



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119685431 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 25

(21) 申请号 202411870260.4

(22) 申请日 2017.12.19

(30) 优先权数据

16205587.5 2016.12.21 EP

17157002.1 2017.02.20 EP

(62) 分案原申请数据

201780079057.7 2017.12.19

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 R·法尔肯施泰因 H·沃尔克

S·马利克 M·托曼

M·弗赖赫尔范罗曼 I·格伦特

R·多恩 M·欣加尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61K 47/38 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

用于体外糖工程化抗体的方法

(57) 摘要

本文报道了一种产生抗体的方法,所述方法包括以下步骤:通过将包含抗体的溶液施加到固定的抗体轻链亲和配体,形成抗体-抗体轻链亲和配体复合物,其中抗体轻链亲和配体固定在固相上,将前一步骤中形成的复合物与一种或多种酶孵育,以修饰抗体的糖基化,从而产生抗体。

1. 一种生产抗体的方法,包括以下步骤:

- 通过将包含抗体的溶液施加到固定的抗体轻链亲和配体上,形成抗体-抗体轻链亲和配体复合物,其中抗体轻链亲和配体对 κ 或 λ 恒定轻链具有特异性并且固定在固相上,
- 将前一步骤中形成的复合物与一种或多种酶一起孵育以修饰抗体的糖基化,从而产生抗体。

2. 根据权利要求1所述的生产糖基化修饰抗体的方法,包括以下步骤:

- 通过将包含抗体的溶液施加到固定的抗体轻链亲和配体上,形成抗体-抗体轻链亲和配体复合物,其中抗体轻链亲和配体对 κ 或 λ 恒定轻链具有特异性并且固定在固相上,
- 将前一步骤中形成的复合物与一种或多种酶和一种或多种活化的糖残基一起孵育以修饰抗体的糖基化,从而产生糖基化修饰的抗体。

3. 根据权利要求1至2中任一项的方法,在孵育步骤之后包括以下步骤

- 从抗体轻链亲和配体中回收修饰的抗体。

4. 根据权利要求1至3中任一项的方法,其按以下顺序包括以下步骤:

- 将包含在N-糖基化位点处具有糖基化的抗体的溶液施加到与固相结合的抗体轻链亲和配体上,由此抗体与配体结合,

- 任选地用缓冲溶液洗涤固相,

- 通过以下方式酶促修饰抗体的N-糖基化位点处的糖基化:

- 在适合酶促修饰配体结合抗体的条件下施加包含第一糖基化修饰酶的第一溶液足够的时间,任选地洗涤经修饰的配体结合抗体,在适合酶促修饰经修饰的配体结合抗体的条件下施加包含第二糖基化修饰酶的第二溶液足够的时间,任选地洗涤经两次修饰的配体结合抗体,

或

- 施加包含第一糖基化修饰酶的第一溶液足够的时间,并在适于至少部分酶促修饰配体结合的抗体的条件下施加,在确定的一段时间后,施加包含第二糖基化修饰酶的第二溶液足够的时间,并在适于酶促修饰经修饰的配体结合的抗体的条件下施加,任选地洗涤修饰两次的配体结合的抗体,

或

- 施加包含第一和第二糖基化修饰酶的溶液足够的时间,并在适于酶促修饰配体结合的抗体的条件下施加,任选地洗涤经修饰的配体结合的抗体,

- 从抗体轻链亲和配体释放抗体,从而产生抗体。

5. 根据权利要求1至3中任一项的方法,其按以下顺序包括以下步骤:

- 将包含在N-糖基化位点处具有糖基化的抗体的缓冲溶液施加到结合到固相的抗体轻链亲和配体上,由此抗体被配体结合,从而产生配体结合抗体,

- 任选地用缓冲溶液洗涤固相而不解吸抗体,

- 通过以下方式酶促修饰抗体的N-糖基化位点处的糖基化:

- 在足以酶促修饰配体结合抗体的条件下施加包含第一糖基化修饰酶和第一活化糖残基的第一缓冲溶液足够的时间,任选地洗涤修饰的配体结合抗体,在足以酶促修饰经修饰的配体结合抗体的条件下施加包含第二糖基化修饰酶和第二活化糖的第二缓冲溶液足够

的时间,任选地洗涤两次修饰的配体结合的抗体,

或

-在足以对配体结合抗体进行至少部分酶修饰的条件下,施加包含第一糖基化修饰酶和第一活化糖的第一缓冲溶液足够的时间,在规定的时间内,在足以对修饰的配体结合抗体进行酶修饰的条件下,施加包含第二糖基化修饰酶和第二活化糖的第二缓冲溶液,任选地洗涤两次修饰的配体结合抗体,

或

-在适合酶促修饰配体结合抗体的条件下,施加包含第一和第二糖基化修饰酶以及第一和第二活化糖的缓冲溶液足够的时间,任选地洗涤修饰的配体结合抗体,

-从抗体轻链亲和配体释放抗体,从而产生糖基化修饰的抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一项的方法,其中抗体选自全长抗体、二价单特异性抗体、双特异性抗体、二价双特异性抗体、三价双特异性抗体、四价双特异性抗体、三价三特异性抗体、抗体Fab片段和四价四特异性抗体。

7. 根据权利要求1至6中任一项的方法,其中抗体是二价或三价或四价双特异性抗体或Fab片段。

8. 根据权利要求1至7中任一项的方法,其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体或人抗体。

9. 根据权利要求4至8中任一项的方法,其中所述第一糖基化修饰酶是半乳糖基转移酶,并且所述第二糖基化修饰酶是唾液酸转移酶。

10. 根据权利要求1至9中任一项的方法,其中溶液包含色谱纯化的抗体,(第一)糖基化修饰酶是GalT1,并且与(第一)糖基化修饰酶的孵育是在37℃或室温下持续24小时。

11. 根据权利要求1至10中任一项的方法,其中所述溶液包含色谱纯化的抗体,所述第一糖基化修饰酶为GalT1,与所述第一糖基化修饰酶的孵育时间为37℃或室温下24小时。

12. 根据权利要求1至11中任一项的方法,其中所述溶液包含色谱纯化的抗体,所述(第二)糖基化修饰酶为ST6,与所述(第二)糖基化修饰酶的孵育时间为37℃或室温下24小时。

13. 根据权利要求1至12任一项所述的方法,其中所述溶液包含经色谱纯化的抗体,所述第二糖基化修饰酶为ST6,与所述第二糖基化修饰酶的孵育时间为37℃或室温下24小时。

14. 根据权利要求1至13任一项所述的方法,其中所述溶液为缓冲的无细胞培养上清液,所述上清液包含抗体,所述第一糖基化修饰酶为GalT1,所述第二糖基化修饰酶为ST6,其在所述第一糖基化修饰酶加入后6至24小时加入,总孵育时间为37℃或室温下24小时至48小时。

15. 根据权利要求1至14中任一项的方法,包括以下步骤:

a) 在包含编码抗体或Fab片段的核酸的细胞中重组产生抗体或Fab片段,以获得在N-糖基化位点具有糖基化的抗体或Fab片段,

b) 分离步骤a)中产生的在N-糖基化位点具有异质糖基化的抗体或Fab片段,

c) 用半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶对在N-糖基化位点具有异质糖基化的抗体或Fab片段进行酶促修饰以获得修饰的抗体,随后将修饰的抗体或Fab片段与酶分离,

d) 任选地通过一个或多个色谱步骤纯化修饰的抗体或Fab片段,

其中所产生的抗体或Fab片段在N-糖基化位点包含相对量的至少70%的双半乳糖基化

的抗体或Fab片段(其中100%对应于G0、G1和G2糖型的量)。

16. 根据权利要求1至15中任一项的方法,包括以下步骤:

- a) 在哺乳动物或CHO细胞中重组产生IgG1同种型的抗体或Fab片段,所述CHO细胞包含编码所述抗体或Fab片段的核酸,以获得在N-糖基化位点处具有糖基化的抗体或Fab片段,
- b) 回收并纯化步骤a)中产生的在N-糖基化位点处具有异质糖基化的抗体或Fab片段,
- c) 用半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶对在N-糖基化位点处具有异质糖基化的抗体或Fab片段进行酶促修饰以获得修饰的抗体,随后将修饰的抗体或Fab片段与酶分离,
- d) 任选地通过一个或多个色谱步骤纯化修饰的抗体或Fab片段,

其中所产生的抗体或Fab片段在N-糖基化位点包含相对量的至少70%的双半乳糖基化的抗体或Fab片段(其中100%对应于G0、G1和G2糖型的量)。

17. 根据权利要求1至16中任一项的方法,其中N-糖基化位点是Fab区N-糖基化位点或天冬酰胺残基297处的Fc区N-糖基化位点(根据Kabat编号)。

18. 一种产生抗体或其片段的方法,其按以下顺序包括以下步骤:

- 提供包含编码抗体或其片段的核酸的细胞,所述抗体或其片段至少包含抗体轻链,
- 在适合于在N-糖基化位点糖基化抗体或其片段表达的条件下培养细胞,所述片段至少包含可特异性地与在后续步骤之一中使用的抗体轻链亲和层析材料结合的轻链,
- 从细胞或培养基中回收抗体或其片段,
- 在适合于抗体或其片段与亲和层析材料结合的条件下将包含抗体或其片段的溶液施加到抗体轻链亲和层析柱中,
- 用本文报道的方法修饰抗体或其片段在N-糖基化位点的糖基化,以及
- 从亲和层析材料中回收在N-糖基化位点具有确定糖基化的修饰抗体或其片段,从而产生抗体。

19. 包含具有确定糖基化的抗体的药物制剂,所述抗体选自G2糖基化形式、G0糖基化形式、M3糖基化形式、S2糖基化形式、A2B糖基化形式、A2BG2糖基化形式和S1糖基化形式。

20. 包含具有确定糖基化的抗体的药物制剂,所述确定糖基化选自半乳糖作为末端糖、GlcNAc作为末端糖、甘露糖作为末端糖和唾液酸作为末端糖,所述抗体被包埋在通过凝聚技术或界面聚合制备的羟甲基纤维素或明胶微胶囊或聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。

21. 根据权利要求20的药物制剂,其中所述制剂是持续释放制剂,选自含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质为成型制品的形式,例如,薄膜或微胶囊。

用于体外糖工程化抗体的方法

[0001] 本申请是申请日为2017年12月19日,发明名称为“用于体外糖工程化抗体的方法”的中国申请201780079057.7的分案申请。

[0002] 本发明属于抗体工程的领域。在本文中更详细地报道了用于抗体Fc区中的糖基化的体外糖工程化方法。

背景技术

[0003] IgG是最丰富的抗体同种型,其中IgG1抗体是表现出最显著程度和效应功能组(array)的亚类。IgG1抗体是免疫疗法中最常用的抗体,其中ADCC和CDC通常被认为是重要的。在抗体结构内,CH2结构域以及IgG铰链区在Fc介导的抗体效应功能中起主要作用。每个CH2结构域包含位于约297位的天冬酰胺残基处的保守糖基化位点(根据Kabat的EU索引编号),其中聚糖部分共价结合(Wright,A.和Morrison,S.L.,TIBTECH 15(1997)26-32)。在成熟IgG分子中,聚糖埋在CH2结构域之间,影响IgG分子的三级结构。

[0004] 抗体Fc区的聚糖主要是高度异质的复合双触角结构。虽然抗体的Fab区内可能存在其他非保守的糖基化位点,但抗体糖基化对其效应功能的影响已归因于Fc区糖基化。

[0005] 已知抗体Fc区中存在的N-连接聚糖对于抗体介导效应功能如ADCC是必需的(Lively,M.R.等人Glycobiol.8(1995)813-822;Jefferis R.等人Immunol Rev.163(1998)59-76)。已经显示N-连接聚糖的组成影响IgG分子的Fc区结构,从而改变抗体效应功能,如Fc-受体结合、ADCC活性和CDC活性(Presta,L.,Curr.Opin.Struct.Biol.13(2003)519-525)。

[0006] 在重组表达系统中表达的(例如,通过原核或真核宿主细胞中表达)IgG抗体中,N-连接的聚糖结构在各个抗体分子之间是不同的。因此,在重组表达系统中产生的抗体可以被认为是“抗体群”(文中进一步使用的术语),其中抗体的氨基酸序列相同但是在其Fc区的N-连接聚糖模式中表现出异质性。

[0007] 已知Fc区聚糖的组成在用于表达重组抗体的不同宿主细胞物种之间是不同的。用于重组表达抗体的两种常用宿主细胞系是中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)和小鼠骨髓瘤细胞(例如sp2/0、P3X63Ag8.653、NS0)。CHO细胞表达重组抗体,其基本上没有末端唾液酸残基,而大部分聚糖模式是岩藻糖基化。相反,小鼠骨髓瘤细胞产生的抗体群具有高达50%(相对频率)的唾液酸残基但具有较少的岩藻糖残基。

[0008] 已知聚糖结构的一些末端残基影响IgG效应功能。已知末端岩藻糖残基的存在有助于降低Fc γ RIIIa结合和降低ADCC。因此,缺乏末端岩藻糖残基的抗体(“非岩藻糖基化(afucosylated)”抗体)与抗体群介导的ADCC增加相关。虽然非岩藻糖基化对ADCC介导的改善的影响在本领域中已被广泛接受,但是Fc区域半乳糖基化在ADCC介导中的作用是有争议的。一些研究表明半乳糖基化对ADCC没有影响(Boyd,P.N.,等人Mol Immunol.32(1995)1311-1318;Hodoniczky,J.,等人Biotechnol.Prog.21(2005)1644-1652;Raju,T.S.,Curr.Opin.Immunol.20(2008)471-478);而其他研究则报道了IgG的半乳糖基化增加Fc γ RIIIa结合(Houde,D.,等人,Mol.Cell.Proteom.9(2010)1716-1728;Kumpel,B.M.,等人,

Hum.Antibod.Hybridom.6(1995)82-88;Thomann,M.,等人,Mol.Immunol.73(2016)69-75)。

[0009] 目前,为了改善抗体介导的ADCC,IgG分子的工程化集中于调节IgG分子的岩藻糖基化。可以通过在基因工程化的宿主细胞中表达抗体来实现重组表达的IgG的非岩藻糖基化,例如,缺乏蛋白岩藻糖基化的Lec13 CHO细胞或基因敲除的细胞系,如敲除 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的CHO细胞。

[0010] 然而,由目前的表达系统(例如,CHO细胞)产生的抗体表现出异质的聚糖模式,导致所产生抗体的不同批次内不同的聚糖种类分布变化。因此,仍然需要定制重组IgG抗体的效应功能,特别是需要提供改善治疗性抗体介导的ADCC的方法。

[0011] 在W02011/012297中报道了生产具有确定的糖结构的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的方法,其包括以下步骤:提供含有免疫球蛋白或免疫球蛋白片段的亲和色谱柱洗脱液,将亲和色谱柱洗脱液与植物来源(例如来自绿色咖啡豆)的(α 1,3)半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)孵育,将孵育的亲和色谱柱洗脱液施加于蛋白A色谱材料,和从蛋白A色谱材料中回收免疫球蛋白或免疫球蛋白片段,从而产生具有确定的糖结构的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段。

[0012] 在W0 2015/123754中,提供了用于将亲和配体结合的异质糖型抗体样品重构为基本上同质的单一所需糖型抗体样品的酶促方法,该抗体样品用于治疗用途,并提供了用于实施所述方法的试剂盒。用于将亲和配体结合的抗体的Fc区从异质糖型酶促改变为基本上同质的单一糖型的方法包括:使亲和配体结合的异质糖型抗体与设计用于特定糖型修饰的反应缓冲液接触足够的时间,并且在将Fc区的糖型修饰为基本上同质的单一形式的条件下接触;任选地加入一种或多种糖核苷酸和/或辅因子;从所述亲和配体释放基本上均质的单一糖型抗体样品。本发明还包括用于治疗癌症和免疫疾患的生物药物,其包含酶促产生的单一糖型mAb和多克隆抗体,以及包含单一糖型抗体作为生物药物的组合物。

[0013] 在W0 2016/037947中报道了IgG1同种型的半乳糖工程化的重组抗体、用于生产所述抗体的方法及其用途。

发明内容

[0014] 在重组产生的单克隆抗体的一个实施方案中,本文报道了用于体外糖工程化抗体的方法,其中在抗体与包含抗体轻链亲和配体的固相结合的同时进行糖基化的修饰。本文报道的方法尤其是用于修饰固定的抗体的改善方法。

[0015] 在本文报道的方法中,单克隆抗体与亲和配体结合,尤其是与抗体轻链亲和配体结合,用于酶促修饰以及随后作为具有修饰的糖结构的单克隆抗体制剂释放。该修饰可以在Fab片段或在Fc区中的N-糖基化位点上进行。令人惊讶地发现,抗体轻链亲和配体结合的抗体可以被有效地酶促修饰,就好像抗体在溶液中一样。本文报道的方法可以容易地整合到任何抗体纯化方法中,从而提供新的、有效的和成本效益的体外抗体聚糖修饰的方法。

[0016] 本文报道的方法可用于任何单克隆抗体的修饰,而无需修改前面的上游生产工艺步骤。本文报道的方法可作为单个体外修饰和纯化步骤整合到现有方法中。固有地,不需要对现有的抗体产生细胞系进行显著改变,因为如本文报道的方法在下游处理期间提供糖结构修饰。

[0017] 使用本文报道的方法,用于抗体糖基化修饰的酶可以从抗体制剂中除去,得到改

善的制剂。

[0018] 本文报道的一个方面是用于酶促制备/产生抗体的方法,所述抗体在N-糖基化位点具有修饰的(基本上同质的)糖基化,其中所述抗体在酶促修饰期间与抗体轻链亲和配体结合。

[0019] 本文报道的一个方面是一种用于酶促修饰抗体的N-糖基化位点上的糖基化(为基本上同质的糖基化)的方法,其中抗体在酶促修饰期间与抗体轻链亲和配体结合。

[0020] 在所有方面的一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0021] -将抗体轻链亲和配体结合的在N-糖基化位点具有糖基化的单克隆抗体与一种或多种酶孵育足够的时间,并在适于将N-糖基化位点的糖基化修饰为确定的(基本上同质的)形式(同质糖基化)的条件下孵育。

[0022] 在所有方面的一个实施方案中,该方法在孵育步骤之前包括步骤

[0023] -使在N-糖基化位点具有糖基化的单克隆抗体与抗体轻链亲和配体结合,和

[0024] 在孵育步骤之后的步骤

[0025] -从抗体轻链亲和配体释放在N-糖基化位点具有确定的(基本上同质的)糖基化的抗体。

[0026] 在所有方面的一个实施方案中,该方法按以下顺序包括以下步骤

[0027] -将包含在N-糖基化位点具有糖基化的抗体的(缓冲)溶液施加到与固相(抗体轻链亲和配体色谱材料)结合的抗体轻链亲和配体,由此抗体与配体结合(产生配体结合的抗体),

[0028] -任选地用缓冲溶液洗涤固相,

[0029] -通过以下酶促修饰抗体的N-糖基化位点上的糖基化:

[0030] -施加包含第一糖基化修饰酶(和第一活化的糖残基)的第一(缓冲)溶液足够的时间,并在适于酶促修饰配体结合的抗体的条件下施加,任选地洗涤修饰的配体结合的抗体,施加包含第二糖基化修饰酶(和第二活化的糖)的第二(缓冲)溶液足够的时间,并在适于酶促修饰修饰的配体结合的抗体的条件下施加,任选地洗涤修饰两次的配体结合的抗体,或

[0031] -施加包含第一糖基化修饰酶(和第一活化的糖)的第一(缓冲)溶液足够的时间,并在适于至少部分酶促修饰配体结合的抗体的条件下施加,在确定的一段时间后,施加包含第二糖基化修饰酶(和第二活化的糖)的第二(缓冲)溶液足够的时间,并在适于酶促修饰修饰的配体结合的抗体的条件下施加,任选地洗涤修饰两次的配体结合的抗体,或

[0032] -施加包含第一和第二糖基化修饰酶(和第一和第二活化的糖)的(缓冲)溶液足够的时间,并在适于酶促修饰配体结合的抗体的条件下施加,任选地洗涤修饰的配体结合的抗体,

[0033] -从抗体轻链亲和配体释放在N-糖基化位点具有确定的糖基化的抗体。

[0034] 本文报道的方法中使用的抗体可以是任何抗体或抗体片段,包括Fab片段、单链抗体、多特异性抗体和抗体融合体,只要其含有N-糖基化位点。

[0035] 在所有方面的一个实施方案中,N-糖基化位点在Fab中或在Fc区中。

[0036] 因此,在本文报道的所有方面的一个实施方案中,抗体选自由抗体Fab片段、全长抗体、二价单特异性抗体、双特异性抗体、二价双特异性抗体、三价双特异性抗体、四价双特异性抗体、三价三特异性抗体和四价四特异性抗体组成的抗体的组。

- [0037] 在一个实施方案中,抗体是二价单特异性抗体。
- [0038] 在一个实施方案中,抗体是二价或三价或四价双特异性抗体。
- [0039] 在一个实施方案中,抗体是嵌合或人源化或人抗体。
- [0040] 在一个实施方案中,抗体是多克隆抗体制剂。
- [0041] 在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体。
- [0042] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,抗体(制剂)是人IgG类的抗体(制剂)。
- 在一个实施方案中,抗体是人IgG1或IgG4亚类的抗体。
- [0043] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,确定的糖基化是选自G2糖型、G0糖型、M3糖型、S2糖型、A2B糖型、A2BG2糖型和S1糖型的糖基化。
- [0044] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,确定的糖基化是选自以下的糖基化:作为末端糖的半乳糖、作为末端糖的G1cNAc、作为末端糖的甘露糖和作为末端糖的唾液酸。
- [0045] 在一个实施方案中,抗体是重组产生的抗体。
- [0046] 本文报道的一个方面是用本文报道的方法产生的抗体。
- [0047] 本文报道的一个方面是药物制剂,其包含通过本文报道的方法产生的具有确定糖基化的抗体。
- [0048] 本发明的另一方面是用于重组产生在N-糖基化位点具有确定的糖基化的抗体的方法,包括以下步骤:
- [0049] a) 在(哺乳动物或CHO)细胞中重组产生(IgG1同种型的)抗体,所述细胞包含编码抗体的核酸,以获得在N-糖基化位点具有糖基化的抗体,
- [0050] b) 分离(回收和任选纯化)在N-糖基化位点具有异质糖基化的抗体,
- [0051] c) 用半乳糖基转移酶和/或唾液酸转移酶酶促修饰在N-糖基化位点具有糖基化的抗体,以获得在N-糖基化位点具有确定的糖基化的抗体,其在N-糖基化位点包含相对量的至少70%的双半乳糖基化的抗体(G2F糖型)(其中100%对应于G0F、G1F和G2F糖型的量),随后从一种或多种酶中分离修饰的抗体,
- [0052] d) 任选地通过一个或多个色谱步骤纯化修饰的抗体,
- [0053] 从而产生在N-糖基化位点具有确定的糖基化的抗体。
- [0054] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,第一糖基化修饰酶是半乳糖基转移酶。
- [0055] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,第一糖基化修饰酶是半乳糖基转移酶,第二糖基化修饰酶是唾液酸转移酶。
- [0056] 在一个实施方案中,半乳糖基转移酶是 β 4GalT1。
- [0057] 在一个实施方案中,唾液酸转移酶是ST6。
- [0058] 在一个实施方案中,唾液酸转移酶是ST6Gal1或ST6Gal2。
- [0059] 在一个实施方案中,(第一)缓冲溶液包含UDP-Gal。
- [0060] 在一个实施方案中,(第二)缓冲溶液包含CMP-NANA。
- [0061] 在一个实施方案中,孵育在室温下(20-25℃,优选约22℃)。
- [0062] 在一个实施方案中,孵育在25℃。
- [0063] 在一个实施方案中,孵育在37℃。
- [0064] 在一个实施方案中,孵育持续7至48小时。

[0065] 在本文报道的所有方面的一个实施方案中,溶液包含色谱法纯化的抗体,(第一)糖基化修饰酶是GalT1,并且与(第一)糖基化修饰酶的孵育是在20-27℃或37℃下持续24小时。在一个实施方案中,孵育是在室温(约22℃)下。

[0066] 在一个实施方案中,溶液包含色谱纯化的抗体,(第二)糖基化修饰酶是ST6,并且与(第二)糖基化修饰酶的孵育在20-27℃或37℃下持续24小时。在一个实施方案中,孵育是在室温(约22℃)下。

[0067] 在一个实施方案中,溶液是包含抗体的缓冲、无细胞的培养上清液,第一糖基化修饰酶是GalT1,第二糖基化修饰酶是ST6,其在第一糖基化修饰酶6至24小时后、优选24小时后加入,总孵育时间为在20-27℃或37℃下24小时至48小时,优选30小时。在一个实施方案中,孵育在室温(约22℃)下进行。

[0068] 本文报道的一个方面是用于产生抗体或其片段的方法,其按以下顺序包括以下步骤:

[0069] -提供包含编码包含至少一条抗体轻链的抗体或其片段的核酸的细胞,

[0070] -在适于表达在N-糖基化位点具有糖基化的抗体或其片段的条件下培养细胞,(该片段至少包含可以被以下步骤之一中使用的抗体轻链亲和色谱材料特异性结合的轻链),

[0071] -从细胞或培养基中回收抗体或其片段,

[0072] -在适于抗体或其片段与亲和色谱材料结合的条件下,将包含抗体或其片段的溶液施加到抗体轻链亲和色谱柱,

[0073] -用本文报道的方法,修饰抗体或其片段在N-糖基化位点的糖基化,和

[0074] -从亲和色谱材料回收在N-糖基化位点具有确定的糖基化的修饰抗体或其片段,

[0075] 从而产生抗体。

[0076] 在一个实施方案中,包括以下步骤作为最终步骤的方法:

[0077] -使用一至三个色谱步骤纯化修饰的抗体或其片段。

[0078] 在所有方面的一个实施方案中,N-糖基化位点在Fab中或在Fc区中。

[0079] 发明的详细描述

[0080] 定义

[0081] 如本文所用,重链和轻链所有恒定区和结构域的氨基酸位置根据Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中描述的Kabat编号系统编号,在文中称为“根据Kabat编号”。具体地,Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda, MD(1991)的Kabat编号系统(参见第647-660页)用于kappa和lambda同种型的轻链恒定结构域CL。具体地,Kabat EU索引编号系统(参见第661-723页)用于恒定重链结构域(CH1、铰链、CH2和CH3,在本文中通过称为“根据Kabat EU索引编号”进一步阐明)。

[0082] 必须注意的是,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一(a)”,“一(an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“一(a)细胞”包括多个这样的细胞及其本领域技术人员已知的等同物,等等。同样,术语“一(a)”(或“一(an)”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。还应注意,术语“包含”、“包括”和“具有”可互换使用。

[0083] 对于本领域技术人员来说,将氨基酸序列(例如多肽的氨基酸序列)转换为编码该氨基酸序列的相应核酸序列是众所周知的。因此,核酸的特征在于由各个核苷酸组成的其核酸序列,并且同样还在于由其编码的多肽的氨基酸序列。

[0084] 术语“约”表示此后数值的 $\pm 20\%$ 的范围。在一个实施方案中,术语“约”表示此后数值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一个实施方案中,术语“约”表示此后数值的 $\pm 5\%$ 的范围。

[0085] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示出所需的抗原结合活性。

[0086] 术语“抗体依赖性细胞毒性(ADCC)”是由Fc受体结合介导的功能,并且是指通过本文报道的抗体在效应细胞存在下裂解靶细胞。在一个实施方案中,在效应细胞如新鲜分离的PBMC(外周血单个核细胞)或从血沉棕黄层纯化的效应细胞(如单核细胞或NK(自然杀伤)细胞)的存在下,通过用本文报道的抗体处理表达CD19的红细胞(例如表达重组人CD19的K562细胞)制剂,来测量ADCC。靶细胞用Cr-51标记,随后与抗体孵育。将标记的细胞与效应细胞孵育,并分析上清液释放的Cr-51。对照包括靶内皮细胞与效应细胞孵育,但不含抗体。通过测量其与表达Fc γ 受体的细胞(如重组表达Fc γ RI和/或Fc γ RIIA的细胞或NK细胞(基本上表达Fc γ RIIIA))的结合来研究抗体诱导介导ADCC的初始步骤的能力。在一个优选的实施方案中,测量与NK细胞上Fc γ R的结合。

[0087] “抗体片段”是指不是完整抗体的分子,其包含结合完整抗体结合的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0088] 术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种的抗体,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种。

[0089] 抗体的“类型”是指抗体重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。存在五种主要类型的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类型免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0090] 术语“补体依赖性细胞毒性(CDC)”是指在补体存在下本文报道的抗体诱导的细胞裂解。在一个实施方案中,在补体存在下通过用本文报道的抗体处理表达CD19的人内皮细胞来测量CDC。在一个实施方案中,细胞用钙黄绿素标记。如果抗体在30 μ g/ml的浓度下诱导20%或更多的靶细胞裂解,则存在CDC。可以在ELISA中测量与补体因子C1q的结合。在这种测定法中,原则上用浓度范围的抗体包被ELISA板,向其中加入纯化的人C1q或人血清。通过针对C1q的抗体,然后通过过氧化物酶标记的缀合物检测C1q结合。结合的检测(最大结合B_{max})测量为过氧化物酶底物ABTS®(2,2'-连氨基-二-[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸酯])在405nm处的光密度(OD405)。

[0091] “效应功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,其随抗体类型而变化。抗体效应功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;和B细胞激活。

[0092] Fc受体结合依赖性效应功能可以通过抗体的Fc区与Fc受体(FcR)的相互作用来介导,Fc受体是造血细胞上的特化细胞表面受体。Fc受体属于免疫球蛋白超家族,已经显示其

通过免疫复合物的吞噬作用介导抗体包被的病原体的去除,以及通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)介导包被相应抗体的红细胞和各种其他细胞靶标(例如肿瘤细胞)的裂解(参见例如Van de Winkel, J.G.和Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49(1991) 511-524)。根据其对应免疫球蛋白同种型的特异性来定义FcR: IgG抗体的Fc受体被称为Fc γ R。Fc受体结合描述于,例如Ravetch, J.V.和Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9(1991) 457-492; Capel, P.J., 等人, *Immunomethods* 4(1994) 25-34; de Haas, M., 等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126(1995) 330-341; 和Gessner, J.E., 等人, *Ann. Hematol.* 76(1998) 231-248。

[0093] IgG抗体Fc区的受体(Fc γ R)的交联引发多种效应功能,包括吞噬作用、抗体依赖性细胞毒性和炎症介质的释放、以及免疫复合物清除和抗体产生的调节。在人类中,已经表征了三类Fc γ R,它们是:

[0094] -Fc γ RI (CD64) 以高亲和力结合单体IgG,并在巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞上表达。在氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327和P329中的至少一个上修饰Fc区IgG(根据Kabat的EU索引编号)降低了与Fc γ RI的结合。位置233-236的IgG2残基被IgG1和IgG4取代,使与Fc γ RI的结合降低 10^3 倍,并消除了人单核细胞对抗体致敏的红细胞的反应(Armour, K.L., 等人, *Eur. J. Immunol.* 29(1999) 2613-2624)。

[0095] -Fc γ RII (CD32) 以中等至低亲和力结合复合的IgG并广泛表达。该受体可分为两种亚型, Fc γ RIIA和Fc γ RIIB。Fc γ RIIA存在于许多参与杀伤的细胞(例如巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞)上,并且似乎能够激活杀伤过程。Fc γ RIIB似乎在抑制过程中起作用,其存在于B细胞、巨噬细胞和肥大细胞和嗜酸性粒细胞上。在B细胞上,其似乎起到抑制进一步产生免疫球蛋白和同种型转换例如IgE类的作用。在巨噬细胞上, Fc γ RIIB抑制通过Fc γ RIIA介导的吞噬作用。在嗜酸性粒细胞和肥大细胞上, B型可能有助于抑制这些细胞通过IgE与其独立受体结合的激活。例如,发现对于包含在氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292和K414(根据Kabat的EU索引编号)中的至少一个上具有突变的IgG Fc区的抗体, Fc γ RIIA的结合降低。

[0096] -Fc γ RIII (CD16) 以中等至低亲和力结合IgG,其以两种类型存在。Fc γ RIIIA存在于NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和一些单核细胞和T细胞上,并介导ADCC。Fc γ RIIB在嗜中性粒细胞上高度表达。例如,发现对于在氨基酸残基E233-G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338和D376(根据Kabat的EU索引编号)中的至少一个上具有突变的IgG Fc区的抗体, Fc γ RIIIA的结合降低。

[0097] 在Shields, R.L., 等人*J. Biol. Chem.* 276(2001) 6591-6604中描述了人IgG1上对于Fc受体的结合位点的定位,上述突变位点和用于测量与Fc γ RI和Fc γ RIIA的结合的方法。

[0098] 如本文所用的术语“Fc受体”是指激活受体,其特征存在于与受体相关的细胞质ITAM序列(参见例如Ravetch, J.V.和Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19(2001) 275-290)。这些受体是Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA。术语“不结合Fc γ R”表示在抗体浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 时,本文报道的抗体与NK细胞的结合是如W02006/029879中报道的抗OX40L抗体LC.001的结合的10%或更低。

[0099] 虽然IgG4显示降低的FcR结合,但其他IgG亚类的抗体显示出强结合。然而, Pro238、Asp265、Asp270、Asn297 (Fc碳水化合物缺失)、Pro329和234、235、236和237 Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434和His435残基如果改变也会降低FcR结合

(Shields, R.L., 等人 J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., 等人, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., 等人, Immunology 86 (1995) 319-324; 和 EP 0 307 434)。

[0100] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,其含有恒定区的至少一部分。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226、或从Pro230、或从Ala 231延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。

[0101] 本文报道的抗体包含Fc区,在一个实施方案中,包含衍生自人源的Fc区。在一个实施方案中,Fc区包含人恒定区的所有部分。抗体的Fc区直接参与补体激活、C1q结合、C3激活和Fc受体结合。虽然抗体对补体系统的影响取决于某些条件,但与C1q的结合是由Fc区中确定的结合位点引起的。这样的结合位点在现有技术中是已知的并且描述于例如Lukas, T.J., 等人, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., 和 Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., 等人, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., 等人, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., 等人, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., 等人, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., 等人, Immunology 86 (1995) 319-324; 和 EP 0 307 434。这样的结合位点是例如L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331和P329(根据Kabat的EU索引编号)。亚类IgG1、IgG2和IgG3的抗体通常显示补体激活、C1q结合和C3激活,而IgG4不激活补体系统、不结合C1q并且不激活C3。“抗体的Fc区”是本领域技术人员熟知的术语,其基于抗体的木瓜蛋白酶切割来定义。在一个实施方案中,Fc区是人Fc区。在一个实施方案中,Fc区是人IgG4亚类,其包含突变S228P和/或L235E和/或P329G(根据Kabat的EU索引编号)。在一个实施方案中,Fc区是人IgG1亚类,其包含突变L234A和L235A以及任选的P329G(根据Kabat的EU索引编号)。

[0102] 术语“野生型Fc区”表示与天然存在的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。野生型人Fc区包括天然人IgG1 Fc区(非A和A同种异型)、天然人IgG2 Fc区、天然人IgG3 Fc区和天然人IgG4 Fc区以及天然存在的其变体。野生型Fc区表示在SEQ ID NO:01(IgG1,高加索人同种异型)、SEQ ID NO:02(IgG1,非裔美洲人同种异型)、SEQ ID NO:03(IgG2)、SEQ ID NO:04(IgG3)和SEQ ID NO:05(IgG4)。

[0103] 变体(人)Fc区由包含的氨基酸突变定义。因此,例如,术语P329G表示变体Fc区,其相对于亲本(野生型)Fc区在氨基酸位置329处具有脯氨酸至甘氨酸的突变(根据Kabat的EU索引编号)。野生型氨基酸的身份可以是未指定的,在这种情况下,前述变体称为329G。

[0104] IgG1亚类的野生型人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列,其开始于第227位的半胱氨酸残基,结束于第446位的甘氨酸残基:

```
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0105] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR (E/D) E (M/L) TKNQVSL
TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS
RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 06).
```

[0106] 具有突变T366S、L368A和Y407V的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

- [0107] CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 07).
- [0108] 具有突变T366W的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列：
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
- [0109] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 08).
- [0110] 具有突变L234A和L235A的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列：
CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
- [0111] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 09).
- [0112] 具有突变L234A、L235A、T366S、L368A和Y407V的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链
具有以下氨基酸序列：
CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
- [0113] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 10).
- [0114] 具有突变L234A、L235A和T366W的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基
酸序列：
CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
- [0115] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 11).
- [0116] 具有突变L234A、L235A和P329G的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基
酸序列：

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0117] KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 12).

[0118] 具有突变L234A、L235A、P329G、T366S、L368A和Y407V的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0119] KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 13).

[0120] 具有突变L234A、L235A、P329G和T366W的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0121] KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 14).

[0122] 具有突变L234A、L235A、P329G、Y349C、T366S、L368A和Y407V的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0123] KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 15).

[0124] 具有突变L234A、L235A、P329G、S354C和T366W的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0125] KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 16).

[0126] 具有突变L234A、L235A、P329G、S354C、T366S、L368A和Y407V的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

[0127] CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPCR DELTKNQVSL SCAVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDS DGSFF LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 17).

[0128] 具有突变L234A、L235A、P329G、Y349C和T366W的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0129] KALGAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR DELTKNQVSL WCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 18).

[0130] 具有突变I253A、H310A和H435A的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMASR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLAQDWLN GKEYKCKVSN
[0131] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNA YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 19).

[0132] 具有突变H310A、H433A和Y436A的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLAQDWLN GKEYKCKVSN
[0133] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALANH ATQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 20).

[0134] 具有突变M252Y、S254T和T256E的IgG1亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0135] KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTT PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 21).

[0136] IgG4亚类的野生型人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列:

CPSCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0137] KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G (SEQ ID NO: 22).

[0138] 具有突变S228P和L235E的IgG4亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列：
CPPCPAPEFE GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN

[0139] KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G (SEQ ID NO: 23).

[0140] 具有突变S228P、L235E和P329G的IgG4亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列：

CPPCPAPEFE GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
[0141] KGLGSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G (SEQ ID NO: 24).

[0142] 具有突变S228P、L235E、P329G、T366S、L368A和Y407V的IgG4亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列：

ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
[0143] YKCKVSNKGL GSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLSCA
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLVS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 25).

[0144] 具有突变S228P、L235E、P329G和T366W的IgG4亚类的变体人Fc区的多肽链具有以下氨基酸序列：

ESKYGPPCPP CPAPEFEGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
[0145] YKCKVSNKGL GSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLWCL
VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG (SEQ ID NO: 26).

[0146] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文中可互换使用，是指具有与天然抗体结构基本相似的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0147] 术语“聚糖”表示多糖或寡糖。本文还使用聚糖来指糖缀合物的碳水化合物部分，糖缀合物如糖蛋白、糖脂、糖肽、糖蛋白质组、肽聚糖、脂多糖或蛋白聚糖。聚糖通常仅由单糖之间的为 β 糖苷键的单糖组成。聚糖可以是单糖残基的均聚物或杂聚物，并且可以是直链

或支链的。

[0148] 术语“糖基转移酶”表示能够将单糖部分从糖核苷酸转移至受体分子(如寡糖中的糖分子)的酶。此类糖基转移酶的实例包括但不限于半乳糖基转移酶和唾液酸转移酶。

[0149] 术语“铰链区”表示抗体重链多肽的一部分,其在野生型抗体重链中连接CH1结构域和CH2结构域,例如,根据Kabat的EU编号系统,从约位置216到约位置230,或者根据Kabat的EU编号系统从约位置226到约位置230。其他IgG亚类的铰链区可以通过与IgG1亚类序列的铰链区半胱氨酸残基比对来确定。

[0150] 铰链区通常是由具有相同氨基酸序列的两个多肽组成的二聚体分子。铰链区通常包含约25个氨基酸残基并且是柔性的,允许相关的靶结合位点独立地移动。铰链区可以细分为三个结构域:上、中和下铰链结构域(参见例如Roux, et al., J. Immunol. 161 (1998) 4083)。

[0151] “人源化”抗体是指嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可以包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经历人源化的抗体。

[0152] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的每个区域,其包含序列上高变(“互补决定区”或“CDR”)的氨基酸残基区段和/或形成结构上限定的环(“高变环”)的氨基酸残基区段,和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的氨基酸残基区段。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3)和三个在VL中(L1、L2、L3)。

[0153] HVR包括

[0154] (a) 在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处存在的高变环(Chothia, C.和Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

[0155] (b) 在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处存在的CDR(Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242);

[0156] (c) 在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处存在的抗原接触(MacCallum等人J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996));和

[0157] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0158] 除非另有说明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)在本文中根据Kabat等人,同上编号。

[0159] “分离的”抗体是一种已经从其天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度,如,例如通过电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱法(例如,离子交换或反相HPLC)测定的。关于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman, S.等人, J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87。

[0160] “分离的”核酸是指已经从其天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但核酸分子存在于染色体外或不同于其天然染

染色体位置的染色体位置。

[0161] 术语“轻链”表示天然IgG抗体的较短多肽链。基于其恒定结构域的氨基酸序列,抗体的轻链可以被分配为称为kappa (κ) 和lambda (λ) 的两种类型中的一种,人kappa轻链恒定结构域参见SEQ ID NO:27,人lambda轻链恒定结构域参见SEQ ID NO:28。

[0162] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群获得的抗体,即,组成群的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位,除了可能的变体抗体,例如,含有天然发生的突变或在单克隆抗体制剂的生产过程中产生的突变,这些变体通常以少量存在。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中描述。

[0163] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,其由二硫键连接的两条相同的轻链和两条相同的重链组成。从N-末端到C-末端,每条重链具有可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,随后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),其中铰链区位于第一和第二恒定结构域之间。类似地,从N-末端到C-末端,每条轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,然后是恒定轻链(CL)结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列,抗体轻链可以被分配为称为kappa (κ) 和lambda (λ) 的两种类型中的一种。

[0164] 术语“N-连接的寡糖”表示通过天冬酰胺-N-乙酰基葡萄糖胺键在天冬酰胺氨基酸残基上与肽主链连接的寡糖。N-连接的寡糖也称为“N-聚糖”。所有N-连接的寡糖具有Man3G1cNAc2的共同五糖核心。它们在外周糖的存在和支链(也称为触角)数量方面不同,所述外周糖如N-乙酰基葡萄糖胺、半乳糖、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖和唾液酸。任选地,该结构还可含有核心岩藻糖分子和/或木糖分子。

[0165] 术语“O-连接的寡糖”表示在苏氨酸或丝氨酸氨基酸残基上与肽主链连接的寡糖。

[0166] 术语“唾液酸”表示九碳羧化糖家族的任何成员。唾液酸家族中最常见的成员是N-乙酰神经氨酸(2-酮-5-乙酰氨基-3,5-二脱氧-D-甘油-D-半乳糖壬基吡喃-1-酮酸(通常缩写为Neu5Ac、NeuAc或NANA)。该家族的第二个成员是N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc或NeuGc),其中NeuAc的N-乙酰基被羟基化。第三个唾液酸家族成员是2-酮-3-脱氧-壬基酮酸(nonulosonic acid)(KDN)(Nadano等人(1986)J.Biol.Chem.261:11550-11557;Kanamori等人,J.Biol.Chem.265:21811-21819(1990))。还包括9-取代的唾液酸,如9-O-C1-C6酰基-NeuSAc,如9-O-乳酰基-Neu5Ac或9-O-乙酰基-NeuSAc、9-脱氧-9-氟-Neu5Ac和9-叠氨基-9-脱氧Neu5Ac。关于唾液酸家族的综述,参见例如Varki,Glycobiol.2(1992)25-40;Sialic Acids:Chemistry, Metabolism and Function, R.Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992))。唾液酸化方法中唾液酸化合物的合成和使用在WO 92/16640中报道了,其全部内容并入本文。

[0167] 关于抗体,术语“基本上”表示相应产物(抗体)具有单糖基化状态,无论该状态是否包括在单个位点或多个位点的糖基化。通常,当抗体占制剂中抗体重量的至少60%时,抗

体基本上是纯的。例如,制剂中的抗体为所需抗体重量的至少约75%,在某些实施方案中至少约80%,在某些实施方案中为约85%,在某些实施方案中至少约90%,在某些实施方案中至少约95%、96%、97%、98%,最优选至少约99%。

[0168] 术语“糖基化状态”表示抗体的特定或所需的糖基化模式。“糖型”是包含特定糖基化状态的抗体。此类糖基化模式包括,例如,在抗体Fc区的N-297位置(根据Kabat编号)连接一个或多个糖,其中所述糖是天然、重组、合成或半合成产生的。可通过本领域已知的许多方法测定糖基化模式。例如,在US2006/0057638和US2006/0127950中报道了分析蛋白质上碳水化合物的方法(其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0169] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的结构域,其参与抗体与抗原的结合。天然抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变结构域通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守构架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt,T.J.等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),第91页)。单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的VH或VL结构域分离结合特定抗原的抗体,以筛选分别互补VL或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano,S.等人,J.Immunol.150(1993)880-887;Clackson,T.et al.,Nature 352(1991)624-628)。

[0170] 术语“N-糖基化位点”表示N-糖基化位点共有序列内的氨基酸残基其连接或可连接的聚糖。通常,N-连接的聚糖与天冬酰胺(Asn,N)侧链的酰胺氮原子连接。N-糖基化位点共有序列是Asn-X-Ser/Thr,其中X可以是除脯氨酸外的任何氨基酸残基。术语“N-连接的糖基化”表示糖分子寡糖(表示为聚糖)连接于例如天冬酰胺的酰胺氮原子的结果。

[0171] 抗体糖基化

[0172] 人抗体主要在重链CH2结构域或Fab区中的约297位置(Asn297)上的天冬酰胺残基上糖基化,其中具有或多或少岩藻糖基化的双触角复合寡糖(抗体氨基酸残基根据Kabat,同上编号)。在每个臂中双触角糖结构可以以至多两个连续的半乳糖(Gal)残基终止。臂根据与中心甘露糖残基的糖苷键表示为(1,6)和(1,3)。表示为G0的糖结构不包含半乳糖残基。表示为G1的糖结构在一个臂中含有一个或多个半乳糖残基。表示为G2的糖结构在每个臂中含有一个或多个半乳糖残基(Raju,T.S.,Bioprocess Int.1(2003)44-53)。人恒定重链区详细报道在Kabat,同上和Brueggemann,M.等人,J.Exp.Med.166(1987)1351-1361;Love,T.W.等人,Methods Enzymol.178(1989)515-527。抗体Fc区的CHO型糖基化描述于例如Routier,F.H.,Glycoconjugate J.14(1997)201-207。

[0173] 术语“抗体”表示并包括各种形式的抗体,如人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或T细胞抗原耗尽抗体(参见例如W098/33523、W098/52976和W000/34317)。在一个实施方案中,本文报道的方法中的抗体是人或人源化抗体。抗体的基因工程例如描述在Morrison,S.L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81(1984)6851-6855;US 5,202,238和US 5,204,244;Riechmann,L.等人,Nature 332(1988)323-327;Neuberger,M.S.等人,Nature 314(1985)268-270;Lonberg,N.,Nat.Biotechnol.23(2005)1117-1125。

[0174] 抗体通常包含两个所谓的全长轻链多肽(轻链)和两个所谓的全长重链多肽(重链)。全长重链和轻链多肽中的每一个含有可变结构域(可变区)(通常是全长多肽链的氨基末端部分),其包含与抗原相互作用的结合区。全长重链和轻链多肽中的每一个包含恒定区(通常是羧基末端部分)。全长重链的恒定区介导抗体i)与携带Fc γ 受体(Fc γ R)的细胞(如

吞噬细胞)或ii)携带新生儿Fc受体(FcRn)(也称为Brambell受体)的细胞的结合。其还介导与某些因子的结合,包括经典补体系统的因子,如组分(C1q)。全长抗体的轻链或重链的可变结构域又包含不同的区段,即四个框架区(FR)和三个高变区(CDR)。“全长抗体重链”是在N末端至C末端方向上由抗体重链可变结构域(VH)、抗体恒定结构域1(CH1)、抗体铰链区、抗体恒定结构域2(CH2)、抗体恒定结构域3(CH3)和任选地在亚类IgE抗体的情况下,抗体恒定结构域4(CH4)组成的多肽。“全长抗体轻链”是在N末端至C末端方向上由抗体轻链可变结构域(VL)和抗体轻链恒定结构域(CL)组成的多肽。全长抗体链通过CL结构域和CH1结构域之间以及全长抗体重链的铰链区之间的多肽间二硫键连接在一起。

[0175] 近年来已经报道,抗体的糖基化模式,即糖组成和多种连接的糖结构,对生物学性质具有强烈影响(参见例如Jefferis,R.,*Biotechnol.Prog.*21(2005)11-16)。由哺乳动物细胞产生的抗体含有2-3质量%的寡糖(Taniguchi,T.等人,*Biochem.*24(1985)5551-5557)。例如,在G类抗体(IgG)中这等同于小鼠源IgG中的2.3个寡糖残基(Mizuochi,T.等人,*Arch.Biochem.Biophys.*257(1987)387-394),以及人源IgG中的2.8个寡糖残基(Parekh,R.B.等人,*Nature* 316(1985)452-457),其中通常两个位于Fc区中的Asn297上,剩余的在可变区中(Saba,J.A.等人,*Anal.Biochem.*305(2002)16-31)。

[0176] 本申请中使用的术语“糖结构”表示在特定氨基酸残基上的单个、确定的N-或O-连接的寡糖。因此,术语“具有G1糖结构的抗体”表示这样的抗体,其在根据Kabat编号方案的约氨基酸位置297的天冬酰胺氨基酸残基上或在FAB区中包含双触角寡糖,该双触角寡糖在寡糖的非还原末端仅包含一个末端半乳糖残基。本申请中使用的术语“寡糖”表示包含两个或更多个共价连接的单糖单元的聚合糖。

[0177] 对于本发明中不同N-或O-连接的寡糖的注释,从寡糖分子的非还原端到还原端列出各个糖残基。选择最长的糖链作为表示的基本链。N-或O-连接的寡糖的还原端是单糖残基,其直接与抗体氨基酸主链的氨基酸结合,而位于基本链还原端的相对末端的N-或O-连接的寡糖末端,被称为非还原端。

[0178] 所有寡糖在本文中描述为非还原糖的名称或缩写(即Gal),然后是糖苷键(α 或 β)、环键(1或2)、参与键合的还原糖的环位置(2、3、4、6或8)、然后是还原糖的名称或缩写(即GlcNAc)的配置。各糖优选为吡喃糖。有关标准糖生物学命名法的综述,参见Essentials of Glycobiology Varki等人编辑,1999,CSHL出版社。

[0179] 术语“确定的糖结构”在本申请中表示糖结构,其中糖结构的非还原端的单糖残基是特定种类。术语“确定的糖结构”在本申请中表示糖结构,其中糖结构的非还原端的单糖残基被确定并且是特定种类。

[0180] 抗体纯化

[0181] 本申请中使用的术语“亲和色谱法”表示采用“亲和色谱材料”的色谱方法。在亲和色谱法中,抗体基于其生物活性或化学结构被分离,该分离依赖于与色谱材料的色谱官能团形成的静电相互作用、疏水键和/或氢键。为了从亲和色谱材料中回收特异性结合的抗体,可以加入竞争配体,或者可以改变色谱条件,如缓冲液的pH值、极性 or 离子强度。示例性的“亲和色谱材料”是金属螯合色谱材料,如Ni(II)-NTA或Cu(II)-NTA,或抗体亲和色谱材料,如包含与其共价连接的蛋白A或蛋白G的色谱材料,或酶结合亲和色谱材料,如包含与其共价结合的酶底物类似物、酶辅因子或酶抑制剂作为色谱官能团的色谱材料,或凝集素结

合色谱材料,如包含与其共价连接的多糖、细胞表面受体、糖蛋白或完整细胞作为色谱官能团的色谱材料。

[0182] 在一个实施方案中,抗体轻链亲和配体使用轻链恒定结构域特异性捕获试剂,例如,该试剂特异于kappa或lambda恒定轻链,取决于抗体中是否含有kappa或lambda轻链。这种轻链恒定结构域特异性捕获试剂的实例是例如KappaSelect™和LambdaFabSelect™(可从GE Healthcare/BAC获得),其基于可以大规模实现高流速和低背压的高刚性琼脂糖基质。这些材料含有分别与kappa或lambda轻链恒定区结合的配体(将不结合缺乏轻链恒定区的抗体或其片段)。因此,两者都能够结合含有轻链恒定区的其他靶分子,例如IgG、IgA和IgM。配体通过长的亲水性间隔臂与基质连接,使其易于与靶分子结合。其基于筛选人Ig kappa或lambda的单链抗体片段。

[0183] 术语“轻链”表示天然IgG抗体的较短多肽链。抗体轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以被分配为称为kappa(κ)和lambda(λ)的两种类型中的一种,人kappa轻链恒定结构域参见SEQ ID NO:27,人lambda轻链恒定结构域参见SEQ ID NO:28。

[0184] 本申请中使用的术语“施加”及其语法等同物表示纯化方法的部分步骤,其中使含有感兴趣物质的溶液与固定相接触。含有待纯化的感兴趣物质的溶液通过固定相,该固定相提供固定相和溶液中物质之间的相互作用。取决于条件,如,例如,pH、导电性、盐浓度、温度和/或流速,溶液的一些物质与固定相结合,并从溶液中除去。其他物质保留在溶液中。溶液中保留的物质可存在于流通液。“流通液”表示在通过色谱装置后获得的溶液,其可以是含有感兴趣物质的施加溶液或缓冲液,该缓冲液用于冲洗柱或使一种或多种与固定相结合的物质洗脱。在纯化步骤之后,可以通过本领域技术人员熟悉的方法从溶液中回收感兴趣物质,如,例如,沉淀、盐析、超滤、渗滤、冻干、亲和色谱法或溶剂体积减少,以获得基本上均质形式的物质。

[0185] 可以通过重组方法产生抗体或抗体片段,其糖结构可以在本文报道的方法中修饰。用于重组产生的方法在现有技术中是众所周知的,并且包括在真核细胞中的蛋白质表达,以及随后分离抗体或抗体片段并纯化至药学上可接受的纯度。为了表达抗体或抗体片段,使用杂交瘤细胞或真核细胞,其中已经导入了编码抗体或抗体片段的一种或多种核酸。在一个实施方案中,真核细胞选自CHO细胞、NS0细胞、SP2/0细胞、HEK 293细胞、COS细胞、PER.C6细胞、BHK细胞、兔细胞或绵羊细胞。在另一个实施方案中,真核细胞选自CHO细胞、HEK细胞或兔细胞。表达后,从细胞中回收抗体或抗体片段(从上清液或裂解后的细胞中回收)。用于重组产生抗体的一般方法在现有技术中是众所周知的,并且报道在例如Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S. 等人, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880的综述文章中。

[0186] 通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl条带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他方法(参见例如Ausubel, F.M, 等人(编辑), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (2005)), 可以进行抗体的纯化以消除细胞组分或其他污染物,例如其他细胞核酸或蛋白质。已经很好地建立了不同的方法并广泛用于蛋白质纯化,如使用微生物蛋白质的亲和色谱法(例如蛋白A或蛋白G亲和色谱法)、离子交换色谱法(例如阳离子交换(羧甲基树脂)、阴离子交换(氨基乙基树脂)和混合模式交换)、亲

硫吸附(例如使用 β -巯基乙醇和其他SH配体)、疏水相互作用或芳香吸附色谱法(例如使用苯基琼脂糖、aza-arenophilic树脂或间氨基苯硼酸)、金属螯合亲和色谱法(例如,使用Ni(II)-和Cu(II)-亲和材料)、尺寸排阻色谱法和电泳方法(如凝胶电泳、毛细管电泳),以及其组合,如使用微生物蛋白的亲和色谱法、阳离子交换色谱法和阴离子交换色谱法(参见例如Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75(1998) 93-102)。一般的色谱方法及其用途是本领域技术人员已知的。参见,例如,Heftmann, E. (编辑), Chromatography, 第5版, Part A: Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, New York (1992); Deyl, Z. (编辑), Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands (1998); Poole, C.F. 和 Poole, S.K., Chromatography Today, Elsevier Science Publishing Company, New York (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J. 等人(编辑), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory出版社, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); 或 Ausubel, F.M. 等人(编辑), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (2005)。

[0187] 为了纯化已经通过细胞培养方法产生的抗体或抗体片段,通常可以采用不同色谱步骤的组合。通常,(蛋白A)亲和色谱法之后是一个或两个另外的分离步骤。在一个实施方案中,另外的色谱步骤是阳离子和阴离子交换色谱步骤,反之亦然。最后的纯化步骤是所谓的“修正步骤”,用于去除痕量杂质和污染物,如聚集的免疫球蛋白、残留的HCP(宿主细胞蛋白)、DNA(宿主细胞核酸)、病毒或内毒素。在一个实施方案中,最终纯化步骤是流通模式的阴离子交换色谱法。

[0188] 本文报道的方法

[0189] 重组产生的抗体或抗体片段的糖结构将由所用细胞系和所用培养条件决定。使用传统的下游处理技术,不可能选择性地去除特定的糖结构。

[0190] 更详细地,重组产生的单克隆抗体通常在糖基化位点含糖型的异质混合物。该糖基化谱受到重组生产过程中不同因素的影响,如宿主细胞中以及培养基中存在的酶活性和培养条件。

[0191] 需要产生具有普遍或甚至预先确定的糖基化的抗体,如,例如,具有治疗效果等等。

[0192] 本文报道的方法通过从培养物中收获抗体后酶促修饰N-糖基化位点上的聚糖,提供在N-糖基化位点上(例如,在Fab区或Fc区的N-糖基化位点上)具有确定的糖基化的抗体,即该抗体基本上含有与Fc区糖基化位点(例如,在Fc区中的Asn297上)连接的单一糖型。由于抗体与抗体轻链亲和配体紧密结合,可以以所需方式修饰其糖基化,因此,本文报道的方法具有的优点是其可以容易地并入用于从培养上清液纯化抗体的标准操作步骤中。因为抗体与抗体轻链亲和配体结合,而抗体亲和配体又可以进一步固定在固相上,所以,除其他外,与在溶液中进行修饰所需的量相比,用于修饰的酶的量可以减少;此外,可以在单个步骤中实现整个修饰。

[0193] 术语“具有确定的糖基化的抗体”或“具有确定的糖结构的抗体”表示抗体分子群,其中有限数量的不同聚糖连接至(预定的)N-糖基化位点,例如,在Fc区中的Asn297(根据

Kabat的EU索引编号)。在一个实施方案中,聚糖中的一种占G0F、G1F和G2F糖型的50%或更多,或者占G0F、G1F、G2F、G1S1F、G2S1F和G2S2F糖型的30%或更多。

[0194] 本文所用的术语“基本上”表示40%或更多,在一个实施方案中表示50%或更多的化合物具有相同的糖基化,即在N-糖基化位点(例如在Fc区域的Asn297(根据Kabat编号))包含相同的聚糖。

[0195] 利用本文报道的方法,可以修饰抗体(不论该抗体的类型和大小)以包含确定的糖型。更具体地,可以定制例如在Fc区中N-糖基化位点的糖基化,例如,用于抗体的预期治疗应用。例如,抗体Fc区的半乳糖基化可用于治疗癌症。进一步地,例如,唾液酸化抗体Fc区为确定的糖型,可用于治疗自身免疫性疾病。对于不同的应用,可能期望Fc区的去半乳糖基化和/或去唾液酸化。仍然在其他实施方案中,可以实现生成具有GlcNAc核心和甘露糖残基的杂合结构,如N-乙酰基葡萄糖胺-GlcNAc;或甘露糖-N-乙酰基葡萄糖胺-N-乙酰基葡萄糖胺-Man-GlcNAc-GlcNAc。可以使用本文报道的方法产生任何前述物质,因为可以用不同的糖基化酶、通过一系列重复本文报道的方法、逐步修饰任何抗体和所述抗体的任何糖结构,以产生所需的确定的糖型抗体。

[0196] 例如,可以使用本文报道的方法从异质的单克隆抗体群产生具有G2糖型的抗体。可以使用相同的方法将可通过糖工程方法产生的非岩藻糖基化的异质抗体转化为均质的G2-糖型。此外,还可以通过使用本文报道的方法将半乳糖基化调节至所需水平来解决批次间抗体半乳糖基化的差异。

[0197] 简而言之,本文报道的方法包括步骤:将包含在N-糖基化位点上(例如在Fc区中)具有糖基化的抗体的溶液施加至固定于固相/支持物的抗体轻链亲和配体上。支持物包括用洗涤缓冲液、然后用反应缓冲溶液洗涤的柱,该反应缓冲溶液适合于在柱上进行相应的所需酶促糖结构修饰。可以通过添加选择的第二酶,任选辅因子和任选糖核苷酸来进一步优化反应缓冲液。然后在室温或约37℃的升高温度下孵育柱。然后用洗涤缓冲液洗涤柱,用洗脱缓冲液从固体支持物上洗脱具有确定糖型的修饰的单克隆抗体。然后可以使用中和缓冲液中和洗脱的抗体。

[0198] 反应缓冲液中使用的糖核苷酸选自UDP-Glc、UDP-Gal、UDP-GalNAc、UDP-GlcNAc、UDP-GlcUA、UDP-Xyl、GDP-Man、GDP-Fuc、CMP-NeuSAc、CMP-NeuSGc及其组合。反应缓冲液中使用的浓度范围为约0.5mM至约5mM,在某些方面约1mM至约1.5mM。用于反应缓冲液的辅因子可选自 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 α -乳白蛋白及其组合。用于反应缓冲液的辅因子浓度可以在约2mM至约10mM的范围内。

[0199] 固定在固相上的抗体轻链亲和配体在纯化和修饰过程中保留在柱中。固相包括但不限于琼脂糖、琼脂糖凝胶、聚丙烯酸、聚苯乙烯和其他合成聚合物,其提供可忽略不计的非靶蛋白和修饰酶的非特异性吸附。亲和配体通过例如与固相的各种化学反应中的任意共价结合到固相上,如N羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、环氧化物、醛或溴化氰与固相。这样的缀合化学反应是本领域公知的,如Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (Amsterdam, the Netherlands, Ed. 2008) 和Wong, S., *Chemistry of Protein Conjugation and CrossLinking*, CRC出版社(Boca Raton, Fla., 1991)中示例的。

[0200] 洗涤缓冲液确保在洗涤步骤期间保持抗体和亲和配体之间的高亲和力。例如,pH为约7.2的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)可以用作洗涤缓冲液,但是本领域技术人员理解pH可

以在一定程度上变化。洗涤和反应缓冲液确保维持抗体和亲和配体之间的高亲和力,同时保持各酶的活性。洗涤和反应缓冲液在约25℃至约40℃的温度以及其间的任何温度下使用。通常使用约37℃的温度。对于抗体与轻链亲和配体的高亲和力,最佳pH范围是约6.0至约8.0。在该pH范围内,缓冲液与可用于本文报道的方法中的亲和配体的最佳pH范围重叠。这些包括但不限于TRIS缓冲液、BIS-TRIS缓冲液、MES缓冲液、BES缓冲液、MOPS缓冲液和HEPES缓冲液。

[0201] 亲和柱的洗涤条件使非特异性结合最小化,从而影响酶反应,从而影响抗体修饰。洗涤条件使得其不会破坏抗体轻链亲和配体和靶单克隆抗体之间的结合。

[0202] 可以根据修饰从下组选择适用于本文报道的方法的酶:甘露糖基-葡萄糖胺转移酶(MGAT1、MGAT2和MGAT3)、半乳糖基转移酶(β 4GalT1、 β 4GalT2、 β 4GalT3、 β 4GalT4、 β 4GalT5、 β 4GalT6、 β 4GalT7)、唾液酸转移酶(ST6Gal1、ST6Gal2);甘露糖苷酶(α 甘露糖苷酶-I、 α 甘露糖苷酶-II、 α (1-2)甘露糖苷酶、 α (1-6)甘露糖苷酶、 α (1-2,3)甘露糖苷酶、 α (1-2,3,6)甘露糖苷酶);己糖胺酶(β -N-乙酰氨基己糖苷酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶);半乳糖苷酶(β -半乳糖苷酶、 β (1-4)半乳糖苷酶、 α (1-3,6)半乳糖苷酶);唾液酸酶(α (2-3,6,8)唾液酸酶、 α (2-3)唾液酸酶)、岩藻糖苷酶(α -L-岩藻糖苷酶、 α (1-6)岩藻糖苷酶、 α (1-2)岩藻糖苷酶、 α (1-3,4)岩藻糖苷酶、 α (1-2,3,4)岩藻糖苷酶)及其任何组合。

[0203] 本文报道的方法可用于从半乳糖中除去或加入末端唾液酸,以产生例如在Fc区具有均质G2糖结构的抗体。因此,例如,可以使用从任何连接中除去唾液酸的非特异性神经氨酸酶或添加相应唾液酸的特定唾液酸酶。该酶可与半乳糖基转移酶组合使用,以同时影响半乳糖基化和去除或添加唾液酸。由此,可以从(例如在Fc区中)具有至少包含糖型G0、G1、G2、G1S1和G2S2的糖基化的抗体中获得具有确定的G2糖型(例如在Fc区中)的抗体。

[0204] 可以使用与各个酶的连续孵育或半连续孵育进行根据本文报道的方法的抗体糖基化的修饰,其中添加第一酶并且在一段时间后添加第二酶,而不除去第一酶,或与同时存在的两种酶一起孵育。与完全在溶液反应中修饰或用固定在蛋白A上的抗体修饰相比,这些方案中的任何都导致改善的修饰。

[0205] 在下文中通过使用相应的转移酶提供在Fc区中具有确定的半乳糖基化和唾液酸化的抗体来举例说明本文报道的方法。

[0206] 柱上的半乳糖基化

[0207] 将纯化的IgG1亚类人源化抗体施加于蛋白A亲和色谱材料和抗体轻链亲和配体色谱材料(来自GE Healthcare的Kappa select)。将结合的抗体在柱上与包含半乳糖基转移酶(GalT1)和UDP-GAL的缓冲溶液孵育。结果如下表所示。可以看出,当抗体与包含抗体轻链亲和配体的柱结合时,实现了更高量的半乳糖基化。

[0208]	时 间 [h]	在抗体 Fc 区亲和配体色谱材料(蛋白 A)上进行的 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰			在抗体轻链亲和配体色谱材料(Kappa select)上进行的 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰		
		G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]
	0	50	35	15	50	35	15
	2	33	50	17	19	58	23
	7	25	50	25	5	49	46
	24	17	42	41	0	22	78

[0209] G0F=具有两个末端N-乙酰基葡萄糖胺残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0210] G1F=具有一个末端N-乙酰基葡萄糖胺残基和一个末端半乳糖残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0211] G2F=具有两个末端半乳糖残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0212] 将纯化的在Fc区中具有均质糖基化的IgG1亚类的人源化抗体(均质G2F糖型)施加到蛋白A亲和色谱材料和抗体轻链亲和配体色谱材料(来自GE Healthcare的Kappa select)上。将结合的抗体在柱上与包含唾液酸转移酶(ST6)和CMP-NANA的缓冲溶液孵育。结果如下表所示。可以看出,当抗体与包含抗体轻链亲和配体的柱结合时,实现更高量的唾液酸化。

[0213]	37°C 时 间 [h]	在抗体 Fc 区亲和配体色谱材料(蛋白 A)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰			在抗体轻链亲和配体色谱材料(Kappa select)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰		
		G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
	0	100	0	0	100	0	0
	2	17	66	17	0	74	26
	7	11	59	30	0	44	56
	24	10	58	32	0	45	55
	48	12	58	30			

[0214]	RT 时 间 [h]	在抗体 Fc 区亲和配体色谱材料(蛋白 A)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰			在抗体轻链亲和配体色谱材料(Kappa select)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰		
		G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
	0	100	0	0	100	0	0
	24	-	-	-	0	38	62
	48	15	54	31	-	-	-

[0215] 碱性磷酸酶的存在与否不会改变蛋白A柱的产量 (19 % G2F、56 % G2S1F、25 % G2S2F)。在溶液中,可以获得以下结果:

[0216]	溶液中		
	37°C 时间 [h]	G2F [%]	G2S1F [%] G2S2F [%]
	0	100	0 0
	48	0	40-30 60-70

[0217] G2F=具有两个末端半乳糖残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0218] G2S1F=具有两个末端半乳糖残基 (其中一个唾液酸化的) 和岩藻糖的复合N-聚糖

[0219] G2S2F=具有两个末端半乳糖残基 (二者都是唾液酸化的) 和岩藻糖的复合N-聚糖

[0220] 将IgG4亚类的人抗体施加到蛋白A亲和色谱材料和抗体轻链亲和配体色谱材料 (来自GE Healthcare的Kappa select) 上。将结合的抗体在柱上与包含半乳糖基转移酶 (GalT1) 和UDP-GAL的缓冲溶液孵育。结果如下表所示。可以看出,当抗体与包含抗体轻链亲和配体的柱结合时,实现了更高量的半乳糖基化。

在抗体 Fc 区亲和配体色谱材料(蛋白 A)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰				在抗体轻链亲和配体色谱材料 (Kappa select)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰			
[0221]	时 间	G0F			G0F	G1F	G2F
	[h]	[%]	G1F [%]	G2F [%]	[%]	[%]	[%]
	0	91	9	0	91	9	0
	2	49	36	15	13	49	38
	7	26	33	41	0	14	86
	24	13	22	65	0	0	100

[0222] G0F=具有两个末端N-乙酰基葡萄糖胺残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0223] G1F=具有一个末端N-乙酰基葡萄糖胺残基和一个末端半乳糖残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0224] G2F=具有两个末端半乳糖残基和岩藻糖的复合N-聚糖

[0225] 将在Fc区中具有均质糖基化 (均质G2F糖型) 的IgG4亚类的人抗体施加到蛋白A亲和色谱材料和抗体轻链亲和配体色谱材料 (来自GE Healthcare的Kappa select) 上。将结合的抗体在柱上与包含唾液酸转移酶 (ST6) 和CMP-NANA的缓冲溶液孵育。结果如下表所示。可以看出,当抗体与包含抗体轻链亲和配体的柱结合时,实现更高量的唾液酸化。

[0226]	时 间 [h]	在抗体 Fc 区亲和配体色谱材料(蛋白 A)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰			在抗体轻链亲和配体色谱材料 (Kappa select)上进行 Fc 区 N-糖基化的酶促修饰		
		G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]	G2F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
	0	100	0	0	100	0	0
	7	n.d.	n.d.	n.d.	0	6	94
	24	0	22	78	0	0	100

[0227] n.d. = 未测定

[0228] 将在 Fab 中具有额外糖基化位点的 IgG1 亚类的人源化抗体施加到蛋白 A 亲和色谱材料和抗体轻链亲和配体色谱材料 (来自 GE Healthcare 的 Kappa select) 上。将结合的抗体在柱上与包含唾液酸转移酶 (ST6) 和 CMP-NANA 的缓冲溶液孵育。结果如下表所示。在该实施例中,修饰了 Fab 中 N-糖基化位点的糖基化。可以看出,当抗体与包含抗体轻链亲和配体的柱结合时,实现了改善的反应动力学。

[0229]	时 间 [h]	在抗体 Fc 区亲和配体色谱材料(蛋白 A)上进行 Fab N-糖基化的酶促修饰			在抗体轻链亲和配体色谱材料 (Kappa select)上进行 Fab 区 N-糖基化的酶促修饰		
		G2 [%]	G2S1 [%]	G2S2 [%]	G2 [%]	G2S1 [%]	G2S2 [%]
	0	0	52	48	0	51	49
	2	0	20	80	0	8	92
	7	0	5	95	0	6	94
[0230]	24	0	5	95	0	8	92

[0231] G2 = 具有两个末端半乳糖残基的复合 N-聚糖

[0232] G2S1 = 具有两个末端半乳糖残基的复合 N-聚糖, 其中一个是唾液酸化的

[0233] G2S2 = 具有两个末端半乳糖残基的复合 N-聚糖, 二者均是唾液酸化的

[0234] 将包含 IgG1 亚类的人源化抗体的无细胞培养上清液施加到蛋白 A 亲和色谱材料和抗体轻链亲和配体色谱材料 (来自 GE Healthcare 的 Kappa select) 上。将结合的抗体在柱上依次首先与包含半乳糖基转移酶 (GalT1) 和 UDP-GAL 的缓冲溶液孵育, 然后与包含唾液酸转移酶 (ST6) 和 CMP-NANA 的缓冲溶液孵育。结果如下表所示。孵育 6 小时后加入唾液酸转移酶。

[0235] 蛋白 A

	时 间 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
[0236]	0	50	38	12	0	0	0
	6	26	47	27	0	0	0
	8	25	36	9	9	14	6
	24	26	31	7	15	13	9
	48	26	32	7	14	13	9

[0237] Kappa select

	时 间 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
[0238]	0	50	38	12	0	0	0
	6	3	42	55	0	0	0
	8	3	32	8	10	39	8
	24	0	24	6	19	30	21
	48	0	24	6	19	30	21

[0239] 用纯化的成批材料(bulk material)重复相同的实验。

[0240] 蛋白A

	时 间 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
[0241]	0	52	40	8	0	0	0
	6	26	48	26	0	0	0
	8	25	38	8	10	14	5
[0242]	24	27	34	7	8	14	10
	48	25	33	6	14	13	9

[0243] Kappa select

	时 间 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
[0244]	0	52	40	8	0	0	0
	6	4	46	50	0	0	0
	8	4	36	6	10	36	8
	24	0	28	4	20	29	19
	48	0	28	3	21	29	19

[0245] 24小时后加入唾液酸转移酶改善的Kappa select方法

	时 间 [h]	G0F [%]	G1F [%]	G2F [%]	G1S1F [%]	G2S1F [%]	G2S2F [%]
[0246]	0	52	40	8	0	0	0
	24	0	22	78	0	0	0
	30	0	12	0	6	53	29

[0247] 本文报道的方法中使用的抗体

[0248] 嵌合和人源化抗体

[0249] 在某些实施方案中,在本文报道的方法中修饰的抗体是嵌合抗体。

[0250] 某些嵌合抗体描述于例如US 4,816,567;和Morrison,S.L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81(1984)6851-6855)。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物如猴的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体是“类型转换的”抗体,其中类型或亚类已经从亲本抗体的类型或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段,只要它们与本文报道的方法中使用的抗体轻链亲和配体结合即可。

[0251] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,非人抗体被人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)衍生自非人抗体,并且FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体任选还包含至少一部分人恒定区。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生HVR残基的抗体)的相应残基取代,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0252] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro,J.C.和Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633,并进一步描述于例如Riechmann,I.等人,Nature332(1988)323-329;Queen,C.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86(1989)10029-10033;US 5,821,337,US 7,527,791,US 6,982,321,和US 7,087,409;Kashmiri,S.V.等人,Methods 36(2005)25-34(描述了特异性决定区(SDR)接枝);Padlan,E.A.,Mol.Immunol.28(1991)489-498(描述了“再表面化”);Dall’Acqua,W.F.等人,Methods 36(2005)43-60(描述了“FR改组”);和Osborn,J.等人,Methods 36(2005)61-68和Klimka,A.等人,Br.J.Cancer 83(2000)252-260(描述了FR改组的“引导选择”方法)。

[0253] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见,例如,Sims,M.J.等人,J.Immunol.151(1993)2296-2308);衍生自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter,P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89(1992)4285-4289;和Presta,L.G.等人,J.Immunol.151(1993)2623-2632);人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro,J.C.和Fransson,J.,Front.Biosci.13(2008)1619-1633);和衍生自筛选FR文库的框架区(参见,例如,Baca,M.等人,J.Biol.Chem.272(1997)10678-10684and Rosok,M.J.et al.,J.Biol.Chem.271(1996)22611-22618)。

[0254] 人体抗体

[0255] 在某些实施方案中,在本文报道的方法中修饰的抗体是人抗体。

[0256] 可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk, M.A. 和van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374和Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459。

[0257] 可以通过将免疫原施用至转基因动物来制备人抗体, 所述转基因动物已被修饰以响应抗原攻击产生具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。这些动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座, 其取代内源性免疫球蛋白基因座, 或者存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因小鼠中, 内源性免疫球蛋白基因座通常已被失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述, 参见Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125。还参见例如US 6,075,181和US 6,150,584, 描述了XENOMOUSE™技术; US 5,770,429, 描述了HUMAB®技术; US 7,041,870, 描述了K-M MOUSE®技术, US2007/0061900, 描述了VELOCIMOUSE®技术, 和WO 2007/131676, 描述了免疫重构小鼠。例如, 可以通过与不同的人恒定区组合进一步修饰由这些动物产生的完整抗体的人可变区。

[0258] 也可以通过基于杂交瘤的方法制备人抗体。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见, 例如, Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), 第51-63页; 和Boerner, P. 等人, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95)。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于Li, J. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562。另外的方法包括以下中描述的那些, 例如US 7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268 (描述了人-人杂交瘤)。人杂交瘤技术(Trioma技术) 也描述于Vollmers, H.P. 和Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937, 以及Vollmers, H.P. and Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191。

[0259] 还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后可以将这样的可变结构域序列与所需人恒定结构域组合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0260] 文库来源的抗体

[0261] 可以通过筛选组合文库中具有一种或多种所需活性的抗体来分离本文报道的方法中修饰的抗体。例如, 本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并筛选这些文库中具有所需结合特征的抗体。这些方法在例如Hoogenboom, H.R. 等人, *Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37中进行了综述, 并进一步描述于例如McCafferty, J. 等人, *Nature* 348 (1990) 552-554; Clackson, T. 等人, *Nature* 352 (1991) 624-628; Marks, J.D. 等人, *J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. 和Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S. 等人, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310; Lee, C.V. 等人, *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472; 和Lee, C.V. 等人, *J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132。

[0262] 在某些噬菌体展示方法中, 通过聚合酶链反应(PCR) 分别克隆VH和VL基因的库, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后筛选该文库中的抗原结合噬菌体, 如Winter, G. 等人, *Ann. Rev. Immunol.* 12 (1994) 433-455所述。噬菌体通常展示作为单链Fv(scFv) 片段或作为

Fab片段的抗体片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如,从人)克隆天然库以提供针对多种非自身和自身抗原的单一抗体来源,而无需任何免疫,如Griffiths, A.D.等人,EMBO J. 12(1993) 725-734所述。最后,也可以通过克隆来自干细胞的非重排V基因区段、使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外完成重排来合成制备天然文库,如Hoogenboom, H.R.和Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388所述。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:US 5,750,373和US2005/0079574、US2005/0119455、US2005/0266000、US2007/0117126、US2007/0160598、US2007/0237764、US2007/0292936和US2009/0002360。

[0263] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0264] 多特异性抗体

[0265] 在某些实施方案中,在本文报道的方法中修饰的抗体是多特异性抗体,例如,双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。双特异性抗体可以制备成全长抗体或抗体片段。包括多特异性(双特异性)抗体的片段,只要它们与本文报道的方法中使用的抗体轻链亲和配体结合即可。

[0266] 制备多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein, C.和Cuello, A.C., Nature 305(1983) 537-540, WO 93/08829, 和Traunecker, A.等人, EMBO J. 10(1991) 3655-3659)、和“旋钮入洞”工程化(参见例如US 5,731,168)。还可以通过工程化用于制备抗体Fc-异二聚体分子的静电转向效应来制备多特异性抗体(WO2009/089004);交联两种或更多种抗体或片段(参见例如,US 4,676,980和Brennan, M.等人, Science 229(1985) 81-83);使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如, Kostelny, S.A.等人, J. Immunol. 148(1992) 1547-1553;使用“双抗体”技术制备双特异性抗体片段(参见,例如, Holliger, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993) 6444-6448);和使用单链Fv (sFv) 二聚体(参见例如Gruber, M等人, J. Immunol. 152(1994) 5368-5374);和制备三特异性抗体,如,例如Tutt, A.等人, J. Immunol. 147(1991) 60-69中所述)。

[0267] 本文还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US2006/0025576)。

[0268] 在本文报道的方法中修饰的抗体或片段还包括“双重作用Fab”或“DAF”(例如,参见US2008/0069820)。

[0269] 本文的抗体或片段还包括WO2009/080251、WO2009/080252、WO2009/080253、WO2009/080254、WO2010/112193、WO2010/115589、WO2010/136172、WO2010/145792和WO2010/145793中描述的多特异性抗体。

[0270] 重组方法和组合物

[0271] 可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如,如US 4,816,567中所述。对于这些方法,提供了编码抗体的一种或多种分离的核酸。

[0272] 在天然抗体或天然抗体片段的情况下,需要两种核酸,一种用于轻链或其片段,一种用于重链或其片段。此类核酸编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含抗体VH的氨基酸序列(例如抗体的轻链和/或重链)。这些核酸可以在相同的表达载体上或不同的表达载体上。

[0273] 在具有异二聚体重链的双特异性抗体的情况下,需要四种核酸,一种用于第一轻

链、一种用于包含第一异单体Fc区多肽的第二轻链、一种用于第二轻链、一种用于包含第二异单体Fc区多肽的第二重链。例如,异二聚体重链之一包含所谓的“旋钮突变”(T366W和任选地S354C或Y349C之一),另一个包含所谓的“洞突变”(T366S、L368A和Y407V以及任选地Y349C或S354C)(参见,例如,Carter,P.等人,Immunotechnol.2(1996)73)。此类核酸编码包含第一VL的氨基酸序列和/或包含第一VH的氨基酸序列(包括第一异单体Fc区)和/或包含第二VL的氨基酸序列和/或包含第二VH的氨基酸序列(包括抗体的第二异单体Fc区)(例如,抗体的第一和/或第二轻链和/或第一和/或第二重链)。这些核酸可以在相同的表达载体上或在不同的表达载体上,通常这些核酸位于两个或三个表达载体上,即一个载体可以包含多于一个这些核酸。这些双特异性抗体的实例是CrossMab和T细胞双特异性抗体(参见例如Schaefer,W.等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,108(2011)11187-11191)。

[0274] 在一个实施方案中,提供了编码本文报道的方法中使用的抗体的分离的核酸。

[0275] 在进一步的实施方案中,提供了包含此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。

[0276] 在进一步的实施方案中,提供了包含此类核酸的宿主细胞。

[0277] 在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含(例如,已转化有):

[0278] -在天然抗体或天然抗体片段的情况下:

[0279] (1) 载体,其包含编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列的核酸,或

[0280] (2) 第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸。

[0281] -在具有异二聚体重链的双特异性抗体的情况下:

[0282] (1) 第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码氨基酸序列的第一对核酸,其中氨基酸序列中的一个包含抗体的第一VL,另一个包含抗体的第一VH,所述第二载体包含编码氨基酸序列的第二对核酸,其中氨基酸序列中的一个包含抗体的第二VL,另一个包含抗体的第二VH,或

[0283] (2) 第一载体、第二载体和第三载体,所述第一载体包含编码氨基酸序列的第一核酸,所述氨基酸序列包含可变结构域之一(优选轻链可变结构域),所述第二载体包含编码氨基酸序列的一对核酸,所述氨基酸序列中的一个包含轻链可变结构域,另一个包含第一重链可变结构域,所述第三载体包含编码氨基酸序列的一对核酸,所述氨基酸序列中的一个包含相对于第二载体中的轻链可变结构域的另一个轻链可变结构域,所述氨基酸序列中的另一个包含第二重链可变结构域,或

[0284] (3) 第一载体、第二载体、第三载体和第四载体,所述第一载体包含编码包含抗体的第一VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含抗体的第一VH的氨基酸序列的核酸,所述第三载体包含编码包含抗体的第二VL的氨基酸序列的核酸,所述第四载体包含编码包含抗体的第二VH的氨基酸序列的核酸。

[0285] 在一个实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了制备抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养包含如上所述编码所述抗体的核酸的宿主细胞,任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收抗体,并用本文报道的方法修饰抗体的糖基化。

[0286] 为了重组产生抗体,分离编码例如如上所述的抗体的核酸,并将其插入一种或多种载体中,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。这些核酸可以使用常规方法容易地分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)或通过重组方法产生或通过化学合成获得。

[0287] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如US5,648,237、US 5,789,199和US5,840,523(还参见Charlton,K.A.,In:Methods in Molecular Biology,第248卷,Lo,B.K.C.(ed.),Humana出版社,Totowa,NJ(2003),第245-254页,其描述了在大肠杆菌中表达抗体片段。表达后,可以从细菌细胞糊的可溶性级分中分离抗体,并且可以进一步纯化。

[0288] 除了原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母是用于编码抗体的载体的合适的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被“人源化”的真菌和酵母菌株,使得产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,T.U.,Nat.Biotech.22(2004)1409-1414;和Li,H.等人,Nat.Biotech.24(2006)210-215。

[0289] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也衍生自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株,其可以与昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0290] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见,例如,US5,959,177、US6,040,498、US6,420,548、US 7,125,978和US6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0291] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾细胞系(293或293细胞,如,例如Graham,F.L.等人,J.Gen Virol.36(1977)59-74中所述);小仓鼠肾细胞(BHK);小鼠睾丸支持细胞(TM4细胞,如,例如Mather,J.P.,Biol.Reprod.23(1980)243-252中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如,例如Mather,J.P.等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383(1982)44-68中所述;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub,G.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(1980)4216-4220);和骨髓瘤细胞系如Y0、NS0和Sp2/0。对于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系,参见,例如,Yazaki,P.和Wu,A.M.,Methods in Molecular Biology,Vol.248,Lo,B.K.C.(编辑),Humana出版社,Totowa,NJ(2004),第255-268页。

[0292] 药物制剂

[0293] 通过将具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合以冻干制剂或水溶液的形式来制备如本文所报道的方法修饰的抗体的药物制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980))。药学上可接受的载体通常在所用剂量和浓度下对接受者无毒,其包括但不限于:缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;

苯扎氯铵;苄索氯铵;酚醇、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚(乙烯吡咯烷酮);氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;金属配合物(例如锌-蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间隙药物分散剂,如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(**HYLENEX®**,Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于US2005/0260186和US2006/0104968中。在一些方面,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0294] 示例性的冻干抗体制剂描述于US6,267,958中。水性抗体制剂包括US6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后者的制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0295] 本文的制剂还可含有多于一种所治疗的具体适应症所必需的活性成分,优选那些具有互补活性但不相互产生不利影响的活性成分。这样的活性成分适当地以对于预期目标有效的量组合存在。

[0296] 可以将活性成分包埋在微胶囊中,所述微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备,例如分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. (编辑) (1980)。

[0297] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如,薄膜或微胶囊。

[0298] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,通过无菌过滤膜过滤可以容易地实现无菌。

[0299] 治疗方法和组合物

[0300] 如本文报道的任何方法修饰的任何抗体均可用于治疗。

[0301] 在一个方面,提供了如本文报道的任何方法修饰的抗体用作药物。在其他方面,提供了如本文报道的任何方法修饰的抗体用于治疗疾病。在某些实施方案中,提供了如本文报道的任何方法修饰的抗体用于治疗疾病。在某些实施方案中,本发明提供如本文报道的任何方法修饰的抗体,其用于治疗患有疾病的个体的方法中,所述方法包括向所述个体施用有效量的如本文报道的任何方法修饰的抗体。在一个这样的实施方案中,该方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在某些实施方案中,本发明提供如本文报道的任何方法修饰的抗体用于治疗个体的方法中,该方法包括向所述个体施用有效的如本文报道的任何方法修饰的抗体。根据任何上述实施方案的“个体”优选是人。

[0302] 在另一方面,本发明提供了如本文报道的任何方法修饰的抗体在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗疾病。在进一步的实施方案中,所述药物用于治疗疾病的方法中,所述方法包括向患有所述疾病的个体施用有效量的药物。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。在另一个实施方案中,所述药物用于在个体中治疗的方法中,所述方法包括向个体施用有效量的

药物。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0303] 在另一方面,本发明提供了治疗疾病的方法。在一个实施方案中,该方法包括向患有这种疾病的个体施用有效量的如本文报道的任何方法修饰的抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂。根据任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0304] 在另一方面,本发明提供药物制剂,其包含如本文报道的任何方法修饰的任何抗体,例如用于任何上述治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含如本文报道的任何方法修饰的任何抗体和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含如本文报道的任何方法修饰的任何抗体和至少一种另外的治疗剂。

[0305] 本发明的抗体可以单独使用或与疗法中的其他药剂组合使用。例如,本发明的抗体可与至少一种另外的治疗剂共同施用。

[0306] 上述这样的组合疗法包括组合施用(其中两种或更多种治疗剂包括在相同或分开的制剂中)和分开施用,在分开施用的情况下,如本文报道的任何方法修饰的抗体可以在另外的一种或多种治疗剂施用之前、同时和/或之后施用。在一个实施方案中,如本文报道的任何方法修饰的抗体的施用与另外的治疗剂的施用彼此发生在约一个月内,或约一周、两周或三周内,或约一、二、三、四、五或六天内。如本文报道的任何方法修饰的抗体也可以与放射疗法组合使用。

[0307] 如本文报道的任何方法修饰的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内,并且如果需要可用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。可以通过任何合适的途径给药,例如,通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短期的还是长期的。本文考虑了各种给药方案,包括但不限于在不同时间点上的单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0308] 如本文报道的任何方法修饰的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用方案、以及医生所知的其他因素。不是必须地、但任选地,抗体与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论疾患的药剂配制。这些其他药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、疾患或治疗的类型、以及上面讨论的其他因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用,或者以本文所述剂量的约1%至99%、或以经验/临床确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[0309] 为了预防或治疗疾病,如本文报道的任何方法修饰的抗体的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、抗体的类型、疾病的严重性和病程、抗体是用于预防还是治疗目的施用、先前的治疗、患者的临床病史和对抗体的反应、以及主治医师的自由裁量。抗体适合一次或在一系列治疗中施用给患者。根据疾病的类型和严重性,施用给患者的初始候选剂量可以为约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.5mg/kg-10mg/kg)抗体,例如,或者通过一次或多次分开的施用、或通过连续输注。根据上述因素,一种典型的日剂量可以为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于数天或更长时间的重复施用,根据病症,通常持续治疗直至发生期望的疾病症状抑制。抗体的一个示例性剂量范围为约0.05mg/kg至约10mg/kg。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任何组合)中的一种或多种剂量。这些剂量可以间歇施用,例如,每周或每

三周(例如,使患者接受约2至约20,或例如约6个剂量的抗体)。可施用初始较高负荷的剂量,然后施用一种或多种较低剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术和测定法可以容易地监测该疗法的进展。

[0310] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容均通过引用整体并入本文。

[0311] 提供以下实施例以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求中阐述。应理解,可以在不脱离本发明精神的情况下对所述步骤进行修改。

实施例

[0312] 材料

[0313] GalT反应溶液 (5mM MnCl₂、10mM UDP-Gal、100mM MES、0.05mg/ml GalT, pH 6.5)

[0314] 153mg UDP-Gal (MW=610.27g/mol)

[0315] 32mg MnCl₂ (MW=125.84g/mol)

[0316] 460μL GalT (c=5.43mg/mL; 10μg/2mg抗体 → 在300μL中10μg=0.033mg/ml)

[0317] 在100mM MES缓冲液pH6.5中

[0318] ST6反应溶液 (0.1mM ZnCl₂, 200nM AP, 50mM MES, 1.7mg/ml CMP-NANA, 0.7mg/ml ST6, pH 6.5)

[0319] 50μL ZnCl (100mM溶液:13.6mg, 在1mL 50mM MES中)

[0320] 28μL碱性磷酸酶 (AP) (c=20mg/mL, MW=56,000g/mol)

[0321] 167mg CMP-NANA (1000μg/2mg抗体 → 1000μg pro 300μL=3.34mg/mL)

[0322] 6mL ST6 (c=5.45mg/mL, 靶标:在300μL中200μg (2mg AK)=0.67mg/mL)

[0323] 在50mM MES缓冲液pH6.5中

[0324] 缓冲液:

[0325] 再生缓冲液1 (0.1M磷酸)

[0326] 再生缓冲液2 (3M盐酸胍)

[0327] 平衡缓冲液 (25mM Tris, 25mM NaCl, 5mM EDTA, pH7.1)

[0328] 洗涤缓冲液1 (100mM MES, pH6.5): 在1000mL H₂O中21.3mg MES, pH 6.5 (用50% (w/v) NaOH调节)

[0329] 洗涤缓冲液2 (1M Tris, pH 7.2)

[0330] 洗涤缓冲液3 (50mM MES, pH6.5): 1:1的洗涤缓冲液100mM MES与蒸馏水

[0331] 洗脱缓冲液Kappa select (0.1M甘氨酸, pH 2.7): 在100mL H₂O中750mg甘氨酸, pH 2.7 (用25% (w/v) HCl调节)

[0332] 洗脱缓冲蛋白A (25mM柠檬酸钠, pH 2.8)

[0333] 实施例1

[0334] 成批材料在柱上半乳糖基化

[0335] • 通过施加2个柱体积的再生缓冲液1、10个柱体积的平衡缓冲液和4个柱体积的洗涤缓冲液1, 再生、平衡和洗涤蛋白A或Kappa select柱

[0336] • 向柱上施加2mg IgG (成批材料)

[0337] • 用10个柱体积的洗涤缓冲液1洗涤

[0338] • 施加2mL半乳糖基化反应溶液 (含0.033mg/ml GalT), 使0.8mL流过

- [0339] • 分别在25℃孵育(2、7或24小时)
- [0340] • 用8个柱体积的洗涤缓冲液1洗涤
- [0341] • 用相应的洗脱缓冲液(对于蛋白A,2个柱体积;对于Kappa select,8个柱体积)洗脱,并使用1M Tris缓冲液(pH 9.0)调节pH
- [0342] 实施例2
- [0343] IgG1成批材料在柱上唾液酸化(蛋白A)
- [0344] • 通过施加2个柱体积再生缓冲液1、10个柱体积平衡缓冲液和10个柱体积洗涤缓冲液3再生、平衡和洗涤蛋白A柱
- [0345] • 向柱上施加2mg IgG(成批材料)
- [0346] • 施加2mL唾液酸化反应溶液(3.3mg/ml CMP-NANA,+/-AP),使0.8mL流过
- [0347] • 分别在37℃(2、7、24或48小时)和25℃(48小时)下孵育
- [0348] • 用4个柱体积的洗涤缓冲液3洗涤
- [0349] • 用2个柱体积的洗脱缓冲液蛋白A(柠檬酸钠)洗脱,并使用1M Tris缓冲液(pH 9.0)调节pH
- [0350] IgG1成批材料在柱上唾液酸化(Kappa select)
- [0351] • 通过施加2个柱体积平衡缓冲液、3个柱体积再生缓冲液2、4个柱体积平衡缓冲液和2个柱体积洗涤缓冲液3再生、平衡和洗涤kappa Select柱
- [0352] • 向柱上施加2mg IgG(成批材料)
- [0353] • 用3个柱体积的洗涤缓冲液3洗涤
- [0354] • 施加2mL唾液酸化反应溶液(3.3mg/ml CMP-NANA,+/-AP),使0.8mL流过
- [0355] • 分别在37℃(2、7和24小时)和25℃(24小时)下孵育
- [0356] • 用3个柱体积的洗涤缓冲液3洗涤
- [0357] • 用8个柱体积的洗脱缓冲液洗脱Kappa select,并使用1M Tris缓冲液(pH9.0)调节pH
- [0358] 实施例3
- [0359] 细胞培养上清液连续的半乳糖基化和唾液酸化
- [0360] • 通过施加2个柱体积的再生缓冲液1和10个柱体积的平衡缓冲液,再生和平衡蛋白A或Kappa Select柱。
- [0361] • 向柱上施加1mg IgG(上清液中)
- [0362] • 用10个柱体积的平衡缓冲液、然后用2个柱体积洗涤缓冲液2和6个柱体积洗涤缓冲液1洗涤
- [0363] • 施加2mL半乳糖基化反应溶液,使0.8mL流过
- [0364] • 在25℃下孵育约6至24小时(以允许足够的半乳糖基化)
- [0365] • 用8个柱体积的洗涤缓冲液1、10个柱体积的平衡缓冲液、2个柱体积的洗涤缓冲液2和6个柱体积的洗涤缓冲液3洗涤
- [0366] • 施加2mL唾液酸化反应溶液,使0.8mL流过
- [0367] • 孵育(例如25℃分别持续2、7或24小时或甚至更长时间)
- [0368] • 用8个柱体积的洗涤缓冲液1洗涤
- [0369] • 用相应的洗脱缓冲液(对于蛋白A,2个柱体积;对于Kappa select,8个柱体积)

洗脱,并使用1M Tris缓冲液 (pH 9.0) 调节pH

[0370] 实施例4

[0371] 成批材料连续的半乳糖基化和唾液酸化

[0372] • 通过施加2个柱体积的再生缓冲液1、10个柱体积的平衡缓冲液和4个柱体积的洗涤缓冲液1,再生、平衡和洗涤蛋白A或Kappa Select柱

[0373] • 向柱上施加1mg IgG (成批材料)

[0374] • 用10个柱体积的洗涤缓冲液1洗涤

[0375] • 施加2mL半乳糖基化反应溶液,使0.8mL流过

[0376] • 在25℃下孵育约6至24小时 (以允许足够的半乳糖基化)

[0377] • 用8个柱体积的洗涤缓冲液1、10个柱体积的平衡缓冲液、2个柱体积的洗涤缓冲液2和6个柱体积的洗涤缓冲液3洗涤

[0378] • 施加2mL唾液酸化反应溶液,使0.8mL流过

[0379] • 孵育 (例如在25℃分别持续2、7或24小时或甚至更长时间)

[0380] • 用8个柱体积的洗涤缓冲液1洗涤

[0381] • 用相应的洗脱缓冲液 (对于蛋白A,2个柱体积;对于Kappa select,8个柱体积) 洗脱,并使用1M Tris缓冲液 (pH 9.0) 调节pH。