

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-542750

(P2009-542750A)

(43) 公表日 平成21年12月3日 (2009. 12. 3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-518782 (P2009-518782)	(71) 出願人	506047949
(86) (22) 出願日	平成19年7月11日 (2007. 7. 11)		グリーンオヴェイション・バイオテック・
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月13日 (2009. 3. 13)		ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/006123		ル・ハフツング
(87) 国際公開番号	W02008/006554		GREENOVATION BIOTEC
(87) 国際公開日	平成20年1月17日 (2008. 1. 17)		H GMBH
(31) 優先権主張番号	06450095.2		ドイツ連邦共和国デー 7 9 1 1 1 フライ
(32) 優先日	平成18年7月11日 (2006. 7. 11)		ブルク、ベッツィンガーシュトラッセ 2 9
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ペー番
		(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 糖が操作された抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗原に対して特異的な動物の改変抗体またはその誘導体または断片を含む以下を特徴とする抗体調製物に関する：

- ・抗体またはその誘導体または断片はフコースおよびキシロースを有さないN-グリカン構造を含む、および
- ・改変抗体、その誘導体または断片の少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 99%、もっとも好ましくは少なくとも 100% は、C-末端リシン残基を欠いている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原に対して特異的な、動物の改変抗体またはその誘導体または断片を含む、以下を特徴とする抗体調製物：

抗体またはその誘導体または断片が、フコースおよびキシロースを含まないN-グリカン構造を含む、および

改変抗体、その誘導体または断片の少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 99%、もっとも好ましくは少なくとも 100% がC-末端リシン残基を欠く。

【請求項 2】

抗体またはその誘導体または断片のN-グリカン構造がガラクトースも含まないことを特徴とする、請求項 1 に記載の抗体調製物。

【請求項 3】

非改変抗体調製物が、抗原に対し、改変抗体またはその誘導体または断片の調製物と同じ親和性を有することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の抗体調製物。

【請求項 4】

動物の、好ましくは哺乳類の非特異的抗体を含む、少なくとも10% の血清溶液において、調製物のADCC 活性の障害の程度が、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 10% 低いことを特徴とする、請求項 1 ないし 3 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 5】

N-グリカン構造が、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ または $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ から選択されることを特徴とする、請求項 1 ないし 4 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 6】

ADCC エフェクター機能が、好ましくは同じ抗原に対して特異的な、動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 5倍、好ましくは少なくとも 10倍、特に好ましくは少なくとも 20倍、より好ましくは少なくとも 30倍、よりいっそう好ましくは少なくとも 40倍、もっとも好ましくは少なくとも 50倍上昇していることを特徴とする、請求項 1 ないし 5 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 7】

抗体またはその誘導体または断片の 50% 未満、好ましくは 30% 未満、より好ましくは 10% 未満がN-グリカン構造を欠くことを特徴とする、請求項 1 ないし 6 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 8】

動物が哺乳類、好ましくはヒトまたはラクダまたはマウスであることを特徴とする、請求項 1 ないし 7 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 9】

動物の非特異的抗体を含む、少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 40%の血清溶液において、調製物のADCC活性の障害の程度が、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 15%、好ましくは少なくとも 20%低いことを特徴とする、請求項 1 ないし 8 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 10】

非特異的抗体溶液において、調製物のADCC 活性の障害の程度が、少なくとも 20%、好ましくは少なくとも 30%低いことを特徴とする、請求項 1 ないし 9 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 11】

動物の改変抗体またはその誘導体または断片が、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であることを特徴とする、請求項 1 ないし 11 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 12】

CDC 活性が、同じ抗原に対して特異的な非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 10%

10

20

30

40

50

低下していることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 1 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 1 3】

調製物が IgG 抗体またはその断片または誘導体であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 2 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 1 4】

調製物がモノクローナル抗体、その断片または誘導体であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 3 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 1 5】

動物の非特異的抗体を含む、少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 40%の血清溶液において、改変抗体、その誘導体または断片のCD16_{158 F/F} に対する結合の阻害の程度が、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 10% 低いことを特徴とする、請求項 1 ないし 1 4 いずれかに記載の抗体調製物。

10

【請求項 1 6】

動物の非特異的抗体を含む、少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 40%の血清溶液において、いずれかの CD16₁₅₈ 遺伝子型のエフェクター細胞によって媒介される、改変抗体、その誘導体または断片の標的細胞の溶解の阻害の程度が、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 10% 低いことを特徴とする、請求項 1 ないし 1 5 いずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 1 7】

β -1,2-キシロシルトランスフェラーゼおよび α -1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性を欠損した細胞、好ましくは植物細胞における、抗体、その断片または誘導体をコードする核酸の発現を介して得られ得る抗体調製物。

20

【請求項 1 8】

細胞がガラクトシルトランスフェラーゼを欠損していることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の抗体調製物。

【請求項 1 9】

細胞が GnTIII 活性を有するよう改変されていることを特徴とする、請求項 1 7 または 1 8 記載の抗体調製物。

【請求項 2 0】

調製物の改変抗体、その誘導体または断片が、爬虫類、好ましくはワニのものであることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 9 いずれかに記載の抗体調製物。

30

【請求項 2 1】

医薬担体または希釈剤中に請求項 1 ないし 2 0 いずれかに記載の抗体調製物を含有する医薬調製物。

【請求項 2 2】

患者、好ましくはヒトまたは哺乳類における、予防および/または治療処置のための、腫瘍細胞の増殖をそれぞれ低減または阻害するための薬剤を調製するための、請求項 1 ないし 2 1 いずれかに記載の抗体に基づく調製物の使用。

【請求項 2 3】

腫瘍細胞の増殖の低減が、同じ抗原に対して特異的な非改変抗体の使用と比較して少なくとも 5%、好ましくは少なくとも 10%、より好ましくは少なくとも 20%、さらにより好ましくは 30%を超えて、もっとも好ましくは 50%を超えて上昇する、請求項 2 2 に記載の調製物の使用。

40

【請求項 2 4】

固形癌の処置のための医薬を製造するための、請求項 1 ないし 2 1 いずれかに記載の調製物の使用。

【請求項 2 5】

上皮起源の固形癌の処置のための、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

微小残存病変の処置のための、請求項 1 ないし 2 1 いずれかに記載の調製物の使用。

50

【請求項 27】

受動免疫療法のための、請求項 22 ないし 26 いずれかに記載の使用。

【請求項 28】

抗体または抗体混合物が、少なくとも 1 mg/用量の投薬量で、好ましくは少なくとも 10mg/用量の投薬量で、より好ましくは少なくとも 50mg/用量の投薬量で使用される、請求項 22 ないし 27 いずれかに記載の使用。

【請求項 29】

対象の、好ましくはヒトのサンプルを提供すること、およびサンプルにおける抗原への抗体の結合現象を検出することを含むインビトロスクリーニング方法のための、請求項 1 ないし 21 いずれかに記載の抗体に基づく調製物の使用。

10

【請求項 30】

抗体、断片または誘導体が、 β 1,2-キシロシルトランスフェラーゼ活性および α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性を欠く細胞、好ましくは植物細胞において発現されることを特徴とする、請求項 1 ないし 20 いずれかに記載の抗体調製物の製造方法。

【請求項 31】

細胞が、1,4 ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を欠くことを特徴とする、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

抗体、断片または誘導体を発現させるために使用される、抗体、断片または誘導体をコードする DNA が、C-末端のリシンのコドンを欠くことを特徴とする、請求項 30 または 31 に記載の方法。

20

【請求項 33】

好ましくはカルボキシペプチダーゼによって、またはインビボでの適切な細胞培養条件の選択、好ましくは動物細胞発現系の選択によって、抗体、断片または誘導体の C-末端リシンが取り除かれることを特徴とする、請求項 30 または 31 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改変抗体、その誘導体または断片の分野に関する。

【背景技術】

30

【0002】

製薬業界は、生物医薬品の費用効率が高い代替的な大規模生産システムの要求にますます遭遇しつつある。植物に基づく発現系は一方、動物細胞工場の好適な代用としての有用性を示してきた。具体的には、ヒト病原体の非存在により汚染のリスクが最小であることによる非常な安全性と組み合わせてのその低い生産コスト(Raskin, I. et al., Trends Biotechnol 20, 522-531 (2002); Fischer, R. et al., Curr Opin Plant Biol 7, 152-158 (2004))は非常に重要である。植物は、高等真核生物の翻訳後修飾のほとんどを行うことが出来る(Gomord, V. & Faye, L., Curr Opin Plant Biol 7, 171-181 (2004))。これらには、複雑なグリコシル化、タンパク質プロセッシングおよびフォールディングならびに複雑な多量体タンパク質のアセンブリーが含まれ、活性の治療抗体の生理活性および薬物動態学に寄与する特徴である。したがって、様々な組換えタンパク質、例えば、ヒト抗体が、植物宿主発現系における発現に成功している (Hiatt, A. et al., Nature 342, 76-78 (1989); Ma, J.K. et al., Nat Rev Genet 4, 794-805 (2003))。

40

【0003】

にもかかわらず、植物由来のN-結合型オリゴ糖は、ヒトにみられるものとはかなり異なっている。 α 1,6-フコシル残基が植物には一般に存在しないことに加えて、翻訳後修飾、例えばグリコシル化における相違が、植物由来タンパク質の性質に影響を与えることが示されている (Daniell et al., 前掲; Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109; Mann et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:255-261)。植物においては、N-結合型グリカンは、抗原性 (Faye et al. (1993) Anal. Biochem. 109:104-108) および/または ア

50

レルゲン性 (van Ree et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:11451-11458) の、グリカンコアのN-結合型 マンノースに結合した β (1,2)-キシロース (Xyl) 残基、および、哺乳類グリカンには存在しない近接した GlcNAc に連結した α (1,3)-フコース (Fuc) 残基を含む。一方、シアル酸残基は通常植物 N-グリカンには結合していない。しかし、植物抗体は、局所受動免疫の成功のためにかかる残基を必要としない (Ma et al., 前掲)。

【0004】

小胞体 (ER) におけるグリコシル化プロセッシングはほとんどすべての種に保存されており、オリゴマンノース ($\text{Man}_5\text{-}_9\text{GlcNAc}_2$) 型N-グリカンに制限されているが、ハイブリッドおよび複合型グリカンに対するゴルジ体による (Golgi-generated) プロセッシングは高度に多様である (Helenius et al. (2001) Science 291:2364-2369)。トランスジェニック植物において発現したタンパク質のERによる保持は通常、生産レベルを向上させる (Conrad et al. (1998) Plant Mol. Biol. 38: 101-109; Sharp et al. (2001) Biotechnol. Bioeng. 73:338-346)。しかし、グリカンプロセッシングは抗体の安定性に影響を与えうるので (Rudd et al. (2001) Science 291:2370-2376)、植物発現系由来の改変グリカン構造を有する抗体が活性であるか、そして有効な全身の曝露後予防を与えることが出来るのかは明らかではない。

【0005】

含まれる懸濁培養における組換えタンパク質のための大規模適合性生産プラットフォームとして、頑強なコケであるニセツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) は、陸生植物の間だけではなく、異常に高速の相同核 DNA 組換えといくつかの有利な特性を組み合わせ、遺伝子の効率的な標的化ノックアウトを可能とすることにより (Gorr, G. & Wagner, S., Modern Biopharmaceuticals 3, 919-929 (2005); Girke, T. et al., Plant J 15, 39-48 (1998); Schaefer, D.G. & Zyrd, J.P; Plant J 11, 1195-1206 (1997)、完全に動物成分を含まない、次世代の生産技術を提供する。「ヒト化」 N-結合型オリゴ糖構造に対する試みにおいて、 β 1,2-キシロシル (xylosyl) トランスフェラーゼおよび α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子についてのダブルノックアウト変異体 ($\Delta \text{xyl-t} / \Delta \text{fuc-t}$) が最近、WO 04/057002 によると作成された。これらのコケの変異体は2つの植物に特異的な糖残基を完全に欠く全糖タンパク質を合成したが、形態、生育、発達および組換え糖タンパク質の分泌能力において影響を受けていなかった (Koprivova, A. et al.; Plant Biotechnol J 2, 517-523 (2004); Huether, C.M. et al. Plant Biol 7, 292-299 (2005))。末端の、ヒト-様1,4結合ガラクトースのコケ由来N-グリカンへの結合の成功も示された (Huether, C.M. et al. Plant Biol 7, 292-299 (2005); Gorr and Jost Bioprocess J 4, 26-30 (2005))。抗体の機能的特徴、例えば、ADCC (抗体依存性細胞性細胞傷害) および CDC (補体依存性細胞傷害) 活性はそこには開示されなかった。

【0006】

植物発現系により抗体を産生する試みがなされているものの、変化したグリコシル化パターンによる抗体の安定性およびエフェクター機能に対する負の効果およびこれら抗体の Fc 領域と Fc 受容体との相互作用が記載されている。免疫グロブリンの Fc-部分によって媒介される機能は、それらのN-結合型オリゴ糖構造に強く関連していることが報告されている (Jefferis, R. et al., Immunol Rev 163, 59-76 (1998))。

【0007】

特にコアフコシル化オリゴ糖は、エフェクター細胞上に発現する Fc γ RIIIa 受容体 (CD 16) に対して弱い結合を示し、その結果、溶解能力 (lytic potential) が低下する (Shields, R.L. et al., J Biol Chem 277, 26733-26740 (2002); Shinkawa, T. et al., J Biol Chem 278, 3466-3473 (2003))。一方、そのN-グリカンパターンにおいてコアフコースを欠いている酵母に産生される抗体は、B-細胞枯渇アッセイにおいて弱い能力を示した。高濃度の抗体によってのみ、健康なドナーからのB-細胞の枯渇が起こった。抗体の特徴、例えば、ADCCおよびCDC 活性はそこでは開示されていなかった。

【0008】

しかし、抗体のインビボでの産生の後、本研究にて存在するN-グリカン構造のほとんど

10

20

30

40

50

は、インビトロで特異的酵素の使用によるさらなる工程においてプロセッシングされて、最終的なN-グリカンパターンが達成された(Li et al., Nat Biotechnol, doi: 10.1038/nbt1178 (2006))。

【0009】

US 6,602,684は、GnTIIIによって修飾された二分されたN-結合型グリカン構造などの、複雑なグリカン構造の修飾により、抗体のエフェクター機能を高める方法を記載している。

【0010】

狂犬病に対するモノクローナル抗体がWO 2005/000225 A2に記載されている。これら抗体は、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgE クラスであり、植物において産生され、アルファ-1,3-フコース残基を有するN-グリカン構造を欠き、アレルゲン性植物エпитープが少ない。

【0011】

WO 2004/050838 A2は、植物において産生され、フコース残基を有さないが、キシロースを含みうる、単純ヘルペスウイルスに対する免疫グロブリン(immunoglobulin)を記載している。

【0012】

WO 01/31045 A1の開示は、植物における哺乳類様糖構造を有するタンパク質の生産方法に関する。好ましくは、植物は、活性なフコシルトランスフェラーゼまたはキシロシルトランスフェラーゼを有さない。

【0013】

US 2006/0034829 A1は、式 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ のN-グリカン構造を有する免疫グロブリンを記載する。

【0014】

US 2006/0029604 A1は、式 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ のN-グリカン構造を有する免疫グロブリンを記載する。これらの構造は β -ガラクトシダーゼ処理により作成される。

【0015】

WO 01/55434 A1は、植物における炭水化物修飾酵素、特に GBSSおよびGnTIの阻害に関する。

【0016】

抗体の開発についての長期かつ熱心な研究を鑑みても、エフェクター機能の上昇といった改善された機能を有する抗体に対して高い要求がいまだに存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の目的は、改善された性質を有する抗体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明によると、この目的は請求の範囲の主題によって達成される。

【0019】

本発明は、抗原に対して特異的な、動物、好ましくは、哺乳類の改変抗体、またはその誘導体または断片を含む、以下を特徴とする抗体調製物を提供する：抗体またはその誘導体または断片は、フコースおよびキシロースを含まないN-グリカン構造を含む、および、調製物のADCC 活性の阻害の程度は、動物の非特異的抗体を含む少なくとも10% の血清溶液 (100% は、非希釈の血清である)において、同じ抗原に特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも 10%低い、および/または、改変抗体、その誘導体または断片の少なくとも 90%、好ましくは 少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 99%、もっとも好ましくは少なくとも 100%は、C-末端リシン残基を欠く。

【0020】

治療抗体のエフェクター機能は、体液に通常みられる正常抗体バックグラウンドにより一般的に阻害されていることが見いだされた。天然血清において、高濃度の治療用IgG（例えば、ヒト IgG1 またはIgG3、または マウス IgG2a）抗体が、過剰の内在性免疫グロブリン Gによる抗体依存性細胞傷害（ADCC）の阻害を補償するために必要である。ヒト血清の平均抗体濃度はおよそ 11.7 mg/mlであり、ここで、IgG1およびIgG3が大部分を構成する（共に7.7mg/ml）。正常血清 IgG レベルは、NK 細胞に存在する低親和性 IgG 受容体（Fc γ RIIIa、CD16）に対する治療用IgG 抗体の結合をブロックする。CD64とともに、これら2つのFc γ 受容体は、ADCCを媒介する主な細胞の受容体である。ADCC 溶解は、異なるグリコシル化構造を介して上昇しうる（例えば、W02006/005367）。しかしこれらの抗体は非特異的血清抗体によって阻害されうる（Preitner et al., Mol. Immunol. 43、1183-1193(2003)）。このたび驚くべきことに、フコースおよびキシロースを有さないN-グリカン構造を有する抗体調製物、特にC-末端リシンを欠き、好ましくはガラクトースも有さない抗体調製物が、かなりの程度でこの阻害に対して高い耐性を示すことが見いだされた。

10

【0021】

動物、特に哺乳類の、同じ抗原に対して特異的な非改変抗体調製物に関する言及は、本発明による抗体では、抗体のC-末端部分におけるエフェクター機能が改変されていることを理解されたい。もちろん溶解活性（ADCC）は、Fc 部分に媒介される溶解エフェクター機能が独立していると考えられるべきその標的に対する抗体の親和性にも依存する。非改変抗体は通常、ガラクトース、フコース（特に α 1,3-フコース）および/または キシロース（特に β 1,2-キシロース）を有するN-グリカン構造を含む。好ましくは、本発明の改変抗体および非改変（即ち、親の）抗体の両方がモノクローナル抗体であり、より好ましくは細胞発現系、例えば、植物細胞において組換えにより発現された（または組換え発現のために設計された）ものである。

20

【0022】

比較(comparative)血清溶液（それは例えば、およそ 10% 血清に希釈されていてもよい）に代えて、非特異的抗体の抗体組成物を利用できる。かかる比較抗体組成物は動物の生理的抗体を有しうるか、または、それは本発明の（改変）抗体の親（非改変）抗体調製物でありうる。比較抗体は、血清抗体と同様の濃度であり得、例えば、0.5 mg/ml~15 mg/ml、好ましくは 1 mg/ml~5 mg/ml、より好ましくは 3 mg/mlである。好ましくは、比較抗体は、IgG1およびIgG3である。血清におけるおよその血清 IgG1およびIgG3 レベルは7.7 mg/mlであるため、10% 血清は0.77 mg/mlの量となり、40% 血清は 3.08 mg/mlのIgG1およびIgG3となる。

30

【0023】

この抵抗性を有する新規抗体、ならびにその誘導体、断片または調製物は、 β 1,2-キシロシルトランスフェラーゼおよび α 1,3-フコシルトランスフェラーゼを欠損する組換え細胞、好ましくは植物細胞において産生できる。

【0024】

好ましくは、抗体またはその誘導体または断片のN-グリカン構造はまた、ガラクトースも有さない。ガラクトースの欠損は、適切な発現系、例えば特定の植物細胞発現系における発現により、またはガラクトシダーゼによる処理により、あるいは、1,4 ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を欠く細胞、例えば、動物細胞における発現により達成することが出来る。

40

【0025】

好ましくは、非改変抗体調製物は、改変抗体またはその誘導体または断片の調製物と抗原に対する同じ親和性を有する。

【0026】

調製物において、改変抗体、その誘導体または断片の、特に（通常、リシンを含みうる）重鎖の和に対して判定して、好ましくは 少なくとも 90%、好ましくは 少なくとも 95%、より好ましくは少なくとも 99%、もっとも好ましくは 100%はC-末端リシン残基を欠いている。抗体はC-末端リシンを含む可能性があるより多くの鎖を有しうるため、リシンの

50

欠損の定量的パーセンテージは、C-末端リシンを有する可能性があるすべての鎖に対するものであると理解される。モノクローナル抗体はC-末端リシンの存在において不均一であることが示された (Lazar et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry (18)、3、239 - 244、2004)。C-末端リシンを定量的に除いた(または発現させない)抗体が、その他の抗体と比べて顕著に有利なエフェクター機能を有することが驚くべきことに見いだされた。ADCCは、生理的に存在する抗体による血清希釈において阻害されることが本明細書において示された。この阻害作用は、C-末端リシンを欠くこの態様の本発明の抗体において存在しなかった(または顕著に低下していた)。

【0027】

さらに、抗体またはその誘導体または断片のN-グリカン構造は好ましくは、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ 、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ または $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ から選択される。好ましくは、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 構造は、抗体、その断片または誘導体の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%またはもっとも好ましくは少なくとも90%に含まれる。別の態様において、好ましい構造は、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ および/または $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ であり、特に $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ および $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$ 構造であり、ここで、それらは改変抗体またはその誘導体または断片のN-グリカン構造の少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%において存在する。

【0028】

抗体調製物の特別の態様において、抗体、その誘導体または断片の50%未満、好ましくは30%未満、より好ましくは10%未満がN-グリカン構造を欠く。ヒトIgG抗体における Asn_{297} に結合するN-グリカン構造は、好ましくは調製物のほとんどの抗体において存在する。

【0029】

改変抗体(ならびにその断片および誘導体)の起源である動物は好ましくは哺乳類であり、特定の態様においてヒトまたはマウス、または爬虫類であり、具体的な態様において、ワニであるが、抗体はその他の生物、例えば、植物細胞において組換え発現させてもよい。

【0030】

好ましくは調製物のADCC活性の阻害の程度は、動物の非特異的抗体を含む少なくとも10%、好ましくは少なくとも40%の血清溶液において、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して、少なくとも10%、特に好ましくは少なくとも15%、20%、25%または30%低い。新規抗体は、動物の体液(例えば、血清)にみられるその他の抗体のマスキング作用に対してこのような例外的な抵抗性を有する。好ましくは調製物のADCC活性の阻害の程度は、非特異的抗体の溶液において少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%低い。

【0031】

抗体の好ましい形態は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体、好ましくはIgG抗体である。

【0032】

本発明の特別の態様において、抗体調製物の好ましい特徴は、CDC活性が、同じ抗原に対して特異的な非改変抗体調製物と比較して少なくとも10%低下していることである。別の態様において、調製物は、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して少なくとも10倍上昇したADCC活性を有する。

【0033】

好ましい態様において、改変抗体、その誘導体または断片の $\text{CD16}_{158\text{ F/F}}$ に対する結合の阻害の程度は、動物の非特異的抗体を含む少なくとも10%、好ましくは少なくとも40%の血清溶液において、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して少なくとも10%低い。

【0034】

好ましくは、いずれかの CD16_{158} 遺伝子型のエフェクター細胞によって媒介される改変

抗体、その誘導体または断片の標的の細胞溶解の阻害の程度は、少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 40%の動物の非特異的抗体を含む血清溶液において、同じ抗原に対して特異的な動物の非改変抗体調製物と比較して少なくとも 10%低い。

【0035】

別の側面において、本発明は、 β 1,2-キシロシルトランスフェラーゼおよび α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性を欠く細胞、好ましくは植物細胞における、抗体、その断片または誘導体をコードする核酸の発現を介してえられうる抗体調製物を提供する。かかる抗体調製物は、好ましくは、上記の機能的および構造的利点によりさらに特徴づけられる。抗体、その断片または誘導体は2以上のアミノ酸鎖によって構成されていてもよく、2以上の核酸（例えば、各鎖について1つ）が、発現に必要であり得ることが理解される。もちろん2以上の鎖は、例えば1つのベクター上の1つの核酸によってコードされていてもよい。

10

【0036】

好ましくは細胞においてえられうる抗体調製物はまた、ガラクトシルトランスフェラーゼも欠き、好ましくは、細胞は完全にガラクトース-1-ホスフェート-ウリジル-トランスフェラーゼまたはあらゆるガラクトシルトランスフェラーゼを欠く。

【0037】

特定の態様において、抗体調製物は、ガラクトース残基を1,4結合においてN-グリカンの末端GlcNAc残基に結合させることが出来る発現系において得ることが出来る。かかる発現系は、天然のガラクトシルトランスフェラーゼ活性を含むものでもよいし、特定のガラクトシルトランスフェラーゼ活性を達成するよう遺伝子操作されたものでもよい。

20

【0038】

好ましくは、抗体調製物は、特にUS 6,602,684またはW099/54342に開示されているようにGnTIII活性を有する細胞にて発現させる。GnTIII活性は、溶解エフェクター機能のさらなる改善を導く（例えば、二分(bisecting)構造の導入）。細胞は例えばGnTIII遺伝子でトランスフェクトされ、その結果、非トランスフェクトまたは非改変細胞と比較してGnTIII発現が上昇する。

【0039】

本発明は、別の側面において、改変抗体またはその誘導体または断片であって、該抗体のグリカン構造がフコースおよびキシロースを含まないことを特徴とするもの、好ましくはガラクトースも含まないもの、そして、N-グリカン構造がGlcNAc₂Man₃、またはGlcNAc₂Man₃GlcNAcまたはGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂であるものを提供する。N-グリカン構造は、好ましくは式 $-\beta-1,4\text{-GlcNAc}-\beta-1,4\text{-GlcNAc}-(\beta-1,4\text{-Man})(\alpha-1,6\text{-Man})(\alpha-1,3\text{-Man})$ にしたがい、ここで α -マンノース残基の1つ（または両方）はさらなる $\beta-1,4\text{-GlcNAc}$ に結合していてもよい（図4）。コアグリコシル化はIgG抗体におけるAsn297に一般にみられる。

30

【0040】

特定の側面において、本発明は、Lewis Y 抗原を認識し、かつ、Lewis Y 抗原を認識し、ガラクトース、フコースまたはキシロースを含む親（即ち、非改変抗体）モノクローナル抗体に由来するモノクローナル抗体またはその誘導体または断片に関し、ここで該モノクローナル抗体のグリカン構造はフコースおよびキシロースを含まず、好ましくはガラクトースも含まず、ADCCエフェクター機能は少なくとも10-倍上昇しており、該抗体の抗原結合特異性および親和性は、非改変親抗体と同一かまたは類似している。この態様のために、Lewis-Yを認識するあらゆる抗体を親抗体として利用することが出来る。

40

【0041】

好ましい親モノクローナル抗体は、ヒト化軽鎖可変領域、ヒト軽鎖定常領域、ヒト化重鎖可変領域およびヒト重鎖定常領域を含む抗体であり、ここで、ヒト化軽鎖可変領域は、図1に示すアミノ酸配列の少なくとも部分を有し得、ヒト化重鎖可変領域は、図2に示すアミノ酸配列の少なくとも部分を有しうる。好ましくは、本発明の抗体のアミノ酸配列は、親抗体と同一である。例えば、抗体誘導体は、EP 0 528 767によるキメラのものでありうる。特定の態様において、抗体誘導体は一本鎖抗体(SCA)である、SCAは、例えばUS 4,94

50

6,778に開示されている。同じDNAにコードされるが、動物、例えば哺乳類宿主によって発現される非改変親抗体と比較して、本発明による抗体は、同一または類似のアセンブリー、フォールディング、特異性および二価性(bivalence)を示し得、好ましくは、より高度の分解または凝集を示さない。

【0042】

抗体誘導体は、組換えまたは人工の群から選択することが出来、例えば、一本鎖抗体、抗体、特に動物からのヒト化抗体が挙げられる。特に、ラクダまたはワニなどの爬虫類由来の抗体が、ヒトにおける抗原性が非常に低く、好ましい。抗体断片は、抗体の定常および/または可変部分を含むかまたはそれらから選択され得、特にFc、Fc-様、Fv、Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、scFv、scfc、V_{HH}から選択される。もっとも好ましくは、抗体断片は、本発明のグリコシル化構造を有するFc-様またはFc断片である。 10

【0043】

親抗体の臨床効果は、ヒト IgG1 分子のFc部分の生物学的活性に関連し、それは、その抗体依存性細胞傷害 (ADCC)を誘導する効力によって判定される。ADCC機能は、顆粒球および単球の上のFcγRIIIと相互作用するFc部分のグリコシル化に依存する(Lifely et al., 1995, Glycobiology, 5(8), 813-822)。

【0044】

本発明による抗体および/または調製物のADCC エフェクター機能は、親抗体のADCC 活性と比較して、即ち、同じ抗原に対して特異的な非改変抗体調製物と比較して、少なくとも5倍上昇しており、好ましくは少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも20倍またはさらに少なくとも30倍上昇しており、さらにより好ましくは少なくとも40倍上昇しており、もっとも好ましくは少なくとも50倍上昇している。ADCC エフェクター機能は、抗体が向けられた抗原を発現する細胞の細胞溶解によってもっともよく判定される(溶解のEC50-値)。抗体が一般的に向けられ得る抗原としての化合物は理解されている(例えば、あらゆるタンパク質、糖タンパク質、核酸等)。抗原は1つのエピトープを有していてもよいし、あるいは2以上のエピトープを有していてもよい。好ましくは、抗体は、モノクローナル抗体におけるものと同じエピトープに対して向けられる。 20

【0045】

本発明の抗体の親抗体と比較してのADCC 溶解活性は、細胞溶解アッセイにおいて標的抗原を有する細胞を用いて測定できる。Lewis-Y 抗原に対して向けられた抗体の場合、Lewis-Y 陽性標的癌細胞株、例えば SKBR5、SKBR3、LoVo、MCF7、OVCAR3およびKato III が標的として使用できる。 30

【0046】

エフェクター細胞に媒介される腫瘍細胞溶解は、免疫グロブリン Fc ドメインとエフェクター細胞上のFc 受容体との相互作用に強く依存する。NK 細胞に発現しているCD16 受容体は、その表現型に依存して、異なる親和性にてIgGに結合することが報告されている(Niwa et al., Cancer Res 64, 2127-2133)。末梢血単核球 ドナーのCD16 遺伝子型がそれゆえ分析され、約 50% (10のうち5)のみが高親和性表現型 (CD16_{158V/V})を発現していることが見いだされた。かかる末梢血単核球 ドナーを用いて行うADCC アッセイは、親抗体調製物および本発明による抗体について、低親和性受容体 (CD16_{158F/F})を発現するNK 細胞と比較して、強く増強された溶解活性を示した。Ovar-3 細胞に対する並列比較は、選択したCD16 表現型には依存せずに、本発明による抗体についておよそ40倍の溶解能力の増強を明らかにした。 40

【0047】

本発明による抗体は、マウス、キメラ、ヒトまたはヒト化抗体であり得、好ましくは、抗体はヒト化抗体である。好ましい態様において、抗体はIgGまたはその断片または誘導体であり、好ましくは IgG1またはその断片または誘導体である。さらなる態様において、本発明の抗体は、ヒト IgGのFc 領域と等価な領域を含む融合タンパク質である。

【0048】

したがって、一つの側面において、本発明はまた、医薬上許容される担体または希釈剤 50

中に本発明による抗体を含む医薬調製物にも関する。

【0049】

さらに、本発明は、医薬としてのこの抗体の使用にも関する。

【0050】

医薬は、特に、例えば、上皮起源の転移腫瘍または播種性腫瘍細胞の処置などの、固形癌の処置のための、患者における腫瘍細胞の生育の低減または阻害のためのそれぞれ予防および/または治療処置のための薬剤として利用できる。さらに、本発明による抗体は、微小残存病変の処置のためにも利用できる。

【0051】

所与の濃度の本発明による抗体は、より広い範囲の抗原密度を有する標的細胞を溶解することが出来た。この現象は腫瘍治療法において関連性があり得、特にそれは、標的抗原密度は上皮腫瘍において一定ではないと考えられ得、原発腫瘍およびそれに由来する転移の両方において変動しうるからである。要約すると、糖が最適化された生産株によって発現される活性の治療抗体 - 例えば、コケによって産生される抗体 IGN314 - は、増強された溶解活性を示し、治療用量を低減し得、所与の濃度で、様々な抗原密度を有するより広いスペクトルの腫瘍細胞を溶解しうる。特に標準的治療抗体を回避しうる抗原密度の低い細胞は、かかる糖が操作された抗体により標的化され破壊されうる。さらに、糖が最適化された抗体は、すべての調査した細胞株および両方のCD16₁₅₈ 表現型に対してより低いEC50 値を示し、これは、CD16_{158F/F}、CD16_{158V/V} 表現型の両方に対するより高い親和性を示す。このより強い相互作用はEC50 濃度を低下させ、両方の表現型について標的細胞溶解を開始するのに必要な閾値濃度を低下させることが出来る。この現象は、低親和性表現型を有する患者にとって特に治療的利益をもたらし得、かかる患者は古典的な抗体調製物で処置された場合、同じ治療効果のためにより高い抗体濃度を必要とするであろう。

【0052】

本発明のさらなる側面において、抗体または抗体混合物の製造方法が提供され、ここで、抗体は細胞中、好ましくは、 β 1,2-キシロシルトランスフェラーゼおよび α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性を欠損する植物細胞、好ましくは完全に β 1,2-キシロシルトランスフェラーゼおよび α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ活性を欠く植物細胞で発現し、そして、この発現によって得られ得る抗体が提供される。例えば、抗体鎖をコードする核酸を含む少なくとも1つのベクターが細胞または植物細胞の形質転換のために利用でき、それらは次いで増殖され得、改変抗体の生産に使用されうる。

【0053】

好ましくは、細胞は1,4 ガラクトシルトランスフェラーゼ活性も欠損している。

【0054】

好ましい態様において、抗体、断片または誘導体の発現に用いられる抗体、断片または誘導体をコードするDNAはC-末端 リシンのためのコドンに欠いている。

【0055】

別の態様において、抗体、断片または誘導体のC-末端リシンは、好ましくはカルボキシペプチダーゼ、例えばカルボキシペプチダーゼ Bによって、またはインビボで適当な細胞培養条件の選択によって、好ましくは動物細胞発現系の選択によって除かれる。発現は好ましくは、BY2 細胞、ニンジン細胞、酵母 (例えば、pichiaまたはsaccharomyces)、繊毛虫類、藻類または昆虫細胞において行われる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】 Lewis Y 標的化モノクローナル抗体 IGN314のヒト化軽鎖可変領域の配列。

【図2】 Lewis Y 標的化モノクローナル抗体 IGN314のヒト化重鎖可変領域の配列。配列1または2を利用できる。

【図3】 精製抗体 IGN314の特徴決定 (a)親抗体 IGN311と比較した精製IGN314の銀染色した SDS- ポリアクリルアミドゲル。IGN311は、ヒト化 モノクローナル IgG 抗-Lewis Y 抗体である。非還元条件下において(左パネル)、両方のサンプルは完全に同じタンパク

10

20

30

40

50

質バンドをおよそ 150 kDaの範囲に示し、これは、インタクトな正しくアセンブリーした IgGの予測分子量に対応する。(-)偽(mock-)形質転換の同時精製培養上清。還元条件下において(右パネル)、およそ 50および25 kDaのタンパク質バンドのみが検出でき、それぞれIgG 重鎖および軽鎖に対応する。(b) IGN314のサイズ排除 HPLC 分析。インタクトな IgGに特徴的な保持時間 8.6分の鋭いピークとして溶出する発現産物。あまり多くない(10%未満)、より短い保持時間である 7.4 および 7.9分の完全に分離されないピークが現れ、これは少量の凝集した抗体構造、例えば、IgG 多量体におそらく対応しうる。(c) 抗-イディオタイプサンドウィッチ ELISA (Runs test)において抗原に結合するその活性を試験することによるIGN314 特異性の検証。希釈曲線は、IGN311との比較においてグラフ表示される。曲線はシグモイド4パラメーターフィットを用いて適合させた(適合度: $R^2 > 0.99$)。

10

【図4】IGN311およびIGN314のN-グリコシル化 それぞれのマススペクトルから推定されるグリカン構造の表を示す。抗体 IGN311 (親)および IGN314 (糖改変)の重鎖のSDS-ポリアクリルアミドゲルバンドから得たトリプシン消化されたペプチドをHPLCで分離し、エレクトロスプレーイオン化質量分析により分析した。グリカンの質量は、配列 TKPREEQYN²⁹STYR (1つの未使用トリプシン切断部位を有する)またはEEQYN²⁹STYRの糖ペプチドの検出された質量に関して計算した。グリカン構造はそれぞれの質量増加(mass increment)から推定される。GlcNAc = N-アセチルグルコサミン、Man = マンノース、Fuc = 1,6 結合フコース、および Gal = 1,4結合ガラクトース 残基。GlcNAc 残基は、2つのアンテナのいずれに結合していてもよい。Gal 残基は、2つのアンテナのいずれに結合していてもよい。Fuc 残基は近接した GlcNAc 残基に結合している。

20

【図5】ヒト IgG1-Fcの構造およびFcγRIII (CD16)との相互作用。パネル A: IgG 抗体の一般構造。マウス IgG2a 抗体はHarris et al 20 (Brookhaven Protein Databank code 1IGT)によって結晶化された。2つの重鎖は、それぞれ暗青色および明青色にて示す。2つの軽鎖は、それぞれ緑色および黄色にて示す。赤色にて、重鎖のAsn297 に結合した炭水化物部分を示す。パネル B: ヒト IgG1-FcとFcγRIII (CD16)との相互作用。複合体は結晶化されており、Brookhaven Protein Databank code: 1T89)において公表されている。ヒト Fc (CH1およびCH2からなる)のリボンモデルをそれぞれ明青色および紫色にて2つの重鎖成分とともに示す。細胞表面 (灰色ボックス)に結合した、CD16の細胞外領域を緑色にて示す。破線は、CD16がシグナル伝達能力のある分子またはGPI-結合(シグナル伝達能力のない)分子として存在することを示す。糖が操作された IGN311 変異体には存在しないフコース 残基の位置を囲んで示す(橙色)。

30

【図6】親抗体 IGN311 (灰色線) およびコケ由来の脱フコシル化変異体 IGN314 (黒色線)に媒介される、ヒト末梢血単核球による、ADCCに媒介される腫瘍細胞の溶解の比較: 異なる血清マトリックスにおける、抗体に媒介される細胞溶解 (ADCC)へのヒト血清の効果。サンプルは一定のマトリックス (それぞれ10% FCS または 40% NHS)においてRPMI 1640で希釈し、そして、ヒト末梢血単核球による、ADCC に媒介される SK-BR-3 腫瘍細胞の溶解は3回測定した。データはシグモイド4パラメーターフィットを用いて適合させた(適合度、すべての場合について $R^2 > 0.92$)。溶解能力は EC_{50} で評価した: 10% FCSにおいては、親の IGN311 野生型 および 糖改変 IGN314 についてそれぞれ 0.301 $\mu\text{g/ml}$ (95% CI: 0.169 - 0.537) および 0.052 $\mu\text{g/ml}$ (95% CI: 0.028 - 0.094)、そして 40% NHSにおいては、親 IGN311 および 糖改変 IGN314 についてそれぞれ 1.558 $\mu\text{g/ml}$ (95% CI: 0.989 - 2.457) および 0.126 $\mu\text{g/ml}$ (95% CI: 0.065 - 0.244)。

40

【図7】(A) IGN311、IGN314、および ヒトポリクローナルIgG の C-末端抗体ペプチド SLSLSPG の C18-クロマトグラフ。(B) IGN311のC-末端抗体ペプチド SLSLSPGK のC18-クロマトグラフ; IGN314 およびヒトポリクローナルIgGのサンプルにおいては、SLSLSPGK は検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0057】

発明の詳細な説明:

50

本明細書において使用される用語は、以下において別に定義しない限り、当該技術分野において一般的に使用されるものと同様である。

【0058】

抗体の語は、抗体またはその抗体誘導体または断片を含み、抗体についての説明は本発明の抗体調製物についても適用される。抗体断片には、免疫グロブリン結合ドメインまたはこの結合ドメインを模倣するペプチドを、Fc領域またはFc領域と相同な領域または少なくともその一部と共に含むあらゆるポリペプチドを含む、抗体と機能的に等価なものまたは抗体のホモログも含まれる。免疫グロブリン結合ドメイン、または等価なものを、別のポリペプチドに融合させて含むキメラ分子が含まれる。

【0059】

例示的な抗体分子はインタクトな免疫グロブリン分子および、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc および F(v)として知られる部分を含む抗原結合部位およびN-グリカン構造を含有する免疫グロブリン分子の部分である。

【0060】

驚くべきことに、本発明の一つの態様において、本発明による抗体が改善された薬物動態学を有し得ることが見出された。抗体分子上の末端のガラクトース残基の欠如は、網状内皮系(reticular endothelial system)の細胞（例えば肝臓におけるクッパー細胞）による該抗体分子の望ましくない取り込みを減少させることができ、肝細胞におけるアシアロ糖受容体を介した取り込みをも減少させることができる。これにより望ましくない副作用を少なくすること、および薬物動態学を改善させること、および抗体の半減期を増大させることができ、抗原（例えば Lewis Y、CD20、Ep-CAM、HER-2、Erb1 受容体、Erb2 受容体）を発現する標的細胞に対する循環抗体のより長い有効濃度およびより長いエフェクター機能がもたらされる。

【0061】

本明細書において用いる場合、本発明による抗体は、抗体を発現するよう改変が可能なあらゆる種類の細胞系を包含する宿主細胞において発現させることができる。本発明の範囲内では、“細胞”という語は個々の細胞、組織、器官、昆虫細胞、トリ細胞、爬虫類細胞、哺乳類細胞、ハイブリドーマ細胞、初代細胞、持続的な細胞株、幹細胞 および/または 遺伝子操作された細胞、例えば本発明によりグリコシル化された抗体を発現する組換え細胞、の培養物を意味する。

【0062】

本発明による抗体の組換え発現に使用される細胞系は、動物界のいずれの細胞、組織、生物、例えば遺伝子組み換えヤギ、CHO細胞、昆虫細胞、ヒト細胞株であってもよい。

【0063】

好ましくは、細胞は動物細胞であり、例えば BSC-1細胞、LLC-MK細胞、CV-1細胞、CHO細胞、COS細胞、マウス細胞、ヒト細胞、HeLa細胞、293細胞、VERO細胞、MDBK細胞、MDCK細胞、MDOK細胞、CRFK細胞、RAF細胞、TCMK細胞、LLC-PK細胞、PK15細胞、WI-38細胞、MR C-5細胞、T-FLY細胞、BHK細胞、SP2/0、NS0細胞、またはそれらの誘導体である。

【0064】

あるいは、細胞、組織、生物は、酵母、タバコ、イネ、アルファルファまたはトウモロコシのような菌界または植物界のものであってもよい。あるいはコケ類細胞も選択でき、例えば、ニセツリガネゴケ属、ヒョウタンゴケ (Funaria) 属、ミズゴケ属、ヤノウエノアカゴケ属、ゼニゴケ属およびダンゴゴケ (Sphaerocarpos) 属の種が挙げられる。例示的なコケ類細胞は WO 04/057002 で使用されているニセツリガネゴケである。

【0065】

あるいは、フコシルトランスフェラーゼが正常に機能しないもしくはコアフコシルトランスフェラーゼが存在しない、および/または キシロシルトランスフェラーゼが正常に機能しないもしくは存在しない、および/または 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼが正常に機能しないもしくは存在しない発現系が使用できる。

【0066】

あるいは、ガラクトース、フコース および/または キシロースは、これら残基を除去する酵素で処理することによって本発明による抗体から除去することができる。当該技術分野において公知の、ガラクトース、フコース および/または キシロース残基をN-グリカンから遊離させるあらゆる酵素が使用でき、例えば、アルファ-ガラクトシダーゼ、ベータ-キシロシダーゼ、アルファ-フコシダーゼが挙げられる。

【0067】

あるいは、1,3 フコシルトランスフェラーゼ および/または 1,2 キシロシルトランスフェラーゼ、および/または 1,4 ガラクトシルトランスフェラーゼの基質として使われ得ない、改変されたN-グリカンを作成する発現系が使用できる。

【0068】

あるいは、C-末端リシン残基の切断の原因となる塩基性カルボキシペプチダーゼを共発現する発現系を使用することができ、それにより切断効率が改善される。

【0069】

あるいは、C-末端リシン残基の切断の改善を達成するよう、最適な局在に標的化された塩基性カルボキシペプチダーゼを含む発現系が使用できる。

【0070】

あるいは、C-末端リシン残基の除去は、重鎖をコードする核酸においてC-末端リシンのコドンに欠いているベクターコンストラクトを使うことによって達成することができる。

【0071】

あるいは、C-末端リシン残基は、所望の塩基性カルボキシペプチダーゼ活性を持つ酵素を用いたインビトロプロセッシングによって除去することができる。

【0072】

本発明によると C-末端リシン残基の切断は、C-末端の望ましい切断に関して、細胞、組織または生物の生育条件を最適化することによって改善することができる。

【0073】

本明細書において使用される抗体依存性細胞傷害 (ADCC) の語は、抗体のFc領域が、エフェクター細胞、例えば、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性型のマクロファージ等の表面に存在するFc受容体に結合することを介してエフェクター細胞を活性化することによって腫瘍細胞等を傷害するあらゆる活性のことを言う。

【0074】

ADCC活性が上昇した抗体は、当業者に公知のあらゆる適切な方法によって判定できる。認められた一つのアッセイを実施例に記載する。

【0075】

上昇したADCCは標的細胞の最大半量の特異的に溶解するのに必要な抗体濃度を示す、EC50抗体濃度の低下として測定される、溶解能力の上昇によって測定することができる。

【0076】

補体依存性細胞傷害(CDC)の語は、補体の結合および活性化による直接的な細胞毒性として定義される。抗体は、例えば腫瘍細胞などの細胞表面にあるその標的に結合しており、“補体カスケード”としても知られる補体系を開始させ、その結果、文字通り細胞膜内に穴を空ける膜攻撃複合体が形成され、細胞溶解および細胞死が引き起こされる。

【0077】

CDC活性が低下した抗体は、当業者に公知のあらゆる適切な方法によって判定できる。認められた一つのアッセイを実施例に記載する。

【0078】

低下したCDC活性は、標的細胞の最大半量を溶解可能なEC50抗体濃度の上昇として定義できる。本発明による抗体のCDC活性は10%まで、あるいは20 %まで、あるいは30%まで低下させることができる。別の態様においてCDC活性は改変されない。

【0079】

本発明の抗体の標的抗原、例えば Lewis Y 抗原、CD20、Ep-CAM または Her-2 に対す

10

20

30

40

50

る結合活性は、親抗体と比較して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 100% である。

【0080】

一つの可能な治療目標は、腫瘍細胞、すなわち腫瘍組織または転移または特に、播種性の腫瘍細胞の効率的な結合および減少である。それぞれ血液、骨髄または器官で検出される腫瘍細胞、または微小転移の数は、有意に減少するであろう。転移の形成は遅くなり、少なくともその増殖速度は低下する。こうして、特異的に標的化された免疫療法によって再発のない寿命および患者の全寿命を延ばすことができる。

【0081】

本発明による使用の範囲内において、特に癌患者、また血液透析においてそれぞれ腫瘍細胞の増殖を低減または阻害する治療が可能である。

10

【0082】

本発明によると、医薬担体または希釈剤中に本発明による抗体を含有する医薬調製物が包含される。調製物は、予防および/または治療処置のため、患者における腫瘍細胞の増殖をそれぞれ低減または阻害する薬剤の調製に用いることができる。腫瘍細胞増殖の低減の程度は、同じ抗原に対して特異的な非改変抗体の使用と比較して少なくとも 5% 上昇し得る。

【0083】

本発明による抗体を含有する調製物は、固形癌、好ましくは上皮起源または微小残存病変の治療のための薬剤を製造するのにも有用である。

20

【0084】

本発明の抗体は受動免疫療法に使用できる。

【0085】

また、対象、好ましくはヒトのサンプルを提供することおよびサンプルにおける抗原への抗体の結合現象を検出することを含むスクリーニング方法（好ましくはインビトロの）のための、本発明の抗体またはその調製物の使用が提供される。同様に、対象（例えばヒト）のサンプルを提供すること、サンプルを抗体と接触させること、および結合現象を検出することを含むスクリーニング方法が提供される。この方法により、本発明の抗体で処置可能な対象を同定することができる。また、特定の疾患または対象の処置のために最適な抗体/調製物を同定することができる。また、（疾患に罹患している可能性がある）対象のサンプルを提供すること、疾患に特有の抗原に特異的な本発明の抗体とサンプルとを接触させること、サンプルにおける抗体と抗原の結合現象を検出すること、および、結合現象が検出された場合には疾患を診断することを含む、特定の疾患を診断する方法が提供される。

30

【0086】

腫瘍細胞の、特定された全ての受容体（改変抗体/調製物の抗原）との結合のためには通常、患者あたり少なくとも 1 mg/用量、好ましくは少なくとも 10 mg/用量、もっとも好ましくは少なくとも 50 mg/用量の用量が投与される。最大用量はそれぞれ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体の耐容性に依存し、ヒト抗体が最も耐容性が高い。患者および処置あたり 1 gまで、または場合によっては 2 gまでの用量が非常に有益になり得る。

40

【0087】

驚くべきことに、本発明においてはADCC活性が上昇するため、治療および/または予防の目的で適用される抗体の量を減らすことができ、減らされた用量においてさえ依然として正の治療効果を導くことが示された。ADCC エフェクター機能の上昇によって、適用する抗体の量は、親抗体の用法・用量と比較して少なくとも 10%、好ましくは少なくとも 20%、より好ましくは少なくとも 30%、さらにより好ましくは少なくとも 40%、もっとも好ましくは少なくとも 50% 減らすことができる。

【0088】

処置は、使用される抗体の半減期に応じて一定の間隔をおいて繰り返すのが好ましく、その間隔は通常、3日から30日までの範囲である。特に抗体を誘導体化することによって

50

半減期を数ヶ月まで増大させ、その結果処置の間隔を延ばすことが可能である。

【0089】

本発明によって使用される薬剤は、好ましくは適切な剤形で提供される。好ましいのは医薬上許容される担体を有する剤形である。後者は例えば、補助剤、緩衝剤、塩および保存料などを含む。好ましくは、使用準備済みの注入溶液が提供される。抗体は比較的安定なため、抗体またはその誘導体に基づく薬剤は貯蔵安定性の溶液として、または使用準備済みの剤形として市場に置くことができるという、かなりの利点がある。前者は、冷蔵庫の温度から室温までの温度で貯蔵安定性の剤形であることが好ましい。しかし、本発明によって使用される薬剤は、必要なときに解凍または再構成することができる冷凍または凍結乾燥の形態で提供されても良い。

10

【0090】

薬剤の有効成分濃度は、その耐容性に依存する。ヒト化抗体に基づいた、特に耐容性の高い調製物は、さらなる希釈をせずに高濃度で患者に直接投与し得る。好ましい濃度である 0.1% から 10% まで、好ましくは 1% から 5% までの範囲では、投与体積およびそれに対応する注入時間を低く抑えることができる。

【0091】

通常、薬剤は静脈内投与される。しかし同様に、腫瘍または転移のある部位において有効成分を全身または局所的に適用する他の非経口または粘膜投与様式も選択できる。

【実施例】

【0092】

以下の実施例は本発明をより詳細に説明するものであるが、本発明を制限するものではない。

20

【0093】

実施例 1

材料および方法

哺乳類細胞株およびコケ産生株

腫瘍細胞株 TF-1 (Kitamura, T. et al., J Cell Physiol 140, 323-334 (1989)), Ovar-3 (Hamilton, T.C. et al., Cancer Res 43, 5379-5389 (1983)), SK-BR-3 (Trempe, G.L., Recent Results Cancer Res 57, 33-41 (1976)) は、American Type Culture Collection (Manassas, CA) から購入した。標的抗原密度 (Lewis Y) は、1 ng/ml から 100 μ g/ml まで段階希釈した、Lewis Y に特異的なヒト化抗体 IGN311 を用いた FACS 分析によって測定した。さらなる分析のために、10 μ g/ml で測定した平均蛍光強度 (MFI) 値を記録した。

30

【0094】

Koprivova, A. et al. (Plant Biotechnol J 2, 517-523 (2004)) に従って、ニセツリガネゴケ (Hedw.) B.S.G. の Δ xyl-t/ Δ fuc-t ダブルノックアウト系統を使用した。コケのプロトプラストを生成するため、選択された Δ xyl-t/ Δ fuc-t ダブルノックアウト系統を以前に記載されているように (Hohe, A. & Reski, R., Plant Sci 163, 69-74 (2002)) フォトバイオリアクター (photobioreactors) 内で培養した。

【0095】

組換え抗体の産生

臨床グレードの IGN311 対照抗体は、FCS を含有する中空繊維産生プロセスおよびプロテインA 捕獲工程を含む古典的な下流のプロセスを用いて、SP 2.0 細胞で発現させた。

40

【0096】

Δ xyl-t/ Δ fuc-t ダブルノックアウトコケで発現させた、糖が操作された IGN311 変異体を IGN314 と称することとした。IGN311 重鎖および軽鎖のコード領域 - それぞれのシグナルペプチドを除いて - を PCR で増幅し (pfu ポリメラーゼ)、植物のシグナルペプチドを使用することで対応する遺伝子産物を分泌するよう設計されたコケ発現ベクター p127 に平滑末端クローニングした (Gorr, G. & Jost, W., Bioprocessing J 4, 26-30 (2005)); Weise et al. Appl Microbiol Biotechnol 70, 337-345)。その結果得られたコンスト

50

ラクト（それぞれ p127-IGN-HC および p127-IGN-LC）を、制限酵素消化およびシーケンシングによって確認した。コケプロトプラストの形質転換は、Jost et al. Curr Genet 47、111-120（2005）で以前に記載されているように2つのコンストラクトを各々 45 μ gずつ同時に使用し、かつ、以下の改変を加えて行った：3倍の数のプロトプラストおよび6倍の量の PEG-溶液（プロトプラスト/DNA 混合物に添加され、その後 12 分間インキュベーションされる）を標準培地（3M; 480mOsm; Jost、W. et al. Curr Genet 47、111-120（2005））と共に使用した。標準培地におけるIgGの力価は比較的低いことが判明したため、大量に産生させる目的で、最適化した培地条件下で（標準培地とW5培地の 1:1 の混合物、Baur、A. et al.、J Biotechnol 119、332-342（2005））8つの異なる日に全部で167の形質転換を行った。全ての培地に 0.01 %（w/v）BSAを補充した。形質転換の手順の後、細胞を 400 μ l の培地中に維持し、その後 300 μ l の培養上清を毎週、新鮮である以外は同一の培地と交換した。偽形質転換は（無精製および同時精製の）ネガティブコントロールの役割を果たした。毎週、1日に行った全ての形質転換の上清をプールし、平衡化した 1 ml の HiTrap プロテインA カラム（Amersham）に直接ロードして精製した。粗培養上清および精製抗体を、抗-イディオタイプサンドウィッチELISA および銀染色のSDS-PAGEで分析した。

10

【0097】

安定に形質転換された植物を生成するため、以前に記載されたように（Jost et al. Curr Genet 47、111-120（2005））PEG-媒介 直接 DNA-導入を行った。DNA を、p127-IGN-HC および p127-IGN-LC を 制限酵素 XhoI、HindIII および ScaI で消化することにより調製した。XhoI / HindIII 消化に関するDNAのバンド - 発現促進配列、植物のシグナルペプチドおよび終結シグナルに融合した、軽鎖または重鎖のコード配列を含む - を、ゲル電気泳動で分離し、切り出してゲル-マトリックスから溶出させた。プロトプラストを Δ xyl-t/ Δ fuc-t ダブルノックアウト系統から単離し、線状化し溶出したDNAコンストラクト各々 5 μ gで共形質転換した。形質転換手順およびその後の希釈および洗浄工程の後、プロトプラストを再分化培地（6% グルコース および 3.6% マンニットを含有する Knop 培地、pH 5.6、 $\sim$ 580 mOsm）中で 5 μ mol m-2s-1 で一晩インキュベートし、その後 40-50 μ mol m-2s-1 で 7-10 日間、明条件のインキュベーションを行った。

20

【0098】

抗体産生のため、両方のコンストラクトを含有し、アセンブリーされた IGN 314 を産生する形質転換系統を抗-イディオタイプサンドウィッチ ELISAを使ったスクリーニングによって単離した。単離された形質転換系統を Knop 培地中でさらに培養した。

30

【0099】

N-結合型オリゴ糖プロファイルの決定

サンプルである IGN311 および IGN314 の重鎖を、Kolarich、D. & Altmann、Anal Biochem 285、64-75（2000）で記載されたように、還元性 SDS-PAGEによって単離した。前掲の Kolarich、D. により記載されたように、クーマシー染色したバンドを切り出し、脱染し、カルバミドメチル化し、トリプシンで消化した後、ゲル断片から抽出した。抽出物を Speed Vac 濃縮器で乾燥させ、0.1 % ギ酸を含有する水で再構成した。質量分析を、標準的なエレクトロスプレーユニット、Cap-LC システム（Waters Micromass）および 10-ポートの溶媒切替えモジュール（Rheodyne）を備えた Q-TOF Ultima Global（Waters Micromass）で行った。サンプルを最初、溶媒として水を使用して Aquasil C18 プレカラム（30 x 0.32 mm、Thermo Electron）で捕獲した。分析用カラムは、溶媒切替え前は 5 % アセトニトリルで保持し、その後 2 μ l/分 の流速で、5 から 50 % までのアセトニトリルの直線的勾配を適用した。全ての溶出液は 0.1 % ギ酸を含有していた。TOF 分析装置のマス・チューニング（Mass tuning）を [Glu1]-フィブリノペプチド B を使用してタンデム MS モードで行った。サンプルを MS モードで分析した。MSモードおよびタンデムMSモード間の切替えを行わなかったため、特に糖ペプチドの分析に関してはシグナルの損失が起こらなかった。データ分析を MassLynx 4.0 SP4 ソフトウェア（Waters Micromass）で行った。

40

50

【0100】

分析方法

精製された発現産物の完全性、分子量および生じうる分解産物を、Novex 電気泳動システム (Invitrogen)を用いて、製造者の説明書に従って NuPAGE 4-12% ビス-トリス ゲルで SDS-PAGE を行うことにより分析した。ゲルは銀染色した (SilverQuest; Invitrogen)。純度、完全性および生じうる分解に関して抗体を分析するために、サイズ排除 HPLCを行った。Dionex HPLC システムで ZORBAX G-250 (Agilent-technologies) カラムを用いてサンプルを分析した。生じうる凝集体を崩壊させるためおよび生じうる沈殿を阻害するため、ランニングバッファーとして 10% アセトニトリル (CH_3CN)を含む 220 mM NaH_2PO_4 (pH=7.0) を使用した (流速 1 ml/分)。溶出液を 214 nm および 280 nm の波長で、オンラインでモニターした。ポリクローナルヒト IgG (Pentaglobin (登録商標)、Biotest)で標準化し、ピークを積分して産物濃度を算出した。

10

【0101】

市販の LAL 検出キット (Charles River Laboratories)を用い、製造者の説明書に従ってエンドトキシン濃度を測定した。

【0102】

フローサイトメトリーのデータを FACS-CALIBUR 装置(Becton Dickinson)で収集した。調査された細胞株において、ヒト Lewis-Y に特異的な抗体 IGN311 を用い、100 $\mu\text{g/ml}$ から 1.6 ng/mlまでの範囲の濃度で抗原の発現を定量した。評価は 10 mg/mlで行った。

【0103】

結合特異性の判定

特異的なサンドウィッチ ELISA において、モノクローナル 抗-イディオタイプ 抗体 M MA383 (Perkins, M. et al., Pharm Res 17, 1110-1117 (2000))でコートされたマイクロタイターウェル内で、段階希釈 (100 pg から 1 $\mu\text{g/ml}$ まで)された抗体サンプルをインキュベートすることにより発現産物の結合活性を分析した。5% FCSでのブロッキングおよび洗浄の後、ヒト IgG、IgM および IgA (Zymed, CA)に特異的なヤギ-免疫グロブリン-ペルオキシダーゼ接合体と反応させて o-フェニレンジアミン/過酸化水素 で染色することにより、結合した発現産物を測定した。吸光度 (492nm) を抗体濃度 (ng/ml) の対数に対してプロットし、GraphPad Prism 4 ソフトウェア を使用してシグモイド 4 パラメーターフィットにより適合させた。EC50 値を算出し、定量的ために使用した。

20

30

【0104】

補体依存性細胞傷害 (CDC)の判定

補体に媒介される細胞溶解活性を、標的として Lewis Y-陽性 SK-BR-3 乳癌細胞株を用いた ^{51}Cr -放出アッセイで 3 回試験した。標的細胞を 100 μCi の ^{51}Cr と共に 1 時間インキュベートし、培地で 2 回洗浄した後、分析予定のサンプルの段階希釈 (72 ng から 75 $\mu\text{g/ml}$) およびボランティアドナーの補体が活性化した血清とともにウェルあたり 20 x 10³ 細胞の密度で 96-ウェル マイクロプレートに播種した。プレートを CO_2 -インキュベーター内で 37°C で 1 時間インキュベートした。上清を収集し、放出された ^{51}Cr (“Cs”) を計数した。代表的なサンプルを培地のみおよび洗浄剤 (SDS) と共にそれぞれインキュベーションした後、自発的な放出 (“Sr”) および 最大放出 (“Mr”) の値を測定した。補体に媒介される細胞毒性を、100 x (Cs-Sr) / (Mr-Sr) の式によって細胞溶解の百分率として算出し、抗体濃度 (ng/ml) の対数に対してプロットし、GraphPad Prism 4 ソフトウェア を使用してシグモイド 4 パラメーターフィットにより適合させた。EC50 値を算出し、定量的ために使用した。負の溶解データを示したサンプルは 0 % に設定した。

40

【0105】

抗体依存性細胞傷害 (ADCC)の判定

ADCC を、標的細胞として様々な Lewis Y-陽性 癌細胞株(SK-BR-3、TF-1、Kato-III および Ovarc 3)を用いた ^{51}Cr 放出アッセイで 3 回試験した。標的細胞を 100 μCi の ^{51}Cr と共に 1 時間インキュベートし、洗浄し、ウェルあたり 25 x 10³ 細胞 の密度で 96-ウェル マイクロプレートに播種した。エフェクター細胞 (健康なボランティアドナーから

50

の末梢血単核球)を新鮮に調製し、分析予定の抗体サンプルの段階希釈(100 pg から 10 μ g/ml)とともに、E:T(エフェクター細胞:標的細胞)が 40:1 の比になるように標的細胞に添加した。CO₂-インキュベーター内で37℃で16時間インキュベーションした後、細胞上清を収集し、放出された ⁵¹Cr (“Cs”)を計数した。代表的なサンプルを培地のみおよび洗浄剤(SDS)と共にそれぞれインキュベーションした後、自発的な放出 (“Sr”)および最大放出 (“Mr”)の値を測定した。細胞毒性を $100 \times (\text{Cs}-\text{Sr}) / (\text{Mr}-\text{Sr})$ の式によって、細胞溶解の百分率として算出した。細胞毒性の百分率を抗体濃度 (ng/ml)の対数に対してプロットし、GraphPad Prism 4 ソフトウェア を使用してシグモイド4パラメーターフィットにより適合させた。EC50 値を算出し、定量のために使用した。

【0106】

末梢血単核球ドナーの CD16 遺伝子型同定

CD16 (Fc γ RIIIa)-158_{V/F} 遺伝子多型を、Koene、H.R. et al.、Blood 90、1109-1114 (1997)によって記載された方法からわずかに改変された PCR に基づくアレル特異的な制限分析アッセイによって分析した。

【0107】

結果: IGN314 の発現および特徴決定

コケ Δ xyl-t/ Δ fuc-t プロトプラストを、重鎖および軽鎖を発現するコンストラクト(p127-IGN-HC、p127-IGN-LC)で一過性に形質転換し、培養上清のプールにおける IgG1 力価を抗-イディオタイプサンドウィッチ酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって毎週評価した。標準的な培養条件の下では、IgG1 力価は比較的低い(0.1-0.5 μ g/ml)ことが判明した。しかし、最適化された培地条件下では IGN314 の分泌は3ヶ月以上の間、有意に増加した。その結果全体として、5 週間のサンプル回収の後すでに得られていた2.0 mgと合わせて、14 週の間全部で 167の 形質転換の実施によって 3.8 mg の IGN314 が得られた(全体平均: 6.1 μ g/ml)。銀染色した粗培養上清のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲルには - コケの培養においては一般的に混入タンパク質によるバックグラウンドが低いうえ - タンパク分解によりプロセッシングされたかもしくは正常に機能しない重鎖または軽鎖またはより小さな抗体断片に相当する追加のバンドは全く見られず、高い割合での完全な IgG1 のアセンブリーが証明された。培養上清をプールし、プロテイン-A による精製を行った後、その抗原への結合特異性を試験するため、精製された IGN314 を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、サイズ排除高速液体クロマトグラフィー (HPLC)および抗-イディオタイプサンドウィッチ ELISA により分析した。結果を図 3 に示し、IgG1 アセンブリー、純度および標的抗原に対する親和性に関してIGN314 の完全性が証明された。さらに重鎖および軽鎖のペプチドマッピングを行い、どちらの場合においても植物のシグナルペプチドが正確に切断され、IGN311 および IGN314 のアミノ酸一次配列が同一である - 両方の重鎖におけるC-末端リシンの除去を含む - ことを確認した。

【0108】

液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)により、それぞれ IGN311 および IGN314 重鎖の異なる N-グリコシル化パターンが明らかになった(図4)。もっとも注目すべきことに、サンプルはコアフコシル化、末端のガラクトシル化の量および全体のグリコシル化の程度に関して異なっていた。IGN311 は哺乳類宿主細胞において発現させた IgG 分子に期待される通り、ほぼ完全にフコシル化され、相当な度合いの末端ガラクトシル化を含有していた。本研究で使用した、糖が操作されたコケ系統によって産生された IGN314 の場合、ガラクトースまたはフコースを含有するグリカン構造は全く検出されず、微量の IGN314 N-グリカンはマンノースで終結していた。IGN311 が完全にグリコシル化されていたのとは対照的に、IGN314 はかなりの量のグリコシル化されていない重鎖も含有していた。2つのサンプルのどちらもキシロース残基は含有していなかった。

【0109】

エフェクター機能

糖が操作された IGN314 の溶解能力を IGN311 の溶解能力と比較し、癌免疫療法におい

10

20

30

40

50

て起こり得る生物学的多様性の側面を包含させることを試みた。この多様性は標的およびエフェクター細胞の両方に関係する。個々の腫瘍標的細胞に発現する標的抗原密度は異なり、患者は 158 番目のアミノ酸に影響を及ぼす遺伝的多型 (CD16_{158V/F}) に起因して、ナチュラルキラー (NK) エフェクター細胞上に発現する CD16 受容体のアレルの違いに関連した IgG 親和性の変動を示すからである。それ故、一方で膜性の Lewis Y 抗原を異なる密度で発現する 3 つの異なる腫瘍細胞株 (Ovcar-3、SK-BR-3 および TF-1) を分析した。ADCC 実験に先立ち、蛍光補助細胞分取 (FACS) を用いてこれら標的細胞株を Lewis Y 密度について分析した。Ovcar-3 が最も高い抗原密度を示し、SK-BR-3 および TF-1 がそれに次いだ (平均蛍光強度の値は 表 1 を参照)。他方では、規定されたエフェクター細胞の調製物を使用するため、末梢血単核球細胞 (PBMC) ドナーの CD16₁₅₈ 多型を分析したところ、約 50% (10 人のうち 5 人) が高親和性 CD16_{158V/V} 表現型を示すことが判明した (示さず)。両方の表現型すなわち 158_{V/V} および 158_{F/F} のドナーの末梢血単核球の調製物を、全ての ADCC アッセイのために調製した。測定に先立ち、全てのサンプルにおいてエンドトキシンが存在しないことを確認した。同時に精製された偽形質転換の培養上清も調査したところ、バックグラウンドと異なるいかなる溶解活性も示さなかった。ADCC 実験の結果 (算出された 50% 有効濃度 (EC50) 値) を 表 1 に要約する。IGN314 について測定された EC50 値は、IGN311 の EC50 値と比較して有意に低かった。これは IGN314 が、親抗体 IGN311 と比較して 7 から 40 倍増強された、細胞傷害に媒介される溶解能力を有することを意味する。さらに、両方の抗体について、標的細胞上の Lewis Y 密度と EC50 濃度との間に逆相関が認められた。Lewis Y 標的抗原密度の低い細胞株 (TF-1) と比較すると、標的抗原密度が上昇している細胞株 (Ovcar-3) は、同じ溶解を誘導するためにかなり低い抗体濃度しか要求しなかった。抗原密度が中程度の細胞株 (SK-BR-3) について測定された EC50 値は、予想通り、高抗原密度および低抗原密度の細胞株について算出された値の間に分布した。

【0110】

CD16 の表現型レベルにおいて、高親和性受容体のドナー (158_{V/V}) から調製されたエフェクター細胞は、IgG に対する親和性が低いと報告されている 158_{F/F} ドナー (Shield s, R.L. et al. J Biol Chem 277, 26733-26740 (2002); Niwa, R. et al. Clin Cancer Res 10, 6248-6255 (2004)) から得られた細胞よりも高い溶解活性を示した。Ovcar-3 標的細胞について、CD16_{158V/V} ドナー由来の末梢血単核球を用いた溶解実験で両方の抗体について算出された EC50 値は、CD16_{158F/F} ドナー由来の末梢血単核球を用いて同一の設定で得られた値よりも 3 倍低かった。要約すれば、IGN311 と比較すると最大でも 40 倍低減した IGN314 濃度で同じ ADCC 溶解効果 (EC50) が導かれ (Ovcar-3、表 1 で比較)、この低減はエフェクター細胞の CD16 表現型 (158_{V/V} または 158_{F/F}) とは独立である。

【0111】

【表 1】

標的細胞株	Le Y 密度 (MFI)	エフェクター 細胞 CD16 ₁₅₈ 表現型	EC50 IGN311 (μ g ml ⁻¹)	EC50 IGN314 (μ g ml ⁻¹)	増強
OVCAR-3	435	V/V	0.315 $\pm$ 0.2	0.008 $\pm$ 0.005	39
OVCAR-3	435	F/F	0.993 $\pm$ 0.3	0.025 $\pm$ 0.01	40
SK-BR-3	213	V/V	1.040 $\pm$ 0.1	0.144 $\pm$ 0.02	7
TF-1	109	V/V	5.318 $\pm$ 3.2	0.366 $\pm$ 0.06	15

表 1: Lewis Y 標的密度の異なる細胞株についての、両方の CD16₁₅₈ 表現型のエフェクター細胞 (NK) を用いた IGN311 および IGN314 の溶解能力の比較 (MFI: 平均蛍光強度; EC50: 50% 有効濃度)。

【0112】

SK-BR-3 標的細胞を用いた溶解実験の第 2 のセットにおいて、IGN314 の補体を活性化
する溶解能力(CDC)を、IGN311 および 脱グリコシル化された IGN311 のものと比較した。
IGN311 が期待された溶解曲線($19.6 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ における EC50 値)を示した一方、
IGN314 の補体に媒介される溶解活性は、最大の値および EC50 濃度を考慮すれば、劇的
に低下した。脱グリコシル化された IGN311 はいずれの溶解活性も全く示さなかった。

【0113】

血清の影響

過剰な内在性免疫グロブリンGによる抗体依存性細胞傷害の障害を補うため、天然血清
において高濃度の治療用 IgG1 抗体 が必要とされている。正常血清の IgG レベルは、NK
細胞上に存在する低親和性 IgG 受容体 (CD16) に対する、治療用 IgG1 抗体の結合を阻
止している。CD64 と合わせて、これら 2 つの Fc γ 受容体が、ADCC を媒介する主な細胞
受容体である。

【0114】

血清 IgG による障害作用を克服する一つの可能性は、多量の治療抗体を適用すること
である。しかしこの方法はコストが高く、正常組織との交差反応性の増強、補体活性化の
増強、深刻な初回投与副作用、ヒト 抗-ヒト抗体 (HAHA) 反応の誘導または免疫複合体の
生成によって引き起こされる、用量依存性の副作用を伴う可能性がある。別の方法は Fc
 γ 受容体に対する親和性を改善するよう操作された治療抗体を使用することである。Fc
 γ R に対する抗体の結合には、抗体重鎖の CH2-領域内の保存された Asn297 残基に共有
結合で繋がったオリゴ糖の存在が必須である (図 5、パネル A)。そして、炭水化物の構
造が、結合を促進する立体構造を安定化することが示唆された。図 5、パネル B に示さ
れるように、Asn297 は受容体結合部位の隣に位置している；しかし、炭水化物部分は接
触面から離れた方向を向いており、受容体と特異的な接触をしないことが示された。

【0115】

糖を改変する方法に関して、典型的な複合型コアフコシル化からこのコアフコシル化を
欠いた構造へとグリコシル化を変化させることによって、抗体の ADCC 活性を増強するこ
とができる。グリコシル化装置に影響を及ぼす遺伝子の共形質移入、特定のグリコシル化
酵素を欠いた産生用宿主での発現、またはそれぞれの酵素の発現を変化させることによ
って、そのような脱フコシル化抗体を生成することができる。

【0116】

これまでに、コアフコース残基を欠く、Lewis-Y に特異的なヒト化抗体 IGN311 の糖が
操作された変異体は、Lewis-Y 陽性の SK-BR-5 腫瘍細胞に対して、特有のコアフコシル
化 N-結合型オリゴ糖パターンを担持する野生型抗体(W02004/062556)と比較して 29-倍
上昇した ADCC 反応性 を示すことが明らかにされた。IGN312 と称される脱フコシル化さ
れた IGN311 を、ヒト胎児腎臓-EBV 核抗原細胞にアセチル-グリコサミニルトランスフェ
ラーゼ-III 遺伝子 および IGN311 の重鎖および軽鎖を一過性に共形質移入して、抗体を
産生する宿主のグリコシル化機構を遺伝子操作することによって生成した。本発明によれ
ば、糖が最適化された別の植物発現系、即ち β 1,2-キシロシルトランスフェラーゼ およ
び α 1,3-フコシルトランスフェラーゼノックアウトのコケであるニセツリガネゴケにお
いて IGN311 の重鎖および軽鎖の遺伝子を発現させることによって、ADCC 活性が 40-倍ま
で上昇することが示された。要約すれば、両方の方法 - フコシル欠損の哺乳類および植
物発現系 - を駆使することで、治療上必要な用量を最小化することが可能な治療用ヒト
化モノクローナル抗体 IGN314 の ADCC 作用強度が有意に上昇することが実証された。糖
が操作された抗体の ADCC 活性の改善は、少なくとも部分的には、エフェクター細胞すな
わち ADCC 活性の主役であり治療抗体とともに見られる NK 細胞上の Fc γ -RIII 受容体
に対する Fc 部分の結合が増大することに起因している。

【0117】

エフェクター細胞上の Fc γ -RIII 受容体に対する結合に関して、脱フコシル化 IGN314
に媒介される親和性の増大は、内在性 IgG と比較して熱力学的に有利な挙動によって説
明できる。ヒト正常血清 (NHS) が、それぞれ IGN311 および 脱フコシル化 IGN314 の A

10

20

30

40

50

DCC 遂行能力に影響を及ぼすか否かを調査した。まず、10% または 40% の正常ヒト血清 (NHS) で希釈された IGN311 は 10% ウシ胎児血清 (FCS) で希釈されたものよりも有意に低い ADCC 活性を示した。これは NHS が IGN311 のエフェクター機能を有意に低下させることを示す (図 6、灰色線)。対照的に、脱フコシル化変異体は NHS による影響を受けず (図 6、黒色線)、それに加えて FCS および NHS 両方において、野生型 IGN311 と比較して有利な EC_{50} 値を示した。さらにこのデータは、治療抗体の糖の操作が、インビボで内在性 IgG に媒介される抗体依存性細胞傷害の阻害を補い得るということを示す。

【0118】

溶解能力は EC_{50} で評価した: 10% FCS においては、親の IGN311 野生型 および 糖改変 IGN314 がそれぞれ $0.301 \mu\text{g/ml}$ (95% CI: $0.169 - 0.537$) および $0.052 \mu\text{g/ml}$ (95% CI: $0.028 - 0.094$) であり、40% NHS においては、親の IGN311 および 糖改変 IGN314 がそれぞれ $1.558 \mu\text{g/ml}$ (95% CI: $0.989 - 2.457$) および $0.126 \mu\text{g/ml}$ (95% CI: $0.065 - 0.244$) であった。 EC_{50} 値は GraphPad Prism ソフトウェアを使用して算出した。

【0119】

さらに、古典的な抗体に基づいた治療の限界は、エフェクター細胞上の $\text{Fc}\gamma\text{-RIII}$ 受容体の機能的な多型性である。ヒト集団においてより低い頻度で存在する $\text{Fc}\gamma\text{RIII-158}_V$ アイソフォームが、天然および糖が操作された抗体の両方に対し高親和性を示す一方、優勢なアイソフォームである $\text{Fc}\gamma\text{RIII-158}_F$ は、糖が操作された抗体に対してのみ高親和性を示す。それゆえ糖の操作は、ヒト血清における溶解エフェクター機能の上昇に基づき、受動抗体免疫療法に対する臨床の反応者の数を劇的に増加させる。同時にこれらのデータは、治療抗体の糖の改変がヒトにおける優れた ADCC 活性につながると期待されることを強く示唆する。

【0120】

C-末端リシン

血清由来の、および組換えにより産生された IgG1 分子は、その C-末端 Lys-残基の出現に関して微少な不均一性を示す。保存された C-末端 Lys-残基の (部分的な) 切断は、細胞内において塩基性カルボキシペプチダーゼの作用によって触媒される翻訳後の現象である (Lazar et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry (18)、3、239 - 244、2004)。

【0121】

2つの C-末端トリプシンペプチド変異体 (“SLSLSPGK” および “SLSLSPG-”) についてのヒトポリクローナル IgG の分析は、プロセシングされた変異体 (“SLSLSPG-”) のみがサンプル中に存在することを示す。同様に、rAb IGN314 (コケ細胞で発現させた) のサンプル中には Lys-欠損変異体が独占的に存在することが見出された。これらの結果とは対照的に、IGN311 のサンプル中には両方のペプチド変異体が検出された (図 7)。

【 図 1 】

Fig. 1:

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSNNTYLEW
 YLQKPGQSPQ LLISKVSNRF SGVPDRFSGS GSGDTFLKI
 SRVEAEDVGV YYCFQGSHVP FTFQGQTKLEIK

【 図 2 】

Fig. 2:

配列 1:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYMYWWRQA
 PEKRLWAY ISNGGGSSHY VDSVKGRFTI SRDNSKNTLY
 LQMNSLRAED TALYHCARGM DYGAWFAYWG QGTLVTVSS

配列 2:

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYMYWWRQA
 PEKRLWAY ISNGGGSSHY VDSVKGRFTI SRDNAKNTLY
 LQMNSLRAED TALYHCARGM DYGAWFAYWG QGTLVTVSS

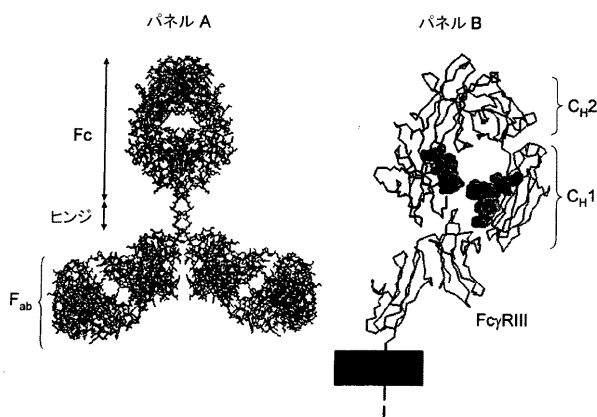
【 図 4 】

Fig. 4

IGN311	IGN314
GlcNAc,Man,GlcNAc,Fuc	GlcNAc,Man,
GlcNAc,Man,GlcNAc,Fuc	GlcNAc,Man,GlcNAc
GlcNAc,Man,GlcNAc,Fuc,Gal	GlcNAc,Man,GlcNAc
GlcNAc,Man,GlcNAc,Fuc,Gal	

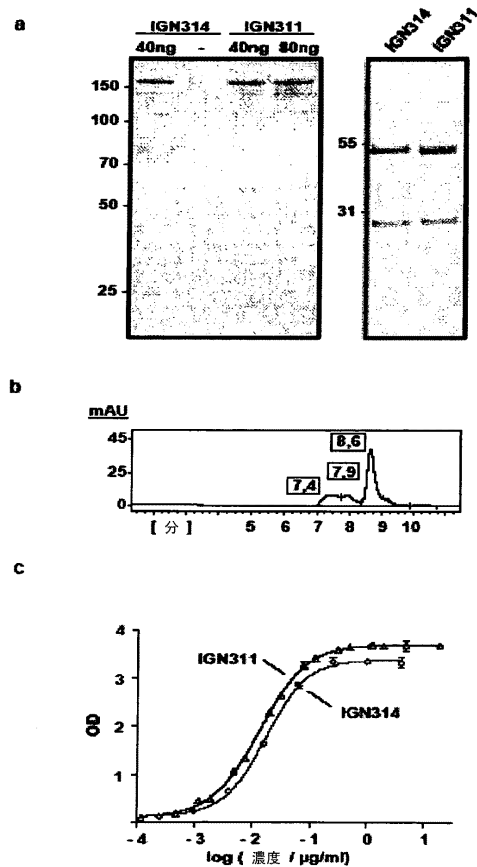
【 図 5 】

Fig. 5



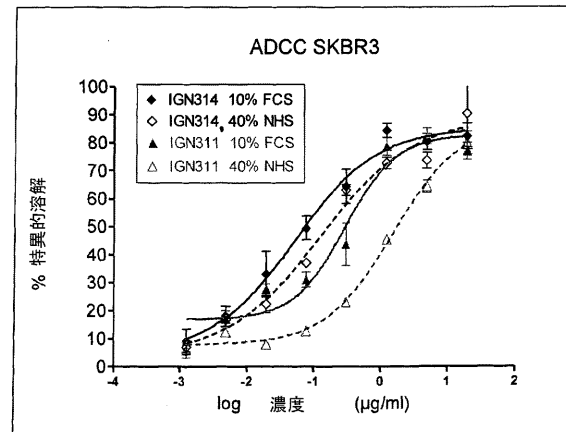
【 図 3 】

Fig. 3



【 図 6 】

Fig. 6



【図 7 A】

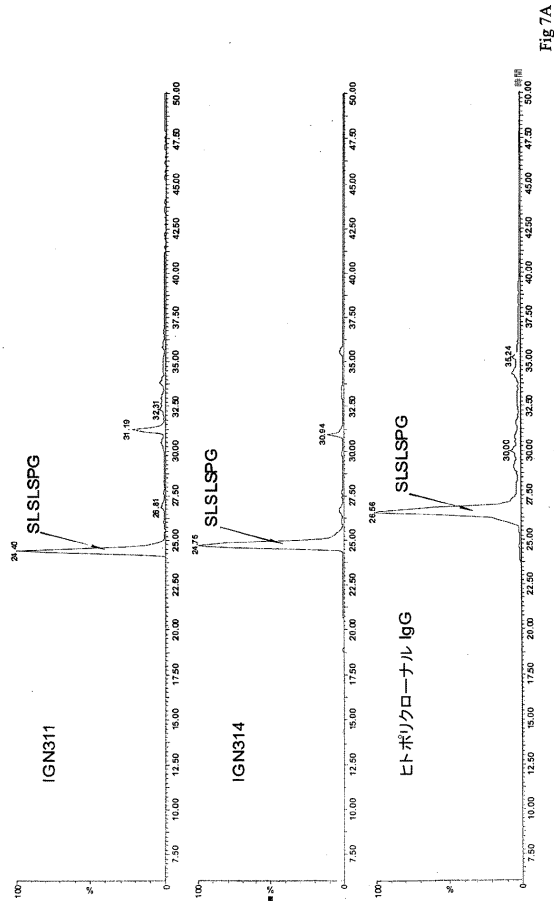


Fig 7A

【図 7 B】

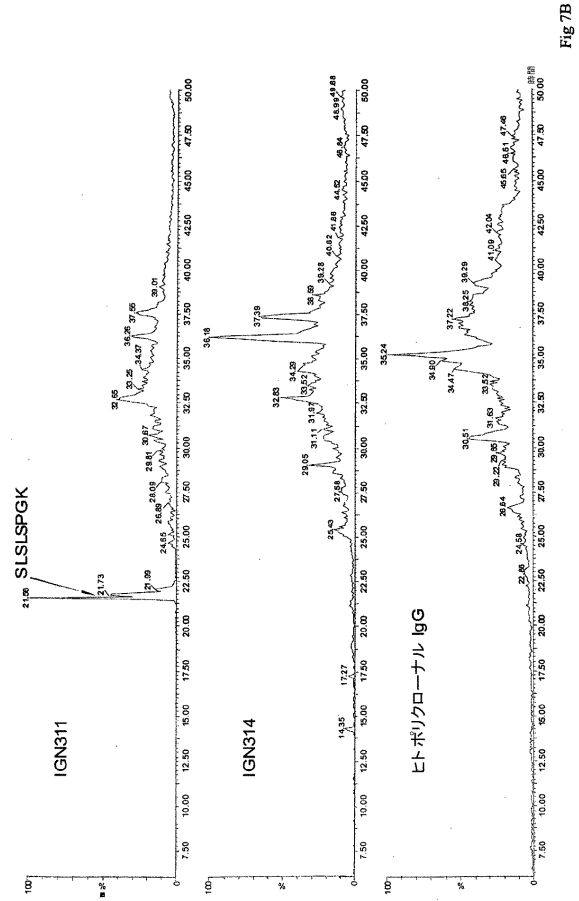


Fig 7B

【配列表】

[2009542750000001.xml](#)

【手続補正書】

【提出日】平成21年3月13日(2009.3.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[2009542750000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/006123

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/28 C07K16/00 G01N33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SRIRAMAN RAJAN ET AL: "RECOMBINANT ANTI-HCG ANTIBODIES RETAINED IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM OF TRANSFORMED PLANTS LACK CORE-XYLOSE AND CORE-ALPHA(1,3)-FUCOSE RESIDUES" PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, BLACKWELL, OXFORD, GB, vol. 2, no. 4, July 2004 (2004-07), pages 279-287, XP008074279 ISSN: 1467-7644	17-19
Y	results and figure 3	1-16, 20-33
Y	EP 0 361 902 A (LILLY CO ELI [US]) 4 April 1990 (1990-04-04) the whole document	1-16, 20-33
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 E earlier document but published on or after the international filing date
 L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 & document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2008

Date of mailing of the international search report

28/02/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/006123

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARRIS R J: "Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 705, no. 1, 23 June 1995 (1995-06-23), pages 129-134, XP004038942 ISSN: 0021-9673 results abstract	1-16, 20-33
A	HUETHER C M ET AL: "GLYCO-ENGINEERING OF MOSS LACKING PLANT-SPECIFIC SUGAR RESIDUES" PLANT BIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 7, no. 3, May 2005 (2005-05), pages 292-299, XP008073959	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/006123

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2007 /006123

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 26-27 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Article 52 (4) EPC - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/006123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0361902	A	04-04-1990	
		AU 615576 B2	03-10-1991
		AU 4234389 A	05-04-1990
		CA 1332367 C	11-10-1994
		DE 68913251 D1	31-03-1994
		DE 68913251 T2	23-06-1994
		IL 91778 A	07-10-1994
		JP 2163096 A	22-06-1990
		JP 2925181 B2	28-07-1999
		PL 162260 B1	30-09-1993

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Z	

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

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 マンフレート・シュースター

オーストリア、アー 2 1 9 1 シュリック、ヨーゼフ・ヴァイラントシュトラセ 8 4 番

(72)発明者 ラルフ・キルヒアイス

オーストリア、アー 1 2 3 0 ヴィエンナ、ハウス・エー、ドラシェシュトラセ 2 4 番

(72)発明者 アンドレアス・ネヒアンスキ

オーストリア、アー 2 5 2 2 オーバーヴァルテルスドルフ、ゼーパルク・バー 1 0 番

(72)発明者 ヴォルフガング・ヨスト

ドイツ連邦共和国デー 7 9 1 1 1 フライブルク、インゲボルクードレヴィッツアレー 3 1 番

(72)発明者 ギルベルト・ゴール

ドイツ連邦共和国デー 7 9 1 1 2 フライブルク、イム・モーナッカー 2 6 番

F ターム (参考) 2G045 AA34 CB01 FB03 FB06

4B064 AG26 CA19

4C085 AA13 CC03 CC04 CC05 DD81 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 BA53 CA40 DA75 EA22 FA72

FA74

专利名称(译)	糖工程抗体		
公开(公告)号	JP2009542750A	公开(公告)日	2009-12-03
申请号	JP2009518782	申请日	2007-07-11
申请(专利权)人(译)	Gurin'o规避角度化生物技术GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	マンフレートシュースター ラルフキルヒアイス アンドレアスネヒアンスキ ヴォルフガングヨスト ギルベルトゴール		
发明人	マンフレート・シュースター ラルフ・キルヒアイス アンドレアス・ネヒアンスキ ヴォルフガング・ヨスト ギルベルト・ゴール		
IPC分类号	C07K16/00 C12P21/08 C07K16/46 A61P35/00 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61P35/00 C07K16/00 C07K16/283 C07K2317/41 C07K2317/52 C07K2317/732 C07K2317/734 C12N15/8258 C07K16/28 C07K2317/14 C07K2317/76		
FI分类号	C07K16/00.ZNA C12P21/08 C07K16/46 A61P35/00 A61K39/395.E G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/CB01 2G045/FB03 2G045/FB06 4B064/AG26 4B064/CA19 4C085/AA13 4C085 /CC03 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD81 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/FA72 4H045 /FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 櫻井洋子		
优先权	2006450095 2006-07-11 EP		
其他公开文献	JP2009542750A5 JP5424878B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含哺乳动物的修饰抗体或对抗原特异的衍生物或片段的抗体制剂，其特征在于，所述抗体或其衍生物或片段包含不含岩藻糖和木糖的N-聚糖结构，和该制剂的ADCC活性在包含哺乳动物的非特异性抗体的至少10%血清溶液中比在相同抗原特异性的哺乳动物的未修饰抗体制剂中抑制至少10%。

【表 1】

標的細胞株	Le Y 密度 (MFI)	エフェクター 細胞 CD16 ₅₃ 表現型	EC50 IG311 (μ g ml ⁻¹)	EC50 IG314 (μ g ml ⁻¹)	増強
OVCAR-3	435	V/V	0.315 $\pm$ 0.2	0.008 $\pm$ 0.005	39
OVCAR-3	435	F/F	0.993 $\pm$ 0.3	0.025 $\pm$ 0.01	40
SK-BR-3	213	V/V	1.040 $\pm$ 0.1	0.144 $\pm$ 0.02	7
TF-1	109	V/V	5.318 $\pm$ 3.2	0.366 $\pm$ 0.06	15