



(10) 申请公布号 CN 115427443 A

(43) 申请公布日 2022.12.02

(21) 申请号 202180029319.5

(22) 申请日 2021.04.23

(30) 优先权数据

20171356.7 2020.04.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/060637 2021.04.23

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/214277 EN 2021.10.28

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 邵志新

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

专利代理师 柴云峰 张莹

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书3页 说明书70页

序列表31页 附图18页

(54) 发明名称

巯基化合物及其衍生物的酶和途径调节

(57) 摘要

本发明涉及具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的蛋白质,具体而言为抗体,诸如抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体和抗 α -突触核蛋白抗体。更具体而言,本发明涉及半乳糖基化工程,以产生具有改进的治疗特性的蛋白质,包括具有增加滴度的蛋白质。本发明还涉及一种细胞培养基和哺乳动物细胞,以及使用所述细胞培养基和所述哺乳细胞生产所述蛋白质的方法。此外,本发明涉及所述抗体用作药物的用途,诸如用于治疗癌症,具体而言为与B细胞相关的癌症,或用于治疗帕金森氏病。

1. 一种具有单半乳糖基化 (G1) 和双半乳糖基化 (G2) 聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体, 所述抗 α -突触核蛋白抗体包含重链可变域 (VH) 以及轻链可变域 (VL), 所述重链可变域包含

- (a) CDR-H1, 其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,
- (b) CDR-H2, 其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列, 以及
- (c) CDR-H3, 其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;

所述轻链可变域包含

- (d) CDR-L1, 其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,
- (e) CDR-L2, 其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列, 以及
- (f) CDR-L3, 其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列; 并且

其中所述抗 α -突触核蛋白抗体具有每个总聚糖中17.2%-48.0% (w/w) 的G1和3.1%-15.0% (w/w) 的G2; 优选每个总聚糖中25.4%-48.0% (w/w) 的G1和3.5%-15.0% (w/w) 的G2; 优选每个总聚糖中27.2%-47.0%的G1和4.4%-15.0%的G2; 优选每个总聚糖中40.0%-46.0% (w/w) 的G1和8.4%-15.0% (w/w) 的G2; 更优选每个总聚糖中41.0%-45.0% (w/w) 的G1和9.5%-14.0% (w/w) 的G2; 且最优选每个总聚糖中42.1%-43.9% (w/w) 的G1和10.6%-13.3% (w/w) 的G2。

2. 根据权利要求1所述的抗 α -突触核蛋白抗体, 其中所述抗 α -突触核蛋白抗体包含:

- (a) SEQ ID NO:16的VH序列;
- (b) SEQ ID NO:17的VL序列; 或
- (c) 如 (a) 中定义的VH序列以及如 (b) 中定义的VL序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗 α -突触核蛋白抗体, 其中所述抗 α -突触核蛋白抗体包含SEQ ID NO:20的重链和SEQ ID NO:21的轻链。

4. 一种具有单半乳糖基化 (G1) 和双半乳糖基化 (G2) 聚糖的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体, 所述抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含第一抗原结合域和第二抗原结合域, 其中所述第一抗原结合域包含重链可变域 (VH) 以及轻链可变域 (VL), 所述重链可变域包含

- (a) CDR-H1, 其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,
- (b) CDR-H2, 其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列, 以及
- (c) CDR-H3, 其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;

所述轻链可变域包含

- (d) CDR-L1, 其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,
- (e) CDR-L2, 其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列, 以及
- (f) CDR-L3, 其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;

其中所述第二抗原结合域包含重链可变域 (VH) 以及轻链可变域 (VL), 所述重链可变域包含

- (a) CDR-H1, 其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,
- (b) CDR-H2, 其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列, 以及
- (c) CDR-H3, 其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;

所述轻链可变域包含

- (d) CDR-L1, 其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列,
- (e) CDR-L2, 其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列, 以及

(f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;并且

其中所述抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0%-29.0% (w/w) 的G1和1.3%-2.8% (w/w) 的G2;优选每个总聚糖中20.0%-28.0% (w/w) 的G1和1.4%-2.7% (w/w) 的G2;更优选每个总聚糖中21.0%-28.0% (w/w) 的G1和1.5%-2.7% (w/w) 的G2;且最优选每个总聚糖中21.0%-27.4% (w/w) 的G1和1.5-2.6% (w/w) 的G2。

5. 根据权利要求4所述的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,其中

(a) 所述第一抗原结合域包含SEQ ID NO:28的VH序列和SEQ ID NO:29的VL序列;

(b) 所述第二抗原结合域包含SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:41的VL序列;或

(c) 所述第一抗原结合域和所述第二抗原结合域包含如(a)中定义的VH序列以及如(b)中定义的VL序列。

6. 根据权利要求4或5所述的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,其中所述抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含

(a) SEQ ID NO:46的第一重链和SEQ ID NO:45的第二重链;

(b) SEQ ID NO:33的第一轻链和SEQ ID NO:44的第二轻链;或

(c) 如(a)中定义的所述第一重链和所述第二重链以及如(b)中定义的所述第一轻链和所述第二轻链。

7. 根据权利要求4至6所述的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,其中所述抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含

(a) SEQ ID NO:47的第一重链和SEQ ID NO:45的第二重链;

(b) SEQ ID NO:33的第一轻链、SEQ ID NO:44的第二轻链和第三轻链;或

(c) 如(a)中定义的所述第一重链和所述第二重链以及如(b)中定义的所述第一轻链、所述第二轻链和所述第三轻链。

8. 一种生产根据权利要求1至3中任一项所述的抗 α -突触核蛋白抗体的方法,所述抗 α -突触核蛋白抗体具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖,所述方法包括:

(a) 在细胞培养基中培养哺乳动物细胞,其中将所述细胞培养基中至少大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及至少大于3.0g/L葡萄糖的浓度保持至少3天,更优选至少4天,且甚至更优选至少5天,

(b) 分离所述抗体。

9. 一种生产根据权利要求4至7中任一项所述的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的方法,所述抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖,所述方法包括:

(a) 在细胞培养基中培养哺乳动物细胞,其中将所述细胞培养基中至少大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及至少大于3.0g/L葡萄糖的浓度保持至少3天,更优选至少4天,且甚至更优选至少5天,

(b) 分离所述抗体。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中将所述浓度保持至少5天,优选至少7天,更优选至少10天,甚至更优选至少12天,且最优选至少14天。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中所述细胞培养基包含浓度至少5.0mM且小于10.0mM,优选至少5.0mM且小于等于9.0mM,更优选至少5.0mM且小于等于

8.0mM,甚至更优选至少5.0mM且小于等于7.0mM,且最优选至少5.0mM且小于等于6.0mM的来自所述一种或多种巯基化合物的所述巯基基团。

12.根据权利要求8至11中任一项所述的方法,其中所述细胞培养基包含介于大于3.0g/L至至多13g/L之间的葡萄糖,优选介于大于3.0g/L至至多8.0g/L之间的葡萄糖,更优选介于大于3.0g/L至至多7.0g/L之间的葡萄糖,甚至更优选介于大于3.0g/L至至多6.0g/L之间的葡萄糖,且最优选介于大于3.0g/L至至多5.0g/L之间的葡萄糖。

13.根据权利要求8至12中任一项所述的方法,其中所述一种或多种巯基化合物选自自由以下项组成的组:半胱氨酸、胱氨酸、及其组合。

14.根据权利要求8至13中任一项所述的方法,其中所述细胞培养基为化学限定培养基,优选不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基。

15.根据权利要求1至4中任一项所述的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,其用于治疗罹患B细胞相关癌症的患者,所述癌症优选慢性白血病和淋巴瘤。

16.根据权利要求5至7中任一项所述的抗 α -突触核蛋白抗体,其用于治疗罹患帕金森氏病的患者。

巯基化合物及其衍生物的酶和途径调节

技术领域

[0001] 本发明涉及具有单半乳糖基化 (G1) 和双半乳糖基化 (G2) 聚糖的蛋白质,具体而言为抗体,诸如抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体和抗 α -突触核蛋白抗体。更特定而言,本发明涉及半乳糖基化工程,以产生具有改进的治疗特性的蛋白质,包括具有增加的滴度的蛋白质。此外,本发明还涉及一种细胞培养基及哺乳动物细胞,以及使用所述细胞培养基和所述哺乳细胞生产所述蛋白质的方法。此外,本发明涉及所述抗体用作药物的用途,该药物诸如用于治疗癌症,特别是与B细胞相关的癌症,或用于治疗帕金森氏病。

背景技术

[0002] 许多糖蛋白已成为生物技术工业的主要产品,并已特别用于治疗目的。实例包括促红细胞生成素 (EPO)、治疗性单克隆抗体 (治疗性mAbs)、组织纤溶酶原激活剂 (tPA)、干扰素- α 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 以及人绒毛膜促性腺激素 (hCG) (Cumming等人, *Glycobiology* 1:115-130 (1991))。因此,糖蛋白的寡糖成分可以影响其涉及治疗性糖蛋白功效的特性,其包含但不限于物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、与免疫系统的相互作用、药代动力学以及特定生物学活性。此类特性不仅取决于寡糖的存在与否,而且还取决于寡糖的具体结构。

[0003] 通常,天然形式的免疫球蛋白或抗体通常是由两条轻链和两条重链组成的四聚体糖蛋白。此类免疫球蛋白通常在重链恒定区的保守性位置处含有寡糖,其可以可变地影响蛋白质组装、分泌、或功能活性 (Boyd等人, (1995) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwer A., 与Howard, S.C. (1990) *Biochem.* 29:4175-4180; Wright, A., 与Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997))。

[0004] 例如,增加抗体的半乳糖基化可能在功能上更具有抗炎的作用,例如,如Karsten等人在一份报告 (*Nature Medicine* 18.9 (2012) 1401-1406) 中描述,在小鼠中IgG免疫复合物的高半乳糖基化促进Fc γ RIIB和dectin-1缔合,从而阻断C5aR和CXCR226的促炎性效应子功能。其它报告的半乳糖基化对IgG分子的影响包括改变物理化学特性,诸如构象和表面可及性 (Krapp等人, *J. Mol. Biol.* 325 (2003) 979-89; Mimura等人, *Immunol.* 37 (2000) 697-706)。Fortunato和Colina (*J. Phys. Chem.* 118 (2014) 9844-9851) 使用显式水原子分子动力学模拟 (explicit water atomistic molecular dynamics simulation) 研究免疫球蛋白G1的Fc域中半乳糖基化的影响。据建议糖基化可以作为改善单克隆抗体的抗聚集性的途径,用于治疗处理。

[0005] 考虑到糖蛋白的不同糖基化水平和/或糖基化模式对其特性的影响,特别是与治疗功效有关的特性,因此,必须确保特别是为临床使用而生产的糖蛋白的糖基化模式是统一的,从而确保至少保留抗体的有利特性。

[0006] 然而,通常情况下,在宿主细胞中表达重组糖蛋白会导致连接在特定糖基化位点的寡糖结构发生变化,从而使产生的糖蛋白以多种糖型存在。因此,直到现在,在给定的治疗性蛋白质生产过程中,精确调节和控制体内生产细胞内的糖基化水平和/或糖基化模式,

在技术上一直是非常具有挑战性的。

[0007] 在过去的几十年中,已经提出了各种方法,并研究了几种可能改变宿主细胞中糖蛋白的糖基化模式的过程参数,其包括在宿主细胞中引入或过表达某些参与寡糖生产的酶(美国专利第5,047,355号、美国专利第5,510,261号),改变氧合水平、pH值、纯化方式等(Werner,R.与Noe,W.(1993),Drug Res.43:1134-1139;Werner,R.与Noe,W.(1993),Drug Res.43:1242-1249;Hayter等人,(1992)Biotech,and Bioeng.39:327-335;Borys等人,(1994)Biotech and Bioeng.43:505-514;Borys等人,(1993)Bio/technology 11:720-724;Hearing等人,(1989)J.Cell Biol.108:339-353;Goochee等人,Frontiers in Bioprocessing II,Todd等人编辑(1992)American Chemical Societ第.199-240页;美国专利第5,096,816号;Chotigeat,W,(1994)Cytotech.15:217-221)。

[0008] 如上所述,生产具有理想的糖基化水平和/或糖基化模式的糖蛋白,对于至少保留并且任选地优化所述抗体的有利特性,特别是与其治疗特性有关的特性是重要的。

[0009] 该技术问题通过以下提供的并且在所附权利要求中表征的实施例来解决。

发明内容

[0010] 在过去的几年中,人们已经做出了许多努力来从根本上理解并且技术上控制哺乳动物细胞(诸如CHO细胞)中的蛋白质的半乳糖基化过程。到目前为止,有几种通用的策略可用于影响蛋白质糖基化的程度,其作用通常是细胞类型和产物特异性的:1)改善糖基转移酶的活性,2)改善核苷酸糖运输蛋白用于核苷酸糖转移的可用性和活性,3)增加核苷酸糖受质的可用性;以及4)减少糖苷酶对细胞外聚糖的降解(Hossler等人,Glycobiology 19(9)(2009)936-949;Hossler,Genomics and Systems Biology of Mammalian Cell Culture 127(2012)187-219)。Crowell等人(Biotechnol Bioeng 96(3)(2007)538-549)表明,锰对于寡糖基转移酶复合物和 β -1,4-半乳糖基转移酶都是优选的辅助因子,在CHO细胞培养物中添加锰,在后期培养阶段提高了rhEPO N-聚糖的位点占有率和 β -1,4-半乳糖基化。Gramer等人(Biotechnol Bioeng.108(7)(2011)1591-602)报告指出,相对于所提供的UMG总浓度,尿苷、 $MnCl_2$ 和半乳糖的协同组合显著提高了mAb半乳糖基化程度。一些研究也已经报告使用糖基转移酶和核苷酸糖运输蛋白的过表达和/或减弱的方法(Jeong等人,J Microbiol Biotechnol18(12)(2008)1945-1952;Weikert等人,Nat Biotechnol 17(11)(1999)1116-1121)。已有报告指出,核苷酸糖前驱物进料是控制重组蛋白糖基化的一种可能策略(Wong等人,Biotechnology and Bioengineering 107.2(2010)321-336)。具体地,已证实在细胞培养基中添加半乳糖、葡萄糖胺和N-乙酰甘露糖氨酸会增加细胞内核苷酸糖的水平。然而,细胞内核苷酸糖的水平升高对糖基化基因表达的影响尚未得到很好的表征。而且,细胞内核苷酸糖的水平升高也不一定会导致重组蛋白糖基化的改善。一些研究采用了减弱细胞糖苷酶的策略,目的是改善蛋白质糖基化(Ngantung等人,Biotechnol Bioeng.95(1)(2006)106-19)。然而,这种方法仅适用于不同情况。总之,仍然需要基础研究来研究各种外部因素如何影响细胞内的半乳糖基化过程。

[0011] 如本文所述,抗体半乳糖基化取决于细胞中存在的UDP-半乳糖的浓度,因为这些糖分子充当半乳糖基化所需的受质。通过这种方式,已发现UDP-半乳糖含量的增加与CHO细胞中表达的抗体的高半乳糖基化以及高唾液酸化有关。改变细胞中UDP-半乳糖的水平可对

聚糖的异质性产生显著的影响。

[0012] 在这种情况下,UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖转化途径包含两种经鉴定的酶,即尿苷二磷酸 α -D-葡萄糖差向异构酶(UDP-Glc-E)和UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸转尿苷酰酶(UDP-Gal-T),这两种酶被发现存在于哺乳动物细胞(诸如CHO细胞)的UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖转化途径中扮演关键角色。

[0013] 在这方面,UDP-Gal-T(EC 2.7.7.12)是一类非常特殊的酶,可以用几种简单的巯基分子(诸如L-半胱氨酸、谷胱甘肽、2-巯醇乙醇和DTT)进行调节。早在1966年,Mayes与Hansen(*Methods Enzymol.* 9(1966) 708-713)发现L-半胱氨酸可以用于活化并促进来自小牛肝脏的部分纯化的UDP-Gal-T的酶的活性。在随后的几年中,Mayes(*Arch. Biochem. Biophys.* 172(1976) 715-720)对来自小牛肝脏的完全纯化的UDP-Gal-T进行了大量研究,进一步证实L-半胱氨酸的活化功能。针对其它生物的UDP-Gal-T也已经进行类似研究。Saito等人(*J. Biol. Chem.* 242(1967) 2362-2368)证明L-半胱氨酸刺激的经纯化的大肠杆菌UDP-Gal-T达到其最大活性。Chowdhury(*Indian J. Biochem. Biophys.* 16(1979) 273-277)也用来自大肠杆菌的经纯化的UDP-GAL-T证实此观察结果。

[0014] 因此,通过本发明发现,在用巯基化合物或其衍生物的制造过程中,可以调节和控制重组蛋白诸如抗体细胞内的UDP-半乳糖含量和半乳糖基化。例如,通过本发明发现,可以在制造过程中用巯基化合物或其衍生物调节和控制重组单克隆抗体的N-聚糖加工,以便成功地特异性地操纵细胞培养过程以微调抗体的半乳糖基化。

[0015] 本发明的一个特点是利用简单的巯基分子或化合物,诸如L-半胱氨酸,在哺乳动物细胞株(诸如CHO K1及其衍生细胞株)中,调节UDP-Gal-T的体内活性,以生产具有单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)聚糖的重组蛋白。换句话说,本发明提供体内调节葡萄糖和半乳糖构型的UDP-糖的新方法,特别是通过在哺乳动物细胞中,诸如在CHO K1及其衍生细胞株中,用两种酶UDP-Gal-T和UDP-Glc-E调节新鉴定的以及指定的转化途径,以生产具有单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)聚糖的重组蛋白。如本文实例所示,已经证明通过调节某些巯基化合物或其衍生物的相对培养基浓度,在高产率、批次或进料批次的生产过程中,可以精确控制不同抗体的半乳糖基化,而对其它糖型、其它产品质量属性或细胞培养性能的影响最小。而且,这些数据表明,可以在生产规模上精确地调节并控制复杂的动态细胞过程,以定义重组抗体产物的分子异质性和生物活性。这使我们能够了解关键的效应子的相互作用,从而以知识为基础设计细胞培养基或进料组成,以便抗体达到特定水平的半乳糖基化,同时最大限度地提高细胞增殖和生产力。

[0016] 特别地,本发明涉及具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含第一抗原结合域和第二抗原结合域,其中该第一抗原结合域包含重链可变域(VH),该重链可变域包含

[0017] (a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

[0018] (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;以及

[0019] (c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;以及

[0020] 轻链可变域(VL),该轻链可变域包含

[0021] (d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;

[0022] (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;以及

- [0023] (f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;
- [0024] 其中该第二抗原结合域包含重链可变域(VH),该重链可变域包含
- [0025] (a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;
- [0026] (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;以及
- [0027] (c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;以及
- [0028] 轻链可变域(VL),该轻链可变域包含
- [0029] (d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;
- [0030] (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;以及
- [0031] (f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;并且
- [0032] 其中该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0-29.0% (w/w)的G1和1.3-2.8% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中20.0-28.0% (w/w)的G1和1.4-2.7% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中21.0-28.0% (w/w)的G1和1.5-2.7% (w/w)的G2;并且最优选具有每个总聚糖中21.0-27.4% (w/w)的G1和1.5-2.6% (w/w)的G2。
- [0033] 优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体是抗体,其中
- [0034] (a) 第一抗原结合域包含SEQ ID NO:28的VH序列,并且第二抗原结合域包含SEQ ID NO:40的VH序列;
- [0035] (b) 第一抗原结合域包含SEQ ID NO:29的VL序列,并且第二抗原结合域包含SEQ ID NO:41的VL序列;或
- [0036] (c) 该第一抗原结合域和该第二抗原结合域包含如(a)中定义的VH序列和如(b)中定义的VL序列。
- [0037] 更优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中
- [0038] (a) 第一抗原结合域的VH序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性,第二抗原结合域的VH序列与SEQ ID NO:40的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;
- [0039] (b) 第一抗原结合域的VL序列与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性,第二抗原结合域的VL序列与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;或
- [0040] (c) 抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含如(a)中定义的第一抗原结合域和第二抗原结合域的VH序列以及如(b)中定义的第一抗原结合域和第二抗原结合域的VL序列。
- [0041] 甚至更优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体是抗体,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含
- [0042] (a) SEQ ID NO:46的第一重链和SEQ ID NO:45的第二重链
- [0043] (b) SEQ ID NO:33的第一轻链和SEQ ID NO:44的第二轻链;或
- [0044] (c) 如(a)中定义的该第一重链和该第二重链以及如(b)中定义的该第一轻链和该第二轻链。
- [0045] 最优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含
- [0046] (a) SEQ ID NO:47的第一重链和SEQ ID NO:45的第二重链
- [0047] (b) SEQ ID NO:33的第一轻链,SEQ ID NO:44的第二轻链和第三轻链;或

[0048] (c) 如(a)中定义的该第一重链和该第二重链以及如(b)中定义的该第一轻链、该第二轻链和该第三轻链。

[0049] 相同地,本发明涉及一种具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体,该抗 α -突触核蛋白抗体包含重链可变域(VH),该重链可变域包含

[0050] (a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0051] (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;以及

[0052] (c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及

[0053] 轻链可变域(VL),该轻链可变域包含

[0054] (d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

[0055] (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;以及

[0056] (f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;并且

[0057] 其中该抗 α -突触核蛋白抗体具有每个总聚糖中17.2-48.0% (w/w)的G1和3.1-15.0% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中25.4-48.0% (w/w)的G1和3.5-15.0% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中27.2-47.0%的G1和4.4-15.0%的G2;优选具有每个总聚糖中40.0-46.0% (w/w)的G1和8.4-15.0% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中41.0-45.0% (w/w)的G1和9.5-14.0% (w/w)的G2,最优选具有每个总聚糖中42.1-43.9% (w/w)的G1和10.6-13.3% (w/w)的G2。

[0058] 优选地,抗 α -突触核蛋白抗体包含

[0059] (a) SEQ ID NO:16的VH序列;

[0060] (b) SEQ ID NO:17的VL序列;或

[0061] (c) 如(a)中定义的VH序列和如(b)中定义的VL序列。

[0062] 更优选地,抗 α -突触核蛋白抗体包含

[0063] (a) VH序列,其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;

[0064] (b) VL序列,其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;或

[0065] (c) 如(a)中定义的VH序列和如(b)中定义的VL序列。

[0066] 甚至更优选地,抗 α -突触核蛋白抗体包含SEQ ID NO:20的重链和SEQ ID NO:21的轻链。

[0067] 优选地,如本发明中所公开的,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体或抗 α -突触核蛋白抗体的单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖与N-乙酰葡萄糖胺相关。

[0068] 同样地,本发明涉及用于生产本发明所公开的抗体的细胞培养基,该抗体在哺乳动物细胞中具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖,该细胞培养基包含浓度大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及浓度至少3.0g/L的葡萄糖。

[0069] 优选地,细胞培养基为化学限定培养基,优选不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基,更优选化学限定培养基,更优选不含血清、不含蛋白质不含寡肽的细胞培养基。

[0070] 同样地,本发明涉及产生如本发明中所公开的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的哺乳动物细胞,其具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖,该聚糖包含与多核苷酸具有80%同一性的序列,该多核苷酸编码第一抗原结合域的序列,并且该第一抗原结合域

的序列包含如本发明所公开的第一重链可变域 (VH) 和第二重链可变域 (VH) ;或其包含与多核苷酸具有80%同一性的序列,该多核苷酸包含编码第二抗原结合域的序列,并且该第二抗原结合域的序列包含如本发明所公开的第一轻链可变域 (VL) 和第二轻链可变域 (VL) ;或一种或多种包含此类多核苷酸的载体,其中在本发明中所公开的细胞培养基中培养所述细胞。

[0071] 优选地,哺乳动物细胞进一步包含与如本发明所公开的编码第一重链和第二重链的多核苷酸具有80%同一性的序列,或其包含与如本发明所公开的编码第一轻链和第二轻链的多核苷酸具有80%同一性的序列,或一种或多种包含此类多核苷酸的载体,其中在本发明所公开的细胞培养基中培养所述细胞。

[0072] 同样地,本发明涉及具有单半乳糖基化 (G1) 和双半乳糖基化 (G2) 聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体,其包含与如本发明所公开的编码重链可变域 (VH) 的多核苷酸具有80%同一性的序列的多核苷酸,或其包含与如本发明所公开的编码轻链可变域 (VL) 的多核苷酸具有80%同一性的序列的多核苷酸,或一种或多种包含此类多核苷酸的载体,其中在本发明中所公开的细胞培养基中培养所述细胞。

[0073] 同样地,本发明涉及一种如本发明所公开的生产具有单半乳糖基化 (G1) 和双半乳糖基化 (G2) 聚糖的抗-CD20/抗CD3双特异性抗体的方法,所述方法包括:

[0074] (a) 在如本发明所公开的细胞培养基中培养如本发明所公开的哺乳动物细胞,其中将该细胞培养基中至少大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及至少大于3.0g/L葡萄糖的浓度保持至少3天,更优选地至少4天,甚至更优选地至少5天,

[0075] (b) 分离所述抗体。

[0076] 优选地,该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0-29.0% (w/w) 的G1和1.3-2.8% (w/w) 的G2;优选具有每个总聚糖中20.0-28.0% (w/w) 的G1和1.4-2.7% (w/w) 的G2;更优选具有每个总聚糖中21.0-28.0% (w/w) 的G1和1.5-2.7% (w/w) 的G2;并且最优选具有每个总聚糖中21.0-27.4% (w/w) 的G1和1.5-2.6% (w/w) 的G2,维持该浓度对于抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的生产是有效的。

[0077] 优选地,哺乳动物细胞的培养使所述抗体的滴度增加至少20%,优选地至少30%,更优选地至少40%,更优选地至少50%,甚至更优选地至少60%,且最优选地至少80%。

[0078] 相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度。作为另一实例,相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度,哺乳动物细胞的培养导致在30%和75%之间的所述抗体的滴度增加。

[0079] 同样地,本发明涉及一种如本发明所公开的生产具有单半乳糖基化 (G1) 和双半乳糖基化 (G2) 聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体的方法,所述方法包括:

[0080] (a) 在如本发明所公开的细胞培养基中培养如本发明所公开的哺乳动物细胞,其中将该细胞培养基中至少大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及至少大于3.0g/L葡萄糖的浓度保持至少3天,更优选地至少4天,甚至更优选地至少5天,

[0081] (b) 分离所述抗体。

[0082] 优选地,该抗 α -突触核蛋白抗体具有每个总聚糖中17.2-48.0% (w/w)的G1和3.1-15.0% (w/w)的G2;具有每个总聚糖中25.4-48.0% (w/w)的G1和3.5-15.0% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中27.2-47.0%的G1和4.4-15.0%的G2;优选具有每个总聚糖中40.0-46.0% (w/w)的G1和8.4-15.0% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中41.0-45.0% (w/w)的G1和9.5-14.0% (w/w)的G2,最优选具有每个总聚糖中42.1-43.9% (w/w)的G1和10.6-13.3% (w/w)的G2,该浓度对于抗 α -突触核蛋白抗体的生产是有效的。

[0083] 优选地,哺乳动物细胞的培养使所述抗体的滴度增加至少10%,优选地至少20%,更优选地至少30%,更优选地至少40%,更优选地至少50%,更优选地至少60%,更优选地至少70%,甚至更优选地至少80%,且最优选地至少100%。

[0084] 相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度。

[0085] 优选地,哺乳动物细胞的培养产生具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体,其特征在于

[0086] (i) 使靶蛋白结合提高至少10%,优选地至少20%,更优选地至少35%,甚至更优选地至少45%,且最优选地至少50%;

[0087] (ii) 使新生儿Fc受体(FcRn)结合提高至少10%,优选地至少20%,更优选地至少33%,更优选地至少40%,且最优选地至少45%;和/或

[0088] (iii) 使Fc γ RIIa结合提高至少10%,优选地至少20%,更优选地至少36%,甚至更优选地45%,并且最优选地50%,

[0089] 相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的抗 α -突触核蛋白抗体的非单半乳糖基化(G1)和非双半乳糖基化(G2)型态。

[0090] 如本发明所公开的方法优选地包含在来自一种或多种巯基化合物的巯基基团的起始浓度至少大于3.0mM且小于10.0mM中培养哺乳动物细胞。优选地,该方法进一步包含在所述培养之前,在细胞培养基中预培养哺乳动物细胞的步骤。优选地,将该浓度保持至少5天,优选地至少7天,更优选地至少10天,甚至更优选地至少12天,且最优选地至少14天。

[0091] 优选地,以还原和/或氧化形式包含如本发明所公开的细胞培养基中来自一种或多种巯基化合物的巯基基团,更优选地,所述巯基的还原形式的浓度范围在4.0mM以上且10.0mM以下和/或所述巯基的氧化形式的浓度范围在2.0mM以上且5.0mM以下。

[0092] 优选地,如本发明所公开的方法进一步包含收获抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体或抗 α -突触核蛋白抗体。

[0093] 优选地,如本发明所公开的方法进一步包含测量抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体或抗 α -突触核蛋白抗体单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的水平。优选地,所述方法进一步包含将抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体或抗 α -突触核蛋白抗体配制成药物产品。

[0094] 优选地,如本发明所公开的细胞培养基包含至少大于4.0mM且小于等于9.0mM,优选地至少大于4.0mM且小于等于8.0mM,更优选地至少大于4.0mM且小于等于7.0mM,甚至更优选地至少大于4.0mM且小于等于6.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。

[0095] 优选地,如本发明所公开的细胞培养基包含浓度至少5.0mM且小于10.0mM,优选地

至少5.0mM且小于等于9.0mM,更优选地至少5.0mM且小于等于8.0mM,甚至更优选地至少5.0mM且小于等于7.0mM,且最优选地至少5.0mM且小于等于6.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。

[0096] 优选地,如本发明所公开的细胞培养基包含至少大于2.0g/L的葡萄糖,优选地至少大于3.0g/L的葡萄糖并且更优选地至少大于4.0g/L的葡萄糖。

[0097] 优选地,该细胞培养基包含最多13.0g/L的葡萄糖,优选地最多8.0g/L的葡萄糖,更优选地最多7.0g/L的葡萄糖,甚至更优选地最多6.0g/L的葡萄糖并且最优选地最多5.0g/L的葡萄糖。

[0098] 优选地,该细胞培养基包含在介于大于2.0g/L至至多13.0g/L之间的葡萄糖,优选地在大于2.0g/L至至多8.0g/L之间的葡萄糖,更优选地在大于2.0g/L至至多7.0g/L之间的葡萄糖,甚至更优选地在大于2.0g/L至至多6.0g/L之间的葡萄糖,并且最优选地在介于大于2.0g/L至至多5.0g/L之间的葡萄糖。

[0099] 优选地,如本发明所公开的细胞培养基中的一种或多种巯基化合物选自由以下项组成组:半胱氨酸、胱氨酸、二巯基丁二酸(succimer)、甲硫咪唑(methimazole)、半胱胺、硫唑嘌呤、硫醇嘌呤、S-甲基半胱氨酸、硒代半胱氨酸、S-磷半胱氨酸、4'-磷酸泛酸巯乙胺、丁酰硫代胆碱、羧甲基半胱氨酸、N-复硫半胱氨酸、阿立辛(alethine)、乙酰半胱氨酸、二巯丙醇、辅酶M、金巯基丁二酸钠、泛双硫醇、布西拉明(bucillamine)、甲基硒代半胱氨酸、二巯基琥珀酸(dimercaptosuccinic acid)、乙酰半胱氨酸酰胺、硫乙醇酸、2,3-二氢硫丙醇、0-甲基硫醇乙醇、氢硫乙酸,fl-巯基丙酸(fl-mercaptopropionic acid)、甲基硫醇、S-甲基硫醇乙醇(S-methylmercaptoethanol)、谷胱甘肽、谷胱甘肽衍生物及其组合。更优选地,一种或多种巯基化合物选自由以下项组成组:半胱氨酸、胱氨酸、及其组合。甚至更优选地,一种或多种巯基化合物为半胱氨酸,并且其中细胞培养基中的半胱氨酸的浓度大于4.0mM且小于10.0mM,优选地半胱氨酸的浓度至少5.0mM且小于等于6.0mM。同样优选地,一种或多种巯基化合物为胱氨酸,并且其中细胞培养基中胱氨酸的浓度大于2.0mM且小于5.0mM,优选地胱氨酸的浓度至少3.0mM且小于等于4.0mM。

[0100] 优选地,如本发明中所公开的培养哺乳动物细胞的方法在大规模形式的生物反应器中进行,优选地在10,000L的生物反应器中进行。

[0101] 同样地,本发明涉及如本发明所公开的一种具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可通过如本发明所公开的方法或哺乳动物细胞获得。

[0102] 同样地,本发明涉及如本发明所公开的一种具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体,该抗 α -突触核蛋白抗体可通过如本发明所公开的方法或哺乳动物细胞获得。

[0103] 优选地,本发明涉及如本发明所公开的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,其具有用作药物的单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖。更优选地,如本发明所公开的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体用于治疗患有B-细胞相关癌症的患者,优选地用于治疗患有慢性白血病和淋巴瘤的患者。

[0104] 同样优选地,本发明涉及用作药物的单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体。更优选地,如本发明所公开的抗 α -突触核蛋白抗体用于治疗患有

帕金森氏病的患者。

附图说明

[0105] 图1:CHO K1M中UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖型成过程中的葡萄糖转化途径。EC 2.7.7.9:UTP: α -D-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。UDP-Glc-E:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶。

[0106] 图2:CHO K1M中UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的组合相互转变途径。EC 2.7.7.9:UTP: α -D-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。UDP-Glc-E:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶。UDP-Gal-T:UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。

[0107] 图3:利用巯基化合物调节CHO K1M中UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的相互转变途径。UDP-Glc-E:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶。UDP-Gal-T:UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。

[0108] 图4:利用细胞培养基中的L-胱氨酸调节CHO K1M中UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的相互转变途径。UDP-Glc-E:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶。UDP-Gal-T:UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。

[0109] 图5:UDP-半乳糖由UDP-葡萄糖生成并且在高基式体(Golgi)中用于蛋白质的半乳糖基化。UDP-Glc-E:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶。UDP-Gal-T:UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。EC2.4.1.38: β -N-乙酰-葡萄糖胺基糖肽 β -1,4-半乳糖基转移酶。

[0110] 图6A:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO L965细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G0形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G0形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0111] 图6B:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO L965细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0112] 图6C:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO L965细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0113] 图6D:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO L965细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的产物滴度的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的产物滴度在14天的生产过程结束时的百分比。

[0114] 图6E:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO L965细胞培养生产抗 α -突触核蛋白抗体的细胞生长(IVCD)的影响。示出细胞生长(IVCD)在14天的生产过程结束时的百分比。

[0115] 图7A:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G0形态的影响。示出抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G0形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0116] 图7B:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G1形态的影响。示出抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G1形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0117] 图7C:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的产物滴度的影响。示出抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的产物滴度在14天的生产过程结束时的百分比。

[0118] 图7D:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养生产抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的细胞生长 (IVCD) 的影响。示出细胞生长 (IVCD) 在14天的生产过程结束时的百分比。

[0119] 图8A:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G0形态的影响。示出抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G0形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0120] 图8B:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G1形态的影响。示出抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的G1形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0121] 图8C:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的产物滴度的影响。示出抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的产物滴度在14天的生产过程结束时的百分比。

[0122] 图8D:在生产介质中使用5mM L-半胱氨酸或10mM L-半胱氨酸,不同浓度的L-半胱氨酸对CHO T104细胞培养生产抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体bsAB的细胞生长 (IVCD) 的影响。示出细胞生长 (IVCD) 在14天的生产过程结束时的百分比。

[0123] 图9A:使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L967细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G0形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G0形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0124] 图9B:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L967细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0125] 图9C:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L967细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0126] 图9D:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L967细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的产物滴度的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的产物滴度在14天的生产过程结束时的百分比。

[0127] 图9E:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L967细胞培养生产抗 α -突触核蛋白抗体的细胞生长 (IVCD) 的影响。示出细胞生长 (IVCD) 在14天的生产过程结束时的百分比。

[0128] 图10A:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G0形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G0形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0129] 图10B:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0130] 图10C:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0131] 图10D:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的产物滴度的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的产物滴度在14天的生产过程结束时的百分比。

[0132] 图10E:在生产介质中使用2mM L-胱氨酸或4mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸对CHO L971细胞培养生产抗 α -突触核蛋白抗体的细胞生长 (IVCD) 的影响。示出细胞生长 (IVCD) 在14天的生产过程结束时的百分比。

[0133] 图11A:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或3mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸/L-半胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G1形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0134] 图11B:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或3mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸/L-半胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的G2形态在14天的生产过程结束时的百分比。

[0135] 图11C:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或3mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸/L-半胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的FcRn相对结合水平的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的FcRn相对结合水平在14天的生产过程结束时的百分比。

[0136] 图11D:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或3mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸/L-半胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的Fc γ -RIIa (H131) 相对结合水平的影响。示出抗 α -突触核蛋白抗体的Fc γ -RIIa (H131) 相对结合水平在14天的生产过程结束时的百分比。

[0137] 图11E:在生产介质中使用6mM L-半胱氨酸或3mM L-胱氨酸,不同浓度的L-胱氨酸/L-半胱氨酸对CHO L971细胞培养中抗 α -突触核蛋白抗体的相对靶标结合的影响。示出相对靶标结合在14天的生产过程结束时的百分比。

[0138] 图12:在Fc区中的糖基化位点(#1Fc-糖基化)、Fc γ IIa和FcRn效应子结合位点(#2Fc γ IIa结合和FcRn结合)、Fab区的抗原结合位点(#4Fab-结合)以及抗体的C端修饰(#5C端变化)的示意图。

具体实施方式

[0139] 重组蛋白具有不同的糖基化模式,特别是半乳糖基化模式的重组蛋白通常通过使用哺乳动物表达系统的发酵生产过程来生产。蛋白质的翻译后糖基化,特别是半乳糖基化对于实现重要的物理化学特性和功能(诸如蛋白质溶解性、稳定性、廓清率、免疫原性和免疫效应子功能)至关重要。在这方面,重组产生的蛋白的糖基化模式,特别是半乳糖基化模式的差异,随着作为可能的预防和治疗方法产生迈向临床应用的重组蛋白,近来已成为科学界的关注焦点。糖蛋白的寡糖侧链可以影响蛋白质的功能(Wittwer与Howard, Biochem. 29 (1990) 4175-4180),并且蛋白部分之间的分子内相互作用导致蛋白质的构象并呈现三维表面(Hart, Curr. Op. Cell Biol., 4 (1992) 1017-1023; Goochee等人, Bio/Technology 9 (1991) 1347-1355; Parekh, Curr. Op. Struct. Biol. 1 (1991) 750-754)。例如,

重组蛋白的半乳糖基化状态由不同的酶调节,其中一种或多种酶在功能上的差异会对重组蛋白的半乳糖基化状态产生显著影响。在这种情况下,已经证明调节酶促UDP-糖途径对重组哺乳动物细胞(例如CHO细胞)的多种影响,其包括但不限于对细胞生长、对重组蛋白生产力和/或蛋白质质量的影响,特别是在半乳糖基化水平上。已证明对重组mAb的生物学功能的进一步影响。因此,重要的是保持重组蛋白的半乳糖基化模式,特别是那些打算用于治疗蛋白质。

[0140] 已知重组蛋白的质量,特别是治疗性蛋白诸如抗体的质量,取决于各种参数,诸如存在于培养基中的各种营养物质的浓度,因为这些营养物质(例如糖分子)作为细胞内糖核苷酸池的前驱物是糖基化所必需的。细胞中糖核苷酸浓度的变化可能会对抗体异质性产生重大影响,在批次或进料批次过程中尤其重要,在批次或进料批次过程中,必须有一致的产品质量才能达到预定的临床结果。

[0141] 因此,本发明的一个主要目的是利用巯基化合物(诸如半胱氨酸或胱氨酸)体内调节哺乳动物细胞(诸如CHO K1及其衍生细胞株)中的UDP-葡萄糖浓度以及UDP-半乳糖浓度,从而提高预定临床应用的最终产品质量。

[0142] 在这种情况下,本发明涉及糖蛋白,特别是具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的重组糖蛋白,以及产生所述糖蛋白的方式和方法。因此,如本文以及在本发明中所描述,糖蛋白可以是例如治疗性糖蛋白,诸如重组糖蛋白。因此,如本文所公开以及在本发明中所使用,糖蛋白诸如重组蛋白是可以与一种或多种聚糖结合的蛋白质。如本文所公开以及所附实例所说明,与一种或多种聚糖结合的蛋白质是指具有单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)聚糖的蛋白质。具有一种或多种聚糖的蛋白质可以具有可以与聚糖结合的几个位点。本领域普通技术人员应理解如本文所述以及在本发明中所公开的聚糖可以与蛋白质结合的潜在位点。例如,该蛋白质可包含至少一种,更优选地至少两种半乳糖基化的聚糖,并且其中半乳糖基化的聚糖可与N-乙酰葡萄糖胺结合。这类聚糖可以是单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)的。如本文所述,单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)蛋白的水平可以通过本领域普通技术人员已知的方式和方法来测量,并且如所附实例所说明。

[0143] 如本文以及在本发明中所公开,重组蛋白可以是治疗性蛋白质。这类治疗性蛋白质可以是例如抗体,但不限于此。因此,所述糖蛋白,例如抗体,可以用作药物。治疗性蛋白质可包括但不限于用于治疗B-细胞增殖性疾病(诸如非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病、帕金森氏病和相关疾病)的治疗性蛋白质。在一特定实施例中,重组蛋白可以是抗体。例如,由哺乳动物细胞产生的抗体是用于治疗的抗体或用作开发用于治疗药物的候选药物的抗体。在一实施例中,重组蛋白可以是抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体。

[0144] 所述糖蛋白,例如抗体,可以由包含编码所述糖蛋白的多核苷酸的哺乳动物细胞产生。例如,如本文以及在本发明中所述的哺乳动物细胞可以在大规模形式生物反应器中进行培养,诸如在10,000L生物反应器中进行培养。中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是生产重组治疗性蛋白质最常用的真核宿主。

[0145] 如本文以及在本发明中所描述,糖蛋白可以是抗体,诸如双特异性抗体,例如抗-CD20/抗-CD3抗体。所述抗体可以在包含一种或多种编码所述抗体的多核苷酸的载体上表达。作为另一实例,抗体可以是抗 α -突触核蛋白抗体,并且所述抗体可以亚克隆到合适的载

体中,诸如但不限于LoxP.SV40.Puro.CMV.FseI nbe或Loxfas.puro.CMV.2L.v1表达载体。用该多顺反子质体转染CHO-K1M TI宿主细胞以产生稳定的真核细胞株。如本文所用,术语“载体(vector)”是指任何遗传因子,诸如质体、噬菌体、转位子、粘粒、染色体、病毒、病毒体等,当与合适的控制元素结合时能够复制并且可以在细胞之间转移基因序列。因此,该术语包括亚克隆和表达载体,以及病毒载体。例如,本文所述的一种或多种载体可以是多顺反子载体。如本文所用,术语“多顺反子(polycistronic)”是指编码一个以上多肽链的mRNA。作为一特定的实例,可以使用一个以上的载体,其中第一载体可以表达第一轻链和第二重链,并且第二载体可以表达第二轻链和第一重链。本领域普通技术人员知道如何构建适用于表达如本文以及本发明中所述的抗体的载体。此外,为了产生重组细胞株,可以将宿主细胞与一种或多种载体共转染,其中所述载体可以包含选择标记,诸如二氢叶酸还原酶(DHFR)基因。例如,鼠类DHFR基因的表达由猿猴病毒40(SV40)早期启动子驱动,并由SV40多腺苷酸化信号(SV40 poly A)终止。

[0146] 进一步地,如本文以及本发明中所述的细胞培养基可用于产生所述糖蛋白,诸如抗体,其中该细胞培养基包含浓度大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及浓度至少3.0g/L的葡萄糖。细胞培养基为化学限定培养基,优选地为不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基。例如,典型的化学限定培养基最多可包含100种成分,这些成分可分为能源、氨基酸、维生素、微量元素和无机盐、核酸衍生物、脂肪酸以及脂质等。

[0147] 如本文所述,可通过以下方法培养产生如本文所述并由所附实例说明的糖蛋白的哺乳动物细胞。

[0148] (a) 在细胞培养基中培养哺乳动物细胞,其中将该细胞培养基中至少大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及至少3.0g/L葡萄糖的浓度保持至少3天,更优选地至少4天,且甚至更优选地至少5天,

[0149] (b) 分离所述糖蛋白。

[0150] 相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度,所述哺乳动物细胞的培养导致的所述糖蛋白的滴度增加。所述培养可额外产生如本文所述的具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的糖蛋白,其特征在于相对于哺乳动物细胞的相应培养中在不将来自一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的细胞培养基中的非单半乳糖基化(G1)和非双乳糖基化(G2)形态的糖蛋白,具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的糖蛋白的靶蛋白结合增加、新生儿Fc受体(FcRn)结合增加和/或FcγRIIa结合增加。特别地,哺乳动物细胞的培养可包括在来自一种或多种巯基化合物的巯基基团的起始浓度至少大于3.0mM且小于10.0mM中进行培养。该方法可进一步包含在所述培养之前,在细胞培养基中预培养哺乳动物细胞的步骤。

[0151] 如本文以及在本发明中所公开的细胞培养过程是指从在细胞培养基中接种细胞开始的细胞培养过程,并且可以结束于从细胞培养基中收获细胞。所述接种是指细胞培养过程的第1天,并且可以例如但不限于在细胞培养的第12、13或14天从细胞培养基中收获细胞。因此,本领域普通技术人员知道如何通过普通技术来选择适合细胞培养过程的持续时间。所附实例也对此进行了说明。如本文所公开以及在本发明中所使用的整个细胞培养过

程可以包含生长阶段以及生产阶段。如本文所述以及如本发明中所使用,来自一种或多种巯基化合物的巯基基团的浓度在细胞培养过程中保持至少5天、优选地至少7天,更优选地至少10天,甚至更优选地至少12天,且最优选地至少14天。

[0152] 如本文以及在本发明中所公开的方法可以进一步包括在细胞培养基中预培养哺乳动物细胞的步骤。所述预培养步骤可包括在细胞培养基中培养细胞,该细胞培养基含有4.0mM至10.0mM的来自如本文以及在本发明中所公开的一种或多种巯基化合物的巯基基团,或者可以不包括细胞培养基中来自一种或多种巯基化合物的所述浓度的巯基。特别地,预培养步骤的细胞培养基可以包含用于接种哺乳动物细胞的生物反应器的培养基,也可以包含不含如本文所述以及在本发明中所公开的用于接种哺乳动物细胞的生物反应器的培养基。

[0153] 来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团可以包含氧化形式和/或还原形式。所述氧化形式是指来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以“结合形式”包含在细胞培养基中,而还原形式是指来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以“游离形式”包含在细胞培养基中,这意味着该巯基包含游离的-SH基。如本文所公开以及在本发明中所使用的细胞培养基可以包含来自一种或多种巯基化合物的4mM至10mM的氧化形式和/或还原形式的巯基。例如,一种或多种巯基化合物可以是半胱氨酸、胱氨酸、二巯基丁二酸、甲硫咪唑、半胱胺、硫唑嘌呤、硫醇嘌呤、S-甲基半胱氨酸、硒代半胱氨酸、S-磷半胱氨酸、4'-磷酸泛酸巯乙胺、丁酰硫代胆碱、羧甲基半胱氨酸、N-复硫半胱氨酸、阿立辛、乙酰半胱氨酸、二巯基丙醇、辅酶M、金巯基丁二酸钠、泛双硫醇、布西拉明、甲基硒代半胱氨酸、二巯基琥珀酸、乙酰半胱氨酸酰胺、硫乙醇酸、2,3-二氢硫丙醇、O-甲基硫醇乙醇、氢硫乙酸、f1-巯基丙酸、甲基硫醇、S-甲基硫醇乙醇、谷胱甘肽、谷胱甘肽衍生物。例如,如本文所公开以及本发明中所使用的,来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团可以是半胱氨酸。作为另一实例,如本文所公开以及本发明中所使用的,在细胞培养基中的一种或多种巯基化合物可以是胱氨酸。作为又一实例,如本文所公开以及本发明中所使用的,在细胞培养基中的一种或多种巯基化合物可以是胱氨酸及半胱氨酸。

[0154] 该方法可进一步包含如本文所述测量糖蛋白诸如抗体的单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的水平。

[0155] 本领域普通技术人员理解如何测量和确定细胞培养基中一种或多种巯基化合物的巯基基团的所述浓度的方式和方法。可以通过质谱法确定巯基化合物的量,并且计算所述巯基化合物中存在的巯基的量来获得此浓度。如何测量和确定来自一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度的进一步方式和方法属于技术人员的普通技术范围。

[0156] 如本文所述的方法或细胞培养基可以包含以下来自一种或多种巯基化合物的巯基基团:例如,至少大于4.0mM且小于等于9.0mM,优选地至少大于4.0mM且小于等于8.0mM,更优选地至少大于4.0mM且小于等于7.0mM,且甚至更优选地至少大于4.0mM且小于等于6.0mM。作为另一实例,细胞培养基包含以下浓度的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团:至少5.0mM且小于10.0mM,优选地至少5.0mM且小于等于9.0mM,更优选地至少5.0mM且小于等于8.0mM,甚至更优选地至少5.0mM且小于等于7.0mM,且最优选地至少5.0mM且小于等于6.0mM。

[0157] 作为一特定的实例,一种或多种巯基化合物为半胱氨酸,并且细胞培养基中半胱

氨酸的浓度大于4.0mM且小于10.0mM,优选地半胱氨酸的浓度至少5.0mM且小于等于6.0mM。作为另一特定的实例,一种或多种巯基化合物为胱氨酸,并且细胞培养基中胱氨酸的浓度大于2.0mM且小于5.0mM,优选地胱氨酸的浓度至少3.0mM且小于等于4.0mM。

[0158] 在用于培养哺乳动物细胞的大多数化学限定细胞培养基中,葡萄糖是最常用的单一碳水化合物,因为它可以有效地运输到细胞中(Wright等人,J Exp Biol 196(1994) 197-212)。葡萄糖是一种简单的单糖。除了用作能源之外,葡萄糖还可以用作许多其它分子和结构的建构单元。为了达到这些目的,必须首先“活化(activate)”给定的单糖。该活化涉及向糖添加核苷二磷酸基团,导致形成核苷酸糖。例如,在CHO细胞中,绝大多数核苷酸糖是在葡萄糖充分表征的反应中合成的。如图1所示,D-葡萄糖转化为D-葡萄糖-1-磷酸盐。通过UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(EC 2.7.7.9)活化D-葡萄糖-1-磷酸盐,产生UDP-葡萄糖的细胞质池(Turnquist与Hansen,The Enzymes,第3版,(Boyer,P.D.,编辑)8(1973) 51-71; Chang等人,Eur.J.Biochem.236(1996) 723-728)。

[0159] 因此,如本文所述以及如本发明中所使用的细胞培养基可包含例如至少大于3.0g/L的葡萄糖,并且更优选地至少大于4.0g/L的葡萄糖。额外地,或替代地L,细胞培养基包含例如最多13.0g/L的葡萄糖,优选地最多8.0g/L的葡萄糖,更优选地最多7.0g/L的葡萄糖,甚至更优选地最多6.0g/L的葡萄糖并且最优选地最多5.0g/L的葡萄糖。作为一特定的实例,细胞培养基包含在3.0g/L至至多13g/L之间的葡萄糖,优选地在3.0g/L至至多8.0g/L之间的葡萄糖,更优选地在3.0g/L至至多7.0g/L之间的葡萄糖,甚至更优选地在3.0g/L至至多6.0g/L之间的葡萄糖,并且最优选地在3.0g/L至至多5.0g/L之间的葡萄糖。

[0160] 特别地,如本文所述以及在本发明中所公开的用于接种和细胞培养的细胞培养基可以包含3.0mM至10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团,其中所述巯基化合物可以为半胱氨酸和/或胱氨酸。例如,产生重组蛋白的细胞可以是产生抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的CHO细胞,并且可以在包含6mM半胱氨酸的细胞培养基中培养。作为另一实例,产生重组蛋白的细胞可以是产生抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的CHO细胞,并且可以在包含5mM半胱氨酸的细胞培养基中培养。作为又一实例,产生重组蛋白的细胞可以是产生抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的CHO细胞,并且可以在包含4mM胱氨酸的细胞培养基中培养。作为又一实例,产生重组蛋白的细胞可以是产生抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的CHO细胞,并且可在包含胱氨酸及半胱氨酸,诸如胱氨酸及半胱氨酸的组合浓度在4.0mM及5.0mM之间的细胞培养基中培养。

[0161] 如本文所述以及在本发明中所公开,可在包含至少大于3g/L的葡萄糖的细胞培养基中培养细胞。所述葡萄糖可以在如本文所述以及在本发明中所公开的细胞培养基接种细胞时存在,或者可以在细胞培养过程中添加,例如,在细胞培养过程的第4天和第14天之间。在一实施例中,葡萄糖可以在细胞培养过程的生产阶段中存在。

[0162] 如所附实例所说明,可在6mM半胱氨酸存在下并且在至少大于3g/L,诸如等于或大于4g/L的葡萄糖存在下培养细胞。如所附实例也说明,可在5mM半胱氨酸存在下并且在至少大于3g/L,诸如等于或大于4g/L的葡萄糖存在下培养细胞。

[0163] 如实例中所说明,可在细胞培养过程的第4天至第14天之间将葡萄糖添加到细胞培养基中。换句话说,如实例中所说明,从向细胞培养基中添加葡萄糖时起,诸如在第4天至

第14天之间,细胞培养基可包含至少大于3g/L的葡萄糖。可通过进料批次过程或灌注过程将葡萄糖添加到如本文所公开且在本发明中使用的细胞培养基中,但是将葡萄糖添加到所述细胞培养基中的方法不限于此。应当理解,细胞培养基中存在的葡萄糖浓度是指不损害细胞的生长和/或细胞对重组蛋白的产生的浓度。换句话说,选择适合于维持和/或增加细胞生长和/或细胞产生重组蛋白的葡萄糖浓度。

[0164] 如所附实例所说明,所述抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可在CHO细胞株诸如CHO K1M细胞株中产生。应当理解,如本文所述以及在本发明中所公开的重组蛋白可以在适合产生所述重组蛋白的任何哺乳动物细胞株中产生。在这种情况下,本领域普通技术人员应理解这类合适的哺乳动物细胞,并且理解如何选择这类哺乳动物细胞以产生如本文所述且在本发明中所公开的重组蛋白。所述产生重组蛋白诸如抗 α -突触核蛋白抗体或抗-CD20-CD3双特异性抗体的细胞可以包含但不限于CHO细胞、Vero细胞、BHK细胞、COS细胞以及HEK293/293T细胞。可以在化学限定细胞培养基中培养哺乳动物细胞。待使用的细胞培养基为如本文所公开的发明内容中的细胞培养基。在这方面,本领域普通技术人员理解待用于本发明的合适的并且可商购的化学限定细胞培养基,诸如但不限于DMEM。如所附实例所说明,不含血清并且化学限定培养基可用于培养哺乳动物细胞。在一实施例中,细胞培养基为化学限定培养基,优选不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基。

[0165] 如本文所公开以及所附实例所说明,哺乳动物细胞,诸如CHO细胞,可以在含有4.0mM至10mM的来自一种或多种巯基化合物(诸如半胱氨酸和/或胱氨酸的巯基)以及至少大于3g/L的葡萄糖的培养基中培养,例如长达14天。

[0166] 该方法可进一步包含如本文所述,收获糖蛋白,诸如抗体。应当理解,可以在生产阶段期间或结束时从细胞培养基中收获细胞。从而,技术人员能够选择从细胞培养基中收获细胞的合适时间点,因为这也由所附的实例说明。该方法可以进一步包含如本文所述的糖蛋白,例如抗体,配制成药物产品。

[0167] 下面在本发明方法中使用的细胞培养基的内容下所描述的所有方面,也解释了本发明中使用的细胞培养基。另外,本发明提供具有所需含量的半乳糖基化聚糖的重组蛋白,其中所述重组蛋白可至少包含单半乳糖基化聚糖,更优选地为双半乳糖基化聚糖。优选地,半乳糖基化聚糖与N-乙酰葡萄糖胺结合。下面在本发明方法中所生产的重组蛋白的内容下所描述的所有方面,也解释了本发明中所生产的细胞培养基。本发明还提供可通过本发明的方法获得的重组蛋白,如下所述。

[0168] 在这种情况下,本发明发现巯基化合物及其衍生物,例如,L-半胱氨酸和/或胱氨酸,可用于活化UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(EC 2.7.7.12)。从而,可有效地活化UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。此外,巯基化合物可用于调节UDP-糖途径,特别是在体内。例如,L-胱氨酸、L-半胱氨酸的氧化二聚体形态,可用于调节UDP-糖途径,特别是在体内。具体而言,UDP-糖途径,特别是在体内,可通过添加巯基化合物及其衍生物(诸如胱氨酸和/或半胱氨酸)来调节,以增加细胞生长、重组蛋白的生产力和/或蛋白质质量,特别是通过哺乳动物细胞培养增加重组蛋白的半乳糖基化水平。

[0169] 术语“氧化程度”是指来自一种或多种巯基化合物的可氧化巯基在细胞培养基中被氧化的程度。例如,如果巯基化合物含有单一的巯基,该巯基通过与另一个(相同或不同

的) 巯基化合物的巯基基团形成双硫键而被氧化, 则所述巯基化合物的质量增加表明巯基被氧化。氧化状态可以通过蛋白质和肽化学技术已知的指针来测量, 包括但不限于氧化残基数、质谱峰强度、质谱综合面积等测定。在本文提供的任何方面的一些实施例中, 以百分比报告氧化状态, 其中0%是指没有氧化, 而100%是指从介质中的一种或多种巯基化合物中完全氧化潜在可氧化的巯基。术语“潜在可氧化的巯基 (potentially oxidizable sulfhydryl group)”等是指介质中一种或多种巯基化合物中可发生氧化作用的巯基总量, 例如通过双硫键的形成。

[0170] 术语“未被氧化的巯基 (sulfhydryl group which is not oxidized)”等是指介质中一种或多种巯基化合物中未被氧化的巯基量。巯基化合物的质量比同一种未被氧化的巯基化合物的质量增加, 反映了巯基化合物中被氧化的巯基数目。具有氧化巯基的巯基化合物的量比没有氧化巯基的巯基化合物的量增加, 反映了氧化的程度。然后, 从具有一个或多个氧化巯基的一种或多种巯基化合物的巯基基团总量及细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团总量中, 确定来自一种或多种巯基化合物的氧化状态。

[0171] 例如, 从细胞培养基中的一种或多种巯基化合物确定巯基的氧化状态的步骤包括以下步骤: a) 确定细胞培养基中一种或多种巯基化合物的质量和量; b) 将确定的一种或多种巯基化合物的质量与一种或多种未被氧化的巯基化合物的质量进行比较, 其中一种或多种巯基化合物的质量比一种或多种未被氧化的巯基化合物的质量增加, 反映了一种或多种巯基化合物中被氧化的巯基的数量; 以及c) 根据具有至少一个氧化巯基的一种或多种巯基化合物的总量, 从而确定一种或多种巯基化合物的氧化状态, 从而确定该一种或多种巯基化合物的巯基基团总量。

[0172] 采用质谱法确定目标碎片的质量。术语“质谱法”、“MS”等是指根据离子的质荷比 (即“ m/z ”) 进行过滤、检测和测量的方法。术语“质量”和“ m/z ”在质谱分析结果中可互换使用, 除非另有说明, 所有 m/z 值均假定为单一离子化物种。术语“主要同位素质量”或“主要同位素 m/z ”是指报告的分子离子的质量, 其中考虑到每种元素最丰富的 (即, 主要的) 同位素的质量。一般来说, 一个或多个目的分子被离子化, 随后离子被引入质谱仪, 在质谱仪中, 由于磁场及电场的组合, 离子在空间的路径取决于质量 (“ m ”) 和电荷 (“ z ”)。参见, 例如, 美国专利第6,204,500号, 其名称为“Mass Spectrometry From Surfaces”; 美国专利第6,107,623号, 其名称为“Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry”; 美国专利第6,268,144号, 其名称为“DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry”; 美国专利第6,124,137号, 其名称为“Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes”; Wright等人, Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2:264-76 (1999); 以及Merchant和Weinberger, Electrophoresis 21:1164-67 (2000), 其中每一项均在此通过引用的方式全部并入。术语“综合强度 (integrated intensity)” “质谱综合面积 (mass spectral integrated area)” “综合质谱强度 (integrated mass spectral intensity)” 等是指与具有特定主同位素 m/z 的分子离子量相对应的质谱曲线下的面积, 这是本领域众所周知的。

[0173] 例如, 在“四极”或“四极离子阱”仪器中, 振荡的射频场中的离子会承受与施加在电极之间的直流电势、RF信号的振幅和 m/z 成比例的力。可以选择电压和振幅, 这样只有具有特定 m/z 的离子才会走过四极的长度, 而所有其它离子都会发生偏转。因此, 四极仪器既

可以作为“质量过滤器 (mass filter)”,也可以作为注入仪器的离子的“质量检测器 (mass detector)”。

[0174] 哺乳动物细胞中的尿苷二磷酸 (UDP) 糖

[0175] 据发现,尿苷二磷酸 (UDP) α -D-葡萄糖差向异构酶 (EC 5.1.3.2) 和UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (EC 2.7.7.12) 在哺乳动物细胞 (例如CHO细胞) 中的UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖转化途径中起着关键作用。

[0176] 如本文所用,术语“尿苷二磷酸 (UDP) α -D-葡萄糖差向异构酶”和“UDP-Glc-E”可互换使用,并且指的是一种酶,该酶是在细菌、真菌、植物以及哺乳动物细胞中发现的同源二聚差向异构酶,其属于EC 5.1.3.2类。如实施例1所示,已对CHO K1M细胞株中UDP-Glc-E的cDNA进行扩增、测序并进一步分析。

[0177] 如本文所用,术语“UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶”、“UDP-Gal-T”和“EC 2.7.7.12”可互换使用,并且是指通过可逆机制催化尿苷-5'-二磷酸葡萄糖 (UDP-葡萄糖) 与半乳糖-1-磷酸盐 (Gal-1-P) 之间的核苷酸交换,产生尿苷-5'-二磷酸半乳糖 (UDP-半乳糖) 和葡萄糖-1-磷酸盐 (Glc-1-P) 的酶。如实施例2所示,已对CHO K1M细胞株中UDP-Gal-T的cDNA进行扩增、测序并进一步分析。

[0178] 尿苷二磷酸-葡萄糖差向异构酶

[0179] UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的合成途径如图-1所示。因此,示出了从 α -D-葡萄糖型成UDP-葡萄糖的,以及随后由UDP-葡萄糖差向异构酶 (UDP-Glc-E:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶.EC 5.1.3.2) 从UDP-葡萄糖型成UDP-半乳糖的UDP-糖相互转变途径。

[0180] UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶

[0181] 进一步扩展UDP-半乳糖和UDP-葡萄糖途径,如图-2所示。因此,示出了从 α -D-葡萄糖型成UDP-半乳糖,以及随后由UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (UDP-Gal-T:UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶EC 2.7.7.12) 将UDP-半乳糖转化回UDP-葡萄糖的UDP-糖相互转变途径。

[0182] 建立UDP-葡萄糖/半乳糖转化途径

[0183] 如图2所示,UDP-Gal-T催化UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的可逆转化。然而,Wagstaff等人((2015) Carbohydrate Research 404:17-25) 发现,在某些情况下 (例如,在存在过量的葡萄糖-1-P的情况下),UDP-Gal-T主要进行逆向转化,从而调节大多数UDP-半乳糖变成UDP-葡萄糖。这种机制可能导致葡萄糖和半乳糖构型UDP糖池中的细胞内变化,从而导致细胞内UDP-半乳糖浓度降低和细胞内UDP-葡萄糖量升高。基于这些实验结果,可以进一步精确地描述这种新的UDP-葡萄糖/UDP-半乳糖途径,例如如图2所示,对于一个给定的治疗性蛋白质生产过程,使用带有过量葡萄糖的化学限定介质平台。

[0184] 具有巯基化合物的哺乳动物细胞中UDP-葡萄糖/UDP-半乳糖途径调节的新方法

[0185] 如图3所示,可以将巯基化合物及其衍生物 (诸如L-半胱氨酸和/或L-胱氨酸) 添加到细胞培养基中,以进一步活化UDP-Gal-T,并额外调节葡萄糖和半乳糖构型哺乳动物细胞 (诸如CHO K1及其衍生细胞株) 中的UDP-糖。因此,本发明人发现,通过添加一种或多种巯基化合物,可产生具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的重组蛋白。如本文所用,术语“巯基化合物 (sulfhydryl compound)”是指含有硫作为分子的组成部分的无机或有机化合物,优选地含有-SH基团的化合物;和/或最初含有-SH基团并且在还原条件下共价连接在一起

的化合物,从而形成双硫键。本发明人已经发现,在哺乳动物细胞培养生产的重组蛋白的生产过程中,一种或多种增加活细胞密度和/或产物滴度的巯基化合物对所生产的重组蛋白的半乳糖含量有直接的相关作用。在这种情况下,本发明提供控制由哺乳动物细胞培养产生的重组蛋白的半乳糖基化程度的过程。按照本文提供的方法,本领域普通技术人员能够确定精确的过程参数,这些参数可用于控制由哺乳动物细胞培养产生的重组蛋白的半乳糖含量。

[0186] 在本发明的一方面,在通过哺乳动物细胞培养产生的重组蛋白的生产过程中,可增加重组蛋白的半乳糖含量。在本发明的又一方面中,具有单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)聚糖的该重组蛋白为抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,其中该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0-29.0% (w/w)的G1和1.3-2.8% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中20.0-28.0% (w/w)的G1和1.4-2.7% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中21.0-28.0% (w/w)的G1和1.5-2.7% (w/w)的G2;并且最优选具有每个总聚糖中21.0-27.4% (w/w)的G1和1.5-2.6% (w/w)的G2。

[0187] 特别地,具有单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)聚糖的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含结合CD3的第一抗原结合域以及结合CD20的第二抗原结合域。抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含由重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成的第一抗原结合域,以及由重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成的第二抗原结合域。

[0188] 更具体地,具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含第一抗原结合域和第二抗原结合域,其中该第一抗原结合域包含重链可变域(VH),该重链可变域包含

[0189] (a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;

[0190] (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;以及

[0191] (c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列;以及

[0192] 轻链可变域(VL),该轻链可变域包含

[0193] (d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;

[0194] (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;以及

[0195] (f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;

[0196] 其中该第二抗原结合域包含重链可变域(VH),该重链可变域包含

[0197] (a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;

[0198] (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;以及

[0199] (c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;以及

[0200] 轻链可变域(VL),该轻链可变域包含

[0201] (d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;

[0202] (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;以及

[0203] (f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;并且

[0204] 其中该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0-29.0% (w/w)的G1和1.3-2.8% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中20.0-28.0% (w/w)的G1和1.4-2.7% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中21.0-28.0% (w/w)的G1和1.5-2.7% (w/w)的G2;并且最优选具有每个总聚糖中21.0-27.4% (w/w)的G1和1.5-2.6% (w/w)的G2。

[0205] 优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体是抗体,其中

[0206] (a) 第一抗原结合域包含SEQ ID NO:28的VH序列,并且第二抗原结合域包含SEQ ID NO:40的VH序列;

[0207] (b) 第一抗原结合域包含SEQ ID NO:29的VL序列,并且第二抗原结合域包含SEQ ID NO:41的VL序列;或

[0208] (c) 该第一抗原结合域和该第二抗原结合域包含如(a)中定义的VH序列和如(b)中定义的VL序列。

[0209] 更优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中

[0210] (a) 第一抗原结合域的VH序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性,第二抗原结合域的VH序列与SEQ ID NO:40的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;

[0211] (b) 第一抗原结合域的VL序列与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性,第二抗原结合域的VL序列与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;或

[0212] (c) 抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含如(a)中定义的第一抗原结合域和第二抗原结合域的VH序列以及如(b)中定义的第一抗原结合域和第二抗原结合域的VL序列。

[0213] 如本文以及在本发明中所公开,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含第三抗原结合域。例如,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含与CD20结合的第三抗原结合域。替代地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含与CD3结合的第三抗原结合域。如本文所用,关于抗原结合域等的术语“第一”、“第二”或“第三”,是用于方便区分每一类型的域何时存在多于一个。除非明确说明,否则使用此类术语并非旨在赋予特定的顺序或方向。

[0214] 例如,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包括与CD3结合的第二抗原结合域、与CD20结合的第一抗原结合域和第三抗原结合域。作为一更具体的实例,第三抗原结合域可与第一抗原结合域相同(即第一抗原结合域和第三抗原结合域可包括相同的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列)。甚至更特别地,包含第一抗原结合域和第三抗原结合域的第一Fab分子和第三Fab分子可以是相同的,并且可以具有相同的域的排列(即已知的或交换型的)。

[0215] 作为另一实例,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含与CD3结合的第一抗原结合域、与CD20结合的第二抗原结合域与第三抗原结合域。作为一更具体的实例,第三抗原结合域可与第二抗原结合域相同(即第二抗原结合域和第三抗原结合域可包括相同的重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列)。甚至更特别地,包含第二抗原结合域和第三抗原结合域的第二Fab分子和第三Fab分子可以是相同的,并且可具有相同的域的排列(即已知的或交换型的)。

[0216] 作为本文所述的更具体的实例,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含第三抗原结合域,其中第三抗原结合域包括重链可变域(VH),该重链可变域包含

[0217] (a) CDR-H1,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列;

[0218] (b) CDR-H2,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列;以及

[0219] (c) CDR-H3,其包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列;以及

[0220] 轻链可变域(VL),该轻链可变域包含

[0221] (d) CDR-L1,其包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列;

[0222] (e) CDR-L2,其包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列;以及

[0223] (f) CDR-L3,其包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列;并且

[0224] 其中该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0-29.0% (w/w) 的G1和1.3-2.8% (w/w) 的G2;优选具有每个总聚糖中20.0-28.0% (w/w) 的G1和1.4-2.7% (w/w) 的G2;更优选具有每个总聚糖中21.0-28.0% (w/w) 的G1和1.5-2.7% (w/w) 的G2;并且最优选具有每个总聚糖中21.0-27.4% (w/w) 的G1和1.5-2.6% (w/w) 的G2。

[0225] 作为甚至更具体的实例,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中第三抗原结合域可包含SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:41的VL序列。优选地,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体,其中该第三抗原结合域可包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性的VH序列,以及与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性的VL序列。

[0226] 抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第一抗原结合域可以是交换型Fab分子,其中Fab重链和Fab轻链的可变域或恒定域被交换,而第二抗原结合域和第三抗原结合域(如果存在)可以是已知的Fab分子。例如,与CD3结合的抗原结合域是交换型Fab分子,其中Fab重链和Fab轻链的可变域或恒定域被交换(即彼此取代)。作为另一更具体的实例,第一抗原结合部分(moiety)是交换型Fab分子,而第二抗原结合部分和第一抗原结合部分各自是传统的Fab分子。

[0227] “Fab分子”是指由免疫球蛋白的重链(“Fab重链”)的VH和CH1域以及轻链(“Fab轻链”)的VL和CL域组成的蛋白质。“融合”意指组分(例如Fab分子及Fc域亚基)经肽键直接或经由一个或多个肽接头连接。

[0228] “交换型(crossover)”Fab分子(亦称为“Crossfab”)意指Fab分子,其中Fab重链和Fab轻链的可变域或恒定域被交换(即彼此替换),即,交换型Fab分子包含由轻链可变域VL和重链恒定域1CH1组成的肽链(VL-CH1,在N端至C端方向中)、以及由重链可变域VH和轻链恒定域CL组成的肽链(VH-CL,在N端至C端方向)。为清楚起见,在Fab轻链和Fab重链的可变域被交换的交换型Fab分子中,包含重链恒定域1CH1的肽链在本文中称为(交换型)Fab分子的“重链”。相反地,在Fab轻链和Fab重链的恒定域被交换的交换型Fab分子中,包含重链可变域VH的肽链在本文中称为(交换型)Fab分子的“重链”。

[0229] 与此相反,“已知”Fab分子意指其自然形式(即包含由重链可变域和恒定域组成的重链(VH-CH1,在N端至C端方向)以及由轻链可变域和恒定域组成的轻链(VL-CL,在N端至C端方向))的Fab分子。

[0230] 第三Fab分子可在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基或第二亚基的N端融合。本文所使用的Fc域的“亚基”是指形成二聚体Fc域的两个多肽中的一个,即包括免疫球蛋白重链的C端恒定区的多肽,能够稳定地自我结合。例如,IgG Fc域的亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定域。

[0231] 例如,第二Fab分子和第三Fab分子各自在Fab重链的C端与Fc域的亚基中的一者的N端融合,并且第一Fab分子在Fab重链的C端与第二Fab分子的Fab重链的N端融合。更特别地,抗体基本上由第一Fab分子、第二Fab分子和第三Fab分子组成,该Fc域由第一亚基和第

二亚基以及任选地存在的一个或多个肽接头构成,其中第一Fab分子在Fab重链的C端与第二Fab分子的Fab重链的N端融合,并且第二Fab分子在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基的N端融合,并且其中第三Fab分子在Fab重链的C端与Fc域的第二亚基的N端融合(另参见EP3252078 A1,具体地是图1B、图1E、图1I及图1M,结合第[0338]段,其通过引用并入本文)。

[0232] 换句话说,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含第三抗原结合域,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第一抗原结合域在Fab重链的C端与第二抗原结合域的Fab重链的N端融合,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第二抗原结合域在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基的N端融合,并且抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第三抗原结合域在Fab重链的C端与Fc域的第二亚基的N端融合。

[0233] 第二Fab分子和第三Fab分子可直接与Fc域融合或通过肽接头与Fc域融合。例如,第二Fab分子和第三Fab分子各自通过免疫球蛋白铰链区与Fc域融合。具体地,免疫球蛋白铰链区为人IgG1铰链区,特别地,其中Fc域为IgG1 Fc域。另外,任选地,第一Fab分子的Fab轻链与第二Fab分子的Fab轻链可彼此融合。

[0234] 替代地,第一Fab分子和第三Fab分子各自在Fab重链的C端与Fc域的亚基中的一者的N端融合,并且第二Fab分子在Fab重链的C端与第一Fab分子的Fab重链的N端融合。更特别地,抗体基本上由第一Fab分子、第二Fab分子和第三Fab分子组成,该Fc域由第一亚基和第二亚基以及任选地存在的一个或多个肽接头构成,其中第二Fab分子在Fab重链的C端与第一Fab分子的Fab重链的N端融合,并且第一Fab分子在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基的N端融合,并且其中第三Fab分子在Fab重链的C端与Fc域的第二亚基的N端融合(另参见EP3252078A1,具体地是图1C、图1F、图1J和图1N,结合第[0339]段,其通过引用并入本文)。

[0235] 换句话说,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含第三抗原结合域,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第二抗原结合域在Fab重链的C端与第一抗原结合域的Fab重链的N端融合,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第一抗原结合域在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基的N端融合,并且抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第三抗原结合域在Fab重链的C端与Fc域的第二亚基的N端融合。

[0236] 第一Fab分子和第三Fab分子可直接与Fc域融合或通过肽接头与Fc域融合。例如,第一Fab分子和第三Fab分子各自通过免疫球蛋白铰链区与Fc域融合。具体地,免疫球蛋白铰链区为人IgG1铰链区,特别地,其中Fc域为IgG1 Fc域。另外,任选地,第一Fab分子的Fab轻链与第二Fab分子的Fab轻链可彼此融合。

[0237] 进一步可替代的,第一Fab分子和第二Fab分子各自在Fab重链的C端与Fc域的亚基中的一者的N端融合,并且第三Fab分子在Fab重链的C端与第一Fab分子的Fab重链的N端融合。更具体地,抗体基本上由第一Fab分子、第二Fab分子和第三Fab分子组成,该Fc域由第一亚基和第二亚基以及任选地存在的一个或多个肽接头构成,其中第三Fab分子在Fab重链的C端与第一Fab分子的Fab重链的N端融合,并且第一Fab分子在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基的N端融合,并且其中第二Fab分子在Fab重链的C端与Fc域的第二亚基的N端融合。换句话说,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含第三抗原结合域,其中抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第三抗原结合域在Fab重链的C端与第一抗原结合域的Fab重链的N端融合,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第一抗原结合域在Fab重链的C端与Fc域的第一亚基的N端融合,并且抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的第二抗原结合域在Fab重链的C端与Fc域的第二亚

基的N端融合。

[0238] 第一Fab分子和第二Fab分子可直接与Fc域融合或通过肽接头与Fc域融合。例如，第一Fab分子和第二Fab分子各自通过免疫球蛋白铰链区与Fc域融合。具体地，免疫球蛋白铰链区为人IgG1铰链区，特别地，其中Fc域为IgG1 Fc域。另外，任选地，第一Fab分子的Fab轻链和第三Fab分子的Fab轻链可彼此融合。

[0239] 如本文以及本发明使用的抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体的进一步配置可以发现，例如在EP3252078 A1中，特别是在图1中和通过引用并入本文的[0335]至[0367]段中。

[0240] 甚至更特别地，抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体，其中该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体可包含

[0241] (a) 与SEQ ID NO:47的氨基酸序列具有至少99%的序列同一性的第一重链，以及与SEQ ID NO:45的氨基酸序列具有至少99%的序列同一性的第二重链；

[0242] (b) 与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少99%的序列同一性的第一轻链，以及与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少99%的序列同一性的第二轻链和第三轻链；或

[0243] (c) 如(a)中定义的该第一重链和该第二重链以及如(b)中定义的该第一轻链、该第二轻链和该第三轻链。

[0244] 甚至更特别地，抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体为抗体，其中该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体包含

[0245] (a) SEQ ID NO:47的第一重链和SEQ ID NO:45之第二重链；

[0246] (b) SEQ ID NO:33的第一轻链，SEQ ID NO:44的第二轻链和第三轻链；或

[0247] (c) 如(a)中定义的该第一重链和该第二重链以及如(b)中定义的该第一轻链、该第二轻链和该第三轻链。

[0248] 在本发明的另一方面中，具有单半乳糖基化(G1)或双半乳糖基化(G2)聚糖的重组蛋白为抗 α -突触核蛋白抗体，其中该抗 α -突触核蛋白抗体具有每个总聚糖中17.2-48.0% (w/w)的G1和3.1-15.0% (w/w)的G2；优选具有每个总聚糖中25.4-48.0% (w/w)的G1和3.5-15.0% (w/w)的G2；优选具有每个总聚糖中27.2-47.0%的G1和4.4-15.0%的G2；优选具有每个总聚糖中40.0-46.0% (w/w)的G1和8.4-15.0% (w/w)的G2；更优选具有每个总聚糖中41.0-45.0% (w/w)的G1和9.5-14.0% (w/w)的G2，最优选具有每个总聚糖中42.1-43.9% (w/w)的G1和10.6-13.3% (w/w)的G2。

[0249] 特别地，具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体包括重链可变域(VH)，该重链可变域(VH)包括

[0250] (a) CDR-H1，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列；

[0251] (b) CDR-H2，其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列；以及

[0252] (c) CDR-H3，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；以及

[0253] 轻链可变域(VL)，该轻链可变域包含

[0254] (d) CDR-L1，其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列；

[0255] (e) CDR-L2，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列；以及

[0256] (f) CDR-L3，其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列；并且

[0257] 其中该抗 α -突触核蛋白抗体具有每个总聚糖中17.2-48.0% (w/w)的G1和3.1-15.0% (w/w)的G2；优选具有每个总聚糖中25.4-48.0% (w/w)的G1和3.5-15.0% (w/w)的

G2; 优选具有每个总聚糖中27.2-47.0%的G1和4.4-15.0%的G2; 优选具有每个总聚糖中40.0-46.0% (w/w) 的G1和8.4-15.0% (w/w) 的G2; 更优选具有每个总聚糖中41.0-45.0% (w/w) 的G1和9.5-14.0% (w/w) 的G2, 最优选具有每个总聚糖中42.1-43.9% (w/w) 的G1和10.6-13.3% (w/w) 的G2。

[0258] 更特别地, 抗 α -突触核蛋白抗体包含

[0259] (a) SEQ ID NO:16的VH序列;

[0260] (b) SEQ ID NO:17的VL序列; 或

[0261] (c) 如(a)中定义的VH序列和如(b)中定义的VL序列。

[0262] 甚至更特别地, 抗 α -突触核蛋白抗体包含

[0263] (a) VH序列, 其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性;

[0264] (b) VL序列, 其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少95%的序列同一性; 或

[0265] (c) 如(a)中定义的VH序列和如(b)中定义的VL序列。

[0266] 甚至更特别地, 抗 α -突触核蛋白抗体包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少99%的序列同一性的重链, 以及与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少99%的序列同一性的轻链。

[0267] 甚至更特别地, 抗 α -突触核蛋白抗体包含SEQ ID NO:20的重链和SEQ ID NO:21的轻链。

[0268] 相对于参考多肽序列所述的“氨基酸序列同一性百分比(%)”, 是指候选序列中氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比, 在比对序列并引入差异后(如有必要), 可实现最大的序列同一性百分比, 并且不考虑将任何保守性替换作为序列同一性的一部分。为确定氨基酸百分比序列同一性的目的而进行的比对可通过本领域中技术范围内的各种方式实现, 例如, 使用公开可获得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域的技术人员可确定用于比对序列的合适参数, 包括在所比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法。然而, 出于本文的目的, 使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%。ALIGN-2序列比较计算机程序由建南德克公司编写, 源代码已与用户文文件一起存盘于美国版权局, 华盛顿特区, 20559, 并以美国版权注册号TXU510087进行注册。ALIGN-2程序可从加利福尼亚南旧金山的建南德克公司公开获得, 或者可从所述源代码编译。ALIGN-2程序应经编译以在UNIX操作系统上使用, 该操作系统优选数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置并且不变。在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下, 给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(其任选地表述为给定氨基酸序列A, 其与给定氨基酸序列B具有或包含一定的氨基酸序列同一性%), 计算如下: X/Y分数的100倍, 其中X是序列比对程序ALIGN-2在A与B程序比对中评分为同一匹配的氨基酸残基数, Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解的是, 在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下, A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另有特别说明, 否则如前一段所述, 使用ALIGN-2计算机程序获得本文使用的所有氨基酸序列同一性%。

[0269] 通过与本发明的参考核苷酸序列具有至少例如95%的“同一性”的核苷酸序列的核酸或多核苷酸, 意指该多核苷酸的核苷酸序列与参考序列具有同一性, 除了参考核苷酸序列的每100个核苷酸, 多核苷酸序列最多可包含五个点突变。换句话说, 为了获得与参考

核苷酸序列具有至少95%的同一性的核苷酸序列的多核苷酸,可删除参考序列中最多5%的核苷酸或用另一个核苷酸取代,或者将参考序列中核苷酸总数最多5%的核苷酸数插入到参考序列中。参考序列的这些改变可能发生在参考核苷酸序列的5'端或3'端位置或这些末端位置之间的任何位置,既散布在参考序列的残基之间,也散布在参考序列内的一个或多个连续基团中。实际上,可使用已知的计算机程序常规地确定任何特定的多核苷酸序列是否与本发明的核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,诸如如上讨论的用于多肽的程序(例如,ALIGN-2)。

[0270] 优选地,如本发明中所公开的,抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体或抗 α -突触核蛋白抗体的单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖与N-乙酰葡萄糖胺相关。

[0271] 如本文所用,术语“细胞培养基(cell culture medium)”和“培养基(culture medium)”可互换使用,并且是指用于培养哺乳动物细胞的营养液,通常可提供以下类别中的一种或多种的至少一种成分:1) 能量来源,通常以碳水化合物的形式,诸如葡萄糖;2) 所有必需氨基酸,通常是二十种氨基酸加半胱氨酸的基本集合;3) 低浓度所需的维生素和/或其它有机化合物;4) 游离脂肪酸;以及5) 微量元素,其中微量元素是指通常需要的浓度很低,通常在微摩尔范围内的无机化合物或天然存在的元素。必要的成分,诸如某一特定细胞株的生长因子,很容易根据经验确定,而无需进行过多的实验,例如在Mammalian Cell Culture (Mather, J.P. 编辑, Plenum Press, N.Y. [1984]), 以及Barnes与Sato. (1980) Cell. 22:649) 中所述。

[0272] 如本文以及本发明所公开,用于产生具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗体的细胞培养基是一种包含浓度大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及浓度至少大于3.0g/L的葡萄糖的细胞培养基。

[0273] 在本发明的一优选的方面中,如本发明中所公开的细胞培养基包含至少大于4.0mM且小于等于9.0mM,优选地至少大于4.0mM且小于等于8.0mM,更优选地至少大于4.0mM且小于等于7.0mM,并且甚至更优选地至少大于4.0mM且小于等于6.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。

[0274] 在另一优选的方面中,如本发明中所公开的细胞培养基包含浓度至少5.0mM且小于10.0mM,优选地至少5.0mM且小于等于9.0mM,更优选地至少5.0mM且小于等于8.0mM,甚至更优选地至少5.0mM且小于等于7.0mM,且最优选地至少5.0mM且小于等于6.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。

[0275] 替代地(例如,在半胱氨酸和/或胱氨酸的情况下),细胞培养基包含在大于0.7g/L且小于等于1.2g/L之间,优选地在大于0.7g/L且小于等于1.1g/L之间,更优选地在大于0.7g/L且小于等于1.0g/L之间,更优选地在大于0.7g/L且小于等于0.9g/L之间,甚至更优选地在大于0.7g/L且0.8g/L之间的一种或多种巯基化合物。

[0276] 如本发明中所公开的细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团以还原和/或氧化的形式包含。例如,所述巯基的还原形式的范围在大于4.0mM至小于10.0mM之间和/或所述巯基的氧化形式的浓度在大于2.0mM至小于5.0mM之间。

[0277] 如本文以及本发明中所公开,一种或多种巯基化合物可以选自由以下项组成组:半胱氨酸、胱氨酸、二巯基丁二酸、甲硫咪唑、半胱胺、硫唑嘌呤、硫醇嘌呤、S-甲基半胱氨酸、硒代半胱氨酸、S-磷半胱氨酸、4'-磷酸泛酸巯乙胺、丁酰硫代胆碱、羧甲基半胱氨酸、N-

复硫半胱氨酸、阿立辛、乙酰半胱氨酸、二巯基丙醇、辅酶M、金硫基丁二酸钠、泛双硫醇、布西拉明、甲基硒代半胱氨酸、二巯基琥珀酸、乙酰半胱氨酸酰胺、硫乙醇酸、2,3-二氢硫丙醇、0-甲基硫醇乙醇、氢硫乙酸、L-巯基丙酸、甲基硫醇、S-甲基硫醇乙醇、谷胱甘肽、谷胱甘肽衍生物、及其组合。优选地，一种或多种巯基化合物选自由以下项组成组：半胱氨酸、胱氨酸、及其组合。

[0278] 特别地，一种或多种巯基化合物可以选自由以下项组成组：半胱氨酸、胱氨酸、及其组合。例如，一种或多种巯基化合物为半胱氨酸，并且细胞培养基中半胱氨酸的浓度大于4.0mM且小于10.0mM，优选地半胱氨酸的浓度至少5.0mM且小于等于6.0mM。

[0279] 替代地（例如，在半胱氨酸和/或胱氨酸的情况下），用于在哺乳动物细胞中生产具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的重组蛋白的细胞培养基包含0.5g/L至1.2g/L，优选地0.6g/L至1.2g/L的一种或多种巯基化合物。

[0280] 如本文以及本发明所述，细胞培养基可包含至少大于3.0g/L的葡萄糖，并且更优选地至少大于4.0g/L的葡萄糖。替代地，细胞培养基可包含最多13.0g/L的葡萄糖，优选地8.0g/L的葡萄糖，更优选地最多7.0g/L的葡萄糖，甚至更优选地最多6.0g/L的葡萄糖且最优选地最多5.0g/L的葡萄糖。特别地，如本文以及本发明所述，细胞培养基可包含在大于3.0g/L与13g/L之间的葡萄糖，优选地在大于3.0g/L至至多8.0g/L之间的葡萄糖，更优选地在大于3.0g/L至至多7.0g/L之间的葡萄糖，甚至更优选地在大于3.0g/L至至多6.0g/L之间的葡萄糖，并且最优选地在大于3.0g/L至至多5.0g/L之间的葡萄糖。

[0281] 正如本领域普通技术人员所认识的，用于培养重组蛋白生产的细胞的基础培养基和进料培养基，以及其它变量（诸如进料期程、生长速度、温度及氧气水平），可影响表达蛋白质的产量和质量。优化这些条件的方法在技术人员知识范围内；示例性的条件在本文的实例中列出。如本文以及本发明中所述，细胞培养基为化学限定培养基，优选地为不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基。

[0282] 在近代史上，已经广泛开发和发表化学限定培养基，包括这类培养哺乳动物细胞的培养基。定义的培养基的所有成分均具有良好的特性，并且此类培养基不含复杂的添加剂，诸如血清和水解产物。通常情况下，这些培养基包括确定数量的纯化的生长因子、蛋白质、脂蛋白以及其它物质，这些物质可由血清或提取物补充提供。生产这种培养基的唯一目的是支持高产率的细胞培养。某些定义的培养基可以称为低蛋白培养基，或者如果不包括低蛋白培养基的典型成分胰岛素及转铁蛋白，则可不含蛋白质。不含血清的培养基也可用于本发明的方法中。这类培养基通常不含血清或蛋白质组分，但可能含有未限定的成分。市售培养基的实例包括Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 及Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) 以及由Life Technologies出售的化学限定培养基和进料补充剂。任何此类培养基均可根据需要补充激素和/或其它生长因子（诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子）；盐类（诸如氯化钠、钙、镁及磷酸盐）、缓冲液（诸如HEPES）；核苷（诸如腺苷及胸苷）、抗生素（诸如GENTAMYCIN™）以及葡萄糖或等效能源。对于特定细胞株，培养基所需的营养物质和生长因子，包括其浓度，是根据经验确定的并且无需进行过多的实验，例如在Mammalian Cell Culture, Mather (Plenum Press: NY 1984)；Barnes与Sato, Cell 22 (1980) 649或Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach M. Butler (IRL Press, 1991) 中所述。合适的培养

基包含基础培养基成分,诸如基于DMEM/HA F12的配方,具有一些成分的改进浓度,诸如氨基酸、盐类、糖类和维生素,并且任选地包含甘氨酸、次黄嘌呤、胸苷、重组人胰岛素、水解蛋白胨,诸如PRIMATONE HS™或PRIMATONE RL™ (Sheffield, England) 或等效物、细胞保护剂,诸如PLURONIC F68™或等效的普朗尼克多元醇(pluronic polyol)和GENTAMYCIN™。

[0283] 在本发明的另一方面,细胞培养基为化学限定培养基,优选地为不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基;并且细胞培养基包含4.0mM至10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。在另一优选的方面中,细胞培养基为化学上限定的培养基,优选地为不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽的细胞培养基;并且该细胞培养基包含至少大于4.0mM且小于等于9.0mM,优选地至少大于4.0mM且小于等于8.0mM,更优选地至少大于4.0mM且小于等于7.0mM,甚至更优选地至少大于4.0mM且小于等于6.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。在本发明的又一优选的方面中,细胞培养基为化学上限定的培养基,优选地为不含血清、不含蛋白质和/或不含寡肽之细胞培养基;并且该细胞培养基包含至少5.0mM且小于10.0mM,优选地至少5.0mM且小于等于9.0mM,更优选地至少5.0mM且小于等于8.0mM,甚至更优选地至少5.0mM且小于等于7.0mM,且最优选地至少5.0mM且小于等于6.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。

[0284] 如上所述,计算出的一种或多种巯基化合物在商业培养基中的浓度,如果这些培养基中补充了复杂的成分,诸如血清或蛋白胨,那么这些培养基的浓度将会改变。当本发明的方法包括通过向培养基中添加这些巯基化合物来调整培养基中的一种或多种巯基化合物的浓度时,可以使用本文所提供的任何巯基化合物,并且适当添加到生产重组蛋白的培养基中。

[0285] 图3示出利用巯基化合物调节CHO K1中UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖的相互转变途径。如图3所示,通过添加巯基化合物(诸如L-半胱氨酸),以刺激UDP-Gal-T,更多的UDP-半乳糖可能被转化为UDP-葡萄糖,因此更少的UDP-半乳糖留在细胞质中。如图4所示,通过在细胞培养基中添加L-胱氨酸,而不是L-半胱氨酸,用L-半胱氨酸刺激UDP-Gal-T酶活性的效果可能会在细胞质中减弱。另一方面,L-胱氨酸摄取量的增加可能为调节细胞存活和改善UDP-半乳糖代谢过程提供更有效的氧化还原系统。

[0286] 本发明的另一方面是利用简单的巯基分子,诸如L-半胱氨酸和/或胱氨酸,在体内调节哺乳动物细胞,诸如CHO K1及其衍生物细胞株中的细胞内UDP-葡萄糖浓度和UDP-半乳糖浓度。例如,可以在培养基中添加L-胱氨酸,以在体内调节CHO K1的细胞内UDP-葡萄糖浓度和UDP-半乳糖浓度。这样一来,最终产品的数量和质量就可以得到控制和提高,以满足预定的临床应用。

[0287] 调节UDP-葡萄糖/UDP-半乳糖途径,以控制产物糖基化和细胞培养过程

[0288] 如图5所示,在糖基转移酶催化的不同半乳糖基化反应中,UDP-半乳糖作为半乳糖基供体。例如,UDP- α -D-半乳糖:N-乙酰- β -D-葡萄糖胺基糖肽-4- β -半乳糖基-转移酶(EC 2.4.1.38)通过将半乳糖基从UDP-半乳糖转移到GlcNAc,催化Gal β 1-4GlcNAc连接的形成(Qasba等人,Curr. Drug. Targets. 9 (2008) 292-309)。

[0289] 细胞质中L-半胱氨酸的增加可能会刺激UDP-Gal-T酶将更多的UDP-半乳糖转化为UDP-葡萄糖,导致细胞质中的UDP-半乳糖池减少,以供随后的半乳糖基化反应使用。另一方面,在细胞培养基中存在L-胱氨酸,而不是L-半胱氨酸,L-胱氨酸通过系统 x_c^- 运输到细胞

中。随着L-胱氨酸摄取量的增加,酶UDP-Gal-T的刺激可能会减弱,从而使细胞质中的UDP-半乳糖池达到平衡,以供随后的半乳糖基化反应使用。

[0290] 根据本发明,控制一种或多种巯基化合物的浓度以影响哺乳动物细胞产生的重组蛋白的半乳糖基化模式。可根据培养的特定宿主细胞和所生产的重组蛋白的所需半乳糖基化模式,使用并修饰具有巯基的一种或多种巯基化合物的浓度,其范围在约4mM至10mM之间。为了生产出具有所需半乳糖基化模式的蛋白质,选择一种或多种巯基化合物的浓度,提供了重组蛋白的恒定均匀的半乳糖基化模式。为了增加重组蛋白的半乳糖基化含量,一般来说,较低的浓度可以提供增强的半乳糖基化含量,同时保持哺乳动物宿主细胞培养的生存力。一般来说,使用一种或多巯基化合物,诸如半胱氨酸和/或胱氨酸,其巯基的浓度在约4mM至10mM之间,优选地约5mM至10mM之间。更优选地,使用的浓度在约至少5.0mM与小于等于9.0mM之间,更优选地在约至少5.0mM与小于等于8.0mM之间,甚至更优选地在约至少5.0mM与小于等于7.0mM之间,且最优选地在约至少5.0mM与小于等于6.0mM之间。替代地(例如,在半胱氨酸和/或胱氨酸的情况下),使用的浓度在约至少0.6g/L与小于等于1.1g/L之间,更优选地在约至少0.6g/L与小于等于1.0g/L之间,更优选地在约至少0.6g/L与小于等于0.9g/L之间,甚至更优选地在约至少0.6g/L与小于等于0.8g/L之间,并且最优选地在约至少0.6g/L与小于等于0.7之间。

[0291] 如本文所用,术语“浓度(concentration)”相对于一种或多种巯基化合物是指在培养基内组成的所有巯基化合物的总浓度。如本文所用,术语“浓度”相对于巯基是指在培养基内组成的所有巯基化合物的总浓度。在这种情况下,巯基指的是-SH(在此也称为[-SH]),也可以指的是已经发生反应的巯基,其中氢从巯基的硫原子解离,并且所述硫原子与另一个发生过所述反应的巯基形成S-S键。换句话说,术语“巯基”也包括已连接的巯基,例如,通过双硫键连接。浓度可以是测量的或可测量的,或也可以是被计算的或可计算的浓度的巯基化合物在给定时间点上在围绕细胞的介质中的浓度。测量这些巯基化合物在介质中的浓度的方法在技术上是已知的。这类方法的实例包括PCI-MS(德国伯布林安捷伦)。因此,浓度也是指在培养过程中在围绕细胞的培养基中所包含的巯基化合物的量,因此是各巯基化合物在特定时间点的实际浓度。该浓度可通过分析来确定,并可通过例如将巯基化合物引入培养物(通过称重、通过从预培养物中转移细胞和介质、通过引入杂质、通过浸出等)、通过从细胞释放(例如通过细胞死亡或通过活性分泌)、通过细胞吸收以及其它因素而产生。

[0292] 如本发明中所使用的,与不包含升高水平的一种或多种巯基化合物的细胞培养基相比,该细胞培养基包含升高水平的一种或多种巯基化合物。

[0293] 特别地,本发明涉及一种生产糖蛋白的方法,诸如重组蛋白或抗体,特别是抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体或抗 α -突触核蛋白抗体,其中所述方法包括

[0294] (a) 在如本文所述的细胞培养基中培养如本文所述的哺乳动物细胞,其中将该细胞培养基中至少大于4.0mM且小于10.0mM的来自一种或多种巯基化合物的巯基基团以及至少大于3.0g/L葡萄糖的浓度保持至少3天,更优选地至少4天,甚至更优选地至少5天,

[0295] (b) 分离所述抗体。

[0296] 在本发明的方法中,相对于使用不包含升高水平的一种或多种巯基化合物的介质产生的重组蛋白的相应水平,重组蛋白具有增加的单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖水

平。如在本发明的方法中所使用的,重组蛋白具有增加的单半乳糖基化或双半乳糖基化的聚糖水平至少3%,更优选地至少5%,甚至更优选地至少10%。如在本发明的方法中所使用的,相对于使用不包含升高水平的一种或多种巯基化合物的介质产生的相应重组蛋白的滴度,增加了所产生的重组蛋白的滴度。优选地,所产生的重组蛋白的滴度为至少2000mg/L。

[0297] 如在本发明的方法中所使用的,相对于在不包含升高水平的一种或多种巯基化合物的介质中的细胞的相应活细胞密度,增加了细胞培养基中的细胞的活细胞密度。优选地,细胞培养基中的最大活细胞密度至少约为 120×10^5 细胞/mL。

[0298] 例如,重组蛋白可为抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体,该抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体具有每个总聚糖中19.0-29.0% (w/w)的G1和1.3-2.8% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中20.0-28.0% (w/w)的G1和1.4-2.7% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中21.0-28.0% (w/w)的G1和1.5-2.7% (w/w)的G2;并且最优选具有每个总聚糖中21.0-27.4% (w/w)的G1和1.5-2.6% (w/w)的G2。相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度,所述哺乳动物细胞的培养可使所述抗体的滴度增加至少20%,优选地至少30%,更优选地至少40%,更优选地至少50%,甚至更优选地至少60%,且最优选地至少80%。

[0299] 作为另一实例,重组蛋白可为抗 α -突触核蛋白抗体,该抗 α -突触核蛋白抗体具有每个总聚糖中17.2-48.0% (w/w)的G1和3.1-15.0% (w/w)的G2;具有每个总聚糖中25.4-48.0% (w/w)的G1和3.5-15.0% (w/w)的G2;优选具有每个总聚糖中27.2-47.0%的G1和4.4-15.0%的G2;优选具有每个总聚糖中40.0-46.0% (w/w)的G1和8.4-15.0% (w/w)的G2;更优选具有每个总聚糖中41.0-45.0% (w/w)的G1和9.5-14.0% (w/w)的G2,最优选具有每个总聚糖中42.1-43.9% (w/w)的G1和10.6-13.3% (w/w)的G2。相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度,所述哺乳动物细胞的培养可使所述抗体的滴度增加至少10%,优选地至少20%,更优选地至少30%,更优选地至少40%,更优选地至少50%,更优选地至少60%,更优选地至少70%,甚至更优选地至少80%,且最优选地至少100%。作为另一实例,相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的滴度,所述哺乳动物细胞的培养导致在9.0%与75%之间的所述抗体的滴度增加。

[0300] 进一步地,所述哺乳动物细胞的培养产生具有单半乳糖基化(G1)和双半乳糖基化(G2)聚糖的抗 α -突触核蛋白抗体,其特征在于

[0301] (i)使靶蛋白结合提高至少10%,优选地至少20%,更优选地至少35%,甚至更优选地至少45%,且最优选地至少50%;

[0302] (ii)使新生儿Fc受体(FcRn)结合提高至少10%,优选地至少20%,更优选地至少33%,更优选地至少40%,且最优选地至少45%;和/或

[0303] (iii)使Fc γ RIIa结合提高至少10%,优选地至少20%,更优选地至少36%,甚至更优选地45%,并且最优选地50%,

[0304] 相对于在相应培养中不将来自细胞培养基中的一种或多种巯基化合物的巯基基团浓度保持在至少大于4.0mM且小于10.0mM的哺乳动物细胞的抗 α -突触核蛋白抗体的非单半乳糖基化(G1)和非双半乳糖基化(G2)型态。

[0305] 本文所用的“重组蛋白”或“重组表达蛋白”是指从宿主细胞中表达的蛋白质,该蛋白质为该表达目的而操作的。操作包括一个或多个遗传修饰,诸如引入一个或多个编码待表达蛋白的异源基因。异源基因可编码该细胞正常表达的蛋白质,也可编码宿主细胞外源蛋白质。操作可以交替地是上调或下调一个或多个内源基因。如在本发明中所使用,重组蛋白具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖。如本文所用,重组蛋白的术语“聚糖”是指糖蛋白。如本文所用,“糖蛋白”一般指具有超过约十个氨基酸和至少一个寡糖侧链的肽和蛋白质。该糖蛋白可以是与宿主细胞同源的,或者优选地是与被利用的宿主细胞异源的,即外源的,诸如由中国仓鼠卵巢(CHO)细胞产生的人蛋白。优选地使用哺乳动物糖蛋白(最初来自哺乳动物生物体的糖蛋白),更优选地使用直接分泌到介质中的糖蛋白。哺乳动物糖蛋白的实例包括诸如细胞因子及其受体的分子、以及包含细胞因子或其受体的嵌合蛋白,其包括例如肿瘤坏死因子 α 和肿瘤坏死因子 β 、其受体及其衍生物;生长激素,其包含人生长激素和小牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素:促甲状腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;卵泡刺激素;降钙素;黄体激素;升糖素;凝血因子,诸如VIII因子、IX因子、冯威里氏因子;抗凝血因子,诸如蛋白C;心房利尿钠因子;肺泡表面活性剂;纤维蛋白溶酶原活化剂,诸如尿激酶或人尿液或组织型纤维蛋白溶酶原活化剂(t-PA);铃蟾素;凝血酶;造血生长因子;脑啡肽酶;RANTES (Regulated on Activation Normally T-cell Expressed and Secreted);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1-alpha);血清白蛋白,诸如人血清白蛋白;谏勒抑制物质;松弛素A链;松弛素B链;前松弛素;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,诸如 β -内酰胺酶;DNase;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体:整合素;蛋白质A或D;类风湿因子;神经营养因子,诸如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经促素-3、神经促素-4、神经促素-5或神经促素-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)或神经生长因子,诸如NGF- β ;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,诸如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),诸如TGF- α 和TGF- β ,其包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;类胰岛素生长因子-I及类胰岛素生长因子-II(IGF-I及IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、类胰岛素生长因子结合蛋白;CD蛋白,诸如CD-3、CD-4、CD-8和Cd-19;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨成形性蛋白质(BMP);干扰素,诸如 α -干扰素、 β -干扰素及 γ -干扰素;集落刺激因子(CSF),例如M-CSF、GM-CSF及G-CSF;白介素(ILs),例如IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰退加速因子;病毒抗原,诸如例如AIDS包膜的一部分;运输蛋白;归巢受体;寻址蛋白;调节蛋白;抗体;嵌合蛋白,诸如免疫黏附素,以及任何上述多肽的片段。如本文所用,关于糖蛋白的“半乳糖基化”是指包含一个或多个半乳糖残基的糖蛋白,其产生G1和G2糖结构。例如,具有单半乳糖基化或双半乳糖基化的聚糖的半乳糖基化的重组蛋白,其含有一个或多个唾液酸残基,诸如GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂Gal₁、GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂Gal₂、GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂GalSia₁、GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂Gal₂Sia₁和GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂Gal₂Sia₁。

[0306] 在本发明所使用的一方面,重组蛋白为抗体。如本文所用,术语“抗体(Ab)”是指免疫球蛋白分子或免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即包含抗原结合位点的分子,诸如无论是自然产生的、部分合成产生的还是全合成产生的Fab或F(ab')₂片段。术语“抗体”以最广义使用且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体或完整的单克隆抗体)、具有多表位特异性的抗体组成物、多克隆抗体、多价抗体(通

常经过工程改造具有三个或多个抗原结合位点),由至少两个完整抗体、双抗体及单链分子(诸如scFv分子)形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)以及抗体片段(例如Fab、F(ab')₂以及Fv),只要它们表达出所需的抗原结合活性即可。多特异性抗体为对至少两个不同位点(即不同抗原上的不同表位或同一抗原上的不同表位)具有结合特异性的单克隆抗体。多特异性抗体可制成全长抗体或抗体片段。

[0307] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达两个具有不同特异性的免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein及Cuello,Nature 305:537(1983))以及“杵臼”(knob-in-hole)工程(参见例如美国专利第5,731,168号,以及Atwell等人J.Mol.Biol.270:26(1997))。多特异性抗体也可以通过如下方法来制备:工程化静电操纵效应以制备抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004);交联两个或更多个抗体或片段(参见例如美国专利第4,676,980号,以及Brennan,M.等人,Science229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如Kostelny,等人,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992);及WO 2011/034605);使用常用轻链技术规避轻链错配问题(参见例如WO 98/50431);使用「双抗体」技术制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber,M.等人,,J.Immunol.,152:5368(1994));以及按照例如Tutt等人,J.Immunol.,147:60(1991)所述的方法制备三特异性抗体。

[0308] 抗体的定义中包括抗体共轭物,诸如抗体药物共轭物(ADC)或与例如标记元素共轭的抗体。在抗体的定义中进一步包括与特定靶蛋白有足够亲和力结合的抗体,使得该抗体作为诊断和/或治疗剂在靶向特定蛋白质时是有用的。例如,抗体可以是能够以足够的亲和力结合 α 突触核蛋白的抗- α 突触核蛋白抗体,使得该抗体可用作靶向 α 突触核蛋白的诊断和/或治疗剂。

[0309] 作为另一实例,抗体可以是能够以足够的亲和力结合CD20-CD3的抗-CD20/抗-CD3抗体,使得该抗体可用作靶向CD20-CD3的诊断和/或治疗剂。在一个方面,抗体与无关、非靶蛋白质结合的程度低于该抗体与靶标结合约10%,其通过例如表面电浆共振(SPR)测量。在某些方面,结合至目标抗体的解离常数(K_D)是 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8} 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9} 至 10^{-13}M)。当抗体的 K_D 为 $1\mu\text{M}$ 或更小时,称该抗体与目标“特异性结合”。在某些方面,抗体与来自不同物种的目标中的保守的目标的表位结合。在本发明所使用的另一方面,重组蛋白为治疗性蛋白。例如,当重组蛋白为抗体时,该抗体可以为一种治疗有效的抗体,并且可以与任何蛋白结合,其包括血管生成素家族的成员,诸如Ang1、Ang2、Ang3和Ang4以及血管生成素家族成员的双特异性抗体,例如,VEGF,诸如Ang2/VEGF;HER受体家族的成员,诸如HER1(EGFR)、HER2、HER3和HER4;CD蛋白诸如CD3、CD4、CD8、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44和CD52;细胞粘附分子,诸如LFA-1、VLA04、ICAM-1、VCAM和整合素,包含 α 亚基或 β 亚基(例如抗CD11 α 、抗CD18或抗CD11 β 抗体);生长因子,诸如血管内皮生长因子(VEGF);细胞因子受体,诸如胸腺基质淋巴细胞生成素受体(TSLP-R);IgE;血型抗原;flk2/flt3受体;肥胖(OB)受体和蛋白C。其它示例性蛋白质包括生长激素(GH),其包含人生长激素(hGH)和小牛生长激素(bGH);生长激素释放因子;甲状旁腺激素;甲状腺刺激激素;脂蛋白;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原,促卵泡激素;降钙素;黄体激素;升糖素;凝血因子,诸如VIII因子;

组织因子 (TF) ; 血管性血友病因子; 心房利尿钠因子; 肺泡界面活性剂; 纤维蛋白溶酶原活化剂, 诸如尿激酶或组织型纤溶酶原活化物 (t-PA)、哌嗪、凝血酶、肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ; 脑啡肽酶; RANTES (Regulated on Activation Normally T-cell Expressed and Secreted); 人巨噬细胞炎性蛋白 (MIP-1- α); 血清白蛋白, 诸如人血清白蛋白 (HSA); 嘌呤抑制物质; 松弛素A链、松弛素B链; 前松弛素; 小鼠促性腺激素相关肽; DNase; 抑制素; 活化素; 激素或生长因子的受体; 蛋白质A或D; 成纤维细胞活化蛋白 (FAP); 癌胚抗原 (CEA); 类风湿因子; 神经营养因子, 诸如骨源性神经营养因子 (BDNF); 神经促素-3、神经促素-4、神经促素-5或神经促素-6 (NT-3、NT-4、NT-5或NT-6) 或神经生长因子, 诸如NGF- β ; 血小板衍生生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子, 诸如aFGF和bFGF; 表皮生长因子 (EGF) 和表皮生长因子受体 (EGFR); 转化生长因子 (TGF), 诸如TGF- α 和TGF- β , 其包含TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4或TGF- $\beta\delta$; 类胰岛素生长因子-1和类胰岛素生长因子-II (IGF-I及IGF-II); des (1-3)-IGF-1 (脑IGF-I); 类胰岛素生长因子结合蛋白 (IGFBP); 促红细胞生成素 (EPO); 血小板生成素 (TPO); 骨诱导因子; 免疫毒素; 骨成形性蛋白质 (BMP); 干扰素 (干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ); 集落刺激因子 (CSF) 例如M-CSF、GM-CSF和G-CSF; 白介素 (ILs), 例如IL-1至IL-10及IL-17; 超氧化物歧化酶; T细胞受体; BlyS (Br3) 受体; Br3-Fc免疫黏附素; Apo-2受体; Fc受体; 表面膜蛋白; 衰退加速因子 (DAF); 病毒抗原, 诸如AIDS包膜的一部分; 运输蛋白; 归巢受体; 寻址蛋白; 调节蛋白; 免疫黏附素; 以及任何上述物质的生物活性片段或变体。替代地, 该抗体可以是针对乳腺上皮细胞或结合结肠癌细胞的抗体、抗EpCAM抗体、抗Gp11b/111a抗体、抗RSV抗体、抗CMV抗体、抗HIV抗体、抗肝炎抗体、抗CA 125抗体、抗人肾细胞癌抗体、抗人结直肠肿瘤抗体、抗人黑色素瘤抗体R24定向GD3神经节苷脂、抗人鳞状细胞癌、抗人白细胞抗原 (HLA) 抗体、抗HLA DR抗体。

[0310] 如本文所用, 术语“抗原 (antigen)”和“表位 (epitope)”可互换使用并且是指抗原上的蛋白质结合或非蛋白质结合抗体结合部分的位点 (例如, 氨基酸的连续延伸或由非连续氨基酸的不同区域构成的构象构型), 以形成抗体结合部分-抗原复合物。因此, 表位为抗原被抗体结合的区域。表位可由连续的氨基酸延伸形成 (线性表位) 或包含非连续的氨基酸 (构象表位), 例如, 由于抗原的折叠, 即通过蛋白抗原的三级折叠而在空间上接近。线性表位通常在蛋白抗原暴露于变性剂后仍被抗体结合, 而构象表位通常在变性剂处理后被破坏。在独特空间构象中, 表位包含至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或8个至10个氨基酸。

[0311] 在某些实施例中, 表位决定因素包括分子的化学活性表面基团, 诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基, 并且在某些实施例中, 可以具有特定的三维结构特征, 和/或特定的电荷特征。例如, 可用的抗原决定位可存在于肿瘤细胞的表面上、受病毒感染的细胞的表面上、其它患病细胞的表面上、免疫细胞的表面上, 不存在于血清中, 和/或存在于细胞外基质 (ECM) 中。除非另有说明, 否则本文中有用的作为抗原的蛋白质可以是来自任何脊椎动物来源的任何天然形式的蛋白质, 该脊椎动物包括哺乳动物, 诸如灵长类动物 (例如人) 和啮齿类动物 (例如小鼠和大鼠)。可使用本技术领域的常规方法筛选与特定表位结合的抗体 (即与相同表位结合者), 例如诸如但不限于丙氨酸扫描、肽印渍 (参见Meth.Mol.Biol.248 (2004) 443-463)、肽裂解分析、表位切除、表位萃取、抗原的化学修饰 (参见Prot.Sci.9 (2000) 487-496)、和交叉阻断 (参见“Antibodies”, Harlow和Lane (Cold Spring Harbor

Press, Cold Spring Harb., NY)。

[0312] 在特定实施例中,该抗原为人蛋白质。在本文中提及特定蛋白质的情况下,该术语涵盖“全长”、未处理的蛋白质以及由在细胞中处理所产生的任何蛋白质形式。该术语亦涵盖天然生成的蛋白质变异体例如剪接变异体或对偶基因变异体。换句话说,该术语也涵盖具有与天然抗体结构基本相似的结构抗体,或具有包含本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0313] 所谓“抗原结合”是指抗体部分的抗原结合位点与抗原特异性结合。换句话说,术语“抗原结合位点(antigen-binding site)”是指抗体的部分,其包含特异性结合抗原的部分或全部且与其互补的区域。“特异性结合”意指结合对抗原具有选择性且可区分出不希望的或非特定的相互作用。抗原结合分子结合特异性抗原的能力可通过酶联免疫吸附测定(ELISA)或所属领域技术人员所熟悉的其它技术,例如表面电浆共振(SPR)技术(于BIAcore仪器上分析)(Liljebblad等人,Glyco J17,323-329(2000))以及传统的结合测定(Heeley, Endocr Res 28,217-229(2002))来测量。

[0314] 免疫球蛋白分子的重链与轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体(Abs)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,其包括免疫系统的各种细胞(诸如效应子细胞)和补体系统的成分,诸如C1q,补体活化的经典途径中的第一成分。本文使用的“可变域”(轻链可变域(VL)、重链可变域(VH))表示直接参与抗体与抗原结合的每一对轻链与重链。人可变轻链与人可变重链的域具有相同的一般结构,并且每个域包含四个骨架(FR)区,其序列被大部分保存,并通过三个“高度可变区”(或互补决定区(CDR))连接。(参见,例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman及Co.,第91页(2007)。)单个VH或VL域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用VH或VL域从结合抗原的抗体中分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补VL或VH域的文库。参见,例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。如本文所用,术语“高度可变区”或“HVR”是指抗体可变域中序列高度可变并决定抗原结合特异性的各个区,例如“互补决定区”(“CDR”)。除非另有说明,否则根据Kabat等人在上述文献中所述的方法确定CDR。本领域的技术人员将理解,也可根据Chothia在上述文献、McCallum在上述文献中所述的方法或任何其它科学上接受的命名系统来确定CDR名称。

[0315] 骨架区采用 β 片构象并且CDR可形成连接 β 片结构的环。每条链上的CDR由骨架区保持其三维结构,并与另一条链上的CDR一起形成抗原结合位点。抗体重链和轻链CDR3区在根据本发明的抗体的结合特异性/亲和力中担负特别重要的作用,因此提供了本发明的另一个目的。除非本文另有说明,否则可变区或恒定区中氨基酸残基的编号根据EU编号系统(也称为EU指数)进行,如Kabat等人所述(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。“骨架(framework)”或“FR”是指除高度可变区(hypervariable region)(HVR)残基之外的可变域残基。可变域的FR通常由四个FR域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常以如下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。除VH中的CDR1外,CDR一般包含形成高度可变环的氨基酸残基。CDR还包括“特异性决定性残基”或“SDR”,它们是接触抗原的残基。SDR包含在CDR区内,称为缩写CDR,或a-CDR。示例性的a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及a-CDR-H3)出现在LI的31-34、L2

的50-55、L3的89-96、HI的31-35B、H2的50-58及H3的95-102的氨基酸残基上。(参见Almagro与Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))。

[0316] 如上所述,除非另有说明或与上下文明确矛盾,本文中的术语抗体包括全长抗体和抗原结合片段的抗体片段,即保留与抗原特异性结合的能力。换句话说,本文使用的术语“片段”是指除完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的一部分,与该完整抗体所结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于(i) Fab' 或Fab片段;双抗体、线性抗体;单链抗体分子(例如, scFv和scFab),由抗体片段形成的多特异性抗体,由V_L、V_H、C_L和C_H1域组成的单价片段,或W02007059782 (Genmab)中所述的单价抗体;(ii) F(ab')₂片段,由两个Fab片段通过铰链区的双硫键连接而成的二价片段;(iii)基本上由V_H和C_H1域组成的Fd片段;(iv)主要由抗体单臂的V_L和V_H域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等人, *Nature* 341,544-546 (1989)),其基本上由V_H域组成,也称为域抗体(Holt等人; *Trends Biotechnol.* 2003Nov; 21 (11): 484-90);(vi) 骆驼科或奈米抗体(Revels等人; *Expert Opin Biol Ther.* 2005Jan; 5 (1): 111-24)以及(vii) 一个分离的互补性决定区(CDR)。胃蛋白酶处理产生一个F(ab')₂片段,该片段具有两个抗原结合位点(两个Fab片段)以及一部分Fc区。关于包含补救受体结合表位残基并且具有增加的体内半衰期的Fab及F(ab')₂片段的论述,参见美国专利号5,869,046。双抗体为具有两个抗原结合位点(其可为二价或双特异性的)的抗体片段。参见例如EP 404,097;W0 1993/01161;Hudson等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003);以及Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)。此外,尽管Fv片段的两个域V_L和V_H是由不同的基因编码的,但它们可以用重组的方法,通过合成的连接基连接起来,使它们能被制成单蛋白链,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv),例如参见Bird等人, *Science* 242,423-426 (1988)以及Huston等人, *PNAS USA* 85,5879-5883 (1988))。因此,“单链可变片段”或“scFv”为抗体的重链(VH)和轻链(VL)的可变域的融合蛋白,其通过连接基连接。特别地,连接基为10个至25个氨基酸组成的短多肽,并且通常富含甘氨酸以提高柔韧性,并含有丝氨酸或苏氨酸以提高溶解性,并且可将VH的N端与VL的C端连接,或反之亦然。尽管去除了恒定区并引入了连接基,但是该蛋白仍保留了原始抗体的特异性。关于scFv片段的综述,参见例如Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*,第113卷,Rosenburg及Moore编辑,Springer-Verlag, New York,第269页至第315页(1994);也可参见W0 93/16185;以及美国专利第5,571,894号和第5,587,458号。单域抗体为包含抗体的重链可变域的全部或部分或抗体的轻链可变域的全部或部分的抗体片段。在某些方面,单域抗体为人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见例如美国专利第6,248,516 B1号)。抗体片段可通过各种技术制造,包括但不限于如本文所述的完整抗体的蛋白水解消化以及重组宿主细胞(例如大肠杆菌)的重组产生。

[0317] 除非另有说明或通过上下文明确指出,这种单链抗体涵盖在术语抗体内。虽然此类片段一般包括在抗体的含义中,但它们共同地和各自独立地是本发明的独特特征,表达出不同的生物学特性和实用性。本发明中的这些和其它有用的抗体片段,以及这些片段的双特异性格式,将在此进一步讨论。关于某些抗体片段的综述,参见Hollinger和Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005)。

[0318] 术语“全长抗体”表示由两条“全长抗体重链”和两条“全长抗体轻链”组成的抗体。“全长抗体重链”是由N端至C端方向的抗体重链可变域(VH)、抗体恒定重链域1(CH1)、抗体

铰链区(HR)、抗体重链恒定域2(CH2)和抗体重链恒定域3(CH3)组成的多肽,简称为VH-CH1-HR-CH2-CH3;以及在IgE亚类抗体的情况下,任选地为抗体重链恒定域4(CH4)组成的多肽。优选地,“全长抗体重链”是由N端至C端方向的VH、CH1、HR、CH2和CH3组成的多肽。“全长抗体轻链”是由N端至C端方向的抗体轻链可变域(VL)和抗体轻链恒定域(CL)组成的多肽,简称VL-CL。抗体轻链恒定域(CL)可以是 κ (kappa)或 λ (lambda)。两条全长抗体链通过CL域和CH1域之间以及全长抗体重链的铰链区之间的多肽间双硫键连接在一起。有五大类主要抗体: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可进一步分为次类(同型(isotype)),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。在某些方面,该抗体是属IgG₁同型。抗体的“类别(class)”是指为其重链所具有的恒定域或恒定区的类型。在某些方面,该抗体是属IgG₁同型,具有P329G、L234A和L235A突变以减少Fc区效应子功能。在其它方面,该抗体是属IgG₂同型。在某些方面,该抗体是属IgG₄同型,在铰链区中具有S228P突变以改善IgG₄抗体的稳定性。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。基于其恒定域的氨基酸序列,抗体的轻链可被归类为两种类型中的一种,称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0319] 还应理解,除非另有说明,否则术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽,诸如嵌合抗体和人源化抗体,以及由任何已知技术,诸如酶切、多肽合成和重组技术提供的保留与抗原特异性结合能力的抗体片段(抗原结合片段)。生成的抗体可拥有任何同型。术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。

[0320] 例如,该抗体可以为单克隆抗体。如本文所用的术语“单克隆抗体”是指获自实质上同源抗体群体的抗体,即群体中包含的受试者抗体是相同的和/或结合相同表位,但不包含,例如,含有天然生成的突变或产生于单克隆抗体制剂生产过程中的可能的变异体抗体,此类变异体通常是以少量存在。与通常包括针对不同决定位(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每个单克隆抗体是针对于抗原上的单一决定位。因此,修饰词“单株”表示抗体的特征是获自实质上同源的抗体群体,并且不应解释为需要通过任何特定方法生产该抗体。例如,该单克隆抗体可通过多种技术来制造,其包含但不限于融合瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法、以及利用包含全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文描述此类方法以及用于制备单克隆抗体的其它示例性方法。

[0321] 作为另一实例,该抗体可以为人源化抗体。术语“人源化抗体”是指其骨架或“互补决定区(CDR)”已被修饰,以包含与母体免疫球蛋白不同特异性的免疫球蛋白的CDR的抗体。换句话说,术语涵盖来自非人CDR之氨基酸残基以及来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些方面,人源化抗体将包括实质上所有的至少一个(并且通常两个)可变域,其中所有或实质上所有CDR对应于非人抗体的那些,以及所有或实质上所有FR对应于非人抗体的那些。人源化抗体任选地可包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式(humanized form)”是指已进行人源化的抗体。生产人源化抗体的方法涉及已知的重组DNA和基因转染技术是本领域众所周知的。参见,例如,Riechmann,L.等人,Nature 332(1988)323-327;以及Neuberger,M.S等人,Nature 314(1985)268-270。

[0322] 作为另一实例,该抗体可以为人抗体。如本文所用,术语“人抗体”意指包括具有源自人生殖株免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。换句话说,术语涵盖氨基酸序列,该氨基酸序列对应于由人或人体细胞产生或源自利用人抗体谱系(antibody repertoire)或

其它人抗体编码序列的非人来源抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特定地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体是众所周知的技术状态(van Dijk, M.A., 和van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374)。可使用此领域中众所周知的各种技术生产人抗体。人抗体一般描述于: van Dijk与van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) 以及Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)。可通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体, 该转基因动物已被修饰以响应于抗原攻击而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常包含全部或部分人免疫球蛋白基因座, 其取代内源性免疫球蛋白基因座, 或存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在此类转基因小鼠中, 内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。有关从转基因动物中获得人抗体的方法的综述, 参见Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。另参见例如: 美国专利第6,075,181号和第6,150,584号(描述了XENOMOUSE™技术); 美国专利第5,770,429号(描述了HuMab®技术); 美国专利第7,041,870号(描述了K-MOUSE®技术); 以及美国专利申请公开第2007/0061900号(描述了VelociMouse®技术)。由此类动物产生的来源于完整抗体的人可变区可被进一步修饰, 例如通过与不同的人恒定区结合来修饰。

[0323] 也可通过基于融合瘤的方法进行制备人抗体。已有描述用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤以及小鼠-人异源骨髓瘤细胞株。(参见例如: Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 以及Boerner等人, *J. Immunol*, 147:86 (1991)。)通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)。其它方法包括描述于例如美国专利号7,189,826(描述了由杂交瘤细胞株生产单株人IgM抗体), 以及Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (描述了人-人杂交瘤)。人杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 以及Vollmers与Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)。

[0324] 也可以通过分离选自人源性噬菌体展示文库的可变域序列产生人抗体。然后将此类可变域序列与所需的人恒定域组合。下文描述了从抗体库中选择人抗体的技术。

[0325] 在本发明中使用的一个方面, 重组蛋白是针对CD3和CD20的抗 α -突触核蛋白抗体或双特异性抗体, 其也表示抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体。术语“双特异性抗体”在本发明的上下文中是指具有由不同的抗体序列定义的两个不同的抗原结合区的抗体。可用于此目的的双特异性抗体形式的实例包括但不限于所谓“BiTE” (bispecific T cell engager) 分子, 其中两个scFv分子通过柔性连接基融合(参见例如WO 2004/106381、WO 2005/061547、WO 2007/042261和WO 2008/119567; Nagorsen与Bäuerle, *Exp Cell Res* 317,1255-1260 (2011)); 双抗体(Holliger等人, *Prot Eng* 9,299-305 (1996))及其衍生物, 诸如串联双抗体(“TandAb”; Kipriyanov等人, *J Mol Biol* 293,41-56 (1999)); “DART”(双亲和性复位位)分子, 其基于双抗体形式, 但具有C端双硫键以供进一步稳定(Johnson等人, *J Mol Biol* 399,436-449 (2010)), 以及所谓triomab, 它们为完整的小鼠/大鼠IgG杂合分子(参见Seimetz等人的综述: *Cancer Treat Rev* 36,458-467 (2010))。本文所包括的特定T细胞双

特异性抗体形式描述于WO 2013/026833;WO 2013/026839;WO 2016/020309;以及Bacac等人Oncoimmunology 5 (8) (2016) e1203498。

[0326] 术语“抗 α -突触核蛋白抗体”、“抗 α -突触核蛋白抗体”以及“结合 α -突触核蛋白的抗体”是指能够以足够的亲和力结合人 α -突触核蛋白的抗体,使得该抗体用作靶向 α -突触核蛋白的诊断和/或治疗剂。 α -突触核蛋白是一种蛋白质,其在大脑中多巴胺能神经元功能的控制起着关键作用,并且被认为与帕金森氏病(PD)的病理生理密切相关。例如,突触核病也称为路易体病(Lewy body diseases,LBD),其特征在于多巴胺能系统性的变性、运动改变、认知障碍和路易体(LB)和/或路易神经突的形成。(McKeith等人,Neurology (1996) 47:1113-24),并且可以用抗 α -突触核蛋白抗体治疗。这类突触核病包括帕金森氏病(包括特发性帕金森氏病)、弥漫性路易体病(DLBD)又称路易体失智症(DLB)、阿兹海默氏病的路易体变异体(LBV)、阿兹海默氏病和帕金森氏病合并症、纯自主神经衰竭和多系统萎缩(MSA;例如,少脑桥小脑萎缩、纹状体黑质变性及夏-德拉格综合症)。

[0327] α -突触核蛋白是一大类蛋白质的一部分,其包括 β -突触核蛋白和 γ -突触核蛋白和降钙素。天然人野生型 α -突触核蛋白为140个氨基酸的肽,其具有以下氨基酸序列:

[0328] MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH GVATVAEKTKEQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEP EA (SEQ ID NO:9)

[0329] (Ueda等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1993) 90:11282-6);GenBank登录号:P37840)。该蛋白具有三个公认的域:一个涵盖氨基酸1-61的KTKE重复域、一个横贯约氨基酸60-95的NAC(非淀粉样蛋白成分)域,以及一个横贯约氨基酸98至140的C端酸性域。提到 α -突触核蛋白或其片段包括上述所示的天然人野生型氨基酸序列及其人等位变体,特别是那些与路易体病相关的序列(例如E46K、A30P和A53T,第一个字母表示SEQ ID NO:9中的氨基酸,数字是SEQ ID NO:9中的密码子位置,并且第二个字母是等位变异体中的氨基酸)。

[0330] α -突触核蛋白在与突触相关的正常状态下表达,并被认为在神经可塑性、学习以及记忆中起作用。几项研究已经表明 α -突触核蛋白在PD发病机理中具有重要作用。在病理条件下,蛋白质可以聚集以形成不溶性原纤维。例如,突触核蛋白在LB中积聚(Spillantini等人,Nature (1997) 388:839-40;Takeda等人,J.Pathol. (1998) 152:367-72;Wakabayashi等人,Neurosci.Lett. (1997) 239:45-8)。 α -突触核蛋白基因中的突变与罕见的帕金森氏病家族形式共分离(Kruger等人,Nature Gen. (1998) 18:106-8;Polymeropoulos等人,Science (1997) 276:2045-7)。 α -突触核蛋白在转基因小鼠(Masliah等人,Science (2000) 287:1265-9)和果蝇(Feany等人,Nature (2000) 404:394-8)中的过表达模拟了路易体病的几个病理方面。另外,已经有人提出,突触核蛋白的可溶性低聚物可能具有神经毒性(Conway KA,等人,Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:571-576;VollesMJ,Lansbury PT, Jr Biochemistry (2003) 42:7871-7878)。 α -突触核蛋白在人、小鼠和苍蝇等物种和动物模型中具有相似的形态学和神经学改变的积累表明,该分子有助于路易体病的发展。

[0331] 例如,抗 α -突触核蛋白抗体可以为抗体,其表示为9E4(普拉西珠单克隆抗体)、BIIB054、1H7、5C1、6H7、8A5以及NI-202.21D11的抗体及其相关抗体。普拉西珠单克隆抗体或9E4也公开称为PRX002和RG7935。如所附实例所说明,CHO L965细胞(实例3)、CHO L967细胞(实例6)和CHO L971细胞(实例7和8)各自产生普拉西珠单克隆抗体。此类抗体的参考文

献可以在本领域中找到,例如9E4(普拉西珠单抗克隆抗体)及其相关抗体可以在US 8,609,820、US 9,556,259、US 9,884,906、US 8,697,082、US 8,506,959、US 9,034,337、US 7,919,088、US 8,092,801、US 8,147,833、US 8,673,593、US 7,910,333以及US 7,674,599中找到。BIIB054(也称为NI-202.12F4)及其相关抗体的参考文献可以在例如US 10,301,381、US 9,975,947、US 8,896,504、US 9,580,493以及US 8,940,276中找到。1H7及其相关抗体的参考文献可以在例如US 7,910,333、US 8,790,644、US 9,234,031、US 9,217,030、US 9,670,273以及US 10,118,960中找到。5C1及其相关抗体的参考文献可以在例如US 9,605,056、US 10,081,674和US 10,301,382中找到。6H7及其相关抗体的参考文献可以在例如US 8,673,593和US 7,910,333中找到。8A5及其相关抗体的参考文献可以在例如US 8,673,593和US 7,910,333中找到。NI-202.21D11及其相关抗体的参考文献可以在例如US 9,580,493中找到。

[0332] 特别是帕金森氏病及相关疾病的患者,可以使用抗 α -突触核蛋白抗体进行治疗。事实上,除了 α -突触核蛋白为路易体(LB)的主要蛋白成分外,遗传学研究表明 α -突触核蛋白基因的某些点突变及增殖会导致家族形式的PD。大量证据表明,多巴胺能突触处的 α -突触核蛋白病理可能是PD脑中神经元细胞功能障碍和变性发生的基础(Bellucci,A.,等人,Brain Res.1432(2012)95-113)。

[0333] 术语“CD20”是指人CD20(UniProtKB/Swiss-Prot No P11836)以及包括由细胞(包括肿瘤细胞)自然表达的或在用CD20基因或cDNA转染的细胞上表达的CD20的任何变异体、异构体以及物种同源物。CD20分子(亦称为人B淋巴细胞限制性分化抗原或Bp35)为疏水跨膜蛋白,其分子量约为35kD,位于pre-B和成熟B淋巴细胞上(Valentine等人,(1989)J.Biol.Chem.264(19):11282-11287;以及Einfield等人,(1988)EMBO J.7(3):711-717)。CD20存在于90%以上来自外周血或淋巴器官的B细胞表面,并且在早期pre-B细胞发育的过程中就已表达并一直保持到浆细胞分化。CD20既存在于正常B细胞上,也存在于恶性B细胞上。特别是,CD20在90%以上的B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)上表达(Anderson等人(1984)Blood 63(6):1424-1433),但在造血干细胞、pro-B细胞、正常浆细胞或其它正常组织上没有发现(Tedder等人(1985)J.Immunol.135(2):973-979)。

[0334] 如本文所用,术语“CD3”是指Cluster of Differentiation 3蛋白,它是T细胞共受体蛋白复合物的一部分,并且由四条不同的链组成。CD3也存在于人并且也存在于其它物种,因此,术语“CD3”可在本文中使用,并且不限于人CD3,除非与上下文相矛盾。在哺乳动物中,复合物包含一条CD3 γ (γ)链(人CD3 γ 链UniProtKB/Swiss-Prot No P09693或食蟹猴CD3 γ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7)、一条CD3 δ (δ)链(人CD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No P04234或食蟹猴CD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8)、两条CD3 ϵ (ϵ)链(人CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No P07766;食蟹猴CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5或恒河猴CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9)以及 ζ 链(人CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot P20963,食蟹猴CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0)。这些链与一种称为T细胞受体(TCR)的分子结合,并在T淋巴细胞中产生激活信号。TCR还CD3分子共同组成TCR复合物。

[0335] 根据本发明,培养哺乳动物细胞以产生具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的重组蛋白。在选择用于生产本发明范围内的重组蛋白的宿主细胞时,本领域技术人员认识到不同的宿主细胞对表达的蛋白的翻译以及翻译后处理和修饰具有不同的特性和/或特定

机制,诸如但不限于糖基化和裂解。在这种情况下,技术人员知道如何在本发明的内容内选择合适的细胞株。换句话说,技术人员知道应该选择哪种细胞株以确保翻译后的修饰是可能的。替代地,可以通过特定的翻译后修饰所需的方式修饰宿主细胞,以表达具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的重组蛋白。可用于生产重组蛋白的重组方法,诸如抗体的生产,例如,如US 4,816,567中所述。对于这些方法,提供了一个或多个编码抗体的经分离的核酸。如果是天然抗体或天然抗体片段,则需要两个核酸,一个用于轻链或其片段,并且另一个用于重链或其片段。此类核酸编码包含VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。这些核酸可在同一表达载体上,也可在不同表达载体上。

[0336] 如果是具有异源二聚体重链的双特异性抗体,需要四个核酸,一个用于第一轻链,一个用于第一重链(其包含第一异源单体Fc区多肽),一个用于第二轻链,并且一个用于第二重链(其包含第二异源单体Fc区多肽)。这四个核酸可包含在一个或多个核酸分子或表达载体中。此类核酸编码包含第一VL的氨基酸序列、和/或包含第一VH(其包括第一异源单体Fc区)的氨基酸序列、和/或包含第二VL的氨基酸序列、和/或包含第二VH(其包括抗体的第二异源单体Fc区域)的氨基酸序列(例如,抗体的第一和/或第二轻链、和/或第一和/或第二重链)。这些核酸可在同一表达载体上,也可在不同表达载体上,通常这些核酸位于两个或三个表达载体上,即一个载体可包含一个以上的这些核酸。这些双特异性抗体的实例是CrossMabs(参见例如Schaefer,W.等人,PNAS,108(2011)11187-11191)。例如,异源单体重链中的一个包含所谓“杵突变”(T366W,任选地为S354C或Y349C中的一者),并且另一个包含所谓“臼突变”(T366S、L368A和Y407V,以及任选地Y349C或S354C)(参见例如Carter,P.等人,Immunotechnol.2(1996)73)(根据EU指数编号)。

[0337] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞株”和“宿主细胞培养物”可互换使用并且是指已向其中引入外源性核酸的细胞,其包括此类细胞的子代细胞。宿主细胞包括“转形体”和“转形细胞”,其包括原代转形细胞以及由其衍生的子代细胞,而与传代次数无关。子代细胞的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但可能含有突变。本文中包括从原始转形细胞中筛选或选择具有相同功能或生物学活性的突变子代细胞。适用于亚克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。有关抗体片段以及多肽在细菌中的表达,参见例如US 5,648,237、US 5,789,199以及US 5,840,523。(另请参见Charlton,K.A.,在:Methods in Molecular Biology,第248卷,Lo,B.K.C.(编辑),Humana Press,Totowa,NJ(2003),第245-254页,其中描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达。)在表达后,抗体可与细菌细胞糊中的可溶性部分分离,并可经过进一步纯化。

[0338] 术语“哺乳动物宿主细胞”、“哺乳动物宿主细胞株”和“哺乳动物宿主细胞培养物”可互换使用并且是指源自哺乳动物的细胞株,这些细胞株在单层培养或悬浮培养中置于含有合适的营养物质和生长因子的介质中时能够生长和存活。必要的某一特定细胞株的生长因子,很容易根据经验确定,而无需进行过多的实验,例如在Mammalian Cell Culture(Mather,J.P.编辑,Plenum Press,N.Y.[1984]),以及Barnes与Sato.((1980)Cell.22:649)中所述。通常情况下,细胞能够表达和分泌大量的特定目的糖蛋白到培养基中。在本发明的上下文中,合适的哺乳动物宿主细胞的实例可以包括中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CH0.Urlaub与Chasm.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.77:4216[1980]);dp12.CHO细胞(EP 307.247发表于1989年3月15日);SV40转化的猴肾CV1细胞株(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚

胎肾细胞株(在悬浮培养中亚克隆生长的293或293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.,36:59[1977]);婴儿仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠睾丸支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-251[1980]);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138.ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562.ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68[1982]);MRC 5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞株(Hep G2)。在本发明的优选的方面,哺乳动物细胞选自由以下项组成组:CHO细胞、Vero细胞、BHK细胞、COS细胞和HEK293/293T细胞,更优选地哺乳动物细胞为CHO细胞。更优选地,哺乳动物宿主细胞为CHO细胞,甚至更优选地,CHO细胞缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR)活性。可选择或操作用于本发明的哺乳动物细胞以产生重组蛋白。操作包括一个或多个遗传修饰,诸如引入一个或多个编码待表达蛋白的异源基因。异源基因可编码该细胞正常表达的蛋白质,也可编码宿主细胞外源蛋白质。操作可以额外地或替代地是上调或下调一个或多个内源基因。通常,例如通过引入编码蛋白质的基因和/或通过引入调节编码目的蛋白质的基因的表达的的控制元素来操作细胞以产生重组蛋白。可通过载体(诸如质体、噬菌体或病毒载体),将编码重组蛋白和/或控制元素的基因引入宿主细胞。如本文所用,术语“载体”是指一种核酸分子,其能够传送与其连接的另一种核酸。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入该宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。这些载体在本文中称为“表达载体”。

[0339] 某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制,而其它载体可以整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。各种载体是可公开获得的,并且载体的精确性质对于本发明不是必不可少的。通常,载体组分包括信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、启动子及转录终止序列中的一者或多者。此类组分如WO 97/25428中所述。

[0340] 细胞培养物的“生长阶段”是指细胞通常迅速分裂的指数细胞生长时期(对数阶段)。在该阶段,将细胞培养一段时间,通常在1-4天之间,并在使细胞生长最大化的条件下进行。可以针对所设想的特定宿主细胞确定宿主细胞的生长周期,而无需进行过多的实验。“时间段以及在使细胞生长最大化的条件下”等是指对于特定细胞株而言被确定为对于细胞生长和分裂而言最佳的那些培养条件。在生长阶段,在含有必要添加剂的营养介质中培养细胞。此外,诸如温度、pH、溶氧(dO_2)等的培养条件是特定宿主一起使用的那些条件,并且对于本领域普通技术人员而言将是显而易见的。通常,使用酸(例如 CO_2)或碱(例如 Na_2CO_3 或 $NaOH$)调节pH。在潮湿、受控的气氛中,用于培养哺乳动物细胞(诸如CHO细胞)的合适温度范围为大约为 $30^{\circ}C$ 至 $38^{\circ}C$,并且合适的 dO_2 为空气饱和度的5%-90%,以使特定细胞株实现最佳生长。例如,可以使用进料批次细胞培养条件,因为设计了进料批次培养条件以在细胞培养的生长阶段中增强哺乳动物细胞的生长。如本文所用,“进料批次培养”是指一种培养细胞的方法,其中在培养过程开始之后的一个或多个时间向培养物中提供额外的组分。进料批次培养通常在某一点停止,并且收获并任选地纯化介质中的细胞和/或组分。此外,在特定阶段,细胞可用于接种细胞培养物的生产阶段或步骤。替代地,生产阶段或步骤可以与接种或生长期或步骤连续。

[0341] 细胞培养物的“过渡阶段”是指生产阶段的培养条件被采用的时间段。在过渡阶

段,环境因素诸如细胞培养物的温度、介质渗透压等,从生长条件转移到生产条件。

[0342] 细胞培养物的“生产阶段”是指细胞生长稳定的时间段。在生产阶段,对数细胞的生长已经结束并且蛋白质的生产是主要的。在这段时间内,通常补充介质以支持持续的蛋白质生产并获得所需的糖蛋白产物。例如,在细胞培养物的生产阶段中的细胞培养物环境受到控制。根据本发明的方法,操作影响哺乳动物宿主细胞培养物的活细胞密度和/或产物滴度的一种或多种因子,从而实现了表达的重组蛋白的特定半乳糖基含量。如本文所用,“滴度”是指在给定量的介质体积中由哺乳动物细胞培养物产生的重组表达的糖蛋白的总量。滴度通常以每毫升介质毫克糖蛋白的单位表达。特别地,在细胞培养物过程的生产阶段中控制增加重组蛋白的半乳糖基含量的因素,使得所得的重组蛋白包含特定的半乳糖基含量。如本文所用,细胞培养物过程的生产阶段之前为细胞培养物的过渡阶段,该阶段涉及细胞培养物的生产阶段的参数。

[0343] 在本发明的方法中,在发酵过程的任何或全部生长或生产阶段中调节一种或多种巯基化合物的浓度和/或葡萄糖的浓度。例如,一种或多种巯基化合物和/或葡萄糖的浓度可在生长阶段的开始或过程中和/或在生产阶段的开始或过程中进行调节。特别地,一种或多种巯基化合物和/或葡萄糖的浓度可在生长开始时以及生产阶段开始时调节,或在生长阶段开始时、生长阶段期间、生产阶段开始时以及生产阶段期间的任何或全部期间调节。在本发明的一优选的方面,在生产阶段开始时或在生产阶段期间将一种或多种巯基化合物和/或葡萄糖添加到介质中,以使介质中和/或至少大于3.0g/L的葡萄糖中产生一种或多种具有约4mM至10mM巯基浓度的巯基化合物。在本发明的另一优选的方面,该方法进一步包括在没有所述一种或多种含约4mM至10mM巯基的巯基化合物和/或至少大于3.0g/L葡萄糖的相同介质中培养哺乳动物细胞的初始步骤。在本发明的另一个方面,该方法进一步包括在没有所述一种或多种含约4mM至10mM巯基的巯基化合物和/或至少大于3.0g/L葡萄糖的相同介质中培养哺乳动物细胞的初始步骤,并在生产阶段开始时或在生产阶段期间将一种或多种巯基化合物和/或葡萄糖添加到介质中,以使介质中和/或至少大于3.0g/L的葡萄糖中产生一种或多种具有约4mM至10mM巯基浓度的巯基化合物。

[0344] 可通过增加或降低培养基中那些巯基化合物的浓度来调节一种或多种巯基化合物的浓度。在本发明中,当增加或降低那些巯基化合物的浓度时,这种浓度的增加或降低是相对于紧接增加前的培养阶段培养基中的那些巯基化合物的浓度而言的。因此,如果在生产阶段开始时,介质中例如胱氨酸和/或半胱氨酸的浓度增加,这就是那些巯基化合物的浓度比紧接生长阶段之前的介质中的那些巯基化合物的浓度增加。同样,如果在生产阶段期间,介质中例如胱氨酸和/或半胱氨酸的浓度增加,这就是那些巯基化合物的浓度比紧接生产阶段之前的一部分介质中的那些巯基化合物的浓度增加。同样,如果在任何生长或生产阶段开始时或期间,介质中例如胱氨酸和/或半胱氨酸的浓度降低,这就是在紧接培养阶段之前的介质中那些巯基化合物的浓度降低。

[0345] 一般优选地,当调整细胞培养基中任何一种或多种巯基化合物的浓度时,同时调节所有那些一种或多种巯基化合物的浓度。然而,本发明的方法还包括调节一种或多种巯基化合物,一次调节第一种巯基化合物,然后调节第二种巯基化合物,或者反之亦然。特别地,如果一种或多种巯基化合物的浓度要增加,并且一种或多种巯基化合物的浓度要减少,则增加和减少的调节可以在同一时间或不同时间进行。在这种情况下,优选地,增加一种或

多种巯基化合物的浓度和减少一种或多种巯基化合物的浓度的调节在同一时间点或同一介质中进行。

[0346] 在本发明的方法中,一种或多种巯基化合物的浓度的调节可以通过适合所使用的发酵条件的任何技术来实现。调节一种或多种巯基化合物的浓度的方法对本发明来说并不是必不可少的,合适的方法是本领域已知的。因此,一种或多种巯基化合物的浓度的调节可以通过补充培养细胞的介质(在一种或多种巯基化合物浓度增加的情况下),或通过将全部或部分细胞转移(例如,通过分裂)到含有所需浓度的一种或多种巯基化合物的新鲜介质中进行。如有需要,可组合使用这些方法。

[0347] 因此,一种或多种巯基化合物的浓度的调节可以是连续的,在整个或部分培养期内进行,或可以是间歇的,例如作为对培养基中一种或多种巯基化合物的假定、计算或测量浓度的反应。本发明定义了在规定时间内调节一种或多种巯基化合物的浓度。如果在限定的培养期间,例如在生长或生产阶段,实际测量或计算一种或多种巯基化合物的每种或全部的浓度,表明一种或多种巯基化合物的每种或全部的浓度落在本文所述的范围内,则只要由此产生的一种或多种巯基化合物的浓度保持在所述范围内,便可对该浓度进行调节。如果需要,在进行调整之前,可利用已知技术测量培养基中一种或多种巯基化合物的实际浓度。

[0348] 因此,如果使用分批发酵条件,实现一种或多种巯基化合物浓度的增加,可通过例如接种到含有或补充了比现有培养基增加的合适的一种或多种巯基化合物浓度的新鲜介质中,或将细胞分装到含有或补充了比现有介质增加的合适的一种或多种巯基化合物浓度的培养基中。如果正在使用进料批次发酵条件,实现一种或多种巯基化合物浓度的增加,可通过例如接种到含有或补充了增加的合适的一种或多种巯基化合物浓度的新鲜介质中,给培养基提供一种或多种栓剂或连续进料合适的一种或多种巯基化合物;通过基于细胞数或根据已知的代谢模型、代谢代用标记等计算确定进食率,或将培养物分装到含有或补充了合适的一种或多种巯基化合物的浓度增加的介质中。如果正在添加栓剂或连续进料,除了一种或多种巯基化合物外,还可能含有培养所需的其它营养物质/成分。如果正在使用灌注发酵条件,实现一种或多种巯基化合物浓度的增加可通过以下实现:例如持续或间歇地将一种或多种巯基化合物同时或分别添加到正在添加到灌注培养物中的其它营养物/组分中的反应器中。

[0349] 如果需要降低一种或多种巯基化合物的浓度,可通过将细胞接种到新鲜介质中,其中一种或多种巯基化合物的浓度的降低是与紧接培养阶段之前的介质中那些一种或多种巯基化合物的浓度相比来实现的。

[0350] 一种或多种巯基化合物浓度降低或增加的具体值是基于培养基中一种或多种巯基化合物的实际测量,或基于细胞周围培养液中一种或多种巯基化合物的理论浓度或计算值。实践者将理解,可能存在例如通过杂质和浸出引入一种或多种巯基化合物的一些浓度,并且在计算根据本发明降低或增加的一种或多种巯基化合物的浓度时将考虑这些因素。

[0351] 在本发明的一方面,可调节培养基中一种或多种巯基化合物的浓度,以增加重组蛋白的聚糖的半乳糖基化。在本发明的另一方面,可以在培养基中调节一种或多种巯基化合物的浓度,以提高活细胞密度、提高重组蛋白的产物滴度和/或然后再调节以提高重组蛋白的聚糖的半乳糖基化。例如,可在培养基中调节一种或多种巯基化合物的浓度,以首先增强生长,然后再调节以提高重组蛋白的聚糖的半乳糖基化。作为另一实例,可在培养基中调

节一种或多种巯基化合物的浓度,以提高活细胞密度,然后再调节以提高重组蛋白的聚糖的半乳糖基化。作为另一实例,可在培养基中调节一种或多种巯基化合物的浓度,以提高重组蛋白的产物滴度,然后再调节以提高重组蛋白的聚糖的半乳糖基化。在本发明的又一方面,可在培养基中调节一种或多种巯基化合物的浓度,以提高活细胞密度、提高重组蛋白的产物滴度,然后再调节以提高重组蛋白的聚糖的半乳糖基化。

[0352] 如本文所用,术语“生物反应器”是指用于原核或真核细胞培养物生长的任何容器,例如动物细胞培养物(诸如哺乳动物细胞培养物)。生物反应器可为任何大小,只要对培养细胞,例如哺乳动物细胞有用。通常情况下,生物反应器将至少为30ml,并且可以为1升、10升、100升、250升、500升、1,000升、2,500升、5,000升、8,000升、10,000升、12,000升或更多,或任何中间容积。生物反应器的内部条件,其包括但不限于pH值和温度,通常在培养期间进行控制。生物反应器可由任何适合于在本发明的培养条件下盛放悬浮在培养基中的哺乳动物细胞培养物的材料组成,其包括玻璃、塑料或金属。本文所用的术语“生产生物反应器”是指用于生产目的多肽或蛋白质的最终生物反应器。大规模细胞培养物生产生物反应器的容积一般大于约100ml,一般至少约10升,也可以为500升、1,000升、2,500升、5,000升、8,000升、10,000升、12,000升或以上或任何中间容积。例如,哺乳动物细胞的培养是在大规模形式的生物反应器中,优选地是在10,000L的生物反应器中。

[0353] 本领域的普通技术人员将知道并能够选择合适的生物反应器用于实施本发明。

[0354] 如在本发明所使用的优选的方面,该方法进一步包括收获哺乳动物细胞生产的重组蛋白。在培养期间或在培养期结束时,优选地在生产阶段,收获表达的蛋白质,可以使用技术中已知的方法实现。该蛋白可作为分泌蛋白从培养基中收获,不过当没有分泌信号而直接生产时,可从宿主细胞裂解液中收获。如果蛋白质为膜结合的,可以使用合适的洗涤剂溶液(例如Triton-X 100)将其从膜上释放出来,或者其细胞外区域可以通过酶解释放。表达的蛋白质可以根据需要使用本领域已知的技术进行分离和/或纯化。“分离的”蛋白诸如抗体是从其自然环境的组分中分离出来的抗体。在一些方面,将蛋白例如抗体纯化至大于95%或99%纯度,通过(例如)电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或层析(例如,离子交换或逆相HPLC)方法测定。关于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如Flatman等人,J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0355] 如本文所用,术语“表达”(expression)或(expresses)可互换使用,并且是指宿主细胞内的转录和翻译。可基于存在于细胞中的相应mRNA的量或相应基因编码的蛋白质的量来确定重组蛋白在宿主细胞中的表达水平。例如,从产物基因转录的mRNA用北方杂交法方便地定量(Sambrook等人,Molecular Cloning A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989))。由产物基因编码的蛋白质可以通过测定蛋白质的生物活性或采用独立于这种活性的测定来定量,诸如使用能够与蛋白质反应的抗体进行蛋白质印迹法或放射免疫测定(Sambrook等人Molecular Cloning A Laboratory Manual,pp 181-1888(Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989))。

[0356] 特别地,表达具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的重组蛋白的哺乳动物细胞应表达或被操作以表达特定的酶,从而在合适的条件下,如本文所述,在体内发生合适的翻译后修饰。酶包括那些添加以及完成N-和O-连接的碳水化合物所必需的酶,诸如Hubbard与Ivan上文中描述的N-连接的寡糖的酶。酶任选地包括寡糖基转移酶、 α -葡萄糖苷酶I、 α -葡

葡萄糖苷酶II、ER α (1.2) 甘露糖苷酶、高尔基 α -甘露糖苷酶I、N-乙酰葡萄糖胺基转移酶I、高尔基 α -甘露糖苷酶II、N-乙酰葡萄糖胺基转移酶II、 α (1.6) 岩藻糖转移酶以及 β (1.4) 半乳糖基转移酶。此外,宿主细胞表达合适的酶,可预期将半乳糖连接在特定的位置并且连接作为宿主细胞基因组的一部分。任选地,通过例如用编码酶的DNA转染宿主细胞,可使宿主细胞表达合适的酶。诸如如上所述的酶将有望将半乳糖添加到合适的寡糖结构中,诸如GlcNAc。在本发明中,合适的酶包括但不限于那些催化N-和O-连接寡糖的半乳糖基化和分支的酶。

[0357] 为了培养表达所需蛋白质的哺乳动物细胞,并能在特定的位置和连接中添加所需的碳水化合物,可以使用众多的培养条件,特别注意培养的宿主细胞。哺乳动物细胞的合适培养条件是本领域众所周知的(J. Immunol. Methods (1983) 56:221-234),或者本领域技术人员可以很容易地确定(例如,参见Animal Cell Culture: A Practical Approach第2版, Rickwood. D. 与Hames. B. D., eds. Oxford University Press. New York (1992))并且根据所选的特定宿主细胞而变化。

[0358] 本发明的哺乳动物细胞培养物是在适合于培养特定细胞的介质中制备的。“介质”、“细胞培养基”和“培养基”在此可互换使用并且是指含有维持哺乳动物细胞生长的营养物质的溶液。通常情况下,这种溶液提供了细胞最低限度生长和/或生存所需的必需和非必需氨基酸、维生素、能量来源、脂质和微量元素。这类溶液还可以含有提高生长和/或存活率高于最小速率的补充成分,其包括但不限于激素和/或其它生长因子、特定离子,诸如钠、氯、钙、镁及磷酸盐、缓冲液、维生素、核苷或核苷酸、微量元素、氨基酸、脂质和/或葡萄糖或其它能量源。介质有利地配制为有利于细胞存活和增殖的最佳pH值和盐浓度。

[0359] 市售的培养基如Ham's F10 (σ)、Minimal Essential Medium ([MEM], σ)、RPMI-1640 (σ) 以及Dulbecco's Modified Eagle's Medium ([DMEM], σ) 是示例性营养液。此外, Ham与Wallace (1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes与Sato (1980) Anal. Biochem., 102:255; 美国专利第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第5,122,469号或第4,560,655号; 国际出版第W0 90/03430号和第W0 87/00195号中所述的任何培养基通过引用将其全部公开内容并入本文,可以将其用作培养基。这些培养基中的任何一种都可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐类(诸如氯化钠、钙、镁及磷酸盐)、缓冲液(诸如HEPES)、核苷(诸如腺苷和胸腺素)、抗生素(诸如GentamycinTM药物)、微量元素(定义为通常存在于最终浓度在微摩尔范围内的无机化合物)、脂类(诸如亚油酸或其它脂肪酸)及其合适的载剂,以及葡萄糖或相当的能源来源。任何其它必要的补充剂也可以包括本领域技术人员已知的合适浓度。

[0360] 如本文所用,术语“在细胞表达重组蛋白的条件下”表示用于培养表达多肽的细胞的条件,这些条件是本领域技术人员已知的或可以确定的。对于本技术领域的技术人员来说众所周知,这些条件可能因培养的细胞类型和表达的重组蛋白类型而不同。一般来说,在温度例如在20 $^{\circ}$ C与40 $^{\circ}$ C之间,并在足以使共轭物有效生产的时间内,例如4至28天,在0.01升至10' 升的体积内培养细胞。

[0361] 优选地,哺乳动物宿主细胞为CHO细胞,优选地缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR)活性的CHO细胞,并且合适的介质含有基础介质组成,诸如基于配方的DMEM/HAMF-12(关于DMEM和HAM F12培养基的组成,请参见American Type Culture Collection Catalogue of Cell

Lines and Hybridomas. 第六版. 1988. 第346-349页中的培养基配方), 含有一些成分的改性浓度, 诸如氨基酸、盐类、糖和维生素, 并任选地含有甘氨酸、次黄嘌呤、胸腺素、重组人胰岛素、水解蛋白胨、细胞保护剂, 诸如Pluronic F68或等效的pluronic多元醇、庆大霉素和微量元素。

[0362] 根据本发明, 我们培养哺乳动物宿主细胞以产生具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的可回收重组蛋白。重组蛋白中半乳糖的总含量是通过控制细胞培养物参数来控制的, 这些参数会影响哺乳动物细胞中的活细胞密度、产物滴度和/或半乳糖的含量。影响活细胞密度和/或产物滴度的因素在本技术中是众所周知的, 其包括但不限于影响DNA RNA拷贝数的因素、影响RNA的因素诸如稳定RNA的因素、培养基营养物质以及其它补充剂、转录增强剂的浓度、培养环境的渗透压、细胞培养物的温度和pH值等。根据本发明调节这些因素, 单独或组合, 以增加活细胞密度和/或产物滴度, 产生具有单半乳糖基化或双半乳糖基化聚糖的重组蛋白。调节这些因素, 单独或组合, 以增加活细胞密度和/或产物滴度, 产生具有增加半乳糖含量的重组蛋白。

[0363] 如本文所用, 术语“细胞密度”、“细胞浓度”或类似术语是指存在于给定体积的介质中的细胞的数量、重量、质量等。“峰值细胞密度”或类似的术语是指在给定体积的介质中能达到的最大细胞数, “期望的峰值细胞密度”或类似的术语是指在给定的细胞体积中从业者希望获得的最大细胞数(例如目标)。这种目标值的变化对于本领域的技术人员来说将是清楚的, 例如, 技术人员可以用所需的细胞质量来表达目标值, 并且这种目标值可以是一个或多个合适的测量单位(例如, 所需的细胞质量峰值单位)。

[0364] 本文所用的术语“细胞生存力”是指培养中的细胞在给定的培养条件或实验变化下存活的能力。本文所用的术语还指在某一特定时间内, 相对于当时培养物中的活细胞和死细胞总数而言, 是活着的那部分细胞。

[0365] 本文所用的术语“培养物”和“细胞培养物”是指在适合细胞群体生存和/或生长的条件下, 将细胞群体悬浮在细胞培养基中。如本文所用, 这些术语可指包括细胞群体(例如, 动物细胞培养物)与群体悬浮于其中的培养基的组合。

[0366] 在一个方面, 该方法进一步包括在细胞培养基中预培养哺乳动物细胞的步骤。如本文所提供的, 细胞可以在合适的细胞培养基中预培养到指数型生长阶段, 该培养基带有或不带有来自一种或多种巯基化合物的巯基基团。如本文所用, 术语“预培养”(pre-cultivation)或(pre-cultivating)可互换使用并且是指在第二培养步骤中培养细胞之前的培养步骤。例如, 细胞可在第一细胞培养物中生长, 作为预培养步骤, 随后接种在第二细胞培养物中, 例如在生物反应器中, 诸如生产生物反应器中。本领域的技术人员知道预培养步骤, 并知道如何进行这种预培养步骤。

[0367] 本文使用的术语“综合活细胞密度”或“IVCD”是指在培养过程中活细胞的平均密度乘以培养运行的时间量。假设产生的多肽和/或蛋白质的量与在培养过程中存在的活细胞数成正比, 综合活细胞密度是估计在培养过程中产生的多肽和/或蛋白质量的有用工具。

[0368] 本发明的重组蛋白可通过在各种细胞培养物条件下培养表达该重组蛋白的细胞来生产。换句话说, 根据本发明的方法, 通过在任何发酵细胞培养物方法或系统下培养细胞来实现哺乳动物细胞的生物量生成和蛋白质表达, 只要是适合细胞生长的生物量生成与蛋白质表达的方法或系统都可以与本发明一起使用。例如, 细胞可以在批次、进料批次、灌注

或分批次培养中生长,在发生足够的蛋白表达后终止培养,之后收获蛋白质,并在需要时进行纯化。

[0369] 例如,在本发明的细胞培养物中,可以采用进料批次培养程序。在进料批次培养中,哺乳动物细胞可以被初始地供应到培养容器中,并且在培养过程中连续地或增量地向培养物进料额外的细胞营养物质,在终止培养之前定期或不定期地收获细胞和/或产物。进料批次培养可包括,例如,半连续进料批次培养,其中周期性地将整个培养物(包括细胞和介质)移除并由新鲜介质取代。进料批次培养区别于单纯的批次培养,在培养过程开始时,用于细胞培养的所有成分(包括细胞及所有培养营养物质)都被供应到培养容器中。进料批次培养可进一步区别于灌注培养,因为在此过程中,上清液不从培养容器中去除(在灌注培养中,细胞在培养中受到限制,例如,过滤、封装、锚定到微载体等,并且培养基连续或间歇地从培养容器中引入并去除)。替代地,细胞可以在灌注培养中生长,其中培养不终止并定期地或连续地向培养物中添加新的营养物质和成分,并定期地或连续地去除经表达的糖蛋白。

[0370] 此外,可根据可能适合特定宿主细胞及所设想的特定生产计划的任何方案或常规繁殖该培养的细胞。例如,用于发酵培养细胞以产生生物质并生产蛋白质的反应器、温度及其它条件,诸如氧气浓度和pH值是本领域已知的。任何适合于所选哺乳动物细胞培养的条件都可以利用现有技术中的资料来选择。培养条件,诸如温度、pH值等,通常是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的条件,对本领域技术人员来说将是显而易见的。如果需要,可以在培养过程中改变温度和/或pH值和/或CO₂,以提高产量和/或增加所需蛋白质质量的相对量。

[0371] 进一步在这种情况下,本发明还考虑了单步培养程序或多步培养程序。在单步培养中,将宿主细胞接种到培养环境中并且在细胞培养物的单一生产阶段采用本发明的过程。替代地,设想了多阶段的培养。在多阶段培养中,可分多个步骤或阶段培养细胞。例如,细胞可在第一步或生长阶段培养中生长,其中将可能从储存库中移出的细胞接种到适合于促进生长以及高生存力的介质中。“细胞生存力”是指培养中的细胞在给定的培养条件或实验变化下存活的能力。本文所用的术语还指在某一特定时间内,相对于当时培养物中的活细胞或死细胞总数而言,活着的那部分细胞。通过向宿主细胞培养物中添加新鲜介质,可使细胞在生长阶段保持合适的时间。

[0372] 例如,用于大规模或小规模生产蛋白质的细胞培养程序在本发明的背景下是潜在有用的。可使用包括但不限于流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养或搅拌釜生物反应器的程序,并且以批次、进料批次和/或灌注模式进行操作。如本文所用,“灌注培养”是指培养细胞的方法,该方法包括在接种基础介质上生长细胞,并且当细胞达到期望的细胞密度时,用新鲜介质代替用过的介质。灌注可以包括连续或间歇性灌注,并且可以包括将至少一种推注进料递送至细胞培养物中。灌注培养之后可以是进料批次培养。如本文所用,术语“生物反应器”是指用于哺乳动物细胞培养物的生长的任何容器。通常情况下,生物反应器将至少为1升,并且可为10升、100升、250升、500升、1000升、2500升、5000升、8000升、10,000升、12,000升或更多,或在两者之间的任何体积。生物反应器的内部条件,其包括但不限于pH值、溶解氧和温度,通常在培养期间进行控制。生物反应器可由任何适合于在本发明的培养条件下盛放悬浮在培养基中的哺乳动物细胞培养物的材料组成,其包括玻璃、塑

料或金属。在本发明的一优选的方面,培养哺乳动物细胞是在生物反应器中,更优选地在大规模形式生物反应器中。在本发明的一更优选的方面,至少在10,000L生物反应器中培养哺乳动物细胞。

[0373] 抗体Fc-半乳糖基化的重要性

[0374] 如图5所示,Asn297连接的碳水化合物链由四个N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和三个甘露糖残基组成共同的双触角聚糖结构,并可变地添加了岩藻糖、半乳糖和唾液酸残基。这些聚糖通常根据双触角末端半乳糖残基的数量来命名,即G0(无半乳糖)、G1(一个半乳糖)、G2(两个半乳糖),并根据是否存在核心岩藻糖残基来命名,即G0(无半乳糖)、G1(一个半乳糖)、G2(两个半乳糖)。

[0375] 在本发明中所用的一优选的方面,该重组蛋白是用于作为药物。类风湿性关节炎首次报告IgG半乳糖基化的变化(Parekh等人,Nature.316(1985)452-457)以及后来的其它自身免疫性疾病,诸如银屑病关节炎和强直性脊柱炎(Martin等人,J Rheumatol 28(2001)1531-1536)。妊娠期间发现半乳糖基化增加,在妊娠引起的缓解的类风湿性关节炎患者中也有出现(Bondt等人,J.Proteome.Res.12(2013)4522-4531)。这表明,抗体半乳糖基化增加可能在功能上更具抗炎性(Zauner等人,Mol.Cell Proteomics.12(2013)856-865)。Karsten等人(Nature Medicine 18.9(2012)1401-1406)通过在小鼠中研究表明,IgG免疫复合物的半乳糖基化可促进Fc γ RIIB与dectin-1的结合,从而阻断C5aR与CXCR226的促炎效应子功能,证实了这种抗炎特性。在本发明中所用的另一优选的方面,重组蛋白用于治疗B细胞增殖性疾病诸如非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病患者或帕金森氏病以及相关疾病患者。

[0376] 在研究末端半乳糖的功能影响时,需要考虑的另一个重要方面是,它为IgG-Fc聚糖上最远程的糖部位-唾液酸的添加提供了基础。寡糖分析表明,蛋白质半乳糖基化的缺失是导致唾液酸含量降低的潜在原因。

[0377] 已知半乳糖终止结构对C1q复合物的亲和力有很大影响,并且去除这些结构会导致补体裂解活性降低(Hodoniczky,J.等人,Biotechnol.Progr.21(2005)1644-1652)。更具体地说,Wright与Morrison(1998)(J Immunol.1998;160:3393-3402)与Hodoniczky等人(2005)发现,mAb Fc寡糖上半乳糖的缺失会降低Fc与补体C1q成分之间的亲和力,从而降低CDC的活性。

[0378] 利妥昔单抗(Rituximab, Rituxan®抗-CD20)于1997年首次批准,是一种在CHO细胞中生产的嵌合单克隆抗体,用于治疗非霍奇金淋巴瘤以及其它B细胞相关疾病。利妥昔单抗在Fc中被糖基化,并且Fc聚糖高度不均匀,主要是由于末端半乳糖残基的可变存在。利妥昔单抗的末端半乳糖残基对CDC活性的影响来自于这种残基参与利妥昔单抗与补体C1q的结合(Hodoniczky等人,2005)。

[0379] IgG聚糖上半乳糖的存在或不存在与一些但不是全部的Fc效应子功能的改变有关(Boyd等人,Mol Immunol.32(1995)1311-1318;Wright及Morrison,J Immunol.160(1998)3393-3402)单株IgG抗体中,表明所观察到的效应可能部分是抗体特异性的。Tsuchiya等人(1989)发现半乳糖IgG对C1q和Fc受体的结合能力降低,并且Boyd等人发现半乳糖Campath1(单株抗-CD52)对细胞介导的裂解(CML)能力降低,但触发ADCC的能力完整。因此,如本文所用,“效应子功能”,是指归因于抗体的Fc区的那些生物活性,其随抗体同型而变化。抗体效

应子功能的实例包括:Clq结合和补体依赖型细胞毒性作用(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以及B细胞活化;另请参见,例如,Thomann等人,PLoS One.2015年8月12日;10(8):e0134949.doi:10.1371/journal.pone.0134949.eCollection 2015。

[0380] 本文中的术语“Fc区”,用于定义包含至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C端区。该术语包括天然序列Fc区和变异体Fc区。尽管IgG重链的Fc区的边界可能略有变化,但通常将人IgG重链的Fc区定义为从Cys226或Pro230延伸至该重链的羧基端。但是,由宿主细胞产生的抗体可能经历重链C端的一种或多种,特别是一种或两种氨基酸的翻译后切割。因此,由宿主细胞通过表达编码全长重链的特定核酸分子而产生的抗体可包括全长重链,或者可包括全长重链的切割变异体(在本文中也称为“切割变异体重链”)。这可能是重链的最后两个C末端氨基酸为甘氨酸(G446)和赖氨酸(K447,根据Kabat EU索引)的情况。因此,可以存在或可以不存在Fc区的C端赖氨酸(Lys447)或C端甘氨酸(Gly446)和赖氨酸(K447)。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号根据EU编号系统(也称为EU指数)进行,如Kabat等人所述(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版 Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。

[0381] 在某些方面,如果重组蛋白为抗体,则与野生型Fc域相比,该抗体的Fc域可包含一个或多个改变。然而,与野生型相比,这些Fc域仍将保留治疗效用所需的基本相同特征。例如,可以在Fc区进行某些改变,这些改变将导致Clq结合的改变(即改善或减少)和/或补体依赖型细胞毒性作用(CDC)的改变,例如,如W099/51642中所述。另参见Duncan&Winter Nature 322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号;以及W094/29351涉及Fc区变异体的其它实例。W000/42072(Presta)和W0 2004/056312(Lowman)描述了与FcR结合改善或减少的抗体变异体。这些专利公开的内容通过引用的方式特别并入本文。也参见例如Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。具有延长的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)结合、负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)中。抗体的半衰期可以取决于抗体的Fc区的结构,而Fc区的结构又影响所述Fc区与新生受体FcRn的结合功效。从而通过维持Fc区与FcRn的结合来增加半衰期。特别地,在pH值约为6.0时,这种结合会导致与FcRn结合的抗体从溶酶体降解途径的内体运输,而回收到浆膜上,IgG在pH值为7.4时重新释放到血液中。因此,通过该途径可增加IgG在血液中的半衰期,这是延长抗体暴露于其目标和增强治疗功效潜力的必要条件;参见Saxena,Abhishek;Bai,Bingxin;Hou,Shin-Chen;Jiang,Lianlian;Ying,Tianlei;等人 Methods in molecular biology(Clifton,N.J.)1827:399-417.(2018);Spearman, Maureen;Dionne,Ben;Butler,Michael.Cell Engineering,Vol 7:Antibody Expression and Production 7:251-292.SPRINGER.(2011),通过引用的方式特别并入本文。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,其改善了Fc区与FcRn的结合。具有改变Fc区氨基酸序列以及增加或减少Clq结合能力的多肽变异体描述于美国专利第6,194,551号和国际出版物W099/51642。页可参见Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)。这些内容通过引用的方式特别并入本文。

[0382] 其它报告的半乳糖基化对IgG分子的影响包括改变物理化学特性,诸如构象和表

面可及性 (Krapp等人, J.Mol.Biol. 325 (2003) 979-89; Mimura等人, Immunol. 37 (2000) 697-706)。Fortunato和Colina (J.Phys.Chem. 118 (2014) 9844-9851) 使用显式水原子分子动力学模拟 (explicit water atomistic molecular dynamics simulation) 研究免疫球蛋白 G1 的 Fc 域中半乳糖基化的影响。据建议糖基化可以作为改善单克隆抗体的抗聚集性的途径, 用于治疗处理。如本文所用, “治疗” (及其语法变体, 诸如“治疗过程”或“治疗中”), 是指试图改变受治疗个体的疾病自然病程的临床干预, 并且可进行预防或在临床病理过程中执行。期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。在一些方面, 本发明的抗体用于延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

[0383] 从目前掌握的资料来看, 抗体中的半乳糖残基会影响某些 IgG 的功能, 并且可能需要在这些分子的半乳糖基化过程中进行有效的监测和控制。

[0384] 如前所述, 已知抗体半乳糖基化细胞中存在的 UDP-半乳糖的浓度, 因为这些糖分子充当半乳糖基化所需的受质。UDP-半乳糖含量的增加已被发现与 CHO 细胞中表达的抗体的高半乳糖基化和高唾液酸化有关。细胞中 UDP-半乳糖水平的变化也可能对其它治疗性蛋白中的其它类型的糖基化产生重大影响。

[0385] 调节UDP半乳糖浓度以进行O-连接糖基化

[0386] 一般来说, 在本文所用的重组蛋白中, 糖可以连接到天冬酰胺侧链中的酰胺氮原子上, 即 N-连接, 或者连接到丝氨酸或苏氨酸侧链中的氧原子上, 即 O-连接。O-连接糖基化是通过酶 UDP-N-乙酰-D-半乳糖胺: 多肽 N-乙酰-半乳糖胺转移酶 (EC 2.4.1.41) 将 N-乙酰-半乳糖胺添加到丝氨酸或苏氨酸残基上, 然后再添加其它碳水化合物, 诸如 UDP-半乳糖。因此, 细胞内 UDP-半乳糖浓度可能会影响 O-连接糖基化。因此, 本发明所述的新方法可用于调节细胞内 UDP-半乳糖水平, 并进一步控制最终蛋白质产物中的半乳糖基化水平。

[0387] 调节UDP半乳糖浓度以进行抗体Fab糖基化

[0388] IgG Fab 聚糖的存在已经有相当长的时间了。据推测, Fab 聚糖对于糖基转移酶来说更容易获得, 因此与空间上定位在 CH₂ 域内面的 Fc 聚糖相比, 处理量更大。因此, 细胞内 UDP-半乳糖浓度也可能影响 IgG Fab 半乳糖基化过程。因此, 本发明所述的新方法可用于调节细胞内 UDP-半乳糖水平, 并进一步控制最终蛋白质产物中的半乳糖基化水平。

[0389] 如在本发明中所使用, 重组蛋白的 N-连接半乳糖基化聚糖的水平增加。因此, 本发明的方法提高了重组蛋白的 N-连接半乳糖基化聚糖的产量。在本发明的一优选的方面, 重组蛋白包含至少单半乳糖基化, 更优选地双半乳糖基化聚糖, 并且其中半乳糖基化聚糖与 N-乙酰葡萄糖胺相结合。半乳糖与重组蛋白内各自目标的连接及其对重组蛋白功能的影响通过实例进一步概述如下。

[0390] 本发明还涉及一种包含重组蛋白的医药组成物。术语“组成物”和“医药组成物”可互换使用, 并应理解为所定义之医药组成物, 其中各个组分或成分本身是医药上可接受的, 例如在预见口服施用的情况下, 可接受口服使用, 并且在预见局部施用的情况下, 局部可接受, 并且还包括其组合物, 即在预见口服及局部施用的情况下, 可接受口服和局部使用。术语也指以下制剂, 其形式为允许包含的活性成分的生物活性有效的形式并且不含对于将被施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分。“药用载体”是指医药组成物或制剂中除对受试者无毒的活性成分以外的成分。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或

防腐剂。

[0391] 医药组成物将以符合良好医疗实践的方式进行配制和施用,并考虑到个别患者的临床状况、医药组合物的递送位点、施用方法、施用时间安排以及从业人员已知的其它因素。因此,本文目的的医药组成物的“有效量”是由这些考虑因素决定的。技术人员知道,向个人施用的医药组成物的有效量将特别取决于化合物的性质。在这种情况下,药剂例如医药组成物的“有效量”是指在所需的施用剂量和时间段内有效实现所需的治疗或预防效果的量。

[0392] 本发明的治疗性蛋白质诸如抗体(以及任何其它治疗剂)可通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则可以采用病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。投配可通过任何合适的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文中考虑各种本文考虑了各种投配时间安排,包括但不限于在各个时间点处的单次或多次施用、推注施用,以及脉冲输注。

[0393] 本发明的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、投配和施用。在这种情况下需要考虑的因素包括待治疗的特定疾患、待治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排,以及执业医师已知的其它因素。该抗体并非必须,而是任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所讨论的病症的药剂共同配制。此类其它药剂的有效量取决于医药组成物中存在的抗体的量、疾患或治疗的类型以及上文讨论的其它因素。这些通常以与本文中所述相同的剂量和施用途径施用,或以本文中所述剂量的约1%至99%施用,或以经验上/临床上确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

[0394] 为预防或治疗疾病,本发明的抗体的合适剂量(当单独使用或与一种或多种额外治疗剂联合使用)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重度和病程、出于预防目的还是治疗目的施用、既往治疗、患者的临床病史和对该抗体的应答以及主治医师的酌处权。

[0395] 如本文所用,术语“和/或”将被视为两个特定的特征或成分中的每个具有或不具有另一个的具体公开。例如,“A和/或B”将被视为(i) A、(ii) B以及(iii) A和B中的每一个的具体公开,就像每个在本文中单独列出一样。

[0396] 下面通过实例进一步描述本发明的各个方面和特征。尽管为了清楚理解的目的先前已经通过说明和实例相当详细地描述了发明,但是所述说明和实例不应解释为限制本发明的范围。

[0397] 本文引用的所有专利和非专利参考文献全文以引用方式并入本文。

[0398] 实施例

[0399] 来自CHO K1M细胞株的尿苷二磷酸(UDP) α -D-葡萄糖差向异构酶(UDP_Glc-E, EC 5.1.3.2)和UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的cDNA分别被亚克隆和测序。这两种酶发现在CHO细胞中的UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖转化途径中起着至关重要的作用。

[0400] 实施例1:尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶(UDP-Glc-E)在CHO K1M细胞株中的cDNA扩增和序列分析

[0401] 酶尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖4-差向异构酶(UDP_Glc-E, EC 5.1.3.2), 也称为UDP-半乳糖4-差向异构酶, 是一种在细菌、真菌、植物和哺乳动物细胞中发现的同源二聚差向异构酶。该酶催化UDP-葡萄糖向UDP-半乳糖的可逆转化。

[0402] 通过使用MagNA Pure LC RNA Isolation Kit-High Performance, 购自Roche (产品编号03542394001) 在Roche MagNA Pure LC 2.0仪器上运行(产品编号05197686001, Roche Diagnostics GmbH), 从CHO K1M细胞株(W02009047007)中提取总细胞RNA。通过Nano Vue (GE Healthcare Bio-Science AB) 测量纯化RNA的浓度, 并在-70°C保存。

[0403] 该经纯化的细胞RNA用于UDP_Glc-E cDNA合成和靶向扩增。使用Roche Transcriptor One-Step RT-PCR Kit (产品编号04655877001, Roche Diagnostics GmbH), 根据NCBI GenBank数据库设计的两个UDP_Glc-E特异性引子进行cDNA合成和扩增。

[0404] 这里使用的两种引子是:

[0405] 正向引子UDP_GlcE-F2-21 (SEQ ID NO:5):

[0406] 5' ATGGCCGAGAAGGTGCTGGTC 3', 和

[0407] 反向引子UDP_GlcE-R21 (SEQ ID NO:6):

[0408] 5' TTAGGCCTGTGCTCCAAAGCC 3'。

[0409] RT-PCR条件:

[0410] 反转录: 50°C 30min

[0411] 初步变性: 94°C 7min

[0412] 扩增PCR:

[0413] 变性: 94°C 10秒

[0414] 退火: 56°C 30秒

[0415] 延伸: 68°C 60秒 (60秒/kb)

[0416] 周期: 10

[0417] 变性: 94°C 10秒

[0418] 退火: 56°C 30秒

[0419] 延伸: 68°C 1:30+5秒 (+5秒/kb)

[0420] 周期: 25

[0421] 最后延伸: 68°C 7min

[0422] 首先用Roche High Pure PCR Product Purification Kit (产品编号11732668001, Roche Diagnostics GmbH) 对扩增的PCR产物进行纯化, 然后进行直接测序分析。UDP_Glc-E cDNA的序列如SEQUENCE-1 (SEQ ID NO:1) 所示。这个cDNA编码预测的348个氨基酸的蛋白质。CHO K1M中UDP-葡萄糖4-差向异构酶的衍生氨基酸序列如SEQUENCE-2 (SEQ ID NO:2) 所示。

[0423] UDP-Glc-E CHO K1M编码的蛋白序列具有与人UDP-葡萄糖4-差向异构酶94.5%的同一性和96.6%的同一性, 与小牛及小鼠的其它UDP-葡萄糖4-差向异构酶关系密切。

[0424] 实施例2: UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(UDP-Gal-T) cDNA扩增和序列分析在CHO K1M细胞株中的应用

[0425] UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(UDP-Gal-T, EC 2.7.7.12) 通过可逆机制催化尿苷-5'-二磷酸葡萄糖(UDP-葡萄糖)与半乳糖-1-磷酸盐(Gal-1-P)之间

的核苷酸交换,产生尿苷-5'-二磷酸半乳糖(UDP-半乳糖)和葡萄糖-1-磷酸盐(Glc-1-P)的酶。

[0426] 通过使用MagNA Pure LC RNA Isolation Kit-High Performance,购自Roche(产品编号03542394001)在Roche MagNA Pure LC 2.0仪器上运行(产品编号05197686001, Roche Diagnostics GmbH),从CHO K1M细胞株中提取总细胞RNA。通过Nano Vue(GE Healthcare Bio-Science AB)测量纯化RNA的浓度,并在-70℃保存。

[0427] 该经纯化的细胞RNA用于UDP-Gal-T cDNA合成和靶向扩增。使用Roche Transcriptor One-Step RT-PCR Kit(产品编号04655877001, Roche Diagnostics GmbH),根据NCBI GenBank数据库设计的两个UDP-Gal-T特异性引子进行cDNA合成和扩增。

[0428] 这里使用的两种引子是:

[0429] 正向引子UDP-Gal-T-F2-21(SEQ ID NO:7):

[0430] 5'ATGTCGCAAAACGGAGATGAT 3',及

[0431] 反向引子UDP-Gal-T-R18(SEQ ID NO:8):

[0432] 5'TCAAGCAACAGCTGCTGT 3'。

[0433] RT-PCR条件:

[0434] 反转录: 50℃30min

[0435] 初步变性: 94℃7min

[0436] 扩增PCR:

[0437] 变性: 94℃10秒

[0438] 退火: 56℃30秒

[0439] 延伸: 68℃60秒 (60秒/kb)

[0440] 周期: 10

[0441] 变性: 94℃10秒

[0442] 退火: 56℃30秒

[0443] 延伸: 68℃1:30+5秒 (+5秒/kb)

[0444] 周期: 25

[0445] 最后延伸: 68℃7min

[0446] 首先用Roche High Pure PCR Product Purification Kit(产品编号11732668001, Roche Diagnostics GmbH)对扩增的PCR产物进行纯化,然后进行直接测序分析。UDP-Gal-T cDNA的序列如SEQUENCE-3(SEQ ID NO:3)所示。这个cDNA编码预测的379个氨基酸的蛋白质。CHO K1M中UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的衍生氨基酸序列如SEQUENCE-4(SEQ ID NO:4)所示。

[0447] UDP-Gal-T CHO K1M编码的蛋白序列具有与人UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶89.4%的同性和94.7%的同性,与小鼠和小牛的其他UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶关系密切。

[0448] 实施例3:CHO细胞株L965中L-半胱氨酸的酶和途径调节用于重组抗人 α -突触核蛋白抗体的生产

[0449] 在本实施例中,使用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞株CHO K1M作为宿主细胞株(WO2009047007)。

[0450] CHO K1M细胞经过工程改造以表达抗人 α -突触核蛋白单克隆抗体(描述于US9670274B2和US9890209B9),该抗体与单体或寡聚人 α -突触核蛋白结合,在此设计为CHO L965细胞株。

[0451] 人 α -突触核蛋白可以形成纤维状聚集体,并且这些聚集体为路易体和路易神经突的主要成分。最近的科学研究表明, α -突触核蛋白的原纤维寡聚体可能为帕金森氏病进展的关键因素(Luk等人,2012)。

[0452] 特异性抗体L965可特异性结合细胞外 α -突触核蛋白,并且可用于预防细胞间聚集体的传播和帕金森氏病的进展。

[0453] 对于细胞培养物过程,订制版的不含血清的化学上限定介质用作培养L965细胞的基础介质。解冻后,将细胞在此介质中通入 $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 杀稻瘟菌素(Blasticidin,InvivoGen S.A.S.,France)和 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素(Puromycin-Solution,InvivoGen S.A.S.,France,Cat.No.ANT-PR),在摇动烧瓶中进行3-4天的期程。通过使用Kuhner Shaker X平台(Adolf Kühner AG,Birsfelden,Basel,Switzerland)的125mL和500mL烧瓶,通道条件为 36.5°C 、 $7\%\text{CO}_2$ 和160rpm。

[0454] 对于接种训练和生产过程,另一个订制版的不含血清的化学上限定介质用作繁殖L965细胞的基础介质。

[0455] 在该生产介质制备过程中,还包括额外的葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素(RTE1.2 Solution,Gibco,UK;Ref.No.043-90585H)和盐。在这种情况下,将介质中L-半胱氨酸(Merck Chemicals GmbH,Cat.No:1.02735.1000)的最终浓度分别调节为6mM和10mM。

[0456] 将预培养的细胞分别与制备的含有6mM或10mM L-半胱氨酸的生产介质平行接种N-2步骤约 3.0×10^5 细胞/mL以及N-1步骤约 5.0×10^5 细胞/mL,全部不含杀稻瘟菌素和嘌呤霉素。生产生物反应器分别以约 10.0×10^5 细胞/mL接种在含有6mM或10mM L-半胱氨酸的介质中。细胞在生产生物反应器中以预定的pH值、溶氧、温度和营养物质进料策略,在进料批次培养条件下进行培养。除非另有说明,通常采用2L生物反应器,初始培养体积为1.2L。

[0457] 生物反应器中的温度控制在 36.5°C ,并且搅拌器转速设置约为223rpm。提供了含有空气、 CO_2 和 O_2 的混合气体。溶解的二氧化碳浓度(dCO_2)每天脱机测量一次。通过改变混合气体中的氧分压,在线控制溶解氧浓度(DO)并调节到35%。除非另有说明,否则通过添加 CO_2 或 1.0M NaHCO_3 ,使pH值保持在7.00的pH设定点,死带为 ± 0.03 个pH单位。

[0458] 进料介质包括内部介质与葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸及盐的组合。该进料介质用溶液配制,并且在第3天、第6天及第9天加入培养物中,每次的量约为工作培养物体积的10体积%。

[0459] 在第4-14天期间,另外制备葡萄糖进料溶液,并添加到培养物中,以维持葡萄糖浓度在约 $\geq 4\text{g}/\text{l}$ 。

[0460] 每天用注射器取生产细胞培养物的样品进行脱机分析。生产时间一般持续约14天。使用CEDEX仪器(德国罗氏诊断有限公司),通过胰蓝排除法测量细胞浓度和生存力。使用COBAS INTEGRA® 400plus(德国罗氏诊断有限公司)对葡萄糖、谷氨酰胺、麸氨酸、乳酸、铵和产物浓度进行脱机测量。使用Cobas b221分析仪(瑞士罗特克莱兹罗氏诊断有限公司CH-6343Rotkreuz)分析溶解的二氧化碳。在Osmomat Auto Osmometer(德国柏林高能泰克)上用冰点降低法测量渗透压。

[0461] 在主要培养生产过程结束后,通过离心收集细胞培养物。上清液进一步用 Protein-A 进行小规模 mAb 纯化。用 2AB 分析经纯化的 mAb 的糖基化模式。

[0462] 图 6A-6E 说明了不同的 L-半胱氨酸浓度对抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G0 形态、抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G1 形态、抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G2 形态、产物滴度和细胞生长的影响 (IVCD)。

[0463] 图 6A 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 6mM L-半胱氨酸的过程中,抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G0 形态比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G0 形态低约 10.4%。

[0464] 图 6B 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 6mM L-半胱氨酸的过程中,抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G1 形态比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G1 形态高约 13%。

[0465] 图 6C 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 6mM L-半胱氨酸的过程中,抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G2 形态比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的抗 α -突触核蛋白抗体 L965 的 G2 形态高约 5%。

[0466] 图 6D 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 6mM L-半胱氨酸的过程中,产物滴度比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的产物滴度高约 73%。

[0467] 图 6E 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 6mM L-半胱氨酸的过程中,细胞生长比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的细胞生长高。

[0468] 实施例 4: CHO 细胞株 T104 中 L-半胱氨酸的酶和途径调节用于重组抗-CD20/抗-CD3 双特异性抗体的生产

[0469] 在本实施例中,使用来自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的细胞株 CHO K1M 作为宿主细胞株 (WO2009047007)。CHO K1M 细胞经过工程改造以表达 CD20-CD3 靶向 T 细胞的双特异性单克隆抗体,抗-CD20/抗-CD3 bsAB (描述于 EP3252078A1),在此设计为 CHO T104 细胞株。

[0470] 抗-CD20/抗-CD3 bsAB 为一种 T 细胞双特异性 (TCB) 抗体,靶向 B 细胞上表达的 CD20 和 T 细胞上存在的 CD3 ϵ 链 (CD3 ϵ)。抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的作用机制包括同时结合 CD20⁺ B 细胞和 CD3⁺ T 细胞,导致 T 细胞活化和 T 细胞介导的 B 细胞杀伤。在 CD20⁺ B 细胞的存在下,无论是循环还是组织常驻,药理活性给药都会引发 T 细胞活化和相关细胞因子的释放。抗-CD20/抗-CD3 bsAB 可用于治疗疾病,特别是 B 细胞增殖性疾病,并用于减少对施用 T 细胞活化治疗剂的不良影响。例如,慢性淋巴细胞白血病患者可以用抗-CD20/抗-CD3 双特异性抗体治疗。

[0471] 对于细胞培养物过程,定制版的不含血清的化学上限定介质用作培养 T104 细胞的基础介质。解冻后,将细胞在此介质中通入 250 nM 甲胺蝶呤 (MTX; Pfizer, Cat.No.13999031),在摇动烧瓶中进行 3-4 天的期程。通过使用 Kuhner Shaker X 平台 (Adolf K ü hner AG, Birsfelden, Basel, Switzerland) 的 125mL 和 500mL 烧瓶,通道条件为 36.5°C、7%CO₂ 和 160rpm。

[0472] 对于接种训练和生产过程,另一个定制版的不含血清的化学上限定介质用作繁殖 T104 细胞的基础介质。在该生产介质制备过程中,还包括额外的葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素 (RTE1.0 Solution, SAFC, Ref.No.CR40054-1000M SLBR5143V) 和盐。在这种情况下,将介质中 L-半胱氨酸 (Merck Chemicals GmbH, Cat.No:1.02735.1000) 的最终浓度分别

调节为5mM和10mM。

[0473] 将预培养的细胞分别与制备的含有5mM或10mM L-半胱氨酸的生产介质平行接种N-2步骤约 3.0×10^5 细胞/mL以及N-1步骤约 5.0×10^5 细胞/mL,全部不含MTX。生产生物反应器分别以约 10.0×10^5 细胞/mL接种在含有5mM或10mM L-半胱氨酸的介质中。细胞在生产生物反应器中以预定的pH值、溶氧、温度和营养物质进料策略,在进料批次培养条件下进行培养。除非另有说明,通常采用2L生物反应器,初始培养体积为1.2L。采用Ambr-250生物反应器,其初始培养体积为200mL。

[0474] 生物反应器中的温度控制在 36.5°C ,并且搅拌器转速设置约为223rpm。提供了含有空气、 CO_2 和 O_2 的混合气体。溶解的二氧化碳浓度(dCO_2)每天脱机测量一次。通过改变混合气体中的氧分压,在线控制溶解氧浓度(DO)并调节到35%。除非另有说明,否则通过添加 CO_2 或 1.0MNaHCO_3 ,使pH值保持在7.00的pH设定点,死带为 ± 0.03 个pH单位。

[0475] 进料介质包括内部介质与葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸及盐的组合。该进料介质用溶液配制,并且在第3天、第6天及第9天加入培养物中,每次的量约为工作培养物体积的10%。

[0476] 在第4-14天期间,另外制备葡萄糖进料溶液,并添加到培养物中,以维持葡萄糖浓度在约 $\geq 3\text{g/l}$ 。

[0477] 每天用注射器取生产细胞培养物的样品进行脱机分析。生产时间一般持续约14天。使用CEDEX仪器(德国罗氏诊断有限公司),通过胰蓝排除法测量细胞浓度和生存力。使用COBASINTEGRA® 400plus(德国罗氏诊断有限公司)对葡萄糖、谷氨酰胺、麸氨酸、乳酸、铵和产物浓度进行脱机测量。使用Cobas b221分析仪(瑞士罗特克莱兹罗氏诊断有限公司CH-6343 Rotkreuz)分析溶解的二氧化碳。在Osmomat Auto Osmometer(德国柏林高能泰克)上用冰点降低法测量渗透压。

[0478] 在主要培养生产过程结束后,通过离心收集细胞培养物。上清液进一步用Protein-A进行小规模mAb纯化。用2AB分析经纯化的mAb的糖基化模式。

[0479] 图7A-7D说明不同L-半胱氨酸浓度对抗-CD20/抗-CD3 bsAB的G0形态、抗-CD20/抗-CD3 bsAB的G1形态、细胞生长(IVCD)和产物滴度的影响。

[0480] 图7A示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加5mM L-半胱氨酸的过程中,抗-CD20/抗-CD3 bsAB的G0形态比在生产介质中添加10mM L-半胱氨酸的过程中的抗-CD20/抗-CD3 bsAB的G0形态低约5.5%。

[0481] 图7B示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加5mM L-半胱氨酸的过程中,抗-CD20/抗-CD3 bsAB的G1形态比在生产介质中添加10mM L-半胱氨酸的过程中的抗-CD20/抗-CD3 bsAB的G1形态高约3.4%。

[0482] 图7C示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加5mM L-半胱氨酸的过程中,产物滴度比在生产介质中添加10mM L-半胱氨酸的过程中的产物滴度高约66%。

[0483] 图7D示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加5mM L-半胱氨酸的过程中,细胞生长比在生产介质中添加10mM L-半胱氨酸的过程中的细胞生长高。

[0484] 实施例5:使用L-半胱氨酸调节重组抗-CD20/抗-CD3双特异性抗体生产CHO细胞株T104的酶和途径改善生产过程

[0485] 在本实施例中,使用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞株CHO K1M作为宿主细胞

株(WO2009047007)。CHO K1M细胞经过工程改造以表达抗-CD20/抗-CD3靶向T细胞的双特异性单克隆抗体,抗-CD20/抗-CD3 bsAB(描述于EP3252078A1),在此设计为T104细胞株。

[0486] 抗-CD20/抗-CD3 bsAB为一种T细胞双特异性(TCB)抗体,靶向B细胞上表达的CD20和T细胞上存在的CD3 ϵ 链(CD3 ϵ)。抗-CD20/抗-CD3 bsAB的作用机制包括同时结合CD20+ B细胞和CD3+ T细胞,导致T细胞活化和T细胞介导的B细胞杀伤。在CD20+ B细胞的存在下,无论是循环还是组织常驻,药理活性给药都会引发T细胞活化和相关细胞因子的释放。抗-CD20/抗-CD3 bsAB可用于治疗疾病,特别是B细胞增殖性疾病,并用于减少对施用T细胞活化治疗剂的不良影响。

[0487] 对于细胞培养物过程,订制的含血清的化学限定内部介质用作培养T104细胞的基础介质。解冻后,将细胞在此介质中通入250 nM甲胺蝶呤(MTX;Pfizer, Cat.No.13999031),在摇动烧瓶中进行3-4天的期程。通过使用Kuhner Shaker X平台(Adolf Kühner AG,Birsfelden,Basel,Switzerland)的125mL和500mL烧瓶,通道条件为36.5°C、7%CO₂和160rpm。

[0488] 对于接种训练和生产过程,另一个定制版的不含血清的化学上限定介质用作繁殖T104细胞的基础介质。在该生产介质制备过程中,还包括额外的葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素(RTE1.2 Solution,Gibco,UK;Ref.No.043-90585H),和盐。在这种情况下,将介质中L-半胱氨酸(Merck Chemicals GmbH,Cat.No:1.02735.1000)的最终浓度分别调节为5mM和10mM。

[0489] 将预培养的细胞分别与制备的含有5mM或10mM L-半胱氨酸的生产介质平行接种N-2步骤约 3.0×10^5 细胞/mL以及N-1步骤约 5.0×10^5 细胞/mL,全部不含MTX。生产生物反应器分别以约 10.0×10^5 细胞/mL接种在含有5mM或10mM L-半胱氨酸的介质中。细胞在生产生物反应器中以预定的pH值、溶氧、温度和营养物质进料策略,在进料批次培养条件下进行培养。除非另有说明,采用2L生物反应器,其初始培养体积为1.2L。除非另有说明,采用Ambr-250生物反应器,其初始培养体积为200mL。

[0490] 生物反应器中的温度控制在36.5°C,并且搅拌器转速设置约为223rpm。提供了含有空气、CO₂和O₂的混合气体。溶解的二氧化碳浓度(dCO₂)每天脱机测量一次。通过改变混合气体中的氧分压,在线控制溶解氧浓度(DO)并调节到35%。除非另有说明,否则通过添加CO₂或1.0M NaHCO₃,使pH值保持在7.00的pH设定点,死带为 ± 0.03 个pH单位。

[0491] 进料介质包括RF1.0 Powder(SAFC,Cat.No.CR60112)、葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸和盐的组合。该进料介质用溶液配制,并且在第3天、第6天及第9天加入培养物中,每次的量约为工作培养物体积的10体积%。

[0492] 在第4-14天期间,另外制备葡萄糖进料溶液,并添加到培养物中,以维持葡萄糖浓度在约 $\geq 3g/l$ 。

[0493] 每天用注射器取生产细胞培养物的样品进行脱机分析。生产时间一般持续约14天。使用CEDEX仪器(德国罗氏诊断有限公司),通过胰蓝排除法测量细胞浓度和生存力。使用COBAS INTEGRA® 400plus(德国罗氏诊断有限公司)对葡萄糖、谷氨酰胺、麸氨酸、乳酸、铵和产物浓度进行脱机测量。使用Cobas b221分析仪(瑞士罗特克莱兹罗氏诊断有限公司CH-6343 Rotkreuz)分析溶解的二氧化碳。在Osmomat Auto Osmometer(德国柏林高能泰克)上用冰点降低法测量渗透压。

[0494] 在主要培养生产过程结束后,通过离心收集细胞培养物。上清液进一步用 Protein-A 进行小规模 mAb 纯化。用 2AB 分析经纯化的 mAb 的糖基化模式。

[0495] 图 8A-8D 说明不同 L-半胱氨酸浓度对抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的 G0 形态、抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的 G1 形态、细胞生长 (IVCD) 和产物滴度的影响。

[0496] 图 8A 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 5mM L-半胱氨酸的过程中,抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的 G0 形态比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的 G0 形态低约 3.8%。

[0497] 图 8B 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 5mM L-半胱氨酸的过程中,抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的 G1 形态比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的抗-CD20/抗-CD3 bsAB 的 G1 形态高约 2.5%。

[0498] 图 8C 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 5mM L-半胱氨酸的过程中,产物滴度比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的产物滴度高约 67%。

[0499] 图 8D 示出,在 14 天生产过程结束时,在生产介质中添加 5mM L-半胱氨酸的过程中,细胞生长比在生产介质中添加 10mM L-半胱氨酸的过程中的细胞生长高。

[0500] 实施例 6: CHO 细胞株 L967 中 L-胱氨酸的途径调节用于重组抗人 α -突触核蛋白抗体的生产

[0501] 在本实施例中,使用来自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的细胞株 CHO K1M 作为宿主细胞株 (WO2009047007)。CHO K1M 细胞经过工程改造以表达抗人 α -突触核蛋白单克隆抗体 (描述于 US9670274B2 和 US9890209B9), 该抗体与单体或寡聚人 α -突触核蛋白结合,在此设计为 L967 细胞株。

[0502] 人 α -突触核蛋白可以形成纤维状聚集体,并且这些聚集体为路易体和路易神经突的主要成分。最近的科学研究表明, α -突触核蛋白的原纤维寡聚体可能为帕金森氏病进展的关键因素 (Luk 等人, 2012)。特异性抗体 L967 可特异性结合细胞外 α -突触核蛋白,并且可用于预防细胞间聚集体的传播和帕金森氏病的进展。

[0503] 对于细胞培养物过程,订制版的不含血清的化学上限定介质用作培养 L967 细胞的基础介质。解冻后,将细胞在此介质中通入 5 μ g/mL 嘌呤霉素 (Puromycin-Solution, InvivoGen S.A.S., France, Cat.No. ANT-PR), 在摇动烧瓶中进行 3-4 天的期程。通过使用 Kuhner Shaker X 平台 (Adolf K ü hner AG, Birsfelden, Basel, Switzerland) 的 125mL 和 500mL 烧瓶,通道条件为 36.5 $^{\circ}$ C、7%CO₂ 和 160rpm。

[0504] 对于接种训练和生产过程,另一个订制版的不含血清的化学上限定介质用作繁殖 L967 细胞的基础介质。在该生产介质制备过程中,还包括额外的葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素 (经稀释的 RTE1.2 Solution, Gibco, UK; Ref.No. 043-90585H) 和盐。使用前,将介质中 L-胱氨酸 (L-胱氨酸二钠盐一水合物; SAFC, 供货商货号 RES1523C-A154X) 的最终浓度分别调节为 2mM 和 4mM。

[0505] 将预培养的细胞分别与制备的含有 2mM 或 4mM L-胱氨酸的生产介质平行接种 N-2 步骤约 3.0 \times 10⁵ 细胞/mL 以及 N-1 步骤约 5.0 \times 10⁵ 细胞/mL。生产生物反应器分别以约 10.0 \times 10⁵ 细胞/mL 接种在含有 2mM 或 4mM L-胱氨酸的介质中。细胞在生产生物反应器中以预定的 pH 值、溶氧、温度和营养物质进料策略,在进料批次培养条件下进行培养。除非另有说明,通常采用 2L 生物反应器,初始培养体积为 1.2L。采用 Ambr-250 生物反应器,其初始培养体积为

200mL。

[0506] 生物反应器中的温度控制在36.5℃,并且搅拌器转速设置约为223rpm。提供了含有空气、CO₂和O₂的混合气体。溶解的二氧化碳浓度(dCO₂)每天脱机测量一次。通过改变混合气体中的氧分压,在线控制溶解氧浓度(DO)并调节到35%。除非另有说明,否则通过添加CO₂或1.0M NaHCO₃,使pH值保持在7.00的pH设定点,死带为±0.03个pH单位。

[0507] 进料介质包括RF1.0 Powder (SAFC, Cat.No.CR60112)、葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸和盐的组合。该进料介质用溶液配制,并且在第3天、第6天及第9天加入培养物中,每次的量约为工作培养物体积的10体积%。

[0508] 在第4-14天期间,另外制备葡萄糖进料溶液,并添加到培养物中,以维持葡萄糖浓度在约≥4g/l。

[0509] 每天用注射器取生产细胞培养物的样品进行脱机分析。生产时间一般持续约14天。使用CEDEX仪器(德国罗氏诊断有限公司),通过胰蓝排除法测量细胞浓度和生存力。使用COBAS INTEGRA® 400plus(德国罗氏诊断有限公司)对葡萄糖、谷氨酰胺、麸氨酸、乳酸、铵和产物浓度进行脱机测量。使用Cobas b221分析仪(瑞士罗特克萊茲罗氏诊断有限公司CH-6343 Rotkreuz)分析溶解的二氧化碳。在Osmomat Auto Osmometer(德国柏林高能泰克)上用冰点降低法测量渗透压。

[0510] 在主要培养生产过程结束后,通过离心收集细胞培养物。上清液进一步用Protein-A进行小规模mAb纯化。用2AB分析经纯化的mAb的糖基化模式。

[0511] 图9A-9E说明了不同的L-胱氨酸浓度对抗α-突触核蛋白抗体L967的G0形态、抗α-突触核蛋白抗体L967的G1形态、抗α-突触核蛋白抗体L967的G2形态、产物滴度和细胞生长的影响(IVCD)。

[0512] 图9A示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,抗α-突触核蛋白抗体L967的G0形态比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的抗α-突触核蛋白抗体L967的G0形态高约6.6%。

[0513] 图9B示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,抗α-突触核蛋白抗体L967的G1形态比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的抗α-突触核蛋白抗体L967的G1形态低约5.9%。

[0514] 图9C示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,抗α-突触核蛋白抗体L967的G2形态比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的抗α-突触核蛋白抗体L967的G2形态低约1.6%。

[0515] 图9D示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,产物滴度比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的产物滴度低约9%。

[0516] 图9E示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,细胞生长比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的细胞生长低约3.7%。

[0517] 实施例7:CHO细胞株L971中L-胱氨酸的途径调节用于重组抗人α-突触核蛋白抗体的生产

[0518] 在本实施例中,使用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞株CHO K1M作为宿主细胞株(WO2009047007)。CHO K1M细胞经过工程改造以表达抗人α-突触核蛋白单克隆抗体(描述于US9670274B2和US9890209B9),该抗体与单体或寡聚人α-突触核蛋白结合,在此设计为

CHO L971细胞株。

[0519] 人 α -突触核蛋白可以形成纤维状聚集体,并且这些聚集体为路易体和路易神经突的主要成分。最近的科学研究表明, α -突触核蛋白的原纤维寡聚体可能为帕金森氏病进展的关键因素(Luk等人,2012)。特异性抗体L971可特异性结合细胞外 α -突触核蛋白,并且可用于预防细胞间聚集体的传播和帕金森氏病的进展。

[0520] 对于细胞培养物过程,订制的¹不含血清的化学性介质用作培养L971细胞的基础介质。解冻后,将细胞在此介质中通入5 μ g/mL嘌呤霉素(Puromycin-Solution,InvivoGen S.A.S.,France,Cat.No.ANT-PR),在摇动烧瓶中进行3-4天的期程。通过使用Kuhner Shaker X平台(Adolf K ü hner AG,Birsfelden,Basel,Switzerland)的125mL和500mL烧瓶,通道条件为36.5 $^{\circ}$ C、7%CO₂和160rpm。

[0521] 对于接种训练和生产过程,另一个定制版的¹不含血清的化学上限定介质用作繁殖L971细胞的基础介质。在该生产介质制备过程中,还包括额外的葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素(RTE1.2 Solution,Gibco,UK;Ref.No.043-90585H),和盐。使用前,将介质中L-胱氨酸(L-胱氨酸二钠盐一水合物;SAFC,供货商货号RES1523C-A154X)的最终浓度分别调节为2mM和4mM。

[0522] 将预培养的细胞分别与制备的含有2mM或4mM L-胱氨酸的生产介质平行接种N-2步骤约3.0 $\times 10^5$ 细胞/mL以及N-1步骤约5.0 $\times 10^5$ 细胞/mL。生产生物反应器分别以约10.0 $\times 10^5$ 细胞/mL接种在含有2mM或4mM L-胱氨酸的介质中。细胞在生产生物反应器中以预定的pH值、溶氧、温度和营养物质进料策略,在进料批次培养条件下进行培养。除非另有说明,通常采用2L生物反应器,初始培养体积为1.2L。采用Ambr-250生物反应器,其初始培养体积为200mL。

[0523] 生物反应器中的温度控制在36.5 $^{\circ}$ C,并且搅拌器转速设置约为223rpm。提供了含有空气、CO₂和O₂的混合气体。溶解的二氧化碳浓度(dCO₂)每天脱机测量一次。通过改变混合气体中的氧分压,在线控制溶解氧浓度(DO)并调节到35%。除非另有说明,否则通过添加CO₂或1.0M NaHCO₃,使pH值保持在7.00的pH设定点,死带为 ± 0.03 个pH单位。

[0524] 进料介质包括RF1.0 Powder(SAFC,Cat.No.CR60112)、葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸和盐的组合。该进料介质用溶液配制,并且在第3天、第6天及第9天加入培养物中,每次的量约为工作培养物体积的10体积%。

[0525] 在第4-14天期间,另外制备葡萄糖进料溶液,并添加到培养物中,以维持葡萄糖浓度在约 ≥ 4 g/l。

[0526] 每天用注射器取生产细胞培养物的样品进行脱机分析。生产时间一般持续约14天。使用CEDEX仪器(德国罗氏诊断有限公司),通过胰蓝排除法测量细胞浓度和生存力。使用COBAS INTEGRA[®]400plus(德国罗氏诊断有限公司)对葡萄糖、谷氨酰胺、麸氨酸、乳酸、铵和产物浓度进行脱机测量。使用Cobas b221分析仪(瑞士罗特克莱兹罗氏诊断有限公司CH-6343 Rotkreuz)分析溶解的二氧化碳。在Osmomat Auto Osmometer(德国柏林高能泰克)上用冰点降低法测量渗透压。

[0527] 在主要培养生产过程结束后,通过离心收集细胞培养物。上清液进一步用Protein-A进行小规模mAb纯化。用2AB分析经纯化的mAb的糖基化模式。

[0528] 图10A-10E说明了不同的L-胱氨酸浓度对抗 α -突触核蛋白抗体L971的G0形态、

抗- α -突触核蛋白抗体L971的G1形态、抗- α -突触核蛋白抗体L971的G2形态、产物滴度和细胞生长的影响(IVCD)。

[0529] 图10A示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,抗- α -突触核蛋白抗体L971的G0形态比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的抗- α -突触核蛋白抗体L971的G0形态高约3%。

[0530] 图10B示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,抗- α -突触核蛋白抗体L971的G1形态比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的抗- α -突触核蛋白抗体L971的G1形态低约2%。

[0531] 图10C示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,抗- α -突触核蛋白抗体L971的G2形态与在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的抗- α -突触核蛋白抗体L971的G2形态相当。

[0532] 图10D示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,产物滴度比在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的产物滴度低约30%。

[0533] 图10E示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加2mM L-胱氨酸的过程中,细胞生长与在生产介质中添加4mM L-胱氨酸的过程中的细胞生长稍微相当。

[0534] 实例8:使用L-半胱氨酸或L-胱氨酸过程生产的重组抗-人 α -突触核蛋白抗体L971的功能比较

[0535] 在本实施例中,使用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的细胞株CHO K1M作为宿主细胞株(WO2009047007)。CHO K1M细胞经过工程改造以表达抗人 α -突触核蛋白单克隆抗体(描述于US9670274B2和US9890209B9),该抗体与单体或寡聚人 α -突触核蛋白结合,在此设计为CHO L971细胞株。

[0536] 人 α -突触核蛋白可以形成纤维状聚集体,并且这些聚集体为路易体和路易神经突的主要成分。最近的科学研究表明, α -突触核蛋白的原纤维寡聚体可能为帕金森氏病进展的关键因素(Luk等人,2012)。特异性抗体L971可特异性结合细胞外 α -突触核蛋白,并且可用于预防细胞间聚集体的传播和帕金森氏病的进展。

[0537] 对于细胞培养物过程,订制的含血清的化学性介质用作培养L965细胞的基础介质。解冻后,将细胞在此介质中通入5 μ g/mL嘌呤霉素(Puromycin-Solution, InvivoGen S.A.S., France, Cat.No. ANT-PR),在摇动烧瓶中进行3-4天的期程。通过使用Kuhner Shaker X平台(Adolf K ü hner AG, Birsfelden, Basel, Switzerland)的125mL和500mL烧瓶,通道条件为36.5 $^{\circ}$ C、7%CO₂和160rpm。

[0538] 对于接种训练和生产过程,另一个定制版的不含血清的化学上限定介质用作繁殖L971细胞的基础介质。

[0539] 在该生产介质制备过程中,还包括额外的葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸、微量元素(RTE1.2 Solution, Gibco, UK; Ref.No. 043-90585H),和盐。使用前,将介质中的一部分介质的L-胱氨酸(L-胱氨酸二钠盐一水合物;SAFC, 供货商货号RES1523C-A154X)的最终浓度调节为3mM。为了直接比较,将介质中的另一部分介质的L-半胱氨酸(Merck Chemicals GmbH, Cat.No:1.02735.1000)的最终浓度调节为6mM。

[0540] 将预培养的细胞分别与制备的含有预定量的L-胱氨酸或L-半胱氨酸的生产介质平行接种N-2步骤约3.0 $\times 10^5$ 细胞/mL及N-1步骤约5.0 $\times 10^5$ 细胞/mL。生产生物反应器分别以

约 10.0×10^5 细胞/mL接种在含有预定量的L-胱氨酸(3mM)或L-半胱氨酸(6mM)的介质中。细胞在生产生物反应器中以预定的pH值、溶氧、温度和营养物质进料策略,在进料批次培养条件下进行培养。除非另有说明,通常采用2L生物反应器,初始培养体积为1.2L。采用Ambr-250生物反应器,其初始培养体积为200mL。

[0541] 生物反应器中的温度控制在 36.5°C ,并且搅拌器转速设置约为223rpm。提供了含有空气、 CO_2 和 O_2 的混合气体。溶解的二氧化碳浓度(dCO_2)每天脱机测量一次。通过改变混合气体中的氧分压,在线控制溶解氧浓度(DO)并调节到35%。除非另有说明,否则通过添加 CO_2 或1.0M NaHCO_3 ,使pH值保持在7.00的pH设定点,死带为 ± 0.03 个pH单位。

[0542] 进料介质包括内部介质与葡萄糖、谷氨酰胺、氨基酸及盐的组合。该进料介质用溶液配制,并且在第3天、第6天及第9天加入培养物中,每次的量约为工作培养物体积的10体积%。

[0543] 在第4-14天期间,另外制备葡萄糖进料溶液,并添加到培养物中,以维持葡萄糖浓度在约 $\geq 4\text{g/l}$ 。

[0544] 每天用注射器取生产细胞培养物的样品进行脱机分析。生产时间一般持续约14天。使用CEDEX仪器(德国罗氏诊断有限公司),通过胰蓝排除法测量细胞浓度和生存力。使用COBAS INTEGRA® 400plus(德国罗氏诊断有限公司)对葡萄糖、谷氨酰胺、麸氨酸、乳酸、铵和产物浓度进行脱机测量。使用Cobas b221分析仪(瑞士罗特克莱兹罗氏诊断有限公司CH-6343 Rotkreuz)分析溶解的二氧化碳。在Osmomat Auto Osmometer(德国柏林高能泰克)上用冰点降低法测量渗透压。

[0545] 在主要培养生产过程结束后,通过离心收集细胞培养物。上清液进一步用Protein-A进行小规模mAb纯化。用2AB分析经纯化的mAb的糖基化模式。

[0546] 新生儿Fc受体(FcRn)影响IgG型抗体的药代动力学(PK)谱,其能力是将抗体从早期内膜中打捞出来,并回收到循环中。与FcRn的相互作用被认为是确定IgG型治疗性抗体PK的最关键因素并且被认为是廓清率的代用指标(参见综述Nimmerjahn和Ravetch2008)。

[0547] $\text{Fc}\gamma$ -受体为免疫效应子细胞上效应子功能的媒介。在不同的人 $\text{Fc}\gamma$ -受体中, $\text{Fc}\gamma$ -RIIa被认为是介导抗体依赖型吞噬作用(ADCP)的主导因素。在 $\text{Fc}\gamma$ -RIIa的两种最普遍的异型中,氨基酸位置131的组氨酸(H131)的形式通常被描述为亲和力较高的异型。(Nimmerjahn与Ravetch 2008,Yamada等人.2013)

[0548] 在这里,通过表面电浆共振(SPR)确定小规模纯化的aSyn-L971-mAb样品与FcRn和 $\text{Fc}\gamma$ 11a(His131)的相对结合。通过ELISA确定小规模纯化的aSyn-L971-mAb样品与目标的相对结合。

[0549] 图11A-11E分别说明了细胞培养物过程中产生的aSyn-L971抗体与3mM L-胱氨酸或6mM L-半胱氨酸在细胞培养基中的直接比较。

[0550] 图11A示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加6mM L-半胱氨酸的过程中,抗- α -突触核蛋白抗体L971的G1形态只稍微比在生产介质中添加3mM L-胱氨酸的过程中的抗- α -突触核蛋白抗体L971的G1形态高。

[0551] 图11B示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加6mM L-半胱氨酸的过程中,抗- α -突触核蛋白抗体L971的G2形态与在生产介质中添加3mM L-胱氨酸的过程中的抗- α -突触核蛋白抗体L971的G2形态相当。

[0552] 图11C示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加6mM L-半胱氨酸的过程中产生的抗- α -突触核蛋白抗体L971的FcRn相对结合水平(相对水平约为118%)比在生产介质中添加3mM L-胱氨酸的过程中产生的抗- α -突触核蛋白抗体L971的FcRn相对结合水平(相对水平约为85%)高出约33%。

[0553] 图11D示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加6mM L-半胱氨酸的过程中产生的抗- α -突触核蛋白抗体L971的Fc γ -RIIa (H131) 相对结合水平(相对水平约为113%)比在生产介质中添加3mM L-胱氨酸的过程中产生的抗- α -突触核蛋白抗体L971的Fc γ -RIIa (H131) 相对结合水平(相对水平约为77%)高出约36%。

[0554] 图11E示出,在14天生产过程结束时,在生产介质中添加6mM L-半胱氨酸的过程中产生的抗- α -突触核蛋白抗体L971的目标相对结合水平(相对水平约为118%)比在生产介质中添加3mM L-胱氨酸的过程中产生的抗- α -突触核蛋白抗体L971的目标相对结合水平(相对水平约为83%)高出约35%。

[0555]

表 1 - 实验结果
总结

编号	抗体	说明	G0 的相 对水平 (在第 14 天) (%)	G1 的相 对水平 (在第 14 天) (%)	G2 的相 对水平 (在第 14 天) (%)	相对滴度 (在第 14 天) (%)	FcRn 结 合的相对 水平 (在 第 14 天) (%)	FcyRIIa 结合的相 对水平 (在第 14 天) (%)	目标结合 的相对水 平 (在第 14 天) (%)	IVCD 的 相对水平 (在第 14 天) (%)
实施例-3	抗- α -突 触核蛋白	抗- α -突触核蛋白 L965 (6 mM Cys)	55.3	31.2	8.4	173.2	无测量	无测量	无测量	377.1
		抗- α -突触核蛋白 L965 (10 mM Cys)	71.7	17.2	3.1	100.0	无测量	无测量	无测量	100.0
实施例-4	抗 CD20- CD3 TCB (T 细胞双 特异性)	抗 CD20-CD3 TCB (5 mM 半胱氨酸)	71.6	26.0	无测量	165.9	无测量	无测量	无测量	183.5
		抗 CD20-CD3 TCB (10 mM 半胱氨酸)	75.9	22.6	无测量	100.0	无测量	无测量	无测量	100.0
实施例-5	抗 CD20- CD3 TCB	抗 CD20-CD3 TCB (5 mM 半胱氨酸)	70.1	28.0	无测量	167.0	无测量	无测量	无测量	179.1
		抗 CD20-CD3 TCB (10 mM 半胱氨酸)	73.2	25.5	无测量	100.0	无测量	无测量	无测量	100.0
实施例-6	抗- α -突 触核蛋白	抗- α -突触核蛋白 L967 (2 mM 胱氨酸)	71.1	21.8	3.1	91.1	无测量	无测量	无测量	96.3
		抗- α -突触核蛋白 L967 (4 mM 胱氨酸)	64.0	27.8	4.7	100.0	无测量	无测量	无测量	100.0
实施例-7	抗- α -突 触核蛋白	抗- α -突触核蛋白 L971 (2 mM 胱氨酸)	65.6	25.5	4.2	69.5	无测量	无测量	无测量	101.4

[0556]

		抗-α-突触核蛋白 L971 (4 mM 脱氨酸)	63.5	27.2	4.4	100.0	无测量	无测量	100.0
实施例-8	抗-α-突 触核蛋白	抗-α-突触核蛋白 L971 (3 mM 脱氨酸)	68.5	25.4	3.5	101.3	85.0	77.0	83.0
		抗-α-突触核蛋白 L971 (6 mM 半胱氨 酸)	66.6	27.2	4.6	100.0	118.0	113.0	118.0

[0557]

序列识别	序列和序列识别号 (SEQ ID NO.s)
CHO K1M 中 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶的 cDNA 序列	atg gcc gag aag gtg ctg gtc aca ggc gga gct ggc tac att ggc agc cac acg gta ctg gag ctg ctg gag gca ggc tac gcc cct gtg gtc atc gac aac ttc cat aat gcc att cgt gga ggg gat tcc atg cct gag agc ctg cgg cgg gtc cag gaa ctg aca ggc cgc tct gtg gag ttt gag gag atg gac atc ttg gac cag gca gcg cta cag cac ctc ttt aag aag cac agc ttt aag gct gtc atc cac ttt gct ggg ctc aag gct gtg ggc gag tgg gtg cag aag cct ctg gat tat tat aga gtt aac cta aca ggg acc atc cag ctt ctg gag atc atg agg gcc cac ggg gtg aag aat ctc gtg ttc agc agc tca gcc acc gtg tat ggg aat ccc cag tac ctg cct ctg gat gag gcc cac ccc acc ggg ggt tgt acc aac ccc tat gga aag tcc aag ttc ttc atc gag gag atg gtc cgg gac ctg tgc cgg gca gat tgg gcc tgg aac gca gtg ctg cta cgc tac ttc aat ccc acg ggt gcc cac gcc tct ggc cgc atc ggc gag gat ccc cag ggc gtc ccc aac aac ctc atg ccc tat gtc tcc cag gtg gca att ggg cga cga gag gcc ctg aat gtc ttt ggt ggt gac tat gat aca gag gat ggc aca ggt gta agg gat tac att cat gtg gtg gat ctg gcg aag ggc cac atc gca gcc ttg aag aag ctg aag gag caa tgt ggt tgc cgg atc tac aac ctg ggc aca ggc aca ggc tac tct gtc ctg cag atg gtc caa gca atg gag aag gct tca ggg aag aag atc cca tac aag gtg gtg gca cgg cgg gaa ggt gac gtg gca gcc tgt tat gcc aac ccc agc ctg gcc cat gag gag ctg ggc tgg aca gca gcc ttg ggg ctg gac agg atg tgt gaa gat cta tgg cgc tgg cag aag cag aac cct tca ggc ttt gga gca cag gcc taa (SEQ ID NO: 1)
CHO K1M 中 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶的氨基酸序列	MAEKVLVTGGAGYIGSHTVLELLEAGYAPVVIDNFHNAIR GGDSMPESLRRVQELTGRSVEFEEMDILDQAALQHLFKK HSFKAVIHFAGLKAVGESVQKPLDYRVNLTGTIQLLEIM RAHGVKNLVFSSSATVYGNPQYLPLDEAHPTGGCTNPYG KSKFFIEEMVRDLCRADSAWNAVLLRYFNPTGAHASGRIG EDPQGVPNLMPYVSQVAIGRREALNVFGGDYDTEGDTG VRDYIHVVDLAKGHIAALKKLKEQCGRYINLGTGTGYS VLQMVQAMEKASGKKIPYKVVARRREGDVAACYANPSLA HEELGWTAALGLDRMCEDLWRWQKQNPSTGFGAQA (SEQ ID NO: 2)
UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸盐 的 cDNA 序列 CHO K1M 中的尿苷 酰转移酶	atg tgg caa aac gga gat gat cct gag cag cgc cag cag gcg tca gag gcg gac gcc atg gca gcg acc ttc cgg gcg agc gaa cac cag cat att cgc tac aat ccg ctc cag gat gag tgg gtg tta gtg tgg gcc cat cgc atg aag cgg ccc tgg caa gga caa gtg gag ccc cag ctt ctg aag aca gtg ccc cgc tat gac cca ctc aac cct ctg tgt ccc ggg gcc aca cga gcc aat ggg gag gtg aat cca cac tat gac agc acc ttc ctg ttt gac aat gac ttc cca gct ctg cag ccc gat gct ccg gat cca gga ccc agt gac cat cct ctt ttt cga gca gag gcg gcc aga gga gtt tgt aag gtc atg tgc ttc cat ccc tgg tgg gat gtg aca ctg cca ctc atg tca gtc cct gag atc cga gct gtc atc gat gcc tgg gct tca gtc acc gag gat ctg ggt gcc cag tat cct tgg gtg cag atc ttt gaa aac aaa gga gcc atg atg ggc tgt tct aac ccc cac ccc cac tgc cag gtt tgg gcc agc agt ttc ctg cca gat att gcc cag cgt gaa gtg cga tcc cag cag aac tat cac agc cag cat gga gaa cct ctg tta ctg gaa tat ggc cgc caa gaa ctc ctc agg aag gaa cgt ctg gtc tta tct

[0558]

	agt gag cac tgg cta gtc ctg gtt ccc ttc tgg gca gtg tgg gct ttc cag aca cta ctg ctg ccc cgc egg cat gta cgt egg cta cct gag ctg acc cct gct gaa cgt gat gat cta gcc tcc atc atg aag aag cta ttg acc aag tat gac aac cta ttt gag aca tct ttt ccc tac tcc atg ggc tgg cat ggg gct ccc acg gga tta aag act gga gcc gcc tat gac cac tgg cag cta cat gct cat tac tat ccc cca ctc ctg cgc tct gct act gtc cgg aaa ttc atg gtt ggc tat gaa atg ctt gcc cat ggg cac cgg gac ctc act cct gaa cag gct gca gag aga cta agg gcg ctt cct gag gta cat tat tgc ctg gca aag aaa gac aag gaa aca gca gct gtt gct tga (SEQ ID NO: 3)
UDP- α -D-葡萄糖: α -D-半乳糖-1-磷酸盐 的氨基酸序列 CHO K1M 中的尿苷 酰转移酶	MSQNGDDPEQRQQASEADAMAATFRASEHQHIRYNPLQD EWVLVSAHRMKRPWQGQVEPQLLKTVPYDPLNPLCPG ATRANGEVNPHYDSTFLFDNDFPALQPDAPDPGSDHPLF RAEAARGVCKVMCFHPWSDVTLPLMSVPEIRAVIDAWAS VTEDLGAQYPWVQIFENKGAMMGCSNPHPHCQVWASSF LPDIAQREVRSQQNYHSQHGEPLLEYGQRQELLRKERLVL SSEHWLVLVPFWAVWAFQTL LPRRHVRRLELTPAERD DLASIMKKLLTKYDNLFETSFPYSMGWGAPTGLKTGAA YDHWQLHAHYPPLLRSATVRKFMVGYEMLAHGHRDLT PEQAAERLRALPEVHYCLAKKDKETAAVA (SEQ ID NO: 4)
正向引子 UDP_GlcE- F2-21	atggccgaga aggtgctggt c (SEQ ID NO: 5)
反向引子 UDP_GlcE- R21	ttaggcctgt gctccaaagc c (SEQ ID NO: 6)
正向引子 UDP-Gal-T- F2-21	atgicgcaaa acggagatga t (SEQ ID NO: 7)
反向引子 UDP-Gal-T- R18	tcaagcaaca gctgctgt (SEQ ID NO: 8)
天然人野生型 α -突触 核蛋白的氨基酸序列	MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGV LYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVT AVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILE DMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ ID NO: 9)
α -突触核蛋白; 重链 的 CDR1 (CDR-H1)	NYGMS (SEQ ID NO: 10)
α -突触核蛋白; 重链 的 CDR2 (CDR-H2)	SISSGGGSTYYPDNVKG (SEQ ID NO: 11)
α -突触核蛋白; 重链 的 CDR3 (CDR-H3)	GGAGIDY (SEQ ID NO: 12)
α -突触核蛋白; 轻链 的 CDR1 (CDR-L1)	KSIQTLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO: 13)
α -突触核蛋白; 轻链 的 CDR2 (CDR-L2)	WASIRKS (SEQ ID NO: 14)
α -突触核蛋白; 轻链 的 CDR3 (CDR-L3)	QQYYSYPLT (SEQ ID NO: 15)
α -突触核蛋白; 重链 可变域 (VH)	EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTFSNYGMSWVRQ APGKGLEWVASISSGGGSTYYPDNVKG RFTISRDDAKNSL

[0559]

	YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGIDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 16)
α -突触核蛋白; 轻链 可变域 (VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAW FQQKPGKAPKLLIYWASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDLATYYCQQYYSYPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 17)
α -突触核蛋白; 重链 恒定域 (CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNNH YTQKLSLSP (SEQ ID NO: 18)
α -突触核蛋白; 轻链 恒定域 (CL)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)
α -突触核蛋白; 重链 (H)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQ APGKGLEWVASISSGGSTYYPDNVKGRFTISRDDAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGIDYWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNNHYT QKLSLSP (SEQ ID NO: 20)
α -突触核蛋白; 轻链 (L)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLTYSSNQKNYLAW FQQKPGKAPKLLIYWASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDLATYYCQQYYSYPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 21)
CD3; 重链的 CDR1 (CDR-H1)	TYAMN (SEQ ID NO: 22)
CD3; 重链的 CDR2 (CDR-H2)	RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 23)
CD3; 重链的 CDR3 (CDR-H3)	HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 24)
CD3; 轻链的 CDR1 (CDR-L1)	GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 25)
CD3; 轻链的 CDR2 (CDR-L2)	GTNKRAP (SEQ ID NO: 26)

[0560]

CD3; 轻链的 CDR3 (CDR-L3)	ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 27)
CD3; 重链可变域 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIKSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 28)
CD3; 轻链可变域 (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLTG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 29)
CD3; 重链恒定域 (CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPK (SEQ ID NO: 30)
CD3; 轻链恒定域 (CL)	ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)
CD3; 重链恒定域 (CD3 CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPK (SEQ ID NO: 32)
CD3; 轻链 (CD3 VH-CL)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIKSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)
CD20; 重链的 CDR1 (CDR-H1)	YSWIN (SEQ ID NO: 34)
CD20; 重链的 CDR2 (CDR-H2)	RIFPGDGD TDYNGKFKG (SEQ ID NO: 35)
CD20; 重链的 CDR3 (CDR-H3)	NVFDGYWLVY (SEQ ID NO: 36)
CD20; 轻链的 CDR1 (CDR-L1)	RSSKSLLSHNGITYLY (SEQ ID NO: 37)
CD20; 轻链的 CDR2 (CDR-L2)	QMSNLVS (SEQ ID NO: 38)
CD20; 轻链的 CDR3 (CDR-L3)	AQNLELPYT (SEQ ID NO: 39)
CD20; 重链可变域 (VH)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLVTV VSS (SEQ ID NO: 40)
CD20; 轻链可变域 (VL)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSTDFTLKISR EAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV (SEQ ID NO: 41)

[0561]

CD20; 重链恒定域 (CH)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDEKVEPK (SEQ ID NO: 42)
CD20; 轻链恒定域 (CL)	AAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 43)
CD20; 轻链 (VL-CL)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLSVGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 44)
CD20; 重链 [CD20 VH-CH1(EE)-Fc (白, P329G LALA)]	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP (SEQ ID NO: 45)
CD3; 重链 [CD3 VL-CH1-Fc (杵, P329G LALA)]	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP (SEQ ID NO: 46)
CD20-CD3; 重链 [CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (杵, P329G LALA)]	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGS QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

[0562]

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP (SEQ ID NO: 47)

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司
 <120> 巯基化合物及其衍生物的酶和途径调节
 <130> AC1883 PCT S3
 <150> EP20 17 1356.7
 <151> 2020-04-24
 <160> 47
 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 1047
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CHO K1M中UDP-葡萄糖4-差向异构酶的cDNA序列
 <220>
 <221> CDS
 <222> 1..1047
 <223> /transl_table=1
 <400> 1
 atg gcc gag aag gtg ctg gtc aca ggc gga gct ggc tac att ggc agc 48
 Met Ala Glu Lys Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 cac acg gta ctg gag ctg ctg gag gca ggc tac gcc cct gtg gtc atc 96
 His Thr Val Leu Glu Leu Leu Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Val Val Ile
 20 25 30
 gac aac ttc cat aat gcc att cgt gga ggg gat tcc atg cct gag agc 144
 Asp Asn Phe His Asn Ala Ile Arg Gly Gly Asp Ser Met Pro Glu Ser
 35 40 45
 ctg cgg cgg gtc cag gaa ctg aca ggc cgc tct gtg gag ttt gag gag 192
 Leu Arg Arg Val Gln Glu Leu Thr Gly Arg Ser Val Glu Phe Glu Glu
 50 55 60
 atg gac atc ttg gac cag gca gcg cta cag cac ctc ttt aag aag cac 240
 Met Asp Ile Leu Asp Gln Ala Ala Leu Gln His Leu Phe Lys Lys His
 65 70 75 80
 agc ttt aag gct gtc atc cac ttt gct ggg ctc aag gct gtg ggc gag 288
 Ser Phe Lys Ala Val Ile His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly Glu
 85 90 95
 tcg gtg cag aag cct ctg gat tat tat aga gtt aac cta aca ggg acc 336

Ser Val Gln Lys Pro Leu Asp Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Thr Gly Thr	
100	105
atc cag ctt ctg gag atc atg agg gcc cac ggg gtg aag aat ctc gtg	384
Ile Gln Leu Leu Glu Ile Met Arg Ala His Gly Val Lys Asn Leu Val	
115	120
ttc agc agc tca gcc acc gtg tat ggg aat ccc cag tac ctg cct ctg	432
Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Asn Pro Gln Tyr Leu Pro Leu	
130	135
gat gag gcc cac ccc acc ggg ggt tgt acc aac ccc tat gga aag tcc	480
Asp Glu Ala His Pro Thr Gly Gly Cys Thr Asn Pro Tyr Gly Lys Ser	
145	150
aag ttc ttc atc gag gag atg gtc cgg gac ctg tgc cgg gca gat tcg	528
Lys Phe Phe Ile Glu Glu Met Val Arg Asp Leu Cys Arg Ala Asp Ser	
165	170
gcc tgg aac gca gtg ctg cta cgc tac ttc aat ccc acg ggt gcc cac	576
Ala Trp Asn Ala Val Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Thr Gly Ala His	
180	185
gcc tct ggc cgc atc ggc gag gat ccc cag ggc gtc ccc aac aac ctc	624
Ala Ser Gly Arg Ile Gly Glu Asp Pro Gln Gly Val Pro Asn Asn Leu	
195	200
atg ccc tat gtc tcc cag gtg gca att ggg cga cga gag gcc ctg aat	672
Met Pro Tyr Val Ser Gln Val Ala Ile Gly Arg Arg Glu Ala Leu Asn	
210	215
gtc ttt ggt ggt gac tat gat aca gag gat ggc aca ggt gta agg gat	720
Val Phe Gly Gly Asp Tyr Asp Thr Glu Asp Gly Thr Gly Val Arg Asp	
225	230
tac att cat gtg gtg gat ctg gcg aag ggc cac atc gca gcc ttg aag	768
Tyr Ile His Val Val Asp Leu Ala Lys Gly His Ile Ala Ala Leu Lys	
245	250
aag ctg aag gag caa tgt ggt tgc cgg atc tac aac ctg ggc aca ggc	816
Lys Leu Lys Glu Gln Cys Gly Cys Arg Ile Tyr Asn Leu Gly Thr Gly	
260	265
aca ggc tac tct gtc ctg cag atg gtc caa gca atg gag aag gct tca	864
Thr Gly Tyr Ser Val Leu Gln Met Val Gln Ala Met Glu Lys Ala Ser	
275	280
ggg aag aag atc cca tac aag gtg gtg gca cgg cgg gaa ggt gac gtg	912
Gly Lys Lys Ile Pro Tyr Lys Val Val Ala Arg Arg Glu Gly Asp Val	
290	295
gca gcc tgt tat gcc aac ccc agc ctg gcc cat gag gag ctg ggc tgg	960

Ala Ala Cys Tyr Ala Asn Pro Ser Leu Ala His Glu Glu Leu Gly Trp
305 310 315 320
aca gca gcc ttg ggg ctg gac agg atg tgt gaa gat cta tgg cgc tgg 1008
Thr Ala Ala Leu Gly Leu Asp Arg Met Cys Glu Asp Leu Trp Arg Trp
325 330 335
cag aag cag aac cct tca ggc ttt gga gca cag gcc taa 1047
Gln Lys Gln Asn Pro Ser Gly Phe Gly Ala Gln Ala
340 345

<210> 2
<211> 348
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> [CDS]:1..1047 来自 SEQ ID NO 1
<400> 2

Met Ala Glu Lys Val Leu Val Thr Gly Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Ser
1 5 10 15
His Thr Val Leu Glu Leu Leu Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Val Val Ile
20 25 30
Asp Asn Phe His Asn Ala Ile Arg Gly Gly Asp Ser Met Pro Glu Ser
35 40 45
Leu Arg Arg Val Gln Glu Leu Thr Gly Arg Ser Val Glu Phe Glu Glu
50 55 60
Met Asp Ile Leu Asp Gln Ala Ala Leu Gln His Leu Phe Lys Lys His
65 70 75 80
Ser Phe Lys Ala Val Ile His Phe Ala Gly Leu Lys Ala Val Gly Glu
85 90 95
Ser Val Gln Lys Pro Leu Asp Tyr Tyr Arg Val Asn Leu Thr Gly Thr
100 105 110
Ile Gln Leu Leu Glu Ile Met Arg Ala His Gly Val Lys Asn Leu Val
115 120 125
Phe Ser Ser Ser Ala Thr Val Tyr Gly Asn Pro Gln Tyr Leu Pro Leu
130 135 140
Asp Glu Ala His Pro Thr Gly Gly Cys Thr Asn Pro Tyr Gly Lys Ser
145 150 155 160
Lys Phe Phe Ile Glu Glu Met Val Arg Asp Leu Cys Arg Ala Asp Ser
165 170 175
Ala Trp Asn Ala Val Leu Leu Arg Tyr Phe Asn Pro Thr Gly Ala His
180 185 190

Ala Ser Gly Arg Ile Gly Glu Asp Pro Gln Gly Val Pro Asn Asn Leu
 195 200 205
 Met Pro Tyr Val Ser Gln Val Ala Ile Gly Arg Arg Glu Ala Leu Asn
 210 215 220
 Val Phe Gly Gly Asp Tyr Asp Thr Glu Asp Gly Thr Gly Val Arg Asp
 225 230 235 240
 Tyr Ile His Val Val Asp Leu Ala Lys Gly His Ile Ala Ala Leu Lys
 245 250 255
 Lys Leu Lys Glu Gln Cys Gly Cys Arg Ile Tyr Asn Leu Gly Thr Gly
 260 265 270
 Thr Gly Tyr Ser Val Leu Gln Met Val Gln Ala Met Glu Lys Ala Ser
 275 280 285
 Gly Lys Lys Ile Pro Tyr Lys Val Val Ala Arg Arg Glu Gly Asp Val
 290 295 300
 Ala Ala Cys Tyr Ala Asn Pro Ser Leu Ala His Glu Glu Leu Gly Trp
 305 310 315 320
 Thr Ala Ala Leu Gly Leu Asp Arg Met Cys Glu Asp Leu Trp Arg Trp
 325 330 335
 Gln Lys Gln Asn Pro Ser Gly Phe Gly Ala Gln Ala
 340 345

<210> 3

<211> 1140

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> UDP- α -D-葡萄糖的cDNA序列:CHO K1M中的 α -D-半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶

<220>

<221> CDS

<222> 1..1140

<223> /transl_table=1

<400> 3

atg tcg caa aac gga gat gat cct gag cag cgc cag cag gcg tca gag 48
 Met Ser Gln Asn Gly Asp Asp Pro Glu Gln Arg Gln Gln Ala Ser Glu
 1 5 10 15
 gcg gac gcc atg gca gcg acc ttc cgg gcg agc gaa cac cag cat att 96
 Ala Asp Ala Met Ala Ala Thr Phe Arg Ala Ser Glu His Gln His Ile
 20 25 30
 cgc tac aat ccg ctc cag gat gag tgg gtg tta gtg tcg gcc cat cgc 144
 Arg Tyr Asn Pro Leu Gln Asp Glu Trp Val Leu Val Ser Ala His Arg

35	40	45	
atg aag cgg ccc tgg caa gga caa gtg gag ccc cag ctt ctg aag aca			192
Met Lys Arg Pro Trp Gln Gly Gln Val Glu Pro Gln Leu Leu Lys Thr			
50	55	60	
gtg ccc cgc tat gac cca ctc aac cct ctg tgt ccc ggg gcc aca cga			240
Val Pro Arg Tyr Asp Pro Leu Asn Pro Leu Cys Pro Gly Ala Thr Arg			
65	70	75	80
gcc aat ggg gag gtg aat cca cac tat gac agc acc ttc ctg ttt gac			288
Ala Asn Gly Glu Val Asn Pro His Tyr Asp Ser Thr Phe Leu Phe Asp			
	85	90	95
aat gac ttc cca gct ctg cag ccc gat gct ccg gat cca gga ccc agt			336
Asn Asp Phe Pro Ala Leu Gln Pro Asp Ala Pro Asp Pro Gly Pro Ser			
	100	105	110
gac cat cct ctt ttt cga gca gag gcg gcc aga gga gtt tgt aag gtc			384
Asp His Pro Leu Phe Arg Ala Glu Ala Ala Arg Gly Val Cys Lys Val			
	115	120	125
atg tgc ttc cat ccc tgg tcg gat gtg aca ctg cca ctc atg tca gtc			432
Met Cys Phe His Pro Trp Ser Asp Val Thr Leu Pro Leu Met Ser Val			
	130	135	140
cct gag atc cga gct gtc atc gat gcc tgg gct tca gtc acc gag gat			480
Pro Glu Ile Arg Ala Val Ile Asp Ala Trp Ala Ser Val Thr Glu Asp			
145	150	155	160
ctg ggt gcc cag tat cct tgg gtg cag atc ttt gaa aac aaa gga gcc			528
Leu Gly Ala Gln Tyr Pro Trp Val Gln Ile Phe Glu Asn Lys Gly Ala			
	165	170	175
atg atg ggc tgt tct aac ccc cac ccc cac tgc cag gtt tgg gcc agc			576
Met Met Gly Cys Ser Asn Pro His Pro His Cys Gln Val Trp Ala Ser			
	180	185	190
agt ttc ctg cca gat att gcc cag cgt gaa gtg cga tcc cag cag aac			624
Ser Phe Leu Pro Asp Ile Ala Gln Arg Glu Val Arg Ser Gln Gln Asn			
	195	200	205
tat cac agc cag cat gga gaa cct ctg tta ctg gaa tat ggc cgc caa			672
Tyr His Ser Gln His Gly Glu Pro Leu Leu Leu Glu Tyr Gly Arg Gln			
210	215	220	
gaa ctc ctc agg aag gaa cgt ctg gtc tta tct agt gag cac tgg cta			720
Glu Leu Leu Arg Lys Glu Arg Leu Val Leu Ser Ser Glu His Trp Leu			
225	230	235	240
gtc ctg gtt ccc ttc tgg gca gtg tgg gct ttc cag aca cta ctg ctg			768
Val Leu Val Pro Phe Trp Ala Val Trp Ala Phe Gln Thr Leu Leu Leu			

ccc cgc cgg cat gta cgt cgg cta cct gag ctg acc cct gct gaa cgt	245	250	255	816
Pro Arg Arg His Val Arg Arg Leu Pro Glu Leu Thr Pro Ala Glu Arg				
	260	265	270	
gat gat cta gcc tcc atc atg aag aag cta ttg acc aag tat gac aac				864
Asp Asp Leu Ala Ser Ile Met Lys Lys Leu Leu Thr Lys Tyr Asp Asn				
	275	280	285	
cta ttt gag aca tct ttt ccc tac tcc atg ggc tgg cat ggg gct ccc				912
Leu Phe Glu Thr Ser Phe Pro Tyr Ser Met Gly Trp His Gly Ala Pro				
	290	295	300	
acg gga tta aag act gga gcc gcc tat gac cac tgg cag cta cat gct				960
Thr Gly Leu Lys Thr Gly Ala Ala Tyr Asp His Trp Gln Leu His Ala				
305	310	315	320	
cat tac tat ccc cca ctc ctg cgc tct gct act gtc cgg aaa ttc atg				1008
His Tyr Tyr Pro Pro Leu Leu Arg Ser Ala Thr Val Arg Lys Phe Met				
	325	330	335	
gtt ggc tat gaa atg ctt gcc cat ggg cac cgg gac ctc act cct gaa				1056
Val Gly Tyr Glu Met Leu Ala His Gly His Arg Asp Leu Thr Pro Glu				
	340	345	350	
cag gct gca gag aga cta agg gcg ctt cct gag gta cat tat tgc ctg				1104
Gln Ala Ala Glu Arg Leu Arg Ala Leu Pro Glu Val His Tyr Cys Leu				
	355	360	365	
gca aag aaa gac aag gaa aca gca gct gtt gct tga				1140
Ala Lys Lys Asp Lys Glu Thr Ala Ala Val Ala				
	370	375		
<210> 4				
<211> 379				
<212> PRT				
<213> 人工序列				
<220>				
<223> [CDS]:1..1140 来自 SEQ ID NO 3				
<400> 4				
Met Ser Gln Asn Gly Asp Asp Pro Glu Gln Arg Gln Gln Ala Ser Glu				
1	5	10	15	
Ala Asp Ala Met Ala Ala Thr Phe Arg Ala Ser Glu His Gln His Ile				
	20	25	30	
Arg Tyr Asn Pro Leu Gln Asp Glu Trp Val Leu Val Ser Ala His Arg				
	35	40	45	
Met Lys Arg Pro Trp Gln Gly Gln Val Glu Pro Gln Leu Leu Lys Thr				

50	55	60
Val Pro Arg Tyr Asp	Pro Leu Asn Pro Leu Cys	Pro Gly Ala Thr Arg
65	70	75
Ala Asn Gly Glu Val	Asn Pro His Tyr Asp	Ser Thr Phe Leu Phe Asp
85	90	95
Asn Asp Phe Pro Ala	Leu Gln Pro Asp Ala	Pro Asp Pro Gly Pro Ser
100	105	110
Asp His Pro Leu Phe	Arg Ala Glu Ala Ala	Arg Gly Val Cys Lys Val
115	120	125
Met Cys Phe His Pro	Trp Ser Asp Val Thr	Leu Pro Leu Met Ser Val
130	135	140
Pro Glu Ile Arg Ala	Val Ile Asp Ala Trp	Ala Ser Val Thr Glu Asp
145	150	155
Leu Gly Ala Gln Tyr	Pro Trp Val Gln Ile	Phe Glu Asn Lys Gly Ala
165	170	175
Met Met Gly Cys Ser	Asn Pro His Pro His	Cys Gln Val Trp Ala Ser
180	185	190
Ser Phe Leu Pro Asp	Ile Ala Gln Arg Glu	Val Arg Ser Gln Gln Asn
195	200	205
Tyr His Ser Gln His	Gly Glu Pro Leu Leu	Leu Glu Tyr Gly Arg Gln
210	215	220
Glu Leu Leu Arg Lys	Glu Arg Leu Val Leu	Ser Ser Glu His Trp Leu
225	230	235
Val Leu Val Pro Phe	Trp Ala Val Trp Ala	Phe Gln Thr Leu Leu Leu
245	250	255
Pro Arg Arg His Val	Arg Arg Leu Pro Glu	Leu Thr Pro Ala Glu Arg
260	265	270
Asp Asp Leu Ala Ser	Ile Met Lys Lys Leu	Leu Thr Lys Tyr Asp Asn
275	280	285
Leu Phe Glu Thr Ser	Phe Pro Tyr Ser Met	Gly Trp His Gly Ala Pro
290	295	300
Thr Gly Leu Lys Thr	Gly Ala Ala Tyr Asp	His Trp Gln Leu His Ala
305	310	315
His Tyr Tyr Pro Pro	Leu Leu Arg Ser Ala	Thr Val Arg Lys Phe Met
325	330	335
Val Gly Tyr Glu Met	Leu Ala His Gly His	Arg Asp Leu Thr Pro Glu
340	345	350
Gln Ala Ala Glu Arg	Leu Arg Ala Leu Pro	Glu Val His Tyr Cys Leu
355	360	365

Ala Lys Lys Asp Lys Glu Thr Ala Ala Val Ala	
370	375
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 UDP_GlcE-F2-21	
<400> 5	
atggccgaga aggtgctggt c	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 UDP_GlcE-R21	
<400> 6	
ttaggcctgt gctccaaagc c	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物 UDP-Gal-T-F2-21	
<400> 7	
atgtcgcaaa acggagatga t	21
<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物 UDP-Gal-T-R18	
<400> 8	
tcaagcaaca gctgctgt	18
<210> 9	
<211> 140	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 合成的

<400> 9

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
 20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45
 Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135 140

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白;重链 CDR1 (CDR-H1)

<400> 10

Asn Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白;重链 CDR2 (CDR-H2)

<400> 11

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白；重链 CDR3 (CDR-H3)

<400> 12

Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白；轻链 CDR1 (CDR-L1)

<400> 13

Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白；轻链 CDR2 (CDR-L2)

<400> 14

Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白；轻链 CDR3 (CDR-L3)

<400> 15

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 16

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白；重链可变区 (VH)

<400> 16

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
           20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
           100          105          110
Thr Val Ser Ser
           115

```

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白；轻链可变结构域 (VL)

<400> 17

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
           20           25           30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
           35           40           45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
           50           55           60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

```

				85					90					95			
Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile		
				100				105					110				
Lys																	
<210>	18																
<211>	328																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	α -突触核蛋白; 重链恒定结构域 (CH)																
<400>	18																
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys		
1				5					10					15			
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr		
			20					25					30				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser		
			35				40				45						
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
			50			55					60						
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr		
65					70					75				80			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
				85						90				95			
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
			100					105						110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
			115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
			130				135				140						
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
145						150				155				160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
				165					170					175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
				180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
				195				200						205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
				210				215						220			

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α-突触核蛋白；轻链恒定结构域 (CL)

<400> 19

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 20

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α -突触核蛋白; 重链 (H)

<400> 20

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Asn	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Gly	Ala	Gly	Ile	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	115	120	125	
Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	130	135	140	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205	
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	225	230	235	240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	245	250	255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	260	265	270	
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	275	280	285	

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440
 <210> 21
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> α -突触核蛋白; 轻链 (L)
 <400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3; 重链 CDR1 (CDR-H1)

<400> 22

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3; 重链 CDR2 (CDR-H2)

<400> 23

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 29

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3; 轻链可变结构域 (VL)

<400> 29

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3; 重链恒定结构域 (CH)

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys
 100

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3; 轻链恒定结构域 (CL)

<400> 31

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 32
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD3 重链恒定结构域 (CD3 CH)
 <400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys
 100

<210> 33
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD3; 轻链 (L)
 <400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	85	90
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe		
	100	105
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val		
	115	120
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
	130	135
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
145	150	155
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
	165	170
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
	180	185
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
	195	200
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
	210	215
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 重链 CDR1 (CDR-H1)

<400> 34

Tyr Ser Trp Ile Asn

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 重链 CDR2 (CDR-H2)

<400> 35

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 重链 CDR3 (CDR-H3)

<400> 36

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 轻链 CDR1 (CDR-L1)

<400> 37

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 轻链 CDR2 (CDR-L2)

<400> 38

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 轻链 CDR3 (CDR-L3)

<400> 39

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 重链可变区 (VH)

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 轻链可变结构域 (VL)

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val
 115

<210> 42

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 重链恒定结构域 (CH)

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys
 100

<210> 43

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD20; 轻链恒定结构域 (CL)

<400> 43

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 1 5 10 15

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 20 25 30

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 35 40 45

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

50	55	60														
Leu Ser Ser Thr	Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys															
65	70	75	80													
Val Tyr Ala Cys	Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr															
	85	90	95													
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys																
	100															
<210> 44																
<211> 219																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> CD20 轻链 (CD20 VL-CL)																
<400> 44																
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly																
1	5	10	15													
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser																
	20	25	30													
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser																
	35	40	45													
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro																
	50	55	60													
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile																
65	70	75	80													
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn																
	85	90	95													
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys																
	100	105	110													
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg																
	115	120	125													
Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe																
	130	135	140													
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln																
145	150	155	160													
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser																
	165	170	175													
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu																
	180	185	190													
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser																

195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 45		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CD20 重链 [CD20 VH-CH1 (EE) -Fc (白,P329G LALA)]		
<400> 45		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
20 25 30		
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50 55 60		
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100 105 110		
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115 120 125		
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130 135 140		
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145 150 155 160		
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165 170 175		
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180 185 190		
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195 200 205		
Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210 215 220		
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		

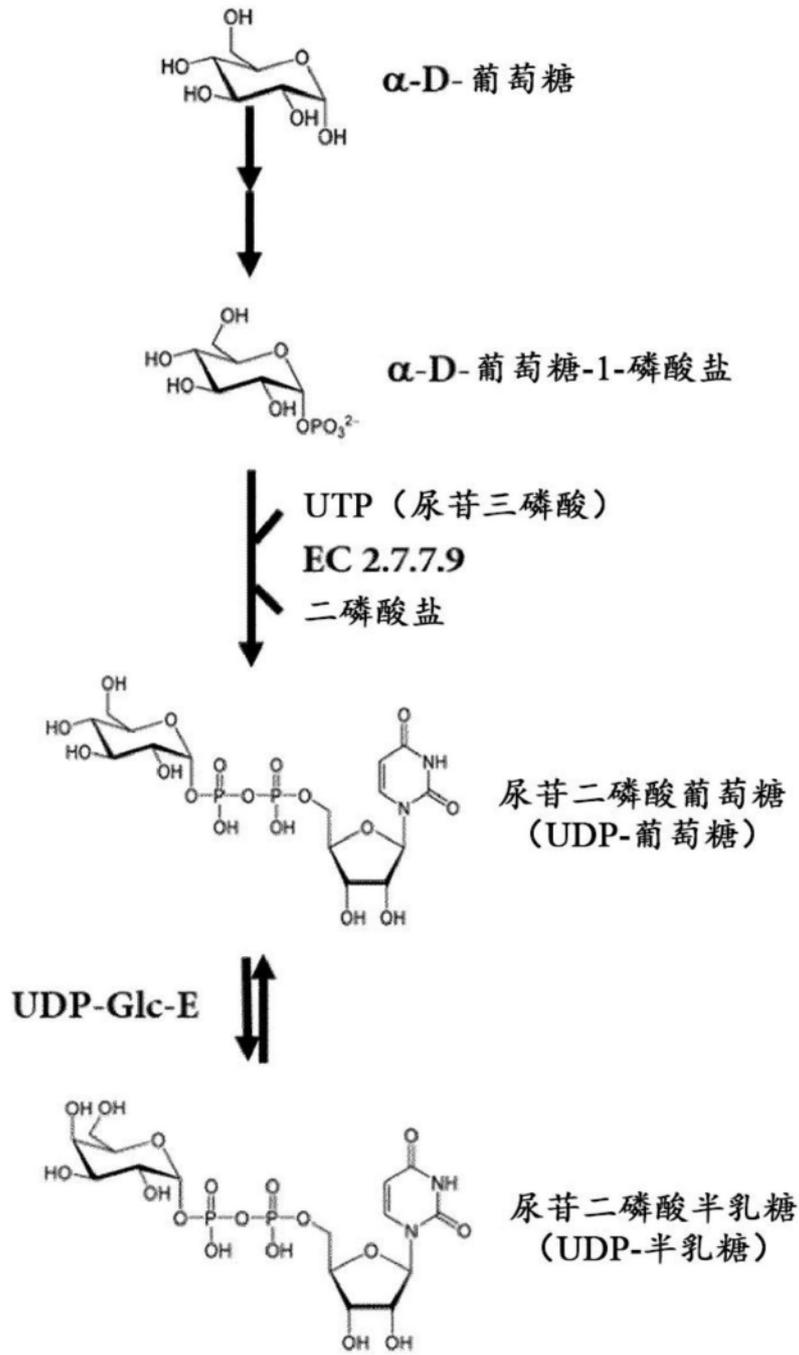
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser			
	355	360	365
Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	435	440	445
<210> 46			
<211> 439			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CD20-CD3 重链 [CD3 VL-CH1-Fc (杵,P329G LALA)]			
<400> 46			
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser			
	20	25	30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly			

35	40	45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe		
50	55	60
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala		
65	70	75
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
85	90	95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala		
100	105	110
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser		
115	120	125
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
130	135	140
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
145	150	155
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
165	170	175
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr		
180	185	190
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys		
195	200	205
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
210	215	220
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
225	230	235
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
245	250	255
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
260	265	270
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
275	280	285
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
290	295	300
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
305	310	315
Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
325	330	335
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu		
340	345	350

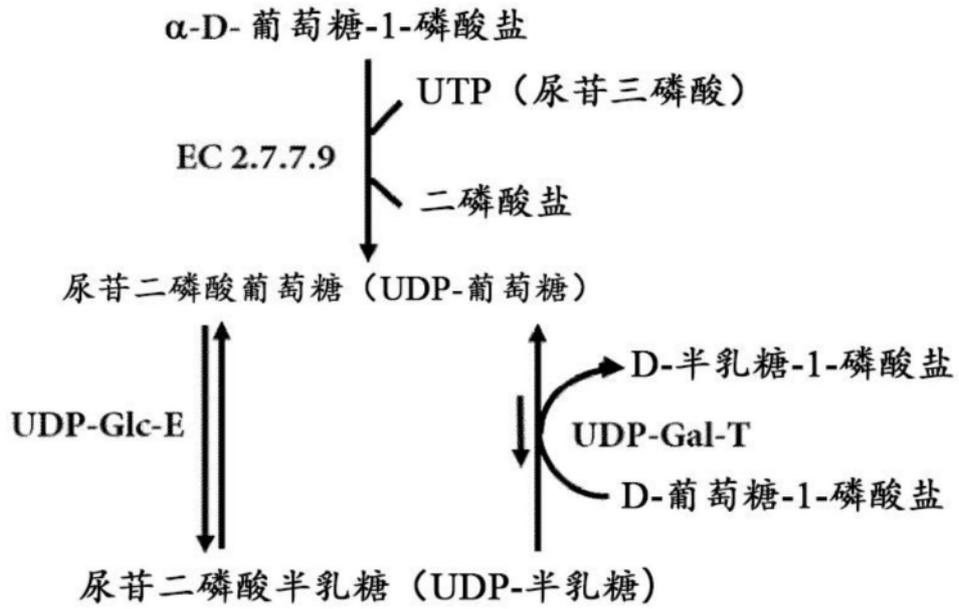
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435
 <210> 47
 <211> 673
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD20 重链 [CD20 VH-CH1 (EE) -CD3 VL-CH1-Fc (杵,P329G
 LALA)]
 <400> 47
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly			
	210	215	220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln			
225	230	235	240
Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys			
	245	250	255
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val			
	260	265	270
Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn			
	275	280	285
Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly			
	290	295	300
Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala			
305	310	315	320
Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly			
	325	330	335
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	340	345	350
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
	355	360	365
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
	370	375	380
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
385	390	395	400
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	405	410	415
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
	420	425	430
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	435	440	445
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly			
	450	455	460

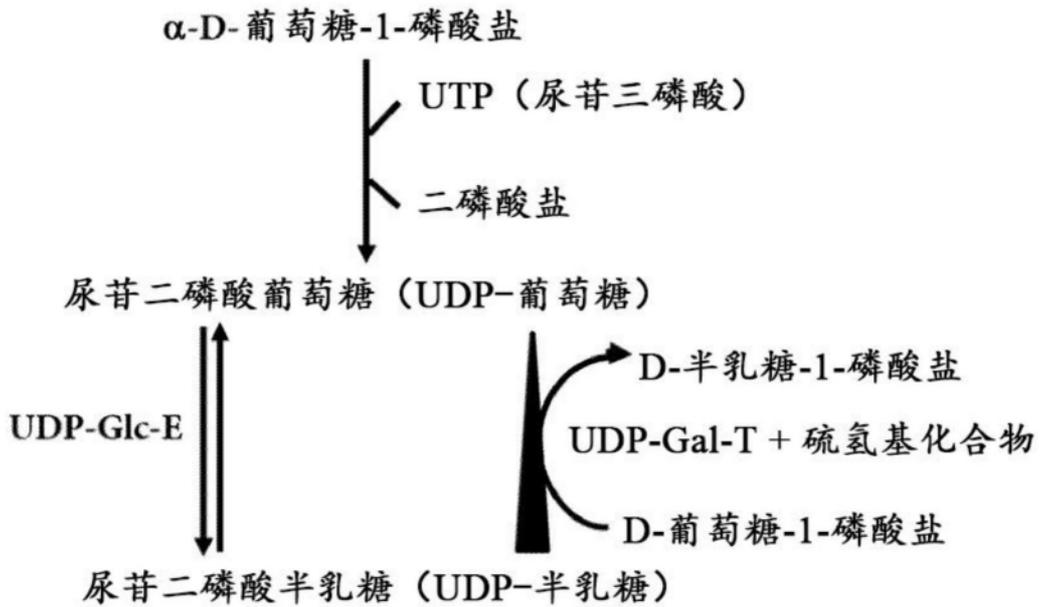
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
465					470					475					480
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
				485					490						495
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
				500					505						510
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
		515						520							525
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
								535							540
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile
545															560
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
															575
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
															590
Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
															605
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
															620
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
625															640
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
															655
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
															670
Pro															



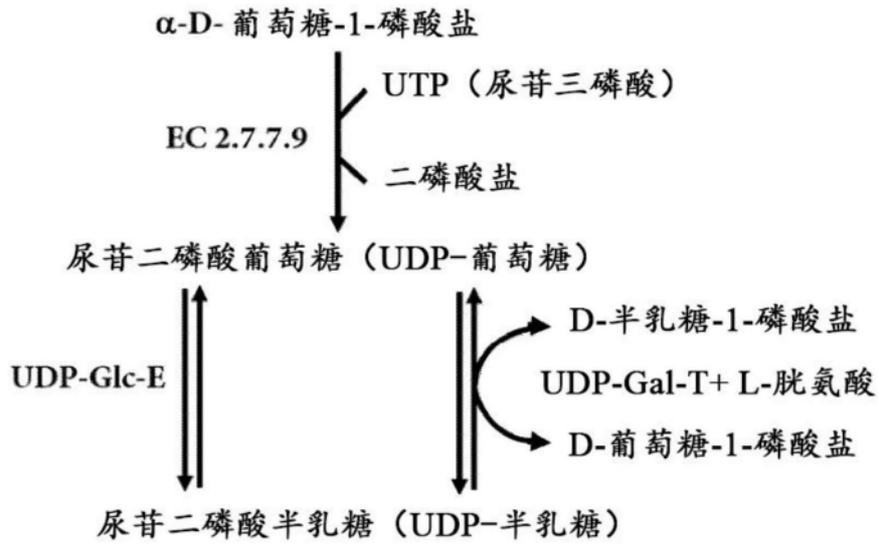
[图1]



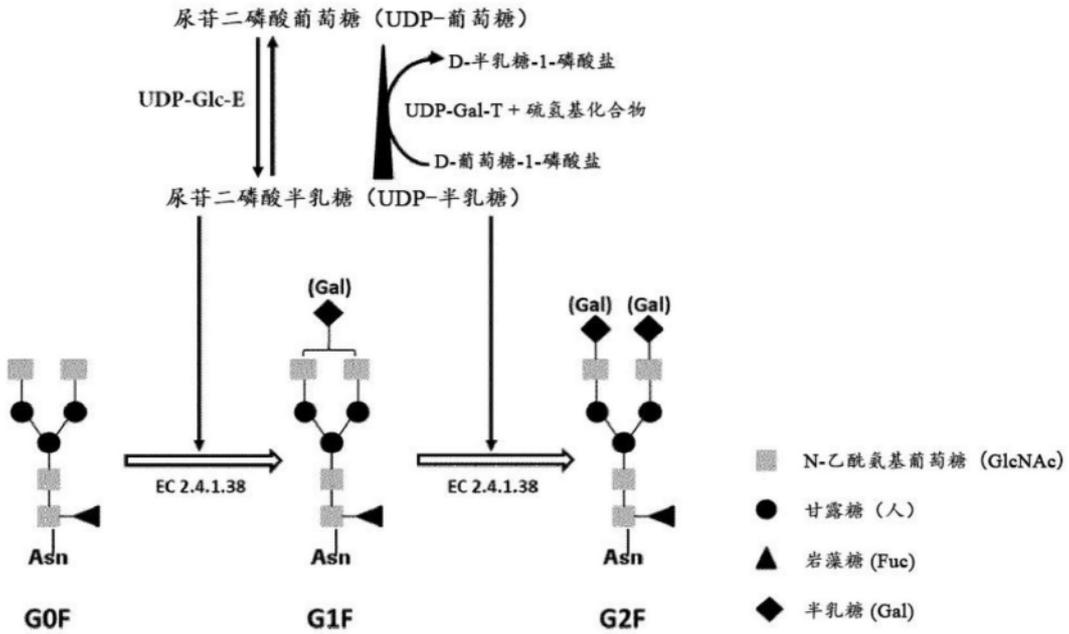
[图2]



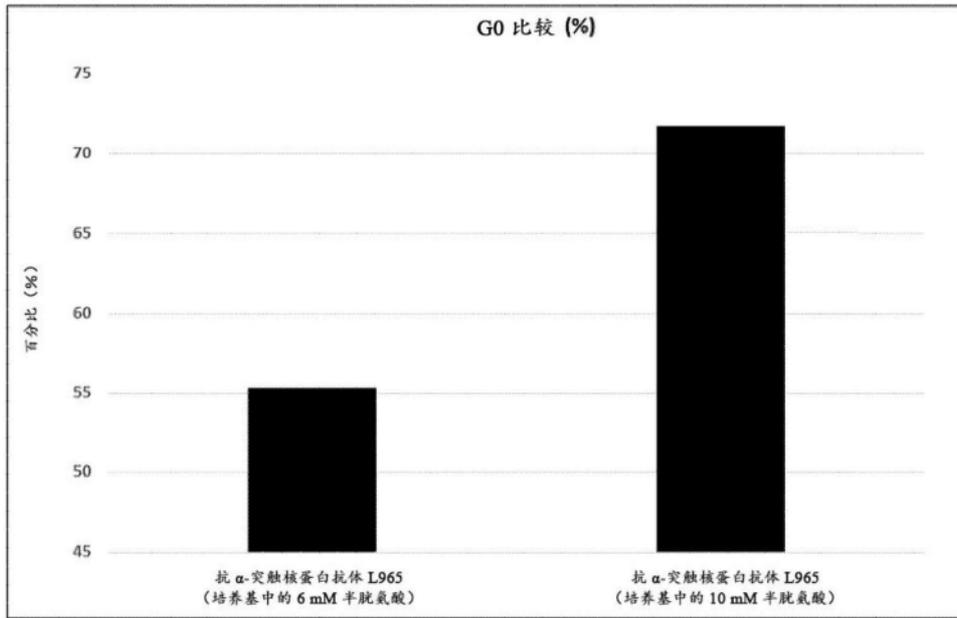
[图3]



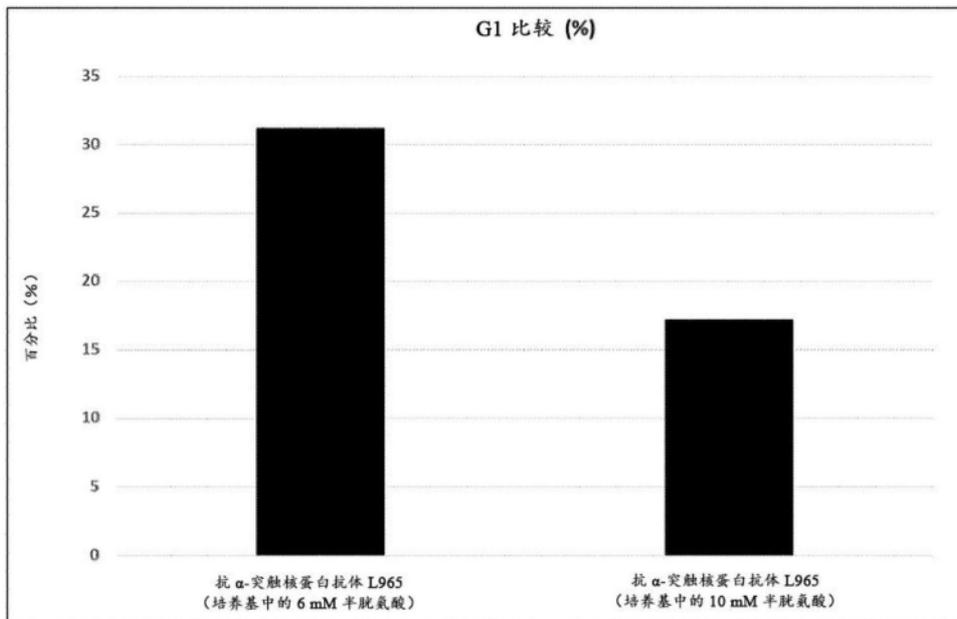
[图4]



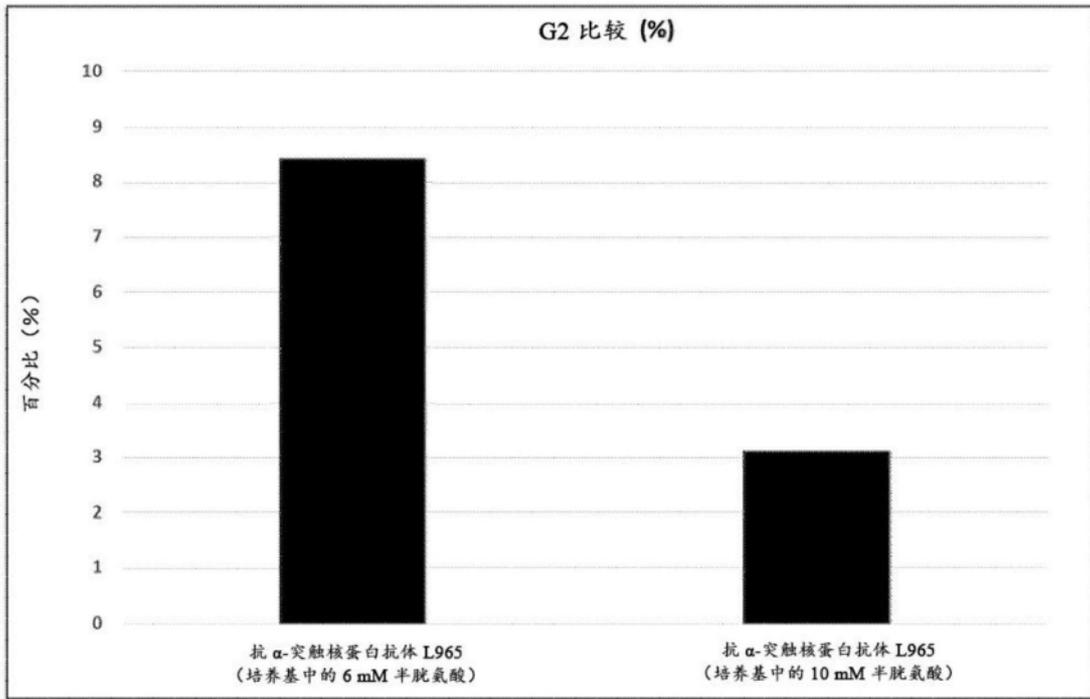
[图5]



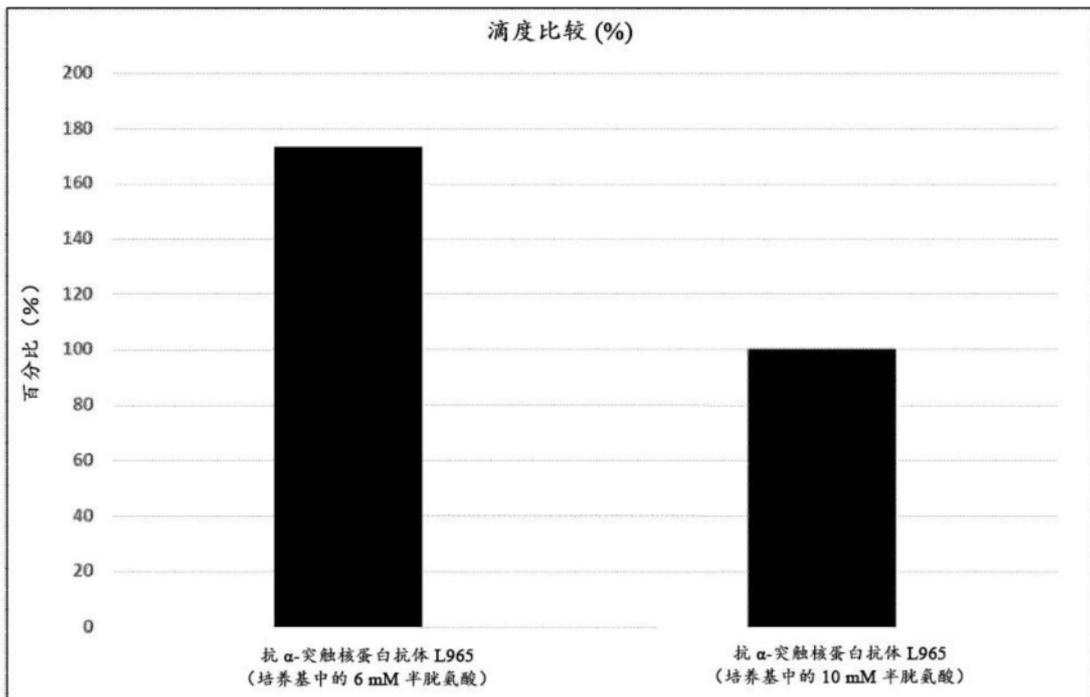
[图6A]



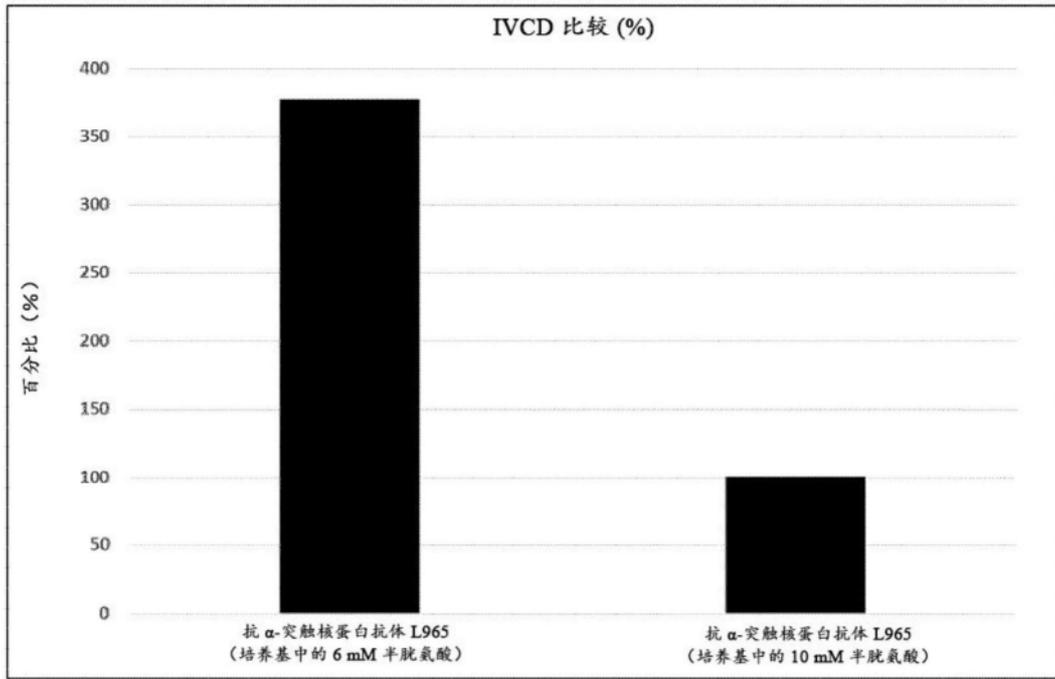
[图6B]



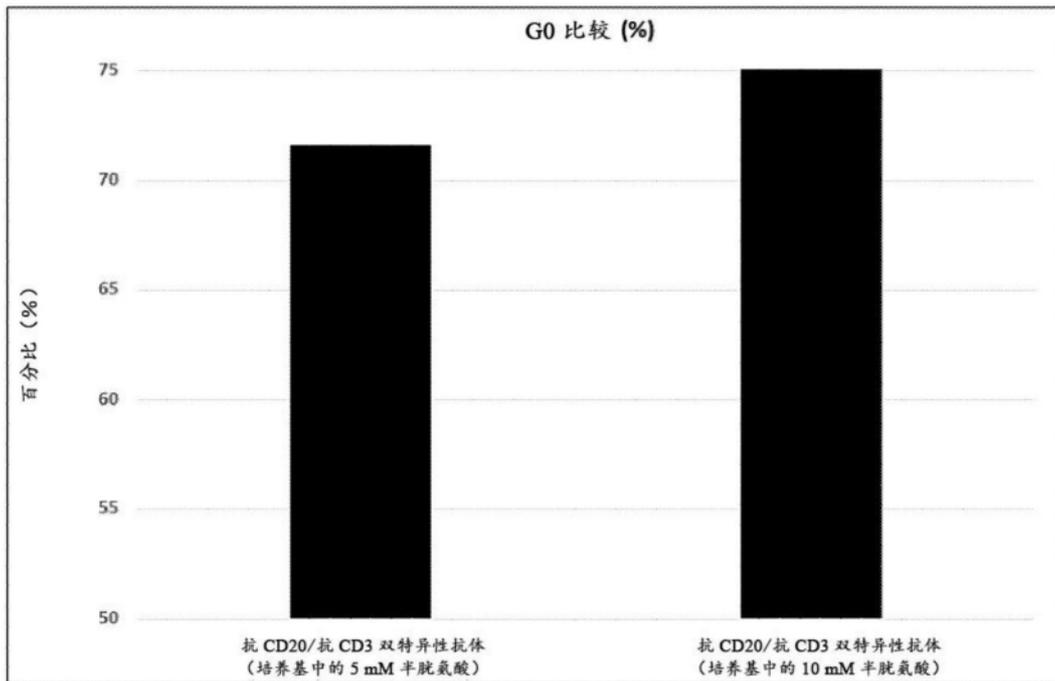
[图6C]



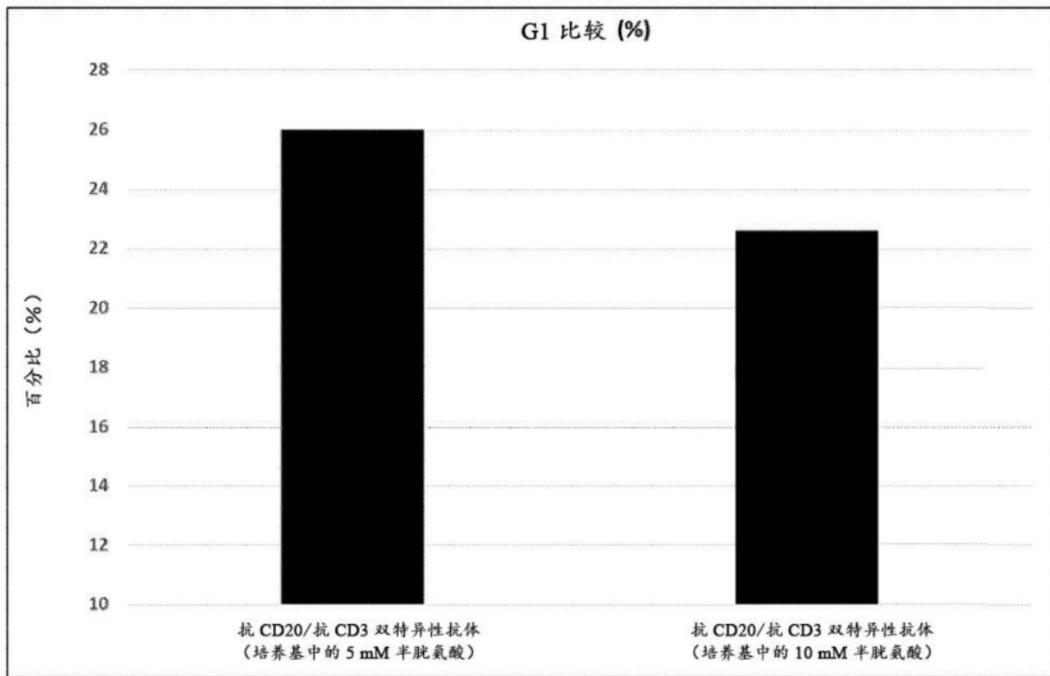
[图6D]



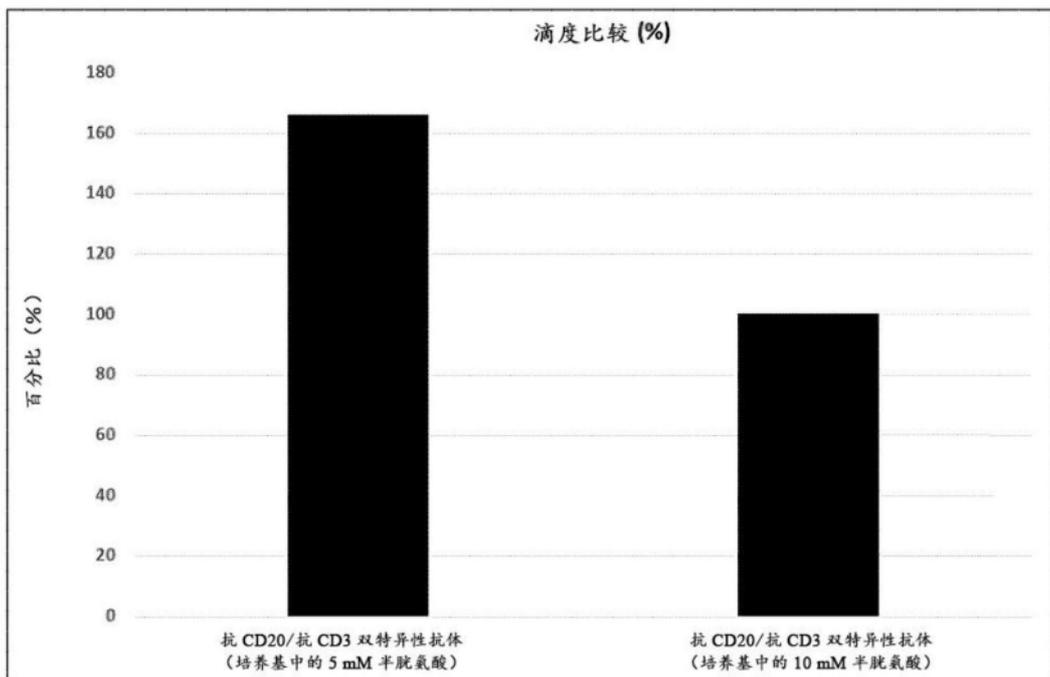
[图6E]



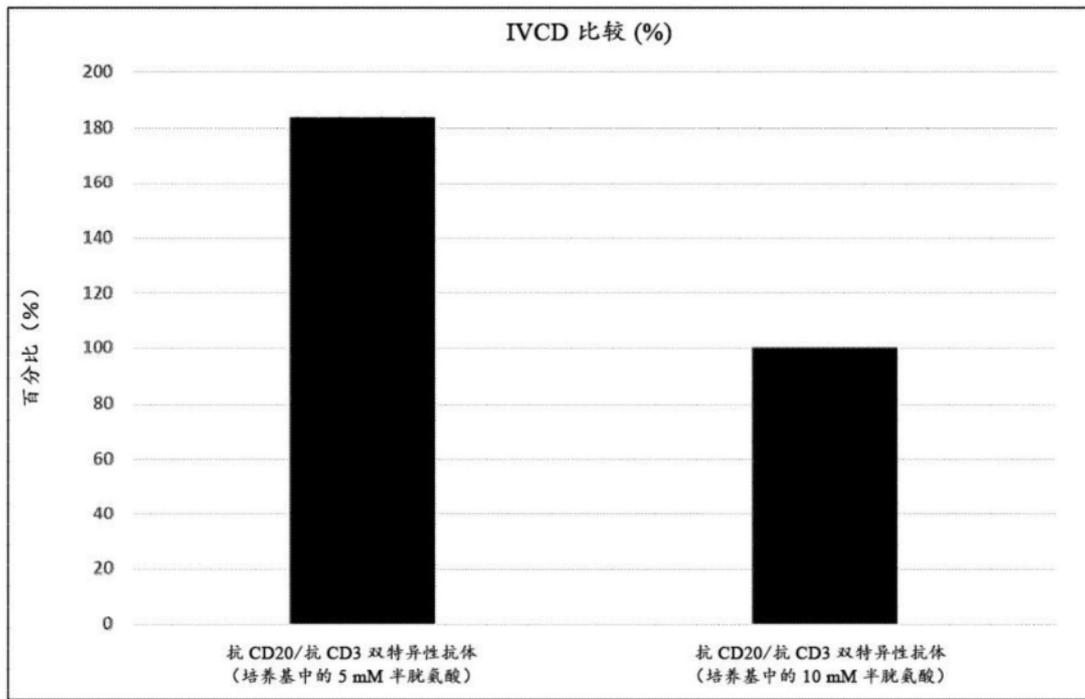
[图7A]



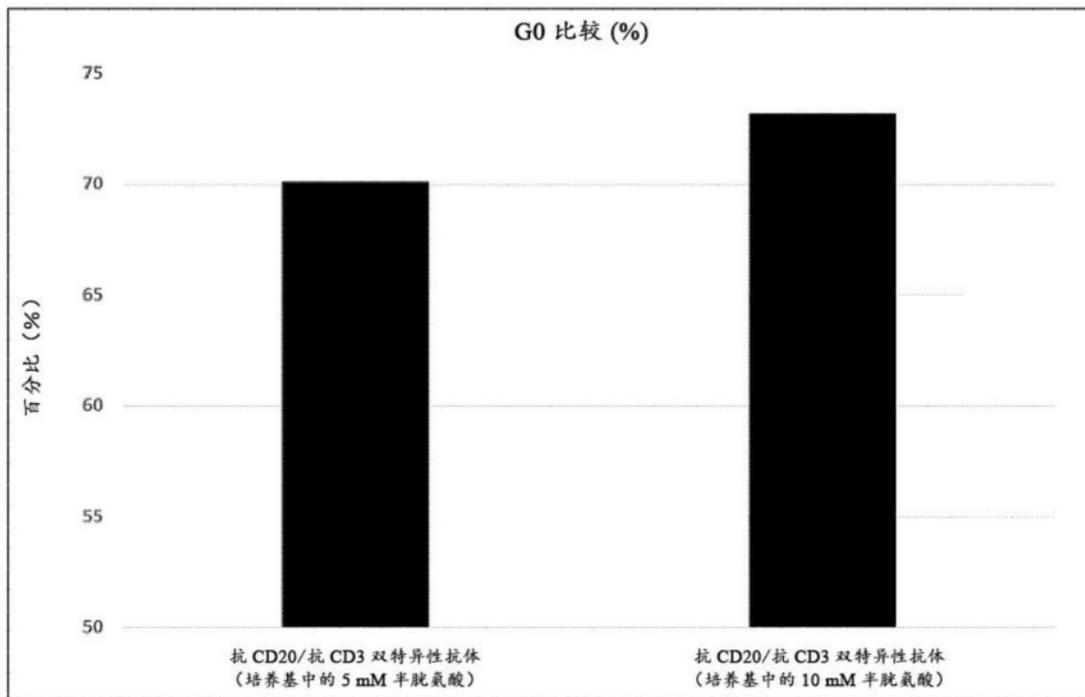
[图7B]



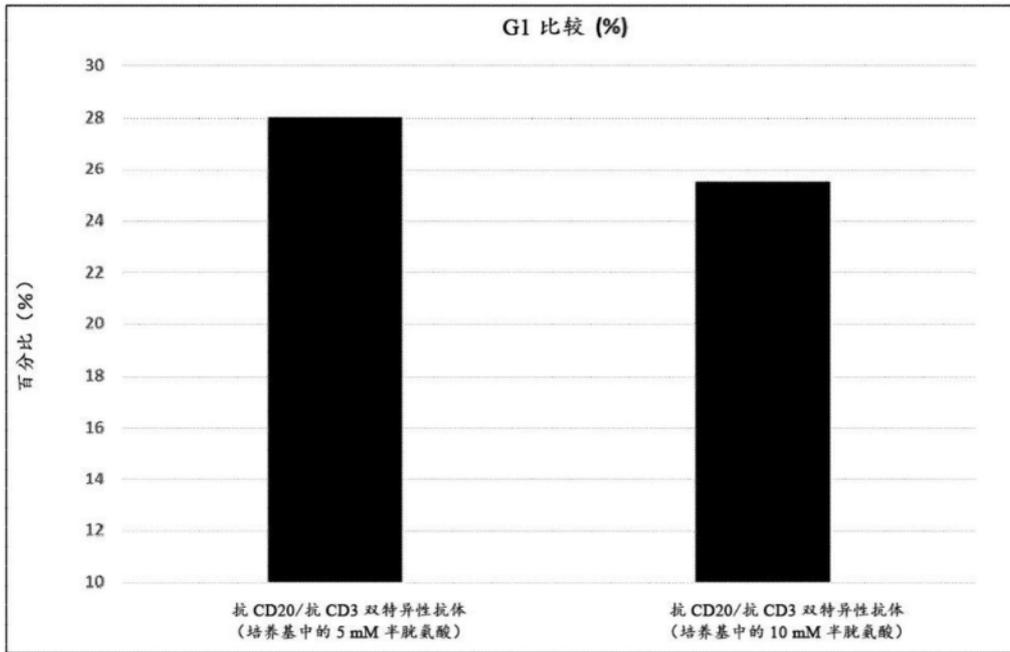
[图7C]



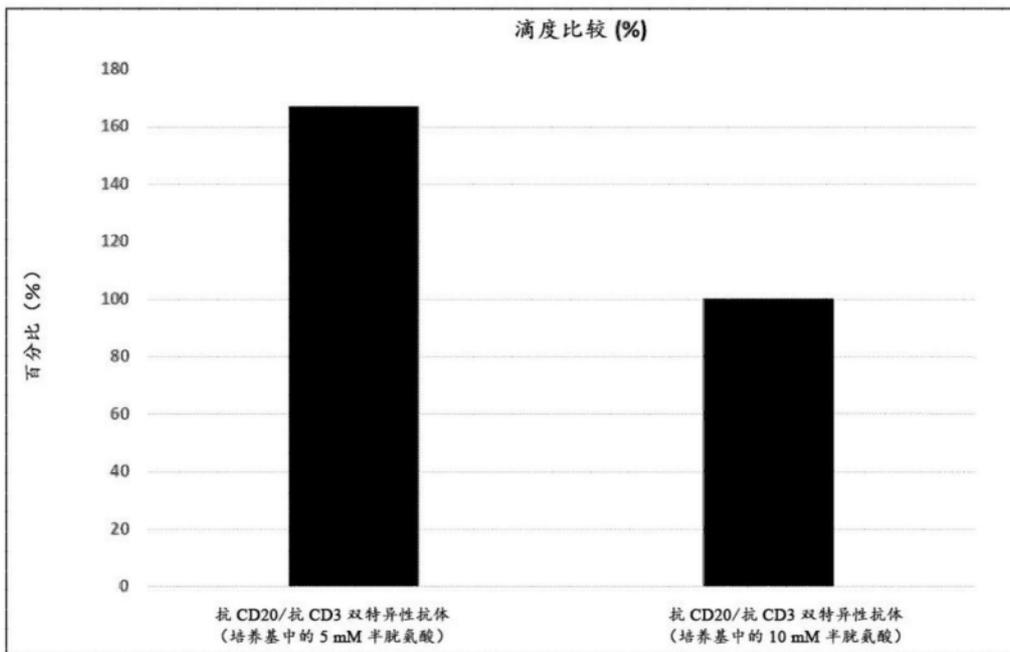
[图7D]



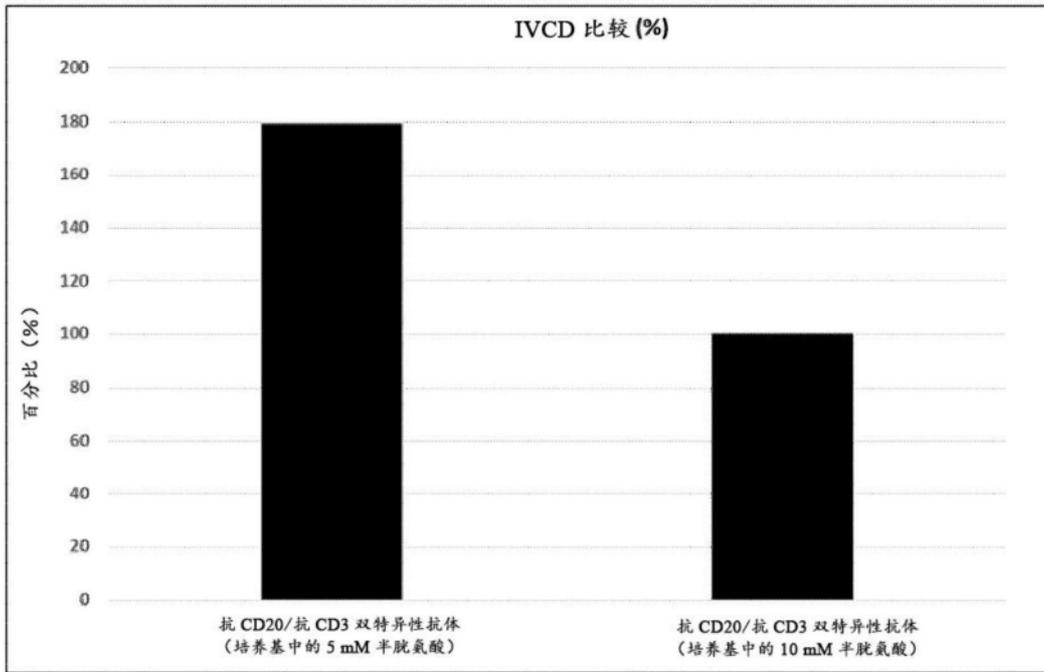
[图8A]



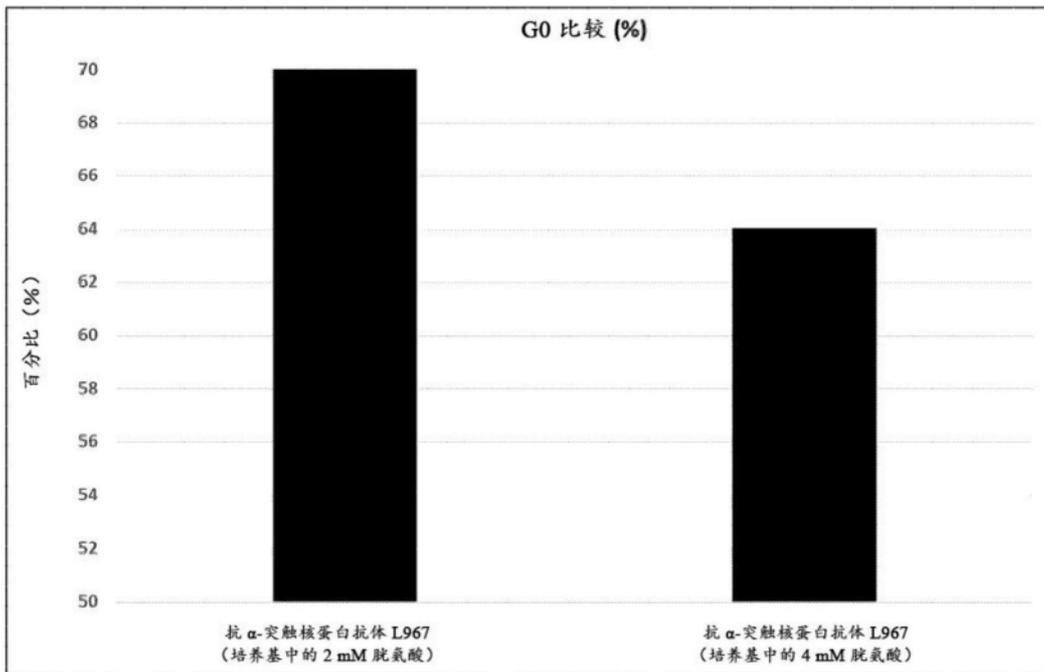
[图8B]



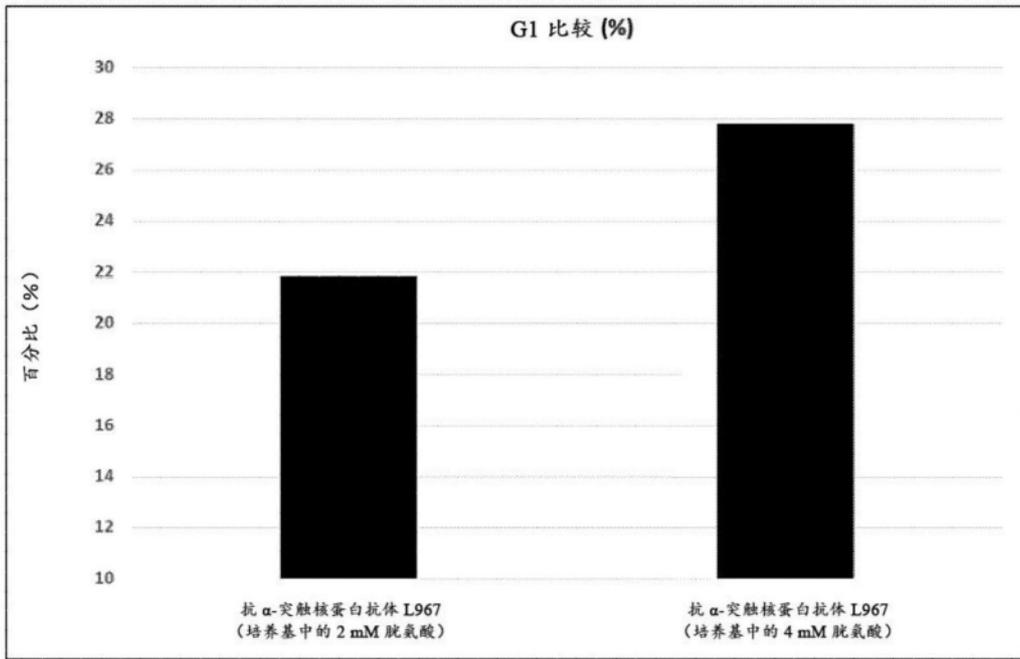
[图8C]



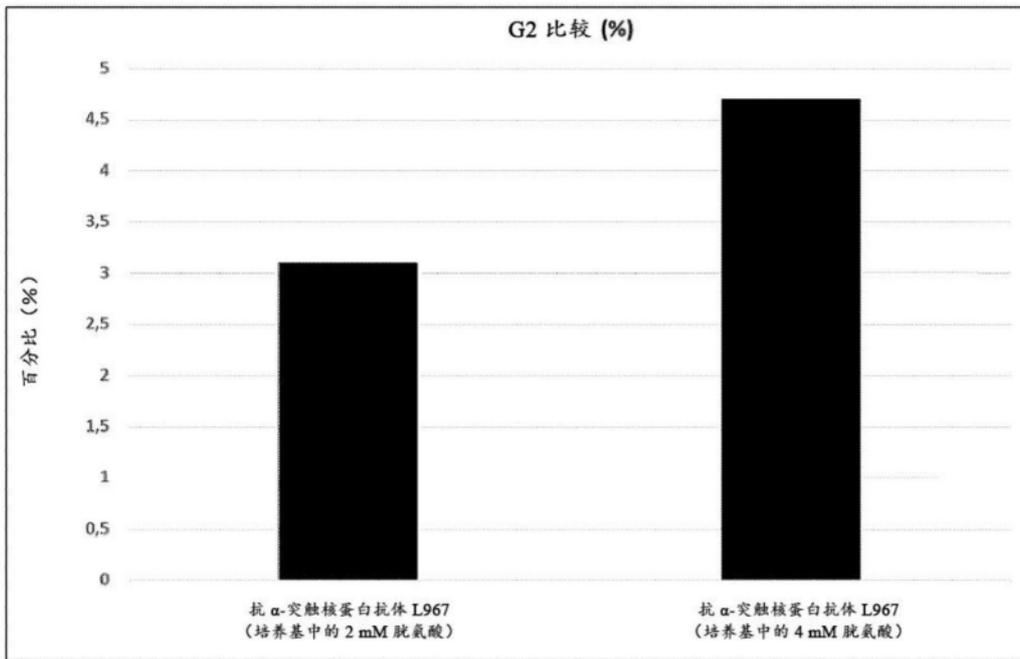
[图8D]



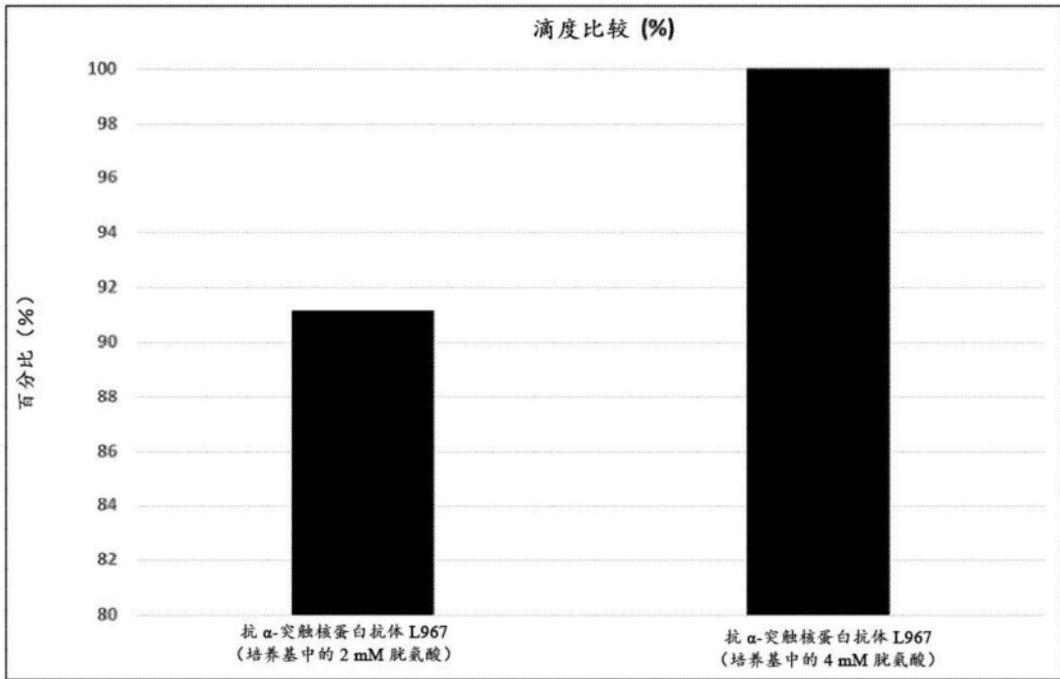
[图9A]



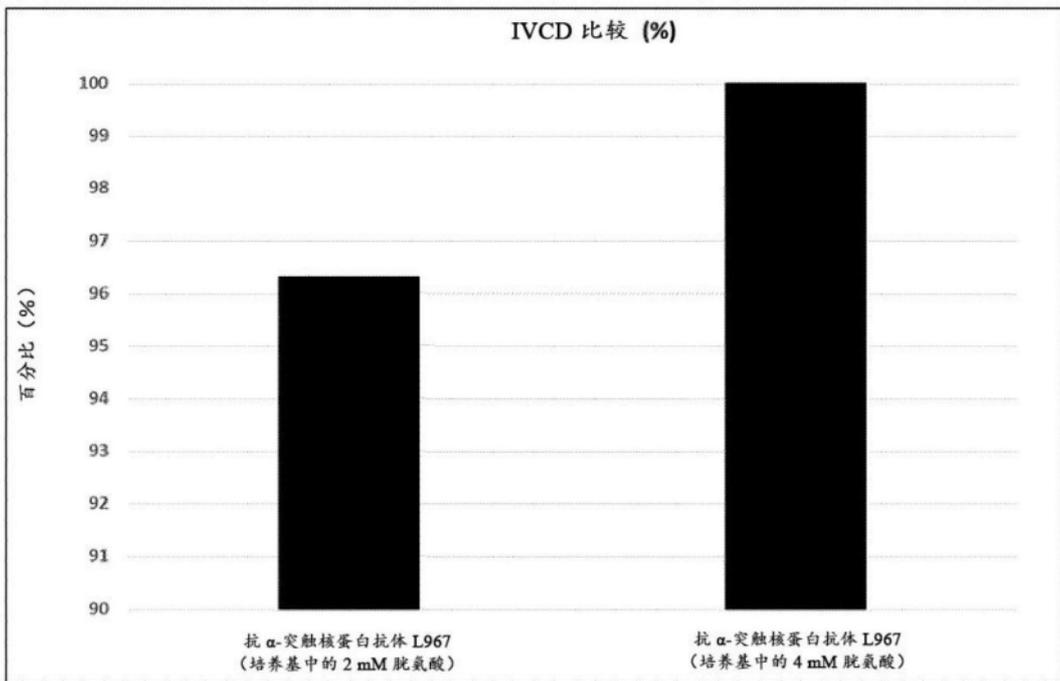
[图9B]



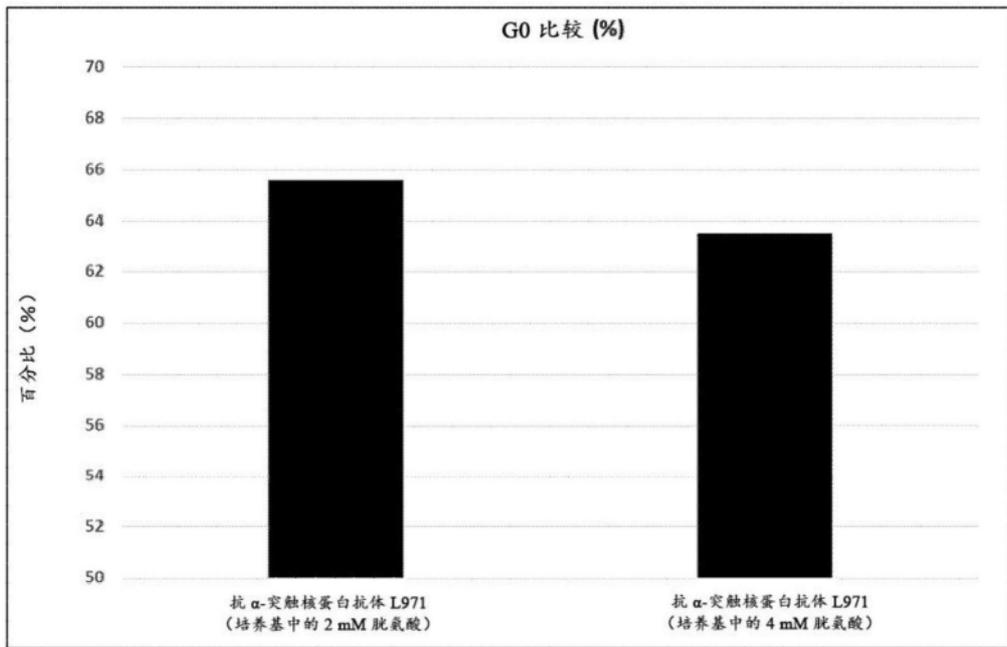
[图9C]



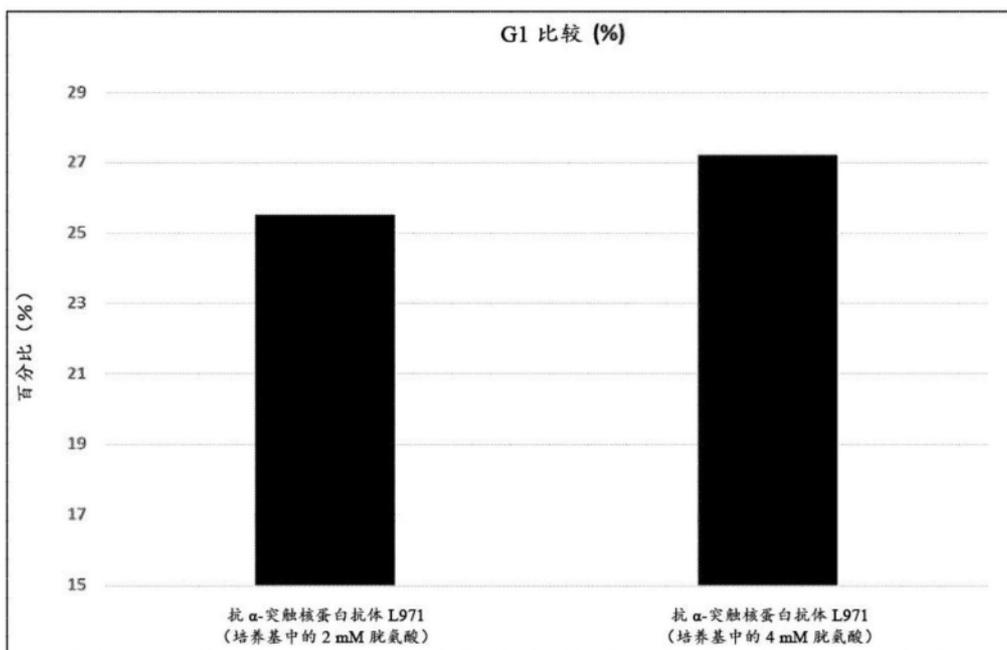
[图9D]



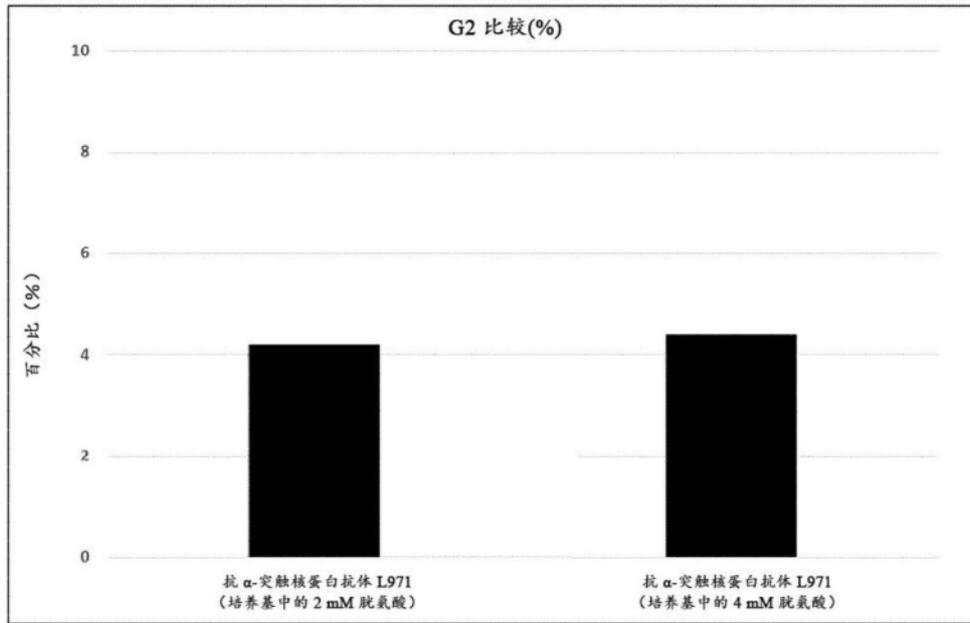
[图9E]



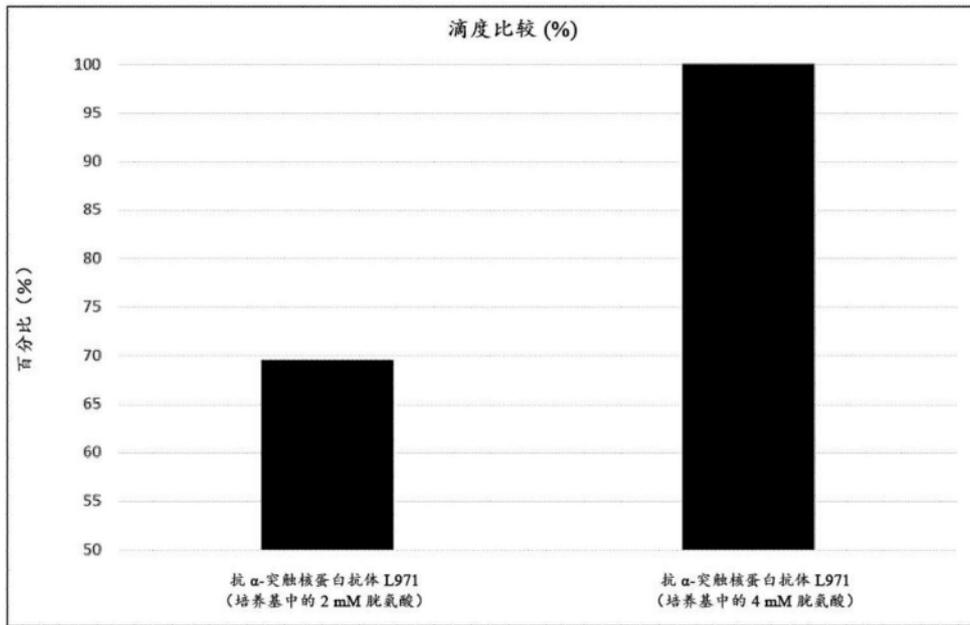
[图10A]



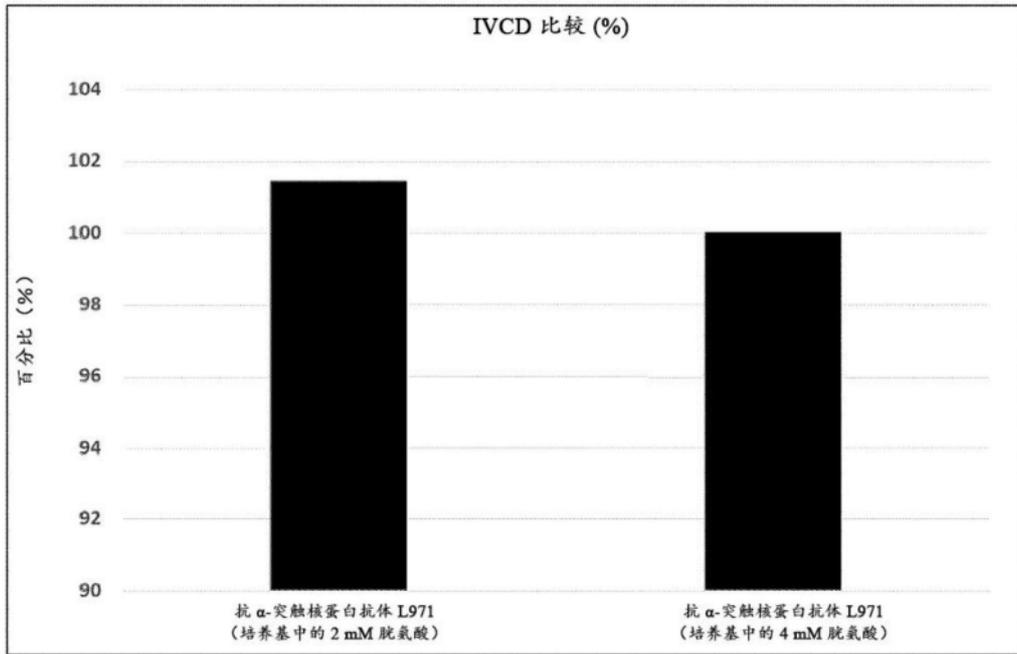
[图10B]



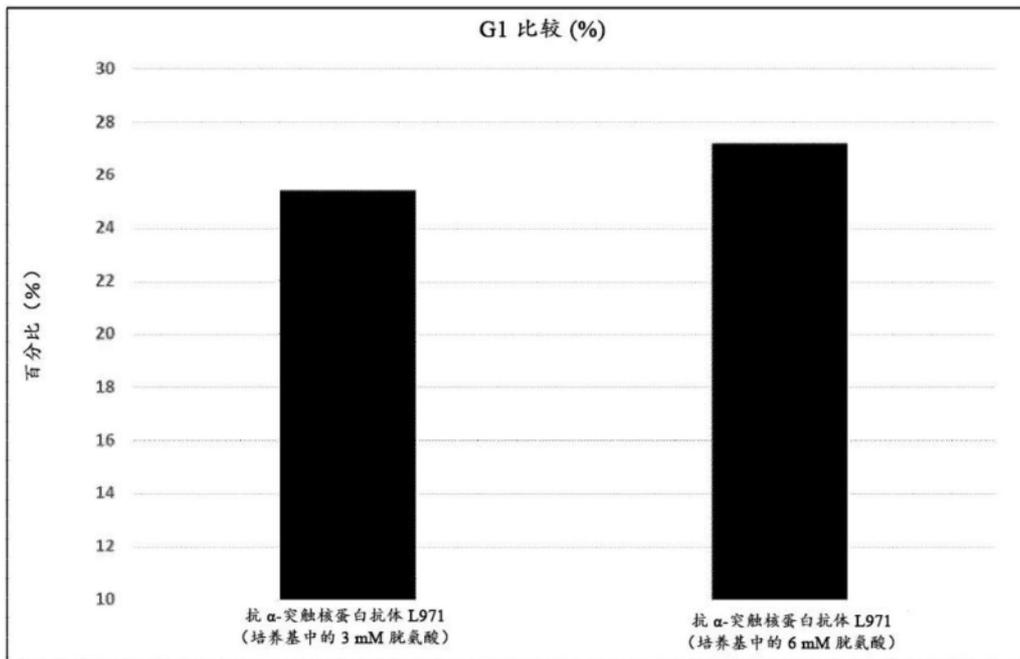
[图10C]



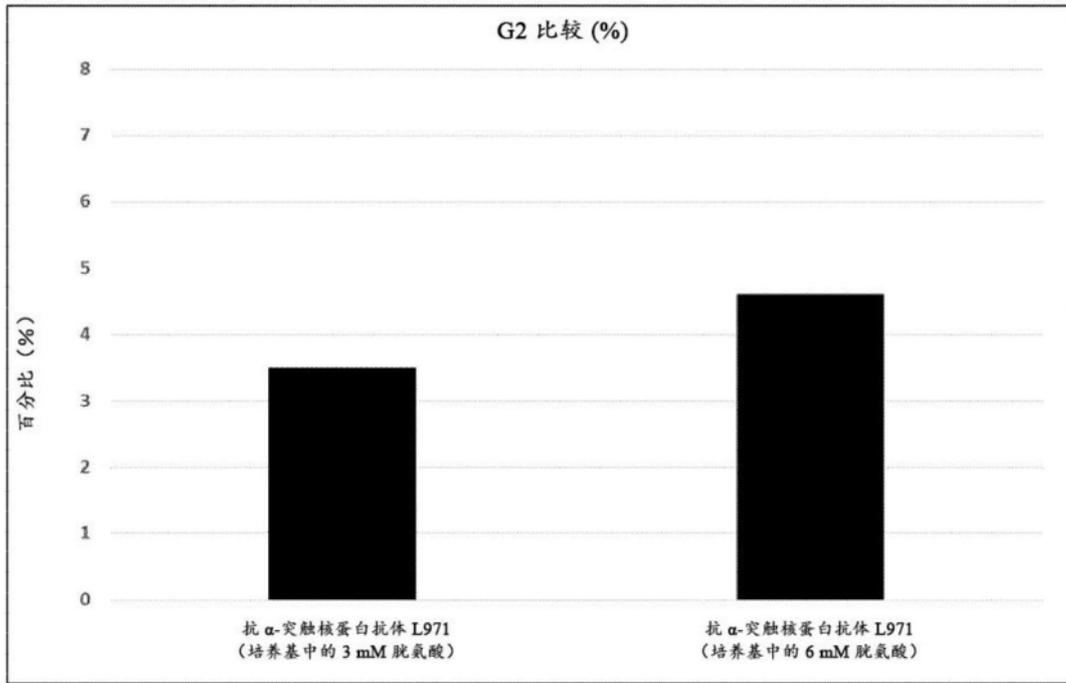
[图10D]



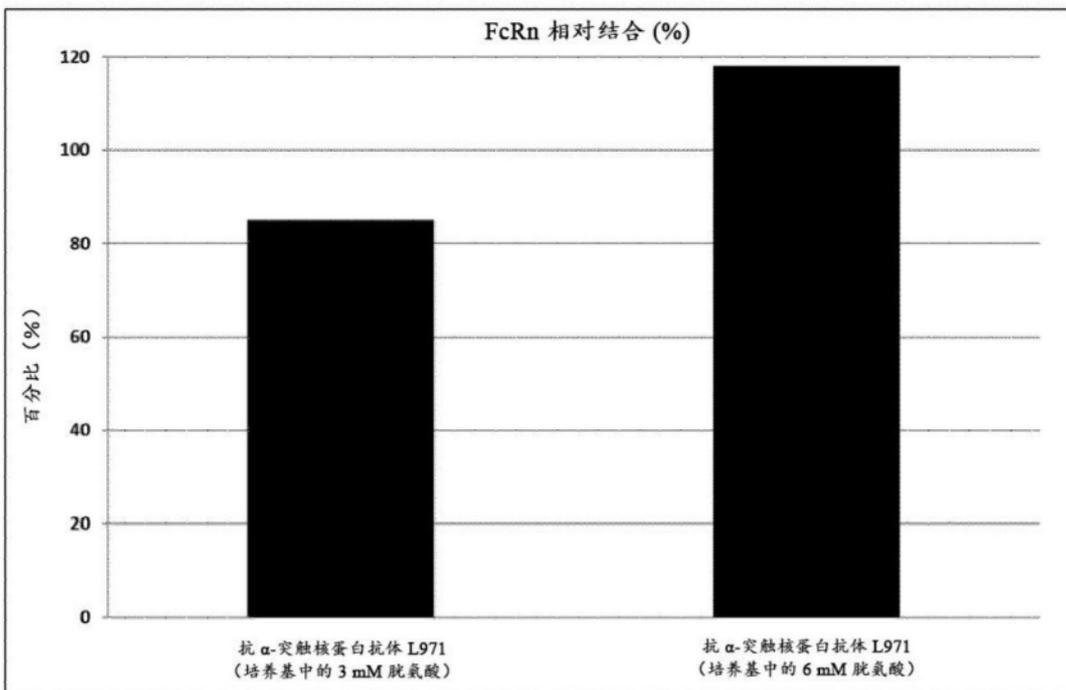
[图10E]



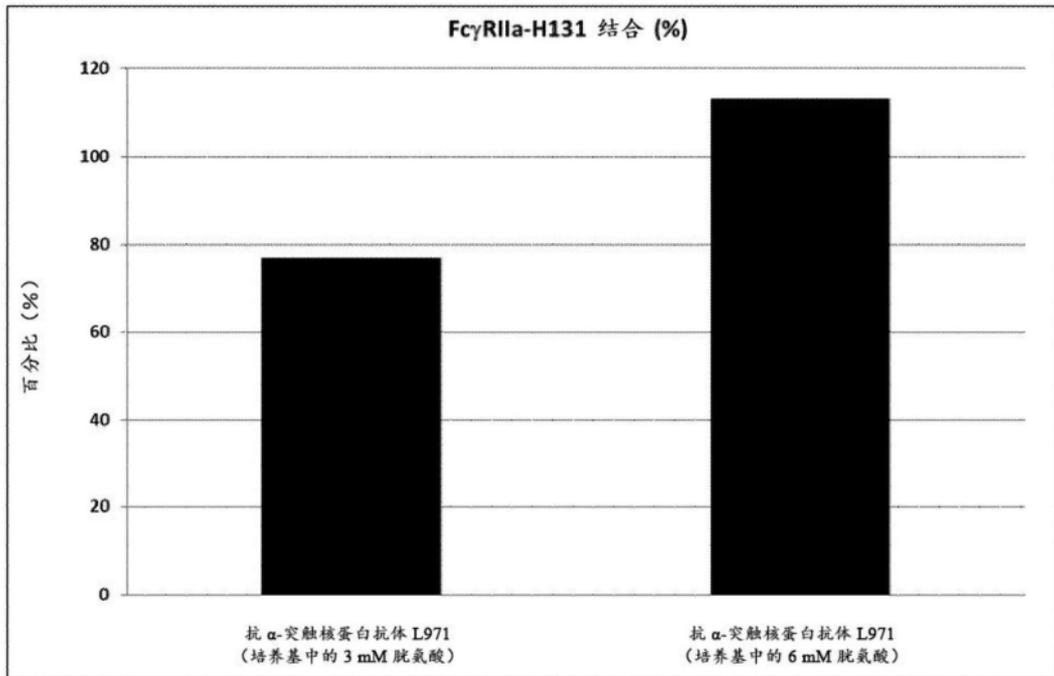
[图11A]



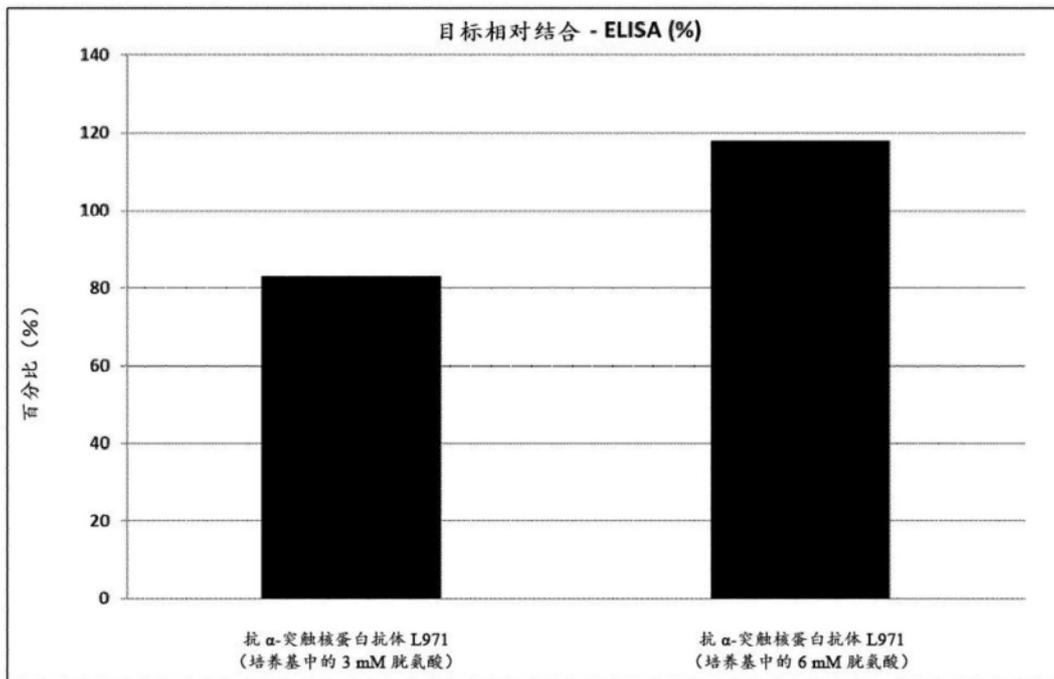
[图11B]



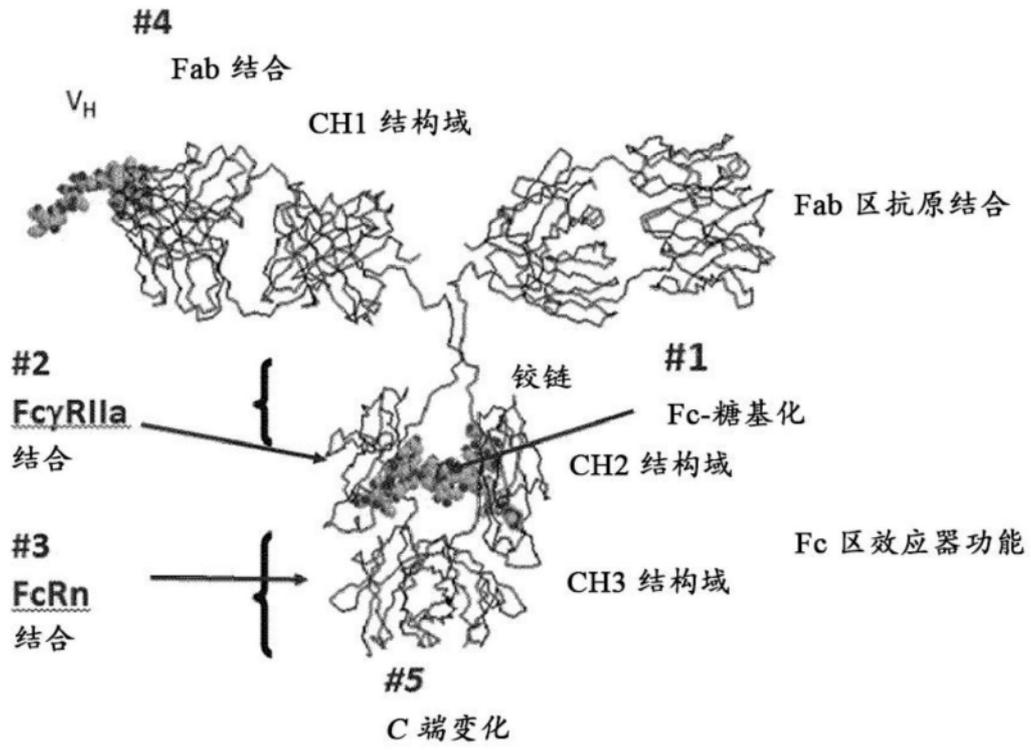
[图11C]



[图11D]



[图11E]



[图12]