験体に治療有効量のFI6糖操作抗体群および薬学的に許容される担体を投与するステップを含む方法の特徴とする。

50

【 0 2 3 9 】

ウイルス性疾患は、H I V（ヒト免疫不全ウイルス）、R S V（呼吸器合胞体ウイルス）、C M V（サイトメガロウイルス）、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（V Z V）、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス（H S V）、ヒトヘルペスウイルス6（H H V - 6）、ヒトヘルペスウイルス8（H H V - 8）、ヒトパピローマウイルス、またはパルボウイルスによって引き起こされ得る。別々の特定の実施形態では、ウイルス性疾患は、H I Vによって、またはC型肝炎ウイルスによって引き起こされる。

【 0 2 4 0 】

一部の実施形態では、本開示は、それを必要とするヒト被験体においてウイルス性疾患を処置するための方法であって、（a）被験体にN K細胞の抑制性受容体を遮断する第1の化合物を投与するステップと、（b）被験体に治療有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップとを含む方法の特徴とする。

【 0 2 4 1 】

「処置すること」または「処置」または「緩和」とは、治療的処置および予防または防止措置の両方を指し、ここで、目的は、標的とした病的状態または障害を防止するまたは減速させる（減らす）ことである。処置を必要とするものとしては、すでに障害を有するものならびに障害を有しやすいものまたは障害が防止されるべきものが挙げられる。被験体または哺乳動物は、治療量の抗体を本発明の方法に従って受けた後、患者が以下の1つまたは複数のうちの観察可能かつ/または測定可能な低下または不在を示した場合、感染に対して成功裏に「処置」されている：感染細胞の数の低下または感染細胞の不在；感染した総細胞のパーセントの低下；ならびに/または特定の感染に付随する症状のうちの1つまたは複数のいくらかの程度までの軽減；罹患率および死亡率の低下、ならびに生活の質の問題の改善。疾患における成功裏の処置および改善を評価するための上記のパラメータは医師によく知られている常套的な手順によって容易に測定可能である。

【 0 2 4 2 】

「治療有効量」という用語は、被験体または哺乳動物における疾患または障害を「処置する」ために有効な抗体または薬物の量を指す。前述の「処置すること」の定義を参照されたい。

【 0 2 4 3 】

1種または複数種の別の治療剤「と組み合わせた」投与は、同時（並行）投与および任意の順序での連続した投与を含む。

【 0 2 4 4 】

「担体」とは、本明細書で使用される場合、使用される投与量および濃度でそれに暴露される細胞または哺乳動物に対して非毒性である、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含む。多くの場合、生理的に許容される担体は、水性p H緩衝溶液である。生理的に許容される担体の例としては、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸を含めた抗酸化剤；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物；E D T Aなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；ならびに/またはT W E E N（商標）ポリエチレングリコール（P E G）、およびP L U R O N I C S（商標）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【 0 2 4 5 】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示されている技法は、本発明者により、本発明の実施においてよく機能することが発見された技法であり、したがって、それを実施するための好ましい方式を構成するとみな

10

20

30

40

50

すことができることが当業者には理解されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、開示されている特定の実施形態に多くの変更を行うことができ、それでもなお、本発明の主旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを理解するべきである。

【実施例】

【0246】

例示的な一般手順

【0247】

方法A：チオ-グリカンドナーによるグリコシル化

グリコシル化のために、モレキュラーシーブMS-4を活性化するために真空系に接続し、1時間加熱した。活性化したモレキュラーシーブを室温まで冷却した後、ドナー（1位置のグリコシル化について1.5~2.0当量）およびアクセプター（1.0当量）を含有するフラスコに添加した。混合物にジクロロメタンを添加し、次いで、溶液を室温で3時間撹拌した。-78で溶液にN-ヨードスクシンイミド（NIS、1.7~2.2当量）およびトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート（TMSOTf、0.1当量）を添加し、次いで、-20で溶液を撹拌した。反応を、裏がガラスのシリカゲルプレート（Merck DC Kieselgel 60F₂₅₄）で行った薄層クロマトグラフィー（TLC）分析によってモニターし、UV光（254nm）および酸性モリブデン酸アンモニウムセリウムによって可視化した。アクセプターが完全に消費された後、飽和NaHCO₃（aq）および20%Na₂S₂O₃を用いて反応をクエンチし、次いで、混合物を、セライトのパッドを通して濾過した。2部分のジクロロメタンを用いて水層を抽出した後、合わせた有機層をブラインで洗浄し、MgSO₄で乾燥し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出系としてトルエン/酢酸エチル）によって精製して、産物を生じさせた（収率をスキーム上に示した）。

【0248】

方法B：フッ化物-グリカンドナーによるグリコシル化

乾燥トルエン中トリフルオロメタンスルホン酸銀（5当量）、ビス（シクロペンタジエニル）ハフニウムジクロリド（3.5当量）および4の活性化したモレキュラーシーブの混合物を室温で1時間撹拌した。次いで、反応混合物を-50まで冷却し、トルエン中アクセプター（1.0当量）およびドナー（1.2~1.5当量）の溶液を添加した。混合物を-10で2~8時間撹拌した。TLCによりアクセプターの完全な消費が示された後、Et₃Nを用いて反応をクエンチし、EtOAcで希釈し、セライトを通して濾過した。濾液を水性NaHCO₃およびブライン溶液で洗浄した。有機層をNa₂SO₄で乾燥し、減圧下で濃縮した。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出系としてトルエン/酢酸エチル）によって精製して産物を生じさせた（収率をスキーム上に示した）。

【0249】

方法C：O-アセチルの脱保護

NaOMe（0.25当量）をTHF/メタノール（2/3）中出発材料（1.0当量）の溶液に添加した。反応を室温で撹拌し、TLC分析によってモニターした。アセチル基を完全に脱保護した後、溶液をIR-120によって中和し、濾過し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出系としてヘキサン/酢酸エチル）によって精製して産物を生じさせた（収率をスキーム上に示した）。

【0250】

方法D：O-Trocの脱保護

Zn粉末（20当量）および酢酸（0.2当量）をTHF中出発材料（1.0当量）の溶液に添加した。反応を室温で撹拌し、薄層クロマトグラフィー（TLC）分析によってモニターした。Troc基を完全に脱保護した後、溶液を濾過し、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出系としてヘキサン/酢酸エチル）によって精製して産物を生じさせた（収率をスキーム上に示した）。

【0251】

方法E：ベンジリデンの脱保護

p - トルエンスルホン酸 (p T S A、1 . 5 当量) を A C N / M e O H (2 / 1) 中出発材料 (1 . 0 当量) の溶液に添加した。反応を室温で攪拌し、薄層クロマトグラフィー (T L C) 分析によってモニターした。ベンジリデン基を完全に除去した後、トリメチルアミンによって反応をクエンチし、次いで、濃縮した。粗製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出系としてヘキサン / 酢酸エチル) によって精製して産物を生じさせた (収率をスキーム上に示した) 。

【0252】

方法F：全体的な脱保護

保護されたオリゴ糖 (5 0 m m o l) とエチレンジアミン : n B u O H (1 / 4) 1 0 m L の混合物を 9 0 で一晩攪拌した。揮発性物質を蒸発させ、粗製物を A c ₂ O / ピリジン (1 / 2) 1 0 m L と一晩反応させた。高真空を使用して溶媒を除去し、産物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶出系としてアセトン / トルエン) によって精製した。産物を、M e O H (1 0 m L) 中ナトリウムメトキシドを使用して一晩にわたって脱アセチル化した。I R - 1 2 0 を使用することによって反応を中和し、次いで、濾過し、真空中で濃縮した。残留物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶出系としてアセトン / トルエン) によって精製した。産物を M e O H : H ₂ O : H C O O H (6 / 3 / 1) 1 0 m L に溶解させ、P d (O H) ₂ (5 0 重量 %) を添加し、反応物を一晩にわたって水素化した。反応混合物を、セライトを通して濾過し、減圧下で濃縮した。残留物を、溶離液として水を使用して G - 1 5 ゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。産物を凍結乾燥して白色粉末を生じさせた (収率をスキーム上に示した) 。

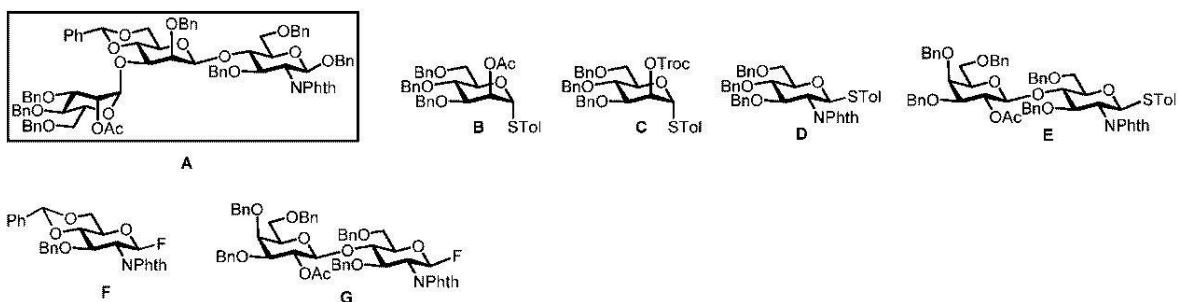
【0253】

方法G：酵素的 (2 , 6) - シアリル化

出発材料 (5 μ m o l) 、 C T P (1 μ m o l) 、 N e u 5 A c (9 . 5 μ m o l) 、 P E P (1 0 μ m o l) 、 - 2 , 6 シアリルトランスフェラーゼ (2 0 0 μ L 、 推定濃度 2 m g / L) 、 C M K (8 0 単位) 、 P K (4 0 単位) 、 および P P A (4 0 単位) を、1 % B S A (1 3 0 μ L) を含有する 5 0 μ m o l のカコジル酸ナトリウム (p H 7 . 4) に溶解させた。反応物を 3 7 で穏やかに攪拌しながら 2 日間インキュベートした。G - 1 5 ゲルクロマトグラフィー (溶離液 H ₂ O) を使用することによって産物を精製して、凍結乾燥後に所望の産物を白色固体としてもたらした。

【化1】

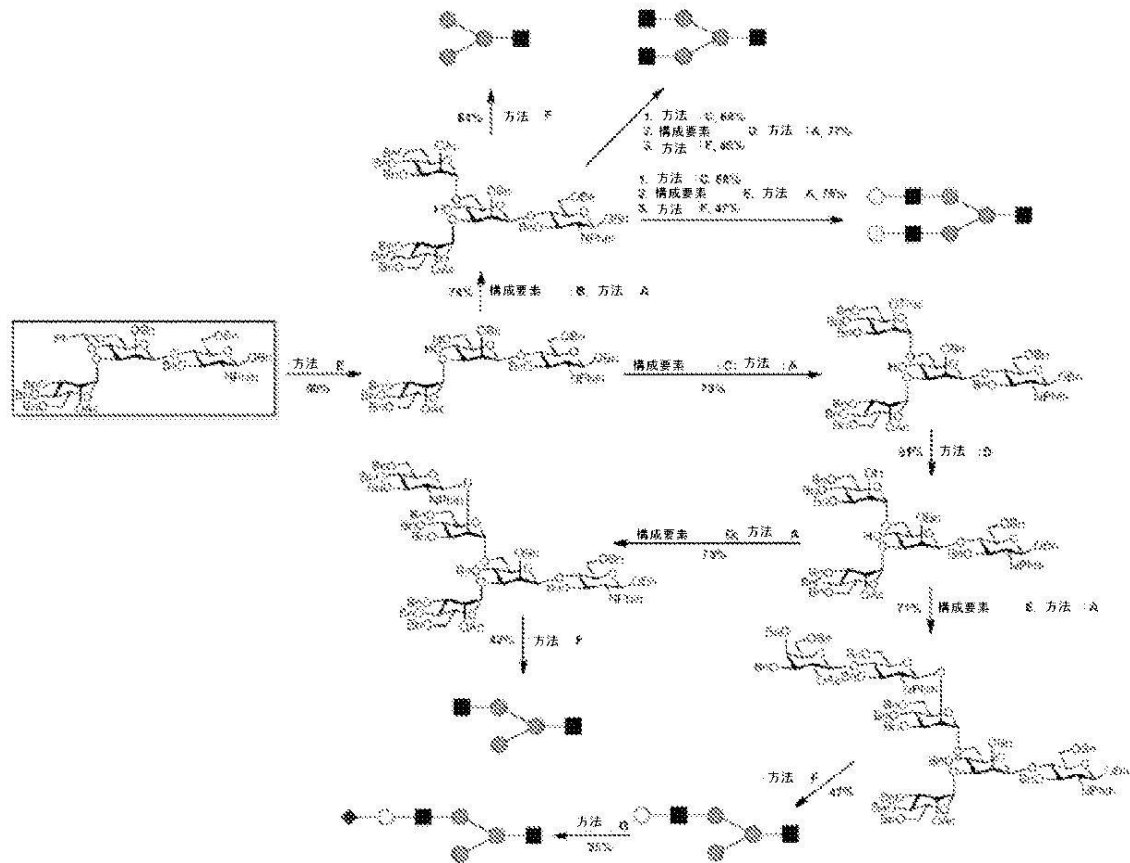
構成要素 :



【化 2】

非対称N-グリカンを合成するための実験手順

スキーム1



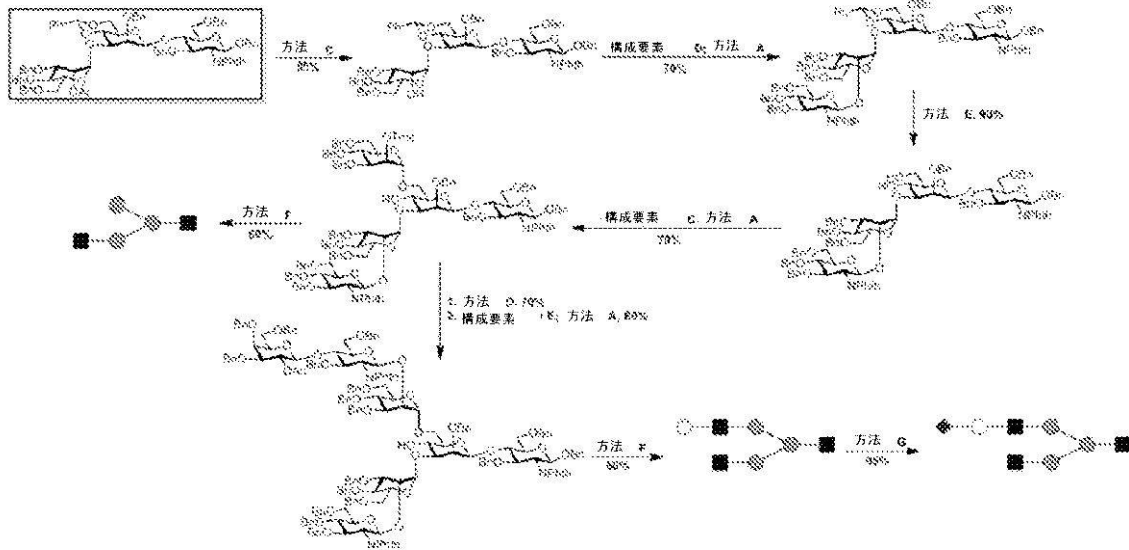
10

20

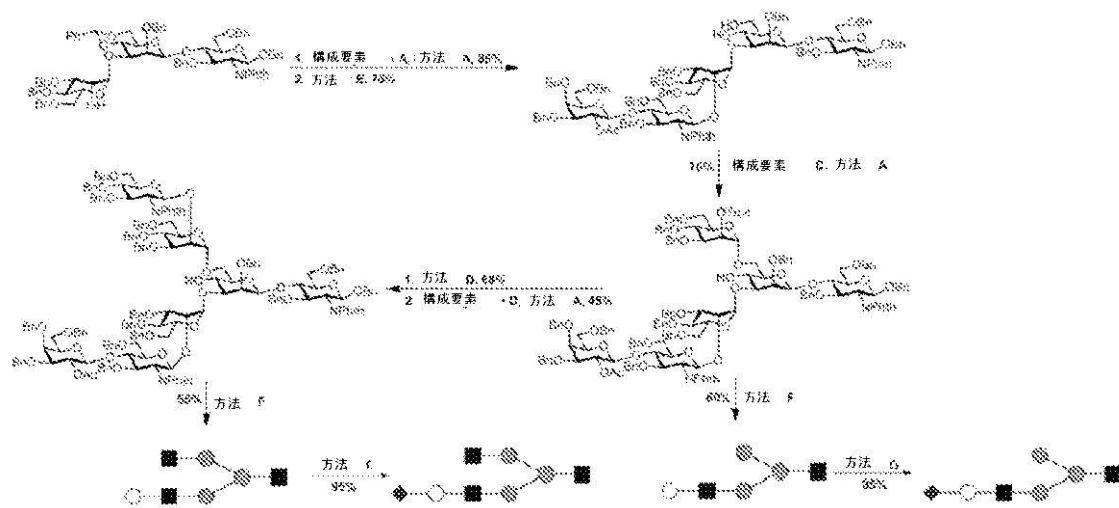
【化 3】

非対称N-グリカンを合成するための実験手順

スキーム2



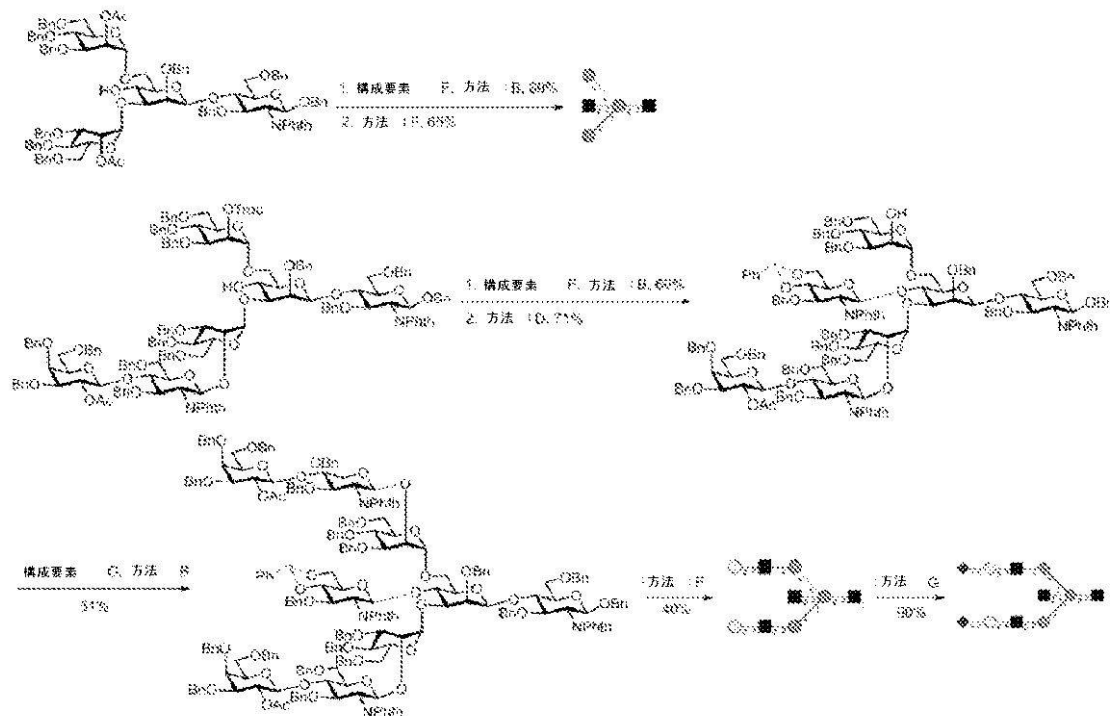
スキーム3



【化 4】

バイセクティング-GlcNAc N-グリカンを合成するための実験手順

スキーム4



10

20

【 0 2 5 4 】

(実施例 1)

I g G 1 抗体の糖鎖工学

この試験の目的は、抗がん機能および抗炎症機能の両方に関して活性が最適化された均一な抗体を調製することである。したがって、市販のリツキシマブ I g G 1 は、がんおよび自己免疫疾患の両方の処置に使用されているので、これをモデルとして選択する。糖タンパク質リモデリングの戦略を使用してまず F c 領域にモノ - G l c N A c を有する均一な抗体を得、次いで、純粋な合成グリカンモノ - G l c N A c 抗体と連結して活性アッセイのための均一な抗体を得た (図 1 a)。1 日以内にワンポットで均一なモノ - G l c N A c グリコシル化抗体を調製するために、E . c o l i 由来のフコシダーゼ B f F u c H を、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e 由来の E n d o S 単独または E n d o F 1 / F 3 または E n d o F 1 / S の混合物のいずれかのエンドグリコシダーゼと組み合わせて使用した。このフコシダーゼは、20 日のインキュベーションが必要なウシ腎臓に由来するフコシダーゼ (2 3) よりも効率的であった。3 7 で 1 週間のインキュベーションにより、リツキシマブ構造の劣化が引き起こされ、その抗原に対する結合親和性が約 1 5 % 失われることが見いだされている (補足情報)。次いで、E n d o S 変異体 (2 3) を使用することにより、一連の合成グリカンオキサゾリンモノ - G l c N A c リツキシマブに成功裏に移行させて、その後の結合アッセイおよび機能アッセイのための、F c 領域に異なるグリカンを持つ均一なリツキシマブを形成した。

30

40

【 0 2 5 5 】

(実施例 2)

2 , 3 - シアリル化リツキシマブと 2 , 6 - シアリル化リツキシマブの間の特性

R a v e t c h のグループにより、2 , 6 - シアリル化 I V I G が、2 , 3 - シアリル化 I V I G と比較して、抗炎症活性を担う主要な構造であったことが報告されたが、種々の F c R との詳細な相互作用は試験されていない (1 1)。さらに、R a j u の試験から、抗体における高レベルのシアリル化により、A D C C が劣化することが示されたが (

50

12)、2,6-シアリル化抗体および2,3-シアリル化抗体の両方が細胞傷害性に対して同様の効果を有するかどうかは明らかにならなかった。これらのシアリル化結合の差異を試験するために、本発明者らは、モノ-GlcNAcリッキシマブから2,6-シアリル化抗体および2,3-シアリル化抗体を調製した(2,6-NSCT-リッキシマブおよび2,3-NSCT-リッキシマブと名付けた)。非修飾リッキシマブと比較して、モノ-GlcNAcリッキシマブでは、FcRIIbに対する結合親和性以外は、FcRIIIa、FcRIIIa、FcRIおよびC1qに対する結合親和性の完全な喪失または実質的な低下が示された。しかし、グリカン伸長させて2,6-NSCT-リッキシマブの構造を形成した後は、FcRIIIa、FcRIIIb、および特にFcRIIIaに対するその結合親和性が増大したが、C1qに対しては有意な変化は観察されなかった(表11A)。それとは異なり、2,3-NSCT-リッキシマブについては、FcRIIIaとの相互作用のみが部分的に増大したが、FcRIIIbおよびFcRIIIaに対するその認識は変化しなかったか、さらには低下した(表11A)。C1qのリッキシマブおよび2,6-NSCT-リッキシマブに対する同等の結合親和性に対応して、FACSの結果から、どちらの抗体もCDCに関して並行した傾向を示すことが示された(表11B)。しかし、最大半量の有効濃度(EC50)の値がより高いことにより示される通り、2,3-NSCT-リッキシマブの細胞傷害性は2,6-NSCT-リッキシマブの細胞傷害性よりも低かった(表11B)。

【0256】

抗体に関連する細胞傷害性の考察においては、CDCに加えてADCCも重要な問題である。IgG1の脱フコシル化により、無フコシル化Fc-グリカンとFcRIIIaとの間の相互作用が増大することによってADCC効果が有効に生じることが報告された(5,33)。本発明者らは、3つの異なるCFSE標識Bリンパ腫細胞、ラジ、ラモスおよびSKW6.4を使用したフローサイトメトリーにおいて、無処理のリッキシマブ、および処理したmAbである2,3-NSCT-および2,6-NSCT-リッキシマブによって誘導された、PBMCM媒介性ADCCアッセイにおけるPI染色死細胞をモニターした。実際に、市販のリッキシマブと比較して、2,6-NSCT-リッキシマブおよび2,3-NSCT-リッキシマブのどちらでも、FcRIIIaとのより強力な相互作用およびADCCにおけるより小さなEC50が示された(表11Aおよび11C)。興味深いことに、2,6-シアリル結合により、FcRIIIaおよびADCCに対する優れた親和性および効果が示され、一方2,3-結合は、より弱い活性を有した。同じ抗体のADCC結果は、ラジ、ラモスおよびSKW6.4を含めた異なる標的細胞の間で同等である(表11C)。

【0257】

(実施例3)

種々の無フコシル化リッキシマブの結合親和性およびB細胞枯渇活性

細胞傷害性が2,6-シアリル化の影響を受けたかどうかを試験するために、本発明者らは、バイセクト型修飾、3'アームにおけるモノ-シアリル化、トリマンノースコア、末端GlcNAc終端(end ing)、ガラクトース尾部のグリカンおよび他の非対称グリカンを含むものを含めた、他の均一な無フコシル化リッキシマブを調製した。表面プラズマ共鳴分析では、修飾された無フコシル化リッキシマブのいずれも、FcRIIIaに対して2,6-NSCT-リッキシマブよりも強力な結合親和性を示さなかったが、異なるグリコフォームの間でいくらかのKd変動が観察された(表12)。次いで、本発明者らは、フローサイトメトリーでCD19⁺CD3⁺B細胞を分析することにより、ヒトB細胞のPBMCM媒介性枯渇における工学的に操作した抗体の細胞傷害性誘導試験を実施した。SPRデータに対応して、2,6-NSCT-リッキシマブのB細胞枯渇の有効性は、抗体濃度が10ng/mLまたはそれ超である場合に極めて優れていた(図2A)。さらに、2,6-NSCT-リッキシマブの活性はまた、非修飾リッキシマブよりも有意に高く、10ドナーの全血B細胞枯渇試験におけるp値は0.0016であり、一方、モノ-GlcNAcリッキシマブにより最低の活性が示された(図2B)。これらの

データにより、免疫グロブリン G 1 における 2 , 3 - シアリル化および 2 , 6 - シアリル化は、免疫グロブリン G 1 の機能に対して異なる活性を有し、B 細胞枯渇のためにはリツキシマブに対する 2 , 6 - N S C T が有益であることが示された。そのような結果は、以前の試験では、試料の多くが C H O 細胞に由来するものであり、この細胞は、2 , 3 - シアリル化を含有するが 2 , 6 結合が欠乏した種々のグリカンを含むタンパク質を発現するので、ほとんど検証されていない (3 4) 。

【 0 2 5 8 】

(実施例 4)

抵抗性細胞株に対する 2 , 6 - N S C T リツキシマブの A D C C 有効性

多くの医薬品と同じく、リツキシマブには、高投与量および長期間の薬物適用に起因して抵抗性が生じている (3 5 、 3 6) 。 2 , 6 - N S C T - リツキシマブが薬物抵抗性細胞に対して有効であるかどうかを理解するために、本発明者らは、ラモスおよびラジのリツキシマブ抵抗性細胞株を調製して、異なる濃度の 2 , 6 - N S C T 修飾リツキシマブの下でのそれらの P B M C 媒介性 A D C C を評価した (図 2 C ~ E) 。長期間にわたってリツキシマブと共培養した後、ラモス B 細胞およびラジ B 細胞の両方が表面上での C D 2 0 発現が少ないものに進化した (図 2 C) 。結果として、非修飾リツキシマブの抵抗性株に対する活性が劇的に失われたことは驚くことではない (図 2 D および 2 E) 。しかし、2 , 6 - N S C T リツキシマブによって示された A D C C 活性は非抵抗性細胞と抵抗性細胞のどちらに対しても非常に優れたものであった。

【 0 2 5 9 】

(実施例 5)

種々の無フコシル化ハーセプチンの F c R I I I a 結合親和性

2 , 6 - N S C T グリカン修飾により引き出される印象的な細胞傷害性を他の抗体に適用することができるかどうかをさらに評価するために、別の抗体、ハーセプチンを異なるグリカン構造を用いて修飾し、評価した。

【 0 2 6 0 】

糖鎖工学により操作されたハーセプチンと F c R I I I a の動力的結合分析が表 4 に列挙されている。E L I S A 分析における 2 , 3 - N S C T - リツキシマブと 2 , 6 - N S C T - リツキシマブの親和性の差異と同様に、2 , 6 - N S C T - ハーセプチンでは F c R I I I a とのより強力な相互作用が示されたが、2 , 3 - N S C T - ハーセプチンでは有害な影響が観察された。その一方で、F c 無フコシル化の効果は、2 , 6 - 結合または 2 , 3 - 結合のいずれを用いたシアリル化の効果よりも有意であった。さらに、全ての糖鎖工学により操作されたハーセプチンの対応する K d については、リツキシマブの場合と同様の傾向が示された (表 1 3) 。G 1 、G 2 、および 2 , 6 - N S C T などの抗体の F c R I I I a に対する親和性は、他の同様の G 3 、G 4 、G 5 、G 6 、G 7 、G 9 および 2 , 3 - N S C T と比較して 9 倍超増大した。特別に、リツキシマブおよびハーセプチンのどちらの場合でも、無フコシル化された、糖鎖工学により操作された G 8 では、A D C C 活性に対する脱フコシル化による利点がほとんど失われた。バイセクト型グリカンを含む抗体である G 9 では、リツキシマブおよびハーセプチンのどちらにおいても、非バイセクト型類似体である G 4 と比較した場合に、F c R I I I a に対する親和性のわずかながら有意でない増大が示された。全体として、2 , 6 - N S C T - ハーセプチンはまた、実際に、S P R 分析において、これらの無フコシル化類似体の中でも非常に優れた F c R I I I a 結合親和性を示した。

【 0 2 6 1 】

ハーセプチンの F c R I I I a 媒介性 A D C C に対する F c グリコシル化の効果をさらに理解するために、本発明者らは、V 1 5 8 F c R I I I a を工学的に作製したジャーカットエフェクター細胞の活性化 T 細胞のシグナル伝達核因子 (N F A T) 経路を利用し、S K B R 3 を標的細胞とし、E / T 比を 6 とした A D C C レポーターバイオアッセイを行った。動力的データと一致して、無フコシル化 G 8 ハーセプチンの E C 5 0 により、F c R I I I a 活性の喪失が示され、フコシル化ハーセプチンと同様の A D C C 効

果が示された(図3A)。興味深いことに、以前の試験から、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIIのレベルの上昇によって抗体上のバイセクト型グリカンがより多くなることが、より強力なADCCと相関することが示された(37)。それどころか、本発明者らの試験から、ハーセプチンおよびリツキシマブのバイセクト型抗体および非バイセクト型抗体であるG9とG4の間で有意なKdの差異は観察されなかったことが示され、ハーセプチングリコフォームのEC50値により、FcRIIIa細胞媒介性アッセイにおいて同様の細胞傷害性プロファイルが示された(図3B)。したがって、本発明者らは、バイセクト型IgG1が、FcRIIIaが優位なADCCではより良好には働かないと結論づけた。

【0262】

さらに、非シアリル化G1-ハーセプチンと比較して、2,3-シアリル化ハーセプチンのADCCは明らかに低下したが、2,6-NSCTハーセプチンの活性はなお維持され(図3C)、これにより、シアリル化媒介性ADCCの低下が、2,3-結合によって引き起こされることが示される。抗体薬物適用における2,6-NSCTの潜在的な有用性を探究するために、本発明者らは、各プレートにおいてEC50が最低である、糖鎖工学により操作された無フコシル化ハーセプチン試料をさらなる活性試験のために選択し(図3D)、全ての試料が良好な細胞傷害性を示し、低濃度でがん細胞の半分を死滅させることができることが見いだされた。

【0263】

(実施例6)

抗ウイルス抗体における2,6-NSCTグリカン修飾のADCC効果

Fc修飾における2,6-NSCTグリカンの利用を探究するために、本発明者らは、抗体の均一の2,6-NSCTグリカン修飾により、ウイルス感染細胞を除去するために抗ウイルス抗体のADCC効果を増大させることができるかどうかを評価した。本発明者らは、インフルエンザの種々の亜型の赤血球凝集素(HA)のSTEM領域に結合することが公知であり、その中和活性がADCCに関連づけられている(38)広範囲に中和する抗インフルエンザ抗体、FI6を調製した。FI6抗体のFcグリカンを修飾して均一な2,6-NSCTグリカンにし、細胞表面上にHAを発現させてインフルエンザ感染細胞を模倣したヒトHEK293T細胞と混合し、次いで、ADCC効果を標的細胞におけるPBMCM媒介性死滅およびエフェクター細胞の活性化T細胞のADCCシグナル伝達核因子(NFAT)経路の活性化の両方によって測定した。細胞傷害性の結果から、実際に、均一な2,6-NSCTグリカン修飾FI6(FI6m)により示されるADCC活性が通常为非修飾FI6抗体よりも有意に高い(2~3倍の増大)ことが示された(図4A)。さらに、エフェクターNK細胞のADCCシグナル伝達NFAT経路の活性化も、均一なFI6mを使用した場合、2倍の増強が観察された(図4B)。本発明者らの観察により、抗ウイルス抗体の均一な2,6-NSCTグリカン修飾が、ウイルス感染細胞に対するADCCのエフェクター機能を増強するための一般戦略になり得ることが示された。

【0264】

次に、本発明者らは、FI6の均一な2,6-NSCT修飾による*in vitro*におけるADCC増強を、致死用量のインフルエンザH1N1を感染させたマウスモデルにおける保護に転換することができるかどうかを試験した。FI6モノクロナルの受動移行により、H1N1感染から保護されることが以前に示されている(39)。実際に、均一な2,6-NSCTグリカン修飾を有すると、マウスをA/California/07/2009 H1N1ウイルスで攻撃した際にFI6mによりなされる保護は有意により良好なものになる(図4C)。生存率は、FI6mでは66%であったのに対して複合型グリカンの混合物を有する通常のFI6では11%であった。結論として、本発明者らにより、インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおいて、抗体の均一な2,6-NSCTグリカン修飾による*in vitro*におけるADCC増強は、*in vivo*におけるウイルス感染からの保護と一致することが実証された。

【0265】

表 1 1 . 市販のリツキシマブおよび糖鎖工学により操作された 2 , 3 - N S C T - リツキシマブおよび 2 , 6 - N S C T - リツキシマブの F c R 結合特性および機能アッセイ。

【 0 2 6 6 】

(A) モノ - G l c N A c リツキシマブ、 2 , 3 - N S C T - リツキシマブおよび 2 , 6 - N S C T - リツキシマブの F c R および C 1 q に対する結合実験を E L I S A で実施した。脱グリコシルにより、モノ - G l c N A c リツキシマブの F c R I I I a、F c R I I a、F c R I および C 1 q に対する結合親和性が失われたが、 2 , 3 - シアリル化抗体および 2 , 6 - シアリル化抗体ではそれらの親和性が回復し、 2 , 6 - シアリル化リツキシマブでは、F c R I I I a、F c R I I I b および F c R I I I a との相互作用の増強が示された。(B) F A C S で実施した C D C アッセイ。 2 , 6 - N S C T - リツキシマブにより、無処理の抗体と同様の C D C 活性が示されたが、 2 , 3 - N S C T - リツキシマブの結果からは、C D C 有効性の低下が示され、E C 5 0 値はより高かった。(C) 新鮮な P B M C 媒介性 A D C C アッセイ。 3 つの異なる B 細胞、ラジ、ラモスおよび S K W 6 . 4 を用いてアッセイ実験を行った。結果から、E C 5 0 値により測定された活性が、非修飾リツキシマブから糖鎖工学により操作された無フコシル化 2 , 3 - N S C T - リツキシマブまで有意に増大し、 2 , 6 - N S C T - リツキシマブの活性が最も高いことが示された。

10

【 0 2 6 7 】

表 1 2 . 表面プラズマ共鳴分析により測定された、糖鎖工学により操作されたリツキシマブ I g G 1 の F c R I I I a に対する結合親和性。

20

【 0 2 6 8 】

分析した抗体をヒト F a b 捕捉キットによって捕捉し、単一サイクルの動力学的方法を用いて検出した。

【 0 2 6 9 】

表 1 3 . 表面プラズマ共鳴分析を使用した、糖鎖工学により操作されたハーセプチン I g G 1 の F c R I I I a に対する結合親和性。

【 0 2 7 0 】

分析した抗体をやぎ抗ヒト F (a b ') ₂ の F (a b ') ₂ 断片によって捕捉し、二重照合 (d o u b l e r e f e r e n c i n g) を用いて単一サイクルの動力学的方法によって検出した。示されているデータは、 2 つの反復の代表である。

30

【表 1 1】

表11

(A)

EC50 (nM)	Roche-リツキシマブ	2,6-NSCT-リツキシマブ	2,3-NSCT-リツキシマブ	N-リツキシマブ
FcγRIIIa	6.2~9.0	0.24~0.27 (30x)	1.2	36.3
FcγRIIa	5.4	3.0 (2.1x)	16.5	>110
FcγRI	0.19	0.23		0.85
FcγRIIb	0.51	0.28 (1.8x)	0.53	0.32
C1q	6.5	8.0		>>50

10

(B)

EC ₅₀ (ug/ml)	ラモス
リツキシマブ (Roche)	0.033
2,3-NSCT-リツキシマブ	0.086 (0.45X)
2,6-NSCT-リツキシマブ	0.039

(C)

EC ₅₀ (ug/ml)	ラジ	ラモス	SKW6.4
リツキシマブ (Roche)	0.319	4.379	2.074
2,3-NSCT-リツキシマブ	0.086(3.7X)	1.45(3.02X)	1.218(1.7X)
2,6-NSCT-リツキシマブ	0.022(14.5X)	0.377(11.6X)	0.276(7.5X)

20

【表 1 2】

表12

試料	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	倍率
リツキシマブ	2.07E+05	0.03344	1.62E-07	49.29	1- 倍
2,6-NSCT	6.86E+05	0.005681	8.28E-09	90.48	19.6- 倍
G1	6.55E+05	0.006116	9.33E-09	93.4	17.4- 倍
G7	2.22E+05	0.01391	6.27E-08	56.28	2.6- 倍
G4	3.56E+05	0.01338	3.75E-08	67.01	4.3- 倍
G9	2.67E+05	0.006993	2.62E-08	76.02	6.2- 倍
G3	2.39E+05	0.01996	8.36E-08	51.03	1.9- 倍
G8	4.44E+05	0.05322	1.20E-07	38.43	1.4- 倍
G2	3.25E+05	0.004263	1.31E-08	72.12	12.4- 倍
G6	3.67E+05	0.01	2.72E-08	70.8	6.0- 倍
G5	3.33E+05	0.006284	1.89E-08	67.52	8.6- 倍

30

40

* 倍率数は市販のリツキシマブのK_D値を糖鎖工学により操作されたリツキシマブのK_D値で割ることによって算出した

50

【表 1 3】

表13

試料	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	倍率
ハーセプチン	1.45E+05	0.0131	9.09E-08	30.01	1-倍
2,6-NSCT	2.14E+05	0.00209	9.76E-09	44.98	9.3-倍
G1	2.04E+05	0.00192	9.37E-09	55.68	9.7-倍
G7	1.68E+05	0.0071	4.22E-08	41.54	2.2-倍
G4	1.59E+05	0.00447	2.81E-08	53.98	3.2-倍
G9	1.74E+05	0.00406	2.33E-08	39.88	3.9-倍
G3	1.61E+05	0.00498	3.08E-08	48.19	3.0-倍
G8	2.03E+05	0.0156	7.68E-08	18.15	1.2-倍
G2	2.15E+05	0.00207	9.61E-09	70.48	9.5-倍
G6	1.23E+05	0.00465	2.72E-08	52.82	2.4-倍
G5	1.67E+05	0.00318	1.89E-08	59.89	4.8-倍
2,3-NSCT	1.83E+05	0.00473	2.58E-09	26.95	3.5-倍

*倍率数は、市販のハーセプチンのK_D値を糖鎖工学により操作されたハーセプチンのK_D値で割ることで算出した

10

20

30

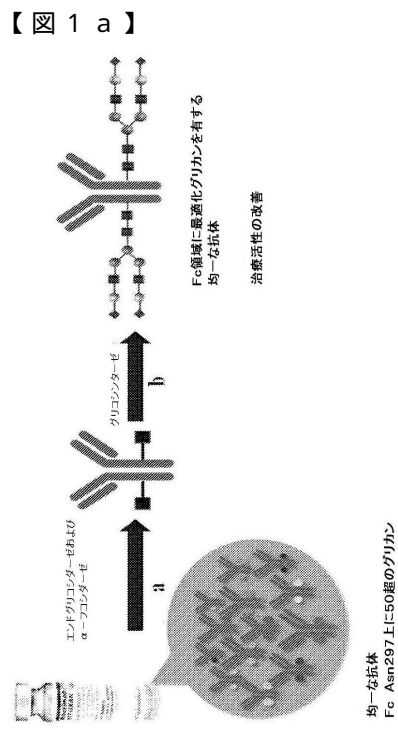


Fig. 1a

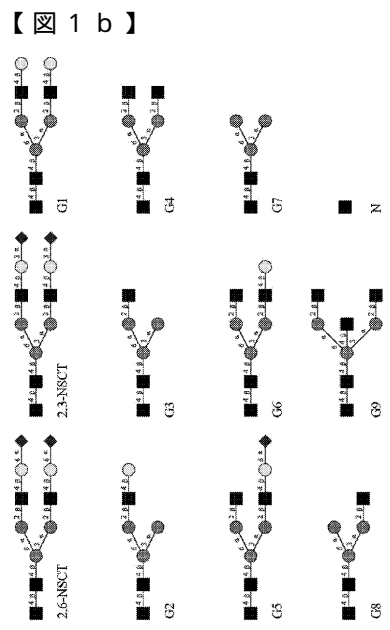


Fig. 1b

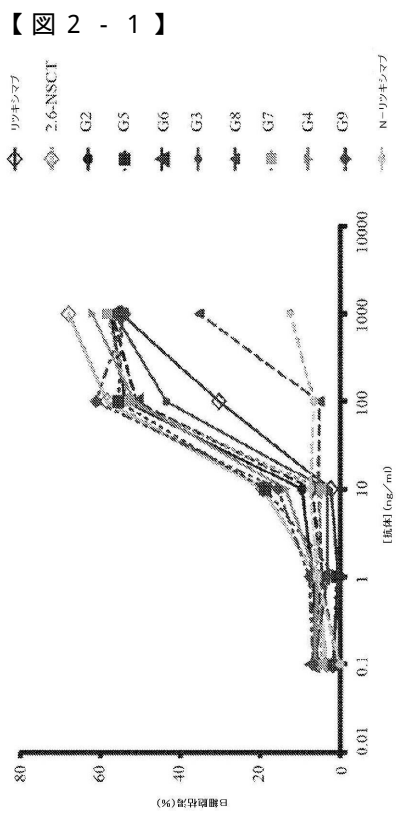


Fig. 2A

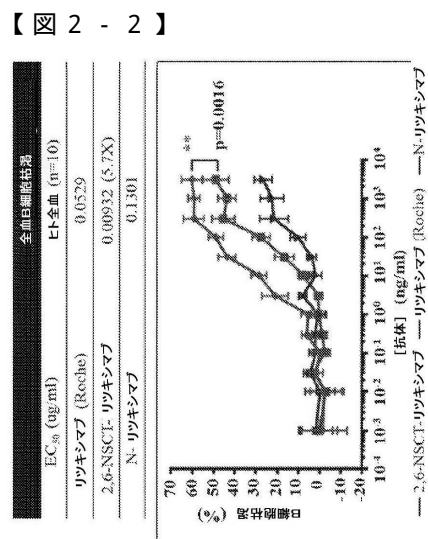


Fig. 2B

【 図 2 - 3 】

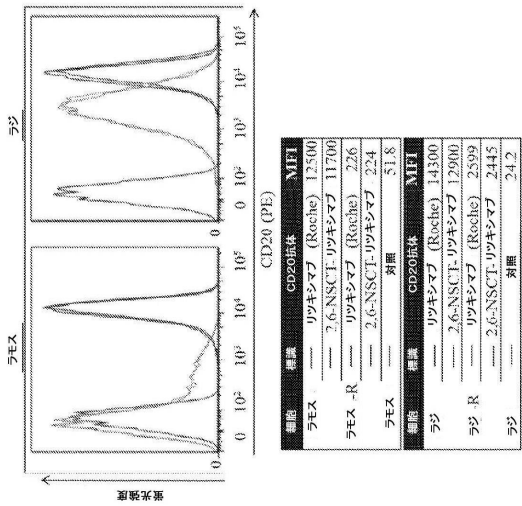


Fig. 2C

【 図 2 - 4 】

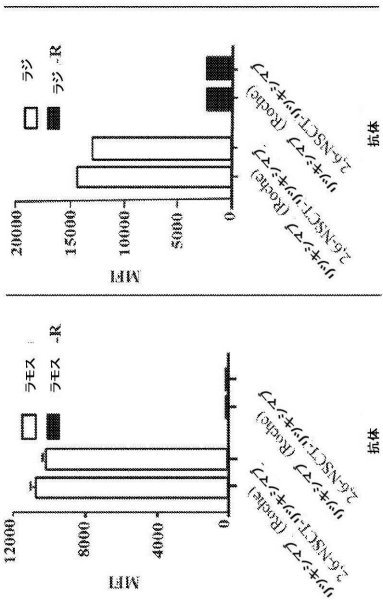


Fig. 2C (続き)

【 図 2 - 5 】

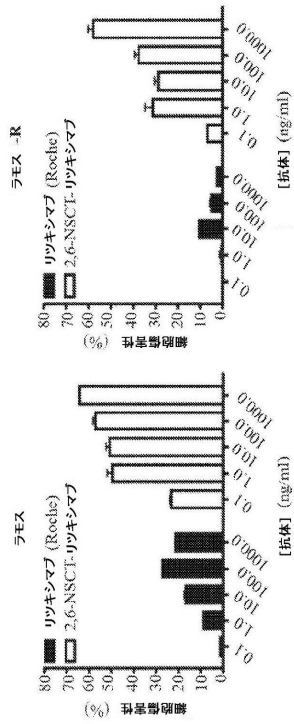


Fig. 2D

【 図 2 - 6 】

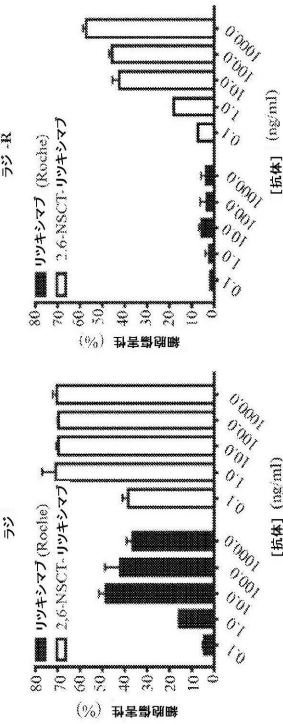


Fig. 2E

【図 3 A】

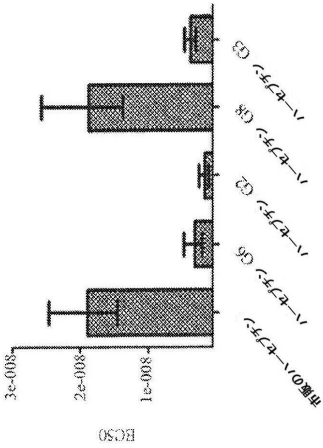


Fig. 3A

【図 3 B】

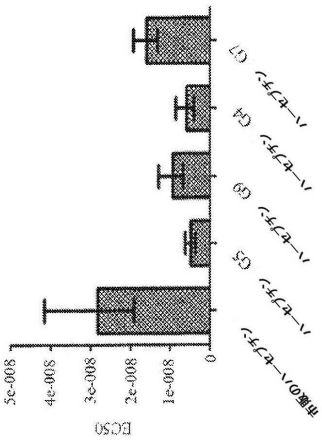


Fig. 3B

【図 3 C】

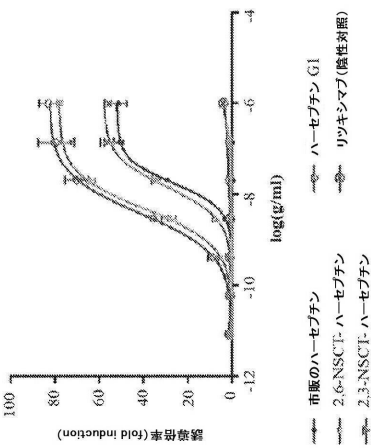


Fig. 3C

【図 3 D】

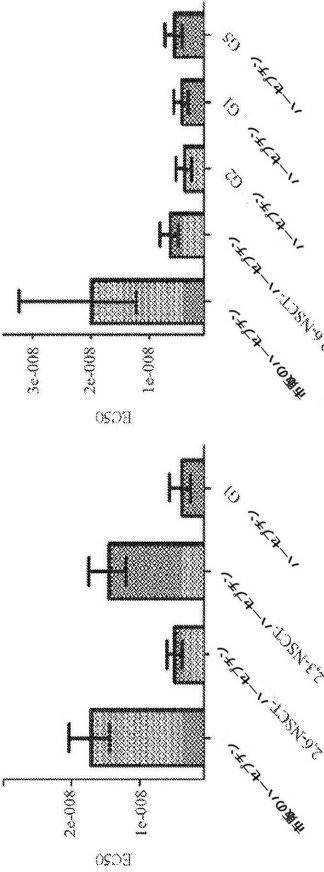


Fig. 3D

【 図 4 A 】

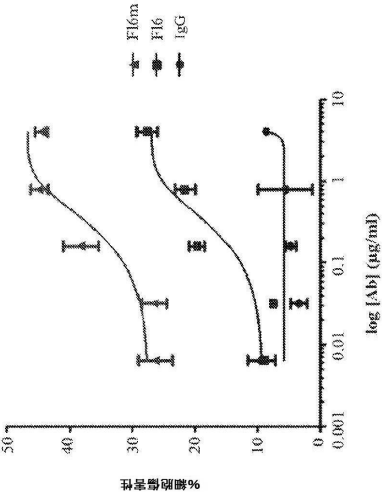


Fig. 4A

【 図 4 B 】

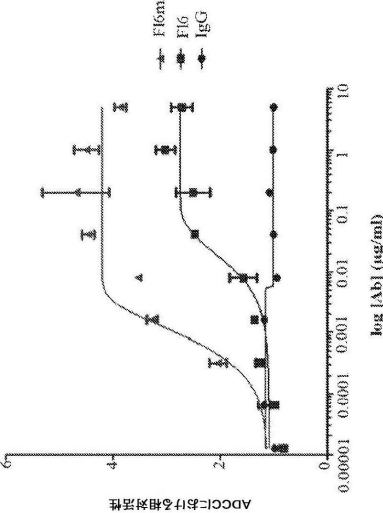


Fig. 4B

【 図 4 C 】

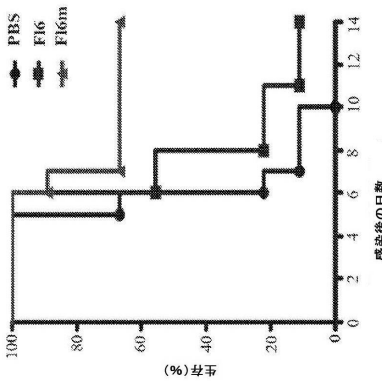


Fig. 4C

【配列表】

0006894239000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)		A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/20 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)		A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 31/22	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
		A 6 1 P 37/02	
		C 0 7 K 16/28	Z N A
		C 1 2 P 21/08	

(31)優先権主張番号 62/003,104

(32)優先日 平成26年5月27日(2014.5.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/003,908

(32)優先日 平成26年5月28日(2014.5.28)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/020,199

(32)優先日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/110,338

(32)優先日 平成27年1月30日(2015.1.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウォン, チ - フェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 7, ランチョ サンタ フェ, ピー・オー・ボックス 8 1 5 4

(72)発明者 ウー, チュン - イ

台湾 2 2 1 ニュー タイペイ シティ, シ - ジ ディストリクト, ドンシ ストリート,

ナンバー 78 - 1

(72)発明者 マ, チェ

台湾 11529 タイペイ, ナンカン, アカデミア ロード 128, セクション 2,
アカデミア シニカ 気付

合議体

審判長 原田 隆興

審判官 齋藤 恵

審判官 進士 千尋

(56)参考文献 国際公開第2012/162277(WO, A1)

国際公開第2013/120066(WO, A1)

米国特許出願公開第2011/0263828(US, A1)

特表2012-503656(JP, A)

特表2009-515979(JP, A)

国際公開第2013/066761(WO, A1)

特表2008-526812(JP, A)

国際公開第2013/011347(WO, A1)

Wei Huang et al, Chemoenzymatic glycoengineering of intact IgG antibodies for gain of functions., Journal of the American chemical society, 2012年 7月25日, vol.134 No.29, pp.12308-12318

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00-90

C07K 1/00-19/00

MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/REGISTORY/CAPLUS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)