



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101802192 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 200880106430.4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.10.14

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10 (2006.01)

2007-267384 2007.10.15 JP

C12P 21/02 (2006.01)

2008-103308 2008.04.11 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/068588 2008.10.14

(87) PCT申请的公布数据

W02009/051108 JA 2009.04.23

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 山田良树 喜安达也 田畑和之

葛卷章浩 山城舞

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

权利要求书 1 页 说明书 12 页 序列表 1 页

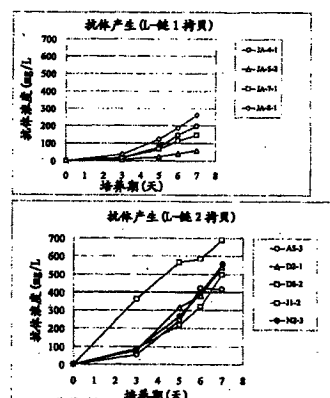
附图 4 页

(54) 发明名称

抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明提供能够高效廉价生产重组抗体的方法。制备抗体或其片段的方法,包括:使用所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞来产生抗体或其片段。还提供重组载体及转化细胞,其中含有 1 拷贝编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链或其片段的 DNA。



1. 制备抗体或其片段的方法,包括:使用所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞来产生抗体或其片段。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞是导入以下载体的细胞,所述载体含 1 拷贝编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码抗体 L 链或其片段的 DNA。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述细胞是动物细胞。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。
5. 权利要求 1 ~ 4 中任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。
6. 权利要求 1 ~ 5 中任一项的方法,其中所述抗体选自:抗 IL-6 受体抗体、抗 IL-6 抗体、抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 GPIIb/IIIa 抗体、抗 TNF 抗体、抗 CD25 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 Her2/neu 抗体、抗 RSV 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD52 抗体、抗 IgE 抗体、抗 CD11a 抗体、抗 VEGF 抗体及抗 VLA4 抗体。
7. 制备药物的方法,该药物包含通过权利要求 1 ~ 6 中任一项的方法制备出的抗体或其片段。
8. 重组载体,其含有 1 拷贝编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码抗体 L 链或其片段的 DNA。
9. 细胞,其中导入有权利要求 8 的载体。
10. 培养的细胞,其中所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多。
11. 制备抗体或其片段的方法,包括:使用以下细胞来产生抗体或其片段,所述细胞的特征是:与抗体 H 链或其片段相比,高表达抗体 L 链或其片段。
12. 权利要求 1 ~ 7、11 中任一项的方法,其中所述细胞是稳定表达抗体或其片段的细胞。
13. 权利要求 9 或 10 的细胞,其稳定表达抗体或其片段。

抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 使用 DNA 重组技术,生产可作为药物使用的重组抗体时,如果使用动物细胞,可以实现复杂翻译后的修饰及折叠,这些是使用原核细胞所不能做到的,所以动物细胞作为生产重组抗体的宿主细胞被广泛应用。

[0003] 近年来,抗体、生物活性蛋白等生物类药物大量问世。尤其是抗体药物通常每次的施用量都在 mg 级,因此这就需要抗体中含有足够量的活性成分。而这种使动物细胞高效生产重组抗体的技术,关系着抗体药物的低成本化,且是向患者稳定供应抗体药物的保证。

[0004] 因此希望有更高效制备重组抗体的方法。

[0005] 在制备用来产生重组抗体的宿主细胞的时候,通常是将编码该抗体 H 链的 DNA 和编码 L 链的 DNA 各一拷贝导入到宿主细胞中(非专利文献 1、2)。

[0006] 非专利文献 1:Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 1994 Jan 15;83(2):435-45.

[0007] 非专利文献 2:Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. Cancer Res. 1997 Oct 15;57(20):4593-9.

发明内容

[0008] 发明拟解决的技术课题

[0009] 另一方面,对于导入了一拷贝编码所欲重组抗体 H 链的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链的 DNA 的稳定转化的表达细胞是否有助于提高所欲重组抗体的产生,目前尚无法得知。

[0010] 所以本发明的目的是提供一种高效生产抗体的方法。

[0011] 解决课题的技术方案

[0012] 本发明的发明者们,为了解决上述课题经过不懈努力,发现当使用所含编码抗体 L 链的外源 DNA 的拷贝数比编码 H 链的外源 DNA 的拷贝数多的细胞,可以提高抗体的产量,从而完成本发明。

[0013] 本发明的要点如下所述。

[0014] (1) 制备抗体或其片段的方法,包括:使用所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞来产生抗体或其片段。

[0015] (2) (1) 的方法,其中所述所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞是导入以下载体的细胞,所述载体含 1 拷贝编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码抗体 L 链或其片段的 DNA。

[0016] (3) (2) 的方法,其中所述细胞是动物细胞。

[0017] (4) (3) 的方法,其中所述动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

[0018] (5) (1) ~ (4) 中任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0019] (6) (1) ~ (5) 中任一项的方法,其中所述抗体选自:抗 IL-6 受体抗体、抗 IL-6 抗体、抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 GPIIb/IIIa 抗体、抗 TNF 抗体、抗 CD25 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 Her2/neu 抗体、抗 RSV 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD52 抗体、抗 IgE 抗体、抗 CD11a 抗体、抗 VEGF 抗体及抗 VLA4 抗体。

[0020] (7) 制备药物的方法,该药物包含通过 (1) ~ (6) 中任一项的方法制备出的抗体或其片段。

[0021] (8) 重组载体,其含有 1 拷贝编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 和 2 拷贝以上编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA。

[0022] (9) 细胞,其中导入有 (8) 的载体。

[0023] (10) 培养的细胞,其中所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多。

[0024] (11) 制备抗体或其片段的方法,包括:使用以下细胞来产生抗体或其片段,所述细胞的特征是:与抗体 H 链或其片段相比,高表达抗体 L 链或其片段。

[0025] (12) (1) ~ (7)、(11) 中任一项的方法,其中所述细胞是稳定表达抗体或其片段的细胞。

[0026] (13) (9) 或 (10) 的细胞,其稳定表达抗体或其片段。

[0027] 技术效果

[0028] 可根据本发明生产出廉价的所欲重组抗体。

[0029] 本说明书包含作为本案的优先权基础的日本专利申请特愿 2008-103308 的说明书及/或附图中记载的内容。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1 示每质粒具有 1 拷贝 L 链表达单位和 1 拷贝 H 链表达单位的 1 拷贝 L 链表达质粒 pHGC33CAG#1 和每质粒具有 2 拷贝 L 链表达单位和 1 拷贝 H 链表达单位的 2 拷贝 L 链表达质粒 pHGC3CAG1。

[0032] 图 2 是显示导入了 1 拷贝 L 链表达质粒的细胞株和导入了 2 拷贝 L 链表达质粒的细胞株的抗体(人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体)产量的坐标图。

[0033] 图 3 示由人源化抗人 IL-6R 抗体基因的 1 拷贝 H 链和 1 拷贝 L 链构成的 1 拷贝 L 链表达质粒和由 1 拷贝 H 链和 2 拷贝 L 链构成的 2 拷贝 L 链表达质粒。

[0034] 图 4 是显示导入了 1 拷贝 L 链表达质粒的细胞株和导入了 2 拷贝 L 链表达质粒的细胞株的抗体(人源化抗人 IL-6R 抗体)产量的坐标图。

[0035] 实施方式

[0036] 以下对本发明的实施方式进行更详细说明。

[0037] 本发明提供制备抗体或其片段的方法,包括:使用所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞来生产抗体或其片段。

[0038] 在本发明的方法中,所述所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码

H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞例如可为导入了 1 拷贝编码所欲重组抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链或其片段的 DNA 的转化细胞,并且也可为产生所欲重组抗体或其片段的细胞。

[0039] 在本发明的方法中,对所欲重组抗体并没有特定限制,可为例如:抗 IL-6 受体抗体、抗 IL-6 抗体、抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体、抗 CD3 抗体、抗 CD20 抗体、抗 GPIIb/IIIa 抗体、抗 TNF 抗体、抗 CD25 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 Her2/neu 抗体、抗 RSV 抗体、抗 CD33 抗体、抗 CD52 抗体、抗 IgE 抗体、抗 CD11a 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 VLA4 抗体等针对任何抗原的重组抗体。所述抗体不仅可为人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猴等动物源单克隆抗体,也包括嵌合抗体、人源化抗体、双特异抗体等经人工改造的基因重组型抗体。重组抗体也可未经聚乙二醇等各种分子结合等化学修饰。而且,对抗体类别无特定限制,对抗体免疫球蛋白类别也无特定限制,可为 IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等)、IgA、IgD、IgE、IgM 等任一类别,但作为药物使用时,优选 IgG 及 IgM。

[0040] 可如下制备编码抗体 L 链的 DNA 和编码 H 链的 DNA。从携带表达抗体的基因的杂交瘤细胞、细胞、噬菌体、核糖体等中提取 mRNA。将此 mRNA 用逆转录酶通过逆转录反应制备 cDNA。用携带与 L 链基因或 H 链基因互补的碱基序列的引物及 cDNA,通过 PCR 扩增 L 链基因或 H 链基因,并通过与克隆用质粒结合来获得各基因。

[0041] 在本发明的方法中,作为所欲重组抗体片段,可举例:Fab、F(ab')₂、Fv 等。

[0042] 可如下制备编码抗体 L 链片段的 DNA 和编码 H 链片段的 DNA。从携带表达抗体的基因的杂交瘤细胞、细胞、噬菌体、核糖体等中提取 mRNA。将此 mRNA 用逆转录酶通过逆转录反应制备 cDNA。用携带与 L 链基因片段或 H 链基因片段互补的碱基序列的引物及 cDNA,通过 PCR 扩增 L 链基因片段或 H 链基因片段,并通过与克隆用质粒结合来获得各基因片段。

[0043] 本发明的发明人通过将导入了 1 拷贝编码重组抗体 H 链的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链的 DNA 的转化细胞用于重组抗体制造,发现与导入了 1 拷贝编码 H 链 DNA 和 1 拷贝编码 L 链 DNA 的转化细胞相比,显著提高所欲重组抗体的产量。

[0044] 构成抗体分子的 H 链多肽和 L 链多肽在 BiP (免疫球蛋白重链结合蛋白) 的帮助下进行装配,然后经折叠形成完整的抗体结构。此装配过程依赖于 L 链多肽进行 (Molecular Biology of the cell, 1999, 10, 2209)。因此,可以认为通过提高 L 链基因数比例和 L 链多肽的比例,可以促进 H 链多肽和 L 链多肽的装配,从而产量增加。

[0045] 可是,与此相对,当是在稳定表达系统 (Stable Expression) 中表达重组抗体的稳定表达转化细胞 (Stable Transformant) 时,与瞬时表达系统 (Transient Expression) 相比, H 链的表达量下降了,从而提示 H 链的表达量更重要 (Biotechnol. Prog., 2005, 21, 122)。由此,对于在稳定表达系统中为了提高抗体的产量应如何控制 H 链和 L 链的表达量比例,目前尚不清楚。

[0046] 编码重组抗体的 H 链或其片段的 DNA 数与编码 L 链或其片段的 DNA 数之比只要比 1 大即可,优选 1.1 ~ 5,最优选为 2。

[0047] 所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞举例如下:

[0048] ● 导入了含有编码 H 链或其片段 DNA 的载体 (如 1 个) 和含有比该载体数多的编码 L 链或其片段 DNA 的载体 (如 2 个以上) 的细胞;

[0049] ●导入了在同一载体内含有 1 拷贝编码 H 链或其片段的 DNA 及 1 拷贝编码 L 链或其片段的 DNA 的载体和 1 个以上的含有 1 拷贝编码 L 链或其片段 DNA 的载体的细胞；

[0050] ●导入了在同一载体内含有 1 拷贝编码 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链或其片段的 DNA 的细胞，

[0051] 优选为导入了在同一载体内含有 1 拷贝编码 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链或其片段的 DNA 的细胞。

[0052] 当 1 拷贝编码 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链或其片段的 DNA 中至少有 1 拷贝 DNA 在其他载体上的时候，这些载体的导入顺序并没有特别限制，既可以分别导入，也可以同时导入。

[0053] 本发明中表达抗体用的细胞也没有特定的限制，可为真核细胞（动物细胞、植物细胞、酵母等）、原核细胞（大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等）等任何细胞，优选为 CHO 细胞、COS 细胞、3T3 细胞、骨髓瘤细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、Vero 细胞等动物细胞，尤其优选为 CHO 细胞。另外，为了制备所欲抗体，优选适合导入所欲基因的细胞（如 CHO dhfr 细胞等）。例如，通过基因工程操作可以培养整合了编码所欲抗体的基因的 COS 细胞或 CHO 细胞。

[0054] 作为本发明的方法中可以使用的载体，例如将大肠杆菌用作宿主时，为了让载体在大肠杆菌（如 JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）等中大量扩增、制备，优选携带能够使载体在大肠杆菌中扩增的“ori”，再具有转化的大肠杆菌的筛选基因（如可通过若干药剂（氨苄青霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素）判别的耐药性基因）。作为载体的例子，可举出 M13 系列载体、pUC 系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。此外，当以 cDNA 的亚克隆、酶切为目的时，除上述载体外，还有例如 pGEM-T、pDIRECT、pT7 等载体。当以生产本发明的抗体或其片段为目的使用载体时，表达载体尤其有用。作为表达载体，例如，以在大肠杆菌中表达为目的时，载体除了具有能在大肠杆菌中扩增上述特征之外，以 JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue 等用作宿主时，优选具有能使在大肠杆菌中优效表达的启动子，如 lacZ 启动子（Ward 等，Nature(1989) 341, 544-546；FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araB 启动子（Better 等，Science(1988) 240, 1041-1043）或 T7 启动子等。这样的载体，除上述载体外，还可例举 pGEX-5X-1（Pharmacia 公司制）、“QIAexpress system”（Qiagen 公司制）、pEGFP 或 pET（此时，宿主优选为表达 T7 RNA 聚合酶的 BL21）等。

[0055] 另外，载体中也可以含有多肽分泌用信号序列。作为多肽分泌用信号序列，如果是要在大肠杆菌细胞周质中产生时，可以使用 pelB 信号序列（Lei, S. P. et al. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379）。而向宿主细胞中导入载体，可以使用氯化钙法、电穿孔法等。

[0056] 除了以大肠杆菌作宿主以外，可用于本发明的方法中的载体还包括：源于哺乳动物的表达载体（如 pcDNA3（Invitrogen 公司制）、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322）、pEF、pCDM8 或 INPEP4（Biogen-IDEA 公司制））、源于昆虫细胞的表达载体（如“Bac 至 BAC 杆状病毒表达系统”（GIBCO BRL 公司制））、源于植物的表达载体（如 pMH1、pMH2）、源于动物病毒的表达载体（如 pHSV、pMV、pAdexLcw）、源于逆转录病毒的表达载体（如 pZIpneo）、源于酵母的表达载体（如“毕赤酵母表达试剂盒”（Invitrogen 公司制）、pNV11、SP-Q01）、源于枯草芽孢杆菌的表达载体（如 pPL608、pKTH50）等。

[0057] 以在 CHO 细胞、COS 细胞、NIN3T3 细胞等动物细胞中表达为目的的时，优选具有使在细胞内表达所必需的启动子，例如 SV40 启动子（Mulligan 等，Nature(1979) 277, 108）、

MMLV-LTR 启动子、EF1 α 启动子 (Mizushima 等, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMV 启动子 (Niwa 等, Gene. (1991) 108, 193)、小鼠 β 珠蛋白启动子 (mBGP) 等, 更优选具有用于筛选细胞转化的基因 (如可通过药剂 (新霉素、G418 等) 判别的抗药性基因)。具备这种特点的载体有, 例如: pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 等。因为已知携带了多聚 A 的 mRNA 在细胞内稳定, 优选具有用于将多聚 A 添加到基因的多聚 A 信号 (如小鼠 β 球蛋白多聚 A 信号、牛生长激素多聚 A 信号、SV40 多聚 A 信号等)。

[0058] 作为本发明的细胞, 既可用瞬时表达 (Transient Expression) 系统表达抗体或其片段; 也可用稳定表达 (Stable Expression) 系统表达, 但优选用稳定表达系统表达。

[0059] 瞬时表达系统是指将环状质粒通过磷酸钙法、电穿孔法、脂质体法等转移到细胞内, 使其表达的方法。由于环状质粒插入染色体的效率低, 目的基因存在于染色体外的情况多。因此, 用环状质粒表达目的基因难以长时间维持。

[0060] 稳定表达系是指将经限制酶处理等制成的线状质粒通过磷酸钙法、电穿孔法、脂质体法等转移到细胞内, 使其表达的方法。线状质粒比环状质粒插入染色体的效率高, 目的基因在染色体上维持的效率也提高。因此, 可以长期维持目的基因的表达。另外, 质粒如果导入了耐药性基因, 就可以进行药剂筛选, 从而能够高效筛选出目的基因在染色体上维持的细胞。作为稳定表达系统使用的动物细胞有例如: CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞等, 优选 CHO 细胞。

[0061] 此外, 当以能稳定表达基因且扩增细胞内基因拷贝数为目的时, 可例举向缺失了核酸合成通路的 CHO 细胞中导入具有弥补所述缺失的 DHFR 基因的载体 (例如 pCHOI 等), 并通过甲氨蝶呤 (MTX) 进行扩增的方法, 另外, 当以瞬时表达基因为目的时, 可例举用携带 SV40 复制起点的载体 (pcD 等) 转化 COS 细胞 (其染色体上携带有表达 SV40T 抗原的基因) 的方法。而作为复制起点, 可以使用源于多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒 (BPV) 等的复制起点。另外, 为在宿主细胞系统中扩增基因拷贝数, 表达载体中可以含有以下选择标记物, 如: 氨基糖苷转移酶 (APH) 基因、胸苷激酶 (TK) 基因、大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Ecogpt) 基因和二氢叶酸还原酶 (dhfr) 基因等。

[0062] 本发明还提供含有 1 拷贝编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码抗体 L 链或其片段的 DNA 的重组载体。

[0063] 本发明的载体可用于在宿主细胞中保持编码重组抗体或其片段的 DNA, 或用于表达重组抗体或其片段。可通过向宿主细胞中导入 1 拷贝编码重组抗体 H 链或其片段的 DNA 和 2 拷贝以上编码 L 链或其片段的 DNA 来促进 H 链多肽抗体分子的装配, 从而能够提高由宿主细胞的所欲重组抗体或其片段的产生。

[0064] 其次, 本发明提供导入有本发明的载体的宿主细胞。对导入有本发明的载体的宿主细胞没有特定限制, 可以使用例如: 大肠杆菌或各种动物细胞等。本发明的宿主细胞可以作为例如制备或表达本发明的抗体或其片段的产生系统使用。作为用于制备多肽的产生系统, 有体外及体内产生系统。作为体外产生系统可以例举使用真核细胞的产生系统或使用原核细胞的产生系统。

[0065] 使用真核细胞时, 可将例如动物细胞、植物细胞、真菌细胞用作宿主。作为动物细胞, 已知哺乳类细胞 (如 CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、骨髓瘤、BHK (幼仓鼠肾)、Hela、Vero)、两栖类细胞 (如非洲爪蟾卵母细胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291,

358-340)) 或昆虫细胞(如 Sf9、Sf21、Tn5)。CHO 细胞中尤其适于使用缺陷 DHFR 基因的 CHO 细胞 -dhfr-CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1980)77, 4216-4220) 或 CHO K-1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1968)60, 1275)。在动物细胞中,如果以大量表达为目的时,尤其优选 CHO 细胞。向宿主细胞中导入载体的方法可包括例如:磷酸钙法、DEAE 右旋糖酐法、使用阳离子核糖体 DOTAP(BoehringerMannheim 公司制)的方法、电穿孔法、脂质体法等。

[0066] 作为植物细胞,已知如源于烟草(Nicotianan tabacum)的细胞作为多肽生产系统,可对其进行愈伤组织培养。作为真菌细胞,已知例如:酵母(如酵母属(Saccharomyces)(例如酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)))、霉菌(如曲霉菌属(Aspergillus)(例如黑曲霉(Aspergillus niger)))。

[0067] 使用原核细胞时幼使用细菌细胞的产生系统。细菌细胞可列举大肠杆菌(E. coli)(如:JM109、DH5 α 、HB101等),其他的还已知枯草芽孢杆菌。

[0068] 通过用目的基因转化这些细胞,并体外培养转化细胞,得到了目的基因编码的多肽。培养可按照众所周知的方法进行。例如,动物细胞的培养液可以使用例如:DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。此时,可以联用胎牛血清(FCS)等血清补液,也可以进行无血清培养。培养时的 pH 值优选约 6~8。培养通常在约 30~40℃进行约 15~200 小时,可根据需要进行培养基的更换、通气、搅拌。

[0069] 可通过培养所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞来由此细胞较以往高表达抗体或其片段。培养所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞,可用一般的细胞(优选动物细胞)培养所用的培养基。这当中一般包含氨基酸、维生素类、脂类因子、能源、渗透压调节剂、铁源、pH 缓冲剂。这些成分的含量一般在氨基酸 0.05~1500mg/L、维生素类 0.001~10mg/L、脂类因子 0~200mg/L、能源 1~20g/L、渗透压调节剂 0.1~10000mg/L、铁源 0.1~500mg/L、pH 缓冲剂 1~10000mg/L、微量元素 0.00001~200mg/L、表面活性剂 0~5000mg/L、生长辅因子 0.05~10000 μ g/L 及核苷 0.001~50mg/L,这样一个范围内比较合适,但并无限制,可根据培养细胞的种类、所欲重组抗体或其片段的种类等适宜决定。

[0070] 除了上述成分以外,也可以添加如微量元素、表面活性剂、生长辅因子、核苷等。

[0071] 具体例示含如下成分的培养基:

[0072] 氨基酸类:如 L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-鸟氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸等,优选 L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸等;

[0073] 维生素类:i-肌醇、生物素、叶酸、硫辛酸、烟酰胺、烟酸、p-氨基安息香酸、泛酸钙、盐酸吡哆醛、盐酸吡哆醇、核黄素、盐酸硫胺、维生素 B12、抗坏血酸等,优选生物素、叶酸、硫辛酸、烟酰胺、泛酸钙、盐酸吡哆醛、核黄素、盐酸硫胺、维生素 B12、抗坏血酸等;

[0074] 脂类因子:氯化胆碱、酒石酸胆碱、亚油酸、油酸、胆固醇等,优选氯化胆碱等;

- [0075] 能源：葡萄糖、半乳糖、甘露糖、果糖等，优选葡萄糖等；
- [0076] 渗透压调节剂：氯化钠、氯化钾、硝酸钾等，优选氯化钠；
- [0077] 铁源类：EDTA 铁、柠檬酸铁、氯化亚铁、氯化铁、硫酸亚铁、硫酸铁、硝酸铁等，优选氯化铁、EDTA 铁、柠檬酸铁等；
- [0078] pH 缓冲剂：碳酸氢钠、氯化钙、磷酸二氢钠、HEPES、MOPS 等，优选碳酸氢钠等。
- [0079] 除上述成分外，也可添加如下成分：
- [0080] 微量金属元素：硫酸铜、硫酸锰、硫酸锌、硫酸镁、氯化镍、氯化锡、氯化镁、偏硅酸钠等，优选硫酸铜、硫酸锌、硫酸镁等；
- [0081] 表面活性剂：吐温 80、Pluronic F68 等；及
- [0082] 生长辅因子：重组型胰岛素、重组型 IGF-1、重组型 EGF、重组型 FGF、重组型 PDGF、重组型 TGF- α 、盐酸乙醇胺、亚硒酸钠、视黄酸、盐酸腐胺等，优选亚硒酸钠、盐酸乙醇胺、重组型 IGF-1、盐酸腐胺等；
- [0083] 核苷：脱氧腺苷、脱氧胞啶、脱氧鸟苷、腺苷、胞啶、鸟苷、尿苷等。
- [0084] 此外，在上述培养基适宜例中，也可以含有抗生素（链霉素、青霉素 G 钾及庆大霉素等）和 pH 指示剂（酚红等）。
- [0085] 培养基的 pH 根据所培养细胞的不同而不同，通常为 pH6.8 ~ 7.6，多数情况下以 pH7.0 ~ 7.4 适宜。
- [0086] 培养基可使用市售的动物细胞培养用培养基，如：D-MEM(Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基)、D-MEM/F-12 1 : 1 混合物(Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基：营养混合物 F-12)、RPMI1640、CHO-S-SFM II(Invitrogen 公司)、CHO-SF(Sigma-Aldrich 公司)、EX-CELL 301(JRH biosciences 公司)、CD-CHO(Invitrogen 公司)、IS CHO-V(Irvine Scientific 公司)、PF-ACF-CHO(Sigma-Aldrich 公司)等。
- [0087] 此外、培养基也可为无血清培养基。
- [0088] 当细胞是 CHO 细胞时，可使用本领域技术人员公知的方法培养 CHO 细胞。例如，通常可在气相 CO₂ 浓度为 0 ~ 40%（优选为 2 ~ 10%）的雾气氛下，于 30 ~ 39℃（优选约 37℃）下进行培养。
- [0089] 适于产生所欲重组抗体或其片段的细胞的培养时间通常为 1 天 ~ 3 个月、优选为 1 天 ~ 2 个月，更优选为 1 天 ~ 1 个月。
- [0090] 另外，作为各种动物细胞培养用装置，可用例如：发酵槽式槽培养装置、气升式培养装置、培养皿式培养装置、旋转皿式培养装置、微载体式培养装置、流动层式培养装置、中空纤维式培养装置、旋转瓶式培养装置、填充槽式培养装置等进行培养。
- [0091] 培养可以使用分批培养(batch culture)、流加培养(fed-batch culture)、连续培养(continuous culture)等中任一种方法，但优选流加培养或连续培养、更优选流加培养。
- [0092] 另一方面，作为体内产生抗体或其片段的系统可例举使用动物的产生系统或使用植物的产生系统。向这些动物或植物中导入目的基因，在动物或植物体内产生多肽，并回收。本发明中所述“宿主”包括这些动物、植物。
- [0093] 用动物作宿主时，有用哺乳类动物、昆虫的产生系统。作为哺乳类动物，可使用山羊、猪、绵羊、小鼠、牛(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。此外，使用哺乳动物时，还可以使用转基因动物。

[0094] 转基因动物的制造方法众所周知。例如,可采用 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384(1980) 中记载的方法得到转基因动物。具体而言,将目的基因导入哺乳动物全能细胞中,并使所述细胞在个体中发生。通过在得到的个体中筛选出体细胞和生殖细胞中整合了导入基因的个体来制造目的转基因动物。作为导入基因的全能细胞,除受精卵或早期胚胎之外,还可例举由具有多能性的 ES 细胞的培养细胞等。

[0095] 例如,可将目的基因(本发明中指的是,编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和编码抗体 L 链或其片段的 DNA)制成与编码乳汁中固有产生的多肽(如山羊 β 酪蛋白等)的基因的融合基因。接着,将含所述融合基因的基因片段注入山羊胚胎,再将此胚胎移植给雌山羊。可从由受纳所述胚胎的山羊生出的转基因山羊或其后代产生的乳汁中得到目的多肽(本发明中是指,抗体或其片段)。为增加由转基因山羊产生的含多肽乳汁,还可以给转基因山羊使用适当的激素(Ebert, K. M. et al., Bio/Technology(1994) 12, 699-702)。

[0096] 此外,作为昆虫,可使用利用蚕。当使用蚕时,通过用插入有编码目的多肽的基因(本发明中指的是,编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和编码抗体 L 链或其片段的 DNA)的杆状病毒感染蚕,就能够从这个蚕的体液中获得目的多肽(Susumu, M. et al., Nature(1985) 315, 592-594)。

[0097] 另外,使用植物时,可使用例如烟草。当使用烟草时,将编码目的多肽的基因(本发明中指的是,编码抗体 H 链或其片段的 DNA 和编码抗体 L 链或其片段的 DNA)插入到植物表达用载体(如 pMON530)中,再将这个载体导入到像农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)这样的细菌中。用这种细菌感染烟草(如烟草(Nicotiana tabacum)),就可以从该烟草的叶子中获得所欲多肽(本发明中是指,抗体或其片段)(Julian K. -C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

[0098] 本发明还提供一种培养细胞,所述细胞所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多。培养细胞如前所述。

[0099] 其次本发明还提供一种制备抗体或其片段的方法,包括:使用以下细胞来产生抗体或其片段,所述细胞的特征是:与抗体 H 链或其片段相比,高表达抗体 L 链或其片段。作为与抗体 H 链或其片段相比,高表达抗体 L 链或其片段的细胞可例举所含编码抗体 L 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数比编码抗体 H 链或其片段的外源 DNA 的拷贝数多的细胞,这种细胞如前所述。而通过培养高表达抗体 L 链或其片段(与抗体 H 链或其片段相比)的细胞,可由所述细胞产生抗体或其片段。培养基、培养条件等如上所述。

[0100] 按本发明的方法制造的抗体,不仅是源于人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猴等动物的单克隆抗体,也包括嵌合抗体、人源化抗体、双特异抗体等经人工改造的基因重组型抗体。另外,对抗体类别无特定限制、对抗体免疫球蛋白类别也无特定限制,可为 IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等)、IgA、IgD、IgE、IgM 等任一类别,但作为药物使用时,优选 IgG 及 IgM。另外,本发明的抗体不仅包括全抗体,也包括 Fv、Fab、F(ab')₂ 等抗体片段。

[0101] 可将采用本发明的方法制备的抗体再与抗体修饰物(聚乙二醇(PEG)等各种分子)结合而用作抗体修饰物。欲得到所述抗体修饰物,可对所得抗体进行化学修饰而得到。本领域已建立了这些方法。

[0102] 上述本发明的抗体,可以通过本领域技术人员公知的方法制备。

[0103] 产生单克隆抗体的杂交瘤细胞,基本可以使用公知方法如下制备。即,将所欲抗

原或表达所欲抗原的细胞用作致敏抗原,将其通过常规免疫方法免疫,再通过常规细胞融合法将得到的免疫细胞与公知的亲本细胞融合,使用常规筛选法筛选出单克隆抗体产生细胞(杂交瘤细胞)而进行制备。杂交瘤细胞可以参照 Milstein 等人采用的方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73 :3-46) 进行制备。当抗原的免疫原性低时,可通过结合白蛋白等具有免疫原性的巨大分子而进行免疫。

[0104] 此外,从杂交瘤细胞克隆抗体基因,整合到合适的载体中,再将其导入宿主,可用使用基因重组技术产生的基因重组型抗体(如,参考 Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990)。具体而言,从杂交瘤的 mRNA 用逆转录酶合成抗体可变区(V区)的 cDNA。如果能够得到编码目的抗体 V 区的 DNA,将其与编码所欲抗体恒定区(C区)的 DNA 连接,并将其整合到表达载体中。另外,也可将编码抗体 V 区的 DNA 整合到含有抗体 C 区的 DNA 的表达载体中。并以可用表达调控区(如增强子、启动子)调控的方式将表达用载体整合到表达载体中,然后,可通过用所述表达载体转化宿主细胞来表达抗体。

[0105] 本发明中,为了达到降低对人的异种抗原性等目的,可以使用经人工改造的基因重组型抗体,如嵌合(Chimeric)抗体、人源化抗体(Humanized)等。这些经改造抗体可以通过已知的方法制备。嵌合抗体是由人以外的哺乳动物(如小鼠)的抗体重链、轻链的可变区与人的抗体重链、轻链的恒定区构成的抗体,可以通过将编码小鼠抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,将其整合到表达载体中,再导入宿主细胞来产生的方法得到。

[0106] 人源化抗体也称重构(reshaped)抗体,是将人以外哺乳动物(如小鼠)抗体的互补决定区(CDR; complementarity determining region)移植至人抗体互补决定区而得到的抗体,已知其常规基因重组手法。具体而言,用制成具有与末端部重叠的部分的数个寡核苷酸,通过 PCR 法合成了设计成连接了鼠抗体的 CDR 和人抗体的构架区(framework region; FR)的 DNA 序列。通过将所得 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,然后整合到表达载体中,再导入宿主来产生的方法得到(参考欧洲专利申请公开 EP 239400、国际专利申请公开 WO 96/02576)。通过 CDR 连接的人抗体 FR 区,可以选择互补决定区形成良好的抗原结合位点的。根据需要,为了使重构抗体的互补决定区形成合适的抗原结合位点,还可以置换抗体可变区构架区的氨基酸(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0107] 另外,已知人抗体的获得方法。如下举例,用所欲抗原或表达所欲抗原的细胞体外致敏人淋巴细胞,将致敏淋巴细胞与人骨髓瘤细胞(如 U266)融合,就可以得到具有抗原结合活性的所欲人抗体(参考特公平 1-59878)。另外,可通过用抗原免疫具有全套人抗体基因的转基因动物来获得所欲人抗体(参考国际专利申请公开 W093/12227、W092/03918、W094/02602、W094/25585、W096/34096、W096/33735)。再者,也已知使用人抗体库,通过淘选获得人抗体的技术。如,可通过将人抗体可变区作为单链抗体(scFv),通过噬菌体展示法在噬菌体表面表达而筛选出结合抗原的噬菌体。如果分析被筛选出的噬菌体的基因,就可确定编码结合抗原的人抗体可变区的 DNA 序列。当清楚了与抗原结合的 scFv 的 DNA 的序列时,就可以制备出包含所述序列的合适的表达载体,进而可以获得人抗体。上述方法也以广为人知,可以参考 W092/01047, W092/20791, W093/06213, W093/11236, W093/19172, W095/01438, W095/15388。

[0108] 可将通过上述方法得到的抗体或其片段纯化至均一。抗体或其片段的分离、纯化

可以按一般多肽的分离、纯化方法进行。可通过适宜选择、组合如下方法（但并不局限于此）来分离、纯化抗体：亲和层析等层析柱、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳等 (Antibodies :A Laboratory Manual.Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。通过上述方法得到的抗体浓度测定可以采用吸光度测定或酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ;ELISA) 等进行。

[0109] 用于亲和层析的层析柱可例举：蛋白 A 柱、蛋白 G 柱。使用蛋白 A 柱的柱可例举：HyperD、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia) 等。

[0110] 除亲和层析之外的层析法可例举如：离子交换层析、疏水性层析、凝胶过滤、反相层析、吸附层析等 (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual.Ed Daniel R.Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。这些层析法可以用 HPLC、FPLC 等液相层析法进行。

[0111] 此外,可在多肽纯化前或纯化后用合适的多肽修饰酶与之作用来附加任意修饰或去除部分肽。作为多肽修饰酶使用的有例如：胰蛋白酶、糜蛋白酶、赖氨酰内肽酶 (Lysyl Endopeptidase)、蛋白激酶、葡萄糖苷酶等。

[0112] 当按本发明的方法制备出的抗体或其片段具有可作为药物使用的生物学活性时,可通过将所述多肽与可药用媒质或添加剂混合而制剂化来制成药物。

[0113] 可药用媒质及添加剂可例举：水、可药用有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、藻酸钠、水溶性右旋糖酐、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白 (HSA)、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖和可作为药物添加物的表面活性剂等。

[0114] 实际添加物可根据本发明治疗剂的剂型选自上述中的一种或几种适宜组合,当然也不限于此。当用作注射用制剂时,可使用将纯化的多肽溶于溶剂（如生理盐水、缓冲液、葡萄糖溶液等）,并向其中加入防吸附剂（例如吐温 80、吐温 20、明胶、人血清白蛋白等）的注射用制剂。也可用作使用前溶解重构的冷冻干燥剂型,冷冻干燥用赋形剂,可使用例如甘露糖醇、葡萄糖等的糖醇或糖类。

[0115] 抗体或其片段的有效施用量可根据抗体或其片段的种类、作为治疗或预防对象的疾病种类、患者年龄、患病程度等适宜选择。例如,当抗体为抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体,且将用作抗癌剂时,所述抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的有效施用量为每次每 1kg 体重 0.001mg ~ 1000mg。或选择每名患者 0.01 ~ 100000mg/ 人的施用量。但对这些施用量无限制。

[0116] 抗体或其片段的施用方法可为经口、非经口施用中的任一种,但优选非经口施用,具体可例举：注射（如,通过静脉注射、肌肉注射、腹腔注射、皮下注射等的全身或局部施用）、经鼻施用、经肺施用、经皮施用等。

实施例

[0117] 以下将通过实施例对本发明进行具体说明。然而这些实施例仅旨在说明本发明,无意限定本发明的范围。

[0118] 实施例 1：人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体表达质粒的制备

[0119] 首先,如下制备了人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体 H 链的基因。用磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 片段(表达通过 PCR 与 GST 的融合蛋白基因而获得)免疫小鼠(MRL/lpr, 日本 Charles River)。用所述小鼠脾脏细胞制备杂交瘤。以磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 作为抗原,通过 ELISA 筛选杂交瘤,并筛选出产生磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合抗体的克隆。从杂交瘤中提取 mRNA,使用逆转录酶通过逆转录反应制备 cDNA。使用具有与小鼠 H 链可变区基因互补的碱基序列的引物(CAGGGGCCAGTGGATAGACCGATG)(SEQ ID NO:1)和 cDNA,通过 PCR 扩增了小鼠抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 H 链可变区基因,并通过与 pGEM-T Easy(Promega)结合而得到。从 Kabatdatabase 检索出与小鼠抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 H 链可变区基因的构架区具有同源性的人抗体 H 链可变区基因,并进行鉴定。设计出结合了经鉴定的人抗体 H 链可变区基因的各构架部分和小鼠抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体 H 链可变区基因的各 CDR 部分的人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 H 链可变区基因的碱基序列,并通过 PCR 合成。将人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 H 链可变区基因与人 IgG1 恒定区基因结合,再通过置换氨基酸进行优化而得到人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 H 链基因(参考 W006/06693)。在 CAG 启动子的下游结合人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的 H 链基因,在再下游结合小鼠 β 球蛋白多聚 A 信号而制成了 H 链表达单位。可用 H 链表达单位上游的 BamHI 和 HindIII,下游的 XhoI 切下 H 链表达单位。

[0120] 接着,如下制备了人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体 L 链的基因。用磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 片段免疫小鼠。用所述小鼠脾脏细胞制备杂交瘤。以磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 作为抗原,通过 ELISA 筛选杂交瘤,并筛选出产生磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 结合抗体的克隆。从杂交瘤中提取 mRNA,使用逆转录酶通过逆转录反应制备 cDNA。使用具有与小鼠 L 链可变区基因互补的碱基序列的引物(GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG)(SEQ ID NO:2)和 cDNA,通过 PCR 扩增了小鼠抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 L 链可变区基因,并通过与 pGEM-T Easy(Promega)结合而得到。从 Kabat database 检索出与小鼠抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 L 链可变区基因的构架区具有同源性的人抗体 L 链可变区基因,并进行鉴定。设计出结合了经鉴定的人抗体 L 链可变区将帅的各构架部分和小鼠抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体 L 链可变区基因的各 CDR 部分的人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 L 链可变区基因的碱基序列,并通过 PCR 合成。将人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 L 链可变区基因与人 IgG κ 恒定区基因结合,再通过置换氨基酸进行优化而得到人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 的 L 链基因(参考 W006/06693)。在 CAG 启动子的下游结合人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体的 L 链基因,在再下游结合小鼠 β 球蛋白多聚 A 信号而制成了 L 链的表达单位。L 链表达单位可用 HindIII 切下。

[0121] 将用 BamHI 和 XhoI 消化的质粒 INPEP4(IDEA 公司制造)与 H 链表达单位结合而制成 pINP-GC33-H1。将经 HindIII 消化的 pINP-GC33-H1 与用 HindIII 切下的 L 链表达单位结合。通过以上操作制成了 1 拷贝 L 链表达质粒 phGC33CAG#1(每质粒具有 1 拷贝 L 链表达单位和 1 拷贝 H 链表达单位)和 2 拷贝 L 链表达质粒 phGC33CAG1(每质粒具有 2 拷贝 L 链表达单位和 1 拷贝 H 链表达单位)(图 1)。

[0122] 实施例 2:人源化抗人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 抗体稳定表达细胞株的制备

[0123] 通过电穿孔法将 phGC33CAG#1 或 phGC33CAG1 导入 CHO 细胞的 DXB11 株中。接着,通过将细胞在 400 μ g/mL 的 G418 存在下培养来筛选出导入了表达质粒的细胞。为旨在基

因扩增表达质粒,接着在 10 ~ 100nM MTX 存在下的进行培养。

[0124] 获得了 4 株导入了 1 拷贝 L 链表达质粒的细胞株和 5 株导入了 2 拷贝 L 链表达质粒的细胞株,通过将它们在 125mL 皿中分批培养来进行比较。在以下条件下进行培养:培养液 50mL、初始细胞密度 2×10^5 细胞/mL,培养温度 37℃,震荡速度 110rpm。在开始培养后的第 3、5、6、7 天测定培养液中的抗体浓度,进行比较。4 株导入了 1 拷贝 L 链表达质粒的细胞株的第 7 天的抗体产量为约 60 ~ 260 μ g/mL。另一方面,5 株导入了 2 拷贝 L 链表达质粒的细胞株的第 7 天的抗体产量为约 420 ~ 690 μ g/mL。导入了 2 拷贝 L 链表达质粒的细胞株的抗体产量比导入了 1 拷贝 L 链表达质粒的细胞株的抗体产量提高了 2 倍以上(图 2)。

[0125] 由此确认,相对 1 拷贝 H 链,向宿主细胞中导入 2 拷贝 L 链比以往向宿主细胞中导入 1 拷贝 L 链抗体产量提高。

[0126] 实施例 3:人源化抗人 IL-6R 抗体稳定表达细胞株的制备

[0127] 分别向 W092/019759 中所述人源化抗人 IL-6R 抗体 H 链基因及人源化抗人 IL-6R 抗体 L 链基因上游结合 CAG 启动子,在更下游结合小鼠 β 球蛋白多聚 A 而制成 H 链表达单位和 L 链表达单位。在整合了新霉素抗性基因和 dhfr 的 pBluescript 上结合 H 链表达单位和 L 链表达单位,从而制成 1 拷贝 L 链表达质粒(由人源化抗人 IL-6R 抗体基因的 1 拷贝 H 链和 1 拷贝 L 链构成)和 2 拷贝 L 链表达质粒(由人源化抗人 IL-6R 抗体基因的 1 拷贝 H 链和 2 拷贝 L 链构成)(图 3),并通过电穿孔法导入 CHO 细胞 DXB11 株中。接着,通过在 400 μ g/mL G418 存在下进行培养来筛选出导入了表达质粒的细胞株。

[0128] 获得了 176 株导入了 1 拷贝 L 链表达质粒的细胞株和 176 株导入了 2 拷贝 L 链表达质粒的细胞株,通过将它们在 24 孔板中分批培养来进行比较。在以下条件下培养条件:培养液 0.7mL,培养温度 37℃,震荡速度 160rpm。在开始培养后第 12 天测定培养液中的抗体浓度,并按抗体产量排序,并进行了组间比较(图 4)。总的来说,结果是导入了 2 拷贝 L 链质粒的细胞的产量高于导入了 1 拷贝 L 链质粒的细胞的产量。

[0129] 由此确认,相对 1 拷贝 H 链,向宿主细胞中导入 2 拷贝 L 链比以往向宿主细胞中导入 1 拷贝 L 链抗体产量提高。

[0130] 本发明可应用到所有抗体产生细胞中。

[0131] 将本说明书中引用的所有刊物、专利及专利申请整体并入本说明书中。

[0132] 工业实用性

[0133] 本发明可用于抗体生产。

[0134] 序列表

[0135] <SEQ ID NO:1>

[0136] SEQ ID NO:1 示具有与小鼠 H 链可变区基因互补的碱基序列的引物序列。

[0137] <SEQ ID NO:2>

[0138] SEQ ID NO:2 示具有与小鼠 L 链可变区基因互补的碱基序列的引物序列。

<110>Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120> 抗体的制备方法

<130>FP-122PCT

<150>JP P2008-103308

<151>2008-04-11

<160>2

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>24

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>1

caggggccag tggatagacc gatg 24

<210>2

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>2

gctcactgga tggatgggaag atg 23

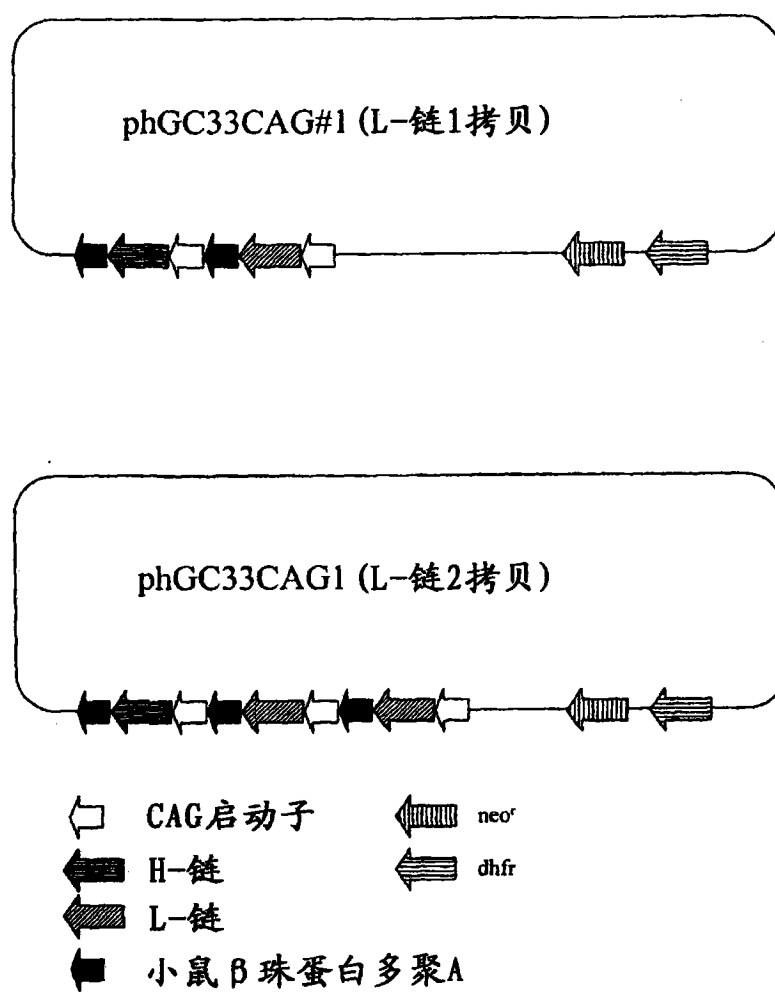


图 1

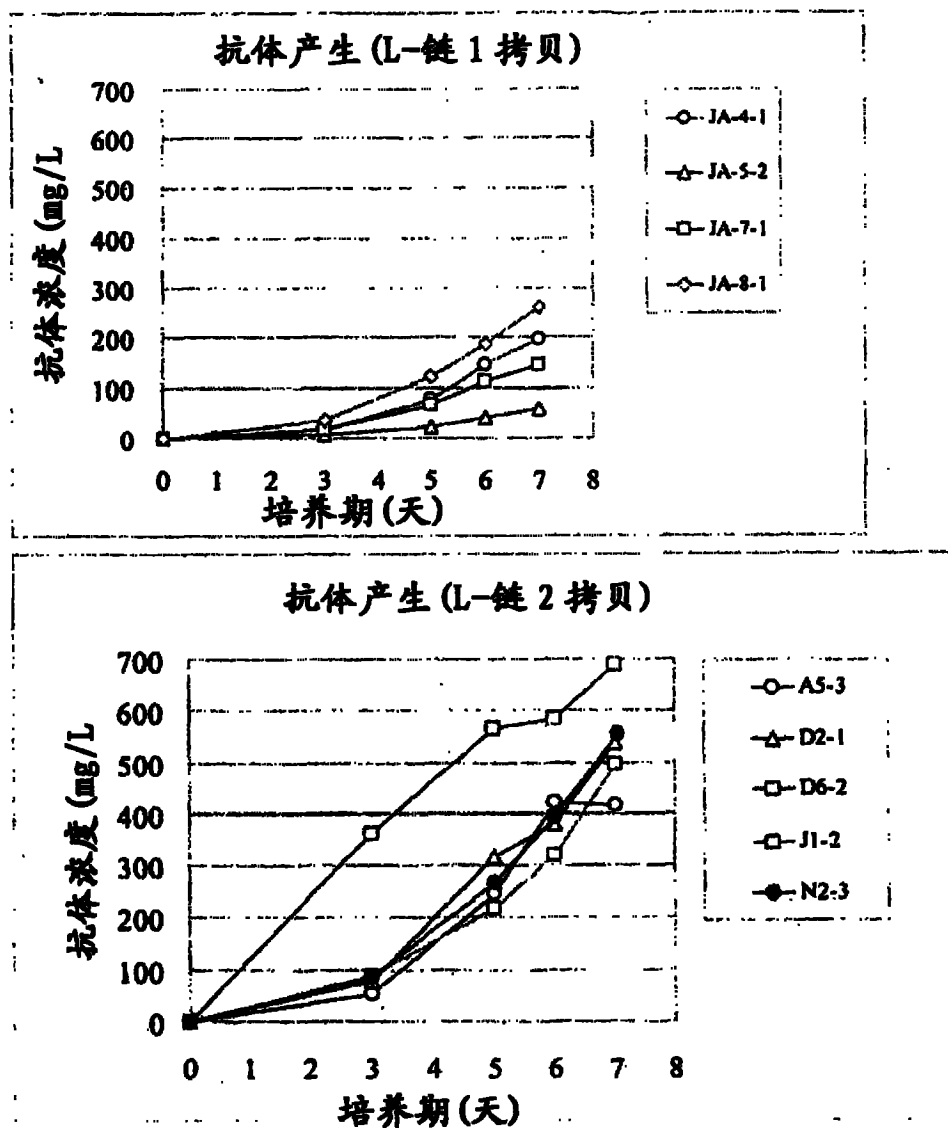


图 2

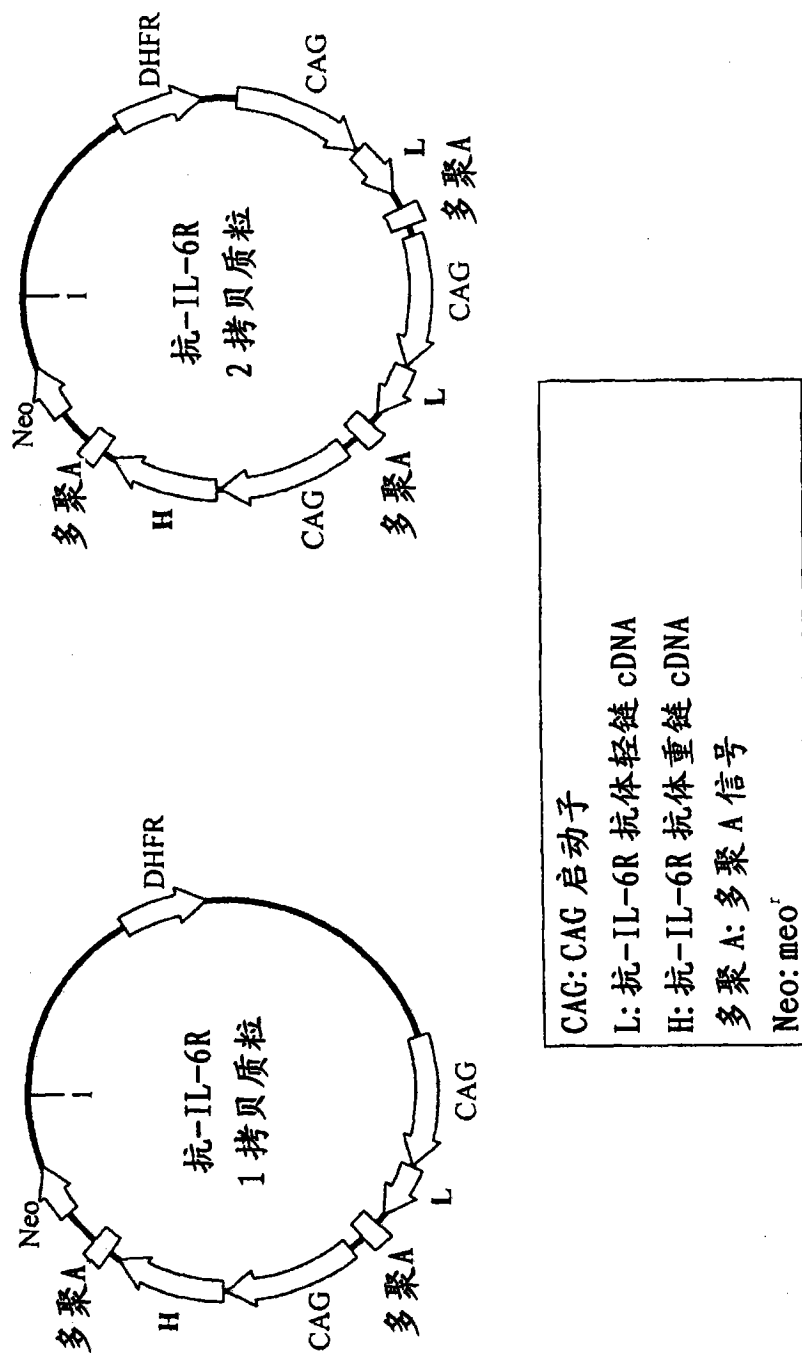


图 3

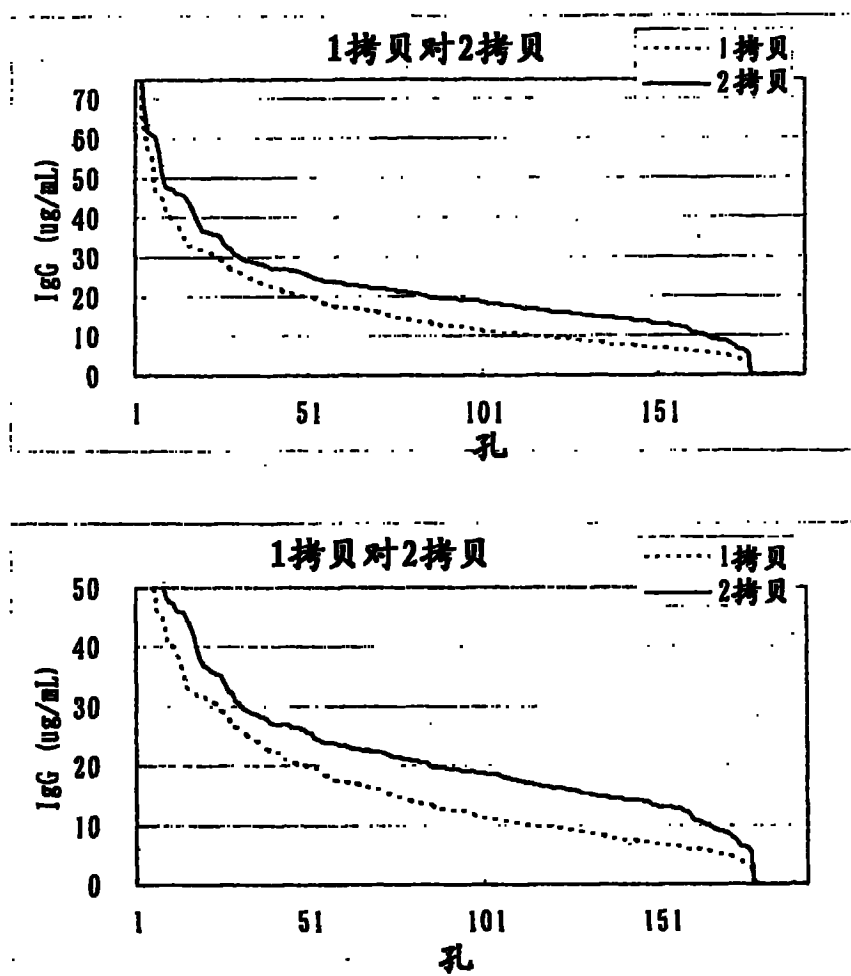


图 4