

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480007564.2

[51] Int. Cl.

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月19日

[11] 公开号 CN 1761746A

[22] 申请日 2004.1.22

[21] 申请号 200480007564.2

[30] 优先权

[32] 2003. 1. 22 [33] US [31] 60/441,307

[32] 2003. 7. 31 [33] US [31] 60/491,254

[32] 2003. 8. 15 [33] US [31] 60/495,142

[86] 国际申请 PCT/IB2004/000844 2004.1.22

[87] 国际公布 WO2004/065540 英 2004.8.5

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.20

[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 P·乌马纳 P·布林克

C·费拉拉 T·苏特尔

[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 赵艳华

权利要求书 24 页 说明书 125 页 附图 43 页

[54] 发明名称

融合构建体及其用来生产 Fc 受体结合亲和性和效应子功能提高的抗体的用途

[57] 摘要

本发明涉及蛋白质糖基化工程领域。更特别地，本发明涉及核酸分子，包括融合构建体，其具有催化活性及其在宿主细胞的糖基化工程中的用途以产生带有增强的治疗特性，包括抗体带有增强的 Fc 受体结合和增强的效应物作用的多肽。

1. 含有编码融合多肽序列的分离的核酸，其中所述的融合多肽具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性并含有高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

2. 根据权利要求 1 的分离的核酸，其中所述融合多肽含有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

3. 根据权利要求 2 的分离的核酸，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

4. 根据权利要求 3 的分离的核酸，具有图 24 和 SEQ ID NO: 14 中所示的核苷酸序列。

5. 根据权利要求 2 的分离的核酸，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

6. 根据权利要求 5 的分离的核酸，具有图 25 和 SEQ ID NO: 12 中所示的核苷酸序列。

7. 根据权利要求 2 的分离的核酸，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

8. 根据权利要求 2 的分离的核酸，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

9. 根据权利要求 2 的分离的核酸，其中所述高尔基体定位结构域是 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

10. 根据权利要求 3 的分离的核酸，含有编码具有图 24 和 SEQ ID NO: 15 中所示氨基酸序列的多肽的序列。

11. 根据权利要求 5 的分离的核酸，含有编码具有图 25 和 SEQ ID NO: 13 中所示氨基酸序列的多肽的序列。

12. 根据权利要求 3 的分离的核酸，含有在严格条件下和杂交探针杂交的序列，探针的核苷酸序列由图 24 和 SEQ ID NO: 14 中所示的核苷酸序列构成。

13. 根据权利要求5的分离的核酸，含有在严格条件下和杂交探针杂交的序列，探针核苷酸序列由图25和SEQ ID NO:12中所示的核苷酸序列构成。

14. 根据权利要求3的分离的核酸，含有和图24和SEQ ID NO:14中所示核苷酸序列至少80%相同的序列。

15. 根据权利要求5的分离的核酸，含有和图25和SEQ ID NO:12中所示核苷酸序列至少80%相同的序列。

16. 根据权利要求3的分离的核酸，含有编码多肽的序列，该多肽具有和图24和SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。

17. 根据权利要求5的分离的核酸，含有编码多肽的序列，该多肽具有和图25和SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。

18. 根据权利要求3的分离的核酸，含有编码多肽的序列，该多肽具有保守氨基酸替代的图24和SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求5的分离的核酸，含有编码多肽的序列，该多肽具有保守氨基酸替代的图25和SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列。

20. 表达载体，含有根据权利要求1-19任一项中的分离的核酸。

21. 融合多肽，具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III活性或 β (1,4)-半乳糖基转移酶活性并含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

22. 根据权利要求21的融合多肽，含有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III或 β (1,4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

23. 根据权利要求21的融合多肽，其中高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶II的定位结构域。

24. 根据权利要求21的融合多肽，其中高尔基体定位结构域是 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶I的定位结构域。

25. 根据权利要求21的融合多肽，其中高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶I的定位结构域。

26. 根据权利要求 21 的融合多肽, 其中高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

27. 根据权利要求 21 的融合多肽, 其中高尔基体定位结构域是 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

28. 含有权利要求 20 的表达载体的宿主细胞。

29. 生产具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性的融合多肽的方法, 包括在允许编码所述融合多肽的所述核酸表达的条件下在培养基中培养权利要求 28 的宿主细胞, 并从所得培养物中收集所述融合多肽。

30. 修饰宿主细胞产生的多肽的糖基化形式的方法, 包括将权利要求 1-19 任一的核酸引入所述宿主细胞中。

31. 修饰宿主细胞产生的多肽的糖基化形式的方法, 包括将权利要求 20 的表达载体引入所述宿主细胞中。

32. 根据权利要求 30 或 31 的方法, 其中所述多肽是 IgG 或其片段。

33. 根据权利要求 32 的方法, 其中所述多肽是 IgG1 或其片段。

34. 根据权利要求 32 的方法, 其中所述多肽是融合蛋白, 该融合蛋白包括等价于人 IgG Fc 区的片段。

35. 宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性的融合多肽的核酸, 表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 片段中的寡糖, 其中所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白, 该融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的片段。

36. 权利要求 35 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽是 IgG 或其片段。

37. 权利要求 35 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽是 IgG1 或其片段。

38. 权利要求 35 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽是融合蛋白, 该融合蛋白包括等价于人 IgG Fc 区的片段。

39. 权利要求 35 的宿主细胞, 其中作为所述修饰的结果所述宿主

细胞产生的所述多肽呈现提高的 Fc 受体结合亲和性。

40. 权利要求 35 的宿主细胞，其中作为所述修饰的结果所述宿主细胞产生的所述多肽呈现提高的效应子功能。

41. 根据权利要求 35 的宿主细胞，其中所述融合多肽含有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

42. 根据权利要求 41 的宿主细胞，其中所述融合多肽进一步包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

43. 根据权利要求 42 的宿主细胞，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

44. 根据权利要求 42 的宿主细胞，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

45. 根据权利要求 42 的宿主细胞，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

46. 根据权利要求 42 的宿主细胞，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

47. 根据权利要求 42 的宿主细胞，其中所述高尔基体定位结构域是 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

48. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是提高的 Fc 介导的细胞毒性。

49. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和 NK 细胞结合的提高。

50. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和巨噬细胞结合的提高。

51. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和多形核细胞结合的提高。

52. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和单核细胞结合的提高。

53. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是

诱导凋亡的直接信号的提高。

54. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是树突细胞成熟的提高。

55. 根据权利要求 40 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是 T 细胞致敏的提高。

56. 根据权利要求 39 的宿主细胞，其中所述 Fc 受体是 Fc γ 活化受体。

57. 根据权利要求 39 的宿主细胞，其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIA 受体。

58. 根据权利要求 35 的宿主细胞，其中所述宿主细胞是 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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。

59. 权利要求 35 的宿主细胞，其中所述宿主细胞产生的所述多肽是抗 CD20 抗体。

60. 权利要求 59 的宿主细胞，其中所述抗 CD20 抗体是 IDEC-C2B8。

61. 权利要求 35 的宿主细胞，其中所述宿主细胞产生的所述多肽是嵌合抗人肾细胞癌单克隆抗体 chG250。

62. 权利要求 35 的宿主细胞，进一步包括至少一种截短的 (transected) 核酸，该核酸编码抗体分子和抗体片段或融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的片段。

63. 权利要求 35 的宿主细胞，其中所述至少一种编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性的融合多肽的核酸是可操作地和组成型启动子元件连接。

64. 权利要求 62 的宿主细胞，其中所述至少一所截短的核酸编码抗 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、肺和乳癌单克隆抗体 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，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, 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 核蛋白抗体, 抗人异常糖基化 MUC1 抗体, 对抗含有 ED-B 结构域的人纤连蛋白变体的抗体或抗人 HER2/neu 抗体。

65. 在宿主细胞中生产多肽的方法, 包括:

a. 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性的融合多肽的核酸, 所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白, 该融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的片段, 其中所述融合多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖; 和

b. 分离所述多肽。

66. 根据权利要求 65 的方法, 其中所述融合多肽包括 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

67. 根据权利要求 65 的方法, 其中所述融合多肽进一步包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

68. 根据权利要求 67 的方法, 其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

69. 根据权利要求 67 的方法, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

70. 根据权利要求 67 的方法, 其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

71. 根据权利要求 67 的方法, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

72. 根据权利要求 67 的方法, 其中所述高尔基体定位结构域是 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

73. 根据权利要求 65 的方法, 其中作为所述修饰的结果所述多肽

具有提高的效应子功能。

74. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是提高的 Fc 介导的细胞毒性。

75. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是和 NK 细胞结合的提高。

76. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是和巨噬细胞结合的提高。

77. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是和单核细胞结合的提高。

78. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是和多形核细胞结合的提高。

79. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是诱导凋亡的直接信号的提高。

80. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是树突细胞成熟的提高。

81. 根据权利要求 73 的方法，其中所述提高的效应子功能是 T 细胞致敏的提高。

82. 根据权利要求 65 的方法，其中作为所述修饰的结果所述宿主细胞产生的所述多肽呈现提高的 Fc 受体结合亲和性。

83. 根据权利要求 82 的方法，其中所述 Fc 受体是 Fc 活化受体。

84. 根据权利要求 82 的方法，其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIA 受体。

85. 根据权利要求 65 的方法，其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的二等分的寡糖。

86. 根据权利要求 65 的方法，其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的非岩藻糖基化寡糖。

87. 根据权利要求 86 的方法，其中所述非岩藻糖基化寡糖是杂合的。

88. 根据权利要求 86 的方法，其中所述非岩藻糖基化寡糖是复合的。

89. 根据权利要求 65 的方法, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的二等分、非岩藻糖基化寡糖。

90. 根据权利要求 89 的方法, 其中所述的二等分非岩藻糖基化寡糖是杂合的。

91. 根据权利要求 89 的方法, 其中所述的二等分非岩藻糖基化寡糖是复合的。

92. 根据权利要求 89 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 20% 是二等分非岩藻糖基化的。

93. 根据权利要求 89 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 25% 是二等分非岩藻糖基化的。

94. 根据权利要求 89 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 30% 是二等分非岩藻糖基化的。

95. 根据权利要求 89 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 35% 是二等分非岩藻糖基化的。

96. 根据权利要求 65-96 任一方法产生的工程化具有提高效应子功能的抗体。

97. 根据权利要求 65-96 任一方法产生的工程化具有提高 Fc 受体结合亲和性的抗体。

98. 根据权利要求 97 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是提高的 Fc 介导的细胞毒性。

99. 根据权利要求 97 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是和 NK 细胞结合的提高。

100. 根据权利要求 97 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是和巨噬细胞结合的提高。

101. 根据权利要求 97 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是和单核细胞结合的提高。

102. 根据权利要求 97 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是和多形核细胞结合的提高。

103. 根据权利要求 97 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是诱导

凋亡的直接信号的提高。

104. 根据权利要求 97 的抗体，其中所述提高的效应子功能是树突细胞成熟的提高。

105. 根据权利要求 97 的抗体，其中所述提高的效应子功能是 T 细胞致敏的提高。

106. 根据权利要求 98 的抗体，其中所述 Fc 受体是 Fc 活化受体。

107. 根据权利要求 98 的抗体，其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIa 受体。

108. 通过权利要求 65-96 任一方法产生的含有 Fc 区和工程化具有提高效应子功能的抗体片段。

109. 通过权利要求 65-96 任一方法产生的包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域和工程化具有提高效应子功能的融合蛋白。

110. 通过权利要求 65-96 任一方法产生的含有 Fc 区和工程化具有提高 Fc 受体结合亲和性的抗体片段。

111. 通过权利要求 65-96 任一方法产生的包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域和工程化具有提高 Fc 受体结合亲和性的融合蛋白。

112. 包括权利要求 97-108 任一项的抗体和药物学上可接受载体的药物组合物。

113. 包括权利要求 109 或权利要求 111 的抗体片段和药物学上可接受载体的药物组合物。

114. 包括权利要求 110 或权利要求 112 的融合蛋白和药物学上可接受载体的药物组合物。

115. 治疗癌症的方法，包括将治疗有效量的权利要求 113-115 任一药物组合物给药于需要的患者。

116. 基于 B 细胞耗尽来治疗疾病的改进方法，包括将治疗有效量的抗体给药于需要的人类受试者，所述的改进包括给药治疗有效量的权利要求 65-96 任一方法产生的抗体。

117. 权利要求 117 的改进方法，其中所述抗体是抗 CD20 单克隆抗体。

118. 权利要求 118 的改进方法,其中所述抗 CD20 抗体是 IDEC-C2B8。

119. 包括编码融合多肽的序列的分离的核酸,其中所述融合多肽具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性并包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

120. 根据权利要求 119 的分离的核酸,其中所述融合多肽含有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

121. 根据权利要求 2 的分离核酸,其中高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

122. 含有根据权利要求 119-121 任一分离核酸的表达载体。

123. 具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性并包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。

124. 根据权利要求 123 的融合多肽,包括 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

125. 根据权利要求 124 的融合多肽,其中高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

126. 含有权利要求 122 的表达载体的宿主细胞。

127. 生产具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性的融合多肽的方法,包括在允许编码所述融合多肽的所述核酸表达的条件下在培养基中培养权利要求 126 的宿主细胞,和从所得培养物中收集所述融合多肽。

128. 修饰宿主细胞产生的多肽的糖基化形式的方法,包括将权利要求 119-121 任一核酸引入所述宿主细胞中。

129. 修饰宿主细胞产生的多肽的糖基化形式的方法,包括将权利要求 122 的表达载体引入所述宿主细胞中。

130. 宿主细胞,包括:

(a) 含有编码融合多肽的核酸分子的表达载体,其中所述融合多肽具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性和包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域; 和

(b) 含有编码多肽的核酸分子的表达载体,其中所述多肽具有甘露糖苷酶 II (ManII) 活性。

131. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中编码所述融合多肽的所述核酸分子和编码所述具有甘露糖苷酶 II 活性的多肽的所述核酸分子在同一表达载体上。

132. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中编码所述融合多肽的所述核酸分子和编码所述具有甘露糖苷酶 II 活性的多肽的所述核酸分子在分开的表达载体上。

133. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述融合多肽含有 GnTIII 的催化结构域。

134. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 ManII 的定位结构域。

135. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

136. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

137. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

138. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 α 1, 6-N 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

139. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。

140. 权利要求 130 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 骨髓瘤细胞、P3X63 小鼠骨髓瘤细胞、PER 细胞、PER.C6 细胞和杂交瘤细胞。

141. 权利要求 130 的宿主细胞, 进一步包括含有编码多肽的核酸分子的表达载体, 其中所述多肽具有 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II (GnTII) 活性。

142. 权利要求 141 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子、所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

143. 权利要求 141 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子、所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在分开的表达载体上。

144. 权利要求 141 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子在一个表达载体上, 所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

145. 权利要求 141 的宿主细胞, 其中所述编码 ManII 的核酸分子在一个表达载体上, 所述编码融合多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

146. 权利要求 141 的宿主细胞, 其中所述编码所述 GnTII 的核酸分子在一个表达载体上, 所述编码融合多肽的核酸分子和所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

147. 宿主细胞, 包括:

(a) 含有编码融合多肽的核酸分子的表达载体, 其中所述融合多肽具有 β (1, 4) 半乳糖基转移酶 (GalT) 活性和包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域; 和

(b) 含有编码多肽的核酸分子的表达载体, 其中所述多肽具有甘露糖苷酶 II (ManII) 活性。

148. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子和所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

149. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子和所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在分开的表达载体上。

150. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述融合多肽含有 GalT 的催化结构域。

151. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 ManII 的定位结构域。

152. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

153. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是

β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

154. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

155. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 α 1, 6-N 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

156. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。

157. 权利要求 147 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 骨髓瘤细胞、P3X63 小鼠骨髓瘤细胞、PER 细胞、PER.C6 细胞和杂交瘤细胞。

158. 权利要求 147 的宿主细胞, 进一步包括含有编码多肽的核酸分子的表达载体, 其中所述多肽具有 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II (GnTII) 活性。

159. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子、所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

160. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子、所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在分开的表达载体上。

161. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述编码融合多肽的核酸分子在一个表达载体上, 所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

162. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述编码 ManII 的核酸分子在一个表达载体上, 所述编码融合多肽的核酸分子和所述编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

163. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述编码所述 GnTII 的核酸分子在一个表达载体上, 所述编码融合多肽的核酸分子和所述编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

164. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述融合多肽包括 GalT 的催

化结构域。

165. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 ManII 的定位结构域。

166. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

167. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

168. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

169. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述高尔基体定位结构域是 α 1, 6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

170. 权利要求 158 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。

171. 权利要求 159 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞选自 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 骨髓瘤细胞、P3X63 小鼠骨髓瘤细胞、PER 细胞、PER.C6 细胞和杂交瘤细胞。

172. 宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一个编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸和至少一个编码具有 ManII 活性的多肽的核酸, 表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 片段中的寡糖, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区域的区域。

173. 宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一个编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸、至少一个编码具有 ManII 活性的多肽的核酸和至少一个编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸, 表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 片段中的寡糖, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区域的区域。

174. 宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一个编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸和至少一个编码具有 ManII 活性的多肽的核酸,

表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 区域中的寡糖，其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区域的区域。

175. 宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸、至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸和至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，该融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

176. 根据权利要求 172-175 任一项的宿主细胞，其中作为所述修饰的结果所述宿主细胞产生的所述多肽呈现提高的 Fc 受体结合亲和性。

177. 根据权利要求 172-175 的宿主细胞，其中作为所述修饰的结果所述宿主细胞产生的所述多肽呈现提高的效应子功能。

178. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是提高的 Fc 介导的细胞毒性。

179. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和 NK 细胞结合的提高。

180. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和巨噬细胞结合的提高。

181. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和多形核细胞结合的提高。

182. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和单核细胞结合的提高。

183. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是诱导凋亡的直接信号的提高。

184. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和树突细胞成熟提高。

185. 根据权利要求 177 的宿主细胞，其中所述提高的效应子功能是和 T 细胞致敏提高。

186. 在宿主细胞中生产多肽的方法，包括：

a. 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，该融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述融合多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖；和

b. 分离所述多肽。

187. 权利要求 186 的方法，其中所述宿主细胞进一步工程化来表达至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸。

188. 根据权利要求 186 或 187 的方法，其中所述融合多肽包括 GnTIII 的催化结构域。

189. 根据权利要求 188 的方法，其中所述融合多肽进一步包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

190. 根据权利要求 189 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

191. 根据权利要求 189 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

192. 根据权利要求 189 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

193. 根据权利要求 189 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

194. 根据权利要求 189 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

195. 根据权利要求 186 的方法，其中作为所述修饰的结果所述多肽具有提高的效应子功能。

196. 在宿主细胞中生产多肽的方法，包括：

a. 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有

ManII 活性的多肽的核酸，所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，该融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述融合多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖；和

b. 分离所述多肽。

197. 根据权利要求 197 的方法，其中所述宿主细胞进一步工程化来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸。

198. 根据权利要求 196 或 197 的方法，其中所述融合多肽包括 GalT 的催化结构域。

199. 根据权利要求 198 的方法，其中所述融合多肽进一步包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。

200. 根据权利要求 199 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。

201. 根据权利要求 199 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域。

202. 根据权利要求 199 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 I 的定位结构域。

203. 根据权利要求 199 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域。

204. 根据权利要求 199 的方法，其中所述高尔基体定位结构域是 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

205. 根据权利要求 199 的方法，其中作为所述修饰的结果所述多肽具有提高的效应子功能。

206. 根据权利要求 186 或 196 的方法，其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的二等分非岩藻糖基化寡糖。

207. 根据权利要求 206 的方法，其中所述二等分非岩藻糖基化寡糖是杂合的。

208. 根据权利要求 206 的方法，其中所述二等分非岩藻糖基化寡糖是复合的。

209. 根据权利要求 206 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 20% 是二等分非岩藻糖基化的。

210. 根据权利要求 206 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 25% 是二等分非岩藻糖基化的。

211. 根据权利要求 206 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 30% 是二等分非岩藻糖基化的。

212. 根据权利要求 206 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 35% 是二等分非岩藻糖基化的。

213. 根据权利要求 196-212 任一方法产生的工程化具有提高效应子功能的抗体。

214. 包括权利要求 213 的抗体和药物学上可接受载体的药物组合物。

215. 治疗癌症的方法, 包括将治疗有效量的权利要求 214 的药物组合物给药于需要的患者。

216. 在宿主细胞中生产具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的多肽的方法, 包括:

a. 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一种编码 GalT 的核酸和至少一种编码 ManII 的核酸, 所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段, 该抗体片段包括免疫球蛋白 Fc 区, 其中 GalT 或 ManII 中的一个或两个的表达水平足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖, 且作为所述修饰的结果其中所述多肽具有提高的 Fc 介导的细胞毒性; 和

b. 分离所述的具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的多肽。

217. 权利要求 216 的方法, 其中步骤 (a) 中, 所述宿主细胞包括至少一种编码整个抗体的核酸。

218. 权利要求 216 的方法, 其中步骤 (a) 中, 所述宿主细胞包括至少一种编码抗体片段的核酸。

219. 权利要求 216 的方法, 其中 GalT 的表达水平产生了具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的抗体分子或包括免疫球蛋白 Fc 区的抗体片段。

220. 权利要求 216 的方法, 其中所述宿主细胞进一步包括至少一种编码 GnTIII 的核酸, 其中所述 GnTIII 的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖, 且作为所述修饰的结果其中所述多肽具有提高的 Fc 介导的细胞毒性。

221. 权利要求 216 或 220 任一的方法, 其中 GalT、ManII 或 GnTIII 中的一个或多个的表达水平足以在所述多肽 Fc 区中形成二等分寡糖。

222. 权利要求 221 的方法, 其中 Fc 区中二等分寡糖对 Fc 区中全部寡糖的比例至少为 45%。

223. 权利要求 221 的方法, 其中所述二等分寡糖是复合的。

224. 权利要求 221 的方法, 其中所述二等分寡糖是杂合的。

225. 权利要求 216 或 220 任一的方法, 其中所述宿主细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。

226. 权利要求 225 的方法, 其中所述宿主细胞是植物细胞。

227. 权利要求 216 或 220 的任一方法, 其中所述宿主细胞选自 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 骨髓瘤细胞、P3X63 小鼠骨髓瘤细胞、PER 细胞、PER.C6 细胞和杂交瘤细胞。

228. 在宿主细胞中生产多肽的方法, 包括:

a. 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞, 该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 α 甘露糖苷酶 II 活性的多肽的核酸, 所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白, 该融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域, 其中所述具有 α 甘露糖苷酶 II 活性的多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖; 和

b. 分离所述宿主细胞产生的所述多肽。

229. 根据权利要求 228 的方法, 其中作为所述修饰的结果所述宿主细胞产生的所述多肽具有提高的效应子功能。

230. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是提高的 Fc 介导的细胞毒性。

231. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是和 NK 细胞结合的提高。

232. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是和巨噬细胞结合的提高。

233. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是和多形核细胞结合的提高。

234. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是和单核细胞结合的提高。

235. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是诱导凋亡的直接信号的提高。

236. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是树突细胞成熟的提高。

237. 根据权利要求 229 的方法, 其中所述提高的效应子功能是 T 细胞致敏的提高。

238. 根据权利要求 228 的方法, 其中作为所述修饰的结果所述宿主细胞产生的所述多肽呈现了提高的 Fc 受体结合。

239. 根据权利要求 238 的方法, 其中所述 Fc 受体是 Fc γ 活化受体。

240. 根据权利要求 238 的方法, 其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIA 受体。

241. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞是 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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。

242. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽是抗 CD20 抗体。

243. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述抗 CD20 抗体是 IDEC-C2B8。

244. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽是嵌合抗人肾细胞癌单克隆抗体 chG250。

245. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞进一步包括至少一种截短的 (transected) 核酸, 该截短的 (transected) 核酸编码抗体分子和抗体片段或融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

246. 根据权利要求 245 的方法, 其中所述的至少一种截短 (transected) 核酸分子编码抗 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、肺和乳癌单克隆抗体 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癌肿瘤抗体 A33, 抗 GD3 神经节苷脂 R24 的抗人黑素瘤抗体, 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, 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 核蛋白抗体, 抗人异常糖基化 MUC1 抗体, 对抗含有 ED-B 结构域的人纤连蛋白变体抗体, 抗人 TAG-72 抗体或抗人 HER2/neu 抗体。

247. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的二等分寡糖。

248. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的非岩藻糖基化寡糖。

249. 根据权利要求 248 的方法, 其中所述非岩藻糖基化寡糖是杂合的。

250. 根据权利要求 248 的方法, 其中所述非岩藻糖基化寡糖是复合的。

251. 根据权利要求 228 的方法, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽在所述多肽 Fc 区中具有提高比例的二等分非岩藻糖基化寡糖。

252. 根据权利要求 251 的方法, 其中所述的二等分非岩藻糖基化寡糖是杂合的。

253. 根据权利要求 251 的方法, 其中所述的二等分非岩藻糖基化寡糖是复合的。

254. 根据权利要求 248 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 20%是非岩藻糖基化的。

255. 根据权利要求 248 的方法, 其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少

25%是非岩藻糖基化的。

256. 根据权利要求 248 的方法，其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 30%是非岩藻糖基化的。

257. 根据权利要求 248 的方法，其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 35%是非岩藻糖基化的。

258. 根据权利要求 248 的方法，其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 40%是非岩藻糖基化的。

259. 根据权利要求 248 的方法，其中所述多肽 Fc 区中寡糖的至少 45%是非岩藻糖基化的。

260. 根据权利要求 248 的方法，其中所述多肽 Fc 区中的寡糖至少 48%是非岩藻糖基化的。

261. 根据权利要求 228 方法产生的工程化具有提高效应子功能的抗体。

262. 根据权利要求 228 方法产生的工程化具有提高 Fc 受体结合亲和性的抗体。

263. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是提高的 Fc 介导的细胞毒性。

264. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是和 NK 细胞结合的提高。

265. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是和巨噬细胞结合的提高。

266. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是和单核细胞结合的提高。

267. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是和多形核细胞结合的提高。

268. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是诱导凋亡的直接信号的提高。

269. 根据权利要求 261 的抗体，其中所述提高的效应子功能是树突细胞成熟的提高。

270. 根据权利要求 261 的抗体, 其中所述提高的效应子功能是 T 细胞致敏的提高。

271. 根据权利要求 262 的抗体, 其中所述 Fc 受体是 Fc 活化受体。

272. 根据权利要求 262 的抗体, 其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIa 受体。

273. 权利要求 228 方法产生的含有 Fc 区和工程化具有提高效应子功能的抗体片段。

274. 权利要求 228 方法产生的包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域和工程化具有提高效应子功能的融合蛋白。

275. 权利要求 228 方法产生的含有 Fc 区和工程化具有提高 Fc 受体结合亲和性的抗体片段。

276. 权利要求 228 方法产生的包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域和工程化具有提高 Fc 受体结合亲和性的融合蛋白。

277. 包括权利要求 261-272 任一权利要求的抗体和药理学上可接受载体的药物组合物。

278. 包括权利要求 273 或权利要求 275 的抗体片段和药理学上可接受载体的药物组合物。

279. 包括权利要求 274 或 276 的融合蛋白和药理学上可接受载体的药物组合物。

280. 治疗肿瘤的方法, 包括将治疗有效量的权利要求 277-279 任一药物组合物给药于需要的患者。

281. 基于 B 细胞耗尽来治疗疾病的改进方法, 包括将治疗有效量的抗体给药于需要的人受试者, 改进包括给药治疗有效量的权利要求 228 方法产生的抗体。

282. 权利要求 281 的改进方法, 其中所述抗体是抗 CD20 单克隆抗体。

283. 权利要求 228 的方法, 其中所述核酸分子包括 SEQ ID NO: 17。

284. 权利要求 228 的方法, 其中所述具有 α -甘露糖苷酶 II 的多肽包括 SEQ ID NO: 18。

-
285. 根据权利要求 121 的分离核酸分子, 含有 SEQ ID NO: 19。
286. 根据权利要求 125 的融合多肽, 含有 SEQ ID NO: 20。

融合构建体及其用来生产 Fc 受体结合亲和性和效应子功能提高的抗体的用途

发明背景

发明领域

本发明涉及蛋白质糖基化工程 (glycosylation engineering) 的领域。更特别地, 本发明涉及具有催化活性的核酸分子, 包括融合构建体, 及其在宿主细胞糖基化工程中的用途, 用来产生治疗特性增强的多肽, 包括 Fc 受体结合提高的和效应子功能提高的抗体。

背景技术

糖蛋白介导人体、其它真核生物和一些原核生物中的许多必要的功能, 包括催化、发出信号、细胞-细胞交流以及分子识别和结合。它们构成真核生物中大部分的非胞质蛋白质。(Lis 等, *Eur. J. Biochem.* 218: 1-27 (1993))。已经开发了许多糖蛋白用于治疗目的, 在最近二十年中, 重组形式的自然生成分泌糖蛋白已经成为生物技术工业中的主要产品。实例包括促红细胞生成素 (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) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。(Cumming 等, *Glycobiology* 1:115-130 (1991))。

寡糖成分可以显著影响和治疗性糖蛋白功效相关的特性, 包括物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、和免疫系统的相互作用、药物动力学和特定生物活性。这样的特性不仅取决于寡糖的存在或不存在, 还取决于其特定的结构。可以形成寡糖结构和糖蛋白功能之间的一些概述。例如, 某些寡糖结构通过和特定碳水化合物结合蛋白的相互作用而介导了糖蛋白从血流中快速清除, 而其它的可以通过抗体结合并引发不期望的免疫反应。(Jenkins 等, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81

(1996))。

由于能将蛋白质糖基化成最适于人应用形式的的能力，因此哺乳动物细胞是生产治疗性糖蛋白的优选宿主。(Cumming 等, *Glycobiology* 1: 115-30 (1991); Jenkins 等, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996))。细菌很少糖基化蛋白质，并和其它种类的普通宿主如酵母、丝状真菌、昆虫和植物细胞一样，产生了从血流中快速清除，不期望的免疫相互作用，以及在一些特定情况中，降低了生物活性的糖基化模式。在过去二十年，哺乳动物细胞中，中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞是使用最普遍的。除了给予合适的糖基化模式，这些细胞持续产生遗传稳定、高产量的克隆细胞系。在简单生物反应器中使用无血清培养基能将它们培养至高密度，并可以开发安全和可再生的生物方法。其它常用的动物细胞包括幼仓鼠肾脏 (BHK) 细胞，NS0-和 SP2/0-小鼠骨髓瘤细胞。最近，已经实验了从转基因动物来生产。(Jenkins 等, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996))。

所有抗体在重链恒定区保守位置含有糖结构，每个同型具有截然不同的 N-连接糖结构排列，其可变地影响蛋白装配、分泌或功能活性。(Wright, A., 和 Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997))。连接的 N-连接糖结构取决于加工程度相当大地改变并可以包括高甘露糖、多支链以及双触角复合寡糖。(Wright, A., 和 Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997))。通常，在特定糖基化位点存在连接核心寡糖结构的异种处理使得单克隆抗体以多糖基化形式存在。同样，已经显示抗体糖基化作用的主要差异发生在细胞系之间，甚至观察到所给细胞系在不同培养条件下生长的细微差异。(Lifely, M. R. 等, *Glycobiology* 5 (8): 813-22 (1995))。

未缀合单克隆抗体 (mAb) 可以用作治疗癌症的药物，如通过美国食品和药物管理局批准的以下药品来证明，Rituximab (Rituxan™, IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, 和 Genentech Inc., San Francisco, CA)，用于治疗 CD20 阳性 B-细胞、低级或囊状非霍奇金淋巴瘤，Trastuzumab (Herceptin™, Genentech Inc.) 用于治疗晚期乳癌

(Grillo-Lopez, A.-J. 等, *Semin. Oncol.* 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21: 309-18 (1999)), Gemtuzumab (Mylotarg™, Celltech/Wyeth-Ayerst) 用于治疗复发的急性骨髓瘤, 和 Alemtuzumab (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) 用于治疗 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病。这些产品的成功不仅依赖于它们的效用还依赖于它们突出的安全性特征 (Grillo-Lopez, A.-J., 等, *Semin. Oncol.* 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21: 309-18 (1999))。尽管这些药物的成功, 目前对获得比未缀合 mAb 治疗通常获得的活性更高的特异性抗体存在大的兴趣。

获得效能极大的提高而维持简单生产方法并潜在避免显著的不理想副作用的一个途径, 是通过工程化 (engineering) 它们的寡糖成分来提高 mAb 天然的细胞介导的效应子功能 (Umaña, 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, 是在每个 CH2 结构域的 Asn297 处具有保守 N-连接糖基化位点的糖蛋白。连接 Asn297 的两个复合双触角寡糖隐藏在 CH2 结构域之间, 形成和多肽主链的充分接触, 且它们的存在对抗体介导效应子功能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))。

本发明者之前显示了 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的超表达, 糖基转移酶催化二等分 (bisected) 寡糖的形成, 显著提高了工程化 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, Umaña, P. 等, *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999), 国际公开 No. WO 99/54342, 每个的全部内容在此以其整体引入作为参考)。抗体 chCE7 属于具有高肿瘤亲和性和特异性的未缀合 mAb 大类, 但是当以缺少 GnTIII 酶的标准工业细胞系生产时效能太小以致不能临床使

用 (Umana, P. 等, *Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999))。该研究首次显示通过工程化抗体生产细胞来表达 GnTIII 而获得 ADCC 活性的极大提高, 其还导致恒定区 (Fc) 相关的二等分寡糖, 包括二等分非岩藻糖基化寡糖比例的增加, 超过天然生成抗体中发现的水平。

大多数研究的结果表明 Fc-受体-依赖性机理基本上解释了细胞毒性抗体对抗肿瘤的作用并表明了对抗肿瘤的最佳抗体优选和活化 Fc 受体结合并最小化和抑制性配偶体 Fc γ RIIB 结合。(Clynes, R. A. 等, *Nature Medicine* 6(4):443-446(2000); Kalergis, A. M., 和 Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195 (12):1653-1659(2002年6月)。例如, 至少一个研究的结果提出特别是 Fc γ RIIIa 受体和抗体治疗效能强烈相关。(Cartron, G. 等, *Blood* 99(3):754-757(2002年2月))。该研究显示了 Fc γ RIIIa 纯合患者对 Rituximab 比杂合患者具有更好的反应。作者推断较优的反应是由于抗体体内结合 Fc γ RIIIa 更好, 其导致更好的对抗淋巴瘤细胞的 ADCC 活性。(Cartron, G. 等, *Blood* 99(3):754-757 (2002年2月))。

除了 ADCC, 成功的抗癌单克隆抗体通常诱导 Fc-依赖性的调节靶细胞存活、增殖, 或死亡的直接信号机理, 通过激活细胞信号级引发或阻断生长因子的通路。(Selenko, N. 等, *J. Clin. Immunol.* 22(3):124-130(2002))。例如, 用 Rituximab 治疗 CD20⁺ 细胞已经显示出诱导补体介导的裂解和 Mab 诱导的凋亡以及 ADCC。(Selenko, N. 等, *J. Clin. Immunol.* 22(3):124-130(2002))。此外, Rituximab 诱导淋巴瘤细胞凋亡, 不仅杀死细胞而且通过抗原递呈树突细胞 (DC) 促进淋巴瘤衍生的肽的吸收和交叉递呈, 诱导 DC 成熟, 并产生特定细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。

发明简述

认识到 Fc 受体结合亲和性提高的和效应子功能提高的抗体的巨大治疗潜能, 因此本发明发明者开发了生产这样抗体的方法, 其包括工程化抗体 Fc 区的糖基化形式 (profile)。

本发明概括地涉及糖基工程化 (glycoengineering) 宿主细胞的方法来改变该宿主细胞产生的一种或多种多肽的糖基化形式。本发明的方法可以用于生产在 Fc 区具有修饰糖基化的治疗抗体, 包括减少了岩藻糖基化, 其中作为修饰糖基化的结果抗体具有提高的效应子功能和/或提高的 Fc 受体结合。本发明糖基工程化抗体特别用于患者的肿瘤治疗。一实施方案中, 糖基工程化本发明的宿主细胞来表达编码具有 GnTIII 催化活性或 GalT 催化活性融合多肽的核酸分子。优选实施方案中, 融合构建体和编码具有人 ManII 催化活性多肽的核酸分子和/或编码具有 GnTII 催化活性多肽的核酸分子共表达。仍然另一实施方案中, 通过糖基工程化而提高表达编码具有 ManII 催化活性多肽的核酸分子的宿主细胞来生产本发明的糖基工程化多肽。

因此, 本发明一方面涉及含有编码融合多肽序列的分离的核酸, 其中所述融合多肽具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (β (1, 4)-N-acetylglucosaminyltransferase III) (“GnTIII”) 活性并含有高尔基体停留多肽 (resident polypeptide) 的高尔基体定位结构域 (localization domain)。在一实施方案中, 融合多肽含有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域。进一步的实施方案中, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (“GnTI”) 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II (“GnTII”) 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选实施方案中, 分离的核酸序列含有图 24 或图 25 所示的核苷酸序列。另一优选实施方案中, 分离的核酸序列编码具有图 24 或图 25 所示氨基酸序列的多肽。仍然另一优选实施方案中, 分离的核酸序列编码具有和图 24 或图 25 所示氨基酸序列至少 80% 相同的氨基酸序列的多肽。

另一方面, 本发明涉及含有编码融合多肽序列的分离的核酸, 其中所述融合多肽具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性并含有高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。一实施方案中, 融合肽含有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。另一实施方案中, 融合肽

含有 β (1, 4)半乳糖基转移酶的催化结构域。进一步的实施方案中, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (“GnTI”) 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II (“GnTII”) 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一方面, 本发明涉及含有分离的核酸的表达载体, 该核酸含有编码融合多肽的序列, 其中所述融合多肽具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性并含有高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。一实施方案中, 表达载体编码含有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 催化结构域和高尔基体定位结构域的融合多肽, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一方面, 本发明涉及含有分离的核酸的表达载体, 该核酸含有编码融合多肽的序列, 其中所述融合多肽具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性并含有高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。一实施方案中, 表达载体编码含有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶催化结构域和高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一方面, 本发明涉及含有上述表达载体的宿主细胞。

另一方面, 本发明涉及宿主细胞, 将该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (“GnTIII”) 活性的融合多肽的核酸, 表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、含有 Fc 区的抗体片段和融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。一实施方案中, 具有 GnTIII 活性的融合多肽含有 β (1, 4)-N-乙酰

氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域和异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一方面, 本发明涉及宿主细胞, 将该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性的融合多肽的核酸, 表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖, 其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、含有 Fc 区的抗体片段、和融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。一实施方案中, 具有 GalT 活性的融合多肽含有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域和异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

优选, 高尔基体定位结构域来自甘露糖苷酶 II 或 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 或半乳糖基转移酶。

另一方面, 本发明涉及具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性并含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。一实施方案中, 本发明的融合多肽含有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域。另一实施方案中, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一方面, 本发明涉及具有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性并含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合蛋白。一实施方案中, 本发明的融合多肽含有 β (1, 4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。

另一实施方案中,高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

优选,高尔基体定位结构域来自甘露糖苷酶 II 或 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (“GnTI”) 或半乳糖基转移酶 (“GalT”)。

另一方面,本发明涉及生产具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性的融合多肽的方法,包括在允许编码融合多肽的核酸表达的条件下在培养基中培养本发明的宿主细胞并从生成培养物中收集融合多肽。一实施方案中,融合多肽含有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域。优选,融合多肽含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域,高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一方面,本发明涉及生产具有 β (1,4)-半乳糖基转移酶活性的融合蛋白的方法,包括在允许编码融合蛋白的核酸表达的条件下在培养基中培养本发明的宿主细胞并从生成培养物中收集融合多肽。一实施方案中,融合多肽含有 β (1,4)-半乳糖基转移酶的催化结构域。优选,融合多肽含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域,高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

优选,高尔基体定位结构域来自甘露糖苷酶 II 或 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 或半乳糖基转移酶 (“GalT”)。

再一方面,本发明涉及改变宿主细胞产生的多肽的糖基化形式 (profile) 的方法,包括将至少一种本发明的核酸或表达载体引入宿主细胞中。优选,多肽是 IgG 或其含有多肽 Fc 区的片段。特别优选的

实施方案中，多肽是 IgG1 或其含有多肽 Fc 区的片段。或者，多肽是融合蛋白，融合蛋白包括等价于人 IgG Fc 区的区域。

另一方面，本发明涉及在宿主细胞中生产多肽的方法，包括：(a) 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性的融合多肽的核酸，产生的多肽选自整个抗体分子、含有 Fc 区的抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述融合蛋白的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖；和 (b) 分离所述多肽。优选，融合多肽含有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的或 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶 (“GalT”) 的催化结构域和进一步包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域，高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 II 的定位结构域、 $\beta(1,2)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 $\beta(1,2)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 $\alpha 1-6$ 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选实施方案中，作为修饰的结果宿主细胞产生的多肽具有提高的效应子功能和/或提高的 Fc 受体结合。特别优选的实施方案中，提高的效应子功能是 Fc 介导的细胞毒性的提高、和 NK 细胞结合的提高、和巨噬细胞结合的提高、和单核细胞结合的提高、和多形核细胞结合的提高、直接信号诱导的凋亡的提高、树突细胞成熟的提高、和/或 T 细胞致敏 (priming) 的提高，提高的 Fc 受体结合是和 Fc 激活受体如 Fc γ RIIIA 结合的提高。优选，呈现效应子功能提高和/或 Fc 受体结合提高的多肽是抗体、抗体片段或融合蛋白并具有提高比例的 Fc 区非岩藻糖基化寡糖，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

另一方面，本发明涉及药物组合物，含有本发明的抗体、含有 Fc 区的抗体片段或融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，和涉及该药物组合物在治疗肿瘤如癌症或其它疾病中的用途。一实施方案中，治疗是 B 细胞耗尽 (B cell depletion)，通过将治疗有效量的该药物组合物给药于需要的患者如人。

仍然再一方面，本发明提供了宿主细胞，包括含有编码融合多肽核酸分子的表达载体，其中所述融合多肽具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域；和含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中所述多肽具有甘露糖苷酶 II (ManII) 活性。优选实施方案中，融合多肽含有 GnTIII 的催化结构域和高尔基体定位结构域，高尔基体定位结构域选自 ManII 的定位结构域、GnTI 的定位结构域、GnTII 的定位结构域、ManI 的定位结构域和 $\alpha 1-6$ 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。一实施方案中，宿主细胞进一步包括编码具有 GnTII 活性的多肽的表达载体。编码融合多肽、具有 ManII 活性的多肽、具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子，可以每个在分开的表达载体中或同一表达载体中。

另外一方面，本发明涉及宿主细胞，包括含有编码融合多肽核酸分子的表达载体，其中所述融合多肽具有 $\beta(1,4)$ -半乳糖转移酶活性 (GalT) 并含有高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域；和含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中所述多肽具有甘露糖苷酶 II (ManII) 活性。优选实施方案中，融合多肽包括 GnTIII 的催化结构域和高尔基体定位结构域，高尔基体定位结构域选自 ManII 的定位结构域、GnTI 的定位结构域、GnTII 的定位结构域、ManI 的定位结构域和 $\alpha 1,6$ 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。一实施方案中，宿主细胞进一步包括编码具有 GnTII 活性的多肽的表达载体。编码融合多肽、具有 ManII 活性的多肽，具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子，可以每个在分开的表达载体中或同一表达载体中。

再一方面中，本发明涉及涉及宿主细胞，该宿主细胞工程来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖，其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

另外的实施方案中，本发明提供了宿主细胞，该宿主细胞工程化

来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸、至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，和至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

再一方面，本发明提供了宿主细胞，该宿主细胞工程来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖，其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

另外一方面，本发明提供了宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸、至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，和至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中所述宿主细胞产生的所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

再一方面，本发明涉及在宿主细胞中生产多肽的方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述融合多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖；和分离所述多肽。

另一方面，本发明涉及在宿主细胞中生产多肽的方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述融合多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖；和

分离所述多肽。

另外一方面，在宿主细胞中生产 Fc 介导的细胞毒性提高的多肽的生产方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码 GalT 的核酸和至少一种编码 ManII 的核酸，产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段，抗体片段包括免疫球蛋白 Fc 区，其中 GalT 或 ManII 中的一个或两个的表达水平足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖和其中作为所述修饰的结果所述多肽具有提高的 Fc 介导的细胞毒性；和分离所述 Fc 介导的细胞毒性提高的多肽。

另一方面，本发明涉及在宿主细胞中生产多肽的方法，包括：(a) 在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 α -甘露糖苷酶 II 活性的多肽的核酸，产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述具有 α -甘露糖苷酶 II 活性的多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖；和 (b) 分离通过所述宿主细胞产生的所述多肽。

另一方面，本发明涉及宿主细胞，该宿主细胞工程化在允许多肽产生的条件下来表达至少一种编码具有 α -甘露糖苷酶 II 活性的多肽的核酸，产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述具有 α -甘露糖苷酶 II 活性的多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖。

仍然另一方面，本发明涉及通过这样的宿主细胞产生的多肽，尤其是作为所述修饰寡糖的结果具有提高的效应子功能和/或提高的 Fc 受体结合的抗体。

附图简述

图 1. 来自 BHK 中产生的重组的未修饰(非糖基工程化的)抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体

pETR1502 转染细胞。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 2. 来自用编码野生型 (“wt”) GnTIII 的核酸工程化的 BHK 中产生的重组的糖基工程化抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体 pETR1502 和 GnTIII 表达载体 pETR1166 共转染细胞。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 3. 来自用编码具有 GnTIII 活性并通过 GnTI-高尔基体定位结构域定位的融合多肽 (“G1-GnTIII”) 的核酸工程化的 BHK 中产生的重组的糖基工程化抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体 pETR1502 和 GnTIII 表达载体 pETR1425 共转染细胞。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 4. 来自用编码具有 GnTIII 活性并通过高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (ManII)-高尔基体定位结构域定位的融合多肽 (“M2-GnTIII”) 的核酸工程化的 BHK 中产生的重组的糖基工程化抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体 pETR1502 和 GnTIII 表达载体 pETR1506 共转染细胞。如实施例 1 材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 5. 来自 HEK293-EBNA 细胞中产生的重组的未修饰 (非糖基工程化的) 抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体 pETR1520 转染细胞。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 6. 来自用编码具有 GnTIII 活性并通过高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (ManII)-高尔基体定位结构域定位的融合多肽 (“M2-GnTIII”) 的核酸工程化的 HEK293-EBNA 中产生的重组的糖基工程化抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体 pETR1520 和用 GnTIII 表达载体 pETR1519 共转染细胞。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 7. 来自用编码具有 GnTIII 活性并通过高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (ManII)-高尔基体定位结构域定位的融合多肽 (“M2-GnTIII”) 的核酸工程化的 HEK293-EBNA 中产生的重组的糖基工程化抗-CD20 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。用抗体表达载体 pETR1520 和用 GnTIII 表达载体 pETR1519 共转染细胞。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。(a) 没有另外酶处理的 PNGaseF-释放寡糖的寡糖特征图。(b) 进一步用 EndoH 消化的 PNGaseF-释放寡糖的寡糖特征图。

图 8. (a) EndoH 催化的消化寡糖的示意图。EndoH 可以消化杂合 (hybrid) (和杂合二等分) 寡糖, 但不消化复合 (complex) 或复合二等分寡糖。(b) 通过分辨复合型和杂合型寡糖, Endo-H 处理将结构分配给最初来自 PNGaseF 处理的 MALDI/TOF-MS 质谱中具有相同 m/z 比例的寡糖峰值。

图 9. “G1-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的, 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。两个抗体都在 BHK 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 3 中和未修饰抗体的那些在图 1 中。靶细胞 (T) 是 SKW6.4 人的类淋巴母细胞。效应细胞 (E) 是新鲜分离的人 PBMC。比例为 25:1 的 E:T 用于 4 小时孵育 ADCC 试验中, 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放来测量细胞毒性, 相对于最大释放 (使用去污剂替代抗体) 和自发释放 (培养基替代抗体) 对照。实施例 1 的材料和方法部分中详细描述了试验。

图 10. “M2-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的, 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。两个抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 6 中和未修饰抗体的那些在图 5 中。靶细胞 (T) 是 SKW6.4 人的类淋巴母细胞。效应细胞 (E) 是新鲜分离的人 PBMC。比例为 25:1 的 E:T 用于 4 小时培养 ADCC 试验中, 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放来测量细胞毒性, 相对于最大释放 (使用去污剂替代抗体) 和自发释放 (培养基替代抗体) 对照。实施例 1 的材料和方法部分中详细描述了试验。

图 11. “M2-GnTIII”糖基工程化的对“wt-GnTIII”糖基工程化的重组的, 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。两个抗体都在 BHK 细胞中产生。M2-GnTIII 糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 4 中和 wt-GnTIII 糖基工程化抗体的那些在图 2 中。靶细胞(T)是 SKW6.4 人的类淋巴母细胞。效应细胞(E)是新鲜分离的人 PBMC。比例为 25:1 的 E:T 用于 4 小时培养 ADCC 试验中, 通过乳酸脱氢酶(LDH)释放来测量细胞毒性, 相对于最大释放(使用去污剂替代抗体)和自发释放(培养基替代抗体)对照。实施例 1 的材料和方法部分中详细描述了试验。

图 12. “M2-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的, 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体和 NK 细胞上的 Fc γ RIIIa 受体的结合。两个抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 6 中和未修饰抗体的那些在图 5 中。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的进行结合试验。在其表面表达 Fc γ RIIIa 受体的人 NK 细胞从已知不产生 Fc γ RIIc 受体(即, Fc γ RIIc 编码序列中含有框内终止密码子的纯合基因变体)的基因型供体分离。通过 FACS 使用 FITC 标记的抗人 IgG 抗体片段来测量的几何平均荧光强度随着重组抗体和 NK 细胞结合的量而增加。该试验中检测的结合是 Fc γ RIIIa 特异性的, 如通过使用竞争 Fc γ RIIIa 特异性抗体片段来证明(参见图 13)。

图 13. 在增加浓度的竞争抗 Fc γ RIII 抗体片段存在下, “M2-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的, 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体和 NK 细胞上的 Fc γ RIIIa 受体的结合。两个重组抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 6 中和未修饰抗体的那些在图 5 中。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的进行结合试验, 但是用重组抗体(通常终浓度为 3 μ g/ml)和增加并改变浓度(参见图表)的竞争 3G8-Fab2 抗 Fc γ RIII 抗体片段共孵育纯化的 NK 细胞。在其表面表达 Fc γ RIIIa 受体的人 NK 细胞从已知不产生 Fc γ RIIc 受体(即, Fc γ RIIc 编码序列中含有框内终止密码子的纯合基因变体)的基因型供体分离。通过 FACS 使用 FITC

标记的抗人 IgG 抗体片段来测量的几何平均荧光强度随着重组抗体和 NK 细胞结合的量而增加。

图 14. 识别纤连蛋白的 ED-B + 同工型并在 HEK293-EBNA 细胞中产生的重组 IgG1 “L19” 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。(a) 在用抗体表达载体 pETR1546 转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的未修饰抗体。(b) 在用抗体表达载体 pETR1546 和 GnTIII 表达载体 pETR1519 共转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的 M2-GnTIII 糖基工程化抗体。通过蛋白质 A 亲和性色谱随后大小排阻色谱步骤从培养基中纯化两种抗体，在 Superdex200 基质 (Amersham) 上将缓冲液调换至磷酸盐缓冲的盐水 (PBS)。如实施例 1 的材料和方法中所述的制备和分析寡糖。

图 15. “M2-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的，抗 ED-B+ 纤连蛋白 IgG1 抗体和 Raji 人淋巴瘤细胞上的 Fc γ RIIb 受体的结合。两个抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 14b 中和未修饰抗体的那些在图 14a 中。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的进行结合试验。通过 FACS 使用 FITC 标记的抗人 IgG 抗体片段来测量的几何平均荧光强度随着重组抗体和 Raji B 细胞淋巴瘤细胞结合的量而增加。

图 16. “M2-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的，抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体和不同供体 NK 细胞上的 Fc γ RIIIa 受体的结合。两个抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 6 中和未修饰抗体的那些在图 5 中。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的进行结合试验。在其表面表达 Fc γ RIIIa 受体的人 NK 细胞从已知不产生 Fc γ RIIc 受体 (即，Fc γ RIIc 编码序列中含有框内终止密码子的纯合基因变体) 的基因型供体分离。两个供体的基因型为 Fc γ RIIIa 受体 158V-“高亲和性”变体的纯合。另外两个供体的基因型为 Fc γ RIIIa 受体 158V-“高亲和性”变体和 158F-“低亲和性”变体的 158V/F 杂合。通过 FACS 使用 FITC 标记的抗人 IgG 抗体片段来测量的几何平均荧光强度随着重组抗体和 NK 细胞结合

的量而增加。该试验中检测的结合是 Fc γ RIIIa 特异性的，如通过使用竞争 Fc γ RIIIa 特异性抗体片段来证明（参见图 13）。

图 17. 截短的 CD4 (tCD4) 表达的 FACS 分析，(a) BHK-1502-28 (野生型) 和 (b) 克隆 BHK-1502-28-11 (M2-GnTIII 糖基工程化的) 稳定的嵌合抗-CD20 IgG1 抗体产生细胞系。通过 pETR1537 GnTIII 表达载体中的 IRES 序列将 tCD4 的表达可操作地和 M2-GnTIII 表达连接并因此用作 GnTIII 表达的间接标记。各自的平均和几何平均荧光强度为，糖基工程化细胞系 27.6 和 19.9，野生型细胞系 4.7 和 4.1。

图 18. 来自 BHK-1502-28-11 细胞系产生的 M2-GnTIII-糖基工程化的重组抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。细胞系、抗体纯化以及寡糖制备和分析描述于实施例 1 的材料和方法部分中。

图 19. 来自 BHK-1502-28-11 细胞系产生的 M2-GnTIII-糖基工程化的重组抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱，通过 PNGaseF 释放寡糖并进一步用 EndoH 消化。细胞系、抗体纯化以及寡糖制备和分析描述于实施例 1 的材料和方法部分中。

图 20. “M2-GnTIII” 糖基工程化的对未修饰的重组的，抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体和 NK 细胞上的 Fc γ RIIIa 受体的结合，抗体由稳定细胞系产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 18 和 19 中。如实施例 1 的材料和方法部分中所述的进行结合试验。在其表面表达 Fc γ RIIIa 受体的人 NK 细胞从已知不产生 Fc γ RIIc 受体（即，Fc γ RIIc 编码序列中含有框内终止密码子的纯合基因变体）的基因型供体分离。通过 FACS 使用 FITC 标记的抗人 IgG 抗体片段来测量的几何平均荧光强度随着重组抗体和 NK 细胞结合的量而增加。该试验中检测的结合是 Fc γ RIIIa 特异性的，如通过使用竞争 Fc γ RIIIa 特异性抗体片段来证明（参见图 13）。

图 21. “M2-GnTIII” 糖基工程化的对未修饰的重组的，抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的补体介导裂解 (CML)。两个抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征描述于图 6 中和未

修饰抗体的那些在图 5 中。靶细胞(T)是 SKW6.4 人的类淋巴母细胞。人补体用于试验。通过 LDH 释放来测量裂解。试验详细描述于实施例 1 的材料和方法部分中。

图 22. 来自识别人表皮细胞生长因子 (EGFR) 并在 HEK293-EBNA 细胞中产生的重组嵌合 IgG1 “C225” 抗体的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。(a) 用抗体表达载体 pURSI28 转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的未修饰抗体。(b) 用抗体表达载体 pETRURSI28 和 GnTIII 表达载体 pETR1519 共转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的 M2-GnTIII 糖基工程化抗体。通过蛋白质 A 亲和性色谱随后大小排阻色谱步骤从培养基中纯化两个抗体, 在 Superdex200 基质 (Amersham) 上将缓冲液调换至磷酸盐缓冲的盐水 (PBS)。如实施例 1 的材料和方法中所述的制备和分析寡糖。

图 23. “M2-GnTIII”-糖基工程化的对未修饰的重组的, 抗 EGFR 嵌合 IgG1 “C225” 抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。两个抗体都在 HEK293-EBNA 细胞中产生。糖基工程化抗体的产生和糖基化特征图描述于图 22b 中和未修饰抗体的那些在图 22a 中。靶细胞(T)是 A431 人鳞状癌细胞 (ECACC No. 85090402)。效应细胞(E)是新鲜分离的人 PBMC。比例为 25:1 的 E:T 用于 4 小时培养 ADCC 试验中, 通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测量细胞毒性, 相对于最大释放(使用去污剂替代抗体) 和自发释放(培养基替代抗体) 对照。实施例 1 的材料和方法部分中详细描述了试验。

图 24. 分别为本发明甘露糖苷酶 II-GnTIII 融合多肽的核酸序列和氨基酸序列。

图 25. 分别为本发明 GnT-I - GnT-III 融合多肽的核酸序列和氨基酸序列。

图 26. 来自用抗体表达载体 pETR1520 转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的未修饰重组 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (“Cwt”) 的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。如实施例 5 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。

图 27. 来自用抗体表达载体 pETR1520 和融合 GnTIII 多肽表达载体 (pETR1519) 共转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的重组糖基工程化 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (“Cbrt”) 的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。如实施例 5 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。(A) 没有另外酶处理的 PNGaseF-释放寡糖的寡糖特征图。(B) 进一步用 EndoH 消化的 PNGaseF-释放寡糖的寡糖特征图。

图 28. 来自用抗体表达载体 pETR1520、融合 GnTIII 多肽表达载体 (pETR1519) 和甘露糖苷酶 II 多肽表达载体 (pCLF9) 共转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的重组糖基工程化 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (“Cm”) 的中性寡糖混合物的 MALDI/TOF-MS 谱。如实施例 5 的材料和方法部分中所述的从培养基中纯化抗体并制备和分析寡糖。(A) 没有另外酶处理的 PNGaseF-释放寡糖的寡糖特征图。(B) 进一步用 EndoH 消化的 PNGaseF-释放寡糖的寡糖特征图。

图 29. 通过在 HEK293-EBNA 细胞中表达编码 ManII-GnTIII 融合多肽的核酸来糖基工程化的嵌合抗 CD20 抗体介导的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC), 其中 GnTIII 催化结构域通过 ManII 高尔基体定位结构域定位, 其中编码 ManII-GnTIII 的核酸在其自身 (抗体 Cbrt) 上表达或和编码 ManII 的核酸 (Cm) 在抗体产生细胞中一起共表达。Cwt 是用抗体表达载体 pETR1520 转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的未修饰的重组 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (“Cwt”)。试验详细描述于实施例 1 的材料和方法部分中。

图 30. 通过在 HEK293-EBNA 细胞中表达编码 ManII-GnTIII 融合多肽的核酸来糖基工程化的嵌合抗 CD20 抗体的 Fc γ RIIIa 受体结合, 其中 GnTIII 催化结构域是通过 ManII 高尔基体定位结构域定位的, 其中 ManII-GnTIII 编码核酸是在其自身 (抗体 Cbrt) 上表达或和编码 ManII 的核酸 (Cm) 在抗体产生细胞中一起共表达。Cwt 是用抗体表达载体 pETR1520 转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的未修饰的重组 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (“Cwt”)。试验详细描述于实施例 1 的材料和

方法部分中。在其表面表达 Fc γ RIIIa 受体的人 NK 细胞从已知不产生 Fc γ RIIc 受体（即，Fc γ RIIc 编码序列中含有框内终止密码子的纯合基因变体）的基因型供体分离。通过 FACS 使用 FITC 标记的抗人 IgG 抗体片段来测量的几何平均荧光强度随着重组抗体和 NK 细胞结合的量而增加。该试验中检测的结合是 Fc γ RIIIa 特异性的，如通过使用竞争 Fc γ RIIIa 特异性抗体片段来证明（参见图 13）。

图 31. 通过在 HEK293-EBNA 细胞中表达编码 ManII-GnTIII 融合多肽的核酸来糖基工程化的嵌合抗 CD20 抗体的补体介导细胞毒性，其中 GnTIII 催化结构域是通过 ManII 高尔基体定位结构域定位的，其中 ManII-GnTIII 编码核酸是在其自身（抗体 Cbrt）上表达或和编码 ManII 的核酸（Cm）在抗体产生细胞中一起共表达。Cwt 是用抗体表达载体 pETR1520 转染的 HEK293-EBNA 细胞中产生的未修饰的重组 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体（“Cwt”）。

图 32(A-C). 表达载体 pCLF9 (A)、pETR1842 (B) 和 pETR1843 (C)。

图 33(A 和 B). 用于融合蛋白 ManII-GalT (A) 和 GalT (B) 的表达载体。

图 34. 在 α -甘露糖苷酶 II 存在下产生的抗 CD20 单克隆抗体的寡糖特征图和所发现的与抗体 Fc 部分相关结构的相对百分比。

图 35(A 和 B). 在融合蛋白 ManII-GalT 存在下产生的抗 CD20 单克隆抗体的寡糖特征图和所发现的与抗体 Fc 部分相关结构的相对百分比。PNGaseF (A) 和 EndoH (B) 消化后的寡糖特征图。

图 36. 在 α -甘露糖苷酶 II (ManII) 存在下产生的抗体和 Fc γ RIIIa 受体结合，具有比野生型抗体高的亲和性。

图 37. 糖基工程化嵌合抗 CD-20 介导的抗体依赖性细胞毒性。

发明详述

在此使用的术语和本领域通常所用的一样，除非另外如下定义。

如在此所用的，术语抗体定义为包括整个抗体分子，包括单克隆、多克隆和多特异性（例如，双特异性）抗体，以及具有 Fc 区的抗体片

段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。还包括人源化和嵌合抗体。

如在此所用的，术语 Fc 区定义为 IgG 重链的 C 末端区域。尽管 IgG 重链 Fc 区的界限可以略微改变，人 IgG 重链 Fc 区通常定义为从位置 Cys226 氨基酸残基开始至羧基末端的一段。

如在此所用的，术语等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域定义为包括免疫球蛋白 Fc 区的天然生成等位基因变体以及具有改变的变体，改变产生了替代、添加或缺失但基本上没有降低免疫球蛋白介导效应子功能（如抗体依赖性细胞毒性）的能力。例如，可以从免疫球蛋白 Fc 区的 N 末端或 C 末端缺失一个或多个氨基酸而基本上没有失去生物功能。可以根据本领域已知的一般规则选择这样的变体使得对活性的影响最小。（参见，例如，Bowie, J. U. 等, *Science* 247: 1306-10(1990)。

如在此所用的，“具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性”的融合多肽指的是能够催化将 β -1-4 键中的 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基添加至 N-连接寡糖的三甘露糖基核心的 β 连接的甘露糖苷上的融合多肽。这包括呈现和 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 酶活性相似但不必需相同的融合多肽，该酶也称为 β -1-4 甘露糖基-糖蛋白 4- β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (EC2.4.1.144)，根据生化和分子生物国际命名委员会 (NC-IUBMB)，如特定生物试验中测定的，有和没有剂量依赖性。在剂量依赖性存在的情况下，不需要等同于 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III，但和 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 相比较基本上和所给活性剂量依赖性相似（即，相对于 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III，候选多肽将呈现更高的活性或不比其活性低 25 倍以上，优选不比其活性低 10 倍以上，最优选不比其活性低 3 倍以上的活性）。

如在此所用的，“具有 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶活性”和“具有 GalT 活性”的融合多肽指的是能够催化将 UDP 半乳糖的半乳糖残基添加至 N 连接寡糖中发现的非还原性末端 GlcNAc 的融合多肽。这包括呈现酶活性和 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶相似但不必需相同的融合多肽，

该酶也称为 UDP-Gal:GlcNAc β -1,4-半乳糖基转移酶 (E.C. 2.4.1.38), 根据生化和分子生物国际命名委员会 (NC-IUBMB), 如特定生物试验中测定的, 有和没有剂量依赖性。在剂量依赖性存在的情况下, 不需要等同于 β (1,4)-半乳糖基转移酶, 但和 β (1,4)-半乳糖基转移酶相比较基本上和所给活性剂量依赖性相似 (即, 相对于 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III, 候选多肽将呈现更高的活性或不比其活性低 25 倍以上, 优选不比其活性低 10 倍以上, 最优选不比其活性低 3 倍以上的活性)。

具有和本发明参照核苷酸序列至少例如 95% “相同” 的核苷酸序列的核酸或多肽, 定义为多核苷酸的核苷酸序列等同于参照序列, 除了多核苷酸序列可以包括参照核苷酸序列每 100 个核苷酸高达五个点突变。换句话说, 为了获得具有和参照核苷酸序列至少 95% 相同的核苷酸序列的多核苷酸, 参照序列中高达 5% 的核苷酸可以删除由另一核苷酸替代, 或高达参照序列中总核苷酸 5% 的多个核苷酸可以插入参照序列中。查询序列可以显示于图 24 或图 25 中的整个序列。

作为实际情况, 可以使用已知计算机程序常规测定是否任何特定的核酸分子或多肽和本发明的核苷酸序列或多肽序列是至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的。测定查询序列 (本发明的序列) 和对象序列之间的最佳整体匹配的优选方法, 也称为全局序列比对, 可以使用基于 Brutlag 等的算法的 FASTDB 计算机程序来测定, Brutlag 等, *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990)。序列比对中, 查询序列和对象序列都是 DNA 序列。通过将 U 转换成 T 可以比较 RNA 序列。所述全局序列比对的结果是 % 相同性。来计算 % 相同性的 DNA 测序的 FASTDB 比对中所用的优选参数是: 矩阵 = 单式的, k-元组 = 4, 错配惩罚 = 1, 连接惩罚 = 30, 随机化组长度 = 0, 关闭值 = 1, 缺口惩罚 = 5, 缺口大小惩罚 0.05, 窗口大小 = 500 或对象核苷酸序列的长度, 以较短者为准。

如果由于 5' 或 3' 缺失, 而不是由于内部缺失, 对象序列比查询序列短, 必须对该结果进行人工校正。这是因为当计算 % 相同性时

FASTDB 程序没有计算对象序列的 5' 和 3' 截短。对于 5' 或 3' 端截短的对象序列，相对于查询序列，通过计算对象序列 5' 和 3' 没有配对/比对的查询序列的碱基数量，作为查询序列总碱基的百分比，来校正%相同性。通过 FASTDB 序列比对的结果来测定核苷酸是否匹配/比对。然后从通过上述使用特定参数的 FASTDB 程序计算的%相同性中减去该百分比，来获得最终的%相同性值。该校正的值是用于本发明目的的值。只计算如通过 FASTDB 比对展示的、没有和查询序列匹配/比对的对象序列 5' 和 3' 碱基外的碱基是为了人工调整%相同性值的目的。

例如，将 90 个碱基的对象序列和 100 个碱基的查询序列进行比对来测定%相同性。在对象序列的 5' 端发生了缺失，因此，FASTDB 比对没有显示 5' 末端头 10 个碱基的匹配/比对。10 个未配对的碱基表示序列的 10% (5' 和 3' 端未匹配碱基数量/查询序列中碱基总数)，因此从 FASTDB 程序计算的%相同性值中减去 10%。如果剩余的 90 个碱基完全匹配，最终%相同性为 90%。另一实施例中，90 个碱基的对象序列和 100 个碱基的查询序列相比较。这次缺失是内部缺失，使得对象序列在 5' 和 3' 没有和查询序列不匹配/比对的碱基。在这种情况下，通过 FASTDB 计算的%相同性没有人工校正。再次，只人工校正了对象序列的 5' 或 3' 没有和查询序列匹配/比对的碱基。没有进行为了本发明目的的其他人工校正。

具有和本发明查询氨基酸序列至少例如 95% “相同” 的氨基酸序列的多肽，定义为对象多肽的氨基酸序列等同于查询序列，除了对象多肽序列可能包括查询氨基酸序列中每 100 个氨基酸高达五个氨基酸的改变。换句话说，为了获得具有和查询氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列的多肽，对象序列中高达 5% 的氨基酸残基可以插入、删除，或用另一氨基酸替代。参照序列的这些改变可以发生在参照氨基酸序列的氨基端或羧基端或那些末端位置之间的任何地方，单个散布在参照序列的残基中或在参照序列内的一个或多个邻接基团中。

作为实际情况，可以使用已知计算机程序来常规测定是否任何特

定多肽和参照多肽是至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99% 相同。测定查询序列（本发明的序列）和对象序列之间的最佳整体匹配的优选方法，也称为全局序列比对，可以使用基于 Brutlag 等的算法的 FASTDB 计算机程序来测定，Brutlag 等，*Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990)。序列比对中，查询序列和对象序列都是核苷酸序列和都是氨基酸序列。所述全局序列比对的结 果是%相同性。FASTDB 氨基酸比对中所用的优选参数是：矩阵 = PAM 0，k-元组 = 2，错配惩罚 = 1，连接惩罚 = 20，随机化组长度 = 0，关闭值 = 1，窗口大小 = 序列长度，缺口惩罚 = 5，缺口大小惩罚 = 0.05，窗口大小 = 500 或对象核苷酸序列的长度，以较短者为准。

如果由于 N-或 C-末端删除，而不是由于内部删除，对象序列比查询序列短，必须对该结果进行人工校正。这是因为当计算全局%相同性时 FASTDB 程序没有计算对象序列的 N-和 C-端截短。对于 N-和 C-端截短的对象序列，相对于查询序列，通过计算对象序列 N-和 C-端的查询序列没有和相应对象序列匹配/比对的残基数量，作为查询序列总碱基的百分比，来校正%相同性。通过 FASTDB 序列比对的结果来测定残基是否匹配/比对。然后从通过上述使用特定参数的 FASTDB 程序计算的%相同性中减去该百分比，来获得最终的%相同性值。该最终百分相同性是用于本发明目的的同 同性。只考虑没有和查询序列相配/比对的对象序列 N-和 C-端的残基是为了人工调整%相同性值的目 的。即，只是对象序列的最远 N-和 C-端外的查询残基位置。

例如，将 90 个氨基酸残基的对象序列和 100 个残基的查询序列进行比对来测定%相同性。在对象序列的 N-端发生了删除，因此，FASTDB 比对没有显示 N-端头 10 个碱基的配对/比对。10 个未配对的碱基表示序列的 10%（N-和 C-端未配对碱基数量/查询序列中碱基总数），因此从 FASTDB 程序计算的%相同性值中减去 10%。如果剩余的 90 个残基完全配对，最终%相同性为 90%。另一实施例中，90 个残基的对象序列和 100 个残基的查询序列相比较。这次删除是内部删除，使得对象序列在 N-或 C-端没有和查询序列不配对/比对的碱基。在这种情况下，通

过 FASTDB 计算的%相同性没有人工校正。再次，只人工校正了对象序列的 N-和 C-端外的残基位置，如 FASTDB 比对中展示的，其没有和查询序列配对/比对。没有进行为了本发明目的的其他人工校正。

如在此所用的，和本发明核酸序列“在严格条件下杂交”的核酸，指的是在含有 50%甲酰胺、5 × SSC (750mM NaCl, 75mM 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠 (pH7.6)、5 × Denhardt 溶液、10%葡聚糖硫酸酯和 20 μg/ml 变性的剪切的鲑鱼精子 DNA 的溶液中 42℃温育过夜，接着用约 65℃的 0.1 × SSC 洗涤滤膜而杂交的多核苷酸。

如在此所用的，术语高尔基体定位结构域指的是高尔基体停留多肽的氨基酸序列，其负责将其固定于高尔基复合体内位置。通常，定位结构域包括酶氨基端的“尾巴”。

如在此所用的，术语效应子功能 (*effector function*) 指的是可导致抗体 Fc 区 (天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区) 的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括，但不限制于，Fc 受体结合亲和性、抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)、细胞因子分泌、通过抗原递呈细胞的免疫复合体介导的抗原吸收、细胞表面受体的下调等。

如在此所用的，术语工程、工程化的、工程化和糖基化工程认为包括天然生成多肽或其片段的糖基化模式的任何操作。糖基化工程包括细胞的糖基化方法的代谢工程，包括寡糖合成途径的基因操作来获得细胞中表达糖蛋白的改变的糖基化。此外，糖基化工程包括突变和细胞环境对糖基化的影响。

如在此所用的，术语宿主细胞涵盖任何种类的细胞系统，其可以工程化来产生修饰糖化形式的目的蛋白质、蛋白质片段或肽，包括抗体、抗体片段和融合蛋白。通常，已经对宿主细胞进行了操作来表达最佳水平的 GnTIII。宿主细胞包括培养的细胞，例如，哺乳动物培养的细胞如 CHO 细胞、BHK 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、YO 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、昆虫细胞和植物细胞，仅仅列举了少数的，而且还包括转基因

动物、转基因植物或培养的植物或动物组织中的细胞。

如在此所用的，术语 *Fc* 介导的细胞毒性包括抗体依赖性细胞毒性和通过含有人 *Fc* 区的可溶性 *Fc*-融合蛋白介导的细胞毒性。这是通过“人免疫效应细胞”导致“抗体靶向细胞”裂解的免疫机理，其中：

“人免疫效应细胞”是白细胞群体，其表面展示 *Fc* 受体其通过这些受体和抗体或 *Fc* 融合蛋白的 *Fc* 区结合并实现效应子功能。这样的群体包括，但不限制于外周血单核细胞 (PBMC) 和/或自然杀伤 (NK) 细胞。

“抗体靶向细胞”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 *Fc* 区部分的 N-端和靶细胞结合。

如在此所用的，术语提高的 *Fc* 介导的细胞毒性定义为在靶细胞周围培养基中给定的抗体或 *Fc* 融合蛋白浓度下，在给定时间内通过以上定义的 *Fc* 介导的细胞毒性机理裂解的“抗体靶向细胞”数量的增加，和/或在给定时间内通过 *Fc* 介导的细胞毒性机理获得裂解给定数量“抗体靶向细胞”需要的靶细胞周围培养基中抗体或 *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通过相同抗体或 *Fc* 融合蛋白介导的细胞毒性，这些抗体或 *Fc* 融合蛋白由相同类型的宿主细胞产生，使用本领域技术人员已知的相同的标准生产、纯化、配制和保存方法，但不是通过在此所述方法工程化来表达糖基转移酶 GnTIII 的宿主细胞产生的。

具有提高的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的抗体意思是如通过本领域普通技术人员已知的任何合适方法测得的具有提高的 ADCC 的抗体。一种公认的体外 ADCC 试验如下：

- 1) 试验使用靶细胞，已知该靶细胞表达通过抗体的抗原结合区识别的靶抗原；
- 2) 试验使用从随机选择的健康供体血液中分离的人外周血单核细胞 (PBMC) 作为效应细胞，；
- 3) 根据以下方案进行试验：
 - i) 使用标准密度离心方法分离 PBMC 并以 5×10^6 个细胞/ml 悬浮

于 RPMI 细胞培养基中;

ii) 通过标准组织培养方法培养靶细胞, 从指数生长期收集存活力高于 90% 的细胞, 用 RPMI 细胞培养基洗涤, 用 100 微居的 ^{51}Cr 标记, 用细胞培养基洗涤两次, 并以 10^5 个细胞/ml 的密度重悬于细胞培养基中;

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

iv) 在培养基中将抗体从 4000ng/ml 连续稀释至 0.04ng/ml, 并将 50 微升所得到的抗体溶液加入 96 孔微量滴定板中的靶细胞中, 将涵盖上述全部浓度范围的各种抗体浓度一式三份进行测试;

v) 对于最大释放 (MR) 对照, 平板上含有标记靶细胞的另外 3 个孔, 接受 50 微升 2%(V/V) 非离子去污剂 (Nonidet, Sigma, St. Louis) 水溶液, 替代抗体溶液 (上述第 iv 点);

vi) 对于自发释放 (SR) 对照, 平板上含有标记靶细胞的另外 3 个孔, 接受 50 微升 RPMI 细胞培养基替代抗体溶液 (上述第 iv 点)

vii) 然后将 96 孔微量滴定板在 $50 \times g$ 离心 1 分钟, 并在 4°C 温育 1 小时;

viii) 将 50 微升 PBMC 悬浮液 (上述第 i 点) 加入每个孔中来产生效应子: 靶细胞的 25:1 的比例, 并将平板放置于 $5\%\text{CO}_2$ 气氛的培养箱中于 37°C 4 小时;

ix) 收集每个孔中的无细胞上清液并使用 γ 计数器定量实验释放的放射性 (ER);

x) 根据公式 $(\text{ER}-\text{MR}) / (\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ 计算每个抗体浓度的特定裂解百分数, 其中 ER 是对于那个抗体浓度的定量的平均放射性 (参见上述第 ix 点), MR 是对于 MR 对照的定量的平均放射性 (参见上述第 v 点), 和 SR 是对于 SR 对照 (参见上述第 vi 点) 的定量的平均放射性 (参见上述第 ix 点);

4) “提高的 ADCC” 定义为上述测试的抗体浓度范围内观察到的特定裂解的最大百分比的提高, 和/或获得上述测试的抗体浓度范围内

观察到的特定裂解最大百分比一半所需的抗体浓度的减少。ADCC 的提高是相对于用上述试验测定的、通过相同抗体介导的、通过相同类型宿主细胞产生的、使用本领域技术人员已知的相同标准的生产、纯化、配制和储存方法,但没有通过工程化来超表达糖基转移酶 GnTIII 的宿主细胞产生的 ADCC。

如在此所用的,术语抗-CD20 抗体定义为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,该磷蛋白通常命名为人 B 淋巴细胞限制性分化抗原 Bp35,一般称为 CD20。

本发明基于以下发现:工程化抗体产生细胞来表达新的融合多肽来形成 Fc 受体结合亲和性提高和效应子功能提高的抗体,该新的多肽具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 或 β (1,4)-半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性,并包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。或者,效应子功能提高的和/或 Fc 受体结合提高的抗体可以通过工程化抗体产生细胞来获得,该抗体产生细胞具有编码具有 α -甘露糖苷酶 II 催化活性的多肽的核酸分子增加的表达。优选实施方案中,具有 GnTIII 或 GalT 活性的融合构建体和编码 ManII 或 GnTII 的核酸分子共表达。

因此,一实施方案中,本发明涉及包括编码融合多肽序列的分离核酸,其中融合多肽具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性和包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。优选实施方案中,融合多肽包括 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域,且高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。进一步的实施方案中,高尔基体定位结构域是 GalT 的定位结构域。

优选,分离的核酸具有图 24 和 SEQ ID NO: 14 所示的核苷酸序列。另一优选实施方案中,融合多肽包括 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域,且高尔基体定位结构域是 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (GnTI) 的催化结构域。优选,核酸具有图 25 和 SEQ ID NO: 12 所示的核苷酸序列。或者,可以使用另一高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。另一优选实施方案中,高尔基体定位结构域选自 β

(1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域、甘露糖苷酶 I 的定位结构域, 和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

另一优选实施方案中, 本发明涉及分离的核酸, 含有编码具有图 24 和 SEQ ID NO:15 或图 25 和 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列的多肽的序列。本发明还包括分离的核酸, 含有在严格条件下和杂交探针杂交的序列, 其核苷酸序列由图 24 和 SEQ ID NO:14 或图 25 和 SEQ ID NO:12 所示的核苷酸序列组成。本发明进一步涉及分离的核酸, 包括和图 24 和 SEQ ID NO:14 或图 25 和 SEQ ID NO:12 所示核苷酸序列至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同的序列。另一实施方案中, 本发明涉及分离的核酸, 包括编码具有和图 24 和 SEQ ID NO:15 或图 25 和 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同的氨基酸序列的多肽的序列。本发明还包括分离的核酸, 包括编码具有保守氨基酸替代的图 24 和 SEQ ID NO:15 或图 25 和 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列的多肽的序列。

另一实施方案中, 本发明涉及表达载体, 包括本发明分离的核酸, 如上述的那些。

进一步的实施方案中, 本发明涉及具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性并含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。优选实施方案中, 本发明的融合多肽包括 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域。特别优选的实施方案中, 融合多肽进一步包括甘露糖苷酶 II 或 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I (GnTI) 的高尔基体定位结构域。可替换的实施方案中, 高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域, 和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。可以在允许编码所述融合多肽的核酸表达的条件下在培养基中培养本发明的宿主细胞并从生成的培养物中收集所述融合多肽来制得本发明的融合多肽。

本发明进一步涉及修饰宿主细胞产生的多肽的糖基化形式 (profile) 的方法, 包括将本发明的核酸或载体引入所述宿主细胞中。

优选,修饰的多肽是 IgG 或其含有 Fc 区的片段。更优选,多肽是 IgG1, 或其含有 Fc 区的片段。另一优选实施方案中,修饰的多肽是融合蛋白, 该融合蛋白包括等价于人 IgG Fc 区的区域。

本发明进一步涉及含有本发明的核酸和表达载体的宿主细胞。一实施方案中,本发明涉及宿主细胞,该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性的融合多肽的核酸,表达量足以修饰所述宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖,其中所述多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白,融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。优选实施方案中,所述宿主细胞产生的多肽是 IgG 或其片段。更优选,所述宿主细胞产生的多肽是 IgG1 或其片段。或者,所述宿主细胞产生的多肽是融合蛋白,该融合蛋白包括等价于人 IgG 例如 IgG1 的 Fc 区的区域。

作为修饰的结果本发明宿主细胞所产生的修饰多肽呈现提高的 Fc 受体结合亲和性和/或提高的效应子功能。优选,提高的 Fc 受体结合亲和性是和 Fc γ 激活受体如 Fc γ RIIIIa 受体结合的提高。提高的效应子功能优选是以下一个或多个的提高:抗体依赖性细胞毒性的提高、抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 的提高、细胞因子分泌的提高、通过抗原递呈细胞的免疫复合体介导的抗原摄取的提高、Fc 介导的细胞毒性的提高、和 NK 细胞结合的提高、和巨噬细胞结合的提高、和多形核细胞 (PMN) 结合的提高、和单核细胞结合的提高、靶结合抗体交联的提高、诱导凋亡直接信号的增强、树突细胞成熟的提高和 T 细胞致敏的提高。

特别优选的实施方案中,本发明的宿主细胞是 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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,和所述宿主细胞产生的多肽是抗 CD20 抗体如 IDEC-C2B8。另一优选实施方案中,宿主细胞是嵌合抗人 EGFR 单克隆抗体 C225。

除了含有本发明的编码融合多肽的核酸,本发明的宿主细胞进一

步含有至少一种截短的 (transected) 核酸, 该核酸编码抗体分子、保留功能性 Fc 区的抗体片段或融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。优选实施方案中, 至少一种截短的核酸编码抗 CD20 抗体, 嵌合抗人成神经细胞瘤单克隆抗体 chCE7, 嵌合抗人肾脏细胞癌单克隆抗体 chG250, 嵌合抗人结肠、肺和乳癌单克隆抗体 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癌抗体 A33, 直接对抗 GD3 神经节苷脂 R24 的抗人黑素瘤抗体, 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, 抗人 PSCA 抗体, 抗人 CD22 抗体, 抗人 CD30 抗体, 抗 TAG72 抗体, 抗高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA) 的抗体, 抗 GD3 神经节苷脂抗体, 抗 GD2 神经节苷脂抗体, 抗 GM2 神经节苷脂抗体, 抗人神经节苷脂抗体, 抗 EGFRvIII 抗体, 抗整联蛋白抗体, 抗 CD80 抗体, 抗 LeY 抗体, 抗粘蛋白抗体, 抗 MUC18 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 核蛋白抗体, 抗人异常糖基化的 MUC1 抗体, 对抗含有 ED-B 结构域的人纤连蛋白变体的抗体或抗人 HER2/neu 抗体。

本发明还涉及在宿主细胞中生产多肽的方法, 包括 (a) 在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞, 宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 活性或 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶 (“GalT”) 活性的融合多肽的核酸, 产生的多肽选自整个抗体分子、含有 Fc 区的抗体片段和融合蛋白, 融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域, 其中所述具有 GnTIII 活性或 GalT 活性的融合多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽 Fc 区中的寡糖; 和 (b) 分离所述多肽。优选实施方案中, 融合多肽包括 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III 的催化结构域。特别优选的实施方案中, 融合多肽进一步包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。优选, 高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 或 $\beta(1,2)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I

(GnTI)的高尔基体定位结构域。或者,高尔基体定位结构域选自甘露糖苷酶 I 的定位结构域、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 的定位结构域和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。本发明方法产生的多肽具有提高的 Fc 受体结合亲和性和/或提高的效应子功能。优选,提高的效应子功能是以下一个或多个: Fc 介导的细胞毒性的提高(包括抗体依赖性细胞毒性的提高)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的提高、细胞因子分泌的提高、通过抗原递呈细胞的免疫复合体介导的抗原摄取的提高、和 NK 细胞结合的提高、和巨噬细胞结合的提高、和单核细胞结合的提高、和多形核细胞结合的提高、靶结合抗体交联的提高、诱导凋亡的直接信号的增强、树突细胞成熟的提高和 T 细胞致敏的提高。提高的 Fc 受体结合亲和性优选是和 Fc 活化受体如 Fc γ RIIIIa 受体结合的提高。

另一实施方案中,本发明涉及通过本发明方法生产的多肽,其在所述多肽的 Fc 区中具有增加比例的二等分(bisected)寡糖。仍然另一实施方案中,作为所述修饰的结果通过本发明方法生产的多肽具有增加比例的 Fc 区中非岩藻糖基化的寡糖。非岩藻糖基化的寡糖可以是杂合型或复合型。特别优选的实施方案中,通过本发明的宿主细胞和方法生产的多肽具有增加比例的 Fc 区中二等分、非岩藻糖基化的寡糖。二等分、非岩藻糖基化的寡糖可以是杂合的或复合的。特别地,本发明方法可以用于生产多肽,其中多肽 Fc 区中的寡糖的至少 15%、更优选至少 20%、更优选至少 25%、更优选至少 30%、更优选至少 35%、更优选至少 40%、更优选至少 45%、更优选至少 50%、更优选至少 55%、更优选至少 60%、更优选至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%、更优选至少 99%,是非岩藻糖基化的。本发明方法还可以用来生产多肽,其中多肽 Fc 区中的寡糖至少 15%、更优选至少 20%、更优选至少 25%、更优选至少 30%、更优选至少 35%、更优选至少 40%、更优选至少 45%、更优选至少 50%、更优选至少 55%、更优选至少 60%、更优选至少 65%、更优选

至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%、更优选至少 99%，是二等分的。仍然进一步，本发明方法可以用来生产多肽，其中多肽 Fc 区中的寡糖至少 15%、更优选至少 20%、更优选至少 25%、更优选至少 30%、更优选至少 35%、更优选至少 40%、更优选至少 45%、更优选至少 50%、更优选至少 55%、更优选至少 60%、更优选至少 65%、更优选至少 70%、更优选至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、更优选至少 95%、更优选至少 96%、更优选至少 97%、更优选至少 98%、更优选至少 99%，是二等分的、非岩藻糖基化的。本发明方法还可以用于生产多肽，其中多肽 Fc 区中的寡糖至少 15%、更优选至少 20%、更优选至少 25%、更优选至少 30%、更优选至少 35%是二等分的杂合非岩藻糖基化的。

另一实施方案中，本发明涉及通过本发明方法生产的抗体，该抗体工程化以具有提高的效应子功能和/或提高的 Fc 受体结合亲和性。优选，提高的效应子功能是以下的一个或多个：Fc 介导的细胞毒性的提高（包括抗体依赖性细胞毒性的提高）、抗体依赖性细胞吞噬作用（ADCP）的提高、细胞因子分泌的提高、通过抗原递呈细胞的免疫复合体介导的抗原摄取的提高、和 NK 细胞结合的提高、和巨噬细胞结合的提高、和单核细胞结合的提高、和多形核细胞结合的提高、靶结合抗体交联的提高、诱导凋亡的直接信号的增强、树突细胞成熟的提高和 T 细胞致敏的提高。优选的实施方案中，提高的 Fc 受体结合亲和性是和 Fc 激活受体结合的提高，更优选是和 Fc γ RIIIa 受体结合的提高。本发明进一步涉及含有 Fc 区的抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。这样的抗体片段和融合蛋白呈现提高的 Fc 受体结合亲和性和/或提高的效应子功能。

本发明进一步涉及药物组合物，包括本发明的抗体、保留 Fc 区的抗体片段以及融合蛋白和药理学上可接受的载体，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

本发明进一步涉及该药物组合物在治疗癌症方法中的用途。特别

地，本发明涉及治疗癌症的方法，包括给药治疗有效量的本发明药物组合物。

本发明还涉及宿主细胞，包括含有编码融合多肽的核酸分子的表达载体，其中融合多肽具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII 活性) 并含有高尔基体停留多肽的定位结构域；和包括编码多肽的核酸分子的表达载体，其中多肽具有 α -甘露糖苷酶 II (ManII) 活性。优选实施方案中，编码融合多肽的核酸分子和编码具有甘露糖苷酶 II 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上或分开的表达载体上。另一优选实施方案中，融合多肽含有 GnTIII 的催化结构域。另外的优选实施方案中，高尔基体定位结构域是 ManII、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II、甘露糖苷酶 I 或 α 1, 6-N 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。进一步优选的实施方案中，宿主细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞和植物细胞。优选，宿主细胞是 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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。

本发明进一步提供宿主细胞，包括含有编码融合多肽的核酸分子的表达载体，融合多肽具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII 活性) 并含有高尔基体停留多肽的定位结构域，含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中多肽具有 α -甘露糖苷酶 II (ManII) 活性，和含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中多肽具有 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II (GnTII) 活性。优选实施方案中，编码融合多肽的核酸分子、编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上或分开的表达载体上。还优选的是编码融合多肽的核酸分子在一个表达载体上，而编码具有 ManII 活性多肽的核酸分子和编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。还优选的是，编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在一个表达载体上，而编码融合多肽的核酸分子和编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。另一实施方

案中，GnTII 在一个表达载体上，而编码融合多肽的核酸分子以及编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。

另外一方面，本发明涉及宿主细胞，包括含有编码融合多肽的核酸分子的表达载体，其中融合多肽具有 β (1,4)-半乳糖基转移酶 (GalT) 活性并包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域；和含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中多肽具有甘露糖苷酶 II (ManII) 活性。优选实施方案中，编码融合多肽的核酸分子、编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上或在分开的表达载体上。优选，融合多肽含有 GalT 的催化结构域。另外的实施方案中，高尔基体定位结构域是 ManII、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I、 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II、甘露糖苷酶 I 或 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选实施方案中，宿主细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。优选，宿主细胞是 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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。

另外一方面，本发明涉及宿主细胞，包括含有编码融合多肽的核酸分子的表达载体，其中融合多肽具有 β (1,4)-半乳糖基转移酶 (GalT) 活性并包括高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域；和含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中多肽具有甘露糖苷酶 II (ManII) 活性；以及含有编码多肽的核酸分子的表达载体，其中多肽具有 β (1,2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II (GnTII) 活性。优选，每个核酸分子在同一表达载体上。分开的实施方案中，每个核酸分子在分开的载体上。本发明进一步提供编码融合多肽的核酸分子是在一个表达载体上，而编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子和编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。本发明还提供了编码 ManII 的核酸分子在一个表达载体上，而编码融合多肽的核酸分子和编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在同一表达载体上。本发明还提供了编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸分子在一个表达载体上，而编码融合多肽的核酸分子和编码具有 ManII 活性的多肽的核酸分子在

同一表达载体上。优选实施方案中，融合多肽含有 GalT 的催化结构域。进一步优选的实施方案中，高尔基体定位结构域是 ManII、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II、甘露糖苷酶 I 或 α 1, 6-N 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。

本发明进一步提供了宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中宿主细胞产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

本发明还提供了宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸、至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸和至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中宿主细胞产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

本发明另外提供了宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中宿主细胞产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

分开的实施方案中，本发明还提供了宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸、至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸和至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸，表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，其中宿主细胞产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。优选，作为修饰的结果通过宿主细胞产生的多肽呈现提高的 Fc 受体结合亲和性。另外的优选实施方案中，作为修饰的结果宿主细胞产生的多肽呈现提高的效应子功能。优选，提高的效应子功能是以下的一个或多个：Fc 介导的细胞毒性的

提高、和NK细胞结合的提高、和巨噬细胞结合的提高、和多形核细胞结合的提高、和单核细胞结合的提高、诱导凋亡的直接信号的增强、树突细胞成熟的提高和/或T细胞致敏的提高。

另外的实施方案中，本发明涉及在宿主细胞中生产多肽的方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中融合多肽表达的量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖；和分离多肽。优选，进一步将宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸。另外的优选实施方案中，融合多肽包括 GnTIII 的催化结构域。进一步优选的实施方案中，融合多肽包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。优选，高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I、甘露糖苷酶 I、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 或 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选，作为上述修饰的结果，多肽具有提高的效应子功能。

本发明进一步涉及在宿主细胞中生产多肽的方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞是工程化来表达至少一种编码具有 GalT 活性的融合多肽的核酸和至少一种编码具有 ManII 活性的多肽的核酸，所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中融合多肽的表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖。另外的实施方案中，进一步将宿主细胞工程化来表达至少一种编码具有 GnTII 活性的多肽的核酸。优选，融合多肽包括 GalT 的催化结构域。还优选的是融合多肽进一步包括异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域。优选，高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 I、甘露糖苷酶 I、 β (1, 2)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 或 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选，作为上述修饰的结果，多

肽具有提高的效应子功能。特别地，优选实施方案中，宿主细胞产生的多肽在 Fc 区中具有比例增加的二等分、非岩藻糖基化的寡糖。优选，二等分、非岩藻糖基化的寡糖是杂合的。更优选，二等分、非岩藻糖基化的寡糖是复合的。优选实施方案中，多肽 Fc 区中的寡糖至少约 10%至 95%是二等分、非岩藻糖基化的。特别优选本发明糖基化多肽 Fc 区中的寡糖约 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%是二等分、非岩藻糖基化的。

另外的优选实施方案中，本发明提供了根据本发明方法工程化的具有提高的效应子功能的抗体。

另外的实施方案中，本发明进一步提供了含有根据本发明方法工程化的抗体的药物组合物。优选，本发明药物组合物包括药物学上可接受的载体。

本发明进一步提供了治疗恶性肿瘤的方法，包括将治疗有效量的本发明药物组合物给药于需要的患者。

本发明进一步涉及在宿主细胞中生产具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的多肽的方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞是工程化来表达至少一种编码 GalT 的核酸和至少一种编码 ManII 的核酸，所产生的多肽选自整个抗体分子、包括免疫球蛋白 Fc 区的抗体片段，其中 GalT 或 ManII 中的一个或两个的表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，且其中作为修饰的结果多肽具有提高的 Fc 介导的细胞毒性；和分离具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的多肽。另外的优选实施方案中，GalT 的表达水平产生了具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的抗体分子或包括免疫球蛋白 Fc 区的抗体片段。

本发明进一步涉及在宿主细胞中生产具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的多肽的方法，包括在允许多肽产生的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞是工程化来表达至少一种编码 GalT 的核酸和至少一种编码 ManII 的核酸，所产生的多肽选自整个抗体分子、包括免疫球蛋白 Fc 区的抗体片段，其中 GalT 或 ManII 中的一个或两个的表达水平足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，且其中作为修饰的结果多肽具

有提高的 Fc 介导的细胞毒性；和分离具有提高的 Fc 介导的细胞毒性的多肽。优选实施方案中，上述宿主细胞进一步包括至少一种编码 GnTIII 的核酸，其中 GnTIII 的表达量足以修饰宿主细胞产生的多肽 Fc 区中的寡糖，且其中作为修饰的结果多肽具有提高的 Fc 介导的细胞毒性。优选，GalT、ManII 或 GnTIII 中的一个或多个的表达水平足以形成多肽 Fc 区中的二等分寡糖。更优选，Fc 区中的二等分寡糖对 Fc 区中总寡糖的比例至少约 25、35、45、55、60、65、70、75、80、85、90 或 95%。优选，Fc 区中的二等分寡糖对 Fc 区中总寡糖的比例至少约 45%。优选实施方案中，二等分寡糖是复合的或杂合的。优选，宿主细胞是哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。更优选，宿主细胞是植物细胞。

另一方面，本发明涉及在宿主细胞中生产多肽的方法：

a. 在允许产生多肽的条件下培养宿主细胞，该宿主细胞是工程化来表达至少一种编码具有 α -甘露糖苷酶 II 活性的核酸分子，所产生的多肽选自整个抗体分子、抗体片段和融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域，其中所述具有 α -甘露糖苷酶 II 活性的多肽的表达量足以修饰所述宿主细胞产生的所述多肽的 Fc 区中的寡糖；和

b. 分离所述宿主细胞产生的所述多肽。

本发明还涉及作为所述修饰寡糖的结果具有提高的效应子功能和/或提高的 Fc 受体结合的多肽，尤其是抗体，以及它们在治疗疾病尤其是肿瘤的治疗组合物中的用途。

需要修饰糖基化模式的蛋白的编码核酸的鉴定和产生

本发明提供了生产的方法和宿主系统的用途，用来生产糖基化形式的抗体、含有 Fc 区的抗体片段和融合蛋白，融合蛋白的一个区域等价于免疫球蛋白的 Fc 区，具有提高的 Fc 受体结合亲和性，优选 Fc 激活受体，和/或具有提高的效应子功能，包括抗体依赖性细胞毒性。

靶表位的鉴定和具有潜在治疗价值的其糖基化模式需要修饰的抗体的产生，及其各自编码核酸序列的分离都在本发明范围之内。

可以使用各种本领域已知的方法来生产目的靶表位的抗体。这样的抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、人源化、全人、单链、Fab片段和通过 ScFv、Fab、VH、IgG 表达文库产生的片段。这样的抗体可以用作如诊断剂或治疗剂。作为治疗剂，特别优选中和抗体，即那些和配体、底物以及连接物分子结合相竞争的抗体。

对于抗体生产，通过注射目的靶蛋白来免疫各种宿主动物，包括但不限于兔子、小鼠、大鼠等。通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂在动物中产生多克隆抗体。根据宿主物种，可以使用各种佐剂来增强免疫应答，包括但不限于，弗氏佐剂 (完全和不完全的)、矿物胶如氢氧化铝、表面活性剂如溶血卵磷脂、多聚醇、聚阴离子、肽、皂苷、油乳浊液，匙孔血蓝蛋白、二硝基酚和可能有用的人佐剂如 BCG (卡介苗) 和小型棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。通过将如 100g 或 5g 蛋白质或缀合物 (各自对于兔子和小鼠) 和 3 体积弗氏完全佐剂，并在多个部位将溶液皮内注射来将动物免疫以对抗抗原、免疫缀合物或衍生物。一个月后，通过在多个部位皮下注射弗氏佐剂中 1/5 至 1/10 原始量的肽和缀合物来加强动物，7 至 14 天后，将动物去毛并分析血清的抗体滴定。加强动物直至滴定平稳。优选，用相同抗原但和不同的蛋白质和/或通过不同的交联剂缀合的缀合物加强动物。还可以在重组细胞培养物如蛋白融合中制得缀合物。

使用通过连续培养细胞系产生抗体分子的任何技术来制备靶目标的单克隆抗体。这些包括，但不限于，杂交瘤技术，最初描述于 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256 : 495-97 (1975)，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)); 此外，可以使用发展来生产“嵌合抗体”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), 通过拼接来自合适抗原特异性的小鼠抗体分子的基因和来自合适生物活性的人抗体分子的基因。这些技术可以用来产生嵌合抗体, 还包括其他哺乳动物的抗体分子。或者, 可以使用描述用来生产单链抗体的技术 (美国专利 4,946,778) 来生产具有理想特异性的单链抗体。本发明进一步涉及根据本发明方法已经糖基工程化的人源化抗体。生产人化抗体的方法公开于例如, Queen 等的美国专利 No. 6,180,320, 在此以其整体引入作为参考。

可以通过已知技术来生产含有目的靶蛋白特异性结合位点的抗体片段。例如, 这样的片段包括, 但不限制于, 通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 $F(ab')_2$ 片段和通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫桥键产生的 Fab 片段。或者, 可以构建 Fab 表达文库 (Huse 等, *Science* 246: 1275-81 (1989)) 来快速而容易地鉴定出带有目的靶蛋白理想特异性的单克隆 Fab 片段。

一旦鉴定出糖基化模式具有需要修饰的抗体或抗体片段, 使用本领域公知的技术鉴定和分离编码核酸序列。

a. 用于产生具有改变的糖基化模式的蛋白质的细胞系的生产

本发明提供了用于生产具有改变的糖基化模式的蛋白质的宿主细胞表达系统。尤其是, 本发明提供了用于生产具有提高治疗价值的糖基化形式的蛋白质的宿主细胞系统。因此, 一方面, 本发明提供了宿主细胞表达系统, 其是经选择或工程化来表达例如具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并包括异源高尔基体停留多肽的定位结构域的融合多肽。特别地, 这样的宿主细胞表达系统可以工程化来含有编码这样的融合多肽的重组核酸分子, 可操作地和组成型或调节的启动子系统连接。

一特定实施方案中, 本发明提供了宿主细胞, 该宿主细胞已经工程化来表达至少一种编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III

(GnTIII) 活性并含有异源高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸。一方面, 将宿主细胞工程化来包括至少一种编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的基因的核酸分子。

通常, 任何类型的培养细胞系可以用作来工程化本发明宿主细胞系的背景。优选实施方案中, CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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、其他哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞用作产生本发明工程化宿主细胞的背景细胞系。(参见 Ma, J. K.-C., 等, *Nature Genetics* 4: 794-805 (2003 年 10 月) 及其引用的参考文献) (其全部内容在此引入作为参考)。

本发明涉及包括如在此所定义的表达具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的任何工程化宿主细胞。

可以在组成型启动子或可调表达系统控制下, 表达一个和数个编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII 活性) 并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸。合适的可调表达系统包括, 但不限制于, 四环素可调表达系统、蜕皮激素可诱导的表达系统、lac-开关表达系统、糖皮质激素可诱导的表达系统、温度诱导的启动子系统和金属硫蛋白金属诱导的启动子系统。如果宿主细胞系统中包括数个不同的编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸, 其中的一些可以在组成型启动子控制下表达, 而另一些在可调表达系统控制下表达。认为最大表达水平是稳定融合多肽表达的对细胞生长率没有显著副作用的最高可能水平, 使用常规试验来测定。通过本领域通常已知的方法来测定表达水平, 包括 Western 印迹分析, 使用对具有 GnTIII 活性的多肽特异性的抗体或对和具有 GnTIII 活性的多肽融合的肽标记特异性的抗体, Northern

印迹分析,使用对编码具有 GnTIII 活性的多肽的基因特异性的核酸探针或对编码和具有 GnTIII 活性的多肽融合的肽标记的核酸特异性的探针,或测量 GnTIII 活性。或者,可以使用和 GnTIII 的生物合成产物结合的凝集素,例如, E₄-PHA 凝集素。或者,可以使用功能性试验,其测量了通过细胞产生的抗体介导的提高了 Fc 受体结合和提高了效应子功能,该细胞工程化而具有编码 GnTIII 活性多肽的核酸。进一步的替换方案中,核酸可以和报告基因可操作地连接;通过测量报告基因表达水平相关的信号来测定具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的表达水平。报告基因可以和编码融合多肽的核酸作为单个 mRNA 分子一起转录;通过内部核糖体进入位点 (IRES) 和通过帽独立翻译增强子 (CITE) 来连接各自的编码序列。报告基因可以和至少一个编码具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸一起翻译,使得形成单个肽链。编码本发明融合多肽的核酸可以在单个启动子的控制下可操作地和报告基因连接,使得编码融合多肽的核酸和报告基因转录成 RNA 分子,其可变剪接成两个分开的信使 RNA (mRNA) 分子;所得到 mRNA 中的一个翻译成报告蛋白,另一个翻译成融合多肽。

如果表达了数个不同的编码具有 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域融合多肽的核酸,它们可以这样安排使得它们以一个和数个 mRNA 分子转录。如果它们作为单个 mRNA 分子转录,通过内部核糖体进入位点 (IRES) 和通过帽子独立翻译增强子 (CITE) 来连接各自的编码序列。可以将它们从单个启动子转录成 RNA 分子,其可变剪接成数个分开的信使 RNA (mRNA) 分子,然后其每个翻译成各自编码的融合多肽。

另一实施方案中,本发明提供了宿主表达系统,用于生产治疗抗体,具有提高了 Fc 受体结合亲和性,尤其是和 Fc 激活受体结合,和提高了效应子功能,包括抗体依赖性细胞毒性。通常,宿主细胞表达

系统已经工程化和/或选择来表达编码需要产生改变的糖基化形式的抗体的核酸，和至少一种编码具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸一起表达。一实施方案中，用至少一种编码这样的融合多肽的核酸来转染宿主细胞系统。通常，选择转染的细胞来鉴定和分离稳定表达本发明融合多肽的克隆。

任何类型的培养细胞系可以用作来工程化本发明宿主细胞系的背景。优选实施方案中，可以使用 CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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、其他哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。通常，这样的细胞系工程化来进一步包括至少一种转染的核酸，该核酸编码整个抗体分子、含有免疫球蛋白 Fc 区的抗体片段或融合蛋白，融合蛋白包括等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。通常这样的抗体生产细胞系源自以 20 至 120pg/(细胞.天) 高特异性产量产生和分泌抗体的克隆。可替换的实施方案中，表达目的特定抗体的杂交瘤细胞系用作生产本发明工程化细胞的背景细胞系。

一实施方案中，将编码抗体、抗体片段或 Fc 融合多肽的核酸克隆进抗体表达载体中，然后转染进宿主细胞中，并选择和筛选特异性抗体产量高且稳定的细胞克隆。然后用糖蛋白-修饰糖基转移酶表达载体转染这样所选择的克隆，该表达载体含有编码以下的核酸，例如，(a) 具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性的融合多肽，或 (b) 具有 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶 (GalT) 活性的融合多肽，或 (c) 具有高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (ManII) 活性的多肽，或 (d) 具有 GnTIII 活性的融合多肽和进一步具有 ManII 活性的多肽，或 (e) 具有 GalT 活性的融合多肽和进一步具有 ManII 活性的多肽。然后选择和筛选克隆，该克隆在导致抗体特异性高产量的水平上稳定表达抗体编码基因，和在导致 Fc 区糖基化模式修饰的表达水平上稳定表达糖蛋白修饰糖基化转移酶基因，所述修饰包括非岩藻糖基化寡糖部分的增加，寡糖是二等分或非二等分的，其进一步可以是复合型或杂合型，其和

增加的 Fc 受体结合相关，特别是 Fc-Fc γ RIII 结合亲和性的提高，和 Fc 受体介导的效应子功能的提高，包括但不限于 Fc 依赖性细胞毒性。以下描述选择和筛选方法。

另一实施方案中，颠倒上述两个转染即抗体表达载体转染和糖蛋白修饰糖基化转移酶表达系统载体转染的次序，即首先用糖蛋白修饰糖基转移酶表达载体转染宿主细胞，然后用抗体表达载体转染。这样的方法中，可以通过以下进一步描述的任一方法筛选来自第一个转染足够稳定表达水平的糖基转移酶基因的克隆，或者用抗体表达载体瞬时转染该克隆的复制子，然后用以下进一步描述的筛选方法，以便鉴定出稳定表达水平的糖基转移酶基因的克隆，该表达水平导致 Fc 区糖基化模式的修饰和导致提高 Fc 受体包括 Fc γ RIII 受体的结合亲和性以及提高 Fc 受体介导的效应子功能，包括 Fc 依赖性细胞毒性。

进一步实施方案中，在单个转染步骤中一起转染抗体编码基因和糖基转移酶基因，在单个表达载体中或在分开的载体中。

通常，宿主细胞系统中的至少一种核酸编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性或 β (1, 4)-半乳糖基转移酶活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽，或者，其编码具有高尔基体 α -甘露糖苷酶 II 活性的多肽。

可以在组成型启动子或可调表达系统的控制下来表达一个或数个编码本发明融合多肽的核酸。合适的可调表达系统包括，但不限制于，四环素可调表达系统、蜕皮激素可诱导的表达系统、lac-开关可调表达系统、糖皮质激素可诱导的表达系统、温度可诱导的启动子系统和金属硫蛋白金属诱导的表达系统。如果宿主细胞系统中包括数个不同的编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸，其中的一些可以在组成型启动子控制下表达，而另一些在可调表达系统控制下表达。认为最大表达水平是稳定融合多肽表达的对细胞生长率没有显著副作用的最高可能水平，使用常规试验来测定。通过本领域通常已知的方法来测定表达水平，包括 Western 印迹分析，例如使

用对具有 GnTIII 活性的多肽特异性的抗体或对和具有 GnTIII 活性的多肽融合的肽标记特异性的抗体, Northern 印迹分析, 例如使用对编码具有 GnTIII 活性的多肽的基因特异性的核酸探针或对编码和具有 GnTIII 活性的多肽融合的肽标记的核酸特异性探针, 或测量 GnTIII 活性。或者, 可以使用和 GnTIII 的生物合成产物结合的凝集素, 例如, E₄-PHA 凝集素。或者, 可以使用功能性试验, 其测量了通过细胞产生的抗体介导的提高了 Fc 受体结合和提高了效应子功能, 该细胞工程化而具有编码 GnTIII 活性多肽的核酸。进一步的替换方案中, 核酸可以和报告基因可操作地连接; 通过测量报告基因表达水平相关的信号来测定本发明融合多肽的表达水平。报告基因可以和编码所述糖蛋白-修饰糖基转移酶的核酸作为单个 mRNA 分子一起转录; 通过内部核糖体进入位点 (IRES) 和通过帽子独立翻译增强子 (CITE) 来连接各自的编码序列。报告基因可以和至少一个编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸一起翻译, 使得形成单个肽链。编码融合多肽的核酸可以在单个启动子的控制下可操作地和报告基因连接, 使得编码本发明融合多肽的核酸和报告基因转录成 RNA 分子, 其可变剪接成两个分开的信使 RNA (mRNA) 分子; 所得到 mRNA 中的一个翻译成报告蛋白, 另一个翻译成融合多肽。

如果表达了数个不同编码具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的核酸, 它们可以这样排列使得它们转录成一个和数个 mRNA 分子。如果它们作为单个 mRNA 分子转录, 通过内部核糖体进入位点 (IRES) 和通过帽子独立翻译增强子 (CITE) 来连接各自的编码序列。它们可以从单个启动子转录成 RNA 分子, 其可变剪接成数个分开的信使 RNA (mRNA) 分子, 然后其每个翻译成各自编码的融合多肽。

i. 表达系统

可以使用本领域据技术人员公知的方法来构建表达载体, 该表达载体含有目的蛋白质的编码序列和具有 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的编码序列以及合适的转录/翻译控制信号。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, 例如描述于 Maniatis 等, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989) 和 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates 和 Wiley Interscience, N. Y (1989) 中的技术。

可以利用各种宿主-表达系统来表达本发明目的蛋白质的编码序列和融合多肽的编码序列。优选, 哺乳动物细胞用作宿主细胞系统, 用含有目的蛋白质的编码序列和融合多肽的编码序列的重组质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体来转染。更特别地, CHO 细胞、BHK 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、YO 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、其它哺乳动物细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞用作宿主细胞系统。表达系统和选择方法的一些实例描述于以下的参考文献中, 在此作为参考: Borth 等, *Biotechnol. Bioen.* 71(4): 266-73 (2000-2001), Werner 等, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8): 870-80 (1998), Andersen 和 Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), Chadd 和 Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001), 和 Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001)。另一实施方案中, 可以使用其它真核宿主细胞系统, 包括酵母细胞, 用含有目的蛋白质的编码序列和本发明的融合多肽的编码序列的重组酵母表达载体转染; 昆虫细胞系统, 用含有目的蛋白质的编码序列和本发明融合多肽的编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 杆状病毒) 感染; 植物细胞系统, 用重组病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 感染或用重组质粒表达载体 (例如, Ti 质粒) 转染, 表达载体含有目的蛋白质的编码序列和本发明融合多肽的编码序列; 或动物细

胞系统，用重组病毒表达载体（例如，腺病毒，牛痘病毒）感染，表达系统包括工程化来含有多拷贝的编码目的蛋白质 DNA 的序列和本发明融合多肽的编码序列的在双微染色体中（例如小鼠细胞系）稳定扩增（CHO/dhfr）或不稳定扩增的细胞系。

对于本发明的方法，通常稳定表达比瞬时表达优选，因为稳定表达通常获得更多重现性的结果还更易于大规模生产，即，在生产规模的细胞系中生产本发明的糖基工程化抗体。除了使用含有病毒复制起点的表达载体，宿主细胞还可以用通过合适的表达控制元件（例如，启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等）来控制的各自编码核酸和可选择标记转化。引入外源 DNA 后，使工程化细胞在富集培养基中生长 1-2 天，然后转换至选择培养基。重组质粒中的可选择标记给予了用来选择的抗性并选择细胞，该细胞稳定地将质粒整合进它们的染色体并生长来形成基因座（foci），接着克隆并扩展成细胞系。

可以使用多种选择系统，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，其各自可以用于 tk^- 、 $hgprt^-$ 或 $aprt^-$ 细胞中。还有，抗代谢物抗性可以用作选择以下的基础：dhfr，其给予了氨甲喋呤抗性（Wigler 等，*Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1989)；O'Hare 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)）；gpt，其给予霉酚酸抗性（Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)）；neo，其给予了氨基糖苷 G-418 抗性（Colberre-Garapin 等，*J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)），和 hygro，其给予了潮霉素抗性（Santerre 等，*Gene* 30:147 (1984)）。最近，描述了其它选择基因，即 $trpB$ ，其使细胞利用吲哚代替色氨酸； $hisD$ ，其使细胞利用组氨酸替代组氨酸（Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047 (1988)）；谷氨酰胺合酶系统；和 ODC（鸟氨酸脱羧酶），其

给予了鸟氨酸脱羧酶抑制剂、2- (二氟甲基)-DL-鸟氨酸、DFMO 的抗性 (McConlogue: *Current Communication in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory 编辑 (1987))。

ii. 表达具有修饰的糖基化模式蛋白质的转染子或转化子的鉴定通过至少四个常规方法来鉴定含有编码序列和表达生物活性基因产物的宿主细胞; (a) DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交; (b) “标记”基因功能的存在或缺失; (c) 评价转录水平, 通过宿主细胞中各自 mRNA 转录本的表达来测量; 和 (d) 检测基因产物, 通过免疫试验或其生物活性来测量。

第一个方法中, 使用含有和各自编码序列或其部分或其衍生物同源的核苷酸序列的探针通过 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交来检测插入表达载体中的目的蛋白质的编码序列和本发明融合多肽的编码序列的存在。

第二个方法中, 基于特定“标记”基因功能的存在或不存在 (例如, 胸苷激酶活性、抗生素抗性、氨甲喋呤抗性、转化表型、杆状病毒中包涵体的形成等) 来鉴定和选择重组表达载体/宿主系统。例如, 如果目的蛋白质的编码序列和本发明的融合多肽编码序列插入载体的标记基因序列中, 通过标记基因功能的缺失来鉴定含有各自编码序列的重组子。或者, 标记基因可以和编码序列串联放置, 在用来控制编码序列表达的相同或不同启动子的控制下。标记响应诱导或选择的表达表明了目的蛋白质的编码序列和融合多肽的编码序列的表达。

第三个方法中, 通过杂交试验来评价目的蛋白质的编码序列和本发明融合多肽的编码序列的转录活性。例如, 使用和目的蛋白质的编码序列和本发明融合多肽的编码序列或其特定部分同源的探针通过 Northern 印迹来分离和分析 RNA。或者, 可以提取宿主细胞的总核酸并试验和这样探针的杂交。

第四个方法中, 可以免疫学评价目的蛋白的蛋白产物的表达和具有 β (1, 4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 活性并含有异种高

尔基体停留多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的编码序列的表达, 例如通过 Western 印迹, 免疫试验如放射性免疫沉淀、酶联免疫试验等。然而, 表达系统的成功最终试验包括生物活性基因产物的检测。

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. 具有提高的效应子功能包括抗体依赖性细胞毒性的抗体的产生和用途

优选实施方案中, 本发明提供了具有提高的 Fc 受体结合和/或效应子功能包括抗体依赖性细胞毒性的糖基化形式的抗体和抗体片段。

未缀合单克隆抗体 (mAb) 用于治疗一些癌症的临床试验最近已经产生了鼓舞人心的结果。Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997); Deo 等, *Immunology Today* 18: 127 (1997)。嵌合的、未缀合 IgG1 已经批准用于低级或滤泡 B-细胞非霍奇金氏淋巴瘤。Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997), 而另一未缀合 mAb, 靶向实体乳腺肿瘤的人源化 IgG1, 已经在 III 期临床试验中显示出远景结果。Deo 等, *Immunology Today* 18: 127 (1997)。这两个 mAb 的抗原在它们各自的肿瘤细胞中高度表达且通过效应细胞在体外或体内抗体介导有效的肿瘤破坏。相反, 许多其它未缀合 mAb 带有细微的肿瘤特异性不能引发足以有效用于临床应用的效应子功能。Frost 等, *Cancer* 80: 317-33 (1997); Surfus 等, *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996)。对于这些较弱 mAb 中的一些, 最近测试了辅助细胞因子治疗。添加细胞因子通过提高循环淋巴细胞的活性和数量可以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, 抗体靶细胞的溶胞攻击, 由于白细胞受体和抗体恒定区 (Fc) 的结合而被引发。Deo 等, *Immunology Today* 18: 127 (1997)。

提高未缀合 IgG1 的 ADCC 活性的不同但互补的方法是工程化抗体的 Fc 片段。蛋白质工程研究已经显示 Fc γ R 和 IgG CH2 结构域的较低

铰链区相互作用。Lund 等, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996)。然而, Fc γ R 结合还需要存在和 CH2 区保守 Asn297 处共价连接的寡糖。Lund 等, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996); Wright 和 Morrison, *Trends Biotech.* 15: 26-31 (1997), 提出寡糖和多肽都直接提供了相互作用位点或需要寡糖来保持活性 CH2 多肽构象。因此, 寡糖结构的修饰可以发展成提高相互作用亲和性的方法。

IgG 分子在其 Fc 区中携带两个 N-连接寡糖, 每个重链中一个。和任何糖蛋白一样, 抗体以糖基化形式的群体产生, 其共享相同多肽主链但具有和糖基化位点连接的不同寡糖。通常发现于血清 IgG Fc 区中的寡糖是复合双触角型 (bi-antennary type) ((Wormald 等, *Biochemistry* 36: 130-38 (1997)), 带有低含量的末端唾液酸和二等分 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。一些研究表明 Fc γ R 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)。

用于工业和学术界中来生产未缀合治疗 mAb 的小鼠或仓鼠来源的细胞系通常将所需寡糖决定簇连接至 Fc 位点。然而, 这些细胞系表达的 IgG 缺乏在低量血清 IgG 中出现的二等分 GlcNAc。Lifely 等, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995)。相反, 最近观察到大鼠骨髓瘤产生的人源化 IgG1 (CAMPATH-1H) 在其一些糖基化形式中携带二等分 GlcNAc。Lifely 等, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995)。大鼠细胞来源的抗体达到和标准细胞系中产生的 CAMPATH-1H 抗体相似最大量的体外 ADCC 活性, 但是在非常低的抗体浓度。

CAMPATH 抗原通常以高水平存在淋巴瘤细胞上, 且在二等分 GlcNAc 缺失下该嵌合 mAb 具有高 ADCC 活性。Lifely 等, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995)。N-连接糖基化途径中, 通过酶 β (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 III (GnTIII) 加入二等分 GlcNAc。Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64: 163-81 (1986)。

之前的研究使用了单个抗体产生 CHO 细胞系, 该细胞系之前已经工程化以外部调节方式来表达不同水平的克隆 GnTIII 基因酶 (Umana,

P. 等, *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)。该方法第一次建立了 GnTIII 表达和修饰抗体 ADCC 活性之间的严格相关性。

进一步本发明具有提高的 Fc 受体结合亲和性和提高的效应子功能的抗体, 包括但不限于, 通过本发明方法产生的抗人成神经细胞瘤单克隆抗体 (chCE7), 通过本发明方法产生的嵌合抗人肾细胞癌单克隆抗体 (chG250), 通过本发明方法产生的人源化抗 HER2 单克隆抗体 (例如, Trastuzumab (HERCEPTIN), 通过本发明方法产生的嵌合抗人结肠、肺和乳癌单克隆抗体 (ING-1), 通过本发明方法产生的人源化抗人 17-1A 抗原单克隆抗体 (3622W94), 通过本发明方法产生的人源化抗人结肠直肠的肿瘤抗体 (A33), 通过本发明方法产生的直接对抗 GD3 神经节苷脂的抗人黑素瘤抗体 (R24), 和通过本发明方法产生的嵌合抗人鳞状细胞癌单克隆抗体 (SF-25), 通过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), 通过本发明方法产生的抗人非霍金奇氏淋巴瘤单克隆抗体 (Bexxar (tositumomab, Coulter Pharmaceuticals), Oncolym (Techniclone, Alpha Therapeutic)), 通过本发明方法制得的抗人鳞状细胞头和颈癌单克隆抗体 (C225, ImClone Systems), 通过本发明方法制得的抗人直肠和结肠癌单克隆抗体 (Panorex (edrecolomab), Centocor, Glaxo Wellcome), 通过本发明方法产生的抗人卵巢癌单克隆抗体 (Theragyn, Antisoma), 通过本发明方法产生的抗人急性骨髓性白血病单克隆抗体 (SmartM195, Protein Design Labs, Kanebo), 通过本发明方法产生的抗人恶性神经胶质瘤单克隆抗体 (Cotara, Techniclone, Cambridge Antibody Technology), 通过本发明方法产生的抗人 B 细胞非霍金奇氏淋巴瘤单克隆抗体 (IDEC-Y2B8, IDEC Pharmaceuticals), 通过本发明方法产生的抗人实体肿瘤的单克隆抗体 (CEA-Cide, Immunomedics), 通过本发明方法产生的抗人结肠直肠癌单克隆抗体 (碘 131-MN-14, Immunomedics), 通过本发明方法产生的抗人卵巢、肾脏、乳腺和前列腺癌单克隆抗体 (MDX-210, Medarex, Novartis), 通过本发明方法产生的抗人结肠直肠和胰腺癌单克隆抗体

(TTMA, Pharmacie & Upjohn), 通过本发明方法产生的抗人 TAG-72 表达癌单克隆抗体 (MDX-220, Medarex), 通过本发明方法产生的抗人 EGFR-表达癌单克隆抗体 (MDX-447), 通过本发明方法产生的抗 VEGF 单克隆抗体 (Genentech), 通过本发明方法产生的抗人乳腺、肺、前列腺和胰腺癌和恶性黑素瘤单克隆抗体 (BrevaRex, AltaRex), 通过本发明方法产生的抗人急性骨髓性白血病单克隆抗体 (Monoclonal Antibody Conjugate, Immunex)。此外, 本发明涉及抗体片段和融合蛋白, 融合蛋白含有等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域。

ii. 促进 Fc 介导细胞毒性的融合蛋白的产生和用途, 融合蛋白含有等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域

如上所述, 本发明涉及提高治疗抗体的 Fc 受体结合亲和性和/或效应子功能的方法。这通过工程化这样抗体的 Fc 区的糖基化模式来实现, 尤其是通过工程化抗体产生细胞来产生例如具有 GnTIII 活性或 GalT 活性或 ManII 活性的多肽, 该多肽修饰了和这样抗体 Fc 区连接的寡糖。该策略可以用来提高通过带有等价于免疫球蛋白 Fc 区的区域的任何分子介导的而不仅是通过治疗抗体介导的对抗不理想细胞的 Fc 介导的细胞毒性, 由于通过糖基化工程引入的改变只影响了 Fc 区, 因此和 ADCC 机理中涉及的效应细胞表面上的 Fc 受体相互作用。可以运用本发明公开的方法的含有 Fc 的分子, 包括但不限于, (a) 由和 Fc 区 N-端融合的靶蛋白结构域制得的可溶性融合蛋白 (Chamov 和 Ashkenazi, *Trends Biotech.* 14:52 (1996)), 和 (b) 由定位于和 Fc 片段 N-端融合的原生质膜的 II 型跨膜结构域制得的原生质体膜锚定的融合蛋白 (Stabila, P. F., *Nature Biotech.* 16:1357 (1998))。

在可溶性融合蛋白 (a) 的情况中, 靶向结构域引导融合蛋白和不期望细胞如癌细胞结合, 即, 以与治疗抗体类似的方式。因此, 本发明公开的这些分子介导的效应子功能包括 Fc 介导的细胞毒性活性的方法的应用和运用至治疗抗体的方法相同。

在膜锚定融合蛋白 (b) 的情况中, 体内不期望的细胞必须表达编码

融合蛋白的基因。这可以通过基因治疗方法获得，即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至不期望细胞，或通过基因工程化在其表面上表达融合蛋白的细胞移植入体内。后者细胞通常在聚合物胶囊中移植入体内（胶囊化细胞治疗），其中它们不受到Fc介导细胞毒性机理的破坏。然而，胶囊装置破碎和逃逸的细胞变得不理想，可以通过Fc介导细胞毒性来消除。Stabila等，*Nature Biotech.* 16:1357 (1998)。在这种情况下，可以使用本发明公开的方法，通过将引导本发明融合多肽合适或最大表达水平的其它基因表达盒并入基因治疗载体中，或工程化待植入来表达合适或最大表达量的本发明融合多肽的细胞。

根据本发明方法产生的抗体、抗体片段和融合多肽的治疗应用

本发明的抗体（即抗体、抗体片段和融合蛋白，其含有等价于免疫球蛋白Fc区的区域）可以单独用来靶向和杀死体内的肿瘤细胞。抗体还可以结合合适的治疗剂使用来治疗人癌症。例如，抗体可以结合常规治疗方法如化疗、放疗一起使用或和治疗药物或毒素以及淋巴因子或肿瘤抑制生长因子缀合或连接来将治疗剂传送至癌部位。

将这样的治疗剂和抗体缀合的技术是公知的[参见，例如 Arnon等，“Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy”，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld等（编辑），pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等，“Antibodies For Drug Delivery”，*Controlled Drug Delivery*（第2版），Robinson等。（编辑），pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe，“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”，*Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera等。（编辑），pp. 475-506 (1985); 和 Thorpe等，“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”，*Immunol. Rev.* , 62: 119-58 (1982)]。

或者，糖工程化抗体可以和高能辐射例如同位素如 $<131>I$ 结合，当其定位于肿瘤部位时，导致数个细胞直径的杀灭[参见，例如，Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等 (编辑), pp. 303-16 (Academic Press 1985)]。仍然根据另一实施方案，本发明的抗体可以和第二抗体缀合来形成抗体异种缀合物来治疗肿瘤细胞，如 Segal 在美国专利 No. 4,676,980 中描述的。

仍然对于本发明抗体的其它治疗应用包括例如通过重组 DNA 技术缀合或连接至能够将前体药物转化成细胞毒性药物的酶并使用抗体-酶缀合物结合前体药物来将前体药物在肿瘤部位转化成细胞毒性剂[参见，例如，Senter 等, "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49: 5789-5792 (1989); 和 Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4: 188-193 (1990)]。

仍然本发明抗体的另一治疗应用，涉及在补体或部分抗体-药物或抗体-毒素缀合物存在下，用于从癌症患者的骨髓中除去肿瘤细胞。根据该方法，通过用抗体处理可以在体外清洗自体骨髓并将骨髓灌输回患者[参见，例如，Ramsay 等., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8 (2): 81-88 (1988)]。

此外，本发明含有所需单克隆抗体的特异性抗原结合区域的嵌合抗体、重组免疫毒素和其它重组构建体可以用于治疗。例如，本发明的单链免疫毒素可以用来体内治疗人癌症。

类似地，和具有抗肿瘤活性的另一种蛋白例如淋巴因子或制瘤素

的至少功能活性部分结合的含有至少本发明抗体的抗原结合区的融合蛋白，可以用来体内治疗人癌症。此外，本领域已知的重组技术可以用来构建双特异性抗体，其中抗体的一个结合特异性涉及肿瘤相关抗原，而抗体的另一结合特异性是除了所述肿瘤相关抗原以外分子的。

本发明提供了选择性地杀灭肿瘤细胞的方法，该肿瘤细胞表达和本发明单克隆抗体或功能等价物特异性结合的抗原。该方法包括将本发明的糖基工程化抗体或含有其的免疫缀合物（例如免疫毒素）和所述肿瘤细胞接触。这些肿瘤细胞可能形成人癌症。

此外，本发明提供了体内治疗癌症（例如人癌症）的方法。该方法包括将治疗有效量的组合物给药于患者，组合物包括至少一种本发明的糖基工程化抗体或含有其的免疫缀合物（例如，免疫毒素）。

再一方面，本发明涉及基于B细胞耗尽（depletion）治疗由致病自体抗体全部或部分产生的免疫疾病的改良方法，包括将治疗有效量的免疫活性抗体给药于需要的患者，改良包括给药治疗有效量的根据本发明方法制得的具有提高ADCC的抗体。优选实施方案中，抗体是抗CD20抗体。自体免疫疾病或失调，包括但不限于，免疫介导的血小板减少症，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，皮炎，舞蹈病，狼疮肾炎，风湿热，多腺综合症，Henoch-Schonlein紫癜，末期链球菌肾炎，结节性红斑，Takayasu's 动脉炎，艾迪生氏病，多形红斑，结节性多动脉炎，僵硬脊柱炎，古德帕斯丘综合征，血栓性脉管炎 ubiteran，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，炎性反应如皮炎，包括牛皮癣和皮炎（例如，特异性皮炎）；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）；呼吸窘迫综合症（包括成人呼吸窘迫综合症；ARDS）；皮炎；脑膜炎；脑炎；葡萄膜炎；结肠炎；肾小球肾炎；变应性病，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 综合症，自身免疫甲状腺炎；变应性脑脊髓炎；Sjorgen's 综合症；少年开始的糖尿病；和通常在肺结核、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；恶性闭经（艾迪生氏病）；涉及白细胞渗出的疾病，中枢神经系统（CNS）炎症；多器官损伤综合症；溶血性贫血（包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯氏阳性贫血）；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；抗磷脂综合症；变应性神经炎；格雷夫斯氏病；Lambert-Eaton 肌无力综合症；类天疱疮大疱；天大疱；自身免疫多内分泌腺病；Reiter's 疾病；强直人综合症；Behcet 疾病；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。本发明这方面中，本发明的抗体消耗血液中的正常 B 细胞以延长的时间段。

根据本发明的实施，患者可以是人、马、猪、牛、鼠、犬、猫和鸟患者。其它温血动物也包括于本发明中。

本发明还提供了治疗癌症患者的方法。患者可以是人、狗、猫、小鼠、大鼠、兔子、马、山羊、绵羊、牛、鸡。癌症可以鉴定为乳腺、膀胱、成视网膜细胞瘤、卵巢乳头状囊腺癌、Wilm's 肿瘤或小细胞肺癌，通常表征为具有细胞表面上抗原相关肿瘤的细胞群。该方法包括将癌症杀灭量的和细胞毒性剂结合的肿瘤靶向抗体给药于患者。通常，在允许结合的抗体结合细胞表面上的目标的目标的条件下形成肿瘤靶向抗体和细胞毒性剂的结合。通过结合目标，肿瘤靶向抗体直接或间接导致或引起结合细胞的杀灭，因此来治疗患者。

还提供了抑制哺乳动物肿瘤细胞增生的方法，其包括将哺乳动物肿瘤细胞和足够浓度的本发明糖基工程化抗体或含有其的免疫缀合物接触，使得抑制哺乳动物肿瘤细胞的增生。

本发明进一步提供了抑制人肿瘤细胞生长、治疗患者肿瘤和治疗

患者增生型疾病的方法。这些方法包括将有效量的本发明组合物给药于患者。

因此很清楚本发明包括了治疗人癌症的药物组合物、混合物和方法。例如，本发明包括用于治疗人癌症的药物组合物，组合物包括药物有效量的本发明抗体和药物学上可接受的载体。

组合物可以含有抗体或抗体片段，未修饰的、和治疗剂（例如，药物、毒素、酶或第二抗体）缀合的或以重组形式（例如，嵌合抗体、嵌合抗体的片段、双特异性抗体）。组合物可以另外包括治疗癌症的其它抗体或缀合物（例如，抗体混合物）。

可以使用常规给药方式来给药本发明的抗体、抗体缀合物和免疫毒素组合物，包括但不限于静脉内、腹膜内、口服、淋巴内或直接给药进肿瘤内。优选静脉内给药。

本发明组合物可以是多种剂型，包括但不限于，液体溶液或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、栓剂、聚合微胶囊或微泡、脂质体和可注射或能注入的溶液。优选形式取决于给药方式和治疗应用。

本发明的组合物还优选包括本领域已知的常规药物学可接受载体和佐剂如人血清白蛋白、离子交换剂、氧化铝、卵磷脂、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾和盐或电解质如鱼精蛋白硫酸盐。

本发明组合物的最有效给药方式和给药方案取决于疾病的严重程度和进程、患者的健康和对治疗的响应以及治疗医师的判断。因此，滴定单个患者的组合物剂量。尽管如此，本发明组合物的有效量为约1至约2000mg/kg。

在此描述的分子可以是多种剂型，包括但不限于，液体溶液或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、栓剂、聚合微胶囊或微泡、脂质体和可注射或能注入的溶液。优选形式取决于给药方式和治疗应用。

本发明分子的最有效给药方式和给药方案取决于待治疗肿瘤的位置、癌症的严重程度和进程、患者的健康和对治疗的响应以及治疗医师的判断。因此，应当滴定单个患者的组合物剂量。

基于表面积 mg/kg 的各种大小和物种的动物以及人的剂量相互关

系描述于 Freireich, E. J.等 *Cancer Chemother.*, Rep. 50 (4): 219-244 (1966)。可以进行给药方案的调整来最佳化肿瘤细胞生长抑制和杀灭响应,例如,可以以日基础将剂量分开和给药或根据情况部分减少剂量(例如,每日给药数个分开的剂量或根据特定治疗情况部分减少)。

应当清楚的是获得治疗需要的本发明组合物剂量可以随着日程表最佳化而进一步减少。

根据本发明的实施,药物载体可以是脂质载体。脂质载体可以是磷脂。此外,脂质载体可以是脂肪酸。还有,脂质载体可以是去污剂。如在此所用的,去污剂是改变液体表面张力通常是降低液体表面张力的任何物质。

本发明一实施例中,去污剂是非离子去污剂。非离子去污剂的实例,包括但不限于,聚山梨酸酯 80(也称为吐温 80 或(聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯),Brij和 Triton(例如 Triton WR-1339和 Triton A-20)。

或者,去污剂可以是离子去污剂。离子去污剂的实例,包括但不限于,烷基三甲基溴化铵。

此外,根据本发明,脂质载体可以是脂质体。如该申请中所用的,“脂质体”是结合载体的任何膜,其含有本发明的任何分子或其组合物。

以下实施例将更详细解释本发明。以下所给的制备和实施例能够使本领域那些技术人员更清楚地理解和实施本发明。然而,本发明不限制于示范实施方案的范围,其仅仅是本发明单个方面的说明,以及功能等价的方法也在本发明范围之内。实际上,除了在此描述的,根据之前的描述和附图,那些对于本发明的各种改变对本领域那些技术人员变得显而易见。这样的改变确定落入所附权利要求的范围中。

实施例

实施例 1

材料和方法

1. 抗体表达载体的构建

抗 CD20 抗体表达载体 pETR1502

C2B8 抗 CD20 抗体表达载体 pETR1502 由四个独立的、分开的表达盒组成（一个用于 C2B8 抗体轻链，一个用于 C2B8 抗体重链，一个用于新霉素抗性基因和一个用于鼠 dhfr 基因）。所有基因在骨髓增生肉瘤病毒（MPSV）启动子的控制下并含有源自兔子 β 球蛋白基因的聚腺苷酸化信号的合成共有聚腺苷酸化信号。

在一步法中使用 PCR 从一系列重叠的单链寡核苷酸组装编码抗 CD20 抗体 C2B8 的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的 cDNA (Kobayashi, N. 等, *Biotechniques* 23: 500-503 (1997))。从公开的国际专利申请中获得编码 C2B8 VL 和 VH 片段的原始序列（国际公开号：W094/11026）。将组装的 VL 和 VH cDNA 片段亚克隆进 pBluescript I IKS (+) 中来产生 pBlue-C2B8VH 和 pBlue-C2B8VL 质粒，并测序。

从相应的 pBlue-C2B8VH 和 pBlue-C2B8VL 质粒扩增 C2B8 的可变链，使用在 5' 端引入 AscI 限制位点和在可变与恒定区连接处引入合适限制位点的引物（BsiWI 用于轻链和 NheI 用于重链）。从人淋巴细胞 cDNA 文库（Quickclone, Clontech）扩增 IgG1 恒定区，使用在 5' 和 3' 端引入合适限制位点的引物（BsiWI 和 BamHI 用于恒定轻链和 NheI 和 BamHI 用于恒定重链）。

确认正确的 DNA 序列后，将 C2B8 抗体的轻链和重链各自和 MPSV 启动子以及聚腺苷酸化信号结合。第一步中，构建两个不同的表达载体：一个用于 C2B8 轻链(pETR1315)，另一个用于 C2B8 重链(pETR1316)。第二步中，将新霉素抗性表达盒（源自 Tn5 转座子的新霉素抗性基因并放置于最小 MPSV 启动子的控制下）引入载体 pETR1315 中形成质粒 pETR1481。将 MPSV 启动子控制下的 dhfr 基因表达盒插入载体 pETR1316 中获得质粒 pETR1328。最后一步中，将两个表达模块（C2B8 轻链 + neo 和 C2B8 重链 + dhfr）合并于一个载体中形成质粒 pETR1502。

抗 CD20 抗体表达载体 pETR1520

pETR1520 组合了 C2B8 抗 CD20 抗体表达载体和复制起点,复制起点来自 Epstein Barr 病毒(oriP),用于游离基因载体于产生 Epstein Barr 病毒核抗原(EBNA)的细胞中的复制和保持。为了构建 C2B8 表达载体 pETR1520,将来自 pETR1416 的 C2B8 表达模块以 HindIII 片段插入含有 oriP 的载体 pETR1507 中。载体 pETR1416 和 pETR1502 相似,除了该质粒的新霉素抗性基因在全部 MPSV 启动子的控制下,而不是最小的 MPSV 启动子。

抗纤连蛋白抗体表达载体 pETR1546

该载体和载体 pETR1520 相同,除了编码 C2B8 抗 CD20 抗体的可变重链和轻链已经各自由抗体 L19 的、识别纤连蛋白 ED-B 结构域的人抗体的编码片段替代。通过重叠延伸 PCR 方法合成编码可变区的 DNA 片段,使用基于 L19 抗体可变区序列的合成寡核苷酸 (Pini, A. 等, *J. Biol. Chem.* 273 (34): 21769-76 (1998))。

抗 EGFR 抗体 (C225) 表达载体 pURSI28

该载体和载体 pETR1520 相同,除了编码 C2B8 抗 CD20 抗体的可变重链和轻链已经由抗体 C225 的、识别人表皮生长因子受体的嵌合抗体的各自编码片段替代。通过重叠延伸 PCR 方法合成编码可变区的 DNA 片段,使用基于 C225 抗体可变区序列的合成寡核苷酸(序列可见于公开的专利申请中,国际公开号 W096/40210,该专利申请的图 16 和 17 各自对应于重链和轻链)。

2. GnTIII 融合表达载体的构建

pETR1166. 用于 GnTIII 组成型表达的载体

为了构建 GnTIII 表达载体 pETR1166,从大鼠肾脏 cDNA 文库 (Clontech) 通过 PCR 扩增大鼠 GnTIII。为了随后通过蛋白质印迹方便地检测 GnTIII,将 C 端 c-myc-表位标记加入紧接着基因终止密码子

的上游(氨基酸序列: PEQKLISEEDL)。确认 GnTIII 的正确序列后,将基因插入在 MPSV 启动子控制下并加入合成兔 β 球蛋白基因的聚腺苷酸化信号。最终 GnTIII 表达载体还含有用于选择的分开的嘌呤霉素抗性盒,嘌呤霉素抗性基因也在 MPSV 启动子控制下和合成的兔 β 球蛋白基因的聚腺苷酸化信号。

PETR1425:人 GnTI 的头 102 个氨基酸替代了 GnTIII 的头 76 个氨基酸

通过接下来的重叠 PCR 反应进行该杂合糖基转移酶基因的构建。一个反应中,使用引物 GAB-179 和 GAB-180 扩增人 GnTI 的主区域。在该 PCR 反应中,在 5' 端还引入了 Kozak 共有序列和 AscI 限制位点。所得到的 PCR 片段从位置 229 开始和 GnTIII 有 23bp 的重叠。第二个 PCR 反应中,用引物 GAB-177 和 GAB-178 扩增位置 229 至 380 的 GnTIII 区,产生了在 3' 端带有唯一 BstXI 位点的 PCR 片段,在 5' 端和 GnTI 主区域有 22bp 的重叠。将两个 PCR 片段纯化并用作第三个 PCR 反应的模板(引物 GAB-179 和 GAB-178)。纯化所得到的片段并用 AscI 消化,并连接载体 pETR1001(用 AscI 和 SmaI 切割)得到质粒 pETR1404。在证实插入序列后,将 MPSV 启动子序列加入作为 AscI(部分消化)/PmeI 片段的 pETR1404 中来产生质粒 pETR1423。来自 pETR1166 的 SphI/BstXI 片段,带有原始大鼠 GnTIII 基因的表达载体,然后用 pETR1423 相应的片段替代得到质粒 pETR1425,含有在 MPSV 启动子控制下的 GnTI-GnTIII 融合和用于选择的嘌呤霉素抗性盒。

引物序列:

GAB-177: GCGTGTGCCTGTGACCCCCGCGCCCCTGCTCCAGCCACTGTCCCC

GAB-178: GAAGGTTTCTCCAGCATCCTGGTACC

GAB-179: CTGAGGCGCGCCGCCACCATGCTGAAGAAGCAGTCTGCAGGGC

GAB-180:

GGGGACAGTGGCTGGAGCAGGGGCGCGGGGTACAGGCACACGCGGC

pETR1506: 人甘露糖苷酶 II 的头 100 个氨基酸替代了 GnTIII 的 76 个 N-端氨基酸

进行 pETR1506 的构建, 类似 pETR1425 的构建。用引物 GAB-252 和 GAB-253 使用载体 pBlueman 作为模板扩增人甘露糖苷酶 II 基因的主区域。在该 PCR 过程中, 在 5' 端引入 FseI 位点和 Kozak 共有序列。所得到的 PCR 片段在位置 229 开始和 GnTIII 基因重叠 23bp。第二个 PCR 反应中, 用引物 GAB-254 和 GAB-255 扩增部分 GnTIII 基因 (位置 229-460)。该 PCR 产生了在 5' 端含有和甘露糖苷酶 II 有 43bp 重叠和在 3' 端含有唯一 StuI 位点的片段。纯化两个片段并用作第三个使用引物 GAB-252 和 GAB-255 的 PCR 中的模板。将所得到的片段插入 pIC19H 得到载体 pETR1484。证实该插入的正确序列后, 通过在载体 pETR12177 (FseI/BamHI) 中连接 pETR1484 的 FseI/StuI 片段和 pETR1166 的 StuI/BamHI 片段构建完整融合基因。所得到的质粒 (pETR1500) 含有在 MPSV 启动子控制下的杂合 manII-GnTIII 基因 (SEQ ID NO: 14)。为了在哺乳动物细胞中选择质粒, 以 pETR1166 的 StuI 片段插入嘌呤霉素抗性盒, 产生质粒 pETR1506。

引物序列:

GAB-252:

GCTAGGCCCGCCGCCACCATGAAGTTAAGCCGCCAGTTCACCGTGTTTCGG

GAB-253:

GGGGACAGTGGCTGGAGCAGGGGTGAGCCAGCACCTTGGCTGAAATTGCTTTGTG

AACTTTTCGG

GAB-254:

TCCGAAAAGTTCACAAAGCAATTTTCAGCCAAGGTGCTGGCTCACCCCTGCT

CCAGCCACTGTCCCC

GAB-255: ATGCCGCATAGGCCTCCGAGCAGGACCCC

pETR1519: 杂合 manII-GnTIII 融合基因和来自 Epstein Barr 病毒的复制起点 oriP 的组合

使用引物 GAB-261 和 GAB-262, 从质粒 pCEP4 (Invitrogen) 扩增含有 oriP 的 2kb 片段。在该 PCR 反应过程中, 在片段的两个末端引入了 SspI 和 EcoRI 位点。为了测序, 将 oriP 片段插入载体 pIC19H 中。已经证实正确序列后, 将 oriP 以 SspI 片段插入载体 pETR1001 中 (用 BsmBI 消化和使用 Klenow 聚合酶补平 5' 重叠端)。所得到的质粒命名为 pETR1507。将来自 pETR1510 的 SphI/NruI manII-GnTIII 表达盒插入用相同限制性核酸内切酶消化的 pETR1507 中来获得质粒 pETR1519。

引物序列:

GAB-261: GCTAAATATTGAATTCCTTTATGTGTA ACTCTGGCTGAAGC
 GAB-262: TAGCAATATTGAATTCGCAGGAAAAGGACAAGCAGCGAAAATT
 CACGC

pETR1537: 杂合 manII-GnTIII 融合基因和截短的 CD4 细胞表面标记基因的结合

修饰 pETR1506 表达载体来另外表达截短的 CD4 细胞表面标记基因。简短地说, 将杂合 manII-GnTIII 融合基因表达盒从单顺反子转化成双顺反子表达盒, 通过将脊髓灰质炎病毒 IRES 序列接着编码截短的人 CD4 蛋白质的 cDNA 插入 manII-GnTIII 融合的终止子的下游 (含有接着跨膜和胞外结构域的用于分泌的人 CD4 前导序列)。

3. 用 GnTIII 融合表达载体和抗体表达载体转染哺乳动物细胞 BHK 细胞的转染

在电穿孔 24 小时之前将按指数规律生长的细胞 (生活力 90-95%) 以 0.9×10^6 个细胞/ml 的浓度接种于合适数量的 T75 培养瓶中。作为培养基, 使用补充 10% 胎牛血清 (FCS) 的 Invitrus (Cell Culture Technologies, Switzerland)。在电穿孔之前将细胞计数。通过离心 (5 分钟, $200 \times g$) 收集 8×10^6 个细胞并丢弃上清液。将细胞重悬浮

于 800 μ l Invitrus 培养基中并转移至已经含有 8 μ g 环形质粒 DNA 的无菌电穿孔小杯中 (0.4cm 间隔) 并在室温孵育 5 分钟。使用 Gene Pulser II (BioRad) 用以下的条件将细胞电穿孔: 400V, 960 μ F, 两次脉冲 30 秒间隔。电穿孔后, 将细胞立即转移至含有 5ml 生长培养基 (Invitrus/20% (V/V) FCS/1.25% (V/V) DMSO) 的 T25 培养瓶中, 并在 5%CO₂ 气氛培养器中 37℃ 培养。对于未修饰 (未糖基化) 抗体的生产, 仅用抗体表达载体转染细胞。对于糖基化抗体的生产, 用两个质粒共转染细胞, 一个用于抗体表达, 另一个用于融合 GnTIII 多肽 (SEQ ID NO: 15) 表达, 各自的比例为 3:1。

HEK293-EBNA 细胞的转染

用磷酸钙沉淀方法来转染按指数规律生长的 HEK293-EBNA 细胞。使用补充 10%FCS 的 DMEM 培养基在 T 培养瓶中使细胞作为粘附性单层培养物生长, 当它们为 50 至 80% 铺满时进行转染。对于 T75 培养瓶的转染, 在转染前 24 小时将 8 百万个细胞接种于 14ml 补充 FCS (最终 10%V/V) 和 250 μ g/ml 新霉素的 DMEM 培养基中, 并将细胞放置于 5%CO₂ 气氛培养器中 37℃ 过夜。对于每个待转染的 T75 培养瓶, 通过混合 47 μ g 总质粒载体 DNA、235 μ l 1M 的 CaCl₂ 溶液并加入水至终体积为 469 μ l 来制得 DNA、CaCl₂ 和水的溶液。向该溶液中加入 469 μ l pH7.05 的 50mM HEPES、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄ 溶液, 立即混合 10 秒钟并在室温下放置 20 秒钟。用 12ml 补充 2%FCS 的 DMEM 稀释悬浮液, 并加入 T75 中替代现有的培养基。细胞在 37℃ 5%CO₂ 下孵育 17 至 20 小时, 然后用 12ml 10%FCS 的 DMEM 替代培养基。对于未修饰 (未糖基化) 抗体的生产, 仅用抗体表达载体转染细胞。对于糖基化抗体的生产, 用两个质粒共转染细胞, 一个用于抗体表达, 另一个用于融合 GnTIII 多肽表达, 各自的比例为 4:1。转化 5 天后, 收集上清液, 在 1200rpm 离心 5 分钟, 随后第二次离心, 4000rpm 10 分钟, 并在 4℃ 保存。

表达重组抗 CD20 抗体的稳定哺乳动物细胞系的产生

用含有新霉素抗性基因表达盒的 pETR1502 C2B8 抗体表达载体通过电穿孔转染 BHK 细胞 (BHK21-13c)。首先选择新霉素抗性克隆来获得一套具有染色体整合的 pETR1502 载体 DNA 的克隆。然后使用 ELISA 试验筛选用于重组抗体生产的克隆。简短地说,电穿孔 24 小时后,计数有生活力的细胞并通过计数平行的用 pEYFP-表达载体进行对照电穿孔的荧光细胞来测定转染率。将细胞稀释于含有 10%FCS 和 1mg/ml 新霉素的 Invitrus 选择培养基中。通常 8 个 96 孔平板接种不同浓度的有生活力的转染细胞 (1×10^3 、 5×10^2 和 1×10^2 个细胞每孔)并在 37℃ 孵育直至可以鉴定克隆。一旦克隆生长至几乎汇合,通过 ELISA 分析上清液的抗体产生。将 ELISA 阳性克隆首先扩展到 24 孔随后 6 孔平板上,然后至 T25 培养瓶。在 T25 培养瓶中生长 5 天后,使用 ELISA 试验测定最终抗体滴度。使用该电穿孔和选择方法,分离出表达 C2B8 抗 CD20 抗体的 BHK 细胞克隆 (BHK-1502-28),该细胞克隆在上述培养条件下产生 13 μ g/ml 抗体。

表达重组抗 CD20 抗体和 GnTIII 融合的稳定哺乳动物细胞系的产生

用 pETR1537 表达载体通过电穿孔转染组成型表达抗 CD20 单克隆抗体基因和新霉素抗性基因的克隆 BHK-1502-28。pETR1537 是用于组成型表达 ManII-GntIII 基因和截短形式人 CD4 的载体,后者是 IRES 依赖性表达的。载体还含有嘌呤霉素抗性基因表达盒。首先选择嘌呤霉素抗性克隆来获得一套具有染色体整合的 pETR1537 载体 DNA 的克隆。然后筛选克隆用于截短的 CD4 (tCD4) 的表面表达,其作为双顺反子 ManII-GnTIII + tCD4 基因表达单位表达水平的标记。使用 ELISA 试验验证所选克隆的重组抗体的产生。

简短地说,用 XmnI 将 pETR1537 载体 DNA 线性化。用 EYFP 表达载体平行进行对照转染。24 小时后计数全部细胞内的表达 EYFP 的细胞来测定转染率。全部细胞的 58% 是表达 EYFP 的。细胞生活力为 91%。转染后一天,将 pETR1537 和 pEYFP 转染的细胞连续稀释为 1:100、

1:500、1:1000 和 1:5000 稀释度并接种于 96 孔平板上的终体积为 0.2ml 的选择培养基中(Invitrus, 10%FCS, 20 μ g/ml 嘌呤霉素, 1mg/ml 新霉素)。两周后可见到克隆。将它们扩展并筛选截短 CD4 (tCD4) 表达和抗体表达。

为了 tCD4 表达水平的筛选, 约 500,000 细胞用 FACS 缓冲液洗涤并用 5 μ l FITC 抗人 CD4 (Becton Dickinson, Switzerland) 在冰上孵育 20 分钟。两次洗涤后, 将细胞重悬浮于 0.5ml FACS 缓冲液并用 FACS 分析 (图 17A-B)。分离出具有良好 tCD4 表达水平的克隆 (BHK-1502-28-11)。在 T25 培养瓶中生长 5 天后, 产生终滴度约为 17 μ g/ml 的抗 CD20 抗体, 如通过 ELISA 所测得的。

4. 未修饰和糖基化抗体的生产和纯化

培养基的收集

用抗体表达载体转染或用抗体表达载体加上 GnTIII 融合表达载体共转染 BHK 细胞的情况下, 在转染后培养转染细胞 96 小时后收集培养物上清液。根据预期的生产力, 对相同载体进行数次电穿孔(10-15)。

用抗体表达载体转染或用表达载体加上 GnTIII 融合表达载体共转染 HEK293-EBNA 细胞的情况下, 转染后约 16 小时用新鲜培养基替换培养基, 然后在进一步培养转染细胞 120 小时后收集后来的培养基。

对于稳定的 BHK-1502-28-11 细胞系, 以 500,000 细胞/ml 接种培养物, 并在培养 4 天后收集上清液, 细胞密度为 1.7×10^6 有生活力细胞/ml, 细胞生活力为 69%。

抗体纯化

使用两个连续的层析步骤从培养物上清液中纯化单克隆抗体。第一个步骤包括蛋白质 A 层析, 使用 pH 梯度洗脱, 有效地分离了牛和人 IgG。随后为阳离子交换层析步骤来将样品缓冲液交换为磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。

5. 寡糖分析

通过 PNGaseF 消化从抗体酶解释放寡糖, 抗体固定于 PVDF 膜上或在溶液中。

所得到的含有释放寡糖的消化溶液直接制得用于 MALDI/TOF-MS 分析或在制备 MALDI/TOF-MS 分析样品之前进一步用 EndoH 糖苷酶消化。

PVDF 膜固定抗体的寡糖释放方法

用 PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) 膜制得的 96 孔平板的孔中用 100 μ l 甲醇湿润, 并将真空运用至 Multiscreen 真空歧管 (Millipore, Bedford, Massachusetts) 上来汲取液体使其通过 PVDF 膜。用 300 μ l 水洗涤 PVDF 膜三次。然后用 50 μ l RCM 缓冲液 (8M 尿素, 360mM Tris, 3.2mM EDTA, pH8.6) 洗涤孔。将 30-40 μ g 抗体装载于含有 10 μ l RCM 缓冲液的孔中。通过运用真空汲取孔中的液体使其通过膜, 随后用 50 μ l RCM 缓冲液洗涤膜两次, 通过加入 50 μ l RCM 中的 0.1M 二硫苏糖醇并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时来进行二硫桥键的还原。

还原后, 运用真空从孔中除去二硫苏糖醇溶液。用 300 μ l 水将孔洗涤三次, 然后通过加入 50 μ l RCM 中的 0.1M 醋酸碘并在室温黑暗中孵育 30 分钟来进行半胱氨酸残基羧甲基化。

羧甲基化后, 用真空汲取孔, 随后用 300 μ l 水洗涤三次。然后通过将 100 μ l 聚乙烯吡咯烷酮 360 的 1% 水溶液在室温孵育 1 小时来封闭 PVDF 膜以防止内切糖苷酶的吸收。然后通过轻度真空除去封闭剂, 接着用 300 μ l 水洗涤三次。

通过加入 2.5mU 肽-N-糖基化酶 F (重组 N-聚糖酶, GLYKO, Novato, CA) 和 0.1mU 唾液酸酶 (GLYKO, Novato, CA) 释放 N 连接寡糖来除去任何可能的带电单糖残基, 酶在 25 μ l 终体积的 pH7.0 的 20mM NaHCO₃ 中, 在 37 $^{\circ}$ C 消化 3 小时。

溶液中抗体的寡糖释放方法

将 40-50 μg 的抗体和 25 微升终体积 pH7.0 的 2 mM Tris 中的 2.5mU PNGaseF (Glyko, U. S. A.) 混合, 将混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 小时。

内切糖苷酶消化的 PNGaseF 释放寡糖将杂合二等分寡糖结构分配给 MALDI/TOF-MS 中性寡糖峰值的用途

随后用内切糖苷酶 H (EC 3.2.1.96) 消化 PNGaseF 释放的寡糖。为了 EndoH 消化, 将 15mU EndoH (Roche, Switzerland) 加入 PNGaseF 消化液 (上述方法溶液中的抗体) 来获得 30 微升的终体积, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 将混合物孵育 3 小时。EndoH 裂解 N-连接寡糖的壳二糖核心的 N-乙酰氨基葡萄糖残基。酶仅可以消化寡甘露糖和大多数杂合型聚糖, 而复合型寡糖没有得到水解。

MALDI/TOF-MS 的样品制备

在将醋酸添加至终浓度 150mM 后, 将含有释放寡糖的酶消化液在室温进一步孵育 3 小时, 随后穿过装入微-生物-旋转色谱柱 (BioRad, Switzerland) 中的 0.6ml 阳离子交换树脂 (AG50W-X8 树脂, 氢形式, 100-200 网孔, BioRad, Switzerland) 来除去阳离子和蛋白质。将 1 微升所得到的样品运用到不锈钢目标平板, 在平板上和 1 μl sDHB 基质混合。通过将 2mg 2,5-二羟基苯甲酸和 0.1mg 5-甲氧基水杨酸溶解于 1ml 的 1:1 (V/V) 乙醇/10mM 氯化钠水溶液中制得 sDHB 基质。将样品空气干燥, 使用 0.2 μl 乙醇, 最终使样品在空气下再结晶。

MALDI/TOF-MS

用来获得质谱的 MALDI-TOF 质谱仪是 Voyager Elite (Perspective Biosystems)。在线性配置中操作设备, 用 20kV 加速度和 80ns 延迟。使用寡糖标准的外部校准来用于离子的质谱分配。总

和来自 200 个激光发射的质谱来获得最终的质谱。

6. PBMC 制备

使用 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc. , St. Louis, MO63178 USA) 并基本上按照制造商的指导制得外周血单核细胞 (PBMC)。简短地, 用肝素化注射器采取志愿者的静脉血样, 志愿者要求全力奔跑 1 分钟, 以便提高血液中的天然杀伤细胞 (NK) 的百分比。用不含有 Ca 或 Mg 的 PBS 将血稀释至 1:0.75-1.3 并铺于 Histopaque-1077 上。在室温 (RT) $400 \times g$ 无间断梯度离心 30 分钟。收集含有 PBMC 的中间相并用 PBS 洗涤(来自两个梯度的每 50ml 细胞) 并通过在 RT $300 \times g$ 离心 10 分钟收集。用 PBS 将沉淀重悬浮后, 将 PBMC 计数并通过在 RT $200 \times g$ 离心 10 分钟来洗涤第二次。然后将细胞重悬浮于合适的培养基中用于随后的程序。

7. NK 细胞分离

从 PBMC 分离人 NK 细胞, 运用阴性选择方法, 使用不结合 CD16 和 CD56 阳性细胞的磁珠 (MACS 系统, 来自 Miltenyi Biotec GmbH, 51429 Bergisch Gladbach, GER)。在冰冷 MACS 缓冲液中 (含有 2%FCS 和 2mM EDTA 的 PBS) 将 PBMC 洗涤一次, 以 20 Mio 细胞每 ml 的 1:1FCS 和 MACS 缓冲液混合物重悬浮并在 4°C 孵育 10 分钟。然后将细胞沉淀并用含有 10%FCS 的 MACS 缓冲液重悬浮, 每 10 百万细胞 $80 \mu\text{l}$ 。然后每 10 百万细胞加入 $20 \mu\text{l}$ 半抗原-抗体溶液。用重复旋涡管将细胞在 4°C 孵育 10 分钟。用至少 $10 \times$ 标记体积的 MACS 洗涤两次后, 将细胞重悬浮于含有 10% 的 MACS 缓冲液中, 每 $80 \mu\text{l}$ 10 百万细胞, 并每 10 百万细胞加入 $20 \mu\text{l}$ 抗半抗原-微珠。用重复旋涡管将管在 4°C 孵育 15 分钟。用 MACS 缓冲液将细胞洗涤一次后, 将细胞重悬浮, 高达 $500 \mu\text{l}$ MACS 缓冲液中 100 百万细胞, 并装载于放置于 MINI-MACS 磁铁中的 LS MACS 柱上, 用 3ml MACS 缓冲液平衡。用 $3 \times 3\text{ml}$ MACS 缓冲液洗涤柱子。收集流过级分中的细胞并随后用作 NK 细胞。通过 CD56 表达测定的纯

度为 88-95%。

8. ADCC 试验

如上所述制得用作效应细胞的 PBMC 或 NK。对于 PBMC 和 NK 各自的细胞效应物对目标的比例为 25:1 和 10:1。在 AIM-V 培养基中制得合适浓度的效应细胞，以便在 96 孔圆底平板的每个孔中加入 50 μ l。C2B8 抗体的靶细胞是生长于含有 10%FCS 的 DMEM 中的 SKW6.4 或 Namalwa B 淋巴细胞。在 PBS 中洗涤靶细胞，计数并重悬浮于 AIM-V，每 ml 0.3 百万，以便在 100 μ l 的每个微孔中加入 30000 个细胞。将抗体稀释于 AIM-V 中，在 50 μ l 中加入预铺板的靶细胞并在 RT 结合目标 10 分钟。然后加入效应细胞并将平板在含有 5%CO₂ 的湿润大气中 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时。使用细胞毒性检测试剂盒 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) 通过测量破坏细胞的乳酸脱氢酶 (LDH) 释放来测试靶细胞的杀灭。平板孵育 4 小时后，在 800 \times g 离心，将每个孔的 100 μ l 上清液转移至新的 96 孔透明平底平板上。将试剂盒中的 100 μ l 颜色底物缓冲液加入每个孔中。在 ELISA 读出器 490nm 测定颜色反应的 Vmax 值至少 10 分钟，使用 SOFTmaxPRO 软件 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA)。从仅含有靶细胞和效应细胞但没有抗体的孔中测量自发 LDH 释放。从仅含有靶细胞和 1%Triton X-100 的孔中测定最大释放。如下计算特定抗体介导的杀灭的百分比： $(x-SR) / (MR-SR) * 100$ ，其中 x 是特定抗体浓度的平均 Vmax，SR 是自发释放的平均 Vmax，MR 是最大释放的平均 Vmax。

9. NK 细胞上的 Fc γ RIIIA 结合

在 200 \times g 将新鲜分离的 NK 细胞离心 5 分钟，用 0.09% (wt/vol) 乳酸溶液 (140mM NaCl, 5mM KCl, pH3.9) 在室温将 3×10^5 细胞/ml 孵育 5 分钟的预处理来除去 NK 细胞相关的 IgG。 (De Haas M., *J. Immunol.* 156 : 2948 (1996))。

用 PBS、0.1% BSA、0.01%叠氮化钠将细胞洗涤两次，并将浓度调节至 PBS、0.15% BSA、0.01%叠氮化钠中 2×10^6 个细胞/ml。用 0、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g/ml}$ 抗体变体将 5×10^5 细胞在 4°C 孵育 30 分钟。然后将细胞洗涤两次，并通过用 1:200 的异硫氰酸荧光素缀合的 F(ab')_2 山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 和抗人 CD56-PE 以 $5 \mu\text{l}/5 \times 10^5$ 细胞 (BD Pharmingen, San Diego, CA) 在 4°C 孵育 30 分钟来检测抗体结合。(Shields R. 等, *J. Biol. Chem.* 277 (30): 26733-26740 (2002))。

在 FACS Calibur (BD Bioscience, San Jose, CA) 上检测 CD56+ 细胞的涉及结合抗体变体的荧光强度。

10. Raji 淋巴细胞上 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ 的结合

在 PBS 中将 Raji 细胞人淋巴细胞在 37°C 洗涤 20 分钟 (浓度为 0.3Mio 细胞/ml)。然后将细胞重悬浮于 PBS、0.1% BSA、0.01% NaN_3 中，2.22 百万细胞/ml，每个 FACS 管中加入 $180 \mu\text{l}$ 。将十倍抗体稀释液 (0、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{g/ml}$) 的 L19-未修饰和 L19 糖基工程化单克隆抗体加入 Raji 细胞中并在 4°C 孵育 30 分钟 (终细胞浓度为 2 百万细胞/ml)。两次洗涤后，将 1:200 的异硫氰酸荧光素缀合的 F(ab')_2 山羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 加入细胞中并在 4°C 孵育 30 分钟。洗涤一次后，将细胞重悬浮于 0.5 ml PBS、0.1% BSA、0.01% NaN_3 中，并在 FACS Calibur 上 (BD Bioscience, San Jose, CA) 测定活细胞的涉及结合抗体变体的荧光强度。

11. 补体依赖性细胞毒性试验

将靶细胞计数、用 PBS 洗涤、重悬浮于 AIM-V (Invitrogen) 中，每 ml 1 百万细胞。将 $50 \mu\text{l}$ 细胞种植于 96 孔平底平板的每个孔中。在 AIM-V 中制得抗体稀释液并将 $50 \mu\text{l}$ 加入细胞中。使抗体在室温和细胞结合 10 分钟。人血清补体 (Quidel) 是新鲜解冻的，用 AIM-V 稀释 3 倍并将 $50 \mu\text{l}$ 加入孔中。如制造商所述的制得兔补体 (Cedarlane

Laboratories), 用 AIM-V 稀释 3 倍并将 50 μ l 加入孔中。作为对照, 在加入试验之前将补体来源在 56 $^{\circ}$ C 加热 30 分钟。

将试验平板在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。通过测量 LDH 释放来测定细胞的杀灭。简短地, 将平板在 300 \times g 离心 3 分钟。将每孔 50 μ l 上清液转移至新的 96 孔平板中并加入 50 μ l 来自细胞毒性试剂盒 (Roche) 的试验试剂。用 ELISA 读出器的动力学测量来测定上清液中 LDH 浓度相应的 V_{max} 。通过在 1% Triton X-100 存在下孵育细胞来测定最大释放。

结果和讨论

通过用表达抗体基因的载体和表达编码带有 GnTIII 活性的各种多肽的载体共转染哺乳动物细胞的培养物来生产糖基工程化形式的抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (C2B8 嵌合抗体, 也称为 rituximab)。通过仅用抗体基因表达的载体转染的哺乳动物细胞生产未修饰形式 (非糖基工程化的) 的相同抗体。转染的细胞至少在培养物中保持三天, 通过蛋白质 A 亲和色谱从培养基中纯化分泌的重组抗体。编码具有 GnTIII 活性的多肽的基因表达相对于没有产生这样抗体的细胞对细胞生活力、细胞生长和抗体产生没有显著影响。

然后分析纯化抗体的糖基化模式。这些抗体携带仅和人 IgG1 Fc 区的 Asn297 残基连接的 N-连接寡糖。通过 PNGaseF 消化从抗体酶解除去寡糖随后通过 MALDI/TOF-MS 分析。使用该技术, 可以检测总的原始 Fc 寡糖群体中不同寡糖种类的部分, 还可以在质谱中将结构分配给不同的峰值 (Umana, P. 等, *Nature Biotechnol.* 17: 176- 180 (1999))。

图 1 显示了 BHK 细胞中产生的重组 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的中性寡糖 MALDI/TOF-MS 特征图。用抗体表达载体 pETR1502 转染这些细胞。图 2 至 4 显示了用编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸工程化的 BHK 细胞产生的相同抗体的相应特征图。图 2 中的特征图由使用编码从载体 pETR1166 表达的野生型 GnTIII 核酸形成的。图 3 中的特征图由使用编码包括在 N-端和 GnTIII C-端催化结构域融合的 GnTI 定位结

构域的融合多肽的核酸形成。该融合基因从载体 pETR1425 表达。图 4 中的特征图由使用核酸编码包括在 N 端和 GnTIII 催化结构域融合的高尔基体 α 甘露糖苷酶 II (ManII) 的定位结构域的融合多肽的核酸形成。该融合基因从载体 pETR1506 表达。

未修饰抗体具有典型的寡糖形式(图 1), m/z 比例为 1485、1648 和 1810 的峰值分别和带有 0、1 和 2 个半乳糖残基的双触角的、核心岩藻糖基化的、复合寡糖一致。在其他标准哺乳动物工业细胞系如 CHO 和小鼠骨髓瘤细胞产生的非工程化 IgG1 抗体的 Fc 区寡糖中发现相似的特征形式(Lifely, M. R. 等, *Glycobiology* 5: 813-822(1995))。通过野生型 GnTIII 的表达而对抗体产生细胞的工程化主要形成二等分、核心岩藻糖基化的、复合双触角寡糖(图 2), 在 m/z 比例 1689、1851 和 2014 的峰值是发现于未修饰抗体中的非二等分、岩藻糖基化寡糖峰值的二等分对应物。通过表达编码 GnTI-GnTIII 融合多肽的核酸而对抗体产生细胞的工程化也主要形成二等分复合双触角寡糖(注意图 3 中 m/z 1689 和 1851 的峰值), 其中 GnTIII 催化结构域是通过 GnTI 高尔基体定位结构域定位。然而, 相对于野生型 GnTIII, 使用 GnTI-GnTIII 融合导致二等分、非岩藻糖基化和二等分、杂合结构的提高(比较图 2 和图 3 之间的 m/z 1664、1810、1826 和 1973 的峰值相对于总体的百分比)。对于 GnTI-修饰的寡糖物质, 二等分、非岩藻糖基化的和二等分、杂合结构的合成由重组 GnTIII 催化结构域和以下之间的竞争形成, (i) 内源性核心 α 1, 6-岩藻糖基转移酶, (ii) 高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (ManII) 和 (iii) GnTII, 由于一旦用通过 GnTIII 催化反应加入的二等分 GlcNAc 修饰寡糖, 这三个其它的酶就不再作用于修饰二等分寡糖。由于 GnTII 作用 N-连接寡糖生物合成途径中的 ManII 下游, 因此通过加入二等分 GlcNAc 的 ManII 阻断作用还有效阻断了 GnTII。 m/z 1664 和 1826 的峰值是非岩藻糖基化的, 而 m/z 1810 和 1973 的峰值是岩藻糖基化的。可以分辨杂合和复合寡糖(图 8A) 的 EndoH 糖苷酶消化, 用来证实这些峰值的提高是由于 Fc 连接的二等分、非岩藻糖基化和二等分、杂合寡糖比例的提高(参见下文)。

和在此所用的其它 GnTIII 活性编码核酸形成对比, 通过编码 ManII-GnTIII 融合多肽 (SEQ ID NO: 14) 核酸的表达对抗体形成细胞的工程化主要形成二等分、非岩藻糖基化和二等分、杂合结构 (注意图 4 中 m/z 1664、1810、1826 和 1973 的峰值), 其中 GnTIII 催化结构域是通过 ManII 高尔基体定位结构域定位的。因此, 相对于野生型 GnTIII 和 GnTI-GnTIII 融合 (SEQ ID NO: 12 和 13), ManII-GnTIII 融合在 Fc 连接的二等分、非岩藻糖基化和二等分、杂合寡糖的合成中更有效 (比较图 2、3 和 4 之间的 m/z 1664 和 1810 的峰值相对于总体的百分比)。由编码野生型 GnTIII、GnTI-GnTIII 融合和 ManII-GnTIII 融合的核酸表达形成的二等分、非岩藻糖基化 Fc 寡糖比例各自为 4、13 和 33%。在未修饰 (非工程化的) 抗体中没有检测到二等分寡糖。

在抗体产生细胞中 ManII-GnTIII 融合构建体表达的提高导致二等分、非岩藻糖基化寡糖比例的进一步提高。这通过在转染 HEK293-EBNA 细胞中表达带有用于游离复制子的 OriP 的来自载体 (pETR1519) 的 ManII-GnTIII 构建体得到证明。已知该表达系统导致高水平的表达, 还用于来自载体 pETR1520 抗体基因的表达。该系统中高水平表达的纯化、未修饰 (非糖基工程化的) 抗体的寡糖特征形式显示于图 5 中, 其再次显示了具有 0、1 和 2 个半乳糖残基的非二等分、岩藻糖基化峰值的典型寡糖特征形式 (例如, 比较图 1 和 5, 显示在 BHK 细胞中表达的未修饰抗体的或在 HEK293-EBNA 细胞中较高水平表达的相似寡糖特征形式)。用编码在该系统中较高水平表达的 ManII-GnTIII 融合的核酸来工程化抗体产生细胞导致抗体的产生, 其中大多数 Fc 寡糖是二等分、非岩藻糖基化的 (参见图 6, 其中二等分、非岩藻糖基化杂合寡糖的 m/z 1664 和 1826 峰值一起构成超过总寡糖的 90%)。

如上所述, 内切糖苷酶 H (EndoH) 用来证实二等分非岩藻糖基化结构和二等分、杂合结构在 MALDI 特征图中观察到的不同寡糖峰的分配。PNGaseF-和 PNGaseF + EndoH-消化源自抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体的聚糖的 MALDI/TOF-MS 中性寡糖特征图显示于图 7 中, 通过 GnTIII (M2)

超表达糖基工程化的 HEK293 细胞产生抗体。 m/z 1664 的峰值可以分配给两个不同的聚糖，即非岩藻糖基化的杂合二等分的或非岩藻糖基化的复合非二等分的。不同的结构显示相同的 m/z 比例是由于相同的单糖组成（图 8B）。

用内切糖苷酶 H 消化 PNGaseF 释放的聚糖产生了新的结构，主要的峰值从 m/z 1664 转换至 1460（图 7B）。差异对应于 GlcNAc 残基的质量。如上所述，EndoH 不能分裂复合型寡糖。因此，在内切糖苷酶 H 消化后， m/z 1664 的主峰值可以分配给非岩藻糖基化杂合二等分型。

其它峰可以分配给复合或杂合二等分聚糖。EndoH 消化后， m/z 1810 的峰消失了，因此结构可以分配给岩藻糖基化的杂合二等分型。来自 m/z 1810 峰值的一个 GlcNAc 残基和一个岩藻糖（来自核心 α -1,6 岩藻糖基化的、还原末端 GlcNAc 残基）残基的减少产生了 m/z 1460 的结构。通过 EndoH 消化（GlcNAc 残基消除） m/z 1502 的峰消失了并出现了 m/z 1298 的峰，证明了 1502 峰可以分配给非岩藻糖基化杂合二等分型。EndoH 消化后 m/z 1647 峰的消失证明了该峰是岩藻糖基化的杂合二等分结构。一个 GlcNAc 和一个岩藻糖的去除产生了 m/z 1298 的结构。 m/z 1826 的峰，非岩藻糖基化的杂合二等分型，通过 EndoH 消化。这产生了 m/z 1622 的结构。EndoH 消化后， m/z 1053 的峰可以分配给高甘露糖型（1257 m/z ），通过 EndoH 消化。正如所料， m/z 1689（复合二等分）的峰没有受到 EndoH 消化的影响。合成中，从表 1 获得的数据，我们推断出 88% 的寡糖结构带有二等分 GlcNAc，其中 60% 是非岩藻糖基化的杂合二等分结构，22% 是岩藻糖基化杂合二等分的和 6% 是岩藻糖基化的复合二等分寡糖结构。

表 1. 寡糖分配

m/z	可能的结构	EndoH 前的相对%	EndoH 后预期的 m/z	EndoH 后观察到的 m/z	EndoH 后的相对%	分配
1256	高甘露糖	9	1053	1053	11	高甘露糖 (9%)
1502	非岩藻糖基化的杂合二等分的或非岩藻糖基化的复合的	7	1298 或 1502	1298 -	13	非岩藻糖基化的杂合二等分的 (7%)
1647	岩藻糖基化的杂合二等分的或岩藻糖基化的复合的	7	1298 或 1647	1298 -	13	岩藻糖基化的杂合二等分的 (7%)
1664	非岩藻糖基化的杂合二等分的或非岩藻糖基化的复合的	49	1460 或 1664	1460 -	60	非岩藻糖基化的杂合二等分的 (49%)
1689	岩藻糖基化的复合二等分的	3	1689	1689	5	岩藻糖基化的复合二等分的 (3%)
1810	岩藻糖基化的杂合二等分的或岩藻糖基化的复合的	15	1460 或 1810	1460 1810	60 2	岩藻糖基化的杂合二等分的 (13%) 和岩藻糖基化的复合的 (2%)
1826	非岩藻糖基化的杂合二等分的	4	1622	1622	7	非岩藻糖基化的杂合二等分的 (4%)
1851	岩藻糖基化的二等分的	3	1851	1851	2	岩藻糖基化的复合二等分的 (3%)
1972	岩藻糖基化的杂合二等分的	3	1622	1622	7	岩藻糖基化的杂合二等分的 (3%)

质量平衡 (以摩尔分数%) :

a) m/z1502 和 1647 的峰: $7 + 7\% = 14\%$ (预期的)。EndoH 对两个峰的消化产生了 m/z1298 (在 EndoH 后获得 13%)

b) m/z1664 和 1810 峰: $49 + 13\% = 62\%$ (预期的)。EndoH 产生 m/z1460 (获得 60%)

c) m/z 1826 和 1972 峰: $4 + 3\% = 7\%$ (预期的)。EndoH 产生 m/z 1622 (7%)

小结 结构总的相对百分比

带有二等分 GlcNAc: 88%

非岩藻糖基化的杂合二等分的: 60%

岩藻糖基化的杂合二等分的: 22%

岩藻糖基化的复合二等分的: 6%

上述数据 (图 1 至 6) 显示了 GnTIII 表达和用来将 GnTIII 催化结构域靶向高尔基体的特定定位结构域两个的水平, 影响了重组 GnTIII 催化结构域与内源性核心 α 1,6-岩藻糖基转移酶、(ManII) 和 GnTII 酶之间对 GnTI 修饰的寡糖底物的竞争。在该竞争中, GnTIII 的较高表达有利于此, 导致二等分、杂合寡糖和二等分、非岩藻糖基化寡糖的较高含量和伴随的二等分复合寡糖和二等分、岩藻糖基化寡糖的含量减少。这对于野生型 GnTIII 之前也注意到了 (Umaña, P. 等, *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999))。然而, 尽管形成相似总水平的二等分寡糖, 相对于野生型 GnTIII, 对于 GnTI 修饰的寡糖底物与内源性核心 α 1,6-岩藻糖基转移酶、ManII 和 GnTII 酶, 通过 GnTI 或通过 ManII 定位结构域来定位 GnTIII 催化结构域将导致更有效的竞争。

和野生型 GnTIII 相比较, GnTI-GnTIII 融合对于二等分、杂合寡糖和二等分、非岩藻糖基化寡糖合成的较高效力, 可以通过早的在 GnTI 相对于 GnTIII 的糖蛋白质物质传送的顺至反方向中的高尔基体分布来解释。GnTI 和 ManII 的精细高尔基体分布之前已经通过定量免疫电子显微术测定 (Rabouille, C. 等, *J. Cell Sci.* 108: 1617-27 (1995))。两个酶沿着高尔基体共分布, 主要定位在内部和穿过高尔基体堆 (stack) 的囊腔 (cisternae), 相对于穿过囊腔的, 内部囊腔中的含量较高。还没有测定核心 α 1,6-岩藻糖基转移酶、GnTII 和野生型 GnTIII 的精确定量空间分布。然而, 上述没有解释为什么对于合

成二等分、杂合寡糖和二等分、非岩藻糖基化寡糖，ManII-GnTIII 融合比 GnTI-GnTIII 融合更有效，由于 GnTI 和 ManII 两者沿着高尔基体区室 (subcompartment) 都具有相同的空间分布。

ManII-GnTIII 融合的较高效力表明了在内部分和穿过-高尔基体囊腔物理区室 (subcompartment) 中的相对组织化的功能糖基化反应区室 (subcompartment) 的存在。相信所谓的“内部-高尔基体糖基化酶”，GnTI、GnTII 和 ManII 作为高分子量复合体存在于高尔基体中。然而，如果定位结构域使得这些酶形成这些复合体的一部分，这对于 GnTI-GnTIII 融合和 ManII-GnTIII 融合是相同的。重组 GnTI-GnTIII 融合的表达没有导致内源性野生型 GnTI 酶置换成对 Fc-寡糖合成的任何显著程度，由于在此所用的所有 GnTIII 构建体导致大部分的寡糖得到 GnTI 和 GnTIII 两个反应的修饰。

我们的数据表明，由于 ManII 定位结构域，在内源性 GnTI 和重组 ManII-GnTIII 融合的催化结构域之间发生了精确的功能配对。生物合成途径中催化随后反应的酶的组织化配对，以偏好将第一个反应的产物转移至相对于该产物远离酶扩散的第二个催化位点的方式，是已知在另一生物合成途径中发生的如糖酵解和聚酮生物合成。已经报道过 GnTI 和 ManII 形成“kin 低聚物”，至少将这些酶中的一个再定位于内质网时 (Nilsson, T. 等, *EMBO J.* 13 (3). 562-74 (1994))。发现这两个酶的每个主区域中的一对带电氨基酸残基对于该 kin 识别是关键性的。GnTI 中残基的电荷和 ManII 中的相反。我们已经鉴定了该部分 N-连接寡糖生物合成途径中涉及的其它高尔基体糖基化酶的主区域中同等位置的相似残基，即核心 α 1,6-岩藻糖基转移酶 (和 GnTI 的电荷相同，而不是如在 ManII 情况中为互补电荷)、ManI 和 GnTII。我们还鉴定出这些残基是物种间保守的。尽管已经提出这些残基对于整合入酶形成的高分子复合体中或甚至对于高尔基体定位不是必要的 (Opat, A. S. 等, *J. Biol. Chem.* 275 (16):11836-45 (2000))，可能它们涉及寡糖生物合成过程中催化结构域的精确配对。这样的配对不需要是不可逆的，但是可以通过酶之间的瞬时的、动力学的相互作用

用来介导。在主区域或催化区域中的别处可能存在另外的配对决定簇。然而,在带有 GnTIII 催化结构域的重组融合中将失去来自 ManII 催化结构域的特定 GnTI-ManII 对的任何贡献。

图 9 至 11 证明了由抗体产生细胞中编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸超表达引起的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的提高,多肽通过不同定位结构域定位于高尔基体。具有 GnTIII 活性并通过 GnTI 高尔基体定位结构域定位于高尔基体的重组多肽的表达引起的 ADCC 提高显示于图 9 中。用于图 9 ADCC 试验中的对照抗体的寡糖特征形式显示于图 1 中。用于图 9 ADCC 试验中的糖基工程化抗体的寡糖特征形式显示于图 3 中。具有 GnTIII 活性并通过糖苷酶 ManII 高尔基体定位结构域定位于高尔基体的重组多肽的表达引起的 ADCC 提高显示于图 10 中。用于图 10 ADCC 试验中的对照抗体的寡糖特征形式显示于图 5 中。用于图 10 ADCC 试验中的糖基工程化抗体的寡糖特征形式显示于图 6 中。

图 11 显示了具有 GnTIII 活性并通过 ManII 高尔基体定位结构域定位于高尔基体的重组多肽的表达导致 ADCC 活性提高,相对于使用自身 GnTIII 高尔基体定位结构域的野生型 GnTIII 多肽。野生型 GnTIII 表达的并用于图 11 ADCC 试验中的糖基工程化抗体的寡糖特征图显示于图 2 中。具有 GnTIII 活性、通过 ManII 高尔基体定位结构域定位于高尔基体的融合多肽表达的并用于图 11 ADCC 试验中的糖基工程化的寡糖特征图显示于图 4 中。这些数据还显示了相对于带有复合的、岩藻糖基化的、非二等分寡糖的抗体,带有二等分寡糖包括二等分杂合寡糖和二等分非岩藻糖基化寡糖的抗体具有提高的 ADCC 活性。必须注意到用于图 10 ADCC 试验中的活性更高抗体的所有二等分寡糖是二等分、非岩藻糖基化的杂合寡糖。如之前所述的,使用具有 GnTIII 活性并通过 ManII 高尔基体定位结构域定位于高尔基体的融合多肽导致更有效合成非岩藻糖基化的二等分寡糖,且图 11 显示了相对于带有较低水平的这些寡糖的抗体,带有提高水平的这些二等分非岩藻糖基化寡糖的抗体在 ADCC 中更有活性。ADCC 活性提高和 Fc 相关寡糖群体中该二等分、非岩藻糖基化寡糖部分的增加相关联,当该部分高于 15-20%

时，可以看出极大的提高。

已知自然杀伤(NK)细胞是ADCC的重要介体。这些细胞在其表面携带激活Fc γ 受体IIIA,也称为CD16a。靶细胞结合抗体的Fc区和NK细胞上Fc γ RIIIA受体的结合对于NK细胞上这些受体的交联和随后ADCC的诱导是必需的。因此,评价在此所述方法产生的抗体和Fc受体的结合是重要的,尤其是人免疫效应细胞展示了它们的天然形式中的受体。图12证明了通过在抗体产生细胞中编码具有GnTIII活性的融合多肽的核酸表达产生的糖基工程化抗体具有提高的和人激活Fc受体Fc γ RIIIA的亲合性结合。如上所述的对于ADCC试验,这些抗体具有提高含量的二等分、非岩藻糖基化寡糖,寡糖是由具有GnTIII活性的融合多肽在抗体产生细胞中的表达产生的。该试验中所用的NK细胞来自在其NK细胞上不表达Fc γ RIIc受体的基因型供体(Metes, D.等, *J. Immunol. Methods* 258 (1-2): 85-95 (2001))。因此,只有这些细胞表面上的Fc受体是激活Fc γ RIIIA受体。图13显示了结合试验测量了和该受体的特异性结合亲和性。这通过和Fc γ RIII-特异性阻断抗体片段(3G8 Fab2-片段)的竞争来显示。

提高的Fc-FcR相互作用对抗肿瘤抗体治疗结果影响的强有力证据来自效力和纯合较高亲和性Fc γ RIIIA受体基因型之间的相关性,发现于接受rituximab的淋巴瘤患者((Cartron, G.等, *Blood* 99 (3): 754-8 (2002))。这是发现和大大提高的目标响应率和提高的分子响应比例相关的单个参数。由于提高的Fc γ RIIIA-Fc受体相互作用提高的效力源自通过各种免疫细胞包括自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突细胞实现的功能。NK细胞、巨噬细胞和单核细胞上激活Fc γ RIIIA受体的交联可以导致通过ADCC的肿瘤细胞裂解(广泛地相信是体内主要的FcR依赖性杀伤机理)(Maloney, D. G.等, *Semin. Oncol.* 29(1 Suppl. 2): 2-9 (2002), Amigorena S., *J. Exp. Med.* 195(1): F1-3 (2002)),还导致抗体依赖性细胞吞噬作用(Hazenbos, W. L.等, *J. Immunol.* 161 (6): 3026-32(1998), Reff, M. E.和 Heard, *C. Crit Rev Oncol Hematol.* 40(1): 25-35 (2001)),以及

导致在肿瘤细胞邻近释放细胞因子 (Carson, W. E. 等, *Eur. J. Immunol.* 31: 3016-3025 (2001))。这些细胞因子随后导致肿瘤细胞上的直接细胞毒性作用, 和导致抗血管生成作用, 其通过剥夺氧和营养物抑制肿瘤生长, 和导致提高的肿瘤抗原递呈, 作为激活 T 细胞介导的对抗肿瘤细胞的免疫应答的一部分。树突细胞对于 T 细胞的抗原递呈是决定性的, Fc γ R111A 在其表面上的交联 (例如, 来自抗体结合的体内通过 ADCC 最初攻击的垂死的肿瘤细胞) 可以导致提高的树突细胞成熟、抗原摄取和对 T 细胞的递呈, 以及细胞毒性 T 细胞的交叉致敏, 后者对激活抗肿瘤免疫性是非常有效的潜在机理 (Amigorena S., *J. Exp. Med.* 195(1) : F1-3 (2002), Kalergis, A. M. 和 Ravetch, J. V. *J. Exp. Med.* 195 (12): 1653-1659 (2002), Selenko, N. 等, *J. Clin. Immunol.* 22 (3): 124- 130 (2002))。通过免疫效应细胞上 Fc 受体的抗体结合靶细胞的交联还导致了靶细胞直接杀灭的提高, 例如通过抗体介导的靶抗原分子的交联而诱导的凋亡 (Reff, M. E. 和 Heard, C. *Crit Rev Oncol Hematol.* 40(1) : 25-35 (2001), Cragg, M. S. 等, *Blood* 101 (3): 1045-1052 (2003)。所有这些免疫效应细胞中, 只有 NK 细胞在其表面上仅仅具有激活 Fc γ R。其它类型细胞中, 激活 Fc γ R111 是和抑制性 Fc γ R11b 一起存在的, 抗肿瘤效应子功能的诱导由超过抑制信号的激活的正向平衡引起。

图 15 显示了提高的 Fc 受体结合和抑制性 Fc γ R11b 相比较是激活受体选择性的。如上解释的, 该选择性对于 NK 细胞以外的免疫细胞实现的效应子功能是重要的。此外, 通过使用在此所述的方法糖基工程化 Fc 抗体区域获得的结合提高比那些自然观察到的接受标准未修饰抗体的纯合较高亲和性 Fc γ R111A 基因型患者/供体的要高得多 (图 16), 且该结合提高和抗癌抗体提高的效力相关 (Cartron, G. 等 *Blood* 99 (3): 754-8 (2002))。

激活 Fc γ R111B 受体的结合结构域和 Fc γ R111A 的几乎相同。因此, 上述数据还表明了在此所述的糖基工程化抗体可以导致通过展示 Fc γ R111B 的效应细胞, 如多形核 (PMN) 细胞, 介质的效应子功能的提

高，包括毒性产物的释放和吞噬作用 (Reff, M. E. 和 Heard, C. *Crit Rev Oncol Hematol.* 40 (1) : 25-35 (2001), Daeron, FM. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-34 (1997), Ravetch, J. V. 和 Bolland S. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 275-90 (2001))。

图 18 显示了 BHK 细胞产生的抗 CD20 抗体的寡糖特征形式，BHK 细胞生长于悬浮液中并工程化来组成型高水平表达重组抗体和具有 GnTIII 活性的融合多肽。对于来自融合 GnTIII 工程化细胞的抗体，该寡糖特征形式显示了二等分非岩藻糖基化寡糖和二等分杂合寡糖水平的增加（也参见表 2）。在通过非糖基工程化 BHK 细胞产生的非糖基工程化抗体中没有发现这些结构（参见图 1）。表达 GnTIII 融合的工程化细胞呈现了在悬浮液中的正常生长和良好的抗体产量。

通过稳定的 BHK-1502-28-11 细胞系产生的糖基工程化单克隆抗体的寡糖的相对百分比列于表 2 中。

表 2: 通过 MALDI/TOF-MS 获得的峰的相对百分比

	峰 (m/z)	相对百分比
1	1257	2.5%
2	1486	2.8%
3	1647	6%
4	1664	22.30%
5	1680	2.5%
6	1689	4.8%
7	1705	3%
8	1810	27.8%
9	1826	10%
10	1851	7.5%
11	1972	9%
12	2012	1.75%

总的二等分的: 88.6% (4+5+6+7+8+9 + 10 + 11 + 12)

总的非岩藻糖基化的二等分的: 37.8% (4+5+7+9)

总的岩藻糖基化的二等分的: 50.8% (6+8+10+11+12)

复合二等分的: 17% (6+7+10+12)

杂合二等分的: 71.6% (4+5+8+9+11)

寡糖分析显示了 88.6% 的结构携带二等分 GlcNAc 残基, 50.8% 是岩藻糖基化的和 37.8% 是非岩藻糖基化的。用内切糖苷酶 H 消化 PNGaseF 释放的寡糖证明了获得的大多数峰是杂合二等分型 (图 19)。图 20 显示了 BHK-1502-28-11 细胞系产生的糖基工程化抗体和人 NK 细胞上的激活 Fc 受体 Fc γ RIIIA 结合亲和性的提高。在悬浮液中生长并组成型稳定表达抗体基因和融合 GnTIII 多肽的细胞系对大规模生产治疗抗体是理想的。使用标准细胞工程方法, 可以通过将融合 GnTIII 基因引入含有抗体基因的细胞系, 或通过将抗体基因引入含有融合 GnTIII 基因的细胞系 (“预糖基工程化的生产细胞系”), 或通过同时引入抗体基因和 GnTIII 融合基因来实现糖基工程化。

还检测了工程化细胞中产生的抗 CD20 抗体的补体介导裂解 (CML), 该工程化细胞用于高水平表达编码具有 GnTIII 活性并通过 ManII 定位结构域定位于高尔基体的融合多肽的核酸, CML 是不依赖于免疫效应细胞上 Fc 受体的不同效应子功能。该糖基工程化抗体的绝大部分寡糖是二等分杂合非岩藻糖基化型。和未修饰抗体相比较, 观察到该抗 CD20 抗体降低的 CML 活性 (图 21)。对于一些应用, 带有提高 ADCC 而带有降低 CML 的抗体是理想的, 例如减少通过 CML 介导的副作用, 如肿瘤部位血管中的血管炎。对于抗 CD20 抗体治疗已经观察到 CML 介导的其它显著副作用 (van der Kolk L. E. 等, *Br J Haematol.* 115 (4): 807-11 (2001))。然而, 上述寡糖特征形式还显示了工程化抗体产生细胞来以中等表达水平表达 GnTIII 融合多肽而导致糖基工程化抗体的 Fc 寡糖群体中中等水平的二等分杂合非岩藻糖基化寡糖 (高于 15%) 而不是具有显著部分的复合寡糖是可能的。这样的复合寡糖和正常的, 没有降低水平的 CML 相关。因此数据表明了可以这样生产带有提高 ADCC 的抗体, 其可以保持和非工程化抗体相比较非常相似水平的 CML 活性。

通过在此所述的方法糖基化识别人表皮生长因子受体 (EGFR) 的另一个嵌合 IgG1 抗体 C225, 也称为 cetuximab。图 22 显示了未修饰抗 EGFR 抗体 C225 和糖基工程化形式的相同抗体的寡糖特征。后者在表达编码具有 GnTIII 活性并通过 ManII 定位结构域定位于高尔基体的融合多肽的核酸的细胞中产生。图 23 显示了由该糖基工程化形成的抗 EGFR 抗体增加的 ADCC。通过在此所述的方法产生的且 ADCC 提高的以及激活 Fc 受体的结合亲和性提高的糖基工程化抗体, 对于癌症和自体免疫疾病的抗体治疗是有远景的分子, 由于用于这些治疗它们导致提高的效力, 相对于这些抗体相应的未修饰 (非糖基工程化的) 形式。此外, 和未修饰的抗体相比较, 对于糖基工程化的抗体可能减少治疗剂量, 这正面影响了抗体生产的经济。

实施例 2

治疗慢性移植物抗宿主疾病患者的免疫介导的血小板减少

慢性移植物抗宿主疾病中的自体免疫血小板减少代表了导致临床疾病的 B 细胞调节异常的实例。为了治疗慢性移植物抗宿主疾病患者的免疫介导血小板减少, 将根据本发明制备的并具有提高 ADCC 的抗 CD20 嵌合单克隆抗体给药于患者, 如 Ratanatharathorn, V. 等, *Ann. Intern. Med.* 133 (4): 275-79 (2000) 中所述的 (在此将其整体引入作为参考)。具体地, 每周输注抗体, 375mg/m², 给药于患者 4 周。抗体治疗产生了外周血中 B 细胞显著减少并降低了血小板相关抗体的含量。

实施例 3

治疗严重的、免疫介导的单纯性红细胞发育不全和溶血性贫血

免疫介导的、获得性单纯性红细胞发育不全 (PRCA) 是极少见的疾病, 通常与自体免疫现象相关。为了治疗患者的免疫介导的、获得性单纯性红细胞发育不全, 将根据本发明制得的并具有提高 ADCC 的抗 CD20 嵌合单克隆抗体给药于患者, 如 Zecca, M. 等, *Blood* 12: 3995-97

(1997)中所述的(在此将其整体引入作为参考)。具体地,给予 PRCA 和自体免疫溶血性贫血的患者两个剂量的抗体, $375\text{mg}/\text{m}^2$, 每周。抗体治疗后,开始用静脉内免疫球蛋白替代治疗。该治疗产生了 B 细胞的显著减少并伴随增加的血红蛋白水平实现了网织红细胞计数的显著提高。

实施例 4

材料和方法

1. 构建 GalT 融合表达载体

用于组成型表达 GalT 的载体

为了构建 GalT 表达载体,从 cDNA 文库(Clontech)通过 PCR 扩增 GalT cDNA。将 C 末端 c-myc-表位标记加入紧接着基因终止子的上游(氨基酸序列:PEQKLISEEDL),为了以后方便地通过蛋白质印迹来测定 GalT。证实 GalT 的正确序列后,将基因插入在 MPSV 启动子控制下,并将合成的兔 β 球蛋白聚腺苷酸化信号加入。最终 GalT 表达载体还含有用于选择的分开的嘌呤霉素抗性盒,带有也在 MPSV 启动子控制下的嘌呤霉素抗性基因和合成的兔 β 球蛋白聚腺苷酸化信号。

用编码人 GnTI 定位结构域的氨基酸替代编码 GalT 定位结构域的氨基酸。

进行该杂合半乳糖基转移酶基因的构建,例如,通过重叠 PCR 反应,形成含有在 MPSV 启动子控制下的 GnTI-GalT 融合和用于选择的嘌呤霉素抗性盒的质粒。

用编码人甘露糖苷酶 II 定位结构域的氨基酸替代编码 GalT 定位结构域的氨基酸。

进行 GalT 表达载体的构建。所得到的质粒含有在 MPSV 启动子控制下的杂合 manII-GalT 基因。

组合杂合 manII-GalT 融合基因和来自 Epstein Barr 病毒的复制起点 oriP.

如实施例 1 所述的将带有 oriP 的 DNA 片段亚克隆进上述的杂合 ManII-GalT 表达载体中。

组合杂合 manII-GalT 融合基因和截短的 CD4 细胞表面标记基因

修饰表达载体用于截短的 CD4 细胞表面标记基因另外的表达。简短地说,将杂合 manII-GalT 融合基因表达盒从单顺反子转换成双顺反子表达盒,通过将后面跟着编码顺反人 CD4 蛋白质 cDNA 的脊髓灰质炎病毒 IRES 序列插入 manII-GalT 融合终止子的下游(包括用于分泌的人 CD4 前导序列,后面跟着跨膜和胞外结构域)。

3. 用 GalT 融合表达载体和抗体表达载体转染哺乳动物细胞 转染 BHK 细胞

如实施例 1 中所述的培养、收集并随后转染按指数生长的细胞(生活力 90-95%)。为了生产糖基工程化抗体,用两个质粒共转染细胞,一个用于抗体表达和另一个用于融合 GalT 多肽表达,各自比例为 3:1。

转染 HEK293-EBNA 细胞

如实施例 1 所述的转染按指数生长的 HEK293-EBNA 细胞。为了生产糖基工程化抗体,用两个质粒共转染细胞,一个用于抗体表达和另一个用于融合 GalT 多肽表达,各自比例为 4:1。转染 5 天后,收集上清液,在 1200rpm 离心 5 分钟,接着在 4000rpm 第二次离心 10 分钟并保持于 4℃。

表达重组抗 CD20 抗体和 GalT 融合的稳定哺乳动物细胞系的产生

通过电穿孔用表达载体转染组成型表达抗 CD20 单克隆抗体基因和新霉素抗性基因的克隆 BHK-1502-28。载体允许 ManII-GalT 基因和截短形式的人 CD4 的组成型表达,后者是 IRES 依赖性表达的。载体

还含有嘌呤霉素抗性基因表达盒。首先选择嘌呤霉素抗性克隆来获得一套染色体整合载体 DNA 的克隆。然后筛选克隆的截短 CD4 (tCD4) 表面表达,其作为双顺反子 ManII-GalT + tCD4 基因表达单位表达水平的标记。使用 ELISA 试验来检验所选克隆重组抗体的产生。

如实施例 1 中所述的进行转染和随后 tCD4 表达水平的筛选。

4. 未修饰抗体和糖基工程化抗体的生产和纯化

用抗体表达载体转染或用抗体表达载体加 GalT 融合表达载体共转染 BHK 细胞的情况下,在转染后将转染的细胞培养 96h 小时后收集培养物上清液。根据预期的生产力,对相同载体进行数次电穿孔 (10-15)。

用抗体表达载体转染或用抗体表达载体加 GalT 融合表达载体共转染 HEK293-EBNA 细胞的情况下,转染约 16 小时后用新鲜培养基替换培养基,然后进一步培养转染细胞 120 小时后收集后加入的培养基。

对于稳定的 BHK-1502-28-11 细胞系,以 500,000 细胞/ml 接种培养物并在培养 4 天后收集上清液。

抗体纯化

使用两个连续层析步骤从培养物上清液中纯化单克隆抗体,如实施例 1 中所述的蛋白质 A 层析和阳离子交换层析。

5. 寡糖分析

通过 PNGaseF 消化从抗体酶解释放寡糖,抗体固定于 PVDF 膜上或在溶液中。

将所得到的含有释放寡糖的消化液直接制备用于 MALDI/TOF-MS 分析或在制备 MALDI/TOF-MS 分析样品之前进一步用 EndoH 糖苷酶消化。

如实施例 1 中所述的,进行 PVDF 膜固定抗体的寡糖释放方法和溶液中抗体的寡糖释放方法。

内切糖苷酶 H 消化的 PNGaseF 释放寡糖将杂合糖基化寡糖结构分配给 MALDI/TOF-MS 中性寡糖峰的用途

如实施例 1 中所述的随后用内切糖苷酶 H (EC 3.2.1.96) 消化 PNGase 释放的寡糖。

MALDI/TOF-MS

如实施例 1 中所述的制备含有释放寡糖的酶解消化液样品并随后进行 MALDI/TOF 质谱。

6. 细胞制备和分离

基本上按照制造商的指导和实施例 1 中所述的方法使用 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA) 制备外周血单核细胞 (PBMC)。

使用如实施例 1 中所述的阴性选择方法从 PBMC 中分离出人 NK 细胞。

8. ADCC 试验

如上所述的制备作为效应细胞的 PBMC 或 NK 并如实施例 1 中所述的在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 试验中测试它们介导细胞毒性的能力。

9. NK 细胞上的 Fc γ RIIIA 结合和 Raji 淋巴细胞上的 Fc γ RIIb 结合

如实施例 1 中所述的测定新鲜分离的 NK 细胞上的 Fc γ RIIIA 结合和在 Raji 淋巴细胞上的 Fc γ RIIb 结合。

10. 补体依赖性细胞毒性试验

根据实施例 1 中所述的方法使用抗体稀释液进行补体依赖性细胞毒性试验。

结果和讨论

为了证明相对于没有产生该多肽的细胞,编码具有 GalT 活性的多肽的基因表达对细胞生活力、细胞生长或抗体产量的影响,进行了试验。

如实施例 1 中所述的通过 MALDI/TOF-MS 分析纯化抗体的糖基化模式。使用该技术,可以测定总的原始 Fc 寡糖群体中的不同寡糖种类的比例,还可以将结构分配给质谱中不同的峰 (Umaña, P. 等, Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999))。

测定未修饰抗体寡糖的特征形式。具体地,测定通过野生型 GalT 表达的抗体产生细胞的工程化是否主要形成半乳糖基化的、核心岩藻糖基化的、复合双触角寡糖。还测定通过编码 GnTI-GalT 融合多肽(其中 GalT 催化结构域是通过 GnTI 高尔基体定位结构域定位的)的核酸表达的抗体产生细胞的工程化是否相对于野生型 GalT 主要形成半乳糖基化的复合双触角寡糖。如果半乳糖基化的、非岩藻糖基化结构和半乳糖基化的、杂合结构是合成的,这些由 GalT 和其它糖基转移酶或糖苷酶竞争形成的。预期一旦通过 GalT 催化的反应加入的半乳糖修饰了寡糖, α 1,6-核心岩藻糖基转移酶、高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (ManII) 和 GnTII 不再起作用来修饰半乳糖基化的寡糖。

使用可以分辨杂合和复合寡糖的 EndoH 糖苷酶消化来估算 Fc 连接的半乳糖基化、非岩藻糖基化寡糖和半乳糖基化杂合寡糖的比例。

进行测试来测定通过编码 ManII-GalT 融合多肽(其中 GalT 催化结构域是通过 ManII 高尔基体定位结构域定位的)的核酸表达的抗体产生细胞的工程化是否主要形成半乳糖基化、非岩藻糖基化和半乳糖基化、杂合的。具体地,测定相对于野生型 GalT 和 GnTI-GalT 融合,是否 ManII-GalT 融合在合成 Fc 连接的半乳糖基化、非岩藻糖基化寡糖和半乳糖基化、杂合寡糖中更有效。

如上所述,使用内切糖苷酶 H (EndoH) 来证实半乳糖基化非岩藻糖基化结构和半乳糖基化杂合结构分配给 MALDI 特征图中观察到的不

同寡糖峰。在带有半乳糖残基的寡糖半乳糖残基中，测定了那些非岩藻糖基化杂合结构、岩藻糖基化杂合和岩藻糖基化复合寡糖结构的百分比。

测定了 GalT 表达水平和用于将 GalT 催化结构域靶向高尔基体的特定定位结构域对 GnTI 修饰的寡糖底物在重组 GalT 催化结构域和内源性核心 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖基转移酶、ManII 以及 GnTII 酶之间竞争的影响。测定了抗体产生细胞中核酸超表达引起的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的水平，该核酸编码具有通过不同定位结构域定位的 GalT 活性的多肽。

还测定了通过抗体产生细胞中核酸表达产生的糖基工程化抗体是否具有提高的和人激活 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的结合亲和性或用于抑制 Fc γ RIIb，该核酸编码具有 GalT 活性的融合多肽。

GalT 构建体将竞争内源性核心 $\alpha 1, 6$ -岩藻糖基转移酶的活性，糖基工程化抗体的 Fc 区并因此提高 ADCC。

测定了 BHK 细胞产生的抗 CD20 抗体的寡糖特征形式，BHK 细胞生长于悬浮液中并工程化来组成型高水平表达重组抗体和具有 GalT 活性的融合多肽。还测定了通过稳定 BHK-1502-28-11 细胞系产生的糖基化单克隆抗体的寡糖相对百分比。

实施例 5

材料和方法

1. ManII 和 GnTII 表达载体的构建

为了构建 ManII 表达载体，将人甘露糖苷酶 II (SEQ ID NO: 17) cDNA 亚克隆进表达载体质粒中 MPSV 启动子的下游和合成的兔 β 球蛋白聚腺苷酸化信号的上游。为了 GnTII 表达，使用了在人 CMV 启动子/增强子的下游和牛生长激素聚腺苷酸化信号的上游亚克隆了人 GnTII cDNA 的表达载体质粒。

组合表达载体和来自 Epstein Barr 病毒的复制起始点 oriP。

如实施例 1 所述的将带有 oriP 的 DNA 片段亚克隆进上述的 ManII 表达载体中来获得 ManII 表达载体 pCLF9。如实施例 1 所述的将带有 oriP 的 DNA 片段亚克隆进上述的 GnTII 表达载体中来获得 GnTII 表达载体 pGnTII。

2. 转染 HEK293-EBNA 细胞

如实施例 1 中所述的转染按指数生长的 HEK293-EBNA 细胞。为了生产未修饰抗体“Cwt”，用抗体表达载体（pETR1520）转染细胞。为了生产糖基工程化抗体“Cbrt”，用两个质粒共转染细胞，一个用于抗体表达（pETR1520）和另一个用于融合 GnTIII 多肽表达（pETR1519），比例为 4:1。为了生产糖基工程化抗体“Cm”，用三个质粒共转染细胞，一个用于抗体表达（pETR1520），一个用于融合 GnTIII 多肽表达（pETR1519），和一个用于甘露糖苷酶 II 表达（pCLF9），比例为 3:1:1。为了生产糖基工程化抗体“Cmg”，用四个质粒共转染细胞，一个用于抗体表达（pETR1520），一个用于融合 GnTIII 多肽表达（pETR1519），一个用于甘露糖苷酶 II 表达（pCLF9），和一个用于 GnTII 表达（pGnTII），比例为 4:0.33:0.33:0.33。

3. 未修饰抗体和糖基工程化抗体的生产和纯化

转染约 16 小时后用新鲜培养基替换上述转染细胞的培养基，然后在进一步培养转染细胞 120 小时后收集后来的培养基。收集的上清液在 1200rpm 离心 5 分钟，接着在 4000rpm 第二次离心 10 分钟并保存于 4℃。

抗体纯化

使用两个连续层析步骤从培养物上清液中纯化单克隆抗体，如实施例 1 中所述的蛋白质 A 层析和阳离子交换层析。对于抗体 cwt7、cbrt5 和 cm1，在阳离子交换步骤后使用 Superdex200 柱（Amersham Pharmacia）进行另外的大小排阻层析步骤并加入磷酸盐缓冲盐水，收

集单体抗体峰。

4. 寡糖分析

如实施例 1 中所述的通过 PNGaseF 消化溶液中抗体酶解释放的寡糖。

内切糖苷酶 H 消化的 PNGaseF 释放寡糖将杂合二等分寡糖结构分配给 MALDI/TOF-MS 中性寡糖峰的用途

如实施例 1 中所述的随后用内切糖苷酶 H (EC 3.2.1.96) 消化 PNGaseF 释放的寡糖。

MALDI/TOF-MS

如实施例 1 中所述的制备含有释放寡糖的酶解消化液样品并随后在 MALDI/TOF 质谱仪上运行。

5. 细胞制备和分离

基本上按照制造商的指导和实施例 1 中所述的方法使用 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, M063178 USA) 制备外周血单核细胞 (PBMC)。

6. NK 细胞分离

使用如实施例 1 中所述的阴性选择方法从 PBMC 中分离出人 NK 细胞。

7. ADCC 试验

如上所述的制得作为效应细胞的 PBMC 或 NK 并如实施例 1 中所述的在抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 试验中测试它们介导细胞毒性的能力。

8. NK 细胞上的 Fc γ R11IA 结合

如实施例 1 中所述的测定在新鲜分离的 NK 细胞上的 Fc γ R11IA 结合和 Fc γ R11b 的结合。

9. 补体依赖性细胞毒性试验

根据实施例 1 中所述的方法使用抗体稀释液进行补体依赖性细胞毒性试验，对于制备人补体来源使用以下的改变。简短地，从健康志愿者的血中制得正常人血清 (NHS)。使血凝结 1 小时，然后在 1200g 离心 20 分钟。将无细胞的上清液血清等分并保存于 -80℃。以 20% 的终试验体积使用 NHS。

结果和讨论

通过哺乳动物细胞的共转染培养制得抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 (C2B8 嵌合抗体，也称为 rituximab) 的糖基工程化形式，哺乳动物细胞用表达抗体基因的载体和表达编码具有 GnT111 和甘露糖苷酶 II 活性的多肽的基因的载体共转染。通过哺乳动物的共转染培养还制得另外的糖基工程化抗体形式，哺乳动物细胞用表达抗体基因的载体和表达编码具有 GnT111 活性、甘露糖苷酶 II 活性和 GnT11 活性的多肽的基因的载体共转染。为了生产糖基工程化抗体 “Cbrt”，用两个质粒共转染细胞，一个用于抗体表达 (pETR1520) 和另一个用于融合 GnT111 多肽表达 (pETR1519)。为了生产糖基工程化抗体 “Cm”，用三个质粒共转染细胞，一个用于抗体表达 (pETR1520)，一个用于融合 GnT111 多肽表达 (pETR1519) 和一个用于甘露糖苷酶 II 表达 (pCLF9)。为了生产糖基工程化抗体 “Cmg”，用四个质粒共转染细胞，一个用于抗体表达 (pETR1520)，一个用于融合 GnT111 多肽表达 (pETR1519)，一个用于甘露糖苷酶 II 表达 (pCLF9) 和一个用于 GnT11 表达 (pGnT11)。仅用表达抗体基因的载体转染哺乳动物细胞来生产相同抗体的未修饰 (非糖基工程化) 形式 “Cwt”。将转染细胞在培养物中保持 5 天，从培养基中纯化分泌的重组抗体。相对于没有产生这样的糖基转移酶或

糖苷酶多肽的细胞,编码具有 GnTIII 和 ManII 活性的多肽的基因表达对细胞生活力、细胞生长和抗体生产没有显著影响。

然后分析纯化抗体的糖基化模式。这些抗体带有仅连接于人 IgG1 Fc 区 Asn297 残基的 N-连接寡糖。通过 PNGaseF 消化从抗体酶解除去寡糖并随后通过 MALDI/TOF-MS 分析。使用该技术,可以测定总的原始 Fc 寡糖群体中的不同寡糖种类的比例,还可以将结构分配给质谱中不同的峰(Umana, P. 等, *Nature Biotechnol.* 17: 176- 180 (1999))。

图 26 显示了未修饰重组 C2B8 抗 CD20 嵌合 IgG1 抗体 Cwt 的中性寡糖 MALDI/TOF-MS 特征图。如之前实施例 1、图 5 中所述的对于未修饰抗体, Cwt 具有典型的寡糖特征图, m/z 1485、1648 和 1810 的峰,分别和具有 0、1 和 2 个半乳糖残基的双触角、核心岩藻糖基化的复合寡糖相一致。通过表达编码 ManII-GnTIII 融合多肽(其中通过 ManII 高尔基体定位结构域定位 GnTIII 催化结构域)的核酸的抗体产生细胞工程化导致产生抗体(Cbrt),其中大部分 Fc 寡糖是二等分、非岩藻糖基化杂合的(参见图 27)。如实施例 1 中所述的,内切糖苷酶 H(EndoH)用来证实二等分非岩藻糖基化结构和二等分杂合结构分配给 MALDI 特征图中所观察到的不同寡糖峰。

通过共表达编码 ManII-GnTIII 融合多肽(其中通过 ManII 高尔基体定位结构域定位 GnTIII 催化结构域)的核酸和编码 ManII 的核酸的抗体产生细胞工程化导致产生抗体(Cm),其中大部分 Fc 寡糖是二等分、非岩藻糖基化复合的(参见图 28)。通过共表达编码 ManII-GnTIII 融合多肽(其中通过 ManII 高尔基体定位结构域定位 GnTIII 催化结构域)的核酸、编码 ManII 的核酸和编码 GnTII 的核酸的抗体产生细胞工程化导致产生抗体(Cmg),其中大部分 Fc 寡糖是二等分、非岩藻糖基化复合的,二等分、非岩藻糖基化复合 Fc 连接的寡糖部分甚至高于抗体 Cm 的。

图 29 显示了证明了提高了的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的数据,该提高的 ADCC 是由编码 ManII-GnTIII 融合多肽(其中通过 ManII 定位结构域定位 GnTIII 催化结构域)的核酸在抗体产生细胞中表达形成

的，其中 ManII-GnTIII 编码核酸是自己（抗体 Cbrt）表达或和编码 ManII (Cm) 的核酸在抗体产生细胞中一起共表达。因此，提高糖基工程化抗体 Fc 区中杂合或复合型的二等分非岩藻糖基化寡糖的含量将导致 ADCC 活性的提高。

已知自然杀伤 (NK) 细胞是 ADCC 的重要媒介。这些细胞在其表面携带激活 Fc γ 受体 IIIA，也称为 CD16a。靶细胞结合抗体的 Fc 区和 NK 细胞上 Fc γ RIIIA 受体的结合对于 NK 细胞上的这些受体的交联和随后 ADCC 的诱导是必需的。因此评价在此所述方法产生的抗体和 Fc 受体尤其是其中人免疫效应物分子展示了它们的天然形式受体的结合是重要的。图 30 证明了通过在抗体产生细胞中编码具有 GnTIII 活性的融合多肽的核酸的表达产生的糖基工程化抗体具有提高的和人激活 Fc 受体 Fc γ RIIIA 的亲合性结合，该核酸自己（抗体 Cbrt）表达或和编码 ManII (Cm) 的核酸在抗体产生细胞中一起共表达。如上所述的对于 ADCC 试验，这些抗体具有提高水平的二等分、非岩藻糖基化寡糖，寡糖由具有 GnTIII 活性的融合多肽在抗体产生细胞中的表达形成。

因此，提高糖基工程化抗体 Fc 区中杂合或复合型的二等分非岩藻糖基化寡糖的水平将导致 ADCC 活性的提高。该试验中所用的 NK 细胞来自在其 NK 细胞上不表达 Fc γ RIIc 受体的基因型供体 (Metes, D. 等, *J. Immunol. Methods* 258 (1-2): 85-95 (2001))。因此只有这些细胞表面上的 Fc 受体是激活 Fc γ RIIIA 受体。

激活 Fc γ RIIIB 受体的结合结构域和 Fc γ RIIIA 的几乎相同。因此，上述数据还表明了在此所述的糖基工程化抗体可以通过展示 Fc γ RIIIB 的效应细胞如多形核 (PMN) 细胞介导的效应子功能提高，包括毒性产物的释放和吞噬作用 ((Reff, M. E. 和 Heard, C. *Crit Rev Oncol Hematol.* 40 (1) : 25-35 (2001), Daeron, FM. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-34 (1997), Ravetch, J. V. 和 Bolland S. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 275-90 (2001))。

还检测了工程化细胞中产生的抗 CD20 抗体 Cbrt 的补体介导裂解 (CML)，该工程化细胞用于表达编码具有 GnTIII 活性并通过 ManII

定位结构域定位于高尔基体的融合多肽的核酸，CML 是不依赖于免疫效应细胞上 Fc 受体的不同效应子功能。该糖基工程化抗体的绝大部分寡糖是二等分杂合非岩藻糖基化型。和未修饰抗体 Cwt 相比较，观察到 Cbrt 抗体降低的 CML 活性（图 31）。对于一些应用，带有提高 ADCC 而带有降低 CML 的抗体是理想的，例如减少通过 CML 介导的副作用，如肿瘤部位血管中的血管炎。对于抗 CD20 抗体治疗已经观察到 CML 介导的其它显著副作用（van der Kolk L. E. 等，*Br J Haematol.* 115 (4): 807-11 (2001)）。然而，可以产生糖基工程化抗体，该抗体相对于未修饰抗体带有提高的 ADCC 活性和 Fc γ RIII 结合，但是没有显著降低 CML 活性，如在抗体 Cm 的情况中（图 31）。这样的抗体对于其中最大靶细胞的消除需要高 ADCC 和高补体激活和 CML 活性的应用是理想的。上述的寡糖特征形式显示了可以通过 GnTIII 融合多肽和编码 ManII（抗体 Cm）的核酸一起共表达或 GnTIII 融合多肽和编码 ManII 的核酸以及编码 GnTII（抗体 Cmg）的核酸一起共表达将细胞工程化来产生抗体，其中抗体中大部分 Fc 连接的寡糖是非杂合型的二等分、非岩藻糖基化复合型。糖基工程化抗体具有和二等分非岩藻糖基化寡糖提高的水平相关的提高的 ADCC 活性和提高的 Fc γ RIII 结合亲和性，而由于复合寡糖部分相对于杂合寡糖部分的增加提高了它们的 CML 活性。

这和之前的实施例已经描述了融合多肽编码核酸的表达，其中融合多肽定位于高尔基复合体并具有和内源性岩藻糖基转移酶竞争的催化结构域，用于之前通过 GnTI 催化的反应修饰的寡糖受体。通过该工程化宿主细胞产生的重组糖蛋白具有提高水平的非岩藻糖基化寡糖。该实施例证明了编码 ManII 和/或 GnTII 核酸和上述编码融合多肽的核酸一起在该宿主细胞中的共表达导致生物合成通量朝向复合寡糖的增加，而不是杂合寡糖，并因此导致合成的糖蛋白具有提高水平的非岩藻糖基化复合寡糖，相对于没有共表达编码 ManII 和/或 GnTII 核酸的细胞中产生的糖蛋白。

实施例 6

α -甘露糖苷酶的超表达

分子克隆

人 α -甘露糖苷酶 II

编码人 α -甘露糖苷酶 II (“hManII”) (E. C. 3.2.1.114) 的基因 (SEQ ID NO: 17), 在 MPSV 启动子控制下, 克隆进含有 OriP 元件的表达载体中。所得到的表达载体 pCLF9 显示于图 32A 中。编码抗 CD20 单克隆抗体的轻链和重链的表达载体各自为 pETR1842 和 pETR1843 (图 32B 和 32C)。

融合蛋白 ManII-Ga1T

如以下所述的构建融合蛋白 (SEQ ID NO: 20), 由 hManII CTS 和人 β (1,4)-半乳糖基转移酶 (M22921, 氨基酸 126-397) 的催化结构域组成。通过 PCR 从 pETR1484 (CF33, GAB252) 扩增 hManII CTS 区域。使用 CF31 和 CF35 从 pBlueGa1T 扩增 Ga1T 的催化结构域 (氨基酸 126-397)。将 hManII CTS 和 Ga1T 的催化结构域合并来获得通过 MPSV 启动子控制的融合蛋白 (pCLF24)。从 pBlueGa1T 获得整个 Ga1T 基因。将编码 Ga1T 的基因测序 (SEQ ID NO: 16):

```
MRLREPLLSGSAAMPGASLQACRLLVAVCALHLGVTLVYYLAGRDLSR
LPQLVGVSTPLQGGSNSAAAIGQSSGELRTGGARPPPPLGASSQPRPGDS
SPVVDSGPGPASNLTSVPVPHTTALSLPACPEESPLLVGPMLEFNMPVDL
ELVAKQNPVVKMGGRYAPRDCVSPHKVAIIPFRNRQEHLKYWLYYLHP
VLQRQQLDYGIYVINQAGDTIFNRKLLNVGFQEQALDYDYTCFVFSQV
DLIPMNDHNAYRCFSQPRHISVAMDKFGFSLPYVQYFGGVSALSQKQFLT
INGFPNNYWGWGGEDDDIFNRLVFRGMSISRPNAVVGRCRMRHSRDKK
NEPNPQRFDRIAHTKETMLSDGLNSLTYQVLDVQRYPLYTQITVDIGTPS
```

用 CF32/CF38 扩增 Ga1T 的 5', 并在基因前面加入 FseI 限制性位点。通过测序发现序列正确并通过 FseI/DraIII 消化在 pCLF24 中交换 (pCLF26)。将 OriP 加入 pCLF24 和 pCLF26 中来分别产生 pCLF25 和 pCLF27 (图 33A 和 33B)。

α -甘露糖苷酶和 ManII-Ga1T 在 HEK293-EBNA 细胞中的表达

用磷酸钙方法转染 HEK293-EBNA 细胞。简短地，为了转染 T150，在转染前 24 小时将 15 百万细胞接种于 28ml DMEM, 10% FCS, 250 μ g/ml 新霉素并在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵育过夜。

对于每个待转染的 T150 培养瓶，通过混合 94 μ g 总质粒载体 DNA、469 μ l 1M 的 CaCl₂ 溶液并加入水至终体积 938 μ l 制得 DNA、CaCl₂ 和水的溶液。向该溶液中加入 938 μ l 50mM HEPES、280mM NaCl、pH7.05 的 1.5mM Na₂HPO₄ 溶液，并立即混合 10 秒并在室温静置 20 秒。用 24ml 补充 2%FCS 的 DMEM 稀释悬浮液，并加入 T150 中替代现有的培养基。将细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵育大约 17 至 20 小时，并用 30ml 10%FCS 的 DMEM 替代培养基。

为了测试 α -甘露糖苷酶 II 对核心岩藻糖基转移酶竞争的影响，用各自比例为 2:2:1 的 pETR1842、pETR1843 和 pCLF9 转染细胞。对于融合蛋白质 ManII-Ga1T，用各自比例为 2:2:1 的 pETR1842、pETR1843 和 pCLF25 转染细胞。转染 5 天后，收集上清液，在 1200rpm 离心 5 分钟，接着在 4000rpm 第二次离心 10 分钟，过滤并保存于 4 $^{\circ}$ C。

抗 CD20 单克隆抗体的纯化

通过两步层析从 30ml 上清液中纯化单克隆抗体，包括第一个蛋白质 A 层析，从存在于血清中的牛抗体分离出单克隆抗体，接着阳离子交换层析，来将样品缓冲液交换至 PBS。

寡糖分析

PNGaseF 消化

用 0.1mU/ μ l 的 N-糖苷酶 F (重组的, Roche, Switzerland) 孵育单克隆抗体样品 (50 μ g)。在 2mM pH7.0 的 Tris 缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 进行消化 3 小时。然后将释放的中性寡糖在 150mM 醋酸中室温孵育 3 小时。然后用装载入微-生物-旋转色谱柱 (BioRad, Hercules, CA) 中的

0.6ml 阳离子交换树脂 (AG50W-X8 树脂, 氢形式, 100-200 目, BioRad, Hercules, CA) 将样品脱盐。

EndoH 消化

在醋酸处理之前, 用内切糖苷酶 H (EC3.2.1.96, ROCHE, Switzerland) 消化 PNGaseF 释放的寡糖, 内切糖苷酶 H 是分裂 N 连接寡糖的壳二糖核心的 N-乙酰氨基葡萄糖残基的酶。酶将分解寡甘露糖, 且多数是杂合型聚糖, 而复合型寡糖没有得到水解。

用 2mM pH7.0 Tris 中的 0.2 mU/ μ l 内切糖苷酶 H 消化寡糖。消化在 37 $^{\circ}$ C 进行 3 小时。寡糖在 150mM 醋酸中室温孵育 3 小时, 随后用装载入微-生物-旋转色谱柱 (BioRad, Switzerland) 中的 0.6ml 阳离子交换树脂 (AG50W-X8 树脂, 氢形式, 100-200 目, BioRad, Switzerland) 将样品脱盐。

基质和样品制备

通过将 2mg 的 2,5-二羟基苯甲酸 + 0.1mg 的 5-甲氧基水杨酸溶解于 1ml 1:1 (v/v) 的乙醇/10mM 氯化钠水溶液中制得 2,5-二羟基苯甲酸基质 (sDHB)。将 1 μ l 样品运用至不锈钢目标上, 并和 1 μ l sDHB 混合。将样品空气干燥并运用 0.2 μ l 乙醇。

MALDI/TOF 分析

用来获得质谱的 MALDI-TOF 质谱仪是装备了延时提取的 Voyager Elite (Perspective Biosystems)。以反射器方式操作该装置。将阳离子在 75ns 延迟后加速至 20 kV。将 40 个发射的五个质谱 (200 个发射) 合并来获得最终的质谱。使用寡糖标准的外部标准来用于离子的质谱分配。

寡糖特征形式

在 ManII 存在下产生的抗 CD20 抗体的寡糖特征形式显示于图 34

中。发现和抗体 Fc 部分相关的寡糖是复合结构，其中 48% 缺少核心岩藻糖。α-甘露糖苷酶 II 和核心岩藻糖基转移酶竞争，产生 48% 非岩藻糖基化寡糖结构。在 α-甘露糖苷酶 II 缺失下，抗体 Fc 部分的寡糖仅包括岩藻糖基化的结构（野生型抗体）。

在 ManII-GalT 融合蛋白存在下产生的抗 CD20 抗体的寡糖特征形式显示于图 35A-B 中。对于 α-甘露糖苷酶 II，还有在 ManII-GalT 融合蛋白情况下，非岩藻糖基化寡糖结构的量增加了。非岩藻糖基化结构的高百分比与高甘露糖结构 (m/z 1256、1419 和 1581) 一致。对于该 67% 非岩藻糖基化糖，发现了另外 30% 的杂合非岩藻糖基化结构 (m/z1622)。因此，在 ManII-GalT 融合蛋白存在下产生的样品显示了几乎 100% 的非岩藻糖基化结构。

在 α-甘露糖苷酶 II 或 ManII-GalT 融合蛋白存在下产生的抗体的生物活性

为了测定 α-甘露糖苷酶 II 和 ManII-GalT 酶在核心岩藻糖基转移酶竞争中作用的效力，进行了相关生物试验。测试了样品的体外抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 以及和工程化 CHO 细胞系 (CHO-1708-37) 表面上表达的 CD16 受体的结合。

在 CHO-1708-37 上的 IgG 结合

CHO-1708-37 细胞系在其表面上表达 Fc γ RIIIA 受体 (CD16) 和 Fc γ RI 受体的 γ 链。通过 FACS 分析使用 3G8-FITC 单克隆抗体来测试 Fc γ RIIIA 受体 (CD16) 的表达 (图 36)。在 0.1% BSA 的 PBS 中孵育 1Mio/ml CHO-1708-37 细胞，使用不同浓度 (10、3、1、0.3、0.1 μg/ml) 的不同抗体变体，一式三份。将细胞在 4℃ 孵育 30 分钟并随后用 0.1% BSA 的 PBS 洗涤。通过用 1:200 异硫氰酸荧光素缀合的 F(ab')₂ 山羊抗人 IgG (Jackson Immuno Reasearch, West Grove, PA) 在 4℃ 孵育 30 分钟来检测抗体结合。在门控活细胞的 FACS Calibur 上 (BD Bioscience, San Jose, CA) 测定涉及结合抗体变体的荧光强度。

以下抗体变体包括于结合试验实验中：

Cwt8 (野生型 1)

ManII (α -甘露糖苷酶 II)

在 α -甘露糖苷酶 II (Man II) 存在下产生的抗体和 Fc γ RIIIA 受体的结合亲和性比野生型抗体的高。

体外抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)

使用 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc. , St. Louis, MO63178 USA) 并基本上按照制造商的指导制得外周血单核细胞 (PBMC)。简短地, 用肝素化注射器从志愿者采取静脉血样, 志愿者被要求全力奔跑 1 分钟, 以便提高血液中的自然杀伤细胞 (NK) 的百分比。用不含有 Ca 或 Mg 的 PBS 将血稀释 1:0.75-1.3, 并铺于 Histopaque-1077 上。在室温 (RT) 于 400g 无间断的梯度离心 30 分钟。收集含有 PBMC 的中间相并用 PBS 洗涤 (来自两个梯度的每 50ml 细胞) 并通过 RT300g 离心 10 分钟收集。用 PBS 将沉淀重悬浮后, 将 PBMC 计数并通过 RT 200g 离心 10 分钟来洗涤第二次。然后将细胞重悬浮于合适的培养基中用于随后的程序。

在 PBS 中洗涤 Raji 靶细胞, 计数并以每 ml 1Mio 重悬浮于 DMEM, 10% FCS, 1%Glutamax。向这些中加入 1:100 calcein 并将细胞在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。然后在 PBS 中洗涤细胞, 计数并每 ml 0.3Mio 重悬浮于 AIM-V 中。将 100 μ l 该细胞悬浮液加入圆底 96 孔平板的每个孔中。在 AIM-V 中稀释抗体, 并将 50 μ l 加入预培养的靶细胞中并在 RT 和靶结合 10 分钟。如上制得作为效应细胞的 PBMC。效应物对靶细胞的比例是 25:1。以每 ml 15 Mio 在 AIM-V 中制得效应细胞并将 50 μ l 加入每个孔中。将平板在含有 5%CO₂ 的湿润气氛中 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时。将细胞在 PBS 中洗涤细胞并加入 200 μ l 硼酸盐溶液。测量用硼酸盐溶液裂解后在培养基中释放的 calcein 来测定靶细胞的杀灭 (图 37)。

从仅含有靶细胞和效应细胞但是无抗体的孔中测量自发释放。从仅含有靶细胞和 1% Triton X-100 的孔中测定最大释放。如下计算特定抗体介导的杀灭的百分比： $((x-SR)/(MR-SR))*100$ ，其中 x 是在特定抗体浓度的平均 V_{max} ， SR 是自发释放的平均 V_{max} ， MR 是最大释放的平均 V_{max} 。

实施例 7

糖基工程化的抗 EGFR 单克隆抗体在治疗牛皮癣中的用途

可以用根据本发明的方法制得的糖基工程化抗 EGFR 单克隆抗体来治疗牛皮癣患者。特别地，患者每周接受荷载量为 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 的糖基工程化抗体的输注。以周为基础给药 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 的保持剂量直至获得完全反应。

实施例 8

糖基工程化抗 ErbB2 单克隆抗体在治疗转移性前列腺癌、转移性乳癌、转移性结肠直肠癌和 IIIb 期或 V 期非小细胞肺癌中的用途

RhuMab2C4 是直接对抗 ErbB2 的全长、人源化单克隆抗体（在 CHO 细胞产生的）。RhuMab2C4 阻断了 ErbB2 和其它 ErbB 家族成员的关联，因此抑制了通过 ErbB 途径的胞外信号。RhuMab2C4 不仅抑制了 ErbB2 超表达肿瘤的生长，而且还阻断了需要 ErbB 配体依赖性信号的肿瘤的生长。

通过本发明方法制得的糖基工程化形式的 RhuMab2C4 可以用作单个药剂用于治疗激素难以治疗（雄激素无关性）的前列腺癌症患者、转移性乳癌患者、转移性结肠直肠癌患者和 IIIb 期或 IV 期非小细胞肺癌患者。具体地，将糖基工程化 RhuMab2C4 每周或每三周静脉内（IV）给药 2 或 $4\text{mg}/\text{kg}$ ，直至疾病进展停止。以多剂量液体制剂补充抗体（20mL 充满浓度 $20\text{mg}/\text{mL}$ 或较高浓度）。

清楚的是可以以之前说明书和实施例中特别描述的不同方式来实施本发明。按照上述的教导本发明的各种修饰和改变是可能的，因此

在所附权利要求的范围内。

在此引用的所有出版物（包括专利、专利申请、期刊文献、实验室手册、书本或其它文献）的全部公开在此引入作为参考。

序列表

<110> GlycArt Biotechnology AG
 Umana, Pablo
 Bruenker, Peter
 Ferrara, Claudia
 Suter, Tobias

<120> 融合构建体及其用来生产 Fc 受体结合亲和性和效应子功能提高的抗体的用途

<130> 1975.018PC04

<150> US 60/441,307
 <151> 2003-01-22

<150> US 60/491,254
 <151> 2003-07-31

<150> US 60/495,142
 <151> 2003-08-15

<160> 20

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 未知的

<220>
 <223> c-myc 表位 tag

<400> 1
 Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

<210> 2
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GAB-177 PCR 引物

<400> 2
 gegtgtgcct gtagcccccg cgcccctgct ccagccactg tcccc 45

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> GAB-178 PCR 引物

<400> 3
 gaaggtttct ccagcatcct ggtacc 26

<210> 4
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> GAB-179 PCR 引物

 <400> 4
 ctgaggcgcg cgcaccat gctgaagaag cagtctgcag ggc 43

<210> 5
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> GAB-180 PCR 引物

 <400> 5
 ggggacagtg gctggagcag gggcgcgggg gtcacaggca cacgcggc 48

<210> 6
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> GAB-252 PCR 引物

 <400> 6
 gctaggccgg cgcaccat gaagttaagc cgccagtcca ccgtgttcgg 50

<210> 7
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> GAB-253 PCR 引物

 <400> 7
 ggggacagtg gctggagcag gggtagcca gcaccttggc tgaaattgct ttgtgaactt 60
 ttcgg 65

<210> 8
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> GAB-254 PCR 引物

 <400> 8
 tccgaaaagt tcacaaagca atttcagcca aggtgctggc tcaccctgc tccagccact 60

gtcccc	66
<210> 9	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GAB-255 PCR 引物	
<400> 9	
atgccgcata ggcctccgag caggacccc	29
<210> 10	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GAB-261 PCR 引物	
<400> 10	
gctaaatatt gaattccctt tatgtgtaac tcttggtga agc	43
<210> 11	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GAB-262 PCR 引物	
<400> 11	
tagcaatatt gaattcgcag gaaaaggaca agcagcgaaa attcacgc	48
<210> 12	
<211> 1715	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GnII - GnTIII 的核苷酸序列	
<400> 12	
atgaagttaa gccgccagtt caccgtgttc ggcagtgcga tcttctgtgt ggtgattttc	60
tcgctctacc tgatgctgga ccggggtcac ttagactacc ccaggaacct gcgccgcgag	120
ggctccttcc ctcaggcca gctctcaatg ttgcaagaaa aaatagacca ttggagcgt	180
ttgctagctg agaataatga gatcatctca aatattagag actcagtcac caatttgagt	240
gagtctgtgg aggatggctc gaaaagttca caaagcaatt tcagccaagg tgctggctca	300
cccctgctcc agccactgtc ccctagcaag gccaccgaag aactgcaccg ggtggacttc	360
gtgttgccgg aggacaccac agagtatttt gtgocacca aagctggcgg tgtgtgcttc	420


```

aaaccaggta ccaggatgct ggagaaacct tctccagggc ggacagagga gaagaccaag    480
gtggctgagg ggtcctcggg ccggggctcct gctcggaggc ctatcgggca tgtgttgagt    540
gcacgggagc gcctgggagg ccggggcact aggcgcaagt gggttgagtg tgtgtgcctg    600
ccaggctggc acgggcccag ctgcgggggtg cccactgtgg tccagtattc caacctgccc    660
accaaggagc gcctgggtacc cagggagggtg ccgaggcggg ttatcaacgc catcaacatc    720
aaccatgagt tgcacctgct ggatgtgcgc ttocatgagc tgggogatgt tgtggacgcc    780
tttgtggtct gcgaatccaa tttcaccgcc tacggggagc ctcggccgct caagttccga    840
gagatgctga ccaatggcac cttcgagtac atccgccaca aggtgctcta cgtcttctg    900
gaccacttcc cacctgggtg ccgtcaggac ggctggattg cagacgacta cctgcgtacc    960
ttctcacc ccaggatggtg ctcccgcctg cgcaacctgc gacctgatga cgtctttatc   1020
atcgacgacg cggacgagat ccctgcgcgt gatgggtgct tgttcctcaa gctctacgat   1080
ggctggacag agcccttcgc cttccatatt gcgaagtccc tgtatggttt cttttggaag   1140
caaccaggca cacggagggtg gtgtcaggct gcaccattga catgctgcag gctgtgtatg   1200
ggctggacgg catccgcctg cggccgcgct agtactacac catgcccacc tttcgacagt   1260
atgagaaccg caccggccac atcctagtgc agtgggtctct cggcagcccc ctgcacttcg   1320
cgggctggca ctgctcctgg tgcttcacac ccgagggcat ctacttcaa ctcgtgtcgg   1380
cccagaatgg tgacttcccc cgctgggggtg actacgagga caagagggac ctcaattaca   1440
tccgaagctt gattcgcact gggggatggt tgcacggcac gcagcaggag taccctcctg   1500
cagaccccag tgaacacatg tatgctccta agtacctgct caagaactat gaccagttcc   1560
gctacttgct cgaaaatccc taccgggagc ccaagagcac tgtagagggt gggcgccgga   1620
accagggctc agacggaagg tcactctgct tcaggggcaa gttggataca acggagggcc   1680
cggaacagaa actgatctct gaagaggacc tgtag                                1715

```

<210> 13
<211> 571
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GnTI - GnTIII 的氨基酸序列

<400> 13

Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys
1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp
 20 25 30

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu
 35 40 45

Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Leu Ala Glu
 50 55 60

Asn Asn Glu Ile Ile Ser Asn Ile Arg Asp Ser Val Ile Asn Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ser Val Glu Asp Gly Pro Lys Ser Ser Gln Ser Asn Phe Ser Gln
 85 90 95

Gly Ala Gly Ser Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys Ala Thr
 100 105 110

Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu Pro Glu Asp Thr Thr Glu
 115 120 125

Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro Gly Thr
 130 135 140

Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys Thr Lys
 145 150 155 160

Val Ala Glu Gly Ser Ser Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro Met Arg
 165 170 175

His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg Gly Thr Arg Arg
 180 185 190

Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro Ser Cys
 195 200 205

Gly Val Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys Glu Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Arg Glu Val Pro Arg Arg Val Ile Asn Ala Ile Asn Ile
 225 230 235 240

Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu Gly Asp
 245 250 255

Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala Tyr Gly
 260 265 270

Glu Pro Arg Pro Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly Thr Phe
 275 280 285

Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val Phe Leu Asp His Phe Pro
 290 295 300
 Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu Arg Thr
 305 310 315 320
 Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg Pro Asp
 325 330 335
 Asp Val Phe Ile Ile Asp Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg Asp Gly
 340 345 350
 Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu Pro Phe Ala Phe
 355 360 365
 His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro Gly Thr
 370 375 380
 Leu Glu Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala Val Tyr
 385 390 395 400
 Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr Met Pro
 405 410 415
 Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val Gln Trp
 420 425 430
 Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser Trp Cys
 435 440 445
 Phe Thr Pro Glu Gly Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln Asn Gly
 450 455 460
 Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys Arg Asp Leu Asn Tyr
 465 470 475 480
 Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr Gln Gln
 485 490 495
 Glu Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro Lys Tyr
 500 505 510
 Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn Pro Tyr
 515 520 525
 Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Gly Arg Arg Asn Gln Gly Ser


```

cgacagtatg agaaccgcac cggccacatc ctagtgcagt ggtctctcgg cagccccctg 1320
cacttcgogg gctggcactg ctcttggtgc ttcacaccg agggcatcta cttcaaactc 1380
gtgtcggccc agaatggtga cttccccgc tggggtgact acgaggacaa gagggacctc 1440
aattacatcc gaagcttgat tgcactggg ggatggttcg acggcacgca gcaggagtac 1500
cctcctgcag accccagtga acacatgtat gctcctaagt acctgctcaa gaactatgac 1560
cagttccgct acttgctcga aaatccctac cgggagccca agagcactgt agaggggtggg 1620
cgccggaacc agggctcaga cggaaggtca tctgctgtca ggggcaagtt ggatacaacg 1680
gagggccccg aacagaaact gatctctgaa gaggacctgt ag 1722

```

<210> 15
<211> 573
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ManII - GmTIII 融合的氨基酸序列

<400> 15

Met Leu Lys Lys Gln Ser Ala Gly Leu Val Leu Trp Gly Ala Ile Leu
1 5 10 15

Phe Val Ala Trp Asn Ala Leu Leu Leu Phe Phe Trp Thr Arg Pro
20 25 30

Ala Pro Gly Arg Pro Pro Ser Val Ser Ala Leu Asp Gly Asp Pro Ala
35 40 45

Ser Leu Thr Arg Glu Val Ile Arg Leu Ala Gln Asp Ala Glu Val Glu
50 55 60

Leu Glu Arg Gln Arg Gly Leu Leu Gln Gln Ile Gly Asp Ala Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gln Arg Gly Arg Val Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ala Gln Pro Arg
85 90 95

Val Pro Val Thr Pro Ala Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser Pro Ser Lys
100 105 110

Ala Thr Glu Glu Leu His Arg Val Asp Phe Val Leu Pro Glu Asp Thr
115 120 125

Thr Glu Tyr Phe Val Arg Thr Lys Ala Gly Gly Val Cys Phe Lys Pro
130 135 140

Gly Thr Arg Met Leu Glu Lys Pro Ser Pro Gly Arg Thr Glu Glu Lys
 145 150 155 160

Thr Lys Val Ala Glu Gly Ser Ser Val Arg Gly Pro Ala Arg Arg Pro
 165 170 175

Met Arg His Val Leu Ser Ala Arg Glu Arg Leu Gly Gly Arg Gly Thr
 180 185 190

Arg Arg Lys Trp Val Glu Cys Val Cys Leu Pro Gly Trp His Gly Pro
 195 200 205

Ser Cys Gly Val Pro Thr Val Val Gln Tyr Ser Asn Leu Pro Thr Lys
 210 215 220

Glu Arg Leu Val Pro Arg Glu Val Pro Arg Arg Val Ile Asn Ala Ile
 225 230 235 240

Asn Ile Asn His Glu Phe Asp Leu Leu Asp Val Arg Phe His Glu Leu
 245 250 255

Gly Asp Val Val Asp Ala Phe Val Val Cys Glu Ser Asn Phe Thr Ala
 260 265 270

Tyr Gly Glu Pro Arg Pro Leu Lys Phe Arg Glu Met Leu Thr Asn Gly
 275 280 285

Thr Phe Glu Tyr Ile Arg His Lys Val Leu Tyr Val Phe Leu Asp His
 290 295 300

Phe Pro Pro Gly Gly Arg Gln Asp Gly Trp Ile Ala Asp Asp Tyr Leu
 305 310 315 320

Arg Thr Phe Leu Thr Gln Asp Gly Val Ser Arg Leu Arg Asn Leu Arg
 325 330 335

Pro Asp Asp Val Phe Ile Ile Asp Asp Ala Asp Glu Ile Pro Ala Arg
 340 345 350

Asp Gly Val Leu Phe Leu Lys Leu Tyr Asp Gly Trp Thr Glu Pro Phe
 355 360 365

Ala Phe His Met Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Trp Lys Gln Pro
 370 375 380

Gly Thr Leu Glu Val Val Ser Gly Cys Thr Ile Asp Met Leu Gln Ala
 385 390 395 400

Val Tyr Gly Leu Asp Gly Ile Arg Leu Arg Arg Arg Gln Tyr Tyr Thr
 405 410 415

Met Pro Asn Phe Arg Gln Tyr Glu Asn Arg Thr Gly His Ile Leu Val
 420 425 430

Gln Trp Ser Leu Gly Ser Pro Leu His Phe Ala Gly Trp His Cys Ser
 435 440 445

Trp Cys Phe Thr Pro Glu Gly Ile Tyr Phe Lys Leu Val Ser Ala Gln
 450 455 460

Asn Gly Asp Phe Pro Arg Trp Gly Asp Tyr Glu Asp Lys Arg Asp Leu
 465 470 475 480

Asn Tyr Ile Arg Ser Leu Ile Arg Thr Gly Gly Trp Phe Asp Gly Thr
 485 490 495

Gln Gln Glu Tyr Pro Pro Ala Asp Pro Ser Glu His Met Tyr Ala Pro
 500 505 510

Lys Tyr Leu Leu Lys Asn Tyr Asp Gln Phe Arg Tyr Leu Leu Glu Asn
 515 520 525

Pro Tyr Arg Glu Pro Lys Ser Thr Val Glu Gly Gly Arg Arg Asn Gln
 530 535 540

Gly Ser Asp Gly Arg Ser Ser Ala Val Arg Gly Lys Leu Asp Thr Thr
 545 550 555 560

Glu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 565 570

<210> 16
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> 未知的

<220>
 <223> 来自 pBlueGalT 的 GalT 氨基酸序列

<400> 16

Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
 20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly
65 70 75 80

Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro
85 90 95

Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser
100 105 110

Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro
115 120 125

Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu
130 135 140

Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn
145 150 155 160

Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His
165 170 175

Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys
180 185 190

Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp
195 200 205

Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe Asn Arg
210 215 220

Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp Tyr Asp
225 230 235 240

Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met Asn Asp
245 250 255

His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser Val Ala
260 265 270

Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe Gly Gly
275 280 285

Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly Phe Pro
290 295 300

Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe Asn Arg
305 310 315 320

Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val Val Gly
325 330 335

Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu Pro Asn
340 345 350

Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met Leu Ser
355 360 365

Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln Arg Tyr
370 375 380

Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser
385 390 395

<210> 17

<211> 3435

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 17

atgaagttaa gccgccagtt caccgtgttc ggcagtgoga tcttctgtgt ggtgattttc 60
tcgctctacc tgatgetgga ccggggtcac ttagactacc ccaggaaccc gcgcccgcgag 120
ggctccttcc ctcagggcca gctctcaatg ttgcaagaaa aaatagacca tttggagcgt 180
ttgctagctg agaataatga gatcatctca aatattagag actcagtcac caatttgagt 240
gagtctgtgg aggatggtcc gaaaagttca caaagcaatt tcagccaagg tgctggctca 300
catcttctgc cctcacaatt atccctctca gttgacactg cagactgtct gtttgettca 360
caaagtggaa gtcacaatc agatgtgcag atggtggatg tttacagtct aatttctttt 420
gacaatccag atggtggagt ttggaagcaa ggatttgaca ttacttatga atctaataa 480
tgggacactg aacccttca agtctttgtg gtgcctcatt ccataacga ccaggttg 540
ttgaagactt tcaatgacta ctttagagac aagactcagt atatttttaa taacatggtc 600
ctaaagctga aagaagactc acggaggaag tttatttggc ctgagatctc ttaccttca 660
aagtgggtgg atattataga tattcagaag aaggatgctg ttaaaagttt aatagaaaat 720
ggtcagcttg aaattgtgac aggtggctgg gttatgctg atgaagctac tccacattat 780
ttgccttaa ttgatcaact aattgaagga catcagtgcc tggaaaataa tataggagtg 840

```

aaacctcggg cgggctgggc tattgatccc ttgggacact caccaacaat ggcttatcct 900
ctaaaccgtg ctggactttc tcacatgctt atccagagag ttcattatgc agttaaaaaa 960
cactttgcac tgcataaac attggagttt tttggagac agaattggga tctgggatct 1020
gtcacagata ttttatgcca catgatgcc ttctacagct atgacatccc tcacacttgt 1080
ggacctgac ctaaaatatg ctgccagttt gattttaaac gtcttctctg aggcagatct 1140
ggttgtoctt ggggagtcct ccagaaaaca atacatcctg gaaatgtcca aagcagggct 1200
cggatgctac tagatcagta ccgaaagaag tcaaagcttt ttcgtaccaa agttctctctg 1260
gctccactag gagatgattt ccgctactgt gaatacacgg aatgggattt acagtttaag 1320
aattatcagc agctttttga ttatatgaat tctcagtcca agtttaaaagt taagatacag 1380
tttggaaact tatcagatct tttgatgctg ctggataaag cagatgaaac tcagagagac 1440
aagggccagt cgatgttccc tgttttaagt ggagattttt tcacttatgc cgatcgagat 1500
gatcattact ggagtggcta tttacatcc agacctttt acaaacgaat ggacagaatc 1560
atggaatctc atttaagggc tctgaaatt ctttactatt tgcctctgag acaagctcac 1620
aaatacaaga taaataaatt tctctcatca tcactttaca cggcactgac agaagccaga 1680
aggaatttgg gactgtttca acatcatgat gctatcacag gaactgcaaa agactgggtg 1740
gttggtggatt atggtaccag actttttcat tctgtaatgg ttttggagaa gataattgga 1800
aattctgcat ttctcttat tttgaaggac aaactcacat acgactotta ctctctctgat 1860
accttctctg agatggattt gaaacaaaaa tcacaagatt ctctgccaca aaaaaatata 1920
ataaggctga gtgcggagcc aaggtagctt gtggcttata atcctttaga acaagaccga 1980
atctcgttgg tctcagtcta tgtgagttcc ccgacagtgc aagtgttctc tgcttcagga 2040
aaacctgtgg aagttcaagt cagcgcagtt tgggatacag caaatactat ttcagaaaca 2100
gcctatgaga tctctttctg agcacatata ccgccattgg gactgaaagt gtataagatt 2160
ttggaatcag caagttcaaa ttcacattta gctgattatg tcttgtataa gaataaagta 2220
gaagatagcg gaatcttcac cataaagaat atgataaata ctgaagaagg tataacacta 2280
gagaactcot ttgttttact tccggttgat caaactggac ttatgaagca aatgatgact 2340
aaagaagatg gtaaacacca tgaagtaaat gtgcaatttt catgggatgg aaccacaatt 2400
aaaagagaca aaagtgggtc ctacctcttc ttacctgatg gtaatgcca gccttatggt 2460
tacacaacac cgccttttgt cagagtgaca catggaagga tttattcgga agtgacttgc 2520
ttttttgacc atgttactca tagagtccga ctataccaca tacagggaat agaaggacag 2580
tctgtggaag ttccaatat tgtggacatc cgaagatgat ataaccgtga gattgcaatg 2640
aaaatttctt ctgatataaa aagccaaaat agattttata ctgacctaaa tgggtaccag 2700

```

```

attcaacctga gaatgacact gagcaaattg cctottcaag caaatgtcta tcccatgacc 2760
acaatggcct atatccagga tgccaaacat cgtttgacac tgctctctgc tcagtcttta 2820
ggggtttcga gtttgaatag tggtcagatt gaagttatca tggatcgaag actcatgcaa 2880
gatgataatc gtggccttga gcaaggtatc caggataaca agattacagc taatctatct 2940
cgaatactac tagaaaaaag aagtgcctgt aatacgggaag aagaaaagaa gtcggtcagt 3000
tatccttctc tccttagcca cataacttct tctctcatga atcatccagt cattccaatg 3060
gcaaataagt tcttctcacc tacccttgag ctgcaagggtg aattctctcc attacagtca 3120
tctttgcctt gtgacattca tctgggtaat ttgagaacaa tacagtcaaa ggtgggcaat 3180
gggcactcca atgaggcagc cttgatcctc cacagaaaag ggtttgattg tgggttctct 3240
agcaaaggca cagggtctgt ttgttctact actcagggaa agatattggt acagaaactt 3300
ttaaacaagt ttattgtcga aagtctcaca ccttcatcac tctccttgat gcattcacct 3360
cccggcactc agaataaag tgagatcaac ttgagtccaa tggaaatcag cacattccga 3420
atccagttga ggtga 3435

```

```

<210> 18
<211> 1144
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 18

```

```

Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys
1           5           10           15

```

```

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp
          20           25           30

```

```

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu
          35           40           45

```

```

Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Leu Ala Glu
50           55           60

```

```

Asn Asn Glu Ile Ile Ser Asn Ile Arg Asp Ser Val Ile Asn Leu Ser
65           70           75           80

```

```

Glu Ser Val Glu Asp Gly Pro Lys Ser Ser Gln Ser Asn Phe Ser Gln
          85           90           95

```

```

Gly Ala Gly Ser His Leu Leu Pro Ser Gln Leu Ser Leu Ser Val Asp
          100          105          110

```

Thr Ala Asp Cys Leu Phe Ala Ser Gln Ser Gly Ser His Asn Ser Asp
 115 120 125

Val Gln Met Leu Asp Val Tyr Ser Leu Ile Ser Phe Asp Asn Pro Asp
 130 135 140

Gly Gly Val Trp Lys Gln Gly Phe Asp Ile Thr Tyr Glu Ser Asn Glu
 145 150 155 160

Trp Asp Thr Glu Pro Leu Gln Val Phe Val Val Pro His Ser His Asn
 165 170 175

Asp Pro Gly Trp Leu Lys Thr Phe Asn Asp Tyr Phe Arg Asp Lys Thr
 180 185 190

Gln Tyr Ile Phe Asn Asn Met Val Leu Lys Leu Lys Glu Asp Ser Arg
 195 200 205

Arg Lys Phe Ile Trp Ser Glu Ile Ser Tyr Leu Ser Lys Trp Trp Asp
 210 215 220

Ile Ile Asp Ile Gln Lys Lys Asp Ala Val Lys Ser Leu Ile Glu Asn
 225 230 235 240

Gly Gln Leu Glu Ile Val Thr Gly Gly Trp Val Met Pro Asp Glu Ala
 245 250 255

Thr Pro His Tyr Phe Ala Leu Ile Asp Gln Leu Ile Glu Gly His Gln
 260 265 270

Trp Leu Glu Asn Asn Ile Gly Val Lys Pro Arg Ser Gly Trp Ala Ile
 275 280 285

Asp Pro Phe Gly His Ser Pro Thr Met Ala Tyr Leu Leu Asn Arg Ala
 290 295 300

Gly Leu Ser His Met Leu Ile Gln Arg Val His Tyr Ala Val Lys Lys
 305 310 315 320

His Phe Ala Leu His Lys Thr Leu Glu Phe Phe Trp Arg Gln Asn Trp
 325 330 335

Asp Leu Gly Ser Val Thr Asp Ile Leu Cys His Met Met Pro Phe Tyr
 340 345 350

Ser Tyr Asp Ile Pro His Thr Cys Gly Pro Asp Pro Lys Ile Cys Cys
 355 360 365

Gln Phe Asp Phe Lys Arg Leu Pro Gly Gly Arg Phe Gly Cys Pro Trp
 370 375 380

Gly Val Pro Pro Glu Thr Ile His Pro Gly Asn Val Gln Ser Arg Ala
 385 390 395 400

Arg Met Leu Leu Asp Gln Tyr Arg Lys Lys Ser Lys Leu Phe Arg Thr
 405 410 415

Lys Val Leu Leu Ala Pro Leu Gly Asp Asp Phe Arg Tyr Cys Glu Tyr
 420 425 430

Thr Glu Trp Asp Leu Gln Phe Lys Asn Tyr Gln Gln Leu Phe Asp Tyr
 435 440 445

Met Asn Ser Gln Ser Lys Phe Lys Val Lys Ile Gln Phe Gly Thr Leu
 450 455 460

Ser Asp Phe Phe Asp Ala Leu Asp Lys Ala Asp Glu Thr Gln Arg Asp
 465 470 475 480

Lys Gly Gln Ser Met Phe Pro Val Leu Ser Gly Asp Phe Phe Thr Tyr
 485 490 495

Ala Asp Arg Asp Asp His Tyr Trp Ser Gly Tyr Phe Thr Ser Arg Pro
 500 505 510

Phe Tyr Lys Arg Met Asp Arg Ile Met Glu Ser His Leu Arg Ala Ala
 515 520 525

Glu Ile Leu Tyr Tyr Phe Ala Leu Arg Gln Ala His Lys Tyr Lys Ile
 530 535 540

Asn Lys Phe Leu Ser Ser Ser Leu Tyr Thr Ala Leu Thr Glu Ala Arg
 545 550 555 560

Arg Asn Leu Gly Leu Phe Gln His His Asp Ala Ile Thr Gly Thr Ala
 565 570 575

Lys Asp Trp Val Val Val Asp Tyr Gly Thr Arg Leu Phe His Ser Leu
 580 585 590

Met Val Leu Glu Lys Ile Ile Gly Asn Ser Ala Phe Leu Leu Ile Leu
 595 600 605

Lys Asp Lys Leu Thr Tyr Asp Ser Tyr Ser Pro Asp Thr Phe Leu Glu
610 615 620

Met Asp Leu Lys Gln Lys Ser Gln Asp Ser Leu Pro Gln Lys Asn Ile
625 630 635 640

Ile Arg Leu Ser Ala Glu Pro Arg Tyr Leu Val Val Tyr Asn Pro Leu
645 650 655

Glu Gln Asp Arg Ile Ser Leu Val Ser Val Tyr Val Ser Ser Pro Thr
660 665 670

Val Gln Val Phe Ser Ala Ser Gly Lys Pro Val Glu Val Gln Val Ser
675 680 685

Ala Val Trp Asp Thr Ala Asn Thr Ile Ser Glu Thr Ala Tyr Glu Ile
690 695 700

Ser Phe Arg Ala His Ile Pro Pro Leu Gly Leu Lys Val Tyr Lys Ile
705 710 715 720

Leu Glu Ser Ala Ser Ser Asn Ser His Leu Ala Asp Tyr Val Leu Tyr
725 730 735

Lys Asn Lys Val Glu Asp Ser Gly Ile Phe Thr Ile Lys Asn Met Ile
740 745 750

Asn Thr Glu Glu Gly Ile Thr Leu Glu Asn Ser Phe Val Leu Leu Arg
755 760 765

Phe Asp Gln Thr Gly Leu Met Lys Gln Met Met Thr Lys Glu Asp Gly
770 775 780

Lys His His Glu Val Asn Val Gln Phe Ser Trp Tyr Gly Thr Thr Ile
785 790 795 800

Lys Arg Asp Lys Ser Gly Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asp Gly Asn Ala
805 810 815

Lys Pro Tyr Val Tyr Thr Thr Pro Pro Phe Val Arg Val Thr His Gly
820 825 830

Arg Ile Tyr Ser Glu Val Thr Cys Phe Phe Asp His Val Thr His Arg
835 840 845

Val Arg Leu Tyr His Ile Gln Gly Ile Glu Gly Gln Ser Val Glu Val
 850 855 860

Ser Asn Ile Val Asp Ile Arg Lys Val Tyr Asn Arg Glu Ile Ala Met
 865 870 875 880

Lys Ile Ser Ser Asp Ile Lys Ser Gln Asn Arg Phe Tyr Thr Asp Leu
 885 890 895

Asn Gly Tyr Gln Ile Gln Pro Arg Met Thr Leu Ser Lys Leu Pro Leu
 900 905 910

Gln Ala Asn Val Tyr Pro Met Thr Thr Met Ala Tyr Ile Gln Asp Ala
 915 920 925

Lys His Arg Leu Thr Leu Leu Ser Ala Gln Ser Leu Gly Val Ser Ser
 930 935 940

Leu Asn Ser Gly Gln Ile Glu Val Ile Met Asp Arg Arg Leu Met Gln
 945 950 955 960

Asp Asp Asn Arg Gly Leu Glu Gln Gly Ile Gln Asp Asn Lys Ile Thr
 965 970 975

Ala Asn Leu Phe Arg Ile Leu Leu Glu Lys Arg Ser Ala Val Asn Thr
 980 985 990

Glu Glu Glu Lys Lys Ser Val Ser Tyr Pro Ser Leu Leu Ser His Ile
 995 1000 1005

Thr Ser Ser Leu Met Asn His Pro Val Ile Pro Met Ala Asn Lys
 1010 1015 1020

Phe Phe Ser Pro Thr Leu Glu Leu Gln Gly Glu Phe Ser Pro Leu
 1025 1030 1035

Gln Ser Ser Leu Pro Cys Asp Ile His Leu Val Asn Leu Arg Thr
 1040 1045 1050

Ile Gln Ser Lys Val Gly Asn Gly His Ser Asn Glu Ala Ala Leu
 1055 1060 1065

Ile Leu His Arg Lys Gly Phe Asp Cys Arg Phe Ser Ser Lys Gly
 1070 1075 1080

Thr Gly Leu Phe Cys Ser Thr Thr Gln Gly Lys Ile Leu Val Gln
 1085 1090 1095

Lys Leu Leu Asn Lys Phe Ile Val Glu Ser Leu Thr Pro Ser Ser
1100 1105 1110

Leu Ser Leu Met His Ser Pro Pro Gly Thr Gln Asn Ile Ser Glu
1115 1120 1125

Ile Asn Leu Ser Pro Met Glu Ile Ser Thr Phe Arg Ile Gln Leu
1130 1135 1140

Arg

<210> 19
<211> 1116
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ManII - Gal T 的核苷酸序列

<400> 19
atgaagttaa gccgccagtt caccgtgttc gccagtgoga tcttctgtgt ggtgattttc 60
tcgctctacc tgatgctgga ccggggtcac ttagactacc ccaggaacc gcgccgcgag 120
ggctccttcc ctcagggcca gctctcaatg ttgcaagaaa aaatagacca ttgggagcgt 180
ttgctagctg agaataatga gatcatctca aatattagag actcagtcac caatttgagt 240
gagtctgtgg aggatggtcc gaaaagtcca caaagcaatt tcagccaagg tgctggetca 300
cccgcctgcc ctgaggagtc cccgctgctt gtgggcccc tgctgattga gtttaacatg 360
cctgtggacc tggagctcgt ggcaaagcag aaccocaaatg tgaagatggg cggccgctat 420
gccccaggg actgcgtctc tcctcacaag gtggccatca tcattccatt ccgcaaccgg 480
caggagcacc tcaagtactg gctatattat ttgcaccag tcctgcagcg ccagcagctg 540
gactatggca tctatgttat caaccaggcg ggagacacta tattcaatcg tgctaagetc 600
ctcaatggtg gctttcaaga agccttgaag gactatgact acacctgctt tgtgtttagt 660
gacgtggacc tcattccaat gaatgaccat aatgcgtaca ggtgtttttc acagccacgg 720
cacatttccg ttgcaatgga taagtttga ttcagcctac cttatgttca gtattttgga 780
ggtgtctctg ctctaagtaa acaacagttt ctaaccatca atggatttcc taataattat 840
tggggctggg gaggagaaga tgatgacatt tttaacagat tagtttttag aggcattgct 900
atatctcgcc caaatgctgt ggtcgggagg tgtcgcatga tccgccactc aagagacaaa 960
aaaaatgaac ccaatcctca gaggtttgac cgaattgcac acacaaagga gacaatgctc 1020
tctgatggtt tgaactcact cacctaccag gtgctggatg tacagagata cccattgtat 1080

accctaatca cagtggacat cgggacaccg agctag

1116

<210> 20
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> ManII - Gal T 的氨基酸序列

<400> 20

Met Lys Leu Ser Arg Gln Phe Thr Val Phe Gly Ser Ala Ile Phe Cys
 1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Leu Tyr Leu Met Leu Asp Arg Gly His Leu Asp
 20 25 30

Tyr Pro Arg Asn Pro Arg Arg Glu Gly Ser Phe Pro Gln Gly Gln Leu
 35 40 45

Ser Met Leu Gln Glu Lys Ile Asp His Leu Glu Arg Leu Leu Ala Glu
 50 55 60

Asn Asn Glu Ile Ile Ser Asn Ile Arg Asp Ser Val Ile Asn Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Ser Val Glu Asp Gly Pro Lys Ser Ser Gln Ser Asn Phe Ser Gln
 85 90 95

Gly Ala Gly Ser Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly
 100 105 110

Pro Met Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala
 115 120 125

Lys Gln Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp
 130 135 140

Cys Val Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg
 145 150 155 160

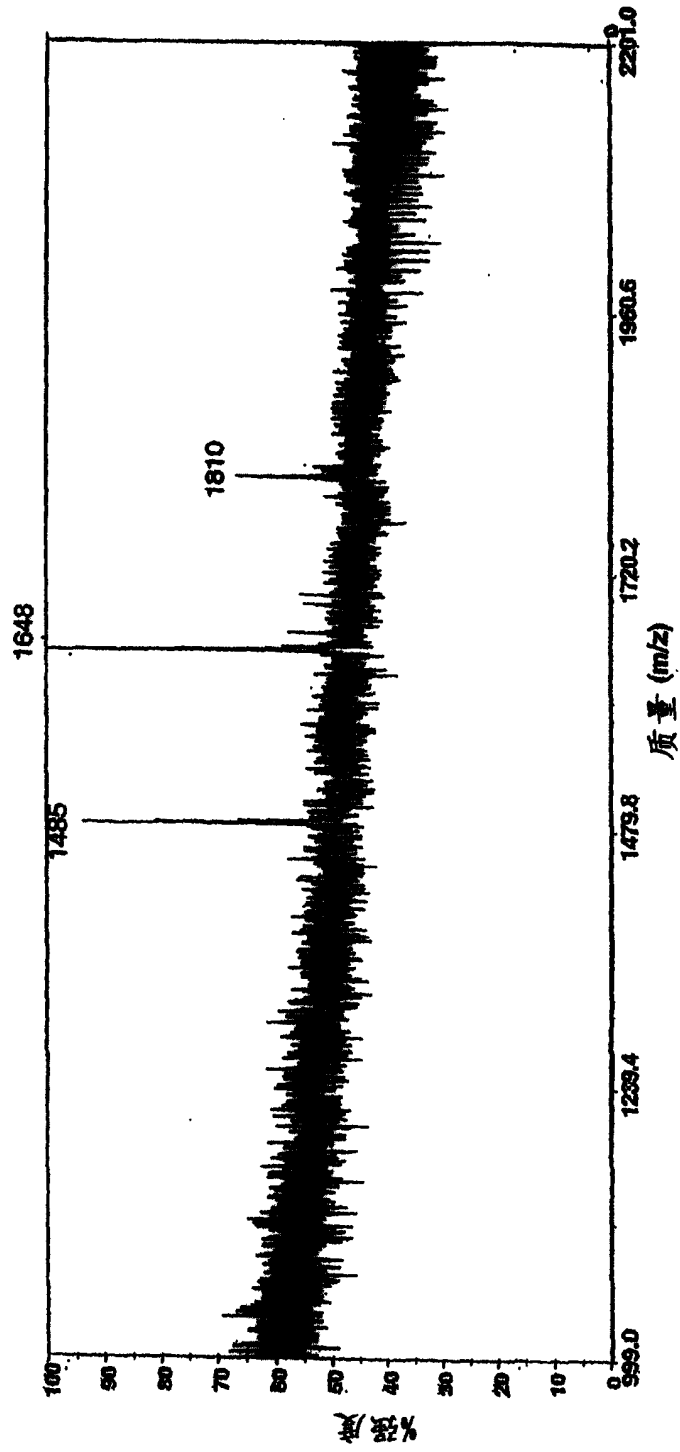
Gln Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln
 165 170 175

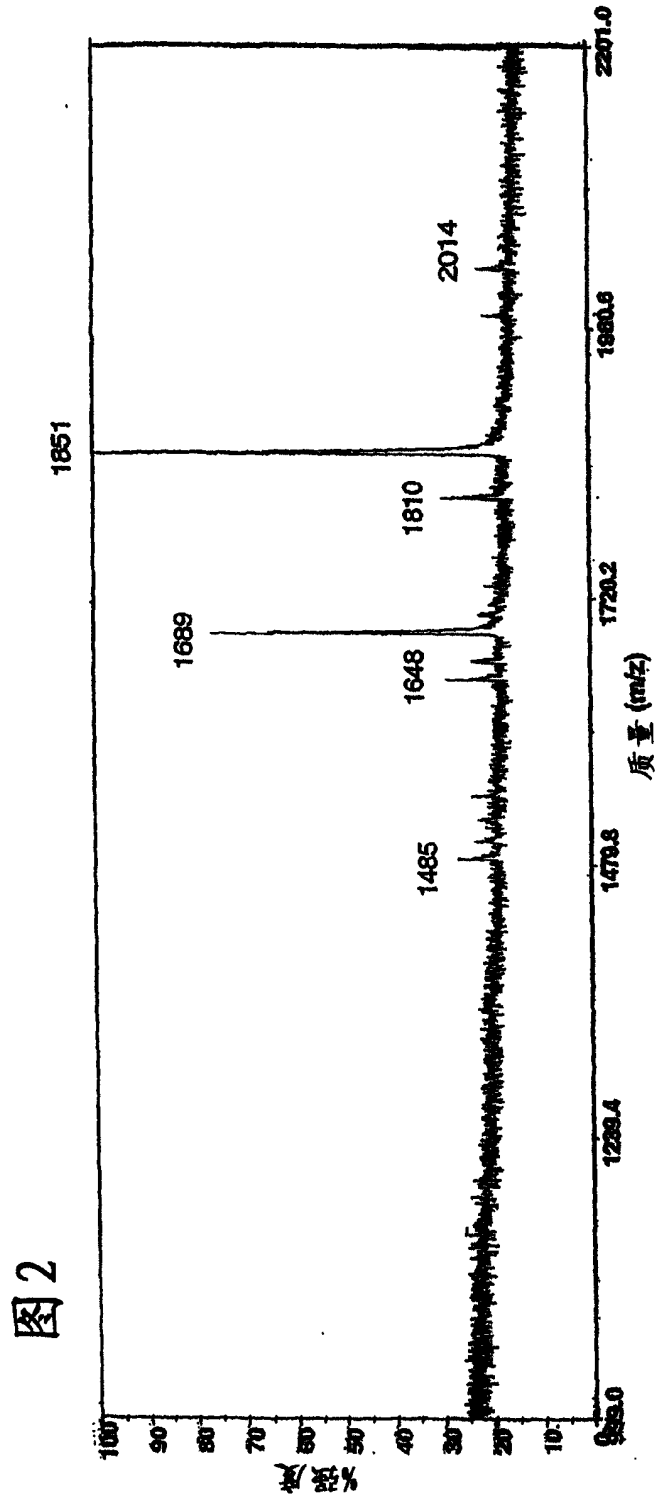
Arg Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp
 180 185 190

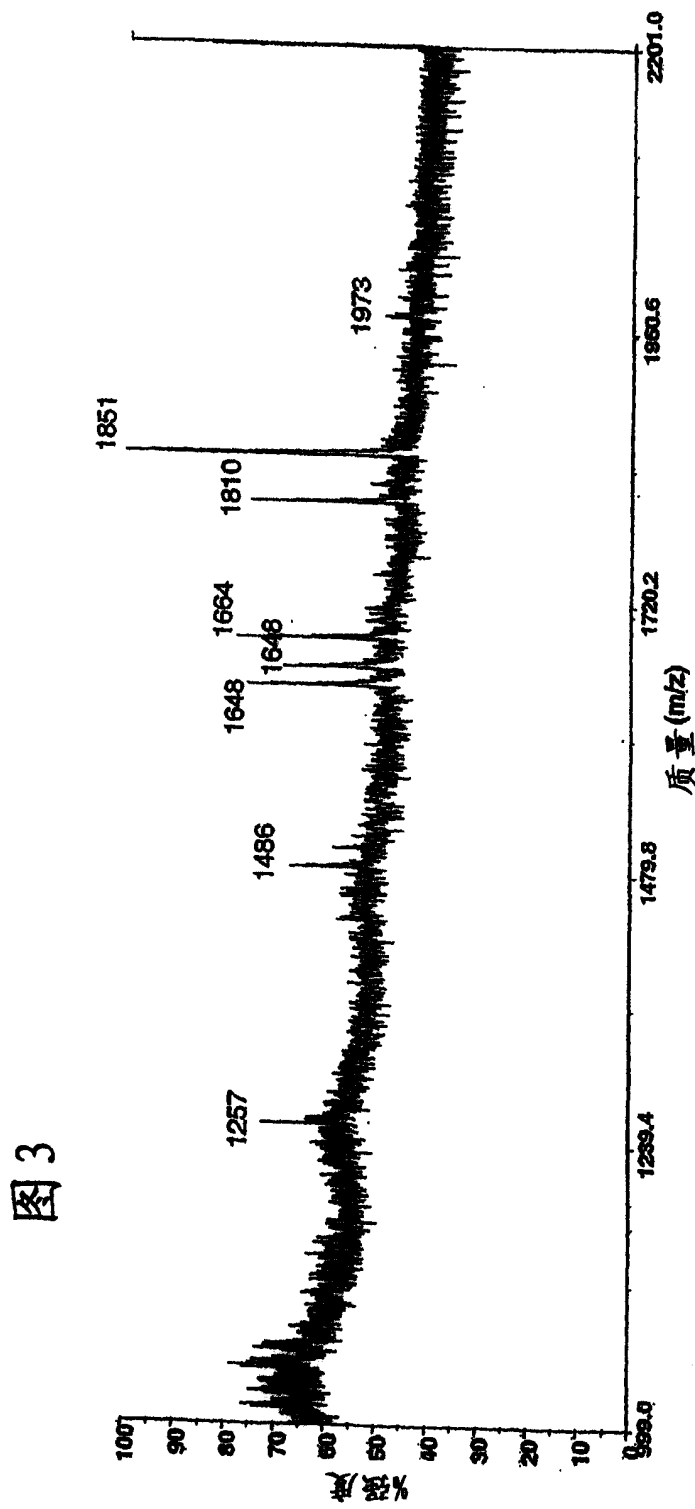
Thr Ile Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala

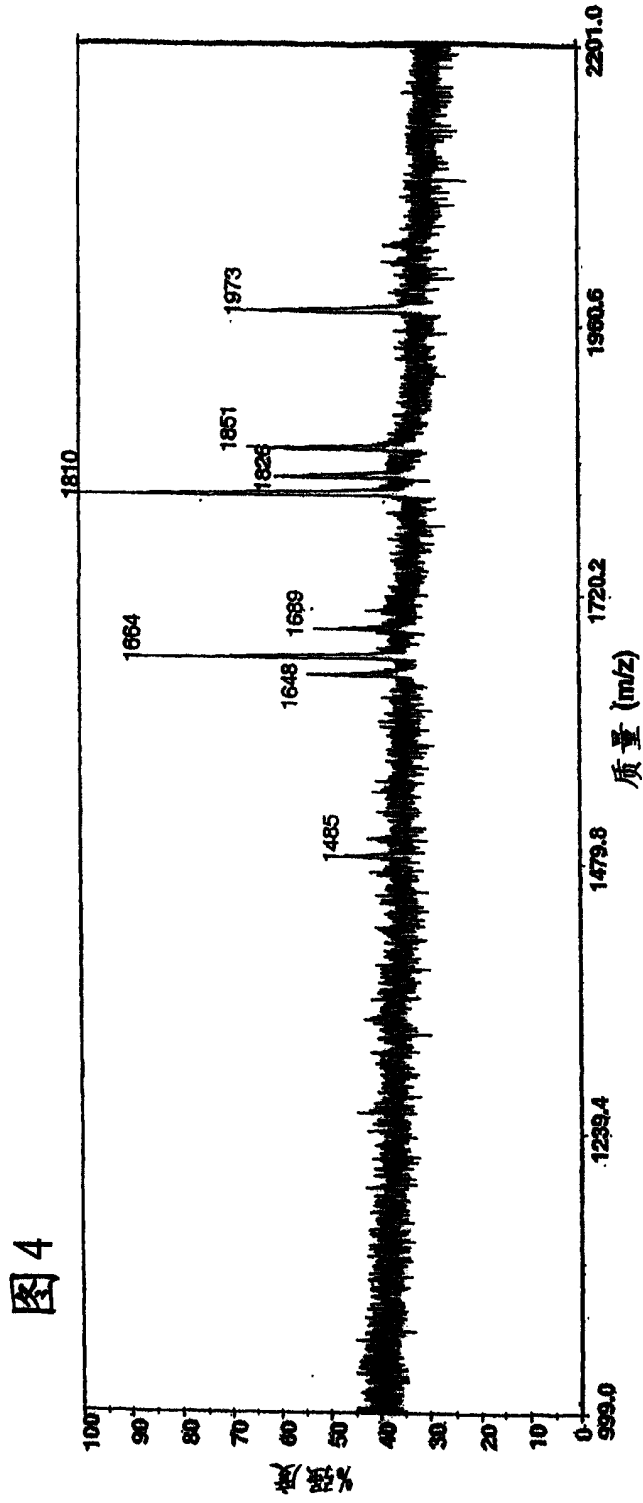
195				200				205							
Leu	Lys	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Thr	Cys	Phe	Val	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu
	210					215					220				
Ile	Pro	Met	Asn	Asp	His	Asn	Ala	Tyr	Arg	Cys	Phe	Ser	Gln	Pro	Arg
	225				230					235					240
His	Ile	Ser	Val	Ala	Met	Asp	Lys	Phe	Gly	Phe	Ser	Leu	Pro	Tyr	Val
				245					250					255	
Gln	Tyr	Phe	Gly	Gly	Val	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Gln	Phe	Leu	Thr
			260					265					270		
Ile	Asn	Gly	Phe	Pro	Asn	Asn	Tyr	Trp	Gly	Trp	Gly	Gly	Glu	Asp	Asp
		275					280					285			
Asp	Ile	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Phe	Arg	Gly	Met	Ser	Ile	Ser	Arg	Pro
	290					295					300				
Asn	Ala	Val	Val	Gly	Arg	Cys	Arg	Met	Ile	Arg	His	Ser	Arg	Asp	Lys
	305				310					315					320
Lys	Asn	Glu	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Phe	Asp	Arg	Ile	Ala	His	Thr	Lys
				325					330					335	
Glu	Thr	Met	Leu	Ser	Asp	Gly	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Tyr	Gln	Val	Leu
			340					345					350		
Asp	Val	Gln	Arg	Tyr	Pro	Leu	Tyr	Thr	Gln	Ile	Thr	Val	Asp	Ile	Gly
		355					360					365			
Thr	Pro	Ser													
		370													

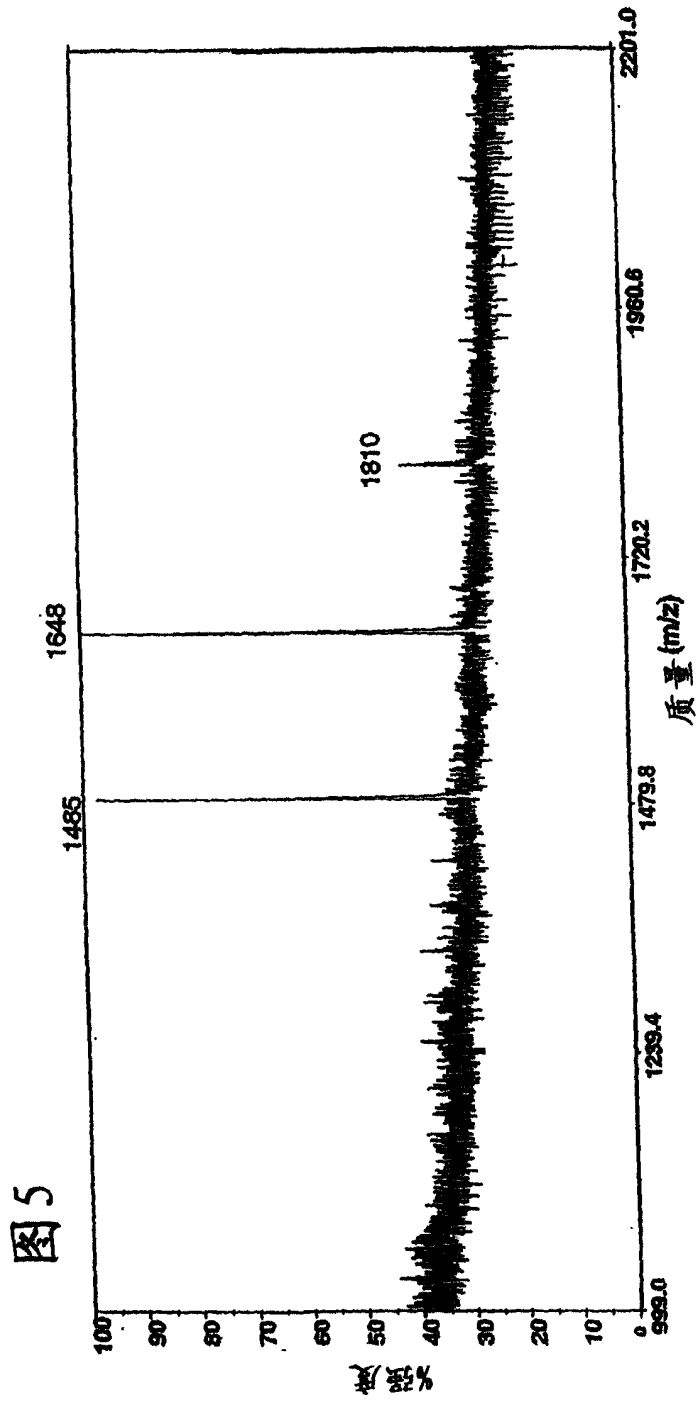
图1











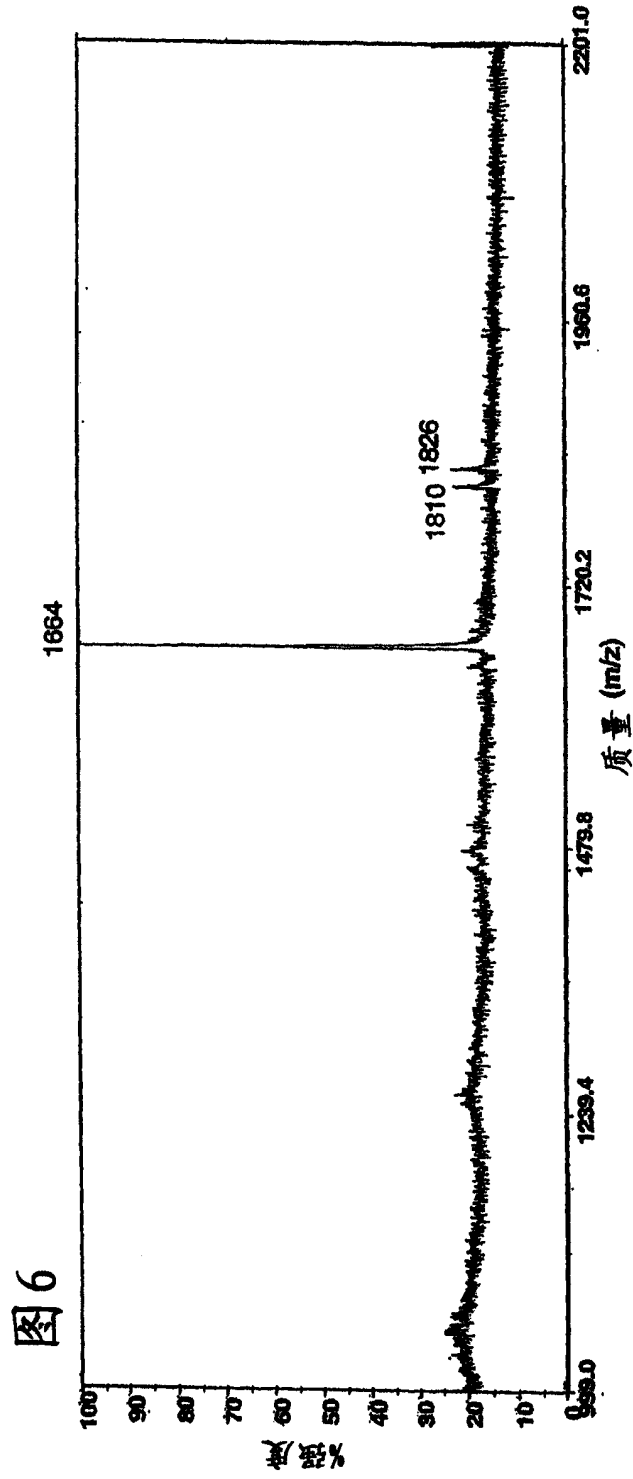


图7

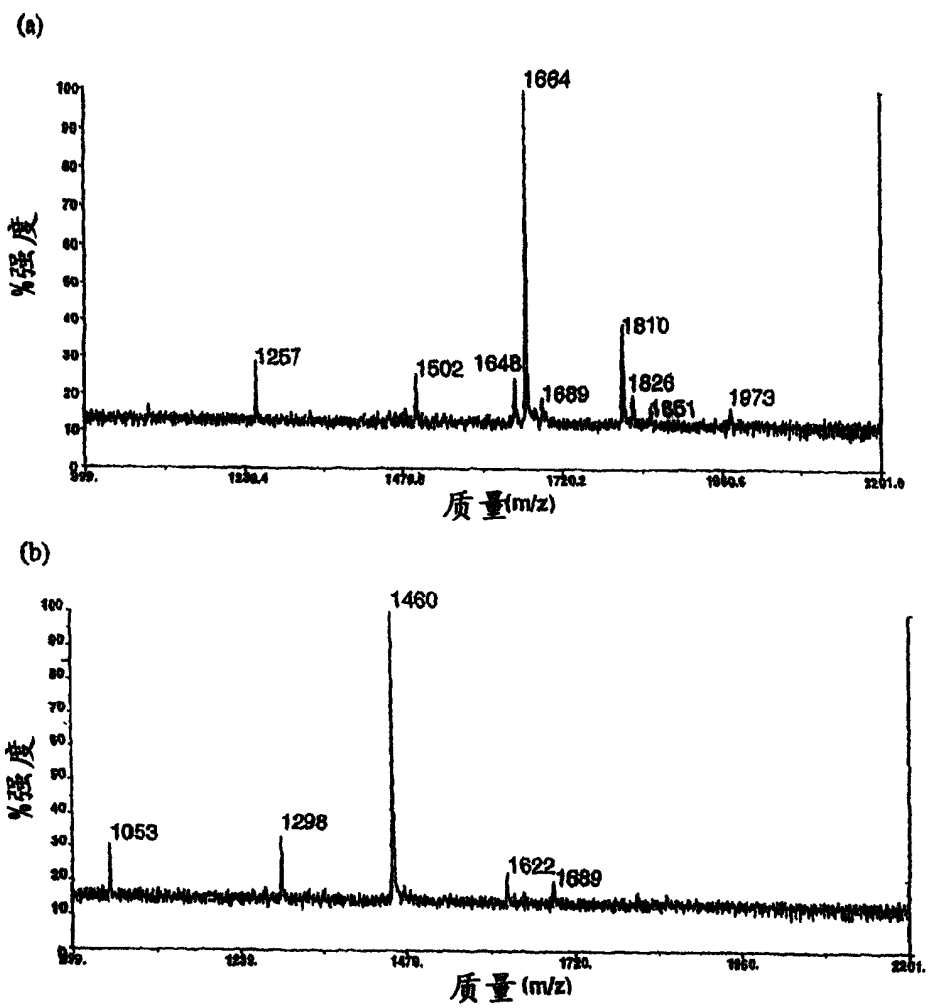
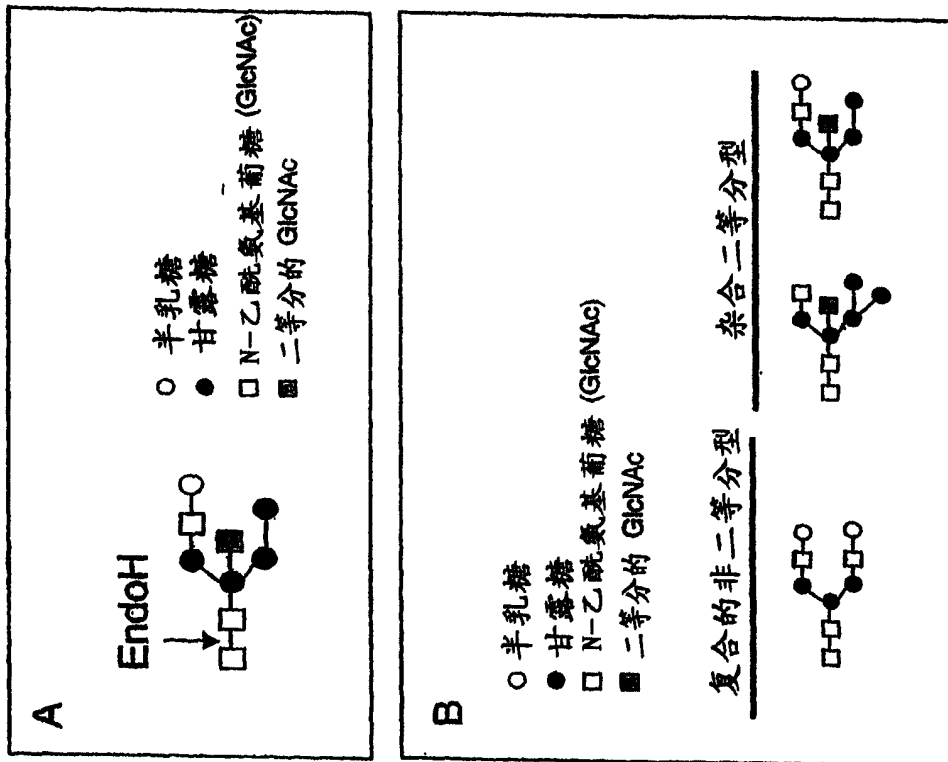
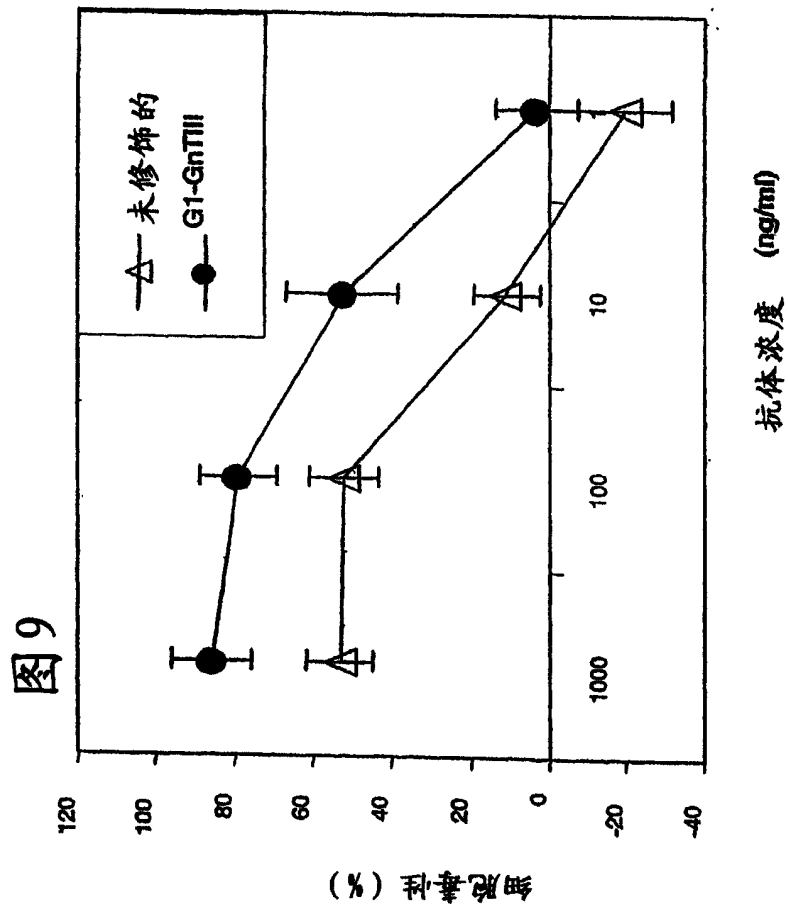
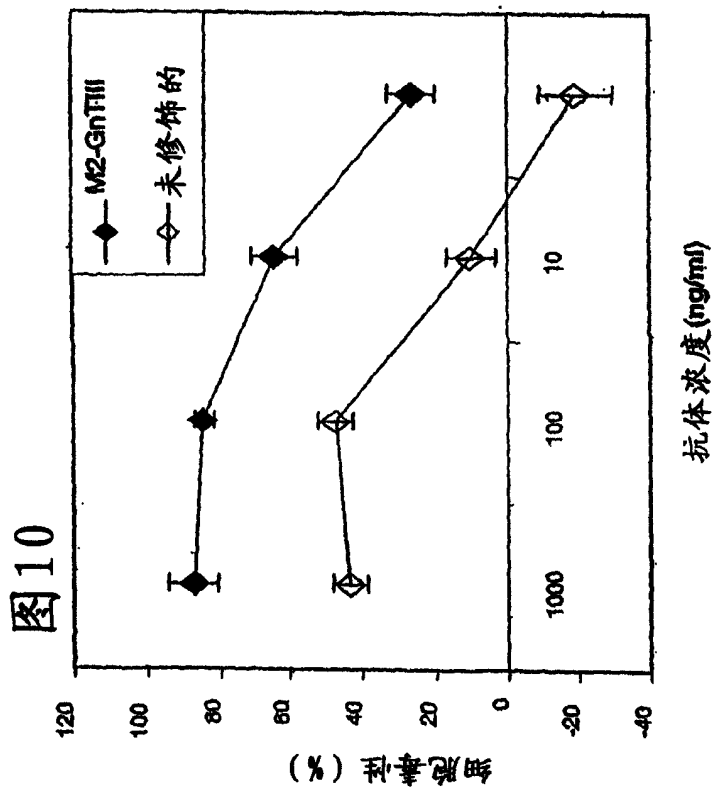


图 8







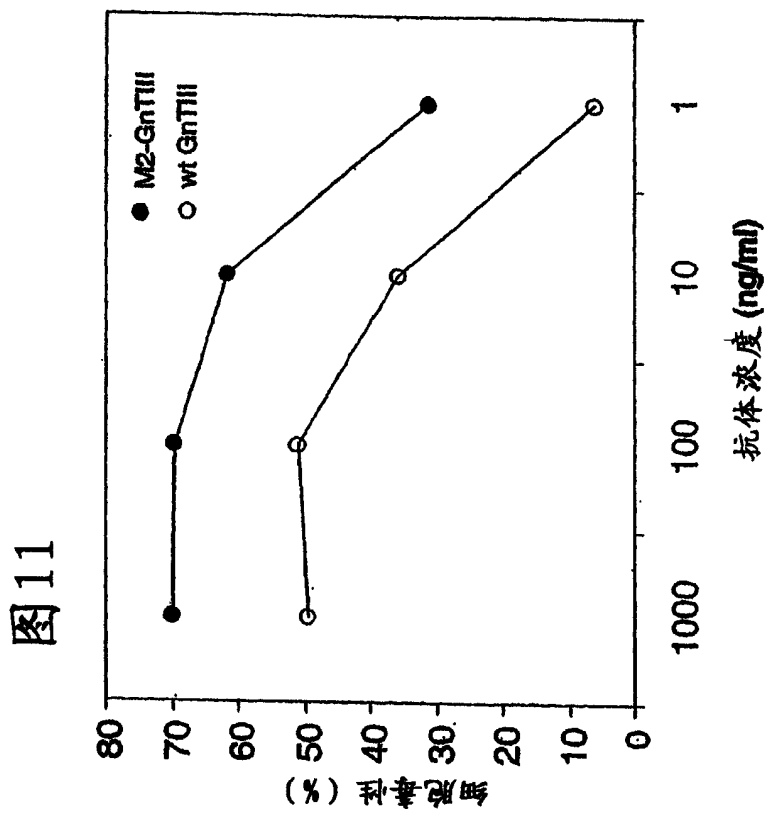
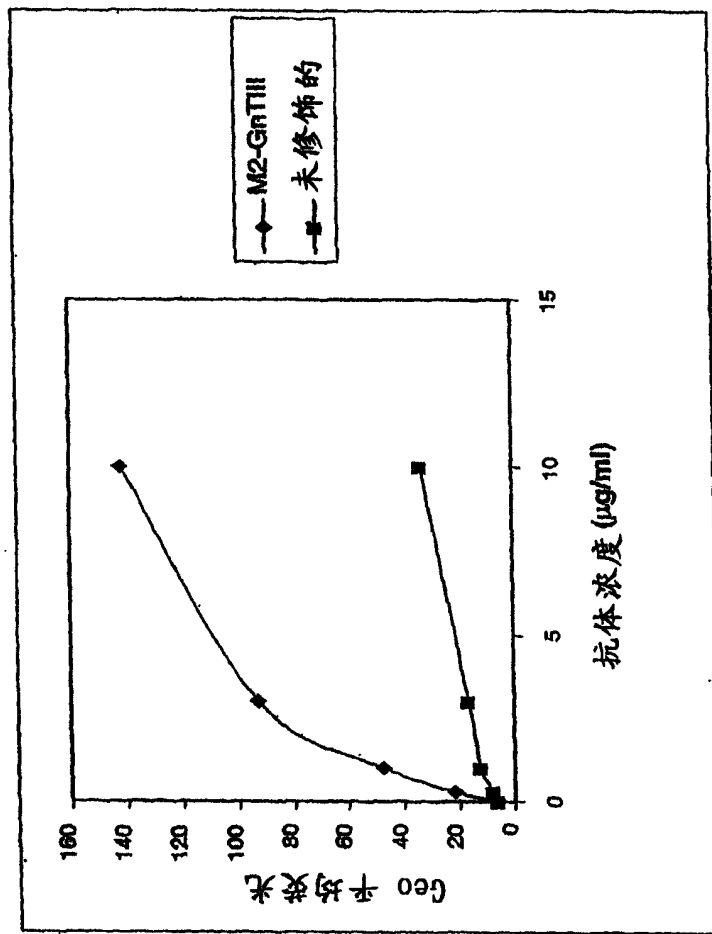


图12



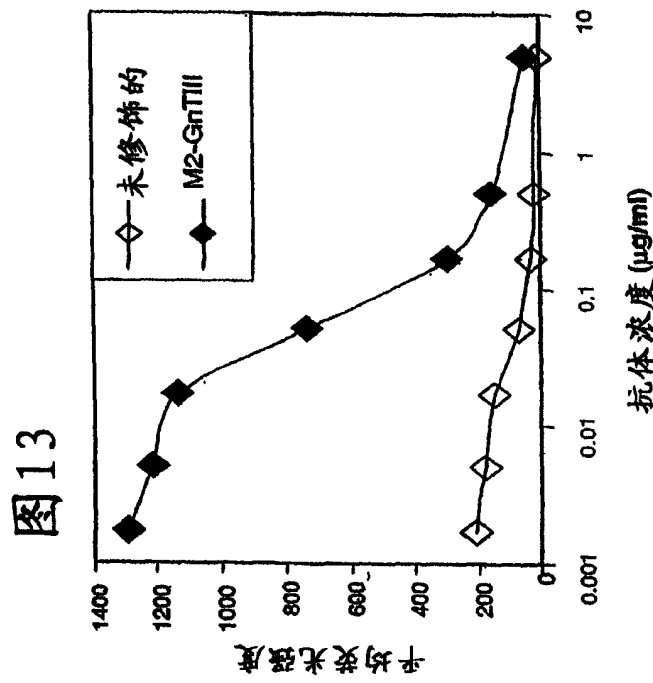
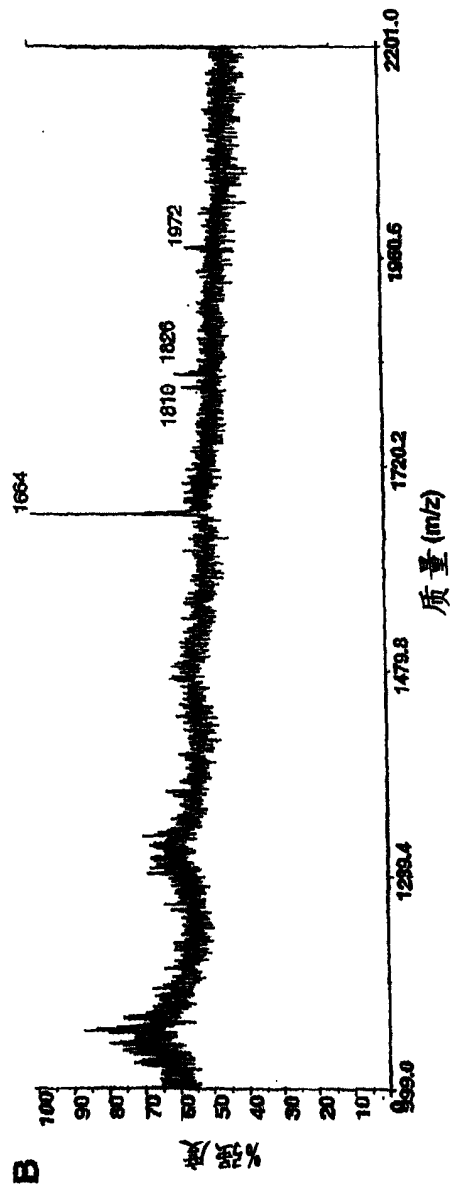
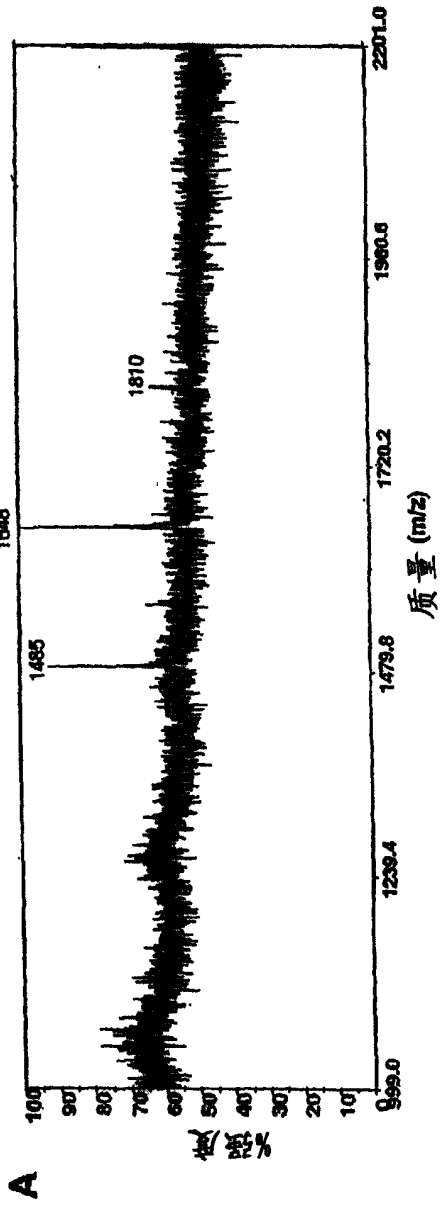


图14



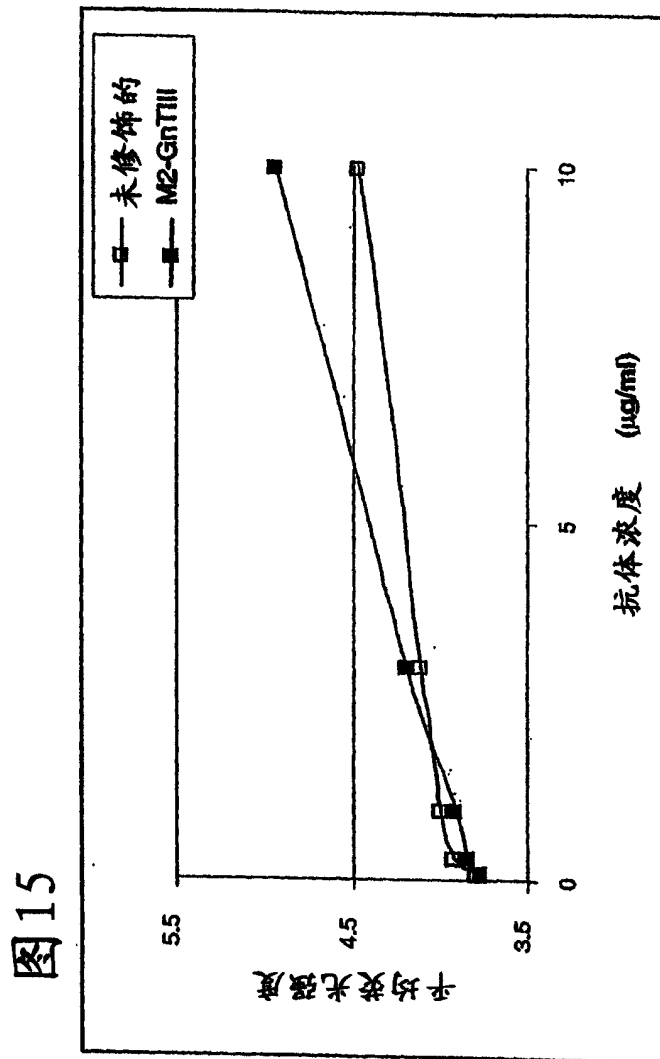
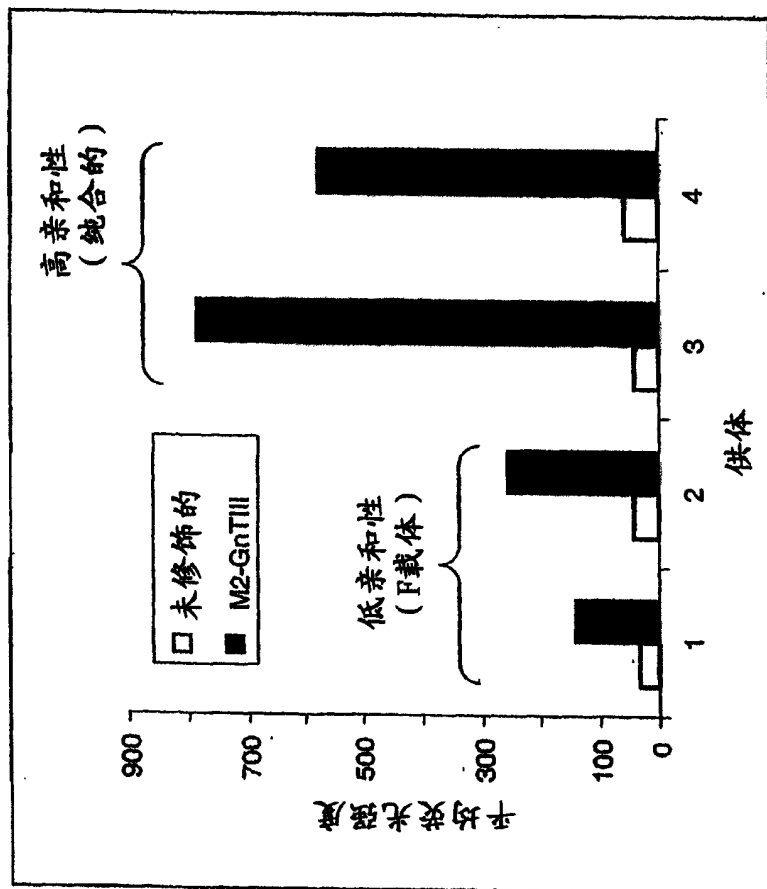
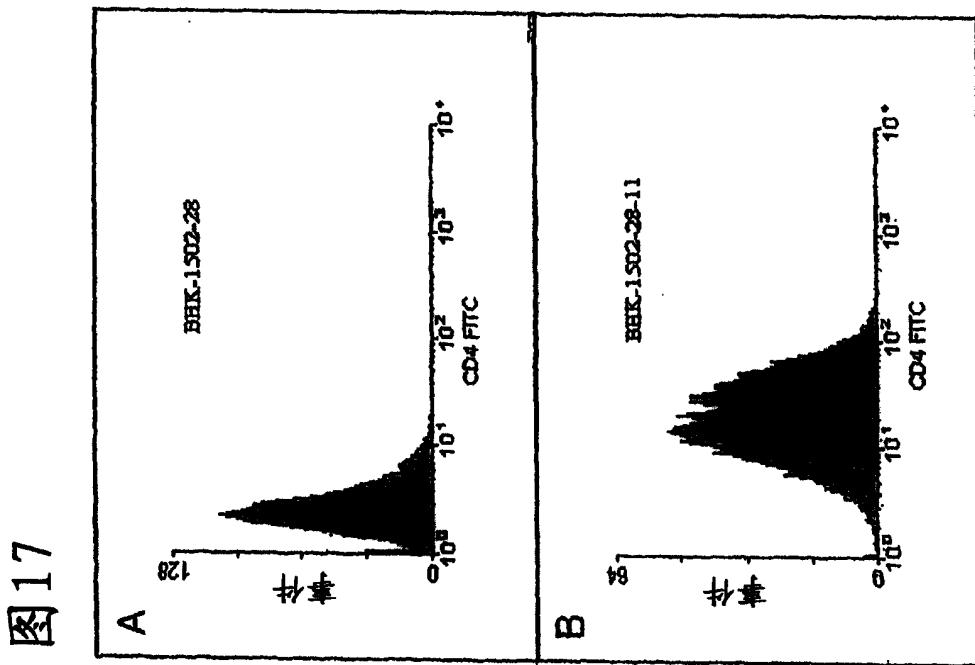


图16





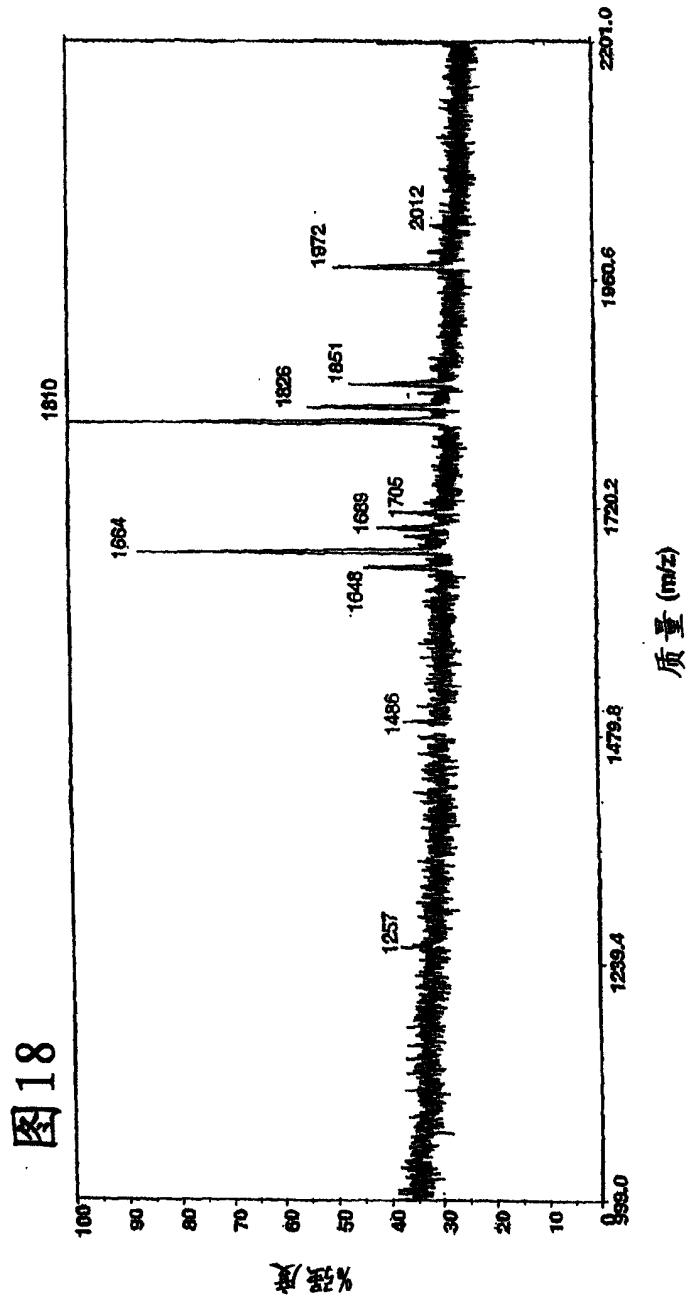
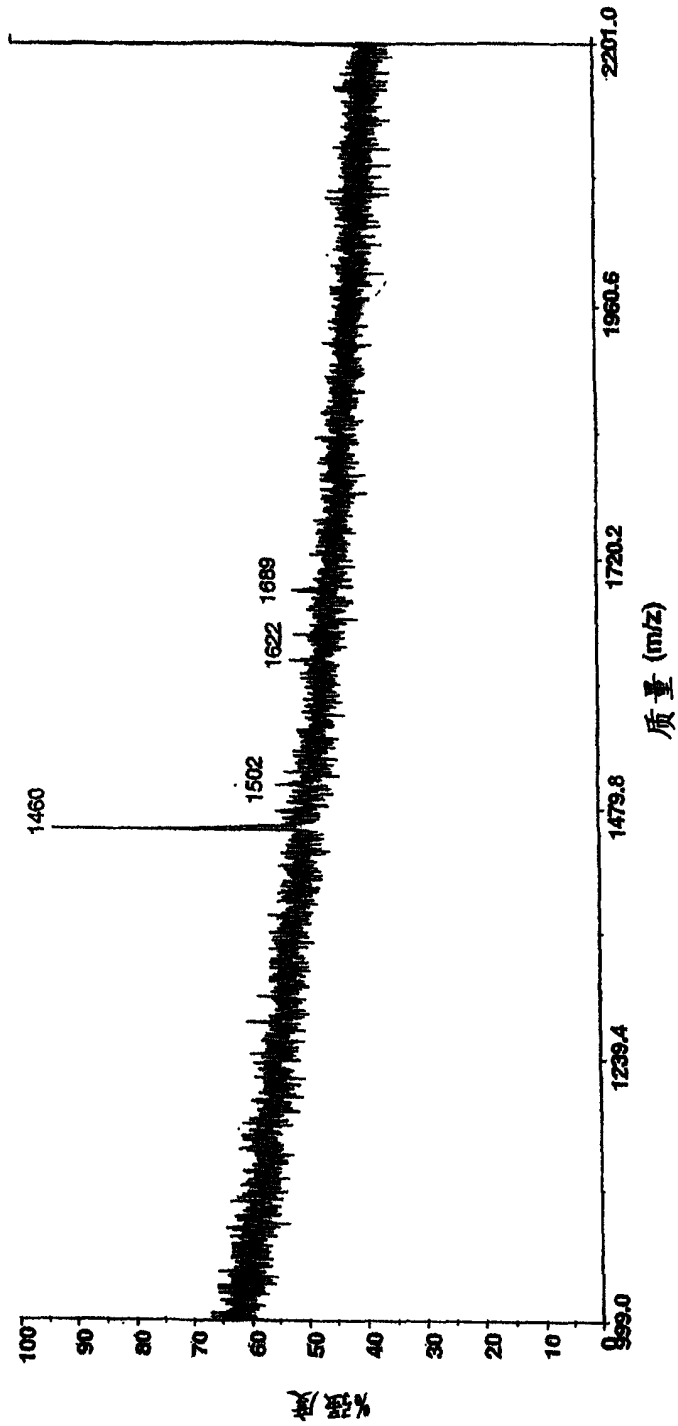
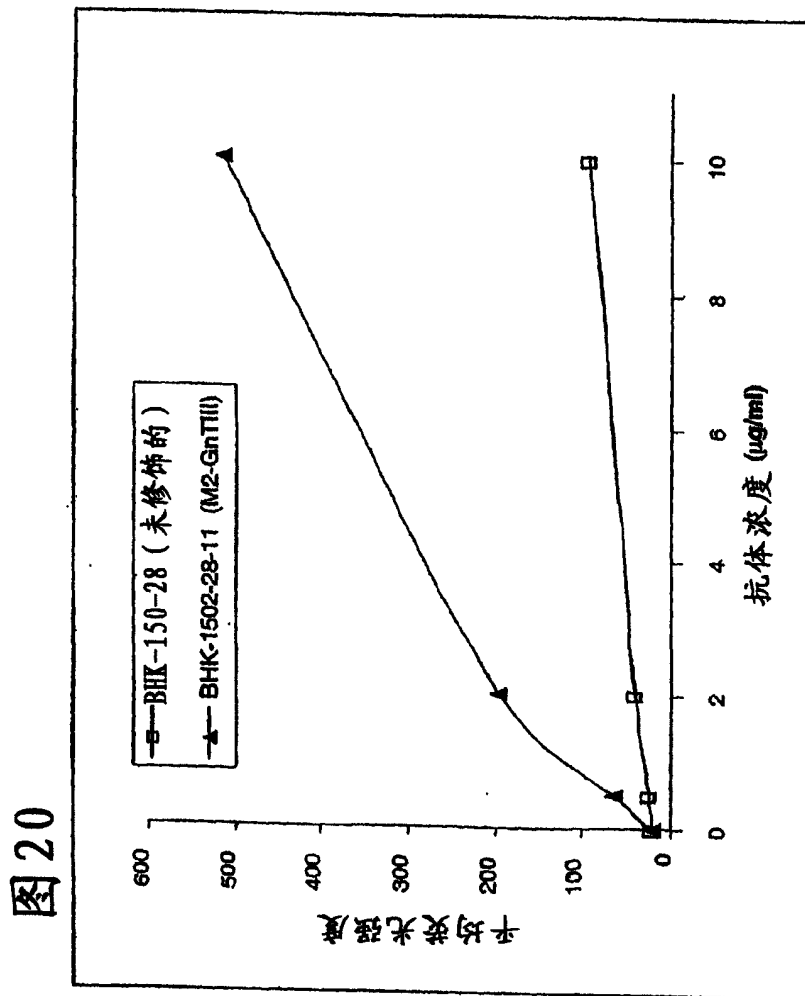


图19





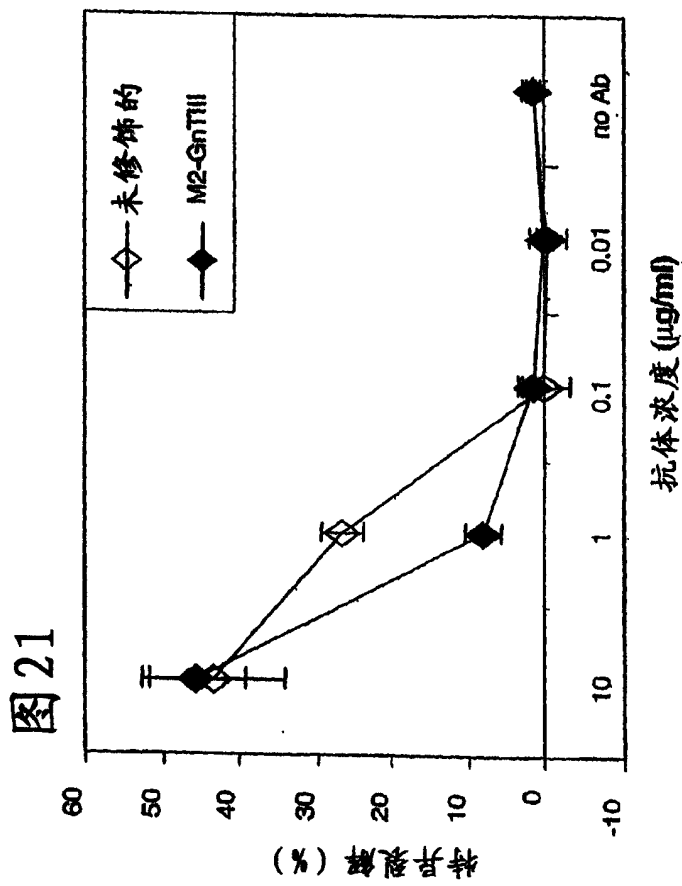


图22

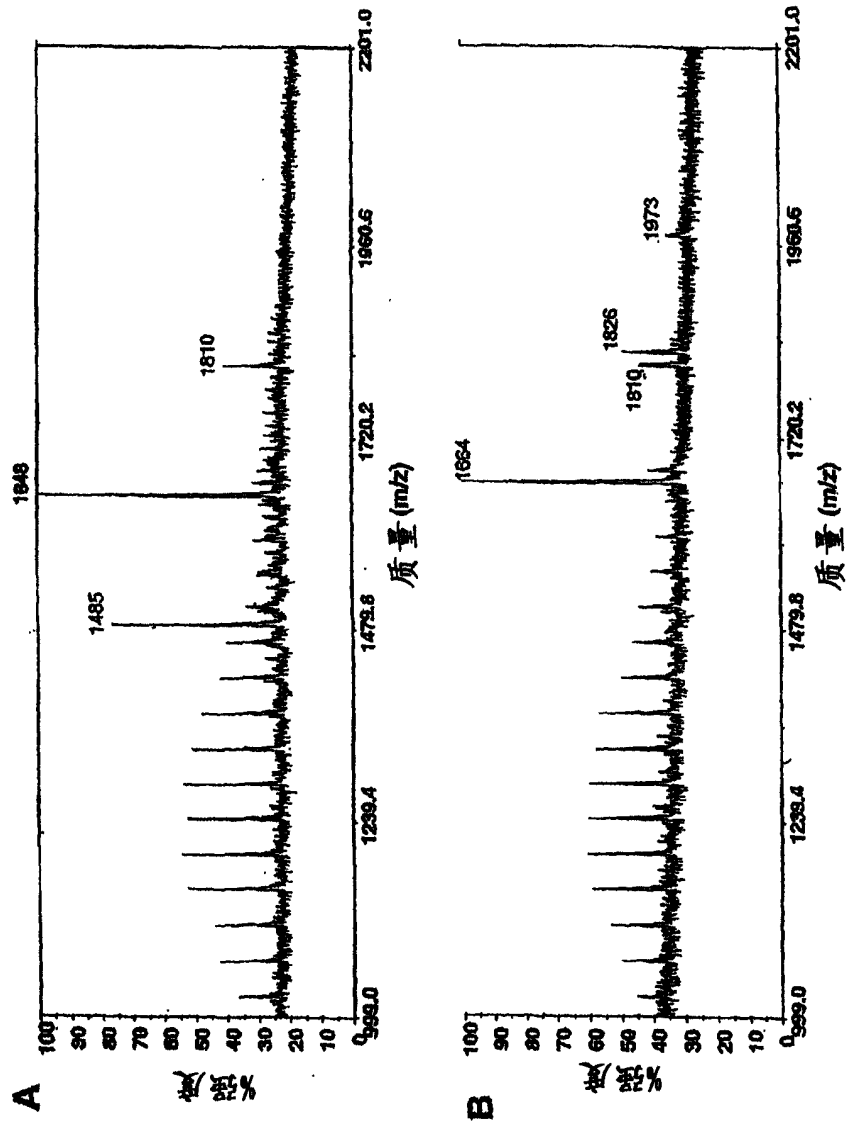


图23

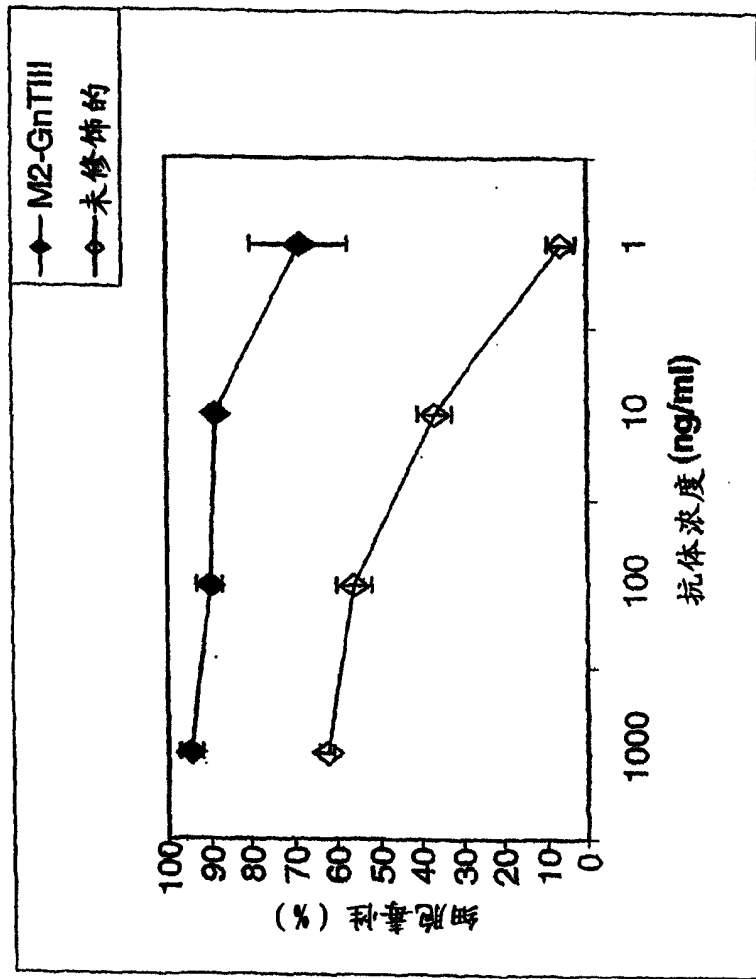


图 26

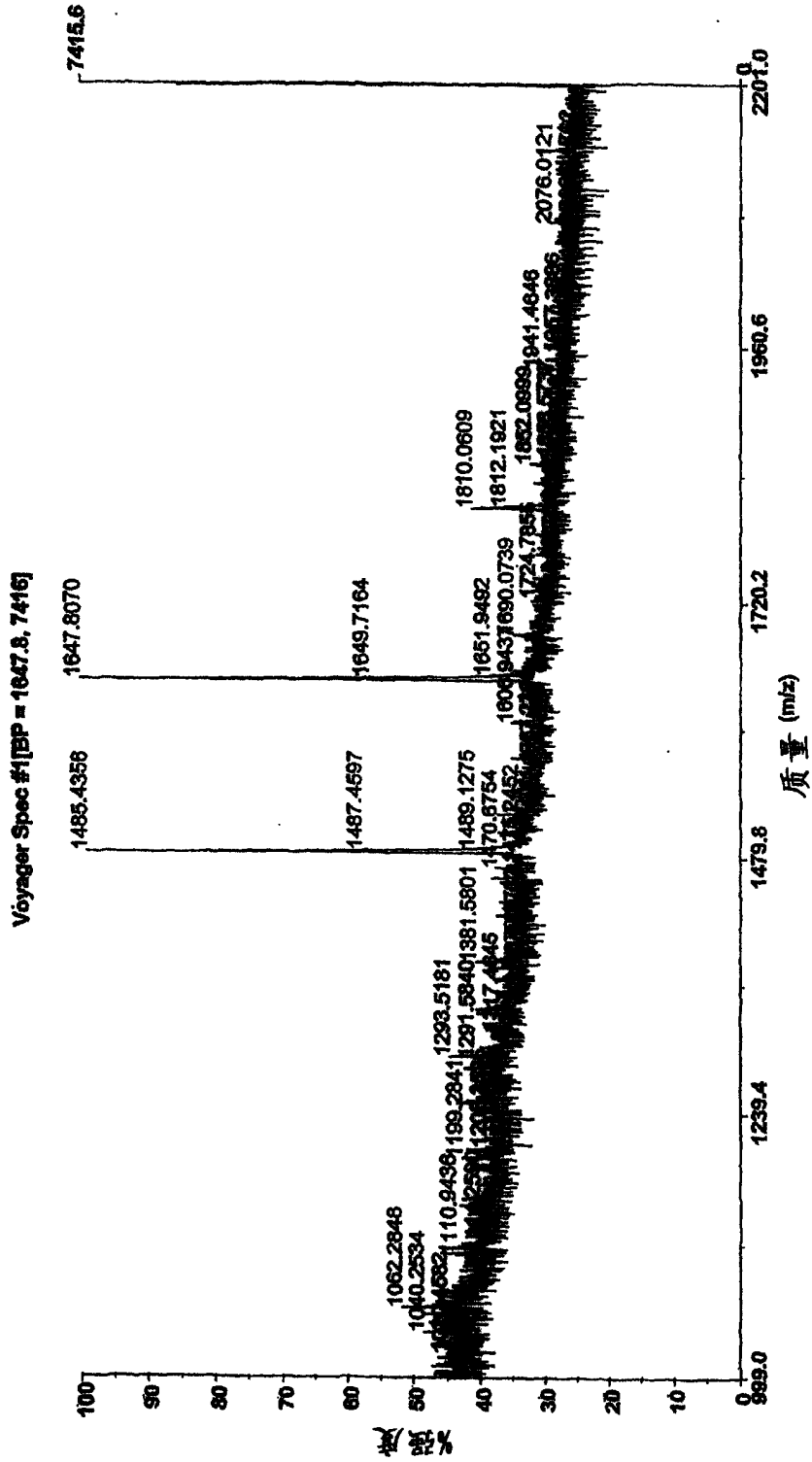


图 27A

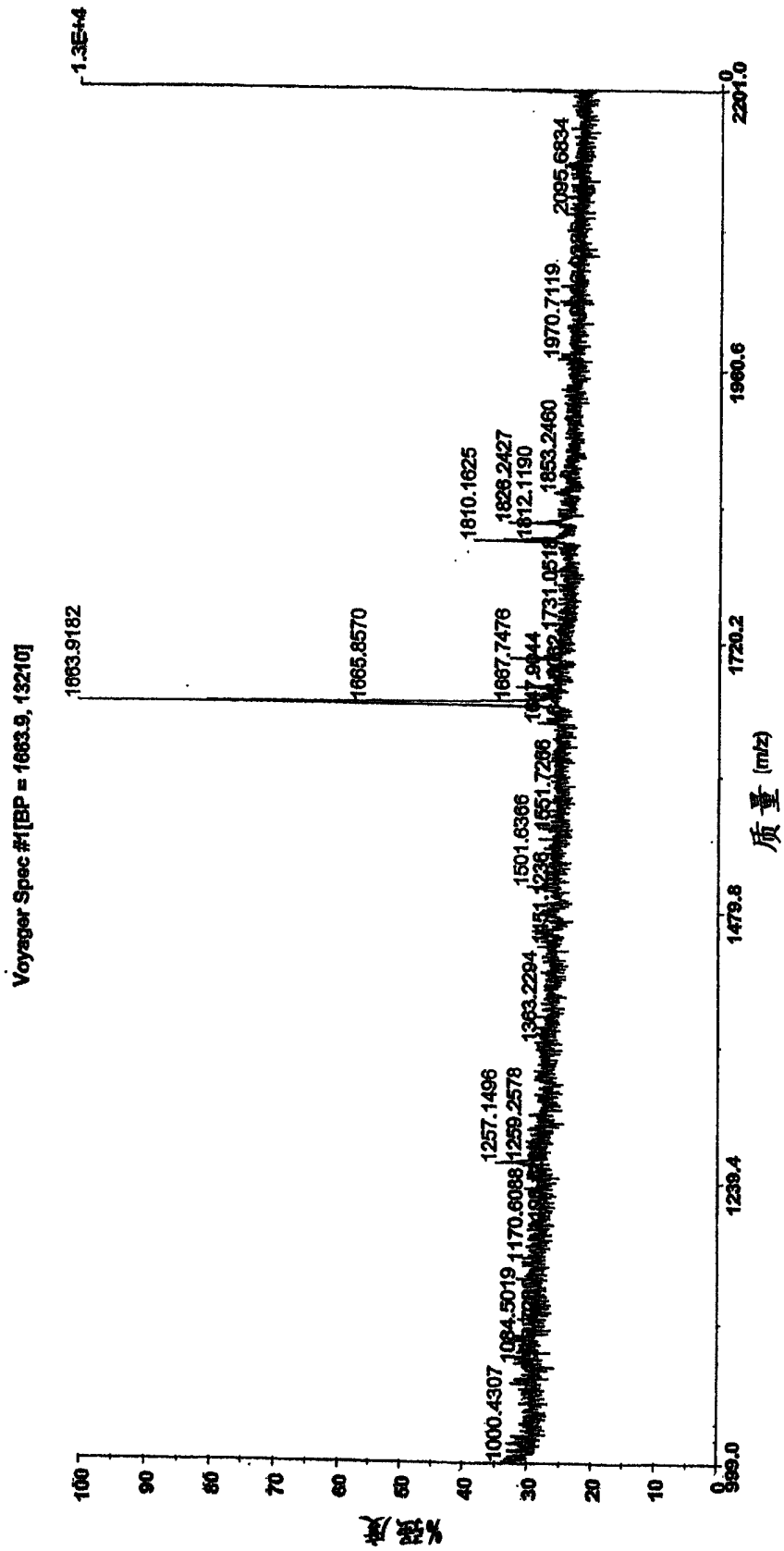


图 27B

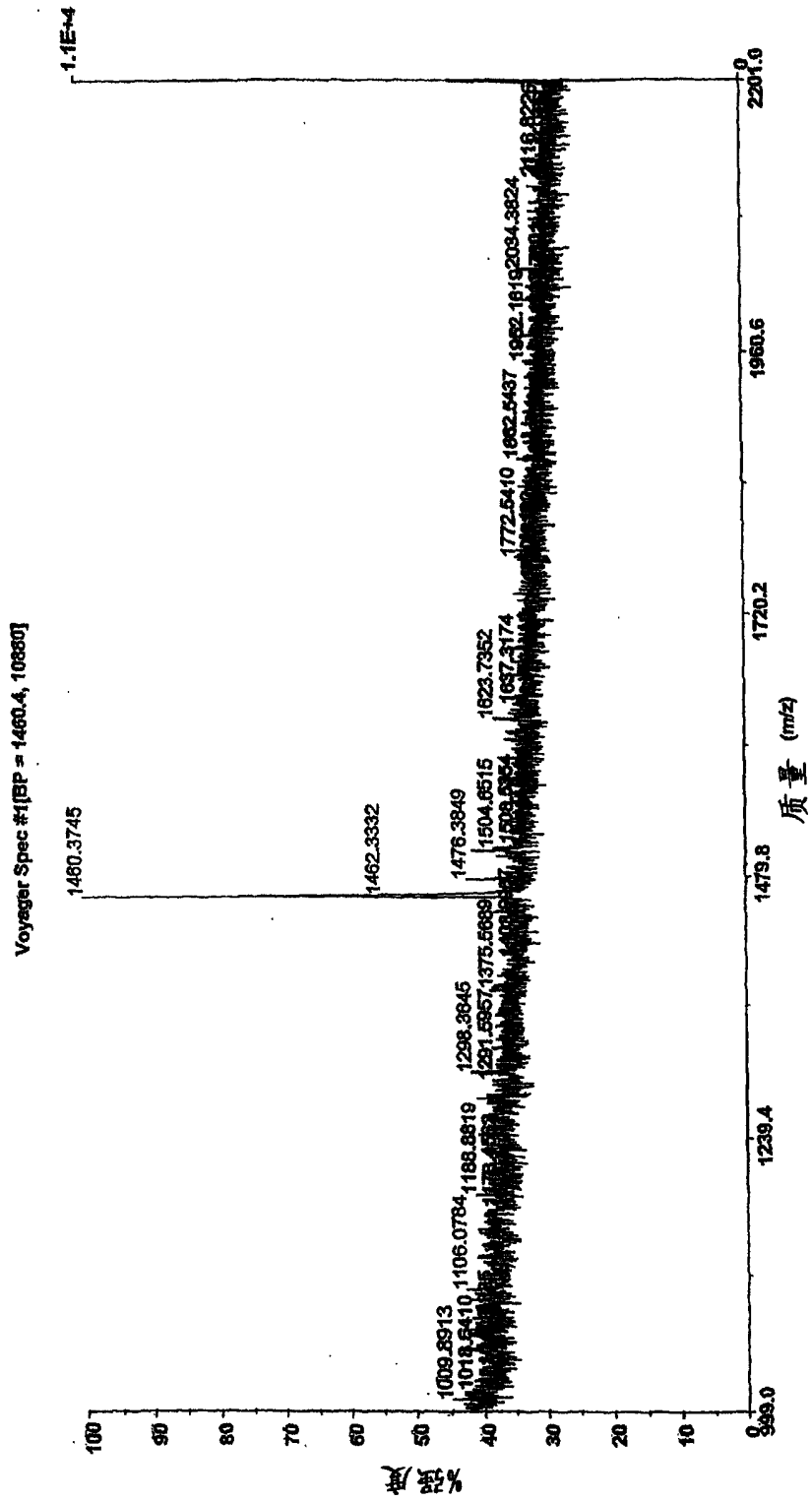
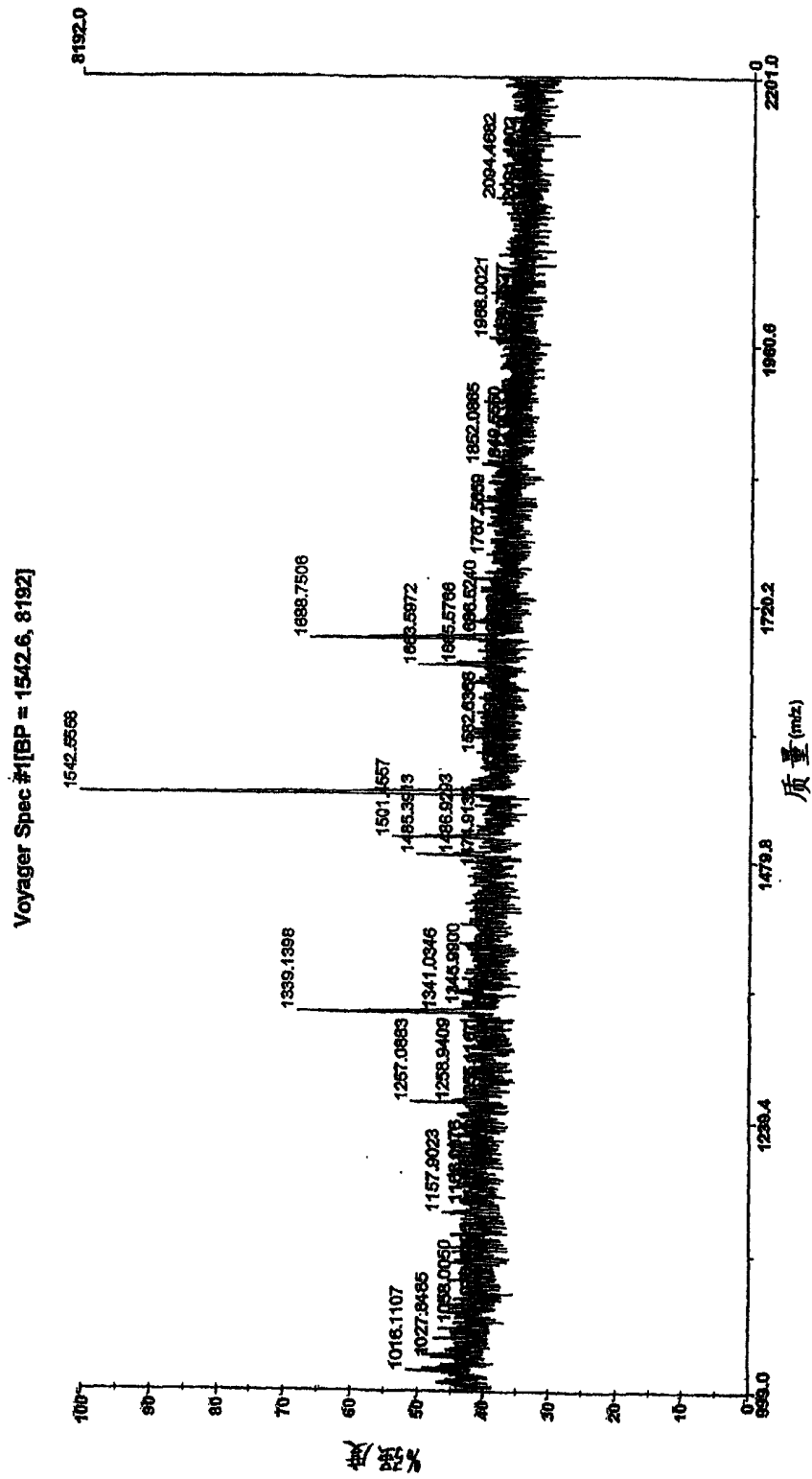
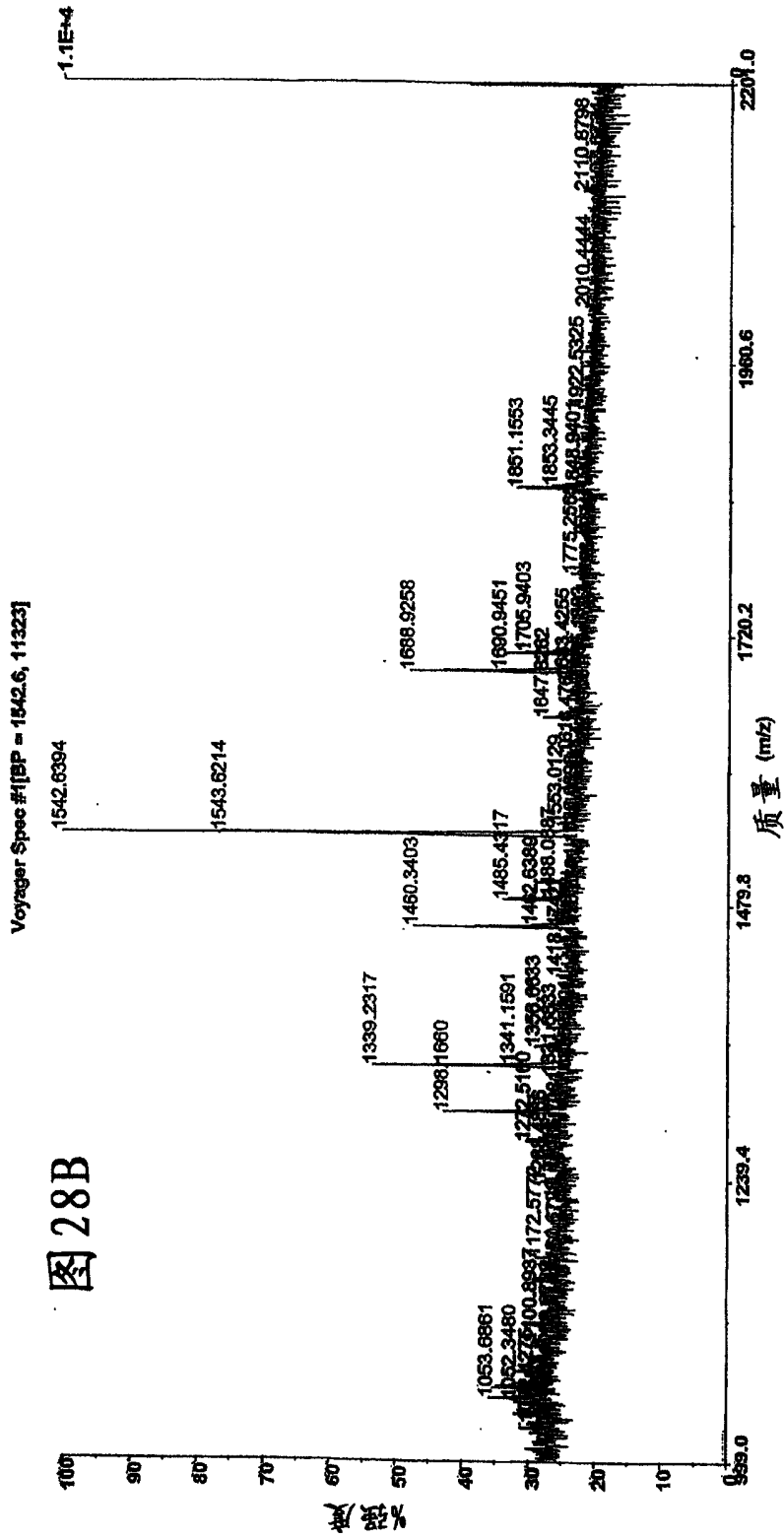


图 28A





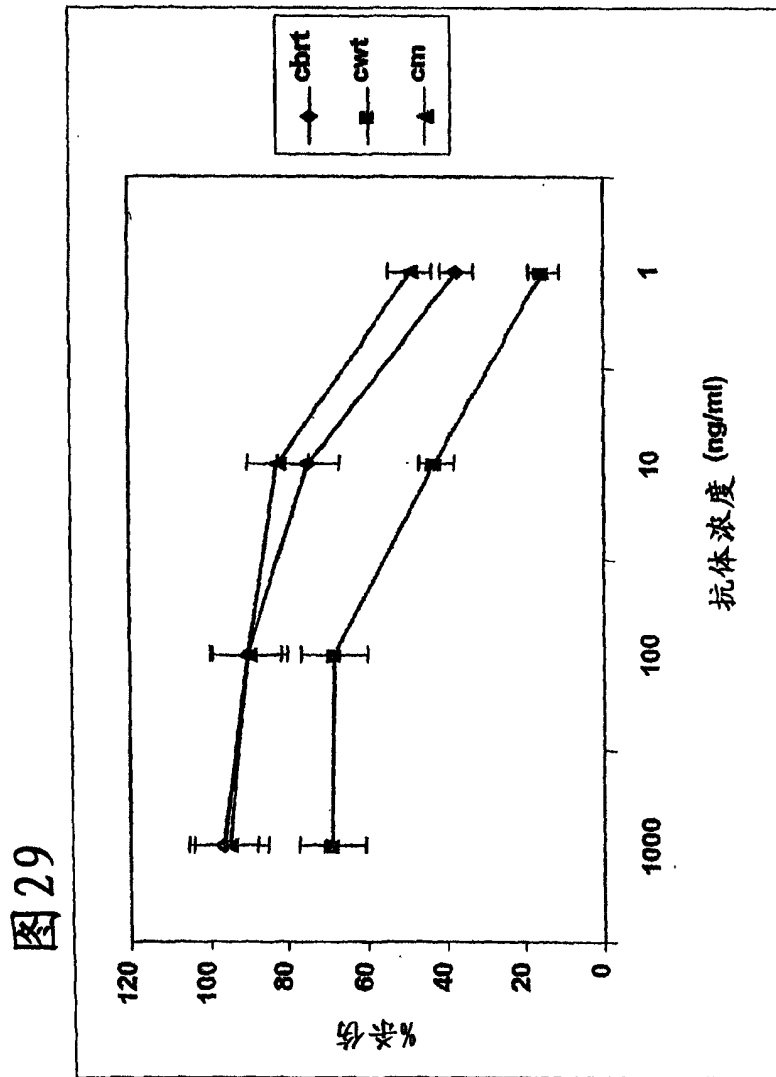
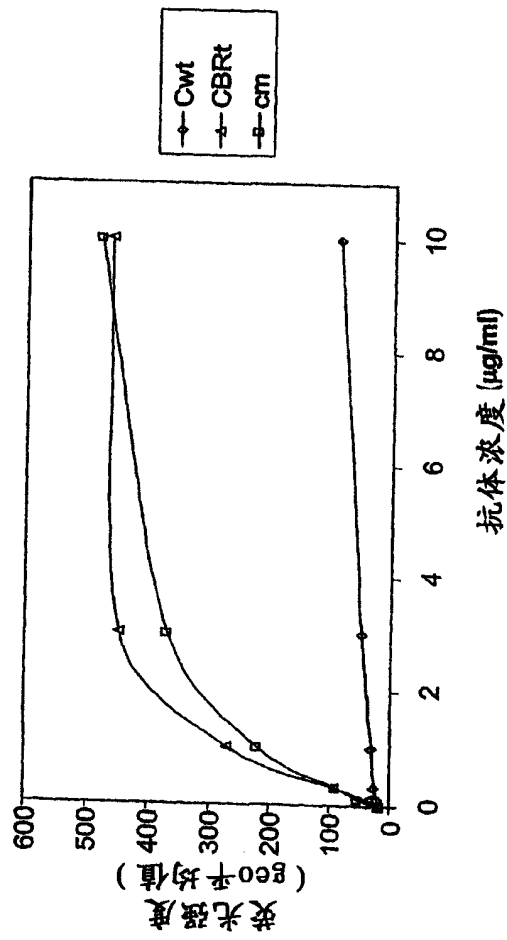


图30



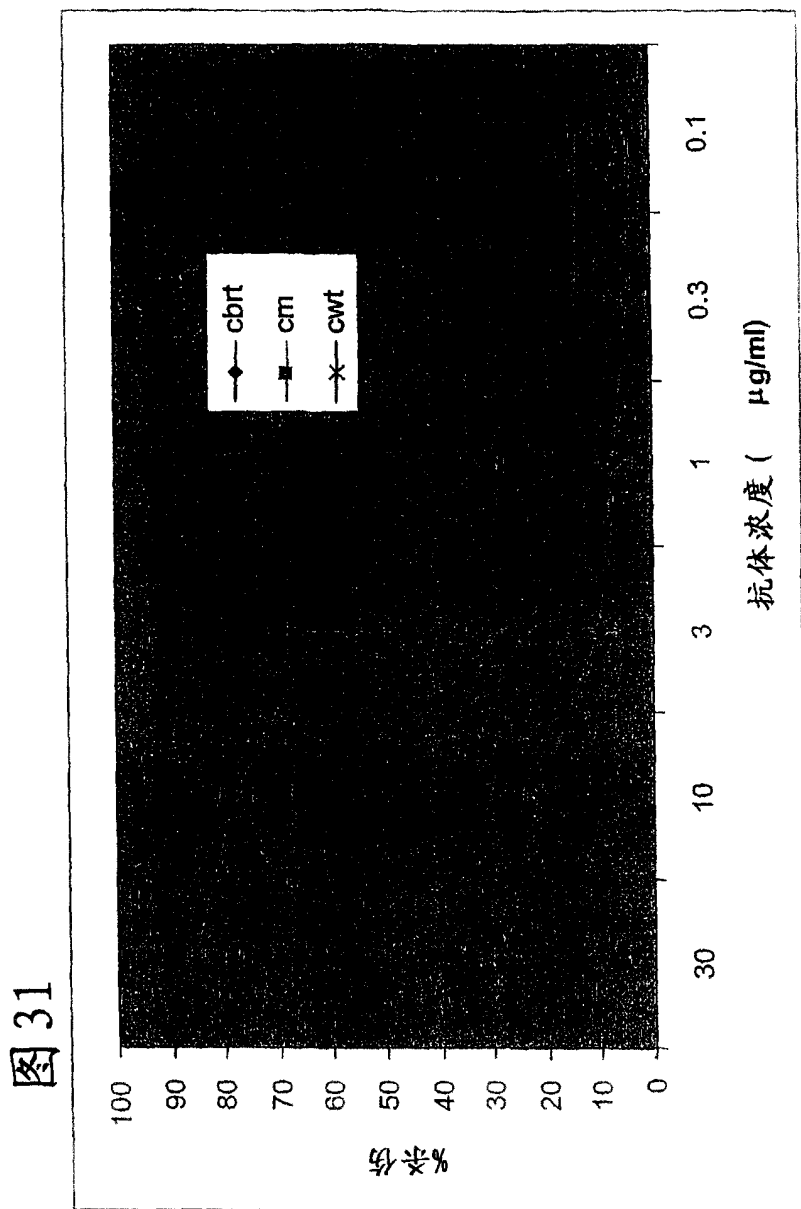


图 32A

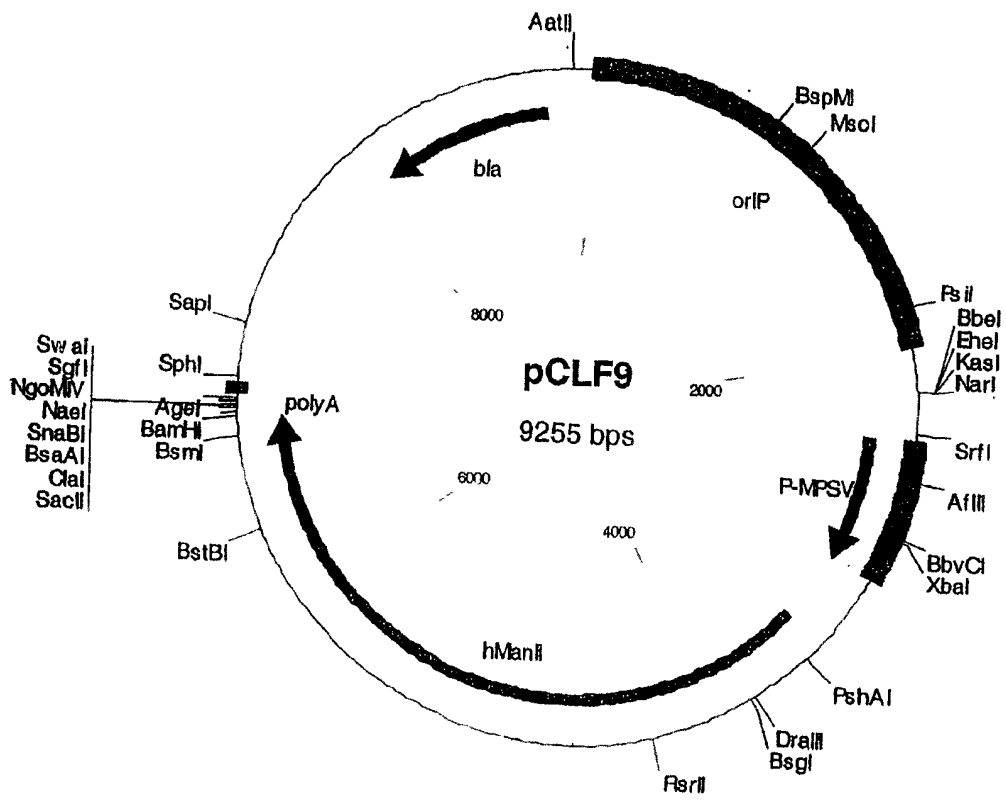
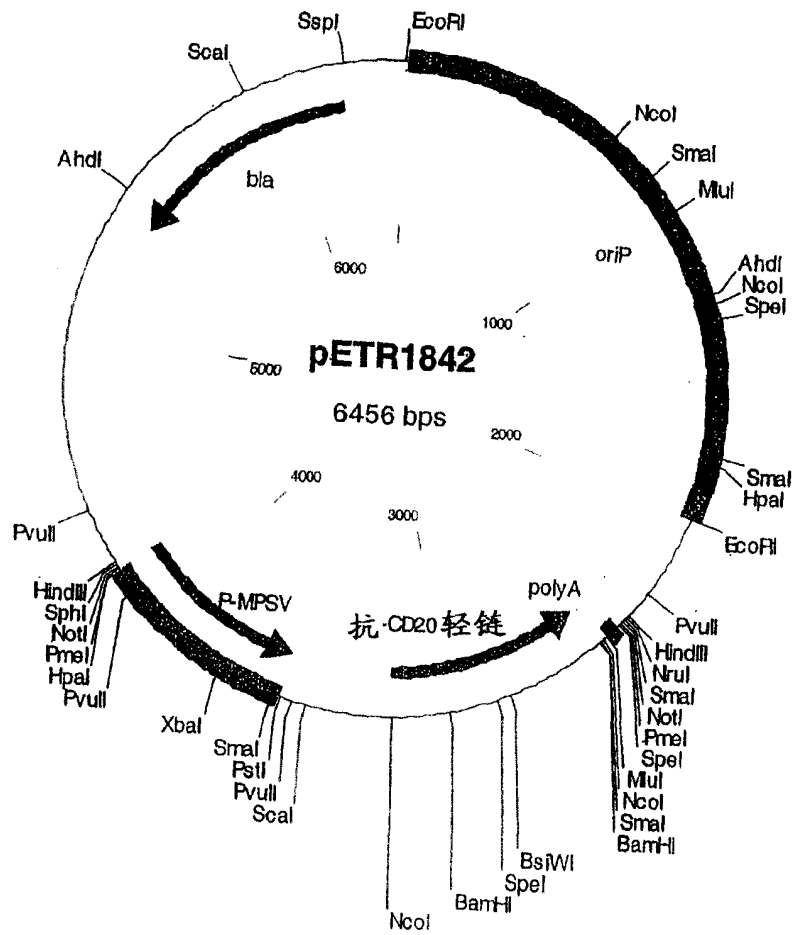


图 32B



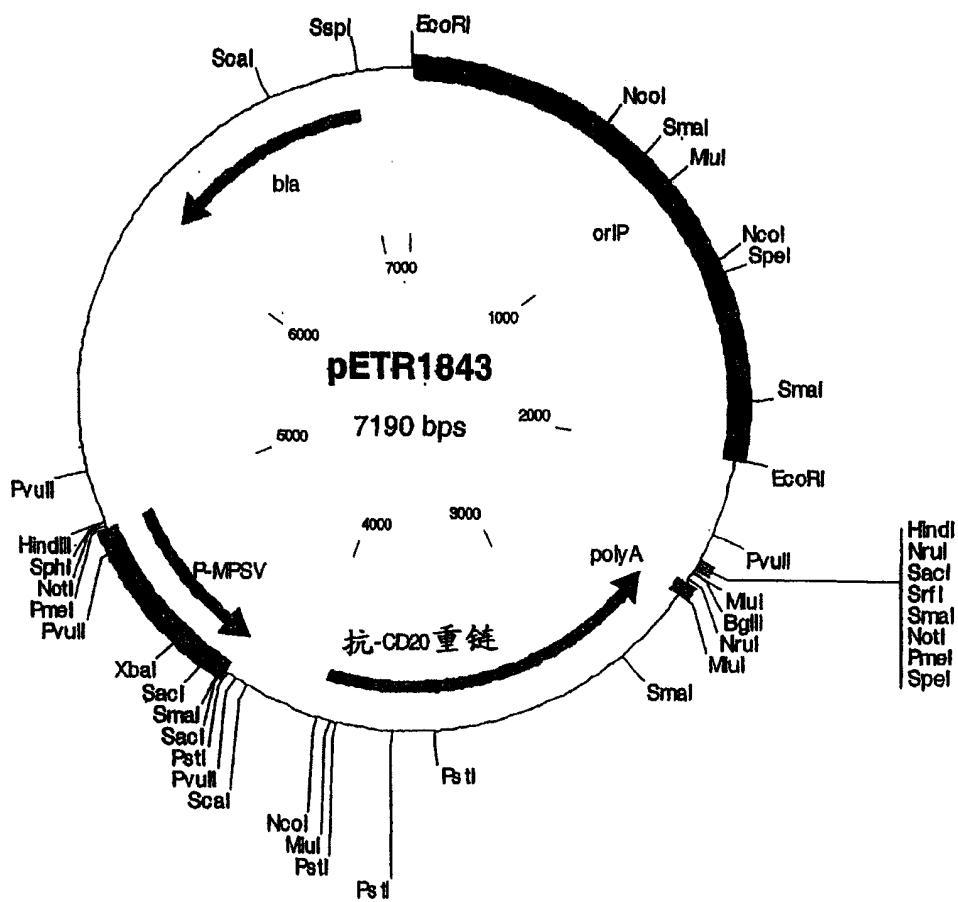


图 33A

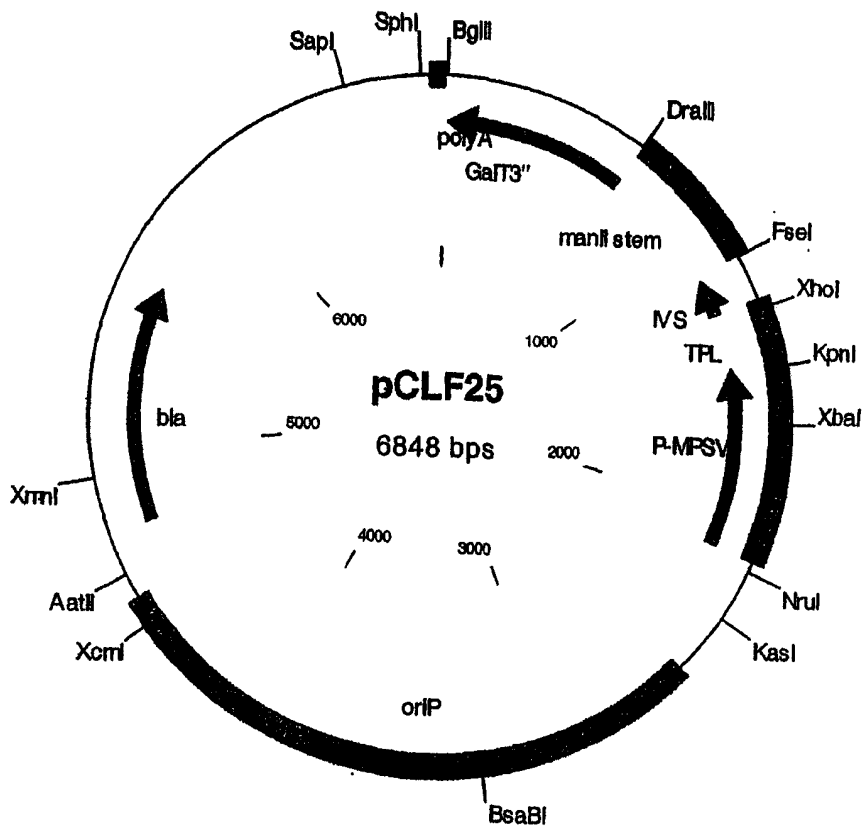


图 33B

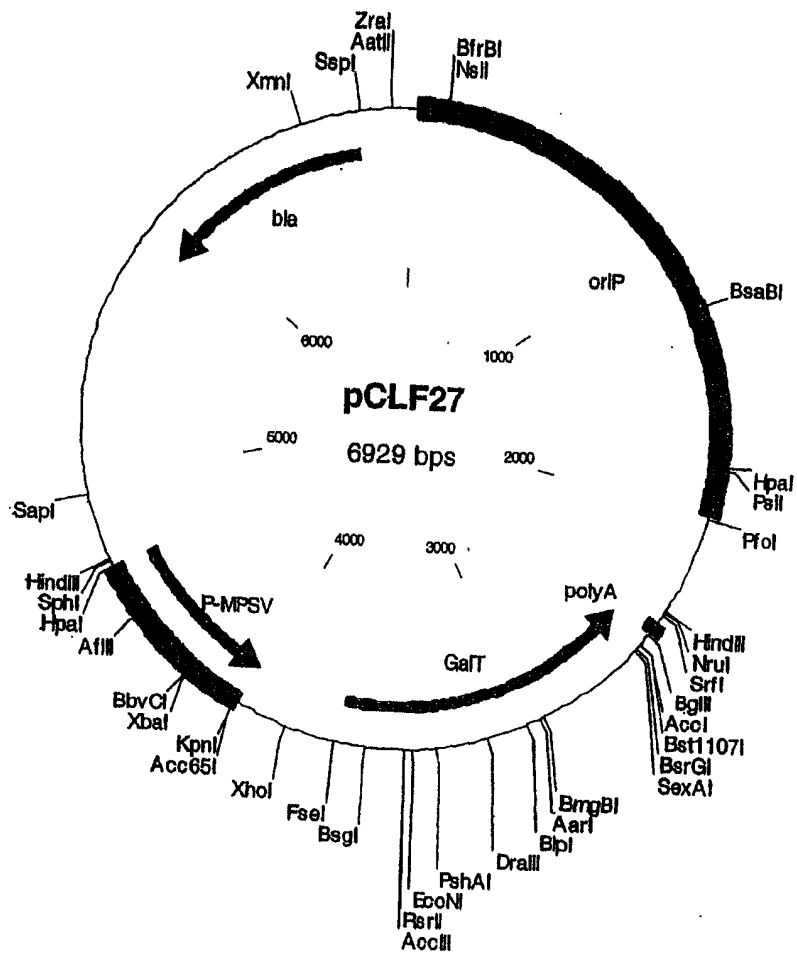


图 34

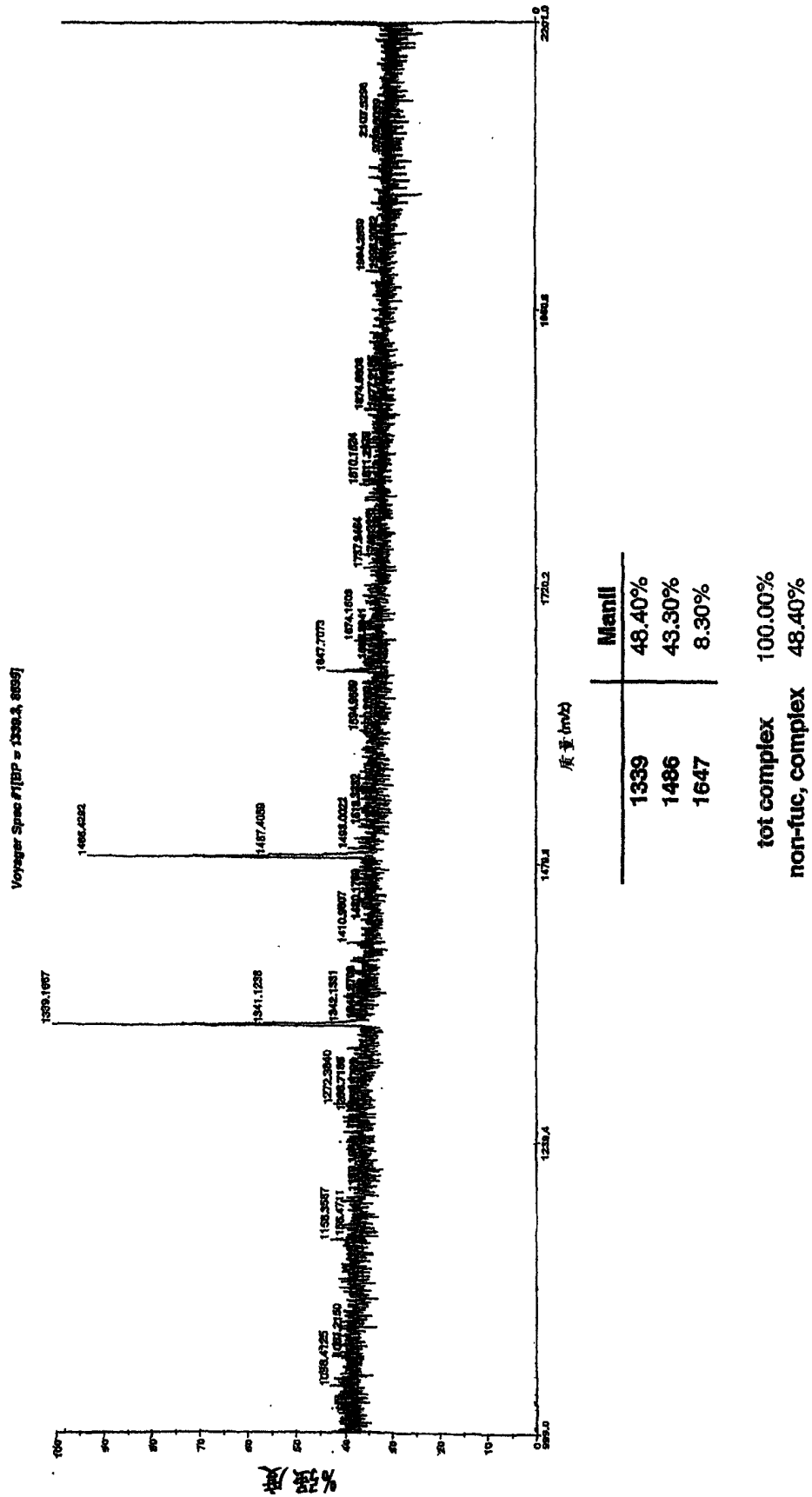


图 35B

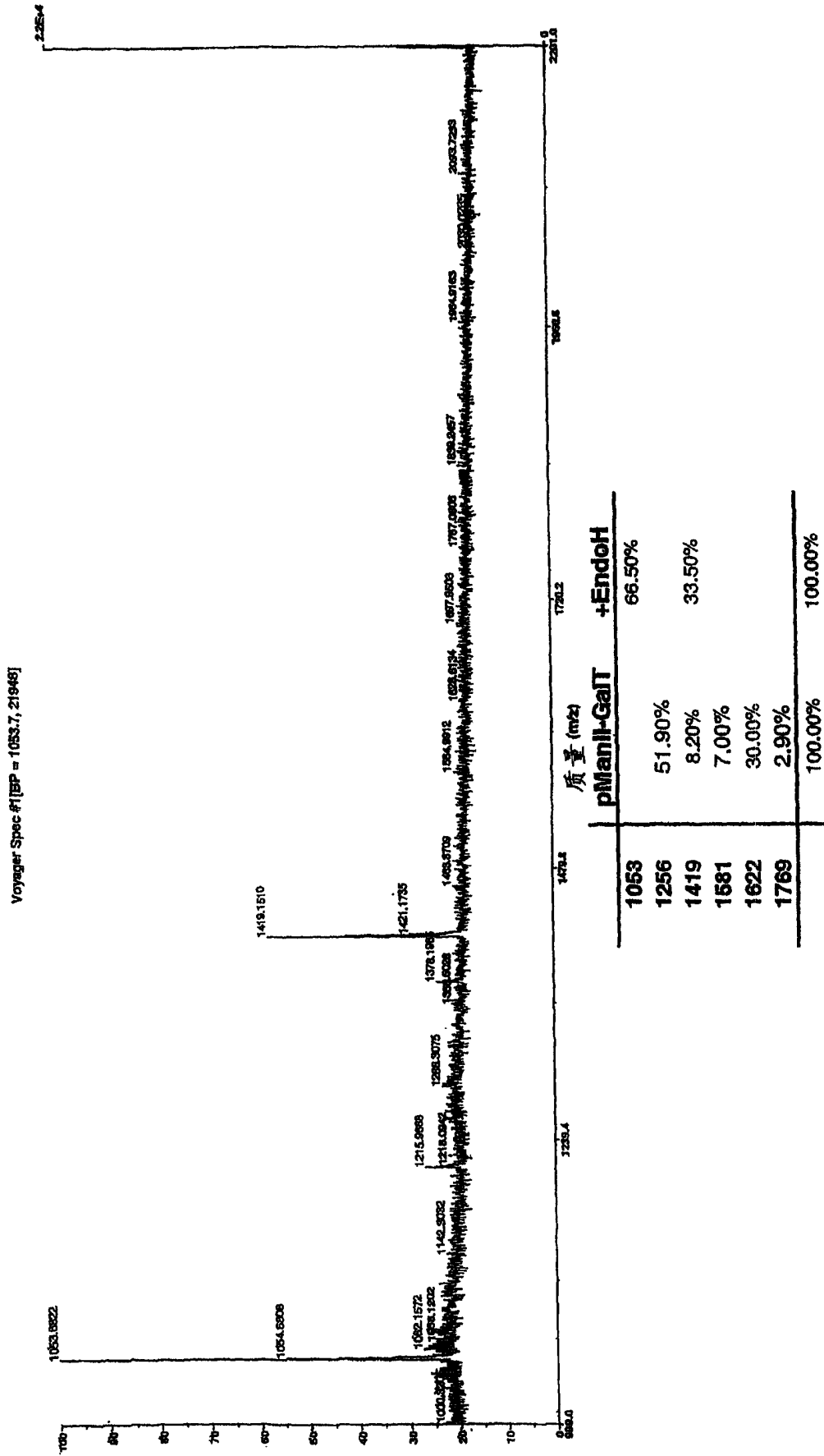


图 36

