



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105163758 B

(45)授权公告日 2017.11.17

(21)申请号 201480024699.3

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105163758 A

(43)申请公布日 2015.12.16

(30)优先权数据  
1352360 2013.03.15 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.10.29

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2014/055179 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/140322 FR 2014.09.18

(73)专利权人 法国血液分割暨生化制品实验室  
地址 法国莱尤里斯

(72)发明人 G·谢弗勒 N·比霍罗

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247  
代理人 柴云峰 黄革生

(51)Int.Cl.  
A61K 39/395(2006.01)  
C07K 1/16(2006.01)

(56)对比文件  
W0 2013004841 A1,2013.01.10,  
W0 2013004841 A1,2013.01.10,  
审查员 李恩

权利要求书5页 说明书32页 附图6页

(54)发明名称

包含富集主要电荷同工型的抗体组合物的  
药物

(57)摘要

本发明属于抗体疗法技术领域,涉及通过ADCC的靶细胞破坏机理。本发明涉及经纯化的抗体组合物,其用做药物,通过层析分级分离抗体组合物中天然存在的多种电荷同工型,并组合对应于层析图的主峰的一个或多个层析级分得到所述抗体组合物,所得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,所述峰占所得组合物的层析图的至少85%。

1. 一种可以通过以下方法获得的单克隆抗体组合物用于制备药物的用途,所述方法包括:

a) 从细胞克隆、非人类转基因动物或转基因植物产生单克隆抗体组合物,

b) 通过离子交换层析、通过层析聚焦或通过疏水相互作用层析将步骤(a)中获得的组合物分级分离,和

c) 合并步骤b)中获得的与层析图主峰相对应的一个或几个层析级分,因而获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,所述主峰占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少90%,其中所述抗体在其Fc片段的N-糖基化位点上包含双天线复杂型聚糖结构并且包含小于或等于65%的岩藻糖含量。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中步骤b)的分级分离通过以下层析技术之一实现:

- 采用离子力梯度洗脱的离子交换层析,
- 采用pH梯度洗脱的离子交换层析,所述梯度在阳离子交换情况下递增,在阴离子交换情况下递减,

- 采用离子力和pH梯度洗脱的离子交换层析,

- 采用置换分子洗脱的离子交换层析,

- 层析聚焦,和

- 疏水相互作用层析。

3. 根据权利要求2的用途,其中步骤b)的分级分离通过以下层析技术之一实现:

- 层析聚焦,使用柱Mono™ P (GE Life Sciences),通过递降pH梯度使用两种缓冲液:缓冲液A:二乙醇胺25mM,缓冲液B:polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5从9.5至8.0洗脱;

- 阳离子交换层析,通过组合缓冲液C:20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,60mM NaCl (pH 6)和缓冲液D:20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,60mM NaCl (pH 10)获得的递增pH梯度洗脱,梯度60分钟内从10%至60%的缓冲液B。

4. 根据权利要求1的用途,其中所述主峰占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少95%。

5. 根据权利要求1的用途,其中所述主峰占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少99%。

6. 根据权利要求2的用途,其中所述主峰占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少95%。

7. 根据权利要求2的用途,其中所述主峰占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少99%。

8. 根据权利要求1的用途,其中在组合物中存在的抗体的至少95%的重链不包含任何C末端赖氨酸残基。

9. 根据权利要求2的用途,其中在组合物中存在的抗体的至少95%的重链不包含任何C末端赖氨酸残基。

10. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原或免疫细胞的抗原。

11. 根据权利要求2的用途,其中所述抗体针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原或免疫细胞的抗原。

12. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体是抗Rhesus D抗体并且所述组合物意在预防Rhesus阴性个体中的同种异体免疫。

13. 根据权利要求2所述的用途,其中所述抗体是抗Rhesus D抗体并且所述组合物意在预防Rhesus阴性个体中的同种异体免疫。

14. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体针对癌细胞的抗原并且所述组合物意在治疗癌症。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述抗体针对以下抗原之一:CD20、Her2/neu、CD52、EGFR、EPCAM、CCR4、CTLA-4 (CD152)、CD19、CD22、CD3、CD30、CD33、CD4、CD40、CD51 (整联蛋白 $\alpha$ -V)、CD80、CEA、FR-alpha、GD2、GD3、HLA-DR、IGF1R (CD221)、磷脂酰丝氨酸、SLAMF7 (CD319)、TRAIL-R1和TRAIL-R2。

16. 根据权利要求2所述的用途,其中所述抗体针对癌细胞的抗原并且所述组合物意在治疗癌症。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述抗体针对以下抗原之一:CD20、Her2/neu、CD52、EGFR、EPCAM、CCR4、CTLA-4 (CD152)、CD19、CD22、CD3、CD30、CD33、CD4、CD40、CD51 (整联蛋白 $\alpha$ -V)、CD80、CEA、FR-alpha、GD2、GD3、HLA-DR、IGF1R (CD221)、磷脂酰丝氨酸、SLAMF7 (CD319)、TRAIL-R1和TRAIL-R2。

18. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体针对病原体感染的细胞的抗原并且所述组合物意在治疗所述病原体所致的感染。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述抗体针对以下抗原之一:艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 抗原、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 抗原、巨细胞病毒抗原、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 抗原、呼吸道合胞体病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、甲型流感病毒抗原、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 血清型IATS 011的抗原、狂犬病病毒抗原,和磷脂酰丝氨酸。

20. 权利要求19所述的用途,其中所述金黄色葡萄球菌抗原是C1fA和脂磷壁酸,巨细胞病毒抗原是糖蛋白B,大肠杆菌抗原是志贺样毒素,根据单位IIB,呼吸道合胞体病毒抗原是蛋白F,甲型流感病毒抗原是血凝素,狂犬病病毒抗原是糖蛋白。

21. 根据权利要求2所述的用途,其中所述抗体针对受病原体感染的细胞的抗原并且所述组合物意在治疗所述病原体的感染。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述抗体针对以下抗原之一:艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 抗原、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 抗原、巨细胞病毒抗原、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 抗原、呼吸道合胞体病毒抗原、乙型肝炎病毒抗原、甲型流感病毒抗原、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 血清型IATS 011的抗原、狂犬病病毒抗原,和磷脂酰丝氨酸。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述金黄色葡萄球菌抗原是C1fA和脂磷壁酸,巨细胞病毒抗原是糖蛋白B,大肠杆菌抗原是志贺样毒素,根据单位IIB,呼吸道合胞体病毒抗原是蛋白F,甲型流感病毒抗原是血凝素,狂犬病病毒抗原是糖蛋白。

24. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体针对免疫细胞的抗原并且所述组合物意在治疗自身免疫疾病。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述抗体针对以下抗原之一:CD20、CD52、CD25、

CD2、CD22、CD3和CD4。

26. 根据权利要求2所述的用途,其中所述抗体针对免疫细胞的抗原并且所述组合物意在治疗自身免疫病。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述抗体针对以下抗原之一:CD20、CD52、CD25、CD2、CD22、CD3和CD4。

28. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含小于或等于50%的岩藻糖含量。

29. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含5%到65%之间的岩藻糖含量。

30. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含5%到50%之间的岩藻糖含量。

31. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗体具有大于60%的G0+G1+G0F+G1F形式含量。

32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述抗体具有小于50%的G0F+G1F形式含量。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中以下细胞系中生产获得所述抗体:YB2/0、CHOLec13、在针对FUT8或GMD的小干扰性RNA存在下培养的野生型CHO细胞系、其编码1,6-岩藻糖基转移酶的基因FUT8的两个等位基因或其编码高尔基体中GDP-岩藻糖转运蛋白的GMD基因的两个等位基因已经被缺失的CHO细胞系。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的用途,其中所述抗体在Fc片段的某些氨基酸残基处包含至少一个突变。

35. 根据权利要求34的用途,其中所述Fc片段的某些氨基酸残基处的所述至少一个突变位于Fc的下列位置:219,222,224,239,247,256,267,270,283,280,286,290,294,295,296,298,300,320,326,330,332,333,334,335,339,360,377,396。

36. 根据权利要求34的用途,其中所述Fc片段的某些氨基酸残基处的所述至少一个突变选自下列取代:S219Y;K222N;H224L;L234E,L234Y,L234V;L235D,L235S,L235Y,L235I;S239D,S239T;V240I,V240M;P247L;T256A,T256N;V264I,V264T;V266I;S267A;D270E;D280A,D280K,D280H,D280N,D280T,D280Q,D280Y;V282M;E283Q;N286S;K290A,K290Q,K290S,K290E,K290G,K290D,K290P,K290N,K290T,K290S,K290V,K290T,K290Y;E294N;Q295K;Y296W;S298A,S298N,S298V,S298D,S298E;Y300I,Y300L;K320M,K320Q,K320E;N325T;K326S,K326N,K326Q,K326D,K326E;A330K,A330L,A330Y,A330I;I332E,I332D;E333A,E333Q,E333D;K334A,K334N,K334Q,K334S,K334E,K334D,K334M,K334Y,K334H,K334V,K334L,K334I;T335E,T335K;A339T;K360A;F372Y;I377F;V379M;P396H,P396L;和D401V。

37. 根据权利要求34的用途,其中所述Fc片段的某些氨基酸残基处的所述至少一个突变选自下列突变组合:E333A/K334A,T256A/S298A,S298A/E333A,S298A/K334A,S298A/E333A/K334A,S267A/D280A,S239D/I332E,S239D/I332E/A330L,V264I/I332E,S298A/I332E,S239E/I332E,S239Q/I332E,S239D/I332D,S239D/I332E,S239D/I332N,S239D/I332Q,S239E/I332D,S239E/I332N,S239N/I332E,S239Q/I332D,A330Y/I332E,V264I/A330Y/I332E,A330L/I332E,V264I/A330L/I332E,S239E/V264I/I332E,S239E/V264I/A330Y/I332E,S239D/A330Y/I332E,S239N/A330Y/I332E,S239D/A330L/I332E,S239N/A330L/I332E,V264I/S298A/I332E,S239D/S298A/I332E,S239N/S298A/I332E,和S239D/V264I/I332E。

38. 根据权利要求1至33中任一项所述的用途,其中所述抗体包含Fc片段的修饰,所述修饰增强所述抗体与蛋白质C1q的结合和所述抗体借助补体的效应子特性。

39. 离子交换层析、层析聚焦或疏水相互作用层析分级分离步骤(步骤a)接着是合并所获得的与层析图主峰相对应的层析级分的步骤(步骤b)的用途,用于增加针对给定抗体的单克隆抗体组合物通过表达Fc  $\gamma$  RIII (CD16) 受体的免疫系统的效应细胞诱导表达所述抗原的靶细胞的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的能力,其中所述抗体在其Fc片段的N-糖基化位点上包含双天线复杂型聚糖结构并且包含小于或等于65%的岩藻糖含量,并且分级分离和合并目标层析级分后获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,所述主峰占步骤b)中获得的组合物的层析图的至少90%。

40. 根据权利要求39的用途,其中通过离子交换层析使用以下洗脱方式之一:离子力梯度、pH梯度、pH和离子力梯度或置换分子实施分级分离。

41. 根据权利要求39的用途,其中所述单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

42. 根据权利要求40的用途,其中所述单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

43. 根据权利要求39的用途,其中所述单克隆抗体针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原,或免疫细胞抗原。

44. 根据权利要求40的用途,其中所述单克隆抗体针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原,或免疫细胞抗原。

45. 根据权利要求39的用途,其中用富含主峰同工型的组合物获得和用分级分离前组合物获得的ADCC水平的比例R(由以下式限定):

$$R = \frac{\text{用富含主峰同工型的组合物获得的ADCC水平}}{\text{用分级分离前组合物获得的ADCC水平}}$$

是至少1.15,对应于ADCC水平增加至少15%。

46. 根据权利要求40的用途,其中用富含主峰同工型的组合物获得和用分级分离前组合物获得的ADCC水平的比例R(由以下式限定):

$$R = \frac{\text{用富含主峰同工型的组合物获得的ADCC水平}}{\text{用分级分离前组合物获得的ADCC水平}}$$

是至少1.15,对应于ADCC水平增加至少15%。

47. 离子交换层析、层析聚焦或疏水相互作用层析分级分离步骤(步骤a)接着是合并所获得的与层析图主峰相对应的层析级分的步骤(步骤b)的用途,用于增加针对给定抗原的单克隆抗体组合物通过补体诱导表达所述抗原的靶细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力,其中所述抗体在其Fc片段的N-糖基化位点上包含双天线复杂型聚糖结构并且包含小于或等于65%的岩藻糖含量,并且分级分离和合并目标层析级分后获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,所述主峰占步骤b)中获得的组合物的层析图的至少90%。

48. 根据权利要求47的用途,其中通过离子交换层析使用以下洗脱方式之一:离子力梯度、pH梯度、pH和离子力梯度或置换分子实施分级分离。

49. 根据权利要求47的用途,其中所述单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

50. 根据权利要求48的用途,其中所述单克隆抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

51. 根据权利要求47的用途,其中所述单克隆抗体针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原,或免疫细胞抗原。

52. 根据权利要求48的用途,其中所述单克隆抗体针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原,或免疫细胞抗原。

53. 根据权利要求47的用途,其中用富含主峰同工型的组合物获得和用分级分离前组合物获得的CDC水平的比例R(由以下式限定):

$$R = \frac{\text{用富含主峰同工型的组合物获得的CDC水平}}{\text{用分级分离前组合物获得的CDC水平}}$$

是至少1.15,对应于CDC水平增加至少15%。

54. 根据权利要求48的用途,其中用富含主峰同工型的组合物获得和用分级分离前组合物获得的CDC水平的比例R(由以下式限定):

$$R = \frac{\text{用富含主峰同工型的组合物获得的CDC水平}}{\text{用分级分离前组合物获得的CDC水平}}$$

是至少1.15,对应于CDC水平增加至少15%。

## 包含富集主要电荷同工型的抗体组合物的药物

### 发明领域

[0001] 本发明属于涉及借助ADCC摧毁靶细胞的机制的抗体疗法技术领域。它涉及作为药物使用的纯化抗体组合物,所述的纯化抗体组合物通过以下获得:借助层析对抗体组合物中天然存在的不同电荷同工型分离并且合并与层析图主峰相对应的一个或多个层析级分,因而获得富含所述主峰的单克隆抗体组合物,后者占获得的组合物的层析图的至少85%。

### 现有技术

[0002] 在过去十年期间,已经在以下各种治疗领域借助抗体、经常借助单克隆抗体大力开发被动免疫疗法治疗:癌症、Rhesus阴性怀孕女性中预防同种异体免疫、感染性疾病、炎性疾病以及尤其自身免疫疾病。

[0003] 尽管借助抗体的被动免疫疗法治疗如今已经显示其治疗益处,但是观察到的临床反应水平仍然不足,并且因此需要有可能增加临床反应并施用更小剂量的更高效抗体组合物,以便限制副作用。

[0004] 如同任何生物产品,抗体组合物本质上是不均一的。实际上,治疗中所用的抗体组合物在生物系统(细胞、转基因动物或植物)中产生,其中蛋白质通常并且因此尤其抗体经受众多翻译后修饰(酶促修饰或降解),这将在一种抗体分子与另一种抗体分子见不同并因而在产生的抗体组合物内部生成微小异质性。

[0005] 抗体是由四条多肽链组成的糖蛋白:以可变数目二硫键和非共价相互作用结合的两条总体上相同的重链(所谓“H”链即“重”链)和两个总体上相同的轻链(所谓“L”链即“轻”链)。这些链形成Y型结构,重链构成Y型结构的茎部并构成Y型结构的每条臂的一半,轻链构成Y型结构的每条臂的一半。每条轻链由一个恒定结构域(C<sub>L</sub>)和一个可变结构域(V<sub>L</sub>)组成;重链由一个可变片段(V<sub>H</sub>)和3个或4个恒定片段(C<sub>H1</sub>至C<sub>H3</sub>或C<sub>H4</sub>)组成,这取决于抗体同种型(IgG包含3个恒定片段C<sub>H1</sub>至C<sub>H3</sub>)。轻链(V<sub>L</sub>+C<sub>L</sub>)和重链V<sub>H</sub>结构域和C<sub>H1</sub>结构域的结合形成Fab片段,结合的结构域V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>负责识别抗原。两条重链的恒定结构域(C<sub>H2</sub>和C<sub>H3</sub>)或(C<sub>H2</sub>至C<sub>H4</sub>)形成恒定Fc片段。

[0006] 已知抗体经历以下翻译后修饰:重链或轻链末端修饰,Fc部分(和任选地Fab)糖基化、脱酰胺化、异构化、氧化、片段化和聚集(参见Vlasak等人,-2008)。

[0007] 大多数翻译后修饰导致抗体的表面电荷特性改变,或通过修饰带电荷基团的数目直接改变,或通过引入结构性修饰间接地改变,所述的结构性修饰本身调整带电荷残基的局部分布或改变它们的pKa。因此,全部这些修饰也均生成微小异质性,许多同工型具有同一种抗体的不同电荷,具有不同的等电点(pI),因此共存于抗体组合物内部(参见Vlasak等人,-2008)。

[0008] 在翻译后修饰当中,抗体恒定部分Fc的糖基化如今因强烈影响抗体的许多生物学特性而知名:体内半寿期(参见Wright等人,-1994),诱导ADCC反应(抗体依赖性细胞毒性细胞反应)的能力(参见Sato等人,-2006,Presta等人,-2006)、CDC反应(补体依赖性细胞毒反应,参见Wright等人,-1994,Presta等人,-2006)等。特别地,岩藻糖化聚糖形式的抗体组

合物的含量如今已知非常强烈地影响组合物在体内诱导ADCC反应的能力。

[0009] 相反,虽然许多文章旨在表征抗体组合物中存在的电荷同工型以判定商业批次单克隆抗体的再现性和质量,但是直到现在仍认为导致同一种抗体的许多不同电荷同工型在抗体组合物内部存在的其他翻译后修饰对抗体的体内生物学特性影响甚微或无影响。因此,虽然现有技术中通常认为就电荷同工型方面追踪商业批次抗体的质量是必不可少的,但是将这种追踪视为纯粹追踪产品质量并且从未存在建议为治疗目的,使用抗体组合物的极度富含特定电荷同工型的纯化级分。实际上,在没有显示明显影响抗体组合物的至少某些生物学特性的情况下,没有理由不使用整个组合物,没有理由使得制备方法复杂化和降低产率。现在,如上文所示,除了糖基化以外,直至现在仍认为导致抗体的许多不同电荷同工型在抗体组合物内存在的其他翻译后修饰不改变抗体的生物学特性。

[0010] 导致几种电荷同工型出现的修饰之一是酶促裂解抗体重链中的C末端赖氨酸。一旦抗体在表达羧肽酶的细胞中产生,则取决于抗体分子,这种裂解在不同水平发生。C末端赖氨酸的存在产生相当碱性的性质,原因在于赖氨酸的侧链。其一条重链或两条重链上的赖氨酸裂解因此产生酸性更强的同工型。通常,存在重链上具有0、1或2个C末端赖氨酸的同工型,因此产生具有略微不同pI的三种同工型(参见Vlasak等人,-2008)。关于这种特定修饰,Antes等人,-2007描述了通过等电聚焦(IEF)分析在血清存在或不存在情况下产生的在癌症被动免疫疗法中使用的批量人源化单克隆抗Lewis-YIGN311抗体。作者显示在血清存在或不存在情况下产生的抗体组合物的电荷同工型概况是不同的,在血清不存在下产生的组合物比血清存在下酶促切割抗体重链的C末端赖氨酸产生的组合物受影响更小。分析这种修饰对两种组合物诱导CDC反应的相应能力(借助补体)尚未显示与这种修饰相关的任何明显效应。

[0011] 导致几种电荷同工型在抗体组合物内部出现的另一类型修饰是N末端谷氨酰胺或谷氨酸残基环化,这导致焦谷氨酸盐(pE)基团的形成并且因此导致酸性更强的同工型。这种修饰在完整抗体组合物中以不同水平系统出现,但不认为它能够影响抗体的功能特性(参见Vlasak等人,-2008)。

[0012] 导致几种电荷同工型在抗体组合物内部出现的再一类型修饰是形成共价加合物和明显糖化现象(非酶促地添加糖),尤其在赖氨酸残基上,这产生酸性更强的同工型。也不认为这种类型的修饰能够影响抗体的功能特性(参见Vlasak等人,-2008)。

[0013] 导致几种电荷同工型在抗体组合物内部出现的另一个寻常类型修饰是天冬酰胺残基的脱酰胺化和天冬氨酸残基的异构化,这产生酸性更强的同工型。在抗体的恒定部分中,对脱酰胺化现象敏感的天冬酰胺残基位于CH3结构域,远离FcRn受体和Fc $\gamma$ R受体结合位点。因此通常不认为这些修饰能够影响抗体的功能特性(参见Vlasak等人,-2008)。Khawli等人,-2010和Gandhi等人,-2011描述了使用阳离子交换树脂以层析技术分离被动免疫疗法中所用单克隆抗体组合物的主要同工型、酸性同工型和碱性同工型;对导致几种同工型存在的翻译后修饰的分析;以及研究三种纯化级分(酸性级分、主要级分和碱性级分)的药代动力学特性和某些功能特性的研究。在两种情况下,天然组合物的层析图总是显示一个由包含酸性同工型的峰和包含碱性同工型的峰包围的主峰。鉴定的翻译后修饰尤其包括某些二硫键还原(Khawli等人,-2010)、糖化(Khawli等人,-2010;Gandhi等人,-2011)、脱酰胺化(Khawli等人,-2010;Gandhi等人,-2011)、切割重链C末端赖氨酸(Khawli等人,-

2010;Gandhi等人,-2011)、存在聚集物(Gandhi等人,-2011)、氧化现象(Gandhi等人,-2011)。药代动力学特性的分析(FcRn结合及体内检验,引自Khawli等人,-2010)没有作出三种所测试纯化级分在行为方面存在显著差异的任何展示。在这两篇文章中,还在效应细胞不存在的情况下测试了三种纯化级分抑制细胞系体外增殖的能力,其中所述细胞系表达抗体对其有特异性的抗原。这种检验有可能展示与抗原结合的能力和诱导凋亡的能力。虽然这两篇文章中酸性级分具有极轻微较低的能力,但是结果不明显并且因此没有在三种纯化级分之间观察到显著差异。另外在分离三种级分之前,与总抗体组合物相比,富含主要同工型的级分不具有增强的能力。

[0014] 另外,其他文献描述了如何分析和/或分离抗体的某些电荷同工型,但是没有比较不同同工型的效应子特性。因此,EP 1308456和W0 2004/024866描述了旨在移除单克隆抗体组合物酸性变体的层析方法,在纯化之前和之后尚未测试该组合物的效应子特性。而且,W02011/009623描述了旨在抑制单克隆抗体组合物酸性变体或碱性变体的层析方法,在纯化之前和之后尚未测试该组合物的效应子特性。另外,这份文献中描述的方法仅允许抑制单一类型的变体并且仅酸性变体的移除实际上适用。

[0015] 因此,除了已知对抗体的功能特性有影响的糖基化外,现有技术中可获得的涉及(从引起主要同工型的不同修饰)产生几种电荷同工型的其他翻译后修饰的要素,表明这些修饰对抗体的功能特性没有任何影响。

[0016] 但是,发明人已经令人惊讶地发现通过层析纯化的富含抗体组合物主要电荷同工型的级分具有借助CD16受体通过表达这种受体的效应细胞诱导效应子反应的显著更强能力。因此,富含抗体组合物主要电荷同工型的纯化级分有可能在体内诱导更强ADCC反应和更强CDC反应,并因此有可能增加临床反应和/或减少施用的剂量,因而限制副作用。

[0017] 发明简述

[0018] 本发明因此涉及一种可以通过以下方法获得的单克隆抗体组合物,所述方法包括:

[0019] a) 从细胞克隆、从非人类转基因动物或从转基因植物产生单克隆抗体组合物,

[0020] b) 通过层析将步骤(a)中获得的组合物分级分离,并且

[0021] c) 合并步骤b)中获得的与层析图主峰相对应的一个或几个层析级分,因而获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,后者占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少85%、有利地至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、更有利地至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、或甚至至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98.5%、至少99%或至少99.5%,

[0022] 其作为药物使用。

[0023] 有利地,通过标准离子交换层析、通过层析聚焦或通过疏水相互作用层析将步骤(a)中获得的组合物分级分离,实现步骤b)。

[0024] 有利地,离子交换层析使用以下洗脱手段之一:

[0025] • 离子力梯度;和/或

[0026] • pH梯度;或

[0027] • 置换分子。

[0028] 有利地,在用作药物的这种组合物中,至少95%、有利地至少96%、至少97%、至

少98%、或甚至至少98.5%、至少99%、或至少99.5%在组合物中存在的抗体的重链不包含任何C末端赖氨酸残基。

[0029] 本发明还涉及一种单克隆抗体组合物,其中至少95%、有利地至少96%、至少97%、至少98%、或甚至至少98.5%、至少99%、或至少99.5%在组合物中存在的抗体的重链不包含任何C末端赖氨酸残基,其作为药物使用。

[0030] 在作为本发明药物使用的组合物中,该抗体有利地针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原或病原体感染的细胞的抗原。

[0031] 特别地,优选以下实施方案:

[0032] -该抗体是抗Rhesus D抗体并且组合物意在预防Rhesus阴性个体中的同种异体免疫。

[0033] -该抗体针对癌细胞的抗原并且组合物意在治疗癌症,

[0034] -该抗体针对病原体感染的细胞的抗原并且组合物意在治疗由所述致病生物所致的感染,

[0035] -该抗体针对免疫细胞的抗原并且组合物意在治疗自身免疫疾病。

[0036] 在一个有利的实施方案中,在作为本发明药物使用的组合物中,抗体包含增加其与Fc $\gamma$ RIII受体结合和其借助Fc $\gamma$ RIII受体的效应子特性的Fc片段的修饰。作为本发明药物使用的组合物尤其可以在Fc片段中包含增加其与Fc $\gamma$ RIII受体结合和/或降低岩藻糖含量的突变。特别有利地,组合物中存在的抗体在其Fc片段的N-糖基化位点上具有双天线型聚糖结构,岩藻糖含量小于65%。

[0037] 在一个有利的实施方案中,在作为本发明药物使用的组合物中,抗体包含增加其与蛋白质C1q结合和其借助补体的效应子特性的Fc片段修饰。

[0038] 本发明还涉及层析分级分离步骤的用途,用于增加针对给定抗体的单克隆抗体组合物通过表达Fc $\gamma$ RIII受体(CD16)的免疫系统效应细胞诱导表达所述抗原的靶细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。

[0039] 本发明还涉及层析分级分离步骤的用途,用于增加针对给定抗体的单克隆抗体组合物通过补体诱导表达所述抗原的靶细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。

[0040] 附图简述

[0041] 图1.通过层析聚焦抗CD20抗体组合物的三种分离物获得的层析图(阴离子交换树脂(GE Life Sciences销售的柱Mono<sup>TM</sup>),通过递降pH梯度(通过使用两种缓冲液:缓冲液A(二乙醇胺25mM),缓冲液B(polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5)从9.5至8.0)洗脱。将抗体组合物脱盐,并注射20mg到柱上。收集2mL级分。收集级分33至50用于分析。

[0042] 图2.与借助阳离子交换层析的11份分离物相对应的11份层析图的叠加(与A相同的柱和洗脱)。将级分F1至F20收集并根据各峰分组:P1(酸性,F1至F3)、P2(酸性,F4和F5)、P3(酸性,F6)、P4(主要峰,F7至F10)、P5(碱性,F11)、P6(碱性,F12至F14)、P7(碱性,F15至F17)和P8(碱性,F18至F20)。

[0043] 图3.通过CEX产生的抗CD20抗体组合物的层析图。A.纯化之前抗CD20抗体组合物的层析图。B.分离(A)之前与层析图主峰相对应的装配级分1至20形成的组合物的层析图。显示了各种峰的百分数。

[0044] 图4.通过阳离子交换层析纯化的级分与CD16的结合(Biacore)。每份样品与CD16

的结合表述为参比样品与CD16结合的百分数。

[0045] 图5.通过层析聚焦(A)或通过阳离子交换层析(B)纯化的级分的CD16活性。每份样品的CD16活性(CD16Jurkat细胞分泌IL-2)表述为参比样品的CD16活性的百分数。

[0046] 图6.通过阳离子交换层析纯化的级分的补体依赖性细胞毒性(CDC)。每份样品的CDC反应表述为参比样品的CDC反应的百分数。

[0047] 发明详述

[0048] 本发明因此涉及一种可以通过以下方法获得的单克隆抗体组合物,所述方法包括:

[0049] a) 从细胞克隆、从非人类转基因动物或从转基因植物产生单克隆抗体 组合物,

[0050] b) 通过层析将步骤(a)中获得的组合物分级分离,并且

[0051] c) 合并步骤b)中获得的与层析图主峰相对应的一个或几个层析级分,因而获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,后者占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少85%、有利地至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、更有利地至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、或甚至至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98.5%、至少99%或至少99.5%,

[0052] 其作为药物使用。

[0053] 在步骤(a)中),从细胞克隆、从转基因动物或从转基因植物产生单克隆抗体组合物。

[0054] “抗体”或“免疫球蛋白”意指一种分子,所述分子包含至少一个与给定抗原结合的结构域和包含能够与FcR受体结合的Fc片段的恒定结构域。在大部分哺乳动物如人和小鼠中,抗体由4条多肽链组成:2条重链和2条轻链,所述链由可变数目的确保分子灵活性的二硫键连接在一起。每条轻链由一个恒定结构域(CL)和一个可变结构域(VL)组成;根据抗体同种型,重链由一个可变结构域(VH)和3个或4个恒定结构域(CH1至CH3或CH1至CH4)组成。在一些罕见哺乳动物如骆驼和羊驼中,抗体仅由两条重链组成,每条重链包含一个可变结构域(VH)和一个恒定区。

[0055] 可变结构域参与抗原识别,而恒定结构域参与抗体的生物学、药代动力学和效应子特性。

[0056] 不同于可变结构域(其序列从一种抗体至另一个抗体之间剧烈变动),恒定结构域以一种抗体至另一个抗体之间(典型地物种的和同种型的)非常接近的氨基酸序列为特征,同时任选地具有一些体细胞突变。Fc片段天然地由重链恒定区组成,不包括结构域CH1,即由下边界区域和恒定结构域CH2和CH3或CH2至CH4组成(取决于同种型)。在人IgG1中,完整Fc片段由始于位置226内半胱氨酸残基(C226)的重链C末端部分组成,在本说明书全文中Fc片段中氨基酸残基的编号是Edelman等人,-1969和 Kabat等人,-1991中描述的index Eu编号。其他类型免疫球蛋白的相应Fc片段可以由本领域技术人员通过序列的比对轻易鉴定。

[0057] Fc片段在CH2结构域中被糖基化,在2条重链的每一条上存在与第297位置内天冬酰胺残基(Asn297)结合的N-聚糖。

[0058] 位于Fc中的以下结合结构域对抗体的生物学特性是重要的:

[0059] -与FcRn受体结合的结构域,参与抗体的药代动力学特性(体内半寿期):

[0060] 不同数据表明位于CH2结构域和CH3结构域交界处的某些残基参与结合FcRn受体。

[0061] -与补体C1q蛋白结合的结构域,参与CDC反应(“补体依赖性细胞毒性”):位于CH2结构域内;

[0062] -FcR受体结合的结构域,参与吞噬或ADCC(“抗体依赖性细胞毒性”)型反应:位于CH2结构域内。

[0063] 在本发明的意义下,抗体的Fc片段可以是天然的,如上文定义,或可以另外以多种方式被修饰,前提是它包含与FcR受体(对于IgG而言,Fc $\gamma$ R受体)结合的功能性结构域和优选地与受体FcRn结合的功能性结构域。这些修饰可以包括缺失Fc片段的某些部分,前提是后者包含与受体FcR(对于IgG而言,受体Fc $\gamma$ R)结合的功能性结构域和优选地与受体FcRn结合的功能性结构域。这些修饰还可以包括能够影响抗体生物学特性的各种氨基酸置换,前提是后者包含与受体FcR结合的功能性结构域和优选地与受体FcRn结合的功能性结构域。特别地,当抗体是IgG时,它可以包含意在增强与受体Fc $\gamma$ RIII(CD16)结合的突变,如WO 00/42072、Shields等人,-2001、Lazar等人,-2006、WO 2004/029207、WO/2004063351、WO 2004/074455中所述。也可以存在允许增强与受体FcRn结合和因此增强体内半寿期的突变,例如Shields等人,-2001、Dall’Acqua等人,-2002、Hinton等人,-2004、Dall’Acqua等人,-2006(a)、WO 00/42072、WO 02/060919 A2、WO 2010/045193、或WO 2010/106180 A2中所描述。可以存在或不存在其他突变,如允许减少或增加与补体蛋白结合并因此减少或增加CDC反应的那些突变(参见WO 99/51642、WO 2004074455 A2、Idusogie等人,-2001、Dall’Acqua等人,-2006(b)和Moore等人,-2010)。

[0064] “单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”意指包含具有相同和独特抗原特异性的抗体分子的组合物。该组合物中存在的抗体分子可以在它们的翻译后修饰,和尤其在其糖基化结构或其等电点方面变动,但是全部由相同的重链序列和轻链序列编码并且因此在任何翻译后修饰之前具有相同的蛋白质序列。然而,蛋白质序列中与翻译后修饰(如例如切割重链C末端赖氨酸、天冬酰胺残基脱酰胺化和/或天冬氨酸残基异构化)相关的某些差异可以在组合物中存在的各种抗体分子之间存在。

[0065] 在本发明范围内作为药物使用的组合物中存在的单克隆抗体可以有利地是嵌合的,人源化的或人的。实际上,这有可能避免患者对所施用抗体产生免疫反应。

[0066] “嵌合”抗体意指一种抗体,所述抗体含有衍生自给定物种抗体的天然可变区(轻链和重链),所述天然可变区与针对所述给定物种为异源的物种的抗体轻链和重链的恒定区结合。有利地,如果作为本发明药物使用的单克隆抗体组合物包含嵌合单克隆抗体,则后者包含人类恒定区。始于非人类抗体,嵌合抗体可以通过使用本领域技术人员熟知的遗传重组技术制备。例如,可以通过针对重链和轻链而克隆包含启动子和编码非人类抗体可变区的序列和编码人抗体恒定区的序列的重组DNA,产生嵌合抗体。就用于制备嵌合抗体的方法,例如可以参考文献Verhoeyn等人,-1988。

[0067] “人源化”抗体意指一种抗体,所述抗体含有衍生自非人类来源的抗体的CDR区,抗体分子的其他部分衍生自一种(或几种)人抗体。另外,可以修饰主链区段(称作FR)的某些残基以保留结合亲和力(Jones等人,-1986;Verhoeyn等人,-1988;Riechmann等人,-1988)。本发明的人源化抗体可以通过本领域技术人员已知的技术制备,如“CDR移植”、“表面重塑”、超人源化、“Human string content”、“FR文库”、“导向选择”、“FR改组”和“人类工程化(Humaneering)”技术,如Almagro等人,-2008的综述中总结。

[0068] “人”抗体意指其完整序列是人源的抗体,即已经通过重组编码抗体的人基因产生其编码序列的抗体。实际上,现在可以产生当免疫时能够在不产生内源免疫球蛋白的情况下产生完整成套人抗体的转基因动物(例如小鼠)(参见Jakobovits等人,-1993(a)和(b); Bruggermann等人,-1993;和Duchosal等人,-1992,美国专利5,591,669,5,598,369,5,545,806,5,545,807,6,150,584)。人抗体也可以从噬菌体展示库获得(Hoogenboom等人,-1991; Marks等人,-1991;Vaughan等人,-1996)。

[0069] 抗体可以具有几种同种型,这取决于其恒定区的性质:恒定区 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\epsilon$ 和 $\delta$ 分别地对应于IgG、IgA、IgM、IgE和IgD免疫球蛋白。有利地,在本发明范围内作为药物使用的组合物中存在的单克隆抗体是IgG同种型。实际上,这种同种型显示在最大数目个体(人)中产生ADCC(“抗体依赖的细胞毒性”)活性的能力。 $\gamma$ 恒定区包括几个亚型: $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ (这三个类型的恒定区具有结合人补体的特殊性)和 $\gamma 4$ ,因而产生亚型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。有利地,在本发明范围内作为药物使用的组合物中存在的单克隆抗体是同种型IgG1或IgG3,优选地是IgG1。

[0070] 可以通过本领域技术人员熟知的技术,由细胞克隆、非人类转基因动物或转基因植物产生单克隆抗体的组合物。

[0071] 尤其,产生组合物的细胞克隆可以通过3项主要技术获得:

[0072] 1) 通过产生目的抗体的B淋巴细胞与永生化细胞系融合获得杂交瘤,

[0073] 2) 通过Epstein-Barr病毒(EBV),使产生目的抗体的B淋巴细胞永生化,

[0074] 3) 分离编码目的抗体(通常从杂交瘤或永生化B淋巴细胞)的序列,在一个或几个载体中克隆编码抗体重链和轻链的表达序列,用表达载体转化细胞系并分离获得的不同细胞克隆。抗体重链和轻链的表达载体包含表达编码抗体重链和轻链的序列所需要的元件,并且尤其包含启动子、启动转录的密码子、终止序列和调节转录的合适序列。这些元件根据用于表达的宿主变动并且由本领域技术人员在考虑其常识情况下容易地选择。载体 尤其可以是质粒或病毒。转化技术也是本领域技术人员熟知的。

[0075] 最常使用编码抗体重链和轻链的序列的一个或几个表达载体转化细胞系,尤其为了获得嵌合抗体或人源化抗体。

[0076] 转化的细胞株系优选地是真核来源并且可以尤其选自昆虫、植物、酵母或哺乳动物细胞。随后可以通过在合适条件下培育宿主细胞产生抗体组合物。产生抗体的合适细胞系尤其包括选自以下的细胞系:SP2/0;YB2/0;IR983F;人骨髓瘤Nama1wa;PERC6;CHO系、尤其CHO-K-1、CHO-Lec10、CHO-Lec1、CHO-Lec13、CHOPro-5、CHO dhfr<sup>-</sup>或两个等位编码基因FUT8基因和/或GMD基因缺失的CHO系;Wil-2;Jurkat;Vero;MoIt-4;COS-7;293-HEK;BHK;K6H6;NS0;SP2/0-Ag14、P3X63Ag8.653、鸭胚细胞系**EB66®**(Vivalis);和大鼠肝癌系H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)(参见WO 2012/041768)。在一个优选实施方案中,抗体在以下细胞系之一中产生:YB2/0;两个等位编码基因FUT8基因和/或GMD基因缺失的CHO系;胚胎鸭细胞系**EB66®**(Vivalis);和大鼠肝癌系H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)。在一个优选实施方案中,抗体在YB2/0(ATCC CRL-1662)中产生。

[0077] 备选地,抗体组合物可以在非人类转基因动物中产生。

[0078] 可以通过在受精卵中直接注射目的基因(这里,编码抗体重链和轻链的重排基因)获得非人类转基因动物(Gordon等人,-1980)。也可以通过以下方式获得非人类转基因动

物:在胚胎干细胞中引入目的基因(这里,编码抗体重链和轻链的重排基因)并通过嵌合体聚集法或嵌合体注射法制备动物(参见Manipulating the Mouse Embryo,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994);Gene Targeting,A Practical Approach,IRL Press at Oxford University Press(1993))。也可以通过下述克隆技术获得非人类转基因动物,其中将已经引入目的基因(这里,编码抗体重链和轻链的重排基因)的细胞核移植入去核的卵中(Ryan等人,-1997;Cibelli等人,-1998,WO 0026357 A2)。可以通过上述方法制备产生目的抗体的非人类转基因动物。抗体随后可以在转基因动物中积累并收获,尤其从该动物的乳或卵收获。关于在非人类转基因动物的乳中产生抗体,制备方法尤其在WO9004036 A1、WO9517085 A1、WO 0126455 A1、WO 2004050847 A2、WO 2005033281 A2、WO 2007048077 A2中描述。从乳纯化目的蛋白的方法也是已知的(参见WO 0126455 A1、WO 2007106078 A2)。目的非人类转基因动物尤其包括小鼠、兔、大鼠、山羊、牛(尤其奶牛)和家禽(尤其鸡)。

[0079] 抗体组合物可以在转基因植物中产生。已经在转基因植物中产生许多抗体并且获得表达目的抗体的转基因植物和回收抗体所需的技术是本领域技术人员熟知的(参见Stoger等人,-2002,Fisher等人,-2003,Ma等人,-2003,Schillberg等人,-2005)。还可能影响植物中获得的糖基化以便获得接近于天然人抗体的糖基化(无木糖)并且进一步轻微岩藻糖化,例如借助小干扰性RNA(Forthal等人,-2010)。

[0080] 在允许获得根据本发明用作药物的单克隆抗体组合物的该方法步骤b)中,通过层析将步骤a)中获得的组合物分级分离,分离在步骤a)中获得的组合物中存在的抗体的不同电荷同工型。

[0081] 如引言中解释,由细胞克隆、非人类转基因动物或转基因植物产生的任何单克隆抗体组合物以存在相同单克隆抗体的某种数目的电荷同工型或变体为特征。这些不同电荷同工型或变体的存在与存在导致抗体表面电荷特性改变的翻译后修饰相关,所述改变通过修饰带电荷基团的数目直接引起,或通过引入结构性修饰间接地引起,所述的结构修饰本身调整带电荷残基的局部分布或改变它们的pKa。每种电荷同工型或变体以其等电点(pI,进一步称作等电氢电势(pHI))为特征,所述等电点对应于这种分子的总体电荷是零时的pH(氢电势)或,换言之,分子呈电中性(两性离子形式或混合型离子)时的pH。在给定的pH,单克隆抗体的不同电荷同工型或变体将因此具有可变净电荷,pI小于携带负电荷的pH的那些同工型或变体(分子趋向于放出其质子至碱性介质),pI等于中性pH的那些同工型或变体,和pI大于携带正电荷的pH的那些同工型或变体(分子趋向于保留其质子或从酸性介质捕获一些质子)。单克隆抗体的不同电荷同工型或变体以可变比例存在,这取决于每种变体上存在的翻译后修饰的频率。单克隆抗体组合物通常包含主要变体或同工型,伴随多种所谓的酸性或碱性变体或同工型,这取决于它们的pI是否小于或大于主要同工型的pI。取决于抗体、其产生模式和它可能已经经历过的纯化步骤,酸性同工型、主峰和碱性同工型的比例(从离子交换层析的层析图计算)通常围绕以下值变动:10%至30%的酸性同工型、50%至75%的主峰和8%至20%的碱性同工型(参见Farnan等人,-2009,Rea等人,-2011,Rea等人,-2012,Khawli等人,-2010,Zhang等人,-2011,WO 2011/009623,和EP1308456)。

[0082] 因为就pI和给定pH时的净电荷而言它们存在差异,所以可以通过不同层析技术分离给定抗体组合物中存在的抗体的电荷同工型。

[0083] 层析是一项基于运行的流动相和静止相(或固定相)之间行为差异而分离化学物质(液态或气态均匀混合物)的技术。层析方法可以根据所用的相或根据分离中所用的现象的性质划分。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,通过离子交换层析实现步骤b)的分级分离。实际上,这允许分离相同蛋白质的电荷同工型。在离子(阴离子或阳离子)交换层析中,将引起不同组分分离的参数是它们的净电荷。

[0085] 首先将抗体组合物加载于离子交换树脂上。为此,使用带正电荷(阴离子交换层析)或带负电荷(阳离子交换层析)的树脂(固定或静止相)。其电荷与树脂离子的电荷相反分子将留下/固定在树脂上。

[0086] 可以使用本领域技术人员已知和适于分离目的抗体组合物的任何类型的阳离子或阴离子交换树脂(无论强或弱)。取决于其蛋白质序列,抗体组合物的平均等电点(pI)通常在5和9之间变动,最经常在7和9之间变动。对于大于8的pI,使用阳离子交换树脂。相反,对于小于6的pI,使用阴离子交换树脂。对于在6和8之间所包含的pI,可以测试两种类型的离子(阳离子或阴离子)交换树脂。因此,即便最经常使用阳离子交换层析(带负电荷的树脂),接着用离子力梯度洗脱,在某些情况下仍可能使用阴离子交换层析(带正电荷的树脂)。

[0087] 离子交换树脂通常由其上接枝有带正电荷基团(阴离子交换树脂)或带负电荷基团(阳离子交换树脂)的交联聚合物或凝胶组成。交联聚合物或凝胶尤其可以选自葡聚糖(例如 **Sephadex®**)、琼脂糖(例如 **Sepharose®**)、纤维素、甲基丙烯酸酯聚合物(例如 **Fratogel®**)、乙烯基聚合物(例如 **Fractoprep®**)如聚(苯乙烯二乙烯基苯)(例如 **Monobeads™**; **Source™**; **Bio MabNP-5**或**NP-10**; **Sepax Antibodix™NP1.7**、**NP3**、**NP5**和**NP10**)。

[0088] 凝胶可以有利地作为平均直径在10和200 $\mu$ m之间的小珠出现。

[0089] 对于阳离子交换树脂,将带负电荷基团接枝于交联聚合物上,如磺丙基(SP)型、甲基磺酸酯(S)型或羧甲基(CM)型基团。

[0090] 对于阴离子交换树脂,将带正电荷基团接枝于交联聚合物上,如季铵型(Q)、尤其季氨乙基(QAE)、二乙基氨基乙基(DEAE)、二甲基氨基乙基(DMAE)、三甲基氨基乙基(TMAE)或二甲基氨基丙基(ANX)型基团。

[0091] 可以在本发明范围内使用的阳离子交换树脂包括树脂**Source™15S**或**30S**、**Mono-S**(GE Life Sciences销售); **ProPac®WCX**(尤其 **ProPac®WCX-10**)、**ProPac®SCX**(尤其 **ProPac®SCX-10**或**SCX-20**)、**ProSwift WCX**、**MABPac®SCX**(尤其 **MABPac®SCX-10**)(**Dionex**销售); **Bio Mab**(尤其**Bio MabNP-5**或**NP-10**,**Agilent**销售)、**PL-SCX**(**Agilent**销售); **Sepax Antibodix™**(尤其**Sepax Antibodix™NP1.7**、**NP3**、**NP5**和**NP10**)(**Sepax**销售)(参见Farnan等人,-2009,Khawli等人,-2010,Gandhi等人,-2011,Zhang等人,-2011,Rea等人,-2011和McAtee等人,-2012)。另外可以在本发明范围内使用的阴离子交换树脂包括树脂**Source™15Q**或**30Q**、**Mono™-Q**(GE Life Sciences销售); **ProPac®WAX**(尤其 **ProPac®WAX-10**)、**ProPac®SAX**(尤其 **ProPac®SAX-10**)(**Dionex**销售)。

[0092] 一旦抗体组合物加载于离子交换树脂上,不同的洗脱方法可以用于分离电荷同工型。

[0093] 固定分子的洗脱可以尤其通过使用含有其电荷与树脂离子的电荷相反的离子的洗脱缓冲液(流动相)实现,所述离子将与固定的分子竞争与树脂带有的电荷相互作用。可能直接使用含有高离子浓度的缓冲液(为了一次性洗脱全部分子)或相反逐渐地增加离子浓度(这种离子浓度则称作离子力梯度),这有可能根据不同分子与树脂的静电相互作用力,使这些分子依次脱离。实践上,在后一种情况下,使用两种缓冲液,一种具有低离子浓度和另一种具有高离子浓度。根据随时间变动的比率,两台驱动泵吸入并混合这两种溶液(强离子浓度溶液的比例逐渐增加)。将这种混合的产物用于柱中。在Gandhi等人,-2011中描述了以这项技术分离抗体组合物的电荷同工型的具体方法的例子。Rea等人,-2012还描述了这项技术的原理,以及如何适当选择柱、缓冲液和运行参数以分离抗体的电荷同工型或变体(参见第7节第447-451页)。

[0094] 在备选的离子交换层析中,不用离子力梯度,而用pH梯度实现洗脱。实际上,许多可电离基团是pH敏感的。随着pH梯度递增(即通过增加pH),有利于(带负电荷的)酸基的电离并且不利于(带正电荷的)碱性基团的电离。通过增加pH,因此有利于携带pH敏感性可电离基团的分子出现净负电荷。渐增的pH梯度因此还允许分离在带负电荷的树脂(阳离子交换剂)上固定的抗体组合物的电荷同工型。随着pH梯度递减(即通过降低pH),有利于(带正电荷的)碱性基团的电离并且不利于(带负电荷的)酸基的电离。通过降低pH,因此有利于携带pH敏感性可电离基团的分子出现净正电荷。递减的pH梯度因此还可能分离在带正电荷的树脂(阴离子交换剂)上固定的抗体组合物的电荷同工型。在Farnan等人,-2009和Rea等人,-2011中描述了通过采用pH梯度洗脱的离子交换层析分离抗体的电荷同工型的具体方法的例子。Rea等人,-2012还描述了这项技术的原理,以及如何适当选择柱、缓冲液和运行参数以分离抗体的电荷同工型或变体(参见第8节第451-452页)。实施例1还描述通过阳离子交换层析和递增pH梯度洗脱分离抗体组合物的电荷同工型。

[0095] 在离子交换层析的另一个备选方案中,也可以通过组合离子力梯度和pH梯度(所谓“杂交”洗脱)实现洗脱,如Rea等人,-2012(参见第9节第453页)中所述。

[0096] 在离子交换层析的又一个备选方案中,其称作“置换离子交换层析”并且也允许分离抗体组合物的电荷同工型,也使用离子(阴离子或阳离子)交换树脂作为固定相或静止相,但是不通过离子力和/或pH梯度而借助置换分子(即对层析树脂具有强亲和力的分子)实现洗脱,所述置换分子将与事先固定在树脂上的抗体分子竞争结合到树脂上,并且因此置换出与置换分子相比对树脂具有较低亲和力的抗体分子。将因此通过置换分子波迫使抗体分子沿柱迁移。随着置换分子波穿过柱,一个新平衡建立,其中抗体分子彼此竞争树脂上仍可获得的结合位点。在这个动态平衡过程期间,抗体的不同电荷变体或同工型根据它们对离子交换树脂的更大或更小的亲和力分离。这种层析分离方法的原理以及其应用于分离抗体组合物的电荷同工型所要求的树脂、缓冲液和材料尤其在Khawli等人,-2010,Zhang等人,-2011,和McAtee等人,-2012中描述。

[0097] 在离子交换层析的这些不同洗脱模式中,可以根据所选择的柱,使用任何合适的洗脱(pH或离子力梯度)或置换缓冲液。树脂和相关缓冲液的例子在Farnan等人,-2009,Khawli等人,-2010,Gandhi等人,-2011,Zhang等人,-2011,Rea等人,-2011和McAtee等人,-2012中描述。

[0098] 允许分离抗体组合物的电荷同工型的另一项层析技术是层析聚焦。在这项技术

中,蛋白质根据其等电点(pI)分离。这项技术基于使用特定树脂(固定相或静止相)和特定两性缓冲液的组合。尤其,获得线性pH梯度要求用于分离的整个pH范围内均等的缓冲液体积,因此要求特别设计用于这种应用的缓冲液和用带电荷的缓冲剂胺取代的树脂。

[0099] 这种分离的原理如下:层析聚焦树脂用pH比要求的最高pH略大的起始缓冲液平衡。使洗脱缓冲液(调节至要求的最低pH)穿过该柱并且开始滴定树脂的胺和蛋白质的胺。随着洗脱缓冲液穿过柱降低pH并且生成渐降性pH梯度。在柱上已经通过第一体积的洗脱缓冲液后,将样品施加至该柱。一旦将样品的蛋白质引入柱中,则滴定这些蛋白质(调整pH)。处在高于其pI的pH的那些蛋白质带负电荷并且靠近柱顶部滞留(通过与带正电荷的胺基结合)。处在低于其pI的pH的蛋白质开始沿柱随缓冲液流一起迁移并且将在到达其中pH大于其pI的区域之前不与柱结合。这是分离过程的开始。

[0100] 逐渐地,随着pH在柱顶部继续下降(pH梯度的时间依赖性变化),其pI大于新pH的任何蛋白质将变得带正电荷的,受带正电荷的胺基驱逐并且开始沿柱随洗脱缓冲液一起迁移,其迁移比pH梯度的迁移更迅速。逐渐地,随着这种蛋白质沿柱迁移,pH升高。当蛋白质到达其中pH大于其pI的区域时,它再次变得带负电荷并再次与柱结合。它仍保持结合直至移动的pH梯度降低局部pH低于其pI,此刻它再次变得带正电荷并再次开始迁移。这个过程重复直至蛋白质在接近于其pI的pH处从柱洗脱。

[0101] 这项技术的名称来自该技术的聚焦效应。实际上,在pH递降梯度中,蛋白质可以按三种电荷状态存在:正、负或中性。另外,在层析聚焦中,随着pH梯度形成并且随着蛋白质迁移穿过柱的不同pH区域,蛋白质电荷的状态连续地变动。在某个区域后部的分子将比同一个区域前面的那些分子迁移得更快,逐渐形成日益狭窄的蛋白质条带,每个条带对应于一种或几种具有相同pI的蛋白质。

[0102] 因此,在聚焦层析中,随着pH梯度形成,具有不同pI的蛋白质以不同速率逐渐地穿过柱迁移,连续地结合携带带正电荷缓冲胺基的树脂并从中解离,同时逐渐聚集成为狭窄条带并最终洗脱。具有最高pI的蛋白质首先洗脱,而具有最低pI的蛋白质将最后洗脱。

[0103] 用于层析聚焦分离的树脂基于标准树脂(如上文所述的交联聚合物或凝胶,优选地如上文所述的小珠),尤其聚(苯乙烯二乙烯基苯)型或交联琼脂糖型标准树脂,后者以接枝带正电荷的缓冲胺基为特征。这些带正电荷的缓冲胺基尤其是仲胺基、叔胺基和/或季胺基。可用于层析聚焦中的树脂的例子包括由GE Life Sciences或GE Healthcare销售的Mono™-P柱(以仲胺基、叔胺基和/或季胺基接枝的交联聚(苯乙烯二乙烯基苯)、PBE94和PBE118(以通过醚键与单糖结合的仲胺基、叔胺基和/或季胺基接枝的交联6%琼脂糖树脂)。Mono™-P和PBE94柱适于pH 9和pH 4之间分离,而柱PBE118适于以高于pH 9起始的pH梯度分离。优选Mono™-P和PBE94柱,并且尤其优选柱Mono™-P。

[0104] 使用的起始缓冲液尤其可以基于不同pH的二乙醇胺、Tri、三乙醇胺、bis-Tris、三乙胺、乙醇胺、咪唑、组氨酸或哌嗪溶液(添加HCl型酸、乙酸或亚氨基二乙酸)。

[0105] 使用的洗脱两性缓冲液尤其包括缓冲液Polybuffer 74(对于Mono™-P柱和PBE94柱,pH范围:7-4)、Polybuffer 96(对于Mono™-P柱和PBE94柱,pH范围:9-6,)和Pharmalyte pH 8-10.5(对于PBE118柱,pH范围:11-8)。

[0106] 使用和选择这些缓冲液的具体说明从这些柱的制造商可获得。

[0107] 允许分离抗体组合物的电荷同工型的又一个层析技术是疏水相互作用层析。

[0108] 因此,有利地,在允许获得根据本发明用作药物的单克隆抗体组合物的方法的步骤b)中,通过以下层析技术之一实现步骤a)的分级分离:

[0109] • 采用离子力梯度洗脱的离子(阴离子或阳离子)交换层析(采用离子力梯度的离子交换层析),

[0110] • 采用pH梯度洗脱的离子(阴离子或阳离子)交换层析(在阳离子交换情况下递增,在阴离子交换情况下递减)(采用pH梯度的离子交换层析),

[0111] • 采用离子力和pH梯度洗脱的离子(阴离子或阳离子)交换层析(杂交离子交换层析),

[0112] • 采用置换分子洗脱的离子(阴离子或阳离子)交换层析(置换离子交换层析),

[0113] • 层析聚焦,和

[0114] • 疏水相互作用层析。

[0115] 有利地,在允许获得根据本发明用作药物的单克隆抗体组合物的方法的步骤b)中,通过以下层析技术之一实现步骤a)的分级分离:

[0116] • 离子交换层析(无论洗脱模式是什么),尤其具有pH梯度的离子交换层析,和

[0117] • 层析聚焦。

[0118] 特别地,发明人能够用可以在本发明范围内使用的两项不同技术分离单克隆抗体组合物的电荷同工型或变体:

[0119] • 层析聚焦:柱Mono™ P(GE Life Sciences),通过递降pH梯度(通过使用两种缓冲液:缓冲液A(二乙醇胺25mM),缓冲液B(polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5)从9.5至8.0)洗脱。

[0120] • 阳离子交换层析(柱SCX,MabPac,Dionex),通过递增pH梯度洗脱(缓冲液A:20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,60mM NaCl(pH 6);缓冲液B:20mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,60mM NaCl(pH 10),梯度:60分钟内10%至60的缓冲液B)。

[0121] 通过允许分离电荷同工型的层析技术获得的抗体组合物的层析图总是包含被小峰围绕的一个主峰,所述主峰包含主要电荷同工型以及类似于主要同工型的其他同工型(即相对于主要同工型而言没许多修饰和因此pI和给定pH处的净电荷非常接近于主要同工型),所述小峰在一方面包含所谓“酸性”同工型和另一方面包含所谓“碱性”同工型,“酸性”同工型的pI低于主要同工型的pI,“碱性”同工型的pI高于主要同工型的pI(参见图1-2)。

[0122] 取决于使用的层析技术,不同的同工型出现在层析图上并按以下顺序洗脱:

[0123] • 使用阳离子交换层析(带负电荷的树脂)时,无论洗脱模式是什么(通过离子力梯度、pH梯度、pH和离子力梯度或通过置换分子洗脱):酸性同工型(其正电荷数少于主要同工型)首先洗脱,随后是主要同工型,并且接着是碱性同工型(其正电荷数多于主要同工型)(参见Khawli等人,-2010的图1,Rea等人,-2012的图3;Farnan等人,-2009的图1和Rea等人,-2011的图1;Zhang等人,-2011的图1和McAtee等人,-2012的图8.10.2;和本说明书的图2);

[0124] • 使用阴离子交换层析(带正电荷的树脂)时,无论洗脱模式是什么(通过离子力梯度、pH梯度、pH和离子力梯度或通过置换分子洗脱):碱性同工型(其负电荷数少于主要同工型)首先洗脱,随后是主要同工型,并且接着是酸性同工型(其负电荷数多于主要同工型);

[0125] • 层析聚焦:碱性同工型首先洗脱,随后是主要同工型,并且接着是 酸性同工型(参见本说明书图1)。

[0126] 也可以用除层析之外的技术分离在细胞克隆、非人类转基因动物或转基因植物产生的抗体组合物内部存在的抗体的电荷同工型或变体。但是,如果这些技术对于分析或表征电荷同工型或变体目的极为可用,则它们不允许以可接受的产率分离这些同工型并且因此极少用于制备性目的。

[0127] 在这类其他技术当中,尤其可以提到等电聚焦法(就“等电聚焦法”而言也即“IEF”,并且也称作电聚焦法)。

[0128] 等电聚焦法(IEF)的基本原理是在凝胶(任选地包含在毛细管内)中产生pH梯度,在其中受到电场作用的蛋白质可以移动。蛋白质将在这个电场中迁移。一旦到达与其pI相对应的pH处,它们将固定化,原因是它们的净电荷将是零。以这种方式,可以根据pI分离制备物的蛋白质。可以用携带某个数目可正离子化或可负离子化基团(胺、羧基或硫酸根)并具有某种缓冲容量的聚电解质产生这种pH梯度。这些分子称作两性电解质。如果这些两性电解质接受在阳极处受强酸溶液限制并且在阴极处受强碱溶液限制的电场作用,则它们将迁移并且按其pI的顺序分布。它们的缓冲容量将有助在其周围维持等于其pI的小pH范围。一系列各自具有覆盖某个pH范围的pI的两性电解质将因此产生一个连续pH梯度。如果在这个系统中其形成后或期间造成少量蛋白质迁移,则这些蛋白质也将迁移并且将在它们的pI处固定。

[0129] 作为这种凝胶的惰性基质,可以使用琼脂糖、丙烯酰胺或更罕见使用葡聚糖,其中将形成pH梯度。最经常使用聚丙烯酰胺凝胶。由于仅pI应当影响迁移,所以不得不使用丙烯酰胺的浓缩物,相对小蛋白质,所述浓缩物的孔隙率将不减缓大蛋白质,但是足够结实,从而容易操作。5-6%凝胶通常是足够的。

[0130] 阳极的缓冲液是强酸,通常是磷酸。在阴极,投放强碱,经常是三乙醇胺。

[0131] 在混合物中包含两性电解质以在其聚合之前制备凝胶。这些分子,作为聚电解质,在电场中移动并且按其自身pI的顺序彼此定位。许多企业生产涵盖非常狭窄或非常宽pH范围的多种两性电解质混合物:**Ampholine®**(尤其Sigma Aldrich销售的**Ampholine®**pH 6/8和**Ampholine®**pH 7/9)、**Pharmalyte®**(尤其Sigma Aldrich和GE Healthcare、Life Sciences销售的**Pharmalyte®**pH 8/10.5)、**BioLite®**(尤其Bio-Rad销售的**BioLite®**pH 6/8、**BioLite®**pH 7/9和**BioLite®**pH 8/10)、**Zoom®**(尤其Lifetechnologies/Invitrogen销售的**Zoom®**pH 6/9)、**Servalyt™**(尤其Serva销售的**Servalyt™**pH 6/8、**Servalyt™**pH 6/9、**Servalyt™**pH 7/9)、**SinuLyte™**(尤其Sinus销售的**SinuLyte™**pH 6/8、**SinuLyte™**pH 6/9、**SinuLyte™**pH7/9、**SinuLyte™**pH 8/10)等。在两个电极之间施加电压时,每种两性电解质将移动尽量远直到其等电点为止并将在那里变得固定。可以通过组合多种两性电解质生成具有各种pH幅度的梯度。特别地,为了分析抗体组合物中的电荷同工型,可以在以抗体的平均pI为中心并且与不同同工型的pI范围相对应的小pH范围(例如在pH 6和pH 8之间或在pH 7和pH 9之间)上产生在每种两性电解质之间间距非常小(例如0.1个pH单位)的梯度,从而允许非常细微地分离不同电荷同工型。

[0132] 待分析的抗体组合物可以在凝胶聚合后添加或在聚合之前直接添加在混合物中。

由于抗体大于两性电解质,它们的迁移将缓慢得多并且两性电解质因此可以在抗体大幅度之前早早在它们的pI处稳定。

[0133] 迁移时间并非关键。实际上,当抗体将在其中它们本将达到其pI的点处固定时,抗体没有离开凝胶的风险。迁移仅应当持续足够长的时间,从而两性电解质具有恰当迁移的时间并且抗体具有达到其pI的时间。在2mA,估计要求的时间是约1小时。

[0134] 在迁移后,可以将凝胶染色以分析抗体组合物中存在的不同电荷同工型。可以通过标准电泳中使用的任何常规技术实现染色。但是,两性电解质应当从凝胶移除,因为它们可能变得着色。因此通常,通过在5%或10%三氯乙酸浴中浸泡或原位固定抗体的同时使两性电解质从凝胶扩散出去后,进行染色。

[0135] 使用具有给定pI的标记可能相当特异地确定不同电荷同工型的pI。

[0136] 在染色之后,IEF中分离的每种电荷同工型的所分析组合物相对于总同工型的比例可以借助图像分析软件包定量,例如Bio-Rad销售的软件包Quantity One®。虽然非常精确和灵敏地分离抗体组合物中存在的电荷同工型,但是等电聚焦技术并不可能轻易收获分离的同工型并且因此通常出于分析和定量目的使用,而非出于制备性分离不同同工型的目的使用。

[0137] 在方法的步骤c)中,通过以下步骤获得意在作为药物使用的本发明目的组合物:合并步骤b)中获得的与层析图主峰相对应的一个或几个层析级分,因而获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,后者占步骤c)中获得的组合物的层析图的至少85%、有利地至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、更有利地至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、或甚至至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少98.5%、至少99%或至少99.5%。

[0138] 有利地,在用作药物的本发明组合物中,至少95%、有利地至少96%、至少97%、至少98%、或甚至至少98.5%、至少99%、或至少99.5%在组合物中存在的抗体的重链不包含任何C末端赖氨酸残基。

[0139] 本发明还涉及一种单克隆抗体组合物,其中至少95%、有利地至少96%、至少97%、至少98%、或甚至至少98.5%、至少99%、或至少99.5%在组合物中存在的抗体的重链不包含任何C末端赖氨酸残基,其作为药物使用。实际上,组合物中存在的抗体的碱性同工型具有至少一条带C末端赖氨酸残基的重链。这种组合物因此只包含主要同工型和酸性同工型。由于就借助Fc $\gamma$ R1IIII和借助补体(参见实施例)实现的效应子功能而言,碱性同工型并不非常有效并且在纯化之前占约8%至20%(如通过层析所测量),所以在排除碱性同工型之前,这种组合物能够借助Fc $\gamma$ R1IIII诱导比总组合物更强的ADCC和更强的CDC反应。这种组合物可以通过如上文所述的层析分离获得,然而,收集的级分在这种情况下对应于酸性同工型和主要同工型的级分。

[0140] 可以通过上述方法获得并且意在作为药物使用的抗体组合物可以用于可用单克隆抗体治疗的任何病变中,尤其当通过ADCC或通过CDC破坏靶细胞可用于治疗时。

[0141] 如今,已知ADCC是被动免疫疗法治疗的临床效率的重要机制,所述被动免疫疗法治疗借助意在治疗癌症的抗体进行(Wallace等人,-1994;Velders等人,-1998;Cartron等人,-2002;Ianello等人,-2005;Weiner等人,-2010),以防止Rhesus阴性孕妇中的同种异体免疫(Béliard等人,-2008)。另外,还已知ADCC反应在针对病毒(Ahmad等人,-1996,Miao等

人,-2009)、细菌(Albrecht等人,-2007;Casadevall等人,-2002)和寄生虫(Zeitlin等人,-2000)的抗感染反应中发挥明显作用。另外,在自身免疫疾病的情况下,新疗法旨在移除负责攻击的免疫细胞,如B或T淋巴细胞,例如,ADCC随后发挥高度明显的作用(Edwards等人,-2006;Chan等人,-2010)。

[0142] 还已知CDC反应在各种病理学中并尤其在治疗癌症中重要。

[0143] 因此,在作为本发明药物使用的组合物中,该抗体有利地针对健康供体细胞上存在的非遍在抗原、癌细胞抗原、病原体感染的细胞的抗原或免疫细胞的抗原。

[0144] 特别地,优选以下实施方案:

[0145] -该抗体是抗Rhesus D抗体(尤其Roledumab、阿托木单抗(atorolimumab)或莫罗木单抗(morolimumab)并且组合物意在预防Rhesus阴性个体中的同种异体免疫,

[0146] -该抗体针对癌细胞的抗原并且组合物意在治疗癌症,

[0147] -该抗体针对病原体感染的细胞的抗原并且组合物意在治疗由所述致病生物所致的感染,

[0148] -该抗体针对免疫细胞的抗原并且组合物意在治疗自身免疫疾病。

[0149] 在治疗癌症的情况下,抗体尤其可以针对以下抗原:CD20、Her2/neu、CD52、EGFR、EPCAM、CCR4、CTLA-4(CD152)、CD19、CD22、CD3、CD30、CD33、CD4、CD40、CD51(整联蛋白 $\alpha$ -V)、CD80、CEA、FR- $\alpha$ 、GD2、GD3、HLA-DR、IGF1R(CD221)、磷脂酰丝氨酸、SLAMF7(CD319)、TRAIL-R1、TRAIL-R2。

[0150] 更具体地,下表1中指出因其治疗意义而著称的特定(抗原/癌症)对(具有这种抗原特异性的抗体在至少一个国家获批用于治疗所提到的癌症或临床试验正在实施)。

[0151] 表1.有意义的特定(抗原/癌症)对

[0152]

抗原	针对这种抗原的抗体的例子	可以用具有这种抗原特异性的抗体治疗的癌症
CD20	利妥昔单抗、奥法木单抗 (Ofatumumab)、奥瑞珠单抗 (Ocrelizumab)、托西莫单抗 (Tositumomab)、维妥珠单抗、Ublituximab	血液学癌，尤其霍非奇金淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、滤泡型淋巴瘤，
Her2/neu	曲妥珠单抗、培妥珠单抗	实体癌，尤其：乳腺癌、非小细胞肺癌、胰癌症、前列腺癌、卵巢癌
CD52	阿伦珠单抗(Alemtuzumab)	血液学癌，尤其：慢性淋巴细胞白血病、慢性髓样白血病、皮肤或外周 T 细胞淋巴瘤
EGFR	西妥昔单抗、帕尼单抗、Futuximab、Imgatuzumab、马妥珠单抗、Necitumumab、尼妥珠单抗、扎芦木单抗	实体瘤，尤其：结直肠癌、头颈癌、肺癌、食道癌症、胃癌、神经胶质瘤、间变性星形细胞瘤、胶质母细胞瘤
EPCAM	依决洛单抗、阿德木单抗、Solitomab、	实体癌，尤其：结直肠癌、前列腺癌、乳腺癌
CCR4	Mogamulizumab	血液学癌，尤其：成体 T 细胞白血病/淋巴瘤
CTLA-4(还以名称 CD152 著称)	伊匹木单抗、曲美木单抗 (Tremelimumab)、	实体瘤，尤其：黑素瘤、前列腺癌、膀胱癌

[0153]

CD19	兰妥莫单抗 (Blinatumomab)(靶向 CD19 和 CD3)	血液学癌, 尤其: 非霍奇金 淋巴瘤、急性淋巴母细胞白 血病、肺癌、胃肠道癌
CD22	依帕珠单抗	血液学癌, 尤其: B 细胞癌
CD3	奥昔珠单抗(Otelixizumab)、 替利珠单抗(Teplizumab)、维 西珠单抗(Visilizumab)	血液学癌, 尤其: 多发性骨 髓瘤
CD30	伊妥木单抗(Iratumumab)	血液学癌, 尤其: 非霍奇金 淋巴瘤
CD33	林妥珠单抗(Lintuzumab)	血液学癌, 尤其: 急性髓样 白血病、骨髓增生异常综合 征
CD4	西利珠单抗(Cedelizumab)、 克立昔单抗(Clenoliximab)、 普立昔单抗(Priliximab)、扎 木单抗(Zanolimumab)	黑素瘤、皮肤或外周 T 细胞 淋巴瘤
CD40	达西珠单抗(Dacetuzumab)、 鲁卡木单抗(Lucatumumab)、 替奈昔单抗(Teneliximab)	血液学癌, 尤其: 非霍奇金 淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多 发性骨髓瘤
CD51(整联 蛋白 $\alpha$ -V)	英妥木单抗(Intetumumab)	实体瘤
CD80	加利昔单抗(Galiximab)	血液学癌, 尤其: B 细胞淋 巴瘤
CEA	拉贝珠单抗(Labetuzumab)	实体瘤, 尤其: 结直肠癌
FR $\alpha$	法利珠单抗(Farletuzumab)	卵巢癌
神经节苷脂 GD2	3F8, TRBS07	神经母细胞瘤、黑素瘤
神经节苷脂 GD3	依美昔单抗(Ecromeximab)、 米妥莫单抗(Mitumomab)	黑素瘤、小细胞肺癌
HLA-DR	阿泊珠单抗	血液学癌

[0154]

<b>IGF1R (CD221)</b>	西妥木单抗(Cixutumumab)、 芬妥木单抗(Figitumumab)、 罗妥木单抗(Robatatumumab)、 盖尼塔单抗(Ganitumab)	实体瘤, 尤其: 非小细胞肺 癌、肾上腺皮质癌、胰癌
<b>磷脂酰丝氨 酸</b>	巴维昔单抗	实体瘤, 尤其: 乳腺癌、非 小细胞肺癌
<b>SLAMF7 (CD319)</b>	依洛珠单抗(Elotuzumab)	多发性骨髓瘤
<b>TRAIL-R1</b>	马帕木单抗(Mapatumumab)	实体瘤, 尤其: 非小细胞肺 癌、结直肠癌; 非霍奇金淋 巴瘤
<b>TRAIL-R2</b>	可那木单抗(Conatumumab)、 来沙木单抗、替加珠单抗 (Tigatuzumab)	实体瘤, 尤其: 乳腺癌、胰 癌、结直肠癌、非小细胞 肺癌、卵巢癌

[0155] 在治疗致病生物感染的情况下, 抗体尤其可以针对以下抗原: 艰难梭菌 (Clostridium difficile) 抗原、金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 抗原 (尤其 ClfA 和脂磷壁酸)、巨细胞病毒抗原 (尤其糖蛋白 B)、大肠杆菌 (Escherichia coli) 抗原 (尤其志贺样毒素, 根据单位 IIB)、呼吸道合胞体病毒抗原 (尤其蛋白 F)、乙型肝炎病毒抗原、甲型流感病毒抗原 (尤其血凝素)、铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa) 血清型 IATS 011 的抗原、狂犬病病毒抗原 (尤其糖蛋白)、磷脂酰丝氨酸。

[0156] 更具体地, 下表 2 中指出因其治疗意义而著称的特定 (抗原/癌症) 对 (具有这种抗原特异性的抗体在至少一个国家获批用于治疗所提到的感染性疾病或临床试验正在进行)。

[0157] 表 2 特定 (抗原/感染性疾病) 目的对

[0158]

<b>抗原</b>	<b>针对这种抗原的抗体的例子</b>	<b>可以用具有这种抗原特异性的抗体治疗的感染性疾病</b>
-----------	---------------------	--------------------------------

[0159]

艰难梭菌抗原	Actoxumab、 Bezlotoxumab	艰难梭菌感染
金黄色葡萄球菌 ClfA 抗原	替非珠单抗 (Tefibazumab)	金黄色葡萄球菌感染
巨细胞病毒抗原	司韦单抗(Sevirumab)	巨细胞病毒感染
巨细胞病毒糖蛋白 B	瑞加韦单抗 (Regavirumab)	巨细胞病毒感染
大肠杆菌志贺样毒素 亚基 IIB	乌珠单抗 (Urtoxazumab)	大肠杆菌血清型 O121 感 染
呼吸道合胞病毒蛋白 F	帕利珠单抗, 莫维珠单 抗(Motavizumab)	呼吸道合胞病毒感染
乙型肝炎病毒表面抗 原	艾韦单抗 (Exbivirumab)、利韦 单抗(Libivirumab)	乙型肝炎病毒感染
乙型肝炎病毒抗原	妥韦单抗(Tuvirumab)	乙型肝炎病毒感染
甲型流感病毒血凝素	CR6261	流感, 尤其西班牙流感和 H5N1
金黄色葡萄球菌脂磷 壁酸	帕吉昔单抗 (Pagibaximab)	金黄色葡萄球菌感染, 金 黄色葡萄球菌所致的脓 毒性休克
磷脂酰丝氨酸	巴维昔单抗	丙型肝炎病毒感染、甲型 和乙型流感、HIV1 和 2、 德国麻疹、呼吸道合胞体 病毒、伯钦特病毒
铜绿假单胞菌血清型 IATS O11 的抗原	帕诺库单抗 (Panobacumab)	铜绿假单胞菌感染
狂犬病病毒的糖蛋白	福拉韦单抗 (Foravirumab)、雷韦 单抗(Rafivirumab)	狂犬病病毒感染

[0160] 在治疗自身免疫疾病的情况下, 抗体尤其可以针对以下抗原: CD20、CD52、CD25、CD2、CD22、CD3 和 CD4。更具体地, 下表 3 中指出因其治疗意义而著称的特定 (抗原/自身免疫疾病) 对 (具有这种抗原特异性的抗体在至少一个国家获批用于治疗所提到的自身免疫疾病或临床试验正在进行)。

[0161] 表 3. 特定 (抗原/自身免疫疾病) 目的对

[0162]

抗原	针对这种抗原的抗体的实例	可以用具有这种抗原特异性的抗体治疗的自身免疫疾病
CD20	利妥昔单抗、奥法木单抗 (Ofatumumab)、奥瑞珠单抗 (Ocrelizumab)、托西莫单抗 (Tositumomab)、维妥珠单抗、Ublituximab	类风湿性关节炎、血小板减少性紫癜、系统性狼疮红斑、多发性硬化
CD52	阿伦珠单抗(Alemtuzumab)	多发性硬化
CD25	达克珠单抗、巴利昔单抗 (Basiliximab)、伊诺莫单抗 (Inolimomab)	葡萄膜炎、多发性硬化、银屑病、I型糖尿病、溃疡性结肠炎
CD2	西利珠单抗(Siplizumab)	银屑病
CD22	依帕珠单抗	红斑狼疮
CD3	奥昔珠单抗(Otelixizumab)、替利珠单抗(Teplizumab)、维西珠单抗(Visilizumab)	I型糖尿病、溃疡性结肠炎、克隆病
CD4	西利珠单抗(Cedelizumab)、克立昔单抗(Clenoliximab)、普立昔单抗(Priliximab)、扎木单抗(Zanolimumab)	类风湿性关节炎、克隆病、多发性硬化、银屑病

[0163] 意图用作本发明药物的抗体组合物尤其意图作为涉及ADCC反应的治疗药,所述ADCC反应包括如上文详述的诸多情况。因此有利的是还已经通过其他手段优化这些抗体以借助Fc $\gamma$ RIII受体尽可能强地在体内诱导ADCC反应。因此,在一个有利的实施方案中,在作为本发明药物使用的组合物中,抗体包含增强其与Fc $\gamma$ RIII受体结合和其借助Fc $\gamma$ RIII受体的效应子特性的Fc片段的修饰。

[0164] 目前已经描述了借助Fc $\gamma$ RIII受体优化ADCC活性的两种主要手段:

[0165] -在Fc片段的某些氨基酸残基处插入至少一个突变,尤其如WO 00/42072、Shields等人,-2001、Lazar等人,-2006、WO 2004/029207、WO/2004063351、WO 2004/074455中描述。

[0166] -优化Fc片段中每条重链的Asn297残基连接的N-聚糖的性质。

[0167] 因此,在一个有利的实施方案中,用作本发明药物的组合物包含单克隆抗体,其序列已经在Fc片段的至少一个氨基酸残基处修饰以增强与Fc $\gamma$ RIII受体的结合,如WO 00/42072、Shields等人,-2001、Lazar等人,-2006、WO 2004/029207、WO/2004063351、WO 2004/074455中所述。特别地,将Fc的以下位置处的突变描述为允许针对Fc $\gamma$ RIII受体的亲和力增加和借助这种受体诱导ADCC的能力增加:219、222、224、239、247、256、267、270、283、280、

286、290、294、295、296、298、300、320、326、330、332、333、334、335、339、360、377、396。

[0168] 特别地,将以下取代描述为允许针对Fc $\gamma$ RIII受体的亲和力增加和借助这种受体诱导ADCC的能力增加:S219Y、K222N、H224L、L234E、L234Y、L234V、L235D、L235S、L235Y、L235I、S239D、S239T、V240I、V240M、P247L、T256A、T256N、V264I、V264T、V266I、S267A、D270E、D280A、D280K、D280H、D280N、D280T、D280Q、D280Y、V282M、E283Q、N286S、K290A、K290Q、K290S、K290E、K290G、K290D、K290P、K290N、K290T、K290S、K290V、K290T、K290Y、E294N、Q295K、Y296W、S298A、S298N、S298V、S298D、S298E、Y300I、Y300L、K320M、K320Q、K320E、N325T、K326S、K326N、K326Q、K326D、K326E、A330K、A330L、A330Y、A330I、I332E、I332D、E333A、E333Q、E333D、K334A、K334N、K334Q、K334S、K334E、K334D、K334M、K334Y、K334H、K334V、K334L、K334I、T335E、T335K、A339T、K360A、F372Y、I377F、V379M、P396H、P396L、D401V。

[0169] 有意义的突变组合包括:E333A/K334A、T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K334A、S298A/E333A/K334A、S267A/D280A (WO 00/42072)、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L (Lazar等人,-2006)、V264I/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239N/I332E、S239Q/I332D、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、S239E/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E (WO 2004/029207)。

[0170] 备选地或额外地,作为本发明药物使用的单克隆抗体组合物包含低岩藻糖含量。“岩藻糖含量”意指在每种抗体每条重链的Fc片段的Asn297残基连接的N-聚糖内部岩藻糖化形式的百分数。“低岩藻糖含量”意指小于或等于65%的岩藻糖含量。实际上,如今已知抗体组合物的岩藻糖含量在这种组合物借助Fc $\gamma$ RIII受体诱导强烈ADCC反应的能力中发挥关键作用。有利地,岩藻糖含量小于或等于65%、优选地小于或等于60%、55%或50%、或甚至小于或等于45%、40%、35%、30%、25%或20%。然而,岩藻糖含量不必要应当为零,并且它可以例如大于或等于5%、10%、15%或20%。岩藻糖含量可以例如位于5%和65%之间、5%和60%之间、5%和55%之间、5%和50%之间、5%和45%之间、5%和40%之间、5%和35%之间、5%和30%之间、5%和25%之间、5%和20%之间、10%和65%之间、10%和60%之间、10%和55%之间、10%和50%之间、10%和45%之间、10%和40%之间、10%和35%之间、10%和30%之间、10%和25%之间、10%和20%之间、15%和65%之间、15%和60%之间、15%和55%之间、15%和50%之间、15%和45%之间、15%和40%之间、15%和35%之间、15%和30%之间、15%和25%之间、15%和20%之间、20%和65%之间、20%和60%之间、20%和55%之间、20%和50%之间、20%和45%之间、20%和40%之间、20%和35%之间、20%和30%之间、20%和25%之间。

[0171] 抗体组合物还可以具有不同类型的糖基化(寡甘露糖型或双天线状复杂型N-聚糖,在双天线状复杂型N-聚糖情况下具有可变比例的对分N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)残基或半乳糖残基),前提是它们具有低岩藻糖含量。因此,寡甘露糖型N-聚糖可以通过在不同糖基化抑制剂,如 $\alpha$ 1,2-甘露糖苷酶I抑制剂(如脱氧甘露伊霉素或“DMM”)或 $\alpha$ -葡糖苷酶抑制剂(如粟精胺或“Cs”)存在下培养或另外通过在CHO Lec1系中产生抗体来获得。在转基因山羊

的乳中生产还导致获得主要N-聚糖为寡甘露糖型的抗体,以具有一个或两个半乳糖的岩藻糖化双天线状复合物形成作为次要形式,无任何对分型G1cNac并且无唾液酸化(G1F或G2F)(参见WO 2007048077A2)。可以在大部分哺乳动物细胞中、还可以在已经修饰其糖基化装置的细菌、酵母或植物中获得双天线状复杂型N-聚糖。为了限制岩藻糖含量,可以使用负责在与Fc片段结合的G1cNac上添加岩藻糖的酶FUT8(1,6-岩藻糖基转移酶)的活性天然低的细胞系;如细胞系YB2/0、鸭胚细胞系 **EB66®**或大鼠肝癌细胞系H4-II-E(DSM ACC3129),H4-II-Es(DSM ACC3130)。也可以使用导致低岩藻糖含量的其他基因的突变和其不足表达或过量表达导致低岩藻糖含量的细胞系,如CHO Lec13细胞系(GDP-岩藻糖合成减少的CHO细胞系的突变体)。还可能选择目的细胞系并降低或消除(尤其通过使用干扰性RNA或通过突变或缺失表达目的蛋白的基因)参与N-聚糖岩藻糖化途径的蛋白质表达(尤其FUT8,参见Yamane-Ohnuki等人,-2004;另外GMD,一种参与转运GDP-岩藻糖的基因,参见Kanda等人,-2007)。另一个备选方案在于选择目的细胞系并过量表达或多或少干扰N-聚糖岩藻糖化的蛋白质,像蛋白质GnTIII( $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶III)。特别地,尤其通过以下方式获得具有略微岩藻糖化N-聚糖的抗体:

[0172] • 在YB2/0(参见EP1176195 A1、WO 01/77181、Shinkawa等人,-2003)、CHOLec13(参见Shields等人,-2002)、**EB66®**(Olivier等人,-2010)或大鼠肝癌系H4-II-E(DSM ACC3129)、H4-II-Es(DSM ACC3130)(参见WO 2012/041768)中生产。

[0173] • 在针对FUT8的小干扰性RNA(Mori等人,-2004,Suzuki等人,-2007,Cardarelli等人,-2009,Cardarelli等人,-2010,Herbst等人,-2010),或GMD(编码高尔基体中GDP-岩藻糖转运蛋白的基因,参见Imai-Nishiya等人,-2007)存在下在野生型CHO细胞系中生产

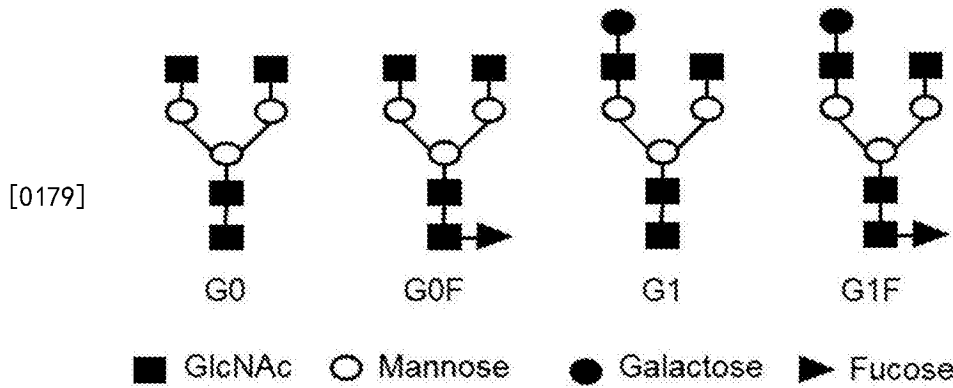
[0174] • 在CHO细胞系中生产,该细胞系中编码1,6-岩藻糖基转移酶的基因FUT8的两个等位基因已经被缺失(Yamane-Ohnuki等人,-2004)或编码高尔基体中GDP-岩藻糖转运蛋白的GMD基因的两个等位基因已经被缺失(Kanda等人,-2007),

[0175] • 在其中编码酶GnTIII( $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶III)的基因通过转基因技术过量表达(Umana等人,-1999)的CHO细胞系中生产。除了低岩藻糖化之外,获得的N-聚糖以高含量对分型G1cNac为特征。

[0176] • 在通过使用小干扰性RNA强烈降低 $\beta(1,2)$ -木糖和 $\alpha(1,3)$ -岩藻糖残基含量的转基因植物(本氏烟草)中生产(Forthal等人,-2010)。

[0177] 与双天线状复杂型N-聚糖相比,寡甘露糖型N-聚糖具有缩短的体内半寿期。因此,有利地,如上文定义,组合物中存在的抗体在其Fc片段的N-糖基化位点上具有岩藻糖含量低的双天线复杂型聚糖结构。

[0178] 特别地,单克隆抗体组合物可以具有大于60%的G0+G1+G0F+G1F形式含量和如上文定义的低岩藻糖含量。它还可以具有大于65%的G0+G1+G0F+G1F含量和如上文定义的低岩藻糖含量。它还可以具有大于70%的G0+G1+G0F+G1F含量和如上文定义的低岩藻糖含量。它还可以具有大于75%的G0+G1+G0F+G1F含量和如上文定义的低岩藻糖含量。它还可以具有大于80%的G0+G1+G0F+G1F形式含量和如上文定义的低岩藻糖含量。它还可以具有大于60%、65%、70%、75%或80%的G0+G1+G0F+G1F形式含量和小于50%的G0F+G1F形式含量。形式G0、G1、G0F和G1F如下文定义:



[0180] 这类抗体组合物尤其可以通过在以下细胞系中生产获得：YB2/0、CHO Lec13、在针对FUT8或GMD的小干扰性RNA存在下培养的野生型CHO细胞系、其编码1,6-岩藻糖基转移酶的基因FUT8的两个等位基因或其编码高尔基体中GDP-岩藻糖转运蛋白的GMD基因的两个等位基因已经被缺失的CHO细胞系。

[0181] 意图作为本发明药物使用的抗体组合物尤其还意图作为涉及CDC反应的治疗药。因此相对于通过Fc  $\gamma$  RIII增加活性的修饰额外或备选地，还可能有利的是还已经通过其他手段优化这些抗体以借助蛋白质C1q尽可能强地在体内诱导CDC反应。在一个有利的实施方案中，在作为本发明药物使用的组合物中，抗体包含增强其与蛋白质C1q结合和其借助补体的效应子特性的Fc片段的修饰。

[0182] 这类突变尤其在以下文献中描述：WO 2004074455A2、Idusogie等人，-2001、Daill'Acqua等人，-2006 (b) 和Moore等人，-2010。

[0183] 本发明还涉及层析分级步骤的用途，目的在于通过表达Fc  $\gamma$  RIII (CD16) 受体的免疫系统效应细胞，增加针对给定抗体的单克隆抗体组合物诱导表达所述抗原的靶细胞的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的能力。

[0184] 因而获得的组合物具有改善的通过表达Fc  $\gamma$  RIII (CD16) 受体的免疫系统效应细胞和尤其通过天然杀伤细胞 (或NK细胞) 诱导对表达目的抗原的靶细胞的ADCC的能力。优选地，用富含主峰同工型的组合物获得和用分级分离前组合物获得的ADCC水平的比例R (由以下式限定)：

$$[0185] \quad R = \frac{\text{用富含主峰同工型的组合物获得的ADCC水平}}{\text{用分级分离前组合物获得的ADCC水平}}$$

[0186] 是至少1.15 (对应于ADCC水平增加至少15%)；有利地至少1.16；至少1.17；至少1.18；至少1.19；更有利地至少1.20；至少1.25；至少1.30；至少1.35；至少1.40；至少1.45；或甚至至少1.50 (对应于ADCC水平增加至少50%)。

[0187] 本发明还涉及层析分级分离步骤的用途，用于通过补体，增加针对给定抗体的单克隆抗体组合物诱导表达所述抗原的靶细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力。

[0188] 因而获得的组合物具有改善的通过补体诱导对表达目的抗原的靶细胞的溶解的能力。优选地，用富含主峰同工型的组合物获得和用分级分离前组合物获得的CDC水平的比例R (由以下式限定)：

$$[0189] \quad R = \frac{\text{用富含主峰同工型的组合物获得的CDC水平}}{\text{用分级分离前组合物获得的CDC水平}}$$

[0190] 是至少1.15 (对应于CDC水平增加至少15%)；有利地至少1.16；至少1.17；至少

1.18;至少1.19;更有利地至少1.20;至少1.25;至少1.30;至少1.35;至少1.40;至少1.45;或甚至至少1.50(对应于CDC水平增加至少50%)。

[0191] 在以上两种用途中,层析分级分离步骤可以按上述的任何方式实施以获得作为本发明药物使用的富含主要同工型的抗体组合物。特别地,可以通过以下层析技术之一实施分级分离:

[0192] • 离子交换层析,无论洗脱模式是什么(离子力梯度、pH梯度、pH和离子力梯度、置换分子);

[0193] • 层析聚焦;

[0194] • 疏水相互作用层析。

[0195] 单克隆抗体组合物可以是上文描述的任何单克隆抗体组合物,对所述单克隆抗体组合物实施这种层析分级分离步骤以借助表达CD16的效应细胞增加ADCC或CDC反应能力。特别地,组合物中存在的单克隆抗体可以是人的、人源化的或嵌合的。

[0196] 它也可以针对任何类型的抗原并且尤其针对上文描述的那些。特别地,当靶细胞是癌细胞时,抗体可以针对癌细胞抗原,并且在治疗癌症情况下尤其针对上文描述的抗原之一。当靶细胞是由病原体感染的细胞时,抗体可以针对感染细胞的抗原,并且在治疗感染性疾病情况下尤其针对上文描述的抗原之一。当靶细胞是参与自身免疫疾病发展的免疫细胞时,抗体可以针对这些免疫细胞的抗原,并且在治疗自身免疫疾病情况下尤其针对上文描述的抗原之一。

[0197] 层析分级分离步骤(步骤a)优选地接续以下一个步骤(步骤b):合并获得的与层析图主峰相对应的层析级分,因而获得的单克隆抗体组合物富含所述主峰,后者占步骤b)中获得的组合物的层析图的至少85%(在分级分离和组合目的层析级分后)。

[0198] 以下实施例对应于本发明的说明。

## 实施例

[0199] 实施例1. 制备抗CD20抗体组合物的电荷同工型的纯化级分,表征同工型和其效应子特性

[0200] 设备和方法

[0201] 抗CD20抗体组合物

[0202] 对克隆YB2/0产生的一批抗CD20抗体组合物全部分离和分析

[0203] 通过层析聚焦分离电荷同工型

[0204] 通过层析聚焦实施了相同抗体组合物的电荷同工型的三次制备性分离。

[0205] 使用阴离子交换树脂Mono P 5/200GL。在每次分离时注入20mg脱盐的蛋白质。通过使用以下两种缓冲液:缓冲液A:二乙醇胺25mM,缓冲液B:polybuffer 96+pharmalyte 8-10.5,通过递降pH梯度(pH 9.5至8.0)实施洗脱。

[0206] 分离的洗脱物以2mL级分收集。目的级分是第33至第50级分。

[0207] 浓缩3次分离的级分以分析。

[0208] 分离1(S1)接受特定浓缩,从而该级分可以通过过滤除菌:

[0209] -在Amicon Ultra 10kDa上浓缩该级分以获得1mL体积

[0210] -无菌过滤

- [0211] -测量浓度的等分试样采样和测量活性的等分试样采样
- [0212] 通过阳离子交换层析(CEX)分离电荷同工型
- [0213] 通过阳离子交换层析,连同递增pH梯度(CEX)洗脱,实现对电荷同工型的11次分离。
- [0214] 在30°C使用阳离子交换树脂SCX(MabPac SC X 10.4x 250mm,Dionex)。通过使用以下两种缓冲液:缓冲液A:20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,60mMNaCl(pH 6),缓冲液B:20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,60mM NaCl(pH 10),通过递增pH梯度(pH 6至10)实现洗脱。
- [0215] 按以下方式获得梯度:60分钟内10%至60%缓冲液B。
- [0216] 分离的洗脱物以级分收集。目的级分是第1至第20级分。
- [0217] 通过BIACORE分析与CD16受体的结合
- [0218] 通过在Biacore T100系统(GEHealthcare)上使用SPR(“表面等离子共振”)技术开发了测量抗体组合物与受体CD16a结合的能力的方法。通过使用胺偶联法,将可溶性受体CD16a固定在检测芯片上。流动小室用于抗体,其他流动小室保持空闲以扣除背景噪声。将抗体以三种浓度注射并且通过以下方式估计动力学参数:对于每种浓度,产生结合相的结合比例和解离相的结合比例。以共振单位(RU)表述的SPR信号表示抗体在受体处的结合和解离。
- [0219] 借助CD16激活效应细胞(CD16Jurkat试验)
- [0220] 测试了通过层析聚焦和通过阳离子交换层析(CEX)分离的包含不同电荷同工型的多种级分借助CD16受体(Fc $\gamma$ RIII)诱导效应细胞反应的能力。
- [0221] 所用的试验如下:
- [0222] 抗体与WIL2-S细胞(阳性CD20靶细胞)和CD16Jurkat细胞(效应细胞)(基因型CD16FF)温育。通过ELISA测量CD16Jurkat细胞分泌的细胞因子(IL2)的量。
- [0223] 更具体地,在96孔平板中混合:
- [0224] • 抗体:50 $\mu$ l在IMDM 5%FCS中范围从0.156ng/ml至10ng/ml的稀释液
- [0225] • PMA:50 $\mu$ l在IMDM 5%FCS中40ng/ml的稀释液(即2ng PMA/50 $\mu$ l)
- [0226] • WIL2-S细胞:50 $\mu$ l在IMDM 5%FCS中6x 10<sup>5</sup>/ml(即30x 10<sup>3</sup>个细胞/50 $\mu$ l)
- [0227] • CD16Jurkat:50 $\mu$ l在IMDM 5%FCS中10x 10<sup>6</sup>/ml(即500x 10<sup>3</sup>个细胞/50 $\mu$ l)
- [0228] 使用两种对照:无任何靶细胞的阴性对照和具有最大活性的阳性对照:
- [0229] 无任何靶细胞的阴性对照:每孔添加:
- [0230] • 50 $\mu$ l在按10x 10<sup>6</sup>个细胞/ml(即500x 10<sup>3</sup>个细胞/50 $\mu$ l)的CD16Jurkat细胞
- [0231] • 50 $\mu$ l在40ng/ml的PMA(即2ng PMA/50 $\mu$ l)
- [0232] • 50 $\mu$ l最高浓度的抗体
- [0233] • 50 $\mu$ l IMDM培养基+5%FCS
- [0234] 最大活性阳性对照:每孔添加:
- [0235] • 50 $\mu$ l按10x 10<sup>6</sup>个细胞/ml(即500x 10<sup>3</sup>个细胞/50 $\mu$ l)的CD16Jurkat细胞
- [0236] • 50 $\mu$ l 40ng/ml的PMA(即2ng PMA/50 $\mu$ l)
- [0237] • 50 $\mu$ l 5 $\mu$ g/ml的离子霉素
- [0238] • 50 $\mu$ l IMDM培养基+5%SVF
- [0239] 温和搅拌并在37°C+/-0.5°C温育过夜

- [0240] 以125g离心细胞1分钟
- [0241] 转移160 $\mu$ l上清液至96孔圆底平板中
- [0242] 再次以125g离心细胞1分钟
- [0243] 在上清液中给予IL-2。在450nm读数。
- [0244] 每份样品的CD16活性(IL-2分泌)表述为参比样品的CD16活性的百分数。
- [0245] 补体依赖性细胞毒性(CDC)
- [0246] 靶细胞Wi12-S在去补体的含10%FCS的IMDM培养基(培养基I10)中培养。将它们一周2次以 $0.2 \times 10^6$ 个细胞/ml移植入F175瓶中的100ml培养基。从24至72小时对移植的细胞进行试验,并再次以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml在去补体的IMDM培养基+5%FCS(培养基I5)中吸收。
- [0247] 人血清(通过全血凝固获得的人血清AB)在使用当日解冻。解冻在4 $^{\circ}$ C实施。在解冻后,血清在培养基I5中稀释至1/2。
- [0248] **CellTiter-Blue<sup>®</sup>**(Promega)贮存在-20 $^{\circ}$ C,使用之前任由其在室温解冻。
- [0249] 待研究抗体的浓度在I5培养基中调节至1 $\mu$ g/ml。
- [0250] 在96孔U底平板中添加:
- [0251] • 50 $\mu$ l靶细胞(Wi12S, $1 \times 10^6$ 个细胞/ml)
- [0252] • 50 $\mu$ l待测试的抗体
- [0253] • 50 $\mu$ l稀释一倍的人血清。
- [0254] 在调整至 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml后,将细胞直接放置于平板中并置于37 $^{\circ}$ C。
- [0255] 将细胞温育5分钟并且将样品在37 $^{\circ}$ C搅拌,之后放置血清。
- [0256] 产生两种对照:不含任何细胞(C-)的对照和具有抗体(AC-)的对照。遗漏的要素用I5培养基替代。
- [0257] 将它们在37 $^{\circ}$ C温育2小时,同时搅拌。随后将30 $\mu$ l **CellTiter-Blue<sup>®</sup>**加入到每个孔,通过添加时反复抽吸混匀,并且温育在37 $^{\circ}$ C进行3小时和30分钟,伴以搅拌。
- [0258] 在温育结束时,通过添加25 $\mu$ l 3%SDS终止和稳定反应,可以将读数延迟到次日。随后在室温保存平板。
- [0259] 在温育结束时或次日,将平板以125g离心2分钟。每孔采样100 $\mu$ l并且随后分配于透明底部黑色光学平板中,同时保持平板水平。
- [0260] 用荧光读数仪按以下参数实施平板的读出:
- [0261] • 激发:530/25nm
- [0262] • 发射:590/20nm
- [0263] • 穿过平板底部读出(FOND)
- [0264] • 积分时间:20 $\mu$ s
- [0265] • 闪烁次数:25
- [0266] • 增益:从不含任何抗体的对照孔(细胞+血清+I5培养基)中取得的孔计算
- [0267] • 以轨道模式进行强度2搅拌15秒。
- [0268] 通过质谱法表征同工型
- [0269] 通过如Chevreux, -2011中所述的质谱法,分析通过层析聚焦或通过阳离子交换层析(CEX)分离的多种级分中存在的多种电荷同工型。
- [0270] 这种方法包括利用细菌蛋白酶半胱氨酸(IdeS,降解酿脓链球菌(*Streptococcus*

pyogenes)的免疫球蛋白的酶),所述酶在其交界结构域处特异性切割IgG,重链被切割成两个分别由VH-CH1结构域和CH2-CH3结构域组成的25kDa片段。这些片段由液相层析法以乙腈梯度分离并且在质谱法中通过以下程序分析:

[0271] 将100 $\mu$ g通过层析聚焦或通过CEX纯化的级分冻干并重溶于20 $\mu$ l消化缓冲液(50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>和150mM NaCl,pH 6.30)中,并按照酶试剂盒(FabRICATOR Kit,Genovis,Lund,瑞典)的说明添加100IU IdeS酶。将制备物在37 $^{\circ}$ C温育1小时,辅以50W功率(CEM Discover System,CEM,Matthews,NC,美国)的微波以促进水解。接下来,添加25 $\mu$ l变性缓冲液(8M脲和0.4M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>,pH 8,0),随后添加5 $\mu$ l 250mM的二硫苏糖醇(DTT)溶液。将样品在50 $^{\circ}$ C温育20分钟,辅以50W功的微波以确保彻底还原蛋白质,所述蛋白质随后由液相层析-质谱(LC-MS)分析。

[0272] 将与20 $\mu$ g量相对应的反应混合物等分试样以350 $\mu$ l/分钟流速注射于平衡至70 $^{\circ}$ C的反相ProSphere C4柱(150x 2.1mm,5 $\mu$ m,Alltech)上。通过使用超高效液相层析系统(UPLC,Acquity UPLC,Waters,Milford,MA,美国),实施反相层析。通过使用0.1%三氟乙酸(TFA)作为流动相A和包含0.1%TFA的乙腈作为流动相B生成梯度。以10%B等梯度洗脱5分钟后,将B升高至27%持续5分钟并且随后升高至40%进一步持续10分钟。随后将柱用90%的B洗涤3分钟并以10%的B再平衡2分钟,产生总持续时间25分钟。

[0273] 随后用质谱仪QSTAR(QSTAR XL,Applied Biosystems,Toronto,加拿大)分析洗脱的种类,所述质谱仪以500至3000m/z的正离子模式运行并根据制造商描述的程序对肾素校准。

[0274] 结果

[0275] 通过层析聚焦分离电荷同工型

[0276] 图1中显示3次分离的层析图,所述层析图显示它们可以完美叠加,因此显示借助层析聚焦的分离方法的重现性。因为使用了阴离子交换树脂和递降pH梯度,所以碱性同工型首先洗脱,随后是主要同工型,并且接着是酸性同工型。

[0277] 收集级分33至50用于分析它们的生物化学特性和效应子特性。

[0278] 通过阳离子交换层析(CEX)分离电荷同工型

[0279] 图2中显示借助电荷同工型的阳离子交换层析(CEX)的11次分离的层析图。因为使用了阳离子交换树脂,所以酸性同工型首先洗脱,随后是主要同工型,并且接着是碱性同工型。

[0280] 在CEX中再分析峰4(P4,主峰)以检验纯化的效率。图3和下表4中显示用CEX分离之前和之后获得的酸性同工型、主要同工型和碱性同工型的百分数,并且这些百分数清楚地显示纯化主峰的效率。

[0281] 表格4.用CEX分离之前和之后酸性同工型、主要同工型和碱性同工型的百分数

[0282]

样品	酸性形式	主峰	碱性形式
分离前	12.6%	58.7%	28.7%
分离后	3.5%	93.4%	3.1%

[0283] 通过BIACORE分析与CD16受体的结合

[0284] 测试了通过阳离子交换层析分离的包含不同电荷同工型的各种级分与受体CD16

结合的能力。

[0285] 结果在图4中显示,并且显示对酸性形式(P1至P3)和对峰7(P7)的亲合力丧失,但是对其他碱性形式(P6、P8)的亲合力未丧失。

[0286] 借助CD16激活效应细胞(CD16Jurkat试验)

[0287] 测试了通过层析聚焦和通过阳离子交换层析(CEX)分离的包含不同电荷同工型的多种级分借助CD16受体(Fc $\gamma$ RIII)诱导效应细胞的反应的能力。

[0288] 在5图(CEX)和下表5(通过层析聚焦分离)中显示结果。

[0289] 在每种情况下,观察到与主要同工型相对应的级分诱导CD16Jurkat细胞活化,这比包含酸性同工型或碱性同工型的显著更明显。

[0290] 因此,多种电荷同工型借助CD16活化效应细胞的能力大幅度变动,与活化表达CD16的效应细胞的其他同工型相比,主要同工型具有显著改善的能力。

[0291] 显示在抗体组合物存在下测量受体CD16转染的Jurkat细胞分泌的IL-2的量的上述试验代表了这种抗体组合物通过表达CD16的效应细胞诱导ADCC的能力(WO 2004/024768)。因此,下表4至表5中所示的结果显示,与其他同工型相比并且与包含全部同工型的总组合物相比,与纯化前层析聚焦或CEX的主峰相对应的纯化级分具有显著改善的借助表达CD16的效应细胞诱导ADCC的能力。

[0292] 表5. 参比组合物、分离前总组合物和来自层析聚焦分离的级分F36(碱性同工型)、F39(主要同工型)和F43、F44、F48、F49和F50(递增的酸性同工型)的CD16Jurkat细胞活化作用。

[0293]

样品	CD16 Jurkat 活性 (%参比组合物)
参比组合物	100%

[0294]

分离前总组合物	80%
F36(碱性同工型)	62%
F39(主要同工型)	96%
F43(酸性同工型)	59%
F44(酸性同工型)	71%
F48(酸性同工型)	27%
F49(酸性同工型)	38%
F50(酸性同工型)	17%

[0295] 补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0296] 测量了通过阳离子交换层析(CEX)分离的包含不同电荷同工型的多种级分诱导补体依赖性细胞毒反应(CDC)的能力。

[0297] 结果在6图中显示,并且显示与主峰(P4)相比,对酸性形式(P1:37%,P2:52%,并

且P3:69%) 和碱性形式 (P5:45%, P6=K1:64%, P7:35%, 并且P8=K2:49%) 的活性的剧烈丧失。与主要同工型 (P4) 相对应的峰因此诱导比包含酸性同工型或碱性同工型的级分显著更大的CDC反应。

[0298] 通过质谱法表征同工型

[0299] 通过层析聚焦纯化的级分和通过CEX纯化的级分由LC-MS分析以表征含有或不含N末端赖氨酸的重链的百分数。

[0300] 对于与分离前主峰相对应的通过层析聚焦纯化的级分和通过CEX纯化的级分, 该分析显示超过95%的重链不包含任何C末端赖氨酸。

[0301] 结论

[0302] 上文所示的结果显示, 与相同抗体组合物的酸性或碱性同工型相比, 与通过离子交换层析 (CEX) 或通过层析聚焦分离的主峰相对应的抗体组合物的电荷同工型具有显著更大的借助受体Fc  $\gamma$  RIII (CD16) 以及还借助补体活化效应细胞的能力。

[0303] 使用与这种主峰相对应的纯化级分因此将在单克隆抗体治疗的病理范围内借助CD16 (ADCC, 细胞因子的分泌) 引起效应子特性进一步增加, 在所述病理内ADCC或CDC反应发挥重要作用, 如预防同种异体免疫或 治疗癌症、感染性疾病和自身免疫疾病。

[0304] 参考文献

[0305] Ahmad等人, FASEB J. 1996. 10:258-266.

[0306] Albrecht MT等人, INFECTION AND IMMUNITY, Nov. 2007, p. 5425-5433.

[0307] Almagro等人, Frontiers in Bioscience 13, 1619-1633, January 1, 2008.

[0308] Antes B等人, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Jun 1; 852 (1-2): 250-6.

[0309] Beliard R等人, Br J Haematol. 2008 Apr; 141 (1): 109-19.

[0310] Bruggemann等人, Year in Immuno., 7:33 (1993);

[0311] Cardarelli等人, Clin Cancer Res 2009 April 28; 15:3376-3383,

[0312] Cardarelli等人, Cancer Immunol Immunother. 2010. 59. 257-265,

[0313] Cartron G等人, Blood. 2002 Feb 1; 99 (3): 754-8.

[0314] Casadevall A. 等人, Emerg Infect Dis. 2002 Aug; 8 (8): 833-41;

[0315] Chan AC等人, Nat Rev Immunol. 2010 May; 10 (5): 301-16.

[0316] Chevreux G等人, Anal Biochem. 2011 Aug 15; 415 (2): 212-4;

[0317] Cibelli等人, 1998 Science, 280:1256-1258

[0318] Dall'Acqua等人, 2002, J Immunol.; 169:5171-80.

[0319] Dall'Acqua等人, 2006, J. Biol. Chem.; 281:23514-24. (a)

[0320] Dall'Acqua等人, J Immunol 2006; 177:1129-1138. (b)

[0321] Duchosal等人, Nature 355:258 (1992)

[0322] Edelman, G.M. 等人, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) .

[0323] Edwards JC等人, Nat Rev Immunol. 2006 May; 6 (5): 394-403.

[0324] EP 1 176 195 A1,

[0325] EP 1 308 456,

[0326] EP 1 829 961,

- [0327] Farnan D,Moreno GT.Anal Chem.2009Nov 1;81 (21) :8846-57.
- [0328] Fisher R等人,Vaccine 21 (2003) 820-825.
- [0329] Forthal等人,J Immunol 2010;185;6876-6882,
- [0330] Gandhi S等人,Pharm Res.2012Jan;29 (1) :209-24.
- [0331] Gene Targeting,A Practical Approach,IRL Press at Oxford University Press (1993)
- [0332] Gordon等人,1980Proc Natl Acad Sci U S A.;77:7380-4
- [0333] Herbst R.等人,J Pharmacol Exp Ther.2010Oct;335 (1) :213-22,
- [0334] Hinton等人,2004,J Biol Chem.;279:6213-6.
- [0335] Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.,227:381 (1991) ;
- [0336] Ianello A等人,Cancer and Metastasis Reviews 24:487-499,2005.
- [0337] Idusogie EE等人,J Immunol.2001;166:2571-5.
- [0338] Imai-Nishiya等人,BMC Biotechnology 2007,7:84;
- [0339] Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.90:2551 (1993) (a) ;
- [0340] Jakobovits等人,Nature,362:255-258 (1993) (b) ;
- [0341] Jones等人,Nature,321:522-525,1986;
- [0342] Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md. (1991) .
- [0343] Kanda Y等人,Journal of Biotechnology 130 (2007) 300-310,
- [0344] Khawli LA等人,MAbs.2010Nov-Dec;2 (6) :613-24.
- [0345] Lazar,G.A.等人,Proc Natl Acad Sci U S A.103 (11) :4005-10.
- [0346] Ma JK等人,Nat Rev Genet.2003Oct;4 (10) :794-805.
- [0347] Manipulating the Mouse Embryo,A Laboratory Manual,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) ;
- [0348] Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-5 597 (1991) ;
- [0349] McAtee CP等人,Curr Protoc Protein Sci.2012Aug;Chapter 8:Unit8.10,
- [0350] Miao C等人,Journal of General Virology (2009) ,90,1119-1123.
- [0351] Moore GL.等人,mAbs 2:2,181-189;March/April,2010;
- [0352] Mori K等人,Biotechnol Bioeng.2004Dec 30;88 (7) :901-8,
- [0353] Olivier S.等人,MAbs.2010Jul-Aug;2 (4) :405-415,
- [0354] Presta LG.Adv Drug Deliv Rev.2006Aug 7;58 (5-6) :640-56.
- [0355] Rea JC等人,J Pharm Biomed Anal.2011Jan 25;54 (2) :317-23.
- [0356] Rea Jennifer C.Innovations in Biotechnology.InTech.February 17, 2012.Chapter 19.
- [0357] Riechmann等人,Nature,332:323-327,1988,
- [0358] Ryan等人,1997Science;278:873-876;
- [0359] Satoh M等人,Expert Opin Biol Ther.2006Nov;6 (11) :1161-73.
- [0360] Schillberg S等人,Vaccine 23 (2005) 1764-1769.
- [0361] Shields RL等人,J Biol Chem.2001Mar 2;276 (9) :6591-604.

- [0362] Stoger E等人,Molecular Breeding 9:149-158,2002.
- [0363] Suzuki等人,Clin Cancer Res 2007March 15;13:1875-1882,
- [0364] Umana等人,Nat Biotechnol.1999Feb;17 (2) :176-80,
- [0365] US 5,591,669,
- [0366] US 5,598,369,
- [0367] US 5,545,806,
- [0368] US 5,545,807,
- [0369] US 6,150,584
- [0370] Vaughan等人,Nature Biotech 14:309 (1996)
- [0371] Velders MP等人,Br J Cancer.1998Aug;78 (4) :478-83.
- [0372] Verhoeyn等人,BioEssays,8:74,1988,
- [0373] Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536,1988;
- [0374] Vlasak J,Ionescu R.Curr Pharm Biotechnol.2008Dec;9 (6) :468-81.
- [0375] Wallace PK等人,J Leukoc Biol.1994Jun;55 (6) :816-26.
- [0376] Weiner LM等人,Nat Rev Immunol.2010May;10 (5) :317-27.
- [0377] WO 9004036 A1,
- [0378] WO 9517085 A1,
- [0379] WO 9951642,
- [0380] WO 0026357 A2,
- [0381] WO 00/42072,
- [0382] WO 01/77181,
- [0383] WO 01/26455 A1,
- [0384] WO 02/060919 A2,
- [0385] WO 2004/024768,
- [0386] WO 2004/024866,
- [0387] WO 2004/029207,
- [0388] WO 2004/050847 A2,
- [0389] WO 2004/063351
- [0390] WO 2004/074455
- [0391] WO 2005/033281 A2,
- [0392] WO 2007/048077 A2
- [0393] WO 2007/106078 A2,
- [0394] WO 2010/045193,
- [0395] WO 2010/106180 A2,
- [0396] WO 2011/009623,
- [0397] WO 2012/041768 A1
- [0398] Wright A,Morrison S L.J Exp Med.1994Sep 1;180 (3) :1087-96,
- [0399] Yamane-Ohnuki N.等人,Biotechnol Bioeng.2004Sep 5;87 (5) :614-22,
- [0400] Zeitlin L.等人,Microbes Infect.2000May;2 (6) :701-8,

[0401] Zhang T.等人, J Chromatogr A. 2011 Aug 5; 1218 (31) : 5079-86.

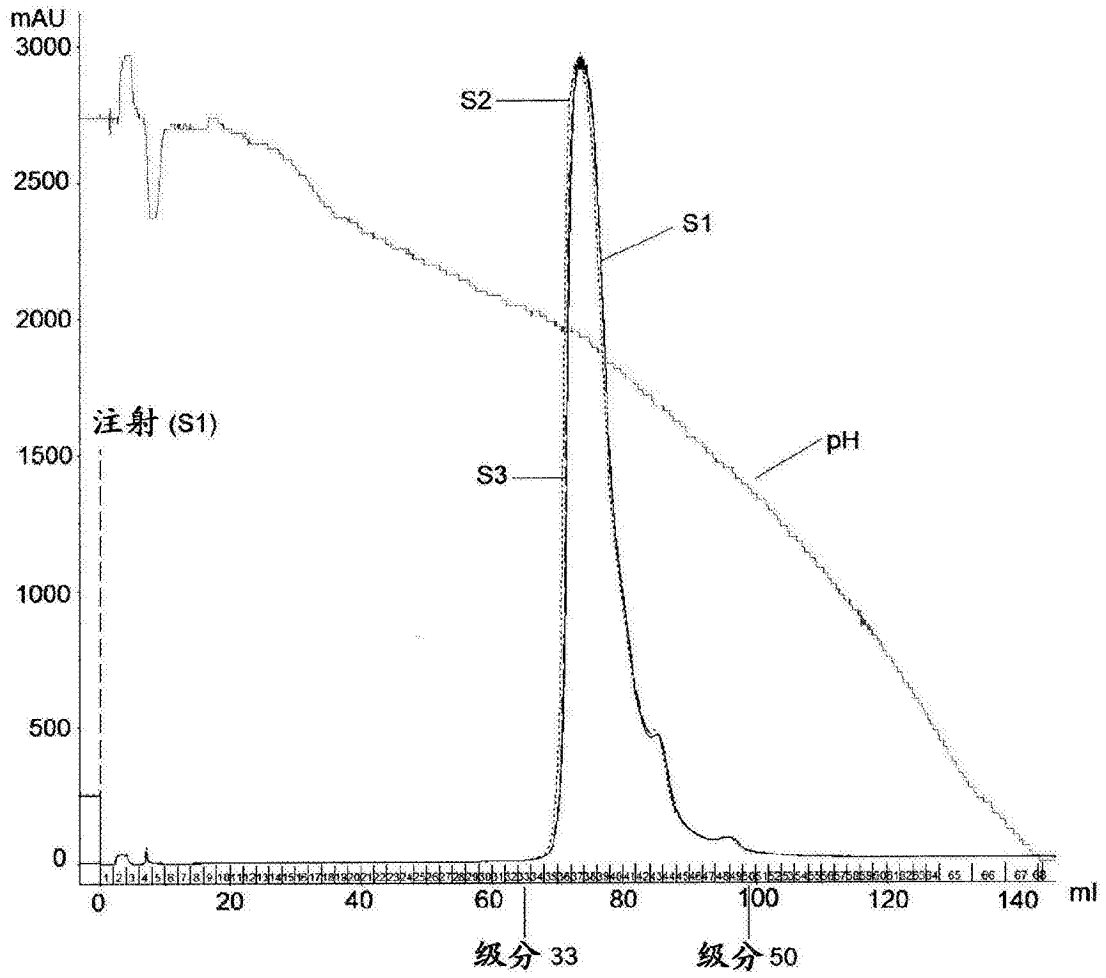


图1

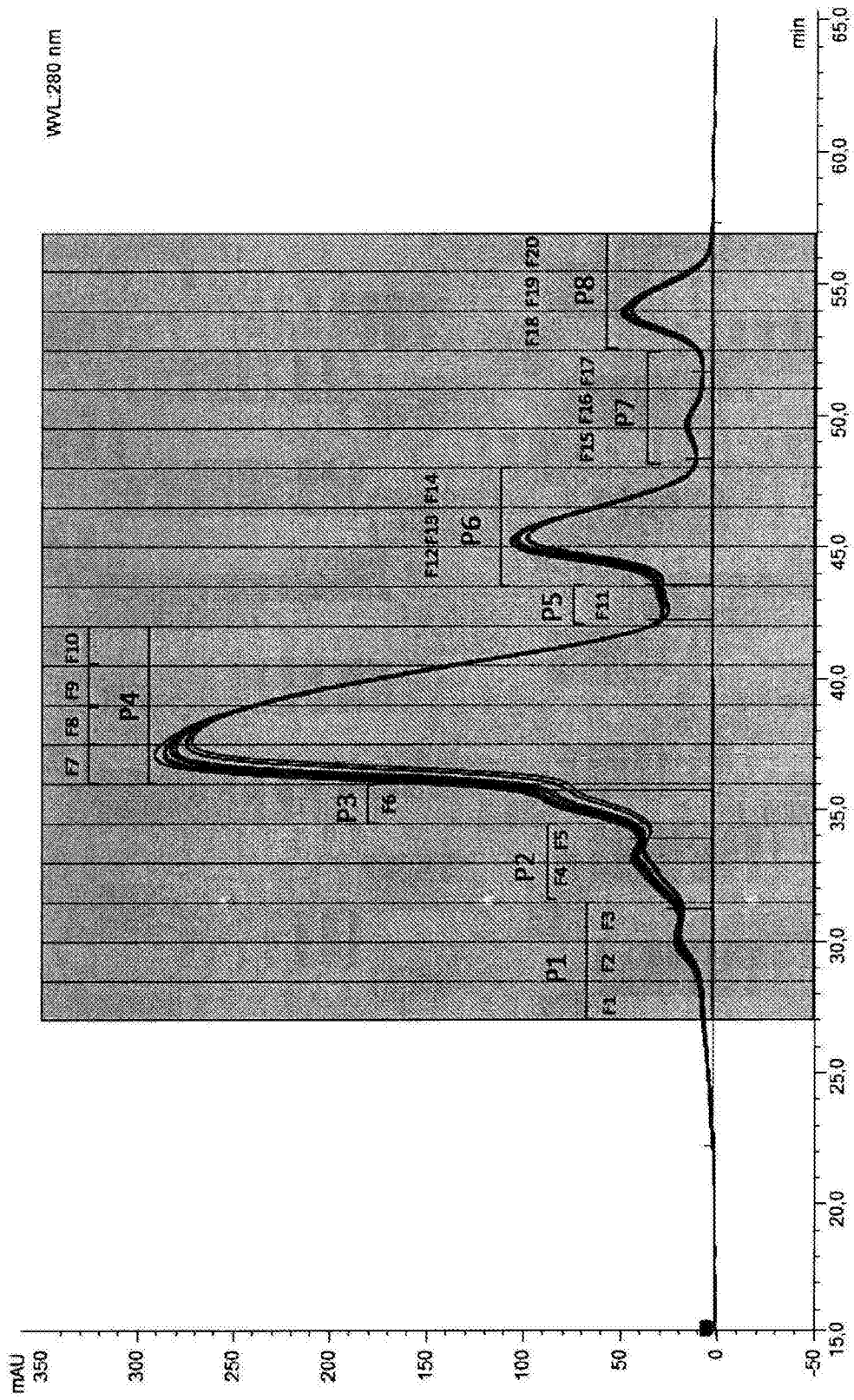


图2

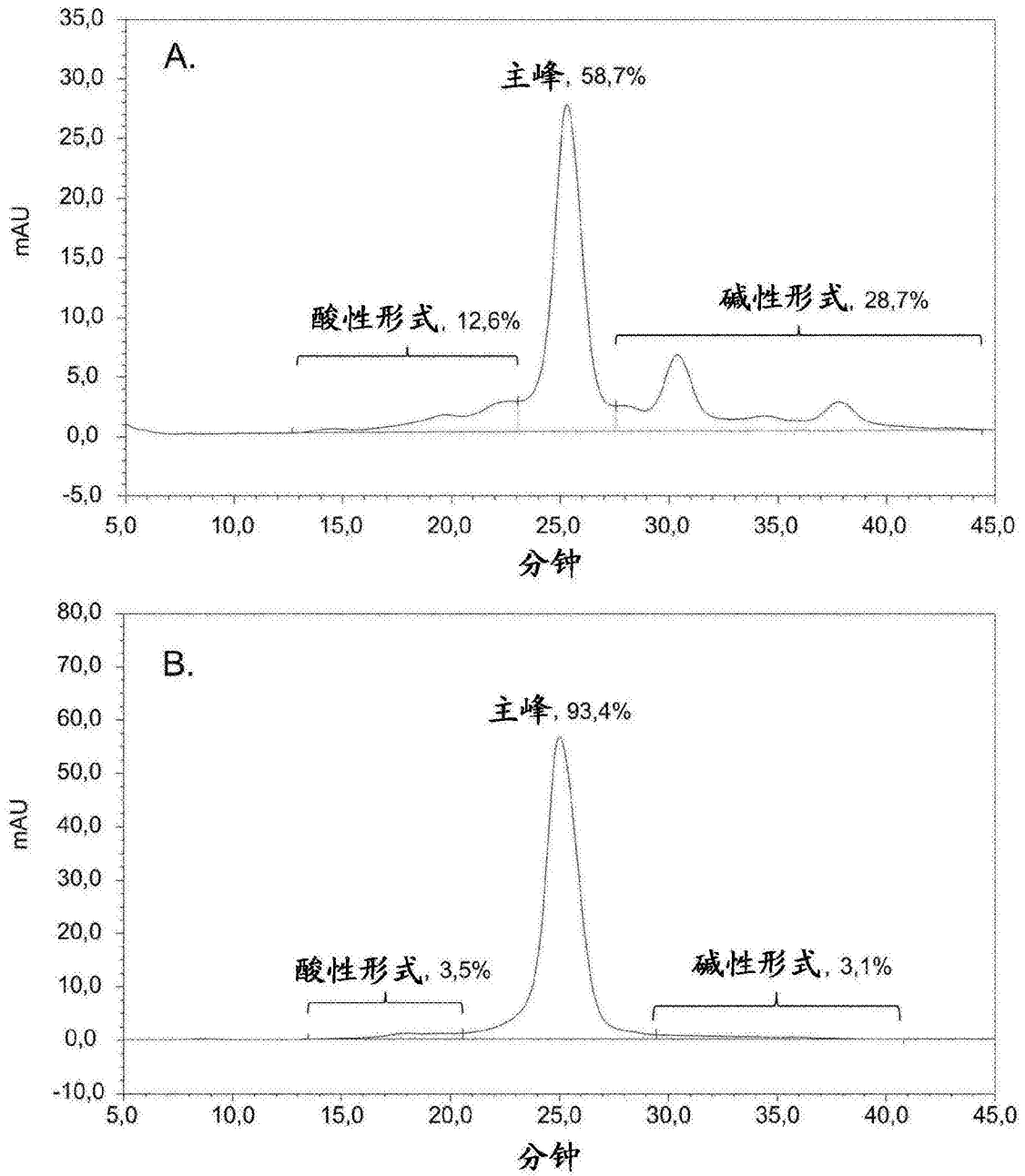


图3

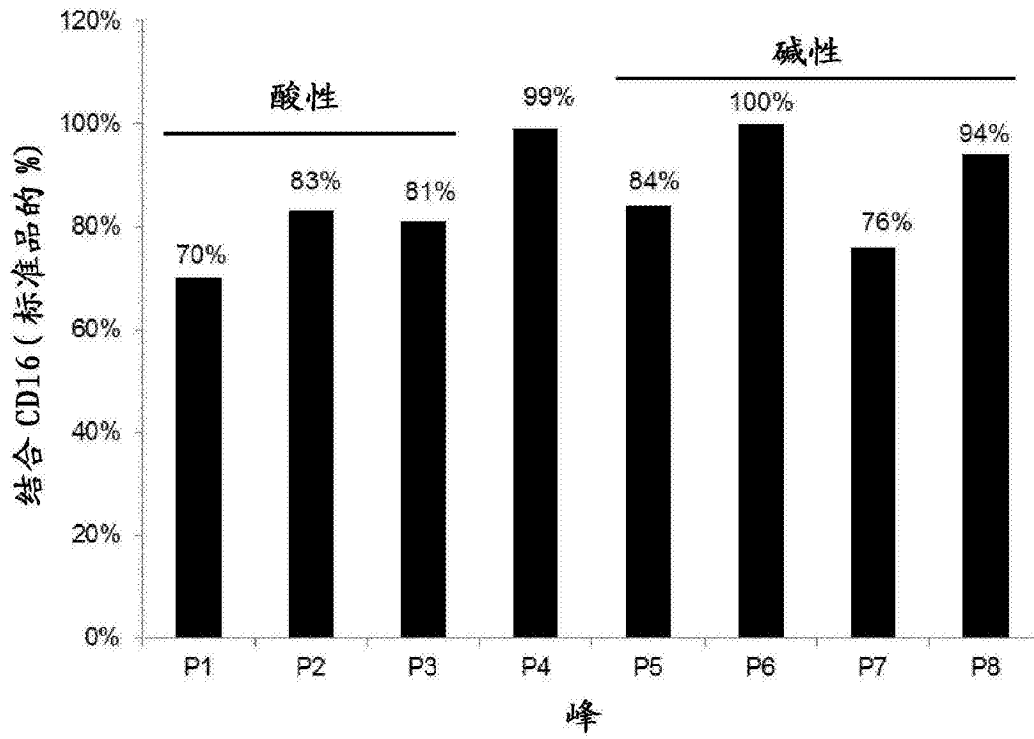


图4

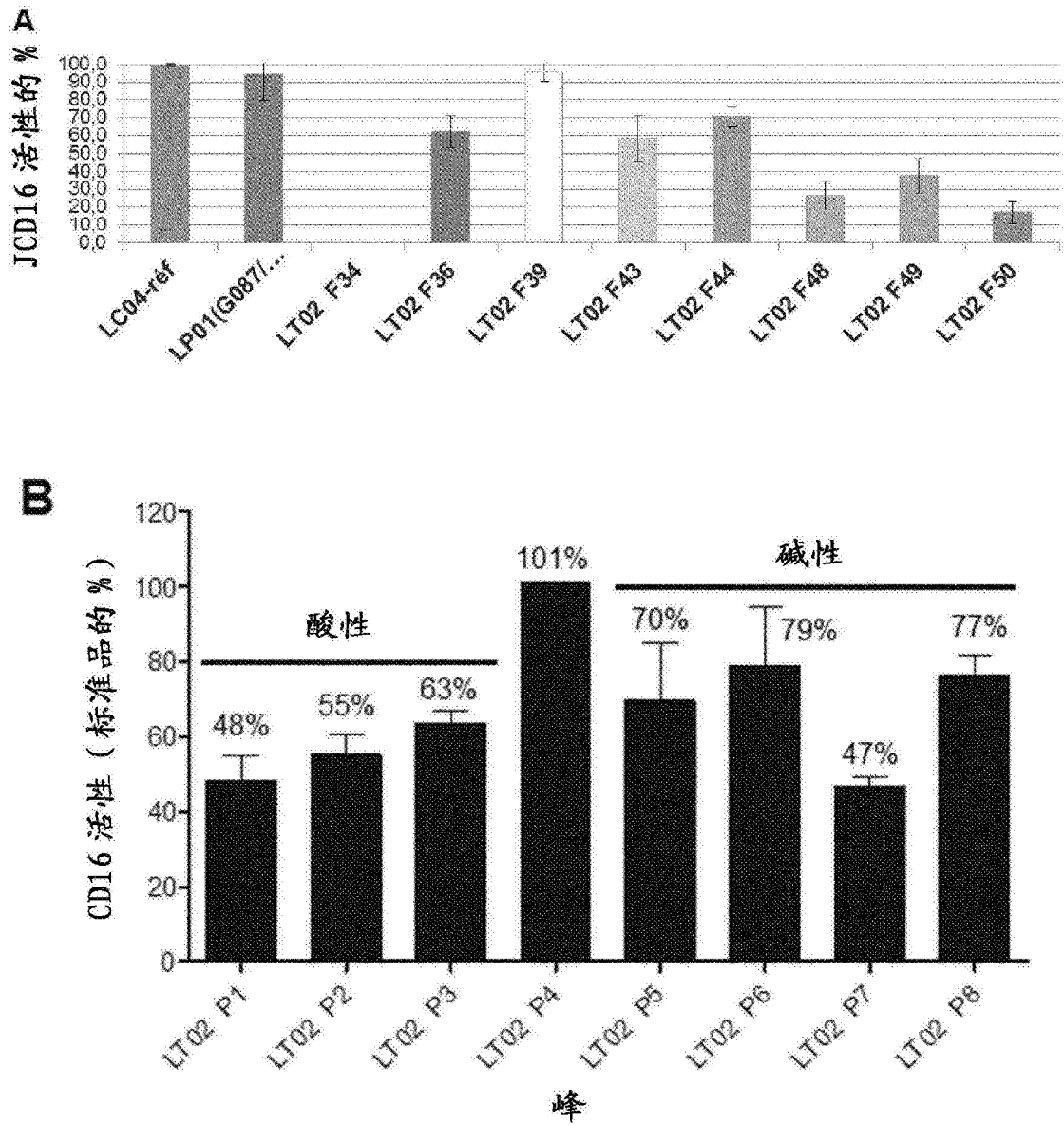


图5

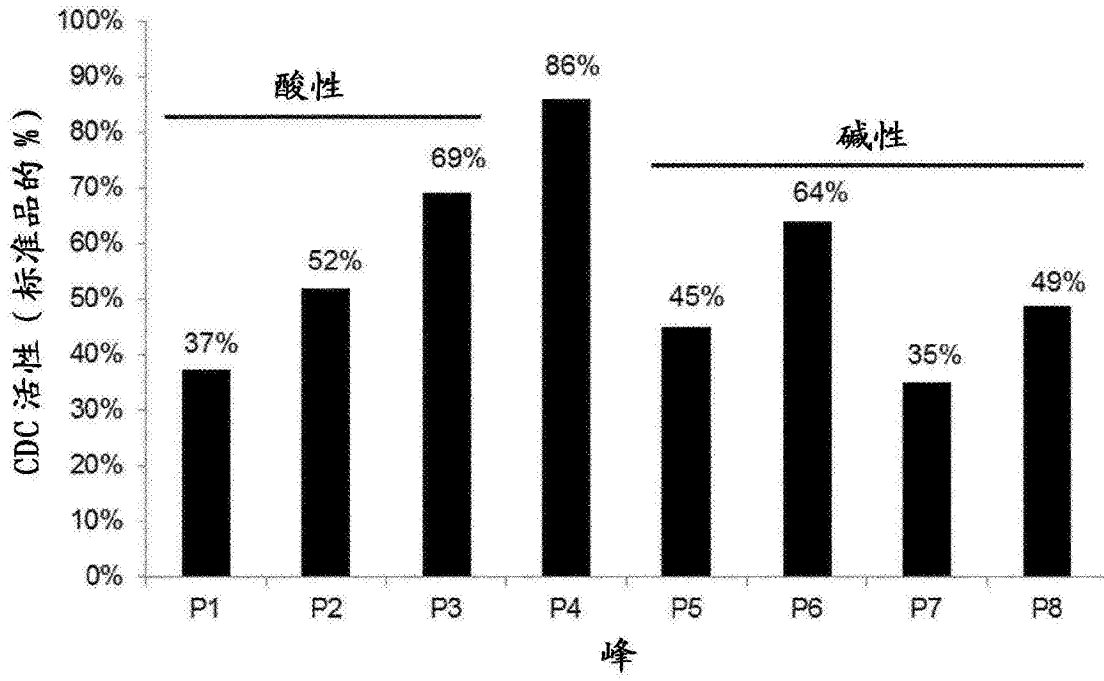


图6