

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-503656

(P2012-503656A)

(43) 公表日 平成24年2月9日(2012.2.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4B024
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B029
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B063
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	4B064
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	4B065
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-529044 (P2011-529044)	(71) 出願人	511071522
(86) (22) 出願日	平成21年7月21日 (2009.7.21)		エウレカ セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月11日 (2011.5.11)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94608, エメリービル, スイート 362, ホールトン ストリート 5858
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/051325	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開番号	W02010/036443		弁理士 稲葉 良幸
(87) 国際公開日	平成22年4月1日 (2010.4.1)	(74) 代理人	100109346
(31) 優先権主張番号	61/194, 292		弁理士 大貫 敏史
(32) 優先日	平成20年9月26日 (2008.9.26)	(72) 発明者	リウ, チェン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94803, リッチモンド, ブリistolコーンドライブ 2266
(31) 優先権主張番号	61/168, 186		
(32) 優先日	平成21年4月9日 (2009.4.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/120, 722		
(32) 優先日	平成20年12月8日 (2008.12.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 変異体グリコシル化パターンを有する細胞株およびタンパク質

(57) 【要約】

本開示は、変異体グリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生する細胞を含む組成物および方法を提供する。方法および組成物は、治療用の価値のある抗体およびタンパク質を産生する上で用いてもよい。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変異体グリコシル化パターンを呈するよう修飾された糖タンパク質であって、前記変異体グリコシル化パターンが、対応する野生型糖タンパク質と比較して少なくとも 2 種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられる、糖タンパク質。

【請求項 2】

前記変異体グリコシル化パターンが、グルコース、ガラクトース、またはその両方のレベルの変化によって証明される、請求項 1 に記載の糖タンパク質。

【請求項 3】

前記ガラクトースのレベルの変化が低下である、請求項 1 に記載の糖タンパク質。

10

【請求項 4】

前記グルコースのレベルの変化が増加である、請求項 1 に記載の糖タンパク質。

【請求項 5】

前記変異体グリコシル化パターンが、グルコースレベルの増加、ガラクトースレベルの低下、およびフコースレベルの低下によって証明される、請求項 1 に記載の糖タンパク質。

【請求項 6】

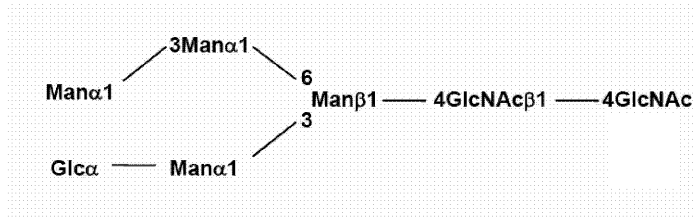
前記変異体グリコシル化パターンが、末端グルコース部分によって証明される、請求項 1 に記載の糖タンパク質。

【請求項 7】

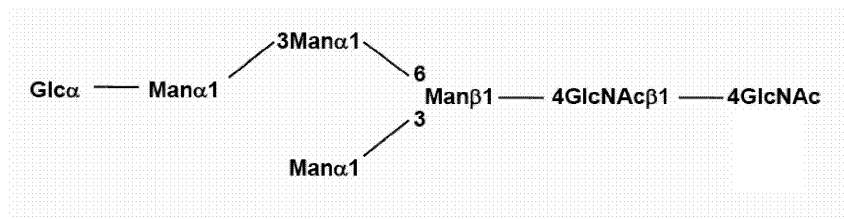
前記変異体グリコシル化パターンが、式 (I) または (I I) の構造：

20

【化 1】



(I)



(I I)

30

を有する N 連結型グリカンを含む、請求項 1 に記載の糖タンパク質。

【請求項 8】

N 連結型グリカンを含む、修飾された宿主細胞によって産生される抗体であって、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc 受容体 I I I a (Fc R I I I a) に対して高い結合親和性を、および / または、Fc 受容体 I I b (Fc R I I b) に対して低い結合親和性を有し、それにより Fc R I I I a および / または Fc R I I b を発現するエフェクター細胞に対して A D C C (抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用) 活性を増大させる、抗体。

40

【請求項 9】

N 連結型グリカンを含む、修飾された宿主細胞によって産生される抗体であって、対応する修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、高い A D C C 活性を呈し、かつ前記高い A D C C 活性が、高親和性 Fc 受容体である Fc R I I I a 1 5 8 V / V を発現するエフェクター細胞、および低親和性 Fc 受容体である Fc R I I I a 1 5 8 F / F または Fc R I I I a 1 5 8 F / V を発現するエフェ

50

クター細胞に対してである、抗体。

【請求項 10】

前記 N 連結型グリカンが、1つのグルコース分子、4つのマンノース分子、および2つの N - アセチルグリコサミン分子を含む、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

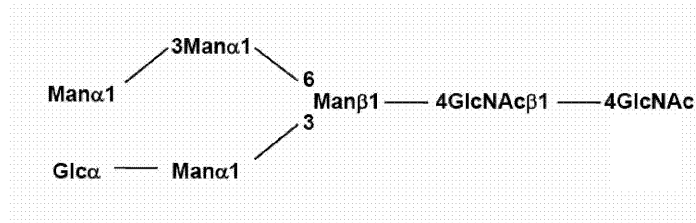
【請求項 11】

前記 N 連結型グリカンが1つ以上のフコース分子を含む、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

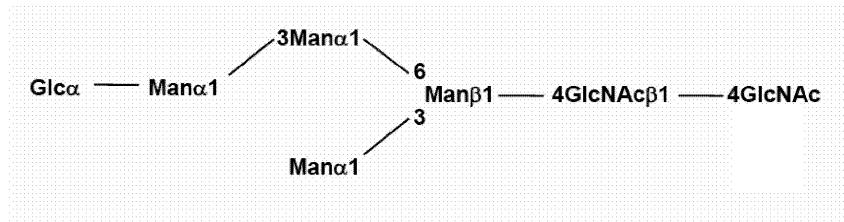
【請求項 12】

N 連結型グリカンが、式 (I) または (I I) の構造：

【化 2】



(I)



(I I)

を有する、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 13】

前記 N 連結型グリカンが、前記抗体の F c 領域に結合する、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗体が、癌抗原に結合する、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 15】

前記癌抗原が、HER2、免疫グロブリン Fc 受容体 II、Alk-1、CD20、EGF 受容体、VEGF 受容体、FGF 受容体、NGF 受容体、PDGF 受容体、Epcam、CD3、CD4、CD11a、CD19、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD51、CD55、CD80、CD95、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CTLA-4、ムチン1、ムチン16、エンドグリン、メソテリン受容体、ノゴ(Nogo)受容体、葉酸受容体、CXCR4、インスリン様増殖因子受容体、ガングリオシドGD3、ならびに および インテグリンからなる群から選択される、請求項 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

前記抗体が、阻害抗体である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 17】

前記抗体が、IgG 抗体である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 18】

前記抗体が、修飾されていない CHO 細胞クローンである CHO - K1 (ATCC # CCL - 61 および CRL - 9618) または CHO - DG44 (Invitrogen # 12609 - 012) によって産生される対応する抗体と比較して、低親和性 FcR、FcRIIIa 158F / F または FcRIIIa 158F / V を発現するエフェクター細胞に対して高い ADCC (抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用) 活性を有す

10

20

30

40

50

る、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体が、修飾されていない CHO 細胞クローンである CHO - K1 (ATCC # CCL - 61 および CRL - 9618) または CHO - DG44 (Invitrogen # 12609 - 012) によって産生される対応する抗体と比較して、高親和性 FcR である Fc RII Ia 158V/V を発現するエフェクター細胞に対して高い ADC C (抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用) 活性を有する、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 20】

前記宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

10

【請求項 21】

前記宿主細胞が、NS0、SP2/0、HEK293、PER.C6、および YB2/0 細胞からなる群から選択される、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 22】

前記宿主細胞が、ミエローマ細胞である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 23】

前記エフェクター細胞が、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 24】

前記抗体が、抗 Her2 抗体である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

20

【請求項 25】

前記エフェクター細胞が、NK 細胞、単球、マクロファージ、または多形核ニュートロフィルス (neutrophils) (PMN) である、請求項 8 または請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 26】

1 つのグルコース分子、4 つのマンノース分子、および 2 つの N - アセチルグリコサミン分子を含む、N 連結型グリカン。

【請求項 27】

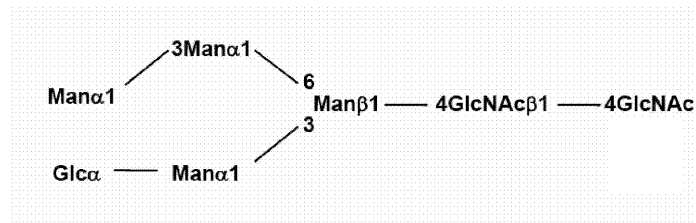
前記グルコースが、前記 N 連結型グリカンの末端に配置され、かつ前記 N 連結型グリカンが、1 つ以上のフコース分子を任意に含む、請求項 26 に記載の N 連結型グリカン。

30

【請求項 28】

式 (I) の構造

【化 3】



(I)

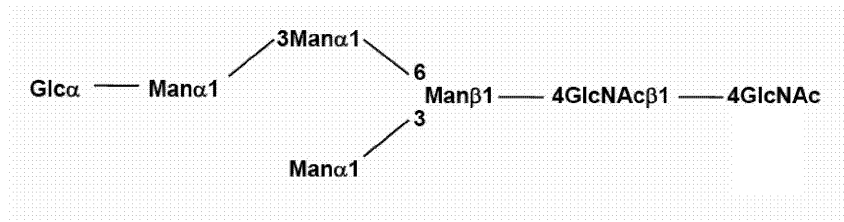
40

を有する、請求項 26 に記載の N 連結型グリカン。

【請求項 29】

式 (II) の構造

【化 4】



(I I)

を有する、請求項 26 に記載の N 連結型グリカン。

10

【請求項 30】

請求項 26 ~ 29 のいずれか一項記載の N グリカンを含む、単離した糖タンパク質。

【請求項 31】

前記糖タンパク質が抗体である、請求項 30 に記載の糖タンパク質。

【請求項 32】

前記糖タンパク質が酵素である、請求項 30 に記載の糖タンパク質。

【請求項 33】

前記 N 連結型グリカンが、前記抗体の Fc 領域に結合する、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

【請求項 34】

前記抗体が癌抗原に結合する、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

20

【請求項 35】

前記癌抗原が、HER2、免疫グロブリン Fc 受容体 II、Alk-1、CD20、EGF 受容体、VEGF 受容体、FGF 受容体、NGF 受容体、PDGF 受容体、Epcam、CD3、CD4、CD11a、CD19、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD51、CD55、CD80、CD95、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CTLA-4、ムチン1、ムチン16、エンドグリン、メソテリン受容体、ノゴ受容体、葉酸受容体、CXCR4、インスリン様増殖因子受容体、ガングリオシド GD3、ならびに および インテグリンからなる群から選択される、請求項 34 に記載の糖タンパク質。

30

【請求項 36】

前記抗体が、N 連結したグリカンの実質的に均質な集団を産生する修飾された宿主細胞によって産生される、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

【請求項 37】

前記抗体が、修飾されていない CHO 細胞クローンである CHO-K1 (ATCC # CCL-61 および CRL-9618) または CHO-DG44 (Invitrogen # 12609-012) によって産生される対応する抗体と比較して、高い ADCC (抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用) 活性を有する、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

【請求項 38】

前記抗体が、修飾されていない CHO 細胞クローンである CHO-K1 (ATCC # CCL-61 および CRL-9618) または CHO-DG44 (Invitrogen # 12609-012) によって産生される対応する抗体と比較して、Fc RIIIA 受容体に対する高い結合親和性を有する、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

40

【請求項 39】

前記抗体が阻害抗体である、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

【請求項 40】

前記抗体が IgG 抗体である、請求項 31 に記載の糖タンパク質。

【請求項 41】

(a) 前記修飾された糖タンパク質をコードする異種性ポリヌクレオチド配列を提供すること；

50

および

(b) 宿主細胞が、グルコース、ガラクトース、マンノース、およびグルコサミンからなる群から選択される1つ以上の糖部分のレベルにおける変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを有するN連結型グリカンを生産する、前記修飾された糖タンパク質を前記宿主細胞において発現させることを含む、修飾された糖タンパク質を生産する方法。

【請求項42】

前記宿主細胞が、無血清培地において維持される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記宿主細胞が、懸濁培養において維持される、請求項41に記載の方法。

10

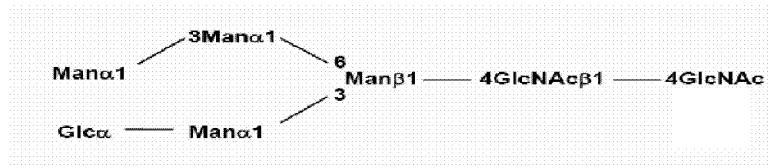
【請求項44】

前記修飾された糖タンパク質が、抗体である、請求項41に記載の方法。

【請求項45】

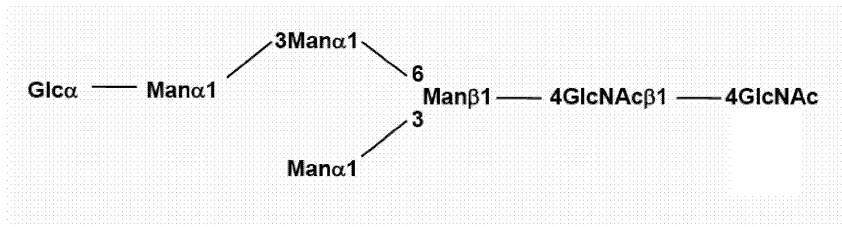
前記宿主細胞が、式(I)または(II)の構造

【化5】



(I)

20



(II)

を有するN連結型グリカンを生産する、請求項41に記載の方法。

30

【請求項46】

修飾されていない親宿主細胞と比較して、グルコース、ガラクトース、マンノース、およびグルコサミンからなる群から選択される1つ以上の糖部分のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを有するN連結型グリカンを生産する、修飾された宿主細胞。

【請求項47】

前記変異体グリコシル化パターンが、前記修飾されていない親宿主細胞と比較して、前記宿主細胞の表面に存在する少なくとも2種類の糖分子のレベルにおける変化によって特徴づけられる、請求項46に記載の修飾された宿主細胞。

【請求項48】

実質的に均質なパターンのN連結型グリカンを示す糖タンパク質を生産する単離された宿主細胞。

40

【請求項49】

前記実質的に均質なパターンのN連結型グリカンが、質量分析によって分離される単一ピークによって立証される、請求項48に記載の宿主細胞。

【請求項50】

N連結型グリカンを生産する修飾された抗体を生産する能力によって特徴づけられる修飾された宿主細胞であって、前記抗体が、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc受容体IIa (FcRIIa) に対する高い結合親和性、および/またはFc受容体IIb (FcRIIb) に対する低い結合親和性を

50

呈し、それにより、Fc R I I I a および / または Fc R I I I b を発現するエフェクター細胞に対する A D C C (抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用) 活性を増大させる、宿主細胞。

【請求項 5 1】

前記増大された A D C C 活性が、高親和性 Fc 受容体である Fc R I I I a 1 5 8 V / V を発現するエフェクター細胞、および低親和性 Fc 受容体である Fc R I I I a 1 5 8 F / F または Fc R I I I a 1 5 8 F / V を発現するエフェクター細胞に対してである、請求項 5 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 2】

前記 N 連結型グリカンが、ガラクトースのレベルの減少によって特徴づけられる変異体パターンを呈する、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

10

【請求項 5 3】

前記変異体グリコシル化パターンが、グルコースレベルの増加によって特徴づけられる、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 4】

対応する修飾されていない宿主細胞よりも高い A D C C 活性を呈する抗体を産生する、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 5】

前記変異体グリコシル化パターンが、末端グルコース部分の存在によって特徴づけられる、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

20

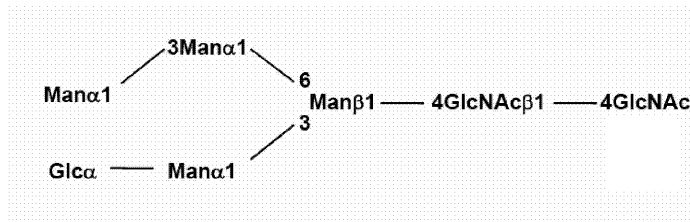
【請求項 5 6】

前記変異体グリコシル化パターンが、フコースレベルの減少、グルコースの増加、およびガラクトースの低下によって特徴づけられる、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 7】

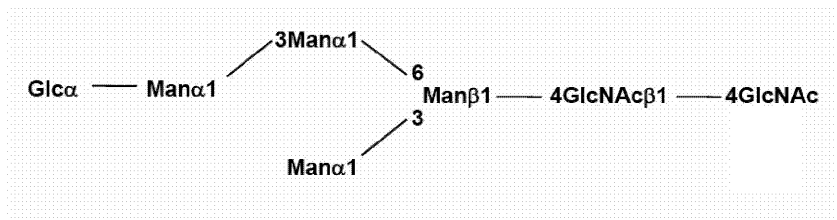
前記 N 連結したパターンが、式 I または I I の構造：

【化 6】



(I)

30



(I I)

40

を有する、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 8】

前記宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 5 9】

前記細胞が、ミエローマ細胞である、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 6 0】

前記細胞が、少なくともおよそ 6 0 回の継代後に変異体グリコシル化パターンを維持す

50

る、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 6 1】

請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む培地。

【請求項 6 2】

無血清培地において請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の複数の宿主細胞を含む培養発酵槽。

【請求項 6 3】

(a) 複数の真核細胞を提供すること；

(b) 無作為な遺伝子突然変異を前記複数の真核細胞に導入すること；および

(c) 前記無作為な遺伝子突然変異に供されなかった対応する親細胞と比較して、少なくとも 1 種類の糖部分のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを呈する少なくとも 1 つの細胞を前記複数の細胞から選択することを含む、変異体グリコシル化パターンを用いて真核細胞を選択する方法。

10

【請求項 6 4】

前記遺伝子突然変異が、化学的変異原によって誘導される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記変異体グリコシル化パターンが、グルコース、ガラクトース、マンノース、およびグルコサミンからなる群から選択される 1 つ以上の糖部分のレベルの変化によって特徴づけられる、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記変異グリコシル化パターンが、ガラクトースのレベルの減少によって特徴づけられる、請求項 6 3 に記載の方法。

20

【請求項 6 7】

前記変異グリコシル化パターンが、D - グルコサミンのレベルの減少によって特徴づけられる、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記変異体グリコシル化パターンが、マンノースのレベルの増加によって特徴づけられる、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記変異体グリコシル化パターンが、末端グルコース分子の存在によって特徴づけられる、請求項 6 3 に記載の方法。

30

【請求項 7 0】

選択された前記真核細胞が、前記無作為な遺伝子突然変異に供されていない対応する細胞の A D C C 活性と比較して高い A D C C 活性を呈する抗体を産生する、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 1】

選択された前記真核細胞が、前記無作為の遺伝子突然変異に供されていない対応する細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc R I I I A 受容体に対する高い結合親和性を有する抗体を産生する、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記真核細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である、請求項 6 3 に記載の方法。

40

【請求項 7 3】

前記真核細胞が、NS 0、SP 2 / 0、HEK 2 9 3、PER . C 6、および Y B 2 / 0 細胞からなる群から選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記真核細胞が、ミエローマ細胞である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

選択された前記細胞が、少なくともおよそ 6 0 回の継代後に前記変異体グリコシル化パターンを維持する、請求項 6 3 に記載の方法。

50

【請求項 76】

選択された前記細胞が、無血清培地において増殖する、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 77】

選択された前記細胞が、懸濁液において増殖する、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 78】

選択された前記細胞が、異種性糖タンパク質をコードする異種性配列を含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 79】

選択された前記細胞が、実質的に均質なパターンの N 連結型グリカンを発現する、請求項 63 に記載の方法。

10

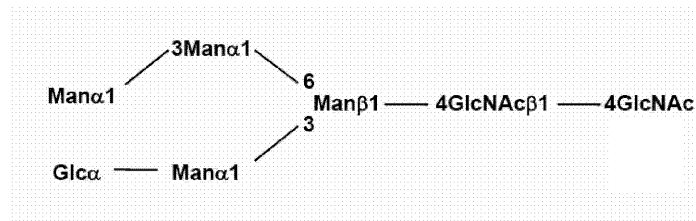
【請求項 80】

前記 N 連結型グリカンの実質的に均質なパターンが、質量分析によって分離される単一のピークによって立証される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

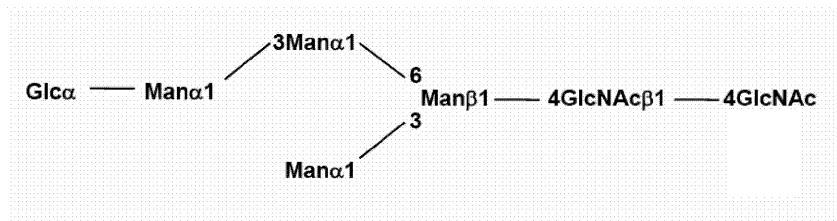
前記変異体グリコシル化パターンが、式 I または I I の構造：

【化 7】



(I)

20



(I I)

30

を有する N 連結したパターンによって特徴づけられる、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 82】

前記変異体グリコシル化パターンが、ガラクトースのレベルの減少、グリコース (glycose) の増加、およびフコースの減少によって特徴づけられる、請求項 63 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、すべての目的においてそれらの全内容が本明細書に組み込まれる、2008年9月26日に提出した米国シリアル番号 61/194,292、2008年12月8日に提出した米国シリアル番号 61/120,722、および2009年4月9日に提出した米国シリアル番号 61/168,186 に対する優先権を主張する。

40

【背景技術】

【0002】

炭水化物、糖、または糖分子の組成物における変化によって、IgG 介在性免疫応答を細胞性エフェクター機能と関連させる FcR の 3 つのクラス (FcRI、FcRII、および FcRIII) に対する IgG の親和性に影響が及ぼされることが示されている (Wright and Morrison, Trends Biotechnol 15(1): 26-32; Gessner et al., Ann Hematol 76(6): 231-48 (1998); Jefferis et al

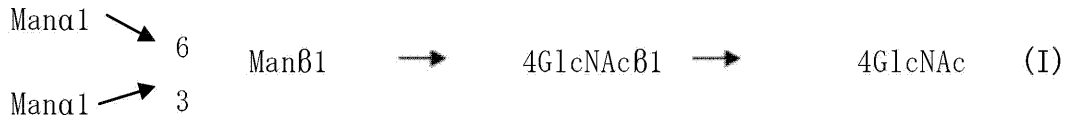
50

. , Immunol Rev 163 : 59 - 76 (1998) . Ravetch and Bolland , Annu Rev Immunol 19 : 275 - 90 (2001) 。

【 0003 】

糖タンパク質の糖鎖は、一般的に、タンパク質性部分への結合形態に基づいて下記の2つの大まかな種類に分けられる：すなわち、アスパラギンに結合する糖鎖（N-グリコシド連結型糖鎖）、およびセリンまたはトレオニンなどの他のアミノ酸に結合する糖鎖（O-グリコシド連結型糖鎖）である。典型的にこれらは、下記の構造式（I）：

【 化 1 】



10

によって示される基本の共通の中心構造を有する。

【 0004 】

N-グリコシド連結型糖鎖は、種々の構造を有し、種々の糖分子を備えている。アスパラギンに結合する糖鎖末端は典型的に、還元末端と呼ばれ、反対側は非還元末端と呼ばれる。N-グリコシド連結型糖鎖には、マンノースが中心構造の非還元末端に単独で結合する高マンノース型；中心構造の非還元末端側が、ガラクトース-N-アセチルグルコサミン（Gal-GlcNAc）の少なくとも1つの並列分岐を有し、かつGal-GlcNAcの非還元末端側が、N-アセチルグルコサミンまたはその類似物を二分するシアル酸の構造を有する複合体型；中心構造の非還元末端側が高マンノース型および複合体型の両方の分岐を有するハイブリッド型；ならびにそれらの類似物を含むことができる。糖鎖の構造は、糖鎖を合成するグリコシルトランスフェラーゼについての遺伝子、および/または糖鎖を加水分解する解糖系酵素についての遺伝子など、糖鎖遺伝子によって決定することができる。

20

【 0005 】

糖タンパク質は典型的に、小胞（ER）内腔における糖鎖を用いて修飾される。例えば、N-グリコシド連結型糖鎖の生合成工程の間、比較的大きな糖鎖は、ER内腔において伸長しているポリペプチド鎖に転移する。糖分子は、リン酸ドリコールなど、約20個の-イソプレレン単位を含む長鎖脂質担体のリン酸基に連続して付加することができる。例えば、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）は、P-Dolに転移してGlcNAc-P-P-Dolを形成した後、1つ以上のGlcNAcが転移して、GlcNAc-GlcNAc-P-P-Dolを形成する。次に、5つのマンノース（Man）を転移し、それにより（Man）5-（GlcNAc）2-P-P-Dolを形成した後、4つのManおよび3つのグルコース（Glc）が転移する。結果として、中心オリゴ糖である糖鎖前駆体（Glc）3-（Man）9-（GlcNAc）2-P-P-Dolが形成される。次に、14個の糖を含む糖鎖前駆体は、ER内腔におけるアスパラギン-X-セリン配列またはアスパラギン-X-トレオニン配列を有するポリペプチドに転移することができる。中心オリゴ糖に結合したピロリン酸ドリコール（P-P-Dol）は典型的に、ピロホスファターゼによる加水分解によって放出されて、リン酸ドリコール（P-Dol）となり、再利用される。糖鎖のトリミングは典型的に、糖鎖がポリペプチドに結合した後に始まる。例えば、3つのGlcおよび1つまたは2つのManは、-1, 2-グルコシダーゼI、-1, 3-グルコシダーゼII、および-1, 2-マンノシダーゼの作用などによって、ERにおいて除去される。

30

40

【 0006 】

ERにおいてトリミングを受けた糖タンパク質は、ゴルジ体に転移して、さらに修飾されることができる。例えば、ゴルジ体のシス部分には、N-アセチルグルコサミンホスホトランスフェラーゼ（リン酸マンノースの付加を助ける）、N-アセチルグルコサミン1-ホスホジエステール-N-アセチルグルコサミニダーゼ（acetylglucosaminidase）、およびマンノシダーゼI（Man残基を5つに減少させる）が存

50

在する。ゴルジ体の中央部分には、N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼ I (G n T I) (複合体型 N - グリコシド連結型糖鎖の最初の外側の G l c N A c の付加を助ける)、 - マンノシダーゼ I I (2 つの M a n の除去を助ける。)、N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼ I I (G n T I I) (外側から 2 番目の G l c N A c の付加を助ける)、および - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ (還元末端 N - アセチルグルコサミンへのフコースの付加を助ける)。ゴルジ体のトランス部分には、ガラクトースの付加を助けるガラクトーストランスフェラーゼ、および N - アセチルノイラミン酸またはそれらの類似物などのシアル酸の付加に関連するシアリルトランスフェラーゼが存在する。このように、種々の N - グリコシド連結型糖鎖は、これらの種々の酵素の活性によって形成することができる。

10

【 0 0 0 7 】

糖鎖構造の変化、またはこのような鎖における種々の糖分子含有量による変異体グリコシル化パターンは、抗体などの糖タンパク質のエフェクター機能において重要な役割を担っている。例えば、I g G 型の抗体の F c 領域において、2 つの N - グリコシド連結型糖鎖結合部位が典型的に存在する。血清 I g G において、糖鎖結合部位は一般に、複数の分岐を有する複合体型糖鎖を結合し、それにおいて、シアル酸または二分している N - アセチルグルコサミンの付加は低い。ガラクトースの付加が、複合体型糖鎖の非還元末端に対してなされ、フコースが還元末端における N - アセチルグルコサミンに対してなされる多様な様式および形態がある (例えば、L e p p a n e n e t a l . , B i o c h e m i s t r y , 3 6 , 7 0 2 6 - 7 0 3 6 (1 9 9 7) 参照)。

20

【 0 0 0 8 】

フコシル化は、新たに合成された抗体を、細胞のゴルジ体におけるフコース糖類の付加によって修飾することができる過程の一例である。このタンパク質修飾は、フコースを用いて修飾したタンパク質に優先的に結合する化学物質であるフルオロフォア抱合 L C A (レンズクリマリス (c u l i m a r i s) 凝集素 - A) を用いて細胞を染色することによって可視化することができる。近年、抗体のフコシル化は、ヒト F c R に結合する抗体および抗体依存性細胞傷害 (A D C C) に影響を及ぼすことが観察されている。抗体結合親和性および抗体介在性 A D C C は、抗体が低レベルのフコースを有する場合、非常に高い (S h i e l d s e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 7 (3 0) : 2 6 7 3 3 - 4 (2 0 0 2) ; S h i n k a w a e t a l . , J B i o l C h e m 2 7 8 (5) : 3 4 6 6 - 7 3 (2 0 0 3))。

30

【 0 0 0 9 】

タンパク質のフコシル化は、遊離フコースの取り込みで始まり、次いでフコースキナーゼによるリン酸化および G D P - フコースピロホスホリラーゼによる G D P - フコースへの変換と続く過程である。フコシルトランスフェラーゼは、フコース残基を分泌経路内のグリカンまたはタンパク質に転移し、その後、修飾した糖タンパク質を分泌のために細胞表面に送達する。抗体産生細胞のフコシル化状態は、抗体における産生したフコース量と相関しており、しかも、細胞レベルおよび抗体レベルの両方において、フコシルトランスフェラーゼの欠如はフコシル化を抑制する (Y a m a n e - O h n u k i e t a l . , B i o t e c h n o l B i o e n g 8 7 (5) : 6 1 4 - 2 2 (2 0 0 4))。

40

【 0 0 1 0 】

A D C C は、治療用抗体が免疫応答を誘導し、癌細胞の死滅を媒介する作用に関する重要な機序である。治療用抗体による A D C C の増大は、臨床応答を改善し、治療的薬用量を減少させることができ、したがって、起こり得る副作用を低減することができる (C a r t e r e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 9 (1 0) : 4 2 8 5 - 9 (1 9 9 2) ; L e w i s e t a l . , C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r 3 7 (4) : 2 5 5 - 6 3 (1 9 9 3) ; C o o l e y e t a l . , E x p H e m a t o l 2 7 (1 0) : 1 5 3 3 - 4 1 (1 9 9 9) ; C l y n e s e t a l . , N a t M e d 6 (4

50

) : 443 - 6 (2000) ; Repka et al. , Clin Cancer Res 9 (7) : 2440 - 6 (2003) ; Gennari et al. , Clin Cancer Res 10 (17) : 5650 - 5 (2004) ; Nahta and Esteve , Cancer Lett 232 (2) : 123 - 38 (2006))。インビボモデルおよび臨床試験は、ハーセプチンなどの治療用抗体が、ADCCを含む細胞傷害特性を有することを示している。これらの特性は、ハーセプチン誘発性乳房腫瘍の退縮および肺転移からの保護における主要な因子である (Shields et al. , J Biol Chem 277 (30) : 26733 - 4 (2002) ; Shinkawa et al. , J Biol Chem 278 (5) : 3466 - 73 (2003))。

10

【0011】

ヒトIgG1サブクラス抗体のADCC活性の発現は典型的に、キラー細胞、天然キラー細胞、活性化したマクロファージまたはその類似物 (FcR) などのエフェクター細胞の表面に存在する抗体受容体および種々の補体成分に対する抗体のFc領域の結合を必要とする。抗体のヒンジ領域の第二のドメイン並びにC領域 (以後、「C2ドメイン」と呼ぶ。) およびC2ドメインに連結された糖鎖におけるいくつかのアミノ酸残基が、この結合反応に重要であることが示唆されている。

【0012】

現在、下記などの、腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体介在性ADCCを増大させるいくつかの戦略が提唱されている：1) 免疫エフェクター細胞をより効率よく動員するために、抗体の1つのアームがIgG受容体に結合する特異的抗癌抗体を開発すること (Segal et al. , J Immunol Methods 248 (1-2) : 1 - 6 (2001)) ; 2) 組換えヒトサイトカインを用いて、免疫エフェクター細胞のエフェクター機能を増大させること (Carson et al. , Eur J Immunol 31 (10) : 3016 - 25 (2001) ; Repka et al. , Clin Cancer Res 9 (7) : 2440 - 6 (2003)) ; 3) IgG-サイトカイン融合タンパク質を用いること (Penichet and Morrison , J Immunol Methods 248 (1-2) : 91 - 101 (2001)) ; 4) IgG受容体に対する改善した結合のために、抗体のFc配列を変化させること (Shields et al. , J Biol Chem 276 (9) : 6591 - 604 (2001)) ; および5) Asn297連結型炭水化物のレベルの最適化 (Umana et al. , Nat Biotechnol 17 (2) : 176 - 80 (1999) ; Davies et al. , Biotechnol Bioeng 74 (4) : 288 - 94 (2001) ; Shinkawa et al. , J Biol Chem 278 (5) : 3466 - 73 (2003))。

20

30

【0013】

1つのアプローチは、抗癌抗体のフコース内容を修飾して、FcRに対する結合親和性およびADCCを増大させることである。IgG1は、中心フコースの存在または不在とともにトリマンノシル中心構造から構成され、N-アセチルグルコサミンおよび末端ガラクトースを二分する、Asn297に結合した2つのN連結型オリゴ糖鎖を有する (Rademacher et al. , Biochem Soc Symp 51 : 131 - 48 (1986))。免疫グロブリンGエフェクターにおけるAsn297連結型炭水化物の性質および重要性は、永く認識されている。リンパ腫治療のための抗CD20抗体である脱フコシル化型リツキサンは、高い親和性および100倍高いADCC活性でFcRIIIaに強く結合する (Shinkawa et al. , J Biol Chem 278 (5) : 3466 - 73 (2003) ; Yamane-Ohnuki et al. , Biotechnol Bioeng 87 (5) : 614 - 22 (2004) ; Kanda et al. , Biotechnol Bioeng 94 (4) : 680 - 8 (2006))。その他は、低フコースのハーセプ

40

50

チンをFc RIIIIaに結合すると、正常フコースのハーセプチンの約100倍改善し、結果としてハーセプチン介在性ADCCは実質的に改善された(Shields et al., J Biol Chem 277(30): 26733-40 (2002))。このことは、抗癌抗体の脱フコシル化が、これらのFc Rに対する結合親和性を増大させ、ADCCを増強することを示す。さらに、このことは、フコース内容の修飾が、抗体の治療効能を増強し、フコシル化型抗体に応答しない癌患者に対する治療を発展させるよう、抗体の抗癌免疫応答を改善することであったことを示唆する。

【0014】

しかしながら、高い治療能力の抗体を修飾する代替的な方法についての需要が残っている。

10

【発明の概要】

【0015】

高いエフェクター機能を有する治療用タンパク質を産生する需要は存在したままである。本開示は、変異体グリコシル化パターンをまたは、対応する野生型タンパク質ともしくは修飾されていないグリコシル化パターンを有する細胞株において産生されたタンパク質と比較して修飾されたグリコシル化パターンを有する細胞株および糖タンパク質を産生することによって、この需要および関連する利点に合った方法および組成物を提供する。宿主細胞によって発現した糖タンパク質の糖鎖内容における差、および抗体など変異体グリコシル化パターンを有する糖タンパク質の産生に使用することのできる宿主細胞の開発は、より高いエフェクター機能を有することができる。

20

【0016】

一実施形態において、修飾されていない親宿主細胞と比較して変異体グリコシル化パターンを生じるよう修飾された宿主細胞を産生および選択するための方法および組成物が本明細書で提供される。変異体グリコシル化パターンを有する宿主細胞を選択する方法は、複数の宿主細胞を提供すること；無作為な遺伝子突然変異を、複数の宿主細胞に導入すること；および複数の細胞から、無作為な遺伝子突然変異に供されなかった対応する親細胞と比較して少なくとも1種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを呈する少なくとも1つの細胞を選択することを含んでもよい。さらにその上、遺伝子突然変異は、化学的変異原によって誘導されてもよい。

30

【0017】

宿主細胞は、哺乳類細胞などの真核細胞であってもよい。修飾された宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞であり得る。宿主細胞は、CHO-1E5、CHO-3F、またはCHO-2.6細胞などの修飾されたCHOであってもよい。また、宿主細胞はミエローマ細胞であってもよい。修飾された宿主細胞は、NS0、SP2/0、HEK293、PER.C6、またはYB2/0細胞であり得る。修飾された宿主細胞は、修飾されていない親宿主細胞と比較して、宿主細胞の表面に存在する少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられることができる変異体グリコシル化パターンを呈する。レベルの変化は少なくともおよそ1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、またはそれよりも高くあり得る。変異体グリコシル化パターンは、フコシル化、マンノシル化、N-アセチルグルコサミン化、またはこれらの組み合わせのレベルの変化によって立証することができる。いくつかの実施形態において、変化は、ガラクトース、グルコース、またはその両方のレベルにおいてであり得る。変化は、ガラクトース、グルコース、またはその両方のレベルの増加または低下であり得る。例えば、変化は、グルコースの増加およびガラクトースの低下であり得る。

40

【0018】

いくつかの実施形態において、レベルの変化は、修飾されていない親宿主細胞と比較して、修飾された宿主細胞のフコシル化のレベルの低下であってもよい。また、変異体グリコシル化パターンは、連結型マンノースのレベルなど、マンノシル化のレベルの変化によっても立証することができる。マンノシル化のレベルは、修飾された宿主細胞において高くてもよい。また、変異体グリコシル化パターンは、修飾された宿主細胞におけるN-

50

アセチルグルコサミニル化の低下または増加など、N - アセチルグルコサミニル化のレベルの変化によって立証することもできる。N - アセチルグルコサミニル化は、連結型または連結型N - アセチルグルコサミンを包含してもよい。修飾されていない親宿主と比較して変異体グリコシル化パターンを生じるよう修飾された宿主細胞は、修飾されていない親宿主細胞の1, 6 - フコシルトランスフェラーゼ活性に匹敵する上記活性を有してもよい。別の態様において、修飾された宿主細胞は、少なくともおよそ30回、40回、50回、60回、80回、100回、120回、150回、200回、1000回、またはそれより多くの回数の継代後に、上記宿主細胞の変異体グリコシル化パターンを維持することができる。また、修飾された宿主細胞は、無血清培地において、懸濁液において、および/または発酵槽において増殖してもよい。

10

【0019】

別の態様において、本発明は、N連結型グリカンの実質的に均質なパターンを呈する抗体を産生する修飾された非リンパ球宿主細胞によって産生される抗体の集団を提供し、ここで、集団のメンバーは、少なくとも2つの種類の異なる抗原を結合する。

【0020】

別の態様において、本発明は、グルコース、ガラクトース、マンノース、およびグルコサミンからなる群から選択される1つ以上の糖部分のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを有するN連結型グリカンを産生する修飾された宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、ガラクトースレベルの減少によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、D - グルコサミンのレベルの減少によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、マンノースのレベルの増加によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、グルコースのレベルの増加によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、対応する修飾されていない宿主細胞のADCC活性と比べて高いADCC活性を呈する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、対応する修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、FcRIIA受容体に対する高い結合親和性を有する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、NS0、SP2/0、HEK293、PER.C6、およびYB2/0細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞はミエローマ細胞である。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、少なくともおよそ60回の継代後に変異体グリコシル化パターンを維持する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、無血清培地において増殖する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、懸濁液において増殖する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、異種性の糖タンパク質をコードする異種性の配列を含む。

20

30

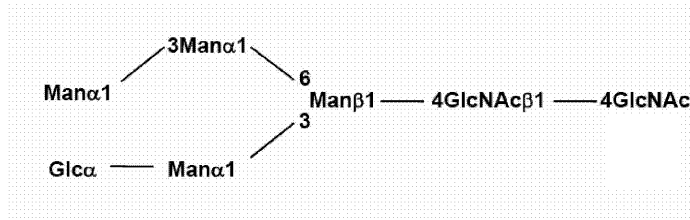
【0021】

さらに別の態様において、本発明は、N連結型グリカンの実質的に均質なパターンを呈する糖タンパク質を産生する単離された宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンの実質的に均質なパターンは、質量分析によって分離される単一ピークによって立証される。いくつかの実施形態において、N連結型パターンは、フコース部分が右から最初の4GlcNAcに任意に連結することができる式IまたはIIの構造

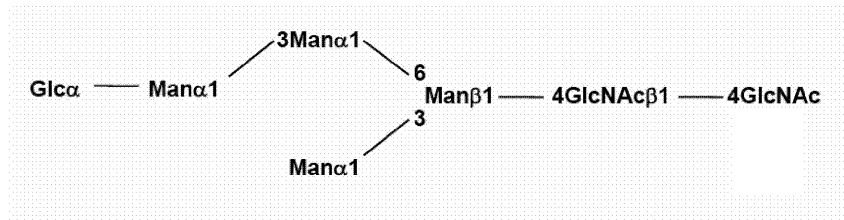
40

:

【化 2】



(I)



(I I)

10

を有する。

【 0 0 2 2 】

さらに別の態様において、修飾された宿主細胞は、異種性の配列を含んでもよく、ここで、異種性の配列は、抗体または酵素などの異種性の糖タンパク質をコードしてもよい。本明細書で開示されるように、修飾された糖タンパク質をコードする異種性のポリヌクレオチド配列を提供すること；および修飾された糖タンパク質を、修飾された宿主細胞において発現させることを含む修飾された糖タンパク質を産生する方法も提供される。このように、また、修飾されていない親宿主細胞によって産生されるなどの対応する野生型糖タンパク質と比較して、少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを呈する異種性の配列によってコードされる異種性の糖タンパク質などの糖タンパク質も提供される。変異体グリコシル化パターンは、N連結型オリゴ糖のレベルの変化によって立証することができる。異種性の糖タンパク質は、修飾されていない親宿主細胞によって産生される対応する野生型糖タンパク質と比較して、低いレベルまたは高いレベルのグルコース、ガラクトース、フコース、マンノース、および/またはN-アセチルグルコサミンの含有量を呈してもよい。N-アセチルグルコサミンは、連結型または連結型のN-アセチルグルコサミンであってもよい。

20

30

【 0 0 2 3 】

一態様において、糖タンパク質は、抗体または抗体断片である。抗体は、癌抗原を結合してもよい。例えば、抗原は、HER2、CD20、EGF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体、EpCam、CD3、CD4、CD19、CD30、CD33、CD40、CD51、CD55、CD80、CD95、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、葉酸受容体、CXCR4、インスリン様増殖因子受容体、およびインテグリンファミリーのメンバーからなる群から選択してもよい。また、抗体は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対抗する抗体と比較して高い抗体依存性細胞傷害(ADCC)も呈してもよい。さらにその上、抗体には、IgG抗体を含んでもよい。本明細書で開示されるように、また抗体は、修飾されていない親宿主細胞によって産生されるなどの対応する野生型抗体と比較して少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを呈してもよい。糖分子は、抗体のFc領域を通じて結合してもよい。

40

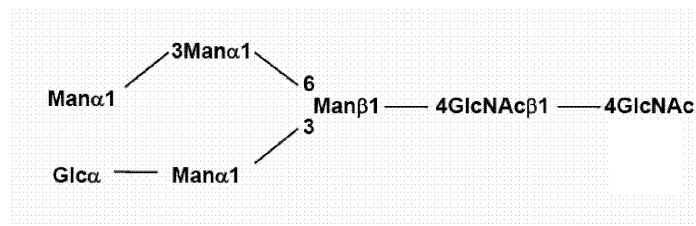
【 0 0 2 4 】

別の態様において、本発明は、1つのグルコース分子、4つのマンノース分子、および2つのN-アセチルグルコサミン分子を含むN連結型グリカンを提供する。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、1つ以上のフコース分子を含む。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、フコース部分が右から最初の4GlcNAcに任意

50

に連結することができる式 (I) の構造を有する。

【化 3】

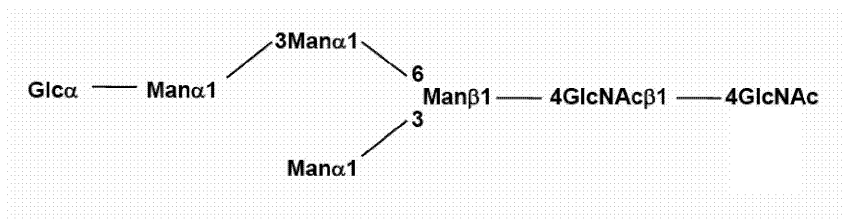


(I)

いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、フコース部分が右から最初の 4 G l c N A c に任意に連結することができる式 (I I) の構造を有する。

10

【化 4】



(I I)

20

【 0 0 2 5 】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示された N - グリカンを含む単離された糖タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、糖タンパク質は抗体である。いくつかの実施形態において、糖タンパク質は酵素である。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、抗体の F c 領域に結合している。いくつかの実施形態において、抗体は癌抗原に結合する。いくつかの実施形態において、癌抗原は、HER 2、免疫グロブリン F c 受容体 I I、A l k - 1、C D 2 0、E G F 受容体、V E G F 受容体、F G F 受容体、N G F 受容体、P D G F 受容体、E p C a m、C D 3、C D 4、C D 1 1 a、C D 1 9、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 4 0、C D 5 1、C D 5 5、C D 8 0、C D 9 5、C C R 2、C C R 3、C C R 4、C C R 5、C T L A - 4、ムチン 1、ムチン 1 6、エンドグリン、メソテリン受容体、ノゴ受容体、葉酸受容体、C X C R 4、インスリン様増殖因子受容体、ガングリオシド G D 3、ならびに および インテグリンからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗体は、実質的に均質な集団の N 連結型グリカンを産生する修飾された宿主細胞によって産生される。いくつかの実施形態において、抗体は、修飾されていない C H O 細胞クローンである C H O - K 1 (A T C C # C C L - 6 1 および C R L - 9 6 1 8) または C H O - D G 4 4 (I n v i t r o g e n # 1 2 6 0 9 - 0 1 2) によって産生される対応する抗体と比較して、高い A D C C (抗体依存性細胞傷害) を有する。いくつかの実施形態において、抗体は、修飾されていない C H O 細胞クローンである C H O - K 1 (A T C C # C C L - 6 1 および C R L - 9 6 1 8) または C H O - D G 4 4 (I n v i t r o g e n # 1 2 6 0 9 - 0 1 2) によって産生される対応する抗体と比較して、F c R I I I A 受容体に対する高い結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、抗体は、阻害性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、刺激性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、I g G 抗体である。

30

40

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、N連結型グリカンの実質的に均質なパターンを呈する糖タンパク質を産生する宿主細胞は、非リンパ球性細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は C H O 細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、N連結型グリカンの実質的に均質なパターンを呈する抗体を産生する。

【 0 0 2 7 】

50

さらに別の態様において、本発明は、(a) 修飾された糖タンパク質をコードする異種性のポリヌクレオチド配列を提供すること；および(b) 本明細書で開示された宿主細胞において、修飾された糖タンパク質を発現させることを含む、修飾された糖タンパク質を産生する方法を提供する。いくつかの実施形態において、修飾された糖タンパク質は、宿主細胞によって分泌される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、無血清培地において維持される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、懸濁培養において維持される。いくつかの実施形態において、修飾された糖タンパク質は抗体である。

【0028】

また、本明細書で開示された宿主細胞を含む培地も、本発明において提供される。いくつかの実施形態において、培地は無血清である。また、本発明は、変異体グリコシル化パターンを有するN-グリカンをも、または、培地においてN-グリカンの実質的に均質なパターンを呈する糖タンパク質を産生する複数の宿主細胞を含む培養発酵槽も開示する。

10

【0029】

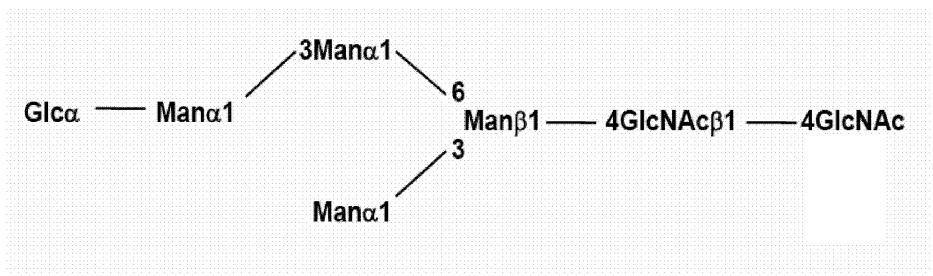
別の態様において、本発明は、N連結型グリカンを含む、修飾された宿主細胞によって産生される抗体を提供し、ここで、抗体は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc 受容体 I I I a (Fc R I I I a) に対する高い結合親和性、および/またはFc 受容体 I I b (Fc R I I b) に対する低い結合親和性を有し、それによりFc R I I I a および/またはFc R I I b を発現するエフェクター細胞に対するADCC (抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用) 活性を高める。別の態様において、本発明は、N連結型グリカンを含む、修飾された宿主細胞によって産生される抗体を提供し、ここで、抗体は、対応する修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、高いADCC活性を呈し、かつ高いADCC活性は、高親和性Fc 受容体であるFc R I I I a 158V/Vを発現するエフェクター細胞、および低親和性Fc 受容体であるFc R I I I a 158F/FまたはFc R I I I a 158F/Vを発現するエフェクター細胞に対してである。

20

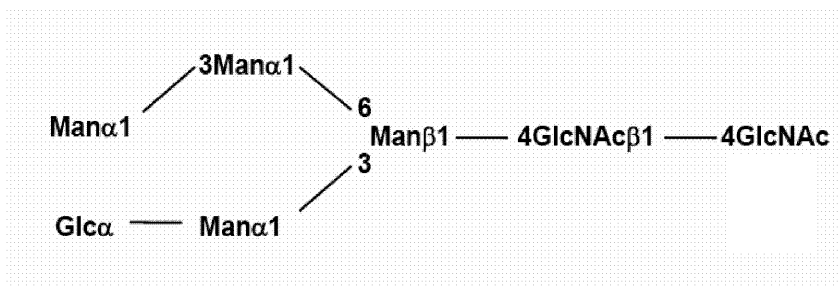
【0030】

本発明の抗体に関するいくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、1つのグルコース分子、4つのマンノース分子、および2つのN-アセチルグリコサミン分子を含む。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、1つ以上のフコース分子を含む。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、フコース部分が右から最初の4GlcNAcに任意に連結することのできる式(I)または(II)の構造を有する。

30



40



(I I)

50

【0031】

いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、抗体のFc領域に結合する。いくつかの実施形態において、抗体は癌抗原に結合する。癌抗原には、HER2、免疫グロブリンFc受容体II、Alk-1、CD20、EGF受容体、VEGF受容体、FGF受容体、NGF受容体、PDGF受容体、EpCam、CD3、CD4、CD11a、CD19、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD51、CD55、CD80、CD95、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CTLA-4、ムチン1、ムチン16、エンドグリン、メソテリン受容体、ノゴ受容体、葉酸受容体、CXCR4、インスリン様増殖因子受容体、ガングリオシドGD3、ならびに および インテグリンを含むことができるが、これらに限定されるわけではない。本発明の抗体は、阻害性抗体または刺激性抗体であり得る。いくつかの実施形態において、抗体はIgG抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、修飾されていないCHO細胞クローンであるCHO-K1(ATCC # CCL-61およびCRL-9618)またはCHO-DG44(Invitrogen # 12609-012)によって産生される対応する抗体と比較して、低親和性FcRであるFcRIIIa 158F/FまたはFcRIIIa 158F/Vを発現するエフェクター細胞に対して高いADCC(抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用)活性を有する。いくつかの実施形態において、抗体は、修飾されていないCHO細胞クローンであるCHO-K1(ATCC # CCL-61およびCRL-9618)またはCHO-DG44(Invitrogen # 12609-012)によって産生される対応する抗体と比較して、高親和性FcRであるFcRIIIa 158V/Vを発現するエフェクター細胞に対して高いADCC(抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用)を有する。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。宿主細胞には、NS0、SP2/0、HEK293、PER.C6、およびYB2/0細胞を含むことができるが、これらに限定されるわけではない。また、宿主細胞は、ミエローマ細胞でもあり得る。いくつかの実施形態において、エフェクター細胞は、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)である。いくつかの実施形態において、エフェクター細胞は、NK細胞、単球、マクロファージ、または多形核ニュートロフィルス(neutrophils)(PMN)である。

【0032】

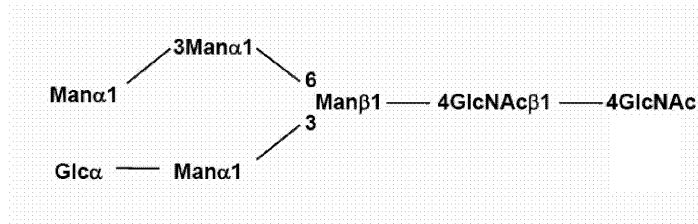
別の態様において、本発明は、N連結型グリカンを有する修飾された抗体を産生する能力によって特徴づけられる修飾された宿主細胞を提供し、ここで、抗体は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc受容体IIIIa(FcRIIIa)に対する高い結合親和性を呈し、それにより、FcRIIIaおよび/またはFcRIIIbを発現するエフェクター細胞に対するADCC(抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用)活性を高める。さらに別の態様において、本発明は、N連結型グリカンを有する修飾された抗体を産生する能力によって特徴づけられる修飾された宿主細胞を提供し、ここで、抗体は、対応する修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して高いADCC活性を呈し、かつ高いADCC活性は、高親和性Fc受容体であるFcRIIIa 158V/Vを発現するエフェクター細胞、および低親和性Fc受容体であるFcIIIIa 158F/FまたはFcRIIIa 158F/Vを発現するエフェクター細胞に対してである。

【0033】

本発明の修飾された宿主細胞に関するいくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、グルコース、ガラクトース、マンノース、およびグルコサミンからなる群から選択される1つ以上の糖部分のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを呈する。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、ガラクトースのレベルの減少によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、D-グルコサミンのレベルの減少によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、マンノースのレベルの増加によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、変異体グリコシル化パターンは、グル

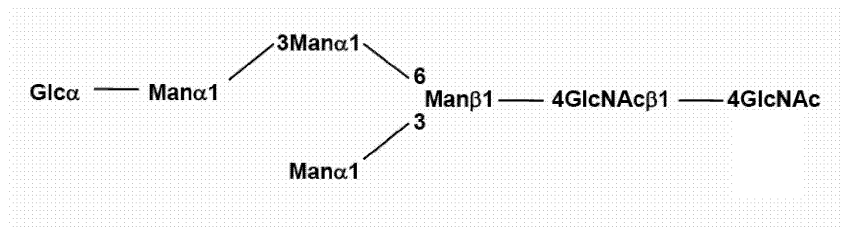
コースのレベルの増加によって特徴づけられる。いくつかの実施形態において、N連結型グリカンは、フコース部分が、右から最初の4GlcNAcに任意に連結することのできる式IまたはIIの構造：

【化6】



(I)

10



(II)

20

を有する。

【0034】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、対応する修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、高親和性Fc受容体であるFcRIIIa158V/Vを発現するエフェクター細胞に対して高いADCC活性を、および低親和性Fc受容体であるFcRIIIa158F/FまたはFcRIIIa158F/Vを発現する細胞に対して高いADCC活性を呈する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc受容体IIa (FcRIIa) に対する高い結合親和性を、および/またはFc受容体IIb (FcRIIb) に対する低い結合親和性を呈する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、抗体は、癌抗原に結合する。癌抗原には、HER2、免疫グロブリンFc受容体II、Alk-1、CD20、EGF受容体、VEGF受容体、FGF受容体、NGF受容体、PDGF受容体、Epcam、CD3、CD4、CD11a、CD19、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD51、CD55、CD80、CD95、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CTLA-4、ムチン1、ムチン16、エンドグリン、メソテリン受容体、ノゴ受容体、葉酸受容体、CXCR4、インスリン様増殖因子受容体、ガングリオシドGD3、ならびにおよびインテグリンを含むことができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。宿主細胞には、NS0、SP2/0、HEK293、PER.C6、およびYB2/0細胞を含むことができるが、これらに限定されない。また、宿主細胞はミエローマ細胞でもあり得る。いくつかの実施形態において、細胞は、少なくともおよそ60回の継代後に変異体グリコシル化パターンを維持する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、無血清培地において増殖する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、懸濁液において増殖する。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、異種性の糖タンパク質をコードする異種性の配列を含む。

30

40

【0035】

また、障害を予防または治療することを必要とする対象に、本明細書に開示された有効量の対象抗体を投与することを含む方法も本発明によって提供される。いくつかの実施形

50

態において、障害は、癌、アレルギー、心血管疾患、炎症性疾患、代謝性疾患、神経学的疾患、ウイルス感染、および/または細菌感染からなる群から選択される。例えば、障害は、癌またはアレルギーであり得る。いくつかの実施形態において、対象は哺乳類、例えばヒトである。いくつかの実施形態において、対象抗体の投与は、非経口注射、注入、経口投与、または吸入を介する。また、本発明は、(a)修飾された抗体をコードする異種性のポリヌクレオチド配列を提供すること；および(b)本明細書に開示された対象宿主細胞において、修飾された抗体を発現させることを含む、修飾された抗体を産生する方法も提供する。いくつかの実施形態において、修飾された抗体は、宿主細胞によって分泌される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、無血清培地において維持される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、懸濁培養において維持される。また、本発明は、対象宿主細胞を含む培地、および培地における複数の対象宿主細胞を含む培養発酵槽も包含する。いくつかの実施形態において、培地は無血清である。

10

【0036】

本出願において言及されるすべての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が、参照により組み込まれるよう具体的かつ個々に示されているかのような場合と同一の程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

本開示の新規の特徴は、付属の特許請求の範囲において特に示される。本開示の特徴および利点をより良好に理解することは、実例となる実施形態を示す下記の詳細な説明に対する参照により得られるであろうし、実施形態において、本開示の原理が利用され、それに付随する図は下記である：

20

【0038】

【図1】化学物質誘発性無作為突然変異誘発後に低フコースを有するCHO-K1細胞を濃縮する戦略の模式図である。CHO-K1細胞は、無作為突然変異誘発を誘導するよう化学物質で処理される。フコシル化を抑制する突然変異を生じる機会は稀なので、LCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンを用いることによって高フコースを有する細胞を枯渇させる独特な過程を用いる。これら2つの試薬をまず混合して、ビオチン-ストレプトアビジン複合体含有培地を形成する。化学物質誘発性突然変異誘発後に、複合体を細胞に添加した。高フコースを有する細胞の表面に結合するLCAは、細胞膜にきわめて近接してサポリンをもたらすであろうし、その結果、細胞を死滅させる。

30

【図2】化学物質誘発性無作為突然変異誘発後に低フコースCHO-K1突然変異株細胞を選択する流れ図である。

【図3】高フコースを有するCHO-K1細胞を死滅させるためのLCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-毒素の至適濃度の決定を示すグラフである。1ウェルあたり 10^5 個のCHO-K1細胞を96ウェルプレートに播種した。LCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンを、示されるように異なる濃度で培地において混合し、細胞に添加した。10日後にMTTアッセイによって細胞増殖を測定した。毒素を有さない培地中で増殖した細胞を対照として用いた。

【図4】LCA/毒素選択が、化学物質誘発性無作為突然変異誘発後の低フコースを有する細胞集団を徐々に濃縮することを示す。A)CHO-K1細胞において無作為突然変異をICR-191によって導入し、細胞をLCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンで70日間処理した。細胞のフコシル化状態を、FITC抱合したLCAによる標識および蛍光標示式細胞分取器分析によって毎週調べた。親CHO-K1細胞をポジティブコントロールとして用いた。B)メタンスルホン酸エチル(EMS)を用いて、CHO-K1細胞における無作為突然変異誘発を誘導した。選択およびフコシル化のモニタリングは、A)において説明したとおりであった。

40

【図5】LCA/毒素耐性細胞における低フコース内容が遺伝子レベルで安定していることを図示するグラフを示す。低フコシル化を伴うクローンのうちの1つを増殖させ、LCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンを含まない培地において3ヶ月間増殖

50

させおよび拡張した。細胞のフコシル化状態を、F I T Cを抱合したL C Aによる標識および蛍光標示式細胞分取器分析によって毎週調べた。

【図6】低L C Aを結合する突然変異株C H O - K 1細胞のN - グリカン特性を示す。L C A - ビオチンおよびストレプトアビジン - サポリン選択後の安定した細胞集団を、F I T C抱合したレクチン(L C A、W G A、C o n A、およびG S - I I)で標識し、蛍光標示式細胞分取器によって分析した。クローンのうちの1つの特性を示す。

【図7】懸濁液における無血清培地に適応させた突然変異株C H O - K 1クローンのうちの1つのN - グリカン特性を図示する。突然変異株クローンを、限定希釈による単一細胞クローニングによって単離した。クローンを無血清懸濁液に適応させ、突然変異株クローンをF I T C抱合したレクチンで標識し(L C A、W G A、C o n A、およびG S - I I)、F A C Sによって分析した。クローンのうちの1つの特性を示す。

【図8】F u t 8の発現が、突然変異株C H O - K 1クローンにおいて変化しないことを図示する。

【図9】懸濁液における無血清培地において増殖した突然変異株クローンによって産生した抗体の独特なN - グリカン特性を示す。発現した抗体E T 1 0 1をS D S - P A G Eゲルによって分離し、A)クマシーブルーで染色し、またはB)ニトロセルロースメンブレンに転移して、ビオチンと抱合したL C A、W G A、C o n A、およびG S - I Iでプロットティングした後、H R P抱合したストレプトアビジンとともにインキュベートした。

【図10A】懸濁液における無血清培地において増殖するのに適応した突然変異株クローンによって産生される抗体における単糖類組成物の独特な特性を示す。A)親C H O細胞、突然変異株C H O - I E 5クローン、突然変異株C H O - 3 Fクローン、または突然変異株C H O - 2 . 6クローンによって産生される抗体E T 1 0 1における単糖類の定量。すべてのC H Oクローンは、懸濁液において培養される無血清培地に適応していた。

【図10B】B)親C H O細胞、突然変異株C H O - 1 E 5クローン、突然変異株C H O - 3 Fクローン、または突然変異株C H O - 2 . 6クローンによって産生されるヒトI g G 1 (E T 1 0 1およびE T 2 0 1)の単糖類組成。

【図10C】C)Y a m a n e - O h n u k i e t a l . , B i o t e c h n o l . B i o g e n g . 8 7 : 6 1 4 - 6 2 2 (2 0 0 4)由来のF u t 8 - / - ノックアウトC H O細胞によって産生されるヒトI g G 1の単糖類組成分析。

【図11】血清含有培地において増殖した突然変異株細胞集団によって産生されるE r b B 2を遮断するヒトI g G 1 (E t 1 0 1)によって示される高いA D C C活性を図示する。A)10%F B Sを含む1mLの培養上清由来の発現した抗体E T 1 0 1を、タンパク質Lビーズによって沈殿させ、還元型S D S - P A G Eゲルによって分離し、クマシーブルーで染色した。空の増殖培地をネガティブコントロールとして用いた。B)S K B R 3細胞を用いたA D C Cアッセイにおける突然変異株クローン(I R C 2 . 2)または野生型C H O(親)において発現したE T 1 0 1抗体。

【図12】グラフにおいてE T 1 0 1と示される親細胞株によって産生されるヒトI g G 1 (E T 1 0 1)と比較して、E T 1 0 1 - 1 E 5と示され無血清培地に適応したC H O - K 1細胞クローンによって産生されるE r b B 2遮断抗体であるE T 1 0 1による、癌細胞株S K O V 3およびM D A - M B - 2 3 1に対する高いA D C C活性を図示する。

【図13】野生型C H O株(C H O)によって産生されるE T 1 0 1と比較して、無結成培地に適応した複数の個々の突然変異株C H O - K 1細胞クローン(I E 5、2 . 6、および3 F)によって産生されるE r b B 2遮断抗体であるヒトI g G 1 (E T 1 0 1)による、細胞株S K O V 3およびM D A - M B - 2 3 1に対する高いA D C C活性を図示する。P B Sまたは非特異的抗体をネガティブコントロールとして用いた。

【図14】E G F Rを標的とする別の遮断抗体であるヒトI g G 1 (E T 2 0 1)による高いA D C C活性癌細胞株A 5 4 9を図示する。野生型のC H O株(C H O)によって産生されるE T 2 0 1と比較して、無結成培地に適応した2つの個々の突然変異株C H O - K 1細胞クローン(I E 5および3 F)によって産生されるE T 2 0 1を図示する。P B Sまたは非特異的抗体をネガティブコントロールとして用いた。

10

20

30

40

50

【図15】図15 aおよびbは、CHO - 1 E 5として示される、本発明の修飾された宿主相棒によって合成されるN連結型オリゴ糖の組成および構造の模式図を表す。

【図16】無血清懸濁液における野生型CHO親宿主細胞（上部パネル）およびCHO - 1 E 5細胞（中央パネル）および対応する単糖類標準物質（下部パネル）によって産生される抗体における単糖類の特性を示す。

【図17】野生型親CHO細胞（上部パネル）およびCHO - 1 E 5細胞（下部パネル）によって産生される抗体由来のN連結型オリゴ糖のMALDI - TOF MSスペクトルを示す。

【図18】野生型親CHO細胞（上部パネル）およびCHO - 1 E 5細胞（下部パネル）によって産生される抗体から放出されるN連結型グリカンの溶出特性を示す。本結果は、CHO - 1 E 5細胞によって産生される抗体が、野生型CHO細胞によって産生される抗体における混合型集団と比較して、単一集団のN連結型オリゴ糖を有することを示す。N - グリカンは、PNGase Fを用いて200 μgの抗体を37 °Cで72時間消化することによって放出された。タンパク質を70%エタノールによって-20 °Cで一晩沈殿させ、遠心分離によって除去した。上清を真空下で乾燥させ、200 μLの脱イオン水に再懸濁した。C18、AG50WX8、およびAG4x4でパックしたマイクロカラムに試料をロードした。次に、カラムを300 μLの脱イオン水で洗浄した。溶出物を回収し、オリゴ糖をPA200カラムおよびDionex ICS - 3000によって分析した。

【図19】CHO - 1 E 5によって産生されるオリゴ糖の組成および推定構造を示す。19 A . CHO - 1 E 5によって産生されるN - グリカンの単糖類組成を、図16および図17において説明したとおり、PA1カラム/Dionex ICS - 3000システムおよびMALDI - TOF MSによって決定した。19 B . N - グリカンの推定構造を、単糖類分析およびMALDI - TOF MSの結果から推定した。

【図20】1, 2, 3マンノシダーゼの消化を通じてCHO - 1 E 5によって産生されたオリゴ糖の構造決定を示す。CHO - 1 E 5および親宿主細胞によって合成された抗体(ET101)を1, 2, 3マンノシダーゼとともに37 °Cで24時間インキュベートした。抗体および酵素を除去するために、消化した抗体溶液をまずMicroCon YM10 (Millipore, Billerica, MA)に、次いでMicroCon YM100 (Millipore, Billerica, MA)に通過させた。試料をPA1カラム/Dionex ICS - 3000システムによって分析した。A . 親宿主細胞の試料由来のN - グリカンの1, 2, 3マンノシダーゼ消化部位。バンドC . 親宿主細胞の試料から18 mM NaOH (B)によっておよび90 mM NaOH (C)によって溶出したサッカリド特性。DおよびE . CHO - 1 E 5の試料から18 mM NaOH (D)によっておよび90 mM NaOH (E)によって溶出したサッカリド特性。FおよびG . CHO - 1 E 5によって合成されたN - グリカンの構造を分析によって推定する。

【図21】還元条件下で野生型親CHO細胞およびCHO - 1 E 5細胞によって産生される抗体重鎖（およそ50 KD）および軽鎖（およそ25 KD）に相当するバンド、ならびに非還元条件下で野生型親CHO細胞およびCHO - 1 E 5細胞によって産生される抗体（およそ150 KD）に相当するバンドを示す電気泳動ゲルの複写物である。本結果は、グリコシル化パターンを呈するオリゴ糖が、CHO - 1 E 5細胞によって産生される抗体のタンパク質構造および構築を変化させないことを示す。

【図22 A】CHO - 1 E 5細胞によって産生されるグリコシル化パターンを呈する抗体による高いADCC活性を示す細胞溶解アッセイの結果を示す。8 A . 無血清培地に適応したCHO - 1 E 5細胞クローンによって産生されるErbb2遮断抗体であるヒトIgG1 (ET101)による複数の癌細胞株(SKOV3およびMDA - MB - 231)に対する高いADCC活性。CHO - 1 E 5細胞において発現したET101抗体を培養上清から、プロテインAクロマトグラフィーによって精製し；およびUV280によって定量した。親ET101を野生型CHO細胞において発現させ、同じ方法で精製した。ADCCアッセイについて、100 μLの標的細胞懸濁液を、発現したErbb2を遮断する

10

20

30

40

50

50 μ Lの抗体ET101とともに、96ウェルプレートにおいて37℃で30分間プレインキュベートした。次に、50 μ LのPBMCを20:1のエフェクター/標的細胞比で添加した。16時間インキュベートした後、プレートを遠心沈殿させ、50 μ Lの無細胞上清を新しいプレートに移した。Cytotox96非放射性細胞傷害アッセイ(Promega, Madison, WI)によって、放出されたLDHを測定した。細胞溶解を式 $(E - S) / (M - S)$ (E:実験による放出、S:自発的放出、M:最大放出)によって算出した。PBSまたは非特異的抗体をネガティブコントロールとして用いた。8B:無血清培地に適応したCHO-1E5細胞クローンによって産生されたEGFR遮断抗体である人IgG1(ET201)による肺癌細胞株(A549)に対する高いADCC活性。CHO-1E5細胞において発現したET201抗体を、プロテインAクロマトグラフィーによって培養上清から精製し; UV280によって定量した。

【図22B】同上。

【図23】抗体/Fc受容体の結合親和性の結果を示す。本結果は、CHO-1E5細胞によって呈されるN-グリカンが、FcRIIIA受容体に対する抗体結合を改善することを示す。抗体をまずビオチン化し、ストレプトアビジン被覆したバイオセンサー(ForteBio, Menlo Park, CA)にロードした。組換えFcRIおよびFcRIIIbタンパク質を、100~400 nM(R&D Systems, Minneapolis, MN)の濃度で懸濁した。ForteBioの標準的な動力学的プロトコールにしたがって、結合親和性(K_D , nM)を評価した。

【図24】CHO-1E5細胞によって産生された抗体のインビボでの薬物動態特性を示す。本結果は、CHO-1E5細胞によって産生された抗体の薬物動態が、野生型親CHO細胞によって産生される薬物動態と実質的に同一であることを示す。

【図25】1, 2, 3マンノシダーゼおよび1, 2, 3, 6マンノシダーゼの消化を通じてCHO-1E5によって産生されるオリゴ糖の構造決定を示す。(A)1E5細胞の試料からの18 mM NaOHおよびN-グリカンの1, 2, 3マンノシダーゼ消化部位によって溶出されたサッカリドまたはポジティブコントロール(B)。(C)1E5細胞の試料から18 mM NaOHおよびN-グリカンの1, 2, 3, 6マンノシダーゼ消化部位によって溶出されたサッカリドまたはポジティブコントロール(D)。

【図26a】種々のFcRIIIa受容体に対する抗体結合親和性を決定するための細胞溶解アッセイを示す。図26aは、低結合親和性FcRIIIa 158F/Fを発現するヒトPBMCをエフェクター細胞として用いた場合、独特なグリコシル化をともなう抗体は、高いADCC活性を有することを示す。

【図26b】図26bは、高親和性FcRIIIa 158V/Vを発現するヒトPBMCへの、独特なグリコシル化をともなう抗体の結合を示す。

【図27】親CHO細胞によって産生される抗体およびN-グリカンの独特な構造を有する抗体のヒトFcRに対する結合親和性のフローサイトメトリー測定結果を示す。図27Aは、N-グリカンの独特な構造が、活性化しているFcRIIIa受容体への結合親和性を改善することを示し、図27Bは、N-グリカンの独特な構造をともなう抗体が、阻害性受容体FcRIIIbへの結合親和性を減少させることを示す。

【図28】CHO-K1-1E5によって産生される抗体が、阻害性受容体FcRIIIbへの低い結合親和性を有し、かつ活性化している受容体FcRIIIaへの高い結合親和性を有することを示す。外来性FcR受容体を安定して発現するCHO-K1細胞は、20 mM EDTA/PBSによって脱着され、単一の細胞へと分散した。CHO(CHO-ET101)またはCHO-K1-1E5(CHO-1E5-ET101)によって産生したビオチン化抗体とともに、細胞を氷上で1時間インキュベートした。PBSを用いて洗浄した後、細胞をストレプトアビジン-FITCとともにインキュベートし、FACS分析によって分析した。蛍光強度の幾何平均を獲得してプロットした。

【図29】与えられた抗体(例えば、CHO-1E5クローンによって産生された抗体)の免疫原性またはその欠失が、霊長類などの試験動物において評価される実験手順を示す。A)雌のカニクイザルは、野生型CHO細胞によって産生された抗体ET101、また

10

20

30

40

50

はCHO-1E5細胞によって産生されたET101抗体を8mg/mL/kgの用量で受容する。0.5mLの血液を注射7日前に、および注射3、5、7、14、21、28、35日後に採取する。血清試料を単離し、-80で凍結させる。ELISAアッセイを用いて、カニクイザルにおけるET101-CHO-1E5抗体の免疫原性を決定する。本アッセイは、投与されたET-101抗体に特異的なサル血清におけるIgMの存在を検出する。ELISAプレートにET101-CHO抗体またはET101-CHO-1E5抗体を被覆する。単離された異なる希釈のサル血清試料をプレートに適用して、被覆した標的抗体に結合させる。結合したIgMを抗IgM二次抗体によって検出する。C)期待されたELISA結果は、ET101-CHOとET101-CHO-1E5の間に免疫原性(サル血清におけるET101特異的IgMレベル)に何ら有意差を示さない。

10

【発明を実施するための形態】

【0039】

本開示の組成物および方法は、変異体グリコシル化パターンを有するよう修飾された細胞株を提供する。このような細胞株を用いて、高い抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性などの高いエフェクター機能を有する抗体などのタンパク質を産生することができる。また、タンパク質は典型的に、変異体グリコシル化パターンも有する。

【0040】

宿主細胞

修飾されていない親宿主細胞と比較して変異体グリコシル化パターンを生じるよう、本開示の宿主細胞を修飾する。宿主細胞には、個々の細胞、細胞培養物、および/または細胞株を含む。宿主細胞には、単一の宿主細胞の後代を含む。宿主細胞には、本開示の異種性配列をトランスフェクトすることができる。宿主細胞は、グリコシル化することのできる細菌細胞、真菌細胞、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、およびこれらの類似物などの原核細胞または真核細胞であり得る。

20

【0041】

細菌宿主細胞の例には、エシェリキア属、セラチア属、バチルス属、プレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属、およびこれらの類似のものに属する微生物を含む。例えば、細菌宿主細胞には、大腸菌XL1-Blue、XL2-Blue、DH1、MC1000、KY3276、W1485、JM109、HB101、No.49、iW3110、NY49、G1698、またはTB1を含んでもよいが、これらに限定されない。他の細菌宿主細胞には、セラチア・フィカリア、セラチア・フォンティコーラ、セラチア・リクファシエンス、霊菌、枯草菌、バチルス・アミロリクエファシエンス、プレバクテリウム・アンモニアゲネス、プレバクテリウム・イマリオフィラム(immariphilum)ATCC14068、プレバクテリウム・サッカロリチカム(saccharolyticum)ATCC14066、プレバクテリウム・フラバムATCC14067、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム(lactofermentum)ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム(aceoacidophilum)ATCC13870、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム(ammoniophilum)ATCC15354、シュードモナス・プチダ、シュードモナス菌種D-0110、およびこれらの類似のものを含んでもよいが、それらに限定されない。

30

40

【0042】

酵母宿主細胞には、出芽酵母、分裂酵母、キラー酵母、トリコスポロン・プルランス(pullulans)、シュワニオミケス・アルビウス(Schwanniomyces alluvius)、カンジダ・ウルティス(Candida utilis)、およびこれらの類似のものなどなど、サッカロミケス属、シキゾサッカロミケス属、クレイベロミケス(Kluyveromyces)属、トリコスポロン属、シュワニオミケス(Schwanniomyces)属、ピキア属、カンジダ属、およびこれらの類似のものに

50

属する微生物を含んでもよい。

【0043】

真核細胞の他の例には、哺乳類細胞などの動物細胞を含む。例えば、宿主細胞には好ましくは、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または、COS細胞などのサル細胞を含むが、これらに限定されない。CHO細胞には、CHO/dhfr細胞またはCHO/DG44細胞を含んでもよいが、これらに限定されない。チャニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞には、チャニーズハムスター(Chinese hamster)(チャニーズハムスター(cricetulus griseus))の卵巣組織から確立された細胞株である任意の細胞を含む。例には、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (pp. 883 - 900); およびこれらの類似のものなどの文書において説明されたCHO細胞を含む。加えてまた、ATCC(米国培養細胞系統保存機関)に登録されたCHO-K1(ATCC CCL-61)、DUXB11(ATCC CCL-9096)、およびPro-5(ATCC CCL-1781)ならびに市販のCHO-S(Life Technologies, カタログ番号11619)または種々の培地を用いて細胞株を適応させることによって得られるサブ細胞株も例示することができる。

10

20

30

【0044】

代替的な実施形態において、親細胞株は、B細胞株などのリンパ球系細胞株に由来する。宿主細胞は、ハイブリドーマ作製において用いられる細胞株に由来してもよい。細胞株は、MOPC-21、MPC-11、NS0、SP-2、Sp2/0、S194、およびX63-Ag8-653細胞などだがこれらに限定されないマウスミエローマ株; Namalwa、Karpas 707H、RPMI 8226、8226 AR/NIP4-1、KM-2R、およびU-266などだがこれらに限定されないヒトミエローマ細胞株; またはYB2/0、YB2/3.0.Ag.20、Y3-Ag1.2.3、IR983Fなどだがこれらに限定されないラットミエローマ細胞株などに由来するミエローマ細胞であり得る。また、HeLa、HEK-293、NIH3T3、COS、CHO、NSO、PER.C6、K562、L1.2、JY、BHK、K562、293F、3T3、およびJurkatなどの細胞株も、本開示において使用してもよい。例えば、いくつかの実施形態において、宿主細胞は、CHO-1E5、CHO-3F、またはCHO-2.6のクローンである。

40

【0045】

昆虫宿主細胞の例には、Sf9およびSf21などのヨトウガ卵巣細胞(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)); High 5(Invitrogenにより製造)などのイラクサキンウワバ卵巣細胞; およびこれらの類似のものを含む。植物宿主細胞の例には、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、ナタネ、アルファルファ、コメ、コムギ、オオムギ、およびこれらの類似のものの植物細胞を含む。

【0046】

本開示の修飾された宿主細胞は、培養物において、および発酵槽を含む培養物を増殖させるのに用いられてもよい任意の装置において増殖してもよい。これらは、単層として増殖してもよく、または表面に結合してもよい。あるいは、宿主細胞は、懸濁液において増

50

殖してもよい。細胞は、無血清である培地において増殖することができる。培地は、8 mM L - グルタミンなどのグルタミンを補充した Opti - CHO (Invitrogen , カタログ番号 12681) などだがそれに限定されない市販の培地であり得る。修飾された宿主細胞は、培養における何回もの継代についてその変異体グリコシル化パターンを維持することができる。例えば、修飾された宿主細胞は、少なくともおよそ 20、30、40、または 50 回の継代後にその変異体グリコシル化パターンを維持することができる。いくつかの実施形態において、修飾された宿主細胞は、少なくともおよそ 60 回の継代後にその変異体グリコシル化パターンを維持することができる。さらに他の実施形態において、修飾された宿主細胞は、少なくともおよそ 100、150、200、500、もしくは 1000 回またはそれより多くの継代後にその変異体グリコシル化パターンを維持することができる。

10

【0047】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は、非リンパ球系細胞である。リンパ球は、脊椎動物免疫系における白血球細胞の一種である。リンパ球には典型的に、T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー (NK) 細胞を含む。非リンパ球系細胞は、リンパ球ではない任意の種類を包含する。本発明の宿主細胞は、ヒト、マウス、ラット、果実、ハエ、虫 (worm)、酵母、および細菌からなる群から選択される種起源を有してもよい。宿主細胞は、血液、筋肉、神経、脳、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、食道、胃、腸、腎臓、精巣、卵巣、毛髪、皮膚、骨、乳房、子宮、膀胱、脊髄、または種々の種類の体液を含むがこれらに限定されない適切な組織に由来してもよい。N - グリカンを生産する宿主細胞は、胚期および成熟期を含む任意の発達段階に、ならびにエクトダーム性の (ectodermal)、中胚葉系、および外胚葉系起源などの発達起源に由来してもよい。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、CHO、NS0、SP2/0、HEK293、PER.C6、または YB2/0 細胞である。

20

【0048】

修飾された細胞株の作製

本開示は、変異体グリコシル化パターンを生じるよう修飾された宿主細胞を作製および選択するための方法を提供する。修飾されたグリコシル化パターンを用いて宿主細胞を選択する方法は、複数の宿主細胞を提供すること；無作為な遺伝子突然変異を複数の宿主細胞に導入すること；および無作為な遺伝子突然変異に供されなかった対応する親細胞と比較して少なくとも 1 種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを呈する少なくとも 1 つの細胞を複数の細胞から選択することを含む。宿主細胞は、CHO 細胞または YB2.0 細胞などの真核細胞を含む、本明細書に記載された任意のものであってもよい。

30

【0049】

遺伝子突然変異は、変異原によって誘導することができる。変異原は、遺伝子的媒介物、化学的媒介物、または放射線媒介物であってもよいが、これらに限定されない。例えば、変異原は、紫外線光、 γ 線、またはアルファ粒子などだがこれらに限定されないイオン化放射線であってもよい。他の変異原には、写し違いを生じることのできる塩基類似体；亜硝酸などの脱アミノ化剤、臭化エチジウムなどのインターカレート剤；プロモウラシルなどのアルキル化剤；トランスポゾン；天然および合成アルカロイド；臭素およびその誘導体；アジ化ナトリウム；ソラレン (例えば、紫外線照射と併用) を含んでもよいが、これらに限定されない。変異原は、ICR191、1, 2, 7, 8 - ジエポキシ - オクタン (DEO) またはメタンスルホン酸エチル (EMS) などだがこれらに限定されない化学的変異原であってもよい。異なる変異原は、宿主細胞に導入される場合、連続的または同時のいずれかで併用してもよい。

40

【0050】

方法には、図 1 および 2 に示される方法、または実施例 2 において説明される方法を含んでもよい。例えば、宿主細胞集団を修飾して変異体グリコシル化パターンを有する修飾された宿主細胞を獲得するために、化学的変異原などの 1 つ以上の変異原を細胞に適用し

50

て、無作為な遺伝子突然変異を生じることができる。化学物質誘発性の無作為な突然変異誘発は、フコシル化、マンノシル化、および/またはN-アセチルグルコサミン化などだがこれらに限定されない糖の生合成およびタンパク質のグリコシル化過程を制御または調節する遺伝子の突然変異をもたらすことができる。また、化学的変異原は、高フコシル化をとまなうものなど、特定のグリコシル化パターンを有する宿主細胞を選択的に死滅させてもよい。したがって、突然変異誘発後の低レベルのフコシル化をとまなう安定したクローンは、高フコシル化をとまなう細胞を特異的に標的とし除去するLCA毒素を用いて細胞を選択することによって、濃縮し単離することができる(図1および図2、実施例2参照)。変異体グリコシル化パターンを有するよう遺伝子修飾された宿主細胞は、無血清培地において維持され、懸濁液において増殖し、および/または発酵槽において増殖するよう選択することができる。また、修飾された宿主細胞は、収穫または収集することのできる糖タンパク質を産生してもよい。糖タンパク質は、本明細書においてさらに説明されるように、分泌され、変異体グリコシル化パターンを呈し、および/または治療用途を有してもよい。糖タンパク質は、本明細書でさらに説明されるように、異種性の配列によってコードされてもよく、および/または修飾されていない親宿主細胞において産生される対応する抗体と比較して高いADCC活性を有する抗体などの抗体であってもよい。

10

20

30

40

50

【0051】

親宿主細胞のグリコシル化パターンは、修飾された宿主細胞の変異体グリコシル化パターンと比較することができ、1種類以上の糖分子のレベルの変化によって立証することができる。例えば、変異体グリコシル化パターンは、以下にさらに説明されるように、フコシル化、マンノシル化、およびN-アセチルグルコサミン化からなる群から選択される少なくとも2種類のグリコシル化の変化によって特徴づけられることができる。さらにその上、変異体グリコシル化パターンは、グルコースの増加およびガラクトースの低下など、グルコースおよび/またはガラクトースのレベルの変化によって立証することができる。追加的な変法を下記のとおり説明する。

【0052】**グリコシル化パターン**

本開示の宿主細胞は、例えば、修飾されていない親宿主細胞と比較して宿主細胞の表面に存在する少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられる変異体グリコシル化パターンを生じるよう修飾される。また、本開示の宿主細胞を用いて、タンパク質または糖タンパク質を産生してもよい。タンパク質は、抗体または酵素であってもよく、治療薬として用いてもよい。さらにその上、糖タンパク質は分泌されてもよい。タンパク質は、変異体グリコシル化パターンを呈する修飾された宿主細胞への異種性配列の導入から産生されるタンパク質などの異種性タンパク質であってもよい。異種性手段は、比較されておりかつ核酸配列などのポリヌクレオチドまたはポリペプチドに適用することができる実体の残りとは遺伝子型的に異なる実体に由来しており、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

【0053】

本開示のタンパク質または糖タンパク質は、内在性または異種性であり得、変異体グリコシル化パターンを呈するよう修飾された宿主細胞において産生される。また、糖タンパク質は、対応する野生型糖タンパク質(例えば、修飾されていない宿主細胞において産生される糖タンパク質)と比較して、少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化を特徴としてもよい変異体グリコシル化パターンを呈してもよい。糖分子は糖タンパク質に直接的に(例えば、糖タンパク質にN連結またはO連結している。)または間接的に(例えば、糖タンパク質にN連結またはO連結している他の糖を通じて連結されている。)結合してもよい。糖鎖における種々の糖分子含有量による糖鎖構造の変化または変異体グリコシル化パターンは、糖タンパク質のエフェクター機能における重要な役割を担っている。例えば、糖タンパク質の変異体グリコシル化パターンは、抗体の抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を増大させるなど、糖タンパク質のエフェクター機能を増大させることができる。

【0054】

宿主細胞のグリコシル化パターンは、任意のタンパク質性部分のN-グリコシル化またはO-グリコシル化であってもよく、ここで、1つ以上の糖分子の付加は、アスパラギンのアミド窒素またはヒドロキシリシンヒドロキシプロリン、セリン、もしくはトレオニンのそれぞれのヒドロキシル酸素においてなされてもよい。グリコシル化パターンは、単糖類、二糖類、多糖類またはオリゴ糖類などの少なくとも2つ以上の糖分子またはサッカリドのレベルの変化を特徴としてもよい。例えば、糖分子は、デオキシヘキソースなどのデオキシ糖などのトリオース、テトロソース (t e t r o s o s e)、ペントース、ヘキソース、ヘプトース、オクトース、ノノース、またはこれらの誘導体；シアル酸などのN置換もしくはO置換誘導体；またはアミノ基を有する糖であってもよい。糖分子には、ガラクトース (G a l)、グルコース (G l c)、マンノース (M a n)、N-アセチルノイラミン酸 (N e u A c)、フコース (F u c)、N-アセチルガラクトースアミン (G a l N A c)、N-アセチルグルコサミン (G l c N A c)；およびキシロース (X y l) を含んでもよいが、これらに限定されない。糖分子は、または 連結を介して他の糖分子に連結してもよい。

10

20

30

40

50

【0055】

本開示の変異体グリコシル化パターンは、少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって立証されてもよく、宿主細胞または糖タンパク質の異なる種類のグリコシル化の変化によって立証することができる。例えば、フコシル化、マンノシル化、N-アセチルグルコサミニル化、および/またはこれらの組み合わせのレベルを、変異体グリコシル化パターンの証拠として用いてもよい。例えば、フコシル化、マンノシル化、および/または N-アセチルグルコサミニル化のレベルは、修飾されていない親細胞と比較して、修飾された宿主細胞において低くまたは高くあり得る。糖タンパク質のフコシル化、マンノシル化、および/または N-アセチルグルコサミニル化のレベルは、(すなわち、修飾されていない親宿主細胞において産生される) 対応する野生型糖タンパク質と比較して低くまたは高くあり得る。例えば、異種性の糖タンパク質は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する野生型糖タンパク質と比較して低レベルのフコース、マンノース、および/または N-アセチルグルコサミン含有量を呈してもよい。グリコシル化は、連結もしくは 連結したマンノースまたは 連結もしくは 連結した N-アセチルグルコサミンなどの 連結もしくは 連結した糖を包含することができる。さらにその上、変異体グリコシル化パターンを有する宿主細胞はさらに、修飾されていない親宿主細胞の 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子活性と比較して、活性をさらに含んでもよくおよび/または維持してもよい。

【0056】

また、本開示の変異体グリコシル化パターンは、修飾されていない親細胞と比較して、グルコース、ガラクトース、またはその両方のレベルの変化によっても立証することができる。例えば、変化は、ガラクトースレベルの増加または低下であり得る。また、変化は、グルコースレベルの増加または低下でもあり得る。いくつかの実施形態において、変化は、図10A、Bに示されるなどのように、グルコースレベルの増加、ガラクトースレベルの低下、またはグルコースレベルの増加かつガラクトースレベルの低下であり得る。変異体グリコシル化パターンは、図16および図20に示されるなどのように、グルコースおよび/またはガラクトースの変化を、フコース、グルコース、マンノース、およびN-アセチルグルコサミンなどだがこれらに限定されない他の単糖類のレベルの変化とともに含むことができる。糖類の異なる組み合わせおよびこのような糖類の変化するレベル、例えば、親細胞と比較したレベルの増加または低下は、本明細書において意図される。

【0057】

変異体グリコシル化パターンは、少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって立証されてもよく、ここで、少なくとも1種類の糖分子のレベルの変化は、少なくともおよそ2倍である。あるいは、レベルの変化は、少なくとも2種類の糖について少なくともおよそ2倍である。変化は、糖分子のレベルの増加または低下であってもよい。レベルの変化は、少なくともおよそ3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、

50、75、100、500、1000倍またはそれよりさらに高くさえあってもよい。
【0058】

いくつかの実施形態において、本発明は、対象のN連結型グリカンを含む組成物を提供し、抗体において呈される場合、抗体の高い抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を結果的に生じる。N連結型グリカンは、タンパク質のアスパラギン側鎖のアミド窒素に結合する。3つの主な種類のN連結型糖類：高マンノースオリゴ糖、複合体オリゴ糖、およびハイブリッドオリゴ糖がある。高マンノースN連結型グリカンは典型的には、多くのマンノース残基を有する2つのN-アセチルグルコサミンを含む。複合体オリゴ糖は典型的に、他の種類のほぼ任意の数の糖類を含む。タンパク質は、異なる部分のタンパク質に関して両方の種類のオリゴによってグリコシル化することができる。N連結型グリカンは、グルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、フコース、およびシアル酸を含む種々の異なる単糖類を用いて修飾することができる。

10

20

30

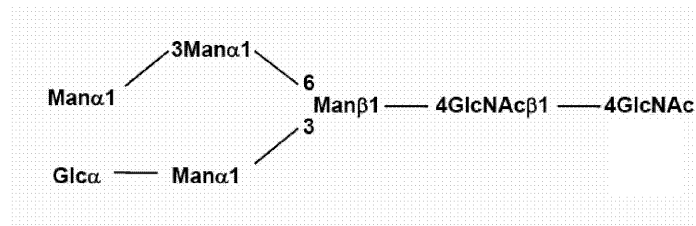
40

50

【0059】

N連結型オリゴ糖の対象のN連結型グリカンの組成および構造は、CHO-1E5と呼ばれる典型的な修飾されたCHO細胞クローンによって產生することができる。抗体に関する単一のN-グリカン構造は、CHO-1E5によって產生される。CHO-1E5は、N-グリカンの生合成を変化させ、この宿主細胞クローンによって產生される抗体は、フコースをとともまたはともなわずに、グルコース、マンノース、およびN-アセチルグルコサミンからなるグリコシル化特性を呈する。N-グリカンの構造式は、GlcNAc2-Man4(+/-Fuc)として示されている。このグリカンは、中心のN連結型オリゴ糖の基本構造：3Man-2GlcNAcを有し、フコースをとともなうかまたはともなわないが、2つの外側のアセチルグルコサミンを欠失している。中心オリゴ糖の側鎖のうちの1つに結合したグルコース分子および余分なマンノース分子がある(図15)。いくつかの実施形態において、グリコシル化パターンは、構造式(I)の組成を表し、この中で、フコース部分は、右から最初の4GlcNAcに任意に連結することができる：

【化7】

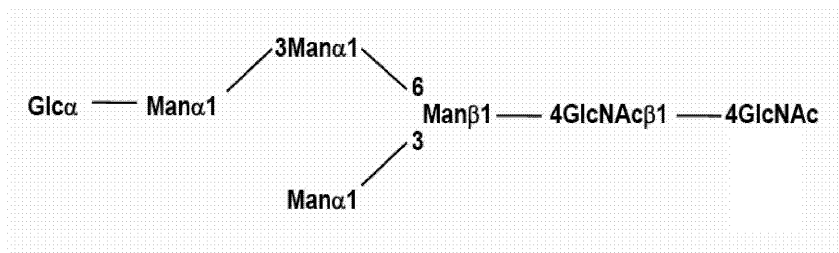


(I)

【0060】

いくつかの実施形態において、グリコシル化パターンは、構造式(II)の組成を表し、この中で、フコース部分は、右から最初の4GlcNAcに任意に連結することができる。

【化8】



(II)

【0061】

先におよび図15に図示した構造式(I)および(II)は、フコース分子が、対象の

N連結型グリカンに存在し得または欠失し得ることを示す。いくつかの実施形態において、対象のN連結型グリカンは、1つのグルコース分子を含む。いくつかの実施形態において、グルコース分子は、対象のN連結型グリカンの末端（すなわち末端グルコース）にある。いくつかの実施形態において、対象のN連結型グリカンは、1つ以上の末端グルコース分子を含む。いくつかの実施形態において、対象のN連結型グリカンは、4つのマンノース分子を含む。いくつかの実施形態において、対象のN連結型グリカンは、2つのN-アセチルグルコサミン分子を含む。

【0062】

いくつかの実施形態において、グリコシル化パターンは、構造式(I)および(II)の混合型組成を表す。いくつかの実施形態において、CHO-1E5と呼ばれる本発明の修飾された宿主細胞によって合成されるN-グリカンは、ガラクトースを欠失し、低レベルのフコースおよびN-アセチルグルコサミンを有し、かつ野生型親宿主細胞によって産生されるN-グリカンと比較して末端グルコースを含む(図16)。いくつかの実施形態において、CHO-1E5クローンによって呈されるN-グリカンは、MALDI-TOF MS分析によって単一のピークとして特徴づけられ、オリゴ糖の実質的に均質な集団を示唆している。

10

【0063】

宿主細胞または糖タンパク質のグリコシル化パターンは、具体的な糖分子または具体的な糖分子と会合もしくは糖分子を用いて修飾されたタンパク質性部分を特異的にまたは優先的に認識しまたは結合する媒介物を用いて検出することができる。媒介物には、フコースを用いて修飾されたタンパク質に特異的に結合する化学物質であるレンズクリマリス凝集素A；N-アセチルグルコサミンに対する優先的な結合を有するコムギ胚芽凝集素(WGA)；連結型マンノースを認識するコンカナバリンA(Con A)；および連結型または連結型N-アセチルグルコサミン残基に結合するグリフォニア(バンデイラエア(Bandeiraea))シンプリシフォリア(Simplificifolia)レクチンII(GS-II)を含んでもよいが、これらに限定されない。

20

【0064】

媒介物は、直接的にまたは間接的に検出されてもよい。例えば、媒介物は、標識に抱合してもよい。蛍光標識などの任意の検出可能な標識を用いることができる。フローサイトメトリーなどの当業者に公知の検出方法は、標識した細胞を検出および/または分離するのに使用してもよい。例えば、検出および/または分離は、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によってもよい。標識には、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、オレゴングリーン、東京グリーン、SNAPFL、カルボキシナフトフルオレsein(CFSE)、カルボキシフルオレseinジアセタートスクシンイミジルエステル(CFDA-SE)、DyLight 488、Alexa Fluor 488、緑色蛍光タンパク質(GFP)、フィコエリトリン、Peridinin Chlorophyllタンパク質(PerCP)、PE-Alexa Fluor 700、PE-Cy5(TRI-COLOR)、PE-Cy5.5m、PE-Alexa Fluor 750、PE-Cy7、アロフィコシアニン(APC)、APC-Cy7、およびこれらの誘導体を含んでもよい。また、上記の標識を用いて、糖タンパク質のグリコシル化パターンを分析してもよい。あるいは、媒介物は、例えば、ウェスタンブロットティングおよび当該技術分野で周知の他の方法によるなど、抗体を用いて媒介物を検出することによって直接的に検出してもよい。

30

40

【0065】

グリコシル化パターンを分析する他の方法には、中性の糖およびアミノ基を有する糖など、異なる種類の糖の組成分析を含んでもよい。例えば、ガラクトース、マンノース、フコース、またはそれらの類似のものなどの中性の糖、およびN-アセチルグルコサミンまたはその類似のものなどアミノ基を有する糖、およびシアル酸またはその類似のものなどの酸性の糖を分析することができる。組成比は、糖鎖の酸加水分解によって中性の糖またはアミノ糖を放出することによって分析することができる。方法には、Dionexによ

50

って製造された糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法を含んでもよいが、これに限定されない。BioLCは、HPAEC-PAD (高性能陰イオン交換クロマトグラフィーパルス化電流測定検出) 方法 (Rocklin et al., J. Lig. Chromatogr. 6 (9), 1577-1590 (1983)) によって糖組成を分析するための装置である。また、組成比は、2-アミノピリジン (PA) を用いる蛍光標識方法によって分析することもできる。具体的には、組成比は、公知の方法 (Kondo et al., Agric. Biol. Chem., 55 (1), 283-284 (1991)) に従って2-アミノピリジンを用いて酸加水分解した試料を蛍光標識して、HPLC分析を実施することによって算出することができる。

【0066】

また、グリコシル化パターンは、2次元糖鎖マッピング法 (Tomiyama et al., Anal. Biochem., 171, 73-80 (1988); Biochemical Experimentation Method 23 - Method for Studying Glycoprotein Sugar Chains (Gakkai Shuppan Center), edited by Reiko Takahashi (1989)) によっても分析することができる。2次元糖鎖マッピング法は、例えば、X軸として逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸として順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置をプロットし、その結果を公知の糖鎖の結果と比較することによって概算される方法である。

【0067】

糖鎖は、ヒドラジン分解によって放出することができ、その後、2-アミノピリジンによる糖鎖の蛍光標識 (Hase et al., J. Biochem., 95, 1973203 (1984)) が実施される。糖鎖は、ゲル濾過によって過剰のPA試薬およびその類似のものから分離され、逆相クロマトグラフィーに供される。その後、分画した糖鎖の各ピークを順相クロマトグラフィーによって分析する。これらの結果に基づいて、糖鎖構造は、2次元糖鎖マップ上にスポットをプロットし、スポットを糖鎖の標準物質 (Takara Shuzoによって製造) または基準物質 (Tomiyama et al., Anal. Biochem., 171, 73-80 (1988)) のスポットと比較することによって概算することができる。

【0068】

加えて、グリコシル化パターンは、各糖鎖のMALDI-TOF-MSまたはその類似のものなどの質量分析によって分析することができる。

【0069】

異種性配列

変異体グリコシル化パターンを生じるよう修飾された本開示の宿主細胞は、異種性の配列を含んでもよい。異種性の配列は、核酸配列を含んでもよい。本明細書で用いられるように、核酸配列は、ポリヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオチド配列、核酸、およびオリゴヌクレオチドと同じ意味で用いられる。これらは、任意の長さのデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体の多型を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有してもよく、公知のまたはまだ分かっていない任意の機能を実行してもよい。下記は、ポリヌクレオチドに関する非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコード化領域または非コード化領域、連鎖分析から規定される遺伝子座 (loci) (遺伝子座 (locus))、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化したヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体など、修飾されたヌクレオチドを含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの構築の前または後に与えられてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド

10

20

30

40

50

成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、標識成分との抱合などにより、重合の後でさらに修飾されてもよい。

【0070】

本開示の異種性配列は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを包含する、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、アミノ酸配列を指すタンパク質性部分をコードすることができる。ポリマーは直鎖または分岐鎖であってもよく、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されてもよい。タンパク質性部分は、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質修飾、アセチル化、リン酸化、または標識成分との抱合などのその他の操作で修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。さらにその上、アミノ酸は、グリシン、およびD型またはL型の両方の光学異性体、アミノ酸類似体、ならびにペプチド模倣薬を含むがこれらに限定されない天然および/または非天然または合成アミノ酸のいずれかを指す。

10

【0071】

本開示の異種性配列によってコードされるタンパク質は典型的に、糖タンパク質であり、酵素または抗体などの免疫学的機能のある分子を含んでもよいがこれらに限定されない。変異体グリコシル化パターンを生じる修飾された細胞株は、関心対象の抗体（ヒト化またはキメラ）、抗体断片、サイトカイン、ホルモン、またはその他のタンパク質を産生する異種性配列を発現してもよい。細胞株によって産生されたタンパク質は、細胞によって分泌および収穫されてもよい。あるいは、細胞は、収穫され、細胞からタンパク質を抽出してもよい。タンパク質または糖タンパク質を治療的に用いて、有益なまたは所望の結果をもたらしてもよい。

20

【0072】

異種性配列は、挿入された核酸分子を宿主細胞におよび/または宿主細胞間に転移させる、好ましくは自己複製する核酸分子であるベクターを含んでもよい。ベクターには、細胞へのDNAまたはRNAの挿入のために主として機能するベクター、DNAまたはRNAの複製のために主として機能するベクターの複製、ならびにDNAあるいはRNAの転写および/または翻訳のために機能する発現ベクターを含んでもよい。また、先の機能の2つ以上を提供するベクターも含まれる。発現ベクターは、適切な宿主細胞に導入された場合にポリペプチドに転写および翻訳することのできるポリヌクレオチドである。

【0073】

タンパク質をコードする異種性配列は、単一のまたは複数のベクターによって発現することができる。核酸配列は、単一のオペロンにおいて、または1つもしくは複数のベクターに配置される個別のオペロンにおいて任意のオーダーで配置することができる。所望の場合、2つ以上の発現ベクターを採用することができ、それらの各々は、単一のオペロンにおいて操作できるよう連結された1つ以上の異種性配列を含む。連結されたとは、化学的抱合または組換え手段を含むものどんな手段によっても、2つ以上の化学的な成分または要素の互いに抱合を指す。操作できるよう連結されたとは、そのように説明された要素が、要素の意図された様式で機能できる関係にある並置を指す。例えば、プロモーター配列が、コード化配列の転写を促進する場合、プロモーター配列は、コード化配列に連結されまたは操作できるよう連結される。

30

40

【0074】

単一のまたは複数のベクターの選択および単一のまたは複数のプロモーターの使用は、異種性配列の大きさおよびベクターの容量に依存してもよいが、選択された宿主細胞において発現する場合、ベクターが提供することのできる所与の糖タンパク質の全体的な収量に大きく依存するであろう。いくつかの場合、2オペロン実験系は、より高い収量の糖タンパク質を提供する。対象のベクターは、エピソームで複製可能で、または宿主細胞ゲノムの統合した部分としてとどまることができる。

【0075】

本開示の異種性配列は、単一の調節エレメントの制御下にあることができる。いくつかの場合、異種性核酸配列は、単一のプロモーターによって調節される。他の場合において

50

、異種性核酸配列は、単一のオペロン内に配置される。さらに他の場合において、異種性核酸配列は、単一のリーディングフレーム内に配置される。

【0076】

対象の核酸の調製は、種々の所定の組換え技術および合成手順によって実施できる。標準的な組換えDNAおよび分子クローニング技術は当該技術分野で周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989) (Maniatis)によって、およびT. J. Silhavy, M. L. Bannan, and L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984)およびAusubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, pub. by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)によって説明されている。簡潔には、対象の核酸は、調製されたゲノムDNA断片、cDNA、およびRNAであり得、これらはすべて、細胞から直接抽出でき、またはPCRおよびリアルタイムPCRを含むがこれらに限定されない種々の増幅過程によって組換えで産生することができる。

10

20

【0077】

核酸の直接的な化学合成は典型的には、伸長中のヌクレオチドポリマー鎖の末端5'-ヒドロキシル基への3'-遮断したおよび5'-遮断したヌクレオチドモノマーの連続的な付加を包含し、ここで、各付加は、典型的にはホスホトリエステル、ホスホールアミダイト、またはこれらの類似のものなどのリン誘導体である付加されたモノマーの3'位において伸長中の鎖の末端5'-ヒドロキシル基の求核攻撃によってもたらされる。このような方法論は、当業者に公知であり、直接関係のある教科書および文献に説明されている(例えば、Matteucci et al., *Tet. Lett.* 521:719 (1980); Caruthersらに対する米国特許第4,500,707号;ならびにSouthernらに対する米国特許第5,436,327号および同第5,700,637号)。

30

【0078】

調節エレメントには、例えば、糖タンパク質をコードする1つ以上の異種性配列の発現を増大させるよう遺伝子操作することもできるプロモーターおよびオペレーターを含む。プロモーターとは、RNAポリメラーゼ酵素によって核酸配列の転写を開始および制御するヌクレオチドの配列である。オペレーターとは、所望の核酸配列の転写を制御するよう機能する、プロモーターに隣接したヌクレオチドの配列である。オペレーターは、特異的なリプレッサータンパク質が結合できるタンパク質結合ドメインを含む。適切なリプレッサータンパク質の不在下で、転写はプロモーターを通じて開始する。適切なリプレッサータンパク質の存在下で、リプレッサータンパク質はオペレーターに結合し、それによりプロモーターからの転写を阻害する。

40

【0079】

本開示のいくつかの実施形態において、発現ベクターに用いられるプロモーターは誘導性である。他の実施形態において、発現ベクターに用いられるプロモーターは構成的である。いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸配列は、誘導性プロモーターに操作できるよう連結されており、1つ以上の他の核酸配列は、構成的プロモーターに操作できるよう連結されている。真核宿主細胞において用いるのに適したプロモーターに関する制限のない例には、CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、初期または後期SV40プロモーター、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネイン-Iプロモーターを含むがこれらに限定されない。

50

【0080】

また、発現ベクターにおける遺伝子は、任意のコードされたmRNA遺伝子産物の直接的な翻訳（すなわち、合成）へのリボソーム結合部位もコードするであろう。発現ベクターに用いてもよい他の調節エレメントには、転写エンハンサーエレメントおよび転写終結因子を含む。例えば、Bitter et al., *Methods in Enzymology*, 153:516-544 (1987)を参照されたい。

【0081】

発現ベクターは、特定の種類の宿主細胞において使用するのに適し得るが、他の種類ではそうではない。しかしながら、当業者は、特定の発現ベクターが所与の宿主細胞に適しているかどうかを、所定の実験を通じて容易に決定することができる。例えば、発現ベクターを宿主生物へと導入することができ、次に、ベクターに含まれる任意の遺伝子の生存率および発現についてモニターする。

10

【0082】

また、発現ベクターは、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよく、マーカー遺伝子が発現の際に、発現ベクターを保有する宿主細胞を選択しまたはそれに替わるものとして同定するのに有用な1つ以上の表現型形質を与える。真核細胞に適切な選択可能なマーカーに関する制限のない例には、ジヒドロ葉酸レダクターゼおよびネオマイシン耐性を含む。

【0083】

対象のベクターは、種々の確立された技術によって安定してまたは一過性に宿主細胞へと導入することができる。例えば、1つの方法は、塩化カルシウム処理を包含し、ここで、発現ベクターは、カルシウム沈殿を介して導入される。また、他の塩、例えばリン酸カルシウムを同様の手順の後に用いてもよい。加えて、電気穿孔（すなわち、核酸に対する細胞の透過性を増大させるための電流の適用）を用いてもよい。他の形質転換方法には、微量注射、DEAEデキストラン介在性形質転換、および酢酸リチウムの存在下での熱ショックを含む。また、脂質複合体、リボソーム、およびデンドリマーを採用して、宿主細胞をトランスフェクトしてもよい。

20

【0084】

異種性配列を宿主細胞に導入する際、種々の方法を実施して、対象ベクターが導入された宿主細胞を同定することができる。1つの典型的な選択方法は、個々の細胞を継代培養して、個々のコロニーを形成した後に所望のタンパク質産物の発現について試験することを包含する。別の方法は、発現ベクター内に含まれる選択可能なマーカー遺伝子の発現を通じて与えられた表現型形質に基づいて異種性配列を含む宿主細胞を選択することを内含する。当業者は、これらまたは当該技術分野で利用可能な他の方法を用いて、遺伝子修飾した宿主細胞を同定することができる。

30

【0085】

例えば、本開示の種々の異種性配列の宿主細胞への導入は、PCR、サザンプロット、またはノーザンプロットハイブリッド形成などの方法によって確認することができる。例えば、核酸は、結果として生じる宿主細胞から調製することができ、関心対象の具体的な配列は、関心対象の配列に特異的なプライマーを用いるPCRによって増幅することができる。増幅した産物をアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、または毛細管電気泳動に供した後、臭化エチジウム、SYBR Green溶液、もしくはこれらの類似のものを用いた染色、またはUV検出を用いたDNAの検出を実施する。あるいは、関心対象の配列に特異的な核酸プローブは、ハイブリッド形成反応において採用することができる。具体的な遺伝子配列の発現は、逆転写を連結したPCRであるノーザンプロットハイブリッド形成を介して対応するmRNAを検出することによって、またはコードした遺伝子産物に反応する抗体を用いたイムノアッセイによって確認することができる。典型的なイムノアッセイには、ELISA、ラジオイムノアッセイ、およびサンドイッチイムノアッセイを含むが、これらに限定されない。

40

【0086】

50

さらにその上、本開示の種々の異種性配列の宿主細胞への導入は、異種性配列のコードする酵素の酵素活性によって確認することができる。酵素は、当業者に公知の種々の方法によってアッセイすることができる。一般に、酵素活性は、調査下の酵素反応の産物の形成または基質の変換によって確認することができる。反応は、インビトロまたはインビボで実施することができる。

【0087】

抗体産生

一態様において、本開示は、抗体を産生する変異体グリコシル化パターンを生じるよう修飾された宿主細胞を提供する。本明細書で用いられる抗体には、組換え抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、融合抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびこれらの類似のものなどのすべての形態の抗体を含む。抗体は断片であってもよい。また、抗体は、薬剤、毒素、または治療用放射性同位体と抱合してもよい。また、2つ以上の抗原に結合するハイブリッド抗体を含む二重特異性抗体融合タンパク質も、本開示の宿主細胞によって産生することができる。それゆえ、抗体は、単一特異性または多選択性であってもよいネイキッド抗体および抱合した抗体ならびに抗体断片を包含する。

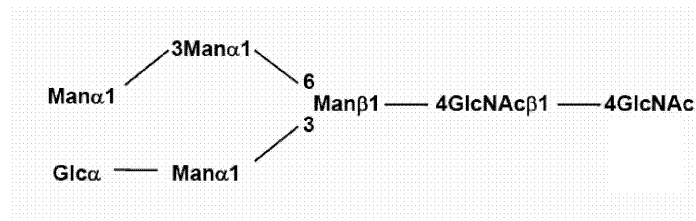
【0088】

また、抗体は、対応する野生型抗体（すなわち、修飾されていない親宿主細胞において産生された抗体）と比較して少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって特徴づけられてもよい変異体グリコシル化パターンを有することもできる。糖分子は、糖タンパク質に直接的に（例えば、糖タンパク質にN連結またはO連結している。）または間接的に（例えば、糖タンパク質にN連結またはO連結した他の糖を通じて連結している。）結合してもよい。糖鎖構造のバリエーション、またはこのような差における種々の糖分子含有量による変異体グリコシル化パターンは、糖タンパク質のエフェクター機能において重要な役割を担っている。例えば、抗体の、先に説明したような変異体グリコシル化パターンは、抗体の抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を増大させるなど、抗体のエフェクター機能を増大させることができる。変異体グリコシル化パターンは、修飾されていない親宿主細胞において産生された対応する抗体と比較して、抗体のFc領域を通じて結合している少なくとも2種類の糖分子のレベルの変化によって立証することができる。

【0089】

いくつかの実施形態において、抗体は、構造式 $\text{GlcNAc} - \text{GlcNAc} - \text{Man}_4 (+/- \text{Fuc})$ を有するN-グリカン呈する。いくつかの実施形態において、抗体は、フコース部分が右から最初の4GlcNAcに任意に連結することのできる構造式（I）：

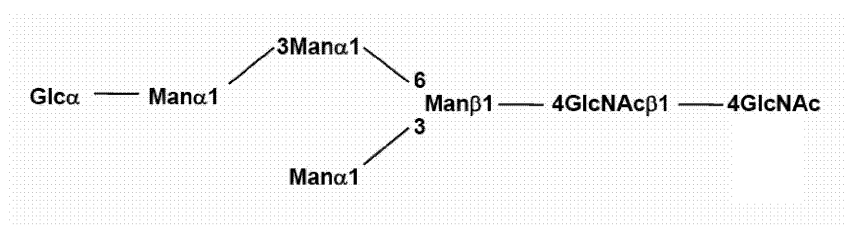
【化9】



(I)

を有するグリコシル化パターンを呈する。いくつかの実施形態において、抗体は、フコース部分が右から最初の4GlcNAcに任意に連結することのできる構造式（II）：

【化10】



(II)

を有するグリコシル化パターンを呈する。

【0090】

構造式(I)および(II)は、1つ以上のフコース分子が対象のN-グリカンにおいて存在しまたは不在である両方のシナリオを包含する。いくつかの実施形態において、フコースはN-グリカンに存在する。他の実施形態において、フコースはN-グリカンに不在である。

【0091】

産生された抗体は、未処置の抗体の4つの主要なクラスのうちの一つに由来し得る：例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM。産生された抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2から選択されるサブクラスのうちの一つのメンバーである。

10

【0092】

本開示の抗体は、モノクローナルであってもよく、実質的に均質な抗体の集団に由来する抗体を指し、すなわち、集団を含む個々の抗体は同一であり、および/または同一のエピトープを結合するが、例外として、モノクローナル抗体の産生の中に生じるかもしれない起こり得る変異体を除くものであり、このような変異体は一般に少量で存在する。このようなモノクローナル抗体には典型的に、標的を結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、ここで、標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含む過程によって得られた。例えば、選択過程は、ハイブリドマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプールなど、フック数のクローン由来の独特なクローンの選択であり得る。

20

【0093】

選択された標的結合配列をさらに変化させて、例えば、標的に対する親和性を改善し、標的結合配列をヒト化し、細胞培養におけるその産生を改善し、インビボでのその免疫原性を減少させ、多選択性抗体を作製するなどができ、かつ変化した標的結合配列を含む抗体も、本開示のモノクローナル抗体であることは理解されるべきである。異なる決定因子(エピトープ)に対して配向する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製とは対照的に、モノクローナル抗体調製の各モノクローナル抗体は、抗原における単一の決定因子に対して配向する。モノクローナル抗体調製物の特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、他の免疫グロブリンが典型的に混入していないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」とは、抗体の実質的に均質な集団から得られた抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本開示に従って用いられるべきモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドマ法(例えば、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)、ファージディスプレイ技術(例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); および Lee et al. J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)参照)およびヒト免疫グロブリン遺伝子座もしくはヒト免疫グロ

30

40

50

プリン配列をコードする遺伝子の一部またはすべてを有する動物におけるヒトまたはヒト様抗体を産生するための技術（例えば、WO 1998/24893； WO 1996/34096； WO 1996/33735； WO 1991/10741； Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)； Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)； Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)； 米国特許第5,545,806号；第5,569,825号；第5,591,669号（すべてGenPharm社）；米国特許第5,545,807号； WO 1997/17852；米国特許第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；および第5,661,016号； Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)； Lonberg et al., Nature, 368:856-859 (1994)； Morrison, Nature, 368:812-813 (1994)； Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996)； Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996)；ならびにLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)参照)を含む種々の技術によって作製してもよい。

【0094】

本明細書のモノクローナル抗体には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一でありまたは相同であるが、鎖の残りが、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体および所望の生物学的活性を呈する限りのこのような抗体の断片における対応する配列と同一であり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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書における関心対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）に由来する可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列とを含む「霊長類化」抗体を含む。

【0095】

また、本開示の宿主細胞を用いて、抗体の産生のためのハイブリドーマを作製することもできる。マウスまたは他の適切な宿主動物（とりわけ、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウマ、ブタ、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、またはスナネズミなど）を免疫化して、免疫化に用いられるタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するまたは産生することのできるリンパ球を誘発することができる。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化してもよい。次に、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いて、リンパ球をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。

【0096】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは、融合していない親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培地に播種し増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPR TまたはHPRT）を欠失している場合、ハイブリドーマのための培地は典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（HAT培地）を含むであろうし、これらの物質は、HGPR T欠損細胞の増殖を防止する。

【0097】

10

20

30

40

50

一実施形態において、効率よく融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を支持し、かつHAT培地などの培地に対して選択的であるミエローマ細胞が用いられる。いくつかの実施形態において、ミエローマ細胞株は、マウスミエローマ株(MOPC-21、MPC-11、SP-2、またはX63-Ag8-653細胞を含むがこれらに限定されない。)、ヒトミエローマ細胞株(Karpas 707H、RPMI 8226、8226 AR/NIP4-1、KM-2R、またはU-266)、またはラットミエローマ細胞株(YB2/3.0.Ag.20、YB2/0、Y3-Ag1.2.3、IR983F)である。

【0098】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地は、抗原に対して配向するモノクローナル抗体の産生のためにアッセイされる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によってまたは、ラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは固相酵素免疫検定法(ELISA)などのインビトロでの結合アッセイによって決定することができる。モノクローナル抗体の結合親和性は例えば、Scatchard分析によって決定することができる(例えば、Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980)参照)。

10

【0099】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、限界希釈手順によってクローンをサブクロニングし、標準的な方法によって増殖させてもよい(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的に適した培地には、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞を、動物における腹水腫瘍としてインビボで増殖させてもよい。

20

【0100】

次に、サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の抗体精製手順によって、培地、腹水液、または血清から適切に分離することができる。

【0101】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、(1)Lowry法によって決定される抗体の95重量%を超えるまで、もっとも好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップ配列決定装置の使用によってN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3)クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いた還元条件下もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEによって均質になるまで精製することができる。

30

【0102】

代替的な実施形態において、本開示の方法によって産生される細胞集団は、組換えDNA法による抗体の産生に用いられる(それらのすべての内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,816,567号)。変異体グリコシル化パターンを呈する修飾された宿主細胞は、HeLa、HEK-293、NIH3T3、COS、CHO、NSO、PER.C6、K562、L1.2、JY、BHK、K562、293F、3T3、またはJurkatなどの親細胞株から産生することができる。代替的な実施形態において、修飾された宿主細胞は、B細胞株などのリンパ球系細胞株に由来する親細胞株に由来する。

40

【0103】

一実施形態において、重鎖または軽鎖をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)は、成熟B細胞またはハイブリドーマ培養物などの適切な源から単離され、RNA単離精製および任意でサイズベースの単離の標準的な技術を採用することによって得られる。次に、cDNAライブラリ構築、ファージライブラリ構築、および特異的な関連プライマー

50

を用いたスクリーニングまたはRT-PCRなど、糖技術分野で公知の技術を用いて、重鎖または軽鎖をコードするmRNAに対応するcDNAを産生しおよび単離する。いくつかの実施形態において、cDNA配列は、具体的な所望のcDNAを産生するための公知のインビトロDNA操作技術を用いて全体的にまたは部分的に産生される配列であってもよい。次に、cDNA配列は、遺伝子とともにリーディングフレームにおいてプロモーターを含み、かつ修飾度の低い宿主細胞と適合性のあるベクターに配置することができる。適切なプロモーター、制御配列、リボソーム結合部位、および転写終結部位、ならびに任意で便利なマーカを含む数多くのプラスミドが当該技術分野で公知であり、これらには、米国特許第4,663,283号および第4,456,748号に説明されているベクターを含むが、これらに限定されない。一実施形態において、軽鎖をコードするcDNAおよび重鎖をコードするcDNAを個別の発現プラスミドに挿入してもよい。代替的な実施形態において、軽鎖をコードするcDNAおよび重鎖をコードするcDNAを、各々が適切なプロモーターおよび翻訳制御の下にある限り、同じプラスミドにともに挿入してもよい。

10

20

30

40

50

【0104】

次に、先に構築した発現ベクターを用いて、本開示の修飾された宿主細胞を形質転換することができる。一実施形態において、軽鎖および重鎖を、同じかまたは異なる種のいずれかの個別の修飾された宿主細胞培養物へと形質転換してもよい。代替的な実施形態において、軽鎖および重鎖についての個別のプラスミドを用いて、単一の修飾された宿主細胞培養物を同時形質転換してもよい。別の実施形態において、両方の遺伝子を含みかつ軽鎖および重鎖の両方についての遺伝子を発現することのできる単一発現プラスミドを単一の修飾された宿主細胞培養物へと形質変換してもよい。

【0105】

重鎖および軽鎖が同じ宿主で同時発現する場合、単離手順は、再構築した抗体を収集するよう設計される。このことは、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の抗体精製手順によって達成することができる。

【0106】

いくつかの実施形態において、組換え方法によって精製されたモノクローナル抗体は、(1)Lowry法によって決定される抗体の95重量%を超えるまで、もっとも好ましくは99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップ配列決定装置の使用によってN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3)クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いた還元条件下もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEによって均質になるまで精製することができる。

【0107】

先に示した組換え方法によって産生される抗体は、ヒトキメラ抗体などのヒト化抗体、またはヒト相補性決定領域(CDR)移植抗体(grafted antibody)であり得る。ヒト化形態の非ヒト(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、またはウサギ)抗体は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小の配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は典型的には、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種の超可変領域に由来する残基(ドナー抗体)によって置換されるヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらにその上、ヒト化抗体は、レシピエント抗体においてもドナー抗体においても認められない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、および典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、それらにおいて、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに相当し、FRのすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のFRである。また、ヒト化抗体は任意に、免疫グロブリンの定常領域(F

c)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含むであろう。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。

【0108】

用語「可変」とは、抗体のうちで配列において広範に異なっている可変ドメインのある一部を指し、各特定の抗体の特定の抗原に対する抗体の結合および特異性において用いられる。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインを通じて均一には分布していない。可変性は、軽鎖および重鎖の両可変ドメインにおいて超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに通常濃縮される。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは各々、シート構造を主として採用する4つのFRを含み、ループ接続を形成しかついくつの場合、シート構造を形成する3つの超可変領域によって接続されている。各鎖における超可変領域は、FRによって他の鎖由来の超可変領域と近接して互いに保持されており、抗体の抗原結合部位の形成に参与している(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)参照)。定常ドメインは、抗体を抗原に結合する上で直接的には参与していないが、抗体依存性細胞傷害(ADCC)における抗体の参加などの種々のエフェクター機能を呈する。

10

20

【0109】

用語「超可変領域」は、本明細書で用いられる場合、抗原結合を生じる抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は一般に、CDR由来のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基24~34(L1)、50~56(L2)、および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメインにおける31~35(H1)、50~65(H2)、および95~102(H3);Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))および/または「超可変ループ」由来のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基26~32(L1)、50~52(L2)、および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメインにおける26~32(H1)、53~55(H2)、および96~101(H3);Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含む。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書に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。

30

【0110】

ヒトキメラ抗体とは、両方ともヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域(以後、「HV」または「VH」と呼び、重鎖は「H鎖」である。)および軽鎖可変領域(以後、「LV」または「VL」と呼び、軽鎖は「L鎖」である。)、ヒト抗体重鎖定常領域(以後、「CH」とも呼ぶ。)およびヒト抗体軽鎖定常領域(以後、「CL」とも呼ぶ。)を含む抗体である。ハイブリドーマがそこから産生することができる限り、ヒト以外の動物として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはこれらの類似のものなどの任意の動物を用いることができる。

40

【0111】

ヒトキメラ抗体は、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)をコードするcDNAを得ること、cDNAを、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞のための発現ベクターに挿入し、それによりヒトキメラ抗体発現ベクターを構築すること、およびその後、ベクターを低フコシル化細胞に導入して抗体を発現させることによって産生することができる。

50

【0112】

ヒトキメラ抗体の重鎖定常領域（CH）に関して、ヒト免疫グロブリン（以後、「hIg」と呼ぶ。）クラスである限り、任意のCHを用いることができる。いくつかの実施形態において、CHは、hIgGクラスまたは、hIgG1、hIgG2、hIgG3、およびhIgG4などのhIgGクラスに属するサブクラスのうちの1つに属する。同様に、ヒトキメラ抗体の軽鎖定常領域（CL）に関して、hIgクラスに属する限り、任意のCLを用いることができる。いくつかの実施形態において、ヒトキメラ抗体の軽鎖定常領域（CL）は、クラスまたはクラスに属する。

【0113】

ヒトCDR移植抗体は、ヒト以外の動物に由来する抗体のVHおよびVLのCDRが、ヒト抗体のVHおよびVLのCDRへと移植された可変領域をコードするcDNAを構築すること、cDNAを、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞のための発現ベクターに挿入し、それによりヒトCDR移植抗体発現ベクターを構築すること、およびその後、本開示の修飾された宿主細胞に発現ベクターを導入して、ヒトCDR移植抗体を発現させることによって産生することができる。

10

【0114】

好ましくは、本発明の抗体は本質的に、親抗体と比較して抗原を結合する能力を保持する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、抗原に対する結合親和性が親抗体よりも例えば少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2、3、4、または5倍高いことを呈する。他の実施形態において、本発明の抗体は、抗原に対する結合親和性が、抗原に対する親抗体の結合親和性の例えば、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、または50%以上低いことを呈する。本発明の抗体の結合能力は例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析または放射線免疫検定法（RIA）などの技術を用いて決定してもよい。

20

【0115】

本開示の変異体グリコシル化パターンを有する抗体および/または修飾された宿主細胞によって産生される抗体は、癌抗原などの抗原を結合してもよい。抗原は、請求項9に記載の糖タンパク質からなる群から選択してもよく、ここで、癌抗原は、HER2、免疫グロブリンFc受容体II、Alk-1、CD20、EGF受容体、VEGF受容体、FGF受容体、NGF受容体、PDGF受容体、EpCam、CD3、CD4、CD11a、CD19、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD51、CD55、CD80、CD95、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CTLA-4、ムチン1、ムチン16、エンドグリン、メソテリン受容体、ノゴ受容体、葉酸受容体、CXCR4、インスリン様増殖因子受容体、ガングリオシドGD3、ならびにおよびインテグリンからなる群から選択される。

30

【0116】

いくつかの実施形態において、ヒト化HER2抗体は、変異体グリコシル化パターンを呈する修飾された宿主細胞において産生される。ヒト化HER2抗体には、参照により本明細書に明白に組み込まれる米国特許第5,821,337号の表3に説明されているhuMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7、およびhuMAb4D5-8またはトラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標））；ヒト化520C9（WO93/21319）；およびペルツズマブなどのヒト化2C4抗体を含むが、これらに限定されない。

40

【0117】

別の実施形態において、EGFR、HER2、HER3、またはHER4抗体などのHER阻害剤をコードするベクターは、本開示の修飾された宿主細胞株へと導入される。HER阻害剤抗体には、トラスツズマブ、ペルツズマブ、セツキシマブ、ABX-EGF、ABX0303、EMD7200、C11033、IMC-11F8、およびIMC-11F5を含む。修飾された宿主細胞において産生されるHER阻害剤は、修飾されていな

50

い親宿主細胞において産生されるHER阻害剤と比較して、先に説明した少なくとも2つの糖分子のレベルの変化など、変異体グリコシル化パターンを呈することができる。

【0118】

本開示のHER抗体または阻害剤を用いて、HERの発現、増幅、または活性化を示す癌細胞を治療することができる。HERの活性化とは、任意の1つ以上のHER受容体の活性化またはリン酸化を指す。一般に、HER活性化は、(例えば、HER受容体または基質ポリペプチドにおけるHER受容体リン酸化チロシン残基の細胞内キナーゼドメインによって生じる)シグナル伝達を結果として生じる。HER活性化は、関心対象のHER受容体を含むHER二量体に結合するHERリガンドによって介在し得る。HER二量体に結合するHERリガンドは、二量体におけるHER受容体の1つ以上のキナーゼドメインを活性化し、それによりHER受容体の1つ以上におけるチロシン残基のリン酸化および/またはAktもしくはMAPK細胞内キナーゼなどの追加的な基質ポリペプチドにおけるチロシン残基のリン酸化を結果として生じ得る。

10

【0119】

HER阻害剤には、HER二量体の形成を阻害する媒介物である二量体化阻害剤を含む。HER二量体化阻害剤は、抗体、例えば、そのヘテロ二量体結合部位においてHER2に結合する抗体であり得る。抗体は、変異体グリコシル化パターンを呈する抗体など、本明細書に説明されている抗体であってもよい。本明細書で意図される二量体化阻害剤は、ペルツズマブまたはモノクローナル抗体2C4(MAb 2C4)である。HER二量体化阻害剤に関する他の例には、EGFRに結合してEGFRと1つ以上の他のHER受容体との二量体化を阻害する抗体(例えば、EGFRモノクローナル抗体806、MAb 806、活性化型または非繫留型EGFRに結合; Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384(2004)参照); HER3に結合してHER3と1つ以上の他のHER受容体との二量体化を阻害する抗体; HER4に結合してHER4と1つ以上の他のHER受容体との二量体化を阻害する抗体; ペプチド二量体化阻害剤を含む。そのすべての内容が全体として参照により本明細書により組み込まれる米国特許第6,417,168号を参照されたい。ペルツズマブなど、HER二量体化を阻害する抗体を用いて癌細胞を治療してもよく、抗体はHER2受容体を過剰発現させたり増幅したりしない。

20

【0120】

また、修飾された宿主細胞を用いて、変異体グリコシル化パターンを有する、全長抗体以外の組換えタンパク質を産生することもできる。当該技術分野で標準的な技術を用いて、組換えタンパク質をコードするベクター(プラスミドまたはウイルスなど)を、修飾された宿主細胞へと導入することができ、組換えタンパク質は、ホルモン、サイトカイン、およびFv、Fab、scFv、または二重特異性抗体の断片などの抗体断片を含む、関心対象の任意のタンパク質であってもよい。

30

【0121】

Fv断片は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密な非共有結合における1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この構成において、各可変ドメインの3つの超可変領域は、VH-VL二量体の表面における抗原結合部位を明確にするよう相互作用する。集約的に、6つの超可変領域は、抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的なたった3つの超可変領域を含むFvの半分)でさえ、抗原を認識しおよび結合する能力を有するが、結合部位全体よりも親和性が低い。

40

【0122】

また、Fab断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一の定常ドメイン(CH1)も含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端において数個の残基を付加することによってFab断片と異なる。Fab'-SHとは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも1つの遊離チオール基を有するFab'についての本明細書における名称である。F(ab')₂抗体断片

50

は本来、ヒンジシステインを間に有する F a b ' 断片の対として産生される。また、抗体断片に関する他の化学的連結も公知である。

【 0 1 2 3 】

一本鎖 F v (s c F v) 抗体断片は、抗体の V H および V L ドメインを含み、ここで、これらの断片は、一本鎖ポリペプチドに存在する。いくつかの実施形態において、F v ポリペプチドはさらに、V H ドメインと V L ドメインの間にポリペプチドリンカーを含み、このことによって s v F v が抗原結合のために所望の構造を形成することができる。s c F v に関する総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照されたい。HER2 抗体の s c F v 断片は、それらのすべての内容が全体として参照により本明細書により組み込まれる WO 03 / 16185 ; 米国特許第 5, 571, 894 号 ; および米国特許第 5, 587, 458 号に説明されており、本開示の修飾された宿主細胞によって産生してもよい。

10

【 0 1 2 4 】

用語「二重特異性抗体」とは、断片が、同一のポリペプチド鎖 (V H - V L) における V L ドメインに接続された V H ドメインを含む 2 つの抗原結合部位を有する低分子抗体断片を指す。短すぎて同一鎖における 2 つのドメイン間で対形成できないリンカーを用いることによって、ドメインは、別の相補的ドメインと対形させられ、2 つの抗原結合部位を作製する。二重特異性抗体は、それらのすべての内容が全体として参照により本明細書により組み込まれる EP 404, 097 ; WO 93 / 11161 ; および Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90 : 6444 - 6448 (1993) においてより十分に説明されている。

20

【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態において、抗体は阻害性抗体である。阻害性抗体は、抗体が結合する抗原の 1 つ以上の生物学的活性を阻害してもよい。例えば、阻害性抗体は、抗原の活性を阻害することによって対応する抗原のシグナル伝達をダウンレギュレートすることができる、または抗原の発現を阻害することができる。いくつかの実施形態において、抗体は中和抗体である。中和抗体は、感染媒介物など、可溶性抗原のまたは生微生物の何らかの生物活性を減少させまたは消失させる。中和抗体は、その抗原についての天然のリガンドまたは受容体と競合してもよい。いくつかの実施形態において、抗体は刺激性のまたは活性化抗体である。刺激性の抗体または活性化抗体は、抗原の結合の際に対応する抗原のシグナル伝達を活性化して、それにより抗原の活性を活性化しもしくはアップレギュレートし、または抗体が結合する抗原の発現をアップレギュレートし得るアゴニスト抗体であってもよい。

30

【 0 1 2 6 】

本発明の N - グリカンを含んでもよい抗体には、アブシキシマブ (ReoPro (登録商標))、アダルIMUMマブ (Humira (登録商標))、アレムツズマブ (Campath (登録商標))、バシリキシマブ (Simulect (登録商標))、ペバシズマブ (Avastin (登録商標))、セツキシマブ (Erbitux (登録商標))、ダクリズマブ (Zenapax (登録商標))、ダセツズマブ、エクリズマブ (Soliris (登録商標))、エファリズマブ (Raptiva (登録商標))、エドレコロマブ (Panorex (登録商標))、エピラツズマブ、イブリツモマブ (Zevalin (登録商標))、チウキセタン、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、ムロモナブ - CD3 (OKT3)、ナタリズマブ (Tysabri (登録商標))、オマリズマブ (Xolair (登録商標))、パリビズマブ (Synagis (登録商標))、パニツムマブ (Vectibix (登録商標))、ラニビズマブ (Lucentis (登録商標))、ゲムツズマブオゾガミシン (Mylotarg (登録商標))、オレゴボマブ (OvaRex (登録商標))、リツキシマブ (Rituxan (登録商標))、トシ

40

50

ツモマブ (B e x x a r (登 録 商 標)) 、 ト ラ ス ツ ズ マ ブ (H e r c e p t i n (登 録 商 標)) 、 M e t M A b 、 オ ク レ リ ズ マ ブ 、 ペ ル ツ ズ マ ブ 、 R a p t i v a (登 録 商 標) (エ フ ア リ ズ マ ブ) 、 h u M 1 9 5 M a b 、 M D X - 2 1 0 、 B E C 2 、 抗 - A 、 抗 - C D 4 、 抗 - I L - 1 3 、 抗 - o x L D L 、 ト ラ ス ツ ズ マ ブ - D M 1 、 、 ア ポ マ ブ (a p o m a b) 、 r h u M A b 7 、 r h u M A b I F N 、 G A 1 0 1 、 抗 - O X 4 0 L 、 イ ピ リ ム マ ブ 、 バ ロ ル チ ム (V a l o r t i m) 、 ウ ス テ キ ヌ マ ブ 、 ゴ リ ム マ ブ 、 オ フ ァ ツ ム マ ブ 、 ザ ル ツ ム マ ブ 、 ト レ メ リ ム マ ブ 、 モ タ ビ ズ マ ブ 、 ミ ツ モ マ ブ (m i t u m o m a b) 、 エ ク ロ メ キ シ マ ブ (e c r o m e x i m a b) 、 A B X - E G F 、 M D X 0 1 0 、 X T L 0 0 2 、 H 1 1 S C F V 、 4 B 5 、 X T L 0 0 1 、 M D X - 0 7 0 、 T N X - 9 0 1 、 I D E C - 1 1 4 、 な ら び に 補 体 C 5 、 C B L 、 C D 1 4 7 、 g p 1 2 0 、 V L A 4 、 C D 1 1 a 、 C D 1 8 、 V E G F 、 C D 4 0 L 、 a n t i - I d 、 I C A M 1 、 C D 2 、 E G F R 、 T G F - 2 、 T N F - 、 T N F 受 容 体 、 E - セ レ ク チ ン 、 F a c t I I 、 H e r 2 / n e u 、 F g p 、 C D 1 1 / 1 8 、 C D 1 4 、 C D 8 0 、 I C A M 3 、 C D 4 、 C D 2 3 、 2 - イ ン テ グ リ ン 、 4 7 、 C D 5 2 、 C D 2 2 、 O X 4 0 L 、 I L - 5 受 容 体 、 G M - C S F 受 容 体 、 G M - C S F 、 H L A - D R 、 o x L D L 、 C D 6 4 (F c R) 、 T C R 、 C D 3 、 H e p B 、 C D 1 2 5 、 D R 5 、 E p C A M 、 g p I I b I I I a 、 I g E 、 7 イ ン テ グ リ ン 、 C D 2 0 、 I L 1 、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 6 、 I L - 8 、 I L - 9 、 I L - 1 0 、 I L - 1 3 、 I L - 1 2 / I L - 2 3 、 I L - 1 5 、 I F N - 、 V E G F R - 1 、 血 小 板 由 来 増 殖 因 子 受 容 体 (P D G F R) 、 血 管 接 着 タ ン プ ク 質 1 (V A P 1) 、 結 合 組 織 増 殖 因 子 (C T G F) 、 A p o 2 / T R A I L 、 C D 2 5 、 C D 3 3 、 H L A 、 F g p 、 I g E 、 C T L A - 4 、 I P - 1 0 、 抗 ク ロ ス ト リ ジ ウ ム ・ デ ィ フ ィ シ ル 毒 素 A お よ び 毒 素 B 、 バ チ ル ス ・ ア ン ト ラ シ ス 、 呼 吸 器 多 核 体 ウ イ ル ス (R S V) 、 マ ン ノ ー ス 受 容 体 / h C G 、 イ ン テ グ リ ン 受 容 体 、 P D 1 、 P D L - 1 、 C D 1 9 、 C D 7 0 、 お よ び V N R イ ン テ グ リ ン を 含 む が こ れ ら に 限 定 さ れ ない 抗 原 に 特 異 的 な 任 意 の 抗 体 断 片 を 含 む が 、 こ れ ら に 限 定 さ れ ない 。

【 0 1 2 7 】

本 発 明 の N - グ リ カ ン を 含 む 抗 体 は 、 天 然 の 抗 体 ま た は 修 飾 さ れ て い ない 宿 主 細 胞 に よ っ て 産 生 さ れ る 抗 体 の 半 減 期 に 匹 敵 す る 良 好 な 半 減 期 を 有 す る 。 抗 体 の 半 減 期 と は 典 型 的 に は 、 抗 体 分 子 の 形 成 後 の 抗 体 分 子 の 平 均 生 存 時 間 の 測 定 結 果 を 指 し 、 通 常 、 動 物 の 身 体 由 来 の 既 知 の 量 の 免 疫 グ ロ ブ リ ン の 5 0 % を 除 去 す る の に 必 要 な 時 間 と し て 表 さ れ る 。 半 減 期 は 、 免 疫 グ ロ ブ リ ン の ク ラ ス に よ っ て 変 化 し 、 ま た 、 種 に よ っ て も 変 化 し 得 る 。 い く つ か の 実 施 形 態 に お い て 、 C H O - 1 E 5 細 胞 に よ っ て 産 生 さ れ る 対 象 の N - グ リ カ ン を 発 現 す る 抗 体 は 、 親 C H O 細 胞 に よ っ て 産 生 さ れ る 抗 体 の 末 端 半 減 期 に 匹 敵 す る イ ン ビ ボ で の 末 端 半 減 期 を 有 す る 。 い く つ か の 実 施 形 態 に お い て 、 対 象 の 抗 体 は 、 少 な く と も 4 、 8 、 1 2 、 2 4 、 4 8 、 7 2 時 間 、 ま た は そ れ よ り 長 く さ え あ る 試 験 動 物 に お け る 末 端 半 減 期 を 有 す る 。 末 端 半 減 期 は 、 初 回 投 与 後 お よ び 規 定 さ れ た 時 間 経 過 に わ た っ て 、 対 象 の 生 物 学 的 流 体 (例 え ば 、 血 液 ま た は 血 清) に と ど ま る 抗 体 の 量 を 定 量 す る こ と に よ っ て 評 価 す る こ と が 可 能 だ り 得 る 。 初 回 投 与 は 、 静 脈 内 で 、 皮 下 で 、 ま た は 当 該 技 術 分 野 で 公 知 の も し く は 本 明 細 書 に 開 示 さ れ た そ の 他 の 適 切 な 経 路 で 実 施 す る こ と が 可 能 だ り 得 る 。

【 0 1 2 8 】

い く つ か の 実 施 形 態 に お い て 、 本 発 明 の N - グ リ カ ン を 含 む 対 象 の 抗 体 は 、 修 飾 さ れ て い ない 宿 主 細 胞 に よ っ て 産 生 さ れ る 親 抗 体 ま た は 本 発 明 の 独 特 な N - グ リ カ ン を 欠 失 す る 抗 体 と 比 較 し て 、 高 い A D C C 活 性 を 有 す る が 、 実 質 的 に 高 い 免 疫 原 性 を 誘 発 し ない 。 免 疫 原 性 と は 、 抗 原 ま た は エ ピ ト ー プ な ど 、 特 定 の 物 質 が 、 免 疫 応 答 、 体 液 性 お よ び / ま た は 細 胞 介 在 性 免 疫 応 答 を 誘 発 す る 能 力 を 指 す 。 タ ン プ ク 質 お よ び 多 糖 類 は 、 免 疫 原 性 で あ り 得 る 。 一 実 施 形 態 に お い て 、 対 象 の N - グ リ カ ン を 含 む 抗 体 は 、 親 C H O 細 胞 に よ っ て 産 生 さ れ る 抗 体 の 免 疫 原 性 に 匹 敵 す る 免 疫 原 性 ま た は イ ン ビ ボ で の そ の 欠 失 を 呈 す る 。 免 疫 原 性 ま た は そ の 欠 失 を 評 価 す る た め の 方 法 は 、 当 該 技 術 分 野 で 公 知 で あ る 。 例 え ば 、 従 来 の ア プ ロ ー チ は 、 血 清 抗 体 力 価 な ど 、 抗 体 応 答 を 誘 発 さ せ る 免 疫 原 性 の 能 力 を 測 定 す る

ことである。実施例14および図29で説明するように、インビボでの免疫原性は、本発明の対象の抗体に対する抗体力価によって測定される。具体的には、一例において、野生型CHO細胞によって産生される対象のET101抗体またはCHO-1E5細胞によって産生されるET101は、2群の非ヒト霊長類へと個別に注射される。注射した対象の抗体に応じた血清IgM産生をELISAによって測定する。血清IgM力価は、対象の抗体によってインビボで誘発される免疫原性のレベルを反映する。抗体力価は、血清の1:1~1:1,000,000希釈の範囲で測定することができる。いくつかの実施形態において、CHO細胞またはCHO-1E5細胞によって産生される対象の抗体に対するIgM力価は、100,000ng/血清mL以下、10,000ng/mL以下、1,000ng/mL以下、100ng/mL以下、またはさらに10ng/mL以下の範囲にある。いくつかの実施形態において、IgM力価は、1:100の血清希釈で405nmにおける約0.1の光学密度(OD)であり、約500ng~1000ng/IgM/血清mLに相当する。図29に示すように、IgM力価は、抗体注射後、7日間超、14日間超、20日間超、24日間超、30日間超、35日間超、またはさらにそれより長い間にわたって増大しない。

10

20

30

40

50

【0129】

対象の抗体の免疫原性を評価するためにIgMまたは他の抗体のアイソタイプ力価を測定するのに適したアッセイには、放射性リガンド、酵素、蛍光、化学発光、または電気化学発光による検出系を用いた直接結合アッセイ、架橋アッセイ、捕捉(サンドイッチ)アッセイ、および競合的イムノアッセイを含むが、これらに限定されない。標的抗体のインビボでの免疫原性を評価するための1つの代替的な方法は、高い循環濃度の標的抗体、すなわちET101-CHO-1E5抗体の存在下でヒトおよびカニクイザルの血清における抗薬剤抗体(ADA)を決定するための磁気ビーズベースの免疫沈降法後の定量的液体クロマトグラフィー-質量分析(LC/MS)である。利用可能なADA結合部位は、過剰量の標的抗体の添加によって飽和させた後、磁気ビーズベースのIgG抗体のならびに抗体の結合した抗原のプロテインGにより単離した後、溶出および消化を行う。次に、標的抗体のペプチドを、全ADAの存在を推測する安定同位体標識した標準物質を用いたLC/MSによって定量する。このアプローチの補完によって、免疫原性応答の評価についての方法論が確立された(Hendrik N. et al. Analytical chemistry, 2008 vol. 80, n° 18, pp. 6907-6914)。

【0130】

標的抗体によって誘導される望ましくない免疫原性は、体液性および細胞性免疫応答を含むことができる。所望の場合、体液性および細胞性の両方の免疫応答を測定することができる。たいていの場合、成熟型IgG応答の顕性は、潜在的な抗原に特異的なヘルパーT細胞の関与を含意する。本発明の対象の抗体の投与の際に細胞介在性応答を検出する/評価するためのアッセイの例には、T細胞刺激/増殖アッセイ、サイトカイン(例えば、IL2、IL4、IFN-)産生/放出法、受容体のリン酸化状態の測定、または1つ以上のT細胞もしくはB細胞の細胞内マーカーの調節を含むが、これらに限定されない。これらは、他の細胞種、例えば樹状細胞の調製物と時々同時に培養されるT細胞調製物の使用を包含する。エリスロットおよびフローサイトメトリー手順は、これらのアッセイに共通して用いられる。記憶B細胞(および時には記憶T細胞)アッセイは、免疫応答の性質に関する有用な情報を提供することができ、免疫原性の顕性の予測の一助となり得る。ペプチドまたは全長の標的タンパク質、例えばET101-CHO-1E5抗体(アッセイおよびアッセイの目的による。)およびエリスロット法を用いた研究を用いることができる("GUIDELINE ON IMMUNOGENICITY ASSESSMENT OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED THERAPEUTIC PROTEINS", 2007参照)。

【0131】

Fc受容体(FcR)結合

一態様において、本発明は、修飾された宿主細胞によって産生された抗体を提供し、ここで、抗体は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、Fc受容体であるFcRIIIaに対する高い結合親和性、および/または別のFc受容体であるFcRIIbに対する低い結合親和性を有し、それにより、このようなFc受容体を発現するエフェクター細胞に対する抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用を高める。別の態様において、本発明は、修飾された抗体を産生する能力によって特徴づけられる修飾された宿主細胞を提供し、ここで、抗体は、修飾されていない宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較してFcRIIIaに対する高い結合親和性、および/またはFcRIIbに対する低い結合親和性を呈する。

【0132】

抗体および抗体-抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用(ADCC)を含む種々の応答に影響をもたらす(Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997); Ward and Ghetie, Therapeutic Immunol. 2:77-94 (1995); および Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)において概説)。

【0133】

用語「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明するために用いられる。典型的なFcRは、天然配列のヒトFcRである。その上、好ましいFcRは、IgG抗体を結合し(受容体)、かつFcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスを受容体を含むものであり、受容体には受容体の対立遺伝子変異体および選択的にスプライシングした形態を含む。FcRII受容体には、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似したアミノ付加配列を有するFcRIIA(「活性化受容体」)およびFcRIIB(「阻害性受容体」)を含む。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメインにおける免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害する受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン阻害モチーフ(ITIM)を含む(総説M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)参照)。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); および de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来同定されるべきものを含む他のFcRは、用語「FcR」によって本明細書に包含される。また、用語には、材料IgGの胎仔への転移を生じる新生仔受容体FcRnも含む(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))。

【0134】

いくつかの抗体エフェクター機能は、抗体のFc領域を結合するFc受容体(FcR)によって媒介される。FcRは、免疫グロブリンのアイソタイプに対するその特異性によって定義される: IgG抗体に対するFc受容体は、FcRと、IgEに対するものはFcRと、IgAに対するものはFcRと、等々呼ばれる。3つのサブクラスのFcRが同定されている: FcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16)。各FcRサブクラスは、2つまたは3つの遺伝子によってコードされており、選択的RNAスプライシングは、複数の転写産物をもたらすので、FcRアイソフォームにおける広範な多様性が存在する。FcRIサブクラスをコードする3つの遺伝子(FcRIA、FcRIB、およびFcRIC)は、染色体1の長いアームの領域1q21.1にクラスター化され; FcRIIアイソフォームをコードする遺伝子(FcRIIA、FcRIIB、およびFcRIIC)およびFcRIIIをコードする2つの遺伝子(RcRIIIAおよびFcRIIIB)はすべ

10

20

30

40

50

て、領域 1 q 2 2 においてクラスター化される。これらの異なる FcR サブタイプは、異なる細胞種において発現する (Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 492 (1991) に概説)。例えば、ヒトでは FcRIIB が好中球でのみ認められるのに対し、FcRIIA は、マクロファージ、単球、NK 細胞、および T 細胞亜集団において認められる。特に、FcRIIA は、NK 細胞に存在する唯一の FcR であり、細胞種の 1 つは ADCc に含まれている。FcRIIA は、マクロファージおよび NK 細胞において発現した活性化膜貫通受容体である。また、FcRIIA は、好中球オプソニン受容体でもある (Ravetch, J. and L. Lanier, 2000, Science 290: 84)。FcRIA は、3 つの細胞外 Ig 様ドメインを有する膜貫通タンパク質である。FcRI は、単球およびマクロファージにおいて構成的に発現し、好中球および好酸球において誘導することができる。造血細胞における FcR 発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 92 (1991) において概説されており、そのすべての内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0135】

一実施形態において、本発明は、FcR 結合親和性の変化した抗体を提供する。FcR 結合親和性の「変化した」抗体とは、親抗体とまたは天然配列 Fc 領域を含む抗体と比較して高いまたは低いいずれかの FcR 結合活性および / または ADCc 活性を有する抗体である。FcR に対して「高い結合を示す」本発明の抗体は、親抗体よりも良好な親和性で少なくとも FcR を結合する。FcR に「低い結合を示す」本発明の抗体は、親抗体よりも低い親和性で少なくとも 1 つの FcR を結合する。FcR に対して低い結合を示すこのような変異体は、FcR に対してはつきりとした結合をほとんどまたはまったく有し得ず、例えば、天然配列 IgG Fc 領域と比較して FcR に対する 0 ~ 20 % の結合を有し得る。

【0136】

親抗体よりも高い親和性で FcR を結合する本発明の抗体は、独特な N 連結型グリカン を有する抗体および親抗体がかなりの量で適用される場合、親抗体よりも実質的に高い結合親和性で先に同定した FcR の任意の 1 つ以上を結合する抗体である。例えば、高い FcR 結合親和性を有する抗体は、親抗体と比較して FcR 結合親和性において約 1.1 倍 ~ 約 10,000 倍、例えば、1.15 倍、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500、1,000、10,000 倍またはそれより多く示し得、ここで、FcR 結合親和性は、例えば本明細書の実施例において開示されるように決定される。

【0137】

句「低親和性受容体」は、例えば約 50 nM 以下の親和性の結合定数を有する関心対象のリガンドに対して弱い結合親和性を有する受容体を示す。典型的な低親和性受容体には、FcRIIa 158F / F および FcRIIa 158F / V を含むが、これらに限定されない。

【0138】

いくつかの実施形態において、CHO 1E5 細胞によって産生される抗体は、活性化 FcR である FcRIIa に対して高い結合を示し、さらに、阻害性 FcR である FcRIIb に対して低い結合を示し得る。

【0139】

抗体依存性細胞傷害 (ADCc) 活性

本開示の修飾された宿主細胞を用いて、先に説明した抗体または機能的抗体断片を産生することができる。また、これらの細胞によって産生された抗体または機能的抗体断片は、修飾されていない親宿主細胞において産生される対応する抗体または機能的抗体断片と比較して、少なくとも 2 つの糖分子のレベルの変化など、本明細書に説明された変異体グリコシル化も呈することができる。さらにその上、変異体グリコシル化パターンを有する

これらの抗体または断片は、修飾されていない親宿主細胞において産生される対応する抗体または抗体断片と比較して、改善された抗体依存性細胞傷害（ADCC）または他の抗体エフェクター機能を有することができる。あるいは、変異体グリコシル化パターンを有する抗体または抗体断片は、変異体グリコシル化パターンを欠失する対応する抗体と比較して、高いADCCを呈する。また、改善されたまたは高いADCC活性を有する抗体または抗体断片は、変異体グリコシル化パターンを有してもよい。

【0140】

例えば、親CHO細胞株は、変異体グリコシル化パターンを有する修飾されたCHO細胞株を生じるよう修飾することができる。次に、修飾されたCHO細胞株は、親CHO細胞によって産生される抗体よりも高いADCC活性を有する抗体を産生することができる。また、修飾されたCHO細胞株によって産生される抗体は、変異体グリコシル化パターンを有することができる。

10

【0141】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用」（ADCC）は、FcRを発現するエフェクター細胞（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）が、標的細胞において結合した抗体を認識し、その後、標的細胞の溶解を生じさせる細胞介在性反応を指す。ADCCを介在する主要な細胞は、NK細胞、単球、およびマクロファージを含む。NK細胞は典型的に、FcRIIIを主として発現するのに対し、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 and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)に要約される。

20

【0142】

「エフェクター細胞」とは、1つ以上のFcRを発現しかつエフェクター機能を実行する白血球である。好ましくは、細胞は、少なくともFcRIIIを発現しかつADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを介在するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞、および好中球を含み；PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、その天然源から、例えば本明細書に説明されている血液またはPBMCから単離されてもよく、または当該技術分野で公知の方法を用いてインビトロで増殖してもよい。

30

【0143】

一実施形態において、本発明の抗体は、対象の抗体がかなりの量で適用される場合、ヒトエフェクター細胞の存在下で、親宿主細胞によって産生される対応する抗体よりも効果的に抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用（ADCC）を媒介する。一般に、ADCC活性は、本明細書に開示されたアッセイを用いて確認することができるが、例えば、動物モデルなどにおけるADCC活性を決定するための他のアッセイまたは方法が意図される。本発明の抗体は、例えば本明細書に開示されるインビトロアッセイにおいて、親抗体よりも介在するADCCにおいて効果的な約1.1倍～約10,000倍、例えば、1.15、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500、1,000、10,000倍またはそれより多くである。

40

【0144】

いくつかの実施形態において、独特なN連結型グリカンを有する本発明の抗体は、親抗体と比較して異なる遺伝子型のFcRIIIaを発現するエフェクター細胞に対して高いADCCを呈する。一例において、独特なN連結型グリカンを有する抗体は、親抗体と比較して、（アミノ酸158が2つの対立遺伝子においてバリンである場合）IgGのFc断片に対して高い親和性を有するFcRIIIa 158V/Vを発現するエフェクター細胞に対して高いADCCを呈する。別の例において、独特なN連結型グリカンを有する抗体は、親抗体と比較して、（アミノ酸158が対立遺伝子のうちの両方または1つにおいてフェニルアラニンである場合）FcRIII 158F/FまたはFcRIII 158F/Vを発現するエフェクター細胞に対して高いADCCを呈する。Fc

50

R I I I aにおけるアミノ酸158においてバリン(V)またはフェニルアラニン(F)の表現型に対応する遺伝子多型は、Fc Rに対するIg G1の親和性に大きく影響することが公知である(Koene HR, et al. Blood 90:1109-1114, 1997)。加えて、Fc R I I I a V対立遺伝子を有する免疫エフェクター細胞は、F対立遺伝子を有する細胞よりも良好に抗HER-2/neu Ig G1変異体のADCCを介在する(Shields RL, et al. J Biol Chem 9:6591-6604, 2001)。抗HER-2/neuモノクローナル抗体であるトラスツズマブは、活性化抗体受容体(断片C受容体(Fc R I I I a; Fc R I I a))および阻害性抗体受容体(Fc R I I b)の両方に結合することが示されており、ナチュラルキラー細胞/単球の抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用(ADCC)に影響を及ぼし得るFc R多型が同定されている。複数の研究は、Fc R多型が、トラスツズマブを受容した乳癌患者の臨床外来と関連しているかどうかを調べた。Fc R I I I a - 158 V/V遺伝子型は、奏効率(ORR)および無進行生存(PFS)と有意に相関していることが認められた。また、Fc R I I a - 131 H/H遺伝子型について、ORRおよびPFSにおける傾向的有意性があった。2つの好性の遺伝子型(VVおよび/またはH/H)が独立して、他の組み合わせと比較してより良好なORRおよびPFSと関連していた。ADCC分析は、V/Vおよび/またはH/H PBM Cが、異なる遺伝子型を有するPBM Cよりも有意に高いトラスツズマブ介在性細胞傷害を有することを示した。Fc R I I I a 158 V/Vを有する患者のPFS概算値は、158 V/F、158 F/F、またはF担体(V/F+F/Fの組み合わせ)を有する患者に関してよりも有意に長い(Antonino Musolino, et al. Journal of Clinical Oncology, Volume 26, No. 11, April 10 2008)。このように、修飾されていない抗体と比較して、Fc R I I I 158 V/Vを発現する細胞およびFc R I I I 158 F/Fを発現する細胞に対して高いADCC活性を有する本発明の抗体は、抗体ベースの治療法で治療された癌を含む種々の障害を有する患者の臨床外来を高める上で非常に有用であり得る。

【0145】

また、本明細書に用いられているADCC活性は、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化型マクロファージ、またはこれらの類似のものなど、エフェクター細胞の表面に存在するFc受容体に対する抗体のFc領域の結合を介してエフェクター細胞を活性化することによって、細胞、例えば腫瘍細胞を損傷させる活性も包含する(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995))。例えば、ADCC活性は、生体における腫瘍細胞の細胞表面抗原に結合した抗体が、Fc受容体(FcR)(例えば、末梢血単核細胞(PBM C)、単球、細胞傷害性T細胞ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)を発現するエフェクター細胞を活性化して、標的細胞における結合した抗体の認識をもたらした後、標的細胞の溶解を生じる細胞傷害活性であり得る(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995))。関心対象の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号において説明されたものなどのインビトロADCCアッセイを実施してもよい。このようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBM C)およびナチュラルキラー(NK)細胞を含む。あるいは、または加えて、関心対象の分子のADCC活性を、例えばClynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)に開示したものなど、動物モデルにおいてインビボで評価してもよい。

【0146】

また、抗体のエフェクター機能には、C1q結合;補体依存性細胞傷害;Fc受容体結

合；抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなども含むが、これらに限定されない。補体依存性細胞傷害（CDC）は、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力を指す。補体活性化経路は、補体系（C1q）の第一成分が、同族の抗原と複合体形成した分子（例えば、抗体）に結合することによって開始される。補体の活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)において説明されたCDCアッセイを実施してもよい。

【0147】

本発明の抗体は、親抗体と比較して生物活性の任意の変化を評価するための1つ以上のアッセイに供してもよい。

10

【0148】

FcRを結合する本発明の抗体の能力を評価してもよい。FcRが、FcRIIIA-158V/Vなどの高親和性Fc受容体である場合、結合は、対象の抗体を滴定すること、および標準的なELISAフォーマットにおける本発明の抗体に特異的に結合する抗体を用いて結合した抗体を測定することによって測定することができる。

【0149】

本発明の抗体のADCC活性を評価するために、変化するエフェクター：標的比を用いて、実施例12において説明されているものなどのインビトロADCCアッセイを実施してもよい。このようなアッセイに有用な「エフェクター細胞」には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞を含む。あるいは、または加えて、本発明の抗体のADCC活性は、インビボで、例えばClynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)において開示されたものなどの動物モデルにおいて評価してもよい。

20

【0150】

製剤、投与、および治療

高いADCC活性を有する本発明の抗体は、種々の障害の予防および治療に有用であり得る。

【0151】

本明細書で用いられる「障害」は、本発明の修飾された宿主細胞によって産生される抗体を用いた治療から恩恵を受けるであろう任意の容態を指す。これには、問題の障害に哺乳類をかかりやすくする病理学的容態を含む慢性および急性の障害または疾患を含む。障害の例には、癌、アレルギー、心血管疾患、炎症性疾患、代謝性疾患、神経学的疾患、ウイルス感染、および/または細菌感染を含むが、これらに限定されない。一実施形態において、障害は癌である。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病を含むが、これらに限定されない。このような癌のより特定の例には、副腎皮質癌、肛門癌、形成不全癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨転移、中枢神経系（CNS）癌、末梢神経系（PNS）癌、乳癌、キャスルマン病、子宮頸癌、小児非ホジキンリンパ腫、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、腫瘍のユーイングファミリー（例えば、ユーイング肉腫）、眼癌、胆嚢癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、妊娠性絨毛性疾患、毛髪様細胞白血病、ホジキン病、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭および下咽頭癌、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、小児白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、肝癌、肺癌、肺カルチノイド腫瘍、非ホジキンリンパ腫、男性乳癌、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽癌、神経芽腫、口腔および中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫（成人柔組織癌）、メラノーマ皮膚癌、非メラノーマ皮膚癌、胃癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宮癌（例えば、子宮肉腫）、腔癌、外陰癌、およびワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症を含むが、これらに限定されない。癌の一例は、「HER2発現癌」であり得、癌は、抗HER2抗体が癌に結合することができるよう細胞表面に存在するHER2受容体タンパク質（Semba et al., PN

30

40

50

AS (USA) 82:6497-6501 (1985) および Yamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (Genebank 寄託番号 X03363) を有する細胞を含む。

【0152】

例えば、悪性腫瘍などの癌において、高ADCC活性を有する抗体は、その細胞傷害効果を通じて癌細胞の増殖を損傷させることによって癌を治療することができる。種々の腫瘍細胞に及ぼす抗体の抗腫瘍効果は、先に説明した方法によって分析することができる。例えば、CDC活性測定法、ADCC活性測定法、およびこれら類似のものなどだがこれに限定されないインビトロ試験、ならびにマウスなどの実験動物における腫瘍系を用いた抗腫瘍実験またはこの類似のものなどのインビボ試験を実施してもよい。CDC活性およびADCC活性測定並びに抗腫瘍実験は、Shitara et al., Cancer Immunology Immunotherapy, 36, 373-380 (1993); Nakamura et al., Cancer Research, 54, 1511-1516 (1994)、およびこれらの類似のものに説明された方法に従って実施することができる。

10

【0153】

アレルギー反応が、免疫細胞からのメディエーター分子の放出によって典型的に誘発されるアレルギーの治療のために、アレルギー反応は、高ADCC活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することによって阻害することができる。心血管疾患は、高ADCC活性を有する抗体を用いることによって、治療後の再狭窄における動脈細胞の増殖を阻害することによって予防し治療することができる。ウイルスまたは細菌感染を含む種々の疾患は、高ADCC活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を阻害することによって予防しおよび治療することができる。

20

【0154】

いくつかの実施形態において、グリコシル化パターンGlu-GlcNAc₂-Man₄(+/-Fuc)を呈する抗体は、修飾されていない親宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して乳癌細胞、卵巣癌細胞、および肺癌細胞を含むがこれらに限定されない種々の癌細胞に対して高いADCC活性を有する。いくつかの実施形態において、グリコシル化パターンGlu-GlcNAc₂-Man₄(+/-Fuc)を呈する抗体は、修飾されていない親宿主細胞によって産生される対応する抗体と比較して、FcRIIA受容体に対する高い結合親和性を有する。Glu-GlcNAc₂-Man₄(+/-Fuc)を呈する抗体は、修飾されていない親宿主細胞によって産生される対応する抗体と類似したインビボでの薬物動態特性を有する。

30

【0155】

本明細書に開示されたN連結型グリコシル化パターンを有する対象の抗体は、野生型親宿主細胞によって産生される抗体のものに匹敵する薬物動態特性を呈する。薬物動態特性は、薬剤が身体によってどのように吸収され、分配され、代謝され、および排出されるかに関するパラメータを説明する。薬物動態は、吸収、分配、組織における局在性、生体内変換、および排泄の過程を含む、身体における薬剤の経時的な作用に関する研究である。薬物動態パラメータには、薬剤投与の経路、分配容積(V_d)を含む第一オーダーの動態、薬剤のクリアランス(CL)、排出定数(k_{el})、排出半減期(t_{1/2})、血清濃度、生物学的利用率、インビボ溶解度、0オーダー排出、投薬計画、肝臓での薬剤クリアランス、薬剤分配、タンパク質結合、およびイオン化の程度を含むが、これらに限定されない。薬物動態は、薬剤の効果の開始、持続時間、および強度を決定する。

40

【0156】

本発明の抗体の治療用製剤は、所望の程度の純度を有する抗体を、任意の生理学的に許容し得る担体、賦形剤、または安定化剤と混合することによって、凍結乾燥した製剤または水溶液の形態で保存のために調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。許容し得る担体、賦形剤、または安定化

50

剤は、採用される薬用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（塩化アンモニウムオクタデシルジメチルベンジル；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；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、また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、ヒスチジン、アルギニン、またはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、または他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および/またはTween、プルロニクス（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0157】

また、本明細書の製剤は、治療中の特定の適応症に必要な2つ以上の活性化化合物、好ましくは互いに有害な影響をもたらさない相補的な活性を有する活性化化合物も含んでもよい。このような分子は、意図される目的に有効な量で組み合わせにおいて適切に存在する。

【0158】

また、活性成分は、例えばコアセルベーションによってまたは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル、およびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに、コロイド薬剤送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）に、またはマクロエマルジョンに閉じ込めてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

20

【0159】

インビボでの投与に用いられるための製剤は、滅菌済みでなければならない。このことは、滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成される。持効性調製物を調製してもよい。持効性調製物の適切な例には、本発明の抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、マトリックスは、成形された物品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持効性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とD-エチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、Lupron Depot（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーが、100日間を超えて分子の放出を可能にするのに対し、アルヒドロゲルは、タンパク質をより短い期間放出する。封入された抗体が、身体に長い時間残存する場合、抗体は、37°Cで湿気に曝露した結果として変性または凝集し、結果的に生物活性を失い、免疫原性に起こり得る変化を生じる。合理的な戦略は、関与する機序に応じた安定化について考案することができる。例えば、凝集の機序が、チオ-ジスルフィド相互変化を通じての分子間S-S結合形成であると発見される場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥させること、湿気含有量を制御すること、適切な添加物を用いること、および具体的なポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成してもよい。

30

40

【0160】

本発明の1E5細胞によって産生される抗体が、哺乳類、例えば、抗体の投与から恩恵

50

を受け得る、疾患または障害に罹患しているまたはそうなりやすい患者を治療するために用いてもよいことは熟慮される。本発明の抗体を用いて治療することのできる容態は多く、癌（例えば、癌において、本発明の抗体がHER2受容体、CD20、または血管内皮増殖因子（VEGF）を結合する）；喘息などのアレルギー容態（抗IgE抗体を用いる。）；およびLFA-1介在性障害（例えば、障害において、本発明の抗体は、抗LFA-1または抗ICAM-1抗体である。）などを含む。

【0161】

抗体がHER2受容体を結合する場合、障害は好ましくは、HER2発現癌、例えば、HER2受容体の過剰発現によって特徴づけられる良性または悪性腫瘍である。このような癌には、乳癌、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、消化管癌、膵癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、肝細胞癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌（liver cancer）、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌（hepatic carcinoma）、および種々の種類の頭頸部癌を含むが、これらに限定されない。本明細書の教示によると、改善されたまたは低いADCC活性を有する変異体Fc領域を備えたポリペプチドを調製してもよい。このような分子によって、異なる障害の治療における応用が見出されるであろう。

10

【0162】

例えば、改善されたADCC活性を有する抗体は、組織または外来微生物の破壊または排除が望ましい疾患または障害の治療において採用してもよい。例えば、本発明の抗体を用いて、癌；炎症性障害；感染（例えば、細菌、ウイルス、真菌、または酵母感染）；および組織の除去が望ましい（甲状腺腫などの）他の容態などを治療してもよい。

20

【0163】

抗体が低いADCC活性を有する場合、このような抗体を用いて、長い半減期のFc領域含有ポリペプチドが所望である疾患または障害を治療してもよいが、本発明の抗体は好ましくは、望ましくないエフェクター機能を有さない。例えば、Fc領域含有ポリペプチドは、抗組織因子（TF）抗体；抗IgE抗体；および抗インテグリン抗体（例えば、抗4-7抗体）であってもよい。このようなFc領域含有ポリペプチドの作用の所望の機序は、リガンド-受容体結合対を遮断することであってもよい。その上、低いADCC活性を有するFc領域含有ポリペプチドは、アゴニスト抗体であってもよい。

【0164】

本発明の抗体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、および鼻内を含む任意の適切な手段によって、および所望の場合、局所的な免疫抑制治療、病巣内投与のために投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、または皮下投与を含む。加えて、本発明の抗体は、特に本発明の抗体の用量を低下させながら、パルス注入によって適切に投与される。好ましくは、投薬は、注入によって、最も好ましくは静脈内注射または皮下注射によって、投与が短時間であるか慢性であるかに一部依存して与えられる。

30

【0165】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体の適切な薬用量は、治療されるべき疾患の種類、疾患の重度および経過、本発明の抗体が予防目的に投与されるのかまたは治療目的のために投与されるのか、先行療法、患者の病歴、および本発明の抗体に対する応答、ならびにかかりつけの医師の裁量に依存するであろう。本発明の抗体は、1回でまたは一連の治療にわたって患者に適切に投与される。

40

【0166】

疾患の種類および重度に応じて、本発明の抗体の約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 0.1 ~ $20\text{mg}/\text{kg}$ ）が、患者への投与のための初期候補薬用量であり、例えば、1回以上の個別投与によるのかまたは連続的な注入によるのかどうかによる。典型的な1日薬用量は、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得、先に述べた因子による。数日間またはそれより長期にわたって反復される投与については、容態に応じて、治療は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。しかしながら、他の薬用量計画は有用であり得る。この治療法の進行は、従来技術およびアッセイによって容易に

50

モニターされる。

【0167】

抗体組成物は、良好な薬務と一致した様式で製剤され、調薬され、および投与されるであろう。本文脈における考慮についての因子には、治療中の特定の障害、治療中の特定の哺乳類、個々の患者の臨床容態、障害の原因、媒介物の送達の部位、投与方法、投与計画、および医療従事者に公知の他の因子を含む。投与されるべき抗体の「治療的有効量」は、このような考慮によって管理されるであろうし、疾患または障害を予防し、寛解させ、または治療するのに必要な最小量である。抗体は、必要性はないものの、問題の障害を予防しまたは治療するのに現に用いられる1つ以上の媒介物とともに任意で製剤される。このような他の媒介物の有効量は、製剤に存在する抗体の両、障害または治療の種類、および先に論議した他の因子による。これらは、一般に、以前に用いられたのと同じの薬用量および投与経路で用いられ、または以前採用された薬用量の約1~99%で用いられる。

10

【0168】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体および/または宿主細胞を用いて、哺乳類の障害を予防しまたは治療してもよい。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、またはヤギからなる群から選択される。

【0169】

発酵および産生方法

一態様において、本発明は、修飾された糖タンパク質をコードする異種性ポリヌクレオチド配列を提供することと、本明細書に開示された宿主細胞において修飾された糖タンパク質を発現させることを含む、修飾された糖タンパク質を産生する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に開示された宿主細胞を含む培地を包含する。他の実施形態において、本発明はさらに、培地における本発明の複数の宿主細胞を含む培養発酵槽を含む。

20

【0170】

発酵は、しばしば好気性増殖条件下での生化学物質および産業用タンパク質を含む生物学的分子の分解および再構築のための関連する分野で周知の標準的な過程である。本明細書で用いられる発酵槽またはバイオリアクターは、大規模または小規模発酵において、および糖タンパク質、例えば抗生物質を含むがこれに限定されない生物学的マクロ分子の商業的産生において用いられる微生物、例えば本発明の宿主細胞の増殖のための至適条件を維持する装置を指す。

30

【0171】

組換えモノクローナル抗体の産生は、「レパートリークローニング」または「ファージディスプレイ/酵母ディスプレイ」と呼ばれる技術を包含する。組換え抗体工学は、抗体を作製するためのマウスよりもむしろウイルスまたは酵母の使用を包含する。これらの技術は、所望の特異性を有する抗体を選択することのできるわずかに異なるアミノ酸配列を有する抗体のライブラリを作製するための免疫グロブリン遺伝子セグメントの迅速なクローニングによる。これらの技術を用いて、抗体が抗原を認識する特異性、種々の環境条件における抗体の安定性、抗体の治療効能、および抗体の診断応用における検出能を高めることができる。発酵チャンバーを用いて、これらの抗体が大規模で産生されてきた。いくつかの実施形態において、本発明の独特なN-グリカンを発現する抗体は、培養発酵槽において産生することができる。

40

【実施例】

【0172】

実施例1：死滅剤の至適濃度の選択

変異体グリコシル化パターンを有する細胞集団を獲得するために、化学物質を細胞に適用して、変異体グリコシル化パターンを有する細胞を選択しもするであろう無作為なゲノム突然変異を生じさせた。化学物質誘発性の無作為な突然変異誘発は、糖の生合成およびフコシル化などのタンパク質のグリコシル化過程を制御しまたは調節する遺伝子の突然変

50

異をもたらすことができる。突然変異誘発後の低フコシル活性を有する安定したクローンは、高フコシル活性を有する細胞が排除されるであろうように、細胞表面のフコシル化タンパク質に結合し毒素を有するLCAを用いて細胞を標的とすることによって、濃縮されおよび単離される(図1および図2参照)。

【0173】

LCA-ビオチンを添加して、細胞表面に結合させた。次に、ストレプトアビジン-サポリンを培地に添加した。ビオチン-ストレプトアビジン相互作用は、複合体が細胞内へと内部移行し得るよう、サポリンを細胞膜近くへともたす。いったん細胞内に入ると、サポリンは標的剤から切り離すことができ、リボソームを失活させて、死に至らすことができる。

10

【0174】

LCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンの至適濃度を決定するために、高フコシル化活性を有する細胞を効率よく死滅するために、非特異的死滅を減少させて、したがって、結果的に変異体グリコシル化パターンを有する細胞を生じるために、親CHO-K1細胞の死滅に及ぼすLCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリン濃度の異なる組み合わせの効果を実施した。およそ10 μ g/mLの濃度のLCA-ビオチンおよびおよそ2 μ g/mLのストレプトアビジン-サポリンは、親CHO-K1細胞の大部分を死滅する至適組み合わせであった(図3)。

【0175】

実施例2：変異体グリコシル化パターンを有する細胞株の安定性

20

2つの化学的変異原であるICR191およびメタンスルホン酸エチル(EMS)を用いて、無作為なゲノム突然変異を導入した。フレームシフト突然変異およびグアニンアルキル化をそれぞれ典型的に生じるICR191またはEMSを用いて、CHO-K1細胞を処理した。化学物質を16時間後に洗浄した。細胞を5日間回復させた。生き残っていた細胞を10 μ g/mLの濃度のLCA-ビオチンおよび2 μ g/mLのストレプトアビジン-サポリンで4週間選択した。細胞をFITC-LCAで所定の手順で染色した後、FACS分析を実施した。選別された細胞を高密度で培養して、細胞の集団を拡張させ、その後のLCA標識およびFACS選別のために細胞を得た。

【0176】

選択によって、ICR191またはEMS誘発性突然変異誘発後に低フコシル化集団を徐々に濃縮した(図4)。4週間の選択後、LCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンを含まない培地において、細胞を2ヶ月間超増殖させた。獲得した集団は、培地にLCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンの存在なしで、集団の低フコシル化状態を維持した(図4A)。産生株として安定した細胞クローンを得るために、限界希釈を用いて、96ウェルプレートに細胞を播種し、LCA-ビオチンおよびストレプトアビジン-サポリンを含まない培地において単一のクローンを拡張した。細胞のフコシル化状態をFACS分析によって毎週3ヶ月間超モニターした。これらの得られたクローンは、非常に安定した低フコシル化を長期間示し、これらのクローンは、親細胞に匹敵する細胞増殖速度を有していた。クローンのうちの1つにおける低フコシル化状態の安定性を図5に示す。これらの結果は、本無作為突然変異誘発および選択戦略が、低フコシル化細胞を特異的に濃縮することを示す。

30

40

【0177】

実施例3：変異体グリコシル化パターンを有する細胞株のグリコシル化特性

低フコシル化細胞クローンは、修飾されていない細胞株または親細胞株と比較して変化したグリコシル化パターンの独特かつ一貫した特性を有する。この特性は、N-アセチルグルコサミン、連結型マンノースを認識するコンカナバリンA(ConA)、および連結型または連結型N-アセチルグルコサミン残基に結合するグリフォニア(バンデイラエア)シンプリシフォリアレクチンII(GS-II)を用いて親細胞および低フコシル化クローンを染色することによって確立した。標識された細胞をFACSによって分析した。また、低フコシル化クローンは、WGAに対する低い結合親和性を有し、これら

50

のクローンは、低レベルのN-アセチルグルコサミンを有することを示唆する(図6)。対照的に、これらのクローンのCon AおよびGS-IIへの結合は、対照の結合よりも有意に高く、これらのクローンが、非常により高い含有量の連結型マンノースおよび連結型または連結型N-アセチルグルコサミンを有することを示す(図6)。また、グリコシル化パターンのこの独特な特性の安定性も試験した。これらのクローンは、LCA-ビオチン非含有培地において増殖させた場合、同一の特性を8週間超維持した(図5)。CHO-K1突然変異クローンは、懸濁液における無血清培地において増殖し、同様のN-グリカン特性を有した(図7)。

【0178】

実施例4：抗体のグリコシル化特性

変異体グリコシル化パターンを有する細胞株において発現した抗体は、低フコース内容を有する。また、抗体は、図9Bに示される変異体グリコシル化パターンも有する。変異体グリコシル化パターンを呈する突然変異体CHO-K1クローン1E5において、ヒト化抗ErB2抗体ET101を発現させた。1E5変異体クローンは、無血清懸濁液において増殖し、修飾されていない宿主細胞と比較して、1,6-フクソチルトランスフェラーゼ(1,6-fucosyltransferase)(Fut8)の類似のレベルの遺伝子産物を有していた(図8)。細胞から単離した全RNAを単離することによって、転写産物レベルを決定した。転写産物をcDNAへと逆転写し、Fut8転写産物をRT-PCRによって増幅した。アガロースゲルにおける電気泳動によってPCR産物を分離し、アクチンのレベルをロード対照として用いた。

【0179】

突然変異体クローン1E5の培養上清から、抗体を得た。SDS-PAGEおよびクマシーブルー染色によって抗体の発現を決定した(図9A)。SDS-PAGEにおいて泳動した一定分量の試料をニトロセルロースメンブレンに転移し、N-アセチルグルコサミンに(-1,6)連結したフコース、N-アセチルグルコサミン、連結型マンノース、および連結型または連結型アセチルグルコサミンにそれぞれ優先的に結合するビオチン化LCA、WGA、Con A、およびGS-IIを用いてプロットした。同一の抗体は、図9Bにおいて「CHO」として示すように、対照として親CHO-K1細胞において発現した。

【0180】

本結果は、クローン1E5によって産生された抗体が、対照と比較してLCA、WGA、GS-IIに対する有意に低い結合親和性およびCon Aに対する高い結合親和性を有する変異体グリコシル化パターンを有するよう修飾されたことを示す(図9B)結果は、抗体のフコース内容が劇的に低下したことを示す。

【0181】

また、異なるCHO株によって産生された抗体ET101およびET201の単糖類特性も図10A、Bに示すように決定した。抗体ET101またはET201は、親CHO細胞、突然変異体CHO-1E5クローン、突然変異体CHO-3Fクローン、または突然変異体CHO-2.6クローンにおいて産生された。CHOクローンはすべて、懸濁液において培養される無血清培地において増殖するのに適していた。単糖類は、4Mトリフルオロ酢酸とともに100℃で2時間加熱することによって、1mgの抗体ET101およびET201から放出された。次に、単糖類を真空下で乾燥させ、水で再構成した。DX-ISC-3000システム(DIONEX, Sunnyvale, CA)を用いる高性能イオン交換クロマトグラフィーによって、単糖類を分析した。CarboPac-PA-1カラム(DIONEX, Sunnyvale, CA)を用いて、0.8mL/分の流速、35℃で単糖を分離した。試料の注入後、単糖類を18mM NaOHで20分間分離し、200mM NaOHによる10分間の溶出によってカラムを再生した。カラムを18mM NaOHで30分間保持した後、次の注入を行った。親CHOおよび変異体クローンによって産生されるET101における単糖類の定量を図10Aに示す。親CHO細胞および変異体クローンによって産生されるヒトIgG1(ET101およ

10

20

30

40

50

びET201)の単糖組成を図10Bに示しており、親細胞において産生されるものと比較して、変異体クローンにおいて産生されたガラクトースレベルの低下およびグルコースレベルの増加を示す。

【0182】

Yamane - Ohnuki et al., Biotechnol. Bioeng. 87:614-622 (2004)において開示されたFu8-/-ノックアウトCHO細胞によって産生されるヒトIgG1の単糖組成分析を図10Cに示し、図10Cは、ガラクトースレベルおよびグルコースレベルが、野生型細胞とFu8-/-ノックアウトCHO細胞の間で比較的一定であることを示す。

【0183】

実施例5：高いADCC活性を有する抗体

変異体グリコシル化パターンを有する突然変異体クローンにおいて、ヒト化抗ErbB2抗体を発現させ、親細胞において産生された抗体と比較して、細胞株によって合成されたErbB2遮断抗体が高いADCC活性を有することを示した。高いADCC活性を示すために、A549、SKBR3、SKOV3、MDA-MB-361、およびMDA-MB-231細胞の抗体介在性溶解を評価して、細胞傷害の効率を比較した。標的細胞を、クローン1E5、2.6、または3Fから産生されたErbB2遮断抗体(ET101またはET2021)とともにプレインキュベートして、抗体をその標的と結合させた。次に、ヒトPBMCを標的細胞とともにインキュベートした。図11B、12、13、および14において示されるように、対照抗体は、期待されるように細胞の溶解を誘導することができ、変異体グリコシル化パターン化した細胞によって産生される抗体は細胞溶解を有意に高め、このことは、ADCC効率が、変異体グリコシル化パターン化した細胞株の産生する抗体によって高められることを示した。

【0184】

図11Aに示すように、10%FBSを含む1mLの培養上清から発現した抗体ET101を、プロテインLビーズによって沈殿させ、還元型SDS-PAGEによって分離し、クマシーブルーを用いて染色した。空の増殖培地をネガティブコントロールとして用いた。突然変異体異クローンにおいて発現したET101抗体を、10%FBSを含む培養上清からプロテインLクロマトグラフィーによって精製し、UV280によって定量した。親ET101を野生型CHOにおいて発現させ、同一の方法で精製した。同様の方法を用いてET201を得た。

【0185】

図11B、12、13、および14において示されるADCCアッセイについて、突然変異体クローンにおいて発現したET101またはET201抗体を、培養上清からプロテインAクロマトグラフィーによって精製し、UV280によって定量した。親ET101またはET201を野生型CHOにおいて発現させ、同一の方法のように精製した。100μLの標的細胞懸濁液を50μLの発現したErbB2遮断抗体ET101とともに96ウェルプレートにおいて37℃で30分間プレインキュベートした。次に、50μLのPBMCを20:1のエフェクター/標的細胞比で添加した。16時間のインキュベーション後、プレートを遠心沈殿させ、50μLの無細胞上清を新たなプレートに移した。放出された乳酸脱水素酵素(LDH)をCytotoxic 96非放射性細胞傷害アッセイ(Promega, Madison, WI)によって測定した。細胞溶解を、式(E-S)/(M-S)(E:実験による放出、S:自発的放出、M:最大放出)によって算出した。PBSまたは非特異的抗体をネガティブコントロールとして用いた。

【0186】

実施例6：抗体は細胞増殖を阻害する

ErbB2を過剰発現している乳癌細胞株SKBR3をリアルタイム増殖アッセイのための96ウェルプレートにおいて、またはコロニー形成アッセイのための低密度での24ウェルプレートにおいて播種する。細胞を一晩結合させた後、種々の濃度の抗体、対照物、または変異体グリコシル化パターンを有する細胞クローンから産生された種々の抗体を

10

20

30

40

50

培地に添加し、細胞増殖に及ぼすこれらの阻害を試験した。変異体グリコシル化パターンを有する細胞クローンから産生されたEr b B 2遮断抗体は、対照抗体（親細胞によって産生された抗体）に匹敵するまたはそれよりも大きな程度まで細胞増殖を阻害する。細胞増殖の阻害は、コロニー形成アッセイ、リアルタイム増殖アッセイ、または当該技術分野で公知の他の方法などの方法によって確認される。

【0187】

実施例7：N-グリカンの組成および構造の決定

N-グリカンの単糖類の成分を決定するために、CHI-1E5細胞の産生した抗体および無血清懸濁液における親宿主細胞によって産生された抗体を、トリフルオロ酢酸(TFA)で加水分解した。精製した抗体(100 μ g)をトリフルオロ酢酸(TFA)と混合して4MのTFAの終濃度にした。混合物を2時間沸騰させ、溶液を真空下で乾燥させた。ペレットを200 μ Lの脱イオン水に溶解した。100 μ Lの再懸濁した試料をPA1カラムに注入して、単糖類の組成をDionex ICS-3000システム(Dionex, Sunnyvale, CA)によって分析した。図16に示すように、CHO-1E5によって合成されたN-グリカンは、野生型親宿主細胞によって産生されたN-グリカンと比較して、ガラクトースを欠失し、低いフコースおよびN-アセチルグルコサミンを有し、グルコース分子を有している。

10

【0188】

本発明のN-グリカンの組成をさらに確立するために、N-グリカンを、CHO-1E5およびその親宿主細胞によって産生した抗体からPNGase F(New England Biolabs, Ipswich, MA)によって切断した。200 μ gの抗体をPNGase Fを用いて37 $^{\circ}$ Cで72時間消化することによって、N-グリカンを放出した。タンパク質を70%エタノールによって-20 $^{\circ}$ Cで一晩沈殿させ、遠心分離によって除去した。上清を真空下で乾燥させ、200 μ Lの脱イオン水に再懸濁した。C18(Waters, Milford, MA)、AG50WX8、およびAG4x4(BioRad Laboratories, Hercules, CA)を充填したマイクロカラムに試料をロードした。次に、カラムを300 μ Lの脱イオン水で洗浄した。通過画分を回収し、真空下で乾燥させた後、N-グリカンを、MALDI-TOF MS分光計を用いてMALDI-TOF MSについて分析した。m/z値は、ナトリウムと会合したオリゴ糖イオンに相当する。各ピークは、[M+Na]⁺に相当する。2つのピークを、親細胞によって産生される抗体に由来するN-グリカンにおいて観察し、これは、G1(Gal₁-Fuc₁-GlcNAc₄-Man₃)およびG0(Fuc₁-GlcNAc₄-Man₃)N-グリカンの質量に相当する(図17)。対照的に、CHO-1E5細胞によって合成された抗体に由来するN-グリカンにおいて、1257.4の質量を有する単一のピークがある(図17)。単糖類の組成との組み合わせ(図16)で、CHO-1E5によって合成されたN-グリカンの分子組成は、Glu-GlcNAc₂-Man₄(+/-Fuc)であると決定された。

20

30

【0189】

CHO-1E5によって合成されたN-グリカンの単一の集団を、オリゴ糖分析によってさらに決定した。N-グリカンを抗体から放出し、MALDI-TOF MS分析のために精製した。簡潔には、200 μ gの抗体をPNGase Fを用いて37 $^{\circ}$ Cで72時間消化することによって、N-グリカンを放出した。タンパク質を70%エタノールによって-20 $^{\circ}$ Cで一晩沈殿させ、遠心分離によって除去した。上清を真空下で乾燥させ、200 μ Lの脱イオン水に再懸濁した。C18、AG50WX8、およびAG4x4を充填したマイクロカラムに試料をロードした。次に、カラムを300 μ Lの脱イオン水で洗浄した。通過画分を回収し、オリゴ糖をPA200カラムに注入した。Dionex ICS-3000システムによって分析した。MALDI-TOF MS分析による知見と一致して、CHO-1E5によって産生される抗体に由来するオリゴ糖は、親宿主細胞によって産生されるオリゴ糖の異種性特性とは異なる単一ピークおよび実質的に均質な集団として存在する(図18)。

40

50

【0190】

CHO - 1 E 5 によって合成された N - グリカンの単糖類の組成および分子量を基にして、N - グリカンの 6 個の考えられ得る構造を推定した (図 1 9 A および 図 1 9 B) 。 CHO - 1 E 5 によって合成された N - グリカンの構造をさらに決定するために、異なるマンノシダーゼを用いて、抗体における N - グリカンを消化し、放出された単糖を PA 1 カラム / Dionex ICS - 3000 システムによって分析し、1, 2 マンノシダーゼ (Prozyme, San Leandro, CA) を用いて、CHO - 1 E 5 および親細胞によって合成された N - グリカンを切断して、マンノース間に 1, 2 結合があるかどうかを決定した。1, 2 マンノース結合が、野生型 CHO 細胞によって産生された N - グリカンに存在しないことは十分に確立されている。抗体が 1, 2 マンノシダーゼで消化された後に抗体からのサッカリドの放出はなく、このことは、CHO - 1 E 5 によって合成された N - グリカンに存在する 1, 2 マンノース結合がないことを示した。ポジティブコントロールを用いて酵素活性を確認した (オリゴマンノース 9、Prozyme, San Leandro, CA) 。次に、別の酵素 1, 2, 3 マンノシダーゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) を用いて抗体から N - グリカンを切断し、放出されたサッカリドの特性を分析した。野生型 CHO 細胞によって合成された N - グリカンの伝統的な構造に基づいて、1, 3 - マンノース結合の唯一の切断部位があり、この酵素が、二糖または三糖を放出することができたと推論された (Fig. 20 A) 。 CHO - 1 E 5 および親宿主細胞によって合成された抗体 (ET 101) を 1 - 2, 3 マンノシダーゼとともに 37 °C で 24 時間インキュベートした。抗体および酵素を除去するために、消化した抗体溶液をまず MicroCon YM 10 (Millipore, Billerica, MA) に、次に MicroCon YM 100 (Millipore, Billerica, MA) に通過させた。PA 1 カラム / Dionex ICS - 3000 システムによって試料を分析した。図 20 B および 図 20 C に示すように、単糖は、18 mM NaOH によって溶出されず、90 mM NaOH によって溶出される場合、二糖 (ショ糖) の溶出時間に相当するピークが現れた。CHO - 1 E 5 によって産生される抗体における N - グリカンを、1 - 2, 3 マンノシダーゼによって消化した場合、マンノースは 18 mM NaOH によって溶出され、二糖は 90 mM NaOH によって溶出された (図 6 D および 図 6 E) 。 1, 2 マンノース結合の欠失および、CHO - 1 E 5 により産生され抗体から放出されたサッカリドの 1, 2, 3 マンノシダーゼによる特性は、1, 2, 3 マンノシダーゼによる消化の特性と符合する 2 つの構造を示唆している (図 20 F および G) 。

【0191】

実施例 8 : N - グリカンは、抗体の構築に影響しない

糖グリコシル化の変化が、タンパク質の折りたたみおよび機能的構築に影響し得るので、抗体を SDS - PAGE 電気泳動において分離することによって、この問題に取り組んだ。親宿主細胞および CHO - 1 E 5 によって産生される精製された抗体を、還元条件下および非還元条件下での SDS - PAGE 電気泳動に供し、クマシーブルーを用いて染色した。図 21 に示すように、単量体 (軽鎖および重鎖) および CHO - 1 E 5 によって合成された抗体全体の泳動は、還元条件下および非還元条件下で親宿主細胞によって産生された抗体と同一であり、このことは、CHO - 1 E 5 細胞によって産生された N - グリカンが、産生された抗体の機能的構築に干渉しないことを示唆する。

【0192】

実施例 9 : 高い ADCC 活性および Fc R I I I a に対するより高い結合親和性を有する抗体

本発明の N - グリカンを用いた抗体の修飾が、ADCC 活性などのその生物学的機能を改善するかどうかを決定するために、Er b B 2 および E G F R を標的とする 2 つの精製された抗体を用いて、これらのインビトロでの ADCC 活性を試験した (それぞれ ET 101 および ET 201) 。 ET 101 抗体は、Er b B 2 を遮断する I g G 1 である。CHO - 1 E 5 細胞によって産生された ET 101 を、培養上清からプロテイン A クロマト

グラフィーによって精製し；およびUV280によって定量した。修飾されていない親ET101を、野生型CHO細胞において発現させ、同一の方法で精製した。ADCCアッセイのために、100 μ Lの標的細胞懸濁液を50 μ Lの発現したErbB2遮断抗体ET101とともに96ウェルプレートにおいて37 $^{\circ}$ Cで30分間プレインキュベートした。16時間のインキュベーションの後、プレートを遠心沈殿させ、50 μ Lの無細胞上清を新たなプレートに移した。放出されたLDHを、Cytotox96非放射性細胞傷害アッセイ(Promega, Madison, WI)によって測定した。細胞溶解を式 $(E - S) / (M - S)$ (E:実験による放出; S:自発的放出; M:最大放出)によって算出した。PBSまたは非特異的抗体をネガティブコントロールとして用いた。卵巣癌細胞株(SKOV3)および乳癌細胞株(MDA-MB-231)に対する無血清培地におけるCHO-1E5細胞クローンによって産生されたN-グリカン呈するET101のADCC活性は、親CHO細胞によって産生される修飾されていないET101のADCC活性と比較して有意に高かった(図22A)。

10

【0193】

ET201は、抗EGFR抗体である。CHO-1E5細胞において発現したET201を、培養上清からプロテインAクロマトグラフィーによって精製し、UV280によって定量した。図8Aにおいて説明されるのと同じ方法を用いて、ADCCアッセイを実施した。肺癌細胞株(A549)に対する無血清培地におけるCHO-1E5細胞クローンによって産生されたN-グリカン呈するET201のADCC活性は、親CHO細胞によって産生された修飾されていないET101のADCC活性と比較して高かった(図22B)。

20

【0194】

本発明のN-グリカンがADCC活性をどのように改善するのかをさらに同定するために、組換えFcRIaおよびFcRIIa(R&D Systems, Minneapolis, MN)およびForteBioシステム(ForteBio, Menlo Park, CA)を用いて、これら2つのFc受容体に対する抗体の結合親和性を測定した。抗体をまずビオチン化し、ストレプトアビジンで被覆したバイオセンサー(ForteBio, Menlo Park, CA)にロードした。組換えFcRIおよびFcRIIタンパク質を100~400nMの濃度で懸濁した(R&D Systems, Minneapolis, MN)。結合親和性(K_D , nM)をForteBioの標準的な動力学プロトコールに従って評価した。CHO-1E5細胞によって産生された抗体は、親CHO細胞によって産生された抗体と比較して、FcRIIaに対する高い結合親和性を有していたが、FcRIaに対する結合においては有意差がなかった(図23)。これらの結果は、本明細書に説明された組成および構造を有するN-グリカンによるタンパク質のグリコシル化が、FcRIIaに対する改善された結合親和性および高いADCC活性を抗体に与えることを示す。

30

【0195】

実施例10：N-グリカン呈する抗体の薬物動態

CHO-1E5細胞によって合成されるN-グリカンによるグリコシル化が、インビボでの抗体の薬物動態に影響を及ぼすことができるかどうかを決定するために、親宿主細胞によってまたはCHO-1E5細胞によってのいずれかで産生される抗体を、各抗体につき3個体の13週齢の雌Balb/cマウスに尾静脈を通じて10mg/kgで注射した。50 μ Lの血液を5分、1時間、6時間、72時間、および120時間で採取した。抗体の血清濃度を注射1、6、72、および120時間後にモニターした。血清における抗体濃度をOCTET(ForteBio, Menlo Park, CA)によって測定した。5分の時の抗体濃度を100%として考えた。CHO-1E5によって産生された抗体の薬物動態は、親宿主細胞によって産生された抗体の薬物動態に匹敵し(図24)、このことは、本発明のN-グリカンが、抗体のインビボでの薬物動態に影響されないことを示す。

40

【0196】

50

実施例 11 : CHO - 1 E 5 によって産生されるオリゴ糖のさらなる構造分析

1 E 5 細胞によって合成された N - グリカンの構造をさらに実証するために、PNGase F によって放出された高品質の N - グリカンを大量に精製し、精製された N - グリカンおよびポジティブコントロール (オリギマンノース (Oligimannose) 9, Glyko, San Leandro, CA) を 1, 2, 3 マンノシダーゼまたは 1, 2, 3, 6 マンノシダーゼで消化し、消化産物を PA1 カラムおよび Dionex ICS - 3000 システム (Dionex, Sunnyvale, CA) によって分析した。

【0197】

1 E 5 (A および C) によって合成された抗体 (ET101) およびポジティブコントロール N - グリカン (バンド D) (オリギマンノース 9, Glyko, San Leandro, CA) を、1, 2, 3 マンノシダーゼ (A および B) または 1, 2, 3, 6 マンノシダーゼ (C および D) とともに 37 °C で 24 時間インキュベートした。抗体および酵素を除去するために、消化した抗体溶液をまず、C18、AG50WX8、および AG4x4 を充填したマイクロカラムに通過させた。次に、カラムを 300 μL の脱イオン水で洗浄した。通過画分を回収し、真空下で乾燥させ、PA1 カラム / Dionex ICS - 3000 システムによって分析した。

【0198】

消化産物を 18 mM NaOH によって溶出すると、2 つのピークを観察した。1 つのピークは、マンノース標準物質の溶出時間に相当する 17 分であった。別のものは、二糖標準物質に類似している 24 分であった (図 25 A)。1, 2, 3 マンノシダーゼによる消化パターンは、2 つの構造、すなわち、本明細書で開示された式 1 および式 2 の予想と一致し、マンノースが、1, 2, 3 マンノシダーゼ消化によって放出されると予測し得なかったため、他の推定構造の可能性を除外する。1, 2, 3 マンノシダーゼによるオリギマンノース 9 の産物は、予想と一致していた (図 25 B)。1, 2, 3, 6 マンノシダーゼによって消化される場合、マンノース、二糖、および三糖の標準物質に相当する 3 つのピークを 18 mM NaOH により溶出した (図 25 C)。また、1, 2, 3, 6 マンノシダーゼによる消化パターンも、構造式 1 および構造式 2 の予想と一致した (図 25 C)。これらのデータは、構造式 1 および構造式 2 が、1 E 5 細胞によって合成された N - グリカンの 2 つの最終候補構造であることをさらに確立する。これら 2 つの構造を識別する利用可能な方法は今のところない。

【0199】

実施例 12 : 低親和性 Fc RIIIIa 158 F / F を発現する細胞に対する高い ADCC

ヒト FC RIIIIa は、アミノ酸 158 における多型を有する。アミノ酸 158 が、2 つの対立遺伝子においてパリンである場合、Fc RIIIIa は、IgG の Fc 断片に対して高い親和性を有する (Fc RIIIIa 158 V / V と命名)。アミノ酸 158 においてフェニルアラニン担体である場合、IgG の Fc 断片に対する Fc RIIIIa の結合親和性は低い (Fc RIIIIa 158 F / F または 158 F / V)。ADCC 活性は、Fc 断片による Fc RIIIIa 結合親和性と正の相関関係にある。ADCC アッセイにおいて用いられる PBMC の Fc RIIIIa の多型を、先に示すように遺伝子型同定した。

【0200】

ADCC アッセイについて、100 μL の標的細胞懸濁液を 50 μL の発現した ErbB2 遮断抗体 ET101 とともに 96 ウェルプレートにおいて 37 °C で 30 分間プレインキュベートした。次に、50 μL の PBMC を 20 : 1 のエフェクター / 標的細胞比で添加した。16 時間のインキュベーション後、プレートを遠心沈殿させ、50 μL の無細胞上清を新たなプレートに移した。放出された LDH を CytoTox 96 非放射性細胞傷害アッセイ (Promega, Madison, WI) によって測定した。細胞溶解を式 (E - S) / (M - S) (E : 実験による放出、S : 自発的放出、M : 最大放出) に

10

20

30

40

50

よって算出した。PBSまたは非特異的抗体をネガティブコントロールとして用いた。これらのアッセイに用いたPMBCからゲノムDNAを単離した。FcRIIIaの多型を遺伝子同定するPCRアッセイは、当該技術分野で標準的なプロトコールに従っている。ADCC活性を卵巣癌細胞株(SKIV3)および乳癌細胞株(MDA-MB-231)に対して測定した。高親和性FcRIIIa 158V/Vまたは低親和性FcRIIIa 158F/Fのいずれかを発現することとなる遺伝子背景のPMBCをエフェクター細胞として用いる場合、CHO-1E5細胞によって産生された独特なN-グリカンを発現する抗体は、ADCC活性を等しく効率的に高めることが認められた(図26Aおよび図26B)。CHO-1E5細胞によって産生されたET101抗体は、低親和性FcRIIIa 158F/Fに等しく十分に結合し、強いADCC応答を誘発した。

10

【0201】

実施例13: IE5細胞によって産生される抗体は、親抗体と比較してFcRIIIaに対するより高い結合親和性およびFcRIIbに対するより低い結合親和性を呈する

ADCCは、細胞表面抗原を標的とする特異的な抗体がまず細胞に結合し、次に、抗体のFc断片が、ナチュラルキラー細胞および単球などのエフェクター細胞を標的細胞へと、エフェクター細胞の細胞表面に発現したFc受容体に対するFc結合を通じて動員する過程である。エフェクター細胞によって標的細胞を死滅するために、動員によって標的およびエフェクター細胞を接近させる。Fc受容体は、I、II、およびIIIの3種類からなる。FcRIa、FcRIIa、およびFcRIIIaは、活性化された場合にADCCを介在し高める活性化受容体である。FcRIIbは、活性化された場合、ADCCを遮断する阻害性受容体である。そのため、FcRIa、FcRIIa、またはFcRIIIaに対する高親和性を有する抗体は、高いADCC活性を有する。しかしながら、FcRIIbに対する親和性を有する抗体は、ADCC活性を阻害し得、その逆もまた同じであり得る(図27)。

20

【0202】

IE5細胞によって産生された抗体によるこの高いADCC活性の機序を決定するために、FcRに対する抗体の結合親和性を評価した。ヒト全長FcRIIIAおよびFcRIIbを発現ベクターへとクローニングし、CHO-K1細胞において安定して発現させた。20mMEDTA含有PBSによって組織培養皿から細胞を放出し、単一の細胞へと分けた。細胞を、5%FBSを有するPBSにおける10μg/mLのビオチン化抗体とともに、氷上で30分間インキュベートした。PBSによる3回の洗浄後、細胞をFITC抱合型ストレプトアビジンとともにインキュベートし、FACSによって分析し、平均蛍光強度(MFI)を獲得した。(10μg/mLにおける)阻害性FcRIIb(A)および活性化FcRIIIA(B)との抗体結合親和性、ならびに機序スキームを図27に示す。

30

【0203】

細胞表面にFcRIIbおよびFcRIIIa 15(V/V型 - 高親和性)を含むヒトFc受容体を安定して過剰発現したCHO-K1細胞株を確立した。FACSアプローチを用いることによって、親CHO細胞およびIE5細胞によって産生された抗体とこれらのFc受容体との結合親和性を、平均蛍光強度(MFI)を定量することによって測定した。IE5細胞によって産生された抗体は、親CHO細胞によって産生された抗体と比較した場合、阻害性受容体FcRIIbとの有意に低い結合親和性を有することが認められ(図27Aおよび図28)、阻害性受容体が、CHO-1E5細胞によって産生された抗体によって非常に低く活性化されることを示唆する。さらにその上、IE5細胞によって産生された抗体は、親CHO細胞によって産生された抗体としてのIgG(FcRN)に匹敵する、FcRIおよび新生仔Fc受容体に対する結合親和性を有した(図28)。これらの結果は、IE5により産生された後退による高いADCC活性が、活性化FcRIIIaの高い活性化および阻害性FcRの低い活性化によって介在されるという機序を示唆する。

40

50

【0204】

実施例14：CHO-1E5細胞によって産生される抗体の免疫原性

修飾されていない親CHO細胞によって産生される抗体のADCC活性と比較して高いADCC活性を呈するCHO-1E5細胞によって産生される抗体の免疫原性を評価するために、対象の抗体のインビボでの免疫原性を、霊長類における対象抗体に対して特異的な抗体の力価を測定することによって評価する。具体的には、体重4～6キログラム(kg)の3～5歳の雌カニクイザルは、野生型CHO細胞によって産生された抗Her2抗体ET101、またはCHO-1E5細胞によって産生されたET101を、8mg/mL/体重kgの用量で受ける。各群2個体であり、0.5mLの血液を抗体注射の7日前、および抗体注射の3、5、7、14、21、28、35日後に採取した。血清試料を単離し、-80℃で凍結した(図29A)。ELISAを用いて、カニクイザルにおけるET101-CHO-1E5抗体の免疫原性を決定した。本アッセイは、投与したET-101抗体に特異的なサル血清におけるIgMの存在を検出した。ELISAプレートをET101-CHOまたはET101-CHO-1E5抗体で被覆する。単離された異なる希釈のサル血清試料を、被覆したプレートに適用して、被覆したET-101-CHOまたはET-101-CHO-1E5抗体に結合させる。結合したIgMを抗IgM二次抗体で検出する(図29B)。ELISAの結果は、ET101-CHOおよびET-101-CHO-1E5抗体の間で免疫原性に有意差を示さない(すなわち、サル血清におけるET101特異的IgMレベル)。本実施例は、CHO-1E5クローンによって産生された抗体が、野生型CHO細胞によって産生された抗体よりも高い免疫原性を誘発しないことを示す。

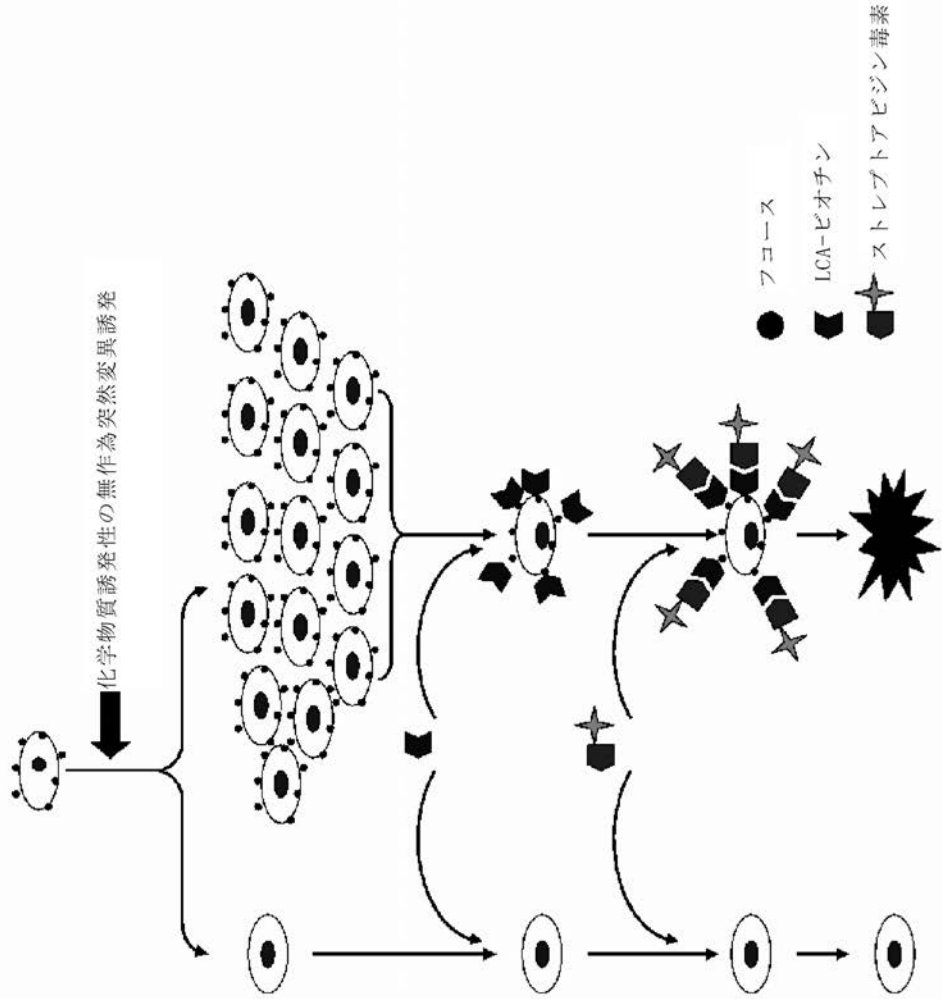
10

20

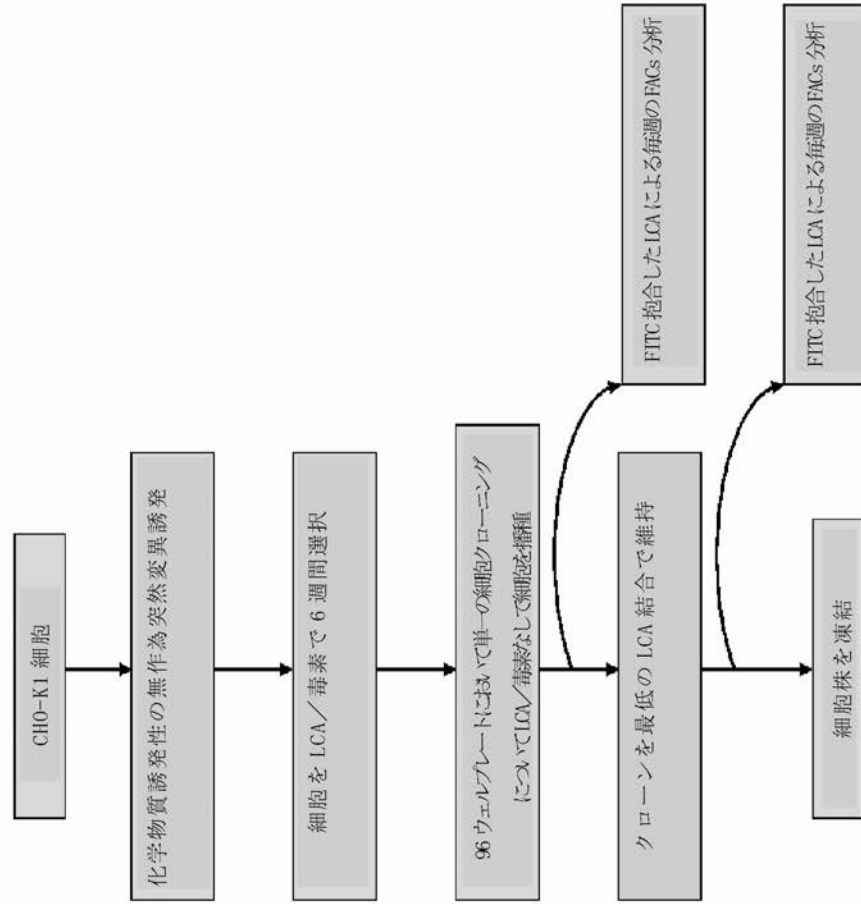
【0205】

本開示は、先に説明した実施形態に限定されるのではなくて、下記の特許請求の範囲内で変更することができる。当業者は、所定の実験だけを用いて、本明細書に説明される本開示の具体的な実施形態の多くの等価物を認識するであろうし、または確認することができるであろう。

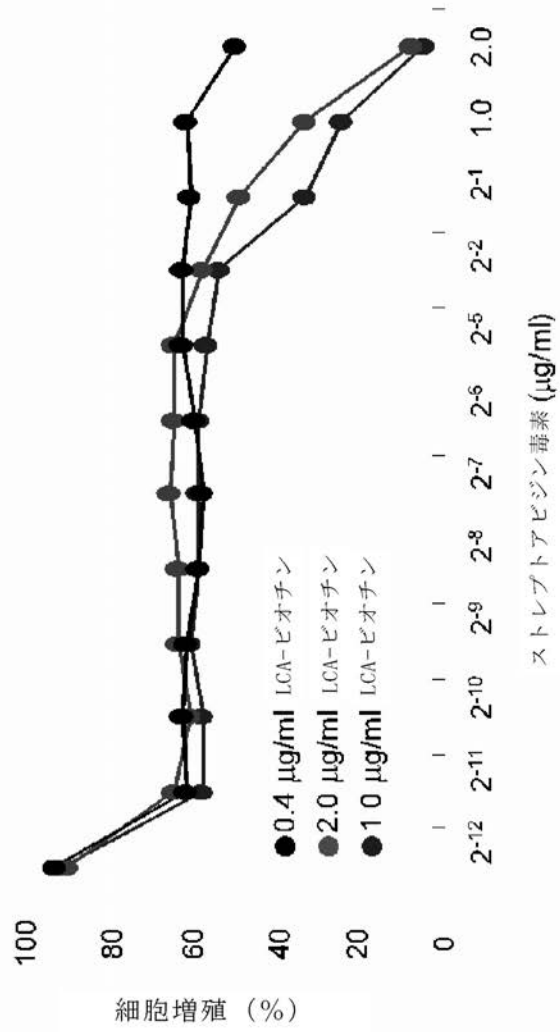
【 図 1 】



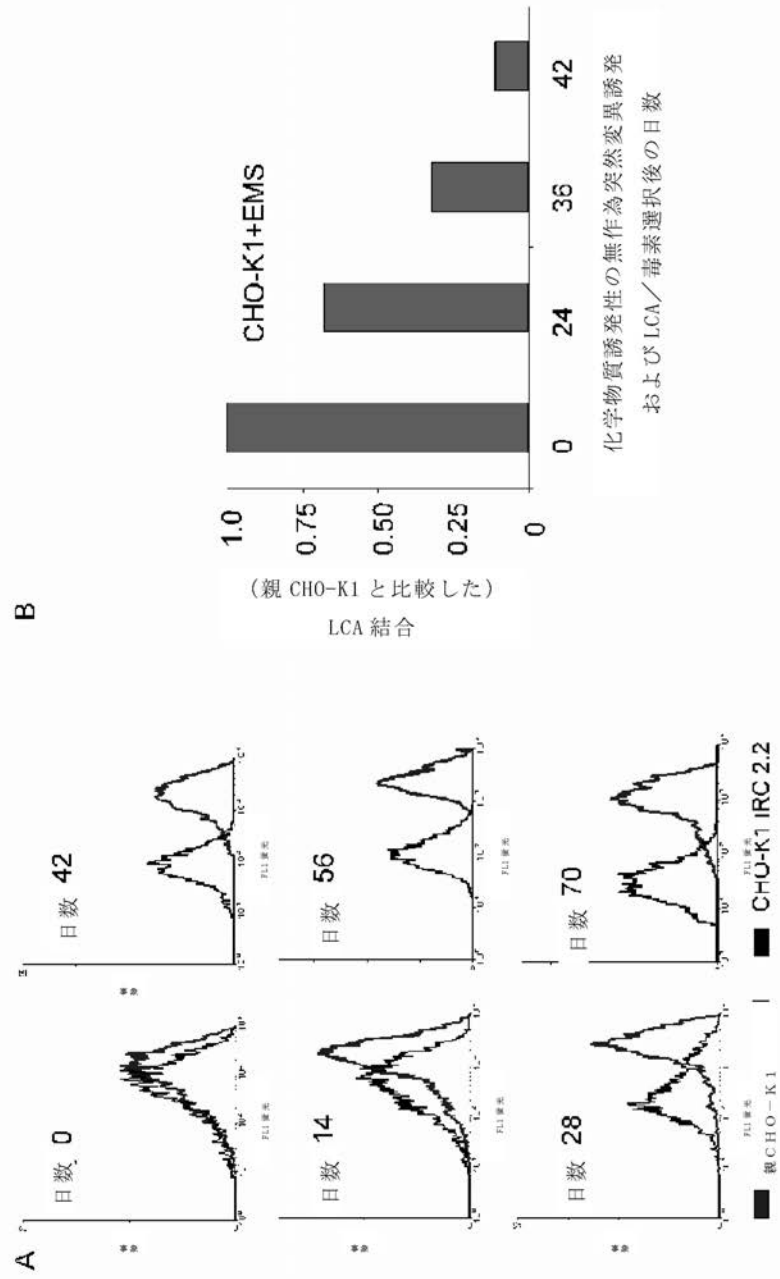
【 図 2 】



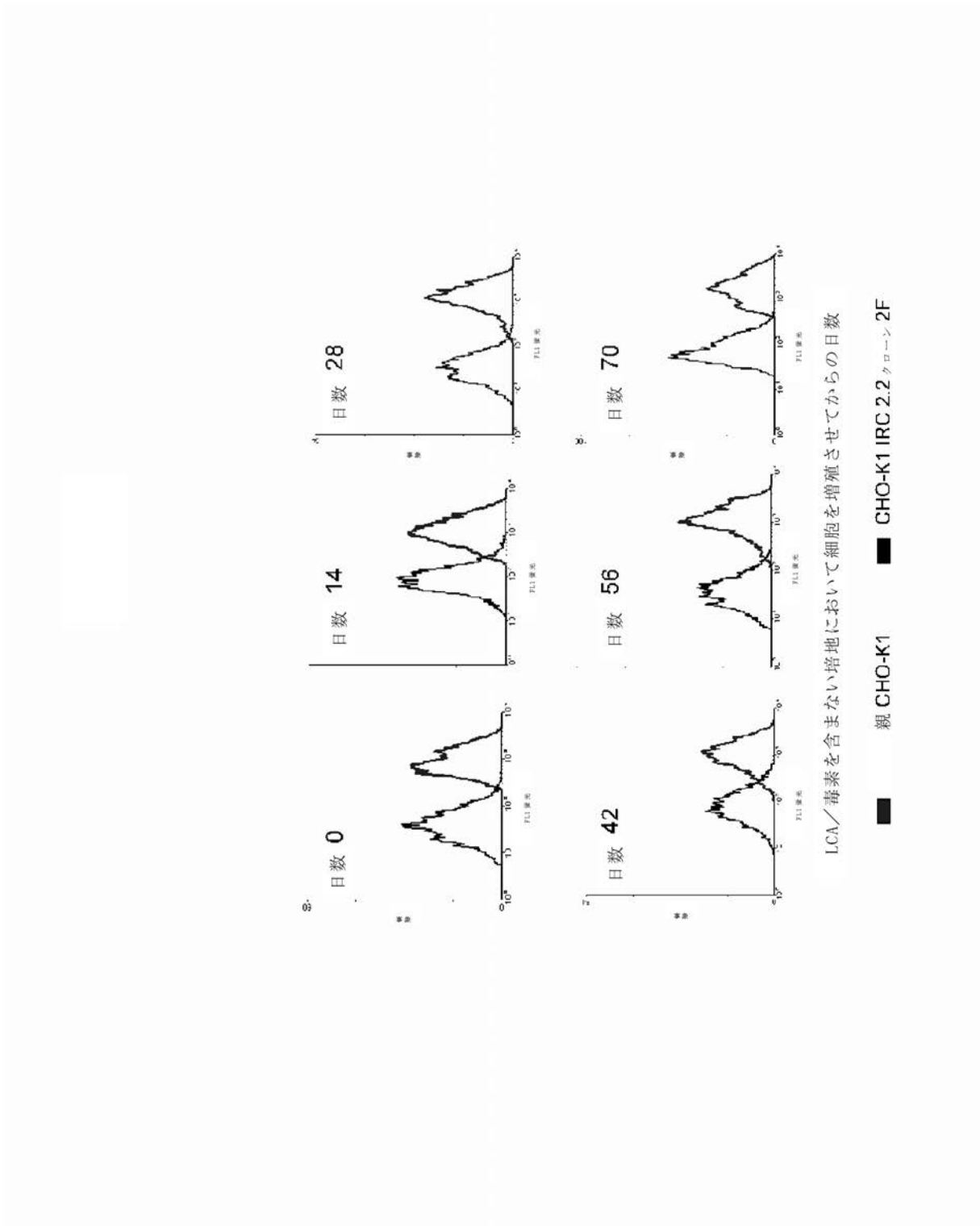
【 図 3 】



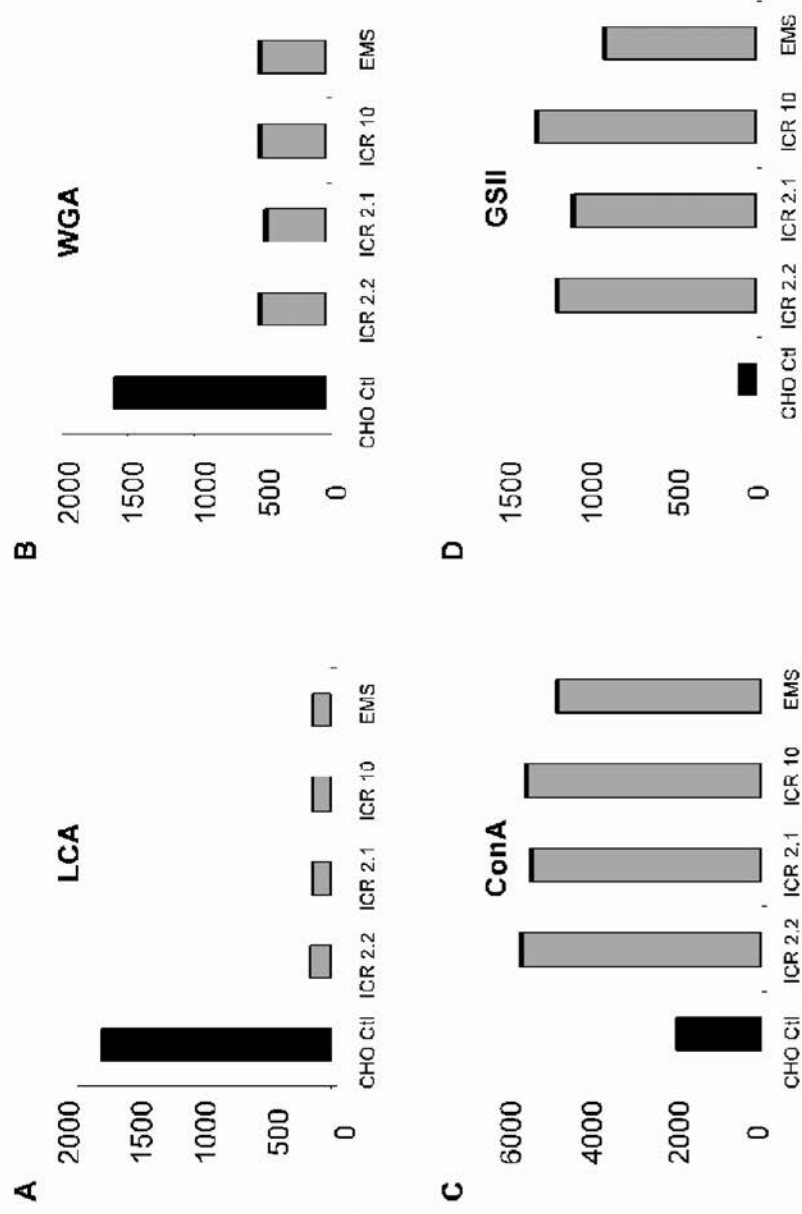
【 図 4 】



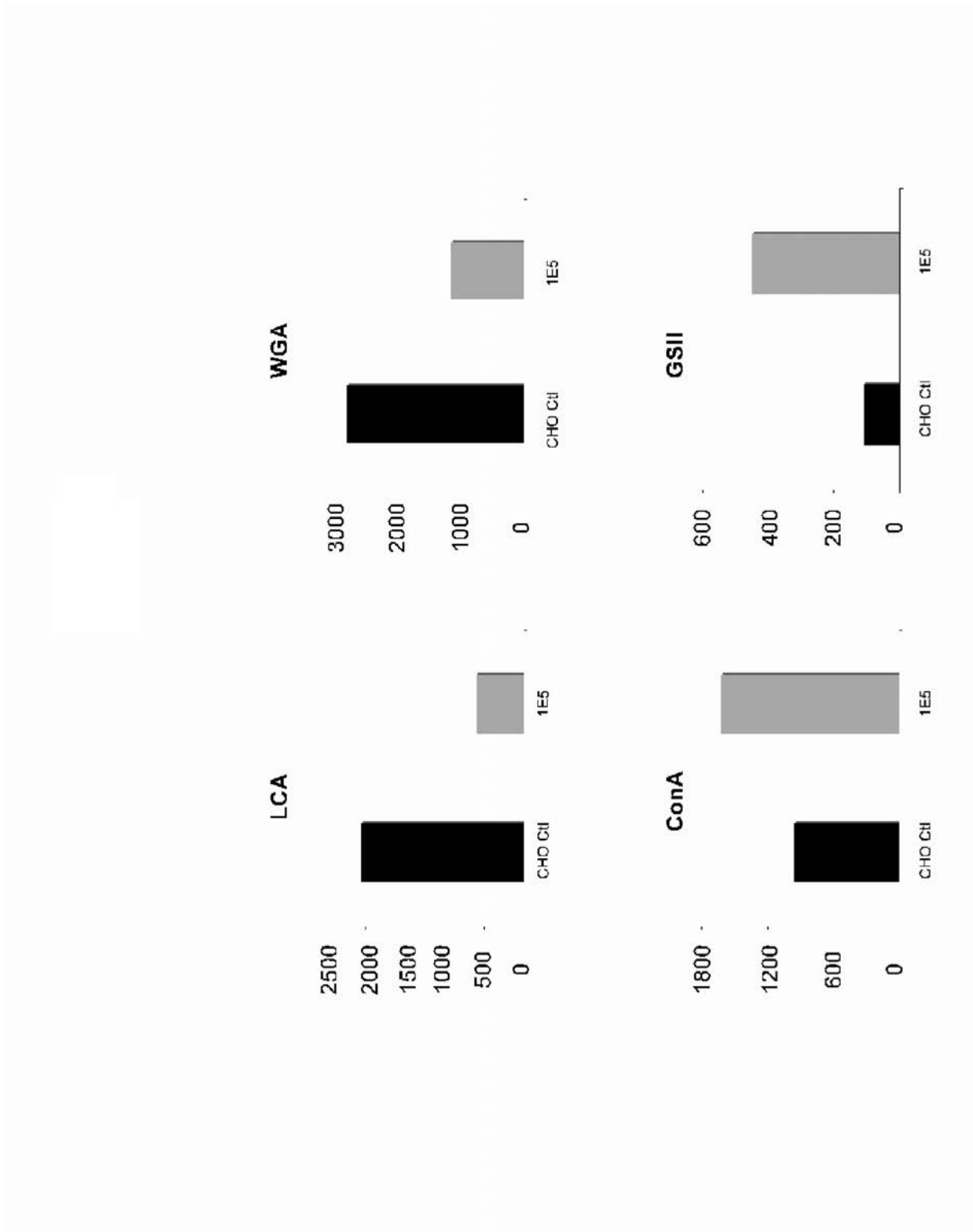
【 図 5 】



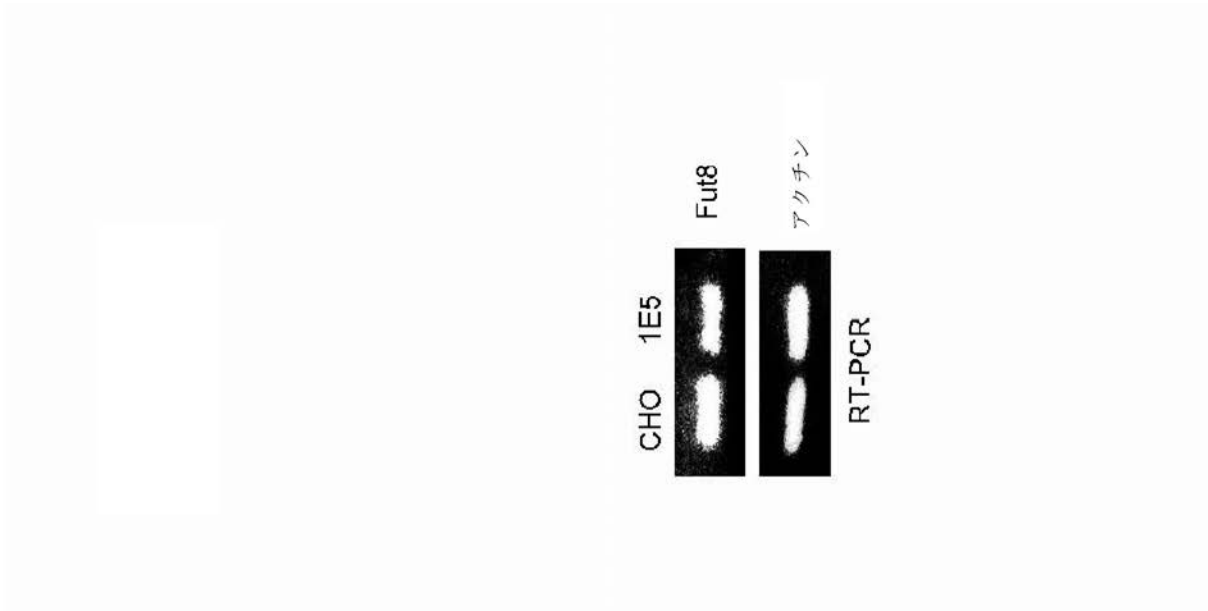
【 図 6 】



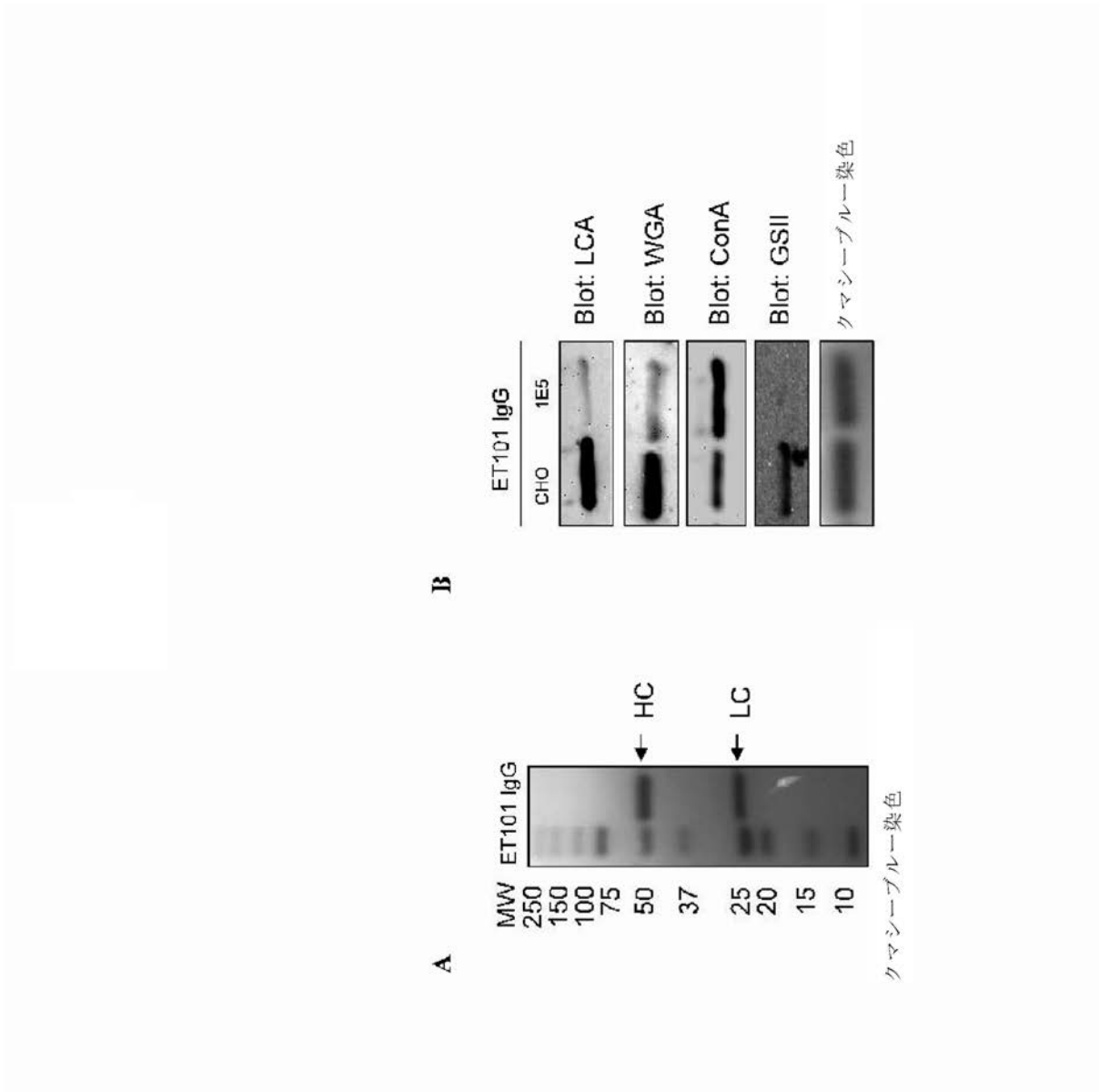
【 図 7 】



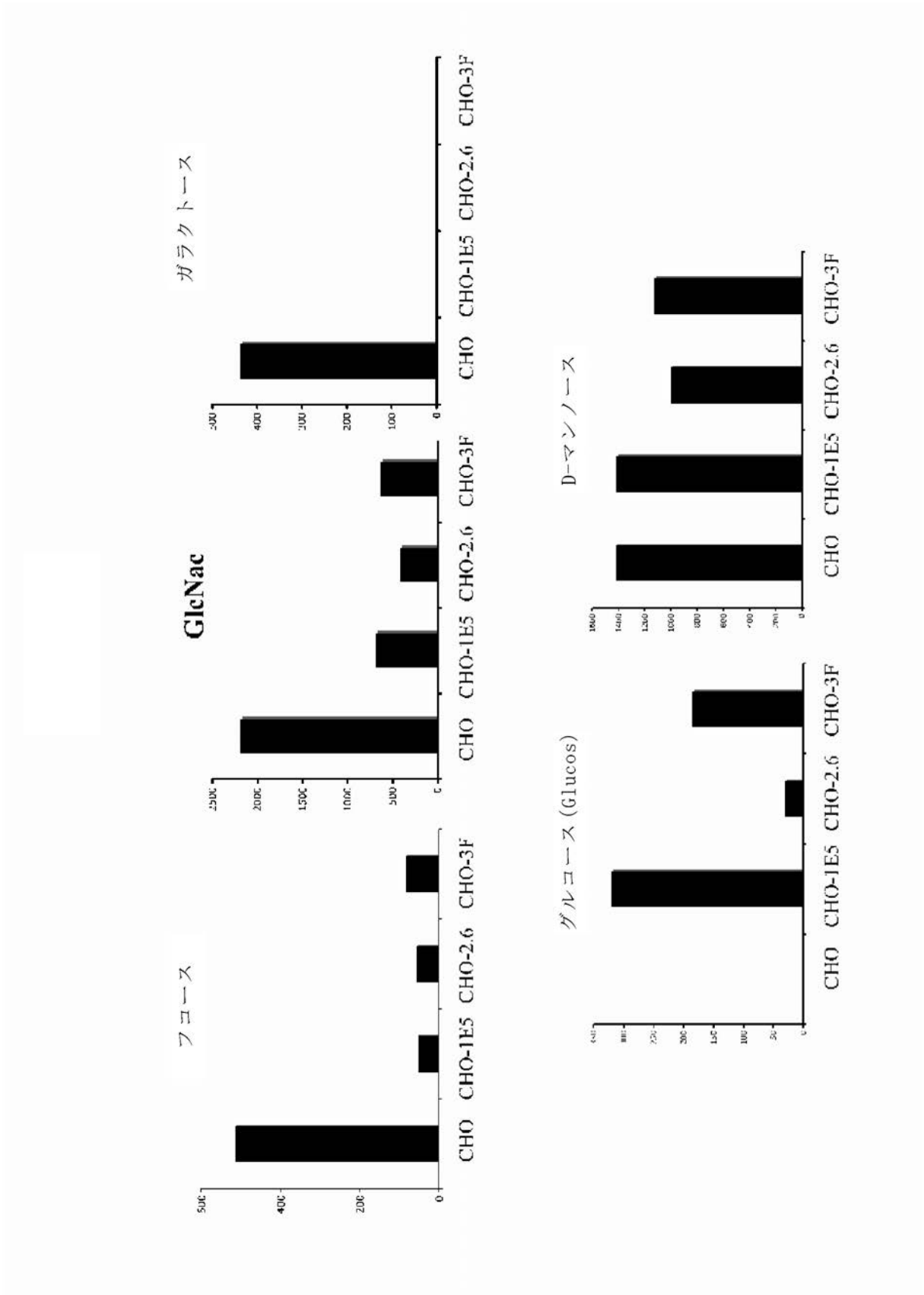
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 A 】



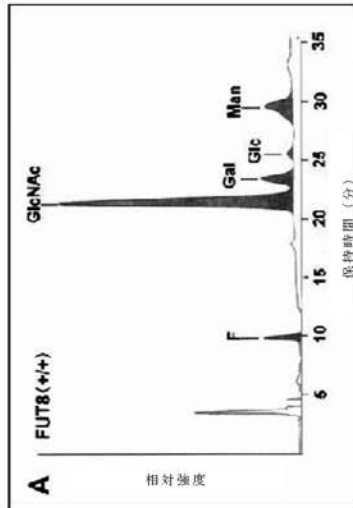
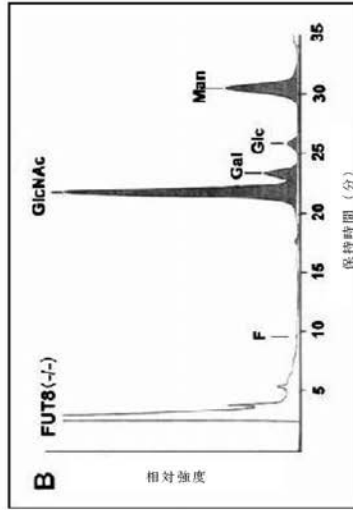
【 図 1 0 B 】

	GlcNac				
	ブコース	ガラクトース	グルコース	マンノース	
CHO-ET101	+	+	-	+	+
CHO-ET201	+	+	-	+	+
CHO-1E5-ET101	+/-	-	+	+	+
CHO-2.6-ET101	+/-	-	+/-	+	+
CHO-3F-ET101	+/-	-	+	+	+
CHO-2.6-ET201	+/-	-	+/-	+	+
CHO-3F-ET201	+/-	-	+	+	+

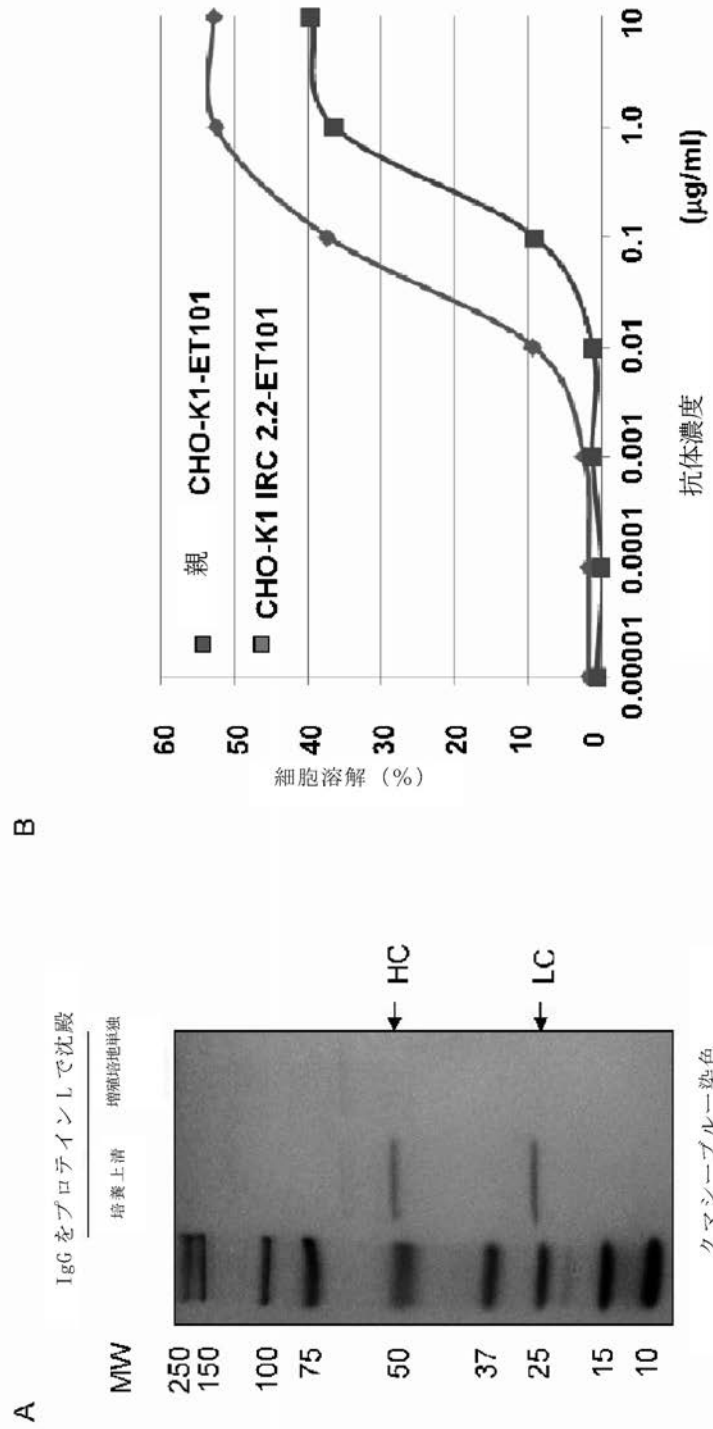
野生型細胞

突然変異体
クローン

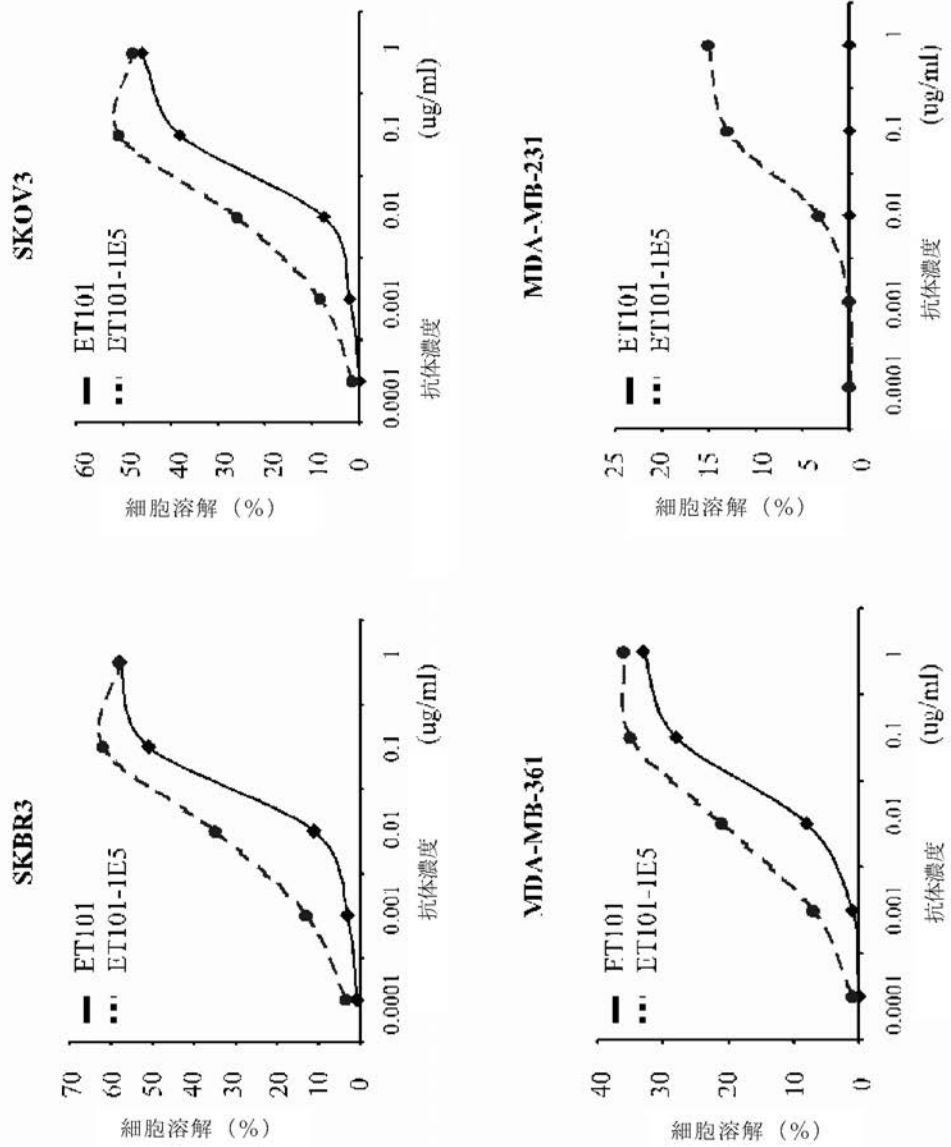
【 図 1 0 C 】



【 図 1 1 】

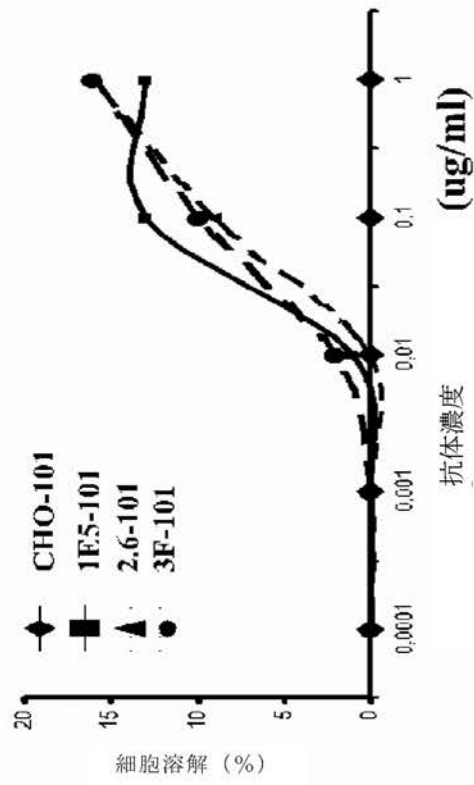


【 図 1 2 】

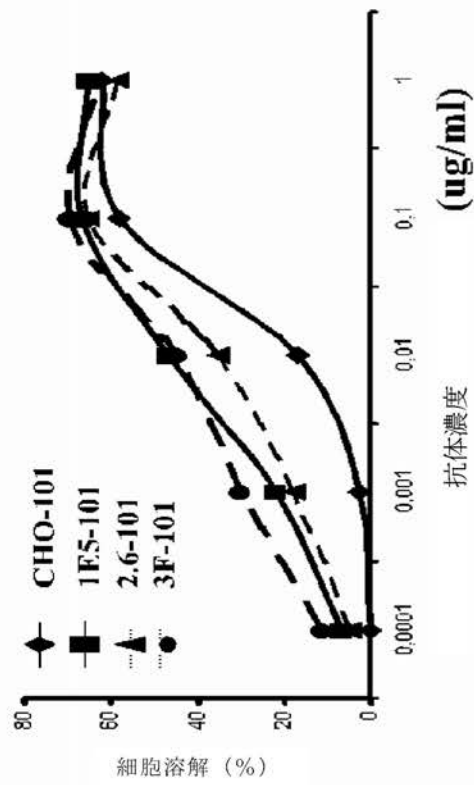


【 図 1 3 】

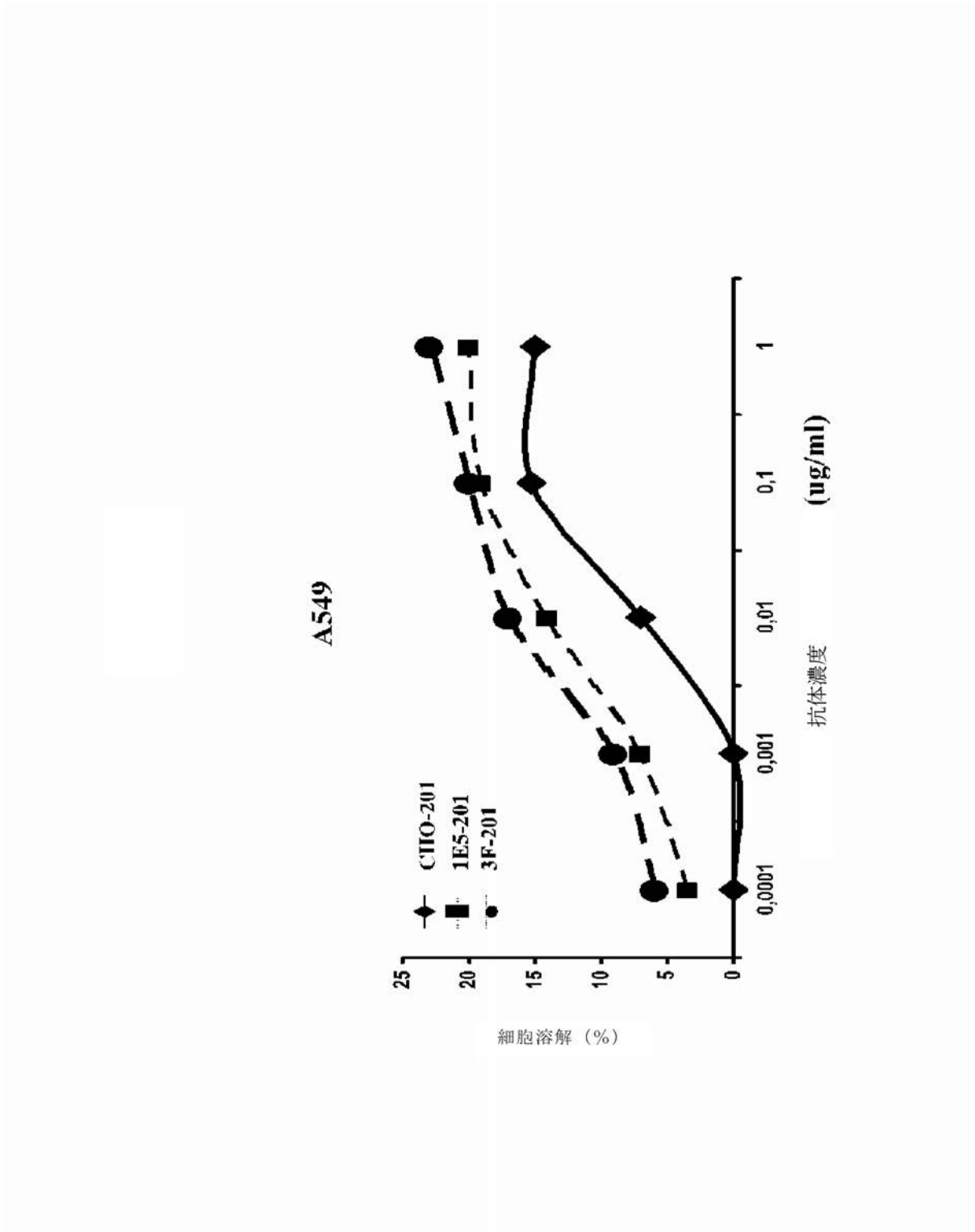
MDA-MB-231



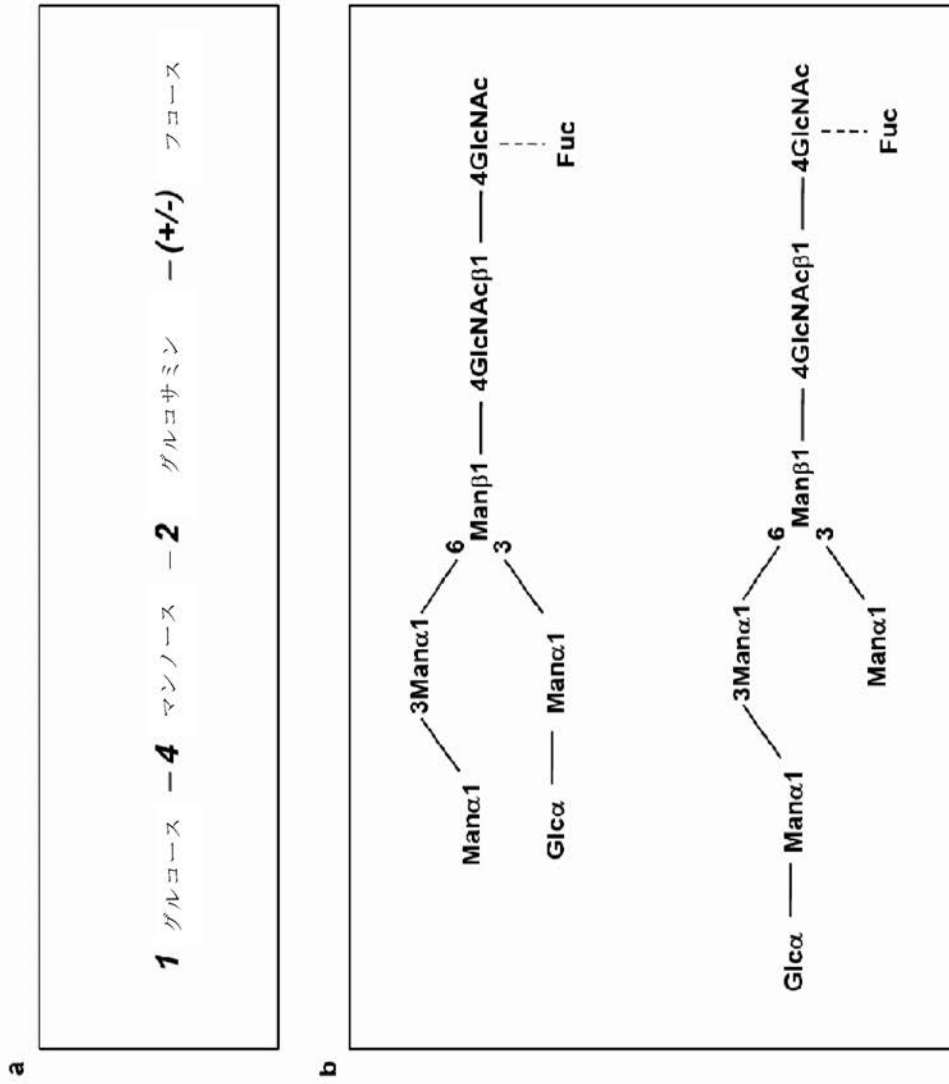
SKOV3



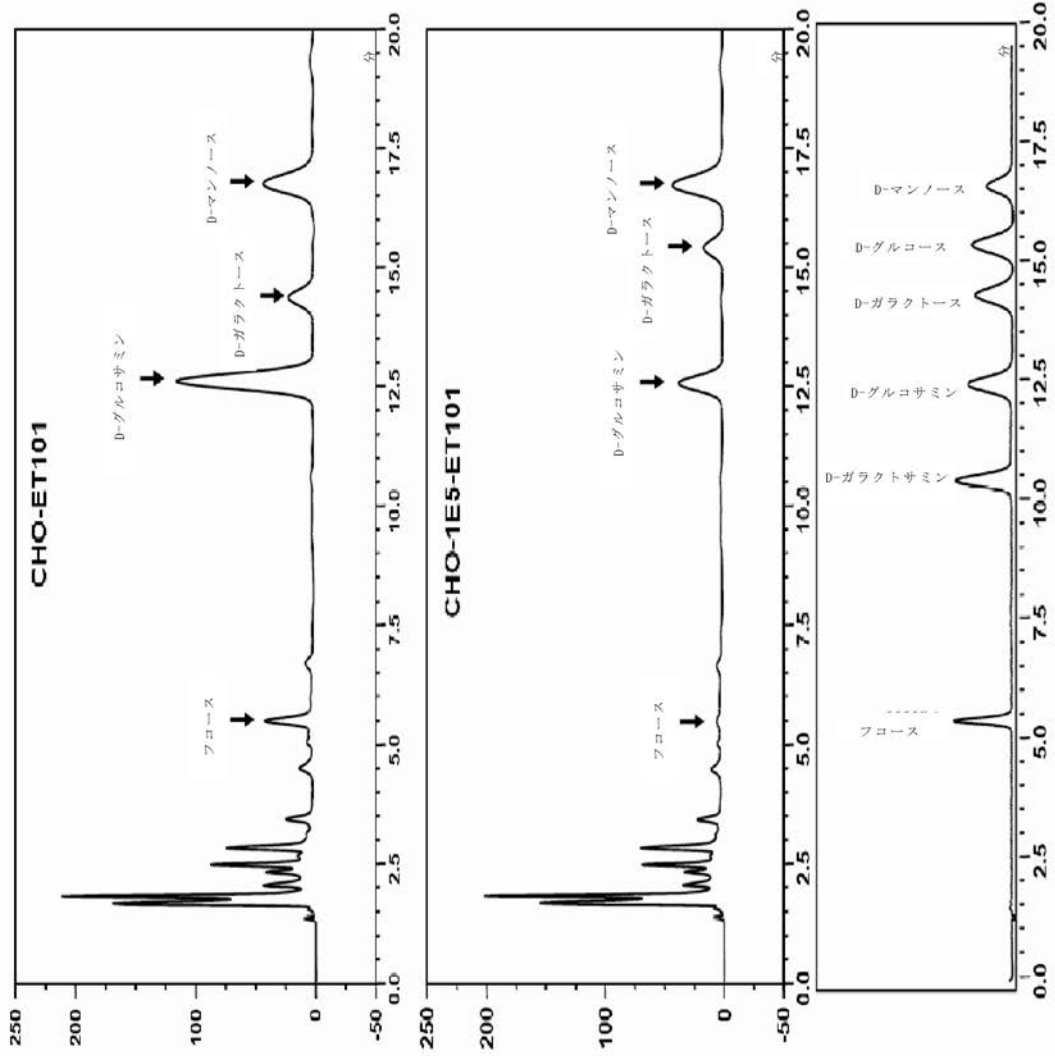
【 図 1 4 】



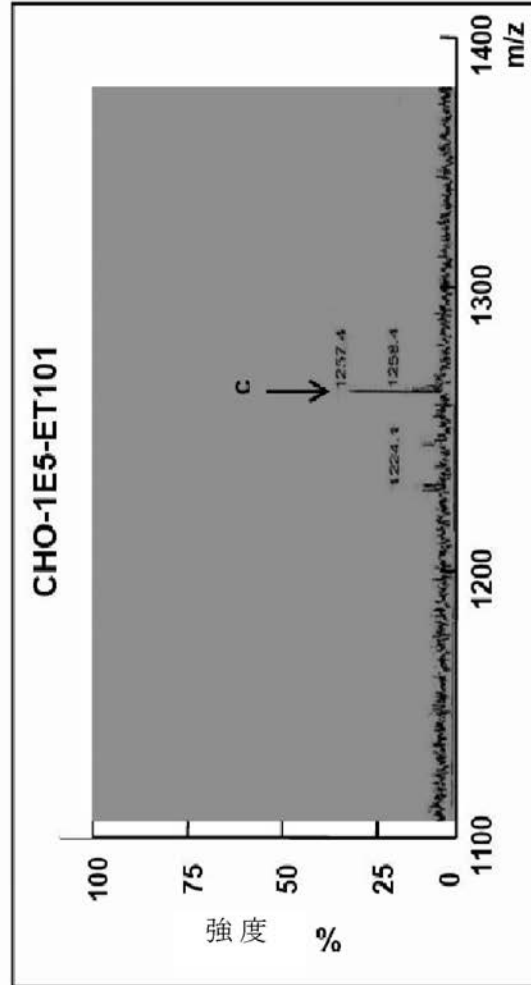
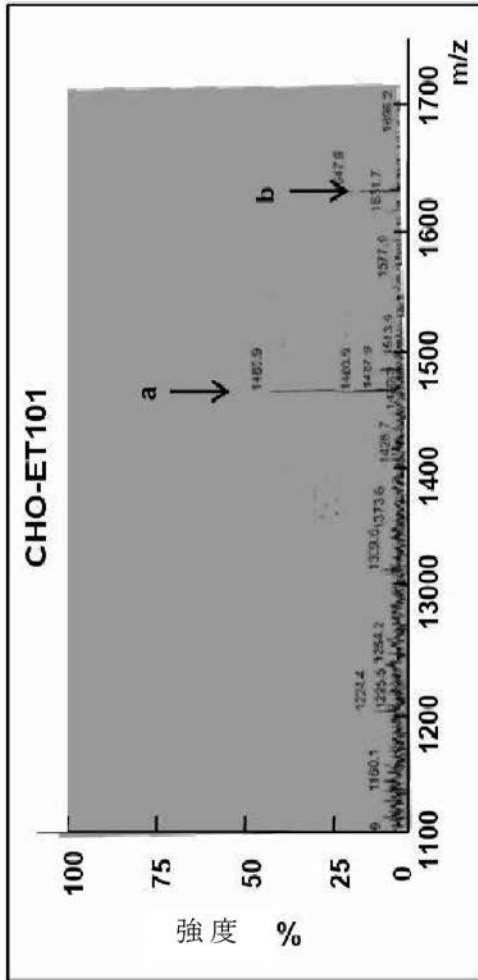
【 図 1 5 】



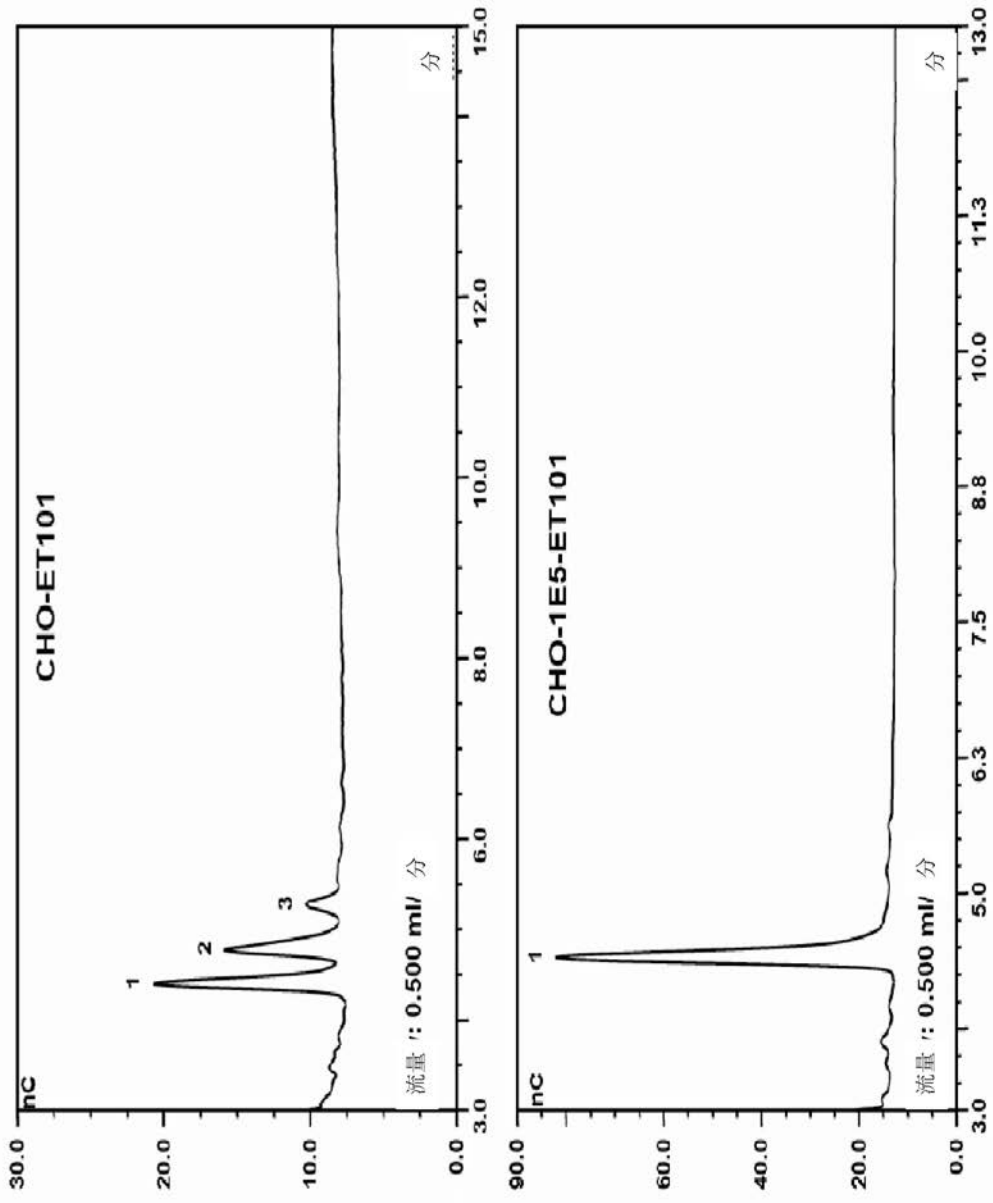
【 図 16 】



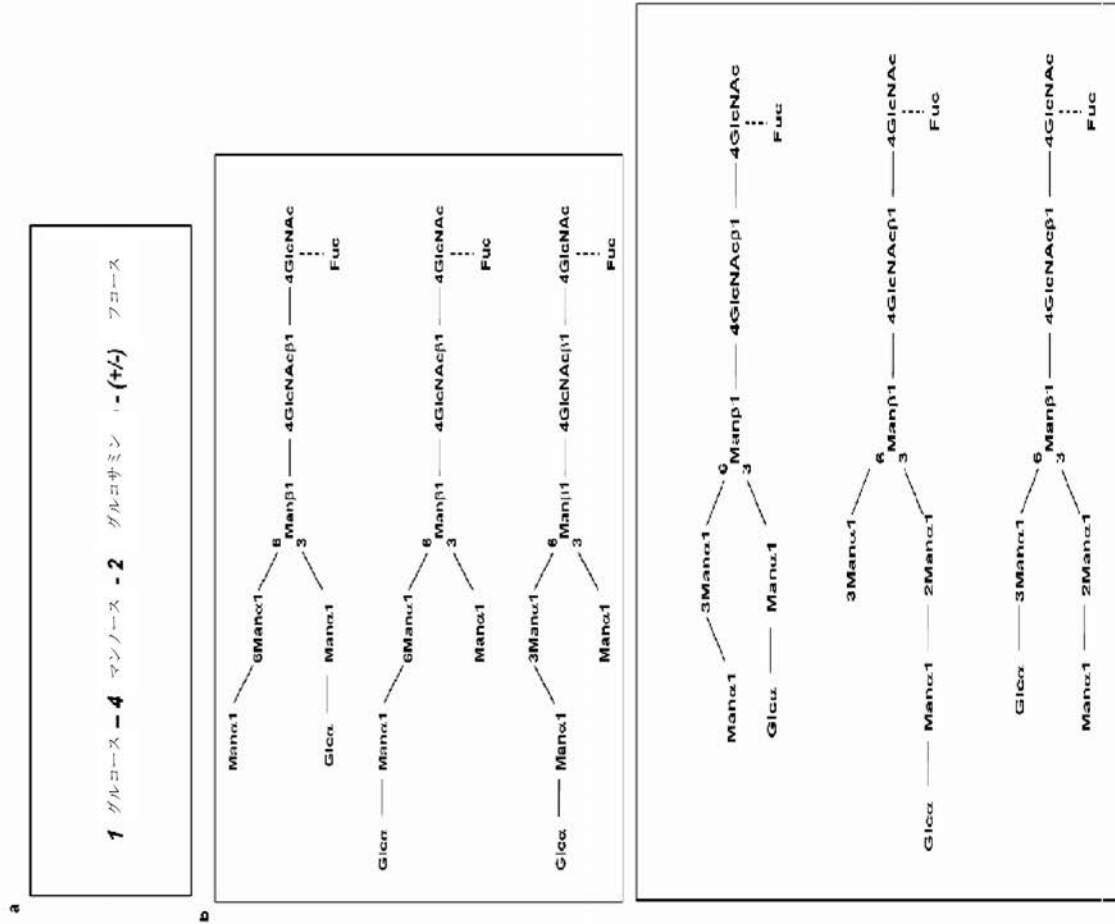
【 図 17 】



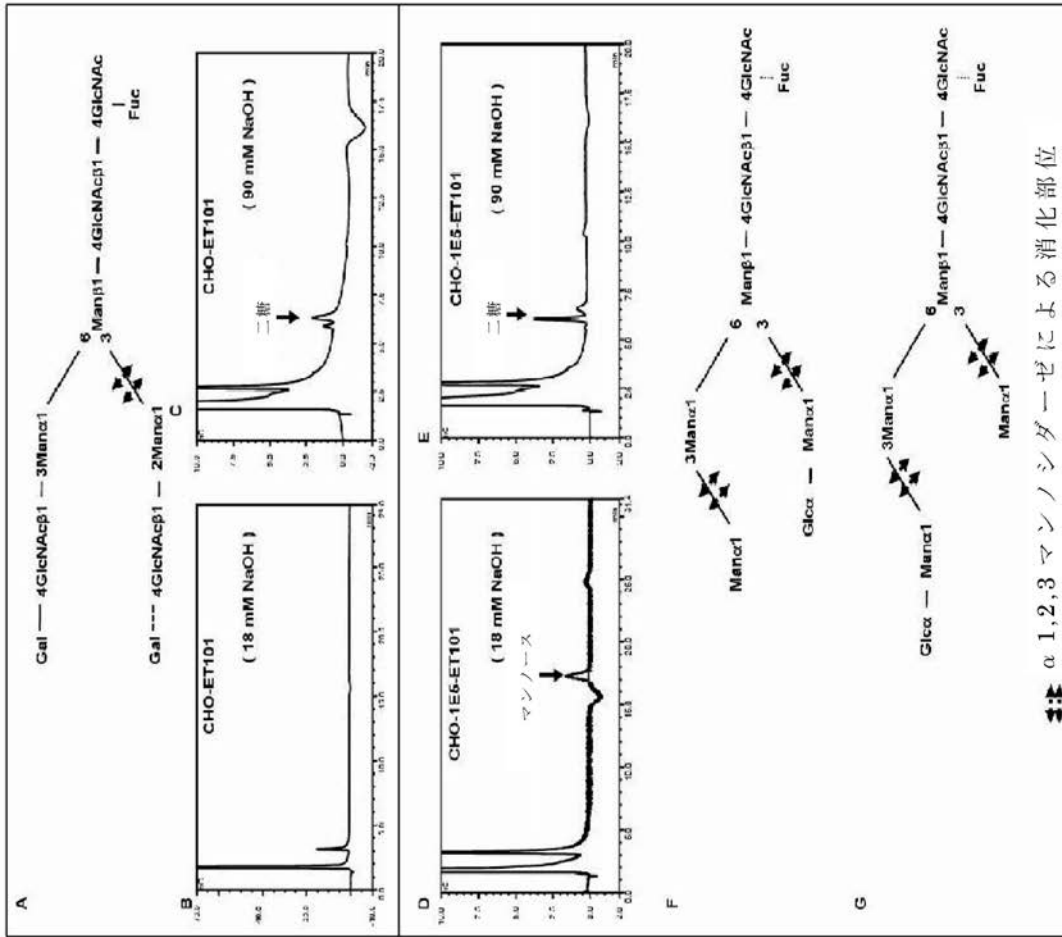
【 図 1 8 】



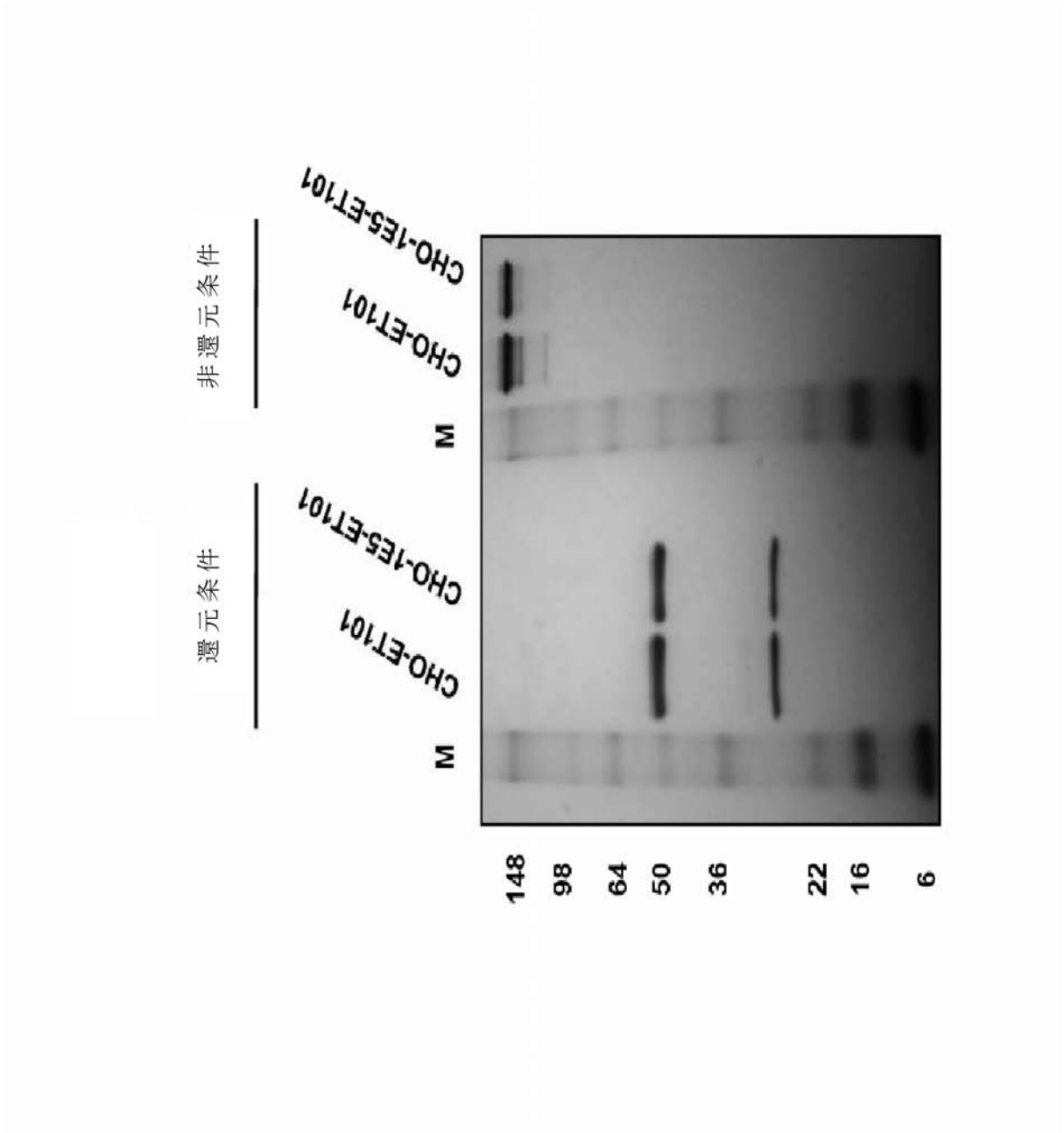
【 図 19 】



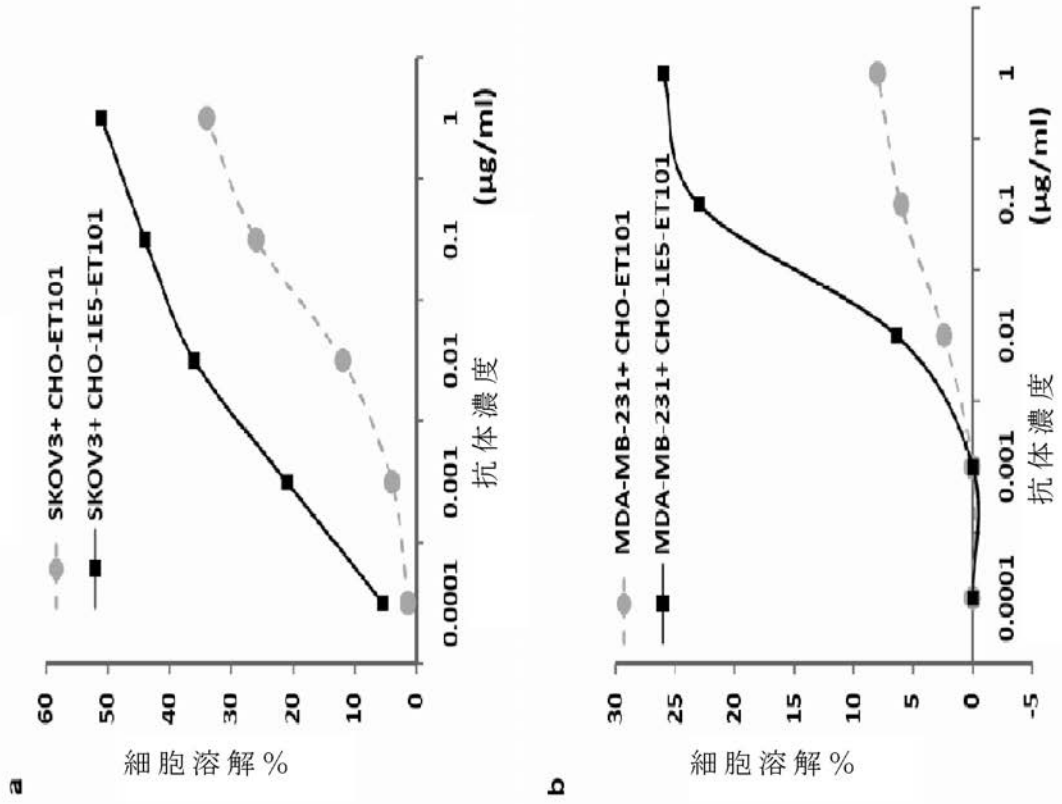
【 図 2 0 】



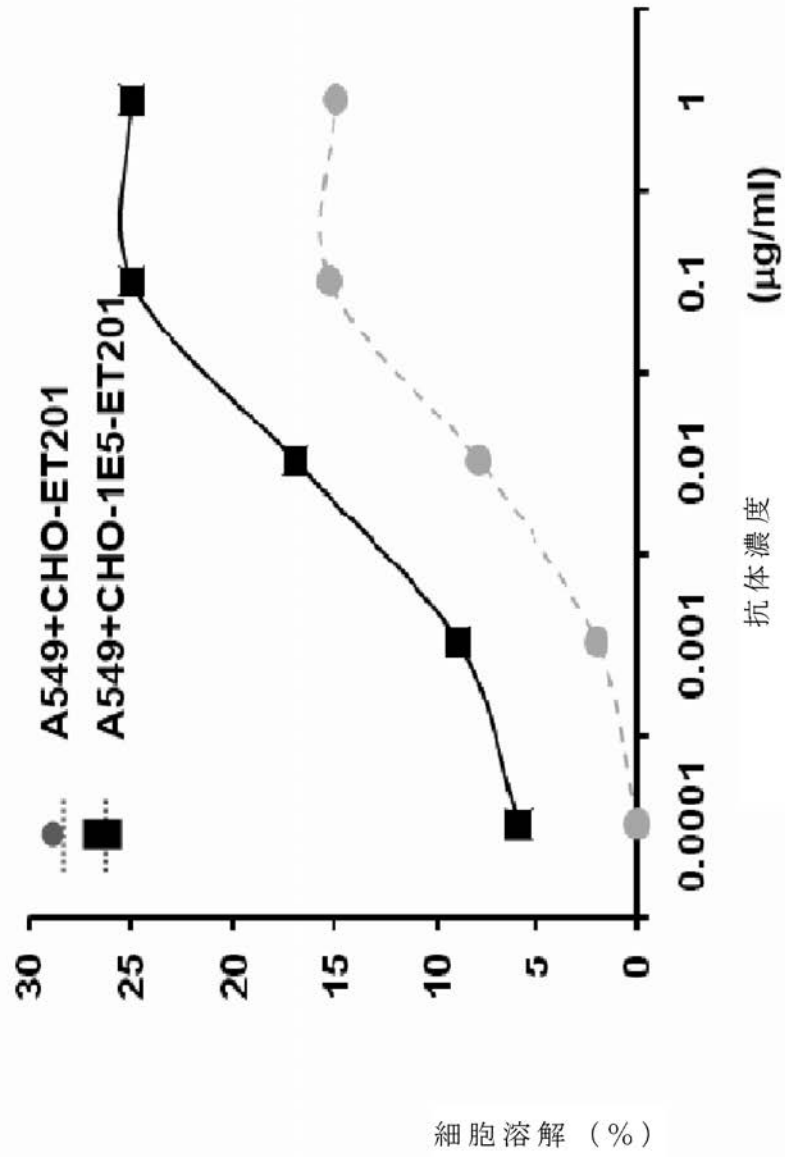
【 図 2 1 】



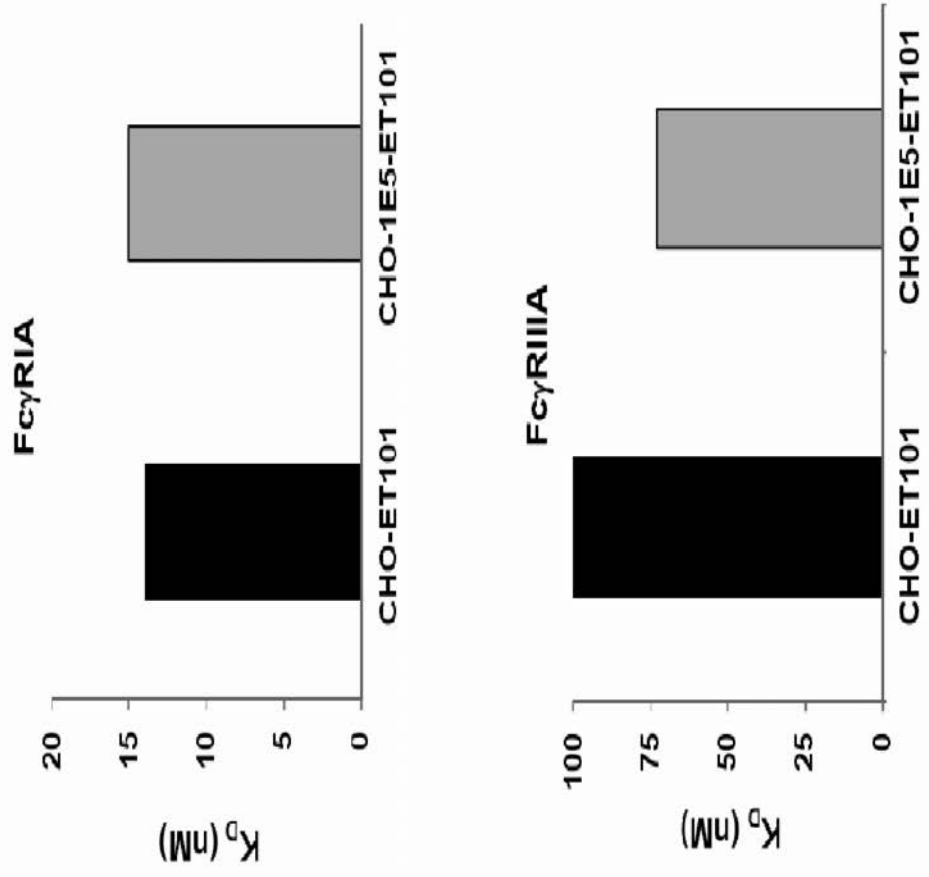
【 図 2 2 A 】



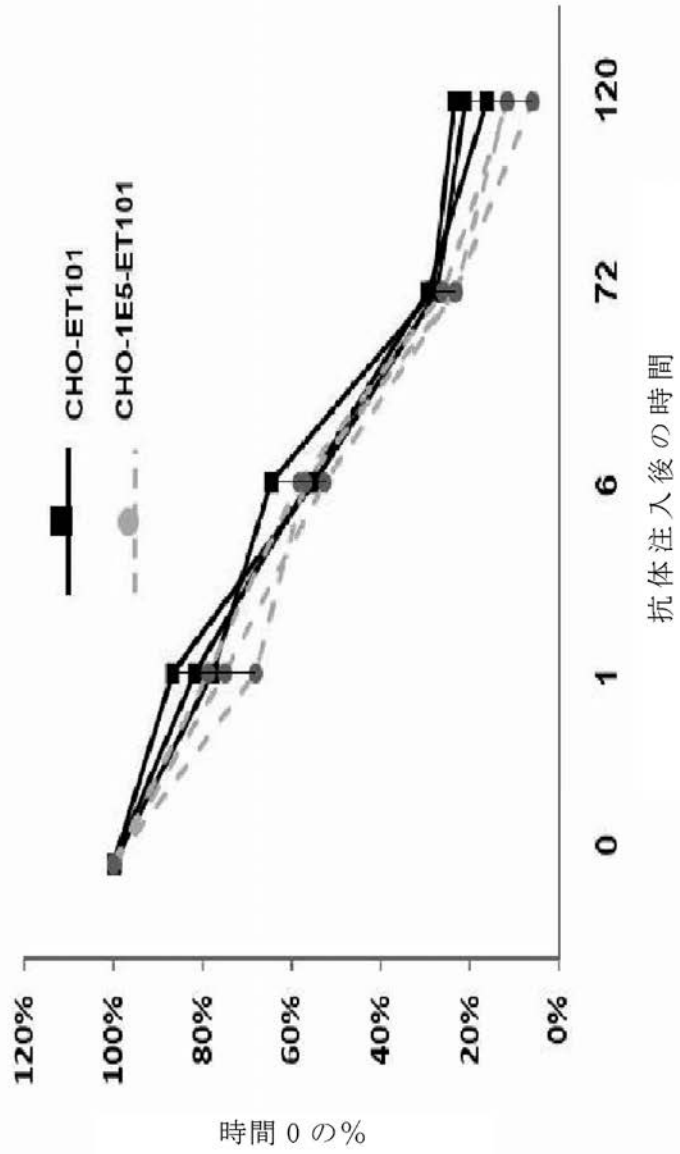
【 図 2 2 B 】



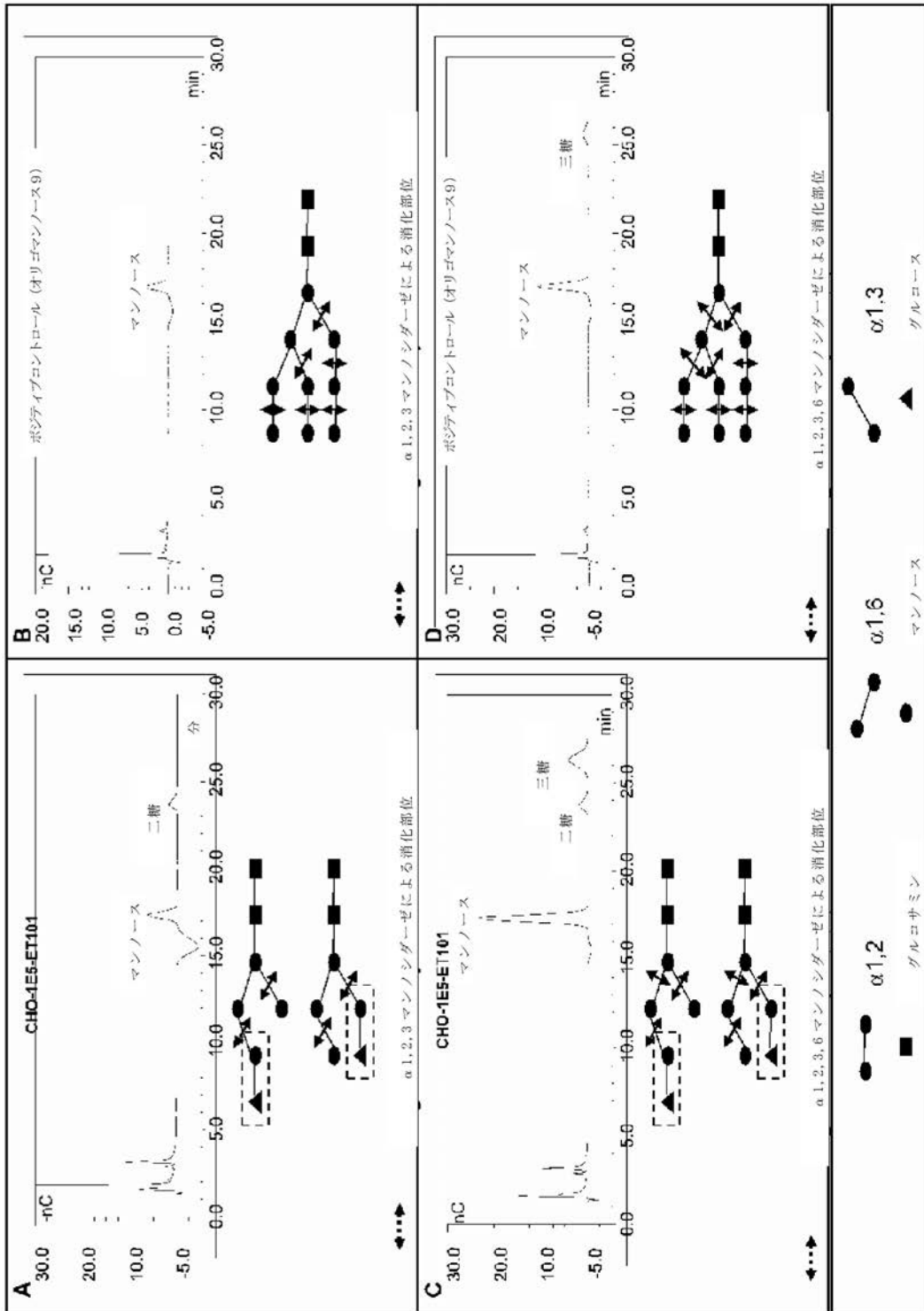
【 図 2 3 】



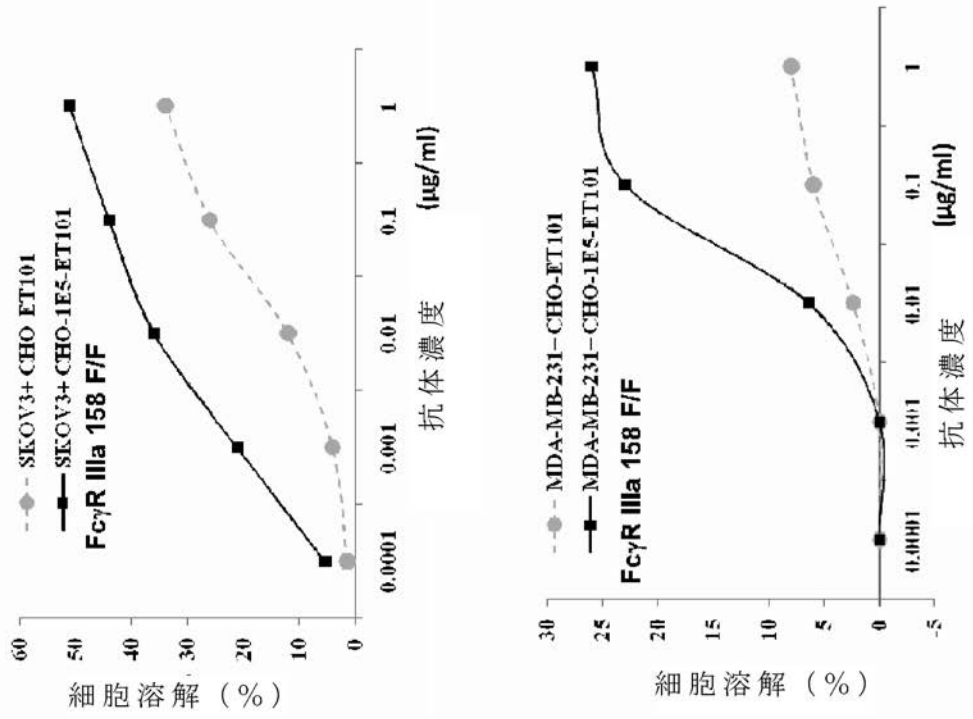
【 図 2 4 】



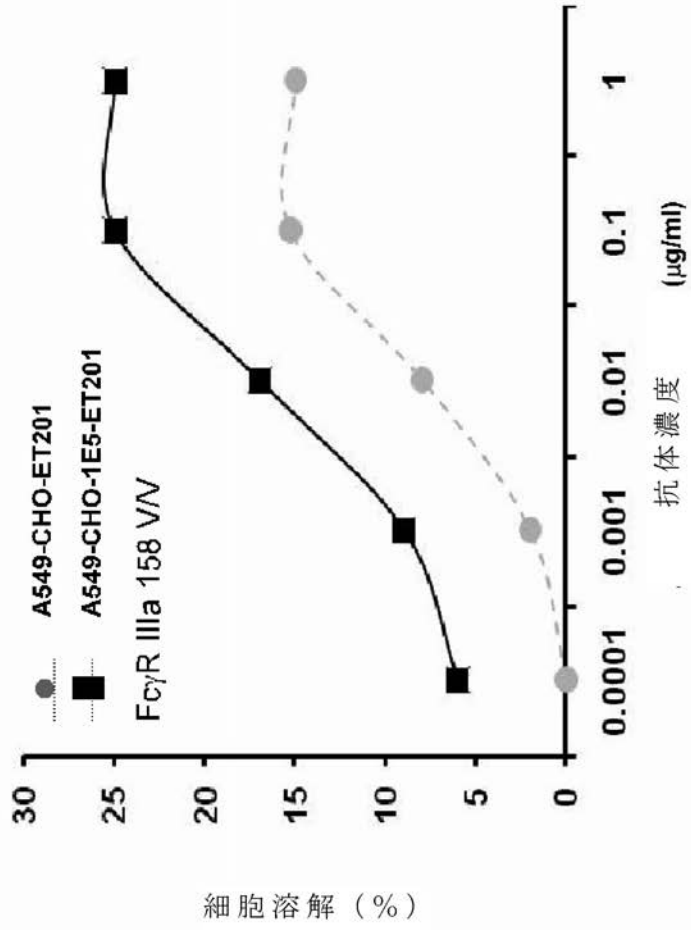
【 図 2 5 】



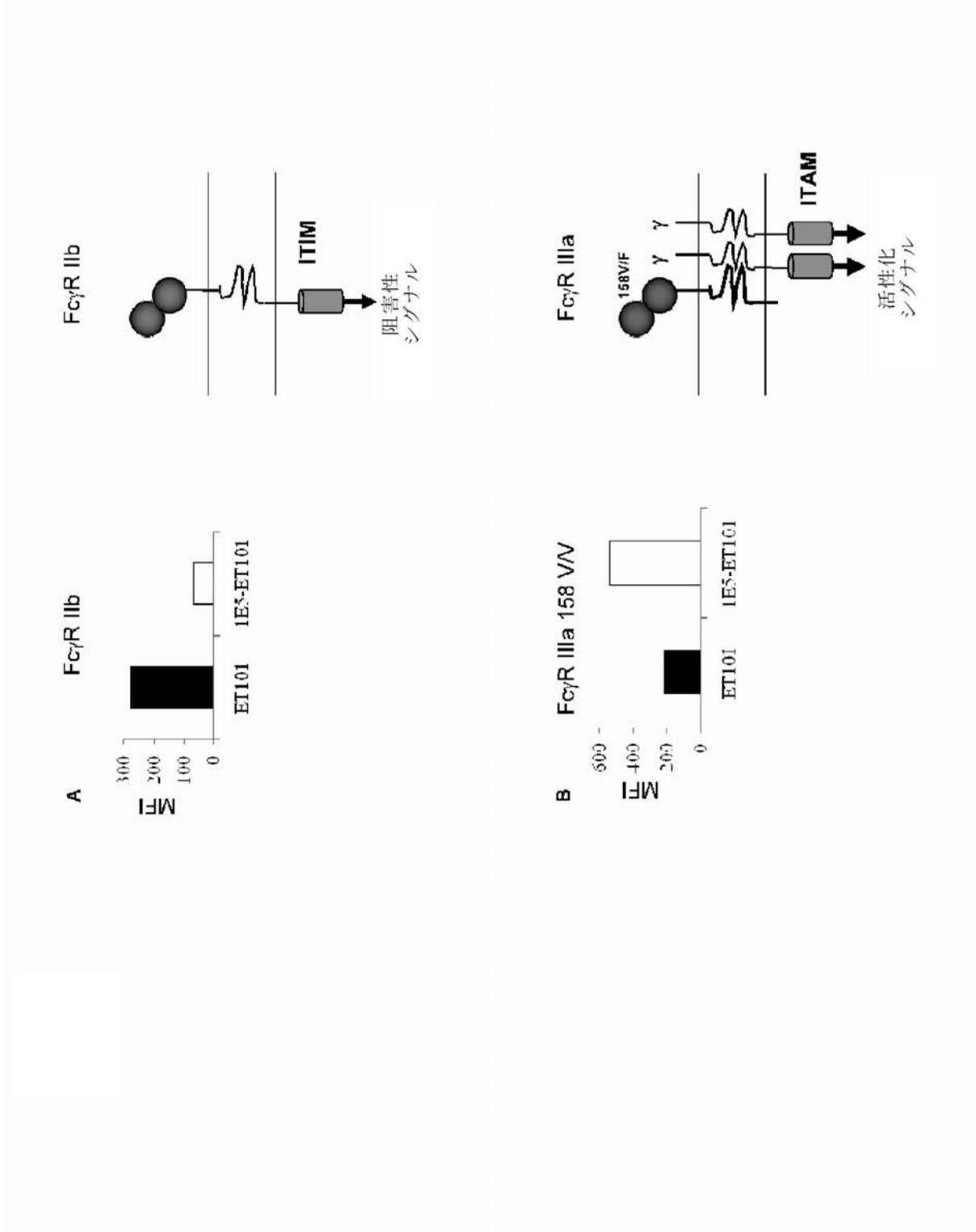
【 図 2 6 a 】



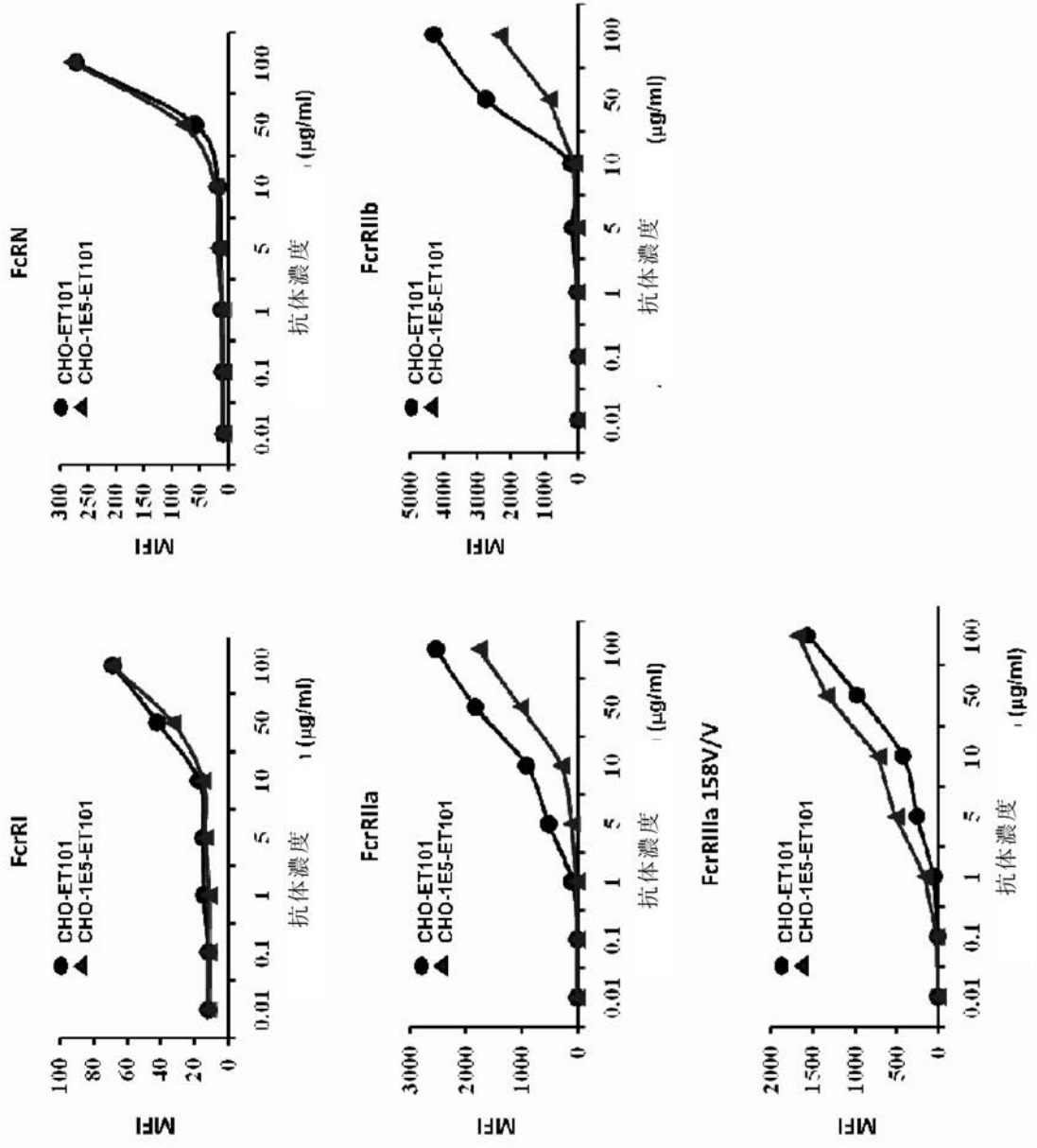
【 図 2 6 b 】



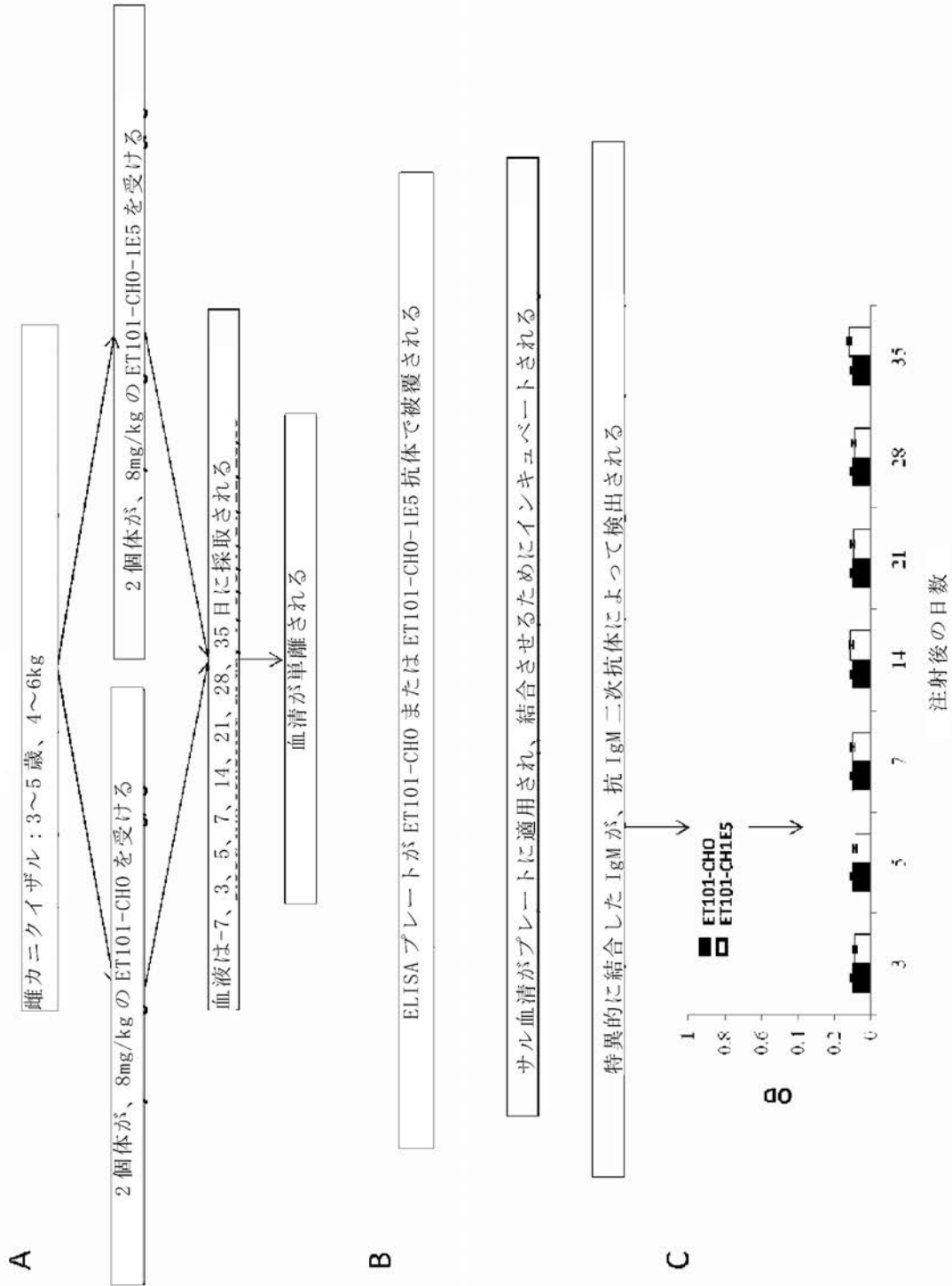
【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2009/051325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/10 C12P21/00 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BANERJEE SULAGNA ET AL: "The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 10 JUL 2007, vol. 104, no. 28, 10 July 2007 (2007-07-10), pages 11676-11681, XP002554536 ISSN: 0027-8424 e.g. page 11678, right-hand column, paragraph 2; Fig. 5(c) the whole document ----- -/--	1-7, 26-49, 52-62
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 November 2009		24/11/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/051325

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 278, no. 5, 31 January 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002965857 ISSN: 0021-9258	1-11, 13-25, 41-62
A	e.g. page 3468-9 and Fig. 3 the whole document	12
X	WO 2007/028144 A (GLYCOFI INC [US]; GERNGROSS TILLMAN U [US]; WILDT STEFAN [US]; LI HUIJ) 8 March 2007 (2007-03-08) claims 1,17	1-11, 13-25, 41-62
A		12
X	WO 2006/014685 A (GLYCOFI INC [US]; GERNGROSS TILLMAN U [US]; LI HUIJUAN [US]; WILDT STE) 9 February 2006 (2006-02-09) e.g. claims 1,10 the whole document	1-11, 13-25, 41-62
A		12
X	WO 2007/029054 A (GLYCOFI INC [US]; GERNGROSS TILLMAN [US]; WILDT STEFAN [US]; LI HUIJUA) 15 March 2007 (2007-03-15) e.g. claims 1,5,9,10 the whole document	1-11, 13-25, 41-62
A		12
X	SALLUSTIO S ET AL: "Novel genetic instability associated with a developmentally regulated glycosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells" SOMATIC CELL AND MOLECULAR GENETICS,, vol. 15, no. 5, 1 September 1989 (1989-09-01), pages 387-400, XP009109721 ISSN: 0740-7750 the whole document	63-82

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/051325

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SHIELDS R L ET AL: "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 277, no. 30, 26 July 2002 (2002-07-26), pages 26733-26740, XP002964542 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1-82
A	<p>YAMANE-OHNUKI N ET AL: "Establishment of FUT8 knockout chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 87, no. 5, 5 September 2004 (2004-09-05), pages 614-622, XP002983153 ISSN: 0006-3592 the whole document</p>	1-82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/051325

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007028144 A	08-03-2007	AU 2006287173 A1	08-03-2007
		CA 2620515 A1	08-03-2007
		EP 1942935 A2	16-07-2008
		JP 2009507040 T	19-02-2009
		US 2009136525 A1	28-05-2009
WO 2006014685 A	09-02-2006	AU 2005269765 A1	09-02-2006
		CA 2573541 A1	09-02-2006
		EP 1771480 A1	11-04-2007
		JP 2008512354 T	24-04-2008
WO 2007029054 A	15-03-2007	AU 2005336263 A1	15-03-2007
		CA 2620713 A1	15-03-2007
		EP 1937305 A1	02-07-2008
		JP 2009507482 T	26-02-2009
		US 2009226464 A1	10-09-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 C 0 8 5
C 0 8 B 37/00 (2006.01)	C 0 8 B	37/00	Z 4 C 0 9 0
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A 4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 シャン, ジンイ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 9 7, ウォールナット クリーク, サン ルイス ロード 2 1 7 0

(72)発明者 ヤン, スー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 7 0 6, オールバニー, ナンバー 2 1 1, ジャクソン ストリート 1 0 2 0

(72)発明者 ワン, ペイ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 5 5, フリーモント, モリナーリ テラス 6 0 3 6

(72)発明者 タイ, ウェイ, チャン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 6 0 8, エメリービル, 6 5 番 ストリート 1 2 9 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 BA80 CA01 DA02 GA11 HA01 HA20

4B029 AA02 BB11 CC01

4B063 QA18 QQ08 QQ79 QQ96 QR48 QS15 QS33 QS36 QX01

4B064 AF22 AF41 AG01 CA10 CA19 CB30 CC24 DA01

4B065 AA90Y AB01 BA02 BB14 BB32 CA24 CA25 CA44

4C085 AA14 AA17 BB01 BB11 BB12 BB36 CC02 CC05 DD61 DD63

4C090 AA01 AA09 BA79 BB12 BB13 BB14 BB18 BB27 BB32 BB33

BB35 BB36 BB38 BB69 BC27 BD41 CA42 DA09 DA23

4H045 AA11 BA10 BA53 CA40 DA76 EA20 FA74