



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101432301 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 08

(21) 申请号 200780015563. 6

(22) 申请日 2007. 04. 03

(30) 优先权数据

60/789, 384 2006. 04. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 10. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/008396 2007. 04. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/117505 EN 2007. 10. 18

(73) 专利权人 洛克菲勒大学

地址 美国纽约州

(72) 发明人 杰夫瑞·V·华弗治 善藤金子

尼莫雅恩·福克

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

代理人 王芝艳 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2005063808 A1, 2005. 07. 14, 权利要求

权利要求书2页 说明书14页 附图10页

(54) 发明名称

具有增强的抗炎性和降低的细胞毒性特性的多肽以及相关方法

(57) 摘要

本发明提供含有至少一个 IgG Fc 区的区域的多肽以及该多肽的制备方法, 该多肽与未纯化的抗体相比, 含有较高的抗炎症活性和较低的细胞毒性活性。

1、说明书第 15 页第 20-21 行, 第 23 页第 10 行至第 24 页第 3 行, 实施例 1-12.

W0 2005063808 A1, 2005. 07. 14, 权利要求

1、说明书第 15 页第 20-21 行, 第 23 页第 10 行至第 24 页第 3 行, 实施例 1-12.

CN 1166772 C, 2004. 09. 15, 全文.

US 20020164328 A1, 2002. 11. 07, 全文.

Weikert S et al. Engineering chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoprotein. 《Nature biotechnology》. 1999, 第 17 卷 (第 11 期), 全文.

审查员 黎舒婷

1. 一种药物制剂, 包括纯化或修饰的 IVIG 和合适的载体或稀释剂, 经过所述的纯化或修饰, 所述的纯化或修饰的 IVIG 比未纯化或未修饰的 IVIG 具有更高百分比的唾液酸含量、更高的抗炎症活性和更低的细胞毒性活性, 其中所述唾液酸是连接在位于 IVIG 的 Fc 区中 Asn²⁹⁷ 上的 N 连接糖上的 α -(2, 6) 连接的唾液酸。

2. 如权利要求 1 所述的药物制剂, 其特征在于, 所述修饰的 IVIG 是用 α -(2, 6) 唾液酸转移酶处理未纯化或未修饰的 IVIG 获得。

3. 如权利要求 1 所述的药物制剂, 其特征在于, 所述纯化的 IVIG 是在凝集素柱上纯化未纯化或未修饰的 IVIG 获得。

4. 如权利要求 3 所述的药物制剂, 其特征在于, 所述凝集素柱包括分离自西洋接骨木的凝集素。

5. 一种制备如权利要求 1-4 所述任一药物制剂的方法, 该方法包括:

提供一种未纯化或未修饰 IVIG 的来源, 所述未纯化或未修饰 IVIG 的来源包含多个含有至少一个带有连接在 Fc 区 Asn²⁹⁷ 上的 N 连接糖上的 α -(2, 6) 连接的唾液酸的 IgG Fc 区的多肽, 以及多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgGFc 区的多肽;

提高多个含有至少一个带有连接在 Fc 区 Asn²⁹⁷ 上的 N 连接糖上的 α -(2, 6) 连接的唾液酸的 IgG Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgGFc 区的多肽的比率, 得到纯化或修饰的 IVIG,

将合适的载体或稀释剂与获得的纯化或修饰的 IVIG 混合。

6. 一种用于增强含 Fc 区多肽的抗炎症活性的方法, 包括:

提供含 Fc 区的多肽的未纯化或未修饰来源, 所述含 Fc 区的多肽的未纯化或未修饰来源包含多个含有至少一个带有连接在 Fc 区 Asn²⁹⁷ 上的 N 连接糖上的 α -(2, 6) 连接的唾液酸的 IgG Fc 区的多肽, 以及多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgG Fc 区的多肽;

提高多个含有至少一个带有连接在 Fc 区 Asn²⁹⁷ 上的 N 连接糖上的 α -(2, 6) 连接的唾液酸的 IgG Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgGFc 区的多肽的比率, 得到纯化或修饰的具有增强的抗炎活性的含 Fc 区的多肽。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的方法, 其中提高多个含有至少一个带唾液酸的 IgG Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgG Fc 区的多肽的比率的步骤通过去除含有至少一个缺乏唾液酸的 Fc 区的多肽而实现。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其中所述去除通过选自 HPLC、凝集素亲和层析、高 pH 阴离子交换层析, 以及其任一组合的方法实现。

9. 如权利要求 5 或 6 所述的方法, 其中提高多个含有至少一个带唾液酸的 IgG Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgG Fc 区的多肽的比率的步骤通过富集含有至少一个带唾液酸的 IgG Fc 区的多肽而实现。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述富集通过选自 HPLC、凝集素亲和层析、高 pH 阴离子交换层析, 以及其任一组合的方法而实现。

11. 如权利要求 9 所述的方法, 其中所述富集是通过分离自西洋接骨木的凝集素进行凝集素亲和层析实现。

12. 如权利要求 5 或 6 所述的方法, 其中提高多个含有至少一个带唾液酸的 IgG Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 IgG Fc 区的多肽的比率的步骤通过用唾液

酸转移酶处理未修饰或未纯化的多肽而实现。

13. 如权利要求 12 的所述的方法,其中所述的唾液酸转移酶是 α -(2,6) 唾液酸转移酶。

14. 一种药物制剂,包括纯化或修饰的 Fc 片段和合适的载体或稀释剂,经过所述的纯化或修饰,所述的纯化或修饰的 Fc 片段比未纯化或未修饰的含 Fc 区的多肽具有更高百分比的连接在 Fc 区 Asn²⁹⁷ 上的 N 连接糖上的 α -(2,6) 连接的唾液酸、更高的抗炎症活性和更低的细胞毒性活性。

15. 如权利要求 14 所述的药物制剂,其中,所述修饰的 Fc 片段是用 α -(2,6) 唾液酸转移酶处理未纯化或未修饰的多肽。

16. 如权利要求 14 所述的药物制剂,其中,所述纯化的 Fc 片段是在凝集素柱上纯化未纯化或未修饰的多肽获得。

17. 如权利要求 16 所述的药物制剂,其中,所述凝集素柱包括分离自西洋接骨木的凝集素。

18. 如权利要求 14 所述的药物制剂,其中,所述纯化或修饰的 Fc 片段包括人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区。

19. 如权利要求 14 所述的药物制剂,其中,所述未纯化或修饰的含 Fc 的多肽是未纯化过的或未修饰过的 Fc 片段。

具有增强的抗炎性和降低的细胞毒性特性的多肽以及相关方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2006 年 4 月 5 日递交的申请号为 60/789,383 的美国临时专利申请的优先权。

[0003] 联邦资助研究相关的陈述

[0004] 导向本发明的研究部分地由国立卫生研究院基金,编号 AI034662 资助。因此,美国政府可以享有本发明的一定权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及用于设计治疗炎症性疾病的治疗性多肽的新方法。

[0006] 发明背景

[0007] 尽管最早鉴定免疫球蛋白的细胞受体是在将近 40 年以前,但在过去的十年中才发现其在免疫应答中的核心作用。他们在免疫应答的传入期和传出期 (both the afferent and efferent phase) 都是非常关键的:设定 B 细胞激活和抗体生成的阈值,调节树突状细胞的成熟并偶联抗体响应效应器途径的精细的特异性,这些效应器途径诸如巨噬细胞吞噬、抗体依赖性细胞毒性作用以及炎症细胞的募集和激活。他们的核心作用将人类免疫系统和天然效应器细胞联系起来,使得他们成为用于增强或限制体内抗体活性的有吸引力的免疫治疗的靶标。

[0008] 抗体和抗体-抗原复合物与免疫系统中细胞的相互作用影响多种反应,包括抗体依赖性细胞毒性作用 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性作用 (CDC)、巨噬细胞吞噬、炎症介质的释放、抗原的清除,以及抗体的半衰期 (综述见 Daron, Annu Rev Immunol, 15, 203-234 (1997); Ward 和 Ghetie, Therapeutic Immunol, 2, 77-94 (1995); Ravetch 和 Kinet, Annu J Rev Immunol, 9, 457-492 (1991), 分别以参考文献形式并入本文)。

[0009] 抗体的恒定区不直接参与抗体对于抗原的结合,但呈现多种效应器功能。抗体或免疫球蛋白根据其重链恒定区的氨基酸序列可被分为不同的类别。有五个主要的免疫球蛋白种类: IgA、IgD、IgE、IgG, 和 IgM, 其中几种可以进一步分为亚类 (同种型), 例如, IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4; IgA1 和 IgA2。与不同种类的免疫球蛋白对应的重链恒定区分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ , 和 μ 。在各种人类免疫球蛋白种类中, 人 IgG1 和 IgG3 比 IgG2 和 IgG4 更有效地介导 ADCC。

[0010] 抗体经木瓜蛋白酶消化产生被称为 Fab 片段的两个相同的抗原结合片段, 分别含有一个单一的抗原结合位点; 以及一个剩余的“Fc”片段, 其命名反映出其容易结晶的能力。Fc 区与抗体的效应器功能密切相关。已确定人类 IgG Fc 区的晶体结构 (Deisenhofer, Biochemistry, 20, 2361-2370 (1981), 其以参考文献形式并入本文)。在人类 IgG 分子中, Fc 区由木瓜蛋白酶裂解的 N-末端至第 226 位的半胱氨酸 (Cys226) 而产生。

[0011] 长期以来, 一直认为 IgG 通过其 Fc 片段介导的相互作用既能介导促炎症作用, 又能介导抗炎症作用。因此, 虽然 Fc-Fc γ 受体 (Fc-Fc γ R) 相互作用负责免疫复合物与细胞

毒性抗体的促炎症特性,静脉注射丙种球蛋白 (IVIG) 及其 Fc 片段是抗炎症的并被广泛用于抑制炎症性疾病。这种荒谬特性的精细机制尚不清楚,但有人提出 IgG 的糖基化对于调控 IgG 的细胞毒性和炎性的潜能是至关重要的。

[0012] IgG 在其两条重链的 CH2 区分别含有一个连在天冬酰胺 297 (Asn297) 上的单, N- 连接聚糖。共价 - 连接的复合糖由一个核心的, 含有 N- 乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 和甘露糖 (man) 的双分支的五多糖组成。在血清抗体中观察到的核心糖结构的进一步修饰发现有岩藻糖、分支 GlcNAc、半乳糖 (gal) 以及末端的唾液酸 (sa) 等不同的配基。已经检测到这个单一的糖基化位点上共价地连接有超过 40 种不同的糖型。Fujii 等人., J. Biol. Chem. 265, 6009 (1990)。显示 IgG 的糖基化通过维持两条重链的开放式构象而对所有的 Fc γ R 的结合都是必要的。Jefferis and Lund, Immune. Lett. 82, 57 (2002), Sondermann 等人., J. Mol. Biol. 309, 737 (2001)。这种 Fc γ R 结合对于 IgG 糖基化的绝对需求证实去糖基化的 IgG 抗体无法介导体内触发的炎症反应, 诸如 ADCC、巨噬细胞吞噬以及炎症介质的释放。Nimmerjahn 和 Ravetch, Immunity 24, 19 (2006)。报道的含有或缺少岩藻糖的 IgG 抗体的个体 Fc γ R 的亲亲和性的改变, 以及其随后对于细胞毒性的影响提示个体 IgG 的糖基化可能有助于调节炎症反应, 这可进一步观察到。Shields 等人., J. Biol. Chem. 277, 26133 (2002), Nimmerjahn 和 Ravetch, Science 310, 1510 (2005)。已经在类风湿性关节炎和一些自身免疫性脉管炎患者中观察到自身免疫状态和 IgG 抗体的特定糖基化模式的联系, 有报道这些患者中 IgG 抗体的半乳糖苷化和唾液酸化减少。Parekh 等人., Nature 316, 452 (1985), Rademacher 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6123 (1994), Matsumoto 等人., J. Biol. Chem. 275, 128,621 (2000), Holland 等人., Biochim. Biophys. Acta Dec 27; [Epub ahead of print] 2005。已经报道 IgG 糖形的变化与年龄和免疫相关, 尽管这些改变在体内的意义还没有确定。Shikata 等人., Glycoconj. J. 15, 683 (1998), Lastra, 等人., Autoimmunity 28, 25 (1998)。

[0013] 因此, 需要开发产生多肽的方法, 其可以解释体内 IgG 性质的不同的观察结果。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明通过提供这些方法和分子填补上述需要。在一方面, 本发明提供含有至少一个 IgG Fc 区的多肽, 所述多肽与未纯化抗体相比具有较高的抗炎活性和较低的细胞毒性活性。

[0016] 在本发明的不同实施方式中, 该多肽含有人类 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区, 所述多肽与非纯化抗体相比, 具有较高的唾液酸含量。

[0017] 在另一方面, 本发明提供一种药物制剂, 该制剂含有一种多肽和适当的载体或稀释剂, 该多肽含有至少一个 Fc 区, 具有较高的抗炎活性以及较低的细胞毒性活性。

[0018] 在还有另一方面, 本发明提供制备含有至少一个 Fc 区的多肽的方法, 所述多肽具有比未纯化抗体较高的抗炎活性和较低的细胞毒性活性, 该方法包括: 提供含有至少一个 Fc 区的非纯化来源的多肽, 该含有至少一个 Fc 区的非纯化来源的多肽包含多个含有至少一个带唾液酸的 Fc 区的多肽, 以及多个含有至少一个缺乏唾液酸的 Fc 区的多肽; 并且提高多个含有至少一个带唾液酸的 Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 Fc 区的多肽的比率。在本发明不同的实施方案中, 该多个含有至少一个带唾液酸的 Fc 区的多肽相对于多个含有至少一个缺乏唾液酸的 Fc 区的多肽的比率通过去除含有至少一个缺乏唾液

酸的 Fc 区的多肽,或者通过唾液酸化含有至少一个 Fc 区的非纯化来源的多肽而实现。

[0019] 附图简要说明

[0020] 图 1 表明 6A6-IgG 抗体同种型糖谱。用基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOFMS) 分析来源于 6A6-IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的 N-糖链。含有唾液酸残基的峰用方括号标出。由瞬时转染的 293T 细胞产生的重组 6A6 抗体转换变异体 (switchvariant) 在其 Asn-297 连接的糖中含有最低水平的唾液酸残基。

[0021] 图 2 显示唾液酸化降低 IgG 的细胞毒性。(A) 附着在抗体 Fc-片段中天冬酰胺 297 (N297) 上的充分加工的糖配基的结构。粗体显示核心糖结构。诸如末端的和平分型的糖的可变残基加下划线,并标出特异的连接。也标出糖酰胺酶和神经氨酸酶的切割位点。该充分加工的糖结构在总血清 IgG 池 (pool) 中的大约占 5%。(1). 缩略语:GlcNAc = N-乙酰氨基葡萄糖,man = 甘露糖,gal = 半乳糖,sa = 唾液酸。(B) 用西洋接骨木凝集素 (SNA) 亲和层析富集高唾液酸含量的 6A6-IgG1 和 gG2b 抗体。(C) 富集唾液酸的 (SA) 或经神经氨酸酶处理去除唾液酸的 (NA) 6A6-IgG1 和 -IgG2b 抗体的体内活性。各组小鼠分别注射 4 μ g 每种抗体 (N = 4, 平均值 $\pm$ 平均标准偏差 (SEM)); * 表示 $p < 0.0001$, ** 表示 $p < 0.01$ 。(D) Fc γ RIIB、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIV 结合带有高水平或低水平唾液酸化的抗体的结合常数 (KA); n. b. 表示没有结合。粗体数字表示负责介导抗体体内活性的同种型特异的 Fc 受体。所有这些测定的标准差都低于 5%。

[0022] 图 3 表明抗体的体内活性是由唾液酸调节的。6A6-IgG1 通过 SNA-琼脂糖进行亲和层析以富集唾液酸。这种 SNA-富集制备物的一部分用神经氨酸酶处理 (SNA-富集 + 神经氨酸酶)。(A) 用 SNA 的凝集素印迹检测抗体制备物中的唾液酸含量。(B) 通过监测由分别注射 4 μ g 抗体制备物诱导的血小板减少检测体内抗体活性 (n = 4-5 只小鼠每组)。

[0023] 图 4 说明 IVIG 的抗炎活性需要唾液酸。(A) 用磷酸缓冲液 (PBS)、IVIG,以及糖酰胺酶 PNGaseF-处理的 IVIG (PNGaseF IVIG) 治疗小鼠 K/BxN 血清-诱导关节炎的临床评分。(B) 除了如图 4(A) 中显示的治疗之外,用神经氨酸酶-处理的 IVIG (NA IVIG) 或 SNA-富集的 IVIG (SNA IVIG) 治疗小鼠。(C) 用 IVIG 的 Fc 片段、神经氨酸酶-处理的 Fc (NA Fc),或 SNA-富集的 Fc (SNA Fc) 治疗小鼠的临床评分 (N = 4, 平均值 $\pm$ 平均标准偏差 (SEM))。(D) IVIG 制备物的糖谱。显示来自未处理的或神经氨酸酶-处理的 IVIG 的 N-糖链 MALDI-TOF-MS 谱。含有唾液酸残基的峰用方括号标出,并且各峰的糖组成在图 5 呈现。(E) 代表性的用或不用 SNA-富集的 IVIG (0.1 克 / 千克) 处理的对照小鼠或 K/N 诱导的关节炎小鼠的踝关节苏木精 / 伊红染色。在 IVIG-SNA (0.1 克 / 千克) 治疗小鼠中不存在 K/N 处理小鼠中观察到的广泛的中性粒细胞浸润。(F) IVIG 的对照 Fc 片段、神经氨酸酶-处理的 Fc (NA Fc) 以及经过西洋接骨木凝集素 (SNA) 亲和层析处理的具有高唾液酸含量的 Fc (SNA Fc) 的凝集素印迹。(G) IVIG 中 2,3 和 2,6 连接的唾液酸残基的分析。IVIG 不经处理 (第 2 道),或用特异作用于 2,3 连接的唾液酸残基的神经氨酸酶处理 (第 3 道),或用特异作用于 2,3 连接和 2,6 连接的唾液酸残基的神经氨酸酶处理 (第 4 道)。用 SNA (其识别 2,6 连接的唾液酸残基) 和 MAL-I (其识别 2,3 连接的唾液酸残基) 进行凝集素印迹以检测唾液酸的去除。用胎球蛋白 (第 1 道) 作为富含 2,3 连接的唾液酸残基的糖蛋白对照。考马斯染色的胶作为上样对照 (考马斯)。(H) 减少 2,3 或者 2,3 和 2,6 连接的唾液酸残基的 IVIG 的抗炎活性。小鼠注射 KRN 血清以诱导关节炎,未治疗 (KRN),或者用

IVIG (KRN+IVIG)、减少 2,3 连接的唾液酸残基的 IVIG (α 2-3 唾液酸酶处理的 IVIG+KRN) 或减少 2,3 和 2,6 连接的唾液酸残基的 IVIG (α 2-3,6 唾液酸酶处理的 IVIG+KRN) 治疗。给小鼠注射 PBS 以作为阴性对照 (未处理)。

[0024] 图 5 说明从 IgG Fc 的 N297 释放的糖配基的组成。连接于抗体重链天冬酰胺残基 297 的核心糖结构由 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 和甘露糖 (Man) 组成。个体的糖形随着附着一个或两个末端的半乳糖 (Gal) 残基,附着末端唾液酸-(人类中是 N-乙酰神经氨酸或 Neu5Ac,小鼠中是 N-羟乙酰神经氨酸或 Neu5Gc) 残基,和/或附着平分型 GlcNAc 或岩藻糖 (Fuc) 而变化。数字表示根据 MALDI-TOF MS 测定的不同糖组成的分子量。标出人类和鼠 (加下划线) 的聚糖结构的质量。

[0025] 图 6 说明去唾液酸的 IVIG 的血清半衰期和蛋白质完整性。(A) 酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 检测指定日期 IVIG 治疗的小鼠血清中的人类 IgG 水平 ($N = 4$, 平均值 $\pm$ SEM)。IVIG 和去唾液酸的 IVIG 的半衰期没有显著性差异。显著性由重复测量的方差分析检验计算。(B) 在非-还原性条件下用 8% 聚丙烯酰胺凝胶通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 10 微克 IVIG 或去唾液酸的 IVIG,并用考马斯亮蓝染色。IVIG 的单体组成和结构完整性未受神经氨酸酶处理影响。

[0026] 图 7 说明 SNA-富集的 IVIG 的血清半衰期和亚类组成。(A) ELISA 检测指定日期 IVIG 治疗的小鼠血清中的人类 IgG 水平 ($N = 4$, 平均值 $\pm$ SEM)。IVIG 和 SNA-富集的 IVIG 组分的半衰期没有显著性差异。显著性由重复测量的方差分析检验计算。(B) ELISA 检测未处理的和 SNA-富集的 IVIG 中的 IgG 亚类。未观察到差异。

[0027] 图 8 说明具有相似糖结构的唾液酸化蛋白质不能保护小鼠免患 K/BxN 血清诱导的关节炎。在注射 K/BxN 血清前 1 小时施用等价摩尔数量 (6.7 微摩尔/千克) 或相同重量 (1 克/千克) 的 IVIG 或唾液酸蛋白胎球蛋白和转铁蛋白,并在第 4 天检测临床评分 ($N = 4$, 平均值 $\pm$ SEM)。使用 PBS 作为额外的对照。与 IgG 相比,胎球蛋白或转铁蛋白在等价摩尔浓度时没有具有统计学显著性的抗炎作用。显著性用曼-惠特尼 (Mann-Whitney) U 检验计算。

[0028] 图 9 说明 SNA 富集的 IVIG 的抗炎活性需要 $Fc\gamma RIIB$ 。(A) 未分级 (unfractionated) 的 IVIG (1 克/千克小鼠体重)、SNA-富集的 IVIG (0.1 克/千克小鼠体重),或作为对照的 PBS 在注射 K/BxN 血清前 1 小时注射 $Fc\gamma RIIB$ -缺陷的小鼠,在第 4 天检测临床评分 ($N = 4$, 平均值 $\pm$ SEM)。关节炎的临床评分没有显著差异。显著性用 Mann-Whitney 的 U 检验计算。(B) 用 SNA-富集的 IVIG 体内富集 $Fc\gamma RIIB^+$ 的单核细胞。野生型小鼠注射 1 克/千克、0.1 克/千克 IVIG 或 0.1 克/千克 SNA-富集的 IVIG,或作为对照的 PBS。注射后 1 天收集骨髓 (左图) 和脾细胞 (右图) 并用流式细胞术分析 ($N = 4$)。用 1 克/千克 IVIG 或 0.1 克/千克 SNA-富集的 IVIG 治疗后, $F4/80^+Fc\gamma RIIB^+$ 细胞显著地积累。显著性用 Student's t 检验计算。

[0029] 图 10 说明主动免疫导致 IgG 唾液酸化减少。(A) 用西洋接骨木凝集素 (SNA) 进行印迹 (见方法) 鉴定取自未处理的 (免疫前) 或患有通过免疫绵羊 IgG 和肾毒性血清 (NTS) 诱导的肾毒性肾炎 (NTN) 的小鼠的血清 IgG 中的唾液酸含量。(B) 用光密度法对未处理小鼠以及 NTN 小鼠中总血清 IgG 和 IgM 抗体以及绵羊 IgG-特异的 IgG 抗体中唾液酸化水平定量 (平均值 $\pm$ SEM)。在小鼠抗体制备物中不存在可检测的绵羊 IgG (数据未显

示)。 (C) 连接于取自未处理小鼠或 NTN 小鼠的 IgG 抗体上的糖残基的 MALDI-TOF 分析。含有唾液酸的部分用方括号标出。单个峰的详细糖配基显示于图 5。 (D) 沉积于注射肾毒性血清, 有 (NTS+CFA) 或没有 (只有 NTS) 用混合在完全弗氏佐剂 (CFA) 中的绵羊 IgG 预先免疫的小鼠的肾小球中抗体的唾液酸含量的检测。

[0030] 发明的详细描述

[0031] 本发明出乎意料地发现 IgG Fc 区的细胞毒性和抗炎症反应由 Fc- 连接的核心多糖不同的唾液酸化而造成。IgG 抗体的细胞毒性因唾液酸化而降低; 相反地, IVIG 的抗炎症活性增强。显示 IgG 的唾液酸化由抗原-特异的免疫应答的诱导调控, 从而提供将 IgG 从先天性的稳定状态的抗-炎症分子转变成抗原激发下的适应性的促炎症的种类的新手段。

[0032] 因此, 本发明提供产生和选取具有理想的细胞毒性和抗-炎症潜能的 IgG 的具有优势的策略。

[0033] 定义

[0034] 贯穿本说明书与权利要求地, 免疫球蛋白重链中残基的编号是如 Kabat 等人, 免疫学目标蛋白的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 5th Ed. PublicHealth Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 的 EU index 编号, 其以参考文献形式特别地并入本文。“如 Kabat 中的 EU index”指人类 IgG1 EU 抗体的残基编号。

[0035] 术语“天然的”或“亲本的”指含有 Fc 氨基酸序列的非修饰多肽。亲本多肽可以包含天然序列的 Fc 区, 或带有预先存在的氨基酸序列修饰 (诸如加入、缺少和 / 或替换) 的 Fc 区。

[0036] 术语“多肽”指任一含有至少一个 IgG Fc 区的蛋白质的片段, 包括, 但不限于, 全功能蛋白质, 诸如, 例如抗体, 例如, IgG 抗体。

[0037] 术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链的 C-末端区域。“Fc 区”可以是天然序列 Fc 区, 或变异的 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可能各有不同, 人类 IgG 重链 Fc 区通常定义为从氨基酸残基 Cys226 或 Pro230 延伸至其羧基端的区域。

[0038] 人类 IgG Fc 区的“CH2 区” (也被称为“C_Y2”区) 通常从氨基酸 231 延伸至约氨基酸 340。CH2 区的独特之处在于其与另一个区并不紧密地配对。更确切地说, 完整的天然 IgG 分子的两个 CH2 区之间插着两个 N 连接的分支糖链。推测糖可以提供用于区-区配对的替代物, 并协助稳定 CH2 区 (Burton, Mol Immunol, 22, 161-206 (1985), 其以参考文献形式并入本文)。

[0039] “CH3 区”包含 Fc 区中从 C-末端延伸至 CH2 区的残基 (即, 从 IgG 的氨基酸残基 341 至氨基酸残基 447)。

[0040] 术语“铰链区”在人类 IgG1 中通常定义为 Glu216 延伸至 Pro230 (Burton (1985))。其他 IgG 同种型的铰链区可以通过设定在同样的位置形成重链间 S-S 键的第一个和最后一个半胱氨酸残基而与 IgG1 的序列匹配。

[0041] 术语“结合域”指多肽中与其他分子结合的区域。对 FcR 而言, 结合域可以包含其多肽链负责结合 Fc 区的那一部分 (例如, 其 α 链)。一个示例性的结合域是 FcR 链的胞外区。

[0042] 功能性“Fc 区”拥有天然序列的 Fc 区的至少一部分“效应器功能”。示例性的“效

效应器功能”包括 C1q 结合 ;补体依赖性细胞毒性作用 ;Fc 受体结合 ;抗体 - 依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ;巨噬细胞吞噬 ;细胞表面受体下调 (例如, B 细胞受体 ;BCR), 等等。这些效应器功能通常需要 Fc 区与结合结构域 (例如, 抗体的可变区) 结合, 并且可以用多种检测来进行评定, 例如, 如本文公开的检测。

[0043] “天然序列的 Fc 区”含有与自然界中发现的 Fc 区氨基酸序列相同的氨基酸序列。如本领域普通技术人员所理解的“变异的 Fc 区”含有凭借至少一个“氨基酸修饰”而与天然序列 Fc 区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。优选地, 变异的 Fc 区与天然序列的 Fc 区或亲本多肽 (parent polypeptide) 的 Fc 区相比, 含有至少一个氨基酸替换, 例如, 天然序列的 Fc 区或亲本多肽 (parent polypeptide) 的 Fc 区中含有大约一个至大约十个氨基酸替换, 并且, 优选地, 含有大约一个至大约五个氨基酸替换。本文中变异的 Fc 区优选拥有与天然序列 Fc 区和 / 或亲本多肽 Fc 区至少约 80% 的同源性, 并更优选与其至少 90% 同源性, 更优选与其至少 95% 同源性, 甚至更加优选地, 与其至少 99% 同源性。

[0044] 术语“改变的糖基化”指如上面所定义的多肽, 可以是天然的或是修饰的, 通过操作使其附着在重链恒定区的糖增加或减少特定的糖组分。例如, 多肽, 诸如, 举例来说, 特定的细胞系中制备的抗体, 诸如, 举例来说, Lec2 或 Lec3, 可以在附着的糖部分中缺乏诸如岩藻糖和唾液酸。

[0045] 术语“Fc 受体”或“FcR”用来描述结合于抗体 Fc 区的受体。在本发明的一个实施方案中, FcR 是人类 FcR 的天然序列。在另一个实施方案中, FcR, 包括人类 FcR, 结合于 IgG 抗体 (γ 受体) 并包括 Fc γ R、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体, 包括这些受体的等位基因变体和选择性的剪切形式。Fc γ RII 受体包括 FcRIIA (“激活性受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制性受体”), 二者的氨基酸序列相似, 区别主要在于其胞浆区。激活性受体 Fc γ RIIA 在其胞浆区含有免疫受体酪氨酸 - 依赖的激活模体 (ITAM)。抑制性受体 Fc γ RIIB 其胞浆区含有免疫受体酪氨酸依赖的抑制模体 (ITIM)。(参见 Daron, Annu Rev Immunol, 15, 203-234 (1997) 的综述 ;FcR 的综述见 Ravetch 和 Kinet, Annu Rev Immunol, 9, 457-92 (1991) ;Capel 等人., Immunomethods, 4, 25-34 (1994) ;和 de Haas 等人., JLab Clin Med, 126, 330-41 (1995), Nimmerjahn 和 Ravetch 2006, Ravetch Fc 受体, 基础免疫学, William Paul 主编, 第五版。以上皆以参考文献形式并入本文。)

[0046] “抗体 - 依赖性细胞 - 介导的细胞毒性作用”和“ADCC”指细胞在体外或体内介导的反应, 其中表达 FcR 的细胞毒性细胞 (例如单核细胞, 诸如天然杀伤 (NK) 细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体, 并随后导致靶细胞的裂解。原则上, 可以触发任何带有激活的 Fc γ R 的效应器细胞以介导 ADCC。一种这样的细胞, NK 细胞, 只表达 Fc γ RIII, 而单核细胞, 取决于其活化状态、定位或分化, 可以表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RI II。Ravetch and Bolland, Annu Rev Immunol, (2001) 中总结了造血细胞上 FcR 的表达, 其以参考文献形式并入本文。

[0047] “人类效应器细胞”是表达一种或多种 FcR 并执行效应器功能的白细胞。优选地, 这些细胞表达至少一种激活的 Fc 受体, 诸如, 举例来说, Fc γ RIII, 并执行 ADCC 效应器功能。介导 ADCC 的人类白细胞的实例包括外周血单核细胞 (PBMC)、自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞以及中性粒细胞, 其中优选 PBMC 和 NK 细胞。效应器细胞可以从其天然来源中分离, 例如, 从如本文描述的血液或 PBMC 中。

[0048] 术语“抗体”使用其最宽泛的含义，并特别包括单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体、多特异性抗体（例如，双特异性抗体），以及抗体片段，只要他们呈现期望的生物活性。

[0049] 术语抗体的“唾液酸含量”既指抗体重链 Fc 区中唾液酸残基的总量，也指在非纯化抗体制备物中唾液酸化抗体与非唾液酸化抗体的比例，除非该术语在上下文中明确地提示意指另一种含义。

[0050] 为了本发明所定义的“抗体片段”包含完整抗体的一部分，通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区，或者保留 FcR 结合能力的抗体的 Fc 区。抗体片段的实例包括线性抗体；单-链抗体分子；以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段优选保留 IgG 重链的至少部分铰链区并且可选地，CH1 区。更优选地，抗体片段保留 IgG 重链的全部恒定区，并包括 IgG 轻链。

[0051] 本发明使用的术语“单克隆抗体”指从基本同质的抗体群中获得的一种抗体，即，即构成该群抗体的单个抗体是相同的，除了可以少量存在的可能自然发生的变异。单克隆抗体具有高度特异性，针对单一抗原位点。并且，与典型地包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的传统的（多克隆）抗体制备物相比，每一种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆的”指从基本同质的抗体群中获得的抗体的特征，而不能解释为需要通过任何特别的方法来制备该抗体。例如，根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256, 495-497 (1975) 首次描述的并以参考文献形式并入本文的杂交瘤方法制备，或可以通过重组 DNA 方法（见美国专利号 4, 816, 567，其以参考文献形式并入本文）制备。单克隆抗体也可以使用在例如分别以参考文献形式并入本文的 Clackson 等人., *Nature*, 352, 624-628 (1991) 和 Marks 等人., *J Mol Biol*, 222, 581-597 (1991) 中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离。

[0052] 在本发明的其他实施方式中，含有至少一个 IgG Fc 区的多肽可以与其他蛋白质片段融合，包括，但不限于，全蛋白。许多蛋白质可以与本发明的多肽融合，包括，但不限于，其他免疫球蛋白，特别是，缺少 Fc 区的免疫球蛋白；这些本领域普通技术人员将可以毋庸置疑地领会。作为选择，其他的生物活性蛋白质或其片段可以与本发明的多肽融合，例如，如美国专利 6, 660, 843 中所描述的，其以参考文献形式并入本文。该实施方式特别有利于这些生物活性蛋白质或其片段对于表达 Fc 受体的细胞的递送。进一步地，可以使用不同的标记，诸如，举例来说，谷胱甘肽转移酶 (GST) 标签或绿色荧光蛋白，或 GFP。

[0053] 本文中的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其重链和 / 或轻链的一部分与来源于特定种属或属于特定抗体种类或亚类的抗体的对应序列相同或同源，同时链上的其余序列与来源于另一种属或属于另一种类或亚类的抗体的对应序列相同或同源，此外还指这些抗体的片段，只要它们表现出期望的生物活性（见美国专利 4, 816, 567；Morrison 等人., *Proc Natl Acad Sci USA*, 81, 6851-6855 (1984)；Neuberger 等人., *Nature*, 312, 604-608 (1984)；Takeda 等人., *Nature*, 314, 452-454 (1985)；国际专利申请 PCT/GB85/00392，其分别以参考文献形式并入本文。）

[0054] 非人类（例如，鼠的）抗体的“人源化”形式指含有最少序列的来源于非人类免疫球蛋白的嵌合抗体。在大多数情况下，人源化抗体是人类免疫球蛋白（受者抗体），其中，来自受者高变区的残基被具有所需的特异性、亲和力和容量的来自诸如小鼠、大鼠、兔或非人

灵长类的非人类种属（供着抗体）的高变区的残基取代。在一些情况下，人类免疫球蛋白的 Fv 骨架区 (FR) 残基被相应的非人类残基取代。此外，人源化抗体可以含有既不存在于受者抗体中，也不存在于供者抗体中的残基。这些修饰进一步优化抗体的性能。通常，人源化抗体包含至少一个，通常是两个可变区的几乎所有部分，其中所有或几乎所有的高变环对应非人类免疫球蛋白的高变环区，并且所有或几乎所有 FR 残基是人类免疫球蛋白序列的 FR 残基。人源化抗体也可以任选的含有免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分，通常是人类免疫球蛋白的序列。进一步的细节见 Jones 等人., *Nature*, 321, 522-525 (1986) ; Riechmann 等人., *Nature*, 332, 323-329 (1988) ; Presta, *Curr Opin Struct Biol*, 2, 593-596 (1992) ; 美国专利 5, 225, 539, 其分别以参考文献形式并入本文。

[0055] 含有至少一个 IgGFc 区的多肽包括那些通过利用重组 DNA 技术以修饰编码重链恒定区的基因将特定氨基酸替换、插入或缺失引入亲本序列的多肽。这些修饰的引入采用如诸如分子克隆 (Sambrook 和 Russel, (2001)) 的操作手册中所描述的分子生物学中的广为采用的技术。此外，至少一个 IgG Fc 区的多肽可以包括那些被选择具有特定的糖修饰的多肽，这些多肽可以通过在已知糖基化特异性的细胞系中表达而获得 (Stanley P., 等人., *Glycobiology*, 6, 695-9 (1996) ; Weikert S., 等人., *Nature Biotechnology*, 17, 1116-1121 (1999) ; Andresen DC 和 Krummen L., *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 117-123 (2002)), 或者通过在特异的凝集素上的富集或消耗, 或者酶处理而获得 (Hirabayashi 等人., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 771, 67-87 (2002) ; Robertson 和 Kennedy, *Bioseparation*, 6, 1-15 (1996))。抗体糖基化的质量和程度根据细胞的类型和培养的条件不同而有所差异, 这在本领域内是已知的。(举例来说, Patel 等人., *Biochem J*, 285, 839-845 (1992) 报道如果抗体以腹水的形式, 或在无血清或含血清的培养基中产生, 则连接于抗体的糖侧链中的唾液酸含量会有很大的差别。此外, Kunkel 等人., *Biotechnol Prog*, 16, 462-470 (2000) 显示使用用于细胞生长的不同的生物反应器, 以及培养基中溶解氧的量都会影响连接于抗体的糖配基中半乳糖和唾液酸的数量。然而, 这些研究并没有指出不同水平的唾液酸残基如何影响抗体的体内活性。

[0056] 宿主表达系统

[0057] 本发明的多肽可以在宿主表达系统, 即, 可以进行 N-连接的糖基化的宿主细胞中表达。典型地, 该宿主表达系统可以包含真菌、植物、脊椎动物或无脊椎动物表达系统。在一个实施方式中, 宿主细胞是哺乳动物细胞, 诸如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系, (例如 CHO-K1 ; ATCC CCL-61), 绿猴细胞系 (COS) (例如 COS1 (ATCC CRL-1650), COS7 (ATCC CRL-1651)) ; 小鼠细胞 (例如 NS/O), 幼仓鼠肾 (BHK) 细胞系 (例如 ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10), 或人类细胞 (例如 HEK293 (ATCC CRL-1573)), 或任何其他合适的细胞系, 例如, 可以从诸如美国典型培养物保藏中心 (洛克维尔, 马里兰州, Rockville, Md.) 的公众保藏中心获得的细胞系, 诸如鳞翅目细胞系的昆虫细胞系, 例如 Sf9 ; 植物细胞系 ; 真菌细胞系, 例如酵母诸如, 举例来说, 酿酒酵母、毕赤酵母、汉逊酵母。本领域普通技术人员可以领会, 在一些情况下, 宿主细胞的修饰可能需要保证产生 N-连接的糖基化和聚糖成熟以造成通常在人类 IgG 的 Fc 区中出现的复杂的, 二天线糖 (biantennary sugar)。(见例如 Hamilton, SR, 等人. *Science*, 313, 1441 (2006) ; Li, H, 等人., *Nature Biotechnology* 24, 210 (2006) ; Wildt, S 和 Grengross, TU *Nature Reviews Microbiology* 3, 119 (2005)。)

[0058] 治疗性制剂 (Therapeutic Formulation)

[0059] 治疗性制剂含有具有所需纯度的含有至少包含一个 Fc 区的本发明的多肽, 可以通过与可选的生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂 (见, 例如, 雷氏药学大全, 16 版, Osol, A. Ed. (1980)) 混合, 并以冻干制剂或水溶液的形式制备用于贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度对受者无毒, 并包括缓冲液诸如磷酸、柠檬酸以及其他有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六烃季铵; 苯扎氯铵; 石炭酸、丁醇或苯甲醇; 烷基对羟基苯甲酸酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 雷琐辛; 环己醇; 3-戊醇和间甲酚); 低分子量 (少于约 10 个残基) 的多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸, 或赖氨酸; 单糖、双糖, 或其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖, 或糊精; 螯合剂诸如乙二胺四乙酸; 糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐反离子诸如钠离子; 金属复合物 (例如, Zn-蛋白质复合物); 和 / 或非-离子型表面活性剂, 诸如 TWEEN™, PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0060] 本文的制剂也包含超过一种对于治疗的特定的适应症必要的活性化合物, 优选那些具有对彼此不造成相反影响的互补活性的化合物。这类分子适合以对预期目标有效的数量联合使用。

[0061] 活性成分也可以, 例如, 通过凝聚技术或通过界面聚合, 包裹于制备的微胶囊中, 举例来说, 分别处于胶体药物递送系统 (例如, 脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊) 或在粗乳状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。这些技术公布于雷氏药学大全, 16 版, A. Ed. (1980)。

[0062] 在优选的实施方案中, 将在体内施用的该制剂是无菌的。本发明的配方可以很容易地灭菌, 例如, 经通过无菌的过滤膜而过滤除菌。

[0063] 也可以制备缓释的制备物。缓释制备物的合适的实例包括含有修饰的抗体的固态疏水性聚合物的半透性基质, 该基质以有形物体的形式存在, 例如, 薄膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯类、水凝胶类 (例如, 聚 (甲基丙烯酸-2-羟乙酯), 或聚 (乙烯醇)), 聚乳酸类 (见, 例如, 美国专利 3, 773, 919), L-谷氨酸和 L-谷氨酸-γ-乙基酯的共聚物, 不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯, 可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™ (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射的微球), 和多聚-D-(-)-3-羟基丁酸。诸如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的多聚物能够释放分子超过 100 天, 而某些水凝胶释放蛋白的时间比之较短。当装入胶囊的抗体在体内长时间维持时, 他们可能因为暴露于 37℃ 的水分中而变性或者聚集, 因此导致其生物活性的损失以及可能的免疫原性的改变。根据涉及的机理, 可以设计合理的策略以稳定之。例如, 如果发现聚集的原理是通过硫代-二硫交换的分子间 S-S 键的形成, 则可以通过修饰巯基残基、在酸性溶液中冻干、控制含水量、使用合适的添加剂, 以及开发特异的多聚物基质组分而实现稳定化。

[0064] 产生含有至少一个 IgG Fc 区的唾液酸化的多肽

[0065] 可以进一步地纯化或修饰本发明的多肽, 使其与未修饰的和 / 或未纯化的抗体相比, 具有提高的唾液酸数量。存在多种方法达到这个目标。在一种方法中, 非纯化来源的多肽, 诸如, 举例来说, 将常规地从中纯化 IVIG 的含有 IgG 的血浆组分通过带有已知可以结合唾液酸的凝集素的柱子。在一个实施方式中, 凝集素分离自西洋接骨木。于是, 含有至少一

个 IgG Fc 区的多肽的唾液酸化组分将保留在柱子上,而非唾液酸化的组分则流过柱子。含有至少一个 IgG Fc 区的多肽的唾液酸化组分可以用不同的严谨条件的另一次洗脱洗下。因此,获得其唾液酸含量与正常含量相比提高的本发明的多肽制备物是可能的。另外,可以如,例如,在美国专利 20060030521 中描述的,用唾液酸转移酶和供体唾液酸进行酶促反应。

[0066] 在要求保护的方法中使用的唾液酸转移酶的合适的非限制性示例是 ST3Gal III,其也被称为 α -(2,3) 唾液酸转移酶 (EC2.4.99.6),以及 α -(2,6) 唾液酸转移酶 (EC2.4.99.1)。 α -(2,3) 唾液酸转移酶催化唾液酸转移至半乳糖- β -1,3-N 乙酰葡萄糖胺 (Gal- β -1,3GlcNAc) 或半乳糖- β -1,3-N 乙酰葡萄糖胺 (Gal- β -1,4GlcNAc) 糖苷的半乳糖 (Gal) (见,例如, Wen 等人., J. Biol. Chem. 267 :21011(1992); Van den Eijnden 等人., J. Biol. Chem. 256 :3159(1991)),并负责糖肽中天冬酰胺-连接的寡糖的唾液酸化。唾液酸连接到 Gal 上,在两个糖之间形成 α 连接。糖之间的键合(连接)发生于 N 乙酰神经氨酸 (NeuAc) 的 2-位和 Gal 的 3-位。已知这种特定的酶可以分离自大鼠肝脏 (Weinstein 等人., J. Biol. Chem. 257 :13845(1982)); 人类 cDNA (Sasaki 等人. (1993) J. Biol. Chem. 268 :22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) J. Biol. Chem. 269 :1394-1401) 和基因组的 (Kitagawa 等人. (1996) J. Biol. Chem. 271 :931-938) DNA 序列,这使得以重组表达的方式生产该酶变得很容易。

[0067] α -(2,6) 唾液酸转移酶的活性造成 6-唾液酸化的寡糖,包括 6-唾液酸化半乳糖。名称“ α -(2,6) 唾液酸转移酶”指将唾液酸连接到受体多糖第六个原子上的唾液酸转移酶家族。从不同的组织中可以分离出不同的 α -(2,6) 唾液酸转移酶的形式。例如,这种酶的一种特异的形式, ST6Gal II,可以分离自脑和胎儿组织。Krzewinski-Recchi 等人, Eur. J. Biochem. 270,950 (2003)。

[0068] 另外,本领域普通技术人员可以领会,可以利用细胞培养条件来改变唾液酸化的水平。例如,为了提高唾液酸含量,会减少产率,并通常将渗透压维持在适于特定宿主细胞培养的下边界。在从约 250 毫渗量 (mOsm) 至约 450 毫渗量范围内的渗透压适于提高唾液酸含量。在例如,美国专利 6,656,466 中描述了该条件以及另一个适宜的细胞培养条件。Patel 等人., Biochem J, 285,839-845 (1992) 报道如果抗体以腹水的形式,或在无血清或含血清的培养基中产生,则连接于抗体的糖侧链中的唾液酸含量会有很大的差别。此外, Kunkel 等人., Biotechnol Prog, 16,462-470 (2000) 显示使用用于细胞生长的不同的生物反应器,以及培养基中溶解氧的数量都会影响连接于抗体的糖配基中半乳糖和唾液酸的数量。

[0069] 在另一个实施方式中,宿主细胞,诸如,举例来说,永生化的人类胚胎视网膜细胞,可以通过引入编码唾液酸转移酶诸如,举例来说, α -2,3-唾液酸转移酶或 α -2,6-唾液酸转移酶的核酸修饰,可操作地与启动子连接,诸如,举例来说,CMV 启动子。 α -2,3-唾液酸转移酶可以是人 α -2,3-唾液酸转移酶,或称为 SIAT4C 或 STZ (GenBank 登录号 L23767),以及,举例来说,如美国专利 20050181359 中描述的序列。

[0070] 编码唾液酸转移酶的核酸可以用任一本领域普通技术人员所知的方法引入宿主细胞。合适的引入外源性核酸序列的方法也描述于 Sambrook 和 Russel, 分子克隆:实验室手册 (第三版),冷泉港出版社, NY, 2000。这些方法包括,但不局限于,物理转移技术,诸

如,举例来说,显微注射或电穿孔;转染,诸如,举例来说,磷酸钙转染;膜融合转移,使用,例如,脂质体;以及病毒转移,诸如,举例来说,使用 DNA 或逆转录病毒载体的转移。

[0071] 含有至少一个 IgG Fc 区的多肽可以从培养上清中回收,并且,如果需要的话,可以经过一个或多个纯化步骤,诸如,举例来说,离子交换或亲和层析。合适的纯化方法对于本领域普通技术人员是显而易见的。

[0072] 本领域普通技术人员可以领会,上面公开的唾液酸化方法的不同组合可以导致产生出具有特别高的唾液酸化水平的含有至少一个 IgG Fc 区的多肽。例如,如上面所描述的,可以在过表达唾液酸转移酶的宿主细胞中表达含有至少一个 IgG Fc 区的多肽,并且随后通过,例如在酶促反应中使这些多肽唾液酸化,然后利用含有凝集素的柱子进行亲和层析来进一步富集这些多肽的唾液酸化的组分。相似地,对于含有至少一个 IgG Fc 区的多肽的 IVIG 来源也可以使用酶促反应紧接亲和层析。

[0073] 为了检测含有至少一个 IgG Fc 区的多肽的糖基化程度,可以纯化这些多肽并在还原条件下进行 SDS-PAGE 分析。可以通过将分离的多肽与特异的亲和素发生相互作用鉴定糖基化,或者,可选择地,如本领域普通技术人员可以领会的,可以用 HPLC 接连质谱以鉴定糖形。(Wormald, MR 等人, Biochem 36:1370 (1997))。

[0074] 为了更详细地描述本发明,以下给出几个示例性的实施例。

[0075] 实施例

[0076] 实施例 1. 提高唾液酸含量的 IVIG 呈现降低的细胞毒性

[0077] 为了检测 IgG 特异的糖形是否参与调节抗体的效应器功能,研究了特异的 Asn297-连接糖在介导特定的 IgG 单克隆抗体的细胞毒性中的作用。用质谱分析检测来源于 6A6 杂交瘤的抗血小板抗体的特异性糖组成和结构(图 1),如前面 Nimmerjahn 等人在 Immunity 23, 41 (2005) 中描述的,该抗体由 293 细胞表达,为 IgG12a 或 2b 转换变异体。这些抗体含有最少的唾液酸残基。通过西洋接骨木凝集素亲和层析富集含有唾液酸的种类收获唾液酸含量富集 60-80 倍的抗体(图 2B 和图 3)。唾液酸化和非唾液酸化的 6A6-IgG1 和 2b 抗体介导血小板清除的能力的对比显示,抗体的唾液酸化与其体内活性呈负相关。6A6 IgG 抗体的唾液酸化造成其生物活性下降 4080% (图 2C 和图 3)。

[0078] 为了确定这种活性下降的机制,进行这些抗体针对每一种小鼠 Fc γ Rs 以及其同源抗原的表面等离子体共振结合试验。

[0079] 根据 Nimmerjahn 和 Ravetch, Science 310, 1510 (2005) 中的描述进行表面等离子体共振分析。简言之,将其糖侧链上含有高或低水平的唾液酸残基的 6A6 抗体变异体固定于 CM5 传感芯片表面。室温下通过流通池(flow cells)以流速 30 μ l/分钟注入在 HBS-EP 运行缓冲液(10mM 羟乙基哌嗪乙磺酸, pH 7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 以及 0.005% 的表面活性剂 P20)中不同浓度的可溶性的 Fc γ -受体。可溶性 Fc-受体注入 3 分钟,观察结合的分子解离 7 分钟。对于对照流通池的背景结合被自动扣除。进行对照试验以排除传质限制。利用对结合相和解离相的感应图的同时拟合以及对组中所有的曲线的整体拟合,从感应图数据中得到亲和常数。1:1 朗格缪尔(Langmuir)结合模型密切拟合观察到的感应图数据,在所有试验中都使用此模型。

[0080] 观察到这些抗体的唾液酸化形式对其相应的活化 Fc γ R 的亲合力与其非相应的唾液酸化形式相比降低 5-10 倍,而未观察到二者对抗原的亲合力的差别(图 2D)。因此,

IgG 的 Asn²⁹⁷ 连接的糖链结构的唾液酸化造成其对于亚类 - 限制的活化 Fc γ R 的亲合力降低并因而降低其体内细胞毒性。

[0081] 为了确定观察到的 N- 连接糖的唾液酸化参与调节其体内抗炎症活性的一般性, 进一步研究了 N- 连接糖在 IVIG 抗炎症活性中的作用。用从 5-10,000 位供体的血清池中纯化的 IgG 组分, 以高剂量 (1-2 克 / 千克) 静脉施用来治疗炎症性疾病, 是广为采用的治疗方法。Dwyer, N. Engl. J. Med. 326, 107 (1992). 该抗炎症活性是 Fc 片段的特性, 并且在特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、类风湿关节炎 (RA) 以及肾毒性肾炎小鼠模型中具有保护性。Imbach 等人., Lancet 1, 1228 (1981), Samuelsson 等人., Science 291, 484 (2001), Bruhns 等人., Immunity 18, 573 (2003), Kaneko 等人., J. Exp. Med. 203, 789 (2006)。

[0082] 提出的这种抗炎症活性的一个共有机制涉及效应器巨噬细胞上抑制性 Fc γ RIIB 分子表面表达的诱导, 其因此提高细胞毒性 IgG 抗体或免疫复合物通过 Fc γ R 触发诱导效应器细胞响应所需的阈值。Nimmerjahn 和 Ravetch, Immunity 24, 19 (2006)。

[0083] 实施例 2. IVIG 去唾液酸化降低其在小鼠关节炎模型中的抗炎症效果

[0084] 小鼠

[0085] C57BL/6 和 NOD 小鼠购自 Jackson 实验室 (Bar Harbor, ME)。Fc γ RIIB^{-/-} 小鼠产生自发明人所在的实验室, 并与 C57BL/6 背景回交 12 代。C57BL/6 背景的 KRN TCR 转基因小鼠 (K/B) 为 D. Mathis 和 C. Benoist (哈佛医学院, 波士顿, MA) 惠赠, 并与 NOD 小鼠繁殖以产生 K/BxN 小鼠。在所有试验中都使用 8-10 周龄的雌性小鼠, 并在洛克菲勒大学的动物设施中维持。所有试验都依照联邦法律和机构指南进行, 并获得洛克菲勒大学 (纽约, NY) 的批准。

[0086] 抗体和可溶性 Fc 受体

[0087] 由瞬时转染的 293T 细胞制备 6A6 抗体的转换变异体 (switch variant), 随后根据 Nimmerjahn 等人., Immunity 23, 41 (2005) 和 Nimmerjahn 和 Ravetch, Science 310, 1510 (2005) 用蛋白 G 纯化。用接骨木凝集素 (SNA) 琼脂糖 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 进行凝集素亲和层析以从这些抗体制备物中分离富含唾液酸的抗体变异体。唾液酸含量的富集由凝集素印迹 (见下) 证实。人静脉注射的免疫球蛋白 (5% IVIG 于 10% 麦芽糖中, 质谱纯化) 购自 Octapharma (Hemdon, VA)。根据中的 Kaneko Y. 等人., Exp. Med. 203, 789 (2006) 描述对 IVIG 进行消化。简言之, IVIG 用 0.5 毫克 / 毫升木瓜蛋白酶于 37°C 消化 1 小时, 加入 2.5 毫克 / 毫升碘代乙酰胺终止反应。用 HiPrep 26/60S-200HR 柱 (GE 医疗集团, Piscataway, NJ) 将得到的 Fab 片段和 Fc 片段与未 - 消化的 IVIG 分离, 随后用蛋白 G 柱 (GE 医疗集团) 和蛋白 L 柱 (Pierce, Rockford, IL) 纯化 Fc 片段和 Fab 片段。用抗 - 人 IgG Fab 或 Fc- 特异的抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 进行免疫印迹以检测片段纯度。得到的纯度大于 99%。F4/80 抗体来自 Serotec (Oxford, UK)。Ly17.2 抗体来自 Caltag (Burlingame, CA)。绵羊抗 - 肾小球基底膜 (GBM) 抗血清 (肾毒性血清, NTS) 由 M. P. Madaio (宾夕法尼亚大学, Philadelphia, PA) 惠赠。C- 末端含有六组氨酸标签的可溶性 Fc 受体由瞬时转染的 293T 细胞产生, 并用镍 - 氨基三乙酸 (Ni-NTA) 琼脂糖根据说明书 (Qiagen) 从细胞培养上清中纯化。

[0088] 用神经氨酸酶处理 IVIG, 用质谱分析其制备物的组成和结构。神经氨酸酶处理后没有检测到含残留的唾液酸的寡糖 (图 4D, F 和 5)。随后检测 IgG 制备物保护小鼠免患由

被动输入 KxN 血清诱导的关节炎的能力,该关节炎是 IgG 1 免疫复合物介导的炎症性疾病模型。用神经氨酸酶去除唾液酸使得 IVIG 制备物在 KxN 血清诱导的关节炎模型中的保护效果丧失 (Figure 4B, C, E)。这种活性的丧失不是因为非唾液酸化 IgG 血清半衰期的降低 (图 6A),或是 IgG 单体组成或结构完整性的改变 (图 6B) 所造成的。用糖苷酶去除所有的聚糖得到相似的结果,且使得 IVIG 的体内保护作用丧失 (图 4A)。选择性地去除 2,6 唾液酸连接使 IVIG 活性丧失,而去除 2,3 唾液酸连接则没有显著的效果 (图 4G, H)。

[0089] 实施例 3. 具有富集的唾液酸含量的 IVIG 组分减轻小鼠关节炎模型中的炎症

[0090] 制备含有增加的唾液酸含量的 IVIG

[0091] 由于显示 IVIG 的抗炎活性需要唾液酸,这种抗炎活性的高剂量 (1 克 / 千克) 需求的基础可能是总 IVIG 制备物中有限的唾液酸化 IgG 浓度。在 SNA-凝集素亲和柱对 IVIG 分级,以获得富含唾液酸修饰的聚糖结构的 IgG 分子。

[0092] 在 KxN 血清输入性关节炎模型上检测富含唾液酸的部分对比于未分级 IVIG 的保护效果。观察到 SNA-结合部分的保护效果增强 10 倍,以致 0.1 克 / 千克 SNA-富集的 IVIG 与 1 克 / 千克未分级 IVIG 相比,获得等效的保护结果 (图 4B, C)。SNA 富集部分 IgG 亚型血清半衰期的分布和未分级的 IVIG 相当 (图 7A, B)。唾液酸化的效果是 IgG 特异的;诸如胎球蛋白或转铁蛋白的具有相似的二天线复杂糖结构的唾液酸化的 N-连接糖蛋白,与等摩尔浓度的 IgG 相比,无统计学显著性抗炎活性 (图 8)。最后,唾液酸化 IVIG 制备物的保护机制与非分级的 IVIG 相似,都依赖于 Fc γ RIIB 的表达并造成这种效应器巨噬细胞上的抑制性受体表达的增加 (图 9)。

[0093] 实施例 4. 带有增加的唾液酸含量的 IVIG 的增强的抗炎性反应由 Fc 区中 N-连接糖的唾液酸化介导

[0094] 由于 IVIG 中的多克隆 IgG 在其轻链或重链可变区同样可以含有唾液酸化的 O 连接和 N 连接的糖,我们证实 SNA 富集的 IgG 制备物增加的抗-炎症活性是由 Fc 中 N-连接的糖基化位点中增加的唾液酸化造成的。Fc 片段产生自未分级的和 SNA 分级的 IVIG,并检测其体内活性。正如在完整的 IgG 中观察到的, SNA-纯化的 Fc 片段与产生自未分级的 IVIG 的 Fc 片段相比,其体内保护效果增强 (图 4C)。相反, Fab 片段在体内试验中则未呈现出抗炎活性。因此, IVIG 抗炎活性的高剂量需求可以归因于在唾液酸化 IgG 总制备物中的贡献是微小的。通过唾液酸结合的凝集素层析富集这些组分因而可以提高其抗炎活性。

[0095] 这些使用 IgG 抗体被动免疫的结果表明,从促炎症类型转化为抗炎类型的能力受 Fc 区中 N-连接糖的唾液酸化程度影响。

[0096] 实施例 5. 主动免疫应答中存在 IgG 唾液酸化介导的抗炎活性的增强

[0097] 患有肺出血-肾炎综合征 (Goodpasture 症) 的小鼠模型

[0098] 在此模型中,用绵羊 IgG 合用佐剂初次致敏小鼠,四天以后注射绵羊抗-小鼠肾小球基底膜制备物 (肾毒性血清, NTS)。简单地说,用 200 μ g 混于 CFA 中的绵羊 IgG (Serotec 公司) 腹腔预免疫小鼠,紧接着 4 天以后,每克体重静脉注射 2.5 μ l NTS 血清。注射抗-肾小球基底膜 (GBM) 抗-血清 4 天后,收集未-处理对照小鼠的血液,用蛋白 G (GE 医疗集团,普林斯顿, NJ) 和通过在 NHS-活化的 sepharose 柱 (GE 医疗集团,普林斯顿, NJ) 上共价偶联绵羊 IgG 生成的 sepharose 结合的绵羊 IgG 柱进行亲和层析以纯化血清 IgG。

[0099] 预致敏随后用 NTS 处理,可以诱导小鼠 IgG2b 抗-绵羊 IgG 抗体 (神经营养因子

NTN 免疫的)。Kaneko Y. 等人., Exp. Med., 203 :789 (2006)。小鼠 IgG2b 抗体与 NTS 抗体一起沉积于肾小球中,并导致由 IgG2b 介导的浸润巨噬细胞上 Fc γ RIV 的活化所造成的急性和重症炎症反应。在不预致敏的情况下,没有观察到炎症,表明小鼠 IgG2b 抗-绵羊 IgG 抗体是该炎症反应的介质。

[0100] 为了检测导致促炎症 IgG 的主动免疫与唾液酸化的变化是否密切相关,通过 SNA 凝集素结合鉴定取自预免疫小鼠以及 NTS 免疫小鼠的血清 IgG 和 IgM 的唾液酸含量、图 10A,B,C)。与未免疫对照相比,接受免疫的小鼠中总 IgG 唾液酸化平均降低 40%。该效应是 IgG 特异的,IgM 的唾液酸化在免疫前与免疫后相同。这种唾液酸化的不同在分析小鼠血清中绵羊特异的 IgG 组分时更加明显,显示与免疫前的 IgG 相比,唾液酸化降低 50-60%。(图 10B)

[0101] 这些结果经 MALDI-TOF-MS 分析而证实。单糖组成分析由加州大学圣地亚哥分校 (UCSD) 糖技术核心资源中心 (San Diego, CA) 完成。糖蛋白样品经 SDS 和 2-巯基乙醇变性,并经糖苷酶 PNGase F. 消化。释放出来的混合的 N-聚糖经反相 HPLC 和固相萃取纯化,继而暴露的 N-聚糖的羟基被甲基化。得到的糖衍生物再次经反相 HPLC 纯化,并用 MALDI-TOF-MS 分析

[0102] 免疫前和免疫后 IgG 的分析证实 N-糖结构的改变对于末端的唾液酸配基是特异的(图 10C)。先前显示负责征集 (engagement) 带有 Fc γ RIV 的浸润性巨噬细胞的,沉积于肾小球的小鼠 IgG2b 抗-绵羊抗体呈现与预免疫对照相比降低的唾液酸含量(图 10D)。

[0103] 本文中所引用的所有专利的和非专利的出版物都并入本文,其引用程度如同每个专利的和非专利的出版物以参考其全文的方式并入本文。另外,尽管本发明参考特定的实施例和实施方式而描述,应理解为这些实施例和实施方式仅仅是本发明的原理和应用的例证。因此应理解可以对于示例性的实施方式进行大量的修饰,并且可以设计其他的安排而不偏离如下面的权利要求所定义的本发明的主旨和范围。

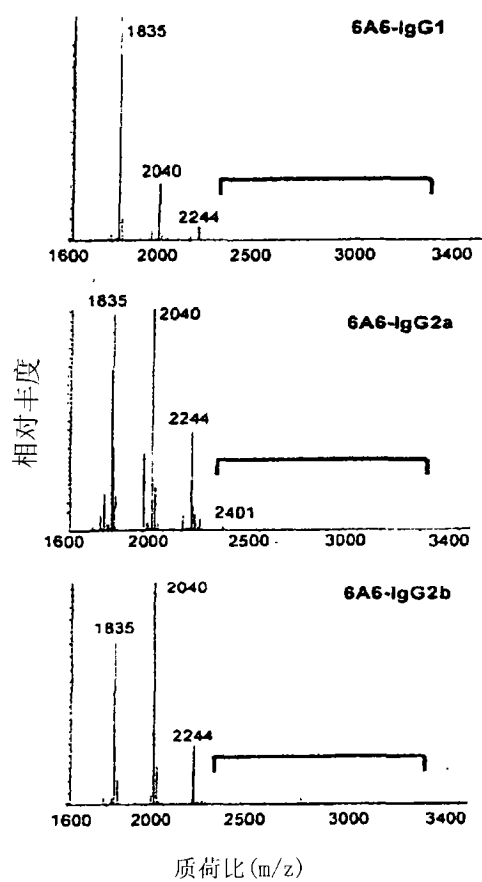


图 1

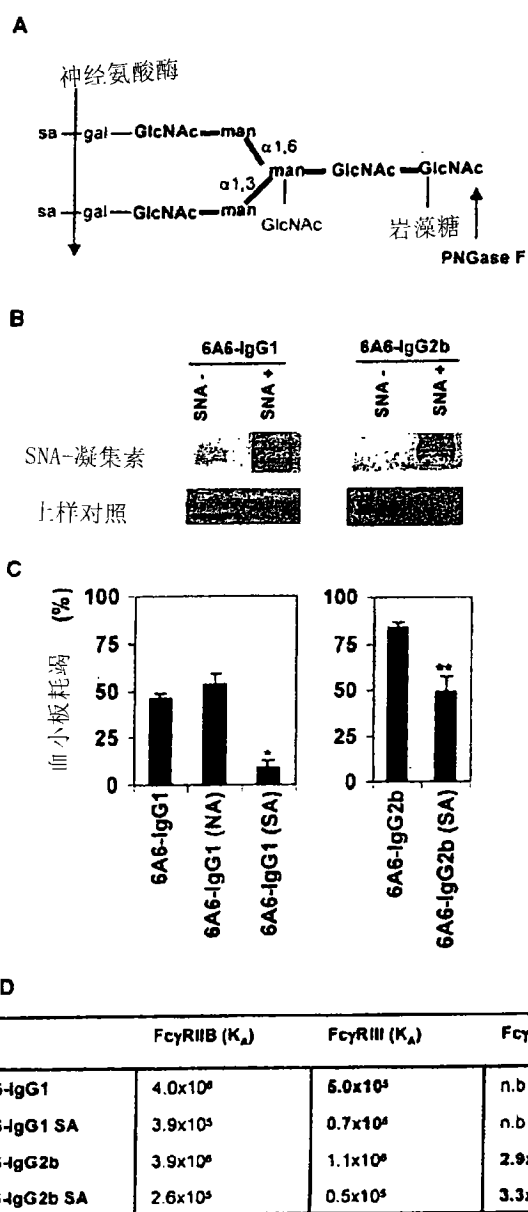


图 2

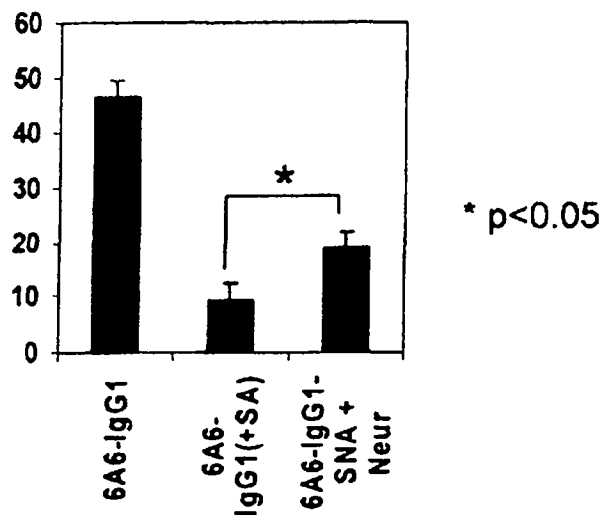
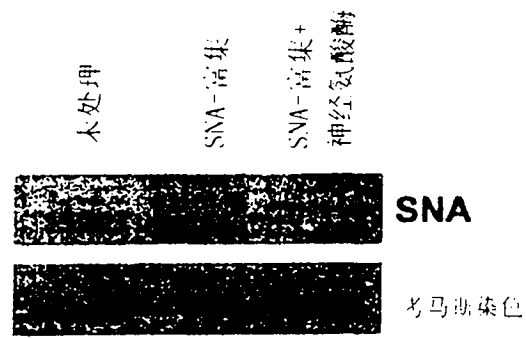


图 3

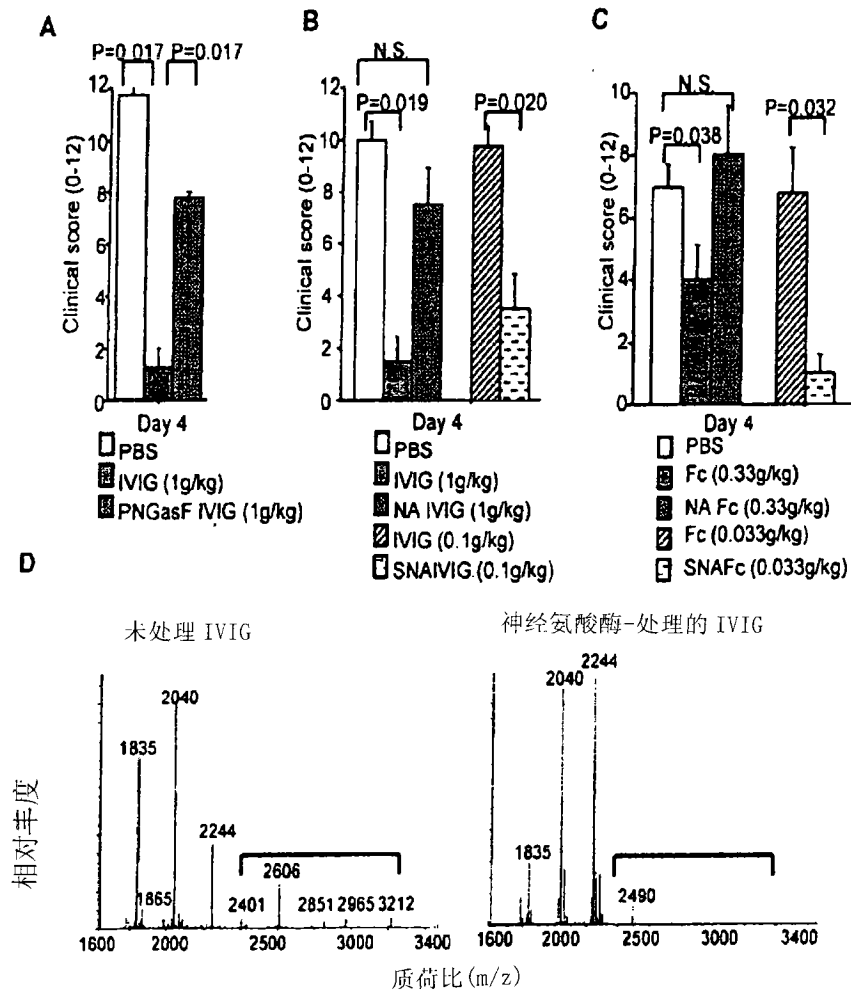


图 4

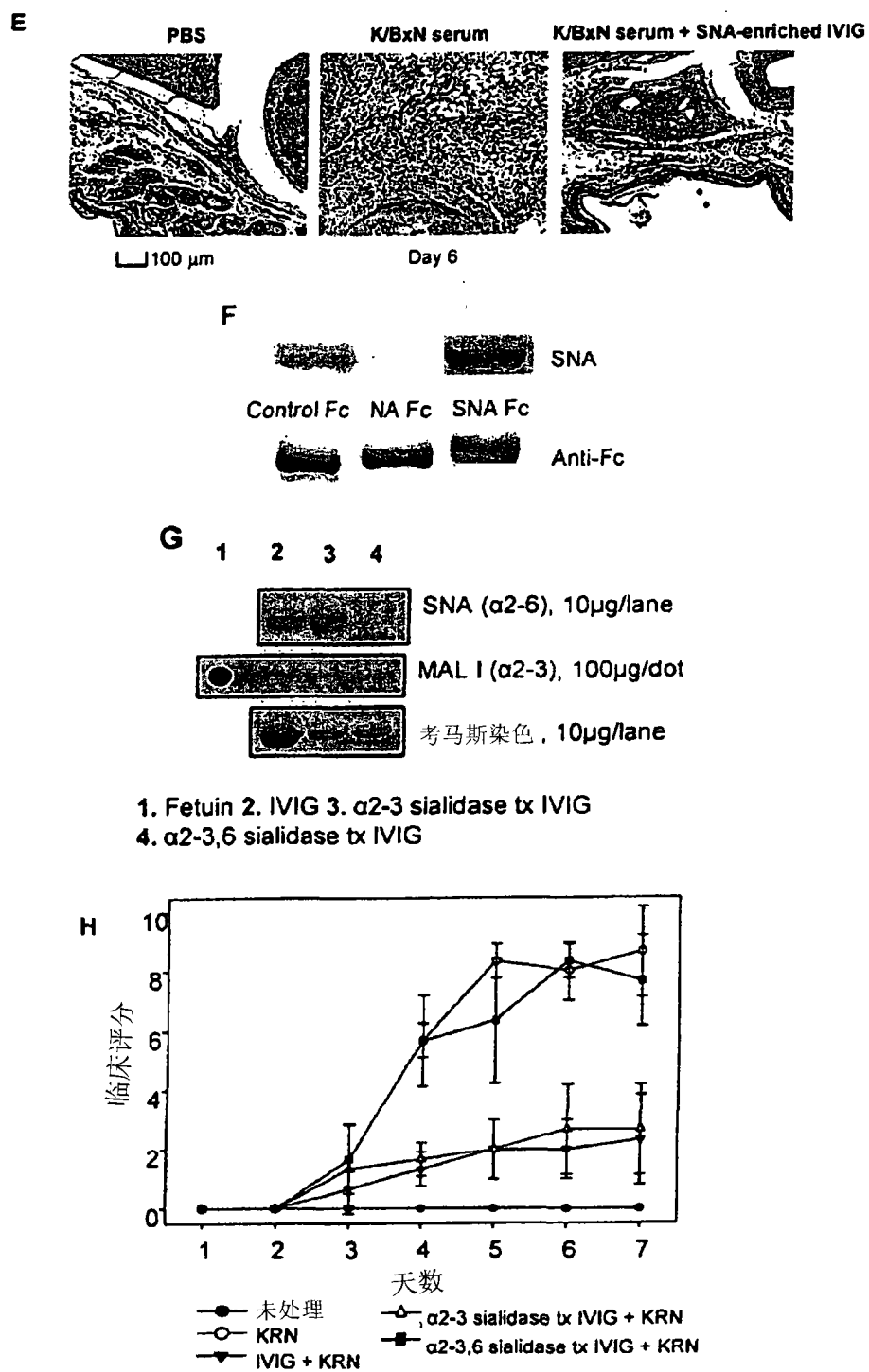


图 4

质荷比(m/z) (人/鼠)	组 成
1835/1835	GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
1865/1865	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2040/2040	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
2070/2070	Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂
2244/2244	Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
2401	Neu5AcGalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
2432	Neu5GcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
2490/2490	Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ (GlcNAc)GlcNAc ₂ Fuc
2606	Neu5AcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
2637	Neu5GcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
2851	Neu5AcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ (GlcNAc)GlcNAc ₂ Fuc
2882	Neu5GcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ (GlcNAc)GlcNAc ₂ Fuc
2965	Neu5Ac ₂ Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
3028	Neu5Gc ₂ Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc
3212	Neu5Ac ₂ Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ (GlcNAc)GlcNAc ₂ Fuc
3275	Neu5Gc ₂ Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ (GlcNAc)GlcNAc ₂ Fuc

图 5

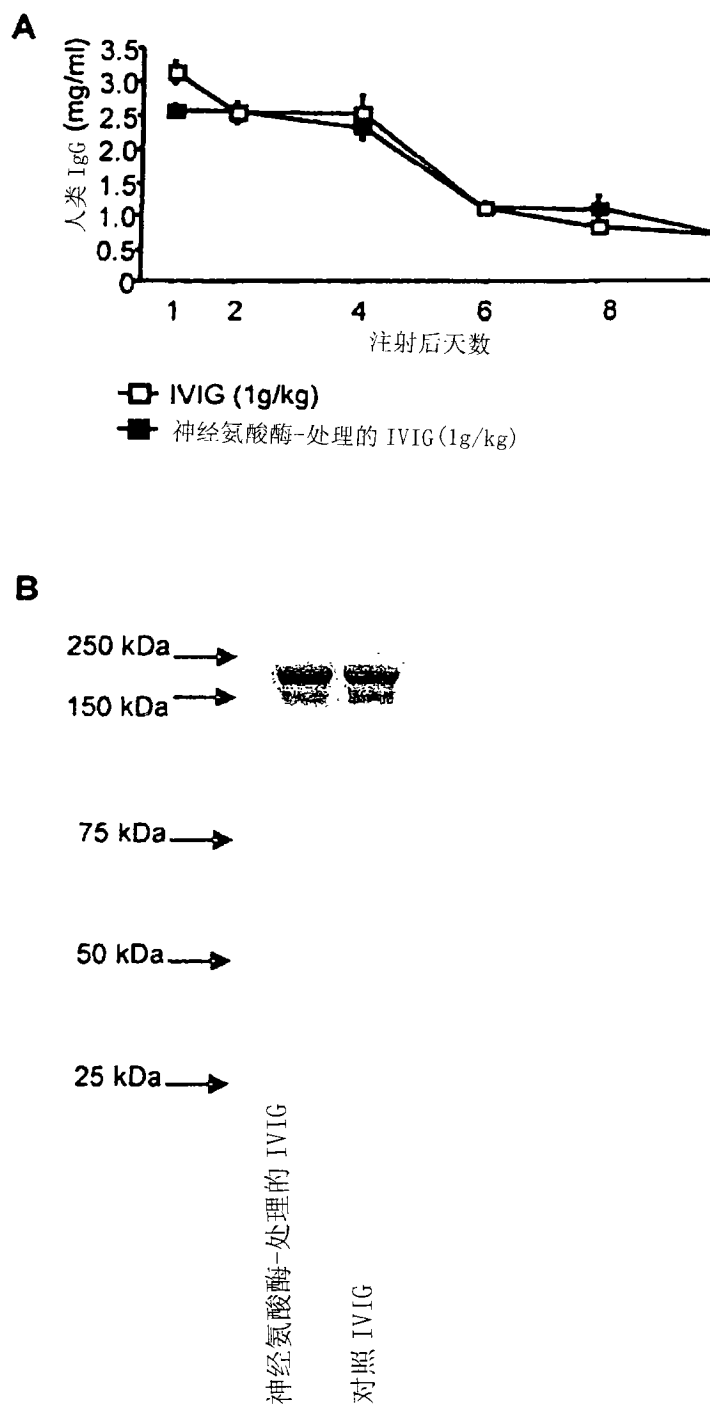


图 6

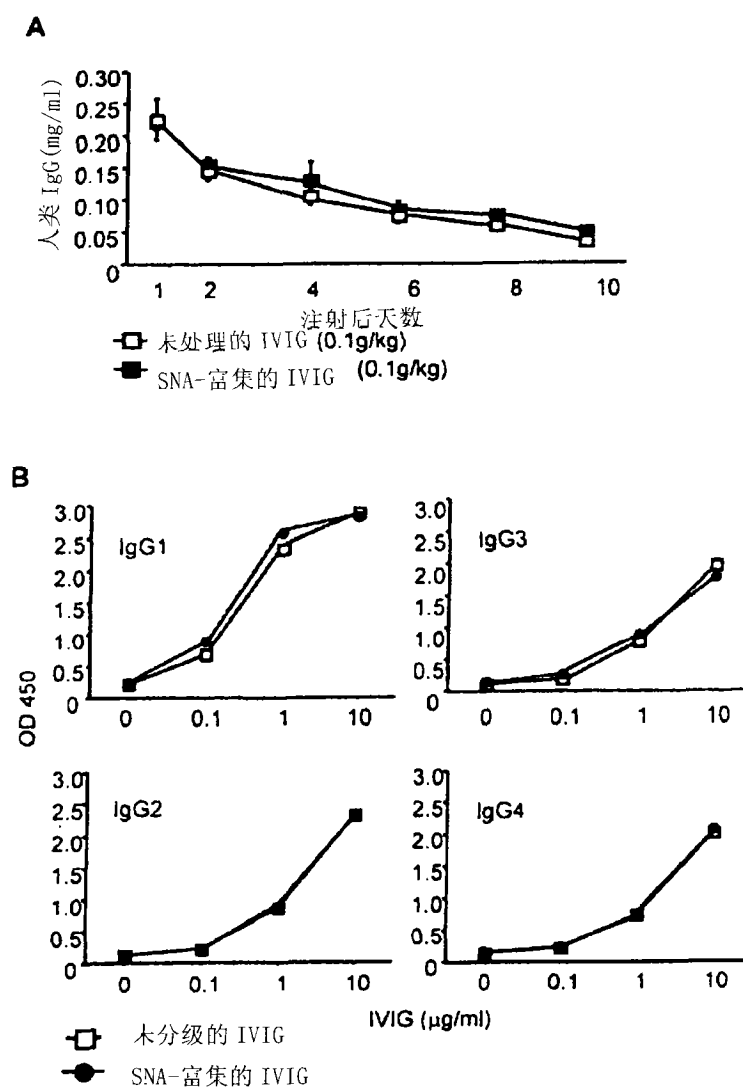


图 7

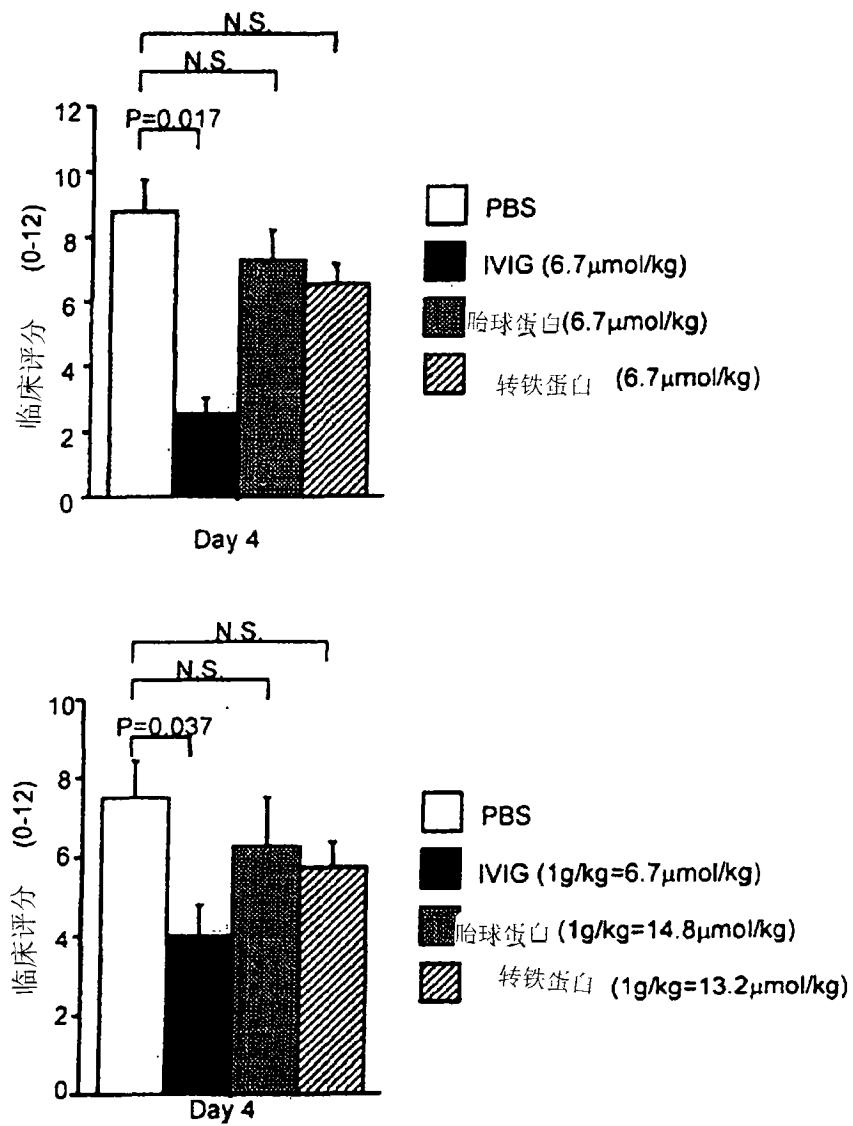


图 8

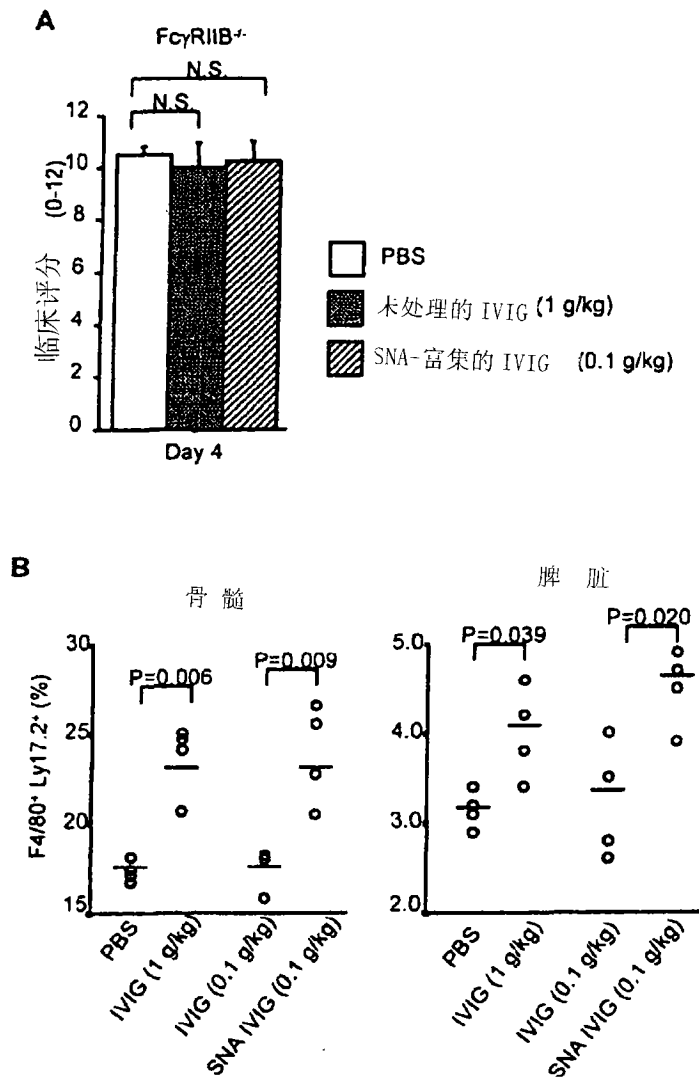


图 9

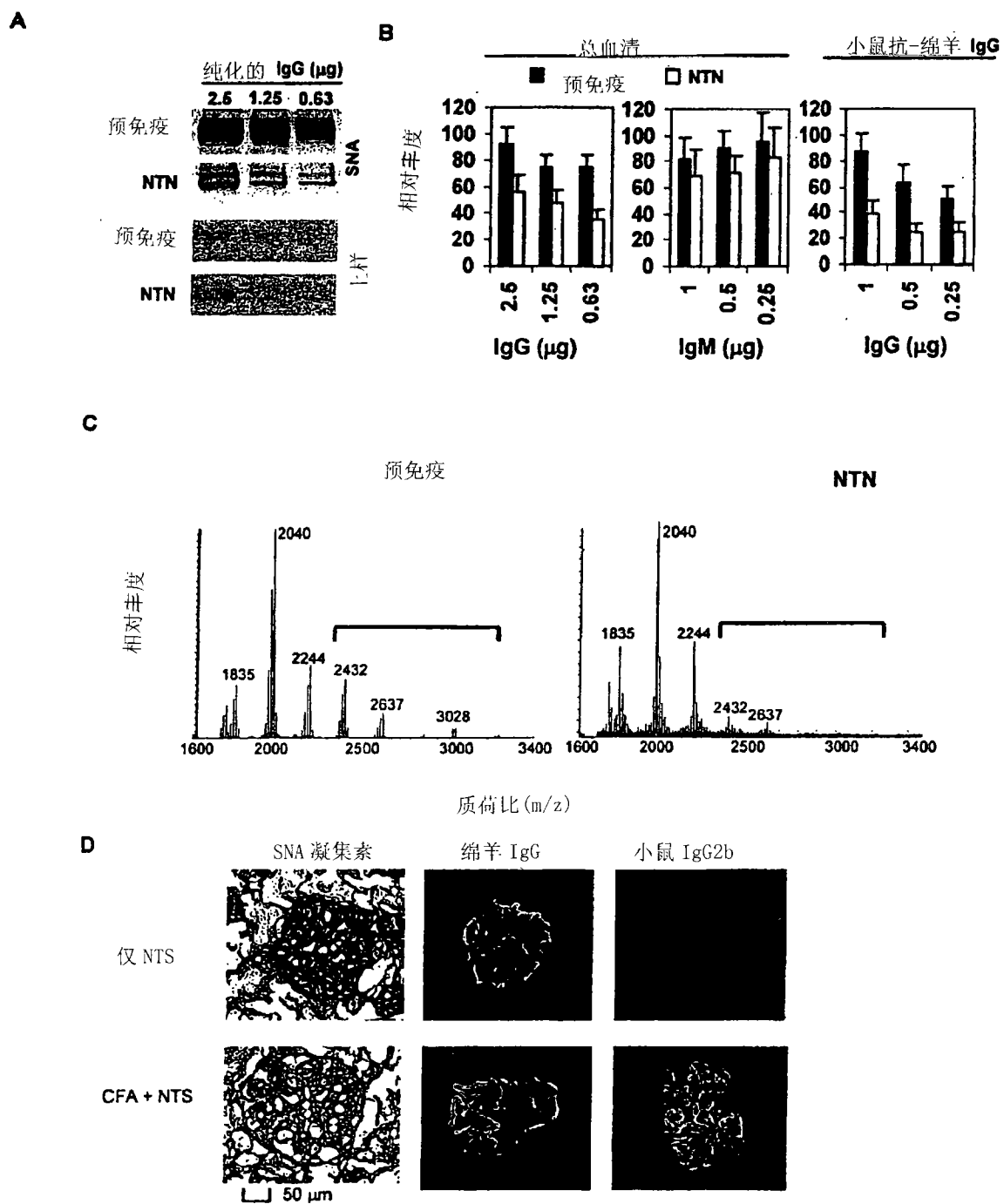


图 10