

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6823175号
(P6823175)

(45) 発行日 令和3年1月27日 (2021.1.27)

(24) 登録日 令和3年1月12日 (2021.1.12)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 17 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-524501 (P2019-524501)	(73) 特許権者	519024647
(86) (22) 出願日	平成29年7月21日 (2017.7.21)		ベイジン マブワークス バイオテック
(65) 公表番号	特表2019-528779 (P2019-528779A)		カンパニー, リミティド
(43) 公表日	令和1年10月17日 (2019.10.17)		中華人民共和国, ベイジン 101111
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/093816		, コーチョアン フォーティーンズ スト
(87) 国際公開番号	W02018/014864		リート エコノミック テクノロジカル
(87) 国際公開日	平成30年1月25日 (2018.1.25)		ディベロップメント エリア, チンハイ
審査請求日	令和1年10月29日 (2019.10.29)		ファースト ロード 99, ホイロンセン
(31) 優先権主張番号	15/461,732		サイエンス アンド テクノロジー パ
(32) 優先日	平成29年3月17日 (2017.3.17)		ーク, ビルディング #3
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	201610584242.9	(74) 代理人	100123582
(32) 優先日	平成28年7月22日 (2016.7.22)		弁理士 三橋 真二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性抗HER2抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化二重特異性抗Her2抗体であって、

配列番号9のアミノ酸配列を有する可変領域（第1のV_H）及び配列番号7のアミノ酸配列を有する定常領域を含む第1の重鎖、配列番号17のアミノ酸配列を有する可変領域（第1のV_L）を含む第1の軽鎖、配列番号10のアミノ酸配列を有する可変領域（第2のV_H）及び配列番号8のアミノ酸配列を有する定常領域を含む第2の重鎖、および配列番号18のアミノ酸配列を有する可変領域（第2のV_L）を含む第2の軽鎖を含み、

前記第1のV_Hおよび前記第1のV_Lは、HER2の細胞外ドメインIVに特異的な第1の抗原結合部位を形成し、前記第2のV_Hおよび前記第2のV_Lは、HER2の細胞外ドメインIIに特異的な第2の抗原結合部位を形成する、ヒト化二重特異性抗Her2抗体。

【請求項 2】

前記第1の重鎖は、配列番号22のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

前記第1の軽鎖は、配列番号19のアミノ酸配列を有する定常領域をさらに含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

10

20

前記第 1 の軽鎖は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記第 2 の重鎖は、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記第 2 の軽鎖は、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する定常領域をさらに含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記第 2 の軽鎖は、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が F c 領域を含み、F c 領域に結合した全糖類の 1 0 % 以下の量でフコースが存在する、請求項 1 に記載の抗体。 10

【請求項 9】

前記抗体の前記 F c 領域に結合した全糖類の 5 % 以下の量のフコースを含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 0】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の核酸分子で形質転換またはトランスフェクトされた、単離された宿主細胞または非ヒト生物。

【請求項 1 2】

請求項 1 に記載の抗体ならびに薬学的に許容される担体、希釈剤、および/またはアジュバントを含む、組成物。 20

【請求項 1 3】

対象における H e r 2 を発現する癌を治療するための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 に記載の抗体を含有し、当該抗体が、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 (A D C C) 及び/又は補体依存性細胞傷害 (C D C) を呈する F c ドメインを含む、医薬組成物。

【請求項 1 4】

前記癌は、乳癌、胃癌、卵巣癌、食道癌、子宮内膜癌、膀胱癌、肺癌、結腸癌、または頭頸部癌、または前立腺癌である、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記癌は、乳癌、胃癌、または卵巣癌である、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 1 6】

前記第 1 の重鎖が配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含み、前記第 1 の軽鎖が配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の重鎖が配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の軽鎖が配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記抗体の前記 F c 領域に結合した全糖類の 5 % 以下の量のフコースを含む、請求項 1 6 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

配列表、表またはコンピュータプログラムへの参照

配列表は、作成日 2 0 1 7 年 3 月 1 3 日、サイズ 3 0 . 7 キロバイトの「S e q u e n c e _ L i s t i n g . t x t」というファイル名で、A S C I I 形式のテキストファイルとして E F S - W e b を介して本明細書と同時に提出される。E F S - W e b を介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

本発明は、腫瘍学治療および分子免疫学の分野に関し、抗 H e r 2 抗体、ならびにその医薬組成物および使用に関する。特に、本発明は、トラスツズマブの重鎖および軽鎖の可 50

変領域を含む1つの抗原結合部位と、ペルツズマブの重鎖および軽鎖の可変領域を含む別の抗原結合部位とを含む、ヒト化二重特異性抗Her2抗体に関する。本発明はまた、機能不全Slc35c1遺伝子を有するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)変異細胞株にも関し、該変異細胞株は、フコシル化が低減したタンパク質を発現する。

【背景技術】

【0003】

ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2、ERBB2、HER2/neuまたはc-erbB2と略される)は、ERBB2遺伝子によってコードされるタンパク質である。正常細胞において、Her2は非常に低い発現量を有するが、Her2は、胚発生の期間中に高度に発現され、細胞増殖、分化、発生、接着および遊走の調節において非常に重要である(Gutierrez, C. and R. Schiff, HER2: biology, detection, and clinical implications. Arch Pathol Lab Med, 2011. 135(1): p. 55-62.)。

10

【0004】

Her2はヒト上皮増殖因子受容体のファミリーに属し、このファミリーは、Her1(EGFR)、Her2、Her3およびHer4の4つのメンバーからなる。Her2は特異的リガンドを有さず、その下流経路の活性化は同種または異種二量体の形成に依存する(Gutierrez et al, Arch Pathol Lab Med, 2011. 135(1): p. 55-62.)。ヒト上皮増殖因子は、全て細胞表面上に位置し、類似の構造を有する: リガンドに結合する1つの細胞外ドメイン(ECD)、1つの単一膜貫通ヘリックス膜貫通ドメイン、および細胞内膜近位ドメイン、チロシンキナーゼ触媒ドメイン、ならびに制御的役割を果たすチロシンリッチC末端テールドメインからなる1つの細胞内領域(Eccles, Int J Dev Biol, 2011. 55(7-9): p. 685-96.)。ヒト表皮増殖因子の細胞外ドメイン(ECD)はさらに4つのサブドメイン、すなわち、領域I、II、IIIおよびIVに分けることができ、領域IIおよびIVはシステインリッチドメインであり、受容体の二量体化および活性化に関与する。

20

【0005】

Her2の過剰発現は、細胞の正常機能の障害をもたらす得、通常、腫瘍の形成および発生に密接に関連している。Her2の同種または異種重合は、受容体のチロシン残基のリン酸化を引き起こし、多くのシグナル経路を開始し、細胞増殖および腫瘍形成を引き起こし得る。予後および予測のためのバイオマーカーとして、Her2遺伝子の増幅または過剰発現は、約15~30%の乳癌および10~30%の胃/食道癌において起こる。Her2の過剰発現はまた、卵巣、子宮内膜、膀胱、肺、結腸、および頭頸部の腫瘍等の他の腫瘍においても観察され得る。

30

【0006】

乳癌において、Her2は一般に予測因子および治療標的として認識されている。Her2は特異的リガンドを有しないため、その抗体は通常、受容体の二量体化および活性化を阻止し、免疫系の殺傷効果を媒介することによって腫瘍細胞を抑制する。現在、トラスツズマブおよびペルツズマブは、Her2を標的とする主要な市販の治療用抗体である。

40

【0007】

1998年に、FDAは、Genentech Inc.社製のHer2を標的とするヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標)とも称される、ヒト化度95%)を承認した。この抗体は、Her2細胞外ドメインIV膜近傍エピトープを認識し、その抗原親和性定数は最大0.1nmol/Lであり得る。トラスツズマブは、セクションIVのC末端にある3つのループ(557-561、570-573および593-603)からなるエピトープを認識する。エピトープは、その二量体化パートナーの結合ドメインに近いまたはそれと直接相互作用し得るため、トラスツズマブのエピトープへの結合は二量体化プロセスを阻害する立体障害を誘導し得る。さら

50

に、トラスツズマブの結合は、H e r 2 受容体の細胞外ドメインを加水分解のためのプロテイナーゼによる攻撃から保護することもできる。

【 0 0 0 8 】

トラスツズマブの作用機序は以下を含み得る：免疫誘導性生物活性（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）およびナチュラルキラー細胞活性）、H e r 2 受容体の内在化の誘導、D N A 修復の阻害、P I 3 K 経路の破壊、p 2 7 k i p 1 によって誘導されるG 1 周期停止の活性化、癌細胞のアポトーシスの刺激、および受容体の細胞外ドメインからの細胞内p 9 5 ドメインの活性化の阻害[4、5]。その中でも、トラスツズマブが誘発する免疫媒介性の治療生理活性が報告されている。具体的には、B T 4 7 4 異種移植マウスモデルにおいて示されたように、A D C C は重要な役割を果たし、F C 受容体がノックアウトされると、癌増殖の抑制率は9 6 % から2 9 % に減少した（N a t M e d , 2 0 0 0 , 6 : 4 4 3 - 6）。K o h r t ら（J C l i n I n v e s t , 2 0 1 2 , 1 2 2 (3) : 1 0 6 6 - 7 5）は、C D 1 3 7 特異的抗体によるナチュラルキラー細胞の刺激が乳癌の異種移植モデルにおけるトラスツズマブの有効性を増強することを報告している。

10

【 0 0 0 9 】

トラスツズマブは、現在、乳癌の治療のための第一選択薬として使用されており、H e r 2 過剰発現を有する転移性乳癌の治療に有効であり、単剤での第一選択治療の客観的な反映率は3 0 ~ 5 0 % である：しかしながら、トラスツズマブは、より低いH e r 2 発現を有する転移性乳癌の治療において満足のいく効果を有しておらず、抗体が1 年以内は最初に有効である多くの患者において耐性が生じている。これは、腫瘍細胞におけるいくつかの遺伝子発現の変化によって引き起こされる抗原エピトープの遮蔽または受容体シグナル伝達経路の異常な活性化に関連している可能性がある。さらに、H e r 2 は、ファミリーの他のメンバー（H e r 1、H e r 3 およびH e r 4）と一緒に、リガンド依存性またはリガンド非依存性の異種二量体を形成することができ、それによって下流経路を活性化し、次いで腫瘍細胞の増殖をもたらすが、一方、トラスツズマブは異種二量体の形成を阻害できないため、これが耐性の発現の理由の1 つであるかもしれない。

20

【 0 0 1 0 】

ベルツズマブ（P E R J E T A（登録商標））は、2 0 1 2 年に米国での販売がF D A により承認されており、進行性前立腺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および乳癌に対してある特定の治療効果を有するが、その治療効果は依然としてH e r 2 発現量に依存している。

30

【 0 0 1 1 】

ベルツズマブは、H e r 2 細胞外ドメインI I の異種二量体化のための重要な部位を認識し、それによって認識されるエピトープはI I サブ領域中心のセグメント2 4 5 ~ 3 1 1 に位置し、重要な残基はH 2 4 5、V 2 8 6、S 2 8 8、L 2 9 5、H 2 9 6 およびK 3 1 1 である。その中で、L 2 9 5、H 2 9 6 は、H e r 2 およびH e r 3 の異種二量体化を媒介するための重要な部位であり、L 2 9 5 A / H 2 9 6 A の二重突然変異は、H e r 2 / H e r 3 の異種二量体化を完全に遮断することができる（F r a n k l i n , M . C . , e t a l . , I n s i g h t s i n t o E r b B s i g n a l i n g f r o m t h e s t r u c t u r e o f t h e E r b B 2 - p e r t u z u m a b c o m p l e x . C a n c e r C e l l , 2 0 0 4 . 5 (4) : p . 3 1 7 - 2 8 .）。それ故、ベルツズマブは、H e r 2 / H e r 3 異種二量体の形成を効果的に阻害するために使用され得るが、E G F R / H e r 2 異種二量体の形成に対しては明らかな阻害効果を示さない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 2 】

現在、新しい抗H E R 2 抗体を開発する必要がある。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

50

【図 1】本発明のヒト化二重特異性抗 H e r 2 抗体の好ましい実施形態の構造を示す。

【 0 0 1 4 】

【図 2】S l c 3 5 c 1 遺伝子をノックアウトした C H O 変異株 C H O K 1 - A F の調製方法のフローチャートを示す。

【 0 0 1 5 】

【図 3】F A C S によって決定された C H O - K 1 細胞 (A) および C H O K 1 - A F 細胞 (B) のフコース発現量を示す。

【 0 0 1 6 】

【図 4】M B S 3 0 1 のインタクトな分子量スペクトルを示す。

【 0 0 1 7 】

【図 5】N 型糖鎖切除修飾後の M B S 3 0 1 のインタクトな分子量スペクトルを示す。

【 0 0 1 8 】

【図 6】M I L 2 0 3 A F、M I L 2 0 4 A F、および M B S 3 0 1 の S E C - H P L C 分析の結果を示す。

【 0 0 1 9 】

【図 7】M I L 2 0 3 / 2 0 4 および M B S 3 0 1 の N 型糖鎖種の解析結果を示す。

【 0 0 2 0 】

【図 8】S K B R - 3 細胞に対する A D C C の作用を示す。

【 0 0 2 1 】

【図 9】B T 4 7 4 細胞に対する A D C C の作用を示す。

【 0 0 2 2 】

【図 10】S W 4 8 0 細胞に対する A D C C の作用を示す。

【 0 0 2 3 】

【図 11】H C C 1 4 1 9 に対する A D C C の作用を示す。

【 0 0 2 4 】

【図 12】B T 4 7 4 細胞に対する直接殺細胞効果を示す。

【 0 0 2 5 】

【図 13】M D A - M B - 1 7 5 細胞に対する直接殺細胞効果を示す。

【 0 0 2 6 】

【図 14】S K B R - 3 細胞に対する直接殺細胞効果を示す。

【 0 0 2 7 】

【図 15】H C C 1 4 1 9 細胞に対する直接殺細胞効果を示す。

【 0 0 2 8 】

【図 16】N C I - N 8 7 細胞に対する直接殺細胞効果を示す。

【 0 0 2 9 】

【図 17】B T 4 7 4 細胞に対する C D C の作用を示す。

【 0 0 3 0 】

【図 18】ヌードマウスにおけるヒト卵巣癌細胞 S K O V 3 のインビボでの腫瘍増殖に対する抑制効果を示す。

【 0 0 3 1 】

【図 19】マウスにおけるヒト乳癌細胞 B T 4 7 4 のインビボでの腫瘍増殖に対する抑制効果を示す。

【 0 0 3 2 】

【図 20】マウスにおけるヒト胃癌細胞 N C I - N 8 7 のインビボでの腫瘍増殖に対する抑制効果を示す。

【 0 0 3 3 】

【図 21】トラスツズマブ耐性胃癌 G A 0 5 5 P D X モデルにおけるインビボでの腫瘍体積に対する抑制効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

定義

本明細書で使用されるとき、用語「約」は列挙された値の $\pm 10\%$ を指す。

【0035】

本明細書で使用される場合、用語「有効量」は、所望の効果を得るまたは少なくとも部分的に得るための量を指す。有効量は、当業者によって決定され得る。例えば、治療使用のための有効量は、治療される疾患の重症度、患者の免疫系の全体的な状態、年齢、体重および性別等の患者の全身状態、薬物の投与方法、ならびに同時に適用される他の治療法に依存する。

【0036】

本明細書で使用される場合、用語「アジュバント」は、抗原とともに送達されたときに、抗原に対する対象の免疫応答を増強し得るか、または免疫応答のタイプを変更し得る、非特異的免疫エンハンサーを指す。アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、フロイントアジュバント、リポ多糖類、および細胞因子を含むがこれらに限定されない、多くの種類のアジュバントが存在する。フロイントアジュバントは、現在、動物実験で最も一般的に使用されているアジュバントであり、一方、水酸化アルミニウムアジュバントは、臨床実験で使用されることが多い。

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、通常2対のポリペプチド鎖（各対は軽（L）鎖および重（H）鎖を有する）からなる免疫グロブリンを指す。抗体軽鎖は、軽鎖および軽鎖として分類することができる。重鎖は、 μ 、 γ 、 α 、または δ として分類することができ、抗体のアイソタイプは、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして別々に定義される。軽鎖および重鎖において、可変領域および定常領域は、約12個以上のアミノ酸を有する「J」領域を介して連結され、重鎖は、約3個以上のアミノ酸を有する「D」領域をさらに含む。各重鎖は、重鎖可変領域（ V_H ）および重鎖定常領域（ C_H ）からなる。重鎖は、3つのドメイン（ $CH1$ 、 $CH2$ 、および $CH3$ ）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ V_L ）および軽鎖定常領域（ C_L ）からなる。抗体の定常領域は、免疫グロブリンを媒介して、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1の成分（ $C1q$ ）を含む宿主組織または因子に結合させることができる。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる比較的保存的な領域が散在する高頻度可変領域（相補性決定領域（CDR）と呼ばれる）としてさらに分類することができる。これらの V_H および V_L 領域は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に3つのCDR領域および4つのFR領域からなる。重鎖/軽鎖の各対の可変領域（ V_H および V_L ）は、抗体結合部位を形成する。

【0038】

本明細書で使用される場合、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性」（ADCC）は、細胞媒介性の免疫防御の機構であり、この機構によって、膜表面抗原が特異的抗体と結合している標的細胞を免疫系のエフェクター細胞が活発に溶解する。

【0039】

本明細書で使用される場合、抗体の「抗原結合断片」という用語は、全長抗体が結合するのと同じ抗原に特異的に結合するおよび/または抗原に特異的に結合するために全長抗体と競合する能力を保持する、全長抗体の断片を含むポリペプチドを指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「補体依存性細胞傷害」（CDC）は補体系の機能である。免疫系の抗体または細胞の関与なしにそれらの膜を損傷させることによって病原体を死滅させることは、免疫系におけるプロセスである。

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「コアフコース」は、N型糖鎖のコア5糖のアスパラギンに関連してGlcNAcに結合したフコースを指す。

【0042】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、用語「EC50」は、最大効果の50%のための濃度、すなわち最大効果の50%を引き起こす濃度を指す。

【0043】

本明細書で使用される場合、用語「FcRIIIa」は、2つのC2構造を有する、Igスーパーファミリーに属する50~70kDaの糖タンパク質であり、その遺伝子は染色体の1q23~24に位置する。FcRIIIは、ヒトIgG、IgG3に結合し、低親和性受容体である。FcRIIIは、2つのアロタイプ、FcRIIIAおよびFcRIIIBを含む。FcRIIIA(AAH17865.1、GenBank)は膜貫通構造を有し、主にマクロファージ、NK細胞および好酸球性顆粒球に分布し、マクロファージは高発現レベルのFcRIIIAを有する一方で、単核細胞はより低い発現量を有する。FcRIIIAは、ジスルフィド結合で連結したCD3またはFcRI鎖二量体に関し、FcRIIIAはマクロファージ上のCD3複合体鎖に関し、FcRIIIAはNK/LGL上の鎖に関する。

【0044】

本明細書で使用される場合、用語「FcRn」は、大きなサブユニットおよび小さなサブユニットからなる異種二量体である新生児Fc受容体(P61769、UniProtKB/Swiss-Prot)であり、大きなサブユニットは、45~53kDの分子量を有し、鎖と呼ばれ、小さいサブユニットは、2ミクログロブリン(2m)であり、14kDの分子量を有し、鎖と呼ばれるが、2つの鎖は非共有結合形態で一緒に結合している。生理学的pHが7.4の場合、FcRnはIgGに結合しないが、エンドソーム酸性pH6~6.5の条件下では、IgGFcに対するFcRnの親和性はナノモルからマイクロモルの範囲である。

【0045】

本明細書で使用される場合、「Her2」という用語は、全長(NP_004439.2)のHer2、あるいはHer2の細胞外断片またはドメインI、II、IIIもしくはIV、あるいはそれらの少なくとも1つを含む断片を指すか、あるいはHer2細胞外断片を含む融合タンパク質を含む。しかしながら、当業者は、Her2のアミノ酸配列が、その生物学的機能に影響を与えることなく、自然発生的または人工的に導入された突然変異または変異(置換、欠失および/または付加を含むがこれらに限定されない)を有し得ることを理解するであろう。したがって、本発明において、用語「Her2」はこれらの配列のいずれか1つを含むべきである。

【0046】

本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」は、ベクターが導入され得る細胞を指し、これは、限定されないが、例えば、大腸菌もしくは枯草菌等の原核細胞、酵母細胞もしくはアスペルギルス等の真菌細胞、S2ショウジョウバエ細胞もしくはSf9細胞等の昆虫細胞、または線維芽細胞、CHO細胞、COS細胞、NSO細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK293細胞もしくはヒト細胞の等の動物細胞を含む。

【0047】

本明細書で使用される場合、用語「K_D」は、抗体と抗原との間の結合親和性を説明するために使用される、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。

【0048】

本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体および/または賦形剤」は、対象および活性成分に薬理的および/または生理学的に適合する担体および/または賦形剤を指す(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照されたい)。薬学的に許容される担体として、限定されないが、pH調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度増強剤が挙げられる。例えば、pH調整剤として、限定されないがリン酸緩衝液が挙げられ、界面活性剤として、限定されないがカチオン性、アニオン性、または非イオン性界面活性剤、例えばTween-80が挙げられ、イオン強度増

10

20

30

40

50

強剤として、限定されないが塩化ナトリウムが挙げられる。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される場合、用語「特異的に結合する」は、2つの分子間の非ランダム結合反応、例えば抗体とその抗原との間の反応を指す。

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、ポリヌクレオチドを挿入するために使用され得る核酸ベクターを指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、そのベクターは発現ベクターと称される。ベクターは、形質転換、形質導入またはトランスフェクションによって宿主細胞に導入することができ、そのため、ベクターによって担持される遺伝物質要素が宿主細胞において発現される。ベクターは当業者に周知であり、限定されないが、プラスミド、ファスミド、コスミド、人工染色体、例えば酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC) または P1 由来人工染色体 (PAC)、ファージまたは M13 ファージ等のファージ、および動物ウイルスを含む。ベクターとして使用可能な動物ウイルスとして、レトロウイルス (レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス (例えば単純ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス (例えば SV40) が挙げられる。ベクターは、限定されないが、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメントおよびレポーター遺伝子を含む複数の発現制御要素を含み得る。また、ベクターは複製開始部位をさらに含んでもよい。

【 0 0 5 1 】

説明

本発明は、トラスツズマブの重鎖および軽鎖の可変領域を含む1つの抗原結合部位と、ペルツズマブの重鎖および軽鎖の可変領域を含む別の抗原結合部位とを含む、ヒト化二重特異性抗 Her2 抗体またはその二重特異性抗原結合断片に関する。二重特異性抗体は、Her2 細胞外ドメイン IV および II を認識する。

【 0 0 5 2 】

本発明の抗 Her2 抗体または抗原結合断片は、トラスツズマブに関連する第1の重鎖および第1の軽鎖と、ペルツズマブに関連する第2の重鎖および第2の軽鎖とを含む。

【 0 0 5 3 】

第1の重鎖は、アミノ酸配列が配列番号1~3に示されるCDRを有するV_Hと、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有するC_Hとを含む。一実施形態において、非CDR領域はヒト抗体に由来する。

【 0 0 5 4 】

第2の重鎖は、アミノ酸配列が配列番号4~6に示されるCDRを有するV_Hと、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するC_Hとを含む。一実施形態において、非CDR領域はヒト抗体に由来する。

【 0 0 5 5 】

第1の重鎖では以下の通りである：

CDR1：GFNIKDTY (配列番号1)

CDR2：IYPTNGYT (配列番号2)

CDR3：SRWGGDG FYAMDY (配列番号3)。

【 0 0 5 6 】

第2の重鎖では以下の通りである：

CDR1：GFTFTDYT (配列番号4)

CDR2：VNPNSSGGS (配列番号5)

CDR3：ARNLGPSFYFDY (配列番号6)。

【 0 0 5 7 】

第1の重鎖の定常領域 (配列番号7)：

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S

WNSGALTS G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
 M T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 Q K S L S L S P G K

【 0 0 5 8 】

第 2 の重鎖の定常領域（配列番号 8）：

10

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 WNSGALTS G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
 M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
 Q K S L S L S P G K

【 0 0 5 9 】

20

一実施形態において、第 1 の重鎖 V_H は、以下に示すアミノ酸配列を有する。

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A
 P G K G L E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S
 （配列番号 9）

【 0 0 6 0 】

第 2 の重鎖 V_H は、以下に示すアミノ酸配列を有する。

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A
 P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S （
 配列番号 10）

30

【 0 0 6 1 】

抗 Her 2 抗体またはその抗原結合断片は、第 1 の軽鎖および第 2 の軽鎖をさらに含む。

【 0 0 6 2 】

アミノ酸配列が配列番号 11 ~ 13 に示される C D R を有する V_L を含む第 1 の軽鎖。

一実施形態において、非 C D R 領域はヒト抗体に由来する。

【 0 0 6 3 】

アミノ酸配列が配列番号 14 ~ 16 に示される C D R を有する V_L を含む第 2 の軽鎖。

一実施形態において、非 C D R 領域はヒト抗体に由来する。

40

【 0 0 6 4 】

第 1 の軽鎖では以下の通りである：

C D R 1 : Q D V N T A （配列番号 11）

C D R 2 : S A S F L Y S （配列番号 12）

C D R 3 : Q Q H Y T T P P T （配列番号 13）。

【 0 0 6 5 】

第 2 の軽鎖では以下の通りである：

C D R 1 : Q D V S I G （配列番号 14）

C D R 2 : S A S Y R Y T （配列番号 15）

C D R 3 : Q Q Y Y I Y P Y T （配列番号 16）。

50

【 0 0 6 6 】

本発明の一実施形態において、第 1 の軽鎖 V_L は以下に示すアミノ酸配列を有する。

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K (配列番号 1 7)

【 0 0 6 7 】

第 2 の軽鎖 V_L は、以下に示すアミノ酸配列を有する。

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K (配列番号 1 8)

10

【 0 0 6 8 】

本発明は、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する可変領域 (V_H) を含む第 1 の重鎖、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する可変領域 (V_L) を含む第 1 の軽鎖、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する可変領域 (V_H) を含む第 2 の重鎖、および配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する可変領域 (V_L) を含む第 2 の軽鎖を含み、第 1 の V_H および第 1 の V_L は、H E R 2 の細胞外ドメイン I V に特異的な第 1 の抗原結合部位を形成し、第 2 の V_H および第 2 の V_L は、H E R 2 の細胞外ドメイン I I に特異的な第 2 の抗原結合部位を形成する、ヒト化二重特異性抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片に関する。

【 0 0 6 9 】

20

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する第 1 の軽鎖 C_H および / または第 2 の軽鎖 C_H をさらに含む。
R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 1 9)

【 0 0 7 0 】

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する第 1 の重鎖を含み、下線部は重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

(配列番号 2 2)

【 0 0 7 1 】

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する第 1 の軽鎖を含み、下線部は軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL
YSGVPSRFSGRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号 2 3)

【 0 0 7 2 】

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する第 2 の重鎖を含み、下線部は重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADV
N
PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP
SYFYFDYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

(配列番号 2 5)

【 0 0 7 3 】

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する第 2 の軽鎖を含み、下線部は軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGV
PSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

(配列番号 2 6)

【 0 0 7 4 】

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、抗体の F c 領域に結合した全糖類の 2 5 % 以下、2 0 % 以下、1 5 % 以下、1 0 % 以下、8 % 以下、6 % 以下、5 % 以下、4 % 以下、3 % 以下、2 % 以下、1 . 5 % 以下、または 1 . 1 % 以下のフコース糖鎖種を含む。フコース糖鎖種の含有量は、全てのフコース含有糖鎖種の含有量を合計することにより得られ、例えば、N 型糖鎖決定法により決定される。

40

【 0 0 7 5 】

本発明の一実施形態において、抗 H e r 2 抗体またはその抗原結合断片は、約 1 0 0 n M 未満、例えば約 1 0 n M、1 n M、0 . 9 n M、0 . 8 n M、0 . 7 n M、0 . 6 n M、0 . 5 n M、0 . 4 n M、0 . 3 n M、0 . 2 n M、0 . 1 n M 未満、またはそれ以下の E C 5 0 で H e r 2 タンパク質に結合する。E C 5 0 は、B i a c o r e 法によって決定され得る。

【 0 0 7 6 】

本発明の二重特異性抗体は、ペルツズマブとトラスツズマブとを組み合わせ、H e r 2 媒介シグナル伝達のより完全な遮断から利益を得る。トラスツズマブは、H e r 2 ホモ二量体化の形成を阻害し、タンパク質分解的切断を受けている H e r 2 の細胞外ドメインが

50

構成的に活性な p 9 5 タンパク質を形成するのを防止し、ペルツズマブは、H e r 2 ヘテロ二量体形成を遮断し、次いで、H e r 2 媒介シグナル伝達を完全に遮断する。単独で使用される場合、ペルツズマブおよびトラスツズマブは C D C 活性を有しない。しかしながら、本発明の二重特異性抗体は、少なくとも 1 つのインビトロ細胞ベースアッセイにおいて観察されるように強い C D C 活性を示す。

【 0 0 7 7 】

本発明の二重特異性抗体は、異なる H e r 2 エピトープを標的とすることで、その腫瘍抑制効果を増強して相乗効果を達成し、A D C C 機能を増強する。

【 0 0 7 8 】

一実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、F c N - グリカン由来のコアフコース残基を欠き、低濃度で強い A D C C を示す。これは、非フコシル化抗体が、ナチュラルキラー (N K) 細胞上の F c ガンマ受容体 I I I a (F c R I I I a) との結合親和性を高め、したがって抗体の A D C C 活性を増大させるためである。同時に、非フコシル化抗体は、ナチュラルキラー (N K) 細胞およびマクロファージ細胞上の F c ガンマ受容体 I I I a (F c R I I I a) との結合に対する血清中のヒト免疫グロブリン G (I g G) からの阻害効果を抑制することができるが、それは、後者の F c R I I I a との結合親和性はるかに弱いためである。

【 0 0 7 9 】

F c R I I I a との抗体親和性を増加させるためのコアフコシル化の除去は、A D C C を増加させるための最も有効な方法の 1 つである。現在市販されているほとんどの治療用抗体は高度にフコシル化されているが、それは、それらの抗体が生成物の F c N - グリカンのコアフコシル化を担う固有の酵素活性を用いてチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 等の哺乳動物細胞株によって産生されるためである。本発明は、グリカンのフコシル化を厳密に調節する G D P - フコーストランスポーター S L C 3 5 C 1 をコードする機能不全 S l c 3 5 C 1 遺伝子を有する C H O 変異株を提供する。本発明の C H O 変異株は、グリカンの調節に影響を及ぼす C H O 由来の 1 つの機能不全遺伝子のみを含み (すなわち、S l c 3 5 C 1 遺伝子がノックアウトされている)、C H O 変異株は、グリカンの調節に影響を及ぼす他の機能不全遺伝子を含まない。例えば、C H O 変異株は、シアル酸の産生に影響を及ぼす機能不全遺伝子を含まない。本発明の S L C 3 5 C 1 欠損 C H O 細胞は、抗体の F c 領域に結合した全糖類の約 1 0 % 以下、8 % 以下、6 % 以下、4 % 以下、3 % 以下、2 % 以下、1 . 5 % 以下、または 1 . 1 % 以下のフコース含有量を有する抗体を産生する。

【 0 0 8 0 】

本発明は、変異型 S L C 3 5 C 1 欠損 C H O 細胞を産生する方法を提供する。本方法は、宿主 C H O 細胞において重要なフコース修飾タンパク質 G F T (G D P - フコーストランスポーター) をノックアウトするためにジンクフィンガー酵素ノックアウト技術を使用し、産生される抗体のフコシル化レベルを効果的に減少させる。この方法は、フコシル化の古典的経路および代償経路の両方を遮断することができるため、本方法はフコシル化を低減するのに有効である。本方法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ技術を用いて、G F T 遺伝子 S l c 3 5 c 1 配列 (G e n B a n k : B A E 1 6 1 7 3 . 1) のための 2 つの G F T ジンクフィンガーヌクレアーゼを設計することを含む：2 つのジンクフィンガーヌクレアーゼは、標的遺伝子の二本鎖 D N A に別々に結合するように設計される。G F T のための 2 つのジンクフィンガーヌクレアーゼ配列をクローニングして 2 つの発現ベクターを構築する。2 つの発現ベクターは、当業者に既知の適切な方法によって、例えばエレクトロトランスフェクション技術によって、標的 C H O 細胞に同時トランスフェクトされる。トランスフェクション後、トランスフェクトした細胞を培養し、継代および増幅を行う。フコシル化修飾されていないクローンは、複数回のネガティブ分離およびクローン培養により選択される。ある特定の方法を図 2 に例示する。

【 0 0 8 1 】

本発明は、抗体の A D C C 効果を高める、二重特異性抗体のコアフコシル化を除去する

方法を提供する。本発明の方法において、二重特異性抗体は、1.5%未満のコアフコースレベルをもたらす機能不全S1c35c1遺伝子、例えばCHOK1-AFを有するCHO変異株を用いて生成される。本特許のMBS301は、コアフコース単位を除去しないMIL203/204と比較して、ADCC活性において10倍の増加を有する。

【0082】

本発明の二重特異性抗体、例えばMBS301は、Her2細胞外ドメインIVおよびIIに対して結合するように設計され、各抗体を単独で使用するよりも高い、マウスにおける直接殺細胞活性、ADCC活性、CDC活性および腫瘍抑制能力を有する。MBS301は、インビトロ細胞株活性試験においてトラスツズマブおよびペルツズマブの併用と比較した場合、より高い直接殺細胞活性、より高いADCC活性を示すが、CDC活性はトラスツズマブおよびペルツズマブの併用と同様である。

10

【0083】

一実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、異種半抗体の対合を容易にするためにCH3領域内に修飾アミノ酸配列を有する「ノブ・イン・ホール」抗体である。例えば、第1の重鎖の定常領域は、ヒトFc由来の3つの突然変異を有する：該突然変異は、配列番号22のT369S、L371A、およびY410Vである。第2の重鎖の定常領域は、ヒトFc由来の1つの突然変異を有する：該突然変異は、配列番号25のT368Wである。「ノブ・イン・ホール」構造抗体は、通常の抗体構造およびサイズを維持し、二機能活性を提供する。

【0084】

20

一実施形態において、本発明は、本発明のHer2抗体の第1および第2の重鎖ならびに第1および第2の軽鎖をコードすることができる単離された核酸分子に関する。

【0085】

別の態様において、本発明は、本発明の単離された核酸を含むベクターに関する。

【0086】

別の態様において、本発明は、本発明の単離された核酸分子または本発明のベクターを含む宿主細胞に関する。好ましくは、宿主細胞はCHOK1-AF細胞である。好ましくは、宿主細胞において、GFTの遺伝子（フコース修飾経路における重要なタンパク質）は、部位直接的にノックアウトされる。好ましくは、ノックアウトはジンクフィンガーヌクレアーゼ技術によって行われる。好ましくは、GFTの遺伝子中のSLC35c1配列（GenBank登録番号：BAE16173.1）は、部位直接的にノックアウトされる。本発明の一実施形態において、フコースはコアフコースである。

30

【0087】

別の態様において、本発明は、抗Her2抗体またはその抗原結合断片およびカップリング部分を含むコンジュゲートに関し、抗Her2抗体は、本発明の項目のいずれか1つによる抗Her2抗体またはその抗原結合断片であり、好ましくは、カップリング部分は、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、着色物質または酵素である。

【0088】

別の態様において、本発明は、本発明による抗Her2抗体またはその抗原結合断片を含むか、または本発明のコンジュゲートを含むキットに関する。キットは、抗Her2抗体またはその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体をさらに含んでもよく、任意選択的に、二次抗体は、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、着色物質または酵素等の検出可能な標識をさらに含む。

40

【0089】

別の態様において、本発明は、キットの製造における本発明による抗Her2抗体もしくはその抗原結合断片または本発明のコンジュゲートの使用に関し、キットは、試料中のHer2またはHer2のレベルを検出するために使用される。

【0090】

別の態様において、本発明は、本発明の抗Her2抗体もしくはその抗原結合断片またはコンジュゲートを含み、任意選択的に、薬学的に許容される担体および/または賦形剤

50

をさらに含み、任意選択的に、1つ以上の化学療法薬または細胞毒性薬をさらに含む、医薬組成物に関する。化学療法薬または細胞毒性薬は、以下から選択され得る：(1) DNA化学構造に作用する薬物：メクロレタミン、ニトロソ尿、メチルスルホン酸エステル等のアルキル化剤；シス-白金、カルボプラチン、およびオキサリプラチン等の白金化合物；マイトマイシン(MMC)；(2) 核酸の合成に影響を与える薬剤：メトトレキサート(MTX)およびアリムタ等のジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤；フルオロウラシル(5FU、FT-207、カペシタビン)等のチミジンシンターゼ阻害剤；6-メルカプトプリン(6-MP)および6-TG等のプリンヌクレオシドシンターゼ阻害剤；ヒドロキシウレア(HU)等のヌクレオチドレダクターゼ阻害剤；シタラビン(Ara-C)およびGemz等のDNAポリメラーゼ阻害剤；(3) 核酸転写に作用する薬物：アクチノマイシンD、ルビドマイシン、アドリマイシン、エピルピシン、アクラシノマイシン、ミトラマイシン等の、DNAテンプレートに選択的に作用し、DNA依存性RNAポリメラーゼを阻害することによってRNA合成を阻害する薬物；(4) 主に微小管合成に作用する薬剤：パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチナム、ピノレルビン、ポドフィロトキシン、ホモハリングトニン；(5) 他の細胞毒性薬：主にタンパク質合成を阻害するアスパラギナーゼ；ホルモン：抗エストロゲン剤：タモキシフェン、ドロロキシフェン、エキセメスタン等；アロマターゼ阻害剤：アミノグルテチミド、レントロン、レトロゾール、Arimidex等；抗アンドロゲン剤：フルタミドRH-LHアゴニスト/アンタゴニスト：ゾラデックス、エナントン等；生物学的応答調節剤：主に身体の免疫機能を介して腫瘍を抑制するインターフェロン；インターロイキン-2；チモシン；モノクローナル抗体：リツキシマブ(MabThera)；セツキシマブ(C225)；HERCEPTIN(登録商標)(トラスツズマブ)；ペバシズマブ(Avastin)；トレチノイン等の細胞分化誘導剤；細胞アポトーシス誘導剤。本発明によって開示される二重特異性抗体およびその組成物は、前述の抗腫瘍薬のうちの1つ以上との薬物の組み合わせで使用することができる。

【0091】

別の態様において、本発明は、癌の予防および/または治療および/または診断のための薬物の製造における、本発明の抗Her2抗体もしくはその抗原結合断片または本発明のコンジュゲートの使用に関する：癌は、乳癌、胃癌、食道癌、卵巣癌、子宮内膜癌、膀胱癌、肺癌、結腸癌、頭頸部癌、および前立腺癌から選択され、例えば、前立腺癌は進行性前立腺癌であり、乳癌は転移性乳癌である。

【0092】

本発明は、さらに癌の治療方法に関する。方法は、有効量の本発明の抗Her2抗体またはその抗原結合断片を、治療を必要とする対象に投与する工程を含む。癌は、乳癌、胃癌、卵巣癌、食道癌、子宮内膜癌、膀胱癌、肺癌、結腸癌、頭頸部癌、および前立腺癌を含む。

【0093】

本発明の医薬組成物は、全身投与または局所投与により適用することができる。全身投与は、経口、非経口(静脈内、筋肉内、皮下、または直腸等)、および他の全身投与経路を含む。全身投与において、活性化合物は、最初に血漿に到達し、次いで標的組織に分布する。

【0094】

組成物の投薬は、癌の程度および各患者の個々の反応に基づいて異なり得る。全身投与の場合、送達される活性化合物の血漿濃度は様々であり得るが、一般的には 1×10^{-10} - 1×10^{-4} モル/リットルであり、好ましくは 1×10^{-8} - 1×10^{-5} モル/リットルである。

【0095】

当業者は、多種多様な送達機構もまた本発明に適していることを認識するであろう。

【0096】

本発明は、ヒト、ウマ、およびイヌ等の哺乳動物対象を治療するのに有用である。本発

10

20

30

40

50

明は、ヒトを治療するのに特に有用である。

【0097】

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。

【実施例】

【0098】

実施例で使用される略語／用語は以下の通りである。

【0099】

M I L 4 0 : H E R C E P T I N (登録商標) アミノ酸配列と一致する、本発明者らによって調製された H E R C E P T I N (登録商標) 試料。

【0100】

M I L 4 1 : P E R J E T A (登録商標) のアミノ酸配列と一致する、本発明者らによって調製された P E R J E T A (登録商標) 試料。

【0101】

M I L 2 0 3 : 重鎖および軽鎖のアミノ酸配列が実施例 1 として設計された不完全抗体 (半抗体)。

【0102】

M I L 2 0 3 A F : フコースノックアウト操作細胞株 (C H O K 1 - A F) において発現されること以外は M I L 2 0 3 と同一のアミノ酸配列。その N 型糖鎖修飾された糖鎖種において、コアフコースを含まない糖鎖種の比率は 9 8 . 5 以上 % であり、すなわち、コアフコースは 1 . 5 % 未満である。

【0103】

M I L 2 0 4 : 重鎖および軽鎖のアミノ酸配列が実施例 1 として設計された不完全抗体 (半抗体)。

【0104】

M I L 2 0 4 A F : M I L 2 0 4 A F の F a b のアミノ酸配列は M I L 2 0 4 のそれと同一であるが、M I L 2 0 4 A F はフコースノックアウト操作細胞株 (C H O K 1 - A F) において発現される。その N 型糖鎖修飾された糖鎖種において、コアフコースを含まない糖鎖種の比率は 9 8 . 5 % 以上であり、すなわち、コアフコースは 1 . 5 % 未満である。

【0105】

M I L 2 0 3 / 2 0 4 : M I L 2 0 3 および M I L 2 0 4 をアセンブリすることによって形成された二機能性抗体。

【0106】

M B S 3 0 1 : M I L 2 0 3 A F および M I L 2 0 4 A F をアセンブリすることによって形成された二機能性抗体。

【0107】

実施例 1 : 抗体 M I L 2 0 3 および M I L 2 0 4 の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列設計および遺伝子配列最適化

(1) M I L 2 0 3 の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列

M I L 2 0 3 の重鎖は、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する。

【0108】

M I L 2 0 3 の軽鎖は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する。

【0109】

(2) M I L 2 0 3 の軽鎖および重鎖の核酸配列

M I L 2 0 3 の軽鎖および重鎖をコードするために最適化された遺伝子配列は以下の通りである。

【0110】

M I L 2 0 3 重鎖塩基配列は配列番号 2 0 として示され、下線部は重鎖可変領域の塩基配列である。

10

20

30

40

gagggtgcagctggtggagagcgcgccgctggtgcagccccggcgagcctgcgcctgagctgcgccgcccagcggc
ttcaacatcaaggatacctacatccactgggtgcgccaggctcccggcaaggcgctggagtggtggtgcccgcattaccccaccaac
ggctacacccgctacgccgatagcgtgaaggccgcttcacatcagcgccgataccagcaagaacaccgcctacctgcagatgaa
cagcctgcgcgccgaggtatccgctgtactactgcagccgctggggcgccgagtggttctacgccatggattactggggccagg
gcacctggtcaccgtgagcagcgctagcaccaaggcccatcggtcttccccctggcacccctctccaagagcacctctgggggc
acagcgccctgggtgcttgcgtcaaggactactccccgaaccggtagcggtgctggtgaactcaggcgccctgaccagcgcgct
gcacacctccccggtgctctacagtctcaggactctactccctcagcagcggtggtgactgtgcctctagcagcttgggcaccaga
cctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatcttgacaaaactcacat
gcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccc
gaccttgaggtacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttaactgtacgtggacggcggtggagg
tgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgctctaccgtctgcaccaggac
tgggtgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcaaagccaaagg
gcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaagagatgaccaagaaccaggtcagcctgagctgcgcagtc
aaaggtcttatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgct
ggactccgacggctcttcttctcgtgagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

10

20

(配列番号 2 0)

【 0 1 1 1 】

M I L 2 0 3 軽鎖塩基配列は配列番号 2 4 として示され、下線部は軽鎖可変領域の塩基配列である。

gatatccagatgaccagagccccagcagcctgagcgccagcggtggcgatcgcgtgaccatcacctgccgcgccagcca
ggatgtgaacaccgcccgtggcctgtaccagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacagcgccagcttctgtaca
gcggcggtgcccagcccgttcagcgccagccgcagcgccaccgatttcacctgacctacagcagcctgcagcccaggatttcgcc
acctactactgccagcagcactacaccacccccccaccttcggccaggcgaccaaggtggagatcaagcgtagcgtggtgcacc
atctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggc
caaaglacagtggaaggtggataacgcccaccaatcggttaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacc
tacagcctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcct
gagctcgccgctcacaagagcttcaacaggggagagtgt

30

(配列番号 2 4)

【 0 1 1 2 】

(3) M I L 2 0 4 の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列

M I L 2 0 4 の重鎖は、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する。

40

【 0 1 1 3 】

M I L 2 0 4 の軽鎖は、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 1 4 】

(4) M I L 2 0 4 の軽鎖および重鎖の核酸配列

M I L 2 0 4 の重鎖の塩基配列は配列番号 2 1 に示され、下線部は重鎖可変領域の塩基配列である。

gaggtgcagctggtgagagcgccggcgccctggtgcagcccgccgagcctgcgcctgtcctgcgccgccagcgct
tcacctttaccgactacaccatggactgggtgcgccaggctccggcaaggcgctggagtgggtggcgacgtgaacccaacagc
ggcgccagcatctacaaccagcgcttaaggcgccgttcacccctgagcgtggaccgcagcaagaacacccctgtacctgcagatgaa
cagcctgcgcgccgagacaccgccgtgtactactgcgcccgaacctgggccccagcttctactcgactattggggcgaggca
ccctgggtcaccgtgagcagcgctagaccaaggggccatcggtcttccccctggcacccctcctcaagagcacctctgggggcaca
gcggccctgggtgcctggtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgca
caccttccgggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtggtgactgtgccctctagcagcttgggcaccagacct
acatctgcaacgtgaatcacaaagccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagccaaatcttgacaaaactcacatgccc
caccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccggagc
ccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgc
ataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgaccaggactgg
ctgaatggcaaggagtagaagtgaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggga
gccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggaagagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctgtgcaaa
ggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgtgg
actccgacggctccttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat
gcatgaggctctgcacaaccactacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

10

20

(配列番号 2 1)

【 0 1 1 5 】

M I L 2 0 4 の軽鎖の塩基配列は配列番号 2 7 に示され、下線部は重鎖可変領域の塩基配列である。

gataaccagatgaccagagccccctccagcctgtccgccaagcgtggcgccagccgtgacatcacctgcaaggccagcca
ggacgtgagcatcgccgtggcctggtaccagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacagcgctcctaccgtaca
ccggcggtgccctcccgttcagcggtccggcagcggcaccgactttaccctgaccatctccagcctgcagccccagggactttgcca
cctactactgccagcagtactacatctatccctataccttgcgccagggcaccaaggtggagatcaagcgtacggtggctgcaccatct
gtttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaa
agtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagaggtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctac
agcctcagcagcaccctgacgtgagcaagcagactacgagaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctga
gctcgcccgctcacaagagcttcaacaggggagagtg

30

(配列番号 2 7)

【 0 1 1 6 】

実施例 2 : 2 0 3 抗体真核生物発現ベクターおよび 2 0 4 抗体真核生物発現ベクターの構築

40

発現ベクター p T G S - F R T - D H F R (中国特許第 Z L 2 0 0 5 / 1 0 0 6 4 3 3 5 . 0 号) を使用し、ハイグロマイシン選択標識を除去し、G S (グルタミンシンターゼ) 発現ボックスを P s h A 1 および X h o 1 制限酵素切断部位を介して付加して選択マーカーとして使用した : G S c D N A は、G S を発現した細胞株 C H O から R T - P C R によって得ることができた。修飾によって得られたベクターを G S ベクターと命名した。

【 0 1 1 7 】

G S ベクターに基づいて、完全に合成された軽鎖定常領域 (定常領域配列は配列番号 2 4 であるか、または配列番号 2 7 の下線のない配列であった) を B s i w I および N o t I 制限酵素切断部位を介して挿入し、次いで、完全に合成された 2 0 3 重鎖定常領域およ

50

び204重鎖定常領域（定常領域配列は、配列番号20および配列番号21において別々に下線のない配列であった）を、Nhe IおよびXho I制限酵素を介して別々に挿入し、定常領域の修飾後、203軽鎖定常領域および重鎖定常領域を含むGS-203ベクターと、204軽鎖定常領域および重鎖定常領域を含むGS-204ベクターとを別々に得た。

【0118】

203軽鎖可変領域および重鎖可変領域ならびに204軽鎖可変領域および重鎖可変領域の遺伝子（これらは、配列番号24、配列番号27、配列番号20および配列番号21において別々に下線を引かれた配列であった）を完全に合成し、構築によりpGEM-TEasyベクターに挿入して、pGEM-TEasy-203/V_Hベクター、pGEM-TEasy-204/V_Hベクター、pGEM-TEasy-203/V_Hベクター、およびpGEM-TEasy-204/V_Hベクターと別々に命名したベクターを得た。

【0119】

pGEM-TEasy-203/V_HおよびpGEM-TEasy-204/V_HをCla IおよびBsiw Iで別々に消化して、203軽鎖可変領域遺伝子および204軽鎖可変領域遺伝子を別々に得た。

【0120】

上記のようにして構築したGS-203ベクターおよびGS-204ベクターを1μgの量で別々に回収し、Cla IおよびBsiw Iで別々に消化した。

【0121】

上記のようにして得られたCla IおよびBsiw Iで消化したGS-203ベクターと203軽鎖可変領域とをT4 DNAリガーゼで連結し、上記のようにして得られたCla IおよびBsiw Iで消化したGS-204ベクターと204軽鎖可変領域とをT4 DNAリガーゼで連結した。その結果得られた203軽鎖および204軽鎖を有するプラスミドを、pTGS-203V_HベクターおよびpTGS-204V_Hベクターと別々に命名した。

【0122】

pGEM-TEasy-203/V_HとpGEM-TEasy-204/V_Hとを別々に採取し、EcoR IおよびNhe Iで消化して203重鎖可変領域遺伝子と204重鎖可変領域遺伝子とを別々に得た。pTGS-203V_HベクターとpTGS-204V_Hベクターとを1μgの量で別々に採取し、EcoR IおよびNhe Iで別々に消化した。上記のようにして得られたEcoR IおよびNhe Iで消化したpTGS-203V_H、ならびに203重鎖可変領域遺伝子だけでなく、pTGS-204V_Hおよび204重鎖可変領域遺伝子もT4 DNAリガーゼで別々に連結した。pTGS-203V_HおよびpTGS-204V_Hに基づいて、抗体203重鎖可変領域遺伝子および抗体204重鎖可変領域遺伝子を別々に有するプラスミドを得、これらを203抗体真核生物発現ベクターおよび204抗体真核生物発現ベクターと別々に命名した。

【0123】

実施例3：宿主細胞のフコースノックアウトおよび懸濁液順化

ATCCから購入したCHO-K1細胞（ATCC：58995535）を遺伝子ノックアウトに供して、それらによって発現されるタンパク質がフコシル化修飾をほとんどまたは完全に有しないようにし、得られたフコースノックアウト宿主細胞をCHO-K1-AFと命名した。具体的な方法は、遺伝子工学技術により発現系を修飾することを含み、抗体発現用の宿主細胞CHO-K1においてフコシル化修飾経路のための重要なタンパク質であるGFTの部位特異的ノックアウトを行い、抗体のフコース修飾レベルを効果的に低下させた。この方法により、典型的なフコシル化機構および補完機構を同時に遮断することができ、フコシル化の完全な除去を達成した。具体的な技術的経路を図2に示すが、ジंकフィンガーヌクレアーゼ技術を用いることにより、2つのGFTジंकフィンガーヌクレアーゼ配列がGFT遺伝子SLC35c1配列（GenBank：BAE16173.1）のために設計され、標的遺伝子の二本鎖DNAに結合するように別々に用いられる

10

20

30

40

50

。発現ベクタープラスミドをそれに応じて構築し、エレクトロトランスフェクション技術により2つのプラスミドをCHO-K1細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を6ウェルプレート上で24時間静置培養し、次いで125 mL 振盪フラスコに移し、振盪フラスコ内で継代および増幅を行うように振盪培養した。糖鎖結合性の凝集素LCA（レンズマメ凝集素）のタンパク質フコシルに対する特異的親和性を用いて、同時トランスフェクトした細胞をビオチン-LCAで染色し、抗ビオチンマイクロビーズおよびMACs LDカラムを組み合わせて使用することによりネガティブ分離を行い、クローン培養をさらにを行い、クローン細胞のフコースノックアウトレベルをフローサイトメトリー技術により決定し、複数回のネガティブ分離およびクローン培養によりフコシル化修飾されていないクローン1G7を得た。

10

【0124】

図3は、CHO-K1細胞(A)およびCHOK1-AF細胞(B)のフコース発現量を示す。濃い色で塗りつぶされたピークは、フコースを発現しない対照細胞を表す。黒い線のピークは、フコース単位に対して高い特異的結合親和性を有するレンズマメ凝集素(LCA)試薬を用いてFCASによって決定されたCHO-K1(A)またはCHOK1-AF細胞(B)のフコース発現量を表す。結果は、CHO-K1細胞が高レベルのフコースを発現し、CHOK1-AF細胞がフコースを発現しないことを示す。

【0125】

CHOK1-AF細胞は、2017年6月14日に、China General Microbiological Culture Collection Center (No. 1 West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China)に、CGMCC第14287の寄託番号で寄託された。

20

【0126】

フコシル化修飾されていないクローン1G7の全RNAを抽出し、逆転写後、GDP輸送タンパク質をコードする遺伝子を取り出して配列決定し、この遺伝子が首尾よく突然変異しており、通常は発現され得ないことを確認した。

【0127】

さらなる順化および培養：融解後の宿主細胞gmt4⁻-CHO-K1を種培地(表1-1参照)(10%のウシ血清を含む)中で接着培養に供し、血清を徐々に減少させ(10%、5%、2.5%、1%、0.5%から血清を全く含まない状態まで)、振盪フラスコに移して懸濁順化させ、合計約10回継代を行った。宿主細胞が完全に懸濁され、指数関数的に安定に増加すると、種培地で増殖することができる安定な宿主細胞が最終的に得られた。

30

【0128】

実施例4：MIL203AFおよびMIL204AF抗体を含む上清の調製

エレクトロトランスフェクション技術を用いて、実施例2で得られた203抗体真核生物発現ベクターおよび204抗体真核生物発現ベクターを別々に標的宿主細胞CHOK1-AFにトランスフェクトし、50 μM MSX(メチオニンスルホキシム)を種培地に加え、37 °CのCO₂インキュベータで2~4週間培養を行い、この培地中で生き残った細胞を選出し、ELISA法を用いて抗体を発現することができる細胞を検出した。サブクローンスクリーニングを限界希釈法によって行い、6~8週間の培養およびスクリーニングの後、MIL203AFおよびMIL204AF抗体を効率的に発現することができるモノクローナル細胞株を得た。

40

【0129】

特定の培地の調製：培地は表1-1、1-2および1-3に示す成分に従って調製した。0.22 μm膜を用いて滅菌条件下で濾過した後、それらを細胞培養に用いた。

【表 1 - 1】

表 1-1：種培地

番号	成分	含有量
1	注射用水 ($25 \pm 5^\circ\text{C}$)	0.9 L
2	Pluronic F-68	1.0 g/L
3	グルコース	8.8 g/L
4	培地パウダーMaxgrow 202	7.44 g/L
5	重炭酸ナトリウム	1.98 g/L
6	塩化ナトリウム	3.47 g/L
7	1M HEPES	15 ml/L
8	5M HCl または 5M NaOH	pH = 7.0 ± 0.1 に調整
1 L に希釈		

10

【表 1 - 2】

表 1-2：生産培地

番号	成分	含有量
1	注射用水 ($25 \pm 5^\circ\text{C}$)	0.8 L
2	水酸化ナトリウム	0.8 g/L
3	培地パウダーMaxpro 302	11.5 g/L
4	1 g/L ビタミン B12 原液	1~2 ml/L
5	10 g/L 硫酸第一鉄原液	0.4~0.6 ml/L
6	リン酸二水素ナトリウム一水和物	0.35 g/L
7	グルコース (一水和物)	8.8 g/L
8	L-システイン塩酸塩一水和物	0.3~0.375 g/L
9	Pluronic F-68	1 g/L
11	塩化ナトリウム	1.55 g/L
12	5M HCl	5.6 ml/L
13	重炭酸ナトリウム	1.22 g/L
14	1M HEPES	7.5 ml/L
15	5M HCl または 5M NaOH	pH = 7.0 ± 0.1 に調整
1 L に希釈		

20

30

【表 1 - 3】

表 1-3：流加培地

番号	成分	含有量
1	注射用水 (25±5℃)	0.8 L
2	5M NaOH	7.325 mL
3	無水リン酸水素二ナトリウム	3.09 g/L
4	流加培地パウダーMax feed 402	39.03 g/L
5	50 g/L レーチロシンナトリウム塩二水和物	23.8 mL
6	50 g/L レーシステイン塩酸塩一水和物	23.2 mL
7	グルコース	50.0 g/L
8	1.75 g/L ビタミンB12	0.3 mL
9	5 g/L 硫酸第一鉄七水和物	0.3 mL
10	Pluronic F-68	0.3 g
11	塩化ナトリウム	0.24 g
12	重炭酸ナトリウム	0.366 g
13	5M HClまたは5M NaOH	pH=7.0±0.1に調整
1 Lに希釈		

【0130】

播種密度が $0.5 \pm 0.2 \times 10^6$ 細胞/mLである培地を用いた多段階培養によって細胞株を増幅し、2～4日に1回継代を行い、増幅によって十分な細胞が得られたときにそれらを発酵培地（生産培地：種培地＝1：1からなる培地）に移した：発酵培地における培養期間は12～14日であり、3日目、6日目、9日目に流加培地を10%体積で加え、培養の終了後に上清を得た。このようにして、MIL203AFおよびMIL204AFをそれぞれ得た。

【0131】

MIL203およびMIL204の調製方法は、宿主細胞がATCCから購入したCHO-K1細胞（ATCC：58995535）であり、フコースノックアウトを行わなかった以外は、本実施例におけるMIL203AFおよびMIL204AFの調製方法を参照した。

【0132】

実施例5：MBS301二重特異性抗体のアセンブリ

1. 半抗体の捕捉

実施例4で得られた細胞発酵ブロスの上清を0.2 μm膜で濾過し、プロテインAカラムを用いて捕捉を行った。最初に、低塩トリス、pH 7.5緩衝液でカラムを平衡化し、次いで上清を充填し、次いで低塩トリス、pH 7.5緩衝液でカラムを溶出し、高塩リン酸カリウム、pH 6.0緩衝液でカラムをさらに溶出し、次いで低塩トリス、pH 7.5緩衝液でカラムを平衡化し、最後に低pH酢酸緩衝液で溶出して半抗体を得た。半抗体溶液をトリス塩基溶液でpH 5.5に調整し、適量のArgを加えて保存した。

【0133】

2. アセンブリ

分光光度計を用いて280 nmの吸光度で半抗体の濃度を決定した。半抗体を1：1のモル比で混合し、トリス塩基緩衝液でpH 8.0に調整し、一定量の還元剤GSHを加え、25℃で一晩低速撹拌して反応させた。脱塩カラム（または限外濾過）により還元剤を除去し、反応を終了させた。

【0134】

3. アニオン(QSFF)

アセンブリし、置き換えた試料を8.0のpH、3.5 mS/cmの導電率を有するよ

うに調整し、 $0.22\ \mu\text{m}$ 膜で濾過した。最初に、アニオンクロマトグラフィーカラムを低塩トリス、 $\text{pH } 8.0$ 緩衝液で平衡化し、次いで試料をアニオンクロマトグラフィーカラムに充填し、漏出成分を回収し、次いで、 $\text{UV } 280$ がベースラインになるまで低塩トリス、 $\text{pH } 8.0$ 緩衝液を溶出に用いた。回収した漏出試料を酢酸溶液で $\text{pH } 5.5$ に調整した。

【0135】

4. カチオン ($50\ \text{HS}$)

アニオン手順で回収した試料を $0.22\ \mu\text{m}$ 膜で濾過した。試料を $50\ \text{HS}$ カラムに充填し、次いで低濃度酢酸、 $\text{pH } 5.5$ 緩衝液で平衡化し、 $0 \sim 100\%$ 高濃度酢酸、 $\text{pH } 5.5$ 、 $20\ \text{CV}$ で直線勾配様式で溶出し、溶出した成分を回収した。

10

【0136】

得られた $\text{MBS } 301$ 抗体を以下の実施例に用いた。

【0137】

実施例 6：質量スペクトルによる分子量の決定

1. 実験方法

脱糖試料の調製： $500\ \mu\text{g}$ の $\text{MBS } 301$ 抗体を $10\ \text{kD}$ 限外濾過チューブで脱塩し、 $10\ \mu\text{L}$ の $\text{G } 7$ 消化緩衝液、 $3\ \mu\text{L}$ の PNGase F を加え、超純水で $100\ \mu\text{L}$ に希釈し、均一に混合して密封フィルムで密封し、 37°C の水浴中に一晩置いた。

【0138】

$\text{LC} - \text{MS}$ 分析： $\text{MBS } 301$ または脱糖試料を $2.5\ \text{mg/mL}$ に希釈し、 $\text{PLRP} - \text{S}$ クロマトグラフィーカラムで脱塩した： 95% 移動相 A ($0.1\% \text{FA}$ 水)、 5% 移動相 B ($0.1\% \text{FA}$ アセトニトリル) から 95% 移動相 B への 10 分間勾配を用いて 10 分間維持し、逆クロマトグラフィーカラムで脱塩した後、 $\text{Triple TOF } 4600$ (AB Sciex) を用いて質量分析を行い、データを $\text{Analyst TF } 1.6$ を用いたデコンボリューション解析に供した。

20

【0139】

2. 実験結果

$\text{MBS } 301$ のインタクトなタンパク質分子量の質量分析結果を図 4 に示した： $\text{MBS } 301$ は、異なる糖鎖種に対応する異なる分子量を有する複数の分子からなり、フコースはこれらの糖鎖種には見られなかった。

30

【0140】

N 型糖鎖修飾の除去後、 $\text{MBS } 301$ の分光分析結果を図 5 に示した：そのインタクトなタンパク質分子量 145 、 154 は理論的分子量と一致しており、 $\text{MIL } 203\ \text{AF}$ および $\text{MIL } 204\ \text{AF}$ のアセンブリが成功したことが示唆された。

【0141】

実施例 7：分子排除クロマトグラフィー ($\text{SEC} - \text{HPLC}$)

1. 実験方法

移動相： $0.2\ \text{mol/L}$ リン酸カリウム緩衝液、 $0.25\ \text{mol/L}$ 塩化カリウム、 $\text{pH } 6.2 \pm 0.1$

試料の調製：試験する試料を移動相で $2\ \text{mg/mL}$ に希釈した。

40

クロマトグラフィー条件：試料注入器温度は 6°C 、試料サイズ： $25\ \mu\text{L}$ 、流速： $0.5\ \text{mL/分}$ 、シグナル： $280\ \text{nm}$ 、カラム温度： 30°C 、均一濃度溶離 30 分間であった。

【0142】

2. 実験結果

アセンブリ前の $\text{MIL } 203\ \text{AF}$ 、 $\text{MIL } 204\ \text{AF}$ およびアセンブリ後の $\text{MBS } 301$ の SEC スペクトルを図 6 に示した。アセンブリ前に、 $\text{MIL } 203\ \text{AF}$ は多くの半抗体 (44.7%) および巨大分子を有していたことが分かる：アセンブリ前に、 $\text{MIL } 204\ \text{AF}$ は広いモノマーピークパターンを有しており、それらの分子サイズが均一に分布していないことが示唆されたが、 $\text{MBS } 301$ のアセンブリ後、分子サイズ分布パターン

50

が整い、モノマー純度は99.1%であった。

【0143】

実施例8：N型糖鎖種分析

1. 実験方法：

500 μ gの抗体を10kD限外濾過チューブで脱塩し、10 μ LのG7消化緩衝液、3 μ LのPNGase Fを加え、超純水で100 μ Lに希釈し、均一に混合して密封フィルムで密封し、37℃の水浴中に一晩置いた。消化した試料を300 μ Lの予冷エタノールに加え、均一に混合し、30分間静置し、12000rpmで5分間遠心分離し、上清を採取し、真空下で濃縮および乾燥した。DMSOと酢酸とを350 μ L：150 μ Lの比で混合し、5mgの2-AB、6mgのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを100 μ LのDMSOおよび酢酸の混合溶液に溶解し、10 μ Lの混合溶液を採取して65℃のオーブンに入れ、3時間誘導した後、80%アセトニトリルと水との混合溶液200 μ Lを加え、2分間遠心分離し、上清を回収した。

【0144】

クロマトグラフィーカラム：WATERS Acquity UPLC BEH Amide 1.7 μ m、2.1 \times 50mmカラム

カラム温度：40℃

励起波長：ex = 330nm、em = 420nm

試料サイズ：10 μ L

クロマトグラフィーカラムを20%移動相A（100mMギ酸アンモニウムpH4.5）、80%移動相B（100%アセトニトリル）で平衡化し、試料を充填した後、相Aの割合を36分後に40%に増加させた。

【0145】

2. 実験結果：

アセンブリしたMIL203/204、MBS301は、図7に示すような糖鎖種スペクトルを有していた。図7ならびに表2および3において、MIL203/204と比較して、MBS301は有意に減少したフコース含有量を有しており、フコース含有糖鎖種G0Fの割合はわずか1.1%であったことが分かる。

【表2】

表2：MIL203/204糖鎖種の糖鎖種の割合

名称	G0F-GN	G0	G0F	MAN5	G1F	G1F'	G2F	G2FS	G2FS2
203-204	1.06	0.62	44.73	0.98	9.27	5.87	8.69	10.53	9.40

【表3】

表3：MBS301の糖鎖種の割合

名称	G0-GN	G0	G0F	MAN5	G1	G1'	G2	G2S	G2S2
203AF-204AF	3.34	46.50	1.1	1.49	7.73	6.11	4.89	5.65	7.77

【0146】

実施例9：抗体に対するHer2結合活性の分析

1. 実験方法：

HBS-EP+緩衝液を用いてMIL40、MIL41、MIL40とMIL41との混合物（1：1）、MIL203/204、およびMBS301の試料をそれぞれ0.1 μ g/mlに希釈してリガンドを形成した。HER2（Sino Biological Inc、10004-H08H）をHBS-EP+緩衝液で4 μ g/ml、2 μ g/ml

1、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈して分析物を形成した。リガンド（抗体）を間接捕捉法によって固定し、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒトIgG抗体（BR100839、GE）をアミノカップリング共有結合を介してCM5チップの表面に最初に結合させ、次いでリガンドと分析物を結合させた。BIAcore（登録商標）（生体分子の相互作用を自動的に測定し調査するための分析器）Wizardモード下で、リガンドとしてMIL40、MIL41、MIL40とMIL41との混合物、およびMBS301の試料を別々に使用し、分析物としてHER2を使用することにより、マルチサイクルモードで親和性分析実験を行った。各試料の分析は、3つの開始試料、1つのゼロ濃度対照試料、6つの勾配濃度試料、および1つの繰り返し濃度試料を含み、各サイクルの終了後に、 3M MgCl_2 再生溶液でチップを再生した。分析物の各濃縮サイクルの捕捉時間は90秒に設定し、リガンド溶液の流速は $10\mu\text{l}/\text{分}$ であった：リガンドと分析物との結合時間は180秒、分析物溶液の流速は $30\mu\text{l}/\text{分}$ であり、解離時間は1200秒であった。元のデータをBIAcore（登録商標）X100分析ソフトウェアに導入し、ゼロ濃度対照を差し引き、体積効果を排除するために参照チャンネルを差し引き、1：1結合モードのKinetics解析法をフィット曲線に使用し、データを照合した。

10

【0147】

2. 実験結果：

【表4】

20

表4. Biacore技術により決定されたHer2結合動力学定数

試料名	k_a ($1/\text{Ms}$)	k_d ($1/\text{秒}$)	K_D (M)
MIL40	$3.293\text{E}+5$	$1.772\text{E}-4$	$5.383\text{E}-10$
MIL41	$1.974\text{E}+5$	$2.117\text{E}-4$	$1.073\text{E}-9$
MIL40/MIL41	$3.172\text{E}+5$	$1.481\text{E}-4$	$4.668\text{E}-10$
MIL203-204	$3.320\text{E}+5$	$1.240\text{E}-4$	$3.735\text{E}-10$
MBS301	$3.465\text{E}+5$	$1.161\text{E}-4$	$3.350\text{E}-10$

【0148】

30

結合動力学定数によれば、MBS301およびMIL203/204は、Her2結合活性においてMIL41よりも優れており、MIL40、およびMIL40とMIL41との混合物（1：1）と実質的に同等であることがこの表から分かる。

【0149】

実施例10：FcRIIIa結合活性の分析

1. 実験方法：

FcRIIIa（Sino Biological Inc、10389-H08C1）をHBS-EP緩衝液で $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈してリガンドを形成した。HBS-EP緩衝液を用いて、MIL40、MIL41、MIL40とMIL41との混合物（1：1）、MIL203/204、およびMBS301の試料を、 $360\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $120\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $13.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4.4\mu\text{g}/\text{ml}$ に別々に希釈して分析物を形成した。リガンドFcRIIIaを間接捕捉法によって固定し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗His IgGをアミノカップリング共有結合を介してCM5チップの表面に最初に結合させ、次いでリガンドと分析物とを結合させた。Biacore Wizardモード下で、リガンドとしてFcRIIIaを使用し、分析物としてMIL40、MIL41、MIL40とMIL41との混合物、およびMBS301の試料をそれぞれ別々に使用することにより、マルチサイクルモードで親和性分析実験を行った。各試料の分析は、3つの開始試料、1つのゼロ濃度対照試料、5つの勾配濃度試料、および1つの反復濃度試料を含み、各サイクルの終了後、 10mM グリシン-HCl、 $\text{pH}1.5$ 再生溶液でチップを再生した。分析物の各濃縮サイクルの捕捉時間は60秒に設定し、リガンド

40

50

溶液の流速は10 μL /分であった。リガンドと分析物との結合時間は180秒、分析物溶液の流速は30 μL /分であり、解離時間は180秒であった。抗His IgGとカップリングさせたCM5チップをスロットに入れ、試料を試験して分析した。元のデータをBIAcore (商標) X100分析ソフトウェアに導入し、ゼロ濃度対照を差し引き、参照チャンネルを差し引いて体積効果を排除し、親和性分析法の恒常性モデル評価をフィット曲線に使用し、データを照合した。

【0150】

2. 実験結果:

表5から、MBS301が最も低い K_D 値を示したことが分かり、それがMIL40、MIL41、MIL40とMIL41との混合物、MIL203/204のものよりも明らかに強いFc RIIaに対する最も強い結合活性を有していたことが示唆され、これによってグリコシル化修飾されたMBS301の優位性が示された。

【表5】

表5.

	K_D (M) $E-7$	K_D (M) $E-7$	K_D 平均 (M) $E-7$
MIL41	8.290	8.059	8.175
MIL40	3.194	3.022	3.108
MBS301	1.252	1.096	1.174
MIL203/204	5.886	5.852	5.869
MIL41/MIL40 混合物	4.312	4.297	4.305

【0151】

実施例11: ADCC活性の分析

1. 実験方法:

標的乳癌細胞SKBR-3(ATCCから購入、CRL-2326)、エフェクター細胞NK92MI-CD16a(Huabo Bioから購入)を1200rpmで4分間遠心分離し、上清を廃棄し、ADCC実験培地を用いて細胞を再懸濁し、次いで1200rpmで4分間遠心分離し、上清を廃棄し、ADCC実験培地を用いて細胞を再懸濁した:細胞生存率は細胞計数によれば90%以上であるはずである。SKBR-3の細胞密度を $1.25 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整し、NK92MI-CD16aの細胞密度を $6.25 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整した。

【0152】

異なる濃度の抗体を別々に加えて、0.000001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.00001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.0001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度をそれぞれ達成し、次いで、エフェクター細胞および標的細胞(エフェクター-標的比は5:1)を加え、37℃で6時間インキュベートし、100 μL /ウェルのLDH現像液を加え、室温で20分間遮光した。測定はMD SpectraMax i3を用いて行った。

【0153】

標的乳癌細胞BT474(ATCCから購入、CRL-2326)、結腸癌SW480(Cell Bank of Chinese Academy of Sciencesから購入、TCHU172)に関して、標的細胞に対するADCCエフェクター細胞の比は10:1であった:すなわち、標的細胞密度は $1.25 \times 10^5 / \text{ml}$ であり、エフェクター細胞密度は $1.25 \times 10^6 / \text{ml}$ であった。他の方法はSKBR-3の場合と同じであった。

【0154】

標的乳癌細胞HCC1419(トラスツズマブ耐性、ATCCから購入、CRL-23

26) に関して、ADCC作用方法はSKBR-3の場合と同じであった。

【0155】

殺傷率の計算：

背景群：培地群

最小放出群：標的細胞群

最大放出群：標的細胞 + 溶解液群

実験群：標的細胞 + エフェクター細胞

殺傷率(%) = [(実験群 - 最小放出群) / (最大放出群 - 最小放出群)] × 100

【0156】

2. 実験結果：

図8～11は、異なる標的細胞に対するMBS301のADCC活性が、MIL40、MIL41、併用投与(1:1)したMIL40およびMIL41、ならびにMIL203/204より有意に優れており、殺傷効果が抗体投与量に依存するという結果を示す。

【0157】

実施例12：直接殺細胞活性の分析

1. 実験材料

ヒト乳癌BT474細胞(ATCCから購入、HTB-20)。

【0158】

ヒト乳癌MDA-MB-175細胞(ATCCから購入、HTB-25)。

【0159】

ヒト乳癌SKBR-3細胞(ATCCから購入、HTB-30)。

【0160】

ヒト乳癌HCC1419細胞(ATCCから購入、CRL-2326)。

【0161】

ヒト胃癌NCI-N87細胞(Cell Bank of Chinese Academy of Sciencesから購入、TCHU130)。

【0162】

これらの細胞のうち、BT474は三重陽性細胞で、Her-2高発現であり、MDA-MB-175、SKBR-3はHER-2陽性で、BT474と比較して低発現であり、HCC1419はHERCEPTIN(登録商標)耐性株であった。

【0163】

2. 実験方法：

対数増殖期にあるヒト乳癌BT474細胞(ATCCから購入、HTB-20)を計数し(生存率>90%)、 6.7×10^4 細胞/mlの細胞密度を有するように調整し、均一に混合し、細胞培養プレートに150μl/分の量で接種した。抗体薬MIL40、MIL41、併用投与したMIL40/MIL41、MIL203/204、MBS301を希釈し、次いで、予め細胞を広げておいた96ウェル培養プレートに50μl/ウェルの量に加え、各抗体薬につき、2.5μg/ml、1.25μg/ml、0.625μg/ml、0.313μg/ml、0.156μg/ml、0.078μg/ml、0.039μg/ml、0.020μg/ml、0.010μg/mlの9種の濃度を設定し、各濃度について反復ウェルを設定し、さらに、薬物不含対照群および細胞培地ブランク対照群も設定した。培養プレートを細胞インキュベータに入れて120時間インキュベートし、次いで10μlのCCK-8溶液を各ウェルに加え、振盪した後、培養プレートをインキュベータに入れて3～5時間インキュベートし、OD₄₅₀値をELISAにより決定した。細胞に対する薬物の抑制率は以下の式により算出した：抑制率 = (1 - (薬物群OD₄₅₀ - ブランク群OD₄₅₀) / (対照群OD₄₅₀ - ブランク群OD₄₅₀)) × 100%。

【0164】

対数増殖期にあるヒト乳癌MDA-MB-175細胞(ATCCから購入、HTB-25)を計数し(生存率>90%)、 1×10^5 細胞/mlの細胞密度を有するように調整

10

20

30

40

50

し、均一に混合し、細胞培養 96 ウェルプレートに 100 μ l / ウェルの量で接種した。各抗体医薬について、500 μ g / ml、125 μ g / ml、31.25 μ g / ml、5.208 μ g / ml、0.868 μ g / ml、0.145 μ g / ml、0.0241 μ g / ml、0.00402 μ g / ml、0.000670 μ g / ml、0.000112 μ g / ml の 10 種の濃度を設定した。培養プレートを細胞培養インキュベータに入れて 72 時間インキュベートし、他の方法は BT 474 細胞の場合と同じであった。

【0165】

対数増殖期にあるヒト乳癌 SKBR-3 細胞 (ATCC から購入、HTB-30) を計数し (生存率 > 90%)、 1×10^5 細胞 / ml の細胞密度を有するように調整し、均一に混合し、細胞培養用の 96 ウェルプレートに 100 μ l / ウェルの量で接種した。各抗体薬物について、100 μ g / ml、25 μ g / ml、6.25 μ g / ml、1.56 μ g / ml、0.39 μ g / ml、0.098 μ g / ml、0.0244 μ g / ml、0.0061 μ g / ml、0.0015 μ g / ml の 9 種の濃度を設定した。培養プレートを細胞培養インキュベータに入れて 120 時間インキュベートし、他の方法は BT 474 細胞の場合と同じであった。

10

【0166】

対数増殖期にあるヒト乳癌 HCC1419 細胞 (ATCC から購入、CRL-2326) を計数し (生存率 > 90%)、 5×10^4 細胞 / ml の細胞密度を有するように調整し、均一に混合し、細胞培養用の 96 ウェルプレートに 100 μ l / ウェルの量で接種した。各抗体薬物について、100 μ g / ml、25 μ g / ml、6.25 μ g / ml、1.56 μ g / ml、0.39 μ g / ml、0.098 μ g / ml、0.0244 μ g / ml、0.0061 μ g / ml、0.0015 μ g / ml の 9 種の濃度を設定した。培養プレートを細胞培養インキュベータに入れて 120 時間インキュベートし、他の方法は BT 474 細胞の場合と同じであった。

20

【0167】

対数増殖期にあるヒト胃癌 NCI-N87 細胞 (Cell Bank of Chinese Academy of Sciences から購入、TCHU130) を計数し (生存率 > 90%)、 5×10^4 細胞 / ml の細胞密度を有するように調整し、均一に混合し、細胞培養用の 96 ウェルプレートに 100 μ l / ウェルの量で接種した。各抗体医薬について、10 μ g / ml、3.33 μ g / ml、1.11 μ g / ml、0.37 μ g / ml、0.123 μ g / ml、0.041 μ g / ml、0.0137 μ g / ml、0.0045 μ g / ml、0.0015 μ g / ml の 9 種の濃度を設定した。培養プレートを細胞培養インキュベータに入れて 7 時間インキュベートし、他の方法は BT 474 細胞の場合と同じであった。

30

【0168】

3. 実験結果:

図 12 に示すように、MIL203/204、MBS301 は、MIL40、MIL40/MIL41 混合物のものよりも高い BT 474 細胞に対する抑制率を有し、MIL41 が最も弱い抑制活性を示した。

【0169】

図 13 に示すように、MIL203/204、MBS301 は、MIL40 のものより有意に高く、かつ MIL41、MIL40/MIL41 混合物 (1:1) の抑制率に非常に近い、MDA-MB-175 細胞に対する抑制率を有していた。

40

【0170】

図 14 に示すように、MIL203/204、MBS301 は、MIL40、MIL41、MIL40/MIL41 混合物のものよりも高い SKBR-3 細胞に対する抑制率を有していた。

【0171】

図 15 に示すように、MIL40、MIL41 は、乳癌細胞 HCC1419 に対して有意な抑制効果を示さず、併用投与 (1:1) した MIL40/MIL41 は、細胞増殖を

50

抑制することができ、M I L 2 0 3 / 2 0 4 および M B S 3 0 1 は、最も高い抑制率を示し、それらの活性は併用投与 (1 : 1) した M I L 4 0 および M I L 4 1 (1 : 1) よりも有意に優れていた。

【 0 1 7 2 】

図 1 6 に示すように、併用投与 (1 : 1) した M I L 4 0 および M I L 4 1 は、M I L 4 0 よりも優れた胃癌細胞 N C I - N 8 7 に対する抑制効果を示し、M I L 4 1 は、有意な抑制効果を示さなかった：M I L 2 0 3 / 2 0 4 および M B S 3 0 1 は、最も高い抑制率を示し、それらの活性は併用投与 (1 : 1) した M I L 4 0 および M I L 4 1 よりも有意に優れていた。

【 0 1 7 3 】

実施例 1 3 : C D C 活性

1 . 実験方法 :

標的細胞 B T 4 7 4 を 1 2 0 0 r p m で 4 分間遠心分離し、上清を廃棄し、細胞を 1 % F B S 培地で再懸濁し、計数した：細胞生存率は 9 0 % 以上であるはずである。B T 4 7 4 細胞の細胞密度を、 $2 \times 10^5 / \text{ml}$ (ウェル当たり 5 0 μl) に調整した。

【 0 1 7 4 】

異なる濃度の抗体を別々に加え、それらの最終濃度をそれぞれ 1 0 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、2 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、6 . 2 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、1 . 5 6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、0 . 3 9 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、0 . 0 9 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、0 . 0 2 4 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、0 . 0 0 6 1 μg とし、5 0 μl のウサギ補体 (1 : 2 0 希釈) を加え、3 7 °C で 2 時間インキュベートし、8 0 μL / ウェルの L D H 現像液を加え、室温で 2 0 分間遮光した。測定は M D S p e c t r a M a x i 3 を用いて行った。

【 0 1 7 5 】

殺傷率の計算 :

背景群 : 培地分

最小放出群 : 標的細胞群

最大放出群 : 標的細胞 + 溶解液群

実験群 : 標的細胞 + 補体

殺傷率 (%) = [(実験群 - 最小放出群) / (最大放出群 - 最小放出群)] \times 1 0 0

【 0 1 7 6 】

2 . 実験結果 :

図 1 7 から、標的細胞 B T 4 7 4 に別々に作用した M I L 4 0、M I L 4 1 は C D C 活性を示さなかったが、それらを併用投与した場合は C D C 効果を示したこと、二機能性抗体 M I L 2 0 3 / 2 0 4、M B S 3 0 1 は、併用投与した M I L 4 0 および M I L 4 1 のものより有意に強い C D C 活性を有し、抗体用量依存性の C D C 殺傷効果を示したことが分かる。

【 0 1 7 7 】

実施例 1 4 : 抗体 F c R n 結合活性の分析

1 . 実験方法

F c R n (S i n o B i o l o g i c a l I n c、C T 0 0 9 - H 0 8 H) を H B S - E P 緩衝液で 0 . 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ に希釈してリガンドを形成した。H B S - E P 緩衝液を用いて、M I L 4 0、M I L 4 1、M I L 4 0 と M I L 4 1 との混合物、M I L 2 0 3 / 2 0 4、および M B S 3 0 1 の試料を、3 6 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、1 2 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、4 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、1 3 . 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、4 . 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ に別々に希釈して分析物を形成した。リガンド F c R n - H i s タグを間接捕捉法によって固定し、5 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の抗 H i s I g G をアミノカップリング共有結合を介して C M 5 チップの表面に最初に結合させ、次いでリガンドと分析物とを結合させた。B i a c o r e W i z a r d モード下で、リガンドとして F c R n を別々に使用し、分析物として M I L 4 0、M I L 4 1、M I L 4 0 と M I L 4 1 との混合物、および M B S 3 0 1 の試料を使用することにより、マルチサイクルモードで親和性分析実験を行った。各試料の分析は、3 つの開始試料、1 つのゼロ

10

20

30

40

50

濃度対照試料、5つの勾配濃度試料、および1つの反復濃度試料を含み、各サイクルの終了後、10 mM グリシン - HCl、pH 1.5 再生溶液でチップを再生した。分析物の各濃縮サイクルの捕捉時間は60秒に設定し、リガンド溶液の流速は10 μ l / 分であった：リガンドと分析物との結合時間は180秒、分析物溶液の流速は30 μ l / 分であり、解離時間は180秒であった。抗His IgGとカップリングさせたCM5チップをスロットに入れ、試料を試験して分析した。元のデータをBIAcore（商標）X100分析ソフトウェアに導入し、ゼロ濃度対照を差し引き、参照チャンネルを差し引いて体積効果を排除し、親和性分析法の恒常性モデル評価をフィット曲線に使用し、データを照合した。

【0178】

10

2. 実験結果：

表6から、MBS301が最も低い K_D 値を示したことが分かり、それがMIL40、MIL41、MIL40とMIL41との混合物より有意に優れた、かつMIL203/204と実質的に同等な、FcRnに対する最も強い結合活性を有していたことが示唆された。

【表6】

表6. Biacore技術により決定されたFcRn結合動力学定数

	K_D (M) E-7	K_D (M) E-7	K_D 平均 (M) E-7
MIL41	5.337	4.495	4.916
MIL40	5.891	5.60	5.746
MBS301	1.930	2.128	2.029
MIL203/204	2.081	2.059	2.07
MIL41/MIL40 混合物	6.050	4.034	5.042

20

【0179】

実施例15：ヌードマウスにおけるインビボ腫瘍抑制の実験

1. 実験方法

30

6～8週齢のNu/Nuヌードマウス、体重17.0～22.0g、雌マウス80匹/バッチをBeijing Vital River Experimental Animal Technology Co., Ltd. から購入した（動物証明書：SCXK（Beijing）-2012-0001）。実験動物は、ケージ当たり5匹のマウスで、独立した空気供給を備えた滅菌IVCケージで飼育した。床敷材は、 ^{60}Co 放射線で滅菌したトウモロコシ穂軸床敷材（サイズ：4～6mm）であり、マウスには、マウス用に特別に処方された滅菌飼料を供給し、自由に飲むために精製水を与えた。動物実験のための実験室では、室温を約25℃に維持し、相対湿度を40～70%に維持し、1日当たり12時間照射した。

【0180】

40

ヌードマウスにSKO-V3を皮下接種した。腫瘍体積が約1500～2000 mm^3 まで増加したとき、腫瘍ブロックを無菌条件下で採取し、約1.0×1.0×1.0 mm^3 片に切断し、それをヌードマウスの右前肢の腋窩に皮下接種した。皮下接種した腫瘍が100～300 mm^3 のサイズになってから、腫瘍の大きさに従ってマウスを無作為にグループ分けした。SKO-V3細胞培養：37℃および5% CO_2 の細胞インキュベータ内に配置した、10%ウシ胎児血清（ペニシリンおよびストレプトマイシン、それぞれ100 μ l / mlを添加）を含むDMEM細胞培地で細胞を培養し、培地を1～2日に1回交換した。0.25%トリプシン消化を用いて継代を行い、1000回転/分で5分間遠心分離した後、上清を廃棄し、継代および培養のために新しい培地を加えた。

【0181】

50

皮下移植後、基準を満たす担腫瘍動物を選択し、腫瘍サイズに従ってグループ当たり約 8 匹の動物に無作為にグループ分けし、連続して 2 週間、週 2 回、尾静脈注射により投与を行った。

【0182】

実験動物を摂食、飲水および運動に関して毎日観察し、各動物の体重および腫瘍サイズを 3 日ごとに測定し、実験終了時に頸椎脱臼により動物を屠殺し、肉眼で見える腫瘍を剥離して秤量した。解剖によって得られた全ての組織を、従来の病理学的検出のために 4 %ホルムアルデヒドに入れて保存した。

【0183】

データは $X \pm s$ で表した：腫瘍増殖抑制率 = (実験群腫瘍体積 - 投与群腫瘍体積) / 対照群腫瘍体積 $\times 100\%$ 、腫瘍体積 = $1/2ab^2$ (a = 腫瘍長径、 b = 腫瘍短径)。

10

【0184】

2. 実験結果

図 18 に示すように、担腫瘍マウスの全ての腫瘍が増殖し、対照群の腫瘍は進行性の増殖を示したが、投与群の腫瘍の増殖は異なる程度まで減速するかまたは停止した。観察期間の終了時に、対照群のヌードマウスは、意気消沈、筋肉量の減少、皮膚収縮、および緩徐な動きを示した。

【0185】

腫瘍増殖曲線を腫瘍サイズおよび期間に従ってプロットした。SKO-V3 細胞担腫瘍マウス群では、二機能性抗体 MIL203/204、MBS301、および併用投与した MIL40/MIL41 は、SKO-V3 腫瘍の増殖を効果的に抑制することができ、それらの腫瘍抑制能は MIL40 および MIL41 単独よりも優れていた。

20

【0186】

実施例 16 マウスにおけるヒト乳房腫瘍体積を減少させるための抗 Her2 二重特異性抗体 MBS301 治療

ヒト乳癌細胞株 BT474

このヒト乳癌細胞株は、乳癌患者の乳管癌から樹立された。BT474 細胞株を、5 % CO₂ の水飽和雰囲気中、37 °C で、10 % ウシ胎児血清 (Gibco、America) を添加した DMEM 培地 (Gibco、America) で日常的に培養した。

【0187】

マウス

雌 BALB/c ヌードマウス、5 ~ 6 週齢、体重 15 ~ 17 g (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) を、12 時間の明期および 12 時間の暗期の日常周期で、特定病原体のない条件下に維持した。到着後、新しい環境に慣れさせるためおよび観察のために、動物を動物施設の検疫部に 1 週間収容した。食料と水は自由に与えた。

30

【0188】

腫瘍細胞注入

注射当日に、腫瘍細胞を培養フラスコから回収した。細胞力価を $1 \times 10^8 / ml$ に調整した。注射前に、17 β -ESTRADIOL ペレット (Innovative Research of America) を BALB/c ヌードマウスの背中に皮下移植した。腫瘍細胞懸濁液をマトリゲル (登録商標) (生物細胞培養基質) と 1 : 1 の比で注意深く混合し、次いで細胞懸濁液を $5 \times 10^7 / ml$ とし、BT474 細胞を 0.2 ml の体積で各マウスの右乳腺脂肪体に注射した。

40

【0189】

処置

マウスを 125 mm³ の腫瘍体積について無作為化し、続いて 10 ml / kg の体積の静脈内注射で週 2 回処置した。併用治療のために、MIL40 および MIL41 を同時に投与した (表 7 参照)。

【表 7】

表 7

群	動物の数	化合物	用量 (mg/kg)	投与経路/投与方法
1	6	ビヒクル	—	週 2 回の静脈内投与
2	6	MIL 40	13.5	週 2 回の静脈内投与
3	6	MIL 41	13.5	週 2 回の静脈内投与
4	6	MIL 40 および MIL 41	6.75 および 6.75	週 2 回の静脈内投与
5	6	MIL 203/304	13.5	週 2 回の静脈内投与
6	6	MBS 301	13.5	週 2 回の静脈内投与

10

【0190】

結果を図 19 に示す。MBS 301 は、MIL 40 よりも効果的に BT 474 腫瘍の増殖を抑制し、MIL 40 と MIL 41 との 1 : 1 混合物と同じくらい効果的に抑制した。

【0191】

実施例 17 マウスにおけるヒト胃腫瘍体積を減少させるための抗 Her 2 二重特異性抗体 MBS 301 治療

ヒト胃癌細胞株 NCI - N87

20

NCI - N87 細胞株の転移部位に由来するこのヒト胃癌細胞を、5% CO₂ の水飽和雰囲気中、37 °C で、10% ウシ胎児血清 (Gibco、America) を添加した 1640 培地 (Gibco、America) で日常的に培養した。

【0192】

マウス

雌 BALB/c ノードマウス、6 ~ 7 週齢、体重 18 ~ 22 g (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) を、12 時間の明期および 12 時間の暗期の日常周期で、特定病原体のない条件下に維持した。到着後、新しい環境に慣れさせるためおよび観察のために、動物を動物施設の検疫部に 1 週間収容した。食料と水は自由に与えた。

30

【0193】

腫瘍細胞注入

注射当日に、腫瘍細胞を培養フラスコから回収した。細胞力価を $5 \times 10^7 / \text{ml}$ に調整した。腫瘍細胞懸濁液をマトリゲルと 1 : 1 の比で注意深く混合し、次いで細胞懸濁液を $2.5 \times 10^7 / \text{ml}$ とし、NCI - N87 細胞を 0.2 ml の体積で各マウスの右背に皮下注射した。

【0194】

処置

マウスを 110 mm^3 の腫瘍体積について無作為化し、続いて 10 ml/kg の体積の静脈内注射で週 1 回を処置した。併用治療のために、MIL 40 および MIL 41 を同時に投与した (表 8 参照)。

40

【表 8】

表 8

群	動物の数	化合物	用量 (mg/kg)	投与経路/投与方法
1	6	ビヒクル	—	週1回の静脈内投与
2	6	M I L 40	20	週1回の静脈内投与
3	6	M I L 41	20	週1回の静脈内投与
4	6	M I L 40およびM I L 41	10および10	週1回の静脈内投与
5	6	M I L 203/304	20	週1回の静脈内投与
6	6	M B S 301 (=M B S 301)	20	週1回の静脈内投与

10

【 0 1 9 5 】

結果を図 20 に示す。M B S 301 は、M I L 40 よりも効果的に N C I - N 87 腫瘍の増殖を抑制し、M I L 41 と同時の M I L 40 と同じくらい効果的に抑制した。

【 0 1 9 6 】

実施例 16 および 17 のインビボ腫瘍増殖抑制試験において、M I L 40 / M I L 41 の組み合わせおよび M B S 301 の両方が腫瘍増殖を抑制し、2つの群の間に有意差はなかった。非フコシル化 M B S 301 の A D C C を介したさらなる腫瘍細胞殺傷活性は、実施例 16 および 17 の結果には示されなかったが、これは、ヒト化抗体が B A L B / c ヌードマウスの N K 細胞およびマクロファージを活性化できないためである。しかしながら、インビトロ細胞ベースの A D C C アッセイにおいて、M B S 301 は、M I L 40 と M I L 41 との混合物と比較して、有意に高い A D C C 活性を示した（実施例 11 ~ 13、および図 8 ~ 17 を参照）。

20

【 0 1 9 7 】

実施例 18 ヒト胃癌 G A 0 0 5 5 患者由来異種移植片 (P D X) ヌードマウスモデル

この腫瘍組織は、69歳のアジア人女性の胃から樹立されたものであり、その病理診断は胃前庭部の前壁の明細胞腺癌、潰瘍型、I H C (免疫組織化学) 結果は高 m R N A 発現量を有する H E R - 2 (+) であった。

【 0 1 9 8 】

マウス

雌 B A L B / c ヌードマウスを、12時間の明期および12時間の暗期の日常周期で、特定病原体のない条件下に維持した。到着後、新しい環境に慣れさせるためおよび観察のために、動物を動物施設の検疫部に1週間収容した。食料と水は自由に与えた。

30

【 0 1 9 9 】

腫瘍接種

腫瘍発生のために、各マウスの右側腹部に原発性ヒト胃癌モデル G A 0 0 5 5 断片 (直径 2 ~ 3 mm) を皮下接種した。平均腫瘍サイズが 146 mm³ に達したとき、マウスを無作為に3つの群にグループ分けした (表 9 を参照)。

【表 9】

表 9

群	動物の数	化合物	用量 (mg/kg)	投与経路/投与方法
1	6	ビヒクル	—	週2回の静脈内投与
2	6	HERCEPTIN (登録商標)	13.5	週2回の静脈内投与
3	6	M B S 301	13.5	週2回の静脈内投与

40

【 0 2 0 0 】

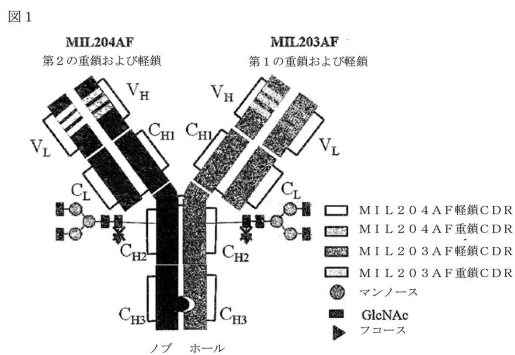
50

この胃癌PDXモデルにおいて、MBS301は、HERCEPTIN（登録商標）よりも効果的に腫瘍の増殖を抑制した：MBS301の最終的な腫瘍増殖抑制率は77.82%であり、一方、ハーセプチンは50.15%である。18日間の処置後、図21に示すように、MBS301とハーセプチンの間には腫瘍サイズの有意差があった。

【0201】

上記は本発明の好ましい実施形態を説明していること、および特許請求の範囲に記載された本発明の範囲から逸脱することなく変更がなされてもよいことを理解されたい。

【図1】



【図2】

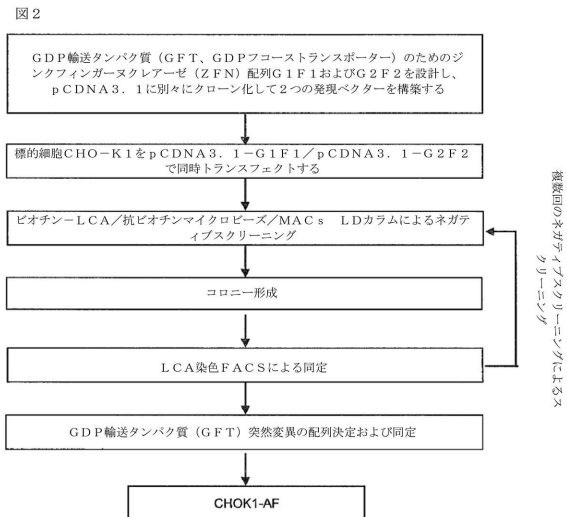


图 3

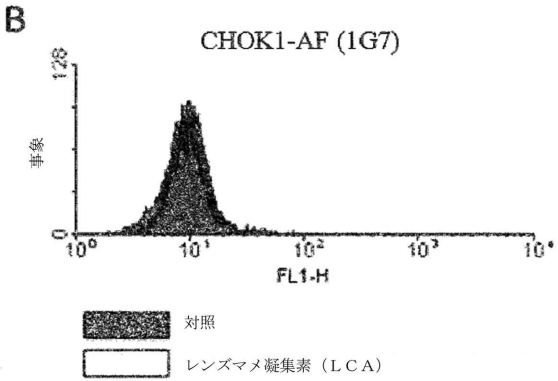


图 4

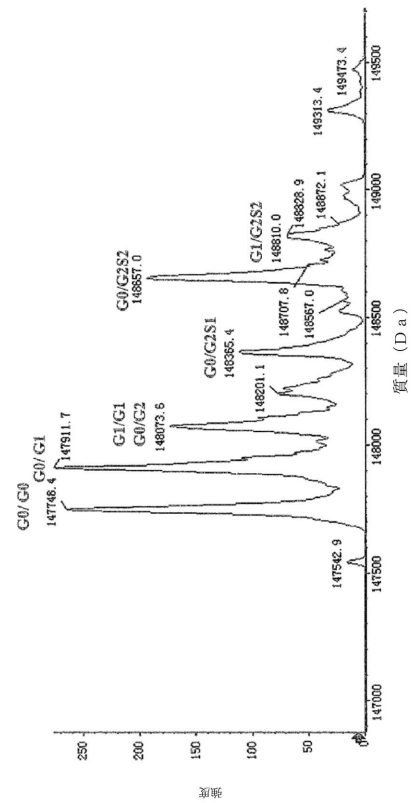


图 5

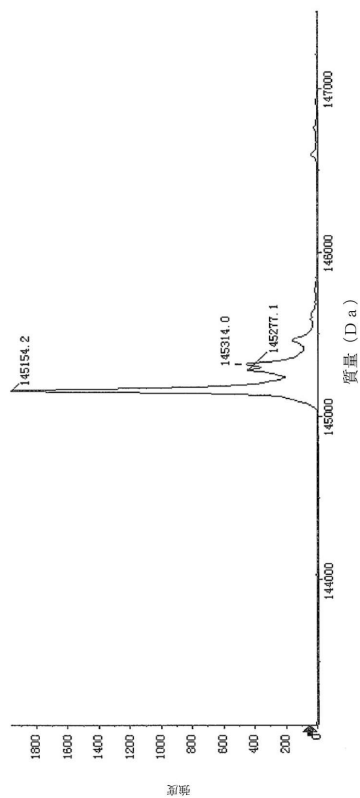


図 6

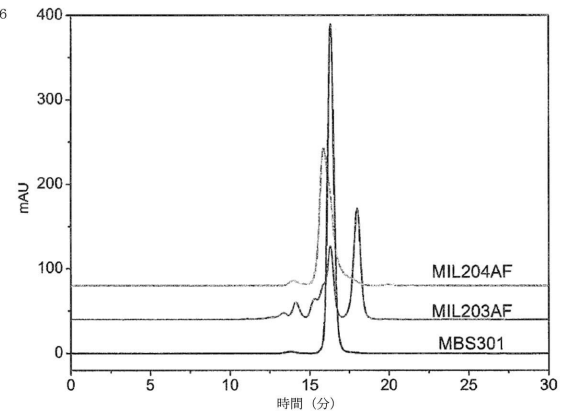
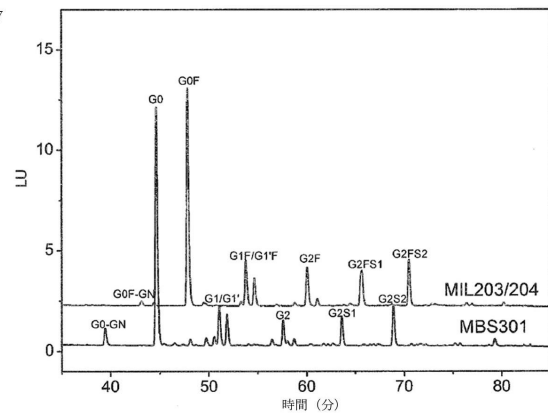
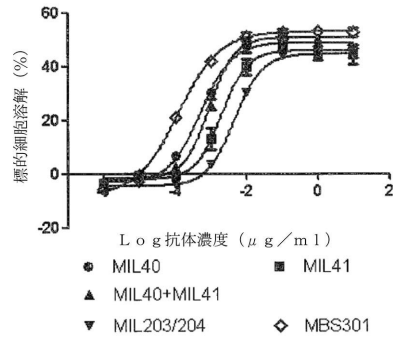


图 7



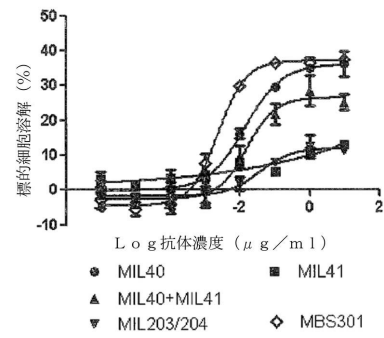
【図 8】

図 8



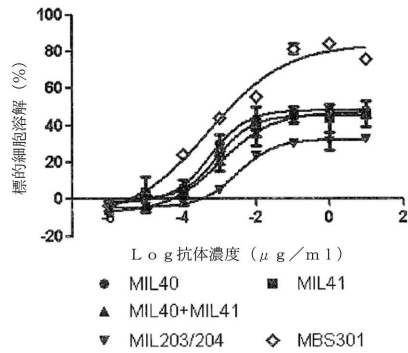
【図 10】

図 10



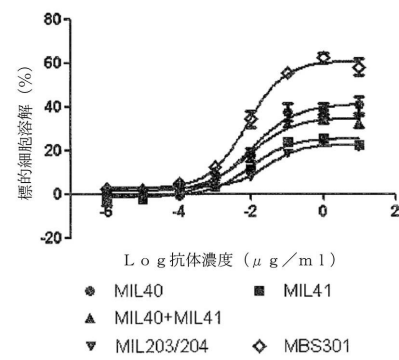
【図 9】

図 9



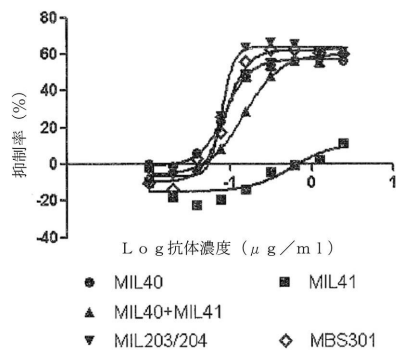
【図 11】

図 11



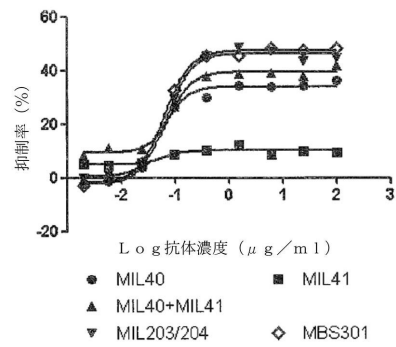
【図 12】

図 12



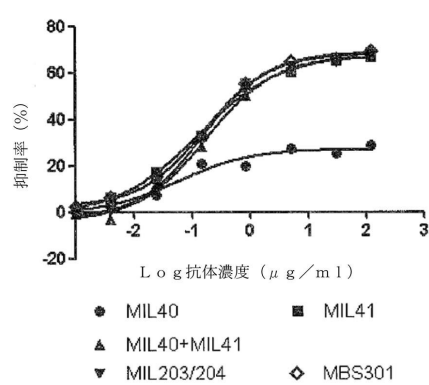
【図 14】

図 14



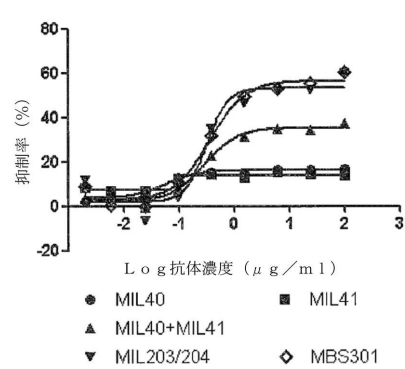
【図 13】

図 13



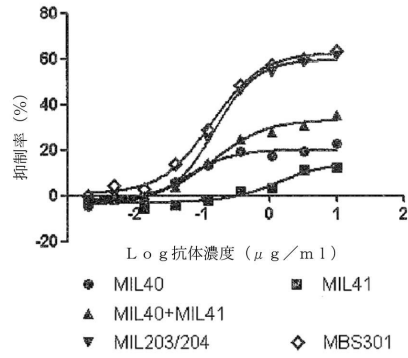
【図 15】

図 15



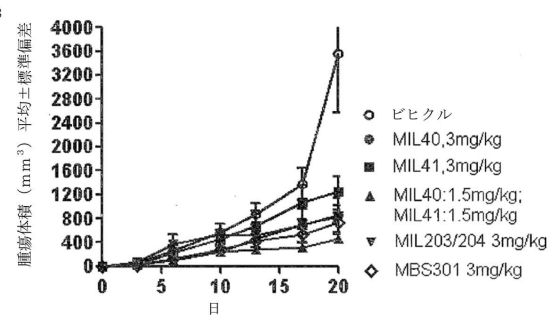
【図 16】

図 16



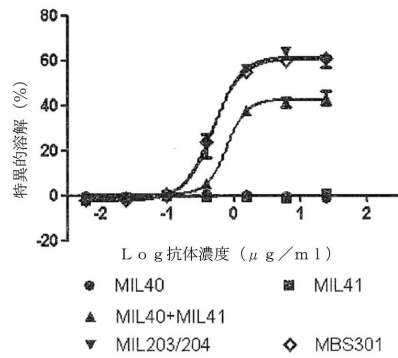
【図 18】

図 18



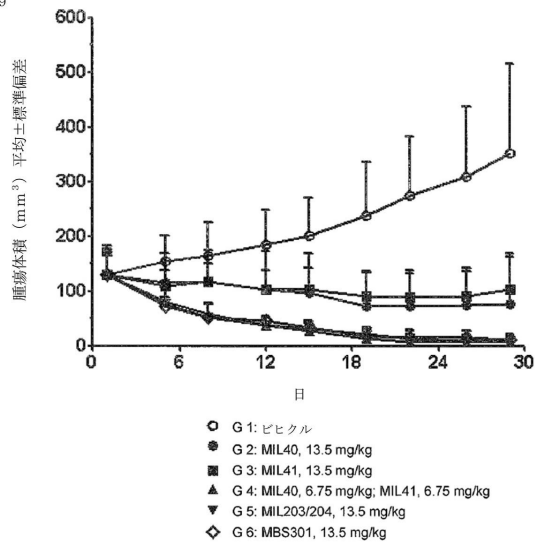
【図 17】

図 17



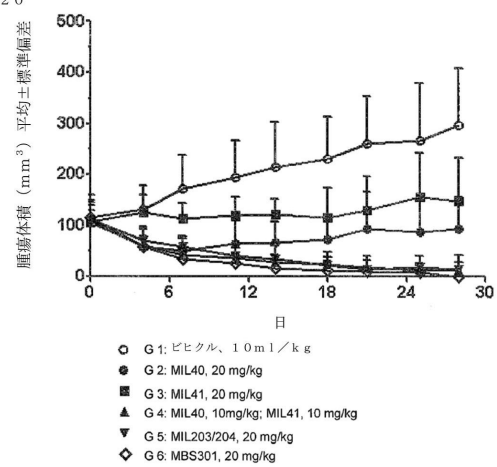
【図 19】

図 19



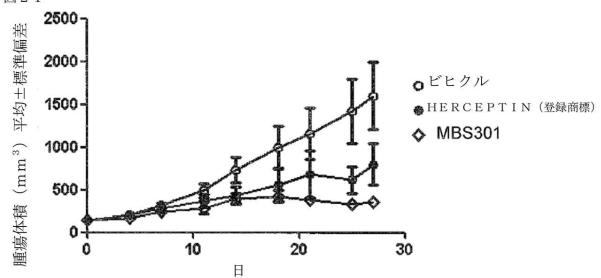
【図 20】

図 20



【図 21】

図 21



【配列表】

0006823175000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00

早期審査対象出願

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100182730
弁理士 大島 浩明
- (72)発明者 リー フォン
中華人民共和国, ベイジン 1 0 1 1 1 1 , コーチョアン フォーティーンズ ストリート エコ
ノミック テクノロジカル ディベロップメント エリア, チンハイ ファースト ロード 9 9
, ホイロンセン サイエンス アンド テクノロジー パーク, ビルディング # 3
- (72)発明者 チャン ポーイェン
中華人民共和国, ベイジン 1 0 1 1 1 1 , コーチョアン フォーティーンズ ストリート エコ
ノミック テクノロジカル ディベロップメント エリア, チンハイ ファースト ロード 9 9
, ホイロンセン サイエンス アンド テクノロジー パーク, ビルディング # 3
- (72)発明者 イェー ペイ
中華人民共和国, ベイジン 1 0 1 1 1 1 , コーチョアン フォーティーンズ ストリート エコ
ノミック テクノロジカル ディベロップメント エリア, チンハイ ファースト ロード 9 9
, ホイロンセン サイエンス アンド テクノロジー パーク, ビルディング # 3
- (72)発明者 チャオ チエン
中華人民共和国, ベイジン 1 0 1 1 1 1 , コーチョアン フォーティーンズ ストリート エコ
ノミック テクノロジカル ディベロップメント エリア, チンハイ ファースト ロード 9 9
, ホイロンセン サイエンス アンド テクノロジー パーク, ビルディング # 3
- (72)発明者 ホアン スーチア
中華人民共和国, ベイジン 1 0 1 1 1 1 , コーチョアン フォーティーンズ ストリート エコ
ノミック テクノロジカル ディベロップメント エリア, チンハイ ファースト ロード 9 9
, ホイロンセン サイエンス アンド テクノロジー パーク, ビルディング # 3
- (72)発明者 チン チュンヤン
中華人民共和国, ベイジン 1 0 1 1 1 1 , コーチョアン フォーティーンズ ストリート エコ
ノミック テクノロジカル ディベロップメント エリア, チンハイ ファースト ロード 9 9
, ホイロンセン サイエンス アンド テクノロジー パーク, ビルディング # 3

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 7 7 8 9 1 (W O , A 1)
Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies ,

Molecular Immunology, 2015年, Vol. 67, p. 95-106

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/62

C07K 16/46

A61K 39/39

A61P 15/00

A61P 35/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

SwissProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)