

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5820800号  
(P5820800)

(45) 発行日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(24) 登録日 平成27年10月9日(2015.10.9)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/00	(2006.01)	C O 7 K 16/00	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 12 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-503137 (P2012-503137)  
 (86) (22) 出願日 平成23年2月28日(2011.2.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/054549  
 (87) 国際公開番号 W02011/108502  
 (87) 国際公開日 平成23年9月9日(2011.9.9)  
 審査請求日 平成25年12月16日(2013.12.16)  
 (31) 優先権主張番号 61/309631  
 (32) 優先日 平成22年3月2日(2010.3.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 000001029  
 協和発酵キリン株式会社  
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
 (74) 代理人 110002000  
 特許業務法人栄光特許事務所  
 (74) 代理人 100090343  
 弁理士 濱田 百合子  
 (74) 代理人 100129160  
 弁理士 古館 久丹子  
 (74) 代理人 100177460  
 弁理士 山崎 智子  
 (74) 代理人 100108589  
 弁理士 市川 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変抗体組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示されるアミノ酸配列において、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス392~394番目に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基におけるAsnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸改変が行われたアミノ酸配列を含む改変抗体組成物または改変抗体断片組成物。

【請求項2】

EUインデックスの392~394番目のうちアミノ酸残基の少なくとも1つのアミノ酸残基が以下のアミノ酸残基に改変された、請求項1に記載の改変抗体組成物または改変抗体断片組成物。

EUインデックス392番目: Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrまたはTrp  
 EUインデックス393番目: Pro

EUインデックス394番目: Leu、Asn、Asp、Lys、Phe、TyrまたはTrp

【請求項3】

CH1ドメインおよびヒンジドメインを含み、該CH1ドメインおよびヒンジドメインがヒトIgG1抗体由来のアミノ酸配列を含む請求項1または2に記載の改変抗体組成物

10

20

または改変抗体断片組成物。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の改変抗体組成物または改変抗体断片組成物において、さらに E U インデックス 3 3 9 番目の Thr が、Asn または Tyr のアミノ酸残基に改変された F c 領域を含む改変抗体組成物または改変抗体断片組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の改変抗体組成物または改変抗体断片組成物において、さらに E U インデックス 3 9 7 番目の Met が、Gln、Asn、Asp および Phe から選ばれるいずれか 1 つのアミノ酸残基に改変された F c 領域を含む改変抗体組成物または改変抗体断片組成物。

10

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の改変抗体組成物または改変抗体断片組成物のアミノ酸配列をコードする DNA。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の DNA を含有するベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の形質転換体を培地内で培養し、培養液中に請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の改変抗体組成物または改変抗体断片組成物を生成蓄積させ、培養液から改変抗体組成物または改変抗体断片組成物を精製する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の改変抗体組成物または改変抗体断片組成物を製造する方法。

20

【請求項 10】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、ヒト IgG 抗体の F c 領域の E U インデックス 3 9 2 ~ 3 9 4 番目に存在する Asn - X - Ser / Thr ( X は Pro 以外のアミノ酸残基 ) 配列を構成するアミノ酸残基における Asn から他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、X から Pro へのアミノ酸改変および Ser / Thr から他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸改変を行う、前記 Asn - X - Ser / Thr 配列の Asn 残基に結合する N - グリコシド結合型糖鎖を欠損させる方法。

【請求項 11】

E U インデックスの 3 9 2 ~ 3 9 4 番目のうちアミノ酸残基の少なくとも 1 つのアミノ酸残基が以下のアミノ酸残基に改変された、請求項 10 に記載の方法。

E U インデックス 3 9 2 番目 : Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、Tyr または Trp

E U インデックス 3 9 3 番目 : Pro

E U インデックス 3 9 4 番目 : Leu、Asn、Asp、Lys、Phe、Tyr または Trp

【請求項 12】

ヒト IgG 抗体が CH1 ドメインおよびヒンジドメインを含み、該 CH1 ドメインおよびヒンジドメインがヒト IgG 1 抗体由来のアミノ酸配列を含む請求項 10 または 11 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体の F c 領域に結合する N - グリコシド結合型糖鎖のうち、E U インデックス 2 9 7 番目以外の Asn 残基に結合する糖鎖が減少または欠損した改変抗体組成物、抗体の F c 領域に結合する N - グリコシド結合型糖鎖のうち、E U インデックス 2 9 7 番目以外の Asn 残基に結合する余分な糖鎖が減少または欠損しかつ抗体のエフェクター活性が維持された改変抗体組成物、該改変抗体分子をコードする DNA、該改変抗体組成物を生産する細胞、該改変抗体組成物を製造する方法および抗体の F c 領域に結合する N -

50

グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する余分な糖鎖を減少させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は、高い結合活性、結合特異性および血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防および治療薬としての応用が試みられてきた（非特許文献1）。また、遺伝子組換え技術を利用して、非ヒト動物抗体からヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体が作製された（非特許文献2～5）。

【0003】

ヒト型キメラ抗体は、抗体可変領域がヒト以外の動物の抗体、定常領域がヒト抗体から構成される。ヒト化抗体とは、ヒト以外の動物の抗体の相補性決定領域（complementarity determining region；CDR以下、CDRと表記する）がヒト抗体のCDRに置換された抗体である。

10

【0004】

ヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体は、非ヒト動物抗体の高い免疫原性、低いエフェクター機能、短い血中半減期などのマウス抗体などが有する問題を解決し、モノクローナル抗体の医薬品としての応用を可能にした（非特許文献6～9）。既に米国においては、例えば、癌治療用抗体として複数のヒト化抗体が認可され、販売されている（非特許文献10）。

【0005】

20

これらのヒト型キメラ抗体およびヒト化抗体は、実際に臨床においてある程度の効果を示しているが、より効果の高い抗体医薬が求められていることも事実である。

【0006】

例えば、CD20に対するヒト型キメラ抗体であるRituxan（登録商標）（非特許文献11）（IDEC社/Roche社/Genentech社）の単独投与では、再発性低悪性度の非ホジキンリンパ腫患者に対する第III相臨床試験における奏効率は48%（完全寛解6%、部分寛解42%）に過ぎず、また、平均の効果持続期間は12ヶ月と報告されている（非特許文献12）。

【0007】

また、Rituxan（登録商標）と化学療法（CHOP：Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine）との併用では、再発性低悪性度および濾胞性の非ホジキンリンパ腫患者に対する第II相臨床試験において、奏効率は95%（完全寛解55%、部分寛解45%）と報告されているが、CHOPに起因する副作用が認められている（非特許文献13）。

30

【0008】

HER2に対するヒト化抗体であるHerceptin（登録商標）（Genentech社）は、単独投与では、転移性乳癌患者に対する第III相臨床試験における奏効率は僅か15%であり、平均の効果持続期間は9.1ヶ月と報告されている（非特許文献14）。

【0009】

40

ヒト抗体分子はイムノグロブリン（以下Ig）とも称し、その分子構造からIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの各クラスに分類される。

【0010】

抗体医薬として主に用いられるヒトIgG（以下IgGと称する）型の抗体分子は2本ずつの重鎖（heavy chain、以下H鎖と称する）と軽鎖（light chain、以下L鎖と称する）と呼ばれるポリペプチドによって形成される。

【0011】

H鎖はN末端側からH鎖可変領域（以下VHと表記する）、CH1、ヒンジ（Hinge）、CH2およびCH3と呼ばれる各ドメイン構造によって形成される。CH1、ヒンジ、CH2およびCH3はあわせて重鎖定常領域（以下、CHと表記する）とも呼ばれ、

50

CH<sub>2</sub>およびCH<sub>3</sub>はあわせてFc領域と呼ばれる。

【0012】

L鎖はN末端側からL鎖可変領域(以下VLと表記する)、L鎖定常領域(以下CLと表記する)と呼ばれる各ドメイン構造によって形成される。

【0013】

IgG型抗体のH鎖にはIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4の4つのサブクラスが存在する。各IgGサブクラスのH鎖はお互いに、可変性に富むヒンジを除く定常領域について95%程度のアミノ酸配列の相同性を有する。

【0014】

各IgGサブクラスはアミノ酸配列の相同性が高いにも関わらず、それらが有する生物活性の強弱は異なる(非特許文献15)。生物活性としては、補体依存性細胞傷害活性(complement-dependent cytotoxicity; CDC、以下、CDC活性と略記する)、抗体依存性細胞傷害活性(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC以下、ADCC活性と略記する)、貪食活性などのエフェクター機能が挙げられ、これらは生体内で異物や病原体排除に重要な役割を果たす。

【0015】

ナチュラルキラー細胞(以下NK細胞と表記する)、単球、マクロファージ、顆粒球などの種々の白血球の表面には、Fc受容体(以下FcRと表記する)のファミリーが発現する。

【0016】

FcRにはFcRI、FcRIIa、FcRIIIa、FcRIIIbの活性型FcRと、FcRIIbの抑制型FcRに分類される。IgG抗体、特にヒトにおいてはIgG1とIgG3はこれらの受容体に強く結合し、その結果白血球によるADCC活性や貪食活性を誘導する。

【0017】

ADCC活性とは、抗原に結合した抗体が、Fc部分を介して主にNK細胞表面のFcRIIIaに結合し、その結果、NK細胞から放出されるパーフォリンやグランザインなどの細胞傷害性分子によって生じる細胞融解反応である(非特許文献16、17)。ADCC活性は、一般的にはIgG1 > IgG3 >> IgG4 > IgG2の序列を示す(非特許文献18、19)。Fc上のFcRIIIaの結合部位はCH<sub>2</sub>ドメインに存在し、二つのCH<sub>2</sub>ドメインの間にFcRIIIaが一分子結合することが結晶構造解析で示されている(非特許文献20)。

【0018】

CDC活性とは、抗原に結合した抗体が、血清中の補体系と呼ばれる一群の血清蛋白質の反応カスケードを活性化し、最終的に標的細胞を融解する反応である。CDC活性は、ヒトIgG1およびIgG3において高く、一般的にIgG3 > IgG1 >> IgG2 > IgG4の序列を示す。補体系はC1~C9の各成分に分類され、その多くが部分分解を受け酵素活性を発現する酵素前駆体である。

【0019】

CDC活性は最初にC1の1成分であるC1qの標的細胞上の抗体のFc領域への結合に始まり、各成分が前段階の成分によって部分分解を受けることにより活性化のカスケードが進行し、最終的にはC5~C9が膜侵襲複合体と呼ばれる孔形成重合体が標的細胞の細胞膜上で形成され、細胞の溶解反応を引き起こす(非特許文献16、17)。Fc領域上のC1qの結合部位はCH<sub>2</sub>ドメインに存在することがFc領域のアミノ酸置換研究により示唆されている(非特許文献21)。

【0020】

臨床に用いられる抗体医薬の薬効メカニズムにおいても、上述のエフェクター機能の重要性が認識されている。上記のRituxan(登録商標)は、IgG1サブクラスのヒト型キメラ抗体であり、in vitroでADCC活性およびCDC活性を示す(非特

10

20

30

40

50

許文献 22)。

【0021】

さらに、Rituxan (登録商標) は、臨床効果においても、ADCC 活性の強い Fc RIIIA 遺伝子型を示す患者において治療効果が高いこと (非特許文献 23)、投与後に速やかに血中より補体成分が消費されること (非特許文献 24)、投与後に再発した患者の癌細胞では CDC 活性を抑制する因子である CD59 の発現が上昇していること (非特許文献 25) などから、Rituxan (登録商標) が実際に患者体内でエフェクター機能を発揮していることが示唆されている。

【0022】

Herceptin (登録商標) も IgG1 サブクラスのヒト化抗体であり、ADCC 活性の強い Fc RIIIA 遺伝子型を示す患者において治療効果が高いことが報告されている (非特許文献 26)。

【0023】

また、ヒト IgG は血管内皮細胞等に発現する胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor for IgG; FcRn、以下 FcRn と記す) とエンドソーム内の低 pH 条件で結合することによりリソソームによる分解を免れ、その結果 7 日 (IgG3) ~ 21 日 (IgG1、2、4) と長い血中半減期を有する。抗体の Fc と FcRn との結合部位は CH2 ドメインと CH3 ドメインの界面に存在することが、Fc のアミノ酸残基改変の研究より示唆されている (非特許文献 27)。

【0024】

以上のことから、ヒト IgG1 抗体は他のサブクラスと比較して、強い ADCC 活性および CDC 活性を有し、さらにヒト血中での半減期が長いことなどから、抗体医薬として最適である。

【0025】

C1q は抗体分子の Fc 領域に結合することが知られる。ヒト IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の単量体に対する C1q の結合定数 (Ka) は、それぞれ  $1.2 \times 10^4$ 、 $0.64 \times 10^4$ 、 $2.9 \times 10^4$ 、 $0.44 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  である (非特許文献 28)。上述のように、Fc 領域の中でも特に CH2 ドメインが重要である (非特許文献 29)。

【0026】

更に詳細には、ヒト IgG1 では EU インデックス (非特許文献 30) において、CH2 中の Leu235 (非特許文献 31)、Asp270、Lys322、Pro329、Pro331 (非特許文献 32)、ヒト IgG3 では Glu233、Leu234、Leu235、Gly236 (非特許文献 33)、Lys322 (非特許文献 34) などが重要なことが知られている。

【0027】

ヒト IgG 重鎖定常領域中にアミノ酸改変を導入することにより IgG の改変体を作製し、C1q との結合活性を上昇させ、CDC 活性を増強させる試みがなされてきた。

【0028】

Idusogie らは、ヒト IgG1 型の定常領域およびマウス由来の可変領域を有する抗 CD20 キメラ抗体 Rituxan (登録商標) の重鎖定常領域中の CH2 ドメイン中の EU インデックス 326 番目の Lys、または 333 番目の Glu を他のアミノ酸に置換すると、最大で 2 倍程度 CDC 活性が増強することを報告した (非特許文献 35、特許文献 2)。

【0029】

Idusogie らは、さらに、IgG1 の数百分の一程度の CDC 活性であった IgG2 の CDC 活性が、ヒト IgG2 型の抗体の EU インデックス 326 番目の Lys、または 333 番目の Glu を他のアミノ酸に置換することにより、IgG1 の CDC 活性の 1/25 程度まで上昇することを示した (特許文献 3~5)。

【0030】

10

20

30

40

50

また Dall'Aquilaらは、ヒトIgG1型の抗EphA2抗体のヒンジ領域に様々なアミノ酸改変を施した結果、複数の改変体において、改変前の抗体よりもC1q結合活性およびCDC活性が上昇することを報告した(非特許文献35)。

#### 【0031】

アミノ酸改変を導入する手法とは異なり、天然に存在する配列の組み合わせによってCDC活性を増強させる例も知られる。Shitaraらは、ヒトIgG1のCH2ドメイン全体、およびCH3ドメインの全体またはN末端側の一部をヒトIgG3の配列に置換すると、IgG1およびIgG3のいずれよりもC1q結合活性およびCDC活性が大きく上昇することを見出した(特許文献6、非特許文献36)。

#### 【0032】

タンパク質に付加する糖鎖にはN-グリコシド結合型糖鎖とO-グリコシド結合型糖鎖の2つのタイプが存在する。Asn側鎖のアミドのN原子に結合する糖鎖はN-グリコシド結合型糖鎖、SerとThr側鎖のヒドロキシ基のO原子に結合する糖鎖はO-グリコシド結合型糖鎖である。

#### 【0033】

N-グリコシド結合型糖鎖には、高マンノース型糖鎖、複合型糖鎖(コンプレックス型糖鎖)および混成型糖鎖(ハイブリッド型糖鎖)の3種のタイプがある。

#### 【0034】

N-グリコシド結合型糖鎖の生合成の過程は、粗面小胞体においてマンノース(Man)9分子を含むドリコール-ピロリン酸-オリゴ糖[(Glc)3(Man)9(GlcNAc)2]が、N-グリコシド結合型糖鎖のコンセンサス配列Asn-X-Ser/Thr(Xはプロリン以外の全てのアミノ酸)のAsn残基に付加することから始まる。その後、種々の酵素によってMan8型、Man7型、Man6型およびMan5型の高マンノース型に変換され、さらにはマンノースの代わりにN-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸およびフコースなどが付加した複合型糖鎖が合成される(非特許文献37)。

#### 【0035】

ただしN-グリコシド結合型糖鎖はタンパク質中の全てのAsn-X-Ser/Thr配列に付加するわけではなく、さらに周辺のアミノ酸配列や立体構造によっては付加しないことが知られる。特に、Asn-X-Ser/ThrのC末端側に続くアミノ酸がProである場合、Asn-X-Ser/ThrのAsn残基にはほとんど糖鎖付加が起こらないことが知られる(非特許文献38、39)。

#### 【0036】

ヒトIgGの定常領域には、唯一CH2ドメインの297番目のAsnにN-グリコシド結合複合型糖鎖が結合することが知られ(非特許文献40)、その他の部位へのN-グリコシド結合型糖鎖の存在は知られていない。唯一マウスIgG3の定常領域471番目のAsnに余分なN-グリコシド結合型糖鎖が結合していることが知られている(非特許文献41)。

#### 【0037】

一方、ヒトIgG3型の定常領域中のCH3ドメインの392~394番目にはAsn-Thr-Thrの配列が存在するが、395番目のアミノ酸はProであり(非特許文献42)、実際にIgG3の392位のAsnへの糖鎖付加は知られていない。

#### 【0038】

ヒトIgGのADCC活性は、297番目のAsnに付加するN-グリコシド結合複合型糖鎖の構造(図1に典型的な複合型糖鎖模式図を示す)によって変化することが知られている(特許文献7)。

#### 【0039】

抗体に結合する糖鎖のガラクトースおよびN-アセチルグルコサミンの含量に依存して、抗体のADCC活性が変化する報告があるが(非特許文献43~46)、最もADCC活性に影響を及ぼすのは、還元末端のN-アセチルグルコサミンに1,6結合するフコ

10

20

30

40

50

ース（以下、コアフコースと記載する場合もある）である。

【0040】

コアフコースの無いN-グリコシド結合複合型糖鎖を有するIgG抗体は、コアフコースが結合したN-グリコシド結合複合型糖鎖を有するIgG抗体よりも顕著に高いADCC活性を示す（非特許文献47、48、特許文献7）。

【0041】

コアフコースの無いN-グリコシド結合複合型糖鎖を有する抗体組成物を生産する細胞としては、1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子がロックアウトされた細胞が知られている（特許文献8、9）。

【0042】

抗体医薬の治療効果にはADCC活性および貪食活性などのFcR依存的な活性、CDC活性並びにFcRn結合活性のいずれもが重要である。

【0043】

しかしながら、CDC活性を惹起する初期段階であるC1q結合、およびADCC活性を惹起する初期段階であるFcRへの結合、長い血中半減期に寄与するFcRnへの結合はいずれも抗体のFc領域を介しているため、Fcにアミノ酸改変を導入した場合、これらの活性を損ねてしまう可能性もある。

【0044】

Idusogieraは、CDC活性を増強させたIgG1のCH2ドメインへのアミノ酸の点変異導入は、ADCC活性が大きく低下してしまうことを報告している（非特許文献49）。

【0045】

またDall'Acquaらは、FcRnへの結合活性を上昇させるIgG1のCH2ドメインへのアミノ酸変異導入は、同時にADCC活性を低下させる現象を報告している（非特許文献50）。

【0046】

興味深いことにこれらの報告は、Fc中のFcRIIIa、C1q、FcRnへの結合部位はそれぞれ微妙に異なる部位に位置するにも関わらず、それぞれの結合性を変化させるアミノ酸改変は、他の結合部位への予期せぬ影響を及ぼすことを示している。

【0047】

IgG重鎖定常領域の392番目のアミノ酸は、抗体分子中の二つのCH3ドメインの界面に位置している（非特許文献51）。該界面に位置するアミノ酸は二つの重鎖分子の会合に大きな役割を果たしており（非特許文献52）、例えば392番目のアミノ酸を改変した場合、抗体分子の立体構造および様々な生物活性に予期せぬ影響を与える可能性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0048】

【特許文献1】欧州特許出願公開第0327378号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2003/0158389号明細書

【特許文献3】国際公開第00/42072号

【特許文献4】米国特許出願公開第2004/0132101号明細書

【特許文献5】米国特許出願公開第2005/0054832号明細書

【特許文献6】国際公開第2007/011041号

【特許文献7】国際公開第00/61739号

【特許文献8】国際公開第02/31140号

【特許文献9】国際公開第03/85107号

【非特許文献】

【0049】

【非特許文献1】モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリ

10

20

30

40

50

- ケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995)
- 【非特許文献2】ネイチャー (Nature), 312, 643 (1984)
- 【非特許文献3】プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81, 6851 (1984)
- 【非特許文献4】ネイチャー (Nature), 321, 522 (1986)
- 【非特許文献5】ネイチャー (Nature), 332, 323 (1988)
- 【非特許文献6】イムノロジー・トゥデイ (Immunol. Today), 21, 364 (2000) 10
- 【非特許文献7】イムノロジー・トゥデイ (Immunol. Today), 21, 403 (2000)
- 【非特許文献8】アナルズ・オブ・アレルギー・アズマ・アンド・イムノロジー (Ann. Allergy Asthma Immunol.), 81, 105 (1998)
- 【非特許文献9】ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnol.), 16, 1015 (1998)
- 【非特許文献10】ネイチャー・レビューズ・キャンサー (Nature Reviews Cancer), 1, 119 (2001)
- 【非特許文献11】カレント・オピニオン・イン・オンコロジー (Curr. Opin. Oncol.), 10, 548 (1998) 20
- 【非特許文献12】ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 16, 2825 (1998)
- 【非特許文献13】ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 17, 268 (1999)
- 【非特許文献14】ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 17, 2639 (1999)
- 【非特許文献15】モノクローナル・アンティボディズ: プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995) 30
- 【非特許文献16】ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)
- 【非特許文献17】イムノロジー・トゥデイ (Immunol. Today), 20, 576 (1999)
- 【非特許文献18】ネイチャー (Nature), 332, 323 (1988)
- 【非特許文献19】ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine), 166, 1351 (1987)
- 【非特許文献20】ネイチャー (Nature), 406, 267 (2000)
- 【非特許文献21】ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 166, 2571 (2001) 40
- 【非特許文献22】オンコジーン (Oncogene), 22, 7359 (2003)
- 【非特許文献23】ブラッド (Blood), 99, 754 (2002)
- 【非特許文献24】ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 172, 3280 (2004)
- 【非特許文献25】ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 21, 1466 (2003)
- 【非特許文献26】ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (J. Clin. Oncol.), 26, 1789 (2008)
- 【非特許文献27】ネイチャー・レビューズ・イムノロジー (Nature Review 50



- ws Immunology), 7, 715 (2007)
- 【非特許文献28】バイオケミストリー (Biochemistry), 15, 5175 (1976)
- 【非特許文献29】ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン (Journal of Experimental Medicine), 173, 1025 (1991)
- 【非特許文献30】プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 63, 78 (1969)
- 【非特許文献31】免疫学 (Immunology), 86, 319 (1995) 10
- 【非特許文献32】ザ・ジャーナル・オブ・免疫学 (J. Immunol.), 164, 4178 (2000)
- 【非特許文献33】モレキュラー・免疫学 (Mol. Immunol.), 34, 1019 (1997)
- 【非特許文献34】モレキュラー・免疫学 (Mol. Immunol.), 37, 995 (2000)
- 【非特許文献35】ザ・ジャーナル・オブ・免疫学 (The Journal of Immunology), 177, 1129 (2006)
- 【非特許文献36】がん研究 (Cancer Research), 68, 3863 (2008) 20
- 【非特許文献37】モレキュラー・セル・バイオロジー (Molecular Cell Biology) 第三版、W. H. Freeman and company, New York, New York and Oxford (1995)
- 【非特許文献38】プロテイン・エンジニアリング (Protein Engineering), 3, 433 (1990)
- 【非特許文献39】バイオケミストリー (Biochemistry), 37, 6833 (1998)
- 【非特許文献40】免疫学 (Immunology) 第5版, Mosby International Ltd (1998)
- 【非特許文献41】モレキュラー・免疫学 (Mol. Immunol.), 34, 593 (1997) 30
- 【非特許文献42】シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・免疫学的・興味 (Sequences of Proteins of Immunological Interest) 第5版, US Dept. Health and Human Services (1991)
- 【非特許文献43】ヒューマン・アンチボディズ・アンド・ハイブリドーマズ (Human Antib Hybrid), 5, 143 (1994)
- 【非特許文献44】ヒューマン・アンチボディズ・アンド・ハイブリドーマズ (Human Antib Hybrid), 6, 82 (1995)
- 【非特許文献45】ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotechnol.) 17, 176 (1999) 40
- 【非特許文献46】バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.) 74, 288 (2001)
- 【非特許文献47】ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 277, 26733 (2002)
- 【非特許文献48】ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 278, 3466 (2003)
- 【非特許文献49】ザ・ジャーナル・オブ・免疫学 (The Journal of Immunology), 166, 2571 (2001)。
- 【非特許文献50】ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Bio 50

1 . C h e m . ) , 2 8 1 , 2 3 5 1 4

【非特許文献51】プロテイン・エンジニアリング ( P r o t e i n E n g i n e e r i n g ) , 9 , 6 1 7 ( 1 9 9 6 )

【非特許文献52】免疫ロジ ( I m m u n o l o g y ) , 1 0 5 , 9 ( 2 0 0 2 )

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0050】

抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、297番目のAsnに結合する糖鎖は抗体の活性や血中安定性に関与しているが、297番目以外のアミノ酸残基に結合した余分な糖鎖は抗体定常領域を介した活性へ影響を及ぼす可能性や、抗体医薬品としての均一性の問題を引き起こす可能性がある。そのため、抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する余分な糖鎖を制御する方法が求められている。

10

【0051】

したがって、本発明は、抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する糖鎖が減少または欠損した改変抗体組成物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0052】

上記課題を鑑み、検討した結果、本発明者らは、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297～299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸改変が行うことにより、抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する糖鎖が減少または欠損することを見出し、本発明を完成させた。

20

【0053】

すなわち、本発明の要旨は以下である。

1 . ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297～299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸改変が行われた改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

30

2 . ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297～299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列中のAsnにN-グリコシド結合型糖鎖が付加されている前項1に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

3 . EUインデックス297～299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列が、EUインデックス392～394番目である、前項1または2に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

40

4 . EUインデックスの392～394番目のうちアミノ酸残基の少なくとも1つのアミノ酸残基が以下のアミノ酸残基に改変された、前項1～3のいずれか1項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

EUインデックス392番目: Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrまたはTrp

EUインデックス393番目: Pro

EUインデックス394番目: Leu、Asn、Asp、Lys、Phe、TyrまたはTrp

5 . ヒトIgG抗体のFc領域が配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む前項1～4の

50

いずれか 1 項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

6. CH1ドメインおよびヒンジドメインを含み、該CH1ドメインおよびヒンジドメインがヒトIgG1抗体由来のアミノ酸配列を含む前項1~5のいずれか1項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

7. EUインデックス339番目のThrが、AsnまたはTyrのアミノ酸残基に改変されたFc領域を含む前項1~6のいずれか1項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

8. EUインデックス397番目のMetが、Gln、Asn、AspおよびPheから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された抗体Fc領域を含む前項1~7のいずれか1項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片。

9. 前項1~8のいずれか1項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片のアミノ酸配列をコードするDNA。

10. 前項9に記載のDNAを含有するベクター。

11. 前項10に記載のベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

12. 前項11に記載の形質転換体を培地内で培養し、培養液中に前項1~8のいずれか1項に記載の改変抗体組成物または該改変抗体組成物断片を生成蓄積させ、培養液から改変抗体組成物または該改変抗体組成物断片を精製する前項1~8のいずれか1項に記載の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片を製造する方法。

13. ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297~299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸改変を行う、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297~299番目以外に存在するAsn残基に結合するN-グリコシド結合型糖鎖を減少させる方法。

14. ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297~299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列のAsn残基にN-グリコシド結合糖鎖が付加されている前項13に記載の方法。

15. EUインデックス297~299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列が、EUインデックス392~394番目である、前項13または14に記載の方法。

16. EUインデックスの392~394番目のうちアミノ酸残基の少なくとも1つのアミノ酸残基が以下のアミノ酸残基に改変された、前項13~15のいずれか1項に記載の方法。

EUインデックス392番目: Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrまたはTrp

EUインデックス393番目: Pro

EUインデックス394番目: Leu、Asn、Asp、Lys、Phe、TyrまたはTrp

17. ヒトIgG抗体のFc領域が配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む前項13~16のいずれか1項に記載の方法。

18. ヒトIgG抗体がCH1ドメインおよびヒンジドメインを含み、該CH1ドメインおよびヒンジドメインがヒトIgG1抗体由来のアミノ酸配列を含む前項13~17のいずれか1項に記載の方法。

【発明の効果】

【0054】

本発明の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片は、抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する糖鎖が減少または欠損した改変抗体組成物、抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する余分な糖鎖

10

20

30

40

50

が減少または欠損し、かつ抗体のエフェクター活性が維持された改変抗体組成物および改変抗体組成物断片である。

【0055】

本発明の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片は抗体のFc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297番目以外のAsn残基に結合する糖鎖が減少または欠損しているため、297番目以外のアミノ酸残基に結合した余分な糖鎖による抗体定常領域を介した活性への影響、および抗体医薬品としての均一性の問題などを引き起こすことがなく、非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】図1(a)および(b)は、N-グリコシド結合複合型糖鎖(コンプレックス型糖鎖)の典型的な構造を示す。

【図2】図2(a)~(c)は、高CDC活性型のIgG1/IgG3ドメイン交換抗体である113F型抗体の構成を示している。

【図3】図3は、GM2-113FのSDS-PAGE像を示す図である。レーン1は分子量マーカー、レーン2はGM2-113Fを分析した。分子量マーカーの分子量は図3の左端に示した。

【図4】図4は、IgG1抗体、IgG3抗体および113F型抗体のH鎖定常領域のアミノ酸配列の比較である。太字で示されたアミノ酸残基は、IgG1抗体とIgG3抗体で異なるアミノ酸を配する部位である。星印は本研究中でアミノ酸置換を行った残基を表す。

【図5】図5は、発現ベクターの作製手順である。図5中でベクターの一部が点線で描かれているのは、PCR後にH鎖定常領域以外の塩基配列が未確認であることを表す。

【図6】図6(a)および(b)は、CD20トランスフェクタントKC1156に対する113F抗体、N392K、T394Y、T394Fおよびrituximabの各種濃度におけるCDC活性測定の結果である。グラフの縦軸は細胞傷害活性(%)を、横軸は抗体濃度を表す。実験はN=3で行った。

【図7】図7(a)~(e)は、CD20陽性腫瘍細胞株であるRaji、Daudi、ST486、EHEBおよびMEC-1に対する113F抗体、N392K、T394Y、T394F、N392K/T339Yおよびrituximabの各種濃度におけるCDC活性測定の結果である。グラフの縦軸は細胞傷害活性(%)を、横軸は抗体濃度を表す。実験はN=3で行った。

【図8】図8は、フローサイトメーターを用いた113F抗体、N392K、T394YおよびT394FのC1q結合活性測定の結果である。実験にはCD20陽性腫瘍細胞であるDaudiを用い、抗体とヒト血清を反応させた後、FITC標識抗ヒトC1q抗体によりC1qの結合を検出した。グラフの縦軸は平均蛍光強度(MFI)を、横軸は抗体濃度を表す。実験はN=3で行った。

【発明を実施するための形態】

【0057】

本発明の改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片は、ヒトIgG抗体のFc領域のKabatrāによるEUインデックス297~299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち、少なくともいずれか1つのアミノ酸改変が行われた改変抗体組成物および該改変抗体組成物断片である。

【0058】

本発明において、EUインデックスとは、シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト第5版(1991)を示す。以下に示すアミノ酸残基の位置は、特に記載の無い場合は全てEUインデックスに基づいて示す。

【0059】

10

20

30

40

50

Asn - X - Ser / Thr 配列は、Asn 残基のNH<sub>2</sub> 基に糖鎖が結合しやすい共通配列（以下、N グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列、または単にコンセンサス配列と記載する）をいう。

【0060】

本発明において、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297～299番目以外に存在するAsn - X - Ser / Thr（XはPro以外のアミノ酸残基）配列としては、392～394番目のAsnが挙げられる。

【0061】

また本発明の改変抗体組成物として、具体的には、抗体のFc領域のEUインデックス392～394番目のAsn - X - Ser / Thr（XはPro以外のアミノ酸残基）配列において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変およびXからProへのアミノ酸改変およびSer / Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち少なくともいずれか1つのアミノ酸改変が行われた改変抗体組成物が挙げられる。

【0062】

本発明の改変抗体組成物として、より具体的には、抗体のFc領域のEUインデックスの392～394番目のアミノ酸残基において、少なくとも1つのアミノ酸残基が以下のアミノ酸残基に改変された改変抗体組成物などが挙げられる。

EUインデックス392番目：Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrまたはTrp

EUインデックス393番目：Pro

EUインデックス394番目：Leu、Asn、Asp、Lys、Phe、TyrまたはTrp

【0063】

本発明のヒトIgG抗体のFc領域としては、少なくともFc領域のEUインデックスの392番目～394番目のアミノ酸配列がAsn - Thr - Thrを有するFc領域、具体的には、EUインデックス231～434番目までがヒトIgG1かつ435～447番目までがヒトIgG3のアミノ酸配列であるFc領域、更に具体的には配列番号1のアミノ酸配列を有するFc領域が挙げられる。

【0064】

本発明の改変抗体組成物として具体的には、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むヒトIgG抗体のFc領域において、EUインデックス392番目のAsnがGly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrおよびTrpから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された改変抗体組成物、EUインデックス393番目のThrがProに改変された改変抗体組成物、およびEUインデックス394番目のThrが、Leu、Asn、Asp、Lys、Phe、TrpおよびTyrから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された改変抗体組成物などが挙げられる。

【0065】

本発明の改変抗体組成物としてより具体的には、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むヒトIgG抗体のFc領域において、EUインデックス392番目のAsnがLysに改変された改変抗体組成物、配列番号3のアミノ酸配列を有する改変抗体組成物などが挙げられる。

【0066】

更に本発明の改変抗体組成物としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むヒトIgG抗体のFc領域において、上述のアミノ酸改変に加えてEUインデックス339番目のThrがTyrに改変された改変抗体組成物、EUインデックス397番目のMetがGln、Asn、AspおよびPheから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された改変抗体組成物も挙げられる。

【0067】

更に本発明の改変抗体としては、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、かつEU

10

20

30

40

50

インデックス339番目のThrがTyrに改変された改変抗体組成物、並びにEUインデックス397番目のMetがGln、Asn、AspおよびPheから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された改変抗体組成物も挙げられる。

【0068】

本発明において、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297～299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基において、Asn、XおよびSer/Thrのいずれのアミノ酸残基をどのアミノ酸残基に改変するかについては、アミノ酸改変の結果、新たなN-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列が生じないように、アミノ酸残基改変を行う位置、改変後のアミノ酸残基を考慮することにより行うことができる。

10

【0069】

本発明の改変抗体組成物は、上述のアミノ酸残基を改変することによって、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297～299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列のAsn残基に結合するN-グリコシド結合型糖鎖が減少または欠損し、かつアミノ酸残基改変を行う前の抗体と比べて、同等以上のエフェクター活性を有する。

【0070】

本発明の改変抗体組成物としては、具体的には、EUインデックス392番目のAsnに糖鎖が結合せず、かつアミノ酸残基の改変を行う前の抗体と比べて、同等以上のエフェクター活性を有する改変抗体組成物が挙げられる。

20

【0071】

本発明においてAsnに結合する糖鎖が減少または欠損するとは、アミノ酸残基改変を行う前の改変抗体組成物と比べて、アミノ酸残基改変を行った後の改変抗体組成物では、実質的に糖鎖が結合していないことを示す。

【0072】

実質的に糖鎖が結合していないとは、下記に述べる糖鎖分析方法などを用いて糖鎖を分析した場合に、該アミノ酸残基改変部位に結合する糖鎖が検出されない、または検出限界以下であることを示す。

【0073】

本発明の改変抗体としては、変異Fcを有し、かつ標的分子への結合活性を有するタンパク質であればいずれのものも包含される。具体的には、変異Fcを有するモノクローナル抗体、変異Fcと抗体断片が結合した融合タンパク質、変異Fcと天然に存在するリガンドまたは受容体が結合したFc融合タンパク質(イムノアドヘシンともいう)、複数のFc領域を融合させたFc融合タンパク質等も本発明に包含される。

30

【0074】

標的分子との結合活性を有する抗体断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどが挙げられる。

【0075】

本発明の改変抗体とは、変異Fcを有するタンパク質をいう。

40

【0076】

本発明において変異Fcとは、抗体Fc領域に結合するN-グリコシド結合型糖鎖のうち、EUインデックス297～299番目以外のN-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列に結合する糖鎖を減少または欠損させるようにアミノ酸改変されたFc領域をいう。

【0077】

即ち、本発明の変異Fcは、Fc領域のEUインデックス297番目のAsnにN-グリコシド結合型糖鎖が結合し、かつそれ以外の余分なN-グリコシド結合糖鎖が結合しないように、N-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列を減少または欠損させたFc領域をいう。

【0078】

50

また、本発明において抗体Fc領域または単にFcとは、Kabataら[シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト第5版(1991)]に報告されている、天然に存在するイムノグロブリンまたは該アロタイプのFcアミノ酸配列、またはエフェクター活性の制御、抗体の安定性や血中半減期の延長等を目的としてアミノ酸改変されたFcアミノ酸配列(国際公開第00/42072号、国際公開第2006/033386号、国際公開第2006/105338、国際公開第2005/070963号、国際公開第2007/011041号、国際公開第2008/145142号)いずれのアミノ酸配列でもよく、Fc領域とFc受容体との結合活性を有しているFc領域、および/またはFc領域とFc受容体を介したエフェクター活性を有しているFc領域であれば、いずれのFc領域でもよい。

10

**【0079】**

即ち、本発明の改変抗体組成物は、抗体Fcに結合するEUインデックス297番目以外の余分なN-グリコシド結合型糖鎖の結合を減少または欠損させた変異Fcを有し、かつFc受容体との結合活性および/またはエフェクター活性が制御された改変抗体組成物である。

**【0080】**

本発明においてモノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ(抗原決定基ともいう)を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列(1次構造)が均一である。本発明の改変抗体組成物は、実質的にモノクローナル抗体の性質を有している改変抗体であり、モノクローナル抗体に包含される。

20

**【0081】**

エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。立体構造は、天然に存在するタンパク質が有する3次元立体構造であり、細胞内または細胞膜上に発現しているタンパク質が構成する立体構造をいう。

**【0082】**

抗体分子はイムノグロブリン(以下、Igと表記する)とも称され、ヒト抗体は、分子構造の違いに応じて、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4およびIgMのアイソタイプに分類される。アミノ酸配列の相溶性が比較的高いIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を総称してIgGともいう。

30

**【0083】**

抗体分子は重鎖(Heavy chain、以下H鎖と記す)および軽鎖(Light chain、以下L鎖と記す)と呼ばれるポリペプチドより構成される。

**【0084】**

また、H鎖はN末端側よりH鎖可変領域(VHとも表記される)、H鎖定常領域(CHとも表記される)、L鎖はN末端側よりL鎖可変領域(VLとも表記される)、L鎖定常領域(CLとも表記される)の各領域により、それぞれ構成される。

**【0085】**

CHは各サブクラスごとに、 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  および $\mu$ 鎖がそれぞれ知られている。CHはさらに、N末端側よりCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの各ドメインにより構成される。

40

**【0086】**

ドメインとは、抗体分子の各ポリペプチドを構成する機能的な構造単位をいう。また、CH2ドメインとCH3ドメインを併せてFc領域または単にFcという。CLは、C鎖およびC鎖が知られている。

**【0087】**

本発明におけるCH1ドメイン、ヒンジドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインおよびFc領域は、EUインデックスにより、N末端からのアミノ酸残基の番号で特定する

50

ことができる。

【0088】

具体的には、CH1はEUインデックス118～215番のアミノ酸配列、ヒンジはEUインデックス216～230番のアミノ酸配列、CH2はEUインデックス231～340番のアミノ酸配列、CH3はEUインデックス341～447番のアミノ酸配列とそれぞれ特定される。

【0089】

本発明の改変抗体組成物としては、特にヒト型キメラ抗体（以下、単にキメラ抗体とも略記する）、ヒト化抗体〔相補性決定領域（Complementarity Determining Region；CDR）移植抗体ともいう〕およびヒト抗体なども含まれる。

10

【0090】

キメラ抗体とは、ヒト以外の動物（非ヒト動物）の抗体のVHおよびVLと、ヒト抗体のCHおよびCLからなる抗体を意味する。非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスターおよびラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

【0091】

ハイブリドーマとは、非ヒト動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、マウスなどに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞をいう。したがって、ハイブリドーマが産生する抗体を構成する可変領域は、非ヒト動物抗体のアミノ酸配列からなる。

20

【0092】

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物細胞由来のハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0093】

ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの対応するCDRに移植した抗体をいう。VHおよびVLのCDR以外の領域はフレームワーク領域（以下、FRと表記する）と称される。

30

【0094】

ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のVHのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVHのFRのアミノ酸配列からなるVHのアミノ酸配列をコードするcDNAと、非ヒト動物抗体のVLのCDRのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列からなるVLのアミノ酸配列をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0095】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体等も含まれる。

40

【0096】

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血から単離したリンパ球を、EBウイルス等を感染させることによって不死化した後、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中より該抗体を精製することができる。

【0097】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFv等の抗体断片を表面に発現させたファージのライブラリーである。

50



## 【 0 0 9 8 】

ヒト抗体ファージライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的的手法により、2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

## 【 0 0 9 9 】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組み込まれた動物をいう。具体的には、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック動物を作製することができる。

10

## 【 0 1 0 0 】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

## 【 0 1 0 1 】

本発明の改変抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、または非ヒト動物抗体のCDRを、ヒト抗体のフレームワークに移植したヒト化抗体のアミノ酸配列のいずれでもよい。

## 【 0 1 0 2 】

具体的には、例えば、ハイブリドーマが産生する非ヒト動物抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列、ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列並びにヒト抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列などが挙げられる。

20

## 【 0 1 0 3 】

本発明の改変抗体におけるCLのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のアミノ酸配列または非ヒト動物抗体のアミノ酸配列のいずれでもよいが、ヒト抗体のアミノ酸配列のCまたはC'が好ましい。

## 【 0 1 0 4 】

本発明の改変抗体のCHとしては、イムノグロブリンに属すればいかなるものでもよいが、好ましくはIgGクラスに属するサブクラスである、1(IgG1)、2(IgG2)、3(IgG3)および4(IgG4)のいずれも用いることができる。

30

## 【 0 1 0 5 】

また、本発明の改変抗体のCHのアミノ酸配列としては、天然に存在するイムノグロブリンCH配列(各サブクラスのアロタイプを含む)だけでなく、天然に存在する2種類以上のイムノグロブリンCH配列を組み合わせたキメラ型のCH配列や、抗体のエフェクター活性を制御するためにアミノ酸残基改変が行われたその他のCHのアミノ酸配列も含まれる。

## 【 0 1 0 6 】

本発明の改変抗体のCHとしては、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むFc領域において、EUインデックス392番目のAsn、393番目のThrおよび394番目のThrにおいて、AsnからSer/Thr以外の他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、ThrからProへのアミノ酸改変およびThrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち、少なくともいずれか1つのアミノ酸改変が行われた変異Fcを有するCHが挙げられる。

40

## 【 0 1 0 7 】

本発明の改変抗体のCHとして具体的には、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むFc領域において、EUインデックス392番目のAsnがGly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrおよびTrpから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された変異Fcを有するCH、EUインデックス393番目のThrがProに改変された抗体Fc領

50

域を有するC H、およびE Uインデックス394番目のT h rが、L e u、A s n、A s p、L y s、P h e、T r pおよびT y rから選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基に改変された変異F cを有するC Hなどが挙げられる。

【0108】

本発明の改変抗体のC Hとしてより具体的には、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むF c領域において、E Uインデックス392番目のA s nがL y sに改変された変異F cを有するC Hが挙げられる。

【0109】

本発明の改変抗体のC Hとしては、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むF c領域において、上述のアミノ酸改変に加えてE Uインデックス339番目のT h rがT y rに改変されたC H、E Uインデックス397番目のM e tがG l n、A s n、A s pおよびP h eから選ばれるいずれかのアミノ酸残基に改変された変異F cを有するC H等も含まれる。

10

【0110】

また本発明の改変抗体のC Hとしては、F c領域以外のC HドメインとしてC H1およびヒンジドメインがヒトI g G1であるC Hが包含される。

【0111】

また本発明の改変抗体のC Hとして具体的には、C H1およびヒンジドメインがI g G1抗体由来のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むF c領域において、E Uインデックス392番目A s n、393番目T h rおよび394番目T h rにおいて、A s nからS e r / T h r以外の他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、T h rからP r oへのアミノ酸改変およびT h rから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち、少なくともいずれか1つのアミノ酸改変が行われたC H、配列番号2のC Hにおいて、E Uインデックス392番目のA s n、393番目のT h rおよび394番目のT h rにおいて、A s nからS e r / T h r以外の他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、T h rからP r oへのアミノ酸改変およびT h rから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち、少なくともいずれか1つのアミノ酸改変が行われたC Hなどが挙げられる。

20

【0112】

エフェクター活性とは、抗体のF c領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性(A n t i b o d y - D e p e n d e n t C e l l u l a r C y t o t o x i c i t y a c t i v i t y ; A D C C活性)、補体依存性傷害活性(C o m p l e m e n t - D e p e n d e n t c y t o t o x i c i t y a c t i v i t y ; C D C活性)や、マクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス(A n t i b o d y - d e p e n d e n t p h a g o c y t o s i s a c t i v i t y ; A D P活性)などが知られている。

30

【0113】

本発明においてA D C C活性およびC D C活性は、公知の測定方法[C a n c e r I m m u n o l . I m m u n o t h e r . , 3 6 , 3 7 3 ( 1 9 9 3 ) ]を用いて測定することができる。

【0114】

A D C C活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が、抗体のF c領域を介して免疫細胞のF c受容体と結合することで免疫細胞(ナチュラルキラー細胞など)を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

40

【0115】

F c受容体(以下、F c Rと記すこともある)とは、抗体のF c領域に結合する受容体であり、抗体の結合によりさまざまなエフェクター活性を誘導する。

【0116】

F c Rは抗体のサブクラスに対応しており、I g G、I g E、I g A、I g MはそれぞれF c R、F c R、F c R、F c μ Rに特異的に結合する。

【0117】

50

更にFcRには、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)のサブタイプが存在し、それぞれFcRIA、FcRIB、FcRIC、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC、FcRIIIA、FcRIIIBのアイソフォームが存在する。これらの異なるFcRは異なる細胞上に存在している(Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492(1991))。

【0118】

ヒトにおいては、FcRIIIBは好中球に特異的に発現しており、FcRIIAは、単球、Natural Killer細胞(NK細胞)および一部のT細胞に発現している。FcRIIAを介した抗体の結合は、NK細胞依存的なADCC活性を誘導する。

【0119】

ADCC活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タンパク質群からなる一連のカスケード(補体活性化経路)を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により免疫細胞の遊走および活性化を誘導することができる。

【0120】

ADCC活性のカスケードは、抗体のFc領域との結合ドメインを有するC1qが、Fc領域に結合し、2つのセリンプロテアーゼであるC1rおよびC1sと結合することでC1複合体を形成することで開始する。

【0121】

本発明のFc領域に結合する297番目以外のAsn残基に結合する糖鎖を減少または欠損させた改変抗体は、297番目以外のAsn残基に糖鎖が結合している抗体と同等以上のエフェクター活性、C1q結合活性、FcR結合活性、ADCC活性および/またはADCC活性を有する。

【0122】

また、本発明の改変抗体組成物は、アミノ酸改変前の抗体(親抗体ともいう)と比べて、実質的に同等、または実質的に同等以上のC1q結合活性、FcR結合活性、ADCC活性および/またはADCC活性を有する。

【0123】

親抗体と比べて、実質的に同等以上のC1q結合活性、FcR結合活性、ADCC活性および/またはADCC活性を有するとは、本発明の改変抗体と親抗体を同時に同じ実験系で解析した時に、FcR結合活性、ADCC活性およびADCC活性から選ばれるいずれか1つ以上の活性が、親抗体の活性と比べて同等かそれ以上であることを示す。

【0124】

アミノ酸改変を行う前の親抗体の活性と比べて同等とは、親抗体の活性を100%とした時に、改変抗体の活性が好ましくは75%、より好ましくは80%、さらに好ましくは85%、よりさらに好ましくは90%、よりさらに好ましくは95%、よりさらに好ましくは96%、よりさらに好ましくは97%、よりさらに好ましくは98%、特に好ましくは99%、最も好ましくは100%以上であることを示す。また、アミノ酸改変を行う前の親抗体の活性と比べて同等以上とは、好ましくは100%、より好ましくは110%、さらに好ましくは120%、よりさらに好ましくは130%特に、好ましくは140%、最も好ましくは150%以上の活性であることを示す。

【0125】

従って、本発明の改変抗体は、EUインデックス297番目以外のAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)コンセンサス配列において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち、少なくともいずれか1つのアミノ酸改変を行うことにより、改変抗体のC1q結合活性、FcR結合活性、ADCC活性および/またはADCC活性を制御することが可能であり、かつ297番目以外のAsn残基に結合する糖鎖を減少または欠損させることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 6 】

更に本発明の改変抗体組成物は、組成物中に含まれる重合体（会合体）量および/または抗体分解物量が減少している。重合体とは、1分子の抗体分子（1量体）が、疎水結合や水素結合などの結合を介して二つ以上重合したものをいい、ダイマー、トリマーまた数分子が重合したオリゴマー、および数分子以上が重合したポリマーなどが挙げられる。

## 【 0 1 2 7 】

また重合体を凝集体と表現する場合もある。また、抗体分解物とは、酵素的、非酵素的に生じる抗体分子の分解物であればいずれのものでもよく、断片化された抗体、酸化体、デアミドーション体およびイソメリゼーション体などが挙げられる。

## 【 0 1 2 8 】

従って、本発明のEUインデックス297番目以外のAsn-X-Ser/Thr（XはPro以外のアミノ酸残基）コンセンサス配列において、Asnから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変、XからProへのアミノ酸改変およびSer/Thrから他のアミノ酸残基へのアミノ酸改変のうち、少なくともいずれか1つのアミノ酸残基改変を含む改変抗体組成物は、抗体を作製・製造する際に重合体量および/または抗体分解物量が減少していることから、抗体医薬品として有用である。当該改変抗体組成物としては、より具体的には、EUインデックスの392番目をLysへアミノ酸残基改変した改変抗体組成物が挙げられる。

## 【 0 1 2 9 】

本発明において抗体断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどが挙げられる。

## 【 0 1 3 0 】

Fabは、IgG抗体を蛋白質分解酵素パピインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合（S-S結合）で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

## 【 0 1 3 1 】

F(ab')<sub>2</sub>は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のS-S結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

## 【 0 1 3 2 】

Fab'は、上記F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ領域のS-S結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

## 【 0 1 3 3 】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを12残基以上の適当なペプチドリinker（P）を用いて連結した、VH-P-VLまたはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

## 【 0 1 3 4 】

Diabodyは、抗原結合特異性の同じまたは異なるscFvが2量体を形成した抗体断片で、同じ抗原に対する2価の抗原結合活性または異なる抗原に対する2特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

## 【 0 1 3 5 】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のS-S結合を介して結合させたものをいう。

## 【 0 1 3 6 】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、CDR同士を直接または適当なペプチドリinkerを介して結合させることができる。

## 【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

50

本発明の改変抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によって製造することもできる。

【0138】

本発明の改変抗体組成物は、いかなる特異性を有する抗体をも包含するが、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスまたは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、腫瘍関連抗原を認識する抗体であることがより好ましい。

10

【0139】

腫瘍関連抗原としては、例えば、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD9、CD10、CD13、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD28、CD30、CD32、CD33、CD38、CD40、CD40 ligand (CD40L)、CD44、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD55、CD59、CD63、CD64、CD66b、CD69、CD70、CD74、CD80、CD89、CD95、CD98、CD105、CD134、CD137、CD138、CD147、CD158、CD160、CD162、CD164、CD200、CD227、adrenomedullin、angiopoietin related protein 4 (ARP4)、aurora、B7-H1、B7-DC、integrin、bone marrow stromal antigen 2 (BST2)、CA125、CA19.9、carbonic anhydrase 9 (CA9)、cadherin、cc-chemokine receptor (CCR)4、CCR7、carcinoembryonic antigen (CEA)、cysteine-rich fibroblast growth factor receptor-1 (CFR-1)、c-Met、c-Myc、collagen、CTA、connective tissue growth factor (CTGF)、CTLA-4、cytokeratin-18、DF3、E-cadherin、epidermal growth factor receptor (EGFR)、EGFRvIII、EGFR2 (HER2)、EGFR3 (HER3)、EGFR4 (HER4)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、endoglin、epithelial cell adhesion molecule (EPCAM)、endothelial protein C receptor (EPCR)、ephrin、ephrin receptor (Eph)、EphA2、endothelinase-2 (ET2)、FAM3D、fibroblast activating protein (FAP)、Fc receptor homolog 1 (FcRH1)、ferritin、fibroblast growth factor-8 (FGF-8)、FGF8 receptor、basic FGF (bFGF)、bFGF receptor、FGF receptor (FGFR)3、FGFR4、FLT1、FLT3、folate receptor、Frizzled homologue 10 (FZD10)、frizzled receptor 4 (FZD-4)、G250、G-CSF receptor、ganglioside (例えば、GD2、GD3、GM2およびGM3等)、globo H、gp75、gp88、GPR-9-6、heparanase I、hepatocyte growth factor (HGF)、HGF receptor、HLA antigen (例えば、HLA-DR等)、HM1.24、human milk fat globule (HMFG)、hRS7、heat shock protein 90 (hsp90)、idiotype epitope、insulin-like growth factor (IGF)、IGF receptor (IGFR)、int

20

30

40

50

erleukin (例えば、IL - 6、IL - 12およびIL - 15等)、interleukin receptor (例えば、IL - 2R、IL - 3R、IL - 6R、IL - 10RおよびIL - 15R等)、integrin、immune receptor translocation associated - 4 (IRTA - 4)、kallikrein 1、KDR、KIR2DL1、KIR2DL2/3、KS1/4、lamp - 1、lamp - 2、laminin - 5、Lewis y、sialyl Lewis x、lymphotoxin - beta receptor (LTBR)、LUNX、melanoma - associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP)、mesothelin、MICA、Mullerian inhibiting substance type II receptor (MISIR)、mucin、neural cell adhesion molecule (NCAM)、Nectin - 5、Notch1、osteopontin、platelet - derived growth factor (PDGF)、PDGF receptor、platelet factor - 4 (PF - 4)、phosphatidylserine、Prostate Specific Antigen (PSA)、prostate stem cell antigen (PSCA)、prostate specific membrane antigen (PSMA)、Parathyroid hormone related protein/peptide (PTHrP)、receptor activator of NF - kappa B ligand (RANKL)、receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM)、ROBO1、SART3、semaphorin 4B (SEMA4B)、secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)、SM5 - 1、sphingosine - 1 - phosphate、tumor - associated glycoprotein - 72 (TAG - 72)、transferrin receptor (TfR)、TGF - beta、Thy - 1、Tie - 1、Tie2 receptor、T cell immunoglobulin domain and mucin domain 1 (TIM - 1)、human tissue factor (hTF)、Tn antigen、tumor necrosis factor (TNF)、Thomsen - Friedenreich antigen (TF antigen)、TNF receptor、tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL)、TRAIL receptor (例えば、DR4およびDR5等)、system ASC amino acid transporter 2 (ASCT2)、trkC、TROP - 2、TWEAK receptor Fn14、urokinase plasminogen activator receptor (uPAR)、type IV collagenase、urokinase receptor、vascular endothelial growth factor (VEGF)、VEGF receptor (例えば、VEGFR1、VEGFR2およびVEGFR3等)、vimentinおよびVLA - 4等が挙げられる。

【0140】

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、例えば、抗GD2抗体 [アンチ・キャンサー・リサーチ (Anticancer Res.) , 13, 331 (1993)]、抗GD3抗体 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.) , 36, 260 (1993)]、抗GM2抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.) , 54, 1511 (1994)]、抗HER2抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 89, 4285 (1992)、欧州特許第882794号明細書]、抗CD52抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 8

10

20

30

40

50

9, 4285 (1992)]、抗CD4抗体、抗MAGE抗体[ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー(British J. Cancer), 83, 493 (2000)]、抗CCR4抗体(米国特許第6, 989, 145号明細書、国際公開第2009/086514号)、抗HM1.24抗体[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 36, 387 (1999)、国際公開第2002/057316号]、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)抗体[キャンサー(Cancer), 88, 2909 (2000)]、抗bFGF抗体、抗FGF-8抗体[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 86, 9911 (1989)]、抗bFGFR抗体、抗FGF-8R抗体[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 265, 16455 (1990)]、抗IGF抗体[ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ(J. Neurosci. Res.), 40, 647 (1995)]、抗IGF-IR抗体[ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ(J. Neurosci. Res.), 40, 647 (1995)]、抗PSMA抗体[ジャーナル・オブ・ウロロジー(J. Urology), 160, 2396 (1998)]、抗VEGF抗体[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 57, 4593 (1997)]、抗VEGFR抗体[オンコジーン(Oncogene), 19, 2138 (2000)、国際公開第96/30046号]、抗c-Met抗体(米国特許第7, 498, 420号明細書)、抗CD20抗体[Rituxan(登録商標)、カレント・オピニオン・イン・オンコロジー(Curr. Opin. Oncol.), 10, 548 (1998)、米国特許第5, 736, 137号明細書]、抗HER2抗体[Herceptin(登録商標)、米国特許第5, 725, 856号明細書]、抗HER3抗体(国際公開第2008/100624号、国際公開第2007/077028号)、抗Bip抗体(国際公開第2008/105560号)、抗CD10抗体、抗HB-EGF抗体(国際公開第2007/142277号)、抗EGFR抗体(Erbitux(登録商標)、国際公開第1996/402010号)、抗Apo-2R抗体(国際公開第98/51793号)、抗ASCT2抗体(国際公開第2010/008075号)、抗5T4抗体(米国特許出願公開第2006/0088522号明細書)、抗CA9抗体(米国特許第7, 378, 091号明細書)、抗CEA抗体[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 55(23 suppl): 5935s-5945s, (1995)]、抗Lewis Y抗体、抗葉酸受容体抗体(国際公開第2005/080431号)、抗TROP-2抗体(米国特許第6, 794, 494号明細書)、抗CD38抗体、抗CD33抗体[Mylotag(登録商標)]、抗CD22抗体(Epratuzumab)、抗EpCAM抗体、抗A33抗体、抗IL-3R抗体(国際公開第2010/126066号)、抗uPAR抗体(米国特許第2008/0152587号明細書)、TRAIL2抗体(国際公開第2002/94880号)などが挙げられる。

#### 【0141】

アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、例えば、抗インターロイキン6抗体[イムノロジカル・レビューズ(Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン6受容体抗体[モレキュラー・イムノロジー(Molecular Immunol.), 31, 371 (1994)]、抗インターロイキン5抗体[イムノロジカル・レビューズ(Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体[サイトカイン(Cytokine), 3, 562 (1991)]、抗インターロイキン4受容体抗体[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 217, 41 (1998)]、抗インターロイキン10受容体(IL-10R)抗体(国際公開第2009/154995号)、抗腫瘍壊死因子抗体[ハイブリドーマ(Hybridoma), 13, 183 (1994)]、抗腫瘍壊死因子受容体抗体[モレキュラー・ファーマコロジー(Molecular Pharmacol.), 58, 237 (2000)]、抗CCR4抗体[ネイチャー(Nature), 400, 776, (1

10

20

30

40

50

999) ]、抗CCR5抗体、抗CCR6抗体、抗ケモカイン抗体(Periet al., J. Immunol. Meth., 174, 249-257, 1994)または抗ケモカイン受容体抗体[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Exp. Med.), 186, 1373(1997)]であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GPIIb/IIIa抗体[ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 152, 2968(1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体[サイエンス(Science), 253, 1129(1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 272, 17400(1997)]、抗血液凝固因子抗体[サーキュレーション(Circulation), 101, 1158(2000)]、抗IgE抗体[Xolair(登録商標)]、抗CD22抗体(Epratuzumab)、抗BAFF抗体(Belimumab)抗<sub>v</sub><sub>3</sub>抗体および<sub>4</sub><sub>7</sub>抗体などが挙げられる。

10

## 【0142】

ウイルスまたは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、例えば、抗gp120抗体[ストラクチャー(Structure), 8, 385(2000)]、抗インフルエンザA型ウイルスのマトリックスタンパク質2(M2, 国際公開第2003/078600号)、抗CD4抗体[ジャーナル・オブ・リウマトロジー(J. Rheumatology), 25, 2065(1998)]、抗CCR5抗体および抗ペロ毒素抗体[ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー(J. Clin. Microbiol.), 37, 396(1999)]などが挙げられる。

20

## 【0143】

さらに、本発明の改変抗体は、プロテインA結合活性を有する。

## 【0144】

プロテインA結合活性を有するとは、改変抗体組成物がプロテインAを用いて精製可能であることをいう。

## 【0145】

プロテインA結合活性は、ELISA法、表面プラズモン共鳴法などを用いて測定することができる。具体的には、プレートに固相化されたプロテインAに、抗体組成物を反応させた後、各種標識を行ったその抗体を認識する抗体をさらに反応させて、プロテインAに結合された抗体組成物を定量することにより測定することができる。

30

## 【0146】

IgG1抗体と同等のプロテインA結合活性とは、上述の測定系を用いて、本発明の改変抗体組成物およびIgG1抗体のプロテインAに対する結合活性を測定した場合、IgG1抗体と実質的に同等な結合活性またはアフィニティーを有する活性をいう。

## 【0147】

またはセファロース等の担体に結合させたプロテインAに、pH5~8前後の高pH条件で抗体組成物を反応させ、洗浄後、さらにpH2~5前後の低pH条件で溶出する抗体組成物を定量することにより測定することができる。

## 【0148】

抗体分子のFc領域には、297番目のAsn残基にN-グリコシド結合型糖鎖が結合するが、それ以外のFc領域のAsn残基には糖鎖は結合することは殆ど知られていない。従って、通常、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。

40

## 【0149】

Fc領域の297番目のAsn残基に結合するN-グリコシド結合型糖鎖としては、コア構造(トリマンノシルコア構造)の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン(以下、Gal-GlcNAcと表記する)の側鎖を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、パイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどを有するコンプレックス型(複合型)糖鎖を挙げることができる。

## 【0150】

本発明において、コアフコース(core-fucose)または1,6-フコース

50



とは、N - グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN - アセチルグルコサミン（以下、GlcNAcと記す場合もある）の6位とフコース（以下、Fucと記す場合もある）の1位が結合した糖鎖構造をいう。また、N - グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合していないことを、単にフコースが無いまたはコアフコースが無い糖鎖という。

【0151】

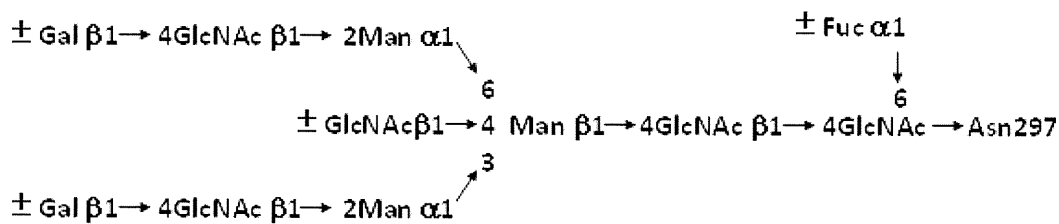
また、本発明において、コア構造またはトリマンノシルコア構造（tri-mannosyl core structure）とは、Man 1 - 6 (Man 1 - 3) Man 1 - 4 GlcNAc 1 - 4 GlcNAc 構造をいう。

【0152】

本発明において、N - グリコシド結合複合型糖鎖は、下記化学式で示される。

【0153】

【化1】



【0154】

本発明の改変抗体組成物は、297番目のAsnにN - グリコシド結合型糖鎖が結合したFc領域を有する抗体分子であって、上記の糖鎖構造を有していれば、単一の糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

【0155】

すなわち、本発明の改変抗体組成物とは、単一または複数の異なる糖鎖構造を有する改変抗体分子からなる組成物を意味する（典型的なコンプレックス型糖鎖構造を図1に示す）。

【0156】

さらに、本発明の改変抗体組成物のうち、297番目のAsnにN - グリコシド結合複合型糖鎖が結合したFc領域を有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物に含まれるFcに結合する全N - グリコシド結合複合型糖鎖のうち、コアフコースが無い糖鎖を有する抗体組成物は、CDC活性の他に高いADCC活性を有する。

【0157】

コアフコースが無い糖鎖の割合としては、ADCC活性が増加すれば、いずれの割合の抗体も含まれるが、好ましくは20%以上、より好ましくは51%~100%、更に好ましくは80%~100%、特に好ましくは90%~99%、最も好ましくは100%の割合が挙げられる。

【0158】

本発明において、フコースが無い糖鎖としては、上記で示された化学式中、還元末端側のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合していなければ、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものであってもよい。

【0159】

本発明において、糖鎖還元末端のN - アセチルグルコサミンにフコースが結合していない（コアフコースが無い）とは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していない抗体組成物とは、具体的には、後述の4に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の抗体組成物である場合をいう。実質的に

10

20

30

40

50

検出できない程度とは、測定の出検限界以下であることをいう。全ての糖鎖にコアフコースが無い抗体組成物は、最も高いADCC活性を有する。

【0160】

N-グリコシド結合複合型糖鎖が結合したFc領域を有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、フコースが無い糖鎖を有する抗体分子の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法〔生物化学実験法23 糖蛋白質糖鎖研究法（学会出版センター）高橋禮子編（1989）〕を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。

【0161】

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖が結合したFc領域を有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、フコースが無い糖鎖を有する抗体分子の割合は、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法〔ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー（J. Liq. Chromatogr.）, 6, 1577（1983）〕によって分析することで決定することができる。

【0162】

本発明の改変抗体組成物を生産する形質転換株は、抗体分子の可変領域および定常領域をコードするDNAを挿入した改変抗体組成物発現ベクターを動物細胞へ導入することにより、取得することができる。

【0163】

改変抗体発現ベクターは、以下のように構築する。

【0164】

前述のCHおよびCLをコードするDNAをそれぞれ改変抗体発現用ベクターに挿入することにより、改変抗体組成物発現ベクターを作製する。

【0165】

改変抗体発現用ベクターとしては、例えば、PAGE107〔日本国特開平3-22979号公報；Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140（1990）〕、PAGE103〔Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310（1987）〕、pHSG274〔Brady G. et al., Gene, 27, 223-232（1984）〕、pKCR〔O'Hare K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1527-1531（1981）〕およびpSG1d2-4〔Miyaji H. et al., Cytotechnology, 4, 173-180（1990）〕等が挙げられる。

【0166】

改変抗体発現用ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、例えば、SV40の初期プロモーターとエンハンサー〔Mizukami T. and Itoh S., J. Biochem., 101, 1307-1310（1987）〕、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターとエンハンサー〔Kuwana Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960-968（1987）〕、および免疫グロブリンH鎖のプロモーター〔Mason J. O. et al., Cell, 41, 479-487（1985）〕とエンハンサー〔Gillies S. D. et al., Cell, 33, 717-728（1983）〕等が挙げられる。

【0167】

改変抗体組成物発現用ベクターは、H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプまたは同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）のどちらでも用いることができるが、改変抗体組成物発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型の改変抗体組成物発現用ベクターの方が好ましい〔Shitara K. et al., J. I

10

20

30

40

50

mmunol. Methods, 167, 271-278 (1994)].

【0168】

タンデム型の改変抗体組成物発現用ベクターとしては、pKANTE X93 (国際公開第97/10354号)、pEE18 [Bentley K. J. et al., Hybridoma, 17, 559-567 (1998)]等が挙げられる。

【0169】

構築された改変抗体組成物発現用ベクターのCHおよびCLをコードするDNAの上流に、各種抗原に対する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAをクローニングすることにより、改変抗体組成物発現ベクターを構築することができる。

【0170】

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法 [日本国特開平2-257891号公報; Miyaji H. et al., Cytotechnology, 3, 133-140 (1990)]等が挙げられる。

【0171】

本発明の改変抗体組成物を生産する宿主細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞および微生物など、組換え蛋白質生産に一般に用いられる宿主細胞であればいかなるものも包含される。

【0172】

本発明の改変抗体組成物を生産する宿主細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞、ラットミエロマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエロマ細胞株NS0細胞、マウスミエロマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、ヒトバーキットリンパ腫由来ナマルバ細胞、ヒト網膜芽腫由来PER.C6細胞、ヒト胚性腎臓組織由来HEK293細胞、ヒト骨髄性白血病由来NM-F9細胞、胚性幹細胞、および受精卵細胞などが挙げられる。

【0173】

好ましくは、遺伝子組換え糖蛋白質医薬品を製造するための宿主細胞、遺伝子組換え糖蛋白質医薬品を生産するヒト以外のトランスジェニック動物を製造するために用いる胚性幹細胞または受精卵細胞、ならびに遺伝子組換え糖蛋白質医薬品を生産するトランスジェニック植物を製造するために用いる植物細胞などが挙げられる。

【0174】

親株細胞としては、GDP-L-フコースの合成に関与する酵素、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素またはGDP-L-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質のゲノム遺伝子を改変させた細胞および遺伝子改変を行う前の細胞いずれも包含する。例えば、以下の細胞が好適に挙げられる。

【0175】

NS0細胞の親株細胞としては、例えば、バイオテクノロジー (BIOTECHNOLOGY), 10, 169 (1992)、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.), 73, 261, (2001)等の文献に記載されているNS0細胞が挙げられる。また、例えば、理化学研究所細胞開発銀行に登録されているNS0細胞株 (RCB0213)、またはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株なども挙げられる。

【0176】

SP2/0-Ag14細胞の親株細胞としては、例えば、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 126, 317, (1981)、ネイチャー (Nature), 276, 269, (1978)およびヒューマン・アンチボディーズ・アンド・ハイブリドーマズ (Human Antibodies and Hybridomas), 3, 129, (1992)等の文献に記載されているSP2/0-Ag14細胞が挙げられる。また、例えば、ATCCに登録されているSP2/0-Ag14細胞 (ATCC CRL-1581) またはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株 (ATCC

10

20

30

40

50

CRL - 1581.1)なども挙げられる。

【0177】

チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞の親株細胞としては、例えば、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, I I (p883 - 900)等の文献に記載されているCHO細胞が挙げられる。

10

【0178】

また、例えば、ATCCに登録されているCHO-K1株(ATCC CCL-61)、DUXB11株(ATCC CRL-9096)、Pro-5株(ATCC CRL-1781)および市販のCHO-S株(Lifetechnologies社製 Cat # 11619)並びにこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株なども挙げられる。

【0179】

ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞の親株細胞としては、例えば、Y3/Ag1.2.3細胞(ATCC CRL-1631)から樹立された株化細胞が包含される。その具体的な例としては、J. Cell. Biol., 93, 576 (1982)、Methods Enzymol. 73B, 1 (1981)等の文献に記載されているYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞が挙げられる。また、ATCCに登録されているYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL-1662)またはこれら株を様々な無血清培地に馴化させた亜株なども挙げられる。

20

【0180】

本発明においてCDC活性だけでなく、ADC活性の高い改変抗体組成物を発現させる宿主細胞としては、コアフコースを認識するレクチンに耐性を有する宿主細胞、例えば、N-グリコシド結合複合型糖鎖が結合したFcを有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれるFcに結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、フコースが結合していない糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物を生産する能力を有する宿主細胞、例えば、以下の(a)~(c)に挙げる少なくとも1つの蛋白質の活性が低下または失活した細胞などが挙げられる。

30

【0181】

(a)細胞内糖ヌクレオチドGDP-L-フコースの合成に関与する酵素；GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ(GMD)、F<sub>x</sub>、GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスホリラーゼ(GFPP)、フコキナーゼ。

(b)N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が結合する糖鎖修飾に関与する酵素；1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)。

40

(c)GDP-L-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質；GDP-L-フコーストランスポーター。

【0182】

また、これら酵素およびトランスポータータンパク質のアミノ酸配列を、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]およびFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)]等の解析ソフトを用いて比較、計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する酵素またはトランスポータータンパク質であって、該酵素

50

またはトランスポータータンパク質の活性を有するものも挙げられる。

【0183】

本発明の改変抗体を生産する細胞としては、具体的には、1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)をコードする遺伝子がノックアウトされたCHO細胞、GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ(GMD)をコードする遺伝子がノックアウトされたCHO細胞、またはGDP-L-フコーストランスポーターをコードする遺伝子がノックアウトされたCHO細胞等(国際公開第02/31140号、国際公開第03/85107号)が挙げられる。

【0184】

このような細胞を取得する方法としては、目的とするゲノムの改変を行うことができれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を欠失させる手法として、以下の(a)~(e)などが挙げられる。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法
- (e) N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

【0185】

N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のコアフコースを認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。レクチンの具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA(Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA(Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA(Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL(Aleuria aurantia由来のLectin)およびアスペルギルス・オリゼレクチンAOL(Aspergillus oryzae由来のLectin)等を挙げることができる。

【0186】

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞をいう。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞(以下、「親株細胞」とも称す)が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が生育できない濃度と同濃度、より好ましくは2~5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

【0187】

本発明において、生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常10 $\mu$ g/mL~10mg/mL、好ましくは0.5mg/mL~2.0mg/mLであることが好ましい。

【0188】

本発明に用いるトランスジェニック動物としては、例えば、GDP-L-フコースの合成に関与する酵素、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素またはGDP-L-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質の活性を欠失させるようにゲノム遺伝子を改変させたトランスジェニック動物などが挙げられる。

【0189】

具体的には、例えば、1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物、GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼをコードする遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物、またはGDP-L-フコーストランスポーターをコードする遺伝子がノックアウトされたトランスジェニック動物などが挙げられる。

【0190】

10

20

30

40

50

本発明の改変抗体には、改変抗体または該抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質、または抗体医薬などを化学的または遺伝子工学的に結合させた融合抗体を包含する。

【0191】

また、本発明の改変抗体と下記に記載する低分子薬剤、高分子薬剤、免疫賦活剤およびサイトカイン等の治療薬とを同時にまたは逐次的に投与する医薬であってもよいし、それぞれの薬剤成分を混合させた合剤であってもよい。それぞれの薬剤成分を混合させた合剤には、本発明の改変抗体および該抗体断片に少なくとも1種類の薬剤を結合させた融合抗体なども包含する。

【0192】

更に、それぞれの薬剤を含有する医薬キットを調製し、これらの薬剤を同時にまたは逐次的に患者に投与してもよいし、混合させた後に患者に投与してもよい。

【0193】

本発明における、融合抗体は、本発明の改変抗体または該抗体断片のH鎖若しくはL鎖のN末端側若しくはC末端側、抗体または該抗体断片中の適当な置換基若しくは側鎖、さらには抗体または該抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子薬剤、高分子薬剤、免疫賦活剤、蛋白質または抗体医薬などを化学的手法〔抗体工学入門，地人書館（1994）〕により結合させることにより製造することができる。

【0194】

また、本発明の改変抗体または該抗体断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質または抗体医薬をコードするDNAとを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的的手法より製造することができる。

【0195】

放射性同位元素としては、例えば、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{77}\text{Lu}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{211}\text{At}$ および $^{212}\text{Bi}$ などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。

【0196】

キレート剤としては、例えば、1 - イソチオシアネートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA) などが挙げられる。

【0197】

低分子薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤およびキナーゼ阻害剤などの抗癌剤〔臨床腫瘍学，癌と化学療法社（1996）〕、またはヒドロコチゾンおよびプレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリンおよびインドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレートおよびペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミドおよびアザチオプリンなどの免疫抑制剤、並びにマレイン酸クロルフェニラミンおよびクレマシチン等の抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法，医歯薬出版株式会社（1982）〕などが挙げられる。

【0198】

抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、エピルピシン、ゲムシタピン（ゲムザール）、ダウノルピシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、5 - フルオロウラシル、フルオロウラシル、ピンブラスチン、ピンクリスチン、プレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイ

10

20

30

40

50

キン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリピン、カンプトテシン、10-ヒドロキシ-7-エチル-カンプトテシン(SN38)、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、イリノテカン(CPT-11)、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リユープロレニン、フルタミド、テニボシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ピノレルピン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタピン、トムデックス、アザチジン、UFT、オキサロプラチン、ゲフィチニブ(イレッサ)、イマチニブ(STI571)、エルロチニブ、FMS-like tyrosine kinase 3(Flt3)阻害剤、vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)阻害剤、fibroblast growth factor receptor(FGFR)阻害剤、イレッサおよびタルセバなどのepidermal growth factor receptor(EGFR)阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール-トランスレチノイン酸、サリドマイド、レナリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、プシラミン、アザチオプリン、ミゾリピン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコチゾン、ベキサロテン(ターグレチン)、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール(アリミデックス)、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリットマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、マイタンシノイド、マイタンシノイドDM1並びにマイタンシノイドDM4またはその誘導体などが挙げられる。

10

20

## 【0199】

低分子薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタルアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法および水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基とを結合させる方法などが挙げられる。

30

## 【0200】

高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(以下、PEGと表記する)、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマーおよびヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。

## 【0201】

これらの高分子化合物を抗体または抗体断片に結合させることにより、(1)化学的、物理的または生物学的な種々の因子に対する安定性の向上、(2)血中半減期の顕著な延長、(3)免疫原性の消失または抗体産生の抑制、などの効果が期待される[バイオコンジュゲート医薬品, 廣川書店(1993)]。

40

## 【0202】

PEGと抗体を結合させる方法としては、例えば、PEG化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる[バイオコンジュゲート医薬品, 廣川書店(1993)]。

## 【0203】

PEG化修飾試薬としては、例えば、リジンの-アミノ基への修飾剤(日本国特開昭61-178926号公報)、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤(日本国特開昭56-23587号公報)、並びにアルギニンのグアニジノ基への

50

修飾剤（日本国特開平2 - 1 1 7 9 2 0号公報）などが挙げられる。

【0204】

免疫賦活剤としては、例えば、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、（1 3）グルカン（レンチナン、シゾフィラン）および ガラクトシルセラミドなどが挙げられる。

【0205】

タンパク質としては、例えば、NK細胞、マクロファージまたは好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカインまたは増殖因子、および毒素蛋白質などが挙げられる。

【0206】

サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、INFと記す）- 、INF - 、INF - 、インターロイキン（以下、ILと記す）- 2、IL - 12、IL - 15、IL - 18、IL - 21、IL - 23、顆粒球コロニー刺激因子（G - CSF）、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM - CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M - CSF）、Fasリガンド（FasL）およびTRAILリガンド（ApoptL）などが挙げられる。

【0207】

毒素蛋白質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシン、弱毒化ジフテリアトキシンCRM197およびONTAKなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

【0208】

抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原および病変部位の血管新生に關与する抗原に対する抗体が挙げられる。

【0209】

抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、Cluster of differentiation（以下、CDと記載する）19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80（B7.1）、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86（B7.2）、Fas受容体、TRAIL受容体、human leukocyte antigen（HLA）- Class IIおよびEpidermal Growth Factor Receptor（EGFR）などが挙げられる。

【0210】

腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子（例えば、CD80、CD86、CD274、B7 - DC、B7 - H2、B7 - H3およびB7 - H4等）、B7ファミリー分子のリガンド（例えば、CD28、CTLA - 4、ICOS、PD - 1およびBTLA等）、OX - 40、OX - 40リガンド、CD137、tumor necrosis factor（TNF）受容体ファミリー分子（例えば、DR4、DR5、TNFR1およびTNFR2等）、TNF - related apoptosis - inducing ligand receptor（TRAIL）ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー（例えば、TRAIL - R1、TRAIL - R2、TRAIL - R3およびTRAIL - R4等）、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand（RANK）、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン〔例えば、IL - 1、IL - 1、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 10、IL - 13、transforming growth factor（TGF）およびTNF など〕、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン（例えば、SLC、ELC、I - 309、TARC、MDCおよびCTACKなど）、またはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

【0211】

10

20

30

40

50



病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Angiopoietin、fibroblast growth factor (FGF)、EGF、platelet-derived growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF、IL-8、EphillinおよびSDF-1並びにこれらの受容体などが挙げられる。

【0212】

蛋白質または抗体医薬との融合抗体は、モノクローナル抗体または抗体断片をコードするcDNAに蛋白質をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

10

【0213】

上記融合抗体を検出方法、定量方法、検出用試薬、定量用試薬または診断薬として使用する場合に、本発明の改変抗体またはその抗体断片に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。

【0214】

標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼおよびルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステルおよびロフィンなどの発光物質、並びにフルオレセインイソチオシアネート (FITC) およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート (RITC) などの蛍光物質などが挙げられる。

20

【0215】

本発明の改変抗体は、抗体が特異的に結合する抗原が発現している疾患であれば、いずれの疾患の治療薬でもよいが、上述した癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、炎症性疾患、循環器疾患、ウイルスまたは細菌の感染症に関連する抗原を発現している疾患の治療薬が好ましい。

【0216】

本発明の改変抗体は、Fc領域への不要な糖鎖の結合が無く、かつ高いエフェクター活性を有することから、癌、自己免疫疾患などの原因細胞の治療に有効である。

30

【0217】

癌としては、例えば、血液癌、頭頸部癌、グリオーマ、舌癌、喉頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌 (例えば、膵頭癌、膵体癌、膵尾癌および膵管癌)、小腸癌、大腸癌、肺癌 (例えば、小細胞性肺癌、大細胞性肺癌、腺癌および扁平上皮癌)、中皮種、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、腎癌、子宮癌 (例えば、子宮頸癌および子宮体癌)、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、骨肉種、皮膚癌、菌状息肉症、ウイング腫瘍、悪性骨腫瘍およびメラノーマなどが挙げられる。

【0218】

血液癌としては、例えば、白血病、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、T細胞由来の癌などが挙げられる。具体的には、例えば、皮膚T細胞性リンパ腫 (Cutaneous T cell lymphoma, CTCL)、末梢T細胞性リンパ腫 (peripheral T cell lymphoma, PTCL)、未分化大細胞型リンパ腫 (Anaplastic large cell lymphoma, ALCL)、急性リンパ性白血病 (Acute lymphatic leukemia, ALL)、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫 (例えば、バーキットリンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、びまん性体細胞性B細胞性リンパ腫、未分化体細胞リンパ腫、MANTLリンパ腫および濾胞性リンパ腫) などが挙げられる。

40

【0219】

自己免疫疾患としては、例えば、橋本病、バセドウ病、突発性血小板減少性紫斑病、突

50

発性好中球減少症、巨赤芽球性貧血、溶血性貧血、重症筋無力症、乾癬、天疱瘡、類天疱瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、強直性脊椎炎、多発性硬化症、I型糖尿病、肝炎、心筋炎、シェーグレン症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、皮膚筋炎、全身性皮膚硬化症および移植後拒絶反応などが挙げられる。

【0220】

アレルギー性疾患としては、例えば、急性または慢性気道過敏症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎などが挙げられる。

【0221】

以下に、本発明の改変抗体組成物の製造方法を具体的に説明する。

10

【0222】

1. 改変抗体組成物の製造方法

本発明の改変抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988(以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993(以下、モノクローナルアンチボディズと略す)およびAntibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996(以下、アンチボディエンジニアリングと略す)等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

20

【0223】

(1) 本発明の改変抗体組成物発現ベクターの構築

本発明の改変抗体組成物発現ベクターとは、本発明の改変抗体組成物に含まれる抗体分子のH鎖定常領域及びL鎖定常領域をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターである。

【0224】

改変抗体組成物発現用ベクターは、動物細胞用発現ベクターに改変抗体組成物に含まれる抗体分子のH鎖定常領域及びL鎖定常領域をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

30

【0225】

本発明の改変抗体組成物に含まれる抗体分子のH鎖定常領域をコードする遺伝子は、IgG1抗体のH鎖定常領域をコードする遺伝子をクローニングした後、所望のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片を連結させることにより、作製することができる。

【0226】

また、合成DNAを用いて全DNAを合成することもでき、PCR法による合成も可能である(モレキュラー・クローニング第2版)。さらに、これらの手法を複数組み合わせることにより、改変抗体のH鎖定常領域を作製することもできる。

【0227】

本発明において、ヒトIgG抗体のFc領域のEUインデックス297~299番目以外に存在するAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列を構成するアミノ酸残基において、Asn、XおよびSer/Thrのいずれのアミノ酸残基をどのアミノ酸残基に改変するかは、N-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列のN末端側またはC末端側のアミノ酸配列を考慮することにより、決定することができる。

40

【0228】

即ち、アミノ酸改変の結果、新たなN-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列が生じないようにアミノ酸残基を行う位置、改変後のアミノ酸残基を考慮して行うことで適切なアミノ酸改変を行うことができる。本発明において具体的には下記のようにデザインを決定することができる。

50

## 【0229】

ヒト抗体のFc領域(配列番号1)においてEUインデックス297~299番以外の結合型糖鎖コンセンサス配列は、392~394番目にAsn-Thr-Thrが存在し、その前後のアミノ酸配列としてはAsn389-Asn390-Tyr391-Asn392-Thr393-Thr394-Pro395-Pro396である(図4参照)

## 【0230】

Asn392をSer/Thrにアミノ酸改変した場合は、390番目にはAsnが存在するため、新たに390Asn-391Tyr-392Ser/Thrのコンセンサス配列が生じてしまう。従って、Asn392は、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Asp、Gln、Glu、Lys、Arg、His、Phe、TyrおよびTrpから選ばれるアミノ酸残基に改変することが好ましい。また、Thr393はProに改変することが好ましく、394ThrはSer/Thr以外のアミノ酸残基に改変することが好ましい。

10

## 【0231】

この様に、Nグリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列の近傍に存在するアミノ酸残基(1~3残基)と、アミノ酸改変後のアミノ酸配列をデザインすることで、適切なアミノ酸改変位置および適切なアミノ酸改変残基を選択することができる。

## 【0232】

動物細胞用発現ベクターとしては、上述の抗体分子の定常領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pKANT EX93[モレキュラー・イムノロジー(Mol.Immunol.),37,1035(2000)]、pAGE107[サイトテクノロジー(Cytotechnology),3,133(1990)]、pAGE103[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.),101,1307(1987)]、pHSG274[ジーン(Gene),27,223(1984)]、pKCR[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.),78,1527(1981)]、pSG1d2-4[サイトテクノロジー(Cytotechnology),4,173(1990)]等が挙げられる。

20

30

## 【0233】

動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.),101,1307(1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR[バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem.Biophys.Res.Commun.),149,960(1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター[セル(Cell),41,479(1985)]とエンハンサー[セル(Cell),33,717(1983)]等が挙げられる。

## 【0234】

本発明の改変抗体組成物発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプまたは同一のベクター上に存在するタイプ(以下、タンデム型と表記する)のどちらでも用いることができるが、本発明の改変抗体組成物発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、並びに動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型の抗体発現用ベクターの方が好ましい[ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J.Immunol.Methods),167,271(1994)]。

40

## 【0235】

構築した本発明の改変抗体組成物発現ベクターは、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体の動物細胞での発現に使用することができる。

## 【0236】

50

## (2) 非ヒト動物抗体の可変領域をコードするcDNAの取得

非ヒト動物抗体、例えば、マウス抗体のH鎖可変領域(以下、VHと表記する)およびL鎖可変領域(以下、VLと表記する)をコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

## 【0237】

任意の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として用い、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージまたはプラスミド等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製する。

## 【0238】

前記ライブラリーより、既存のマウス抗体の定常領域または可変領域をコードするDNAをプローブとして用い、VHをコードするcDNAを有する組換えファージまたは組換えプラスミド及びL鎖可変領域をコードするcDNAを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。

10

## 【0239】

組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

## 【0240】

任意の非ヒト動物抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、抗体が結合する抗原を非ヒト動物に免疫し、周知の方法[モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988(以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993(以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996(以下、アンチボディエンジニアリングと略す)]に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製する。次いでシングルセルクローニングしたハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

20

30

## 【0241】

非ヒト動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスターおよびウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

## 【0242】

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、例えば、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法[メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3(1987)]、RNeasy kit(QIAGEN社製)が挙げられる。

## 【0243】

全RNAからmRNAを調製する方法としては、例えば、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法[モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989]等が挙げられる。

40

## 【0244】

また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、例えば、Fast Track mRNA Isolation Kit(Invitrogen社製)およびQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia社製)等が挙げられる。

## 【0245】

50

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、例えば、常法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] および市販のキットを用いる方法が挙げられる。

## 【0246】

市販のキットとしては、例えば、Super Script (登録商標) Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製) および ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) などが挙げられる。

10

## 【0247】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。

## 【0248】

例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)], pBluescript II SK (+) [ヌクレイック・アシーズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)], ZAP II (Stratagene社製)、gt10、gt11 [ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)], Lambda BlueMid (Clontech社製)、ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及びpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等を用いることができる。

20

## 【0249】

ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。

30

## 【0250】

例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)], Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)], NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)], K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

## 【0251】

cDNAライブラリーからの非ヒト動物抗体のVHおよびVLをコードするcDNAクローンを選択する方法としては、アイソトープまたは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法またはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。

40

## 【0252】

また、プライマーを調製し、cDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular

50

Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] により V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードする cDNA を調製することもできる。

#### 【0253】

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM 377 DNA シークエンサー (Applied Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該 cDNA の塩基配列を決定することができる。

10

#### 【0254】

決定した塩基配列から V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> を完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

20

#### 【0255】

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードする DNA の塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

#### 【0256】

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変領域をコードする DNA 配列を設計し、設計した DNA 配列に基づき、100~150塩基前後の長さからなる数本の合成 DNA を合成する。その後、合成 DNA を用いて PCR 法を行うか、完全長の DNA を合成することで、DNA を得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に上述と同様にして DNA を得ることができる。

30

#### 【0257】

##### (3) 非ヒト動物抗体の可変領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及び N 末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> の各 CDR のアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

40

#### 【0258】

##### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項 1 の (1) に記載の本発明の改変抗体組成物発現用ベクターのヒト抗体の H 鎖定常領域及び L 鎖定常領域をコードする遺伝子の upstream に、非ヒト動物抗体の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> をコードする cDNA をそれぞれ挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

50

## 【 0 2 5 9 】

例えば、非ヒト動物抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを、非ヒト動物抗体VHおよびVLの3'末端側の塩基配列とヒト抗体のCHおよびCLの5'末端側の塩基配列とからなり、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結する。それぞれを本項1の(1)に記載の本発明の改変抗体組成物発現用ベクターのヒト抗体のH鎖定常領域及びL鎖定常領域をコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

## 【 0 2 6 0 】

(5) ヒト化抗体の可変領域をコードするcDNAの構築

ヒト化抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的の非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRを移植するヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領域(以下、FRと表記する)のアミノ酸配列を選択する。

10

## 【 0 2 6 1 】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dep 20

20

## 【 0 2 6 2 】

その中でも、十分な活性を有するヒト化抗体を作製するためには、目的の非ヒト動物抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが好ましい。

## 【 0 2 6 3 】

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的の非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列を完全合成する。

30

## 【 0 2 6 4 】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)で構築した本発明の改変抗体組成物発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

40

## 【 0 2 6 5 】

(6) ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト動物抗体に比べて低下してしまうことが知られている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266(1991)]。

## 【 0 2 6 6 】

この原因としては、元の非ヒト動物抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、F

50

Rのいくつかのアミノ酸残基が直接的または間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。

【0267】

この問題を解決するため、ヒト化抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元の非ヒト動物抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている[バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266(1991)]。

10

【0268】

ヒト化抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 112, 535(1977)]またはコンピューターモデリング[プロテイン・エンジニアリング(Protein Engineering), 7, 1501(1994)]等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト化抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来た。

【0269】

しかしながら、あらゆる抗体に適応可能なヒト化抗体の作製法は未だ確立されていない。現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

20

【0270】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いて本項1の(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項1の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

【0271】

(7) ヒト化抗体発現ベクターの構築

本項1の(1)に記載の本発明の改変抗体組成物発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流に、本項1の(5)および(6)で構築したヒト化抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

30

【0272】

例えば、本項1の(5)および(6)でヒト化抗体のVHおよびVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項1の(1)に記載の本発明の改変抗体組成物発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

40

【0273】

(8) ヒト化抗体の安定的生産

本項1の(4)及び(7)に記載のヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

【0274】

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[日本国特開平2-257891号公報; サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133(1990)]等が挙げられる。

【0275】

ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト型

50



キメラ抗体またはヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

【0276】

具体的には、例えば、マウスミエローム細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローム細胞YB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローム細胞であるナマルバ細胞などが挙げられる。これらの中でも、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、およびラットミエロームYB2/0細胞等が好ましい。

【0277】

ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、日本国特開平2-257891号公報に開示されている方法に従い、G418硫酸塩（以下、G418と表記する；SIGMA社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。

【0278】

動物細胞培養用培地としては、例えば、RPMI1640培地（日水製薬社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL302培地（JRH社製）、IMDM培地（GIBCO BRL社製）、Hybridoma-SFM培地（GIBCO BRL社製）、EagleのMEM培地[サイエンス(Science), 122, 501(1952)]、ダルベッコ改変MEM培地[ヴュウロロジー(Virology), 8, 396(1959)]、199培地[プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1(1950)]およびWhitten培地[発生工学実験マニュアル-トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]並びにこれら培地に牛胎児血清（以下、FCSと表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。

【0279】

得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法[以下、ELISA法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等により測定できる。

【0280】

また、形質転換株は、日本国特開平2-257891号公報に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

【0281】

ヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる[アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]。

【0282】

また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例

10

20

30

40

50

えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。

【0283】

精製したヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体のH鎖、L鎖若しくは抗体分子全体の分子量は、例えば、SDS変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動[以下、SDS-PAGEと表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]およびウエスタンブロッティング法[アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996]等で測定することができる。

10

【0284】

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体または植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

【0285】

したがって、宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、以下に示す抗体分子を発現させる宿主細胞に抗体遺伝子を導入した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の改変抗体組成物を製造することができる。

20

【0286】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)およびYcp50(ATCC37419)等が挙げられる。

【0287】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよい。例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF1プロモーターおよびCUP1プロモーター等が挙げられる。

30

【0288】

宿主細胞としては、例えば、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物等が挙げられる。具体的には、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomycetes alluvius等が挙げられる。

【0289】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法[メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods Enzymol.), 194, 182(1990)]、スフェロプラスト法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 1929(1978)]、酢酸リチウム法[ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriology), 153, 163(1983)およびプロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929(1978)]に記載の方法等をあげることができる。

40

【0290】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、

50

p c D M 8 (フナコシ社より市販)、p A G E 1 0 7 [日本国特開平3 - 2 2 9 7 9号公報; サイトテクノロジー (C y t o t e c h n o l o g y), 3, 1 3 3, (1 9 9 0)]、p A S 3 - 3 [日本国特開平2 - 2 2 7 0 7 5号公報]、p C D M 8 [ネイチャー (N a t u r e), 3 2 9, 8 4 0, (1 9 8 7)]、p c D N A I / A m p (I n v i t r o g e n社)、p R E P 4 (I n v i t r o g e n社)、p A G E 1 0 3 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J . B i o c h e m i s t r y), 1 0 1, 1 3 0 7 (1 9 8 7)]およびp A G E 2 1 0等が挙げられる。

【0291】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス (C M V) の I E (i m m e d i a t e e a r l y) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーターおよびS R プロモーター等が挙げられる。また、ヒトC M VのI E遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

10

【0292】

宿主細胞としては、例えば、ヒトの細胞であるナマルバ (N a m a l w a) 細胞、サルの細胞であるC O S細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるC H O細胞、H B T 5 6 3 7 (日本国特開昭63 - 2 9 9号公報)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞および受精卵細胞等が挙げられる。

20

【0293】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーB a c u l o v i r u s E x p r e s s i o n V e c t o r s, A L a b o r a t o r y M a n u a l, W. H. F r e e m a n a n d C o m p a n y, N e w Y o r k (1 9 9 2) およびバイオ/テクノロジー (B i o / T e c h n o l o g y), 6, 4 7 (1 9 8 8)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0294】

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

30

【0295】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、p V L 1 3 9 2、p V L 1 3 9 3、p B l u e B a c I I I (ともにI n v i t r o g e n社)等が挙げられる。

【0296】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (A u t o g r a p h a c a l i f o r n i c a n u c l e a r p o l y h e d r o s i s v i r u s) が挙げられる。

【0297】

昆虫細胞としては、例えば、S p o d o p t e r a f r u g i p e r d aの卵巣細胞であるS f 9、S f 2 1 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーB a c u l o v i r u s E x p r e s s i o n V e c t o r s, A L a b o r a t o r y M a n u a l, W. H. F r e e m a n a n d C o m p a n y, N e w Y o r k (1 9 9 2)]およびT r i c h o p l u s i a n iの卵巣細胞であるH i g h 5 (I n v i t r o g e n社)等を用いることができる。

40

【0298】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記発現導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (日本国特開平2 - 2 2 7 0 7 5号公報) およびリポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル

50

・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)] 等が挙げられる。

【0299】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等が挙げられる。

【0300】

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等が挙げられる。

【0301】

宿主細胞としては、例えば、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギおよびオオムギ等の植物細胞等が挙げられる。

【0302】

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) [日本国特開昭 59-140885 号公報、日本国特開昭 60-70080 号公報、国際公開第 94/00977 号]、エレクトロポレーション法 [日本国特開昭 60-251887 号公報] およびパーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本国特許第 2606856 号明細書、日本国特許第 2517813 号明細書] 等が挙げられる。

【0303】

組換えベクターの導入方法としては、例えば、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [日本国特開平 2-227075 号公報]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレーティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本国特許第 2606856 号明細書、日本国特許第 2517813 号明細書]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4 遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版] 等を挙げることができる。

【0304】

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、例えば、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、または Fc と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

【0305】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0306】

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源および無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地および合成培地のいずれを用いてもよい。

【0307】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含み、糖蜜、デンプンおよびデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸およびプロピオン酸等の有機酸、エタノールおよびプロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

10

20

30

40

50

## 【0308】

窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウムおよびリン酸アンモニウム等の無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、並びに各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

## 【0309】

無機塩類としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅および炭酸カルシウム等を用いることができる。

10

## 【0310】

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行うことが好ましい。培養温度は15～40℃が好ましく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

## 【0311】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンおよびテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0312】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

20

## 【0313】

培養は、通常pH6.0～8.0、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行うことが好ましい。

## 【0314】

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

30

## 【0315】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharming社)、Sf-900 IISFM培地(Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium[ネイチャー(Nature), 195, 788(1962)]等を用いることができる。

## 【0316】

培養は、通常pH6.0～7.0、25～30℃等の条件下で、1～5日間行うことが好ましい。

40

## 【0317】

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0318】

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地およびホワイト(White)培地並びにこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等の植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

## 【0319】

50

培養は、通常 pH 5.0 ~ 9.0、20 ~ 40 の条件下で 3 ~ 60 日間行うことが好ましい。

【0320】

また、培養中必要に応じて、カナマイシンおよびハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0321】

上記のとおり、抗体分子をコードする DNA を組み込んだ発現ベクターを保有する動物細胞、または植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

10

【0322】

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、例えば、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法に準じて、分泌生産、または融合蛋白質発現等を行うことができる。

【0323】

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0324】

抗体組成物が宿主細胞内または宿主細胞外膜上に生産される場合、例えば、ポールソンの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、日本国特開平 05-336963 号公報および国際公開第 94/23021 号公報等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

20

【0325】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

30

【0326】

また、日本国特開平 2-227075 号公報に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0327】

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体 (トランスジェニック非ヒト動物) または植物個体 (トランスジェニック植物) を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

40

【0328】

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

【0329】

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば、公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (19

50

96) ; バイオテクノロジー ( Bio / Technology ) , 9 , 830 ( 1991 ) ] に準じて遺伝子を導入して作成した動物中に目的とする抗体組成物を生産させる方法が挙げられる。

【 0330 】

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク ( 日本国特開昭 63 - 309192 号公報 ) または卵等をあげることができる。

【 0331 】

この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができる。例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである カゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーターおよびホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【 0332 】

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [ 組織培養 , 20 ( 1994 ) ; 組織培養 , 21 ( 1995 ) ; トレンド・イン・バイオテクノロジー ( Trends in Biotechnology ) , 15 , 45 ( 1997 ) ] に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法が挙げられる。

【 0333 】

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば、抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

【 0334 】

前記無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル ( DEAE ) - セファロース、DIAION HPA - 75 [ 三菱化学 ( 株 ) 製 ] 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S - Sepharose FF ( Pharmacia 社 ) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法および等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独または組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【 0335 】

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【 0336 】

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物またはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【 0337 】

本発明の精製された改変抗体組成物は、Fc領域においてEUインデックス297番目のAsn以外に糖鎖が結合していない抗体分子を単一に含んでいる組成物である。即ち、

10

20

30

40

50

本発明の精製された改変抗体組成物は、Fc領域においてEUインデックス297番目のAsnにのみ糖鎖が結合している改変抗体分子を単一に含んでいる組成物である。

【0338】

また、本発明の精製された改変抗体組成物は、Fc領域においてEUインデックス297番目のAsn以外の余分な糖鎖が結合していない抗体分子を均一に含む抗体組成物であるため、余分な糖鎖が結合した抗体分子を含む抗体組成物と比べて、より医薬品として有用である。

【0339】

## 2. 本発明の改変抗体組成物を生産する細胞の作製

本発明の改変抗体組成物において、Fc領域の297番目のAsnに結合する糖鎖のコアフコースを制御することで、297番目以外のAsnに結合する糖鎖が減少または欠損し、かつ高いADCC活性を有する改変抗体組成物を作製することができる。コアフコースを制御した細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

【0340】

具体的には、抗体Fc領域の297番目のAsnに結合する糖鎖のコアフコース糖鎖修飾に関連する酵素であるGDP-L-フコースの合成もしくはゴルジ体への輸送に關与する酵素、またはコアフコースの結合に關与する酵素が失活した細胞を選択するか、または後述に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。以下、詳細に説明する。

【0341】

具体的には、コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素活性を減少または欠損させる方法、またはコアフコース切断酵素活性を増加させることにより、コアフコースを制御した細胞を作製することができる。

【0342】

コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素としては、例えば、GDP-L-フコースの合成または輸送に關与する酵素、およびN-グリコシド結合複合型糖鎖のコアフコースの結合に關与する酵素が挙げられる。

【0343】

GDP-L-フコースの合成またはゴルジ体への輸送に關与する酵素としては、具体的には、例えば、GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ(以下、GMDと表記する)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ(以下、Fxと表記する)、GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスホリラーゼ(GFPP)、フコキナーゼおよびGDP-L-フコーストランスポーターなどが挙げられる。

【0344】

コアフコースの結合に關与する酵素としては、例えば、1,6-フコシルトランスフェラーゼ(以下、FUT8と表記する)、-L-フコシダーゼなどが挙げられる。

【0345】

本発明の改変抗体組成物を生産する細胞としては、上述の1つの酵素活性を低下または欠損させてもよいし、複数の酵素活性を組み合わせることで低下または欠損させてもよい。また、元々コアフコースの糖鎖修飾に関連する酵素活性が低い細胞のコアフコースの糖鎖修飾に関連する酵素活性を更に低下、欠損させることもできる。

【0346】

### (1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

高いADCC活性を有する抗体(以下、高ADCC活性抗体という)産生細胞の作製のために用いる宿主細胞は、コアフコース糖鎖修飾に関連する酵素の遺伝子破壊を行うことで作製することができる。

【0347】

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

【0348】

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であ

10

20

30

40

50



ればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、「RDO法」と表記する）、RNAインターフェアレンス法（以下、「RNAi法」と表記する）、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等が挙げられる。以下これらを具体的に説明する。

【0349】

本発明の改変抗体組成物を作製するために用いられる宿主細胞としては、例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞など、標的とするフコース修飾に関連する酵素の遺伝子を有している、または元々該フコース修飾に関連する酵素の遺伝子を有さないものであればいずれも用いることができる。具体的には、上述1.に記載の宿主細胞のいずれも用いることができる。

10

【0350】

植物細胞を用いる場合には、1,3-フコースの結合に関与する酵素および1,2-キシロースの結合に関与する酵素の遺伝子を減少または欠損させることで用いることで、ヒト型糖鎖を有するタンパク質を生産することができる。

【0351】

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の改変抗体組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の改変抗体組成物作製のために用いる宿主細胞は、フコース修飾に関連する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学、12,239(1993)、バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY)、17,1097(1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum.Mol.Genet.)、5,1083(1995)、細胞工学、13,255(1994)およびプロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)、96,1886(1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

20

【0352】

フコース修飾に関連する酵素をコードするcDNAまたはゲノムDNAを調製する。調製したcDNAまたはゲノムDNAの塩基配列を決定する。決定したDNAの配列に基づき、フコース修飾に関連する酵素をコードするDNA部分、非翻訳領域の部分またはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

30

【0353】

前記アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

【0354】

フコース修飾に関連する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生糖蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

40

【0355】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能であるか、または染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子若しくはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、例えば、後述3に記載の発現ベクターが挙げられる。

【0356】

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、例えば、後述2に記載の各種宿主細胞に

50

適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0357】

フコース修飾に関連する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法が挙げられる。

【0358】

(形質転換体を選択する方法)

フコース修飾に関連する酵素の活性が欠失した細胞を選択する方法としては、例えば、文献[新生化学実験講座3 糖質I, 糖タンパク質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコールシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコール, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法および遺伝子工学的な方法などを用いて、フコース修飾に関連する酵素の活性を測定する方法が挙げられる。

10

【0359】

生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法が挙げられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等が挙げられる。

【0360】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述5に記載の方法が挙げられる。産生糖蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述5に記載の方法が挙げられる。

20

【0361】

フコース修飾に関連する酵素をコードするcDNAを調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法が挙げられる。

【0362】

(cDNAの調製方法)

各種宿主細胞の組織又は細胞から全RNA又はmRNAを調製する。調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。フコース修飾に関連する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法でフコース修飾に関連する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

30

【0363】

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、フコース修飾に関連する酵素をコードするDNAを取得することができる。ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞のmRNAは市販のもの(例えば、Clontech社)を用いてもよいし、以下のようにしてヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。

【0364】

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNAを調製する方法としては、例えば、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法[メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 154, 3(1987)]および酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法[アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry), 162, 156(1987); 実験医学, 9, 1937(1991)]などが挙げられる。

40

【0365】

また、全RNAからpoly(A)<sup>+</sup> RNAとしてmRNAを調製する方法としては、例えば、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)等が挙げられる。

【0366】

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invit

50

rogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社)などの市販のキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0367】

次に、調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法および市販のキットを用いる方法などが挙げられる。

【0368】

市販のキットとしては、例えば、SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)およびZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社)を用いる方法などが挙げられる。

【0369】

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクターおよびプラスミドベクター等のいずれでも使用できる。

【0370】

具体的には、例えば、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)], pBluescript IISK (+) [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)], ZAP II (STRATAGENE社)、gt10、gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)], Triplex (Clontech社)、ExCell (Pharmacia社)、pT7T318U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]およびpUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)]等が挙げられる。

【0371】

cDNAライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、例えば、Escherichiacoli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)], Escherichiacoli C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)], Escherichiacoli Y1088 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)], Escherichiacoli Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)], Escherichiacoli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)], Escherichiacoli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)]およびEscherichiacoli JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)]等が用いられる。

【0372】

このcDNAライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げ、なるべく完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン (Gene), 138, 171 (1994); ジーン (Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング (羊土社) (1996); 遺

10

20

30

40

50

伝子ライブラリーの作製法(羊土社)(1994)]を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

【0373】

フコース修飾に関連する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'末端および3'末端の塩基配列に特異的なデジェネレティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法[ピーシーアール・プロトコルズ(PCR Protocols), Academic Press(1990)]を用いてDNAの増幅を行うことにより、フコース修飾に関連する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

【0374】

取得した遺伝子断片がフコース修飾に関連する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger)らのジデオキシ法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463(1977)]およびABI PRISM 377 DNAシーケンサー(Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0375】

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAまたはcDNAライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーションおよびブラークハイブリダイゼーション(モレキュラー・クローニング第2版)等を用いて、フコース修飾に関連する酵素のDNAを取得することができる。

【0376】

また、フコース修飾に関連する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いて増幅することにより、フコース修飾に関連する酵素のcDNAを取得することもできる。

【0377】

取得したフコース修飾に関連する酵素をコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger)らのジデオキシ法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463(1977)]およびABI PRISM 377 DNAシーケンサー(Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0378】

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、取得したDNAがデータベース中の遺伝子の中でフコース修飾に関連する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

【0379】

上記の方法で得られるGDP-L-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、国際公開第2005/035741号に記載のGMD、及び、F<sub>x</sub>の塩基配列が挙げられる。

【0380】

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖のコアフコースの糖鎖修飾に関する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、米国特許第7393683号明細書に記載のFUT8の塩基配列が挙げられる。

【0381】

上記の方法で得られるGDP-L-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質としては、例えば、米国特許出願公開第2004/0110282号明細書に記載のGDP-

10

20

30

40

50

L - フコーストランスポーターの塩基配列が挙げられる。

【0382】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機model 392 (Perkin Elmer社製)等のDNA合成機で化学合成することにより、フコース修飾に関連する酵素のcDNAを取得することもできる。

【0383】

フコース修飾に関連する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法が挙げられる。

【0384】

(ゲノムDNAの調製方法)

ゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、モレキュラー・クローニング第2版およびカレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法が挙げられる。

【0385】

また、例えば、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社) およびUniversal Genome Walker (登録商標) Kits (CLONTECH社)などを用いることにより、フコース修飾に関連する酵素のゲノムDNAを取得することもできる。

【0386】

取得したフコース修飾に関連する酵素をコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger)らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] およびABI PRISM 377 DNA シークエンサー (Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0387】

決定したゲノムDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、取得したDNAがデータベース中の遺伝子の中でフコース修飾に関連する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

【0388】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機model 392 (Perkin Elmer社製)等のDNA合成機で化学合成することにより、フコース修飾に関連する酵素のゲノムDNAを取得することもできる。

【0389】

また、発現ベクターを用いず、フコース修飾に関連する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法またはDNA合成機により調製することができる。

【0390】

具体的には、フコース修飾に関連する酵素をコードするcDNAおよびゲノムDNAの塩基配列のうち、連続した好ましくは5~150塩基、より好ましくは5~60塩基、さらに好ましくは10~40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴヌクレオチド) または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して調製することができる。

【0391】

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体 (以

10

20

30

40

50

下、オリゴヌクレオチド誘導体という)等が挙げられる。

【0392】

オリゴヌクレオチド誘導体としては、例えば、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン(phenoxazine-modified cytosine)で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等が挙げられる[細胞工学, 16, 1463(1997)]。

10

【0393】

(b) 相同組換え法による本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、フコース修飾に関連する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用いて改変することによって作製することができる。

20

【0394】

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994)(以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press(1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社(1995)(以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す)等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

30

【0395】

フコース修飾に関連する酵素のゲノムDNAを調製する。ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子(例えば、フコース修飾に関連する酵素の構造遺伝子、およびプロモーター遺伝子)を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

【0396】

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、染色体上の標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

40

【0397】

宿主細胞としては、例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞等の標的とするフコース修飾に関連する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞が挙げられる。

【0398】

フコース修飾に関連する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、本項1(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などが挙げられる。

【0399】

染色体上の標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press a

50

t Oxford University Press (1993) およびバイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲットング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。

【0400】

ターゲットベクターは、リプレースメント型およびインサクション型のいずれでも用いることができる。

【0401】

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0402】

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) およびバイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲットング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択およびポリA選択などの方法を用いることができる。

【0403】

選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、例えば、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング第2版)およびPCR法[ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)]等が挙げられる。

【0404】

(c) RDO方法による本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製  
本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、フコース修飾に関連する酵素の遺伝子を標的とし、RDO法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

【0405】

フコース修飾に関連する酵素のcDNAまたはゲノムDNAを本項1(a)に記載の方法を用い、調製する。調製したcDNAまたはゲノムDNAの塩基配列を決定する。決定したDNAの配列に基づき、フコース修飾に関連する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分またはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

【0406】

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわちフコース修飾に関連する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の組成物作製のための宿主細胞を作製することができる。

【0407】

宿主細胞としては、例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞等の標的とするフコース修飾に関連する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述3に記載の宿主細胞が挙げられる。

【0408】

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0409】

フコース修飾に関連する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項1(a)に記載のcDNAの調製方法などが挙げられる。

【0410】

フコース修飾に関連する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、本項1(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などが挙げられる。

【0411】

10

20

30

40

50

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにサブクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー(Sanger)らのジデオキシ法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463(1977)]等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM 377 DNAシーケンサー(Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0412】

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

10

【0413】

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、フコース修飾に関連する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法が挙げられる。

【0414】

また、前記に記載の、導入したフコース修飾に関連する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、または、後述の産生糖蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

20

【0415】

RDOのコンストラクトは、例えば、サイエンス(Science), 273, 1386(1996);ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285(1998);ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462(1997);ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960(1999);ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960(1999);ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829(1997);プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774(1999);プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768(1999);ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323(1999);インベストイゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172(1998);ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343(1998);ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43(2000);ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555(2000)等の記載に従って設計することができる。

30

【0416】

(d) RNAi法による本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製  
本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、フコース修飾に関連する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

40

【0417】

フコース修飾に関連する酵素の上記1に記載の方法を用い、cDNAを調製する。調製したcDNAの塩基配列を決定する。決定したcDNAの配列に基づき、フコース修飾に関連する酵素をコードする部分または非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi遺伝子のコンストラクトを設計する。

【0418】

前記RNAi遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したcDNAの断片、または全

50



長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

【0419】

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

【0420】

導入したフコース修飾に関連する酵素の活性、または産生糖蛋白質分子若しくは細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。

【0421】

宿主細胞としては、例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞等の標的とするフコース修飾に関連する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、例えば、後述3に記載の宿主細胞が挙げられる。

【0422】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組み込みが可能で、設計したRNAi遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述3に記載の発現ベクターが挙げられる。

【0423】

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0424】

フコース修飾に関連する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1に記載の方法が挙げられる。

【0425】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1(a)に記載の方法が挙げられる。産生糖蛋白質分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述5の方法が挙げられる。

【0426】

フコース修飾に関連する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項1(a)に記載されたcDNAの調製方法などが挙げられる。

【0427】

また、発現ベクターを用いず、フコース修飾に関連する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

【0428】

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。RNAi遺伝子のコンストラクトは、例えば、[ネイチャー(Nature), 391, 806(1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502(1998); ネイチャー(Nature), 395, 854(1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049(1999); セル(Cell), 95, 1017(1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451(1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959(1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70(2000)]等の記載に従って設計することができる。

【0429】

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の改変抗体組成物を作製するために用

10

20

30

40

50

### いる宿主細胞の作製

本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genetics, 25, 35 (2000)) 等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、フコース修飾に関連する酵素の活性、または産生糖蛋白質分子若しくは細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

#### 【0430】

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムである。通常、トランスポゾンに挿入された外来遺伝子に突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

10

#### 【0431】

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

#### 【0432】

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

#### 【0433】

宿主細胞としては、例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞等の標的とするフコース修飾に関連する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、例えば、後述2に記載の宿主細胞が挙げられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

20

#### 【0434】

フコース修飾に関連する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1(a)に記載の方法が挙げられる。

#### 【0435】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1(a)に記載の方法が挙げられる。産生糖蛋白質分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述5に記載の方法が挙げられる。

30

#### 【0436】

##### (2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の改変抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、フコース修飾に関連する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。

#### 【0437】

GDP-L-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、例えば、GMDおよびFxなどが挙げられる。

#### 【0438】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、例えば、1,6-フコシルトランスフェラーゼなどが挙げられる。

40

#### 【0439】

GDP-L-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質としては、具体的には、例えば、GDP-L-フコーストランスポーターなどが挙げられる。

#### 【0440】

これらの酵素または蛋白質は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素や蛋白質であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素や蛋白質の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。

#### 【0441】

標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体に作製につい

50

て具体的に以下に述べる。

【0442】

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸(133番目のThr、135番目のGlu、157番目のTyr、161番目のLys)が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている(Structure, 8, 2, 2000)。

【0443】

そこで、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。

10

【0444】

一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこれら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。

【0445】

大腸菌由来のGMDのドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMDでは、155番目のThr、157番目のGlu、179番目のTyrおよび183番目のLysを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。

20

【0446】

このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

【0447】

高ADCC活性抗体生産細胞を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子(以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する)を用い、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

30

【0448】

GDP-L-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長DNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

【0449】

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

40

【0450】

GDP-L-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素の活性、または産生抗体分子若しくは細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、高ADCC活性抗体生産細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

【0451】

宿主細胞としては、例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞等の標的とするGDP-L-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用

50

いることができる。具体的には、例えば、前述 1 に記載の宿主細胞が挙げられる。

【 0 4 5 2 】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、例えば、前述 1 に記載の発現ベクターが挙げられる。

【 0 4 5 3 】

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、前述 1 に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【 0 4 5 4 】

GDP-L-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 2 ( 1 ) の ( a ) に記載の方法が挙げられる。

【 0 4 5 5 】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 2 の ( 5 ) に記載の方法が挙げられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法が挙げられる。

【 0 4 5 6 】

( 3 ) 酵素に突然変異を導入する手法

高 ADC 活性抗体生産細胞を作製するために用いる宿主細胞は、GDP-L-フコースの合成に関与する酵素または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

【 0 4 5 7 】

GDP-L-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、例えば、GMD および Fx などが挙げられる。

【 0 4 5 8 】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、例えば、1, 6-フコシルトランスフェラーゼおよび -L-フコシダーゼなどが挙げられる。

【 0 4 5 9 】

酵素に突然変異を導入する方法としては、例えば、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体または自然発生的に生じた突然変異体から、GDP-L-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体または自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法および 3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体または自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などが挙げられる。

【 0 4 6 0 】

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失またはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。具体的には、例えば、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理および放射線の照射などが挙げられる。また、例えば、種々のアルキル化剤および発癌物質なども突然変異誘発物質として用いることができる。

【 0 4 6 1 】

突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版 ( 朝倉書店 ) 日本組織培養学会編 ( 1 9 9 6 ) およびネイチャー・ジェネティクス ( Nature Genet. ) , 2 4 , 3 1 4 , ( 2 0 0 0 ) 等に記載の方法を挙げることが

10

20

30

40

50

できる。

【0462】

自然発生的に生じた突然変異体としては、例えば、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げる事ができる。

【0463】

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

高ADCC活性抗体生産細胞を作製するために用いる宿主細胞は、GDP-L-フコースの合成に参与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のコアフコース糖鎖修飾に参与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA/DNA技術[バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322(1992)、化学, 46, 681(1991)、Biotechnology, 9, 358(1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87(1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152(1992)、細胞工学, 16, 1463(1997)]、トリプル・ヘリックス技術[Trends in Biotechnology, 10, 132(1992)]等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

10

【0464】

(5) N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のコアフコースを認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

20

高ADCC活性抗体生産細胞を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のコアフコースを認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

【0465】

N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のコアフコースを認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス(Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51(1986)等に記載のレクチンを用いた方法が挙げられる。

【0466】

レクチンとしては、N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができる。

30

【0467】

その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA(Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)エンドウマメレクチンPSA(Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA(Vicia faba由来のAgglutinin)およびヒヨコチャワンタケレクチンAAL(Aleuria aurantia由来のLectin)等を挙げる事ができる。

【0468】

具体的には、1 $\mu$ g/mL~1mg/mLの濃度の上述のレクチンを含む培地で好ましくは1日~2週間、より好ましくは1日~1週間培養し、生存している細胞を継代培養またはコロニーをピックアップし別の培養容器に移す。さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、N-グリコシド結合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

40

【0469】

3. 抗体組成物の活性評価

精製した改変抗体組成物の蛋白量、FcR結合活性、C1q結合活性、抗原結合活性、並びにADCC活性およびCDC活性等の細胞傷害活性を測定する方法としては、例えば、モノクローナルアンチボディズおよびアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の

50

方法を用いることができる。

【0470】

具体的な例としては、抗体組成物がヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性は、E L I S A 法及び蛍光抗体法 [ キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー ( Cancer Immunol . Immunother . ) , 36 , 373 ( 1993 ) ] 等により測定できる。

【0471】

また、抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、C D C 活性およびA D C C 活性等を測定することにより、評価することができる [ キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー ( Cancer Immunol . Immunother . ) , 36 , 373 ( 1993 ) 、米国特許出願公開第2004/0259150号明細書 ] 。

10

【0472】

本発明の改変抗体組成物がF c R への結合活性を有することは、遺伝子組み換えF c R I I I A タンパク質や遺伝子組換え胎児F c R ( neonatal Fc receptor , FcRn ) タンパク質を作製して、結合活性を測定することで確認することができる ( 米国特許出願公開第2004/0259150号明細書 ) 。

【0473】

A D C C 活性を測定する方法としては、例えば、放射性同位体、蛍光物質または色素等で標識された標的細胞、抗体およびエフェクター細胞を接触させた後、傷害された標的細胞から遊離される標識物質の活性または遊離する酵素の生理活性等を測定する方法など挙げられる。

20

【0474】

C D C 活性を測定する方法としては、例えば、放射性同位体、蛍光物質または色素等で標識された標的細胞、抗体および補体成分を含む血清等の生体試料を接触させた後、傷害された標的細胞から遊離される標識物質の活性または遊離する酵素の生理活性を測定する方法など挙げられる。

【0475】

本発明の297番目のA s n 以外に不要な糖鎖が結合しないようにアミノ酸改変された改変抗体組成物は、アミノ酸改変を行う前の抗体と比べて、同等以上のF c R 結合活性、A D C C 活性および/またはC D C 活性を有する。

30

【0476】

即ち、本発明の改変抗体組成物は、F c 領域においてA s n 297番目以外のN - グリコシド結合型糖鎖が結合するアミノ酸配列のアミノ酸改変を行ったにも関わらず、元のF c 領域を有する抗体と同等以上のF c R 結合活性、A D C C 活性および/またはC D C 活性を有する。

【0477】

また本発明の改変抗体組成物は、ヒトI g G 1 およびヒトI g G 3 よりも高いC D C 活性を有し、かつアミノ酸改変を行う前の抗体と比べて、実質的に同等以上のF c R 結合活性、A D C C 活性および/またはC D C 活性を有する。

【0478】

更に、本発明の配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む定常領域を有する改変抗体組成物は、ヒトI g G 1 およびヒトI g G 3 よりも高いC D C 活性を有し、かつ配列番号1のF c 領域を有する抗体組成物と比べて、実質的に同等以上のF c R 結合活性、A D C C 活性および/またはC D C 活性を有する。

40

【0479】

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

【0480】

#### 4 . 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じ

50

て行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖は、ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)およびフコース(Fuc)などの中性糖、並びにN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)などのアミノ糖、シアル酸(Sial)などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

**【0481】****(1) 中性糖・アミノ糖組成分析**

抗体組成物の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

**【0482】**

具体的な方法として、例えば、Dionex社製糖組成分析装置を用いる方法が挙げられる。BioLCは、HPAEC-PAD(high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection)法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577(1983)]によって糖組成を分析する装置である。

**【0483】**

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、例えば、公知の方法[アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 55(1), 283-284(1991)]に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジンで蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

**【0484】****(2) 糖鎖構造解析**

抗体組成物の糖鎖の構造解析は、二次元糖鎖マップ法[アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.), 171, 73(1988)、生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989年)]により行うことができる。

**【0485】**

二次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

**【0486】**

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン(以下、PAと略記する)による糖鎖の蛍光標識[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 95, 197(1984)]を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。

**【0487】**

次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、二次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード(TAKARA社製)、文献[アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.), 171, 73(1988)]とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

**【0488】**

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、二次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

**【0489】**

抗体Fc領域のいずれの部分に糖鎖が結合しているのかは、還元アルキル化処理した抗体をトリプシン、ペプシン、Lys-C、Asp-Nなどのエンドプロテアーゼで処理したものを、逆相クロマトグラフィー(LC)で分離した後に、質量分析計(MS)などで

10

20

30

40

50

分析することにより確認できる。

【0490】

即ち、目的とするFc領域のアミノ酸配列に基づき、プロテアーゼ処理により生成するペプチドの分子量および糖鎖が結合したペプチドの分子量と、MSの分析値が一致するか否かにより、実際に糖鎖が結合しているか否かを確かめることができる。

【0491】

5. 抗体分子の糖鎖構造の識別方法

本発明の抗体組成物は、抗体Fcの297番目のAsnに結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の改変抗体組成物のFcに結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、コアフコースの無い糖鎖の割合が20%以上である抗体組成物は、高いADCC活性を示す。このような抗体組成物は、上記4.に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

【0492】

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献[モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院(1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画(1985)]等に記載のウエスタン染色、RIA(Radioimmunoassay)、VIA(Viroimmunoassay)、EIA(Enzymeimmunoassay)、FIA(Fluoroimmunoassay)およびMIA(Metalloimmunoassay)などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

【0493】

抗体組成物含まれる抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

【0494】

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA(T. vulgaris由来のwheat-germ agglutinin)、ConA(C. ensiformis由来のconcanavalin A)、RIC(R. communis由来の毒素)、L-PHA(P. vulgaris由来のleukoagglutinin)、LCA(L. culinaris由来のlentil agglutinin)、PSA(P. sativum由来のPea lectin)、AAL(Aleuria aurantia Lectin)、ACL(Amaranthus caudatus Lectin)、BPL(Bauhinia purpurea Lectin)、DSL(Datura stramonium Lectin)、DBA(Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL(Elderberry Balk Lectin)、ECL(Erythrina cristagalli Lectin)、EEL(Euonymus europaeus Lectin)、GNL(Galanthus nivalis Lectin)、GSL(Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA(Helix pomatia Agglutinin)、HHL(Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL(Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL(Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL(Maackia amurensis Lectin)、MPL(Maclura pomifera Lectin)、NPL(Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA(Peanut Agglutinin)、E-PHA(Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL(Psophocarpus tetragonolobus Le

10

20

30

40

50



ctin)、RCA(Ricinus communis Agglutinin)、STL(Solanum tuberosum Lectin)、SJA(Sophora japonica Agglutinin)、SBA(Soybean Agglutinin)、UEA(Ulex europaeus Agglutinin)、VVL(Vicia villosa Lectin)およびWFA(Wisteria floribunda Agglutinin)が挙げられる。

【0495】

コアフコースを特異的に認識するレクチンを用いることが好ましい。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA(Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)エンドウマメレクチンPSA(Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA(Vicia faba由来のAgglutinin)およびヒヨコチャワンタケレクチンAAL(Aleuria aurantia由来のLectin)を挙げることができる。

10

【0496】

#### 6. 本発明の遺伝子組換え抗体組成物の使用

本発明の改変抗体組成物は、Fc領域の297番目以外のAsnの糖鎖が減少または欠損した改変抗体分子を単一に含む組成物であり、単一の抗体分子を製造しなければならないタンパク質医薬品製造において非常に有用である。

【0497】

また、本発明の抗体組成物のうち、コアフコースが無い糖鎖の割合が組成物全体の糖鎖の20%以上である抗体組成物は、Fc領域の297番目以外のAsnの糖鎖が減少または欠損した改変抗体分子を単一に含む組成物であり、かつ高いADCC活性を有しているため、従来の抗体組成物よりも治療効果に優れた性質を有している。

20

【0498】

また、本発明の改変抗体組成物のうち、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むFc領域において、392番目のAsnがLysに改変された変異Fcを有する抗体であって、コアフコースが無い糖鎖の割合が組成物全体の糖鎖の20%以上である抗体組成物は、Fc領域の297番目以外のAsnの糖鎖が減少または欠損した改変抗体分子を単一に含む組成物であり、ヒトIgG1およびヒトIgG3よりも高いCDC活性を有し、かつ高いADCC活性を有する。

30

【0499】

更に、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むFc領域において、392番目のAsnがLysに改変された変異Fcを有する抗体であって、コアフコースが無い糖鎖の割合が100%である抗体組成物は、Fc領域の297番目以外のAsnの糖鎖が減少または欠損した改変抗体分子を単一に含む組成物であり、ヒトIgG1およびヒトIgG3よりも高いCDC活性を有し、かつ最も高いADCC活性であることから、高い臨床効果が期待できる。

【0500】

本発明の改変抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つまたはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

40

【0501】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与が挙げられる。抗体製剤の場合、静脈内投与が好ましい。

【0502】

投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏およびテープ剤等が挙げられる。

【0503】

50

経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤および顆粒剤等が挙げられる。

【0504】

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、例えば、水、ショ糖、ソルビトールおよび果糖等の糖類、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油および大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバーおよびペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0505】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、例えば、乳糖、ブドウ糖、ショ糖およびマンニトール等の賦形剤、デンプンおよびアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムおよびタルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロースおよびゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、並びにグリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

10

【0506】

非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤および噴霧剤等が挙げられる。

【0507】

注射剤は、例えば、塩溶液およびブドウ糖溶液並びに両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウム

20

を加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

【0508】

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

【0509】

担体として、具体的には、例えば、乳糖、グリセリン等が例示される。抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾルおよびドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することも

30

【0510】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢および体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり10 $\mu$ g/kg~20mg/kgである。

【0511】

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、例えば、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等が挙げられる。また、インビボ実験としては、例えば、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等が

40

【0512】

CDC活性、ADCC活性および抗腫瘍実験は、文献[キヤンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373(1993); キヤンサー・リサーチ(Cancer Research), 54, 1511(1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

【実施例】

【0513】

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0514】

50

また、以下の実施例においてアミノ酸残基を3文字または1文字表記し、N392Kは、EUインデックス392番目のAsn(N)をLys(K)にアミノ酸改変した改変抗体を示す。

【0515】

[実施例1]高CDC活性型抗体の糖鎖分析

ヒト抗体のFc領域において、EUインデックス297~299番目のAsn-X-Ser/Thr(XはPro以外のアミノ酸残基)配列のAsnに糖鎖が結合することが知られているが、297~299番目以外のN-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列に糖鎖が結合することは知られていない。

【0516】

国際公開第2007/011041号に記載の高CDC活性型CH配列を有する抗体1133、113D、113E、113F、113Gおよび113Hは、いずれもヒトIgG1のFc領域とヒトIgG3のFc領域の全部または一部のドメインが交換された抗体であり、CH3ドメインのEUインデックス392番目がAsnであるため、N-グリコシド結合糖鎖コンセンサス配列Asn-X-Ser/Thrが存在している。

【0517】

また、天然のヒトIgG3抗体も同じN-グリコシド結合糖鎖コンセンサス配列Asn-X-Ser/Thr有している。そこでヒトIgG3型抗体、および国際公開第2007/011041号に記載のIgG1/IgG3ドメイン交換抗体のAsn392に糖鎖が付加しているか否かを検討するため、これら抗体の糖鎖分析を行った。

【0518】

IgG1/IgG3ドメイン交換抗体としては、国際公開第2007/011041号に記載の113F型抗GM2抗体GM2-113Fを用いた。113F抗体の構造は、図2(a)~(c)に模式的に示すように、CHの118~230番目がヒトIgG1抗体由来のアミノ酸配列、231~422番目がヒトIgG3抗体由来のアミノ酸配列および423~447番目がヒトIgG1抗体由来のアミノ酸配列を含む抗体である(配列番号2)。

【0519】

ヒトIgG3型の抗体としては、IgG1/型抗CD20キメラ抗体rituximab(米国特許第5,736,137号明細書)のCHをヒトIgG3型に置換したKM3523(Journal of Immunological methods 2005,306:151-60)およびIVIg(intravenous immunoglobulins)製剤より精製した天然に存在するヒトIgG3抗体を用いた。

【0520】

まず初めに、GM2-113FおよびKM3523を還元条件下で8%ゲル(Novex)を用いてSDS-PAGEを行った。その結果を図3に示す。

【0521】

図3に示すように、GM2-113FのH鎖のバンド(バンドB)の直上にマイナーバンド(バンドA)を検出した。また、GM2-113Fの分子量を、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いて測定した結果、GM2-113Fに相当する分子量(約148 kDa)の他に約1380 Da大きい分子量を有する成分を検出した。

【0522】

一方、KM3523および天然に存在するヒトIgG3抗体のH鎖のバンドは単一の分子量を示した。

【0523】

前述の通りAsn392およびThr394は、N-グリコシド結合糖鎖コンセンサス配列であることから、113F型抗体のAsn392に高マンノースタイプのN型糖鎖(Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>、分子量1378.48、以下Man<sub>6</sub>型糖鎖と表記する)が付加している可能性が示唆されたため、以下により詳細な解析を実施した。

【0524】

10

20

30

40

50

GM2-113FおよびKM3523を6mol/Lグアニジン塩酸を含む0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液に溶解し、ジチオトレイトール (nacalai tesque社製) を終濃度1.8 mg/mLとなるように加え、56で1時間還元反応を行った。反応後の溶液にヨードアセトアミド (nacalai tesque社製) を終濃度11 mg/mLで添加し、遮光下において37で1時間反応しアルキル化した。

【0525】

次に、限外ろ過膜を用いて反応液を酵素消化用緩衝液 (1mol/L Urea、0.1mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) に置換し、更に Asp-N溶液 (Sequencing Grade、Roche製) を加えて (E/S = 1/50)、37で16時間消化し、反応は1mol/LのHClを適量加えて停止した。

10

【0526】

Asp-N消化によって得られるペプチド断片はLC-MSで解析した。即ち、ペプチド断片混合物を逆相HPLC (使用カラム: YMC Pro C18、1mm I.D. x 250 mm、YMC製、流速: 60 μL/min) を使用して、移動相A (0.1% TFA) から移動相B (0.1% TFA、90% CH<sub>3</sub>CN) の直線濃度勾配により分離した。

【0527】

溶出液はエレクトロスプレー化によって質量分析計 (LTQ Orbitrap、thermo scientific製) に導入し、ペプチド断片の分子量を測定した。

20

【0528】

得られたデータは質量分析計に付属のソフトウェア (Xcalibur Qual Browser) を用いて解析し、Asn392を含むペプチド断片 (配列DIAVEWESSGQPENNYNTTPML) の分子イオン (m/z = 1296.58、z = 2) と、そのペプチド断片にMan6型糖鎖に相当する分子量 (m/z = 689.24、z = 2) が付加した分子イオン (m/z = 1985.81、z = 2) のピークを抽出し、シグナル強度を数値化した。その結果を表1に示す。

【0529】

表1はGM2-113FおよびKM3523のペプチドマッピングにおいて得られた、Asn392を含むペプチド断片に関するLC-MS解析結果を示す表である。表1中の数値は、質量分析計におけるシグナル強度を示している。N.D. はシグナルが検出されなかったことを示す。

30

【0530】

【表1】

GM2-113F および KM3523 の Asn392 を含むペプチド断片に関する LC-MS 解析結果

	N 型糖鎖非結合ペプチドのシグナル強度	Man6 型糖鎖結合ペプチドのシグナル強度
GM2-113F	2.42×10 <sup>6</sup>	1.16×10 <sup>5</sup>
KM3523	3.03×10 <sup>6</sup>	N.D.

40

【0531】

表1に示すように、GM2-113Fには、Man6型糖鎖が付加した分子イオンが検出された。一方、KM3523では糖鎖付加シグナルは検出されなかった。このことから、Asn392への糖鎖付加はGM2-113Fに固有の事象であると考えられた。

【0532】

GM2-113FのLC-MS測定結果から抗体1分子にMan6型糖鎖が1分子結合していると仮定した場合、表1に示した結果から、Man6型糖鎖が結合した抗体は抗体組成物全体の10%程度と考えられた。

50

## 【0533】

以上より、同じN-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列を有するにも関わらず、ヒトIgG3抗体のH鎖定常領域のAsn392には全くN型糖鎖が結合していない一方で、113F型抗体のAsn392位には、一定の割合でMan6型糖鎖が付加することが明らかとなった。

## 【0534】

[実施例2] 改変抗体のデザインと作製

## 1. 改変配列のデザイン

実施例1で明らかとなった、113F型のH鎖定常領域のAsn392の糖鎖付加を回避するため、Asn392、Thr393、Thr394を別のアミノ酸に置換することによりN-グリコシド結合型糖鎖コンセンサス配列を破壊した46種類のアミノ酸改変体の作製を試みた(下記、表2および表3)。

10

## 【0535】

また、一部の改変抗体では、113F型のFc領域の276、339および397番目のヒトIgG3抗体に特有のアミノ酸残基を改変することにより、改変抗体の生物活性に与える影響を確認した。

## 【0536】

図4はヒトIgG1抗体、ヒトIgG3抗体および113F型抗体のH鎖定常領域のアミノ酸配列のアラインメントであり、本研究で改変を行った113F型抗体Fc領域の6アミノ酸残基を示す。

20

## 【0537】

このうち、Lys276、Thr339、Asn392、Met397の4残基はヒトIgG1抗体とヒトIgG3抗体で異なるアミノ酸を残基である。尚、CLのDNA配列はヒト型配列を用い、V領域のDNA配列は抗ヒトCD20抗体rituximab(米国特許第5,736,137号明細書)と同じ配列を用いた。

## 【0538】

## 2. 改変抗体の作製

## (1) 発現ベクターの構築

発現ベクター構築の概要は図5に示す。

## 【0539】

以下に記載する改変抗体のCHをコードするDNAへの部位特異的変異導入にはPrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit(宝酒造社)を用いた。プライマーは、CH領域に各種アミノ酸残基改変(表1)を導入するような配列を製品手順書に従って設計し、合成した(Invitrogen社製)。

30

## 【0540】

鑄型には、国際公開第2007/011041号に記載のpKTX93/113Fベクターを用いた。これらのプライマーと鑄型を用いてPCR反応を行い、H鎖定常領域遺伝子配列中に目的の変異を有するベクター取得した。

## 【0541】

N392Kアミノ酸改変と、276、339、393および397から選ばれるいずれか1つのアミノ酸残基改変を組み合わせ、2アミノ酸改変を有する抗体のアミノ酸配列は、上記の手順で作製したN392K変異を有する改変抗体発現ベクター(pKTX93/113F-N392K)を鑄型にして同様の操作を行うことで取得した。

40

## 【0542】

目的の変異を有するH鎖定常領域遺伝子配列をApaIとNruI(New England Biolabs社製)によりpKTX93/113Fに移し変えた。

## 【0543】

## (2) 抗体産生細胞の作製

細胞の培養は37の5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで行った。高ADCC型の脱フコシル化抗体を取得するため、宿主細胞には1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を

50

ノックアウトしたCHO/DG44細胞(以下、FUT8KO細胞と略記する)(米国特許第6,946,292号明細書)を用いた。

【0544】

エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133(1990)]により、4 $\mu$ gの発現ベクターを $1.6 \times 10^6$ 個のFUT8KO細胞に導入した後、IMDM-(10)[透析牛血清(dFBS)を10%含むIMDM培地(GIBCO社)]で培養した。2日間培養後、G418硫酸塩(ナカライテスク社)を0.5mg/mLの濃度で含むIMDM-(10)[以下IMDM-(10G)と表記]に培地を交換し培養を続けた細胞をG418耐性株とした。

【0545】

(3)抗体の発現と精製

表2およびに示す改変抗体と113Fについて、以下の方法で精製抗体を取得した。前項で取得したG418耐性株を $3 \times 10^5$ 個/mLになるようにIMDM-(10G)に懸濁して3日間培養した後、Ex-cell 302(SAFC Biosciences社)に培地を交換して7~11日間培養後、培養上清を回収した。

【0546】

MabSelect SuRe(GE healthcare社)担体0.5mLを充填したカラムに、前項で取得した培養上清を流速0.5~1.0mL/分で通過させた。3mLのホウ酸緩衝液(0.2Mホウ酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム)と0.25mLの0.1Mクエン酸ナトリウム溶液(pH3.6)を順に添加して洗浄した後、1.5mLの0.1Mクエン酸ナトリウム溶液(pH3.6)で溶出した画分を粗溶出画分として回収した。

【0547】

10mLのEcono-Pac 10DG(BIO RAD)を充填したカラムに粗溶出画分1.5mLを通過させた。1.5mLのクエン酸緩衝液(150mM塩化ナトリウム、10mMクエン酸ナトリウム、水酸化ナトリウムでpH6.0に調整)で洗浄後、3.0mLの同クエン酸緩衝液で溶出した画分を抗体溶液として回収した。

【0548】

(4)改変抗体のSDS-PAGE解析

表2および表3に示す改変抗体のうち、N392K/K276S以外の精製抗体について以下の方法でSDS-PAGE解析を実施した。0mM(非還元条件)または10mM(還元条件)のジチオトレイトールを含有するサンプル緩衝液[0.3Mトリス塩酸(pH6.8)、10%ドデシル硫酸ナトリウム、50%グリセロール]で0.1mg/mLに調製し、100で5分間処理した抗体溶液を、ポリアクリルアミドゲル(ATTO社)に1レーンあたり10 $\mu$ L充填し、ゲル1枚あたり20mAでおおよそ2時間電気泳動した。ゲルを回収後、CBB stain one(ナカライテスク社)を用いて製品手順書に従い染色した。

【0549】

非還元条件下のサンプルのSDS-PAGEでは、全ての改変抗体で改変前の113F型抗体と類似したバンドパターンを確認でき、精製品の純度に問題はないことが示された。還元処理を行ったサンプルのSDS-PAGEの結果、113FにおいてH鎖の高分子量側にマイナーバンドが観察されたが、改変抗体では同バンドの消失を認め、作製した改変抗体において392Asn残基に付加した糖鎖が除去されたことが明らかになった。

【0550】

[実施例3]改変抗体の活性評価

1. CDC活性の測定

マウス胸腺腫細胞株EL4にヒトCD20遺伝子を導入した形質転換細胞KC1156[Clin. Cancer Res., 11, 2327(2005)]とCD20陽性腫瘍細胞株Daudi(JCRB)、Raji(JCRB)、ST486(ATCC)、HEB(DSMZ)、MEC-1(DSMZ)を標的細胞として改変抗体のCDC活性を

10

20

30

40

50

測定した。

【0551】

I g G 1 型のH鎖定常領域を有する抗体のコントロールとして抗CD20抗体 r i t u x i m a b (米国特許第5,736,137号明細書)を用いた。96ウェル平底プレート(住友ベークライト社)の各ウェルに、10%FBS(JRH社)を含むRPMI1640(和光純薬工業社)を用いて $1.0 \times 10^6$ 個/mLに希釈した標的細胞50 $\mu$ Lと終濃度の3倍に調整した抗体溶液50 $\mu$ Lと2倍もしくはEL4/CD20-Aでは8倍に希釈したヒト補体(SIGMA社)50 $\mu$ Lを分注した。

【0552】

また、抗体を含まないウェルを0% 反応ウェル、標的細胞を含まないウェルを100% 反応ウェルとして用意した。37 (5% CO<sub>2</sub>)で2時間培養後、各反応ウェルにWST-1(ROCHE社)を15 $\mu$ Lずつ添加し37 (5% CO<sub>2</sub>)で3時間培養した。反応終了後、各ウェルのOD450を測定し、下式を用いて細胞傷害活性(%)を算出した。

10

【0553】

細胞傷害活性(%) =  $100 \times \{1 - (\text{反応ウェル吸光度} - 100\% \text{反応ウェル吸光度}) / (0\% \text{反応ウェル吸光度} - 100\% \text{反応ウェル吸光度})\}$

【0554】

全改変抗体のCDC活性を同一条件で比較するため、抗体濃度1 $\mu$ g/mLにおけるKC1156に対するCDC活性測定を全サンプル同一プレート上で行い、結果を表2および表3に示す。

20

【0555】

【表 2】

改変抗体	アミノ酸残基						CDC 活性*	
	Lys276	Thr339	Asn392	Thr393	Thr394	Met397		
N392F			Phe				+	
N392L			Leu				+	
N392I			Ile				+	
N392M			Met				+	10
N392V			Val				+	
N392P			Pro				+	
N392A			Ala				+	
N392Y			Tyr				+	
N392H			His				+	
N392Q			Gln				+	
N392K			Lys				+	
N392D			Asp				+	20
N392E			Glu				+	
N392W			Trp				+	
N392R			Arg				+	
N392G			Gly				+	
T393P				Pro			++	
T394Y					Tyr		++	
T394L					Leu		+	
T394F					Phe		++	30
T394D					Asp		+	
T394K					Lys		+	
T394N					Asn		+	

\* CDC 活性は、113F 型抗体の活性と比較して、同等以上の CDC 活性を有する改変抗体を ++ または + と表記し、CDC 活性が低下した改変抗体を - と表記した。

【 0 5 5 6 】



【表 3】

改変抗体	アミノ酸残基						CDC 活性*
	Lys276	Thr339	Asn392	Thr393	Thr394	Met397	
N392K/T393A			Lys	Ala			+
N392K/K276F	Phe		Lys				-
N392K/K276S	Ser		Lys				-
N392K/T339N		Asn	Lys				-
N392K/T339Y		Tyr	Lys				++
N392K/M397F			Lys			Phe	+
N392K/M397L			Lys			Leu	-
N392K/M397I			Lys			Ile	-
N392K/M397V			Lys			Val	-
N392K/M397S			Lys			Ser	-
N392K/M397P			Lys			Pro	-
N392K/M397T			Lys			Thr	-
N392K/M397A			Lys			Ala	-
N392K/M397Y			Lys			Tyr	-
N392K/M397H			Lys			His	-
N392K/M397Q			Lys			Gln	+
N392K/M397K			Lys			Lys	-
N392K/M397D			Lys			Asp	+
N392K/M397E			Lys			Glu	-
N392K/M397W			Lys			Trp	-
N392K/M397R			Lys			Arg	-
N392K/M397G			Lys			Gly	-
N392K/M397N			Lys			Asn	+

\* CDC 活性は、113F 型抗体の活性と比較して、同等以上の CDC 活性を有する改変抗体を ++ または + と表記し、CDC 活性が低下した改変抗体を - と表記した。

## 【0557】

表 2 および表 3 に示すように、T393P、T394Y、T394F、N392K/T339Y は改変前の 113F より CDC 活性が上昇していた。また、392 位と 397 位は網羅的に改変を行ったが、Asn392 の改変抗体は 113F と比較して同等以上の CDC 活性を示し、Met397 の一部の改変抗体は活性が低下する傾向が明らかになった。

## 【0558】

N392K、T394Y および T394F について、CD20 トランスフェクタント K C 1 1 5 6 に対する CDC 活性測定をより詳細に行った。その結果を図 6 (a) および (b) に示す。

## 【0559】

図 6 に示すように、N392K は改変前の 113F 型抗体と同等の CDC 活性であった。また、T394Y と T394F は、113F 型抗体と比べて、顕著な CDC 活性の増加

10

20

30

40

50

が認められた。

【0560】

N392K、T394Y、T394FおよびN392K/T339YのCD20陽性腫瘍細胞に対するCDC活性を測定した結果を図7(a)~(e)に示す。

【0561】

図7(a)~(e)に示すように、CD20陽性腫瘍細胞に対するCDC活性も同様に、N392Kは113F型抗体と同等のCDC活性であり、T394Y、T394FおよびN392K/T339Yは改変前の113F型抗体と比べて、CDC活性の増加が認められた。

【0562】

2. 補体結合活性

補体第一成分であるC1qと改変抗体の結合活性を、フローサイトメーターを用いて測定した。比較対照として113F型抗体およびIgG1型抗体のrituximabを用いた。96ウェルU底プレート(ファルコン社)の各ウェルに、RPMI1640(GIBCO社)で $1.5 \times 10^7$ 個/mLに希釈したDauid細胞50 $\mu$ Lと終濃度の3倍に調整した抗体溶液50 $\mu$ Lを分注して37(5% CO<sub>2</sub>)で10分間静置した後、6%に希釈したヒト血清(SIGMA社)を1ウェルあたり50 $\mu$ Lずつ添加して37(5% CO<sub>2</sub>)で15分間静置した。

【0563】

PBSで2回洗浄後、FACS用緩衝液[1% BSA、0.02% エチレンジアミン四酢酸、0.05% アジ化ナトリウム、PBSに溶解]で100倍に希釈したFITC標識抗ヒトC1q抗体(DakoCytomation社)を1ウェルあたり50 $\mu$ Lずつ添加し、遮光下4で30分反応させた。

【0564】

細胞をFACS用緩衝液200 $\mu$ Lで2回洗浄後、200 $\mu$ LのFACS用緩衝液に懸濁して、Cytomics FC500 MPL(ベックマン・コールター社)で蛍光強度を測定した。

【0565】

尚、反応の50%効果濃度(EC<sub>50</sub>)は、KaleidaGraph(ヒューリンクス社)の投与反応ロジスティック(dosersplgst)より最小値を0に固定して算出した。その結果を図8に示す。

【0566】

また、グラフから算出したEC<sub>50</sub>の値を表4に示す。表4中のYmaxは近時曲線の最大値を表す。

【0567】

10

20

30

【表 4】

改変抗体	C1q 結合活性		
	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Ymax (MFI)	
113F	3.39	106.6	10
N392K	3.19	101.3	
T394Y	2.52	120.7	
T394F	2.77	119.6	20
Rituximab	6.16	35.3	

## 【0568】

図8および表4に示すように、N392KのC1q結合活性は113Fと同等であった。本解析でT394FとT394YのC1q結合活性は改変前の113F型抗体よりも更に上昇していた。

## 【0569】

## 3. ADCC活性

上記実施例2で作製した改変抗体のADCC活性は、国際公開第2007/011041号に記載の方法により測定した。作製した改変抗体は全て、コアフコースの無い高ADCC型抗体であるため、陰性対照としてrituximabを用いた。

## 【0570】

標的細胞としてCD20陽性腫瘍細胞Dauidi、RajiおよびST486を用い、エフェクター細胞には健常人ドナーより調製したPBMCを用いた。

## 【0571】

ターゲット細胞に対するエフェクター細胞の比は、1:20、1:25、1:30で実験を行い、細胞傷害活性(%)は以下の式より算出した。

## 【0572】

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = 100 \times (S - Ab) / (Max - T)$$

S = サンプル反応ウェル吸光度 - 培地ウェル吸光度

Ab = 抗体無添加ウェル吸光度 - 培地ウェル吸光度

T = 標的ウェル吸光度 - 培地ウェル吸光度

Max = 100%反応ウェル吸光度 - 100%反応対照ウェル吸光度

## 【0573】

その結果、N392K、T394FおよびT394YのADCC活性は113F型抗体と同等であり、rituximabよりも大顕著に増加した。

## 【0574】

#### 4. FcRnおよび $\alpha_2$ ミクログロブリン( $\alpha_2$ -microglobulin)タンパク質の作製

可溶性ヒト胎児性Fc受容体(FcRn)のC末端にヒスチジンタグ(6個のHisが連続したアミノ酸配列)を有するタンパク質を作製するために、ヒト胎盤由来cDNAライブラリー(クロンテック社製)を鋳型として、プライマーFcRn-fw(配列番号4)およびプライマーFcRn-rv(配列番号5)を用いてPCRを行い、FcRn鎖の細胞膜ドメインのC末端にヒスチジンタグを有するタンパク質をコードするcDNAを増幅した。

##### 【0575】

PCR反応はKODポリメラーゼ(東洋紡社製)に添付の説明書に基き行い、FcRn鎖のC末端にヒスチジンタグを含むタンパク質をコードするcDNAを含むプラスミドpCRFcRnを取得した。

10

##### 【0576】

一方、以下の手順でヒト $\alpha_2$ ミクログロブリンをコードするcDNAの構築を行った。ヒト $\alpha_2$ ミクログロブリンのDNA配列をカバーする4本の合成DNAを作製し、上記と同様にしてPCRを行い、ヒト $\alpha_2$ ミクログロブリンのcDNAをコードするDNAを含むプラスミドpCRB2M取得した。

##### 【0577】

次に、国際公開第97/10354号記載の動物細胞用ヒト化抗体発現ベクターpKANTEX93を制限酵素NotIおよびBamHIで消化し、ヒト抗体の重鎖定常領域をコードするcDNA領域が除去された約11KbpのDNA断片を回収した。

20

##### 【0578】

一方、pCRB2Mを制限酵素NotIおよびBamHIで消化することにより、ヒト $\alpha_2$ ミクログロブリンをコードする約400bpのDNA断片を得た。これら約11KbpのDNA断片と約400bpのDNA断片をLigation High(東洋紡社製)を用いて連結し、大腸菌DH5株(東洋紡績社製)を形質転換してプラスミドpKANTEXB2Mを構築した。

##### 【0579】

次にpKANTEXB2Mを制限酵素EcoRIおよびDraIIIで消化することによりヒト抗体軽鎖定常領域をコードするcDNAが除去された約11Kbpのプラスミド断片を回収した。一方、プラスミドpCRFcRnをEcoRIおよびDraIIIで消化して得られる約0.9KbpのFcRn鎖をコードするcDNAを回収した。

30

##### 【0580】

上記、約11KbpのDNA断片と約0.9KbpのDNA断片をLigation Highを用いて連結後、大腸菌DH5を形質転換することにより、プラスミドpKANTEXFcRnHisを得た。

##### 【0581】

得られたプラスミドは制限酵素AatII(New England BioLab社製)で切断し、直鎖化した後、細胞への導入に用いた。切断後は反応液をアガロース電気泳動に供し、該プラスミドが正確に直鎖化されていることを確認した。

40

##### 【0582】

FcRnと $\alpha_2$ ミクログロブリンを共発現させた細胞は、上述と同様にして作製し、培養を行った。培養後、培養上清を回収し、Ni-NTA agarose(QIAGEN社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、可溶性FcRnの精製を行い、可溶性FcRnタンパク質と $\alpha_2$ ミクログロブリンの複合体タンパク質を取得した。

##### 【0583】

取得した可溶性FcRnタンパク質と $\alpha_2$ ミクログロブリンの複合体タンパク質を、可溶性FcRnとして用いた。

##### 【0584】

#### 5. FcRn結合活性

50

抗体の血中半減期はエンドソームに存在する neonatal Fc receptor (FcRn) に対する pH 6.0 と pH 7.4 における結合活性と関係していることが知られている [ J. Immunol. , 176 , 346 ( 2006 ) ]。

## 【 0585 】

改変による血中半減期への影響を検討するため、改変抗体の pH 6.0 または pH 7.4 における FcRn 結合活性を Biacore T-100 (GE healthcare 社) にて評価した。

## 【 0586 】

コントロールには、rituximab および公知の文献に記載のある FcRn に対する結合活性が上昇した IgG1 改変配列 ( T250Q / M428L ) [ J. Immunol. , 176 , 346 ( 2006 ) ] を有する rituximab を用いた。

10

## 【 0587 】

Acetate 5.5 で 10  $\mu$ g / mL に希釈した抗 2-microglobulin 抗体 ( abcama 社) を流速 10  $\mu$ L / 分で 420 秒間反応させ、アミンカップリング法にて CM5 センサーチップ ( GE healthcare 社) に固定化した ( 目標量 : 10,000 RU )。

## 【 0588 】

また、pH 6.0 または pH 7.4 に調整した HBS-EP + Buffer ( GE healthcare 社) で 1  $\mu$ g / mL 可溶性 FcRn を流速 5  $\mu$ L / 分で 24 秒間反応させセンサーチップ表面に捕捉した ( 目標量 : 100 RU )。

20

## 【 0589 】

抗体は pH 6.0 または pH 7.4 の HBS-EP + Buffer で希釈し流速 30  $\mu$ L / 分で 120 秒間反応させ、結合・解離反応を測定した。センサーチップの再生は Glycine-HCl pH 2.0 を流速 60  $\mu$ L / 分で 60 秒間反応させることで行った。

## 【 0590 】

$K_D$  値は Biacore T-100 Evaluation software ( GE healthcare 社) にて Bivalent binding model を用いた解析により算出した。

## 【 0591 】

表 5 に改変抗体の pH 6.0 における各種反応定数を示す。

30

## 【 0592 】

## 【表 5】

アッセイ 1	$ka_1$ ( $\times 10^5$ 1/Ms)	$kd_1$ (1/s)	$K_D$ ( $\times 10^{-8}$ M)
T250Q/M428L	5.23	0.021	3.99
Rituximab	3.25	0.127	38.9
N392K	4.71	0.166	35.2
T394Y	2.83	0.124	43.9
T394F	3.18	0.132	41.3

40

アッセイ 2	$ka_1$ ( $\times 10^5$ 1/Ms)	$kd_1$ (1/s)	$K_D$ ( $\times 10^{-8}$ M)
T250Q/M428L	3.68	0.034	9.98
Rituximab	3.96	0.236	59.6
113F	2.44	0.143	58.5
N392K	3.26	0.146	44.8

50

【 0 5 9 3 】

表 5 に示すように、N 3 9 2 K、T 3 9 4 Y および T 3 9 4 F の pH 6 . 0 における反  
応速度定数  $K_D$  は 1 1 3 F 型抗体や r i t u x i m a b と同等であった。また、p H 7 .  
4 においてはいずれの抗体も結合活性が認められなかった。

【 0 5 9 4 】

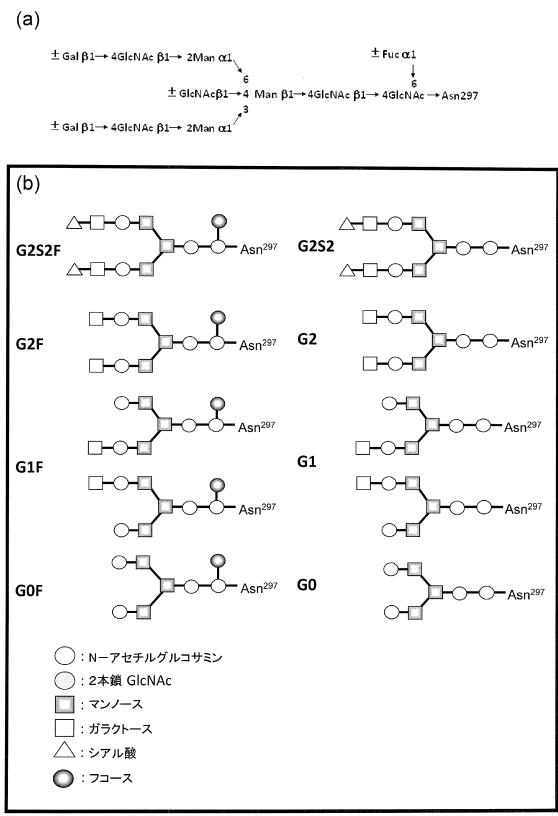
本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく  
様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願  
は、2 0 1 0 年 3 月 2 日付けで出願された米国仮出願 ( 6 1 / 3 0 9 6 3 1 号 ) に基づい  
ており、その全体が引用により援用される。

【 配 列 表 フ リ ー テ キ ス ト 】

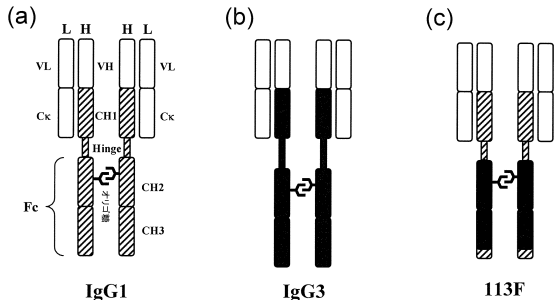
【 0 5 9 5 】

- 配列番号 1 : 1 1 3 F F c 領域のアミノ酸配列
- 配列番号 2 : 1 1 3 F 定常領域のアミノ酸配列
- 配列番号 3 : N 3 9 2 K 定常領域のアミノ酸配列
- 配列番号 4 : F c R n f w プライマーの塩基配列
- 配列番号 5 : F c R n r v プライマーの塩基配列

【 図 1 】

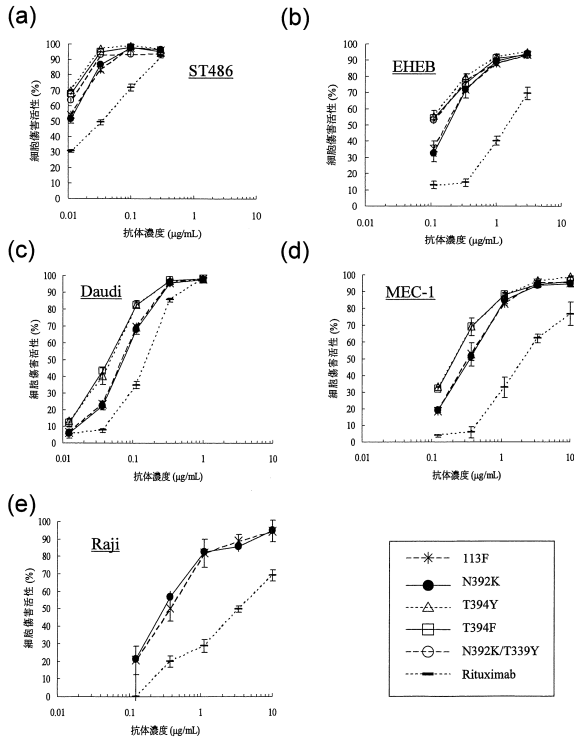


【 図 2 】

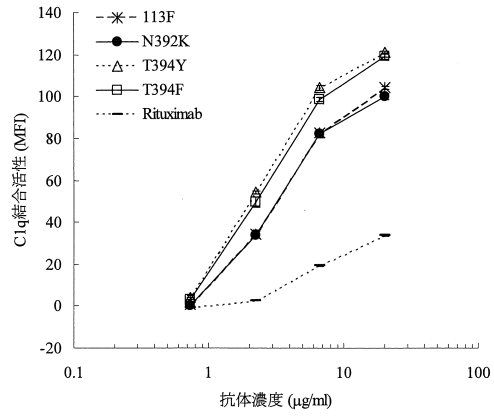




【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

000582080000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1  
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 丹羽 倫平  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内  
(72)発明者 土屋 摩珠  
東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 バイオ医薬研究所内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2006/075668(WO,A1)  
国際公開第2004/063351(WO,A2)  
国際公開第2005/115452(WO,A2)  
国際公開第2006/105062(WO,A2)  
国際公開第2005/070963(WO,A1)  
国際公開第2006/019447(WO,A1)  
国際公開第2007/011041(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
C 1 2 N 15/00 - 15/90  
C 0 7 K 1/00 - 19/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)