

[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 200680052923.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月25日

[11] 公开号 CN 101375160A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.15

[21] 申请号 200680052923.5

[30] 优先权

[32] 2005.12.16 [33] FR [31] 0512815

[86] 国际申请 PCT/FR2006/002767 2006.12.15

[87] 国际公布 WO2007/071839 法 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.15

[71] 申请人 LFB 生物科技公司

地址 法国雷祖里

[72] 发明人 纳塔莉·富涅尔

克里斯托夫·德罗默夫

[74] 专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司

代理人 丛芳 彭晓玲

权利要求书2页 说明书16页 附图4页

[54] 发明名称

由单克隆抗体产生的凋亡增强

[57] 摘要

本发明涉及一种表达在细胞系 YB2/0 的海藻糖含量低于 65% 的抗 - MLA - DR 抗体组合物在体外诱导凋亡中的用途。

1. 由单克隆抗体组合物诱导靶细胞体外凋亡的方法，包括在在其表面表达CD16的细胞存在下，将所述抗体与所述靶细胞接触，所述抗体直接针对所述靶细胞，且所述抗体组合物具有低于65%的海藻糖含量。
2. 根据权利要求1的方法，其特征在于所述海藻糖含量低于30%。
3. 根据权利要求1或2任意一项的方法，其特征在于所述海藻糖含量介于20%和45%之间，或介于25%和40%之间。
4. 根据前述权利要求中任意一项的方法，其特征在于所述抗体组合物由YB2/0细胞系产生。
5. YB2/0细胞系用于生产具有强凋亡能力的抗体的用途。
6. 选择具有强凋亡能力的抗体组合物的方法，其包括以下步骤：
 - i) 在在其表面表达CD16的细胞存在下，将待评估抗体与所述抗体的抗原（或者表达该抗原的细胞）接触；
 - ii) 测定诱导的凋亡；
 - iii) 选择与阴性对照相比（缺乏CD16），在表达CD16的细胞存在下，显示所诱导的凋亡高出至少20%，甚至高出50%或更多的抗体组合物。
7. 根据权利要求6的方法，其特征在于所选择的抗体是抗-因子VIII抑制剂的抗-独特型抗体、直接针对自体抗体的抗体和直接针对表达于被感染细胞表面的病毒和/或细菌蛋白质。
8. 单克隆抗体用于制备药物的用途，该组合物具有低于65%的海藻糖含量，或者根据权利要求6或7任一的方法获得，所述药物不具有免疫效应器细胞的细胞毒性功能，意欲治疗定量或定性NK-细胞缺陷（无ADCC）。

9. 根据权利要求8的用途, 其中所述单克隆抗体组合物的海藻糖含量低于30%。

10. 根据权利要求8的用途, 其中所述单克隆抗体组合物的海藻糖含量介于20%和45%之间, 或介于25%和40%之间。

11. 根据权利要求8的用途, 其中所述单克隆抗体组合物由YB2/0细胞系产生。

12. 根据权利要求8至11任一项的用途, 其用于制备意欲治疗B-CLL的药物。

13. 根据权利要求8至11任一项所述用途, 该用途用于制备意欲治疗红斑狼疮、扩张性心肌病、嗜血细胞性组织细胞增生症以及HIV和血友病A或B的药物。

由单克隆抗体产生的凋亡增强

技术领域

本发明涉及海藻糖含量低于 65% 的抗体组合物用于体外凋亡诱导的用途。

背景技术

抗体不仅越来越多地应用于研究中，它们也形成了用于诊断和治疗方法的理想工具，其中它们为常规的治疗提供了另一种选择。

许多具有治疗用途的血浆或单克隆来源抗体目前已经上市或者正处于临床开发。它们的特性被用来获得能够特异性结合其靶物和能够有效招募免疫效应细胞并由此通过这些细胞的细胞毒性功能导致靶细胞被破坏的治疗工具。

然而，在一些比如慢性淋巴细胞白血病（CLL）这样的病理学中，观察到患者具有有缺陷的免疫效应细胞（尤其是NK细胞）活性，这可能是导致这些患者中次级病理学发生率提高的原因（Ziegler等人，1981）。而且，当用抗-CD20单克隆抗体Rituxan治疗这些患者的CLL时，该治疗似乎功效很小，这可能部分归因于其NK细胞的低ADCC活性（Farag 2003）。

在红斑狼疮患者患者（Green 2005）、扩张性心肌病患者（Anderson 1982）、嗜血细胞性组织细胞增生症（穿孔素缺陷——Clementi R, 2005）和HIV-感染患者（穿孔素和酶缺陷——Portales, 2003）中也发现了NK细胞缺陷。因此由于与前述的相似性，对于CLL患者来说令人害怕的是，采用常规的单克隆抗体治疗将具有极少或没有效果。

因此本申请人尝试提供其活性不依赖于免疫效应细胞细胞毒性功能且由此能够施用于具有减弱的免疫效应细胞活性的患者的工具。

在文献WO 01/77181中，申请人证明了选择可用于产生具有经由FcγRIII受体（CD16）的强ADCC活性的抗体的细胞系的重要性。其中显示，对比如YB2/0这样的大鼠淋巴瘤细胞系中产生的抗体Fc区的改良糖基化会导致ADCC活性提高。所述抗体组合物的聚糖结构赋予抗体组合物低岩藻糖基化。

申请人惊奇的发现所述抗体组合物，除了其强细胞毒性活性外，其表面表达CD16的细胞的存在下诱导细胞凋亡，而CHO中产生的相同抗体则具有低得多的引发凋亡的倾向。

发明内容

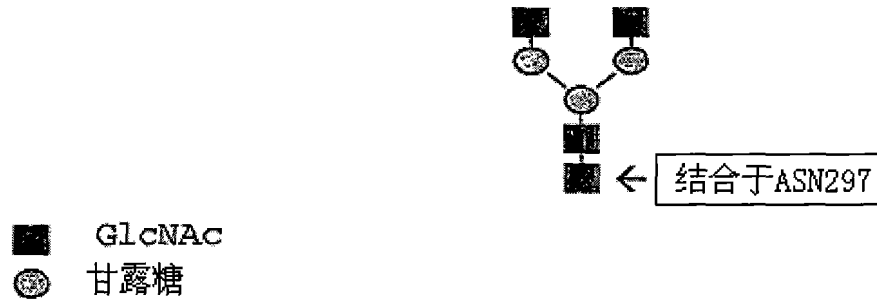
因此本发明涉及其海藻糖含量低于65%的抗体组合物用于体外、离体或体内诱导凋亡的用途。

本发明的第一目的尤其涉及用抗体组合物体外、离体或体内诱导靶细胞凋亡的方法，它包括在表面表达CD16的细胞存在下，将抗体组合物与靶细胞接触，抗体针对靶细胞，并且抗体组合物的海藻糖含量低于65%。

抗体由通过二硫键结合在一起的重链和轻链组成。各链由位于N-末端位置特异于抗体所针对的抗原的可变区（或结构域）以及位于C-末端位置的恒定区组成，所述恒定区由轻链的一个CL结构域和重链的数个结构域（CH₁、CH₂和CH₃）组成。可变区与重链和轻链的CH₁和CL结构域的结合构成抗体的Fab片段，其通过一个能够使各Fab与靶抗原结合的非常灵活的铰链区与Fc区连接。介导抗体的效应器特性的Fc区保持能够与比如FcγR受体（FcγRIII）这样的效应器分子接近。由两个球形结构域CH₂和CH₃

组成的Fc区在CH₂结构域处被糖基化,两条链上都存在有结合于精氨酸297 (Asn 297) 的双触角 (bi-antenna) N-聚糖。

所述N-聚糖为以下通式,其上可添加其它糖类 (显示形式: “G0”):

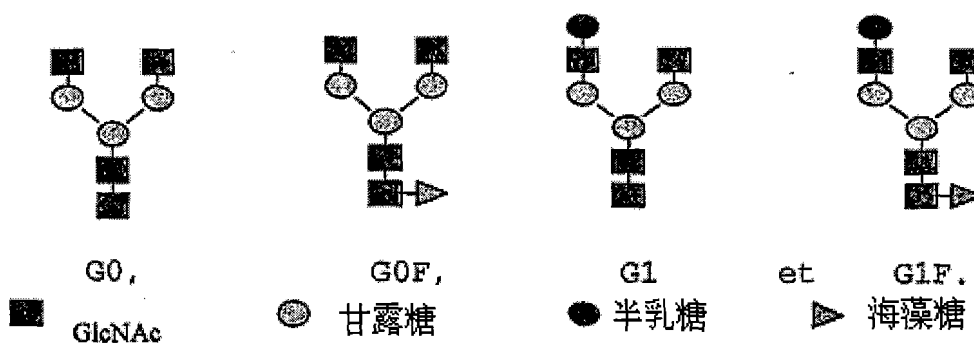


因此,在本发明的抗体组合物中,“海藻糖”意指由这些N-寡糖携带的海藻糖。海藻糖分子,当其存在时,结合于N-寡糖的N-酰基葡萄糖胺 (GlcNAc),该GlcNAc本身结合于Asn 297。

由各抗体的两条重链任一携带的各N-聚糖可能或者可能不携带海藻糖分子。因此根据其N-聚糖是否不携带海藻糖、仅其N-聚糖中的一个携带一个海藻糖分子、或其两个N-聚糖各携带一个海藻糖分子,各抗体可能含有0、1或2个海藻糖分子。

因此,“其海藻糖含量低于65%的抗体组合物”意指这样的抗体组合物,其中在由组合物中的抗体的各糖基化位点所携带的所有聚糖结构中,低于65%含有海藻糖分子。

有利的是,所述聚糖结构更特别地选自下述形式:



因此,有利地,在由本发明组合物中的抗体的各糖基化位点(Asn297)所携带的形式G0、G0F、G1和G1F的聚糖结构中,海藻糖含量低于65%。

所述抗体组合物及其在ADCC(抗体依赖的细胞介导的细胞毒性)诱导方面的有利特性描述于文献WO 01/77181中。

本发明的抗体组合物具有引起强凋亡反应的独特性和优势。凋亡在引起细胞死亡中起重要作用。凋亡诱导涉及许多因素,但是它们都达到一条经由线粒体、蛋白质Bcl-2及其级联反应的共同途径。

引发细胞程序性死亡的主要机制是胁迫(例如低氧合)、用细胞毒性物质或皮质激素处理、生长因子的去除、DNA损伤和死亡信号(细胞毒性淋巴细胞和天然杀伤细胞、TNF- α 坏死因子的Fas受体)的传递。

细胞死亡信号后,导致凋亡相关蛋白被激活的级联反应被激活。磷脂酰丝氨酸被从细胞膜内表面转定位到外表面。通过Annexin V在细胞表面的固定,可在体外将它们可视化。然后可以看见细胞质、核和染色质浓缩、DNA片段化、质膜起泡以及膜对称性的丧失。在该阶段,细胞体外固定碘化丙啶(DNA嵌入剂)。之后形成被其四周所包围的巨噬细胞消化的凋亡体。

由本发明的抗体组合物所诱导的凋亡的增强,不是缘于免疫效应器细胞的毒性功能,而是由抗体Fc区与表达于免疫效应器细胞表面的CD16受体的强聚集所诱导的。

有利地,基于G0F+G1F形式的含量低于50%,优选低于30%的理解,本发明的抗体组合物具有浓度高于60%,优选高于80%的G0+G1+G0F+G1F形式。

本发明抗体组合物凋亡诱导的体外证明,是用与NK细胞相反的经CD16转染的缺乏细胞溶解活性Jurkat细胞完成的。这形成了一个其中细胞死亡只能由凋亡诱导的模型。

因此，本发明的意欲体外诱导靶细胞凋亡的方法，借助在其表面表达CD16但并非效应器细胞的细胞来实施。这些细胞因此不具有或不再具有针对靶细胞的细胞毒性活性。例如，可以提到CD16 Jurkat细胞。

用本发明的组合物的凋亡的体外增强用任何表达CD16的效应器细胞实现，尤其是表达CD16的外周血细胞，比如单核细胞-巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和特定的T-细胞亚群。因此本发明的组合物可以在定量或定性免疫效应器细胞（细胞毒性细胞）群缺陷（无ADCC）下存在使用。在这种情况下，通过其它在其表面表达CD16的细胞（CD16+细胞），尤其是在其表面表达CD16但不具有或不再具有细胞毒性活性的细胞，该增强是可能的。

在B-细胞CLL（慢性淋巴细胞白血病）患者以及红斑狼疮患者中发现了所述缺陷，在B-细胞CLL患者中观察到了NK细胞活性的下降（Foa 1986, Ziegler 1981）或更确切地说是细胞溶解分子缺陷（Katrinakis 1996），在红斑狼疮患者中描述了NK细胞缺陷（Green 2005）。在所述病理学中可根据本发明使用该抗体组合物。

有利地，本发明的抗体组合物具有低于55%，或甚至低于40%、30%或20%的海藻糖含量。

在一种尤其有利的方式中，抗体组合物的海藻糖含量介于20%和45%之间，或介于25%和40%之间。

在尤其有利的方式中，本发明的抗体组合物还具有低于0.6的海藻糖/半乳糖含量比率。有利地，该比率低于0.5；低于0.4；低于0.2或更有利地低于0.1。为本发明的目的，“海藻糖含量/半乳糖含量比率”意指抗体组合物中的海藻糖含量与抗体组合物中半乳糖含量之间的比率，这两种糖类能够被结合于组合物中抗体上各糖基化位点（Asn 297）的各聚糖结构携带。

有利地，本发明中所使用的抗体组合物产生于YB2/0细胞系，或源自YB2/0并带来相同的蛋白质翻译后修饰，尤其是糖基化，的特性的任何细胞。

根据其产生抗体组合物的能力来选择该系，经过选择后，其中一些抗体组合物显示低糖基化，该特性的实用性由本申请人在本发明中通过能够诱导强调亡的抗体组合物的生产得到证实。

因此本发明的又一个目的是YB2/0细胞系用于生产具有强调亡能力的抗体的用途。

本发明的又一个目的是，选择具有强调亡能力的抗体组合物的方法，包括以下步骤：

- 1) 在其表面表达CD16受体的细胞存在下，将待评估抗体与所述抗体的抗原（和表达该抗原的细胞）接触；
- 2) 测定诱导的凋亡；
- 3) 选择与阴性对照相比，在表达CD16的细胞存在下，显示所诱导的凋亡高出至少20%，甚至高出50%或更多的抗体组合物。

在实施该方法的步骤1)时，该阴性对照可通过例如在不表达CD16的细胞存在下获得。

对于步骤2)，凋亡诱导的测定可通过几种不同的方式进行，利用特定的常规技术来测定凋亡，比如Annexin V的测定（凋亡早期阶段测定暴露于细胞表面的磷脂酰丝氨酸）与碘化丙啶相关的测定（凋亡发展期测定DNA降解）或比如YO Pro-1这样的其它标记物（DNA嵌入剂测定该DNA的片段化）。

为本发明的目的，“强调亡能力”意指在CD16-表达细胞的存在下，诱导与阴性对照相比至少高出20%，甚至高出50%或更多的凋亡的能力。

为实施该方法，在其表面表达CD16的细胞可以是CD16-转染的细胞，尤其是Jurkat细胞，表达CD16的外周血细胞，例如单核细胞-巨噬细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和T-细胞的一些亚群，这个列表不是限制性的。优选地，在其表面表达CD16的细胞是不具有或不再具有任何细胞毒性活性的细胞。

有利地，本发明的方法还包括确定所选择的抗体组合中海藻糖含量的步骤。该确定可在将待评估抗体与抗原接触之前完成，或者对显示所诱导的凋亡大于阴性对照的抗体组合物的选择之后进行。

如果抗体组合中海藻糖含量的确定是在将待评估抗体与抗原接触前完成，则有利的是选择具有低于65%海藻糖含量的抗体组合物。优选地，所选择的抗体组合物具有低于30%或介于20%和45%之间，或介于25%和40%之间的海藻糖含量。

有利地，所选择的抗体是抗-因子VIII抑制剂的抗-独特型抗体、直接针对靶向记忆B淋巴细胞的自体抗体的抗体、和直接针对被感染细胞表面所表达的病毒和/或细菌蛋白的抗体，以诱导去除它们。还有可能选择任何识别优选在肿瘤细胞，包括造血增殖，表面表达的抗原的抗体。

本发明的又一个目的涉及海藻糖含量低于65%，优选低于30%，更优选在20%与45%之间和25%与40%之间的单克隆抗体组合物，或利用上述选择方法所选择出的抗体组合物用于制备药物产品的用途，所述药物产品不涉及免疫效应器细胞的细胞毒性功能，意欲治疗选自尤其是B-CLL（B-细胞慢性淋巴细胞白血病）、红斑狼疮、扩张性心肌病、嗜血细胞性组织细胞增生症以及HIV和血友病A或B的定量或定性NK-细胞缺陷（无ADCC）。

所述抗体组合物比治疗性抗体Rituxan显示高出至少2倍、甚至有利地10倍的与CD16的交互作用。

抗体Fc区与CD16受体间的交互作用可通过与针对抗体Fc部分的结合位点的3G8型抗-CD16单克隆抗体竞争在CD16阳性细胞上的直接或间接结合来测量。

有利地，根据本发明使用的抗体组合物具有大于60%，优选大于80%的G0+G1+G0F+G1F形式，其被理解为形式G0F+G1F的含量低于50%，优选低于30%。

在尤其有利的方式中，根据本发明所使用的抗体组合物还具有低于0.6的海藻糖含量/半乳糖含量比率。有利地，该比率低于0.5；低于0.4；低于0.2或更有利地低于0.1。

有利地，该用途意欲用于制备治疗其中一或多种效应器细胞群体被减少或甚至为零的病理学的药物，所述细胞由此诱导经由ADCC的低细胞毒性活性。

本发明的又一个目的涉及根据本发明的方法所选择出的与CD16有强烈相互作用或满足上述岩藻糖基化特征的抗-CD20单克隆用于生产药物的用途，所述药物不具有免疫效应器细胞的细胞毒性功能，意欲用于治疗B-CLL患者以及可以观察到NK细胞的细胞溶解功能降低的患者。

通常本发明的抗体可用于治疗任何造血细胞增殖。

本发明的有一个目的是所述单克隆抗体组合物用于生产药物的用途，所述药物不具有免疫效应器细胞的细胞毒性功能，意欲用于治疗NK细胞缺陷患者以及不能用仅通过NK表达细胞毒性的抗体治疗的患者。

借助例子，可提及的是红斑狼疮患者（Green 2005）、扩张性心肌病患者（Anderson 1982）、嗜血细胞性组织细胞增生症患者（穿孔素缺陷）（Clementi R, 2005）和HIV-感染患者（穿孔素和粒酶缺陷）（Portales, 2003）。

患有 trisomy-21 (Nurmi 1982) 的那些人以及接受移植的患者 (Alamartine 1997) 也可包括在内, 后者的相关治疗导致NK细胞缺陷和发展中的肿瘤风险提高。在造血病理学中, 除B-CLL患者, 已经在急性髓细胞性白血病患者 (Nasrallah, 1983) 和毛细胞白血病患者 (Trentin 1990) 中描述了与NK细胞相关的细胞毒性缺陷。更常见地, 吸烟人群 (Takeuchi 2001) 与非吸烟者相比显示降低的NK活性。此外, 根据本发明的抗体可尤其有利地用于治疗血友病A和B患者, 可选地靶向记忆B淋巴细胞。

本发明的其它方面和优势描述于以下实施例中, 这些实施例被解释为示例性的且不限本发明的范围。

附图说明

图1: 表1

图2: 表2

图3: 经由CD16的凋亡增强图。

图4:

A: 抗-人IgG抗体对Daudi细胞的增强的凋亡。

B: 抗-人IgG抗体对B细胞的增强的凋亡。在存在或不存在交联剂 (人 Ig 的 F(ab')₂ 抗 -Fc 片段) 的情况下, 存在或由抗 -HLA-DR-EMABling®抗体 (DR YB2/0) 和抗-HLA DR CHO (DR CHO) 抗体在24小时诱导的对纯化自外周血的B细胞的凋亡。

图5:

A: CD16 Jurkat诱导的对Daudi细胞的增强的凋亡。

B: Jurkat CD16诱导的对B细胞的增强凋亡。在转染的Jurkat细胞 (CD16 Jurkat) 或无CD16 (WT Jurkat) 存在下, 由抗-HLA-DR

EMABling®抗体 (DR YB2/0) 和抗-HLA DR CHO抗体 (DR CHO) 在24小时诱导的对纯化自外周血的B细胞的凋亡。

具体实施方式

抗体

用一种抗-HLA-DR抗体设计研究模型。它是一种重组抗体，其中可变结构域是大鼠来源的，而恒定部分是人源的。

在CHO系和YB2/0系(这些在YB2/0中表达的抗体被称作“EMABling®抗体”)中表达相同的序列。

细胞

E6.1 Jurkat细胞克隆来自欧洲细胞培养物保藏中心——ECACC。这些相同的细胞用编码gamma (γ) 链和编码Fc γ RIIIa (L48F158单元型) 的表达载体转染。这些为表达CD16而用DNA分子转染的细胞不能诱导经ADCC机制的细胞毒性。

Daudi细胞来自美国典型培养物保藏中心—ATCC。

NK细胞(自然杀伤细胞)通过在Myltenyi磁珠上的阴性选择纯化自外周血样品。

凋亡的诱导

条件1: Daudi细胞 (2.5×10^5 细胞) 与抗-HLA-DR (1 μ g/ml) 在24孔板 (P24) 中37 $^{\circ}$ C 孵育24小时。

条件2: Daudi细胞 (2.5×10^5 细胞) 与抗-HLA-DR (1 μ g/ml) 在抗-人IgG (20 μ g/ml) 存在下在24孔板 (P24) 中37 $^{\circ}$ C 孵育24小时。

条件3: Daudi细胞 (2.5×10^5 细胞) 与抗-HLA-DR (1 μ g/ml) 在Jurkat细胞 (2.5×10^5 细胞) 存在下在24孔板 (P24) 中37 $^{\circ}$ C 下孵育24小时。

条件4: Daudi细胞 (2.5×10^5 细胞) 与抗-HLA-DR ($1 \mu\text{g/ml}$) 在用CD16转染的Jurkat细胞 (2.5×10^5) 存在下在24孔板 (P24) 中 37°C 下孵育24小时 (图3)。

条件5: Daudi细胞 (2.5×10^5 细胞) 与抗-HLA-DR ($1 \mu\text{g/ml}$) 在NK细胞 (2.5×10^5 细胞) 以及 4mM EGTA/ 2mM MgCl_2 的混合物存在下, 在24孔板 (P24) 中 37°C 下孵育24小时。

用ANNEXIN V/PI技术测定凋亡

然后收集细胞, 洗涤两次后按照生产商 (BD Biosciences) 的说明与Annexin V-FITC和碘化丙啶 (PI) 孵育。借助Beckman Coulter的Expo 32软件, 用流式细胞术分析细胞 (EPICS XL细胞计, Beckman Coulter)。Annexin V的结合对应于凋亡的早期信号, 而PI的结合出现得较晚 (DNA片段化), 所谓的凋亡细胞百分数任意定义为Annexin V阳性细胞总数和二倍Annexin V/PI阳性细胞。

实施例1: 抗-人IgG抗体诱导的凋亡增强 (交联剂)

在无抗体存在下观察到的Daudi细胞凋亡 (自然死亡) 约为10%。该基本数值是从不同试验所得结果推断而来的, 且因此任意设置为0%。

表1 (参见图1) 中, 结果表示为凋亡细胞百分数 (Annexin V和PI阳性)。以 $1 \mu\text{g/ml}$ 浓度单独使用的抗-HLA-DR EMABling®和CHO抗体 (条件1) 对Daudi诱导极少凋亡 (<3%)。另一方面, 在直接针对人免疫球蛋白Fc区的抗体的存在下 (条件2), 其在Daudi细胞表面聚集抗-HLA-DR抗体, 对于两种抗体都以相同的方式使凋亡增强从低于3%至19%。

在图4A中, 结果表示为所观察到的凋亡细胞的百分数, 研究了对各条件任意代表100%的EMABling®抗体。在这些条件下, 统计研究显示, 由CHO表达的抗体和由抗-HLA-DR EMABling®抗体诱导的凋亡的增强之间无显著差异 ($p=0.85$)。

显示凋亡细胞百分数的图4B显示,来自外周血的B细胞的凋亡仅在抗-人IgG抗体存在下获得。在这些条件下,该研究显示,由CHO (DR CHO)表达的抗体和抗-HLA-DR EMABling®抗体 (DR YB2/0)诱导的凋亡增强间无显著差异。

实施例 2: 通过CD16 Jurkat对凋亡的增强

对Daudi细胞(表2,参见图2)的结果表示为凋亡细胞百分数(Annexin V和PI阳性)。在对照Jurkat细胞(未转染的)存在下,以1 μ g/ml浓度使用的抗-HLA-DR EMABling®和CHO抗体分别对Daudi诱导3%和2%的凋亡(条件3)。在CD16 Jurkat细胞存在下(条件4),CD16 Jurkat细胞可经CD16与固定于Daudi细胞表面的抗-HLA-DR抗体的Fc部分相互作用,凋亡被增强。在由CHO和EMABling®细胞产生的抗体存在下,最终的凋亡百分数分别为8%和19%。因此,在EMABling®抗体存在下凋亡的增强约100%高于由CHO产生的抗体诱导的。在图5A中,结果表示为所观察到的凋亡细胞的百分数,各研究条件中EMABling®抗体任意表示100%。在这些条件下,统计研究显示,两种抗体的凋亡增强之间存在显著差异($p < 0.0001$),EMABling®抗体更高。

还研究了用经CD16转染的Jurkat细胞替换抗-人IgG抗体(交联剂)后,源自外周血的B细胞的凋亡。野生型非转染的Jurkat细胞(WT)用作阴性对照。表达为凋亡细胞百分数的结果(图5B)指明,由抗-HLA-DR EMABling® (DR YB2/0)诱导的凋亡与由在CHO (DR CHO)中产生的抗体诱导的相比被显著增强。这一特性可能是由于抗-HLA-DR EMABling® (DR-YB2/0)与抗HL-DR CHO (DR CHO)相比更好地固定于CD16。

EMABling®抗体与CD16的强相互作用不仅转变为ADCC和细胞因子分泌提高(参见文献EP 1537419),而且还转变为凋亡的增强。这为

EMABling® 抗体带来了一个与由CHO产生的相同抗体相比主要的额外的功能优势。

参考文献

- Alamartine E, Sabido O, Dumollard JM, Berthoux F, Lack of evidence for natural cytotoxicity deficiency against human ex vivo tumour cells in allograft recipients, *Nephrol Dial Transplant*. 1997 May; 12(5): 988-94.
- Anderson JL, Carlquist JF, Hammond EH. Deficient natural killer cell activity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 1982; Nov20; 2(8308): 1124-7.
- Clementi R, Locatelli F, Dupre L, Garaventa A, Emmi L, Bregni M, Cefalo G, Moretta A, Danesino C, Comis M, Pession A, Ramenghi U, Maccario R, Arico M, Roncarolo MG. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood*. 2005 Jun 1; 105(11): 4424-8.
- Farag SS, Flinn IW, Modali R, Lehman TA, Young D, Byrd JC. *Blood*. 2004 Feb 15; 103(4): 1472-4. Epub2003. Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukaemia.
- Foa R, Fierro MT, Lusso P, Raspadori D, Ferrando ML, Matera L, Malavasi F, Lauria F. Reduced natural killer T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia identified by three monoclonal antibodies: Leu-11, A10, AB8.28. *Br J Haematol*. 1986 Jan; 62(1):151-4.
- Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES. Homodimers but not monomers of Rituxan(chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin.*Blood*. 2001 Mar 1; 97(5):1392-8.
- Green MR, Kennell AS, Larche MJ, Seifert MH, Isenberg DA, Salaman MR. Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus

- erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. *Clin Exp Immunol.* 2005 Jul; 141(1): 165-73.
- Katrinakis G, Kyriakou D, Papadaki H, Kalokyri I, Markidou F, Eliopoulos GD. Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematol.* 1996; 96(1): 16-23.
 - Liu C, DeNardo G, Tobin E, DeNardo S. Antilymphoma effects of anti-HLA-DR and CD20 monoclonal antibodies(Lym-1 and Rituximab) on human lymphoma cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2004 Oct; 19(5): 545-61.
 - Nasrallah AG, Miale TD. Decreased natural killer cell activity in children with untreated acute leukaemia. Natural killer cell activity was evaluated in children with acute lymphocytic and acute myelogenous leukaemia. *Cancer Res.* 1983 Nov; 43(11): 5580-5.
 - Nurmi T, Huttunen K, Lassila O, Henttonen M, Sakkinen A, Linna SL, Tiilikainen A. Natural killer cell function in trisomy-21(Down's syndrome). *Clin Exp Immunol.* 1982 Mar; 47(3): 735-41.
 - Portales P, Reynes J, Pinet V, Rouzier-Panis R, Baillat V, Clot J, Corbeau P. Interferon-alpha restores HIV-induced alteration of natural killer cell perforin expression in vivo. *AIDS.* 2003 Mar 7; 17(4): 495-504.
 - Takeuchi M, Nagai S, Nakajima A, Shinya M, Tsukano C, Asada H, Yoshikawa K, Yoshimura M, Izumi T. Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages. *Respiration.* 2001; 68(3):262-7.
 - Trentin L, Zambello R, Agostini C, Ambrosetti A, Chisesi T, Raimondi R, Bulian P, Pizzolo G, Semenzato G. Mechanisms accounting for the defective

-
- natural killer activity in patients with hairy cell leukaemia. *Blood*. 1990 Apr 1; 75(7): 1525-30.
- Van der Kolk LE, de Haas M, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, van Oers MH. Analysis of CD20-dependent cellular cytotoxicity by G-CSF-stimulated neutrophils. *Leukaemia*. 2002 Apr; 16(4): 693-9.
 - Ziegler HW, Kay NE, Zarling JM. Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Int J Cancer*. 1981 Mar 15; 27(3): 321-7.

		%凋亡 (n=3)	
		平均值	SD
无交联剂	无Ac	0.5	0.0
	DR YB20 1 μ g/ML	0.5	0.0
	DR CHO 1 μ g/ml	2.1	2.0
含交联剂 (ant IgG)	无Ac	0.5	0.0
	DR YB20 1 μ g/ml	18.8	2.5
	DR CHO 1 μ g/ml	18.7	2.7

图 1

		%凋亡 (n=3)	
		平均值	SD
Jurkat野生型 (WT)	无Ac	0.0	0.0
	DR YB20 1 μ g/ML	3.0	2.6
	DR CHO 1 μ g/ml	2.0	1.8
Jurkat CD16	无Ac	0.0	0.0
	DR YB20 1 μ g/ml	18.6	8.1
	DR CHO 1 μ g/ml	8.2	3.7

图 2



图3

一种抗-人IgG抗体对凋亡的增强

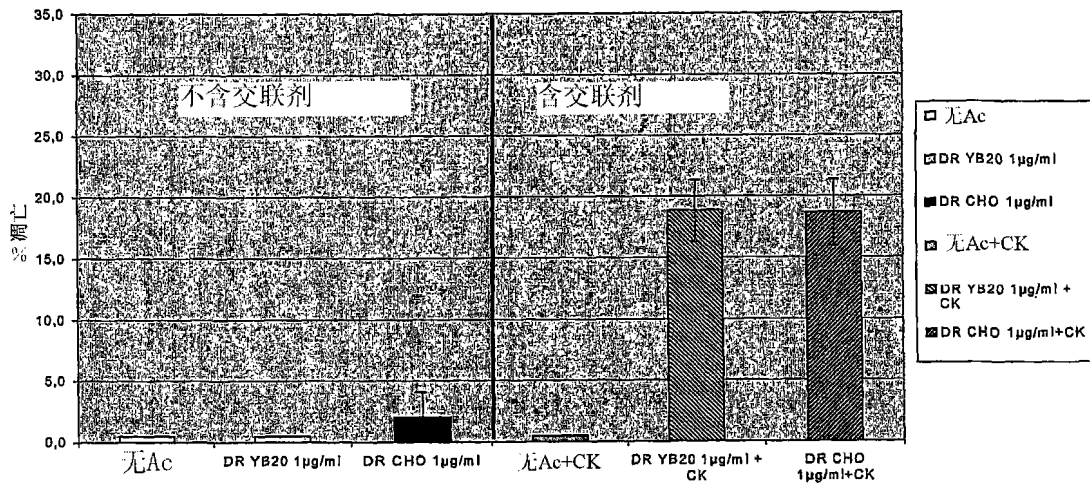


图4A

一种抗-人IgG抗体对B-细胞凋亡的增强

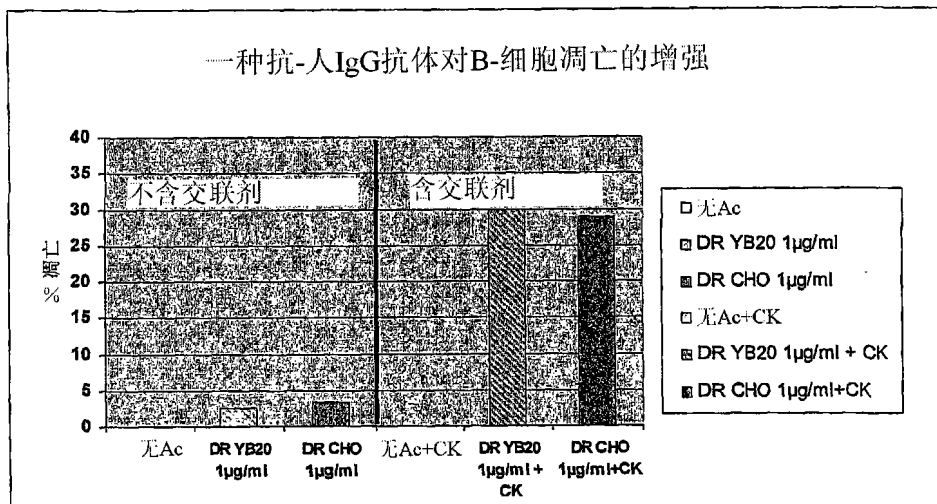


图4B

CD16对凋亡的增强

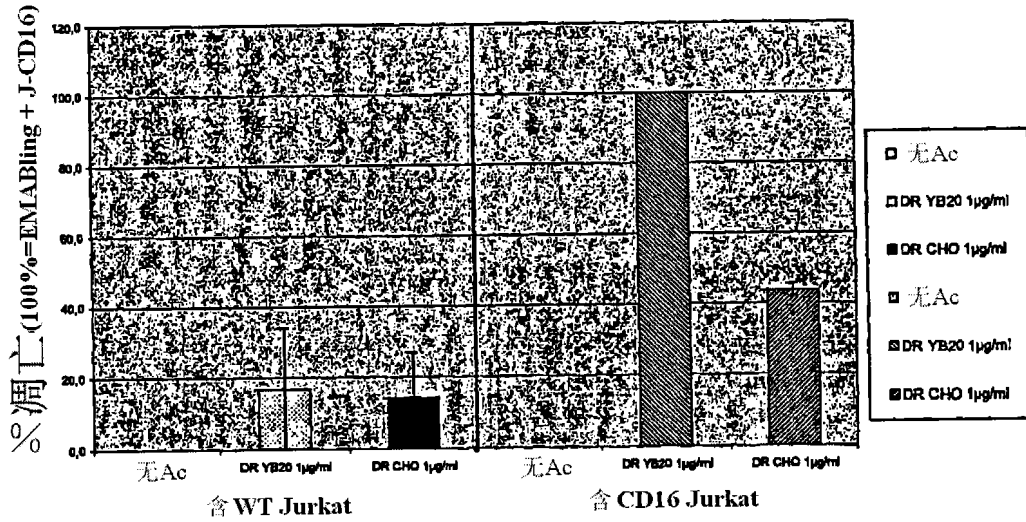


图5A

一种抗-人IgG对B-细胞凋亡的增强

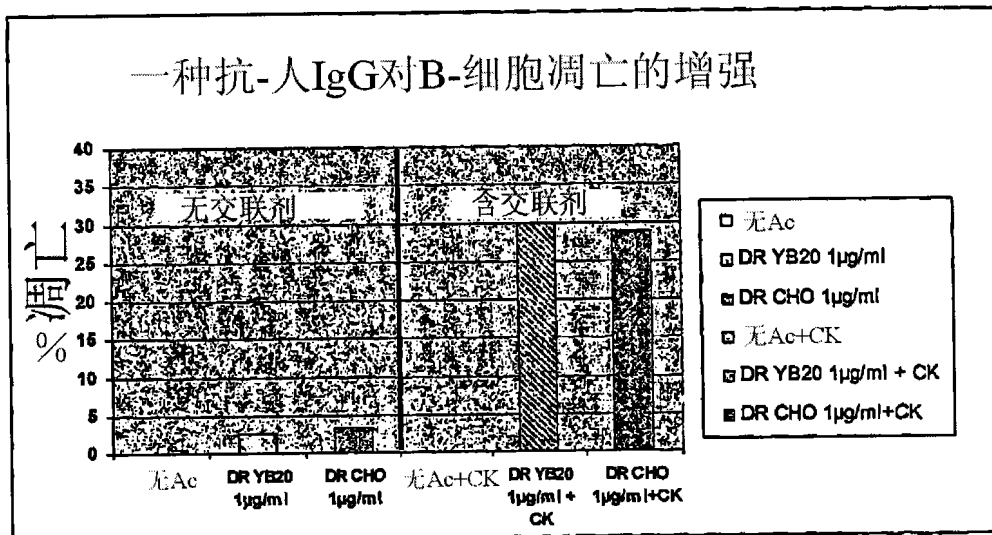


图5B

专利名称(译)	由单克隆抗体产生的凋亡增强		
公开(公告)号	CN101375160A	公开(公告)日	2009-02-25
申请号	CN200680052923.5	申请日	2006-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	LFB生物科技公司		
申请(专利权)人(译)	LFB生物科技公司		
当前申请(专利权)人(译)	LFB生物科技公司		
[标]发明人	纳塔莉富涅尔 克里斯托夫德罗默夫		
发明人	纳塔莉·富涅尔 克里斯托夫·德罗默夫		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/00 A61K39/395 A61P21/00 A61P7/04 A61P9/00 C07K16/28 A61P37/00 C12N5/078		
CPC分类号	C07K16/2833 C07K2317/71 C12N5/0634 C07K2317/41 A61P21/00		
代理人(译)	丛芳 彭晓玲		
优先权	2005012815 2005-12-16 FR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种表达在细胞系YB2/0的海藻糖含量低于65%的抗 - MLA - DR抗体组合物在体外诱导凋亡中的用途。

