

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-155838  
(P2016-155838A)

(43) 公開日 平成28年9月1日(2016.9.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C07K 16/00 ZNA	4B024
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	4B064
<b>A61P 29/00 (2006.01)</b>	A61P 29/00	4C084
<b>A61P 37/02 (2006.01)</b>	A61P 37/02	4C085
<b>A61P 37/08 (2006.01)</b>	A61P 37/08	4H045

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-54741 (P2016-54741)  
 (22) 出願日 平成28年3月18日 (2016.3.18)  
 (62) 分割の表示 特願2013-512181 (P2013-512181) の分割  
 原出願日 平成23年5月25日 (2011.5.25)  
 (31) 優先権主張番号 61/348,968  
 (32) 優先日 平成22年5月27日 (2010.5.27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 390023526  
 メルク・シャープ・エンド・ドーム・コーポレーション  
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100119253  
 弁理士 金山 賢教  
 (74) 代理人 100124855  
 弁理士 坪倉 道明  
 (74) 代理人 100129713  
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された特性を有する抗体の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 グリコシル化タンパク質(糖タンパク質)、特に、ヒトまたは動物用治療剤として有用である、改善された特性を有するFc含有ポリペプチドの製造のための製造方法および組成物の提供。

【解決手段】 Fc含有ポリペプチドのFc領域の243位および264位への突然変異、および、ヒトにおけるグリコシル化の過程を模倣した酵母株ピチア・パストリスによる糖操作。

【選択図】 図1

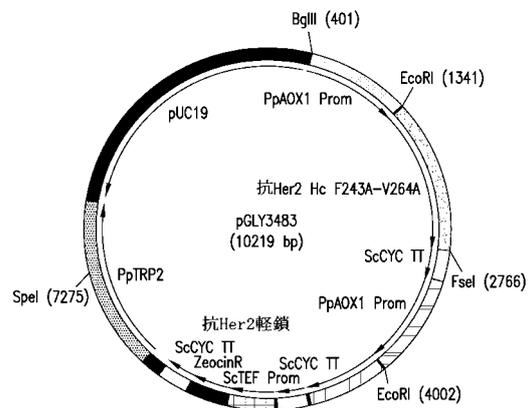


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

F c 領域のアミノ酸位置 2 4 3 位および 2 6 4 位に突然変異を含む F c 含有ポリペプチドであって、2 4 3 位の突然変異が、F 2 4 3 A、F 2 4 3 G、F 2 4 3 S、F 2 4 3 T、F 2 4 3 V、F 2 4 3 L、F 2 4 3 I、F 2 4 3 D、F 2 4 3 Y、F 2 4 3 E、F 2 4 3 R、F 2 4 3 W および F 2 4 3 K からなる群から選択され、2 6 4 位の突然変異が、V 2 6 4 A、V 2 6 4 G、V 2 6 4 S、V 2 6 4 T、V 2 6 4 D、V 2 6 4 E、V 2 6 4 K、V 2 6 4 W、V 2 6 4 H、V 2 6 4 P、V 2 6 4 N、V 2 6 4 Q および V 2 6 4 L からなる群から選択され、ここで、該番号付けが K a b a t におけるものと同様の E U インデックスに準拠している、F c 含有ポリペプチド。

10

## 【請求項 2】

2 4 3 位および 2 6 4 位の突然変異が、

- a) F 2 4 3 A および V 2 6 4 A、
- b) F 2 4 3 Y および V 2 6 4 G、
- c) F 2 4 3 T および V 2 6 4 G、
- d) F 2 4 3 L および V 2 6 4 A、
- e) F 2 4 3 L および V 2 6 4 N、ならびに
- f) F 2 4 3 V および V 2 6 4 G

からなる群から選択される、請求項 1 記載の F c 含有ポリペプチド。

## 【請求項 3】

該 F c 含有ポリペプチドが抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 記載の F c 含有ポリペプチド。

20

## 【請求項 4】

該 F c 含有ポリペプチドがシアル酸化 N - グリカンを含む、請求項 1 記載の F c 含有ポリペプチド。

## 【請求項 5】

該シアル酸化 N - グリカンのシアル酸残基が - 2 , 6 結合により結合している、請求項 4 記載の F c 含有ポリペプチド。

## 【請求項 6】

該 F c 含有ポリペプチドが、親 F c 含有ポリペプチドと比較した場合に、以下の特性、すなわち、

30

- a) 低下したエフェクター機能、
- b) 増強した抗炎症特性、
- c) 増加したシアル酸化、
- d) 非経口投与された場合の、増強したバイオアベイラビリティ、ならびに
- e) F c R I、F c R I I a、F c R I I b および F c R I I I a への結合の低下

の 1 以上を有する、請求項 1 記載の F c 含有ポリペプチド。

## 【請求項 7】

宿主細胞における F c 含有ポリペプチドの製造方法であって、

40

a) F c 含有ポリペプチドを産生するように遺伝的に操作された細胞を準備し(ここで、該宿主細胞は、アミノ酸位置 2 4 3 位および 2 6 4 位に突然変異をコードする核酸を含み、2 4 3 位の突然変異は、F 2 4 3 A、F 2 4 3 G、F 2 4 3 S、F 2 4 3 T、F 2 4 3 V、F 2 4 3 L、F 2 4 3 I、F 2 4 3 D、F 2 4 3 Y、F 2 4 3 E、F 2 4 3 R、F 2 4 3 W および F 2 4 3 K からなる群から選択され、2 6 4 位の突然変異は、V 2 6 4 A、V 2 6 4 G、V 2 6 4 S、V 2 6 4 T、V 2 6 4 D、V 2 6 4 E、V 2 6 4 K、V 2 6 4 W、V 2 6 4 H、V 2 6 4 P、V 2 6 4 N、V 2 6 4 Q および V 2 6 4 L からなる群から選択され、ここで、該番号付けは K a b a t におけるものと同様の E U インデックスに準拠している)、

b) 該 F c 含有ポリペプチドの発現を引き起こす条件下で該宿主細胞を培養し、

50

c) 該宿主細胞から該 F c 含有ポリペプチドを単離することを含む、製造方法。

【請求項 8】

該核酸が、

- a) F 2 4 3 A および V 2 6 4 A、
- b) F 2 4 3 Y および V 2 6 4 G、
- c) F 2 4 3 T および V 2 6 4 G、
- d) F 2 4 3 L および V 2 6 4 A、
- e) F 2 4 3 L および V 2 6 4 N、ならびに
- f) F 2 4 3 V および V 2 6 4 G

からなる群から選択される突然変異をコードしている、請求項 7 記載の製造方法。

10

【請求項 9】

該 F c 含有ポリペプチドが抗体または抗体フラグメントである、請求項 7 記載の製造方法。

【請求項 10】

該 F c 含有ポリペプチドがシアル酸化 N - グリカンを含む、請求項 7 記載の製造方法。

【請求項 11】

該シアル酸化 N - グリカンのシアル酸残基が - 2 , 6 結合により結合している、請求項 10 記載の製造方法。

【請求項 12】

全シアル酸化 N - グリカンの量および比率が親 F c 含有ポリペプチドと比較して増加している N - グリカン組成を該 F c 含有ポリペプチドが有する。請求項 10 記載の製造方法。

20

【請求項 13】

該 F c 含有ポリペプチドが、親 F c 含有ポリペプチドと比較した場合に、以下の特性、すなわち、

- a) 低下したエフェクター機能、
- b) 増強した抗炎症特性、
- c) 増加したシアル酸化、
- d) 非経口投与された場合の、増強したバイオアベイラビリティ、ならびに
- e) F c R I、F c R I I a、F c R I I b および F c R I I I a への結合の低下

30

の 1 以上を有する、請求項 7 記載の製造方法。

【請求項 14】

F c 領域の 2 4 3 位および 2 6 4 位 ( 該番号付けは K a b a t におけるものと同様の E U インデックスに準拠している ) に突然変異を導入することを含む、F c 含有ポリペプチドの抗炎症特性を増強する又は細胞傷害性を低下させる方法であって、該 F c 含有ポリペプチドが、親 F c 含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症特性または低下した細胞傷害性を有する、方法。

【請求項 15】

2 4 3 位および 2 6 4 位における突然変異が、

40

- a) F 2 4 3 A および V 2 6 4 A、
- b) F 2 4 3 Y および V 2 6 4 G、
- c) F 2 4 3 T および V 2 6 4 G、
- d) F 2 4 3 L および V 2 6 4 A、
- e) F 2 4 3 L および V 2 6 4 N、ならびに
- f) F 2 4 3 V および V 2 6 4 G

からなる群から選択される、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

炎症状態の治療を要する対象における炎症状態の治療方法であって、F c 領域の 2 4 3 位および 2 6 4 位 ( 該番号付けは K a b a t におけるものと同様の E U インデックスに準

50

抛している)に突然変異を含むFc含有ポリペプチドの治療的有効量を該対象に投与することを含む方法。

【請求項17】

243位および264位における突然変異が、

- a) F243AおよびV264A、
- b) F243YおよびV264G、
- c) F243TおよびV264G、
- d) F243LおよびV264A、
- e) F243LおよびV264N、ならびに
- f) F243VおよびV264G

からなる群から選択される、請求項16記載の方法。

10

【請求項18】

重鎖と軽鎖とを含むFc含有ポリペプチドであって、該重鎖が配列番号9のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該軽鎖が配列番号2のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該変異体が、配列番号1の重鎖アミノ酸配列と配列番号2の軽鎖アミノ酸配列とを含む抗体と比較した場合に、以下の特性、すなわち、

- a) 低下したエフェクター機能、
- b) 増強した抗炎症特性、
- c) 増加したシアル酸化、
- d) 非経口投与された場合の、増強したバイオアベイラビリティ、ならびに
- e) FcRI、FcRIIa、FcRIIbおよびFcRIIIaへの結合の低下

20

の1以上を有する、Fc含有ポリペプチド。

【請求項19】

重鎖と軽鎖とを含むFc含有ポリペプチドであって、該重鎖が配列番号12のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該軽鎖が配列番号11のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該変異体が、配列番号10の重鎖アミノ酸配列と配列番号11の軽鎖アミノ酸配列とを含む抗体と比較した場合に、以下の特性、すなわち、

- a) 低下したエフェクター機能、
- b) 増強した抗炎症特性、
- c) 増加したシアル酸化、
- d) 非経口投与された場合の、増強したバイオアベイラビリティ、ならびに
- e) FcRI、FcRIIa、FcRIIbおよびFcRIIIaへの結合の低下

30

の1以上を有する、Fc含有ポリペプチド。

【請求項20】

重鎖と軽鎖とを含むFc含有ポリペプチドであって、該重鎖が配列番号15のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該軽鎖が配列番号14のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該変異体が、配列番号13の重鎖アミノ酸配列と配列番号14の軽鎖アミノ酸配列とを含む抗体と比較した場合に、以下の特性、すなわち、

- a) 低下したエフェクター機能、
- b) 増強した抗炎症特性、
- c) 増加したシアル酸化、
- d) 非経口投与された場合の、増強したバイオアベイラビリティ、ならびに
- e) FcRI、FcRIIa、FcRIIbおよびFcRIIIaへの結合の低下

40

の1以上を有する、Fc含有ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、グリコシル化タンパク質（糖タンパク質）、特に、ヒトまたは動物用治療剤として有用であるFc含有ポリペプチドの製造のための製造方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

モノクローナル抗体は、しばしば、2つの結合事象によりその治療利益をもたらす。第1に、抗体の可変ドメインが標的細胞上の特異的タンパク質、例えば癌細胞の表面上のCD20に結合する。抗体の定常領域（Fc）に結合し、該抗体が結合した細胞を破壊するナチュラルキラー（NK）細胞のようなエフェクター細胞のリクルートメントが、これに続いて生じる。抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）として公知のこの過程は、IgG1の重鎖のFcドメイン内のAsn297における特異的N-グリコシル化事象に依存している（Rothmanら、Mol. Immunol. 26: 1113 - 1123 (1989)）。このN-グリコシル化構造を欠く抗体は抗体に尚も結合するが、ADCCを引き起こすことができない。これは、NK細胞の表面上のFc受容体FcRIIIaに対する抗体のFcドメインのアフィニティの低下の結果として生じるらしい。

10

【0003】

N-グリコシル化の存在が抗体のエフェクター機能における役割を果たしているだけでなく、N結合オリゴ糖の個々の組成もその最終的な機能に重要である。フコースの欠如または二分岐N-アセチルグルコサミンの存在はADCCの強度に正に相関されている（Rothman (1989), Umanaら、Nat. Biotech. 17: 176 - 180 (1999), Shieldsら、J. Biol. Chem. 277: 26733 - 26740 (2002) および Shinkawaら、J. Biol. Chem. 278: 3466 - 3473 (2003)）。Fc領域におけるシアル酸化が静脈内用免疫グロブリン（IVIg）の抗炎症特性に対して正に相関するという証拠も存在する。例えば、Kaneckoら、Science, 313: 670 - 673, 2006; NimmerjahnおよびRavetch., J. Exp. Med., 204: 11 - 15, 2007を参照されたい。

20

【0004】

抗体の機能および効力における特異的N-グリコシル化の効用を考慮すると、N結合オリゴ糖の組成を修飾し、抗体のエフェクター機能を修飾するための方法が望ましいであろう。

30

【0005】

酵母および他の真菌宿主は組換えタンパク質の製造のための重要な製造媒体である。酵母は真核生物であり、したがって、分泌経路内で生じる翻訳後修飾の多くを含む、高等真核生物と共通の進化的過程を有する。糖操作における最近の進歩は、ヒトにおけるグリコシル化の過程を模倣した一連の酵素反応を行うことを可能にする遺伝的に修飾されたグリコシル化経路を有する酵母株ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）の細胞系をもたらしている。例えば、ヒト対応物と実質的に同一である下等真核宿主細胞における組換え糖タンパク質の製造方法を記載している米国特許第7,029,872号、第7,326,681号および第7,449,308号を参照されたい。前記方法によりピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）において産生されるものと同様のヒト様シアル酸化二分岐複合体N結合グリカンは治療用糖タンパク質の製造に関する有用性を示している。したがって、ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）のような酵母における抗体の製造を更に修飾または改善するための方法が望ましいであろう。

40

【発明の概要】

【0006】

発明の概括

本発明は、Fc領域のアミノ酸位置243位および264位に突然変異を含むFc含有ポリペプチドに関するものであり、ここで、243位の突然変異は、F243A、F243G、F243S、F243T、F243V、F243L、F243I、F243D、F

50

2 4 3 Y、F 2 4 3 E、F 2 4 3 R、F 2 4 3 WおよびF 2 4 3 Kからなる群から選択され、2 6 4 位の突然変異は、V 2 6 4 A、V 2 6 4 G、V 2 6 4 S、V 2 6 4 T、V 2 6 4 D、V 2 6 4 E、V 2 6 4 K、V 2 6 4 W、V 2 6 4 H、V 2 6 4 P、V 2 6 4 N、V 2 6 4 QおよびV 2 6 4 Lからなる群から選択され、ここで、番号付けはK a b a tにおけるものと同様のE Uインデックスに準拠している。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 AおよびV 2 6 4 Aを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 YおよびV 2 6 4 Gを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 TおよびV 2 6 4 Gを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 LおよびV 2 6 4 Aを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 LおよびV 2 6 4 Nを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 VおよびV 2 6 4 Gを含む。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは抗体または抗体フラグメントである。一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる(または実質的になる)抗体フラグメントである。

10

20

30

40

50

**【0007】**

一つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドは、配列番号9の重鎖アミノ酸配列またはその変異体を含む抗体である。一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号9に挙げられている最後のリシン(K)残基を欠く配列番号9の重鎖アミノ酸配列を含む抗体である。

**【0008】**

一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号12の重鎖アミノ酸配列またはその変異体と配列番号11の軽鎖アミノ酸配列またはその変異体とを含む抗体である。

**【0009】**

一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号15の重鎖アミノ酸配列またはその変異体と配列番号14の軽鎖アミノ酸配列またはその変異体とを含む抗体である。

**【0010】**

幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、シアル酸(NANA、NGNAならびにそれらの類似体および誘導体を含む)を含むN-グリカンを含む。一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは-2,3および-2,6結合シアル酸の混合物を含む。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは-2,6結合シアル酸のみを含む。一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは-2,6結合シアル酸を含み、検出可能なレベルの-2,3結合シアル酸を含まない。一つの実施形態においては、該シアル酸はN-アセチルノイラミン酸(NANA)もしくはN-グリコリルノイラミン酸(NGNA)またはそれらの混合物である。もう一つの実施形態においては、該シアル酸は、シアル酸の9位にアセチル化を含有するNANAまたはNGNAの類似体または誘導体である。一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチド上のN-グリカンはNANAを含み、NGNAを含まない。

**【0011】**

本発明のFc含有ポリペプチド上のN-グリカンは、所望により、フコースを含みうる。一つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンはフコシル化N-グリカンと非フコシル化N-グリカンとの混合物を含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンはフコースを欠く。

**【0012】**

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較した場合に以下の特性の1以上を有する：(i)低下したエフェクター機能、(ii)増強した抗炎症特性、(iii)増加したシアル酸化、(iv)増強したバイオアベイラビリティ(吸収または曝露)、ならびに(v)Fc RI、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIa (Fc RIIIa-V158またはFc RIIIa-F158)およびFc RIIbへの結合の低下。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較してエフェクター機能における少なくとも7、10、15、30、50、100、500または1000倍の低下を伴う。1つの実施形態においては、該エフェクター機能はADCCである。もう1つの実施形態においては、該エフェクター機能はCDCである。

10

## 【0013】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したADCC活性を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも7、10、15、30、50、100、500または1000倍の低下を伴う。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも100倍の低下を伴う。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも500倍の低下を伴う。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも1000倍の低下を伴う。

20

## 【0014】

もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したCDC活性を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはCDC活性における少なくとも100倍の低下を伴う。

## 【0015】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したアフィニティでFc RI、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIa (Fc RIIIa-V158またはFc RIIIa-F158)およびFc RIIbに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも50倍低下したアフィニティでFc RIIaに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも20倍低下したアフィニティでFc RIIbに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも10倍低下したアフィニティでFc RIIIa-LFに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも1、2または10倍低下したアフィニティでFc RIIIa-LVに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したアフィニティでFc RIIb、Fc RIIIa-LFおよびFc RIIIa-LVに結合する。

30

## 【0016】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症特性を有する。

40

## 【0017】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、非経口的に注入された場合に、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強したバイオアベイラビリティ(吸収または曝露)を有する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、皮下に注入された場合に、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強したバイオアベイラビリティ(吸収または曝露)を有する。

## 【0018】

1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは天然Fc領域を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはF243A突然変異を含む。もう

50

1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはV264A突然変異を含む。

【0019】

本発明はまた、(i)Fc含有ポリペプチドを産生するように遺伝的に操作された宿主細胞を準備し(ここで、該宿主細胞は、アミノ酸位置243位および264位に突然変異をコードする核酸を含み、243位の突然変異は、F243A、F243G、F243S、F243T、F243V、F243L、F243I、F243D、F243Y、F243E、F243R、F243WおよびF243Kからなる群から選択され、264位の突然変異は、V264A、V264G、V264S、V264T、V264D、V264E、V264K、V264W、V264H、V264P、V264N、V264QおよびV264Lからなる群から選択され、ここで、番号付けはKababtにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している)、(ii)該Fc含有ポリペプチドの発現を引き起こす条件下で該宿主細胞を培養し、(iii)該宿主細胞から該Fc含有ポリペプチドを単離することを含む、宿主細胞におけるFc含有ポリペプチドの製造方法を含む。1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243AおよびV264Aをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243YおよびV264Gをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異243TおよびV264Gをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸はF243LおよびV264Aをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243LおよびV264Nをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243VおよびV264Gをコードしている。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは抗体または抗体フラグメントである。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる(または実質的になる)抗体フラグメントである。

10

20

【0020】

1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法を哺乳類細胞において実施する。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法を植物細胞において実施する。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法を細菌において実施する。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法を昆虫細胞において実施する。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法を下等真核細胞において実施する。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法を酵母細胞において実施する。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの製造方法をピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)において実施する。

30

【0021】

1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、シアル酸(NANA、NGNAならびにそれらの類似体および誘導体を含む)を含むN-グリカンを含む。1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、該Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも40モル%、70モル%または90モル%がシアル酸化されている( $SA_{(1-4)}Gal_{(1-4)}GlcNAc_{(2-4)}Man_3GlcNAc_2$ または $SAGalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$ から選択される構造を有する)、N-グリカン組成を有する。1つの実施形態においては、該抗体上のN-グリカンの少なくとも47モル%が構造 $SA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を有する。もう1つの実施形態においては、該抗体上のN-グリカンの少なくとも47モル%が構造 $NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を有する。もう1つの実施形態においては、該抗体上のN-グリカンの少なくとも66モル%が構造 $SA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を有する。もう1つの実施形態においては、該抗体上のN-グリカンの少なくとも66モル%が構造 $NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を有

40

50

する。1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは - 2, 3 および - 2, 6 結合シアル酸の混合物を含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは - 2, 6 結合シアル酸のみを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは - 2, 6 結合シアル酸を含み、検出可能なレベルの - 2, 3 結合シアル酸を含まない。1つの実施形態においては、該シアル酸はN-アセチルノイラミン酸(NANA)またはN-グリコリルノイラミン酸(NGNA)またはそれらの混合物である。もう1つの実施形態においては、該シアル酸は、該シアル酸上の9位にアセチル化を含有するNANAまたはNGNAの類似体または誘導体である。1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチド上のN-グリカンはNANAを含み、NGNAを含まない。

10

## 【0022】

特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチド上のN-グリカンは、所望により、フコースを含みうる。1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチド上のN-グリカンはフコシル化N-グリカンと非フコシル化N-グリカンとの混合物を含む。1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチド上のN-グリカンはフコースを欠く。

## 【0023】

1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、全シアル酸化N-グリカンの量および比率が親Fc含有ポリペプチドと比較して増加している、N-グリカン組成を有する。

20

## 【0024】

幾つかの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較した場合に以下の特性の1以上を有する：(i)低下したエフェクター機能、(ii)増強した抗炎症特性、(iii)増加したシアル酸化、(iv)増強したバイオアベイラビリティ(吸収または曝露)、ならびに(v)FcRI、FcRIIa、FcRIIbおよびFcRIIIaへの結合の低下。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較してエフェクター機能における少なくとも7、10、15、30、50、100、500または1000倍の低下を伴う。1つの実施形態においては、該エフェクター機能はADCCである。もう1つの実施形態においては、該エフェクター機能はCDCである。

30

## 【0025】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したADCC活性を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも7、10、15、30、50、100、500または1000倍の低下を伴う。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも100倍の低下を伴う。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも500倍の低下を伴う。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはADCC活性における少なくとも1000倍の低下を伴う。

40

## 【0026】

もう1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したCDC活性を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはCDC活性における少なくとも100倍の低下を伴う。

## 【0027】

1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したアフィニティでFcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIa(FcRIIIa-V158またはFcRIIIa-F158)およびFcRIIIbに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも5

50

0倍低下したアフィニティでFc RIIaに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも20倍低下したアフィニティでFc RIIbに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも10倍低下したアフィニティでFc RIIa LFに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して少なくとも1、2または10倍低下したアフィニティでFc RIIa LVに結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したアフィニティでFc RIIb、Fc RIIa LFおよびFc RIIa LVに結合する。

10

## 【0028】

1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症特性を有する。

## 【0029】

1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、非経口的に注入された場合に、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強したバイオアベイラビリティ（吸収または曝露）を有する。1つの実施形態においては、特許請求している方法により製造されるFc含有ポリペプチドは、皮下に注入された場合に、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強したバイオアベイラビリティ（吸収または曝露）を有する。

20

## 【0030】

1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは天然Fc領域を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはF243A突然変異を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはV264A突然変異を含む。

## 【0031】

本発明はまた、親Fc含有ポリペプチドの243位および264位（該番号付けはKabababにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している）に突然変異を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドのエフェクター機能を低下させる方法を含み、ここで、該Fc含有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したエフェクター機能を有する。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243AおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243YおよびV264Gをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異243TおよびV264Gをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243LおよびV264Aをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243LおよびV264Nをコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異F243VおよびV264Gをコードしている。1つの実施形態においては、該エフェクター機能はADCCである。もう1つの実施形態においては、該エフェクター機能はCDCである。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは抗体または抗体フラグメントである。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる（または実質的になる）抗体フラグメントである。1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは天然Fc領域を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはF243A突然変異を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはV264A突然変異を含む。

30

40

## 【0032】

本発明はまた、親Fc含有ポリペプチドの243位および264位（該番号付けはKabababにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している）に突然変異を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性を増強する方法を含み、ここで、該Fc含

50

有ポリペプチドは、親Fc含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症活性を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243AおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243YおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異243TおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Nを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243VおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは抗体または抗体フラグメントである。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-23R、IL-25、IL-27、IL-33、CD2、CD4、CD11A、CD14、CD18、CD19、CD23、CD25、CD40、CD40L、CD20、CD52、CD64、CD80、CD147、CD200、CD200R、TSLP、TSLPR、PD-1、PDL1、CTLA4、VLA-4、VEGF、PCSK9、 $\alpha$ 4 $\beta$ 7-インテグリン、E-セレクトリン、FactRII、ICAM-3、 $\beta$ 2-インテグリン、IFN- $\gamma$ 、C5、CBL、LCAT、CR3、MDL-1、GITR、ADDL、CGRP、TRKA、IGF1R、RANKL、GTCまたは前記分子のいずれかに対する受容体からなる群から選択される抗原に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントである。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはTNF- $\alpha$ に結合する。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはHer2に結合する。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはPCSK9に結合する。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる（または実質的になる）抗体フラグメントである。1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは天然Fc領域を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはF243A突然変異を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドはV264A突然変異を含む。

### 【0033】

本発明はまた、炎症の治療に有用な親Fc含有ポリペプチド（例えば、炎症に關与する抗原に結合する抗体またはイムノアドヘシン）を選択し、該Fc領域の243位および264位（該番号付けはKababtにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している）に突然変異を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性を増強する方法を含み、ここで、該Fc含有ポリペプチドは、該親Fc含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症活性を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243AおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243YおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異243TおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Nを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243VおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは抗体または抗体フラグメントである。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-23R、IL-25、IL-27、IL-33、CD2、CD4、CD11A、CD14、CD18、CD19、C

D 2 3、C D 2 5、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 2 0、C D 5 2、C D 6 4、C D 8 0、  
 C D 1 4 7、C D 2 0 0、C D 2 0 0 R、T S L P、T S L P R、P D - 1、P D L 1、  
 C T L A 4、V L A - 4、V E G F、P C S K 9、4 7 - インテグリン、E - セレク  
 チン、F a c t I I、I C A M - 3、ベータ2 - インテグリン、I F N、C 5、C B  
 L、L C A T、C R 3、M D L - 1、G I T R、A D D L、C G R P、T R K A、I G F  
 1 R、R A N K L、G T Cまたは前記分子のいずれかに対する受容体からなる群から選択  
 される抗原に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントである。1つの実施形態に  
 10 おいては、該 F c 含有ポリペプチドは T N F - に結合する。もう1つの実施形態におい  
 ては、該 F c 含有ポリペプチドは H e r 2 に結合する。もう1つの実施形態において  
 は、該 F c 含有ポリペプチドは P C S K 9 に結合する。1つの実施形態においては、本発明の  
 F c 含有ポリペプチドは、配列番号 1 8 を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施  
 形態においては、本発明の F c 含有ポリペプチドは、配列番号 1 9 を含む抗体フラグメン  
 トである。もう1つの実施形態においては、本発明の F c 含有ポリペプチドは、配列番号  
 1 8 または配列番号 1 9 からなる（または実質的になる）抗体フラグメントである。1つ  
 の実施形態においては、該親 F c 含有ポリペプチドは天然 F c 領域を含む。もう1つの実  
 施形態においては、該親 F c 含有ポリペプチドは F 2 4 3 A 突然変異を含む。もう1つの  
 実施形態においては、該親 F c 含有ポリペプチドは V 2 6 4 A 突然変異を含む。

#### 【 0 0 3 4 】

本発明はまた、炎症状態の治療を要する対象における炎症状態の治療方法を含み、該方  
 法は、2 4 3 位および 2 6 4 位（該番号付けは K a b a t におけるものと同様の E U イン  
 20 デックスに準拠している）に突然変異を含む F c 含有ポリペプチドの治療的有効量を該対  
 象に投与することを含む。1つの実施形態においては、該 F c 含有ポリペプチドは、I L  
 - 1、I L - 6、R A N K L、T R A P、A T P 6 v 0 d 2、M D L - 1、D A P 1 2  
 、C D 1 1 b、T I M P - 1、M M P 9、C T S K、P U - 1、M C P 1、M I P 1、  
 C x c l 1 - G r o a、C X c l 2 - G r o b、C D 1 8、T N F、F c R I、F c  
 R I I b、F c R I I I および F c R I V からなる群から選択される遺伝子の発現を  
 低下させる。1つの実施形態においては、該 F c 含有ポリペプチドは突然変異 F 2 4 3 A  
 および V 2 6 4 A を含む。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異 F 2 4 3 Y  
 および V 2 6 4 G をコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は突然変異  
 2 4 3 T および V 2 6 4 G をコードしている。もう1つの実施形態においては、該核酸は  
 30 突然変異 F 2 4 3 L および V 2 6 4 A をコードしている。もう1つの実施形態において  
 は、該核酸は突然変異 F 2 4 3 L および V 2 6 4 N をコードしている。もう1つの実施形態  
 においては、該核酸は突然変異 F 2 4 3 V および V 2 6 4 G をコードしている。1つの実  
 施形態においては、該エフェクター機能は A D C C である。1つの実施形態においては、  
 該 F c 含有ポリペプチドは非経口投与される。1つの実施形態においては、該 F c 含有ポ  
 リペプチドは皮下投与される。1つの実施形態においては、該 F c 含有ポリペプチドは抗  
 体またはその抗原結合性フラグメントである。1つの実施形態においては、該 F c 含有ポ  
 リペプチドは、炎症状態の治療に有用な抗体またはその抗原結合性フラグメントである。  
 1つの実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、T N F -、  
 40 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 2、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2 0、I L - 2 1、I L -  
 2 2、I L - 2 3、I L - 2 3 R、I L - 2 5、I L - 2 7、I L - 3 3、C D 2、C D  
 4、C D 1 1 A、C D 1 4、C D 1 8、C D 1 9、C D 2 3、C D 2 5、C D 4 0、C D  
 4 0 L、C D 2 0、C D 5 2、C D 6 4、C D 8 0、C D 1 4 7、C D 2 0 0、C D 2 0  
 0 R、T S L P、T S L P R、P D - 1、P D L 1、C T L A 4、V L A - 4、V E G F  
 、P C S K 9、4 7 - インテグリン、E - セレクチン、F a c t I I、I C A M -  
 3、ベータ2 - インテグリン、I F N、C 5、C B L、L C A T、C R 3、M D L - 1  
 、G I T R、A D D L、C G R P、T R K A、I G F 1 R、R A N K L、G T Cまたは前  
 記分子のいずれかに対する受容体からなる群から選択される抗原に結合する。1つの実施  
 50 形態においては、該 F c 含有ポリペプチドは T N F - に結合する。もう1つの実施形態

においては、該Fc含有ポリペプチドはHer2に結合する。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドはPCSK9に結合する。一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる（または実質的になる）抗体フラグメントである。

#### 【0035】

本明細書に開示するもう一つの発明は、Fc含有ポリペプチドを含む医薬組成物に関するものであり、ここで、該Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも70%は、 $SA_{(1-4)}Gal_{(1-4)}GlcNAc_{(2-4)}Man_3GlcNAc_2$ および $SAGalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$ からなる群から選択されるオリゴ糖構造を含み、該Fc含有ポリペプチドは該Fc領域のアミノ酸位置243位および264位（該番号付けはKababtにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している）に突然変異を含む。一つの実施形態においては、該突然変異はF243AおよびV264Aである。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243YおよびV264Gである。もう一つの実施形態においては、該核酸は突然変異243TおよびV264Gをコードしている。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243LおよびV264Aである。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243LおよびV264Nである。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243VおよびV264Gである。一つの実施形態においては、該N-グリカンの少なくとも47モル%が構造 $SA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を有する。もう一つの実施形態においては、該N-グリカンの少なくとも47モル%が構造 $NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ を有する。一つの実施形態においては、該シアル酸化N-グリカンは-2, 3および-2, 6結合シアル酸の混合物を含む。もう一つの実施形態においては、該シアル酸化N-グリカンは-2, 6結合シアル酸のみを含む。もう一つの実施形態においては、該シアル酸化N-グリカンは-2, 6結合シアル酸を含み、検出可能なレベルの-2, 3結合シアル酸を含まない。一つの実施形態においては、該シアル酸はN-アセチルノイラミン酸(NANA)またはN-グリコリルノイラミン酸(NGNA)またはそれらの混合物である。もう一つの実施形態においては、該シアル酸は、該シアル酸上の9位にアセチル化を含有するNANAまたはNGNAの類似体または誘導体である。一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンはNANAを含み、NGNAを含まない。一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる（または実質的になる）抗体フラグメントである。

#### 【0036】

本明細書に開示するもう一つの発明は、Fc含有ポリペプチドを含む医薬組成物に関するものであり、ここで、該Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも70%は、 $SA_{(1-4)}Gal_{(1-4)}GlcNAc_{(2-4)}Man_3GlcNAc_2$ および $SAGalGlcNAcMan_5GlcNAc_2$ からなる群から選択されるオリゴ糖構造を含み、ここで、該シアル酸残基は専ら-2, 6結合により結合しており、該N-グリカンはフコースを欠き、該Fc含有ポリペプチドは該Fc領域のアミノ酸位置243位および264位（該番号付けはKababtにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している）に突然変異を含む。一つの実施形態においては、該突然変異はF243AおよびV264Aである。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243YおよびV264Gである。もう一つの実施形態においては、該核酸は突然変異243TおよびV264Gをコードしている。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243LおよびV264Aである。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243LおよびV264Nである。もう一つの実施形態においては、該突然変異はF243VおよびV26

10

20

30

40

50

4 Gである。1つの実施形態においては、該N - グリカンの少なくとも47モル%が構造  $S A_2 G a l_2 G l c N A c_2 M a n_3 G l c N A c_2$  を有する。もう1つの実施形態においては、該N - グリカンの少なくとも47モル%が構造  $N A N A_2 G a l_2 G l c N A c_2 M a n_3 G l c N A c_2$  を有する。1つの実施形態においては、該シアル酸化N - グリカンは - 2, 3および - 2, 6結合シアル酸の混合物を含む。もう1つの実施形態においては、該シアル酸化N - グリカンは - 2, 6結合シアル酸のみを含む。もう1つの実施形態においては、該シアル酸化N - グリカンは - 2, 6結合シアル酸を含み、検出可能なレベルの - 2, 3結合シアル酸を含まない。1つの実施形態においては、該シアル酸はN - アセチルノイラミン酸 (NANA) またはN - グリコリルノイラミン酸 (NGNA) またはそれらの混合物である。もう1つの実施形態においては、該シアル酸は、  
 10  
 該シアル酸上の9位にアセチル化を含有するNANAまたはNGNAの類似体または誘導体である。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチド上のN - グリカンはNANAを含み、NGNAを含まない。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号19を含む抗体フラグメントである。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは、配列番号18または配列番号19からなる (または実質的になる) 抗体フラグメントである。

#### 【0037】

本発明はまた、重鎖と軽鎖とを含むFc含有ポリペプチドを含み、ここで、該重鎖は配列番号9のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該軽鎖は配列番号2のアミノ酸配列またはその変異体を含み、ここで、該変異体は、配列番号1の重鎖アミノ酸配列と配列番号2の軽鎖アミノ酸配列とを含む抗体と比較した場合に以下の特性の1以上を有する：低下したエフェクター機能、増強した抗炎症特性、増加したシアル酸化、非経口投与された場合のバイオアベイラビリティ (吸収または曝露) の増強、ならびにFc RI、Fc RIIa、Fc RIIbおよびFc RIIIIaへの結合の低下。本発明はまた、重鎖と軽鎖とを含むFc含有ポリペプチドを含み、ここで、該重鎖は配列番号12のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該軽鎖は配列番号11のアミノ酸配列またはその変異体を含み、ここで、該変異体は、配列番号10の重鎖アミノ酸配列と配列番号11の軽鎖アミノ酸配列とを含む抗体と比較した場合に以下の特性の1以上を有する：低下したエフェクター機能、増強した抗炎症特性、増加したシアル酸化、非経口投与された場合のバイオア  
 20  
 30  
 40  
 ベイラビリティ (吸収または曝露) の増強、ならびにFc RI、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIIaおよびFc RIIIIbへの結合の低下。本発明はまた、重鎖と軽鎖とを含むFc含有ポリペプチドを含み、ここで、該重鎖は配列番号15のアミノ酸配列またはその変異体を含み、該軽鎖は配列番号14のアミノ酸配列またはその変異体を含み、ここで、該変異体は、配列番号13の重鎖アミノ酸配列と配列番号14の軽鎖アミノ酸配列とを含む抗体と比較した場合に以下の特性の1以上を有する：低下したエフェクター機能、増強した抗炎症特性、増加したシアル酸化、非経口投与された場合のバイオアベイラビリティ (吸収または曝露) の増強、ならびにFc RI、Fc RIIa、Fc RIIb、Fc RIIIIaおよびFc RIIIIbへの結合の低下。1つの実施形態においては、該変異体は0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個まで又はそれ以上の連続的または非連続的アミノ酸置換を含む。1つの実施形態においては、該変異体は、特許請求している配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を含む。

#### 【0038】

本発明はまた、親Fc含有ポリペプチドの243位の突然変異または264位の突然変異 (該番号付けはKabab tにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している) を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性を増強する方法を含み、ここで、該Fc含有ポリペプチドは、該親Fc含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症活性を有する。本発明はまた、炎症の治療に有用な親Fc含有ポリペプチド (例えば、炎症に  
 50  
 関与する抗原に結合する抗体またはイムノアドヘシン) を選択し、親Fc含有ポリペプチ

ドの243位の突然変異または264位の突然変異（該番号付けはK a b a tにおけるものと同様のE Uインデックスに準拠している）を導入することを含む、F c含有ポリペプチドの抗炎症特性を増強する方法を含み、ここで、該F c含有ポリペプチドは、該親F c含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症活性を有する。1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 Aを含む。もう1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドは突然変異V 2 6 4 Aを含む。1つの実施形態においては、該親F c含有ポリペプチドは天然F c領域を含む。

【0039】

本発明はまた、炎症状態の治療を要する対象における炎症状態の治療方法を含み、該方法は、243位の突然変異または264位の突然変異（該番号付けはK a b a tにおけるものと同様のE Uインデックスに準拠している）を含むF c含有ポリペプチドの治療的有効量を該対象に投与することを含む。1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドを非経口投与する。1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドを皮下投与する。1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドは突然変異F 2 4 3 Aを含む。もう1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドは突然変異V 2 6 4 Aを含む。1つの実施形態においては、該親F c含有ポリペプチドは天然F c領域を含む。

10

【0040】

前記実施形態のいずれにおいても、抗炎症活性の増強は、当技術分野で公知のいずれかの方法を用いて検出されうる。1つの実施形態においては、抗炎症活性の増強は、I L - 1、I L - 6、R A N K L、T R A P、A T P 6 v 0 d 2、M D L - 1、D A P 1 2、C D 1 1 b、T I M P - 1、M M P 9、C T S K、P U - 1、M C P 1、M I P 1、C x c l 1 - G r o a、C X c l 2 - G r o b、C D 1 8、T N F、F c R I、F c R I I b、F c R I I IおよびF c R I Vからなる群から選択される遺伝子の発現の低下を測定することにより検出される。

20

【0041】

発明の詳細な説明  
定義

本明細書中で用いる「G 0」なる語は、ガラクトースもフコースも含有しない複合二分岐オリゴ糖G l c N A c<sub>2</sub> M a n<sub>3</sub> G l c N A c<sub>2</sub>を意味する。

【0042】

本明細書中で用いる「G 1」なる語は、フコースを含有せず1個のガラクトシル残基を含有する複合二分岐オリゴ糖G a l G l c N A c<sub>2</sub> M a n<sub>3</sub> G l c N A c<sub>2</sub>を意味する。

30

【0043】

本明細書中で用いる「G 2」なる語は、フコースを含有せず2個のガラクトシル残基を含有する複合二分岐オリゴ糖G a l<sub>2</sub> G l c N A c<sub>2</sub> M a n<sub>3</sub> G l c N A c<sub>2</sub>を意味する。

【0044】

本明細書中で用いる「G 0 F」なる語は、コアフコースを含有しガラクトースを含有しない複合二分岐オリゴ糖G l c N A c<sub>2</sub> M a n<sub>3</sub> G l c N A c<sub>2</sub> Fを意味する。

【0045】

本明細書中で用いる「G 1 F」なる語は、コアフコースおよび1個のガラクトシル残基を含有する複合二分岐オリゴ糖G a l G l c N A c<sub>2</sub> M a n<sub>3</sub> G l c N A c<sub>2</sub> Fを意味する。

40

【0046】

本明細書中で用いる「G 2 F」なる語は、コアフコースおよび2個のガラクトシル残基を含有する複合二分岐オリゴ糖G a l<sub>2</sub> G l c N A c<sub>2</sub> M a n<sub>3</sub> G l c N A c<sub>2</sub> Fを意味する。

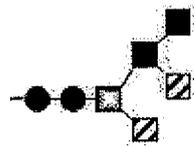
【0047】

本明細書中で用いる「M a n 5」なる語は、以下に示すオリゴ糖構造を意味する。

【0048】

50

## 【化 1】



- ▨ α1,3マンノース
- GlcNAc
- ▣ β1,4α1,3
- α1,6マンノース

10

本明細書中で用いる「GFI5.0」なる語は、Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> N-グリカンを中心に有する糖タンパク質を産生する糖操作されたピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株を意味する。

## 【0049】

本明細書中で用いる「GFI6.0」なる語は、NANA<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> N-グリカンを中心に有する糖タンパク質を産生する糖操作されたピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株を意味する。

## 【0050】

本明細書中で用いる「GS5.0」なる語はN-グリコシル化構造Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を意味する。

20

## 【0051】

本明細書中で用いる「GS5.5」なる語は、N-グリコシル化構造NANAGal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を意味し、これは、2,6シアリルトランスフェラーゼが糖操作されているピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株において産生された場合には2,6結合シアル酸を与え、2,3シアリルトランスフェラーゼが糖操作されているピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株において産生された場合には2,3結合シアル酸を与える。

## 【0052】

本明細書中で用いる「GS6.0」なる語は、N-グリコシル化構造NANAGal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を意味し、これは、2,6シアリルトランスフェラーゼが糖操作されているピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株において産生された場合には2,6結合シアル酸を与え、2,3シアリルトランスフェラーゼが糖操作されているピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株において産生された場合には2,3結合シアル酸を与える。

30

## 【0053】

ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株に関して本明細書中で用いる「野生型」または「wt」なる語は、グリコシル化を制御するための遺伝的修飾に付されていない天然ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株を意味する。

## 【0054】

本明細書中で用いる「抗体」なる語は、免疫グロブリン分子の可変領域内に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して特異的抗原に結合しうる免疫グロブリン分子を意味する。本明細書中で用いる該用語は、4つのポリペプチド鎖、すなわち、2つの同一ペアのポリペプチド鎖 [各ペアは1つの「軽」鎖 (LC) (約25kDa) および1つの「重」鎖 (HC) (約50~70kDa) を有する] からなる完全ポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけでなく、それらのフラグメント、例えばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖 (ScFv)、それらの突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および免疫グロブリン分子のいずれかの他の修飾形態 (C<sub>H</sub>2ドメインのN結合グリコシル化部位を含む重鎖免疫グロブリン定常領域のC<sub>H</sub>2ドメインの少なくとも一部と抗原認識部位とを含むもの)、またはそれらの変異体をも含む。本明細書中で用いる該用語は、それぞれIgG (例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4)、IgM、

40

50

I g A、I g DおよびI g Eのようないずれかのクラスの抗体を含む。

【0055】

本明細書中で用いる「C<sub>H</sub>2のコンセンサス配列」なる語は、種々の抗体のC<sub>H</sub>2ドメインにおいて見出される最も共通しているアミノ酸配列に由来するN結合グリコシル化部位を含有する重鎖定常領域のC<sub>H</sub>2ドメインのアミノ酸配列を意味する。

【0056】

「Fc領域」なる語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を示すために用いられる。「Fc領域」は天然配列Fc領域または変異体Fc領域でありうる。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は様々でありうるが、ヒトI g G重鎖Fc領域は、通常、Cys 226位またはPro 230位のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端に伸長すると定められる。免疫グロブリンのFc領域は2つの定常ドメインC<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3を含み、所望により、ヒンジ領域を含みうる。1つの実施形態においては、該Fc領域は配列番号18のアミノ酸配列を含む。1つの実施形態においては、該Fc領域は配列番号19のアミノ酸配列を含む。もう1つの実施形態においては、該Fc領域は、5'末端におけるリシン(K)残基の付加を伴う配列番号18のアミノ酸配列を含む。該Fc領域は、抗体の完全長重鎖のAsn 297部位に対応するC<sub>H</sub>ドメインにおける単一のN結合グリコシル化部位を含有する。

【0057】

「Fc含有ポリペプチド」なる語は、Fc領域を含む、例えば抗体またはイムノアドヘシンのようなポリペプチドを意味する。この用語は、Fc領域を含む又はFc領域からなる(または実質的になる)ポリペプチドを含む。Fc領域を含むポリペプチドは抗体のパパイン消化または組換えDNA技術により製造されうる。

【0058】

本明細書中で用いる「親抗体」、「親免疫グロブリン」または「親Fc含有ポリペプチド」なる語は、本明細書に開示されているFc領域突然変異を欠く抗体またはFc含有ポリペプチドを意味する。親Fc含有ポリペプチドは、天然配列Fc領域、または既存アミノ酸配列修飾を含有するFc領域を含みうる。天然配列Fc領域は、天然で見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列Fc領域は、天然配列ヒトI g G 1 Fc領域、天然配列ヒトI g G 2 Fc領域、天然配列ヒトI g G 3 Fc領域および天然配列ヒトI g G 4 Fc領域ならびに天然で見出されるそれらの変異体を含む。親抗体または親Fc含有ポリペプチドは、比較手段として使用される場合、いずれかの細胞内で発現されうる。1つの実施形態においては、親抗体または親Fc含有ポリペプチドは本発明のFc含有ポリペプチドと同じ細胞内で発現される。

【0059】

本明細書中で用いる「イムノアドヘシン」なる語は、免疫グロブリン定常ドメインと異種「アドヘシン」タンパク質(例えば、受容体、リガンドまたは酵素)の「結合ドメイン」とを併せ持つ抗体様分子を示す。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識および結合部位(抗原合体部位)以外である(すなわち、「異種」である)所望の結合特異性を有するアドヘシンアミノ酸配列と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合体を含む。本明細書中で用いる「リガンド結合ドメイン」なる語は、いずれかの天然細胞表面受容体、または対応天然受容体の少なくとも定性的リガンド結合能を保有するそのいずれかの領域もしくは誘導体を意味する。特定の実施形態においては、該受容体は、免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーに相同である細胞外ドメインを有する細胞表面ポリペプチドからのものである。免疫グロブリンスーパー遺伝子ファミリーのメンバーではないが、この定義に尚も明確に含まれる他の受容体としては、サイトカインに対する受容体、特に、チロシンキナーゼ活性を有する受容体(受容体チロシンキナーゼ)、ヘマトポエチンおよび神経成長因子のメンバー(問題の障害に哺乳動物が罹患する素因を与えるもの)が挙げられる。1つの実施形態においては、該障害は癌である。イムノアドヘシンの製造方法は当技術分野でよく知られている。例えば、WO 00 / 42072を参照されたい。

10

20

30

40

50

## 【0060】

本明細書中で用いる「Her 2」または「Her 2 抗体」なる語は、哺乳類細胞（すなわち、CHO細胞）において製造されたトラスツズマブ（trastuzumab）として公知の商業的に入手可能なHer 2 抗体のものに類似したアミノ酸配列を有する抗体を意味する。

## 【0061】

本明細書中で用いる「ピチア（Pichia）Her 2 抗体」または「ピチア（Pichia）抗Her 2 抗体」なる語は、糖操作ピチア・パストリス（Pichia pastoris）において製造された商業的に入手可能なHer 2 抗体（トラスツズマブ（trastuzumab））のものに類似したアミノ酸配列を有する抗体を意味する。

10

## 【0062】

本明細書中で用いる「Fc 突然変異タンパク質抗体」なる語は、本明細書に記載されている単一Fc 突然変異タンパク質または二重Fc 突然変異タンパク質の1つを含む抗体を意味する。

## 【0063】

本明細書中で用いる「Fc 突然変異タンパク質」なる語は、Fc 領域に1以上の点突然変異が施されているFc 含有ポリペプチドを意味する。

## 【0064】

本明細書中で用いる「Fc 突然変異」なる語は、Fc 含有ポリペプチドのFc 領域に施された突然変異を意味する。そのような突然変異の例には、本明細書に記載されているF243AまたはV264A突然変異が含まれる。

20

## 【0065】

本明細書中で用いる「単一Fc 突然変異タンパク質」なる語は、Fc 領域の243位または264位に突然変異を含むFc 含有ポリペプチドを意味する。「F243A」なる語はFc 含有ポリペプチドのFc 領域の243位におけるF（野生型）からAへの突然変異を意味する。「V264A」はFc 含有ポリペプチドのFc 領域の264位におけるV（野生型）からAへの突然変異を意味する。243位および264位はFc 含有ポリペプチドのFc 領域のCH2ドメインにおけるアミノ酸位置を表す。

## 【0066】

本明細書中で用いる「二重Fc 突然変異タンパク質」なる語は、Fc 領域の243位および264位に突然変異を含むFc 含有ポリペプチドを意味する。「F243A/V264A」なる語は、2つの特定されている突然変異を含む二重Fc 突然変異タンパク質を意味する。

30

## 【0067】

本明細書および特許請求の範囲の全体において、免疫グロブリン重鎖またはFc 含有ポリペプチドにおける残基の番号は、Kabatiら, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)（これを参照により明示的に本明細書に組み入れることとする）におけるものと同様のEUインデックスのものである。「Kabatiにおけるものと同様のEUインデックス」はヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを意味する。

40

## 【0068】

本明細書中で用いる「エフェクター機能」なる語は、Fc 受容体またはリガンドとの抗体Fc 領域の相互作用から生じる生化学的事象を意味する。典型的な「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；抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなどが含まれる。そのようなエフェクター機能は、当技術分野で公知の種々のアッセイを用いて評価されうる。

## 【0069】

50

本明細書中で用いる「糖操作(された)ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)」なる語は、ヒト様N-グリカンを発現するように遺伝的に改変されているピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)株、例えば前記のGFI5.0、GFI5.5およびGFI6.0株を意味する。

【0070】

本明細書中で用いる「N-グリカン」、「糖タンパク質」および「グリコフォーム(糖形態)」なる語は、N結合オリゴ糖、例えば、ポリペプチドのアスパラギン残基にアスパラギン-N-アセチルグルコサミン結合により結合しているN結合オリゴ糖を意味する。糖タンパク質上に見出される主な糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミン(*GalNAc*)、N-アセチルグルコサミン(*GlcNAc*)およびシアル酸(*SA*、例えば*NANA*、*NGNA*ならびにそれらの誘導体および類似体、例えばアセチル化*NANA*またはアセチル化*NGNA*)が挙げられる。糖操作ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)においては、シアル酸は専らN-アセチル-ノイラミン酸(*NANA*)である(Hamiltonら、Science 313(5792):1441-1443(2006))。N-グリカンは $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ の共通の五糖コアを有し、ここで、「Man」はマンノースを意味し、「Glc」はグルコースを意味し、「NAc」はN-アセチルを意味し、*GlcNAc*はN-アセチルグルコサミンを意味する。N-グリカンは、「トリマンノースコア」、「五糖コア」または「小(*pauci*)マンノースコア」とも称される $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (「Man3」)コア構造に付加される周辺糖(例えば、*GlcNAc*、ガラクトース、フコースおよびシアル酸)を含む分岐(アンテナ)の株において異なる。N-グリカンは、その分岐(分枝)構成成分に従い分類される(例えば、高マンノース、複合またはハイブリッド)。

10

20

【0071】

本明細書中で用いる「シアル酸」または「SA」なる語は、限定的ではないが以下のものを含むシアル酸ファミリーのいずれかのメンバーを意味する：N-アセチルノイラミン酸(*Neu5Ac*または*NANA*)、N-グリコリルノイラミン酸(*NGNA*)およびそれらのいずれかの類似体または誘導体(該シアル酸分子上のいずれかの位置におけるアセチル化により生じるものを含む)。シアル酸は、多数の複合糖質の必須成分である約30個の天然に存在する酸性炭水化物のグループに関する一般名である。Schauer, Biochem. Society Transactions, 11, 270-271(1983)。シアル酸は、通常、オリゴ糖の末端残基である。N-アセチルノイラミン酸(*NANA*)は最も一般的なシアル酸形態であり、N-グリコノイラミン酸(*NGNA*)はそれに続く第2の一般的な形態である。Schauer, Glycobiology, 1, 449-452(1991)。*NGNA*は動物界全体に広範囲に広まっており、種および組織に応じて、しばしば、複合糖質結合シアル酸の相当な割合を占める。ある種、例えばニワトリおよびヒトは例外的である。なぜなら、それらは正常組織において*NGNA*を欠くからである。Corfieldら、Cell Biology Monographs, 10, 5-50(1982)。ヒト血清サンプルにおいては、*NGNA*の形態のシアル酸の割合は全シアル酸の0.01%であると報告されている。Schauer, "Sialic Acids as Antigenic Determinants of Complex Carbohydrate" [The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates, (Plenum Press, New York, 1988)中に見出される]。

30

40

【0072】

本明細書中で用いる「ヒト様N-グリカン」なる語は、未操作野生型ヒト細胞により産生されるオリゴ糖に酷似しているN結合オリゴ糖を意味する。例えば、野生型ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)および他の下等真核細胞は、典型的に、N-グリコシル化部位における高マンノシル化タンパク質を産生する。本明細書に記載されている宿主細胞は、高マンノシル化されていないヒト様N-グリカンを含む糖タンパク質

50

(例えば、抗体)を産生する。幾つかの実施形態においては、本発明の宿主細胞は、ハイブリッドおよび/または複合N-グリカンを伴うヒト様N-グリカンを産生しうる。本発明の宿主細胞から産生される個々の糖タンパク質上に存在する個々のタイプの「ヒト様」グリカンは、該宿主細胞において行われる個々の糖操作工程に左右されるであろう。

【0073】

本明細書中で用いる「高マンノース」型N-グリカンなる語は、5個以上のマンノース残基を有するN-グリカンを意味する。

【0074】

本明細書中で用いる「複合」型N-グリカンなる語は、「トリマンノース」コアの1, 6マンノースアームに結合した少なくとも1つのGlcNAcと、1, 3マンノースアームに結合した少なくとも1つのGlcNAcとを有するN-グリカンを意味する。複合N-グリカンは、シアル酸または誘導体(例えば、「NANA」または「NeuAc」が挙げられ、ここで、「Neu」はノイラミン酸を意味し、「Ac」はアセチルを意味する)で修飾されることがあるガラクトース(「Gal」)またはN-アセチルガラクトサミン(「GalNAc」)残基をも有しうる。複合N-グリカンは、コアフコース(「Fuc」)および「二分岐(bisecting)」GlcNAcを含む鎖内置換をも有しうる。一例として、N-グリカンがトリマンノースコア上に二分岐GlcNAcを含む場合、該構造は $Man_3GlcNAc_2(GlcNAc)$ または $Man_3GlcNAc_3$ と表されうる。N-グリカンが、トリマンノースコアに結合したコアフコースを含む場合、該構造は $Man_3GlcNAc_2(Fuc)$ と表されうる。複合N-グリカンはまた、「トリマンノース・コア」上に複数のアンテナを有することが可能であり、これは、しばしば、「多アンテナグリカン」と称される。

【0075】

本明細書中で用いる「ハイブリッド」N-グリカンなる語は、「トリマンノース」コアの1, 3マンノースアームの末端における少なくとも1つのGlcNAcと、トリマンノースコアの1, 6マンノースアーム上の0個以上のマンノースとを有するN-グリカンを意味する。

【0076】

糖タンパク質の調製物中に存在するグリカンの「モル%(モル百分率)」に言及する場合、この用語は、該タンパク質調製物をPNGアーゼで処理し、ついで、グリコフォーム組成物により影響されない方法(例えば、PNGアーゼにより遊離したグリカンプールを2-アミノベンズアミドのような蛍光タグで標識し、ついで高速液体クロマトグラフィーまたはキャピラリー電気泳動により分離し、ついで蛍光強度によりグリカンを定量すること)により定量した場合に遊離したN結合オリゴ糖のプール内に存在する特定のグリカンのモル%を意味する。例えば、50モル%の $NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ は、遊離したグリカンの50%が $NANA_2Gal_2GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ であり、残りの50%が他のN結合オリゴ糖から構成されることを意味する。

【0077】

本明細書中で用いる「抗炎症抗体」なる語は、炎症を治療するために使用されることが意図される抗体を意味する。Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性は、当技術分野で公知のいずれかの方法を用いて測定されうる。1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性は、動物モデル、例えば、Kanekoら、Science 313: 670-673 (2006), Anthonyら、Science 320: 373-376 (2008)および本明細書中の実施例20~21に記載されているモデルを使用して測定される。もう1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性は、炎症に関連した生物マーカー(限定的なものではないが以下のものを含む: CRP、炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壊死因子(TNF-アルファ)、インターフェロン-ガンマ、インターロイキン6(IL-6、IL-8、IL-10、ケモカイン、凝血マーカーD-二量体、sCD14、腸脂肪酸結合ペプチド(IFABP)およびヒアルロン酸)のレベ

10

20

30

40

50

ルを決定することにより測定される。1つの実施形態においては、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性は、当技術分野で公知の方法を用いてC-反応性タンパク質(CRP)のレベルを決定することにより測定される。C-反応性タンパク質のレベルの減少は、該Fc含有ポリペプチドが抗炎症特性を有することを示している。

【0078】

「保存的に修飾された変異体」または「保存的置換」は、タンパク質中のアミノ酸が、類似特性(例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、バックボーンコンホメーションおよび剛性など)を有する他のアミノ酸と置換されることを意味し、この場合、該変化は、しばしば、該タンパク質の生物活性を変化させずに施されうる。一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させない、と当業者は認識している(例えば、Watsonら(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)を参照されたい)。また、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物活性を損なう可能性が低い。典型的な保存的置換を以下に列挙する。

【0079】

【表1】

元の残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Fc領域Asn297(EU付番系に準拠)免疫グロブリンG(IgG)のグリコシル化は、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)を含むエフェクター経路の最適な認識および活性化に必要であることが示されている。Wright & Morrison, *Trends in Biotechnology*, 15: 26-31 (1997), Tao & Morrison, *J. Immunol.*, 143(8): 2595-2601 (1989)。したがって、IgGの定常領域におけるグリコシル化操作は治療用モノクローナル抗体(mAb)の開発のための活発な研究の領域になっている。Asn297におけるN結合グリコシル化の存在は、ADCC(Rothman(1989), Livelyら, *Glycobiology*, 5: 813-8

22 (1995), Umana (1999), Shields (2002) および Shinokawa (2003) および補体依存性細胞傷害 (CDC) (Hodoniczky ら, Biotecnol Prog., 21 (6): 1644 - 1652 (2005) および Jefferis ら, Chem. Immunol., 65: 111 - 128 (1997)) を含む免疫エフェクター機能アッセイにおける mAb 活性に決定的に重要であることが確認されている。機能に対するこの効果は、グリコシル化 Fc ドメインがとる特異的コンホメーションによるものであると考えられており、これは、グリコシル化が存在しない場合には欠如しているようである。より詳しくは、Fc C<sub>H</sub>2 ドメインにおけるグリコシル化を欠く IgG は、Fc RI、Fc RII および Fc RIII を含む Fc R に結合しない (Rothman (1989))。

10

## 【0080】

抗体のエフェクター機能においてはグリコシル化の存在が何らかの役割を果たしているようであるが、それだけではなく、N 結合オリゴ糖の個々の組成も重要である。例えば、フコースの存在はインビトロ Fc RIIIA 結合およびインビトロ ADC C に対して顕著な効果を示す (Rothman (1989) および Li ら, Nat. Biotechnol. 24 (2): 2100 - 215 (2006))。哺乳類細胞培養、例えば CHO または NS0 により産生される組換え抗体は、主にフコシル化されている N 結合オリゴ糖を含有する (Hossler ら, Biotechnology and Bioengineering, 95 (5): 946 - 960 (2006), Umana (1999) および Jefferis ら, Biotecnol. Prog. 21: 11 - 16 (2005))。また、Fc 領域におけるシアル酸化が抗体に抗炎症特性を付与するという証拠が存在する。シアル酸化形態を富化するためにレクチンカラムで精製された静脈内用免疫グロブリン (IVIg) は、シアル酸化 Fc フラグメントに限定された顕著な抗炎症効果を示し、抑制性受容体 Fc RIIb の発現の増強に関連づけられた (Nimmerjahn および Ravetch, J. Exp. Med. 204: 11 - 15 (2007))。

20

## 【0081】

哺乳類細胞系に由来する抗体の Fc 領域におけるグリコシル化は、典型的に、グリコフォームの異種混合物からなり、主要形態は、典型的に、複合フコシル化グリコフォーム、すなわち、G0F、G1F およびそれらより低い割合ではあるが G2F から構成される。G0F 構造への不完全なガラクトース転移を引き起こす考えられうる状態には、限定的なものではないが、非最適化ガラクトース転移装置 (例えば、-1, 4 ガラクトシルトランスフェラーゼ)、およびゴルジ装置内への劣悪な UDP - ガラクトース輸送、最適未満の細胞培養およびタンパク質発現条件、ならびに該オリゴ糖に隣接するアミノ酸残基による立体障害が含まれる。これらの状態のそれぞれは末端ガラクトースの最終的な度合を調節しうるが、Fc オリゴ糖への後続のシアル酸転移は、C<sub>H</sub>2 ドメインの、閉じたポケット立体配置により抑制されると考えられている。例えば、図 1、Jefferis, R., Nature Biotech., 24 (10): 1230 - 1231, 2006 を参照されたい。適正な末端単糖、特にガラクトースの非存在下または不十分な末端ガラクトシル化形態の存在下では、治療用タンパク質として作用しうるシアル酸化形態を産生する可能性は、シアルトランスフェラーゼの存在下で産生された場合であっても、ほとんどない。ヒト IgG - Fc グリコフォームのタンパク質工学および構造分析は、グリコシル化プロファイルが Fc コンホメーションにより影響されることを示している。例えば、CHO 産生 IgG3 由来のオリゴ糖上のガラクトースおよびシアル酸のレベルの増加は、Fc ポケットからの特定のアミノ酸が、F241、F243、V264、D265 および R301 を含むアラニンに突然変異した場合に生じることが見出された (Lund ら, J. Immunol. 157 (11): 4963 - 4969 (1996))。或る突然変異は細胞媒介性スーパーオキシド生成および補体媒介性赤血球溶解 (これらは、それぞれ、Fc RI および C1q 結合に関する代替マーカーとして用いられる) に何らかの影響を及ぼすことが更に示された。

30

40

## 【0082】

50

高度に均一なグリコシル化を伴う糖タンパク質を分泌しうる宿主株を得るために酵母を遺伝的に操作することが報告されている。Choiら、PNAS, USA 100(9):5022-5027(2003)は、1,2マンノシダーゼ触媒ドメインおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI触媒ドメインのライブラリーを、触媒ドメインを分泌経路に局在化する真菌II型膜タンパク質リーダー配列のライブラリーと組合せて使用することを記載している。このようにして、均一なMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>またはGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>N-グリカン構造を有するインビボ糖タンパク質を産生する株が単離された。Hamiltonら、Science 313(5792):1441-1443(2006)は、主としてシアル酸化グリカン構造体GS6.0, NANA<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(90.5%)およびモノシアル酸化体GS5.5, NANAGal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>(7.9%)からなるグリカン組成を有するものとしてピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)において産生された糖タンパク質エリスロポエチンの製造を記載している。しかし、類似株において産生される抗体は、それより著しく低いシアル酸化N-グリカン含量を有するであろう。なぜなら、図4において見られるとおり、該抗体においては末端ガラクトース基質のレベルが相対的に低いからである。また、Fcオリゴ糖のシアル酸化は治療用静脈内用ガンマグロブリンおよびそのFcフラグメントに抗炎症特性を付与することKanekoら、Science 313(5787):670-673(2006)、ならびに該抗炎症活性はシアル酸の2,6-結合形態には依存するが、2,3形態には依存しないこと(Anthonyら、Science, 320:373-376(2008))が最近示されている。

10

20

30

40

50

## 【0083】

## 宿主生物および細胞系

本発明のFc含有ポリペプチドはいずれかの宿主生物または細胞系において製造される。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、シアル酸化N-グリカンを産生しうる宿主細胞において製造される。

## 【0084】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは哺乳類細胞において製造されることが可能であり、この場合、該細胞は、内因的に又は遺伝的もしくはプロセス操作により、末端2-6および2-3シアル酸の混合物または末端2-6シアル酸のみを含有する糖タンパク質を産生する。培養(組織培養)における哺乳類細胞の増殖は常套手段となっている。有用な哺乳類宿主細胞系の具体例としては、SV40により形質転換されたサル腎CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651); ヒト胎児腎系(懸濁培養内での増殖のためにサブクローニングされた293または293細胞); 乳児ハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞/ -DHFR(CHO); マウスセトリ細胞(TM4); サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞(MDK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065); マウス乳癌(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI細胞; MRC 5細胞; FS4細胞; ハイブリドーマ細胞系; NS0; SP2/0; およびヒト肝癌系(Hep G2)が挙げられる。

## 【0085】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、シアル酸化N-グリカンを産生するように操作された植物細胞において製造されうる。例えば、Coxら、Nature Biotechnology (2006) 24, 1591-1597(2006)およびCastilhoら、J. Biol. Chem. 285(21):15923-15930(2010)を参照されたい。

## 【0086】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、シアル酸化N-グリカンを産生するように操作された昆虫細胞において製造されうる。例えば、HarrisonおよびJarvis, Adv. Virus Res. 68:159-91(2006)を参照されたい。

【0087】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、シアル酸化N-グリカンを産生するように操作された細菌細胞において製造されうる。例えば、Lizakら, Bioconjugate Chem. 22:488-496(2011)を参照されたい。

【0088】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは下等真核宿主細胞または生物において製造されうる。最近の進歩は、下等真核宿主生物、酵母および糸状菌、例えばピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)における完全ヒト化治療用物質の製造を可能にしている(Gerngrossら, 米国特許第7,029,872号および米国特許第7,449,308号(それらの開示を参照により本明細書に組み入れることとする))。Jacobsonら, Nature Protocols 4(1):58-70(2009)も参照されたい。本出願人は、本発明において、重鎖のFc領域内の243位および264位のアミノ酸に対する2つの突然変異を含む抗体を発現しうる修飾ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)宿主生物および細胞系を更に開発した。これらの突然変異を有する抗体は、親抗体と比較した場合に、2,6結合シアル酸化N-グリカンのレベルの上昇およびより均一な組成を有していた。本出願人はまた、驚くべきことに、重鎖のFc領域内のアミノ酸243位および264位における突然変異が、全てのFc受容体への結合の低下およびC1q結合の低下を伴う抗体を与えることを見出した。その前者はADCCの代替物であり、これは2,6-結合シアル酸のレベルの減少には左右されなかった。したがって、末端2,6結合シアル酸N-グリカンのレベルの増加およびより高い均一性に基けば、親抗体と比較して増強した抗炎症特性を有する組換えグリコシル化抗体を下等真核細胞、例えば酵母および糸状菌、特にピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)において製造するために本明細書に記載の材料および方法が使用可能である、と当業者は認識し理解するであろう。

【0089】

FcRおよびC1q結合の低下に基けば、親抗体と比較して低下したエフェクター機能を有する組換えグリコシル化抗体を製造するために本明細書に記載の材料および方法が使用可能である。このようにして本発明の方法によりピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)において製造される抗体は、特異的Fc突然変異を欠く糖操作ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)細胞において又は自らの内在性グリコシル化装置を保有するピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)宿主細胞において製造された抗体と比較して、エフェクター機能の低下を伴って高収率で製造され、末端2,6結合シアル酸残基を有する糖タンパク質の主要種を有していた。

【0090】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、末端シアル酸を含む主要N-グリカンを有する糖タンパク質を産生するように操作された宿主細胞、特に酵母または糸状菌宿主細胞において製造される。本発明の1つの実施形態においては、該主要N-グリカンは、いずれの2,3結合シアル酸をも産生しない、2,6シアリルトランスフェラーゼで糖操作された株において産生されるSA<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>の2,6結合形態である。他の実施形態においては、該株は、2,3シアリルトランスフェラーゼを単独で又は2,6シアリルトランスフェラーゼと共に発現して2,3結合シアル酸または2,6結合シアル酸と2,3結合シアル酸との組合せ体を主要N-グリカンとして産生するように操作される。

【0091】

本発明のFc含有ポリペプチドを製造するために使用される細胞系は、いずれかの細胞

10

20

30

40

50

系、例えば、1以上のシアル酸化糖タンパク質を産生する能力を有する細胞系でありうる。本明細書に記載の材料および方法は、本明細書中に一例として記載されているピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) の特定の株には限定されず、例えば Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub> のような1以上の末端ガラクトースを有するN-グリカンを生産するあらゆるピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株または他の酵母もしくは糸状菌株を含む、と当業者は認識し理解するであろう。該末端ガラクトースは 2, 6 結合シアル酸の産生のための基質として作用して、N-グリカン構造 NANAG<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> を与える。適当な株の例は米国特許第 7, 029, 872号、US 2006-0286637 および Hamiltonら, *Science* 313(5792):1441-1443(2006) (それらの記載を、該記載が完全に記載されているのと同様に、本明細書に組み入れることとする) に記載されている。

#### 【0092】

一般に、タンパク質、特に糖タンパク質の発現には、下等真核生物、例えば酵母が使用される。なぜなら、それらは経済的に培養可能であり、高い収率を与えることが可能であり、適当に修飾された場合には適当なグリコシル化が可能だからである。酵母は特に、迅速な形質転換、試験されたタンパク質局在化方法および簡便な遺伝子ノックアウト技術を可能にする確立された遺伝学を提供する。適当なベクターは、発現制御配列、例えばプロモーター(3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖酵素を含む)、および複製起点、終結配列などを、所望により有する。

#### 【0093】

本明細書においてはメチロトローフ酵母ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) を使用して本発明が実証されているが、他の有用な下等真核宿主細胞には以下のものが含まれる: ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピチア・フィンランドイカ (*Pichia finlandica*)、ピチア・トレハロフィラ (*Pichia trehalophila*)、ピチア・コクラメ (*Pichia koclamae*)、ピチア・メンブランエファシエンス (*Pichia membranaefaciens*)、ピチア・ミヌタ (*Pichia minuta*) (オガタエア・ミヌタ (*Ogataea minuta*))、ピチア・リンドネリ (*Pichia lindneri*)、ピチア・オープンチエ (*Pichia opuntiae*)、ピチア・テルモトレランス (*Pichia thermotolerans*)、ピチア・サリクタリア (*Pichia salictaria*)、ピチア・グエルクウム (*Pichia guercuum*)、ピチア・ピエペリ (*Pichia pijperi*)、ピチア・スティプティス (*Pichia stiptis*)、ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピチア属種 (*Pichia sp.*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス属種 (*Saccharomyces sp.*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、クライベロミセス属種 (*Kluyveromyces sp.*)、クライベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・レーゼイ (*Trichoderma reesei*)、クリソスポリウム・ルックノウエンス (*Chryso sporium lucknowense*)、フザリウム属種 (*Fusarium sp.*)、フザリウム・グラミネウム (*Fusarium gramineum*)、フザリウム・ベネナム (*Fusarium venenatum*) およびニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)。種々の酵母、例えばクライベロミセス・ラクチス (*K. lactis*)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) およびハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula p*

10

20

30

40

50

olymorpha)は細胞培養に特に適している。なぜなら、それらは高い細胞密度まで増殖可能であり、大量の組換えタンパク質を分泌しうるからである。同様に、糸状菌、例えばアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、フザリウム属種(Fusarium sp.)、ニューロスポラ・クラッサ(Neurospora crassa)などは、本発明の糖タンパク質を工業的規模で製造するために使用される。

#### 【0094】

下等真核生物、特に酵母および糸状菌は、グリコシル化パターンがヒト様である又はヒト化されている糖タンパク質をそれらが発現するように遺伝的に修飾されうる。前記のとおり、本明細書中で用いる「ヒト様N-グリカン」なる語は、未操作野生型ヒト細胞により産生されるオリゴ糖に酷似しているN結合オリゴ糖を意味する。本発明の好ましい実施形態においては、本発明の宿主細胞は、ハイブリッドおよび/または複合N-グリカン、すなわち、「ヒト様N-グリコシル化」を伴うヒト様糖タンパク質を産生しうる。本発明の宿主細胞から産生される糖タンパク質上に主に存在する個々の「ヒト様」グリカンは、行われる個々の操作工程に左右されるであろう。このように、特定の所望のグリコフォームが組成物において優勢である糖タンパク質組成物が製造されうる。選択された内在性グリコシル化酵素を除去し、および/または宿主細胞を遺伝的に操作し、および/または外因性酵素を供給して、哺乳類グリコシル化経路の全部または一部を模擬することにより(米国特許第7,449,308号に記載されているとおり)、これは達成されうる。所望により、該糖タンパク質がコアフコシル化を伴って又は伴わずに産生されるように、該グリコシル化の追加的な遺伝的操作が行われうる。下等真核宿主細胞の使用は更に有利である。なぜなら、これらの細胞は高度に均一な糖タンパク質組成物を産生して、該糖タンパク質の主要グリコフォームが該組成物中の糖タンパク質の30モル%以上で存在しうるようにするからである。特定の態様においては、該主要グリコフォームは、該組成物中に存在する糖タンパク質の40モル%、50モル%、60モル%、70モル%以上、最も好ましくは、80モル%以上で存在しうる。

10

20

#### 【0095】

下等真核生物、特に酵母は、グリコシル化パターンがヒト様である又はヒト化されている糖タンパク質をそれらが発現するように遺伝的に修飾されうる。選択された内在性グリコシル化酵素を除去し、および/または外因性酵素を供給することにより(Gerngrössら,米国特許第7,449,308号に記載されているとおり)、これは達成されうる。例えば、宿主細胞は、糖タンパク質上のN-グリカンにマンノース残基を付加する1,6-マンノシルトランスフェラーゼ活性が激減するように選択または操作されうる。

30

#### 【0096】

1つの実施形態においては、該宿主細胞は更に、1,2-マンノシダーゼ触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、1,2-マンノシダーゼ活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る組換え糖タンパク質の通過は、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>グリコフォームを含む組換え糖タンパク質、例えば、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>グリコフォームを主に含む組換え糖タンパク質組成物を産生する。例えば、米国特許第7,029,872号および米国特許第7,449,308号ならびに米国公開特許出願第2005/0170452号は、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>グリコフォームを含む糖タンパク質を産生しうる下等真核宿主細胞を開示している。

40

#### 【0097】

更に詳細な実施形態においては、直前の宿主細胞は更に、GlcNAcトランスフェラーゼI(GnTI)触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、GlcNAcトランスフェラーゼI活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化する

50

ように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む組換え糖タンパク質、例えば、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを主に含む組換え糖タンパク質組成物を産生する。例えば、米国特許第7,029,872号および米国特許第7,449,308号ならびに米国公開特許出願第2005/0170452号は、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む糖タンパク質を産生しうる下等真核宿主細胞を開示している。前記細胞において産生された糖タンパク質をヘキサミンダーゼでインビトロで処理して、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む組換え糖タンパク質を産生させることが可能である。

【0098】

更に詳細な実施形態においては、直前の宿主細胞は更に、マンノシダーゼII触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、マンノシダーゼII活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む組換え糖タンパク質、例えば、 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを主に含む組換え糖タンパク質組成物を産生する。米国特許第7,029,872号および米国公開特許出願第2004/0230042号は、マンノシダーゼII酵素を発現し、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを主に有する糖タンパク質を産生しうる下等真核宿主細胞を開示している。前記細胞において産生された糖タンパク質をヘキサミンダーゼでインビトロで処理して、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む組換え糖タンパク質を産生させることが可能である。

【0099】

更に詳細な実施形態においては、直前の宿主細胞は更に、 $\text{GlcNAc}$ トランスフェラーゼII ( $\text{GnT II}$ ) 触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、 $\text{GlcNAc}$ トランスフェラーゼII活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む組換え糖タンパク質、例えば、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを主に含む組換え糖タンパク質組成物を産生する。米国特許第7,029,872号および第7,449,308号ならびに米国公開特許出願第2005/0170452号は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む糖タンパク質を産生しうる下等真核宿主細胞を開示している。前記細胞において産生された糖タンパク質をヘキサミンダーゼでインビトロで処理して、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む組換え糖タンパク質を産生させることが可能である。

【0100】

更に詳細な実施形態においては、直前の宿主細胞は更に、ガラクトシルトランスフェラーゼ触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ もしくは $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームまたはそれらの混合物を含む組換え糖タンパク質、例えば、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームもしくは $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームまたはそれらの混合物を主に含む組換え糖タンパク質組成物を産生する。米国特許第7,029,872号および米国公開特許出願第2006/0040353号は、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ グリコフォームを含む糖タンパク質を産生しうる下等真核宿主細胞を開示している。前記細胞において産生された糖タンパク質をガラクトシダーゼでインビトロで処理して、 $\text{GlcNAc}_2\text{Ma}$

10

20

30

40

50

$n_3 \text{GlcNAc}_2$  グリコフォームを含む組換え糖タンパク質、例えば、 $\text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$  グリコフォームを主に含む組換え糖タンパク質組成物を産生させることが可能である。

【0101】

更に詳細な実施形態においては、直前の宿主細胞は更に、シアリルトランスフェラーゼ触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、シアリルトランスフェラーゼ活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。好ましい実施形態においては、該シアリルトランスフェラーゼはアルファ2, 6 - シアリルトランスフェラーゼである。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、 $\text{NANA}_2 \text{Gal}_2 \text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$  グリコフォームもしくは  $\text{NANA} \text{Gal}_2 \text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$  グリコフォームまたはそれらの混合物を主に含む組換え糖タンパク質を産生する。下等真核宿主細胞、例えば酵母および糸状菌の場合、該宿主細胞が、N - グリカンへの転移のためのCMP - シアル酸を供与するための手段を更に含むことが有用である。米国公開特許出願第2005/0260729号は、CMP - シアル酸合成経路を有するように下等真核生物を遺伝的に操作するための方法を開示しており、米国公開特許出願第2006/0286637号は、シアル酸化糖タンパク質を産生するように下等真核生物を遺伝的に操作するための方法を開示している。シアル酸の量を増加させるためには、CMP - シアル酸合成経路の2以上のコピーまたはシアリルトランスフェラーゼの2以上のコピーを含むように宿主細胞を構築することが有利でありうる。前記細胞において産生された糖タンパク質をノイラミニダーゼでインビトロで処理して、 $\text{Gal}_2 \text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$  グリコフォームもしくは  $\text{Gal} \text{GlcNAc}_2 \text{Man}_3 \text{GlcNAc}_2$  グリコフォームまたはそれらの混合物を主に含む組換え糖タンパク質を産生させることが可能である。

10

20

【0102】

前記宿主細胞はいずれも、米国公開特許出願第2005/0208617号および2007/0037248号に開示されているような二分岐(bisected)( $\text{GnT I II}$ )および/または多分岐( $\text{GnT IV}$ 、 $\text{V}$ 、 $\text{VI}$ および $\text{IX}$ )N - グリカン構造を有する糖タンパク質を産生させるための $\text{GnT I II}$ 、 $\text{GnT IV}$ 、 $\text{GnT V}$ 、 $\text{GnT VI}$ および $\text{GnT IX}$ からなる群から選択される1以上の $\text{GlcNAc}$ トランスフェラーゼを更に含む。更に、前記宿主細胞は、 $\text{SA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(2-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  を含む組換え糖タンパク質、例えば、 $\text{NANA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(2-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{NGNA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(2-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  または  $\text{NANA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(2-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  と  $\text{NGNA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(2-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  との組合せを含む抗体を産生しうる。1つの実施形態においては、該組換え糖タンパク質は、 $\text{SA}(1-4)\text{Gal}(1-4)\text{GlcNAc}(2-4)\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  からなる群から選択される構造を含みいずれの2 - 3結合SAをも欠くN - グリカンを含む。

30

40

【0103】

更に詳細な実施形態においては、 $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  N - グリカンを主に有する糖タンパク質を産生する宿主細胞は更に、ガラクトシルトランスフェラーゼ触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、 $\text{Gal} \text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  グリコフォームを主に含む組換え糖タンパク質を産生する。

【0104】

更に詳細な実施形態においては、 $\text{Gal} \text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$  N - グ

50

リカンを主に有する糖タンパク質を産生した直前の宿主細胞は更に、シアリルトランスフェラーゼ触媒ドメインを含み、該触媒ドメインは、該触媒ドメインに通常は結合していない細胞標的化シグナルペプチドに融合しており、該シグナルペプチドは、シアリルトランスフェラーゼ活性を該宿主細胞のERまたはゴルジ装置に標的化するように選択される。該宿主細胞のERまたはゴルジ装置を通る該組換え糖タンパク質の通過は、SAGalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>グリコフォーム（例えば、NANA GalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>もしくはNGNA GalGlcNAcMan<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>またはそれらの混合物）を含む組換え糖タンパク質を産生する。

#### 【0105】

前記宿主細胞はいずれも、更に、1以上の糖輸送体、例えばUDP-GlcNAc輸送体 [例えば、クライベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) およびムス・ムスクルス (*Mus musculus*) UDP-GlcNAc輸送体]、UDP-ガラクトース輸送体 [例えば、キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) UDP-ガラクトース輸送体] およびCMP-シアル酸輸送体 (例えば、ヒトシアル酸輸送体) を含む。下等真核宿主細胞、例えば酵母および糸状菌は前記輸送体を欠くため、下等真核宿主細胞、例えば酵母および糸状菌は、前記輸送体を含むように遺伝的に操作されることが好ましい。

#### 【0106】

更に、前記宿主細胞はいずれも、更に、N-グリカン占拠を増加させるために操作される。例えば、Gaulitzekら, *Biotecnol. Bioengin.* 103: 1164-1175 (2009); Jonesら, *Biochim. Biophys. Acta* 1726: 121-137 (2005); WO2006/107990を参照されたい。1つの実施形態においては、前記宿主細胞はいずれも、更に、異種単一サブユニットオリゴサッカリルトランスフェラーゼ (例えば、リーシュマニア属種 (*Leishmania* sp.) STT3Aタンパク質、STT3Bタンパク質、STT3Cタンパク質、STT3Dタンパク質またはそれらの組合せ) をコードする少なくとも1つの核酸分子、および該異種糖タンパク質をコードする核酸分子を含むように操作されることが可能であり、ここで、該宿主細胞は、内在性OTase複合体を含むタンパク質をコードする内在性宿主細胞遺伝子を発現する。1つの実施形態においては、前記宿主細胞はいずれも、更に、リーシュマニア属種 (*Leishmania* sp.) STT3Dタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸分子、および該異種糖タンパク質をコードする核酸分子を含むように操作されることが可能であり、ここで、該宿主細胞は、内在性OTase複合体を含むタンパク質をコードする内在性宿主細胞遺伝子を発現する。

#### 【0107】

宿主細胞には更に、 $\alpha$ -マンノシダーゼ耐性N-グリカンをも有しない糖タンパク質を産生するように遺伝的に操作された下等真核細胞 (例えば酵母、例えばピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)) が含まれる。これは、ホスホマンノシルトランスフェラーゼ遺伝子PNO1およびMNN4B (例えば、米国特許第7,198,921号および第7,259,007号を参照されたい) の一方または両方を欠失または破壊することによりホスホマンノース残基を有する糖タンパク質を、ならびに $\alpha$ -マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子 (例えば、BMT1、BMT2、BMT3およびBMT4) (米国公開特許出願第2006/0211085号を参照されたい) の1以上を欠失または破壊することにより達成されることが可能であり、更に詳細な態様においては、それはまた、MNN4A遺伝子を欠失または破壊することを含む。破壊は、特定の酵素をコードするオープンリーディングフレームを破壊すること、または該オープンリーディングフレームの発現を破壊すること、または干渉性RNA、アンチセンスRNAなどを使用して、 $\alpha$ -マンノシルトランスフェラーゼおよび/またはホスホマンノシルトランスフェラーゼの1以上をコードするRNAの翻訳を阻害することを含む。更に、細胞は、化学的インヒビターの添加または細胞培養条件の修飾により $\alpha$ -マンノシダーゼ耐性N-グリカンをも有する糖タンパク質を産生しうる。これらの宿主細胞は、特定のN-グリカン構造を産生する

10

20

30

40

50

ように前記のとおりにより更に修飾されうる。

【0108】

宿主細胞には更に、タンパク質 O - マンノシルトランスフェラーゼ [ D o l - P - M a n : タンパク質 ( S e r / T h r ) マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子 ] ( P M T ) ( 米国特許第 5 , 7 1 4 , 3 7 7 号を参照されたい ) ] の 1 以上を欠失または破壊することにより糖タンパク質の O - グリコシル化を制御するように遺伝的に修飾された、あるいは公開国際出願番号 W O 2 0 0 7 / 0 6 1 6 3 1 に開示されているとおりに P m t p インヒビターおよび / または - マンノシダーゼの存在下で増殖された、あるいはそれらの両方に付された下等真核細胞 [ 例えば酵母、例えばピチア・パストリス ( P i c h i a p a s t o r i s ) ] が含まれる。破壊は、P m t p をコードするオープンリーディングフレームを破壊すること、または該オープンリーディングフレームの発現を破壊すること、または干渉性 RNA、アンチセンス RNA などを使用して、P m t p の 1 以上をコードする RNA の翻訳を阻害することを含む。該宿主細胞には更に、特定の N - グリカン構造を産生するように修飾された前記宿主細胞のいずれかが含まれる。

10

【0109】

P m t p インヒビターには、ベンジリデンチアゾリジンジオンが含まれるが、これに限定されるものではない。使用されうるベンジリデンチアゾリジンジオンの例としては、5 - [ [ 3 , 4 - ビス ( フェニルメトキシ ) フェニル ] メチレン ] - 4 - オキソ - 2 - チオキソ - 3 - チアゾリジン酢酸、5 - [ [ 3 - ( 1 - フェニルエトキシ ) - 4 - ( 2 - フェニルエトキシ ) ] フェニル ] メチレン ] - 4 - オキソ - 2 - チオキソ - 3 - チアゾリジン酢酸、および 5 - [ [ 3 - ( 1 - フェニル - 2 - ヒドロキシ ) エトキシ ) - 4 - ( 2 - フェニルエトキシ ) ] フェニル ] メチレン ] - 4 - オキソ - 2 - チオキソ - 3 - チアゾリジン酢酸が挙げられる。

20

【0110】

特定の実施形態においては、少なくとも 1 つの内在性 P M T 遺伝子の機能または発現が低減、破壊または欠失される。例えば、特定の実施形態においては、P M T 1、P M T 2、P M T 3 および P M T 4 遺伝子からなる群から選択される少なくとも 1 つの内在性 P M T 遺伝子の機能または発現が低減、破壊または欠失され、あるいは該宿主細胞は 1 以上の P M T インヒビターの存在下で培養される。更に詳細な実施形態においては、該宿主細胞は 1 以上の P M T 遺伝子の欠失または破壊を含み、該宿主細胞は 1 以上の P m t p インヒビターの存在下で培養される。これらの実施形態の特定の態様においては、該宿主細胞は分泌性 - 1 , 2 - マンノシダーゼをも発現する。

30

【0111】

P M T 欠失もしくは破壊および / または P m t p インヒビターは、O - グリコシル化の占拠を低減することにより、すなわち、グリコシル化される糖タンパク質上の O - グリコシル化部位の総数を減少させることにより、O - グリコシル化を制御する。該細胞により分泌される - 1 , 2 - マンノシダーゼの更なる添加は、該糖タンパク質上に存在する O - グリカンのマンノース鎖長を減少させることにより、O - グリコシル化を制御する。したがって、P M T 欠失もしくは破壊および / または P m t p インヒビターを分泌性 - 1 , 2 - マンノシダーゼの発現と組合せることは、占拠および鎖長を減少させることにより O - グリコシル化を制御する。個々の状況においては、個々の異種糖タンパク質 ( 例えば、F a b および抗体 ) は種々の度合の効率で発現されゴルジ装置から輸送される可能性があり、したがって、P M T 欠失または破壊、P m t p インヒビターおよび - 1 , 2 - マンノシダーゼの特定の組合せを要しうるため、P M T 欠失または破壊、P m t p インヒビターおよび - 1 , 2 - マンノシダーゼの個々の組合せは実験的に決定される。もう 1 つの態様においては、1 以上の内在性マンノシルトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子が欠失される。この欠失は分泌性 - 1 , 2 - マンノシダーゼおよび / または P M T インヒビターの供与と組合せられることが可能であり、あるいは分泌性 - 1 , 2 - マンノシダーゼおよび / または P M T インヒビターの供与の代わりに行われうる。

40

【0112】

50

したがって、O-グリコシル化の制御は、より良好な通算収率または適切に構築された糖タンパク質の収率で、本明細書に開示されている宿主細胞において特定の糖タンパク質を製造するのに有用でありうる。O-グリコシル化の低減または排除は全抗体およびFabフラグメントの構築および輸送に有益な効果をもたらすらしい。なぜなら、それらは分泌経路を横断し、細胞表面へ輸送されるからである。したがって、O-グリコシル化が制御された細胞においては、適切に構築された抗体またはFabフラグメントの収率が、O-グリコシル化が制御されていない宿主細胞において得られる収率と比較して増加する。

#### 【0113】

-マンノシダーゼに耐性である、-結合マンノース残基を有するN-グリカンおよびO-グリカンの可能性を減少させ又は排除するために、-マンノシルトランスフェラーゼ遺伝子(例えば、BMT1、BMT2、BMT3およびBMT4)の1以上を欠失または破壊することにより、-マンノシダーゼ耐性N-グリカンを有する糖タンパク質を除去するために、組換え糖操作ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)宿主細胞を遺伝的に操作する(米国特許第7,465,577号および米国特許第7,713,719号を参照されたい)。また、BMT2とBMT1、BMT3およびBMT4の1以上との欠失または破壊は、宿主細胞タンパク質に対する抗体に対する検出可能な交差反応性を低減または排除する。

10

#### 【0114】

糖タンパク質の収率は、幾つの場合には、哺乳類またはヒトシャペロンタンパク質をコードする核酸分子を過剰発現させることにより、あるいは1以上の内在性シャペロンタンパク質をコードする遺伝子を、1以上の哺乳類またはヒトシャペロンタンパク質をコードする核酸分子で置換することにより改善されうる。また、宿主細胞における哺乳類またはヒトシャペロンタンパク質の発現も該細胞におけるO-グリコシル化を制御するらしい。したがって、シャペロンタンパク質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子の機能が低減または排除されており、該シャペロンタンパク質の哺乳類またはヒトホモログの少なくとも1つをコードするベクターが細胞内で発現される、本発明における宿主細胞が更に含まれる。また、該内在性宿主細胞シャペロンおよび該哺乳類またはヒトシャペロンタンパク質が発現される宿主細胞も含まれる。更に詳細な態様においては、下等真核宿主細胞は酵母または糸状菌宿主細胞である。組換えタンパク質の収率の改善およびO-グリコシル化の低減または制御のためにヒトシャペロンタンパク質が導入される、宿主細胞のシャペロンの使用的具体例は、公開国際出願番号WO 2009105357およびWO 2010019487(それらの開示を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されている。前記と同様に、該内在性シャペロンタンパク質の1以上をコードする遺伝子を、1以上の哺乳類またはヒトシャペロンタンパク質をコードする核酸分子で置換すること、あるいは前記のとおり1以上の哺乳類またはヒトシャペロンタンパク質を過剰発現させることに加えて、タンパク質O-マンノシルトランスフェラーゼ(PMT)タンパク質をコードする少なくとも1つの内在性遺伝子の機能または発現が低減、破壊または欠失されている、下等真核宿主細胞が更に含まれる。特定の実施形態においては、PMT1、PMT2、PMT3およびPMT4遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの内在性PMT遺伝子の機能が低減、破壊または欠失されている。

20

30

40

#### 【0115】

また、O-グリコシル化は、抗体またはFabフラグメントの、抗原に対するアフィニティおよび/またはアビディティに影響を及ぼしうる。抗体またはFabの製造のための最終的な宿主細胞が、該抗体の選択に使用された宿主細胞と同じでない場合に、これは特に重要でありうる。例えば、O-グリコシル化は、抗体またはFabフラグメントの、抗原に対するアフィニティを阻害し、したがって、該阻害が無ければ抗原に対する高いアフィニティを有しうる抗体またはFabフラグメントは特定されない可能性があるであろう。なぜなら、O-グリコシル化は、抗体またはFabフラグメントが抗原に結合する能力を阻害しうるからである。他の場合には、O-グリコシル化は、抗体またはFabフラグメントの、抗原に対するアビディティを阻害するため、抗原に対する高いアビディティを

50

有する抗体またはF a bフラグメントは特定されない可能性があるであろう。前記の2つの場合においては、該抗体またはF a bフラグメントを特定し選択するための宿主細胞が、別の細胞型のもの、例えば酵母または真菌細胞（例えば、ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*））であったため、哺乳類細胞系において産生された場合に特に有効でありうる抗体またはF a bフラグメントは特定されない可能性があるであろう。酵母におけるO - グリコシル化は哺乳類細胞におけるO - グリコシル化と有意に異なりうるということがよく知られている。これは、野生型酵母O - グリコシル化を哺乳類におけるムチン型またはジストログリカン型O - グリコシル化と比較した場合に特に顕著である。特定の場合には、O - グリコシル化は、抗原結合を妨げるのではなく、抗体またはF a bフラグメントの、抗原に対するアフィニティまたはアビディティを増強しうるであろう。この効果は、抗体またはF a bフラグメントを特定し選択するために使用される宿主細胞と製造用宿主細胞が異なることになる（例えば、特定および選択は酵母において行われ、該製造用宿主は哺乳類細胞である）場合には望ましくない。なぜなら、該製造用宿主においては、該O - グリコシル化は、もはや、該抗原に対するアフィニティまたはアビディティの増強を引き起こしたタイプのものではないからである。したがって、O - グリコシル化の制御は、特定の抗原に対する特異性を有する抗体またはF a bフラグメントを、該抗体またはF a bフラグメントの特定および選択が宿主細胞のO - グリコシル化系により影響されることなく、該抗体またはF a bフラグメントの該抗原に対するアフィニティまたはアビディティに基づいて特定し選択するための、本明細書における材料および方法の使用を可能にしうる。したがって、O - グリコシル化の制御は更に、哺乳類細胞系において最終的に産生された抗体またはF a bフラグメントを特定し選択するための、酵母または真菌宿主細胞の有用性を増大させる。

10

20

#### 【0116】

本明細書に記載されている方法および材料を、特定のN - グリカンまたはシアル酸化糖タンパク質を産生するように遺伝的に操作された他のピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）および酵母細胞系、例えば、特定のガラクトシル化またはシアル酸化形態を産生するように遺伝的に操作された前記の宿主生物および細胞系（これらに限定されるものではない）と共に利用する方法を当業者は更に認識し理解するであろう。例えば、US 2006 - 0286637（Production of Sialylated N - Glycans in Lower Eukaryotes）（その記載を、それが完全に記載されている場合と同様に本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。それにおいては、炭素源としてのガラクトースの取り込み及び利用のための経路が遺伝的に修飾されている。

30

#### 【0117】

また、本明細書における方法は、2, 6シアリルトランスフェラーゼ活性を有さないヒト様およびヒト糖タンパク質を産生するように操作された他の下等真核細胞系において前記の組換えFc含有ポリペプチドを製造するために使用されうる。該方法は、シアル酸化N - グリカンの産生が固有の特徴である真核細胞系において前記の組換えFc含有ポリペプチドを製造するためにも使用されうる。

40

#### 【0118】

該Fc含有ポリペプチド上の2, 3および2, 6結合シアル酸のレベルは、核磁気共鳴（NMR）、順相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、およびパルス化電流測定検出を伴う高速アニオン交換クロマトグラフィー（HPAEC - PAD）を含むよく知られた技術を用いて測定されうる。

#### 【0119】

Fc突然変異タンパク質の生物学的特性

多数のFc含有ポリペプチドに関しては、Fc RおよびC1q結合の低下により示される、エフェクター機能の欠如またはその有意な低下（Idusogieら、J. Immunology, 164（8）：4178 - 84（2000）およびShieldsら、J. Biol. Chem., 276：6591 - 6604（2001））、ならびに抗炎

50

症特性の増強は、望ましい特性であろう。本出願人は、I g GのF c領域内のアミノ酸243位および264位における特定の修飾が、末端グリカン位置におけるシアル酸化の存在には無関係に、エフェクター機能の欠如またはその有意な低下をもたらしうることを、本発明において見出した。特に、本出願人は、F c領域内の残基F243およびV264に対するアラニンへの修飾が、F c受容体およびC1qへの結合の低下を伴う抗体を与えることを見出した。これらのF c領域修飾を伴って産生された抗体は、それらが末端グリカンとして2,6結合シアル酸形態を有することが判明しているかどうかにかかわらず、F c受容体への結合の低下を示したことに注目すべきである。

#### 【0120】

したがって、本出願人は、前記の所望の特性を有するF c含有ポリペプチドを与える二重F c突然変異タンパク質F243A/V264Aを本発明において開発した。本明細書における実施例は、F c領域の243位および264位に突然変異を含むF c含有ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換宿主細胞を培養して、該F c含有ポリペプチドを得ることを含む。

10

#### 【0121】

##### F c含有ポリペプチドの製造

本発明のF c含有ポリペプチドは、F c領域を含むポリペプチドの製造に適した当技術分野で公知のいずれかの方法に従い製造されうる。1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドは、抗体または抗体フラグメント（限定的なものではないが、抗体のF c領域からなる又は実質的になるポリペプチドを含む）である。もう1つの実施形態においては、該F c含有ポリペプチドはイムノアドヘシンである。抗体および抗体フラグメントの製造方法は当技術分野でよく知られている。ポリペプチド内への点突然変異の導入方法、例えば部位特異的突然変異誘発も当技術分野でよく知られている。

20

#### 【0122】

本明細書に開示されている実施例においては、コンセンサスC<sub>H</sub>2配列を含有するI g G1重鎖および軽鎖ならびに本明細書に記載されているF c二重突然変異タンパク質は2つの異なる糖操作ピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）株において発現された。後記実施例に記載されているとおり、重鎖および軽鎖遺伝子配列はメタノール誘導プロモーター、A O X 1および組込まれたプレオマイシン（ゼオシン）選択マーカーの制御下にあった。この方法は相同DNA組換えにより発現カセット全体をT r p 2遺伝子座内に組込む。

30

#### 【0123】

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーおよびそれに続くS o u r c e 30 S カチオン交換精製工程により発酵ブロスから分泌抗体を捕捉した。精製された抗体をS D S - P A G E（図2）ならびにサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）および逆相H P L Cにより特徴づけして、適切な構築を評価した。図2から分かるとおり、本明細書における材料および方法により製造された抗体は、哺乳類細胞（C H O）において製造されたH e r 2抗体に関するものに類似した、S D S - P A G E上の純度プロファイルを有していた。S E Cおよび逆相H P L CによるI g G分析は、F c突然変異タンパク質糖操作株から製造された抗体が適切に構築されており、哺乳類細胞において製造された抗体に構築の点で類似していることを更に実証した（データ非表示）。本明細書における材料および方法により製造された種々の抗体に対する抗原アフィニティを、S K - B R 3細胞系（これは、この場合は、H e r 2過剰発現ヒト乳癌系であった）を使用する、細胞に基づくアッセイにより測定した。予想どおり、該F c突然変異タンパク質を含む該抗体の全てはS K - B R 3細胞系に同等に良好に結合した（図3）。

40

#### 【0124】

##### F c突然変異タンパク質のN - グリカン分析

ある抗体を含む多数の糖タンパク質に関しては、I g G F c領域の末端N結合グリカンのシアル酸化は、治療活性をもたらす適正なコンホメーションを有する糖タンパク質および抗体の産生に必須である。例えば、末端シアル酸化がI V I G調製物の抗炎症活性と

50

相関されている、Anthonyら、Science, 320:373-376(2008)を参照されたい。シアル酸化は最後から2番目のガラクトースの存在を要し、それに対してシアリルトランスフェラーゼが作用してシアル酸化グリカンを形成する。したがって、1以上の末端ガラクトースグリコフォームを欠く糖タンパク質は、抗炎症活性を伴う2,6結合シアル酸組成を有する抗体を産生し得ない。

#### 【0125】

典型的に、哺乳類細胞培養(例えば、CHO細胞)において製造された抗体は、G0F(37%)、G1F(43%)、G2F(9%)、G0(4%)、G1(3%)およびMan5(3%)を含むグリコフォーム組成を有し、これは、シアル酸の転移のための基質として作用する末端ガラクトースをほとんど又は全く有さない。CHO細胞製造の場合、産生される末端グリカンは2,3結合形態であり、CHO細胞は、抗炎症活性に関連づけられているシアル酸の2,6結合形態を産生するのに必要な2,6シアリルトランスフェラーゼを発現しない。しかし、CHOにおける特定の2,6シアリルトランスフェラーゼの過剰発現は2,3結合および2,6結合シアル酸の混合物を与えうる(Bragonziaら、BBA 1474:273-282(2000); Biochem. Biophys. Res. Comm. 289:243-249(2001))。糖操作ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)GF15.0株は高レベルのガラクトシル化非抗体タンパク質、例えばエリスロポエチンを産生することが可能であり(Hamiltonら、Science, 313:1441-1443(2006))、2,6結合シアル酸化形態を形成するための作用対象となりうる相対的に低い量の末端ガラクトースを含有する抗体を産生する(図4)。そのようなピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)株において産生された抗体は、典型的に、グリコフォームG0(60%)、G1(17%)、G2(4%)およびMan5(8%)を含む組成を有する。G0(43.5%)、G1(20.8%)、G2(2.7%)、NANA Gal GlcNAc Man<sub>5</sub> GlcNAc<sub>2</sub>(5.5%)およびNANA Gal<sub>2</sub> GlcNAc<sub>2</sub> Man<sub>3</sub> GlcNAc<sub>2</sub>(4.9%)を含むグリカン組成を有する、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)GF16.0株において産生された抗体でさえも、相対的に低いレベルの2,6結合シアル酸化形態を有する。したがって、GF15.0および6.0株において産生された抗体は、同じ株において産生された非抗体タンパク質(例えば、エリスロポエチン)と比較して遥かに低いレベルのガラクトシル化およびシアル酸化を有する。

#### 【0126】

糖操作ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)GF15.0およびGF16.0株において本発明で製造されたHer2抗体および対応Fc突然変異抗体のN-グリカン組成を、ペプチド-N-グリコシダーゼFでの該抗体の遊離の後、マトリック支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析により分析した(図4~8)。Her2およびFc突然変異タンパク質抗体の遊離炭水化物組成をAllentech Prevail carbo(Allentech Associates, Deerfield IL)カラム上のHPLCにより定量した。

#### 【0127】

GF15.0株からのピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)Her2抗体のグリコフォームは二分岐G0、G1およびG2ならびに他の中性グリカンを含んでおり、G0が主要グリコフォームであった(図4)。このグリカン組成は、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)由来抗体がフコースを本来的に欠いている点を除き、CHO細胞において商業的に製造されたものと一致している。逆に、GF15.0において産生されたFc突然変異タンパク質抗体からのグリコフォームは非類似グリカン組成を有する。MALDI-TOF質量分析における最高ピークから分かるとおり、単一Fc突然変異タンパク質抗体(F243AまたはV264A)は、2,6シアリルトランスフェラーゼの基質として働きうるガラクトシル化N-グリカンにおける増加を示し(図5および6)、一方、Fc二重突然変異タンパク質抗体F243A/V264Aの

10

20

30

40

50

N - グリカン組成はより一層大きな増加を示し、全 N - グリカンの 80% 以上がグリコシル化されていた (図 7)。Fc 二重突然変異タンパク質抗体上に存在する G2 (ビ - ガラクトシル化 N - グリカン) は、本出願人が評価したあらゆる抗体で見られた G2 の最大比率に相当する。これらの同じ Fc 突然変異タンパク質抗体を GFI6.0 株において発現させた場合、2, 6 結合シアル酸が G1 (モノ - ガラクトシル化) または G2 (ビ - ガラクトシル化) N - グリカンに付加された。単一 Fc 突然変異タンパク質抗体の場合、G2 N - グリカンのほぼ全てがシアル酸化グリカンに変換されていた (データ非表示)。単一 Fc 突然変異体から産生された抗体は非常に高いレベルの 2, 6 結合シアル酸化を示したが (40 ~ 51%、表 3 を参照されたい)、該レベルは、Fc 二重突然変異タンパク質から産生された抗体の場合より低く (図 8 および表 3)、この場合、バイオリアクター発酵で 74% のシアル酸化が達成され、小規模発酵で 91% 以上のシアル酸化が達成された。

10

#### 【0128】

いずれの理論にも束縛されるものではないが、Fc オリゴ糖へのシアル酸転移は、Fc 単一突然変異タンパク質と比較して、Fc 二重突然変異タンパク質によりもたらされる、より開いた C<sub>H</sub>2 ドメインポケット立体配置により増強される、と本出願人は考えている。GFI6.0 株から産生されるシアル酸の 2, 6 形態は、ヒトにおいて産生されるものと同じ形態であり、CHO 細胞系において産生される抗体上に存在する 2, 3 結合シアル酸形態とは異なることにも注目されるべきである (Jassalら, Biochem. Biophys. Res. Comm. 289: 243 - 249, 2001)。

20

#### 【0129】

##### Fc 突然変異タンパク質の Fc 結合

ELISA に基づくアッセイを用いて、本出願人は、ピチア・パストリス (Pichia pastoris) Her 抗体、単一および二重 Fc 突然変異タンパク質抗体ならびに Her2 抗体への Fc ガンマ受容体 (Fc $\gamma$ R) 結合を比較した。実施例 11 および 15 に記載されている実験において示されているとおり、Fc 二重突然変異タンパク質は Fc $\gamma$ RI に対するアフィニティの低下を示した。Fc $\gamma$ RI は、抗体結合に際して免疫応答を刺激することが示されている受容体であるため、これらのデータは、二重突然変異タンパク質抗体がより低い免疫応答促進能を有することを示唆しているであろう。

30

#### 【0130】

Fc $\gamma$ RI より低い抗体アフィニティを有し、免疫応答を抑制することが示されている受容体である Fc $\gamma$ RIIb の場合、該二重 Fc 突然変異タンパク質は、低下したアフィニティで結合する。Fc $\gamma$ RIIa の場合も、該二重 Fc 突然変異タンパク質は、低下したアフィニティで結合するらしい。これらのデータは、Fc $\gamma$ RIIa および Fc $\gamma$ RIIb/c を介して免疫応答を抑制する能力が有意に低減または排除されるように該二重突然変異タンパク質抗体のコンホメーション構造が改変されていることを示唆している。

40

#### 【0131】

Fc $\gamma$ RIIIa - F158 および Fc $\gamma$ RIIIa - V158 は、免疫応答を刺激することが知られている受容体の多形であるが、Fc $\gamma$ RI より低い抗体アフィニティを有する。該 Fc 二重突然変異タンパク質は Fc $\gamma$ RIIIa - F158 に対してはアフィニティをほとんど有さないが、Fc $\gamma$ RIIIa - V158 に対しては幾らかのアフィニティを尚も保有する。総合すると、該二重 Fc 突然変異タンパク質は、マクロファージ、単球およびナチュラルキラー細胞のような免疫細胞を活性化しリクルートする傾向が、親抗体と比べて低いことを、これらのデータは示唆している。

40

#### 【0132】

##### Fc 突然変異タンパク質の C1q 結合

抗体 - C1q 結合は補体依存性細胞傷害に関する重要なパラメーターである。C1q への免疫グロブリン (IgG) 分子の結合活性 (アフィニティ) は、細胞に基づくアッセイ、例えば、本明細書中の実施例 13 に記載されているアッセイにより測定されうる。開示されているアッセイは任意の IgG 分子での使用に容易に適合化されうる、と当業者は認

50

識し理解するであろう。

【0133】

Fc突然変異タンパク質に対するADCC効果

FcRIIIa (CD16) 受容体は抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) をもたらしることが十分に確認されている (Daeronら, Ann. Rev. Immunol. 15: 203-234, 1997)。本出願人は、本明細書に記載されている二重Fc突然変異タンパク質から産生された抗体がFcRIIIa結合の低下を伴い (図9CおよびD; 表4および5)、したがって、FcRIIIa媒介性ADCCを引き起こす能力の低下を伴う可能性があることを見出した。

【0134】

実施例13は、B細胞喪失および蛍光放出ADCCを測定するためのインビトロアッセイを記載している。

【0135】

Fc突然変異タンパク質のバイオアベイラビリティ

バイオアベイラビリティは、活性部分が、それが薬物であるか代謝産物であるかには無関係に、ヒトの循環内に進入して作用部位に接近する度合および速度を意味する。薬物のバイオアベイラビリティは、薬物の物理化学的特性よりも剤形の特性に主に影響され、今度はこれがその吸収能を決定しうる。化学的同等性は、薬品が同一活性成分を同量で含有するが、他の不活性物は異なりうることを示唆する。同様に、生物学同等性は、2つの薬品が、同一患者に同一投与計画で投与された場合、循環および組織内で同等の薬物濃度を与えることを示唆する。逆に、同一でない2つの薬品は、同一患者に投与された場合、同一の治療効果 (および副作用) を与えるかもしれない。したがって、薬物のバイオアベイラビリティは、バイオアベイラビリティがたとえ異なる場合であっても、治療的同等性を達成する可能性がありうる点でのいずれかの同等性の決定に関連している。狭い治療係数 (すなわち、50%有効濃度に対する最小毒性濃度の比) を有する薬物の場合、バイオアベイラビリティの相違は治療的非同等性をもたらしうる。

【0136】

本出願人は、驚くべきことに、本明細書における材料および方法によりピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) において製造されたFc二重突然変異タンパク質抗体が、皮下注射された場合、公知の商業的方法によりCHO細胞において製造された比較されうる抗体より良好なバイオアベイラビリティ (吸収または曝露) を示すことを本発明において見出した。皮下用製剤は患者が自分で投与可能であるため、一般に、静脈内投与よりも皮下投与が好ましい。図12に示されているとおり、Fc二重突然変異タンパク質抗体で (実施例14に記載されているとおりに) 処理されたマウスからの血清濃度は、CHOにおいて製造された対応物の血清濃度と比較して約30%増加し、2,6結合シアル酸化形態の増加を欠くピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) において製造された抗体の場合より大きかった。

【0137】

シアル酸化のレベルの増加を伴うヒトグリコシル化抗体の製造

本明細書における知見の結果として、本出願人は、Asn297位のシアル酸化およびガラクトシル化の増加を伴う抗体をインビボで産生しうる株が作製されるように、抗体のFc領域の修飾により、2,6結合シアル酸の増加を伴う抗体の製造方法を開発した。いずれの理論にも束縛されるものではないが、抗体のAsn297位にN-グリカン上に存在する低レベルのガラクトースおよびシアル酸の欠如は、それぞれのグリコシルトランスフェラーゼの低い効率によるものではなく、むしろ、Fc領域の構造に固有の立体障害によるものである、と本出願人は提示している。Fc領域の構造は、抗体が分泌経路を通過する短時間の間にガラクトースおよびシアル酸の付加を妨げる、と本出願人は考えている。これまでの報告は、インビボで典型的に用いられるものより長いインキュベーション時間がガラクトシルトランスフェラーゼと共に用いられた場合、CD20 mAbの高レベルのガラクトシル化がインビトロで可能であったことを示唆している (Liら, Nat

10

20

30

40

50

. B i o t e c h n o l . 2 4 ( 2 ) : 2 1 0 - 2 1 5 ( 2 0 0 6 ) )。より少ない立体障害を伴って抗体が開いた立体配置で存在する場合、ガラクトース転移が生じると考えられた。二重突然変異(すなわち、二重Fc突然変異タンパク質)から生じる構造変化またはコンホメーション変化は永久的な開いたコンホメーションをもたらして、ガラクトースおよびシアル酸転移の著しい増強を可能にする。

【0138】

本明細書における本出願人の研究から、アミノ酸F243またはV264の個々の突然変異はIgG1分子のFc領域のガラクトシル化およびシアル酸の増強に同様の影響を及ぼしたようである。Lundr, J . I m m u n o l o g y 157(11):4963-4969(1996)は、Fc領域内の単一アミノ酸(Phe241、Phe243、Val264、Asp265またはTyr296)を変化させて12~42%のレベルのモノシアル酸化および4~31%のレベルのビスシアル酸化形態を得ることによる、CHO-K1細胞系において産生されたシアル酸化IgG3の中等度の増加を報告している。ここにおいて報告されているとおり、本明細書における材料および方法により製造された抗体は、特定の部位(F243またはV264)がアラニンに変化した場合に、シアル酸化における有意な増強を示した。更に、両方の部位が同時に突然変異した場合、91%を超える2,6-シアル酸化種のレベルが得られた(表3)。

10

【0139】

生物学的標的

後記実施例においては、商業的に入手可能な抗Her2および抗TNF抗体の配列に類似した配列を有するIgG1抗体を使用する本発明の材料および方法を本出願人は例示しているが、本発明は、開示されている抗体に限定されないことに注目すべきである。本明細書における材料および方法は、抗炎症活性の増強またはエフェクター機能の低下の特性が望ましい任意のFc含有ポリペプチドを製造するために使用されうる、と当業者は認識し理解するであろう。更に、本発明によりこのようにして製造されるFc含有ポリペプチドまたは抗体のタイプ(型)には何ら制限がないことに注目すべきである。該Fc含有ポリペプチドのFc領域はIgA、IgD、IgE、IgGまたはIgMからのものでありうる。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドのFc領域は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を含むIgGからのものである。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドのFc領域はIgG1からのものである。特定の実施形態においては、本明細書における材料および方法により製造される抗体または抗体フラグメントはヒト化抗体、キメラ抗体またはヒト抗体でありうる。

20

30

【0140】

幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、炎症に關与する生物学的標的に結合する。

【0141】

幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは炎症性サイトカインに結合する。幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択される分子に結合する: TNF-、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-23R、IL-25、IL-27、IL-33、CD2、CD4、CD11A、CD14、CD18、CD19、CD23、CD25、CD40、CD40L、CD20、CD52、CD64、CD80、CD147、CD200、CD200R、TSLP、TSLPR、PD-1、PDL1、CTLA4、VLA-4、VEGF、PCSK9、47-インテグリン、E-セレクトイン、Fact II、ICAM-3、ベータ2-インテグリン、IFN、C5、CBL、LCAT、CR3、MDL-1、GITR、ADDL、CGRP、TRKA、IGF1R、RANKL、GTC、Blysまたは前記分子のいずれかに対する受容体。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはTNF-に結合する。もう1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはHer

40

50

2に結合する。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはPCSK9に結合する。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはTNFRに結合する。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはLCATに結合する。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはTSLPに結合する。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはPD-1に結合する。もう一つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドはIL-23に結合する。

#### 【0142】

幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、自己免疫抗原、アレルゲン、MHC分子またはリーザス因子D抗原から選択される抗原に特異的である。例えば、WO2010/10910（これを参照により本明細書に組み入れることとする）の表1に挙げられている抗原を参照されたい。

10

#### 【0143】

抗炎症特性を増強させる又はエフェクター機能/細胞傷害性を低下させる方法

本発明はまた、炎症の治療に有用な親Fc含有ポリペプチド（例えば、炎症に關与する抗原に結合する抗体またはイムノアドヘシン）を選択し、該Fc含有ポリペプチドの243位および264位（該番号付けはKabataにおけるものと同様のEUIンデックスに準拠している）に突然変異を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドの抗炎症特性を増強する方法を含み、ここで、該Fc含有ポリペプチドは、該親Fc含有ポリペプチドと比較して増強した抗炎症活性を有する。一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243AおよびV264Aを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243YおよびV264Gを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異243TおよびV264Gを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Aを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Nを含む。もう一つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243VおよびV264Gを含む。一つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは、炎症に關与する抗原に結合する抗体、抗体フラグメントまたはイムノアドヘシンである。一つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは、炎症状態の治療のために既に市販されている又は開発中である抗体、抗体フラグメントまたはイムノアドヘシンである。もう一つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択される抗体である：ムロモナブ（Muronomab）-CD3（抗CD3受容体抗体）、アブキシマブ（Abciximab）（抗CD417E3抗体）、リツキシマブ（Rituximab）（抗CD20抗体）、ダクリズマブ（Dacalizumab）（抗CD25抗体）、バシリキシマブ（Basiliximab）（抗CD25抗体）、パリビズマブ（Palivizumab）（抗RSV（呼吸器性シンシチウムウイルス）抗体）、インフリキシマブ（Infliximab）（抗TNF抗体）、トラスツズマブ（Trastuzumab）（抗Her2抗体）、ゲムツズマブ オゾガマイシン（Gemtuzumab ozogamicin）（抗CD33抗体）、アレムツズマブ（Alemtuzumab）（抗CD52抗体）、イブリツモマブ チウキセテン（Ibritumomab tiuxeten）（抗CD20抗体）、アダリムマブ（Adalimumab）（抗TNF抗体）、オマリズマブ（Omalizumab）（抗IgE抗体）、トシツモマブ（Tositumomab）-<sup>131</sup>I（抗CD20抗体のヨウ素化誘導体）、エファリズマブ（Efalizumab）（抗CD11a抗体）、セツキシマブ（Cetuximab）（抗EGF受容体抗体）、ゴリムマブ（Golimumab）（抗TNF抗体）、ベバシズマブ（Bevacizumab）（抗VEGF-A抗体）、ナタリズマブ（Natalizumab）（抗4インテグリン）、エファリズマブ（Efalizumab）（抗CD11a）、セトリズマブ（Cetolizumab）（抗TNF抗体）、トシリズマブ（Tocilizumab）（抗IL-6R）、ウステンキヌマブ（Ustekinumab）（抗IL-12/23）

20

30

40

50

、アレムツズマブ (alemtuzumab) (抗CD52) およびナタリズマブ (natalizumab) (抗4インテグリン) ならびにそれらの変異体。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択されるFc融合タンパク質である：アルカリスト/リロナセプト (Arcalyst/rilonacept) (IL1R-Fc融合体)、オレニシア/アバタセプト (Orencia/abatacept) (CTLA-4-Fc融合体)、アメビベ/アレファセプト (Amevive/alefacept) (LFA-3-Fc融合体)、アナキンラ (Anakinra) - Fc融合体 (IL-1Ra-Fc融合タンパク質)、エタネルセプト (etanercept) (TNFR-Fc融合タンパク質)、FGF-21-Fc融合タンパク質、GLP-1-Fc融合タンパク質、RAGE-Fc融合タンパク質、ActRIIA-Fc融合タンパク質、ActRIIB-Fc融合タンパク質、グルカゴン-Fc融合タンパク質、オキシントモジュリン (oxyntomodulin) - Fc融合タンパク質、GM-CSF-Fc融合タンパク質、EPO-Fc融合タンパク質、インスリン-Fc融合タンパク質、プロインスリン-Fc融合タンパク質およびインスリン前駆体-Fc融合タンパク質ならびにそれらの類似体および変異体。

10

20

30

40

50

#### 【0144】

本発明はまた、親Fc含有ポリペプチドの243位および264位 (該番号付けはKababababにおけるものと同様のEUインデックスに準拠している) に突然変異を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドのエフェクター機能を低下させる方法を含み、ここで、該Fc含有ポリペプチドは、該親Fc含有ポリペプチドと比較して低下したエフェクター機能を有する。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243AおよびV264Aを含む。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは抗体またはその抗原結合性フラグメントである。1つの実施形態においては、該エフェクター機能はADCCである。もう1つの実施形態においては、該エフェクター機能はCDCである。

#### 【0145】

本発明はまた、炎症状態の治療に有用な親Fc含有ポリペプチド (例えば、炎症に關与する抗原に結合する抗体またはイムノアドヘシン) を選択し、該Fc含有ポリペプチドの243位および264位 (該番号付けはKabababにおけるものと同様のEUインデックスに準拠している) に突然変異を導入することを含む、Fc含有ポリペプチドの細胞傷害性を低下させる方法を含み、ここで、該Fc含有ポリペプチドは、該親Fc含有ポリペプチドと比較して低下した細胞傷害性を有する。

#### 【0146】

1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは天然Fc領域を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは突然変異F243A突然変異を含む。もう1つの実施形態においては、該親Fc含有ポリペプチドは突然変異V264A突然変異を含む。

#### 【0147】

##### 治療方法

本発明はまた、炎症状態の治療を要する対象における炎症状態の治療方法を含み、該方法は、243位および264位 (該番号付けはKabababにおけるものと同様のEUインデックスに準拠している) に突然変異を含むFc含有ポリペプチドの治療的有効量を該対象に投与することを含む。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243AおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243YおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243TおよびV264Gを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Aを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243LおよびV264Nを含む。もう1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは突然変異F243VおよびV264Gを含む。本発明のFc含有ポリペプチドは任意の経路によ

り投与されうる。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは非経口投与される。1つの実施形態においては、該Fc含有ポリペプチドは皮下投与される。

【0148】

1つの実施形態においては、該炎症状態は望ましくない炎症免疫反応である。

【0149】

1つの実施形態においては、該炎症状態は自己免疫疾患である。1つの実施形態においては、該炎症状態は多発性硬化症である。1つの実施形態においては、該炎症状態は全身性エリテマトーデスである。1つの実施形態においては、該炎症状態はI型糖尿病である。

【0150】

1つの実施形態においては、該炎症状態は、先天性ガンマグロブリン欠乏血症および低ガンマグロブリン血症、尋常性多様性免疫不全、重症複合性免疫不全またはウイスコット・アルドリッチ症候群を含む原発性免疫不全症候群である。

【0151】

1つの実施形態においては、該炎症状態は、B細胞リンパ球性白血病、HIV感染または同種骨髄移植を含む続発性免疫不全症候群である。

【0152】

1つの実施形態においては、該炎症状態は特発性血小板減少性紫斑病である。

【0153】

1つの実施形態においては、該炎症状態は多発性骨髄腫である。

【0154】

1つの実施形態においては、該炎症状態はギラン - バレー症候群である。

【0155】

1つの実施形態においては、該炎症状態は川崎病である。

【0156】

1つの実施形態においては、該炎症状態は慢性脱髄性ニューロパチー（CIDP）である。

【0157】

1つの実施形態においては、該炎症状態は自己免疫性好中球減少症である。

【0158】

1つの実施形態においては、該炎症状態は溶血性貧血である。

【0159】

1つの実施形態においては、該炎症状態は抗因子VII自己免疫疾患である。

【0160】

1つの実施形態においては、該炎症状態は多巣性ニューロパチーである。

【0161】

1つの実施形態においては、該炎症状態は全身性脈管炎（ANCA陽性）である。

【0162】

1つの実施形態においては、該炎症状態は多発性筋炎である。

【0163】

1つの実施形態においては、該炎症状態は皮膚筋炎である。

【0164】

1つの実施形態においては、該炎症状態は抗リン脂質症候群である。

【0165】

1つの実施形態においては、該炎症状態は敗血症症候群である。

【0166】

1つの実施形態においては、該炎症状態は移植片対宿主疾患である。

【0167】

1つの実施形態においては、該炎症状態はアレルギーである。

【0168】

10

20

30

40

50

1つの実施形態においては、該炎症状態は抗リーザス因子D反応である。

【0169】

1つの実施形態においては、該炎症状態は心血管系の炎症状態である。本発明のFc含有ポリペプチドは、アテローム性動脈硬化症、アテローム血栓症、冠状動脈高血圧、急性冠状動脈症候群および心不全（これらの全ては炎症に関連している）を治療するために使用されうる。

【0170】

1つの実施形態においては、該炎症状態は中枢神経系の炎症状態である。もう1つの実施形態においては、該炎症状態は末梢神経系の炎症状態である。例えば、本発明のFc含有ポリペプチドは、例えばアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（別名ALS、ルー・ゲーリック病）、虚血性脳損傷、プリオン病およびHIV関連痴呆の治療に使用されうる。

10

【0171】

1つの実施形態においては、該炎症状態は胃腸管の炎症状態である。例えば、本発明のFc含有ポリペプチドは、炎症性腸障害、例えばクローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病および過敏性腸症候群を治療するために使用されうる。

【0172】

1つの実施形態においては、該炎症状態は乾癬、アトピー性皮膚炎、関節炎、例えば慢性関節リウマチ、変形性関節症および乾癬性関節炎である。

【0173】

1つの実施形態においては、該炎症状態はステロイド依存性アトピー性皮膚炎である。

20

【0174】

1つの実施形態においては、該炎症状態は悪液質である。

【0175】

本発明のFc含有ポリペプチドを使用して治療されうる炎症障害の例には以下のものも含まれる：尋常性ざ瘡、喘息、自己免疫疾患、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、骨盤内炎症性疾患、再灌流損傷、サルコイドーシス、移植拒絶、脈管炎、間質性膀胱炎およびミオパチー。

【0176】

1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは1～100ミリグラム/kg体重の用量で投与される。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは0.001～10ミリグラム/kg体重の用量で投与される。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは0.001～0.1ミリグラム/kg体重の用量で投与される。1つの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは0.001～0.01ミリグラム/kg体重の用量で投与される。

30

【0177】

医薬製剤

本発明はまた、本発明のFc含有ポリペプチドと医薬上許容される担体とを含む医薬製剤を含む。

【0178】

1つの実施形態においては、本発明は、Fc含有ポリペプチドを含む医薬組成物に関するものであり、ここで、該Fc含有ポリペプチド上のN-グリカンの少なくとも70%は、 $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ からなる群から選択されるオリゴ糖構造を含み、該Fc含有ポリペプチドは該Fc領域のアミノ酸位置243位および264位（該番号付けはKabataにおけるものと同様のEインデックスに準拠している）に突然変異を含む。1つの実施形態においては、該突然変異はF243AおよびV264Aである。1つの実施形態においては、該N-グリカンの少なくとも47モル%が構造 $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ を有する。1つの実施形態においては、該シアル酸化N-グリカンはにおけるシアル酸残基は-2,6結合により結合している。1つの実施形態においては、該シアル酸化N

40

50

- グリカンにおけるシアル酸残基は - 2 , 6 結合により結合しており、検出可能なレベルの - 2 , 3 結合シアル酸は存在しない。1つの実施形態においては、該シアル酸化 N - グリカンは N - グリコリルノイラミン酸 ( N G N A ) を含まない。

【 0 1 7 9 】

本明細書中で用いる「医薬上許容される」なる語は、動物、より詳しくはヒトにおける使用に関して連邦もしくは州政府の規制機関により承認されている又は米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に収載されている、有効成分の生物活性の有効性を妨げない無毒性物質に関するものである。「担体」なる語は、治療用物質と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを意味し、水および油のような無菌液を包含するが、これらに限定されるものではない。該担体の特性は投与経路に左右される。

10

【 0 1 8 0 】

治療用物質および診断用物質の医薬製剤は、例えば凍結乾燥粉末、スラリー、水性溶液または懸濁液の形態で、許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより製造されうる(例えば、Hardmanら(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, WilliamsおよびWilkins, New York, NY; Avisら(編)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; WeinerおよびKotkoskie(2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NYを参照されたい)。

20

【 0 1 8 1 】

投与方法は様々でありうる。適当な投与経路には、経口、直腸、経粘膜、腸、非経口；筋肉内、皮下、皮内、脊髄内、鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、眼内、吸入、通気、局所、皮膚、経皮または動脈内が含まれる。

30

【 0 1 8 2 】

ある実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、侵襲的経路、例えば注射(前記を参照されたい)により投与されうる。本発明の幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドまたはその医薬組成物は静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、関節内(例えば、関節炎関節)、腫瘍内に、または吸入、エアゾール運搬により投与される。非侵襲的経路(例えば経口、例えば丸剤、カプセル剤または錠剤によるもの)による投与も本発明の範囲内である。

【 0 1 8 3 】

ある実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、侵襲的経路、例えば注射(前記を参照されたい)により投与されうる。本発明の幾つかの実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドまたはその医薬組成物は静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、関節内(例えば、関節炎関節)、腫瘍内に、または吸入、エアゾール運搬により投与される。非侵襲的経路(例えば経口、例えば丸剤、カプセル剤または錠剤によるもの)による投与も本発明の範囲内である。

40

【 0 1 8 4 】

組成物は、当技術分野で公知の医学的装置を使用して投与されうる。例えば、本発明の医薬組成物は、例えば予め充填されたシリンジまたは自動注射装置を含む皮下針を使用する注射により投与されうる。

【 0 1 8 5 】

50

本発明の医薬組成物はまた、無針皮下注射装置、例えば、米国特許第6,620,135号、第6,096,002号、第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号または第4,596,556号に開示されている装置を使用して投与されうる。

【0186】

本発明の医薬組成物はまた、注入により投与されうる。医薬組成物を投与する良く知られたインプラントおよびモジュール形態の例には以下のものが含まれる：米国特許第4,487,603号に開示されている、制御された速度で薬物を投薬するための移植可能な微量注入ポンプ；米国特許第4,447,233号に開示されている、正確な注入速度で薬物を運搬するための薬物注入ポンプ；米国特許第4,447,224号に開示されている、連続的薬物運搬のための種々の流動移植可能注入装置；米国特許第4,439,196号に開示されている、多室コンパートメントを有する浸透薬物運搬系。多数の他のそのようなインプラント、運搬系およびモジュールは当業者に良く知られている。

10

【0187】

あるいは、全身的ではなく局所的に、例えば、多くの場合にはデポ剤または徐放製剤で、関節炎関節内に直接的に該抗体を注射することにより、該抗体を投与することが可能である。更に、例えば、免疫病理により特徴づけられる病原体誘発病変または関節炎関節を標的化する標的化薬物運搬系で、例えば、組織特異的抗体で被覆されたりリポソームで、該抗体を投与することが可能である。該リポソームは罹患組織に標的化され、罹患組織により、選択的に取り込まれる。

20

【0188】

投与計画は、該治療用抗体の血清または組織代謝回転速度、症状の程度、該治療用抗体の免疫原性、および生物学的マトリックスにおける標的細胞の利用可能性を含む幾つかの要因に左右される。好ましくは、投与計画は、標的病態における改善をもたらすと同時に望ましくない副作用を最小にするのに十分な治療用抗体を運搬する。したがって、運搬される生物学的物質の量は、1つには、個々の治療用抗体、および治療される状態の重症度に左右される。治療用抗体の適当な用量を選択する際の指針が利用可能である（例えば、Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (編) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (編) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert̄s, (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 601 - 608; Milgrom̄s, (1999) *New Engl. J. Med.* 341: 1966 - 1973; Slamon̄s (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783 - 792; Beniaminovi t̄z̄s (2000) *New Engl. J. Med.* 342: 613 - 619; Ghos h̄s (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 24 - 32; Lipskȳs (2000) *New Engl. J. Med.* 343: 1594 - 1602を参照されたい)。

30

40

【0189】

適当な用量の決定は、例えば、治療に影響を及ぼすことが当技術分野において知られている又は疑われているパラメータまたは因子を用いて、臨床家により行われる。一般に、投与は、最適用量より幾分少ない量から開始し、ついで、いずれかの負の副作用との比較において所望の又は最適な効果が得られるまで、小さな増加量でそれを増加させる。重要な診断尺度には、例えば炎症の症状の尺度、または産生される炎症性サイトカインのレベルが含まれる。好ましくは、使用される生物学的物質は、治療の標的となる動物と同じ種から誘導され、それにより、該物質に対する免疫応答を最小に抑える。ヒト対象の場合、

50

例えば、キメラ、ヒト化および完全ヒトFc含有ポリペプチドが好ましい。

【0190】

Fc含有ポリペプチドは、連続的注入により、または例えば毎日、週1~7回、毎週、隔週、毎月、隔月、年4回、年2回、毎年などで投与される複数の用量により供与される。用量は、例えば静脈内、皮下、局所、経口、鼻腔内、直腸内、筋肉内、大脳内、髄腔内に、または吸入により投与されうる。毎週の合計用量は、一般には少なくとも0.05 μg/kg体重、より一般には少なくとも0.2 μg/kg、0.5 μg/kg、1 μg/kg、10 μg/kg、100 μg/kg、0.25 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/ml、10 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kgまたはそれ以上である(例えば、Yangら、New Engl. J. Med. 349:427-434 (2003); Heroldら、New Engl. J. Med. 346:1692-1698 (2002); Liuら、J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456 (1999); Portieljiら、Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144 (2003)を参照されたい)。他の実施形態においては、本発明のFc含有ポリペプチドは、毎週、隔週、「4週ごとに」、毎月、隔月または年4回、10、20、50、80、100、200、500、1000または2500 mg/対象で、皮下または静脈内投与される。

10

【0191】

本明細書中で用いる「治療的有効量」、「治療的有効用量」および「有効量」なる語は、単独で又は追加的な治療用物質と共に細胞、組織または対象に投与された場合に、疾患もしくは状態の症状の1以上またはそのような疾患もしくは状態の進行における測定可能な改善を引き起こすのに有効である、本発明のFc含有ポリペプチドの量を意味する。治療的有効量は更に、症状の少なくとも部分的な改善、例えば、関連医学的状态の治療、治癒、予防もしくは改善、またはそのような状態の治療、治癒、予防もしくは改善の率における増加をもたらすのに十分なFc含有ポリペプチドの量を意味する。治療的有効量は、単独で投与される個々の有効成分に適用される場合には、その成分のみに関するものである。治療的有効量は、組合せ体に適用される場合には、連続投与または同時投与のいずれで組合せ投与されるかにかかわらず、治療効果をもたらす、有効成分の組合せられた量を意味する。治療用物質の有効量は、少なくとも10%、通常は少なくとも20%、好ましくは少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%の、診断尺度またはパラメータの改善をもたらす。有効量はまた、疾患の重症度を評価するために主観的尺度が用いられる場合には、主観的尺度における改善をもたらす。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0192】

【図1】図1はF243AおよびV264A二重突然変異タンパク質発現プラスミドpGLY3483を図示する。重鎖および軽鎖は共にメタノール誘導性プロモーターAOX1の制御下であった。PpTrp2遺伝子は、該カセット全体を組み込むために適用された遺伝子座であった。重鎖上の突然変異を除き、発現プラスミド構造は野生型(親)、単一F243A突然変異タンパク質、単一V264A突然変異タンパク質および該二重突然変異タンパク質発現プラスミドと同一であった。

40

【図2】図2は、本明細書における材料および方法により産生された非還元(NR)および還元(R)抗体を特徴づけるSDS-PAGE分析からのゲルを示す。レーン1は抗Her2モノクローナル抗体Her2を含有し、レーン2は単一Fc突然変異タンパク質F243Aを含有し、レーン3は単一Fc突然変異タンパク質V264Aを含有し、レーン4は二重Fc突然変異タンパク質F243A/V264Aを含有する。

【図3】図3は、Her2過剰発現ヒト乳癌系であるSK-BR3細胞系を使用する細胞に基づくアッセイにより測定した場合の、本明細書における材料および方法により産生された種々の抗体に対する抗原アフィニティを示す。- Her2; - F243A/V264A GS6.0グリコシル化; - GS6.0グリコシル化を伴うF243A; -

50

G S 6 . 0 グリコシル化を伴う V 2 6 4 A ; - 対照 I g G : x - G F I 5 . 0 グリコシル化を伴って産生されたピチア・パストリス ( P i c h i a p a s t o r i s ) H e r 2 。

【図 4】図 4 は、G F I 5 . 0 株 Y D X 4 7 7 において産生されたピチア・パストリス ( P i c h i a p a s t o r i s ) H e r 2 抗体の N - グリカンの M A L D I - T O F M S 分析を示す。ピークは M a n <sub>5</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 2 6 1 . 2 4 ( G S 2 . 0 )、G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 3 4 3 . 5 0 ( G 0 ) ( 優 勢 )、G a l G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 5 0 5 . 9 7 ( G 1 ) および G a l <sub>2</sub> G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 6 6 8 . 4 7 ( G 2 ) である。

【図 5】図 5 は、G F I 5 . 0 株 Y D X 5 5 1 において産生された単一 F c 突然変異タンパク質 F 2 4 3 A 抗体の N - グリカンの M A L D I - T O F M S 分析を示す。ピークは M a n <sub>5</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 2 6 1 . 0 5、G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 3 4 3 . 7 1、G a l G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 5 0 6 . 6 2 および G a l <sub>2</sub> G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 6 6 8 . 4 7 ( 優 勢 ) である。

【図 6】図 6 は、G F I 5 . 0 株 Y D X 5 5 1 において産生された単一 F c 突然変異タンパク質 V 2 6 4 A 抗体の N - グリカンの M A L D I - T O F M S 分析を示す。ピークは M a n <sub>5</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 2 6 1 . 9 8、G a l G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 5 0 5 . 4 5 および G a l <sub>2</sub> G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 6 6 8 . 8 5 ( 優 勢 ) である。

【図 7】図 7 は、G F I 5 . 0 株 Y D X 5 5 7 において産生された二重 F c 突然変異タンパク質 F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 抗体の N - グリカンの M A L D I - T O F M S 分析を示す。主要ピークは G a l <sub>2</sub> G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> , 1 6 6 8 . 3 9 ( 優 勢 ) に対応する。

【図 8】図 8 は、G F I 6 . 0 株 Y G L Y 4 5 6 3 において産生された二重 F c 突然変異タンパク質 F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 抗体の N - グリカンの M A L D I - T O F M S 分析を示す。2 2 2 4 . 2 8 および 2 2 4 5 . 8 3 ( 優 勢 ) における二重ピークはそれぞれ N A N A G a l <sub>2</sub> G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> および N A N A <sub>2</sub> G a l <sub>2</sub> G l c N A c <sub>2</sub> M a n <sub>3</sub> G l c N A c <sub>2</sub> に対応する。

【図 9 A】図 9 A ~ 9 D は、実施例 1 1 に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対する F c R 結合を図示する：F c R I I I a L F ( 図 9 A )、F c R I ( 図 9 B )、F c R I I b / c ( 図 9 C ) および F c R I I I a L V ( 図 9 D )。図 9 A ~ 9 D に関しては、- H e r 2 ; - G F I 6 . 0 において産生された F 2 4 3 A ; - G F I 6 . 0 において産生された V 2 6 4 A ; - G F I 6 . 0 において産生された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A ; - G F I 6 . 0 において産生され P N G アーゼで処理された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 。

【図 9 B】図 9 A ~ 9 D は、実施例 1 1 に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対する F c R 結合を図示する：F c R I I I a L F ( 図 9 A )、F c R I ( 図 9 B )、F c R I I b / c ( 図 9 C ) および F c R I I I a L V ( 図 9 D )。図 9 A ~ 9 D に関しては、- H e r 2 ; - G F I 6 . 0 において産生された F 2 4 3 A ; - G F I 6 . 0 において産生された V 2 6 4 A ; - G F I 6 . 0 において産生された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A ; - G F I 6 . 0 において産生され P N G アーゼで処理された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 。

【図 9 C】図 9 A ~ 9 D は、実施例 1 1 に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対する F c R 結合を図示する：F c R I I I a L F ( 図 9 A )、F c R I ( 図 9 B )、F c R I I b / c ( 図 9 C ) および F c R I I I a L V ( 図 9 D )。図 9 A ~ 9 D に関しては、- H e r 2 ; - G F I 6 . 0 において産生された F 2 4 3 A ; - G F I 6 . 0 において産生された V 2 6 4 A ; - G F I 6 . 0 において産生された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A ; - G F I 6 . 0 において産生され P N G アーゼで処理された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 。

【図 9 D】図 9 A ~ 9 D は、実施例 1 1 に記載されている材料および方法により産生され

10

20

30

40

50

た種々の抗体に対するFcR結合を図示する：FcRIIIaLF（図9A）、FcRI（図9B）、FcRIIb/c（図9C）およびFcRIIIaLV（図9D）。図9A～9Dに関しては、-Her2；-GFI6.0において産生されたF243A；-GFI6.0において産生されたV264A；-GFI6.0において産生されたF243A/V264A；-GFI6.0において産生されPNGアーゼで処理されたF243A/V264A。

【図10】図10は、実施例12に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するC1q結合を図示する。-抗CD20抗体、陽性対照；-Her2；-GS6.0グリコシル化を伴って産生されたF243A；-GS6.0グリコシル化を伴って産生されたV264A；-GS6.0グリコシル化を伴って産生されたF243A/V264A；-GS6.0グリコシル化およびPNGアーゼを伴うF243A/V264A。

【図11】図11は、実施例13に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。-Her2；-GS6.0グリコシル化を伴って産生されたF243A；-GS6.0グリコシル化を伴って産生されたV264A；-GS6.0グリコシル化を伴って産生されたF243A/V264A；-抗体の非存在下で殺傷するNK細胞；x-GFI2.0において産生されたHer2。

【図12】図12は、実施例14に記載されているとおり、-Her2；x-GFI5.0において産生されたHer2；-GFI6.0において産生されたF243A/V264Aが注射されたマウスに関する経時的な血清モノクローナル抗体濃度を図示する。

【図13A】図13A～13Eは、実施例15に記載されている種々の抗体に対するFcR結合を図示する。

【図13B】図13A～13Eは、実施例15に記載されている種々の抗体に対するFcR結合を図示する。

【図13C】図13A～13Eは、実施例15に記載されている種々の抗体に対するFcR結合を図示する。

【図13D】図13A～13Eは、実施例15に記載されている種々の抗体に対するFcR結合を図示する。

【図13E】図13A～13Eは、実施例15に記載されている種々の抗体に対するFcR結合を図示する。

【図14A】図14は、実施例16に記載されている材料および方法により製造された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。図14Aおよび14Bにおける結果は、ヘテロ接合性F/Vエフェクター細胞を使用した実験からのものである。

【図14B】図14は、実施例16に記載されている材料および方法により製造された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。図14Aおよび14Bにおける結果は、ヘテロ接合性F/Vエフェクター細胞を使用した実験からのものである。

【図14C】図14は、実施例16に記載されている材料および方法により製造された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。図14Cおよび14Dにおける結果は、F/Fエフェクター細胞を使用した実験からのものである。

【図14D】図14は、実施例16に記載されている材料および方法により製造された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。図14Cおよび14Dにおける結果は、F/Fエフェクター細胞を使用した実験からのものである。

【図14E】図14は、実施例16に記載されている材料および方法により製造された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。図14Eからの結果は、V/Vエフェクター細胞を使用した実験からのものである。

【図15】図15は、実施例17に記載されている単一突然変異体のそれぞれの推定相対的参照曲線と比較した場合の抗Her2Fc二重突然変異体のADCC活性を図示する。

【図16A】図16は、実施例18に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。

10

20

30

40

50

【図16B】図16は、実施例18に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。

【図16C】図16は、実施例18に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。

【図16D】図16は、実施例18に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するADCC応答を図示する。

【図17】図17は、実施例19に記載されている材料および方法により産生された種々の抗体に対するCDC応答を図示する。

【図18A】図18は、実施例20に記載されているAIAモデルにおける本発明のFc突然変異タンパク質の効果を図示する。

【図18B】図18は、実施例20に記載されているAIAモデルにおける本発明のFc突然変異タンパク質の効果を図示する。

【図19A】図19は、実施例21に記載されているAIAモデルにおける本発明のFc突然変異タンパク質の効果を図示する。

【図19B】図19は、実施例21に記載されているAIAモデルにおける本発明のFc突然変異タンパク質の効果を図示する。

【図20-1】図20は、実施例22に記載されている抗TNF抗体に対するFcR結合を図示する。

【図20-2】図20は、実施例22に記載されている抗TNF抗体に対するFcR結合を図示する。

【図21A】図21は、実施例23に記載されている抗TNF抗体に対するFcR結合を図示する。

【図21B】図21は、実施例23に記載されている抗TNF抗体に対するFcR結合を図示する。

【図22】図22は、実施例24に記載されているAIAモデルにおける本発明のFc突然変異タンパク質の効果を図示する。実施例1株および試薬大腸菌(*Escherichia coli*)株TOP10またはDH5(*Invitrogen, CA*)を組換えDNA研究に使用した。制限エンドヌクレアーゼ、DNA修飾酵素およびPNGアゼFをNew England Biolabs, Ipswich, MAから入手した。オリゴヌクレオチドをIntegrated DNA Technologies, Coralville, IAから取り寄せた。

【0193】

実施例2

抗Her2 IgG1 Fc突然変異タンパク質およびピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)組換え発現ベクターの構築

ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)におけるHer2 IgG1モノクローナル抗体の単一および二重Fc突然変異タンパク質の製造を、後記に挙げる配列およびプロトコルを用いて行った。

【0194】

A. 重鎖および軽鎖

Her2モノクローナルIgG1抗体の製造に使用した重鎖および軽鎖配列(それぞれ、配列番号1および2)は後記に記載されている。重鎖抗Her2二重突然変異タンパク質抗体のアミノ酸配列は配列番号9に示されている。該重鎖および軽鎖はピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)コドン使用頻度に従い最適化され、Gene Art AG(*Josef-Engert-Str. 11, D-93053 Regensburg, Germany*)により合成され、pUC19内にクローニングされた。

【0195】

フォワードおよびリバースプライマーとしてそれぞれFcF243A-F(配列番号3)およびFcF243A-R(配列番号4)を使用し、QuickChange(登録商標)Site-Directed Mutagenesis Kit(*Stratagen*)

10

20

30

40

50

e, CA) を使用して、アミノ酸位置 F 2 4 3 におけるアラニン F c 突然変異を行った。同様に、フォワードおよびリバースプライマーとしてそれぞれ V 2 5 4 A - F (配列番号 5) および V 2 6 4 A - R (配列番号 6) を使用して、アミノ酸位置 V 2 6 4 における突然変異を行った。該単一突然変異タンパク質プラスミドのそれぞれからの F 2 4 3 A 部位と V 2 6 4 A 部位との間の酵素消化およびそれに続く連結を用いて、二重突然変異を行った。

【 0 1 9 6 】

B . シグナル配列

- 接合因子プレドメインのシグナル配列を、PCR 融合により、軽鎖または重鎖の 5 ' 末端にインフレームで融合させた。該配列を前記のとおりにより最適化した。コザック配列 A A A C G をメチオニンの 5 ' 末端に付加し、クローニング目的のために E c o R I 部位を該コザック配列の前に付加した。D N A 配列 (配列番号 7) およびアミノ酸 (配列番号 8) の翻訳は後記に示されているとおりである。

10

【 0 1 9 7 】

C . I g G 1 および I g G 1 F c 突然変異タンパク質の発現のための組換えプラスミド

I g G 1 およびその突然変異タンパク質の融合シグナル配列を有する重鎖および軽鎖を、それぞれ、ピチア・パストリス ( *P i c h i a p a s t o r i s* ) A O X 1 プロモーター下およびサッカロミセス・セレビスエ ( *S . c e r e v i s i a e* ) C y c ターミネーターの前にクローニングした。その完成した重鎖および軽鎖の発現カセットを最終的な発現ベクターへと合体させた。ピチア・パストリス ( *P i c h i a p a s t o r i s* ) 内へのゲノム挿入を、S p e 1 での該ベクターの線状化および T r p 2 部位内への標的化組込みにより行った。

20

【 0 1 9 8 】

本明細書中で使用されているプラスミドの要約を以下の表 1 に示す。H e r 2 二重 F c 突然変異タンパク質のための最終的な発現プラスミドの図示を図 1 に示す。

【 0 1 9 9 】

【表 2】

表 1

プラスミド	説明
pGLY2336	アルファ MF プレシグナル配列およびコザック配列と共に WT 軽鎖を有する pCR2.1 topo
pGLY2337	アルファ MF プレシグナル配列およびコザック配列と共に WT 重鎖を有する pCR2.1 topo
pGLY2338	WT 軽鎖発現ベクター
pGLY2987	WT 重鎖発現ベクター
pGLY2988	重鎖と軽鎖との両方を有する WT IgG1 発現最終ベクター
pGLY3067	IgG1 重鎖 F243A 突然変異を有する pCR2.1 topo ベクター
pGLY3473	IgG1 重鎖 V264A 突然変異を有する pCR2.1 topo ベクター
pGLY3474	F243A 突然変異タンパク質発現ベクター
pGLY3475	V264A 突然変異タンパク質発現ベクター
pGLY3479	F243 および V264A 二重突然変異タンパク質発現ベクター
pGLY3481	1 コピーの軽鎖を有する pGLY3474 (BmHI/NotI) + pGLY2338 (BglII/NotI) F243A 突然変異体
pGLY3482	1 コピーの軽鎖を有する pGLY3475 (BmHI/NotI) + pGLY2338 (BglII/NotI) V264A 突然変異体
pGLY3483	重鎖と軽鎖との両方を有する F243 および V264A 二重突然変異最終発現ベクター

## 実施例 3

抗 Her 2 およびその Fc 突然変異タンパク質を製造するための糖操作ピチア (Pichia) GF I 5 . 0 および GF I 6 . 0 宿主

2つの異なる糖操作ピチア (Pichia) 宿主、すなわち、GF I 5 . 0 および GF I 6 . 0 を、本発明において適用した。Gerngross, US 7, 029, 872 および Gerngross, US 7, 449, 308 に開示されている方法に従い、所望の N-グリコフォームを主要種として有する所望のポリペプチドを発現しうるように下等真核宿主細胞を遺伝的に操作するのに有用であるベクターを構築することが可能である。Hamiltonら, *Science*, 313: 1441 - 1443 (2006) および Hamilton US 2006/0286637 に記載されている方法に従い、NRRL 11430 (American Type Culture Collection (ATCC) P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) から GF I 5 . 0 および GF I 6 . 0 株を操作した。操作されたピチア・パストリス (Pichia pastoris) 株 GF I 5 . 0 は、末端ガラクトースを伴う二分岐 N-グリカン構造を有するタンパク質を産生しうる。本明細書において使用されている GF I 5 . 0 株 RDP 697 の遺伝子型は以下のとおりである: `ura5 :: ScSUC2 och1 :: lacZ bmt2 :: lacZ / KLMNN2 - 2 mnn4 L1 :: lacZ / MmSLC35A3 pno1 :: lacZ ADE1 :: lacZ / FB8 / NA10 / MmSLC35A3 his1 :: lacZ - URA5 - lacZ / XB33 / SpGALE / DmUGT arg1 :: HIS1 / KD53 / TC54`。操作されたピチア・パストリス (Pichia pastoris) 株 GF I 6 . 0 である YGLY3582 の遺伝子型は以下のとおりである: `ura5 :: ScSUC2 och1 :: lacZ, bmt2 :: lacZ / KLMNN2 - 2 mnn4 L1`

10

20

30

40

50

::lacZ/MmSLC35A3, pno1 mnn4 ::lacZ met16  
 ::lacZ, his1 ::lacZ/ScGAL10/XB33/DmUGT, arg1  
 ::HIS1/KD53/TC54, ADE1::lacZ/NA10/MmSLC35A3/FB8, PRO1::lacZ-URA5-lacZ/TrMDS1, TRP2:ARG1/MmCST/HsGNE/HsCSS/HsSPS/MmST6-33Y。GFI6.0株は、末端 2, 6 結合シアル酸がガラクトースに結合した二分岐N-グリカン構造を有するタンパク質を産生しうる。

#### 【0200】

遺伝子型を示すために用いられる略語は一般に公知であり、当業者に理解されており、以下の略語を含む。

ScSUC2: サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) インベルターゼ;

OCH1: アルファ-1, 6-マンノシルトランスフェラーゼ;

KLMNN2-2: クライベロミセス・ラクチス (*K. lactis*) UDP-GlcNAc 輸送体;

BMT1: ベータ-マンノース-転移 (ベータ-マンノース除去);

BMT2: ベータ-マンノース-転移 (ベータ-マンノース除去);

BMT3: ベータ-マンノース-転移 (ベータ-マンノース除去);

BMT4: ベータ-マンノース-転移 (ベータ-マンノース除去);

MNN4L1: MNN4 様1 (電荷除去);

MmSLC35A3: UDP-GlcNAc 輸送体のマウスホモログ;

PNO1: N-グリカンのホスホマンノシル化 (電荷除去);

MNN4: マンノシルトランスフェラーゼ (電荷除去);

ScGAL10: UDP-グルコース4-エピメラーゼ;

XB33: ScKRE2リーダに融合したトランケート化HsGalT1;

DmUGT: UDP-ガラクトース輸送体;

KD53: ScMNN2リーダに融合したトランケート化DmMNSII;

TC54: ScMNN2リーダに融合したトランケート化RnGNTII;

NA10: PpSEC12リーダに融合したトランケート化HsGNTI;

FB8: ScSEC12リーダに融合したトランケート化MmMNS1A;

TrMDS1: 分泌トリコデルマ・レーゼイ (*T. reesei*) MNS1;

ADE1: N-スクシニル-5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボチド (SAICAR) シンテターゼ;

MmCST: マウスCMP-シアル酸輸送体;

HsGNE: ヒトUDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼ;

HsCSS: ヒトCMP-シアル酸シンテターゼ;

HsSPS: ヒトN-アセチルノイラミナート-9-ホスファートシンテターゼ;

MmST6-33: ScKRE2リーダに融合したトランケート化マウスアルファ-2, 6-シアルルトランスフェラーゼ;

LmSTT3d: リーシュマニア・メジャー (*Leishmania major*) からのオリゴサッカリルトランスフェラーゼ触媒サブユニット。

#### 【0201】

##### 実施例4

##### 酵母の形質転換およびスクリーニング

糖操作GFI5.0およびGS6.0株を、YPDに富む培地 (酵母エキス1%、ペプトン2%および2%デキストロース) 内で増殖させ、対数増殖期に遠心分離により集め、氷冷1Mソルビトールで3回洗浄した。1~5µgのSpe1消化プラスミドをコンピレント酵母細胞と混合し、Bio-Rad Gene Pulser Xcell (商標) (Bio-Rad, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules

10

20

30

40

50

s, CA 94547) プリセット ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) エレクトロポレーションプログラムを使用してエレクトロポレーションした。24 時間の回収用豊富 (rich) 培地内で1時間の後、該細胞を、300  $\mu$ g/ml ゼオシンを含有する最少デキストロス培地 (1.34% YNB、0.0004% ビオチン、2% デキストロス、1.5% 寒天) 上でプレーティングし、該形質転換体が出現するまで24 時間でインキュベートした。

#### 【0202】

高力価株に関してスクリーニングするために、96個の形質転換体を緩衝化グリセロール複合培地 (BMGY) に接種し、72時間増殖させ、ついで緩衝化メタノール複合培地 (BMMY) 内で24時間の誘導を行った。以下のとおりにプロテインAビーズアッセイにより抗体の分泌を評価した。96ウェルプレート培養からの50マイクロリットルの上清を非結合性96ウェルアッセイプレート内で50mM Tris (pH 8.5) で1:1に希釈した。各96ウェルプレートに関して、2mlの磁性 BioMag Protein A 懸濁液ビーズ (Qiagen, Valencia, CA) を磁性ラック内に保持されたチューブ内に配置した。2~3分後、該ビーズが該チューブの側面に集められ、該バッファーをデカントした。該ビーズを、元の容量 (100mM Tris、150mM NaCl、pH 7.0) に等しい容量の洗浄バッファーで3回洗浄し、同じ洗浄バッファーに再懸濁させた。20  $\mu$ l のビーズを、希釈サンプルを含有するアッセイプレートの各ウェルに加えた。該プレートを覆い、穏やかにボルテックスし、ついで、15分ごとにボルテックスしながら室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、該ビーズが各ウェルの片側に集まるように誘導する磁性プレート上に該サンプルプレートを配置した。Biomek NX Liquid Handler (Beckman Coulter, Fullerton, CA) で、該プレートからの上清を廃棄物容器へと除去した。ついで該サンプルプレートを該磁石から取り出し、該ビーズを100  $\mu$ l の洗浄バッファーで洗浄した。該プレートを該磁石上に再び配置した後、該洗浄バッファーを吸引により除去した。20  $\mu$ l のローディングバッファー (25mM NEM (Pierce, Rockford, IL) を含有する Invitrogen E-PAGE ゲルローディングバッファー) を各ウェルに加え、該プレートを手短かにボルテックスした。Beckman Allegra 6 遠心機上の500rpmでの遠心分離の後、該サンプルを99で5分間インキュベートし、ついでE-PAGEハイスループット・プレキャストゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) 上で泳動させた。ゲルをゲル染色溶液 (0.5g クーマシー-G250 プリリアントブルー、40% MeOH、7.5% 酢酸) で覆い、電子レンジ内で35秒間加熱し、ついで室温で30分間インキュベートした。該ゲルを蒸留水中で一晩にわたって脱染した。高力価コロニーを、実施例5に詳細に記載されている更なる Sixfors 発酵スクリーニングのために選択した。IgG1 野生型 (親) およびFc突然変異タンパク質産生株の要約を以下の表2に示す。

#### 【0203】

10

20

30

【表 3】

表 2

株	遺伝子型	説明
YDX477	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3 pno1Δ::lacZ ADE1::lacZ/FB8/NA10/MmSLC35A3 his1::lacZ-URA5-lacZ/XB33/SpGALE/DmUGT arg1::HIS1/KD53/TC54</i>	WT IgG1を産生する GFI5.0株
YDX551	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3 pno1Δ::lacZ ADE1::lacZ/FB8/NA10/MmSLC35A3 his1::lacZ-URA5-lacZ/XB33/SpGALE/DmUGT arg1::HIS1/KD53/TC54</i>	抗Her2 Fc V264A突然変異タンパク質を産生する GFI5.0株
YDX552	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3 pno1Δ::lacZ ADE1::lacZ/FB8/NA10/MmSLC35A3 his1::lacZ-URA5-lacZ/XB33/SpGALE/DmUGT arg1::HIS1/KD53/TC54</i>	抗Her2 Fc F243A突然変異タンパク質を産生する GFI5.0株
YDX557	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3 pno1Δ::lacZ ADE1::lacZ/FB8/NA10/MmSLC35A3 his1::lacZ-URA5-</i>	抗Her2 Fc F243A, V264A 二重突然変異

10

20

	<i>lacZ/XB33/SpGALE/DmUGT arg1::HIS1/KD53/TC54</i>	タンパク質を産生する GFI5.0株
YGLY4570	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ, bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3, pno1Δmnn4Δ::lacZ met16Δ::lacZ, his1Δ::lacZ/ScGAL10/XB33/DmUGT, arg1Δ::HIS1/KD53/TC54, ADE1::lacZ/NA10/MmSLC35A3/FB8, PRO1::lacZ-URA5-lacZ/TrMDS1, TRP2:ARG1/MmCST/HsGNE/HsCSS/HsSPS/MmST6-33</i>	抗Her2 Fc V264A突然変異タンパク質を産生する GFI6.0株
YGLY4568	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ, bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3, pno1Δmnn4Δ::lacZ met16Δ::lacZ, his1Δ::lacZ/ScGAL10/XB33/DmUGT, arg1Δ::HIS1/KD53/TC54, ADE1::lacZ/NA10/MmSLC35A3/FB8, PRO1::lacZ-URA5-lacZ/TrMDS1, TRP2:ARG1/MmCST/HsGNE/HsCSS/HsSPS/MmST6-33</i>	抗Her2 Fc F243A突然変異タンパク質を産生する GFI6.0株
YGLY4563	<i>ura5Δ::ScSUC2 och1Δ::lacZ, bmt2Δ::lacZ/KIMNN2-2 mnn4L1Δ::lacZ/MmSLC35A3, pno1Δmnn4Δ::lacZ met16Δ::lacZ, his1Δ::lacZ/ScGAL10/XB33/DmUGT, arg1Δ::HIS1/KD53/TC54, ADE1::lacZ/NA10/MmSLC35A3/FB8, PRO1::lacZ-URA5-lacZ/TrMDS1, TRP2:ARG1/MmCST/HsGNE/HsCSS/HsSPS/MmST6-33</i>	抗Her2 F243A/V264A二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0株

30

40

## 実施例 5

バイオリクター (Sixfors) スクリーニング

バイオリクター発酵スクリーニングを、以下のとおりに記載されているとおりに行った。糖操作ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) のフェッドバッチ発

50

酵を0.5リットルのバイオリアクター (Sixfors マルチ・ファーマンテーション・システム (multi-fermentation system), ATR Biotech, Laurel, MD) 内で以下の条件下で行った: pH 6.5、24、300 ml 気流/分、および350 ml (330 mlのBMGY培地 [100 mM リン酸カリウム、10 g/l 酵母エキス、20 g/l ペプトン (BD, Franklin Lakes, NJ)、40 g/l グリセロール、18.2 g/l ソルビトール、13.4 g/l YNB (BD, Franklin Lakes, NJ)、4 mg/l ビオチン] および20 mlの接種物) の初期実施体積での550 rpmの初期攪拌速度。該発酵の1時間から10時間までの間に攪拌速度を550 rpmから1200 rpmへ直線的に増加させるために、IRIS マルチ・ファーマンター (multi-fermentor) ソフトウェア (ATR Biotech, Laurel, MD) を使用した。それにより、溶存酸素濃度が該発酵中に変動することを可能にした。初期グリセロール仕込み (40 g/l) が消費されるまで (典型的には18~24時間)、該発酵をバッチ形態で行った。17 mlのグリセロール供給溶液 (50% [w/w] グリセロール, 5 mg/l ビオチン, 12.5 ml/l PMT1塩 (65 g/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 20 g/l  $ZnCl_2$ , 9 g/l  $H_2SO_4$ , 6 g/l  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 5 g/l  $H_2SO_4$ , 3 g/l  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 500 mg/l  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 200 mg/l  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ , 200 mg/l ビオチン, 80 mg/l  $NaI$ , 20 mg/l  $H_3BO_4$ ) を該バイオリアクターに加えることにより、第2バッチ段階を開始した。加えたグリセロールが消費されるまで (典型的には6~8時間)、該発酵を再びバッチ形態で行った。溶存酸素の急上昇により示される、第2バッチ段階の完了の後、メタノール溶液 (100% [w/w] メタノール, 5 mg/l ビオチン および12.5 ml/l PMT1塩) を、0.6 g/時間で、典型的には回収前に36時間にわたって供給することにより、誘導段階を開始した。全容量を該リアクターから取り出し、SLC-6000ローターを備えたSorvall Evolution RC遠心機 (Thermo Scientific, Milford, MA) で8,500 rpmで30分間遠心分離した。細胞塊を廃棄し、上清を精製および分析のために保持した。グリカンの質をMALDI飛行時間型 (TOF) 質量分析および2-アミノベンジジン (2-AB) 標識 (Lira, Nat. Biotech. 24 (2): 210-215 (2006) に従って行う) により評価する。グリカンをPNGアーゼ-Fでの処理により該抗体から遊離させ、MALDI-TOFにより分析してグリカンの構造を確認した。存在する中性および荷電グリカンの相対量を定量するために、N-グリコシダーゼFにより遊離したグリカンを2-ABで標識し、HPLCにより分析した。

#### 【0204】

##### 実施例6

##### バイオリアクター培養

3 L (Applikon, Foster City, CA) および15 L (Applikon, Foster City, CA) ガラスバイオリアクターならびに40 L (Applikon, Foster City, CA) ステンレス鋼スチーム・イン・プレイス (steam in place) バイオリアクターにおいて発酵を行った。凍結ストックバイアルを1%の体積比で直接的にBMGY培地に接種することにより、シード培養を調製した。移した直後に細胞が指数関数的に増殖することが保証されるように、 $2.0 \pm 5$  の光学密度 ( $OD_{600}$ ) を得るためにシードフラスコを24で48時間インキュベートする。該培地は、1リットル当たり、40 g グリセロール、18.2 g ソルビトール、2.3 g  $K_2HPO_4$ , 11.9 g  $KH_2PO_4$ , 10 g 酵母エキス (BD, Franklin Lakes, NJ), 20 g ペプトン (BD, Franklin Lakes, NJ),  $4 \times 10^{-3}$  g ビオチンおよび13.4 g 酵母窒素ベース (BD, Franklin Lakes, NJ) を含有していた。該バイオリアクターに初期培地に対して10%の体積比のシードを接種する。以下の条件下、フェッドバッチ形態で培養を行った:  $24 \pm 0.5$  に設定された温度、 $NH_4OH$  で  $6.5 \pm 0.1$  に制御さ

10

20

30

40

50

れた pH、O<sub>2</sub> の添加の際の段階的 (cascading) 攪拌速度による 1.7 ± 0.1 mg/L に維持された溶存酸素。気流速度は 0.7 vvm に維持した。初期仕込みグリセロール (40 g/L) が消失した後、250 g/L の湿潤細胞重量に達するまで、12.5 mL/L の PTM1 塩を含有する 50% グリセロール溶液を、最大増殖速度の 50% で、8 時間にわたって指数関数的に供給した。0.01 時間<sup>-1</sup> の比増殖速度を維持するためにメタノールを指数関数的に供給して、30 分間の飢餓段階を行った後、誘導を開始した。150 mM/L/時間の酸素取り込み速度に達したら、酸素限界を避けるために、該メタノール供給速度を一定に維持した。

#### 【0205】

##### 実施例 7

##### 抗体の精製

分泌抗体の精製は、利用可能な公開されている方法、例えば、Liら, Nat. Biotech. 24 (2) : 210 - 215 (2006) の方法を用いて当業者により行われることが可能であり、この場合、抗体が発酵上清からプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーにより捕捉され、フェニルセファロス高速流動樹脂を使用する疎水性相互作用クロマトグラフィーにより更に精製される。

10

#### 【0206】

##### 実施例 8

##### グリカンの MALDI-TOF 分析

Choiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 : 5022 - 5027 (2003) および Hamiltonら, Science 301 : 1244 - 1246 (2003) に記載されているとおりに N-グリカンを分析した。糖タンパク質を還元し、カルボキシメチル化した後、ペプチド-N-グリコシダーゼ F での処理により N-グリカンを遊離させた。該タンパク質をエタノールで沈殿させた後、該遊離オリゴ糖を回収した。Voyager PRO リニア MALDI-TOF (Applied Biosystems) 質量分析計を遅延抽出と共に該製造業者の説明に従い利用することにより、分子量を決定した。前記実施例に従い製造された抗 Her2 抗体の N-グリカン分析の結果を図 4 ~ 8 に示す。

20

#### 【0207】

##### 実施例 9

##### HPLC による N 結合グリカン分析

各グリコフォームの相対量を定量するために、N-グリコシダーゼ F 遊離グリカンを 2-アミノベンジジン (2-AB) で標識し、HPLC により分析した (Choiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 : 5022 - 5027 (2003) および Hamiltonら, Science 313 : 1441 - 1443 (2006) に記載されているとおりに行った)。3 L バイオリアクターにおいて産生された単一および二重突然変異タンパク質に関する並びに小規模 0.5 L バイオリアクターにおいて産生された野生型および二重突然変異タンパク質に関する GF I 6.0 株において産生されたシアル酸化抗 Her2 抗体の量を表 3 に示す。

30

#### 【0208】

40

【表 4】

表 3

	モノ-シアル酸化	ビ-シアル酸化	総シアル酸化
野生型	10.4%	0%	10.4%
単一突然変異タンパク質 V264A	43%	8%	51%
単一突然変異タンパク質 F243A	23%	7%	30%
二重突然変異タンパク質 F243A/V264A	27%	47%	74%
二重突然変異タンパク質 F243A/V264A (0.5L バイオリクター)	25%	66%	>91%

10

20

## 実施例 10

## 抗原アフィニティアッセイ

抗原を発現する哺乳類細胞をトリプシン処理により集め、40  $\mu$ m 細胞濾過器で濾過し、96 深ウェルプレート内のリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の 1% ウシ胎児血清 (FBS) に懸濁させた。該精製抗体の系列希釈物を 10 から 0.01  $\mu$ g/ml - 1 までの範囲の最終濃度で該細胞に加えた。該抗体細胞混合物を氷上で 45 分間インキュベートした。該細胞を冷 PBS 中で洗浄し、PBS 中の 1% FBS 中の 2  $\mu$ g/ml - 1 の抗ヒト IgG - Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で、暗室内で氷上で 45 分間染色した。該細胞を冷 PBS 中で再び洗浄し、PBS 中の 1% FBS に懸濁させ、U 底 96 ウェルプレート (USA Scientific, Ocala, FL) に移した。488 nm の励起波長および 525 nm の発光波長を用いて、Guava Express Plus (Millipore, Billerica, MA) 上で平均蛍光強度 (MFI) を検出した。結果を図 3 に示す。

30

## 【0209】

## 実施例 11

## Fc R 結合アッセイ

Shields ら, J. Biol. Chem. 276: 6591 - 6604 (2001) に記載されている方法を若干変更した方法により、Fc 受容体結合アッセイを行った。高タンパク質結合 96 ウェルプレート (Corning Costar, Lowell, MA) を PBS 中の以下の濃度の 100  $\mu$ l / ウェルの Fc 受容体溶液でコートした: Fc RI (R&D Systems) および Fc RIIa (Pichia pastoris 産生体) は 1  $\mu$ g/ml、Fc RIIb/c (P. pastoris 産生体) は 2  $\mu$ g/ml、Fc RIIa - V158 は 0.4  $\mu$ g/ml ならびに Fc RIIa - F158 (共に P. pastoris 産生体) は 0.8  $\mu$ g/ml。Fc RIIa - V158 および Fc RIIa - F158 受容体を、Li ら, Nat. Biotech. 24: 210 - 215 (2006) に記載されているとおりにピチア・パストリス (P. pastoris) を使用して発現させた。

40

## 【0210】

また、Li らに記載されているものに類似した方法を用いて、Fc RIIa を糖操作ピチア (Pichia) において発現させた。Fc RIIa 細胞外ドメインをヒト cD

50

NAからPCR増幅し、pCR2.1 topoベクター内にクローニングした。サッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) アルファ接合因子プレプロドメインを使用し、AOX1プロモーター下、Fcガンマ受容体をピチア (*Pichia*) 発現ベクター内にクローニングした。pGLY3249をyGLY638 (GFI2.0宿主) 内に形質転換することにより、最終株yGLY4665を得た。

【0211】

糖操作ピチア (*Pichia*) YGLY638 (GFI2.0宿主) を使用して、FcRIIb/cを発現させ、産生させた。C末端9Hisタグを含有するヒトFcガンマ受容体IIb/c (NP\_\_003992) の細胞外ドメインのDNA配列をピチア (*Pichia*) に関してコドン最適化し、pAS197 (Gene Art, Germany) と命名した。FcRIIb/cのヒスチジンタグ付き細胞外ドメインのアミノ酸配列は配列番号17に見られうる。pGLY3246のプラスミド構築のために、コドン最適化hFcRIIb/c (AfeI/KpnI) およびサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) MFプレプロ (EcoRI/平滑) をEcoRIおよびKpnI部位においてpGLY2219内にクローニングした。得られたプラスミドpGLY3246をyGLY638内に形質転換して、yGLY4653を得た。YGLY4653を発酵させ、精製した (Liらに従い行った)。

10

【0212】

FcRIの場合には、該抗体を、アッセイ希釈剤 (1% BSA、PBS、0.05% Tween 20) 中、単量体形態でコートした。全ての他の受容体の場合には、室温で1時間、アルカリホスファターゼ結合抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub> (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) で二量体化した後、該抗体をコートした。また、F(ab')<sub>2</sub> を使用してFcRI結合抗体を検出し、SuperPhos (ViroLabs, Chantilly, VA) の存在下の18時間のインキュベーションの後、340nmにおける励起および465nmにおける発光を測定することにより、全てのプレートを定量した。

20

【0213】

結果を図9に示す。図9Aに示されているとおり、Fc単一突然変異タンパク質 ( および ) は、Her2抗体 ( ) (図9A) およびピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) Her2 (データ非表示) の両方に類似したFcRI (Fc受容体ガンマ-鎖I、CD64) 結合を示し、一方、Fc二重突然変異タンパク質 ( ) はFcRIに対するアフィニティにおける約14倍の減少を示した (図9A)。

30

【0214】

FcRIIb/cの場合、Fc単一突然変異タンパク質 ( および ) は、Her2抗体 ( ) と比較して受容体結合特性における10倍の減少を示したが (図9B)、二重Fc突然変異タンパク質はFcRIIb/cに結合しないらしい。

【0215】

FcRIIIa-F158およびFcRIIIa-V158の場合、両方の単一Fc突然変異タンパク質 ( および ) は、FcRIIIa-F158には、市販のヘルセプチン抗体 ( ) より20倍良好に結合するが、FcRIIIa-V158には、市販のヘルセプチン (Herceptin) 抗体 ( ) より僅かに良好に結合するに過ぎない (図9D)。Fc二重突然変異タンパク質 ( ) はFcRIIIa-F158に対してはアフィニティをほとんど示さなかったが (50倍の減少) (図9C)、FcRIIIa-V158に対しては、市販のヘルセプチン抗体 ( ) およびGS5.0からのピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) Her2 (データ非表示) より30倍弱いものの、幾らかのアフィニティを尚も保有していた。

40

【0216】

更に、FcRIIIaの多形体の両方に対する二重Fc突然変異タンパク質のアフィニティはノイラミニダーゼによるシアル酸の遊離に際して変化しないらしい (データ非表示)。したがって、いずれの理論にも束縛されるものではないが、FcRIIIaの多

50

形の両方に対するアフィニティの減少は、該二重突然変異（すなわち、二重Fc突然変異タンパク質）により生じた構造変化またはコンホメーション変化によるものであり、2, 6結合シアル酸化N-グリカンのレベルの増加によるものではない、と本出願人は考えている。

【0217】

実施例12

抗Her2抗体およびそのFc突然変異タンパク質に関するC1q結合アッセイ

Idusogieら, J. Immunology, 164: 4178-4184 (2000)の方法を記載どおりに用いて、C1q結合アッセイを行った。高結合性プレートを無効(clear)にするために、系列希釈抗体を50mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> (pH9.0)中の100μl/ウェルでコートした。ヒトC1q補体(US Biological, Swampscott, MA)をアッセイ希釈剤(0.1% Bovine Gelatin, PBS, 0.05% Tween20)中の2μg/mLで2時間コートした。C1qをHRP結合ヒツジポリクローナル抗ヒトC1q抗体(ABDSerotec)で検出し、OD<sub>450</sub>を測定することにより定量した。

10

【0218】

結果を図10に示す。図10に示されているとおり、本明細書に記載されている材料および方法により産生された単一および二重Fc突然変異タンパク質抗体は、哺乳類細胞培養または非シアル酸化ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)株において産生されたものと比較して低下したC1q結合を示した。単一Fc突然変異体(または )から産生された抗体に対するC1q結合は、Her2抗体と比較して5~10倍低下し、一方、二重Fc突然変異体( )に対するC1q結合は実質的に消失した。

20

【0219】

GFI5.0株において産生されたピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)Her2抗体(データ非表示)および該Her2抗体は共に、C1qに対する類似したアフィニティを示した。

【0220】

実施例13

抗Her2およびそのFc突然変異タンパク質に関する抗体依存性細胞傷害

ユウロピウム取り込みアッセイを用いて抗体依存性細胞傷害(ADCC)を測定した。ヒト卵巣腺癌系SKOV3を、10%ウシ胎児血清(FBS)で補足されたMcCoyの5A培地内で培養した。末梢血単核細胞(PBMC)をロイコパック(Leucopak)から得た。PBMCをフィコール・バック密度遠心分離に付し、2% FBSで補足されたPBS中で洗浄し、10% FBSを含有するMcCoyの5A培地に再懸濁させた。FcRIIIA F158V遺伝子型を各ドナーに関して決定した。SKOV3細胞をEuDTPAで標識した。該細胞を5000/ウェルで96ウェル組織培養プレートに加え、エフェクター細胞(PBMC)を300,000/ウェル(E:T 60:1)で加えた。抗体を種々の濃度で加え、該プレートにわたって希釈した。対照には、バックグラウンド、標的およびエフェクターベースライン計数、ならびに100%細胞溶解ウェルが含まれた。抗体を含有する又は含有しない該PBMC混合物を37℃で4時間インキュベートした。20μlの該上清をDELPHIA増強溶液(Perkin Elmer, cat# 1244-105)と混合して高蛍光キレートを形成させ、それを時間分解蛍光光度分析を用いて測定することにより、細胞溶解PBMCからのEuDTPAの遊離を決定した。各抗体希釈物に関して三重ウェルを準備し、式: ((実験的遊離 - バックグラウンド) / (最大遊離 - バックグラウンド)) - ((自然細胞傷害 - バックグラウンド) / (最大遊離 - バックグラウンド))に従い、細胞溶解の割合を計算した。これらの用語は以下のとおりに定義される。実験的遊離は、エフェクター細胞および抗体の存在下の標的細胞に関する平均計数を表し、バックグラウンドは、標的細胞を標識した後の最終洗浄からの上清に関する平均を表し、最大遊離は、DELPHIA細胞溶解バッファー(Perkin Elmer, cat# 4005-0010)と共にインキュベートされた標的

30

40

50

細胞に関する平均を表し、自然細胞毒性はエフェクター細胞の存在下の標的細胞に関する平均計数を表す。Prism 5.0ソフトウェアを使用して、データ点を4パラメータ・ロジスティック回帰モデルに当てはめた。全ての曲線は、同じ最大値、最小値および勾配を共有するように拘束された。

#### 【0221】

実施例10～12におけるアッセイは、任意の免疫グロブリン分子に関する要件に容易に適合化されうる、と当業者は認識し理解するであろう。更に、動物モデルにおけるインビボADCCアッセイは、Borchmannら、Blood, 102:3737-3742(2003); Niwaら、Cancer Research, 64:2127-2133(2004)の方法を用いて、任意の特異的IgGに適合化されうる。

10

#### 【0222】

結果を図11に示す。該単一Fc突然変異タンパク質が示したADCC活性プロファイルは該Her2抗体のものに類似しており、GFI5.0宿主において産生されたピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)Her2抗体より約5倍低かった。図11に示されているとおり、FcRIIIa結合データから予想されたとおり、二重Fc突然変異タンパク質から産生された抗体にはADCC活性は実質的に存在しない。

#### 【0223】

##### 実施例14

##### 抗Her2およびそのFc突然変異タンパク質に関する皮下PK研究

皮下PK研究をC57B6マウスにおいて行った。抗体サンプルを1mg/kgの用量で皮下投与した(n=3)。10μlの血液を1、6、24、53、77、120、192、240、288および360時間の採集時点において毛管で集め、90μlのカルシウムおよびマグネシウム非含有PBSならびに1.8mg/ml K2EDTAを含有するマイクロフュージ(microfuge)チューブに移した。サンドイッチイムノアッセイを用いて、Gyros(登録商標)Bioaffy(Uppsala, Sweden)ワークステーションでヒトIgGレベルを決定した。100μg/ml ビオチン化マウスモノクローナル抗ヒトカップ鎖(BD Pharmingen, San Diego, CA)を捕捉抗体として使用し、12.5nM ALEXA-64標識マウスモノクローナル抗ヒトFc Pan IgG(Southern Biotech, Birmingham, AL)を検出抗体として使用した。捕捉抗体の固定化およびアナライトの添加から、検出抗体の添加および洗浄工程まで、全イムノアッセイを自動化した。標準物およびQCを5% マウス対照血漿(EDTA)中で20xストックとして調製し、分析前にアッセイバッファー(PBS、0.01% Tween)中の5% マウス血漿中に1:20希釈した。正確なIgG濃度の決定のための直線範囲を添加QCで確定し、それが5~5000ng/mlであることが判明した。正確さ及び精度の許容性限界は、+/-25%の定量下限(LLoQ)を伴う+/-20%であった。標準物およびQCは、シグナルの有意な喪失を伴うことなく、3回、凍結および解凍することが可能であった。標準物、QCおよび研究サンプルは-70℃で貯蔵した。研究サンプルを解凍し、アッセイバッファー中の5% マウス血漿中に1:20希釈し、レベルが直線アッセイ範囲外である場合には更に1:10希釈した。全ての標準物、QCおよび研究サンプルを二重にアッセイし、平均結果を示した。第5パラメータ・ロジスティック曲線フィットを用いて、濃度を決定した。血清mAb濃度-時間データ(WinNonlin Enterprise Version 5.01, Pharsight Corp, Mountain View, CA)の非コンパートメント分析を用いて、WinNonlinで、薬物動態学的パラメータを各動物に関して計算した。

20

30

40

#### 【0224】

図12に示されているとおり、GFI5.0グリコシル化を伴うピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)Her2およびHer2で処理されたマウスは、類似したt<sub>1/2</sub>および血清濃度を有し、一方、GFI6.0グリコシル化を伴って産生されたFc二重突然変異タンパク質Her2で処理されたマウスは、CHO細胞において産

50

生された Her2 で処理されたマウスと比較して、より高い Cmax (最大濃度)、および血清濃度における約 30% の増加を示した。したがって、皮下注射された 3 つのサンプルのうち、Fc 二重突然変異タンパク質抗体が、より高い Cmax および血清濃度に基づいて、より良好なバイオアベイラビリティ (吸収または曝露) を示した。

【0225】

実施例 15

本発明の抗 Her2 抗体およびその Fc 突然変異タンパク質に関するもう 1 つの一連の Fc 受容体結合アッセイを、実施例 11 に記載されているとおりに行い、結果を図 13 ならびに表 4 および 5 に示す。

【0226】

【表 5】

表 4

Her2 抗体への FcγR 結合アフィニティの比較

サンプル	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb/c	FcγIIIa LF	FcγIIIa LV
Her2 Ab	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Pichia Her2 Ab	0.6	0.4	0.9	11.3	2.8
F243A/V264A	0.2	0.02	無結合	0.04	0.4
F243A	0.6	0.1	0.3	8.4	3.3
V264A	0.6	0.03	0.2	3.6	1.4

比の計算: STD EC50/抗抗原 mAb

比 > 1.0 Her2 Ab より高いアフィニティ

比 < 1.0 Her2 Ab より低いアフィニティ

【0227】

【表 6】

表 5

Pichia Her2 抗体への FcγR 結合アフィニティの比較

サンプル	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb/c	FcγIIIa LF	FcγIIIa LV
Pichia Her2 Ab	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
F243A/V264A	0.5	0.04	無結合	0.003	0.1
F243A	1.0	0.2	0.3	0.74	1.2
V264A	0.9	0.1	0.2	0.3	0.5

比の計算: STD EC50/抗抗原 mAb

比 > 1.0 Pichia Her2 Ab より高いアフィニティ

比 < 1.0 Pichia Her2 Ab より低いアフィニティ

実施例 6

抗 HER2 抗体および Fc 突然変異タンパク質の ADCC の評価

SKOV3 標的細胞 (ATCC, Cat # HTB-77) を使用して ADCC 分析を行った。該アッセイの前日に、初代 NK エフェクター細胞 (Biological Speciality, Cat # 215-11-10) を 1000 rpm で 15 分間にわたりペレ

10

20

30

40

50

ット化し、10% FBS (Cellgro, Cat# 35-016-CV) で補足されたRPMIマイナスフェノールレッド培地 (Invitrogen, カタログ# 11835-030) に $1 \times 10^6$ 細胞/mlまで再懸濁させた。該再懸濁NK細胞を5% CO<sub>2</sub>下、37℃で一晩インキュベートした。

#### 【0228】

アッセイ当日、付着SKOV3標的細胞のフラスコをPBSで洗浄し、該細胞を、3mlのトリプシン (Cellgro, Cat# 25-053-CI) および37℃で2~5分間のインキュベーションを用いて脱離させた。該細胞を23mlのRPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSで集め、上下にピペティングして塊をばらばらにした。集めた細胞を1800rpmで5分間遠心分離し、 $1 \times 10^7$ 細胞/mlの濃度までRPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSで再懸濁させた。該標的細胞 ( $1 \times 10^7$ 細胞) を100μCiのクロム-51 (正常食塩水中の5mCi クロム酸ナトリウム; Perkin Elmer, Cat# NEZ03005MC) で標識した。標的細胞を、15分ごとに振とうしながら、37℃で1時間インキュベートした。細胞を1800rpmで2分間遠心分離し、1mlのRPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSに再懸濁させた。細胞を1mlのRPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSで更に2回洗浄した。そのそれぞれの洗浄と洗浄との間に、1800rpmで2分間の遠心分離を行った。最終洗浄後、該標識標的細胞を $2.5 \times 10^5$ 細胞/mlの最終濃度までRPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSに再懸濁させた。

10

20

#### 【0229】

これらのアッセイにおいて使用した試験抗体は、GFI5.0において産生された抗HER2 mAb、GFI6.0において産生された抗HER2 mAb F243A (GS6.0/F243A)、GFI6.0において産生された抗HER2 mAb V264A (GS6.0/V264A)、およびGFI6.0において産生された抗HER2 mAb F243A/V264A (GS6.0/F243A/V264A)であった。SKOV3標的細胞を標識している間に、ポリスチレン96ウェルプレート (Costar, Cat# 353077) 内で、RPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSにおいて、3倍系列滴定 (1μg/mlから開始) を用いて試験抗体を希釈した。別の96ウェルアッセイプレートのウェルに、100μlのCr-51標識SKOV3標的細胞 (= 25,000細胞) を移した。該抗体希釈プレートを調製した後、10μlの各希釈物を、該標識標的細胞を含有する96ウェルアッセイプレートに移した。対照として、10μlのTriton-X100 (10% ストック, Fluka Analytical, Cat# 93443) または10μlの培地をそれぞれ「最大細胞溶解」または「自然遊離」対照ウェルに加えた。各抗体希釈物は、二重に (2回重複試験で) 試験し、一方、各対照は、6回重複試験で試験した。

30

#### 【0230】

初代NK細胞を1200rpmで5分間にわたってペレット化し、 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mlまでRPMIマイナスフェノールレッド培地、10% FBSに穏やかに再懸濁させた。全てのサンプルウェルおよび「無抗体」対照ウェル (すなわち、「自然遊離」および「最大細胞溶解」対照を除外) に、100μlのNK細胞 (= 250,000細胞) を10:1のエフェクター:標的比で加えた。該アッセイプレートを5% CO<sub>2</sub>下、37℃で4時間インキュベートした。該インキュベーションの後、該アッセイプレートを300rpmで5分間遠心分離した。30μlの該上清を96ウェルPicoplate (Perkin Elmer, Cat# 6005185) 内の250μlのMicroscount 20 (Perkin Elmer, Cat# 6013621) に加えた。該Cr-51遊離をPackard Top Countシンチレーションカウンターにおいて測定した。

40

#### 【0231】

細胞溶解率 (%) を ( (ADC C 実験的遊離 - 自然遊離) / (最大遊離 - 自然遊離) )

50

\* 100として計算した。

【0232】

これらのアッセイの結果を図14に示す。図14に示されているとおり、F243A単一突然変異タンパク質抗体およびV264A単一突然変異タンパク質抗体は、親（野生型）抗体と比較してADCC活性における5～10倍の低下を示し、一方、F243A/V264A二重突然変異タンパク質抗体は、親（野生型）抗体と比較してADCC活性における100倍を超える低下を示した。

【0233】

実施例17

抗HER2抗体およびその突然変異タンパク質のADCCデータの統計分析

10

本研究の目的は、該二重突然変異体の細胞溶解率が、それらの2つの単一突然変異体と比較して相乗的であるかどうかを判定することであった。該決定は、該二重突然変異体（群4）と推定相加的参照曲線（図15および表6に示されている）との間でED50（50%細胞溶解に対応する抗体レベル）を比較することによりなされる。該二重突然変異体曲線のED50の下限は、アッセイされた最高抗体レベルより高く、相加的参照曲線のED50の上限よりも十分に高いため、本発明者らは、該二重突然変異の効果は相加的效果より遥かに大きいと結論づけている。

【0234】

統計的方法および結果

該目的は、ヘルセプチン（Herceptin）抗体の二重突然変異体（GS6.0/F243A/V264A）が、2つの単一突然変異変異体（GS6.0/F243AおよびGS6.0/V264A）と比較して相乗効果を示すかどうかを判定することであった。以下の4つの抗体群を用いた：群1（GS5.0）、群2（GS6.0/F243A）、群3（GS6.0/V264A）および群4（GS6.0/F243A/V264A）。

20

【0235】

3つのドナーからのデータを別々の96ウェルプレートに関して処理する。各プレートからの観察を、以下のとおりに値を細胞溶解率に変換することにより正規化する。

【0236】

【数1】

30

$$\%細胞溶解 = 100 \times \left( \frac{O_{rc} - O_N}{O_P - O_N} \right)$$

（式中、 $O_{rc}$  は、各プレートの第  $r$  行第  $c$  列において観察された応答である；

$O_N$  は、各プレートに関する陰性対照の平均応答である；

$O_P$  は、各プレートに関する陽性対照の平均応答である）。

【0237】

40

ついで、各抗体・レベルおよび群に関する二重（2回重複試験）の%細胞溶解を平均する。

【0238】

全4群および全3ドナーからのデータを一緒にモデル化する。本発明者らは、「抗体レベル・応答」関係がS字形のヒルの式（式1）に従うと考えている。本発明者らは、本発明者らの応答変数（ $Y$ ）として（100% - %細胞溶解）を、そして実験的変数（ $X$ ）として  $\log$  抗体・レベルを用いる。種々の突然変異の効力に関する比較を行い、該モデルを当てはめるために、各群に関する該モデルパラメータについての幾つかの仮定を行う。

【0239】

用いるモデルの形態は以下のことを仮定する。

50

【 0 2 4 0 】

1. 全ての4つの処理群に関して、範囲 ( a ) およびプラトー ( d ) は同じである。

【 0 2 4 1 】

2. 異なる勾配を有することが可能な G S 5 . 0 群を除く全ての処理群に関する同じ勾配。

【 0 2 4 2 】

3. E C 5 0 パラメータは群によって異なる。

【 0 2 4 3 】

ヒルの式：

【 0 2 4 4 】

【 数 2 】

$$Y_{ij} = \frac{a}{1 + \left( \frac{X_{ij}}{\gamma + \gamma_j} \right)^{\beta_0 + \beta_j}} + d \quad (\text{式1})$$

10

以下の制約を伴う：  $\beta_1 = 0$  ,  $\beta_2 = 0$  および  $\beta_3 = \beta_4 =$   
ここで、

20

$Y_{ij}$  は第  $j$  の処理に関する第  $i$  の応答 ( 1 0 0 - % 細胞溶解 ) である。

$X_{ij}$  は、 $Y_{ij}$  に対応する抗体レベル ( 対数表示 ) である。

$j = \text{G S 5 . 0}$  に関しては 1、 $j = \text{G S 6 . 0 / F 2 4 3 A}$  に関しては 2、 $j = \text{G S 6 . 0 / V 2 6 4 A}$  に関しては 3、 $j = \text{G S 6 . 0 / F 2 4 3 A / V 2 6 4 A}$  に関しては 4。

【 0 2 4 5 】

更に、2つの単一突然変異体 ( G S 6 . 0 / F 2 4 3 A および G S 6 . 0 / V 2 6 4 A ) が相加的であれば、合わさった効果に関する式は以下のようにになると仮定される。

【 0 2 4 6 】

【 数 3 】

$$Y_{i(\text{additive})} = \frac{a}{1 + \left( \frac{X_{i(\text{additive})}}{(\gamma + \gamma_2 + \gamma_3)} \right)^{\beta_0 + \beta}} + d \quad (\text{式2})$$

30

( 式中、パラメーター a、d、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ 、および  $\beta_0$  は式 1 の場合と同じである )。

【 0 2 4 7 】

S A S v 9 . 2 における PROC NLIN を用いて、モデル ( 式 1 および 式 2 ) を当てはめる。4つの群に関する観察データ値および当てはめられた曲線ならびに合わされた2つの単一突然変異群に関する推定相加的参照曲線を図 1 5 に示す。E D 5 0 およびその信頼区間 ( 元の尺度で表示 ) を表 6 に示す。

40

【 0 2 4 8 】

【表 7】

表 6

群	ED50	95%信頼区間	
群 1:GS5.0(GFI5.0 において産生された抗 Her2 mAb)	0.011	0.0085	0.0131
群 2:GS6.0/F243A(GFI6.0 において産生された抗 Her2 mAb F243A)	0.059	0.0457	0.0769
群 3:GS6.0/V264A(GFI6.0 において産生された抗 Her2 mAb V264A)	0.072	0.0558	0.0942
群 4:GS6.0/F243A/V264A(GFI6.0 において産生された抗 Her2 mAb F243A/V264A 二重突然変異タンパク質)	>1*	>1*	>1*
群 2 及び 3 の組合せ: 相加的参照曲線	0.407	0.3031	0.5455

\* 推定値は該実験における最高抗体レベルより大きい。

10

2つの単一突然変異GS6.0/F243AおよびGS6.0/V264Aと比較してGS6.0/F243A/V264Aの効果を評価するために、群4のED50を相加的参照曲線のED50と比較する。信頼区間が重複していない場合には、それらの2つの量は統計的に異なると結論づけることが可能である。

20

## 【0249】

相加的参照曲線のED50の95%信頼区間は(0.3031, 0.5455)であり、一方、群4のED50に関する推定値および信頼区間は全て1より大きい(該推定値は抗体-レベルの観察範囲外である)。該二重突然変異のED50の95%信頼下限は>1であり、これは参照相加的曲線(群2および3を合わせたもの)のED50の95%信頼上限より遥かに高い。したがって、それらの2つの量は有意に異なると結論づけることが可能である。

## 【0250】

ED50の信頼区間の前記比較は $\mu_4$ と和( $\mu_2 + \mu_3$ )との比較、すなわち、 $H_0: \mu_4 = (\mu_2 + \mu_3)$ という仮説を、 $H_a: \mu_4 > (\mu_2 + \mu_3)$ という対立仮説に対して検定することと同等である。

30

## 【0251】

$SSE_{reduced}$ および $SSE_{full}$ がそれぞれ低減(reduced)モデルおよび完全(full)モデルからの残差平方和であるとする。完全モデルは、式1を該データに当てはめることにより得られ、低減モデルは、式1における $\mu_4$ を( $\mu_2 + \mu_3$ )で置換することにより得られる。

## 【0252】

仮説:

$$H_0: \mu_4 = (\mu_2 + \mu_3) \quad \text{対} \quad H_a: \mu_4 > (\mu_2 + \mu_3)$$

検定統計量:

40

## 【0253】

## 【数 4】

$$F_{obs} = \left\{ \frac{SSE_{reduced} - SSE_{full}}{DF_{reduced} - DF_{full}} \right\} / MSE_{full}$$

50

p 値：  
【 0 2 5 4 】  
【 数 5 】

$$P(F_{obs} > F_{(DF_{reduced}-DF_{full}),DF_{full}}) < 0.0001$$

p 値が < 0 . 0 0 0 1 であるため、H<sub>0</sub>を棄却し、 $t_4 > (t_2 + t_3)$  であると結論づけることが可能である。

【 0 2 5 5 】

データおよびモデルに基づく該比較は、二重突然変異GS6.0/F243A/V264Aが、2つの単一突然変異の合された仮説効果より有意に低い細胞溶解率を有することを示している。該二重突然変異の効果は該単一突然変異の相加効果より遥かに大きい。

【 0 2 5 6 】

本実施例に関する参考文献：

[ 1 ] SAS (r) Proprietary Software 9.2 (TS2M2), SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

[ 2 ] ' Application of the Four - Parameter Logistic Model to Bioassay : Comparison with Slope Ratio and Parallel Line Models ' ; *Age Volund, Biometrics, Vol. 34, No. 3 (Sep. 1978), pp. 357 - 365.*

【 0 2 5 7 】

実施例 1 8

抗TNF Fc突然変異タンパク質の構築およびADCC評価

ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) における抗TNFモノクローナル抗体の二重Fc突然変異タンパク質 (F243A/V264A) の製造を、後記に挙げる配列およびプロトコルを用いて行った。親 (野生型) 抗TNF抗体の重鎖および軽鎖配列は配列番号10および11に記載されている。該二重突然変異タンパク質抗TNF抗体の重鎖の配列は配列番号12に記載されている。wtおよび二重突然変異タンパク質抗TNF抗体の軽鎖配列は同一である。

【 0 2 5 8 】

アルファ - 接合因子プレドメインのシグナル配列 (配列番号8) を、PCR融合により、軽鎖または重鎖の末端にインフレームで融合させた。該配列はGenscript (Genscript USA Inc., 860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854, USA) によりコドン最適化され、合成された。重鎖および軽鎖の両方を、抗Her2 IgG1およびそのFc突然変異体の構築に類似した方法により、抗体発現ベクター内にクローニングした。

【 0 2 5 9 】

IgG1およびその突然変異タンパク質の融合シグナル配列を有する重鎖および軽鎖を、それぞれ、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) AOX1プロモーター下およびサッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) Cycターミネーターの前にクローニングした。その完成した重鎖および軽鎖の発現カセットを最終的な発現ベクターへと合体させた。ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 内へのゲノム挿入を、Spe1での該ベクターの線状化およびTrp2部位内への標的化組込みにより行った。プラスミドpGLY6964は野生型抗TNF IgG1抗体をコードしている。プラスミドpGLY7715は抗TNFアルファIgG1 F243A/V264A二重突然変異タンパク質をコードしている。

【 0 2 6 0 】

抗TNFアルファおよびそのFc突然変異タンパク質を製造するための糖操作ピチア (

10

20

30

40

50

P i c h i a ) G F I 5 . 0 Y G L Y 8 3 1 6 および G F I 6 . 0 Y G L Y 2 2 8 3  
4 宿主

抗 T N F 抗体およびその F c 突然変異タンパク質の発現のために使用される G F I 5 . 0 株 Y G L Y 1 6 7 8 6 の遺伝子型は以下のとおりである : u r a 5 : : S c S U C 2 o c h 1 : : l a c Z b m t 1 : : l a c Z b m t 2 : : l a c Z b m t 3 : : l a c Z b m t 4 : : l a c Z / K L M N N 2 - 2 m n n 4 L 1 : : l a c Z / M m S L C 3 5 A 3 p n o 1 : : l a c Z A D E 1 : : l a c Z / F B 8 / N A 1 0 / M m S L C 3 5 A 3 h i s 1 : : l a c Z - U R A 5 - l a c Z / X B 3 3 / S p G A L E / D m U G T a r g 1 : : H I S 1 / K D 5 3 / T C 5 4 P R O 1 : : A R G 1 / A O X 1 - S c M F p r e T r M N S 1 P R O 1 : : A R G 1 / A O X 1 - S c M F p r e T r M N S 1 .

10

#### 【0261】

抗 T N F F c D M 突然変異タンパク質の発現のために使用されるピチア・パストリス ( P i c h i a p a s t o r i s ) G F I 6 . 0 株 Y G L Y 2 3 4 2 3 の遺伝子型は以下のとおりである : u r a 5 : : S c S U C 2 o c h 1 : : l a c Z b m t 2 : : l a c Z / K L M N N 2 - 2 m n n 4 L 1 : : l a c Z / M m S L C 3 5 A 3 p n o 1 m n n 4 : : l a c Z A D E 1 : l a c Z / N A 1 0 / M m S L C 3 5 A 3 / F B 8 h i s 1 : : l a c Z / S c G A L 1 0 / X B 3 3 / D m U G T a r g 1 : : H I S 1 / K D 5 3 / T C 5 4 b m t 4 : : l a c Z b m t 1 : : l a c Z b m t 3 : : l a c Z T R P 2 : A R G 1 / M m C S T / H s G N E / H s C S S / H s S P S / M m S T 6 - 3 3 s t e 1 3 : : l a c Z / T r M D S 1 d a p 2 : : N a t <sup>R</sup> T R P 5 : H y g <sup>R</sup> M m C S T / H s G N E / H s C S S / H s S P S / M m S T 6 - 3 3 V p s 1 0 - 1 : : A O X 1 p \_ \_ L m S T T 3 d .

20

#### 【0262】

実施例 4 ~ 7 に示されているとおりに、該細胞を形質転換し、スクリーニングし、精製した。

#### 【0263】

抗 T N F F c 突然変異タンパク質の抗体依存性細胞性細胞傷害 ( A D C C ) の評価最初の 1 2 アミノ酸が除去された T N F の非切断可能変異体を安定に発現する J u r k a t F l p I n 標的細胞、すなわち、J u r k a t F l p I n T N F ( 1 - 1 2 ) 標的細胞を使用して、A D C C 分析を行った。J u r k a t F l p I n ヒト T 細胞白血病細胞 ( I n v i t r o g e n ) を T N F の非分泌性細胞表面突然変異体 ( 1 - 1 2 T N F ) ( P e r e z ら , C e l l 6 3 ; 2 5 1 - 2 5 8 ( 1 9 9 0 ) ) でトランスフェクトすることにより、これらの細胞を調製した。1 - 1 2 T N F D N A を、トランスフェクションに使用するために p c D N A 5 ベクター ( I n v i t r o g e n ) 内にクローニングした。細胞表面 T N F の発現をフローサイトメトリーにより確認した。

30

#### 【0264】

アッセイの前日に、初代 N K エフェクター細胞 ( B i o l o g i c a l S p e c i a l t y , C a t # 2 1 5 - 1 1 - 1 0 ) を 1 2 0 0 r p m で 1 2 分間ペレット化し、1 0 % 熱不活性化 F B S ( S i g m a , C a t # F 4 1 3 5 ) 、 1 0 m M H e p e s ( G i b c o , C a t # 1 5 6 3 0 ) 、 2 m M L - グルタミン ( C e l l g r o , C a t # 2 5 - 0 0 5 - C I ) および 1 x ペニシリン / ストレプトマイシン ( C e l l g r o , C a t # 3 0 - 0 0 2 - C I ) で補足された R P M I マイナス フェノールレッド培地 ( I n v i t r o g e n , カタログ # 1 1 8 3 5 - 0 3 0 ) に約 1 ~ 1 . 5 x 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / m l まで穏やかに再懸濁させた。該再懸濁 N K 細胞を 5 % C O <sub>2</sub> 下、3 7 ° で一晚インキュベートした。

40

#### 【0265】

アッセイの当日に、J u r k a t F l p i n T N F ( 1 - 1 2 ) 標的細胞を 1 2 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを、5 % 熱不活性化 F B S で補足され

50

たRPMIマイナス フェノールレッド培地に $2 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度まで再懸濁させた。該細胞を25 $\mu$ lのDELFLIA BATDA標識試薬(DELFLIA EuTDA Cytotoxicityキット, Perkin Elmer, Cat#AD0116)で標識した。細胞を穏やかに混合し、10分ごとに穏やかに混合しながら37で20分間インキュベートした。細胞容量を、1.5mM プロベニシド(Invitrogen, Cat#P36400)を含有するDPBSで30mlに調節し、1200rpmで5分間遠心分離した。1.5mM プロベニシドを含有する30mlのDPBSで細胞を3回洗浄し、それぞれの洗浄と洗浄との間に、1200rpmで5分間の遠心分離を行った。最終洗浄後、5% 熱不活性化FBSおよび1.5mM プロベニシドで補足されたRPMIマイナス フェノールレッド培地に $2.5 \times 10^5$ 細胞/mlの最終濃度まで該標識標的細胞を再懸濁させた。

10

## 【0266】

該アッセイにおいて使用した試験抗体は、GFI5.0において産生された抗TNF IgG1野生型抗体(「GFI774」と称される)、GFI5.0において産生された非シアル酸化抗TNF IgG1抗体(GFI774)F234A/V264A、およびGFI6.0において産生されたシアル酸化抗TNF IgG1抗体(GFI774)F243A/V264Aであった。GFI5.0において産生された非シアル酸化抗TNF IgG1抗体-F243A/V264Aは以下のグリコフォームを含む: 84% G2、2% G1および14% ハイブリッドN-グリカン。GFI6.0において産生されたシアル酸化抗TNF IgG1抗体-F243A/V264Aは以下のグリコフォームを含む: 27% A1、50.6% A2および5.7% A1ハイブリッド(合計で、該N-グリカンの83%以上がシアル酸化されている)。

20

## 【0267】

Jurkat FlpIn TNF (1-12)標的細胞を標識している間に、丸底プレート(Costar, Cat#5699; 蓋-Costar Cat#3931)内で、5% 熱不活性化FBSおよび1.5mM プロベニシドで補足されたRPMIマイナス フェノールレッド培地において、3倍系列(40 $\mu$ g/mlから開始)を用いて、2 $\times$ 濃度の抗体を希釈した。該希釈プレートを調製した後、100 $\mu$ lの各2 $\times$ 希釈物を新たな96ウェル丸底ポリプロピレンプレート(「無抗体」対照として100 $\mu$ lの培地のみを移した)に移した。また、「自然遊離」および「混合細胞溶解」対照(150 $\mu$ l/ウェル)ならびに「バックグラウンド」対照(200 $\mu$ l/ウェル)として、5% 熱不活性化FBSおよび1.5mM プロベニシドで補足されたRPMIマイナス フェノールレッド培地を該96ウェルプレートに移した。各抗体希釈物は二重に試験し、各対照は四重に試験した。

30

## 【0268】

「バックグラウンド」対照を除く全てのウェルに、50 $\mu$ lのユロピウム標識標識Jurkat FlpIn TNF (1-12)細胞(=12,500細胞)を加え、穏やかに混合した。初代NK細胞を1200rpmで12分間ベレット化し、5% 熱不活性化FBSおよび1.5mM プロベニシドで補足されたRPMIマイナス フェノールレッド培地に $2.5 \times 10^6$ 細胞/mlまで穏やかに再懸濁させた。全てのサンプルウェル(すなわち、「自然遊離」、「混合細胞溶解」および「バックグラウンド」対照を除く)に、50 $\mu$ lのNK細胞(=125,000細胞)を10:1のエフェクター:標的比で加えた。サンプルを穏やかに混合し、該アッセイプレートを37で2時間インキュベートした。1時間15分後、10 $\mu$ lの20% Triton-X100(Pierce Surfact-Amps X-100, Cat#28314)または10 $\mu$ lの培地をそれぞれ「混合細胞溶解」または「自然遊離」対照に加えた。該プレートを37で更に45分間(合計インキュベーション時間は2時間であった)インキュベートした。プレートをインキュベートしている間に、DELFLIA Europium Solution(DELFLIA EuTDA Cytotoxicityキットのもの)を室温で平衡化した。2時間の該インキュベーションの後、該アッセイプレートを1500rpmで

40

50

5分間遠心分離した。泡が入らないように注意しながら、20 $\mu$ lの上清を白色平底透明プレート(DELFLIA EuTDA Cytotoxicityキットからのもの、またはCostar, Cat#3632)に移した。各ウェルに、200 $\mu$ lのDELFLIA Europium Solutionを加え、該プレートをアルミホイルシールで覆った。穏やかに振とうしながら、該アッセイプレートを室温で15分間インキュベートした。ユウロピウムを讀取るためにPerkin Elmer Envision装置を使用して、蛍光を測定した。以下のとおりに細胞溶解率を計算した。

- 1) バックグラウンド対照の平均を全ての生(raw)の値から差し引いた。
- 2) ADC C活性の割合(%)を、 $(ADC C \text{ 実験値} - \text{自然遊離}) / (\text{最大細胞溶解} - \text{自然遊離}) * 100$ として計算した。そして、
- 3) 最終細胞溶解率(%)を、工程2からの%ADC C活性から「無抗体」対照を差し引いたものとして示した。

#### 【0269】

これらのアッセイの結果を図16に示す。図16に示されているとおり、非シアル酸化およびシアル酸化抗TNF IgG1-F243A/V264A二重突然変異タンパク質は、GS5.0において産生された親(野生型)ポリペプチドと比較してADC Cにおける1000倍を超える減少を示した。

#### 【0270】

##### 実施例19

抗TNF 二重Fc突然変異タンパク質の補体依存性細胞傷害(CDC)の評価  
最初の12アミノ酸が除去されたTNF の非切断可能変異体を安定に発現するHEK 293 FlpIn細胞を使用して、CDC分析を行った。10% 熱不活性化FBS(Sigma, Cat#F4135)、100 $\mu$ g/ml ヒグロマイシンB(Cellgro, Cat#30-240-CR)およびL-グルタミン(Cellgro, Cat#25-005-CI)で補足されたダルベッコ最少必須培地(DMEM)マイナス フェノールレッド(Gibco, Cat#21063)内で組織培養フラスコにおいて70%コンフルエンスまでHEK293 FlpIn TNF (1-12)を増殖させた。細胞を2mlのトリプシン(Cellgro, Cat#MT25-053-CI)で処理し、8mlの DMEMマイナス フェノールレッド培地、10% 熱不活性化FBSを使用して集め、1200rpmで10分間遠心分離した。上清を除去し、細胞ペレットをDMEMマイナス フェノールレッド培地、熱不活性化10% FBSに $4 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度まで再懸濁させた。該細胞を96ウェル黒色透明底プレート(Costar, Cat#3603)内で100 $\mu$ l(40,000細胞)/ウェルでプレーティングし、5% CO<sub>2</sub>下、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。

#### 【0271】

該アッセイにおいて使用した試験抗体は、GF I5.0において産生された抗TNF IgG1抗体(「GF I774」と称される)、GF I5.0において産生された抗TNF IgG1抗体(GF I774)F234A/V264A、およびGF I6.0において産生された抗TNF IgG1抗体(GF I774)F243A/V264Aであった(これらの抗体は実施例18に記載されている)。該アッセイの当日、該培地をマルチチャンネルピペッターで該96ウェルプレートのウェルから吸引し、50 $\mu$ lのDMEMマイナス フェノールレッド培地、1 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシンと交換した。1 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシン、10 $\mu$ g/ml 抗ヒトCD55マウスIgG1モノクローナル抗体(IGRL Research Products, Clone BRIC216, Cat#9404P)および10 $\mu$ g/ml 抗ヒトCD59マウスIgG2bモノクローナル抗体(IGRL Research Products, Clone BRIC229, Cat#9409P)を含有するDMEMマイナス フェノールレッド培地内で試験抗体の2倍系列滴定物(30 $\mu$ g/mlから開始)を調製した。適当なアッセイプレートウェルに、50 $\mu$ lの該希釈抗体を加えた。アッセイ陰性対照はアッセイ培地の単体、およびアッセイDMEMマイナス フェノールレッド培地(CD55およ

10

20

30

40

50

びCD59抗体を含有する)中で希釈されたヒトIgG(Jackson Immuno Research, Cat#009-000-003)であった。該アッセイ細胞溶解対照は、アッセイDMEMマイナスフェノールレッド培地(CD55およびCD59抗体を含有する)中で希釈された0.25% Triron X100(10%ストック, Fluka, Cat#93443)であった。各試験抗体は二重に試験し、該アッセイ対照は三重に試験した。試験サンプルを含有するアッセイプレートを、軽く叩くことにより混合し、該プレートを37で約10分間インキュベートし、その間にヒト補体血清を調製した。3mlのヒト補体(QUIDEL, Cat#A113)を、1xペニシリン/ストレプトマイシンを含有する3mlのDMEMマイナスフェノールレッド培地で1:2希釈し、50μlの該希釈補体を該アッセイプレートウェルに加えた。該アッセイプレートを、軽く叩くことにより混合し、該プレートを5%CO<sub>2</sub>下、37で4時間インキュベートした。1xペニシリン/ストレプトマイシンを含有するDMEMマイナスフェノールレッド培地で100%ストックを希釈することにより、40%アラマー(alamar)ブルー(Biosource, Cat#DAL1100)の溶液を調製し、50μlの該希釈アラマーブルー溶液を該アッセイプレートウェルに加えた(=10%最終)。該アッセイプレートを、軽く叩くことにより混合し、該プレートを5%CO<sub>2</sub>下、37で一晩(15~20時間)インキュベートした。翌日、該アッセイプレートをシェーカー上で室温で10分間インキュベートし、励起544nm、発光590nmで蛍光を讀取った。CDC率(%)を(1-(サンプル生蛍光単位(RFU)-Triton RFU)/(RFU中央値-Triton RFU))\*100として計算した。

10

20

## 【0272】

これらのアッセイの結果を図17に示す。図17に示されているとおり、非シアル酸化およびシアル酸化抗TNF IgG-F243A/V264A二重突然変異タンパク質は、親(野生型)抗体と比較してCDC活性における約10倍の減少を示した。

## 【0273】

## 実施例20

コラーゲン-抗体誘発性関節炎(AIA)モデルにおける抗TNF抗体およびそのFc突然変異タンパク質の効果

モデル誘発:II型コラーゲンの種々の種における保存されたエピトープを認識する5つのモノクローナル抗体、すなわち、クローンA2-10(IgG2a)、F10-21(IgG2a)、D8-6(IgG2a)、D1-2G(IgG2b)およびD2-112(IgG2b)の混合物からなる市販のArthrogen-CIA(登録商標)関節炎生成性モノクローナル抗体(Chondrexから購入)で、AIA(抗体誘発性関節炎)を誘発させる。

30

## 【0274】

動物:共刺激因子の添加を伴うことなく関節炎誘発に対して感受性である10週齢のB10.RII雄マウスを使用した。これらの動物はJackson Laboratoryから購入した。

## 【0275】

臨床スコア化:関節炎の誘発後に毎日、脚の腫張を測定した。該疾患の重症度を以下のとおりに脚ごとに0~3の尺度で等級化した:0,正常;1,1つの指の腫張;2,2以上の指の腫張;3,脚全体の腫張。マウス当たりの最大臨床スコアは12である。

40

## 【0276】

研究設計:第0日に、3mgの抗CII mAb病原体混合物IVの受動移入により関節炎を誘発させた。マウスの群を以下の試薬で皮下処理した。

## 【0277】

【表 8】

群/試薬	ロット	用量
A. ナイーブ	***	***
B. イソタイプ IgG1	78ABY	33mpk
C. 非シアル酸化抗 TNF	36ADV	33mpk
D. $\alpha$ 2,6 シアル酸化抗 TNF	37ADV	33mpk
E. mTNFR-Ig	82ABW	33mpk
F. GAMMAGARD	84ADU	33mpk
G. GAMMAGARD	84ADU	1000mpk
H. HUMIRA	85ADU	33mpk

群 A および H は n=3 であり、それ以外の全ての群は n=5

10

イソタイプ IgG1 抗体を対照として使用した。該抗体はマウス抗ヘキソンに結合し、「27F11」なる名称を有していた。

## 【0278】

「非シアル酸化抗 TNF」として特定されているサンプルは、F243A/V264A 突然変異を含む GF I 5.0 において産生された実施例 18 に記載されている抗 TNF 抗体に対応する。「 $\alpha$ 2,6 シアル酸化抗 TNF」として特定されている抗体は、F243A/V264A 突然変異を含む GF I 6.0 において産生された実施例 18 に記載されている抗 TNF 抗体に対応する。GF I 5.0 において産生された非シアル酸化抗 TNF IgG1 抗体 - F243A/V264A は以下のグリコフォームを含む：84% G2、2% G1 および 14% ハイブリッド N - グリカン。GF I 6.0 において産生されたシアル酸化抗 TNF IgG1 抗体 - F243A/V264A は以下のグリコフォームを含む：27% A1、50.6% A2 および 5.7% A1 ハイブリッド（合計で、該 N - グリカンの 83% 以上がシアル酸化されている）。

20

## 【0279】

mTNFR - Ig は、ヒンジから始まり CH2 および CH3 領域に広がる mIgG1 Fc に連結された mTNFR2 の細胞外ドメインを含む、ならびに CHO 細胞において産生された配列番号 16 のアミノ酸配列を含むイムノアドヘシン（抗 TNF 受容体 Ig - 融合タンパク質）である。

30

## 【0280】

GAMMAGARD 液は Baxter Corp から購入した。

## 【0281】

HUMIRA は Abbott Labs から購入した。HUMIRA は、非常に僅かな末端ガラクトースを有する非シアル酸化 N - グリカンを含む。

40

## 【0282】

mTNFR - Ig 以外は第 - 1 日および第 7 日に全てのマウス群に投与し、mTNFR - Ig は第 - 1 日、+ 3 日および + 7 日に合計 3 用量を投与した。該臨床スコアを 14 日間モニターした。

## 【0283】

これらの実験の結果を図 18A および 18B に示す。本研究においては、GAMMAGARD は臨床効力を示さなかった。Mu - TNF - Ig は 5 匹中 4 匹のマウスにおいて疾患からの良好な防御を示した。HUMIRA は対照 IgG1 に非常に類似した疾患動態を示した。非シアル酸化抗 TNF は或る程度の疾患抑制を示した。 $\alpha$ 2,6 シアル酸化抗 TNF は 5 匹中 5 匹のマウスにおいて良好な疾患防御を示し、スコアは抗 TNF 療法に匹敵するものであった。

50

## 【0284】

遺伝子発現分析：炎症および骨リモデリング遺伝子の発現を、イソタイプ、2, 6シアル酸化mAbまたはmTNFR-Ig処理マウス(n=4/群)からの後脚のRT/PCR分析により測定した。定量的PCRを行うために、RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX, USA)を使用して、後脚から全RNAを単離した。全RNA(5µg)をDNアーゼ(Roche)での処理に付した。DNアーゼ処理全RNAを、Superscript II(Gibco/BRL)を使用して逆転写した。プライマーを、Primer Express(PE Biosystems)を使用して設計し、またはApplied Biosystemsから商業的に入手した。

10

## 【0285】

各サンプルからの10ngのcDNAに関するリアルタイム定量的PCRを、2つの方法のうちの一つを用いて行った。第1の方法においては、ABI 5700 Instrumentを使用するPerkin Elmer SYBRグリーン・リアルタイム定量的PCRアッセイにおいて、2つの遺伝子特異的非標識プライマーを400nMで使用した。第2の方法においては、ABI 7700配列検出系でのTAQMAN(商標)リアルタイム定量的PCR反応において、それぞれ900nMの2つの非標識プライマーを250nMのFAM標識プローブ(Applied Biosystems)と共に使用した。CD4プロモーターのゲノム領域を認識するプライマーを使用してゲノムDNA汚染の非存在を確認し、リアルタイムPCRによる検出可能なDNA汚染を有するサンプルを該研究から除外した。ユビキチンレベルを別の反応において測定し、各サンプルに関する関心遺伝子およびユビキチンに関する平均サイクル閾値(ct)値を用いる - Ct法によりデータを正規化するために使用した。正規化値を得るために、式： $1.8^{\text{Ctユビキチン}-\text{Ct関心遺伝子}} \times 10^4$ を用いた。結果を表7に示す。示されているデータは、ナイーブ対照マウスの後脚における遺伝子発現と比較された場合の炎症/骨リモデリング遺伝子発現の増加倍率である。

20

## 【0286】

【表 9】

表7  
 ナイーブマウスに対する増加倍率

遺伝子	イソタイプ 33mpk	$\alpha 2,6$ SA Humira 33mpk	mTNFR-Ig 33mpk
IL-1b	14.43	0.90	0.43
IL-6	18.45	0.75	0.77
Tnfsf2 - Tnfa	2.63	0.98	0.70
Tnfsf11 - Rankl	10.94	1.27	0.67
Tnfrsf11a - Rank	2.21	0.86	0.74
MDL-1 long	5.25	1.82	0.88
F4/80	3.20	1.75	0.56
Cd11b	3.57	1.35	1.07
Cd14	2.48	1.53	0.52
Dap12	4.36	1.33	0.90
TIMP-1	15.85	1.44	1.38
PU.1 - Sfp1	3.88	1.09	0.79
Trap - Acp5	10.19	1.85	1.17
Ccl2 - Mcp1	8.01	1.24	0.87
Ccl3 - Mip1a	4.06	1.09	0.58
Cxcl1 - Groa	16.39	1.65	0.69
Cxcl2 - Grob	5.33	0.50	0.32
Atp6v0d2	17.45	2.05	1.74
Mmp9	13.53	1.88	1.32
Fcgr1 - Cd64	4.51	1.04	0.68
Fcgr2b - Cd32a	2.75	1.11	0.71
Fcgr3	0.57	0.74	0.66
Fcgr4	6.54	1.38	1.04
Ctsk	6.85	1.65	0.91
Calcr	1.80	0.49	0.94
Cd68 - Scard1	3.19	1.29	0.94
Itgb2 - Cd18	3.90	1.33	0.88

10

20

30

## 実施例 2 1

コラーゲン - 抗体誘発性関節炎 (A I A) モデルにおける抗 T N F 抗体またはその突然変異タンパク質の効果

実施例 2 0 に記載されている実験を、G A M M A G A R D を静脈内投与した (一方、全ての他の試薬は皮下投与した) こと以外は、それにおいて記載されているとおりに反復した。

## 【 0 2 8 7 】

研究設計：実施例 2 0 に記載されているとおりに、関節炎を誘発させた。

## 【 0 2 8 8 】

m T N F R - I g 以外は第 - 1 日に全てのマウス群に投与し、m T N F R - I g は第 - 1 日および + 3 日に合計 2 用量を投与した。該臨床スコアを 7 日間モニターした。

40

## 【 0 2 8 9 】

マウスの群を以下の試薬で処理した。

## 【 0 2 9 0 】

【表 10】

群/試薬	ロット	用量
ナীব	***	***
イソタイプ IgG1	78ABY	33mpk
非シアル酸化抗 TNF	36ADV	33mpk
$\alpha$ 2, 6 シアル酸化抗 TNF	37ADV	33mpk 又は 6. 6mpk
$\alpha$ 2, 3 シアル酸化抗 TNF	19ADX	33mpk
mTNFR-Ig	82ABW	33mpk
GAMMAGARD	84ADU	1000mpk
HUMIRA	85ADU	33mpk
18 ADX PNG Humira	18ADX	33mpk
20 ADX No Glyco	20ADX	33mpk

全ての群で n=5

試薬：「イソタイプ I g G 1」、「非シアル酸化抗 T N F」、「 $\alpha$  2, 6 シアル酸化抗 T N F、m T N F R - I g、G A M M A G A R D および H U M I R A は実施例 20 に記載されている。

## 【0291】

「 $\alpha$  2, 3 シアル酸化抗 T N F」として特定されている試薬は、 $\alpha$  2, 6 結合シアル酸を除去するためにノイラミニダーゼでインビトロで処理され、 $\alpha$  2, 3 シアリルトランスフェラーゼで更にインビトロで処理された、F 2 4 3 A / V 2 6 4 A を含む G F I 6 . 0 において産生された実施例 18 に記載されている抗 T N F 抗体に対応する。簡潔に説明すると、該精製抗体 ( 4 ~ 5 m g / m l ) は、p H 5 . 2 に調節された、1 m l 当たり 6 . 1 6 m g の塩化ナトリウム、0 . 9 6 m g の一塩基性リン酸ナトリウム脱水物、1 . 5 3 m g の二塩基性リン酸ナトリウム脱水物、0 . 3 0 m g のクエン酸ナトリウム、1 . 3 0 m g のクエン酸ナトリウム一水和物、1 2 m g のマンニトール、1 . 0 m g のポリソルベート 8 0 を含む製剤化バッファー中に存在した。ノイラミニダーゼ ( 1 0 m U / m l ) を抗体混合物に加え、少なくとも 5 時間または脱シアル酸化が完了に達するまで、37 でインキュベートした。該脱シアル酸化物質を、ノイラミニダーゼを除去するために C a p t o M M C ( G E H e a l t h c a r e ) カラム精製に適用し、シアリルトランスフェラーゼバッファー ( 5 0 m M H e p e s p H 7 . 2 , 1 5 0 m M N a C l , 2 . 5 m M C a C l 2 , 2 . 5 m M M g C l 2 , 2 . 5 m M M n C l 2 ) 中に 4 m g / m l で再配合した。ピチア ( P i c h i a ) において発現され h i s タグにより精製されたマウス  $\alpha$  2, 3 シアリルトランスフェラーゼ組換え酵素を  $\alpha$  2, 3 シアル酸の伸長のために使用した。該混合物を 1 . 2 m g / m l でプロテアーゼインヒビター混合物 ( P r o t e a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l ) ( R o c h e ( 商 標 ) , c a t # 1 1 8 7 3 5 8 0 0 0 1 ) の存在下の P B S 中に配合した。該シアル酸化反応の前に、ペプスタチン ( 5 0  $\mu$  g / m l )、キモスタチン ( 2 m g / m l ) および 1 0 m M C M P - シアル酸を該酵素混合物に加え、ついで 0 . 2  $\mu$  m フィルターで滅菌した。1 m l の酵素混合物を 1 0 m l の脱シアル酸化物質に加えた。該反応を 37 で 8 時間行った。シアル酸化収率を E S I - Q - T O F による質量測定により確認した。該最終物質を、M a b S e l e c t ( G E H e a l t h c a r e ) を使用して精製し、前記のバッファー中に配合し、滅菌濾過 ( 0 . 2  $\mu$  m 膜 ) した。

## 【0292】

「18 ADX PNG Humira」として特定されている試薬は、全ての N - グ

10

20

30

40

50

リカンを除去するためにPNGアーゼでインビトロで処理された、F243A/V264Aを含むGFI6.0において産生された実施例18に記載されている抗TNF抗体に対応する。PNGアーゼF酵素をProzyme, Inc.から入手し、pH7.4において4mgのIgG1に対して化学量論量の2 $\mu$ lの市販酵素と共に使用した。消化された該物質を、MabSelect (GE Healthcare)を使用して精製した。該最終物質を配合し、滅菌濾過(0.2 $\mu$ m膜)した。

【0293】

「20 ADX No Glyco」として特定されている試薬は、GFI5.0 YGLY8316において産生された、グリコシル化を引き起こさない297位の単一突然変異を含む実施例18に記載されている野生型抗TNF抗体に対応する。この抗体を産生する株を、Sorvall Evolution RC (kendo, Asheville, NC)中、13,000gで15分間の遠心分離により清澄化した。該捕捉工程を、MabSelect (GE Healthcare)を使用して行い、ついで、Capto MMC (GE Healthcare)を使用して精製工程を行った。該最終物質を配合し、滅菌濾過(0.2 $\mu$ m膜)した。

10

【0294】

これらの実験の結果を図19Aおよび19Bに示す。

【0295】

遺伝子発現分析：炎症および骨リモデリング遺伝子の発現をRT/PCR分析により測定した。定量的PCRを行うために、RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX, USA)を使用して、後脚から全RNAを単離した。全RNA(5 $\mu$ g)をDNアーゼ(Roche)での処理に付した。DNアーゼ処理全RNAを、Superscript II (Gibco/BRL)を使用して逆転写した。プライマーを、Primer Express (PE Biosystems)を使用して設計し、またはApplied Biosystemsから商業的に入手した。

20

【0296】

各サンプルからの10ngのcDNAに関するリアルタイム定量的PCRを、2つの方法のうちの一つを用いて行った。第1の方法においては、ABI 5700 Instrumentを使用するPerkin Elmer SYBRグリーン・リアルタイム定量的PCRアッセイにおいて、2つの遺伝子特異的非標識プライマーを400nMで使用した。第2の方法においては、ABI 7700配列検出系でのTAQMAN(商標)リアルタイム定量的PCR反応において、それぞれ900nMの2つの非標識プライマーを250nMのFAM標識プローブ(Applied Biosystems)と共に使用した。CD4プロモーターのゲノム領域を認識するプライマーを使用してゲノムDNA汚染の非存在を確認し、リアルタイムPCRによる検出可能なDNA汚染を有するサンプルを該研究から除外した。ユビキチンレベルを別の反応において測定し、各サンプルに関する関心遺伝子およびユビキチンに関する平均サイクル閾値(ct)値を用いる - Ct法によりデータを正規化するために使用した。正規化値を得るために、式： $1.8^{\text{Ct}} \times 10^4$  (Ctユビキチン - Ct関心遺伝子)を用いた。結果を表8に示す。示されているデータは、ナイーブ対照マウスの後脚における遺伝子発現と比較された場合の炎症/骨リモデリング遺伝子発現の増加倍率である。

30

40

【0297】

【表 1 1】

表8  
 ナイーブマウスに対する増加倍率

遺伝子	イソタイプ	Asialyated	$\alpha$ 2,3	Gamma	TNFR-Ig 82ABW	$\alpha$ 2,6高
	対照	Humira	Humira	Guard		Humira
	78ABY	36ADV	19ADX	84ADU		37ADV
IL-1b	47.09	25.75	58.94	1.58	1.76	4.55
IL-6	26.18	3.64	10.71	0.37	0.80	0.59
RankL	186.32	138.96	347.65	6.25	20.36	21.26
MDL-1	4.65	3.79	5.71	1.23	0.97	1.93
Cd11b	9.43	13.20	23.11	1.77	3.17	5.25
Dap12	4.45	3.54	6.01	1.81	1.59	2.26
TIMP-1	15.98	6.80	18.43	1.40	1.21	1.38
PU.1	6.91	9.18	15.50	1.00	1.48	3.17
Trap - Acp5	13.88	15.44	35.34	1.19	2.14	5.72
MCP1	14.96	5.66	11.62	1.46	1.44	1.59
Cxcl1 - Groa	23.04	4.92	18.10	0.39	1.34	1.41
Cxcl2 - Grob	30.83	6.30	16.06	2.93	1.15	0.99
Atp6v0d2	16.62	9.81	21.87	1.60	1.81	2.68
Mmp9	15.00	12.33	26.43	1.69	2.26	3.24
Fcgr1 - Cd64	5.84	4.48	8.68	1.87	1.59	2.36
Fcgr2b - Cd32a	3.63	2.81	4.34	1.48	1.59	1.60
Fcgr3	4.07	6.64	7.73	1.33	1.81	4.86
Fcgr4	8.91	7.79	14.10	2.93	2.12	4.15
Ctsk	13.13	15.04	30.55	1.25	2.20	4.17
Itgb2	6.46	7.66	17.07	1.16	1.68	3.24
MIP1a	5.12	3.15	5.19	1.39	1.08	1.47

10

20

30

## 実施例 2 2

抗 TNF 抗体および突然変異タンパク質の Fc R 結合アッセイ

Fc 受容体結合アッセイを、実施例 1 8 に記載されている抗 TNF 抗体を使用して、実施例 1 に記載されているとおりに行った。結果を図 2 0 および表 9 ~ 1 0 に示す。

【 0 2 9 8 】

【表 1 2】

表 9

GS5.0 において産生された野生型(親)抗体と比較した場合の Fc $\gamma$  受容体への結合における低下

40

サンプル	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RIIa	Fc $\gamma$ RIIb/c	Fc $\gamma$ IIIa LF	Fc $\gamma$ IIIa LV
抗 TNF DM (GS5.0 において産生)	↓ 4-10	↓ 60-100	無結合	↓ 11-12	↓ 1.5-1.7
抗 TNF DM (GS6.0 において産生)	↓ 2-3	↓ 100	無結合	↓ 10-12	↓ 1.5-2.0

↓はアフィニティの減少倍率を示す。

↑はアフィニティの増加倍率を示す。

50

【 0 2 9 9 】

【 表 1 3 】

表 10

市販の HUMIRA と比較した場合の Fc $\gamma$  受容体への結合における低下

	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RIIa	Fc $\gamma$ RIIb/c	Fc $\gamma$ IIIa LF	Fc $\gamma$ IIIa LV
抗 TNF DM (GS5.0 において産生)	↓ 4-11	無結合	↓ 20	差無し	差無し
抗 TNF DM (GS6.0 において産生)	↓ 2-4	無結合	↓ 20	差無し	差無し
抗 TNF DM 野生型 (GS5.0 において産生)	差無し	↑ 30	↑ 2	↑ 13-15	↑ 1.8-2.0

↓はアフィニティの減少倍率を示す。

↑はアフィニティの増加倍率を示す。

10

## 実施例 23

20

追加的な抗 Her 2 Fc 二重突然変異タンパク質 ( 2 4 3 / 2 6 4 位におけるもの )  
およびそれらの N - グリカン組成物の構築

縮重プライマーを使用して飽和突然変異誘発を行うために、Stratagene QuikChange (登録商標) Site-Directed Mutagenesis Kit Catalog # 200518 (30 反応) を、それが提供しているプロトコールに従い使用して、実施例 2 に記載されている Her 2 Ig G 1 抗体の追加的な Fc 二重突然変異タンパク質を構築した。アルファ - 接合因子プレドメインのシグナル配列を軽鎖および重鎖の 5 ' 末端にインフレームで融合した。Ig G 1 およびその突然変異タンパク質の融合シグナル配列を有する得られた重鎖および軽鎖をそれぞれピチア・パストリス ( Pichia pastoris ) A O X 1 プロモーター下およびサッカロミセス・セレビスイ ( S . cerevisiae ) Cyc ターミネーターの前にクローニングした。完成した重鎖および軽鎖の発現カセットを最終的な発現ベクターへと合体させた。

30

【 0 3 0 0 】

該ベクターを糖操作ピチア ( Pichia ) G F I 6 . 0 宿主細胞 Y G L Y 3 5 8 2 および Y G L Y 2 2 8 1 2 において発現させた。

【 0 3 0 1 】

【表 1 4】

表11

株	説明
YGLY4563	抗 Her2 F243A/V264A 二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0 宿主 YGLY3582
YGLY23294	抗 Her2 F243Y/V264G 二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0 宿主 YGLY22812
YGLY23280	抗 Her2 F243T/V264G 二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0 宿主 YGLY22812
YGLY23301	抗 Her2 F243L/V264A 二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0 宿主 YGLY22812
YGLY25259	抗 Her2 F243L/V264N 二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0 宿主 YGLY22812
YGLY23305	抗 Her2 F243V/V264G 二重突然変異タンパク質を産生する GFI6.0 宿主 YGLY22812

10

20

GFI6.0 YGLY3582 株の遺伝子型は実施例 4 に記載されている (YGLY4563 と同じ)。

## 【0302】

抗 TNF Fc DM 突然変異タンパク質の発現のために使用されるピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) GFI6.0 株 YGLY22812 の遺伝子型は以下のとおりである: *ura5* : : *ScSUC2 och1* : : *lacZ bmt2* : : *lacZ / KLMNN2 - 2 mnn4 L1* : : *lacZ / MmSLC35A3 pno1 mnn4* : : *lacZ ADE1* : : *lacZ / NA10 / MmSLC35A3 / FB8his1* : : *lacZ / ScGAL10 / XB33 / DmUGT arg1* : : *HIS1 / KD53 / TC54 bmt4* : : *lacZ bmt1* : : *lacZ bmt3* : : *lacZ TRP2* : : *ARG1 / MmCST / HsGNE / HsCSS / HsSPS / MmST6 - 33 ste13* : : *lacZ / TrMDS1 dap2* : : *Nat<sup>R</sup> TRP5* : : *Hyg<sup>R</sup> MmCST / HsGNE / HsCSS / HsSPS / MmST6 - 33 Vps10 - 1* : : *AOX1p\_\_LmSTT3d*。YGLY23294、YGLY23280、YGLY23301、YGLY25259 および YGLY23305 は、表 11 に挙げられている異なる突然変異タンパク質をそれらが発現すること以外は同じ遺伝子型を有する。

30

## 【0303】

該株を、24 で 3 日間振とうされる 300 ml の 2% BMGY 培地を含有する 500 ml の振とうフラスコ内で培養した。

40

## 【0304】

振とうフラスコの誘導のためのプロトコール : 各培養の全容量 (300 ml) をファルコンチューブ内に集め、2500 rpm で 5 分間遠心する。上清を移し、細胞ペレットを 150 ml の 2% BMMY および 360 μl の PMTi4 (ストック濃度 0.65 mg/ml) の最終容量に再懸濁させる。新鮮な 500 ml 振とうフラスコに移し、24 で 2 日間振とうする。該誘導培養物を遠心沈降させ、上清を新鮮なファルコンチューブ内に集める。

## 【0305】

GE Healthcare, STREAMLINE rProtein A (カタログ番号 17-1281-01) および BioRad ポリ-プレップ (poly prep

50

) クロマトグラフィーカラム ( 10 ml ) ( カタログ番号 731 - 1550 ) プロテイン A カラムにより、該分泌抗体を精製した。以下のバッファーを使用した。

- ・洗浄バッファー # 1 : 20 mM Tris pH 7.0 , 1 M NaCl
- ・洗浄バッファー # 2 : 20 mM Tris pH 7.0
- ・中和バッファー : 1 M Tris pH 8.0 ~ pH 9.0
- ・溶出バッファー : 100 mM または 50 mM クエン酸ナトリウム pH 3.0
- ・クリーニング溶液 : 水中の 6 M 尿素

精製プロトコルは以下のとおりである。

・ 500  $\mu$ l の STREAMLINE rProtein A ビーズを各 BioRad カラムに加える。該ビーズは 20% エタノール中に存在するべきである。該ビーズスラリーの組成は 50% ビーズ、50% 液体であるべきである。

・ 該プロテイン A ビーズが該カラム内に入ったら、それらを 5 ml の洗浄バッファー # 2 で洗浄すべきである ( フロースルーは廃棄する ) 。

・ 10 ml の上清を BioRad カラムに加える。この工程中に、該抗体はプロテイン A ビーズに結合するであろう ( フロースルーは廃棄する ) 。

・ 5 ml の洗浄バッファー # 1 を該カラムに加えることにより、望ましくない過剰のタンパク質を洗い落とす ( フロースルーは廃棄する ) 。

・ 5 ml の洗浄バッファー # 2 を加えることにより、該カラムを再び洗浄する ( フロースルーは廃棄する ) 。

・ 1 ml の中和バッファーを 15 ml タンパク質収集チューブに加える。

・ BioRad カラムを該 15 ml 収集チューブ内に配置する。

・ 3 ml の溶出バッファーを BioRad カラムに加える。これは所望の抗体をプロテイン A ビーズから除去するであろう。

・ 溶出タンパク質を該 15 ml タンパク質収集チューブ内に集める。

・ ブラッドフォードアッセイ ( 10  $\mu$ l のタンパク質をブラッドフォードアッセイに使用する ) により該溶出タンパク質の濃度を決定する。

#### 【0306】

各グリコフォームの相対量を定量するために、N-グリコシダーゼ F 遊離グリカン を 2-アミノベンジジン ( 2-AB ) で標識し、HPLC により分析した ( Choi ら , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 : 5022 - 5027 ( 2003 ) および Hamilton ら , Science 313 : 1441 - 1443 ( 2006 ) に記載されているとおりに行った ) 。表 12 は、産生された抗体のグリカンプロファイルを示す ( NQP = 定量不可能 ) 。

#### 【0307】

#### 【表 15】

表12

	M5	G2	M7	M8	A1	A1H	A2	HM
YGLY4563	2.4	3.2	2.8	2.5	7.9	9.6	67.3	4.3
YGLY23294	16.9	NQP	--	--	23.4	--	59.7	--
YGLY23280	20.6	NQP	--	--	16.3	--	63.1	--
YGLY23301	15.5	--	--	--	21.9	--	59.4	--
YGLY25259	27.7	NQP	--	--	23.9	--	48.3	--
YGLY23305	29.6	NQP	--	--	18.1	--	52.4	--

種々の Fc 受容体への前記突然変異体の結合を、実施例 11 に記載されている方法を用いて測定した。結果を図 21 ならびに表 13 および 14 に示す。

#### 【0308】

【表 16】

表 13

F243A/V264A 二重突然変異タンパク質と比較した場合の結合アフィニティ

サンプル	Fc $\gamma$ RIIb/c	Fc $\gamma$ IIIa LF	Fc $\gamma$ IIIa LV
YGLY23301	↑ 2	↑ 20	↑ 2.2
YGLY23305	↑ 12	↑ 15	↑ 3
YGLY23280	無変化	↓ 4	↑ 3
YGLY23294	↑ 50	↑ >100	↑ 9
YGLY25259	無変化	↑ >30	↑ 4

10

【0309】

【表 17】

表 14

商業的に入手可能な Herceptin と比較した場合の結合アフィニティ

サンプル	Fc $\gamma$ RIIb/c	Fc $\gamma$ IIIa LF	Fc $\gamma$ IIIa LV
YGLY4563	無結合	↓ 8.4	無変化
YGLY23301	↓ 3	↑ 2.4	↑ 2.2
YGLY23305	↑ 2	無変化	無変化
YGLY23280	↓ 3	↓ 25	↓ 6
YGLY23294	↑ >15	↑ 10	↑ 3.5
YGLY25259	↓ 2.5	↑ 2.5	無変化

20

実施例 23

抗 P C K S 9 親抗体および F c 突然変異タンパク質

配列番号 13 の重鎖アミノ酸配列と配列番号 14 の軽鎖アミノ酸配列とを有する抗 P C S K 9 抗体も構築し、重鎖の突然変異 F 2 4 3 A および V 2 6 4 A を導入した（実施例 2 に記載されているとおりに行った）。該抗 P C S K 9 二重突然変異タンパク質の重鎖アミノ酸配列を配列番号 15 に示す。該抗体の野生型および二重突然変異形態を糖操作ピチア（P i c h i a）G F I 5 . 0 および G F I 6 . 0 において発現させ、精製し（実施例 3 ~ 7 に記載されている方法に従い行った）、種々の F c 受容体へのそれらの結合能を、実施例 11 に記載されている方法を用いて測定した。該抗 P C S K 9 二重突然変異タンパク質抗体（配列番号 15 の重鎖アミノ酸配列と配列番号 14 の軽鎖アミノ酸配列とを含む、G F I 6 . 0 において産生されたもの）は、親抗体（G F I 5 . 0 において産生されたもの）と比較された場合、F c R I への結合における約 4 倍の低下、F c R I I I a L F への結合における 8 ~ 60 倍の低下、F c R I I I a L V への結合における 2 ~ 6 倍の低下を示し、また、F c R I I a または F c R I I b / c への検出可能な結合を示さなかった。

30

40

【0310】

実施例 24

コラーゲン - 抗体誘発性関節炎（A I A）モデルにおける抗 H e r 2 抗体およびその F c 突然変異タンパク質の効果

モデル誘発：I I 型コラーゲンの種々の種における保存されたエピトープを認識する 5 つのモノクローナル抗体、すなわち、クローン A 2 - 1 0（I g G 2 a）、F 1 0 - 2 1

50

( I g G 2 a )、D 8 - 6 ( I g G 2 a )、D 1 - 2 G ( I g G 2 b ) および D 2 - 1 1 2 ( I g G 2 b ) の混合物からなる市販の A r t h r o g e n - C I A ( 登録商標 ) 関節炎生成性モノクローナル抗体 ( C h o n d r e x から購入 ) で、A I A ( 抗体誘発性関節炎 ) を誘発させる。

【 0 3 1 1 】

動物：共刺激因子の添加を伴うことなく関節炎誘発に対して感受性である 1 0 週齢の B 1 0 . R I I I 雄マウスを使用した。これらの動物は J a c k s o n L a b o r a t o r y から購入した。

【 0 3 1 2 】

臨床スコア化：関節炎の誘発後に毎日、脚の腫張を測定した。該疾患の重症度を以下のとおりに脚ごとに 0 ~ 3 の尺度で等級化した：0 , 正常；1 , 1 つの指の腫脹；2 , 2 以上の指の腫脹；3 , 脚全体の腫脹。マウス当たりの最大臨床スコアは 1 2 である。

10

【 0 3 1 3 】

研究設計：第 0 日に、3 m g の抗 C I I m A b 病原体混合物 I V の受動移入により関節炎を誘発させた。

【 0 3 1 4 】

全ての群のマウスに第 - 1 日に投与した。臨床スコアを 7 日間モニターした。

【 0 3 1 5 】

マウスの群を以下の試薬で皮下処理した。

【 0 3 1 6 】

20

【表 1 8 】

群/試薬	ロット	用量
A. ナイーブ	***	***
B. イソタイプ IgG1	78ABY	33mpk
C. 非シアル酸化抗 Her2	38ADV	33mpk
D. $\alpha$ 2, 6 シアル酸化抗 Her2	37ADV	33mpk
E. muTNFR-Ig	82ABW	33mpk

群 E は n=4 であり、それ以外の全ての群は n=5 である。

30

イソタイプ I g G 1 抗体を対照として使用した。該抗体はマウス抗ヘキソンに結合し、「 2 7 F 1 1 」なる名称を有していた。

【 0 3 1 7 】

「非シアル酸化抗 H e r 2 」として特定されているサンプルは、G F I 5 . 0 株 Y G L Y 1 9 7 0 9 において産生された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 突然変異を含む抗 H e r 2 抗体に対応する。該 Y G L Y 1 9 7 0 9 株は、L s S T T 3 d を発現させるためにプラスミド p G L Y 6 3 0 1 で形質転換された抗 H e r 2 抗体産生株 Y G L Y 1 3 9 7 9 から誘導された。株 Y G L Y 1 3 9 7 9 およびプラスミド p G L Y 6 3 0 1 は特許出願 W O 2 0 1 0 / 0 9 9 1 8 6 に記載されている。

40

【 0 3 1 8 】

「 2 , 6 シアル酸化抗 H e r 2 」として特定されているサンプルは、G F I 6 . 0 株 Y G L Y 4 5 6 3 ( 実施例 4 を参照されたい ) において産生された F 2 4 3 A / V 2 6 4 A 突然変異を含む抗 H e r 2 抗体に対応する。

【 0 3 1 9 】

m T N F R - I g は、ヒンジから始まり C H 2 および C H 3 領域に広がる m I g G 1 F c に連結された m T N F R 2 の細胞外ドメインを含む、ならびに C H O 細胞において産生された配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含むイムノアドヘシン ( 抗 T N F 受容体 I g - 融

50

合タンパク質)である。

【0320】

これらの実験の結果を図22に示す。

【0321】

【表19】

配列表

配列番号	説明	配列
1	wt抗HER抗体の重鎖アミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDITYIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	抗HER抗体の軽鎖アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFSGS RSGTDFLELTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	プライマー	GGTCCTCCGTTTTTTTTGGCCCCACCAAGCCAAAGGACACTTTG
4	プライマー	GTGTCCCTTGGCTTTGGTGGGGCCAAAAAACGGAAGGACCACC
5	プライマー	gttacatgtgttgttctgacgtttctcagag
6	プライマー	GGTCCTCGTGAGAAACGTCAGCAACAACACATG

10

20

7	アルファ接合因子 DNA配列	GAATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATT AGCT
8	アルファ接合因子 アミノ酸配列	MRFPSIFTAVLFAASSALA
9	二重突然変異 タンパク質 抗HER抗体の 重鎖アミノ酸配列	EVQLVESGGGLVQPQGSRLRSLCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSSGLYSLSVVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLAPPKKDTLMI SRT EVTQVADVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSP GK
10	野生型抗TNF アルファ抗体の 重鎖アミノ酸配列	E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S A I T W N S G H I D Y A D S V E G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V S Y L S T A S S L D Y W G Q G T L V T V S S 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 W N S G A L T S 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 P 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 K 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 A K C K V S N K V 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 D E L T K N Q V S L T 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
11	抗TNFアルファ 抗体の 軽鎖アミノ酸配列	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 G I R N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S T I L S Q S G V P P S R F S G S S G T D F T A L P T L S S L Q P E D V A T Y Y Q R Y N R A P Y T F G Q G T K V E I K 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 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
12	二重突然変異 タンパク質抗TNF アルファ抗体の 重鎖アミノ酸配列	E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S A I T W N S G H I D Y A D S V E G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V S Y L S T A S S L D Y W G Q G T L V T V S S 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 W N S G A L T S 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 P 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 K G G P S V F L A P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V A 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 A K C K V S N K V 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 D E L T K N Q V S L T 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
13	wt抗PCSK9抗体の 重鎖アミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYFTFTDYMNWVRQAPGQGLEWIGDINPNNGGAIYNQKFK GRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCTSGIITETAEDFWGQGLVTV S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A

10

20

30

40

		L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S 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 C N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C L 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 D E L T K N Q V S L T 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
14	wt抗PCSK9抗体の 軽鎖アミノ酸配列	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGTNVVWYQOKPKGAPKALIHSAFYRYSQVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQYKTYPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	二重突然変異 タンパク質 抗PCSK9抗体の 重鎖アミノ酸配列	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFDDYMNWVRQAPGQGLEWIGDINPNNGGAIYNQKFK GRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCTSGLITEIAEDFWGQGTLVTV S S 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 W N S G A L T S 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 A P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V A 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 C Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T 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
16	抗TNF Ig融合 タンパク質	Vvltpykpepgyecqisqeyydrkaqmccakcpggyvkhfncnksdtvcadceasmytgvnqf rtclscsssccttdqveiractkqgnrvcaaceagrycalthsgscrqcmrlskcpgpfgvassra pngnvlckacaptgfsdttsstdvcrphricsilaipgnastdavoapesptlsaiprtlyvsqp eptrsqpldqepggsqtpsiltslsgstpiiegstkggsvprdcgckpcictvpevssvfifppk pkdvltitltpkvvcvvdiskddpevgfswfvddvevhtaqtkpreeqfnstfrsvselpimhg dwlngkefkorvnsaafpapiektisktkgrpkapqvtytpppkeqmakdkvsltcmidffped itvewqwnqpaenykntqpmtdtgsyfvysklnvqksnweagntftcsvglhghhhteksl shspgk
17	FcγRIIb/cの 細胞外ドメイン 及び ヒスチジンタグ	M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S L N E K R A P P K A V L K L E P Q W I N V L Q E D S V T L T C R G T H S P E S D S I Q W F H N G N L I P T H T Q P S Y R F K A N N N D S G E Y T C Q T G Q T S L S D P V H L T V L S E W L V L Q T P H L E F Q E G E T I V L R C H S W K D K P L V K V T F F Q N G K S K K F S R S D P N F S I P Q A N H S H S G D Y H C T G N I G Y T L Y S S K P V T I T V Q A P G G G H H H H H H H H
18	Fc領域	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 D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q

10

20

30

40

		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												
19	Fc領域	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	F	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	D	E	L	T
		K	N	Q	V	S	L	T	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			

10

本発明は、例示されている実施形態に関して本明細書に記載されているが、本発明はそれらに限定されないと理解されるべきである。当業者および本明細書における教示の読者は本発明の範囲内の追加的な修飾および実施形態を認識するであろう。

20

【 図 1 】

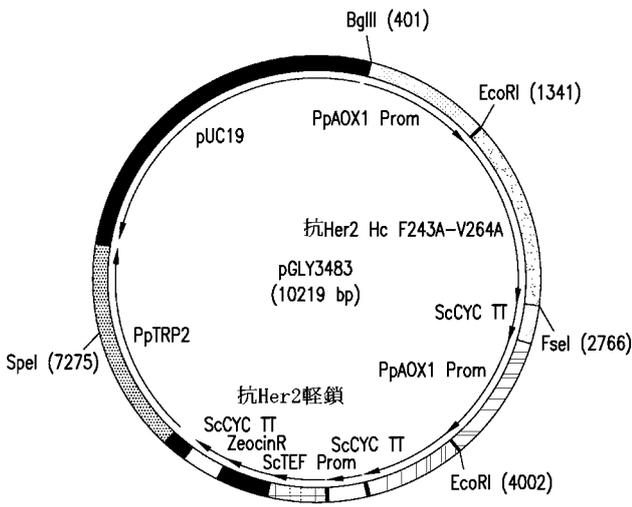


FIG.1

【 図 2 】

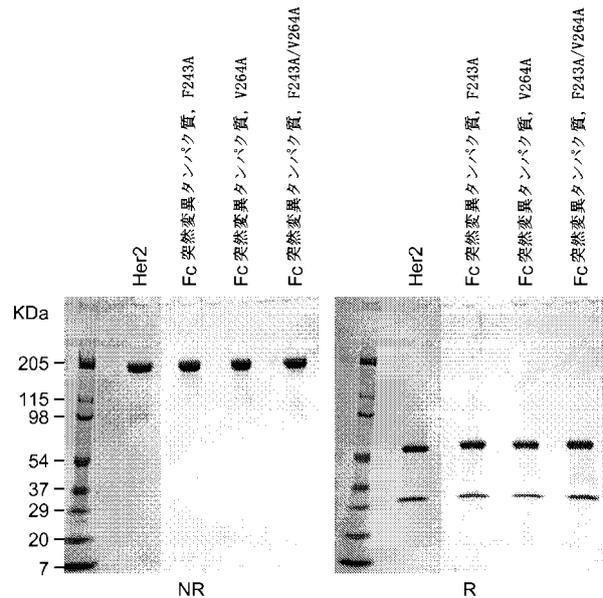


FIG.2

【 図 3 】

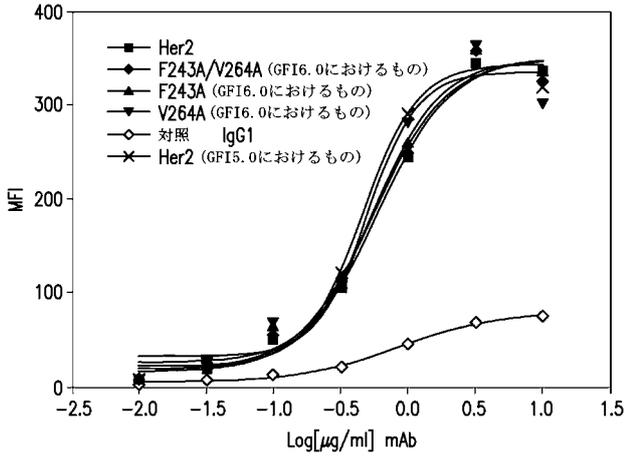


FIG.3

【 図 4 】

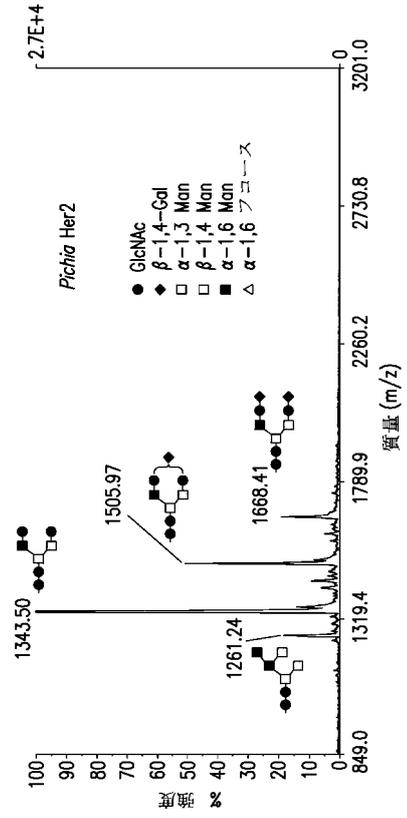


FIG.4

【 図 5 】

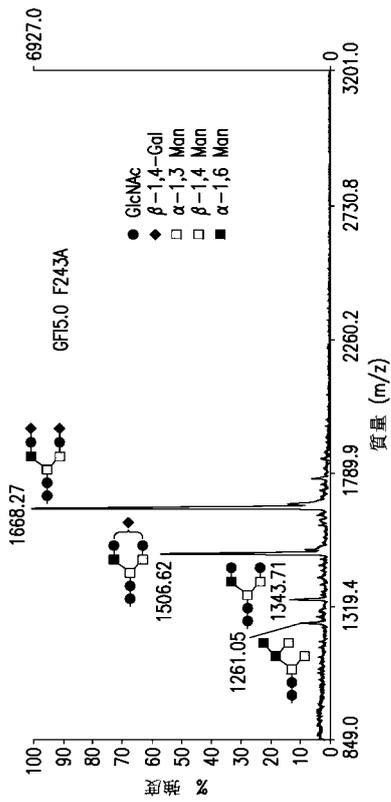


FIG.5

【 図 6 】

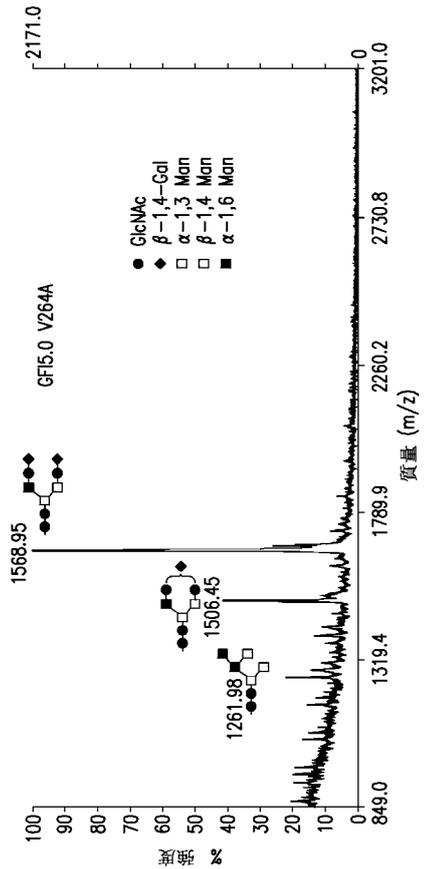


FIG.6

【 図 7 】

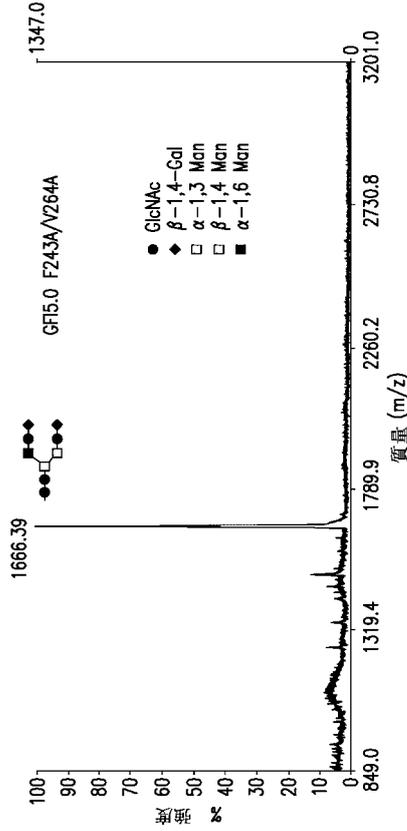


FIG.7

【 図 8 】

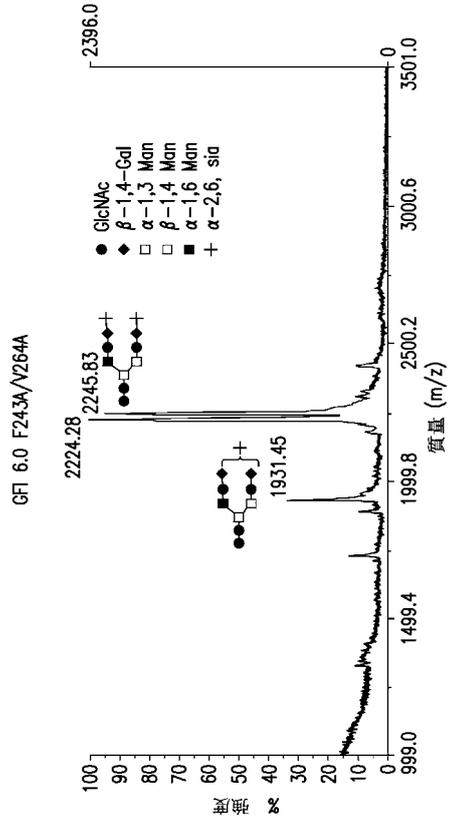


FIG.8

【 図 9 A 】

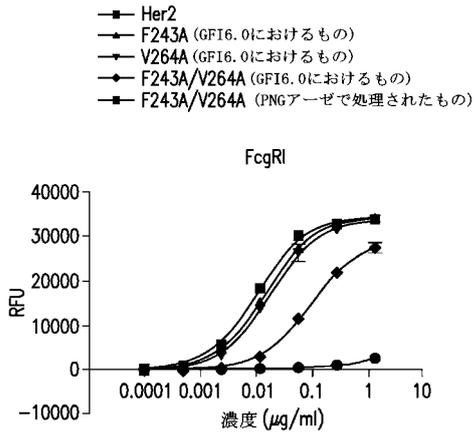


FIG.9A

【 図 9 B 】

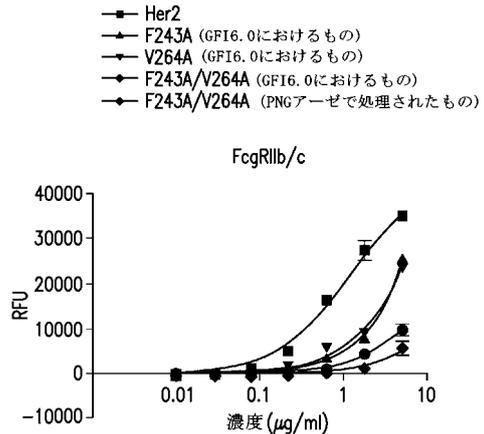


FIG.9B

【 図 9 C 】

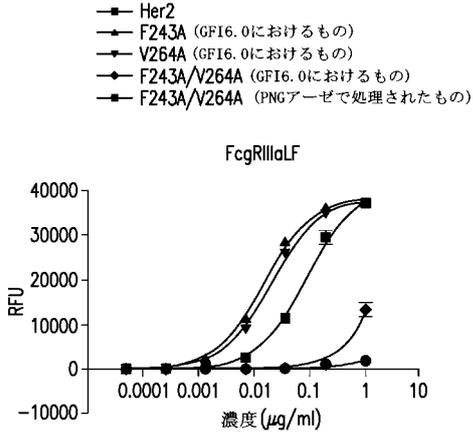


FIG.9C

【 図 9 D 】

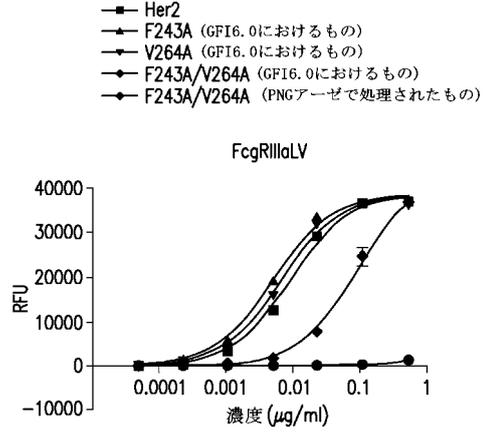


FIG.9D

【 図 1 0 】

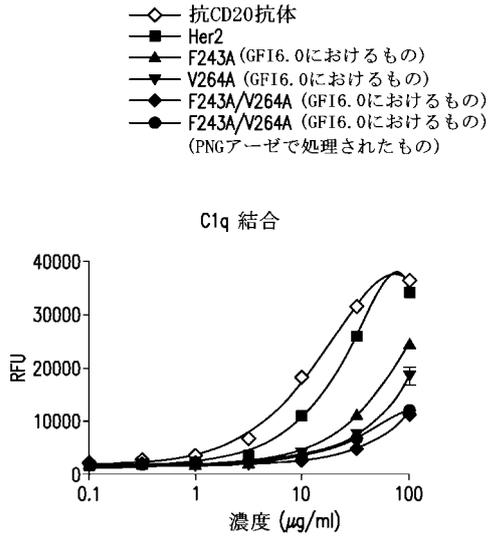


FIG.10

【 図 1 1 】

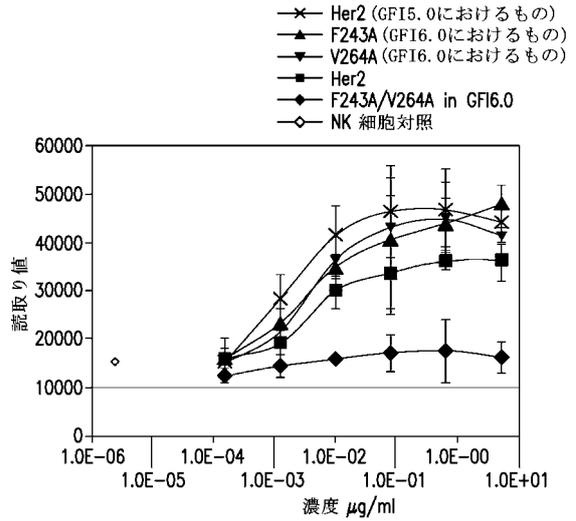


FIG.11

【 図 1 2 】

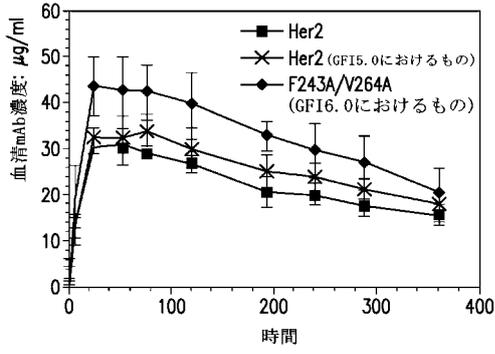


FIG.12

【 図 1 3 B 】

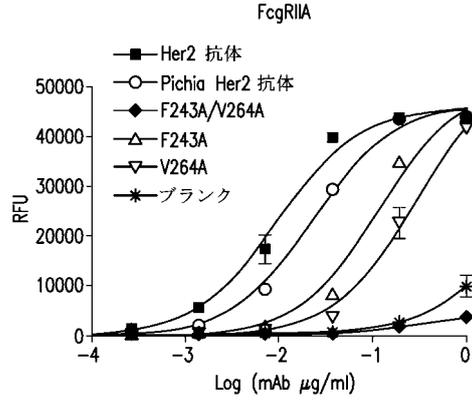


FIG.13B

【 図 1 3 A 】

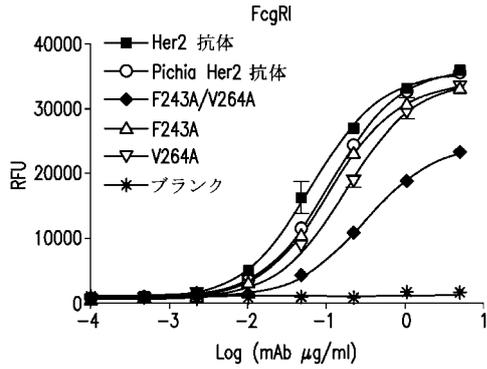


FIG.13A

【 図 1 3 C 】

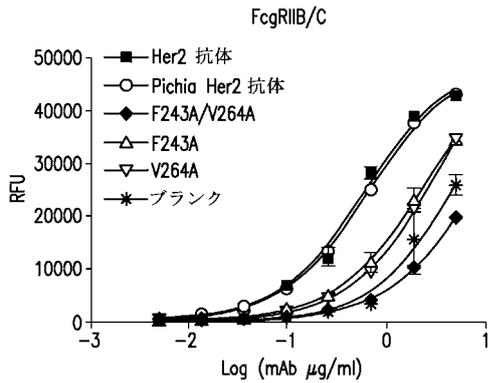


FIG.13C

【 図 1 3 D 】

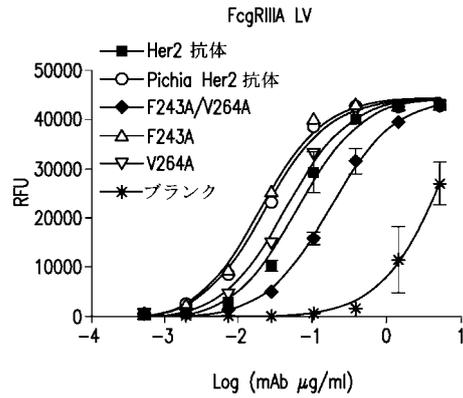


FIG.13D

【 図 1 3 E 】

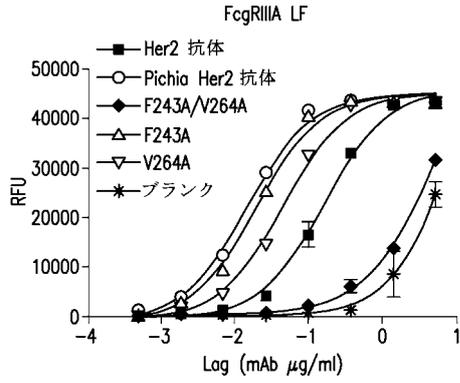


FIG.13E

【 図 1 4 A 】

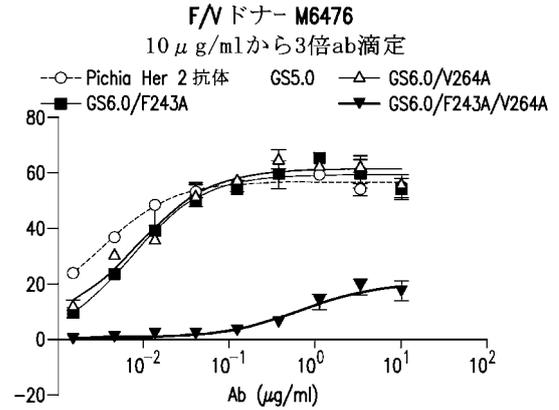


FIG.14A

【 図 1 4 B 】

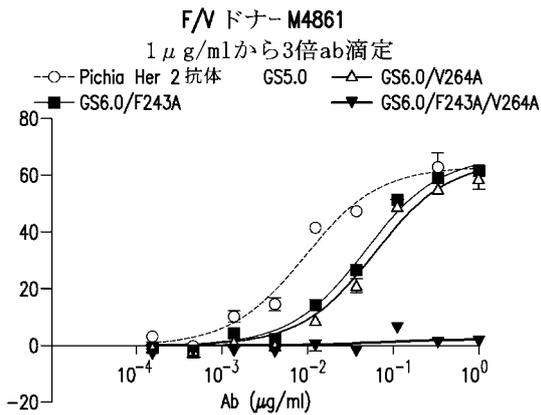


FIG.14B

【 図 1 4 C 】

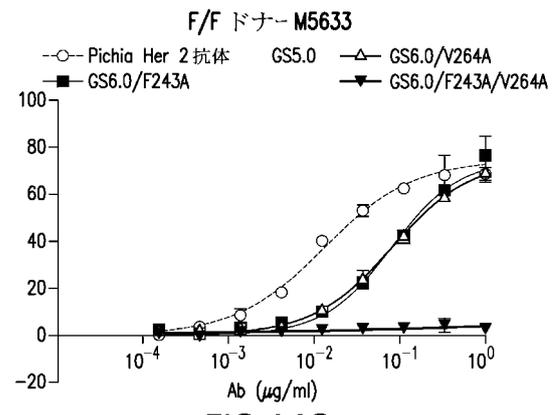
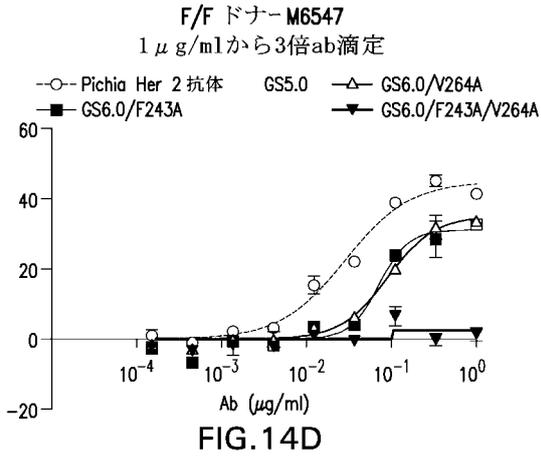
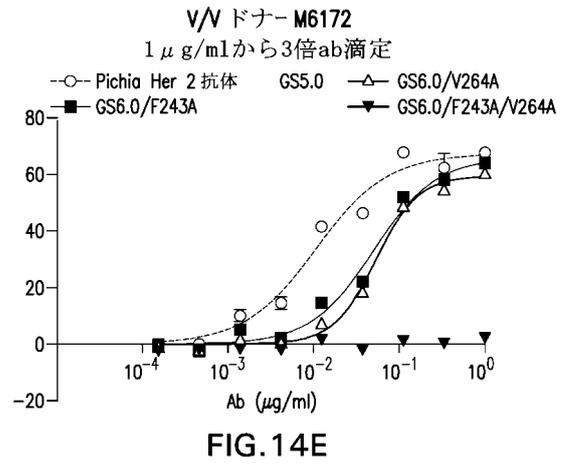


FIG.14C

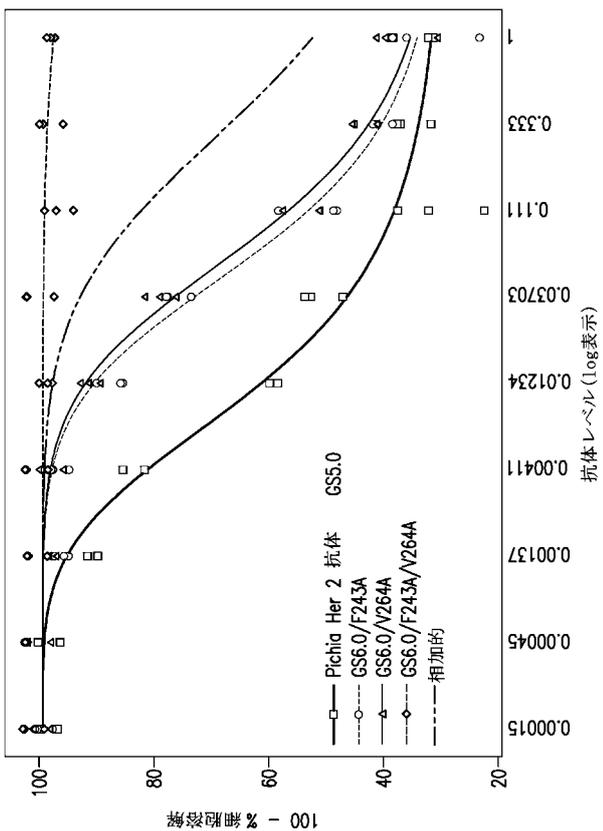
【 図 1 4 D 】



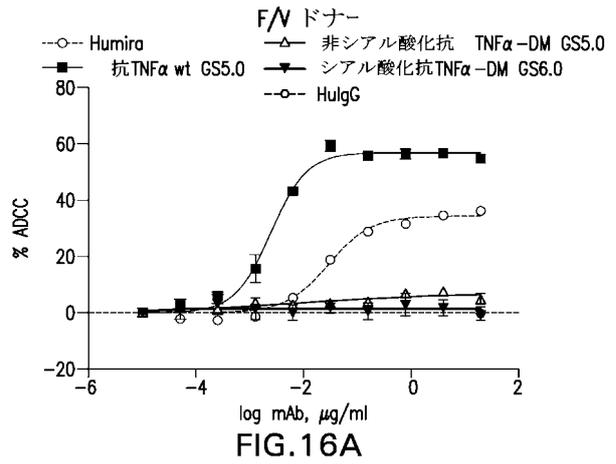
【 図 1 4 E 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】

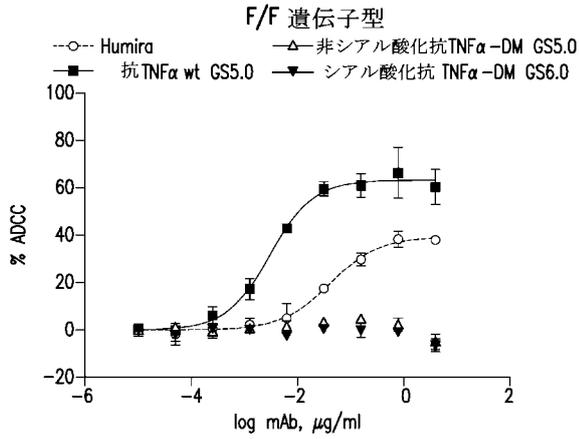


FIG.16B

【 図 1 6 C 】

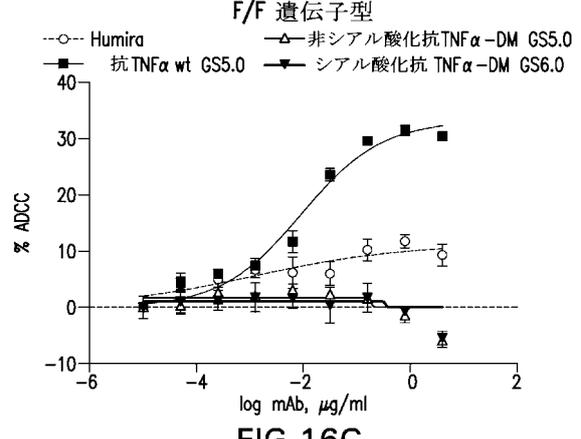


FIG.16C

【 図 1 6 D 】

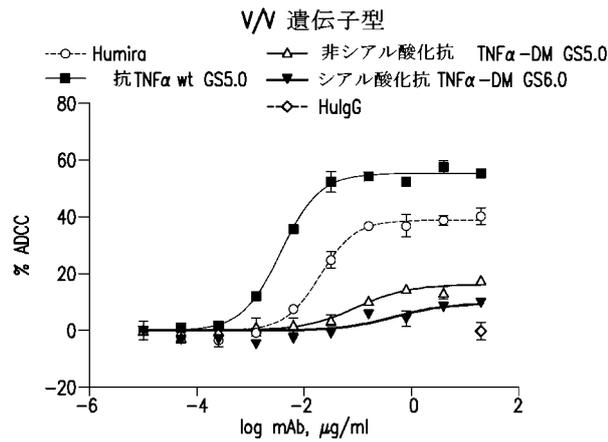


FIG.16D

【 図 1 7 】

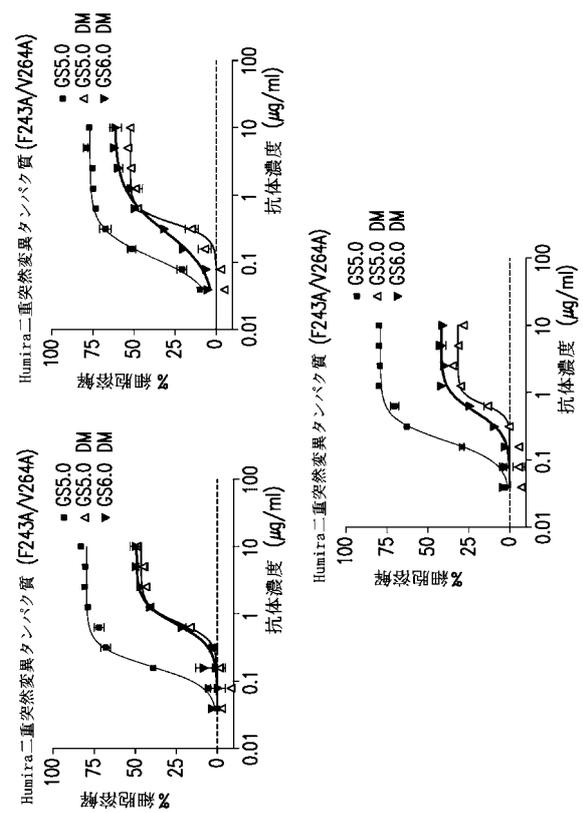


FIG.17

【 図 1 8 A 】

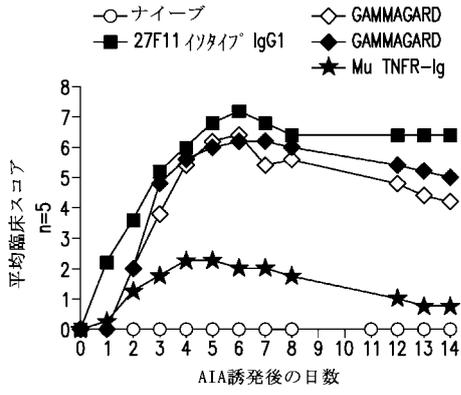


FIG. 18A

【 図 1 8 B 】

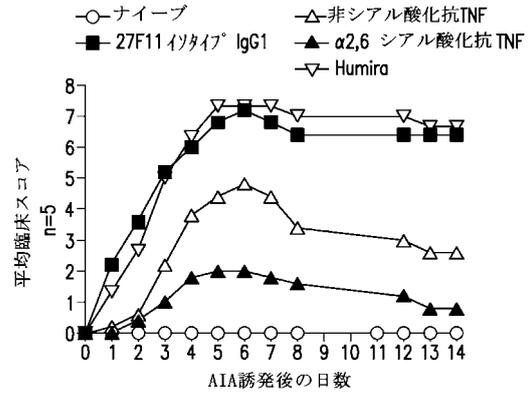


FIG. 18B

【 図 1 9 A 】

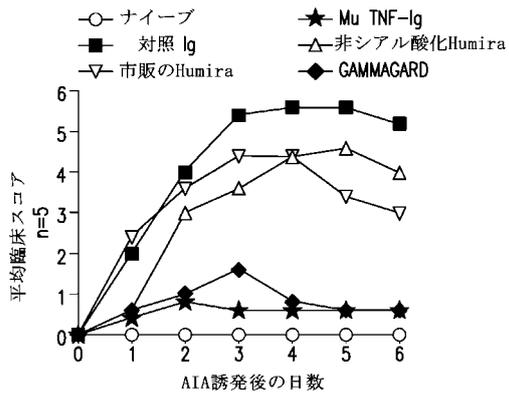


FIG. 19A

【 図 1 9 B 】

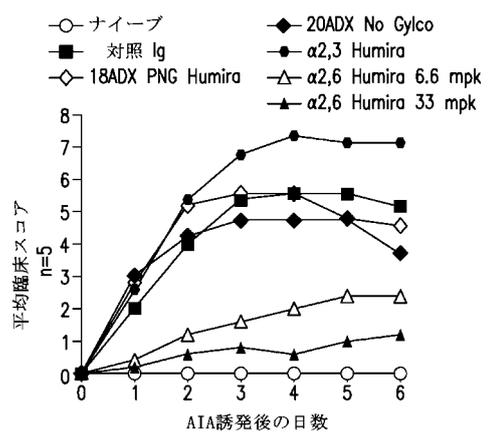
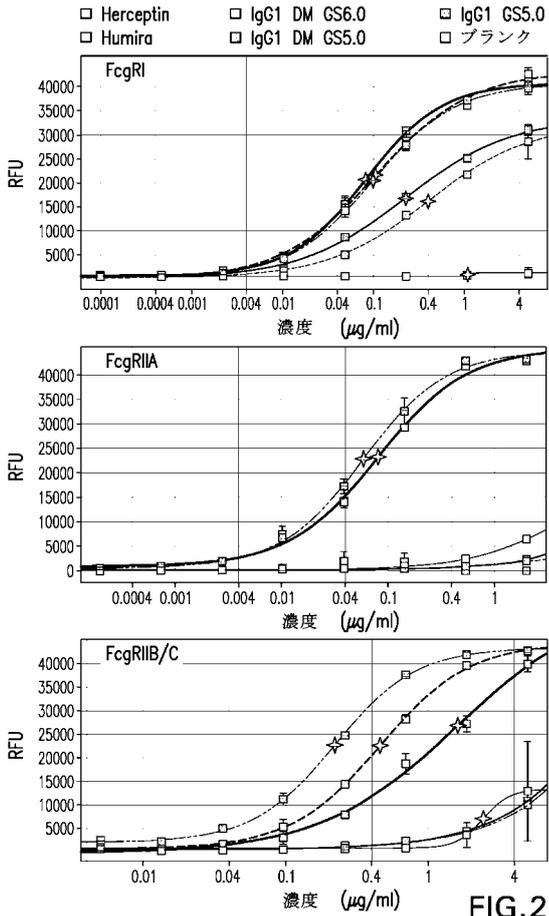
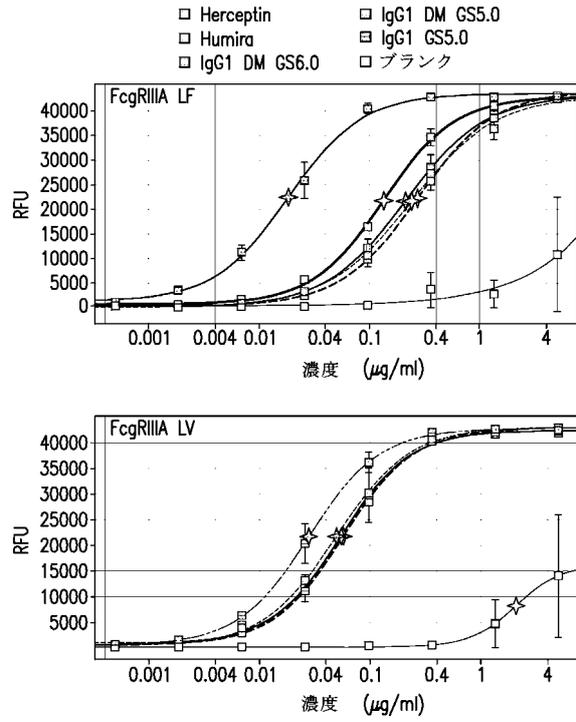


FIG. 19B

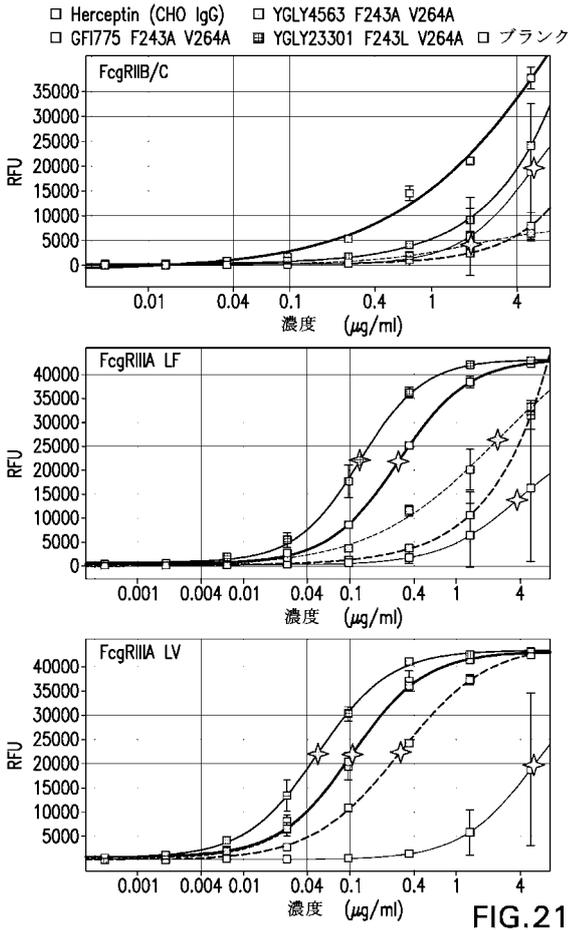
【 図 2 0 - 1 】



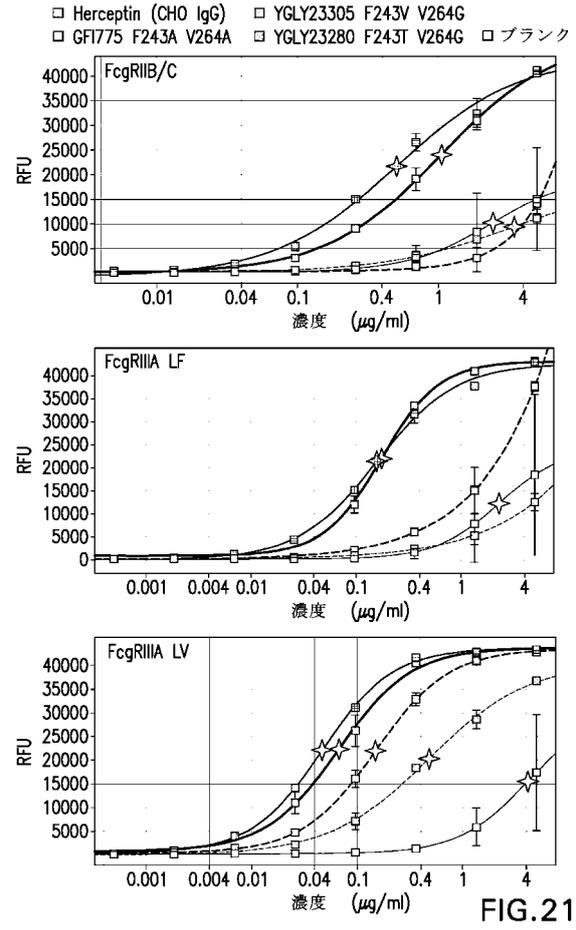
【 図 2 0 - 2 】



【 図 2 1 A 】



【 図 2 1 B 】



【 図 2 2 】

- ナイーブ
- △ 38ADY HER2 GS5.0
- IgG1 イソタイプ
- ▲ 37ADY HER2 GS6.0 F243A V264A
- 82ABW mu-TNFR-Ig

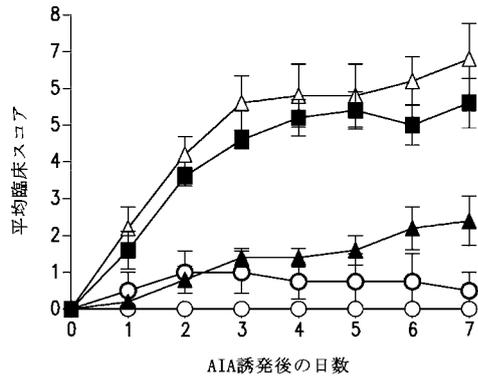


FIG.22

【 配列表 】

2016155838000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	1 0 1
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	1/14 (2006.01)	A 6 1 P	21/02	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	17/10 (2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	13/10 (2006.01)	A 6 1 P	17/10	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	13/10	
		A 6 1 K	37/02	
		A 6 1 K	39/395	N
		A 6 1 K	48/00	
		C 1 2 N	15/00	A

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 スタッドハイム, テランス・エイ

アメリカ合衆国、ニュー・ハンブシャー・0 3 7 6 6、レバノン、ラフアイエット・ストリート・

21、スイート・200

(72)発明者 ジヤー, ドンシン

アメリカ合衆国、ニュー・ハンプシャー・03766、レバノン、ラファイエット・ストリート・  
21、スイート・200

(72)発明者 リウ, リーミン

アメリカ合衆国、ペンシルベニア・19486、ウエスト・ポイント、サムニータウン・パイク・  
770

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA06 CA07 CA20 DA12 EA04 FA02 FA07 GA14  
GA19 HA01 HA06  
4B064 AG27 BH07 BJ10 CA06 CA19 CA21 CC03 CC06 CC10 CC12  
CC24 CD01 CD02 CD06 CD09 CD20 CD21 CE03 CE12 DA01  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA56 NA14  
ZA012 ZA022 ZA152 ZA162 ZA202 ZA362 ZA372 ZA402 ZA422 ZA452  
ZA512 ZA542 ZA552 ZA622 ZA682 ZA692 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962  
ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZC022  
ZC352 ZC552  
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 EE01  
4H045 AA11 AA30 BA53 DA76 EA20 FA70 FA74 GA26 HA05