



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103347537 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 09

(21) 申请号 201180050383. 8

J · 扬 J · 姚

(22) 申请日 2011. 10. 19

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(30) 优先权数据

利商标事务所 11038

61/394, 812 2010. 10. 20 US

代理人 袁泉

(85) PCT申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2013. 04. 19

A61K 39/395 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

C07K 16/30 (2006. 01)

PCT/US2011/056966 2011. 10. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02012/054654 EN 2012. 04. 26

(83) 生物保藏信息

PTA-7552 2006. 04. 24

(71) 申请人 莫弗泰克股份有限公司

地址 美国弗吉尼亚

(72) 发明人 P · M · 萨斯 N · 尼古莱德斯

L · 格拉索 E · 鲁蒂埃 W · 顾

权利要求书3页 说明书46页 附图19页

(54) 发明名称

抗叶酸受体 A 抗体糖型

(57) 摘要

本发明提供了具有新型 N 联中性聚糖谱的抗 FRA 抗体, 因为与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较, 一种或多种中性聚糖的相对量是增加的或减少的。本发明还提供了在表达 FRA 的细胞中具有改变的与 FRA 结合、改变的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和 / 或改变的速率和 / 或内在化效率的抗 FRA 抗体。在相关方面, 本发明提供了包含本发明的抗 FRA 抗体的细胞培养物、从此类培养物中分离的细胞、包含本发明的抗 FRA 抗体的试剂盒和组合物、产生本发明的抗 FRA 抗体的方法以及本发明的抗 FRA 抗体的诊断和治疗用途。

1. 一种特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列, 连同或不连同 C 末端赖氨酸, 并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列: 与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列; SEQ ID NO:6 的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列, 并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的 ADCC 相比较, 所述单克隆抗体具有改变的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

2. 权利要求 1 的单克隆抗体, 其中所述 ADCC 是增加的。

3. 权利要求 1 的单克隆抗体, 其中所述 ADCC 是减少的。

4. 权利要求 2 的单克隆抗体, 其中与在参考培养条件下制备的单克隆抗体的内在化速率相比较, 其具有增加的内在化速率。

5. 一种特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列, 连同或不连同 C 末端赖氨酸, 并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列: 与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列; SEQ ID NO:6 的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列, 并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的内在化速率相比较, 所述单克隆抗体具有改变的内在化速率。

6. 权利要求 5 的单克隆抗体, 其中所述内在化速率是增加的。

7. 权利要求 5 的单克隆抗体, 其中所述内在化速率是减少的。

8. 一种特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列, 连同或不连同 C 末端赖氨酸, 并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列: 与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列; SEQ ID NO:6 的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列, 并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的 N 联中性聚糖谱相比较, 所述单克隆抗体具有改变的 N 联中性聚糖谱。

9. 权利要求 8 的单克隆抗体, 其中所述改变的 N 联中性聚糖谱包含下述中的一种或多种:

- a) 增加的或减少的 M3N2;
- b) 增加的或减少的 M3N2F;
- c) 增加的 NA2;
- d) 增加的或减少的 NA2F;
- e) 增加的或减少的 MAN5;
- f) 增加的 NGA2;
- g) 增加的或减少的 NGA2F; 或
- h) 增加的或减少的 NA2G1F。

10. 一种特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列, 连同或不连同 C 末端赖氨酸, 并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列: 与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列; SEQ ID NO:6 的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列, 并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体相比较, 所述单克隆抗体具有增加的 ADCC, 且具有包含增加的 NGA2 和增加的总非岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

11. 权利要求 10 的单克隆抗体, 其中所述抗体还具有增加的内在化速率。

12. 一种特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ

ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列,连同或不连同 C 末端赖氨酸,并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列:与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的内在化效率相比较,所述单克隆抗体具有减少的内在化效率。

13. 权利要求 12 的单克隆抗体,其中所述内在化效率是 28ng/ml 或更低。

14. 权利要求 13 的单克隆抗体,其中所述内在化效率是 990ng/ml 或更低。

15. 权利要求 13 的单克隆抗体,其中所述内在化效率是 1632ng/ml 或更低。

16. 一种特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列,连同或不连同 C 末端赖氨酸,并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列:与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的结合亲和力相比较,所述单克隆抗体具有改变的结合亲和力。

17. 权利要求 16 的单克隆抗体,其中所述结合亲和力是增加的。

18. 权利要求 16 的单克隆抗体,其中所述结合亲和力是减少的。

19. 权利要求 17 的单克隆抗体,其中所述结合亲和力增加 10% 或更多。

20. 权利要求 18 的单克隆抗体,其中所述结合亲和力减少 10% 或更多。

21. 一种组合物,其包含根据权利要求 1-20 中任一项的抗体。

22. 权利要求 21 的组合物,其进一步包含另外的活性剂。

23. 一种包含真核宿主细胞的细胞培养物,所述宿主细胞包含编码 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的氨基酸和编码选自下述的氨基酸序列的核酸:与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,其中细胞培养条件包含选自下述的参数:半乳糖、减少的溶解氧张力、降低的温度、丁酸钠、氯化铜、高同渗容摩和高 CO₂。

24. 权利要求 23 的细胞培养物,其还包含根据权利要求 1-20 中任一项的抗体。

25. 权利要求 23 的细胞培养物,其中所述真核宿主细胞是 CHO 细胞。

26. 一种宿主细胞,其从权利要求 24 的细胞培养物中分离。

27. 一种单克隆抗体,其特异性结合从权利要求 24 的细胞培养物中分离的叶酸受体 α (FRA)。

28. 一种用于产生特异性结合 FRA 的单克隆抗体的方法,其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列,连同或不连同 C 末端赖氨酸,并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列:与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列;SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的 ADCC 相比较,所述单克隆抗体具有改变的 ADCC,所述方法包括步骤在包含选自下述的参数的细胞培养条件中培养包含编码重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列的核酸的 CHO 细胞:半乳糖、减少的溶解氧张力、降低的温度、丁酸钠、氯化铜、高同渗容摩和高 CO₂。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述 ADCC 是增加的,并且所述培养条件选自减少的溶解氧张力和降低的温度。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述抗体还具有增加的内在化速率。

31. 一种用于产生特异性结合 FRA 的单克隆抗体的方法, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列, 连同或不连同 C 末端赖氨酸, 并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列: 与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列; SEQ ID NO:6 的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列, 并且其中与在参考培养条件下制备时的单克隆抗体的内在化速率相比较, 所述单克隆抗体具有改变的内在化速率, 所述方法包括步骤在包含选自下述的参数的细胞培养条件中培养包含编码重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列的核酸的 CHO 细胞: 半乳糖、减少的溶解氧张力、降低的温度、丁酸钠、氯化铜、高同渗容摩、高 CO₂、在小于 13 或超过 15 天收获。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述内在化速率是增加的, 并且所述培养条件选自减少的溶解氧张力或在小于 13 或超过 15 天收获。

33. 一种通过根据权利要求 28-32 中任一项的方法制备的特异性结合叶酸受体 α (FRA) 的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 中的重链氨基酸序列, 连同或不连同 C 末端赖氨酸, 并且还包含选自下述的轻链氨基酸序列: 与 SEQ ID NO:2 中的氨基酸序列 99% 相同的氨基酸序列; SEQ ID NO:6 的氨基酸序列; 或 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

34. 一种减少与有此需要的受试者中增加的 FRA 表达相关的发育不良细胞的生长的方法, 其包括步骤给所述受试者施用根据权利要求 1-20、27 或 33 中任一项的单克隆抗体。

35. 权利要求 34 的方法, 其中所述发育不良细胞是卵巢、乳腺、肾、结肠直肠、肺、子宫内膜、脑、输卵管、子宫癌细胞或白血病细胞。

36. 权利要求 34 的方法, 其中所述受试者是人。

37. 一种用于治疗有此需要的受试者中的癌症的方法, 其包括步骤给所述受试者施用根据权利要求 1-20、27 或 33 中任一项的单克隆抗体。

38. 权利要求 37 的方法, 其中所述癌症选自卵巢、乳腺、肾、结肠直肠、肺、子宫内膜或脑癌。

39. 一种用于检测表达 FRA 的细胞的方法, 其包括步骤使所述细胞与根据权利要求 1-20、27 或 33 中任一项的抗体接触且检测结合。

权利要求 39 的方法, 其中所述细胞是发育不良细胞。

40. 一种用于检测生物样品中的 FRA 的方法, 其包括步骤使所述生物样品与根据权利要求 1-20、27 或 33 中任一项的抗体接触且检测结合。

抗叶酸受体 A 抗体糖型

[0001] 发明背景

[0002] 膜结合的叶酸受体结合维生素叶酸且将维生素叶酸转运到细胞内。存在膜结合的叶酸受体的三个主要同种型： α 、 β 和 γ 。“叶酸受体 α ”、“FRA”或“FR- α ”指膜结合的叶酸受体的 α 同种型。FRA 是单链 GPI 锚定的膜蛋白质(Kelemen (2006) Int. J. Cancer119:243-250)。 α 和 β 同种型具有约 70%氨基酸序列同一性并且在其对于一些叶酸的立体特异性中显著不同。两种同种型都在胎儿和成人组织中表达,尽管正常组织一般表达低至中等量的 FR- β (或 FRB)。然而,FRA 在正常上皮细胞子集中表达,并且通常在多种癌中显著升高(Ross 等人(1994)Cancer73 (9):2432-2443 ;Rettig 等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:3110-3114 ;Campbell 等人(1991) Cancer Res. 51:5329-5338 ;Coney 等人(1991) Cancer Res. 51:6125-6132 ;Weitman 等人(1992) Cancer Res. 52:3396-3401 ;Garin-Chesa 等人(1993)Am. J. Pathol. 142:557-567 ;Holm 等人(1994)APMIS102:413-419 ;Franklin 等人(1994) Int. J. Cancer8 (Suppl.) :89-95 ;Miotti 等人(1987) Int. J. Cancer39:297-303 ;和 Vegglan 等人(1989)Tumori75:510-513)。FRA 在超过 90%的卵巢癌中过表达(Sudimack 和 Lee (2000) Adv. Drug Deliv. Rev. 41 (2) :147-62)。

[0003] 相应地,需要关于特别是用于治疗 FRA 介导的疾病,例如 FRA 介导的癌症的抗 FRA 抗体。特别地,需要具有不同性质的抗 FRA 抗体和用于制备此类抗体的方法和关于使抗体的功能特征适合于多种治疗和诊断用途的方法。例如,可以改变抗 FRA 抗体的结合亲和力、抗体依赖性细胞毒性、内在化效率和 / 或内在化速率用于所需用途。

[0004] 发明概述

[0005] 在一个方面,本发明涉及具有不同 N 联中性聚糖谱和 / 或不同性质的抗人 FRA 单克隆抗体,特别是 MORAb-003 单克隆抗体,并且涉及通过下述用于制备和使用此类抗体的方法:将葡萄糖替换为半乳糖作为糖源、降低温度、减少溶解氧(DO)水平、增加 CO₂ 水平、将 CuCl 或丁酸钠加入培养基中或增加同渗容摩或在培养不同时间段后收获抗 FRA 抗体。本发明还涉及具有改变的结合亲和力、抗体依赖性细胞毒性、内在化效率和 / 或内在化速率的抗人 FRA 抗体,特别是 MORAb-003 抗体,并且涉及通过下述用于产生此类抗体的方法:将葡萄糖替换为半乳糖作为糖源、降低温度、减少溶解氧(DO)水平、增加 CO₂ 水平、将 CuCl 或丁酸钠加入培养基中或增加同渗容摩或在培养不同时间段后收获抗 FRA 抗体。在另一个方面,本发明涉及通过本文描述的任何方法产生的抗人 FRA 抗体和包含所述抗体的组合物。在另一个方面,本发明涉及改造为表达抗人 FRA 抗体,特别是 MORAb-003 抗体的重和轻链的细胞培养物,其中细胞培养条件包含选自下述的参数:半乳糖补充、减少的 DO、降低的温度、丁酸钠或氯化铜补充、高同渗容摩和高 CO₂。本发明还涉及从此类细胞培养物中分离的宿主细胞。

[0006] 本发明的特定非限制性实施方案在下述编号段落中阐述。

[0007] 1. 用于在宿主细胞中产生具有所需 N 联中性聚糖谱的抗人叶酸受体 α (FRA) 抗体的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:

[0008] (1) 使用葡萄糖作为糖源将宿主细胞培养第一个时间段;和(2) 使用半乳糖作为

糖源将宿主细胞培养第二个时间段。

[0009] 2. 实施方案 1 的方法,其中所述宿主细胞从培养起始的第 0 天到第 14 天使用半乳糖作为糖源进行培养。

[0010] 3. 实施方案 1 的方法,其中所述第二个时间段在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。

[0011] 4. 实施方案 1 的方法,其中所述第二个时间段在选自从培养起始的第 5 天到第 7 天的一天开始。

[0012] 5. 用于产生具有减少的结合亲和力的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:使用葡萄糖作为糖源将包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞培养第一个时间段;和随后使用半乳糖作为糖源将所述宿主细胞培养第二个时间段,其中与通过无半乳糖培养所述宿主细胞而产生的抗人 FRA 抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有减少的结合亲和力。

[0013] 6. 实施方案 5 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 10%。

[0014] 7. 实施方案 5 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 15%。

[0015] 8. 用于产生具有减少的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:使用葡萄糖作为糖源将包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞培养第一个时间段;和随后对于第二个时间段使用半乳糖作为糖源,其中与通过无半乳糖培养所述宿主细胞而产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体具有减少的 ADCC。

[0016] 9. 实施方案 8 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 5%。

[0017] 10. 实施方案 8 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 65%。

[0018] 11. 实施方案 1、5 或 8 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

[0019] 12. 实施方案 11 的方法,其中所述哺乳动物宿主细胞是衍生自 GSCHO (中国仓鼠卵巢)细胞系的重组细胞。

[0020] 13. 实施方案 1、5 或 8 中任一项的方法,其中所述葡萄糖浓度是 1g/L-4g/L。

[0021] 14. 实施方案 1、5 或 8 中任一项的方法,其中所述半乳糖浓度是 0.01g/L-20g/L。

[0022] 15. 实施方案 14 的方法,其中所述半乳糖浓度是 1g/L-10g/L。

[0023] 16. 实施方案 14 的方法,其中所述半乳糖浓度是 2g/L-4g/L。

[0024] 17. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分使用半乳糖作为糖源完成。

[0025] 18. 实施方案 17 的方法,其中使用半乳糖作为糖源完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。

[0026] 19. 实施方案 17 的方法,其中使用半乳糖作为糖源完成的培养的部分在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。

[0027] 20. 实施方案 17 的方法,其中使用半乳糖作为糖源完成的培养的部分在选自从培养起始的第 3 天到第 7 天的一天开始。

[0028] 21. 实施方案 17 的方法,其中所述半乳糖浓度是 0.01g/L-20g/L。

[0029] 22. 实施方案 17 的方法,其中所述半乳糖浓度是 1g/L-10g/L。

[0030] 23. 实施方案 17 的方法,其中所述半乳糖浓度是 2g/L-4g/L。

[0031] 24. 实施方案 1 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 0-6.3%G0、21-68%G0F、24-63%G1F、0-0.8%G2、3-11%G2F、0-0.39%M3N2、0-0.35%M3N2F、和 0-5%MAN5。

[0032] 25. 实施方案 1 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含以约 1:1:1.7:60:20:16:365:370 的比率的 M3N2:M3N2F:NA2:NA2F:MAN5:NGA2:NA2G1F:NGA2F。

[0033] 26. 实施方案 1、5、8 或 17 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0034] 27. 实施方案 1 的方法,其中所述 N 联中性聚糖谱是在 CHO 中使用抗体获得的谱,所述抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0035] 28. 实施方案 5 的方法,其中与通过无半乳糖培养所述宿主细胞而产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 81.3-88.3% 的相对结合亲和力。

[0036] 29. 实施方案 8 的方法,其中与通过无半乳糖培养所述宿主细胞而产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体诱导在范围 39.0-97.4% 中的 ADCC。

[0037] 30. 用于在宿主细胞中产生具有所需 N 联中性聚糖谱的抗人 FRA 抗体的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:

[0038] (1) 在第一个温度培养宿主细胞;和随后(2) 在低于第一个温度的第二个温度培养宿主细胞。

[0039] 31. 实施方案 30 的方法,其中所述宿主细胞在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始在较低温度培养。

[0040] 32. 实施方案 30 的方法,其中所述宿主细胞在选自从培养起始的第 3 天到第 5 天的一天开始在较低温度培养。

[0041] 33. 用于产生具有增加的内在化速率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个温度培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在低于第一个温度的第二个温度培养宿主细胞;其中与通过在第一个温度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化速率相比较,所述抗人 FRA 抗体具有增加的内在化速率。

[0042] 34. 实施方案 33 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 15%。

[0043] 35. 实施方案 33 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 25%。

[0044] 36. 用于产生具有增加的内在化效率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个温度培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在低于第一个温度的第二个温度培养宿主细胞;其中与通过在第一个温度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗体具有减少的内在化效率。

[0045] 37. 实施方案 36 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 15%。

[0046] 38. 实施方案 36 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 25%。

[0047] 39. 实施方案 30、33、36 或 230 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0048] 40. 实施方案 39 的方法,其中所述哺乳动物宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞系的重组细胞。

[0049] 41. 实施方案 30、33、36 或 230 中任一项的方法,其中宿主细胞在其下生长的所述第一个温度是约 36-38℃。

[0050] 42. 实施方案 30、33、36 或 230 中任一项的方法,其中所述第二个温度是 28-35℃。

- [0051] 43. 实施方案 42 的方法,其中所述第二个温度是 30-33℃。
- [0052] 44. 实施方案 42 的方法,其中所述第二个温度是 30-31℃。
- [0053] 45. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分在低温完成。
- [0054] 46. 实施方案 45 的方法,其中在低温完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。
- [0055] 47. 实施方案 45 的方法,其中在低温完成的培养的部分在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。
- [0056] 48. 实施方案 45 的方法,其中在低温完成的培养的部分在选自从培养起始的第 3 天到第 5 天的一天开始。
- [0057] 49. 实施方案 45 的方法,其中低温是 28-35℃。
- [0058] 50. 实施方案 45 的方法,其中低温是 30-33℃。
- [0059] 51. 实施方案 45 的方法,其中低温是 30-31℃。
- [0060] 52. 实施方案 30 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 0-6.3%G0、21-68%G0F、24-63%G1F、0-0.8%G2、3-11%G2F、0-0.39%M3N2、0-0.35%M3N2F、和 0-5%MAN5。
- [0061] 53. 实施方案 33 的方法,其中与通过在所述第一个温度单独产生的抗体的内在化速率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 117-143% 的速率内在化到靶细胞内。
- [0062] 54. 实施方案 30、33、36、45 或 230 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 的 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。
- [0063] 55. 用于在宿主细胞中产生具有所需 N 联中性聚糖谱的抗人 FRA 抗体的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:
- [0064] (1) 在正常同渗容摩在细胞培养基中培养宿主细胞;和随后(2) 在高同渗容摩细胞培养基中培养宿主细胞。
- [0065] 56. 用于产生具有减少的结合亲和力的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常同渗容摩在细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在高同渗容摩细胞培养基中培养宿主细胞。
- [0066] 57. 实施方案 56 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 25%。
- [0067] 58. 实施方案 56 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 40%。
- [0068] 59. 用于产生具有减少的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常同渗容摩在细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在高同渗容摩细胞培养基中培养宿主细胞。
- [0069] 60. 实施方案 59 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 50%。
- [0070] 61. 实施方案 59 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 65%。
- [0071] 62. 用于产生具有增加的内在化速率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常

同渗容摩在细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞 ;和随后在高同渗容摩细胞培养基中培养宿主细胞。

[0072] 63. 实施方案 62 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 5%。

[0073] 64. 实施方案 62 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 10%。

[0074] 65. 用于产生具有减少的内在化效率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常同渗容摩在细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞 ;和随后在高同渗容摩细胞培养基中培养宿主细胞。

[0075] 66. 实施方案 65 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 98.6%。

[0076] 67. 实施方案 55、56、59、62 或 65 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0077] 68. 实施方案 67 的方法,其中所述宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢)细胞系的重组细胞。

[0078] 69. 实施方案 55、56、59、62 或 65 中任一项的方法,其中所述细胞培养基的正常同渗容摩在范围 250-350mOsm/L 中。

[0079] 70. 实施方案 55、56、59、62 或 65 中任一项的方法,其中所述高同渗容摩培养基的同渗容摩是 360-800mOsm/L。

[0080] 71. 实施方案 70 的方法,其中所述高同渗容摩培养基的同渗容摩是 400-650mOsm/L。

[0081] 72. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分在高同渗容摩完成。

[0082] 73. 实施方案 72 的方法,其中在高同渗容摩完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。

[0083] 74. 实施方案 72 的方法,其中在高同渗容摩完成的培养的部分在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。

[0084] 75. 实施方案 72 的方法,其中在高同渗容摩完成的培养的部分在选自从培养起始的第 3 天到第 5 天的一天开始。

[0085] 76. 实施方案 72 的方法,其中所述高同渗容摩是 360-800mOsm/L。

[0086] 77. 实施方案 72 的方法,其中所述高同渗容摩是 400-650mOsm/L。

[0087] 78. 实施方案 55 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 0-7%G0、49-95%G0F、0-39%G1F、0-0.7%G2、0-6%G2F、0-0.35%M3N2、0.04-0.46%M3N2F、和 1.2-5.6%MAN5。

[0088] 79. 实施方案 56 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 66.8-78.9%的相对结合亲和力。

[0089] 80. 实施方案 62 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体诱导在 101%的范围中的 ADCC。

[0090] 81. 实施方案 62 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在细胞培养基中培养所述宿

主细胞产生的抗体的内在化速率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 107% 的速率内在化到靶细胞内。

[0091] 82. 实施方案 65 的方法,其中与通过在正常同渗容摩在细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 1.40–1.42% 的效率内在化到靶细胞内。

[0092] 83. 实施方案 55、56、59、62、65 或 72 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO :2 或与 SEQ ID NO :2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0093] 84. 用于在宿主细胞中产生抗人 FRA 抗体的所需 N 联中性聚糖谱的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:

[0094] (1) 在正常细胞培养基中培养宿主细胞;和随后(2) 将丁酸钠加入正常细胞培养基中。

[0095] 85. 用于产生具有减少的结合亲和力的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后将丁酸钠加入正常细胞培养基中。

[0096] 86. 实施方案 85 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 40%。

[0097] 87. 实施方案 85 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 50%。

[0098] 88. 用于产生具有减少的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后将丁酸钠加入正常细胞培养基中。

[0099] 89. 实施方案 88 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 25%。

[0100] 90. 实施方案 88 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 50%。

[0101] 91. 用于产生具有减少的内在化效率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞,在正常细胞培养基中培养宿主细胞;和随后将丁酸钠加入正常细胞培养基中。

[0102] 92. 实施方案 91 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 20%。

[0103] 93. 实施方案 91 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 50%。

[0104] 94. 实施方案 84、85、88 或 91 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0105] 95. 实施方案 94 的方法,其中所述宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢) 细胞系的重组细胞。

[0106] 96. 实施方案 84、85、88 或 91 中任一项的方法,其中所述正常细胞培养基不含丁酸钠。

- [0107] 97. 实施方案 84、85、88 或 91 中任一项的方法,其中所述丁酸钠浓度是 0.5mM。
- [0108] 98. 实施方案 84、85、88 或 91 中任一项的方法,其中所述丁酸钠浓度是 10mM。
- [0109] 99. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分在包含丁酸钠的培养基中完成。
- [0110] 100. 实施方案 99 的方法,其中在包含丁酸钠的培养基中完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。
- [0111] 101. 实施方案 99 的方法,其中在包含丁酸钠的培养基中完成的培养的部分在选自培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。
- [0112] 102. 实施方案 99 的方法,其中在包含丁酸钠的培养基中完成的培养的部分在选自培养起始的第 3 天到第 7 天的一天开始。
- [0113] 103. 实施方案 99 的方法,其中所述丁酸钠浓度是 0.01mM-90mM。
- [0114] 104. 实施方案 99 的方法,其中所述丁酸钠浓度是 0.01mM-16mM。
- [0115] 105. 实施方案 99 的方法,其中所述丁酸钠浓度是 0.5mM-10mM。
- [0116] 106. 实施方案 84 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 0-8%G0、39-86%G0F、9-48%G1F、0-1.0%G2、0-7%G2F、0-0.41%M3N2、0.03-0.45%M3N2F、和 0-4.4%MAN5。
- [0117] 107. 实施方案 85 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 59-64% 的相对结合亲和力。
- [0118] 108. 实施方案 85 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 44-55% 的相对结合亲和力。
- [0119] 109. 实施方案 88 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体诱导在范围 26-91% 中的抗体依赖性细胞毒性。
- [0120] 110. 实施方案 91 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 45-84% 的效率内在化到靶细胞内。
- [0121] 111. 实施方案 84、85、88、91 或 99 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。
- [0122] 112. 用于在宿主细胞中产生抗人 FRA 抗体的所需 N 联中性聚糖谱的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:
- [0123] (1)在第一个溶解氧(DO)浓度培养宿主细胞;和随后(2)在低于第一个 DO 浓度的第二个 DO 浓度培养宿主细胞。
- [0124] 113. 用于产生具有减少的结合亲和力的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 DO 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在低于第一个 DO 浓度的第二个 DO 浓度培养宿主细胞。
- [0125] 114. 实施方案 113 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 30%。
- [0126] 115. 实施方案 113 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 50%。
- [0127] 116. 用于产生具有增加的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 DO 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在低于第一个 DO 浓度

的第二个 DO 浓度培养宿主细胞。

[0128] 117. 实施方案 116 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 增加至少 25%。

[0129] 118. 实施方案 116 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 增加至少 50%。

[0130] 119. 用于产生具有减少的内在化效率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 DO 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在低于第一个 DO 浓度的第二个 DO 浓度培养宿主细胞。

[0131] 120. 实施方案 119 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 30%。

[0132] 121. 实施方案 119 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 60%。

[0133] 122. 实施方案 112、113、116 或 119 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0134] 123. 实施方案 122 的方法,其中所述宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢)细胞系的重组细胞。

[0135] 124. 实施方案 112、113、116 或 119 中任一项的方法,其中宿主细胞可以在其下生长的所述第一个溶解氧浓度是 30%-100%。

[0136] 125. 实施方案 112、113、116 或 119 中任一项的方法,其中所述第二个 DO 浓度是 0%-25%。

[0137] 126. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分在低 DO 完成。

[0138] 127. 实施方案 126 的方法,其中在低 DO 完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。

[0139] 128. 实施方案 126 的方法,其中在低 DO 完成的培养的部分在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。

[0140] 129. 实施方案 126 的方法,其中在低 DO 完成的培养的部分在选自从培养起始的第 3 天到第 7 天的一天开始。

[0141] 130. 实施方案 126 的方法,其中低 DO 是 0%-30%。

[0142] 131. 实施方案 130 的方法,其中低 DO 是 5%-25%。

[0143] 132. 实施方案 130 的方法,其中低 DO 是 5%-10%。

[0144] 133. 实施方案 112 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 2-11%G0、32-79%G0F、12-52%G1F、0-1.0%G2、0-7%G2F、0-0.28%M3N2、0.01-0.43%M3N2F、和 0.1-4.4%MAN5。

[0145] 134. 实施方案 113 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 50-63%的相对结合亲和力。

[0146] 135. 实施方案 116 的方法,其中与通过在第一个 DO 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体诱导在大于 100%到大于或等于 200%的范围中的抗体依赖性细胞毒性。

[0147] 136. 实施方案 119 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 以 39-64% 的效率内在化到靶细胞内。

[0148] 137. 实施方案 112、113、116、119 或 126 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO :2 或与 SEQ ID NO :2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0149] 138. 用于在宿主细胞中产生抗人 FRA 抗体的所需 N 联中性聚糖谱的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:

[0150] (1) 在第一个 CO_2 浓度培养宿主细胞;和随后(2)在高于第一个 CO_2 浓度的第二个 CO_2 浓度培养宿主细胞。

[0151] 139. 用于产生具有减少的结合亲和力的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 CO_2 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在高于第一个 CO_2 浓度的第二个 CO_2 浓度培养宿主细胞。

[0152] 140. 实施方案 139 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 25%。

[0153] 141. 实施方案 139 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 50%。

[0154] 142. 用于产生具有减少的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 CO_2 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在高于第一个 CO_2 浓度的第二个 CO_2 浓度培养宿主细胞。

[0155] 143. 实施方案 142 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 50%。

[0156] 144. 实施方案 142 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 65%。

[0157] 145. 用于产生具有增加的内在化速率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 CO_2 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在高于第一个 CO_2 浓度的第二个 CO_2 浓度培养宿主细胞。

[0158] 146. 实施方案 145 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化速率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 5%。

[0159] 147. 实施方案 145 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化速率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 25%。

[0160] 148. 用于产生具有减少的内在化效率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个 CO_2 浓度培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后在高于第一个 CO_2 浓度的第二个 CO_2 浓度培养宿主细胞。

[0161] 149. 实施方案 148 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 25%。

[0162] 150. 实施方案 148 的方法,其中与通过第一个 CO_2 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 50%。

[0163] 151. 实施方案 138、139、142、145 或 148 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0164] 152. 实施方案 151 的方法,其中所述宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢)细胞系的重组细胞。

[0165] 153. 实施方案 138、139、142、145 或 148 中任一项的方法,其中所述第一个 CO₂ 浓度是约 5% 或更少。

[0166] 154. 实施方案 138、139、142、145 或 148 中任一项的方法,其中所述更高的 CO₂ 浓度是 10%-30%。

[0167] 155. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分在高 CO₂ 浓度完成。

[0168] 156. 实施方案 155 的方法,其中在高 CO₂ 浓度完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。

[0169] 157. 实施方案 155 的方法,其中在高 CO₂ 浓度完成的培养的部分在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。

[0170] 158. 实施方案 155 的方法,其中在高 CO₂ 浓度完成的培养的部分在选自从培养起始的第 3 天到第 7 天的一天开始。

[0171] 159. 实施方案 155 的方法,其中高 CO₂ 浓度是 10%-30%。

[0172] 160. 实施方案 155 的方法,其中高 CO₂ 浓度是 20%。

[0173] 161. 实施方案 138 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 0-7%G0、50-97%G0F、0-39%G1F、0-0.7%G2、0-6%G2F、0-0.46%M3N2、0.06-0.48%M3N2F、和 0-3.8%MAN5。

[0174] 162. 实施方案 139 的方法,其中与通过在第一个 CO₂ 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 45-56% 的相对结合亲和力。

[0175] 163. 实施方案 142 的方法,其中与通过在第一个 CO₂ 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体诱导在 23-89% 的范围中的 ADCC。

[0176] 164. 实施方案 145 的方法,其中与通过在第一个 CO₂ 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 105-125% 的效率内在化到靶细胞内。

[0177] 165. 实施方案 148 的方法,其中与通过在第一个 CO₂ 浓度培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 40-68% 的效率内在化到靶细胞内。

[0178] 166. 实施方案 138、139、142、145、148 或 155 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0179] 167. 用于在宿主细胞中产生抗人 FRA 抗体的所需 N 联中性聚糖结构的方法,其中所述宿主细胞包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸,所述方法包括步骤:

[0180] (1) 在正常细胞培养基中培养宿主细胞;和随后(2) 将氯化铜加入正常细胞培养基中。

[0181] 168. 用于产生具有减少的结合亲和力的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞,在宿主细胞可以在其中生长的正常细胞培养基中培养宿主细胞;和随后将氯化铜加入正常细胞培养基中。

[0182] 169. 实施方案 168 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 40%。

[0183] 170. 实施方案 168 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产

生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 50%。

[0184] 171. 用于产生具有减少的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后将氯化铜加入正常细胞培养基中。

[0185] 172. 实施方案 171 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 20%。

[0186] 173. 实施方案 171 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 80%。

[0187] 174. 用于产生具有减少的内在化效率的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在正常细胞培养基中培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞;和随后将氯化铜加入正常细胞培养基中。

[0188] 175. 实施方案 174 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 30%。

[0189] 176. 实施方案 174 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 60%。

[0190] 177. 实施方案 167、168、171 或 174 中任一项的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0191] 178. 实施方案 177 的方法,其中所述宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢)细胞系的重组细胞。

[0192] 179. 实施方案 167、168、171 或 174 中任一项的方法,其中所述正常细胞培养基不含氯化铜。

[0193] 180. 实施方案 167、168、171 或 174 中任一项的方法,其中所述氯化铜浓度是 0.01 μ M-0.5mM。

[0194] 181. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中培养的至少部分在包含氯化铜的培养基中完成。

[0195] 182. 实施方案 181 的方法,其中在包含氯化铜的培养基中完成的培养的部分是从培养起始的第 0 天到第 14 天。

[0196] 183. 实施方案 181 的方法,其中在包含氯化铜的培养基中完成的培养的部分在选自从培养起始的第 2 天到第 10 天的一天开始。

[0197] 184. 实施方案 181 的方法,其中在包含氯化铜的培养基中完成的培养的部分在选自从培养起始的第 3 天到第 6 天的一天开始。

[0198] 185. 实施方案 181 的方法,其中所述氯化铜浓度是 0.01 μ M-0.5mM。

[0199] 186. 实施方案 181 的方法,其中所述氯化铜浓度是 0.01mM-0.5mM。

[0200] 187. 实施方案 181 的方法,其中所述氯化铜浓度是 0.5mM。

[0201] 188. 实施方案 167 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱包含 0-8%G0、34-81%G0F、13-53%G1F、0-0.7%G2、0-7%G2F、0.07-0.61%M3N2、0.16-0.58%M3N2F、和 0-4.3%MAN5。

[0202] 189. 实施方案的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,所述抗人 FRA 抗体具有 41-56% 的相对结合亲和力。

[0203] 190. 实施方案 171 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的 ADCC 相比较,所述抗人 FRA 抗体诱导在 21-87% 的范围中的抗体依赖性细胞毒性。

[0204] 191. 实施方案 174 的方法,其中与通过在正常细胞培养基中培养所述宿主细胞产生的抗体的内在化效率相比较,所述抗人 FRA 抗体以 41-71% 的效率内在化到靶细胞内。

[0205] 192. 实施方案 167、168、171、174 或 181 中任一项的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO :2 或与 SEQ ID NO :2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0206] 193. 改变选自下述的抗人 FRA 抗体的一种或多种性质的方法:

[0207] a) 抗人 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱;

[0208] b) 结合亲和力;

[0209] c) ADCC;

[0210] d) 内在化速率;和

[0211] e) 内在化效率;

[0212] 其包括步骤:培养包含编码所述抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞,并且在培养起始后小于 13 天或超过 15 天的时间收获产生抗人 FRA 抗体的宿主细胞。

[0213] 194. 实施方案 193 的方法,其中与通过在培养起始后 13-15 天收获的细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,抗人 FRA 抗体的结合亲和力是减少的。

[0214] 195. 实施方案 193 的方法,其中与通过在培养起始后 13-15 天收获的细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 25%。

[0215] 196. 实施方案 193 的方法,其中与通过在培养起始后 13-15 天收获的细胞产生的抗体的结合亲和力相比较,抗人 FRA 抗体的结合亲和力减少至少 50%。

[0216] 197. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的 ADCC 是减少的。

[0217] 198. 实施方案 194 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 50%。

[0218] 199. 实施方案 195 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的 ADCC 减少至少 65%。

[0219] 200. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的内在化速率是增加的。

[0220] 201. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 5%。

[0221] 202. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的内在化速率增加至少 25%。

[0222] 203. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的内在化效率是减少的。

[0223] 204. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 25%。

[0224] 205. 实施方案 193 的方法,其中与在培养起始后 13-15 天时收获的抗体相比较,抗

人 FRA 抗体的内在化效率减少至少 50%。

[0225] 206. 用于产生抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,其中宿主细胞在从培养开始 13 天前的时间或 15 天后的时间收获。

[0226] 207. 实施方案 193 或 206 的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0227] 208. 实施方案 207 的方法,其中所述哺乳动物宿主细胞是衍生自 GS CHO (中国仓鼠卵巢)细胞系的重组细胞。

[0228] 209. 实施方案 193 或 206 的方法,其中所述收获时间选自:在培养起始后 240 小时-312 小时的时间和在培养起始后 360 小时-480 小时的时间。

[0229] 210. 实施方案 209 的方法,其中所述收获时间是在培养起始后 240 小时。

[0230] 211. 实施方案 209 的方法,其中所述收获时间是在培养起始后 408 小时。

[0231] 212. 实施方案 209 的方法,其中所述收获时间是在培养起始后 480 小时。

[0232] 213. 实施方案 193 或 206 的方法,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO :2 或与 SEQ ID NO :2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0233] 214. 包含改造为表达抗人 FRA 抗体的重和轻链的真核宿主细胞的细胞培养物,其中细胞培养条件包含选自下述的参数:半乳糖补充、减少的溶解氧(DO)、降低的温度、丁酸钠、氯化铜、高同渗容摩和高 CO₂。

[0234] 215. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述 DO 水平是 0%-约 25%。

[0235] 216. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述 CO₂ 浓度是约 10%-约 30%。

[0236] 217. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述温度是:28℃-约 35℃。

[0237] 218. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述半乳糖浓度是 0.01g/L-20g/L。

[0238] 219. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述丁酸钠浓度是 0.5mM-10mM。

[0239] 220. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述氯化铜浓度是 0.01 μ M-0.5mM。

[0240] 221. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述细胞培养物的同渗容摩是 360-800mOsm/L。

[0241] 222. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述真核宿主细胞是 CHO 细胞。

[0242] 223. 实施方案 222 的细胞培养物,其中所述 CHO 细胞是 CHO-K1 细胞。

[0243] 224. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述抗人 FRA 抗体包含 IgG1 同种型的人重链恒定区。

[0244] 225. 实施方案 214 的细胞培养物,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO :1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO :2 或与 SEQ ID NO :2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0245] 226. 从实施方案 214 的细胞培养物中分离的宿主细胞。

[0246] 227. 通过实施方案 1、5、8、17、30、33、36、45、55、56、59、62、65、72、85、88、91、99、113、116、119、126、139、142、145、148、155、168、171、174、181、206 或 230 中任一项的方法产生的抗人 FRA α 抗体或所述抗体的抗原结合部分。

[0247] 228. 组合物,其包含实施方案 227 的抗人 FRA 抗体和药学可接受的载体。

[0248] 229. 实施方案 228 的组合物,其还包含另外的治疗剂。

[0249] 230. 用于产生具有增加的 ADCC 的抗人 FRA 抗体的方法,其包括步骤:在第一个温

度培养包含编码抗人 FRA 抗体的核酸的宿主细胞；和随后在低于第一个温度的第二个温度培养宿主细胞。

[0250] 231. 从实施方案 225 的细胞培养物中分离的宿主细胞。

[0251] 232. 实施方案 227 的抗人 FRA α 抗体,其中所述抗人 FRA 抗体包括包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:2 或与 SEQ ID NO:2 有 99% 相同的序列的轻链氨基酸序列。

[0252] 233. 组合物,其包含实施方案 232 的抗人 FRA 抗体和药学可接受的载体。

[0253] 附图简述

[0254] 图 1A-1H 显示从抗 FRA 抗体中回收的中性 N 联抗体聚糖结构的图解。该图描述了部分加工的聚糖结构 M3N2 (图 1A)、M3N2F (图 1B)、MAN5 (图 1C),以及完全加工的聚糖结构 NGA2 (G0) (图 1D)、NGA2F (G0F) (图 1E)、NA2G1F (G1F) (图 1F)、NA2 (G2) (图 1G) 和 NA2F (G2F) (图 1H)。

[0255] 图 2 是显示从通过在多个条件下培养的宿主细胞产生的抗 FRA 抗体中回收的中性 N 联抗体聚糖结构分布的图表。“阳性对照”代表通过在表 3 中作为“阳性对照”列出的条件下培养的宿主细胞产生的抗 FRA 抗体。“MORAb-003 参考标准”代表具有包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的重链氨基酸序列和包含 SEQ ID NO:7 中的氨基酸序列的轻链氨基酸序列的抗 FRA 抗体,其在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应。对应于“半乳糖补充”、“低温”、“高同渗容摩”、“0.5mM 丁酸钠”、“低 DO”、“高 CO₂”、“10mM 丁酸钠”、“CuCl 补充”、“第 10 天收获”、“第 14 天收获”、“第 17 天收获”和“第 20 天收获”的宿主细胞培养条件在实施例 1 中描述。

[0256] 图 3 是显示从通过在多个条件下培养的宿主细胞产生的抗 FRA 抗体中回收的中性 N 联抗体聚糖结构分布的表。“MORAb-003 参考标准”是如与图 2 结合描述的抗体。

[0257] 图 4 是显示通过在多个条件下培养的宿主细胞产生的抗 FRA 抗体的 FRA 结合亲和力的表。

[0258] 图 5 是显示通过在多个条件下培养的宿主细胞产生的抗 FRA 抗体的 ADCC 的表。

[0259] 图 6 是在 ADCC (y 轴)和抗 FRA 抗体中的聚糖 NGA2 (G0) 的相对浓度 (%) (x 轴)之间的关联的杠杆曲线图。

[0260] 图 7 是在 ADCC (y 轴)和抗 FRA 抗体中的非岩藻糖化聚糖的相对浓度 (%) (x 轴)之间的关联的杠杆曲线图。

[0261] 图 8 是在 ADCC (y 轴)和抗 FRA 抗体中的聚糖 M3N2F 的相对浓度 (%) (x 轴)之间的关联的杠杆曲线图。

[0262] 图 9 是显示测量抗 FRA 抗体的内在化的实验结果的曲线图。抗 FRA 抗体的内在化通过使用抗人次级免疫毒素根据 FRA 表达细胞增殖的抑制进行测量。OD540 显示在 y 轴上。抗 FRA 抗体的浓度显示在 x 轴上。“参考标准”指与图 2 结合描述的 MORAb-003 抗体。

[0263] 图 10 是显示导致 FRA 表达细胞增殖的 50% 抑制 (IC₅₀) 的抗 FRA 抗体浓度计算的表。“参考标准”指与图 2 结合描述的 MORAb-003 抗体。

[0264] 图 11 是显示测量抗 FRA 抗体的内在化活性的 FACS 结合实验结果的直方图。“参考标准”指与图 2 结合描述的 MORAb-003 抗体。阴影面积 (P1 群体) 对应于与 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育的细胞。P2 群体 (0% 对照) 对应于与作为对照的无关人 IgG 和 FITC

缀合的抗人 IgG 抗体一起温育的细胞。P3 群体对应于与抗 FRA 抗体和 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育且用酸性甘氨酸缓冲液洗涤的细胞。P4 群体(100% 对照)对应于与抗 FRA 抗体和 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育伴随 PBS 缓冲液洗涤的细胞。

[0265] 图 12 是显示测量抗 FRA 抗体的内在化活性的 FACS 结合实验结果的曲线图,所述抗 FRA 抗体在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应。通过 FRA 表达细胞群体的流式细胞术测量的平均荧光强度(MFI)百分比(y 轴)描述为相对于在每个时间点的总结合的时间(x 轴)的函数。

[0266] 图 13 是显示测量表 4 中所述的抗 FRA 抗体以及对照抗 FRA 抗体的内在化活性的 FACS 结合实验结果的曲线图。通过 FRA 表达细胞群体的流式细胞术测量的 MFI 百分比(y 轴)描述为相对于在每个时间点的总结合的时间(x 轴)的函数。“MORAb-003 参考标准”指与图 2 结合描述的 MORAb-003 抗体。

[0267] 图 14 是根据时间的抗 FRA 抗体内在化百分比的拟合模型,其中 Log(激动剂)与应答-可变斜率比较。“参考标准”指与图 2 结合描述的 MORAb-003 抗体。

[0268] 图 15 是概括实施例 5 中所述的 FACS 内在化研究的结果的表。

[0269] 图 16 是概括与抗 FRA 抗体的结合亲和力、ADCC、内在化速率和内在化效率有关的数据的表。“MORAb-003 参考标准”指与图 2 结合描述的 MORAb-003 抗体。

[0270] 发明详述

[0271] 本发明部分基于令人惊讶的发现:通过改变用于抗 FRA 抗体特别是 MORAb-003 抗 FRA 单克隆抗体的重组生产的特定细胞培养条件,可以改变抗体的 N 联中性聚糖谱,并且在一些情况下,改变抗 FRA 抗体的一种或多种性质。特别地,本发明人已发现可以通过下述改变抗 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱:将葡萄糖替换为半乳糖作为糖源、降低温度、减少溶解氧(DO)水平、增加 CO₂ 水平、将 CuCl 或丁酸钠加入培养基中、增加同渗容摩或在培养不同时间段后收获抗 FRA 抗体,并且前述培养条件各自改变 N 联中性聚糖谱。即,相对于在如本文定义的参考条件下产生的抗 FRA 抗体谱中所述聚糖的量,构成谱的一种或多种中性聚糖以增加或减少的量存在。具有改变的 N 联中性聚糖的抗 FRA 单克隆抗体例如 MORAb-003 抗体用作备选治疗分子,因为此类分子可以具有一种或多种期望性质,包括但不限于改变的 pK 和或 pD、改变的半衰期、改善的可溶性、减少的免疫原性或减少的副作用。本发明人进一步发现在这些条件中的任何下产生抗 FRA 抗体改变抗 FRA 抗体的结合亲和力、ADCC、内在化速率和 / 或内在化效率。

[0272] 相应地,在一个方面,本发明提供了具有新型 N 联中性聚糖谱的抗 FRA 抗体,因为与在如本文定义的参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较,一种或多种中性聚糖的相对量是增加的或减少的。本发明还提供了在表达 FRA 的细胞中具有改变(一般减少)的与 FRA 结合、改变的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和 / 或改变的内在化速率和 / 或内在化效率的抗 FRA 抗体。在多个实施方案中,抗 FRA 抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列或至少 95% 等同的序列,和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列或至少 95% 等同的序列。在特定实施方案中,抗体包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和与 SEQ ID NO:2 的轻链氨基酸序列 99% 相同的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 的轻链氨基酸序列,或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列、SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列,或与上述序列至少 95% 等同的序列(Ebel 等人,(2007))

Cancer Immunity,7:6)。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体具有与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 相同的重链氨基酸序列,和与 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 相同的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体包含由 SEQ ID NO:8 的核苷酸序列编码的重链(连同或不连同编码引导序列的核苷酸)和由 SEQ ID NO:9 的核苷酸序列编码的轻链(连同或不连同编码引导序列的核苷酸)。在一些实施方案中,重链氨基酸序列缺乏 C 末端赖氨酸。在多个实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体具有通过细胞系产生的抗体的氨基酸序列或缺乏重链 C 末端赖氨酸的此类序列,所述细胞系于 2006 年 4 月 24 日在保藏号 PTA-7552 下根据布达佩斯条约条款保藏于美国典型培养物中心(ATCC),10801 University Blvd., Manassas, VA20110-2209。

[0273] 在相关方面,本发明提供了包含本发明的抗 FRA 抗体的细胞培养物,从此类培养物中分离的细胞以及包含本发明的抗 FRA 抗体的试剂盒和组合物。

[0274] 在另一个方面,本发明提供了通过改变细胞培养条件用于产生抗 FRA 抗体的方法,所述改变选自:使用半乳糖作为糖源、降低温度、减少溶解氧(DO)水平、增加 CO₂ 水平、将 CuCl 或丁酸钠加入培养基中、增加同渗容摩或在培养不同时间段后收获抗 FRA 抗体,和通过该方法产生的抗 FRA 抗体。本发明还提供了通过在本文描述的改变培养条件下培养表达抗 FRA 抗体的宿主细胞,用于改变抗 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱和/或一种或多种性质或用于产生具有所需 N 联中性糖型谱或性质的抗 FRA 抗体的方法。

[0275] 在再进一步方面,本发明提供了使用本发明的抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,抗体用于在体外或体内检测 FRA 的存在或定量 FRA 或表达 FRA 的细胞。在其他实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体单独或与一种或多种另外的治疗剂组合用于治疗。

[0276] 本发明的抗体与人叶酸受体 α (FRA) 特异性结合。如本文使用的,特异性结合 FRA 的抗体(在本文中也称为抗 FRA 抗体)不与非 FRA 的蛋白质显著结合。当解离常数(K_D)是 $\leq 1\text{mM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 或 $\leq 10\text{nM}$ 时,抗体被说成特异性结合抗原。在特定实施方案中, K_D 是 1pM – 500pM 。在其他实施方案中, K_D 是 500pM – $1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $1\text{ }\mu\text{M}$ – 100nM 或 100mM – 10nM 。在优选实施方案中,FRA 是人 FRA,例如包含 SEQ ID NO:3 中所示的氨基酸序列或由 SEQ ID NO:4 中的核苷酸序列编码的氨基酸序列的人 FRA。

[0277] 在本发明的一些实施方案中,抗 FRA 抗体是包含两条重链和两条轻链的四链抗体(也称为免疫球蛋白)。本发明的抗 FRA 抗体的重链由重链可变结构域(V_H)和轻链恒定区(C_H)组成。轻链由轻链可变结构域(V_L)和轻链恒定结构域(C_L)组成。为了本申请的目的,成熟重链和轻链可变结构域各自包含在四个构架区(FR1、FR2、FR3 和 FR4)内的三个互补决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3),从 N 末端到 C 末端这样排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。在本文中对于每个结构域的氨基酸指定依照 Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 和 1991)), Chothia&Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901–917 或 Chothia 等人, Nature (1989) 342:878–883 的定义。

[0278] 本发明的抗体是具有人 κ 轻链的人免疫球蛋白 G 亚型 1 (IgG1)。

[0279] 术语“抗体”可以指个别抗体分子或多个抗体分子,如对于上下文合适的。本领域技术人员应当理解例如中性聚糖谱指多个抗体分子。

[0280] 在多个实施方案中,本发明提供了具有在图 3 中所示或下文“培养条件”部分中所述的任何 N 联中性聚糖谱的抗 FRA 抗体。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 M3N2、NA2、NA2F、MAN5 和 NA2G1F 和减少的 NGA2F。在一些实施方案中,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,抗 FRA 抗体的 N 联中性聚糖谱具有增加量的 NGA2,例如 NGA2 中的至少两倍或至少三倍增加。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体包含约 9% 的非岩藻糖基化糖型。本发明还提供了具有 N 联中性聚糖谱的抗 FRA 抗体,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 NA2、NGA2F 和 MAN5 和减少量的 NA2G1F。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 M3N2 和 NA2。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 NA2 和 NGA2。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 M3N2 和 NA2 和减少量的 NA2F。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 M3N2F、NA2 和 MAN5。在一些实施方案中,抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考培养条件下产生的抗体的谱相比较,其包含增加量的 M3N2、M3N2F 和 NA2。

[0281] 在此类谱中,M3N2、M3N2F 和 MAN5 可以增加至少约 2 倍或更多。NA2 可以增加至少约 10 倍或更多。NA2F 可以增加至少约 2 倍或更多。NA2F 可以减少至少约 40% 或更多,或可以增加至少约 2 倍或更多。NA2G1F 可以减少至少约 25% 或 30% 或更多,并且 NGA2F 可以减少至少约 10% 或 15% 或更多。

[0282] 在特定实施方案中,抗 FRA 单克隆抗体是 MORAb-003 单克隆抗体。“MORAb-003”指包含 SEQ ID NO :5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO :7 的轻链氨基酸序列的抗 FRA 抗体,并且在参考培养条件下产生且由外部制造商供应。在 MORAb-003 抗体参考标准和纯化的 FR- α 之间的动力学和稳态结合常数已通过表面等离子共振光谱法进行测定。结合速率(k_a)测定为 $(2.25. \pm 0.02) M^{-1}s^{-1}$, 并且解离速率(k_d)测定为 $(5.02. \pm 0.08) s^{-1}$ 。稳态解离常数(K_D)已测定为 2.23nM (美国专利申请 20050232919)。

[0283] 在多个实施方案中,本发明提供了与在参考培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较,具有减少的结合亲和力、增加或减少的 ADCC、减少的内在化效率和 / 或增加的内在化速率的抗 FRA 抗体。

[0284] 如本文使用的,N 联中性聚糖附着至保守糖基化位点或相应位置(SEQ ID NO :5 中的 Asn299)。如本文使用的,抗 FRA 抗体的“N 联中性聚糖谱”包含图 1 中所示的中性聚糖结构。此类结构包括部分加工的聚糖 M3N2、M3N2F 和 MAN5,以及完全加工的聚糖 NGA2 (G0)、NGA2F (G0F)、NA2G1F (G1F)、NA2 (G2) 和 NA2F (G2F)。为了本发明的目的,“G0”指无半乳糖化的聚糖,“G1”指单半乳糖化的聚糖,并且“G2”指二半乳糖化的聚糖。

[0285] 本发明的抗体的聚糖谱可以如实施例 2 中所述进行测定。简言之,附着至抗体重链的 N 联聚糖使用肽-N-糖苷酶 F (PNGase F) 进行酶促去除,并且通过凝胶过滤色谱法纯化。所得到的聚糖混合物使用例如 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)进行荧光标记,并且通过正相 HPLC 分辨。荧光标记的聚糖通过荧光进行定量。来自在分离过程中出现的峰的聚糖的鉴定通过线内质谱检测完成。复合 N 联聚糖可以在酶促去除后进行标记,使用任何合适的

荧光团(例如 2-氨基苯甲酸(2-AA)、2-氨基苯甲酰胺(2-AB)、2-氨基吡啶(2-AP)、8-氨基萘-1,3,6-三磺酸(ANTS)、2-氨基吡啶酮(AMAC)、或 9-氨基芘-1,3,6-三磺酸(APTS)),或使用放射性同位素,或使用自身可以使用其他方法检测的小化学标签(例如生物素)。无论是标记还是未标记的,复合聚糖随后可以通过多种方法进行分离,包括 HPLC(反相、正相、阴离子交换)、和基于凝胶或毛细管电泳方法,并且可以通过荧光、脉冲安培、折光指数、蒸发光散射或质谱技术进行计数。

[0286] 根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体通过培养表达抗体的细胞产生。在一些实施方案中,将编码重链、轻链或两者的核酸插入表达载体内,并可以与表达控制序列例如转录和翻译控制序列可操作地连接。

[0287] “可操作地连接的”序列包括与目的基因邻接的表达控制序列,和反式或隔一段距离作用以控制目的基因的表达控制序列。如本文使用的术语“表达控制序列”意指影响它们与之连接的编码序列表达和加工的多核苷酸序列。表达控制序列可以包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;RNA 加工信号例如剪接和多腺苷酸化信号;稳定化细胞质 mRNA 的序列;增强翻译效率的序列(即 Kozak 共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;和需要时,增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质取决于宿主生物而不同;在真核生物中,一般地,此类控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意欲最低限度包括其存在是表达和加工所需的所有组分,并且还可以包括其存在是有利的另外组分,例如引导序列和融合配偶体序列。

[0288] 表达载体包括质粒、逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒(AAV)、EBV 衍生的附加体等。在一些情况下,编码本发明的抗体、抗体链或抗原结合片段的核酸这样连接到载体内,从而使得在载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因的转录和翻译的预期功能。如技术人员众所周知的,表达载体和表达控制序列选择为与所需表达水平、使用的表达宿主细胞等相容。编码抗体轻链或片段和抗体重链或片段的核酸可以插入分开的载体或相同的表达载体内。核酸通过标准方法插入表达载体内(例如在抗体编码核酸和载体上的互补限制位点的连接,或如果不存在限制位点,那么平端连接)。

[0289] 用作表达用宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的,并且包括可从美国典型培养物中心(ATCC)获得的许多永生化细胞系。这些尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如 CHO-K1 细胞)、NS0 细胞、SP2 细胞、HEK-293T 细胞、NIH-3T3 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、非洲绿猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如 Hep G2)、A549 细胞、和许多其他细胞系。特别优先的细胞系通过测定何种细胞系具有高表达水平进行选择。在一个实施方案中,细胞不是温度敏感性突变细胞系。在另一个实施方案中,细胞是温度敏感性突变细胞系。在一些实施方案中,宿主细胞是 CHO 细胞、CHO-K1 细胞或 GS CHO-K1 细胞。

[0290] 在一些实施方案中,将编码抗体的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞内,并且通过将宿主细胞培养足够时间段以允许抗体在宿主细胞中表达或抗体分泌到宿主细胞在其中生长的培养基内产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0291] 进一步地,来自生产细胞系的表达可以使用许多已知技术得到增强。例如,谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS 系统)是用于在特定条件下增强表达的普通方法。GS 系统与通过引用整体合并入本文的欧洲专利号 216846、256055、323997 和 338841 结合整体或部分讨论。

[0292] 在一个方面,本发明提供了使用多种细胞培养条件用于产生抗 FRA 抗体的方法。如本文使用的,“参考培养条件”指在 180rpm 在 CD-CHO (Invitrogen) 培养基中在 2L 搅拌槽生产生物反应器中培养的细胞。参考细胞培养的 pH 在 6.9-7.1 的范围中。例如, pH 可以是 7.0。参考细胞培养的葡萄糖浓度是 1g/L-4g/L、或 1g/L-3g/L。参考细胞培养的温度是约 36-38℃。例如,温度可以是 36.5℃。CO₂ 浓度是约 5%。细胞培养基的参考同渗容摩在 250-350mOsm/L 的范围中。参考细胞培养基不含丁酸钠或氯化铜。参考细胞培养基的溶解氧张力(DO)在 30-100% 的范围中。例如,参考细胞培养基的 DO 是 30%-40%。在参考细胞培养条件下培养的抗体的收获时间可以是在细胞培养开始后 13-15 天,例如 14 天(即, 336 小时),其预期是在其下培养活力是 50% 的时间。图中所述的“MORAb-003 参考标准”、“MORAb-003 参考标准”和“参考标准”样品包含 SEQ ID NO :5 中的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO :7 中的轻链氨基酸序列,并且通过在先前描述的参考培养条件下培养的细胞产生且由外部制造商供应。

[0293] 在一些实施方案中,培养条件在生长期和 / 或对数期过程中改变。分批培养物是在封闭系统中生长的细胞群体。在分批培养物中的细胞群体的一般生长曲线包含对数期、指数期、静止期和死亡期。对数期指当群体从旧生长环境取到新环境时,生长周期的第一个阶段,其中细胞适合于新营养来源;合成 RNA、蛋白质和其他分子但仍未分裂。这个时期的长度可以是短暂或延长的,取决于培养历史和生长条件。

[0294] 例如,本发明提供了通过对于至少部分培养时间使用半乳糖作为糖源培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,半乳糖从第 0 天向前用作糖源,其中第 0 天是接种当天。在其他实施方案中,细胞使用葡萄糖作为糖源培养第一个时间段,并且使用半乳糖作为糖源培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体通过在对数期中使用葡萄糖作为糖源和在生长期中使用半乳糖作为糖源的细胞培养产生。在一些实施方案中,从第 0 天到第 14 天,或从第 2 天到第 10 天的任何天起始,或优选从第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天或第 7 天起始,使用半乳糖作为糖源培养细胞。对于任何上述方法,半乳糖浓度可以是 0.01g/L-20g/L、优选 1g/L-10g/L、或更优选 2g/L-4g/L。在一些实施方案中,半乳糖浓度可以是 2g/L。

[0295] 根据本发明,通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与抗 FRA 抗体参考标准相比较,其包含增加的 M3N2、NA2、NA2F、MAN5 和 NA2G1F 和减少的 NGA2F。在一些实施方案中,通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),其包含减少的 M3N2F 和 / 或增加的 NA2F 和 / 或增加的 NA2G1F 和 / 或减少的 NGA2F。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2F 糖型的量可以减少至少 30%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2F 糖型的量可以增加至少两倍。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2G1F 糖型的量可以增加至少 40%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA

抗体中的 NGA2F 糖型的量可以减少 25%。在一些实施方案中,通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1:1:1.7:60:20:16:365:370 的 M3N2:M3N2F:NA2:NA2F:MAN5:NGA2:NA2G1F:NGA2F 比。在一些实施方案中,通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.12%M3N2、0.14%M3N2F、0.2%NA2、7.06%NA2F、2.42%MAN5、1.9%NGA2、43.73%NA2G1F 和 44.43%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的至少 6% 或 7% 中性聚糖可以具有 NA2F 糖型。在一些实施方案中,通过使用半乳糖作为糖源培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 4.64% 非岩藻糖基化糖型和 95.36% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0296] 本发明还提供了通过对于至少部分培养时间在低温培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,从第 0 天向前在低温培养细胞,其中第 0 天是接种当天。在其他实施方案中,细胞在第一个温度培养第一个时间段,并且在更低的温度培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体通过在对数期中使用第一个温度和在生长期中使用更低的温度的细胞培养产生。第一个温度可以是约 36-38℃。更低的温度可以约 28-35℃、或约 30-33℃、或约 30-31℃,并且可以是约 28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃或 35℃。在一些实施方案中,细胞在 36.5℃ 的温度培养第一个时间段,并且在 30℃ 培养第二个时间段。从第 0 天到第 14 天,或从第 2 天到第 10 天的任何天起始,或优选从第 3 天、第 4 天或第 5 天起始,可以在更低的温度培养细胞。

[0297] 根据本发明,通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与抗 FRA 抗体参考标准相比较,其包含增加的 NGA2。根据本发明,通过在更低的温度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),其包含增加的 NGA2 和 / 或减少的 NG2G1F。在一些实施方案中,通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),其包含增加的非岩藻糖基化糖型。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NGA2 糖型的量可以增加至少两倍。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB810-10),通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2G1F 糖型的量可以减少至少 30%。在一些实施方案中,在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1:13:2.5:70:100:350:1050:3500 的 M3N2:M3N2F:NA2:NA2F:MAN5:NGA2:NA2G1F:NGA2F 比。在一些实施方案中,通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.02%M3N2、0.25%M3N2F、0.05%NA2、1.36%NA2F、2.04%MAN5、6.98%NGA2、68.52%NA2G1F 和 90.92%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的至少 6% 或 7% 中性聚糖可以具有 NGA2 糖型。在一些实施方案中,通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体可以包含约 9% 非岩藻糖基化糖型。在一些实施方案中,通过在低温培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 9.09% 非岩藻糖基化糖型和 90.92% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0298] 本发明还提供了通过对于至少部分培养时间在高同渗容摩培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,从第 0 天向前在高同渗容摩培养细

胞,其中第0天是接种当天。在其他实施方案中,细胞在参考同渗容摩培养第一个时间段,并且在更高的同渗容摩培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗FRA抗体通过在对数期中使用参考同渗容摩和在生长期中使用更高的同渗容摩的细胞培养产生。参考同渗容摩可以在250-350mOsm/L的范围中。更高的同渗容摩可以是360-800mOsm/L、或400-650mOsm/L。在一些实施方案中,细胞在约450mOsm/L、475mOsm/L、500mOsm/L、525mOsm/L、550mOsm/L、575mOsm/L、600mOsm/L、625mOsm/L或650mOsm/L培养。在一些实施方案中,细胞在250-350mOsm/L培养第一个时间段,并且在600mOsm/L培养第二个时间段。从第0天到第14天,或从第2天到第10天的任何天起始,优选从第3天到第5天的任何天起始,即如本文描述的在更高的同渗容摩培养细胞,从第2天、第3天、第4天或第5天起始,可以在更高的同渗容摩培养细胞。

[0299] 根据本发明,通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体具有这样的N联中性聚糖谱,与抗FRA抗体参考标准相比较,其包含增加的NA2、MAN5和NGA2F和减少的NA2G1F。根据本发明,通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体具有这样的N联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗FRA抗体相比较(批号NB810-10),其包含增加的MAN5和/或减少的NA2G1F和/或增加的NGA2F。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗FRA抗体相比较(批号NB810-10),通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体中的MAN5糖型的量可以增加至少40%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗FRA抗体相比较(批号NB810-10),通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体中的NA2G1F糖型的量可以减少至少30%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗FRA抗体相比较(批号NB810-10),通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体中的NGA2F糖型的量可以增加至少15%。在一些实施方案中,在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体具有N联中性聚糖谱,其包含约1:3:3:15:43:33:250:900的M3N2:M3N2F:NA2:NA2F:MAN5:NGA2:NA2G1F:NGA2F比。在一些实施方案中,通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体具有约0.08%M3N2、0.25%M3N2F、0.23%NA2、1.23%NA2F、3.4%MAN5、2.63%NGA2、19.57%NA2G1F和72.6%NGA2F的N联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体中的至少3%或4%中性聚糖可以具有MAN5糖型。在一些实施方案中,通过在高同渗容摩培养的细胞产生的抗FRA抗体具有约6.34%非岩藻糖基化糖型和93.65%岩藻糖基化糖型的N联中性聚糖谱。

[0300] 本发明还提供了通过对于至少部分培养时间在丁酸钠的存在下培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗FRA抗体的方法。在一些实施方案中,从第0天向前在丁酸钠的存在下培养细胞,其中第0天是接种当天。在其他实施方案中,细胞在不存在丁酸钠的情况下培养第一个时间段,并且在丁酸钠的存在下培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗FRA抗体通过在对数期中在不存在丁酸钠的情况下和在生长期中在丁酸钠的存在下的细胞培养产生。在一些实施方案中,丁酸钠可以以0.01mM-90mM、或0.01mM-16mM浓度使用。在一些实施方案中,丁酸钠可以以0.5mM或10mM浓度使用。在一些实施方案中,在培养起始后第6天时加入丁酸钠。从第0天到第14天,或从第2天到第10天的任何天起始,优选从第3天、第4天、第5天、第6天或第7天起始,可以在丁酸钠的存在下培养细胞。

[0301] 根据本发明,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗FRA抗体具有这样的N

联中性聚糖谱,与抗 FRA 抗体参考标准相比较,其包含增加的 M3N2 和 NA2。在一些实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),其包含减少的 MAN5。在其他实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),其包含减少的 M3N2 和 / 或增加的 M3N2F 和 / 或减少的 NA2 和 / 或增加的 MAN5。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 MAN5 糖型的量可以减少至少 25%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 MAN5 糖型的量可以增加至少 30%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2 糖型的量可以减少至少 75%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2F 糖型的量可以减少至少 70%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2 糖型的量可以减少至少 75%。在一些实施方案中,在丁酸钠的存在下培养的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 : 1.7 : 3 : 18 : 16 : 23 : 200 : 450 的 M3N2 : M3N2F : NA2 : NA2F : MAN5 : NGA2 : NA2G1F : NGA2F 比。在其他实施方案中,在丁酸钠的存在下培养的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 : 8 : 3 : 40 : 80 : 55 : 500 : 1500 的 M3N2 : M3N2F : NA2 : NA2F : MAN5 : NGA2 : NA2G1F : NGA2F 比。在一些实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.14%M3N2、0.24%M3N2F、0.47%NA2、2.49%NA2F、2.19%MAN5、3.26%NGA2、28.66%NA2G1F 和 62.55%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.05%M3N2、0.4%M3N2F、0.13%NA2、1.83%NA2F、4.11%MAN5、2.77%NGA2、25.33%NA2G1F 和 65.38%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的至少 4% 或 5% 中性聚糖可以具有 MAN5 糖型。在一些实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 6.06% 非岩藻糖基化糖型和 93.94% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在丁酸钠的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 7.06% 非岩藻糖基化糖型和 92.94% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0302] 本发明还提供了通过对于至少部分培养时间在低溶解氧张力(DO)培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,从第 0 天向前在低 DO 培养细胞,其中第 0 天是接种当天。在其他实施方案中,细胞在参考 DO 培养第一个时间段,并且在更低的 DO 培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体通过在对数期中使用参考 DO 和在生长期中使用更低的 DO 的细胞培养产生。参考 DO 可以在 30-100% 的范围中。例如,参考细胞培养基的 DO 可以是 30%-40%。更低的 DO 可以是 0%-25%、或 5%-25%,优选 5%-20%、5%-15%、5%-10%,例如约 5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14% 或 15% 的 DO。在一些实施方案中,细胞在 30% 的 DO 张力培养第一个时间段,并且在 5% 的 DO 张力培养第二个时间段。从第 2 天到第 10 天的任何天起始,优选第 3 天到第 7 天,例如在第 3 天、第 4

天、第 5 天、第 6 天或第 7 天起始,可以在低 DO 培养细胞。

[0303] 根据本发明,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体相比较,其包含增加的 NA2 和 NGA2。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体相比较,其包含增加的 NA2 和 M3N2。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),其包含减少的 M3N2 和 / 或减少的 MAN5 和 / 或增加的 NGA2 和 / 或增加的 NA2G1F 和 / 或减少的 NGA2F。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),其包含增加的非岩藻糖基化糖型。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),其包含减少的 M3N2。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2 糖型的量可以减少至少 95%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 MAN5 糖型的量可以减少至少 25%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NGA2 糖型的量可以增加至少 2 倍。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的非岩藻糖基化糖型的量可以增加至少 40%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2G1F 糖型的量可以增加至少 20%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NGA2F 糖型的量可以减少至少 15%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2 糖型的量可以减少至少 80%。在一些实施方案中,在低 DO 培养的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 : 20 : 50 : 280 : 220 : 650 : 3200 : 5500 的 M3N2 : M3N2F : NA2 : NA2F : MAN5 : NGA2 : NA2G1F : NGA2F 比。在其他实施方案中,在低 DO 培养的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 : 8 : 30 : 40 : 55 : 80 : 550 : 1800 的 M3N2 : M3N2F : NA2 : NA2F : MAN5 : NGA2 : NA2G1F : NGA2F 比。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.01%M3N2、0.22%M3N2F、0.48%NA2、2.8%NA2F、2.22%MAN5、6.53%NGA2、31.98%NA2G1F 和 55.75%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.04%M3N2、0.31%M3N2F、0.3%NA2、1.59%NA2F、2.23%MAN5、3.17%NGA2、21.9%NA2G1F 和 70.46%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的至少 6% 或 7% 中性聚糖可以具有 NGA2 糖型。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 9% 或 10% 非岩藻糖基化糖型。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 9.24% 非岩藻糖基化糖型和 90.75% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在低 DO 培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 5.74%

非岩藻糖基化糖型和 94.26% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0304] 本发明还提供了通过对于至少部分培养时间在高 CO₂ 浓度培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,从第 0 天向前在高 CO₂ 浓度培养细胞,其中第 0 天是接种当天。优选地,CO₂ 浓度在对数期后增加。在其他实施方案中,细胞在参考 CO₂ 浓度培养第一个时间段,并且在高 CO₂ 浓度培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体通过在对数期中使用参考 CO₂ 浓度和在生长期中使用高 CO₂ 浓度的细胞培养产生。参考 CO₂ 浓度可以是约 5%。高 CO₂ 浓度可以是 10%-30%、或 10%-20%,即约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、约 21%、约 22%、约 23%、约 24%、约 25%、约 26%、约 27%、约 28%、约 29% 或约 30%。在一些实施方案中,细胞在约 5% 的 CO₂ 浓度培养第一个时间段,并且在高达 20% 的 CO₂ 浓度培养第二个时间段。从第 2 天到第 10 天的任何天起始,即在第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天、第 7 天、第 8 天、第 9 天或第 10 天起始,可以在高 CO₂ 浓度培养细胞。

[0305] 根据本发明,通过在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与抗 FRA 抗体参考标准相比较,其包含增加的 M3N2 和 NA2 和减少的 NA2F。根据本发明,通过在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),其包减少的 NA2 和 / 或减少的 MAN5。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2 糖型的量可以减少至少 60%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 MAN5 糖型的量可以减少至少 40%。在一些实施方案中,在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1:1.5:1:7:8:16:100:400 的 M3N2:M3N2F:NA2:NA2F:MAN5:NGA2:NA2G1F:NGA2F 比。在一些实施方案中,通过在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.19%M3N2、0.27%M3N2F、0.23%NA2、1.34%NA2F、1.61%MAN5、3.04%NGA2、19.51%NA2G1F 和 73.81%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在高 CO₂ 浓度培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 5.07% 非岩藻糖基化糖型和 94.93% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0306] 本发明还提供了通过对于至少部分培养时间在氯化铜(CuCl)的存在下培养能够表达抗体的细胞,用于产生抗 FRA 抗体的方法。在一些实施方案中,从第 0 天向前在 CuCl 的存在下培养细胞,其中第 0 天是接种当天。在其他实施方案中,细胞在不存在 CuCl 的情况下培养第一个时间段,并且在 CuCl 的存在下培养第二个时间段。例如,根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体通过在对数期中在不存在 CuCl 的情况下和在生长期中在 CuCl 的存在下的细胞培养产生。CuCl 可以以 0.01 μ M-0.5mM、或 0.01mM-0.5mM 的任何浓度使用。在一些实施方案中,CuCl 以 0.5mM 浓度使用。在一些实施方案中,可以在培养起始后第 0 天到第 14 天的任何天起始加入 CuCl。在一些实施方案中,在培养起始后第 6 天时加入 CuCl。

[0307] 根据本发明,通过 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与抗 FRA 抗体参考标准相比较,其包含增加的 M3N2、M3N2F 和 NA2。根据本发明,通过 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),其包含增加的 M3N2 和 /

或增加的 M3N2F 和 / 或减少的 NA2 和 / 或减少的 MAN5 和 / 或增加的 NA2G1F 和 / 或减少的 NGA2F。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2 糖型的量可以增加至少 50%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2F 糖型的量可以增加至少 60%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2 糖型的量可以减少至少 75%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 MAN5 糖型的量可以减少至少 25%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2G1F 糖型的量可以增加至少 30%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB809-65),通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NGA2F 糖型的量可以减少至少 10%。在一些实施方案中,在 CuCl 的存在下培养的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 2 : 2 : 1 : 17 : 14 : 25 : 220 : 400 的 M3N2 : M3N2F : NA2 : NA2F : MAN5 : NGA2 : NA2G1F : NGA2F 比。在一些实施方案中,通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 0.34%M3N2、0.37%M3N2F、0.15%NA2、2.6%NA2F、2.16%MAN5、3.88%NGA2、33.03%NA2G1F 和 57.46%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在 CuCl 的存在下培养的细胞产生的抗 FRA 抗体具有约 6.53% 非岩藻糖基化糖型和 93.46% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0308] 根据本发明,抗 FRA 抗体可以在细胞培养开始后约 10 天(240 小时)、13 天、14 天(336 小时)、15 天、17 天(408 小时)或 20 天(480 小时)时收获。

[0309] 根据本发明,通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与抗 FRA 抗体参考标准相比较,其包含增加的 M3N2 和 NA2。根据本发明,通过在 17 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体相比较,其包含增加的 M3N2、NA2 和 MAN5。根据本发明,通过在 20 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体相比较,其包含增加的 M3N2 和 NA2。

[0310] 根据本发明,通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),其包含减少的 M3N2 和 / 或减少的 M3N2F 和 / 或减少的 MAN5。在一些实施方案中,通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),其包含减少的非岩藻糖基化糖型。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2 糖型的量可以减少至少 80%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 M3N2F 糖型的量可以减少至少 25%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 MAN5 糖型的量可以减少至少 50%。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条

件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),通过在 10 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体中的非岩藻糖基化糖型的量可以减少至少 25%。在一些实施方案中,在 10 天时收获的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 :6 :8 :40 :30 :70 :550 :1800 的 M3N2 :M3N2F :NA2 :NA2F :MAN5 :NGA2 :NA2G1F :NGA2F 比。在一些实施方案中,在 10 天时收获的抗 FRA 抗体具有约 0.04%M3N2、0.24%M3N2F、0.31%NA2、1.48%NA2F、1.28%MAN5、2.64%NGA2、22.33%NA2G1F 和 71.68%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,在 10 天时收获的抗 FRA 抗体具有约 4.27% 非岩藻糖基化糖型和 95.73% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0311] 根据本发明,通过在 17 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体具有这样的 N 联中性聚糖谱,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),其包含增加的 NA2。在一些实施方案中,与在参考细胞培养条件下产生的抗 FRA 抗体相比较(批号 NB859-25),通过在 17 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体中的 NA2 糖型的量可以增加至少 50%。在一些实施方案中,在 17 天时收获的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 :2 :3 :13 :20 :18 :170 :440 的 M3N2 :M3N2F :NA2 :NA2F :MAN5 :NGA2 :NA2G1F :NGA2F 比。在一些实施方案中,在 17 天时收获的抗 FRA 抗体具有约 0.15%M3N2、0.34%M3N2F、0.51%NA2、1.9%NA2F、3.16%MAN5、2.77%NGA2、24.87%NA2G1F 和 66.3%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,通过在第 17 天时收获的细胞产生的抗 FRA 抗体中的至少 3% 或 4% 中性聚糖可以具有 MAN5 糖型。在一些实施方案中,在 17 天时收获的抗 FRA 抗体具有约 6.59% 非岩藻糖基化糖型和 93.41% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0312] 在一些实施方案中,在 20 天时收获的抗 FRA 抗体具有 N 联中性聚糖谱,其包含约 1 :1.8 :2.5 :10 :19 :17 :140 :430 的 M3N2 :M3N2F :NA2 :NA2F :MAN5 :NGA2 :NA2G1F :NGA2F 比。在一些实施方案中,在 20 天时收获的抗 FRA 抗体具有约 0.16%M3N2、0.29%M3N2F、0.4%NA2、1.66%NA2F、2.96%MAN5、2.64%NGA2、22.43%NA2G1F 和 69.45%NGA2F 的 N 联中性聚糖谱。在一些实施方案中,在 20 天时收获的抗 FRA 抗体具有约 6.16% 非岩藻糖基化糖型和 93.83% 岩藻糖基化糖型的 N 联中性聚糖谱。

[0313] 本发明包含使用上文描述的任何一种或多种条件产生抗 FRA 抗体的方法。

[0314] 在一个实施方案中,相对于抗 FRA 参考标准,本发明的抗 FRA 抗体对于人 FRA 具有改变的结合亲和力。在一些实施方案中,结合亲和力与 MORAb-003 参考标准相比较可以是减少的,并且在如本文定义的参考培养条件下产生的抗体(阳性对照)相比较是减少的。此类抗体可以通过下述培养表达抗 FRA 抗体的宿主细胞产生:使用半乳糖作为糖源,在低温,在高同渗容摩,在丁酸钠的存在下,在低 DO,在高 CO₂ 浓度下,在氯化铜的存在下,或通过在培养起始后 10、17 或 20 天收获表达抗 FRA 抗体的细胞,如本文描述的。在使用半乳糖作为糖源的实施方案中,可以在培养起始后 5 天时加入 2g/L 半乳糖。在使用低温的实施方案中,培养温度可以在培养起始后 5 天时从 36.5℃ 转变为 30℃。在使用增加的同渗容摩的实施方案中,通过在培养起始后 7 天时加入 NaCl,培养物的同渗容摩可以增加至 600mOsm/L。在使用减少的溶解氧张力(DO)的实施方案中,DO 可以在培养起始后 6 天时从 30% 变为 5%。在使用丁酸钠的实施方案中,可以在培养起始后 6 天时加入 0.5mM 或 10mM 丁酸钠。在使用氯化铜的实施方案中,可以在培养起始后 6 天时加入 0.5mM 氯化铜。在其他实施方案中,培养基中的 CO₂ 浓度在培养起始后 5 天时增加至 20%。

[0315] 在任何前述实施方案中,培养物可以由 CHO 细胞组成,例如包含核酸的 CHO-K1 细

胞,所述核酸编码 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列或编码至少 95% 等同的序列,和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列或编码至少 95% 等同的序列。特别地,细胞可以包含编码下述的核酸:SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和与 SEQ ID NO:2 的轻链氨基酸序列 99% 相同的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 的轻链氨基酸序列,或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列,或与上文提及的序列至少 95% 等同的编码序列。在一些实施方案中,编码重链的核酸包含 SEQ ID NO:8 的核苷酸序列连同或不连同编码引导序列的核苷酸,和编码轻链的核酸包含 SEQ ID NO:9 的核苷酸序列连同或不连同编码引导序列的核苷酸。在多个实施方案中,抗 FRA 抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列或至少 95% 等同的序列,和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列或至少 95% 等同的序列。在特定实施方案中,抗体包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和与 SEQ ID NO:2 的轻链氨基酸序列 99% 相同的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 的轻链氨基酸序列,或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列,或与上文提及的序列至少 95% 等同的序列。

[0316] 抗 FRA 抗体的结合亲和力可以通过 ELISA、RIA、流式细胞术或表面等离子共振例如 **BIACORE**[®] 进行测量。如本文使用的,术语“表面等离子共振”指允许通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度中的改变来分析实时生物特异性相互作用的光学现象,例如使用 **BIACORE**[®] 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N. J.)。关于进一步描述,参见 Jonsson U. 等人,Ann. Biol. Clin. 51:19-26(1993);Jonsson U. 等人,Biotechniques 11:620-627 (1991);Jonsson B. 等人,J. Mol. Recognit. 8:125-131 (1995);和 Johnsson B. 等人,Anal. Biochem. 198:268-277 (1991)。

[0317] 相对于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体,抗 FRA 抗体的结合亲和力可以减少至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95%。在多个实施方案中,与人 FRA 具有减少的结合的本发明的抗 FRA 抗体包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列或至少 95% 等同的序列,和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列或至少 95% 等同的序列。特别地,抗体包含 SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和与 SEQ ID NO:2 的轻链氨基酸序列 99% 相同的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 的轻链氨基酸序列,或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列,或与上文提及的序列至少 95% 等同的序列。

[0318] 对于人 FRA 具有减少的结合亲和力的抗 FRA 单克隆抗体用于治疗癌症。不希望受理论束缚,减少的结合亲和力可以允许更深地渗透到肿瘤内,以允许靶向内部肿瘤团块。参见,Adams 等人,“High Affinity Restricts the Localization and Tumor Penetration of Single-Chain Fv Antibody Molecules,”Cancer Res 61:4750-4755 (2001 年 6 月 15 日)。

[0319] 在一些实施方案中,相对于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体,本发明的抗 FRA 抗体可以具有改变的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。在一些实施方案中,

ADCC 与抗 FRA 抗体参考标准相比较是增加的。在一些实施方案中,与在参考条件下产生的抗体(阳性对照)相比较,通过在改变的培养条件下培养产生的抗体也具有增加的 ADCC。在其他实施方案中,ADCC 与阳性对照相比较是增加的,但与抗体参考标准相比较是减少的。在另外其他实施方案中,ADCC 与阳性对照和抗体参考标准相比较是减少的。具有增加的 ADCC 的抗 FRA 单克隆抗体对于其中作用方式是引发针对 FRA 表达靶细胞的免疫效应子功能的疗法是有用的,例如以治疗其中希望杀死 FRA 表达细胞的疾病和病状。具有减少的 ADCC 的抗 FRA 单克隆抗体在其中作用方式是使用抗体作为靶向试剂将细胞毒性有效负荷递送给靶细胞的疗法中是有用的。不受理论束缚,可以期望减少 ADCC 活性,以使抗体缀合物的局部浓度以及抗体的内在化效率达到最大。如对于 ADCC 所需的,抗体与免疫效应细胞的相互作用将预测减少抗体缀合物在细胞表面上的可用度,并且减少抗体缀合物的功效。

[0320] 如本文使用的,ADCC 是抗体的免疫效应活性。ADCC 可以通过效应细胞上的 Fc 受体介导,所述效应细胞包括但不限于细胞毒性 T 细胞、自然杀伤(NK)细胞或巨噬细胞,导致 FRA 表达靶细胞的细胞裂解和/或死亡。本发明的抗 FRA 抗体的 ADCC 可以使用本领域已知的标准测定法进行测量(参见例如通过引用整体合并的美国专利申请公开号 2006/0239911)。例如,FRA 表达细胞可以暴露于多个浓度的抗 FRA 抗体(或阴性对照,例如无抗体或对照 Ig)和活化效应细胞,例如外周血单核细胞(PBMCs)。ADCC 可以通过在 FRA 表达细胞的细胞裂解后发生的乳酸脱氢酶(LDH)释放进行监控。LDH 的活性可以通过分光光度计测定法进行测量。ADCC 还可以通过用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFDA SE)标记 FRA 表达细胞进行测量。标记的细胞随后与抗 FRA 抗体的稀释物和衍生自 PBMCs 的未标记的效应细胞混合。在温育后,通过流式细胞术就剩余活的、标记的 FRA 表达细胞评分细胞群体。

[0321] 在多个实施方案中,相对于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体(即,抗体参考标准和/或阳性对照)发生的那种,本发明的抗 FRA 抗体可以引发高至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的 ADCC。在其他实施方案中,相对于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体发生的那种,本发明的抗 FRA 抗体可以引发低至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的 ADCC。

[0322] 根据本发明的方法,通过如本文描述的在低温或低 DO 培养表达抗体的宿主细胞,可以增加抗 FRA 抗体的 ADCC。在一些实施方案中,低温可以是在培养起始后 5 天时从 36.5°C 到 30°C 的转变。在一些实施方案中,DO 可以在培养起始后 6 天时从 30% 变为 5%。根据其他方法,通过从培养开始早于 13 天或晚于 15 天的培养物中收获抗体,可以减少 ADCC。

[0323] 在任何前述实施方案中,培养物可以由 CHO 细胞组成,例如包含核酸的 CHO-K1 细胞,所述核酸编码 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列或编码至少 95% 等同的序列,和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列或编码至少 95% 等同的序列。特别地,细胞可以包含编码下述的核酸:SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和与 SEQ ID NO:2 的轻链氨基酸序列 99% 相同的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 的轻链氨基酸序列,或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:

7 的轻链氨基酸序列,或与上文提及的序列至少 95% 等同的编码序列。在一些实施方案中,编码重链的核酸包含 SEQ ID NO :8 的核苷酸序列连同或不连同编码引导序列的核苷酸,和编码轻链的核酸包含 SEQ ID NO :9 的核苷酸序列连同或不连同编码引导序列的核苷酸。

[0324] 依照本发明,增加的 ADCC 与抗 FRA 抗体中增加量的 NGA2 (G0)聚糖或非岩藻糖基化聚糖关联,并且与抗 FRA 抗体中的 M3N2F 聚糖量反相关。

[0325] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体在与细胞表面上的 FRA 结合后在细胞中内在化。此类内在化抗体可以缀合至化学治疗剂,例如免疫毒素、放射性核素或细胞毒素或细胞生长抑制剂。在一些实施方案中,相对于在参考培养条件下产生的抗体,本发明的抗 FRA 抗体可以具有改变的内在化效率或内在化速率。在这个背景下,内在化效率指由于其抗 FRA 抗体可以保留在靶细胞内的能力,而内在化速率指在其下抗 FRA 抗体可以穿过靶细胞的细胞膜的速率。本领域已知的标准测定法可以用于监控在 FRA 表达细胞中本发明的抗 FRA 抗体的内在化(参见例如过引用整体合并的美国专利申请公开号 2006/0239911)。例如,第二种免疫毒素例如 Hum-ZAP 测定法(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA)可以用于监控本发明的抗 FRA 抗体的内在化。第二种免疫毒素是次级抗体的缀合物,例如山羊抗人 IgG,和核糖体灭活蛋白质,皂草素。此类第二种免疫毒素可以这样选择,使得它们与本发明的抗 FRA 抗体结合。如果抗 FRA 抗体是内在化的,那么皂草素将抑制蛋白质合成且促使细胞死亡。暴露于本发明的抗 FRA 抗体和第二种免疫毒素(或阴性对照)的 FRA 表达细胞的细胞活力可以用标准细胞活力测定法进行测量,例如通过分光光度法阅读活细胞数目的那些。

[0326] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以显示出高于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 99% 或至少 99.9% 的内在化速率。具有增加的内在化速率的抗 FRA 单克隆抗体对于例如抗体缀合物是有用的,而更快速的内在化可以等于更好的药效学,和潜在更不频繁或更低的给药。另外,对于其中希望通过抗体-抗原复合物的内在化从细胞表面去除抗原的疗法,更快的内在化速率将预期导致抗原从细胞表面去除的增加效率。例如,在靶向涉及癌细胞死亡的 FRA 介导的发信号途径的疗法中,抗 FRA 抗体通过经由内在化从细胞表面去除受体来减少受体发信号。

[0327] 在其他实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体显示出低于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的内在化速率。

[0328] 当治疗作用方式涉及细胞内机制和效应子功能时,具有减少的内在化速率的抗 FRA 单克隆抗体可以是有用的。不希望受理论束缚,更缓慢地内在化的抗 FRA 抗体保留在细胞表面上且对于效应活性包括 ADCC 和 CDC 具有增加的机会。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以具有约 57 分钟或 58 分钟的半最大内在化常数。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体具有约 36 分钟、37 分钟、41 分钟、42 分钟、45 分钟或 46 分钟的半最大内在化常数。半最大内在化常数可以通过本文描述的内在化测定法包括 FACS 分析进行测定。

[0329] 在一个实施方案中,与在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体的内在化效率相比较,本发明的抗 FRA 抗体可以显示出减少的内在化效率。具有减少的内在化

效率的抗 FRA 抗体用于增加抗体对于免疫系统的可用度,并且还使 ADCC 或补体依赖性细胞毒性(CDC)成为可能。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以显示出低于在如本文定义的“参考培养条件”下产生的抗 FRA 抗体至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的内在化效率。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以具有 1632ng/mL 或 990ng/mL 的内在化 IC₅₀。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体具有 1632ng/mL 或 990ng/mL 的内在化 IC₅₀。IC₅₀ 和 EC₅₀ 可以通过本文描述的内在化测定法进行测定。

[0330] 如本文描述的通过在低 DO 培养表达抗 FRA 抗体的宿主细胞或通过在培养起始后 17 或 20 天收获抗 FRA 抗体,可以增加内在化速率。在一些实施方案中,DO 可以在培养起始后 6 天时从 30% 变为 5%。

[0331] 在任何前述实施方案中,培养物可以由 CHO 细胞组成,例如包含核酸的 CHO-K1 细胞,所述核酸编码 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列或编码至少 95% 等同的序列,和 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列或编码至少 95% 等同的序列。特别地,细胞可以包含编码下述的核酸:SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和与 SEQ ID NO:2 的轻链氨基酸序列 99% 相同的轻链氨基酸序列,SEQ ID NO:1 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:6 的轻链氨基酸序列,或 SEQ ID NO:5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列,或与上文提及的序列至少 95% 等同的编码序列。在一些实施方案中,编码重链的核酸包含 SEQ ID NO:8 的核苷酸序列连同或不连同编码引导序列的核苷酸,和编码轻链的核酸包含 SEQ ID NO:9 的核苷酸序列连同或不连同编码引导序列的核苷酸。

[0332] 药物组合物

[0333] 在进一步方面,本发明提供了组合物,其包含具有本文描述的一种或多种改变特征的本发明的抗 FRA 抗体,特别是 MORAb-003 抗体,和药学可接受的载体或赋形剂。“药学可接受的载体”可以是生理学相容的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。仅作为举例说明,药学可接受的载体的一些例子是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等,及其组合。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。药学可接受的物质的另外例子是增强抗体的贮存期限或有效性的湿润剂或小量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0334] 包含本发明的抗 FRA 抗体的组合物可以以任何合适的形式用于施用于受试者,例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、气溶胶、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。如技术人员应当理解的,形式取决于预期施用方式 and 治疗应用。在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体以可注射或可输注溶液的形式,例如组合物可以类似于用于人的被动免疫接种的那些。优选施用方式是例如通过静脉内输注或注射的肠胃外的(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内),但还考虑了通过肌内或皮下注射、经口和鼻途径的施用。由本发明考虑的其他施用方式包括支气管内、经粘膜、脊柱内、滑膜内、主动脉内、眼、耳、局部和颊和瘤内。

[0335] 在一些实施方案中,用于治疗用途的抗 FRA 抗体组合物在制造和贮存条件下是无菌和稳定的。本发明包括配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构的组合物。本发明的无菌可注射溶液可以通过下述进行制备:将抗 FRA 抗体与上

文列举的成分之一或组合以所需量掺入合适溶剂中,需要时,随后为过滤灭菌。包含本发明的抗 FRA 抗体的分散体可以通过将活性化合物掺入无菌媒介物内进行制备,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自上文列举那些的所需其他成分。在用于制备包含本发明抗 FRA 抗体的无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其获得来自其先前无菌过滤溶液的活性成分加上任何另外所需成分的粉末。溶液的适当流动性可以例如通过下述得到维持:使用涂层例如卵磷脂,在分散体的情况下维持所需粒子大小和使用表面活性剂。本领域技术人员应当理解为了延长本发明的可注射组合物的吸收,可以在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶。

[0336] 在特定实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以用载体进行制备,所述载体将保护抗体不受快速释放,即作为控制释放制剂,包括埋植剂、经皮贴剂和装入微胶囊的递送系统。可以使用生物可降解、生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法是本领域技术人员一般已知的。参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。

[0337] 在一些实施方案中,包含本发明的抗 FRA 抗体的组合物还包含另外的活性化合物。在特定实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体与一种或多种另外的治疗、诊断或预防试剂共配制和/或共施用。治疗剂包括但不限于具有不同精细特异性的抗 FRA 抗体、结合其他靶的抗体、非类固醇抗炎剂、镇痛剂、抗癌剂、类固醇、抗过敏药、化学治疗剂、抗肿瘤药和细胞毒素剂。

[0338] 根据本发明,本发明的抗 FRA 抗体可以与已知抑制肿瘤或癌细胞增殖的抗体或其他试剂共配制,例如抑制 erbB2 受体、E-选择素、EGF-R、CD20、VEGF (例如 **AVASTIN**[®] (贝伐珠单抗)、**LUCENTIS**[®] (雷珠单抗) 和 **MACUGEN**[®] (培加尼布))、VEGF 受体 1 (VEGFR1)、VEGF 受体 2 (VEGFR2) 或 VEGF 受体 3 (VEGFR3) 的抗体或试剂。

[0339] 化学治疗剂的例子包括但不限于 **GLEEVEC**[®] (伊马替尼)、**ERBITUX**[®] (西妥昔单抗)、L-天冬酰胺酶、**IRESSA**[®] (吉非替尼)、**TARCEVA**[®] (埃罗替尼) 和 **VELCADE**[®] (硼替佐米) 等。

[0340] 更具体而言,本发明的抗 FRA 抗体可以与烷化剂共配制。有用的烷化剂的例子包括但不限于六甲蜜胺(六甲三聚氰胺)、白消安、卡铂、卡莫司汀(BCNU)、苯丁酸氮芥、顺铂、**CYTOXAN**[®] (环磷酰胺)、达卡巴嗪(DTIC)、异环磷酰胺、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺(氮芥)、美法仑、奥沙利铂(oxalaplatin)、链佐星、**TEMODAR**[®] (替莫唑胺) 和噻替派等。

[0341] 本发明的抗 FRA 抗体可以与抗代谢药共配制。有用的抗代谢药的例子包括但不限于 5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯嘌呤(6-MP)、**XELODA**[®] (卡培他滨)、**ARA-C**[®] (阿糖胞苷)、氟达拉滨、**GEMZAR**[®] (吉西他滨)、氮甲蝶呤和 **ALIMTA**[®] (培美曲塞) 等。

[0342] 本发明的抗 FRA 抗体可以与拓扑异构酶 I 和 II 抑制剂共配制,包括但不限于

CAMPTOSAR[®] (伊立替康 HCl)、SN-38、喜树碱、**HYCAMTIN**[®] (拓扑替康)、依托泊苷、替尼泊苷、**ELLENC**[®] (表柔比星)、**ADRIAMYCIN**[®] (多柔比星)、伊达比星、米托蒽醌、片螺素 D 和 HU-331 (通过引用合并入本文的 Kogan 等人 (2007) *Molecular Cancer Therapeutics* 6:173-183) 等。

[0343] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与抗肿瘤抗生素例如放线菌素 -D、博来霉素和丝裂霉素 -C 等共配制。

[0344] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与有丝分裂抑制剂共配制。有用的有丝分裂抑制剂的非限制性例子包括 **EMCYT**[®] (雌氮芥)、**IXEMPRA**[®] (依沙比酮)、**TAXOTERE**[®] (多西他赛)、**TAXOL**[®] (紫杉醇)、**VELBAN**[®] (长春碱)、**ONCOVIN**[®] (长春新碱)、和 **NAVELBINE**[®] (长春瑞滨) 等。

[0345] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与分化剂共配制。有用的分化剂的非限制性例子包括三氧化二砷、视黄素、维甲酸和 **TARGRETIN**[®] (贝沙罗汀) 等。

[0346] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与类固醇化合物例如泼尼松、甲泼尼龙和地塞米松等共配制。

[0347] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与激素相关化合物共配制。有用的激素相关化合物的非限制性例子包括雌激素、孕激素 (例如 **MEGACE**[®] (乙酸甲地孕酮))、**FASLODEX**[®] (氟维司群)、它莫西芬、托瑞米芬、**LUPRON**[®] (亮丙瑞林)、**ZOLADEX**[®] (戈舍瑞林)、**ARIMIDEX**[®] (阿那曲唑)、**FEMARA**[®] (来曲唑)、**AROMASIN**[®] (依西美坦)、**CASODEX**[®] (比卡鲁胺)、**EULEXIN**[®] (氟他胺) 和 **NILANDRON**[®] (尼鲁米特)。

[0348] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与 COX-II (环氧合酶 II) 抑制剂共配制。有用的 COX-II 抑制剂的非限制性例子包括 **CELEBREX**[®] (塞来昔布)、伐地考昔和罗非昔布等。

[0349] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与免疫治疗剂共配制。有用的免疫治疗剂的非限制性例子包括干扰素 (例如干扰素 - α)、BCG、白细胞介素 -2 (IL-2)、沙立度胺、来那度胺、**CAMPATH**[®] (阿仑珠单抗) 和 **RITUXAN**[®] (利妥昔单抗) 等。

[0350] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与 MMP 抑制剂共配制。例如,抗 FRA 抗体可以与抗血管生成剂例如 MMP-2 (基质金属蛋白酶 2) 抑制剂或 MMP-9 (基质金属蛋白酶 9) 抑制剂共配制。优选的 MMP 抑制剂是并未证实关节痛的那些。更优选的是相对于其他基质金属蛋白酶 (即 MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12 和 MMP-13), 选择性抑制 MMP-2 和 / 或 MMP-9 的那些。在本发明中有用的 MMP 抑制剂的一些具体例子是 AG-3340、R032-3555、RS13-0830 和在下述列表中所述的化合物: 3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (1-羟基氨基甲酰基-环戊基)-氨基]-丙酸; 3-外-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-二环 [3.2.1] 辛烷-3-羧酸羟基酰胺; (2R,3R) 1-[4-(2-氯-4-氟-苯甲氧基)-苯磺酰]-3-羟基-3-甲基-哌

啉-2-羧酸羟基酰胺;4-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-4-羧酸羟基酰胺;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (1-羟基-氮甲酰基-环丁基)-氨基]-丙酸;4-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-4-羧酸羟基酰胺;(R)3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-3-羧酸羟基酰胺;(2R,3R)1-[4-(4-氟-2-甲基-苯甲氧基)-苯磺酰]-3-羟基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羟基酰胺;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (1-羟基氨基甲酰基-1-甲基-乙基)-氨基]-丙酸;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (4-羟基氨基甲酰基-四氢-吡喃-4-基)-氨基]-丙酸;3-外-3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-*i*-环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;3-内-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-*i*-环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;和(R)3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-呋喃-3-羧酸羟基酰胺等;和所述化合物的药学可接受的盐和溶剂化物。

[0351] 在一些实施方案中,抗 FRA 抗体可以与整联蛋白抑制剂共配制。整联蛋白抑制剂包括但不限于 obtustatin、rhodocetin、Vitaxin (MedImmune)、西仑吉肽(EMD121974; Merck)、S137 (Pfizer)、S247 (Pfizer) 和 JSM6427 (Jerini) (参见例如, Brown 等人(2008) *International Journal of Cancer* 123:2195-2203; Stupp 等人(2007) *Journal of Clinical Oncology* 25:1637-1638; Ebble 等人(2003) *Biochem J.* 376:77-85, 都通过引用合并入本文)。

[0352] 本发明的组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量的”本发明的抗 FRA 抗体。“治疗有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需治疗结果的量。抗体或抗体部分的治疗有效量可以根据因素而改变,例如个体的疾病状态、年龄、性别和重量,和抗体或抗体部分在个体中引发所需应答的能力。治疗有效量还是其中抗体或抗体部分的任何毒性或有害效应由治疗有利效应超过的量。“预防有效量”指在所需剂量和时间段有效达到所需预防结果的量。一般地,因为预防剂量在疾病之前或在疾病早期用于受试者中,所以预防有效量可以小于治疗有效量。

[0353] 可以调整剂量方案以提供最佳所需应答(例如治疗或预防应答)。例如,可以施用单次推注,可以随着时间过去施用几个分份剂量,或可以如通过治疗情况的紧迫指示的按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物是尤其有利的用于容易施用和剂量的均匀性。如本文使用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理上不连续的单位;每个单位含有与所需药物载体结合的计算为产生所需疗效的预定数量的活性化合物。关于本发明的剂量单位形式的规格由下述指示且直接依赖于下述:(a) 抗 FRA 抗体的独特特征和待达到的具体治疗或预防效应,和(b) 例如用于治疗个体中的敏感性的抗体的配药法中固有的局限性。

[0354] 关于本发明的抗 FRA 抗体的治疗或预防有效量的示例性、非限制性范围是 0.025-50mg/kg、0.1-50mg/kg、0.1-25mg/kg、0.1-10mg/kg 或 0.1-3mg/kg。在一个实施方案中,抗 FRA 抗体在制剂中作为无菌水溶液施用,所述无菌水溶液具有范围为约 5.0-约 6.5 的 pH,且包含约 1mg/ml-约 200mg/ml 抗体,约 1 毫摩尔-约 100 毫摩尔 Tween,约 0.01mg/ml-约 10mg/ml 聚山梨糖醇 80 或聚山梨糖醇 20,约 100 毫摩尔-约 400 毫摩尔选自但不限于海藻糖或蔗糖的非还原糖,约 0.01 毫摩尔-约 1.0 毫摩尔二钠 EDTA 二水化物,且任选包含药学可接受的抗氧化剂加上螯合剂。合适的抗氧化剂包括但不限于甲硫氨酸、硫代硫酸

钠、过氧化氢酶和铂。例如,组合物可以含有以范围为 1mM- 约 100mM,且特别是约 27mM 浓度的甲硫氨酸。在一些实施方案中,制剂含有在 20mM 柠檬酸钠,pH5.5,140mM NaCl 和 0.2mg/ml 聚山梨醇酯 80 缓冲液中的 5mg/ml 抗体。应当指出剂量值可以随着待减轻的病状的类型和严重性而改变。还应当理解对于任何具体受试者,具体剂量方案应随着时间过去根据个体需要和施用或监督组合物施用的个人的专业判断进行调整,并且本文所述的剂量方案仅是示例性的,并且不预期限制请求保护的组合物的范围或实践。

[0355] 本发明的另一个方面提供了包含本发明的抗 FRA 抗体或包含此类抗 FRA 抗体的药物组合物的试剂盒。除了抗体或药物组合物外,试剂盒可以包括诊断或治疗剂。试剂盒还可以包括关于在诊断或治疗方法中使用的说明书,以及包装材料,例如但不限于冰、干冰、泡沫聚苯乙烯、泡沫、塑料、赛璐玢、收缩包装、水泡包装、卡纸板和淀粉花生。在一个实施方案中,试剂盒包括抗体或包含抗体和诊断试剂的药物组合物,所述诊断试剂可以在本文描述的方法中使用。在另外一个实施方案中,试剂盒包括抗体或包含抗体和一种或多种治疗剂的药物组合物,所述治疗剂可以在本文描述的方法中使用。

[0356] 本发明还涉及用于抑制哺乳动物中的癌症的组合物和试剂盒,其包含与化学治疗剂的量组合的本发明抗体的量,其中化合物、盐、溶剂化物或药物前体和化学治疗剂的量一起在抑制异常细胞生长中 useful。许多化学治疗剂是本领域目前已知的。在一些实施方案中,化学治疗剂选自有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢药、嵌入抗生素、趋化因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答改性剂、抗激素例如抗雄激素、和抗血管生成剂。

[0357] 诊断方法

[0358] 本发明的抗 FRA 抗体可以用于在体外或体内检测生物样品中的 FRA 或 FRA 表达细胞。抗 FRA 抗体可以用于常规免疫测定法中,包括但不限于 ELISA、RIA、流式细胞术、免疫细胞化学、组织免疫组织化学、蛋白质印迹或免疫沉淀。本发明的抗 FRA 抗体可以用于检测来自人的 FRA。

[0359] 在另一个方面,本发明提供了用于检测生物样品中的 FRA 的方法。该方法包括使生物样品与本发明的抗 FRA 抗体接触且检测结合的抗体。抗 FRA 抗体可以用可检测标记直接标记或可以是未标记的。如果使用未标记的抗体,那么标记的可以结合抗 FRA 抗体的第二种抗体或其他分子用于检测与 FRA 结合的抗体。如本领域技术人员众所周知的,选择能够特异性结合第一种抗体的特定物种和类别的第二种抗体。例如,如果抗 FRA 抗体包含人 IgG,那么次级抗体可以是标记的抗人 IgG 抗体。可以与抗体结合的其他分子包括但不限于蛋白质 A 和蛋白质 G,两者都例如从 Pierce Chemical Co 商购可得。

[0360] 用于抗体或次级分子的合适标记已得到公开,并且包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、磁性试剂和放射性材料。合适酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、0- 半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合物的例子包括链霉亲和素生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子包括鲁米诺;磁性试剂的例子包括钆;并且合适的放射性材料的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0361] 本发明的抗 FRA 抗体可以用于测定组织或衍生自组织的细胞例如发育不良细胞中 FRA 的存在和 / 或水平。组织可以是患病组织例如肿瘤或其活组织检查。细胞可以是例

如卵巢、胰腺、前列腺或肺癌细胞。检测可以在组织样品中或在体内。本发明的抗 FRA 抗体可以通过上文讨论的方法根据本发明用于检测和 / 或定量组织中的 FRA、FRA 的细胞表面水平或 FRA 的定位。

[0362] 本发明的抗体尤其是人源化抗体还可以在体内用于检测组织和器官例如 FRA 表达肿瘤中的 FRA。对于 FRA 的体内检测,将标记的抗 FRA 抗体施用于需要此类诊断测试的患者,并且对患者实施成像分析以便测定 FRA 表达组织的定位。成像分析是医学领域众所周知的,并且包括但不限于 x 射线分析、磁共振成像(MRI)或计算机体层摄影术(CT)。在该方法的另一个实施方案中,肿瘤或组织活检检查得自患者,以测定它是否表达 FRA。对于成像,抗 FRA 抗体可以用可以在患者中成像的可检测试剂进行标记。例如,用可以用于 x 射线分析的造影剂例如钡,或可以用于 MRI 或 CT 的磁性造影剂例如钆螯合物,可以标记抗 FRA 抗体。其他标记试剂包括但不限于放射性同位素例如 ^{99}Tc 。根据本发明,抗 FRA 抗体还可以是未标记的,并且成像是通过施用可检测且可以结合抗 FRA 抗体的第二种抗体或其他分子。

[0363] 治疗方法

[0364] 在另一个方面,本发明提供了使用本发明的抗 FRA 抗体用于治疗的方法。本发明的方法包括在体外或体内减少 FRA 表达细胞的生长、增殖或存活。本发明还提供了用于治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,其包括步骤:给受试者施用本发明的抗 FRA 单克隆抗体。在多个实施方案中,癌症是卵巢、乳腺、肾、结肠直肠、肺、子宫内膜、脑、输卵管或子宫癌或白血病。本发明还提供了用于减少与有此需要的受试者中增加的 FRA 表达相关的发育不良细胞的生长的方法,其包括步骤:给受试者施用本发明的抗 FRA 单克隆抗体。在多个实施方案中,发育不良细胞是卵巢、乳腺、肾、结肠直肠、肺、子宫内膜、脑、输卵管、子宫癌细胞或白血病细胞。在优选实施方案中,受试者是人。

[0365] 在一个实施方案中,本发明提供了用于抑制 FRA 活性的方法,其包括使表达 FRA 的细胞与抗 FRA 抗体接触或使表达 FRA 的细胞暴露于抗 FRA 抗体。在一些实施方案中,将抗 FRA 抗体施用于有此需要的受试者。受试者可以患有特征在于 FRA 的发育不良或增加表达的疾病或病状。非限制性例子包括癌症、肿瘤生长和过度增生病症。受试者可以是人受试者或兽医受试者,包括人疾病的非人动物模型。抗 FRA 抗体可以用于制造用于治疗特征在于 FRA 的发育不良或增加表达的疾病或病状的药物。

[0366] 根据本发明的方法,本发明的抗 FRA 抗体可以净施用,或可以掺入适合于施用于受试者的药物组合物内。药物组合物可以包含药学可接受的载体,例如生理学相容的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。仅作为举例说明,药学可接受的载体的例子包括但不限于水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇中的一种或多种,及其组合。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。药学可接受的物质例如增强抗体或抗体部分的贮存期限或有效性的湿润剂或小量辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0367] 抗 FRA 抗体可以施用一次或多次。当使用多次施用时,它们可以是每天、每周或每月一次,或任何合适的时候,定期地包括多个日剂量。施用可以按照计划表,例如每天三次、每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次和每六个月一次。抗 FRA 抗体还可以例如经由微型泵连续施用。抗 FRA

抗体可以例如经由粘膜、颊、鼻内、可吸入、静脉内、皮下、肌内、肠胃外或瘤内途径施用。抗 FRA 抗体可以施用一次、至少两次或至少直至病状治疗、姑息或治愈的时间段。抗 FRA 抗体一般施用病状存在之久或更久以预防病状的复发。抗 FRA 抗体一般作为如上所述的药物组合物的部分施用。抗 FRA 抗体的剂量一般在 0.1-100mg/kg、更优选 0.5-50mg/kg、更优选 1-20mg/kg、和甚至更优选 1-10mg/kg 的范围中。抗 FRA 抗体的血清浓度可以通过本领域已知的任何方法进行测量。

[0368] 在另一个实施方案中,抗 FRA 抗体可以与另一种治疗剂包括另一种抗 FRA 抗体共施用。另外的治疗剂还可以是通过 RNA 干扰减少 FRA 表达的寡核苷酸,包括单链或双链核酸分子。在患有过度增生病症例如癌症或肿瘤的受试者的情况下,另外的治疗剂可以是抗肿瘤药。在一个方面,本发明涉及用于治疗有此需要的受试者中的过度增生病症的方法,其包括给所述受试者施用与选自但不限于下述的抗肿瘤剂组合的治疗有效量的本发明的抗 FRA 抗体:有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢药、嵌入剂、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答改性剂、抗激素、激酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、基因治疗、抗雄激素、抗肿瘤药和细胞毒素剂。在另一个优选实施方案中,抗 FRA 抗体或组合疗法连同放射疗法、化学疗法、光动力学疗法、手术或其他免疫疗法一起施用。

[0369] 根据本发明,本发明的抗 FRA 抗体可以与已知抑制肿瘤或癌细胞增殖的抗体或其他试剂施用,例如抑制 erbB2 受体、E-选择素、EGF-R、CD20、VEGF (例如 **AVASTIN**[®] (贝伐珠单抗)、**LUCENTIS**[®] (雷珠单抗) 和 **MACUGEN**[®] (培加尼布))、VEGF 受体 1 (VEGFR1)、VEGF 受体 2 (VEGFR2) 或 VEGF 受体 3 (VEGFR3) 等的抗体或试剂。

[0370] 本发明的抗 FRA 抗体可以与化学治疗剂共施用,所述化学治疗剂包括但不限于 **GLEEVEC**[®] (伊马替尼)、**ERBITUX**[®] (西妥昔单抗)、L-天冬酰胺酶、**IRESSA**[®] (吉非替尼)、**TARCEVA**[®] (埃罗替尼) 和 **VELCADE**[®] (硼替佐米) 等。

[0371] 更具体而言,本发明的抗 FRA 抗体可以与烷化剂共施用。有用的烷化剂的例子包括但不限于六甲蜜胺(六甲三聚氰胺)、白消安、卡铂、卡莫司汀(BCNU)、苯丁酸氮芥、顺铂、**CYTOXAN**[®] (环磷酰胺)、达卡巴嗪(DTIC)、异环磷酰胺、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺(氮芥)、美法仑、奥沙利铂(oxalaplatin)、链佐星、**TEMODAR**[®] (替莫唑胺)、噻替派等。

[0372] 本发明的抗 FRA 抗体可以与抗代谢药共施用。有用的抗代谢药的例子包括但不限于 5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯嘌呤(6-MP)、**XELODA**[®] (卡培他滨)、**ARA-C**[®] (阿糖胞苷)、氟达拉滨、**GEMZAR**[®] (吉西他滨)、氮甲蝶呤、**ALIMTA**[®] (培美曲塞) 等。

[0373] 本发明的抗 FRA 抗体可以与拓扑异构酶 I 和 II 抑制剂共施用,包括但不限于 **CAMPTOSAR**[®] (伊立替康 HCl)、SN-38、喜树碱、**HYCAMTIN**[®] (拓扑替康)、依托泊苷、替尼泊苷、**ELLENC**[®] (表柔比星)、**ADRIAMYCIN**[®] (多柔比星)、伊达比星、米托蒽醌、片螺素 D、HU-331 (Kogan 等人(2007) *Molecular Cancer Therapeutics* 6:173-183) 等。

[0374] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与抗肿瘤抗生素例如放线菌素-D、

博来霉素和丝裂霉素 -C 等共施用。

[0375] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与有丝分裂抑制剂共施用。有用的有丝分裂抑制剂的非限制性例子包括 **EMCYT**[®] (雌氮芥)、**IXEMPRA**[®] (依沙比酮)、**TAXOTERE**[®] (多西他赛)、**TAXOL**[®] (紫杉醇)、**VELBAN**[®] (长春碱)、**ONCOVIN**[®] (长春新碱)、**NAVELBINE**[®] (长春瑞滨) 等。

[0376] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与分化剂共施用。有用的分化剂的非限制性例子包括三氧化二砷、视黄素、维甲酸和 **TARGRETIN**[®] (贝沙罗汀) 等。

[0377] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与类固醇化合物例如泼尼松、甲泼尼龙、地塞米松等共施用。

[0378] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与激素相关化合物共施用。有用的激素相关化合物的非限制性例子包括雌激素、孕激素(例如 **MEGACE**[®] (乙酸甲地孕酮))、**FASLODEX**[®] (氟维司群)、它莫西芬、托瑞米芬、**LUPRON**[®] (亮丙瑞林)、**ZOLADEX**[®] (戈舍瑞林)、**ARIMIDEX**[®] (阿那曲唑)、**FEMARA**[®] (来曲唑)、**AROMASIN**[®] (依西美坦)、**CASODEX**[®] (比卡鲁胺)、**EULEXIN**[®] (氟他胺)、**NILANDRON**[®] (尼鲁米特) 等。

[0379] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与 COX-II (环氧合酶 II) 抑制剂共施用。有用的 COX-II 抑制剂的非限制性例子包括 **CELEBREX**[®] (塞来昔布)、伐地考昔、罗非昔布等。

[0380] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与免疫治疗剂共施用。有用的免疫治疗剂的非限制性例子包括干扰素(例如干扰素 - α)、BCG、白细胞介素 -2 (IL-2)、沙立度胺、来那度胺、**CAMPATH**[®] (阿仑珠单抗)、**RITUXAN**[®] (利妥昔单抗)。

[0381] 在一些实施方案中,本发明的抗 FRA 抗体可以与 MMP 抑制剂共施用。例如,抗 FRA 抗体可以与抗血管生成剂例如 MMP-2 (基质金属蛋白酶 2) 抑制剂或 MMP-9 (基质金属蛋白酶 9) 抑制剂共施用。优选的 MMP 抑制剂是并未证实关节痛的那些。更优选的是相对于其他基质金属蛋白酶(即 MMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12 和 MMP-13),选择性抑制 MMP-2 和 / 或 MMP-9 的那些。在本发明中有用的 MMP 抑制剂的一些具体例子是 AG-3340、R032-3555、RS13-0830 和在下述列表中所述的化合物:3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (1-羟基氨基甲酰基-环戊基)-氨基]-丙酸;3-外-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-二环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;(2R,3R)-1-[4-(2-氯-4-氟-苯甲氧基)-苯磺酰]-3-羟基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羟基酰胺;4-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-4-羧酸羟基酰胺;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (1-羟基-氨基甲酰基-环丁基)-氨基]-丙酸;4-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-4-羧酸羟基酰胺;(R)-3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-吡喃-3-羧酸羟基酰胺;(2R,3R)-1-[4-(4-氟-2-甲基-苯甲氧基)-苯磺酰]-3-羟基-3-甲基-哌啶-2-羧酸羟基酰胺;3-[[4-(4-氟-苯氧基)-苯

磺酰]- (1-羟基氨基甲酰基-1-甲基-乙基)-氨基]-丙酸;3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰]- (4-羟基氨基甲酰基-四氢-吡喃-4-基)-氨基]-丙酸;3-外-3-[4-(4-氯-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-i环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;3-内-3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-8-氧杂-i环[3.2.1]辛烷-3-羧酸羟基酰胺;和(R)3-[4-(4-氟-苯氧基)-苯磺酰氨基]-四氢-呋喃-3-羧酸羟基酰胺;和所述化合物的药学可接受的盐和溶剂化物。

[0382] 在一些实施方案中,抗 FRA 抗体可以与整联蛋白抑制剂共施用。整联蛋白抑制剂包括但不限于 obtustatin、rhodocetin、Vitaxin (MedImmune)、西仑吉肽(EMD121974; Merck)、SI37 (Pfizer)、S247 (Pfizer) 和 JSM6427 (Jerini) (参见例如, Brown 等人 (2008) International Journal of Cancer 123:2195-2203; Stupp 等人 (2007) Journal of Clinical Oncology 25:1637-1638; Eble 等人 (2003) Biochem J. 376:77-85, 都通过引用合并入本文)。

[0383] 本发明的抗 FRA 抗体与另外的治疗剂的共施用(组合疗法)包含施用包含抗 FRA 抗体和另外的治疗剂的药物组合物以及施用两种或多种分离的药物组合物:一种包含抗 FRA 抗体并且另一种包含另外的治疗剂。进一步地,共施用或组合疗法包括同时或顺次或两者施用的抗 FRA 抗体和另外的治疗剂。例如,抗 FRA 抗体可以每三天施用一次,而另外的治疗剂与抗 FRA 抗体同时或在不同时间每天施用一次。抗 FRA 抗体可以在用另外的治疗剂治疗前或后施用。类似地,本发明的抗 FRA 抗体的施用可以是治疗方案的部分,所述治疗方案包括其他治疗模式,包括辐射、手术、锻炼、光疗法包括激光疗法和饮食补充。可以施用组合疗法以预防病状的复发。优选地,将组合疗法施用多次。组合疗法可以从每天三次施用到每六个月一次。施用可以按照计划表,例如每天三次、每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次和每六个月一次,或可以例如经由微型泵连续施用。组合疗法可以例如经由经口、粘膜、颊、鼻内、可吸入、静脉内、皮下、肌内或肠胃外途径施用。

[0384] 在一个实施方案中,抗 FRA 抗体在制剂中作为无菌水溶液施用,所述无菌水溶液具有范围为约 5.0-约 8.0、优选约 6.5-约 7.5、和更优选约 7.0-约 7.2 的 pH。制剂可以包含约 1mg/ml-约 200mg/ml、约 5mg/ml-约 50mg/ml、或约 10mg/ml-约 25mg/ml 抗体。制剂可以包含约 1 毫摩尔-约 100 毫摩尔 Tween,约 0.01mg/ml-约 10mg/ml 聚山梨糖醇 80,约 100 毫摩尔-约 400 毫摩尔海藻糖,和约 0.01 毫摩尔-约 1.0 毫摩尔二钠 EDTA 二水合物。在优选实施方案中,抗体在 10mM 磷酸钠、150mM 氯化钠, pH7.2、0.01%USP Tween80 中的 5.0±0.5mg/mL 抗体的制剂中施用。

[0385] 在再进一步的实施方案中,抗 FRA 抗体用放射性标记、免疫毒素或毒素进行标记,或是包含细胞毒性肽的融合蛋白。抗 FRA 抗体或抗 FRA 抗体融合蛋白将放射性标记、免疫毒素、毒素或毒性肽导向 FRA 表达肿瘤或癌细胞。在优选实施方案中,放射性标记、免疫毒素、毒素或毒性肽在抗 FRA 抗体与肿瘤或癌细胞表面上的 FRA 结合后内在化。

[0386] 应当理解本文描述的实施例和实施方案仅用于举例说明目的,并且根据其的多种修饰或改变对于本领域技术人员将是显而易见的,并且应包括在本发明的真正范围内,并且可以不背离本发明的真正范围而作出。

[0387] 实施例

[0388] 实施例 1 :在不同条件下培养的抗 FRA 抗体的培养和纯化

[0389] 从低温保存恢复产生抗 FRA 抗体的 CHO-K1 细胞,并且在表 1 中所示的条件下亚培养,所述抗 FRA 抗体包含 SEQ ID NO :5 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO:7 的轻链氨基酸序列。接种物扩增和亚培养在 125mL 和 500mL 摇瓶中执行。

[0390] 表 1 :低温保存的细胞原种恢复和亚培养条件

[0391]

参数	值 / 范围
培养基	CD-CHO (Invitrogen)
温育温度(°C)	37°C ±0.5
振荡速度(rpm)	120±5
顶空平衡气体	在 95% 空气中的 5%CO ₂
复苏接种活细胞浓度(10 ⁶ /mL)	0.30
在复苏和第一次亚培养之间的天数	3
系列亚培养接种活细胞浓度(10 ⁶ /mL)	0.2
在第一次和后续亚培养之间的天数	4

[0392] 在恢复和亚培养后,细胞在 2L 搅拌槽生产生物反应器(B-DCU,Sartorius)分批补料培养中进行培养,具有多种实验细胞培养条件变化和阳性对照(表 2 和 3)。

[0393] 表 2 :用于操作 2L 搅拌槽生产生物反应器分批补料培养的条件。

[0394]

参数	值/范围
培养基	CD-CHO (Invitrogen)
生产生物反应器接种细胞浓度(10 ⁶ 活细胞/mL)	0.18 - 0.25
温度设定点(°C)	36.5
pH	7.1 - 6.9 死区
溶解氧张力(%)	30.0
搅动(rpm)	180
300g/L 葡萄糖补料	根据需要应用的连续变量速率以靶向 1.00 - 3.00g/L 的葡萄糖浓度
条件变化	在不同时间点应用的多种条件变化(参见表 3)

[0395] 表 3 :生物反应器条件变化的表。

[0396]

	参数	值 / 范围

1	阳性对照	T=36.5℃, pH=7.0, DO=30%, 1.00-3.00g/L 的葡萄糖浓度
2	半乳糖补充	在培养起始后 5 天的 2g/L 弹丸添加
3	低温	在培养起始后 5 天从 36.5℃到 30℃的转变
4	高同渗容摩	在培养起始后 7 天加入 NaCl 以达到 600mOsm/L
5	0.5mM 丁酸钠	在培养起始后 6 天的弹丸添加
6	低溶解氧(DO)	DO 在培养起始后 6 天时从 30% 变为 5%
7	高 CO ₂	在培养起始后 5 天使培养基中的 CO ₂ 累积达到高达 20%
8	10mM 丁酸钠	在培养起始后 6 天的弹丸添加
9	氯化铜	在培养起始后 6 天的 0.5mM 弹丸添加
10	时间点	在第 10、14、17 和 20 天收获样品

[0397] 如下纯化 MORAb-003 抗 FRA 抗体培养物。通过离心(10,000g, 20 分钟)澄清来自分泌 MORAb-003 的细胞的条件培养基(对于每种条件 1.5L)。将所得到的上清液通过 0.22mm 膜过滤。在条件培养基中的 MORAb-003 抗体通过蛋白质 A 亲和色谱法进行纯化,借助于 AktaExplorer100A (GE Healthcare)。简言之,用 PBS (0.02M 磷酸钾、0.15M 氯化钠, pH7.2) 平衡由 ProSep vA (目录 #113115830, Millipore) 填充的 20mL 柱床体积柱。在澄清后,将含 MORAb-003 条件培养基以 5.0mL/ 分钟的速率装载到柱上。将树脂用 PBS 洗涤 12 柱体积(CV),随后为结合的 MORAb-003 抗体的洗脱,使用 3.5CV 的洗脱缓冲液(10mM 乙酸、100mM 甘氨酸, pH3.8)。将树脂用 2CV6M 盐酸胍净化。在除了装载外的所有步骤中的流速是 7.0mL/ 分钟。合并的洗脱馏分针对 2L PBS 在 4℃透析约 15 小时,使用 10kDa 截断 SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing (Prod#68100, Thermo Scientific)。

[0398] 实施例 2 :在不同条件下培养的抗 FRA 抗体的聚糖谱

[0399] 在如实施例 1 中所述培养且纯化 MORAb-003 抗 FRA 抗体后,如下去除、分离、鉴定且定量在抗体上发现的中性、N 联复杂碳水化合物结构。指定至在不同条件下培养的抗 FRA 抗体样品的批号在表 4 中显示。MORAb-003 抗体重链中的 N 联聚糖使用肽-N-糖苷酶 F (PNGase F) 酶促去除,并且通过凝胶过滤色谱法纯化。所得到的聚糖混合物使用例如 2-氨基苯甲酰胺(2-AB)进行荧光标记,并且通过正相 HPLC 使用 Tosoh TSK-Gel80- 酰胺柱分辨。荧光标记的聚糖通过荧光(Ex330nm/Em420nm)进行定量。来自在分离过程中出现的峰的聚糖的鉴定通过线内质谱检测完成,使用以总离子色谱图或提取离子色谱图模式的 Agilent ESI-TOF 质谱仪。回收的聚糖结构的图解显示于图 1 中。

[0400] 表 4 :对应于抗 FRA 抗体培养条件的批号。

[0401]

客户批次 #	生物反应器	循环	参数

NB810-10	BR5	1	阳性对照 ;在培养起始后 14 天收获
NB810-11	BR6	1	半乳糖补充 ;在培养起始后 14 天收获
NB810-12	BR7	1	低温 ;在培养起始后 14 天收获
NB810-13	BR8	1	高同渗容摩 ;在培养起始后 14 天收获
NB809-65	BR1	2	阳性对照 ;在培养起始后 13 天收获
NB809-66	BR3	2	0.5mM 丁酸钠 ;在培养起始后 13 天收获
NB809-67	BR4	2	低 DO ;在培养起始后 13 天收获
NB809-68	BR5	2	高 CO ₂ ;在培养起始后 13 天收获
NB809-69	BR7	2	10mM 丁酸钠 ;在培养起始后 13 天收获
NB809-70	BR8	2	CuCl 补充 ;在培养起始后 13 天收获

[0402]

客户批次 #	生物反应器	循环	参数
NB859-24	BR1	3	在培养起始后 10 天收获
NB859-25	BR1	3	在培养起始后 14 天收获
NB859-26	BR1	3	在培养起始后 17 天收获
NB859-27	BR1	3	在培养起始后 20 天收获
NB859-28	BR2	3	低 DO ;在培养起始后 14 天收获

[0403] 批次 NB859-25 衍生自在用于阳性对照批次 NB810-10 和 NB809-65 的那些的条件下生长的培养物。批次 NB859-25 指定为阳性对照用于与第 3 轮中产生的其他批次的实验结果比较的目的。

[0404] MORAb-003 抗 FRA 抗体样品中的主要中性 N 联聚糖分布的初步结果显示于图 2 中。MORAb-003 抗 FRA 抗体样品中的中性聚糖分布的另外结果显示于图 3 中。“MORAb-003 参考标准”是在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应的 MORAb-003 抗 FRA 抗体。

[0405] 实施例 3 :抗 FRA 抗体的结合亲和力与抗体培养条件和聚糖结构的关联

[0406] 通过表面等离子共振光谱法测定 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品的相对结合亲和力。经由胺偶联将重组人叶酸受体 α (FRA)(SEQ ID NO :3)固定到研究级别 CM5 芯片的表面上。在表面上系列注射 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准或变体样品制剂跨越 0.02-44mg/mL 的稀释物,所述 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准在如本文定义的“参考培养条件”下产生

且由外部制造商供应,并且在允许结合进行 40 秒后测量结合水平。在循环之间通过用 10mM 甘氨酸 pH2.0 冲洗来再生表面。使用 BiaEvaluation4.1 (GE Healthcare),对于参考样品和所有样品标绘根据 MORAb-003 浓度的结合水平。将数据拟合至五参数逻辑曲线拟合,并且使用 STATLIA 版本 3.2 (Brendan Technologies),通过平行线分析测定与参考样品相比较的每种样品的相对结合效力。结果显示于图 4 中。为了计算在“测量效力”列中的结果,将参考标准的结合效力设为 100%。与在如本文定义的“参考培养条件”下产生且由外部制造商供应的 MORAb-003 抗 FRA 抗体相比较,所有培养条件包括阳性对照具有更低的结合亲和力。

[0407] 实施例 4 :抗 FRA 抗体的 ADCC 与抗体培养条件和聚糖结构的关联

[0408] 如下测量通过 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品介导的体外抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯 (CFDA SE) 标记 FRA 表达 IGROV-1 人卵巢腺癌细胞 (Bernard, 等人 (1985) Cancer Res 44:4970-4979)。标记的细胞与 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品的稀释物和衍生自人外周血单核细胞 (PBMC) 的未标记的效应细胞混合。在 4 小时温育后,通过流式细胞术就剩余活的、标记的 IGROV-1 细胞评分细胞群体。用 MORAb-003 抗 FRA 抗体的变体样品批次处理后的剩余细胞馏分与用相等浓度的 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准制剂处理的细胞的那种相比较,所述 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准制剂在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应。结果显示于图 5 中。为了计算在“测量效力”列中的结果,将参考标准的 ADCC 设为 100%。为了计算在“相对效力”列中的结果,将两个阳性对照的测量 ADCC 的平均值设为 100%。

[0409] 低温和低 DO 细胞培养条件产生具有高百分比的 NGA2 (G0) 聚糖的 MORAb-003 抗 FRA 抗体同种型。NGA2 (G0) 聚糖的存在与增加的 ADCC 关联 (图 6)。这种关联是统计上显著的。

[0410] 非岩藻糖基化聚糖的存在与增加的 ADCC 关联 (图 7)。这种关联是统计上显著的。

[0411] M3N2F 聚糖的存在与增加的 ADCC 反相关 (图 8)。

[0412] 实施例 5 :抗 FRA 抗体的内在化活性与抗体培养条件和聚糖结构的关联

[0413] 使用抗人次级免疫毒素,通过 FRA 表达细胞的杀死程度评分 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品的内在化活性。将 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品的稀释物和缀合至细胞毒性植物蛋白质皂草素 (Hum-ZAP, Advanced Targeting Systems, Inc.) 的固定量的山羊抗人 IgG 次级抗体加入含有 2,000 细胞 / 孔的人 FRA 表达 IGROV-1 细胞的 96 孔组织培养处理的微量滴定板的孔中。在抗原结合后 MORAb-003-Hum-ZAP 复合物的内在化导致细胞毒素以 MORAb-003 依赖性方式释放到 IGROV-1 细胞内。内在化的 MORAb-003 抗 FRA 抗体馏分因此可以基于 IGROV-1 细胞的杀死程度进行评分。使用 SpectraMax190 微板阅读器 (Molecular Devices Corp.),通过剩余活细胞的 Sulforhodamine Blue 染色测量 IGROV-1 细胞增殖。将数据 (OD540 与 MORAb-003 抗 FRA 抗体的浓度相比较)拟合至 5 参数逻辑曲线拟合算法。由对于每个曲线测量的曲线拟合参数计算导致 IGROV-1 细胞的 50% 杀死 (IC50) 的 MORAb-003 抗 FRA 抗体浓度 (参见图 9 和图 10)。

[0414] 还通过 FACS 测量 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品的内在化活性。使人 FRA 表达 IGROV-1 细胞在 4°C 与 1 μ g/mL MORAb-003 抗 FRA 抗体样品温育 30 分钟,并且用 PBS 洗涤。细胞随后在 4°C 与 40 μ g/mL FITC 缀合的抗人 IgG 抗体温育 30 分钟,并且用 PBS 洗涤。细胞随后

在 37℃温育给定时间段,以起始内在化。细胞在 4℃用酸性甘氨酸缓冲液洗涤,以去除所有膜结合的抗体。在酸性甘氨酸缓冲液洗涤后,在 4℃对细胞执行流式细胞术。在所有实验中,内在化定义为平均荧光强度(MFI)中的时间依赖性增加,因为仅在质膜内内在化的抗体将得到保留且在酸性洗涤后产生荧光信号。

[0415] 图 11 显示用 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准执行的 FACS 结合实验结果的直方图,所述 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应。阴影面积(P1 群体)对应于与 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育的细胞。P2 群体(0%对照)对应于与作为对照的无关人 IgG 和 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育的细胞。P3 群体对应于与抗 FRA 抗体和 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育且用酸性甘氨酸缓冲液洗涤的细胞。P4 群体(100%对照)对应于与抗 FRA 抗体和 FITC 缀合的抗人 IgG 抗体一起温育伴随 PBS 缓冲液洗涤的细胞。

[0416] 如下由相对荧光强度计算 MORAb-003 抗 FRA 抗体内在化百分比:

[0417]
$$((\text{MFI}[\text{样品}]-\text{MFI}[0\% \text{对照}]) / (\text{MFI}[100\% \text{对照}]-\text{MFI}[0\% \text{对照}])) \times 100$$

[0418] 图 12 描述在时间和 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准通过 IGROV-1 细胞的内在化之间的关系,所述 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应。y 轴代表相对于在每个时间点的总结合随着时间过程(x 轴)通过 IGROV-1 细胞群体的流式细胞术测量的 MFI 百分比。图 13 描述在时间和表 4 中所述的 MORAb-003 抗 FRA 抗体样品以及 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准通过 IGROV-1 细胞的内在化之间的关系,所述 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应。其中标记“MORAb-003 参考标准”的三种样品代表在 FACS 实验的不同运行中使用的相同抗体分批。图 14 描述图 13 中的数据通过非线性回归拟合至四参数逻辑曲线。所得到的 EC50 曲线拟合参数用于填充(populate)图 15。

[0419] 图 15 概括 FACS MORAb-003 抗 FRA 抗体样品内在化研究的结果且提供 EC50 值。更低的 EC50 值指示更快速的内在化。在如本文定义的“参考培养条件”下产生,并且由外部制造商供应 MORAb-003 抗 FRA 抗体参考标准在约 2 小时(120 分钟)时达到内在化峰。样品 NB859-26 和 NB859-27 (17 和 20 天培养产物)具有更低的 EC50 值,指示比阳性对照更快速的内在化过程。样品 NB859-28 (用低溶解氧处理的培养物)也证实比阳性对照更快速的内在化过程。

[0420] 图 16 概括在实施例 3、4 和 5 中所述的活性数据。

[0421] 除非本文另有定义,与本发明结合使用的科学和技术术语应具有由本领域普通技术人员通常理解的含义。进一步地,除非上下文另有需要,单独术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。一般地,与本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交结合使用的命名法及其技术是本领域众所周知且通常使用的那些。

[0422] 本发明的方法和技术一般根据本领域众所周知和如本说明书自始至终引用且讨论的各种一般和更具体的参考文献中描述的常规方法执行,除非另有说明。参见例如,通过引用合并入本文的 Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000); Ausubel 等人, Short Protocols in Molecular Biology :A Compendium of Methods from

Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John&Sons, Inc. (2002); Harlow 和 Lane Using Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1998); 和 Coligan 等人, Short Protocols in Protein Science, Wiley, John&Sons, Inc. (2003)。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书执行,如本领域通常完成或如本文描述的。与本文描述的分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学结合使用的命名法,及其实验室程序和技术是本领域众所周知且通常使用的那些。

[0423] 本文引用的所有出版物、专利、专利申请或其他文件为了所有目的在此通过引用整体合并,其程度与每个个别出版物、专利、专利申请或其他文件个别指出为了所有目的通过引用合并相同。

[0424] 本说明书和实施方案自始至终,单词“包含”应理解为暗示包括所述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。

[0425] 表 5 :序列表

[0426] 引导序列是斜体的。CDRs 是有下划线的。

[0427] 抗 FRA 抗体重链氨基酸序列

[0428] MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAP

[0429] GKGLEWVAMISSGGSYTTYADSVKGRFAISRDNANTLFLQMDSLRLPEDTGVIYFCARHGD

[0430] DPAWFAYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

[0431] SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

[0432] CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

[0433] DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA

[0434] KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD

[0435] SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :1)

[0436] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYTTYADSVKGRFAISRDNANTLFLQMDSLRLPEDTGVIYFCARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :5)

[0437] 抗 FRA 抗体轻链氨基酸序列

[0438] MGWSCIILFLVATATGVHSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSISSDNLHWYQQKP

[0439] GKAPKPIYGTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQQWSSYPYMYTF

[0440] GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN

[0441] SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :2)

[0442] MGWSCIILFLVATATGVHSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKPIYGTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :6)

[0443] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKPIYGTSNLASGVPSRFSGSGSG

TDYTFTISSLPEDIATYYCQWSSYPYMYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO :7)

[0444] 抗 FRA 抗体重链核苷酸序列

[0445] atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaggtccaactg
gtggagagcggtggaggtgttgtgcaacctggccggctccctgcgctgtcctgctccgcatctggcttcaccttcag
cggctatgggttgtcttgggtgagacaggcacctggaaaaggctcttgagtgggttgcaatgattagtagtggtggta
gttatacctactatgcagacagtggtgaagggtagatttgcaatatcgcgagacaacgccaagaacacattgttcctg
caaatggacagcctgagacccgaagacaccggggctctatTTTTGTGCAAGACATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGC
TTATTGGGGCCAAGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCT
CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGTGTCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCT
CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGT
CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC
AGGTGACCGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAATAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCTGTCTCCCGGAAATGA (SEQ ID NO :8)

[0446] 抗 FRA 抗体轻链 DNA 序列

[0447] atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgacatccagctg
accagagcccaagcagcctgagcgccagcggtgggtgacagagtgaccatcacctgtagtgtcagctcaagtataag
ttccaacaacttgactggtaccagcagaagccaggtaaggctccaaagccatggatctacggcacatccaacctgg
cttctggtgtgccaagcagattcagcggtagcggtacggactacaccttaccatcagcagcctccagcca
gaggacatcgccacctactactgccaacagtggagtagttaccgtacatgtacacgttcggccaagggaccaaggt
ggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactg
cctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgcctccaa
tcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgt
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa
agagcttcaacaggggagagtgttaa (SEQ ID NO :9)

[0448] 人 FRA 氨基酸序列

[0449] MAQRMTTQLLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTN
TSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLEYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDC
RTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAAQGNPNE
EVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS (SEQ ID NO :3)

[0450] 人 FRA 核苷酸序列

[0451] atggctcagcggatgacaacacagctgctgctccttctagtgtgggtggctgtagtaggggaggctcagacaaggattgcatgggccaggactgagcttctcaatgtctgcatgaacgccaagcaccacaaggaaaagccaggcccgaggacaagttgcatgagcagtgctgaccctggaggaagaatgcctgctgttctaccaacaccagccaggaa gcccataaggatgtttcctacctatatagattcaactggaaccactgtggagagatggcacctgcctgcaaacgg catttcatccaggacacctgcctctacgagtgtcccccaacttggggccctggatccagcaggtggatcagagc ttggcgcaaagagcgggtactgaacgtgcccctgtgcaaagaggactgtgagcaatggtgggaagattgtcgcacc tcctacacctgcaagagcaactggcacaagggtggaactggacttcagggtttaacaagtgcgcagtgaggagct gcctgccaacctttccatttctacttccccacaccactgttctgtgcaatgaaatctggactcactcctacaag gtcagcaactacagccgaggagtggtggcgctgcatccagatgtggttcgaccagcccagggaacccaatgag gaggtggcgagggttctatgctgcagccatgagtggggctgggccctgggcagcctggcctttcctgcttagcctg gccctaattgctgctgtggctgctcagctag (SEQ ID NO :4)

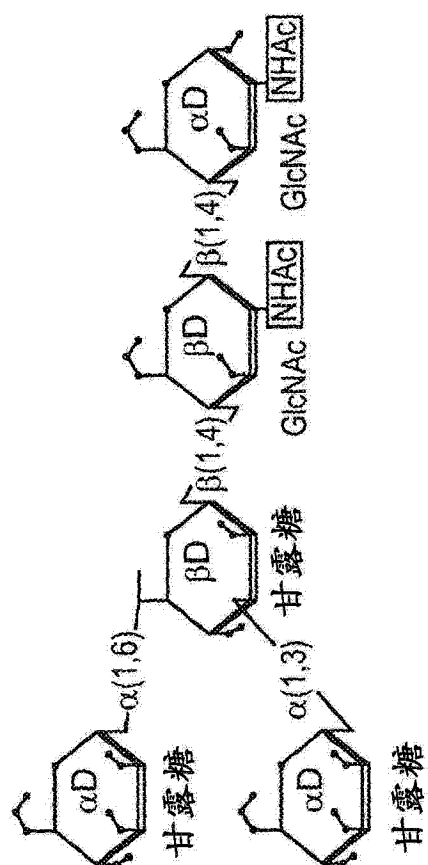


图 1A

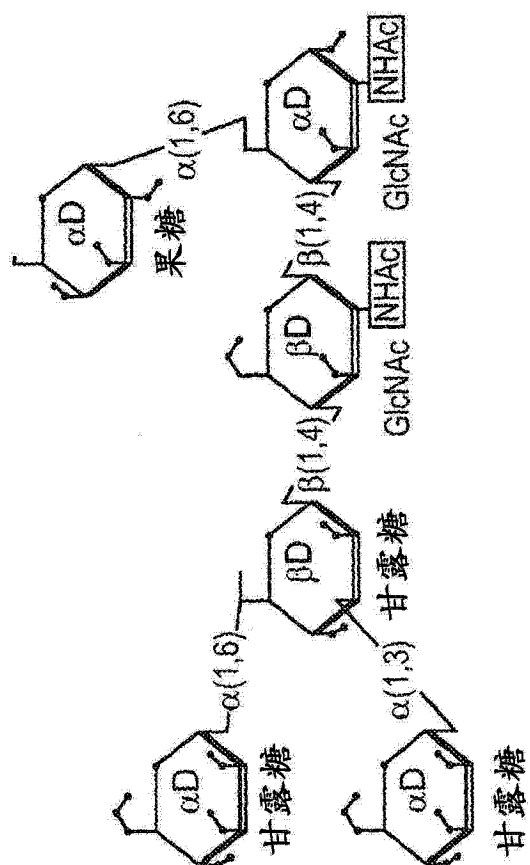


图 1B

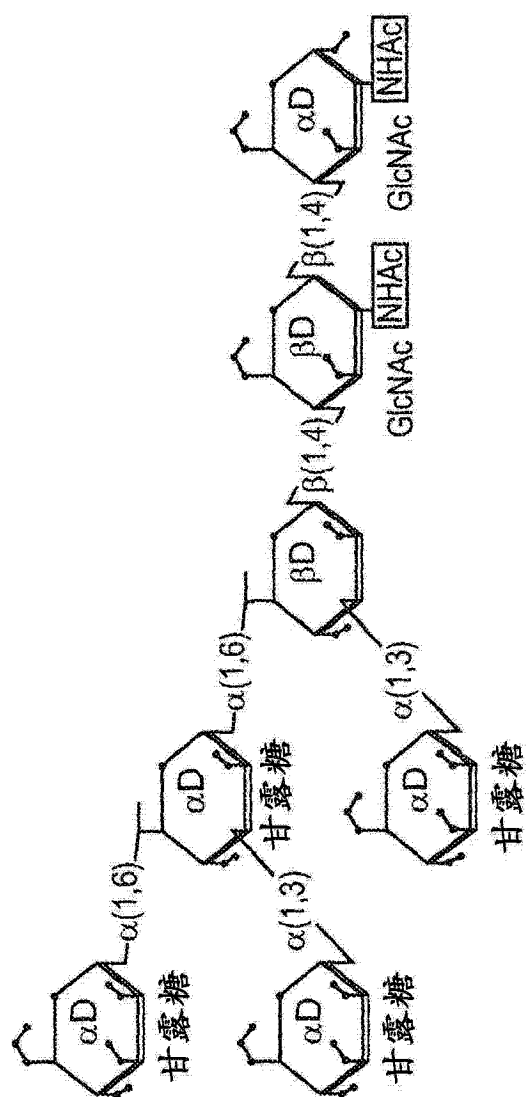


图 1C

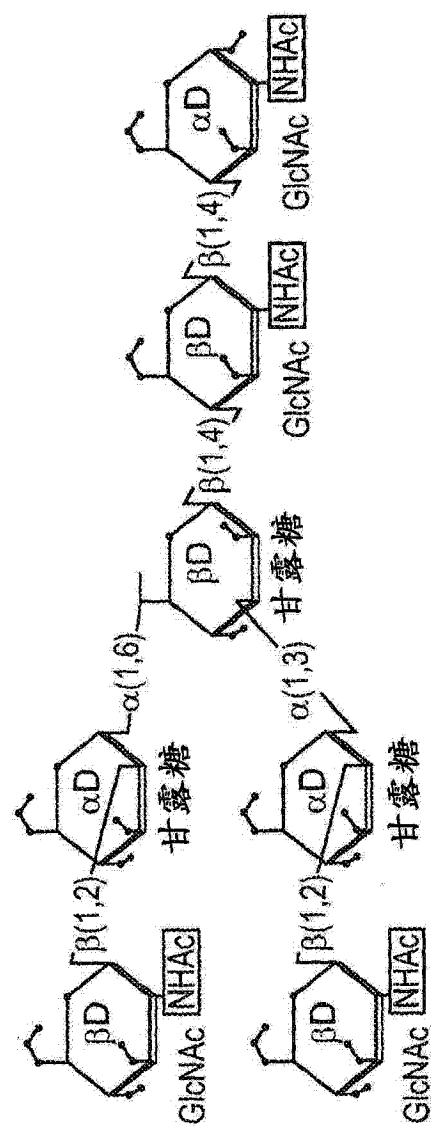


图 1D

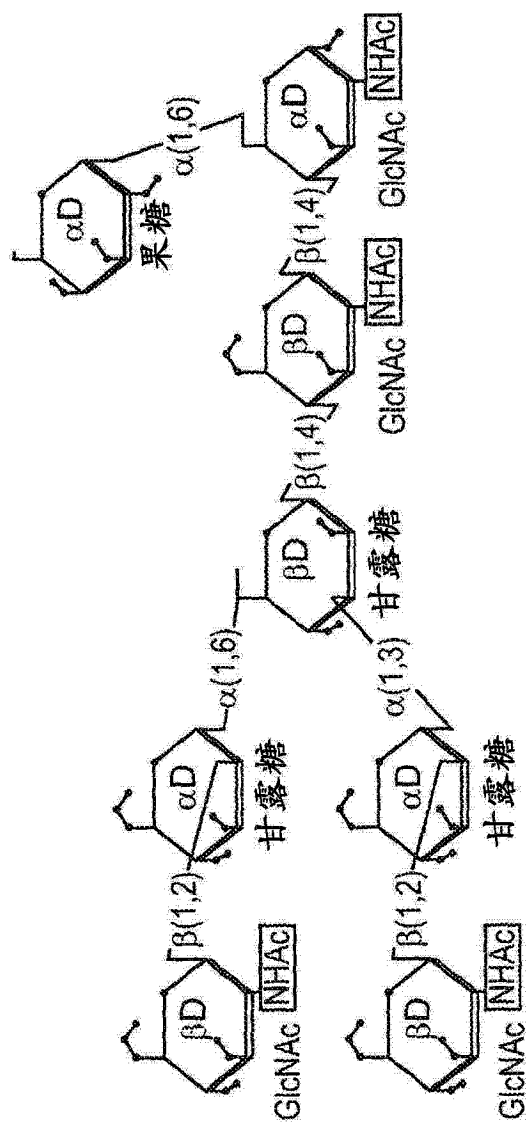


图 1E

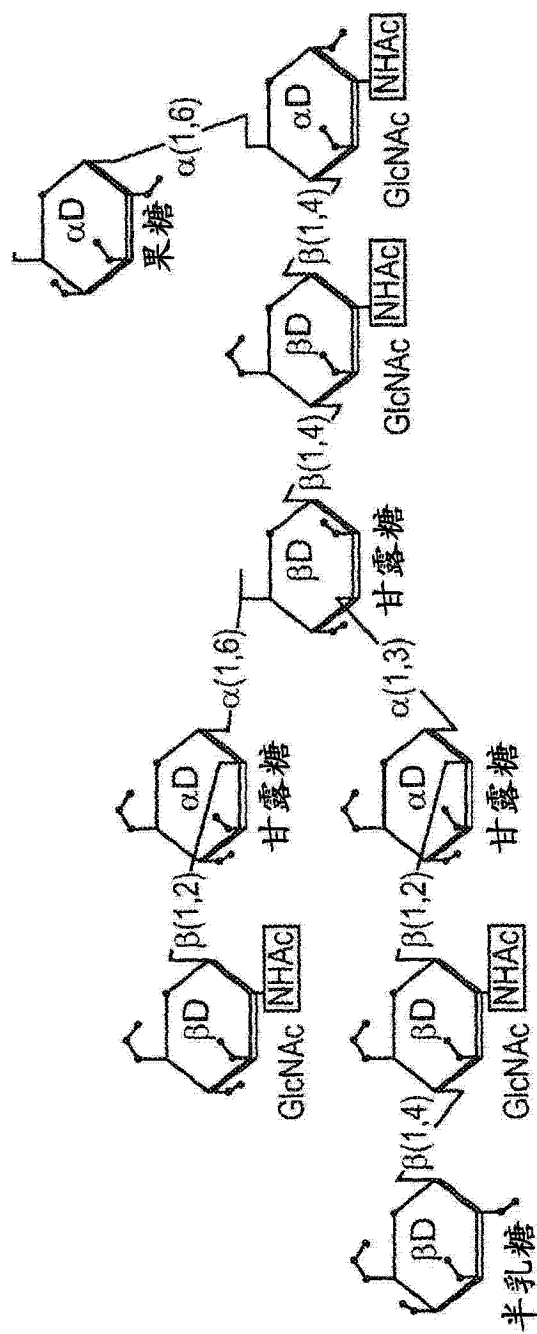


图 1F

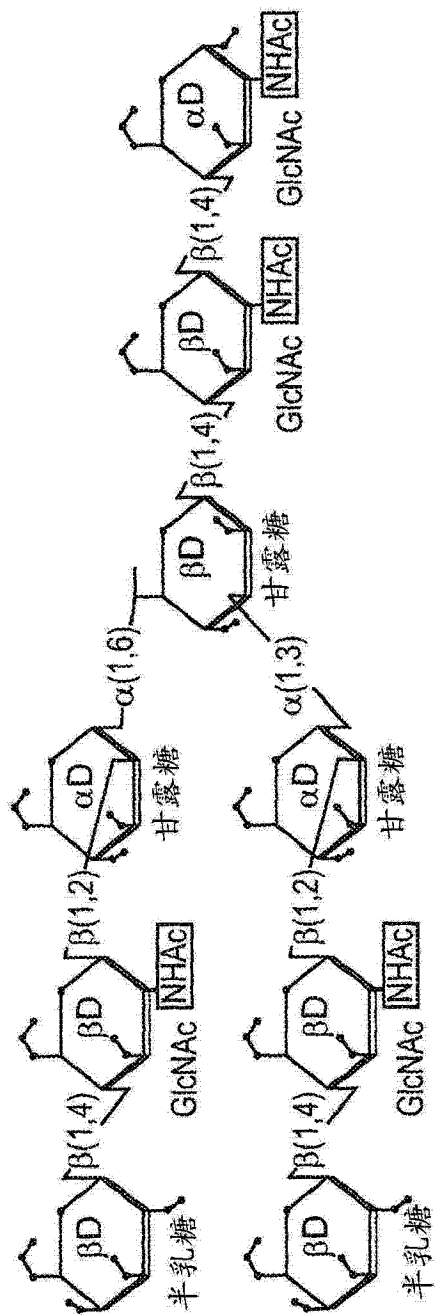


图 1G

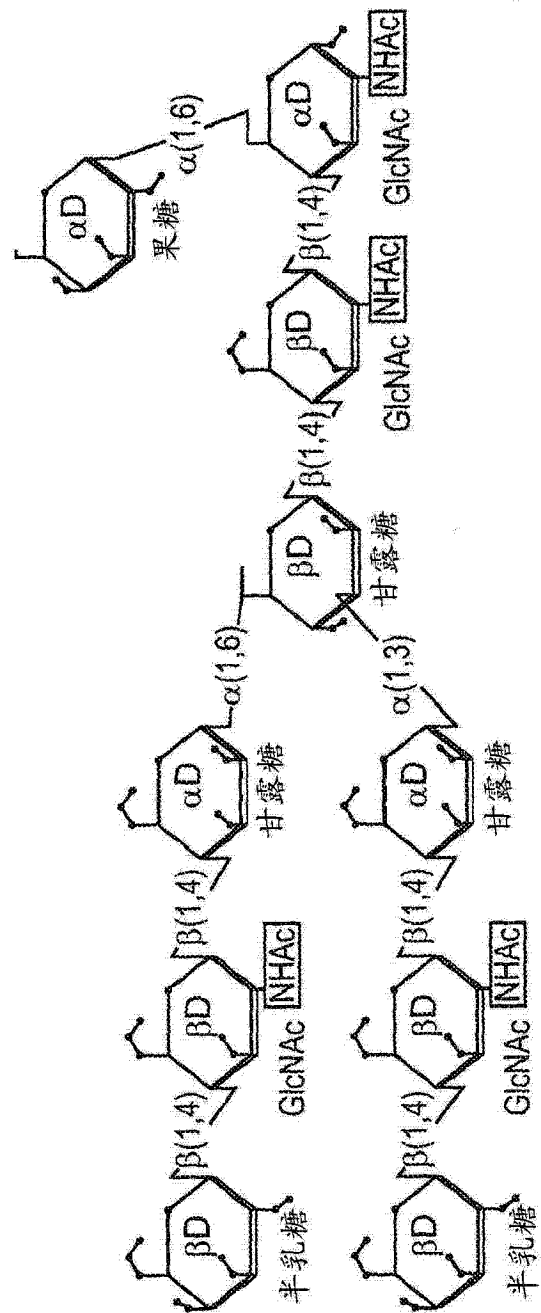


图 1H

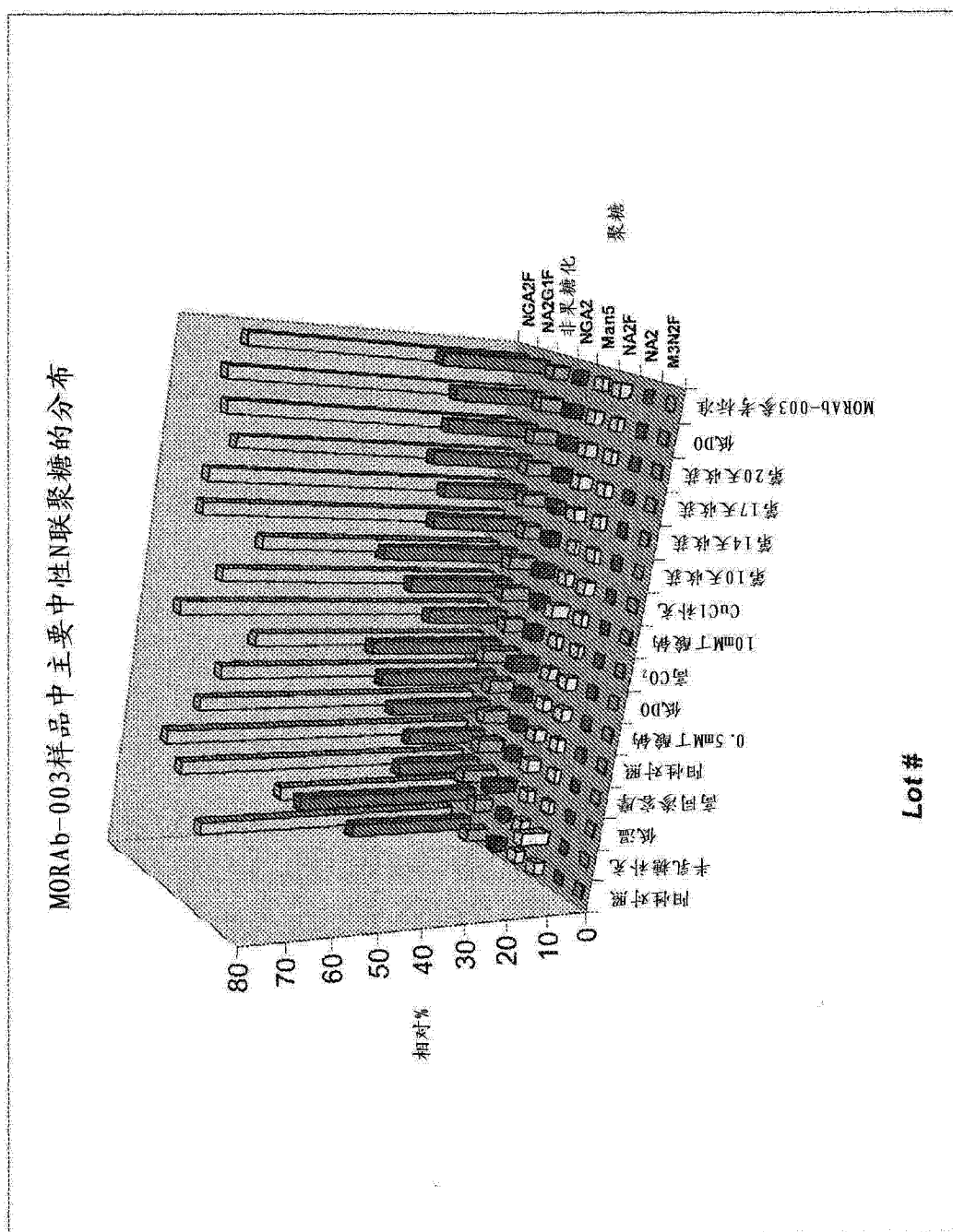


图 2

来自不同MDRAB-003样品的N-聚果糖的相对%												Lot#	生物反应器	轮次	因子	值
M3N2	M3N2F	NA2	NA2F	Man5	NGA2	非果糖化的		果糖化的		NA2G1F	NGA2F					
0.06	0.22	0.15	2.5	2.4	2.72	5.33		94.65		29.74	62.19	NB810-10	BR5	1	阳性对照	
0.12	0.14	0.2	7.06	2.42	1.9	4.64		95.36		43.73	44.43	NB810-11	BR6	1	非乳糖补充	
0.02	0.25	0.05	1.36	2.04	6.98	9.09		90.92		20.79	66.52	NB810-12	BR7	1	低湿	30°C 5天
0.08	0.25	0.23	1.23	3.4	2.63	6.34		93.65		19.57	72.6	NB810-13	BR8	1	高同渗容厚	800 mOsm/kg 7天
0.22	0.23	0.64	2.18	3.02	2.45	6.33		93.66		24.96	66.29	NB809-65	BR1	2	阳性对照	
0.14	0.24	0.47	2.49	2.19	3.26	6.06		93.94		28.66	62.55	NB809-66	BR3	2	0.5mM 丁酸钠	
0.01	0.22	0.48	2.8	2.22	6.53	9.24		90.75		31.98	55.75	NB809-67	BR4	2	低DO	5% 6天
0.19	0.27	0.23	1.34	1.61	3.04	5.07		94.93		19.51	73.81	NB809-68	BR5	2	高CO	20% 6天
0.05	0.4	0.13	1.83	4.11	2.77	7.06		92.94		25.33	65.38	NB809-69	BR7	2	10mM 丁酸钠	
0.34	0.37	0.15	2.6	2.16	3.88	6.53		93.46		33.03	57.46	NB809-70	BR8	2	CuCl 补充	0.5mM 氯化铜
0.04	0.24	0.31	1.48	1.28	2.64	4.27		95.73		22.33	71.66	NB859-24	BR1	3	第10天收获	
0.2	0.33	0.32	1.49	2.85	2.6	5.97		94.03		20.76	71.45	NB859-25	BR1	3	第14天收获	
0.15	0.34	0.51	1.9	3.16	2.77	6.59		93.41		24.87	66.3	NB859-26	BR1	3	第17天收获	
0.16	0.29	0.4	1.66	2.96	2.64	6.16		93.83		22.43	69.45	NB859-27	BR1	3	第20天收获	
0.04	0.31	0.3	1.59	2.23	3.17	5.74		94.26		21.9	70.46	NB859-28	BR2	3	低DO	(5% 6天)
0.02	0.16	0.02	2.57	1.64	2.12	3.8		96.2		26.45	67.02	N/A			MORAB-003 参考标准	
0.12	0.27	0.29	2.26	2.43	3.26	6.14		93.86		26.00	65.33	avg				
0.09	0.07	0.17	1.43	0.72	1.48	1.39		1.39		6.67	7.86	SD				

图 3

样品批号	95%置信下限 (%)	测量效力 (%)	相对效力 (阳性对照的%)	95%置信上限 (%)
NB810-10	82.1	85.5	100.0	89.2
NB810-11	81.3	84.7	99.1	88.3
NB810-12	82.7	87.3	101.7	92.0
NB810-13	66.8	72.6	84.9	78.9
NB809-065	43.7	49.7	100.0	56.4
NB809-066	59.0	61.5	123.7	64.1
NB809-067	50.3	56.2	113.1	62.9
NB809-068	45.0	50.5	101.6	56.6
NB809-069	44.1	49.3	99.2	55.0
NB809-070	41.3	48.0	96.6	55.8
NB859-024	29.4	33.8	65.1	38.8
NB859-025	39.1	51.9	100.0	69.0
NB859-026	24.5	27.5	51.9	30.9
NB859-027	47.9	53.3	102.7	59.3
NB859-028	37.6	44.5	85.7	52.6

图 4

样品 批号	F测试 机率	卡方测试 机率	测量效力	相对效力 (平均阳性 对照的%)	生物 反应器	轮次	因子	值
NB810-10	0.716	0.859	70.8%	129.2%	BR5	1	阳性对照	30°C 5天 600 mOsm/kg 7天
NB810-11	0.713	0.930	62.0%	113.1%	BR6	1	半乳糖补充	
NB810-12	0.075	0.248	103.9%	189.6%	BR7	1	低温	
NB810-13	0.149	0.420	55.3%	100.9%	BR8	1	高同渗容摩	
NB809-065	0.218	0.107	38.8%	70.8%	BR1	2	阳性对照	
NB809-066	0.828	0.866	48.8%	89.1%	BR3	2	0.5mM丁酸钠	5% 6天 20% 6天 0.5mM氯化铜
NB809-067	0.145	0.268	97.7%	178.3%	BR4	2	低D0	
NB809-068	0.890	0.903	46.0%	83.9%	BR5	2	高C0	
NB809-069	0.437	0.513	41.0%	74.8%	BR7	2	10mM丁酸钠	
NB809-070	0.387	0.525	42.6%	77.7%	BR8	2	CuCl补充	
NB859-024	0.071	0.120	18.0%	32.8%	BR1	3	第10天收获	(5% 6天)
NB859-025	0.203	0.463	33.6%	61.3%	BR1	3	第14天收获	
NB859-026	0.043	0.360	20.9%	38.1%	BR1	3	第17天收获	
NB859-027	0.051	0.389	35.2%	64.2%	BR1	3	第20天收获	
NB859-028	0.030	0.076	26.6%	48.5%	BR2	3	低D0	
				阳性对照的 平均 (n=2)				
				54.8%				

图 5

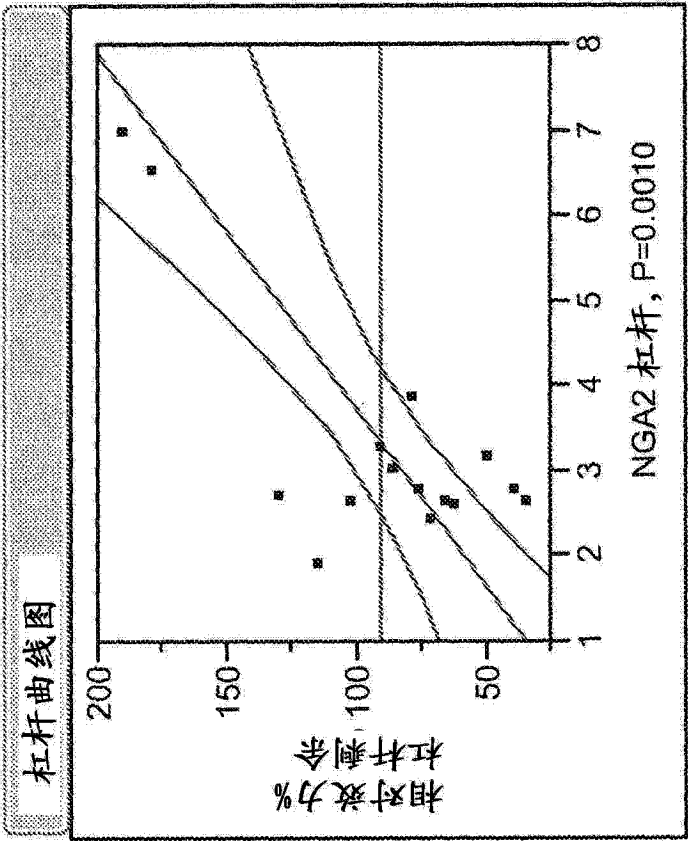


图 6

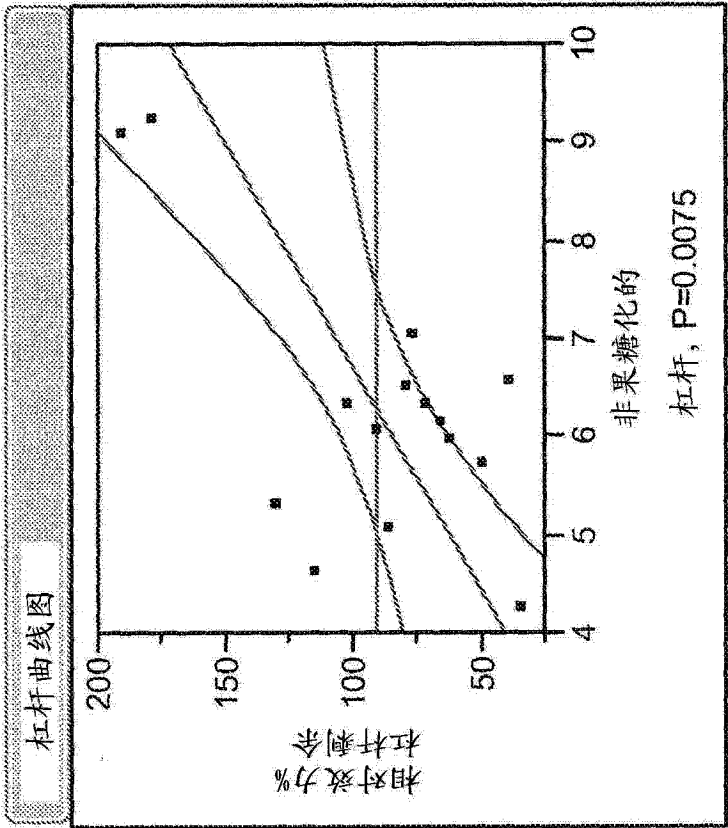


图 7

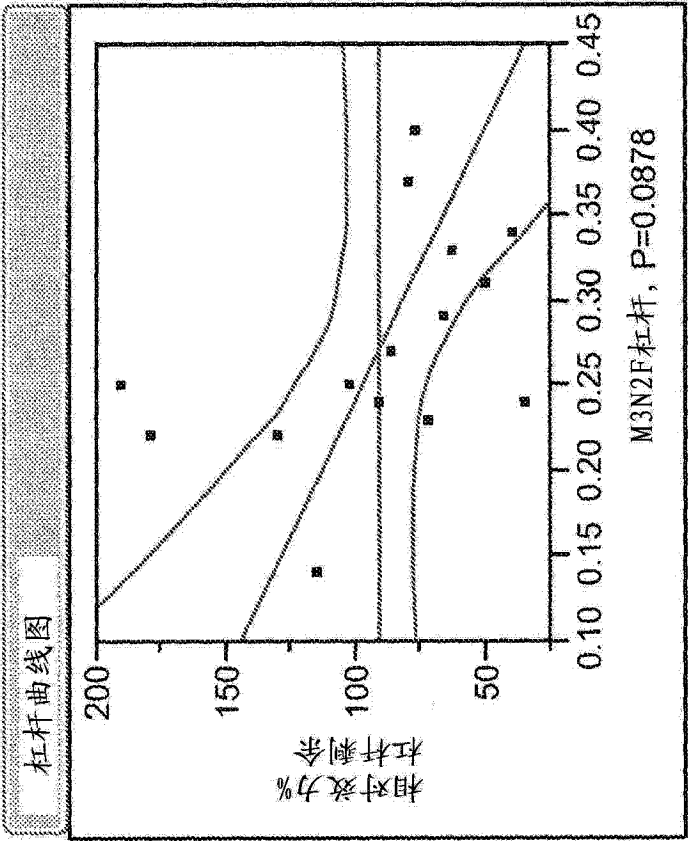


图 8

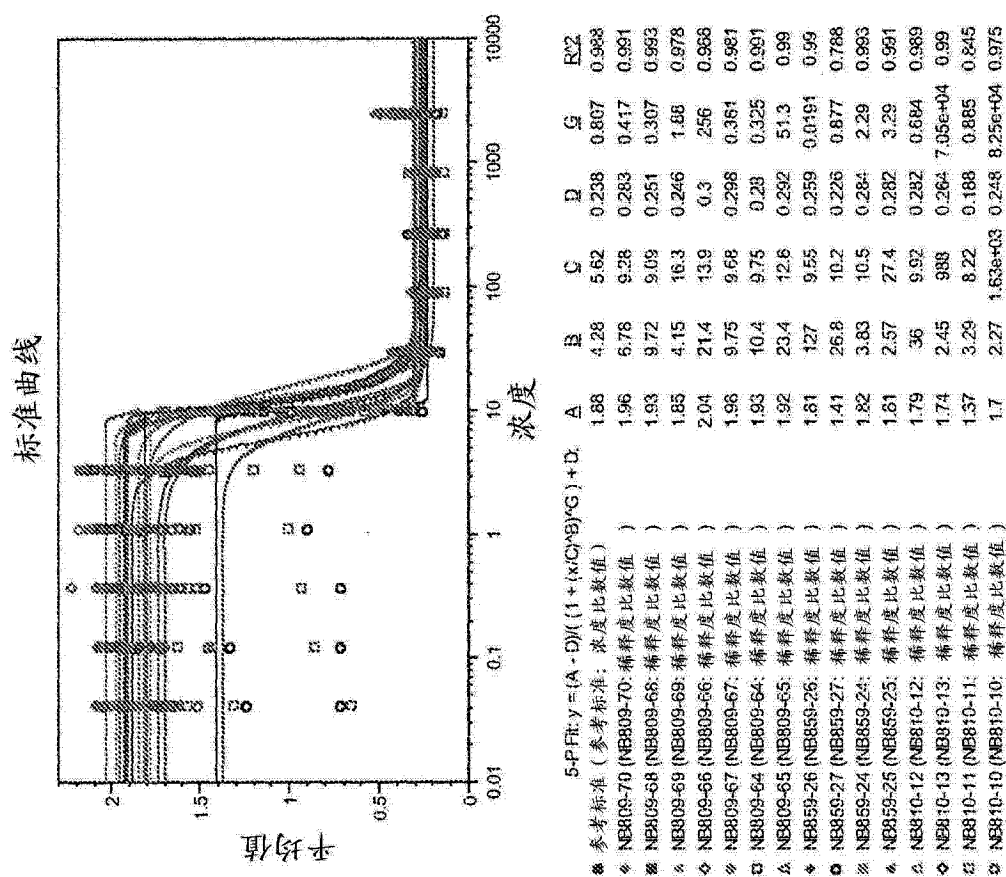


图 9

Lot	a	b	c	d	g	R2	IC50 (ng.mL)
参考标准	1.88	4.28	5.62	0.238	0.807	0.988	14
NB810-10	1.7	2.27	1.63E+03	0.248	8.25E+04	0.975	1632
NB810-11	1.37	3.29	8.22	0.188	0.885	0.845	19
NB810-12	1.79	36	9.92	0.282	0.684	0.989	25
NB810-13	1.74	2.45	988	0.264	7.05E+04	0.99	990
NB859-24	1.82	3.83	10.5	0.284	2.29	0.993	15
NB859-25	1.81	2.57	27.4	0.282	3.29	0.991	32
NB859-26	1.81	127	9.55	0.259	0.0191	0.99	36
NB859-27	1.41	26.8	10.2	0.226	0.877	0.788	23
NB809-64	1.93	10.4	9.75	0.28	0.325	0.991	30
NB809-65	1.92	23.4	12.6	0.292	51.3	0.99	14
NB809-66	2.04	21.4	13.9	0.3	256	0.988	15
NB809-67	1.98	9.75	9.68	0.298	0.361	0.981	29
NB809-68	1.93	9.72	9.09	0.251	0.307	0.993	28
NB809-69	1.85	4.15	16.3	0.246	1.88	0.978	24
NB809-70	1.96	6.78	9.28	0.283	0.417	0.991	27
						AVG	24
						SD	7

图 10

MORAb-003 (参考标准) 的直方图
结合IGROV, 通过FITC染色

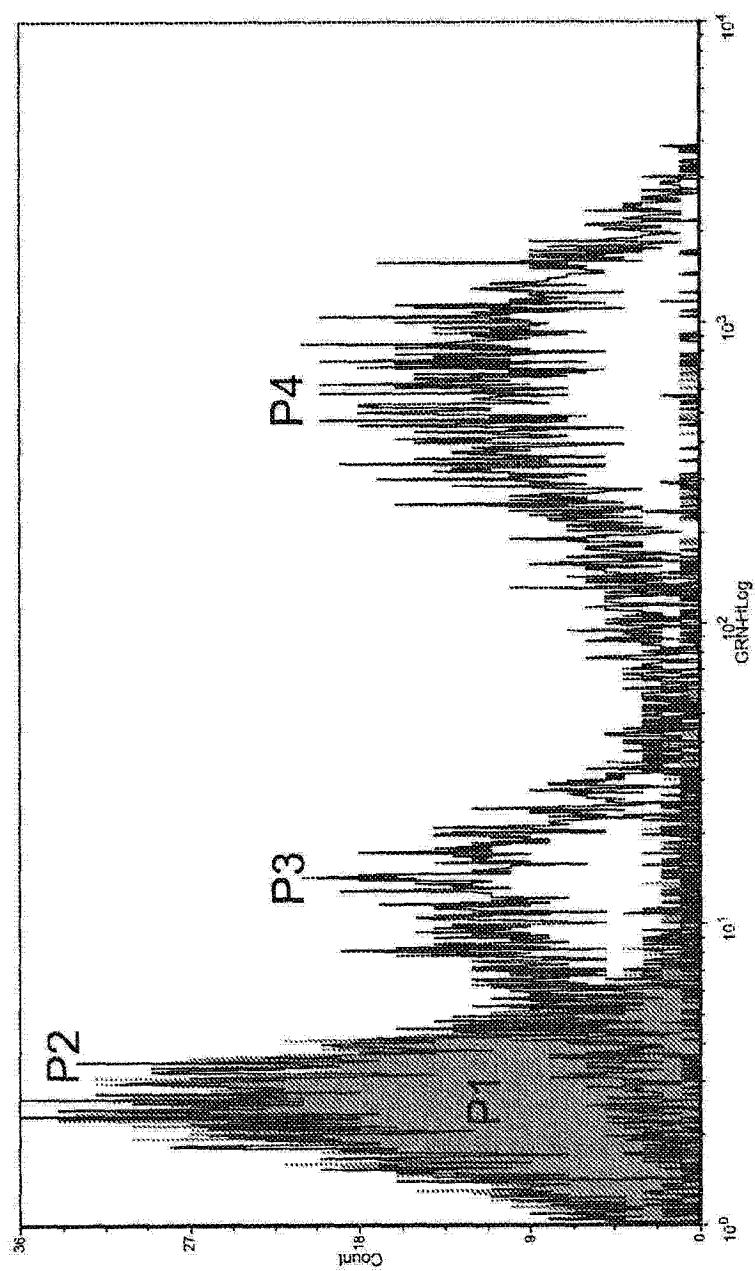


图 11

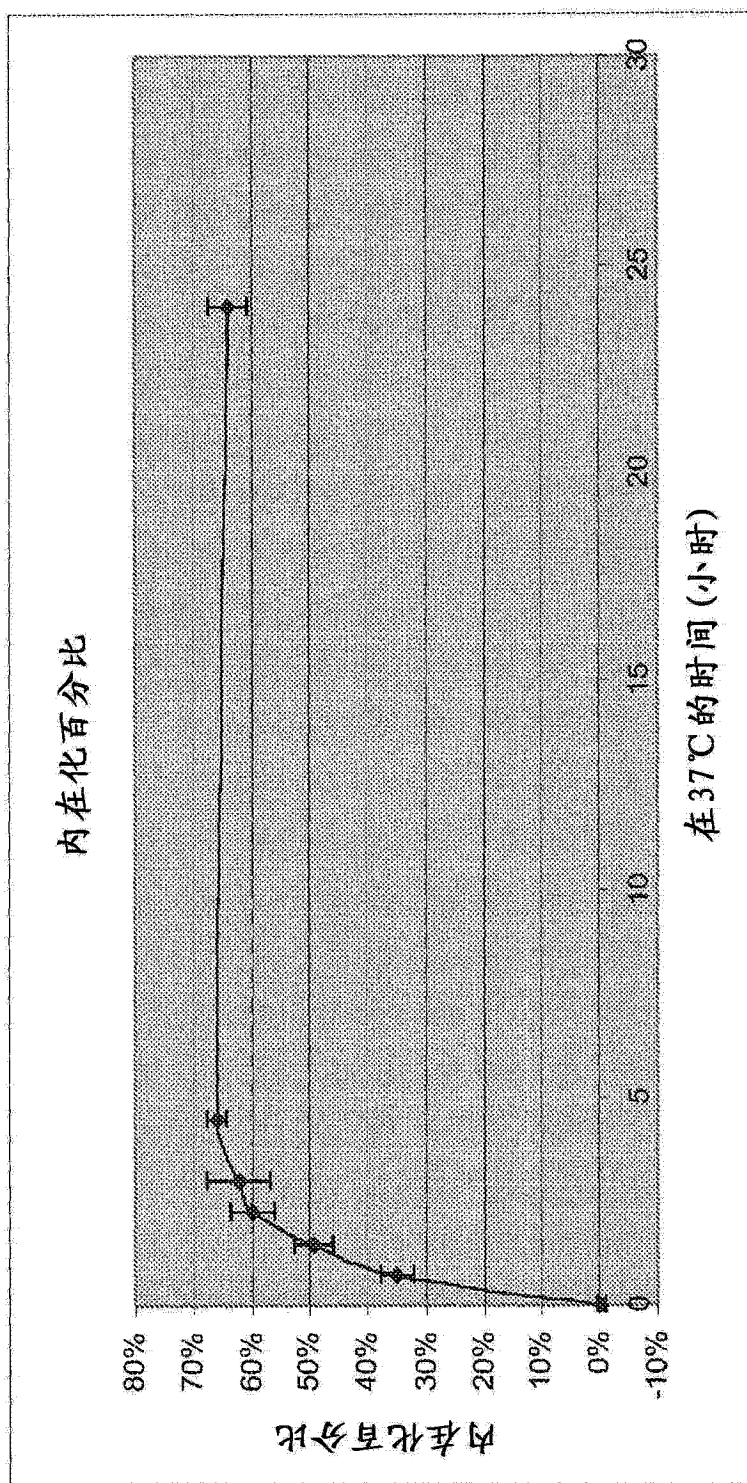


图 12

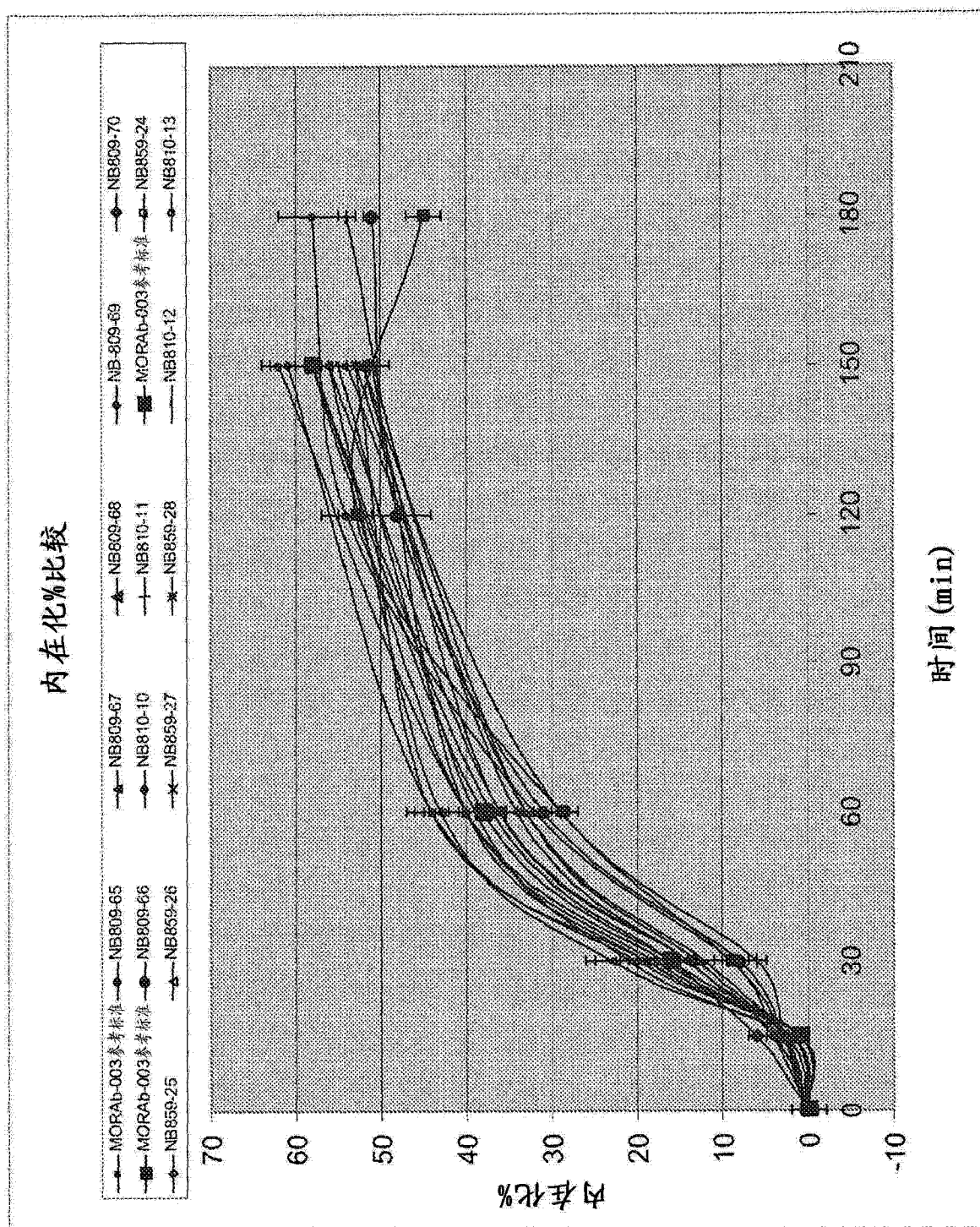


图 13

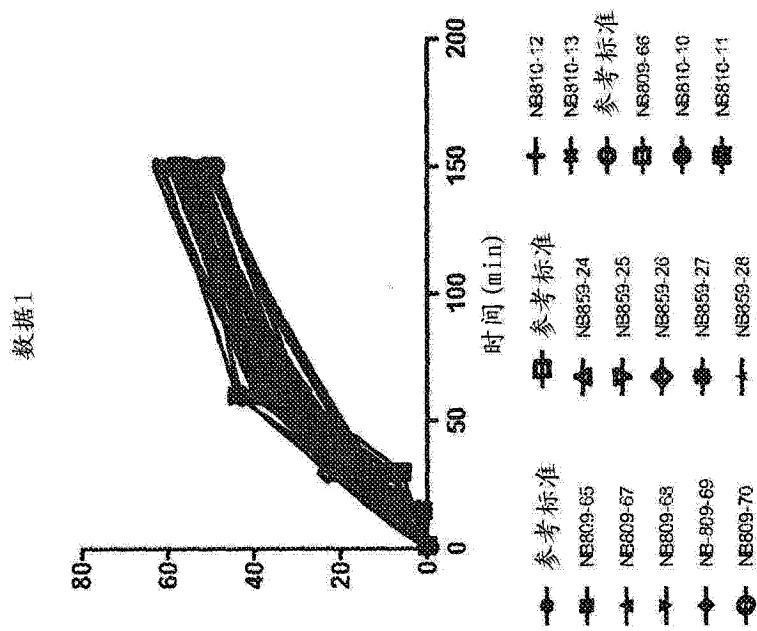


图 14

样品	INTL % (0 Min)	INTL % (15 min)	INTL % (30 min)	INTL % (60 min)	INTL % (150 min)	EC50
MORAb-003 参考标准	0	3	12	33	54	54.34
NB809-65	0	3	13	33	52	51.67
NB809-67	0	3	14	34	53	50.73
NB809-68	0	4	14	36	52	46.53
NB-809-69	0	4	14	36	56	51.22
NB809-70	0	6	16	37	58	53.33
MORAb-003 参考标准	0	1	16	38	58	48.36
NB859-24	0	1	18	40	58	44.61
NB859-25	0	1	20	44	61	41.99
NB859-26	0	2	23	43	56	36.58
NB859-27	0	1	19	40	51	37.31
NB859-28	0	2	19	44	53	36.47
NB810-12	0	3	21	39	55	41.18
NB810-13	0	2	17	40	62	49.58
MORAb-003 参考标准	0	3	9	29	49	56.33
NB809-66	0	3	8	31	50	53.55
NB810-10	0	4	9	32	56	58.39
NB810-11	0	3	6	29	50	56.62
					参考标准平均	51.455
					STD	2.65165
					所有平均	47.77471
					STD	6.998751

图 15

样品批号	结合			ADCC	内在化	
	95%置信 下限	相对 效力	95%置信 上限		半最大内在化 常数 (min)	内在化 IC50 (ng/mL)
MORAb-003		ND		100.0%	54.34 56.33 48.36	14
NB810-10	82.1%	85.5%	89.2%	129.2%	58.39	1632
NB810-11	81.3%	84.7%	88.3%	113.1%	56.62	19
NB810-12	82.7%	87.3%	92.0%	189.6%	41.18	25
NB810-13	66.8%	72.6%	78.9%	100.9%	49.58	990
NB809-065	43.7%	49.7%	56.4%	70.8%	51.67	14
NB809-066	59.0%	61.5%	64.1%	89.1%	53.55	15
NB809-067	50.3%	56.2%	62.9%	178.3%	50.73	29
NB809-068	45.0%	50.5%	56.6%	83.9%	46.53	28
NB809-069	44.1%	49.3%	55.0%	74.8%	51.22	24
NB809-070	41.3%	48.0%	55.8%	77.7%	53.33	27
NB859-024	29.4%	33.8%	38.8%	32.8%	44.61	15
NB859-025	39.1%	51.9%	69.0%	61.3%	41.99	32
NB859-026	24.5%	27.5%	30.9%	38.1%	36.58	36
NB859-027	47.9%	53.3%	59.3%	64.2%	37.31	23
NB859-028	37.6%	44.5%	52.6%	48.5%	36.47	ND

图 16