



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105392878 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201480041292. 1

代理人 李程达

(22) 申请日 2014. 07. 23

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

3265/CHE/2013 2013. 07. 23 IN

3262/CHE/2013 2013. 07. 23 IN

C12N 1/00(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

C07K 14/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/063348 2014. 07. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/011660 EN 2015. 01. 29

(71) 申请人 百康有限公司

地址 印度卡纳塔克邦

申请人 分子免疫中心

(72) 发明人 P·纳伊尔 R·梅拉克德

R·文卡塔拉曼 L·阿迪卡瑞

A·彼哈特纳噶 S·普拉布胡

K·舒克拉 D·巴斯卡 S·德桑

H·V·派 J·E·蒙特罗卡西米洛

(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

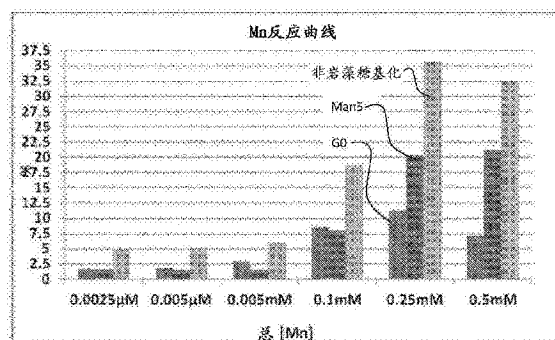
权利要求书2页 说明书14页 附图11页

(54) 发明名称

用于控制蛋白质中的岩藻糖基化水平的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于控制、抑制或减少真核动物和 / 或真核动物的蛋白质表达系统中的蛋白质岩藻糖基化的方法或过程。所述方法包括在存在升高的锰或锰离子总浓度的情况下进行蛋白质表达和 / 或翻译后修饰。



1. 一种用于修饰真核生物和 / 或真核生物的蛋白质表达系统中的岩藻糖基化的方法或过程, 在所述方法或过程中控制培养基中的锰或锰离子的总浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法或过程, 所述方法或过程是减少岩藻糖基化的方法或过程, 并且在所述方法或过程中, 蛋白质表达和 / 或翻译后修饰是在存在升高的锰或锰离子的总浓度的情况下进行的。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述升高的锰或锰离子的总浓度在 $\geq 0.05\text{mM}$ 至 $\leq 10\text{mM}$ 的范围内。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述蛋白质表达和 / 或翻译后修饰是在选自昆虫细胞、真菌细胞、酵母细胞、原生动物细胞和 / 或哺乳动物细胞的蛋白质表达系统中进行的。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述蛋白质是糖蛋白。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述蛋白质是重组蛋白。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述蛋白质是免疫配体。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述免疫配体是选自下述的至少一种: 鼠、嵌合、人源化、人的单克隆抗体或其衍生物、新抗体形式、由融合至靶结合部分例如受体片段的免疫球蛋白 Fc 区域组成的融合肽。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 相较于在不存在升高的锰或锰离子浓度的情况下表达的免疫配体, 所述免疫配体具有降低的岩藻糖基化程度。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 相较于 (i) 在不存在升高的锰或锰离子浓度的情况下表达的或 (ii) 具有较高的岩藻糖基化程度的免疫配体, 所述免疫配体显示增加的 ADCC 活性。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述免疫配体靶向牵涉细胞介导免疫防御的一种或多种细胞表面抗原。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程, 在所述方法中, 所述免疫配体是 Itolizumab。

13. 一种糖蛋白, 其通过根据前述权利要求中任一项所述的方法或过程产生。

14. 根据权利要求 13 所述的糖蛋白, 所述糖蛋白是重组蛋白。

15. 根据权利要求 13 至 14 中任一项所述的糖蛋白, 所述糖蛋白是免疫配体, 优选地是抗体。

16. 根据权利要求 13 至 15 中任一项所述的糖蛋白, 所述糖蛋白或其子结构域在其岩藻糖基化模式中具有减少的岩藻糖含量。

17. 根据权利要求 13 至 16 中任一项所述的糖蛋白, 所述糖蛋白或其子结构域具有约 35% 的非岩藻糖基化水平。

18. 根据权利要求 13 至 17 中任一项所述的糖蛋白, 所述糖蛋白具有增加的 ADCC。

19. 根据权利要求 13 至 18 中任一项所述的糖蛋白, 所述糖蛋白是 Itolizumab。

20. 根据权利要求 13 至 19 中任一项所述的糖蛋白,所述糖蛋白实现对于 CD25 和 CD4 呈阳性的细胞特别是 CD4+T 细胞在体外或体内的减少。

21. 根据权利要求 13 至 20 中任一项所述的糖蛋白用于制造治疗人或动物患者的药物的用途。

22. 根据权利要求 13 至 20 中任一项所述的糖蛋白用于治疗人或动物患者的用途。

23. 根据权利要求 21 至 22 中任一项所述的用途,其中所述人或动物患者患有选自以下的疾病或已被诊断为处于发生选自以下的疾病的风险中:

- 肿瘤疾病,包括肿瘤、淋巴瘤及白血病,特别是 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL) 和 T 细胞白血病;
- 自身免疫疾病,包括类风湿性关节炎、银屑病、克罗恩氏病、红斑狼疮、舍格伦病;
- 神经退行性疾病,包括多发性硬化、帕金森氏病、阿尔茨海默病、亨廷顿病和 / 或肌萎缩侧索硬化;
- 感染性疾病。

24. 根据权利要求 21 至 23 中任一项的用途,其用于治疗或预防已进行移植的人或动物中的不良反应如移植物抗宿主病 (GVHD)。

用于控制蛋白质中的岩藻糖基化水平的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2013 年 7 月 23 日向印度专利局提交的印度临时专利申请 3262/CHE/2013 及在 2013 年 7 月 23 日向印度专利局提交的印度临时专利申请 3265/CHE/2013 的权益及优先权。依据专利合作条约实施细则 4.18, 为了所有目的, 2013 年 7 月 23 日提交的所述申请的内容整体援引加入到本文中, 包括加入未包含在本文中并在专利合作条约实施细则 20.5(a) 中提到的结论、权利要求书或附图的任何项目或部分。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于控制蛋白质中的岩藻糖基化水平的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 在真核生物表达系统中表达的蛋白质经历涉及糖基化的翻译后修饰过程。现今已被建立用于产生糖蛋白 (如 IgG 及其它包含 Fc 区域的单克隆抗体) 的真核生物表达系统将 N-聚糖添加至多肽链。

[0006] 在 IgG 中, 最重要的 N-聚糖连接至两条 CH2 链的 Asn297 处 (参见图 14), 其尤其包括 N-乙酰基-神经氨酸 (唾液酸)、N-乙酰基-葡萄糖胺、半乳糖、甘露糖及岩藻糖残基。

[0007] 这基本上适用于转基因植物表达系统以及适用于哺乳动物细胞系、昆虫细胞系等。在所有这些情况下, N-聚糖包含至少一个岩藻糖残基, 其以 α -3-糖苷或 α -6-糖苷连接至与多肽链的 Asn 残基连接的 N-乙酰基-葡萄糖胺残基。

[0008] 酵母表达系统易于产生富含甘露糖的高糖蛋白, 其治疗性抗体被施用至患者时常常导致非期望的免疫反应。杆状病毒转染的昆虫细胞系统因低糖基化而引起问题, 其负面地影响治疗性抗体的效应子功能。此外, 主要的缺点是感染性杆状病毒的催化性质, 其使得用于完整 IgG 生产的范围 (window) 变窄。

[0009] ADCC 是细胞介导免疫的机制, 藉此免疫系统的效应细胞主动地裂解已被特异性抗体结合的靶细胞。它是作为体液免疫反应的一部分的抗体可以通过其作用来限制及遏制感染的多种机制中的一种。经典的 ADCC 介导的效应细胞是自然杀伤 (NK) 细胞; 但单核细胞和嗜酸性粒细胞也可以介导 ADCC。由于其依赖于先前的抗体反应, 所以 ADCC 是适应性免疫反应的一部分。

[0010] 用于在靶细胞中引发 ADCC 的治疗性抗体需要 Fc 区域, 以被所述效应细胞的 Fc γ 受体所识别。

[0011] 近来的研究已显示, 相较于岩藻糖基化抗体, 在其糖基化模式中具有减少量的岩藻糖的单克隆抗体显示出高得多的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性。再次, 岩藻糖残基的缺乏导致增加的 ADCC 的位置基本上是 Asn297 位置。低 / 无岩藻糖抗体的 ADCC 增加的机制似乎是由如此修饰的 Fc 区域针对 Fc γ R (例如, Fc γ IIIa (CD16), 其是在人免疫效应细胞中针对 ADCC 的主要 Fc 受体) 的亲和力增加所介导的 (Shields 等人, 2002)。

[0012] 岩藻糖基化是牵涉糖蛋白或糖脂上的寡糖的最常见修饰中的一种。岩藻糖基化包括将岩藻糖残基附接至 N-聚糖、O-聚糖及糖脂。O-岩藻糖基化 (一种特殊类型的岩藻糖

基化)对于Notch信号转导非常重要。岩藻糖基化的调控机制是复杂的。许多种类的岩藻糖基转移酶、GDP-岩藻糖合成途径及GDP-岩藻糖转运蛋白参与了岩藻糖基化的调控。

[0013] 已知糖基化影响治疗性单克隆抗体的效应子功能。在抗体的寡糖链中的不同糖残基中,岩藻糖是影响由产物诱导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的关键糖类之一。

[0014] 通常使用细胞培养参数的操作来控制抗体的半乳糖苷化及唾液酸化。岩藻糖基化的控制主要通过使用FUT8敲除细胞和其它基因沉默模型通过细胞系工程改造来完成。

[0015] US20090208500公开了通过操作FUT8敲除细胞来产生具有减少的岩藻糖和改善的Fc功能的抗体。

[0016] US7972810公开了细胞培养方法和含锰培养基,其改善糖蛋白(包括红细胞生成素及其类似物或衍生物)的糖基化或唾液酸化。根据该公开内容,锰增加了唾液酸化和在O-连接及N-连接糖基化的情况下的位点占用(即较少的非糖基化产物),而且还增加末端半乳糖苷化。

[0017] 此外,可以由培养基渗透压来控制单克隆抗体的岩藻糖含量以用于高抗体依赖性细胞毒性(Konno等人,2012)。

[0018] 然而,存在对于在所需细胞系中产生糖蛋白同时控制重组工程改造抗体的岩藻糖含量而无需每次经历在所选细胞系中产生FUT8基因敲除的费力过程的有效方法的需要。

[0019] 发明的实施方案

[0020] 这些目标通过使用根据本发明的独立权利要求的方法和手段得到满足。从属权利要求涉及优选实施方案。还应理解,由数值限定的取值范围应被理解为包含该限定值。

[0021] 发明概述

[0022] 在详细描述本发明之前,应理解,本发明不限制于所描述的装置的特定组成部分或所描述的方法的特定工艺步骤,因为这样的装置以及方法可发生变化。还应理解,本文使用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的,并不意欲进行限制。必须注意,如在说明书及所附权利要求书中所使用的,除非上下文另外地清楚指明,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括单数和/或复数对象。此外,还应理解,在通过数值限定给出参数范围时,该范围被视为包括这些限定值。

[0023] 根据本发明的一个实施方案,提供了一种用于在真核生物和/或真核生物的蛋白质表达系统中修饰岩藻糖基化的方法或过程,在该方法或过程中,控制培养基中的锰或锰离子的总浓度。

[0024] 糖蛋白的岩藻糖基化是由岩藻糖基转移酶(FUT)完成的。这些酶是将L-岩藻糖从GDP-岩藻糖(鸟苷二磷酸岩藻糖)供体底物转移至受体底物的酶。受体底物可以是另一种糖,例如在N-连接糖基化的情况下将岩藻糖转移至核心GlcNAc(N-乙酰基葡萄糖胺)糖或是在由O-岩藻糖基转移酶产生的O-连接糖基化的情况下将岩藻糖转移至蛋白质。在哺乳动物中有不同的岩藻糖基转移酶,其中绝大多数位于高尔基体。最近已显示O-岩藻糖基转移酶定位于内质网(ER)。哺乳动物岩藻糖基转移酶的实例是FUT1、FUT2、FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT8、FUT9、FUT10及FUT11。

[0025] 尽管锰的作用还未被完全理解,锰是参与许多酶系统的必需微量元素。它在对于能量产生是必需的酶中用作辅因子,并且涉及葡萄糖的代谢作用、肝脏中的糖原储存、蛋白质消化作用以及胆固醇及脂肪酸的合成。它对于DNA和RNA分子的合成也是必需的。

[0026] 锰对于神经系统的生长及维护、骨和关节的发育及维护、雌性性激素及甲状腺激素的功能是必需的。超氧化物歧化酶 (SOD, MnSOD) 是一种在其结构中含有锰的抗氧化酶。

[0027] 在细胞外液体或真核生物中, 锰实际上不存在, 然而在哺乳动物中, 锰的细胞内浓度是在 0.010 皮克 / 细胞至 0.10 皮克 / 细胞的范围内。

[0028] 然而, 本发明人出人意料地发现, 锰的浓度对于糖蛋白的岩藻糖基化水平具有直接效应。

[0029] 因此, 本发明提供用于通过在过程中改变培养基及进料中的锰或锰离子的总浓度来修改糖基化蛋白质的岩藻糖含量。

[0030] 优选地, 该方法或过程是降低岩藻糖基化的方法或过程。在这样的方法或过程中, 蛋白质表达和 / 或翻译后修饰是在存在升高的锰或锰离子的总浓度的情况下进行的。

[0031] 出人意料地, 本发明人发现, 在这样的条件下, 所表达的糖蛋白具有降低的岩藻糖基化水平。此外, 他们发现, 细胞生长、存活力及所产生的蛋白质的滴度未受锰或锰离子浓度升高的影响。

[0032] 此外, 他们发现, 糖基化模式的其它性质 (即 G0 以及 Man5) 在存在升高的锰或锰离子的总浓度的情况下增加。

[0033] 如本文所使用, 术语“岩藻糖基化水平”意指其中聚糖携带岩藻糖的糖蛋白的总量。同样地, 术语“非岩藻糖基化水平”以及“非岩藻糖基化百分比”意指在其聚糖中没有岩藻糖的糖蛋白的百分比。

[0034] 在根据本发明的方法或过程的优选实施方案中, 提供的升高的锰或锰离子浓度是在 $\geq 0.05\text{mM}$ 至 $\leq 10\text{mM}$ 的范围内。

[0035] 优选地, 升高的锰或锰离子浓度为 0.05 ; 0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.25 ; 0.3 ; 0.35 ; 0.4 ; 0.45 ; 0.5 ; 0.55 ; 0.6 ; 0.65 ; 0.7 ; 0.75 ; 0.8 ; 0.85 ; 0.9 ; 0.95 ; 1 ; 1.05 ; 1.1 ; 1.15 ; 1.2 ; 1.25 ; 1.3 ; 1.35 ; 1.4 ; 1.45 ; 1.5 ; 1.55 ; 1.6 ; 1.65 ; 1.7 ; 1.75 ; 1.8 ; 1.85 ; 1.9 ; 1.95 ; 2 ; 2.05 ; 2.1 ; 2.15 ; 2.2 ; 2.25 ; 2.3 ; 2.35 ; 2.4 ; 2.45 ; 2.5 ; 2.55 ; 2.6 ; 2.65 ; 2.7 ; 2.75 ; 2.8 ; 2.85 ; 2.9 ; 2.95 ; 3 ; 3.05 ; 3.1 ; 3.15 ; 3.2 ; 3.25 ; 3.3 ; 3.35 ; 3.4 ; 3.45 ; 3.5 ; 3.55 ; 3.6 ; 3.65 ; 3.7 ; 3.75 ; 3.8 ; 3.85 ; 3.9 ; 3.95 ; 4 ; 4.05 ; 4.1 ; 4.15 ; 4.2 ; 4.25 ; 4.3 ; 4.35 ; 4.4 ; 4.45 ; 4.5 ; 4.55 ; 4.6 ; 4.65 ; 4.7 ; 4.75 ; 4.8 ; 4.85 ; 4.9 ; 4.95 ; 5 ; 5.05 ; 5.1 ; 5.15 ; 5.2 ; 5.25 ; 5.3 ; 5.35 ; 5.4 ; 5.45 ; 5.5 ; 5.55 ; 5.6 ; 5.65 ; 5.7 ; 5.75 ; 5.8 ; 5.85 ; 5.9 ; 5.95 ; 6 ; 6.05 ; 6.1 ; 6.15 ; 6.2 ; 6.25 ; 6.3 ; 6.35 ; 6.4 ; 6.45 ; 6.5 ; 6.55 ; 6.6 ; 6.65 ; 6.7 ; 6.75 ; 6.8 ; 6.85 ; 6.9 ; 6.95 ; 7 ; 7.05 ; 7.1 ; 7.15 ; 7.2 ; 7.25 ; 7.3 ; 7.35 ; 7.4 ; 7.45 ; 7.5 ; 7.55 ; 7.6 ; 7.65 ; 7.7 ; 7.75 ; 7.8 ; 7.85 ; 7.9 ; 7.95 ; 8 ; 8.05 ; 8.1 ; 8.15 ; 8.2 ; 8.25 ; 8.3 ; 8.35 ; 8.4 ; 8.45 ; 8.5 ; 8.55 ; 8.6 ; 8.65 ; 8.7 ; 8.75 ; 8.8 ; 8.85 ; 8.9 ; 8.95 ; 9 ; 9.05 ; 9.1 ; 9.15 ; 9.2 ; 9.25 ; 9.3 ; 9.35 ; 9.4 ; 9.45 ; 9.5 ; 9.55 ; 9.6 ; 9.65 ; 9.7 ; 9.75 ; 9.8 ; 9.85 ; 9.9 ; 9.95 ; 或 10mM。

[0036] 这些浓度意指在发生蛋白质表达和 / 或翻译后修饰的培养基中的总浓度。这意味着, 例如, 进料液 (feed solutions) 可以具有显著较高的锰或锰离子浓度。

[0037] 优选地, 锰的浓度是通过将锰加至培养基和 / 或进料培养基来完成的。

[0038] 同样优选地, 在蛋白质表达和 / 或翻译后修饰期间, 锰浓度增加或降低。

[0039] 在根据本发明的方法或过程的优选实施方案中, 提供的是, 在选自以下的蛋白质

表达系统中进行蛋白质表达和 / 或翻译后修饰：

- [0040] • 昆虫细胞；
- [0041] • 真菌细胞；
- [0042] • 酵母细胞；
- [0043] • 原生动物细胞；和 / 或
- [0044] • 哺乳动物细胞。
- [0045] 优选地，哺乳动物细胞选自鼠细胞（例如，NS0）、仓鼠细胞（例如，CHO 或 BHK）和 / 或人类细胞（例如，PER. C6）。
- [0046] 优选地，蛋白质是糖蛋白。更优选地，蛋白质是重组蛋白。
- [0047] 在根据本发明的方法或过程的优选实施方案中，提供的是，蛋白质是免疫配体。
- [0048] 本文所使用的术语“免疫配体”意指具有以足够程度的灵敏度和 / 或特异性与另一生物学实体结合的能力的实体。
- [0049] 在根据本发明的方法或过程的另一个优选实施方案中，提供的是，免疫配体是选自以下的至少一种：
- [0050] • 单克隆抗体（鼠、嵌合、人源化、人）或其衍生物
- [0051] • 新的抗体形式
- [0052] • 由融合至靶结合部分（例如受体片段）的免疫球蛋白 Fc 区域组成的融合肽。
- [0053] 优选地，以上列出的免疫配体包含能够被糖基化和 / 或与 Fc 受体（例如 Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a), Fc γ RIIB (CD16b)) 结合的 Fc 区域或另一种结构域。
- [0054] 如本文所使用的，术语“单克隆抗体 (mAb)”应意指具有同质抗体群体（即，由完整的免疫球蛋白或其片段或衍生物组成的同质群体）的抗体组成物。特别优选的，这样的抗体选自 IgG、IgD、IgE、IgA 和 / 或 IgM、或其片段或衍生物。
- [0055] 如本文所使用，术语“衍生物”应意指与一般抗体概念结构上不同但仍具有某些结构关系的蛋白质构建体。
- [0056] 用于产生和 / 或选择嵌合、人源化和 / 或人 mAb 的方法是本领域已知的。例如，Genentech 的 US6331415 描述嵌合抗体的产生，而 Medical Research Council 的 US6548640 描述 CDR 移植技术，以及 Celltech 的 US5859205 描述人源化抗体的产生。除其它以外，体外抗体文库公开于 MorphoSys 的 US6300064 以及 MRC/Scripps/Stratagene 的 US6248516 中。噬菌体展示技术例如被公开于 Dyax 的 US5223409 中。转基因哺乳动物平台例如被描述于 TaconicArtemis 的 US200302048621 中。
- [0057] 术语“新抗体形式”包含例如双特异性或三特异性抗体构建体、双体抗体、骆驼科动物抗体、域抗体、具有由 scFvs 组成的两条链的双价同二聚体、IgAs（通过 J 链和分泌性成分连接的两个 IgG 结构）、鲨鱼抗体、由新世界灵长类动物框架加上非新世界灵长类动物 CDR 组成的抗体、包含 CH3+VL+VH 的二聚化构建体以及抗体缀合物（例如，连接到毒素、细胞因子、放射性同位素或标记的抗体或片段或衍生物）。然而此列表不是限制性的。
- [0058] 此外，该术语也包括免疫毒素（即，由抗体或其片段组成的杂二聚体分子），以及细胞毒性、放射性及细胞凋亡因子。这样的形式类型例如已由 Philogen 开发（例如，与人 TNF 融合的抗 -EDB 人抗体 L19）或是由与细胞毒性的 Mertansine (DM1) 连接的曲妥珠单抗

组成的 Trastuzumab emtansine (T-DM1)。

[0059] 术语“融合肽”或“融合蛋白”涉及例如由免疫球蛋白 Fc 部分加上靶结合部分组成的蛋白质（所谓的 -cept 分子）。

[0060] 在根据本发明的方法或过程的另一个优选实施方案中，提供的是，相较于在不存在升高的锰或锰离子浓度的情况下表达的免疫配体，该免疫配体具有减少程度的岩藻糖基化。

[0061] 优选地，根据本领域的方法来测定岩藻糖基化程度。除其它以外，这样的方法包括用肽-N-糖苷酶 F (PNGase F) 消化以将抗体去糖基化（更多细节参见图 1 的描述），和随后收集分离出的聚糖。将收集到的聚糖用邻氨基苯甲酸标记，并且随后藉由 NP HPLC 进行分析。该方法的全部细节公开于 Anumula (2012)，其内容通过引用并入本文。

[0062] 术语“不存在升高的锰或锰离子浓度”是指在该过程期间或在该过程的准备中，没有出于自愿地引入锰或锰离子。这并未排除仍可存在微量的锰，其天然存在于介质（如水）中。

[0063] 在根据本发明的方法或过程的优选实施方案中，提供的是，相较于 (i) 在不存在升高的锰或锰离子浓度的情况下表达的或 (ii) 具有较高的岩藻糖基化程度的免疫配体，该免疫配体显示增加的 ADCC 活性。

[0064] 术语“ADCC”涉及细胞介导免疫防御的机制，藉此免疫系统的效应细胞主动地裂解靶细胞，其膜表面抗原已被特异性抗体结合。它是作为体液免疫反应的一部分的抗体通过其可以用来限制及遏制感染的多种机制中的一种。经典的 ADCC 是由自然杀伤 (NK) 细胞介导的；巨噬细胞、嗜中性粒细胞及嗜酸性粒细胞也可以介导 ADCC。由于其依赖于先前的抗体反应，所以 ADCC 是适应性免疫反应的一部分。

[0065] 优选地，通过根据本领域的方法来测定 ADCC 活性。除其它以外，这样的方法包括如图 3 显示的细胞毒性测定法。

[0066] 其它合适的测定法包括铬 -51 [Cr51] 释放测定法、铕 [Eu] 释放测定法及硫 -35 [S35] 释放测定法。通常，表达某一表面暴露抗原的被标记的靶细胞系与特异于该抗原的抗体一起温育。在洗涤后，表达 Fc 受体 CD16 的效应细胞与抗体标记的靶细胞共温育。随后，以闪烁计数器或分光光度法通过细胞内标记的释放来测量靶细胞裂解。耦合的生物发光方法 aCella TOX 现在普遍地用于 ADCC 及其它细胞毒性评估。由于此技术测量天然存在于靶细胞中的酶的释放，不需要标记步骤并且不使用放射性试剂。

[0067] 优选地，免疫配体靶向牵涉细胞介导免疫防御的一种或多种细胞表面抗原。

[0068] 优选地，所述细胞表面抗原选自亲环蛋白 C、补体因子 I、CD6、CD5、牛 WC-1 和 M130。

[0069] CD6 是主要由人 T 细胞及 B 细胞的子集以及由一些 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病和神经元表达的一种重要的细胞表面蛋白 (Aruffo 等人 1991, Kantoun 等人 1981, Mayer 等人 1990)。CD6 是蛋白质大家族的一员，特征在于具有与 I 型巨噬细胞的清道夫受体的富含半胱氨酸结构域 (SRCR) 同源的至少一个结构域 (Matsumoto 等人 1991 以及 Resnick 等人 1994)。此家族的其它成员包括 CD5 (Jones 等人, 1986)、亲环蛋白 C (Friedman 等人 1993)、结合活化的补体蛋白 C3b 及 C4b 的补体因子 I (Goldberger 等人, J. Biol. Chem. 1987, 262:10065)、由 τ / δ T 细胞表达的牛 WC-1 (Wijngaard 等人 1992) 以及 M130 (Law 等人 1993)，其是巨噬细胞活化标志物。

[0070] 其它优选的表面抗原包括 CD20、EGFR、HER2/neu 以及膜结合的 TNF。

[0071] 在根据本发明的方法或过程的优选实施方案中,提供的免疫配体是 Itolizumab。

[0072] Itolizumab (INN, 商品名 **Alzumab®**) 是由 Biocon 开发的一种“全新”人源化 IgG1 单克隆抗体。它选择性地靶向 CD6, 其是牵涉 T 细胞的共同刺激、附着及成熟的泛 T 细胞 (pan T cell) 标志物。Itolizumab 通过与 CD6 结合下调 T 细胞活化, 导致促炎症细胞因子合成的减少并且可能通过减少 T 细胞在炎症位置的渗入作用而发挥重要的作用。相较于安慰剂, itolizumab 的双盲的、安慰剂对照的、III 期治疗 - 斑块研究 (phase III treat - Plaques study) 在治疗具有中度至严重银屑病的患者 12 周后, 成功地满足了 PASI-75 分 (银屑病面积和严重指数) 得分的显著改善的预先指定主要终点。Biocon 在 2013 年 1 月从印度药品管理总局 (DCGI) 收到了药品销售许可, 并且在 2013 年 8 月在印度境内开始销售 (Jayaraman, 2013)。

[0073] 从小鼠衍生的 NS0 细胞系 (本文称做“T1h”) 并且还从中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 (本文称做“Bmab-600”) 产生 Itolizumab。因为翻译后修饰, 特别是非岩藻糖基化模式随着细胞系和培养条件而变化, Bmab-600 及 T1h 的 Fc 部分以不同的亲和力与 Fc γ RIIIa 结合。

[0074] 可以例如从小鼠衍生的 NS0 细胞系 (本文称做“T1h”) 并且还从中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系 (本文称做“Bmab-600”) 产生 Itolizumab。因为翻译后修饰, 特别是非岩藻糖基化模式随着细胞系和培养条件而变化, Bmab-600 及 T1h 的 Fc 部分以不同的亲和力与 Fc γ RIIIa 结合。

[0075] 根据本发明的另一方面, 提供了一种糖蛋白, 所述糖蛋白用根据本发明的任何方法或过程的方法或过程来产生。

[0076] 优选地, 所述糖蛋白是重组蛋白。更优选地, 所述糖蛋白是免疫配体, 优选是抗体。特别优选的是, 所述糖蛋白在其糖基化模式上具有减少的岩藻糖含量。

[0077] 优选地, 糖蛋白或其子结构域 (如 Fc 区域) 具有约 35% 的非岩藻糖基化水平。

[0078] 在优选实施方案中, 提供的是, 糖蛋白具有增加的 ADCC。优选地, 所述糖蛋白是 Itolizumab。

[0079] 在另一个优选实施方案中, 提供的是, 糖蛋白实现对于 CD25 和 CD4 呈阳性的细胞特别是 CD4+T 细胞在体外或体内的减少。

[0080] 本发明人出人意料地显示, 根据本发明的抗 CD6 抗体的使用导致对于表面抗原 CD25 和 CD4 (参见图 5b 及描述) 呈成阳性的细胞特别是 CD4+T 细胞的增殖减少。

[0081] 如本文所使用的术语“细胞的减少”意指 (i) 增殖的抑制、(ii) 耗尽、(iii) 细胞凋亡的诱发或 (iv) 导致这样的细胞的减少的其它机制。

[0082] 根据本发明的另一方面, 提供了如上所示的糖蛋白用于制造治疗人或动物患者的药物的用途。同样地, 提供了如上所示的糖蛋白用于治疗人或动物患者的用途。

[0083] 在这样的用途的优选实施方案中, 人或动物患者患有选自以下的疾病或已被诊断为处于发生选自以下的疾病的风险中:

[0084] • 肿瘤疾病, 包括肿瘤、淋巴瘤及白血病, 特别是 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL), 特别是 T 细胞白血病

[0085] • 自身免疫疾病, 包括类风湿性关节炎、银屑病、克罗恩氏病、红斑狼疮和 / 或舍格

伦病

[0086] • 神经退行性疾病,包括多发性硬化和 / 或帕金森氏病、阿尔茨海默病、亨廷顿病和 / 或肌萎缩侧索硬化,和 / 或

[0087] • 感染性疾病

[0088] 优选地,这样的用途涉及治疗或预防已进行移植的人或动物中的不良反应如移植物抗宿主病 (GVHD)。这样的移植包括器官移植以及骨髓移植。

[0089] 实验和附图 / 实施例

[0090] 虽然已在附图以及前文描述中详细说明及描述本发明,但这样的说明及描述应被认为是示例性或范例性的且不是限制性的;本发明并不受限于所公开的实施方案。本领域普通技术人员在实施请求保护的发明中可以通过研读附图、公开内容及所附权利要求书而理解并实现对公开的实施方案的其它变化。在权利要求书中,单词“包含”未排除其它元素或步骤,而且不定冠词“一个”或“一种”并未排除复数。仅某些措施记载于互相不同的从属权利要求中的事实并非表明不能使用这些措施的组合以处于优势。权利要求中的任何参考记号不应被解释为限制范围。

[0091] 图 1 :用具有 Fc 区域的抗体进行的去糖基化实验的结果。

[0092] 将抗 CD 抗体 Itolizumab (也称做 T1h) 用去糖基化缓冲液 (50mM Tris, 1mM CaCl₂, pH = 8.1) 以对于 Itolizumab (5mg/ml) 1:1 的比例进行温育,随后用肽 -N- 糖苷酶 F (PNGase) 酶 (对于 1mg 抗体为 10U) 温育 24 小时。

[0093] 在 37°C 下温育 24 小时后,在样品中加入相等体积的 T1h 缓冲液 (组氨酸海藻糖缓冲液) 并且在 4°C、4000rpm 于 centricon 管 (50kD 截断过滤器) 中离心 15 分钟。将残留体积再次以相等体积的 T1h 缓冲液重新悬浮,并在 4°C、4000rpm 下离心 15 分钟。将去糖基化的 Ab 储存于最终的储存管中,并通过 Nano drop 估计浓度。通过 CE-SDS (毛细管电泳) 确认去糖基化。随后进行荧光活化细胞分选仪 (FACS) 分析。简言之,用抗 CD6 抗体 T1h 或如上所述产生的去糖基化的 T1h 抗体标记 HUT78 细胞 (T 细胞系)。

[0094] 随后使用 FITC 标记的抗 Fc 的第二抗体,观察到信号。图 1 显示 Th1 的 Fc 区域的去糖基化并未损及其与表达 CD6 的细胞系结合的能力。这些结果进一步由等离子体共振实验确认。

[0095] 图 2 :使用具有 Fc 区域的抗体进行的去糖基化实验的结果。

[0096] 具体地,如上文所讨论的,将抗 CD 抗体 Itolizumab 去糖基化。其抑制活化的 T 细胞增殖的能力随后在合适的增殖测定法中与未经修饰的 T1h 的能力进行比较。使用尼妥珠单抗作为阴性对照,尼妥珠单抗是具有与 Itolizumab 相同的 IgG 骨架但与 EGFR 结合的抗体。

[0097] 简言之,使用碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.5) 将抗体以 0 至 1 μ g/ml 范围的浓度涂布在无菌的 96 孔板中过夜。在洗涤后,将来自正常健康志愿者的纯化淋巴细胞加至板中。加入从 80 至 1 μ g/ml 的 Itolizumab,并且将培养物温育 4 天。加入阿拉玛蓝以测量增殖。相对于未受刺激的细胞对照来计算倍数差异。使用同种型尼妥珠单抗抗体作为对照。附着在板上的抗 CD3 (所使用的抗 CD3 是在古巴分子免疫学中心制造的 OKT3 克隆) 刺激来自正常健康的志愿者的幼稚 T 细胞 (来自在 Ficol1 密度梯度上纯化的人供体的外周血单核细胞 (PBMC)) 的增殖。

[0098] 尼妥珠单抗 (80 μ g/ml) 不显示任何的 T- 细胞增殖抑制, 与未受刺激的细胞相比, 导致了大约 2.75 倍的细胞增加, 而天然的 T1h 显示 T- 细胞增殖的抑制 (在 80 μ g/ml 至 1.25 μ g/ml 的范围为 35 至 20% 抑制)。与此相反, 去糖基化的 T1h 的影响与尼妥珠单抗的影响类似。这意味着, 在去糖基化后, 抗体失去其抑制 T 细胞增殖的能力。

[0099] 图 3: 比较天然抗体和去糖基化抗体的细胞毒性测定法的结果

[0100] 将冷冻的 PBMC 于具有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中在 IL-2 (浓度 2.5ng/mL) 的存在下解冻, 并于 37°C、5% CO₂ 培养箱中温育过夜。第二天, 将细胞重新悬浮于没有 IL-2 的培养基中并温育 4 至 5 小时。将 12,000 个 Hut-78 细胞 / 50 μ L 加入 96 孔板中的每一孔。按照模板加入 50 μ L 的 3X 浓缩药物 (10 微克 / 毫升的天然 T1h、去糖基化的 T1h 或抗 CD3) 并于 37°C、5% CO₂ 培养箱中温育 2 小时。将 PBMC 重新悬浮于测定培养基中并加入 240,000 个 PBMC / 50 μ L / 孔, 以获得 1:20 的靶对效应物的比例。将板于 37°C、5% CO₂ 培养箱中温育 22 小时。将 50 μ L 的 Cyto Tox-Glo 加至板并且于室温温育 30 分钟。使用 Spectramax 来读取板的发光, 以测定细胞毒性。

[0101] 虽然天然的 T1h 相较于抗 CD3 (其为靶向 T 细胞的部分耗尽抗体) 显示轻微的但统计上一致性的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性, 但该 ADCC 活性在分子的去糖基化后显著地降低, 表明了 T1h 的效应子功能。使用 Itolizumab 的 Fab2 片段也可以与去糖基化分子相当降低 ADCC 活性。

[0102] 图 4: 比较天然的抗体和去糖基化的抗体的混合性淋巴细胞反应 (MLR) 实验的结果。

[0103] PBMC 的制备: 从健康供体收集 30ml 的血液。通过标准 FICOLL 密度梯度离心来分离 PBMC。

[0104] 单核细胞耗尽及建立

[0105] 树突细胞 (DC) 衍生测定: 将这些细胞于 CO₂ 培养箱中温育 2 小时。使单核细胞附着在塑料表面上。随后将未附着的细胞 (PBL) 从培养瓶移除。用 1XPBS 洗涤所有的培养瓶一次。将 20ml 的 DC 培养基 (制成 50ml 贮存液, 在 50ml 的测定培养基中的 10 μ l 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 5 μ l 的 IL-4) 加至每一培养瓶。将培养瓶保持在 CO₂ 培养箱中 6 天。

[0106] 对生长中的树突细胞进行 LPS 处理: 在第 6 天, 将具有脂多糖 (LPS) 的 DC 培养基加入每一培养瓶 (在培养瓶中的 LPS 最终浓度为 4ug/ml) 并且放回 CO₂ 培养箱中 40 至 48 小时。

[0107] DC 的制备: 在 LPS 处理后, 从两个培养瓶收集细胞悬浮物 (DC)。用 1XPBS 洗涤每一培养瓶一次。以 1500rpm、5 分钟转下细胞悬浮物, 并且于 3ml 培养基中重建。计数 LPS 处理过的 DC, 并且按照测定要求在培养基中重建。

[0108] PBL 的制备: 采用如前文所述的相同方案, 在从另一健康个体收集血液后, 进行 Ficoll 分离。在单核细胞耗尽之后, 收集未附着的外周血淋巴细胞 (PBL) 并以 1500rpm、5 分钟转下并在 5ml 培养基中重建。计数 PBL 并重建至 1.0x10⁶ 个细胞 / 毫升。

[0109] 对树突细胞 (DC) 进行 SEB 处理: 葡萄球菌肠毒素 B (SEB) 贮存液浓度为 1mg/ml。从贮存液中, 将 3 μ l 的 SEB 溶解于 3ml 的培养基, 得到 1mg/ml 的 SEB 工作溶液。按照标准方案, 用 0.6ug 的 SEB 处理 0.06x10⁶ 个 DC。制得 0.1x10⁶ 个细胞 / 毫升的贮存液 (LPS 处

理过的成熟 DC)。由此,将 600 μ l 的细胞悬浮物溶解于 2.4ml 的测定培养基(细胞悬浮物的总体积为包含 0.02 $\times 10^6$ 个细胞/毫升的 3ml)中。将其以 1500rpm、5 分钟旋转,并且将 600ml 的 SEB(1 μ g/ml)加至沉淀物。将其在 37 $^{\circ}$ C 下于 CO₂ 培养箱内温育 20 分钟。温育后将过量的培养基(2ml)加至试管内,并且以 1500rpm 洗涤 5 分钟。丢弃上清液,并且再次用 3ml 的培养基洗涤细胞。最后将沉淀物溶解于 3ml 的测定培养基。

[0110] 对 PBL 进行丝裂霉素 C 处理:从 1mg/ml 的丝裂霉素贮存液制得 25 μ g/ml 的丝裂霉素溶液。在 37 $^{\circ}$ C 下于 CO₂ 培养箱内用 500 μ l 的 25 μ g/ml 丝裂霉素对 0.5 $\times 10^6$ 个 PBL 处理 30 分钟。温育后,向其加入过量的培养基(2ml),并在 1500rpm 下洗涤细胞 5 分钟。丢弃上清液,并且再次用 3ml 的培养基洗涤细胞。

[0111] MLR 测定 - 增殖的抑制:以 DC:PBL = 1:50 的比例进行 MLR 测定。使用的阴性对照是尼妥珠单抗。将天然的 T1h 针对其缺少完整功能的 Fc 区域的 Fab2 形式进行测试。6 天后使用 Bio-Tek Synergy HT Gen5 读板器利用阿拉玛蓝来读取板。

[0112] 完整的抗体可以抑制在此反应中诱发的 T 细胞增殖,而具有不同特异性的阴性对照尼妥珠单抗则不能。没有 Fc 区域的 T1h 也无法抑制 T 细胞增殖,表明在此测定中糖基化的 Fc 区域和 Fab 对 T1h 的抑制能力是关键性的。在使用去糖基化的 T1h 中也观察到类似的效应,由此确认 T1h 的效应子功能需要糖基化。

[0113] 图 5a:比较不同免疫调节剂的另一混合淋巴细胞反应(MLR)实验的结果

[0114] 实验方案与图 4 相同。其为混合淋巴细胞反应。除了 4 倍浓度的天然 T1h 外,还使用其它免疫抑制剂及免疫调节剂,亦即吡美莫司(Pim)、阿巴西普(Aba)及达利珠单抗(Dac)被包括作为用于测定的阳性对照。尼妥珠单抗(hR3)用作阴性对照。

[0115] 事实证明,相较于与人 EGFR 结合的特同种型抗体尼妥珠单抗,T1h 能够降低混合性淋巴细胞反应中诱导的 T 细胞增殖。由 T1h 诱导的倍数降低可与由阿巴西普(CTLA4-IgG1Fc)、达利珠单抗(抗 CD25)及吡美莫司(小分子,IL2 抑制剂)诱导的倍数降低相当。

[0116] 图 5b:显示于图 5a 中的实验的分析。

[0117] 该分析涉及 144 小时(6 天)混合性淋巴细胞反应后来自培养物的细胞。B--、B++、B+- 和 B-+ 为四个象限。这里,在 6 天后评估 MLR 的培养物中的细胞。虽然与其它抗体相比较,T1h 有好的抑制能力,但 T1h 的途径是不同的,因为在这里与使用其它分子的实验不同,在 CD4/CD25 活化的 T 细胞群中存在显著减少。T1h 显示出 CD25+、CD4+ 以及 CD4+T 细胞的减少。这表明 T 细胞子集的选择性耗尽。因此,虽然如图 5a 所显示,在 MLR 中通过 T1h 的抑制可与达利珠单抗、阿巴西普及吡美莫司的抑制相当,但仅 T1h 显示 CD25+、CD4+ 以及 CD4+T 细胞的减少。

[0118] 图 6:比较天然抗体和去糖基化抗体的细胞毒性测定的结果。

[0119] 图 3 中的相同测定被用于(与阳性对照(抗-CD3)相比较)评估具有不同非岩藻糖基化含量的抗体。显示的数据是来自 n = 4 的独立实验的汇编。

[0120] 如本文其它处所描述地进行非岩藻糖基化(参见,例如图 11 的描述)。Itolizumab 的 Fc 区域的非岩藻糖基化增加显示由该抗体相对于阳性对照抗体(抗人 CD3)展示的 ADCC 活性的线性增加。这证实了通过仅增加非岩藻糖基化的 Fc 聚糖含量使 ItoHzumab 更具细胞毒性的能力。例如,为了将 ADCC 从相对于抗 CD3 的活性的 20%增强到高于 40%,抗体中

的非岩藻糖基化含量应大于 10%。

[0121] 如于下文讨论的 biacore 数据所示,这样的增加可通过与 Fc γ RIII 更好的结合而引起(其中 Bmab 600 以相较于 T1h 的更好亲和力来结合)。因此在抗体中增加非岩藻糖基化种类可引起与 Fc γ RIII 的更好结合,并且这转变为更好的 ADCC 功能活性。

[0122] 图 7:比较 T1h 和利妥昔单抗的 CDC 测定的结果

[0123] 使用人 T 细胞淋巴瘤细胞系 Hut78(**ATCC**[®] TIB-161[™]) 来评估 T1h 的 CDC 活性。将 1×10^4 个细胞与 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 的各药物稀释液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中温育 20 分钟。以 1:10 的最终浓度加入合并的正常人血清,并在 37°C 将细胞温育 2 小时。加入 **AlamarBlue**[®] (Invitrogen) 并在 37°C 将细胞温育 20 至 22 小时。染料被细胞的摄取和随后它的降低被读取为在 530/590nm 处的荧光。

[0124] 在测定中使用利妥昔单抗(一种靶向 B 细胞系(Daudi)上的 CD20 受体并引起补体依赖性细胞毒性(CDC)的抗 CD20)作为阳性对照,以显示导致 CDC 的血清组分是完整的。

[0125] T1h 未显示 CDC 活性。Itolizumab 的非岩藻糖基化种类的增加没有增加该分子的 CDC 活性,从而得出结论为只有 ADCC 效应子功能随着非岩藻糖基化的增加而增强。

[0126] 表 1:图 6 和 7 所示的测定中使用的差别非岩藻糖基化 T1h 样品的聚糖特征谱。

[0127]

批次	G0-GN	G0F-GN	G0	G0F	Man5	G1F-GN,G1	G1F	Man6,(G1F-GN)S1	G1FS1, 具有 1G、混合物 S1 的三糖角复合物	G2F	G2FS1, 具有小混合物	G2FS2	其它混合种类	总的非岩藻糖基化种类
T1h 范围	0.1-0.5	0.8-2.2	0.1-0.3	23.5-36.7	1.2-3.7	1.2-3.4	37.9-43.8	0.6-1.4	1.8-2.6	6.2-12.2	6.5-13.6	1.5-3.8	0.5-1.3	3.95
1185/12/03/250	0.7	2.2	5.1	45.1	3.0	3.4	31.3	1.3	1.0	4.2	1.9	0.2	0.7	10.1
1185/12/03/270	0.5	1.5	4.3	42.7	2.6	3.6	34.4	1.3	1.0	5.0	2.1	0.3	0.8	9.7
1185/12/03/340	0.5	1.3	4	45.1	6.8	2.9	29.2	1.8	0.9	4.2	1.9	0.7	0.9	13.1
1185/12/03/310	0.6	1.5	4.5	42.4	7.3	3.7	29.1	2.1	1.0	4.0	2.3	0.3	1.1	14.5
1185/11/01/350	0.7	1.4	6.5	46.7	4.8	3.5	28.2	1.4	0.8	3.4	1.3	0.6	0.7	13.4

[0128] 用标准方法进行糖基化模式的分析。简言之,用肽 -N- 糖苷酶 F(PNGase F) 消化抗体,以使抗体去糖基化(对于更多细节参见图 1 的描述),并且收集分离的聚糖。将收集到的聚糖用邻氨基苯甲酸标记,并且随后藉由 NP HPLC 进行分析。该方法的全部细节公开于 Anumula(2012),其内容通过引用并入本文。

[0129] 在此表中,使用了以下的缩写:G0 = 没有半乳糖,G1 = 1 个末端半乳糖残基,G2 = 2 个末端半乳糖残基,GN = N-乙酰基葡萄糖胺或 GlcNac, F = 岩藻糖,Man5 = 5 个甘露糖残基,Man6 = 6 个甘露糖残基以及 S = 唾液酸。

[0130] 在图 15 中提供了在本文所示的实验过程中所测定的糖基化模式的说明以及所使用的命名法。

[0131] 图 8 至图 10:用等离子体共振检测 T1h 对 Fc γ RIIIa 的结合曲线。

[0132] BIAcore 是一种分析装置,其检测接近传感器表面的基于表面等离子体共振的折射率变化的差异。测定抗体针对 Fc 受体配体的亲和力常数的此方法已被广泛使用。为了检测相互作用,将一个分子(配体)固定在传感器表面上。将它的结合配偶体(分析物)通过流动池以及在连续的流动下注入到水溶液(样品缓冲液)中。当分析物与配体结合时,蛋白质在表面上的累积导致了折射率的增加,其对时间作图以产生感应图。从感应图的分析测定缔合常数(K_a)、解离速率常数(K_d)及平衡解离常数(K_D)。

[0133] $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 被认为是一种中间型亲和受体。它可以变化地结合单体 IgG 并且似乎与较低亲和力 $\text{Fc}\gamma$ 受体相比具有对 IgG 的高亲和力。它们在 NK 细胞和血液细胞的单核细胞上表达。

[0134] 因为翻译后修饰,特别是非岩藻糖基化模式随细胞系和培养条件而变化,Bmab-600 和 T1h 的 Fc 部分以不同的亲和力结合至 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 。我们在 Biacore 仪器中评估这两种产物针对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的结合亲和力。相较于 T1h, Bmab-600 的结合亲和力结果显示与 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 受体结合的更高亲和力。在固定有 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 受体的表面上分析以下样品:

[0135] 1. T1h 抗体

[0136] 2. Bmab-600 抗体

[0137] 3. 去糖基化 T1h 抗体

[0138] 每一样品分析两次并报告平均 K_D (μM) 值并且彼此比较。图 8 显示 T1h 抗体对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的结合曲线,图 9 显示 Bmab-600 抗体对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的结合曲线,以及图 10 显示去糖基化 T1h 抗体对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的结合曲线。

[0139] 该方法是灵敏的并且能够区分固有地存在于 Bmab-600 和 T1h 的差异非岩藻糖基化样品中的非岩藻糖基化差异之间的不同。该数据还显示,随着非岩藻糖基化水平增加, $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 结合亲和力值成比例地降低(意味更高的亲和力)。还通过在没有观察到结合相互作用时分析 T1h 的去糖基化样品证实该方法的特异性。

[0140] 表 2:T1h 抗体对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的动力学值(参见图 8)

[0141]

样品	K_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	K_D (μM)	平均 K_D (μM)
T1h(NS0)	1.52E+04	5.65E-03	3.72E-07	0.372	0.440
	1.16E+04	5.88E-03	5.08E-07	0.508	

[0142] 表 3:Bmab600 抗体对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的速率常数(参见图 9)

[0143]

样品	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	K_D (μM)	平均 K_D (μM)
Bmab-600(CHO)	2.46E+04	4.76E-03	1.93E-07	0.193	0.200
	2.78E+04	5.73E-03	2.07E-07	0.207	

[0144] 表 4:去糖基化 T1h 抗体对 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 的速率常数(参见图 10)

[0145]

样品	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	K_D (μ M)	平均 K_D (μ M)
T1h (NS0)	阴性相互作用				

[0146] 表 5: Bmab-600 和 T1h 抗体对 Fc γ RIIIa 的差异非岩藻糖基化样品的速率常数 (参见图 10)

[0147]

样品	非岩藻糖基化%	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	K_D (μ M)
T1h	2.5	1.18E+04	5.54E-03	4.686E-07	0.468
Bmab-600	5.1	1.28E+04	4.20E-03	3.28E-07	0.328
Bmab-600	9.6	1.96E+04	6.00E-03	3.06E-07	0.306
Bmab-600	35.6	2.73E+04	5.34E-03	1.95E-07	0.195

[0148] 图 11 : 通过加入锰 (Mn) 引起的非岩藻糖基化

[0149] 针对产生 T1h 单克隆抗体的 CHO-S 细胞系测试加入浓度高于培养基浓度 (0.005μ M) 的 Mn。试验以 80 万至 90 万个细胞 / 毫升的起始细胞数开始。在过程期间进行葡萄糖和氨基酸的常规进料, 以满足细胞的营养需求。对样品进行定期取样以检验细胞生长、存活力及 IgG 滴度特征谱。在培养结束时收获培养基并且如本文别处描述地分析糖基化特征谱。

[0150] 以两组来完成试验。第一组是在振荡瓶中进行, 而第二组是在 50L 生物反应器中进行。将锰加入培养基中并且在运行期间以指定间隔通过进料加入。

[0151] 图 11 显示将锰加入培养基和通过进料加入使非岩藻糖基化水平的增加。非岩藻糖基化特征谱对应于在 0.1mM、0.2mM 及 0.25mM 的情况下的第 10 天样品; 以及在 0.075mM 及 0.23mM 的情况下的第 11 天样品。结果概述于以下表中:

[0152] 表 6 : 使用 0.1mM、0.2mM 和 0.25mM 锰 (Mn) 浓度的 10 天振荡瓶试验的聚糖特征谱

所测试的 Mn 浓度	G0-GN	G0f-GN	G0	G0f	Man5	G1f-GN, G1	G1f	Man6, (G1f-GN)S1	G1fS1, 具有 1G、混合物 S1 的三糖	G2f	G2fS1, 具有小混合物	G2fS2	其它混合物种类	非岩藻糖基化
0.1 mM	0.5	1.1	4.9	56.7	3.1	1.9	25.2	1.1	0.8	2.5	1.2	0.5	0.5	9.6
0.2 mM	0.6	0.9	6.3	55.1	4.2	2.3	24.1	1.2	0.8	2.4	1.1	0.5	0.7	12.3
0.25 mM	1.2	1	10.3	51.2	6.8	3.1	20.3	1.1	0.7	1.9	1	0.4	1	19.4

[0154] 表 7 :使用 0.075mM 和 0.23mM Mn 浓度 11 天 50L 批次运行的聚糖特征谱

[0155]

所检测的 Mn 浓度	G0-GN	G0f-GN	G0	G0f	Man5	G1f-GN,G1	G1f	Man6, (G1f-GN)S1	G1fS1, 具有 IG、混合物 S1 的三触角复合物	G2f	G2fS1, 具有小混合物	G2fS2	其它混合物种类	非岩藻糖基化
0.075mM	0.2	1	2	40.6	1.9	2.3	38.9	1.8	1.1	6.2	2.3	0.9	0.8	5.9
0.23mM	0.6	1.5	4.5	42.4	7.3	3.7	29.1	2.1	1	4	2.3	0.3	1.1	14.5

[0156] 基于以上实验,随着锰的总浓度的增加观察到非岩藻糖基化百分比的增加。细胞生长、存活力和 IgG 滴度特征谱未受 Mn 添加的影响。

[0157] 图 12 :通过加入锰 (Mn) 增加 G0、Man5 和非岩藻糖基化水平。

[0158] 通过改变在培养基中的浓度来测试锰在 0.0025 μ M 至 0.5mM 的范围中的效应。没有通过进料来加入锰。试验在振荡瓶中进行,并且在第 8 天针对糖基化特征谱来分析样品。可以观察到,随着锰浓度的增加,G0、Man5 和非岩藻糖基化水平也逐步增加。

[0159] 图 13 :铜浓度不具有对岩藻糖基化的效应。

[0160] 为了评估其它二价阳离子的效应,选择 Cu 用于研究,因为 Cu 也是在糖基化途径中的辅因子(针对唾液酸转移酶)。在振荡瓶中测试在培养基中 0.01 μ M 至 200 μ M 范围内的不同铜浓度。如图 3 所示,没有观察到以任何值的增加/效应(G0、Man5 和非岩藻糖基化)。这证实铜离子不影响蛋白质中的非岩藻糖基化水平。

[0161] 图 14 :免疫球蛋白 G 的示意图。

[0162] 图 14 显示免疫球蛋白 G(IgG) 的示意图。IgG 包含两条相同的轻链(各自包含两个结构域, V_L 和 V_H) 和两条相同的重链(各自包含四个结构域, V_H 、 C_H1 、 C_H2 和 C_H3)。抗体结合表面由重链和轻链的可变结构域形成,并且效应子功能(例如补体活化以及结合细胞毒性细胞)由抗体的 V_c 区域介导。

[0163] 图 15 :N-聚糖结构的命名法。

[0164] 图 15 显示不同 N-聚糖的概述。一般地,术语“N-糖基化”意指氨基酸残基天冬酰胺(N)的糖基化。这里,寡糖链由寡糖基转移酶附接至存在于三肽序列 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 中的那些天冬酰胺残基,其中 X 可以是除了 Pro 之外的任何氨基酸。

[0165] 本文显示的实验清楚地证实:

[0166] a) 糖蛋白的岩藻糖含量可以通过在蛋白质表达过程中改变培养基和进料中的锰或锰离子的总浓度而进行操纵。

[0167] b) 增加锰或锰离子的总浓度导致糖蛋白的非岩藻糖基化增加或导致糖蛋白的糖基化模式中的岩藻糖含量降低。

[0168] c) 在免疫配体（如具有 Fc 区域的抗体）中，在存在升高的锰或锰离子浓度的情况下的蛋白质表达导致了 (i) 较高的非岩藻糖基化程度以及 (ii) 增加的 ADCC。

[0169] d) 在这些免疫配体中，增加非岩藻糖基化程度不导致增加的 CDC。

[0170] e) 相反地，免疫配体（如具有 Fc 区域的抗体）的去糖基化不导致增加的 ADCC。

[0171] f) 除了非岩藻糖基化，免疫配体（如具有 Fc 区域的抗体）的去糖基化可以导致这样的免疫配体的功能活性的丧失，特别是如果这样的功能活性与如效应子功能和 / 或 ADCC 的活性有关的话。

[0172] 参考文献

[0173] Jayaraman K, Nature Biotechnology 31, 1062 - 1063 (2013)

[0174] Anumula KR, Glycobiology (2012) 22 (7):912-917.

[0175] Shields 等人, J BiolChem 277:26733 - 26740.

[0176] Konno 等人, Cytotechnology. 2012May ;64 (3):249-65

[0177] Aruffo 等人, J. Exp. Med. 1991, 174:949

[0178] Kantoun 等人, J. Immunol. 1981, 127:987

[0179] Mayer 等人, J. Neuroimmunol. 1990. 29:193

[0180] Matsumoto 等人, J. Exp. Med. 1991, 173:55

[0181] Resnick 等人, Trends Biochem. Sci. 1994, 19:5

[0182] Jones 等人, Nature. 1986, 323:346

[0183] Friedman 等人. 1993, PNAS 90:6815

[0184] Goldberger 等人, J. Biol. Chem. 1987, 262:10065

[0185] Wijngaard 等人, J. Immunol. 1992, 149:3273

[0186] Law 等人, Eur J. Immunol. 1993, 23:2320

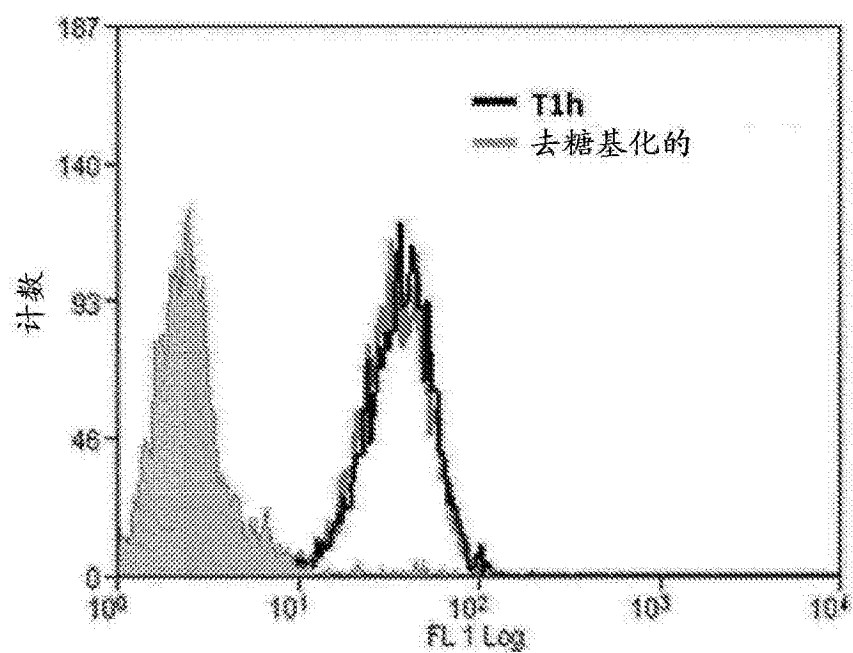


图 1

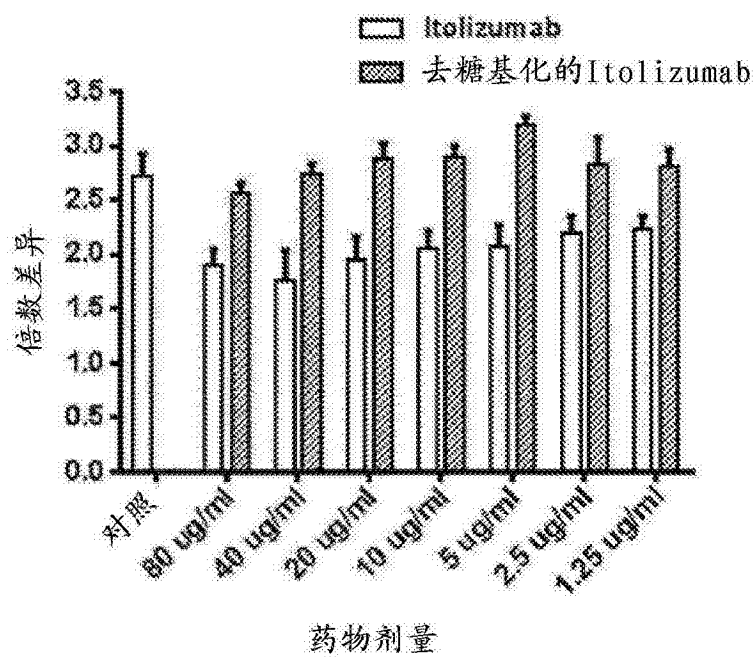


图 2

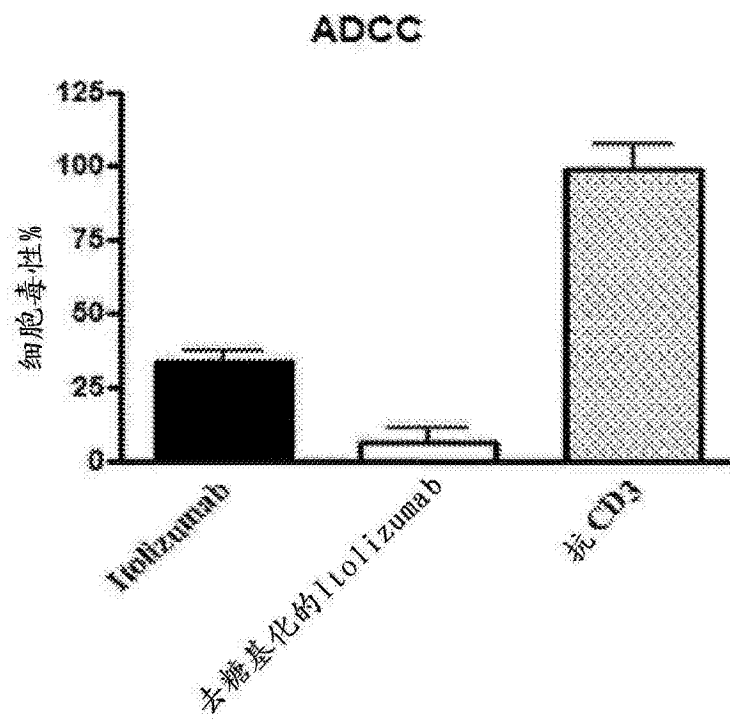


图 3

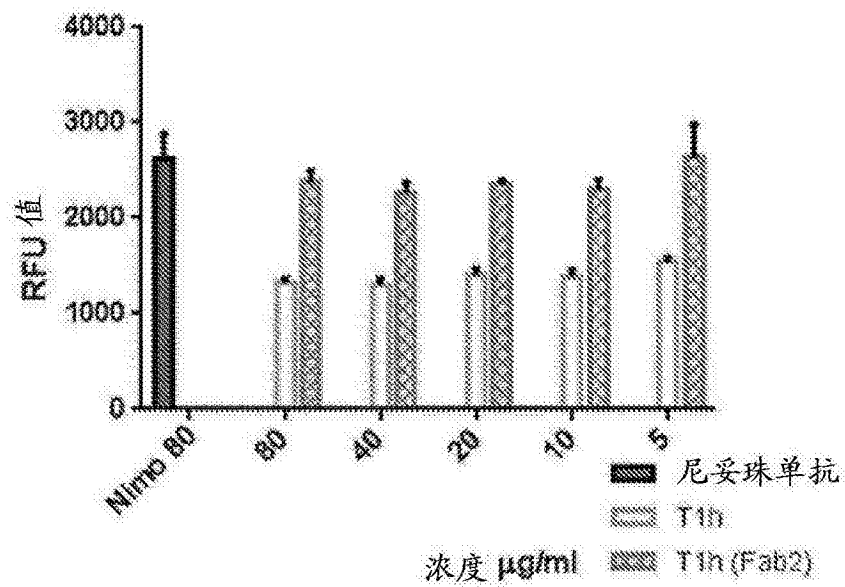


图 4

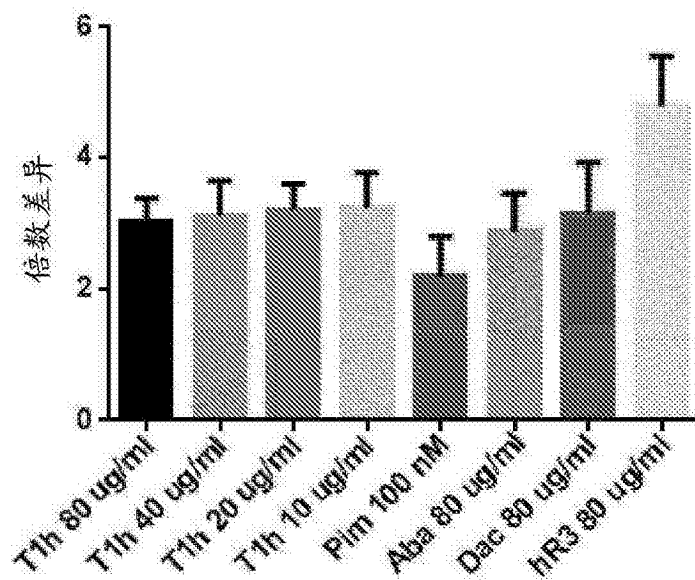


图 5a

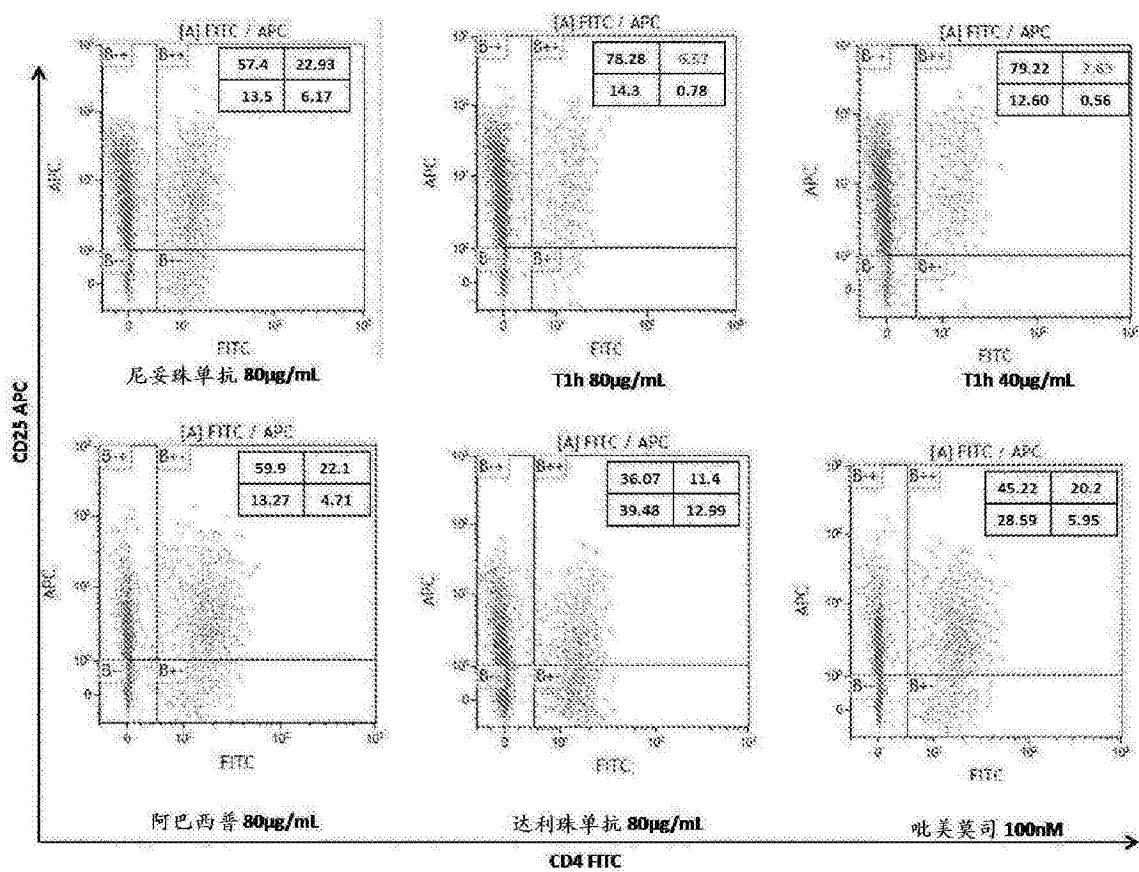


图 5b

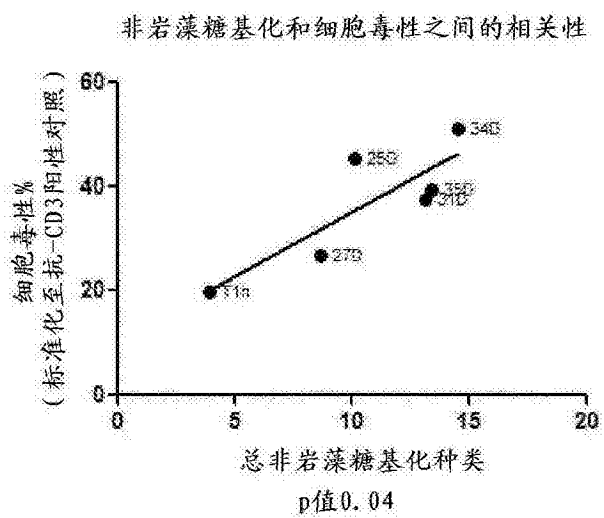


图 6

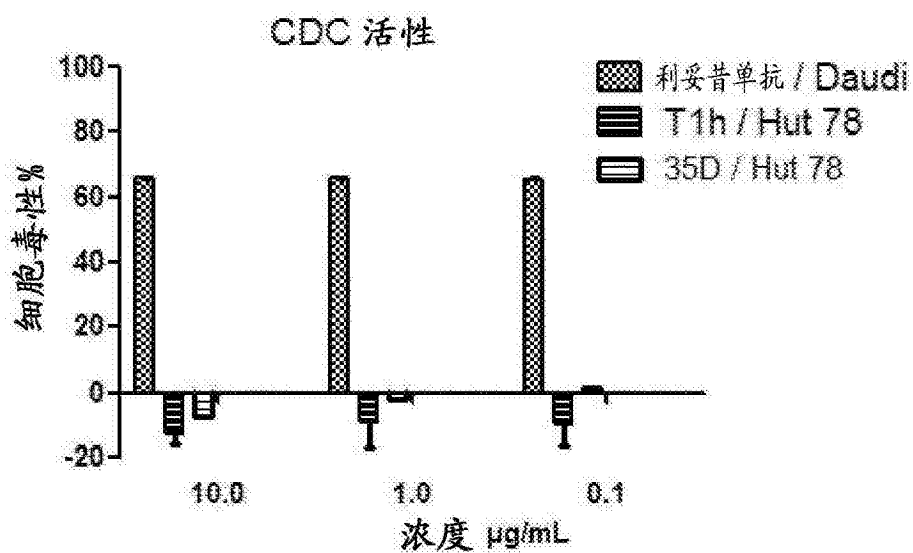


图 7

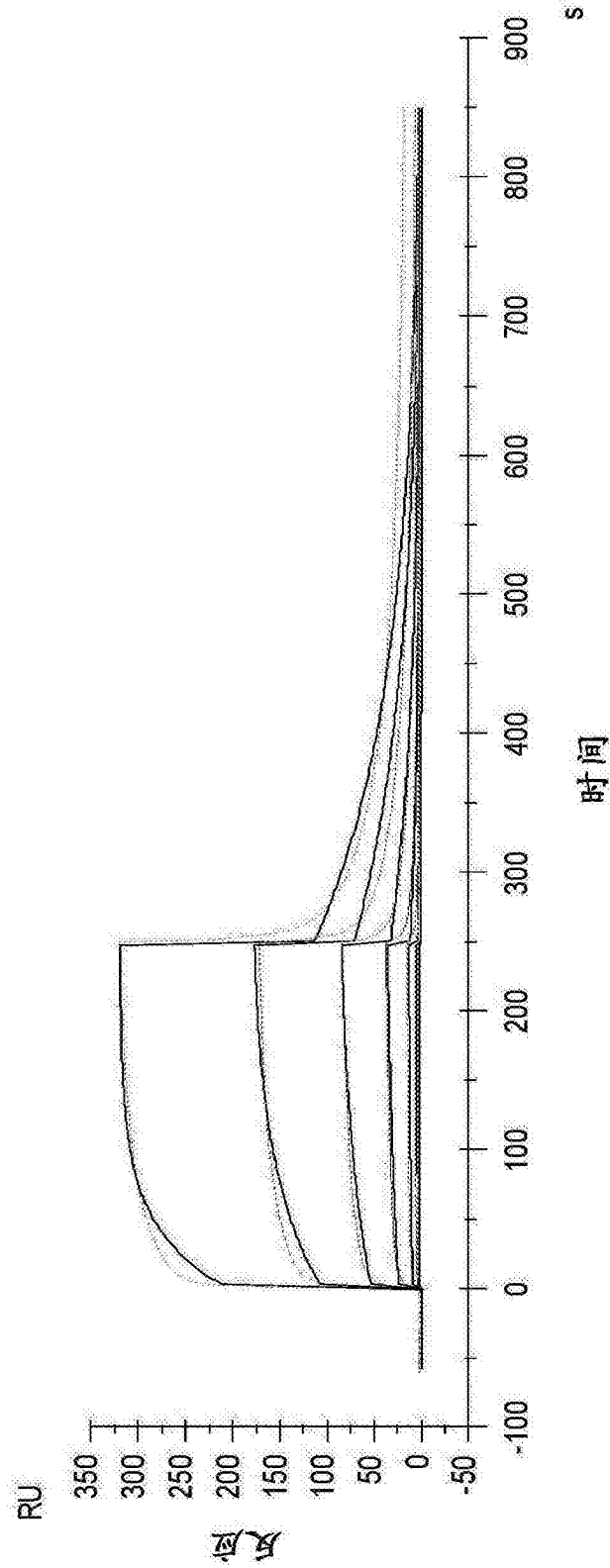


图 8

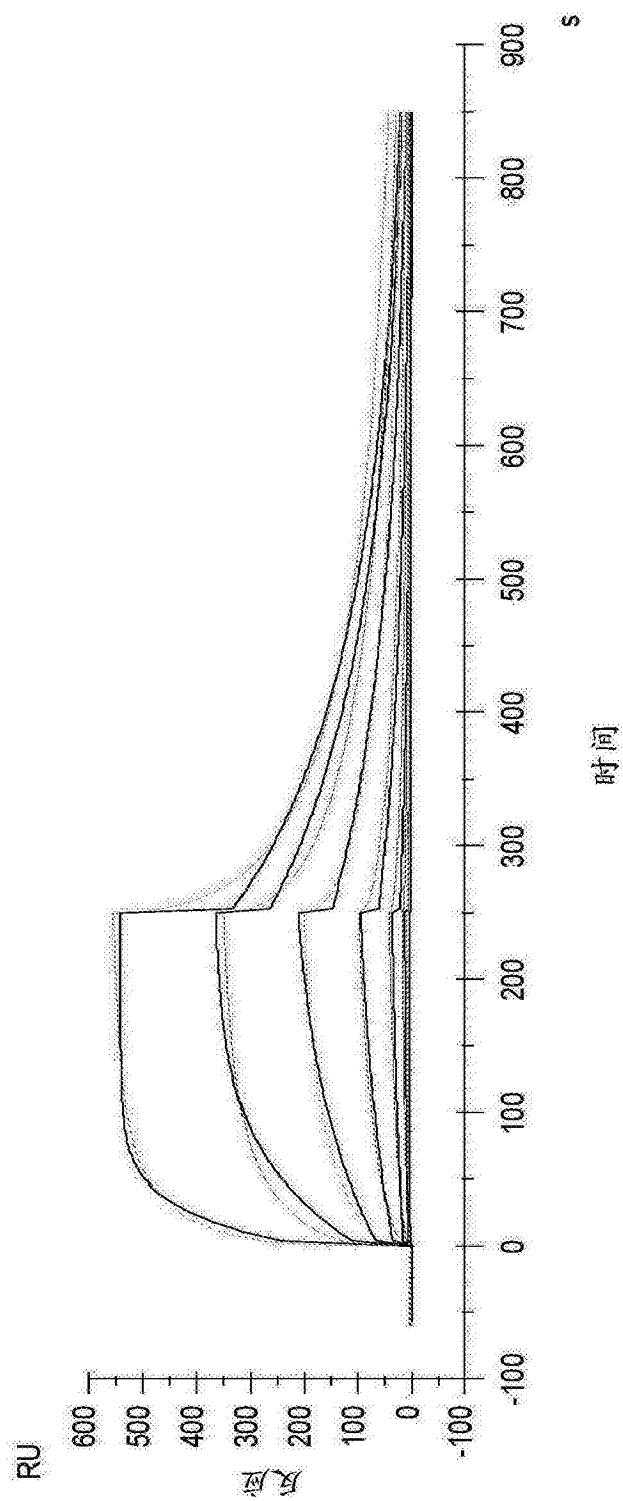


图 9

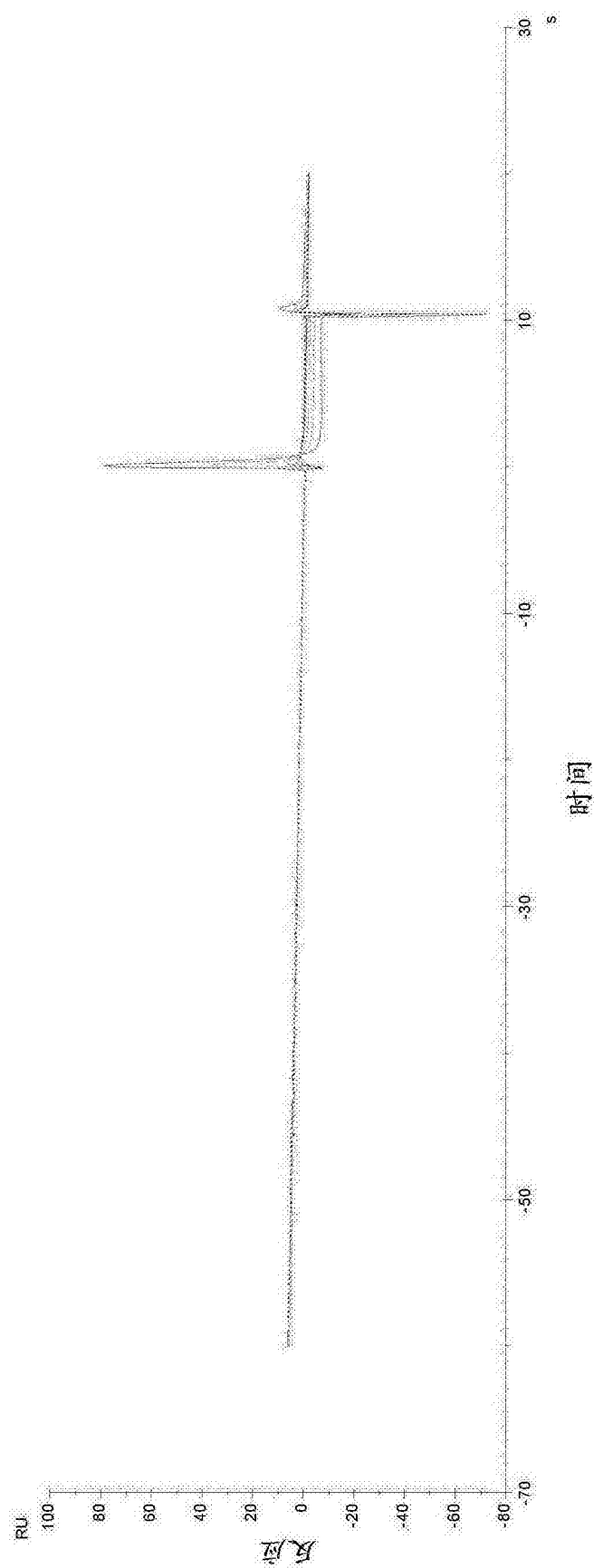


图 10

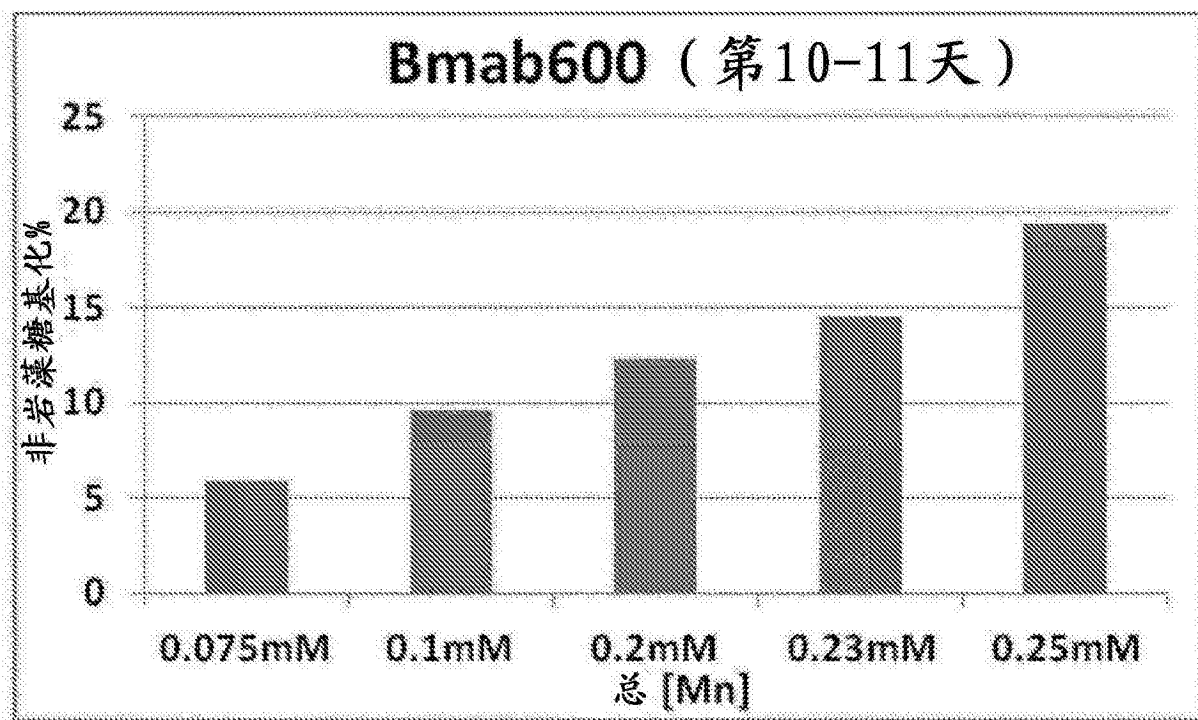


图 11

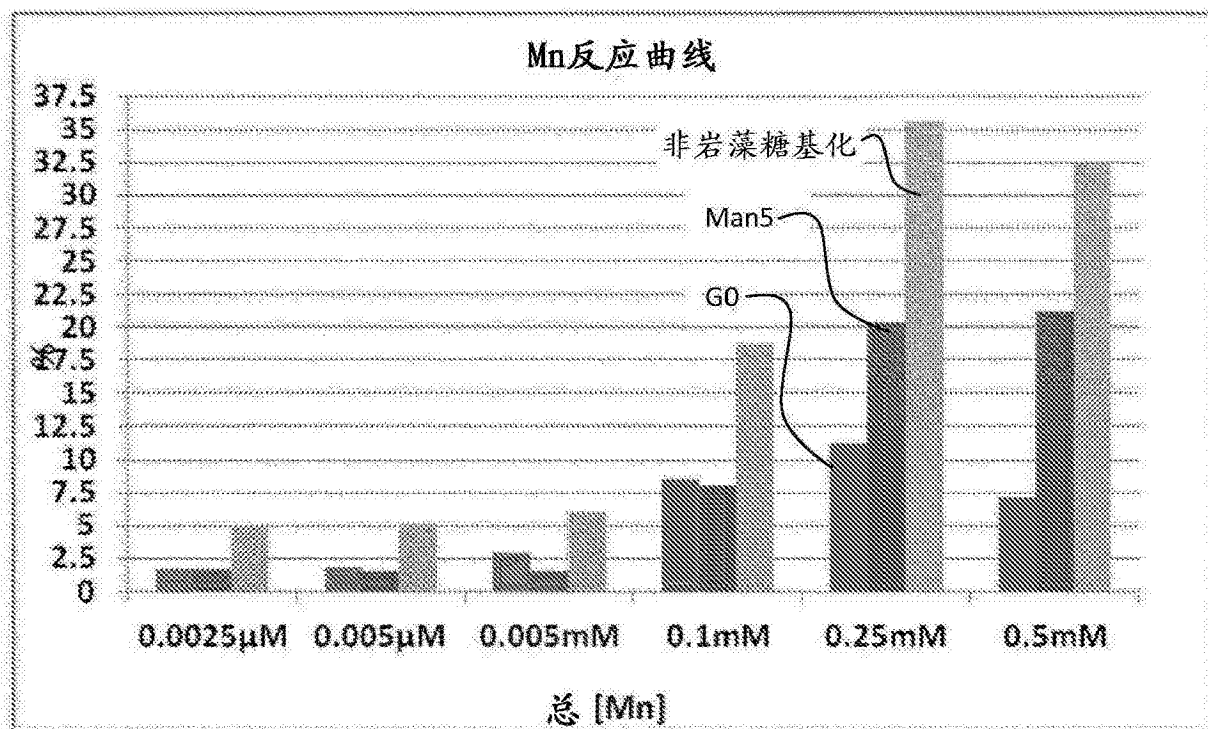


图 12

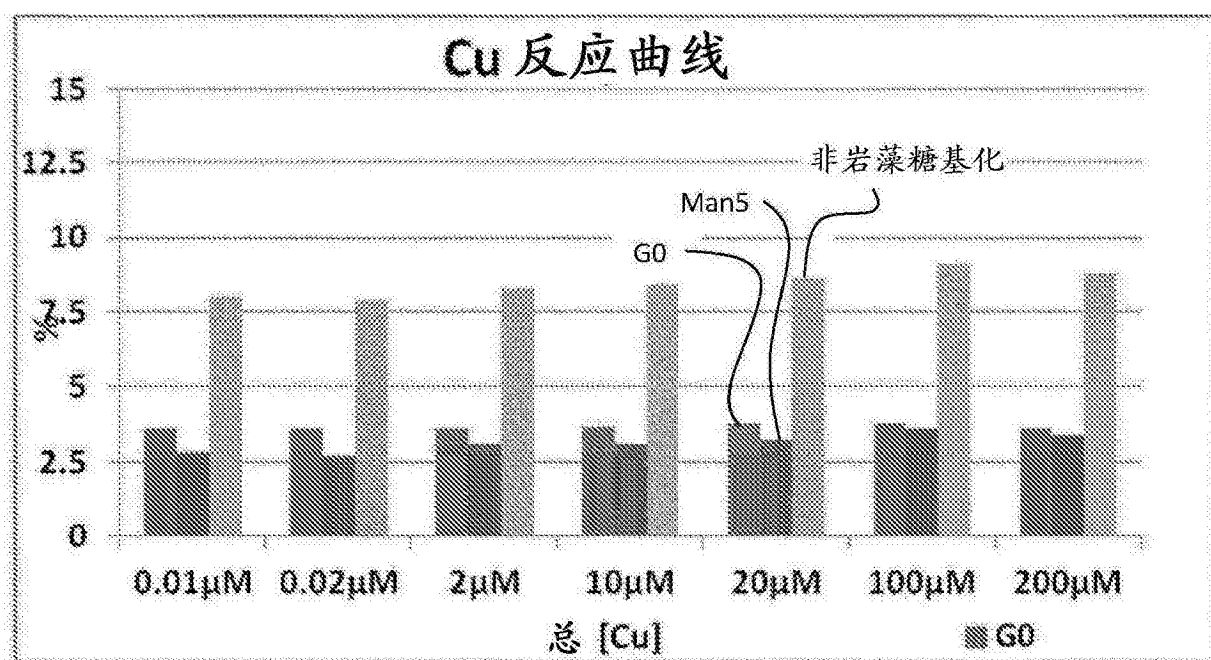


图 13

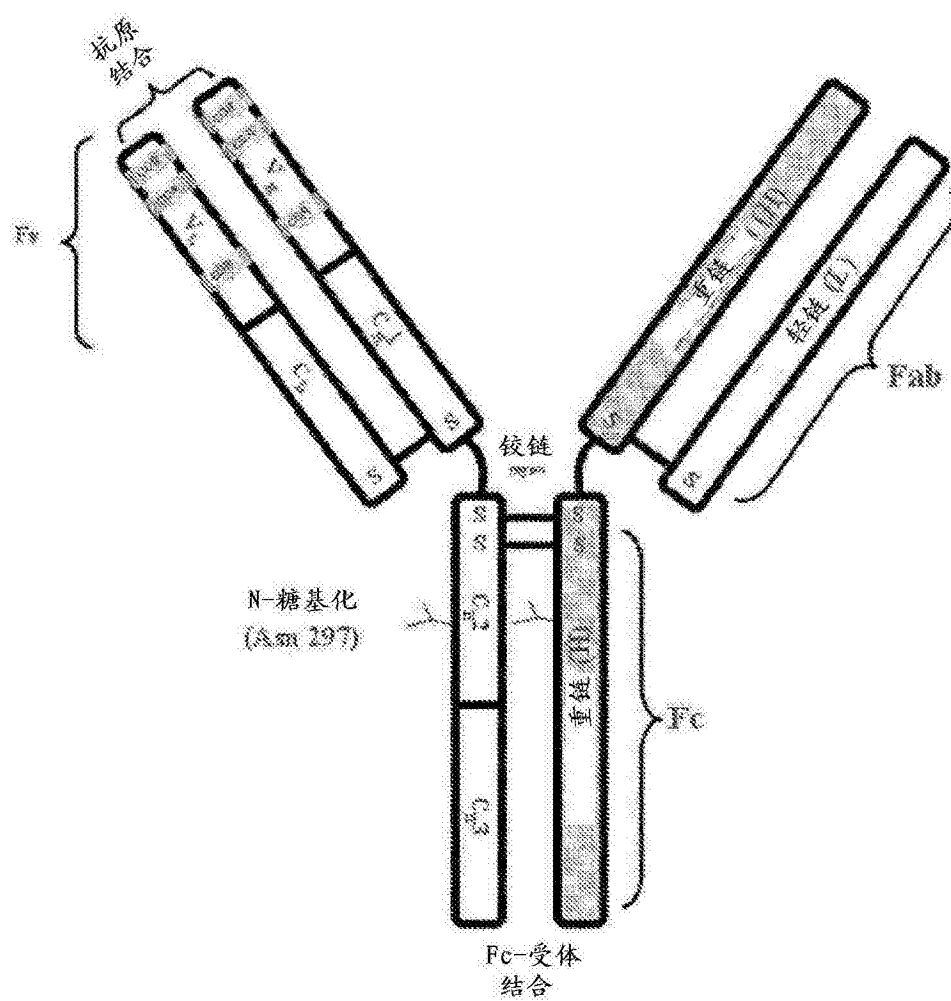
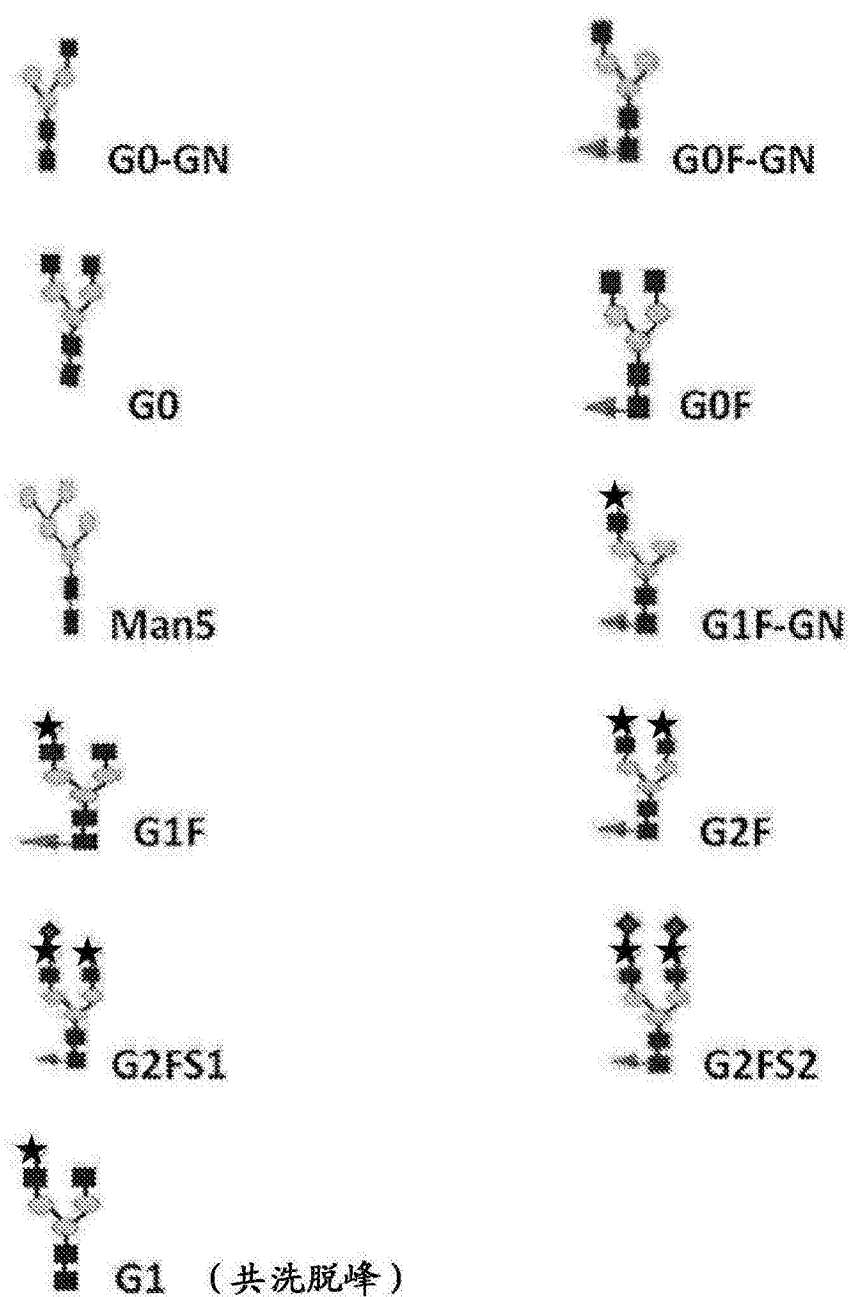


图 14



方块-N-乙酰基葡萄糖胺，圆圈-甘露糖，
星形-半乳糖，三角形-岩藻糖，菱形-唾液酸

图 15