



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101484470 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 23

(21) 申请号 200680048006. X

(22) 申请日 2006. 10. 23

(30) 优先权数据

60/729, 054 2005. 10. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 06. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/041656 2006. 10. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/048077 EN 2007. 04. 26

(73) 专利权人 阿伊沃生物制剂有限公司

地址 美国马塞诸塞州

专利权人 健赞公司

(72) 发明人 丹尼尔·申德勒 哈里·M·米德

蒂莫西·埃德蒙兹 约翰·麦克弗森

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 刘晓东 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

C07K 16/04 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2004009618 A2, 2004. 01. 29, 82 页第
21-25 行、83 页 22-30 行、实施例 5.

EP 1400171 A1, 2004. 03. 24, 全文.

W0 2004050847 A2, 2004. 06. 17, 第 2 页
18-25 行、48 页第 9-11 行、表 3、实施例 1-2.

W0 2006088464 A2, 2006. 08. 24, 第 0015、
0016、0059、00127、00171、00144、00180、00189
段, 第 12 页 25-30 行.

AF Kolb et al. Virus-neutralizing
monoclonal antibody expressed in milk of
transgenic mice provides full protection
against virus-induced encephalitis.

《Journal of virology》. 2001, 第 75 卷 (第 6
期), 2803-2909.

Liu A et al. A comparison of herpes
simplex virus specific antibodies found
in human milk and serum. 《Pediatric
research》. 1992, 第 31 卷 (第 6 期), 表 1、593
页右栏第 57-60 行.

审查员 高欣

权利要求书 1 页 说明书 43 页

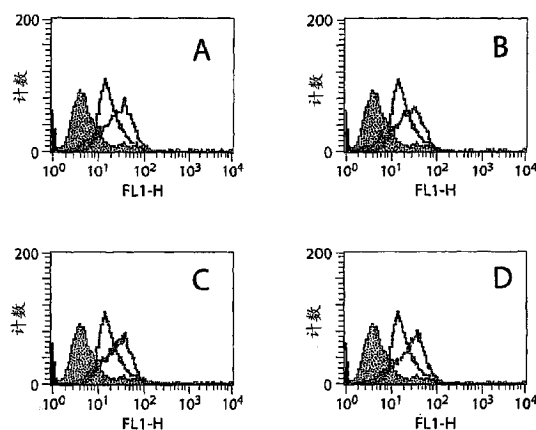
序列表 1 页 附图 14 页

(54) 发明名称

具有增强的抗体依赖性细胞毒性活性的抗体
及其生产方法和用途

(57) 摘要

本发明的一部分涉及具有提高的 ADCC 活性的抗体。本发明还提供了生产这些抗体的方法。本发明的抗体在乳腺上皮细胞中产生, 例如经改造在其乳中表达和分泌所述抗体的非人转基因动物的乳腺上皮细胞。所述抗体或包含所述抗体的组合物可用于治疗其中 ADCC 活性提供益处的疾病。因此, 在一个实施方案中, 所述抗体或包含所述抗体的组合物可用于治疗癌症、淋巴增生性疾病或自身免疫病。



1. 一种增强抗体 ADCC 活性的非治疗方法,其包括:

修饰抗体的糖基化,其中通过在哺乳动物乳腺上皮细胞中产生所述抗体来修饰所述糖基化,所述哺乳动物乳腺上皮细胞是经改造以在其乳中表达所述抗体的非人哺乳动物的细胞。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体的至少一条链中不含有岩藻糖。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体的一条链中不含有岩藻糖。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述抗体经修饰以使其含有甘露寡糖或额外的甘露寡糖。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体经修饰以使其含有甘露寡糖或额外的甘露寡糖。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体中的碳水化合物显示高甘露糖的糖基化模式。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体的至少一条链含有甘露寡糖并且是非岩藻糖基化的。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体的一条链含有甘露寡糖并且是非岩藻糖基化的。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体中的主要碳水化合物是非岩藻糖基化的。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述主要碳水化合物是非岩藻糖基化的甘露寡糖。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述主要碳水化合物是非岩藻糖基化的 Man5。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体经修饰以使该抗体中少于 40% 的碳水化合物含有岩藻糖。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体经修饰以使至少 30% 的所述抗体含有至少一个甘露寡糖。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述抗体为 IgG1 或 IgG2 抗体。

具有增强的抗体依赖性细胞毒性活性的抗体及其生产方法和用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U.S.C. § 119 要求 2005 年 10 月 21 日提交的美国临时申请序列号 60/729054 的优先权。其全部内容通过参考并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本申请的一些方面可能是使用来自国家癌症研究院 SBIR 基金号 5R43CA107608-02 的经费进行的。因此,政府可拥有本发明中的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及具有增强的抗体依赖性细胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 活性的抗体、其生产方法及其使用方法。

背景技术

[0006] 在疾病治疗的军火库中,单克隆抗体是一种重要的武器。例如,ADCC 是抗癌抗体有效性的主要贡献者。介导 ADCC 的关键受体是 Fc γ IIIa (CD16) 受体——一种表达于自然杀伤 (NK) 细胞上的针对 IgG 的低亲和力受体。缺乏此受体的小鼠对利妥昔 (rituximab) 单抗的抗肿瘤应答显著更低 (Clynes 等,2000, Nat. Med 6 :443-446)。在小鼠中, Fc γ IIIa 受体在介导肿瘤的细胞毒性中发挥作用 (Clynes 等,1998, PNAS 95 :652-656)。编码 Fc γ IIIa 受体的 FCGR3A 基因中 158 位缬氨酸代替苯丙氨酸的多态性更紧密的结合 IgG,赋予 NK 细胞以增强的 ADCC 活性 (Wu 等,1997, J Clin Invest 100 :1059-1070)。FCGR3A 基因的此基因型 --FCGR3A-158V/V-- 在应答于利妥昔单抗的非何杰金淋巴瘤 (Carton 等,2002, Blood 99 :754-758)、Waldenstrom' s 巨球蛋白血症 (Treon 等,2005, J Clin Oncol 23 :474-481) 以及自身免疫病系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) (Anolik 等,2003, Arthritis Rheum 48, 455-459) 患者中具有正效应。相同的多态性还与克罗恩病中对另一种抗体英利昔单抗 (infliximab) 的较好生物学应答相关 (Louis 等,2004, A Phar Ther 19 :511-519)。这些发现示例了 ADCC 在人类中单克隆抗体的治疗作用中发挥了重要的作用。因此提高治疗性抗体促进 ADCC 活性的能力具有潜在的治疗价值。

[0007] 人抗体具有两个糖基化位点,相同的重链上各有一个。使用糖基化和碳水化合物加工抑制剂的早先实验发现,在受到抑制的杂交瘤克隆中产生的抗体具有增强的 ADCC 活性 (Rothman,1989)。其它工作显示,抗体的糖基化状态和 ADCC 活性都受到产生该抗体的细胞系的影响 (Lifely,1995)。一些研究小组已经证明,在重链糖基化上缺乏 1,6-岩藻糖的抗体具有对 Fc γ RIII 受体增强的结合亲和力以及增强的 ADCC 活性 (Shields 等,2002 ; Shinkawa 等,2002)。另外,已经建立了对 Fc γ RIII 受体的结合亲和力与 ADCC 活性之间的相关性 (Okazaki,2004 ; Dall' Ozzo,2004)。

[0008] 已经建立了缺乏“FUT8”—— α -1,6-岩藻糖基转移酶 (其催化此岩藻糖的转移) 的细胞系。这些敲除细胞可用于产生具有较高 ADCC 活性的抗体。例如,已经建立了缺

乏 FUT8 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (Yamane-Ohnuki 等, 2004)。小干扰 RNA (siRNA) 也已经用于阻断 FUT8 基因的表达 (Mori 等, 2004)。大鼠细胞系已经用于产生具有增强的 ADCC 活性的抗体 (Niwa 等, 2004, 2005)。除了活性更高之外, 低岩藻糖 IgG1 不依赖于 Fc γ RIII 多态性, 由此缺乏野生型细胞中使用曲妥珠单抗 (trastuzumab) 或利妥昔单抗可见的差异 (Niwa 等, 2004b, vol 10 Clin Canc Res)。

[0009] 尽管之前已经在多种表达系统中产生了抗体, 但是从未认识到在哺乳动物的乳腺上皮细胞 (例如经改造在其乳中分泌所述抗体的转基因动物的哺乳动物乳腺上皮细胞) 中产生的抗体具有增强的 ADCC 活性。

发明内容

[0010] 已经发现, 与来源于细胞培养物的材料相比, 在哺乳动物乳腺上皮细胞 (例如经改造在其乳中分泌所述抗体的转基因动物的哺乳动物乳腺上皮细胞) 中产生的抗体具有增强的 ADCC 活性和增强的对 CD16 的结合。对乳来源抗体糖基化的研究显示, 在乳来源的抗体中岩藻糖含量较低。因此, 本文提供抗体及其组合物。所提供的抗体是在哺乳动物乳腺上皮细胞中产生的抗体。还提供了产生所述抗体的方法及其使用方法。

[0011] 具有增强的 ADCC 活性的抗体通过在哺乳动物乳腺上皮细胞中表达该抗体来产生。在一个实施方案中, 哺乳动物乳腺上皮细胞是经改造在其乳中表达抗体的转基因非人哺乳动物的乳腺上皮细胞。在另一个实施方案中, 所述乳腺上皮细胞是转染了编码抗体序列并能使所述抗体在乳腺上皮细胞中表达的核酸 (例如 DNA) 构建体的培养细胞。

[0012] 因此, 在本发明的一个方面中, 提供了包含乳腺上皮细胞来源抗体的组合物, 其中所述抗体具有增强的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性。在本发明的另一个方面中提供了包含乳来源抗体的组合物, 其中所述乳来源抗体具有增强的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性。在一个实施方案中, 所述抗体的 ADCC 活性是细胞培养物来源抗体的 ADCC 活性的至少两倍。在另一实施方案中, 所述抗体的 ADCC 活性是细胞培养物来源抗体的 ADCC 活性的至少 3 倍、4 倍、5 倍、7 倍或 10 倍。在一个实施方案中, 从其中获得乳来源抗体的乳是来自经改造以表达所述抗体的非人转基因哺乳动物的乳。

[0013] 根据本发明的一个方面, 如果 IgG1 抗体缺乏发现附着在 Fc 区 Asn297 糖基化位点的核心岩藻糖 (例如连接到二天线结构基部 (the base of the biantennary structure) 的岩藻糖), 那么所述抗体 Fc 区的结合增强。在一些方面中, 本发明的抗体缺乏此核心岩藻糖。在其它一些方面中, 乳产生的单克隆抗体主要是高甘露糖和杂合结构。一般地, 本发明的抗体可更紧密地结合 FcRIII 受体, 并且可导致增强的 ADCC。

[0014] 在本发明的另一个方面中, 所述抗体经修饰具有如本文所提供的糖基化模式, 因而具有增强的 ADCC 活性。所述修饰是产生所述抗体的结果, 使得它在本文所提供的哺乳动物乳腺上皮细胞中表达。

[0015] 所提供的组合物中的抗体就其糖基化而言可以是同质或异质的。

[0016] 在一个实施方案中, 所述抗体的至少一条链已经过修饰而不含有岩藻糖。在另一个实施方案中, 所述抗体的一条链已经过修饰而不含有岩藻糖。在另一实施方案中, 所述抗体的一条链或至少一条链不含有 1,6-岩藻糖。在又一个实施方案中, 所述抗体的至少一条链经修饰从而不含有岩藻糖, 而且该抗体还经过修饰从而含有甘露寡糖 (oligomannose)

或额外的甘露寡糖 (additional oligomannose)。所述含有甘露寡糖的链可以是不含有岩藻糖的同一链,但是并不必需如此。在另一个实施方案中,所述抗体的氨基酸序列经过修饰,然后在哺乳动物乳腺上皮细胞中表达。在一个实施方案中,所述抗体的氨基酸序列经过了修饰。在另一个实施方案中,所述抗体(例如抗 CD137 抗体)的氨基酸序列具有 Asn297 的氨基酸替换。在又一个实施方案中,所述替换是替换为一个不会被岩藻糖基化的氨基酸。在另一个实施方案中,Asn297 被替换为 Gln。

[0017] 在另一个实施方案中,所提供的抗体已经修饰而含有甘露寡糖或额外的甘露寡糖。在另一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得至少 30% 的所述抗体含有至少一个甘露寡糖。在另一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得至少 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或者更多的抗体含有至少一个甘露寡糖。在又一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得少于 50%、40%、30%、20%、10% 或更少的抗体在一条或至少一条链上不含有岩藻糖。在另一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得至少 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或者更多的抗体含有至少一个甘露寡糖,并且少于 50%、40%、30%、20%、10% 或更少的抗体在一条或至少一条链上含有岩藻糖。

[0018] 在另一个实施方案中,所述抗体的碳水化合物经过修饰以显示出高甘露糖的糖基化模式。在又一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得所述抗体的至少一条链含有甘露寡糖并且是非岩藻糖基化的。在又一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得抗体的主要碳水化合物是非岩藻糖基化的。在一个实施方案中,所述主要碳水化合物是非岩藻糖基化甘露寡糖。在另一个实施方案中,所述主要碳水化合物是非岩藻糖基化 Man5。在又一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得抗体中少于 40% 的碳水化合物含有岩藻糖。在又一个实施方案中,所述抗体经过了修饰使得抗体少于 30%、20%、10% 或更少的碳水化合物含有岩藻糖。在一个实施方案中,所述岩藻糖是 1,6-岩藻糖。在另一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得抗体中至少 60% 的碳水化合物是非岩藻糖基化甘露寡糖,并且所述抗体中少于 40% 的碳水化合物含有岩藻糖。在又一个实施方案中,所述抗体经过修饰以使得抗体中 63% 的碳水化合物是非岩藻糖基化甘露寡糖,所述抗体中 16% 的碳水化合物是含有核心岩藻糖的 G1F,并且所述抗体中 21% 的碳水化合物是含有核心岩藻糖的 G2F。

[0019] 本发明的另一个方面中,具有增强 ADCC 活性的抗体事实上不是由本文提供的手段修饰的,而是针对上述糖基化模式选择出来的抗体。

[0020] 在一个实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在另一个实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。在又一个实施方案中,所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。在另一个实施方案中,所述抗体是全长抗体。在又一个实施方案中,所述抗体是全长单链抗体。在又一个实施方案中,所述全长抗体包含重链和轻链。在又一个实施方案中,所述抗体是抗体片段。在又一个实施方案中,所述抗体片段是 Fc 融合多肽的一部分。

[0021] 在本发明的另一个方面中,所述抗体由转基因 DNA 构建体编码,所述构建体含有包含 N-连接寡糖的 Fc 区。在一个实施方案中,所述抗体产生于非人转基因动物的乳中。在又一个实施方案中,所述抗体具有如本文所述的糖基化模式。

[0022] 在一个实施方案中,所述抗体是 IgG、IgA 或 IgD 同种型。在又一个实施方案中,所述抗体是 IgG 同种型。在另一个实施方案中,所述抗体是 IgG1 或 IgG2 同种型。在又一个实施方案中,所述抗体是抗体片段。在本发明的另一个方面,提供了具有改进特征(例如

ADCC 特征)的本发明抗体的人源化形式。

[0023] 所述抗体可以抗任何抗原。在一个实施方案中,所述抗体是针对 CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD32B、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD59、CD74、CD80、CD126、CD138、CD137 或 GPIIbIIIa。在另一个实施方案中,所述抗体是针对 HM1.24、HLA-DR、MUC1、生腱蛋白(tenascin)、PIGF、VEGF、癌基因、癌基因产物、坏死抗原、17-A1 抗原、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1、GD3、神经节苷脂(ganglioside)或 TRAIL-R2。在一个实施方案中,所述抗体是抗 CD137 抗体。

[0024] 在本文所提供的任何组合物和方法中,所述抗体是抗 CD137 抗体。

[0025] 在一个实施方案中,包含所提供抗体的组合物可另外包含可药用载体。在另一个实施方案中,所提供的组合物可另外包含其它治疗剂。在一个实施方案中,所述其它治疗剂是抗癌剂或免疫调节剂。

[0026] 应该注意,本发明的一些实施方案包括药物组合物,所述药物组合物包含一定量的目的转基因蛋白、其药物前体或者所述化合物或所述药物前体的可药用盐,以及可药用赋形剂、稀释剂或载体。

[0027] 所提供的组合物可用于许多治疗方法。在本发明的一个方面,提供了治疗受试者的方法,其包括对受试者以在该受试者中有效增强 ADCC 的量施用本文所提供的组合物。在本发明的另一个方面,提供了治疗受试者的方法,其包括对此需要的受试者以有效治疗疾病的量施用本文所提供的组合物,所述疾病是受试者所患疾病或者有患病风险的疾病。在一个实施方案中,所述疾病是癌症。在一些实施方案中,本发明抗体可提供有益疗效的具体适应症包括治疗实体瘤;黑色素瘤;以及乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和肺癌。推测所述治疗可能是因为所述抗体会帮助提供有效的免疫调节治疗因而有效,但本发明并不受限于此。

[0028] 因此,具体靶标还可包括抗 CD3 抗体(例如非何杰金淋巴瘤;自身免疫病-SLE)、抗 CD16 抗体(例如 FcRIII)、抗 CD19(例如非何杰金淋巴瘤)、抗 CD20、抗 CD32B 抗体(例如 FcRIIB 和变态反应)、抗 CD30(例如何杰金病)、抗 GPIIbIIIa(例如血栓症)、抗 TNF- α (例如类风湿性关节炎和克罗恩病)、用于肿瘤内皮标志物的抗 TEM 抗体(例如用于控制血管发生-抗癌)等等。

[0029] 在另一个实施方案中,所述疾病是淋巴增生性疾病。在又一个实施方案中,所述疾病是自身免疫病。在本发明的另一个实施方案中,本发明的 ADCC 抗体在治疗自身免疫来源的脑-脊髓炎、系统性红斑狼疮、以及其它抗 CD137 可提供某些益处的疾病上是有效的。

[0030] 在一个实施方案中,施用给受试者的抗体量是约 0.01mg/kg/天至约 50mg/kg/天。

[0031] 在另一个实施方案中,还对所述受试者施用了其它治疗剂。在一个实施方案中,所述其他治疗剂是抗癌剂。在另一个实施方案中,所述其它治疗剂是免疫调节剂。在一个实施方案中,所述免疫调节剂是 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素、紫杉醇、TNF- α 或者其组合。在另一个实施方案中,还对受试者施用了 IL-2。在另一个实施方案中,还对受试者施用了 IL-12。在另一个实施方案中,还对受试者施用了抗癌剂和免疫调节剂。在一个实施方案中,还对受试者施用了免疫调节剂和曲妥珠单抗。在又一个实施方案中,还对受试者施用了 IL-21 和曲妥珠单抗。在一个实施方案中,乳腺上皮细胞来源的抗 CD137 抗体与 IL-21 和曲妥珠单抗联合使用。在另一个实施方案中,抗 CD137 抗体是

缺乏核心岩藻糖的高甘露糖抗体。因此,在一些实施方案中,所述抗体与免疫调节剂一起使用,所述免疫调节剂在缩小实体瘤及防止其复发方面是有效的。在另一些实施方案中,所述抗体与其它抗癌治疗剂(例如 IL-21、IL-12 和 / 或曲妥珠单抗)一起使用。

[0032] 所述受试者可以是任何期望 ADCC 活性的受试者。在一个实施方案中,所述受试者是人。在另一个实施方案中,所述受试者是狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊或灵长类。

[0033] 本文还提供了通过修饰抗体来产生 ADCC 活性增强的抗体的方法。这些方法包括通过在哺乳动物乳腺上皮细胞中产生所述抗体来修饰所述抗体的糖基化。在一个实施方案中,所述哺乳动物乳腺上皮细胞是经改造以在其乳中表达所述抗体的非人哺乳动物的细胞。在另一个实施方案中,所述哺乳动物乳腺上皮细胞是培养物中的哺乳动物乳腺上皮细胞。

[0034] 本发明的一个方面提供了产生转基因抗体及其变体和片段的方法,所述方法包括在非人转基因哺乳动物的乳中表达由核酸构建体编码的转基因抗体。在一个实施方案中,产生本发明抗体的方法包括:

[0035] (a) 用编码所期望转基因抗体的转基因 DNA 构建体转染非人哺乳动物细胞;

[0036] (b) 选择其基因组中已经插入所述转基因 DNA 构建体的细胞;和

[0037] (c) 实施第一次核移植操作,以产生对于所期望转基因抗体而言属杂合的非人转基因哺乳动物,所述抗体可在其乳中表达。

[0038] 在另一个实施方案中,所述方法包括:

[0039] (a) 提供经改造而表达抗体的非人转基因哺乳动物,

[0040] (b) 在所述非人转基因哺乳动物的乳中表达所述抗体;和

[0041] (c) 分离乳中所表达的所述抗体。

[0042] 在其它一些实施方案中,所述方法还包括诱导泌乳的步骤和 / 或测定所得抗体的 ADCC 活性的步骤。在又一些实施方案中,所述方法还包括额外的分离和 / 或纯化步骤。在又一些实施方案中,所述方法还包括比较所得抗体与细胞培养物中所产生抗体的 ADCC 活性的步骤。在另一些实施方案中,所述方法还包括比较所得抗体与非乳腺上皮细胞所产生抗体的 ADCC 活性的步骤。这些细胞可以是细胞培养物的细胞。

[0043] 在一些实施方案中,可通过从如本文所述产生的转基因动物的乳中收集所述抗体来获得所述抗体,或者从所述转基因动物的后代中收集。

[0044] 在一些实施方案中,由至少一个 β 酪蛋白启动子来驱动编码所期望抗体(或抗体融合多肽)的构建体。在另一些实施方案中,所述非人转基因哺乳动物是有蹄动物。在又一些实施方案中,所述非人转基因哺乳动物是山羊。

[0045] 在一些实施方案中,通过转基因哺乳动物产生的抗体以至少 1 克 / 升所产乳的水平产生。

[0046] 在又一个方面,提供了增强抗体 ADCC 活性的方法,其包括通过本文所述方法修饰所述抗体的糖基化。在一个实施方案中,所述抗体经修饰以使得所述抗体的至少一条链中不含有岩藻糖。在另一个实施方案中,所述抗体经修饰以使得所述抗体的一条链中不含有岩藻糖。在另一个实施方案中,所述抗体经修饰以使其含有甘露寡糖或额外的甘露寡糖。在另一个实施方案中,所述抗体经修饰以使其含有甘露寡糖或额外的甘露寡糖。

[0047] 在又一个实施方案中,所述抗体经修饰以使所述抗体的碳水化合物表现出高甘露

糖的糖基化模式。在一个实施方案中,所述抗体经修饰以使所述抗体的至少一条链中含有甘露寡糖并且是非岩藻糖基化的。在另一个实施方案中,所述抗体经修饰以使所述抗体的一条链含有甘露寡糖并且是非岩藻糖基化的。在又一个实施方案中,所述抗体经修饰以使所述抗体的主要碳水化合物是非岩藻糖基化的。在一个实施方案中,所述主要碳水化合物是非岩藻糖基化的甘露寡糖。在另一个实施方案中,所述主要碳水化合物是非岩藻糖基化 Man5。在又一个实施方案中,所述抗体经修饰以使所述抗体中少于 40% 的碳水化合物含有岩藻糖。在一个实施方案中,所述抗体经修饰以使所述抗体中少于 30%、20%、10% 或更少的碳水化合物含有岩藻糖。在又一个实施方案中,所述抗体经修饰以使至少 30% 的所述抗体带有至少一个甘露寡糖。在一个实施方案中,所述抗体经修饰以使至少 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多的所述抗体带有至少一个甘露寡糖。在又一个实施方案中,所述抗体经修饰以使至少 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多的抗体含有至少一个甘露寡糖并且少于 50%、40%、30%、20%、10% 或更少的抗体在一条链或至少一条链上含有岩藻糖。在另一个实施方案中,所述抗体经修饰以使抗体中至少 60% 的碳水化合物是非岩藻糖基化的甘露寡糖,并且所述抗体中少于 40% 的碳水化合物含有岩藻糖。在又一个实施方案中,所述抗体经修饰以使抗体中 63% 的碳水化合物是非岩藻糖基化的甘露寡糖,所述抗体 16% 的碳水化合物是含有核心岩藻糖的 G1F,以及所述抗体 21% 的碳水化合物是含有核心岩藻糖的 G2F。

[0048] 在本发明的又一个方面,提供了产生抗体的方法,其包括从经改造而在其乳中表达所述抗体的非人转基因哺乳动物的乳中收集所述抗体以及测定所述抗体的 ADCC 活性。在一个实施方案中,所述方法还包括比较所收集抗体与细胞培养物中所表达抗体的 ADCC 活性。在又一个实施方案中,所述非人转基因哺乳动物是山羊、绵羊、野牛、骆驼、牛、猪、兔、水牛、马、大鼠、小鼠或美洲驼 (llama)。

[0049] 在本发明的另一个方面,提供了产生抗体的方法,其包括从经改造以表达所述抗体的乳腺上皮细胞中收集所述抗体以及测定所述抗体的 ADCC 活性。在一个实施方案中,所述方法还包括比较所收集抗体与非乳腺上皮细胞中所表达抗体的 ADCC 活性。

[0050] 在本发明的又一个方面,提供了这样的方法,其包括按照本文所述方法获得抗体以及比较所述抗体与其它抗体组的 ADCC 活性。在一个实施方案中,所述其它抗体组是获得自细胞培养物的抗体。在另一个实施方案中,所述其它抗体组是获得自培养的非乳腺上皮细胞的抗体。在又一个实施方案中,所述其它抗体组是获得自培养的乳腺上皮细胞的抗体。在又一个实施方案中,所述其它抗体组是获得自体液或身体组织的抗体。在又一个实施方案中,所述其它抗体组是获得自哺乳动物乳的抗体。在一个实施方案中,所述哺乳动物是经改造以在其乳中表达所述其它抗体组的非人转基因哺乳动物。

[0051] 本发明的每个限定可包含本发明的多个实施方案。因此,预期本发明涉及任一要素或要素组合的每个限定可包含在本发明的每个方面中。

附图说明

[0052] 图 1 提供了糖基化抗 CD137 抗体的 N- 连接寡糖的 MALDI-TOF 谱。通过 PNG 酶 F 释放聚糖。图 1A 提供了小鼠乳来源抗体的图谱;图 1B 提供了细胞培养物来源抗体的图谱;图 1C 提供了山羊乳来源抗体的图谱。

[0053] 图 2 提供了通过使用荧光检测 (2-AA 标记的) 从糖基化抗体所释放寡糖的 HPLC 获得的寡糖图的比较。图 2A 提供了与小鼠乳来源抗体的比较;图 2B 提供了与使用 Endo H 处理过的小鼠乳来源抗体的比较;图 2C 提供了与细胞培养物来源抗体的比较;图 2D 提供了与使用 EndoH 处理过的细胞培养物来源抗体的比较;图 2E 提供了与山羊乳来源抗体的比较;图 2F 提供了与使用 Endo H 处理过的山羊乳来源抗体的比较。

[0054] 图 3 举例说明了释放自小鼠乳来源抗 CD137 抗体的主要寡糖的 Endo H 敏感性。用 Endo H 过夜处理来自图 2 的样品。图 3A 提供了小鼠乳来源抗体的结果;图 3B 提供了使用 Endo H 处理过的小鼠乳来源抗体的结果;图 3C 提供了细胞培养物来源抗体的结果;图 3D 提供了使用 Endo H 处理过的细胞培养物来源抗体的结果。

[0055] 图 4 显示抗体的伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A) 结合。将 A 蛋白纯化的抗体上样到 Con A 柱,用含 α 甲基甘露糖苷酶的缓冲液洗脱。以 280nm 处的吸光度监测级分。图 4A 显示 Con A 柱上糖基化抗 CD137 抗体的结果;图 4B 显示 Con A 柱上非糖基化抗 CD137 抗体的结果。

[0056] 图 5 证明了抗体与 786-0 细胞的结合。每种抗体的结合通过 FACS 分析进行测定,并覆盖了阴性对照抗体 (抗 2,4-二硝基苯酚 (dinitrophenol, DNP)) 和抗 HER2。图 5A 显示小鼠乳来源非糖基化 (aglycosylated) 抗体的结果;图 5B 显示小鼠乳来源糖基化抗体的结果;图 5C 显示细胞培养物来源糖基化抗体的结果;图 5D 显示山羊乳来源糖基化抗体的结果。

[0057] 图 6 举例说明在 ADCC 测定中通过乳来源抗体增强对 786-0 细胞的杀伤。方块:小鼠乳来源;倒三角:山羊来源;菱形:细胞培养物来源;圆形:非糖基化小鼠乳来源;空心方块:曲妥珠单抗;三角:抗 DNP 抗体。

[0058] 图 7 提供了用于抗体乳表达的转基因构建体的一般性示意图。目的基因替换了山羊 β 酪蛋白 (一种乳特异性基因) 的编码区。将 6.2kb 的启动子区与 IgG H 或 L 链的编码区连接,其后是非翻译的山羊 β 酪蛋白 3' 序列以及下游元件。黑色长方形:H 和 L 外显子;条纹长方形:基因组内含子;箭头:转录方向。

[0059] 图 8 提供了由转基因动物产生的抗体上存在或不存在的碳水化合物的分解。

[0060] 图 9 提供了一个生产方法实例的一般性示意图。

[0061] 图 10 举例说明了显示核心岩藻糖物理位置的抗体空间填充模型。

[0062] 图 11 证明了抗体与表达 CD137 的 CHO 细胞的结合。图 11A 提供了无 CD137 的 CHO 细胞的结果 (阴性对照);图 11B 提供了表达 CD137 的 CHO 细胞的结果。每张图上的实心曲线是用无关抗 DNP 抗体染色的。

[0063] 图 12 举例说明了在 ADCC 测定中通过乳来源抗体来增强对表达 CD137 的 CHO 细胞的杀伤。

[0064] 图 13 提供了 IgG1-sFcγRIIIa 结合的生物传感器分析结果。图 13A 显示来自山羊乳的抗体的结果;图 13B 显示来自小鼠乳的抗体的结果;图 13C 显示来自细胞培养物的抗体的结果;图 13D 显示来自小鼠乳的非糖基化抗体的结果。

[0065] 图 14 举例说明了包含具有增强 ADCC 活性的抗体的试剂盒。

[0066] 发明详述

[0067] 已经发现,转基因动物乳中所产生的抗体相对于通过体外细胞培养物产生的重组

抗体而言具有增强的 ADCC 活性。还已经评估了具有增强 ADCC 活性的抗体的糖基化模式。提供了乳腺上皮细胞中产生的抗体的组合物及其生产和使用方法。

[0068] 在本发明的一个方面中,所述抗体具有增强的 ADCC 活性。本文使用的“增强的 ADCC 活性”意为当通过改变其糖基化模式的方法产生时,抗体或其组合物所显示的 ADCC 活性高于当通过不改变其糖基化模式的方法产生时,或者高于通过本文提供的方法改变其糖基化模式之前所具有的 ADCC 活性水平。具有增强的 ADCC 活性的抗体包括在改变之前不显示任何 ADCC 活性的抗体。本文所使用的“糖基化模式”指存在于单种抗体或抗体组之上的碳水化合物组。可通过改变一种抗体或一组抗体的糖基化来实现对糖基化模式的改变。抗体组合物糖基化模式的改变旨在包括以下情况:单个抗体、组合物中的抗体亚组或者组合物中所有抗体发生了改变。可通过许多本领域已知的许多方法确定糖基化模式。例如,分析蛋白质上碳水化合物的方法描述于美国专利申请序列号 11/107982 和序列号 11/244826。分析蛋白质上碳水化合物的方法通过参考并入本文。

[0069] 糖基化对于治疗性糖蛋白的正确折叠、靶向、生物活性以及清除是重要的。随着例如转基因动物作为表达系统的开发,已经认识到不同的遗传背景导致了所产生蛋白质的不同表达和糖基化水平。从山羊乳中分离的转基因来源蛋白质的糖基化不同于从细胞培养物中收获的蛋白质的糖基化 (Denman 等,1991)。在转基因产生的人抗凝血酶中,糖基化的类型是位点依赖性的。岩藻糖基化、唾液酸化 (sialylated) 寡糖可见于 Asn96 和 Asn192 位置,而 Asn155 具有甘露寡糖 (Edmunds 等,1998)。位点依赖性糖基化还可见于小鼠乳中产生的 γ 干扰素中 (James 等,1995)。

[0070] 糖基化是能产生多种自然状态最终蛋白质形式的翻译后修饰。IgG 分子在 Fc 区中 CH2 结构域的 Asn₂₉₇ 残基处被糖基化。碳水化合物结构的某些改变也可影响抗体的功能或治疗有效性。例如,在例如类风湿性关节炎的疾病中,高于正常发生率的非半乳糖基化结构 (其似乎是 IgGFc 相关碳水化合物特异性的) 已有报道 (Parekh 等 1985 ;Rademacher 等 1988a)。已经提出,这种非糖基化结构比此区域通常所见的结构更易移动,因此可诱导糖蛋白四级结构的变化、促进所述抗体的免疫原性,或者其自身可对异常抗体功能有贡献 (Rademacher 等 1988b ;Axford 等 1992)。但是,在疾病状态下此结构仅是所观察到的众多糖型 (glycoform) 中的一种。

[0071] 在一些实施方案中,本文所提供的抗体具有至少两倍于非乳腺上皮细胞培养物来源抗体的 ADCC 活性。在其它一些实施方案中,所述抗体的糖基化通过所提供的方法进行修饰,经修饰抗体的 ADCC 活性是相同抗体的未修饰形式的至少两倍。在一些实施方案中,所述抗体具有至少 3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或 30 倍高的 ADCC 活性。所提供的抗体获得自在哺乳动物乳腺上皮细胞中的表达。在本文中这些抗体也称为乳腺上皮细胞来源抗体。在一些实施方案中,所述抗体获得自在非人转基因动物乳中的表达。在本文中这些抗体也被称为“乳来源抗体”。本文所使用的“转基因”指细胞,所述细胞包含了人工插入细胞或其祖先 (ancestor) 中并成为该细胞所发育出的动物基因组一部分的核酸分子。该术语也用于指代含有人工插入其细胞或基因组中的核酸分子的动物。

[0072] 一般地,在一些实施方案中,所述糖基化显示出高甘露糖的糖基化模式。本文所使用的“高甘露糖的糖基化模式”意指含有至少一个甘露寡糖的抗体,或者其中至少 30% 的所述抗体含有至少一个甘露寡糖的抗体组合物。在一些实施方案中,所述抗体中至少 30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%或者更多的碳水化合物是甘露寡糖。在一些实施方案中,所述抗体中至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或者更多的碳水化合物是非岩藻糖基化的甘露寡糖。在另一些实施方案中,所述抗体中少于 50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少的碳水化合物含有岩藻糖。在又一些实施方案中,所述抗体是低岩藻糖且高甘露寡糖的。因此,在另一些实施方案中,所述抗体中至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或者更多的碳水化合物是甘露寡糖,并且所述抗体中少于 50%、40%、30%、20%、10%或 5%的碳水化合物含有岩藻糖。因此在另一个实施方案中,所述抗体中至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或者更多的碳水化合物是非岩藻糖基化的甘露寡糖,并且所述抗体中少于 50%、40%、30%、20%、10%或 5%的碳水化合物含有岩藻糖。本发明的一个实施方案涉及具有增强的 ADCC 活性且重链不含有 1,6-岩藻糖的抗体。在一个实施方案中,如果抗体缺乏发现附着在 Fc 区 Asn297 糖基化位点上的核心岩藻糖(例如连接到二天线结构基部的岩藻糖),则增强了所述抗体 Fc 区与单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞上发现的 Fc γ RIII 受体的结合。

[0073] 在本文的实施例中描述了具有特定糖基化模式的其它一些抗体。如本文中所使用的,当讨论抗体的组合物时,所述组合物在糖基化方面可以是同质或异质的。

[0074] 可针对其结合受体或其它蛋白质(例如参与疾病过程和/或 ADCC 的蛋白质)的能力来选择所述抗体。所述抗体可以针对任何细胞标志物,其中提供针对该细胞标志物并具有 ADCC 活性的抗体会提供治疗益处。所述抗体包括可结合靶抗原(例如肿瘤细胞标志物)的抗体。细胞标志物实例及本文所考虑的示例性疾病包括:CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD32B、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD59、CD74、CD80、CD126、CD138、CD137 或 GPIIbIIIa。在一些实施方案中,所述抗体可以针对 HM1.24、HLA-DR、MUC1、生腱蛋白、PIGF、VEGF、癌基因、癌基因产物、坏死抗原、17-A1 抗原、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1、GD3 神经节苷脂或 TRAIL-R2。其它靶标包括:抗 CD3 抗体(例如非何杰金淋巴瘤;自身免疫病-SLE)、抗 CD16 抗体(例如 FcRIII)、抗 CD19(例如非何杰金淋巴瘤)、抗 CD20、抗 CD32B 抗体(例如 FcRIIB 和过敏)、抗 CD30(例如何杰金病)、抗 GPIIbIIIa(例如血栓症)、抗 TNF- α (例如类风湿性关节炎和克罗恩病)、用于肿瘤内皮标志物的抗 TEM 抗体(例如用于控制血管发生-抗癌)。一旦结合肿瘤细胞标志物,本发明的抗体可募集单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞来攻击肿瘤细胞。因此,具有增强的 ADCC 的抗体可被认为是能有效缩小实体瘤并阻止其复发的免疫调节剂。

[0075] 广泛的研究证明,通过其天然配体或激动性抗体刺激 CD137 增强了抗肿瘤应答,使得在多个模型中抑制已建立的小鼠肿瘤。CD137(也称为 4-1BB)是在数种淋巴细胞类型中表达的膜糖蛋白。已有报道针对小鼠 CD137 的激动性单克隆抗体在体内缩小小鼠肿瘤并且阻止其复发。通过其天然配体或激动性抗体刺激 CD137 可通过刺激肿瘤反应性效应 T 细胞和增强了调节性 NK 活性而增强体内抗肿瘤免疫应答。全身性单独施用或与其它治疗方式联合施用抗小鼠 CD137 单克隆抗体在小鼠中诱导了对大肿瘤的完全抑制,例如弱免疫原性的 AGF104A 肉瘤和高致瘤性的 P815 肥大细胞瘤,以及 EL4 胸腺瘤、K1735 黑色素瘤、B10.2 和 87 肉瘤、RENCA 肾癌、J558 浆细胞瘤、MCA205 肉瘤、JC 乳腺癌、MCA26 结肠癌和 GL261 神经胶质瘤。

[0076] 在本发明的一个实施方案中,可克隆抗 CD137 抗体并作为基因组“小基因(mini-gene)”在数个品系的转基因小鼠和山羊的乳中表达。此基因的表达处于山羊 β 酪蛋白调控元件的控制下。在小鼠和山羊中均已建立了所述抗体变体的实质性表达。在一个实施方案中,本发明提供了具有增强的 ADCC 活性并因此具有增强的治疗特性的抗 CD137 抗体。根据本发明并使用转基因动物产生的抗 CD137 抗体作为本发明的一个实例,开发了非人:人嵌合单克隆抗体(即小鼠:人)激动剂抗 CD137。预计抗 CD137 抗体的人源化可增强其用于接受免疫治疗的患者或者用于其它适应症的用途。基于所观察到的氨基酸序列同一性,将 VL 和 VH 区的互补决定区(complementary determining region, CDR)移植到人抗 DNA 相关独特型免疫球蛋白克隆上。通过竞争性 ELISA 观察到,与小鼠单克隆抗体相比,本发明的重组嵌合抗体显示出相似的生物活性谱。在测定时,所述抗 CD137 抗体在介导抗体依赖性细胞毒性和补体依赖性细胞毒性中都是有效的。预计本发明抗体序列的人源化会消除任何不需要的人抗小鼠抗体应答,允许对人重复进行静脉内施用。

[0077] 本文所使用的术语“抗体”指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,即包含由不同基因编码的两条相同 IgH 链和两条相同 L 链的共价异源四聚体。每条重链由重链可变区(本文缩写为 HCVR 或 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 构成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为 LCVR 或 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 构成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为被相对保守的区域(称为构架区/framework region, FR)分隔开的高变区(称为互补性决定区/complementarity determining region, CDR)。每个 V_H 和 V_L 区由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成,从氨基端至羧基端的排列顺序如下:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导该免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括与免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和经典补系统的第一成员(C1q)的结合。当两种蛋白质以化学计量性的量(stoichiometric quantity)表达并以正确的构型自组装时,可形成成熟的功能性抗体分子。

[0078] 术语抗体旨在包括其抗原结合片段。本文所使用的抗体的“抗原结合片段”指抗体中保持特异性结合抗原的能力的一个或多个部分。已经显示,抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来实现。包括在术语抗体的“抗原结合片段”中的结合片段实例包括:(i) Fab 片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的一价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含通过在铰链区的二硫桥相连的两个 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 由单个抗体臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段,(v) 由 V_H 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等,(1989)Nature341:544-546);以及(vi) 分离的互补性决定区(CDR)。另外,尽管 Fv 片段的两个结构域 V 和 V_H 由不同的基因编码,但是可以使用重组方法通过合成接头将它们相连,所述接头使得它们可以作为单个蛋白质链产生,其中 V_L 和 V_H 配对形成一价分子(称为单链 Fv(scFv);参阅如 Bird 等(1988)Science 242:423-426;和 Huston 等(1988)Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883)。这些单链抗体还旨在涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”之中。这些抗体片段使用常规操作获得,例如 J. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 98-118 页(N. Y. Academic Press 1983)(通过参考并入本文)中所述的蛋白水解性片段化操作以及本领域技术人员已知的其它技术。以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0079] 优选的抗原结合片段包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段和 Fv 片段 CDR3。在一个实施方案中,所述抗体片段是 Fc 融合多肽的一部分。例如,所述抗体片段是含有 N 连接寡糖的 Fc 区。

[0080] 本文所使用的“分离的抗体”指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。但是,特异性结合抗原的表位、同工型或变体的分离的抗体可能与其它相关抗原(例如来自其它物种的抗原)交叉反应。另外,分离的抗体可基本不含其它细胞材料和/或化学物质。本文所使用的“特异性结合”指结合预定抗原的抗体。通常,抗体结合的亲和力至少两倍于其结合除预定抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原的亲和力。因此,在一些实施方案中本文所提供的抗体特异性结合靶抗原。

[0081] 在一些实施方案中,所述抗体是 IgG、IgA 或 IgD 同种型。在另一些实施方案中,所述抗体选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、IgE,或者具有 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 或 IgE 的免疫球蛋白恒定和/或可变结构域。在另一些实施方案中,所述抗体是双特异性或多特异性抗体。在又一些实施方案中,所述抗体是重组抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体或嵌合抗体,或者其混合物。在一些实施方案中,所述嵌合抗体是非人(如小鼠、大鼠、兔)抗体部分与人抗体部分的遗传工程融合物。在一些实施方案中,所述嵌合抗体可含有约 33% 的非人蛋白质和 67% 的人蛋白质。就小鼠嵌合体而言,可开发它们以降低小鼠抗体所引发的 HAMA 应答,因为它们可以将小鼠抗体的特异性与人抗体的高效人免疫系统相互作用结合在一起。

[0082] 在其它一些实施方案中,所述抗体是重组抗体。本文所使用的术语“重组抗体”旨在包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的抗体,例如从转入了另一物种免疫球蛋白基因的动物中分离的抗体、使用转染进宿主细胞的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合抗体文库中分离的抗体,或者通过任何其它涉及将免疫球蛋白基因序列与其它 DNA 序列进行剪接的手段制备、表达、产生或分离的抗体。

[0083] 在其它一些实施方案中,所述抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。本文所使用的“嵌合抗体”指将小鼠可变区或高变区与人恒定区或恒定和可变构架区组合在一起的抗体。本文所使用的术语“人源化抗体”指只保留了与人构架区相关联的来自亲本抗体的抗原结合 CDR 的抗体(参见 Waldmann, 1991, Science 252:1657)。这些保留了小鼠抗体结合特异性的嵌合或人源化抗体预计在根据本发明以诊断、预防或治疗用途体内施用时期具有降低的免疫原性。

[0084] 在本发明的另一个实施方案中,所述抗体是具有提高的 ADCC 活性的人源化抗体。在一个实施方案中,此抗体是 CD137。人源化(也被称为改形(reshaping)或 CDR 移植)是用于降低来自异种来源(例如小鼠)的单克隆抗体免疫原性的成熟技术。可通过标准分子生物学技术生成人源化抗体。在一个实施方案中,这包括将啮齿动物互补性决定区(CDR)移植到人构架中。但是,此技术很大程度上是一种反复性方法,当设计人源化抗体时有多种要素参与:CDR 的长度、人构架以及将来自啮齿动物 mAb 的残基替换进入构架区(回复突变)。

[0085] 治疗性小鼠 mAb 对于人类应用经常是不理想的,因为 HAMA(人抗小鼠抗体, human anti-mouse antibody)应答中和了所述抗体,并且迅速将其从循环中清除,在最坏的情况下,还诱导严重的变应性超敏反应。已经开发了一些策略用于使用人序列替换大部分的小

鼠 Ig 序列,使得在保持效力的同时副作用更小。一种用于开发人治疗性 mAb 的策略是使用人的区域替换小鼠重链 (H) 和轻链 (L) 恒定区 (分别为 C_H 和 C_L),或者一般地替换非人链,以使所得的嵌合抗体除了抗原结合结构域仍为非人的之外主要由人 IgG 蛋白序列组成。此策略被用于开发美罗华(**Rituxan**)[®] (利妥昔抗人 CD20 单抗, Genentech),它是第一个在美国获得批准的单克隆抗体,用于治疗非何杰金淋巴瘤。据估计,提供带有人 C_H 和 C_L 序列的治疗性 mAb 将减少小鼠抗体蛋白约 90% 的免疫原性。

[0086] 根据本发明的一个方面,提供了非人:人嵌合单克隆抗体(即小鼠:人)抗 CD137 抗体。将小鼠抗体的 V_L 和 V_H 区的互补决定区(CDR)移植到人抗 DNA 相关独特型免疫球蛋白克隆上。通过竞争性 ELISA,本发明的重组嵌合抗体显示出与小鼠单克隆抗体类似的生物活性谱。所述抗 CD137 抗体在介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性中均有效。

[0087] 根据一个替代性实施方案,本发明的单克隆抗体可被修饰成双特异性抗体或者多特异性抗体的形式。术语“双特异性抗体”旨在包括任何具有两种不同结合特异性的物质(例如蛋白质、肽、或者蛋白质或肽的复合物),其与(a)细胞表面抗原和(b)效应细胞表面的 Fc 受体结合或相互作用。术语“多特异性抗体”旨在包括任何具有两种以上不同结合特异性的物质(例如蛋白质、肽、或者蛋白质或肽的复合物),其与(a)细胞表面抗原,(b)效应细胞表面的 Fc 受体,和(c)至少一种其它成分结合或相互作用。因此,本发明包括但不限于针对细胞表面抗原并针对效应细胞上 Fc 受体的双特异性、三特异性、四特异性以及其它多特异性抗体。术语“双特异性抗体”还包括双抗体(diabody)。双抗体是二价双特异性抗体,其中 V_H 和 V_L 结构域表达于单个多肽链上,但是使用了短到不允许同一条链上两个结构域之间配对的接头,由此迫使所述结构域与另一条链上的互补结构域配对,形成了两个抗原结合位点(参见,例如 Holliger, E, 等 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 :6444-6448 ; Poijak, R.J., 等 (1994) Structure 2 :1121-1123)。

[0088] 在一些实施方案中,所述抗体是人抗体。本文所使用的术语“人抗体”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。但是,本文所使用的术语“人抗体”不旨在包括其中将来源于另一种哺乳动物物种种系(如小鼠)的 CDR 序列移植到人构架区序列上的抗体(本文称之为“人源化抗体”)。使用带有人免疫系统部分而非鼠免疫系统部分的转基因小鼠产生人抗体。

[0089] 也可通过免疫针对大部分人免疫球蛋白重链和轻链基因座而言为转基因的小鼠来制备全人单克隆抗体。参阅如美国专利 5, 591, 669, 5, 598, 369, 5, 545, 806, 5, 545, 807, 6, 150, 584 以及其中所引参考文献,其内容通过参考并入本文。这些动物经过了遗传修饰,从而功能性缺失了内源(例如小鼠)抗体的产生。所述动物被进一步修饰以含有所有或部分人种系免疫球蛋白基因座,使得对这些动物进行的免疫产生抗目的抗原的全人抗体。在免疫这些小鼠(例如 XenoMouse (Abgenix)、HuMAb 小鼠 (Medarex/GenPharm))之后,根据标准杂交瘤技术制备单克隆抗体。这些单克隆抗体具有人免疫球蛋白氨基酸序列,因此在施用于人时不会激发人抗小鼠抗体(HAMA)应答。像本文所提供的其它抗体那样,人抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体或者单克隆抗体和多克隆抗体的混合物。

[0090] 在一些实施方案中,所述抗体是全长抗体。在一些实施方案中,所述全长抗体包含重链和轻链。

[0091] 产生多克隆抗体的操作是公知的。例如,通过对已取血以获得免疫前血清的新西兰白兔皮下施用抗原来产生抗体。可以在六个不同部位以总体积 100 μ l/ 部位注射所述抗原,通常有一个或多个调整。接着在初次注射两周后从所述兔子取血,每六周使用相同抗原定期加强 3 次。每次加强后十天收集血清样品。从血清中回收多克隆抗体,优选通过使用抗原捕获所述抗体的亲和层析来回收。用于产生多克隆抗体的这种操作及其它操作公开于 E. Harlow 等编辑, *Antibodies :A Laboratory Manual* (1988), 其通过参考并入本文。

[0092] 为了产生单克隆抗体,多次注射小鼠(参见上文),取出小鼠脾并重悬于磷酸缓冲盐水(PBS)中。脾细胞作为淋巴细胞的来源,其中的一些产生具有合适特异性的抗体。然后,将其与永生化骨髓瘤伴侣细胞融合,将融合产物铺在存在选择剂(例如 HAT)的多个组织培养孔中。然后通过 ELISA 筛选这些孔以鉴定含有产生有用抗体的细胞的孔。然后,重新铺板。在生长一段时间后,再次筛选这些孔以鉴定产生抗体的细胞。实施若干克隆操作直至超过 90% 的孔含有抗体产生为阳性的单克隆。在此操作中建立了产生所述抗体的稳定克隆系。然后可通过使用 A 蛋白琼脂糖的亲和层析、离子交换层析以及这些技术的变型和组合来纯化所述单克隆抗体(参阅如美国专利 6,998,467)。

[0093] 开发 mAb 产物的一种替代性策略是在转基因小鼠中产生所述抗体,在所述小鼠中整个天然 Ig 库已被替换为人 Ig 基因。这些小鼠产生全人抗体蛋白。以这种方式可产生嵌合、人源化或全人抗体,均为本发明的实施方案。这些抗体均会具有效应子功能,且可用于治疗癌症和癌损伤。本发明的嵌合抗体实施方案保留了原始的小鼠可变(抗原结合)序列,因此应保留其结合及功能特性。

[0094] 所述抗体可具有如本文任一处所述的糖基化模式,所述糖基化模式为抗体提供了或增强了 ADCC 活性。本发明包括所有产生具有如本文所提供的增强 ADCC 活性的抗体的方法。在一个实施方案中,所述方法包括产生全人单克隆抗体。在另一个实施方案中,所述方法包括使用转基因小鼠,或者其它非人动物受试者,它们的抗体基因被入基因替换,并且响应于目的抗原免疫而产生“人源化”抗体。在又一个实施方案中,可使用噬菌体展示来改造噬菌体,以在其表面展示全人单克隆抗体。通过上述任一方法产生的抗体可用于产生转基因动物。在一个实施方案中,这通过将编码所述抗体的 DNA 构建体插入转基因动物的基因组来进行。

[0095] 本发明的一个方面是转基因动物(包括小鼠和山羊)所产生的可包含大量含有甘露寡糖的抗体的乳。这些含有甘露寡糖的抗体具有增强的 ADCC 谱,并发挥单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞靶受体的优选靶标的功能。提供了用于重组产生本文所述抗体以使它们在哺乳动物乳腺上皮细胞中产生的方法。这可在细胞培养物中完成。这也可通过在转基因动物的乳中表达抗体来完成。

[0096] 在一个实施方案中,所述哺乳动物乳腺上皮细胞已被改造为在所述转基因动物(如小鼠或山羊)的乳中表达所述抗体。例如,此基因的表达处于山羊 β 酪蛋白调控元件的控制之下。在小鼠和山羊中均已建立了所述抗体的实质性表达。可通过共转染含有 H 和 L 链的不同构建体或者同时含有两条链的一种构建体来产生转基因动物。在一些实施方案中,两种转基因都插入到相同的染色体位点,使得所述基因一起转移到后代中,并且蛋白质

表达是受到共同调控。在一些实施方案中,针对产生乳蛋白的各个乳腺管上皮细胞对所述表达进行优化。所述动物可以是例如乳品动物(例如山羊和牛)或小鼠。

[0097] 例如,为了产生含有构建体(例如编码嵌合抗人 CD137)的原代细胞系以用于通过核移植产生转基因山羊,可将重链和轻链构建体转染进原代山羊皮肤上皮细胞,其进行了无性扩增并完全表征以评估转基因拷贝数、转基因结构完整性和染色体整合位点。本文所使用的“核移植”指将来自供体细胞的核移植到除去细胞核的卵母细胞中的克隆方法。

[0098] 目的蛋白质的编码序列可通过筛选基因组材料文库或者通过逆转录来自所选动物(如牛或小鼠)的信使 RNA 得到、从例如 NCBI、Genbank 的序列数据库得到或者通过获得抗体序列得到等。可将所述序列克隆进合适的质粒载体,并在合适的宿主生物(例如大肠杆菌)中扩增。在扩增所述载体之后,可切下 DNA 构建体,将其从载体的其余部分中纯化出来,并引入到可用于产生转基因动物的表达载体中。所述转基因动物将具有整合进其基因组中的期望的转基因蛋白。

[0099] 在扩增所述载体之后,可将所述 DNA 构建体与合适的 5' 和 3' 控制序列一起切下,将其从载体的其余部分中纯化出来,并用于产生转基因动物,所述转基因动物具有整合进其基因组中的期望的非糖基化相关转基因蛋白。相反,使用一些载体(例如酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC))时,不需要将组装的构建体从载体中移出;在这些情况下所扩增的载体可直接用于产生转基因动物。所述编码序列可与使该编码序列能够在非人转基因哺乳动物的乳中表达的控制序列有效连接。

[0100] 适于将产生导向至转基因动物乳中的 DNA 序列可携带来自天然来源乳蛋白的 5' 启动子区。由此该启动子处于激素和组织特异性因子的控制之下,在泌乳的乳腺组织中活性最高。在一些实施方案中,所述启动子是山羊 β 酪蛋白启动子。所述启动子可与指导蛋白质前导序列产生的 DNA 序列有效连接,所述前导序列指导转基因蛋白穿过乳腺上皮细胞分泌到乳中。在一些实施方案中,可添加来源于天然分泌乳蛋白的 3' 序列以改善 mRNA 的稳定性。

[0101] 本文所使用的“前导序列”或“信号序列”是编码蛋白质分泌信号的核酸序列,其在与编码转基因蛋白的下游核酸分子有效连接时指导分泌。所述前导序列可以是天然人前导序列、人工来源的前导序列,或者可得自与用于指导转基因编码序列转录的启动子相同的基因,或者来自通常从细胞(例如哺乳动物乳腺上皮细胞)中分泌出来的另一个蛋白质。

[0102] 在一些实施方案中,所述启动子是乳特异性启动子。本文所使用的“乳特异性启动子”是天然地指导基因在将蛋白质分泌进乳的细胞(如乳腺上皮细胞)中表达的启动子,并包括如酪蛋白启动子如 α 酪蛋白启动子(如 α S-1 酪蛋白启动子和 α S2-酪蛋白启动子)、 β 酪蛋白启动子(如山羊 β 酪蛋白基因启动子(DiTullio BIOTECHNOLOGY 10: 74-77, 1992)、 γ -酪蛋白启动子、 κ -酪蛋白启动子、乳清酸性蛋白(whey acidic protein, WAP)启动子(Gorton 等, BIOTECHNOLOGY 5:1183-1187, 1987)、 β -乳球蛋白启动子(Clark 等, BIOTECHNOLOGY 7:487-492, 1989)和 α 乳白蛋白启动子(Soulier 等, FEBS LETTS. 297: 13, 1992)。此定义中还包括在乳腺组织中特异性激活的启动子,例如小鼠乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)的长末端重复(long terminal repeat, LTR)启动子。

[0103] 如本文所使用的,当编码序列和调控序列以下述方式共价连接时被称为“有效连接”,所述方式使得该编码序列的表达或转录处于该调控序列的影响或控制之下。为了使编

码序列翻译成功能性蛋白质,将编码序列与调控序列有效连接。如果诱导 5'调控序列中的启动子引起编码序列转录并且两个 DNA 序列间的连接性质不出现下述情况,那么两个 DNA 序列被称为有效连接,所述情况为:(1) 引入移码突变,(2) 干扰启动子区指导编码序列转录的能力,或者(3) 干扰相应 RNA 转录物翻译成蛋白质的能力。因此,如果启动子区能够实现 DNA 序列的转录以使所得转录物可翻译成期望的蛋白质或多肽,则所述启动子区与编码序列有效连接。

[0104] 本文所使用的“载体”可以是多种核酸中的任一种,在所述核酸中可通过限制性处理及连接来插入期望的序列,用于在不同遗传环境之间进行运送或者用于在宿主细胞中进行表达。尽管 RNA 载体也可以使用,但是载体通常由 DNA 组成。载体包括但不限于质粒和噬粒。克隆载体是能够在宿主细胞中复制的载体,并且进一步表征为一个或多个核酸内切酶限制性位点,在这些位点处可以以预定的方式切割所述载体,并可连接进期望的 DNA 序列,以使新的重组载体保留在宿主细胞中复制的能力。在质粒的情况下,所期望序列的复制可随着质粒在宿主细菌中拷贝数的增加而发生许多次,或者可随着宿主通过有丝分裂增殖而每个宿主仅发生一次。在噬菌体的情况下,复制可在溶解期主动发生,或者在溶原期被动发生。表达载体是可通过限制性处理和连接将期望的 DNA 序列插入其中,以使所述 DNA 序列与调控序列有效连接并可表达为 RNA 转录物的载体。载体可另外含有一个或多个适用于鉴定细胞是否已被所述载体转化或转染的标记序列。标记包括如编码提高或降低对抗生素或其它化合物的抗性或敏感性的蛋白质的基因、编码其活性可通过本领域已知的标准测定检测的酶(例如 β 半乳糖苷酶或碱性磷酸酶)的基因,以及可见地影响所转化或转染细胞、宿主、集落或菌斑表型的基因。优选载体是能够自主复制并表达与其有效连接的 DNA 区段中存在的结构基因产物的载体。

[0105] 本发明的一个方面提供了产生转基因抗体及其变体和片段的方法,所述方法包括在非人转基因哺乳动物的乳中表达由核酸构建体编码的转基因抗体。在一个实施方案中,产生本发明抗体的方法包括:

[0106] (a) 用编码期望的转基因抗体的转基因 DNA 构建体转染非人哺乳动物细胞;

[0107] (b) 选择其基因组中已经插入所述转基因 DNA 构建体的细胞;和

[0108] (c) 实施第一次核移植操作以产生就所期望的转基因抗体而言为杂合的、并能将其在乳中表达的非人转基因哺乳动物。

[0109] 在另一个实施方案中,所述方法包括:

[0110] (a) 提供经改造而表达抗体的非人转基因哺乳动物,

[0111] (b) 在所述非人转基因哺乳动物的乳中表达所述抗体;和

[0112] (c) 分离乳中所表达的所述抗体。

[0113] 这些方法还可包括诱导泌乳的步骤以及确定所得抗体的 ADCC 活性的步骤。所述方法还可包括额外的分离和/或纯化步骤。所述方法还可包括将所得抗体的 ADCC 活性与细胞培养物中所产生的抗体进行比较的步骤。在一些实施方案中,可将所得抗体的 ADCC 活性与非乳腺上皮细胞所产生的抗体进行比较。这些细胞可以是细胞培养物的细胞。用于评估所述抗体 ADCC 活性的实验技术可以是本领域技术人员已知或本文提供的任何技术,例如下文实施例中的技术。在一些实施方案中,可通过从如本文所述产生的转基因动物的乳中或者从所述转基因动物的后代收集抗体来获得所述抗体。

[0114] 在一些实施方案中,通过至少一个 β 酪蛋白启动子来驱动编码所期望抗体(或抗体融合多肽)的构建体。在另一些实施方案中,所述非人转基因哺乳动物是有蹄动物。在又一些实施方案中,所述非人转基因哺乳动物是山羊。

[0115] 在一些实施方案中,通过转基因哺乳动物产生的抗体以至少 1 克/升所产乳的水平产生。

[0116] 也可根据本领域已知的方法产生能够重组表达抗体的转基因动物(参见如美国专利号 5,945,577)。适于转基因表达的动物包括但不限于山羊、绵羊、野牛、骆驼、牛、猪、兔、水牛、马、大鼠、小鼠或美洲驼。合适的动物还包括牛、山羊、绵羊和猪,其分别涉及多个物种的牛、山羊、绵羊和猪。合适的动物还包括有蹄动物。本文所使用的“有蹄动物”是或者涉及有蹄的通常食草的四足哺乳动物,其包括但不限于绵羊、猪、山羊、牛和马。在一个实施方案中,通过用含有重链和轻链的独立载体共转染原代细胞来产生所述动物。然后将这些细胞用于核移植。或者,如果使用显微注射产生所述转基因动物,共注射所述构建体。如果在一个实施方案中需要改变糖基化水平,那么可使用定点诱变。

[0117] 克隆将得到多种转基因动物,每种能够产生抗体或其它目的基因构建体。生产方法包括使用所克隆的动物及其后代。在一些实施方案中,所克隆动物是猪、牛或小鼠。克隆还包括胚胎核移植、核移植、组织和器官移植以及产生嵌合体后代。

[0118] 克隆方法的一个步骤包括将含有目的转基因的细胞基因组移植到去掉核的卵母细胞中。本文所使用的“转基因”指任一段人工插入到细胞或其祖先中的核酸分子,并且其成为细胞所发育成的动物基因组的一部分。这样的转基因可包括对转基因动物来说部分或完全外源(即外来的)的基因,或者可代表与动物内源基因具有同一性的基因。

[0119] 卵母细胞的合适的哺乳动物来源包括山羊、绵羊、牛、猪、兔、豚鼠、小鼠、仓鼠、大鼠、非人灵长类等。优选地,卵母细胞获得自有蹄动物,最优选山羊或牛。分离卵母细胞的方法是本领域公知的。基本上,所述方法包括从哺乳动物(例如山羊)的卵巢或生殖道分离卵母细胞。方便可用的有蹄动物卵母细胞来源是激素诱导的雌性动物。为了成功应用例如遗传工程、核移植和克隆的技术,卵母细胞在其用作核移植的受体细胞之前和由精细胞受精发育成胚胎之前可以在体内成熟。已在体内成熟的减数分裂 II 期卵母细胞已成功地用于核移植技术。基本上,在发情期开始后数小时或者注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)或类似激素后数小时,通过手术从非超排卵或超排卵动物中收集成熟的减数分裂 II 期卵母细胞。

[0120] 用于预测重组蛋白在乳腺中表达的质和量的一个工具是通过诱导泌乳来实现(Ebert KM, 1994)。诱导泌乳允许从转基因产生的早期开始表达和分析蛋白质,而不是从至少一年后怀孕所导致的第一次天然泌乳开始。诱导泌乳可通过激素或手动进行。多种泌乳操作(尤其是激素诱导泌乳)有可能影响乳腺中糖基化转移酶的转录调控。除了 NeuGc 含量之外,来自多个所克隆动物泌乳样品的 N 连接寡糖是相似的。来自天然泌乳的转基因抗体生产中的碳水化合物含有比其它泌乳操作更多量的 NeuGc,尽管来自不同泌乳的样品中总唾液酸含量相当。类似地,山羊乳中产生的转基因蛋白看来也由各个蛋白质种类的复杂混合物组成(Zhou, 2005)。

[0121] 在体外分析从来自每个品系的合并乳样品中分离的 A 蛋白纯化的 IgG 级分,以表征抗体结合特异性和亲和力以及 T 细胞增殖的剂量依赖性增强。在一个实施方案中,是原

始 GW mAb 的乳来源糖基化和非糖基化嵌合制备物。

[0122] 建立了具有正常生长和繁殖特征以及合理的生物活性抗体水平 ($> 1\text{mg/ml}$) 的健康转基因小鼠。在带有给定构建体的小鼠生产可以是在如山羊或牛的物种中大规模产生的前提。嵌合抗 CD137 的产生和表征引起在小鼠模型中测试一种或多种这些制备物以证明体内抗肿瘤活性。其后,糖基化和非糖基化嵌合抗体构建体均用于产生在其乳中表达抗 CD137 的转基因山羊。

[0123] 通过转基因技术修饰动物基因组的能力为生产具有修饰的糖基化模式的重组蛋白提供了新的替代方法。在转基因农场动物的乳中产生人重组药物解决了许多与微生物生物反应器相关(例如缺乏翻译后修饰、不正确的蛋白质折叠、高纯化成本)或与动物细胞生物反应器相关(例如高成本、培养基昂贵、低产率)的问题。在一些实施方案中,本发明包括抗体的转基因生产在优化抗体分子糖基化模式的期望基因因为纯合的转基因动物乳中的用途。

[0124] 根据本发明的另一个实施方案,靶分子的糖基化模式可以例如通过改变非人哺乳动物的喂食来修饰(Kerr 等,2003)。

[0125] 本发明还提供了生产抗体的方法,其包括从经改造以在其乳中表达所述抗体的转基因非人动物的乳中收集所述抗体,以及测定所述抗体的 ADCC 活性。在一些实施方案中,将其 ADCC 活性与细胞培养物中所表达抗体的 ADCC 活性进行比较。在另一个实施方案中,从经改造以表达所述抗体的培养的乳腺上皮细胞中收集抗体,并测定所述抗体的 ADCC 活性。在一些实施方案中,将其 ADCC 活性与细胞培养物中所表达抗体的 ADCC 活性进行比较。在一些实施方案中,所述细胞培养物中的细胞是非乳腺上皮细胞。用于评估 ADCC 活性的测定在下文实施例中提供,并且也是本领域已知的。

[0126] 本文所使用的术语“基本上纯的”指蛋白质基本不含其它物质,其程度使其预期用途可行且适当。特别地,所述蛋白质是充分纯的并且充分地不含宿主细胞的其它生物成分,以使得可用于例如蛋白质测序或生产药物制剂。因此,在一些实施方案中,所述抗体是基本上纯的。

[0127] 本文中就多肽而言所使用的“分离的”指从其天然环境中分离,并且以足以允许其鉴定或应用的量存在。当指蛋白质或多肽时,分离的意为,例如:(i) 通过表达克隆选择性产生或者(ii) 通过如层析或电泳进行纯化。分离的蛋白质或多肽可以是(但不必然是)基本上纯的。由于在药物制剂中分离的多肽可以与可药用载体混合,因此所述多肽可只占该制剂的一小部分重量百分比。无论怎样,所述多肽是都分离的,因为它已经与在活系统中可与之相关的物质分离开,即从其它蛋白质中分离。因此,在一些实施方案中,所述抗体是分离的。

[0128] 所述抗体表现出增强的 ADCC 活性,ADCC 活性是在治疗中成功应用单克隆抗体的重要因素。同时结合本发明抗体的恒定或 Fc 区可诱导生物应答。这些应答之一是在靶细胞中诱导细胞凋亡或 ADCC。ADCC 通过 Fc 区与 Fc γ 受体的结合起作用,所述受体位于单核细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞的表面。一旦结合所述受体,这些细胞就被活化并释放细胞因子和可杀伤靶细胞(含有抗原靶标的细胞)的氧化自由基。

[0129] 因此,在一个方面,本发明涉及具有增强的 ADCC 活性并因此具有增强治疗特性的抗体制剂。所提供的组合物可用于治疗 ADCC 活性会赋予至少某些医学益处的受试者。因

此,所提供的组合物可用于治疗患病的受试者。在一些实施方案中,所述抗体可用于通过施用该抗体来增强受试者中的 ADCC 活性,从而治疗受试者。

[0130] 本文所使用的术语“治疗”包括阻止性(例如预防性)和姑息性治疗。

[0131] 所提供组合物可提供有益疗效的具体适应症包括癌症,例如对实体瘤、黑色素瘤以及乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肾癌、前列腺癌和肺癌的有效免疫调节治疗。

[0132] 本文所使用的“癌症”指干扰身体器官和组织的正常功能的细胞非受控生长。从原发部位转移并波及重要器官的癌症可通过患病器官的功能性衰退最终导致该受试者死亡。癌症包括何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、蕈样肉芽肿/塞扎里综合征、组织细胞增多病 X、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom's 巨球蛋白血症、冷球蛋白血症和重链病。造血系统癌症(例如白血病)能够在竞争中胜过受试者中正常的造血对应物,由此导致造血障碍(为贫血、血小板减少和嗜中性粒细胞减少的形式),最终导致死亡。

[0133] 转移是由于癌细胞从原发肿瘤传播到身体其它部分而产生的不同于原发肿瘤部位的癌细胞区域。在诊断原发肿瘤块时,可监测受试者中转移的存在情况。除了监测具体症状以外,最经常通过单独或联合使用磁共振成像(MRI)扫描、计算机断层(CT)扫描、血及血小板计数、肝功能研究、胸部 X 射线和骨扫描来检测转移。

[0134] 本文所使用的癌症包括下述癌症类型:乳腺癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌(包括成胶质细胞瘤和成神经管细胞瘤)、宫颈癌、绒膜癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、白血病、血液瘤(包括急性淋巴细胞白血病和髓性白血病)、T 细胞急性淋巴母细胞白血病/淋巴瘤、毛细胞白血病、慢性髓性白血病、多发性骨髓瘤、AIDS 相关白血病和成人 T 细胞白血病淋巴瘤、上皮内瘤(包括鲍恩病和佩吉特病)、肝癌、肺癌、淋巴瘤(包括何杰金病和淋巴细胞性淋巴瘤)、成神经细胞瘤、口癌(包括扁平上皮细胞癌)、卵巢癌(包括发生于上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞的癌)、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤(包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤)、皮肤癌(包括黑色素瘤、卡波西肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌)、睾丸癌(包括生殖细胞瘤例如精原细胞瘤、非精原细胞瘤(畸胎瘤、绒膜癌)、基质癌和生殖细胞癌;胸腺癌(包括胸腺腺癌和髓癌)以及肾癌(包括腺癌和肾母细胞瘤)。其它癌症是本领域技术人员已知的,包括肥大细胞瘤、胸腺瘤、浆细胞瘤和神经胶质瘤。

[0135] 本发明的组合物也可用于治疗免疫疾病。“免疫疾病”包括成人呼吸窘迫综合征、动脉硬化、哮喘、静脉硬化、胆囊炎、硬化病、克罗恩病、糖尿病、肺气肿、嗜酸性粒细胞增多症(hypereosinophilia)、炎症、肠易激综合征、多发性硬化、重症肌无力、心肌炎或心包炎、骨关节炎、骨质疏松症、胰腺炎、类风湿性关节炎、硬皮病和结肠炎(参见如美国公开专利申请 2003/0175754)。

[0136] 本发明的组合物还可用于治疗自身免疫病,包括但不限于系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、糖尿病、炎症肠病、乳糜泻、自身免疫性甲状腺疾病、阿狄森氏病、Sjogren 综合征、小舞蹈症(Sydenham's chorea)、高安动脉炎、韦氏肉芽肿病、自身免疫性胃炎、自身免疫性肝炎、皮肤自身免疫病、自身免疫性扩张性心肌病、多发性硬化、心肌炎、重症肌无力、恶性贫血、多肌痛、银屑病、急进性肾小球肾炎、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、脉管炎、肌肉自身免疫病、睾丸自身免疫病、卵巢自身免疫病和眼自身免疫病。

[0137] 在另一个实施方案中,具有增强 ADCC 活性的抗体在治疗自身免疫所产生的脑脊髓炎、系统性红斑狼疮及其它疾病方面是有效的。

[0138] 本文所提供的抗体可与其他治疗剂组合。可同时或依次施用所述抗体和其它治疗剂。当所述其它治疗剂同时施用时,它们可以在相同或不同制剂中施用,但是在同一时间施用。当所述其它治疗剂与所述抗体的施用在时间上分开时,所述其它治疗剂彼此依次施用,并与所述抗体依次施用。这些化合物的施用之间的时间间隔可以是数分钟或者可以更长。

[0139] 其它治疗剂包括例如但不限于抗癌疗法。抗癌疗法包括癌症药物、放射和手术操作。本文所使用的“癌症药物”指出于治疗癌症的目的而施用于受试者的药剂。本文所使用的“治疗癌症”包括预防癌症发生、减少癌症症状和 / 或抑制已形成癌症的生长。在其他一些方面,对有发生癌症风险的受试者施用所述癌症药物,以降低发生癌症的风险。本文描述了用于治疗癌症的多种药物类型。就本说明书而言,癌症药物分为化疗剂、免疫治疗剂、癌症疫苗、激素治疗和生物应答调节剂。

[0140] 化疗剂可选自氨甲喋呤、长春新碱、阿霉素、顺铂、不含糖的氯乙基硝基脲类、5- 氟尿嘧啶、丝裂霉素 C、博来霉素、多柔比星、达卡巴嗪、紫杉醇、fragyline、葡甲胺 GLA、戊柔比星、卡莫司汀和聚苯丙生、MMI270、BAY 12-9566、RAS 法呢基转移酶抑制剂、法呢基转移酶抑制剂、MMP、MTA/LY231514、LY264618/ 洛美曲索、Glamolec、CI-994、TNP-470、和美新 / 托泊替康、PKC412、伐司朴达 /PSC833、米托蒽醌 /Mitroxantrone、Metaret/ 苏拉明、巴马司他、E7070、BCH-4556、CS-682、9-AC、AG3340、AG3433、Incel/VX-710、VX-853、ZD0101、ISI641、ODN 698、TA 2516/Marmistat、BB2516/Marmistat、CDP 845、D2163、PD183805、DX8951f、Lemonal DP 2202、FK 317、Picibanil/OK-432、AD 32/ 戊柔比星、美他特龙 / 锗衍生物、泰道 / 替莫唑胺、Evacet/ 脂质体多柔比星、Yewtaxan/ 紫杉醇、泰素 / 紫杉醇、希罗达 / 卡培他滨、氟铁龙 / 去氧氟尿苷、Cyclopax/ 口服紫杉醇、口服紫杉烷、SPU-077/ 顺铂、HMR 1275/flavopiridol、CP-358 (774)/EGFR、CP-609 (754)/RAS 癌基因抑制剂、BMS-182751/ 口服铂、UFT (替加氟 / 尿嘧啶)、尔吉咪唑 / 左旋咪唑、恩尿嘧啶 (Eniluracil)/776C85/5FU 增强剂、开普拓 / 左旋咪唑、Camptosar/ 伊立替康、Tumodex/Ralitrexed、Leustatin/ 克拉屈滨、Paxex/ 紫杉醇、Doxil/ 脂质体多柔比星、Caelyx/ 脂质体多柔比星、Fludara/ 氟达拉滨、Pharmarubicin/ 表柔比星、DepoCyt、ZD1839、LU 79553/- 二萘二亚胺 (Bis-Naphtalimide)、LU 103793/ 多拉司他汀、Caetyx/ 脂质体多柔比星、Gemzar/ 吉西他滨、ZD 0473/Anormed、YM116、碘粒、CDK4 和 CDK2 抑制剂、PARP 抑制剂、D4809/ Dexifosamide、Ifes/Mesnex/ 异环磷酰胺、威猛 / 替尼泊苷、伯尔定 / 卡铂、Plantinol/ 顺铂、Vepeside/ 依托泊苷、ZD 9331、泰索帝 / 多西紫杉醇、鸟嘌呤阿拉伯糖苷前药、紫杉烷类似物、亚硝基脲、烷化剂例如美法仑和环磷酰胺、氨鲁米特、门冬酰胺酶、白消安、卡铂、苯丁酸氮芥、盐酸阿糖胞苷、放线菌素、盐酸柔红霉素、雌莫司汀磷酸钠、依托泊苷 (VP16-213)、氟尿嘧啶脱氧核苷、氟尿嘧啶 (5-FU)、氟他胺、羟基脲 (hydroxycarbamide)、异环磷酰胺、干扰素 α -2a、 α -2b、乙酸亮丙瑞林 (LHRH- 释放因子类似物)、洛莫司汀 (CCNU)、盐酸氮芥 (氮芥子气)、巯嘌呤、美司钠、米托坦 (o. p' -DDD)、盐酸米托蒽醌、奥曲肽、普卡霉素、盐酸丙卡巴肼、链佐星、柠檬酸他莫昔芬、硫鸟嘌呤、塞替派、硫酸长春碱、安吖啶 (m-AMSA)、阿扎胞苷、促红细胞生成素、六甲嘧胺 (HMM)、白介素 2、米托胍脲 (甲基 -GAG ; 甲基乙二醛丙酮双胍脲 ; MGBG)、喷司他丁 (2' 脱氧助间型霉素)、司莫司汀 (甲基 -CCNU)、替尼泊苷

(VM-26) 和硫酸长春地辛,但不限于此。

[0141] 免疫治疗剂可选自 Ributaxin、赫赛汀、Quadramet、Panorex、IDEC-Y2B8、BEC2、C225、Oncolym、SMART M195、ATRAGEN、Ovarex、百克沙、LDP-03、ior t6、MDX-210、MDX-11、MDX-22、OV103、3622W94、抗 VEGF、赛尼哌、MDX-220、MDX-447、MELIMMUNE-2、MELIMMUNE-1、CEACIDE、Pretarget、NovoMAb-G2、TNT、Gliomab-H、GNI-250、EMD-72000、LymphoCide、CMA 676、Monopharm-C、4B5、ior egfr3、ior c5、BABS、抗 FLK-2、MDX-260、ANA Ab、SMART 1D10Ab、SMART ABL 364Ab 和 ImmuRAIT-CEA,但不限于此。

[0142] 癌症疫苗可选自 EGF、抗独特型癌症疫苗、Gp75 抗原、GMK 黑色素瘤疫苗、MGV 神经节苷脂缀合疫苗、Her2/neu、Ovarex、M-Vax、O-Vax、L-Vax、STn-KHL theratope、BLP25 (MUC-1)、脂质体独特型疫苗、Melacine、肽抗原疫苗、毒素 / 抗原疫苗、基于 MVA 的疫苗、PACIS、BCG 疫苗、TA-HPV、TA-CIN、DISC 病毒和 ImmuCyst/TheraCys,但不限于此。

[0143] 所述其它的治疗剂还可以是免疫调节剂。可施用的免疫调节剂实例有 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素、紫杉醇、TNF- α 或其组合,但不限于此。本发明的抗体还可与免疫调节剂和 / 或其它的抗癌剂 (例如 IL-21、IL-12 和 / 或曲妥珠单抗) 联合施用。

[0144] 有效量的所提供组合物是有用的。术语“有效量”指实现期望的生物效应所必需或足够的量。结合本文所提供的教导,通过在多种活性化合物和权重因子 (例如效力、相对生物利用率、患者体重、不良副作用的严重程度和优选的给药模式) 之间进行选择,可设计出不带来显著毒性但仍有效治疗特定受试者的有效的预防性或治疗性治疗方案。任一具体应用的有效量可根据以下因素而变化,例如所治疗的疾病或病症、所施用的具体组合物、受试者的身材或者疾病或病症的严重程度。本领域技术人员可经验性地确定具体组合物的有效量,而不需要过度实验。一般优选使用最大剂量,即根据一些医学判断的最大安全剂量。可以考虑每天多次给药以达到合适的化合物全身水平。合适的全身水平可通过例如测量患者的药物峰值或持续血浆水平来确定。在本文中“剂量”和“给药”可互换使用。

[0145] 治疗有效量的确定具体取决于例如该药剂的毒性和效力的因素。可使用本领域公知的方法确定毒性。可使用同样的指导确定效力。因此,药用有效量是临床医师认为具有可容忍毒性且有效的量。例如,可通过测量靶组织处 T 淋巴细胞细胞毒性的诱导或显著诱导或者靶组织量的减小来测定疗效。根据一个优选实施方案,预计合适的剂量为约 1mg/kg 至 10mg/kg。

[0146] 根据一些涉及对需要治疗的受试者施用治疗有效量的本发明抗体的实施方案,“治疗有效”表示抑制或逆转疾病状况 (例如减少或抑制癌生长) 所需的抗体量。一些方法考虑与已知的癌症药物或疗法 (如化疗,优选使用本文列出的化合物类型,或放射) 的组合疗法。所述患者可以是人或非人动物。当患有特征为促进癌症维持或增殖的受体水平提高的癌症时,患者通常是需要治疗的。

[0147] 一般地,活性化合物的每日经口剂量将是约每天 0.01 毫克 /kg 至 1000 毫克 /kg。预计每日一次或多次施用的 0.5 至 50 毫克 /kg 剂量会获得期望的结果。可适当调整剂量以实现期望的药物水平 (局部或全身),这取决于给药模式。例如,预计静脉内给药将的每日剂量可低一个至几个数量级。如果在此剂量下受试者的应答不足,那么可使用程度为患者的耐性所允许的更高剂量 (或者通过更为局部的不同递送途径实现的更高有效剂量)。

考虑每日多次给药以达到合适的抗体全身水平。

[0148] 在一些实施方案中,所提供的组合物用于体内应用。取决于预期的体内给药模式,所使用的组合物剂型可以是固体、半固体或液体,例如片剂、丸剂、粉剂、胶囊剂、凝胶剂、软膏剂、液体剂、混悬剂等。优选所述组合物以适于单次施用精确剂量的单位剂型施用。根据所期望的制剂,所述组合物还可包含可药用载体或稀释剂,其定义为通常用于配制用于动物或人类施用的药物组合物的水基载体。选择所述稀释剂以使其不影响目的人重组蛋白的生物活性。这些稀释剂的实例是蒸馏水、生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和 Hank' s 溶液。可使用相同稀释剂来重建冻干的目的人重组蛋白。另外,所述药物组合物还可包含其它药用剂 (medicinal agent)、药剂 (pharmaceutical agent)、载体、佐剂、非毒性、非治疗性、非免疫原性的稳定剂等等。这些稀释剂或载体的有效量是有效获得就组分的溶解度、生物活性等方面而言可药用制剂的量。在一些实施方案中,本文提供的组合物是无菌的。

[0149] 本文的组合物可经口、胃肠外或局部施用以及全身性形式施用于人,用于抗黑色素瘤、抗淋巴瘤、抗白血病和抗乳腺癌治疗。本发明的组合物还可用于治疗多种自身免疫病,例如类风湿性关节炎、系统性狼疮、多发性硬化等。

[0150] 在体内治疗过程中的施用可以通过任意种途径实现,包括胃肠外和经口,但是优选胃肠外。可使用囊内、静脉内、鞘内和腹膜内途径的施用,一般优选静脉内。本领域技术人员了解,给药途径根据所治疗的疾病而变化。

[0151] 对于治疗应用,可通过任何将所述组合物递送到预期表面的方式对受试者施用有效量的所述组合物。可通过任何本领域技术人员已知的方式完成本发明药物组合物的给药。优选的给药途径包括但不限于经口、胃肠外、肌肉、鼻内、舌下、气管内、吸入、眼、阴道和直肠的给药。

[0152] 当需要全身递送时,可将所述化合物配制成用于通过注射(例如通过推注或连续输注)进行胃肠外给药。用于注射的制剂可以是单位剂型,例如在安瓿中或在多剂量容器中,其中加入了防腐剂。所述组合物可采取如混悬液、溶液或者油载体或水载体乳剂的形式,并可含有配制剂,例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0153] 用于胃肠外给药的药物制剂包括水溶性形式活性化合物的水溶液。此外,活性化合物的混悬液可制备成合适的油性注射混悬液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油(例如芝麻油)或合成的脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酸酯)或脂质体。水性注射混悬液可含有增加混悬液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,所述混悬剂还可含有合适的稳定剂或增加所述化合物溶解度的物质,以允许制备更高浓度的溶液。

[0154] 或者,所述活性化合物可以是在使用前与合适载体(例如无菌无热原的水)混合的粉末形式。

[0155] 对于经口给药,药物组合物可以采取片剂或胶囊剂的形式,其通过常规手段使用可药用赋形剂来制备,所述赋形剂例如粘合剂(如预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(如硬脂酸镁、滑石或硅石);崩解剂(如土豆淀粉或淀粉乙二醇酸钠);或润湿剂(如月桂基硫酸钠)。所述片剂可通过本领域公知的方法进行包衣。用于经口给药的液体制剂可采取例如溶液剂、糖浆剂或混悬剂的形式,或者它们可在使用前与水或其它合适载体重建的干燥产物。这些液体制剂可使用可药用添加剂通过常规手段制备,所述添加剂例如助悬剂(如山梨醇糖

浆、纤维素衍生物或氢化可食用脂)；乳化剂(如卵磷脂或阿拉伯胶)；非水载体(如杏仁油、油性酯、乙醇或分级植物油)和防腐剂(如甲基或丙基对羟基苯甲酸或山梨酸)。所述制备物在适当时还可含有缓冲盐、芳香剂、着色剂和甜味剂。

[0156] 可适当地配制用于经口给药的制剂，以提供活性化合物的受控释放。对于口给药，所述组合物可采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0157] 对于经口给药，例如可通过将活性抗体与本领域公知的可药用载体组合来简单地配制所述抗体。这些载体能够将本发明配制成片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、混悬剂等，以用于被所治疗的受试者经口消化。可作为固体赋形剂获得用于经口使用的药物制剂，任选地粉碎所得混合物，并且需要时在加入合适的辅料后加工颗粒混合物，以获得片剂或糖锭剂芯。具体地，合适的赋形剂是填充剂，例如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、土豆淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。需要时可加入崩解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐，例如海藻酸钠。任选地，经口制剂还可在盐水或缓冲液(即用于中和和内在酸性条件的 EDTA) 中配制，或者可在无任何载体的情况下施用。

[0158] 具体地，还考虑了所述抗体的经口剂型。可对所述组分进行化学修饰，以使所述抗体的经口递送是有效的。一般地，所考虑化学修饰是在抗体上附着至少一个部分，其中所述部分允许(a)抑制蛋白水解以及(b)从胃或肠摄入到血流中。还期望所述抗体的总稳定性提高，以及在身体中的循环时间提高。这些部分的实例包括：聚乙二醇、乙二醇和丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮和聚脯氨酸。Abuchowski 和 Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts", *Enzymes as Drugs*, Hosenberg 和 Roberts 编辑, Wiley-Interscience, New York, NY, 367-383 页; Newmark, 等, 1982, *J. Appl. Biochem.* 4:185-189。其它可使用的聚合物是聚-1,3-二氧戊环和聚-1,3,6-三氧八环。如上所述，优选用于药物应用的是聚乙二醇部分。

[0159] 所述组合物的释放部位可以是胃、小肠(十二指肠、空肠或回肠)或者大肠。本领域技术人员拥有不在胃中溶解而在十二指肠或肠的其它位置释放所述物质的可用制剂。优选地，所述释放会避免对胃环境的有害作用，这是通过对抗体的保护或者通过生物活性物质在胃环境之外的地方(例如肠)释放来实现的。

[0160] 为了确保完全的胃抗性，在至少 pH 5.0 下不透的包衣是必需的。更常见的用作肠衣的惰性成分实例是乙酸苯三甲酸纤维素(cellulose acetate trimellitate, CAT)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯(hydroxypropylmethylcellulose phthalate, HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、聚乙烯乙酸邻苯二甲酸酯(polyvinyl acetate phthalate, PVAP)、丙烯酸树脂(Eudragit)L30D、Aquateric、乙酸邻苯二甲酸纤维素(cellulose acetate phthalate, CAP)、丙烯酸树脂 L、丙烯酸树脂 S 和虫胶。这些包衣可作为混合膜使用。

[0161] 包衣或包衣的混合物还可用于不旨在提高胃保护的片剂上。这可包括糖包衣或使得所述片剂易于吞咽的包衣。胶囊可由用于递送干燥治疗剂(如粉剂)的硬壳(例如明胶)组成；对于液体形式，可使用软的明胶壳。扁囊剂的壳材料可以是粗淀粉或其它可食用纸。对于丸剂、锭剂、模制片剂或研制片剂，可使用湿法聚集(massing)技术。

[0162] 所述治疗剂可作为细小的多颗粒(multi-particulate)包含在所述制剂中，所述

多颗粒为约 1mm 大小的颗粒或小丸的形式。用于胶囊施用的材料的制剂还可以是粉剂、轻微压制的丸剂或甚至片剂。可通过压制来制备所述治疗剂。

[0163] 着色剂和芳香剂都可包含在内。例如,可配制所述组合物(例如通过脂质体或微球封装),然后进一步包含在可食用产品中,例如含有着色剂和芳香剂的清凉饮料。

[0164] 可使用惰性材料来稀释治疗剂或增大其体积。这些稀释剂可包括碳水化合物,尤其是甘露醇、 α -乳糖、无水乳糖、纤维素、蔗糖、改性葡聚糖和淀粉。一些无机盐也可用作填充剂,包括三磷酸钙、碳酸镁和氯化钠。一些市售稀释剂是 Fast-Flo、Emdex、STA-Rx 1500、Emcompress 和 Avicell。

[0165] 崩解剂可包含固体剂型的治疗制剂中。用作崩解剂的材料包括但不限于淀粉,包括基于淀粉的商品崩解剂 Explotab。淀粉乙醇酸钠、Amberlite、羧甲基纤维素钠、ultramylopectin、藻酸钠、明胶、桔皮、酸性羧甲基纤维素、天然海绵和膨润土均可使用。另一种形式的崩解剂是不溶性阳离子交换树脂。粉状的树脂可用作崩解剂和粘合剂,它们可包括粉状树脂如琼脂、卡拉牙胶或黄芪胶。海藻酸及其钠盐也可用作崩解剂。

[0166] 结合剂可用于将治疗剂保持在一起以形成硬片剂,包括来自天然产物的材料,如阿拉伯胶、黄芪胶、淀粉和明胶。其它的包括甲基纤维素(methyl cellulose,MC)、乙基纤维素(ethylcellulos,EC)和羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose,CMC)。聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone,PVP)和羟丙基甲基纤维素(hydroxypropylmethyl cellulose,HPMC)均可用于醇溶液中,以对治疗剂进行造粒。

[0167] 抗摩剂(anti-frictional agent)可包含在治疗制剂中,以防止配制过程中的粘附。润滑剂可用作治疗剂与模壁之间的层,它们可包括但不限于:硬脂酸包括其镁盐和钙盐、聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene,PTFE)、液体石蜡、植物油和蜡。也可以使用可溶性润滑剂,例如月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁、多种分子量的聚乙二醇、Carbowax 4000 和 6000。

[0168] 可以添加可改善药物在配制过程中的流动特性以及在压制过程中帮助重排的助流剂。所述助流剂可包括淀粉、滑石、热解硅石和水合硅铝酸。

[0169] 为了帮助治疗剂溶解到水性环境中,可添加表面活性剂作为润湿剂。表面活性剂可包括阴离子去污剂例如月桂基硫酸钠、琥珀酸二辛酯磺酸钠和二辛酯磺酸钠。可使用阳离子去污剂,可包括苯扎氯铵或苄索氯铵。可包括在制剂中作为表面活性剂的可能的非离子去污剂列表如下:聚桂醇 400、硬脂酸聚羟氧 40 酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油 10、50 和 60、单硬脂酸甘油酯、聚山梨醇 40、60、65 和 80、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。这些表面活性剂可单独或作为不同比例的混合物存在于制剂中。

[0170] 可经口使用的药物制剂包括明胶制成的压出式(push-fit)胶囊,以及由明胶和增塑剂(例如甘油或山梨醇)制成的软密封胶囊。压出式胶囊可含有与填充剂(例如乳糖)、粘合剂(例如淀粉)和/或润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)以及任选的稳定剂相混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬于合适液体(例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇)中。另外,可加入稳定剂。也可使用配制用于经口给药的微球。这些微球是本领域中已经充分定义过的。所有用于经口给药的制剂均应该是适于这种给药的剂量。

[0171] 对于口给药,所述组合物可采取常规方式制备的片剂或锭剂的形式。

[0172] 对于吸入给药,根据本发明应用的化合物可方便地以气雾剂的形式递送,所述气雾剂来自加压包或喷雾器,其使用了合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体。在加压气雾剂的情况下,可以通过提供阀门来确定剂量单位,以递送计量的量。可将用于吸入器或吹入器的(例如明胶)胶囊和药筒配制成含有所述化合物与适当粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0173] 本文还考虑了肺递送。所述组合物可在吸入时递送到哺乳动物的肺,并穿过肺上皮细胞层达到血流。吸入分子的其它一些报道包括 Adjei 等,1990, *Pharmaceutical Research*, 7 :565-569 ;Adjei 等,1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63 :135-144(乙 酸 亮 丙 瑞 林);Braquet 等,1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(suppl. 5) :143-146(内皮素-1);Hubbard 等,1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, 206-212 页(a1- 抗胰蛋白酶);Smith 等,1989, *J. Clin. Invest.* 84 : 1145-1146(a-1- 蛋 白 酶);Oswein 等,1990, " Aerosolization of Proteins ", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (重组人生长素);Debs 等,1988, *J. Immunol.* 140 :3482-3488(干扰素- γ 和肿瘤坏死因子 α) 和 Platz 等,美国专利 No. 5, 284, 656(粒细胞集落刺激因子)。用于肺递送药物产生全身性作用的方法和组合物描述于 Wong 等 1995 年 9 月 19 日授权的美国专利号 5, 451, 569。

[0174] 考虑在本发明实践中使用多种设计用于肺递送治疗物的机械装置,包括但不限于喷雾器、计量吸入器和粉末吸入器,所有这些都是本领域技术人员熟悉的。

[0175] 适于实施本发明的市售装置的一些具体实例为 Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri 制造的 Ultravent 喷雾器;Marquest Medical Products, Englewood, Colorado 制造的 Acorn II 喷雾器;Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina 制造的 Ventolin 计量吸入器;和 Fisons Corp., Bedford, Massachusetts 制造的 Spinhaler 粉末吸入器。

[0176] 所有这些装置都需要使用适于分散的制剂。通常,每种制剂对于所使用的装置类型是特定的,除了治疗中使用的常规稀释剂、佐剂和 / 或载体之外还可涉及使用合适的推进剂材料。还考虑使用脂质体、微胶囊或微球、包含络合物或其它类型的载体。化学修饰的抗体也可制备成不同制剂,取决于化学修饰的类型或所用装置的类型。

[0177] 适于使用喷雾器(喷射或超声)的制剂通常包含溶解于水中的治疗剂,其溶解浓度为每毫升溶液约 0.1 至 25mg 生物活性治疗剂。所述制剂还可包含缓冲剂和单糖(例如用于稳定抗体和调节渗透压)。喷雾器制剂还可含有表面活性剂,以降低或防止在形成气雾剂过程中溶液雾化导致的表面诱导的治疗剂聚集。

[0178] 用于计量吸入装置的制剂一般包含精细分割的粉末,其含有在表面活性剂帮助下悬于推进剂中的治疗剂。推进剂可以是任何用于此目的常规材料,例如氯氟碳化合物、氢氯氟碳化合物、氢氟碳化合物或碳氢化合物,其包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙烷、和 1,1,1,2- 四氟乙烷,或其组合。合适的表面活性剂包括山梨聚糖三油酸酯和大豆卵磷脂。油酸也可用作表面活性剂。

[0179] 用于从粉末吸入装置中分散的制剂会包含含有治疗剂的精细分割干粉,并且还可包含填充剂(例如乳糖、山梨醇、蔗糖或甘露糖),其量促进粉末从所述装置中分散,例如制

剂重量的 50 至 90%。所述治疗剂可以制备成平均粒径小于 10 毫米（或微米）、最优选 0.5 至 5 毫米的特定形式，以最有效地递送到远端肺。

[0180] 还考虑了本发明药物组合物的鼻递送。鼻递送允许本发明药物组合物在对鼻施用所述治疗产品后直接传递到血流，而无需所述产品在肺中沉积。用于鼻递送的制剂包括含有葡聚糖或环糊精的制剂。

[0181] 对于鼻给药，可用装置是附有计量喷雾器的小硬瓶。在一个实施方案中，通过将本发明药物组合物溶液吸到确定体积的腔室中来递送计量药剂，所述腔室具有雾化气雾剂所需的孔径尺寸，所述雾化是通过当在所述腔室中液体被压缩时形成喷雾来实现的。所述腔室被压缩以施用本发明药物组合物。在一个具体实施方案中，所述腔室是活塞设置。这些装置是市售的。

[0182] 或者，使用塑料挤瓶，其具有尺寸为通过在挤压时形成喷雾来雾化气雾剂所需的孔径或开口。所述开口常见于所述瓶的顶部，所述顶部一般是逐渐变细的以适合鼻道，以有效施用气雾剂。优选地，所述鼻吸入器提供计量的气雾剂，以施用定量的药物。

[0183] 所述化合物也可配制成直肠或阴道组合物，例如栓剂或保留灌肠剂，例如含有常规栓剂基质如可可脂或其它甘油酯。

[0184] 除了前述制剂以外，所述化合物还可配制成长效制剂（depot preparation）。这些长效制剂可使用下列项来配制：合适的聚合或疏水材料（例如可接受油中的乳剂）或离子交换树脂，或者微溶衍生物例如微溶盐。

[0185] 所述药物组合物还可包含合适的固体或凝胶相的载体或赋形剂。这些载体或赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、多种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶以及聚合物例如聚乙二醇。

[0186] 合适的液体或固体药物制剂形式为例如用于吸入的水或盐水溶液、微封装的、螺旋状的（enochleated）、涂敷在显微金粒上的、脂质体中包含的、喷雾化的、气雾剂、用于植入皮肤的小球、或者在用于划破进入皮肤的锋利物体上干燥的。所述药物组合物还可包括颗粒剂、粉剂、片剂、包衣片剂、（微）胶囊剂、栓剂、糖浆剂、乳剂、混悬剂、霜剂、滴剂或活性化合物受保护释放的制剂，其中制剂赋形剂和添加剂和 / 或辅料（例如崩解剂、粘合剂、包衣剂、溶胀剂、润滑剂、芳香剂、甜味剂或增溶剂如上文所述常规使用。所述药物组合物适用于多种药物递送系统。药物递送方法的简要综述可参见 Langer, Science 249 :1527-1533, 1990, 其通过参考并入本文。

[0187] 所述抗体及任选的其它治疗剂可以以自身（纯的）施用，或者以可药用盐的形式施用。当用于药物时，所述盐应该是可药用的，但是非药用盐可方便地用于制备其可药用盐。这些盐包括但不限于由下述酸所制备的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲烷磺酸、蚁酸、丙二酸、琥珀酸、奈 2-磺酸和苯磺酸。这些盐还可制备为碱金属盐或碱土金属盐，例如羧酸基的钠、钾或钙盐。

[0188] 合适的缓冲剂包括：乙酸及盐（1-2%（重量 / 体积））；柠檬酸及盐（1-3%（重量 / 体积））；硼酸及盐（0.5-2.5%（重量 / 体积））；磷酸及盐（0.8-2%（重量 / 体积））。合适的防腐剂包括苯扎氯铵（0.003-0.03%（重量 / 体积））；氯丁醇（0.3-0.9%（重量 / 体积））；对羟基苯甲酸酯（0.01-0.25%（重量 / 体积））和硫柳汞（0.004-0.02%（重量 / 体积））。

[0189] 本发明的药物组合物含有有效量的抗体以及任选的包含在可药用载体中的治疗剂。术语可药用载体指适于对人类或其它脊椎动物施用的一种或多种相容性固体或液体填充剂、稀释剂或封装物质。术语载体指天然或合成的有机或无机成分,其与活性成分相组合以便于应用。所述药物组合物的组分能够以不显著破坏所需药物疗效的方式与本发明的化合物混合,并彼此混合。

[0190] 所述治疗剂(具体包括但不限于所述抗体)可以颗粒形式提供。本文所使用的颗粒指纳米或微米颗粒(或者在一些情况下更大),其可全部或部分由抗体组成。所述颗粒可在核心含有所述治疗剂,所述核心被包衣(包括但不限于肠衣)包围。所述治疗剂还可分散在整个颗粒中。所述治疗剂还可被吸附到颗粒中。所述颗粒可以是任何级的释放动力学情况,包括零级释放、一级释放、二级释放、延迟释放、持续释放、立刻释放及其组合等。除了治疗剂之外,所述颗粒还可包含常规用于药剂和药物领域的任何材料,包括但不限于易蚀的、不易蚀的、可生物降解的或不可生物降解的材料或其组合。所述颗粒可以是微胶囊,其含有溶液或半固体状态的抗体。所述颗粒可以基本为任何形状。

[0191] 不可生物降解的和可生物降解的聚合物均可用于制造用于递送所述治疗剂的颗粒。这些聚合物可以是天然或合成聚合物。所述聚合物根据期望的释放时间进行选择。特别感兴趣的生物粘附聚合物包括 H. S. Sawhney, CP. Pathak 和 J. A. Hubell 在 *Macromolecules*, (1993) 26 :581-587 中描述的生物易蚀水凝胶,其教导并入本文。它们包括聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酐、聚丙烯酸、藻酸、壳聚糖、聚(异丁烯酸甲酯)、聚(异丁烯酸乙酯)、聚(异丁烯酸丁酯)、聚(异丁烯酸异丁酯)、聚(异丁烯酸己酯)、聚(异丁烯酸异癸酯)、聚(异丁烯酸月桂酯)、聚(异丁烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)以及聚(丙烯酸十八酯)。

[0192] 所述治疗剂可包含在受控释放系统中。术语“受控释放”意指药物从制剂释放的方式和特征谱受到控制的任何含有药物的制剂。这是指立即释放和非立即释放制剂,非立即释放制剂包括但不限于持续释放和延迟释放制剂。术语“持续释放”(也被称为“延长释放”)以其常规意义使用,指提供在延长的时间中逐渐释放药物并优选地(尽管不是必需的)导致在延长的时间内基本恒定的药物血液水平的制剂。术语“延迟释放”以常规意义使用,指在制剂的施用与药物释放之间有时间延迟的药物制剂。“延迟释放”可涉及或不涉及药物在长期时间内的逐渐释放,因此可以是或不是“持续释放”。

[0193] 长期持续释放植入物的应用可特别适用于治疗慢性病症。本文所使用的“长期”释放指构建并安置所述植入物以在至少 7 天、优选 30-60 天中递送治疗水平的活性成分。长期持续释放植入物是本领域技术人员公知的,其包括一些上文所述的释放系统。

[0194] 本文还提供了含有所提供抗体的试剂盒。图 14 显示了这些试剂盒的一个例子。试剂盒 10 包含抗体 12。试剂盒 10 还可含有一种或多种管或容器 14。所述试剂盒还包含用于对患有本文所述疾病(如癌症)或具有此疾病症状的受试者施用所述成分的说明。

[0195] 在一些实施方案中,试剂盒 10 可包含药物制剂瓶、药物制剂稀释剂瓶、以及所述抗体。含有用于药物制剂的稀释剂的瓶是任选的。所述稀释剂瓶含有稀释剂例如生理盐水,以稀释所述抗体的浓溶液和冻干粉末。所述说明可包含混合特定量稀释剂和特定量浓药物制剂,由此制备用于注射或输注的最终制剂的说明。所述说明可包含在注射器或其它施用装置中使用的说明。说明 20 可包含使用有效量的抗体来治疗患者的说明。还应理解,含有

所述制剂的容器（无论所述容器是瓶、带隔膜的瓶、带隔膜的安瓿、灌注袋等）都可含有标记例如常规标签，其在所述制剂经高压灭菌或其它灭菌时改变颜色。

[0196] “受试者”应指人或脊椎哺乳动物，其包括但不限于狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊或灵长类，如猴。

[0197] 除非本文另外定义，与本发明相关所使用的科技术语具有本领域技术人员通常所理解的含义。另外，除非上下文另外需要，单数术语包含复数，复数术语包含单数。一般地，根据本领域公知的常规方法实施本发明的方法和技术。一般地，与本文所述的生物化学、酶学、分子和细胞生物学、微生物学、遗传学和蛋白质及核酸化学以及杂交相关使用的命名法和技术是本领域公知且常规使用的。除非另有指出，本发明的方法和技术一般根据本领域公知的常规方法并如本说明书中引用并讨论的多个一般性和较具体的参考文献中所述来实施。

[0198] 通过下述实施例进一步说明本发明，所述实施例不应以任何方式理解为进一步的限制。本申请中所引用的所有参考文献（包括文献、授权专利、公开的专利申请以及共同未决的专利申请）的全部内容通过参考明确地并入本文。

[0199] 实施例

[0200] 材料和方法

[0201] 测序来自杂交瘤的 mRNA

[0202] 使用 Qiagen RNeasy Mini 试剂盒（目录号 74104）制备 RNA。在第 4 天，将 13ml 培养物离心 5 分钟，重悬于 PBS。再次离心 5 分钟。将所得沉淀重悬于含 6 μ l μ -ME 的 600 μ l RNeasy RLT 中。将裂解液 5 次穿过 22g 针，加入 600 μ l 170% EtOH 并混合。两次将 700 μ l 等分试样加到 RNeasy 柱，离心 30 秒，用 700 μ l RW1 洗涤。用 500 μ l PPE 洗涤两次，干燥 1 分钟，用 50 μ l 水洗脱两次。

[0203] 使用寡聚 dT 引物，用 Promega 逆转录系统（目录号 A3500）对 2 μ l RNA 进行逆转录。反应物在 42℃ 孵育 1 小时，然后加热到 95℃ 保持 5 分钟。然后用水将反应物稀释到 100 μ l。用引物对 1 μ l cDNA 等分试样进行 PCR，所述引物选自 N 端或 5' 末端之一以及 C 端或 3' 末端之一。使用仅来自恒定区的引物进行 PCR 作为阳性对照。

[0204] 使用 Qiagen QiaQuick PCR 纯化试剂盒（目录号 28104）来纯化 PCR 产物。进行另外的洗脱以使终体积为 100 μ l 测定 260nm 处的吸光度。浓度在 10-26ng/ μ l 变化，取出 100ng 与 PCR 所用的 N 端引物一起用于测序。

[0205] 因为所用氨基端引物是抗体氨基端编码序列的一部分，所以它们可在所述序列中引入突变。使用所得序列，从小鼠基因组鉴定种系基因。然后合成这些基因末端的引物，用于从 cDNA 中 PCR 得到完整编码序列。以这种方式获得了所述抗体的完整编码序列，而不含任何 PCR 引物所贡献的序列。因为在每种情况下它都与氨基端序列一致，所以所述编码序列是所表达抗体的序列。如序列中标注出的，从已知 J 区中鉴定出 J 区。

[0206] 抗人 CD137 重链和轻链基因的克隆和测序

[0207] 构建含有四个主要 IgG 亚类的人恒定区序列的转基因表达载体。这些载体携带山羊 β 酪蛋白启动子以及确保乳腺特异性转基因表达的其它 5' 和 3' 调控序列。通过插入小鼠抗人 CD137 抗体的可变区序列来构建所述嵌合抗体变体。通过对相应可变区测序来鉴定小鼠序列的抗 CD137H 和 L 链。组装代表来自多个小鼠免疫球蛋白家族 5' 编码区序列的寡

核苷酸集合。单个使用小鼠免疫球蛋白序列作为 5' 引物来扩增从杂交瘤 RNA 制得的 cDNA, 对所得 PCR 产物进行克隆和测序。3' PCR 引物从恒定区的已知序列中制得。所述 PCR 引物包含限制性内切酶位点, 以使所扩增的序列可插入表达载体中。将这些序列插入所述构建体中以产生编码嵌合蛋白的基因。

[0208] 用于克隆和测序抗 CD137 抗体基因可变区的方法包括下述步骤 (1)–(5)。(1) 从杂交瘤 RNA 得到 cDNA。通过标准方法从杂交瘤制备 RNA, 通过使用市售试剂盒 (Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI) 的逆转录来制备 cDNA。(2) 使用基于数个良好表征的小鼠单克隆抗体 V_H 和 V_L 区氨基端已知序列的引物, 通过 PCR 扩增 cDNA。(3) 通过将 PCR 产生的序列插入带有新霉素抗性 (neo^R) 选择标记的克隆载体来扩增可变区序列, 分离 neo^R 菌落。(4) 对从约 6 个菌落制得的 H 和 L 链 cDNA 进行测序, 以确定每个可变区的共有序列。确保没有在 PCR 产物序列中引入突变是很重要的。DNA 测序通过 SequeGen, Co. (Worcester, MA) 的付费服务进行。(5) 对分离自杂交瘤上清液的 H 和 L 蛋白进行测序, 将实际的蛋白质序列与从基因序列推导出的蛋白质序列进行比较。此步骤确认了所克隆的基因编码功能性抗体链。蛋白质测序通过 Cardinal Health (San Diego, CA) 的付费服务进行。

[0209] 产生用于嵌合抗体的分离的嵌合 IgG 重链及轻链构建体

[0210] 使用根据上文所提供方法获得的可变区序列来替换现有人 IgG1 抗体中的人可变区序列。在本发明的一个实施方案中, IgG1 表达载体中的人可变区序列与小鼠可变区序列一起使用, 以产生嵌合人源化抗体。所述抗体表达载体含有天然糖基化模式的 IgG1H 基因。IgG1 糖基化位点是 CH2 结构域中 297 位的 Asn 残基。通过基因序列中的定点诱变将 Asn₂₉₇ 改变成 Gln₂₉₇, 产生 IgG1H 链的非糖基化形式。这提供了 3 种构建体: L 链、糖基化 H 链和非糖基化 H 链。使用每个构建体的两种形式进行测试。通过限制性作图和 Southern 印迹分析来评价每个构建体, 所述构建体用于产生转基因动物。另外, 所述构建体用于瞬时转染研究, 以测试经遗传改造的嵌合蛋白的生物活性。

[0211] 用于开发转基因动物的构建体含有山羊 β 酪蛋白启动子和用于确保高水平乳腺特异性转基因表达的其它 5' 和 3' 调控序列。因为启动子和其它调控元件的物种交叉识别, 所以同一构建体可用于产生转基因小鼠和山羊。一旦育种后, 针对糖基化水平和增强的 ADCC 特性来筛选山羊和 / 或小鼠。通过限制性作图来确认所述构建体的结构完整性。所述构建体用于产生瞬时转染的细胞和转基因动物。

[0212] 构建重链嵌合物并插入表达载体中

[0213] 为了构建小鼠 IgG2a 恒定区被人 IgG1 恒定区替换的重链嵌合物, 使用含有带小鼠前导序列的人抗体序列的 BC2083 表达载体 (质粒 1)。通过不改变 C 端附近甘氨酸编码的 G 到 A 沉默突变来消除剪接供体位点。将唯一的位点置于 BC2083 表达载体中可变区附近。将 DraIII 和 PmII 置于 N 端, ApaI 存在于重链恒定区的氨基部分中。通过使用引物从 CMV-Zeo 中进行 zeo 基因的 PCR, 将这些位点克隆到 BC2083 的 XhoI 位点中, 得到 p80BC2083zeo (质粒 2)。这种将限制性位点插入质粒的快速方法使用了 zeo 基因所赋予的 zeocin 抗性。通过使用 NZYCM 琼脂中 25 μg/ml 的 zeocin 来选择 zeocin 抗性。

[0214] 通过将人 IgG1 恒定区部分从 BC2083 中切出并克隆进 p80 来将其放回到唯一的 ApaI 和 XhoI 位点, 得到 p83BC2083DraIII IgG1 (质粒 3)。此质粒具有重链可变区侧翼的

唯一的 DraIII/PmlI 和 ApaI 位点,使得任何重链可变区附着到人 IgG1 恒定区编码序列。

[0215] 通过 PCR 将 DraIII 和 PmlI 位点置于氨基端并且将 Apa 位点置于 C 端,制备用于插入的抗 CD137 抗体的重链可变区。所述 ApaI 位点天然存在于人 IgG1 恒定区的氨基端附近。使用引物 MHE 和 MHEC,利用 PfuTurbo(Stratagene 目录号 600153-81) 和 cDNA 实施 PCR。将 PCR 片段克隆进 pCR-BluntII-TOPO(Invitrogen 目录号 :K28602),使用 pcr2.1f 和 pcr2.1b 进行测序。这得到了 p96,其含有侧翼是 DraIII-PmlI 和 ApaI 的重链可变区(质粒 4)。

[0216] 通过分离 p96pCR-BluntII-Mayo-重链 DraIII-ApaI 片段并连接到 DraIII-ApaI 切割的 p83BC2083DraIII IgG1(质粒 3)中来构建 β 酪蛋白表达载体, p100BC2083 重链(BC2197)(质粒 5)。

[0217] 为了通过将靶天冬酰胺改变为谷氨酰胺来阻断糖基化,通过使用 PfuTurbo 和引物的 PCR 从 BC2083 来制备重链编码序列,将重链恒定 N 和重链恒定 C 亚克隆到 pCR-Zero-Blunt 中。这得到了 p76 和 p77pCR2.1-Blunt-IgG1-重链恒定。对这些质粒进行测序以确保在 PCR 过程中没有在恒定区中引入突变。根据一个实施方案,使用 QuickChangeXL Mutagenesis(Stratagene) 试剂盒和诱变寡聚物对 p77 中亚克隆的抗 CD137 抗体恒定区进行诱变。此寡聚物将天冬酰胺 297 改变为谷氨酰胺并去除邻近的 BsaAI 位点,以便于通过苏氨酸密码子沉默突变的限制性酶分析来进行筛选。这得到了质粒 p88、p89 和 p90pCR2.1-Blunt-IgG1-重链-mut。使用引物对这些质粒进行 PCR 以制备用于测序的片段。

[0218] 构建轻链嵌合物并插入到表达载体中

[0219] 用于轻链的表达载体是 BC1060(质粒 6)。为了使得可变区能够与人 κ 恒定区融合,将两个限制性位点依次改造进入小鼠 J 区。通过将甘氨酸密码子从 GGG 或 GGC 改变为 GGT 来引入 KpnI 位点。将亮氨酸的编码序列从 CTG 改变为 CTT 以产生 HindIII 位点(质粒 8)。

[0220] 通过使用 PfuTurbo(Stratagene) 的 PCR,使用引物从 BC1060 中分离出人 κ 链恒定区编码区,其带有编码区起始处的 KpnI 和 HindIII 位点以及编码区末端天然存在的 SacI 位点。将 PCR 产物克隆到 ZEROblunt TOPO PCR W EC 中(Invitrogen 目录号: K286020)。对这些质粒进行测序。这得到了 p85pcr-blunt-1060 κ 恒定 rev(质粒 7) 和 p86pcr-blunt-1060 κ 恒定(质粒 8)。

[0221] 类似地,使用引物通过 PCR 从 cDNA 中分离出可变区,并克隆到 pCR2.1-Blunt-TOPO 中,得到 p92pCR2.1-Blunt- κ 可变(质粒 9),其中所述可变区的侧翼是 340 位核苷酸处的 XhoI 位点以及 731 位核苷酸附近的 KpnI 和 HindIII 位点。对这些质粒进行测序。

[0222] 首先使用 3 段 DNA 将轻链嵌合物构建到 pCR-Blunt 中。p86pcr-blunt-1060 κ 恒定提供 XhoI 至 SacI 的主链。 κ 恒定区是来自 p85pcr-blunt-1060 κ 恒定 rev 的 HindIII-SacI 片段。使用 XhoI-HindIII 片段由 p92pCR2.1-Blunt- κ 可变 rev 提供可变区。通过 PCR 使用引物 pcr2.1f 和 pcr2.1b 通过查找 863bp 片段的产生来检测菌落。这得到了 p94pCR-BluntII-Mayo-kap-chim(质粒 10)。通过使用 XhoI 和 SacI 的切割得到 684bp 片段来检测所述质粒。

[0223] 将所述轻链嵌合物置于含有带小鼠重链前导序列的免疫原人轻链的 β 酪蛋白表达载体 BC1060。用 XhoI-SacI 切割 p94,分离小片段。用 KpnI-SacI 切割 BC1060,分离

5206bp 的片段。用 KpnI、XhoI 和 PacI 切割 BC1060 以分离大主链。连接这三个片段,使用所需引物筛选菌落。用 BglIII 检测阳性质粒,对 PCR 产物测序。此质粒是 p104BC1060LC chim(BC2198)(质粒 11)。

[0224] 构建细胞培养表达载体

[0225] 为了构建轻链的瞬时表达载体,将来自 p104BC1060LC chim(质粒 11)的 XhoI 片段连接进 pCEP4 的 XhoI 位点,得到 p106 和 p107pCEP4-Mayo-LC(#2203)(质粒 12)。通过使用寡聚 CEPF 和 KVC 的 PCR 来检测阳性克隆。

[0226] 为了构建重链的瞬时表达载体,将 p100BC2083 重链的 BamHI 片段克隆进 BamHI 切割的 pCEP4。通过使用 HVC09 和 CEPF 的 PCR 来筛选菌落。这得到了质粒 p110pCEP4-BamHI-HC(#2202)(质粒 13)。

[0227] 通过将含有可变区的 #110pCEP4-BamHI-HC(#2202)的 KpnI-AgeI 小片段连接进 KpnII-AgeI 切割的 #88pCR2.1-Blunt-IgG1-重链-mut 来制备带有抗 CD137 抗体重链可变区的嵌合物。这得到了质粒 p111pCR2.1-Mayo-IgG1-重链-mut(质粒 14)。用 BsaAI-PstI 检测此质粒。

[0228] 为了构建瞬时表达载体,将来自含有嵌合抗体编码区的 p111 的 XhoI 小片段插入到 pCEP4 的 XhoI 位点。通过使用 HVC C09 和 CEPF 的 PCR 来检测菌落。这得了了 p112pCEP4-Xho-Mayo-IgG1-aglycos(BC2206)。使用 EcoRV-HindIII 消化(2479bp)和 BamHI 消化(1454bp)获得预期片段。为了构建 β 酪蛋白表达载体,将来自含有嵌合抗体编码区的 p111 的 XhoI 小片段插入到 BC2083 的 XhoI 位点。通过使用寡聚 HVC 09 和 CA5 的 PCR 来检测菌落。用 MluI-Eco47III-NotI 消化得到预期的 2479bp 片段,而使用 BamHI 消化得到预期的 1454bp 片段。

[0229] 克隆 IgG1 突变体

[0230] 在小鼠乳中表达所使用的抗 CD137 抗体。对于小鼠表达,使用 BC2197(p100BC2083 重链)和(BC2198)p104BC1060 轻链的构建技术。类似地,亲本质粒是用于重链的 BC2083 或用于轻链的 BC1060。基本上,将亲本质粒中包含前导序列的可变区与来自抗 CD137 抗体 cDNA 重链和轻链可变区的 cDNA 序列进行交换。所述表达载体的恒定区(重链的 IgG1 和轻链的 κ)被所克隆的序列取代。

[0231] 克隆 IgG1 序列

[0232] 从购自 Invitrogen 的 cDNA 中克隆所使用的抗体重链。使用胎盘 cDNA 和下文所示引物实施利用 PfuTurbo 的 PCR。C 端引物 61960C11 相对于野生型序列改变了一个碱基以破坏剪接供体位点。将 993bp 片段克隆进 ZeroBlunt。所述序列表明一个序列是 G1m(3)。存在与来自人血清的 γ 球蛋白相关的内在差异(Grubb 1956;Grubb 和 Laurell1956)。具有 Km 类似的系统(κ 标记物,之前称为 Inv,其代表 ϵ InhibitriceVirmí)。这是白人同种异型 G1m(f) 或 G1m(3),其取代了起始质粒上存在的黑人同种异型 G1m(z) 或 G1m(17)。

[0233] 为了克隆其它的同种异型,如上所述从脑 cDNA 进行了 PCR,得到质粒 p116、p117、p118 和 p119。这些质粒中无一具有正确的序列。例如,大部分的所述质粒丢失了序列末端应该由 PCR 引物提供的 ApaI 和 / 或 XhoI 位点。使用 p116 或脑 cDNA 作为模板再次进行 PCR。

[0234] 对 p116 的 PCR 得到了 121、122 和 123。对脑 cDNA 的 PCR 得到了 124。使用来自

质粒 121 的插入片段产生 p133、p134、p135 和 p136,它们是通过用 ApaI 和 XhoI 切割 100c BC2083 重链并用 ApaI 和 XhoI 切割 p121ZeroBlunt-IgG1 G1m(17)、连接并在卡那霉素上进行选择的 BC2083 重链 G1m(17)。使用了 p133。

[0235] 对于小鼠表达,只有质粒 BC2083 中的可变区发生了改变,所述质粒是含有带小鼠前导序列的人抗体序列的表达载体。它在 IgG1 恒定区末端具有剪接供体位点,所述位点被不改变甘氨酸编码的 G 到 A 的沉默突变所消除。为了增强山羊表达,将所述恒定区改变为随后克隆的 IgG1 恒定区。将来自 p114 的克隆恒定区用于产生 p137 和 138。用 ApaI-XhoI 切割 p100BC2083 重链 (BC2197),用 ApaI 和 XhoI 切割 114ZeroBlunt-Ig G1G1m(3),然后连接得到 p138(BC2228)。从 p121(G1m(17)) 克隆的恒定区用于产生 p133、134、135 和 136BC2083 重链 G1m(17)。κ 恒定区也被 GTC Biotherapeutics 克隆的所替换。SEQ. ID. NO. 1 :AGGGTACCAAGCTTGAAATCAAACGAAC-κ 恒定人 H01 ;SEQ IDNO. 2 :5'AAGGGTCCGGATCC TCGAGGATCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC- 人 κ C#7734。

[0236] 产生皮肤成纤维细胞系

[0237] 在体外将来自新鲜山羊皮肤活检样品的成纤维细胞在原代培养物中维持。简言之,在无 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中切碎皮肤样品,用 EDTA 中稀释的胰酶收获以回收单细胞悬液并培养于 37°C 下。用胰酶消化会合的细胞,传代培养。将细胞的等分试样冷冻于液氮中待用。

[0238] 分析转染细胞系

[0239] 使用转基因 (例如 β 酪蛋白、嵌合抗 CD137H 和 L 链 cDNA) 特异性探针,通过 Southern 印迹分析来表征转染细胞,以确定转基因的拷贝数并鉴定可能的重排。还通过 FISH 分析每个细胞系,以证实单整合并确定染色体位置。进行细胞遗传分析以证实细胞系的核型。FISH

[0240] 对于分裂间期 FISH,将来自每个扩增集落的数百个细胞固定在滤膜上,并与扩增转基因特异性的地高辛标记探针杂交。对于分裂中期 FISH,细胞培养于 Lab Tek 室玻片 (Nunc, Rochester, NY),用 5- 溴 -2' 脱氧尿苷 (BrdU) 脉冲处理以得到复制带。用 FITC 缀合的抗地高辛检测探针结合,用 4',6- 二脒 -2- 苯基吡啶 (DAPI) 复染染色体。使用 Zeiss Axioskop 显微镜 (Zeiss Imaging, Thornwood, NY)、Hamamatsu 数码照相机 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) 和 Image Pro-Plus 软件 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) 来捕获图像。大部分探针是相对大且易于检测的。对于个体 IgGH 和 L 链 (其由相对短的 cDNA 序列编码) 的探针太小,以至于其自身不能得到好的分辨率。这些小探针与来自山羊 β 酪蛋白乳特异性启动子的序列相混合。

[0241] 细胞遗传分析

[0242] 实施对供体转染成纤维细胞系的细胞遗传分析。通过缺口翻译用地高辛 -dUTP 标记转基因探针。用 FITC 缀合的抗地高辛或者用辣根过氧化物酶缀合的抗地高辛和之后 FITC 缀合的酪胺来检测探针与变性染色体的结合。用 DAPI 使染色体带模式可见。山羊具有 60 个染色体,均为近端着丝粒 (在一端而不是在中部或中部附近具有着丝粒)。在分裂中期伸展中检查严重异常的迹象,例如染色体丢失、重复或明显的重排。用于产生第一代转基因山羊的细胞系是核型一般正常的,并且携带结构完整的嵌合抗 CD137H 和 L 链基因以及 β 酪蛋白启动子和其它必要调控元件。

[0243] 产生在乳中表达嵌合抗人 CD137 的转基因动物

[0244] 已产生了糖基化和非糖基化形式的嵌合抗人 CD137 抗体。在从乳中纯化足够量的抗体以测试生物活性之后,发现尽管它们基本以相同的水平产生,但是两种形式的活性谱有所不同。

[0245] 嵌合抗体的转基因构建体用于产生转基因小鼠和山羊。转基因动物通过引入 H 链和 L 链构建体的 1 : 1 混合物来产生成熟抗体。L 链构建体糖基化或非糖基化 H 链构建体相组合。具体地,在体外通过 Western 印迹分析和抗体结合测量对乳中生物活性产物的相对及绝对水平进行测量。

[0246] 转基因小鼠

[0247] 用于测试转基因小鼠中诱导型系统可行性的实用策略是评估第一代 (F_1) 小鼠乳中的转基因蛋白表达。已经确定,在一些转基因动物中,原始转基因构建体在显微注射后在细胞分裂时整合进染色体位点。因此,初始动物是可影响转基因表达水平的嵌合体。这些染色体整合位点将在后续世代中发生分离,以形成稳定的同质转基因动物品系。因此, F_1 小鼠是用于确定转基因表达稳定性及其生物产物稳定性的合理模型。另外,为了让小鼠泌乳,它们必须成熟(需约 2 个月的时间)、交配并产生后代。在分析之后,确定分泌水平是稳定的,所使用的构建体是有效的。

[0248] 通过 CsCl 梯度和之后的电洗脱来纯化来自每个所制备构建体的线性 DNA,通过前核显微注射产生转基因小鼠。通过尾组织 DNA 的 PCR 分析来鉴定转基因初始小鼠,使用 Southern 印迹分析测定相对拷贝数。对每个构建体(糖基化和非糖基化)产生许多转基因第一代的携带转基因的“初始”(F_0) 雌性。在成熟时这些 F_0 小鼠交配开始泌乳。用山羊抗人 Fc 抗体进行的 Western 印迹分析它们的乳,以鉴定分泌结构完整的带有人 C_H 区的嵌合抗体的小鼠。

[0249] 然后繁殖最佳初始动物(定义为具有在其乳中最大合理抗体表达的健康动物)以产生 F_1 雌性,其用于提供足够收集用于体外和体内测试的抗体的乳。

[0250] 转基因山羊

[0251] 使用本领域中常规的核转移技术产生具有预先确定遗传学情况的转基因山羊。核转移消除了在前几代中转基因镶嵌现象的问题,因为所有来自于转基因细胞系的动物都应完全是转基因。通过标准转染方法(脂转染或电穿孔)将所述转基因构建体引入原代细胞系中。在重组原代细胞系用于产生转基因动物之前,针对重要特征(例如转基因拷贝数、完整性和整合位点)对它们进行体外筛选。雌性山羊皮肤成纤维细胞用于产生转染的转基因细胞,作为核转移的核供体,得到全部雌性后代。因此,可直接从 F_0 山羊获得含有重组蛋白的乳。通过 Western 印迹测定乳中生物活性产物的相对和绝对水平。

[0252] 结果

[0253] 抗体的纯化和表征

[0254] 产生了四种不同的嵌合抗 CD137 抗体。一种变体是通过将 Ash297 突变为谷氨酰胺而非糖基化的。此抗体变体可在功能性研究中发挥阴性对照的作用,因为已知非糖基化 IgG 不结合 Fc 受体,且在 ADCC 中无活性(Nose 等,1983)。从乳中制备了另外两种抗体变体,一种来自小鼠乳,一种来自山羊乳。在 HEK 293 细胞(人细胞系)表达第四种抗体变体。

[0255] 在人细胞中表达一种抗体变体。人胚肾 293 细胞系(293)适用于瞬时转染技术,

因为它可被高效转染。使用稳定表达 EBV EBNA1 蛋白 (293E) 的遗传变体,其在 EBV 的 oriP 存在于载体骨架中时提供显著更高的蛋白表达。

[0256] 当进行瞬时转染时,oriP/EBNA1 系统中获得的表达提高似乎与附加体复制无关,因为去除 oriP 中负责在 EBNA1 阳性细胞中起始 DNA 复制的 DS 结构域不降低转基因表达,而去除 FR 而不是 DS 则显著降低表达。因此,表达提高似乎是由于 oriP 的 EBNA1 依赖性增强子活性与质粒入核增多的联合作用,入核增多是由于 EBNA1 中存在核定位信号 (Pham 等, 2003)。

[0257] 使用设计用于从 CMV 启动子高水平组成型表达的载体 pCEP4 (目录号 V04450; Invitrogen, Carlsbad, CA) 来表达所述抗体。293EBNA/ebv 载体宿主系统表现出对基于 COS7/SV40ori 的系统的显著改善 (Jalanko 等,1988;Shen 等,1995)。高水平重组蛋白表达的一个重要问题在于使用具有在宿主细胞系中高活性启动子的载体,所述启动子例如 CMV 启动子,其在 293 细胞中特别有力,因为它通过组成型表达腺病毒 E1a 蛋白来反式活化 (Durocher 等,2002)。

[0258] 通过用如前述的标准方法 (Wilcox 等,2002, J Clin Inv 109 :651-659) 将 BALB/c 小鼠的脾 B 细胞与小鼠浆细胞瘤融合来产生生产人 CD137 特异性单克隆抗体的杂交瘤 (GW),所述 BALB/c 小鼠已经用人 CD137 胞外部分和小鼠 IgG2a Fc 区的融合蛋白进行了免疫。所述抗 CD137 抗体是小鼠单克隆抗体 (mAb) 与人 CD137 的嵌合形式,其中重链和轻链的恒定区已分别被人 IgG1 恒定区和人 κ 恒定区所替换。这种抗体使用 β 酪蛋白启动子在小鼠和山羊乳中表达 (Pollock 等, J Immunol Meth 231 :147-157),或者使用巨细胞病毒 (CMV) 启动子通过瞬时转染在 HEK 293 细胞中表达。山羊乳来自转基因山羊的激素诱导泌乳 (Ebert 等,1994, Biotech 12 :699-702)。通过 A 蛋白层析纯化所述抗体。在泌乳 9 天后纯化山羊乳抗体,以避免污染早期挤奶所得初乳的山羊抗体。通过尺寸排阻层析发现,山羊乳来源的嵌合抗 CD137 抗体的类似制剂是 90% 的单体和 10% 的聚集体。通过 280nm 处的吸光度来测量抗体浓度,使用 1.4mg/ml 为 10D 的值作为换算因子。

[0259] 糖分析

[0260] 使用 PNG 酶 F,在 37°C 下在含 1% 巯基乙醇的 50mM 磷酸钠缓冲液 pH7.0 中过夜释放天冬酰胺连接的寡糖。使用 Voyager-DE PRO Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),通过基质辅助的激光解吸电离飞行时间 (matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight, MALDI-TOF) 质谱 (mass spectrometry, MS) 分析来分析样品。以阳离子、反射模式使用 2,5-二羟基苯甲酸/2-羟基-5-甲氧基苯甲酸 (9 : 1, 体积 / 体积) 基质来实施 MALDI-TOF MS 分析。小鼠乳来源抗体中的主要碳水化合物 (63%) 是非岩藻糖基化的 Man5。图 1 显示通过 PNG 酶 F 消化从所述抗体中释放的 N-聚糖的 MALDI-TOF MS 分析。将来自小鼠乳来源抗体的结果与来自细胞培养物来源抗体的结果进行比较,显然来自小鼠乳来源抗体的主要寡糖是含有 5 个甘露糖残基和 2 个 GlcNAc 残基的 Man5。

[0261] 对 PNG 酶 F 在 37°C 过夜消化后所释放的 2-氨基苯甲酸标记的寡糖进行高压液相层析 (high-pressure liquid chromatography, HPLC) 分析。用 PNGF 酶在 37°C 过夜处理 80 μ g 抗体。用 10kDa 滤器过滤样品,然后在生物透析器中用水透析过夜。干燥样品,用 2-氨基苯甲酸标记,回收以除去过量的标记物。在蒸发干燥之后,用 500 μ l 水重建样品,根

据 Anumula 等所述的方法 (Cammusco 等, 2000, Anim Biotech 11;1-17), 使用装备有荧光检测器 (230nm 激发, 425nm 发射) 的 HP1100 系统将 100 μ l 注入 Asahipak NH2P-504D 柱 (4.6 $\times$ 250mm, Phenomenex)。Man5 和 Man6 标准品购自 Prozyme。通过 HPLC 分析进行定量, 示于图 2。确认来自小鼠乳来源的抗体种类 (其与标准 Man5 的实验表现相同) 是甘露糖寡糖的是其 Endo H 敏感性的证实 (Maley 等, 1981 和 Tarentino 等, 1974)。用 Endo H 处理之后, Man5 峰消失, 证实了在小鼠乳来源抗体样品中 36.5 分钟所见峰的身份 (图 2 和 3)。存在一些次要种类, 例如含有核心岩藻糖的 G1F (16%) 和 G2F (21%), 以及更少量的非岩藻糖基化的 G1 和 Man6。含有甘露寡糖结构的鸡 IgG 含有 2068 和 1906 处的种类, 对应于 Man8 和 Glc1Man8 (Raju 等)。尽管在 1420 处可检测到 Man6, 但是在 1582、1744 和 1906 处的高聚甘露寡糖明显不存在。相反, 存在于 HEK293 细胞来源的材料中的主要种类是岩藻糖基化的 G0F (55%) 和 G1F (37%), G2F 为次要种类 (8%)。HEK293 细胞已知无法有效对蛋白质进行高水平的唾液酸化 (Chitlaru 等, 2002; Chitlaru 等, 1998)。

[0262] 图 1 (MS 数据) 和图 2 均显示, 乳来源抗体与细胞培养物来源抗体的碳水化合物组成显著不同。图 2 是使用荧光检测的 HPLC 所获得的寡糖图的比较, 显示小鼠乳来源抗体中主要的碳水化合物 (63%) 是非岩藻糖基化 Man5, 而细胞培养物来源抗体中的主要碳水化合物则被岩藻糖基化。非糖基化抗体不得到任何峰。HPLC 数据显示, 乳来源抗体中的主要寡糖是甘露寡糖, 而细胞培养物来源抗体中缺乏甘露寡糖。

[0263] 伴刀豆球蛋白 A (Con A) 是一种结合末端甘露糖残基的凝集素 (Goldstein 等, 1965a, Biochim Biophys Acta; Goldstein 等, 1965b Biochem)。与我们乳来源抗体中含有甘露寡糖的发现一致, 其结合伴刀豆球蛋白 A, 并被 α -甲基甘露糖苷洗脱 (图 4)。来源于细胞培养物的材料中的主要种类是具有末端 GlcNAc 残基的 G0F, 预计它不结合伴刀豆球蛋白 A。图 4 显示转基因乳来源抗体中含有甘露寡糖。相反, 所使用的非糖基化抗体在相同实验中不结合。

[0264] 来源于 HEK293 细胞的材料中存在的主要种类是岩藻糖基化的 G0F (55%) 和 G1F (37%), G2F 为次要种类 (8%)。这意味着来源于细胞培养物的抗体是完全岩藻糖基化的。来源于细胞培养物的抗体中缺乏唾液酸修饰, 因为已知 HEK293 无法有效对蛋白质进行高水平的唾液酸化 (Chitlaru 等, 2002; Biochem J 363, 619-631)。

[0265] 与来源于细胞培养物的抗体中绝大多数糖基化是岩藻糖基化的情况相反, 小鼠乳来源抗体中的主要碳水化合物 (63%) 是非岩藻糖基化 Man5。小鼠乳来源抗体中的主要种类与标准 Man5 的实验表现一致。在 HPLC 分析中 G1F 的实验表现与 Man5 接近, 但是确认该峰是甘露糖寡糖的是其 Endo H 敏感性的证实 (Maley 等, 1981, J Biol Chem 256: 1088-1090)。在用 Endo H 处理之后, 小鼠乳来源抗体样品中 36.5 分钟处可见的峰消失 (图 2D)。存在次要种类例如含核心岩藻糖的 G1F (16%) 和 G2F (21%), 以及更少量的非岩藻糖基化的 G1 和 Man6。对山羊乳来源物质中糖的 MALDI-TOF 分析显示了比小鼠乳来源的材料中所见更为广泛的含甘露糖的糖分布, 值得注意的是, Man7 和 Man8 的存在表明甘露糖苷酶加工不足。这使得 HPLC 分析的定量更加困难, 因为非岩藻糖基化糖分散在更宽的范围内。HPLC 分析证明存在代表 10-20% 总糖的许多 EndoH 敏感峰 (图 2)。

[0266] 流式细胞术分析

[0267] 通过 FACS 分析评价不同形式嵌合抗体的结合。将 2×10^5 个细胞与 5% FBS 的 PBS

中 $1 \mu\text{g/ml}$ 浓度的抗体一起孵育。用 1 : 100 稀释的 FITC 标记的山羊抗人 Fc (Jackson Immuno Research Labs) 检测抗体,通过 FACSCalibur (Becton Dickinson) 进行分析。图 5 所示数据证明,所研究的所有抗体均相似地结合抗原,无论其来源如何。与预计一致,抗 DNP 抗体对照不结合。

[0268] 表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance)

[0269] 通过表面等离子共振在 BIAcore2000 设备和 CM5 传感芯片 (BIAcore, Uppsala, Sweden) 上测定 IgG1 与 CD16a 相互作用的动力学情况。用 NHS/EDC 偶联条件将抗 HPC4 抗体固定在所述芯片上。所述抗体浓度是 $20\text{--}50 \mu\text{g/ml}$, pH 为 5.0, 得到 11000RU 的芯片。CD16a-HPC4 被捕获到此抗体表面,其中使用 3 分钟注射的 $30 \mu\text{g/ml}$ 蛋白质,流速为 $5 \mu\text{g/分钟}$,所述蛋白质在含有 0.15M NaCl 和 0.005% (体积 / 体积) P20 表面活性剂 (HBS-P 缓冲液, BIAcore AB) 并加入 1mM CaCl_2 的 10mM Hepes 缓冲液 (pH7.4) 中。然后将测试抗体在上述结合缓冲液中稀释到 $50 \mu\text{g/ml}$, 并以 $20 \mu\text{l/分钟}$ 的流速注射到所捕获的 CD16a 上一分钟。监测解离 3 分钟。然后,在下一轮的捕获 - 结合 - 再生之前,用 HBS-P 缓冲液中制得的 5mM EDTA 的 3 分钟注射来再生表面。图 13 显示与来源于细胞培养物的抗体相比,乳来源抗体具有更强的结合。接着确定这种增强的 ADCC 活性是否反映为对 NK 细胞受体 CD16 的亲和力提高。使用表面等离子共振测定测量多种抗体与固定化 CD16 的结合。乳来源抗体比来源于细胞培养物的抗体结合得更好 (图 13)。

[0270] 细胞测定

[0271] 人肾癌细胞 786-0 和人胚肾 (human embryonic kidney, HEK) 293 细胞购自 ATCC。786-0 是来自肾细胞腺癌的贴壁上皮细胞 (Williams 等, 1978, *In vitro* 14 : 779-786)。所述细胞在调整为含 2mM L-谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖、10mM HEPES 和 1.0mM 丙酮酸钠、90%, 胎牛血清 (FBS) 10% 的 RPMI 1640 培养基中培养。

[0272] 用表达 CD137 编码序列的 pCEP4 载体转染 CHO 细胞。通过用潮霉素选择来分离克隆,通过 FACS 对细胞表面表达进行筛选,使用一个克隆。

[0273] ADCC 测定

[0274] 为了测试乳来源和细胞培养物来源的抗体的相对 ADCC 活性,制备来自不同来源的相同抗体。制备了四种不同形式的嵌合抗 CD137 抗体。一种形式是通过将 Asn297 突变为谷氨酰胺而成为非糖基化。这作为阴性对照,因为已知非糖基化 IgG 不结合 Fc 受体,且在 ADCC 中无活性 (Nose 等, 1983, PNAS 80 : 6632-6636)。从乳中制备了两种其它形式的抗体,一种来自小鼠乳,另一种来自山羊乳。第四种形式来自瞬时转染的 HEK 293 细胞 (一种人细胞系)。

[0275] 使用 1 : 50 Versene (Invitrogen) 收集 786-0 细胞,重悬于培养基中,使用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ($1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) 标记 1.5 小时,之后用 RPMI 将细胞洗涤三遍。效应细胞是如前之前 van Epps 等所述 (Van Epps 等, 1999, *J Virol* 73 : 5301-5308) 制备的人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。使用 200 : 1 的效应细胞 : 靶细胞比,因为解冻后 PBMC 的成活力只有 40-60%。细胞在 37°C 下共孵育 12 小时,然后转移 $25 \mu\text{l}$ 上清液用于计数。通过将靶细胞与等量含抗体培养基 (无 PBMC) 一起孵育来测定自发释放。通过将靶细胞与等体积含 1% Triton-X100 (Sigma) 的培养基一起孵育来测定总放射性。按照如下计算特异性裂解百分比 : $([E-S]/(T-S)) \times 100$, 其中 T 是总放射性, E 是实验释放, S 是

自发释放,为 $19 \pm 3\%$ 。

[0276] 为了测试这些制备物的 ADCC 活性,鉴定表达 CD137 的肿瘤细胞系。786-0 是表达少量 CD137 并有时表达 HER2 的肾细胞癌细胞系。为了比较不同形式嵌合抗 CD137 抗体的结合,使用了 FACS。就这个此标准而言所有抗体的结合是相同的(图 5)。但是,当在 ADCC 测定中测定活性时,抗体的效力差别很大。两种乳来源蛋白都是有活性的,而来源于细胞培养物的材料尽管也结合,但不具有任何活性(图 6)。无细胞时的细胞毒性(即自发释放)不存在,这证明该抗体自身不具有杀伤性。在图 6 中,显示在转基因动物的乳中所产生的分子具有增强的 ADCC 活性。此特征提高了转基因乳来源的抗体杀伤靶细胞(例如肿瘤细胞)的能力。所使用的对照是不应结合靶细胞的抗 DNP 抗体以及不应结合 Fc 受体的非糖基化抗 CD137。

[0277] 还测试了这些多种制剂对用 CD137 表达载体转染的 CHO 细胞的 ADCC 活性。同样,所有抗体制备均相同地结合转染细胞(图 11)。乳来源抗体的活性是细胞培养物来源抗体的两倍(图 12)。

[0278] 在一些实施方案中,增强的 ADCC 活性是因为重链恒定区的糖基化中缺乏岩藻糖。在小鼠乳中,糖基化主要是前体 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,而不是岩藻糖。但是发生了一些加工,因为不存在高聚甘露糖种类。乳来源抗体 Man6 可在 1420(图 1)处检测到,而 1582(Man7)、1744(Man8)和 1906(Man9)处的高聚甘露寡糖明显不存在,表明发生了一些甘露糖苷酶 I 介导的加工。

[0279] N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 I(GnT-1)是引起生长中碳水化合物链对高尔基体 α -甘露糖苷酶 II 的敏感性的关键酶。在小鼠乳腺中此酶似乎具有功能性限制,因为糖基化阻断导致 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 的积累(Li 等,1978, J Biol Chem 253 :6426-6431)。这种积累也可以是所述抗体未在此酶所定位的中间高尔基体区室中度过足够时间的结果。不能将 GlcNAc 转移到此链阻止了它被高尔基体 α -甘露糖苷酶 II 切割,该酶将允许 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 II(GnT-II)和半乳糖苷转移酶的进一步加工。1,6-岩藻糖在 GnT-II 修饰之后加入,这解释了为何甘露寡糖结构不被岩藻糖基化(Longmore 等,1982, carbohy Res 100 :365-392)。IgG 的这种甘露寡糖糖基化形式之前已在缺乏 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 I 活性的 Lec1 细胞、CHO 细胞中产生(Wright 等,1994, J Exp Med 180 :1087-1096)。发现它在补体介导的溶血和 FcRI 结合中有缺陷。相比于其它抗体,它显著更多地结合补体活性旁路途径中的 C3(Wright 等, J Immunol 160 :3393-3402)。

[0280] 来源于山羊乳的抗体显示出更异质的糖基化。尽管大量材料进行了 G1F 和 G2F 加工,但含有甘露糖的寡糖为 Man5 至 Man8(图 1)。

[0281] 低水平的岩藻糖消耗导致在 ADCC 增强中的良好效果。抗体的重链是二聚体。如果重链的糖基化是全或无的,那么抗体会在两条重链上均具有甘露寡糖,或者在两条重链上均具有经加工的甘露糖 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$;不会有混合的二聚体。高水平的 ADCC 表明,所述链是独立糖基化的,就增强活性而言仅需一条链中缺乏岩藻糖。抗体链在内质网中多聚化,而糖基化是在高尔基体中完成的。由于重链的独立糖基化及 20%的链为高甘露糖,因此仅有 4%的抗体分子两条链中均含甘露寡糖,64%的两条链均含加工甘露糖,而其余的 32%由一条含甘露寡糖的链和一条含加工甘露糖的链组成。这使得共有 36%的抗体分子具有至少一条甘露寡糖链。因此,看来单个缺乏岩藻糖的重链足以增强 ADCC。考虑到 Fc 受体与免疫球

蛋白分子的不对称结合,这是合理的,所述免疫球蛋白分子中大致是 D1 区结合一条链, D2 区结合另一条链 (Radaev 等,2002, Mol Immun 38 :1073-1083)。因此岩藻糖基化只影响与一个结构域的结合,这足以增强亲和力。在之前研究中,在岩藻糖基化抗体含有 91% 岩藻糖、缺乏岩藻糖的抗体含有 72% 岩藻糖的情况下观察到了相似的 ADCC 提高 (Shinkawa 等, 2003, J Biol Chem 278 :3466-3473)。

[0282] 令人惊奇的是,该实验在这样的低抗原密度下运行得如此良好。已经证明,从 IgG1 中除去岩藻糖可由于有效活化 NK 细胞而降低 ADCC 活性所需的抗原量。这种作用很可能解释了用 CD137 表达很弱的细胞系所获得的优良结果。

[0283] 小鼠乳中产生的抗体在较高浓度时具有比山羊乳来源抗体更高的活性。山羊乳来源的抗体制备物可含有 10% 聚集体,所示聚集体可在不结合靶细胞的情况下直接结合 PBMC。此非生产性结合可阻断 PBMC 的活性 (Kipps 等,1985, J Exp Med 161 :1-17)。

[0284] 因此,已经发现转基因乳是增强了 ADCC 活性的抗体的良好来源。有报道称,在昆虫细胞中产生的抗体比在哺乳动物细胞中产生的相同抗体更加有效 (Lang 等,2004)。尝试了其它系统但是没有成功。在黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 产生的抗体不具有增强的 ADCC 活性,可能是因为它是非糖基化抗体和糖基化抗体的混合物 (Ward 等,2004)。有报道称,在酵母中产生的嵌合抗体具有与来源于细胞培养物的抗体相同的 ADCC 活性 (Horwitz 等, 1988)。Fc γ IIIb 的活化也导致细胞因子的分泌。

[0285] 在一些实施方案中,可以通过使抗体混合物通过凝集素柱来将含有岩藻糖的抗体与非糖基化抗体分离。

[0286] 上文不旨在描述本发明的所有方面或所有实施方案,并且不以任何方式限制本发明。加入并构成说明书一部分的附图展示了本发明的实施方案,并与说明书一起用于解释本发明的原理。

[0287] 本说明书中提及的所有公开出版物和专利申请均通过参考并入本文,其程度等同于具体指明将每个独立的公开出版物或专利申请通过参考并入本文。

[0288] 尽管结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但是应该理解,它能够进行其他改变,本申请旨在涵盖本发明的任何变化、用途或适应性调整,这些变化、用途或适应性调整总体上遵循本发明的原理,并包括本发明所属领域领域中已知或惯用实践范围内可用于本文公开必要特征的改动。

[0289] 本文引用的参考文献不意为承认所述参考文献是现有技术文献。

[0290] 参考文献

[0291] 1. Anolik, J. H., et al., (2003) *A_{RTHITTS} R_{HEUM}* 48, 455-459.

[0292] 2. Anumula, K. R., and Dhume, S. T. (1998) *G_{LYCOBIOLOGY}* 8, 685-694.

[0293] 3. Axford, J. S., N. Sumar, et al. (1992), Changes In Normal Glycosylation Mechanisms In Autoimmune Rheumatic Disease, *J. C_{LIN} I_{NVEST}* 89 (3) :1021-31.

[0294] 4. Baguisi A, et al. (1999), Production of Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer, *N_{ATURE} B_{IOTECH}*, 17 :456-461.

[0295] 5. Cammuso, C., et al., (2000) *A_{NIM} B_{IOTECHNOL}* 11, 1-17.

[0296] 6. Canfield, S. M. and S. L. Morrison (1991) The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the

CH2 domain and is modulated by the hinge region, J. Exp. Med. 173(6) :1483-91.

[0297] 7. Cartron, G., et al., (2002) Blood 99, 754-758.

[0298] 8. Chen, S. H., et al. (2000), Rejection of Disseminated Metastases of Colon Carcinoma by Synergism of IL-12 Gene Therapy And 4-1BB Costimulation, Mol. Ther. 2 : 39-46.

[0299] 9. Chitlaru, T., et al., (2002) Biochem J 363 :619-31.

[0300] 10. Chitlaru, T., et al., (1998) Biochem J 336 :647-58.

[0301] 11. Chiu M. H. et al. (1994), In Vivo Targeting Function of N-Linked Oligosaccharides with Terminating Galactose and N-Acetylgalactosamine Residues, J. Biol. Chem. 269(23) :16195-202).

[0302] 12. Clynes, R. A., et al., (2000) Nat. Med. 6, 443-46.

[0303] 13. Clynes, R. A., et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 652-56.

[0304] 14. Dall'Ozzo, S., et al., (2004) Cancer Res 64, 4664-69.

[0305] 15. Denman, J., et al., (1991) BioTechnology (N.Y.) 9, 839-43.

[0306] 16. Dorai, H., B. M. Mueller, et al. (1991), Aglycosylated Chimeric mouse/human IgG1 Antibody Retains Some Effector Function, Hybridoma 10(2) :211-17.

[0307] 17. Ebert, K. M., et al., (1994) BioTechnology (NY) 12, 699-702.

[0308] 18. Edmunds, T., et al., (1998) Blood 91, 4561-71.

[0309] 19. Foell, J. et al. (2003), CD137 Co-Stimulatory T cell Receptor Engagement Reverses Acute Disease in Lupus-Prone NZB x NZW F1 mice, J. Clin. Invest. 111(10), 1505-1518.

[0310] 20. Fuji, S., T. Nishiura, et al. (1990), Structural Heterogeneity of Sugar Chains in Immunoglobulin G. Conformation of Immunoglobulin G Molecule and Substrate Specificities of Glycosyltransferases, J. Biol. Chem. 265(11) :6009-18.

[0311] 21. Goldstein, I. J., et al., (1965) Biochim. Biophys. Acta 97, 68-76.

[0312] 22. Goldstein, I. J., et al., (1965) Biochemistry 4, 876-83.

[0313] 23. Gottlieb, C., et al., (1975) J. Biol. Chem. 250, 3303-3309.

[0314] 24. Gruel, Y., et al., (2004) Blood 10, 10.

[0315] 25. Guinn, B. A. et al. (1999), 4-1BB Cooperates With B7-1 And B7-2 In Converting A B Cell Lymphoma Cell Line Into A Long-Lasting Antitumor Vaccine, J. Immunol. 162 :5003-5010.

[0316] 26. Harpaz, N., and Schachter, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4885-4893.

[0317] 27. Hong, H. J., J. W. Lee, et al. (2000), A humanized anti-4-1BB monoclonal antibody suppresses antigen-induced humoral immune response in nonhuman primates, J. Immunother. 23(6) :613-21.

[0318] 28. Horwitz, A. H., et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8678-82.

[0319] 29. Jalanko, A., A. Kallio, et al. (1988), An EBV-based mammalian cell expression vector for efficient expression of cloned coding sequences, Biochim. Biophys. Acta 949(2) :206-12.

- [0320] 30. James, D. C., et al., (1995) *B_{TECHNOLOGY}* (N Y) 13, 592-596.
- [0321] 31. Jeffeds, R., J. Lund, et al. (1995), Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation, *I_{MMUNOL L_{ETT}}* 44(2-3): 111-17.
- [0322] 32. Kasinathan P. et al. (2001), Production of Calves from G1 Fibroblasts, *N_{ATURE} B_{TECH}*, 19: 1176-78.
- [0323] 33. Kerr, D. E., and Wellnitz, O., Mammary Expression of New Genes to Combat Mastitis, *J. A_{NIM}. S_{CI}*. 2003. 81: 38-47 (2003).
- [0324] 34. Kim et al. (2001), Divergent Effects of 4-1BB Antibodies on Antitumor Immunity and on Tumor Reactive T-Cell Generation, *C_{ANCER} R_{ESARCH}* 61: 2031-2037.
- [0325] 35. Kim, J. K., M. F. Tsen, et al. (1994), Catabolism of the murine IgG1 molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG in the circulation of mice, *S_{CAND}. J. I_{MMUNOL}*. 40(4): 457-65.
- [0326] 36. Kipps, T. J., et al., (1985) *J E_{XP} M_{ED}* 161, 1-17.
- [0327] 37. Knight, D. M., C. Wagner, et al. (1995), The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions, *M_{OL}. I_{MMUNOL}* 32(16): 1271-81.
- [0328] 38. Koene, H. R., et al., (1997) *B_{LOOD}* 90, 1109-14.
- [0330] 39. Lang, P., et al., (2004) *B_{LOOD}* 103, 3982-85.
- [0331] 40. Leatherbarrow, R. J., T. W. Rademacher, et al. (1985) Effector Functions of a Monoclonal Aglycosylated Mouse IgG2a: Binding and Activation of Complement Component C3 and Interaction with Human Monocyte Fc Receptor, *M_{OL}. I_{MMUNOL}*. 22(4): 407-15.
- [0332] 41. Li, Q., et al. (2003), Polarization Effects of 4-1BB during CD28 Costimulation in Generating Tumor-reactive T Cells for Cancer Immunotherapy, *C_{ANCER} R_{ESARCH}* 63(10): 2546-52.
- [0333] 42. Li, E., and Kornfeld, S. (1978) *J B_{IOLOGICAL} C_{HEM}* 253, 6426-31.
- [0334] 43. Lifely, M. R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M. J. and Phillips, J., (1995) *G_{LYCOBIOLOGY}* 5, 813-822.
- [0335] 44. LoBuglio, A. F., R. H. Wheeler, et al. (1989), Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response, *P_{ROC. N_{ATL}. A_{CAD}. S_{CI}. U S A}* 86(11): 4220-24.
- [0336] 45. Louis, E., et al., (2004) *A_{LIMENT} P_{HARMACOL} T_{HER}* 19, 511-19.
- [0337] 46. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1993), Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin Gs, *M_{OL}. I_{MMUNOL}*. 30(8): 741-8.
- [0338] 47. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1996), Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor 1 and influence the synthesis of its oligosaccharide chains,

J. IMMUNOL. 157(11) :4963-9.

[0339] 48. Lund, J., N. Takahashi, et al. (1995), Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors, FASEB J. 9(1) : 115-9.

[0340] 49. Malaise, M. G., C. Hoyoux, et al. (1990), Evidence for a role of accessible galactosyl or mannosyl residues of Fc domain in the in vivo clearance of IgG antibody-coated autologous erythrocytes in the rat, CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL. 54(3) : 469-83.

[0341] 50. Maley, F., and Trimble, R. B. (1981) J. BIOL. CHEM. 256, 1088-1090.

[0342] 51. Malhotra, R., M. R. Wormald, et al. (1995), Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein, NAT. MED. 1(3) :237-43.

[0343] 52. Martinet, O., et al. (2000), Immunomodulatory gene therapy with interleukin-12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model, J. NATL. CANCER INST. 92 :931-936.

[0344] 53. Maynard, J. and G. Georgiou (2000), Antibody engineering, ANNUAL REV. BIOMED. ENG. 2 :339-76.

[0345] 54. Melero, I., et al. (1997), Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors, NAT. MED. 3 :682-685. BMS.

[0346] 55. Melero, I., et al. (1998), Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway, EUR. J. IMMUNOL. 28 :1116 ~ 1121.

[0347] 56. Mimura, Y., P. Sonderrmann, et al. (2001), Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding, J. BIOL. CHEM. 276(49) :45539-47.

[0348] 57. Miller et al. (2002), 4-1BB-Specific Monoclonal Antibody Promotes the Generation of Tumor-Specific Immune Responses by Direct Activation of CD8 T Cells in a CD40-Dependent Manner, THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 169 :1792-1800. Immunex.

[0349] 58. Mittler, R. S., et al. (1999), Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell energy, J. EXP. MED. 190 :1535.

[0350] 59. Mizuochi, T., T. Taniguchi, et al. (1982), Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G, J. IMMUNOL. 129(5) : 2016-20.

[0351] 60. Mori, K., et al., (2004) BIOTECHNOL. BIOENG. 28, 28.

[0352] 61. Niwa, R., et al., (2004) CANCER RES. 64, 2127-2133.

[0353] 62. Niwa, R., et al., (2005) CLIN. CANCER RES. 11, 2327-2336.

[0354] 63. Niwa, R., et al., (2004) CLIN. CANCER RES. 10, 6248-6255.

[0355] 64. Nose, M., and Wigzell H. (1983), Biological Significance of Carbohydrate Chains on Monoclonal Antibodies, PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A 80(21) :

6632-36.

[0356] 65. Okazaki, A., et al., (2004) *J Mol Biol* 336, 1239-1249.

[0357] 66. Pham, P. L., S. Perret, et al. (2003), Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293EBNA1 cells: Peptone additives improve cell growth and transfection efficiency, *BioTechnol BioEng* 84(3) :332-42.

[0358] 67. Pollock, D. P., et al., (1999) *J Immunol Methods* 231, 147-157.

[0359] 68. Rademacher, T. W. (1993), Glycosylation as a Factor Affecting Product Consistency, *BioLogicals* 21(2) :103-4.

[0360] 69. Rademacher, T. W., S. W. Homans, et al. (1986), Immunoglobulin G as a glycoprotein, *Biochem Soc Symp* 51 :131-48.

[0361] 70. Rademacher, T. W., R. B. Parekh, et al. (1988), The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Springer Semin Immunopathol* 10(2-3) :231-49.

[0362] 71. Raju, T. S., et al., (2000) *Glycomology* 10, 477-486.

[0363] 72. Rothman, R. L., et al., (1989) *Mol Immunol* 26, 1113-23.

[0364] 73. Rudd, P. M., R. J. Leatherbarrow, et al. (1991), Diversification of the IgG molecule by oligosaccharides, *Mol Immunol* 28(12) :1369-78.

[0365] 74. Remington's Pharmaceutical Sciences (16th ed., Osol, A., editor, Mack, Easton Press. (1980)).

[0366] 75. Sacchi, S., M. Federico, et al. (2001), Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab, *Crit Rev Oncol Hematol* 37(1) :13-25.

[0367] 76. Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2nd Edition).

[0368] 77. Shen, E. S., G. M. Cooke, et al. (1995), Improved expression cloning using reporter genes and Epstein-Barr virus ori-containing vectors, *Gene* 156(2) :235-9.

[0369] 78. Shields, R. L., et al., (2002) *J Biol Chem* 277, 26733-26740.

[0370] 79. Shinkawa, T., et al., (2002) *J Biol Chem* 277, 8.

[0371] 80. Simmons, L. C., D. Reilly, et al. (2002), Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies, *J Immunol Methods* 263(1-2) :133-47.

[0372] 81. Stanley, P. (1984), Glycosylation Mutants of Animal Cells, *Annu Rev Genet* 18 :525-52.

[0373] 82. Stanley, P., et al., (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3323-27.

[0374] 83. Strome S. E. et al. (2002), Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response, *Cancer Research* 62 :1884-89.

[0375] 84. Sumar, N., K. B. Bodman, et al. (1990), Analysis of glycosylation changes in IgG using lectins, *J Immunol Methods* 131(1) :127-36.

[0376] 85. Sutton, B. J. and D. C. Phillips (1983), The three-dimensional structure of the carbohydrate within the Fc fragment of immunoglobulin G, *Biochem Soc Trans* 11(Pt

2) :130-2.

[0377] 86. Sun, Y. et al. (2002), Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of spontaneous autoimmune disease, *NAT MED*. 8(12), 1405-13.

[0378] 87. Sun, Y. et al. (2002), Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. IMMUNOL*. 168(3), 1457-65.

[0379] 88. Takeuchi, T., et al., (1999) *AUTOIMMUNITY* 31, 265-271.

[0380] 89. Tamamori, Y., et al., (2002) *INT J ONCOL* 21, 649-654.

[0381] 90. Tandai, M., T. Endo, et al. (1991), Structural study of the sugar moieties of monoclonal antibodies secreted by human-mouse hybridoma, *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 291(2) :339-48.

[0382] 91. Tao, M. H. and S. L. Morrison (1989), Studies of glycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region, *J. IMMUNOL*. 143(8) :2595-601.

[0383] 92. Tao, M. H., R. I. Smith, et al. (1993), Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation, *J. EXP. MED*. 178(2) :661-67.

[0384] 93. Tarentino, A. L., et al., (1974) *J BIOL CHEM* 249, 818-24.

[0385] 94. Treon, S. P., et al., (2005) *J CLIN ONCOL* 23, 474-81.

[0386] 95. Tsuchiya, N., T. et al. (1989), Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG, *J. RHEUMATOL*. 16(3) : 285-90.

[0387] 96. Van Epps, H. L., Schmaljohn, C. S., and Ennis, F. A. (1999) *J VIROL* 73, 5301-5308.

[0388] 97. Walker, M. R., J. Lund, et al. (1989), Aglycosylation of human IgG and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors, *BIOCHEM J*. 259(2) :347-53.

[0389] 98. Ward, M., et al., (2004) *APPL ENVIRON MICROBIOL* 70, 2567-76.

[0390] 99. White, K. D., M. B. Frank, et al. (1996), Effect of immunoglobulin variable region structure on C3b and C4b deposition, *MOL. IMMUNOL*. 33(9) :759-68.

[0391] 100. Wilcox R. A., et al. (2002), Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors, *J. CLIN. INVEST*. 109 :651-59.

[0392] 101. Wilcox R. A. et al. (2002), Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T lymphocytes and responsiveness to interleukin-2, *J. IMMUNOL*. 169 :4230-36.

[0393] 102. Williams, R. D., et al., (1978) *IN VITRO* 14, 779-786.

[0394] 103. Wilmut I, et al. (Oct 10, 2002), Somatic Cell Nuclear Transfer, *NATURE* 419(6907) :583-86.

- [0395] 104. Wilmut I, et al. (Feb 27, 1997), Viable Offspring Derived From Fetal and Adult Mammalian Cells, *NATURE* 385(6619) :810-3.
- [0396] 105. Wolff, E. A., et al., (1993) *CANCER RES* 53, 2560-65.
- [0397] 106. Wright, A. and S. L. Morrison (1994), Effect of altered CH2-associated Carbohydrate Structure On The Functional Properties And In Vtvo Fate Of Chimeric Mouse-Human Immunoglobulin G1, *J. EXP. MED.* 180(3) :1087-96.
- [0398] 107. Wright, A., and Mordson, S. L. (1998) *J IMMUNOL* 160, 3393-3402.
- [0399] 108. Wu, J., et al., (1997) *J CLIN INWST* 100, 1059-1070.
- [0400] 109. Yamane-Ohnuki, N., et al., (2004) *BIO TECHNOL. BIOENG.* 87, 614-22.
- [0401] 110. Zhou, Q., et al., (2005) *J. BIO TECHNOL.* 117, 57-72.
- [0402] 111. Zhu G., et al. (2001), Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB(CD137) ligand/I-E β transgenic mice, *J. IMMUNOL.* 167 :2671-6.
- [0403] 112. Zou X, et al. (2002), Generation of Cloned Goats (*Capra Hircus*) from Transfected Foetal Fibroblast Cells, the Effect of Donor Cell Cycle, *MOL REPROD DEV.* ; 61 :164-172.
- [0404] Chen et al., 20050013811

[0001]

<110> GTC 生物治疗有限公司

<120> 具有增强的抗体依赖性细胞毒性活性的抗体及其生产方法和用途

<130> G0744.70045WO00

<140> 未指定

<141> 2006-10-23

<150> US 60/729,054

<151> 2005-10-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 1

agggtaccaa gcttgaaatc aaacgaac

28

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 2

aagggtccgg atcctcgagg atcctaacac tctcccctgt tgaagctc

48

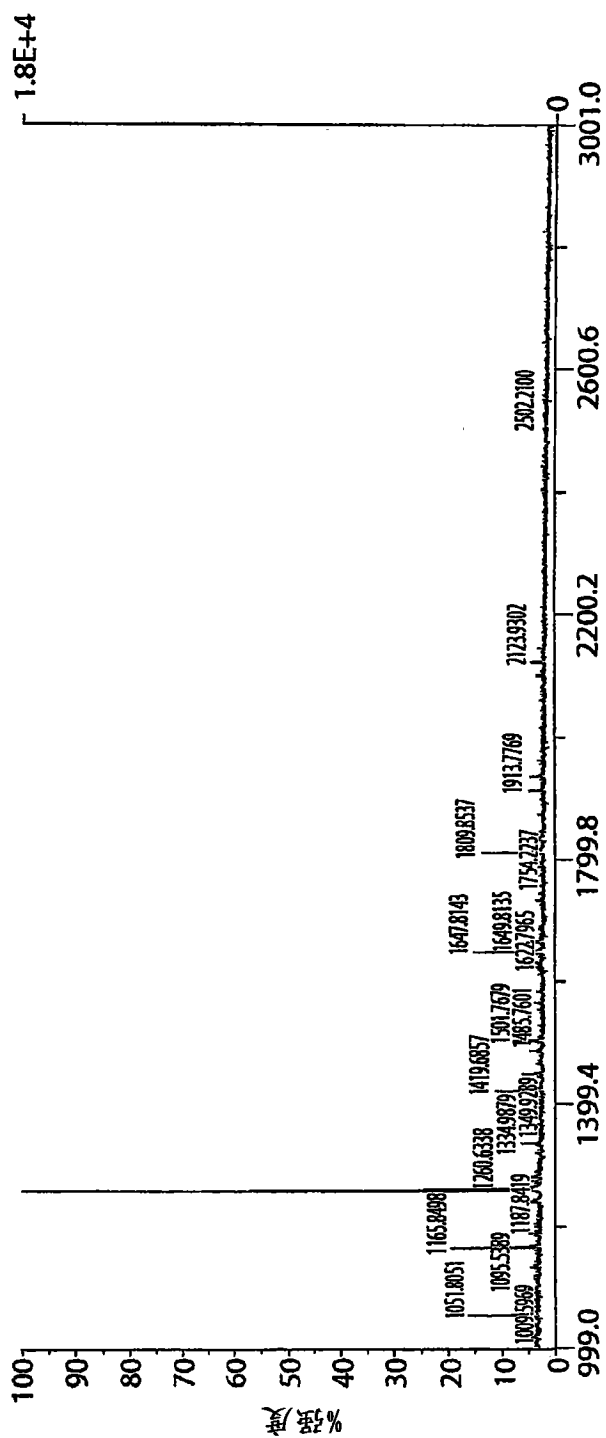


图 1A

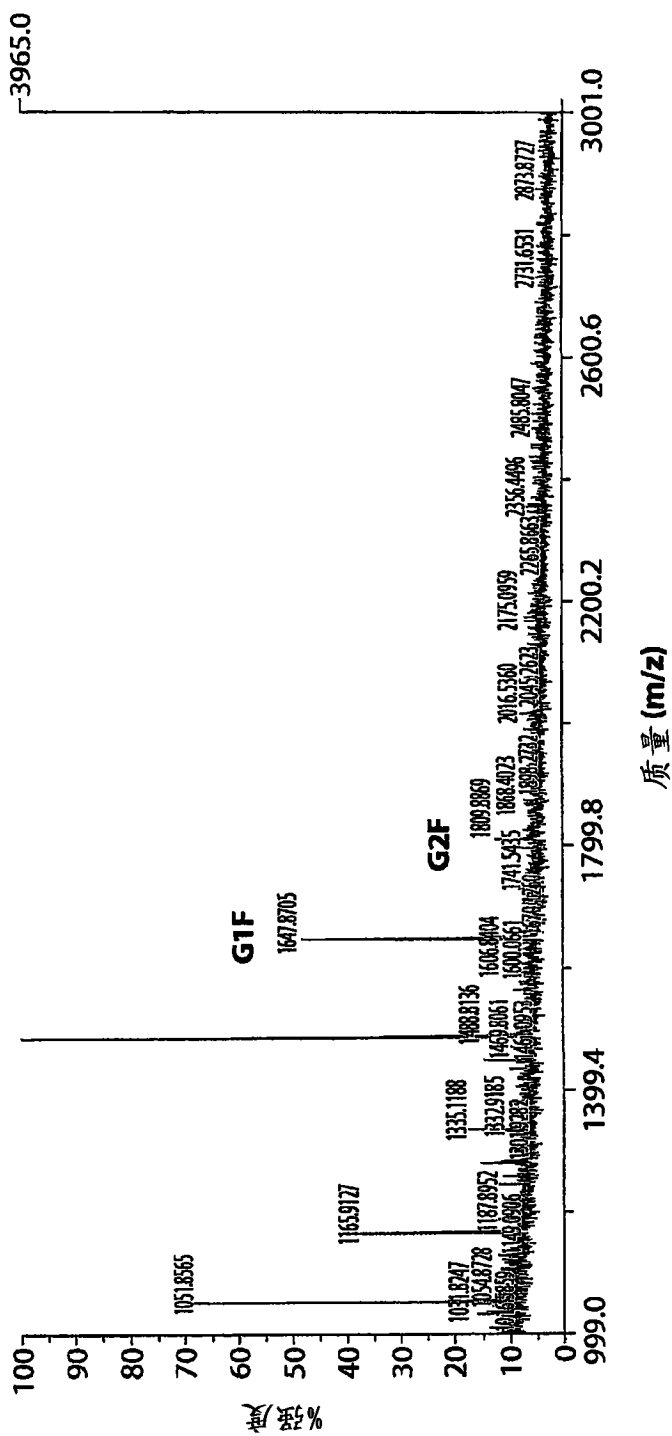
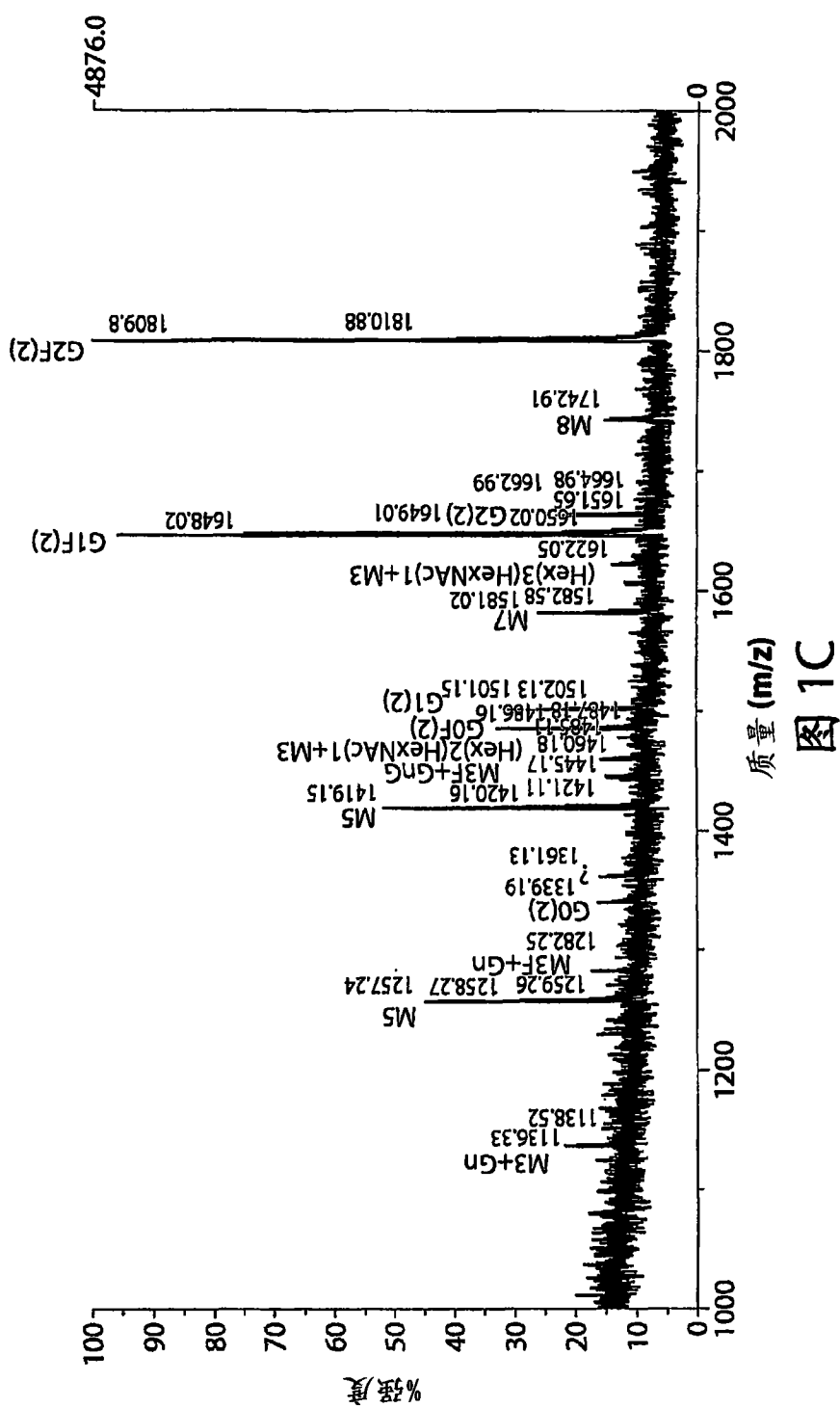


图1B



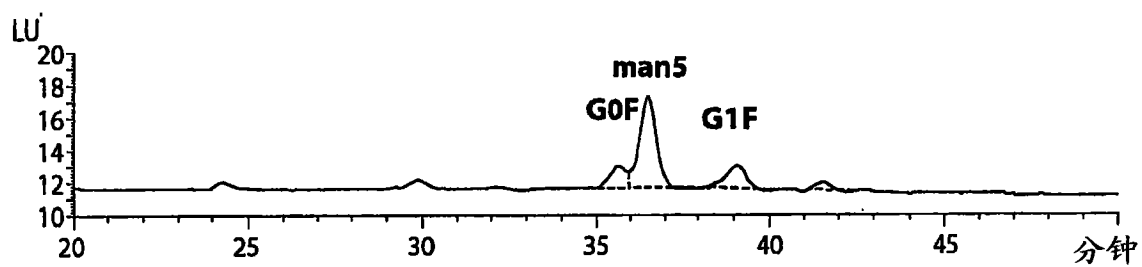


图 2A

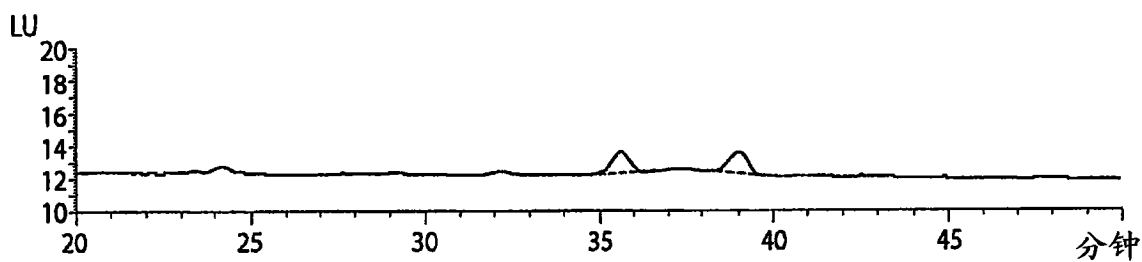


图 2B

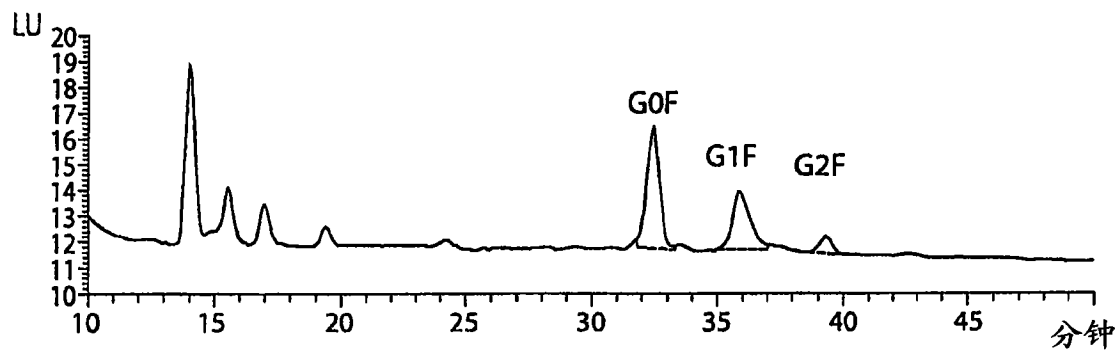


图 2C

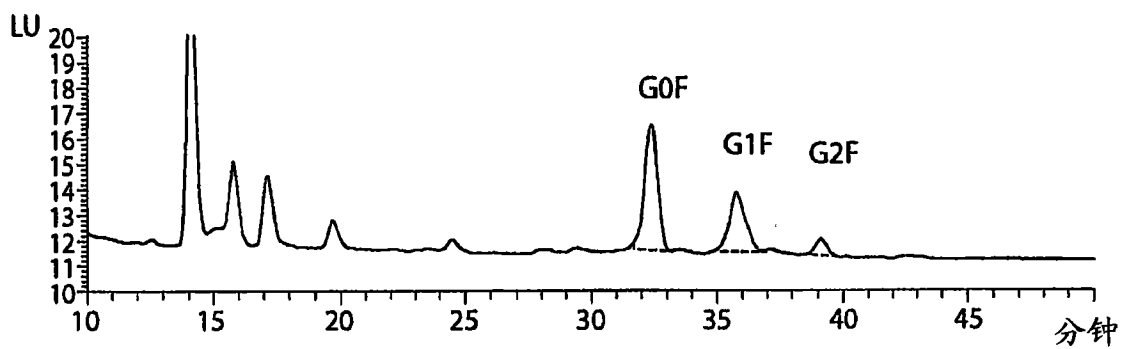


图 2D

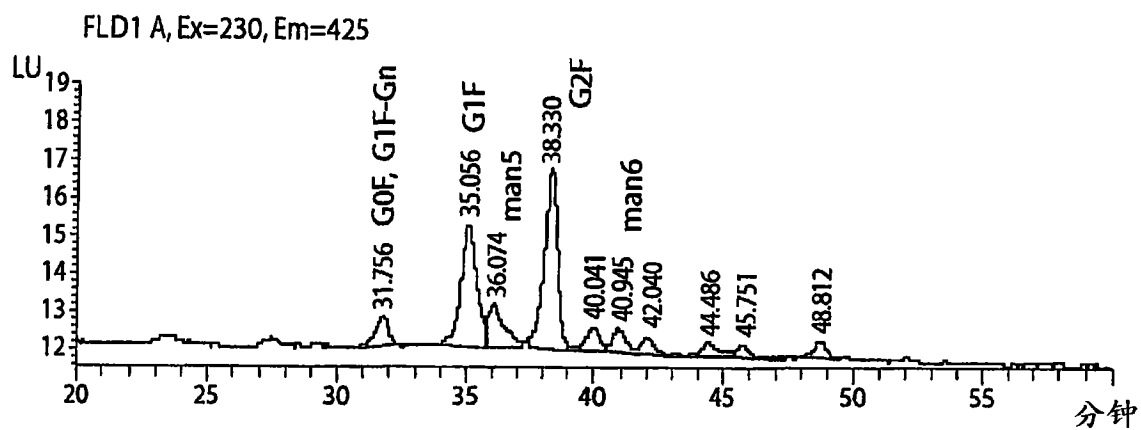


图 2E

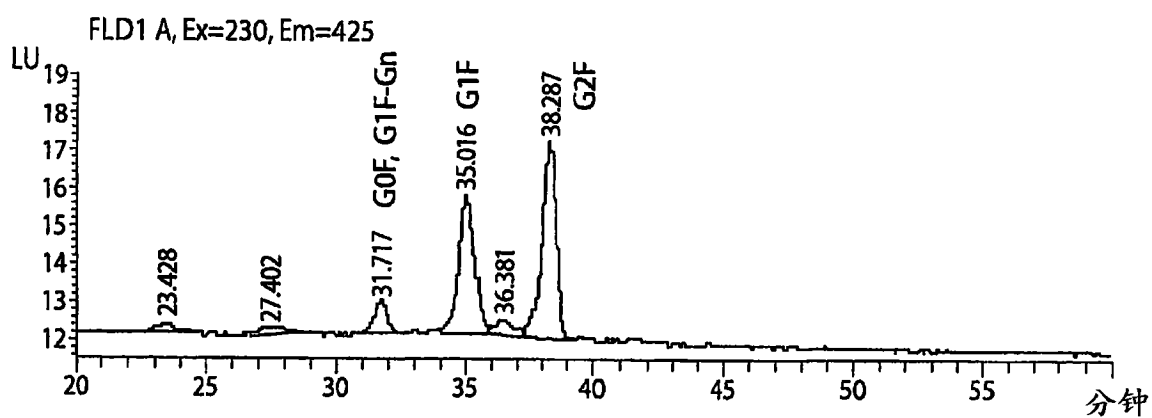


图 2F

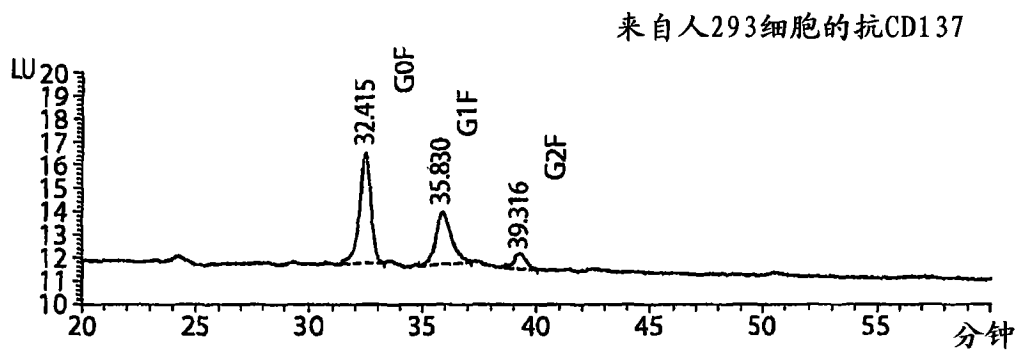


图 3A

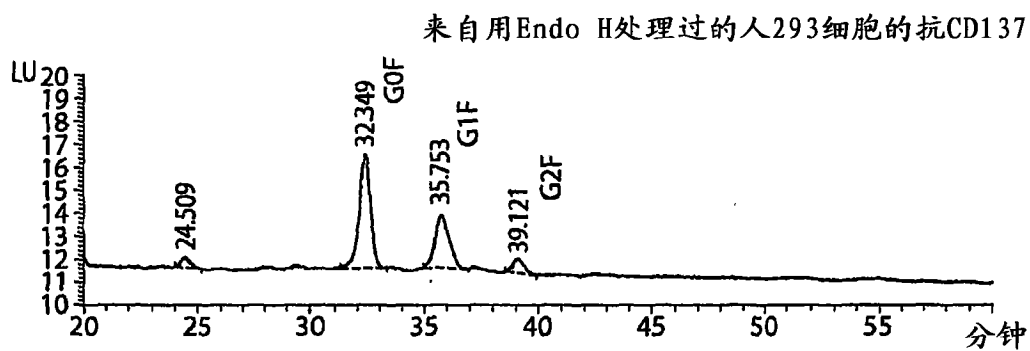


图 3B

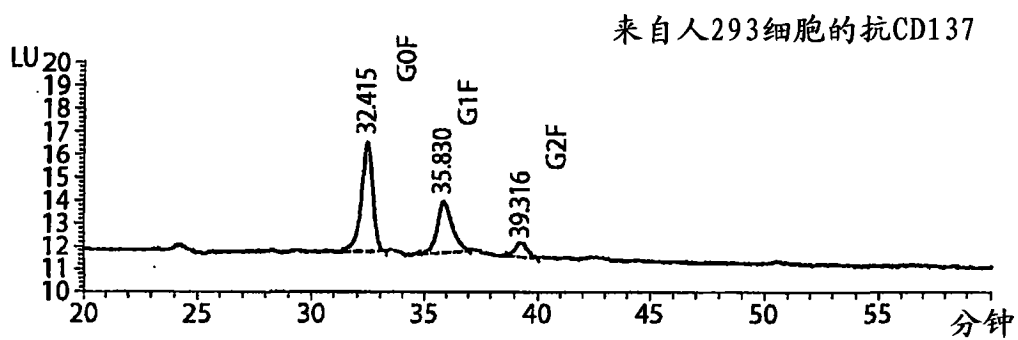


图 3C

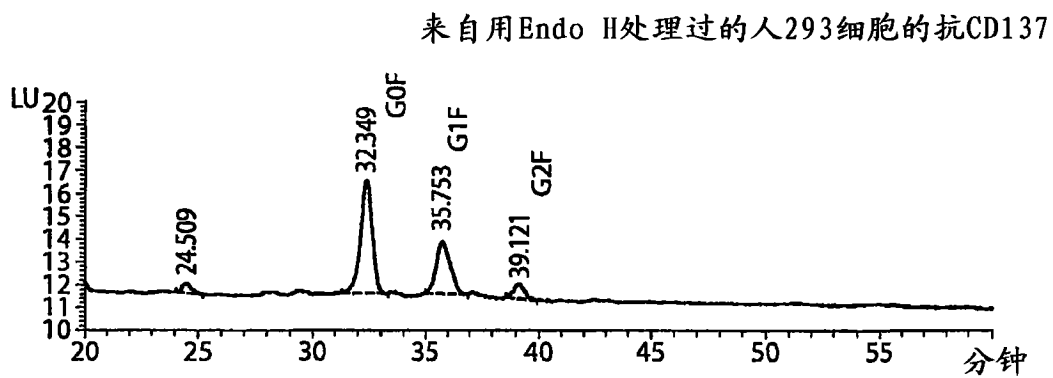


图 3D

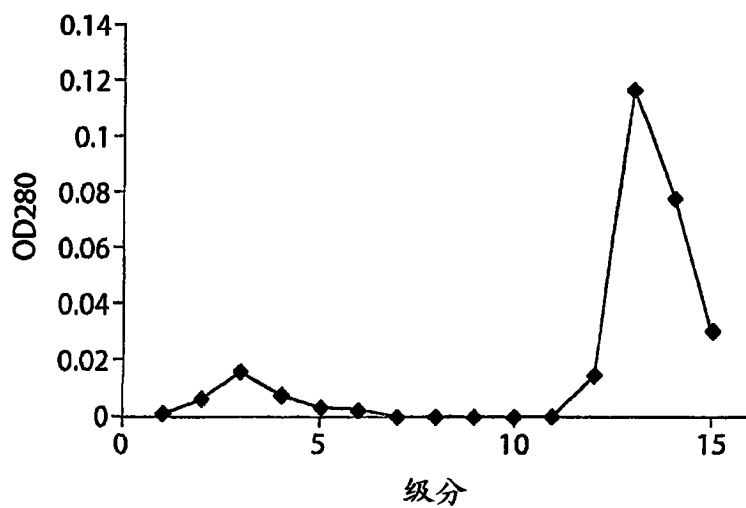


图 4A

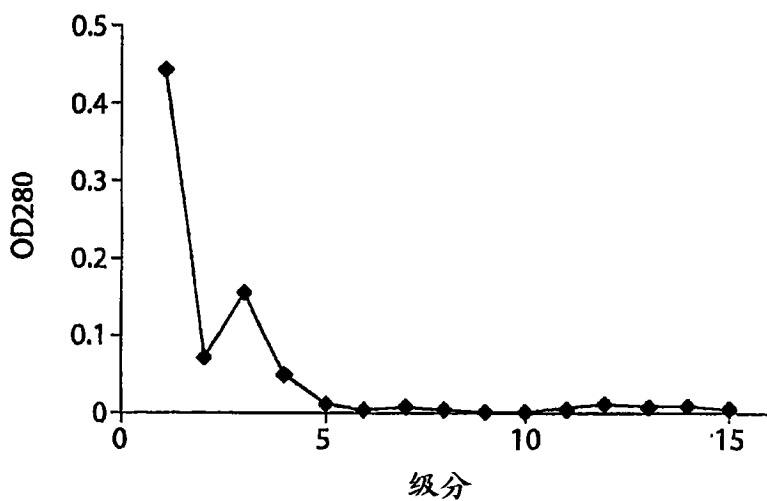


图 4B

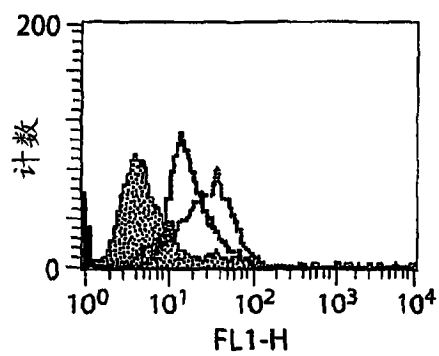


图 5A

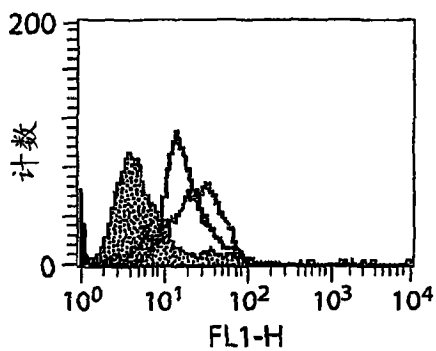


图 5B

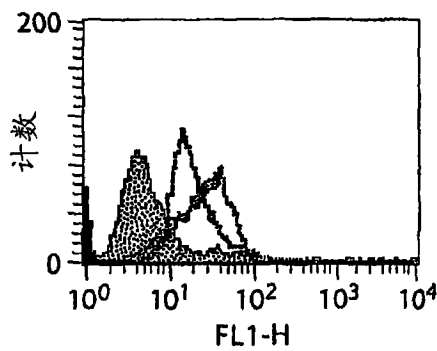


图 5C

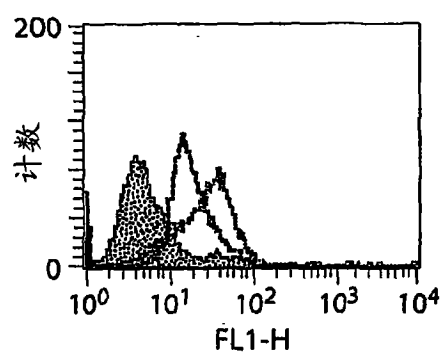


图 5D

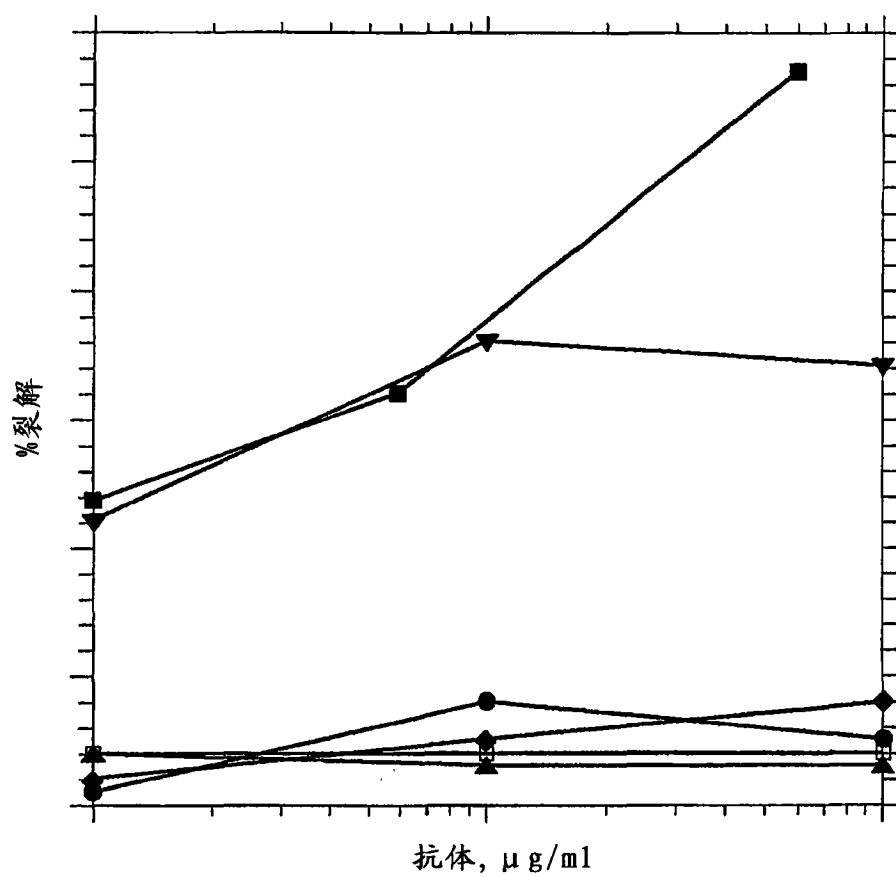


图 6

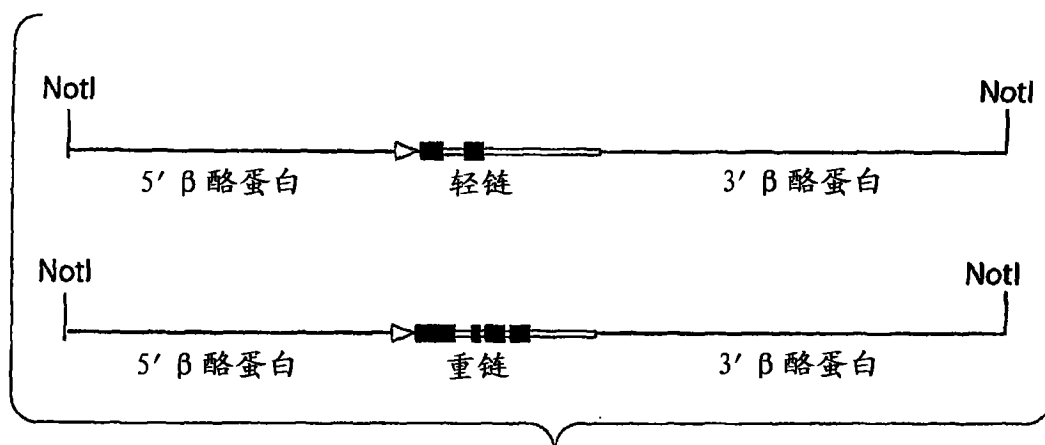


图 7

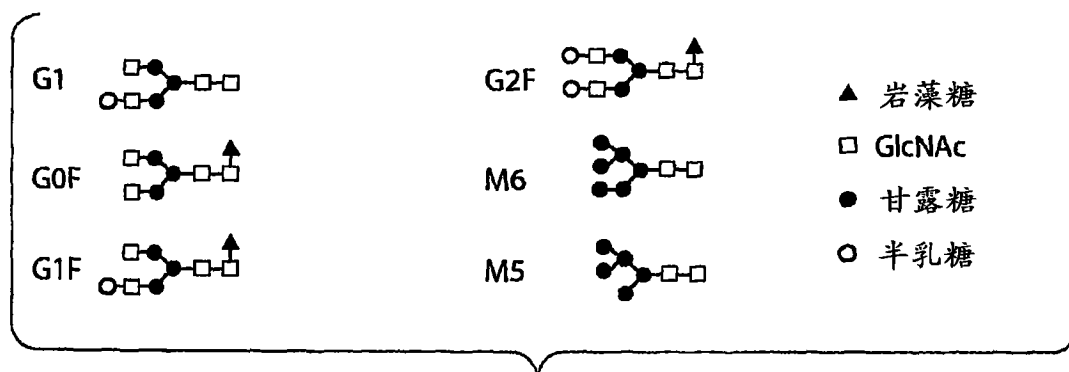


图 8

一个生产方法实施例的流程图

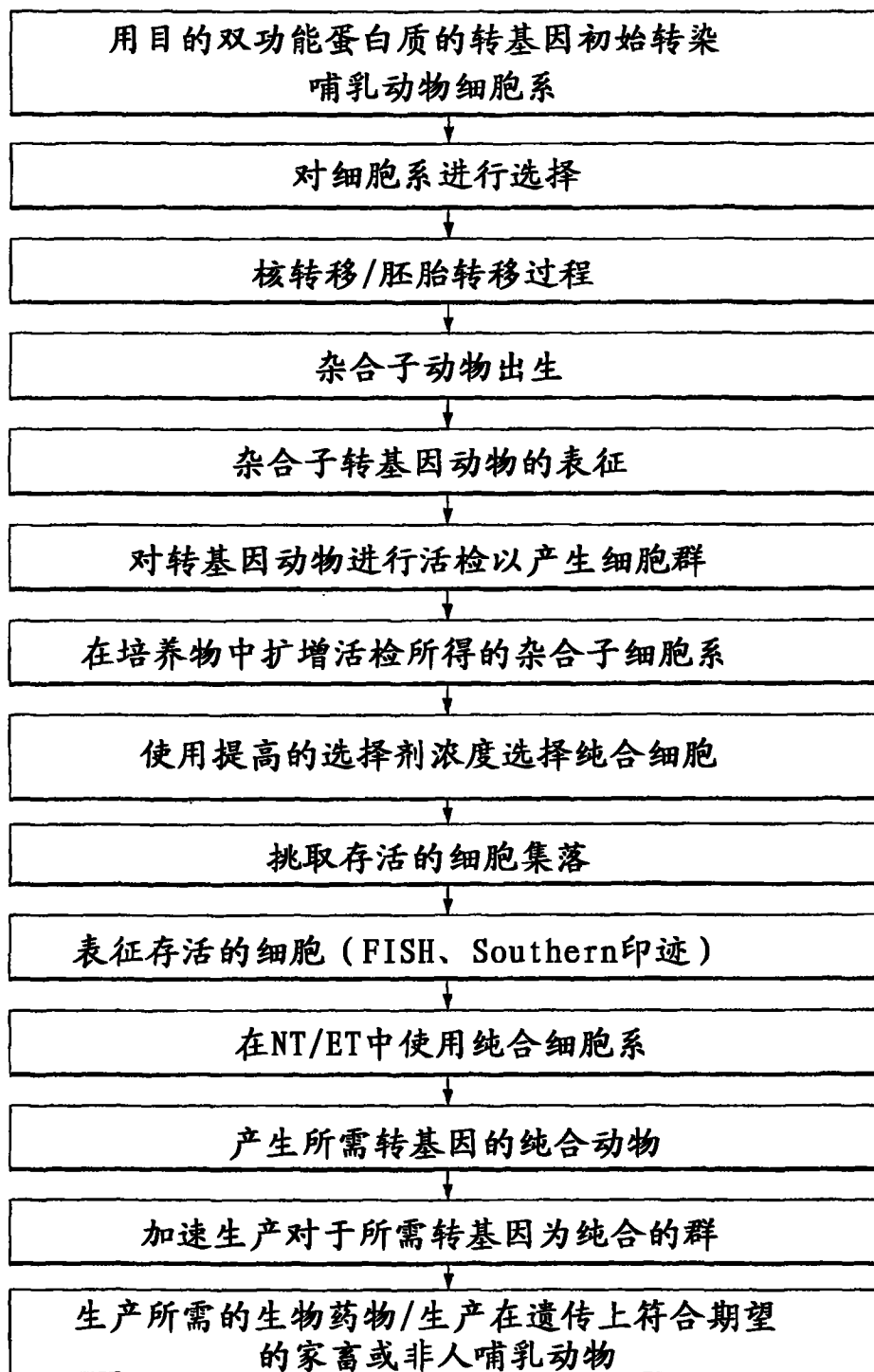


图 9

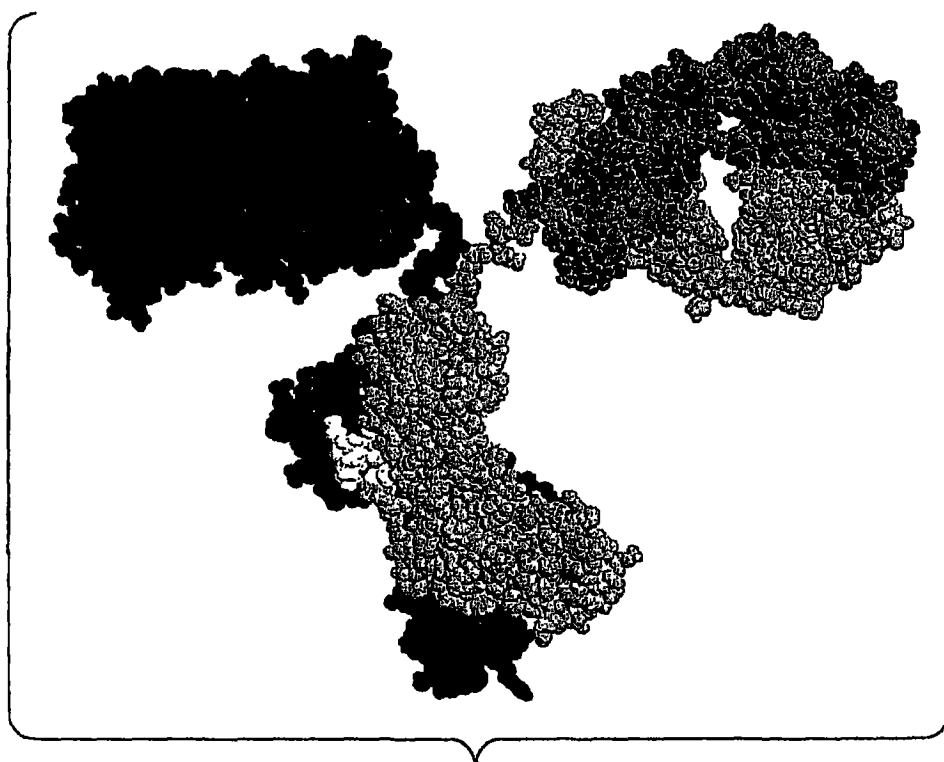


图 10A

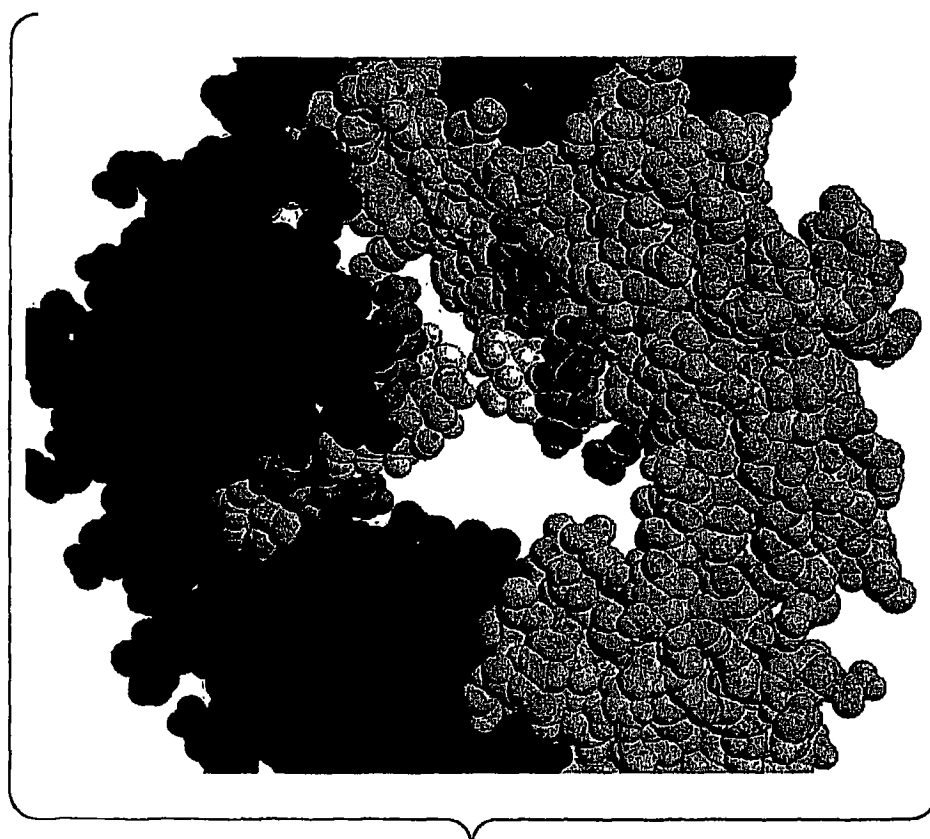


图 10B

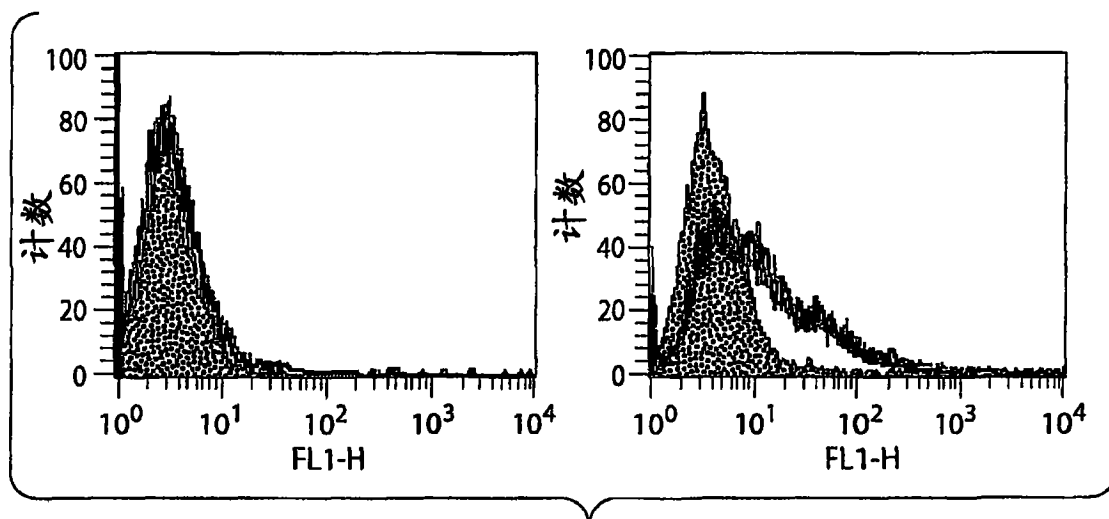


图 11

ADCC: 1小时标记/15小时测定
在CHO或表达CD137的CHO细胞系上测试CD137抗体
E: T比为100: 1 PBMC

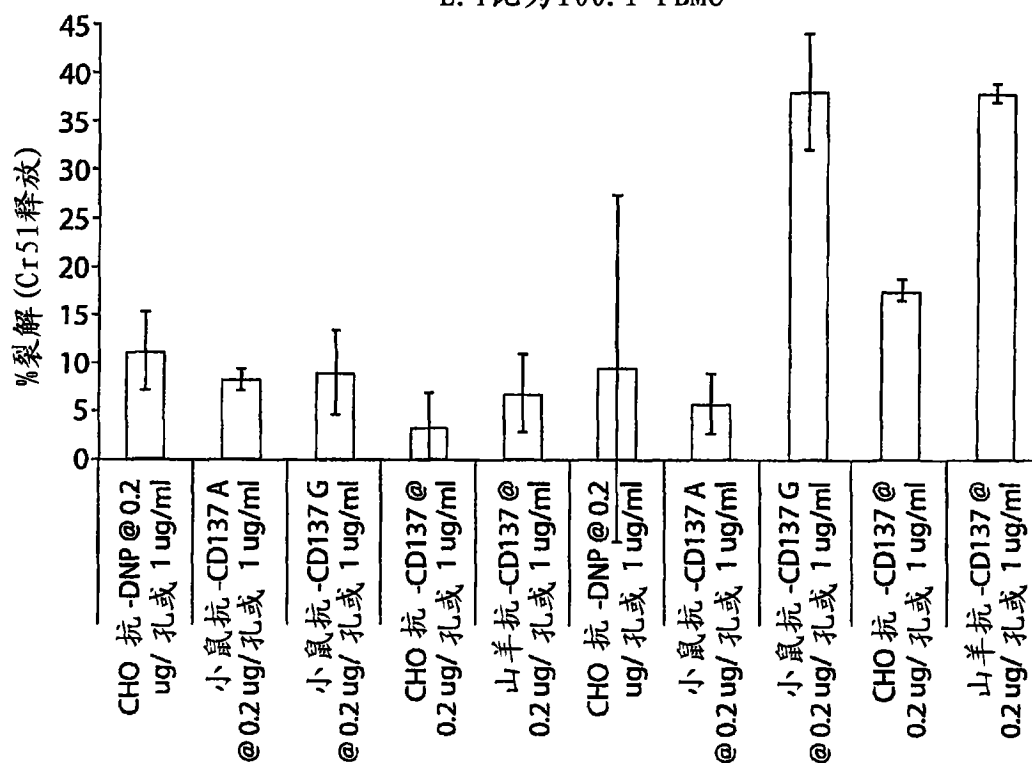


图 12

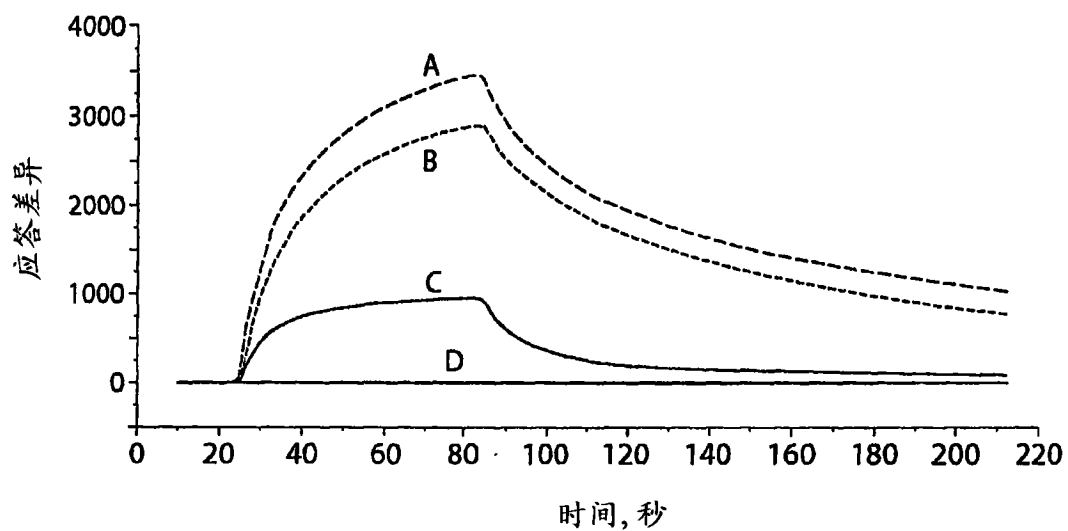


图 13

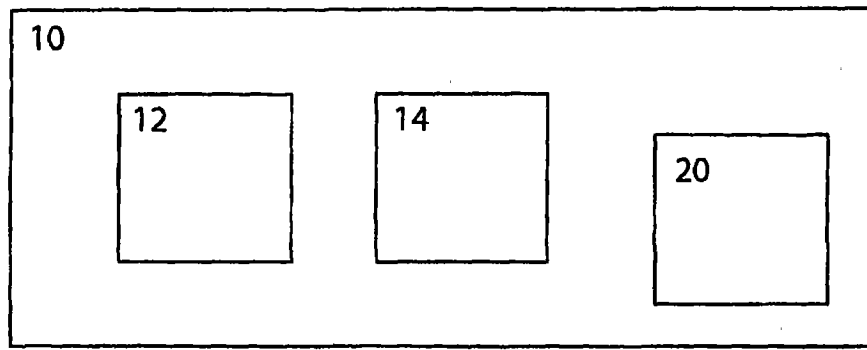


图 14