

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 5/10
C12N 5/12 C12N 5/16
C12N 5/20 C12N 5/24
C12N 9/10 C12N 15/12
C12N 15/13 C12N 15/54
C07K 16/28 C07K 16/30
A61K 39/395



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02818173.5

[43] 公开日 2004 年 12 月 15 日

[11] 公开号 CN 1555411A

[22] 申请日 2002.8.5 [21] 申请号 02818173.5
[30] 优先权
[32] 2001. 8. 3 [33] US [31] 60/309,516
[86] 国际申请 PCT/US2002/024739 2002.8.5
[87] 国际公布 WO2003/011878 英 2003.2.13
[85] 进入国家阶段日期 2004.3.17
[71] 申请人 格黎卡特生物技术股份公司
地址 瑞士苏黎世
[72] 发明人 J·珍－麦瑞特 P·乌玛娜
J·E·贝利

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 李 瑛

权利要求书 5 页 说明书 39 页 附图 13 页

[54] 发明名称 抗体－依赖性细胞毒性增大的抗体
糖基化变体

[57] 摘要

本发明涉及蛋白质糖基化工程领域。更具体地说，本发明涉及糖基化工程产生具有提高的治疗性能的蛋白质，包括具有提高的抗体－依赖性细胞毒性的抗体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种通过表达至少一种编码 β (1,4)-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 的核酸而产生具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的多肽的工程宿主细胞,其中由所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子,抗体片段,和包含与免疫球蛋白的 Fc 区等价的区域的融合蛋白,并且其中以足以提高 Fc 区中带有等分杂合寡糖或半乳糖基化复合体寡糖或其混合物的所述多肽相对于 Fc 区中带有等分复合体寡糖的多肽的比例的量表达所述 GnT III.

2. 权利要求 1 的宿主细胞,其中所述多肽是 IgG 或其片段.

3. 权利要求 1 的宿主细胞,其中所述多肽是 IgG1 或其片段.

4. 权利要求 1 的宿主细胞,其中所述多肽是包含与人 IgG 的 Fc 区等价的区域的融合蛋白.

5. 权利要求 1 的宿主细胞,其中包含至少一种编码 GnTIII 的基因的核酸分子已被导入所述宿主细胞中.

6. 权利要求 1 的宿主细胞,其中所述宿主细胞经工程处理使得内源 GnT III 基因被激活.

7. 权利要求 6 的宿主细胞,其中所述内源 GnTIII 已经通过将提高基因表达的 DNA 元件插入到宿主染色体中而被激活.

8. 权利要求 6 的宿主细胞,其中选择带有触发内源 GnTIII 表达的突变的所述宿主细胞.

9. 权利要求 8 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是 CHO 细胞突变体 lec 10.

10. 权利要求 1 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞.

11. 权利要求 10 的宿主细胞,其中所述多肽是抗-CD20 抗体.

12. 权利要求 11 的宿主细胞,其中所述抗-CD20 抗体是 IDEC-C2B8.

13. 权利要求 10 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是 SP2/0 细胞.

14. 权利要求 13 的宿主细胞,其中所述抗体是嵌合式抗-人肾细胞癌单克隆抗体 chG250.

15. 权利要求 5 的宿主细胞,其中所述编码 GnTIII 的至少一种基因已被导入所述宿主细胞染色体中.

16. 权利要求 6 的宿主细胞,其中所述内源 GnTIII 已经通过将启动子元件, 转座子, 或逆转录病毒元件插入到宿主细胞的染色体中而被激活.

17. 权利要求 1 的宿主细胞,进一步包含至少一种编码抗体分子, 抗体片段或者含有等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的融合蛋白的转染的核酸.

18. 权利要求 1 的宿主细胞,其中所述至少一种编码 GnTIII 的核

酸与组成型启动子元件操作性连接。

19. 权利要求 17 的宿主细胞,其中所述宿主细胞包含编码下面蛋白质中的至少一种转染的核酸: 抗-CD20 抗体,嵌合式抗-人成神经细胞瘤单克隆抗体 chCE7, 嵌合式抗-人肾细胞癌单克隆抗体 chG250, 嵌合式抗-人结肠癌,肺癌,和乳房癌单克隆抗体 ING-1, 人源化抗-人 17-1A 抗原单克隆抗体 3622W94, 人源化抗-人结肠直肠肿瘤抗体 A33, 抗 GD3 神经节苷脂 R24 的抗-人黑素瘤抗体,或者嵌合式抗-人鳞状细胞癌单克隆抗体 SF-25, 抗-人 EGFR 抗体,抗-人 EGFRvIII 抗体,抗-人 PSMA 抗体,抗-人 PSCA 抗体,抗-人 CD22 抗体,抗-人 CD30 抗体,抗-人 CD33 抗体, 抗-人 CD38 抗体, 抗-人 CD40 抗体, 抗-人 CD45 抗体, 抗-人 CD52 抗体, 抗-人 CD138 抗体, 抗-人 HLA-DR 变体抗体, 抗-人 EpCAM 抗体, 抗-人 CEA 抗体, 抗-人 MUC1 抗体, 抗-人 MUC1 核心蛋白抗体, 抗-人畸变糖基化 MUC1 抗体, 抗包含 ED-B 结构域的人纤连蛋白变体的抗体或抗-人 HER2/neu 抗体。

20. 一种在宿主细胞中产生多肽的方法, 包括在允许产生具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的所述多肽的条件下培养权利要求 1-19 任一项的宿主细胞。

21. 权利要求 20 的方法,进一步包括分离所述具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的多肽。

22. 权利要求 20 的方法,其中所述宿主细胞包含编码含有等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的融合蛋白的至少一种核酸。

23. 权利要求 20 的方法,其中所述多肽的 Fc 区中 50%以上的寡糖是等分的。

24. 权利要求 20 的方法,其中所述多肽的 Fc 区中 70%以上的寡糖是等分的。

25. 权利要求 20 的方法,其中 Fc 区中等分杂合寡糖或半乳糖基化复合体寡糖或其混合物的比例大于所述多肽的 Fc 区中等分复合体寡糖的比例。

26. 权利要求 20 的方法,其中所述多肽是抗 CD20 抗体 IDEC-C2B8, 并且由所述宿主细胞产生的 IDEC-C2B8 抗体具有糖基化分布,如 MALDI/TOF-MS 分析的,与图 2E 所示的基本上相当。

27. 权利要求 20 的方法,其中所述多肽是 chG250 单克隆抗体并且所述宿主细胞产生的 chG250 抗体具有糖基化分布,如 MALDI/TOF-MS 分析的,与图 7D 所示的基本上相当。

28. 通过权利要求 21 的方法制备的具有提高的抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 的抗体。

29. 权利要求 28 的抗体,其中所述抗体选自 IDEC-C2B8, chCE7, ch-G250, 人源化抗-HER2 单克隆抗体, ING-1, 3622W94, SF-25, A33, 和 R24。

30. 通过权利要求 21 的方法制备的包含等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的并且具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的抗体片段。

31. 通过权利要求 21 的方法制备的包含等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的并且具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的融合蛋白。

32. 含有权利要求 28 的抗体和药学可接受载体的药物组合物。

33. 含有权利要求 30 的抗体片段和药学可接受载体的药物组合物。

34. 含有权利要求 31 的融合蛋白和药学可接受载体的药物组合物。

35. 一种治疗癌症的方法，包括对需要治疗的患者施用治疗有效量的权利要求 32-34 任一项的药物组合物。

36. 一种改进的以 B-细胞排除为基础的疾病治疗方法，包括对需要治疗的人患者施用治疗有效量的抗体，所述改进包括施用治疗有效量的由权利要求 28 的方法制备的抗体。

37. 权利要求 36 的改进的方法，其中所述抗体是抗-CD20 单克隆抗体。

38. 权利要求 37 的改进的方法，其中所述抗-CD20 抗体是 IDEC-C2B8。

抗体-依赖性细胞毒性增大的抗体糖基化变体

发明领域

本发明涉及蛋白质糖基化工程领域。更具体地说,本发明涉及生产治疗性能得到改进的蛋白质,包括抗体-依赖性细胞毒性增大的抗体的糖基化工程。

背景技术

糖蛋白介导人、其它真核生物和一些原核生物的许多重要功能,包括催化作用,发出信号,细胞-细胞转染和分子识别和缔合。它们构成真核生物中非胞质蛋白的大部分(Lis 等, Eur. J. Biochem.218 : 1-27 (1993))。已经开发了很多用于治疗目的的糖蛋白,近二十年来,天然存在的重组型的分泌型糖蛋白已经是生物技术产业的主要产物。例子包括红细胞生成素(EPO),治疗性单克隆抗体(治疗性 mAb),组织纤溶酶原激活剂(tPA),干扰素- β (IFN- β),粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),和人绒毛膜促性腺素(hCG) (Cumming 等, Glycobiology 1 :115-130 (1991))。

寡糖成分能显著影响与治疗性糖蛋白效力相关的性质,包括物理稳定性,对蛋白酶作用的抗性,与免疫系统的相互作用,药物动力学和特异生物活性。这样的性质可能不仅仅取决于存在或不存在寡糖,而且还取决于寡糖的具体结构。可以进行寡糖结构与糖蛋白功能之间的一些总结。例如,一些寡糖结构通过与特异性碳水化合物结合蛋白质的相互作用而介导血流中糖蛋白的快速清除,而其它的能被抗体结合并且引起不希望的免疫反应(Jenkins 等, Nature Biotechnol. 14: 975-81 (1996))。

哺乳动物细胞由于它们能将蛋白质糖基化成最适于人应用的形式, 所以成为生产治疗性糖蛋白的优选宿主 (Gumming 等, *Glycobiology* 1 :115- 30 (1991); Jenkins 等, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)). 细菌很少将蛋白质糖基化,而且就象酵母, 丝状真菌, 昆虫和植物细胞这样的其它类型的普通宿主一样, 得到与从血流中快速清除, 不期望的免疫相互作用, 和在某些特殊情况下, 降低的生物活性相关的糖基化模式。近二十年中, 在哺乳动物细胞中,最常使用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。除了给出合适的糖基化模式之外,这些细胞持续产生遗传上稳定的,高产率的无性繁殖细胞系。在简单的生物反应器中使用无血清培养基能将它们培养至高密度,使得发展安全而可重复的生物加工过程成为可能。其它常用动物细胞包括幼仓鼠肾(BHK)细胞,NSO-和 SP2/O-小鼠骨髓瘤细胞。最近,也试验了由转基因动物进行生产(Jenkins 等, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)).

所有的抗体在重链恒定区中的保守位置含有糖结构, 每个同种型具有不同的 N-连接糖结构排列方式, 它们不定地影响蛋白质组装, 分泌或功能活性(Wright, A.和 Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 : 26-32 (1997)). 被连接的 N-键接糖的结构变化很大,这取决于处理程度, 并且可包括高-甘露糖,多支链的以及双触角的复合寡糖(Wright, A. , 和 Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15 : 26-32 (1997))。典型地, 在特定的糖基化位点存在着对连接的核心寡糖结构的多种不同加工以致于即使单克隆抗体也以多糖基化形式存在。同样,已经证明抗体糖基化作用中的主要差异出现在细胞系之间,甚至不同培养条件下培养的特定细胞系也可以见到十分细微的差别(Lifely, M. R. 等, *Glycobiology* 5 (8) : 813-22 (1995)).

由美国食品与药物管理局批准用于治疗 CD20 阳性 B-细胞, 低级或囊状非霍奇金淋巴瘤的利妥希玛 (Rituxan[™]; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, and Genentech Inc., San Francisco,

CA) 和用于治疗晚期乳房癌(Grillo-Lopez, A. -J., 等, Semin. Oncol. 26 : 66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21 : 309-18 (1999)) 的 Trastuzumab (HerceptinTM; Genentech Inc.)证明, 未缀合的单克隆抗体(mAb)能成为有用的治疗癌症的药物。这些产品的成功不仅仅依赖它们的药效, 而且还依赖它们出色的安全性(Grillo-Lopez, A. -J., 等, Semin. Oncol. 26 : 66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21 : 309-18 (1999))。虽然完成了这两种药物,最近人们在获得比通过未缀合的 mAb 治疗通常提供的特异性抗体活性更高的特异性抗体活性方面有很大兴趣。

效力获得大幅提高并且保留简单的生产过程并且潜在避免了明显的不期望的副作用的一条途径是通过对它们的寡糖成分进行技术处理来提高 mAb 的天然的, 由细胞介导的效应子功能(Umana, P.等, Nature Biotechnol. 17 : 176-180 (1999)). IgG1 型抗体,癌症免疫治疗中最常用的抗体,是在各个 CH2 结构域中的 Asn297 处具有保守的 N-连接糖基化位点的糖蛋白。CH2 结构域之间有与 Asn297 连接的两个复合双触角寡糖,与多肽主链形成充分接触,而且它们的存在对于抗体介导效应子功能例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)是必需的(Lifely, M. R. 等, Glycobiology 5 : 813-822 (1995); Jefferis, R. 等, Immunol Rev. 163 : 59-76 (1998) ; Wright, A. 和 Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15 : 26-32 (1997)).

本发明人先前证明中国仓鼠卵巢(CHO)细胞过量表达 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶 III (GnTIII), 一种催化等分寡糖的形成的糖基转移酶, 显著提高工程 CHO 细胞产生的抗成神经细胞瘤嵌合单克隆抗体(chCE7)的体外 ADCC 活性(参见 Umana, P. 等, Nature Biotechnol. 17 : 176-180 (1999), 国际公开 No. WO 99/54342, 其全部内容在此全文引作参考)。抗体 chCE7 属于一大类未缀合的 mAb, 它们具有高肿瘤亲和性和特异性,但是当在没有 GnTIII 酶的常用工业细胞

系中产生时其效力太小以致于不能进行临床使用(Umana, P., 等, Nature Biotechnol 17 : 176-180 (1999))。该项研究首次证明通过将恒定区(Fc)-结合的等分寡糖的比例增大到高于天然存在抗体中的水平能大幅度提高最大体外的 ADCC 活性。为了测定该项发现是否能外推到未缀合的 mAb, 它在没有等分寡糖存在下已经具有显著的 ADCC 活性, 本发明人已经将该项技术应用于利妥希玛, 抗-CD20, IDEC-C2B8 嵌合抗体。本发明人还同样将该项技术应用于未缀合的抗-癌 mAb chG250。

本发明概述

本发明人现在利用遗传工程处理的以四环素调节方式过量表达 N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶 III (GnTIII; EC 2.1. 4.144)的产生 mAb 的细胞系制备了新的抗-CD20 单克隆抗体(mAb)IDEC-C2B8 (利妥希玛)和抗-癌 mAb chG250 的糖基化变体。等分寡糖的合成需要 GnTIII,发现它在天然存在的人抗体中以低水平至中等水平存在,但是在常规工业细胞系中产生的 mAb 中则不存在。新的糖基化变型在生物(ADCC)活性方面超过了 MabtheraTM (欧洲市场出售的 Rixtuximab 版本)和小鼠-骨髓瘤衍生的 chG250。例如,达到与 MabtheraTM 一样的最大 ADCC 活性需要低 10 倍量的具有最高水平的等分寡糖的变体。对于 chG250, 具有最高水平的等分寡糖变体在比检测未改构的对照 chG250 的低 ADCC 活性所需浓度低 125-倍的浓度下介导显著 ADCC 活性。发现 GnTIII 表达水平与 ADCC 活性之间存在明确的关系。

因此,本发明的一方面涉及通过表达至少一种编码 $\beta(1,4)$ -N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶 III (GnTIII)的核酸而产生 Fc-介导的细胞毒性提高的多肽的工程宿主细胞,其中由宿主细胞产生的多肽选自完整抗体分子,抗体片段,和包括与免疫球蛋白的 Fc 区等价的区域的融合蛋白,并且其中以足以提高 Fc 区中带有等分杂合寡糖或半乳糖基化复合寡糖或其混合物的所述多肽相对于 Fc 区中带有等分复合体寡糖的多肽

的比例的量表达 GnT III.

在优选的实施方案中,所述多肽是 IgG 或其片段,最优选地是 IgG1 或其片段。在另一个优选的实施方案中,所述多肽是包括与人 IgG 的 Fc 区等价的区域的融合蛋白。

在本发明的另一个方面中,将含有至少一个编码 GnTIII 的基因的核酸分子导入宿主细胞。在优选的实施方案中,将至少一个编码 GnTIII 的基因导入宿主细胞的染色体。

或者,对宿主细胞进行基因工程处理致使内源 GnT III 基因被激活,例如,通过将提高基因表达的 DNA 元件插入宿主染色体。在优选的实施方案中,通过将启动子,一个增强子,一个转录因子结合位点,转座子,或逆转录病毒元件或其组合插入到宿主细胞染色体中来将内源性 GnTIII 激活。另一方面,选择带有内源性 GnT III 的突变引发表达的宿主细胞。优选地,宿主细胞是 CHO 细胞突变体 lec10。

在本发明另一个优选的实施方案中,编码 GnTIII 的至少一种核酸与组成型启动子元件操作性连接。

在另一个优选的实施方案中,宿主细胞是 CHO 细胞, BHK 细胞, NSO 细胞, SP2/0 细胞, 或杂交瘤细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞或 PER. C6 细胞和所述多肽是抗 CD20 抗体。在另一个优选的实施方案中,宿主细胞是 SP2/0 细胞并且多肽是单克隆抗体 chG250。

另一方面,本发明涉及宿主细胞,该宿主细胞进一步含有编码抗体分子,抗体片段,或者包括与免疫球蛋白的 Fc 区等价的区域的融合蛋白的至少一种转染的核酸。在优选的实施方案中,宿主细胞含有编

码下面蛋白的至少一种转染的核酸: 抗 CD20 抗体, 嵌合抗-人成神经细胞瘤单克隆抗体 chCE7, 嵌合抗-人肾细胞癌单克隆抗体 chG250, 嵌合抗-人结肠癌, 肺癌和乳房癌单克隆抗体 ING-1, 人源化抗-人 17-1A 抗原单克隆抗体 3622W94, 人源化抗-人结肠直肠肿瘤抗体 A33, 针对 GD3 神经节苷脂 R24 的抗-人黑素瘤抗体, 或者嵌合抗-人鳞状细胞癌单克隆抗体 SF-25, 抗-人 EGFR 抗体, 抗-人 EGFRvIII 抗体, 抗-人 PSMA 抗体和抗-人 PSCA 抗体, 抗-人 CD22 抗体, 抗-人 CD30 抗体, 抗-人 CD33 抗体, 抗-人 CD38 抗体, 抗-人 CD40 抗体, 抗-人 CD45 抗体, 抗-人 CD52 抗体, 抗-人 CD138 抗体, 抗-人 HLA-DR 变体抗体, 抗-人 EpCAM 抗体, 抗-人 CEA 抗体, 抗-人 MUC1 抗体, 抗-人 MUC1 核心蛋白抗体, 抗-人异常糖基化 MUC1 抗体, 针对包含 ED-B 结构域的人纤连蛋白变体的抗体和抗-人 HER2/neu 抗体。

另一方面, 本发明涉及在宿主细胞中产生多肽的方法, 包括在允许产生所述 Fc-介导的细胞毒性提高的多肽的条件下培养上述宿主细胞。在优选的实施方案中, 所述方法进一步包括分离所述 Fc-介导的细胞毒性提高的多肽。

在进一步优选的实施方案中, 宿主细胞含有至少一种编码包括与免疫球蛋白的糖基化 Fc 区等价的区域的融合蛋白的核酸。

在优选的实施方案中, 所述多肽的 Fc 区中的等分寡糖的比例大于 50%, 更优选地大于 70%。在另一个实施方案中, Fc 区中的等分杂合寡糖或半乳糖基化复合寡糖或其混合物的比例大于所述多肽的 Fc 区中的等分复合寡糖的比例。

在所述方法的一个优选方面中, 所述多肽是抗 CD20 抗体并且由所述宿主细胞产生的抗-CD20 抗体具有糖基化分布, 如 MALDI/TOF-MS 所分析的, 与图 2E 所示的基本上相当。

在所述方法的一个优选方面中,所述多肽是 chG250 单克隆抗体并且由所述宿主细胞产生的 chG250 抗体具有糖基化分布,如 MALDI/TOF-MS 分析的,与图 7D 所示的基本上相当。

另一方面,本发明涉及通过上述任何方法产生的具有提高的抗体依赖性细胞毒性(ADCC) 的抗体。在优选的实施方案中,所述抗体选自抗-CD20 抗体, chCE7, ch-G250, 人源化抗-HER2 单克隆抗体,ING-1, 3622W94, SF-25, A33 和 R24。或者,所述多肽可以通过上述任何方法制备的具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的包含相当于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的抗体片段。

另一方面,本发明涉及通过上述任何方法制备的包含相当于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的并且具有提高的 Fc-介导的细胞毒性的融合蛋白。

另一方面,本发明涉及含有本发明的抗体, 抗体片段或融合蛋白和药学可接受载体的药物组合物。

另一方面,本发明涉及一种治疗癌症的方法, 包括对需要药物组合物的患者施用治疗有效量的所述药物组合物。

另一方面,本发明涉及一种治疗全部或部分由以 B-细胞缺失为基础的病原性自身抗体引起的自身免疫疾病的改进方法, 包括对需要的人受试者施用治疗有效量的免疫活性抗体, 所述改进方法包括施用治疗有效量的如上所述制备的具有提高的 ADCC 的抗体。在优选的实施方案中,所述抗体是抗-CD20 抗体。自身免疫疾病或病症的例子包括但不限于,免疫-介导的血小板减少症,例如急性特发性血小板减少紫癜和慢性特发性血小板减少紫癜,皮肤肌炎,舞蹈病,狼疮肾炎,风湿病

发烧，多腺综合征，Henoch-Schonlein 紫癜，链球菌肾炎，erythema nodosum，锁骨下静脉闭塞性血栓动脉炎，青铜色皮病，多形红斑，结节性多动脉炎，僵硬脊柱炎（ankylosing spondylitis），古德帕斯丘综合征，血栓性脉管炎 obliterans，原发性胆汁肝硬化，Hashimoto's 甲状腺炎，甲状腺毒症，慢性活动性肝炎，多肌炎/皮肌炎，多发性软骨炎，pamphigus vulgaris，韦格内氏肉芽肿病，膜肾病，肌萎缩性侧索硬化，脊髓痨，多肌痛，恶性贫血，快速进行性肾小球性肾炎和纤维组织形成肺泡炎，炎症反应例如皮炎，包括牛皮癣和皮肤炎（例如特应性皮炎）；全身硬皮病和硬化病；与肠炎相关的反应（例如节段性回肠炎和溃疡性结肠炎）；呼吸窘迫综合征（包括成年人呼吸窘迫综合征；ARDS）；皮炎；脑膜炎；脑炎；葡萄膜炎；结肠炎；肾小球肾炎；变应性疾病例如湿疹和哮喘以及其它病症，包括 T 细胞浸润和慢性炎症反应；动脉粥样硬化；白细胞粘着不足；类风湿性关节炎；全身红斑狼疮（SLE）；糖尿病（例如 I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病）；多发性硬化病；Reynaud's 综合征；自身免疫甲状腺炎；变应性脑脊髓炎；Sjorgen's 综合征；少年开始的糖尿病；和一般在肺结核，结节病，多肌炎，肉芽肿病和结节性脉管炎中发现的由细胞因子和 T-淋巴细胞介导的急性和延迟性过敏症相关的免疫应答；恶性经闭（青铜色皮病）；涉及白细胞渗出的疾病；中枢神经系统（CNS）炎症；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-抗体复合体介导的疾病；抗-血管小球肌膜病；抗磷脂综合征；变应性神经炎；格雷夫斯病；Lambert-Eaton 肌无力综合征；类天疱疮大疱；天疱疮；自身免疫多内分泌腺病；莱特尔氏病；强直一人（stiff-man）综合征；被切特氏病；巨大细胞动脉炎；免疫复合体肾炎；IgA 肾病；IgM 多神经病；免疫血小板减少紫癜（ITP）或自身免疫血小板减少症等。在本发明的这方面，本发明的抗体被用来长时间排除血液中的正常 B-细胞。

附图简要描述

图 1. 间接免疫荧光测试表明抗体制剂 C2B8-25t 对 CD20 阳性 SB 细胞的反应性。阴性对照物,包括 HSB CD20 阴性细胞系和只用二抗 FITC-缀合的抗-人 Fc 多克隆抗体处理的细胞。

图 2A-2E. 从 Mabthera™ (图 2A), C2B8-nt (图 2B), C2B8-2000t (图 2C), C2B8-50t (图 2D) 和 C2B8-25t (图 2E) 抗体样品衍生的寡糖的 MALDI/TOF-MS 图谱。寡糖作为 $[M+Na^+]$ 和 $[M+K^+]$ 离子出现。在头两个图谱中出现的寡糖是从不表达 GnTIII 的细胞培养物中得到的,而 C, D, 和 E 中的寡糖是从以不同水平(即四环素浓度)表达 GnTIII 的单一细胞系得到的。

图 3A 和 3B. 说明典型的人 IgG Fc-结合寡糖结构(A)和部分 N-连接糖基化途径(B)。(图 3A) 寡糖的核心由与 Asn₂₉₇ 连接的三个甘露糖(M)和两个 N-乙酰基氨基葡萄糖(Gn)单糖残基组成。半乳糖(G), 岩藻糖(F)和等分 N-乙酰基氨基葡萄糖(Gn, boxed)可以存在或不存在。也可以存在末端 N-乙酰基神经氨酸,但是图中没有包括。(图 3B) 导致形成主要寡糖类的部分 N-连接糖基化途径(虚线框)。等分 N-乙酰基氨基葡萄糖被表示为 G^b_n 。下标数字表明每个寡糖中存在多少个单糖残基。每个结构给出了它的钠-结合 $[M+Na^+]$ 质谱。也包括包含岩藻糖(f)的那些结构的质谱。

图 4A 和 4B. 利妥希玛糖基化变体的 ADCC 活性。通过不同 mAb 浓度介导的人淋巴细胞(E: T 之比例是 100: 1)对 ^{51}Cr 标记的 CD20 阳性 SB 细胞的溶胞作用测定细胞毒性百分比。(图 4A) 从单细胞得到但以递增 GnTIII 表达水平(即,递减的四环素浓度)产生的 C2B8 样品的活性。样品是 C2B8-2000t, C2B8-50t, C2B8-25t 和 C2B8-nt (对照 mAb 来自不表达 GnTIII 的克隆)。(图 4B) 与 Mabthera™ 相当的 C2B8-50t 和 C2B8-25t 的 ADCC 活性。

图 5. 七个 GnTIII 表达克隆和野生型的蛋白质印迹分析。将 30 微克各种样品加载到 8.75% SDS 凝胶上,转移到 PVDF 膜并且用抗 -c-myc 单克隆抗体(9E10)探测。WT 指 wt-chG250-SP2/0 细胞。

图 6. 分离的纯化抗体样品的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

图 7A-7D. 得自由表达不同 GnTIII 水平的克隆和 wt-chG250-SP2/0 细胞产生的 chG250 mAb 样品的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 图谱: WT (图 7A), 2F1 (图 7B), 3D3 (图 7C), 4E6 (图 7D)。

图 8A-8D. 得自由表达不同 GANTE 水平的克隆产生的 chG250 mAb 样品的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 图谱: 4E8, (图 8A); 5G2, (图 8B); 4G3, (图 8C); 5H12, (图 8D)。

图 9. 来自对照 wt-chG250-SP2/-细胞和 GnTIII 转染克隆 3D3 和 5H12 的抗体样品的体外 ADCC 测定。

本发明的详细描述

这里使用的术语和本领域一般使用的一样,除非另外如下定义:

本文使用的术语抗体意在包括所有的抗体分子, 抗体片段或者包括等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的融合蛋白。

本文使用的术语等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域意在包括天然存在的免疫球蛋白的 Fc 区的等位变体以及具有取代, 添加或缺失改变但是不实质性降低免疫球蛋白介导抗体依赖性细胞毒性能力的变体。例如, 免疫球蛋白 Fc 区的 N-末端或 C-末端可以缺失一个或几个氨基酸而不实质性损失生物学功能。可以根据本领域公知的一般原则选择这样的变体以使对活性的影响最小(参见, 例如, Bowie, J. U.等,

Science 247 : 1306-10 (1990).

本文使用的术语糖蛋白-修饰的糖基转移酶指 $\beta(1,4)$ -N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶 III (GnTIII)。

本文使用的术语工程和糖基化工程被认为包括天然存在的多肽或者其片段的糖基化作用方式的任何操作。糖基化工程包括细胞糖基化机构的代谢工程,包括实现改变在细胞中表达的糖蛋白糖基化作用的寡糖合成途径的遗传操作。此外,糖基化工程包括突变和细胞环境对糖基化作用的影响。

本文使用的术语宿主细胞覆盖所有类型的细胞体系,它们经工程处理产生令人感兴趣的修饰的糖基化形式的蛋白质,蛋白质片段,或肽,包括抗体和抗体片段。典型地,操纵宿主细胞表达最佳水平的 GnT III。宿主细胞包括培养的细胞,例如,哺乳动物培养细胞,例如 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞,酵母细胞和昆虫细胞,以及很少的,但是还有包含在转基因动物或培养组织中的细胞。

本文使用的术语 Fc-介导的细胞毒性包括抗体-依赖性细胞毒性和包含人 Fc-区的可溶性 Fc-融合蛋白介导的细胞毒性。它是一种导致"人免疫效应子细胞"对"抗体-定向细胞"进行溶胞的免疫机理,其中:

"人免疫效应子细胞"是一群白细胞,它们展示其表面上的 Fc 受体,它们通过该受体与抗体的或 Fc-融合蛋白的 Fc 区结合并且实施效应子功能。这样的细胞群可以包括但不限于外周血单核细胞(PBMC)和/或自然杀伤(NK) 细胞。

"抗体-定向细胞"是通过抗体或 Fc 融合蛋白结合的细胞。抗体或 Fc 融合蛋白通过蛋白质 Fc 区的部分 N-末端与靶细胞结合。

本文使用的术语提高的 Fc-介导的细胞毒性被定义为通过上文定义的 Fc-介导的细胞毒性的机理,在靶细胞周围的培养基中的给定浓度的抗体或 Fc-融合蛋白下,于给定时间下溶解的"抗体-定向细胞"数目的增加,和/或通过 Fc-介导的细胞毒性的机理,在给定时间下,实现给定数目的"抗体-定向细胞"的溶解需要的在靶细胞周围的培养基中抗体或 Fc-融合蛋白浓度的降低。Fc-介导的细胞毒性的提高是相对于应用本领域技术人员公知的相同标准制备,纯化,配制和贮存方法由相同类型的宿主细胞产生的而不是通过本文描述的方法经工程处理而表达糖基转移酶 GnTIII 的宿主细胞产生的相同抗体或 Fc-融合蛋白介导的细胞毒性。

所谓具有提高的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的抗体是指根据本领域技术人员公知的任何合适的方法测定具有提高的 ADCC 的抗体。一种被接受的体外 ADCC 测定方法如下所示:

1)测定使用已知表达被抗体的抗原结合区识别的靶抗原的靶细胞;

2)测定使用从随机选择的健康供血者的血液中分离的人外周血单核细胞(PBMC)作为效应细胞;

3) 根据下面的程序进行测定:

i)利用标准密度离心方法分离 PBMC,并且以 5×10^6 细胞/毫升悬浮于 RPMI 细胞培养基;

ii) 通过标准组织培养方法培养靶细胞,从成活率高于 90%的指数成长期收获靶细胞,用 RPMI 细胞培养基洗涤,用 100 微居里的 ^{51}Cr 标记,用细胞培养基洗涤两次,并且以 10^5 细胞/毫升的密度再次悬浮于细胞培养基;

iii) 将 100 微升上面最终的靶细胞悬浮液转移到 96-孔微量滴定板的每个孔中;

iv) 在细胞培养基中对抗体从 4000 ng/ml 系列稀释,至 0.04

ng/ml, 并且向 96-孔微量滴定板中的靶细胞加入 50 微升得到的抗体溶液,以覆盖上面整个浓度范围的各种抗体浓度重复三次试验;

v) 关于最大释放(MR)对照,板中含有标记的靶细胞的另外的 3 个孔接受 50 微升的 2%(V/V) 非离子洗涤剂水溶液(Nonidet, Sigma, St. Louis), 以代替抗体溶液(上面的第 iv 点);

vi) 关于自发释放(SR)对照,板中含有标记的靶细胞的另外的 3 个孔接受 50 微升的 RPMI 细胞培养基以代替抗体溶液(上面的第 iv 点);

vii) 然后以 50 x g 将 96-孔微量滴定板离心 1 分钟,并且在 4℃ 下温育 1 小时;

viii) 向每个孔加入 50 微升的 PBMC 悬浮液(上面的第 i 点)以使效应物:靶细胞之比为 25: 1 , 并且将板放在保温箱中在 5%CO₂ 的大气中在 37℃ 下温育 4 小时;

ix) 从各个孔收集不含细胞的上清液, 并且用 γ 计数器定量测定试验上释放的放射性(ER);

x) 根据公式 $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ 针对于每一个抗体浓度计算特异溶胞作用百分比, 其中 ER 是针对那个抗体浓度定量测定的平均放射性(参见上面的第 ix 点), MR 是针对 MR 对照物(参见上面的第 v 点) 定量测定的平均放射性(参见上面的第 ix 点), 和 SR 是对于 SR 对照物(参见上面的第 vi 点) 定量测定的平均放射性(参见上面的第 ix 点);

4)"提高的 ADCC"被定义为在上面测试的抗体浓度范围内发现的特异溶胞作用的最大百分比提高, 和/或实现在上面测试的抗体浓度范围内发现的特异溶胞作用的最大百分比的一半所需抗体浓度的减小。ADCC 的提高是相对于用上面的分析测定法的、相同抗体介导的、应用本领域技术人员公知的相同的标准制备, 纯化, 配制和贮存方法由相同类型的宿主细胞产生的而不是通过经工程处理而过量表达糖基转移酶 GnTIII 的宿主细胞产生的 ADCC。

如本文使用的术语抗-CD20 抗体意指特异性识别细胞表面 35,000 道尔顿的非糖基化磷蛋白的抗体,一般被命名为人 B 淋巴细胞限制性分化抗原 Bp35,一般称作 CD20.

需要糖基化模式修饰的蛋白质的编码核酸的鉴定和产生

本发明提供用于产生具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的糖基化形式的抗体或抗体片段或包括抗体片段的融合蛋白的宿主细胞系统的制备和使用的方法。靶表位的鉴定和需要糖基化模式修饰的具有潜在治疗价值的抗体的制备,它们各自的编码核酸序列的分离都在本发明的范围内。

可以应用本领域公知的各种方法来制备抗令人感兴趣的靶表位的抗体。这样的抗体包括但不限于多克隆,单克隆,嵌合的,单链, Fab 片段和 Fab 表达文库产生的片段。这样的抗体可以被用作,例如,作为诊断或治疗药物。作为治疗药物,中和抗体,即,与配体、底物或衔接分子结合相竞争的那些抗体是特别优选令人感兴趣的。

关于抗体的制备,通过用令人感兴趣的靶蛋白注射来免疫各种宿主动物,包括但不限于兔,小鼠,大鼠等。可以根据宿主物种使用各种佐剂来增强免疫应答,包括但不限于弗氏佐剂(完全的和不完全的),矿物凝胶,例如氢氧化铝,表面活性物质如溶血卵磷脂,多聚醇,聚阴离子,肽类,皂甙,油乳状液,匙孔血蓝蛋白,二硝基苯酚和可能有用的人佐剂如 BCG (卡介苗)和小型棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)。

利用通过连续细胞系培养产生抗体分子的任何技术可以制备令人感兴趣的针对靶向物的单克隆抗体。这些包括但不限于最初由 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256 : 495-97 (1975)描述的杂交瘤技术,人 B-细胞杂交瘤技术(Kosbor 等, *Immunology Today* 4: 72(1983) ; Cote 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 : 2026-30 (1983)和 EBV-杂交瘤技术(Cole

等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77-96 (Alan R. Liss, Inc. , 1985))。另外, 可以利用为了制备"嵌合抗体"而开发的技术 (Morrison 等, Proc.Natl. Acad Sci. U. S. A. 81: 6851-55 (1984); Neuberger 等, Nature 312: 604-08 (1984); Takeda 等, Nature 314: 452-54(1985) , 通过拼接合适抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与合适的生物活性的人抗体分子的基因。或者, 可以采用被记载用于制备单链抗体的技术(美国专利 US 4,946, 778)制备具有所需特异性的单链抗体。

通过公知技术可以制备包含令人感兴趣的靶蛋白的特异结合位点的抗体片段。例如, 这样的片段包括但不限于通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 $F(ab')_2$ 片段和通过将 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥还原而产生的 Fab 片段。或者, 可以构建 Fab 表达文库 (Huse 等, Science 246: 1275-81 (1989), 从而快速而容易地鉴定对令人感兴趣的靶蛋白具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。

一旦鉴定出对需要以糖基化模式进行修饰的抗体或抗体片段, 应用本领域公知的技术鉴定和分离核酸编码序列。

a. 用于产生具有改变的糖基化模式的蛋白质的细胞系的产生

本发明提供了用于产生具有修饰的糖基化模式的蛋白质的宿主细胞表达系统。特别是, 本发明提供了用于产生具有提高的治疗价值的糖基形式的蛋白质的宿主细胞系统。因此, 本发明提供了经选择或工程处理而提高了糖蛋白-修饰糖基转移酶即 $\beta(1,4)$ -N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶 III (GnTIII) 的表达水平的宿主细胞表达系统。具体地说, 可以工程处理这样的宿主细胞表达系统, 使其包含与组成型或调节的启动子系统操作连接的编码 GnTIII 的重组核酸分子。或者, 宿主细胞表达系统可以使用那种自然产生, 经诱导产生, 和/或被选择用来产生 GnTIII 的那些细胞表达系统。

在一个具体的实施方案中,本发明提供经工程处理以表达至少一种编码 GnTIII 的核酸的宿主细胞。一方面,用包含至少一种编码 GnTIII 的基因的核酸分子转化或转染宿主细胞。另一方面,以这样的方式工程处理和/或选择宿主细胞使得内源 GnTIII 被激活。例如,可以选择宿主细胞进行内源 GnTIII 的诱变触发表达。在一个具体的实施方案中,宿主细胞是 CHOlecl0 突变体。或者,可以工程处理宿主细胞使得内源 GnTIII 被激活。或者,通过向宿主细胞染色体插入组成型启动子元件,转座子,或逆转录病毒元件来工程处理宿主细胞使得内源 GnTIII 被激活。

一般来说,培养的细胞系类型可以被用作工程处理本发明的宿主细胞系的背景。在优选实施方案中,CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞,酵母细胞,或昆虫细胞被用作产生本发明的工程宿主细胞的背景细胞系。

本发明涉及包括本文定义的表达 GnTIII 的任何工程宿主细胞。

在组成型启动子的控制下,或者在调控表达系统的控制下,可以表达编码 GnTIII 的一种或几种核酸。合适的调节的表达系统包括但不限于四环素-调节的表达系统,蜕皮素-可诱导表达系统, lac-开关表达系统,糖皮质激素-可诱导表达系统,温度-可诱导表达系统,和金属硫蛋白金属-可诱导表达系统。如果宿主细胞系统中包含编码 GnTIII 的几种不同的核酸,它们中的一些可以在组成型启动子的控制下进行表达,而其余的在调节启动子控制下表达。认为最大表达水平是对细胞生长速率没有明显副作用的稳定的 GnTIII 表达的可能最高水平,利用常规试验测定。通过本领域一般公知的方法测定表达水平,包括使用 GnTIII 特异抗体的 Western 印迹分析,使用 GnTIII 特异核酸探针的

Northern 印迹分析,或者测定酶活性。或者,可以使用凝集素,该凝集素结合 GnTIII 的生物合成产物,例如,E₄-PHA 凝集素。或者,核酸还可以操作连接报道基因;通过测定与报道基因的表达水平相关的信号测定 GnTIII 表达水平。报道基因可以与编码所述 GnTIII 的核酸一起转录成单一 mRNA 分子;它们各自的编码序列可以通过内部核糖体进入位点(IRES) 或者通过帽-独立性翻译增强子(CITE)来连接。报道基因可以与编码所述 GnTIII 的至少一种核酸一起进行翻译从而形成单链多肽。编码 GnTIII 的核酸在单一启动子的控制下可以与报道基因操作连接,这样编码 GnTIII 的核酸和报道基因被转录到 RNA 分子中,其另外被剪接成两个独立的信使 RNA(mRNA)分子;得到的 mRNA 中的一个被翻译成所述报道蛋白质,另一个被翻译成所述 GnTIII。

如果表达编码 GnTIII 的几种不同的核酸,它们可以以这样的方式排列以使它们被转录成一种或几种 mRNA 分子。如果它们被转录成单一 mRNA 分子,他们各自的编码序列可以通过内部核糖体进入位点(IRES) 或者通过帽-独立性翻译增强子(CITE)来连接。它们可以从单一启动子被转录到 RNA 分子中,其另外被剪接成几个分开的信使 RNA(mRNA)分子,其然后各自被翻译成它们各自编码的 GnTIII。

在其它实施方案中,本发明提供了用于产生具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的治疗性抗体的宿主细胞表达体系,和在其表面展示促进 Fc-介导的细胞毒性的 IgG Fc 区的细胞。一般情况下,宿主细胞表达体系经工程处理和/或选择来表达编码抗体的核酸,该抗体需要产生改变的糖基化形式,以及至少一种编码 GnTIII 的核酸。在一个实施方案中,用编码 GnTIII 的至少一种基因转染宿主细胞体系。一般情况下,选择鉴定转染的细胞并且分离稳定表达 GnTIII 的克隆。在另一个实施方案中,选择表达内源 GnTIII 的宿主细胞。例如,选择带有触发另外沉默 GnTIII 进行表达的突变的细胞。例如,已知 CHO 细胞带有沉默 GnTIII 基因,该基因在一些突变体中是有活性的,例如,在突变体 Lec10

中。此外,可以利用本领域公知的方法激活沉默 GnTIII,包括插入调节型或组成型启动子,使用转座子,逆转录病毒元件等。也可以应用基因剔除技术或者应用核糖体方法调节宿主细胞的 GnTIII 表达水平,并且因此在本发明的范围内。

任何类型的培养细胞系能被用作对本发明的宿主细胞系进行工程处理的背景。在优选的实施方案中,可以使用例如 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞,酵母细胞,或昆虫细胞。典型地,工程处理这样的细胞系以便进一步包含编码整个抗体分子,抗体片段,或者包括等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的融合蛋白中的至少一种转染的核酸,在另一个实施方案中,表达令人感兴趣的特定抗体的杂交瘤细胞系被用作产生本发明的工程宿主细胞的背景细胞系。

典型地,宿主细胞系中的至少一种核酸编码 GnT III。

在组成型启动子或者调节表达体系的控制下可以表达编码 GnTIII 的一种或几种核酸。合适的调节表达系统包括但不限于四环素-调节的表达系统,蜕皮素-可诱导表达系统, lac-开关表达系统,糖皮质激素-可诱导表达系统,温度-可诱导表达系统和金属硫蛋白金属-可诱导表达系统。如果宿主细胞系统中包括编码 GnTIII 的几种不同的核酸,它们中的一些可以在组成型启动子的控制下表达,而其它的在调节启动子控制下表达。认为最大表达水平是对细胞生长速度没有明显副作用的稳定 GnTIII 表达的可能最高水平,并能利用常规试验测定。通过本领域中公知的方法测定表达水平,包括使用 GnTIII 特异抗体的 Western 印迹分析,使用 GnTIII 特异核酸探针的 Northern 印迹分析或者测定酶活性。或者,可以使用凝集素,该凝集素结合 GnTIII 的生物合成产物,例如,E₄-PHA 凝集素。或者,核酸可以操作连接报道基因;通过测定与报道基因的表达水平相关的信号测定糖蛋白修饰的

糖基化转移酶的表达水平。报道基因可以与编码所述糖蛋白修饰的糖基化转移酶的核酸一起转录成单一 mRNA 分子;它们各自的编码序列可以通过内部核糖体进入位点(IRES) 或者通过帽-独立性翻译增强子(CITE)而连接。报道基因可以与编码 GnTIII 的至少一种核酸一起翻译以便形成单链多肽。编码 GnTIII 的核酸在单一启动子的控制下可以与报道基因操作连接,这样编码 GnTIII 的核酸和报道基因被转录到 RNA 分子中,其另外被剪接成两个分开的信使 RNA(mRNA)分子;得到的 mRNA 中的一个被翻译成所述报道蛋白质,另一个被翻译成所述 GnTIII。

如果表达编码 GnTIII 的几种不同的核酸,它们可以以这样的方式排列使得它们被转录成一种或几种 mRNA 分子。如果它们被转录成单一 mRNA 分子,它们各自的编码序列可以通过内部核糖体进入位点(IRES) 或者通过帽-独立性翻译增强子(CITE)来连接。他们可以从单一启动子被转录到 RNA 分子中,其另外被剪接成几个分开的信使 RNA(mRNA)分子,然后各自被翻译成他们各自编码的 GnTIII。

i. 表达体系

可以应用本领域技术人员公知的方法构建包含令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列和合适的转录/翻译控制信号的编码系列的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术,合成技术和体内重组/基因重组。参见,例如,Maniais 等, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989)和 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.(1989)中记载的技术。

可以利用各种宿主表达载体系统来表达令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列。优选地,哺乳动物细胞被用作采用包含令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列的重组质粒

DNA 或粘粒 DNA 表达载体转染的宿主细胞系统。

最优选地, CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞, 酵母细胞或昆虫细胞被用作宿主细胞体系。在另一个实施方案中, 可以包括其它真核宿主细胞体系, 包括, 用包含令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母细胞; 用包含令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列的重组病毒表达载体 (例如杆状病毒) 转染的昆虫细胞体系; 用包含令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒, CaMV ; 烟草花叶病毒, TMV) 转染的或者用包含令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列的重组质粒表达载体 (例如, Ti 质粒) 转化的植物细胞体系; 或者用重组病毒表达载体 (例如腺病毒, 牛痘病毒) 转染的动物细胞体系, 包括经工程处理而包含在双微染色体中稳定扩增的 (CHO/dhfr) 或者不稳定扩增的 (例如, 鼠细胞系) 编码令人感兴趣的蛋白质的 DNA 的多个拷贝和 GnTIII 的编码序列的细胞系。

对于本发明的方法, 稳定表达一般比瞬时表达优选, 这是因为它通常能或得多个可重复结果, 而且更适合大规模生产。与其使用包含病毒复制起点的表达载体, 不如用各个通过合适的表达调控元件 (例如, 启动子, 增强子, 序列, 转录终止子, 多腺苷酸化位点等) 控制的编码核酸和可选择标记转化的宿主细胞。导入外源 DNA 之后, 可以让工程细胞在营养充分的培养基中生长 1-2 天, 然后换成选择性培养基。重组质粒中的可选择标记带来对选择的抗性并且使得选择质粒稳定整合到它们的染色体中的细胞, 并且生长形成中心, 接着进行克隆并且被扩展成细胞系。

可以使用很多选择体系, 包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶

(Wigler 等, Cell 11 : 223 (1977)), 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Szybalska & Szybalski, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 48 : 2026 (1962)) 和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy 等, Cell 22 : 817 (1980)) 基因, 其可以分别在 tk⁻, hgp⁺或 ap⁺细胞中进行使用. 还有, 抗代谢物抗性可以被用作选择 dhfr 的基础, 它带来对甲氧喋呤的抗性 (Wigler 等, Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567 (1989); O'Hare 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 1527(1981)) ; gpt, 它带来对霉酚酸的抗性(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 2072 (1981)) ; neo, 它带来对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Colberre-Garapin 等, J. Mol Biol. 150 : 1 (1981)) ; 和 hygro, 它带来对潮霉素的抗性(Santerre 等, Gene 30 : 147 (1984)) 基因. 最近, 有人描述了其它可选择基因, 即 trpB, 它使得细胞利用吲哚代替色氨酸; hisD, 它使得细胞利用组氨酸代替组氨酸(Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 8047 (1988)) ; 谷酰胺合酶体系; 和 ODC (鸟氨酸脱羧酶) , 它带来对鸟氨酸脱羧酶抑制剂, 2-(二氟甲基)-DL 鸟氨酸, DFMO 的抗性 (McConlogue, in : Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

ii. 表达具有修饰的糖基化模式的蛋白质的转染体或转化体的鉴定

通过至少四种一般方法可以鉴定包含编码序列并且表达生物活性基因产物的宿主细胞: (a) DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交; (b) 存在或不存在"标记"基因功能; (c) 根据各个 mRNA 转录本在宿主细胞中的表达评价转录水平; 和 (d) 根据免疫测定或者通过其生物活性测定检测基因产物.

在第一种方法中, 通过 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交, 使用包含分别与各个编码序列或其部分或其衍生物同源的核苷酸序列的探针, 能检测表达载体中插入的令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII

的编码序列的存在。

在第二种方法中,根据存在或不存在某些"标记"基因功能(例如,胸苷激酶活性,抗生素抗性,甲氨喋呤抗性,转化表型,杆状病毒中包涵体形成等),能鉴定和选择重组表达载体/宿主体系。例如,如果在载体的标记基因序列中插入令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列,通过不存在标记基因功能能鉴定包含各个编码序列的重组体。或者,标记基因可以与编码序列串联放置,处于用来控制编码序列表达的相同的或不同的启动子的控制下。标记基因响应诱导或选择而进行表达表明对令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列进行表达。

在第三种方法中,通过杂交测定能评价令人感兴趣的蛋白质的编码区和 GnTIII 的编码序列的转录活性。例如,使用与令人感兴趣的蛋白质的编码序列和 GnTIII 的编码序列或者其特定部分同源的探针通过 Northern 印迹能分离和分析 RNA。或者,可以提取宿主细胞的完整核酸并且分析与这种探针的杂交。

在第四种方法中,能免疫学测定令人感兴趣的蛋白质的蛋白质产物的表达和 GnTIII 的编码序列的表达,例如通过蛋白质印迹,免疫分析,如放射免疫-沉淀法,酶联免疫测试等。但是表达系统成功的最终试验包括检测生物学活性基因产物。

b. 具有改变的糖基化模式的蛋白质和蛋白质片段的产生和用途

i. 具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的抗体的产生和用途

在优选的实施方案中,本发明提供具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的糖基化形式的抗体和抗体片段。

用于治疗某些类型癌症的未缀合单克隆抗体(mAb)的临床试验最近得到了令人鼓舞的结果。Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12 : 223-25 (1997); Deo 等, *Immunology Today* 18 : 127 (1997). 已经批准嵌合的未缀合 IgG1 用于低级或滤泡 B-细胞非何杰金氏淋巴瘤, Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12 : 223-25 (1997), 而另一种未缀合的 mAb, 一种人源化 IgG1 定向实体乳房肿瘤, 在三期临床试验中也证明有希望的结果。Deo 等, *Immunology Today* 18 : 127 (1997). 这两种 mAbs 的抗原在他们各自的肿瘤细胞中高度表达并且抗体在体外和体内通过效应细胞介导有力的肿瘤破坏。相反, 很多其它有小的肿瘤特异性的未缀合的 mAb 不能触发足以有效用于临床应用的效应物功能。Frost 等, *Cancer* 80 : 317-33 (1997); Surfus 等, *J. Immunother.* 19 : 184-91 (1996). 对于这些较弱的 mAb 中的一些, 最近测试了辅助细胞因子治疗。细胞因子的加入通过提高循环淋巴细胞的活性和数目能刺激抗体-依赖性细胞毒性(ADCC)。Frost 等, *Cancer* 80 : 317-33(1997); Surfus 等, *J. Immunother.* 19 : 184-91 (1996). ADCC, 对抗体-靶向细胞进行的溶胞作用攻击触发白细胞受体与抗体的恒定区(Fc)结合。Deo 等, *Immunology Today* 18 : 127 (1997).

与提高未缀合 IgG1 的 ADCC 活性的不同的但起补充作用的方法是对抗体的 Fc 区进行工程处理以提高他们对淋巴细胞受体(FcγRs)的亲合性。蛋白质工程研究表明 FcγRs 与 IgG CH2 结构域的较低绞合区相互作用。Lund 等, *J. Immunol.* 157 : 4963-69 (1996). 但是, FcγR 结合还需要与 CH2 区中保守的 Asn 297 供价连接的寡糖的存在。Lund 等, *J. Immunol.* 157 : 4963-69 (1996); Wright 和 Morrison, *Trends Biotech.* 15 : 26-31 (1997), 提出寡糖和多肽两者都直接影响相互作用位点, 并且需要寡糖来保持活性 CH2 多肽构象。因此, 寡糖结构的修饰能被开发成提高相互作用亲和性的一种方法。

IgG 分子在它的 Fc 区带有两个 N-连接寡糖, 每条重链上一个。和

任何糖蛋白一样,将抗体制备成多糖基化形式,它们共有相同的多肽主链但是在糖基化位点处连接不同的寡糖。一般在血清 IgG 的 Fc 区中发现的寡糖是复合体双触角型 (Wormald 等, *Biochemistry* 36 : 130-38 (1997), 有低水平的末端唾液酸和等分 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 和可变程度的末端半乳糖基化和核心岩藻糖基化作用。一些研究表明 FcγR 结合需要的最小糖结构位于寡糖核心中。Lund 等, *J.Immunol.* 157 : 4963-69 (1996) 。去除末端半乳糖导致 ADCC 活性降低大约两倍,表明这些残基在 FcγR 受体结合中的作用。Lund 等, *J. Immunol.* 157 : 4963-69 (1996) 。

工业和学术中用于制备未缀合治疗性 mAb 的得自小鼠或仓鼠的细胞系一般将所需寡糖决定簇与 Fc 位点连接。但是这些细胞系中表达的 IgG 缺少血清 IgG 中少量发现的等分 GlcNAc 。Lifely 等, *Glycobiology* 318 : 813-22 (1995)。相反,最近发现大鼠骨髓瘤产生的人源化 IgG1(CAMPATH-1H) 在它的一些糖基化形式中带有 GlcNAc 。Lifely 等, *Glycobiology* 318 : 813-22 (1995)。大鼠细胞产生的抗体达到和标准细胞系中产生的 CAMPATH-1 H 抗体类似的体外 ADCC 活性,但是抗体浓度低得多。

CAMPATH 抗原一般以高浓度存在于淋巴组织瘤细胞上,这种嵌合的 mAb 在没有等分 GlcNAc 存在下具有高 ADCC 活性。Lifely 等, *Glycobiology* 318 : 813-22 (1995)。在 N-连接糖基化途径中,通过酶 (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnT III) 加上等分 GlcNAc 。Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64 : 163-81 (1986)。

本发明人使用单一的产生抗体的 CHO 细胞系,它事先经工程处理以外部调节方式表达不同水平的克隆 GnT III 基因。这种方法首次建立了 GnTIII 表达与修饰的抗体 ADCC 活性之间的精确关系。

本发明人先前表明根据公开的方法修饰的 C2B8 抗体比相同细胞培养和纯化条件下产生的标准未修饰的 C2B8 抗体 ADCC 活性高大约 16 倍。简要地说,如人淋巴细胞对 SB 细胞(CD20+)的体外溶胞作用所测定的,在没有 GnT III 表达的 CHO-tTA-C2B8 细胞中表达的 C2B8 抗体样品证明细胞毒素活性大约 31 % (1 微克/毫升抗体浓度)。相反,在 1 微克/毫升抗体浓度下,从基础性大量表达水平表达 GnT III 的 CHO 细胞培养物中得到的 C2B8 抗体表明相对于相同抗体浓度的对照物来说 ADCC 活性提高 33%。此外,与相同抗体浓度的对照物相比,提高 GnT III 表达,将最大 ADCC 活性(在 1 微克/毫升抗体浓度下)提高将近 80%(参见国际公开 WO 99/54342,其全文在此引作参考)。

本发明的具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的其它抗体包括但不限于本发明方法产生的抗-人成神经细胞瘤单克隆抗体(chCE7),本发明方法产生的嵌合抗-人肾细胞癌单克隆抗体(ch-G250),本发明方法产生的人源化抗-HER2 单克隆抗体(例如, Trastuzumab (HERCEPTIN)),本发明方法产生的嵌合抗-人结肠癌,肺癌和乳房癌单克隆抗体(ING-1),人源化抗-人 17-1 A 抗原单克隆抗体(3622W94),本发明方法产生的人源化抗-人结肠直肠肿瘤抗体(A33),本发明方法产生的针对 GD3 神经节苷脂的抗-人黑素瘤抗体(R24),本发明方法产生的嵌合抗-人鳞状细胞癌单克隆抗体(SF-25),本发明方法产生的抗-人小细胞肺癌单克隆抗体 (BEC2, ImClone Systems, Merck KgaA),本发明方法产生的抗-人非何杰金氏淋巴瘤单克隆抗体(Bexxar (tositumomab, Coulter Pharmaceuticals), Oncolym (Techniclone, Alpha Therapeutic)),本发明方法产生的抗-人鳞状细胞头和颈癌单克隆抗体(C225, ImClone Systems),本发明方法制备的抗-人直肠和结肠癌单克隆抗体(帕罗瑞星(edrecolomab), Centocor, Glaxo Wellcome),本发明方法制备的抗-人卵巢癌单克隆抗体(哈拉宗钠, Antisoma),本发明方法制备的抗-人急性骨髓性白血病癌单克隆抗体

(SmartM195, Protein Design Labs, Kanebo), 本发明方法制备的抗-人恶性神经胶质瘤单克隆抗体 (Cotara, Techniclone, Cambridge Antibody Technology), 本发明方法制备的抗-人 B 细胞非-何杰金氏淋巴瘤单克隆抗体 (IDEC-Y2B8, IDEC Pharmaceuticals), 本发明方法制备的抗-人实体肿瘤单克隆抗体 (CEA-Cide, Immunomedics), 本发明方法制备的抗-人直肠和结肠癌单克隆抗体 (碘 131-MN-14, knmunomedics), 本发明方法制备的抗-人卵巢癌, 肾癌, 乳房癌和前列腺癌单克隆抗体 (MDX-210, Medarex, Novartis), 本发明方法制备的抗-人直肠结肠和胰腺癌单克隆抗体 (TTMA, Pharmacie & Upjohn), 本发明方法制备的抗-人 TAG-72-表达癌单克隆抗体 (MDX-220, Medarex), 本发明方法制备的抗-人 EGFr-表达癌单克隆抗体 (MDX-447), 本发明方法制备的抗-VEGF 单克隆抗体 (Genentech), 本发明方法制备的抗-人乳房癌, 肺癌, 前列腺癌和胰腺癌和恶性黑素瘤单克隆抗体 (BrevaRex, AltaRex), 本发明方法制备的抗-人急性骨髓性白血病单克隆抗体 (单克隆抗体结合物, Immunex)。另外, 本发明涉及包括等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的抗体片段和融合蛋白。

ii. 包含促进 Fc-介导的细胞毒性的等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的融合蛋白的产生和使用

如上文讨论的, 本发明涉及用于提高治疗性抗体的 ADCC 活性的方法。这通过对这样的抗体的 Fc 区的糖基化形式进行工程处理来实现, 特别是通过将它们在它们的 Fc 区中带有与保守糖基化位点 N-连接的等分复合体寡糖和等分杂合寡糖的抗体分子的比例最大化来实现。这个侧略能用来提高带有等价于免疫球蛋白的 Fc 区的区域的任何分子介导的而不只是治疗性抗体介导的抗不需要细胞的 Fc-介导的细胞毒性, 因为糖基化工程所导入的变化只影响 Fc 区, 以及它与 ADCC 机理中涉及的效应细胞表面上的 Fc 受体相互作用。对其可以应用本发明公开的方法的包含 Fc 的分子包括但不限于, (a) 由与 Fc-区的 N-末端融

合的靶向蛋白质结构域构成的可溶性融合蛋白 (Chamov 和 Ashkenazi, Trends Biotech. 14 : 52 (1996) 和(b)由定位于与 Fc-区的 N-末端融合的质膜的 II 型跨膜结构域构成的质膜-固定的融合蛋白(Stabila, P.F., NatureBiotech. 16 : 1357 (1998))。

对于可溶性融合蛋白(a)来说, 靶向结构域指导融合蛋白与不期望的细胞例如癌细胞结合,即 ,以与治疗性抗体类似的方式。因此, 本发明公开的提高这些分子介导的 Fc-介导的细胞毒素活性的方法的应用与对治疗性抗体应用的方法相同。

对于质膜-固定的融合蛋白(b)来说, 体内不期望的细胞不得不表达编码融合蛋白的基因。或者通过基因治疗方法, 即通过用指导融合蛋白编码基因表达的质粒或病毒载体体内转染细胞,或者通过在体内植入经遗传工程处理而在他们表面上表达融合蛋白的细胞来实现。后面这种细胞一般以聚合物胶囊的形式被植入体内(胶囊化细胞治疗), Fc-介导的细胞毒性机理不能破坏它们。但是, 一旦胶囊破碎, 逃脱的细胞就变成不期望的了,他们之后由 Fc-介导的细胞毒性消除。 Stabila 等, Nature Biotech. 16 : 1357 (1998)。在这种情况下,应用本发明公开的方法, 或者向基因治疗载体中插入另外的基因表达盒指导 GnTIII 适当的或最大表达水平, 或者通过工程处理要植入的细胞以适合的或最大水平表达 GnT III。在这两种情况下, 公开的方法的目的在于将表面展示的带有等分复合体寡糖和 / 或等分杂合寡糖的 Fc 区的比例提高或最大化。

下面的实施例更详细地解释本发明。给出下面的制备和实施例使得本领域技术人员更清楚地理解和实施本发明。但是, 本发明范围不受例举的实施方案的限制, 实施例只是为了详细说明本发明的一方面, 而功能等价的方法是在本发明的范围之内的。事实上,除了这里所述的之外的本发明的各种各样的修饰对于本领域技术人员来说根据上面的

描述和附图而变得显而易见。这样的修饰是在后面的权利要求书范围内的。

实施例 1

通过产生 IDEC-CEB8 的细胞系的糖基化工程获得的具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的嵌合式抗-CD20 抗体 IDEC-C2B8 的新变型

IDEC-C2B8 的 VH 和 VL 编码区的合成和哺乳动物表达载体的构建

利用 PCR (Kobayashi, N.,等, Biotechniques 23: 500-503 (1997))以一步法从一组重叠的单链寡核苷酸组装编码 IDEC-C2B8 抗体的 VH 和 VI 区的 cDNA. 从公开的国际专利申请(国际公开号 : WO 94/11026) 获得 IDEC- C2B8 VL 和 VH 的原始序列数据。将组装的 VL 和 VH cDNA 片段亚克隆到 pBluescriptIIS (+) 中, 测序并且通过分别与人恒定轻链(Ig κ)和重链(IgG1) cDNA 连接而直接连接, 使用的是可变区和恒定区接点处导入的而不改变原来氨基酸残基序列的独特限制性位点 (Umana, P.等, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999); Reff, M. E., 等, Blood 53 : 435-445 (1994))。各个全长 cDNA 被分别亚克隆到 pcDNA3. 1 (+) (Invitrogen, Leek, The Netherlands) 中, 得到用于嵌合 C2B8 轻链(pC2B8L)和重链(pC2B8H)的哺乳动物表达载体。

在 CHO 细胞中表达不同水平 GnTIII 的 IDEC-C2Bf 的制备

建立两个 CHO 细胞系, 根据四环素浓度在培养基中表达不同水平 GnTIII 的 CHO-tet-GnTIII; 和 CHO-tTA, 先前描述过的不表达 GnTIII 的亲代细胞系 (Umana, P.等, Nat Biotechnol. 17 : 176 180 (1999); Umana, P., 等, BiotechnolBioeng. 65 : 542-549 (1999))。利用磷酸钙方法, 每个细胞系采用载体 pC2B8L, pC2B8H 和 pZeoSV2 (+) (对 Zeocin 抗性 ; Invitrogen, Leek, The Netherlands) 进行共同转染。将 Zeocin 抗性克隆转移到 96-孔板中并且利用对人恒定区(4)特异性的 ELISA 测试来测定 IDEC-C2B8 产生。从选择的克隆

(CHO-tet-GnTIII-C2B8)的平行培养物获得三个 IDEC-C2B8 样品,只是加给培养基的四环素浓度不同(分别是 25, 50 和 2000ng/mL)。在指数期后期收集培养物上清液。从产生 CHO-tTA 的克隆获得另外的抗体样品,CHO-tTA-C2B8,在相同的条件下培养,但是培养基中不加入四环素。通过蛋白质 A 亲和层析法从培养基中纯化抗体样品,并且如先前所述将缓冲液换成阳离子交换柱上的 PBS (Umana, P.等, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999))。使用从 Molecular Probes (Leiden, The Netherlands)得到的以荧光为基础的试剂盒以利妥希玛作为标准物测定抗体浓度。

间接免疫荧光法

CD20-阳性细胞(SB 细胞; ATCC 保藏号 ATCC CCL120)和 CD20-阴性细胞 (HSB 细胞; ATCC 保藏号 ATCCCCL120. 1)分别与 Hank's 平衡盐溶液 (GibcoBRL, Basel, Switzerland)中 2.5 微克/毫升的 CHO-tet GnTIII-衍生的 IDEC-C2B8 抗体和 2%牛血清白蛋白级分 V (Roche Diagnostics, Rotkreuz, 瑞士)(HBSSB)温育 1 小时。作为阴性对照物,使用 HBSSB 代替 C2B8 抗体。对于所有样品, PITS-结合的抗-人 Fc 多克隆抗体被用作二抗 (SIGMA, 圣路易斯)。使用 Leica 荧光显微镜 (Wetzlar, 德国)检查细胞。

通过 MALDI/TOF-MS 分析寡糖分布

如前所述(Umana, P.等, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999)), 从 C2B8 抗体样品, MabTheraTM (利妥希玛欧洲对应物; R Stahel, Universitätsspital, 瑞士, 馈赠), C2B8-25t, C2B8-50t, C2B8-2000t 和 C2B8-nt, (各 100 微克)衍生中性的、N-连接寡糖。简要地说,首先用 *Arthrobacter ureafaciens* 唾液酸酶(Oxford Glycosciences, Abingdon, UK)处理抗体样品, 去除所有的唾液酸单糖残基。然后使用肽-N-糖苷酶 F (Oxford Glycosciences)从去唾液酸抗体样品释放中性 N-1 连接寡糖, 利用微量柱子纯化,并且利用 Elite Voyager 400 分光计(Perseptive

Biosystems, Farmingham, MA)通过 MALDI/TOF- MS 进行分析。

ADCC 活性测定

通过用 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Dübendorf, 瑞士) 梯度离心从用肝素盐化的新鲜人血中分离外周血单核细胞(PBMC) (在从相同的健康供血者获得的所有的实验中)。通过塑料附着从 PBMC (效应物)中排除单核细胞。37℃下用 100μCi ^{51}Cr (Amersham, Dübendorf, 瑞士)将 CD20-阳性 SB (靶)细胞标记 90 分钟, 用 RPMI (GibcoBRL, Basel, 瑞士)洗涤两次并且以 10^5 细胞/毫升的浓度再次悬浮。将 50 微升用 RPMI 培养基中稀释的 C2B8 mAb 加到 96-孔圆底微量滴定板 (Greiner, Langenthal, 瑞士) 中的 100 微升 SB 细胞 (10,000 细胞/孔) 中, 以 50xg 离心 1 分钟, 并且在 4℃下温育 1 小时。接着, 在 96-孔的每个孔中加入 50 微升效应细胞 (以 2×10^7 细胞/毫升悬浮于 RPMI 培养基中), 得到最终 E: T 之比为 100。37℃和 5% CO_2 下将板温育 4 小时, 用 Skatron 收集系统(Skatron Instruments, Sterling, VA)收集上清液, 并且利用 Cobra 05005γ 计数器(Canberra Packard, Meriden, CT)计数(ER, 实验释放)。通过取代 C2B8 mAb 而向 100 微升标记的靶细胞分别加入 100 微升的 1% Nonidet (Sigma, St. Louis)或 100 微升的 RPMI 培养基从而获得的最大(MR)和自发(SR) 释放。所有的数据点重复进行三次。用下面的公式计算特异溶胞作用 (%):(ER-SR)/(MR-SR) x 100。

结果和讨论

IDEC-C2B8 的产生和特异性抗原结合的验证

建立具有稳定的四环素-调节表达 GnTIII 和稳定的组成型表达 IDEC-C2B8 的 CHO-tet-GnTIII 细胞, 并且规模放大达到生产一组抗体样品。放大规模期间,相同克隆的平行培养物在三个不同的四环素浓度, 25, 50 和 2000 ng/ml 下生长。先前已经证明这些四环素水平导致不同水平的 GnTIII 和等分寡糖(Umana, P.等, Nat Biotechnol. 17 :

176-180 (1999); Umana,P.等,Biotechnol Bioeng. 65 : 542-549 (1999)). 还建立了不表达 GnTIII 的产生 C2B8-的对照细胞系, 并且在与三个 CHO-tet-GnTIII 平行培养相同的条件下培养。蛋白质 A-亲和层析之后, 通过 SDS-PAGE 和考马斯兰染色评估 mAb 纯度高于 95% 。根据加到用于它们制备的培养基中的四环素浓度命名样品: C2B8-25t, C2B 8-50t, C2B8-2000t 和 C2B 8-nt (即,对非等分对照物没有四环素)。通过使用 CD20-阳性和 CD20-阴性细胞(图 1)的间接免疫荧光法, 样品 C2B8-25t 表现出特异性抗原结合性,表明合成的 VL 和 VH 基因片段功能是正确的。

用 MALDI/TOF-MS 分析寡糖分布

通过释放的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 分析各个抗体样品的糖基化作用分布。在该项技术中, 不同质量的寡糖表现为谱图中的各个峰以及它们的比例通过相对峰高来定量反映(Harvey, D. J., Rapid Common MassSpectrom. 7: 614-619 (1993); Harvey, D. J.,等, Glycoconj J. 15 : 333-338 (1998))。以它们预期的分子量为基础将寡糖结构分配对应给不同的峰, 先前寡糖的结构数据来自相同宿主产生的 IgGI mAb,和有关 N-连接寡糖生物合成途径的信息。

发现 GnTIII 表达水平(即, 四环素浓度)与来自不同抗体样品的等分寡糖的量之间存在清楚的关系。正如所预料的,MabThera™ 和 C2B8-nt, 它们来自不表达 GnTIII 的宿主,不带有等分寡糖(图 2A 和 2B)。相反, 等分结构的量最多达到样品 C2B8-2000t 中寡糖混合物的 35%, 即, GnTIII 表达的基础水平。在这种情况下, 主要等分寡糖峰是复合型的, 在 m/z 1689 和 m/z 1851 峰之间不明确(图 2C)。下一个较高的 GnTIII 表达水平, 样品 C2B8-50t, 导致这些峰增大(包括 m/z 1705 和 1861 处它们的相关钠加成物)20%左右。这样的增大伴随它们的非等分对应物分别在 m/z 1486 和 1648 处的减小(图 2D)。在最高 GnTIII 表达水平, 样品 C2B8-25t, GnTIII 的主要底物, m/z 1486, 几乎减小至

基础水平,而复合体等分结构(m/z 1689 和 1851)减少,而 m/z 1664,1810 和 1826 峰增大 (图 2E)。这些峰能分配给等分杂合化合物,给半乳糖基化复合体寡糖,或者给两者的混合物。但是它们的相对增大与等分杂合化合物的积累相吻合,因为 CnTIII 过量表达能在该途径的早期转移生物合成通量 (参见图 3A 和 3B)。对于该样品,等分寡糖结构(复合体和杂合型)的量达到大约 80%。

IDEG - C2B8 糖基化变体的 ADCC 活性

测定 CD20-阳性 SB 细胞的体外溶胞作用,比较不同的 C2B8 mAb 糖基化变体的 ADCC 活性。还研究了来自缺乏 GnTIII 的亲代细胞系的其它 mAb 样品, C2B8-nt。

以基础 GnTIII 表达水平产生的并且带有低含量等分寡糖的 C2B8-2000t 样品比 C2B8-nt 活性稍微高一些(图 4A)。在接下来的较高水平的 GnTIII-表达下,样品 C2B8-50t 带有大约相等含量的等分和非等分寡糖,但是不显著介导更高的靶细胞溶胞作用。但是,在最低四环素浓度下,样品 C2B8-25t,它含有高达 80% 的等分寡糖结构,在整个抗体浓度范围内,比其余样品的活性高得多。在抗体浓度低 10 倍下达到样品 C2B8-nt 的 ADCC 活性的最大水平 (图 4A)。样品 C2B8-25t 还被证明相对对照物来说最大 ADCC 活性显著提高(50%相对 30% 溶胞作用)。

样品 C2B8-50t 和 C2B8-25t,带有最高比例的等分寡糖,进一步与 MabtheraTM 比较 ADCC 活性, MabtheraTM 是最近在欧洲上市的 RituxanTM 型(图 4B)。样品 C2B8-50t 表现出活性稍微增加,而样品 C2B8-25t 在所有的抗体浓度下明显超过 MabtheraTM。要求低大约 5 - 10 倍浓度的 C2B8-25t 达到 MabtheraTM 的最大 ADCC 活性,并且最大活性比 MabtheraTM 高大约 25%。

这些结果表明,一般来说, C2B8 抗体的体外 ADCC 活性与 Fc 区带

有等分寡糖的分子的比例有关。我们以前报道过,对于 chCE7,具有低基线水平的 ADCC 活性的抗体来说,通过将等分寡糖的成分增加到高于天然存在的抗体中发现的水平来获得活性的显著提高(Umana,P.等, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999)). 对于 C2B8 mAb 也是如此,它在没有等分寡糖存在下已经具有高 ADCC 活性。但是对 chCE7 来说,在等分寡糖主要是复合体型的情况下,在 GnTIII 表达水平下发现 ADCC 活性有了非常大的提高(Umana, P.等, Nat Biotechnol. 17 : 176-180 (1999))。对于有效的 C2B8 mAb 来说,只是在所研究的 GnTIII 的最高表达水平下发现活性有如此的加强,这种情况下等分寡糖主要转换成杂合型(图 2)。对于两种 mAb 来说,具有最高活性的样品等分寡糖比非等分寡糖的最高活性高得多。总的来说,这些观察表明可能两种复合体和杂合等分寡糖对于 ADCC 活性都是重要的。

在复合体和杂合寡糖中,等分 GlcNAc 导致寡糖构象发生很大变化(Balaji, P. V.等, Int.J. Biol. Macromol. 18 : 101-114(1996))。寡糖的一部分中发生变化,该变化与 CH2 结构域中的多肽广泛作用 (Jefferis, R. 等, Immunol Rev. 163 : 59-76 (1998))。因为多肽在这个位置相对柔顺(Jefferis, R. , 等, Immunol Rev.163 : 59-76(1998)), 有可能的是,等分 N-乙酰氨基葡萄糖通过 Fc 区中的构象变化介导它的生物学作用。可能改变的构象可能已经存在于自然界中,因为所有的血清 IgG 带有等分寡糖。工程抗体和天然抗体之间的主要区别是展示更具活性的构象的分子的比例。

用于提高未缀合 mAb 的活性的各种方法最近正在进行临床评价,包括放射-免疫治疗,抗体依赖性酶/前体药物治疗,采用细胞因子的免疫毒素和佐剂治疗 (Hjelm Skog A., 等, Cancer Immunol Immunother. 48 :463-470 (1999); Blakey, D. C.等, Cell Biophys. 25 : 175-183 (1994); Wiseman, G. A.等, Clin Cancer Res. 5 : 3281s-3296s (1999); Hank, J. A.,等,Cancer Res. 50 : 5234-5239 (1990))。这些技术

都使活性大大提高,但是它们还能导致副作用显著增加,与未缀合 mAb 相比,它们存在升高的生产成本和从制备到对患者给药复杂的后勤。这里给出的技术为获得效能增加而保持简单的生产过程提供了一条替代途径,并且应该适用于很多未缀合的 mAb。

实施例 2

通过产生 chG250 的细胞系的糖基化工程而获得的具有提高的抗体-依赖性细胞毒性的抗-肾细胞癌抗体 chG250 的新变型

1. 细胞培养

在补加有 1:100 (v/v) 青霉素/链霉素/抗真菌溶液(SIGMA, Buchs, 瑞士)的标准细胞培养基中培养产生 chG250 嵌合 mAb 的 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞(wt-chG250-SP2/0 细胞)。细胞在 37℃ 和 5% CO₂ 潮湿气氛下在组织培养瓶中培养。每 3-4 天更换一次培养基。在含有 10% DMSO 的培养基中冷冻细胞。

2. 表达 pGnTIII-puro 的 SP2/0 细胞的产生

通过电穿孔,采用用于通过 IRES 与嘌呤霉素抗性基因操作连接的组成型 GnTIII 表达的载体转染 wt-chG250-SP2/0 骨髓瘤细胞。电穿孔之前 24 小时,更换培养基,并且以 5×10^5 细胞/毫升接种细胞。4℃ 下以 1300 rpm 将七百万个细胞离心 4 分钟。用 3 mL 新培养基洗涤细胞并且再次离心。将细胞重新悬浮于 0.3-0.5 ml 体积的反应混合物中,培养基中含有 1.25% (v/v) DMSO 和 20-30 微克 DNA。然后将电穿孔混合物转移到 0.4 cm 比色杯中并且使用购自 Bio Rad 的 Gene Pulser 在低压(250-300 V)和高电容(960 μ F)下进行脉冲。电穿孔之后,将细胞快速转移给 T25 培养瓶中的 6 mL 1.25% (v/v) DMSO 培养基并且在 37℃ 下温育。通过电穿孔 2 天后对培养基施加 2 微克/毫升嘌呤霉素来选择稳定整合体。2-3 周之后获得稳定的嘌呤霉素-抗性混合集落。通过 FACS 获得单细胞产生克隆并且接着进行扩冲并且保持在嘌呤霉素选择条件下。

3. 蛋白质印迹

通过蛋白质印迹筛选用于 GnTIII 表达的嘌呤霉素-抗性克隆。蛋白质印迹清楚地表明克隆 5H12, 4E6 和 4E8 表达最高水平的 GnTIII。5G2 还表现出中等强度的 GnTIII 带, 而 2F1, 3D3 和 4G3 具有最低的带强度, 因此表达最低量的 GnTIII (图 5)。

4. 由包括野生型在内的七个 GnTIII-表达克隆制备和纯化 chG250 单克隆抗体

以 3×10^5 细胞/毫升将克隆 2F1, 3D3, 4E6, 4E8, 4G3, SG2, 5H12 和野生型(wt-chG250-SP2/0 细胞) 接种到总体积是 130 毫升的培养基中, 并且在一个三联体瓶中培养。用于接种的细胞都处于完全指数生长期, 因此当开始生产批次时认为细胞处于相同的生长状态。将细胞培养 4 天在晚指数生长期收集含有抗体的上清液保证再现性。用两步色谱法纯化 chG250 单克隆抗体。首先用 HiTrap 蛋白质 A 亲和层析法纯化每一批产生的含有 chG250 单克隆抗体的培养上清液。蛋白质 A 对于人 IgG Fc 区是高度特异性的。来自蛋白质 A 洗出液的合并样品通过在 Resource S1ml 柱子(Amersham Pharmacia Biotech) 上进行的阳离子交换层析法缓冲液交换成 PBS。通过 SDS-染色和考马斯兰染色判断最终纯度高于 95% (图 6)。使用已知浓度的野生型抗体用标准校正曲线测定各个样品的浓度。

5. 来自表达不同 GnTIII 水平的七个克隆的 mAb 制剂的寡糖分布

通过飞行质谱(MALDI/TOF-MS)的矩阵辅助激光解吸/电离时间获得寡糖分布, MALDI/TOF-MS 精确提供了不同寡糖结构的分子量。该项技术定量分析混合物中不同寡糖结构之间的比例。中性寡糖主要表现为 $[M + Na^+]$ 离子, 但是有时它们伴有较小的 $[M + K^+]$ 离子, 导致 m/z 质量增加 16。作为钾离子加成物出现的结构百分比取决于基

体含量,因此各个样品之间是不同的。使用 2,5-脱水苯甲酸 (2,5-DHB) 作为基体分析从各个抗体制剂得到的中性 N-连接寡糖的混合物。谱图中的一些峰明确地对应于特定寡糖结构,这是因为已知的单糖组成和独特质量。但是,有时多重结构对应于特定质量。MALDI 能确定质量但是不能区别异构体。生物合成途径知识和以前的结构数据在大多数情况下能将寡糖结构与谱图中的峰对应起来。

来自 wt-chG250-SP2/0 细胞系产生的 mAb 样品的寡糖,它不表达 GnTIII, 包含非等分双触角复合体(m/z 1486)和单-或双-半乳糖基化非等分双触角复合体结构 (图 7A), 核心区中的两个 α (1,6)-岩藻糖基化结构(峰分别是 m/z 1648 和 1810)。

GnTIII 的表达产生两种类型的等分 Fc-结合寡糖结构: 复合体或杂合体。复合体等分寡糖明确对应于 m/z 1543, 1689, 1705, 1851 和 1867 的峰($[M+K^+]$ 加成物)。正如所预期的, 等分寡糖的增加伴随 m/z 1486 和 1648 峰的减小,那相应于非等分复合体寡糖。对于来自 GnTIII 表达克隆的所有样品, GnTIII 的主要底物(m/z 1486)大大减少。根据预期的, 对应于 m/z 1648 峰的非等分复合体寡糖型的百分比对于表达最高水平 GnTIII 的克隆(克隆 4E6,4B8, 5G2 和 SH12)有最低值。这两个减小的峰有利于等分复合体和等分杂合体型寡糖的积累 (图 7A-7D 和 8A-8D)。对于来自表达较低量的 GnTIII 的克隆的样品, 等分复合体寡糖的百分比比较高。这与下面的事实相符合: 较高的 GnTIII 表达水平可能将生物合成通量改变为等分杂合体结构,从而减小复合体和复合体等分化化合物的相对比例。对于等分杂合体结构,两种可能的结构有时被对应于单一峰。因此,为了接近这些结构相对全部寡糖集合物的百分比而进行一些假定。峰 m/z 1664,1680, 1810 和 1826 可能、对应于等分杂合体型,对应于半乳糖化的复合体寡糖,或者它们的混合物。由于 wt-抗体制剂具有相对低百分比峰 1664 的事实,假设这个峰,以从不同克隆得到的抗体样品中明显量出现,完全对应于等分杂合体结

构(图 7A-7D 和 8A-8D)。但是为了使具体结构对应于峰 m/z 1810 和 1826，必须进行进一步的定性。总之，通过过量表达 GnTIII，产生等分寡糖结构，并且他们相对的比例与 GnTIII 表达水平有关。

6. 通过钙黄绿素-AM 滞留测定抗体介导的细胞毒性

测定细胞毒性的钙黄绿素-AM 滞留方法测定细胞与抗体温育之后残留在细胞内的染料荧光。在补加有 10%胎牛血清的 1.8 毫升 RPMI-1640 细胞培养基 (GIBCO BRL, Basel, 瑞士)中用 10 μ M 钙黄绿素-AM (Molecular Probes, Eugene, OR)在 37℃ 和 5%CO₂ 潮湿气氛中将四百万 G250 抗原-阳性细胞 (靶物) 标记 30 分钟。用培养基将细胞洗涤两次并且再次悬浮于 12 毫升 AIMV 无血清培养基 (GIBCO BRL, Basel, 瑞士)中。然后将标记的细胞转移到 U-底 96-孔 (30,000 细胞/孔)并且一式三份与不同浓度的抗体在 4℃ 下温育 1 小时。通过用 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Dübendorf, 瑞士) 梯度离心从用肝素盐处理的新鲜人血中分离外周血单核细胞(PBMC) (在从相同的健康供血者获得的所有的实验中)。在三个孔中在 50 微升体积中加入 PBMC，得到的效应物与靶物之比(E: T 之比)是 25:1 并且最终体积是 200 微升。然后在 37℃ 和 5%CO₂ 气氛中将 96-孔板温育 4 小时。然后将 96-孔板以 700 x g 离心 5 分钟并且弃除上清液。细胞沉降物用 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)洗涤两次，并且溶解于 200 微升 0.05M 硼酸钠, pH 9.0, 1% TritonX-100 中。用 FLUOstar 微板读数器 (BMG LabTechnologies, Offenburg, 德国)测定靶细胞中荧光染料的残留。相对总的溶解对照物计算具体的溶胞作用，是从靶细胞接触皂甙 (200 微克/毫升 AIMV ; SIGMA, Buchs, 瑞士)代替接触抗体而得出的。用下面的公式计算特定的溶胞作用(%):

$$\% \text{ 细胞毒性} = \frac{F_{\text{med}} - F_{\text{exp}}}{F_{\text{med}} - F_{\text{det}}}$$

其中 F_{med} 代表单独用培养基处理的靶细胞的荧光并且认为是 PMBC 的非特异性溶解, F_{exp} 代表用抗体处理的细胞的荧光, 而 F_{det} 代表用皂甙代替抗体处理过的细胞的荧光。

为了测定 chG250 的修饰的糖基化变体对体外 ADCC 活性的作用, 将 G250 抗原-阳性靶细胞与有和没有不同浓度的 chG250 抗体样品的 PBMC 培养。将来自野生型细胞系的未修饰 chG250 抗体的细胞毒性分别与来自表达中等和高水平 GnTIII 的两个细胞系(3D3, 5H12)的两种抗体制剂相比较(参见图 5)。

在分析中使用的整个浓度范围中, 未修饰的 chG250 抗体不介导显著 ADCC 活性(活性与背景没有显著不同)。用来自克隆 3D3 的抗体样品观察到在 2 微克/毫升下提高了的 ADCC 活性(接近 20%, 参见图 9), 克隆 3D3 表达中等水平的 GnTIII。这个抗体样品的细胞毒性不随较高抗体浓度而提高。正如所预料的, 来自克隆 5H12 的抗体制剂表现出其介导抗靶细胞的 ADCC 能力比样品 3D3 和未修饰抗体高得多。这种抗体制剂的最大 ADCC 活性是 50%左右, 并且当与未修饰对照样品比较时以低 125-倍的浓度显著介导显著的 ADCC 活性。

实施例 3

对慢性移植物-抗-宿主疾病患者治疗免疫-介导的血小板减少症

慢性移植物-抗-宿主疾病中的自身免疫血小板减少症代表导致临床疾病的 B-细胞失调的例子。为了对患有慢性移植物-抗-宿主疾病患者的免疫-介导的血小板减少症进行治疗, 根据 Ratanatharathorn, V.等, Ann. Intern. Med. 133 (4) : 275 79 (2000) (其全文在此引作参考)所述, 对患者施用根据本发明方法制备的并且具有提高的 ADCC 的抗-CD20 嵌合单克隆抗体。具体地说, 每周对患者输注抗体, 375mg/m^2 , 持续四周。抗体治疗导致在外周血中显著消耗 B 细胞并且降低血小板结合抗体的水平。

实施例 4

治疗严重的免疫-介导的纯红细胞发育不全和溶血性贫血

免疫-介导的后天纯红细胞发育不全(PRCA)是一种罕见的疾病,经常与其他自身免疫现象相关。为了治疗免疫-介导的后天纯红细胞发育不全患者,根据 Zecca,M. 等, Blood 12 : 3995-97 (1997) (其全文在此引作参考)所述,对患者施用根据本发明方法制备的并且具有提高的 ADCC 的抗-CD20 嵌合单克隆抗体。具体地说,每周对 PRCA 和自身免疫溶血性贫血患者施用两个剂量的抗体, $375\text{mg}/\text{m}^2$ 。抗体治疗之后,开始静脉施用免疫球蛋白的替代治疗。该项治疗导致 B 细胞显著消耗并且伴随提高的血红蛋白水平,网状细胞数显著增加。

清楚的是,除了上文具体描述和实施例之外可以以其它方式实施本发明。着眼于上面的教导对本发明进行多种修饰和改变是可能的,因此在所附权利要求书的保护范围内。

这里引述的所有的公开物(包括专利,专利申请,期刊文章,实验手册,书和其它文献)的全部公开内容在此引作参考。

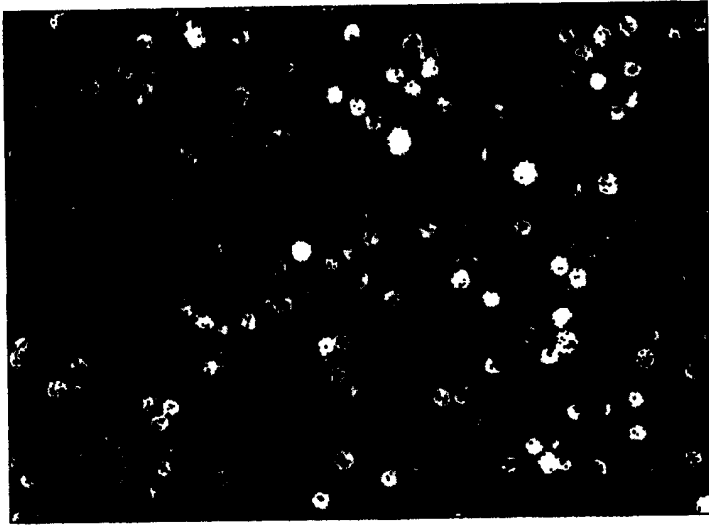


图1

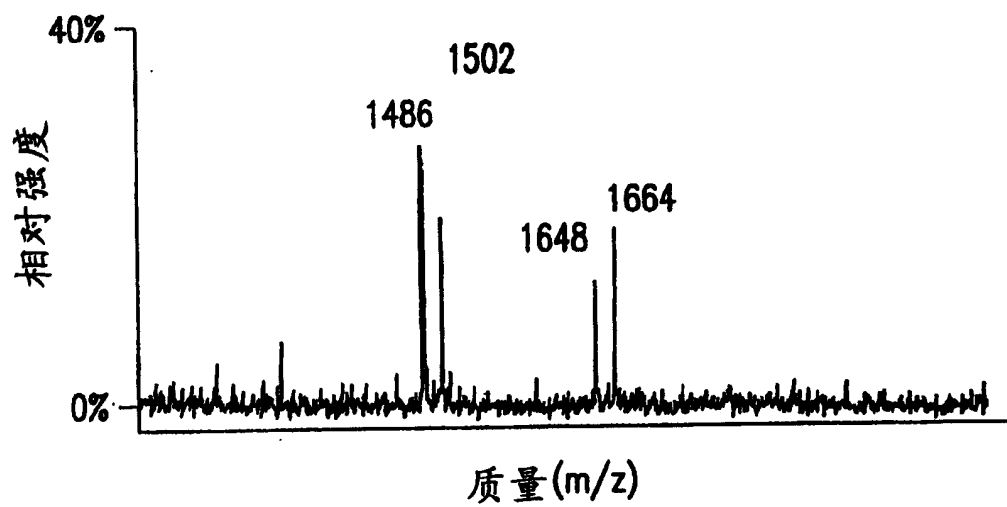


图 2A

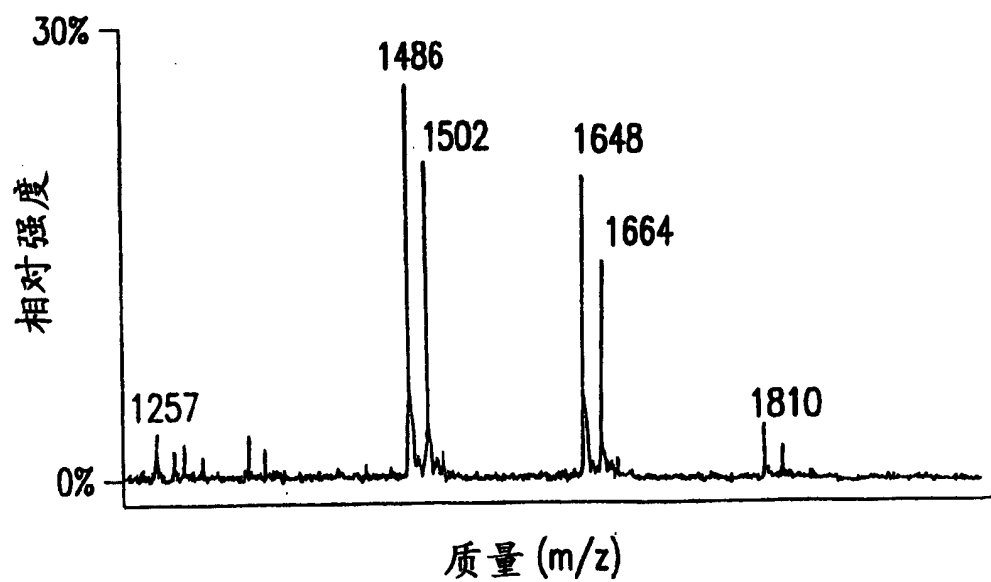


图 2B

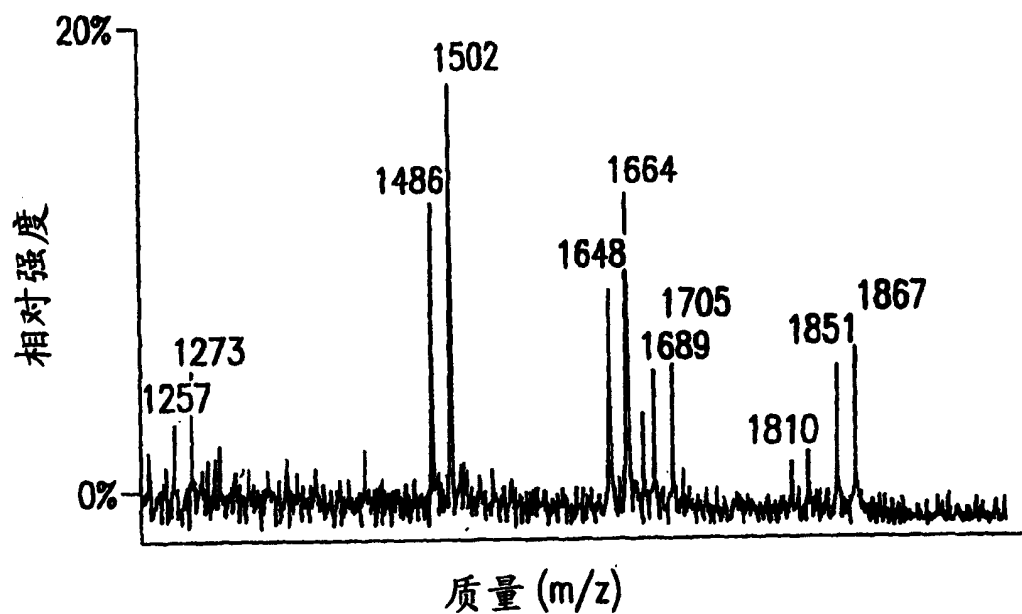


图 2C

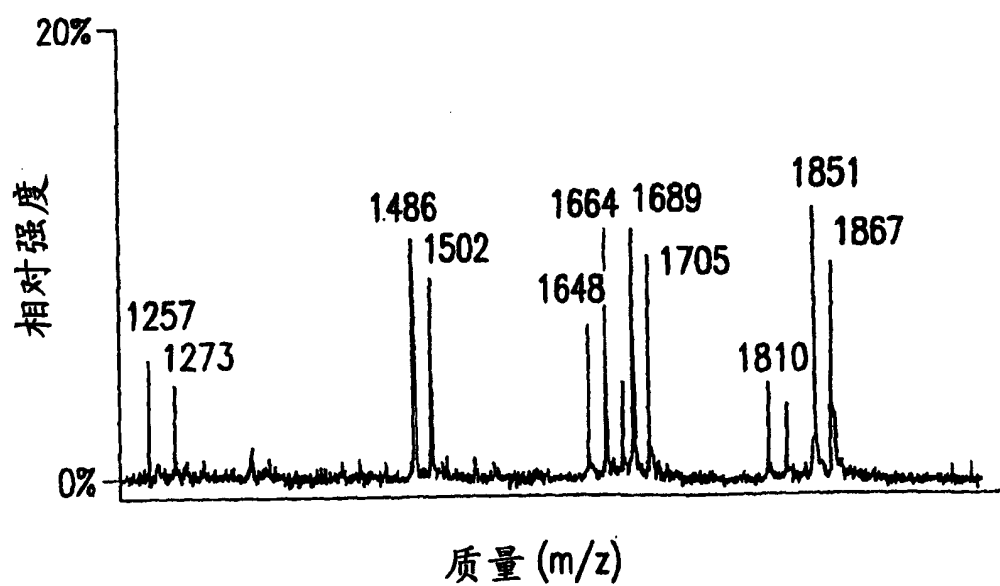


图 2D

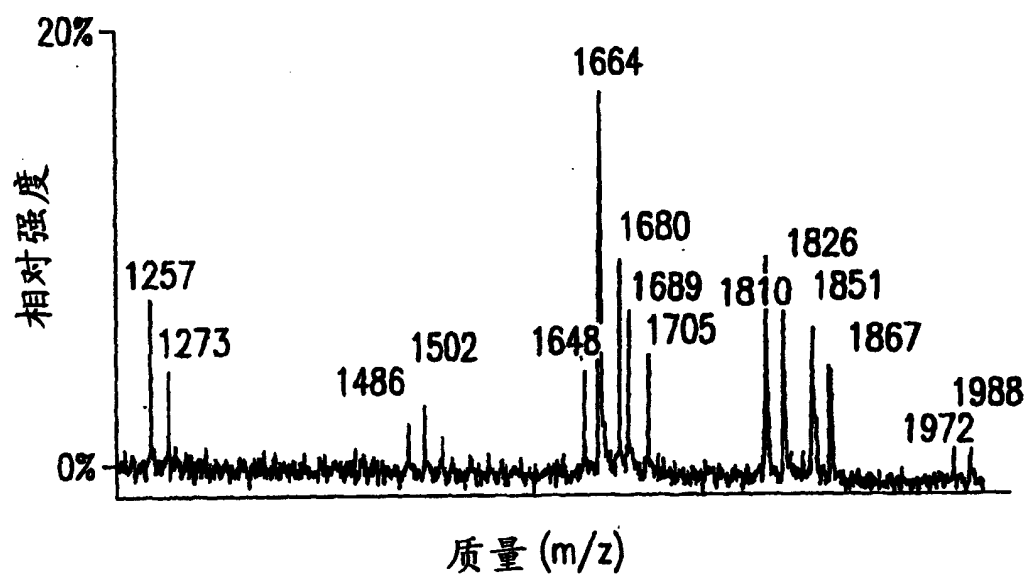


图 2E

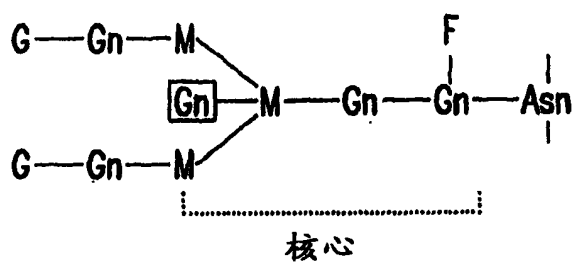


图 3A

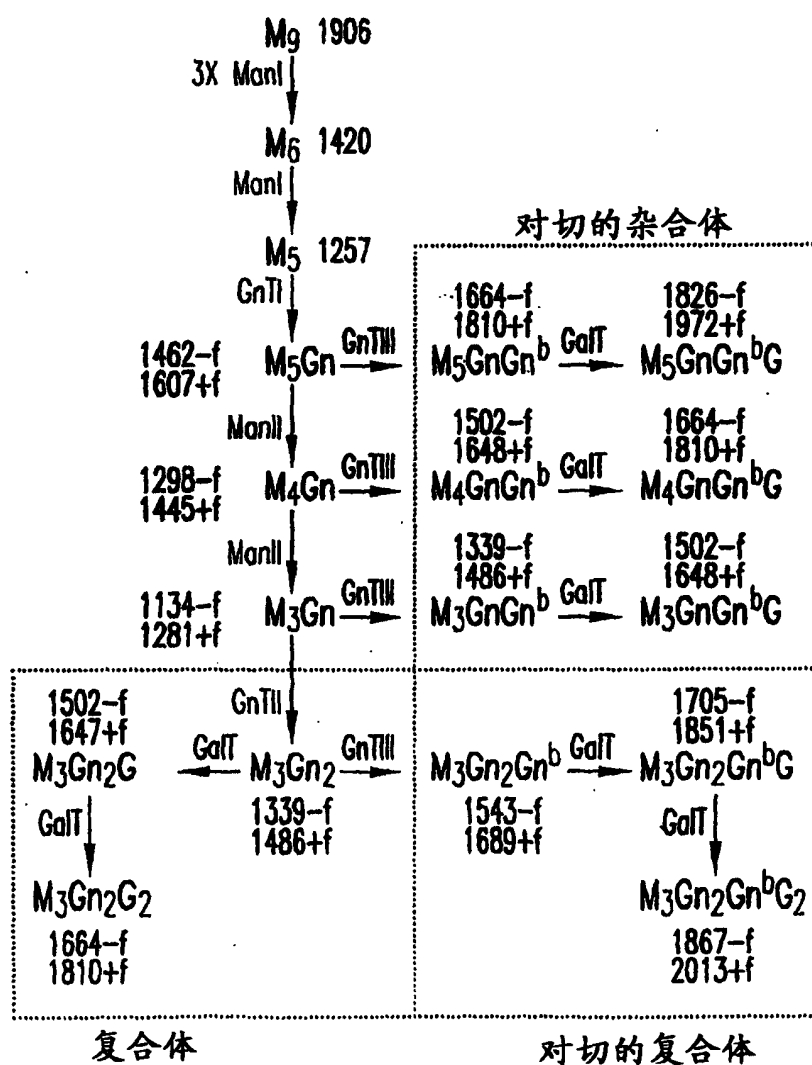


图 3B

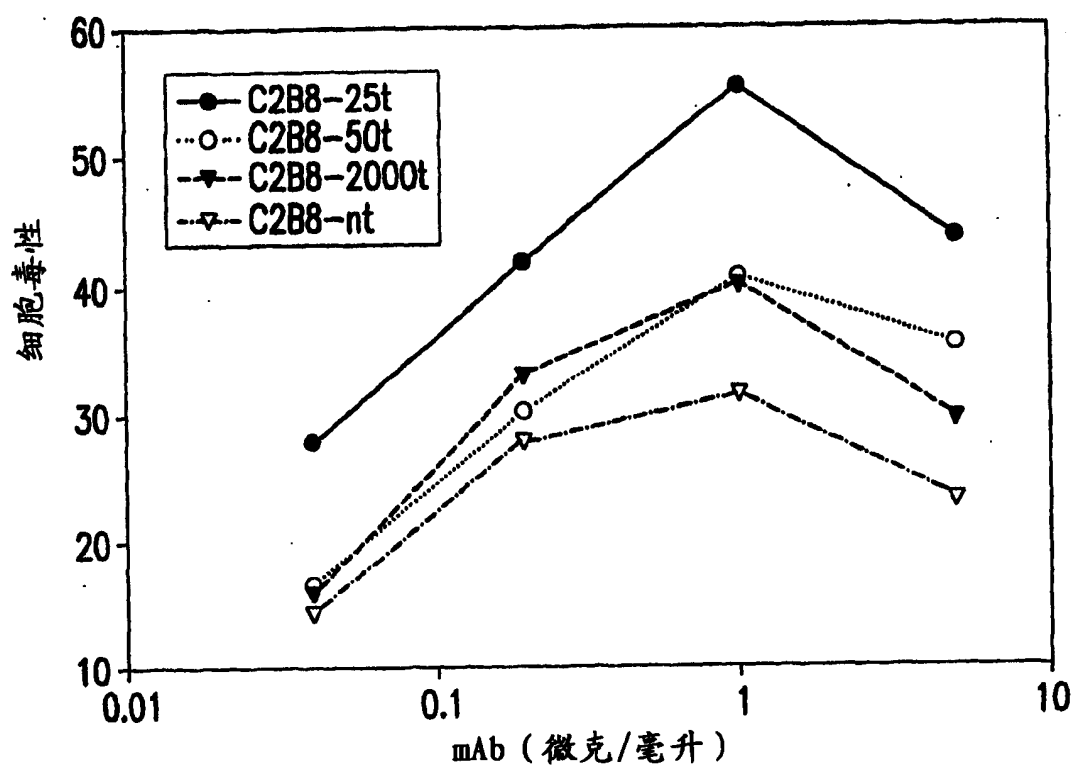


图 4A

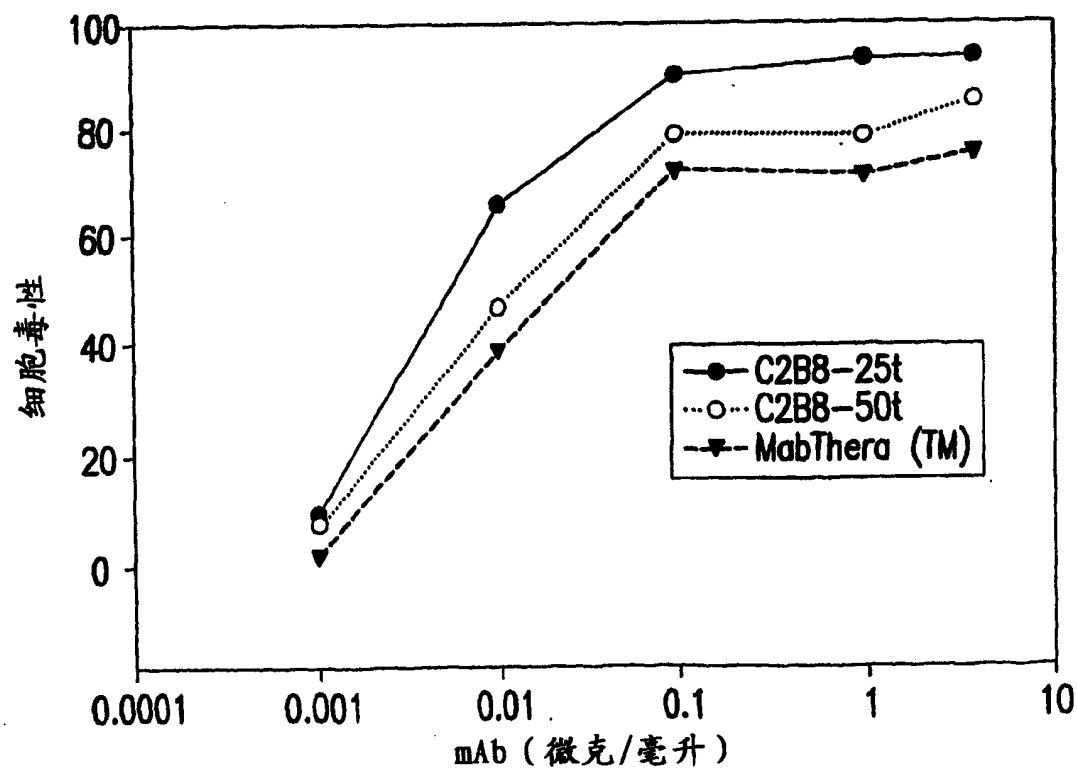


图 4B

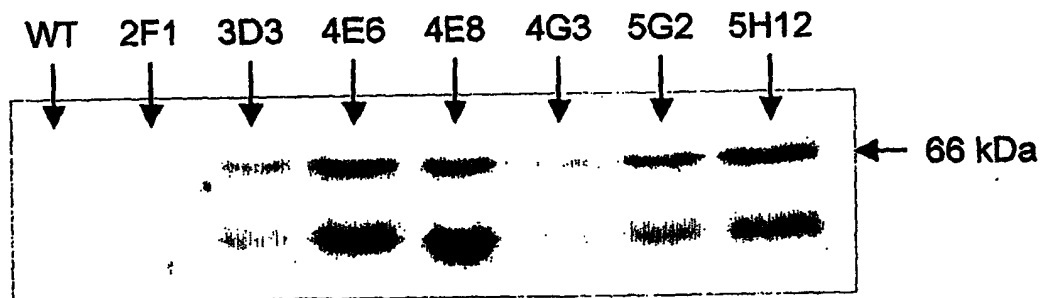


图5

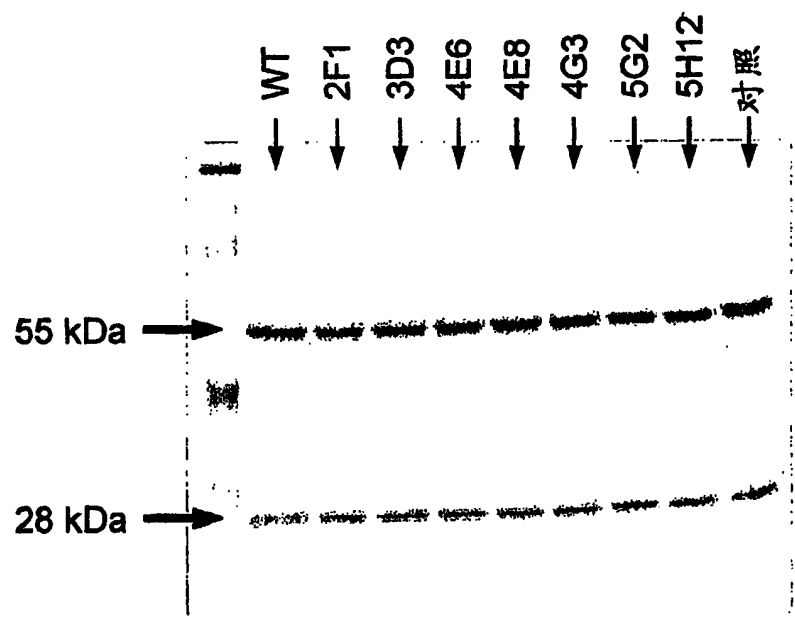


图 6

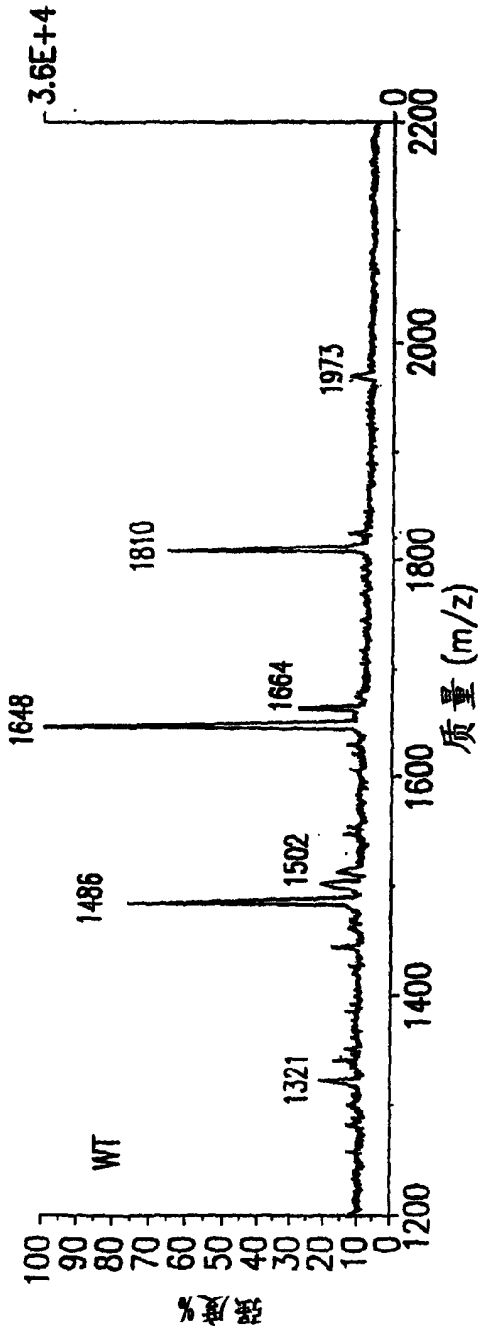


图 7A

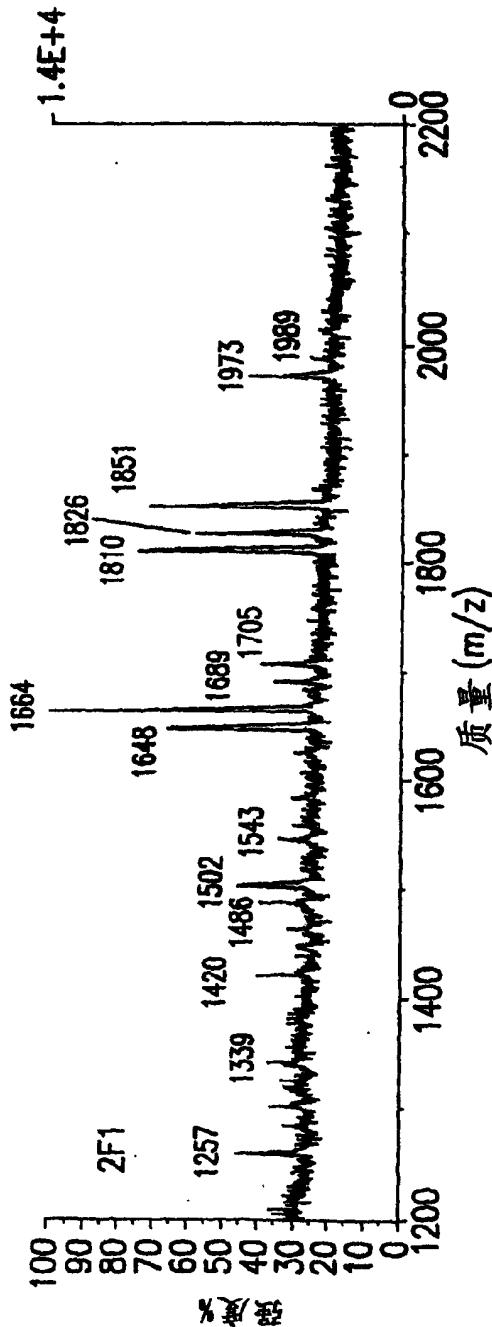


图 7B

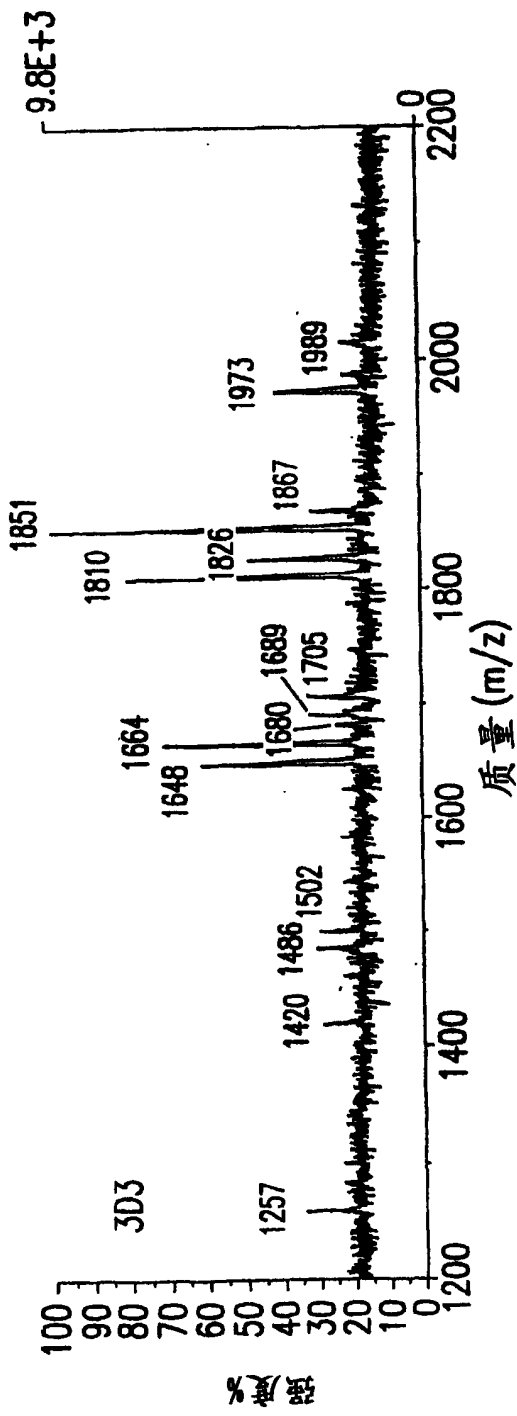


图 7C

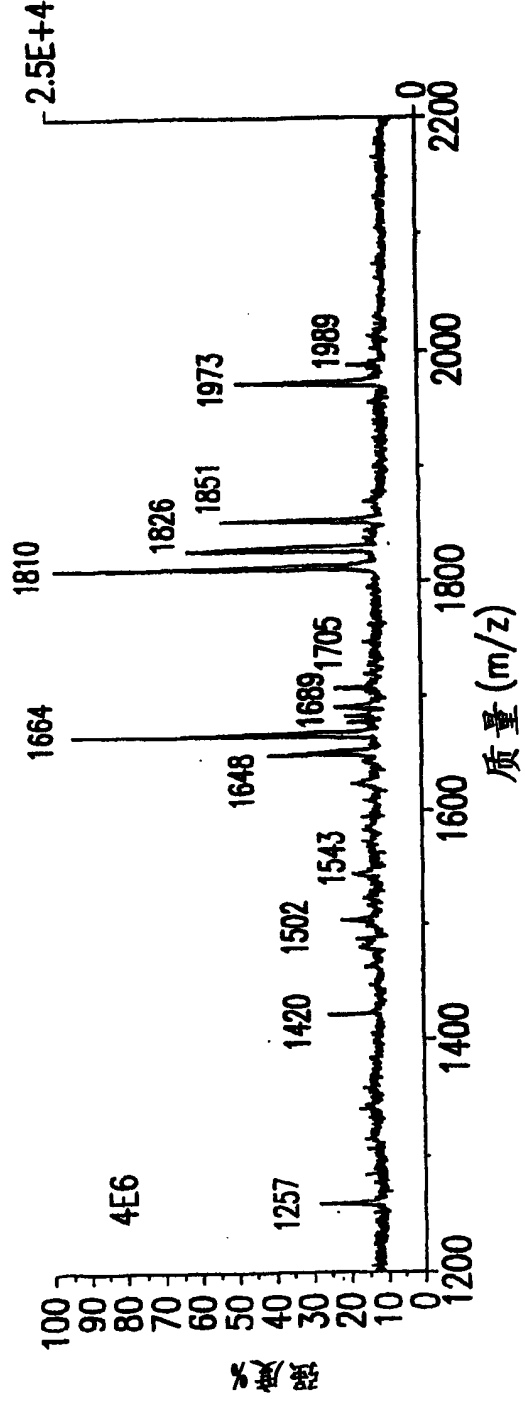
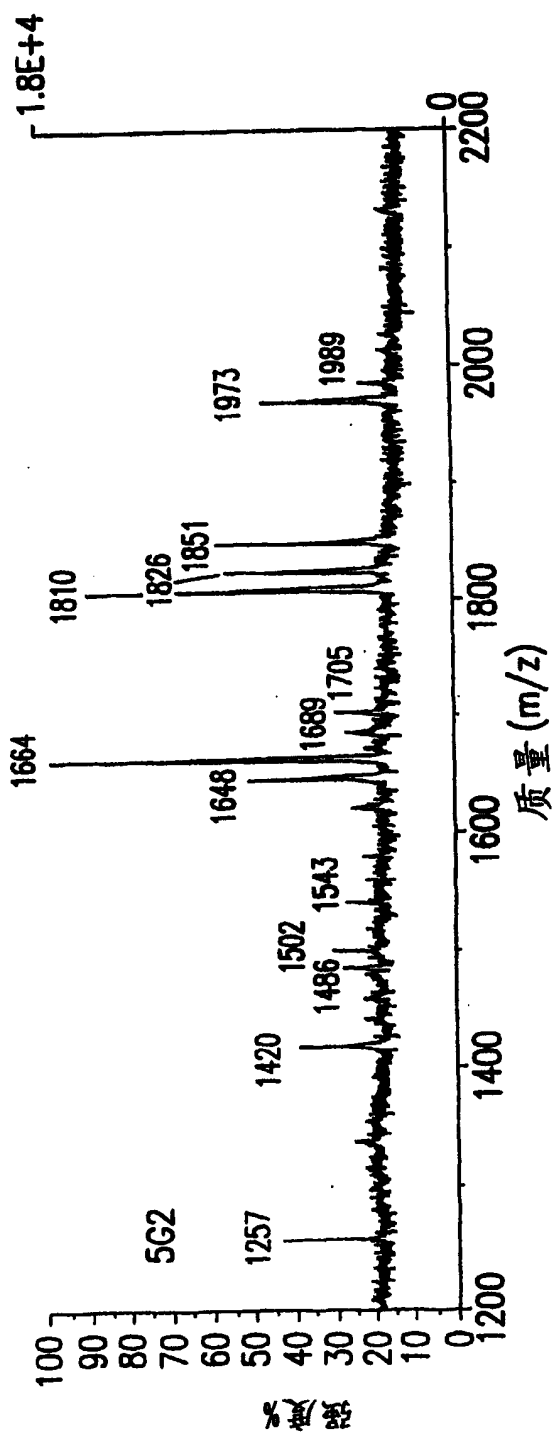
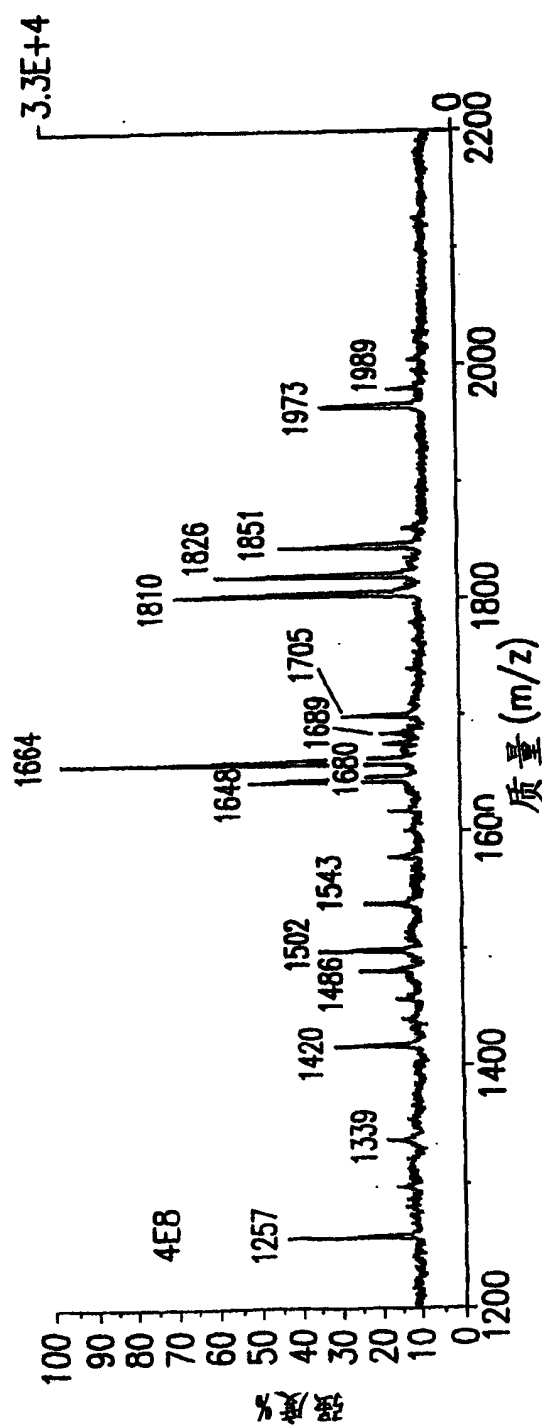


图 7D



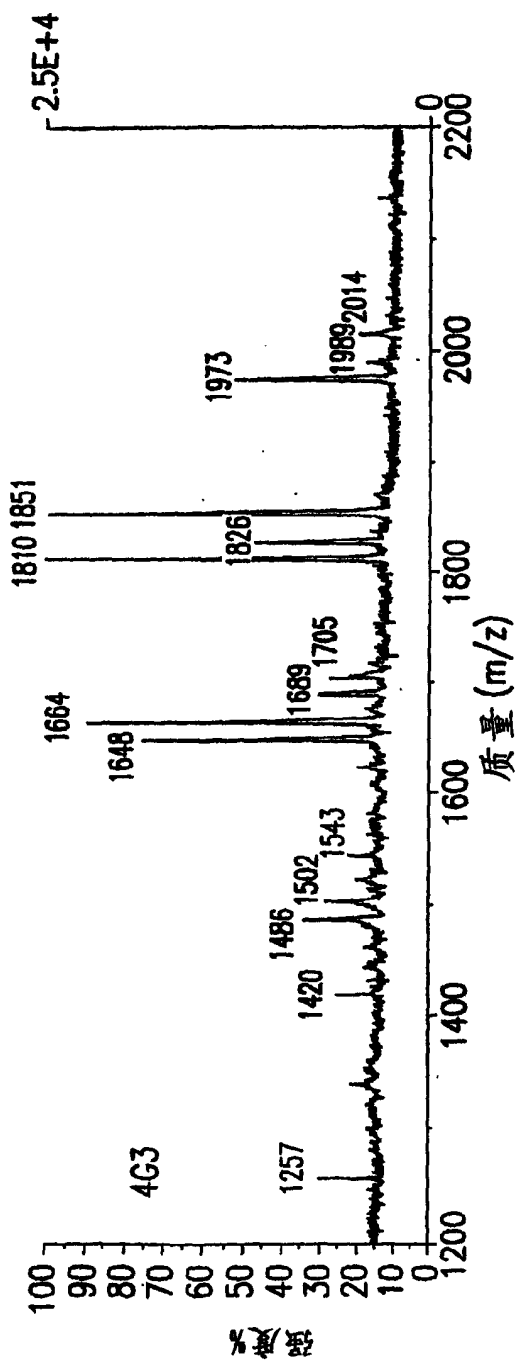


图 8C

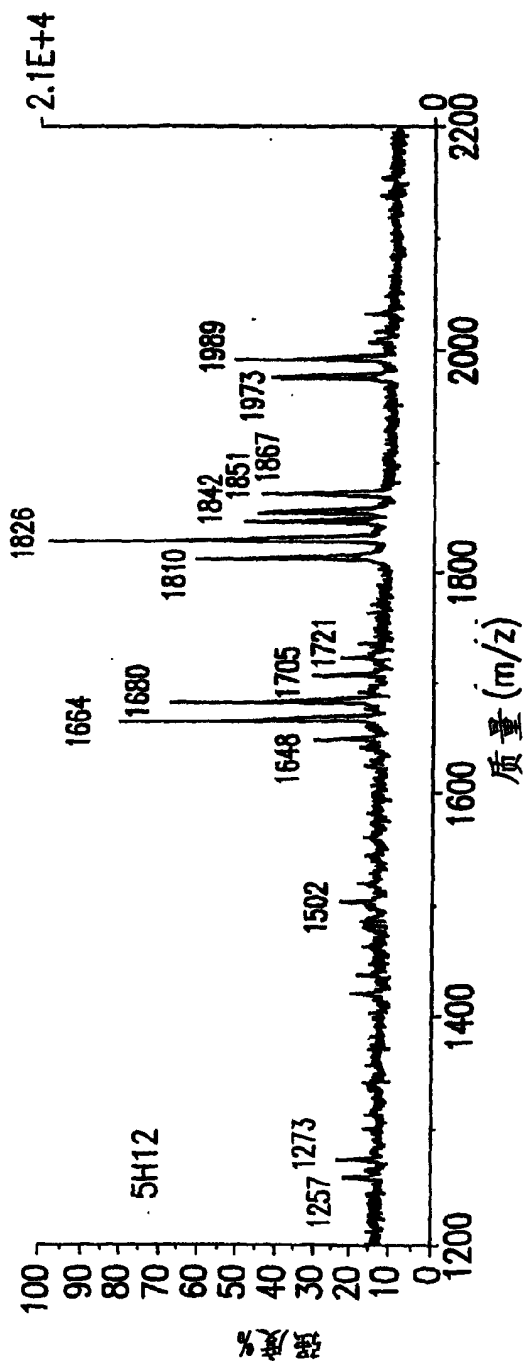


图 8D

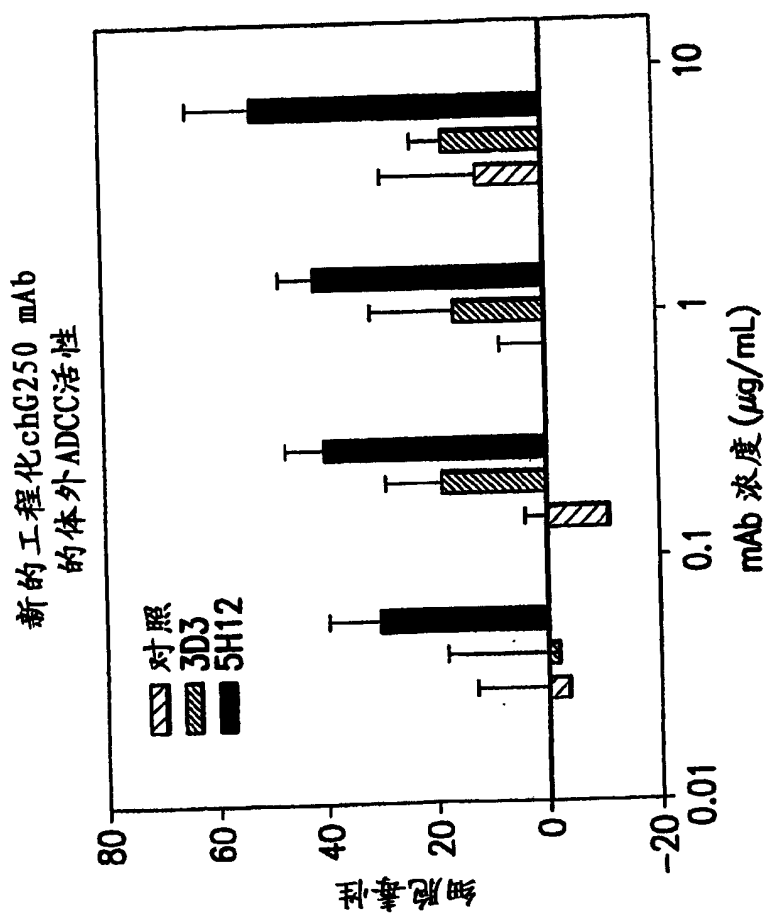


图 9