

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02826018. X

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100423777C

[22] 申请日 2002. 10. 22 [21] 申请号 02826018. X

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 25 [33] US [31] 60/337,642

[32] 2002. 1. 9 [33] US [31] 60/347,694

[86] 国际申请 PCT/US2002/033739 2002. 10. 22

[87] 国际公布 WO2003/035835 英 2003. 5. 1

[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 24

[73] 专利权人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 伦纳德·G·普雷斯塔

[56] 参考文献

Characterization of mouse ST8SiaII as a neutral cell adhesion Molecule - specific polysialic acid synthase. . J. Biol. Chem. , Vol. 271 No. 32. 1996

Expression of GnTIII in a recombinant anti - CD20 CHO production cell line. Biotechnol. Bioeng. , Vol. 74 No. 4. 2001

审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 100 页 附图 29 页

[54] 发明名称

糖蛋白组合物

[57] 摘要

本发明涉及包含具有 Fc 区的糖蛋白的组合物，该组合物中约 80 - 100% 的糖蛋白包含缺乏岩藻糖的成熟的核心碳水化合物结构，该结构附着于糖蛋白的 Fc 区。 优选的糖蛋白是抗体和免疫粘附素。

1. 包含具有 Fc 区的糖蛋白的组合物, 该组合物中 80-100%的糖蛋白包含成熟的核糖碳水化合物结构, 该结构缺乏岩藻糖, 附着于糖蛋白的 Fc 区, 其中所述糖蛋白是免疫粘附素或抗体。
2. 权利要求 1 的组合物, 其中所述糖蛋白是抗体。
3. 权利要求 1 的组合物, 其中 Fc 区包括人 IgG Fc 区。
4. 权利要求 3 的组合物, 其中人 IgG Fc 区包括人 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。
5. 权利要求 1 的组合物, 其中的糖蛋白结合 Fc $\gamma$ RIII。
6. 权利要求 5 的组合物, 与具有附着于糖蛋白 Fc 区的包含岩藻糖的成熟核糖碳水化合物结构的糖蛋白相比, 该组合物中的糖蛋白以更好的亲和力结合 Fc $\gamma$ RIII, 或者更有效地介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用。
7. 权利要求 1 的组合物, 其中抗体是嵌合的, 人源化的或人的抗体。
8. 权利要求 1 的组合物, 其中抗体结合选自如下的抗原: B 细胞表面标志物, ErbB 受体, 肿瘤相关抗原或血管生成因子。
9. 权利要求 1 的组合物, 其中抗体结合 CD20, HER2, 血管内皮生长因子(VEGF), CD40, 或前列腺干细胞抗原(PSCA)。
10. 权利要求 9 的组合物, 其中抗体包括人源化抗-HER2 抗体, 嵌合抗-CD20 抗体和人源化抗-VEGF 抗体。
11. 权利要求 1 的组合物, 该组合物中 90-99%的糖蛋白包含成熟核糖碳水化合物结构, 该结构缺乏岩藻糖, 附着于糖蛋白的 Fc 区。
12. 权利要求 1 的组合物, 其中糖蛋白由中国仓鼠卵巢(CHO)细胞产生。
13. 权利要求 12 的组合物, 其中 CHO 细胞是 Lec13 细胞。
14. 权利要求 1 的组合物, 其中 90%-100%的糖蛋白缺乏附着于成熟核糖碳水化合物结构的对分 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)。
15. 权利要求 1 的组合物, 其中糖蛋白含有附着于成熟核糖碳水化合物结构的对分 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)。
16. 权利要求 1 的组合物, 其中糖蛋白含有附着于成熟核糖碳水化合物结构的一个或多个半乳糖残基。
17. 权利要求 1 的组合物, 其中 90%-100%的糖蛋白缺乏附着于成熟核

心碳水化合物结构的一个或多个半乳糖残基。

18. 权利要求 1 的组合物, 其中糖蛋白含有附着于成熟核心碳水化合物结构的一个或多个唾液酸残基。

19. 权利要求 1 的组合物, 其中 90%-100% 的糖蛋白缺乏附着于成熟核心碳水化合物结构的一个或多个唾液酸残基。

20. 权利要求 1 的组合物, 它是一种药物制剂。

21. 权利要求 20 的药物制剂, 进一步包含可药用的载体。

22. 权利要求 1 的组合物, 它是无菌的。

23. 权利要求 1 的组合物, 它是冻干的。

24. 权利要求 1 的组合物, 其中糖蛋白是免疫粘附素。

25. 包含具有 Fc 区的糖蛋白的组合物, 该组合物中 51-100% 的糖蛋白包含成熟核心碳水化合物结构, 该结构缺乏岩藻糖, 并附着于糖蛋白的 Fc 区, 其中 Fc 区包含与天然序列 Fc 区不同的氨基酸序列, 其中所述糖蛋白是免疫粘附素或抗体。

26. 权利要求 25 的组合物, 对其中的 Fc 区残基采用 EU 编号, 该 Fc 区包含氨基酸位置 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 或 430 中的任何一个或多个位置上的氨基酸取代。

27. 权利要求 26 的组合物, 其中 Fc 区包含对位置 298, 333 和 334 中的任何二个或三个残基的氨基酸取代。

28. 权利要求 27 的组合物, 其中 Fc 区包含对位置 298, 333 和 334 的氨基酸取代。

29. 权利要求 28 的组合物, 其中位置 298, 333 和 334 上的取代残基是丙氨酸。

30. 一种制品, 其包括:

容器;

所述容器上的标签; 和

包含在所述容器内的权利要求 1 的组合物。

31. 权利要求 30 的制品, 其中容器上的标签说明该组合物可用于治疗癌症, 自身免疫性疾病, 炎性疾病, 感染, 或其它需要去除细胞或组织的病症。

32. 权利要求 1 的组合物在制备治疗哺乳动物疾病的药物中的用途。

- 
33. 权利要求 32 的用途，其中的哺乳动物是人。
  34. 权利要求 33 的用途，其中所述的人表达 FcγRIII(F158)。
  35. 权利要求 32 的用途，其中所述的疾病或病症选自：癌症，自身免疫性疾病，炎性疾病，感染，或其它需要去除细胞或组织的病症。
  36. 包含编码糖蛋白的核酸的宿主细胞，该糖蛋白包含 Fc 区，其中由该宿主细胞产生的糖蛋白 80-100%包含成熟核心碳水化合物结构，该结构缺乏岩藻糖，并附着于糖蛋白的 Fc 区，其中所述糖蛋白是免疫粘附素或抗体。
  37. 权利要求 36 的宿主细胞，其为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。
  38. 产生糖蛋白的方法，包括培养权利要求 36 的宿主细胞以便表达所述核酸。
  39. 权利要求 38 的方法，进一步包括自宿主细胞培养物回收所述糖蛋白。
  40. 权利要求 39 的方法，进一步包括将所述糖蛋白与异源分子偶联。
  41. 权利要求 40 的方法，其中的异源分子是细胞毒剂或酶。

## 糖蛋白组合物

### 技术领域

本发明涉及包含具有改变的糖基化模式的糖蛋白的组合物。更具体地，本发明涉及包含具有 Fc 区的糖蛋白的组合物，其中约 80-100% 的糖蛋白包含成熟的核心碳水化合物结构，该结构缺乏岩藻糖，附着于糖蛋白的 Fc 区。

### 背景技术

#### 抗体

抗体是显示与特定抗原结合的特异性的蛋白。天然抗体通常是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白，由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接，不同免疫球蛋白的同种型(isotype)的重链间二硫键数目不同。每条重链和每条轻链也都具有规则排列的链间二硫桥。每条重链在一个末端具有可变区( $V_H$ )和多个恒定区。每条轻链在一个末端具有可变区( $V_L$ )，在其另一末端具有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一恒定区并列，轻链的可变区与重链的可变区并列。据信特定氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

术语“可变的”指不同抗体的可变区特定部分的序列差异极大，并导致每种特定抗体对其特定抗原的结合特异性。然而，该可变性在抗体的可变区中并非均匀分布。它主要集中在轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDRs)的三个片段中。可变区较保守的部分称为框架区(FRs)。天然重链和轻链的可变区各包含四个 FRs，大多数采用由三个 CDRs 连接的 $\beta$ -折叠构型，这三个 CDRs 形成连接 $\beta$ -折叠结构的环，在某些情况下形成 $\beta$ -折叠结构的一部分。每条链中的 CDRs 由 FRs 紧密相连，并且与来自另一条链的 CDRs 一起形成抗体的抗原结合位置(见 Kabat 等, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))。

恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但显示多种效应器(effector functions)功能。根据其重链恒定区的氨基酸序列，抗体或免疫球蛋白可分

为不同种类。主要有五种免疫球蛋白：IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM, 其中几种可被进一步分成亚类(同种型), 例如 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4; IgA1 和 IgA2。相应于免疫球蛋白不同种类的重链恒定区分别称为 $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , 和 $\mu$ 。不同的人免疫球蛋白种类中, 已知只有人 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgM 活化补体; 并且人 IgG1 和 IgG3 介导 ADCC 比 IgG2 和 IgG4 更有效。

图 1A 显示了天然 IgG1 的图示, 该图示表明了天然抗体分子的各个部分。抗体经木瓜蛋白酶消化可产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段)和残余的“Fc”片段, 每个“Fab”片段都具有单独的抗原结合位点, “Fc”片段的名称反应了其易于结晶的能力。已测定人 IgG Fc 区的晶体结构(Deisenhofer, *Biochemistry* 20:2361-2370(1981))。在人 IgG 分子中, 通过木瓜蛋白酶在 N 末端到 Cys226 的切割产生 Fc 区。Fc 区对抗体的效应器功能很重要。

本发明还涉及其它抗体样分子。例如, 已有文献报道“免疫粘附素”, 它组合了异源蛋白(例如受体, 配体或酶)的结合结构域和 Fc 区的效应器功能。此种分子的实例是美国专利 5,610,297 所述的肿瘤坏死因子受体-IgG(TNFR-IgG) 免疫粘附素。已描述双特异免疫粘附素和抗体-免疫粘附素嵌合体。Stabila, P., *Nature Biotech*, 16:1357(1998) 描述了另一种包含 Fc 区、胞浆膜锚着的融合蛋白。在该对比文件中, 该融合蛋白结合位于胞浆膜的 II 型跨膜结构域, 该跨膜结构域融合于 Fc 区的 N 末端。

抗体和免疫粘附素正被用作人类疾病的治疗剂。(Glennie 等 *Immunol. Today* 21:403-410(2000); King 等, *Curr. Opin. Drug Discovery Develop* 2:110-117(1999); Vaswani 等, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 81:105-119(1998); 和 Abraham 等, *Sec. Intern. Autumnal Them. Meeting on Sepsis*, Deauville, France(1995))。这些抗体和免疫粘附素中的一些可不利用抗体效应器机制起作用, 例如与受体或配体结合并因此阻断配体受体相互作用的那些。其它可能需要募集(recruit)免疫系统来杀死靶细胞(Clynes 等 *Nature Med.* 6:443-446(2000); Clynes 等 *PNAS(USA)* 95:652-656(1998); 和 Anderson 等 *Biochem. Soc. Trans.* 25:705-708(1997))。

### 抗体的效应器功能

抗体 Fc 区介导的效应器功能可分成两类: (1)抗体与抗原结合后启动的

效应器功能(这些功能涉及补体级联作用或具有 Fc 受体(FcR)的细胞的参与);和(2)不依赖抗原结合起作用的效应器功能(这些功能赋予在循环中的持续性和通过胞转(transcytosis)越过细胞屏障转移的能力)。Ward 和 Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94(1995)。

尽管抗体与必需抗原的结合具有中和效应,可防止外来抗原与其内源性靶点(例如受体或配体)的结合,但结合本身不能去除外来抗原。为有效去除和/或破坏外来抗原,抗体应具有对其抗原的高亲合力和有效的效应器功能。

抗体和抗体-抗原复合物与免疫系统细胞的相互作用产生多种应答,包括抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖的细胞毒作用(CDC)(综述见 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997); Ward 和 Ghetie, *Therapeutic Immunol.* 2:77-94(1995); 以及 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991))。

Fc 受体(FcRs)介导若干抗体效应器功能,该受体结合抗体的 Fc 区。按照对免疫球蛋白同种型的特异性定义 FcRs; IgG 抗体的 Fc 受体称为 Fc $\gamma$ R, IgE 抗体的 Fc 受体称为 Fc $\epsilon$ R, IgA 抗体的 Fc 受体称为 Fc $\alpha$ R, 以此类推。已鉴定 Fc $\gamma$ R 的三种亚类: Fc $\gamma$ RI(CD64), Fc $\gamma$ RII(CD32)和 Fc $\gamma$ RIII(CD16)。由于每种 Fc $\gamma$ R 亚类由二个或三个基因编码,并且可选地, RNA 剪拼产生多种转录物,因此存在大量不同的 Fc $\gamma$ R 同种型。编码 Fc $\gamma$ RI 亚类(Fc $\gamma$ RIA, Fc $\gamma$ RIB 和 Fc $\gamma$ RIC)的三种基因聚集在染色体 1 长臂上的 1q21.1 区; 编码 Fc $\gamma$ RII 亚类(Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB 和 Fc $\gamma$ RIIC)的基因和编码 Fc $\gamma$ RIII(Fc $\gamma$ RIIIA 和 Fc $\gamma$ RIIIB)的两种基因都聚集在 1q22 区。这些不同的 FcR 亚型在不同的细胞类型上表达(综述见 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991))。例如在人体内, Fc $\gamma$ RIIIB 只见于中性粒细胞,而 Fc $\gamma$ RIIIA 见于巨噬细胞,单核细胞,自然杀伤细胞(NK)和 T 细胞亚群。

结构上, Fc $\gamma$ R 是免疫球蛋白超家族的所有成员,具有结合 IgG 的  $\alpha$  链,其胞外部分由二个 Fc $\gamma$ RI 和 Fc $\gamma$ RIII 或三个(Fc $\gamma$ RI)Ig 样结构域组成。此外, Fc $\gamma$ RI 和 Fc $\gamma$ RIII 具有附加的蛋白链( $\gamma$ ,  $\xi$ ),它们与在信号转导中起作用的  $\alpha$  链相连。受体也由其对 IgG 的亲合力而被鉴别。Fc $\gamma$ RI 对 IgG 显示高亲合力,  $K_a = 10^8 - 10^9 M^{-1}$  (Ravetch 等 *Ann. Rev. Immunol.* 19:275-290(2001)),而且可结合单体 IgG。相反 Fc $\gamma$ RII 和 Fc $\gamma$ RIII 对单体 IgG 显示相对较弱的亲合力,

$K_a \leq 10^7 M^{-1}$  (Ravetch 等 *Ann. Rev. Immunol.* 19:275-290(2001)), 并因此只与多聚体免疫复合物相互作用。Fc $\gamma$ RII 受体包括 Fc $\gamma$ RIIA(“活化受体”)和 Fc $\gamma$ RIIB(“抑制受体”), 其具有类似的氨基酸序列, 它们的主要差别在其胞浆区。活化受体 Fc $\gamma$ RIIA 的胞浆区包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。抑制受体 Fc $\gamma$ RIIB 的胞浆区包含免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)(见 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997)中的综述)。NK 细胞只携带 Fc $\gamma$ RIIA, 而且抗体与 Fc $\gamma$ RIIA 的结合导致 NK 细胞产生 ADCC 活性。

在人群中发现了若干人 Fc $\gamma$ R 的等位基因变体。已证明这些等位基因变体形式在与人和鼠 IgG 的结合中显示差异, 一些联合研究也将临床结果与特定等位基因形式联系起来(见 Lehrnbecher 等 *Blood* 94(12):4220-4232(1999))。已有对 Fc $\gamma$ RIIA 的两种形式 R131 和 H131 以及它们与临床结果的关系的若干研究。(Hatta 等 *Genes and Immunity* 1:53-60(1999); Yap 等 *Lupus* 8:305-310(1999); 和 Lorenz 等 *European J. Immunogenetics* 22:397-401(1995))。而仅现在正在研究 Fc $\gamma$ RIIA 的两种等位基因形式 F158 和 V158(Lehrnbecher 等, 见上文; 和 Wu 等 *J. Clin. Invest.* 100(5): 1059-1070(1997))。Fc $\gamma$ RIIA(Val158)的同种异型与人 IgG 的反应优于 Fc $\gamma$ RIIA(Phe158)的同种异型(Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604(2001); Koene 等 *Blood* 90:1109-1114(1997); 和 Wu 等 *J. Clin. Invest.* 100: 1059-1070(1997))。

Fc 受体的另一种类型是新生儿 Fc 受体(FcRn)。FcRn 在结构上与主要组织相容性复合物(MHC)相似, 并且由与 $\beta$ -微球蛋白非共价结合的 $\alpha$ 链组成。据称 FcRn 调节血液中 IgG 的动态平衡并可能控制组织间的胞转作用。(Ghetie 等 *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766(2000))。

已确定人和鼠抗体上的 Fc $\gamma$ R 结合位点位于由残基 233-239 组成的所谓“较低铰链区”(EU 索引编号见 Kabat 等, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))。Woof 等 *Molec. Immunol.* 23:319-330(1986); Duncan 等 *Nature* 332:563(1988); Canfield 和 Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491(1991); Chappel 等, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:9036-9040(1991)。在残基 233-239 中, 据称 P238 和 S239 可能参与结合。

可能参与同 Fc $\gamma$ R 结合的其它已述区域是: G316-K338(人 IgG)结合人



FcγRI(仅通过序列比对; 没有评估取代突变体)(Woof 等 *Molec. Immunol.* 23:319-330(1986)); K274-R301(人 IgG1)结合人 FcγRIII(根据肽)(Sarmay 等 *Molec. Immunol.* 21:43-51(1984)); Y407-R416(人 IgG)结合人 FcγRIII(根据肽)(Gergely 等 *Biochem. Soc. Trans.* 12:739-743(1984)); 以及 N297 和 E318(小鼠 IgG2b)结合小鼠 FcγRII(Lund 等, *Molec. Immunol.* 29:53-59(1992))。也见 Armour 等 *Eur. J. Immunol.* 29: 2613-2624(1999)。

WO00/42072(Presta)描述了具有对 FcRs 增强或降低的结合的多肽变体。该专利公开的内容包含于本文中作为参考。也见 Shields 等 *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604(2001)。

C1q 和两种丝氨酸蛋白酶, C1r 和 C1s, 形成复合物 C1, 它是补体依赖的细胞毒作用(CDC)途径的第一组分。C1q 是六价分子, 其分子量约为 460,000, 并且具有被比作一束郁金香花的结构, 在该结构中, 六个互相粘链的“茎”与六个球形头区相连。Burton 和 Woof, *Advances in Immunol.* 51:1-84(1992)。为活化补体级联反应, 需要 C1q 与 IgG1, IgG2 或 IgG3 中至少两个分子结合(大多数人认为 IgG4 不活化补体), 但只需要与一个 IgM 分子结合, 从而附着于抗原靶点。Ward 和 Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94(1995) p80。

基于化学修饰和晶体学研究, Burton 等 *Nature*, 288:338-344(1980) 认为 IgG 上补体亚成分 C1q 的结合位点涉及 CH2 区最后两个(C 末端)β链。Burton 后来认为(*Molec. Immunol.*, 22(3):161-206(1985))包含氨基酸残基 318 到 337 的区可能参与补体固定。

Duncan 和 Winter *Nature* 332:738-40(1988), 利用定点诱变, 报道 Glu318, Lys320 和 Lys322 形成对 C1q 的结合位点。Duncan 和 Winter 的数据是通过检测小鼠 IgG2b 同种型与豚鼠 C1q 的结合产生的。通过包含这些残基的短合成肽抑制补体介导的溶解的能力证实了 Glu318, Lys320 和 Lys322 残基在 C1q 的结合中的角色。类似的结果在 1997 年 7 月 15 日公开的美国专利 5,648,260 和 1997 年 4 月 29 日公开的美国专利 5,624,821 中被公开。

通过分析人 IgG 亚类行使补体介导的细胞溶解的能力表明残基 Pro331 参与 C1q 结合。IgG4 中 Ser331 突变成 Pro331 可赋予其活化补体的能力。(Tao 等, *J. Exp. Med.*, 178:661-667(1993); Brekke 等, *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47(1994))。

通过比较 Winter 组和 Tao 等以及 Brekke 等的文章的数据, Ward 和 Ghetie 在其综述中推断至少有两个不同的区参与 C1q 的结合: 一个在 CH2 区的 $\beta$ 链上, 包含 Glu318, Lys320 和 Lys322 残基, 另一个区的位置在与同一 $\beta$ 链紧邻的转向(turn)处, 包含位置 331 上的关键氨基酸残基。

其它报道称位于较低铰链区的人 IgG1 残基 Lys235, 和 Gly237, 在补体固定和活化中起重要作用。Xu 等, *J. Immunol.* 150:152A(Abstract)(1993)。1994 年 12 月 22 日公开的 WO94/29351 报道人 IgG1 的 C1q 和 FcR 的结合必需的氨基酸残基位于 CH2 区的 N 末端区, 即残基 231 到 238 处。

据称 IgG 结合 C1q 和活化补体级联反应的能力也有赖于位于两个 CH2 区之间的碳水化合物部分(通常锚着于 Asn297)的存在、缺失或修饰。Ward 和 Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94(1995), 第 81 页。

美国专利 6,194,551B1 和 WO99/51642 中描述了具有改变的 Fc 区的氨基酸序列和增加或降低的 C1q 结合能力的多肽变体。那些专利公开的内容包含于本文中作为参考。也见等 *J. Immunol.* 164: 4178-4184(2000)。

其它增强免疫系统募集的方法包括双特异抗体, 其中抗体的一条臂结合 IgG 受体(Segal 等 *J. Immunol. Meth.* 248:1-6(2001)); 以及细胞因子-IgG 融合蛋白(Penichet 等 *J. Immunol. Meth.* 248:91-101(2001))。

### 抗体的糖基化

许多多肽, 包括抗体, 经过涉及碳水化合物部分的多种翻译后修饰, 例如以寡糖糖基化。此种糖基化的多肽称为“糖蛋白”。

若干因素影响糖基化。物种, 组织和细胞类型对糖基化发生的方式很重要。此外, 通过改变胞外环境的培养环境例如血清浓度, 可能对糖基化有直接的影响。(Lifely 等 *Glycobiology* 5(8): 813-822(1995))。多种方法可改变特定宿主有机物的糖基化模式, 包括引入或过度表达参与寡糖产生的特定酶(美国专利 5,047,335; 美国专利 5,510,261)。这些方案不限于细胞内方法(美国专利 5,278,299)。

所有抗体在重链恒定区的保守位置包含碳水化合物。每种抗体同种型都具有多种独特的 N 连接的碳水化合物结构。除了附着于重链的碳水化合物, 约 30%的人 IgGs 具有糖基化的 Fab 区。IgG 在 CH2 区的 Asn297 具有单一的 N 连接双触角碳水化合物。本文图 2 显示附着于 Asn297 的充分加工

后的碳水化合物结构。就连接于 Asn297 的碳水化合物而言, 来自血清或在体外由杂交瘤制备或由改造后的细胞产生的 IgG 是异源性的。Jefferis 等 *Immunol. Rev.* 163:59-76(1998); 和 Wright 等 *Trends Biotech* 15:26-32(1997)。对于人 IgG, 核心寡糖通常由 GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc 组成, 其外部残基的数目不同。本文的图 2 显示将寡糖加工成成熟碳水化合物的方法。当初期合成的种类 Glu<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> 自核糖体脱出时, 将它转移至抗体 CH<sub>2</sub> 区的 Asn297。糖蛋白经过内质网时三个末端葡萄糖被修剪, 此后糖蛋白移向高尔基体内侧网络(cis Golgi), 在该处甘露糖残基经 $\alpha$ 甘露糖苷酶的作用被去除。加工可停止于该结合点, 产生高甘露糖基化的糖蛋白。否则, 加工可继续进行产生 Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>。高尔基体中间囊泡(medial Golgi)上的 N-乙酰葡萄糖胺酰转移酶(N-acetylglycosaminyl transferase)I 是复合寡糖合成中的限速步骤。在高尔基体中间和外侧网络中, 寡糖经进一步加工修剪去掉甘露糖残基, 并顺序加入糖残基。新合成的糖蛋白随后离开高尔基体, 并被转运至细胞膜或被分泌。

通过半乳糖和/或半乳糖-唾液酸在两个末端 GlcNAc 的附着或通过第三个 GlcNAc 臂(对分(bisecting) GlcNAc)的附着产生单个 IgG 间的变异。已对连接于 IgG 的 Asn297 的碳水化合物进行了研究。碳水化合物的缺失影响与 C1q 和 Fc $\gamma$ R 的结合(并因此影响补体活化和 ADCC)。Leatherbarrow 等 *Molec. Immunol.* 22:407-415(1985); Duncan 等 *Nature* 332:738-740(1988); Walker 等 *Biochem. J.* 259:347-353(1989); Dorai 等 *Hybridoma* 10:211-217(1990); 和 Horan Hand 等 *Cancer Immunol. Immunother.* 35:165-174(1992)。尽管与 FcRn 的结合看似未受碳水化合物缺乏的影响, (Hobbs 等 *Molec. Immunol.* 29:949-956(1992); 和 Kim 等 *Eur. J. Immunol.* 24:542-548(1994)), 但对清除的影响是不确定的。(Dorai 等 *Hybridoma* 10:211-217(1990); Horan Hand 等 *Cancer Immunol. Immunother.* 35:165-174(1992); Hobbs 等 *Molec. Immunol.* 29:949-956(1992); Kim 等 *Eur. J. Immunol.* 24:542-548(1994); Wawrzynczak 等 *Biochem. Soc. Trans.* 17:1061-1062(1989); 和 Tao 等 *J. Immunol.* 143:2595-2601(1989))。当存在碳水化合物时, 糖残基的性质也可影响 IgG 效应器功能。据报道末端半乳糖残基的存在或缺失可影响功能(Wright 等 *J. Immunol.* 160:3393-3402(1998))并似乎与类风湿性关节炎相关(Parekh 等 *Nature* 316:452-457(1985))。自患有多发性骨髓瘤的病人血清中分离的人 IgG

在岩藻糖, 半乳糖和对分 N-乙酰葡糖胺的存在/缺失方面显示极端情况。(Parekh 等 *Nature* 316:452-457(1985)). Raju 等描述了不同物种的 IgG 糖基化的变异(Raju 等 *Glycobiology* 10(5):477-486(2000)).

Boyd 等发现通过糖肽酶 F 的消化从源于 CHO 的 CAMPATH-1H 去除末端唾液酸不影响任何待测 IgG 活性, 而发现从去除唾液酸后的 CAMPATH-1H 中去除多数半乳糖残基降低(但不完全破坏)补体溶解活性。其它活性未受去半乳糖基化的影响。Boyd 等 *Molec. Immunol.* 32(17/18):1311-1318(1995)。Kumpel 等, *Hum. 抗 bod. Hybridomas*, 5(3-4):143-151(1994)报道人 IgG 单克隆抗体的半乳糖基化影响 Fc 受体介导的功能活性。

Rothman 等检验了自杂交瘤纯化的单克隆 IgG 的 ADCC 功能, 所述杂交瘤经在碳水化合物加工途径中的不同阶段起作用的糖苷酶抑制物的处理。Rothman 等 *Molecular Immunol.* 26(12):1113-1123(1989)。经栗树精胺(castanospermine)(抑制自初生寡糖去除葡萄糖残基(Kaushal 等 *Meth. Enzymol.* 230:316-329(1994)))处理后, 仅表达 Fc $\gamma$ RIII 的 NK 细胞显示增强的 ADCC, 而其它类型的效应细胞例如单核细胞则不显示增强的 ADCC。凝集素结合分析显示栗树精胺处理后的 IgG 缺乏岩藻糖; 然而经栗树精胺处理产生的 IgG 可能具有其它的碳水化合物结构, 例如高甘露糖基化以及末端葡萄糖残基(Kaushal 等 *Meth. Enzymol.* 230:316-329(1994); Hashim 等 *Immunology* 63:383-388(1988); Hashim 等 *Molec. Immunol.* 24:1087-1096(1987)), 它们在由未处理的细胞分泌或来自人血清的 IgG 上未被常规地发现。

WO 97/30087 描述了糖基化抗体的制备, 其中抗体 Fc 区的 N 糖基化位置被双触角(biantennary)的寡糖取代。

Umana 等将 $\beta$ (1,4)-N-乙酰葡糖胺转移酶 III(GcTIII)基因引入中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 该酶催化向附着于抗体的 Asn297 的碳水化合物核心上添加对分 GlcNAc。认为通过改造的 CHO 细胞产生的糖基化形式具有最优化的 ADCC。见 WO 99/54342 和 Umana 等, *Nature Biotechnology*, 17:176-180(1999)。

WO98/58964(Raju 等) 描述了抗体组合物, 其中基本上所有 N 连接的寡糖是 G2 寡糖。G2 指具有两个末端 Gals 而不具有 NeuAcs 的双触角结构。WO99/22764(Raju 等) 指其 CH2 区基本上不包含具有 N 连接的 G1, G0 或

G-1 寡糖的糖蛋白的抗体组合物。G1 指具有一个 Gal 而不具有 NeuAcs 的双触角结构，G0 指其中不存在末端 NeuAcs 或 Gals 的双触角结构，而 G-1 指核心单位减去一个 GlcNAc。

WO00/61739 报道了 YB2/0(大鼠骨髓瘤)细胞表达的抗-hIL-5R 抗体的 47%具有 $\alpha$ 1-6 岩藻糖连接的糖链，而 NSO(小鼠骨髓瘤)细胞表达的该抗体的 73%具有该糖链。不同宿主细胞表达的 $\alpha$ -hIL-5R 抗体的岩藻糖相对比例是 YB2/0 < CHO/d < NSO。

Routier 等研究了 CHO-DUKX 细胞表达的人源化 IgG1 抗体(D1.3)的糖基化模式。CHO 表达的该抗体的 N-多糖结构是具有核心岩藻糖但缺乏对分 GlcNAc 和唾液酸的双触角 N-多糖。因其末端半乳糖基化不同，上述结构是异质的，并因此被称作 G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 和 G<sub>0</sub>。Routier 等 *Glycoconjugate J.* 14:201-207(1997)。

已有报道 O-连接的岩藻糖见于一些多肽中而且附着的岩藻糖对多肽的适当活性很重要。见 WO98/33924，其描述了以 O-岩藻糖部分进行糖基化的方法。Stankova 等 *J. Immunol.* 135(6):3719-3728(1985)发现岩藻糖显著增强混合白细胞培养(MCL)物诱导的或预孵育的效应细胞的溶细胞能力。Cameron 等 *Immunol. Lett.* 11:39-44(1985) 发现 $\alpha$ -L-岩藻糖在巨噬细胞-肿瘤细胞相互作用中起重要作用。

本领域持续需要产生诸如抗体等具有改良生物活性的糖蛋白。

### 发明综述

本发明涉及具有 Fc 区的糖蛋白的糖蛋白组合物，组合物中约 80-100%(优选约 90-99%)的糖蛋白包含缺乏岩藻糖的成熟核心碳水化合物结构，该结构附着于糖蛋白的 Fc 区。令人吃惊地，在本文中此种组合物与 Fc $\gamma$ RIIIA(F158)的结合显示增强 100 倍，但与人 IgG 的相互作用方面不及 Fc $\gamma$ RIIIA(V158)有效。因此，预计本文的组合物优于前述的组合物，尤其是对于治疗表达 Fc $\gamma$ RIIIA(F158)的人类病人。通常情况下，健康的非洲裔美国人和白人，Fc $\gamma$ RIIIA(F158)比 Fc $\gamma$ RIIIA(V158)更常见。见 Lehrnbecher 等 *Blood* 94:4220(1999)。

本发明进一步证实由于本文的糖基化变体与糖蛋白 Fc 区的氨基酸序列修饰的结合导致 Fc $\gamma$ RIII 结合和/或 ADCC 功能的协同增加。为产生具有增

强的 ADCC 活性的 Fc 区氨基酸序列变体, 技术人员通常改造具有增强的对 Fc $\gamma$ RIII 的结合亲和力的 Fc 区变体, 其被认为是介导 ADCC 的重要 FcR。例如, 技术人员可将氨基酸修饰(例如取代)引入亲本 Fc 区的氨基酸位点 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 或 430 中的任何一个或多个位置以产生此种变体。具有增强的对 Fc $\gamma$ RIII 的结合亲和力的变体可进一步具有降低的对 Fc $\gamma$ RII 的结合亲和力, 尤其是对抑制性 Fc $\gamma$ RIIB 受体的亲和力。在优选的实施方案中, Fc 区在位置 298, 333 和 334 具有氨基酸取代, 例如 S298A/E333A/K334A。具有改变的氨基酸序列的 Fc 区进一步包含更进一步增强 ADCC 的糖基化改变。例如, 变体 Fc 区可附着于缺乏岩藻糖的成熟核心碳水化合物结构。

因此, 本发明提供包含具有 Fc 区的糖蛋白的组合物, 组合物中的糖蛋白的约 51-100% 包含缺乏岩藻糖的成熟核心碳水化合物结构, 并附着于糖蛋白的 Fc 区, 而且其中的 Fc 区包含与天然序列 Fc 区不同的氨基酸序列。更优选地, 组合物中的糖蛋白约 80-100% 包含缺乏岩藻糖的成熟核心碳水化合物结构, 并更优选, 组合物中的糖蛋白约 90-99% 缺乏附着于成熟核心碳水化合物结构的岩藻糖。

例如, 所述糖蛋白可包括抗体和免疫粘附素。糖蛋白通常包含 Fc 区, 优选人 Fc 区; 例如人 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。糖蛋白显示对 Fc $\gamma$ RIII(例如 Fc $\gamma$ RIIIA(F158)和/或 Fc $\gamma$ RIIIA(V158))的增强的结合, 并且相对于具有附着于其成熟核心碳水化合物结构的岩藻糖的糖蛋白 ADCC 增强。

本发明还提供药物制剂, 它包含糖蛋白和可选的药用载体或稀释剂。可以用于治疗的制剂是无菌的并可以是冻干的。

本文涉及所述糖蛋白的诊断和治疗用途。在诊断应用中, 本发明提供确定感兴趣抗原的存在的方法, 包括将包含该抗原的可疑样品暴露于糖蛋白, 并测定糖蛋白对样品的结合。

在治疗应用中, 本发明提供治疗患有可从此种治疗中获益的疾病或有患该疾病倾向的哺乳动物的方法, 包括对哺乳动物使用治疗有效量的本文的组合物, 尤其在该组合物是药物制剂时。

本发明进一步提供了包含编码糖蛋白的核酸的宿主细胞, 该糖蛋白包含 Fc 区, 其中宿主细胞产生的糖蛋白的约 80-100% 包含成熟核心碳水化合物

物结构，该结构缺乏附着于糖蛋白 Fc 区的岩藻糖。此外，本发明提供了生产糖蛋白的方法，包括培养宿主细胞以表达所述核酸，并且可选地，自宿主细胞培养物中回收糖蛋白(例如从宿主细胞培养基中)。

本发明进一步提供了可用于治疗疾病的制品或试剂盒中的糖蛋白。

### 附图简述

图 1A 是天然 IgG 和其经酶消化所产生的各种抗体片段的图示。以 CH1 和 CL 区和两个 CH2 区之间的双线代表二硫键。V 是可变区；C 是恒定区；L 代表轻链而 H 代表重链。图 1B 显示附着于血清 IgG 的 Asn297 的经充分加工或“成熟”的核心碳水化合物结构(2100)，具有单个半乳糖残基(2110)的成熟核心碳水化合物结构以及具有两个半乳糖残基和一个对分 GlcNAc(3120)的核心碳水化合物结构。本图显示的四位编号系统反映了 GlcNAc，岩藻糖，半乳糖和唾液酸残基各自的编号。

图 2 显示将寡糖添加到 IgG CH2 区的 Asn297，随后在高尔基体内侧、中间和外侧对其进行加工以产生充分加工的复合双触角碳水化合物结构。栗树精胺抑制自初生寡糖去除葡萄糖和甘露糖残基。

图 3 显示具有正常岩藻糖代谢的 CHO 细胞表达的抗体上发现的重链 (Fc)寡糖。

在整个附图说明和实施例中，使用以下名称：

“Hu4D5”是人源化抗-HER2 4D5 抗体的简称，中国仓鼠卵巢简称为“CHO”，15cm 板中培养的 CHO-DP12 细胞命名为“CHO-P”，旋转培养瓶 (spinner flask) 中培养的 CHO-DP12 细胞命名为“CHO-S”，人胚胎肾 293 细胞简称为“HEK293”，“Lec 13”代表由 Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University Bronx, New York 的 Pamela Stanley 提供的具有岩藻糖代谢缺陷的 CHO 细胞系。在其 Fc 区具有 S298A/E333A/K334A 取代的 Hu4D5 称为“Hu4D5-AAA”，“E27”是美国专利 6,172,213 描述的亲合力成熟的/人源化的抗-IgE 抗体，在其 Fc 区具有 S298A/E333A/K334A 取代的 E27 称为“E27-AAA”，外周血单个核细胞抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用简称为“PBMC ADCC”。

图 4 显示 Hu4D5 单体与人 FcγRI 的结合。Hu4D5 抗体在 CHO-S，HEK293 细胞，CHO-P，或 Lec13 CHO 细胞(不同的两批)中表达。

图 5 显示 Hu4D5 二聚体与人 FcγRIIB 的结合。Hu4D5 抗体在 CHO-S 或 Lec13 细胞(不同的三批)中表达。

图 6 显示 Hu4D5 二聚体与人 FcγRIIA(R131)的结合。Hu4D5 抗体在 CHO-S 或 Lec13 细胞(不同的三批)中表达。

图 7 显示 Hu4D5 二聚体与人 FcγRIIA(R131)的结合。Hu4D5 抗体在 CHO-S 或 Lec13 细胞中表达(不同的三批)。

图 8 显示 CHO-S 或 Lec13 细胞(分别是不同的三批和两批)中表达的 Hu4D5 或 Hu4D5-AAA 二聚体与人 FcγIIIA(V158)的结合。

图 9 显示 CHO-S 或 Lec13 细胞(不同的三批)中表达的 Hu4D5 二聚体或 Lec13 细胞(不同的两批)中表达的 Hu4D5-AAA 二聚体与人 FcγIIIA(F158)的结合。

图 10 显示抗-IgE(E27)二聚体与人 FcγRIIIA(V158)的结合。在该试验中检测了 HEK293 细胞, CHO-P 细胞(两批)或 Lec13 细胞(两批)中表达的 E27。

图 11 显示抗-IgE(E27)二聚体与人 FcγIIIA(F158)的结合。在该试验中检测了 HEK293 细胞, CHO-P 细胞(两批)或 Lec13 细胞(两批)中表达的 E27。

图 12 显示抗-IgE(E27)六聚体和 E27-AAA 与 FcγIIIA(F158)的结合。该抗体是在 CHO-P, Lec13 或 HEK293 细胞中表达的。

图 13 显示抗-IgE(E27)六聚体和 E27-AAA 与 FcγIIIA(V158)的结合。该抗体是在 CHO-P, Lec13 或 HEK293 细胞中表达的。

图 14 显示 CHO-P, CHO-S 或 Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 与人 FcRn 的结合。

图 15 显示 Hu4D5 和抗-CD20(RITUXAN®)与人 C1q 的结合。Hu4D5 在 CHO-P 或 Lec13 细胞(两批)中表达。RITUXAN®在 CHO-P 细胞中表达。

图 16 代表 Hu4D5 或 RITUXAN®与人 C1q 的结合。用于本试验的 Hu4D5 在 CHO-P, Lec13(不同的三批) 或 CHO-S 细胞中表达。RITUXAN®在 CHO-P 细胞中表达。

图 17 利用 FcγRIII VF 供体显示对 SKBR3 乳腺肿瘤细胞(E:T 30:1)的 PBMC ADCC。显示了自发 ADCC 与由 CHO-S 或 Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 产生的 ADCC 的比较。

图 18 利用另一种 FcγRIII VF 供体显示对 SKBR3 乳腺肿瘤细胞(E:T 30:1)的 PBMC ADCC。显示了自发 ADCC 与由 CHO-S 或 Lec13 细胞中表达



的 Hu4D5 产生的 ADCC 的比较。

图 19 利用 Fc $\gamma$ RIII FF 供体显示对 SKBR3 乳腺肿瘤细胞(E:T 30:1)的 PBMC ADCC。显示了自发 ADCC 与由 CHO-S 或 Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 产生的 ADCC 的比较。

图 20 利用另一种 Fc $\gamma$ RIII FF 供体显示对 SKBR3 乳腺肿瘤细胞(E:T 30:1)的 PBMC ADCC。显示了自发 ADCC 与由 CHO-S 或 Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 产生的 ADCC 的比较。

图 21 利用 Fc $\gamma$ RIIA RR 供体显示对 SKBR3 乳腺肿瘤细胞(E:T 10:1)的 PBMC ADCC。显示了自发 ADCC 与由 CHO-S 或 Lec13 细胞(不同的两批)中表达的 Hu4D5 产生的 ADCC 的比较。

图 22 利用 Fc $\gamma$ RIIA HH 供体显示对 SKBR3 乳腺肿瘤细胞(E:T 10:1)的 PBMC ADCC。显示了自发 ADCC 与由 CHO-S 或 Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 产生的 ADCC 的比较。

图 23 显示天然序列 IgG Fc 区的比对。显示了天然序列人 IgG Fc 区的序列, humIgG1(非-A 和 A 同种异型)(分别为 SEQ ID NOs:1 和 2), humIgG2(SEQ ID NO:3), humIgG3(SEQ ID NO:4) 和 humIgG4(SEQ ID NO:5)。人 IgG1 序列是非-A 同种异型, 并在人 IgG1 序列下显示了该序列与 A 同种异型的差异(位置 356 和 358; EU 编号系统)。也显示了天然序列小鼠 IgG Fc 区的序列, murIgG1(SEQ ID NO:6), murIgG2A(SEQ ID NO:7), murIgG2B(SEQ ID NO:8)和 murIgG3(SEQ ID NO:9)。

图 24 显示 Hu4D5 和 Hu4D5-AAA 与 CD56 阳性自然杀伤(NK) 细胞的结合。被检物是:(1) FITC 偶联的抗-人 IgG, (2)来自 CHO-S 的 Hu4D5, (3)Lec 13 细胞中表达的 Hu4D5, 和(4) Lec 13 细胞中表达的 Hu4D5-AAA。

图 25 显示表达 Fc $\gamma$ RIII(F/F)受体的纯化的 NK 细胞的免疫荧光染色。

图 26 提供了来自 CHO-S 的 Hu4D5, 来自 Lec13 细胞的 Hu4D5, 来自 Lec 13 细胞的 Hu4D5-AAA, 和来自 HEK293 细胞的 Hu4D5 的 NK ADCC 活性的比较。供体是 Fc $\gamma$ RIII(F/F)。

图 27 用不同的 Fc $\gamma$ RIII(F/F)供体重复了图 26 中的试验。

图 28 显示抗-HER2 Hu4D5 单体与稳定转染人 Fc $\gamma$ RIIA  $\alpha$  链和 $\gamma$ 链的 CHO 细胞系的结合(一次实验的图示)。Hu4D5 CHO-S, 空心环; Hu4D5 Lec13-D, 空心正方形; Hu4D5 Lec13-E, 空心菱形; Hu4D5 Lec13-F, 空心

三角形; Hu4D5 HEK293-AAA, 实心环; Hu4D5 Lec13-AAA-B, 实心正方形; Hu4D5 Lec13-AAA-C, 实心菱形。

## 优选实施方案详述

### I. 定义

在本说明和权利要求书中, 免疫球蛋白重链中残基的编号使用 EU 索引, 如 Kabat 等所述, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991), 第 5 版, 其引入本文中作为参考。“Kabat 中的 EU 索引”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

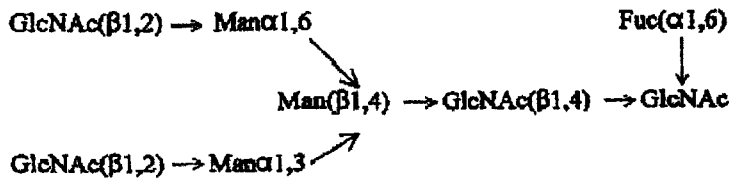
将参考通常用于描述寡糖的命名法描述本发明的碳水化合物部分。使用该命名法的碳水化合物化学的综述见 Hubbard 等 *Ann. Rev. Biochem.* 50:555-583(1981)。该命名法包括, 例如, Man 代表甘露糖; GlcNAc 代表 2-N-乙酰葡糖胺; Gal 代表半乳糖; Fuc 代表岩藻糖; 和 Glc 代表葡萄糖。通过以简化符号 NeuNAc 代表 5-N-乙酰神经氨酸, NeuNGc 代表 5-乙醇酰神经氨酸(5-glycolylneuraminic)描述唾液酸。

术语“糖基化”指寡糖(包含两个或更多连接在一起的单糖的碳水化合物, 例如连接在一起的二到约十二个单糖)与糖蛋白的附着。寡糖侧链通常通过 N 或 O 连接与糖蛋白的骨干连接。本发明的寡糖通常作为附着于 Fc 区的 CH2 区的 N 连接的寡糖出现。

“N-连接的糖基化”指碳水化合物部分附着于糖蛋白链中的天冬酰胺残基。本领域熟练技术人员已知, 例如小鼠 IgG1, IgG2a, IgG2b 和 IgG3 中的每一种, 以及人 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 和 IgD CH2 区在氨基酸残基 297 具有单独的 N 连接糖基化位点(Kabat 等 *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991)。

“糖蛋白”是具有一个或多个附着于它的寡糖侧链的多肽。

本文的“成熟核心碳水化合物结构”指附着于 Fc 区的加工后的核心碳水化合物结构, 通常由以下碳水化合物结构组成, GlcNAc(岩藻糖)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)<sub>2</sub>, 该结构通常是下图所示的双触角寡糖:



该术语特别包含缺乏 $\beta$ -1,2 GlcNAc 残基的核心成熟碳水化合物结构的 G-1 形式。然而, 优选该核心碳水化合物结构包含两种 $\beta$ -1,2 GlcNAc 残基。本文的成熟核心碳水化合物结构通常不是高甘露糖基化的。

成熟核心碳水化合物结构通常通过与 Fc 区的 CH2 区的 Asn297 之间的 N 连接, 附着于糖蛋白的 Fc 区。

“对分 GlcNAc”是附着于成熟核心碳水化合物结构的 $\beta$ 1,4 甘露糖的 GlcNAc 残基。通过 $\beta$ (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺酰转移酶 III(Gn III)的作用, 对分 GlcNAc 可附着于成熟核心碳水化合物结构。CHO 细胞通常不表达 GnTIII(Stanley 等 *J. Biol. Chem.* 261:13370-13378(1984)), 但经改造可以表达之(Umana 等 *Nature Biotech.* 17:176-180(1999))。

“基本不含”一个或多个选定的糖基(例如对分 GlcNAc, 一个或多个半乳糖残基, 或一个或多个唾液酸残基)的糖蛋白通常由将选定的糖基添加到成熟核心碳水化合物结构上有缺陷的宿主细胞产生, 例如组合物中约 90-100%的糖蛋白缺乏附着于成熟核心碳水化合物结构的选定的糖基。

“糖苷酶”是涉及天冬酰胺连接的(N-连接的)糖蛋白的生物合成的酶。

“修剪(trimming)”酶是除去寡糖的酶, 而“转移酶”添加寡糖。糖苷酶的实例包括修剪性葡萄糖苷酶(trimming glucosidase)例如葡萄糖苷酶 I 和葡萄糖苷酶 II; 修剪甘露糖苷酶例如粗面内质网甘露糖苷酶(rER 甘露糖苷酶), 甘露糖苷酶 IA, 甘露糖苷酶 IB 和甘露糖苷酶 II; 以及转移酶如糖基转移酶, 例如((1,4)-N-乙酰葡萄糖胺酰转移酶 III(GnT III), Gal-转移酶, 唾液酸转移酶和岩藻糖转移酶。

“糖苷酶抑制物”指降低或阻止通过一种或几种糖苷酶所进行的 N-连接的寡糖加工的化合物或组合物。实例包括, 野苾霉素(nojirimycin), 1-脱氧野苾霉素(1-deoxynojirimycin)(dNM), N-甲基-1-脱氧-野苾霉素(M-dNM), 栗树精胺(castanospermine), 溴环己烯四醇(bromoconduritol), 1-脱氧甘露野苾霉素(1-deoxymannojirimycin)(dMM), australine, MDL, lentiginosine, 和苦马豆素(Swainsonine)(Sw)。糖苷酶抑制物的综述见 Fuhrmann 等 *Biochim. Biophys. Acta* 825:95-110(1985); Kaushal 和 Elbein, *Methods in Enzym.*

230:316-329(1994); 和 Elbein, A. *FASEB* 5:3055-3063(1991)。

“Lec13”指凝集素抗性中国仓鼠卵巢(CHO)突变细胞系, 该细胞系显示有缺陷的岩藻糖代谢, 并因此具有降低的将岩藻糖添加到复合碳水化合物的能力。该细胞系在 Ripka 和 Stanley, *Somatic Cell & Molec. Gen.* 12(1):51-62(1986); 和 Ripka 等 *Arch. Biochem. Biophys.* 249(2):533-545(1986) 中描述并可自 Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, New York 获得。据信 Lec13 细胞缺乏 GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶的转录物, 该酶是岩藻糖代谢的关键酶。Ohyama 等 *J. Biol. Chem.* 273(23):14582-14587(1988)。GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶从 GDP-甘露糖产生 GDP-甘露糖-4-酮-6-D-脱氧甘露糖, 后者随后被 FX 蛋白转化成 GDP-L-岩藻糖。岩藻糖基化寡糖的表达有赖于 GDP-L-岩藻糖供体底物和岩藻糖转移酶。

“岩藻糖转移酶”是将一个或多个岩藻糖添加于糖蛋白的酶。实例包括 $\beta$ -1,6-岩藻糖转移酶, FucTI, FucTII, FucTIII, FucTIV, FucTV, FucTVI 和 FucTVII。Uozumi 等 *J. Biol. Chem.* 271:27810-27817(1996), 和 Yanagidani 等 *J. Biochem.* 121:626-632(1997)分别描述了猪和人 $\alpha$ 1,6-岩藻糖转移酶。

“唾液酸转移酶”是将一个或多个唾液酸残基添加到糖蛋白的酶。 $\alpha$ 2,3 唾液酸转移酶可将唾液酸残基添加到附着于成熟核心碳水化合物结构的半乳糖残基。

“半乳糖转移酶”是将一个或多个半乳糖残基添加到糖蛋白的酶。 $\beta$ 1,4-半乳糖转移酶可将半乳糖残基添加到成熟核心碳水化合物结构。

术语“包含 Fc 区的糖蛋白”指糖蛋白, 例如包含 Fc 区的抗体或免疫粘附素。

术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C 末端区, 例如, 如图 1A 所示。Fc 区可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可变, 人 IgG 重链 Fc 区通常被限定为自氨基酸残基 Cys226 位点, 或自位点 Pro230 延伸至该重链羧基端的区段。免疫球蛋白的 Fc 区通常包括两个恒定区, CH2 区和 CH3 区, 如图 1A 所示。

“功能性 Fc 区”包括天然序列 Fc 区的“效应器功能”。“效应器功能”的实例包括: C1q 结合; 补体依赖的细胞毒作用(CDC); Fc 受体结合; 抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC), 吞噬作用; 细胞表面受体下调(例如 B

细胞受体, BCR)等。此种效应器功能通常需要 Fc 区与结合区(例如抗体的可变区)相组合, 并可使用例如本文公开的多种方法对其进行评估。

“天然序列 Fc 区”包括与天然发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区显示于图 23, 并包括天然序列人 IgG1 Fc 区(非-A 和 A 同种异型); 天然序列人 IgG2 Fc 区; 天然序列人 IgG3 Fc 区和天然序列人 IgG4 Fc 区以及其天然存在的变体。天然序列小鼠 Fc 区也显示于图 23。天然序列 Fc 区的其它实例包括天然序列人 IgA Fc 区和天然序列人 IgD Fc 区。

“变体 Fc 区”包含经过本文限定的至少一个“氨基酸修饰”, 与天然 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选, 变体 Fc 区与天然序列 Fc 区或与亲代多肽 Fc 区相比具有至少一个氨基酸取代, 例如天然序列 Fc 区中或亲代多肽 Fc 区中从约一个到约十个氨基酸取代, 例如从约一个到约十个氨基酸取代, 优选天然序列 Fc 区中或亲代多肽 Fc 区中从约一个到约五个氨基酸取代。本文的变体 Fc 区将优选与天然序列 Fc 区和/或亲代多肽 Fc 区具有至少约 80% 的同一性, 更优选地至少约 90% 的同一性, 更优选地至少约 95% 的同一性。

“同一性”定义为经过序列比对氨基酸序列变体中相同残基的百分比, 并在必要时引入缺口以获得序列最大百分比的同一性。本领域技术人员熟悉比对的方法和计算机程序。一种这样的计算机程序是“ALIGN-2”, 该程序由 Genentech, Inc. 授权, 其源代码已连同用户手册于 1991 年 11 月 10 日提交美国版权局, 华盛顿特区, 20559,

“Fc 受体”或“FcR”描述结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。而且, 优选的 FcR 是结合 IgG 抗体( $\gamma$ 受体)和包括 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII 和 Fc $\gamma$ RIII 亚类的受体, 包括等位基因变体和这些受体的不同剪接形式。Fc $\gamma$ RII 受体包括 Fc $\gamma$ RIIA(“活化受体”)和 Fc $\gamma$ RIIB(“抑制受体”), 这两种受体具有相似氨基酸序列, 它们的差别主要在胞浆区域。活化受体 Fc $\gamma$ RIIA 的胞浆区包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc $\gamma$ RIIB 的胞浆区包含免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)(参见 Daeron, *Annu.Rev.Immunol.*, 15:203-2349(1997)中的综述)。本文的 Fc 受体包括两种已知天然存在的人 Fc $\gamma$ RII 同种异型, 即 Fc $\gamma$ RII(H131) 和 Fc $\gamma$ RII(R131)(由位置 131 的氨基酸决定(Clark 等 *J. Immunol.* 143: 1731-1734(1989))), 和人 Fc $\gamma$ RIIA 的天然存在

的同种异型。人 Fc $\gamma$ RIIIA 在位置 48(Leu, His 或 Arg)和位置 158(Val 或 Phe)上具有天然存在的同种异型。Fc $\gamma$ RIIIA(V158)同种异型与人 IgG 的反应优于 Fc $\gamma$ RIIIA(F158)同种异型(Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604(2001); Koene 等 *Blood* 90:1109-1114(1997); 和 Wu 等 *J. Clin. Invest.* 100: 1059-1070(1997))。有关 FcRs 的综述可参见 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92(1991); Capel 等, *Immunomethods*, 4:25-34(1994); 和 de Haas 等, *Lab. Clin. Med.*, 126:330-41(1995)。其它 FcRs, 包括有待将来鉴定的那些, 均包含于本文术语“FcR”中。该术语还包括新生儿受体, FcRn, 其负责将 IgGs 由母体转运至胎儿(Guyer 等, *J. Immunol.*, 117:587(1976)和 Kim 等, *J. Immunol.*, 24:249(1994))。

“抗体依赖细胞介导的细胞毒作用”或“ADCC”指一种细胞介导的反应, 其中表达 FcRs 的非特异细胞毒作用细胞(例如自然杀伤(NK)细胞, 中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞的溶解。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞只表达 Fc $\gamma$ RIII, 而单核细胞表达 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII 和 Fc $\gamma$ RIII。造血细胞上 Fc $\gamma$ R 的表达在 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92(1991)464 页的表 3 中总结。

“人效应器细胞”是表达一种或多种 FcRs 并行行使效应器功能的白细胞。优选, 该细胞至少表达 Fc $\gamma$ RIII 并行行使 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人白细胞的实例包括外周血单个核细胞(PBMC), 自然杀伤细胞(NK), 单核细胞, 细胞毒性 T 细胞和中性粒细胞; 优选 PBMCs 和 NK 细胞。效应器细胞可自其天然来源, 例如自血液或 PBMCs 中分离。

“铰链区”通常被定义为人 IgG1 的自 Glu216 至 Pro230 的延伸区域(Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206(1985))。可通过将形成重链间 S-S 键的最开始的和最后的半胱氨酸残基置于相同位置上, 来比对其它 IgG 同种型的铰链区和 IgG1 的序列。

Fc 区的“较低铰链区”通常被限定为紧邻铰链区 C 末端残基的延伸区, 即 Fc 区的残基 233 到 239。

本发明的“CH<sub>2</sub>”区用于描述具有至少一个 N-连接寡糖的附着位点的 CH<sub>2</sub> 区, 该位点通常在 Asn297。本发明的糖蛋白的特征在于其包含或经修饰而至少包含具有人 IgG CH<sub>2</sub> 区的 N-连接寡糖的 CH<sub>2</sub> 区。优选 CH<sub>2</sub> 区是人 IgG1 的 CH<sub>2</sub> 区。使用免疫球蛋白重链残基编号方式的 EU 索引, 人 IgG

CH2 区通常自 Fc 区的大约氨基酸 231 延伸至大约氨基酸 340。

“CH3 区”包括 Fc 区中 C 末端到 CH2 区残基的延伸区域(即 IgG 中自大约位点 341 的氨基酸残基到大约位点 447 的氨基酸残基)。

术语“氨基酸”指所有天然存在的  $\alpha$  氨基酸的 D 和 L 的立体异构形式, 及其类似物和衍生物。类似物定义为以通常具有相似性质的不同原子对氨基酸中的原子的取代。衍生物定义为具有附着于它的另一分子或原子的氨基酸。衍生物包括, 例如氨基基团的乙酰化, 羧基基团的氯化, 或将两个半胱氨酸分子的硫残基氧化以形成胱氨酸。

本文的“多肽”通常指具有约十个以上氨基酸的肽和蛋白质。多肽可以和表达它的宿主细胞同源, 或优选, 可以是外源的, 意味着它们是异源的, 即, 对所使用的宿主细胞而言是外来的, 例如 CHO 细胞产生的嵌合的, 人源化的或人抗体。

术语“抗体”是指最广义上的抗体并尤其包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体), 多克隆抗体, 多特异抗体(例如双特异抗体)和显示所需生物活性的抗体片段。

用于本发明目的的“抗体片段”包含完整抗体的一部分, 通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区或抗体的 Fc 区。抗体片段的实例包括线形抗体; 单链抗体分子; 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

本文术语“单克隆抗体”是指自一群基本同质的(homogeneous)抗体群获得的抗体, 即除了少量可能天然存在的突变以外, 包含在该群中的各个抗体完全相同。单克隆抗体针对单个抗原位点高度特异。而且, 与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反, 每种单克隆抗体针对抗原的单个决定簇。除特异性外, 单克隆抗体的优点在于可通过杂交瘤培养来合成, 不受其它抗体污染。修饰词“单克隆”表明抗体的特点是来自基本同质的抗体群, 而不解释为需通过任何特殊方法产生抗体。例如, 根据本发明应用的单克隆抗体可通过 Kohler 等(Nature, 256: 495(1975))首先描述的杂交瘤法, 或者重组 DNA 法制备(例如见美国专利 4816567)。还可用例如 Clackson 等(Nature, 352: 624-628(1991))和 Marks 等(J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991))所述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

本文中单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白), 其重链和/或

轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体的相应序列相同或同源，但该链剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体(以及此抗体的片段，只要它们显示所需生物活性)的相应序列相同或同源。美国专利 4,816,567; 和 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855(1984)。

非人(例如小鼠)抗体的“人源化”形式是包含非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在很大程度上，人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体)，其中来自受者超变区的残基被具有所需特异性、亲合力和性能的来自非人物种例如小鼠、大鼠或家兔(供体抗体)的超变区残基所取代。在一些实例中，人免疫球蛋白的 Fv 框架区(FR)残基被相应非人残基取代。而且，人源化抗体可包括在受者抗体或供体抗体中未被发现的残基。这些修饰旨在进一步改善抗体的性能。通常，人源化抗体基本上包括至少一个(通常包括两个)可变区的全部，其中全部或基本上全部超变区环对应于非人免疫球蛋白的超变区环，而全部或基本上全部 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人源化抗体可选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常是人免疫球蛋白的 Fc 区。详见 Jones 等, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

“人抗体”是具有相应于人产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或使用本文公开的任何一种制备人抗体的技术制备的抗体。人抗体的定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。使用各种本领域已知的技术可产生人抗体。在一个实施方案中，人抗体选自噬菌体文库，该噬菌体文库表达人抗体(Vaughan 等 *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets 等 *PNAS(USA)* 95:6157-6162(1998)); Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991))。也可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物制造人抗体，该转基因动物可以是例如内源性免疫球蛋白基因被部分或完全灭活的小鼠。攻击后观察人抗体的产生，其与在人中所见的情形在各方面均十分相似，包括基因重排，组装，和抗体库。该方法在例如美国专利 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 和以下科学出版物中描述: Marks 等, *Bio/Technology* 10: 779-783(1992); Lonberg 等, *Nature* 368: 856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild 等, *Nature Biotechnology* 14: 845-51(1996);



Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826(1996); Lonberg 和 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)。可选地, 可通过将产生针对目的抗原(此种 B 淋巴细胞可自个体回收或在体外被免疫)的抗体的人 B 淋巴细胞永生化制备人抗体。见例如, Cole 等, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner 等, *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991); 和美国专利 5,750,373。

本文中术语“超变区”是指抗体上负责与抗原结合的氨基酸残基。超变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即, 轻链可变区中的残基 24-34(L1), 50-56(L2)和 89-97(L3), 重链可变区中的 31-35(H1), 50-65(H2)和 95-102(H3); Kabat 等, *Sequence of proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)), 和/或来自“超变环”的那些残基(即, 轻链可变区中的残基 26-32(L1), 50-52(L2)和 91-96(L3), 重链可变区中的 26-32(H1), 53-55(H2)和 96-101(H3); Chothia 和 Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基是那些可变区的残基而不是本文定义的超变区残基。

本文中所用术语“免疫粘附素”为抗体样分子, 其组合了异源“粘附素”蛋白(例如受体, 配体或酶)的“结合结构域”与免疫球蛋白恒定区。结构上, 免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点(抗原结合位点), 但具有所需结合特异性的粘附素氨基酸序列(即是“异源性的”)与免疫球蛋白恒定区序列的融合。

本文的术语“配体结合区”指任何细胞表面的天然受体或其至少保持相应天然受体性质上的配体结合能力的任何区或衍生物。在特定的实施方案中, 受体来自于具有胞外区的细胞表面多肽, 该多肽与该免疫球蛋白超家族的成员同源。其它不是免疫球蛋白超家族成员但又为该概念明确涵盖的受体是细胞因子的受体, 特别是具有酪氨酸激酶(受体酪氨酸激酶)活性的受体, 促红细胞生成素和神经生长因子受体超家族成员, 以及细胞粘附分子, 例如(E-, L- 和 P-) 选择素。

术语“受体结合区”指任何受体的天然配体, 包括细胞粘附分子, 或至少保持相应天然配体性质上的受体结合能力的此种天然配体的任何区或衍生物。此外, 该定义特别包括了上述受体的配体的结合序列。

“抗体-免疫粘附素嵌合体”包含将抗体(本文的)的至少一个结合区与至少一个免疫粘附素(本文的)结合的分子。抗体-免疫粘附素嵌合体的实例

是双特异 CD4-IgG 嵌合体, 见 Berg 等, *PNAS(USA)* 88:4723-4727(1991)和 Chamow 等, *J. Immunol.* 153:4268(1994)。

本文术语“制备物”定义了已被鉴定并分离和/或作为其环境的组分回收的组合物或糖蛋白。该制备物的环境的污染成分是干扰组合物或糖蛋白的诊断或治疗用途的物质, 例如不需要的或不想要的糖形式(glycoform), 并且可包括酶, 激素, 和其它蛋白或非蛋白溶质。本发明的制备物基本不含这些污染物。在优选的实施方案中, 糖蛋白制备物可被纯化(1)至通过 Lowry 方法测定的抗体重量的 95% 以上, 并最优选大于 99% 重量, (2)至足以通过采用转杯式测序仪(spinning cup sequenator)得到 N-末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基, 或(3)至在还原或非还原条件下经 SDS-PAGE 及考马斯兰或优选银染色证实为均质。

本文的“药物制剂”是适合用药于哺乳动物, 尤其是人的组合物。因此该组合物可用于治疗哺乳动物中的疾病或失调。此外, 组合物中的活性成分糖蛋白经过一次或多次纯化或分离步骤, 使得可能干扰其治疗用途的污染物从中分离出来。通常, 药物制剂包含治疗性糖蛋白和可药用的载体或稀释剂, 其实例在下文描述。该制剂通常是无菌的, 也可以是冻干的。

本文的“亲本糖蛋白”是除岩藻糖附着于成熟核心碳水化合物结构外, 具有与本发明糖蛋白变体相同的氨基酸序列和成熟核心碳水化合物结构的糖蛋白。例如在包含亲本糖蛋白的组合物中, 约 50-100%或约 70-100%的亲本糖蛋白包含具有附着的岩藻糖的成熟核心碳水化合物结构。

以比亲本糖蛋白“更好的亲合力”结合 FcR 的糖蛋白变体, 是当结合实验中糖蛋白变体和亲本多肽的量基本相同时, 以实质好于亲本糖蛋白的结合亲合力结合任何一种或几种上述的 FcR 的糖蛋白。例如, 具有提高的 FcR 结合亲合力的变体与亲本糖蛋白相比, 在 FcR 结合亲合力上可显示约 5 倍到约 1000 倍, 例如从约 10 倍到约 500 倍的提高, 其中按照如本文实施例公开的内容测定 FcR 结合亲合力。

与亲本多肽相比, “在人效应器细胞存在时更有效地介导抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)”的糖蛋白变体是当结合实验中糖蛋白变体和亲本糖蛋白的量基本相同时, 在体外或体内比亲本糖蛋白更有效地介导 ADCC 的糖蛋白。通常, 使用本文公开的体外 ADCC 实验可鉴定此种糖蛋白变体, 但也涉及其它测定 ADCC 活性的实验或方法, 例如在动物模型中等等。优

选的糖蛋白变体介导 ADCC 的效率比其亲本糖蛋白高约 1.5 倍到约 100 倍，例如约 2 倍到约 50 倍，例如在本文公开的体外实验中。

“氨基酸修饰”指预先测定的氨基酸序列的氨基酸序列中的变化。修饰的实例包括氨基酸取代，插入和/或缺失。本文优选的氨基酸修饰是取代。

特定位点的“氨基酸修饰”，例如 Fc 区的氨基酸修饰，指特定残基的取代或缺失，或者与特定残基邻近的至少一个氨基酸残基的插入。“邻近”特定残基的插入指在其邻近一至二个残基内的插入。该插入可位于特定残基的 N 末端或 C 末端。

“氨基酸取代”指以另一个不同的“取代”氨基酸残基取代至少一个存在于预测定的氨基酸序列中的氨基酸残基。取代的一个残基或多个残基可以是“天然存在的氨基酸残基”(即由基因密码编码)和选自以下的氨基酸：丙氨酸(Ala); 精氨酸(Arg); 天冬酰胺(Asn); 天冬氨酸(Asp); 半胱氨酸(Cys); 谷氨酰胺(Gln); 谷氨酸(Glu); 甘氨酸(Gly); 组氨酸(His); 异亮氨酸(Ile); 亮氨酸(Leu); 赖氨酸(Lys); 蛋氨酸(Met); 苯丙氨酸(Phe); 脯氨酸(Pro); 丝氨酸(Ser); 苏氨酸(Thr); 色氨酸(Trp); 酪氨酸(Tyr); 和缬氨酸(Val)。优选，取代残基不是半胱氨酸。以一个或多个非天然存在的氨基酸进行取代也包含在本文的氨基酸取代概念中。“非天然存在的氨基酸残基”指能够共价结合多肽链中的邻近氨基酸残基的残基，而不是上述的那些天然存在的氨基酸。非天然存在的氨基酸残基的实例包括正亮氨酸，鸟氨酸，正缬氨酸，高丝氨酸和其它氨基酸残基类似物，例如 Ellman 等 *Meth. Enzym.* 202:301-336(1991)中描述的那些。为产生此种非天然存在的氨基酸残基，可使用 Noren 等 *Science* 244:182(1989)和 Ellman 等，见上文中的方法。简言之，这些方法涉及以非天然存在的氨基酸残基以化学方法活化抑制 tRNA，并随后进行 RNA 的体外转录和翻译。

“氨基酸插入”指至少一个氨基酸纳入预测定的氨基酸序列。尽管插入通常由一或两个氨基酸残基的插入组成，但本发明还涉及更大的“肽插入”，例如约三个到约五个甚至约十个氨基酸残基的插入。如上述，插入残基可以是天然存在的或非天然存在的氨基酸残基。

“氨基酸缺失”指自预测定的氨基酸序列去除至少一个氨基酸残基。

“C1q”是包括免疫球蛋白 Fc 区的结合位置的多肽。C1q 和两种丝氨酸蛋白酶，Clr 和 Cls，形成复合物 C1，其是补体依赖的细胞毒作用(CDC)

途径的第一成分。人 C1q 可自例如 Quidel, San Diego, CA, 作为商品购买。

“治疗”指治疗性疗法和防病或预防措施。需要治疗的包括那些已患该病或那些需预防该病的人。

文中的“疾病”指任何可从糖蛋白的治疗中受益的情况。包括慢性和急性疾病或包括使哺乳动物对所述疾病具有倾向性的那些病理情况。在一个实施方案中, 该疾病是癌症, 自身免疫病, 炎性疾病, 感染或其它情况例如需要去除不良组织或细胞的甲状腺肿。本文优选的待治疗疾病是癌症或自身免疫病。

术语“癌症”和“癌症的”指或描述哺乳动物以失控的细胞生长为典型特征的病理情况。癌症的实例包括但不限于, 癌, 淋巴瘤, 母细胞瘤, 肉瘤和白血病。此种癌症更具体的例子包括鳞状细胞癌, 小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 肺腺癌, 胃肠道癌, 肺鳞状细胞癌, 腹膜癌, 肝细胞癌, 胰腺癌, 胶质母细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌, 膀胱癌, 乳腺癌, 结肠癌, 结肠直肠癌, 子宫内膜癌或子宫癌, 唾液腺癌, 肾癌, 前列腺癌, 外阴癌, 甲状腺癌, 和各种头颈部癌。

本文的“B 细胞恶性疾病”包括非霍奇金氏淋巴瘤(NHL), 包括低级/滤泡状 NHL, 小淋巴细胞性(SL) NHL, 中级/滤泡状 NHL, 中级弥漫型 NHL, 高级免疫母细胞性 NHL, 高级淋巴母细胞性 NHL, 高级小非凹陷(non-cleaved)细胞 NHL, 巨大肿块(bulky disease)NHL, 套细胞(mantle cell)淋巴瘤, AIDS-相关的淋巴瘤, 和原发性巨球蛋白血症; 白血病, 包括急性淋巴母细胞白血病(ALL), 慢性淋巴细胞白血病(CLL), 毛细胞白血病和慢性粒细胞白血病; 和其它血液系统恶性疾病。针对 B 细胞表面标志物例如 CD20 的抗体可治疗此类恶性疾病。

“非激素依赖的”癌症是其生长不依赖于同癌症细胞表达的受体结合的激素的存在的一类癌症。施用可降低肿瘤中或其附近的激素浓度的药物或手术不能使此类癌症发生临床退化。非激素依赖的癌症的实例包括非雄激素依赖的前列腺癌, 非雌激素依赖的乳腺癌, 子宫内膜癌和卵巢癌。此种癌症可以开始是激素依赖的肿瘤, 然后在抗激素治疗后, 从激素敏感的阶段发展到激素抵抗的肿瘤。

本文中“自身免疫病”是一种源自个体自身组织或直接针对个体自身组织的非恶性疾病。自身免疫性疾病或失调的实例包括但不限于, 炎性反

应例如炎性皮肤病,包括银屑病和皮炎(如异位皮炎);系统性硬化和硬皮病,与炎性肠管疾病相关的反应(例如克隆氏病(crohn's disease)和溃疡性结肠炎);呼吸窘迫综合征(包括成人呼吸窘迫综合症; ARDS); 皮炎; 脑膜炎; 脑炎; 葡萄膜炎; 结肠炎; 肾小球肾炎; 过敏性疾病例如湿疹和哮喘以及其它涉及 T 细胞浸润的情况和慢性炎性反应; 动脉硬化症; 白细胞粘附缺陷; 类风湿性关节炎; 系统性红斑狼疮(SLE); 糖尿病(例如 I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病); 多发性硬化; 雷诺综合症; 自身免疫性甲状腺炎; 过敏性脑脊髓炎; 干燥综合症; 幼年型糖尿病; 和与细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发超敏反应相关的免疫反应, 常见于结核, 结节病, 多肌炎; 肉芽肿病和血管炎; 恶性贫血(艾迪森氏病); 涉及白细胞渗出的疾病; 中枢神经系统(CNS)感染性疾病; 多器官损伤综合征; 溶血性贫血(包括, 但不限于冷球蛋白血症或 Coombs 阳性贫血); 重症肌无力; 抗原-抗体复合物介导的疾病; 抗肾小球基底膜病; 抗磷脂综合症; 过敏性神经炎; Graves' 病; Lambert-Eaton 肌无力综合症; 大疱性类天疱疮; 天疱疮; 自身免疫性多发性内分泌病; Reiter's 病; 僵人综合症(stiff man syndrome); 白塞病; 巨细胞动脉炎; 免疫复合物肾炎; IgA 肾病; IgM 多发性神经病; 免疫性血小板减少性紫癜(ITP) 或自身免疫性血小板减少症等等。

“炎性疾病”指由炎症造成的病理状态, 通常由中性粒细胞的趋化作用引起。此种疾病的实例包括银屑病和异位皮炎; 系统性硬化和硬皮病; 与炎性肠病相关的反应(例如克隆氏病和溃疡性结肠炎); 缺血再灌注疾病包括手术组织再灌注损伤, 心肌缺血病症例如心肌梗死, 心脏骤停, 心脏手术后再灌注和经皮穿透冠状血管扩张术(percutaneous transluminal coronary angioplasty)后收缩, 中风, 和腹主动脉瘤; 继发于中风的脑水肿, 脑外伤; 低血容量性休克; 晕厥; 成人呼吸窘迫综合症; 急性肺损伤; 白塞病; 皮炎; 多肌炎; 多发性硬化; 皮炎; 脑膜炎; 脑炎; 葡萄膜炎; 骨关节炎; 狼疮肾炎; 自身免疫性疾病例如类风湿性关节炎, 干燥综合症, 血管炎; 涉及白细胞渗出的疾病; 中枢神经系统(CNS)炎性疾病; 继发于败血症或外伤的多器官损伤综合征; 酒精型肝炎; 细菌性肺炎; 抗原-抗体复合物介导的疾病包括肾小球肾炎; 败血症; 结节病; 针对组织/器官移植的免疫病理应答; 肺部炎症, 包括胸膜炎, 肺泡炎, 血管炎, 肺炎, 慢性支气管炎, 支气管扩张, 弥漫性泛支气管炎, 超敏反应性肺炎, 特发性肺纤维化(IPF),

和囊性纤维化；等等。优选的指征包括急性肺损伤，成人呼吸窘迫综合症，缺血再灌注(包括手术组织缺血性损伤，心肌缺血和急性心肌梗死)，低血容量性休克，哮喘，细菌性肺炎和炎性肠管(bowel)病例如溃疡性结肠炎。自身免疫疾病可能与感染性疾病交叠，或反之。

“阻断”对异体抗原的“免疫应答”指减轻或防止至少一种由于暴露于异体抗原产生的免疫介导的应答。例如，通过预防或降低哺乳动物体内针对抗原的抗体的产生可减轻对异体抗原的体液反应。可选地，或此外，可抑制独特型；“平定”被同种抗体覆盖的细胞的去除；和/或通过抗原呈递细胞的损耗，影响对同种抗原(alloantigen)的呈递。

“外来抗原”指对暴露于它的哺乳动物是非内源或非天然的分子。外来抗原可以引起免疫应答，例如哺乳动物中体液和/或 T 细胞介导的应答。通常外来抗原会引起针对它的抗体的产生。本文涉及的外来抗原的实例包括免疫原性治疗剂，例如蛋白质如抗体，特别是包含非人氨基酸残基的抗体(例如啮齿类，嵌合/人源化，和灵长类化抗体)；毒素(可选地与目的分子例如抗体偶联，其中目的分子也可以是免疫源性的)；基因治疗病毒载体，例如逆转录病毒和腺病毒；移植物；感染性制剂(例如细菌和病毒)；同种抗原(即在同一物种的有些个体中出现，而在其它个体中不出现的抗原)例如血型的不同，人淋巴细胞抗原(HLA)，血小板抗原，在被移植器官上表达的抗原，血液成分，妊娠抗原(Rh)，和血友病因子(例如因子 VIII 和因子 IX)。

本文的“肿瘤相关抗原”是其特征为在肿瘤细胞上的表达较正常细胞高的抗原。具体实例包括 ErbB 受体，B 细胞表面标志物，神经节苷酯 GD2，GD3 和 GM2(Ragupathi G, *Cancer Immunol. Immunother.* 43:152(1996))；CD52(Ginaldi 等, *Leukemia Research* 22:185(1998))；前列腺干细胞抗原(PSCA)；和 MAGE(Kirkin 等, *APMIS* 106:665(1998))。

本文的“血管生成因子(angiogenic factor)”是刺激血管生成的分子。实例包括血管内皮生长因子(VEGF)，碱性或酸性纤维母细胞生长因子(FGF)，和血小板来源的内皮细胞生长因子(PD-ECGF)。

“ErbB 受体”是属于 ErbB 受体家族的受体蛋白酪氨酸激酶，并且包括 EGFR, ErbB2, ErbB3 和 ErbB4 受体和将在未来被鉴定的其它成员。ErbB 受体通常包含结合 ErbB 配体的胞外区；亲脂跨膜区；保守的细胞内酪氨酸激酶区；和具有若干可被磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号区。

术语“ErbB1”，“表皮生长因子受体”和“EGFR”在本文可互换使用，并且指如 Carpenter 等 *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914(1987)中公开的 EGFR，包括其天然存在的突变体形式(例如如 Humphrey 等 *PNAS(USA)* 87:4207-4211(1990)中的缺失突变体 EGFR)。erbB1 指编码 EGFR 蛋白产物的基因。

术语“ErbB2”和“HER2”在本文可互换使用，并且指例如 Semba 等，*PNAS(USA)* 82:6497-6501(1985) 和 Yamamoto 等 *Nature* 319:230-234(1986)(Genebank 保藏号 X03363)中所述的人 HER2 蛋白。结合 HER2 的抗体的实例包括 4D5, 7C2, 7F3 和 2C4, 及其人源化变体, 包括 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8, 如美国专利 5,821,337 的表 3 所述, 包含于文中作为参考; 和 WO01/00245 中所述的人源化 2C4 突变体 560, 561, 562, 568, 569, 570, 571, 574, 或 56869. WO98/17797 描述了 7C2 和 7F3 以及它们的人源化变体。优选的抗体是那些包含 huMAb4D5-8, 或人源化 2C4 突变体 574 的重链和轻链可变区的抗体。

“Trastuzumab” (HERCEPTIN®)是重组 DNA 来源的人源化抗体, 它在基于细胞的检测中以高亲和力结合 HER2 的胞外区(Kd = 5 nM)。该抗体是包含变体 huMAb4D5-8 的重链和轻链可变区的 IgG1 抗体, 如美国专利 5,821,337 的表 3 所述。该抗体由 CHO-DP12 细胞产生。

“ErbB3”和“HER3”指在例如美国专利 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus 等 *PNAS(USA)* 86:9193-9197(1989)中公开的受体多肽。

本文术语“ErbB4”和“HER4”指在例如欧洲专利申请 599,274; Plowman 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750(1993); 和 Plowman 等, *Nature*, 366:473-475(1993)中公开的受体多肽, 包括 1999 年 4 月 22 日公布的 WO99/19488 中公开的其同种型。

本文的“B 细胞表面标志物”是在 B 细胞表面表达的抗原, 它可作为与之相结合的抗体的靶向目标。B 细胞表面标志物的实例包括 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 和 CD86 白细胞表面标志物。特别感兴趣的 B 细胞表面标志物是那些与哺乳动物的其它非 B 细胞组织相比, 优先表达在 B 细胞上的标

志物，并可在前体 B 细胞和成熟 B 细胞上表达。在一个实施方案中，所述标志物是像 CD20 或 CD19 一样，从该谱系的干细胞阶段到恰好最终分化成浆细胞之前的分化阶段，见于 B 细胞上的一种标志物。本文优选的 B 细胞表面标志物是 CD19，CD20，CD22 和 CD40。

“CD20”抗原是见于外周血或淋巴器官中 90%以上的 B 细胞表面的 ~35 kDa，而非糖基化的磷蛋白质。CD20 在早期前 B 细胞发育过程中表达，并持续存在，直到分化成浆细胞才消失。CD20 存在于正常 B 细胞和恶性 B 细胞上。文献中 CD20 的其它名称包括“B 淋巴细胞限制的抗原”和“Bp35”。在例如 Clark 等 *PNAS(USA)* 82:1766(1985)中描述了 CD20 抗原。

结合 CD20 抗原的抗体的实例包括：“C2B8”，现在称为“Rituximab” (“RITUXAN®”) (美国专利 5,736,137，包含在文中作为参考)；钇-[90]标记的 2B8 小鼠抗体，称为“Y2B8” (美国专利 5,736,137，包含在文中作为参考)；可选地以 <sup>131</sup>I 标记的小鼠 IgG2a “B1”，以产生“<sup>131</sup>I-B1”抗体 (BEXXAR™) (美国专利 5,595,721，包含在文中作为参考)；小鼠单克隆抗体“1F5” (Press 等 *Blood* 69(2):584-591(1987))；“嵌合 2H7”抗体 (美国专利 5,677,180，包含在文中作为参考)；和单克隆抗体 L27，G28-2，93-1B3，B-C1 或 NU-B2，自 International Leukocyte Typing Workshop 获得 (Valentine 等，*Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p.440, Oxford University Press(1987))。

本文术语“Rituximab”或“RITUXAN®”指针对 CD20 抗原的基因改造后的嵌合小鼠/人单克隆抗体，在美国专利 5,736,137 中称之为“C2B8”，包含在文中作为参考。该抗体包含小鼠轻链和重链可变区序列和人恒定区序列的 IgG<sub>1</sub>κ 免疫球蛋白。Rituximab 对约 8.0nM 的 CD20 抗原具有结合亲和力。Rituximab 是由 CHO DG44 细胞产生的。

术语“哺乳动物”是指属于哺乳动物类的任何动物，包括人、牛、马、狗和猫。本发明优选的实施方案中，哺乳动物是人。

本文中“生长抑制剂”是指在体内或体外抑制细胞(例如癌症细胞)生长的化合物或组合物。因此，生长抑制剂可以是显著降低 S 期 恶性细胞百分比的药物。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期(在除 S 期以外的阶段)进展的药物，例如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药物。经典的 M 期阻断剂包括长春花类(长春新碱和长春花碱)，taxol，美登木素生物碱和 topo II 抑制剂如阿



霉素、柔红菌素、依托泊甙和博来霉素等。那些使 G1 期停滞的药物还连带 (spill over) 使 S 期停滞, 例如 DNA 烷化剂象他莫昔芬、强的松、达卡巴嗪、氮芥(mechlorethamine)、顺铂、氮甲蝶呤、5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷等。详见“癌症的分子基础” Mendelsohn 和 Israel 编, 第一章, Murakami 等的题为“细胞周期调节, 肿瘤和抗肿瘤药物”的文章(WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其见第 13 页。

“生长抑制性”抗体的实例是与抗原结合并抑制表达该抗原的细胞生长的那些。优选的生长抑制性抗-HER2 抗体在约 0.5 到 30 $\mu$ g/ml 的抗体浓度下, 抑制细胞培养中 SK-BR-3 乳腺肿瘤细胞的生长大于 20%, 并优选大于 50%(例如从约 50%到约 100%), 其生长抑制是将 SK-BR-3 细胞暴露于抗体 6 天后测定的(见美国专利 5,677,171, 1997 年 0 月 14 日公开)。优选的生长抑制抗体是 huMAb4D5-8。

“诱导细胞死亡”的抗体是引起活细胞失去活力的抗体。文中的细胞是表达抗体结合的抗原的细胞。在补体和免疫效应细胞不存在时可测定体外细胞死亡, 以区别抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)或补体依赖的细胞毒作用(CDC)诱导的细胞死亡。因此, 可使用热灭活血清(即在补体不存在的情况下)和免疫效应细胞不存在的情况下进行细胞死亡的测定。为测定抗体能否诱导细胞死亡, 以碘化丙啶(PI), 锥虫蓝(见 Moore 等 *Cytotechnology* 17:1-11(1995))或 7AAD 的摄取进行评估, 可相对于未经处理的细胞评定膜的完整性的丧失。优选的细胞死亡诱导抗体是在 BT474 细胞的 PI 摄取测定中诱导 PI 摄取的那些。

“诱导凋亡”的抗体是诱导程序性细胞死亡的抗体, 通过膜联蛋白 V, DNA 断裂, 细胞皱缩, 内质网扩张, 细胞断裂, 和/或膜小泡的形成(称为凋亡小体)测定程序性细胞死亡。细胞表达抗体结合的抗原。优选细胞是肿瘤细胞。评估与凋亡相关的细胞事件可采用多种方法。例如, 通过膜联蛋白结合可测定磷脂酰丝氨酸(PS) 易位; 通过 DNA 梯子可评价 DNA 断裂; 可通过亚二倍细胞中的任何增加评价核/染色体浓缩和 DNA 断裂。优选, 诱导凋亡的抗体是在使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合实验中, 其导致膜联蛋白结合的诱导相对于未经处理的细胞为约 2 到 50 倍, 优选约 5 到 50 倍, 最优选约 10 到 50 倍。

术语“治疗有效量”指有效“治疗”个体或哺乳动物的疾病的药物的

量。对于癌症，此药物治疗有效量可减少癌细胞的数量；减小肿瘤体积；抑制(即减慢到一定程度并优选停止)癌细胞对周围器官的浸润；抑制(例如减慢到一定程度并优选停止)肿瘤转移；在一定程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上减轻与癌症相关的一种或多种症状。根据阻止癌细胞的生长和/或杀死已有癌细胞的程度，该药物可以是抑制细胞生长和/或细胞毒作用的。对于癌症治疗，可通过例如评定肿瘤进展时间(TTP)和/或测定反应速率(RR)测定其功效。

“抗原表达的癌症”是一种疾病，它包含在其表面具有足够水平的抗原的细胞，从而使抗-抗原的抗体可与其结合并对癌症具有治疗效果。

“以受体过度活化”为特征的癌症是癌细胞中受体活化的程度显著超出同一组织类型中非癌细胞上该受体活化水平的癌症。此种过度活化可能是由于受体的过度表达和/或活化癌细胞中的受体的配体高于正常水平。此种过度活化可引起癌细胞的恶性状态和/或由癌细胞的恶性状态引起。在一些实施方案中，可对癌症进行诊断或预测性分析来确定导致受体如此过度活化的受体的扩增和/或过度表达是否存在。可选地，或此外，可对癌症进行诊断或预测性分析来确定导致受体过度活化的配体扩增和/或过度表达是否存在于癌症中。自此类癌症的亚类中，受体的过度活化可能由自分泌刺激途径引起。

“过度表达”受体的癌症是与同样组织类型的非癌细胞相比，在其细胞表面具有明显更高水平的受体，例如 HER2 的一种。此种过度表达可能由基因扩增或增加的转录或翻译引起。在诊断或预测性分析中，通过评估细胞表面上受体蛋白的增加水平(例如通过免疫组化分析；IHC)可测定受体的过度表达。可选地，或此外，可通过例如原位荧光杂交(FISH；见 WO98/45479 published October, 1998)，southern 蛋白印迹，或聚合酶链反应(PCR)技术，例如实时荧光定量 PCR(RT-PCR)，测定细胞中编码受体的核酸。也可通过测定生物液体例如血清中的脱落抗原(例如，胞外区)研究受体过度表达。(见，例如，美国专利 4,933,294，1990 年 6 月 12 日；WO91/05264，1991 年 4 月 18 日公开；美国专利 5,401,638，1995 年 3 月 28 日公开；和 Sias 等 *J. Immunol. Methods* 132: 73-80(1990))。除了上述方法，熟练技术人员可利用多种体内实验方法。例如，可将病人体内的细胞暴露于可选地由可检测标志物标记的抗体，例如放射活性同位素，而且可以通过例如放射

活性体外扫描或分析取自曾经暴露于该抗体的病人的活组织来评价抗体与细胞的结合。

“过度表达”配体的癌症是与同样组织类型的非癌细胞相比，产生明显更高水平的该配体的一种癌症。此种过度表达可能由基因扩增或增加的转录或翻译引起。在例如肿瘤活检或多种诊断实验如 IHC, FISH, southern 蛋白印迹, PCR 或上述体内实验中，通过评估病人体内的配体(或编码它的核酸)的水平诊断性地测定配体的过度表达。

本文所用术语“细胞毒作用制剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意在包括放射性同位素(例如 At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup> 和 Lu 的放射性同位素)，化疗剂和毒素例如小分子毒素或细菌，真菌，植物或动物来源的酶活性毒素，包括其片段和/或变体。

“化疗剂”是在肿瘤治疗中使用的化学化合物。化疗剂实例包括烷化剂，如噻替哌(thiotepa)h 环磷酰胺(cyclophamide)(CYTOXAN<sup>TM</sup>)；烷基磺酸酯如白消安(busulfan)，英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)如苯并多巴(benaodopa)，卡波醌(carboquone)，美妥替哌(meturedopa)和尿烷亚胺(uredopa)；氮丙啶(ethyleneimine)和 methylamelamine 包括六甲蜜胺(altretamine)，三亚胺嗪(triethylenemelamine)，三亚乙基磷酰胺，三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine)；氮芥(nitrogen mustards)如苯丁酸氮芥(chlorambucil)，萘氮芥，胆磷酰胺(cholophosphamide)，雌氮芥(estramustine)，异环磷酰胺(ifosfamide)，氮芥(mechlorethamine)，盐酸氮芥；左旋苯丙氨酸氮芥(melphalan)，新氮芥(novembichin)，胆甾醇苯乙酸氮芥，松龙苯芥(prednimustine)，曲磷胺(trofosfamide)，尿嘧啶氮芥；亚硝基脲(nitrosureas)如亚硝基脲氮芥(carmustine)，氯脲菌素(chlorozotocin)，福莫司汀(fotemustine)，洛莫司汀(lomustine)，尼莫司汀(nimustine)，雷莫司汀(ranimustine)；抗生素如阿克拉霉素，放线菌素，authramycin，重氮丝氨酸，博来霉素，放线菌素 C(cactinomycin)，加利车霉素(加利车霉素)，carabycin，洋红霉素(chromomycin)，嗜癌素(carzinophilin)，色霉素，放线菌素 D，柔红菌素(daunorubicin)，地托比星(detorubicin)，6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸，阿霉素(doxorubicin)，表阿霉素(epirubicin)，依索比星(esorubicin)，伊达比星

(idarubicin), 发波霉素(marcellomycin), 丝裂霉素, 霉酚酸, 诺加霉素(nogalamycin), 橄榄霉素(olivomycin), 培洛霉素(peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素(quelamycin), 罗多比星(rodorubicin), 链黑菌素; 链脲霉素(streptozocin), 杀结核菌素, 乌苯美司(ubenimex), 净司他丁(zinostatin), 佐柔比星(zorubicin); 抗代谢药如氮甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin), 氮甲蝶呤, 蝶罗呤, 三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物如氟达拉滨(fludarabine), 6-巯基嘌呤, 硫咪嘌呤, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine), 阿扎胞苷(azacitidine), 6-氮尿苷, 卡莫氟(carmofur), 阿糖胞苷, 双脱氧尿苷, 去氟氧尿苷(doxifluridine), 依诺他滨(enocitabine), 氟尿苷, 5-FU; 雄激素类如二甲睾酮(calusterone), 丙酸甲雄烷酮(dromostanolong propionate), 环硫雄醇(epitiostanol), 美雄氨(mepitiostane), 睾内酯(testolactone); 抗肾上腺类如氨鲁米特(aminoglutethimide), 米托坦(mitotane), 曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂如frolinic acid; 醋葡内酯; 醛磷酸胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 安吡啶(amsacrine); bestrabucil; 比生群(biasntrene); 依达曲沙(edatraxate); defofamine; 秋水仙胺; 地吡醌(diaziquone); elfornithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 米托胍脘(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 硝呋旦(nitracrine); 喷司他丁(pintostatin); phenamet; 吡柔比星(pirarubicin); 鬼臼树酸(podophyllinic acid); 2-乙酰肼; 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®; 雷佐生(razoxane); 西索菲兰(sizofiran); 锗螺胺(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2'''-三氯三乙胺(trichlorotriethylamine); 乌拉坦(urethan); 长春碱酰胺; 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酸胺; 三胺硫磷(thiotepa); taxanes, 如紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)和紫杉萜(doxetaxel)(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨(gemcitabine); 6-硫代鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氮甲蝶呤; 铂类似物如顺铂和卡铂; 长春花碱; 铂; 依托泊甙(etoposide)(VP-16); 异环磷酸胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞宾(vinorelbine); 新霉

酰胺(navelbine); novantrone; 替尼泊甙(teniposide); 柔红霉素; 氨基蝶呤; xeloda; 伊拜膦酸盐(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 维甲酸; esperamicins; capecitabine; 以及上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂, 如抗雌激素制剂包括他莫昔芬(tamoxifen), 雷洛昔芬(raloxifene), 芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), keoxifene, LY117018, onapristone, 和托瑞米芬(Fareston); 和抗雄激素制剂如氟他米特(flutamide), 尼鲁米特(nilutamide), bicalutamide, 亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin); 和上述任何物质的药用盐、酸或衍生物。

本文术语“EGFR 定向药物”指结合 EGFR, 并可选地, 抑制 EGFR 活化的药剂。此种药剂的实例包括抗体和结合 EGFR 的小分子。结合 EGFR 的抗体的实例包括 MA b 579(ATCC CRL HB 8506), MA b 455(ATCC CRL HB8507), MA b 225(ATCC CRL 8508), MA b 528(ATCC CRL 8509)(见美国专利 4,943,533, Mendelsohn 等)及其变体, 例如嵌合 225(C225)和再造(reshaped)人 225(H225)(见 WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); 结合 II 型突变体 EGFR 的抗体(美国专利 5,212,290); 如美国专利 5,891,996 中所述的结合 EFGR 的人源化和嵌合抗体; 和结合 EGFR 的人抗体(见 WO98/50433, Abgenix)。抗-EGFR 抗体可以和细胞毒作用剂偶联, 从而产生免疫偶联物(见例如, EP659,439A2, Merck Patent GmbH)。结合 EGFR 的小分子的实例包括 ZD1839(IRESSA<sup>®</sup>)(Astra Zeneca), CP-358774 或 OSI-774(TARCEVA<sup>™</sup>) (Genentech)和 AG1478。

术语“细胞因子”是一般性术语, 指由一个细胞群释放的对另一个细胞群起细胞间介质作用的蛋白。此种细胞因子的实例是淋巴细胞因子, 单核细胞因子和传统的多肽激素。这些细胞因子包括生长激素, 如人生长激素, N-甲二磺酰人生长激素, 和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 前胰岛素; 松驰素; 前松驰素; 糖蛋白激素如卵泡刺激素(FSH), 甲状腺刺激素(TSH), 促黄体(生成)激素(LH); 肝细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子; 催乳激素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和 $\beta$ ; 苗勒氏管抑制物质(mullerian-inhibiting substance); 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 苯丙酸诺龙; 血管内皮细胞生长因子; 整合素; 血小板生成素(TPO); 神经生长因子如 NGF- $\beta$ ; 血小板生长因子; 转化生长因子(TGF)如 TGF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ ; 胰

岛素样生长因子-I和-II; 促红细胞生成素(EPO); 骨诱导因子(osteoinductive factors); 干扰素如干扰素- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; 集落刺激因子(CSF)如巨噬细胞-CSF(M-CSF); 粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF); 粒细胞-CSF(G-CSF); 白细胞介素(IL)如 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 肿瘤坏死因子如 TNF- $\alpha$ 或 TNF- $\beta$ ; 和其它多肽因子包括 LIF 和 kit 配体(KL)。本文中术语细胞因子包括天然蛋白或来自重组细胞培养物的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

本文所用术语“前体药物”指药理学活性物质的前体或衍生物形式, 其较亲本药物对癌细胞的细胞毒作用小并能被酶活化或转化成更具活性的亲本形式。见例如 Wilman “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, pp.357-382, 615<sup>th</sup> Meeting Belfast(1986)和 Stella 等, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt 等, (ed.), pp.247-267, Humana Press(1985)。本发明的前体药物包括但不限于, 含磷酸盐前体药物, 含硫代磷酸脂前体药物, 含硫酸盐前体药物, 含肽前体药物, D 氨基酸修饰的前体药物, 糖基化前体药物, 含 $\beta$ 内酰胺的前体药物, 任选取代的含苯氧基乙酰胺的前体药物或任选取代的含苯基乙酰胺的前体药物, 可被转化成更具活性且不具有细胞毒作用的药物的 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿嘧啶前体药物。可被衍生为本发明所用前提药物形式的细胞毒作用药物的实例包括, 但不限于, 上述那些化疗剂。

“脂质体”是由能向哺乳动物有效运送药物(如本文的抗体)的各类脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊泡。脂质体的组分通常排列为双层形式, 与生物膜的脂质排列相似。

术语“包装插页”通常指包含在治疗产品的商品包装中给用户的说明, 其包含有关适应症, 用途, 剂量, 施用方法, 禁忌症, 和/或与使用此种治疗产品有关的说明。

“分离的”核酸分子是一种从通常与该多肽核酸天然来源相关的至少一种混合核酸分子中鉴定并分离的核酸分子。分离的核酸分子不同于其天然发现的形式。因此分离的核酸分子可从天然细胞中的该核酸分子区别出来。然而, 分离的核酸分子包括包含于通常表达该多肽的细胞中的核酸分子, 在该细胞中核酸分子位于与天然细胞不同的染色体位置。

术语“调控序列”指特定宿主有机体中可操作地连接的编码序列的表

达所需的 DNA 序列。适合原核生物的调控序列，例如，包括启动子，可选地包括操纵子序列，和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子，多腺苷化信号和增强子。

当与另一核酸序列发生功能关联时，核酸是“可操作地连接的”。例如，前序列或分泌性前导序列如果被表达为参与多肽分泌的前蛋白，其可操作地连接该多肽的 DNA；如果启动子或增强子影响编码序列的转录，其可操作地连接于该序列；或如果核糖体结合位点位于可促进翻译的位置，其可操作地连接编码序列。通常，“可操作地连接于”的意思是被连接的 DNA 序列是相邻的，并且如果是分泌性前导序列，应是相邻的并且处于阅读阶段。然而，增强子则不一定是相邻的。通过在方便的限制位点接合(ligation)而实现连接(linking)。如果此种位点不存在，合成的寡核苷酸连接物或连头的使用符合常规的作法。

本文术语“细胞”，“细胞系”，和“细胞培养”可互换使用并且所有此种名称包括其子代。因此，术语“转化体”和“转化后细胞”包括原代处理细胞及其衍生的培养物，而不考虑传代的次数。由于有意和无意的突变，也可理解所有子代的 DNA 含量均不是恰好相同的。具有与原始转化后细胞中筛选到的功能或生物活性相同的功能或生物活性的突变体子代也包括在内。尽管命名截然不同，从上下文来看这一点是清楚的。

## II. 具体实施方案

本发明涉及制造基本均一的包含 Fc 区的糖蛋白制备物的方法，组合物中的糖蛋白约 80-100%包含附着于糖蛋白 Fc 区的缺乏岩藻糖的成熟核心碳水化合物。在本文优选的实施方案中，所述蛋白是抗体或免疫粘附素。可通过例如以下方法制备糖蛋白(a) 使用改造后的或突变体宿主细胞，其岩藻糖代谢是有缺陷的，因此它具有降低的(或不能)岩藻糖基化所表达的蛋白的能力；(b)在防止或降低岩藻糖基化的条件下培养细胞；(c)岩藻糖的翻译后去除(例如使用岩藻糖苷酶)；(d)所需碳水化合物的翻译后添加，例如在非糖基化糖蛋白的重组表达后；(e)糖蛋白的纯化用以选出未被岩藻糖基化的产物。本发明涉及结合这些典型方法(a)-(e)中的两种或多种方法。

最优选地，编码所需糖蛋白的核酸在宿主细胞内表达，该宿主细胞具有降低的(或不能)岩藻糖基化其中表达的蛋白的能力。优选，宿主细胞是二





与同样的糖蛋白组合物相比，文中不含岩藻糖的糖蛋白组合物显示与一种或多种 FcγRIII 受体更好的结合，但该组合物中的大部分(例如约 50-100%，或约 70-100%)糖蛋白具有附着于成熟核心碳水化合物结构的岩藻糖(下文的“含有岩藻糖的糖蛋白组合物”)。例如，文中不含岩藻糖的糖蛋白组合物与含岩藻糖的糖蛋白组合物相比，显示 100-1000 倍更好的与 FcγRIII，例如 FcγRIII(F158)的结合。F158 同种异型与人 IgG 的相互作用不如 V158 有效，因而这从治疗角度提供了显著的优点，尤其是在表达 FcγRIII(F158)的病人中。此外，文中不含岩藻糖的糖蛋白组合物与其对应的含岩藻糖的糖蛋白组合物相比，显示更好的 ADCC 活性，例如约 2-20 倍提高的 ADCC 活性。

除了不含岩藻糖的成熟核心碳水化合物结构，其它寡糖可附着于核心碳水化合物结构。例如，对分 GlcNAc 可以附着或不附着。通过举例，宿主细胞可能缺乏 GnTIII 酶并因此糖蛋白可基本不含对分 GlcNAc。可选地，糖蛋白可在添加了对分 GlcNAc 的宿主细胞中表达(例如 Y0 宿主或改造的 CHO 细胞)。一个或多个(通常是一或二个)半乳糖残基也可附着于核心碳水化合物结构。最后，一个或多个(通常是一或二个)末端唾液酸残基可附着于核心碳水化合物结构，例如通过与半乳糖残基的连接。

在优选的实施方案中，制备本文的组合物并将它用于治疗用途。因此，优选的组合物是包含糖蛋白和可药用的载体或稀释剂(例如下文示例的那些)的药物制剂。此种制剂通常是无菌的并且可以是冻干的。

在本发明优选的实施方案中，糖蛋白是抗体，而且产生抗体的典型方法在下面的部分更详细地叙述。然而，糖蛋白可以是任何其它包含 Fc 区的糖蛋白，例如免疫粘附素。制造免疫粘附素的方法在下文详述。

#### A. 变体 Fc 区序列

在本发明的一个实施方案中，糖基化变体进一步包含具有与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列的变体 Fc 区。变体 Fc 区具有多于一处的氨基酸取代时，通常但非必要地，结合同一类别的氨基酸取代以达到所需的结果。下表描述了氨基酸取代的各种类别。

表 1  
Fc 区变体的种类

种类	FcR 结合特性	Fc 区取代的位置
1A	对所有 FcγR 的结合降低	238, 265, 269, 270, 297*, 327, 329
1B	对 FcγRII 和 FcγRIII 的结合降低	239, 294, 295, 303, 338, 373, 376, 416, 435
2	对 FcγRII 和 FcγRIII 的结合改善	256, 290, 312, 326, 330, 339, 378, 430
3	对 FcγRII 的结合改善而对 FcγRIII 的结合没有作用	255, 258, 267, 276, 280, 283, 285, 286, 305, 307, 309, 315, 320, 331, 337, 398
4	对 FcγRII 的结合改善而对 FcγRIII 的结合降低	268, 272, 301, 322, 340
5	对 FcγRII 的结合降低而对 FcγRIII 的结合没有作用	292, 324, 335, 414, 419, 438, 439
6	对 FcγRII 的结合降低而对 FcγRIII 的结合改善	298, 333
7	对 FcγRII 的结合没有作用而对 FcγRIII 的结合降低	248, 249, 252, 254, 278, 289, 293, 296, 338, 382, 388, 389, 434, 437
8	对 FcγRII 的结合没有作用而对 FcγRIII 的结合改善	334, 360

\*去糖基化版本

除了氨基酸取代, 本发明还涉及对亲代 Fc 区氨基酸序列的其它修饰, 以产生具有改变的效应器功能的 Fc 区变体。

技术人员可以, 例如, 缺失 Fc 区的一个或多个氨基酸残基来降低与 FcR 的结合。通常, 技术人员缺失一个或多个本文鉴定影响 FcR 结合的 Fc 区残基以产生此种 Fc 区变体。通常, 根据本发明的实施方案, 将缺失不多于一个到约十个 Fc 区残基。本文中包含一个或多个氨基酸缺失的 Fc 区优选保留亲代 Fc 区或天然序列人 Fc 区的至少约 80%, 并优选至少约 90%, 更优选至少约 95%。

技术人员也可以制造氨基酸插入 Fc 区的变体, 该变体具有改变的效应器功能。例如, 技术人员可在邻近本文鉴定为影响 FcR 结合的一个或多个 Fc 区位置处引入至少一个氨基酸残基(例如一到二个氨基酸残基和通常不

多于十个残基)。“邻近的”意思是距离本文鉴定的 Fc 区残基一个到二个氨基酸残基内。此种 Fc 区变体显示增强或减弱的 FcR 结合和/或 ADCC 活性。为产生此种插入变体,技术人员可评估包含 FcR 结合区(例如感兴趣的 FcR 的胞外区)和氨基酸残基待插入的 Fc 区(见,例如, Deisenhofer, *Biochemistry* 20(9):2361-2370(1981); 和 Burmeister 等, *Nature* 342:379-383,(1994))的多肽的共结晶结构,从而理性地设计具有例如改善的 FcR 结合能力的 Fc 区变体。此种插入通常在 Fc 区环中进行,而不在 Fc 区的二级结构中(即在 $\beta$ 链中)。

通过在亲代 Fc 区中引入适宜的氨基酸序列修饰,技术人员可产生在人效应细胞存在时更有效地介导抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或较亲代多肽以更好的亲合力结合 Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)的变体 Fc 区。此种 Fc 区变体通常包含 Fc 区内的至少一个氨基酸修饰。联合氨基酸修饰被认为是特别可取的。例如,变体 Fc 区可能包括对例如本文鉴定的特定 Fc 区位置中的二个,三个,四个,五个等取代。

优选地,亲代多肽 Fc 区是人 Fc 区,例如天然序列人 Fc 区人 IgG1(A 和非 A 同种异型), IgG2, IgG3 或 IgG4Fc 区。此类序列显示于图 23 中。

为产生具有增强的 ADCC 活性的 Fc 区,亲代多肽优选具有已经存在的 ADCC 活性,例如,它包含人 IgG1 或人 IgG3Fc 区。在一个实施方案中,具有增强的 ADCC 活性的变体介导 ADCC 比具有天然序列 IgG1 或 IgG3 的 Fc 区和变体的抗原结合区的抗体有效得多。优选地,变体包含 Fc 区位置 298, 333 和 334 中的二个或三个残基的取代,或者基本由这些取代组成。最优选地,位置 298, 333 和 334 上的残基被取代(例如被丙氨酸残基)。此外,为产生具有增强的 ADCC 活性 Fc 区变体,技术人员通常改造对 Fc $\gamma$ RIII 具有增强的结合亲合力的 Fc 区变体, Fc $\gamma$ RIII 被认为是重要的介导 ADCC 的 FcR。例如,技术人员可将氨基酸修饰(例如取代)引入亲代 Fc 区的氨基酸位置 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 或 430 中的任何一个或多个氨基酸位置,以产生此种变体。对 Fc $\gamma$ RIII 具有增强的结合亲合力的变体可进一步对 Fc $\gamma$ RII 具有降低的结合亲合力,尤其是对抑制性 Fc $\gamma$ RIIB 受体具有降低的亲合力。

由于本发明的实验表明 CH2 区对 FcR 结合活性很重要,氨基酸修饰优选被引入 Fc 区的 CH2 区。此外,与上述所引用技术的教导不同,本申请涉及将修饰引入除较低链区外的 Fc 区部分。

用于修饰以产生具有改变的 Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)结合亲和力或活性的变体 IgG Fc 区的氨基酸位置包括 Fc 区氨基酸位置 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 或 439 中的任何一个或多个。优选, 用作模板以产生此种变体的亲本 Fc 区包含人 IgG Fc 区。残基 331 被取代之处的亲本 Fc 区优选不是人天然序列 IgG3, 或包含位置 331 处的取代的变体 Fc 区优选显示 FcR 例如对 Fc $\gamma$ RII 的结合增强。

为产生具有减弱的与 Fc $\gamma$ R 结合的 Fc 区变体, 技术人员可在氨基酸位置 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 或 439 中的任何一个或多个位置引入氨基酸修饰。

显示减弱的与 Fc $\gamma$ RI 结合的变体包括那些含有位于氨基酸位置 238, 265, 269, 270, 327 或 329 中任何一个或多个氨基酸位置上的 Fc 区氨基酸修饰的变体。

显示减弱的与 Fc $\gamma$ R II 结合的变体包括那些含有位于氨基酸位置 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 或 439 中的任何一个或多个氨基酸位置上的 Fc 区氨基酸修饰的变体。

显示减弱的与 Fc $\gamma$ RIII 结合的 Fc 区变体包括那些含有位于氨基酸位置 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 或 437 中任何一个或多个氨基酸位置上的 Fc 区氨基酸修饰的变体。

也可制备具有增强的与一个或多个 Fc $\gamma$ Rs 结合的变体。此种 Fc 区变体可以包含位于 Fc 区氨基酸位置 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 298, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 或 430 中任何一个或多个氨基酸位置上的氨基酸修饰。

例如, 具有增强的 Fc $\gamma$ R 结合活性的变体可以显示增加的与 Fc $\gamma$ RIII 的结

合，并可选地可进一步显示降低的与 FcγRII 的结合；例如所述变体可包含位于 Fc 区氨基酸位置 298 和/或 333 上的氨基酸修饰。

具有增加的与 FcγRII 结合的变体包括那些含有位于 Fc 区氨基酸位置 255, 256, 258, 267, 268, 272, 276, 280, 283, 285, 286, 290, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 326, 330, 331, 337, 340, 378, 398 或 430 中任何一个或多个氨基酸位置上的氨基酸修饰的变体。此种变体可进一步显示降低的与 FcγRIII 的结合。例如，它们可包括位于氨基酸位置 268, 272, 298, 301, 322 或 340 中任何一个或多个位置上的 Fc 区氨基酸修饰。

虽然优选改变与 FcγR 的结合，本文也涉及具有改变的对新生儿受体 (FcRn) 的结合亲合力的 Fc 区变体。据预计具有增强的对新生儿受体 (FcRn) 的亲合力的 Fc 区变体具有更长的血清半衰期，而且此种分子在需要长半衰期的给药多肽来治疗哺乳动物的方法中具有有益的用途，例如治疗慢性疾病。相反，预计具有降低的对新生儿受体 (FcRn) 的亲合力的 Fc 区变体具有较短的半衰期，例如此种分子可在短的循环时间有利时用于哺乳动物，例如用于多肽的体内诊断性显像，当该多肽较长时间遗留在血流中随之循环时，具有毒副作用，如此等等。据预计具有降低的 FcRn 结合亲合力的 Fc 区变体不太可能穿过胎盘，因此可用于治疗怀孕妇女的疾病。

具有改变的对 FcRn 的结合亲合力的 Fc 区变体包括含有位于氨基酸位置 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 或 447 中的任何一个或多个氨基酸位置上的 Fc 区氨基酸修饰的那些。显示降低的与 FcRn 的结合的那些变体通常包含位于氨基酸位置 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 或 447 中的任何一个或多个氨基的位置上的 Fc 区氨基酸修饰；而具有增强的与 FcRn 的结合的那些变体通常包含位于氨基酸位置 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 或 434 中的任何一个或多个氨基酸位置上的 Fc 区氨基酸修饰。

通常根据多肽的预期用途，进一步修饰以上述方法制备的多肽变体。此种修饰可能涉及氨基酸序列的进一步改变(氨基酸序列的取代，插入和/或缺失，与异源多肽的融合和/或共价修饰。此种“进一步修饰”可在以上公开的氨基酸修饰(导致 Fc 受体结合和/或 ADCC 活性的改变)之前，同时，

或之后进行。在一个实施方案中，技术人员可结合本文的 Fc 区修饰和本说明“相关技术”部分中引用的对比文件中公开的 Fc 区取代。

可选地或此外，将上述氨基酸修饰和改变 Fc 区的 C1q 结合和/或补体依赖的细胞毒作用功能的一个或多个进一步的氨基酸修饰结合可能是有用的。

本文特别感兴趣的起始多肽是通常结合 C1q 和显示补体依赖的细胞毒作用(CDC)的多肽。本文所述的进一步的氨基酸取代通常用于改变起始多肽结合 C1q 的能力和/或修饰该多肽的补体依赖的细胞毒作用功能，例如降低或优选消除这些效应器功能。然而，本文涉及包含位于所述位置中一个或多个位置上的取代的多肽，它具有增强的 C1q 结合和/或补体依赖的细胞毒作用(CDC)功能。例如，起始多肽可能不能结合 C1q 和/或介导 CDC，但可以根据本文的教导进行修饰使该多肽获得这些进一步的效应器功能。此外，可以修饰具有已有 C1q 结合活性，并可选地还具有介导 CDC 能力的多肽，以便使这些活性之一或均被增强。

为产生具有改变的 C1q 结合和/或补体依赖的细胞毒作用(CDC)功能的 Fc 区，通常从重链位置 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333, 和 334 中选择待修饰的氨基酸位置，其中 IgG 重链中残基的编号按照 Kabat 等, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)中 EU 索引的方式。在一个实施方案中，以上鉴定的八个位置中只有一个被改变，以便产生具有改变的 C1q 结合和/或补体依赖的细胞毒作用(CDC)功能的多肽变体区。在这种情况下，优选只改变残基 270, 329 或 322。可选地，修饰以上鉴定的两个或多个位置。如果取代将被组合，通常组合增强人 C1q 结合的取代(例如残基位置 326, 327, 333 和 334 上的取代)或结合那些降低人 C1q 结合的取代(例如残基位置 270, 322, 329 和 331 上的取代)。在后一种实施方案中，可以取代所有的四个位置(即，270, 322, 329 和 331)。优选地，将位于位置 326, 327, 333 或 334 中的二个，三个或所有位置上的进一步的取代，可选地与其它 Fc 区取代组合，产生具有增强的人 C1q 结合和优选在体外或体内具有增强的 CDC 活性的多肽。

脯氨酸在人 IgG's 中的位置 329 是保守的。该残基优选由丙氨酸取代，然而，也可用任何其它氨基酸取代，例如丝氨酸，苏氨酸，天冬酰胺，甘

氨酸或缬氨酸。

赖氨酸在人 IgG's 中的位置 322 是保守的。该残基优选由丙氨酸残基取代，然而，也可用任何其它氨基酸取代，例如丝氨酸，苏氨酸，甘氨酸或缬氨酸。

D270 在人 IgGs 中是保守的。而且，该残基可被另一种氨基酸残基取代，例如丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸，甘氨酸，缬氨酸或赖氨酸。

K326 在人 IgGs 中也是保守的。而且，该残基可被另一种氨基酸残基取代包括，但不限于，缬氨酸，谷氨酸，丙氨酸，甘氨酸，天冬氨酸，蛋氨酸，或色氨酸，优选色氨酸。

同样地，E333 在人 IgGs 中也是保守的。E333 优选地被具有较小的侧链体积的氨基酸残基取代，例如缬氨酸，甘氨酸，丙氨酸，或丝氨酸，优选丝氨酸。

K334 在人 IgGs 中是保守的，而且，可被另一种残基取代，例如丙氨酸或其它残基。

在人 IgG1 和 IgG3 中，残基 327 是丙氨酸。为产生具有增强的 C1q 结合的变体，该丙氨酸由另一种残基取代例如甘氨酸。在 IgG2 和 IgG4 中，残基 327 是甘氨酸，并且可由丙氨酸(或另一种残基)取代来减少 C1q 的结合。

如上述，技术人员可设计具有改变的效应器功能的 Fc 区，例如，通过修饰 C1q 结合和/或 FcR 结合，并从而改变 CDC 活性和/或 ADCC 活性。例如，技术人员可以产生具有增强的 C1q 结合和增强的 FcγRIII 结合的变体 Fc 区；例如具有增强的 ADCC 活性和增强的 CDC 活性的变体 Fc 区。可选地，需要效应器功能降低或消失时，技术人员可以改造出具有降低的 CDC 活性和/或减弱的 ADCC 活性的变体 Fc 区。在其它实施方案中，技术人员可以仅增加这些活性之一，并可选地还减弱其它活性，例如产生具有增强的 ADCC 活性和减弱的 CDC 活性的 Fc 区变体或反之。

至于进一步的氨基酸序列变异，通常也可由丝氨酸取代任何未参与保持多肽变体的正确构象的半胱氨酸残基，从而增进该分子的氧化稳定性并防止错误的交联。

另一种类型的氨基酸取代用于改变多肽的糖基化模式。这可以消除多肽中发现的一个或多个碳水化合物部分，和/或增加多肽中不存在的一个或

多个糖基化位点获得。多肽的糖基化通常是 N-连接或 O-连接的。N-连接指碳水化合物部分对天冬酰胺残基的附着。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是碳水化合物部分对天冬酰胺侧链的酶附着的识别序列，其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此，多肽中这些三肽序列任何一个的存在都创造了一个潜在的糖基化位置。O-连接的糖基化指糖 N-乙酰半乳糖胺，半乳糖，或木糖之一对羟基氨基酸的附着，最常见的羟基氨基酸是丝氨酸或苏氨酸，尽管也使用 5-羟脯氨酸和羟赖氨酸。通过改变氨基酸序列使其包含上述三肽序列中的一种或多种，可轻易实现糖基化位点之于多肽的增加(适于 N-连接的糖基化位点)。也可通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基加入原始多肽，或用这些残基进行取代造成改变。典型糖基化变体的重链具有残基 Asn 297 上的氨基酸取代。

此外，通过一处或多处进一步的氨基酸取代可改变 Fc 区的种类，亚类或同种异型，产生出具有与所需的不同类型，亚类或同种异型更同源的氨基酸序列的 Fc 区。例如，可以改变小鼠 Fc 区以产生与人 Fc 区更同源的氨基酸序列；人非-A 同种异型 IgG1 Fc 区可经修饰产生人 A 同种异型 IgG1 Fc 区如此等等。在一个实施方案中，本文中改变 FcR 结合和/或 ADCC 活性的氨基修饰在 Fc 区的 CH2 区中产生，而 CH3 区被缺失或者被另一种二聚化的区域所替换。然而优选地，CH3 区是保留的(除了如本文中公开的改变效应器功能的氨基酸修饰)。

通常根据糖蛋白的预期用途，将如上述制备的糖蛋白做进一步修饰。此种修饰可能涉及氨基酸序列的进一步改变(氨基酸残基的取代，插入和/或缺失)，与异源性多肽融合和/或共价修饰。

另一种类型的氨基酸取代用于改变多肽的糖基化模式。由于缺乏本文所述的海藻糖，此种糖基化改变可能是文中糖基化改变以外的形式，并且可以通过缺失多肽中发现的一个或多个碳水化合物部分，和/或增加多肽中不存在的一个或多个糖基化位置获得。多肽的糖基化通常是 N-连接或 O-连接的。N-连接指碳水化合物部分对天冬酰胺残基的附着。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是碳水化合物部分对天冬酰胺侧链的酶附着的识别序列，其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此，多肽中这些三肽序列中任何一个的存在都创造了一个潜在的糖基化位置。O-连接的糖基化指糖 N-乙酰半乳糖胺，半乳糖，或木糖之一对羟基氨基酸的附着，



最常见的羟基氨基酸是丝氨酸或苏氨酸，尽管也使用 5-羟脯氨酸和羟赖氨酸。通过改变氨基酸序列使其包含上述三肽序列中的一种或几种三肽序列，可轻易实现糖基化位点之于多肽的增加(适于 N-连接的糖基化位点)。也可通过将—个或多个丝氨酸或苏氨酸残基加入原始多肽，或用这些残基进行取代造成改变。

## B. 生物活性筛查

通过一项或多项试验，可评估糖蛋白变体较起始多肽在生物活性上的任何变化。

优选地，与非变体多肽相比，糖蛋白变体基本保持与抗原结合的能力，即其结合能力不差于非变体多肽的约 20 倍，例如不差于非变体多肽的约 5 倍。例如，使用例如荧光活化的细胞分类(FACS)或放射免疫沉淀(RIA)技术可测定多肽变体的结合性能。

可评估糖蛋白变体结合 FcR 的能力。若 FcR 是高亲合力 Fc 受体，例如 FcγRI, FcRn, FcγRIIB 或 FcγRIIIA, 可使用抗体通过滴定单体糖蛋白变体并测定结合的糖蛋白变体来测定结合，所述抗体在标准 ELISA 形式中特异地结合糖蛋白变体(见以下实施例)。低亲合力 FcRs 的另一种 FcR 结合实验在 WO00/42072(Presta)和美国专利 6,242,195B1 中叙述。

为评定糖蛋白变体的 ADCC 活性，可使用不同的效应物:目标比(effector-target)进行体外 ADCC 实验。对此类实验有用的“效应物细胞”包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选地，或此外，可在体内评定糖蛋白变体的 ADCC 活性，例如，在如 Clynes 等 *PNAS(USA)* 95:652-656(1998)公开的动物模型中。

可以评定变体结合 C1q 和介导补体依赖的细胞毒作用(CDC)的能力。

为测定 C1q 的结合，可进行 C1q 结合 ELISA。简言之，将实验板置于含有糖蛋白变体或起始多肽(对照)的包被缓冲液中包被，4℃下过夜。然后洗涤并封闭该板。洗涤后，将等量的人 C1q 加入每个孔中，并在室温下孵育 2 小时。进一步洗涤后，将 100μl 绵羊抗-补体 C1q 过氧化物酶偶联的抗体加入每个孔中，并在室温下孵育 1 小时。再次用洗涤缓冲液洗涤该板，并在每孔中加入 100μl 含有 OPD(O-二盐酸亚苯二胺(phenylenediamine dihydrochloride)(Sigma))的底物缓冲液。通过黄色的出现观察氧化反应，使反应进行 30 分钟，然后加入 100(1.4.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。可在(492-405) nm

读取吸收值。

典型糖蛋白变体是在本实验中显示“C1q 结合显著减少”的糖蛋白变体。这意味着与 100 $\mu$ g/ml 具有未突变的 IgG1 Fc 区的对照抗体相比, 约 100 $\mu$ g/ml 的糖蛋白变体显示约 50 倍或更多 C1q 结合的减少。在最优选的实施方案中, 糖蛋白变体“不结合 C1q”, 即与 100 $\mu$ g/ml 对照抗体相比, 100 $\mu$ g/ml 糖蛋白变体与 C1q 的结合降低约 100 倍或更多。

另一种典型变体是“对人 C1q 具有比亲代多肽更好的结合亲合力”的变体。此种分子可以显示, 例如与亲代多肽相比, 与人 C1q 的结合提高约两倍或更多, 并优选约五倍或更多(例如这两种分子在 IC<sub>50</sub> 值时)。例如, 与亲代多肽相比, 与人 C1q 的结合提高约两倍到约 500 倍, 并优选从约两倍或约五倍到约 1000 倍。

为评定补体活化, 可进行补体依赖的细胞毒作用(CDC)测定, 例如 Gazzano-Santoro 等, *J. Immunol. Methods* 202:163(1996)所述。简言之, 可用缓冲液稀释得到各种浓度的糖蛋白变体和人补体。可将表达糖蛋白变体结合抗原的细胞稀释到 $\sim 1 \times 10^6$  细胞/ml 的浓度。可将糖蛋白变体混合物, 稀释的人补体和表达该抗原的细胞加到平底组织培养 96 孔板上, 使其在 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 下孵育 2 小时, 以便促进补体介导的细胞溶解。随后将 50 $\mu$ l 的 alamar blue(Accumed International)加入每个孔中, 并在 37°C 下孵育过夜。在 530 nm 激发, 并在 590 nm 发射下使用 96 孔荧光计测定吸收值结果以相对荧光单位(RFU)表示。样品浓度可用标准曲线计算, 并且报告感兴趣的糖蛋白变体较非变体多肽的百分比活性。

另一种典型变体“不活化补体”。例如, 与 0.6(g/ml 具有未突变的 IgG1 Fc 区的对照抗体相比, 0.6(g/ml 糖蛋白变体在本实验中显示约 0-10%的 CDC 活性。优选地, 变体在上述 CDC 测定中, 不具有任何 CDC 活性。

糖蛋白可以是与亲代多肽相比, 显示增强的 CDC 的一种, 例如, 在体外或体内 CDC 活性中 CDC 的活性显示约两倍到约 100 倍的提高(例如在每个被比较的分子的 IC<sub>50</sub> 值时)。

本文也涉及对新生儿受体(FcRn)具有变异的结合亲合力的 Fc 区变体。对 FcRn 具有增强的亲合力的 Fc 区变体据预计具有更长的血清半衰期, 而且此种分子在需要长半衰期给药多肽来治疗哺乳动物的方法中具有有益用途, 例如治疗慢性疾病。相反, 预计具有降低的对新生儿受体(FcRn)的亲

合力的 Fc 区变体具有较短的半衰期，例如此种分子可在短的循环时间有利时用于哺乳动物，用于例如多肽的体内诊断性显像，当该多肽较长时间遗留在血流中随之循环时，具有毒副作用，如此等等。据预计具有降低的 FcRn 结合亲和力的 Fc 区变体不太可能穿过胎盘，因此可用于治疗怀孕妇女的疾病。

### C. 抗体的制备

在本发明优选的实施方案中，根据本文的教导修饰的糖蛋白是抗体。产生抗体的方法如下：

#### (i) 抗原选择和制备

当糖蛋白是抗体时，它针对感兴趣的抗原。优选地，所述抗原是生物学上重要的糖蛋白而且将该抗体用药于患病哺乳动物可在该哺乳动物中产生治疗益处。然而，也涉及针对非多肽抗原的抗体(如肿瘤相关的糖脂类抗原；见美国专利 5,091,178)。

当抗原是多肽时，它可以是跨膜分子(例如受体)或配体例如生长因子。典型抗原包括如下分子：例如肾素；生长激素，包括人生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；甲状旁腺激素；甲状腺刺激激素；脂蛋白； $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶；胰岛素 A-链；胰岛素 B-链；前胰岛素；滤泡刺激激素；降钙素；黄体生成素；胰高血糖素；凝血因子例如因子 VIIIc，因子 IX，组织因子(TF)，和 von Willebrands 因子；抗-凝血因子例如蛋白 C；心房利钠因子；肺表面活性剂；纤溶酶原激活物，例如尿激酶或人尿或组织类型的纤溶酶原激活物(t-PA)；铃蟾肽(bombesin)；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和- $\beta$ ；脑啡肽酶；RANTES(由活化调解，通常是 T 细胞表达和分泌的)；人巨噬细胞炎症蛋白(MIP-1- $\alpha$ )；血清白蛋白例如人血清白蛋白；苗勒管抑制物(Muellerian-inhibiting substance)；松弛素 A-链；松弛素 B-链；前松弛素；小鼠促性腺激素相关肽；微生物蛋白，例如 $\beta$ -内酰胺酶；DNase；IgE；细胞毒性 T-淋巴细胞相关抗原(CTLA)，例如 CTLA-4；抑制素(inhibin)；活化素(activin)；血管内皮生长因子(VEGF)；激素或生长因子的受体；蛋白 A 或 D；类风湿因子；神经营养因子例如骨源性神经营养因子(BDNF)，神经营养因子-3, -4, -5, 或 -6(NT-3, NT-4, NT-5 或 NT-6)，或神经生长因子例如 NGF- $\beta$ ；血小板源性生长因子(PDGF)；纤维母细胞生长因子例如 aFGF 和

bFGF; 表皮生长因子(EGF); 转化生长因子(TGF) 例如 TGF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ , 包括 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4, 或 TGF- $\beta$ 5; 肿瘤坏死因子(TNF) 例如 TNF- $\alpha$ 或 TNF- $\beta$ ; 胰岛素样生长因子-I 和-II(IGF-I 和 IGF-II); des(1-3)-IGF-I(脑 IGF-I); 胰岛素样生长因子结合蛋白; CD 蛋白例如 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 和 CD40; 红细胞生成素; 骨诱导因子; 免疫毒素; 骨形态发生蛋白(BMP); 干扰素例如干扰素- $\alpha$ , - $\beta$ 和- $\lambda$ ; 集落刺激因子(CSFs), 例如, M-CSF, GM-CSF, 和 G-CSF; 白介素(ILs), 例如, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 和 IL-10; 过氧化物歧化酶; T-细胞受体; 表面膜蛋白; 衰变加速因子; 病毒抗原如, 例如, AIDS 包膜的一部分; 转运蛋白; 归巢受体; 地址素; 调节蛋白; 整合素例如 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 和 VCAM; 肿瘤相关抗原例如 HER2, HER3 或 HER4 受体; 和任何上述多肽的片段。

本发明包括的抗体的典型靶分子包括 CD 蛋白例如 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34 和 CD40; ErbB 受体家族成员, 例如 EGF 受体, HER2, HER3 或 HER4 受体; 前列腺干细胞抗原(PSCA); 细胞粘附分子例如 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM,  $\alpha$ 4/ $\beta$ 7 整合素, 和  $\alpha$ v/ $\beta$ 3 整合素包括其 $\alpha$ 或 $\beta$ 亚单位(例如抗-CD11a, 抗-CD18 或抗-CD11b 抗体); 生长因子例如 VEGF; 组织因子(TF); 肿瘤坏死因子(TNF) 例如 TNF- $\alpha$  或 TNF- $\beta$ , 干扰素( $\alpha$ -IFN); 白介素, 例如 IL-8; IgE; 血型抗原; flk2/flt3 受体; 肥胖(OB) 受体; *mpl* 受体; CTLA-4; 蛋白 C 等等。

可选地与其它分子偶联的可溶抗原及其片段, 可用作产生抗体的免疫原。对于跨膜分子, 例如受体, 这些抗原的片段(例如受体的胞外区)可用作免疫原。可选地, 表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。此种细胞可来自天然来源(例如癌细胞系)或者可以是经重组技术转化表达跨膜分子的细胞。其它抗原及其可用于制备抗体的形式对本领域技术人员来说是显而易见的。

## (ii) 多克隆抗体

优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物体内制备多克隆抗体。它可用来将相关抗原(尤其使用合成肽时)与在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白偶联。例如, 可以用双功能制剂或衍生制剂使抗原与钥孔血蓝蛋白(KLH), 血清白蛋白, 牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制物

结合，所述双功能或衍生制剂例如马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)，N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)，戊二醛，琥珀酸酐， $\text{SOCl}_2$ ，或  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中 R 和  $\text{R}^1$  是不同的烷基基团。

通过将例如 100 $\mu\text{g}$  或 5 $\mu\text{g}$  蛋白或偶联物(分别对兔子或小鼠而言)与 3 倍体积的弗氏(Freund's)完全佐剂混合，并经皮内多位点注射该溶液，可以使动物对抗原、免疫原性偶联物、或衍生物接受免疫。一个月后，将含有 1/5 到 1/10 最初量的多肽或偶联物的弗氏完全佐剂经皮下注射到多个位点，来给动物加强免疫。7 到 14 天后，自动物取血并分析血清中抗体的滴度。对动物加强免疫直到抗体滴度至平台。优选，用同一抗原的偶联物，但与不同蛋白和/或通过不同交联剂对动物加强免疫。偶联物也可在重组细胞培养中产生，为蛋白融合体形式。另外，聚集剂例如明矾也适宜用来增强免疫应答。

### (iii) 单克隆抗体

单克隆抗体可用 Kohler 和 Milstein, Nature, 256: 495(1975) 首先描述的杂交瘤法制备或通过重组 DNA 法(美国专利 4,816,567)制备。

在杂交瘤方法中，如上述免疫小鼠或其它适宜的宿主动物，例如仓鼠，来激发产生或能产生特异结合免疫所用蛋白的抗体的淋巴细胞。可选地，所述淋巴细胞可被体外免疫。免疫后，淋巴细胞可被分离并随后使用适宜的融合剂例如聚乙二醇与骨髓瘤细胞系融合，以形成杂交瘤细胞(Goding, *单克隆抗体: Principles and Practice*, 59-103 页(Academic Press, 1986))。

由此制备的杂交瘤细胞被接种于适宜的培养基并在其中生长，该培养基优选包含一种或多种抑制未融合亲代骨髓瘤细胞的生长或存活物质。例如，如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)，杂交瘤的选择培养基通常包括次黄嘌呤，氨基蝶呤，和胸腺嘧啶 (“HAT 培养基”) 这些抑制 HGPRT-缺陷细胞生长的物质。

优选骨髓瘤细胞为那些能有效融合、支持所选抗体生成细胞以稳定的高水平产生抗体、并对如 HAT 培养基敏感的骨髓瘤细胞系。在众多这样的细胞系中，优选的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤系，如由 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 提供的 MOPC-21 和 M.C.-11 小鼠肿瘤，和由美国典型培养物保藏中心，Rockville, Maryland USA 提供

的 SP-2 或其衍生物, 如 X63-Ag8-653 细胞。也描述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系可用于产生人单克隆抗体 [Kozbor, J. Immunol., 133: 3001(1984); 和 Brodeur 等, 单克隆抗体的制备技术和应用 (Marcel Dekker, Inc., New York 纽约, (1987)) 51-63 页]。

可在含有生长的杂交瘤细胞的培养基中分析抗所述抗原的单克隆抗体的产生。优选地, 杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合试验, 如放射免疫分析 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 来分析。

单克隆抗体的结合亲和力可通过, 例如 Muson 等, *Anal. Biochem.*, 107:220(1980)所述 Scatchard 分析来测定。

一旦鉴定出产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞, 这些细胞克隆可通过有限稀释进行亚克隆, 并通过标准方法 (Goding, 单克隆抗体: *Principles and Practice*, 59-103 页 (Academic Press, 1986)) 使其生长。适合此目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 通过例如将细胞注射入小鼠中, 可以使杂交瘤细胞以动物腹水肿瘤的形式在体内生长。

上述亚克隆所分泌的单克隆抗体可用经典抗体纯化方法如, 例如, 亲和层析 (例如使用蛋白 A-Sepharose), 羟基磷灰石层析, 凝胶电泳, 透析等从培养基, 腹水或血清中分离。

使用传统方法 (例如通过使用能与编码小鼠抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针) 可轻易分离并测序编码单克隆抗体的 DNA。杂交瘤细胞是此 DNA 的优选来源。一旦分离出该 DNA, 可以将它置入表达载体中, 该载体随后被转染至宿主细胞中例如大肠杆菌细胞, 猴 COS 细胞, 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 或不另外生成抗体蛋白的骨髓瘤细胞, 从而在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。抗体的重组生产将在下文详述。

在进一步的实施方案中, 可从使用 McCafferty 等, *Nature*, 348:552-554(1990)描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628(1991) 和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离小鼠和人抗体。随后的文章描述了通过链改组产生高亲和性 (纳米级) 人抗体 (Marks 等, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)), 以及将组合感染和体内重组作为策略构建非常大的噬菌

体文库(Waterhouse 等, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266(1993))。因此, 这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行(viable)选择。

也可采用以下方法对 DNA 进行修饰: 例如, 以人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源小鼠序列(美国专利 4,816,567; Morrison 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851(1984)), 或将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽(异源多肽)的完整或部分编码序列共价结合。

通常, 上述非免疫球蛋白多肽序列可取代抗体的恒定区, 或它们可取代抗体的一个抗原结合位点的可变区以产生嵌合二价抗体, 该抗体包含两个特异于不同抗原的抗原结合位点。

#### (iv) 人源化抗体和人抗体

人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入它的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称为“引进的”残基, 它们通常来自“引进的”可变区。人源化过程基本是按照 Winter 及其同事(Jones 等, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536(1988))的方法, 通过用啮齿类 CDRs 或 CDR 序列替换人抗体的对应序列来进行。因此, 这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567), 其中完整人类可变区的很少一部分被非人物种的相应序列取代。实践中, 人源化抗体通常是人的抗体, 其中一些 CDR 残基且可能有部分 FR 残基被啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

选择人源化抗体制备所用的人轻链和重链可变区, 对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最适”方法, 针对已知人可变区序列的整个文库筛选啮齿类抗体的可变区序列。随后将与啮齿类最接近的人序列作为人框架区(FR)用于人源化抗体(Sims 等, *J. Immunol.*, 151:2296(1993); Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。另一种方法是使用从轻链或重链特定亚群的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同样的框架区可被用于几种不同的人源化抗体(Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta 等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

更重要的是, 将抗体人源化后保留了对抗原的高亲合力和其它有利的生物特性。为达到此目的, 根据优选方法, 通过用亲本序列和人源化序列

的三维模型分析亲本序列和各种概念性(conceptual)人源化产物来制备人源化抗体。免疫球蛋白三维模型已有商品,是本领域技术人员所熟悉的。还有用于描述和展示所选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序。通过观察这些展示结果可分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能发挥的作用,即分析能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。通过这种方法,可从受体序列和引进序列中选出 FR 残基并组合,从而得到所需抗体性质,如对靶抗原的亲合力增加。总之,超变区残基直接并且最主要涉及对抗原结合的影响。

可选的,可以制备转基因动物(如小鼠),它经过免疫能在缺乏内源性免疫球蛋白生成的情况下产生全套人抗体。例如,已指出在嵌合和胚系(germ-line)突变小鼠中,抗体重链连接区( $J_H$ )基因的纯合缺失导致内源性抗体生成的完全抑制。将人胚系免疫球蛋白基因阵列(array)转移到此胚系突变小鼠中,将导致在抗原攻击的情况下产生人抗体。见例如, Jakobovits 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggemann 等, *Year in Immuno.*, 7:33(1993); 和 Duchosal 等, *Nature* 355:258(1992)。人抗体也可来自噬菌体展示文库(Hoogenboom 等, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991); Vaughan 等, *Nature Biotech* 14:309(1996))。

### (v) 多特异抗体

多特异抗体对至少两种不同的抗原具有结合特异性。尽管此种分子通常只结合两种抗原(即双特异抗体, BsAbs), 具有附加特异性的抗体例如三特异抗体也包含在文中所用的术语中。BsAbs 的实例包括具有针对肿瘤抗原的一条臂和针对细胞毒作用触发分子(cytotoxic trigger molecule)的另一条臂的那些抗体, 例如抗-FcγRI/抗-CD15, 抗-p185<sup>HER2</sup>/FcγRIII(CD16), 抗-CD3/抗-恶性 B-细胞(1D10), 抗-CD3/抗-p185<sup>HER2</sup>, 抗-CD3/抗-p97, 抗-CD3/抗-肾细胞癌, 抗-CD3/抗-OVCAR-3, 抗-CD3/L-D1(抗-结肠癌), 抗-CD3/抗-黑色素细胞刺激激素类似物, 抗-EGF 受体/抗-CD3, 抗-CD3/抗-CAMA1, 抗-CD3/抗-CD19, 抗-CD3/MoV18, 抗-神经细胞粘附分子(NCAM)/抗-CD3, 抗-叶酸结合蛋白(FBP)/抗-CD3, 抗-泛癌相关抗原(AMOC-31)/抗-CD3; 一条臂特异地结合肿瘤抗原而另一条臂结合毒素的 BsAbs 例如 抗-皂草素/抗



-Id-1, 抗-CD22/抗-皂草素, 抗-CD7/抗-皂草素, 抗-CD38/抗-皂草素, 抗-CEA/抗-蓖麻毒素 A 链, 抗-干扰素- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )/抗-杂交瘤独特型, 抗-CEA/抗-长春花碱; 转化酶活化的前体药物的 BsAbs 例如 抗-CD30/抗-碱性磷酸酶(催化磷酸丝裂霉素前药物向丝裂霉素醇的转化); 可用作纤维蛋白溶解剂的例如 抗-纤维蛋白/抗-组织纤溶酶原激活物(tPA), 抗-纤维蛋白/抗-尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA); 将免疫复合物靶向细胞表面受体的 BsAbs 例如抗-低密度脂蛋白(LDL)/抗-Fc 受体(例如 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII 或 Fc $\gamma$ RIII); 用于治疗感染性疾病的 BsAbs 例如抗-CD3/抗-单纯疱疹病毒(HSV), 抗-T-cell 受体:CD3 复合物/抗-流感病毒, 抗-Fc $\gamma$ R/抗-HIV; 体外或体内检测肿瘤的 BsAbs 例如抗-CEA/抗-EOTUBE, 抗-CEA/抗-DPTA, 抗-p185<sup>HER2</sup>/抗-hapten; 作为疫苗佐剂的 BsAbs; 和作为诊断工具的 BsAbs 例如 抗-兔 IgG/抗-铁蛋白, 抗-辣根过氧化物酶(HRP)/抗-激素, 抗-生长抑素/抗-物质 P, 抗-HRP/抗-FITC, 抗-CEA/抗- $\beta$ -半乳糖苷酶。三特异抗体的实例包括抗-CD3/抗-CD4/抗-CD37, 抗-CD3/抗-CD5/抗-CD37 和抗-CD3/抗-CD8/抗-CD37。双特异抗体可被制备为全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')<sub>2</sub> 双特异性抗体)。双特异性抗体的综述见 Segal 等 *J. Immunol. Methods* 248:1-6(2001)。

制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上, 全长双特异性抗体的重组制备是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中这两条链具有不同特异性(Millstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链轻链随机搭配, 这些杂交瘤(quadroma)产生 10 种不同抗体分子的潜在的混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。对正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤来进行)非常复杂, 且产量很低。类似的方法见 WO93/08829(1993 年 5 月 13 日公开)和 Traunecker 等, *EMBO J*, 10: 3655-3659(1991)。

依据不同的方法, 可将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合优选与至少包含铰链区、CH2 及 CH3 区部分的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)出现在至少在一种融合中。可将编码免疫球蛋白重链融合体, 以及必要时, 编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入不同表达载体, 共转染至适当宿主生物。这使得在使用非等比的三种多肽链进行构建的实施方案中, 能够较灵活地调整三种多肽片段的相互比例, 以获得最

佳产量。但也可在至少两种多肽链以等比例表达而获得高产时或所述比例无特别意义时，将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。

在该方法的一个优选实施方案中，所述双特异性抗体由一条臂上的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现这种不对称结构有利于从非必要免疫球蛋白链的组合中分离出所需双特异性化合物，因为只在该双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链，这使得分离更加容易。此方法公开于1994年3月3日公开的WO94/04690中。制备双特异性抗体的进一步细节可以参见，例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121: 210(1986)。根据 W096/27011 所述的另一种方法，可改造一对抗体分子之间的界面，使得从重组细胞培养中获得的异二聚体的百分比最大。优选的界面包括抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中，源于第一抗体分子界面上的一条或多条小的氨基酸侧链被较大侧链(如酪氨酸或色氨酸)取代。与所述大侧链大小相同或相近的互补“沟”可通过将氨基酸大侧链用小侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代而在第二抗体分子的界面上形成。这提供了一种机制，其使异二聚体的产量比不想要的终产物如同二聚体高。

双特异性抗体包括交联抗体或“异源偶联的”抗体。例如，可使异源偶联物中的抗体之一与抗生物素蛋白偶联，使另一抗体与生物素偶联。有观点认为，这类抗体可用于将免疫细胞导向不想要的细胞(美国专利 4676980)，也可用于治疗 HIV 感染(WO91/00360, WO92/200373 和 EP03089)。异源偶联抗体可通过任何适当的交联方法制备。适当的交联制剂和多种交联技术为本领域已知，可在美国专利 4676980 号中获得。

本发明还涉及二价以上的抗体。例如可制备三特异抗体。Tutt 等 *J. Immunol.* 147: 60(1991)。

#### (vi) 多价抗体

多价抗体比二价抗体可更快地被表达与该抗体结合的抗原的细胞内化(和/或异化)。本发明的抗体可以是具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体(例如四价抗体)(它们不是 IgM 类)，通过使编码所述抗体多肽链的核酸重组表达可轻易制备该抗体。多价抗体可以包含二聚体化结构域和三个或更多个抗原结合位点。优选的二聚体化结构域包括 Fc 区或铰链区，或由它

们组成。在本文中，抗体包含一个 Fc 区和三个或更多个位于 Fc 区氨基端的抗原结合位点。优选的多价抗体在此包括三到约八个抗原结合位点，但优选四个抗原结合位点，或由它们组成。多价抗体包括至少一条多肽链(并优选两条多肽链)，其中所述多肽链包含两个或多个可变区。例如，多肽链可包含  $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ ，其中 VD1 是第一可变区，VD2 是第二可变区，Fc 是 Fc 区的一条多肽链，X1 和 X2 代表氨基酸或多肽，n 是 0 或 1。例如，多肽链可包括 VH-CH1-柔韧接头(flexible linker)-VH-CH1-Fc 区链；或 VH-CH1-VH-CH1-Fc 区链。本文的多价抗体优选进一步包含至少二个(优选四个)轻链可变区多肽。例如本文的多价抗体可包含从约二个到约八个轻链可变区多肽。本文的轻链可变区多肽包含轻链可变区以及可选地进一步包含 CL 结构域。对多价抗体的描述见 WO 01/00238 and WO 00/44788。

#### **(vii) 亲和力成熟的抗体**

本文的抗体可以是亲和力成熟的抗体，它包含对亲代抗体(例如人源化或人抗体)一个或多个超变区残基的取代。通常，相对于其产生的亲代抗体，生成的用于进一步改造的变体具有改良的生物学特性。产生此种取代变体的便利方法涉及使用噬菌体展示的亲和力成熟。简言之，若干超变区位点(例如 6-7 位点)经突变在每个位点产生所有可能的氨基取代。以单价形式从丝状噬菌体颗粒将如此产生的抗体变体显示为包裹在每个颗粒中的与 M13 的基因 III 产物的融合物。随后筛选该噬菌体展示的变体的生物活性(例如结合亲和力)。为鉴定修饰的候选超变区位点，可进行丙氨酸扫描诱变鉴定对抗原结合有显著贡献的超变区残基。可选地，或此外，分析抗原抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体及其抗原之间的接触点是有益的。此种接触残基和邻近残基是根据本文所述技术进行取代的候选残基。一旦产生这样的变体，便对这样的变体组(panel)进行筛选，可选出在一项或几项相关实验中具有出众特性的抗体进一步改造。

#### **(viii) 免疫偶联物**

本发明还涉及用包含与抗癌药剂例如细胞毒作用剂或生长抑制剂偶联的糖蛋白的免疫偶联物所进行的治疗。

用于产生此种免疫偶联物的化疗剂已在上文中描述。

本文也涉及抗体和一个或多个小分子毒素的偶联物，例如加利车毒素，美登木素(maytansinoid)，单端孢霉烯(trichothene)和 CC1065，以及这些毒素具有毒素活性的衍生物。

在一个优选的实施方案中，本发明的糖蛋白与一个或多个美登木素分子偶联。

本领域已知多种制造抗体-美登木素生物碱偶联物的连接基团，包括例如美国专利 5,208,020 或 欧洲专利 EP 0 425 235 B1，和 Chari 等 *Cancer Research* 52: 127-131(1992)公开的那些。连接基团包括二硫基，硫醚基，酸不稳定基团，光不稳定基团，肽酶不稳定基团，或酯酶不稳定基团，如上述专利所公开，优选二硫基和硫醚基。

通过以化学方法将糖蛋白(例如抗体)连接与美登木素分子而不显著减少糖蛋白或美登木素分子的生物活性可以制备糖蛋白-美登木素偶联物。虽然即使是一个分子的毒素/抗体比起使用裸露的抗体来，就可以增强细胞毒作用，每个抗体分子平均偶联的 3-4 个美登木素分子已显示出在不负面影响抗体的功能和溶解性下，增强目的细胞细胞毒作用的效力。本领域人员了解美登木素生物碱并可通过已知技术合成或从天然来源分离它。适宜的美登木素生物碱在例如美国专利 5,208,020 和上述的其它专利以及非专利文献中公开。优选的美登木素生物碱是美登木醇(maytansinol)和对美登木醇分子的芳香环或其它位点进行修饰的美登木醇类似物，例如美登木醇的各种酯。本领域已知许多制造抗体-美登木素偶联物的连接基团，包括，例如，美国专利 5,208,020 或 EP 专利 0 425 235 B1，和 Chari 等 *Cancer Research* 52: 127-131(1992)重公开的那些。连接基团包括二硫基团，硫醚基团，酸不稳定基团，光不稳定基团，肽酶不稳定基团，或酯酶不稳定基团，如上述专利公开，优选二硫基和硫醚基。使用多种双功能蛋白偶联剂可制造抗体和美登木素偶联物，所述双功能蛋白偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯，亚胺基硫烷(iminothiolane)(IT)，亚胺酸酯的双功能衍生物(如盐酸二甲基己二酸亚胺酯(dimethyladipimidate HCl))，活性酯类(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)，醛类(如戊二醛(glutarealdehyde))，双-叠氮化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)，双-重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)，二异氰酸酯(如亚甲代苯基 2,6-二异氰酸酯)，和双-活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-

二硝基苯)。尤其优选的偶联剂包括 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson 等, *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) 和 N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)来提供二硫连接。接头可附着于美登木素生物碱分子的不同位点,这取决于连接的类型。例如,使用传统的偶联技术通过与羟基反应形成酯连接。该反应可出现在含有羟基的 C-3 位置,经羟甲基修饰的 C-14 位置,经羟基修饰的 C-15 位置,以及含羟基的 C-20 位置。在优选的实施方案中,在美登木醇或美登木醇类似物的 C-3 位置形成连接。

另一种感兴趣的免疫偶联物包括与一个或多个加利车霉素分子偶联的糖蛋白。抗生素的加利车霉素家族能够在亚皮摩尔的浓度造成双链 DNA 断裂。加利车霉素家族偶联物的制备见美国专利 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296(均属于 American Cyanamid Company)。可利用的加利车霉素的结构类似物包括,但不限于,  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-乙酰- $\gamma_1^I$ , PSAG 和  $\theta_1^I$ (Hinman 等 *Cancer Research* 53: 3336-3342(1993), Lode 等 *Cancer Research* 58: 2925-2928(1998)和前述所有属于 American Cyanamid 的专利)。另一种可偶联糖蛋白的抗肿瘤药物是 QFA,它是一种抗叶酸剂。加利车霉素和 QFA 都具有作用的胞内位点,而且不轻易穿过胞浆膜。因此,通过抗体介导的内化,这些药剂的细胞摄取大大地增强了其细胞毒作用。

其它可与本发明的抗体偶联的抗肿瘤药物包括 BCNU, 链脲菌素(streptozocin), 长春新碱和 5-氟尿嘧啶, 美国专利 5,053,394, 5,770,710 所述的已知统称为 LL-E33288 复合物的药物家族,以及 esperamicins(美国专利 5,877,296)。

可以应用的酶活性毒素及其片段包括: 白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 $\alpha$ -帚曲毒素、油桐(*Aleutites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca Americana*)蛋白(PAPI, PAPII, PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制因子、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂, 白树毒素、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公开的 WO93/21232。

本发明还涉及一种免疫偶联物，其由抗体与具有核酸分解活性的化合物(如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶如脱氧核糖核酸酶；DNase)形成。

为选择性破坏肿瘤，抗体可包含高度放射活性原子。多种放射性同位素可用于制备放射性偶联的抗体，实例包括  $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$  以及 Lu 的放射性同位素。当偶联物用于诊断时，它包含可用于闪烁照相研究的放射活性原子，例如  $tc^{99m}$  或  $I^{123}$ ，或可以用于核磁共振(NMR)成像(也称磁共振现象，mri)的旋转标记(spin label)，例如碘-123，碘-131，铟-111，氟-19，碳-13，氮-15，氧-17，钆，锰或铁。

放射性标记或其它标记可通过已知方法掺入偶联物中。例如，所述肽可以生物合成，或使用涉及例如氟-19 取代氢的适宜氨基酸前体进行化学氨基酸合成。标志物例如  $tc^{99m}$  或  $I^{123}$ ， $Re^{186}$ ， $Re^{188}$  和  $In^{111}$  可以借助所述肽中的半胱氨酸残基来附着。钇-90 可以借助赖氨酸残基来附着。可用 IODOGEN 法(Fraker 等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 掺入碘-123。

“免疫闪烁照相术中的单克隆抗体”(Chatal, CRC Press 1989)详细描述了其它方法。

抗体和细胞毒作用制剂的偶联物可通过多种双功能蛋白偶联剂来连接，所述双功能蛋白偶联剂如：N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯，亚胺基硫烷(IT)，亚胺酸酯的双功能衍生物(如盐酸二甲基己二酸亚氨酯)，活性酯类(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)，醛类(如戊二醛)，双-叠氮化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)，双-重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)，二异氰酸酯(如亚甲代苯基 2,6-二异氰酸酯)，和双-活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻毒蛋白免疫毒素可如 Vitetta 等，*Science* 238: 1098(1987)所述制备。 $C^{14}$  标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二乙烯三氨五乙酸(MX-DTPA)是将放射性核苷酸偶联至抗体的偶联剂之一。见 WO94/11026。这种接头可能是有利于细胞毒作用药物在细胞内释放的“可断开的接头”。例如，可使用酸不稳定型接头，肽酶敏感型接头，光不稳定型接头，二甲基接头或含二硫键的接头(Chari 等，*Cancer Research* 52: 127-131(1992)；美国专利 5,208,020)。

可选地，通过例如重组技术或肽合成制备包含抗体和细胞毒作用剂的融合蛋白。DNA 的长度可包含分别编码该偶联物的两个部分的区域，它们

彼此邻接，或被编码接头肽但不破坏该偶联物的所需特性的区域分开。

在另一实施方案中，抗体可与肿瘤预靶向中应用的“受体”（如链霉亲和素）偶联，将该抗体-受体偶联物给予患者，之后用清除剂（clearing agent）除去循环中未结合的偶联物，再给予已偶联了细胞毒作用制剂（如放射性核苷酸）的“配体”（如抗生物素蛋白）。

#### **(ix) 抗体依赖酶介导的前体药物的治疗(ADEPT)**

通过将抗体偶联于前体药物活化酶，本发明的抗体也可用于 ADEPT，该酶将前体药物（例如肽基化疗剂，见 WO81/01145）转化成活性抗癌药物。参见，例如，WO 88/和美国专利 4,975,278。

用于 ADEPT 的免疫结合物的酶组分包括任何能够对前体药物起作用，将它转化成更加有活性的细胞毒作用形式的酶。

可用于本发明的方法的酶包括，但不限于，碱性磷酸酶，用于将含有磷酸盐的前体药物转化成游离药物；芳香硫酸酯酶，用于将含有硫酸盐的前体药物转化成游离药物；胞嘧啶脱氨酶，用于将含有无毒的 5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物 5-氟尿嘧啶；蛋白酶，例如沙雷氏菌属蛋白酶，嗜热菌蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶，羧肽酶和组织蛋白酶（例如组织蛋白酶 B 和 L），用于将含肽的前体药物转化成游离药物；D-丙酰胺羧肽酶，用于转化含有 D-氨基酸取代物的前体药物；碳水化合物-切割酶，例如 $\beta$ -半乳糖苷酶和神经酰胺酶，用于将糖基化的前体药物转化成游离药物； $\beta$ -内酰胺酶，用于将 $\beta$ -内酰胺衍生的药物转化为游离药物；和青霉素酰氨酶，例如青霉素 V 酰氨酶或青霉素 G 酰氨酶，用于将由苯氧乙酰基或苯乙酰基自其胺氮衍生的药物分别转化成游离药物。可选地，具有酶活性的抗体（本领域也称“抗体酶”）可用将本发明的前体药物转化成游离活性药物（参见，例如，Massey, *Nature* 328: 457-458(1987)）。可如本文所述方法制备抗体-抗体酶偶联物，从而将抗体酶递送到肿瘤细胞群。

通过本领域已知的技术，本发明的酶可与抗体共价偶联，例如使用上述的异双功能交联剂。可选地，使用本领域技术人员熟悉的重组 DNA 技术构建融合蛋白，该融合蛋白至少包含本文抗体的抗原结合区，并连接于本发明的酶的至少一个功能活化部分。（见，例如，Neuberger 等，*Nature*, 312:604-608(1984)）。

### (x) 其它糖蛋白修饰

本文涉及糖蛋白的其它修饰。例如，糖蛋白可与多种非蛋白聚合物之一连接，例如，聚乙二醇、聚丙二醇，聚氧化烯或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。也可以将抗体包封在按照例如凝聚技术或界面聚合技术制备的微胶囊(分别例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中，在胶体药物释放系统(例如脂质体，白蛋白微球体，微乳剂，纳米颗粒和毫微胶囊)中或在大乳剂中。这类技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed.,(1980)。

可将本文公开的糖蛋白配制成免疫脂质体。“脂质体”是由能向哺乳动物有效运送药物(如本文公开的抗 ErbB2 抗体，和任选的一种化疗剂)的各类脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小分子囊泡。脂质体的组分通常排列为双层形式，与生物膜的脂质排列相似。含有所述抗体的脂质体可通过本领域已知方法制备，如 Epstein 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.82: 3688(1985); Hwang 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 4030(1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 以及公开于 1997 年 10 月 23 日的 WO97/38731。在美国专利 5,013,566 中公开了循环时间已增加了的脂质体。

特别有用的脂质体可利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物经反相蒸发法产生。通过使脂质体在挤压之下穿过指定孔径大小的滤膜，可获得具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可如 Martin 等，J. Biol. Chem., 257: 286-288(1982)所述，经二硫键交换反应与脂质体偶联。可任选在所述脂质体中包含一种化疗药物。见 Gabizon 等，J. National Cancer Inst, 81(19)1484(1989)。

### (xi) 抗体的实例

本发明范围内优选的抗体包括包含以下抗体的氨基酸序列的那些：

抗-HER2 抗体，包括含有 huMAb 4D5-8(Carter 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289(1992)，美国专利 5,725,856)的重链和轻链可变区的抗体；

抗-CD20 抗体，例如美国专利 5,736,137(RITUXAN®)中的嵌合抗-CD20 “C2B8”，美国专利 5,721,108，B1 中 2H7 抗体的嵌合或人源化变体或 Tositumomab(BEXXAR®)；



抗-IL-8(St John 等, *Chest*, 103:932(1993), 和国际申请(国际申请 No.) WO 95/23865);

抗-VEGF 抗体, 包括人源化和/或亲合力成熟抗-VEGF 抗体, 例如人源化抗 VEGF 抗体 huA4.6.1 AVASTIN™(Kim 等, *Growth Factors*, 7:53-64(1992), WO 96/30046, 和 WO 98/45331, 1998 年 10 月 15 日公开);

抗-PSCA 抗体(WO01/40309);

抗-CD40 抗体, 包括 S2C6 及其人源化变体(WO00/75348);

抗-CD11a(美国专利 5,622,700, WO 98/23761, Steppe 等, *Transplant Intl.* 4:3-7(1991), 和 Hourmant 等, *Transplantation* 58:377-380(1994));

抗-IgE(Presta 等, *J. Immunol.* 151:2623-2632(1993), 和国际申请 WO 95/19181; 美国专利 5,714,338, 1998 年 2 月 3 日授权或美国专利 5,091,313, 1999 年 2 月 25 日授权, WO 93/04173, 1993 年 3 月 4 日公开, 或 WO 99/01556, 1999 年 1 月 14 日公开, 美国专利 5,714,338);

抗-CD18(美国专利 5,622,700, 1997 年 4 月 22 日授权或 WO 97/26912, 1997 年 7 月 31 日公开);

抗-Apo-2 受体抗体(WO 98/51793, 1998 年 11 月 19 日公开);

抗-TNF- $\alpha$ 抗体包括 cA2(REMICADE®), CDP571 和 MAK-195(见美国专利 5,672,347, 1997 年 9 月 30 日授权, Lorenz 等 *J. Immunol.* 156(4):1646-1653(1996), 和 Dhainaut 等 *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469 (1995));

抗-组织因子(TF)(欧洲专利 0 420 937 B1, 1994 年 11 月 9 日授权);

抗-人 $\alpha_4\beta_7$ 整合素(WO 98/06248, 1998 年 2 月 19 日公开);

抗-EGFR(例如 WO96/40210 中的嵌合或人源化 225 抗体 1996 年 11 月 19 日公开);

抗-CD3 抗体, 例如 OKT3(美国专利 4,515,893, 1985 年 5 月 7 日授权);

抗-CD25 或抗-tac 抗体例如 CHI-621(SIMULECT®)和(ZENAPAX®)(参见美国专利 5,693,762, 1997 年 12 月 2 日授权);

抗-CD4 抗体例如 cM-7412 抗体(Choy 等 *Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996));

抗-CD52 抗体, 例如 CAMPATH-1H(Riechmann 等 *Nature* 332:323-337 (1988));

抗-Fc 受体抗体, 例如针对 Fc $\gamma$ RI 的 M22 抗体, Graziano 等 *J. Immunol.*

155(10):4996-5002(1995);

抗-癌胚抗原(CEA)抗体, 例如 hMN-14(Sharkey 等 *Cancer Res.* 55(23Suppl): 5935s-5945s(1995);

针对乳腺上皮细胞的抗体包括 huBrE-3, hu-Mc3 和 CHL6(Ceriani 等 *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s(1995); 和 Richman 等 *Cancer Res.* 55(23 Supp): 5916s-5920s(1995));

与结肠癌细胞结合的抗体例如 C242(Litton 等 *Eur J. Immunol.* 26(1):1-9(1996));

抗-CD38 抗体, 例如 AT 13/5(Ellis 等 *J. Immunol.* 155(2):925-937(1995));

抗-CD33 抗体, 例如 Hu M195(Jurcic 等 *Cancer Res* 55(23 Suppl):5908s-5910s(1995)和 CMA-676 或 CDP771;

抗-CD22 抗体, 例如 LL2 或 LymphoCide(Juweid 等 *Cancer Res* 55(23 Suppl):5899s-5907s(1995);

抗-EpCAM 抗体, 例如 17-1A(PAN 或 EX®);

抗-GpIIb/IIIa 抗体, 例如 abciximab 或 c7E3 Fab(REOPRO®);

抗-RSV 抗体, 例如 MEDI-493(SYNAGIS®);

抗-CMV 抗体, 例如 PROTOVIR®;

抗-HIV 抗体, 例如 PRO542;

抗-肝炎抗体, 例如抗-Hep B 抗体 OSTAVIR®;

抗-CA 125 抗体 OvaRex;

抗-独特型 GD3 表位抗体 BEC2;

抗- $\alpha v \beta 3$  抗体 VITAXIN®;

抗-人肾细胞癌抗体, 例如 ch-G250; ING-1;

抗-人 17-1A 抗体(3622W94);

抗-人结肠直肠肿瘤抗体(A33);

抗-人黑素瘤抗体 R24, 它针对 GD3 神经节苷脂;

抗-人鳞状细胞癌(SF-25); 和

抗-人白细胞抗原(HLA)抗体, 例如 Smart ID10 和抗-HLA DR 抗体 Oncolym(Lym-1)。

本文感兴趣的糖蛋白优选是抗体, 和其它可根据本文所述方法修饰的含有 Fc 区的糖蛋白。此种分子的实例是免疫粘附素。

#### D. 免疫粘附素制备

最简单和最直接的免疫粘附素设计将粘附素的结合结构域(例如受体的胞外结构域(ECD))和免疫球蛋白重链的 Fc 区结合。通常,制备本发明的免疫粘附素时,编码粘附素结合结构域的核酸将以 C 末端与编码免疫球蛋白恒定区序列的 N 末端的核酸融合,而以 N 末端融合也是可能的。

典型地,在所述融合中,所编码的嵌合多肽会保留至少具有功能活性的免疫球蛋白重链恒定区的铰链, CH2 和 CH3 区。也可产生与恒定区 Fc 部分的 C-末端,或重链 CH1 的临近 N-末端或轻链的对应区域的融合物。融合所在的精确位置是不严格的;特别的位点是众所周知的并可选以最优化免疫粘附素的生物活性,分泌或结合特性。

在优选方案中,将粘附素序列融合到免疫球蛋白 G1(IgG1)的 Fc 区域的 N-末端。可将整个重链恒定区融合到粘附素序列。然而,更优选地,在融合物中应用开始于铰链区,刚好位于化学限定 IgG Fc 的木瓜蛋白酶剪切位点上游的序列(即残基 216,将重链恒定区的第一个残基作为 114)或其它免疫球蛋白的类似位点。在特别优选实施方案中,将所述粘附素氨基酸序列融合到 IgG 重链的(a)铰链区, CH2 和 CH3 区,或(b)铰链区, CH1, CH2 和 CH3 区。

对于双特异性免疫粘附素,该免疫粘附素作为多聚体,特别作为异源二聚体或异源四聚体组装。一般,这些组装的免疫球蛋白会具有已知的单位结构。基本的四链结构单位是 IgG, IgD 和 IgE 存在的形式。在较高分子量的免疫球蛋白中重复一种四链单位; IgM 通常以四个基本单位通过二硫键抱团的五聚体存在。IgA 球蛋白,偶尔是 IgG 球蛋白,也会以血清中的多聚体形式存在。在多聚体情况下,每个四单位可相同或不同。

本文范围内多个举例组装的免疫粘附素见如下图表示意:

- (a)  $AC_L-AC_L$ ;
- (b)  $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, \text{或 } V_LC_L-AC_H)$ ;
- (c)  $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HCH, V_LC_L-AC_H, \text{或 } V_LC_L-V_HCH)$ ;
- (d)  $AC_L-V_HCH-(AC_H, \text{或 } AC_L-V_HCH, V_LC_L-AC_H)$ ;
- (e)  $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HCH, \text{或 } V_LC_L-AC_H)$ ; 和
- (f)  $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HCH)_2$ .

其中每个 A 代表同一或不同的粘附素氨基酸序列;

$V_L$  为免疫球蛋白轻链可变区;

$V_H$  为免疫球蛋白重链可变区;

$C_L$  为免疫球蛋白轻链恒定区;

$C_H$  为免疫球蛋白重链恒定区;

N 为大于 1 的整数;

Y 命名的是共价交联剂的残基。

为简短起见, 前述结构只表现出主要性质; 它们不表示免疫球蛋白的连接区(J)或其它结构域, 也不显示二硫键。然而, 当所述结构域对结合活性所必需时, 它们将被构建在免疫球蛋白分子中其所占据的常规(ordinary)位置。

可选地, 该粘附素序列可被插入免疫球蛋白重链和轻链序列之间, 因而可获得包含嵌合重链的免疫球蛋白。在此实施方案中, 所述粘附素序列被融合到免疫球蛋白每条臂上的免疫球蛋白重链的 3'末端, 或者在铰链和 CH2 结构域之间, 或者在 CH2 和 CH3 结构域之间。相似构建体已被 Hoogenboom 等, *Mol. Immunol.*, 28 : 1027-1037(1991)报道。

尽管本发明的免疫粘附素不需要免疫球蛋白轻链的存在, 免疫球蛋白轻链可以共价连接到粘附素-免疫球蛋白重链融合多肽, 或直接融合到粘附素的方式存在。在前者的情况下, 编码免疫球蛋白轻链的 DNA 通常与编码粘附素-免疫球蛋白重链融合蛋白的 DNA 共表达。一旦分泌, 杂交重链和轻链可共价连接以提供包含两个双硫-连接的免疫球蛋白重链-轻链对的类免疫球蛋白结构。适合制备此种结构的方法, 在例如美国专利 4,816,567(发表于 1989 年 3 月 28 日)中公开。

通过将编码框内粘附素部分的 cDNA 序列与免疫球蛋白 cDNA 序列融合来非常方便地构建免疫粘附素。然而, 也可用与基因组免疫球蛋白片段的融合(见例如, Aruffo 等, *Cell*, 61 : 1303-1313(1990); 和 Stamenkovic 等, *Cell*, 66 : 1133-1144(1991))。后一种类型的融合需要 Ig 表达调控序列的存在。基于源自脾或外周血淋巴细胞的 cDNA 文库的公布序列, 用杂交或聚合酶链式反应(PCR)技术, 分离编码 IgG 重链恒定区的 cDNA。将编码“粘附素”的 cDNA 和免疫粘附素的免疫球蛋白部分的 cDNA 串联插入到在所选宿主细胞中指导有效表达的质粒载体中。

### E.载体, 宿主细胞和重组方法

本发明还提供编码本文糖蛋白的分离的核酸, 载体和包含该核酸的宿主细胞, 和生产糖蛋白的重组技术。

为进行糖蛋白的重组生产, 分离编码它的核酸并把核酸插入可复制的载体中进一步克隆(DNA 扩增)或表达。编码糖蛋白的 DNA 易于利用传统方法分离和测序(例如, 通过使用能够与编码糖蛋白的基因特异结合的寡核苷酸探针)。可利用许多载体。载体的组分通常包括, 但不限于, 以下物质中的一种或多种: 信号序列, 复制起点, 一个或多个标记基因, 增强子, 启动子, 和转录终止序列。

#### (i)信号序列成分

本发明的糖蛋白不仅可直接被重组生产, 也可以作为与异源多肽的融合蛋白被生产, 该异源多肽优选是信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端具有特定切割位点的其它多肽。选定的异源信号序列优选是可由宿主细胞识别和加工(即, 由信号肽酶切割)的序列。对于不识别和加工天然多肽信号序列的原核细胞, 信号序列由以下原核信号序列取代, 例如选自碱性磷酸酶, 青霉素酶, lpp, 或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌物, 天然信号序列可由例如酵母转化酶前导序列,  $\alpha$ 因子前导序列(包括糖酵母(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母(*Kluyveromyces*) $\alpha$ -因子前导序列), 或酸性磷酸酶前导序列, 白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖淀粉酶前导序列, 或 WO 90/13646 中所述的信号序列。在哺乳动物细胞表达中, 可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌性前导序列, 例如, 单纯疱疹 gD 信号。

在阅读框架中, 此种前体区的 DNA 连接于编码多肽的 DNA。

#### (ii)复制成分的起点

表达载体和克隆载体都包含能使该载体在一或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。一般情况下, 在克隆载体中, 这种序列是能使该载体独立于宿主染色体 DNA 而复制的序列, 包括复制起点或自我复制序列。这样的序列在各种细菌、酵母和病毒中都是众所周知的。质粒 pBR322 的复制起点适合大多数革兰氏阴性细菌, 2 $\mu$ 质粒起点适合酵母菌, 多种病毒起点

(SV40, 多瘤病毒(Polyoma), 腺病毒, VSV 或 BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。复制起点组分一般不是哺乳动物表达载体所必需的(SV40 起点的使用通常仅仅是由于其包含早期启动子)。

### (iii) 选择基因成分

表达载体和克隆载体应该包含选择基因, 也称选择标记。该基因编码使经过转化的宿主细胞在选择性培养基中存活或生长所必需的蛋白。没有被包含该选择基因的载体转化的宿主细胞在所述选择性培养基中不能存活。典型的选择基因编码具有以下性质的蛋白: (a) 赋予对抗生素或其它毒素(如氨基青霉素, 新霉素, 氨基蝶呤或四环素)的抗性, (b) 弥补营养缺陷, 或(c) 提供复合培养基不能供给的关键营养物, 例如编码芽孢杆菌 D-丙氨酸消旋酶的基因。

选择方案的一个实例是利用药物限制(arrest)宿主细胞的生长。那些被异源基因成功转化的细胞产生一种赋予药物抗性的蛋白, 从而在该选择环境中存活。这种显性选择可以采用的药物有新霉素, 霉酚酸和潮霉素。

适合于哺乳动物细胞的另一例选择标记是允许鉴定能摄取多肽核酸的细胞的那些标记, 如 DHFR 或胸苷激酶, 金属硫蛋白-I 和-II, 优选灵长类金属硫蛋白基因, 腺苷脱氨酶, 鸟氨酸脱羧酶等。

例如, 用 DHFR 选择基因转化的细胞首先通过将所有转化体培养在包含氨基蝶呤(Mtx, 为 DHFR 的一种竞争型拮抗剂)的培养基中进行鉴定。当采用野生型 DHFR 时, 合适的宿主细胞包括 DHFR 活性有缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

或者, 宿主细胞(尤其包含内源 DHFR 的野生型宿主)被编码 Bv8 的 DNA 序列, 野生型 DHFR 蛋白, 以及另一种选择标记如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶 (APH) 转化或共转化以后, 可以通过在含有针对该选择标记的选择试剂如氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素, 新霉素或 G418)的培养基中培养细胞来进行选择。参见美国专利 4,965,199。

适用于酵母的合适选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 *trp1* 基因 (Stinchcomb 等, Nature, 282: 39(1979))。Trp1 基因为不能在色氨酸中生长的酵母突变株(例如 ATCC 44076 或 PEP4-1)提供了选择标记(Jones, Genetics, 85: 12(1977))。此后, 酵母宿主细胞基因组中 *trp1* 损伤的存在提供了通过

在缺乏色氨酸的条件中生长而检测转化的有效环境。类似地, *Leu2*-缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)可以由携带 *Leu2* 基因的已知质粒来补充。

此外, 源自 1.6 $\mu$ m 环状质粒 pKDI 的载体可以用于转化克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)。Bianchi 等, *Curr. Genet.*, 12:185(1987)。可选地, Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135(1990)报道了一种用于在乳克鲁维酵母(*K. lactis*)中大规模制备重组小牛凝乳酶的表达系统。已公开由克鲁维酵母的工业生产菌株产生分泌重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体。Fleer 等, *Bio/Technology*, 9:968-975(1991)。

#### (iv) 启动子成分

表达载体和克隆载体通常包含能被宿主生物识别的启动子, 它与多肽核酸可操作相连。适用于原核宿主的启动子, 包括 *phoA* 启动子,  $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统, 碱性磷酸酶, 色氨酸(*trp*)启动子系统, 和杂化启动子如 *tac* 启动子。然而, 也可以使用其它已知的细菌启动子。适用于细菌系统的启动子还包含与编码多肽的 DNA 可操作相连的 Shine-Dalgarno(S. D.) 序列。

真核生物的启动子序列也是已知的。几乎所有的真核基因在转录起始点上游约 25-30 个碱基处具有 AT-富集区。很多基因在其转录起始点上游 70-80 个碱基处有另一种序列: CXCAAT, 其中 X 可以是任何核苷酸。大多数真核基因的 3'端是 AATAAA 序列, 它可以作为一种信号用于将 poly-A 尾添加到编码序列 3'端。所有这些序列都适合于插入真核表达载体中。

适用于酵母宿主的启动序列的实例包括: 3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman 等, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073(1980))或其它糖酵解酶(Hess 等, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149(1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900(1978))的启动子, 所述其它糖酵解酶如烯醇化酶, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 己糖激酶, 丙酮酸脱羧酶, 磷酸果糖激酶, 葡萄糖-6 磷酸异构酶, 3-磷酸甘油变位酶, 丙酮酸激酶, 磷酸丙糖异构酶, 磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。

其它的酵母启动子, 即那些还具有由生长条件控制转录的优点的诱导型启动子, 是下述基因的启动子区: 醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。在 EP 73,657 中进一步描述了适用于酵母表达系统

的载体和启动子。酵母增强子与酵母启动子联合使用也是有利的。

在哺乳动物宿主细胞中，从载体转录多肽可以受启动子调控，所述启动子例如来自病毒基因组，如多形瘤病毒、鸡痘病毒(1989年7月5日公布的UK 2211504)、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猴病毒40(SV40)的启动子，或者来自异源哺乳动物的启动子，如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子等，来自热休克蛋白的启动子，以及来自通常与Bv8序列相连的启动子，前提是这些启动子与宿主细胞系统相容。

SV40病毒的早期和晚期启动子可以作为还包含SV40病毒复制起点的SV40限制性片段而方便地获得。人巨细胞病毒的立即早期启动子可以作为Hind III E限制性片段方便地获得。美国专利4,419,446中公开了在哺乳动物宿主中用牛乳头瘤病毒作为载体来表达DNA的系统。美国专利4,601,978中叙述了对这个系统的改进。另见Reyes等, *Nature*, 297: 598-601(1982)中关于在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子控制下在小鼠细胞中表达人 $\beta$ 干扰素cDNA。可选地，可将劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

#### (v) 增强子成分

编码本发明多肽的DNA在高等真核生物中的转录常常通过将增强子序列插入载体中来增加。目前已知很多哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。但通常使用真核细胞病毒的增强子。实例包括在其复制起始点晚期侧的SV40增强子(bp 100-270)，巨细胞病毒早期启动子增强子，在其复制起始点晚期侧的多形瘤增强子，和腺病毒增强子。也可参见Yaniv, *Nature*, 297:17-18(1982)所述用于活化真核启动子的增强元件。所述增强子可以剪接插入载体中多肽编码序列的5'或3'侧，但优选位于启动子的5'侧。

#### (vi) 转录终止成分

用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物的有核细胞)的表达载体，还包括对转录终止和稳定mRNA所必需的序列。这些序列通常来自真核或病毒DNA或cDNA的5'(偶尔为3')非翻译区。这些区域包含转录为编码多肽的mRNA的非翻译区中聚腺苷酸化片



段的核苷酸片段。一种有用的转录终止元件是牛生长激素多腺苷区。见 WO94/11026 和其中公开的表达载体。

### (vii) 宿主细胞的选择和转化

克隆或表达本文所述载体中 DNA 的适宜宿主细胞，包括原核生物、酵母或高等真核细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌，如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌，例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae)，如埃希氏菌属(*Escherichia*)，例如，大肠杆菌(*E.coli*)，肠杆菌属(*Enterobacter*)，欧文菌属(*Erwinia*)，克雷白菌属(*Klebsiella*)，变形菌杆属(*Proteus*)，沙门菌属(*Salmonella*)(如鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*))，沙雷菌属(*Serratia*)(如粘质沙雷菌(*Serratia marcescans*))和志贺菌属(*Shigella*)等，以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)(例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD 266,710 中所述地衣芽孢杆菌 41P)等，假单胞菌属(*Pseudomonas*)如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)，及链霉菌(*Streptomyces*)。优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC 31,446)，但其它菌株，如大肠杆菌 B，大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些实例是用于说明，并非限制。

除了原核生物，真核微生物如丝状真菌或酵母也是适合于多肽编码载体的克隆或表达的宿主。酿酒酵母或常见的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。还有多个其它属、种和株已有商品供应，并且可以用于本发明，例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主，例如乳克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克曼氏克鲁维酵母(*K.wickeramii*)(ATCC 24,178)、*K.waltii*(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维氏酵母(*K.marxianus*)等；*yarrowia*(EP 402,226)；巴斯德毕赤酵母(*pichia pastoris*)(EP 183,070；Sreekrishna 等，*J. Basic Microbiol.*，28: 265-278(1988))；念珠菌属；*Trichoderma reesia*(EP 244,234)；粗糙链孢霉；许旺氏酵母属(*schwanniomyces*)如西方许旺氏酵母(*schwanniomyces occidentalis*)等；和丝状真菌，例如链孢霉属、青霉属、*Tolypocladium* 以及曲霉属宿主如构巢曲霉和黑曲霉。

适合于表达糖基化多肽的宿主细胞来自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。目前已经从下述宿主中鉴定了大量的杆状病毒株和变体以及相应的容许型昆虫宿主细胞：草地夜蛾(*Spodoptera Frugiperda*, 毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*, 蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*, 蚊子)、*Drosophila melanogaster*(果蝇)和家蚕蛾(*Bombyx mori*)等。用于转染的各种病毒株公众可以获得，例如加利福尼亚 Y 级夜蛾(*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕蛾 NPV 的 Bm-5 株，并且这些病毒可以在此用作本发明的病毒，尤其是用于转染草地夜蛾细胞。

棉花、玉米、土豆、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草等的植物细胞培养物也可以用作宿主。

然而，关注最多的是脊椎动物细胞，而且在培养(组织培养)中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规方法。有效哺乳动物宿主细胞系的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系(293 细胞或经过再克隆以便能在悬浮培养物中生长的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen Virol.* 36:59(1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR(CHO, Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4216(1980)); 小鼠足细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980)); 猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK ATCC CCL 34); 布法罗(buffalo)大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞(Mather 等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68(1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 小鼠骨髓瘤细胞, 例如 NSO(如 RCB0213, Bebbington 等, *Bio/Technology* 10:169(1992)) 和 SP2/0 细胞(例如 SP2/0-Ag14 细胞, ATCC CRL 1581); 大鼠骨髓瘤细胞, 例如 YB2/0 细胞(例如 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞, ATCC CRL 1662); 和人肝癌细胞系(Hep G2)。实施本发明优选的细胞系是二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷的 CHO, 如 CHO-K1, DUX-B11, CHO-DP12, CHO-DG44(Urlaub 等, *Somatic Cell and Molecular Genetics* 12:555(1986)), 而 Lec13 是典型的 CHO 宿主细胞系。DUX-B11 细胞已由携带前胰岛素原 cDNA 的 pSVEHIGNeo 转染, 产生克隆 CHO-DP12。对于 CHO-K1(ATCC CRL 61), DUX-B11(Simonsen 等 *PNAS(USA)*

80:2495-2499(1983)), DG44 或 CHO-DP12 宿主细胞, 它们可能发生变异导致其岩藻糖基化其中表达的蛋白的能力有缺陷。

本发明也可用于杂交瘤细胞。术语“杂交瘤”指通过免疫来源的无限增殖细胞系与抗体生产细胞的融合产生的杂交细胞系。该术语包含异种杂交瘤融合物的子代, 它是与人细胞和小鼠骨髓瘤细胞系的融合的结果, 其中小鼠骨髓瘤细胞系后来与浆细胞融合, 通常称为三瘤细胞系。进一步地, 该术语意在包括任何产生抗体的无限增殖杂交细胞系例如, quadromas(见, 例如, Milstein 等, *Nature*, 537:3053(1983))。杂交细胞系可以是任何物种的, 包括人和小鼠的。

在最优选的实施方案中, 哺乳动物细胞是非杂交瘤哺乳动物细胞, 它由体外分离的感兴趣的多肽编码核酸转化。“外源性核酸”或“异源核酸”是指与对该细胞而言是外来的核酸序列, 或与细胞同源但其在宿主细胞中的位置通常没有核酸被发现。

#### **(viii) 培养宿主细胞**

宿主细胞由上述多肽生产的表达或克隆载体转化, 并在传统培养基中培养, 该宿主细胞经修饰适合诱导启动子, 选择转化体, 或扩增编码所需序列的基因。

可在多种培养基中培养用于生产本发明多肽的宿主细胞。作为商品提供的培养基例如 Ham's F10(Sigma), Minimal Essential Medium((MEM),(Sigma), RPMI-1640(Sigma),和 Dulbecco's Modified Eagle's Medium((DMEM), Sigma)适宜培养宿主细胞。此外, Ham 等, *Meth. Enzym.* 58:44(1979), Barnes 等, *Anal. Biochem.* 102:255(1980), 美国专利 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利 Re. 30,985 中所述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。在需要时均可向这些培养基的任何一种补充激素和/或其它生长因子(例如胰岛素, 转铁蛋白, 或表皮生长因子), 盐(例如氯化钠, 钙, 镁, 和磷酸盐), 缓冲液(例如 HEPES), 核苷酸(例如腺苷酸和胸腺嘧啶), 抗生素(例如 GENTAMYCIN™ 药物), 微量元素(定义为无机化合物, 通常终浓度在微摩尔范围内), 和葡萄糖或对等的能源。也可包括本领域熟练技术人员所知的适当浓度的任何其它必需添加剂。培养条件, 例如温度, pH, 等是此前选

择用于表达的宿主细胞的条件，并且是本领域普通熟练技术人员显而易见的。

所有培养基通常提供以下一种或多种类别中的至少一种组分：

- 1) 能源，通常是碳水化合物的形式，例如葡萄糖；
- 2) 所有必需氨基酸，通常是二十种基础氨基酸加半胱氨酸；
- 3) 维生素和/或其它需要保持低浓度的有机化合物；
- 4) 游离脂肪酸；和

5) 微量元素，其中微量元素定义为无机化合物或天然存在的元素，通常需要保持极低浓度，多在微摩尔范围内。

培养基优选不含血清和其它动物源性蛋白，例如少于约5%，优选少于1%，更优选0到0.1%血清。然而，如果需要，可以使用上述物质。在本发明优选的实施方案中，细胞培养基包括超量的氨基酸。超量提供的氨基酸可，例如，选自Asn, Asp, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr和Val。优选，超量提供Asn, Asp, Lys, Met, Ser和Trp。例如，可使用的氨基酸，维生素，微量元素和其它介质成分的量是欧洲专利EP 307,247或美国专利6,180,401中所述范围的一或两倍。

对于表达所需蛋白并能够将所需碳水化合物添加到特定位置的哺乳细胞的培养，只要特别注意到所培养的细胞，可使用多种培养条件。本领域人员熟悉适宜哺乳细胞的培养条件(Cleveland等, *J. Immunol. Methods* 56:221-234(1983))或者可由熟练技术人员轻易确定(见，例如, *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2<sup>nd</sup> Ed., Rickwood, D.和 Hames, B.D., eds. Oxford University Press, New York(1992))，并可根据具体选定的宿主细胞变化。

### (ix) 糖蛋白的纯化

使用重组技术时，糖蛋白可在细胞内，壁膜间隙产生，或直接分泌到培养基中。如果糖蛋白在细胞内产生，第一步需要去除宿主细胞或溶解片段的粒状残骸，例如，通过离心或超滤作用。Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992)描述了分离抗体的方法，该抗体被分泌到大肠杆菌的壁膜间隙。简言之，细胞悬浊液(paste)在乙酸钠(pH 3.5)，EDTA，和phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF)存在下，经过30分钟解冻。通过离心可

去除细胞碎片。如果糖蛋白被分泌到培养基中，通常首先使用作为商品提供的蛋白浓缩滤纸(例如，Amicon 或 Millipore Pellicon ultrafiltration unit)浓缩该表达系统的上清。在此前的任何步骤中，可使用蛋白酶抑制物例如 PMSF 抑制蛋白溶解，以及使用抗生素防止外来污染物的生长。

由细胞制备的糖蛋白组合物可使用如下方法纯化：例如，羟磷灰石层析，凝胶电泳，透析和亲和层析，优选亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性有赖于存在于糖蛋白中的任何免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人(1,  $\gamma$ 2, 或  $\gamma$ 4 重链的糖蛋白(Lindmark 等, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13(1983))。蛋白 G 用于所有小鼠同种型和人  $\gamma$ 3(Guss 等, *EMBO J.* 5:1567-1575(1986))。亲和配体附着的基质通常是琼脂糖，但也可用其它基质。物理稳定的基质例如孔径被控制的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯(poly(styrenediviny)benzene)比使用琼脂糖获得更快的流率而且加工时间更短。对于含有 C<sub>H</sub>3 区的糖蛋白, Bakerbond ABX™树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)可用于纯化。根据待回收的糖蛋白，也可利用其它蛋白纯化技术例如；在离子-交换柱上分级分离；乙醇沉淀；反相 HPLC；在硅石(silica)上层析，在肝素 SEPHAROSE™上层析，在阳离子或阴离子-交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)上层析；聚焦层析；SDS-PAGE；硫酸铵沉淀。

在一个实施方案中，利用对凝集素底物(例如凝集素亲和柱)的吸附也可以纯化糖蛋白，该吸附作用可从制备物中去除含有岩藻糖的糖蛋白，从而富集不含岩藻糖的糖蛋白。

## F. 糖蛋白分析

可轻易分析按照本发明的方法生产的糖蛋白的复合碳水化合物部分，从而确定上述糖基化反应已完成。通过传统的碳水化合物分析技术分析寡糖。因此，例如，本领域人员熟悉的凝集素蛋白印迹技术，显示了末端甘露糖或其它糖例如半乳糖的比例。

优选地，利用实施例 1 和 Shields 等, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604(2001) 中的 MALDI-TOF 质谱分析来分析碳水化合物。

本领域已知若干糖基化分析方法，这些方法可用在本文中。这些方法提供了关于附着于多肽的寡糖的同一性和组成的信息。用于本发明的碳水化合物分析法包括但不限于，凝集素层析；HPAEC-PAD，它利用高 PH 阳

离子交换层析根据电荷分离寡糖；NMR；质谱分析；HPLC；GPC；单糖成分分析；连续酶消化。

此外，本领域人员已知释放寡糖的方法。这些方法包括

- 1) 酶的方法，例如使用岩藻糖苷酶例如 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶去除岩藻糖；
- 2) 苛刻碱性环境下的消除，释放主要是O-连接的结构；和
- 3) 化学方法，使用无水肼释放N-连接的和O-连接的寡糖。

通过高效阳离子交换层析和脉冲电流检测(HPAE-PAD 碳水化合物系统, Dionex Corp.)检测中性糖和氨基糖。例如, 100℃条件下, 通过在20%(v/v)的三氟乙酸中水解6小时可释放糖。随后通过冻干法或由Speed-Vac(Savant Instruments)干燥水解产物。然后在1%的乙酸钠三水合物溶液中溶解残基, 并如Anumula等*Anal. Biochem.* 195:269-280(1991)所述在HPLC-AS6柱上分析。

在平行三份样品中, 通过Yao等*Anal Biochem.* 179:332-335(1989)的直接比色法可单独测定唾液酸。在优选的实施方案中, 使用Warren, L. *J. Biol Chem* 238:(8)(1959)的硫代巴比妥酸(TBA)。

可选地, 可进行免疫印迹碳水化合物分析。根据本方法, 使用商品化的多糖检测系统(Boehringer)可检测蛋白连接的碳水化合物, 该系统基于Haselbeck和Hosel(Haselbeck等*Glycoconjugate J.*, 7:63(1990))所述的氧化物免疫印迹法。

分析的方法包括为分析抗体相关的寡糖所述的那些和例如Wormald等, *Biochem.* 36:1370-1380(1997); Sheeley等*Anal. Biochem.* 247:102-110(1997) and Cant等, *Cytotechnology* 15:223-228(1994)以及其中引用的对比文件所述的那些。

## G. 药物配制剂

可以通过将具有适当纯度的所需化合物与可选的药用载体, 赋形剂, 或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Osol, A. ed.(1980))混合形成冻干制剂或水溶液制备治疗配制剂。可接受的载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性, 并包括缓冲剂例如磷酸盐, 柠檬酸盐及其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化己烷双胺; 氯化苄烷铵(benzalkonium chloride), 苯索

氯铵；酚、丁醇或苯甲醇；烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；间甲酚)；低分子量多肽(少于10个残基)；蛋白质如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸，谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂如EDTA；糖类如蔗糖、甘露醇、岩藻糖或山梨醇；成盐反离子如钠；金属复合物(例如锌-蛋白复合物)；和/或非离子表面活性剂，例如TWEEN<sup>TM</sup>，PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

本文的配制剂也可包含治疗特定指征所需的一种以上的活性化合物，优选活性互补但相互无副作用的那些。例如，该配制剂可进一步包含另一种抗体或化疗剂。此种分子以有效治疗量出现于联合用药中。

该活性成分也可包裹在通过诸如凝聚技术或界面聚合而制备的微胶囊中，例如，分别在胶质药物传送系统(例如，脂质体，白蛋白微球，微乳状液，纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗滴乳状液中的羟甲基纤维素或凝胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开于 Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)。

用于体内给药的本发明化合物必需是无菌的。这可以通过在冷冻干燥和重新配制之前或之后通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

可制备缓释制剂。缓释制剂的适当实例包括具有一定形状且含有糖蛋白的固体疏水聚合物半通透基质，例如膜或微胶囊。缓释基质实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)(Langer 等, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277(1981); Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105(1982))或聚(乙烯醇)，聚交酯(美国专利 3773919, EP 58,481)，L-谷氨酸与 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸的共聚物(Sidman, 等, *Biopolymers* 22:547(1983))，不可降解的乙烯-乙酸酯(ethylene-vinyl acetate)(Langer, 等, 出处同上)，或可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 Lupron Depot<sup>TM</sup>(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体)，以及聚D-(-)-3-羟丁酸。聚合物如乙烯-乙酸酯和乳酸-羟基乙酸能持续释放分子100天以上，而一些水凝胶释放蛋白的时间却较短。当胶囊化抗体长时间停留在体内时，它们可能由于暴露在37℃潮湿环境中而变性或凝聚，导致损失生物活性，且免疫原性可能会改变。可以根据相关机理来设计使蛋白稳定的合理策略。例如，

如果发现凝聚的机理是通过硫代二硫键互换而形成分子间 S-S 键,则可通过修饰巯基残基、从酸性溶液中冻干、控制湿度、采用合适的添加剂、和开发特异性聚合物基质组合物来实现稳定。

药物组合物可以是冻干的。美国专利 6,267,958 描述了冻干的抗体配制剂。美国专利 6,171,586B1 描述了稳定的液体抗体配制剂。

## H. 糖蛋白的非治疗用途

本发明的糖蛋白可用作亲和纯化试剂。在该方法中,利用本领域已知的方法将糖蛋白固定于例如葡聚糖凝胶树脂或滤纸的固相上。固定的糖蛋白与含有待纯化抗原的样品接触,随后使用适宜的溶剂洗涤支持物,该溶剂可充分去除样品中除结合与固定糖蛋白的待纯化抗原外所有的物质。最后,以另一种适宜的洗涤剂例如甘氨酸缓冲液, pH 5.0, 洗涤支持物,该缓冲液可将抗原从糖蛋白上释放出来。

糖蛋白也可用于诊断分析,例如,用于检测特定细胞,组织或血清中感兴趣的抗原的表达。

用于诊断时,通常用可检测的部分标记糖蛋白。可利用多种标记,通常分为以下几类;

(a) 放射性同位素,例如  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , 和  $^{131}\text{I}$ 。使用例如 *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen 等, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs.(1991)中所述的技术可用放射性同位素标记糖蛋白并且可使用闪烁技术测定放射活性。

(b) 可利用荧光标记,例如稀土元素螯合物(镧螯合物)或荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹酰,里沙明(Lissamine),藻红蛋白和 Texas Red。利用例如上文的 *Current Protocols in Immunology*, 中公开的技术可将荧光标志物偶联于糖蛋白。可用荧光计定量荧光。

(c) 可利用各种酶底物标记,美国专利 4,275,149 提供了其中的一些的综述。酶通常催化产生底物的化学变化,利用各种技术可测量这种化学变化。例如,酶可催化底物中的颜色变化,这种变化可用分光光度法测定。可选地,酶可改变底物的荧光或化合光。定量荧光变化的技术见上文。化学发光底物经化学反应而电激发,发射出可测量的光(例如使用化学光度计)或将能量释放到荧光接收器。酶标记的实例包括荧光素酶(例如,萤火虫荧



光素酶和细菌荧光素酶；美国专利 4,737,456), 虫荧光素(luciferin), 2,3-二氢二氮杂萘啉(2,3-dihydrophthalazinedione), 苹果酸脱氢酶, 脲酶, 过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRPO), 碱性磷酸酶,  $\beta$ -半乳糖苷酶, 葡糖淀粉酶, 溶菌酶, 糖氧化酶(例如, 葡萄糖氧化酶, 半乳糖氧化酶, 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶), 杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶), 乳过氧化物酶, 微过氧化物酶(microperoxidase), 如此等等。对将酶偶联于抗体的技术描述见 O'Sullivan 等, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.*(ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166(1981)。

酶底物结合物的实例包括, 例如:

(i) 辣根过氧化物酶(HRPO), 以氢过氧化物酶为底物, 其中氢过氧化物酶氧化染料前体(例如, 邻苯二胺(OPD)或盐酸 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB));

(ii) 碱性磷酸酶(AP), 以磷酸对硝基苯作为产色底物; 和

(iii)  $\beta$ -D-半乳糖苷酶( $\beta$ -D-Gal)和产色底物(例如, p-硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷酶)或荧光底物 4-甲基伞形酰(methylumbelliferyl)- $\beta$ -D-半乳糖苷酶。

本领域熟练技术人员熟悉许多其它的酶-底物结合物。有关综述见美国专利 4,275,149 和 4,318,980。

有些情况下, 标志物间接地与糖蛋白偶联。熟练技术人员熟悉各种实现此种偶联的技术。例如, 糖蛋白可与生物素偶联, 而且上述标志物的三种广义类别中的任何一种均可与抗生物素蛋白偶联, 或反之。生物素选择性地结合抗生物素蛋白, 并由此将标志物以这种间接的方式偶联于糖蛋白。可选地, 为获得标志物与糖蛋白的间接偶联, 糖蛋白与小的半抗原(例如, 地高辛)偶联, 而且上述不同类型的标志物之一可以和抗-半抗原多肽(例如, 抗-地高辛抗体)偶联。由此实现标志物和糖蛋白的间接偶联。

在本发明的另一实施方案中, 无需标记糖蛋白, 而且利用与糖蛋白结合的标记抗体可检测糖蛋白的存在。

本发明的糖蛋白可用于任何已知的实验方法, 例如, 竞争结合分析, 直接和间接夹心法分析, 和免疫沉淀分析。Zola, *单克隆抗体: A Manual of Techniques*, 147-158 页(CRC Press, Inc. 1987)。

糖蛋白也可用于体内诊断分析。通常, 以放射性核素(例如  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,

$^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  或  $^{35}\text{S}$ )标记糖蛋白, 使得利用免疫闪烁照相可以定位表达该糖蛋白的抗原或细胞。

### I. 糖蛋白的体内使用

据预计本发明的糖蛋白可用于治疗哺乳动物例如患有将从该糖蛋白的用药中受益的疾病或有得病倾向的病人。可由该糖蛋白治疗的情形很多, 包括癌症(例如糖蛋白结合肿瘤相关抗原, B-细胞表面抗原例如 CD20, ErbB 受体例如 HER2 受体, 血管生成因子 例如血管内皮生长因子(VEGF)的情形); 过敏性疾病例如哮喘(利用抗-IgE 抗体); 和 LFA-1-介导的疾病(例如糖蛋白是抗-LFA-1 或抗-ICAM-1 抗体时)等等。如果抗体结合 B-细胞表面标志物例如 CD20, 优选的指征是 B-细胞恶性疾病(例如非何杰金氏淋巴瘤), 自身免疫性疾病, 或为阻断对外来抗原的免疫反应(见 WO01/03734)。

如果抗体结合 ErbB 受体, 优选的疾病是表达 ErbB 的癌症, 例如良性或恶性肿瘤, 其特征是 ErbB 受体的过度表达。此种癌症包括, 但不限于, 乳腺癌, 鳞状细胞癌, 小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 胃肠道癌, 胰腺癌, 成胶质细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 膀胱癌, 肝癌(hepatoma), 结肠癌, 结肠直肠癌, 子宫内膜癌, 唾液腺癌, 肾癌, 肝癌(liver cancer), 前列腺癌, 外阴癌, 甲状腺癌, 肝癌(liver carcinoma)和各种头颈部癌。

根据本发明的教导, 技术人员可以制备具有变体 Fc 区的糖蛋白, 它具有增强的 ADCC 活性。此种分子常见地用于治疗不同的疾病。

例如, 具有增强的 ADCC 活性的糖蛋白可用于治疗需要破坏或去除组织或外来微生物的疾病。例如, 该糖蛋白可用于治疗癌症, 自身免疫性疾病, 炎性疾病; 感染(例如细菌, 病毒, 真菌或酵母菌感染); 和其它需要去除组织的情形(例如甲状腺肿)等等。

糖蛋白可以任何适宜的途径给药, 包括, 胃肠外, 皮下, 腹膜内, 肺内和鼻内, 而且如果用于局部免疫抑制治疗, 可通过损伤部位内给药。胃肠外输液包括肌肉内, 静脉内, 动脉内, 腹膜内或皮下给药。此外, 糖蛋白适合脉冲输液给药, 尤其是糖蛋白的剂量递减时。优选通过注射给药, 更优选静脉内或皮下注射, 根据用药是短期或长期而不同。

为预防或治疗疾病, 糖蛋白的适当剂量依赖于所治疾病的类型, 疾病的严重程度和进程, 糖蛋白给药的目的是预防还是治疗, 先前的治疗, 患

者的临床病史和对抗体的应答，以及主治医生的判断。糖蛋白适宜一次性地或以一系列治疗的方式施用于患者。

根据受治疾病的严重程度和类型，施用于患者的糖蛋白的初始候选剂量是约 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  到约 15  $\text{mg}/\text{kg}$  体重(例如约 0.1-20  $\text{mg}/\text{kg}/\text{剂}$ )，无论是例如通过一次或分多次给药，还是通过连续输注给药。典型的日剂量可从约 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  到约 100  $\text{mg}/\text{kg}$  或更多，根据上述因素不同而变化。对于数天或更长时间的重复给药，视具体情况而将治疗持续到出现对疾病症状的所需抑制为止。然而，除此之外，其它的剂量方案也可以使用。治疗的进展很容易通过常规技术和试验来监测。本文的实施例显示，与含有岩藻糖的糖蛋白相比，可给药较低剂量的糖蛋白(例如不含岩藻糖的抗体)。

糖蛋白组合物的配制，确定剂量，和给药均应以符合良好医疗实践的方式进行。本文考虑的因素包括待治疗的具体疾病，待治疗的具体哺乳动物，每个病人的临床情况，疾病的原因，药剂的传送部位，给药方法，给药方案，和其它医务人员已知的因素。给药糖蛋白的“治疗有效量”由上述因素控制，而且是预防，改善或治疗疾病所必需的最小量。糖蛋白无需，但任选地可与一种或几种目前用来预防或治疗所述疾病的药剂配制在一起。这些其它药剂的有效量有赖于配置剂中糖蛋白的量，疾病或治疗的类型，和上述讨论的其它因素。通常它们使用的剂量相同，用药途径如上文所述或约为迄今使用剂量的 1 到 99%。

治疗抗体组合物通常置于具有无菌存取口的容器中，例如静脉注射袋或带有能通过皮下注射针刺穿的塞子的小瓶。

用作为拮抗剂的本发明抗体治疗的患者，也可接受放射治疗。或者或此外，可以将其它化疗剂给药该患者。此类化疗剂的配制和给药方案可以按照制造商的指示进行或者由熟练的临床医师根据经验决定。此类化疗剂的配制和给药方案也可以参见 *Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)*。化疗剂可以在给药本发明抗体之前或之后给药，或者二者同时给药。对于癌症的指征，也可给药针对肿瘤相关抗原或针对血管生成因子的额外抗体，例如与 HER2 或血管内皮生长因子(VEGF)结合的抗体。可选地，或此外，可将一种或多种细胞因子共同给药病人。

本发明进一步提供了制品和含有对治疗癌症有用的物质的试剂盒。所

述制品包含有标签的容器。适宜容器包括，例如，瓶，小瓶，和试管。容器可由各种材料如玻璃或塑料制成。该容器内盛放包含上述糖蛋白制剂的组合物。该组合物中的活性剂是特定糖蛋白。容器上的标签说明该组合物用于治疗或预防特定疾病，并说明了体内的用法，例如上述那些。

本发明的试剂盒包含上述容器和包含缓冲液的第二容器。进一步包括具有商业需要以及符合用户需要的其它材料，如其它缓冲液、稀释剂，过滤用品，针头，注射器，以及带有使用说明书的包装插页。

参考以下实施例可更充分的理解本发明。然而，不能将其理解为限制本发明的范围。涉及的所有文献和专利说明包含于本文中作为参考。

### 实施例

为评价岩藻糖基化的寡糖在 IgG 功能中的作用，使用 Lec13 细胞系 (Ripka 等 *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545(1986)) 表达人 IgG1。该 CHO 细胞系添加岩藻糖的能力有缺陷，但提供了具有寡糖的 IgG，该 IgG 在其它方面与正常 CHO 细胞系中发现的和来自人血清的相似。产生的 IgG 产物用于评估岩藻糖基化的碳水化合物对抗体效应器功能的影响，包括对与人 FcγR，人 C1q，人 FcRn 结合的影响，和对利用人效应器细胞的 ADCC 的影响。

#### 实施例 1: 与人 FcR 的结合

**稳定细胞系的 cDNA 构建体:** 将人源化抗-HER2 抗体 Hu4D5 (Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992)), 人源化的亲合成熟抗-IgE 抗体 E27 (美国专利 6,172,213), 和嵌合抗-CD20 抗体 C2B8 (美国专利 5,736,137) 的重链和轻链亚克隆入前述的哺乳动物细胞表达载体中 (Lucas 等 *Nucl. Acid Res.* 24, 1774-1779(1996))。使用嘌呤霉素作为 DHFR(+) 细胞中的选择标记, 例如 Lec13 细胞, 并且保留 DHFR 位点用于稳定细胞系的甲氨喋呤扩增。

**Lec13 和野生型 CHO 细胞的转染和培养:** CHO 细胞系 Pro-Lec13.6a (Lec13) 自 Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University 的 Pamela Stanley 教授获得。亲代细胞系是 Pro-(脯氨酸营养缺陷型) 和 Gat-(甘氨酸, 腺苷, 胸苷营养缺陷型)。用于野生型抗体的 CHO-DP12 细胞系是 CHO-K1 细胞系 (ATCC #CCL-61) 的衍生物, 它是二氢叶酸还原酶

缺陷的,并且具有降低的对胰岛素的需求。使用 Superfect法(Qiagen, Valencia, CA)用 cDNA 转染细胞系。使用 10 $\mu$ g/ml 的二盐酸嘌呤霉素(puromycin dihydrochloride)在含有以下成分的培养基中选择表达所转染抗体的 Lec13 细胞: 含有 L-谷氨酰胺, 核糖核苷和脱氧核糖核苷(GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD)的 MEM $\alpha$  培养基, 添加 10% 灭活的 FBS(GIBCO), 10 mM HEPES, 和 1X 青霉素/链霉素(GIBCO)。类似地, 在含有无 GHT 的 Ham's F12 生长培养基中选择 CHO 细胞: 低葡萄糖 DMEM, 不含甘氨酸, 含有 NaHCO<sub>3</sub>, 添加 5% FBS(GIBCO), 10 mM HEPES, 2 mM L-谷氨酰胺, 1X GHT(甘氨酸, 次黄嘌呤, 胸苷), 和 1X 青霉素/链霉素。菌落在两到三周内形成, 收集后用于扩增和蛋白表达。开始将细胞按照 3 x 10<sup>6</sup> 个细胞/10 cm 板接种, 用于小批蛋白的表达。一旦细胞长满该板的 90-95%时, 将其转至不含血清的培养基中, 3-5 天后, 收集细胞上清, 并在 Fc IgG-ELISA 和完整 IgG-ELISA 中进行检验, 估测蛋白表达水平。转至 PS24 生产培养基的前一天, 按照大约 8 x 10<sup>6</sup> 个细胞/15 cm 板接种 Lec13 和 CHO 细胞, 并添加 10 mg/L 重组人胰岛素和 1mg/L 微量元素。

**蛋白表达:** Lec13 细胞和 CHO 细胞在不含血清的生产培养基中保持 3-5 天。收集上清, 在 150 ml 锥形试管中离心去除细胞和碎片。加入蛋白酶抑制剂 PMSF 和抑肽酶(Sigma, St. Louis, MO), 在使用蛋白 G 层析(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)进行即刻纯化前, 使用 MWCO30 滤纸(Amicon, Beverly, MA)在搅匀的细胞上浓缩上清 5 倍。使用 Centriprep-30 浓缩器(Amicon)将所有蛋白的缓冲液都换成磷酸盐缓冲液(PBS)并用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。用 A280 测定蛋白浓度并用氨基酸组成分析验证。平均每个 15 cm 的板中的 Lec13 细胞产生 10 $\mu$ g mAb; 对照 CHO 细胞中所有抗体的表达比 Lec13 细胞中高 4-5 倍。由板上生长的 CHO-DP12 产生的抗体表示为 CHO-P。

CHO-DP12 细胞也在玻璃旋转培养瓶中生长。以 6 x 10<sup>5</sup> 细胞/ml 接种细胞, 并在 37 $^{\circ}$ C 下生长两天。第三天, 温度改为 33 $^{\circ}$ C, 并且允许细胞生长直到由于 PH 降低到~6.5 其生存力降低到 70%。玻璃旋转培养瓶中生长的来自 CHO-DP12 细胞的抗体表示为 CHO-S。

**天冬酰胺-连接寡糖的基质辅助激光电离吸附飞行时间(MALDI-TOF)质谱分析:** 使用 Papac 等, *Glycobiology* 8, 445-454(1998)的方法, 将 N-连接

的寡糖自重组糖蛋白中解离。简言之,用 100 $\mu$ l 甲醇处理 96 孔 PVDF 覆盖的微滴定板(Millipore, Bedford, MA)的各孔,即使微孔过滤器多银幕真空歧管(Millipore Multiscreen vacuum manifold)处于真空从而使甲醇通过真空抽吸穿过 PDVF 膜。以 3 X 250 $\mu$ l 水洗涤处理后的 PVDF 膜。在所有洗涤步骤之间,通过将微真空加于歧管而完全抽空各孔。使用还原和羧甲基化的缓冲液(RCM)洗涤膜,该缓冲液由 6 M 盐酸胍, 360 mM Tris, 2 mM EDTA 组成, pH 为 8.6。将糖蛋白样品(50 $\mu$ g)加入各孔,再次通过微真空抽吸使样品通过 PVDF 膜,并使用 2 X 50 $\mu$ l RCM 缓冲液洗涤各孔。在各孔中加入 50 $\mu$ l 0.1 M 二硫苏糖醇(DTT)溶液,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时以还原固定后的样品。通过真空去除 DTT,并用 4 x 250 $\mu$ l 水洗涤各孔。加入 50 $\mu$ l 0.1 M 碘乙酸(IAA)溶液羧甲基化半胱氨酸残基,所述 IAA 溶液在 1 M NaOH 中新鲜制备,并用 RCM 缓冲液稀释至 0.1 M。室温下避光孵育 30 分钟完成羧甲基化。对该板施用真空以去除 IAA 溶液,并用 4 x 250 $\mu$ l 纯净水洗涤各孔。加入 100 $\mu$ l 1% PVP360(polyvinylpyrrolidone 360,000 MW)(Sigma)溶液封闭 PVDF 膜并在室温下孵育 1 小时。利用温和的真空吸引去除 PVP-360 溶液并用 4 x 250 $\mu$ l 水洗涤各孔。将 PNGase F(New England Biolabs, Beverly, MA)消化液, 10 mM 醋酸 Tris 中的 25 $\mu$ l 的 25 单位/ml 溶液, pH 8.4, 加入各孔并在 37 $^{\circ}$ C 下消化 3 小时。消化后,将样品转移到 500 $\mu$ l Eppendorf 管中,并将 2.5 $\mu$ l 的 1.5 M 乙酸溶液加入各样品中。酸化的样品在室温下孵育 3 小时,将寡糖由氨基葡萄糖转化成羟基形式。在 MALDI-TOF 质谱分析前,使用以搅拌方式紧密填充的 0.7-ml 柱床体积的阳离子交换树脂反应管(氢形式 AG50W-X8 树脂)(Bio-Rad, Hercules, CA)(US Biochemical, Cleveland, OH)对释放的寡糖脱盐。

对于样品在正电荷模式中的 MALDI-TOF 质谱分析,将脱盐的寡糖(0.5 $\mu$ l 等份)和 0.5 $\mu$ l 2,5-二羟基苯甲酸基质(sDHB)用于没有污染的靶点(stainless target),该基质是通过将 2 mg 2,5 二羟基苯甲酸和 0.1 mg 5-甲氧基唾液酸(5-methoxysilylic acid)溶解于 1ml 乙醇/10 mM 氯化钠 1:1(v/v)中制得的。样品/基质混合物由真空干燥。对于样品在负电荷性模式中的 MALDI-TOF 质谱分析,将脱盐的 N-连接的寡糖(0.5 $\mu$ l 等份)和 0.5 $\mu$ l 2',4',6'-三羟基苯乙酮基质(THAP)用于没有污染的靶点,该基质是在 1:3(v/v) 乙腈/13.3 mM 柠檬酸铵缓冲液中制得的。样品/基质混合物经真空干燥,并且在

分析前允许样品吸收空气中的水分。通过 MALDI-TOF 在 PerSeptive BioSystems Voyager-DE 质谱分析仪上分析释放的寡糖。在 20 kV、具有线性构象的正电荷或负电荷模式下，利用延迟提取(delayed extraction)操作质谱分析仪。使用 1300 的激光能量获得总和状态的数据(240 倍扫描)以提高信号抗噪音的能力。使用标准寡糖混合物校准仪器，并在给出质谱值前利用 19 点 Savitsky-Golay 算法(19 point Savitsky-Golay algorithm)处理数据。使用 Caesar 7.0 数据分析软件包(SciBridge Software)整合质谱数据。结果总结于下表中。

表 2. 抗体与人 FcγR 的结合

均值 (S.D.)	N	%-Fuc <sup>c</sup>	%Gal0	%Gal1	%Gal2	
<b>FcγRIA<sup>b</sup></b>						
CHO-S	1.00	5	3	53	42	6
CHO-P	0.97(0.07)	5	2	73	25	3
Lec13(A)	1.04(0.07)	4	92	50	43	7
Lec13(B)	1.04(0.10)	5	91	55	40	5
<b>FcγRIIA(R131)<sup>c</sup></b>						
CHO-S	1.00	3	3	53	42	6
CHO-P	0.87(0.14)	2	2	73	25	3
Lec13(A)	1.70(0.04)	3	92	50	43	7
Lec13(B)	1.49(0.16)	3	91	55	40	5
Lec13(C)	1.77(0.38)	3	93	51	43	7
Lec13(D)	1.71(0.40)	3	88	51	43	7
Lec13-Avg	1.62(0.32)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)
<b>FcγRIIA(H131)<sup>d</sup></b>						
CHO-S	1.00	3	3	53	42	6
CHO-P	0.87(0.07)	2	2	73	25	3
Lec13(A)	0.93(0.08)	3	92	50	43	7
Lec13(B)	0.75(0.07)	3	91	55	40	5
Lec13(C)	0.94(0.15)	3	93	51	43	7
Lec13(D)	0.91(0.07)	3	88	51	43	7
Lec13-Avg	0.88(0.12)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)
<b>FcγRIIB<sup>c</sup></b>						
CHO-S	1.00	3	3	53	42	6
CHO-P	0.81(0.11)	2	2	73	25	3
Lec13(A)	2.27(0.35)	3	92	50	43	7
Lec13(B)	1.51(0.22)	3	91	55	40	5



Lec13(C)	2.07(0.33)	2	93	51	43	7
Lec13(D)	1.60(0.45)	3	88	51	43	7
Lec13-Avg	1.81(0.49)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)

FcγRIIIA(F158)<sup>e</sup>

CHO-S	1.00	3	3	53	42	6
CHO-P	0.94(0.01)	2	2	73	25	3
Lec13(A)	27.0(2.1)	3	92	50	43	7
Lec13(B)	22.8(2.3)	3	91	55	40	5
Lec13(C)	25.1(2.4)	3	93	51	43	7
Lec13(D)	22.3(1.0)	3	88	51	43	7
Lec13-Avg	24.3(2.6)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)
HEK293-AAA	20.8(0.9) <sup>2</sup>					
Lec13-AAA(A)	32.8	1	95	75	22	2
Lec13-AAA(B)	32.9(2.9)	3	92	75	22	3
Lec13-AAA(C)	34.8(3.0)	2				
Lec13-AAA-Avg	33.5(2.1)	6				

FcγRIIIA(F158)<sup>f</sup>

HEK293	1.00	2
DP12	0.35(0.01)	2
Lec13	7.63(0.20)	2

FcγRIIIA(F158)<sup>g</sup>

HEK293	1.00	3
CHO-P	0.65(0.24)	3
Lec13	1.92(0.39)	3
HEK293-AAA	1.87(0.24)	3

FcγRIIIA(F158)-转染的 CHO 细胞<sup>h</sup>

CHO-S1.00 4

Lec13-D	15.7	2.4	4
Lec13-E	17.0	3.1	3
Lec13-F	15.8	3.2	3
Lec13-Avg	16.1	2.5	10
HEK293-AAA	10.7	1.4	3
Lec13-AAA-B	26.8	6.6	3
Lec13-AAA-C	25.9	5.9	3
Lec13-AAA-Avg	26.4	5.6	6

FcγRIIIA(V158)<sup>e</sup>

CHO	1.00	3	3	53	42	6
DP12	0.61(0.01)	2	2	73	25	3
Lec13(A)	14.9(2.9)	3	92	50	43	7
Lec13(B)	12.5(1.3)	3	91	55	40	5
Lec13(C)	12.6(3.3)	3	93	51	43	7
Lec13(D)	14.5(1.9)	3	88	51	43	7
Lec13-Avg	13.6(2.4)	12	91(2)	52(2)	42(2)	7(1)
HEK293-AAA	9.3	1				
Lec13-AAA(A)	25.4		1	95	75	22 2
Lec13-AAA(B)	23.8(1.1)	3	92	75	22	3
Lec13-AAA(C)	22.5(0.2)	2				
Lec13-AAA-Avg	23.1(1.4)	6				

FcγRIIIA(V158)<sup>f</sup>

HEK293	1.00	2
CHO-P	0.32(0.01)	2
Lec13	6.44(0.19)	2

FcγRIIIA(V158)<sup>g</sup>

HEK293	1.00	3
CHO-P	1.00(0.13)	3

Lec13	1.18(0.10)	3
HEK293-AAA	1.15(0.05)	3

a: 所有的值是 A490nm 测定的 A(变体)/A(标准品)的比例。CHO-S 代表玻璃旋转培养瓶中 CHO 细胞表达的 IgG, CHO-P 代表 15cm 板中 CHO 细胞表达的 IgG, Lec13 代表板上 Lec13 细胞表达的 IgG, HEK293 代表人胚胎肾 293 细胞表达的 IgG, AAA 代表 Ser298Ala/Glu333Ala/Lys334Ala IgG1 变体, Lec13-S 代表玻璃旋转培养瓶(而不是板)中 Lec13 细胞表达的 IgG。括号中的字母表示独立表达的 IgG 群。

b: Hu4D5 二聚体, [mAb]=0.12 µg/ml.

c: %-Fuc 是不含岩藻糖的寡糖总量的百分比, %Gal0, %Gal1, %Gal2 是不含(无半乳糖基), 含一个(单半乳糖基)或二个(二半乳糖基)与末端甘露糖残基共价连接的半乳糖残基的寡糖总量的百分比。括号中的数值是四个独立表达的 Lec13-Hu4D5 群的均值的偏差。

d: Hu4D5 二聚体, [mAb]=3.33 µg/ml

e: Hu4D5 二聚体, [mAb]=1.11 µg/ml

f: Hu4D5 二聚体, [mAb]=0.12 µg/ml

g: E27 二聚体, [mAb]=0.12 µg/ml

h: E27 六聚体, [mAb]=0.12 µg/ml

测定 IgG1 与 FcγR 和 FcRn 结合的实验(ELISA-形式和基于细胞的)已在 (Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604(2001)和 WO00/42072(Presta)描述。

单体 Lec13-Hu4D5 IgG1 与人 FcγRI 的结合与 Hu4D5-CHO-S 和 CHO-P 的结合等同(图 4; 表 2)。尽管碳水化合物的存在对于 FcγRI 的结合是必需的(Walker 等 *Biochem. J.* 259: 347-353(1989)), 但无论岩藻糖含量存在什么差异(Lec13 对 CHO)或半乳糖含量存在什么差异(CHO-P 对 CHO-S), IgG1 的结合是相等的这一事实显示人 FcγRI 对碳水化合物上这些部分的存在不敏感。已经研究了半乳糖苷化对 IgG 与人 FcγRI 的结合的影响(Wright 等 *J. Immunol.* 160: 3393-3402(1998); Kumpel 等 *Antibod bod. Hybridomas* 5: 143-151(1994); 和 Tsuchiya 等 *J. Rheumatol.* 16: 285-290(1989)), 数据表明如果半乳糖苷化影响与 FcγRI 的结合, 也是非常微小的, 并且是同种型(isotype)依赖的(Wright 等 *J. Immunol.* 160: 3393-3402(1998))。

与 IgG1 和人 FcγRI 的单体结合不同, 低亲和力的人 FcγR(FcγRII, FcγRIII) 的结合实验需要二聚体(Hu4D5, HuE27)或六聚体(HuE27)的形成才能对结合进行检测。人 FcγRIIA 具有两种已知的、天然存在的同种异型, 由氨基酸位置 131 确定(Clark 等 *J. Immunol.* 143: 1731-1734(1989))。人 FcγRIIIA 在氨基酸位置 48(亮氨酸, 组氨酸, 或精氨酸)和位置 158(缬氨酸或苯丙氨酸)上具有天然存在的同种异型; FcγRIIIA(Val158)同种异型与人 IgG 的反应优于 FcγRIIIA(Phe158)同种异型 (Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604(2001); Koene 等 *Blood* 90:1109-1114(1997); 和 Wu 等 *J. Clin. Invest.* 100: 1059-1070(1997))。

与 CHO-Hu4D5(图 5, 6; 表 2)相比, Lec13-Hu4D5 二聚体与人 FcγRIIB 和 FcγRIIA 的人 R131 多态形式的结合显示分别提高 1.8-倍和 1.6-倍。反之, 缺乏岩藻糖不影响与人 FcγRIIA H131 多态形式的结合(图 7; 表 2)。与对 FcγRIIA(H131)没有作用相比, 不含岩藻糖的 IgG1 与人 FcγRIIA(R131)和 FcγRIIB(均在位置 131 上具有精氨酸)的结合的提高程度相似, 提示岩藻糖或者可与在位置 131 上的 FcγR 残基直接作用或者当精氨酸出现在位置 131 上时, 改变 IgG1 构型从而对结合造成微弱的负面影响。

FcγRIIIA 的多态形式均显示出与缺乏岩藻糖的 IgG1 的结合显著增强。二聚体 Lec13-Hu4D5 与 FcγRIIIA(V158)的结合比 CHO-Hu4D5 增强 14 倍(图 8; 表 2)而与 FcγRIIIA(F158)的结合显示至少增强 100 倍(图 9)。Lec13-HuE27 二聚体也显示与 FcγRIIIA 的两种多态形式的结合增强(图 10, 11; 表 2)。

以往关于人 IgG1 蛋白-序列变体对与人 FcγR 的结合的影响的研究中, 使用由三个抗-IgE E27 和三个 IgE 组成的六聚体复合物(Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604(2001)); 因此, 这些复合物在抗-IgE E27 中是三聚体。在该研究中, S298A/E333A/K334A-IgG1 变体与 FcγRIIIA(F158)和 FcγRIIIA(V158)的结合分别增强 1.5-到 2-倍和 1.1-倍; 尽管这样的增强可能看起来极小, 但对 ADCC 的影响是显著的(Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604(2001))。在目前的研究中, S298A/E333A/K334A-IgG1 六聚体复合物显示与两种 FcγRIIIA 多态形式的结合增强, 这与前述的研究数值相符(图 12, 13; 表 2); 同样 Lec13-HuE27 六聚体复合物(天然 IgG1)显示与 FcγRIIIA(F158)的结合约增强两倍(表 2)。作为二聚体分析时, 具有岩藻糖的 S298A/E333A/K334A-IgG1 变体与 FcγRIIIA(V158)和 FcγRIIIA(F158)的结

合分别增强 9-倍和 20-倍; 不含有岩藻糖的同样变体与所述多态形式的结合增加更多, 分别是 21-倍和 33-倍(表 2)。因此, 缺乏岩藻糖不仅增加了天然 IgG1 与 Fc $\gamma$ RIIIA 的结合, 还可增强了 IgG1 Fc 变体的结合。因此, 蛋白和碳水化合物的改变是协同的。

对于所有形式的 HuE27(天然的, S298A/E333A/K334A-IgG1, Lec13-衍生的), 较大复合物(在 HuE27 中为三聚体)的结合的增加比作为二聚体复合物的相同 mAb 中所观察到的要小得多。例如, 二聚体 Lec13-HuE27 的结合显示增强约 20-倍, 但对于较大复合物, 只有 2 倍(表 2)。这表明随着免疫复合物体积的增加, 对亲合力的影响开始在结合中占优势。

用与 $\gamma$ 链在 CHO 细胞上共表达的 Fc $\gamma$ RIIIA(Phe 158)全长  $\alpha$  链(图 28; 表 2)证实了岩藻糖缺陷的 IgG1 与 Fc $\gamma$ RIIIA 的结合的增强。对于 ELISA-中单独的  $\alpha$  链融合蛋白, 岩藻糖缺陷与 S298A/E333A/K334A-IgG1 变体是协同的。

也可评价天然和去掉岩藻糖的 IgG1 与小鼠 Fc $\gamma$ RII 和 Fc $\gamma$ RIII 的结合。人 IgG1, 即使是二聚体, 与这些受体的结合也很差, 而且在不含岩藻糖的 IgG1 中没有发现结合增强。另一种 IgG 受体, 新生儿 Fc 受体(FcRn), 在结构上与 Fc $\gamma$ R 无关(Burmeister 等 *Nature* 372: 379-383(1994); 和 Raghavan 等 *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 181-220(1996)), 并且据称参与多种生物过程包括 IgG 的清除 (Ghetie 等 *Annu. Rev. Immunol.* 18: 739-766(2000))。岩藻糖基化和非岩藻糖基化的 IgG1 与 FcRn 的结合相等(图 14)。由于未糖基化的 IgG1 和糖基化的 IgG1(无糖(aglyco)Ab 结合 FcRn)与该受体的结合相似, 因此前述现象并不令人吃惊。

Asn29 连接的碳水化合物缺乏岩藻糖导致在 ELISA 形式的实验中, 与人 Fc $\gamma$ RIIIA(F158 和 V158 多态形式)的结合显著增强。与 Fc $\gamma$ RIIIA 增强的结合进一步由利用纯化的人 PBMCs 在 ADCC 分析中, 去掉岩藻糖的 IgG 提高细胞毒作用的能力证实。增强的细胞毒作用在低浓度的抗体时尤其明显, 表明可给予低剂量的利用 ADCC 的治疗性抗体产生与较高剂量的岩藻糖化 IgG 相同的杀细胞作用。

发现去掉岩藻糖的 IgG 与人 Fc $\gamma$ RIIA(R131)和 Fc $\gamma$ RIIB 的结合较小程度地增强; 而与人 Fc $\gamma$ RIIA(H131)的结合没有区别。前两种受体在位置 131 上都具有精氨酸, 意味着不限于本理论的情况下, 在岩藻糖化的 IgG 中, 岩

藻糖残基或可以直接(并且明显地, 负性地)与 FcγRII 残基 131 反应, 或可以轻微影响 IgG 构型, 从而导致负性反应(negative interaction)。尽管去掉岩藻糖-的 IgG 与 FcγRIIA(R131)和 FcγRIIB 的结合的增强在 ELISA-形式的实验中较小(~2-倍), 但使用单核细胞的 ADCC 实验还是显示了在抗体浓度较低时细胞毒作用的增强。单核细胞表达 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, 而且只有单核细胞的一个亚群表达 FcγRIIA。由于岩藻糖基化的 IgG 和不含岩藻糖的 IgG 与人 FcγRI 的结合相同, 因此 ADCC 的增强不太可能由于与 FcγRI 不同的相互作用引起。FcγRIIA(R131/R131)和 FcγRIIA(H131/H131)供体单核细胞的 ADCC 都显示有所增强(图 21, 22), 表明不限于任何理论, (1) FcγRIIA 在单核细胞上的表达水平可能不够高, 不能显示两种多态形式之间的差异, (2) FcγRIIB 可能是优势结合 FcγR(因此对 R131/R131 和 H131/H131 单核细胞的影响相等), 或(3)表达 FcγRIIA 的单核细胞的亚群可能导致增强的 ADCC。

天然 IgG 上发现的碳水化合物与 Lec13-产生的和 CHO-产生的 IgG 上发现的碳水化合物相比, 没有发现半乳糖基化程度有明显差异, 因而该结果可完全归结于岩藻糖的存在/缺失。然而, 相对于 S298A/E333A/K334A IgG1 变体, Lec13 产生的, HEK293-产生的和 DP12-产生的 IgG 在半乳糖基化中显示差异。但是, 蛋白序列的改变和岩藻糖的缺乏相组合的结果看来确实是相加性的。

以前关于人 IgG 蛋白序列变体的研究发现某些 Fc 位置上的丙氨酸(和其它)取代会降低或增强与 FcγR 的结合并显示增强的 ADCC(Shields 等 *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-6604(2001))。有趣的是, 一些取代不临近人 IgG Fc-人 FcγRIIA 复合物晶体结构的(Sondermann 等 *Nature* 406:267-273(2000))作用界面。例如, 在三个用于本发明的丙氨酸取代 S298A/E333A/K334A 中, 仅 S298 位于 Fc-FcγRIIA 晶体结构的界面。同样的, 在共结晶结构中, 两条 Fc 重链上的岩藻糖残基均不与 FcγRIIA 反应。对人和啮齿类 Fc 或 IgG 的晶体结构观察显示岩藻糖可采用不同的构型, 并显示高 B-因子, 表明高活动性。

正常 CHO 和 HEK293 细胞将岩藻糖添加于 IgG 寡糖, 达到较高程度(97-98%)。血清中的 IgG 也是高度岩藻糖基化的。

### 实施例 2: C1q 和 FcRn 的结合

C1q 与抗体的结合是经典补体活化途径中的第一步(Makrides, S. C. *Pharmacol. Rev.* 50: 59-87(1998)). IgG 上碳水化合物的性质影响与 C1q 的相互作用 (Wright 等 *J. Immunol.* 160: 3393-3402(1998); Boyd 等 *Molec. Immunol.* 32: 1311-1318(1995); 和 Tsuchiya 等 *J. Rheumatol.* 16: 285-290(1989)). Hu4D5 结合人 C1q 不如 RITUXAN®, 后者是抗-CD20 小鼠/人嵌合 IgG1(图 15, 16)(Idusogie 等 *J. Immunol.* 164: 4178-4184(2000)), 而且缺乏岩藻糖不影响 Hu4D5 和人 C1q 反应的能力(图 15, 16)。同样的, 岩藻糖的存在或缺乏不影响 IgG1 与 FcRn 的结合。

### 实施例 3: 抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)

使用人乳腺癌细胞系 SK-BR-3(Hudziak 等 *Mol. Cell Biol.* 9: 1165-1172(1989))上的 Lec13-Hu4D5 IgG1 评价缺乏岩藻糖对 ADCC 的影响。将来自两个 FcγRIIIA(V158/F158)供者和两个 FcγRIIIA(F158/F158)供者的 PBMCs 作为效应细胞, 其效应细胞: 靶细胞比是 30:1。对于所有的供者, 不含有岩藻糖的 IgG1 与含有岩藻糖的 IgG1 相比, 其 ADCC 显著增强(图 17-20)。值得注意的, 对于所有的供者, 细胞毒作用随抗体浓度的降低更加明显增强。这反映了所见到的二聚体的结合与六聚体相比增强的幅度更大, 即为影响效应细胞的结合/活化, 不含岩藻糖的变体需要位于靶细胞表面的 mAbs 更少。

人单核细胞表达 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, 而只有一个亚群表达 FcγRIIIA。由于缺乏岩藻糖不影响与 FcγRI 的结合, 但对与 FcγRIIA(R131) 和 FcγRIIB 的结合有较小的影响, 将纯化的人单核细胞作为效应细胞, 在效应细胞: 靶细胞比为 20:1, 10:1, 和 5:1 时进行 ADCC 实验。单核细胞的纯化比 PBMCs 的纯化更困难, 因此 ADCC 实验也较为困难。与 PBMC 的 ADCC 相比, 尽管效应看似不明显, 而且单核细胞杀死靶细胞的能力也比 PBMCs 降低了(图 21-22), 但是单核细胞 ADCC 还是显示了缺乏岩藻糖的 IgG1 具有增强的细胞毒作用。

### 实施例 4: Fc 变体抗体的 ADCC 活性

以下实验比较了: (1) CHO 细胞中表达的 Hu4D5(Hu4D5 CHO-S), (2)

Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 岩藻糖缺陷变体(hu4D5 Lec13), (3) 293HEK 细胞中表达的 Hu4D5 三丙氨酸 Fc 区取代变体(Hu4D5 HEK293-AAA); 和(4) Lec13 细胞中表达的 Hu4D5 岩藻糖缺陷的三丙氨酸 Fc 区取代变体(Hu4D5-Lec13-AAA)。

**ADCC 方法:**使用磁性珠子(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)自两个供者的外周血中通过负选择纯化自然杀伤(NK) 细胞。选择的供者是等位基因的纯合子, 该等位因表达 FcγR3(CD16)(F/F158)的 F158 形式(Shields 等, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604(2001)), 该 FcγR3 表现出与 IgG 表型的较低的亲和力。在 5°C, 由 1ng/ml 各种抗体在实验介质(含有 50:50 Hams F12: DMEM, 其中包含 1%热灭活的胎牛血清和 10mM HEPES 缓冲液)中调理过度表达 HER2 的 SKBR-3 乳腺癌细胞 45 分钟, 然后在效应细胞对靶细胞比(E:T)为 10:1 到 0.156 的情况下, 将各种浓度的 NK 细胞于 37°C 下在潮湿的 CO<sub>2</sub> 孵育箱中孵育 5 小时。通过乳酸脱氢酶(LDH)的释放, 使用商品试剂盒(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)可测定细胞毒作用。

**NK 细胞的间接免疫荧光染色法:**纯化的 NK 细胞与 2μg/ml 各种 Hu4D5 变体在 4°C 的染色缓冲液(磷酸缓冲盐溶液, 0.1%牛血清白蛋白, 0.01%叠氮钠)中共同孵育 30 分钟。洗涤细胞 3 次, 并与藻红蛋白偶联的小鼠单克隆抗体抗-人 CD56(Pharmingen, San Diego, CA)和特异性的 FITC - F(ab')<sub>2</sub> 山羊抗-人 IgG(F(ab')<sub>2</sub>)(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)一起于 4°C 下再孵育 30 分钟。在 FACScan™流式细胞仪上(B.D. Biosciences, San Jose, CA)分析细胞的双色免疫荧光染色。

**结论:**在两个供者中(5365 和 7580), 当 E/T 比大于 2 时, 相对于 Hu4D5 的 Hu4D5-Lec13 形式, Hu4D5 的 Hu4D5-Lec13-AAA 形式具有增强的 ADCC 活性(见图 26 和 27), 表明在岩藻糖缺陷的三丙氨酸 Fc 变体中, FcγRIII 结合/ADCC 协同增强。在表达 CD56/CD16 的 NK 细胞中的供体 5365(见图 24 和 25)中, 通过 NK 细胞的间接免疫荧光染色证实了结合的增强。

尽管本发明的叙述与具体实施方案相关, 应理解还可对本发明进行进一步修饰。本申请意在涵盖根据本发明原则进行的任何变更, 使用或改写, 并且包括脱离本发明但又符合本发明所属领域的已知或习惯性做法, 而且其与所附权利要求范围内的、上文所述的本质特征相符合。



## 序 列 表

<110> 杰南技术公司 (Genentech, Inc.)

<120> 糖蛋白组合物

<130> P1877R1PCT

<140> PCT/US02/33739

<141> 2002-10-22

<150> US 60/337,642

<151> 2001-10-25

<150> US 60/347,694

<151> 2002-01-09

<160> 9

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 1

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1           5           10           15
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
           20           25           30
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
           35           40           45
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
           50           55           60
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
           65           70           75
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
           80           85           90
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
           95           100          105
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
           110          115          120
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
           125          130          135
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
           140          145          150
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
           155          160          165
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
           170          175          180
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
           185          190          195

```

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
215

<210> 2

<211> 218

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 2

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
215

<210> 3

<211> 217

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 3

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
20 25 30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val  
65 70 75

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
80 85 90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
95 100 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
110 115 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
125 130 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
140 145 150

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
155 160 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
170 175 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
200 205 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
215

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 4

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln  
35 40 45

Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

	50		55		60
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser	65		70		75
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	80		85		90
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	95		100		105
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	110		115		120
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser	125		130		135
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	140		145		150
Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr	155		160		165
Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys	170		175		180
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser	185		190		195
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys	200		205		210
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	215				

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 5

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	1	5	10	15
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	20	25	30	
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln	35	40	45	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	50	55	60	
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	65	70	75	
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	80	85	90	
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys	95	100	105	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				

	110		115		120									
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				125					130					135
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				140					145					150
Glu	Trp	Glx	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				155					160					165
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg
				170					175					180
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				185					190					195
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
				200					205					210
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys							
				215										

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 215

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠 (Mus musculus)

&lt;400&gt; 6

Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
1				5					10					15
Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val
				20					25					30
Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp
				35					40					45
Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg
				50					55					60
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro
				65					70					75
Ile	Met	His	Gln	Asp	Cys	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg
				80					85					90
Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				95					100					105
Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro
				110					115					120
Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				125					130					135
Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln
				140					145					150
Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile
				155					160					165

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val  
170 175 180

Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val  
185 190 195

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser  
200 205 210

His Ser Pro Gly Lys  
215

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val  
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln  
35 40 45

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
50 55 60

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser  
65 70 75

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe  
80 85 90

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg  
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr  
110 115 120

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr  
125 130 135

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val  
140 145 150

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr  
155 160 165

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys  
170 175 180

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser  
185 190 195

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys  
200 205 210

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
215

<210> 8  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 8  
 Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val  
 20 25 30  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln  
 35 40 45  
 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
 50 55 60  
 Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser  
 65 70 75  
 His Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe  
 80 85 90  
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg  
 95 100 105  
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr  
 110 115 120  
 Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser  
 125 130 135  
 Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val  
 140 145 150  
 Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr  
 155 160 165  
 Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys  
 170 175 180  
 Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser  
 185 190 195  
 Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys  
 200 205 210  
 Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 215

<210> 9  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 9  
 Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val  
 20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His  
 35 40 45  
 Val Ser Trp Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr  
 50 55 60  
 Gln Pro Arg Glu Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser  
 65 70 75  
 Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe  
 80 85 90  
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg  
 95 100 105  
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr  
 110 115 120  
 Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser  
 125 130 135  
 Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val  
 140 145 150  
 Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr  
 155 160 165  
 Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys  
 170 175 180  
 Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr  
 185 190 195  
 Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys  
 200 205 210  
 Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 215



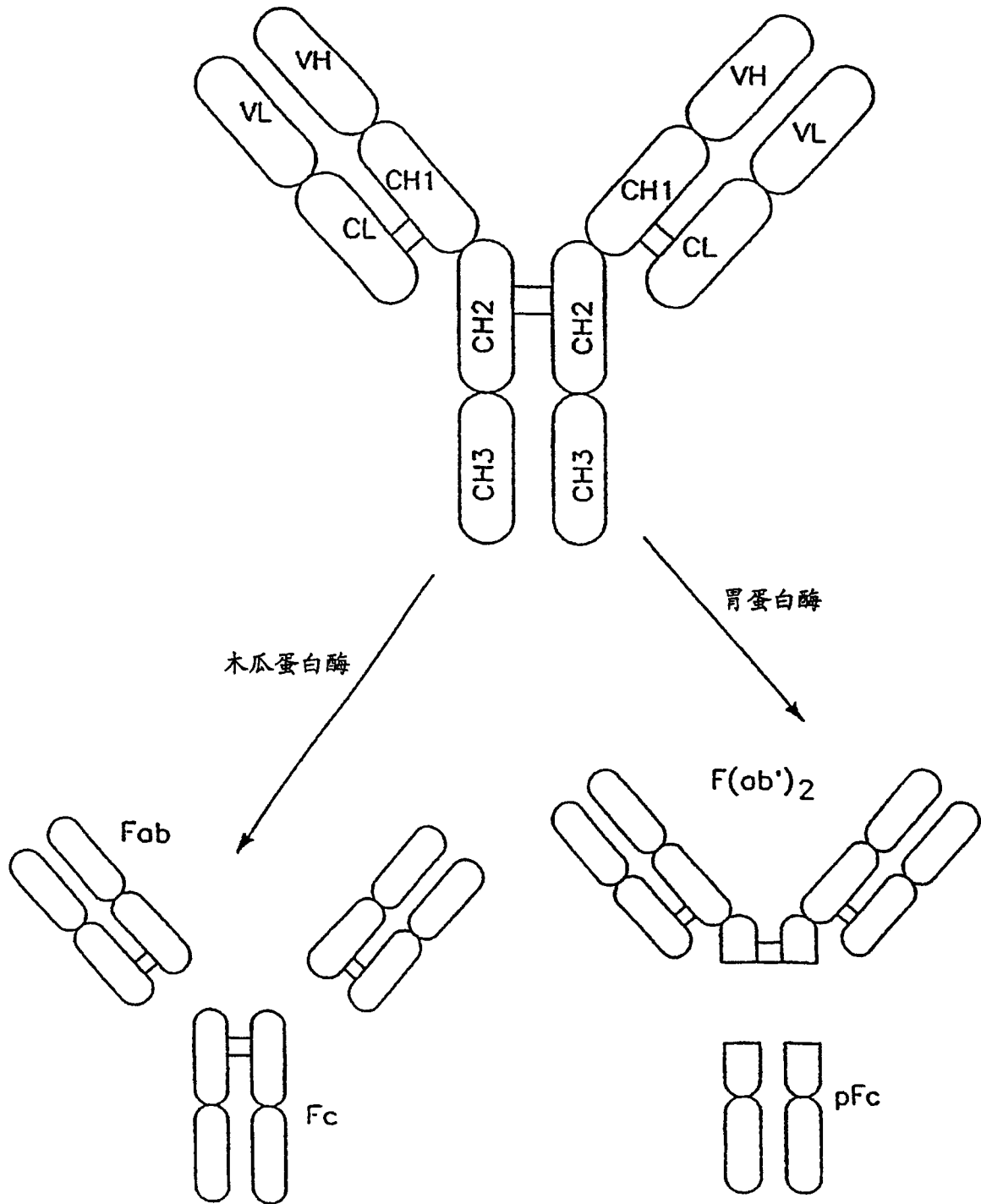


图 1A

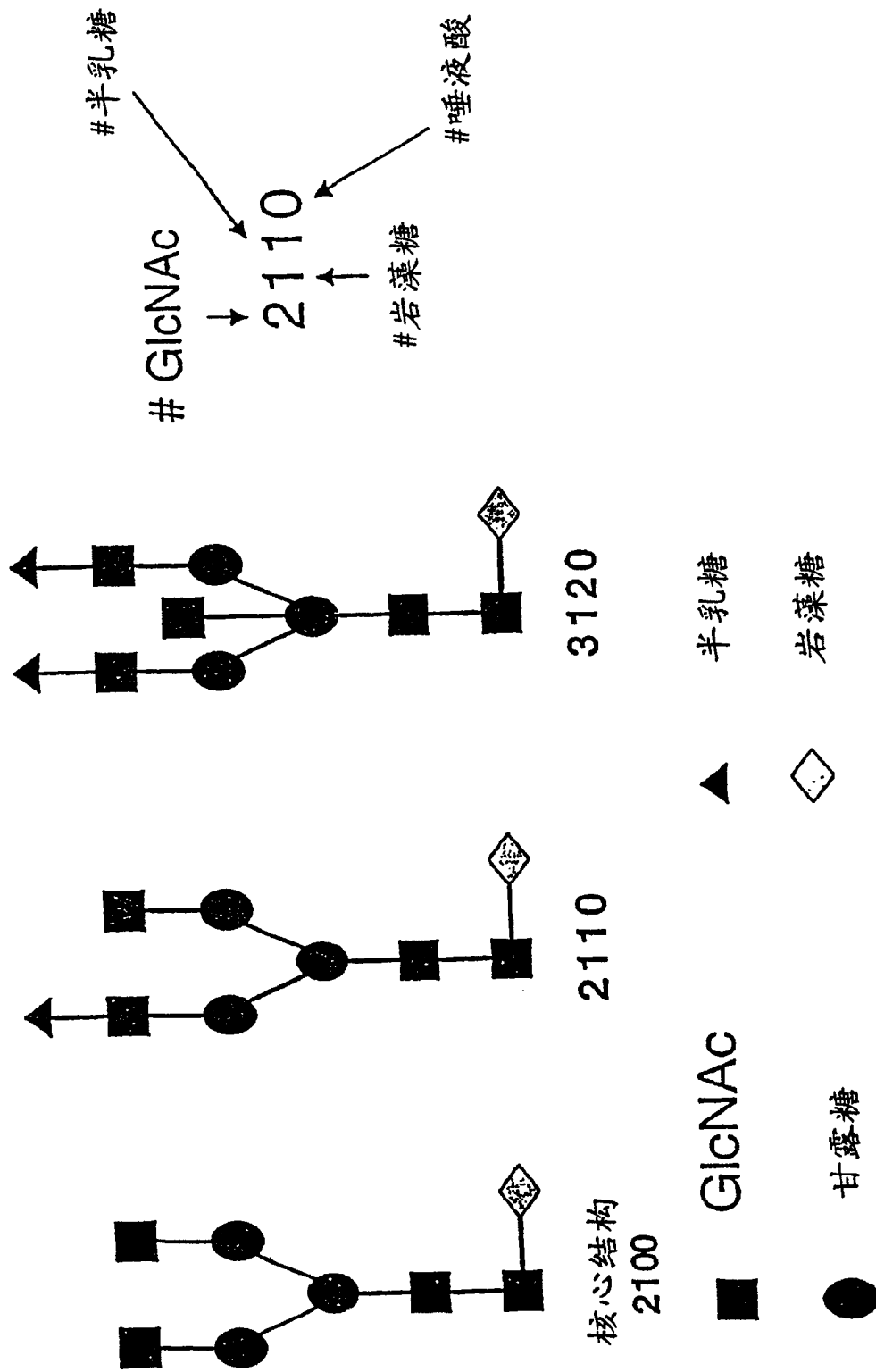


图 1B

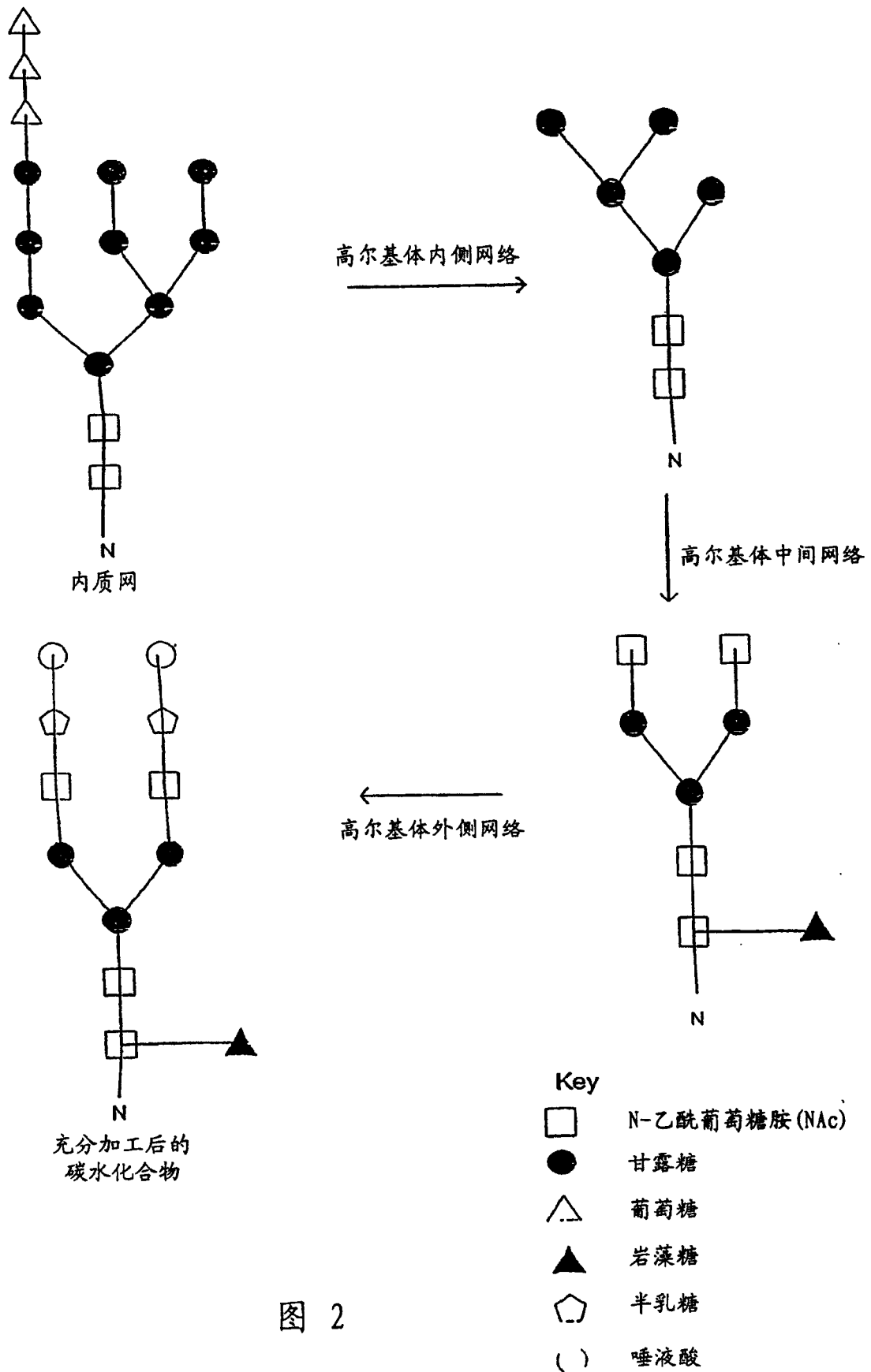


图 2

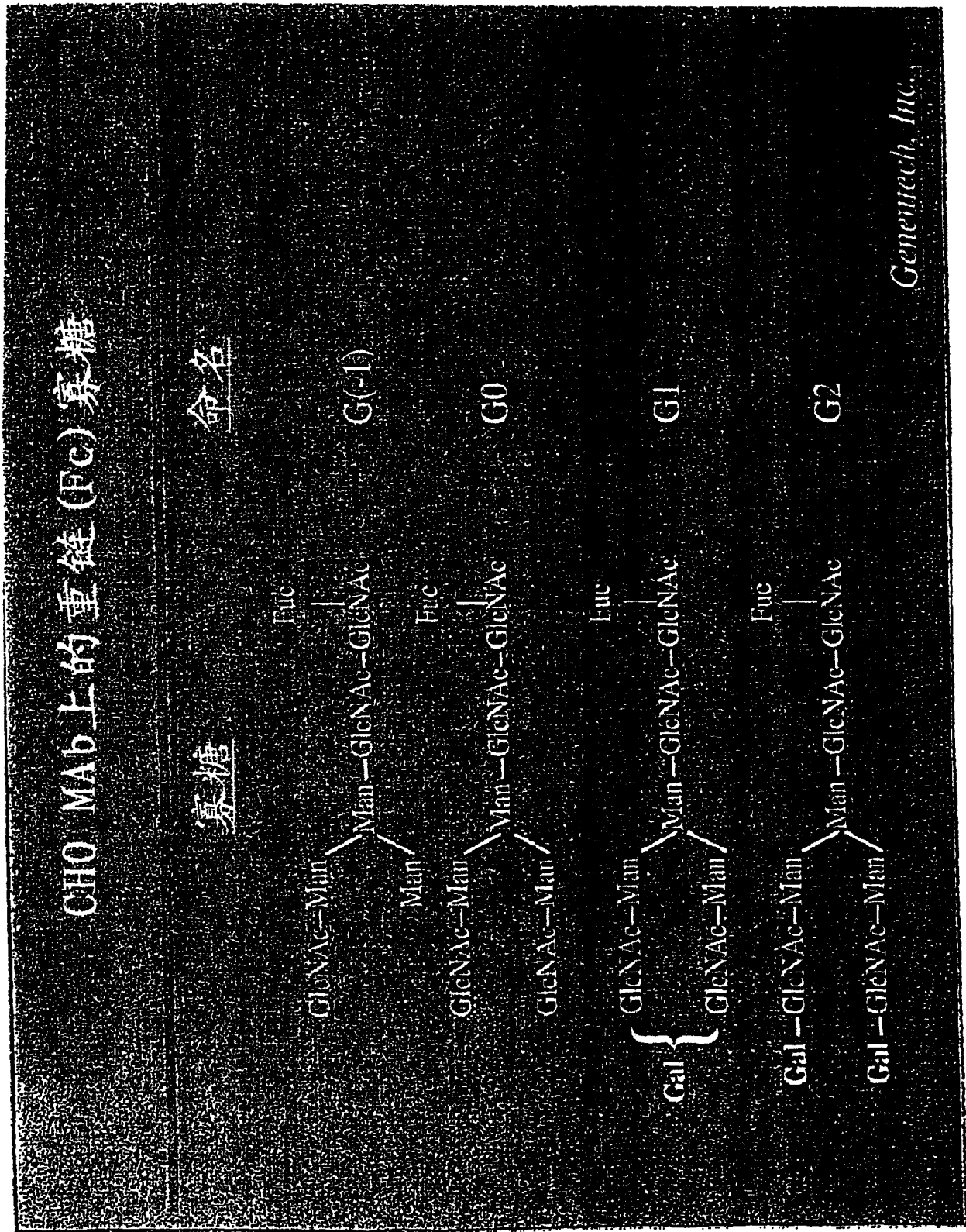


图 3

人Fc $\gamma$ RI: Hu4D5单体的结合

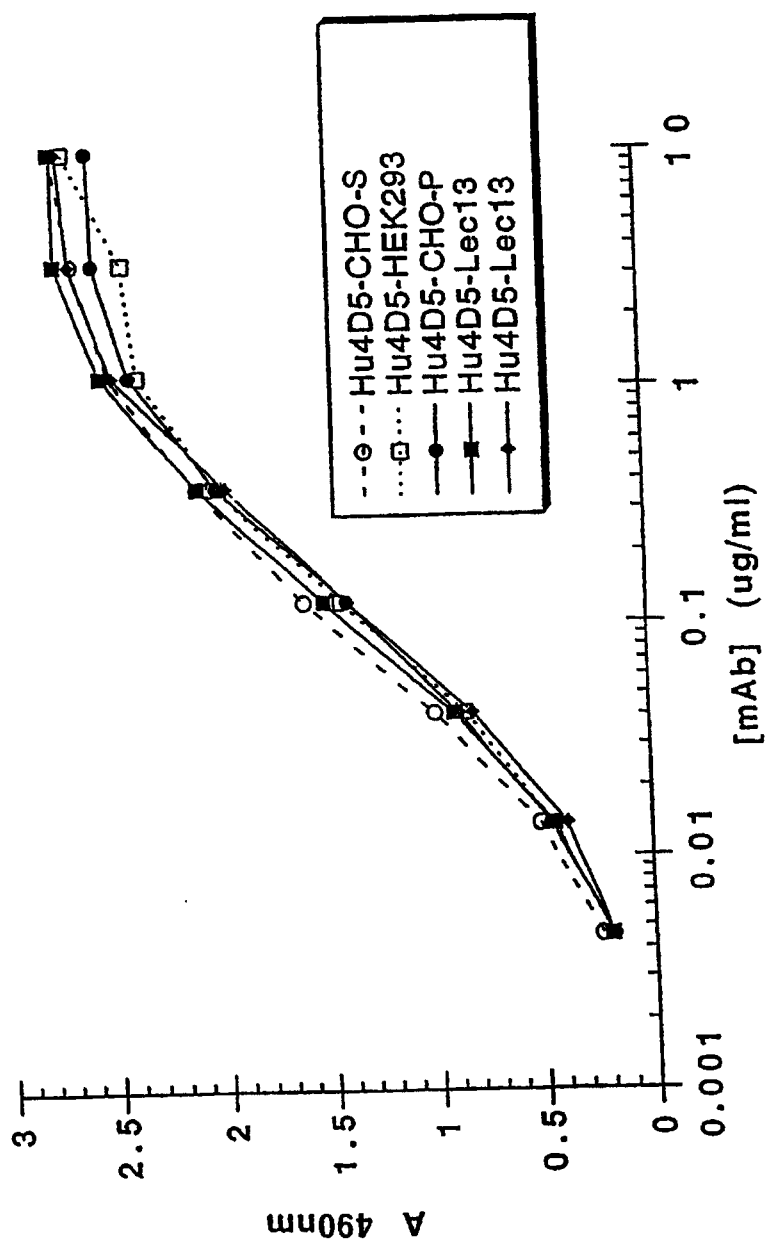


图 4

人FcγRIIB: Hu4D5二聚体的结合

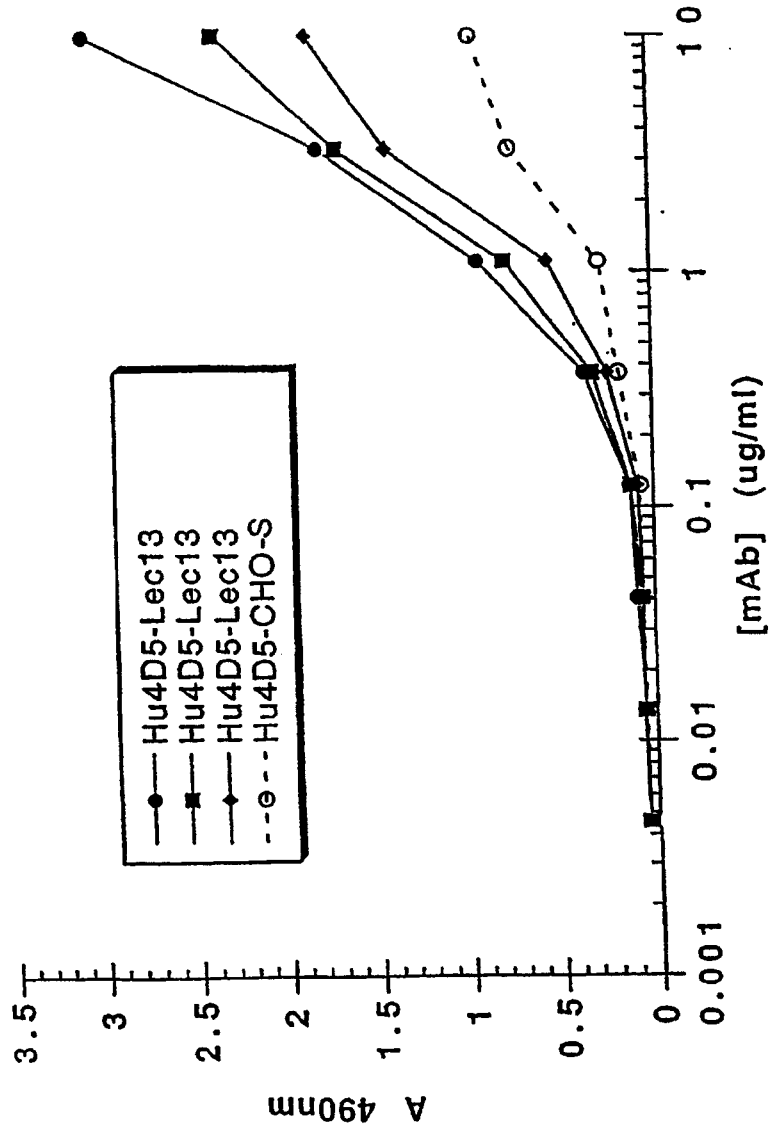


图 5

人FcγRII A (R131): Hu4D5二聚体的结合

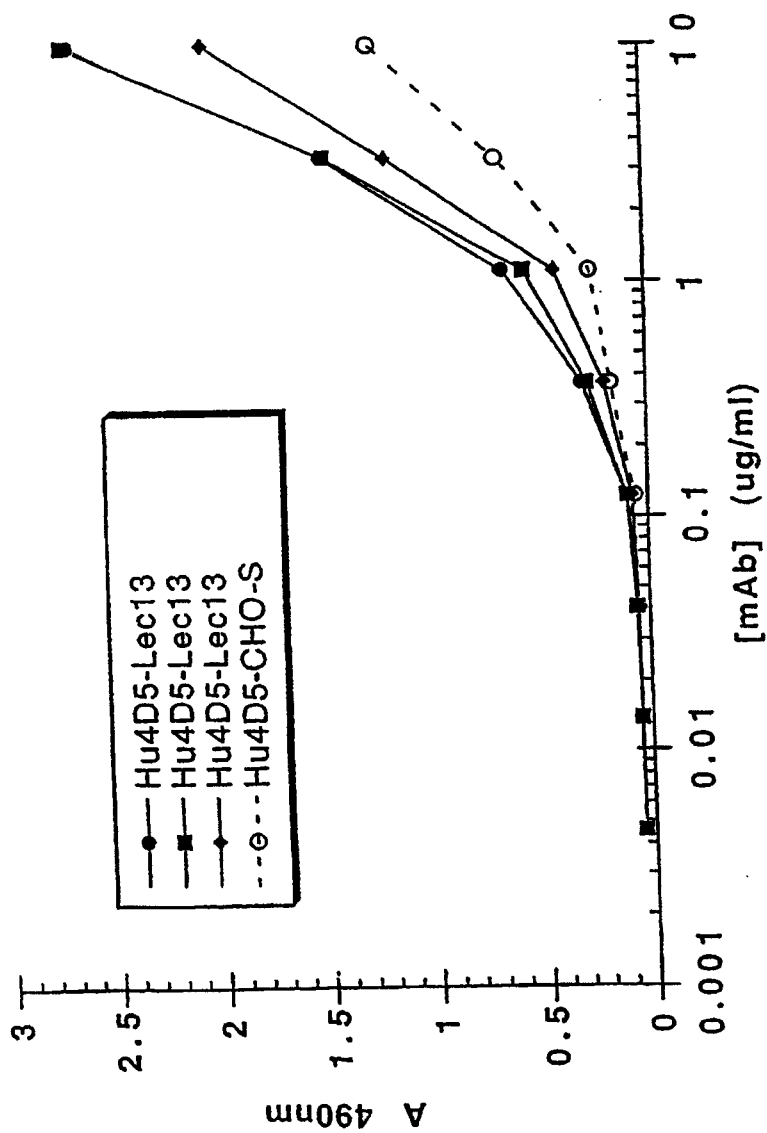


图 6

人FcγR II A (H131): Hu4D5二聚体的结合

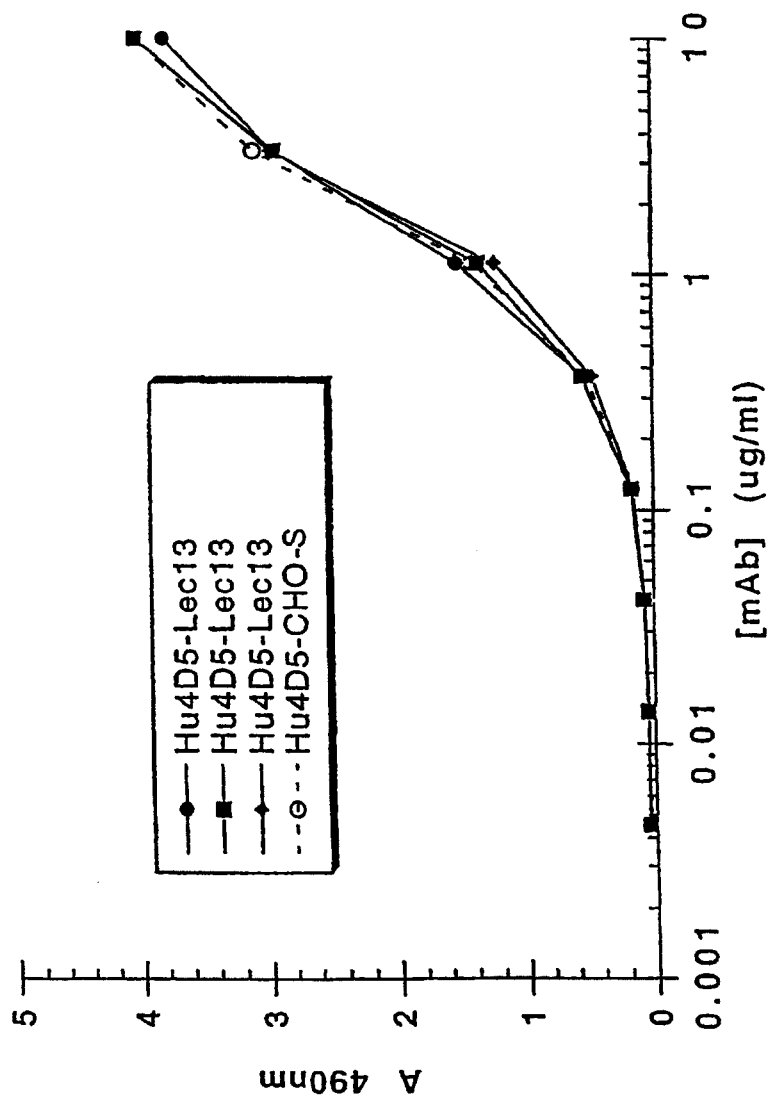


图 7



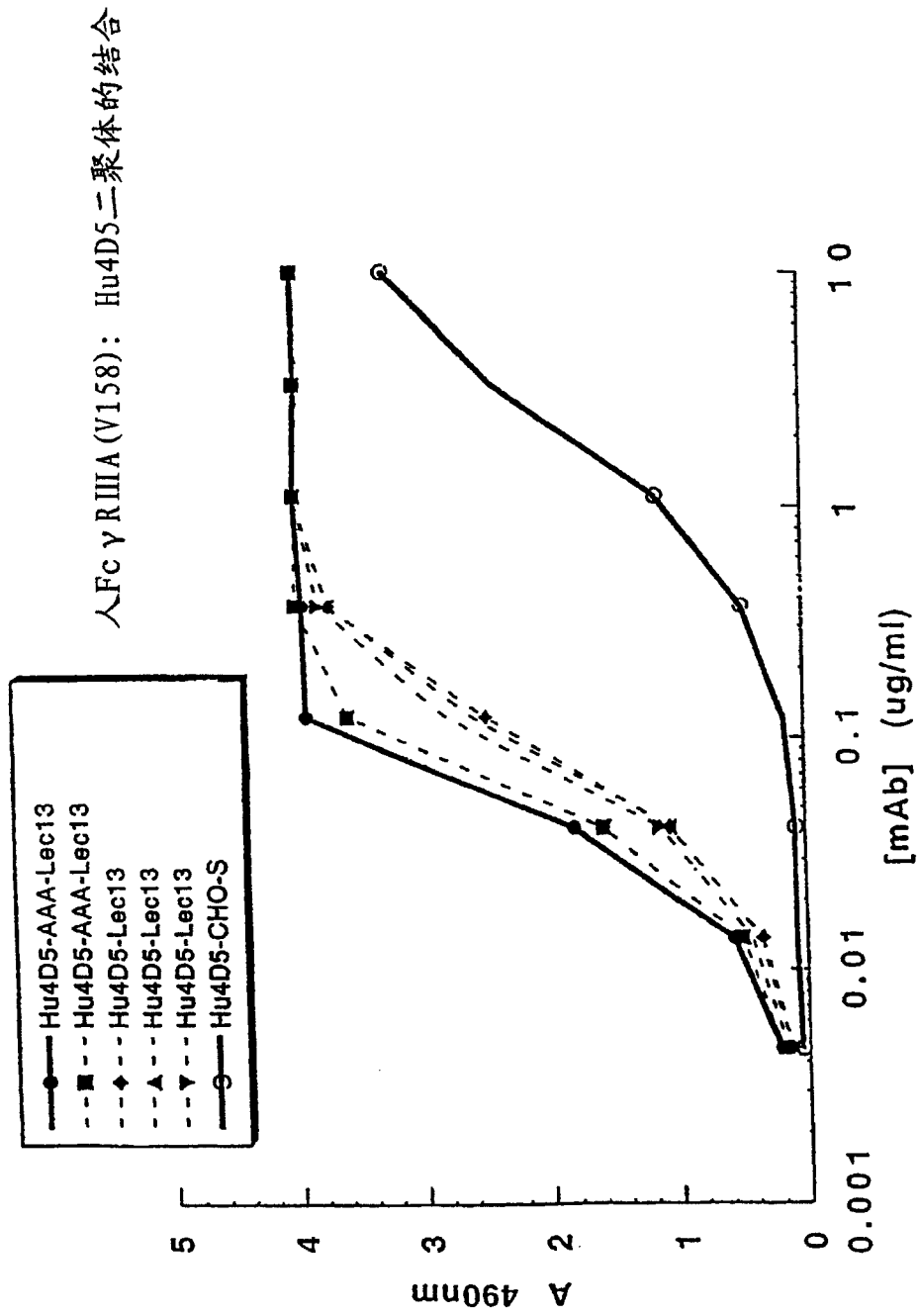


图 8

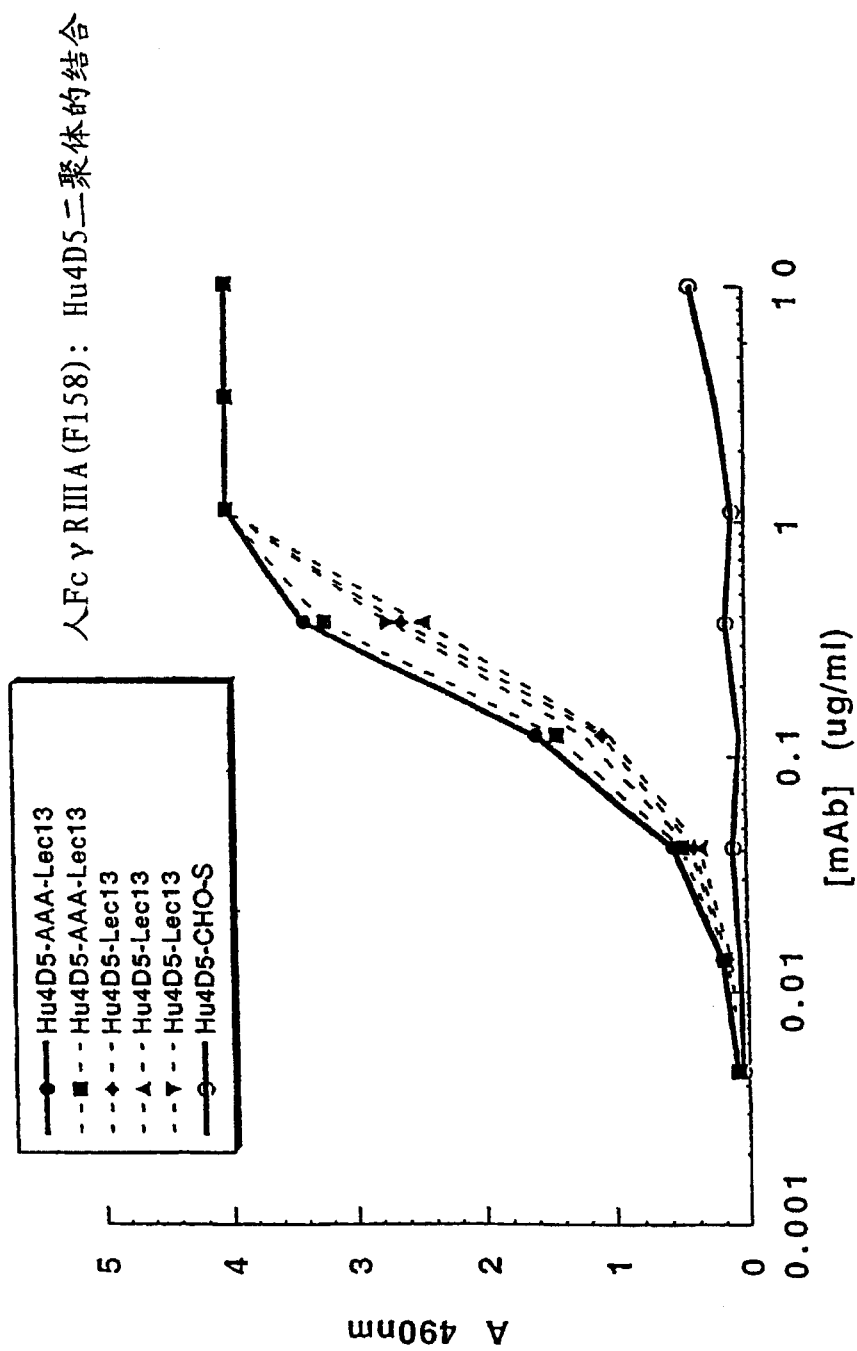


图 9

抗IgE E27 二聚体与人Fc $\gamma$ R1IA (F158) 的结合

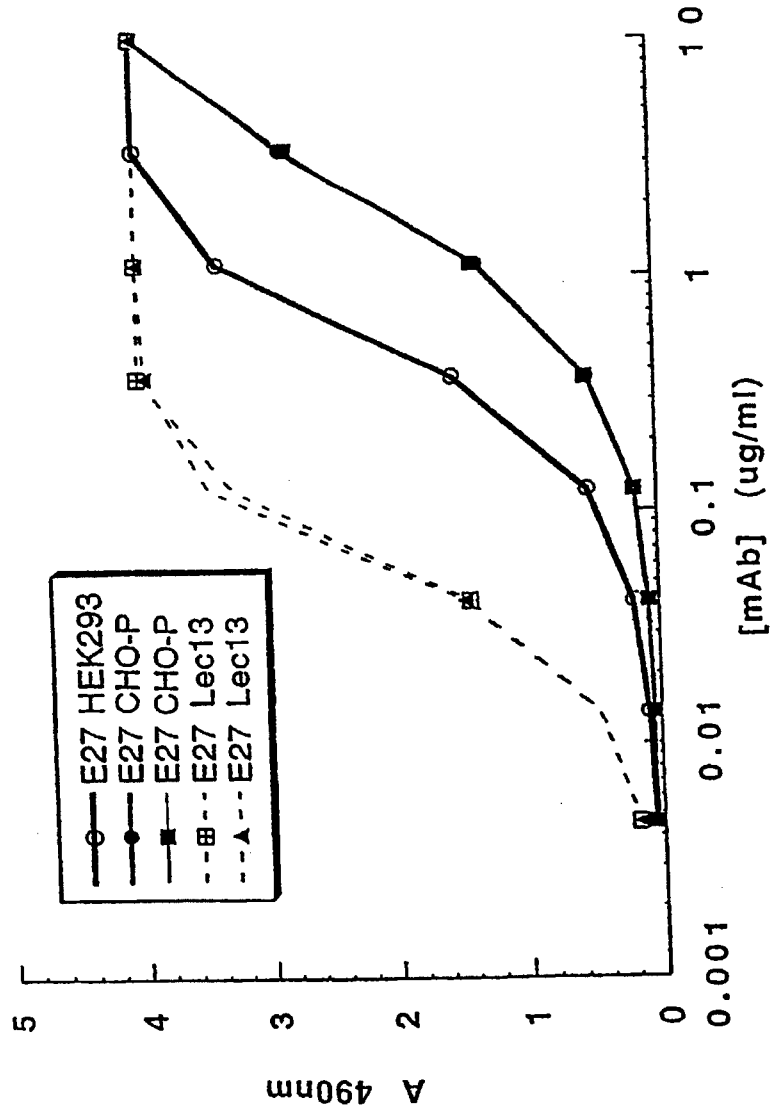


图 10

抗IgE E27 二聚体与人FcγRIIIA (F158) 的结合

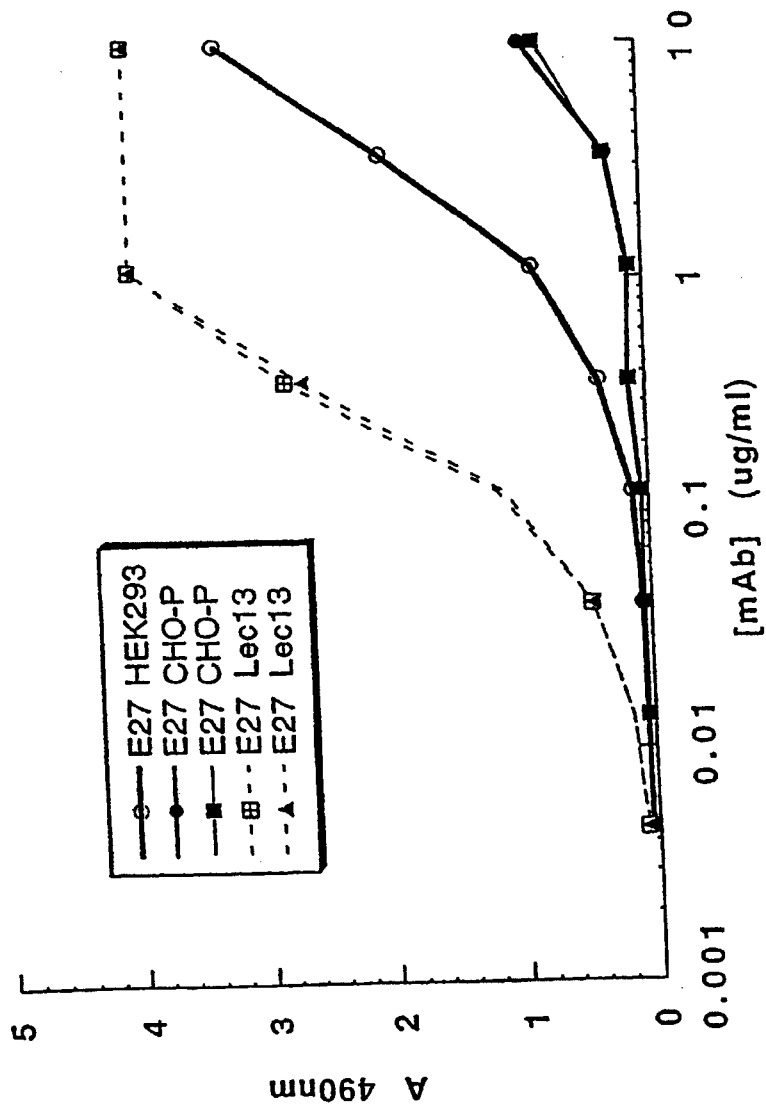


图 11

抗IgE E27 六聚体与人FcγRIIIA (F158) 的结合

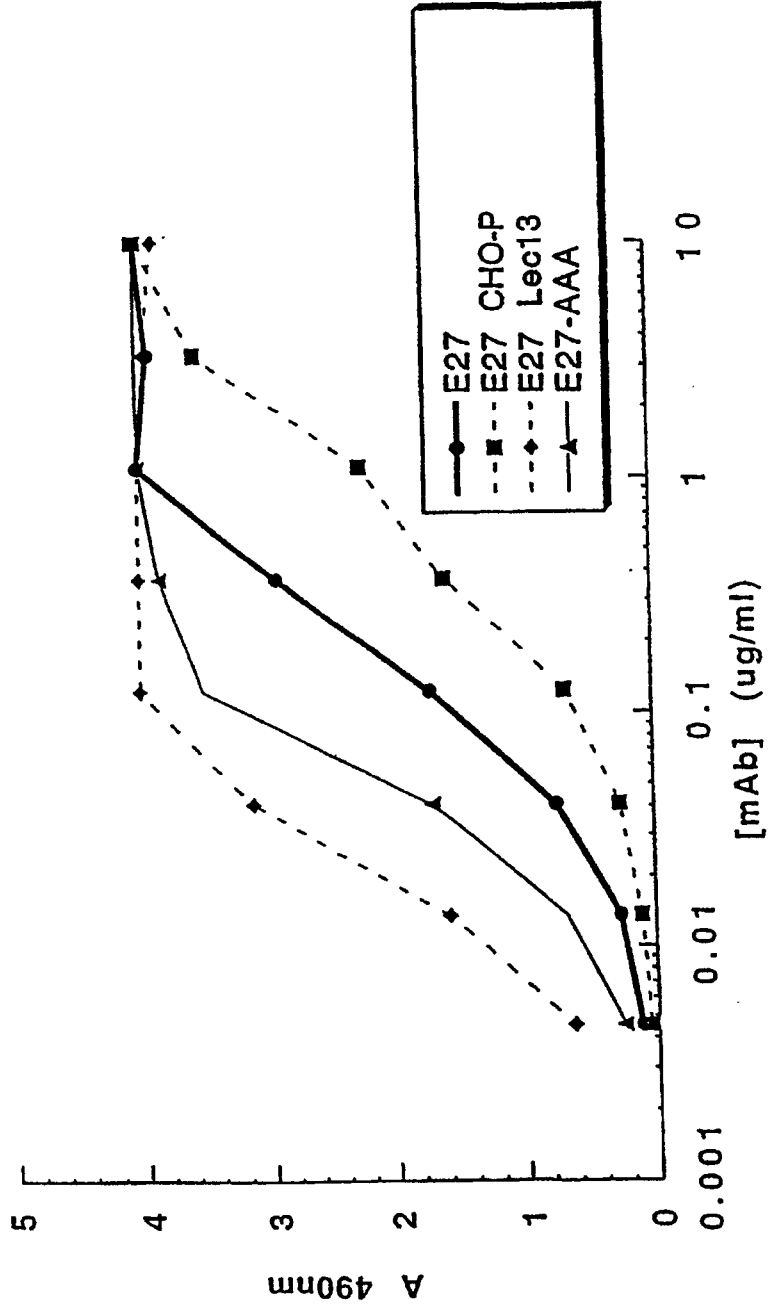


图 12

抗IgE E27 六聚体与人FcγRIIIA (V158) 的结合

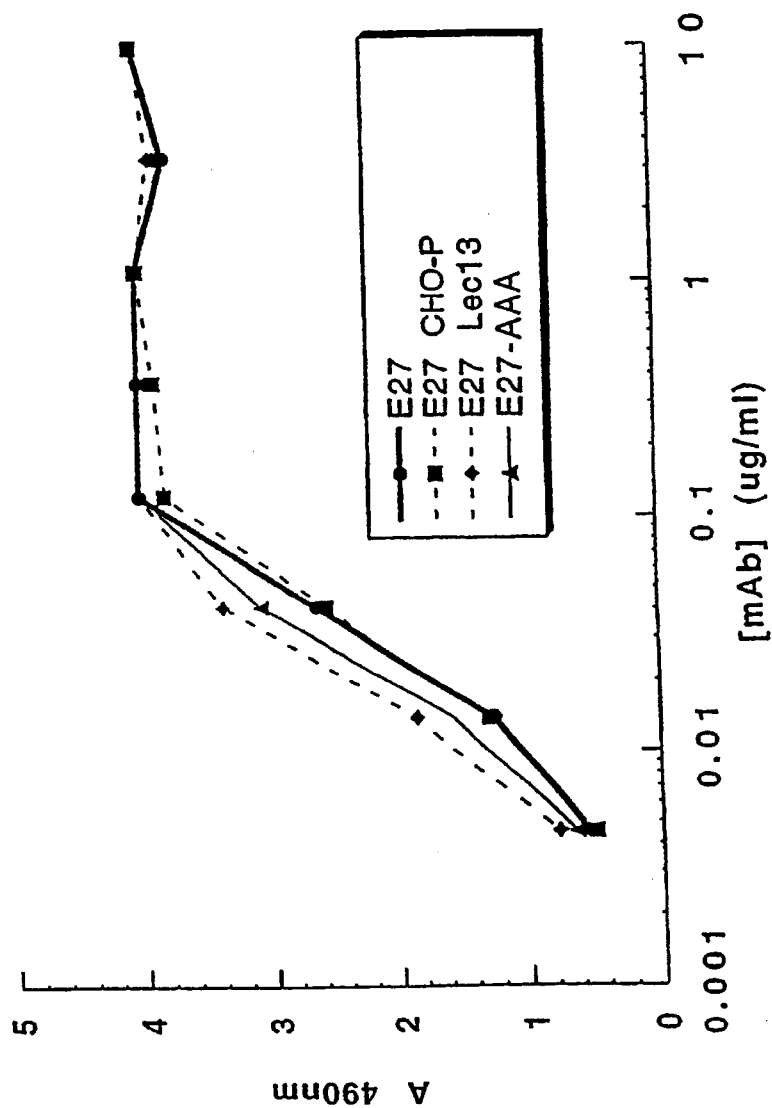


图 13

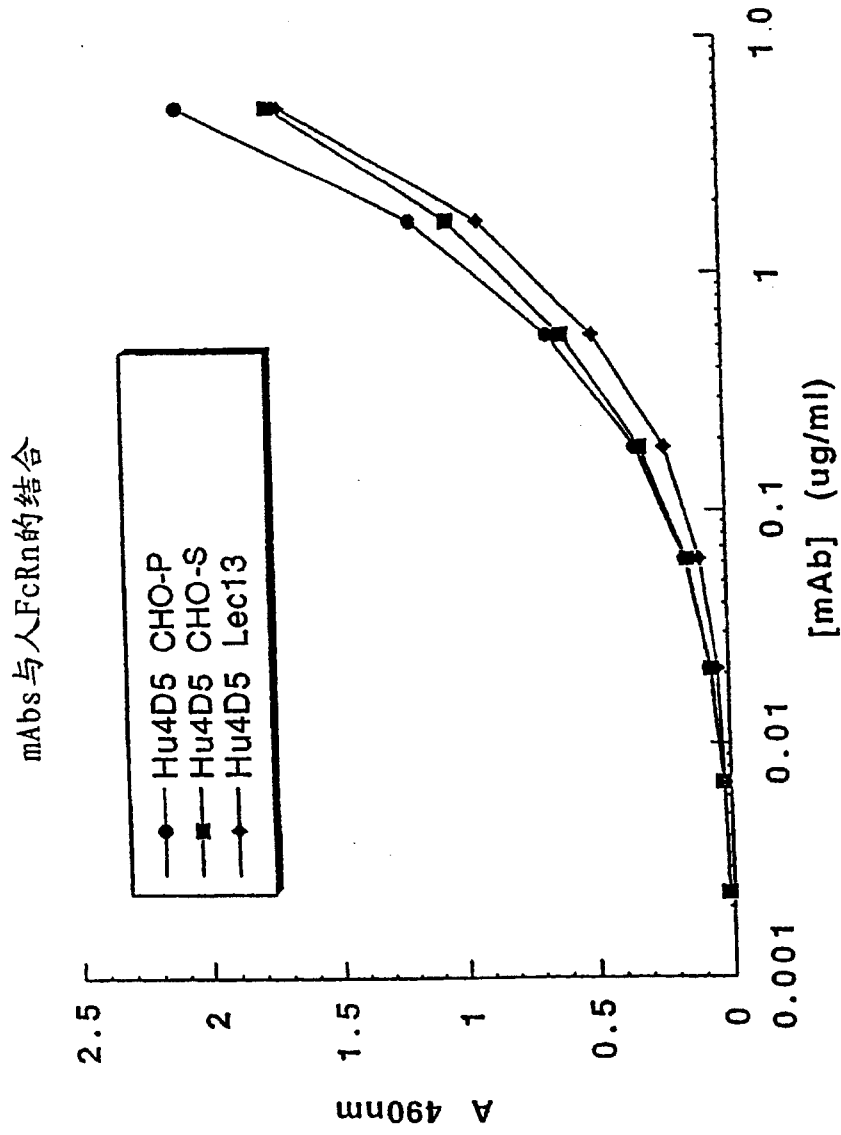


图 14

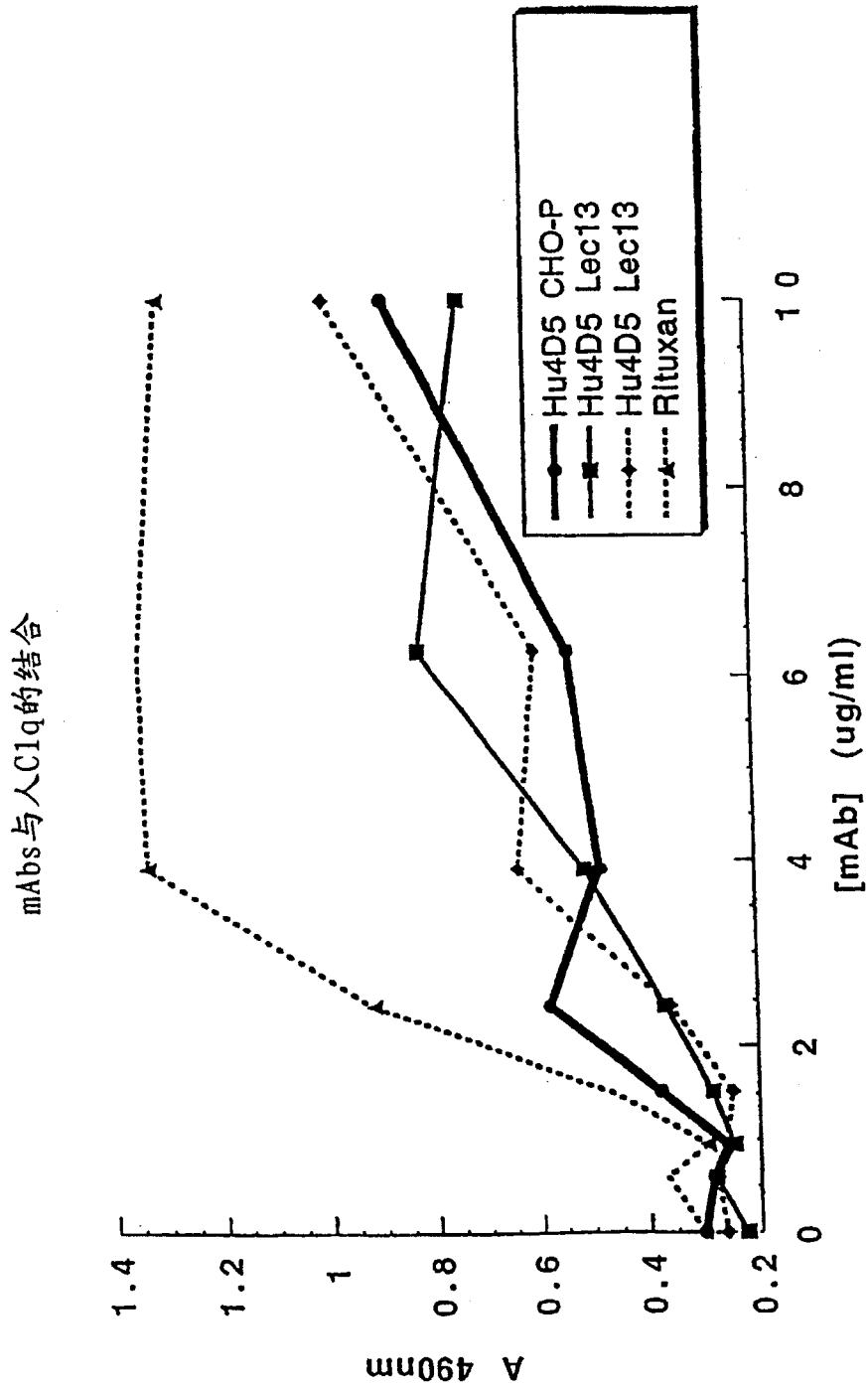


图 15



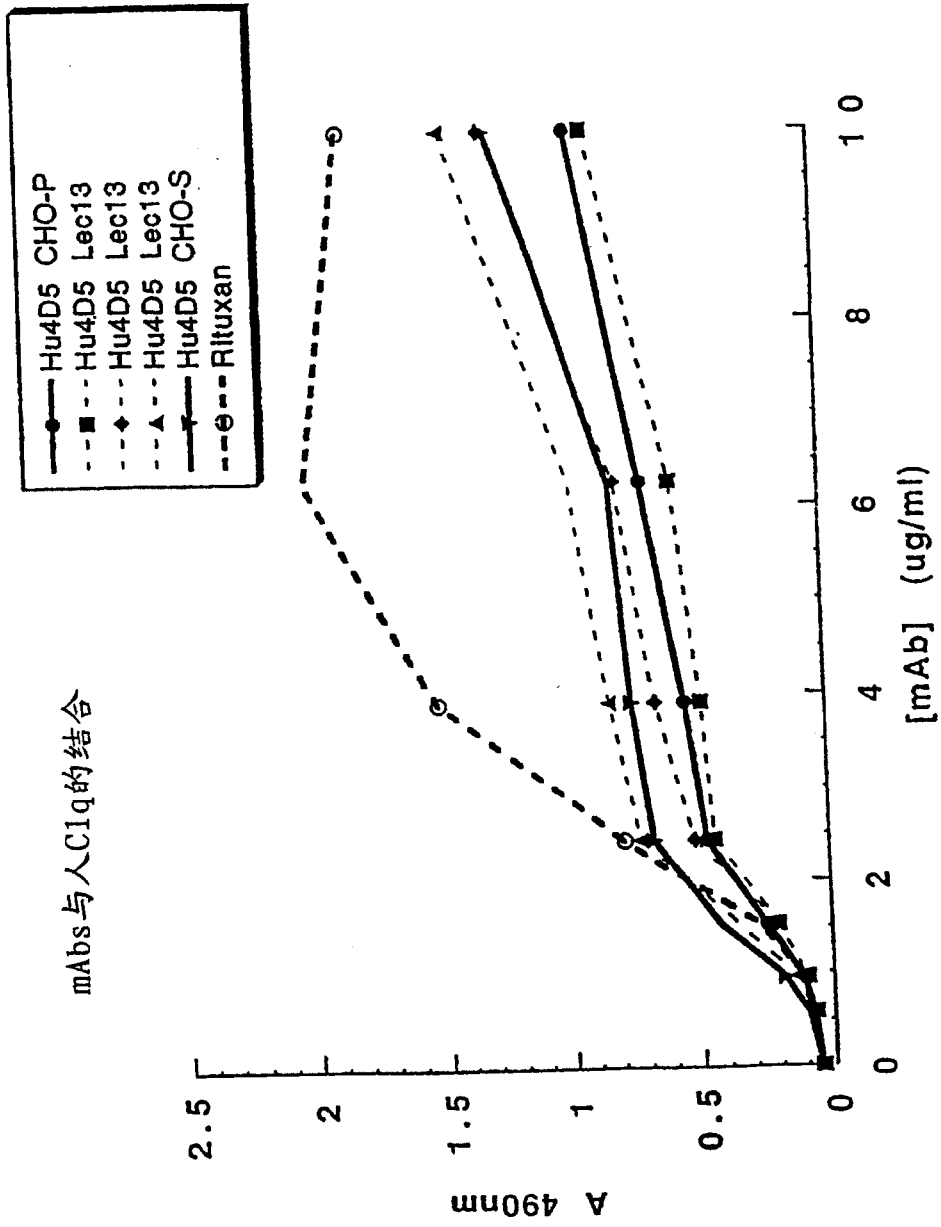


图 16

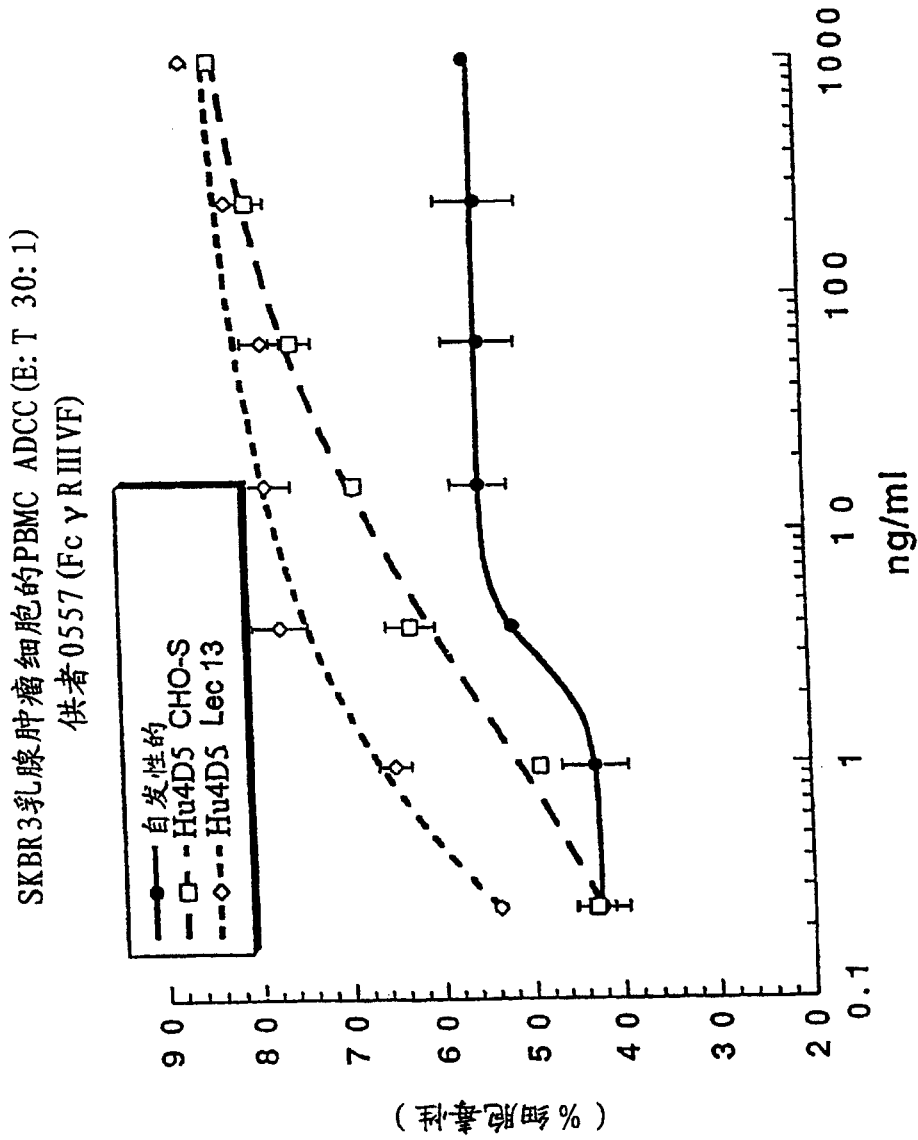


图 17

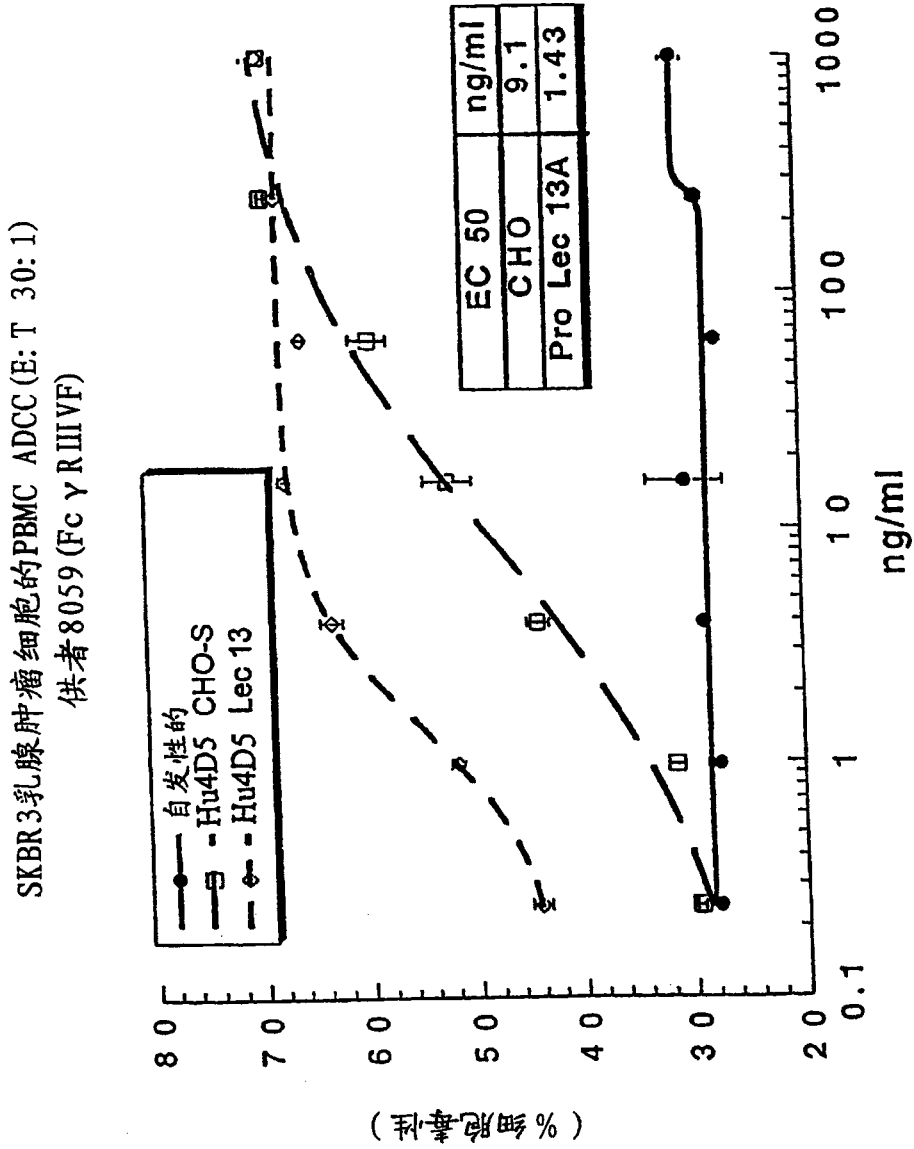


图 18

SKBR3乳腺肿瘤细胞的PBMC ADCC (E: T 30: 1)  
供者9123 (Fc γ RIIIF)

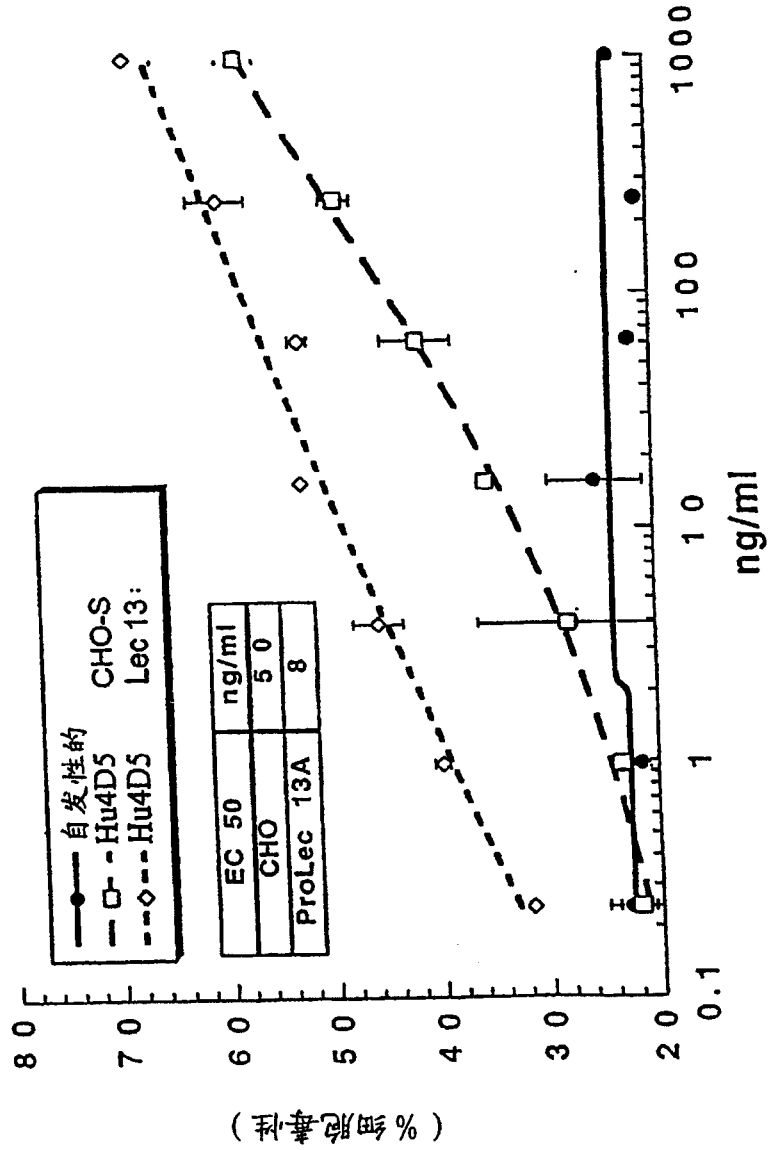


图 19

SKBR3乳腺肿瘤细胞的PBMC ADCC (E:T 30:1)  
供者1497 (FcγRIIIFF)

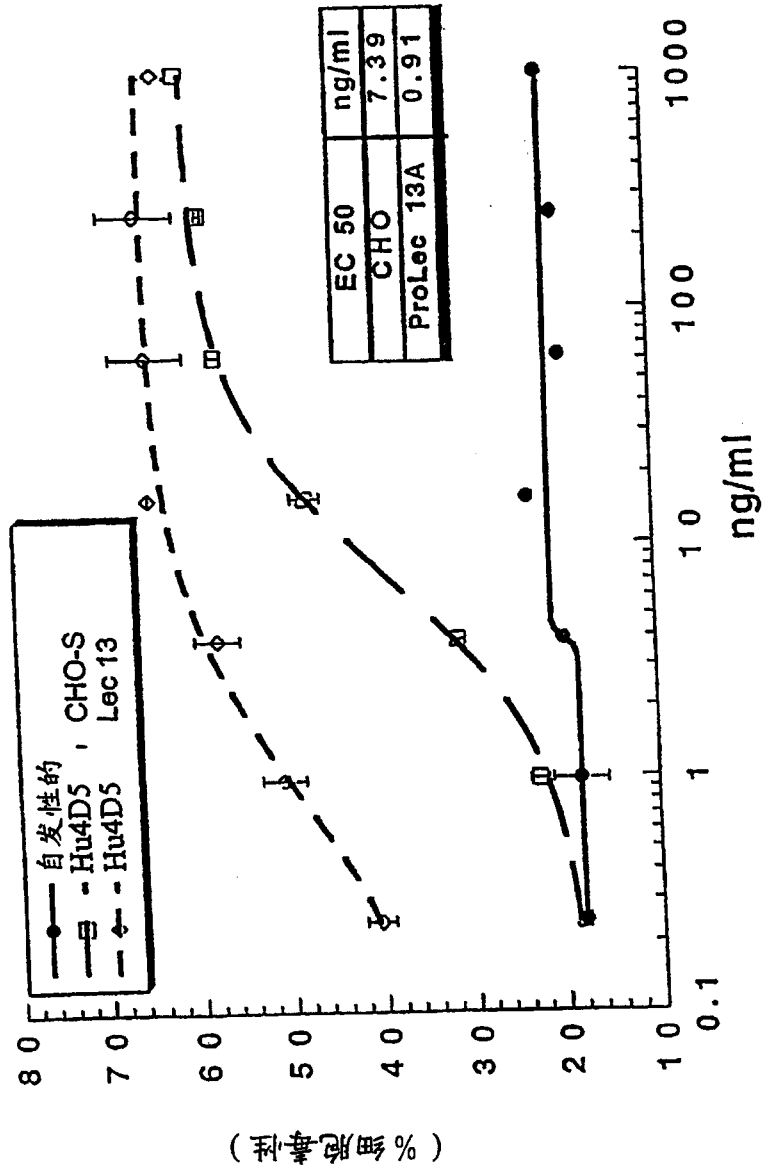


图 20

SKBR3 乳腺肿瘤细胞的单核细胞ADCC (E: T 10: 1)  
供者 8764 (Fc $\gamma$ RII A RR)

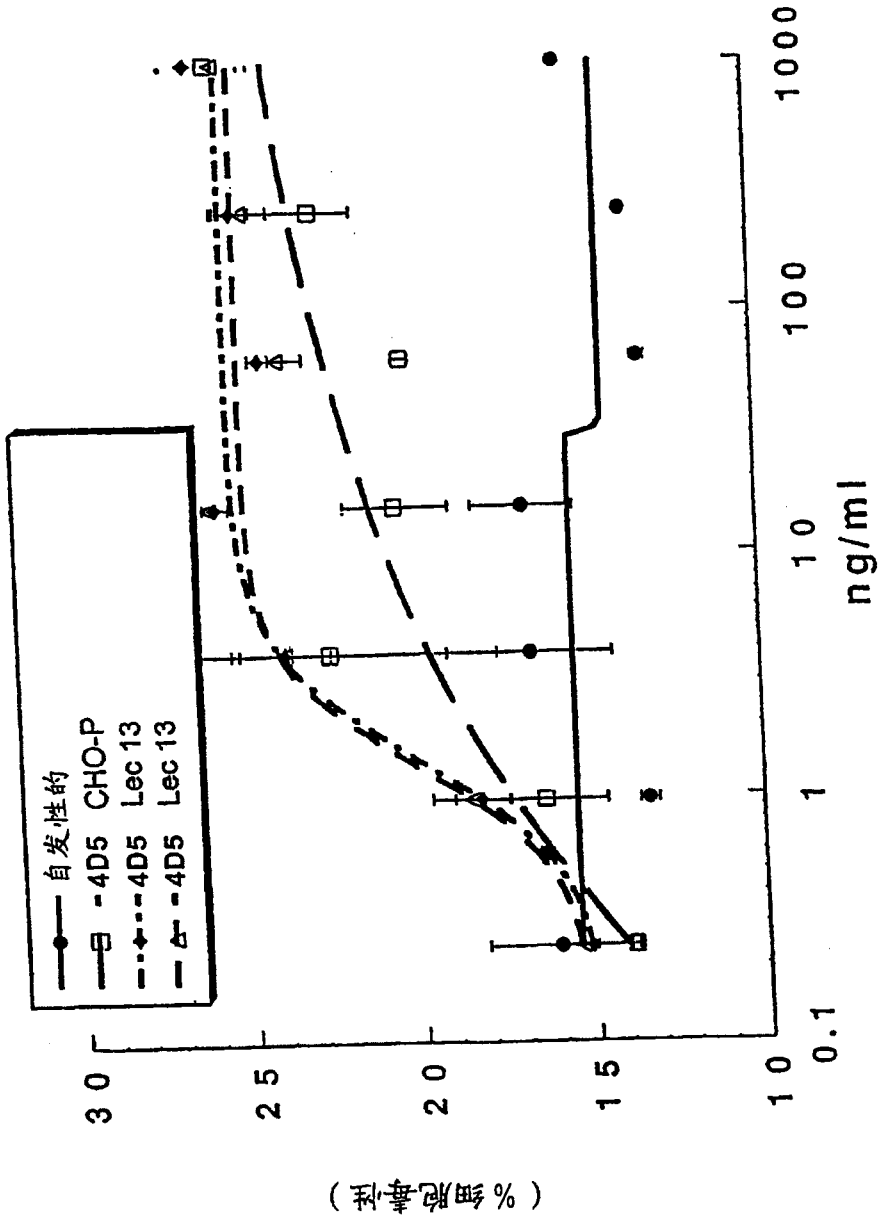


图 21

SKBR3乳腺肿瘤细胞的单核细胞ADCC (E: T 10: 1)  
供者9730 (FcγR II A 2HH)

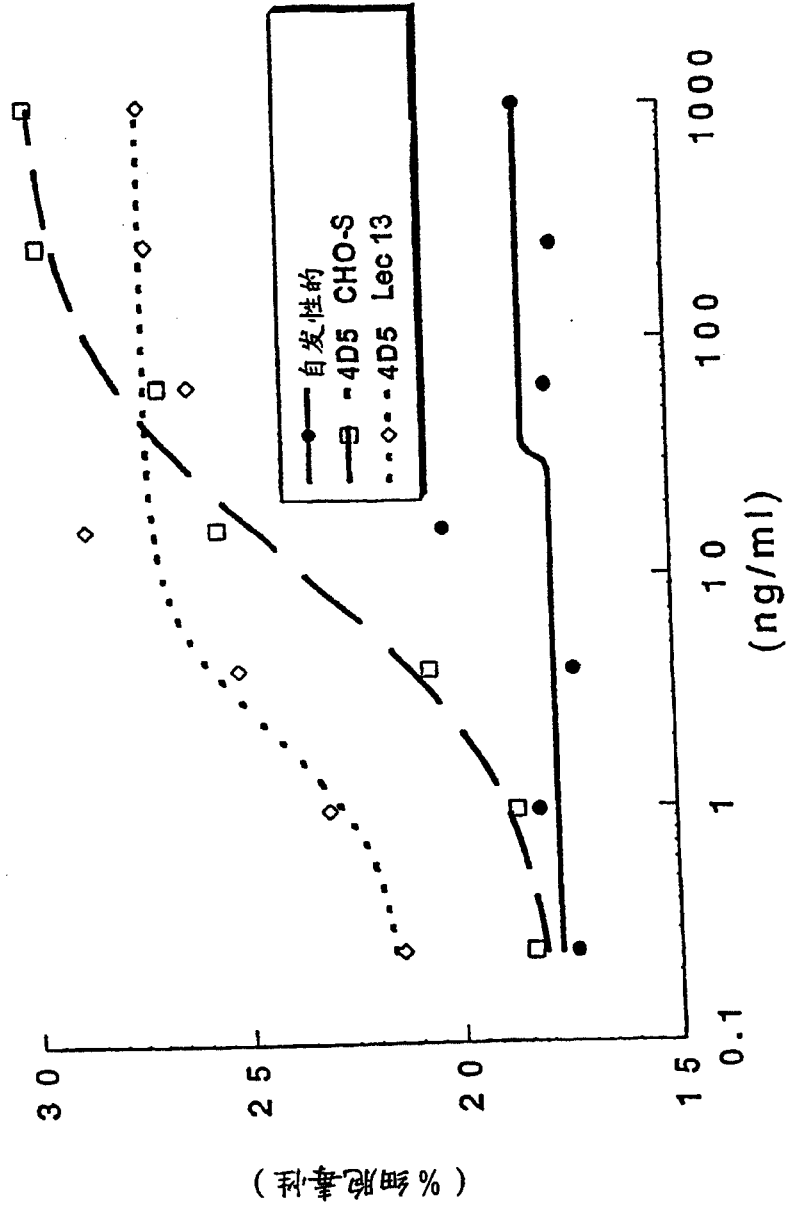


图 22

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP- PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV				
murIgG1	---TVPEVSSVFIFPPKPKDVLTIITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFV				
murIgG2A	PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG2B	PAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISSLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV				
murIgG3	PPGNILGGPSVFIFPPKPKDALMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVHVSWFV				
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
murIgG1	DDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRVSELPIMHQDCLNGKEFKCRVNSAAFP				
murIgG2A	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDL				
murIgG2B	NNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDL				
murIgG3	DNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALP				
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
murIgG1	APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITV				
murIgG2A	APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV				
murIgG2B	SPIERTISKPKGLVRAPQVYTLPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISV				
murIgG3	APIERTISKPKGRAQTPOVYTIPPPPEEQMSKKKQVSLTCLVTNFPSEAISV				
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH				
humIgG4	EWZSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH				
murIgG1	EWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLH				
murIgG2A	EWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH				
murIgG2B	EWTNSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLVNMKTSKWEKTDTSFSCNVRH				
murIgG3	EWERNGELEQDYKNTTPIILDSDGTYFLYSKLVDTDSWLQGEIFTCSVVH				
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGGK				
murIgG1	EGLHNHHTTEKSLSHSPGK				
murIgG2A	EGLHNHHTTKSFSRTPGK				
murIgG2B	EGLKNYYLKKTISRSPGK				
murIgG3	EALHNHHTQKNLSRSPGK				

图 23



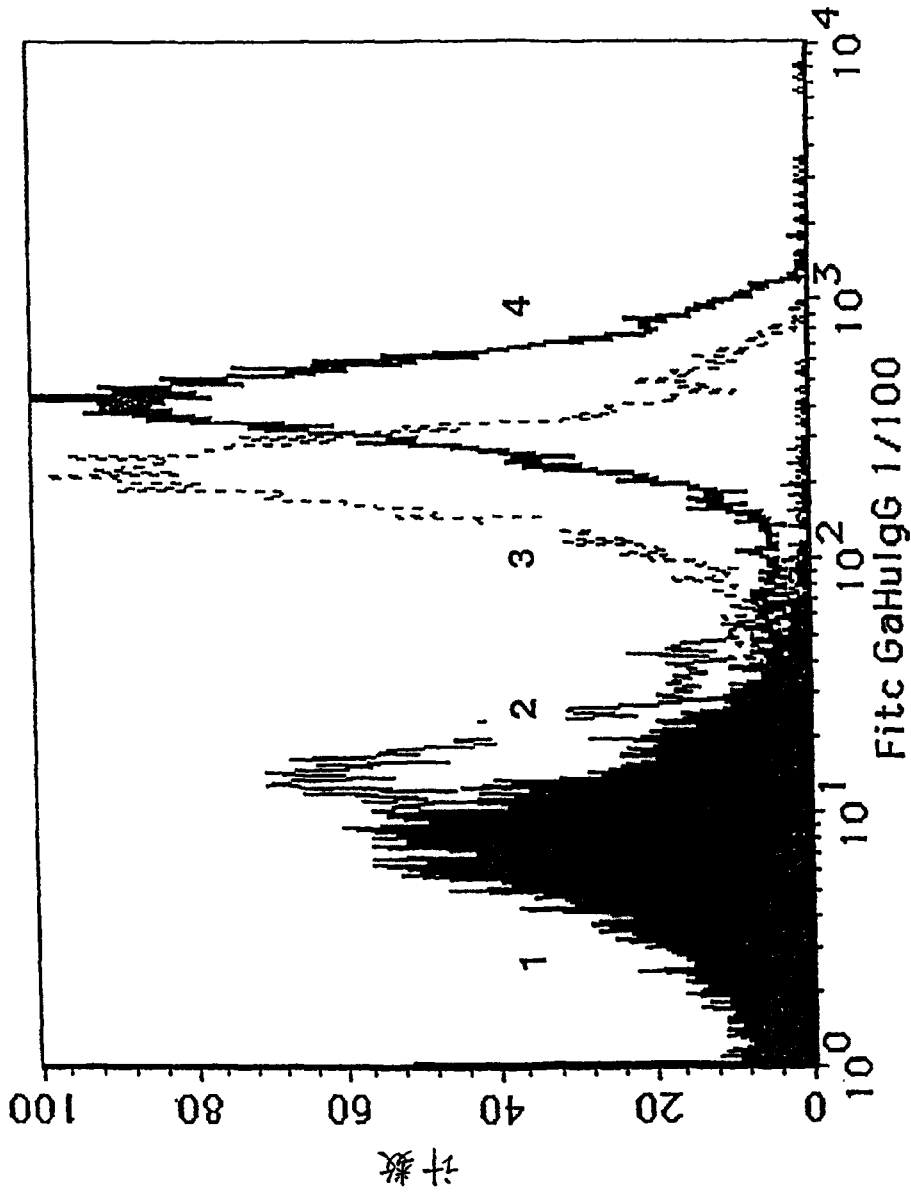


图 24

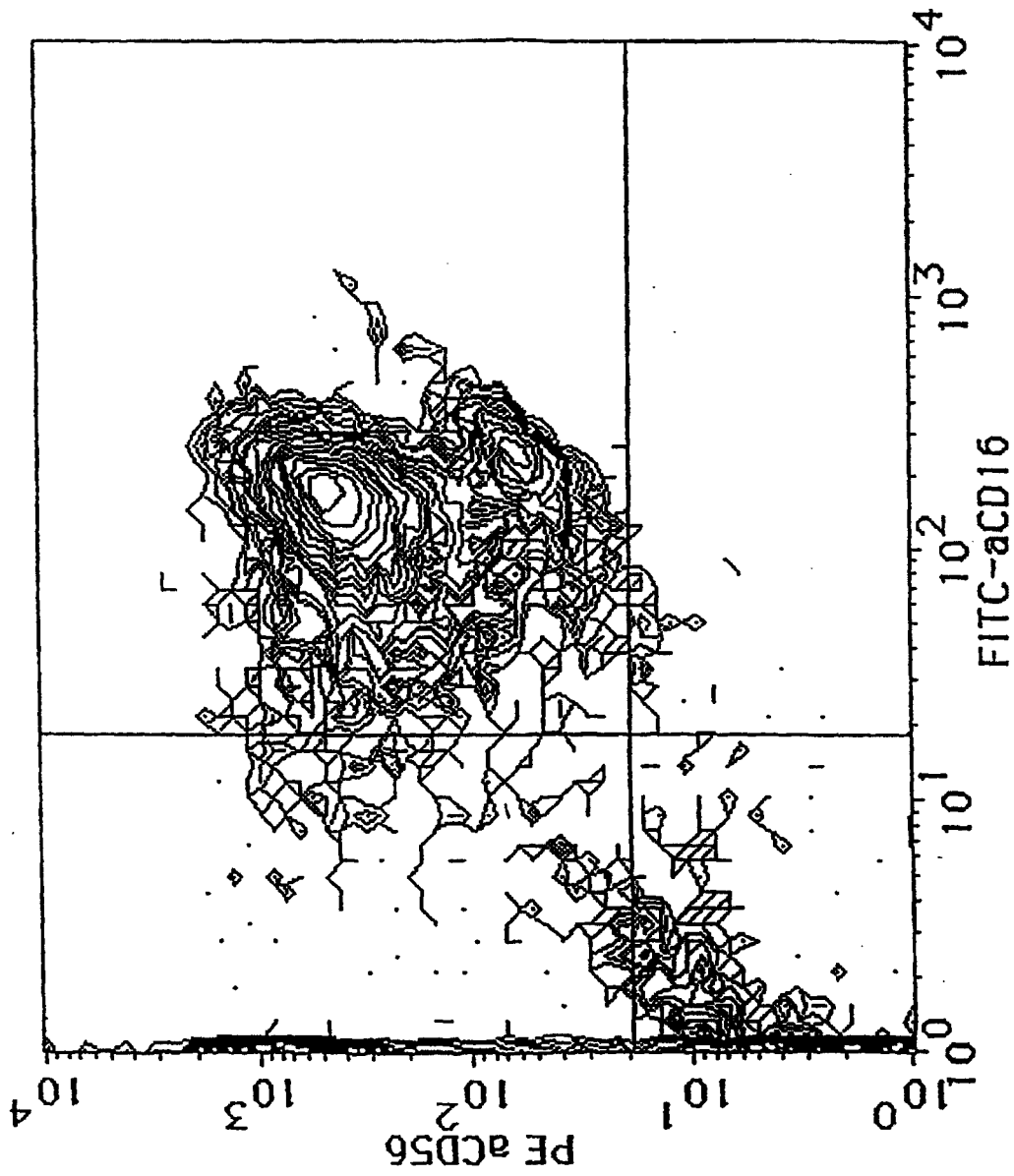


图 25

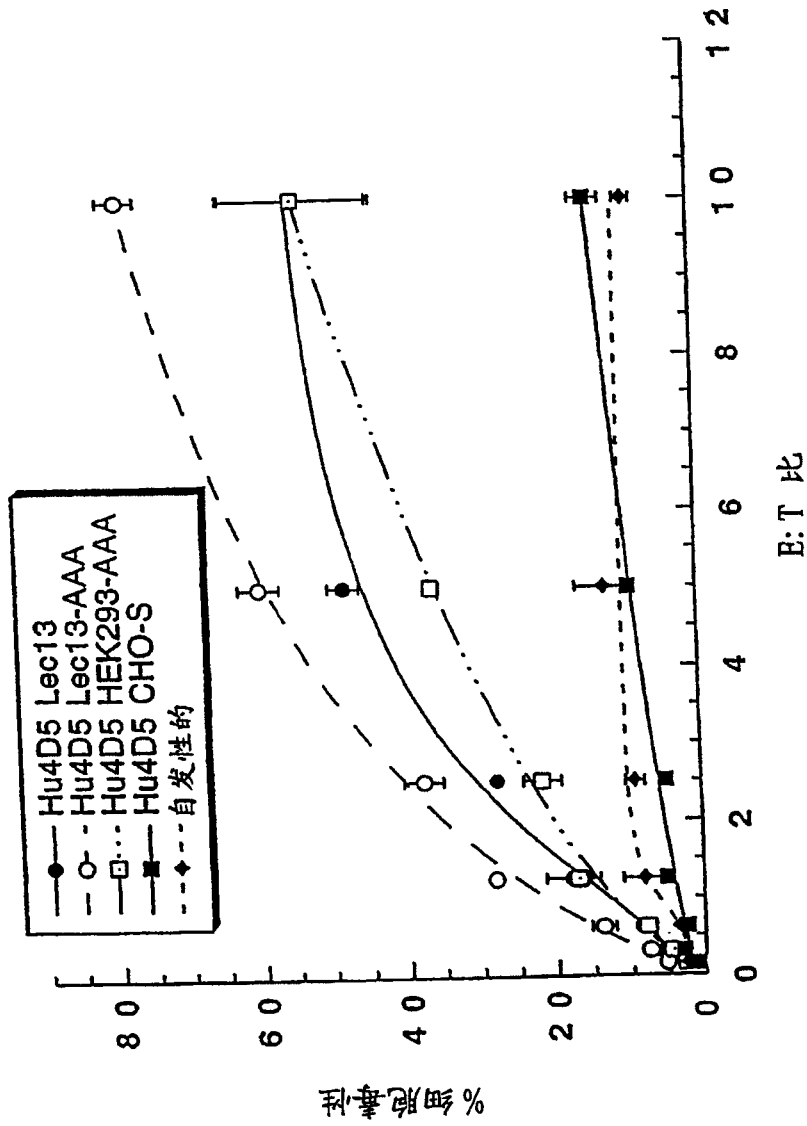


图 26

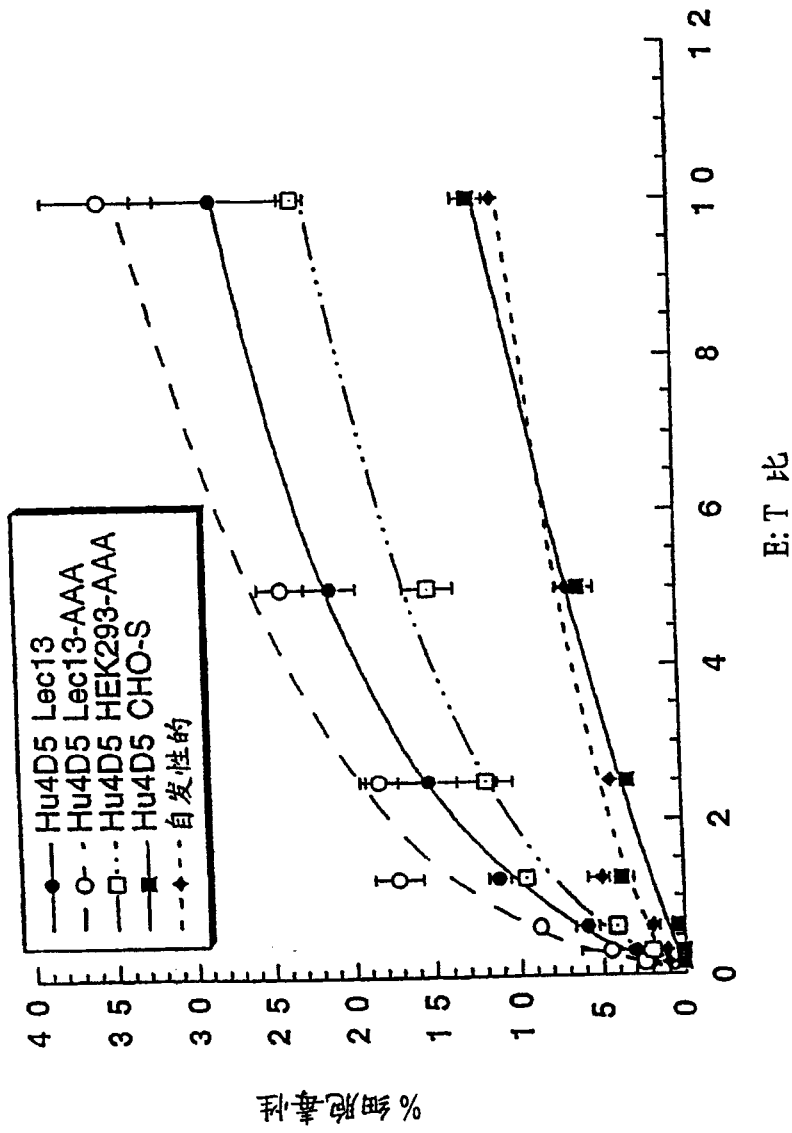


图 27

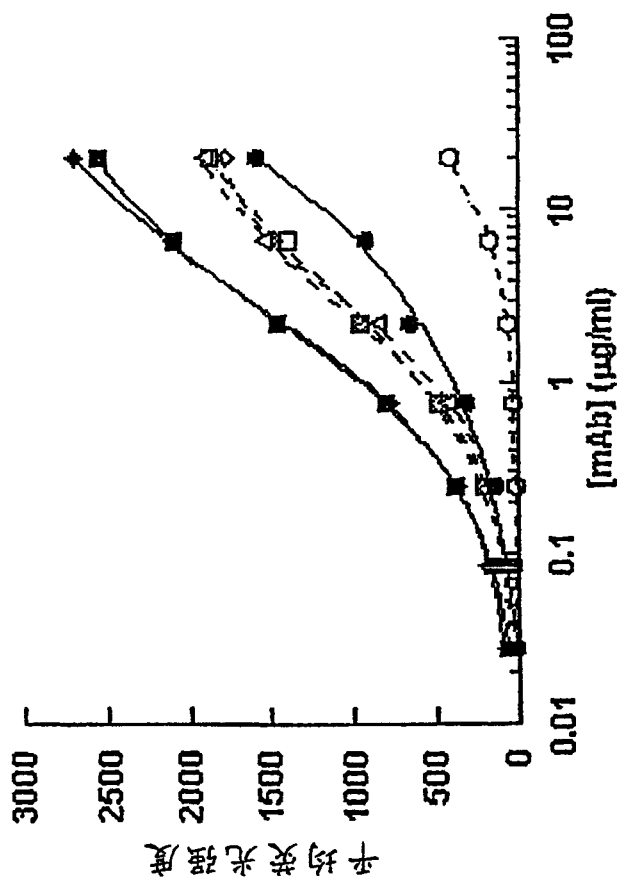


图 28