



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105143257 B

(45) 授权公告日 2020.10.27

(21) 申请号 201480021119.5
 (22) 申请日 2014.03.14
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 105143257 A
 (43) 申请公布日 2015.12.09
 (30) 优先权数据
 61/791,624 2013.03.15 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.10.14
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2014/029585 2014.03.14
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02014/144960 EN 2014.09.18
 (73) 专利权人 艾伯维生物医疗股份有限公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 F.A.哈丁 P.R.辛顿 M.熊
 O.J.拉佐 S.叶

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 11105
 代理人 张文辉

(51) Int.Cl.
 C07K 16/00 (2006.01)
 A61K 39/00 (2006.01)
 C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
 WO 2004099249 A3, 2006.01.26
 WO 2011120134 A1, 2011.10.06
 US 2010111856 A1, 2010.05.06
 CN 1867583 A, 2006.11.22
 Sergei Radaev et al..The Structure of a Human Type III Fcγ Receptor in Complex with Fc.《J. Biol. Chem.》.2001,第276卷(第19期),16469-16477.

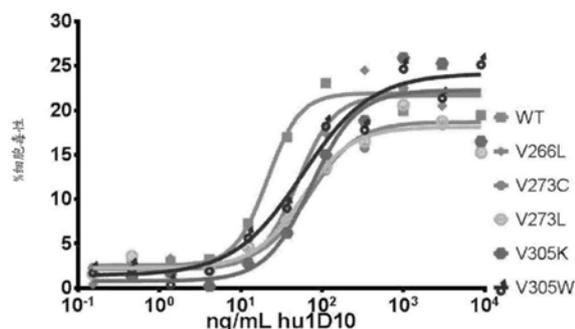
审查员 李翠莹

权利要求书3页 说明书39页
 序列表17页 附图20页

(54) 发明名称
 FC变体

(57) 摘要
 本公开涉及具有经修饰的Fc域的多肽变体，其具有改变的对Fc受体的亲和力。

ADCC
 40:1 PBMC:Raji



1. 一种包含重链的抗体,所述重链各自具有SEQ ID NO:2的CH2域,其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有单个氨基酸取代V273E。
2. 一种包含重链的抗体,所述重链各自具有SEQ ID NO:2的CH2域,其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有单个氨基酸取代V273M。
3. 一种包含重链的抗体,所述重链各自具有SEQ ID NO:2的CH2域,其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有单个氨基酸取代V273S。
4. 一种包含重链的抗体,所述重链各自具有SEQ ID NO:2的CH2域,其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有单个氨基酸取代V273Y。
5. 权利要求1-4中任一项的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
6. 权利要求1-4中任一项的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
7. 权利要求1-4中任一项的抗体,其中所述抗体是人源化的。
8. 权利要求7的抗体,其中所述抗体特异性结合CD40。
9. 权利要求1-4中任一项的抗体,其中所述抗体特异性结合CD25、CD3、HLA分子、共刺激分子、细胞因子、趋化因子、粘附分子、活化标志物或免疫调控蛋白。
10. 权利要求9的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
11. 权利要求9的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
12. 权利要求9的抗体,其中所述抗体是人源化的。
13. 权利要求9的抗体,其中所述共刺激分子选自CD28、PD-1、CTLA-4、CD80、CD86、TIM3、OX40、4-1BB、GITR、CD27、B7-H4或DC-SIGN。
14. 权利要求13的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
15. 权利要求13的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
16. 权利要求13的抗体,其中所述抗体是人源化的。
17. 一种包含重链的抗体,所述重链各自具有SEQ ID NO:2的CH2域,其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有单个氨基酸取代V263L,其中所述抗体特异性结合CD40。
18. 权利要求17的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
19. 权利要求17的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
20. 权利要求17的抗体,其中所述抗体是人源化的。
21. 一种包含重链的抗体,所述重链各自具有SEQ ID NO:2的CH2域,其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有单个氨基酸取代V263L,其中所述抗体特异性结合选自CD28、PD-1、CTLA-4、CD80、CD86、TIM3、OX40、4-1BB、GITR、CD27、B7-H4或DC-SIGN的共刺激分子。
22. 权利要求21的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
23. 权利要求21的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体。
24. 权利要求21的抗体,其中所述抗体是人源化的。
25. 一种缀合物化合物,包含连接于效应模块或可检测标记物的权利要求1-24中任一项的抗体。
26. 一种药物组合物,包含权利要求1-24中任一项的抗体和药学上可接受的载体。
27. 一种药物组合物,包含权利要求25的缀合物化合物和药学上可接受的载体。
28. 一种核酸,包含编码权利要求1-24中任一项的抗体的核苷酸序列。
29. 一种载体,包含权利要求28的核酸。

30. 一种真核宿主细胞,包含权利要求29的载体。
31. 一种经工程化以表达权利要求28的核酸的真核宿主细胞。
32. 权利要求30的真核宿主细胞,其为哺乳动物宿主细胞。
33. 一种产生抗体的方法,包括:(a) 培养权利要求32的真核宿主细胞和(b) 回收所述抗体。
34. 根据权利要求1-4、8和10-24中任一项的抗体,其用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症。
35. 根据权利要求5的抗体,其用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症。
36. 根据权利要求6的抗体,其用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症。
37. 根据权利要求7的抗体,其用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症。
38. 根据权利要求9的抗体,其用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症。
39. 根据权利要求34使用的抗体,其中所述抗体是抗CD40抗体且其中所述癌症是血液癌症。
40. 根据权利要求35-38中任一项使用的抗体,其中所述抗体是抗CD40抗体且其中所述癌症是血液癌症。
41. 根据权利要求34使用的抗体,其中所述癌症选自慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)或实体瘤癌症。
42. 根据权利要求35-38中任一项使用的抗体,其中所述癌症选自慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)或实体瘤癌症。
43. 根据权利要求41使用的抗体,其中所述实体瘤癌症选自卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌或肾癌。
44. 根据权利要求42使用的抗体,其中所述实体瘤癌症选自卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌或肾癌。
45. 根据权利要求1-24中任一项的抗体在制造用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症的药物中的用途。
46. 根据权利要求45的用途,其中所述抗体是抗CD40抗体,且其中所述癌症是血液癌症。
47. 根据权利要求45的用途,其中所述癌症选自慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)或实体瘤癌症。
48. 根据权利要求47的用途,其中所述实体瘤癌症选自卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌或肾癌。
49. 根据权利要求25的缀合物化合物,其用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症。
50. 根据权利要求49使用的缀合物化合物,其中所述抗体是抗CD40抗体,且其中所述癌症是血液癌症。

51. 根据权利要求50使用的缀合物化合物,其中所述癌症选自慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)或实体瘤癌症。

52. 根据权利要求51使用的缀合物化合物,其中所述实体瘤癌症选自卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌或肾癌。

53. 根据权利要求25的缀合物化合物在制造用于在有所需要的患者中治疗免疫病症或癌症的药物中的用途。

54. 根据权利要求53的用途,其中所述抗体是抗CD40抗体,且其中所述癌症是血液癌症。

55. 根据权利要求54的用途,其中所述癌症选自慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)或实体瘤癌症。

56. 根据权利要求55的用途,其中所述实体瘤癌症选自卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌或肾癌。

FC变体

[0001] 1. 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求35 U.S.C. §119 (e) 下2013年3月15日提交且通过提述完整并入本文的临时申请no. 61/791,624的权益。

[0003] 2. 序列列表

[0004] 本申请含有序列表, 其已以ASCII形式电子提交且通过提述完整并入本文。所述ASCII拷贝创建于2014年3月13日, 名称为81493-884W0 (125234) _SL.txt且大小为31,705个字节。

[0005] 3. 发明背景

[0006] 抗体的可结晶片段(“Fc”)区由两个相同的蛋白质片段组成, 其源自抗体两条重链的第二和第三恒定域。Fc区结合免疫细胞上称为Fc受体的受体(“FcR”), 导致激活和抑制性信号。例如, Fc γ RIIIA (亦称为CD16或CD16a) 见于天然杀伤细胞和巨噬细胞上, 且具有对Fc区的低亲和力。Fc配体对Fc γ RIIIA受体的结合能导致抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的诱导和巨噬细胞的细胞因子释放的诱导。相比之下, Fc γ RIIB受体(亦称为CD32b) 见于巨噬细胞、嗜中性粒细胞和嗜曙红细胞上, 且Fc配体对Fc γ RIIB受体的结合抑制细胞活性。

[0007] 由不同FcR引起的下游信号传导中的差异基于结构差异。在Fc gamma受体(“Fc γ R”)家族(包括Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a) 和Fc γ RIIB (CD16b)) 中, Fc受体经由称为免疫受体基于酪氨酸的激活基序(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM))的基序生成活化信号。Fc γ RIIA、Fc γ RI和Fc γ RIIIA都经由其ITAM, 或通过含ITAM亚基的相互作用产生活化信号。或者, Fc受体可含有生成抑制性信号的免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM))。Fc γ RIIB的可变剪接形式Fc γ RIIB1和Fc γ RIIB2(统称为“Fc γ RIIB”)具有ITIM序列, 如此充当抑制性Fc受体(见Blank等, 2009, Immunol Rev. 232 (1): 59-71)。

[0008] 通过改变抗体的Fc区, 可进行改进来提高抗体治疗功效、延长抗体半衰期和减少不想要的副作用。

[0009] 4. 发明概述

[0010] 由于Fc γ RIIIA生成活化免疫细胞, 特别是介导ADCC的细胞的信号, 因此认为降低Fc对Fc γ RIIIA的结合将导致降低的免疫细胞活化和降低的ADCC水平。而且, 由于Fc γ RIIB生成一直免疫细胞的信号, 因此增加Fc对Fc γ RIIB的结合与降低Fc对Fc γ RIIIA的结合偶联的双重效果将导致比调控单一受体的结合更大的对免疫细胞活化的抑制。发明人已鉴定了Fc分子的CH2域中影响对两种Fc受体的结合的单个氨基酸取代或点突变。例如, 如将在下文更详细论述的, 在单一位置(例如V263)处的氨基酸取代能显著增加对Fc γ RIIB的结合和降低对Fc γ RIIIA的结合。将这类氨基酸取代掺入到抗体和其他基于Fc的治疗分子中能产生变体多肽, 其与调控对单一受体的结合的取代相比具有更大的对免疫细胞活化的抑制。所述变体多肽特别适用于治疗不期望诱导免疫活化的适应证, 例如在免疫性病症的治疗中。

[0011] 因此,在一个方面,本公开提供包含经修饰的(或变体)CH2域或完整Fc域的多肽(统称为“变体多肽”或“变体Fc多肽”),其包含相比于相应野生型CH2(SEQ ID NO:2)或Fc区(SEQ ID NO:1)的结合增加对Fc γ RIIB的结合和/或降低对Fc γ RIIIA的结合的氨基酸取代。本公开的多肽可以是单体或多聚体(例如二聚体或四聚体),每个单体单元包含一个或多个CH2或Fc域。本公开的多肽通常是包含本公开的变体CH2或Fc域的抗体或Fc融合蛋白。本公开的变体CH2或变体Fc域通常包含在位置263,位置266,位置273和位置305处的一种或多种取代,其中Fc域中残基的编号是如Kabat中EU指引的编号。这些氨基酸位置在图2中分别由星号(*)、剑号(†)、双剑号(‡)和数字符号(#)指示。

[0012] 如此,在一个方面,本公开提供一种多肽,其包含与SEQ ID NO:2的CH2域具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的变体CH2域。相对于SEQ ID NO:2的CH2域,所公开的多肽可包含选自以下的一种或多种取代:(a)增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V263取代;(b)增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V266取代;和(c)增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V273取代。

[0013] 在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:2的CH2域,所述多肽包含选自V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K和V305W的一种或多种取代。在具体的实施方案中,CH2域的一种或多种取代选自V263L, V273E, V273F, V273M, V273S和V273Y。

[0014] 在另一个方面,本公开提供一种多肽,其包含相比于SEQ ID NO:2的CH2域具有多达6个,多达5个,多达4个,多达3个,多达2个取代或单个氨基酸取代的变体CH2域,包括选自以下的一种或多种取代:(a)增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V263取代;(b)增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V266取代;和(c)增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V273取代。

[0015] 本公开的多肽还可以包含以下变体CH2域,其相比于SEQ ID NO:2的CH2域具有多达6个,多达5个,多达4个,多达3个,多达2个取代或单个氨基酸取代,包括选自V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K和V305W的一种或多种取代。在具体的实施方案中,CH2域的一种或多种取代选自V263L, V273E, V273F, V273M, V273S和V273Y。

[0016] 如本文中详细论述的,CH2域是抗体的Fc域的组分。因此,在一个方面,提供包含Fc域的多肽,所述Fc域包含本公开的CH2域。在一些实施方案中,所述Fc域相比于SEQ ID NO:1的Fc域的CH2域具有多达20个,多达15个,多达12个,多达10个,多达9个,多达8个,多达7个,多达6个,多达5个或多达4个氨基酸取代。总体上,所述多肽的Fc域可与SEQ ID NO:1的Fc域具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0017] 熟练技术人员将领会所公开的Fc域可包含本文中描述的任意一种或多种CH2取代。如此,提供多肽,包括其中包含V263取代(例如V263L), V266取代(例如V266L), V273取代(例如V273E, V273F, V273L, V273M, V273S或V273Y),或V305取代(例如V305K或V305W)的那些多肽。

[0018] 在多个实施方案中,所述多肽包含变体CH2域,其与SEQ ID NO:2的CH2域具有至少

70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性,且其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有选自以下的一种或多种取代:增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V263取代;和增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V273取代。

[0019] 在多个实施方案中,所述多肽包含变体CH2域,其与SEQ ID NO:2的CH2域具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性,且其相对于SEQ ID NO:2的CH2域具有:取代V263L;和/或选自V273C,V273E,V273F,V273L,V273M,V273S,V273Y的V273取代。

[0020] 在多个实施方案中,所述多肽包含相比于SEQ ID NO:2的CH2域具有多达6个,多达5个,多达4个,多达3个,多达2个取代或单个氨基酸取代的变体CH2域,包括选自以下的一种或多种取代:增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V263取代;增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V266取代;和增加对Fc γ RIIB的亲合力和降低对Fc γ RIIIA的亲合力的V273取代。

[0021] 在多个实施方案中,所述多肽包含相比于SEQ ID NO:2的CH2域具有多达6个,多达5个,多达4个,多达3个,多达2个取代或单个氨基酸取代的变体CH2域,包括选自以下的一种或多种取代:取代V263L;和/或选自V273C,V273E,V273F,V273L,V273M,V273S,V273Y的V273取代。

[0022] 已知Fc域介导Fc效应功能,如3.5部分描述的。因此,本公开提供还包含修饰Fc效应功能的一个或多个另外的取代或取代组合的多肽。通常,可修饰的Fc效应功能包括(a)降低或增加对FcRN的结合;(b)降低或增加对Fc γ RI的结合;(c)降低或增加对Fc γ RIIA或Fc γ RIIB的结合;(d)降低或增加对Fc γ RIIIA的结合;或(e)前述两种、三种、四种或所有的组合。

[0023] 已知修饰Fc效应功能的例示性取代是Fc取代M428L,其可与Fc取代T250Q组合发生。另外,如相比于SEQ ID NO:1的Fc域,本公开的Fc域可包含选自表1的一个或多个另外的取代。

[0024] 在一个方面,本公开提供作为抗体的多肽,其在3.1部分进一步论述。这些抗体可以是人或人源化抗体。在典型的实施方案中,抗体特异性结合CD40、CD25、CD3、HLA分子、共刺激分子、细胞因子(例如TNF- α 或IL-2)、趋化因子、粘附分子(例如 α 4整联蛋白)、活化标志物或免疫调控蛋白。所述共刺激分子可以是CD28,PD-1,CTLA-4,CD80,CD86,TIM3,OX40,4-1BB,GITR,CD27,B7-H4或DC-SIGN。在一些实施方案中,所述免疫调控蛋白是细胞表面分子。在其他实施方案中,所述免疫调控蛋白是可溶性分子。

[0025] 在典型实施方案中,所述抗体特异性结合CD25。在其他实施方案中,所述抗体特异性结合CD40。

[0026] 本公开的多肽还包括Fc融合蛋白,其中CH2域是可操作连接于至少一种融合伴侣(fusion partner)的Fc域的一部分。Fc融合蛋白在3.3部分详细论述。在这类Fc蛋白中,所述至少一种融合伴侣可以是TNF受体II的胞外域(“ECD”);淋巴细胞功能有关抗原3(LFA-3)的第一ECD;人细胞毒性T淋巴细胞有关分子4(CTLA-4)的ECD;IL-1R辅助蛋白配体结合区的C末端;IL-1RI ECD的N末端;肽血小板生成素(TPO)模拟物;具有两个氨基酸取代L104E和A29Y的CTLA-4的ECD;VEGF受体1的ECD和/或VEGF受体2的ECD。

[0027] 在另一个方面,本公开提供缀合物化合物,其包含连接于效应模块或可检测标记物的本公开的多肽。缀合物化合物在3.6部分进一步论述。在一些实施方案中,所述缀合物化合物包含连接于可检测标记物,如放射性化合物、荧光化合物、酶、底物、表位标签或毒素的多肽。在一些实施方案中,所述缀合物化合物包含连接于效应模块如细胞毒剂的多肽。熟练的技术人员将领会可将多种细胞毒剂连接于本公开的多肽,所述细胞毒剂包括阿里他汀(auristatin)、DNA小沟(minor groove)结合剂、DNA小沟烷化剂、烯二炔、多卡米星、美登木素生物碱(maytansinoid)或长春花生物碱(vinca alkaloid)。其他例示性细胞毒剂是抗微管蛋白、AFP、MMAF或MMAE。

[0028] 本公开还提供药物组合物,其包含本公开的多肽和药学可接受的载体或本公开的缀合物化合物。药物组合物和治疗方法在3.7部分详细论述。

[0029] 本文中提供包含编码本公开的多肽的核苷酸序列,以及包含核酸的载体。另外,本文中提供用包含编码所公开的多肽的核苷酸序列的载体转化的原核和真核宿主细胞,以及工程化为表达所述核苷酸序列的真核(如哺乳动物)宿主细胞。通过培养宿主细胞和回收多肽来产生多肽的方法在下文3.4部分进一步论述。

[0030] 熟练的技术人员将领会本公开的多肽可用于治疗多种疾病或病症如免疫病症或癌症,对于所述疾病或病症将适于对此需要的患者施用本公开的适宜的多肽、药物组合物或缀合物化合物。

[0031] 在一些实施方案中,所述多肽是可用于治疗癌症的抗CD40抗体。在具体的实施方案中,癌症是血液癌症,任选地选自慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金(Hodgkin)氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)或卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)。在具体的实施方案中,癌症是实体瘤癌症,任选地选自卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑色素瘤、胰腺癌和肾癌。抗CD40抗体的例示性VL和VH序列分别以SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4提供。在具体的实施方案中,所述抗CD40抗体是多特异性抗体。

[0032] 在其他实施方案中,所述多肽是可用于治疗免疫性病症的抗CD20抗体,所述免疫性病症是类风湿性关节炎或多发性硬化症。抗CD20抗体的例示性VL和VH序列分别以SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6提供。

[0033] 仍在其他实施方案中,所述多肽是可用于治疗免疫性病症或癌症的抗CD25抗体,所述免疫性病症是多发性硬化症、哮喘、银屑病、葡萄膜炎、眼部炎症或器官移植排斥,或所述癌症是人T细胞白血病病毒1有关的T细胞白血病。抗CD25抗体的例示性VL序列包括SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9。抗CD25抗体的例示性VH序列包括SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:10。

[0034] 仍在其他实施方案中,所述多肽是可用于治疗免疫性病症的抗TNF α 抗体,所述免疫性病症是类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎或斑块状银屑病(plaque psoriasis)。抗TNF α 抗体的例示性VL序列包括SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13。抗TNF α 抗体的例示性VH序列包括SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:14。

[0035] 仍在其他实施方案中,所述多肽是可用于治疗免疫性病症的抗IL-6受体抗体,所述免疫性病症是类风湿性关节炎或卡斯尔曼氏病(Castleman's Disease)。抗IL-6受体抗体的例示性VL和VH序列分别以SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16提供。所述多肽还可以是可用

于治疗免疫性病症的抗 $\alpha 4$ -整联蛋白抗体,所述免疫性病症是多发性硬化症。在一些实施方案中,所述多肽是可用于治疗免疫性病症的抗IL-1抗体,所述免疫性病症是Cryopyrin相关的周期综合征(Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes,“CAPS”)。抗IL-6受体抗体的例示性VL和VH序列分别以SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18提供。所述多肽还可以是可用于治疗免疫性病症的抗BAFF抗体,所述免疫性病症是系统性红斑狼疮或过敏。抗BAFF抗体的例示性VL和VH序列分别以SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20提供。

[0036] 应理解上述概述不意图描述本文公开的多个发明的每个实施方案或每个执行方案。发明详述和实施例部分进一步例示了示例的实施方案。本文中描述的各个实施方案意图组合公开,如同每个特定组合被明确披露的。实施例仅为代表性的且不应解译为排他性或限制本文公开的多个发明的范围。

[0037] 通过下文详细描述提供了对本文中公开的多个发明和其伴随的许多优点的更完整的品鉴。

[0038] 如本文中贯穿说明书和所附权利要求中使用的,以下术语和表述意图具有以下含义:

[0039] 不定冠词“一个”和“一种”和定冠词“该/所述”意图包括单数和复数,除非上下文清楚地指示另外的含义。

[0040] “至少一个/一种”和“一个/种或多个/种”交换使用,意指该项可包含所列要素的一个/种或超过一个/种。

[0041] 除非另外指示,应理解说明书和权利要求中使用的表示量、比率、成分的数值特性、反应条件等的所有数字涵盖在所有情况中能通过术语“约/大概”修饰。

[0042] 5.附图简述

[0043] 图1提供天然IgG的示意图。二硫键由CH1和CL域之间和两个CH2域之间的粗线表示。V是可变域;C是恒定域;L代表轻链而H代表重链。

[0044] 图2A-2B.图2A提供来自人IgG1的野生型Fc域的序列(SEQ ID NO:1)。在Fc域内,CH2域(其序列为APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK;SEQ ID NO:2)加双下划线而CH3域(其序列为GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;SEQ ID NO:21)为粗体。残基263、266、273和305分别由星号(*)、剑号(†)、双剑号(‡)和数字符号(#)指示。图2B显示氨基酸序列和CH1、铰链、CH2和CH3域中氨基酸的编号。图2B中CH1、铰链、CH2和CH3域的全长序列称为SEQ ID NO:38。

[0045] 图3提供用于测量本公开的多肽对Fc受体的结合的复合物的示意图。

[0046] 图4提供对于野生型hu1D10对(A)Fc γ RIIB1和(B)Fc γ RIIIA的结合的FACS滴定曲线和EC₅₀测量。

[0047] 图5提供代表性FACS分选结果。

[0048] 图6的图展现对于Fc γ RIIB结合显著增加且对于Fc γ RIIIA结合降低的个体克隆的富集比率。

[0049] 图7提供鉴定为具有显著增加的Fc γ RIIB结合和降低的对Fc γ RIIIA结合的位置和取代。每个突变体的富集比率制表。

- [0050] 图8提供本公开的多肽对Fc γ RIIB的结合的单点FACS数据。
- [0051] 图9提供本公开的多肽对Fc γ RIIIA的结合的单点FACS数据。
- [0052] 图10A-10B提供显示本公开的多肽比野生型抗体展现更高的对Fc γ RIIB的最大结合的确证性数据。图10A显示WT和变体Fc区对Fc γ RIIB的结合曲线；图10B显示每种变体的结合的EC50和相对于野生型结合的倍数。
- [0053] 图11A-11B提供显示本公开的多肽比野生型抗体展现更高的对Fc γ RIIIA的最大结合的确证性数据。图11A显示WT和变体Fc区对Fc γ RIIIA的结合曲线；图11B显示每种变体的结合的EC50和相对于野生型结合的倍数。
- [0054] 图12提供使用非放射性ADCC测定法得到的来自本公开的测试多肽的FACS数据。
- [0055] 图13A-13D. 图13A提供对IgG浓度作图以测定EC50的百分比细胞毒性。图13B显示具有有一些ADCC活性(尽管低于野生型)的Fc γ RIIB上调突变体(up-mutant)。图13C显示具有极小至无ADCC活性的多肽。图13D将非ADCC hu1D10多肽与先前已知的产生降低的对Fc γ RIIIA结合的取代(S267E、L328F, 双重突变体“SELF”)比较。
- [0056] 图14A-14B. 图14A提供使用铬释放测定法得到的本公开的多肽诱导ADCC的结果。图14B提供图14A的符号表示。
- [0057] 图15A-15C提供使用单核细胞来源的未成熟树突细胞得到的对于本公开的多肽的树突细胞活化的结果。图15A显示通过ADCC诱导性变体的树突细胞活化。图15B显示通过非ADCC诱导性变体的树突细胞活化。图15C显示IL-12诱导的EC50。
- [0058] 图16以粗体显示具有最低ADCC活性和保留/改进的Fc γ RIIB结合的Fc变体。
- [0059] 6. 发明详述
- [0060] 6.1 Fc变体多肽
- [0061] 免疫球蛋白的Fc域牵涉非抗原结合功能且具有由效应分子的结合介导的几种效应功能。如图1中例示的, Fc域由两个主要域CH2域和CH3域构成, 且在CH2域的N末端具有小铰链区。本公开提供包含经修饰的CH2域的多肽(和包含经修饰的CH2域的经修饰Fc域), 在本文中统称为变体多肽、Fc变体或简称为变体或多肽。所述变体多肽通常为抗体或抗体片段(本文中统称为抗体变体)或Fc融合蛋白。
- [0062] 如本文中使用的, 抗体氨基酸残基的编号依照Kabat EU命名法完成, 除非另有指示。
- [0063] 如本文中使用的, 术语“Fc域”指免疫球蛋白重链的C末端区。尽管一般接受的免疫球蛋白重链的Fc域的边界可能变化, 但人IgG重链Fc域通常限定为从位置Cys226或从Pro230的氨基酸残基延伸至其羧基末端。在一些实施方案中, 变体仅包含Fc域的部分且可包含或不包含羧基末端。免疫球蛋白的Fc域一般包含两个域CH2和CH3。本公开的Fc变体多肽通常包含CH2域且时常还包含CH3域。
- [0064] 如本文中使用的, “CH2域”(亦称为“C γ 2”域)一般包含Fc域中(例如人IgGFc域中)从约氨基酸231延伸至约氨基酸340的残基区段。CH2域的独特之处在于其不与另外域紧密配对。相反, 两个N连接的分支糖链介入在完整天然IgG分子的两个CH2域之间。
- [0065] 如本文中使用的, “CH3域”(亦称为“C γ 3”域)一般包含Fc域中在CH2域C末端的残基区段(例如人IgG Fe区的约氨基酸残基341至约氨基酸残基447)。
- [0066] 术语“Fc受体”和“FcR”用于描述结合Fc域(例如抗体或抗体片段的Fc域)的受体。

本发明的一些实施方案中特定地涵盖Fc受体的部分。在优选实施方案中,所述FcR是天然序列人FcR。在其他优选的实施方案中,FcR结合IgG抗体(gamma受体)且包括Fc γ RI,Fc γ RRII和Fc γ RRIII亚类的受体,包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。Fc γ RRII受体包括Fc γ RRIIA(一种“激活受体”)和Fc γ RRIIB(一种“抑制性受体”),其具有相似的氨基酸序列,差别主要是在其细胞质域中。激活受体Fc γ RRIIA在其细胞质域中含有免疫受体基于酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制性受体Fc γ RRIIB在其细胞质域中含有免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)。其他FcR,包括未来将鉴定出的那些,由本文中术语“FcR”涵盖。该术语还包括新生儿受体FcRn。

[0067] 本公开的多肽包含Fc变体域,其具有与人免疫球蛋白恒定区的所有或部分(优选IgG C域)实质性同源的氨基酸序列。

[0068] 已公开了人C区的大量序列;参见例如Clark,1997,Chem.Immunol.65:88-110。人免疫球蛋白重链的其他序列可使用Lasergene软件(DNAStar Limited,London UK)从SwissProt和PIR数据库登录号A93433、B90563、A90564、B91668、A91723和A02146(对于人Ig γ -1链C区),A93906、A92809、A90752、A93132、A02148(对于人Ig γ -2链C区),A90933、A90249、A02150(对于人Ig γ -4链C区),和A23511(对于人Ig γ -3链C区)下获得。例示性Fc域具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0069] 在多个实施方案中,Fc变体域的氨基酸序列与前述任意Fc域参照共享至少约70%,75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性。在优选的实施方案中,参照Fc域包含SEQ ID NO:1。

[0070] 序列比较通常通过在“比较窗口”比较序列以鉴定和比较局部区的序列相似性来实施。“比较窗口”指与参照序列比较的通常为12个连续残基的概念性区段。与参照序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口可包含约20%或更少的添加或缺失(即缺口)用于相应序列的最佳比对。用于比对比较窗口的最佳序列比对可以通过计算机化执行算法(Intelligenetics的Geneworks程序;Wisconsin Genetics软件包7.0版本,Genetics Computer Group,575Science Drive Madison,Wis.,USA中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,通过提述并入本文)或目察来进行且通过选择的任意多种方法生成最佳比对(即产生在比较窗口中的最高百分比同源性)。可参见例如由通过提述并入本文的Altschul等,1997,Nucl.Acids Res.25(17):3389-402披露的BLAST程序家族。

[0071] 本公开提供包含经修饰的Fc域的多肽,其中多肽对第一Fc受体例如Fc γ RRIIB的结合相比于野生型Fc域的增加,且多肽对第二Fc受体例如Fc γ RRIIA的结合相比于具有野生型Fc域的抗体的降低。所述多肽可以是抗体或Fc融合蛋白。

[0072] Fc变体多肽可包含单一取代,其导致对Fc γ RRIIB的增加的结合和对Fc γ RRIIA的降低的结合两者,如与具有野生型Fc域的多肽相比的。

[0073] 所述Fc变体多肽可包含变体恒定区重链域2(“CH2”),其与SEQ ID NO:2的CH2域相比具有选自V263L,V266L,V273C,V273E,V273F,V273L,V273M,V273S,V273Y,V305K和V305W的至少一个取代。变体CH2域优选与SEQ ID NO:2的CH2域具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。在多个实施方案中,CH2域包含选自V263L,V273E,V273F,V273M,V273S和V273Y的至少一个取代。

[0074] 在一些实施方案中,变体CH2域相比于SEQ ID NO:2的CH2域具有总共多达20个,多达15个,多达12个,多达10个,多达9个,多达8个,多达7个,多达6个,多达5个或多达4个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述CH2域相比于SEQ ID NO:2的CH2域可具有不超过6个,不超过5个,不超过4个,不超过3个或不超过2个氨基酸取代。

[0075] 所述Fc变体多肽可包含变体Fc区,其包含CH2域,该CH2域相比于SEQ ID NO:2的CH2域具有选自V263L,V266L,V273C,V273E,V273F,V273L,V273M,V273S,V273Y,V305K和V305W的至少一个取代。变体Fc区优选与SEQ ID NO:1的Fc区具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。在多个实施方案中,CH2域包含选自V263L,V273E,V273F,V273M,V273S和V273Y的至少一个取代。

[0076] 在一些实施方案中,所述变体Fc区域相比于SEQ ID NO:1的Fc域具有总共多达20个,多达15个,多达12个,多达10个,多达9个,多达8个,多达7个,多达6个,多达5个或多达4个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述变体Fc区相比于SEQ ID NO:1的Fc区可具有不超过6个,不超过5个,不超过4个,不超过3个或不超过2个氨基酸取代。

[0077] 本公开的变体多肽可以是抗体或Fc融合蛋白。例如但不限于,Fc融合蛋白可以是重组表达为融合蛋白的抗体,例如具有细胞因子蛋白、毒素蛋白或其他生物活性蛋白。在其他实施方案中,Fc融合蛋白含有抗体的Fc域,诸如如本文中公开的变体Fc域,其与融合伴侣重组表达为融合蛋白。在其他实施方案中,Fc融合蛋白含有Fc区的CH2或CH3域,诸如如本文中公开的变体CH2域,其与融合伴侣重组表达为融合蛋白。本公开的变体抗体可以是抗体-药物缀合物。例如但不限于,所述变体抗体可缀合至摩尔分子毒素或生物活性小分子化合物。例示性抗体和融合蛋白在各部分描述。

[0078] 本公开的变体Fc域可包含影响效应功能的一种或多种取代(除了产生对Fc γ RIIB增加的亲和力和对Fc γ RIIIA降低的亲和力的一种或多种取代以外)。

[0079] 在一个实施方案中,所述变体Fc域含有导致对Fc γ R的降低的结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置238,239,248,249,252,254,265,268,269,270,272,278,289,292,293,294,295,296,298,301,303,322,324,327,329,333,335,338,340,373,376,382,388,389,414,416,419,434,435,437,438或439中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0080] 例如,所述变体Fc域可含有导致对Fc γ RI的降低的结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置238,265,269,270,327或329中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0081] 所述变体Fc域可含有导致对Fc γ RII的降低的结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置238,265,269,270,292,294,295,298,303,324,327,329,333,335,338,373,376,414,416,419,435,438或439中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0082] 感兴趣的变体Fc域可含有导致对Fc γ RIII的降低的结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置238,239,248,249,252,254,265,268,269,270,272,278,289,293,294,295,296,301,303,322,327,329,338,340,373,376,382,388,389,416,434,435或437中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0083] 在另一实施方案中,具有改变的Fc γ R结合亲和力的所述变体Fc域含有导致对Fc γ R的改进结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置255,256,258,267,268,272,276,280,283,285,286,290,298,301,305,307,309,312,315,320,322,326,330,331,333,334,337,340,360,378,398或430中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0084] 例如,所述变体Fc域可含有导致对Fc γ R III的增加的结合的一种或多种取代且任选地,可进一步含有导致对Fc γ R II的降低的结合的一种或多种取代。例示性的这类变体在Fc域的位置298和/或333处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0085] 所述变体Fc域可含有导致对Fc γ R II的增加的结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置255,256,258,267,268,272,276,280,283,285,286,290,301,305,307,309,312,315,320,322,326,330,331,337,340,378,398或430中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。这类具有对Fc γ R II的增加的结合的变体Fc域任选地可以进一步含有导致对Fc γ R III的降低的结合的一种或多种取代,而且可以例如在Fc域的氨基酸位置268,272,298,301,322或340中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。

[0086] 在又一个方面,所述Fc变体多肽可经修饰以增加或降低其对胎儿Fc受体FcRn的结合亲和力,例如通过突变涉及FcRn相互作用的特定区处的免疫球蛋白恒定区区段(参见例如W0 2005/123780)。因此,本公开进一步提供多肽,其包含具有改变的新生儿Fc受体(FcRn)结合亲和力的变体Fc域,该多肽在Fc域的氨基酸位置238,252,253,254,255,256,265,272,286,288,303,305,307,309,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,386,388,400,413,415,424,433,434,435,436,439或447中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。具有降低的对FcRn结合的这类变体Fc域可在Fc域的氨基酸位置252,253,254,255,288,309,386,388,400,415,433,435,436,439或447中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。或者,上述变体Fc域可以含有导致对FcRn的增加的结合的一种或多种取代且在Fc域的氨基酸位置238,256,265,272,286,303,305,307,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,413,424或434中的任意一处或多处包含氨基酸修饰,其中Fc域中的残基编号是如Kabat中EU索引的编号。在又一些实施方案中,所述变体Fc域具有增强对FcRn的亲合力的至少一种或多种修饰,例如对氨基酸残基251-256,285-290,308-314,385-389和428-436中一个或多个的修饰(例如M428L),或在位置250和428处的修饰(例如T250Q/M428L),参见例如Hinton等,2004,J Biol Chem 279(8):6213-6;PCT公开文本No.W0 97/34631;和W002/060919,其均通过提述完整并入本文。在具体的实施方案中,突变IgG类的抗体从而使得重链恒定区的氨基酸残基250,314和428中的至少一个被单独或以其任意组合取代,如在位置250和428,或在位置250和314,或在位置314和428,或在位置250、314和428取代,其中位置250和428为特定的组合。对于位置250,取代的氨基酸残基可以是除苏氨酸以外的任意氨基酸,包括但不限于,丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于位置314,取代的氨基酸残基可以是除亮氨酸以外的任

意氨基酸,包括但不限于,丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。对于位置428,取代的氨基酸残基可以是除甲硫氨酸以外的任意氨基酸,包括但不限于,丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸或酪氨酸。这类突变增加抗体对FcRn的结合,其保护抗体免于降解并延长其半衰期。

[0087] 导致Fc效应功能修饰的其他例示性取代是在美国专利No.7,632,497中公开的那些,其通过提述完整并入本文。在具体的实施方案中,另外的取代选自下表1中的那些。表1显示指示的取代对于结合指示Fc γ R的影响(上调、下调或无变化“nc”)(Shields等,2001,J Biol Chem 276(9):6591-604)。

[0088]

表1					
取代	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
E233P	下调	下调	下调	下调	下调
L234V	下调	下调	下调	下调	下调
L235A	下调	下调	下调	下调	下调
P238A	下调	下调	下调	下调	下调
S239A	nc	nc	nc	nc	下调
I253A	下调	nc	nc	nc	nc
S254A	下调	nc	nc	nc	nc
R255A	nc	nc	上调	上调	nc
T256A	nc	nc	上调	上调	上调
E258A	nc	nc	上调	上调	nc
D265A	下调	下调	下调	下调	下调
D265N	--	--	下调	下调	下调
D265E	--	--	下调	下调	下调

[0089]

表1					
取代	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
S267A	nc	nc	上调	上调	nc
S267G	--	--	nc	nc	下调
S267T	--	--	下调	下调	下调
H268A	nc	nc	上调	上调	下调
E269A	nc	nc	nc	nc	下调
D270A	nc	nc	下调	下调	下调
D270N	--	--	下调	下调	下调
D270E	--	--	下调	下调	nc
E272A	nc	nc	上调	上调	nc
N276A	nc	nc	上调	上调	nc
D280A	nc	nc	上调	上调	nc
H285A	nc	nc	上调	上调	nc
N286A	nc	nc	上调	上调	nc
K288A	下调	nc	nc	nc	nc
K290A	nc	nc	上调	上调	上调
R292A	nc	nc	下调	下调	nc
E293A	nc	nc	nc	nc	下调
E293D	--	--	下调	下调	下调
Q295A	nc	nc	下调	下调	下调
Y296F	nc	nc	nc	nc	下调
N297A	下调	下调	下调	下调	下调
S298A	nc	nc	下调	下调	上调
S298T	--	--	下调	下调	nc
S298N	--	--	下调	下调	下调
R301A	nc	nc	上调	上调	下调
R301M	--	--	上调	上调	下调
V303A	nc	nc	nc	nc	下调
V305A	上调	nc	nc	nc	nc

[0090]

表1					
取代	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
T307A	nc	nc	上调	上调	nc
L309A	nc	nc	上调	上调	nc
Q311A	上调	nc	nc	nc	nc
D312A	上调	nc	nc	nc	nc
N315A	nc	nc	上调	上调	nc
K317A	上调	nc	nc	nc	nc
K322A	nc	nc	上调	上调	下调
K326A	nc	nc	上调	上调	nc
A327Q	下调	下调	下调	下调	下调
A327S	nc	nc	下调	下调	下调
A327G	nc	nc	nc	nc	下调
P329A	下调	下调	下调	下调	下调
P331A	nc	nc	上调	上调	nc
P331S	--	--	nc	下调	下调
E333A	nc	nc	nc	nc	上调
E333Q	--	--	下调	下调	nc
E333N	--	--	下调	下调	下调
E333D	--	--	--	--	上调
K334A	nc	nc	nc	nc	上调
K334R	--	--	nc	上调	下调
K334Q	--	--	nc	nc	上调
K334E	--	--	下调	nc	上调
K334V	--	--	上调	nc	上调
S337A	nc	nc	上调	上调	nc
K338A	nc	nc	nc	nc	下调
K338M	--	--	nc	nc	下调
A339T	nc	nc	nc	nc	上调
K360A	上调	nc	nc	nc	nc

表1					
取代	FcRn	RI	RIIA	RIIB	RIII
Q362A	上调	nc	nc	nc	nc
D376A	nc	nc	nc	nc	下调
A378Q	nc	nc	上调	上调	nc
E380A	上调	nc	nc	nc	nc
E382A	上调	nc	nc	nc	nc
[0091] K414A	nc	nc	下调	下调	nc
S415A	下调	nc	nc	nc	nc
S424A	上调	nc	nc	nc	nc
E430A	nc	nc	上调	上调	nc
H433A	下调	nc	nc	nc	nc
N434A	上调	nc	nc	nc	nc
H435A	下调	nc	nc	nc	nc
Y436A	下调	nc	nc	nc	nc

[0092] 在某些实施方案中,本公开的变体Fc区可在其铰链区中(CH2域N末端的SEQ ID NO:1的部分)具有影响效应功能的一种或多种取代,例如如W02009/006520中描述的,特别是在W02009/006520的权利要求7中所列的氨基酸位置处。在具体的实施方案中,铰链区可包含如W02009/006520的权利要求8中所列的称为a至ff的取代组合的至少一种。W02009/006520通过提述完整并入本文。

[0093] 6.2变体抗体

[0094] 本公开的多肽可以是包含如本文中描述的变体Fc序列的抗体,称为“变体抗体”。

[0095] 在某些实施方案中,本公开的变体抗体是单克隆抗体。如本文中使用的,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”指源自单一克隆,包括任何真核、原核或噬菌体克隆的抗体,而不是产生其的方法。关于本公开可用的单克隆抗体可使用很多种本领域中已知的技术来制备,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。本公开的Fc变体包括嵌合、灵长类化(primatized)、人源化或人的抗体。

[0096] 本公开的变体抗体可以是嵌合抗体。术语“嵌合”抗体如用于本文指以下抗体,其具有源自非人免疫球蛋白(如大鼠或小鼠抗体)的可变序列和典型地选自人免疫球蛋白模板的人免疫球蛋白恒定区。用于产生嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见例如Morrison,1985,Science 229(4719):1202-7;Oi等,1986,BioTechniques 4:214-221;Gillies等,1985,J.Immunol.Methods125:191-202;美国专利No.5,807,715;4,816,567;和4,816397,其通过提述完整并入本文。

[0097] 本公开的变体抗体可以是人源化的。非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是以下嵌合免疫球蛋白、其免疫球蛋白链或片段(如Fv,Fab,Fab',F(ab')₂或抗体的其他靶物结合子

域),其含有源自非人免疫球蛋白的最少序列。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域,其中所有或基本上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体还可包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白通用序列的恒定区。抗体人源化的方法是本领域中已知的。参见例如Riechmann等,1988,Nature 332:323-7;美国专利Nos:5,530,101;5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370至Queen等;EP239400;PCT公开文本W0 91/09967;美国专利No.5,225,539;EP592106;EP519596;Padlan,1991,Mol.Immunol.,28:489-498;Studnicka等,1994,Prot.Eng.7:805-814;Roguska等,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.91:969-973;和美国专利No.5,565,332,其全部通过提述完整并入本文。

[0098] 本公开的变体抗体可以是人抗体。完全的“人”Fc抗体可能是治疗性处理人患者所期望的。如本文中使用的,“人抗体”包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体且包括从人免疫球蛋白文库或从对于一种或多种人免疫球蛋白转基因且不表达内源免疫球蛋白的动物分离的抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成,包括噬菌体展示方法,其使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库。参见美国专利Nos.4,444,887和4,716,111;和PCT公开文本W0 98/46645;W0 98/50433;W0 98/24893;W0 98/16654;W0 96/34096;W0 96/33735;和W0 91/10741,其各自通过提述完整并入本文。人抗体还可以使用转基因小鼠产生,该小鼠不能表达功能性内源免疫球蛋白,但能表达人免疫球蛋白基因。参见例如PCT公开文本W0 98/24893;W0 92/01047;W0 96/34096;W0 96/33735;美国专利Nos.5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;和5,939,598,其通过提述完整并入本文。另外,可雇佣公司如Medarex (Princeton, NJ), Astellas Pharma (Deerfield, IL), Amgen (Thousand Oaks, CA) 和Regeneron (Tarrytown, NY) 来提供针对选定抗原的人抗体,其使用类似于上文所述的那些的技术。识别选定表位的完全的人抗体可使用称为“指引选择(guided selection)”的技术生成。在该办法中,选定的非人单克隆抗体例如小鼠抗体被用来指引识别相同表位的完全的人抗体的选择(Jespersen等,1988,Biotechnology 12:899-903)。

[0099] 本公开的变体抗体可以是灵长类化的。术语“灵长类化的抗体”指包含猴可变区和人恒定区的抗体。产生灵长类化的抗体的方法是本领域中已知的。参见例如美国专利Nos.5,658,570;5,681,722;和5,693,780,其通过提述完整并入本文。

[0100] 本公开的变体抗体可以是双特异性抗体。双特异性抗体是单克隆的抗体(经常是人或人源化的),其对至少两种不同的抗原具有结合特异性。双特异性抗体的抗原靶物的非限制性例子包括细胞表面蛋白质、受体、受体亚基、组织特异性抗原、病毒来源的蛋白质、病毒编码的包膜蛋白、细菌来源的蛋白或细菌表面蛋白等。

[0101] 本公开的变体抗体可以是双可变域(“DVD”)免疫球蛋白(“DVD-Ig”) (参见Gu&Ghayur,2012,Methods in Enzymology 502:25-41,通过提述完整并入本文)。DVD-Ig经由接头组合两种单克隆抗体的靶物结合可变域以创建四价、双靶向性单一药剂。适用于本公开的DVD的轻链中的接头包括通过提述并入本文的Gu&Ghayur,2012,Methods in Enzymology 502:25-41,第30页上表2.1鉴定的那些:短κ链接头ADAAP (SEQ ID NO:22) (鼠)和TVAAP (SEQ ID NO:23) (人);长κ链接头ADAAPTVSIFP (SEQ ID NO:24) (鼠)和TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:25) (人);短λ链接头QPKAAP (SEQ ID NO:26) (人);长λ链接头

QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:27) (人);GS短接头GGSGG (SEQ ID NO:28),GS中等接头GGSGGGSG (SEQ ID NO:29)和GS长接头GGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:30) (所有GS接头是鼠和人的)。适用于本公开的DVD的重链中的接头包括通过提述并入本文的Gu&Ghayur, 2012, *Methods in Enzymology* 502:25-41, 第30页上表2.1鉴定的那些:短接头AKTTAP (SEQ ID NO:31) (鼠)和ASTKGP (SEQ ID NO:32) (人);长接头AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:33) (鼠)和ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:34) (人);GS短接头GGGGSG (SEQ ID NO:35),GS中等接头GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:36)和GS长接头GGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO:37) (所有GS接头是鼠和人的)。优选地,人接头用于人或人源化的DVD-Ig。

[0102] 在本公开中,所述DVD-Ig针对两种不同的靶物。所述靶物可选自EGFR、HER2、ErbB3或2011年2月24日公开的Tariq等美国专利申请公开文本No.2011/0044980中描述的任何其他靶物(通过提述完整并入本文)。

[0103] DVD免疫球蛋白的靶物结合域通常串联排置,一个可变域堆积在另一个顶部上以形成内部和外部Fv域。

[0104] 本公开的变体抗体包括衍生化的抗体。例如,但不限制地,衍生化的抗体通常由糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭性基团的衍生化、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其他蛋白(见第6.5部分中抗体缀合物的论述)等来修饰。可通过已知的技术来实施任意数量的化学修饰,包括但不限于,特定的化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外,衍生物可含有一个或多个非天然氨基酸,例如使用Ambrx技术(参见例如Wolfson, 2006, *Chem. Biol.* 13 (10):1011-2)。

[0105] 6.2.1 Fc变体抗体的靶物

[0106] 本公开的抗体可以靶向基本上任意抗原,包括但不限于属于以下靶抗原列表(包括可溶性因子如细胞因子和包括跨膜受体在内的膜结合因子两者)的蛋白质、亚基、域、基序、和/或表位:17-IA、4-1BB、4Dc、6-酮-PGF1a、8-异-PGF2a、8-氧-dG、A1腺苷受体、A33、ACE、ACE-2、激活素(Activin)、激活素A、激活素AB、激活素B、激活素C、激活素RIA、激活素RIA ALK-2、激活素RIB ALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、地址素(Addressin)、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、alpha-1-抗胰蛋白酶、alpha-V/beta-1拮抗剂、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、Artemin、抗Id、ASPARTIC、心房利纳因子、av/b3整联蛋白、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-淋巴细胞刺激物(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2BMP-2a、BMP-3成骨素(Osteogenin)、BMP-4BMP-2b、BMP-5、BMP-6Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II(BRK-3)、BMPs、b-NGF、BOK、铃蟾肽(Bombesin)、骨来源的神经营养因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、补体因子3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、降钙素、cAMP、癌胚抗原(CEA)、癌有关抗原、组织蛋白酶(Cathepsin)A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C/DPPI、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶H、组织蛋白酶L、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V、组织蛋白酶X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、

CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67蛋白)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*) 毒素、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、细胞角蛋白肿瘤有关抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、衰变加速因子 (Decayaccelerating factor)、脱 (1-3)-IGF-I (脑IGF-1)、Dhh、地高辛、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、内皮缩血管肽受体、脑啡肽 (Enkephalinase)、eNOS、Eot、eotaxin1、EpCAM、Ephrin B2/EphB4、EPO、ERCC、E-selectin、ET-1、因子10a、因子VII、因子VIIIc、因子IX、成纤维细胞活化蛋白 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、铁蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、Fibrin、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵泡刺激素 (Follicle stimulating hormone)、Fractalkine、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (Myostatin)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-alpha1、GFR-alpha2、GFR-alpha3、GITR、胰高血糖素、Glut 4、糖蛋白 10b/IIIa (GP10b/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、生长激素释放因子、半抗原 (NP-cap或NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gB包膜糖蛋白、HCMV gH包膜糖蛋白、HCMV UL、造血生长因子 (HGF)、Hep B gp120、类肝素酶 (heparanase)、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、单纯疱疹病毒 (HSV) gB糖蛋白、HSV gD糖蛋白、HGFA、高分子量黑色素瘤有关抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV IIIB gp120 V3 loop、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、人心肌球蛋白、人巨细胞病毒 (HCMV)、人生长激素 (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受体、IgE、IGF、IGF结合蛋白、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、干扰素 (INF)-alpha、INF-beta、INF-gamma、Inhibin、iNOS、胰岛素A-链、胰岛素B-链、胰岛素样生长因子1、整联蛋白alpha2、整联蛋白alpha3、整联蛋白alpha4、整联蛋白alpha4/beta1、整联蛋白alpha4/beta7、整联蛋白alpha5 (alphaV)、整联蛋白alpha5/beta1、整联蛋白alpha5/beta3、整联蛋白alpha6、整联蛋白beta1、整联蛋白beta2、干扰素gamma、IP-10、I-TAC、JE、激肽释放酶 (Kallikrein) 2、激肽释放酶5、激肽释放酶6、激肽释放酶11、激肽释放酶12、激肽释放酶14、激肽释放酶15、激肽释放酶L1、激肽释放酶L2、激肽释放酶L3、激肽释放酶L4、KC、KDR、角质形成细胞生长因子 (KGF)、核纤层蛋白5、LAMP、LAP、LAP (TGF-1)、潜伏性TGF-1、潜伏性TGF-1bp1、LBP、LDGF、LECT2、Lefty、Lewis-Y抗原、Lewis-Y相关抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-选择蛋白 (Selectin)、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性物、黄体化激素、淋巴毒素Beta受体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、

Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1-alpha、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、粘蛋白 (Muc1)、MUC18、Muellerian-inhibitin物质、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-钙粘蛋白 (Cadherin)、NCA 90、NCAM、NCAM、Neprilysin、神经营养因子-3、-4或-6、Neurturin、神经元生长因子 (NGF)、NGFR、NGF-beta、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-钙粘蛋白、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盘碱性磷酸酶 (PLAP)、PIGF、PLP、PP14、原胰岛素、原松弛素 (Prorelaxin)、蛋白C、PS、PSA、PSCA、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、松弛素A-链、松弛素B-链、肾素、呼吸道合胞病毒 (RSV) F、RSV Fgp、Ret、风湿样因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清清蛋白、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72 (肿瘤有关的糖蛋白72)、TARC、TCA-3、T细胞受体 (例如T细胞受体 alpha/beta)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP样碱性磷酸酶、TfR、TGF、TGF-alpha、TGF-beta、TGF-beta泛特异性 (Pan Specific)、TGF-beta RI (ALK-5)、TGF-beta RII、TGF-beta RIIb、TGF-beta RIII、TGF-beta1、TGF-beta2、TGF-beta3、TGF-beta4、TGF-beta5、凝血酶、胸腺Ck-1、促甲状腺激素、Tie、TIMP、TIQ、组织因子、TMEFF2、Tmpe、TMPRSS2、TNF、TNF-alpha、TNF-alpha beta、TNF-beta2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A (RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2TNFRH2)、TNFRST23 (DcTRAILR1TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2配体、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK配体ODF、OPG配体)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3配体、DR3配体)、TNFSF13 (APRILTALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM配体、LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITR配体AITR配体、TL6)、TNFSF1A (TNF-a Conectin、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40配体gp34、TXGP1)、TNFSF5 (CD40配体CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6 (Fas配体Apo-1配体、APT1配体)、TNFSF7 (CD27配体CD70)、TNFSF8 (CD30配体CD153)、TNFSF9 (4-1BB配体CD137配体)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、转运受体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、肿瘤有关的抗原CA125、表达Lewis Y相关糖的肿瘤有关抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-钙粘蛋白、VE-钙粘蛋白-2、VEGFR-1 (f1t-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (f1t-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR整联蛋白、von Willebrands因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、

WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、以及激素和生长因子的受体。

[0107] 包含本文中描述的变体Fc域的本公开的抗体可包含已知“亲本”抗体的CDR序列或可变域序列。在一些实施方案中,除了如本文中公开的对Fc域的修饰以外,亲本抗体和本公开的抗体可共享相似或相同的序列。

[0108] 例如,亲本抗体可基本类似于利妥昔单抗(rituximab) (**Rituxan®**, IDEC/Genentech/Roche) (见例如美国专利No.5,736,137),一种批准为治疗非霍奇金氏淋巴瘤的嵌合抗CD20抗体;HuMax-CD20,目前正由Genmab开发的一种抗CD20,美国专利No.5,500,362中描述的抗CD20抗体,AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), 和PR070769 (PCT/US2003/040426, 题为“Immunoglobulin Variants and Uses Thereof”)。许多靶向表皮生长因子受体家族成员(包括EGFR (ErbB-1)、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4))的抗体可能受益于本发明的Fc多肽。例如,本发明的Fc多肽可用于基本上类似于以下抗体的抗体:曲妥珠单抗(trastuzumab) (**Herceptin®**, Genentech) (见例如美国专利No.5,677,171),一种批准为治疗乳腺癌的人源化抗Her2/neu抗体;pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg™), 目前正由Genentech开发;美国专利No.4,753,894中描述的抗Her2抗体; cetuximab (**Erbix®**, Imclone) (美国专利No.4,943,533; PCT WO 96/40210), 在临床试验中用于多种癌症的一种嵌合抗EGFR抗体; ABX-EGF (美国专利No.6,235,883), 目前正由Abgenix-Immunex-Amgen开发; HuMax-EGFr (美国Ser.No.10/172,317), 目前正由Genmab开发; 425、EMD55900、EMD62000和EMD72000 (Merck KGaA) (美国专利No.5,558,864; Murthy等1987, Arch Biochem Biophys. 252 (2) : 549-60; Rodeck等, 1987, J Cell Biochem. 35 (4) : 315-20; Kettleborough等, 1991, Protein Eng. 4 (7) : 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi等, 1993, J Cell Biophys. 1993, 22 (1-3) : 129-46; Modjtahedi等, 1993, Br J Cancer. 1993, 67 (2) : 247-53; Modjtahedi等, 1996, Br J Cancer, 73 (2) : 228-35; Modjtahedi等, 2003, Int J Cancer, 105 (2) : 273-80); TheraCIM hr3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba (美国专利No.5,891,996; 美国专利No.6,506,883; Mateo等, 1997, Immunotechnology, 3 (1) : 71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth等2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100 (2) : 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); 和SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138)。在另一个优选的实施方案中,本发明的Fc多肽可用于alemtuzumab (**Campath®**, Millenium), 一种目前批准用于治疗B细胞慢性淋巴细胞白血病的人源化单克隆抗体。本发明的Fc多肽可用于基本上类似于其他临床产品和候选物的多种抗体或Fc融合物,包括但不限于muromonab-CD3 (Orthoclone **OKT3®**), 一种由Ortho Biotech/Johnson&Johnson开发的抗CD3抗体, ibritumomab tiuxetan (**Zevalin®**), 一种由IDEC/Schering AG开发的抗CD20抗体, gemtuzumab ozogamicin (**Mylotarg®**), 一种由Celltech/Wyeth开发的抗CD33 (p67蛋白) 抗体, abciximab

(**ReoPro®**),由Centocor/Lilly开发,basiliximab(**Simulect®**),由Novartis开发,palivizumab(**Synagis®**),由MedImmune开发,英夫利昔单抗(infliximab) (**Remicade®**),一种由Centocor开发的抗TNFalpha抗体,adalimumab(**Humira®**),一种由Abbott开发的抗TNFalpha抗体,Humicade™,一种由Celltech开发的抗TNFalpha抗体,ABX-CBL,一种目前由Abgenix开发的抗CD147抗体,ABX-IL8,一种目前由Abgenix开发的抗IL8抗体,ABX-MA1,一种目前由Abgenix开发的抗MUC18抗体,Pemtumomab (R1549,90Y-muHMF G1),一种正由Antisoma开发的抗MUC1,Therex (R1550),一种目前由Antisoma开发的抗MUC1抗体,AngioMab (AS1405),目前由Antisoma开发,HuBC-1,目前由Antisoma开发,Thioplantin (AS1407),目前由Antisoma开发,**Antegren®** (natalizumab),一种目前由Biogen开发的抗alpha-4-beta-1 (VLA-4)和alpha-4-beta-7抗体,VLA-1mAb,一种目前由Biogen开发的抗VLA-1整联蛋白抗体,LTBR mAb,一种目前由Biogen开发的抗淋巴毒素beta受体 (LTBR) 抗体,CAT-152,一种目前由Cambridge Antibody Technology开发的抗TGF-β2抗体,J695,一种目前由Cambridge Antibody Technology和Abbott开发的抗IL-12抗体,CAT-192,一种目前由Cambridge Antibody Technology和Genzyme开发的抗TGFβ1抗体,CAT-213,一种目前由Cambridge Antibody Technology开发的抗Eotaxin1抗体,LymphoStat-B™,一种目前由Cambridge Antibody Technology和Human Genome Sciences Inc.开发的抗Blys抗体,TRAIL-R1 mAb,一种目前由Cambridge Antibody Technology和Human Genome Sciences, Inc.开发的抗TRAIL-R1抗体,Avastin™ (bevacizumab,rhuMAb-VEGF),一种目前由Genentech开发的抗VEGF抗体,目前由Genentech开发的抗HER受体家族抗体,抗组织因子(ATF),一种目前由Genentech开发的一种抗组织因子抗体,Xolair™ (Omalizumab),一种目前由Genentech开发的抗IgE抗体,Raptiva™ (Efalizumab),一种目前由Genentech和Xoma开发的抗CD11a抗体,MLN-02抗体(前称LDP-02),目前由Genentech和Millenium Pharmaceuticals开发,HuMax CD4,一种目前由Genmab开发的抗CD4抗体,HuMax-IL15,一种目前由Genmab和Amgen开发的抗IL15抗体,HuMax-Inflam,目前由Genmab和Medarex开发,HuMax-Cancer,一种目前由Genmab和Medarex和Oxford GcoSciences开发的抗类肝素酶I抗体,HuMax-Lymphoma,目前由Genmab和Amgen开发,HuMax-TAC,目前由Genmab开发,IDEC-131,一种目前由IDEC Pharmaceuticals开发的抗CD40L抗体,IDEC-151 (Clenoliximab),一种目前由IDEC Pharmaceuticals开发的抗CD4抗体,IDEC-114,一种目前由IDEC Pharmaceuticals开发的抗CD80抗体,IDEC-152,一种目前由IDEC Pharmaceuticals开发的抗CD23,目前由IDEC Pharmaceuticals开发的抗巨噬细胞迁移因子(MIF)抗体,BEC2,一种目前由Imclone开发的抗个体基因型抗体,IMC-1C11,一种目前由Imclone开发的抗KDR抗体,DC101,一种目前由Imclone开发的抗flk-1抗体,目前由Imclone开发的抗VE钙粘蛋白抗体,CEA-Cide™ (labetuzumab),一种目前由Immunomedics开发的抗癌胚抗原(CEA)抗体,LymphoCide™ (Epratuzumab),一种目前由Immunomedics开发的抗CD22抗体,AFP-Cide,目前由Immunomedics开发,MyelomaCide,目前由Immunomedics开发,LkoCide,目前由Immunomedics开发,ProstaCide,目前由Immunomedics开发,MDX-010,一种目前由Medarex开发的抗CTLA4抗体,MDX-060,一种目前由Medarex开发的抗CD30抗体,目前由Medarex开发的MDX-070,目前由Medarex开发的MDX-018,Osidem™ (IDM-1),一种目前由Medarex和

Immuno-Designed Molecules开发的抗Her2抗体,HuMaxTM-CD4,一种目前由Medarex和Genmab开发的抗CD4抗体,HuMax-IL15,一种目前由Medarex和Genmab开发的抗IL15抗体,CNT0 148,一种目前由Medarex和Centocor/J&J开发的抗TNF α 抗体,CNT0 1275,一种目前由Centocor/J&J开发的抗细胞因子抗体,MOR101和MOR102,一种目前由MorphoSys开发的抗细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) (CD54) 抗体,MOR201,一种目前由MorphoSys开发的抗成纤维细胞生长因子受体3 (FGFR-3) 抗体,**Nuvion**[®] (visilizumab),一种目前由Protein Design Labs开发的抗CD3抗体,HuZAFTM,一种目前由Protein Design Labs开发的抗gamma干扰素抗体,抗 α 5 β 1整联蛋白,目前由Protein Design Labs开发,抗IL-12,目前由Protein Design Labs开发,ING-1,一种目前由Xoma开发的抗Ep-CAM抗体,以及MLN01,一种目前由Xoma开发的抗Beta2整联蛋白抗体,本段中的所有上文引用的参考内容均通过提述明确并入本文。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的变体用于治疗自身免疫、炎性或移植适应证。与这类疾病相关的靶抗原和临床产品和候选物包括但不限于,抗 α 4 β 7整联蛋白抗体如LDP-02、抗beta2整联蛋白抗体如LDP-01、抗补体 (C5) 抗体如5G1.1、抗CD2抗体如BTI-322、MEDI-507、抗CD3抗体如OKT3、SMART抗CD3、抗CD4抗体如IDEC-151、MDX-CD4、OKT4A、抗CD11a抗体、抗CD14抗体如IC14、抗CD18抗体、抗CD23抗体如IDEC 152、抗CD25抗体如Zenapax、抗CD40L抗体如5c8、Antova、IDEC-131、抗CD64抗体如MDX-33、抗CD80抗体如IDEC-114、抗CD147抗体如ABX-CBL、抗E-选择蛋白抗体如CDP850、抗gpIIb/IIIa抗体如ReoPro/Abcixima、抗ICAM-3抗体如ICM3、抗ICE抗体如VX-740、抗FcR1抗体如MDX-33、抗IgE抗体如rhuMab-E25、抗IL-4抗体如SB-240683、抗IL-5抗体如SB-240563、SCH55700、抗IL-8抗体如ABX-IL8、抗干扰素gamma抗体、抗TNF (TNF、TNF α 、TNF α 、TNF- α lpha) 抗体如CDP571、CDP870、D2E7、英夫利昔单抗、MAK-195F、和抗VLA-4抗体如Antegren。

[0110] 可工程化为掺入本公开的变体Fc区的例示性抗体在下表2中列出:

[0111]

表2			
抗体靶物和名称	链	序列标识符	序列
抗CD40 (S2C6)	VL	SEQ ID NO:3	DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQS LVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPKLLIYT VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDLGVYFCSQTHVPWTFGGGTKL EIQ
	VH	SEQ ID NO:4	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGY SFTGYYIHMVKQSKGHSLEWIGRVIPN NGGTSYNQKFKGKAILTVDKSSSTAY MELRSLTSEDSAVYYCAREGIYWWGH GTTTLTVSS
抗CD20 (利妥 昔单抗)	VL	SEQ ID NO:5	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSS VSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLAS GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA TYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
	VH	SEQ ID NO:6	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASG YTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIY PGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGG DWYFNVWGAGTTVTVSA
抗CD25 (达克 珠单抗 (daclizumab))	VL	SEQ ID NO:7	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCSASSSI SYMHWYQQKPGKAPKLLIYTTSNLAS GVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFA TYYCHQRSTYPLTFGQGTKVEVK
	VH	SEQ ID NO:8	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG

表2			
抗体靶物和名称	链	序列标识符	序列
			YTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYIN PSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA YMELSSLRSED T AVYYCARGGGVFDY WGQGTLLTVSS
抗CD25 (basiliximab)	VL	SEQ ID NO:9	QIVLTQSPA I MSASPGEKVTMTCSASSS ISYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLA SGV P ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDA ATYYCHQRSSYTFGGGTKLEIK
	VH	SEQ ID NO:10	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASG YSFTRYWMHWIKRPGQGLEWIGAIY PGNSDTSYNQKFEGKAKLTAVTSASTA YMELSSLTHE S AVYYCSR D YGY F DF FWGQGTLLTVSS
抗TNF α (adalimumab)	VL	SEQ ID NO:11	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTITCRASQ <u>GIRNYLA</u> WYQQKPGKAPKLLIYAAS T LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK
	VH	SEQ ID NO:12	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS C AASGF TFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIT WNSGHIDYADSV E GRFTISRDN A KNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAK V SYLSTA SSLDYWGQGTLLTVSS
抗TNF α (英夫利昔单抗)	VL	SEQ ID NO:13	SIVMTQTPKFLV S AGD R VTITCTASQS VSNDV V WYQQKPGQSPKMLMYSAFN RYTGVPDRFTGRGYGTDFTFTISSVQA EDLAVYFCQQDYNSPRTFGGGTKLEIK R
	VH	SEQ ID NO:14	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGY TFTHYGMNWVKQAPGKGLKWMGWI NTYTGEPTYADDFKEHF A SLETSAST VFLQINN L KNEDTATYFCARERGDAM DYWGQGTSVTVSS
抗 IL-6R (tocilizumab)	VL	SEQ ID NO:15	DIQMTQSPSSLSASVGD R VTITCRASQD ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY T SR L H SGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIA TYYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIK
	VH	SEQ ID NO:16	QVQLQESGPG L VRPSQTL S LCTVSGY SITSDHAW S VRQPPGRGLEWIGYISY SGITTYNPSL K SRVTMLRDT S KNQFSL RLSSVTAADTAVYCARSLARTTAM D Y WGQGS L TVSS
抗 IL-1 (canakinumab)	VL	SEQ ID NO:17	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSI GSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFS GVPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAA AAYCHQSSSLPFTFGPGTK
	VH	SEQ ID NO:18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS C AASG FTFSVYGMNWVRQAPGKGLEWVAIIW

[0112]

表2			
抗体靶物和名称	链	序列标识符	序列
			YDGDNQYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGP FDYWGQGLVT
[0113] 抗 BAFF (belimumab)	VL	SEQ ID NO:19	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSL RSYYASWYQQKPGQAPVLYIYGKNNR PSGIPDRFSGSSGNRPSGIPNRFSGSSG NASLTITGAQAEDAADYYCSSRDSSGN HWVFGGGTELTVLG
	VH	SEQ ID NO:20	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSKASG GTFNINNAINWVRQAPGQGLEWMGGII PMFGTAKYSENFQGRVAITADESTGTA SMELSSLRSEDTAVYYCARSRDLLLFP HHALSPWGRGTMVTVSS

[0114] 本部分中描述的几种抗体已进行突变分析以改进其生物学特性。这类具有期望特性的突变体抗体可经修饰以掺入本公开的变体CH2域和Fc区。例如,US 2010/0266613 A1披露了抗TNF α 抗体adalimumab的变体V_L和V_H序列。本公开的变体CH2域和Fc区可掺入到通过提述完整并入本文的US 2010/0266613 A1中披露的任意一种变体抗TNF α 抗体中。在一些实施方案中,所述变体抗TNF α 抗体包含US 2010/0266613的表5中的一种或多种取代,即V_L链中的A25W, Q27R, Q27T, I29V, R30Q和L33E。在其他实施方案中,所述变体抗TNF α 抗体包含US 2010/0266613的表10的取代组合,即V_L链中的I29T/A34G, N31T/A34G, R30Q/A34S, R30Q, Q27G/A34G, Q27H/A34S, Q27R/A34S, G28S/A34S, N31T/A34S或N31S/A34S, 最优选G28S/A34S。跨越A25至A34的氨基酸区段在上表2中为粗体划线。

[0115] 在一些实施方案中,使用针对感染性疾病的抗体。针对真核细胞的抗体包括靶向酵母细胞,包括但不限于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉森酵母(*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)和乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、*Pichia guillermondii*和巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)、粟酒裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)、*plasmodium falciparium*、和解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)的抗体。

[0116] 针对别的真菌细胞,包括与念珠菌菌株(包括光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、克鲁斯念珠菌(*C.krusei*)、葡萄牙假丝酵母(*C.lusitaniae*)和麦芽糖假丝酵母(*C.maltosa*))以及曲霉属(*Aspergillus*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、组织胞浆菌(*Histoplasma*)、球孢子菌属(*Coccidioides*)、子囊酵母菌(*Blastomyces*)和青霉属(*Penicillium*)等的物种有关的靶抗原的抗体也是有用的。

[0117] 针对与原生动物有关的靶抗原的恶抗体包括但不限于,与锥体虫属(*Trypanosoma*)、包括杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)在内的利什曼原虫属(*Leishmania*);疟原虫物种(*Plasmodium spp.*),卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*),小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*),兰伯氏贾第虫(*Giardia lamblia*),痢疾变形虫(*Entamoeba histolytica*)和*Cyclospora cayetanensi*有关的抗体。

[0118] 针对原核抗原的抗体也是可用的,包括针对适宜的细菌如病原性和非病原性原核

生物的抗体,所述适宜的细菌包括但不限于芽孢杆菌 (*Bacillus*),包括炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*);弧菌,例如霍乱弧菌 (*V.cholerae*);埃希氏菌属 (*Escherichia*),例如产肠毒素大肠杆菌;志贺氏菌属 (*Shigella*),例如痢疾志贺氏菌 (*S.dysenteriae*);沙门氏菌属 (*Salmonella*),例如伤寒沙门氏菌 (*S.typhi*);分枝杆菌 (*Mycobacterium*) 例如结核分枝杆菌 (*M.tuberculosis*)、麻风分枝杆菌 (*M.leprae*);梭菌 (*Clostridium*),例如肉毒梭菌、破伤风梭菌 (*C.tetani*)、艰难梭菌 (*C.difficile*)、产气荚膜梭菌;棒状杆菌 (*Corynebacterium*),例如白喉棒状杆菌 (*C.diphtheriae*);链球菌属 (*Streptococcus*),酿脓链球菌 (*S.pyogenes*)、肺炎链球菌 (*S.pneumoniae*);葡萄球菌属 (*Staphylococcus*),例如金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*);嗜血杆菌属 (*Haemophilus*),例如流感嗜血杆菌 (*H.influenzae*);奈瑟氏菌属 (*Neisseria*),例如脑膜炎奈瑟氏菌 (*N.meningitides*)、淋病奈瑟氏菌 (*N.gonorrhoeae*);耶尔森氏菌属 (*Yersinia*),例如 *Y.lambliia*、鼠疫耶尔森氏菌 (*Y.pestis*);假单胞菌属 (*Pseudomonas*),例如铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*)、恶臭假单胞菌 (*P.putida*);衣原体,例如沙眼衣原体 (*C.trachomatis*);博德特氏菌属 (*Bordetella*),例如百日咳博德特氏菌 (*B.pertussis*);密螺旋体属 (*Treponema*),例如梅毒密螺旋体 (*T.palladium*);炭疽芽孢杆菌 (*B.anthraxis*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Y.pestis*)、布鲁氏菌属菌种 (*Brucella spp.*)、土拉热弗朗西斯菌 (*F.tularensis*)、鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*B.mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*B.pseudomallei*)、鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*B.mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌 (*B.pseudomallei*)、肉毒梭菌 (*C.botulinum*)、沙门氏菌属菌种、SEB 霍乱弧菌毒素B、大肠杆菌O157:H7、利斯特氏菌属菌种 (*Listeria spp.*)、白吉利毛孢子菌 (*Trichosporon beigeli*)、红酵母属物种 (*Rhodotorula species*)、异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*)、肠杆菌属菌种 (*Enterobacter sp.*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 菌种、利斯特氏菌属菌种、支原体菌种等。

[0119] 在一些方面,所述抗体针对病毒感染;这些病毒包括但不限于,包括正粘病毒,(例如流感病毒),副粘病毒(例如呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒),腺病毒,鼻病毒,冠状病毒,呼吸道肠道病毒(reovirus),外衣病毒(togavirus)(例如风疹病毒),细小病毒,痘病毒(例如天花病毒、牛痘病毒),肠道病毒(例如脊髓灰质炎病毒,柯萨奇病毒(coxsackievirus)),肝炎病毒(包括A、B和C),疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹(varicella-zoster)病毒、巨细胞病毒、Epstein-Barr病毒),轮状病毒,Norwalk病毒,汉坦病毒(hantavirus),沙粒病毒,棒状病毒(例如狂犬病病毒),逆转录病毒(包括HIV、HTLV-I和-II),乳头状多瘤空泡病毒(例如乳头状瘤病毒),多瘤病毒和小RNA病毒等。

[0120] 6.3 Fc融合蛋白

[0121] 在一个实施方案中,本发明的多肽是Fc融合蛋白。基于Fc的融合蛋白通常由直接连接于其他肽的免疫球蛋白Fc域组成。如Czajkowsky等,2012,EMBO Mol Med 4:1015-1028解释的,融合配偶提可以是任何其他感兴趣的蛋白质性分子,如在与细胞表面受体相互作用时活化的配体,针对激发性病原体的肽抗原(Ag)或鉴定在蛋白质微芯片中装配的结合伴侣的“诱饵”蛋白。最经常地,Fc域融合于具有治疗潜力的多肽以赋予融合物许多另外的有益生物学和药理学特性。Fc域的存在可以显著地延长蛋白质的血浆半衰期,由于其与救助新生儿Fc受体的相互作用(FcRn;Roopenian&Akilesh,2007,Nat Rev Immunol 7:715-725)以及对较大大分子的更慢的肾清除(Kontermann,2011,Curr Opin Biotechnol 22:868-

876),这延长其治疗活性。附接的Fc域还使得这些分子能与见于免疫细胞上的Fc受体(FcR)相互作用(Nimmerjahn&Ravetch,2008,Nat Rev Immunol 8:34-47)。

[0122] 因此,Fc融合物将抗体的Fc区,如此将其有利的效应功能和药动学,与受体、配体或一些其他蛋白质或蛋白质于的靶物结合区组合。后者的作用是介导靶物识别,且如此其功能类似于抗体可变区。由于Fc融合物与抗体的结构和功能上的重叠,因此除非另外指示本公开中对抗体的论述扩展到Fc融合物上。

[0123] 在例示性实施方案中,Fc融合伴侣是TNF受体II的胞外域(“ECD”);淋巴细胞功能有关抗原3(LFA-3)的第一ECD;人细胞毒性T淋巴细胞有关分子4(CTLA-4)的ECD;融合于IL-1RI ECD的N末端的IL-1R辅助蛋白配体结合区的C末端;肽血小板生成素(TPO)模拟物;具有两个氨基酸取代L104E和A29Y的CTLA-4的ECD;或VEGF受体1和2的ECD。

[0124] 包含本文中描述的变体Fc域的本公开的Fc融合蛋白可基于已知的“亲本”Fc融合物,如表3中的批准的生物制剂。

[0125]

表3			
国际通用(商 标)名	描述	作用模式	首次美国批 准的年份和 适应证
Etanercept (Enbrel®)	融合于人 IgG1 Fc的肿瘤坏死因 子(TNF)受体II的 75 kDa可溶性胞 外域(ECD)	结合TNF的膜结合和 可溶性形式, 由此降 低炎性细胞因子的浓 度	1998 类风湿性关 节炎
Alefacept (Amevive®)	融合于人 IgG1 Fc的淋巴细胞功 能有关抗原 3 (LFA-3) 的第一 ECD	结合CD2; 阻断APC 上的LFA与T细胞上 的CD2之间的相互作 用, 由此抑制T细胞活 化	2003 斑块状银屑 病
Abatacept (Orencia®)	融合于人 IgG1 Fc的人细胞毒性 T淋巴细胞有关 分子4 (CTLA-4) 的ECD	阻断 APC 上的 CD80 或CD86与T细胞上的 CD28之间的相互作 用, 由此抑制T细胞活 化	2005 类风湿性关 节炎
Rilonacept (Arcalyst®)	两条链, 各包含 IL-1R 辅助蛋白 配体结合区的C 末端融合于 IL-1RI ECD的N 末端, 融合于人 IgG1 Fc	结合IL-1, 由此阻止 与内源性细胞表面受 体的相互作用	2008 斑块状银屑 病
Romiplostim (Nplate®)	融合于无糖基化 人IgG1 Fc的C末 端的肽血小板生 成素(TPO)模拟 物; 在大肠杆菌 中产生	结合并使TPO受体激 动(agonize); 由于缺 少糖基化Fc功能最小 化	2008 血小板减少

表3			
国际通用(商 标)名	描述	作用模式	首次美国批 准的年份和 适应证
[0126] Belatacept (Nulojix®)	融合于人 IgG1 Fc 的 CTLA-4 的 ECD , 与 abatacept 差别是 CTLA-4 区中的 两个氨基酸取代 (L104E, A29Y)	阻断 APC 上的 CD80 或 CD86 与 T 细胞上的 CD28 之间的相互作用, 由此抑制 T 细胞活 化	2011 预防成人肾 移植接受者 中的器官排 斥
Aflibercept (Eylea™)	融合于人 IgG1 Fc 的 VEGF 受体 1 和 2 的 ECD	结合所有形式的 VEGF-A 以及胎生 生长因子, 由此抑制血 管发生	2011 湿性年龄相 关的黄斑变 性

[0127] 在一些实施方案中,除了如本文中公开的对Fc域的修饰以外,亲本Fc融合物和本公开的Fc融合物可共享相似或相同的序列。

[0128] Fc融合蛋白还可以含有仅变体CH2域而不是全部的Fc区。含有变体CH2域的融合蛋白可用作例如二聚化域和/或指导融合多肽至FC γ RIIB。在一个实施方案中,融合伴侣是另一种Fc域如IgE Fc域,从而创建“串联”Fc多肽。显示IgG-IgE融合多肽结合Fc ϵ R和Fc γ RIIB并关闭肥大细胞脱粒。见Cermerski等,2012,Immunol.Lett.143:34-43。

[0129] 6.4核酸和表达系统

[0130] 本公开涵盖编码本公开的Fc变体多肽的核酸分子和宿主细胞。

[0131] 本公开的变体多肽可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。例如,为了重组表达抗体,将宿主细胞用携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的DNA片段的一种或多种重组表达载体转染,从而使得轻链和重链在宿主细胞中表达和任性地分泌到培养宿主细胞的培养基中,可从该培养基回收所述抗体。标准的重组DNA方法学被用来获得抗体重链和轻链基因,将这些基因掺入重组表达载体和将载体引入宿主细胞,如记载于Molecular Cloning;A Laboratory Manual,Second Edition(Sambrook,Fritsch和Maniatis(eds),Cold Spring Harbor,N.Y.,1989),Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel,F.M.等,编,Green Publishing Associates,1989)和美国专利No.4,816,397的那些。

[0132] 在一个实施方案中,Fc变体多肽类似于其野生型等同物,只不过在其Fc域中改变。为了生成编码这类Fc变体多肽的核酸,可以合成编码野生型抗体的Fc域(称为“野生型Fc域”)或Fc域部分的DNA片段并作用模板以使用常规诱变技术诱变生成如本文中描述的多肽;或者,可直接合成编码该多肽的DNA片段。

[0133] 一旦获得编码野生型Fc域的DNA片段,就可通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,例如将恒定区基因转化为全长抗体链基因。在这些操作中,编码CH的DNA片段可操作地连接于编码另一种蛋白质如抗体恒定区或柔性接头的另一种DNA片段。术语“可操作地

连接”如此背景中使用的意图指两个DNA片段连接为使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持符合阅读框。

[0134] 为了表达本公开的Fc变体多肽,将如上文所述获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体中,使得基因可操作地连接于转录和翻译调控序列。在该背景中,术语“可操作地连接”意图指多肽基因以如下方式连接到载体中,使得载体中的转录和翻译调控序列发挥其意图的功能,即调控该多肽基因的转录和翻译。表达载体和表达调控序列选择为与使用的表达宿主细胞相容。变体抗体轻链基因和抗体重链基因可插入分别的载体中,或更典型地,两种基因均插入同一表达载体中。

[0135] 通过标准方法将多肽基因插入表达载体中(例如多肽基因片段和载体上互补限制位点的连接,或如果不存在限制位点为平端连接)。在插入变体Fc域序列之前,表达载体可以已经携带抗体可变区序列。另外/或者,重组表达载体可编码信号肽,其促进抗体链从宿主细胞的分泌。抗体链基因可以克隆到载体中,使得信号肽符合阅读框地连接于抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白蛋白的信号肽)。

[0136] 除了抗体链基因以外,本公开的重组表达载体携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调控序列。术语“调控序列”意图包括启动子、增强子和其他控制抗体链基因的转录和翻译的表达调控元件(例如聚腺苷酸化信号)。这类调控序列记载于例如Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990) 中。本领域技术人员将领会表达载体的设计(包括调控序列的选择)可能依赖于这类因素如要转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等。适用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括指导蛋白质在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件,如源自巨细胞病毒(CMV)的启动子和/或增强子(如CMV启动子/增强子)、猿病毒40(SV40)(如SV40启动子/增强子)、腺病毒(例如腺病毒主要后期启动子(AdMLP))和多瘤病毒。对于病毒调控元件及其序列的进一步描述,见例如Stinski的美国专利No. 5,168,062, Bell等的美国专利No. 4,510,245和Schaffner等的美国专利No. 4,968,615。

[0137] 除了抗体链基因和调控序列以外,本公开的重组表达载体可携带别的序列,如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)和可选择标志基因。可选择标志基因协助对其中引入载体的宿主细胞的选择(见例如美国专利Nos. 4,399,216, 4,634,665和5,179,017,均为Axel等人的)。例如,通常可选择标志基因赋予其中已引入载体的宿主细胞对药物如G418、嘌呤霉素、杀稻瘟素、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。适合的可选择标志基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于具有甲氨蝶呤选择/扩增的DHFR-宿主细胞)和neo基因(用于G418选择)。为了表达轻链和重链,将编码重链和轻链的一种或多种表达载体通过标准技术转染到宿主细胞中。术语“转染”的多种形式意图涵盖常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞中的很多种技术,例如电穿孔、脂质转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。

[0138] 可以在原核或真核宿主细胞中表达本公开的多肽。在某些实施方案中,多肽的表达在真核细胞,例如哺乳动物宿主细胞中进行,用于适宜折叠且免疫学活性的多肽的最优分泌。例示性的用于表达本公开的重组多肽的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括DHFR⁻CHO细胞,记载于Urlaub和Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220, 与DHFR可选择标志一起使用,例如如记载于Kaufman和Sharp, 1982,

Mol. Biol. 159:601-621)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞、293细胞和SP2/0细胞。当将编码多肽基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,通过培养宿主细胞达足以允许该多肽在宿主细胞中表达或该多肽分泌到生长宿主细胞的培养基中的一段时间来产生该多肽。可使用标准蛋白纯化方法从培养基回收抗体。宿主细胞也可以用于产生完整多肽的部分,如Fab片段或scFv分子。理解对上述规程的变化在本公开的范围內。

[0139] 重组DNA技术还可以用于除去编码轻链和重链任一或两者、对于结合抗原不是必要的一些或所有DNA。从这类截短的DNA分子表达的分子也涵盖在本公开的多肽中。

[0140] 在一些实施方案中,本公开的多肽可以是双功能抗体。这类抗体其中一条重链和一条轻链特异于一种抗原,而其他重链和轻链特异于第二抗原,该抗体可通过标准的化学交联方法将本公开的抗体交联至第二抗体来产生。双功能抗体也可通过表达工程化为编码双功能抗体的核酸来制备。

[0141] 在某些实施方案中,双重特异性抗体,即使用相同结合位点结合一种抗原和第二种不相关抗原的抗体,可通过突变轻链和/或重链CDR中的氨基酸残基来产生。例示性第二抗原包括促炎性细胞因子(如例如淋巴毒素、干扰素 γ 或白介素-1)。双重特异性抗体可通过突变抗原结合位点周围的氨基酸残基来产生(参见例如Bostrom等,2009,Science 323:1610-1614)。双功能抗体可通过表达工程化为编码双重特异性抗体的核酸来制备。

[0142] 本公开的多肽还可通过化学合成产生(例如通过Solid Phase Peptide Synthesis,2nd ed.,1984The Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.中描述的方法)。还可以使用无细胞平台来生成多肽(参见例如Chu等,Biochemia No.2,2001(Roche Molecular Biologicals))。

[0143] 用于重组表达Fc融合蛋白的方法记载于Flanagan等,Methods in Molecular Biology,vol.378:Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols。

[0144] 一旦已通过重组表达产生本公开的多肽,可通过本领域中已知用于纯化免疫球蛋白分子的任意方法来对其纯化,例如通过层析(例如离子交换,亲和层析,特别是通过在蛋白A或蛋白G选择后对抗原的亲合力,和大小分级柱层析)、离心、差异溶解度、或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。另外,本公开的多肽或其片段可融合至本文中描述的或其他本文中另外已知的异源多肽序列以协助纯化。

[0145] 一旦分离,在期望时可进一步纯化多肽,例如通过高效液相色谱(参见例如Fisher,Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology(Work和Burdon,编,Elsevier,1980)),或通过在SuperdexTM 75柱上的凝胶过滤层析(Pharmacia Biotech AB,Uppsala,Sweden)。

[0146] 6.5 Fc变体多肽的生物学活性

[0147] 由于在影响对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIB结合的Fc区中掺入氨基酸取代,本公开的多肽展现出经修饰的生物学活性,例如经修饰的效应功能和/或对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIB的结合。

[0148] 在一个实施方案中,所述效应功能是ADCC。因此,本公开提供变体Fc多肽,其特征为展现出与非变体Fc多肽,即除了增加对Fc γ RIIB的结合和/或降低对Fc γ RIIIA的结合的一个或多个取代以外其他都相同的多肽相比,降低至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%或甚至更多的ADCC,所述取代为例如V263L,V266L,V273C,V273E,

V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K和V305W中的一个或多个取代。

[0149] 在某些实施方案中,在体外测定法中测量ADCC中的降低,多肽浓度为1 μ g/mL或2 μ g/mL或更多(例如3 μ g/mL、4 μ g/mL或5 μ g/mL),使用例如25:1、40:1、50:1或60:1的效应对靶细胞比,例如当使用来自3位或更多、6位或更多、10位或更多、或50位或更多位健康供体的PBMC效应细胞时。可通过流式细胞术测量ADCC活性,如实施例9中描述的,或通过测量⁵¹Cr释放,如实施例10中描述的。ADCC测定法中利用的靶细胞将取决于变体多肽的结合特异性,且可由本领域技术人员容易地确定。例如,如实施例9中描述的,Raji细胞是适用于测定抗体Hu1D10(及其Fc变体)的ADCC活性的靶细胞,且如实施例10中描述的,淋巴瘤RL细胞是适用于测定抗CD40抗体(及其Fc变体)的ADCC活性的靶细胞。

[0150] 在另一个实施方案中,效应功能是通过交联Fc多肽对靶细胞的免疫活化。例如在一个测定法中,靶细胞是树突细胞而交联Fc多肽是抗CD40抗体。典型地,Fc区对Fc γ RIIB的结合经由受体的ITAM基序提供对Fc γ RIIB阳性细胞的负向信号。然而,抗CD40抗体的Fc区对树突细胞表面上Fc γ RIIB的结合改进CD40的交联,导致树突细胞的增加的IL-12产生。因此,增加对Fc γ RIIB的亲合力导致更高的IL-12分泌。因此,本公开提供变体Fc多肽,其Fc区在嫁接到CD40抗体上时增加树突细胞中的IL-12分泌。在多个实施方案中,与非变体抗CD40抗体,即除了增加对Fc γ RIIB的结合和任选地还降低对Fc γ RIIA的结合的一个或多个取代以外其他都相同的抗CD40抗体相比,所述Fc区能将树突细胞活化至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%或甚至更多,所述取代为例如V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K和V305W的一个或多个取代。

[0151] 在某些实施方案中,在IL-12p70分泌测定法中测量树突细胞的免疫活化。简言之,可用本公开的多肽刺激单核细胞来源的未成熟树突细胞("moDC")和用IFN γ 引发,并例如通过ELISA测定产生的所得IL-12p70的量。在一个例示性实施方案中,如下文实施例11中描述的实施例IL-12p70分泌测定法。

[0152] 在其他实施方案中,本公开的变体多肽展现对Fc γ RIIB的增加结合和/或对Fc γ RIIA的降低结合。例示性结合测定法在实施例7和8中描述。在某些实施方案中,变体多肽与Fc γ RIIB的结合比非变体Fc多肽,即除了V263L, V266L, V273C, V273E, V273F, V273L, V273M, V273S, V273Y, V305K和V305W的一个或多个取代以外其他都相同的多肽对Fc γ RIIB的结合大至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%或至少约50%。在别的实施方案中,变体多肽对Fc γ RIIA的结合比非变体Fc多肽,即除了V263L、V266L、V273C、V273E、V273F、V273L、V273M、V273S、V273Y、V305K和V305W的一个或多个取代以外其他都相同的多肽对Fc γ RIIA的结合小至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%或至少约50%。

[0153] 6.6多肽缀合物

[0154] 本公开的多肽包括修饰的多肽缀合物,例如通过将任意类型的分子共价附接于多肽从而使得共价附接不干扰对抗原的结合。

[0155] 在某些方面,本公开的多肽可以缀合于效应模块或标记物。术语“效应模块”如本文使用的包括,例如抗肿瘤剂(antineoplastic agent)、药物、毒素、生物活性蛋白质例如酶、抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸(例如DNA和RNA)、放射性核素(特别是放射性碘化物、放射性同位素)、螯合金属、纳米颗粒和报道基团如荧光化合物或可通过NMR

或ESR光谱检测的化合物。

[0156] 在一个例子中,多肽可以缀合于效应模块,如细胞毒剂、放射性核素或药物模块,以修改给定的生物学应答。效应模块可以是蛋白质或多肽,如例如且不限于,毒素(如相思豆毒素、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素)、信号传导分子(如 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板来源的生长因子或组织血纤维蛋白溶酶原活化剂)、血栓形成剂或抗血管生成剂(例如血管他丁(angiostatin)或内皮他丁(endostatin))或生物学应答修饰物如细胞因子或生长因子(例如白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、或神经生长因子(NGF))。

[0157] 在另一个例子中,效应模块可以是细胞毒素或细胞毒剂。细胞毒素或细胞毒剂的例子包括紫杉醇(taxol)、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、tenoposide、长春新碱、长春碱、colchicin、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素、放射菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素类、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安(propranolol)和嘌呤霉素及其类似物或同源物。

[0158] 效应模块还包括但不限于,抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺(decarbazine)、烷化剂(例如双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、噻替派(thioepa)氯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲菌素(streptozotocin)、丝裂霉素C5和顺式-二氯二胺铂(cis-dichlorodiamine platinum)(II)(DDP)顺铂)、蒽环类抗生素(anthracyclines)(例如柔红霉素(之前称道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(dactinomycin)(之前的放线菌素)、博来霉素、光神霉素、氨苄霉素(anthracyclin)(AMC)、calicheamicin或多卡米星)、和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。

[0159] 其他效应模块可包括放射性核素如但不限于, ^{111}In 和 ^{90}Y 、 Lu^{177} 、铋 213 、镭 223 、铀 235 和钍 232 、和药物如但不限于,烷基胆碱磷酸、拓扑异构酶I抑制剂、紫杉烷和苏拉明(suramin)。

[0160] 用于缀合这类效应模块至多肽的技术是本领域中公知的(参见例如Hellstrom等,Controlled Drug Delivery,2nd Ed.,at pp.623-53(Robinson等,编,1987));Thorpe等,1982,Immunol.Rev.62:119-58和Dubowchik等,1999,Pharmacology and Therapeutics 83:67-123)。

[0161] 在一个例子中,所述多肽经由共价键(例如肽键),经由多肽的N末端或C末端或内部融合于另一蛋白质(或其部分,例如蛋白质的至少10、20或50个氨基酸部分)的氨基酸序列。所述多肽可在多肽Fc域的N末端连接于其他蛋白质。重组DNA规程可用于创建这类融合,例如如记载于WO 86/01533和EP0392745的。在另一个例子中,效应分子能增加体内半衰期,和/或增强多肽穿过上皮屏障到达免疫系统的投递。适宜的这类效应分子的例子包括聚合物、清蛋白、清蛋白结合蛋白或清蛋白结合化合物如WO 2005/117984中描述的那些。

[0162] 在某些方面,多肽缀合于小分子毒素。在某些例示性实施方案中,本公开的多肽缀合于多拉司他汀(dolastatin)或多拉司他汀肽类似物或衍生物,例如阿里他汀

(auristatin) (美国专利Nos.5,635,483和5,780,588)。多拉司他汀或阿里他汀药物模块可经由多肽的N(氨基)末端、C(羧基)末端或内部附接于多肽(WO 02/088172)。例示性阿里他汀实施方案包括N末端连接的单甲基阿里他汀(monomethylauristatin)药物模块DE和DF,如通过提述完整并入本文的美国专利No.7,498,298中披露的(披露了例如接头和制备缀合于接头的单甲基缬氨酸化合物如MMAE和MMAF的方法)。

[0163] 在其他例示性实施方案中,小分子毒素包括但不限于加利车霉素(calicheamicin)、美登素(maytansine) (美国专利No.5,208,020)、trichothene,和CC1065。在本公开的一个实施方案中,多肽缀合于一个或多个美登素分子(例如约1至约10个美登素分子每多肽分子)。美登素可以例如转化为May-SS-Me,其可以还原成May-SH3并与多肽反应(Chari等,1992,Cancer Research 52:127-131)以生成美登木素生物碱(maytansinoid)-多肽或美登木素生物碱-Fc融合缀合物。还可以使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^1 , γ_3^1 , γ_3^1 , N-乙酰- γ_1^1 , PSAG和 θ_1^1 , (Hinman等,1993,Cancer Research 53:3336-3342;Lode等,1998,Cancer Research 58:2925-2928;美国专利No.5,714,586;美国专利No.5,712,374;美国专利No.5,264,586;美国专利No.5,773,001)。

[0164] 本公开的多肽还可以缀合于脂质体用于靶向投递(参见例如Park等,1997,Adv.Pharmacol.40:399-435;Marty&Schwendener,2004,Methods in Molecular Medicine 109:389-401)。

[0165] 在一个例子中,本公开的多肽可附接于聚(乙二醇)(PEG)模块。在一个具体的例子中,多肽是抗体片段且PEG模块可经由位于抗体片段中的任何可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团,例如任何游离氨基、亚氨基、硫醇、羟基或羧基基团附接。这类氨基酸可天然存在于抗体片段中或者可使用重组DNA方法工程化到片段中。参见例如美国专利No.5,219,996。多为点可用于附接两个或更多个PEG分子。PEG模块可经由位于抗体片段中的至少一个半胱氨酸残基的巯基基团共价连接。当巯基基团被用作附接点时,可以使用适宜活化的效应模块(例如巯基选择性衍生物如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物)。

[0166] 词语“标记物”在用于本文时指可检测的化合物或组合物,其可直接或间接缀合于本公开的多肽。标记物本身可以是可检测的(例如放射性同位素标记物或荧光标记物)或者,在酶标记物的情况中,可以催化底物化合物或组合物的可检测的化学改变。可用的荧光模块包括但不限于,荧光素、荧光素硫氰酸酯、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯(naphthalenesulfonyl chloride)、藻红蛋白等。可用的酶标记物包括但不限于,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等。

[0167] 6.7 药物组合物和治疗方法

[0168] 由于其低ADCC活性,本公开的多肽尤其可用于免疫疾病和病症的背景中,包括其中不想要细胞杀伤的自身免疫疾病。这类疾病和病症的例子包括阿狄森氏病(Addison's disease)、耳的自身免疫疾病、眼的自身免疫疾病如葡萄膜炎、自身免疫性肝炎、克罗恩病(Crohn's disease)、糖尿病(I型)、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、Guillain-Barre综合征、桥本病(Hashimoto's disease)、溶血性贫血、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化症、重症肌无力、寻常型天疱疮(pemphigus vulgaris)、银屑病、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、银屑病、斯耶格伦氏综合征(Sjogren's syndrome)、脊椎关节病(spondyloarthropathies)、甲状腺炎、溃疡性结肠炎和/或血管炎。然而,本公开的多肽还

可以用于治疗其中期望细胞杀伤的适应证,例如肿瘤适应证,特别是当所述多肽能经由靶分子进行信号传导和/或当缀合于效应模块时。适合使用Fc变体多肽治疗的特定的一种或多种适应证将取决于Fc变体多肽的非Fc或部分的序列和/或特性,且可由本领域的普通技术人员容易地确定。例示性实施方案在下文列出。

[0169] 在一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗CD40抗体且用于治疗表达CD40的癌症,如慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、卵巢癌、乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌和肾癌。所述抗CD40抗体可以是多特异性抗体。

[0170] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗CD20抗体且用于治疗类风湿性关节炎或多发性硬化症。

[0171] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗CD25抗体且用于治疗多发性硬化症、银屑病、哮喘、葡萄膜炎、眼部炎症或人T细胞白血病病毒1有关的T细胞白血病或预防器官移植排斥。

[0172] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗TNF α 抗体且用于治疗类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎或斑块状银屑病。

[0173] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗IL-6受体抗体且用于治疗类风湿性关节炎卡斯尔曼氏病(Castleman's Disease)。

[0174] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗 α 4-整联蛋白抗体且用于治疗多发性硬化症。

[0175] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗IL-1抗体且用于治疗Cryopyrin相关的周期综合征("CAPS")。

[0176] 在另一个实施方案中,本公开的变体多肽是抗BAFF抗体且用于治疗系统性红斑狼疮或过敏。

[0177] 本公开提供在由此需要的患者中治疗任意前述疾病的方法,包括:对患者施用治疗有效剂量的本公开的适宜的多肽。

[0178] 如本文中使用的,多肽的“治疗有效的”量可作为单个剂量施用或在治疗方案的过程中,例如在1周、2周、3周、1个月、3个月、6个月、1年或更长的过程中施用。

[0179] 要施用的本公开多肽的剂量将随着具体的抗原特异性、自身免疫性或炎症疾病的类型、受试者、和疾病的性质和严重性、受试者的身体状况、治疗方案(例如是否使用组合治疗剂)、以及选择的施用路径而变化;适宜的剂量可由本领域技术人员容易地确定。

[0180] 对于人和动物中自身免疫或炎症疾病的治疗和/或预防,可以使用任何适宜的施用路径,如注射和其他本领域已知用于基于抗体的临床产品的施用路径,以治疗或预防有效的剂量(例如导致自身免疫或炎症疾病的抑制和/或自身免疫或炎症疾病症状的减轻的剂量)来对患者(例如人受试者)施用包含多肽的药物组合物。

[0181] 本领域技术人员将认可本公开多肽的各个剂量的最佳量和间隔将由所治疗的疾患的性质和程度,施用的形式、路径和部位,以及所治疗的具体受试者的年龄和状况来决定,而且医师将最终决定要使用的适宜剂量。该剂量可以如适宜地进行频繁重复。如果出现

副作用,可以根据正常临床实践改变或降低剂量的量和/或频率。

[0182] 依照本公开,疾病的治疗涵盖对已经诊断为患有处于任何临床阶段或表现的任何形式的疾病的患者的治疗;延迟疾病的症状或病征的发作或进化或加重或恶化;和/或预防和/或降低疾病的严重性。

[0183] 施用本公开的多肽的“受试者”或“患者”优选为哺乳动物如非灵长类(例如牛、猪、马、猫、犬、大鼠等)或灵长类(例如猴或人)。在某些实施方案中,受试者或患者是人。在某些方面,所述人是小儿患者。在其他方面,所述人是成年患者。

[0184] 本文中提供包含本公开的多肽的组合物。所述组合物将通常作为无菌、药物组合物的部分供应,该药物组合物将通常包含药学可接受的载体。该组合物可以为任何适宜的形式(根据将其施用给患者的期望的方法)。

[0185] 药物组合物可方便地以单位剂量形式呈现,其每剂含有预确定量的本公开的多肽。这类单位可含有例如但不限于5mg至5g,例如10mg至1g,或20至50mg,40mg至100mg,或50mg至300mg。用于本公开的药学可接受的载体可采用很多种形式,其根据例如要治疗的疾患或施用路径。

[0186] 本公开的多肽的治疗性制剂可配制用于以冻干的制剂或水溶液存储,其通过将具有期望的纯度程度的多肽与任选的本领域中通常采用的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(本文中均称为“载体”),即缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子型去污剂、抗氧化剂和其他混杂性添加剂混合。参见Remington's Pharmaceutical Sciences,16th edition (Osol, ed.1980)。这类添加剂必须是在采用的剂量和浓度处对接受者无毒性的。

[0187] 缓冲剂帮助将pH维持在接近生理学状况的范围内。它们可以以范围为约2mM至约50mM的浓度存在。适用于本公开的缓冲液包括有机和无机酸及其盐如柠檬酸盐缓冲液(例如柠檬酸单钠-柠檬酸双钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸单钠混合物等)、琥珀酸盐缓冲液(例如琥珀酸-琥珀酸单钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲液(例如酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、延胡索酸盐缓冲液(例如延胡索酸-延胡索酸单钠混合物、延胡索酸-延胡索酸二钠混合物、延胡索酸单钠-延胡索酸二钠混合物等)、葡糖酸盐缓冲液(例如葡糖酸-葡糖酸钠混合物、葡糖酸-氢氧化钠混合物、葡糖酸-葡糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲液(例如草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲液(例如乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和醋酸盐缓冲液(例如醋酸-醋酸钠混合物、醋酸-氢氧化钠混合物等)。另外,还可以使用磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐如Tris。

[0188] 可添加防腐剂以阻止微生物生长,且可以以范围从0.2%-1% (w/v) 的量添加。适用于本公开的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间-甲酚(m-cresol)、对羟基苯甲酸甲酯(methyl paraben)、对羟基苯甲酸丙酯(propyl paraben)、十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、benzalconium卤化物(例如氯化物、溴化物和碘化物)、氯己双铵(hexamethonium chloride)和烷基对羟基苯甲酸酯类如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。可添加等渗剂(有时称为“稳定剂”)以确保本公开的液体组合物的等渗性且包含多羟基糖醇,例如三羟基或更高级糖醇,如丙三醇、赤藻糖醇、阿拉伯糖醇(arabitol)、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇。稳定剂指广泛范围的赋形剂,其功能的范围可以

从膨胀剂到溶解治疗剂或帮助预防变性或对容器壁的粘附的添加剂。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇(上文枚举的);氨基酸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等,有机糖或糖醇,如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、核糖醇、肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、甘油等,包括环醇如肌醇(inositol);聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α -硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如10个残基或更少的肽);蛋白质如人血清清蛋白、牛血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮单糖,如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖如乳糖、麦芽糖、蔗糖和三糖如棉子糖;和多糖如葡聚糖。稳定剂可以以0.1至10,000重量每份重量活性蛋白质的范围存在。

[0189] 可以添加非离子型表面活性剂或去污剂(也称为“润湿剂”)来帮助治疗剂的溶解以及保护治疗性蛋白质免于搅动诱发的聚集,这还允许制剂暴露于受应力的剪切表面而不导致蛋白质的变性。适宜的非离子型表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、polyoxamers(184、188等)、pluronic多元醇、聚氧乙烯山梨聚糖单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)。非离子型表面活性剂可以约0.05mg/ml至约1.0mg/ml,例如约0.07mg/ml至约0.2mg/ml的范围存在。

[0190] 其他混杂性赋形剂包括膨胀剂(例如淀粉)、螯合剂(例如EDTA)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E)和共溶剂。适用于本公开的多肽的其他制剂在内容通过提述完整并入本文的美国专利申请No.2004/0033228A1中披露。

实施例

[0191] 实施例1:构建CH2逐点式(Point-by-point)(PxP)文库

[0192] 将Hu1D10,一种对HLA-DR的beta-链特异性的单克隆抗体(Shi等,2002,Leuk Lymphoma.43(6):1303-12),用作模型系统。通过商业基因合成供应商(DNA 2.0Inc.,Menlo Park,CA)构建Hu1D10的合成VL和VH域并克隆到载体pYA206中以创建pYA206-Hu1D10质粒。载体pYA206是埃巴病毒(Epstein-Barrvirus)衍生的附加体载体,其设计为在哺乳动物细胞表面上表达和展现抗体。

[0193] 使用NNK随机化办法,靶向恒定区重链域2(CH2)中的84个氨基酸位置进行诱变。使用NNK编码方案(其中N=A、C、G或T,且K=G或T),原因是1)仅需要32个密码子来编码所有20种天然存在的氨基酸,2)这32中包括仅单个终止密码子(TAG),和3)最大简并性(编码单个氨基酸的不同密码子数)为3,而非在完全64个密码子遗传密码中存在的最大6倍简并性。

[0194] 由合成基因的商业供应商(DNA 2.0, Menlo Park, CA)合成编码人Fc γ 同种型(Fc γ)的84种不同的DNA片段,每种在不同的CH2位置具有NNK简并性。将合成Fc γ 基因用SalI和NotI限制酶消化并亚克隆到质粒pYA206-hu1D10中。将连接物转化到大肠杆菌Top10细胞(Invitrogen, CA)中使得获得比子文库中的可能密码子的总数多至少10倍的大肠杆菌转化体。所得CH2文库由在84个不同位置的总共1680种不同密码子组成。

[0195] 实施例2:Fc γ RIIB结合测定

[0196] 实施荧光活化细胞分选(FACS)滴定来评估Fc γ RIIB对未经修饰的对照Fc γ 的结合。由于Fc γ RIIB和Fc γ 之间的低亲和力相互作用,将8:4:1复合物用于流式细胞术(图3):将5微克的Fc γ RIIB(R&D Systems, 1875-CD)与12.5 μ g的生物素化抗聚组氨酸(R&D

Systems, BAM050) 预温育, 然后添加至3.5 μ g的链霉亲合素-APC (Southern Biotech, cat# 7100-11L)。接着将该复合物系列稀释4倍并与山羊抗人kappa-PE (Southern Biotech, 2060-09) 组合。为了测定Fc γ R-复合物结合的EC₅₀, 将100 μ l的复合物以每种浓度添加至2x 10⁵个细胞并温育1hr。在FACS缓冲液中的3次清洗后, 通过流式细胞术在FACSCalibur (BD Biosciences) 中分析细胞。测定在双重阳性象限中的细胞百分比并相对于Fc γ RIIB浓度作图。测定EC₅₀为3.6 μ g/mL (图4A)。

[0197] 实施例3: Fc γ RIIIA结合测定

[0198] 实施FACS滴定来评估Fc γ RIIIA对Fc γ 的结合。由于Fc γ RIIIA和Fc γ 之间的低亲和力相互作用, 将2:1:1复合物用于流式细胞术 (图3)。将9微克的Fc γ RIIIA (R&D Systems, cat#4325-FC) 与15 μ g的生物素化抗聚组氨酸 (R&D Systems, BAM050) 预温育, 然后添加至15 μ g的链霉亲合素-APC (Southern Biotech, cat#7100-11L)。接着将该复合物系列稀释4倍并与山羊抗人kappa-PE (Southern Biotech, 2060-09) 组合。为了测定Fc γ R-复合物结合的EC₅₀, 将100 μ l的复合物以每种浓度添加至2x 10⁵个细胞并温育1hr。在FACS缓冲液中的3次清洗后, 通过流式细胞术在FACSCalibur (BD Biosciences) 中分析细胞。测定在双重阳性象限中的细胞百分比并相对于Fc γ RIIIA浓度作图。测定EC₅₀为0.17 μ g/mL (图2B)。

[0199] 实施例4: CH2文库的荧光活化细胞分选 (FACS)

[0200] 使用0.5 μ g文库质粒、100 μ g pACYC184载体质粒和250 μ l lipofectamine将CH2文库转染到293c18细胞中; 2天后使用0.8 μ g/ml嘌呤霉素选择, 并在FACS分选前再培养18天。

[0201] 将细胞与1:200PE标记的抗人Kappa-PE抗体 (Southern Biotech) 共染色, 通过滴定确定, Fc γ RIIIA-或Fc γ RIIB-复合物 (图3) 处于或低于50%最大结合。基于对Fc γ R的差异结合, 从3个群体 (高 (H)、中 (M) 和低 (L)) 分选出最少1x10⁵个细胞。代表性FACS分选结果显示于图5中。具有期望特性的变体富集于Fc γ RIIB结合中的H-设门中和Fc γ RIIIA结合中的L-设门中。

[0202] 实施例5: “表达的”和“分选的”群体的大规模并行测序

[0203] 如实施例4中描述的从分选的H、M和L细胞群体回收质粒, 并实施PCR扩增以制备适用于大规模并行测序的短扩增子。然后使用Genome Sequencer FLX如制造商指导的 (454Life Sciences, Branford, CT) 对扩增子测序。对于FACS分选的细胞的每种群体测定约800,000个单个序列。

[0204] 检查序列并将在“表达的”和“分选的”群体中发现的每个点突变的次数列表。初始鉴定每种氨基酸密码子并列表。对于具有超过一种密码子的氨基酸, 将每种氨基酸的不同密码子的出现加到一起以对每个子群体中该氨基酸变体的行为进行总体汇总。对于CH2文库的3路分选以评估对Fc γ RIIIA或Fc γ RIIB的结合, 对每种密码子变体分配富集比率 (ER) 得分。ER指示与变体总体频率相比, 在H群体中找到它较频繁或较不频繁多少。类似地, 可对M和L群体的每种中的每个变体计算富集比率。预期更高亲和力的变体在H群体中富集 (ER > 1) 且在L群体中减少 (ER < 1)。相反, 预期更低亲和力的突变体在H群体中减少 (ER < 1) 且在L群体中富集 (ER > 1)。可以简单通过观察H群体的富集比率来鉴定更高、更低和中间亲和力的变体。

[0205] 实施例6: 鉴定具有期望特性的点突变体

[0206] CH2中84个位置处的全面诱变鉴定出具有显著增加的Fc γ RIIB结合和降低的Fc γ

RIIIA结合(低于WT)的变体,在图6中为右下象限。在本实施例中,高于野生型平均数的2个标准偏差视为显著增加,而低于野生型平均数的视为降低。

[0207] 鉴定为具有显著增加的Fc γ RIIB结合和降低的Fc γ RIIIA结合的位置和取代显示于图7。变体人IgG与Hu1D10结合域表达为可溶性IgG1或在293c18细胞上表面表达。

[0208] 实施例7:使用单点(一点)FACS确认改进的结合

[0209] 为了确认对Fc γ RIIB的改进的结合,实施一点FACS分析,比较293c18细胞上表达的变体和亲本IgG。将表达IgG变体的293c18和对照用EC50浓度的Fc γ RIIB复合物染色。将表达含有N297A修饰的Fc变体的293c18用作阴性对照。纳入S267E、L328F和双突变体“SELF”作为阳性对照。通过流式细胞术在FACSCalibur装置中分析样品并将每种变体的结果相对于野生型作图,其中在y轴上为Fc γ R结合而在x轴上为IgG表达(图8)。

[0210] 为了确认对Fc γ RIIIA的降低的结合,实施一点FACS分析,比较293c18细胞上表达的变体和亲本IgG。将表达IgG变体的293c18和对照用EC50浓度的Fc γ RIIIA复合物染色。将表达N297A、S267E、L328F和双突变体“SELF”的293c18用作对照。通过流式细胞术在FACSCalibur装置中分析样品并将每种变体的结果相对于WT作图,其中在y轴上为Fc γ R结合而在x轴上为IgG表达(图9)。发现具有最显著下移的变体为V263L、V273E、V273F、V273M、V273S和V273Y。

[0211] 实施例8:变体对表达Fc γ R的细胞的结合

[0212] Hu1D10 IgG变体抗体以可溶性形式表达、纯化、然后用于评估对表达Fc γ RIIB的CHO细胞的结合。将IgG变体以20 μ g/mL或133nM开始系列稀释3倍,然后添加至 2×10^5 个细胞/测试。抗人kappa抗体用于检测变体IgG结合。在FACSCalibur中分析样品并相对于IgG浓度绘出荧光。图10确认所有变体比野生型抗体具有更高的对Fc γ RIIB的最大结合。

[0213] 纯化Hu1D10 IgG变体并用于评估对Fc γ RIIIA CHO转染体的结合。将IgG变体以20 μ g/mL或133nM开始系列稀释3倍,然后添加至 2×10^5 个细胞/测试。将抗人kappa抗体的次级染色用于检测变体IgG结合。在FACSCalibur中分析样品并在图11中相对于IgG浓度绘出荧光。所有变体与含野生型Fc的抗体相比同等或不太好地结合Fc γ RIIIA。

[0214] 实施例9:基于FACS的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0215] 优化非放射性抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)测定法并用于测试Hu1D10 IgG变体。Raji细胞和从新鲜抽出的全血纯化的PBMC被分别用作靶细胞和效应细胞,比率为1:40。

[0216] 清洗Raji细胞并以 10^6 个细胞/mL重悬于PBS,然后与CSFE(CellTechnology, Inc., part 4002)的1:2000稀释物温育30分钟。接着清洗加载有CFSE的Raji细胞并在由RPMI+10%热灭活的FBS组成的生长培养基中重悬至 4×10^5 /mL。将50 μ L的细胞悬液添加至V形底板的每个孔。对每个孔添加50 μ L 3倍系列稀释的IgG变体,开始于18 μ g/mL。

[0217] 从以665RCF在Ficoll-Paque(GE, 17-1440-02)上离心30分钟的新鲜抽出的肝素化血液纯化PBMC。收集PBMC层并在PBS+10%FBS中清洗3次,第一次清洗以1350RCF 15分钟,第二次清洗以225RCF 10分钟,而第三次清洗以225RCF 10分钟。在最终清洗后,将细胞重悬于生长培养基中并使用Vi-Cell Rx计数。将细胞离心并在生长培养基中重悬为 8×10^6 细胞/mL。对每个靶物/IgG悬液的孔添加100 μ L的细胞悬液并在37C温育4小时。将细胞悬液用7AAD(BD Biosciences, 货号559925)的1:5稀释物染色并温育30分钟。为了测定靶细胞的自然死

亡,加载CSFE的Raji细胞仅与培养基温育(0mg/mL IgG,无PBMC),然后用7AAD染色。在FACSCalibur中分析样品。

[0218] 对每份样品的FACS数据作图,x轴上为CFSE(FL1),y轴中为7AAD(FL3)。绘出象限,区分靶细胞(CFSE+)和PBMC(CFSE-),以及7AAD阳性和7AAD阴性细胞(图12)。右上象限中的细胞数定义为“死亡”而在右下象限中的那些为“活的”。计算百分比细胞毒性,减去自然死亡。相对于IgG浓度绘出百分比细胞毒性以测定EC₅₀(图13A)。

[0219] 基于ADCC活性将Hu1D10变体分组。图13B显示具有一些ADCC活性(尽管低于野生型)的Fc γ RIIB上调突变体(up-mutant);图13C显示具有极少至无ADCC活性的变体。图13D将无ADCC hu1D10变体与根据文献产生降低的对Fc γ RIIIA结合的取代(S267E,L328F,双重突变体“SELF”)比较。图13D显示V263L、V273E、V273F、V273M、V273S和V273Y引发与L328F可比的应答和低于S267E和SELF的ADCC应答。

[0220] 实施例10:抗CD40 mAb的Fc结合变体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0221] 根据标准方案设计抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)测定法(Law等,2005,Cancer Res.65:8331-8),其使用在Fc γ 中具有修饰的抗CD40单克隆抗体。将淋巴瘤RL细胞淋巴瘤RL用⁵¹铬标记1小时作为靶细胞。将PBMC用作效应细胞并与靶细胞以50:1比混合。系列稀释抗CD40并施加到靶物/效应细胞混合物。在37C、5%CO₂温育4小时后,收获100 μ l的培养上清并通过gamma计数器监测放射性释放。无抗体的培养物被记录为用培养基处理的阴性对照,且最大⁵¹铬释放通过Triton X100处理经标记的靶细胞实现。细胞毒性的最终百分比使用以下公式计算:
$$\frac{(\text{样品} - (\text{靶物} + \text{培养基}))}{((\text{靶物} + \text{Triton}) - (\text{靶物} + \text{培养基}))} * 100$$
。Fc γ 变体V263L、V273E、V273F、V273M、V273S和V273Y未诱导ADCC活性(图14)。

[0222] 实施例11:具有Fc γ 取代的抗CD40 mAb的功能活性

[0223] 为了测试对Fc γ RIIB的差异结合是否影响树突细胞的免疫活化,构建在Fc γ 中具有取代的抗CD40单克隆抗体并在IL-12p70分泌测定法中测试。

[0224] 将来自健康人供体的全血,用等体积PBS稀释,添加到含有低于frit的Ficoll-Paque Plus的Leucosep(Greiner Bio One)管中(15mL)。然后将血液以1,000g无制动离心15分钟。收集PBMC并用PBS清洗一次,以1,300rpm在室温离心5分钟,并用RPMI 1640清洗一次。将细胞重悬于SN12C培养基(RPMI1640+10%热灭活的FBS)。

[0225] 生成单核细胞来源的未成熟树突细胞(moDC):使用来自StemCell的富集试剂盒从PBMC分离单核细胞并在补充有10ng/ml GM-CSF和20ng/ml IL-4的StemSep无血清培养基中在37C、5%CO₂培养6天。在第3天将新鲜的GM-CSF和IL-4添加到培养物以帮助维持DC分化。在6天培养后,对单核细胞来源的未成熟DC进行FACS分析以验证未成熟DC表型:Lin⁻,CD80/CD86⁺,HLA-DR⁺,CD11C⁺。

[0226] 监测抗CD40在刺激来自moDC的IL-12p70中的激动性活性(agonistic activity):将未成熟moDC在补充有GM-CSF和IL-4的无血清培养基中用抗CD40刺激并用IFN γ 引发48小时。收获培养上清液并通过商品化的ELISA试剂盒测定IL-12p70产生。图15显示ADCC诱导性变体(图15A)和非ADCC诱导性变体(图15B)的IL-12p70产生。在非ADCC变体中,V273F和V273Y显示增强最多的树突细胞活化,如通过IL-12p70分泌测量的(图15C)。

[0227] 本申请中引用的所有公开出版物、专利、专利申请和其他文件通过提述完整并入本文用于所有目的,其程度如同每个公开出版物、专利、专利申请或其他文件单独指示为通

过提述引入用于所有目的的。

[0228] 尽管已例示和描述了多个具体的实施方案,但应领会可进行多种改变而不背离本发明的精神和范围。

序列表

<110> 艾伯维生物医疗股份有限公司 (ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.)

<120> FC 变体

<130> 381493-884W0 (125234)

<140>

<141>

<150> 61/791,624

<151> 2013-03-15

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 227

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

[0001]

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 2
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

[0002] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 100 105 110

<210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 3
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
100 105 110

<210> 4
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 4
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Met Val Lys Gln Ser Lys Gly His Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0003] Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 5
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 6
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0004]

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

[0005]

<400> 8

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 Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Arg Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn 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 Gly Gly Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 104

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

 <400> 9
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
 20 25 30

 Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Tyr Thr Phe Gly
 85 90 95

 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100

[0006]

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

 Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Glu Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ser Arg Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 11
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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

[0007]

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn 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 Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 13
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Met Leu Met
35 40 45

[0008] Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 14
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Glu His Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0009]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 16
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 16
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0010] <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 17
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 100

<210> 18
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

[0011] Leu Val Thr
115

<210> 19
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

 <400> 19
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

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

 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Ser Gly Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asn Arg Phe Ser Gly Ser Ser
 65 70 75 80

 Ser Gly Asn Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu
 85 90 95

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Trp Val
100 105 110

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly
115 120

<210> 20
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Glu Asn Phe
50 55 60

[0012] Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Gly Thr Ala Ser
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 Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 21
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

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

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 22
Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

[0013]

<400> 23
Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 24
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
1 5 10

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 25
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 26
Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 27
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 28
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

[0014]

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 29
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 31
Ala Lys Thr Thr Ala Pro
1 5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 32
Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 33
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
1 5 10

[0015]

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 34
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
1 5 10

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 35
Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 36
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的肽"

<400> 37
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 38
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注解="人工序列描述: 合成的多肽"

<400> 38
 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 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

[0016]

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

[0017]

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 Gly Lys
 325 330

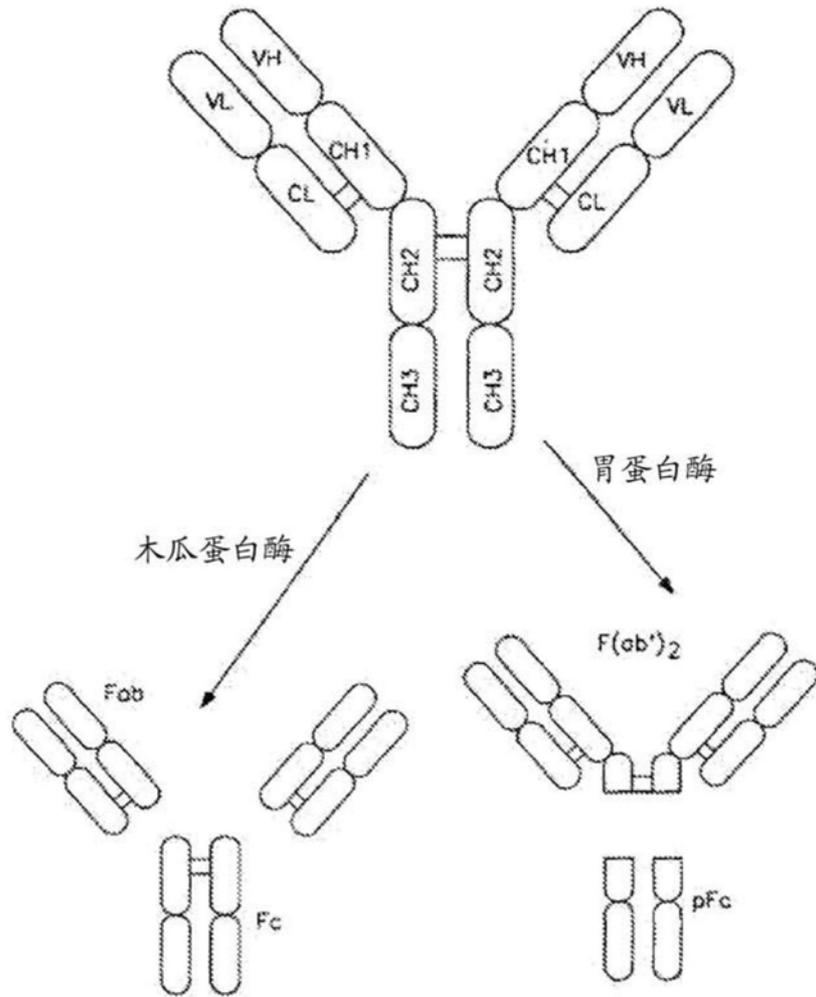


图1

*

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

† ‡ #
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLP

GK

图2A

CH1

118 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
 138 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 158 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 178 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 198 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V

较链

216 E P K S C D K T H T C P P C P

CH2

231 A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
 251 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
 271 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
 291 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
 311 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
 331 P I E K T I S K A K

CH3

341 G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
 361 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
 381 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 401 D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 421 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 441 L S L S P G K

图2B

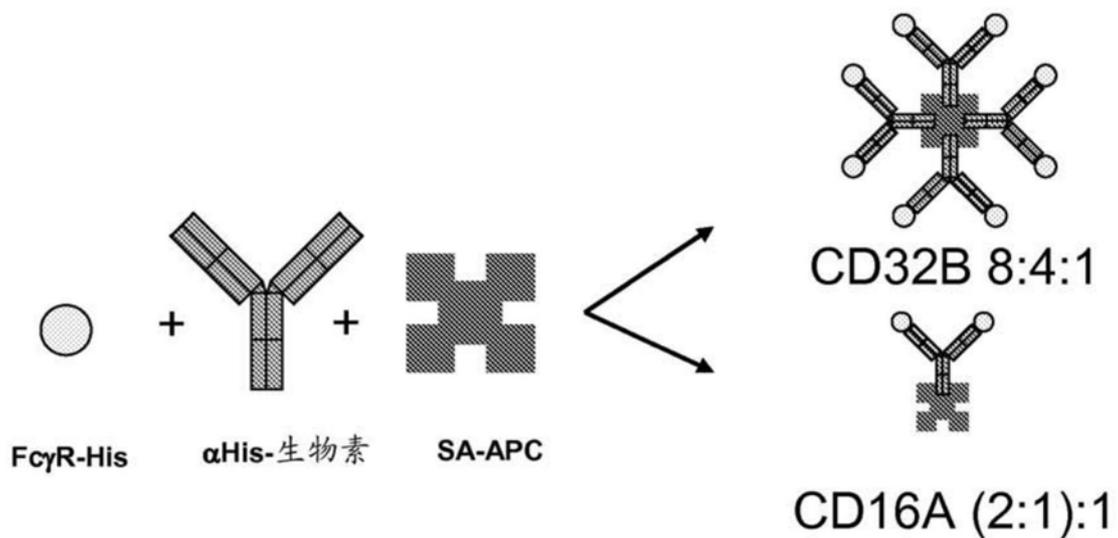


图3

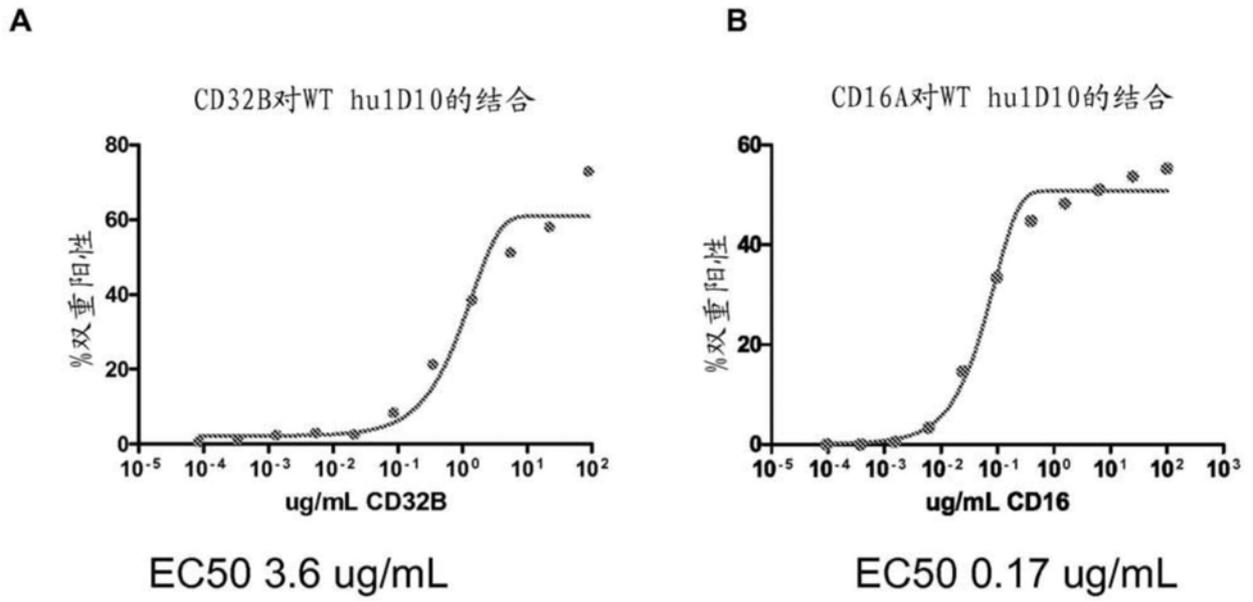


图4

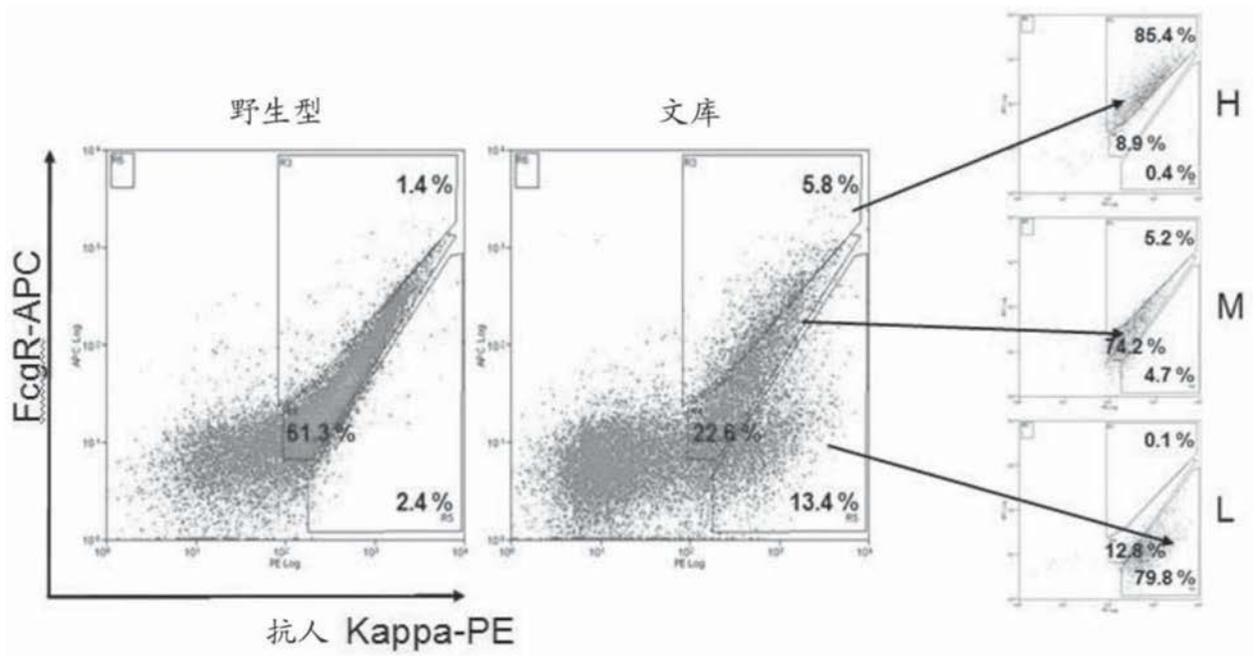


图5

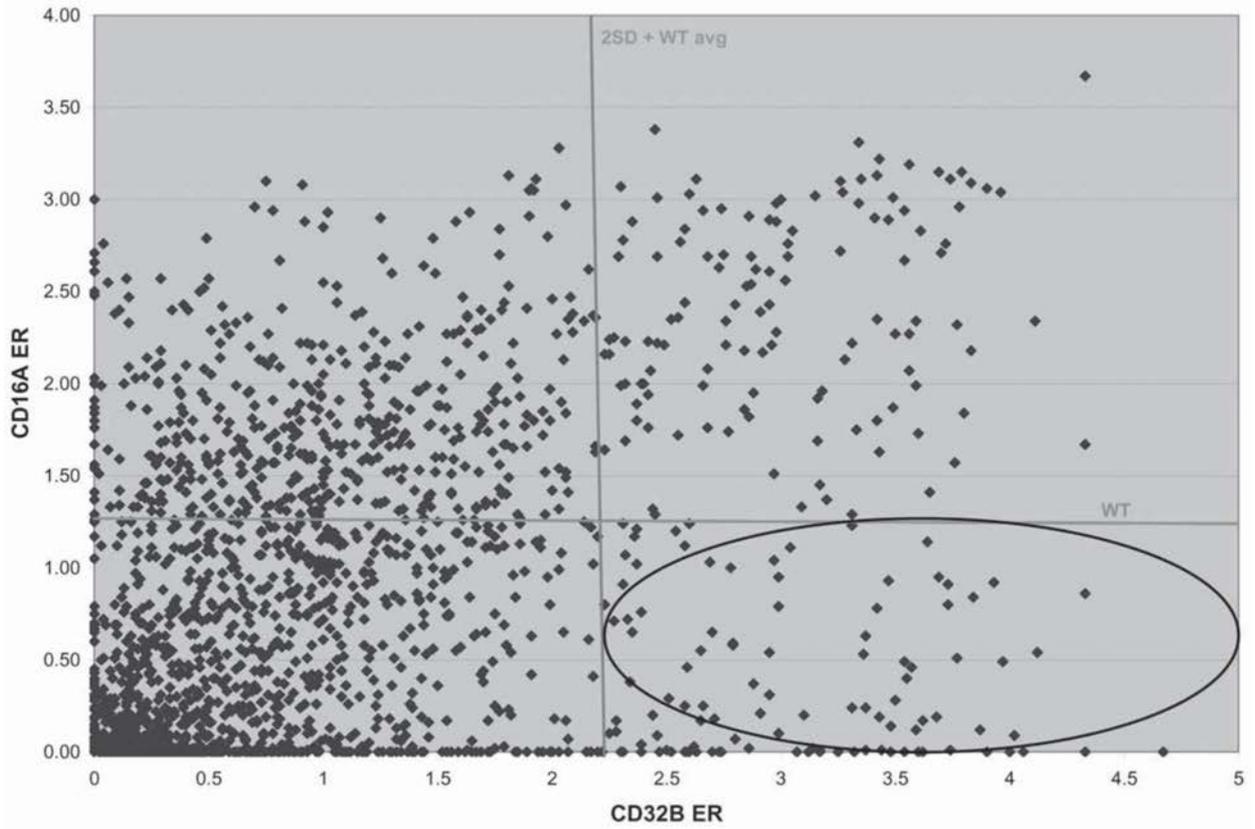


图6

	WT-AA	EU	AA	CD32b_ER	CD16_ER
	V	263	L	2.25	0.10
	V	266	L	3.93	0.92
	V	273	C	2.70	0.65
	V	273	E	3.54	0.49
	V	273	F	4.00	0.00
	V	273	L	3.57	0.28
	V	273	M	3.74	0.01
	V	273	S	3.42	0.75
	V	273	Y	3.97	0.49
	V	305	K	2.14	1.25
	V	305	W	2.03	1.32
		WT			
对照	N	297	A		
对照	S	267	E		
对照	L	328	F		
对照		SELF			

图7

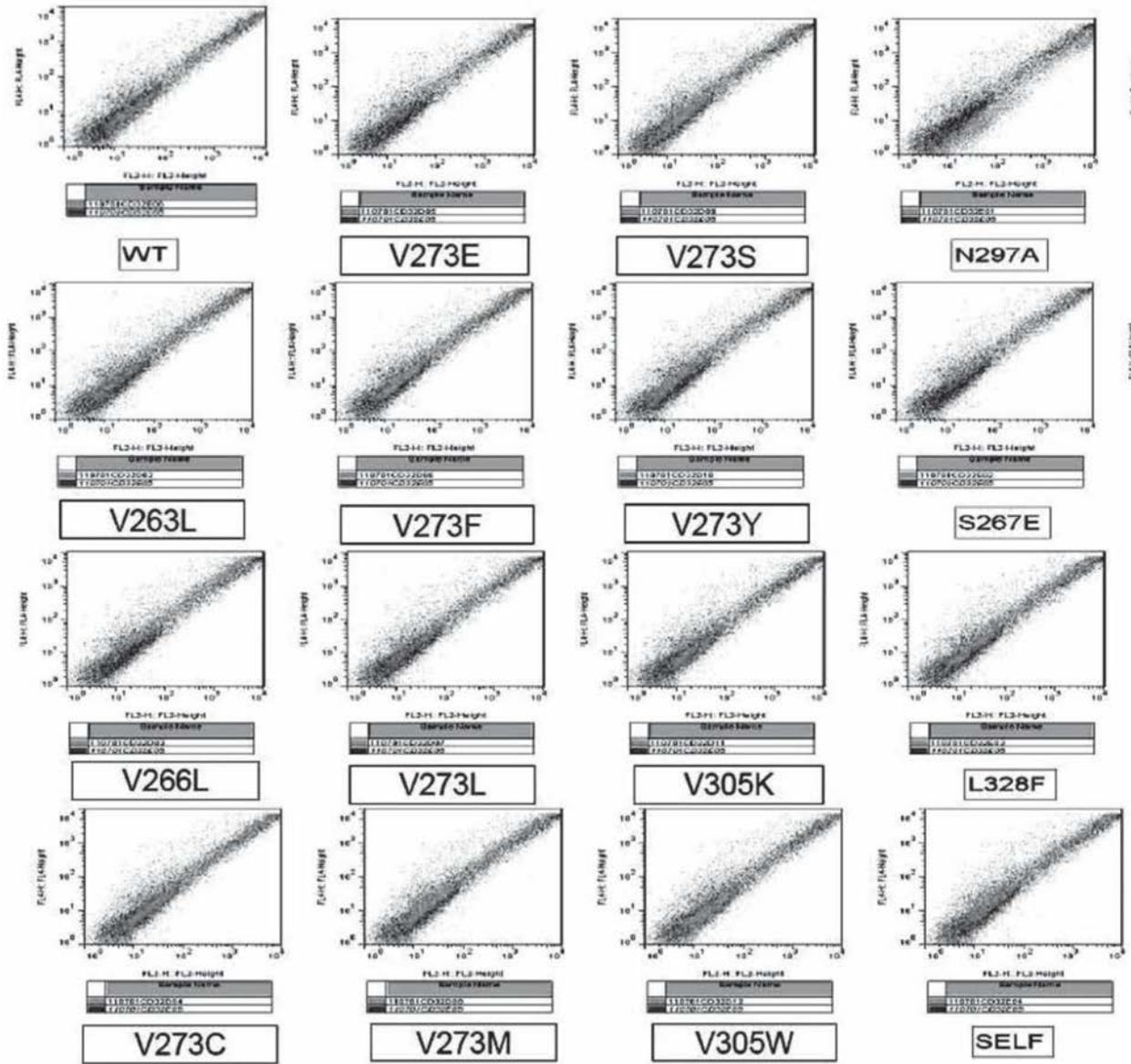


图8

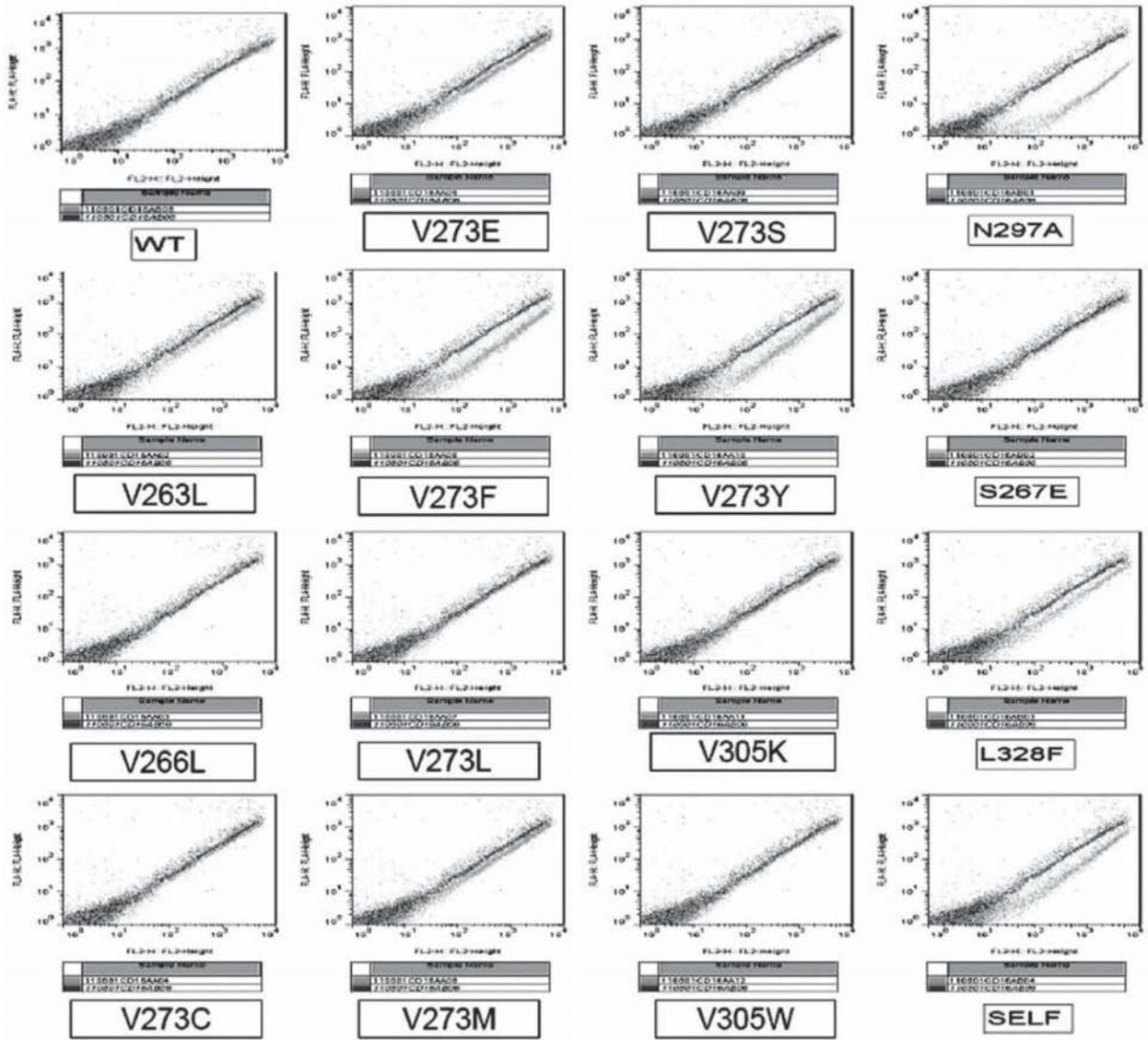


图9

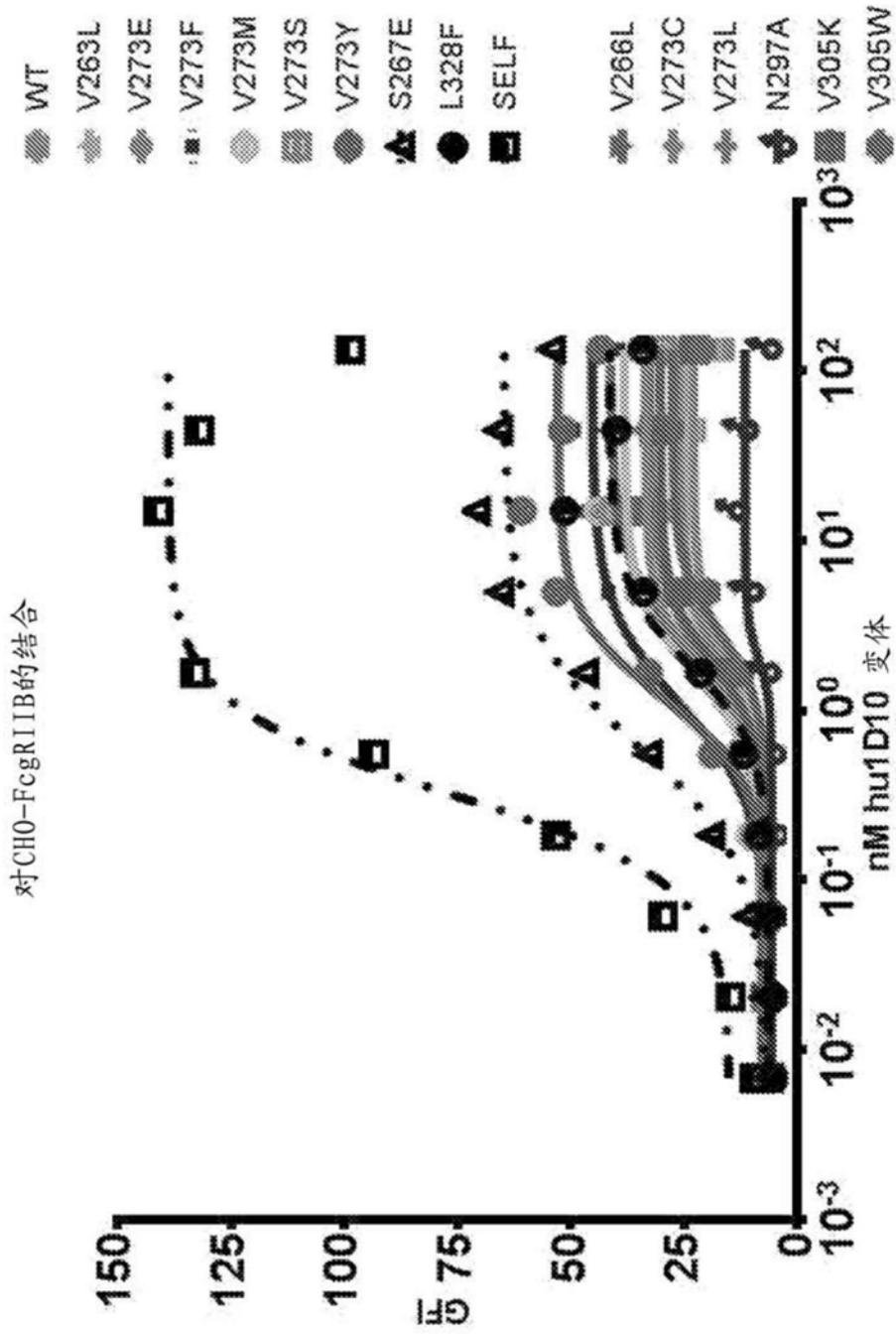


图10A

	变体	EC50 (nM)	相对于WT的倍数
	WT	1.83	1.00
	V263L	1.80	1.02
	V266L	2.22	0.82
	V273C	2.03	0.90
	V273E	1.66	1.10
	V273F	1.08	1.70
	V273L	1.66	1.11
	V273M	1.63	1.12
	V273S	1.72	1.06
	V273Y	1.18	1.55
	V305K	1.93	0.95
	V305W	2.86	0.64
对照	N297A	2.00	0.91
对照	S267E	0.64	2.85
对照	L328F	1.85	0.99
对照	SELF	0.32	5.70

图10B

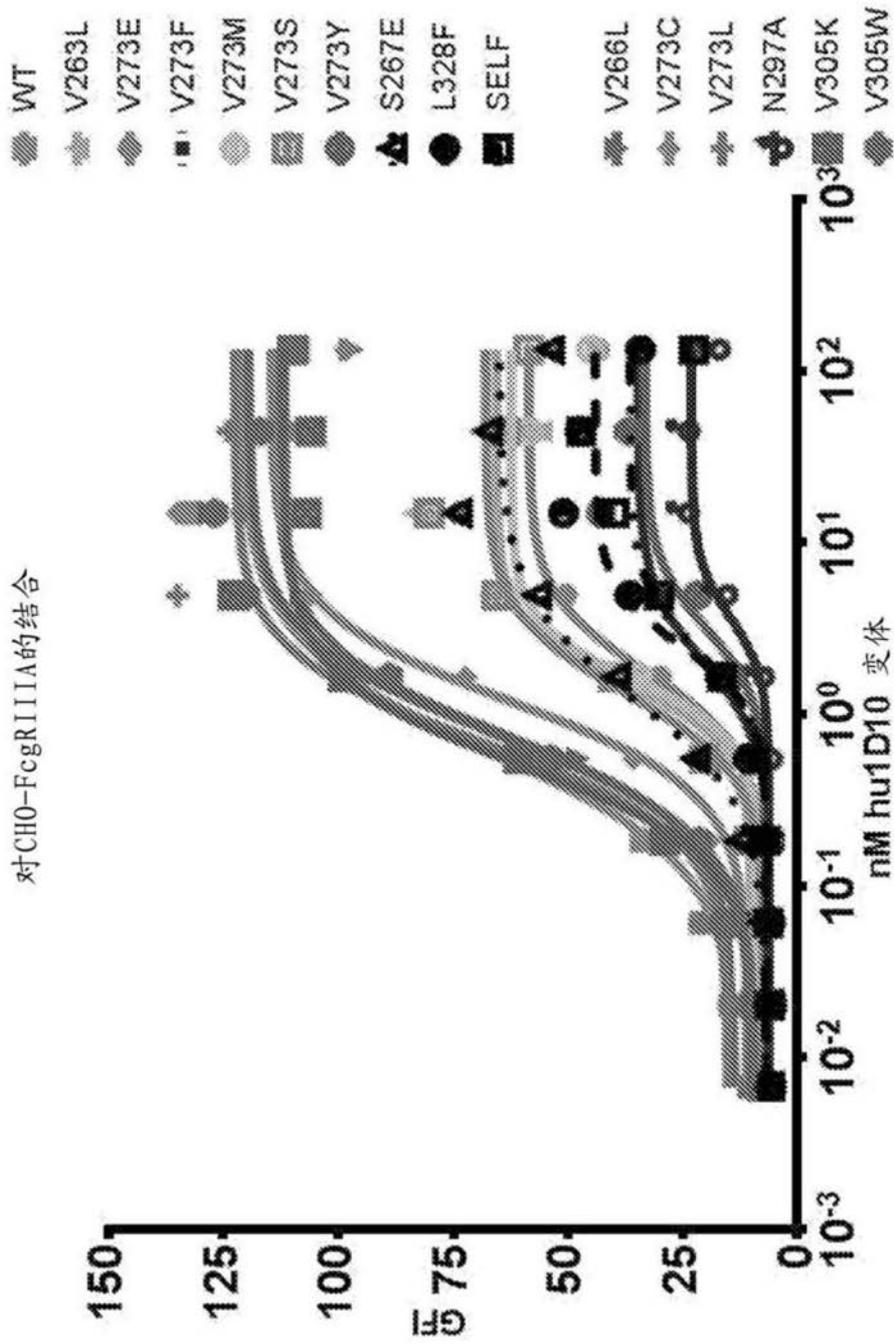
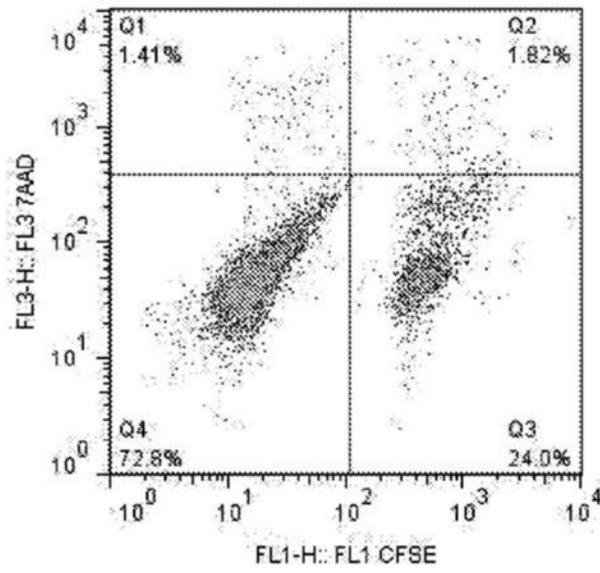


图11A

	变体	EC50 (nM)	相对于WT的倍数
	WT	0.61	1.00
	V263L	1.52	0.40
	V266L	0.76	0.80
	V273C	1.19	0.51
	V273E	1.78	0.34
	V273F	2.01	0.30
	V273L	0.69	0.88
	V273M	1.59	0.38
	V273S	1.33	0.45
	V273Y	3.19	0.19
	V305K	0.51	1.18
	V305W	0.74	0.82
对照	N297A	3.67	0.17
对照	S267E	1.24	0.49
对照	L328F	2.51	0.24
对照	SELF	2.31	0.26

图11B

A: 0.0 ug/mL WT hu1D10 = 7% 细胞毒性



B: 1.0 ug/mL WT hu1D10 = 46% 细胞毒性

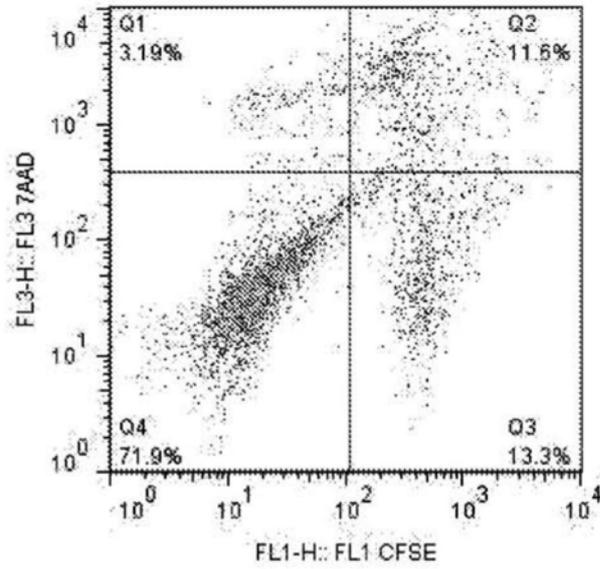


图12

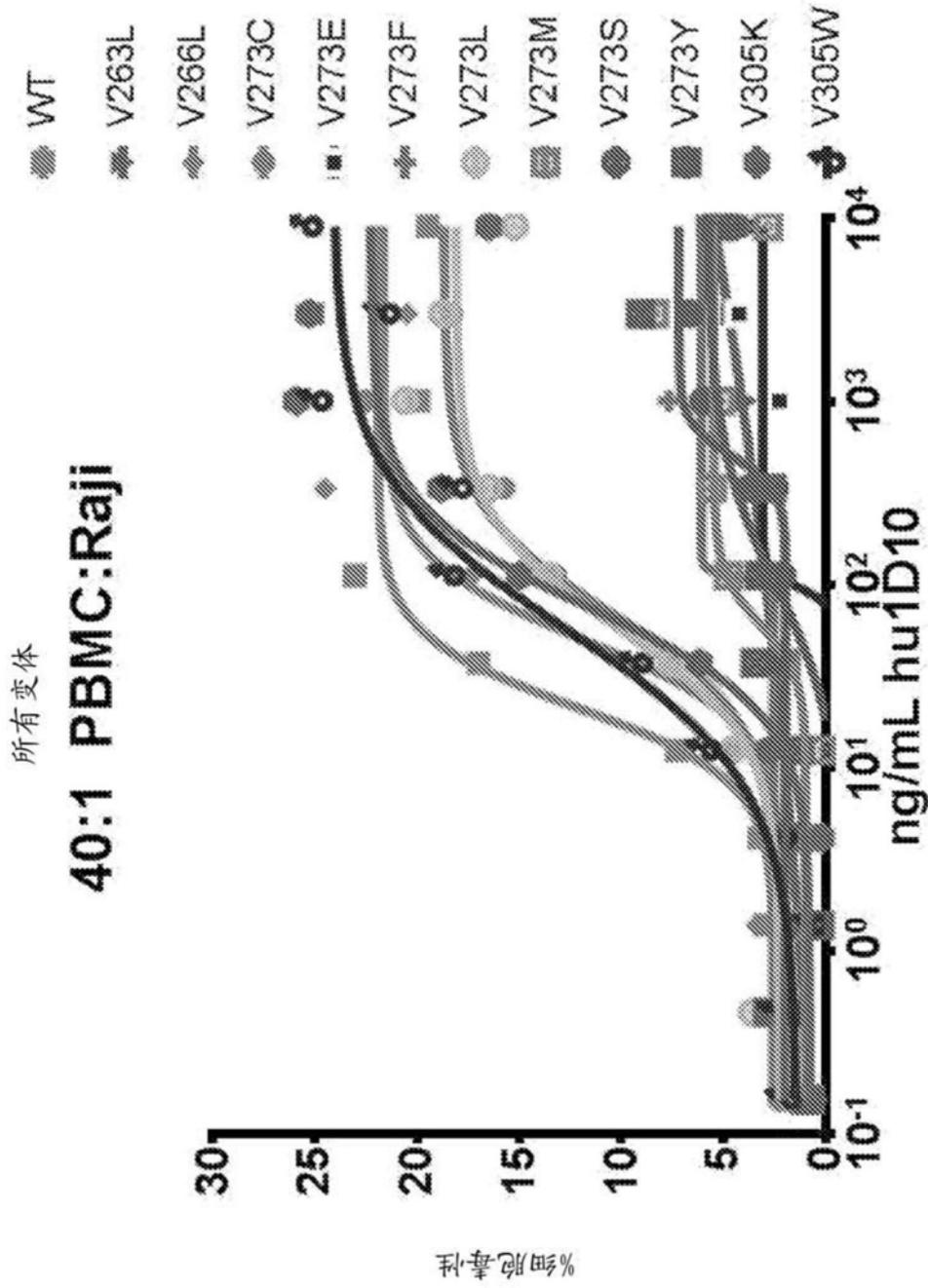


图13A

ADCC 40:1 PBMC:Raji

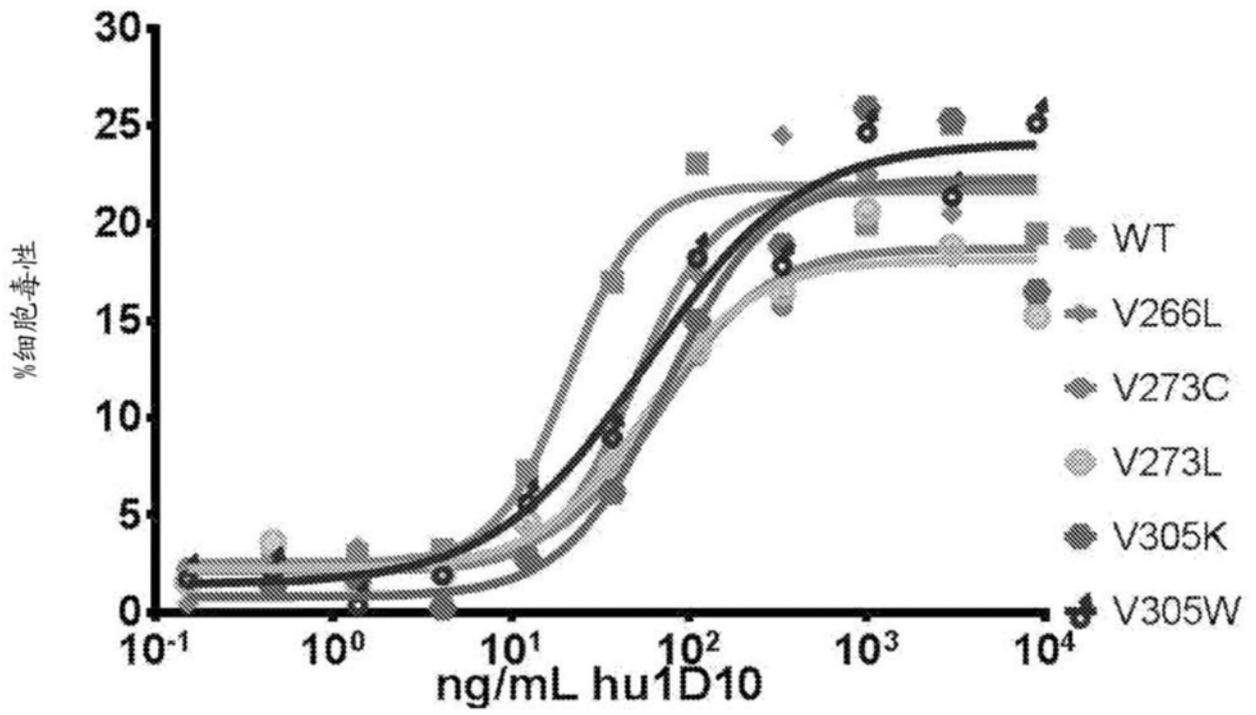


图13B

无ADCC

40:1 PBMC:Raji

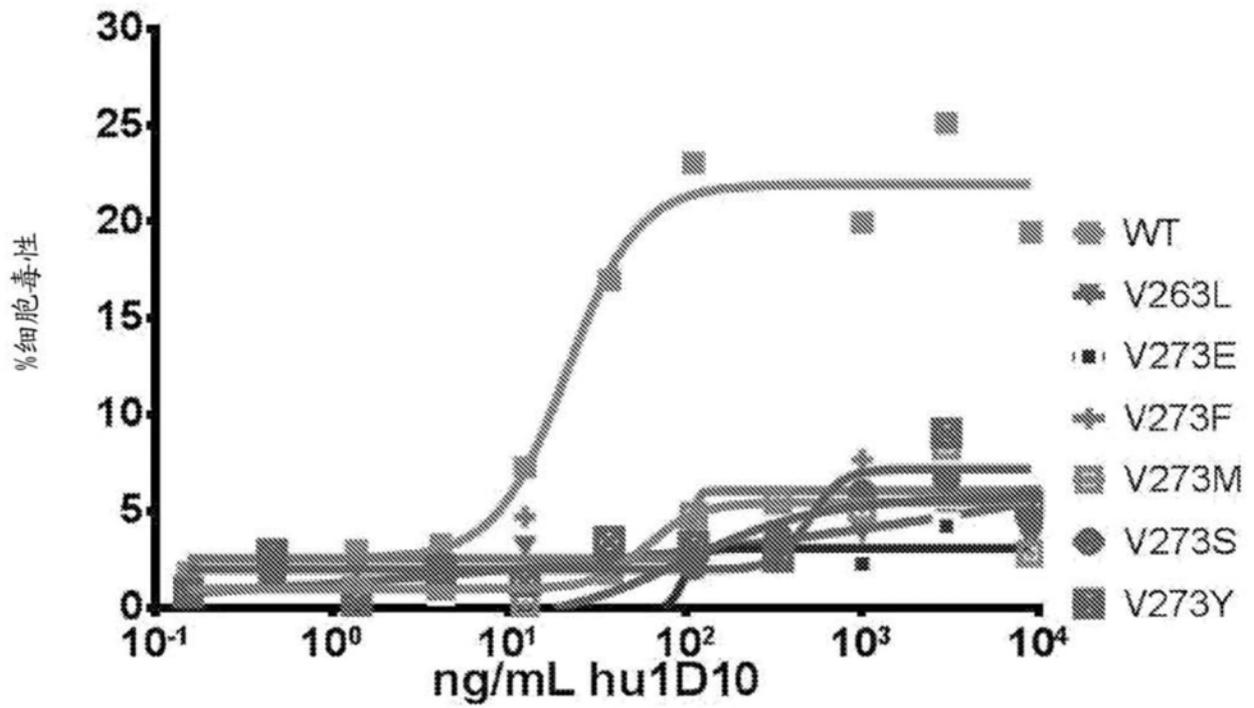


图13C

ADCC 40:1 PBMC:Raji

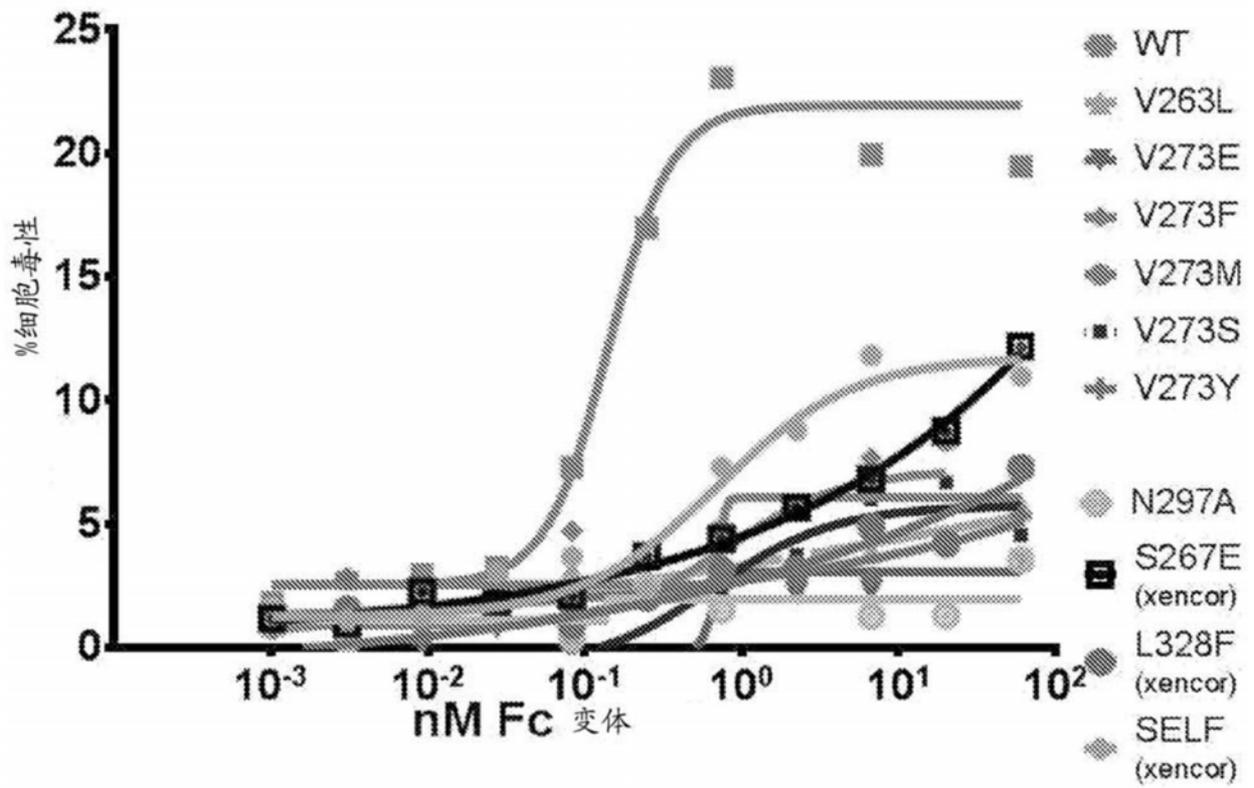


图13D

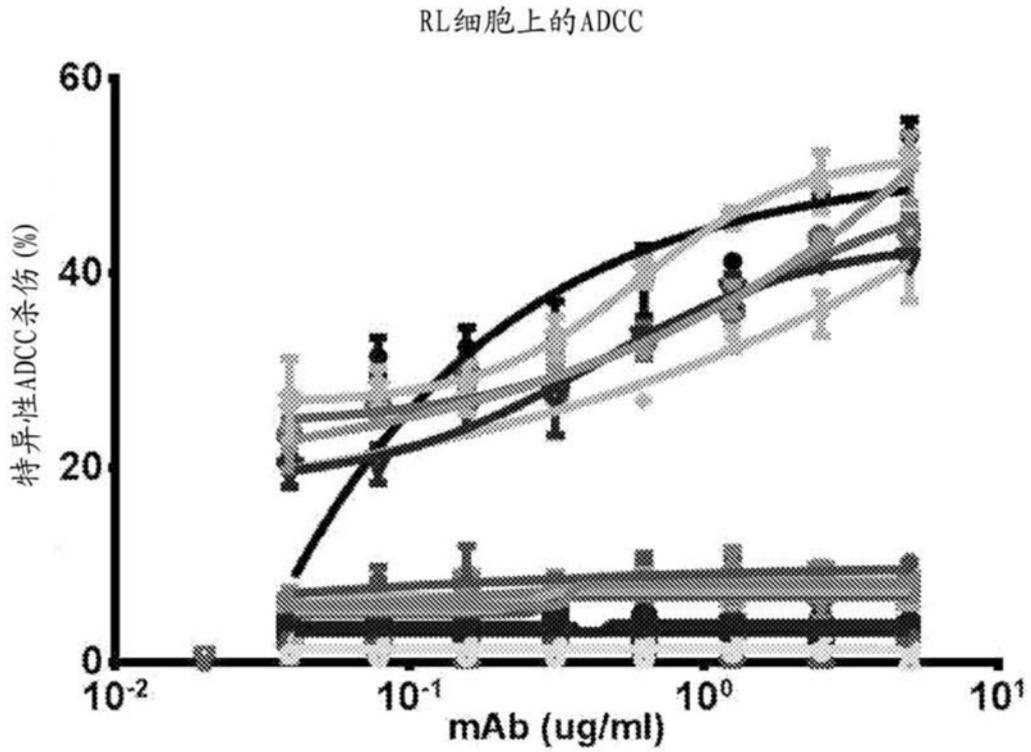


图14A

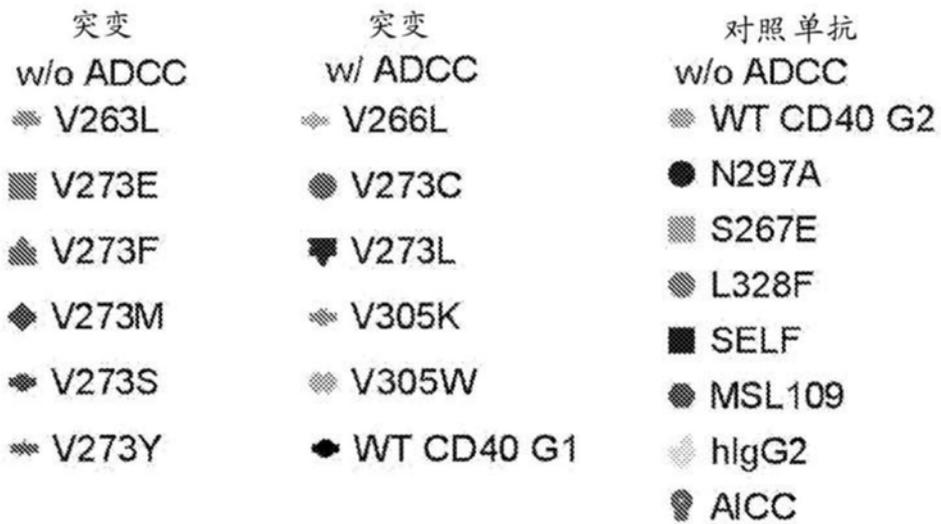


图14B

ABR4021 G1 Fc突变体诱导
的IL-12 p70生产 (ADCC)

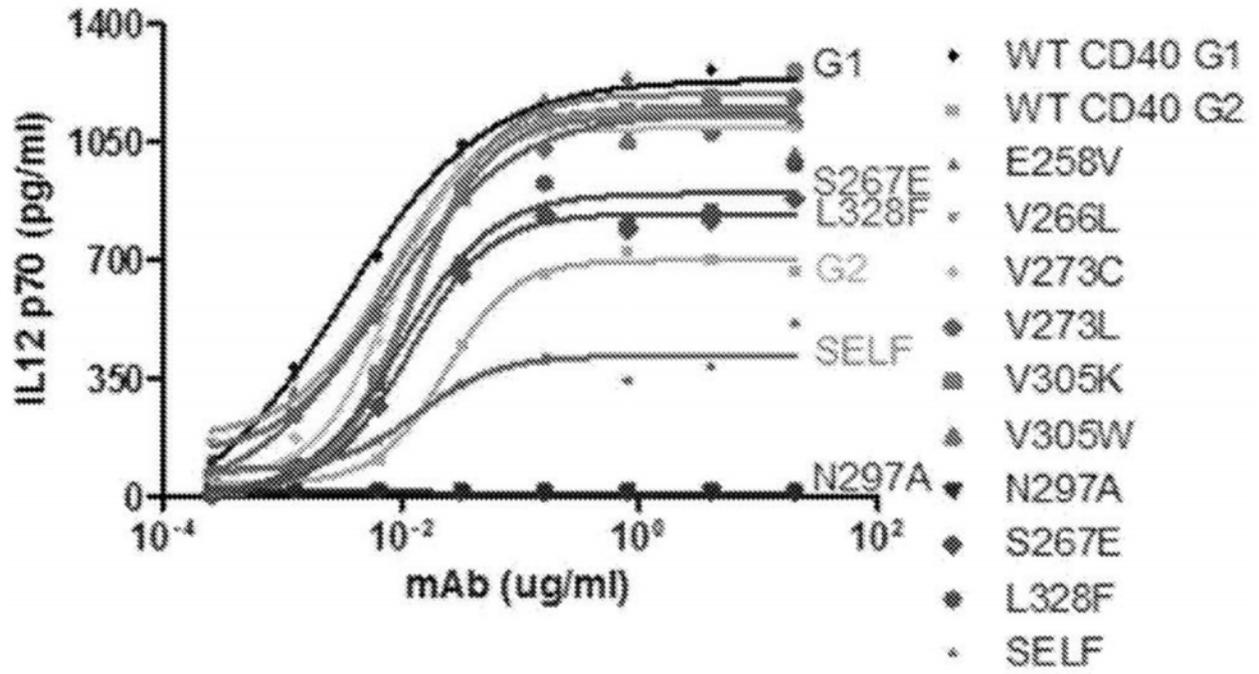


图15A

ABR4021 G1 Fc突变体诱导的IL-12 p70生产(无ADCC)

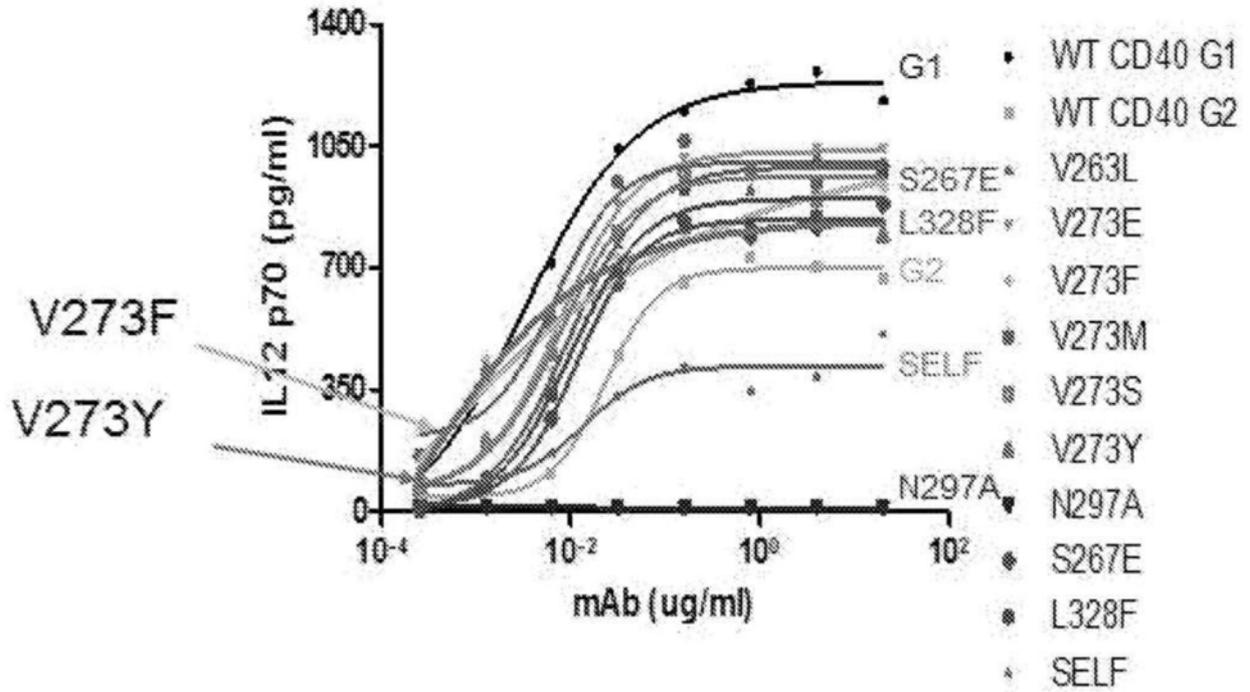


图15B

	EC50, ng/mL
WT CD40 G1	3.25
V263L	9.54
V273E	7.85
V273F	
V273M	6.95
V273S	7.74
V273Y	0.19
N297A	
S267E	11.80
L328F	10.05
SELF	13.97

图15C

	WT-AA	EU	AA
	V	263	L
	V	266	L
	V	273	C
	V	273	E
	V	273	F
	V	273	L
	V	273	M
	V	273	S
	V	273	Y
	V	305	K
	V	305	W
		WT	
对照	N	297	A
对照	S	267	E
对照	L	328	F
对照		SELF	

图16