

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610094297.8

[51] Int. Cl.

A61D 99/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年1月10日

[11] 公开号 CN 1891178A

[22] 申请日 2006.6.29

[21] 申请号 200610094297.8

[30] 优先权

[32] 2005.6.30 [33] EP [31] 05105946.7

[71] 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 H·贝克 A·伊格莱希亚斯

T·施莱特米勒 M·措赫尔

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书2页 说明书27页 附图10页

[54] 发明名称

用于免疫可比性的体内模型

[57] 摘要

本发明涉及用于确定外源抗体变体的相对免疫原性的方法，其包括：a) 产生对标准抗体转基因的非人动物，b) 将所述转基因非人动物与外源抗体接触，此处所述的外源抗体是 a) 中所述转基因标准抗体的变体，和 c) 确定由 (b) 的外源抗体所引起的转基因非人动物的免疫应答。

1. 用于确定外源抗体的相对免疫原性的方法，其包括：
  - a) 产生对标准抗体转基因的非人动物，
  - b) 将所述转基因非人动物与外源抗体接触，此处所述的外源抗体是所述转基因标准抗体的变体，
  - c) 确定由(b)的外源抗体引起的转基因非人动物的免疫反应。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述外源抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述转基因标准抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述转基因标准抗体是抗人淀粉状蛋白  $\beta$  肽的抗体。
5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述非人动物是哺乳动物。
6. 根据权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述非人动物是啮齿类动物。
7. 根据权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述非人动物是小鼠。
8. 根据权利要求 1-6 任一项所述的方法，其中所述变体包含一级、二级和三级蛋白质结构的变异、氨基酸的糖基化和化学修饰。
9. 用于评估治疗性抗体的免疫可比性的方法，其包括：
  - a) 产生对标准抗体转基因的非人动物，
  - b) 将所述转基因非人动物用治疗性抗体免疫，其中该治疗性抗体是标准抗体的变体，
  - c) 收集经免疫的转基因动物的血清，
  - d) 测量血清中针对所述治疗性抗体的抗体。
10. 对标准抗体转基因的非人动物用于确定外源抗体的相对免疫原性的用途，其中该外源抗体是所述转基因标准抗体的变体。

11. 根据权利要求 10 所述的用途, 其中所述外源抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
12. 根据权利要求 10 所述的用途, 其中所述转基因标准抗体是抗人淀粉状蛋白  $\beta$  肽的抗体。
13. 根据权利要求 10-12 任一项所述的用途, 其中所述非人动物是哺乳动物。
14. 根据权利要求 10-12 任一项所述的用途, 其中所述非人动物是啮齿类动物。
15. 根据权利要求 10-12 任一项所述的用途, 其中所述非人动物是小鼠。
16. 基本上如本文前面描述、特别是参考前述实施例描述的方法和用途。

## 用于免疫可比性的体内模型

### 发明领域

本发明涉及一种体内模型，其用于评估基于抗体的不同治疗或诊断制剂的相对免疫原性。免疫原性是通过包含如下步骤的方法进行比较的：a) 产生抗体转基因的非人动物，b) 将所述转基因非人动物与外源抗体接触，在此所述的外源抗体是(a)中转基因抗体或其变体的标准制剂，和 c) 测定由(b)的外源抗体引发的转基因非人动物的免疫应答。

### 背景技术

1986年，随着重组鼠抗体 Orthoclone 即 OKT-3 (适应症为预防肾移植中同种异体移植物的排斥) 的批准，治疗性单克隆抗体被引入临床实践 [Proceedings of an international symposium on monoclonal antibody therapy with orthoclone OKT3 in renal transplantation. Transplant Proc, 1986. 18(4): p. 923-56; Burdick, J.F. 等人, Reversal of progressive renal allograft dysfunction with OKT3. Nephron, 1987. 46 Suppl 1: p. 52-5; Farges, O. 等人, A randomized trial of OKT3-based versus cyclosporine-based immunoprophylaxis after liver transplantation. Long-term results of a European and Australian multicenter study. Transplantation, 1994. 58(8): p. 891-8; Farrell, M.L., Orthoclone OKT3: a treatment for acute renal allograft rejection. Anna J, 1987. 15(6): p. 373-6; Friedman, J. 等人, Orthoclone OKT3 treatment of acute renal allograft rejection. Transplant Proc, 1987. 19 (2 Suppl 2): p. 46; Gordon, R.D. 等人, Experience with Orthoclone OKT3 monoclonal antibody in liver transplantation. Am J Kidney Dis, 1988. 11(2): p. 141-4; Smith, S.L., Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a

*review*. *J Transpl Coord*, 1996. 6(3): p. 109-19; quiz 120-1]. 1994年, FDA正式批准了 ReoPro [Tcheng, J.E., *Dosing and administration of ReoPro (c7E3 Fab)*. *J Invasive Cardiol*, 1994. 6 Suppl A: p. 29A-33A; discussion 51A-54A; Faulds, D.和 E.M. Sorokin, *Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease*. *Drugs*, 1994. 48(4): p. 583-98; Huston, J.S.和 A.J. George, *Engineered antibodies take center stage*. *Hum Antibodies*, 2001. 10(3-4): p. 127-42], 这表明制药工业对治疗性抗体的治疗剂潜力以及商业潜力的接受最初很缓慢。与生物治疗剂的大规模生产相关的技术挑战, 癌症治疗的早期挫折, 以及对于治疗剂在人体内引发的免疫反应的关注, 这些都在很大程度上解释了这些新的治疗剂的延迟发展。

近来, 通过在抗体产生、发展和生产技术方面的改进, 已克服了很多与治疗性抗体相关的早期困难[Kipriyanov, S.M.和 F. Le Gall, *Generation and production of engineered antibodies*. *Mol Biotechnol*, 2004. 26(1): p. 39-60]。2002年, 美国正式批准了 13 种基于单克隆抗体的治疗剂, 另有 400 种产品处于临床试验阶段[Gura, T., *Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target*. *Nature*, 2002. 417(6889): p. 584-6]。然而, 关于针对很多这些治疗剂所产生的免疫原性应答的可获得信息仍然有限[Schellekens, H., *Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(6): p. 457-62; Schellekens, H., *When biotech proteins go off-patent*. *Trends Biotechnol*, 2004. 22(8): p. 406-10]。

与小分子药物形成对照, 治疗性抗体是具有高度复杂的三维结构的大分子。虽然使用灵敏的物理化学分析方法能较好地表征合成药物, 但仅仅使用物理化学方法不能充分地表征重组蛋白质。重组生物蛋白质由内在可变的遗传修饰细胞分泌。产物能以不同的异构体产生, 或可形成团聚体。糖基化作用和其它翻译后修饰是导致异质性的其它复杂因素。用于生物治疗剂的生产方法远比用于合成药物产品的方法复杂得多。因此生物治疗性蛋白质的最终性质很大程度上取决于生产方法 [Rosenberg, A.S.,

*Immunogenicity of biological therapeutics: a hierarchy of concerns*. Dev Biol (Basel), 2003. 112: p. 15-21], 并且也可能受剂型的影响。批次到批次 (Batch-to-batch) 的变化是很普遍的, 这使得重复性成为评估产品质量的标准之一。由于物理化学方法不能充分表征生物治疗性产品, 因此需要生物系统与物理化学数据相补充来表征该产品 [Schellekens, H., *Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals*. Nat Rev Drug Discov, 2002. 1(6): p. 457-62]。确保不同生产批次在它们的内在免疫学性质上具有可比性已成为生物治疗剂生产中所面临的最严峻的挑战之一。

当将治疗性蛋白质施与患者时, 它们大多数都能诱导免疫应答 [Ryff, J.C.和 H. Schellekens, *Immunogenicity of rDNA-derived pharmaceuticals*. Trends Pharmacol Sci, 2002. 23(6): p. 254-6], 治疗性抗体也不例外 [Ryff, J.C.和 H. Schellekens, *Immunogenicity of rDNA-derived pharmaceuticals*. Trends Pharmacol Sci, 2002. 23(6): p. 254-6]。然而, 抗产品抗体的发生在不同产品之间大为不同, 有些在大多数个体中都能诱导抗体, 而对于其它的来说很少发生免疫反应 [Schellekens, H., *Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects*. Clin Ther, 2002. 24(11): p. 1720-40; discussion 1719]。很多因素影响免疫应答的产生, 它们可能是抗体结构内非人氨基酸序列的存在、靶分子的性质、应用途径或作为治疗剂适应症的疾病类型。在含有完全相同的氨基酸一级序列的相同产品的两次装料 (charges) 中, 团聚体的形成、蛋白质的差异折叠的三维结构的存在, 或杂质的存在都可以严重影响免疫原性 [Schellekens, H., *When biotech proteins go off-patent*. Trends Biotechnol, 2004. 22(8): p. 406-10]。当抗产品抗体与患者的内源性蛋白质交叉反应时, 令人印象深刻地观察到了惊人的免疫原性后果, 这在重组促红细胞生成素- $\alpha$  的剂型变化后观察到 [Casadevall, N., *Antibodies against rHuEPO: native and recombinant*. Nephrol Dial Transplant, 2002. 17 Suppl 5: p. 42-7; Casadevall, N., *Pure red cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies in patients treated with epoetin*. Nephrol Dial Transplant, 2003. 18 Suppl 8: p. viii37-41; Casadevall,

N.和 L. Croisille, [*Erythropoiesis disorders and other central autoimmune anemias*]. *Rev Prat*, 2001. 51(14): p. 1547-51; Casadevall, N.等人, *Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin*. *N Engl J Med*, 2002. 346(7): p. 469-75]。因此迫切需要监测生产变化对产品就免疫原性而言的质量所产生的结果的系统。

使用包括分离的人树突细胞和人 T 辅助淋巴细胞的体外系统能够很容易地监测到蛋白质的一级序列变化[Stickler, M.M., D.A. Estell 和 F.A. Harding, *CD4+ T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells*. *J Immunother*, 2000. 23(6): p. 654-60]。这些模型可受 T 细胞前体发生频率中供体-到-供体的差异和 MHC 多态性的限制, 因此迫使人们研究大量具有不同 MHC 基因型的供体以得出具有统计学意义的结果。更重要的是, 在分离的体外系统中不能监测到除了一级结构之外的但涉及蛋白质三级结构的更微小的变化, 因此需要更为完整的免疫系统模型。通过体内动物系统能够提供这样的模型。

特别是, 人同系物在动物体内是免疫原性的, 同样, 在动物体内测试人抗体很难预测它们在人体内的免疫原性潜力 [Schellekens, H., *Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(6): p. 457-62]。然而, 在有些情况中可以评估不同制剂的相对免疫原性 [Palleroni, A.V., 等, *Interferon immunogenicity: preclinical evaluation of interferon-alpha 2a*. *J Interferon Cytokine Res*, 1997. 17 Suppl 1: p. S23-7]。虽然人蛋白质对动物来说是外来的并因此将引起免疫应答, 但已被转入了目的人蛋白质的转基因动物将把该转基因识别为自身的(基因)并对由该转基因所编码的蛋白质变得耐受。虽然目前没有动物模型或体外系统能预测针对人体内治疗性蛋白质的免疫应答(这只能在临床试验中排他且可靠地测定), 但人抗体转基因小鼠 [Storb, U., *Transgenic mice with immunoglobulin genes*. *Annu Rev Immunol*, 1987. 5: p. 151-74] 是评价造成破坏 B 细胞针对治疗性抗体的耐受性的因素的最好的模型, 并将因此构成评估免疫可比性的重要工具, 也就是, 评估生产变

化对转基因小鼠内治疗性抗体的相对免疫原性性能的影响。

抗体转基因小鼠是本领域众所周知的；然而，尚未采用它们来解决治疗性抗体的免疫可比性评估的问题。本发明致力于解决在人体外系统中所遇到的缺陷，并为目前尚未解决的确保治疗性抗体的免疫可比性的问题提供一种解决方案。

## 发明内容

本发明提供一种用于评估抗体的免疫可比性的方法，由此能够确定抗体制剂相对于标准抗体制剂来说引起免疫应答与否(相对免疫原性)。

本发明提供一种用于确定外源抗体的相对免疫原性的方法，其包括如下步骤：a)产生对标准抗体转基因的非人动物，b)将所述转基因非人动物与外源抗体接触，此处所述的外源抗体是转基因标准抗体的变体，和c)确定由(b)的外源抗体引起的转基因非人动物的免疫应答。

外源抗体可以是治疗性抗体。优选地，外源抗体是人的、人源化的或嵌合抗体。更优选地，转基因抗体是免疫球蛋白 $\gamma$ (IgG)。甚至更优选地，该抗体是抗人淀粉状蛋白 $\beta$ -肽或其变体的抗体。最优选的抗体是抗-A $\beta$ IgG的变体。该抗-A $\beta$ IgG详细描述于专利申请WO03/070760之中，其在此完整引用作为参考。

优选地，转基因标准抗体是人的、人源化的或嵌合抗体。更优选地，转基因抗体是免疫球蛋白 $\gamma$ (IgG)。甚至更优选地，该抗体是抗人淀粉状蛋白 $\beta$ -肽的抗体。最优选的抗体是抗-A $\beta$ IgG。

转基因非人动物可以是任何非人动物。优选的非人动物是哺乳动物。更优选地，该非人动物是啮齿类动物，例如小鼠或大鼠。

如文中所用的术语“标准抗体”指的是在确定条件下产生的抗体，其用作定量或定性值比较的公认量度。

如文中所用的术语“变体”或“抗体变体”指的是在结构特征、制备方法、剂型、或保存条件方面与标准抗体不同的抗体。结构变体可包含一级、二级和三级蛋白质结构的变异(即构象变化)、氨基酸的糖基化作用和化学修

饰。进一步的结构变异即是备选的结构域间构建体(VL/VL, VH/VH)、二聚体、寡聚体和较大的团聚体。

可能影响相对免疫原性性能的因素可包含药物物质的结构改变、药品的剂型、杂质和污染物。特别关注的是,可能由下游加工、储存、配制和处理的改变而引起的天然蛋白质及其结构变体之间免疫原性的差别 [Sharma, V.K.和 D.S. Kalonia, *Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability*. Pharm Res, 2003. 20(11): p. 1721-9; Chirino, A.J.和 A. Mire-Sluis, *Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes*. Nat Biotechnol, 2004. 22(11): p. 1383-91]。这些变异包括一级结构的改变,例如氨基酸交换,糖基化变体和化学修饰,例如乙酰化作用,天冬酰胺脱氨基作用,甲硫氨酸、组氨酸或色氨酸氧化作用或者其它由例如氧化或光应激、具有诱导衍生作用潜能的赋形剂或杂质导致的化学修饰 [Moss, C.X.等人, *Asparagine deamidation perturbs antigen presentation on class II MHC molecules*. J Biol Chem, 2005; Mamula, M.J.等人, *Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins*. J Biol Chem, 1999. 274(32): p. 22321-7; Duenas, E.T.等人, *Comparison between light induced and chemically induced oxidation of rhVEGF*. Pharm Res, 2001. 18(10): p. 1455-60; Gribben, J.G.等人, *Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF*. Lancet, 1990. 335(8687): p. 434-7; Mimura, Y.等人, *Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding*. J Biol Chem, 2001. 276(49): p. 45539-47; Chianese-Bullock, K.A.等人, *Antigen processing of two H2-IEd-restricted epitopes is differentially influenced by the structural changes in a viral glycoprotein*. J Immunol, 1998. 161(4): p. 1599-607; Khosravi M, Shire SJ, Borchardt RT. *Evidence for the involvement of histidine A(12) in the aggregation and precipitation of human relaxin induced by metal-catalyzed*

*oxidation. Biochemistry. 2000 May 16;39(19):5876-85; Margiloff L, Chaplia L, Chow A, Singhal PC, Mattana J. Metal-catalyzed oxidation of immunoglobulin G impairs Fc receptor-mediated binding to macrophages. Free Radic Biol Med. 1998 Nov 1;25(7):780-5; Duenas, E.T. 等人, Comparison between light induced and chemically induced oxidation of rhVEGF. Pharm Res, 2001. 18(10): p. 1455-60]. 通过全部或部分还原、分子内二硫桥键的改变(“不规则性”), 或分子内共价交联, 二级和三级结构的变体例如能作为一级结构的修饰结果出现。例如通过热应激、pH 短暂改变或与有机溶剂孵育, 能形成一级序列与天然蛋白相同的构象异构体 [Sharma, V.K.和 D.S. Kalonia, Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability. Pharm Res, 2003. 20(11): p. 1721-9; Vermeer, A.W.和 W. Norde, The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. Biophys J, 2000. 78(1): p. 394-404; Ronnelid, J.等人, Immune complexes from SLE sera induce IL10 production from normal peripheral blood mononuclear cells by an Fc gamma RII dependent mechanism: implications for a possible vicious cycle maintaining B cell hyperactivity in SLE. Ann Rheum Dis, 2003. 62(1): p. 37-42; Melnikova, Y.I. 等人, Antigen-binding activity of monoclonal antibodies after incubation with organic solvents. Biochemistry (Mosc), 2000. 65(11): p. 1256-65; Reed MA 等人, The denatured state under native conditions: a non-native-like collapsed state of N-PGK. J Mol Biol. 2006 Mar 24;357(2):365-72]. 例如通过氧化应激, 和/或具有诱导分子间交联潜能的赋形剂或杂质存在时诱导的共价分子间交联能形成更高级别的结构变异, 像备选的结构域间构建体(VL/VL, VH/VH)、二聚体、寡聚体和较大的团聚体。二聚体、寡聚体和较大的团聚体也能通过非共价分子间相互作用形成, 例如作为非天然构象异构体的形成、胶束形成或一级结构修饰的结果。*

特别关注的是较大的团聚体, 因为它们的重叠表位特征, 除了构象变

化之外，已知它们还能增强多种治疗性蛋白质的免疫原性(Braun, A.等人, *Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice.* Pharm Res, 1997. 14(10): p. 1472-8; Hochuli, E., *Interferon immunogenicity: technical evaluation of interferon-alpha 2a.* J Interferon Cytokine Res, 1997. 17 Suppl 1: p. S15-21; Hermeling S 等人, *Structural characterization and immunogenicity in wild-type and immune tolerant mice of degraded recombinant human interferon alpha2b.* Pharm Res. 2005 Dec; 22(12):1997-2006)。已知通过例如暴露于光、物理应力(震动或搅拌)能促进团聚体的形成，并且团聚体形成可以在长期储存期间特别是在温度升高情况下或者是对药品的不适当处理下发生(Wang, W. *Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics.* Int J Pharm. 2005 Jan 31, 289(1-2):1-30, 以及文中引用的文献)。

术语“免疫反应”用于本文中指的是免疫系统对抗原性刺激的任何反应，包括抗体产生、细胞介导的免疫以及免疫耐受。

术语“治疗性抗体”用于本文中指的是可以用于处理、治疗和诊断疾病的单克隆抗体。治疗性抗体可以是任何动物作为对抗原免疫应答所产生的抗体。优选地，治疗性抗体通过啮齿类动物产生，更优选通过小鼠产生。治疗性抗体也可以是通过遗传工程产生的抗体。适当的方法是本领域公知的，也就是噬菌体展示(Brekke OH 和 Loset GA, *New technologies in therapeutic antibody development* Curr Opin Pharmacol. 2003 Oct; 3(5): 544-50.)。优选地，治疗性抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

本发明进一步提供一种用于评估治疗性抗体的免疫可比性的方法，包括如下步骤：

- a)产生对标准抗体转基因的非人动物，
- b)用治疗性抗体免疫所述转基因非人动物，其中所述治疗性抗体是标准抗体的变体，
- c)收集被免疫的转基因动物的血清，

d)测量血清中针对所述治疗性抗体的抗体。

血清中针对所述治疗性抗体的抗体是转基因动物作为针对所述治疗性抗体的免疫应答所产生的抗体。

产生转基因非人动物的方法是本领域公知的。合适的方法即是 Hogan B., Beddington R., Costantini F. & Lacy E. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 第 2 版(1994). Cold Spring Harbor Laboratory Press 中描述的方法。

转基因非人动物中抗体的表达可以是组成型的或诱导型的。优选该抗体的表达是组成型的。

用于评估免疫应答的方法是本领域公知的。合适的方法是例如 ELISA; 更多的方法可在 Harlow E. & Lane D. *Antibodies. A laboratory manual*. (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press 中找到。

此外, 本发明涉及标准抗体转基因非人动物及其用于确定外源抗体的相对免疫原性的用途, 其中所述外源抗体是转基因标准抗体的变体, 优选是治疗性抗体的变体。

转基因非人动物可以是任何非人动物。优选的非人动物是哺乳动物。更优选地, 该非人动物是啮齿类动物, 例如小鼠或大鼠。用于产生转基因非人动物的方法是本领域公知的。合适的方法即是 Hogan B., Beddington R., Costantini F. & Lacy E. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. 第 2 版(1994). Cold Spring Harbor Laboratory Press 中的方法。

用于评估免疫应答的方法也是本领域公知的。合适的方法例如是 ELISA; 更多的方法可在 Harlow E. & Lane D. *Antibodies. A laboratory manual*. (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press 中找到。

外源抗体可以是治疗性抗体。优选地, 外源抗体是人的、人源化的或嵌合抗体。更优选地, 转基因抗体是免疫球蛋白  $\gamma$  (IgG)。甚至更优选地, 抗体是抗人淀粉状蛋白  $\beta$  肽或其结构变体的抗体。最优选的抗体是抗-A $\beta$ IgG 的变体。抗-A $\beta$ IgG 详细描述于专利申请 WO03/070760 中, 其在此完整引用作为参考。

优选地，转基因标准抗体是人的、人源化的或嵌合抗体。更优选地，转基因抗体是免疫球蛋白  $\gamma$  (IgG)。甚至更优选地，抗体是针对人淀粉状蛋白  $\beta$  肽的抗体。最优选的抗体是抗-A $\beta$ IgG。

现在已对本发明进行了一般性描述，参考特定实施例将会更好地理解这些内容，除非另有说明，纳入本发明中的这些特定实施例与下面的附图相结合只是用于阐明的目的而非旨在限制。

#### 附图说明

图 1 显示了特异于克隆入表达载体 pHSE3'用于转基因表达的人 A  $\beta$  的人 Ig  $\gamma$ 1 基因的完整编码序列。用于 PCR 扩增的引物的位置和名称显示于相应序列的上面或下面。终止密码子以粗体显示。

图 2 显示了特异于克隆入表达载体 pHSE3'用于转基因表达的人 A  $\beta$  的人 Ig  $\kappa$ 基因的完整编码序列。用于 PCR 扩增的引物的位置和名称显示于相应序列的上面或下面。终止密码子以粗体显示。

图 3 显示了转基因小鼠血清分析的图示。进行了对人 $\kappa$ 轻链和人 $\gamma$ 重链特异的夹心 ELISA。MS:小鼠血清。hIgG1:  $\gamma$ 1 同种型的重组人免疫球蛋白。F 2F: 建立者小鼠 2F。Neg: PCR-阴性同窝仔畜对照。Tg 5M+:转基因小鼠 5M+。Tg 7M+:转基因小鼠 7M+。转基因小鼠在同一分子内表达两个抗体链。

图 4 显示了用 FACS(荧光激活细胞分选术)评估淋巴细胞亚群的图示。用特异于 B 细胞、T 细胞和 T 辅助细胞以及细胞毒素 T 细胞的抗体对来自野生型和转基因小鼠的外周血淋巴细胞进行染色。在野生型和 hIgG1-转基因小鼠的淋巴细胞亚群之间未能检测到显著差异。A)野生型 B1/6, B)转基因小鼠。

图 5 为显示野生型(WT)和转基因(TG)小鼠体内的抗-KLH 抗体滴度的图示。在第 0 天用 KLH 免疫野生型和转基因小鼠。在第 7 天和第 12 天，评估抗-KLH 抗体的滴度。在 KLH 刺激时，转基因小鼠与野生型小鼠反应相似。

图 6 为显示转基因小鼠体内抗-HUMIRA 滴度的图示。在第 0 天用人 IgG1 抗体 HUMIRA 免疫转基因小鼠。在第 7、12、21 和 35 天，测量血清抗-HUMIRA 的滴度。转基因小鼠产生了针对 HUMIRA 的应答。

图 7 显示了 A)分子量标准 B)Mab11 空白对照剂和 C)Mab11 的大小排除层析图(SEC)。设备、运行条件以及操作描述于方法部分。

图 8 显示了 A)Mab11 空白对照剂和 B)Mab11 的离子交换层析图。设备、运行条件以及操作描述于方法部分。

图 9 显示了在 A)非还原和 B)还原条件下，Mab11 和还原的/烷基化的 Mab11 (RA-Mab11)在 4-12 % Bis-Tris 凝胶上跑样的 SDS-PAGE 图。

图 10 为还原的/烷基化的 Mab11 (RA-Mab11)的 LC/MS 分析的图示。A) C8 RP-HPLC, UV-追踪(214nm), B)去卷积(deconvoluted)质谱。C) B) 中 HMW 质量峰局部放大区域。有关观察到和计算的质量分配参见表 3。

图 11 显示野生型(WT)和转基因(TG)动物中抗 Mab-11 滴度的图示。在第 0 天用天然 Mab-11 免疫野生型和转基因小鼠。在第 7、12、21 和 35 天，评估抗-Mab-11 抗体的滴度。转基因小鼠对 Mab-11 的刺激表现出耐受性。

图 12 显示在野生型(WT)和转基因(TG)小鼠中抗-RA Mab-11 滴度(RA=还原的-烷基化的)的图示。在第 0 天用 RA Mab-11 免疫野生型和转基因小鼠。在第 7、12、21 和 35 天，评估抗-RA Mab-11 的滴度。野生型和转基因小鼠都对 RA Mab-11 应答。

图 13 显示转基因(TG)小鼠对 Mab-11(◆)和还原的-烷基化的(RA)-Mab-11(●)的抗体反应的图示。用天然的 Mab-11 和 RA Mab-11 免疫转基因小鼠。第一次免疫后 3 个月，用天然 Mab-11 加强动物。评估加强前后对天然 Mab-11 的抗体应答。2/5 小鼠显示出与天然 Mab-11 的交叉反应。

## 实施例

除非另有说明，根据厂商的说明来使用实施例中涉及的商业可获得的

试剂。

### 实施例 1: 人免疫球蛋白转基因小鼠的产生 构建体的产生

使用对人 Ab 肽具有特异性的编码同种型 $\gamma 1$  的免疫球蛋白(Ig)重链(H)的 cDNA (SEQ. ID. NO: 1)和编码同种型 $\kappa$ 轻链(L)的 cDNA (SEQ. ID. NO: 2) [Bardroff, M.e.a., *Anti-amyloid beta antibodies and their use*. EP03001759 EP, 2003]。使用表 1 中的引物, 通过 PCR 反应来扩增这些 cDNAs。为直接插入到 pHSE3'载体中, 5'引物含有 Sall (或相容的 XhoI) 位点, 并且 3'引物含有 BamHI (或相容的 BglII)位点[Pircher, H.等人, *T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice*. Embo J, 1989. 8(3): p. 719-27]。首先用两个限制性内切酶 Sall 和 BamHI 来酶切 PCR 扩增的 cDNAs, 然后将它们分别插入载体 pHSE3'的相应位点。pHSE3'内 Ig cDNAs 的表达由 MHC I 类基因 H-2k 的鼠源启动子驱动, 并由位于该克隆基因 3'的鼠源 Ig H 基因增强子增强[Pircher, H. 等人, *T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice*. Embo J, 1989. 8(3): p. 719-27]。该表达载体确保了在转基因小鼠的 T 和 B 淋巴细胞内相应插入的基因产物的高水平产生([Pircher, H. 等人, *T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor V beta 8.1 chain transgenic mice*. Embo J, 1989. 8(3): p. 719-27]以及未发表的资料)。随后将包括(从 5'到 3'): H-2K 启动子、插入的 cDNA、poly-A 和剪接位点以及 Ig H 基因增强子元件的完整的表达盒通过限制性内切酶 XhoI 切割从载体上切除, 并进行琼脂糖凝胶纯化, 然后制备成适合微量注射到受精小鼠卵母细胞的足够浓度(溶于 10 mM TrisHCl/0.1 mM EDTA, pH 7, 2  $\mu\text{g/ml}$ )。通过测序编码抗-A $\beta$  Ig H 和 L 基因的完整 cDNAs 来证实 cDNA 的编码潜力(参见图 1)。

表 1. 克隆引物的序列

引物名称	序列	限制性位点 (斜体)	SEQ. ID
G1.11Salfor (5'IgH)	5'-ACGTGTCGACGCCGCCACCATGAAACACCTG-3'	SalI ( <i>GTCGAC</i> )	3
G1.11Bamrev (3'IgH)	5'-ACGTGGATCCTCATTACCCGGAGACAG-3'	BamHI ( <i>GGATCC</i> )	4
K.11Xhonor (5'IgL)	5'-ACGTCTCGAGGCCGCCACCATGGTGTTCAG-3'	XhoI ( <i>CTCGAG</i> )	5
K.11Bglrev (3'IgL)	5'-ACGTAGATCTCTAACACTCTCCCCTGTTG-3'	BglII ( <i>AGATCT</i> )	6

### 抗- $\beta$ IgG1 转基因小鼠的产生

用前面部分描述的纯化的编码 Ig H 和 L 基因的 XhoI 片段的 1:1 混合物显微注射来自 C57BL/6 雌性供体的受精卵母细胞以获得双转基因动物。通过用特异性引物扩增从尾部活组织检查制备的基因组 DNA, 来筛选这些由显微注射的卵母细胞产生的幼畜中转基因的存在。所使用的引物显示于表 2。

表 2. 用于检测转基因的引物序列

PCR 测定	引物	PCR 片段	SEQ. ID.
Ig H 基因	5H2KP 5'-ATGAATTCACAGTTTCACTTCTGCACC-3'	660 bp	7
	G1.0501 5'-TGTACTCCTTGCCATTCAGC-3'		8
Ig L 基因	5H2KP 5'-ATGAATTCACAGTTTCACTTCTGCACC-3	660bp	9
	K.44 5'-GCTCATCAGATGGCGGGAAG-3		10

使用 1 $\mu$ l (大约 100 ng) 得自尾部活组织检查的总 DNA 进行 PCR 反应, PCR 反应条件如下: 90 $^{\circ}$ C 1 分钟, 30x [94 $^{\circ}$ C 10 秒, 64 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒], 72 $^{\circ}$ C 7 分钟。最后用 1.5% 琼脂糖凝胶观察到了分别对应于转基因 Ig H 和 L 基因的大约 660bp 的 PCR 扩增的 DNA 片段。

总计产生了 5 只携带 Ig H 和 L 基因的转基因小鼠和一只仅携带 IgH 基因的转基因小鼠, 并对它们进行繁育。

## 实施例 2: 转基因小鼠的表型特征

### 血清分析

通过尾部静脉穿刺获得血液。并于室温过夜进行凝固。以 500xg 离心 10 分钟分离血清并于 -20 $^{\circ}$ C 冻存待进一步分析。

为确定转基因小鼠是否表达完整的人抗体, 开发了 ELISA 系统。使用多克隆山羊-抗-人  $\kappa$  链特异性抗体 (Sigma K 3502) 来捕获人抗体。用偶联于过氧化物酶 (POD, Sigma A 0170) 的单克隆小鼠-抗-人  $\gamma$  链特异性抗体进行检测。如图 5 所示, 转基因小鼠表达完整的人免疫球蛋白。

用 FACS 检测淋巴细胞亚群。通过尾部静脉穿刺获得血液并将其收集于肝素包被的管 (Sarstedt) 内。像厂商描述的那样在裂解缓冲液 (缓冲液 EL, Cat. No. 70217, Qiagen) 中裂解红细胞。将细胞重悬于 FACS-缓冲液 (PBS, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 3% FCS) 中, 根据厂商的建议 (Becton-Dickinson) 进行抗体染色。如图 4 所示, 野生型和转基因小鼠都含有相当比率的 B 细胞 (B220+), T-细胞 (CD5+), CD4+ T 辅助细胞和 CD8+ 细胞毒性 T 细胞。因此, 转基因人 IgG1 的表达不影响淋巴细胞亚群。

为评估免疫能力, 用模型抗原 KLH (匙孔血蓝蛋白, Sigma, H-7017, Lot 121K4838) 免疫 5 只转基因和野生型同窝对照小鼠的组。通过 ELISA 测定抗-KLH 的滴度, 使用包被在 maxisorp 板 (Nunc) 上的 KLH 来捕获, 并使用抗-小鼠 IgG1 (BD Pharmigen) 来检测。野生型和转基因小鼠对 KLH 产生了相当的免疫反应 (图 5)。因此 hIgG1 转基因小鼠具有免疫能力。

通过用人 IgG1 抗体 HUMIRA (Abbott) 免疫来评估针对密切相关抗原

的应答。将 10  $\mu\text{g}$  HUMIRA 乳化于 200  $\mu\text{l}$  Rehydragel HPA (Reheis) 中。在第 0 天腹腔内 (i.p.) 免疫动物, 在第 7、12、21 和 35 天通过尾部静脉穿刺抽血, 制备血清, 并通过 ELISA 测定抗-HUMIRA 滴度, 通过用 HUMIRA 包被 maxisorp 板(Nunc)来捕获, 并通过抗-小鼠 IgG (BD Pharmigen) 来检测抗-HUMIRA 抗体。如图 6 所示, 转基因小鼠产生了针对密切相关的人 IgG1 抗体 HUMIRA 的应答。

### 实施例 3: Mab11 (也称之为抗-A $\beta$ -IgG1) 的产生、纯化和表征 细胞培养

中国仓鼠卵巢细胞(Hoffmann-La Roche, 瑞士)经改造适合在自制的 DHI 培养基制剂(Invitrogen)内进行无血清培养, 该培养基制剂是 DMEM、Ham's F12 和 IMDM 分别以 1:1:2 (v:v:v)比例的混合物(Schlaeger & Schumpp 1992), 并含有 0.2% 大豆 HyPep 1510 和 0.2% 稻 HyPep 4601 的植物水解产物(Kerry Bioscience)。使用大约 70% 推荐的工作体积以 80-100 rpm 将这些细胞常规培养于旋转烧瓶(Bellco, Inotech AG, Dotlikon, Switzerland)内。大规模的培养和转染也可在 6L 旋转烧瓶或 5 到 14 升搅拌釜生物反应器内进行(Chemap, MBR, Zürich, and Infors, Bottmingen, 瑞士)。使用商业可获得的试剂盒(Nucleobond Ax, Macherey-Nagel AG, 瑞士)进行 pMab-11 的质粒制备。以 pUC18 DNA (Pharmacia Biotech, Zürich, 瑞士)为标准, 通过分光光度法测定并通过琼脂糖凝胶电泳估计质粒的浓度。

### 转染操作

为进行转染试验, 将生长于 DHI 培养基内的悬浮 CHO 细胞以  $1 \times 10^6/\text{ml}$  的密度接种于最终容器中, 并培养至密度为  $2-3 \times 10^6$  个细胞/ml (1-2 天)。然后用新鲜的 DHI 培养基将细胞浓度再调整至  $1-1.5 \times 10^6$  个细胞/ml, 并在进行转染之前让培养物生长 3-4h。在加入转染复合体后, 将细胞在转染后于  $37^\circ\text{C}$  培养 24 小时。从 24 小时开始, 将剩余培养物的温度转变为  $33^\circ\text{C}$ , 并

培养 5-6 天。每 24 小时常规收获上清液样品，并通过蛋白 A 亲和层析法 (Amersham, Aekta FPLC 系统) 来测定单克隆抗体(mAb)的含量。通过过滤收集上清液，并将其直接上样到装有蛋白 A 树脂的第一个纯化柱(mAb Select, Amersham, GE)上。

### 转染复合体的制备

DNA 复合体在室温以 1/10 培养体积形成于不含肝素的 HL 培养基内 (Schlaeger & Schumpp 1990, Schlaeger 1996)。在优化的用于 CHO 细胞的基因递送条件下，将 0.7  $\mu\text{g}$  DNA/ml 细胞加入 0.1 ml 新鲜培养基中并轻轻混合。两分钟后，加入 1  $\mu\text{l}$  Ro1539 Xtreme Gene (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) 并混合。室温孵育 15 分钟后，将转染复合体转至等量的细胞，也就是在生物反应器或旋转烧瓶中的细胞。

### 从发酵上清液分离和纯化 Mab11

所有步骤都是在无内毒素的条件下通过只使用回火的玻璃仪器进行，所有设备包括柱子的卫生处理都是用 0.5M NaOH 进行，并且所有缓冲液都过滤除菌(0.22 $\mu\text{m}$ )。只使用新鲜的凝胶材料。

### 第一步：蛋白 A 亲和层析

先用 3 倍凝胶体积(GV)的平衡缓冲液(25 mM Tris/HCl; 25 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 7.1)来洗涤 BioRad econo 柱(BioRad)内的 Mab Select 凝胶 (Amersham)，然后用 2GV 再生缓冲液(2M Guanidin, 100 mM Tris pH 7.5)接着用 5 GV 平衡缓冲液洗涤。预运行后，将最多 20 mg Mab/ml 上样凝胶。先用 3GV 平衡缓冲液洗涤柱子，然后用 4 GV 洗涤缓冲液(1 M Tris/HCl pH 7.2)和 3GV 平衡缓冲液洗涤。用 100 mM HAc pH 2.9 洗脱蛋白 A 结合的抗体。为灭活病毒，用 HAc 将洗脱液调节至 pH  $\leq$  3.6，然后室温孵育 15 分钟。然后用 1M Tris 于室温调节至 pH 4.0。

### **第二步: 离子交换层析(阳离子交换层析)**

先用 2GV 再生缓冲液(0.5 M NaOH, 1M NaCl)和 3GV 再生缓冲液缓冲液 A (50 mM HAc, pH 5.0) 洗涤 BioRad econo 柱 (BioRad) 内的 SP-Toyopearl 650M (Tosoh)。预运行后, 将最多 10 mg Mab/ml 上样凝胶。先用 0.5GV 缓冲液 A 洗涤柱, 然后用 0-100% 的缓冲液 B (50mM HAc, 1M NaCl pH 5.0) 进行梯度洗脱。收集洗脱的蛋白质级分并通过 IEX 和 SEC HPLC 分析。

### **第三步: 大小排阻层析(Flow-through 阴离子交换层析)**

通过超滤浓缩第二步的级分, 将其 pH 值调节至 7.5 并上样至 BioRad econo 柱(BioRad)内的 Q-Sepharose FF 凝胶(Biorad)。使用 25mM Tris/HCl, 80 mM 乙酸钠, pH 7.5 作为流动相进行 SEC 层析。根据 UV 信号分级分离流出液, 并将其 pH 调节至 5.5。在 Amicon 搅拌室内使用 10 kDa 膜将缓冲液交换成含有 20 mM 组氨酸/140 mM NaCl, pH 5.5 的 Mab11 空白对照剂并调节浓度。最后将该溶液通过 0.22  $\mu\text{m}$  Millex-GV 无菌过滤器 (Millipore) 过滤, 并等份保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

### **Mab11 的表征**

#### **大小排阻层析**

使用 Jasco PU-980 HPLC 系统, 通过大小排阻层析来分析纯化的 Mab11 样品。将这些样品在 TSK-Gel G3000SWXL, 7.8 x 300 mm, 5 $\mu\text{m}$  柱 (Tosho Biosciences) 上层析, 以 0.2M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.25M KCl, pH 7.0 作为流动相。流速设为 0.5 ml/分钟。使用连到 Merck-Hitachi D-2500 记录系统的 Jasco UV-975 检测器来监测 220 nm 处的吸收。

平衡柱子直到获得稳定的基线。序列注入相应的凝胶过滤标准(BioRad, 151-1901, 包括 670 kD 牛甲状腺球蛋白、158 kD 牛 IgG、44 kD OVA、17 kD 马肌红蛋白、1.35 kD 维生素 B12)、Mab11 空白对照剂 (阴性对照: 没有 Mab11 的缓冲液)、Mab11 样品。注入的量对应于约 50  $\mu\text{g}$  样品。代表

性的大小排阻层析图显示于图 7。结果：在保留时间内对称峰对应 155-160 kDa。未检测到团聚体或片段。

### 离子交换层析

使用 Jasco PU-980 HPLC 系统，通过离子交换层析来分析纯化的 Mab11 样品。20 分钟内通过使用 0% B 到 52% B 的梯度将样品在 Mono S 5/50 GL 柱(Amersham Biosciences)上层析(流动相 A: 50mM 溶于水的丙二酸/丙二酸盐, pH5.3; 流动相 B: 溶于流动相 A 的 1 M 乙酸钠, pH 5.3)。流速设为 1 ml/分钟。使用连接到 Merck-Hitachi D-2500 记录系统的 Jasco UV-975 检测器来监测在 280 nm 处的吸收。

用流动相 A 平衡柱子直到获得稳定的基线。序列注入相应的 Mab11 空白对照剂和 Mab11 样品。Mab11 的注入量对应于约 50  $\mu$ g。代表性的离子交换层析图(IEC)显示于图 8。结果：在较高的保留时间内，95% 的 Mab11 样品洗脱成单一峰，其具有不可分辨的肩峰。大约 5% 洗脱具有较短的保留时间。

### 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

使用 Xcell Mini-Cell II Gelsystem (Invitrogen)，通过 SDS-PAGE 来分析纯化的 Mab11 样品。将事先稀释的样品与还原或非还原样品缓冲液混合至浓度为 2-8  $\mu$ g/20  $\mu$ L。根据厂商的指导将 NuPAGE LDS 样品缓冲液 (Invitrogen) 与 NuPAGE 还原剂 (Invitrogen) 混合制备还原样品缓冲液。将还原样品缓冲液中的样品于 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。将样品和标准上样于 NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝胶，10 孔梳，1.0 mm 厚 (Invitrogen, #NP0301BOX)。使用覆盖 200-2.5kDa 的 Mark12<sup>TM</sup> 分子量标准 (Invitrogen, #LC5677) 作为标准物。使用 NuPAGE MOPS SDS 跑样缓冲液 (Invitrogen) 在 200V 进行凝胶跑样。用 StainEase 凝胶染色托盘 (Invitrogen) 对凝胶染色过夜，并通过光密度法进行扫描和分析。参考从在同一凝胶上电泳的对照标准获得的标准样品曲线来计算蛋白质浓度。结果：在还原条件下的

SDS-PAGE 显示出对应于 IgG<sub>1</sub> H-链和 L-链的分子量的两条带。未检测到团聚体和片段(参见图 9)。

### 质谱

为进行质谱分析,根据实施例 5 中描述的方法制备还原的/羧甲基化的抗体。通过使用 Agilent 1100 Capillary-HPLC 系统,对样品进行分析性 RP-HPLC 分析。应用梯度系统(A: 水 0.1 % 甲酸, B: 乙腈 0.1 % 甲酸)将样品在 Agilent Poroshell C8-反相柱 (0.5 x 75 mm) 上层析。流速设为 15  $\mu$ l/分钟,柱温设为 70 $^{\circ}$ C。随后将层析流应用于质谱仪的 ESI 离子源。在 ESI-Q-TOF 质谱仪 (Micromass/Waters Q-TOF Ultima, Manchester, UK) 上以阳性模式和 lockspray 质量校正进行测量。用 Masslynx MaxEnt1 模块对蛋白质光谱去卷积。

RA-Mab11 的 LC/MS 分析显示于图 10,观察到的和计算的质量在表 3 中予以分配。

表 3. RA-Mab11 的 LC/MS 分析结果,观察到的质量分配(参见图 10)。

L-链=轻链, H-链=重链

观察到的质量[M+H] <sup>+</sup>	分配 (理论质量[M+H] <sup>+</sup> )
23845 Da	Mab11; L-链, 还原的 & 羧甲基化的(23844 Da)
51770 Da	Mab11; H-链-G <sub>0</sub> , Pyro-Glu, - Lys, 还原的 & 羧甲基化的(51770 Da)
51932 Da	Mab11; H-链-G <sub>1</sub> , Pyro-Glu, - Lys, 还原的 & 羧甲基化的(51932 Da)
52094 Da	Mab11; H-链-G <sub>2</sub> , Pyro-Glu, - Lys, 还原的 & 羧甲基化的(52094 Da)

结果:检测的质量与具有 Mab11 一级序列的抗体的理论上预期的还原的&羧甲基化的 H-和 L-链相匹配,其中 H-链内带有一个 pyro-Glu 以及一个 Lys 缺失。该 H-链主要是 G<sub>0</sub> 和 G<sub>1</sub> 糖基化的, G<sub>2</sub> 只是很小程度地糖基化。

#### 实施例 4: 耐受性的免疫评估

用乳化于 200  $\mu$ l Rehydragel-HPA (Reheis)的 10  $\mu$ g 重组 Mab-11 通过腹膜内(i.p.)途径免疫 5 只转基因和野生型同窝对照小鼠的组。在第 7、12、21 和 35 天,通过尾部静脉穿刺获得血液。通过凝结制备血清,用 ELISA 方法,通过将 Mab-11 包被于 maxisorp 板(Nunc)上,并通过抗-小鼠 IgG (BD Pharmingen)检测抗 Mab-11 抗体来测定血清抗-Mab-11 滴度。ELISA 分析揭示了在野生型动物体内产生了针对 Mab-11 的强烈的免疫应答,而 hIgG1-转基因动物不能产生对 rhIgG1 的免疫应答(图 11)。因此, hIgG1 转基因小鼠对外源供应的相同同种型和特异性的抗体,例如,对它们的转基因产物是耐受的。

#### 实施例 5: 药物物质变体的产生

作为结构变体,选择还原的/烷基化的 Mab11,这是因为这些衍生物是充分确定的而且适于全面的物理化学表征。通过链间二硫键的还原切割,将抗体切割成重链和轻链。自由巯基随后用碘乙酸烷基化从而阻止通过再氧化的聚合作用。

#### 还原的/烷基化 Mab11 的产生和表征

为制备完全还原和羧甲基化的 Mab11,将二硫苏糖醇(DTT)溶于去离子水至 0.1g/ml,并加到溶于 6M 盐酸胍 0.3M Tris/HCl pH 8.5 中的 1 mg/ml Mab11 至终浓度 20 mM。于 50°C +/- 3°C 孵育 60 分钟后,加入刚溶解于去离子水的碘乙酸(IAA) 0.33 g/ml 至终浓度 50 mM。在黑暗中于室温进行烷基化 30 分钟。通过加入相对于 IAA 1.5 倍摩尔过量 DTT 来钝化碘乙酸

并将其于室温孵育 10 分钟。

根据厂商的教导,使用 PD-10 脱盐柱(Aemrsham)纯化还原的/烷基化的抗体(RA-Mab-11),以 20 mM Tris/HCl 缓冲液 pH 8.5 为流动相,最大样品负荷为每柱 1.5 ml。使用 PD-10 或 NAP-5 脱盐柱(Amersham),以 PBS pH 7.4 或 Mab11 空白对照剂为流动相,再次纯化含蛋白质的流出液。收集含蛋白质的级分,并将其在层流下无菌过滤,将其等分子于无菌聚丙烯管内并贮存于-80°C。产物对照和还原的/羧甲基化的抗体的蛋白质浓度的测定如实施例 3 中所概述的那样通过毛细管 LC-QTOF-MS 和 SDS-PAGE 进行。

RA-Mab11 的表征,结果:在还原条件下的 SDS-PAGE 显示出对应于 IgG<sub>1</sub> H-和 L-链分子量的两条带。未检测到团聚体或片段(参见图 9)。质谱分析的结果参见实施例 3(表 3 和图 10)。

实施例 6:评价 Mab-11 转基因小鼠和非转基因同窝小鼠体内 Mab-11 的还原的/烷基化的(RA-)变体的免疫原性

为确定与天然蛋白质相比构象的变化是否对体内转基因小鼠模型中致敏发挥关键作用,我们使用通过完全或部分还原和烷基化二硫键制备的 Mab-11 的衍生物来免疫转基因小鼠及非转基因同窝小鼠。通过 ELISA 评价对天然蛋白质及其结构变体的体液免疫反应的幅度。

在第 0 天,通过腹膜内途径,使用乳化于 200  $\mu$ l Rehydrigel-HPA (Reheis)的 10 $\mu$ g RA-Mab-11 免疫野生型和转基因小鼠组(N = 5)。在第 7、12、21 和 35 天,通过尾部静脉穿刺抽取血液。通过凝固制备血清并贮存于-20°C。

通过 ELISA 检测结合 RA-Mab-11 的抗体。用溶于 PBS 的 RA- Mab-11 在 4°C 过夜包被 96 孔 MaxiSorp™ 板(Nunc)的孔。用含有 0.05% Tween 20 的 PBS (PBST)中的 2% BSA 进行封闭。PBST 用于洗涤,溶于 PBST 的 0.5 % BSA 用作稀释液。洗涤 3 次后,将 100  $\mu$ l 稀释的血清样品加入包被的孔内并于 37°C 孵育 1 小时。使用抗-小鼠 IgG<sub>1</sub> 抗体(BD Pharmigen)来评价抗体水平。在用 ABTS 底物溶液(Roche)显影后,使用自动平板读数器在

450 nm 处检测抗体的结合。

ELISA 分析显示 RA-Mab-11 在 Mab-11 转基因小鼠和非转基因的同窝小鼠中引起了强烈的体液免疫应答(图 12)，而 Mab-11 转基因小鼠对天然的、重组 Mab-11 的处理却是耐受的(图 11)。然而，天然 Mab-11 在野生型同窝小鼠中诱导免疫应答(图 11)。有趣的是，由于当用 RA-Mab-11 免疫时，小鼠产生针对天然 Mab-11 的交叉反应抗体，因此用 RA-Mab-11 免疫破坏了一些动物体内针对自身天然蛋白质的耐受性。在初次免疫后三个月用天然 Mab-11 加强，诱导了以交叉反应性抗-RA-Mab-11 为特征的记忆 B 细胞反应，以及以前在相同的交叉反应小鼠内检测到的抗-Mab-11 滴度(图 13)。这些结果清楚表明 Mab-11 的结构变体在转基因小鼠内诱导了免疫应答，所述转基因小鼠对未改变的天然蛋白质是耐受的。因此 Mab-11 转基因小鼠是检测抗体二级和三级结构变化的合适的系统。

## 序 列 表

<110> 弗.哈夫曼-拉罗切有限公司

<120> 用于免疫可比性的体内模型

<130> 23082

<160> 10

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 1562

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

gcgccaccat gaaacacctg tggttcttcc tctgctggt ggcagctccc agatgggtcc   60
tgtcccaggt ggaattgggt gaaagcggcg gcggcctggt gcaaccgggc ggcagcctgc  120
gtctgagctg cgcggcctcc ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc tgggtgcgcc  180
aagcccctgg gaaggtcta gagggtgga gcggtattaa tgctgctggt tttcgtactt  240
attatgctga ttctgttaag ggtcgtttta ccatttcacg tgataattcg aaaaacaccc  300
tgtatctgca aatgaacagc ctgcgtgcgg aagatacggc cgtgtattat tgcgcgcgtg  360
gtaagggtaa tactcataag cttatggtt atgttcgtta tttgatggt tggggccaag  420
gcaccctggt gacggttagc tcagcctcca ccaaggccc atcggctctc cccctggcac  480
cctctccaa gagcacctct gggggcacag cagccctggg ctgcctggtc aaggactact  540
tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct  600
tcccggctgt cctacagtec tcaggactct actcctcag cagcgtggtg accgtgcctt  660
ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca  720
aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc  780

```

---

cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca	840
ccctcatgat ctcccgacc cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag	900
accctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca	960
agccgcggga ggagcagta aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc	1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag	1080
ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca	1140
ccctgcccc atcccgat gatgtagca agaaccaggc cagcctgacc tgcctggtca	1200
aaggcttcta tcccagcag atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca	1260
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc	1320
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagctcc gtgatgatg	1380
aggtctgca caaccactac acacagaaga gcctctcct gtctccgggt aatgagtgc	1440
cagggccgac aagccccgc tcccaggct ctcggggtcg cgcgagatg cttggcacgt	1500
acccgtgta catacttccc aggcaccag catgaaata aagcaccag cgcttccctg	1560
gg	1562
<210> 2	
<211> 715	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 2	
cgccaccatg gtgtgcaga cccaggtctt catttctctg ttgctctgga tctctggtc	60
ctacgggat atcgtgctga cccagagccc ggcgaccctg agcctgtctc cggcgcaacg	120
tgcgaccctg agctgcagag cgagccagta tgttgatcgt acttatctgg cgtggtacca	180
gcagaaacca ggtcaagcac cgcgtctatt aatttatggc gcgagcagcc gtgcaactgg	240

---

ggtcccggcg cgttttagcg gctctggatc cggcacggat tttaccctga ccattagcag 300  
 cctggaacct gaagactttg cgacttatta ttgccagcag atttattctt ttctcatac 360  
 ctttggccag ggtacgaaag ttgaaattaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat 420  
 cttcccgccca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa 480  
 taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg 540  
 taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag 600  
 caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac 660  
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 715

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: G1.11Salfor, 人抗-A $\beta$  IgG1 的重链的 5' 末端的引物

<400> 3

acgtgtcgac gccgccacca tgaaacacct g 31

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: G1.11Bamrev, 人抗-A $\beta$  IgG1 的重链的 3' 末端的引物

<400> 4

acgtggatcc tcatttaccg ggagacag 28

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: K. 11Xhofor, 人抗-A $\beta$  IgG1 的轻链的 5' 末端的引物

<400> 5

acgtctcgag gccgccacca tgggtgttgca g

31

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: K. 11Bglrev, 人抗-A $\beta$  IgG1 的轻链的 3' 末端的引物

<400> 6

acgtagatct ctaacactct cccctgttg

29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: 5H2KP, 人抗-A $\beta$  IgG1 的重链基因的 PCR 引物

<400> 7

atgaattcac agtttcactt ctgcacc

27

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: G1.0501, 人抗-A $\beta$  IgG1 的重链基因的 PCR 引物

<400> 8

tgtactcctt gccattcagc

20

<210> 9  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: 5H2KP, 人抗-A $\beta$  IgG1 的轻链基因的 PCR 引物

<400> 9

atgaattcac agtttcactt ctgcacc

27

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>

<223> 人工序列的描述: K. 44, 人抗-A $\beta$  IgG1 的轻链基因的 PCR 引物

<400> 10

gctcatcaga tggcgggaag

20

```

SalI
  \      G1.11Salfor      \
1  GCGCCACCAT GAAACACCTG TGGTTCTTCC TCCTGCTGGT GGCAGCTCCC 前导序列
51 AGATGGGTCC TGTCCCAGGT GGAATTGGTG GAAAGCGGCG GCGGCCTGGT VH
101 GCAACCGGGC GGCAGCCTGC GTCTGAGCTG CGCGGCCTCC GGATTTACCT
151 TTAGCAGCTA TCGGATGAGC TGGGTGCGCC AAGCCCCTGG GAAGGGTCTA
201 GAGTGGGTGA GCGGTATTAA TGCTGCTGGT TTTCGTA CTT ATTATGCTGA
251 TTCTGTAAAG GGTCGTTTTA CCATTTACAG TGATAATTCG AAAAACACCC
301 TGTATCTGCA AATGAACAGC CTGCGTGCGG AAGATACGGC CGTGTATTAT
351 TGCGCGCGTG GTAAGGGTAA TACTCATAAG CTTTATGGTT ATGTTCTGTTA
401 TTTTGATGTT TGGGGCCAAG GCACCCTGGT GACGGTTAGC TCAGcctcca
451 ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct
501 gggggcacag cagccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc
551 ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct
601 tccccgctgt cctacagtcc tcaggactct actcctcag cagcgtgggtg
651 accgtgcctt ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa
701 tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt
751 gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg
801 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat
851 ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag
901 accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat
951 gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt
1001 cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca
1051 agtgcaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc
1101 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc
1151 atcccgggat gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcttggtca
1201 aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag
1251 ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc
1301 cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg
1351 ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac
1401 acacagaaga gcctctcctt gtctccgggt aatgagtgc cacggccggc
      \      G1.11Bamrev      \
1451 aagccccgc tcccaggct ctcggggtcg cgcgaggatg cttggcacgt
      BamHI
1501 accccgtgta catacttccc aggcaccag catggaaata aagcaccag
1551 cgcttccctg gg

```

图 1

```

XhoI
      \      K.11XhoIfor      \
1  CGCCACCATG GTGTTGCAGA CCCAGGTCTT CATTCTCTG TTGCTCTGGA

51  TCTCTGGTGC CTACGGGGAT ATCGTGCTGA CCCAGAGCCC GCGACCCCTG

101 AGCCTGTCTC CGGGCGAACG TGCGACCCCTG AGCTGCAGAG CGAGCCAGTA

151 TGTTGATCGT ACTTATCTGG CGTGGTACCA GCAGAAACCA GGTCAAGCAC

201 CGCGTCTATT AATTTATGGC GCGAGCAGCC GTGCAACTGG GGTCCC GGCG

251 CGTTTTAGCG GCTCTGGATC CGGCACGGAT TTTACCCTGA CCATTAGCAG

301 CCTGGAACCT GAAGACTTTG CGACTTATTA TTGCCAGCAG ATTTATTCTT

351 TTCCTCATACTTTGGCCAG GGTACGAAAG TTGAAATTAA ACGTACGGTG

401 GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTTCCC GCCA TCTGATGAGC AGTTGAAATC

451 TGGAAGTACC TCTGTTGTGT GCCTGCTGAA TAACTTCTAT CCCAGAGAGG

501 CCAAAGTACA GTGGAAGGTG GATAACGCCC TCCAATCGGG TAACTCCCAG

551 GAGAGTGTC AAGAGCAGGA CAGCAAGGAC AGCACCTACA GCCTCAGCAG

601 CACCCTGACG CTGAGCAAAG CAGACTACGA GAAACACAAA GTCTACGCCT

651 GCGAAGTCAC CCATCAGGGC CTGAGCTCGC CCGTCACAAA GAGCTTCAAC

701 AGGGGAGAGT GTTAG
      K.11Bglrev      \
                          BglII

```

图 2

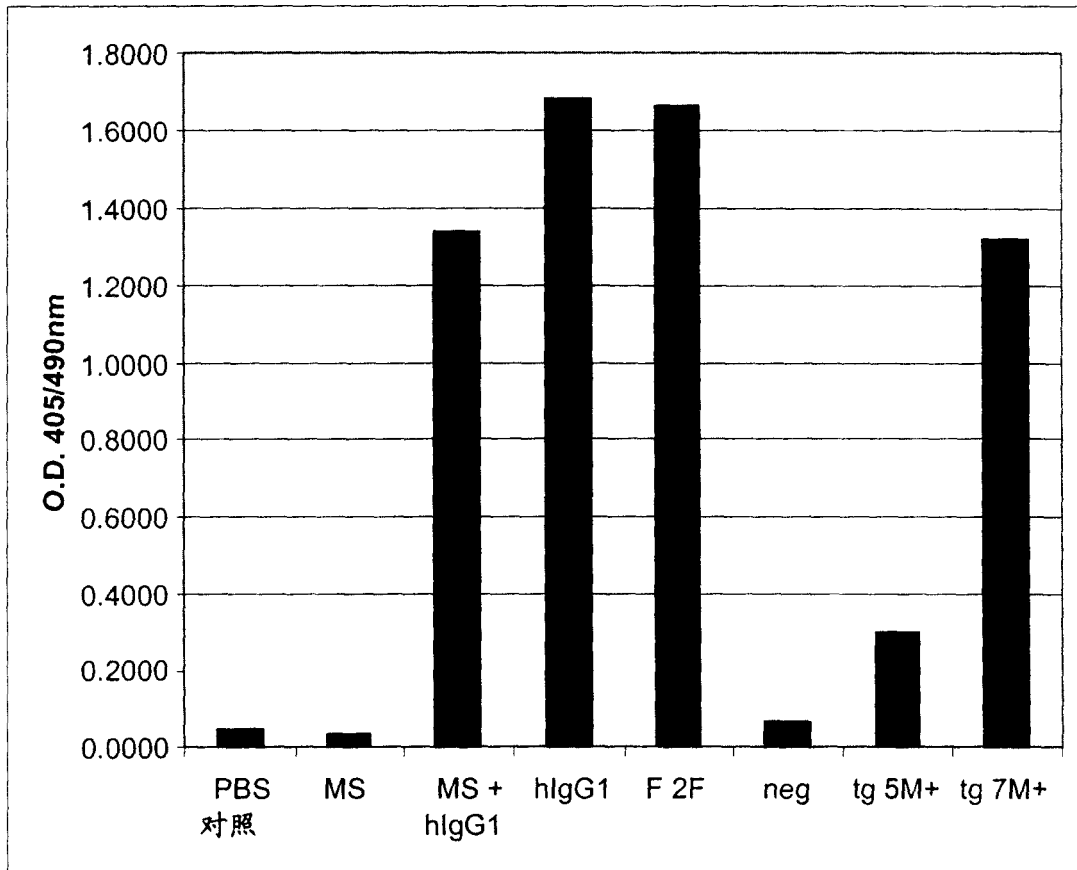


图 3

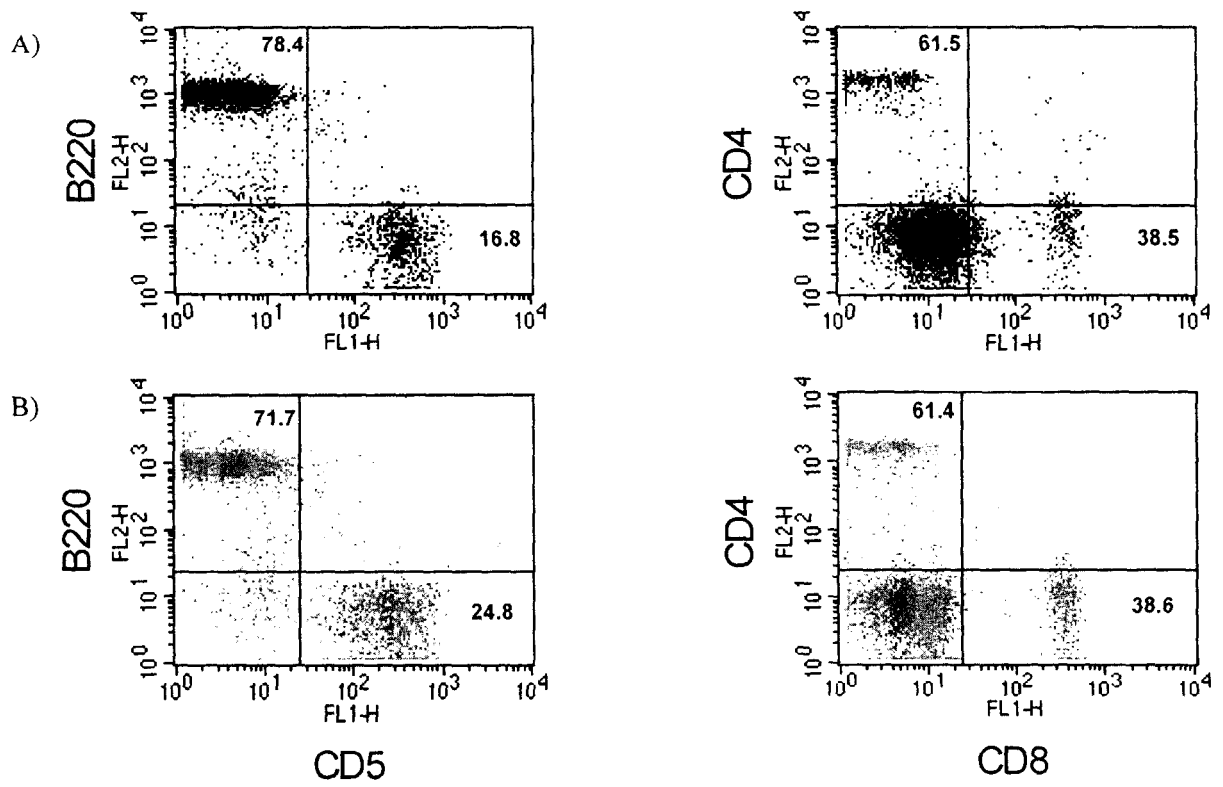


图 4

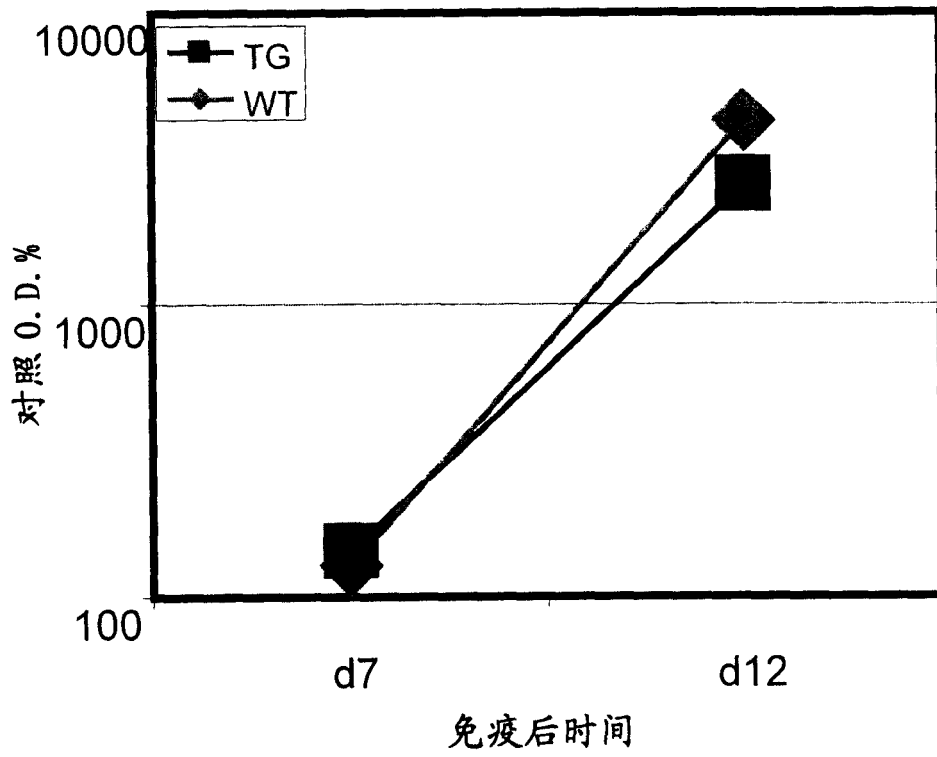


图 5

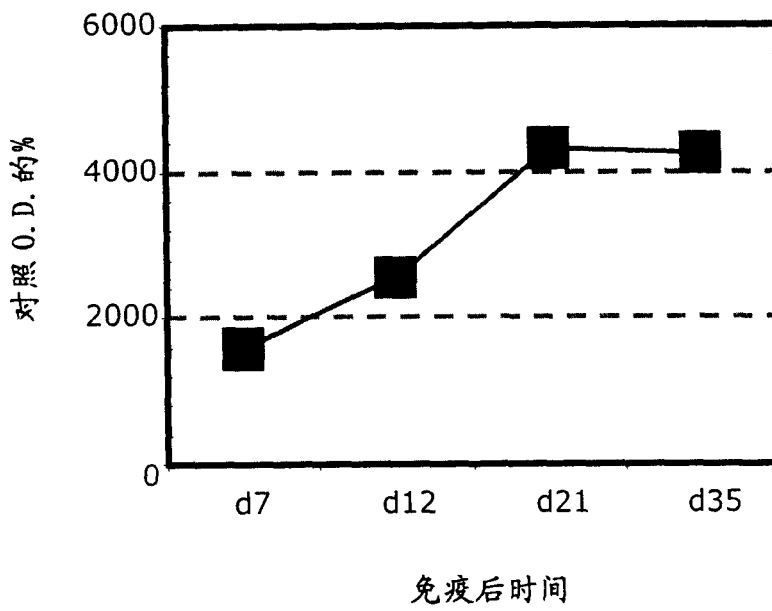
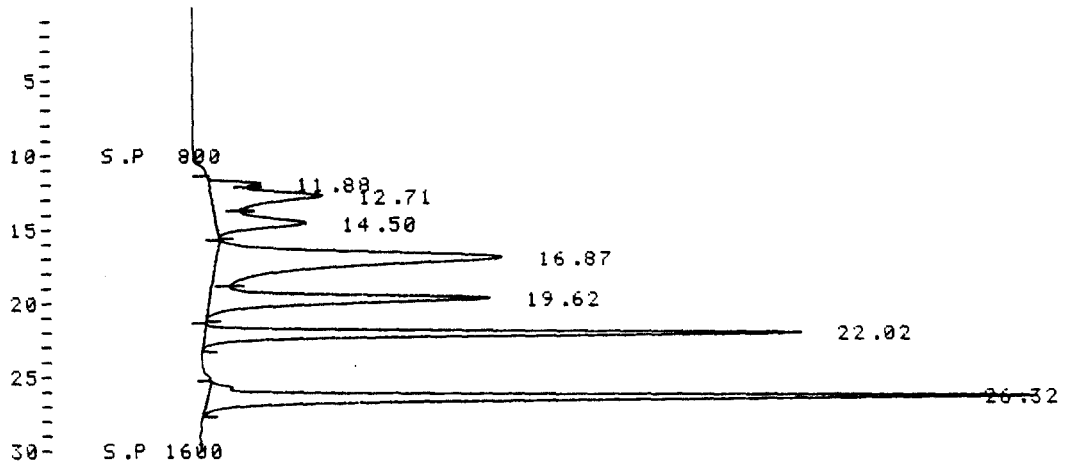
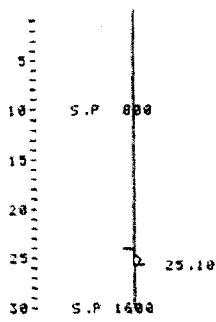


图 6

A)



B)



C)

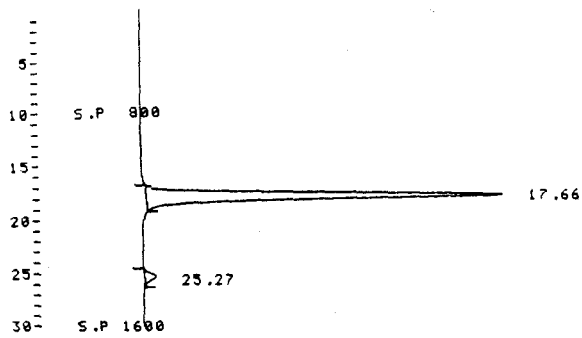


图 7

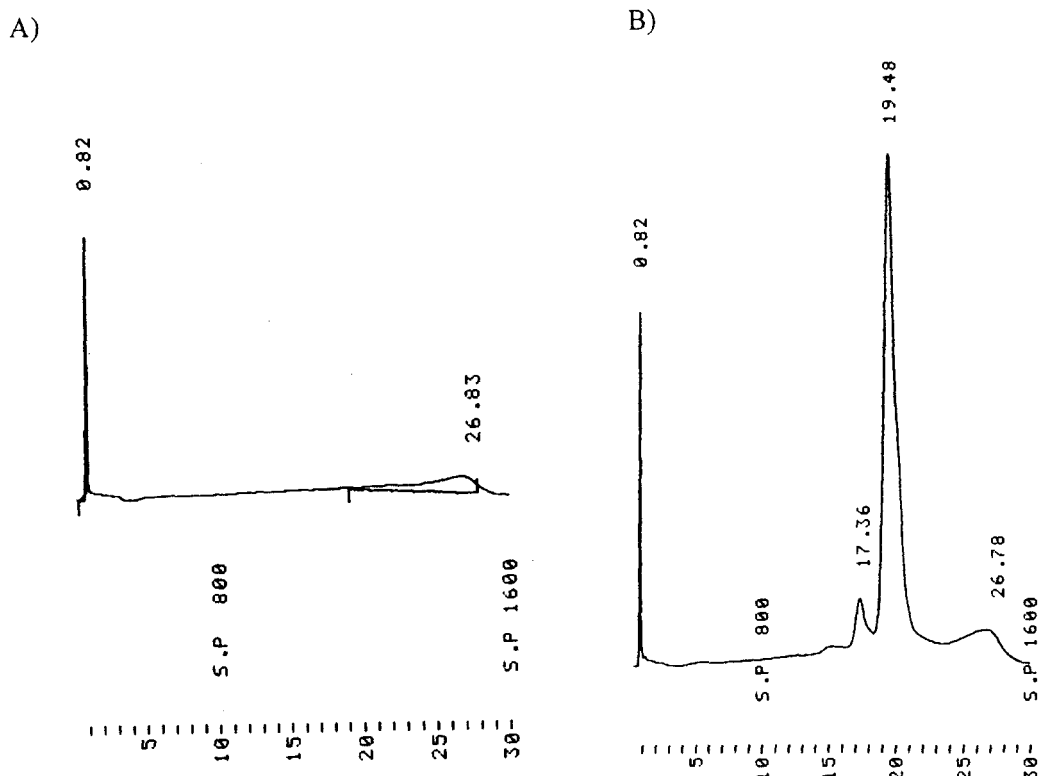


图 8

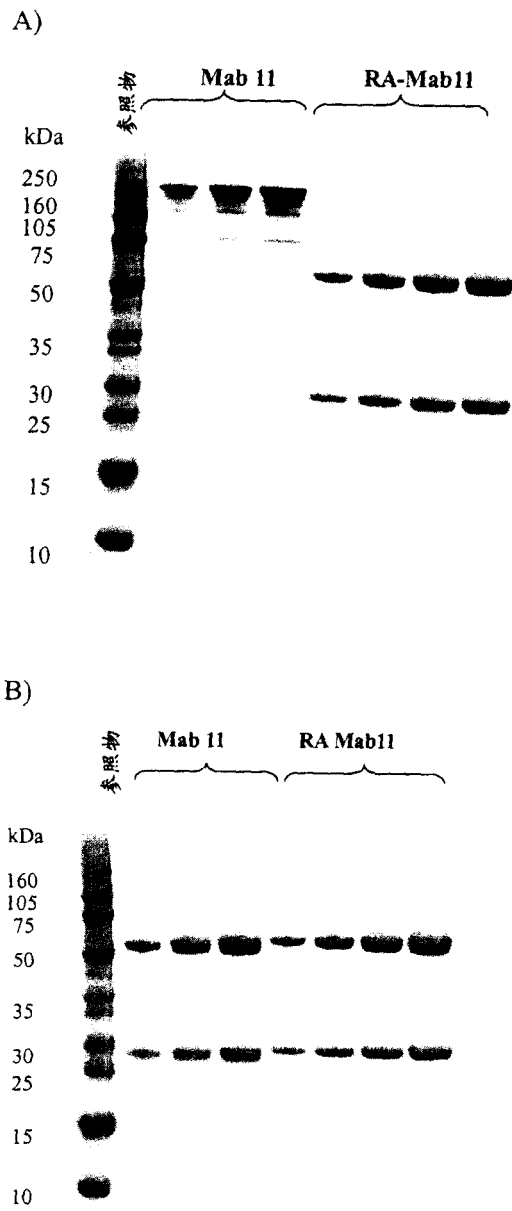
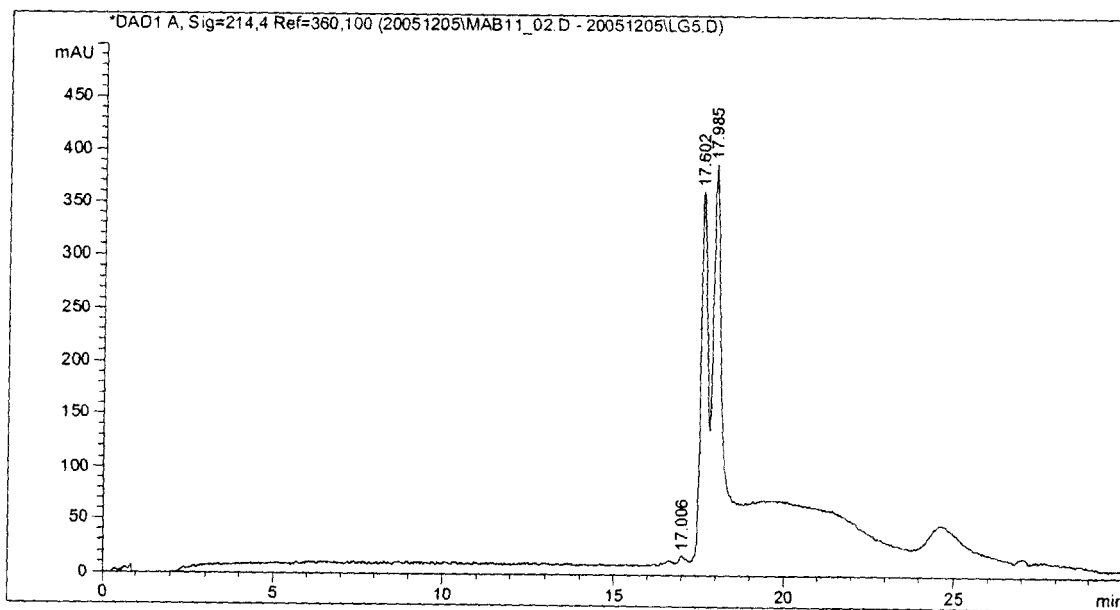
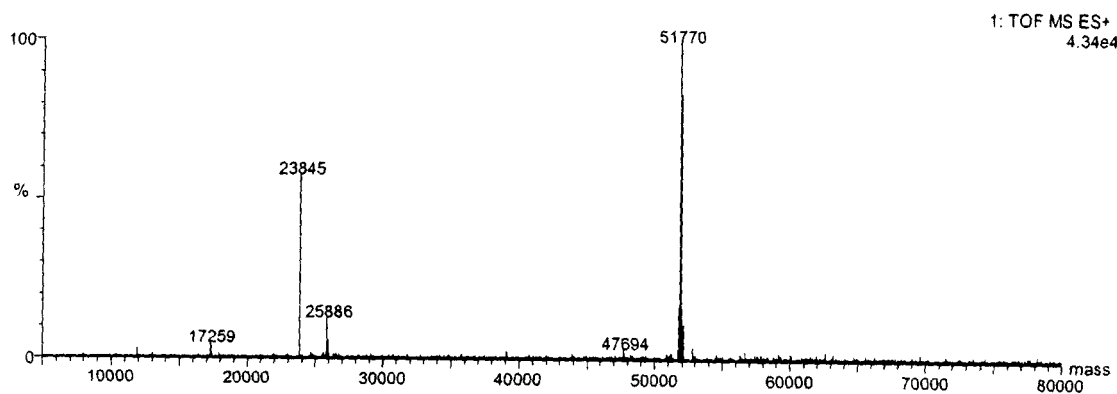


图 9

A)



B)



C)

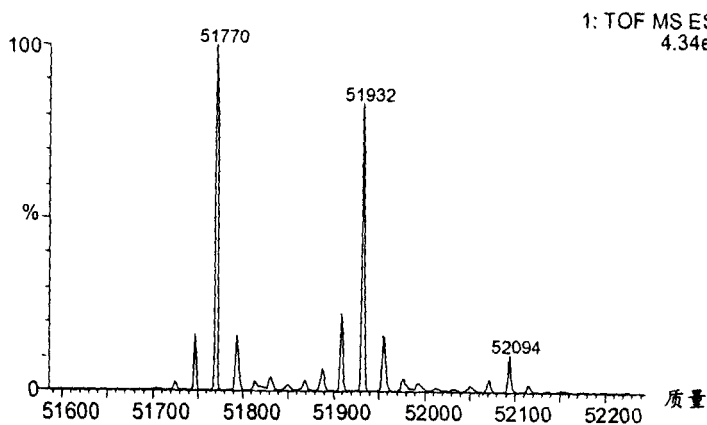


图 10

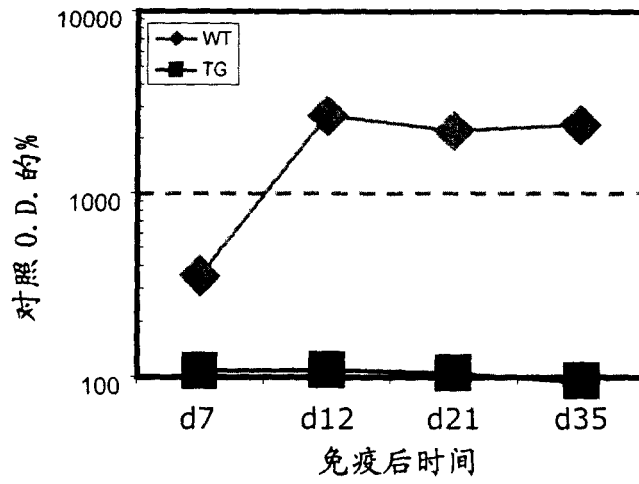


图 11

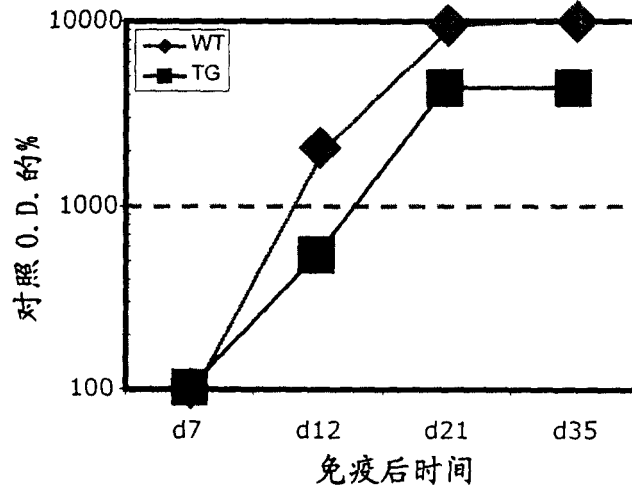


图 12

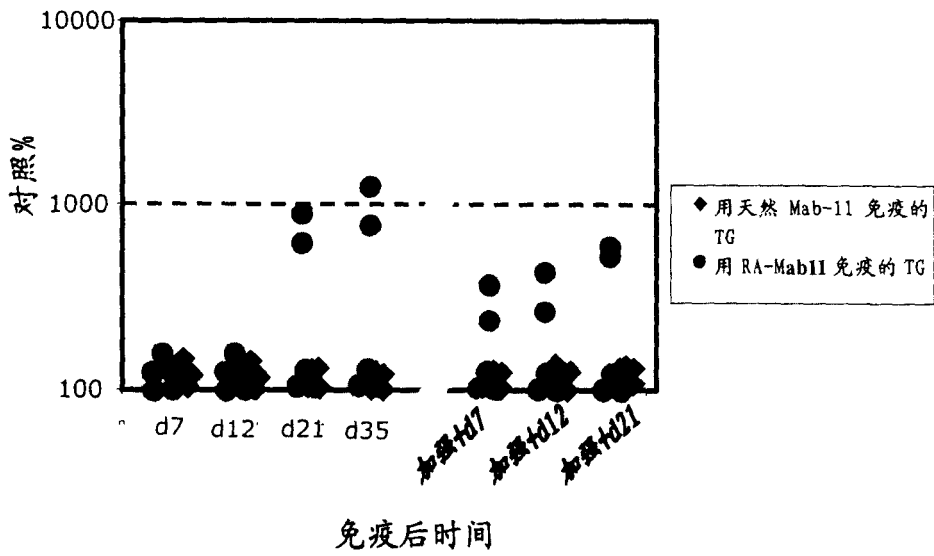


图 13

专利名称(译)	用于免疫可比性的体内模型		
公开(公告)号	<a href="#">CN1891178A</a>	公开(公告)日	2007-01-10
申请号	CN200610094297.8	申请日	2006-06-29
申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
[标]发明人	H贝克 A伊格莱希亚斯 T施莱特米勒 M措赫尔		
发明人	H·贝克 A·伊格莱希亚斯 T·施莱特米勒 M·措赫尔		
IPC分类号	A61D99/00 G01N33/53 A61K49/00		
CPC分类号	G01N33/5088 A01K2217/05 A01K67/0275 A01K2217/072 A01K2267/03		
优先权	2005105946 2005-06-30 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于确定外源抗体变体的相对免疫原性的方法，其包括：a)产生对标准抗体转基因的非人动物，b)将所述转基因非人动物与外源抗体接触，此处所述的外源抗体是a)中所述转基因标准抗体的变体，和c)确定由(b)的外源抗体所引起的转基因非人动物的免疫应答。

```

Sali  \          G1.11salfor  \
1  GCCTCCCAT GAAACACCGT TGGTCTTCC TCTCTCGT GGCAGCTCCC 前导序列
51  AGATGGGTCC TGTCCAGGCT GGAATGCTG GAAAGCCGGC CCGGCTGGT  7H
101 GCACCCGGC GCGAGCTGC GTCTGAGCTG CCGGCTGC GATTTACTT
151 TTAGCAGCTA TCCGATGAGC TGGTCCGCC AAGCCCTGG GAAGGTCTA
201 GAGTGGGTGA CCGTATTAA TCTGTCTGGT TTTCGTACTT ATTATGCTA
251 TTCTGTTAAG GGTCTGTTTA CCATTTACAG TGATAAATTCG AAAAACACCC
301 TGTATCTGCA AATGACACAG CTCGCTGCCG AAGATACGGC CGTGTATTAT
351 TCCTGCGCTG GTAAGGGTAA TACTCATAAG CCTTATGGTT ATGTTCTGTA
401 TTTTGTATGT TGGGGCCAA GACCCCTGGT GACGGTTAAG TCAGCTTCAA
451 CCAAGGGCCC ateggtcttc cccctggcac cctcctccaa gaggcacctct
501 gggggcacag cagccctggg ctgctggctc aaggactact tcccgaacc
551 ggtgacgggt tcgtggaact caggccctct gaccagcggc gtgcacactt
601 tcccggtgt cctacagctc tcaggactct actcctccag cagcgtggtg
651 accgtgctct ccagcagctt gggcaccacg acctacatct gcaacgtgaa
701 tcacaagccc agcaaacaca aggtggacaa gaaagttag cccaatctt
751 gtgacaaaa tcacacatgc ccaacctgcc cagcacctga acctcctggg
801 ggaacctcag tcttctcttt ccccceaaaa cccaaggaca cctctcatgat
851 ctcccggacc cctgaggtca catgctgggt ggtggaactg agccacgaag
901 acctgaggt caagttcaac tggtaagtgag acgggtgga ggtgcataat
951 gccaaagcaa agccgggga ggagcagtac aacagcagt acctgtggt
1001 cagcgtctct accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca
1051 agtgcagggt ctcaaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc
1101 tcacaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctctgcccc
1151 atcccgggat gaggtgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca
1201 aaggtctcta tcccagcagc atcgcctgag agtggggag caatgggcag
1251 ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgtggact ccgacggctc
1301 ctctctctct tacagcagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg
1351 ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctgca caaccactac
1401 acacagaaga gccctctccc gtctccgggt aaatgagtgc caeggcggc
          G1.11Bamrev  \
1451 aagccccgcg tcccaggct ctggggtg cgcgaggatg ctggcacgt
1501 acccctgata catacttccc aggcaccacg cctggaaata aagcaccag
1551 cgcttctctg gg
  
```